



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117903007 A

(43) 申请公布日 2024.04.19

(21) 申请号 202311134345.1

(22) 申请日 2023.09.05

(71) 申请人 中国科学院分子植物科学卓越创新中心

地址 200032 上海市徐汇区枫林路300号

(72) 发明人 杨琛 席华超 朱虹

(74) 专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280  
专利代理师 贾师英

(51) Int. Cl.

C07C 279/12 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页  
序列表(电子公布) 附图7页

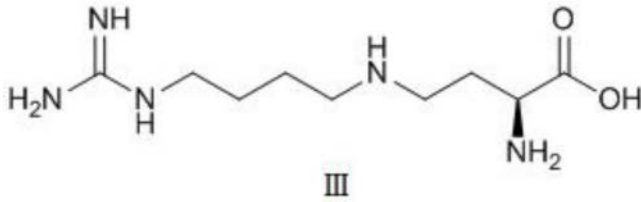
(54) 发明名称

一种亚精胺生物合成途径关键酶

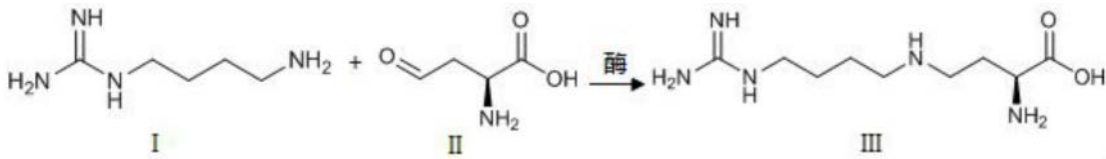
(57) 摘要

本发明公开了一种亚精胺生物合成新途径,其中氨基酸序列为SEQ ID NO:2的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶催化胍基丁胺和天冬氨酸半醛发生还原缩合反应生成一种新化合物(S)-2-氨基-4-((4-胍基)氨基)丁酸。本发明为亚精胺、亚精胺中间体及其他多胺衍生物的生物合成提供了新的策略,具有研究开发应用潜力。

1. 式III所示的化合物,其为(S)-2-氨基-4-((4-胍丁基)氨基)丁酸,将其命名为羧氨丙基胍丁胺:



2. 一种合成如权利要求1所述化合物的方法,其特征在于,包括下述步骤:以式I所示胍基丁胺和式II所示天冬氨酸半醛为底物原料,在酶的催化下通过还原缩合反应来制化合物III:



所述酶命名为羧氨丙基胍丁胺脱氢酶。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述酶是选自下组的多肽:

(a) 氨基酸序列为SEQ ID NO:2的多肽;

(b) 将SEQ ID NO:2所示氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)多肽功能的由(a)衍生的多肽;

(c) 与(a)限定的多肽序列有45%以上同源性,且具有(a)多肽功能的由(a)衍生的多肽;或

(d) 序列中含有(a)或(b)或(c)中所述多肽序列的衍生多肽。

4. 如权利要求2或3所述的方法,其特征在于,所述羧氨丙基胍丁胺脱氢酶呈酶形式或者呈其表达微生物菌体形式。

5. 如权利要求2或3所述的方法,其特征在于,反应体系中添加有辅酶NADPH或者NADH。

6. 一种亚精胺生物合成途径,其特征在于,包含如权利要求2或3中所述的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶以及羧氨丙基胍丁胺脱羧酶和氨丙基胍丁胺尿素水解酶。

7. 如权利要求6所述的亚精胺生物合成途径,其特征在于,从胍基丁胺和天冬氨酸半醛出发,经由羧氨丙基胍丁胺脱氢酶催化缩合生成羧氨丙基胍丁胺;羧氨丙基胍丁胺经由羧氨丙基胍丁胺脱羧酶催化生成氨丙基胍丁胺;氨丙基胍丁胺经由氨丙基胍丁胺尿素水解酶催化生成亚精胺。

8. 如权利要求2或3中所述的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶或者如权利要求6中所述的亚精胺生物合成途径在构建亚精胺生产菌中的用途。

9. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,所述羧氨丙基胍丁胺脱氢酶、羧氨丙基胍丁胺脱羧酶和氨丙基胍丁胺尿素水解酶的编码基因被克隆入亚精胺生产菌中,即亚精胺生物合成途径被构建于亚精胺生产菌中形成亚精胺工程菌。

10. 一种亚精胺生产菌,其特征在于,包含如权利要求6中所述的亚精胺生物合成途径。

## 一种亚精胺生物合成途径关键酶

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物合成领域,具体地说,涉及一种亚精胺生物合成途径关键酶--羧氨丙基胍丁胺脱氢酶(CAPADH)及其在制备亚精胺和亚精胺中间体中的用途。

### 背景技术

[0002] 多胺是含有两个及以上氨基的分子化合物,在几乎所有细菌、古菌和真核细胞中存在,并在多种细胞过程中发挥重要作用,包括基因调控、细胞增殖和分化,以及对各种胁迫的适应等。亚精胺,作为生物中最普遍存在的三胺化合物,直接参与真核生物翻译因子eIF5a修饰以支持蛋白质的正常翻译,为真核生物所必需。在细菌中亚精胺也具有重要生理功能,包括维持转录翻译、维持生长、调控生物被膜的合成等。在人体健康方面,亚精胺作为一种天然多胺具有显著的心脏保护和神经保护作用,以及一定的抗炎、抗衰老特性。由于多胺与临床和农业密切相关,结构复杂多样的多胺与多胺衍生物可作为候选的药物、农用化学品、功能性食品等,并受到广泛关注。

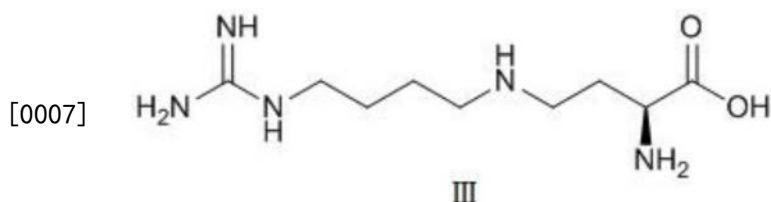
[0003] 目前已知主要的亚精胺生物合成途径有两种,其反应本质都是对腐胺的氨丙基化来合成亚精胺,参见CN112111536A和CN113736719A。一是由氨丙基转移酶即亚精胺合酶催化的氨丙基化反应,将脱羧的S-腺苷蛋氨酸转移到腐胺的骨架上形成亚精胺;二是羧亚精胺脱氢酶催化腐胺与天冬氨酸半醛形成羧基亚精胺,再由羧基亚精胺脱羧酶脱羧生成亚精胺。然而许多细菌体内并不存在亚精胺合酶,尽管这些细菌能够合成亚精胺,但其具体生物合成途径却仍然未知。

[0004] 解析细菌中多胺的生物合成途径及其关键酶,对理解与人工调控细菌中和多胺相关的生理功能具有重要作用,为多胺的高效合成提供新的策略与工具。合成途径中发现的新的多胺中间体及其衍生物还可进入多胺化合物库,用于后续分子功能的研究,以及医学临床或工业方面的应用。

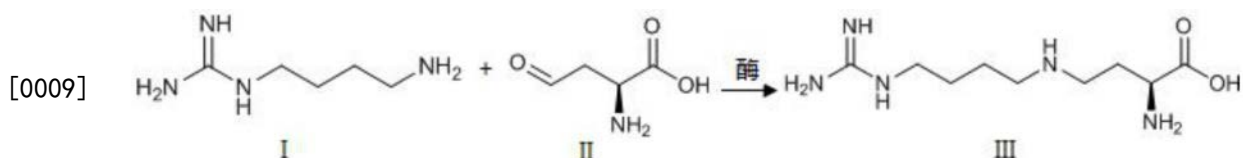
### 发明内容

[0005] 本发明成功解析了蓝细菌体内一条新的亚精胺生物合成途径,对途径中一个关键酶--基因CAPADH编码的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶(Carboxyaminopropylagmatine Dehydrogenase,简称CAPADH)进行了功能鉴定,其可以在辅酶NADPH或NADH存在时,催化胍基丁胺和天冬氨酸半醛发生还原缩合反应。在该解析过程中发现了一种全新的中间体产物(S)-2-氨基-4-((4-胍丁基)氨基)丁酸((S)-2-amino-4-((4-guanidinobutyl)amino)butanoic acid),将其命名为羧氨丙基胍丁胺(carboxyaminopropylagmatine,简称CAPA),并对其结构进行了鉴定。本课题组鉴定的酶CAPADH和化合物CAPA可用于亚精胺、亚精胺中间体及其他多胺衍生物的人工合成。上述研究发现奠定了本发明的基础。

[0006] 因此,本发明的第一个方面提供了式III所示的化合物,其为(S)-2-氨基-4-((4-胍丁基)氨基)丁酸,将其命名为羧氨丙基胍丁胺(carboxyaminopropylagmatine,简称CAPA):



[0008] 本发明的第二个方面提供了一种合成上述化合物的方法,包括下述步骤:以式I所示胍基丁胺和式II所示天冬氨酸半醛为底物原料,在酶的催化下通过还原缩合反应来制化合物III:



[0010] 基于该功能,所述酶命名为羧氨丙基胍丁胺脱氢酶 (Carboxyamino-propyl-arginine Dehydrogenase,简称CAPADH)。

[0011] 优选地,所述酶是选自下组的多肽:

[0012] (a) 氨基酸序列为SEQ ID NO:2的多肽;

[0013] (b) 将SEQ ID NO:2所示氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)多肽功能的由(a)衍生的多肽;

[0014] (c) 与(a)限定的多肽序列有具有45%以上同源性、例如50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、优选地80%以上、优选地85%以上、优选地90%以上、优选地95%以上、优选地98%以上、更优选地99%以上同源性,且具有(a)多肽功能的由(a)衍生的多肽;或

[0015] (d) 序列中含有(a)或(b)或(c)中所述多肽序列的衍生多肽。

[0016] MAKVMIVGAGGVGSSVVAHKCAALEFTDILLASRTVAKCDQIAAHIGSPKVKTAALDAFQVSDTVKLL QDFGADLLINVALPYQDLVMDACLEAGVDYLDLTANYEPPDVAKFEYSWQWAYQDKFKDAGLMALLGCGFDPGVTG VFTAYALKHHFDEIHYLDIVDCNAGNHGQAFATNPNPEINIREITQKGRYHEDGVWQEIDPLSVHRDINYPHIGDR PSYLLYHEELESVKNIPTLKRARFWMTFSEAYINHLRVLEAVGMTRIDEVEYQGQKIVPLQFLKAVLPEPASLAE NYSGQTSIGCYIKGVKDGQAKTYIYNNCDHAVCFAEVGSQAISYTTGVPALGGLMMVQGWKQAGVFNVEEMDP DPFLAKLGEMGLPWHEVVNGPPFPDD (SEQ ID NO:2)。

[0017] 在反应中,该羧氨丙基胍丁胺脱氢酶可以呈酶形式或者呈其表达微生物菌体形式。

[0018] 在一种实施方式中,反应体系中还可以添加有辅酶NADPH( $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸,辅酶II)或者NADH( $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,即辅酶I),以便为CAPADH的酶促反应提供电子,增强酶的还原力,从而促进还原缩合反应。

[0019] 本发明的第三个方面提供了一种亚精胺生物合成途径,其包含上述的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶以及羧氨丙基胍丁胺脱羧酶 (Carboxyamino-propyl-arginine Decarboxylase,简称CAPADC)和氨丙基胍丁胺尿素水解酶 (Aminopropyl-arginine Ureohydrolase,简称APAUH)。

[0020] 上述的亚精胺生物合成途径是,从胍基丁胺(式I)和天冬氨酸半醛(式II)出发,经由羧氨丙基胍丁胺脱氢酶(CAPADH)催化缩合生成羧氨丙基胍丁胺(CAPA)(式III);羧氨丙

基胍丁胺 (CAPA) 经由羧氨丙基胍丁胺脱羧酶 (CAPADC) 催化生成氨丙基胍丁胺 (APA); 氨丙基胍丁胺 (APA) 经由氨丙基胍丁胺尿素水解酶 (APAUH) 催化生成亚精胺, 如图3所示的那样。

[0021] 上述的亚精胺生物合成途径可用于体外多级酶联反应或基因工程菌发酵生产亚精胺、亚精胺中间体及其他多胺衍生物。例如在体外联合使用羧氨丙基胍丁胺脱氢酶、羧氨丙基胍丁胺脱羧酶与氨丙基胍丁胺尿素水解酶以胍基丁胺和天冬氨酸半醛为底物催化合成亚精胺、亚精胺中间体及其他多胺衍生物; 或构建可以共表达羧氨丙基胍丁胺脱氢酶、羧氨丙基胍丁胺脱羧酶与氨丙基胍丁胺尿素水解酶的大肠杆菌基因工程菌来发酵生产亚精胺、亚精胺中间体及其他多胺衍生物。

[0022] 本发明的第四个方面提供了上述的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶或者上述的亚精胺生物合成途径在构建亚精胺生产菌中的用途。

[0023] 在一种具体的实施方式中, 上述羧氨丙基胍丁胺脱氢酶、羧氨丙基胍丁胺脱羧酶和氨丙基胍丁胺尿素水解酶的编码基因被克隆入亚精胺生产菌中, 即, 亚精胺生物合成途径被构建于亚精胺生产菌中形成亚精胺工程菌。

[0024] 本发明还提供了一种亚精胺生产菌, 其包含上述的亚精胺生物合成途径。

[0025] 其中, 羧氨丙基胍丁胺 (CAPA) 的合成或产生可以作为上述亚精胺工程菌的标志性事件。

[0026] 本发明的另一个方面提供了编码上述羧氨丙基胍丁胺脱氢酶的基因, 也将该基因简称为CAPADH。

[0027] 优选地, 编码氨基酸序列为SEQ ID NO:2的多肽的基因可以是核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示的多核苷酸。

[0028] 相应地, 本发明的又一个方面提供了包含上述多核苷酸的载体、以及转化了所述载体的微生物, 用于表达上述羧氨丙基胍丁胺脱氢酶 (CAPADH)。

[0029] 上述载体可以是pET系列质粒例如pET22b、pET24a、pET28a, 也可以是pSH质粒、pRSFDuet质粒等其他载体。

[0030] 上述微生物可以选自大肠杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母、解脂耶氏酵母、枯草杆菌。优选为大肠杆菌BL21 (DE3)。

[0031] 本发明首次解析了蓝细菌体内一条新的亚精胺生物合成途径, 发现了该途径中一个关键酶即羧氨丙基胍丁胺脱氢酶 (CAPADH), 并对其功能进行了鉴定; 还鉴定出该途径中的标志性化合物羧氨丙基胍丁胺 (CAPA), 这给亚精胺及其中间体的生物合成或者酶法制备工艺策略设计带来了极大便利, 值得进一步深入研究进化。

## 附图说明

[0032] 图1显示了多胺化合物浓度迅速响应外界营养条件的波动情况。其中, A显示了外界营养迅速恢复过程中集胞藻胞内代谢物的浓度变化, B显示了高分辨质谱分析集胞藻胞内两种多胺代谢物在氮源刺激时浓度迅速升高。

[0033] 图2是羧氨丙基胍丁胺carboxyaminopropylagmatine的核磁共振谱图。其中, A是核磁共振氢谱 ( $^1\text{H-NMR}$ , 400MHz, in  $\text{D}_2\text{O}$ ), B是核磁共振碳谱 ( $^{13}\text{C-NMR}$ , 100MHz, in  $\text{D}_2\text{O}$ ), C是核磁共振二维氢谱 ( $^1\text{H-}^1\text{H}$ ), D是核磁共振HSQC谱, E是核磁共振HMBC谱。

[0034] 图3显示了本发明发现的CAPADH介导的亚精胺合成途径。

[0035] 图4显示了稳定同位素示踪检测CAPA途径中间代谢物的标记

[0036] 图4A显示了碳氮全标的精氨酸( $[U-^{13}C, U-^{15}N]$  arginine) 示踪时中间代谢物的标记

[0037] 图4B显示了全碳标记的天冬酰胺( $[U-^{13}C]$  asparagine) 示踪时中间代谢物的标记

[0038] 图5显示了CAPA途径突变体与回补菌株中多胺代谢物的浓度情况。其中,A为CAPA途径突变体中多胺代谢物的浓度,B为高分辨质谱分析CAPA途径突变体与回补菌株中多胺代谢物的浓度。

[0039] 图6显示了CAPADH的体外酶反应。其中,A显示了SDS-PAGE检测纯化的CAPADH的照片,B显示了HPLC分析CAPADH体外酶反应的产物,C显示了高分辨质谱分析CAPADH体外酶反应的产物,D显示了高分辨质谱分析比较胞内CAPA与CAPADH体外酶反应的产物。

[0040] 图7显示了在大肠杆菌中构建CAPA途径合成亚精胺及其他多胺衍生物。其中,A显示了大肠杆菌中构建CAPA途径的菌株构建策略,B显示了高分辨质谱分析大肠杆菌工程菌的发酵产物。

### 具体实施方式

[0041] 亚精胺是维持细菌重要生理功能的一种多胺,然而许多细菌体内缺乏传统的通过亚精胺合酶从S-腺苷蛋氨酸合成亚精胺的途径,它们如何合成亚精胺还亟待阐明。发明人经过大量的 $^{13}C$ 和 $^{15}N$ 示踪实验,并结合代谢组学、遗传操作和生化鉴定的方法,在模式蓝细菌*Synechocystis* sp. PCC 6803中发现了一条经由羧氨丙基胍丁胺脱氢酶基因CAPADH介导的亚精胺合成途径,该途径以胍基丁胺和天冬氨酸半醛为底物,经由CAPADH编码的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶(CAPADH),在NADPH或NADH的作用下催化生成一种全新的中间产物羧氨丙基胍丁胺(CAPA, (S)-2-氨基-4-((4-胍丁基)氨基)丁酸);CAPA经由羧氨丙基胍丁胺脱羧酶(CAPADC)催化生成氨丙基胍丁胺(APA);APA经由氨丙基胍丁胺尿素水解酶(APAUH)催化最终生成亚精胺。同时,在蓝细菌*Synechocystis* sp. PCC 6803从营养限制转到营养丰富培养条件时,发明人也检测到一种全新的中间体化合物羧氨丙基胍丁胺(CAPA)在菌体内大量累积。

[0042] 在本文中,为了描述简便,有时会将某种蛋白比如羧氨丙基胍丁胺脱氢酶(CAPADH)与其编码基因名称混用,本领域技术人员应能理解它们在不同描述场合表示不同的物质。本领域技术人员根据语境和上下文容易理解它们的含义。例如,对于CAPADH,用于描述羧氨丙基胍丁胺脱氢酶功能或类别时,指的是蛋白质;在作为一种基因描述时,指的是编码该酶的基因。

[0043] 基于上述发现,本发明揭示了新的细菌体内参与亚精胺生物合成途径的关键酶--羧氨丙基胍丁胺脱氢酶,其能催化胍基丁胺与天冬氨酸半醛缩合生成羧氨丙基胍丁胺。优选地,所述的羧氨丙基胍丁胺脱氢酶具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0044] 本发明涉及的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的CAPADH活性多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物)中产生。根据重组生产方案所用的宿主,本发明的多肽可以是糖基化的,或可以是非糖基化的。本发明的多肽还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

[0045] 应理解,本发明目的之一在于提供具有催化胍基丁胺和天冬氨酸半醛还原缩合为羧氨丙基胍丁胺的功能的酶,其包括但不限于氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的多肽的突变体,只要其与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有较高同源性例如45%以上同源性、且具有催化底物胍基丁胺和天冬氨酸半醛还原为羧氨丙基胍丁胺的功能,优选具有更高的催化活性。

[0046] 术语“(催化活性)更高”、“提高”或“增强”可以表示相较于参考水平(比如野生型CAPADH)增加至少10%,例如相较于参考水平增加至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%、或最高达并包括100%的增加,或者在10%-100%之间的任意增加,或相较于参考水平的至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约10倍的增加。

[0047] 氨基酸的突变包括取代、缺失或添加。其中,氨基酸的取代包括保守取代和非保守取代,“保守取代”是指具有相似侧链的残基的可互换性,并因此通常包括用相同或相似的氨基酸定义类别中的氨基酸取代多肽中的氨基酸。例如但不限于,具有脂肪族侧链的氨基酸可以用另一种脂肪族氨基酸例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸取代;具有羟基侧链的氨基酸用另一种具有羟基侧链的氨基酸例如丝氨酸和苏氨酸取代;具有芳香族侧链的氨基酸用另一种具有芳香族侧链的氨基酸例如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸取代;具有碱性侧链的氨基酸用另一种具有碱性侧链的氨基酸例如赖氨酸和精氨酸取代;具有酸性侧链的氨基酸用另一种具有酸性侧链的氨基酸例如天冬氨酸或谷氨酸取代;并且疏水性氨基酸或亲水性氨基酸分别用另一种疏水性氨基酸或亲水性氨基酸取代。“非保守取代”是指用具有显著差别的侧链特性的氨基酸取代多肽中的氨基酸。非保守取代可以利用限定组之间而不是它们之内的氨基酸,并且影响:(a)取代区域(例如,脯氨酸取代甘氨酸)中的肽骨架的结构,(b)电荷或疏水性,或(c)侧链体积。例如但不限于,示例性非保守取代可以用碱性或脂肪族氨基酸取代酸性氨基酸;用小氨基酸取代芳香族氨基酸;和用疏水性氨基酸取代亲水性氨基酸。

[0048] 这些突变形式包括但并不限于:一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加或缺失一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。又比如,在本领域内,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。本发明还提供所述多肽的类似物。这些类似物与天然多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到,如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变,还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 $\beta$ 、 $\gamma$ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的多肽并不限于上述例举的代表性多肽。

[0049] 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的多肽CAPADH的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段,作为蛋白标签。这些标签可用于对蛋白进行纯化。为了使翻译的蛋白分泌表达(如分泌到胞外),还可以在所述多肽CAPADH的氨基酸氨基末端添上信号肽序列。信号肽在多肽从细胞内分泌出来的过程可被切去。

[0050] 编码CAPADH多肽的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。编码CAPADH成熟多肽的多核苷酸包括:只编码成熟多肽的编码序列;成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列;成熟



多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0051] 编码CAPADH的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。还可通过化学合成将突变引入本发明的蛋白序列中。

[0052] 本发明也涉及包含CAPADH的多核苷酸的载体,以及用本发明的载体经基因工程产生的宿主细胞,以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

[0053] CAPADH多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含CAPADH编码DNA序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。

[0054] 包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0055] 为了使该羧氨丙基胍丁胺脱氢酶CAPADH能够大量应用于羧氨丙基胍丁胺或者其他化合物的酶催化法制备,通过微生物表达该多肽是制备该酶的最好方法。

[0056] 本发明的CAPADH由于氨基酸序列SEQ ID NO:2明确,因此本领域技术人员很容易获得其编码基因、包含这些基因的表达盒和质粒、以及包含该质粒的转化体。这些基因、表达盒、质粒、转化体可以通过本领域技术人员所熟知的基因工程构建方式获得。

[0057] 上述转化体宿主可以是任何适合表达SEQ ID NO:2的微生物,括细菌和真菌。优选微生物选自大肠杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母、解脂耶氏酵母、枯草杆菌。更优选为大肠杆菌BL21(DE3)。

[0058] 本领域公知,同样一种核苷酸序列,在不同的微生物宿主中的表达结果往往有很大差异。为了在基因工程中最常用的大肠杆菌中最佳地表达羧氨丙基胍丁胺脱氢酶CAPADH或其突变体,可以对这些酶的表达基因进行了密码子优化。

[0059] 密码子优化是可用于通过增加感兴趣基因的翻译效率使生物体中蛋白质表达最大化的一种技术。不同的生物体由于突变倾向和天然选择而通常示出对于编码相同氨基酸的一些密码子之一的特殊偏好性。例如,在生长快速的微生物如大肠杆菌中,优化密码子反映出其各自的基因组tRNA库的组成。因此,在生长快速的微生物中,氨基酸的低频率密码子可以用用于相同氨基酸的但高频率的密码子置换。因此,优化的DNA序列的表达在快速生长的微生物中得以改良。

[0060] 上述CAPADH或其衍生多肽可应用于在本发明发现的羧氨丙基胍丁胺的合成反应上,以胍基丁胺(式I)和天冬氨酸半醛(式II)为底物,获得产物羧氨丙基胍丁胺(III)。上述CAPADH或其衍生多肽的用途不仅限于合成羧氨丙基胍丁胺(III),还包括体外多级酶联反应或大肠杆菌基因工程菌发酵生产亚精胺或其中间体。所述的亚精胺中间体至少包括羧氨丙基胍丁胺、氨丙基胍丁胺。

[0061] 本发明人通过重组表达CAPADH进行体外酶活实验,证明了CAPADH的催化活性。

[0062] 当作为生物催化剂用于催化合成亚精胺中间体例如羧氨丙基胍丁胺的反应时,本发明的CAPADH可以呈现酶的形式或者菌体的形式。所述酶的形式包括游离酶、固定化酶,包括纯化酶、粗酶、发酵液、载体固定的酶等;所述菌体的形式包括存活菌体和死亡菌体。

[0063] 在具体应用时,特别是体外酶联催化中,本发明的多肽CAPADH或其衍生多肽还可



被固定于其他的固相载体上,获得固定化的酶,应用于与底物进行体外反应。所述的固相载体例如是一些无机物制成的微球,管状体等。固定化酶的制备方法有物理法和化学法两大类。物理方法包括物理吸附法、包埋法等。化学法包括结合发、交联法。结合法又分为离子结合法和共价结合法。上述的固定化酶的方法均可被应用于本发明中。

[0064] 此外,本发明还涉及一种具有式(III)结构的新化合物,其是CAPADH催化胍基丁胺与天冬氨酸半醛缩合后的产物,是蓝细菌亚精胺生物合成途径中重要的中间产物,可被应用于亚精胺或亚精胺中间体的人工合成,具有产业应用价值。

[0065] 以下结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。

[0066] 本文中涉及到多种物质的添加量、含量及浓度,其中所述的百分含量,除特别说明外,皆指质量百分含量。

[0067] 本文的实施例中,如果对于反应温度或操作温度没有做出具体说明,则该温度通常指室温(15-30℃)。

[0068] 实施例

[0069] 材料和方法

[0070] 实施例中引物合成及测序皆委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

[0071] 实施例中的分子生物学实验包括质粒构建、酶切、连接、感受态细胞制备、转化、培养基配制等等,主要参照《分子克隆实验指南》(第三版),J.萨姆布鲁克,D.W.拉塞尔(美)编著,黄培堂等译,科学出版社,北京,2002)进行。必要时可以通过简单试验确定具体实验条件。

[0072] PCR扩增实验根据质粒或DNA模板供应商提供的反应条件或试剂盒说明书进行。必要时可以通过简单试验予以调整。

[0073] LB培养基:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,pH7.2。(LB固体培养基另加20g/L琼脂粉。)

[0074] 以下实施例中,使用含卡那霉素(kan)培养基时,所述抗生素在培养基中的终浓度为50μg/ml。

[0075] 实施例中所使用的PCR引物如表1所示。

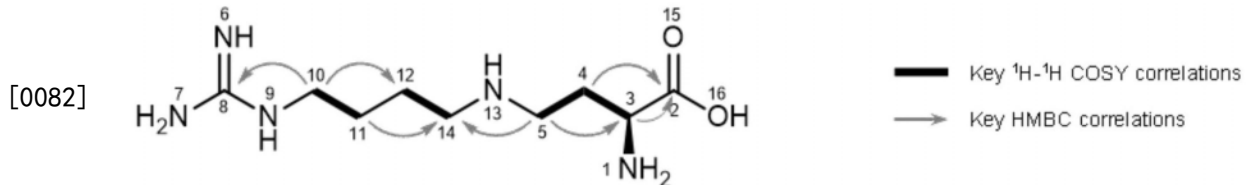
[0076] 表1、实施例中所使用的引物

[0077]	名称	序列(5'-3')	编号
	P1	taactttaagaaggagatataccatggctaagtaatgattgtgggag	SEQ ID NO: 3
	P2	tcagtggtggtggtggtgctcgcagatcgtaaaaggaaaaggccg	SEQ ID NO: 4
	P3	ctcatggtatatctccttctttcaatcgtaaaaggaaaaggcc	SEQ ID NO: 5
[0078]	P4	attgaaagaaggagatataccatgagcagttttgcggtgaaca	SEQ ID NO: 6
	P5	tcagtggtggtggtggtgctcgcagtcacctaagcggttgcgataatct	SEQ ID NO: 7
	P6	atcgcaaccgcttaggtgaaagaaggagatataccatgcatagtcctaataaattacctctgg	SEQ ID NO: 8
	P7	tcagtggtggtggtggtgctcgcagctagatgtttttccgtgggactctc	SEQ ID NO: 9

[0079] 实施例1:蓝细菌中亚精胺合成途径的发现

[0080] 发明人经过大量前期研究,发现模式蓝细菌集胞藻*Synechocystis* sp.PCC 6803在由氮源、磷源或硫源限制的培养条件转为营养丰富的培养条件时,有两种多胺类化合物的浓度在菌体内出现明显的累积,其中一种多胺类化合物为新化合物,如图1所示。该化合物的核磁共振数据如表2所示,核磁共振氢谱、碳谱以及其他二维谱图如图2所示。通过二级质谱与核磁共振谱图的解析,确定了该化合物的结构,为(S)-2-氨基-4-((4-胍丁基)氨基)丁酸((S)-2-amino-4-((4-guanidinobutyl) amino) butanoic acid),本文中将其命名为羧氨丙基胍丁胺,英文名为carboxyamino-propylagmatine,简称CAPA。

[0081] 表2、羧氨丙基胍丁胺的核磁共振数据



Position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$ (J in Hz)
2	173.23	/
3	52.68	3.86 (1H, dd, 7.6, 5.7)
4	26.84	2.24 (2H, m)
[0083] 5	44.63	3.27 (2H, m)
8	156.89	/
10	40.52	3.24 (2H, m)
11	25.13	1.68 (2H, m)
12	22.95	1.75 (2H, m)
[0084] 14	47.08	3.11 (2H, m)

[0085] 为了探究CAPA的合成来源,发明人根据大量的 $^{13}\text{C}$ 和 $^{15}\text{N}$ 示踪实验,并结合代谢组学、遗传操作和生化鉴定的方法,在模式蓝细菌*Synechocystis* sp.PCC 6803中发现了一条亚精胺合成的新途径,命名为羧氨丙基胍丁胺途径,或CAPA途径,如图3所示。在培养基中添加碳氮全标的精氨酸( $[\text{U}-^{13}\text{C}, \text{U}-^{15}\text{N}]$  arginine),或全碳标记的天冬酰胺( $[\text{U}-^{13}\text{C}]$  asparagine),孵育4h后,检测集胞藻胞内中间代谢物的标记状态。如图4所示,碳氮全标的精氨酸在胞内被精氨酸脱羧酶一步反应转化为碳氮全标的胍基丁胺,随后胍基丁胺的标记进入羧氨丙基胍丁胺(CAPA)、氨丙基胍丁胺(APA)以及亚精胺,表明胍基丁胺直接参与亚精胺的合成;类似地,全碳标记的天冬酰胺在胞内被天冬酰胺酶水解转化为全碳标记的天冬氨酸,随后标记进入羧氨丙基胍丁胺(CAPA)、氨丙基胍丁胺(APA)以及亚精胺,表明天冬氨酸在形成天冬氨酸半醛后,作为底物用于羧氨丙基胍丁胺(CAPA)及亚精胺的合成。

[0086] 发明人通过在模式蓝细菌*Synechocystis* sp.PCC 6803中敲除多个可能与亚精胺合成相关的基因。如图5所示,通过比较野生型菌株和敲除菌株的代谢组差异,发现在敲除CAPADH后的菌体内胍基丁胺的浓度大幅上升,且检测不到羧氨丙基胍丁胺(CAPA)与其下游产物;敲除CAPADC后,羧氨丙基胍丁胺(CAPA)大量累积,且检测不到氨丙基胍丁胺(APA)及亚精胺;敲除APAUH后,氨丙基胍丁胺(APA)大量累积且检测不到亚精胺,如图6所示。 $^{13}\text{C}$ 和

<sup>15</sup>N示踪实验也证明了这一点(参见图4)。在敲除CAPADH后回补CAPADH,胞内胍基丁胺和亚精胺的浓度恢复至野生型菌株的水平。这说明CAPADH催化了胍基丁胺和天冬氨酸半醛的缩合反应,生成了羧氨丙基胍丁胺(CAPA);CAPADC催化了羧氨丙基胍丁胺(CAPA)的脱羧反应,生成了氨丙基胍丁胺(APA);APAUH催化了氨丙基胍丁胺(APA)的水解,脱去一分子尿素生成亚精胺。

[0087] 其中基因CAPADH的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,编码的多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0088] 实施例2:CAPADH表达载体的构建与纯化

[0089] 2.1载体构建

[0090] 使用pET28a载体(Novagen),经限制性内切酶NcoI和XhoI酶切产生粘性末端。使用引物P1和P2,以*Synechocystis* sp. PCC 6803的基因组为模板,高保真DNA聚合酶(PhantaMax,诺唯赞)扩增出DNA片段,将回收的DNA片段与酶切后的载体以及克隆试剂盒混合,50℃孵育30分钟,使片段与载体连接。构建C端带有6×Histidine tag的目的蛋白用于后续亲和纯化。

[0091] 2.2大肠杆菌转化

[0092] 从-80℃冰箱中取出大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞(Novagen),置于冰上缓慢融化。待感受态细胞刚好融化时,将步骤2.1得到的连接产物缓慢沿壁加入感受态细胞中,用指尖轻弹混匀,混匀后置于冰上冰浴30min。42℃水浴热激90s,再次置于冰上2min。加入1mL LB培养基,置于37℃、170rpm转速的摇床中复苏1h。8000×g离心1min以富集菌体,在超净台内弃多余上清,将菌体用剩余约100 $\mu$ L培养基吹吸混匀。用灭菌的涂布棒将混匀的菌液均匀涂布于加入含有50 $\mu$ g/mL Kanamycin的LB固体平板上,置于37℃培养箱培养10h。次日单克隆经PCR与电泳验证条带正确,测序验证无误后,提取质粒。

[0093] 2.3原核表达与蛋白纯化

[0094] 将步骤2.2中构建得到的质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中。挑单克隆并接种到含有50 $\mu$ g/mL Kanamycin的4mL LB液体培养基试管中,37℃、190rpm培养10h。以1% v/v的接种量将培养的菌液接种到含有50 $\mu$ g/mL Kanamycin的50mL LB液体培养基三角瓶中,37℃、190rpm培养1.5h左右,当OD<sub>600</sub>位于0.4-0.6的范围内时,加入10 $\mu$ L 1M IPTG溶液,16℃、110rpm诱导培养16h。诱导培养后将菌液置于冰上冷却,8000×g、4℃低温离心5min收集沉菌。超声破碎细胞,收集破碎后的总蛋白,将其12000×g、4℃低温离心60min后得到上清。经Ni-NTA树脂亲和纯化带有6×Histidine tag的目的蛋白,通过Bradford显色法测量蛋白浓度,通过SDS-PAGE电泳检测蛋白分子量及纯度,如图6所示。蛋白置于-80℃保存。

[0095] 实施例3:CAPADH的体外酶活测定

[0096] 3.1酶活测定

[0097] 反应体系为200 $\mu$ L of 50mM磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4),含有5mM胍基丁胺,1.25mM天冬氨酸半醛,0.25mM NADPH,以及1mM dithiothreitol(二硫苏糖醇,DTT),通过添加0.5 $\mu$ g纯化的CAPADH起始反应,温度维持在30℃。反应2h后终止反应,通过液相色谱HPLC或高分辨质谱检测产物。酶反应动力学通过分光光度计检测A<sub>340</sub>随时间的速率来反映NADPH的消耗。

[0098] 发明人在以胍基丁胺、天冬氨酸半醛和NADPH为底物的反应体系中,利用HPLC和高

分辨质谱可以检测到加入CAPADH蛋白后,底物被消耗,生成了新的产物(图6),且该产物的色谱保留时间、精确分子量以及MS/MS与*Synechocystis* sp.PCC 6803胞内的羧氨丙基胍丁胺(CAPA)一致。不含有CAPADH或NADPH的反应体系则检测不到羧氨丙基胍丁胺(CAPA)的生成。

#### [0099] 3.2利用HPLC制备纯化CAPADH的产物

[0100] 利用纯化的CAPADH进行酶反应,反应体系中包含50mM磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)、5mM胍基丁胺(Agmatine)、2mM天冬氨酸半醛(L-Aspartate semialdehyde)、2mMNADPH、1mM dithiothreitol和500 $\mu$ g纯化的CAPADH。30 $^{\circ}$ C孵育过夜后,采用制备型高效液相色谱(1290infinity II-6125,Agilent)进行产物的制备纯化。通过Xbridge酰胺柱(150mm $\times$ 4.6mm,3.5 $\mu$ m,Waters)对产物进行色谱分离,流动相A为0.5%甲酸水溶液,B为含0.5%甲酸的乙腈。色谱柱温保持在40 $^{\circ}$ C,溶剂流速为1mL/min,洗脱梯度为:0分钟,95%B;4分钟,70%B;10分钟,60%B;11分钟,20%B;15分钟,20%B;15.1分钟,95%B;24分钟,95%B。每隔0.5min收集一管流出组分,采用高分辨质谱分析纯度。核磁共振分析确认,CAPADH体外酶反应的产物结构与羧氨丙基胍丁胺(CAPA)一致。综上,可以确定CAPADH参与的亚精胺合成途径中的如下反应:

[0101]  $\text{Agmatine} + \text{L-Aspartate semialdehyde} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Carboxyaminopropylagmatine} + \text{NAD(P)}^+$

[0102] 实施例4:异源构建CAPA途径以合成亚精胺及其他多胺衍生物

#### [0103] 4.1菌株构建

[0104] 通过过表达CAPA途径中的关键酶CAPADH、以及其他相关蛋白,可用于合成亚精胺中间体CAPA、APA、亚精胺以及其他多胺衍生物。菌株构建如图7所示。使用pET28a载体,经限制性内切酶NcoI和XhoI酶切产生粘性末端。

[0105] 以*Synechocystis* sp.PCC 6803的基因组为模板,使用引物P1和P2,通过PCR扩增出含有CAPADH基因的DNA片段,将回收的DNA片段与酶切后的载体以及克隆试剂盒混合,50 $^{\circ}$ C孵育30分钟,使片段与载体连接。质粒转化至BL21(DE3)菌株中,得到菌株Strain 1,该菌株可通过IPTG诱导表达CAPADH。

[0106] 以*Synechocystis* sp.PCC 6803的基因组为模板,使用引物P1和P3、引物P4和P5,分别PCR扩增出含有CAPADH基因和CAPADC基因的DNA片段,将回收的DNA片段与酶切后的载体以及克隆试剂盒混合,50 $^{\circ}$ C孵育30分钟,使片段与载体连接。质粒转化至BL21(DE3)菌株中,得到菌株Strain 2,该菌株可通过IPTG诱导表达CAPADH和CAPADC。提取菌株Strain 2中的质粒,经限制性内切酶XhoI酶切产生粘性末端。

[0107] 以*Synechocystis* sp.PCC 6803的基因组为模板,使用引物P6和P7,通过PCR扩增出含有APAUH基因的DNA片段,将回收的DNA片段与酶切后的载体以及克隆试剂盒混合,50 $^{\circ}$ C孵育30分钟,使片段与载体连接。质粒转化至BL21(DE3)菌株中,得到菌株Strain 3,该菌株可通过IPTG诱导表达CAPADH、CAPADC和APAUH。

[0108] 另外,将pET28a载体直接转化至BL21(DE3)菌株中作为负对照。

#### [0109] 4.2菌株发酵

[0110] 将上述各菌株于LB平板上划线,挑取单克隆接种到含有Kanamycin的4mL LB液体培养基试管中,37 $^{\circ}$ C、190rpm培养10h。以1%v/v的接种量将培养的菌液接种到含有Kana的

50mL LB液体培养基三角瓶中,37℃、220rpm培养3h左右,加入1M IPTG(5000×)10μL,16℃、150rpm发酵15h。

[0111] 4.3发酵产物分析

[0112] 发酵后,取细胞培养液1mL,于4℃、14000rpm离心3min,取上清,通过高分辨质谱检测发酵产生的多胺及其上清。如图7所示,在构建的三株含有CAPA途径的大肠杆菌中,其发酵产物内检测到多种多胺及多胺衍生物。

[0113] 在Strain 1中,过表达CAPADH使得细胞合成羧氨丙基胍丁胺(CAPA)及其乙酰化产物,乙酰羧氨丙基胍丁胺(Acetyl-CAPA);

[0114] 在Strain 2中,过表达CAPADH和CAPADC使得细胞合成氨丙基胍丁胺(APA)及其乙酰化产物,乙酰氨丙基胍丁胺(Acetyl-APA);

[0115] 在Strain 3中,过表达CAPADH和CAPADC使得细胞合成亚精胺及其乙酰化产物,N<sup>1</sup>-乙酰亚精胺(N1-Acetylspermidine),N<sup>8</sup>-乙酰亚精胺(N8-Acetylspermidine)和双乙酰亚精胺(Diacetylspermidine)。

[0116] 因此,通过在大肠杆菌底盘中异源构建CAPA途径可以实现包括羧氨丙基胍丁胺、氨丙基胍丁胺、亚精胺及其衍生物的生物合成。

[0117] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和修饰,这些改进和修饰也应视为本发明的保护范围。

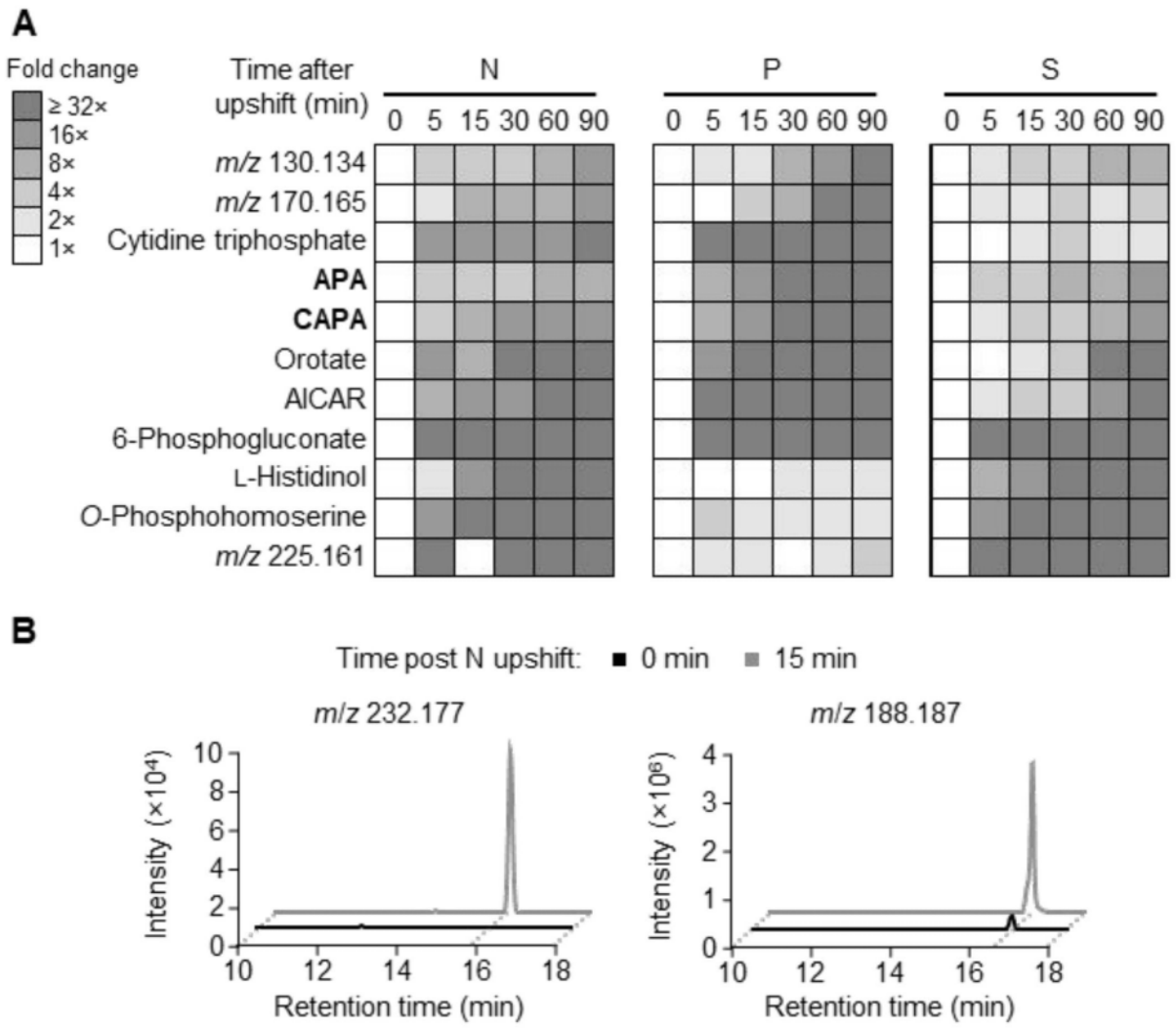


图1

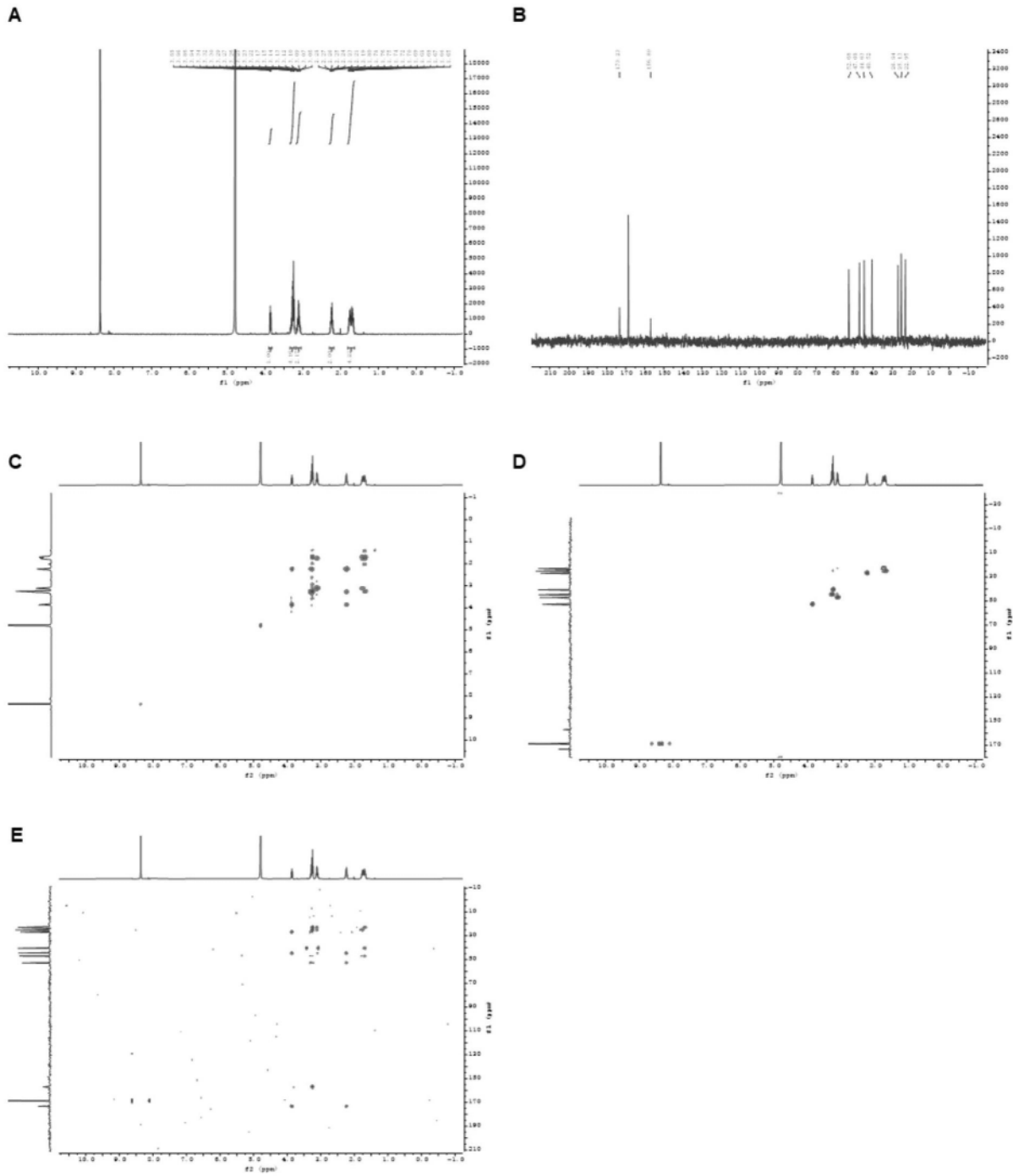


图2



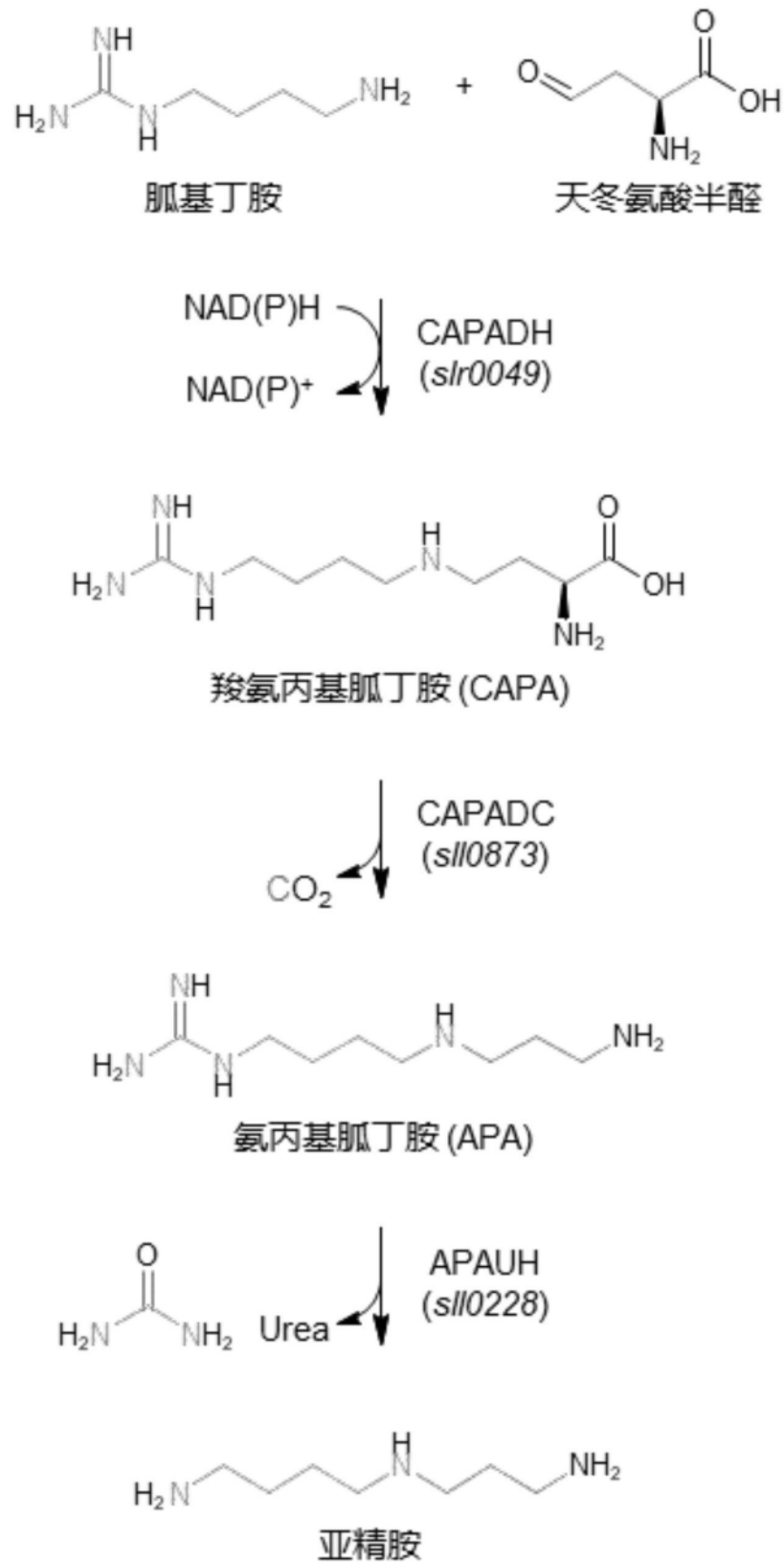


图3

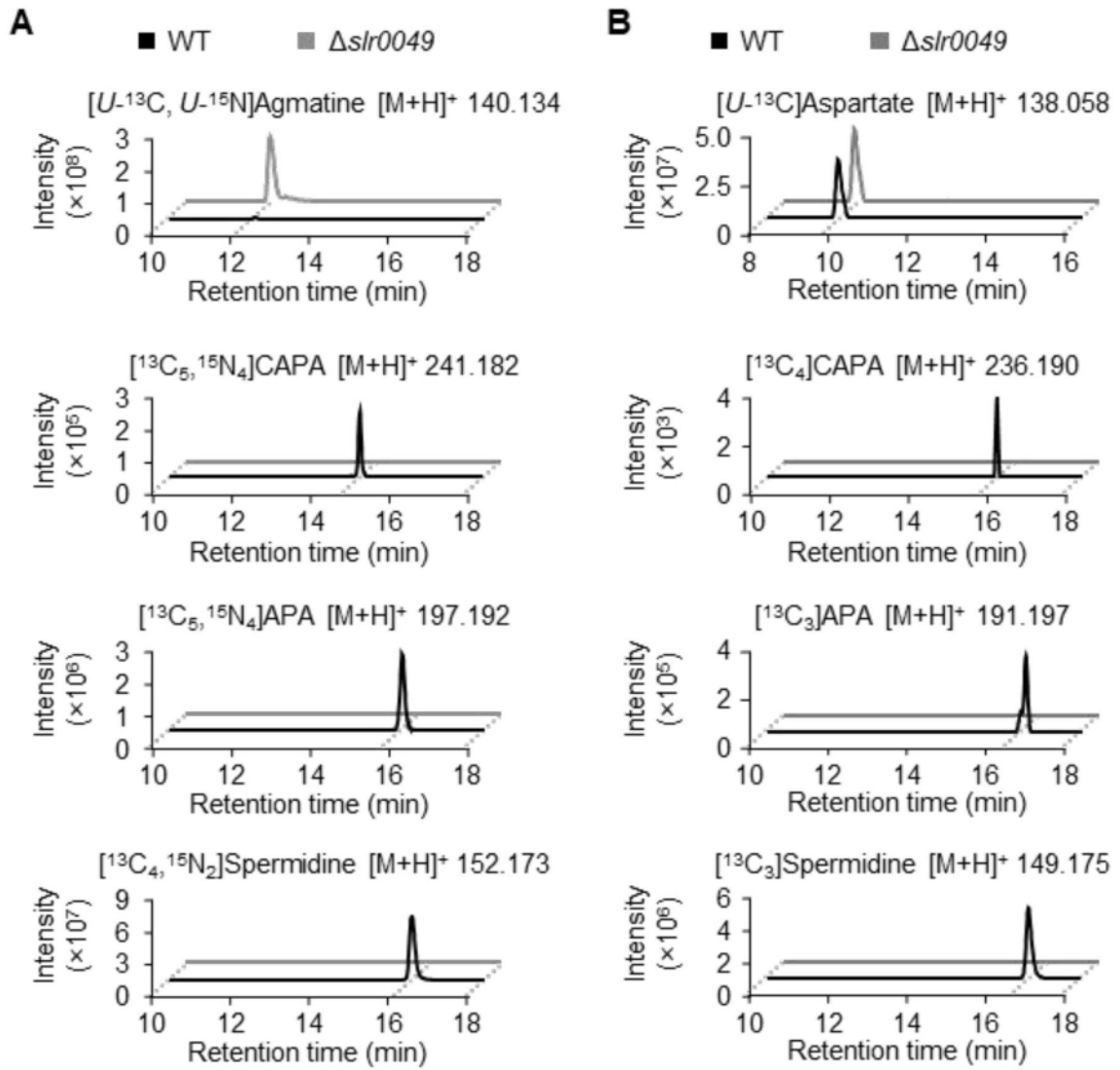


图4

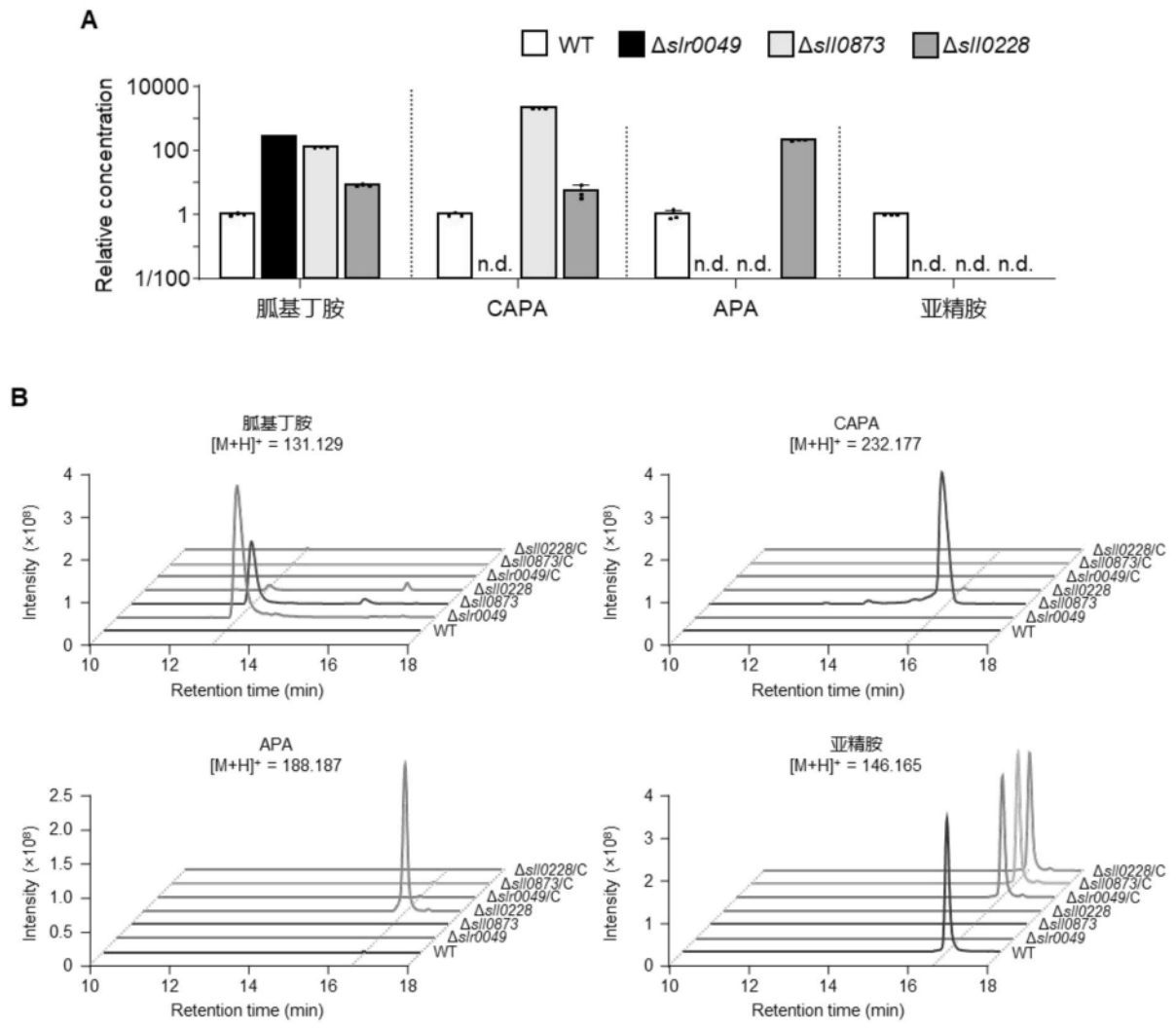


图5

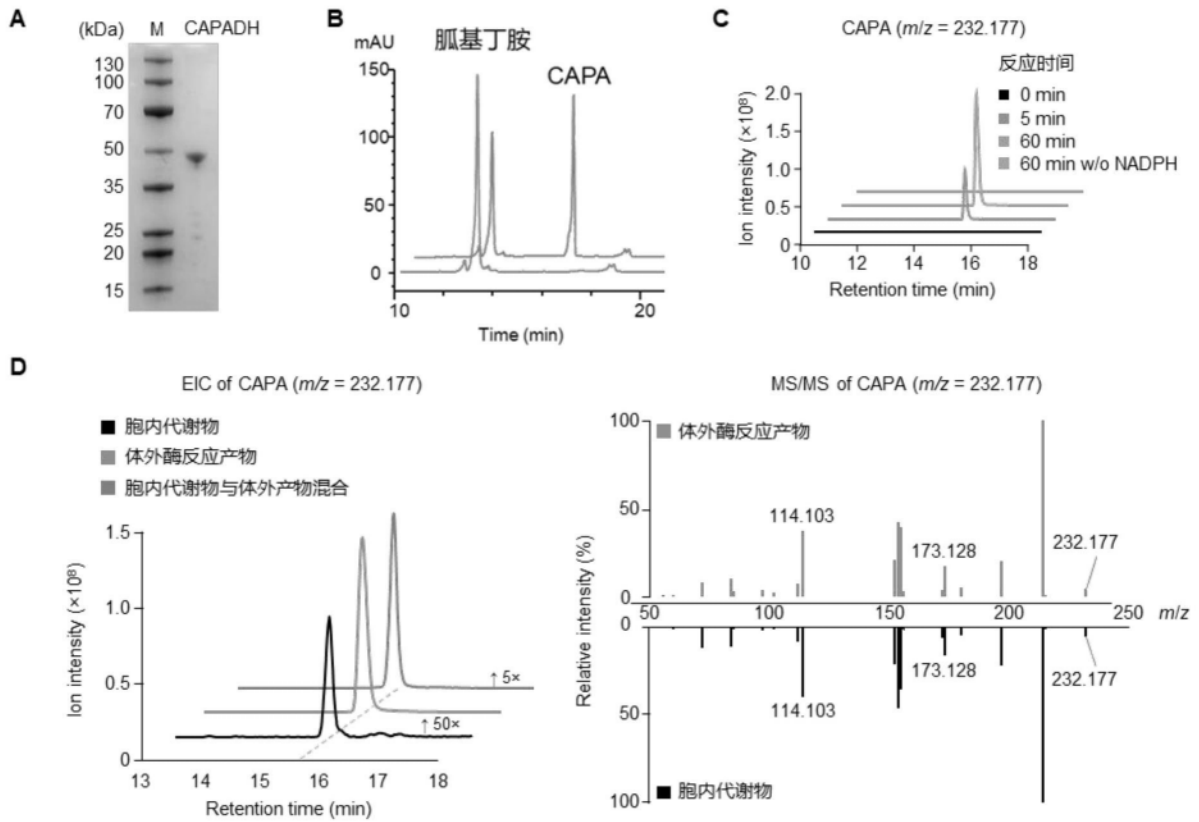


图6

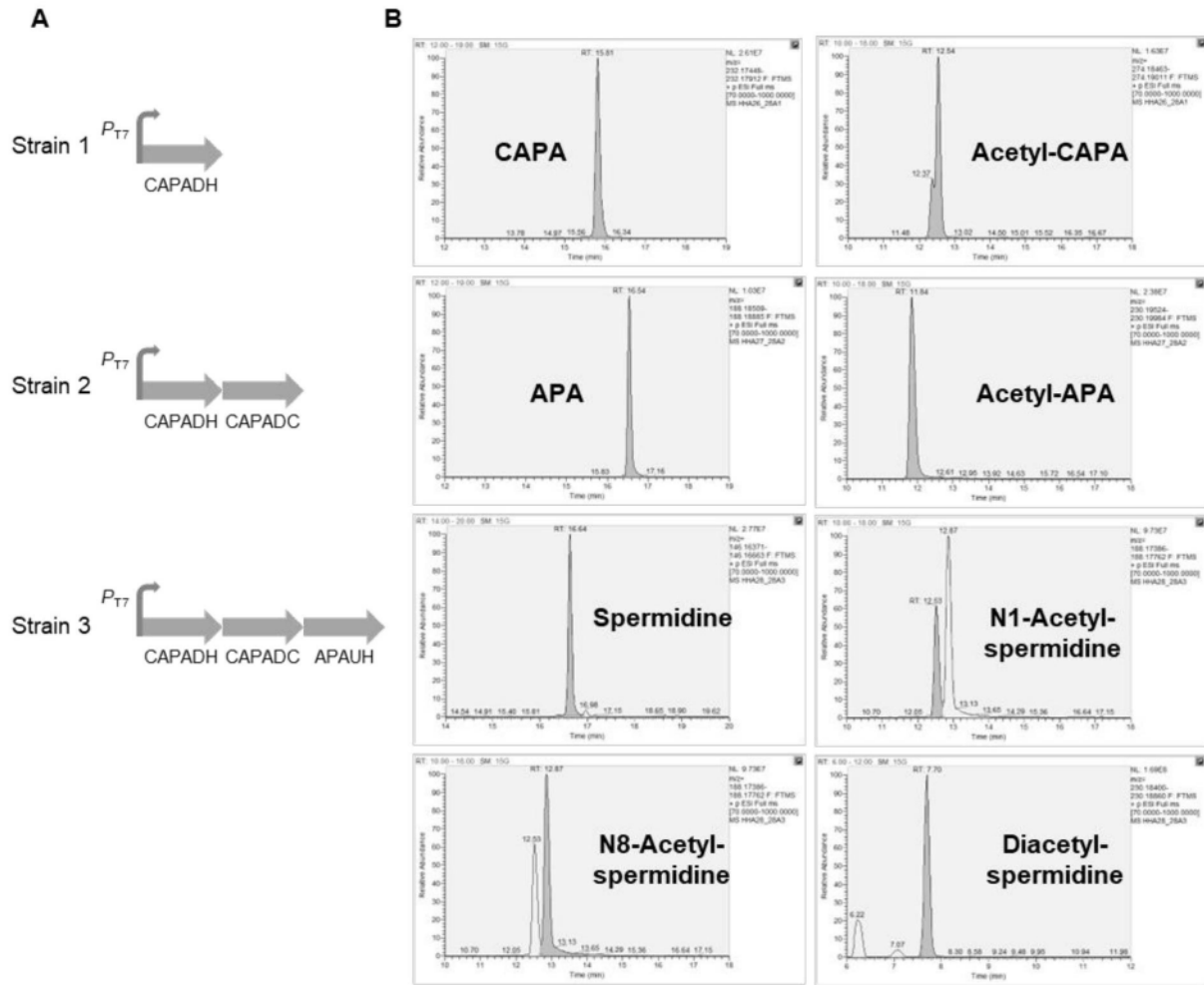


图7