

# 麦角生物碱生物合成研究进展

朱 平\*

(中国医学科学院药物研究所, 卫生部天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050)

关键词: 麦角生物碱; 生物合成途径; 基因克隆

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2000)08 - 0630 - 05

医用麦角生物碱(ergot alkaloids)大多是由天然麦角生物碱经过结构改造而成,多具有重要的临床用途,少数天然麦角生物碱可直接作为药物。由于麦角生物碱类药物在临床应用上占有重要位置,加之麦角肽碱(ergot peptide alkaloids, ergopeptines)有特殊的环肽结构,因此麦角生物碱生物合成的研究历来受到重视。近年来,现代生物技术和分子生物学方法进一步促进了麦角生物碱生物合成的研究。已基本弄清其生物合成途径,尤其是对一些关键酶的研究已有较大进展。

## 1 麦角生物碱的生物合成途径

麦角菌属(*Claviceps*)真菌多达40余种,最常见的有黑麦麦角菌(麦角菌)(*C. purpurea*)、雀稗麦角菌(*C. paspali*)、拂子茅麦角菌(*C. microcephala*)和*C. fusiformis*等,其中以黑麦麦角菌为代表。它们的产碱类型有差异:*C. paspali*和*C. fusiformis*等主要产生结构较为简单的棒麦角生物碱(clavines)或简单的麦角酸衍生物(如麦角酰胺,lysergic acid amide),*C. purpurea*则还能产生结构复杂的麦角肽碱。另外,在酸或碱的影响下,麦角酸及其生物物的第8位可发生异构化(由8R转变成8S)形成不具生理活性的异构体,如麦角克碱(ergocristine)转变成麦角异克碱(ergocristinine)(图1)。

麦角肽碱在结构上很相似,其差别仅在于环肽上的个别氨基酸残基(均为L-型氨基酸),见表1。其中 $\alpha$ -麦角隐亭( $\alpha$ -ergocryptine), $\beta$ -麦角隐亭( $\beta$ -ergocryptine),麦角考宁(ergocornine)和麦角克碱(ergocristine)仅第2位氨基酸不同,这4个麦角生物碱最早称为麦角毒碱(ergotoxones)。

合成麦角肽碱环肽部分的前体物是游离氨基

Tab 1 Amino acid sequences in ergopeptines

Ergopeptines	Amino acid sequence
$\alpha$ -Ergocryptine	Lysergic acid- <i>val</i> - <i>leu</i> - <i>pro</i>
$\beta$ -Ergocryptine	Lysergic acid- <i>val</i> - <i>ile</i> - <i>pro</i>
Ergocornine	Lysergic acid- <i>val</i> - <i>val</i> - <i>pro</i>
Ergocristine	Lysergic acid- <i>val</i> - <i>phe</i> - <i>pro</i>
Ergosine	Lysergic acid- <i>ala</i> - <i>leu</i> - <i>pro</i>
Ergotamine	Lysergic acid- <i>ala</i> - <i>phe</i> - <i>pro</i>

酸<sup>[1]</sup>。以ergocristine为例,早期提出的假说是:生物合成在多酶复合体(multienzyme complex)上进行,环肽形成时氨基酸掺入顺序依次为第3个氨基酸L-pro,第2个氨基酸L-phe和第1个氨基酸L-val,最后,L-val的氨基与D-麦角酸的羧基脱水缩合形成酰胺键。离开多酶复合体后的中间产物5[D-麦角酸(L,L,L)三肽内酰胺],在第1个氨基酸L-val的 $\alpha$ -碳原子上引入羟基,然后,可能经过非酶促反应产生闭环形成ergocristine。但如果中间产物5的L-pro异构化为D-pro,则形成不活泼终端途径(dead-end route)的副产物6[一种D-麦角酸(L,L,D)三肽内酰胺],后者的L-val $\alpha$ -碳原子因不能羟基化而无法进一步转变成环肽结构<sup>[2-4]</sup>(图2)。已有一些证据支持该假说<sup>[5-7]</sup>,但在氨基酸、D-麦角酸掺入顺序上后来已证明是错误的,这主要是因为当时没有分离出多酶复合体的缘故。

现已分离出负责麦角肽碱合成的多酶复合体D-麦角酸肽合成酶(D-lysergyl peptide synthetases, LPS),它由2个亚基(LPS1和LPS2)组成,以非核糖体合成(nonribosomal peptide synthesis)模式催化麦角肽碱的合成<sup>[8-10]</sup>(图3)。

## 2 麦角生物碱生物合成酶的研究

麦角生物碱的生物合成途径大约有十几步反应,但有关酶学方面的知识仍然有限<sup>[11]</sup>。迄今只有少数几个酶进行过比较深入的研究,如:二甲烯丙基

收稿日期: 1999-09-02

\* Tel: (010) 63165197, Fax: (010) 63017757,

E-mail: zhuping@imm.ac.cn

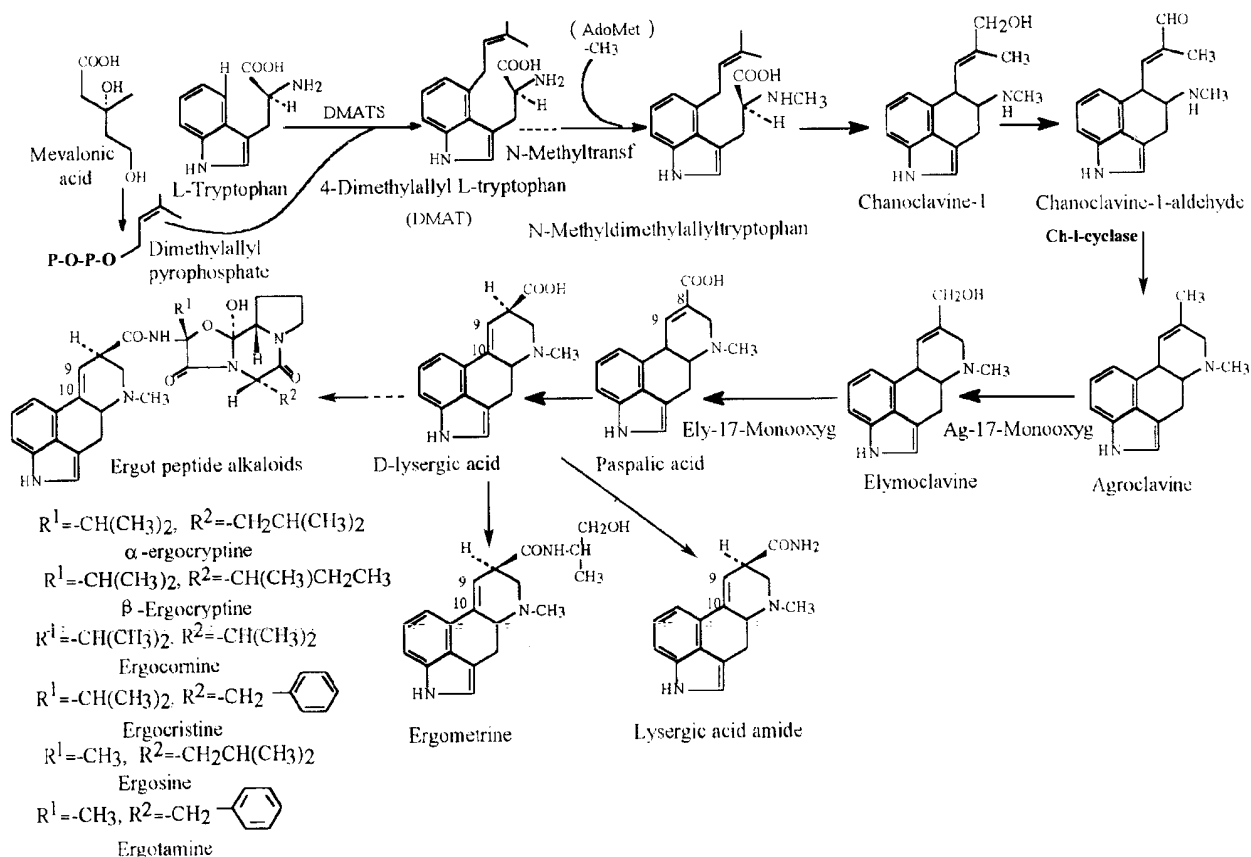


Fig 1 The ergot alkaloid biosynthesis pathway

DMAT. Dimethylallyltryptophan; DMATS. DMAT synthetase; Ado Met. Adenosine methionine; N-Methyltransf. N-Methyltransferase; Ch. Chanoclavine; Ag. Agroclavine; Ely. Ely moclavine; Monooxyg. Monoxygenase

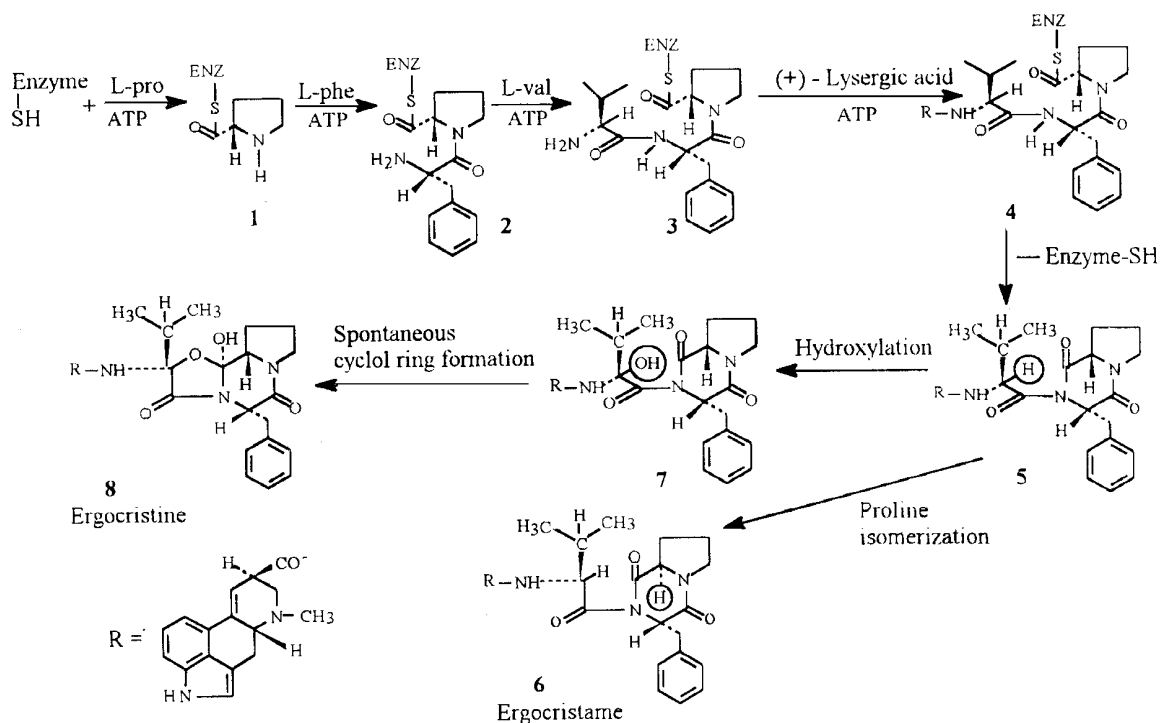


Fig 2 Hypothetic formation of ergopeptines and ergopeptames on a multienzyme complex (=ENZ)

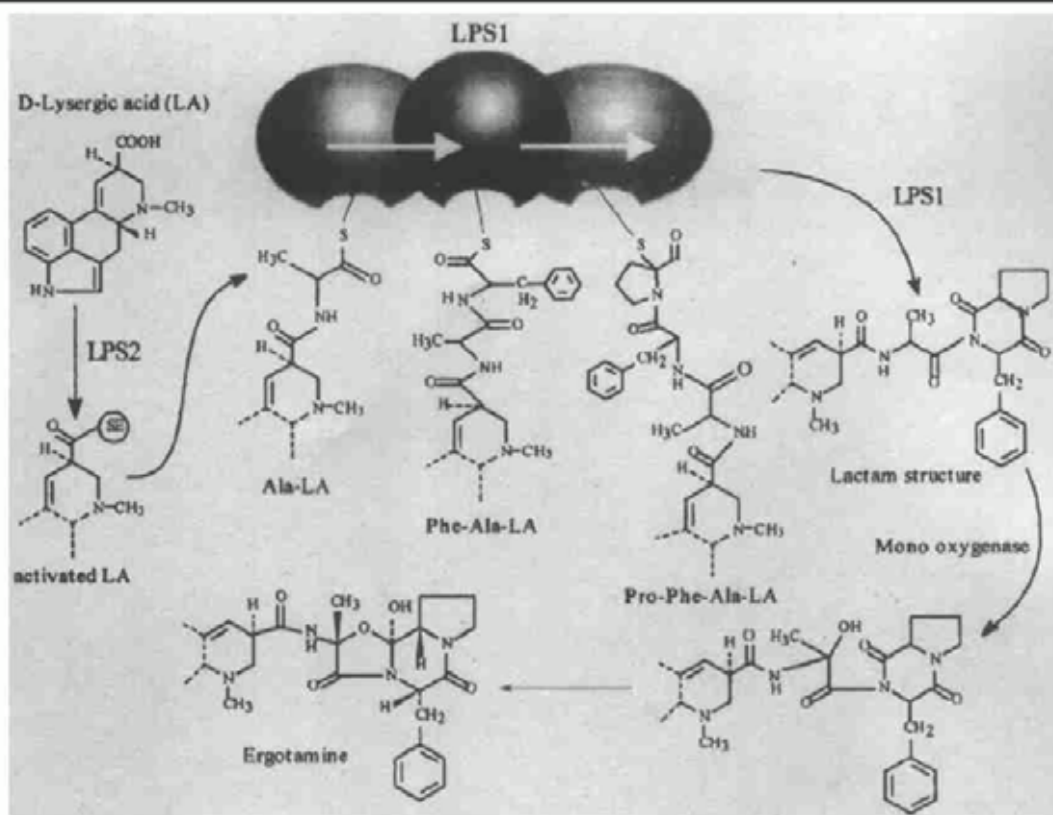


Fig 3 Biosynthesis of ergopeptines, as exemplified by ergotamine<sup>[10]</sup>  
LPS. *D*-Lysergyl peptide synthetase; SE. Thioesterified LPS2

色氨酸合成酶( dimethylallyltryptophan synthetase, DMATS)<sup>[12]</sup>、裸麦角生物碱-1-环化酶( chanoclavine-1-cyclase)<sup>[11]</sup>、加氧酶类[ 田麦角生物碱 17-单加氧酶( agroclavine 17- monooxygenase) 和野麦角生物碱 17-单加氧酶( elyoclavine 17- monooxygenase) ]<sup>[13]</sup> 以及 *D*-麦角酸肽合成酶( LPS)。而从酶的作用机制、结构和基因水平进行过详细研究的只有 DMATS 和 LPS。前者被认为是第一个关键酶, 在研究麦角生物碱生物合成的调节上有十分重要的意义; 后者则是麦角肽碱合成的关键酶, 并且对于揭示麦角肽碱生物合成的机理起很重要的作用<sup>[9]</sup>。最近 Tudzynski 等<sup>[10]</sup>还发现在黑麦麦角菌中麦角生物碱生物合成基因成簇( cluster) 存在的现象。

**2.1 DMAT 合成酶(DMATs)** DMATs 首先从麦角菌株 ATCC 26245 中纯化得到, 催化机理已阐明<sup>[12,14]</sup>, 它是一个同型二聚体( 每个亚基分子量为 52-ku)。Tsai 等<sup>[15]</sup>用反向遗传学( reverse genetics) 方法从上述菌株中克隆了 DMATs 的基因( *dmaW*), 该基因在靠近编码区的 3'-端有 2 个内含子, 根据编码的核苷酸序列推算 *dmaW* 编码 455 个氨基酸, 多肽长度 51 824 u。由酵母表达载体携带

的该基因 cDNA 于酵母菌中得以表达。最近, Arntz 等<sup>[16]</sup>以 ATCC 26245 菌株为材料, 用 cDNA 差异筛选法( differential cDNA screening approach) 也获得了编码 DMATs 的部分 cDNA 片段( *cpd1*), 其核苷酸序列与 *dmaW* 100% 相同, 并且证明它的 mRNA 只在诱导麦角生物碱合成的条件下才产生, 即该基因受转录水平上的调控。但 ATCC 26245 菌株不产生麦角肽碱, 只产生结构较为简单的棒麦角生物碱( clavines), 后来的分子生物学研究证实该菌株应属于 *C. fusiformis*<sup>[17]</sup>, 而非 Tsai 文中的 '*C. purpurea*'。

Tudzynski 等<sup>[10]</sup>第 1 个从 *C. purpurea* 中克隆 DMATs 基因, 他们以 *dmaW* 的 cDNA 为探针, 从麦角胺产生菌( *C. Purpurea* P1) 的基因文库中获得了 DMATs 基因的阳性克隆( 该基因被命名为 *cpd1*), *cpd1* 含有 1 344 bp 的开放阅读框架, 编码 448 个氨基酸, 编码区有 2 个内含子( 大小分别为 65 和 54 bp), 2 个内含子所处的位置与在 *dmaW* 中的相同。但是, 由 *cpd1* 推断出的基因产物 CPD1 与 *dmaW* (来自 ATCC 26245 菌株) 的基因产物只有 68% 的相似性, 两者的异戊烯转移酶结构域( prenyltransferase domain, 或 prenyl diphosphate

binding motif) 也有很大的不同, 分别为 DDSYN 和 KDTFN; 而 2 个基因的启动子区域则完全不同, 再次证明 ATCC 26245 与 *C. Purpurea* PI 亲源关系较远。在 *cpd1* 基因的启动子上有几个被公认的结合位点, 这些结合位点可能分别与碳代谢、氮代谢和磷酸盐代谢对麦角生物碱生物合成的调节有关<sup>[10]</sup>。而大多数麦角菌在纯培养条件下其麦角生物碱的生物合成受到严格调控: 色氨酸既作为前体物又是诱导物, 磷酸盐、葡萄糖以及铵则抑制麦角生物碱的合成<sup>[11]</sup>。这样, DMATS 作为麦角生物碱生物合成途径的第一个限速酶, 在低磷酸盐条件下其基因可被诱导激活(通过有关正向调节蛋白与启动子结合), 并伴随着麦角生物碱的产生<sup>[10]</sup>。

**2.2 麦角酸肽合成酶(LPS)** LPS 含有 2 条肽链(即 2 个亚基), 一条 370 ku(LPS1), 另一条 140 ku(LPS2)<sup>[8,9]</sup>。LPS1 含有 3 个氨基酸激活域; LPS2 与麦角酸的激活有关, 故又称为 D-麦角酸活化酶(D-lysergic acid activating enzyme)<sup>[18]</sup>。已发现 D-麦角酸肽合成中特有的肽中间物以及 D-麦角酸与各个氨基酸在多酶复合体(LPS1, LPS2)上的装配顺序<sup>[9]</sup>: 两个 LPS 亚基均含有 4'-磷酸泛酰巯基乙胺(4'-phosphopantetheine), 借此以共价的酶-硫酯形式与底物相连, 催化产生 D-麦角酸-一肽、D-麦角酸-二肽和 D-麦角酸-三肽, 此过程为不可逆。肽的合成始于 D-麦角酸结合到 LPS2 亚基, 这是一个有序连续酰基转移过程。麦角肽碱在 LPS 上的生物合成模式详见图 3, 其氨基酸掺入顺序与图 2 正好相反。

Riederer 等<sup>[8]</sup>还用离体实验证明 LPS 具有多功能的特性, 即从主产麦角胺(ergotamine)的菌株 *C. purpurea* DI 制备 LPS, 在消耗 ATP 和第 3 位氨基酸(L-pro)不变的前提下可根据所提供的氨基酸的不同催化形成不同的 D-麦角酸-(L, L, L)三肽内酰胺(又称为 D-麦角酸肽, 是含环肽的麦角肽碱直接前体物)。结果说明: 不同麦角菌株在产碱类型上

的差异, 至少部分反映了在细胞内的游离氨基酸库中各种底物氨基酸浓度上的差别。

最近 Tudzynski 等<sup>[10]</sup>在克隆 *C. purpurea* 的 DMAT 合成酶基因(*cpd1*)时, 发现在该基因的下流有一未知的开放阅读框架(ORF), 紧接着是 1 个与已知的细菌或真菌肽合成酶基因具有很大相似性的大 ORF。这个完整基因(命名为 *cpps1*)大于 9 kb, 编码 3233 个氨基酸, 包含 3 个重复的保守区。推测 *cpps1* 编码具有 3 个结构域的肽合成酶, 这与 LPS1 极为相似。氨基酸序列分析表明, 在对应的区段上 LPS1 与 *cpps1* 的推断产物 CPPS1 基本一致, 例如, LPS1 上的一段 17 肽序列几乎完全同源于 CPPS1 中第 2 结构域的一段顺序。由此推论 *cpps1* 就是 LPS1 的编码基因。*cpps1* 的第 2 单元近末端有一内含子(RT-PCR 验证为 99 bp), 考虑到内含子的存在, 理论上该基因编码的多肽的分子量为 356 ku(文献报道 LPS1 的分子量是 370 ku<sup>[9]</sup>), pI 6.04。在 *cpps1* 的启动子区显示一些调节蛋白的结合位点, 说明该基因是受转录水平调节的, 而 Riederer 等<sup>[8]</sup>发表的数据则表明, *C. purpurea* 的 LPS1 是以组成型方式合成的。

### 2.3 麦角生物碱生物合成基因簇(cluster)

Tudzynski 等<sup>[10]</sup>通过染色体步移法显示在 DMAT 合成酶基因(*cpd1*)的上游也有一些很可能与麦角生物碱生物合成有关的基因: *cpox1* 可能编码 FAD-依赖型的氧化还原酶(oxidoreductase), 该酶可能是裸麦角生物碱环化酶(chanoclavine cyclase); 第 2 个推测的氧化还原酶基因, *cpox2* 以反向与 *cpox1* 紧密连锁; 连同 *cpps1* 在内, 可看出在 *C. Purpurea* 中至少有一部分麦角生物碱生物合成基因是成簇存在的。看来, 在真菌中编码次生代谢生物合成途径的基因组织以基因簇的形式出现, 可能是一种较为普遍的现象<sup>[19]</sup>。RT-PCR 显示, 在麦角肽碱生物合成时, *cpd1*, *cpps1*, *cpox1*, *cpox2* 均处于表达状态。上述几个基因在染色体上的排列情况见图 4。

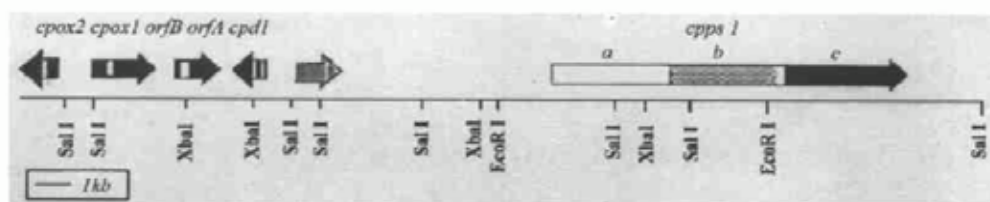


Fig 4 Schematic map of the genomic region including *cpd1*, *cpps1* of *Claviceps purpurea* (the orientation of the genes is indicated by arrowheads, the three modules of *cpps1* are indicated by different shading, positions of introns by open boxes)

## 结 束 语

对麦角生物碱生物合成的研究现已进入基因水平,这对于深入探索麦角生物碱生物合成的调节机制,更合理地进行菌种选育,甚至利用 LPS 的催化特点按照研究者的意愿去开发新的化合物供药理筛选等具有理论和实际意义。基因簇的发现为克隆其他麦角生物碱生物合成基因提供了线索。但还有一些问题需要解决或澄清,如:仍有一些与生物合成有关的基因没有被认识或尚未作深入的研究,尤其是参与麦角肽碱合成的 LPS2,其编码基因目前尚未被认识;LPS1 的合成究竟是诱导型还是组成型,生化分析与基因结构分析的结果尚存在矛盾;LPS1 的编码基因 *cpps1* 虽然已克隆,但基因的功能性分析尚未见报道,因而制约了对 LPS1 在麦角肽碱合成中的作用的全面认识;有些麦角菌确实以产某种麦角生物碱为主,培养条件的不同也会大大改变麦角菌的产碱谱(待发表);通过菌种选育以期某一生物碱的产量大幅度提高,而其它的“副产物”降低。那么,影响产碱谱的因素除了细胞的氨基酸库以外,其它因素起多大作用?如 LPS 本身对选择性底物亲和力是否因菌株不同而有差异?环境因素(如 pH,添加物)对产碱谱的影响是通过氨基酸库,还是通过生物合成酶本身发挥作用或兼而有之?这些问题都有待进一步研究。

## REFERENCES:

- [1] Kobel H, Sanglier JJ. Ergot alkaloids [A]. Pape H, Rehm HJ. *Biotechnology*, Vol 4 [M]. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1986. 569 - 609.
- [2] Floss HG, Tscheng Lin M, Kobel H, et al. On the biosynthesis of peptide ergot alkaloids [J]. *Experientia*, 1974, **30**(12):1369 - 1370.
- [3] Floss HG, Anderson JA. Biosynthesis of ergot toxins [A]. Steyn PS. *The Biosynthesis of Mycotoxins, a Study in Secondary Metabolism* [M]. New York: Academic Press, 1980. 17 - 67.
- [4] Stadler PA. New results of ergot alkaloid research [J]. *Planta Med*, 1982, **46**(3):131 - 144.
- [5] Stütz P, Brunner R, Stadler PA. Ein neues Alkaloid aus dem Mycel eines *Claviceps purpurea* Stammes. Zur Biogenese von Ergocristin [J]. *Experientia*, 1973, **29**

- (8):936 - 937.
- [6] Hofmann A, Ott H, Griot R, et al. Ergot alkaloids. LVIII. Synthesis and stereochemistry of ergotamine [J]. *Helv Chim Acta*, 1963, **46**(6):2506 - 2536.
- [7] Keller U, Han M, Stöffler-Meilicke M. D-lysergic acid activation and cell-free synthesis of D-lysergyl peptides in enzyme fractions from the ergot fungus *Claviceps purpurea* [J]. *Biochemistry*, 1988, **27**(16):6164 - 6170.
- [8] Riederer B, Han M, Keller U. D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea* [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(44):27524 - 27530.
- [9] Walzel B, Riederer B, Keller U. Mechanism of alkaloid cyclopeptide formation in the ergot fungus *Claviceps purpurea* [J]. *Chem Biol*, 1997, **4**(3):223 - 230.
- [10] Tudzynski P, Hölter K, Correia T, et al. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea* [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, **261**(1):133 - 141.
- [11] Socic H, Gaberc-Porekar V. Biosynthesis and physiology of ergot alkaloids. Arora DK, Elander RP, Mukerji KG. *Handbook of applied mycology, Vol 4. Fungal biotechnology* [M]. New York: Dekker, 1992. 475 - 515.
- [12] Gebler JC, Poulter CD. Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, **296**(1):308 - 313.
- [13] Schumann B, Maier W, Gröger D. Characterization of some *Claviceps* strains derived from regenerated protoplasts [J]. *Z Naturforsch*, 1987, **42c**(4):381 - 386.
- [14] Gebler JC, Woodside AB, Poulter CD. Dimethylallyltryptophan synthase. An enzyme-catalyzed electrophilic aromatic substitution [J]. *J Am Chem Soc*, 1992, **114**(19):7354 - 7360.
- [15] Tsai HF, Wang H, Gebler JC, et al. The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **216**(1):119 - 125.
- [16] Arntz C, Tudzynski P. Identification of genes induced in alkaloid producing cultures of *Claviceps* sp [J]. *Curr Genet*, 1997, **31**(4):357 - 360.
- [17] Pazoutova S, Tudzynski P. *Claviceps* sp. PRL 1980 (ATCC 26245), 59 and Pepty 695/ch - 1: their true story [J]. *Mycol Res*, 1999, **103**(8):1044 - 1048.
- [18] Keller U, Zocher R, Krengel U, et al. D-lysergic acid-activating enzyme from the ergot fungus *Claviceps purpurea* [J]. *Biochem J*, 1984, **218**(3):857 - 862.
- [19] Keller NP, Hohn TM. Metabolic pathway gene cluster in filamentous fungi [J]. *Fungal Genet Biol*, 1997, **21**(1):17 - 29.

## RESEARCH PROGRESS IN THE BIOSYNTHESIS OF ERGOT ALKALOIDS

ZHU Ping

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**KEY WORDS:** ergot alkaloids; biosynthetic pathway; gene cloning