

# 代谢控制分析的理论与应用

## Introduction to the Theory and Practice of Metabolic Control Analysis

凌利                      陈光旨\*                      周河治\*\*

Ling Li                      Chen Guangzhi                      Zhou Hezhi

(广西大学生物技术与糖业工程学院 南宁市西乡塘路10号 530004)

(College of Biotechnology & Sugar-Industry Engineering,

Guangxi Univ., 10 Xixiangtanglu, Nanning, Guangxi, 530004)

**摘要** 代谢控制分析 (Metabolic Control Analysis, 简称 MCA) 是一种以系统观点对细胞内代谢调控进行定量分析的理论和实验方法。根据 MCA 理论, 代谢控制是细胞内代谢的系统属性, 并且可以用酶动力学性质进行定量表示。MCA 指出了“限速步骤”观念的局限性, 认为代谢途径中酶促反应步骤对代谢的控制作用随系统内外条件的改变而变化。用理论计算或试验确定的控制系数能够加深对代谢的控制结构特性的理解。MCA 与计算机仿真技术和各种现代生物实验技术有机结合, 正成为代谢工程中越来越重要的手段和一种有效的研究模式。目前 MCA 还处在发展完善之中, 需要扩大其研究和应用的范围, 积累更多的应用实例。

**关键词** 细胞代谢调控 代谢控制分析 代谢通量 代谢工程

中图分类号 Q 591.1

**Abstract** Metabolic Control Analysis (MCA) is a quantitative analysis theory and an experimental methodology with the systemic view for metabolic regulation and control. MCA reveals that control is an attribute of metabolic systems by the abstraction of real metabolic phenomenon, and can quantify the control with enzyme kinetics. The traditional unique rate-limiting step is invalidated, and the control exerted by each step (enzyme) in a pathway is varied with the steady-states in which the pathway works. Evaluating the control coefficients theoretically or experimentally is to characterize the properties of the metabolic networks. The coherence of MCA, computer simulation and rapid measure techniques will be the powerful method for metabolic engineering. There are some limitations of MCA which shall be improved by theoretical development and expansion of the applications to accumulate examples.

**Key words** metabolic control and regulation, Metabolic Control Analysis, metabolic flux, metabolic engineering

细胞代谢的调节和控制方式很多, 其中以调控代谢通量 (即代谢物生成与消耗的速率) 的方式最重要。在代谢调控机制的作用下, 细胞代谢在外界条件变化时仍然保持稳定, 代谢物浓度没有剧烈地波动。由于细胞中各种代谢反应及各代谢途径之间相互联系, 仅仅研究其中某些反应的特征及其调节和控制机制是不够的。在由代谢途径组成的代谢系统中, 往往几种调控机制同时发挥作用并把这些作用传播到整个系统。由于在分子水平上影响代谢通量的因素众多, 在

确定的环境下, 对通过特定代谢途径的代谢通量变化往往存在各种各样的解释。如果这些解释使用的是定性的方法, 就更难对这些解释进行评价了。

在这种情况下, 一些研究团体就致力于研究分子水平的定量理论来解释细胞代谢的调控。代谢控制分析 (Metabolic Control Analysis, 简称 MCA)<sup>[1, 2]</sup> 就是这些理论中最具代表性的一种<sup>[3]</sup>。MCA 是在生化反应系统敏感性分析<sup>[4]</sup> 的基础上发展起来的。研究分析代谢途径中代谢的控制在各个反应步骤之间如何分配的理论。尽管这一理论起初沉寂了相当长时间, 但由于该理论可以用数学形式表达, 可以同实验方法结合对细胞代谢的调控问题提出定量的解释并具有应用的潜力, 随着对复杂代谢现象认识的需要和在生物技术中研究和应用实例的积累, 代谢控制分析理论

1998-07-14收稿。

\* 广西大学物理系, 南宁, 530004 (Dept. of Physics, Guangxi Univ., Nanning, Guangxi, 530004)

\*\* 广西大学食品与发酵工程研究所, 南宁, 530004 (Institute of Food & Fermentation Engineering, Guangxi Univ., Nanning, Guangxi, 530004)

渐渐引起广泛的关注

本文在综述 MCA 的基本概念、理论和应用的基础上,说明 MCA 是一种以系统观点从整体上分析细胞代谢调控的理论和实验方法。同时,论述了 MCA 在代谢网络分析和代谢工程中广阔的发展前景和当前 MCA 理论和实验方法的局限性以及研究进展。

## 1 代谢控制分析的理论

MCA 的基本研究对象是由代谢反应步骤以及代谢途径组成的代谢系统,单个反应步骤是组成系统的基本结构单元。MCA 认为代谢系统中所有反应步骤都对代谢通量和代谢物浓度进行控制;因此对其中一个反应步骤施加微扰而产生的代谢通量(或代谢物浓度)变化大小,可以作为该反应步骤对代谢系统控制的度量。控制系数、弹性系数等是代谢控制分析理论的基本概念;根据这些基本概念,结合直线式代谢系统的结构约束条件,可以导出总和原理和连通性原理;以上的概念和原理就形成 MCA 理论的基本形式。

控制系数是指在生理条件(即某一恒态)下,对代谢系统中某一步反应施加一个微小扰动,所引起指定的代谢通量或代谢物浓度的相对变化与该反应的反应速度  $V_i$  相对变化之比:

$$C_i^A = \frac{\partial A}{A} / \frac{\partial v_i}{v_i} = \frac{\partial \ln A}{\partial \ln v_i}$$

上式中如果  $A$  代表指定的代谢通量,则  $C_i^A$  称为该步骤关于这个通量的通量控制系数,上式中如果  $A$  代表指定代谢物的浓度,则  $C_i^A$  称为该步骤关于这个代谢物的浓度控制系数

弹性系数是指在一个与代谢系统中某一步反应具有相同参数的酶促反应中,对该反应某一参数  $p$ (如底物、产物、酶浓度、温度、效应物等)进行微扰,所引起的反应速度  $V_i$  的相对变化与该参数的相对变化之比,定义为该参数的弹性系数,即:

$$X_i = \frac{\partial v_i}{v_i} / \frac{\partial p}{p} = \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln p}$$

总和原理与连通性原理是在假设代谢系统是直线式代谢途径(恒态代谢系统中任何两个反应步骤是通过唯一的共同中间代谢物连接的),系统内代谢物是均匀分布的。根据这些条件,可以推导出总和原理和连通性原理<sup>[1,2,5]</sup>。

总和原理是指代谢系统中指定的代谢通量  $J$  和代谢物  $S$ ,所有反应步骤  $i$  对  $J$  的通量控制系数的总和:  $\sum_i C_i^J = 1$ ,对  $S$  的浓度控制系数的总和:  $\sum_i C_i^{[S]} = 1$

总和原理说明代谢控制是一种系统特性,控制系

数的大小表示每一步对代谢控制作用的强弱,代谢系统的全部反应步骤共同承担了代谢通量的控制,某些通量控制系数的增加就意味着其他通量控制系数的减少,这样才能保证系统的整个通量控制系数之和为 1。也就是说,对于处于恒态下的代谢系统,所有反应步骤控制系数的总和是固定的。

连通性原理是指在代谢系统中,若以中间代谢物  $S$  为弹性系数的微扰参数,则对于由  $S$  联结的全部反应的通量控制系数和浓度控制系数,与这些反应对  $S$  的弹性系数乘积之和是定值:

$$\begin{aligned} \sum_i C_i^J X_{S1} &= 0, \\ \sum_i C_i^{[A]} X_{S1} &= 0, A \neq S, \\ \sum_i C_i^{[S]} X_{S1} &= -1. \end{aligned}$$

连通性原理在 MCA 理论中具有十分重要的意义。它提供了用酶的动力学性质(用弹性系数表示)确定控制系数的方法,是经典的酶动力学与 MCA 联系的纽带。在代谢系统中,中间代谢物联结的两个反应都对其浓度的变化非常敏感。连通性原理表明,通过这种方式联结的反应,其控制系数和弹性系数之间存在着确定的关系。

## 2 应用

### 2.1 代谢途径中的限速步骤

MCA 的研究突破了传统的限速步骤观念,使人们对代谢的调控有了更加全面的认识。长期以来,人们一直认为代谢途径存在着固定的限速步骤,它们控制着通过代谢途径的代谢通量,主要表现在:

限速步骤的反应速度很低,整个系统的代谢通量取决于此步骤酶的活性;限速步骤是热力学不能进行的反应,具有很高的平衡常数,需要由与其偶联的、热力学上容易进行的反应驱动;限速步骤受制于该步骤酶活性与酶合成的调节。

以直线式代谢途径形式的代谢系统为例。代谢系统处于恒态情况下,所有反应步骤应具有相同的反应速度。根据限速步骤的观点,与代谢途径上其他反应步骤的酶相比,限速步骤的酶在很低的速度下催化反应,这些所谓的限速酶“控制”着代谢途径的反应速度,如果想要增加代谢途径的通量就必须增加限速酶的水平。而许多实验研究即显示,大幅提高代谢途径中限速酶的水平并没有伴随着代谢通量显著增加。例如在粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 精氨酸合成途径中,酶浓度的增加使该途径上某些代谢物的通量增加,但使另一些代谢物的通量减少,用限速酶概念

不能解释这种途径的代谢通量控制<sup>[6]</sup>；对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的酵解途径中一个及多个被认为是限速步骤的酶,通过 DNA重组技术,分别构建提高这些酶活力水平的菌株,没有观察到乙醇产率及生长速度显著地变化,这表明通过增加基因拷贝来提高某一特定酶水平的方法增大代谢通量的效果不大<sup>[7,8]</sup>；酿酒酵母色氨酸合成途径中限速酶的控制系数很小,即使限速酶超量表达仍然不能提高色氨酸的合成速率,并且随着酶活力的增加,限速酶对代谢通量的控制趋于减小<sup>[9]</sup>；而在运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 中,通过 DNA重组技术提高那些被认为是控制 ED途径代谢通量的酶的水平,不仅没有提高反而显著地降低了酵解途径的通量和生长速度<sup>[10]</sup>。

若用 MCA理论来推理,限速酶的通量系数应为 1,根据总和原理,其他步骤(酶)的通量控制系数应为 0,这不符合 MCA关于代谢调控是由系统中各个步骤共同实施的观点。MCA理论认为,代谢通量的控制是由组成代谢途径的各个步骤及其相互之间的关系决定的,并且分布在整个代谢途径上；生物大分子和效应物并不能直接产生控制,而是通过影响所在的反应来影响整个代谢系统的控制；限速步骤不是固定的,但系统控制系数的总和却是固定的,并且可以定量描述各个步骤对代谢控制的相对程度,从而对实验结果的解释更加合理。实验研究表明,在代谢系统中,大多数反应步骤的通量控制系数是正值,并且在大多数情况下是个很小的数值<sup>[3]</sup>。通量控制系数出现负值的情况并不普遍,主要发生在分支途径的分支点后附近,以及底物抑制和产物激活酶的情形下。而对于代谢系统中的直线式代谢途径部分,各步骤通量控制系数之和是趋向 1的。因此 MCA的总和原理即使对于包含分支途径的复杂代谢系统也是很有意义的。

另一方面,根据 MCA理论,代谢系统处于不同的内部和外部环境条件下,各反应步骤的控制系数也将随之变化甚至差别巨大,并且代谢途径中对通量控制起主导作用的酶也是变化的,没有唯一或固定不变的限速步骤。因而研究有关代谢调控的问题,必须把代谢途径作为一个内部相互作用的整体来看待,并且不能脱离代谢途径所处的环境。因此从 MCA的观点看,“限速”概念只能对特定的代谢途径在具体环境条件下使用。

## 2.2 代谢网络

细胞内同时进行的数千个生化反应构成了错综复杂的代谢网络,它们的反应速率决定了代谢通量。

而反应速率受参与反应的酶水平和代谢物浓度的影响,酶和代谢物浓度又受细胞基因和所处环境的制约。因此,代谢通量是如何分布的、如何受代谢反应的调节和控制,以及基因的改变和不同环境条件对通量控制的影响等问题是研究代谢网络的重要内容<sup>[11]</sup>。

MCA从系统论的角度考察代谢现象,把酶促反应作为代谢系统的基本组成部分,而把基因、酶的水平、代谢物的浓度、抑制机制、效应物、抑制剂与激活剂、环境条件等等的的影响归结为对酶促反应的扰动,再根据代谢系统的结构特点。因此,MCA为代谢网络这种复杂系统的研究,提供了现实的理论框架和实验方法,也为研究代谢网络的方法提供了一个可比较的基础<sup>[12]</sup>。

MCA的重要特点之一是能够结合具体酶的反应动力学性质,来说明代谢网络特性。如利用与代谢网中某一步反应具有相同参数的酶促反应的速度方程求导得到弹性系数,或通过体内实验测定弹性系数,利用连通性原理可以确定网络中的控制系数,如利用鼠肝线粒体对酮体合成复杂代谢网络的控制分析<sup>[13]</sup>。这也说明 MCA的连通性原理还能将 MCA推广,用来描述代谢系统中代谢物的扰动通过代谢网络(酶链)传播的机理。

随着理论研究的深入发展,MCA已经大大突破原有假定条件的限制,发展到可以对含有分支途径、循环、酶-酶相互作用、级联反应等各种结构形式的代谢系统进行代谢控制分析<sup>[3]</sup>。MCA在研究复杂代谢网络中的进展,不仅加深了对代谢网络中控制结构的了解,而且对不同代谢系统类型的控制分析更加系统化,形成了所谓的矩阵方法<sup>[14]</sup>,并且促进了计算机技术在这一领域的应用,显示出 MCA应用于代谢网络分析和评价的广阔前景。

## 2.3 代谢工程

细胞代谢是生物漫长进化过程中“自然设置”的,从人类利用的角度看,并不一定理想。代谢工程通过修饰特定的生化反应或通过 DNA重组技术导入新的基因,定向改良细胞代谢的特性,来达到合成新的产物,增加所需产物的产率以及减少不必要的副产品等目的。尽管许多研究显示代谢工程的可行性,但是在提高产率和生产能力方面,取得的实际成就很少<sup>[15]</sup>。主要原因是由于代谢系统本身的控制结构造成的,这种控制结构阻止代谢系统以最大产率超量生产代谢物,以及防止出现代谢通量分布的巨大变化<sup>[11]</sup>。因此,在强化所需代谢产物的生产能力之前,需要鉴别细胞内反应步骤和代谢途径,以及相应的控

制结构,并且定量确定该控制结构对代谢通量的控制程度,这样才能有效地达到代谢工程的目标。与代谢网络的情形类似,对控制结构的认识可以利用 MCA 实现<sup>[16]</sup>。

其次,代谢工程的产物往往需要细胞内很多代谢反应步骤来合成,所以代谢工程比基因工程更复杂,例如为了得到一种抗体除虫菌素(avermectin),需要35个以上的反应步骤,每一步骤至少有一个酶以及编码这个酶的基因。因此,代谢工程就不能局限于仅仅改良代谢系统中某一具体反应步骤,而是要对生物体内代谢途径及控制结构反复进行组织和评估,所以它需要新的概念和工具来面对挑战。广义地说,代谢工程是为了特定的目标而进行的代谢网络的理性设计。这种设计需要通过反复优化来实现<sup>[15]</sup>,而代谢工程中经常使用的各种定性设计的试错法似乎已经走到极限。代谢途径上对代谢通量影响最大的步骤与细胞生存环境的变化有关<sup>[17]</sup>;通过基因工程技术改变代谢途径上一个或多个酶的水平,将引起细胞原有代谢通量控制结构的变化,这种变化又与基因表达的调控相互作用。这意味着通过代谢工程对细胞代谢特性的优化需要反复进行,每次调整基因后,可以用 MCA 确定代谢通量的控制分布来指导后续的调整。

MCA 与计算机仿真技术和各种现代生物实验技术相结合,正成为代谢工程中越来越重要的手段和一种有效的研究模式。如在反应动力学和代谢网络分析的基础上,建立计算机代谢模拟系统。在这种代谢模拟系统上,可以方便地应用 MCA,导出各个反应步骤的弹性系数,确定控制系数,由此能够直接确定控制代谢通量的主要步骤。或某个步骤的反应动力学特性是如何影响整个代谢系统行为的。另一方面,当一个代谢模拟系统建立起来后,就比较容易对影响反应速度的参数进行扰动,因而可以用 MCA 对代谢控制结构进行快速评价,并且有利于制订代谢工程的具体实施方案<sup>[16,17]</sup>。

### 3 MCA 的局限性及进展

控制系数是否可以描述代谢的调节与控制,这在 MCA 出现伊始就引起质疑,其原因包括:与变构酶的效应物作用相比,酶浓度不是对代谢调控特别有影响的参数;控制系数是否可以作为代谢控制的标准值得怀疑,因为控制系数只在测量条件下有效,并且随着系统状态的变化而变化,因此是作用有限的预测值<sup>[3]</sup>。有学者认为代谢网络中的调控作用不一定是通量控制<sup>[12]</sup>。

当涉及 MCA 的连通性原理时,要求对代谢系统

中的所有反应及酶与代谢物的中间反应等都鉴别清楚。而在实际应用中,一般典型生物的代谢知识太少,对其他具有利用潜力的生物更是所知不多。这是 MCA 理论应用的“瓶颈”。目前已经发展了一种称为“自上而下”的实验方法拓展了 MCA 的应用前景,可以用来对这些复杂代谢系统进行代谢控制分析<sup>[13,18]</sup>。

MCA 在指导代谢工程方面的能力还存在问题。MCA 只能处理恒态下的代谢系统,并且代谢通量的控制分布只能在对反应速度微扰的情况进行评估,所确定的控制系数只对该恒态有效而与其他恒态无关,在代谢工程中用 MCA 来指导另一种恒态下代谢系统的调整是有疑问的。此外,以 MCA 为理性设计基础的代谢工程多集中在对酶浓度的调整上。但是通量控制系数较大的酶有时不能进行调整,如在具有反馈抑制机制的直线式代谢途径中,受抑制的酶常常控制着代谢通量,通常的做法是考虑解除反馈抑制,而不是提高受反馈抑制的酶的活力<sup>[11]</sup>。目前在 MCA 中有学者运用了一种定位诱变(site-directed mutagenesis)的策略来解决这一问题<sup>[19]</sup>。

目前, MCA 的发展主要集中在解决有关试验设计和实施中的问题,积累更多的应用实例。例如根据定义,控制系数只能从微小扰动的效果产生,而在一些与基因或生理有关的试验中,往往涉及大的扰动。这个方面进展将突破当前 MCA 的主要局限性。因此,有人提出了一种称为“通用方法”,可以不受微小扰动的限制<sup>[20]</sup>。

近年来生物化学和分子生物学知识的激增使生物技术领域更加广阔。与此同时,依靠传统的理论和方法把握生物分子与细胞整体功能之间的复杂关系也变得越来越困难,这不仅需要从组成细胞代谢的各个要素之间的相互关系方面来考察和改造细胞代谢,而且还需要从系统整体特性的角度了解和应用代谢和生物分子功能方面的知识。MCA 从系统的角度考察并高度概括了复杂的代谢现象。从这个意义上说, MCA 的理论和方法更具有系统论的思想。另一方面, MCA 把代谢的控制问题形式化,不仅推导出一系列代谢系统中的重要原理,而且还设计了研究代谢系统控制的实验。在此基础上, MCA 将理论与实验结果相结合,将代谢系统特性与分离酶的动力学特性相结合,使代谢系统的控制特性更易于描述,代谢研究的工作不至于沉没在既浩瀚又分散而且还在激增的生物学知识中。这对分析复杂代谢现象,对有目的改进细胞代谢以及促进细胞代谢多学科研究的交流,具有重要的现实意义。因此, MCA 在这些领域

参考文献

- 1 Kacser H, Burns J A. The control of flux. Symp Soc Exp Biol, 1973, 27 65~ 104.
- 2 Heinrich R, Rapoport T A. A linear steady-state treatment of enzymatic chains: general properties, control and effector strength. Eur J Biochem, 1974, 42 89~ 95.
- 3 Fell D A. Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. Biochem J, 1992, 286 313~ 330.
- 4 Higgins J. Analysis of sequential reactions. Ann N Y Acad Sci, 1963, 108 305~ 321.
- 5 Westerhoff H V, Chen Y D. How do enzyme activities control metabolite concentrations? An additional theorem in the theory of metabolic control. Eur J Biochem, 1984, 142 425~ 430.
- 6 Flint H J, Tateson R W, Barthelmess I B et al.. Control of the arginine flux in the arginine pathway of *Neurospora crassa*. Modulations of Enzyme Activity and Concentration. Biochem J, 1981, 200 231~ 246.
- 7 Schaaf I, Heinisch J, Zimmerman F K. Overproduction of glycolytic enzymes in Yeast. Yeast, 1989, 5 285~ 290.
- 8 Davies S E C, Brindle K M. Effects of overexpression of phosphofructokinase on glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry, 1992, 31 4729 ~ 4735.
- 9 Neiderberger P, Prasad R, Miozzari G et al.. A strategy for increasing an in vivo flux by genetic manipulations. Biochem J, 1992, 287 473~ 479.
- 10 Snoep J L, Yomano L P, Westerhoff H V et al.. Protein Burden in *Zymomonas mobilis*: negative flux and growth control due to overproduction of glycolytic enzymes. Microbiology, 1995, 141 2329~ 2337.
- 11 Stephanopoulos G, Vallino J J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. Science, 1991, 252 1675~ 1681.
- 12 Majewski R A, Domach M M. Effect of regulatory mechanism on hyperbolic reaction network properties. Biotechnol Bioeng, 1990, 36 166~ 178.
- 13 Quant P A. Experimental application of top-down control analysis to metabolic systems. Tren Biochem Sci, 1993, 18 26~ 30.
- 14 Reder C. Metabolic control theory: a structural approach. J Theor Biol, 1988, 135 175~ 201.
- 15 Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering. Science, 1991, 252 1668~ 1675.
- 16 Pissara P D, Nielsen J, Bazin M J. Pathway kinetics and metabolic control analysis of a high-yielding strain of penicillium-chrysogenum during fed-batch cultivations. Biotechnol Bioeng, 1996, 51 168~ 176.
- 17 Galazzo J L, Bailey J E. Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. Biotechnol Bioeng, 1990, 36 417~ 426.
- 18 Brown G C, Hafner R P, Brand M D. A 'top-down' approach to the determination of control coefficients in metabolic control theory. Eur J Biochem, 1990, 188 321~ 325.
- 19 Westerhoff H V, Kell D B. What biotechnologists knew all along.?. J theor Biol, 1996, 182 411~ 420.
- 20 Kacser H, Acerenza L. A universal method for achieving increases in metabolite production. Eur J Biochem, 1993, 216 316~ 367.

(责任编辑: 黎贞崇)

## 德国科学家发现 2 种新疱疹病毒

德国罗伯特—考赫研究所的科学家利用修改基因验证法, 在屠宰后的猪脾脏和血中发现了两种新的疱疹病毒。这 2 种病毒命名为 PLHV-1 和 PLHV-2

科学家利用修改基因验证法, 将这 2 种病毒的细菌进行了克隆和序列分析, 从而了解了大部分的病毒遗传信息。根据序列的分析比较, 证明这两种病毒类似于  $\Gamma$  疱疹病毒, 属于疱疹病毒的亚科类。 $\Gamma$  疱疹病毒在人体中已早有发现, 如爱波斯斯坦—巴氏病毒和卡波西氏肉瘤疱疹病毒, 这些病毒都会在人体中引发肿瘤。

据研究负责人埃勒斯博士介绍, 目前还没有证据表明这 2 种猪体内新的疱疹病毒有可能传染给健康人体, 但科学家将作进一步研究。随着基因技术的发展, 未来猪器官最有可能作为人体器官移植的替代品, 因此需要深入研究这些猪的病毒是否有可能传染给动物器官接受者, 以及病人对移植器官所带病毒的抵抗能力。德国罗伯特—考赫研究所目前正与联邦卫生部紧密合作, 对新发现的猪  $\Gamma$  疱疹病毒作进一步研究, 以了解异体器官移植的潜在危险。

(摘自《科技日报》1999年5月27日)