



安丝菌素聚酮合酶模块 2 中脱水酶结构域的生化功能

王安琪^{1,2}, 黄群刚^{1,2}, 康前进^{1,2*}, 白林泉^{1,2*}

¹ 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

² 上海交通大学代谢与发育国际联合合作实验室, 上海 200240

摘要: 【目的】I型聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)模块中不同的修饰是聚酮类化合物结构多样性的重要原因之一。抗癌药物安丝菌素化学结构中C11-C14区域存在特殊的双键迁移结构, 可能与聚酮合酶模块2或者3中脱水酶结构域(Dehydratase, DH)的催化密切相关, 本研究通过探究聚酮合酶模块2中DH结构域(Ansa DH₂)的生化功能, 确定其在安丝菌素聚酮链延伸过程中的脱水功能。【方法】本文以安丝菌素产生菌*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* ATCC 31280为研究材料, 首先, 对安丝菌素聚酮合酶模块中的4个不同DH结构域进行了生物信息学分析; 然后, 利用化学方法合成了Ansa DH₂的底物类似物**waq-1**, 建立和优化了Ansa DH₂的体外生化反应体系; 并利用ESI-MS²的方法鉴定了Ansa DH₂催化形成的终产物的结构, 确定了Ansa DH₂在安丝菌素聚酮链延伸中的 α - β 脱水作用; 最后, 通过定点突变的策略, 对Ansa DH₂的关键氨基酸进行了鉴定。【结果】通过生物信息学分析显示Ansa DH₂和Ansa DH₃与已报道的催化双键迁移的DH结构域进化关系近; 通过六步线性化学反应合成了Ansa DH₂底物类似物**waq-1**, 终产率为17.81%; 建立并优化了Ansa DH₂的生化反应条件, 使36 h的底物转化率达到45%; 通过对Ansa DH₂催化形成的终产物的结构鉴定, 证明安丝菌素聚酮链延伸过程中Ansa DH₂催化底物类似物发生了 α - β 脱水; 最后, 氨基酸的定点突变证明了Ansa DH₂第48位的组氨酸(H)是脱水活性的必需氨基酸。【结论】本研究证明了Ansa DH₂具有催化 α - β 脱水的功能, 丰富了DH结构域的研究, 为后续研究安丝菌素聚酮链延伸过程中的双键迁移奠定了基础。

关键词: 安丝菌素, 聚酮, 双键迁移, DH 结构域, α - β 脱水

聚酮类化合物结构丰富多样、生物活性强, 使用的聚酮类化合物的年销售额已超过了 100 亿美元^[1]。临床上作为药物 美元^[2]。安丝菌素是一种大环内酰胺类化合物,

基金项目: 国家自然科学基金(31770034, 21661140002, 31700027)

*通信作者。Tel: +86-21-34206119; E-mail: 康前进, qjkang@sjtu.edu.cn, 白林泉, bailq@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-04-23; 修回日期: 2020-05-20; 网络出版日期: 2020-05-29

能够阻碍微管蛋白形成, 具有良好的抗肿瘤活性, 是聚酮类化合物中安莎类化合物的典型代表, 具有较大的市场前景。

聚酮化合物由聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)催化形成。已发现的聚酮合酶可以分为 I 型、II 型和 III 型三大类^[3]。其中, I 型模块化聚酮合酶的线性组装是由若干功能不同的结构域组成, 每个结构域在合成过程中仅使用一次, 参与聚酮链形成的一步反应^[4]。在聚酮化合物的基本生物合成过程中, 首先是聚酮链的起始与延伸, 由酰基转移酶(Acyl transferase, AT)、酮脂酰-ACP-合成酶(Ketoacyl-ACP synthase, KS)、酰基载体蛋白(Acyl carrier protein, ACP)负责催化^[5], 然后在聚酮链延伸过程中, 聚酮合酶模块中的酮基还原酶(Ketoreductase, KR)将酮基还原成羟基、脱水酶(Dehydratase, DH)负责羟基脱水形成双键、烯键还原酶(Enoylreductase, ER)将双键再次还原形成饱和状态, 每个聚酮模块可以不含或者含有不同的修饰结构域, 从而产生多样化的聚酮修饰, 最后在硫酯酶(Thioesterase, TE)的催化下进行成熟聚酮链的释放^[6]。

I 型聚酮类化合物结构多样性的一大来源为聚酮链延伸过程中的不同程度的修饰^[7]。在聚酮的碳链修饰中, DH 结构域负责完成碳链上 β -羟基的脱水, 其序列具有保守的“HXXXGXXXXP”基序, 保守基序内的组氨酸(H)与基序外的天冬氨酸(D)协同参与, 完成 α - β 脱水形成双键。H 负责脱去 α 质子, 质子离去后, D 辅助 β -羟基的离去并形成 α - β 双键(图 1-A)^[8]。除催化常规 α - β 脱水外, 部分 DH 结构域还具有其他的特殊功能。如: 脱水后催化双键迁移^[9], 即 DH 催化已形成的 α - β 双键迁移至 β - γ 位^[10]、甲基差向异构^[11]、双键 Z/E 异构^[12]、环化^[13]、烯键 γ 位脱水^[14]等, 其中研究最广泛的为双键迁移现象^[15]。安莎类化合物中双键迁移的发生普遍与 DH 结构域相关^[16]。

在安丝菌素生物合成过程中共有 4 个 DH 结构域催化的脱水反应, 其中, Ansa DH₂ 和 Ansa DH₃ 结构域对应的 C13-C14 和 C11-C12 处发生了脱水反应以及 β - γ 双键迁移^[17](图 1-B), 暗示 Ansa DH₂ 与 Ansa DH₃ 可能参与催化共轭双键迁移的发生。2009 年 Kirschning 课题组以安丝菌素产生菌 *Actinosynnema pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC

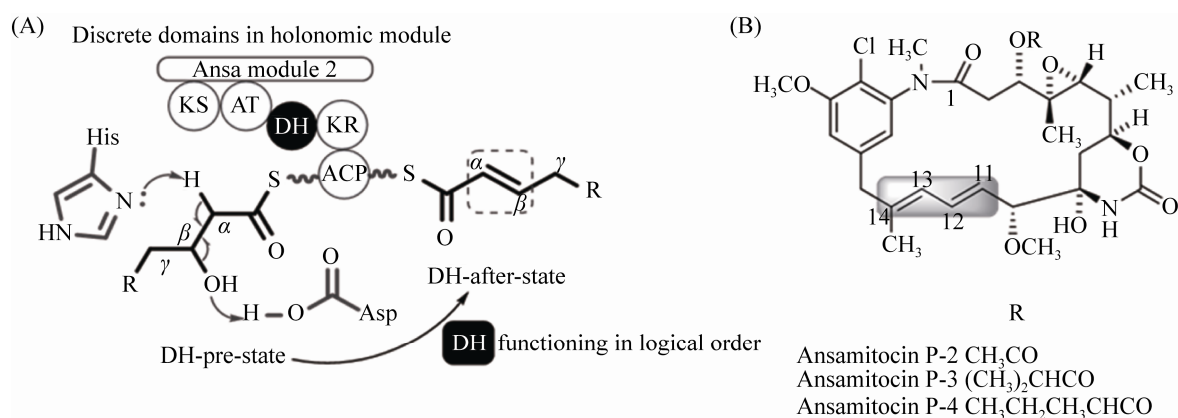


图 1. 安丝菌素聚酮合酶 DH 结构域的功能及安丝菌素的结构式^[8]

Figure 1. The function of DH domain in the polyketide synthase module 2 of ansamitocin and the chemical structures of ansamitocin^[8]. A: Dehydration mechanism of DH domain; B: Chemical structures of ansamitocins.

31565 的 AHBA 缺失突变株为研究材料, 通过底物喂养和转化实验, 推测了 Asm DH₃ 可能参与了安丝菌素结构中的 C11-C12 位置双键的迁移^[18], 但由于缺乏 C13-C14 双键的三酮化合物的喂养实验, Asm DH₂ 结构域确切的催化特征与功能尚不清楚, 仍需要进一步明确。为了对安丝菌素聚酮链延伸模块 2 中的脱水酶结构域进行更深入的解析, 本研究以安丝菌素产生菌 *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* ATCC 31280 中聚酮合酶模块 2 中的 Ansa DH₂ 为研究对象, 利用化学方法经六步线性反应合成了 Ansa DH₂ 底物类似物 **waq-1**, 并以此为底物对 Ansa DH₂ 进行了催化特征分析, 结果表明 Ansa DH₂ 能够催化 α - β 脱水, 通过体外生化反应完善了 Ansa DH₂ 结构域的功能研究, 且 Ansa DH₂ 底物类似物 **waq-1** 的化学全合成也为后续深入研究 DH 结构域催化的安丝菌素的双键迁移提供了可催化的底物结构, 本研

究为后续安丝菌素生物合成过程中双键迁移的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物: 见表 1。

1.1.2 主要生化试剂及仪器: 用于化合物萃取与分离的有机试剂如三氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇等购自国药集团; 用于 HPLC 及 ESI-MS² 的乙腈与甲醇购自安捷伦公司; 用于核磁鉴定的氘代溶剂购于 SIGMA 公司; 用于化合物合成的原料购自韶远试剂公司; 细胞破碎仪购自新芝生物科技有限公司; 恒温振荡摇床购自上海知楚有限公司; 电子天平购自 Sartorius 公司; 高速离心机购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 化合物精确分子量的测定使用 Agilent G6540 Q-TOF, 核磁共振数据使用 Bruker 公司的 Avance III 600MHz 核磁共振仪采集。

表 1. 实验中所用菌株、质粒和引物

Table 1. Strains, plasmids and primers used in this study

Strains/plasmids/primers	Related characters or sequences	Sources or references
Strains		
<i>A. pretiosum</i> ATCC 31280	Ansamitocin producing strain	ATCC
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F ⁻ (<i>tra</i> Δ36 <i>lacI</i> q <i>proAB</i> <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>rpsL</i> (<i>str</i> ^R) <i>thr</i> <i>leu</i> <i>endA</i> <i>thi-1</i> <i>lacY</i> <i>galK</i> <i>galT</i> <i>ara</i> <i>tonA</i> <i>tsx</i> <i>dcm</i> <i>dam</i> <i>supE</i> 44 Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrC-mrr</i>)102::Tn10 (<i>tet</i> ^R)	GIBCO-BRL
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	TaKaRa ^[19]
Plasmids		
pET28a	<i>ori</i> -pBR322, <i>Km</i> ^r , <i>lac</i> I, His-tag	Novagen
pLQ1201	pET28a-based plasmid for Ansa DH ₂ expression	This work
Primers		
Ansa DH ₂ -cF	GGTGATCAGGGAGTGGTCC	
Ansa DH ₂ -cR	CAGCCGCGTCGACTCCAGCG	
Ansa DH ₂ -F- <i>Nde</i> I	AAACATATGTGGCTGGACCCC	
Ansa DH ₂ -R- <i>Hind</i> III	AAAAGCTTTCAGCGCAGCAGCACCCCC	
Ansa DH ₂ -HF-F	CCGTGGCTGGCCGACTTCCGGCTGCTCGAC	
Ansa DH ₂ -HF-R	GAAGTCGGCCAGCCACGGGTGGACGCCGGT	

Underline: Restriction sites.

1.1.3 培养基: 大肠杆菌的培养采用 LB 及 LA 培养基^[20], 放线菌的培养采用 TSBY 液体培养基 (g/L): 胰蛋白胨 30, 酵母提取物 10, 蔗糖 103, pH 7.0–7.2; 放线菌活化采用 YMG 固体培养基 (g/L): 酵母提取物 4, 麦芽提取物 10, 葡萄糖 4, 琼脂 18, pH 7.2–7.4。

1.2 *A. pretiosum* ATCC 31280 总 DNA 的提取

将菌种在 YMG 固体培养基活化 2–3 d, 取少量菌体接于新鲜的 TSBY 培养基 30 °C 培养过夜。取 200 μ L 菌液于 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μ L 2 mg/mL 溶菌酶, 37 °C 水浴 30 min 破壁处理, 加入 50 μ L 2% SDS。然后, 加入 250 μ L 苯酚/氯仿, 上下颠倒混匀并用 12000 r/min 离心 5 min, 取 500 μ L 上清至新的离心管中, 加入 50 μ L 3 mol/L 醋酸钠溶液, 混匀后加入 500 μ L 异丙醇沉淀 DNA。静置后 DNA 沉淀析出, 捞出絮状的 DNA 沉淀, 用 70%乙醇溶液洗涤 2 次并挥发干乙醇, 加入 30 μ L ddH₂O 溶解总 DNA。

1.3 底物与产物的化学合成

以 2-甲基苯丙醇为底物, 经氧化-酯缩合-羟基保护-酯水解-缩合-羟基脱保护共 6 步反应得到 **waq-1**, 每一步中间产物产物通过 ¹H NMR 鉴定, 终产物 **waq-1** 通过 ¹H NMR 与 ESI-MS 鉴定结构。

化合物 2 合成: 称取化合物 **1** (1 g, 6.696 mmol) 溶于 10 mL 无水二氯甲烷中, 2,2,6,6-四甲基哌啶氮氧化物 (10.4 mg, 0.067 mmol) 溶于 5 mL 无水二氯甲烷中, 缓慢加入反应体系中, 随后加入 0.5 mL 溴化钾 (80 mg, 0.67 mmol) 水溶液, 并缓慢加入 6% 次氯酸钠溶液 10 mL, 室温搅拌 1 h 后, 经由薄层色谱 (TLC) 监测反应完毕。分出有机层,

水层用 60 mL 二氯甲烷萃取, 合并有机层, 依次用 1 mol/L 的盐酸溶液、饱和硫代硫酸钠与饱和食盐水洗涤有机层。洗涤完毕后, 无水硫酸钠干燥 1 h, 抽滤, 旋干滤液。2 g 硅胶制砂, 30 g 硅胶装柱, 采用石油醚: 乙酸乙酯=5:1 洗脱得 800 mg 黄色油状物化合物 **2**, 产率为 81.04%。

化合物 3 合成: 2 mol/L 二异丙基氨基锂-四氢呋喃溶液 8.25 mL 加入 250 mL 三颈瓶中, 加入 10 mL 无水四氢呋喃, 在氮气保护下干冰丙酮浴冷却至 -78 °C, 1.1 g 乙酸甲酯溶于 10 mL 无水四氢呋喃, 缓缓滴加入反应体系。滴加完毕后, -78 °C 继续搅拌 0.5 h, 将化合物 **2** (2.2 g, 16.5 mmol) 溶于 20 mL 无水四氢呋喃中, 缓慢滴加至反应液, 滴加完毕后控制温度在 -78 °C 继续反应 2 h, TLC 监测反应完毕。冰浴下缓慢滴加饱和氯化铵淬灭反应, 真空旋干反应液, 加入 50 mL 水, 90 mL 乙酸乙酯分 3 次萃取反应液, 合并有机层, 并用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥 1 h, 抽滤, 旋干滤液。8 g 硅胶制砂, 60 g 硅胶装柱, 采用石油醚: 乙酸乙酯=10:1 洗脱杂质, 石油醚: 乙酸乙酯=5:1 洗脱得 1.96 g 黄色油状化合物 **3**, 产率为 59.39%。

化合物 4 合成: 称取化合物 **3** (108 mg, 0.5 mmol) 溶于 5 mL 无水二氯甲烷中, 冰浴下加入 2,6-二甲基吡啶 (91 μ L, 0.78 mmol)、叔丁基二甲硅基三氟甲磺酸酯 (155 μ L, 0.68 mmol), 继续反应 12 h, TLC 监测反应完毕。冰浴下缓慢滴加饱和氯化铵淬灭反应, 真空旋干反应液, 加入 10 mL 水, 30 mL 乙酸乙酯分 3 次萃取, 合并有机层, 并用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥 1 h, 抽滤, 旋干滤液。0.5 g 硅胶制砂, 5 g 硅胶装柱, 采用石油醚: 乙酸乙酯=10:1 洗脱杂质, 石油醚: 乙

酸乙酯=5:1 洗脱得 100 mg 黄色油状化合物 **4**, 产率为 62.11%。

化合物 5 合成: 称取化合物 **4** (1 g, 3 mmol) 溶于 15 mL 无水二氧六环中, 加入 15% 氢氧化钠 15 mL, 80 °C 加热反应 4 h, TLC 监测反应完毕。冰浴下缓慢滴加饱和氯化铵淬灭反应, 真空旋干反应液, 加入 30 mL 水, 60 mL 乙酸乙酯分 3 次萃取, 合并有机层, 并用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥 1 h, 抽滤, 旋干滤液。2 g 硅胶制砂, 25 g 硅胶装柱, 采用石油醚: 乙酸乙酯=5:1 洗脱杂质, 石油醚: 乙酸乙酯=2:1 洗脱得 950 mg 黄色油状化合物 **5**, 产率为 91.04%。

化合物 7 合成: 称取化合物 **5** (143 mg, 0.46 mmol) 溶于 5 mL 无水 *N,N*-二甲基甲酰胺中, 加入 *N,N'*-羰基二咪唑 (162 mg, 1 mmol), 室温搅拌 1 h 后, 加入 *N*-乙酰基半胱胺 (122 mg, 1.85 mmol), 继续室温下搅拌 1 h, 加入 *N,N*-二甲基吡啶 (61 mg, 0.46 mmol), 室温继续搅拌 12 h 后 TLC 监测反应完毕。冰浴下缓慢滴加饱和氯化铵淬灭反应, 真空旋干反应液, 加入 10 mL 水, 30 mL 乙酸乙酯分 3 次萃取, 合并有机层, 并用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥 1 h, 抽滤, 旋干滤液。0.5 g 硅胶制砂, 5 g 硅胶装柱, 采用石油醚: 乙酸乙酯=2:1 洗脱得 180 mg 黄色油状化合物 **7**, 产率为 95.67%。

化合物 waq-1 合成: 称取化合物 **7** (50 mg, 0.12 mmol) 溶于 1 mL 无水乙腈中, 加入 40% 氢氟酸 0.5 mL, 室温搅拌 1 h 后, TLC 监测反应完毕。冰浴下缓慢滴加 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 5 mL 淬灭反应, 真空旋干反应液, 加入 5 mL 水, 15 mL 乙酸乙酯分 3 次萃取, 合并有机层, 并用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥 1 h, 抽滤, 旋干滤

液。0.5 g 硅胶制砂, 5 g 硅胶装柱, 采用石油醚: 乙酸乙酯=1:1 洗脱得 25 mg 黄色油状物 **waq-1**, 产率为 68.44%。

1.4 Ansa DH₂ 表达载体的构建、蛋白异源表达与纯化

1.4.1 蛋白表达质粒构建: 结合已经报道的红霉素^[15]、利福霉素^[21]聚酮合酶模块中 DH 结构域的大小与边界, 确定了安丝菌素聚酮合酶 Ansa DH₂ 结构域的表达边界。在边界两侧设计外引物 Ansa DH₂-cF/R, 首先以 ATCC 31280 总 DNA 为模板, 用外引物进行 PCR 扩增, 首轮扩增完毕后, 以首轮扩增产物为模板, 以携带 *Nde* I、*Hind* III 酶切位点的内引物 Ansa DH₂-*Nde* I-F、Ansa DH₂-*Hind* III-R 进行次轮 PCR 扩增 Ansa DH₂ 结构域, 回收 0.8 kb 的目的条带, 经 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切处理后, 胶回收纯化并与相同酶处理的 pET 28a 载体相连接, 构建 Ansa DH₂ 表达质粒 pLQ1201, 将其导入 *E. coli* BL21(DE3), 获得蛋白表达菌株。

1.4.2 蛋白表达: 将蛋白表达菌株接于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养 12–16 h, 而后以 1% 的接种量转接到含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 0.6–0.8, 然后加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导 16–20 h。表达完毕后, 5000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 使用 50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl 配置的 Binding Buffer (pH 8.0) 洗涤菌体, –80 °C 保存备用。

1.4.3 蛋白纯化: 将菌体重悬在 4 °C 预冷的 50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl 的 Binding Buffer (pH 8.0) 中, 超声破碎。4 °C、12000 r/min 离心 30 min 分离上清和细胞沉淀。取上清进行镍

亲和层析, 分别以 Binding Buffer、Binding Buffer 添加 15 mmol/L 咪唑和 50 mmol/L 咪唑洗去杂蛋白, 再用 Binding Buffer 添加 250 mmol/L 咪唑洗脱目标蛋白。目标蛋白经超滤脱盐并浓缩后, 利用 SDS-PAGE 检测蛋白纯化情况, 并用于体外生化反应。

1.5 Ansa DH₂ 结构域的定点突变

以质粒 pLQ1201 为模板, 用携带突变位点的上下游引物 Ansa DH₂-HF-F、Ansa DH₂-HF-R 进行 PCR 扩增, 产物用 *Dpn* I 酶解去除模板质粒。经胶回收纯化后, 用 DNA 连接酶 solution I 于 16 °C 连接 1 h, 转入 *E. coli* DH 10B 感受态细胞。经筛选和测序验证后, 提取突变质粒, 导入 *E. coli* BL21(DE3), 完成蛋白定点突变表达菌株的构建。将定点突变表达菌株进行蛋白诱导表达与纯化, 测试定点突变蛋白的体外生化反应活性。

1.6 酶促反应体系的建立与产物分离

1.6.1 反应体系 Buffer 筛选: 在 10 μ L 反应体系中加入 5 mmol/L 底物和终浓度为 2 mg/mL 的酶, 分别使用 HEPES 及 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5), 30 °C 恒温孵育 24 h。加入 20 μ L 甲醇终止反应, 利用 HPLC 检测反应物与产物含量, 确定适宜的反应缓冲液。

1.6.2 时间曲线绘制: 在 70 μ L 反应体系中加入 5 mmol/L 底物和终浓度为 2 mg/mL 的酶, 使用 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5), 30 °C 恒温孵育 1、2、4、10、16、36 h。分别取 10 μ L 反应液, 加入 20 μ L 甲醇终止反应, 利用 HPLC 鉴定产物与反应物含量, 绘制时间曲线, 确定反应时间。

1.6.3 产物的分离与鉴定: 在反应液中加入 2 倍体积乙酸乙酯萃取 3 次, 将萃取液合并、旋干并溶于 5 μ L 乙酸乙酯。以 254 nm 荧光为指示, 薄

层色谱法在硅胶板上分离反应物与产物。将产物点回收, 溶于丙酮, 蒸干溶剂后溶于乙腈, 利用 ESI-MS² 鉴定结构。

1.7 LC-MS 检测

用于检测的色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈ (4.6 mm \times 150 mm, 直径 5 μ m)。洗脱流动相为: MeCN-H₂O (0.1% HCOOH)。洗脱程序为: 0–5 min 为 90%的 A 相(V/V)平衡色谱柱; 5–25 min 为 90%–10%的 A 相(V/V)梯度洗脱; 25–28 min 为 10%的 A 相(V/V)洗脱; 28–30 min 为 90%的 A 相(V/V)。检测采用阳离子模式, ESI 源进行分子量鉴定。

2 结果和分析

2.1 Ansa DH₂ 的生物信息学分析

经氨基酸序列比对分析, 安丝菌素聚酮合酶模块 1、2、3 和 6 中的 DH 结构域与已经解析晶体结构的红霉素生物合成聚酮合酶模块 4 (Ery DH4)及利福霉素生物合成聚酮合酶模块 10 (Rif DH10)中的 DH 结构域同源性较高(图 2-A)。以 Ansa DH₂ 为例, 在 “HXXXGXXXXP” 保守基序中的 48 位 H 残基完成 α -质子离去, 与 211 位的 D 残基共同完成脱水。从氨基酸序列上分析, 安丝菌素聚酮合酶模块 1、2、3 和 6 中的脱水酶结构域都含有负责质子离去的 H 和羟基离去的 D (Ansa DH₃ 对应位置为性质类似的 E), 均具有脱水活性。

将 Ansa DH 序列在 NCBI 进行 BLAST 寻找同源性较高的序列, 使用 MEGA X^[22]以最大似然原则及 JTT 矩阵模型^[23]对 Ansa DH₂ 和 Ansa DH₃ 进行系统进化分析, 构建系统进化树^[24], 依据同

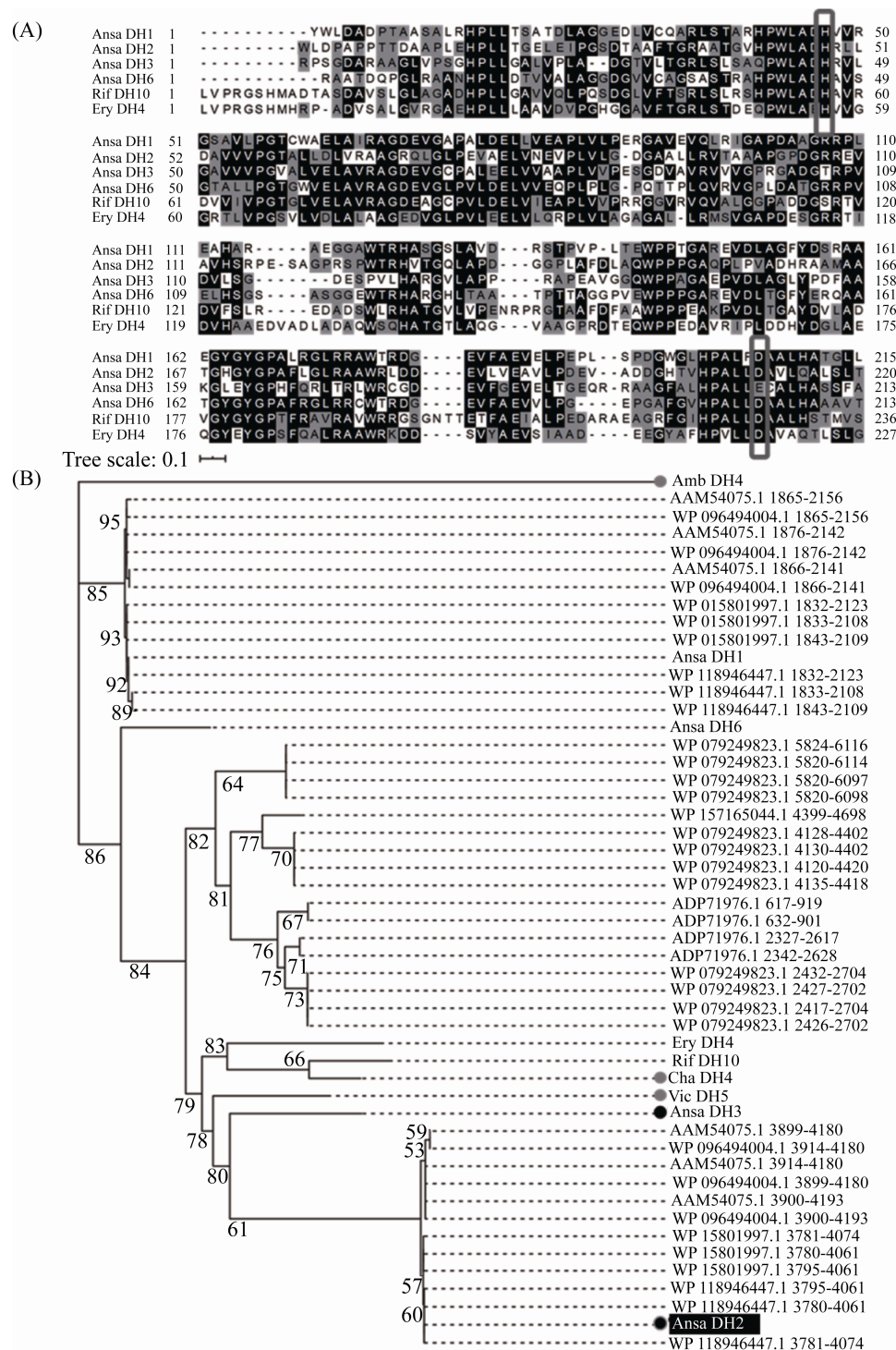


图 2. Ansa DH 生物信息学分析

Figure 2. Bioinformatics analysis of Ansa DHs with their homologs. A: Homologous evolution of Ansa DH amino acids with conserved residues highlighted. All DH domains show high similarity. Based on sequence analysis, four Ansa DHs should have the ability to catalyze dehydration; B: Phylogenetic tree of DH domains shows that Ansa DH₂ and Ansa DH₃ (highlighted with black dots) possess much higher homology with DHs (highlighted with gray dots), which might be responsible for the olefin shift.

源性进行无监督聚类发现, Ansa DH₂ 与 Ansa DH₃ 结构域从系统进化角度较为接近, 同源率为 36%。此外, 结合催化双键迁移的 Amb DH₄、Cha DH₄ 和 Vic DH₅ 可以发现^[11,16], Ansa DH₂ 及 Ansa DH₃ 与催化双键迁移的 Cha DH₄ 和 Vic DH₅ 同源性均超过 30% (图 2-B)。与催化双键迁移的 DH 结构域的较高同源性暗示着 Ansa DH₂ 及 Ansa DH₃ 可能与安丝菌素 C13-C14、C11-C12 位置的双键迁移相关。为了证明 Ansa DH₂ 的脱水作用, 确定其是否能够催化安丝菌素 C13-C14 双键迁移, 需要合成其底物进行体外生化反应分析。

2.2 Ansa DH₂ 结构域的底物类似物的化学全合成

根据文献报道, 体外酶促反应多以 SNAC (*N*-乙酰基半胱胺) 衍生物模拟体内 ACP 活化的底物^[25]。为了便于研究 Ansa DH₂ 结构域的功能, 我们以化合物 **1** 为原料, 利用 1.3 中的方法, 经过六步反应合成了 Ansa DH₂ 底物类似物 **waq-1**,

作为 Ansa DH₂ 生化功能研究的底物(图 3)。对每一步中间产物和终产物分别进行了 ¹H NMR 的结构鉴定, **waq-1** 的终产率为 17.81%。

中间产物 **2** 的结构鉴定如下: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.67 (s, 1H), 7.29 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.24–7.14 (m, 3H), 3.03 (dd, *J*=13.6, 6.0 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J*=14.0, 7.0 Hz, 1H), 2.58 (dd, *J*=13.5, 8.0 Hz, 1H), 0.95 (d, *J*=7.0 Hz, 3H)。

中间产物 **3** 的结构鉴定如下: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.27 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.17 (t, *J*=6.7 Hz, 3H), 4.82 (dd, *J*=29.0, 5.7 Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.59 (d, *J*=8.7 Hz, 3H), 2.85–2.71 (m, 1H), 2.59–2.20 (m, 3H), 0.74 (dd, *J*=9.5, 6.9 Hz, 3H)。

中间产物 **4** 的结构鉴定如下: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 7.35–7.27 (m, 2H), 7.25–7.14 (m, 3H), 4.20 (m, 1H), 3.71 (d, *J*=0.6 Hz, 3H), 2.88 (ddd, *J*=18.7, 13.3, 4.5 Hz, 1H), 2.50 (dd, *J*=6.4, 3.3 Hz, 2H), 2.27 (ddd, *J*=24.0, 13.3, 10.2 Hz, 1H), 2.02–1.86 (m, 1H), 0.94 (t, *J*=11.8 Hz, 9H), 0.89–0.79 (m, 3H), 0.18–0.02 (m, 6H)。

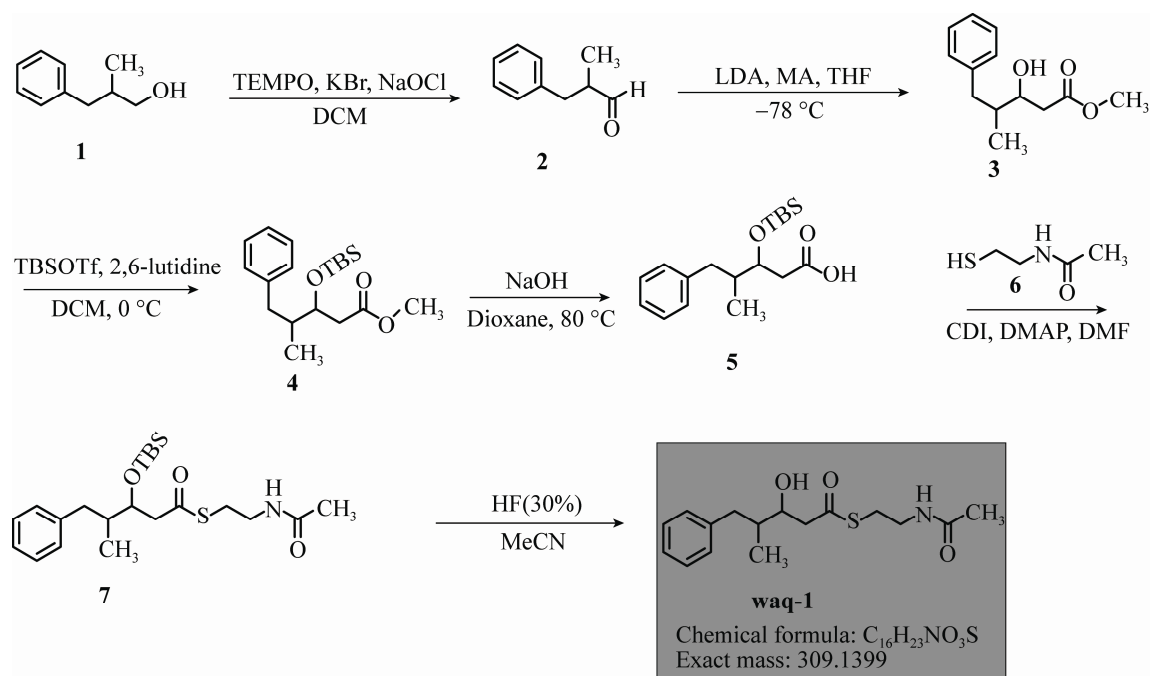


图 3. **waq-1** 的化学合成路线

Figure 3. Chemical synthesis route of **waq-1**.

中间产物 **5** 的结构鉴定如下: ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.35–7.12 (m, 5H), 4.11 (m, 1H), 2.94–2.63 (m, 1H), 2.52–2.37 (m, 2H), 2.37–2.21 (m, 2H), 0.94–0.84 (m, 9H), 0.83–0.72 (m, 3H), 0.13–0.05 (m, 6H)。

中间产物 **7** 的结构鉴定如下: ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 7.28 (ddd, $J=7.5, 5.9, 2.8$ Hz, 2H), 7.23–7.16 (m, 1H), 7.16–7.10 (m, 2H), 5.92 (s, 1H), 4.25–4.14 (m, 1H), 4.14–4.09 (m, 1H), 3.52–3.35 (m, 2H), 3.13–2.91 (m, 3H), 2.86–2.62 (m, 3H), 2.25 (ddd, $J=23.9, 13.3, 10.0$ Hz, 1H), 2.05–1.96 (m, 3H), 0.94–0.90 (m, 3H), 0.88–0.76 (m, 9H), 0.12–0.05 (m, 6H)。

waq-1 的结构鉴定如下: ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ 7.28 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.18 (dd, $J=13.4, 7.4$ Hz, 3H), 6.05 (s, 1H), 4.10–3.88 (m, 1H), 3.44 (dd, $J=15.3, 10.5$ Hz, 2H), 3.13–2.97 (m, 2H), 2.94–2.82 (m, 2H), 2.82–2.64 (m, 2H), 2.41 (ddd, $J=22.5, 13.4, 9.0$ Hz, 1H), 1.97 (d, $J=2.4$ Hz, 3H), 0.87 (dd, $J=16.3, 6.8$ Hz, 3H) (图 4)。

2.3 Ansa DH₂ 结构域的酶促反应体系优化

按照 1.4 所示方法构建蛋白表达菌株, 进行蛋白的诱导表达, 经镍柱亲和层析法可纯化获得 Ansa DH₂ 蛋白(图 5-A)。按照 1.6 所述方法, 以 **waq-1** 为底物对不同反应缓冲液进行选择。最后, 使用

Tris-HCl 作为反应缓冲液, 30 °C 反应 24 h 时, 转化率可以达到 19.47%, 且可有效降低副产物的含量。

按照 1.6 的方法使用 TLC 对产物进行分离, 采用 LC-ESI-MS 测得产物分子量与 **waq-1** 脱水化合物 **waq-2** 一致(图 5-B), 推测 Ansa DH₂ 结构域可以催化底物类似物 **waq-1** 完成脱水(图 5-C)。反应过程中观察到蛋白迅速沉淀并失活, 反应效率极低。多元醇常用来提高蛋白的溶解性, 甘油作为一种常见饱和多元醇常用于稳定蛋白^[26]。有研究表明甘油可提高蛋白热稳定性^[27]与溶解度^[28]。通过在反应体系中添加终浓度为 20% 的甘油, 结合 Ansa DH₂ 等电点($pI=6.04$)将反应液 pH 优化至 8.5 后, 提高了蛋白溶解性, 24 h 的催化转化率提高到 41% (图 5-D)。适度延长反应时间至 36 h, 经 HPLC 检测 **waq-2** 的产量略有提升, 产率由 41% 提高至 45%。结合转化率兼顾反应效率, 最终确定反应时间为 36 h (图 5-E)。

经过反应缓冲液的筛选、甘油的添加、pH 及反应时间的优化, 将 36 h 的反应效率提高至 45% 左右, 确定最适反应条件为 5 mmol/L 底物、终浓度为 2 mg/mL 的酶、Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)、终浓度为 20% 的甘油, 30 °C 孵育 36 h。

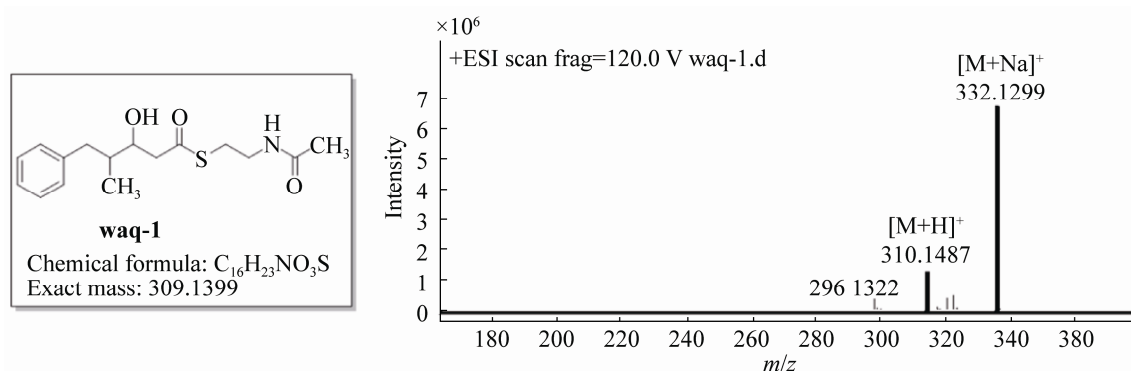


图 4. **waq-1** 的 ESI-MS 分析
Figure 4. ESI-MS profile of **waq-1**.

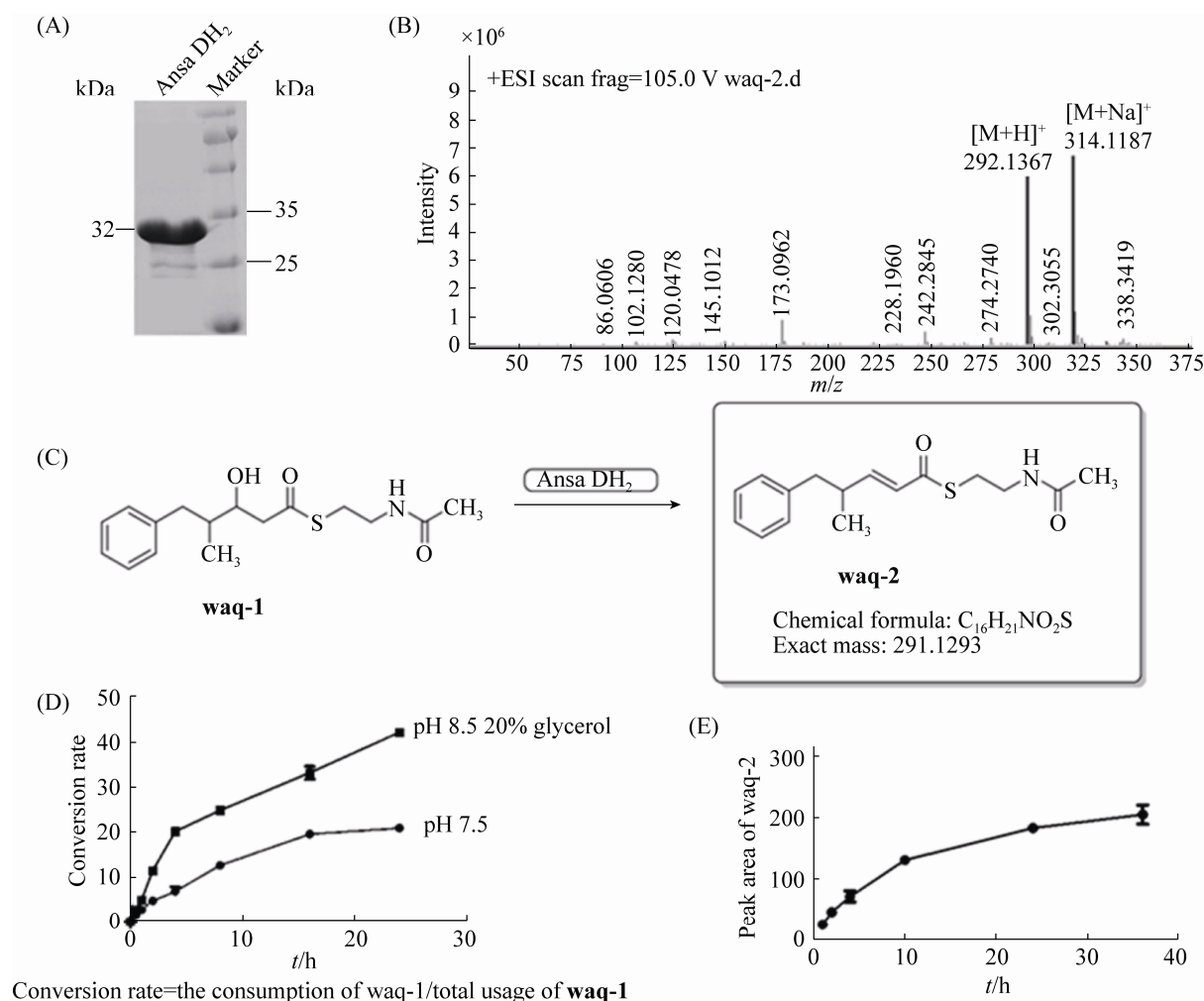


图 5. Ansa DH₂ 体外实验结果

Figure 5. *In vitro* test of Ansa DH₂. A: SDS-PAGE analysis of Ansa DH₂. B: LC-ESI-MS analysis of the product. C: Putative function of Ansa DH₂. D: Conversion rate of **waq-1** using different buffers. With 20% glycerol added in Tris-HCl (pH 8.5), the conversion rate of **waq-1** has increased to 41%. E: Ansa DH₂ time course in Tris-HCl (pH 8.5) adding 20% glycerol. The peak area of **waq-2** increased slowly after 24 h.

2.4 Ansa DH₂ 结构域催化了 α - β 脱水

按照 1.6 所述方法将产物纯化并进行二级质谱分析, 采用分子断裂碎片来确定产物结构。通过 ESI-MS 确定产物精确分子量后, 以不同电压轰击产物分子, 得到不同轰击电压下产物二级质谱断裂碎片, 其中以 20 eV 轰击时, 断裂碎片为特征(图 6-A)。在 20 eV 轰击时, 产物分子硫酯键发生 σ 断裂, 二级质谱可以发现产物分子去除 SNAC 的 m/z 173 碎片峰。此外, 还可以得到 m/z

173 碎片脱去羰基的 m/z 145 碎片峰、 m/z 145 碎片发生烯丙基位断裂的 m/z 91 碎片峰和 m/z 55 碎片峰。通过其断裂模式可初步判断 Ansa DH₂ 催化底物类似物的 α - β 脱水(图 6-B)。

在以 **waq-1** 为底物的反应条件下, 通过 MS² 断裂碎片分析可知, Ansa DH₂ 可催化完成 α - β 脱水, 这说明 Ansa DH₂ 结构域拥有 α - β 脱水功能, 这为后续研究安丝菌素聚酮延伸过程中的双键迁移现象奠定了实验基础。

2.5 Ansa DH₂ 结构域催化脱水的关键氨基酸残基的确定

为了对 DH 结构域的脱水机制进行初步解析, 采用定点突变的策略证明 Ansa DH₂ 结构域中的保守位点 H 是活性必需氨基酸。H 的拔质子作用来源于碱性侧链基团, 参考氨基酸性质及侧

链基团大小, 将 Ansa DH₂ 结构域保守位点即第 48 位的组氨酸突变成了残基大小较为接近的中性氨基酸苯丙氨酸(F)。依据 1.5 的方法构建定点突变蛋白表达菌株, 经诱导表达与镍柱亲和层析, 纯化获得 Ansa DH₂ (H48F) 蛋白(图 7-A)。在 Ansa DH₂ 的最适反应条件下, Ansa DH₂ (H48F)

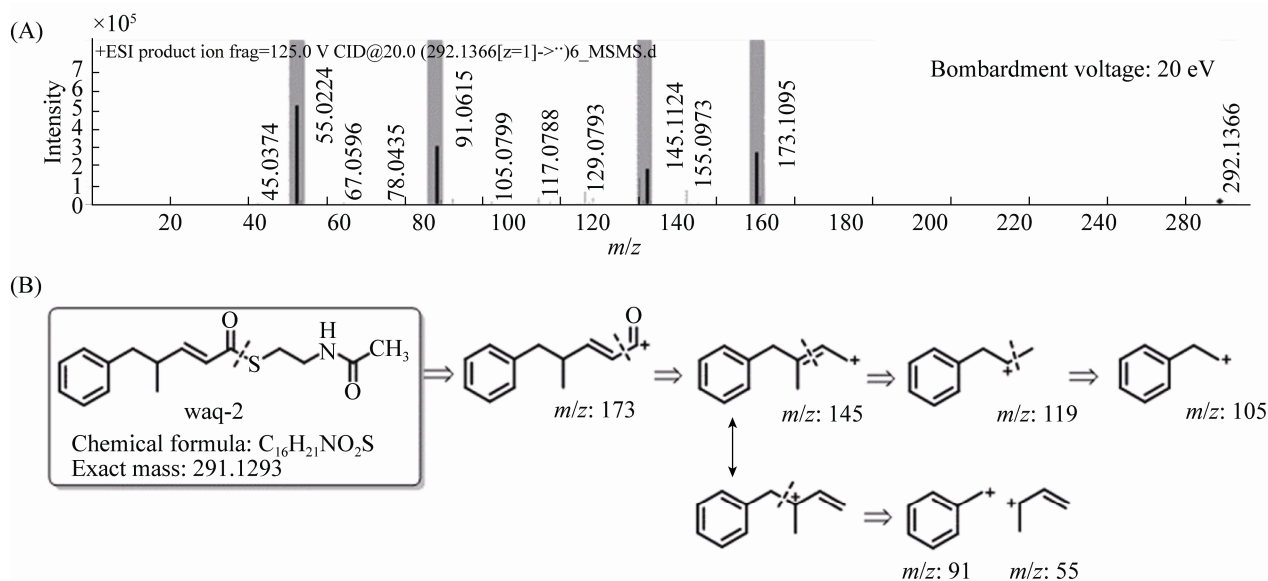


图 6. 产物 waq-2 的结构鉴定

Figure 6. The elucidation of the structure of waq-2. A: The profiles of MS² at bombardment voltage 20 eV with characteristic fragmentations highlighted; B: Putative fragmentations of waq-2.

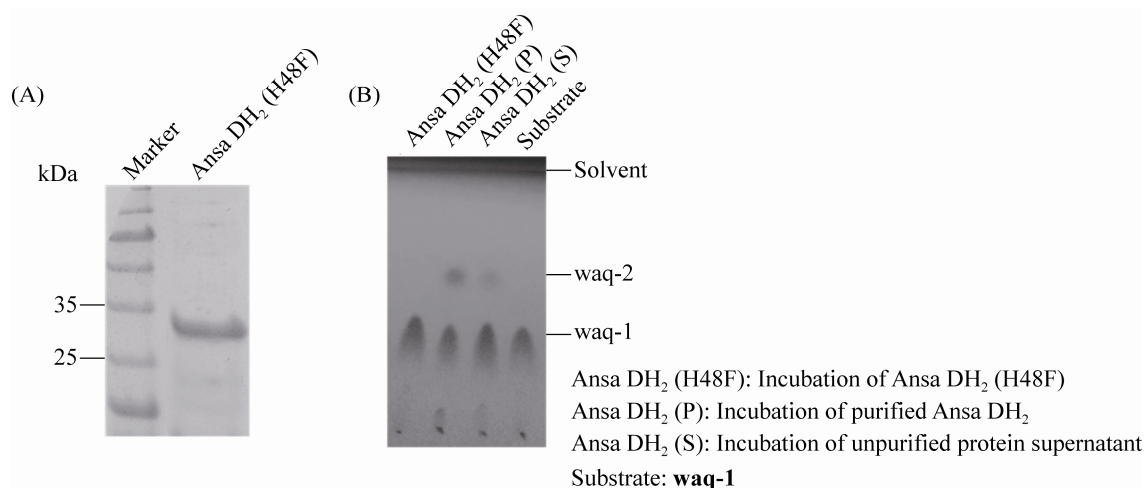


图 7. Ansa DH₂ (H48F) 突变蛋白的体外实验结果

Figure 7. *In vitro* analysis of Ansa DH₂ (H48F). A: SDS-PAGE analysis of Ansa DH₂ (H48F). B: TLC analysis. Ansa DH₂ (H48F): TLC analysis of incubation of Ansa DH₂ (H48F); Ansa DH₂ (P): TLC analysis of incubation of purified Ansa DH₂; Ansa DH₂ (S): TLC analysis of incubation of unpurified protein supernatant; substrate: TLC analysis of waq-1.

突变蛋白无法催化脱水反应,而阳性对照经 TLC 检测可获得产物(图 7-B)。因此,Ansa DH₂ 结构域具有催化脱水的活性,48 位的 H 为脱水活性的关键氨基酸。

3 讨论

聚酮类化合物生物合成过程中的不同链长、PKS 延伸过程中的修饰以及复杂的 PKS 合成后修饰,产生了多种多样的聚酮类化合物^[29]。结构多样性导致生物活性多样性^[30],这使其成为药物开发的重要来源^[31]。安丝菌素是一种大环内酰胺类化合物,它能够与微管蛋白 β 亚基结合,阻碍微管蛋白的组装,具有显著的抗肿瘤活性,还能够抑制真菌、酵母等真核生物的生长^[32],有重要的临床应用价值。

通过系统进化分析发现,安丝菌素聚酮合酶 DH 结构域中的 Ansa DH₂ 及 Ansa DH₃ 结构域与催化双键迁移的 DH 结构域同源性更高。通过优化 Ansa DH₂ 反应缓冲液与 pH,将 36 h 反应效率由初始的 19.47%提高至 45%;通过 ESI-MS² 鉴定产物结构,证实了 Ansa DH₂ 可以催化 α - β 脱水;对 Ansa DH₂ 第 48 位 H 进行了定点突变,证明了 H 为脱水活性的必需氨基酸。由于 **waq-1** 与 Ansa DH₂ 真实底物存在区别以及 SNAC 衍生与 ACP 结构域上载的差异,因此 Ansa DH₂ 体内能否催化双键迁移仍需要进一步验证。后续还需要对其天然底物进行合成,并经由 ACP 上载进行体外生化反应进行确认。

不同于已被充分解析的脂肪酸合成过程中的双键迁移现象^[33],包括安丝菌素在内的具有共轭双键迁移的聚酮类化合物中,其双键迁移机制尚未研究透彻。共轭双键的迁移很可能是由于

DH 结构域的底物口袋以及催化位点附近的氨基酸的作用。双键迁移所导致的化合物结构多样性为发现更多具有优良药理活性的衍生物提供了可能性;此外,利用 DH 结构域催化双键迁移的功能可以将双键迁移至易于衍生的位置(如部分聚酮化合物中的末端烯键等),极大地方便后续的化学修饰。基于此还可以对化合物进行理性设计与定向改造,有研究表明对 DH-KR 结构域的 PKS 模块改造可以提高低毒性匹马霉素衍生物的相对含量^[34]。在确定负责催化安丝菌素双键迁移的脱水酶结构域后,可以对其进行晶体结构的解析与计算,在晶体结构的指导下确定共轭双键迁移与脱水酶反应中心关键氨基酸的关联性,并以此为依据,尝试对聚酮合酶进行设计与改造,以期得到更多的结构新颖、生物活性强的聚酮化合物。

参考文献

- [1] Tan GY, Liu TG. Rational synthetic pathway refactoring of natural products biosynthesis in actinobacteria. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 228–236.
- [2] Rong H, Huang HQ, Bao SX. Research progresses on biosynthesizing polyketides in heterologous hosts. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19(6): 1097–1100, 1078. (in Chinese)
荣辉, 黄惠琴, 鲍时翔. 异源生物合成聚酮化合物的研究进展. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(6): 1097–1100, 1078.
- [3] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(2): 285–295.
- [4] Keatinge-Clay AT. The structures of type I polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1050–1073.
- [5] Hopwood DA. Genetic contributions to understanding polyketide Synthases. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2465–2498.
- [6] Holzbaur IE, Harris RC, Bycroft M, Cortes J, Bisang C, Staunton J, Rudd BAM, Leadlay PF. Molecular basis of Celmer's rules: the role of two ketoreductase domains in the control of chirality by the erythromycin modular polyketide synthase. *Chemistry & Biology*, 1999, 6(4): 189–195.

- [7] Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews*, 2006, 106(8): 3468–3496.
- [8] Weissman KJ. Uncovering the structures of modular polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 2015, 32(3): 436–453.
- [9] Moldenhauer J, Gotz DC, Albert CR, Bischof SK, Schneider K, Sussmuth RD, Engeser M, Gross H, Bringmann G, Piel J. The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: direct evidence for β,γ dehydration by a *trans*-acyltransferase polyketide synthase. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, 49(8): 1465–1467.
- [10] Kusebauch B, Busch B, Scherlach K, Roth M, Hertweck C. Functionally distinct modules operate two consecutive $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$ double-bond shifts in the rhizoxin polyketide assembly line. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, 49(8): 1460–1464.
- [11] Berkhan G, Merten C, Holec C, Hahn F. The Interplay between a multifunctional dehydratase domain and a C-methyltransferase effects olefin shift in ambruticin biosynthesis. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2016, 55(43): 13589–13592.
- [12] Dodge GJ, Ronnow D, Taylor RE, Smith JL. Molecular basis for olefin rearrangement in the gephyronic acid polyketide synthase. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(9): 2699–2707.
- [13] Sung KH, Berkhan G, Hollmann T, Wagner L, Blankenfeldt W, Hahn F. Insights into the dual activity of a bifunctional dehydratase-cyclase domain. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2018, 57(1): 343–347.
- [14] Fiers WD, Dodge GJ, Sherman DH, Smith JL, Aldrich CC. Vinylogous dehydration by a polyketide dehydratase domain in curacin biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(49): 16024–16036.
- [15] Keatinge-Clay A. Crystal structure of the erythromycin polyketide synthase dehydratase. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 384(4): 941–953.
- [16] Keatinge-Clay AT. The uncommon enzymology of cis-acyltransferase assembly lines. *Chemical Reviews*, 2017, 117(8): 5334–5366.
- [17] Kang QJ, Shen YM, Bai LQ. Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Natural Product Reports*, 2012, 29(2): 243–263.
- [18] Taft F, Brünjes M, Knobloch T, Floss HG, Kirschning A. Timing of the $\Delta_{10,12}$ - $\Delta_{11,13}$ double bond migration during ansamitocin biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum*. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(11): 3812–3813.
- [19] Moffatt BA, Studier FW. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*, 1987, 49(2): 221–227.
- [20] Rebets Y, Brotz E, Manderscheid N, Tokovenko B, Myronovskyi M, Metz P, Petzke L, Luzhetskyy A. Insights into the pamamycin biosynthesis. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015, 54(7): 2280–2284.
- [21] Gay D, You YO, Keatinge-Clay A, Cane DE. Structure and stereospecificity of the dehydratase domain from the terminal module of the rifamycin polyketide synthase. *Biochemistry*, 2013, 52(49): 8916–8928.
- [22] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [23] Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 1992, 8(3): 275–282.
- [24] Eickmeyer K, Huggins P, Pachter L, Yoshida R. On the optimality of the neighbor-joining algorithm. *Algorithms for Molecular Biology*, 2008, 3: 5.
- [25] Li Y, Dodge GJ, Fiers WD, Fecik RA, Smith JL, Aldrich CC. Functional characterization of a dehydratase domain from the pikromycin polyketide synthase. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(22): 7003–7006.
- [26] Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 289(1/2): 1–30.
- [27] Baier SK, Decker EA, McClements DJ. Impact of glycerol on thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18(1): 91–100.
- [28] Kamerzell TJ, Esfandiary R, Joshi SB, Middaugh CR, Volkin DB. Protein-excipient interactions: mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011, 63(13): 1118–1159.
- [29] McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C. Engineered biosynthesis of novel polyketides: manipulation and analysis of an aromatic polyketide synthase with unproven catalytic specificities. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115(25): 11671–11675.
- [30] Hopwood DA, Sherman DH. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 1990, 24: 37–62.
- [31] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3): 629–661.
- [32] Tanida S, Hasegawa T, Hatano K, Higashide E, Yoneda M.

- Ansamitocins, maytansinoid antitumor antibiotics producing organism, fermentation, and antimicrobial activities. *The Journal of Antibiotics*, 1980, 33(2): 192–198.
- [33] Liavonchanka A, Rudolph MG, Tittmann K, Hamberg M, Feussner I. On the mechanism of a polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(12): 8005–8012.
- [34] Qi Z, Zhou YC, Kang QJ, Jiang CY, Zheng JT, Bai LQ. Directed accumulation of less toxic pimaricin derivatives by improving the efficiency of a polyketide synthase dehydratase domain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(6): 2427–2436.

Biochemical analysis of the dehydratase domain in module 2 involved in ansamitocin biosynthesis

Anqi Wang^{1,2}, Qungang Huang^{1,2}, Qianjin Kang^{1,2*}, Linquan Bai^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] Multifarious modular modifications in type I polyketide synthase (PKS) serve as crucial contributing factors for the diversity of polyketides. Ansamitocins, an antitumor agent, possess unique olefin shifts in the region of C11-C14, which might be catalyzed by dehydratase domain in PKS module 2 and 3. We evaluated the biochemical function of dehydratase domain in module 2 (Ansa DH₂). [Methods] Using ansamitocin-producing strain *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* ATCC 31280, we chose four different Ansa DHs in the ansamitocin biosynthetic modules to achieve bioinformatics analysis. Coupled with chemical synthesis of an analogue substrate **waq-1** of Ansa DH₂, we presented our *in vitro* investigations. ESI-MS² analysis revealed the structure of the final product, which confirmed the α - β dehydration activity of Ansa DH₂. Ultimately, the correlation between the catalytic function and requisite amino acid residues has been determined through site-directed mutagenesis. [Results] Bioinformatics analysis suggests that Ansa DH₂ and Ansa DH₃ were closely related to those known DHs, which are responsible for olefin shift. An effective synthetic route was accomplished to afford **waq-1** in 17.81% yield over six linear steps. The conversion rate of **waq-1** reached 45% after 36 h by optimized *in vitro* enzymatic reactions. The α - β dehydration activity of Ansa DH₂ was reaffirmed by fragmentations in MS² profiles. Residue His48 in Ansa DH₂ was turned out to be indispensable for dehydration function by site-directed mutagenesis. [Conclusion] This work focused on the biochemical function of Ansa DH₂, which not only verified its α - β dehydration activity, but also shed light on further mechanistic study of olefin shift.

Keywords: ansamitocin, polyketide, olefin shift, dehydratase domain, α - β dehydration

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770034, 21661140002, 31700027)

*Corresponding authors. Tel: +86-21-34206119; E-mail: Qianjin Kang, qjkang@sjtu.edu.cn, Linquan Bai, bailq@sjtu.edu.cn

Received: 23 April 2020; Revised: 20 May 2020; Published online: 29 May 2020