

利用III型聚酮合酶 CsyB 起始单元的底物多样性体内合成 csypyrone 类化合物

潘丽霞¹, 朱婧¹, 王青艳¹, 申乃坤¹, 李亿¹, 杨登峰^{1,2}

1 广西科学院 非粮生物质酶解国家重点实验室 国家非粮生物质能源工程技术研究中心 广西生物质产业化工程院 广西生物炼制重点实验室, 广西 南宁 530007

2 广西科学院 广西北部湾海洋研究中心 广西海洋天然产物与组合合成生物化学重点实验室, 广西 南宁 530007

潘丽霞, 朱婧, 王青艳, 等. 利用III型聚酮合酶 CsyB 起始单元的底物多样性体内合成 csypyrone 类化合物. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1137-1146.

Pan LX, Zhu J, Wang QY, et al. *In vivo* synthesis of csypyrone derivatives by exploring the substrate diversity of start units of type III polyketide synthase CsyB. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1137-1146.

摘要: 作为新型III型聚酮合酶, 米曲霉来源的 CsyB 能够依次接受一个起始单元为短链脂肪酰辅酶 A、一个延伸单元为丙二酰辅酶 A 和另一个延伸单元为乙酰乙酰辅酶 A 的 3 个底物形成短链的 csypyrone B1-3。基于 CsyB 的晶体结构分析, 显示它的活性中心存在一个长约 16 Å 的能够接受脂肪酰辅酶 A 结合通道, 这个通道很可能能够接受多种底物。为了检测该酶的底物多样性, 将 CsyB 基因导入到存在长链脂肪酰辅酶 A 前体的大肠杆菌中表达。高效液相色谱显示, 相比对照菌株, 重组菌株产生了一系列长链的 csypyrone 衍生物。利用紫外可见光特征吸收值和高分辨液相色谱-质谱联用仪对这些新产物作了初步分析。对 3 个具有羟基的 csypyrone 产物的结构进行了核磁共振一维谱和二维谱的详细鉴定, 确定了其羟基的位置。上述结果显示, CsyB 具有广泛的底物特异性, 不但可以接受多种长链饱和或不饱和脂肪酰辅酶 A, 还可以接受具有羟基修饰的长链脂肪酰辅酶 A 作为底物。

关键词: III型聚酮合酶, CsyB, 底物多样性, 体内合成, csypyrone

Received: October 29, 2017; **Accepted:** December 11, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31660251), Natural Science Foundation of Guangxi Province, China (No. 2017GXNSFAA198010).

Corresponding author: Dengfeng Yang. Tel: +86-771-2503973; E-mail: yangdengfeng@gxas.cn

国家自然科学基金 (No. 31660251), 广西自然科学基金 (No. 2017GXNSFAA198010) 资助。

In vivo synthesis of csypyrone derivatives by exploring the substrate diversity of start units of type III polyketide synthase CsyB

Lixia Pan¹, Jing Zhu¹, Qingyan Wang¹, Naikun Shen¹, Yi Li¹, and Dengfeng Yang^{1,2}

¹ Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, National Engineering Research Center of Non-food Biorefinery, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

² Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: As a novel fungal type III polyketide synthase, CsyB from *Aspergillus oryzae* can sequentially accept one molecular short chain fatty acyl CoA as start unit, one molecular malonyl-CoA and one molecular acetoacetyl-CoA as extend unit to produce the short chain csypyrone B1-3. On the basis of crystal structure of CsyB, a fatty acyl CoA binding tunnel of a length of about 16 Å is located in its active center that is proposed to accept diversified start units. In order to examine the substrate diversity of CsyB, *CsyB* gene was introduced and expressed in *Escherichia coli* that contained a number of precursors of long chain fatty acyl CoA *in vivo*. The results of HPLC revealed that a series of long chain csypyrone derivatives were detected in the recombinant strain in comparison with the control strain. These new csypyrone compounds were preliminarily analyzed by UV-visible spectroscopy and LC-HRMS. Three hydroxylated csypyrones were intensively determined by 1D and 2D NMR experiments, especially the position of the hydroxyl group in these compounds. These results demonstrate that CsyB exhibits a broad substrate specificity, which not only can accept the long chain saturated or unsaturated fatty acyl CoA as substrate, but also accept hydroxylated long chain fatty acyl CoA.

Keywords: type III polyketide synthase, CsyB, substrate diversity, *in vivo* synthesis, csypyrone

聚酮类化合物是一类化学结构复杂多样、生物活性良好的天然产物。它广泛存在于自然界中,具有抗菌、抗肿瘤、抗寄生虫和免疫抑制等药理活性^[1-5]。常见的聚酮类药物有洛伐他汀、阿霉素、红霉素、四环素、两性霉素等。尽管它们在结构上是多样的,但在其生物合成途径中,其核心结构均由聚酮合酶 (Polyketide synthase, PKS) 催化合成。根据聚酮合酶的结构及其他性质,其被分为模块型的 I 型PKS、迭代型的 II 型PKS和查尔酮型的 III 型PKS三大类^[6-9]。

由于独特的结构、作用机制及催化活性, III 型PKS的研究备受瞩目。III 型PKS和其他两种PKS迥然不同,它在不需酰基载体蛋白 (Acyl carrier protein, ACP) 的情况下直接催化丙二酰辅酶A间的缩合,主要负责单环或双环芳香类聚酮化合物的生物合成,如白藜芦醇、花青素、查耳酮、二苯乙烯、苯甲酮、吡啶酮、间苯三酚、吡喃酮和

苯并- γ -吡喃酮等含有黄酮类骨架结构的化合物。这些化合物使植物拥有抗氧化、抗诱变、抗紫外辐射、抗病害侵扰等抵御外界胁迫的能力。目前研究表明,它们与人类的健康也有密切的关系,具有抗炎、抗癌、保护心脑血管系统等多种药理作用^[10-12]。III 型聚酮合酶的查尔酮合酶超家族 (CHS; EC 2.3.1.74) 是一类蛋白质分子量为40–45 kDa的酶,一般是形成简单的同源二聚体,以具有芳香基团或脂肪链基团的辅酶A为底物,连续地催化和丙二酰辅酶A的脱羧缩合反应,形成一系列具有生物活性的次级代谢产物^[13-15]。尽管III 型聚酮合酶主要分布在植物中,但在微生物中也发现了它的存在,不仅有细菌还有像真菌这样的真核微生物^[16-18]。

来源于米曲霉的 CsyB 是一个独特的 III 型聚酮合酶,它存在于 csypyrone B1-3 的生物合成途径中。CsyB 是第一个 III 型 PKS 的双功能酶,不

仅具有常规III型 PKS 催化脱羧克莱森缩合反应的能力,而且可以催化非脱羧的克莱森缩合反应,一步法缩合两个二酮辅酶 A 单元^[19-23]。具体来说,CsyB 能够接受脂肪酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和乙酰乙酰辅酶 A 为底物。首先,将脂肪酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 脱羧缩合产生 β -酮酰基二缩酮 (β -ketoacyl-diketide),然后,再与乙酰乙酰辅酶 A 完成非脱羧的缩合反应,产生 3-乙酰基-4-羟基-6-烷基- α -吡喃酮 (3-acetyl-4-hydroxy-6-alkyl- α -pyrone),一个假定的 csypyrone B 的前体 (图 1A, 1)。此外,CsyB 可以催化两个乙酰乙酰辅酶 A 分子或两分子 β -酮酰基二缩酮中间体的缩合反应,分别产生脱氢乙酸 (3-acetyl-4-hydroxy-6-methyl- α -pyrone) 和 3-乙酰基-4-羟基-6-烷基- α -吡喃酮 (图 1A, 2)^[23]。

为了更好地了解该酶的催化特性,我们对该酶的晶体结构进行了解析,得到了 1.7 Å 的晶体^[24]。对晶体结构的详细分析显示,它是一个典型的硫解酶结构,如图 1B 所示,活性口袋由三部分构成:一是从活性中心一直延伸到酶表面的、狭长的接受起始单元脂肪酰辅酶 A 的结合通道;二是

酶的催化中心,由三联催化中心 (Cys-His-Asn, CHN) 所构成,负责延伸单元与起始单元的碳碳键的形成;三是能够容纳乙酰基或者更长侧链的一个额外的底物接纳口袋。虽然在米曲霉中,CsyB 基因表达后的产物是接受四碳或者五碳的酰基辅酶 A 所产生的,但 CsyB 存在一个长约 16 Å 的底物起始单元结合通道,显然从该通道的长度和大小上分析,可以容纳更大的底物,这一特点与另外两个接受长链底物的酶极为相似,即粗糙脉孢霉的 2'-氧烷基雷琐酸合成酶 (2'-oxoalkylresorcylic acid synthase, ORAS) 和米曲霉的 CsyA^[25]。这两个酶的产物分别是五缩酮烷基间苯二酚酸 (pentaketide alkylresorcylic acid) 和二羟基苯甲酸 (dihydroxybenzoic acid)。另外,CsyB 与 ORAS 和米曲霉来源的 CsyA 分别具有 37% 和 45% 的氨基酸序列一致性。因此,有理由相信 CsyB 可以接受更多复杂长链的底物。为了进一步研究 CsyB 的底物多样性,我们将 CsyB 在大肠杆菌中进行异源表达,希望借助大肠杆菌这个具有长链脂肪酸前体的系统,对 CsyB 的底物耐受性进行更为全面的考察。

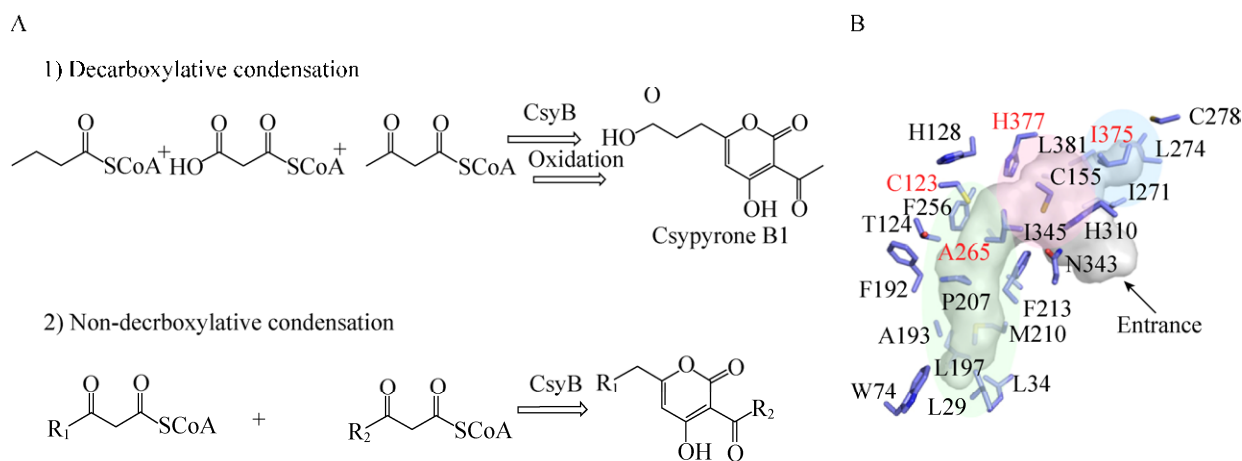


图 1 CsyB 催化的酶反应 (A) 及其蛋白质晶体结构 (B)

Fig. 1 The catalytic reaction of CsyB (A) and crystal structure of CsyB (B).

1 材料与amp;方法

1.1 材料

表达质粒 pET28a 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 购自美国 NOVAGEN 公司。氯化钠、琼脂、卡那霉素、异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 购自上海生物工程有限公司;乙腈、乙酸乙酯购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;蛋白胨、酵母提取物购自英国 OXOID 公司;氘代氯仿、NMR 核磁管购自美国 NORELL 公司;脱氢乙酸购自 Sigma-Aldrich 公司。培养基为 Luria-Bertani (LB) 培养基。活化固体培养基:蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 10 g, 去离子水定容至 1 L。活化液体培养基:蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 氯化钠 10 g, 去离子水定容至 1 L。发酵培养基:蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 去离子水定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 表达质粒 pET28a-CsyB 的构建

以米曲霉全基因组为模板,使用带有限制性酶切位点 *Nde* I 的正向引物 (5'-CCTCATATG ATCGAACCGTTACCGAC-3') 和带有 *Xho* I 的酶切位点的反向引物 (5'-AATCTCGAGTTATGC GTGCAGATACGAGC-3') 为引物,对 *CsyB* 基因进行扩增。扩增程序如下:预热 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次;最后,延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。使用适量的快速限制性内切酶 FastDigest *Nde* I 和 *Xho* I, 对质粒和 PCR 产物进行双酶切 (37 $^{\circ}$ C 3 h), 然后将酶切产物进行胶回收, 在 16 $^{\circ}$ C 下连接 3 h, 再将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 挑取转化子进行菌体 PCR, 对阳性克隆进行酶切和测序验证, 对测序正确的转化子, 扩大培养, 提取其质粒, 转化至表达宿主 BL21 (DE3) 中待用。

1.2.2 重组大肠杆菌发酵液的制备

将保藏在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱甘油中的含有表达载体

pET28-CsyB 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 活化, 使用接种环将甘油保藏的菌种在含有卡那霉素抗性 (50 μ g/mL) 的活化固体培养基平板上划线, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。用灭菌牙签挑取生长良好的单菌落, 转接到含有卡那霉素抗性 (50 μ g/mL) 的液体活化液体培养基 5 mL 中, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养 7-8 h, 然后, 按照 0.1% 的接种率接种到含有卡那霉素抗性 (50 μ g/mL) 的液体发酵培养基中, 待培养基 *OD*₆₀₀ 值达到 0.6 时, 将诱导剂 IPTG 的终浓度设为 0.5 mmol/L 进行诱导, 在 25 $^{\circ}$ C 条件下培养 2-3 d。

1.2.3 重组大肠杆菌发酵提取物的提取与粗分

发酵培养结束后, 使用德国 BECKMAN COULTER J-26 XP 离心机, 5 000 r/min 离心 20 min, 将菌体与菌液分离, 取上层菌液, 使用分液漏斗, 以乙酸乙酯为萃取溶剂, 按体积比 1:1 萃取 3 次, 收集乙酸乙酯层, 使用 EYELA 旋转蒸发器将其减压浓缩获得粗浸膏, 通过减压硅胶柱层析, 以氯仿甲醇 (体积比分别为 10%、30%、50%、70%、90% 和 100%) 为流动相进行梯度洗脱, 获得 6 个组分。将主要含有新产物的 3 号和 4 号组分, 使用 Agilent 1260 的半制备液相色谱仪进行分离, 使用的是反相柱 Agilent ZORBAX SB-C18 5 μ m (9.3 mm \times 250 mm), 程序为: 20% 乙腈, 洗脱 5 min; 20%-55% 乙腈, 洗脱 5 min; 55%-65% 乙腈, 洗脱 5 min; 65%-100% 乙腈, 洗脱 8 min; 最后, 100% 乙腈洗脱 10 min, 紫外检测器的吸收为 310 nm。流动相分别为 A: 超纯水 (0.05% 三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA)); B: 乙腈 (0.05% TFA), 以 3 mL/min 的流速进行分离, 将收集的各个产物旋转蒸发干, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.4 重组大肠杆菌发酵提取物组分的 HPLC 以及 LC-HRMS 的分析

对粗浸膏以及划段后的 6 个组分进行 HPLC 分析, 使用分析液相色谱仪 Ultimate 3000 Thermo Scientific Dionex 公司进行分析, 使用的是菲罗门反相柱 Gemini[®] 5 μ m C18 (4.6 mm \times 250 mm), 程

序：20%乙腈，洗脱5 min；20%–55%乙腈，洗脱5 min；55%–65%乙腈，洗脱5 min；65%–100%乙腈，洗脱8 min；最后，100%乙腈洗脱10 min。紫外检测器的吸收为310 nm，流动相分别为A：超纯水（0.05% TFA）；B：乙腈（0.05% TFA），以1 mL/min的流速进行分析。

对分离的新产物进行 LC-HRMS 分析，使用 Water UPLC-QTOF-MS/MS 型号液质进行产物的分析，使用的是高效反相柱 ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)，程序为：20%乙腈，洗脱5 min；20%–55%乙腈，洗脱5 min；55%–65%乙腈，洗脱5 min；65%–100%乙腈，洗脱8 min；最后，100%乙腈洗脱10 min。紫外检测器的吸收为310 nm，流动相分别为A：超纯水（0.5%乙酸）；B：乙腈（0.5%乙酸），以0.5 mL/min的流速进行分析。离子扫描模式为：ESI-正离子模式；扫描范围：100–1 200 Da。

1.2.5 重组大肠杆菌发酵提取物组分的 NMR 分析

将分离得到的新产物称重，溶解在 200 μL 的氘代氯仿中，用移液器小心地转移入核磁管中，在 800 兆美国 Agilent 1001 核磁共振仪中进行一维核磁共振谱氢谱和碳谱，以及二维核磁共振谱 COSY 谱、HMQC 谱和 HMBC 谱的测定。

2 结果与分析

2.1 高效液相的结果分析

从高效液相结果可以看出，与对照菌株相比，在含有 CsyB 基因的重组大肠杆菌的发酵液中，明显出现了 12 个新峰，而且这些新峰的特征紫外吸收峰和之前报道的 csypyrone B1-3 化合物的紫外吸收峰完全一致，都出现在 310 nm 处，说明这些产生的新峰形成的都是 csypyrone 的结构类似物。因此，这些产物都是 CsyB 在大肠杆菌中表达后，利用大肠杆菌中自身的代谢物中间体为底物所

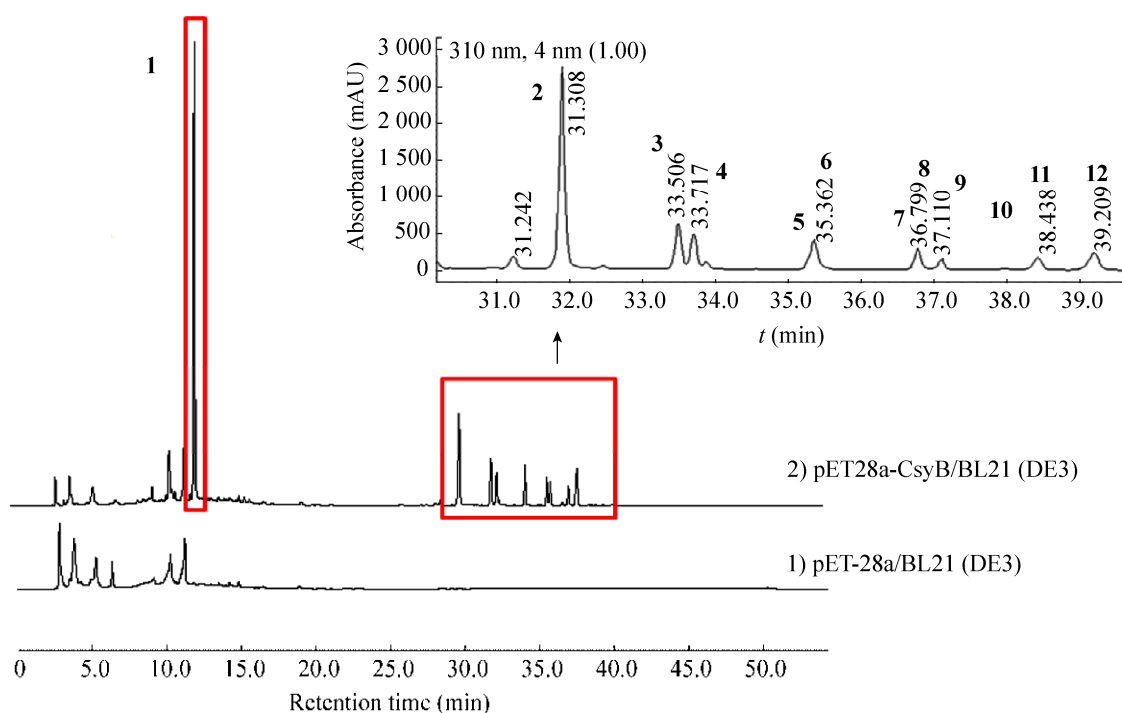


图 2 含表达质粒 pET28a-CsyB 的重组大肠杆菌的高效液相图

Fig. 2 The HPLC result of recombinant *E. coli* pET28a-CsyB/BL21 (DE3).

形成的新产物。为了便于说明,将其命名为化合物 1–12 (图 2)。从这 12 个化合物的分布看,化合物 1 出峰时间较早,在 11.6 min 出峰,而其他 11 个产物均在大约 30–40 min 出峰。这说明化合物 1 的极性较大,而其他 11 个产物的极性相对较小,因此,化合物 1 可能是短链的产物,而其他产物可能是脂肪酸链较长的产物。从产量看,化合物 1 的产量明显高于其他 11 个产物,而且呈现出一种逐渐递减的趋势,原因可能是酶的底物特异性所引起的或者是反应前体在大肠杆菌中的产量差异所引起的。

2.2 LC-HRMS 的结果分析

根据之前 HPLC 分析的结果,对重组大肠杆菌发酵提取物组分中的化合物 1–12 进行高分辨率分子量的测定。将分析的结果汇总在表 1 中,并根据 csypyrone 类化合物推测了这些化合物的分子式。化合物 1 的实测分子量是 168.043 7,与预测分子量 168.042 3 符合,根据 csypyrone 的骨架可以判断,它是由两分子乙酰乙酰辅酶 A 自身缩合而成的最小的 csypyrone 化合物脱氢乙酸,通过与该已知化合物的标准品比较,1 和脱氢乙酸

完全一致。化合物 2、7、9 和 11 的实测分子量分别是 280.165 3、308.196 4、336.231 2 和 364.263 2,与预测分子量 280.167 5、308.198 8、336.230 1 和 364.261 4 相符合,与脱氢乙酸相差分子量分别为 112、140、168 和 196,因此,这 4 个化合物与脱氢乙酸分别相差 4、5、6 和 7 个碳二单元 (C_2H_4),说明这 4 个化合物是在脱氢乙酸的基础上,起始单元更加长的产物。根据分子量大小,可以推测化合物 2、7、9 和 11 是由起始单元分别为癸酰辅酶 A、月桂酰辅酶 A、肉蔻酰辅酶 A 以及软脂酰辅酶 A 为起始底物合成出来的,它们都是饱和长链的 csypyrone 化合物。

化合物 6、8 和 10 的实测分子量分别是 306.182 6、334.212 3 和 362.244 3,与预测分子量 306.183 1、334.214 4 和 362.245 7 相符合,比 7、9 和 11 分子量少 2,因此,6、8 和 10 分别比 7、9 和 11 多出一个双键结构。另外,化合物 12 的实测分子量是 390.275 5,与预测分子量 390.277 0 相符合,分子量比 11 多出 28,也就是说比化合物 11 多出一个碳二单元。值得一提的是,化合物 12 的起始底物是硬脂酰辅酶 A,碳链长度达到 18,是目前 CsyB 可以接受的最长起始底物。因此,化合物 6、8、10 和 12 都是由含一个双键的癸酰辅酶 A、月桂酰辅酶 A、肉蔻酰辅酶 A 以及软脂酰辅酶 A 为起始底物合成出来的,它们都是含有一个双键的不饱和长链的 csypyrone 化合物。

化合物 3、4 和 5 的实测分子量分别为 350.216 2、352.231 4 和 376.231 8,与预测分子量 350.217 1、352.232 8 和 376.232 7 相符合。化合物 3、4 和 5 分别比化合物 8、9 和 10 的分子量多出 16,推测化合物 3、4 和 5 是化合物 8、9 和 10 的羟基化的产物。因此,化合物 3 和 5 是一类羟基化的饱和长链的 csypyrone 化合物,化合物 4 是一个羟基化的含有双键的不饱和长链的 csypyrone 化合物。

表 1 Csypyrone 衍生物的分子量

Table 1 Molecular weight of csypyrone derivatives

No.	Formula	Calculate M_w	M_w
1	$C_8H_8O_4$	168.042 3	168.043 7
2	$C_{16}H_{24}O_4$	280.167 5	280.165 3
3	$C_{20}H_{30}O_5$	350.217 1	350.216 2
4	$C_{20}H_{32}O_5$	352.232 8	352.231 4
5	$C_{22}H_{34}O_5$	376.232 7	376.231 8
6	$C_{18}H_{26}O_4$	306.183 1	306.182 6
7	$C_{18}H_{28}O_4$	308.198 8	308.196 4
8	$C_{20}H_{30}O_4$	334.214 4	334.212 3
9	$C_{20}H_{32}O_4$	336.230 1	336.231 2
10	$C_{22}H_{34}O_4$	362.245 7	362.244 3
11	$C_{22}H_{36}O_4$	364.261 4	364.263 2
12	$C_{24}H_{38}O_4$	390.277 0	390.275 5

2.3 NMR 的结果分析

我们选取产量相对较高、结构最为复杂的含有羟基的 2 个 csypyrone 化合物 **3** 和 **4** 进行了详细的结构鉴定,完成了氢谱、碳谱、COSY 谱、HMBC 谱以及 HMQC 谱的测定,结果见表 2。化合物 **3** 和 **4** 推测的结构如图 3 所示,**3** 和 **4** 的结构是非常接近的,在氢谱上,**3** 出现 13 个信号,**4** 出现 9 个信号,吡喃酮环上的碳 2、3、4、6 位的氢没有信号,碳 5 位分别在化学位移 6.02 和 6.03 处出

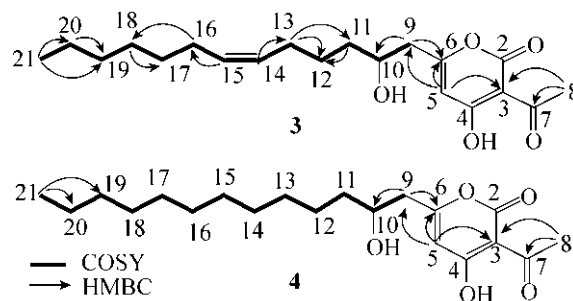


图 3 **3** 和 **4** 的 ^1H - ^1H COSY 谱和 HMBC 谱中的相关
Fig. 3 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **3** and **4**.

表 2 **3** 和 **4** 的氢谱和碳谱数据

Table 2 ^1H and C^{13} spectrum of **3** and **4**

Position	3		4	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	161.27		161.30	
3	100.32		100.31	
4	180.99		180.99	
5	102.69	6.02 (1H,s)	102.68	6.03 (1H,s)
6	169.66		169.74	
7	205.39		205.39	
8	30.22	2.66 (3H,s)	30.24	2.66 (3H,s)
9	42.39	2.64 (1H,m) 2.55 (1H,m)	42.30	2.64 (1H,m) 2.57 (1H,m)
10	69.09	4.06 (1H,m)	69.35	4.04 (1H,m)
11	37.12	1.55 (2H,t)	37.46	1.53 (2H,t)
12	25.61	1.55 (2H,m)	25.53	1.59 (2H,m)
13	26.95	2.07 (2H,m)	29.42	1.25 (2H,m)
14	128.85	5.32 (1H,m)	29.51	1.25 (2H,m)
15	130.98	5.36 (1H,m)	29.62	1.25 (2H,m)
16	27.37	2.00 (2H,m)	29.71	1.25 (2H,m)
17	29.08	1.31 (2H,m)	29.74	1.25 (2H,m)
18	29.74	1.29 (2H,m)	29.78	1.25 (2H,m)
19	31.85	1.29 (2H,m)	32.00	1.25 (2H,m)
20	22.74	1.27 (2H,m)	22.60	1.25 (2H,m)
21	14.18	0.87 (3H,t)	14.24	0.87 (3H,t)

现特征信号峰,在乙酰基上的 7 位碳没有信号,从而确定了 csypyrone 的基本骨架。在 **3** 的氢谱中,化学位移 5.32 和 5.36 的位置多出两个多重峰,这说明在 **3** 中存在一个双键,而在 **4** 的氢谱中,由于没有双键,在化学位移 1.25 左右处出现了严重的重叠,另外,**3** 和 **4** 分别在化学位移 4.06、4.04 处出现了信号,是连接羟基的特征峰。在碳谱上,它们都出现 21 个信号,化合物 **3** 的碳 14 位和 15 位的化学位移分别是 128.95 和 130.98,这些结果都说明 **3** 在碳 14 位和碳 15 位之间比 **4** 多出一个双键。另外,**3** 和 **4** 的碳 10 位的化学位移分别出现在 69.09 和 69.42,说明这个位置的碳原子可能连上了一个羟基基团。

在二维谱 COSY 谱中,各相邻近碳之间的氢发生相关,吡喃酮环上的数据和已经报道的 csypyrone 化合物完全相同。在长链部分,可以检测到明显的 ^1H - ^1H 化学相关(图 3),如 9 和 10、11 和 12、12 和 13、13 和 14、15 和 16、16 和 18、18 和 19、19 和 20、20 和 21。HMBC 的信号也较为清楚(图 3),可以看到相关发生在 3 和 5、3 和 8、5 和 6、5 和 9、6 和 9、7 和 8、9 和 10、11 和 12、12 和 13、11 和 13、13 和 14、15 和 16、16 和 18、17 和 19、19 和 20、19 和 21、20 和 21。另外,HMQC 的结果也归纳在表 2 中。这样,化合物 **3** 和 **4** 的结构就完成了解析。

2.4 新产物结构及其生物合成途径的推测

根据化合物 3 和 4 的化学结构以及前面各化合物的高分辨分子量的结果,可以对 CsyB 在大肠杆菌中表达所产生的新产物 1-12 的结构作出推测,将这些结构归纳到图 4 中。化合物 1 是 CsyB 通过两分子乙酰乙酰辅酶 A 一步缩合而成的,或者是由一分子乙酰辅酶 A、一分子丙二酰辅酶 A 和一分子乙酰乙酰辅酶 A 反应所得。化合物 2、7、9 和 11 是分别通过一分子不同的起始单元癸酰辅酶 A、月桂酰辅酶 A、肉蔻酰辅酶 A 或者软脂酰辅酶 A,然后接受一分子丙二酰辅酶 A 和一分子乙酰乙酰辅酶 A 缩合而成的。化合物 6、8、10 和 12 同样是由不同的起始单元,即都含有一个双键的月桂酰辅酶 A、肉蔻酰辅酶 A、软脂酰辅酶 A 或者硬脂酰辅酶 A,然后接受一分子丙二酰辅酶 A 和一分子乙酰乙酰辅酶 A 缩合而成的。化合物 4 的起始单元换为一个含有羟基的肉蔻酰辅酶 A,然后,接受一分子丙二酰辅酶 A 和一分子乙酰乙酰辅酶 A 缩合而成的。化合物 3 和 5 的起始单元换为一个既含有羟基又含有双键的

肉蔻酰辅酶 A 和软脂酰辅酶 A,然后接受一分子丙二酰辅酶 A 和一分子乙酰乙酰辅酶 A 缩合而成的。这些中间体都是来源于大肠杆菌的脂肪酸合成途径,尽管对大肠杆菌的这些中间体研究较少,但是,通过本实验的结果和之前的研究^[26-28],更加明确了大肠杆菌脂肪酸合成途径和合成过程中的一些中间体。在这个脂肪酸合成的过程中,脂肪酸的延伸是通过众多的 Fab 酶完成的,如 FabH、FabB/F、FabG 等。每次链伸长一个碳二单元要经历循环往复的过程,缩合一个来源于丙二酰辅酶 A 的含有羰基的碳二单元,然后还原羰基基团为羟基基团,接着,脱水去掉羟基基团形成双键,最后,还原双键形成单键,完成碳二单元的延伸。在这个过程中会出现含有双键、羟基或同时含有双键和羟基的中间体。这些与 ACP 蛋白连接的脂肪酰中间体通过与丙二酰辅酶 A 或者丙二酰 ACP 反应,形成长链的二酮的中间体,这个中间体和乙酰乙酰辅酶 A 或乙酰乙酰 ACP 发生非脱羧的克莱森缩合反应,生产最终 csypyrone 产物。

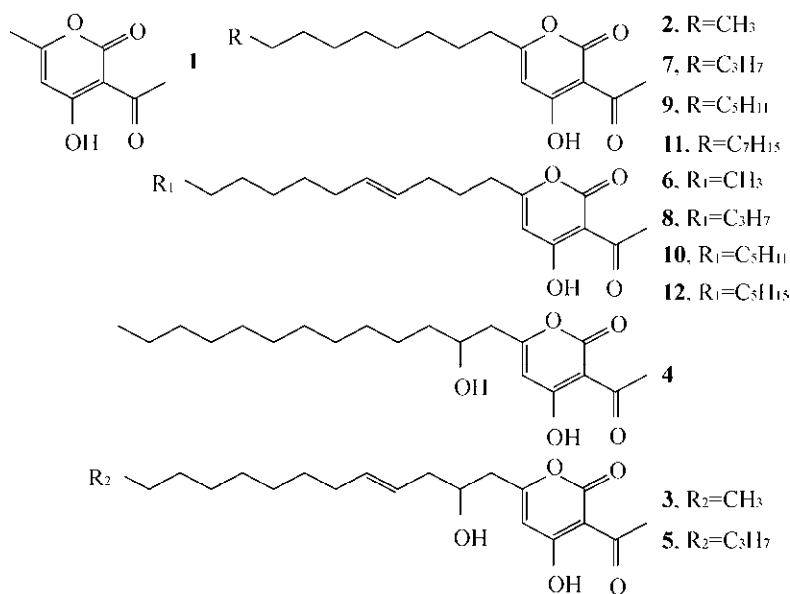


图 4 推测的化合物 1-12 的结构

Fig. 4 Proposed structure of compound 1-12.

3 讨论

米曲霉来源的 CsyB 是一个多功能的III型 PKS, 它与结核分枝杆菌烷基吡喃酮合成酶 PKS18 具有 26% 的序列一致性, 与粗糙脉孢菌 2'-氧烷基雷琐酸合成酶 ORAS 具有 37% 的同源性, 它们通过脂肪酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 的迭代缩合, 产生长链的烷基吡喃酮和烷基雷琐酸。PKS18 和 ORAS 的晶体学研究发现了一个狭长的绑定脂肪酰基辅酶 A 的疏水通道, 研究表明这个通道具有广泛的底物多样性。在 CsyB 的晶体结构中同样发现了这样的一个通道, 这条通道从酶的活性中心延伸到蛋白质的表面, 使得蛋白质可以接受多种不同类型的脂肪酰辅酶 A 作为底物。因此, III型 PKS 酶功能的多样性被认为是和其起始底物的兼容性密切相关。

本研究通过在大肠杆菌体内表达 CsyB 蛋白, 得到了一系列 csypyrone 的衍生物, 这一类化合物具有乙酰基吡喃酮的碳骨架, 它的催化过程是由连续的两步缩合反应完成, 先接受一分子起始单元, 然后, 缩合一分子丙二酰辅酶 A, 最后, 缩合一分子乙酰乙酰辅酶 A。CsyB 对起始单元的特异性上, 表现出很宽的范围和很强的容忍度, 最短可以接受碳链长度为 2 的乙酰辅酶 A, 最长可以接受碳链长度为 18 的硬脂酰辅酶 A。除了可以接受饱和脂肪酰辅酶 A 外, 还可以接受不饱和脂肪酰辅酶 A。另外, 还可以接受 3 个具有羟基修饰的脂肪酰辅酶 A。归根到底, 这些特点都与其特有的结构密不可分, 长且宽大的底物结合通道使其具有了可以跟更多底物结合的可能性。进而, 在大肠杆菌体内完成了 csypyrone 类化合物的合成, 得到了一系列新的产物。同时, 在这个过程中, 对大肠杆菌中的脂肪酸代谢中的中间体也有了更加全面的了解。

REFERENCES

[1] Gokhale RS, Sankaranarayanan R, Mohanty D.

Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(6): 736-743.

[2] Quadri LEN. Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49(3): 179-211.

[3] KuzmaKuzniarska M, Cornell HR, Moneke MC, et al. Lovastatin-mediated changes in human tendon cell. *J Cell Physiol*, 2015, 230(10): 2543-2551.

[4] Maksimenko A, Dosio F, Mougin J, et al. A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(2): E217-E226.

[5] Zhou H, Li YR, Tang Y. Cyclization of aromatic polyketides from bacteria and fungi. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(6): 839-868.

[6] Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep*, 2001, 18(4): 380-416.

[7] Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48(26): 4688-4716.

[8] Jing SS, Zhao SJ. A comprehensive overview of type III polyketide synthases from plants: molecular mechanism and application perspective-a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(11): 1601-1607 (in Chinese).

晶生书, 赵树进. 植物III型聚酮合酶的分子机制与应用前景. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1601-1607.

[9] Su SY, Teng C, Zhang W, et al. Progress on type III polyketide synthase from bacteria. *J Agric Sci Technol*, 2013, 15(6): 119-129 (in Chinese).

苏世友, 滕超, 张维, 等. 细菌III型聚酮合酶研究进展. *中国农业科技导报*, 2013, 15(6): 119-129.

[10] Jang MS, Cai LN, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275(5297): 218-220.

[11] Frankel EN, German JB, Kinsella JE, et al. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 1993, 341(8843): 454-457.

[12] Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 1993, 341(8852): 1103-1104.

[13] Abe I, Morita H. Structure and function of the chalcone

- synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(6): 809–838.
- [14] Austin MB, Noel JP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(1): 79–110.
- [15] Katsuyama Y, Horinouchi S. Microbial type III polyketide synthases//Mander LM, Liu HW. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, Volume 1: Natural Products Structural Diversity-I Secondary Metabolites: Organization and Biosynthesis*. Oxford: Elsevier, 2010: 147–170.
- [16] Sankaranarayanan R, Saxena P, Marathe UB, et al. A novel tunnel in mycobacterial type III polyketide synthase reveals the structural basis for generating diverse metabolites. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(9): 894–900.
- [17] Goyal A, Saxena P, Rahman A, et al. Structural insights into biosynthesis of resorcinolic lipids by a type III polyketide synthase in *Neurospora crassa*. *J Struct Biol*, 2008, 162(3): 411–421.
- [18] Lv YY, Xiao J, Pan L. Type III polyketide synthase is involved in the biosynthesis of protocatechuic acid in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(11): 2303–2310.
- [19] Seshime Y, Juvvadi PR, Kitamoto K, et al. Identification of csypyrone B1 as the novel product of *Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase CsyB. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(12): 4542–4546.
- [20] Hashimoto M, Ishida S, Seshime Y, et al. *Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase CsyB uses a fatty acyl starter for the biosynthesis of csypyrone B compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(20): 5637–5640.
- [21] Hashimoto M, Koen T, Takahashi H, et al. *Aspergillus oryzae* CsyB catalyzes the condensation of two β -ketoacyl-CoAs to form 3-acetyl-4-hydroxy-6-alkyl- α -pyrone. *J Biol Chem*, 2014, 289(29): 19976–19984.
- [22] Hashimoto M, Nonaka T, Fujii I. Fungal type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(10): 1306–1317.
- [23] Mori T, Yang DF, Matsui T, et al. Structural basis for the formation of acylalkylpyrones from two β -ketoacyl units by the fungal type III polyketide synthase CsyB. *J Biol Chem*, 2015, 290(8): 4214–5225.
- [24] Yang DF, Mori T, Matsui T, et al. Expression, purification and crystallization of a fungal type III polyketide synthase that produces the csypyrone. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2014, 70(6): 730–733.
- [25] Seshime Y, Juvvadi PR, Kitamoto K, et al. *Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase CsyA is involved in the biosynthesis of 3,5-dihydroxybenzoic acid. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(16): 4785–4788.
- [26] Feng SX, Ma JC, Yang J, et al. *Ralstonia solanacearum* fatty acid composition is determined by interaction of two 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductases encoded on separate replicons. *BMC Microbiol*, 2015, 15: 223.
- [27] Brock DJH, Bloch K. Control of the synthesis of long-chain fatty acids and triacetic acid in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966, 23(5): 775–780.
- [28] Kass LR, Bloch K. On the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, 58(3): 1168–1173.

(本文责编 郝丽芳)