

· 综 述 ·

3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸的高效合成及其应用

周正雄^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 康振^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

周正雄, 堵国成, 康振. 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸的高效合成及其应用. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1222-1233.

Zhou ZX, Du GC, Kang Z. Production and application of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1222-1233.

摘要: 硫酸化化合物广泛存在于胞浆、细胞表面及胞外基质中, 在机体细胞发育、分化、免疫、解毒和信号传递等生命活动过程中起着不可替代的作用。3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS) 是化合物硫酸化过程中最常用的硫酸基供体, 但目前合成 PAPS 并最终实现其工业化应用还困难重重。文中主要综述过去 10 年内关于 PAPS 的生物合成及应用的研究进展, 以期为 PAPS 的合成及其在芥子油苷、肝素、硫酸软骨素及羟胺硝喹等的生物合成中的应用提供参考。

关键词: 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸, 硫酸基供体, 硫酸化反应, 芥子油苷, 肝素, 硫酸软骨素, 羟胺硝喹, 生物合成

Production and application of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate

Zhengxiong Zhou^{1,2}, Guocheng Du^{1,2}, and Zhen Kang^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Sulfated compounds are widely present in cytoplasm, on cell surface, and in extracellular matrix. These compounds play important roles in cell development, differentiation, immune response, detoxication, and cell signal transduction. 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) is the universal sulfate group donor for the biosynthesis of sulfated compounds. Up to now, the synthesis of PAPS is still too expensive for industrial applications. This review focuses on the recent progress of PAPS production and summaries the application of PAPS, particularly in the production of glucosinolate, heparin, chondroitin sulfate, and oxamniquine production.

Received: December 20, 2018; **Accepted:** February 18, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670092), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 1012050205181370).

Corresponding authors: Zhen Kang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn
Guocheng Du. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: gcd@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31670092), 江南大学自主科研计划重点项目基金 (No. 1012050205181370) 资助。

网络出版时间: 2019-03-13

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190311.1544.004.html>

Keywords: 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, sulfate group donor, sulfation, glucosinolate, heparin, chondroitin sulfate, oxamniquine, biosynthesis

硫酸化反应广泛存在于生物体内源性物质代谢及外源性物质化学修饰过程中,对细胞发育、分化、免疫、解毒等生物学功能作用显著。在生物体中,大部分硫酸转移酶催化 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS) 的硫酸基团转移到对应的底物中合成硫酸化的代谢产物。上述硫酸化反应机制也用于生物体或体外酶法制备肝素、硫酸软骨素、羟胺硝喹等化合物。但 PAPS 是一类高能磷酸化合物,在胞内不能大量积累,在体外不能稳定保存。因此,构建稳定、高效的 PAPS 合成体系对肝素、硫酸软骨素、羟胺硝喹等高附加值化合物的生成尤为重要。

在过去十年,研究者从 PAPS 的代谢途径、合成方式及其生物学应用对其进行探究。文中主要综述了全细胞合成 PAPS、体外酶法制备 PAPS 及 PAPS 的生物学应用,为 PAPS 的高效制备及其应用提供潜在的方向。

1 PAPS 的合成

1.1 利用全细胞合成 PAPS

从单细胞生物到哺乳动物细胞中都存在 ATP 到 PAPS 的合成途径。ATP 经 ATP 硫酸化酶催化形成 5'-磷酸腺苷硫酸 (Adenosine-5'-phosphosulfate, APS), 再经 APS 激酶催化形成 PAPS (图 1), 或由双功能酶 PAPS 合酶催化 ATP 合成 PAPS。PAPS 合成过程中存在 3 个关键因素: 1) 硫酸基团的转运和供给; 2) ATP 的合成速度; 3) ATP 合成 PAPS 的转化效率。

1) 硫酸基团的转运和供给。在生物体内硫酸基团的转运方式有两种: 钠离子偶联型及钠离子非偶联型离子通道。所谓钠离子偶联型通道是通过钠离子偶联转运体转运钠离子的同时按照 3 : 1

的比例转运硫酸基团等-2 价阴离子,这种转运方式主要存在于肾脏细胞及肠道细胞中^[1]。钠离子非偶联型离子通道又称硫酸根离子通道 I, 主要用于非特异性的转运如草酰乙酸、琥珀酸等有机离子。其中钠离子偶联型离子通道对硫酸根的转运能力比钠离子非偶联型离子通道转运能力高 50 倍以上^[2]。

2) ATP 的合成速度。ATP 是细胞内的能量物质,主要由氧化磷酸化和糖酵解途径产生。氧化磷酸化发生在线粒体中(真核生物)或细胞质中(原核生物),糖酵解途径在细胞质中进行。在有氧呼吸条件下,氧化磷酸化提供细胞生长代谢所需的绝大部分 ATP。膜内外电位差及 ΔpH 驱动

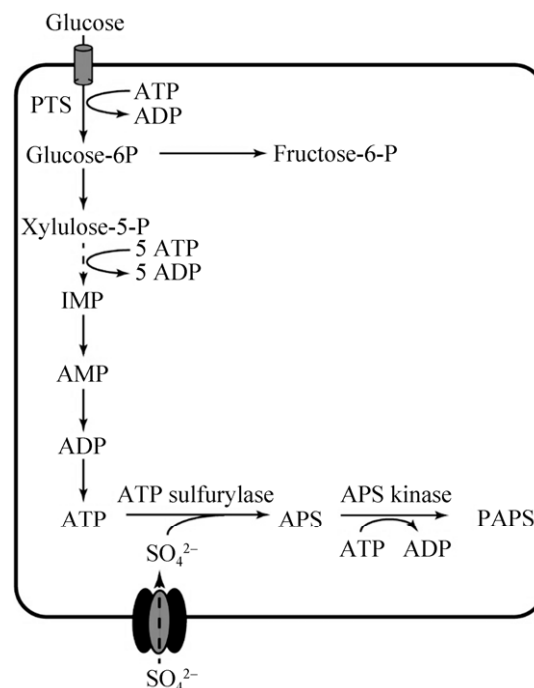


图 1 PAPS 合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of PAPS. PTS: phosphoenolpyruvate-dependent glucose phosphotransferase system; IMP: inosine monophosphate; PAPS: 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate.

ADP 和 Pi 合成 ATP^[3]。降低细胞有氧呼吸的程度即降低细胞中的溶解氧水平能显著降低 ATP 的合成速度^[4]。而 Ca²⁺能够促进线粒体的有氧呼吸代谢从而提高 ATP 的合成速度^[5]。在正常条件下,细胞内的 ATP 浓度约为 5 nmol/mg 蛋白, ATP 的合成速度约为 400 nmol/(min·mg 蛋白)^[4]其中绝大部分的 ATP 用于细胞自身的能量代谢, ATP 浓度过高或过低都会造成细胞的代谢紊乱^[6]。

3) ATP 合成 PAPS 的转化效率。目前,生物体内催化 ATP 合成 PAPS 的途径有两种。在植物和微生物细胞中 ATP 经 ATP 硫酸化酶及 APS 激酶共同催化形成 PAPS。在哺乳动物细胞中存在一种双功能酶 PAPS 合酶能直接催化 ATP 合成 PAPS。其 N 端序列表现为 APS 激酶活性, C 端序列表现为 ATP 硫酸化酶活性。ATP 分子结合 ATP 硫酸化酶后形成 U 型结构并与硫酸根结合催化形成 APS^[7]。但催化形成的 APS 占据 ATP 硫酸化酶的底物结合位点阻止 ATP、硫酸基团与酶的结合从而抑制 ATP 硫酸化酶的活性。同时 APS 对 APS 激酶也产生抑制作用。APS 激酶的催化机理也遵从如 ATP 硫酸化酶一样的乒乓机制,即 APS 激酶结合 Mg²⁺、ATP 后再与 APS 结合形成 PAPS 和 ADP, 然后释放出 PAPS 最后释放 ADP

还原成活性酶。但过量的 APS 能在 ADP 释放前与其结合形成 APS 激酶-APS-ADP 的复合物阻止 ADP 的释放和 Mg²⁺、ATP 的结合从而抑制 APS 激酶活性^[8]。对于双功能酶 PAPS 合成酶而言,其硫酸化活性远大于其激酶活性,这也就意味着 APS 很容易过量积累从而抑制 PAPS 合酶的活性。

综上所述,全细胞合成 PAPS 要解决的关键问题是:①增强硫酸基团转运和供给能力:通过异源表达钠离子依赖性离子通道增强硫酸基团转运能力。②增强 ATP 的合成速度,同时增加 ATP 流向 PAPS 的代谢通量维持机体正常的 ATP 供给水平。③解除 APS 的反馈抑制、底物抑制作用:提高 APS 激酶活性和对 ADP 的释放能力从而消除 APS 对 APS 激酶的抑制作用,同时提高 ATP 硫酸化酶对 APS 的释放能力达到提高 ATP 到 PAPS 的转化率。

1.2 体外酶法制备 PAPS

作为高能化合物 PAPS 在细胞内的积累水平相对较低,因此由细胞制备 PAPS 距离工业化应用还较远。研究人员一般采用体外酶法制备 PAPS 供给后续应用。体外酶法制备 PAPS 主要包括两种方法:ATP 硫酸化酶和 APS 激酶催化 ATP 制备 PAPS (图 2A)、酰基磺酸转移酶 (Arylsulfotransferase IV, ASTIV)

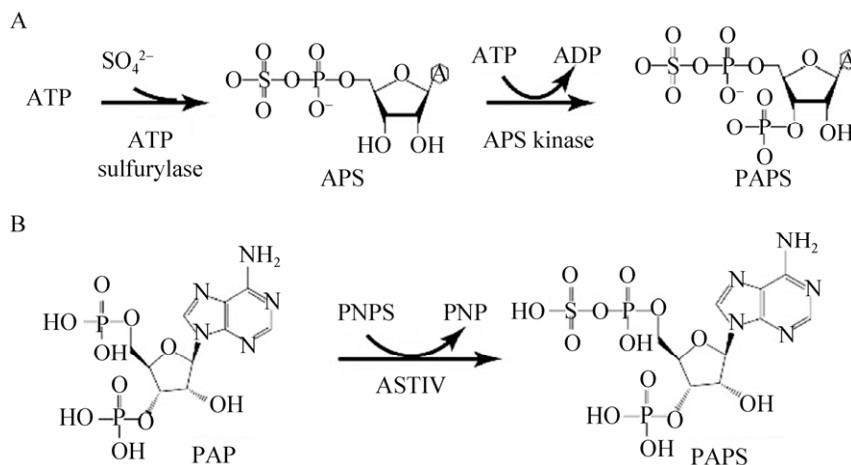


图 2 PAPS 再生系统

Fig. 2 Regeneration system of PAPS. (A) PAPS production based on ATP. (B) PAPS production based on PAP. PNPS: *para*-nitrophenylsulfate; PNP: *para*-nitrophenol; PAP: 3'-phosphoadenosine-5'-phosphate.

催化 3',5'-二磷酸腺苷 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphate, PAP)合成 PAPS (图 2B)。

1) 基于 ATP 硫酸化酶和 APS 激酶制备 PAPS。不同来源的 ATP 硫酸化酶序列相似性较低, 约为 20%–30%, 空间结构也复杂多样, 包括单体、同源二聚体、同源四聚体、同源六聚体和异源多聚体^[7, 9-16]。但其单体的空间结构却呈保守的不规则球形, 其底物结合口袋由一条宽阔的通道与球体表面相通, Arg、His 等碱性氨基酸与 ATP 的 β 、 γ -磷酸基团相结合固定底物 ATP 和硫酸基团, HXXH 残基直接决定其硫酸化活性^[13, 17]。在体外酶催化反应过程中, ATP 硫酸化酶也遵循乒乓机制, 即 ATP 硫酸化酶先与 Mg^{2+} 、ATP 结合再与硫酸根结合后合成并释放出 APS, 最后释放出 PPi 。

从动力学的角度来说, ATP 硫酸化酶反应释放出的副产物 PPi 能与大环荧光探针 3-(9-蒽甲基)-3,6,9,15-四氮杂双环十五-1,11,13-三烯和 Zn^{2+} 复合物结合发生荧光淬灭, 达到实时检测 ATP 硫酸化酶的活性的能力^[18]。ATP 硫酸化酶的催化速度可以达到 $0.1\text{--}0.4 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg 蛋白})$ ^[19]。但植物来源的 ATP 硫酸化酶催化活性相对较低, 约为 $0.1\text{--}0.3 \text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg 蛋白})$ ^[20]。镁离子是 ATP 硫酸化酶反应的必需金属离子, 而氯酸盐却能在一定程度上抑制 ATP 硫酸化酶活性^[21]。这为随机突变 ATP 硫酸化酶提供良好的检测基础及实施的可能性。

不同来源的 APS 激酶在氨基酸序列和空间结构上也存在保守序列或保守空间。APS 激酶在生物体内以二聚体的形式存在, 其 N 端的 Cys 之间形成二硫键 (蓝藻来源 APS 激酶除外)。其 N 端的二硫键改变 APS 激酶 N 端序列的空间结构, 降低 APS 造成的底物抑制作用, 且还原态的 APS 激酶活性高于氧化态的 APS 激酶活性^[22-24]。蛋白质的二级结构分析表明, Arg⁹³ 是底物识别的重要

氨基酸, 突变体 R93A 完全失去了底物抑制作用, 同时也降低了 ADP 物质的亲和作用 (降低 217 倍), 达到提高 APS 激酶活性的目的^[23]。

在理想条件下, APS 激酶的催化速度可以达到 $10\text{--}900 \text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg 蛋白})$ ^[25]。ATP 转化为 PAPS 的转化率为 47%, 与此同时生成等量的副产物 ADP。An 等^[26]通过引入丙酮酸激酶催化 ADP 合成 ATP 进一步提高 ATP 合成 PAPS 的转化率至超过 90%。

较高的转化率为 PAPS 的高效合成提供有力的保障。想要体外酶法高效制备 PAPS 还需要较高的酶量。目前报道的 ATP 硫酸化酶有 30 000 多种, APS 激酶有 3 200 多种 (www.ncbi.nlm.nih.gov), 其中能在微生物中进行表达的屈指可数。大肠杆菌和酿酒酵母是 ATP 硫酸化酶或 APS 激酶表达的常用工业宿主。来自于拟南芥等的 ATP 硫酸化酶可在酿酒酵母中进行活性表达^[27]。来自酿酒酵母^[28]、洋葱^[29]、山茶花^[30]、产黄青霉^[31]、乳酸克鲁维酵母^[32]等的 ATP 硫酸化酶和 APS 激酶可在大肠杆菌中进行活性表达。但目前关于上述来源的 ATP 硫酸化酶和 APS 激酶没有产量的报道。从酶的空间结构来说, 动物来源和植物来源的 ATP 硫酸化酶是同源二聚体, 而微生物来源的 ATP 硫酸化酶是由基因 *cysD*、*cysN* 共同编码的异源二聚体。在大肠杆菌中共表达 *cysD*、*cysN* 时得到的 ATP 硫酸化酶活性是单独表达 *cysD* 的 ATP 硫酸化酶的活性的 40 倍^[33]。APS 激酶在 N 端形成分子内的二硫键使 APS 激酶处于氧化态^[23], 因此要选择合适的表达宿主如大肠杆菌 Rosetta 等^[34]或在 N 端融合促进二硫键形成的短肽如 TrxA^[35], 或共表达促进蛋白质折叠的伴侣分子 DsbL 等帮助蛋白质折叠^[36-37], 或者进行分泌表达, 将蛋白分泌到周质空间中提供二硫键形成的环境^[38]或者选用大肠杆菌以外的合适的表达宿主。

综上所述,以 ATP 为底物催化合成 PAPS 时,需要解决的问题包括:①提高 ATP 硫酸化酶释放产物 APS 的速度降低 APS 的产物抑制作用:通过改变底物结合口袋的氨基酸序列,在底物结合口袋中引入酸性或中性氨基酸减少酶与产物间的引力作用,从而加快 APS 的释放。②提高 APS 激酶释放产物 PAPS 和 ADP 的速度降低 APS 的底物抑制作用:通过在 U 型通道后面引入更多疏水性氨基酸扩大底物结合口袋 U 型通道,加快 PAPS 和 ADP 的释放速度,从而降低酶-ADP-APS 复合物形成的可能性即降低 APS 的底物抑制作用,达到提高 APS 激酶活性的目的。③ATP 硫酸化酶和 APS 激酶的表达:筛选合适的表达宿主及基因来源提高上述两个酶的表达量,以大肠杆菌为宿主进行表达上述基因时,除了常规的优化启动子、RBS、终止子、诱导剂浓度、诱导温度等手段提高表达量外,还要在 N 端或 C 端融合相应的蛋白提高二硫键的形成概率达到提高蛋白正确折叠的目的。

2) 基于 ASTIV 催化 PAP 合成 PAPS。来自于哺乳动物和微生物的酰基磺酸转移酶能催化 PAP 合成 PAPS。目前人来源 ASTIV 共有 3 种同工酶,分别是 hSULT1A1、hSULT1A2、hSULT1A3,这 3 种同工酶的序列相似性在 90% 以上,且与小鼠来源的 ASTIV 序列相似性也达到约 80%。其晶体呈粗糙球形,PAP 的底物结合口袋在球体内部,通往底物结合口袋的通道入口有一段柔性区域像整个口袋的帽子(又称作门控序列, Gating loop),阻挡底物与酶的结合,从而降低 PAPS 的合成速率(图 3)。因此小分子底物或者偏中性底物相对容易进入底物结合口袋通道,而大分子的带负电荷的物质相对较难进入通道,也就意味着 ASTIV 对大分子 PAP 的亲和力相对较弱。但该门控序列所属类型(包括翼门型(Wing gate)、双开门型(Swinging door gate)、光圈孔型(Aperture gate)、

吊门和双吊门型(Drawbridge and double drawbridge gates)、外壳门型(Shell gate))及作用方式目前研究还较少,因此目前对该段柔性 Loop 还没有较多理性的改造方式,后期研究过程中可以对其进行随机突变来提高 PAPS 的合成速度^[39]。

此外,底物口袋表面多为亲水性、碱性氨基酸包括 Lys、His、Arg 等用于与 PAP 的磷酸基团结合固定底物,其催化氨基酸为 His^[40]。然而 ASTIV 的底物结合口袋具有很强的可塑性以适应不同的底物,因此其底物谱较广^[41]。除了能催化 PAP 硫酸化为 PAPS 外,还能催化其他酚类、醇类、含氮类化合物硫酸化,且对小分子物质的亲和性相对较强但催化活性都较低,其中 hSULT1A1 主要催化小分子酚类物质,hSULT1A3 主要催化胺类物质^[42]。同时其底物结合口袋背面的氨基酸决定底物结合口袋的相对大小,从而调节催化活性及底物谱,如 Y149F 能提高 hSULT1A2 对对硝基苯酚的 K_m 值近 40 倍^[43],A146E 能够改变 hSULT1A1 的底物谱类似 hSULT1A3^[44]。

与 ATP 硫酸化酶及 APS 激酶催化 ATP 合成 PAPS 一样,影响 ASTIV 催化形成 PAPS 应用于工业生产的因素除了其比酶活外还有得到 ASTIV 的成本,即 ASTIV 的表达水平。根据前期本课题组得到的数据表明,不同温度条件下 ASTIV 可溶表达的水平相差不大,但随着温度的升高,不可溶表达的 ASTIV 含量越高。换言之,影响 ASTIV 活性表达的因素不是蛋白的翻译水平而是蛋白的折叠水平,本课题组在 ASTIV N 端融合促融标签麦芽糖融合蛋白(Maltose binding protein, MBP),但效果不够显著^[45]。分析其结构表明,ASTIV 内部有一对二硫键,而在大肠杆菌胞内合成和折叠不利于二硫键的形成,从而导致可溶表达的水平较低^[46]。因此,可以采取同 APS 激酶表达同样的策略提高 ASTIV 的可溶表达。

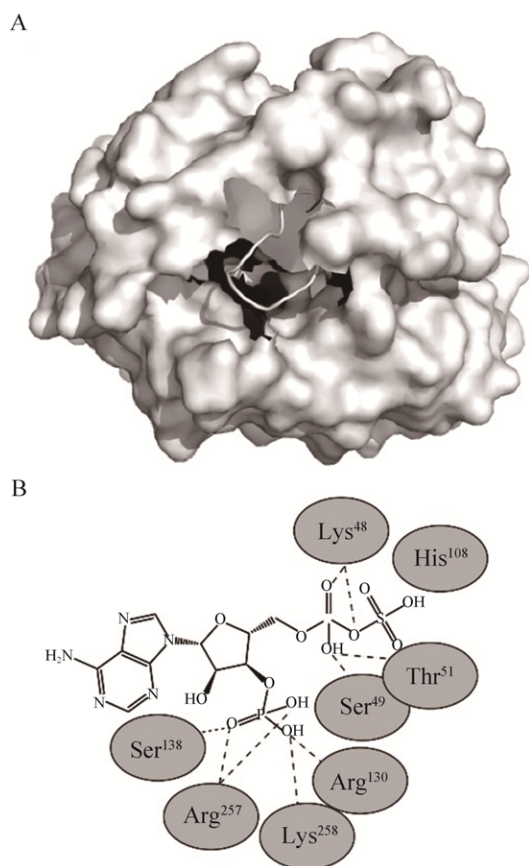


图3 人来源 ASTIV (SULT1A1) 晶体结构

Fig. 3 3D structure of human SULT1A1. (A) 3D structure of human SULT1A1. The gray loop was the gating loop, and the black ball was the substrate, PAPS. (B) Amine acids in SULT1A1-PAPS interactions on a 2D diagram.

综上所述,以 PAPS 为底物催化合成 PAPS 时,需要解决的问题包括:①减少底物结合口袋帽子结构的酸性氨基酸含量:通过点突变减少帽子结构中 Glu 的含量,从而减少帽子结构对于带负电荷的底物 PAPS 的排斥作用,提高酶对 PAPS 的亲合力。②理性设计突变底物结合口袋的氨基酸序列:通过增加碱性氨基酸的数量进一步提高底物结合口袋对于 PAPS 的正负电荷引力作用,同时扩大底物结合口袋提高 PAPS 进入底物结合口袋的速率从而达到提高 PAPS 合成速率的目的。③提高 ASTIV 二硫键形成的速率:通过融合蛋白或者共表达伴

侣分子等策略提供二硫键形成的环境提高 ASTIV 二硫键形成的速率达到提高 ASTIV 可溶表达水平。

2 PAPS 的生物学应用

2.1 芥子油苷的生物合成

芥子油苷也称硫代葡萄糖苷或硫苷 (Glucosinolate, GLS),是十字花科植物中的一类次级代谢物,主要存在于植物细胞的液泡中,当组织受到损伤时与黑芥子酶发生水解反应形成具有实际活性的物质异硫氰酸盐、硫氰酸盐和吲哚,从而达到保护植物的目的^[47-48]。目前研究表明芥子油苷通过肠道内的微生物分解后形成异硫氰酸盐还具有抗癌的功效。研究其结构表明其含有 1 个 R 侧链和 1 个硫原子相连的 D-吡喃葡萄糖。根据其 R 侧链差异分为脂肪族、芳香族和吲哚族芥子油苷。

在芥子油苷合成过程中,硫酸根经硫酸根转运通道(Sulfate transporter, SULTR)转运进细胞后经过质体膜跨膜蛋白转运进入质体。在细胞质中,硫酸根经 ATP 硫酸化酶(由 *cyt-ATPS2* 编码)及 APS 激酶(由 *APK3* 编码)共同催化形成 PAPS;质体中 ATP 硫酸化酶由 *ATPS1*、*ATPS2*、*ATPS3*、*ATPS4* 编码,APS 激酶由 *APK1*、*APK2*、*APK4* 编码。质体中合成的 PAPS 经跨膜通道进入细胞质中,催化脱硫酸芥子油苷 (Desulfo-glucosinolate, Desulfo-GLS)合成芥子油苷(图 4)。因此,提高土壤中硫酸盐的供给或者细胞膜对硫酸根的转运能力能提高 PAPS 的合成能力从而提高芥子油苷的合成能力^[49]。此外, Yatusевич 等^[50]研究表明提高转录因子 R2R3-MYB 的表达量能增加 ATP 硫酸化酶及 APS 激酶的表达量,加速 PAPS 的合成从而增加芥子油苷的合成量。

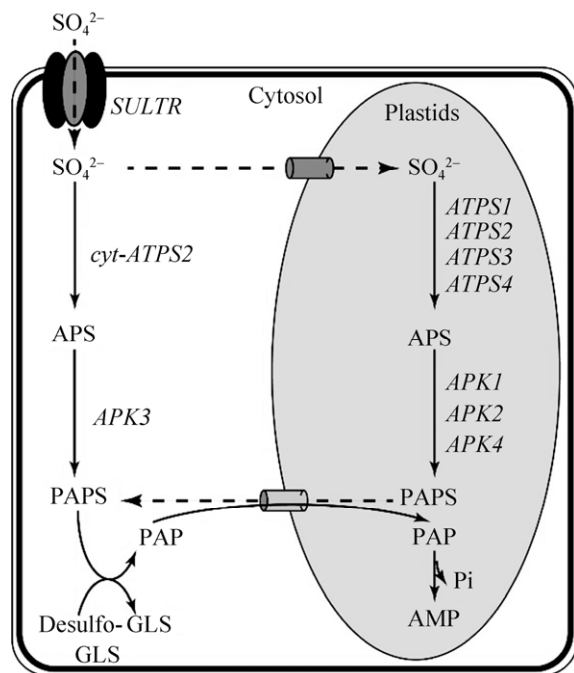


图 4 植物细胞中芥子油苷的合成机制

Fig. 4 Biosynthesis of glucosinolate in plant cell. SULTR: sulfate transporter; desulfo-GLS: desulfo-glucosinolate; *cyt-ATPS2* is the *ATPS2* in cytosol.

2.2 糖胺聚糖的生物合成

糖胺聚糖是一类广泛存在于细胞表面和胞外基质中的多糖类物质，主要包括肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、透明质酸等 6 类，除了透明质酸外其他 5 类都需要硫酸化修饰形成具有生物学活性的产物 (图 5)。糖胺聚糖具有信号传递、免疫等生物学功能，在临床上被广泛用于术后抗凝血 (肝素)、骨关节炎的治疗 (硫酸软骨素) 等^[51]。但临床上使用的糖胺聚糖主要从动物组织中提取，含有较多的杂多糖，降低相应药物的疗效甚至危及生命^[52]。酶法制备糖胺聚糖具有产物单一的优势，因此被认为是最有可能替代动物组织提取被应用于临床的糖胺聚糖生产方式^[53]。

在肝素和硫酸乙酰肝素合成过程中，肝素前体经 N-脱乙酰/N-硫酸转移酶 (N-deacetylase/

N-sulfotransferase, NDST)、葡萄糖醛酸变构酶 (Glucuronyl C5 epimerase, C5epi)、肝素 2-O-硫酸转移酶 (Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase, HS2ST)、肝素 6-O-硫酸转移酶 (Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase, HS6ST)、肝素 3-O-硫酸转移酶 (Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase, HS3ST) 等催化合成具有抗凝血活性的肝素，在此过程中，PAPS 是肝素前体硫酸化修饰的直接硫酸基供体 (图 5A)^[54-55]。在硫酸软骨素合成过程中，软骨素经软骨素 4-O-硫酸转移酶 (Chondroitin 4-O-sulfotransferase, C4ST) 或软骨素 6-O-硫酸转移酶 (Chondroitin 6-O-sulfotransferase, C6ST) 或

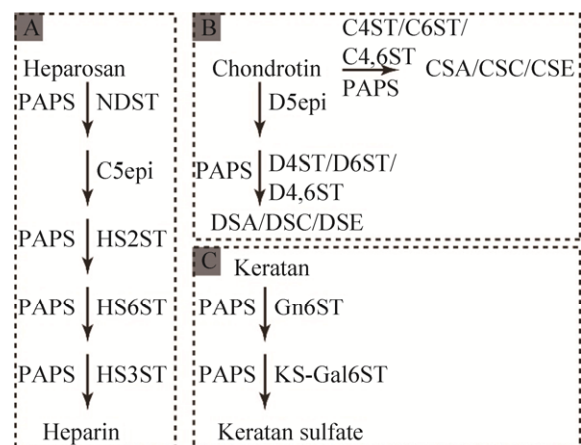


图 5 酶法合成糖胺聚糖

Fig. 5 Enzymatic synthesis of glycosaminoglycan. (A) Enzymatic synthesis of heparin base on heparosan. NDST, N-deacetylase/N-sulfotransferase; C5epi, glucuronyl C5 epimerase; HS2ST, heparan sulfate 2-O-sulfotransferase; HS6ST, heparan sulfate 6-O-sulfotransferase; HS3ST, heparan sulfate 3-O-sulfotransferase. (B) Enzymatic synthesis of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. C4ST, chondroitin 4-O-sulfotransferase; C6ST, chondroitin 6-O-sulfotransferase; C4,6ST, chondroitin 4,6-O-sulfotransferase; D5epi, dermatan epimerase; D4ST, dermatan 4-O-sulfotransferase; D6ST, dermatan 6-O-sulfotransferase; D4,6ST, dermatan 4,6-O-sulfotransferase. (C) Enzymatic synthesis of keratan sulfate. Gn6ST, corneal N-acetylglucosaminyl-6-sulfotransferase; KS-Gal6ST, keratan sulfate galactosyl-6-sulfotransferase.

软骨素 4,6-O-硫酸转移酶 (Chondroitin 4,6-O-sulfotransferase, C4, 6ST) 催化形成硫酸软骨素 A (Chondroitin sulfate A, CSA)、硫酸软骨素 C (Chondroitin sulfate C, CSC) 或硫酸软骨素 E (Chondroitin sulfate E, CSE), 在此过程中所用的硫酸基供体还是 PAPS (图 5B)^[56]。在软骨素经软骨素葡萄糖醛酸变构酶 (Dermatan epimerase, D5epi)、皮肤素 4-O-硫酸转移酶 (Dermatan 4-O-sulfotransferase, D4ST)、皮肤素 6-O-硫酸转移酶 (Dermatan 6-O-sulfotransferase, D6ST)、皮肤素 4,6-O-硫酸转移酶 (Dermatan 4,6-O-sulfotransferase, D4, 6ST) 催化形成多种硫酸皮肤素 (Dermatan sulfate, DS) 及角质素经角膜 N-乙酰氨基 6-硫酸转移酶 (Corneal N-acetylglucosaminyl-6-sulfotransferase, Gn6ST)、半乳糖苷-6-硫酸转移酶 (Keratan sulfate galactosyl-6-sulfotransferase, KS-Gal6ST) 催化形成硫酸角质素 (Keratan sulfate, KS) 过程中, 所用的硫酸基供体全是 PAPS (图 5C)^[57-58]。

20年前人们研究上述糖胺聚糖酶法合成一般采用外源添加 PAPS, 造成合成糖胺聚糖的价格昂贵^[59]。且在硫酸化反应过程中产生大量的副产物 PAP, 而 PAP 能够进一步与硫酸转移酶中的 PAPS 底物结合位点进行结合抑制硫酸转移酶的活性, 降低相应产物的硫酸化程度。由 ATP 硫酸化酶和 APS 激酶催化 ATP 合成 PAPS 的再生系统引入糖胺聚糖酶法催化系统, 在一定程度上降低了 PAPS 的合成成本实现化学酶法合成糖胺聚糖^[32, 45], 但没有解决副产物抑制的问题。由 ASTIV 催化 PAP 合成 PAPS 的再生循环系统降低了硫酸化修饰过程中副产物 PAP 的抑制作用。虽然上述两种 PAPS 再生的方式在一定程度上降低了酶法制备糖胺聚糖的成本, 但酶法合成糖胺聚糖还是成本较高, PAPS 合成成本依旧是制约化学酶法或酶法合成糖胺聚糖的关键因素, 距离酶法合成糖胺聚糖的工业化应用还有一段距离。

2.3 羟胺硝喹疗效激活

目前全世界有近 3 亿人正在饱受血吸虫病的折磨, 大约有 20 万人因此而丧命^[60]。同时血吸虫病能够诱导产生很多其他的并发症, 如肝纤维化^[61]、尿血症^[60]等。20 世纪 80 年代之前, 治疗血吸虫病的主要药物为羟胺硝喹, 但随着此药物的大量使用, 血吸虫病的病原菌埃及血吸虫 *Schistosoma heamatobium*、日本血吸虫 *Schistosoma japonicum* 和曼氏血吸虫 *Schistosoma mansoni* 对此产生了耐药性^[62]。研究发现 *S. mansoni* 中存在一种硫酸转移酶能够催化羟胺硝喹的羟基硫酸化修饰为硫酸硝喹并抑制 *S. mansoni* 的生长, 从而达到治疗 *S. heamatobium*、*S. mansoni* 引起的血吸虫病 (由这两种病菌造成全世界 99% 的血吸虫病)^[63-64], 在此过程中使用的硫酸基供体也为 PAPS。

此外, PAPS 再生系统还应用于黄酮类^[65]、胆碱类^[66-67]、雌激素类^[68-69]、固醇类^[70-71]和倍萜类化合物^[67]的硫酸化修饰及蛋白质酪氨酸硫酸化修饰等蛋白质翻译后修饰系统^[72-73]等。

3 展望

PAPS 再生系统在整个化合物的硫酸化修饰过程中占据无比重要的位置, 且对于工业化应用来说是成本控制的关键。目前不论从 ATP 合成 PAPS 还是从 PAP 合成 PAPS 的合成成本都离工业化还有一段距离。因此, 未来可以从提高酶的活性表达和酶的转化效率上来进一步提高合成 PAPS 的速度达到降低生产成本的目的。提高酶的活性表达水平包括: 1) 优化酶的转录和翻译元件, 如优化启动子、RBS、终止子序列等。2) 提高二硫键形成速率帮助酶正确折叠, 如共表达伴侣分子 DsbL、在 N 端融合硫氧还蛋白、筛选合适的信号肽将酶分泌到周质空间等。3) 优化诱导剂浓度、诱导温度等培养条件提高酶的表达。提

高酶的转化效率是指提高比酶活, 是根据 ATP 硫酸化酶、APS 激酶和 ASTIV 的底物结合口袋和催化机制来理性设计调控底物结合口袋和通道序列, 达到提高底物结合能力及产物释放速度。

REFERENCES

- [1] Markovich D, Murer H. The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflügers Arch*, 2004, 447(5): 594–602.
- [2] Bissig M, Hagenbuch B, Stieger B, et al. Functional expression cloning of the canalicular sulfate transport system of rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1994, 269(4): 3017–3021.
- [3] Turina P, Petersen J, Gräber P. Thermodynamics of proton transport coupled ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(6): 653–664.
- [4] Vanasco V, Magnani ND, Cimolai MC, et al. Endotoxemia impairs heart mitochondrial function by decreasing electron transfer, ATP synthesis and ATP content without affecting membrane potential. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(2): 243–252.
- [5] Tarasov AI, Griffiths EJ, Rutter GA. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca^{2+} . *Cell Calcium*, 2012, 52(1): 28–35.
- [6] Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell*, 2014, 156(4): 825–835.
- [7] Ullrich TC, Blaesse M, Huber R. Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *EMBO J*, 2001, 20(3): 316–329.
- [8] Mueller JW, Shafqat N. Adenosine-5'-phosphosulfate – a multifaceted modulator of bifunctional 3'-phospho-adenosine-5'-phosphosulfate synthases and related enzymes. *FEBS J*, 2013, 280(13): 3050–3057.
- [9] Mougous JD, Lee DH, Hubbard SC, et al. Molecular basis for G protein control of the prokaryotic ATP sulfurylase. *Mol Cell*, 2006, 21(1): 109–122.
- [10] Taguchi Y, Sugishima M, Fukuyama K. Crystal structure of a novel zinc-binding ATP sulfurylase from *Thermus thermophilus* HB8. *Biochemistry*, 2004, 43(14): 4111–4118.
- [11] MacRae IJ, Segel IH, Fisher AJ. Allosteric inhibition via R-state destabilization in ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(12): 945–949.
- [12] Beynon JD, MacRae IJ, Huston SL, et al. Crystal structure of ATP sulfurylase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Biochemistry*, 2001, 40(48): 14509–14517.
- [13] Herrmann J, Ravilious GE, McKinney SE, et al. Structure and mechanism of soybean ATP sulfurylase and the committed step in plant sulfur assimilation. *J Biol Chem*, 2014, 289(15): 10919–10929.
- [14] Lalor DJ, Schnyder T, Saridakis V, et al. Structural and functional analysis of a truncated form of *Saccharomyces cerevisiae* ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity. *Protein Eng*, 2003, 16(12): 1071–1079.
- [15] MacRae IJ, Segel IH, Fisher AJ. Crystal structure of ATP sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*: insights into the allosteric regulation of sulfate assimilation. *Biochemistry*, 2001, 40(23): 6795–6804.
- [16] Ullrich TC, Huber R. The complex structures of ATP sulfurylase with thiosulfate, ADP and chlorate reveal new insights in inhibitory effects and the catalytic cycle. *J Mol Biol*, 2001, 313(5): 1117–1125.
- [17] Jaramillo ML, Abanto M, Quispe RL, et al. Cloning, expression and bioinformatics analysis of ATP sulfurylase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in *Escherichia coli*. *Bioinformatics*, 2012, 8(15): 695–704.
- [18] Wang XB, Zhang ZY, Ma XY, et al. Real-time fluorescence assays of alkaline phosphatase and ATP sulfurylase activities based on a novel PPi fluorescent probe. *Talanta*, 2015, 137: 156–160.
- [19] Mugford SG, Matthewman CA, Hill L, et al. Adenosine-5'-phosphosulfate kinase is essential for *Arabidopsis* viability. *FEBS Lett*, 2010, 584(1):

- 119–123.
- [20] Schiffmann S, Schwenn JD. APS-sulfotransferase activity is identical to higher plant APS-kinase (EC 2.7.1.25). *Febs Lett*, 1994, 355(3): 229–232.
- [21] Ravilious GE, Herrmann J, Lee SG, et al. Kinetic mechanism of the dimeric ATP sulfurylase from plants. *Biosci Rep*, 2013, 33(4): e00053.
- [22] Herrmann J, Nathin D, Lee SG, et al. Recapitulating the structural evolution of redox regulation in adenosine 5'-phosphosulfate kinase from cyanobacteria to plants. *J Biol Chem*, 2015, 290(41): 24705–24714.
- [23] Ravilious GE, Westfall CS, Jez JM. Redox-linked gating of nucleotide binding by the N-terminal domain of adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *J Biol Chem*, 2013, 288(9): 6107–6115.
- [24] Ravilious GE, Nguyen A, Francois JA, et al. Structural basis and evolution of redox regulation in plant adenosine-5'-phosphosulfate kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(1): 309–314.
- [25] Schriek U, Schwenn JD. Properties of the purified APS-kinase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, 1986, 145(1): 32–38.
- [26] An CY, Zhao L, Wei ZJ, et al. Chemoenzymatic synthesis of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate coupling with an ATP regeneration system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(20): 7535–7544.
- [27] Logan HM, Cathala N, Grignon C, et al. Cloning of a cDNA encoded by a member of the *Arabidopsis thaliana* ATP sulfurylase multigene family: expression studies in yeast and in relation to plant sulfur nutrition. *J Biol Chem*, 1996, 271(21): 12227–12233.
- [28] Luo J, Wu WJ, Zou BJ, et al. Expression and purification of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* and its application in pyrosequencing//Zhou GH, Song QX, Eds. *Advances and Clinical Practice in Pyrosequencing*. New York: Springer, 2016: 187–195.
- [29] Cumming M, Leung S, McCallum J, et al. Complex formation between recombinant ATP sulfurylase and APS reductase of *Allium cepa* (L.). *Febs Lett*, 2007, 581(22): 4139–4147.
- [30] Zhu L, Deng WW, Ye AH, et al. Cloning of two cDNAs encoding a family of ATP sulfurylase from *Camellia sinensis* related to selenium or sulfur metabolism and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Physiol Bioch*, 2008, 46(8/9): 731–738.
- [31] Bao FF, Yan HH, Sun HJ, et al. Hydrolysis of by-product adenosine diphosphate from 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate preparation using Nudix hydrolase NudJ. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(24): 10771–10778.
- [32] Zhou XX, Chandarajoti K, Pham TQ, et al. Expression of heparan sulfate sulfotransferases in *Kluyveromyces lactis* and preparation of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *Glycobiology*, 2011, 21(6): 771–780.
- [33] Leyh TS, Taylor JC, Markham GD. The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12: cloning, genetic, and enzymatic characterization. *J Biol Chem*, 1988, 263(5): 2409–2416.
- [34] Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*, 2013, 32(6): 419–425.
- [35] Bessette PH, Åslund F, Beckwith J, et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(24): 13703–13708.
- [36] Inaba K. Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J Biochem*, 2009, 146(5): 591–597.
- [37] Ito K, Inaba K. The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18(4): 450–458.
- [38] Salinas G, Pellizza L, Margenat M, et al. Tuned *Escherichia coli* as a host for the expression of disulfide-rich proteins. *Biotechnol J*, 2011, 6(6): 686–699.
- [39] Marques SM, Daniel L, Buryska T, et al. Enzyme tunnels and gates as relevant targets in drug design. *Med Res Rev*, 2017, 37(5): 1095–1139.
- [40] Malojčić G, Owen RL, Grimshaw JPA, et al. A structural and biochemical basis for PAPS-independent sulfuryl transfer by aryl

- sulfotransferase from uropathogenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(49): 19217–19222.
- [41] Berger I, Guttman C, Amar D, et al. The molecular basis for the broad substrate specificity of human sulfotransferase 1A1. PLoS ONE, 2011, 6(11): e26794.
- [42] Gamage NU, Tsvetanov S, Duggleby RG, et al. The structure of human SULT1A1 crystallized with estradiol. An insight into active site plasticity and substrate inhibition with multi-ring substrates. J Biol Chem, 2005, 280(50): 41482–41486.
- [43] Lu JH, Li HT, Zhang JP, et al. Crystal structures of SULT1A2 and SULT1A1*3: Insights into the substrate inhibition and the role of Tyr149 in SULT1A2. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(2): 429–434.
- [44] Brix LA, Barnett AC, Duggleby RG, et al. Analysis of the substrate specificity of human sulfotransferases SULT1A1 and SULT1A3: site-directed mutagenesis and kinetic studies. Biochemistry, 1999, 38(32): 10474–10479.
- [45] Zhou ZX, Li Q, Huang H, et al. A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans. Biotechnol Bioeng, 2018, 115(6): 1561–1570.
- [46] Grimshaw JPA, Stirnimann CU, Brozzo MS, et al. DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. J Mol Biol, 2008, 380(4): 667–680.
- [47] Grubb CD, Abel S. Glucosinolate metabolism and its control. Trends Plant Sci, 2006, 11(2): 89–100.
- [48] Wang JS, Gu HH, Yu HF, et al. Network of regulation and metabolism of indole glucosinolate in plants. Acta Agric Zhejiangensis, 2012, 24(4): 739–747 (in Chinese).
王建升, 顾宏辉, 虞慧芳, 等. 植物吲哚族芥子油苷的代谢调控网络. 浙江农业学报, 2012, 24(4): 739–747.
- [49] Aziz M, Nadipalli RK, Xie XT, et al. Augmenting sulfur metabolism and herbivore defense in *Arabidopsis* by bacterial volatile signaling. Front Plant Sci, 2016, 7: 458.
- [50] Yatusevich R, Mugford SG, Matthewman C, et al. Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 2010, 62(1): 1–11.
- [51] Kang Z, Zhou ZX, Wang Y, et al. Bio-based strategies for producing glycosaminoglycans and their oligosaccharides. Trends Biotechnol, 2018, 36(8): 806–818.
- [52] Szajek AY, Chess E, Johansen K, et al. The US regulatory and pharmacopeia response to the global heparin contamination crisis. Nat Biotechnol, 2016, 34(6): 625–630.
- [53] Zhang X, Pagadala V, Jester HM, et al. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin oligosaccharides and NMR analysis: paving the way to a diverse library for glycobiochemists. Chem Sci, 2017, 8(12): 7932–7940.
- [54] Liu J, Linhardt RJ. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin. Nat Prod Rep, 2014, 31(12): 1676–1685.
- [55] Li XY. Study on efficient preparation of several key enzymes and its mutienzymatic reaction engineering for heparin biosynthesis[D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
李晓燕. 生物酶法合成肝素的多种关键酶制备和酶反应工程研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2016.
- [56] Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(10): 4719–4733.
- [57] Habicher J, Haitina T, Eriksson I, et al. Chondroitin/dermatan sulfate modification enzymes in zebrafish development. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0121957.
- [58] Pomin VH. Keratan sulfate: an up-to-date review. Int J Biol Macromol, 2015, 72: 282–289.
- [59] Kuberan B, Lech MZ, Beeler DL, et al. Enzymatic synthesis of antithrombin III-binding heparan sulfate pentasaccharide. Nat Biotechnol, 2003, 21(11): 1343–1346.
- [60] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, et al. Human schistosomiasis. Lancet, 2014, 383(9936): 2253–2264.

- [61] Carson JP, Ramm GA, Robinson MW, et al. Schistosome-induced fibrotic disease: the role of hepatic stellate cells. *Trends Parasitol*, 2018, 34(6): 524–540.
- [62] Anderson TJC, LoVerde PT, Le Clec'h W, et al. Genetic crosses and linkage mapping in schistosome parasites. *Trends Parasitol*, 2018, 34(11): 982–996.
- [63] Valentim CL, Cioli D, Chevalier FD, et al. Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in schistosome parasites. *Science*, 2013, 342(6164): 1385–1389.
- [64] Taylor AB, Roberts KM, Cao XH, et al. Structural and enzymatic insights into species-specific resistance to schistosome parasite drug therapy. *J Biol Chem*, 2017, 292 (27): 11154–11164.
- [65] Chu LL, Dhakal D, Shin HJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of naringenin 7-sulfate and its biological activities. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1671.
- [66] Rivoal J, Hanson AD. Choline-O-sulfate biosynthesis in plants (identification and partial characterization of a salinity inducible choline sulfotransferase from species of limonium (plumbaginaceae). *Plant Physiol*, 1994, 106(3): 1187–1193.
- [67] Hirschmann F, Krause F, Papenbrock J. The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 556.
- [68] Guo Y, Hu BF, Huang H, et al. Estrogen sulfotransferase is an oxidative stress responsive gene that gender-specifically affects liver ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem*, 2015, 290(23): 14754–14764.
- [69] Mungenast F, Aust S, Vergote I, et al. Clinical significance of the estrogen-modifying enzymes steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4047–4054.
- [70] Mueller JW, Idkowiak J, Gesteira TF, et al. Human DHEA sulfation requires direct interaction between PAPS synthase 2 and DHEA sulfotransferase SULT2A1. *J Biol Chem*, 2018, 293(25): 9724–9735.
- [71] Foster PA, Mueller JW. Sulfation pathways: insights into steroid sulfation and desulfation pathways. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61(2): T271–T283.
- [72] Teramoto T, Fujikawa Y, Kawaguchi Y, et al. Crystal structure of human tyrosylprotein sulfotransferase-2 reveals the mechanism of protein tyrosine sulfation reaction. *Nat Commun*, 2013, 4: 1572.
- [73] Hartmann-Fatu C, Bayer P. Determinants of tyrosylprotein sulfation coding and substrate specificity of tyrosylprotein sulfotransferases in metazoans. *Chem-biol Interact*, 2016, 259: 17–22.

(本文责编 陈宏宇)