

# 蛋白磷酸酶抑制剂变构霉素的生物合成 及其抑制位点研究

柴小涛 陈小龙 郑裕国\* 沈寅初

(浙江工业大学生物与环境工程学院 生物工程研究所 浙江 杭州 310014)

**摘要:** 变构霉素具有很强的蛋白磷酸酶抑制作用和良好的抗菌活性, 尤其是对油菜菌核病的抑制作用。本文综述了近年来有关变构霉素生物合成和蛋白磷酸酶抑制位点方面的最新研究进展。

**关键词:** 蛋白磷酸酶, 变构霉素, 生物合成, 抑制

## Biosynthesis of Tautomycin and Its Inhibition Region of Protein Phosphatase

CHAI Xiao-Tao CHEN Xiao-Long ZHENG Yu-Guo\* SHEN Yin-Chu

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

**Abstract:** Tautomycin is one of well-known specific protein phosphatase inhibitors and exhibiting potent antifungal ability, especially to *Sclerotinia sclerotium*. This article reviews the recent research progress of tautomycin, focusing on its inhibition region and biosynthesis.

**Keywords:** Protein phosphatase, Tautomycin, Biosynthesis, Inhibition

变构霉素(Tautomycin, TTM), 又称互变霉素。上世纪 60 年代上海农药所的学者在筛选抗油菜菌核病的抗生素时, 从放线菌 *Streptomyces spiroverticillatus* 的发酵产物中分离得到。1987 年, 在和日本的 Isono 研究小组合作下, 初步测定了它的结构<sup>[1,2]</sup>。1990 年, 该研究小组完全鉴定了变构霉素的结构, 化学式为 C<sub>41</sub>H<sub>66</sub>O<sub>13</sub>, 相对分子量 766, 有 13 个手性中心, 化学结构中含有独特的顺丁烯二酸酐和螺缩酮结构(图 1)<sup>[3]</sup>。变构霉素是白色的无定形粉末状固体, 160°C 开始逐渐分解, 具有旋光性,  $[\alpha]_D^{20} + 3.5^\circ$  (C=1, CHCl<sub>3</sub>), 溶于甲醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲

烷和苯, 难溶于水和正己烷。UV  $\lambda_{\max}=210$  nm, 在 250 nm 有一个肩峰<sup>[1]</sup>。

变构霉素有很好的抗菌活性, 抗真菌作用比较突出, 尤其是对油菜菌核病菌(IC<sub>50</sub> 为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 而抗细菌作用比较小<sup>[1]</sup>。此外, 变构霉素也是一种选择性丝/苏氨酸蛋白磷酸酶抑制剂, 能引起人体白血病细胞 K562 形态改变。目前作为一种重要的分子工具被用来研究分子内信号传导途径<sup>[2,4]</sup>。由于变构霉素具有多种生物活性, 因此研究和开发变构霉素的工作引起了许多科学家的重视。尤其是变构霉素对蛋白磷酸酶的选择性抑制作用, 已成为世界上的

基金项目: 浙江省科技厅重大专项(No. 2007C12088); 浙江省教育厅重点项目(No. 20060855)

\*通讯作者: Tel: 86-571-88320379; E-mail: zhengyg@zjut.edu.cn

收稿日期: 2009-02-24; 接受日期: 2009-04-09

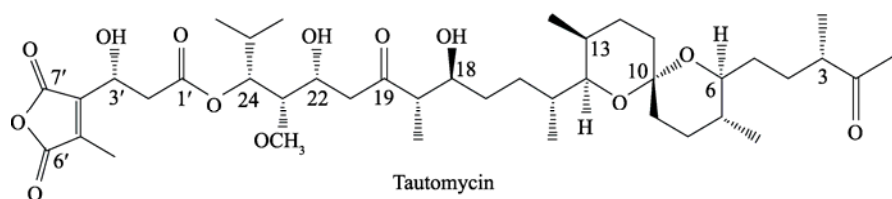


图 1 变构霉素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of tautomycin

一个研究热点。

## 1 生物合成

为了研究变构霉素的生物合成, 1995年 Isono 研究小组<sup>[5]</sup>通过同位素标记前体喂养实验研究了产变构霉素菌株 *S. spiroverticillatus* sp. JC-84-44 的生物合成途径, 推断出变构霉素的生物合成分为两个部分: 先分别合成左边的二烷基马来酸酐结构和右边的聚酮链, 然后两部分脱水形成酯键连接。二烷基马来酸酐由一个丙酸和 C-5 单位合成。C-1' 和 C-7' 来自 [1-<sup>13</sup>C] 标记的乙酸, 2', 3', 4' 位上的碳原子来自 [2-<sup>13</sup>C] 标记的乙酸, 这表明这个 C-5 单位可能来自乙酸经由三羧酸循环得到的  $\alpha$ -酮戊二酸。 $\alpha$ -酮戊二酸的酮基和丙酰 CoA 的活性亚甲基发生醛醇缩合反应脱水形成双键, 然后在 C-3' 位上水合羟化。聚酮链从异丁酸出发, 外加 1 个羟乙酸、5 个乙酸和 5 个丙酸单位经由聚酮途径合成。末端的甲基碳(C-1)来自 [2-<sup>13</sup>C] 标记的乙酸, 甲基酮可能是乙酸分子经过脱羧形成的。

后来, Li 等<sup>[6]</sup>为了阐明与变构霉素分子结构特征相关的生物合成机制, 从 *S. spiroverticillatus* 中分离和鉴定了变构霉素的生物合成基因簇, 并通过基因失活和互补实验证实了这些参与变构霉素生物合成的基因。变构霉素的基因簇定位于一个 86 kb 大小的 DNA 区域, 它由 20 个开放阅读框构成, 这些阅读框编码的蛋白包括 3 个聚酮合成酶 I (TtmHJ), 1 个硫酸酯酶 II (TtmT), 5 个合成甲氧丙二酰-S-ACP 的酶 (TtmABCDE), 8 个调控和合成二烷基马来酸酐的酶 (TtmKLMNOPRS), 还有 2 个调控蛋白 (TtmF 和 TtmQ) 和 1 个修饰酶 (TtmG)。根据从序列分析得出的功能分配提出了变构霉素生物合成的模型 (图 2), 这个模型与 Isono 研究小组报道的同位素标记实验相吻合, 并且由活体基因失活实验所验证<sup>[7]</sup>。

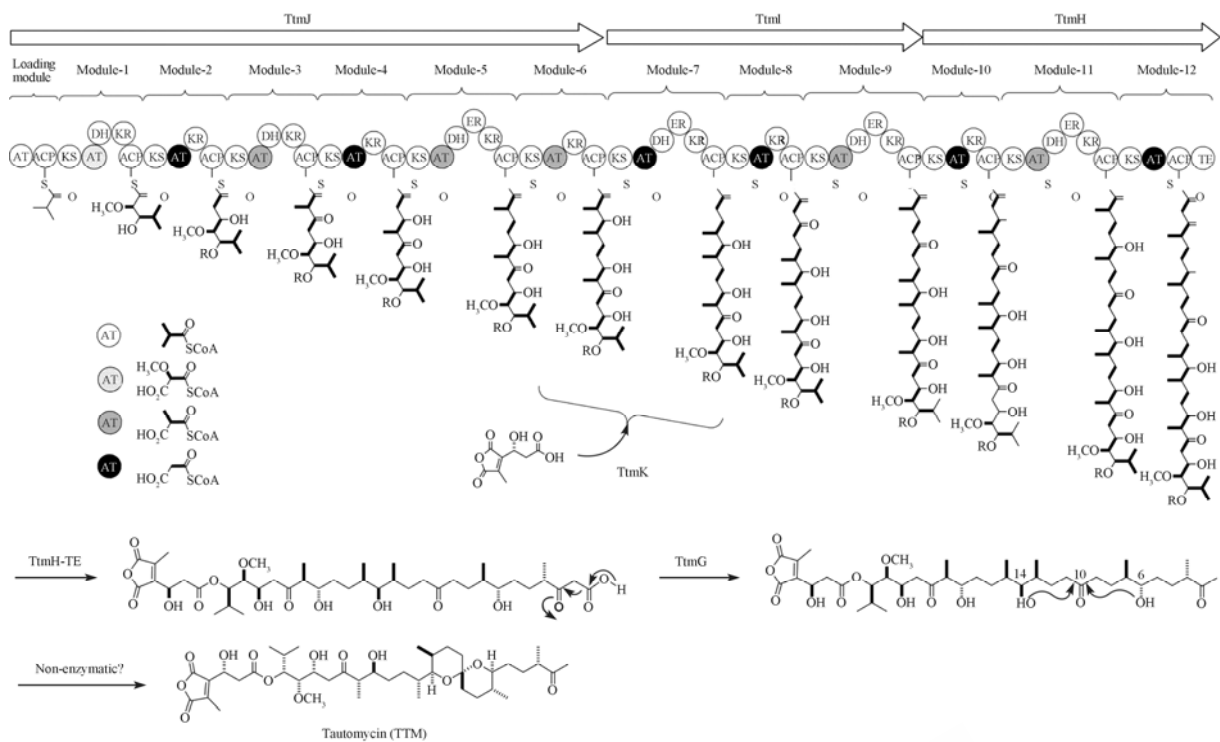
Li<sup>[6]</sup>报道了甲氧丙二酰 ACP 生物合成基因是变

构霉素合成的所必需的。甲氧丙二酰 ACP 生物合成的基因座包含 5 个基因: *ttmC*, *ttmA*, *ttmD*, *ttmB* 和 *ttmE*。这 5 个基因决定了变构霉素的聚酮链由 3 个 PKSs I (TtmHJ) 催化合成。通过与已知 PKSs 的序列同源性推导出变构霉素 PKS 可能的功能和结构域<sup>[8-11]</sup>。在 PKSs I (TtmHJ) 催化作用下, 聚酮主链以异丁酰 CoA 为起始单位, 1 个甲氧丙二酰 ACP、6 个丙二酰单酰 CoA 和 5 个甲基丙二酰 CoA 为延伸单位, 经过 12 次脱羧缩合而成。

TtmO 催化的甲氧丙二酰 CoA 和  $\alpha$ -酮戊二酸的  $\alpha$ -羰基的醛醇缩合反应启动了二烷基马来酸酐合成过程。TtmP (丙酮酸 CoA 转移酶) 和 TtmR (丙酮酸脱水酶) 分别参与了随后的 CoA 释放和脱水反应。TtmM 催化 C-3' 位的羟化作用, 然后经 TtmK (酯酶的同系物) 酯化偶联到聚酮链上。TtmN 的作用是作为一个细胞的能量水平的检测剂来调控二烷基马来酸酐结构的生物合成。

Ikeda<sup>[12]</sup>和 Frank 等<sup>[13]</sup>研究发现含螺缩酮结构的阿维菌素和 Spirangienes 的生物合成基因簇中没有调控合成螺缩酮的基因, 通过与阿维菌素和 Spirangienes 的合成基因簇的组织类比也没有找到变构霉素生物合成基因簇中有此类基因。因此推测变构霉素中螺缩酮的形成可能是一个自发过程, 但也不排除变构霉素合成基因簇之外的基因编码的酶催化了该反应。

变构霉素生物合成有两个关键的修饰步骤, 分别是聚酮链末端甲基酮的形成和二烷基马来酸酐结构与聚酮链中间体 C-24 位上的羟基酯化偶联。TtmK 同来源于 *Bacillus* sp. BP-7 酯酶同系物 EstA1 (CAB93516)<sup>[14]</sup> 的功能一样, 也是一种酯化酶, 它催化 2 个片段发生酯化作用偶联。TtmG (丙酮酸脱羧酶) 的同系物是来源于 *Parvibaculum lavamentivorans* 的羧基粘糠酸内酯脱水酶 Plav\_1659<sup>[15]</sup>, 功能是催化聚酮链中间体发生脱羧作用形成甲基酮。

图2 变构毒素的生物合成基因簇结构<sup>[7]</sup>Fig. 2 Biosynthesis gene cluster of tautomycin<sup>[7]</sup>

Li 等<sup>[7]</sup>研究发现钝化编码二烷基马来酸酐合成的基因后, 发酵不能得到变构毒素, 反而合成了变构毒素的聚酮链结构和相关的代谢产物, 这表明二烷基马来酸酐单位合成后与聚酮长链发生酯化偶联, 而不是与一段聚酮链偶联后聚酮链不断延伸加长。

## 2 蛋白磷酸酶抑制位点

变构毒素作为一种选择性抑制 PP1 的天然小分子抑制剂, 从发现至今一直吸引众多科学家对此开展研究。

变构毒素最早被认为是类似于佛波醇的 PKC 活化剂。但是, 变构毒素不与佛波醇酯竞争结合到细胞上, 在体内不能明显的激活 PKC<sup>[16]</sup>。Magae<sup>[17]</sup>和 MacKintosh<sup>[18]</sup>等研究发现变构毒素提高磷酸化作用是因为它对蛋白质磷酸化的抑制作用, 这种作用与冈田酸类似。进一步研究证实变构毒素是蛋白磷酸酶 PP1/PP2A 的抑制剂, 对 PP1 和 PP2A 的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.21 nmol/L 和 0.94 nmol/L, 且对 PP1 有更高的选择性抑制作用, 两种蛋白磷酸酶的选择性约为 4.9:1<sup>[19]</sup>。

1996 年 Sugiyama 等<sup>[20]</sup>发现变构毒素的二酸形式(TTMDA)才有 PP1 和 PP2A 的抑制活性, 而酸酐形式没抑制活性。构效关系研究发现, 变构毒素的

酸酐片段和 C1~C7 片段都无抑制活性, 含 C22~C26 的部分有抑制活性, 表明 C22~C26 片段在抑制蛋白磷酸酶活性方面是必需的, 酸酐部分可加强其抑制作用, 而且酸酐部分酯化可以增加 PP1 和 PP2A 的 IC<sub>50</sub>。2000 年 Takai 等<sup>[21]</sup>进一步研究发现, C22 和 C3' 位的羟基是产生抑制活性的必要结构, 而且疏水螺缩酮结构是控制蛋白磷酸酶抑制选择性的关键结构。2003 年 Liu 等<sup>[19]</sup>证实 C1'~C7' 片段是与 PP1 和 PP2A 相结合的关键结构, 不是控制抑制选择性的结构。Colby 等<sup>[22]</sup>研究发现变构毒素与 PP1 的结合模型同冈田酸是不同的。冈田酸的螺缩酮与 PP1 的 β12-β13 环多重结合形成一个假环式。变构毒素仅单一的与 β12-β13 环上的 Tyr272 残基结合, 而螺缩酮结构结合到蛋白磷酸酶的疏水凹槽 Val223 残基上。并通过合成结构类似物证明了缺失螺缩酮的冈田酸几乎没有活性, 而缺失螺缩酮的变构毒素依然保有显著的活性, 只是选择性更差了。

由于天然的变构毒素是非晶体, 因此有关变构毒素与 PP1 结合物的晶体结构很难得到。2008 年 Sydnes 等<sup>[23]</sup>在前人研究的基础上提出了一个 PP1γ 和变构毒素(二酸形式)结合物的结构模型(图 3)。变构毒素的抑制活性取决于它的功能基团能否最大程

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

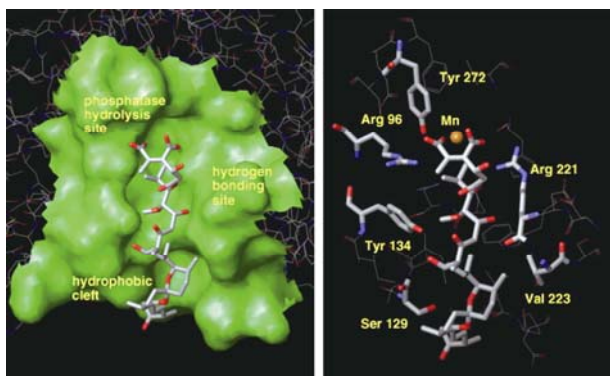


图 3 PP1 $\gamma$  和变构霉素(二酸形式)结合物的结构模型<sup>[23]</sup>

Fig. 3 Structure of PP1 $\gamma$  complexed with TTMAD<sup>[23]</sup>

度的结合到蛋白磷酸酶的 Arg96、Tyr134、Arg221 和 Tyr272 四个氨基酸残基位点上, 其中 Tyr272 氨基

酸残基是最重要的活性位点。

最近, Kelker 等<sup>[24]</sup>研究建立了 PP1-变构霉素结合物的共晶结构模型(见图 4)。根据这个结构模型将变构霉素分为 2 个功能片段: 亲水结构(C18~C7')和疏水螺缩酮结构(C1~C17)。亲水结构的马来二酸结合 PP1 的活性位点, 而疏水螺缩酮结构与 PP1 的疏水凹槽结合。C22 位的羟基和 C6'位的羧酸形成一个很强的分子间氢键, 这个氢键使二酸结构保持稳定, 从而与活性位点更加紧密牢固的结合。疏水螺缩酮通过疏水作用与 PP1 的残基 W206, V223, I133, G222, S129 和 C127 相结合。另外, PP1 的残基 W206 与 C2 位的氧之间形成一个水介导的氢键进一步加强了变构霉素与 PP1 的结合。证实了螺缩酮结构是控制抑制选择性的部位。

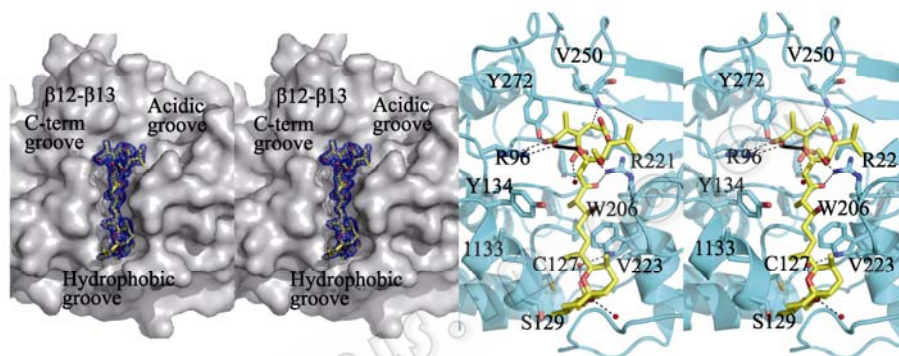


图 4 PP1-变构霉素结合物的结构模型<sup>[24]</sup>

Fig. 4 Structure of PP1-tautomycin<sup>[24]</sup>

### 3 结语

变构霉素的发现起源于直接从天然产物中筛选抗生素。它的优秀特征包括: 独特的化学结构和良好的生物活性, 具有开发为新药的潜力。目前, 国内对变构霉素的研究还很少, 国外的研究主要集中在它对蛋白磷酸酶的抑制作用方面, 而且对 PP1 的抑制位点也较明确, 这为以后开发类似结构的新 PP1 抑制剂奠定了基础。变构霉素生物合成途径的确立以及相关基因簇结构的测定为今后研究变构霉素的发酵生产提供了指导。近来, 我们研究发现, 含顺丁烯二酸酐结构的天然化合物都具有良好的生物活性。但变构霉素的毒性比较大, 限制了它的应用。因此, 一方面可以对变构霉素的结构进行修饰, 构建顺丁烯二酸酐化合物库, 为开发农药和医药服务;

另一方面可以根据变构霉素的蛋白磷酸酶抑制模型, 建立 PP1/PP2A 选择性抑制剂的筛选模型, 筛选新的蛋白磷酸酶抑制剂。目前, 我们正在开展对变构霉素结构的修饰工作, 合成了部分化合物。

### 参考文献

- [1] Cheng XC, Kihara T, Kusakabe H, *et al.* A new antibiotic, tautomycin. *Journal of Antibiotics*, 1987, **40**(6): 907-909.
- [2] Chen XL, Zheng YG, Shen YC. Natural products with maleic anhydride structure: nonadrides, tautomycin, chaetomelic anhydride, and other compounds. *Chemical Reviews*, 2007, **107**(5): 1777-1830.
- [3] Cheng XC, Ubukata M, Isono K. The structure of tautomycin, a dialkylmaleic anhydride antibiotic. *Journal of Antibiotics*, 1990, **43**(7): 809-819.
- [4] Oikawa H. Synthesis of specific protein phosphatase in-

- hibitors, tautomycin and tautomycetin toward structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry*, 2002, **9**(22): 2033–2054.
- [5] Ubukata M, Cheng XC, Uzawa J, *et al.* Biosynthesis of the dialkylmaleic anhydride-containing antibiotics, tautomycin and tautomycetin. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*, 1995, **19**: 2399–2404.
- [6] Li WL, Ju JH, Osada H, *et al.* Utilization of the methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus for cloning of the tautomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces spiroverticillatus*. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(11): 4148–4152.
- [7] Li WL, Ju JH, Rajski SR, *et al.* Characterization of the tautomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces spiroverticillatus* unveiling new insights into dialkylmaleic anhydride and polyketide biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(42): 28607–28617.
- [8] Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 2001, **18**: 380–416.
- [9] Aparicio JF, Molnar I, Schwecke T, *et al.* Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, 1996, **169**(1): 9–16.
- [10] Bevitt DJ, Cortes J, Haydock SF, *et al.* 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea* cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 1992, **204**: 39–49.
- [11] Donadio S, Katz L. Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene*, 1992, **111**: 51–60.
- [12] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, *et al.* Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 1999, **96**: 9509–9514.
- [13] Frank B, Knauber J, Steinmetz H, *et al.* Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes. *Chemistry & Biology*, 2007, **14**: 221–233.
- [14] Spiller B, Gershenson A, Arnold FH, *et al.* A structural view of evolutionary divergence. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 1999, **96**: 12305–12310.
- [15] Schleheck D, Knepper TP, Eichhorn P, *et al.* *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1<sup>T</sup> degrades centrally substituted congeners of commercial linear alkylbenzenesulfonate to sulfophenyl carboxylates and sulfophenyl dicarboxylates. *Applied Environmental Microbiology*, 2007, **73**: 4725–4732.
- [16] Magae J, Watanabe C, Osada H, *et al.* Induction of morphological change of human myeloid-leukemia and activation of protein-kinase C by a novel antibiotic, Tautomycin. *Journal of Antibiotics*, 1988, **41**(7): 932–937.
- [17] Magae J, Osada H, Fujiki H, *et al.* Respiratory burst induced by phorbol ester in the presence of tautomycin, a novel inhibitor of protein phosphatases. *Journal of Antibiotics*, 1992, **45**(2): 246–251.
- [18] Mackintosh C, Klumpp S. Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*, another potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2a. *FEBS Letters*, 1990, **277**(1-2): 137–140.
- [19] Liu W, Sheppeck JE, Colby DA, *et al.* The selective inhibition of phosphatases by natural toxins: the anhydride domain of tautomycin is not a primary factor in controlling PP1/PP2A selectivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, **13**(9): 1597–1600.
- [20] Sugiyama Y, Ohtani II, Isobe M, *et al.* Molecular shape analysis and activity of tautomycin, a protein phosphatase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1996, **6**(1): 3–8.
- [21] Takai A, Tsuboi K, Koyasu M, *et al.* Effects of modification of the hydrophobic C-1–C-16 segment of tautomycin on its affinity to type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochemical Journal*, 2000, **350**: 81–88.
- [22] Colby DA, Liu W, Sheppeck JE, *et al.* A new model of the tautomycin-PP1 complex that is not analogous to the corresponding okadaic acid structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, **13**(9): 1601–1605.
- [23] Sydnés MO, Kuse M, Kurono M, *et al.* Protein phosphatase inhibitory activity of tautomycin photoaffinity probes evaluated at femto-molar level. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, **16**(4): 1747–1755.
- [24] Kelker WS, Page R, Peti W. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of Serine/Threonine phosphatase inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 2009, **385**(1): 11–21.