



专论与综述

非典型角蕈环聚酮氧化开环酶的功能与进化

杜凤翔^{*1} 杨靖¹ 李金洋¹ 杨琳¹ 唐梦雅¹ 张岳¹ 范可强^{*2}

1 北京联合大学生物化学工程学院 生物质资源化利用北京市重点实验室 北京 100023

2 中国科学院微生物研究所 北京 100101

摘要: 非典型角蕈环聚酮化合物是一类经过氧化重排反应形成的具有独特骨架结构的芳香聚酮类化合物。近年来的研究表明, 尽管此类化合物具有多种多样的骨架结构, 它们都是由共同的生物合成中间体 Dehydrabelomycin 生成的。一个独特的加氧酶家族(称为非典型角蕈环氧化开环酶)催化了 Dehydrabelomycin 的氧化碳-碳键断裂与重排反应。尽管这些酶属于同一个蛋白质家族, 催化相同的底物发生氧化开环反应, 但是通过不同的重排方式形成了对应于各自生物合成终产物的骨架结构, 对这类化合物最终结构的形成起到了关键作用。对这一家族的加氧酶进行深入的催化功能与反应机理研究, 不仅有助于对已知芳香聚酮的结构改造与新颖骨架结构芳香聚酮的发现, 也有助于加深对于蛋白质序列进化与功能演化的认识。

关键词: 芳香聚酮, 氧化重排反应, 加氧酶

Catalysis and evolution of the ring-opening oxygenases in biosynthesis of atypical angucyclines

DU Feng-Xiang^{*1} YANG Jing¹ LI Jin-Yang¹ YANG Lin¹ TANG Meng-Ya¹
ZHANG Yue¹ FAN Ke-Qiang^{*2}

1 Beijing Union University, Biochemical Engineering College, Beijing Key Laboratory of Biomass Waste Resource Utilization, Beijing 100023, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Atypical angucyclines are a class of aromatic polyketides with unique structures and formed via oxidative rearrangement reactions. Recent studies have demonstrated that their various skeletons are derived from a common biosynthetic intermediate dehydrabelomycin. A unique family of oxygenases, atypical angucycline ring-opening oxygenases, catalyzes the oxidative carbon-carbon bond cleavage and rearrangement reactions of dehydrabelomycin, which is a critical step in the biosynthesis of these

Foundation items: Premium Funding Project for Academic Human Resources Development in Beijing Union University (BPHR2017DZ05); Practical Training Program Project for Beijing Higher Education Cross-trained High-level students; Venus Research Training College Students Program

***Corresponding authors:** DU Feng-Xiang: E-mail: flydfx@163.com

FAN Ke-Qiang: Tel: 86-10-64807800; E-mail: fankq@im.ac.cn

Received: 17-10-2018; **Accepted:** 10-01-2019; **Published online:** 16-01-2019

基金项目: 北京联合大学人才强校优选计划(BPHR2017DZ05); 北京高校高水平人才交叉培养“实培计划”毕设(科研类)项目; 启明星科研训练计划成果

***通信作者:** 杜凤翔: E-mail: flydfx@163.com

范可强: Tel: 010-64807800; E-mail: fankq@im.ac.cn

收稿日期: 2018-10-17; **接受日期:** 2019-01-10; **网络首发日期:** 2019-01-16

compounds. Although these ring-opening oxygenases belong to the same protein family, and catalyze the oxidative ring-opening reaction of the same substrate dehydrorabelomycin, different rearrangement reactions render different structures of the products, which are consistent with the skeletons of their final products. The in-depth study on the catalysis of this family of oxygenases will not only contribute to the structural modification of known aromatic polyketides and the discovery of polyketides with novel skeletons, but also help to deepen our understanding of protein sequence evolution and functional diversities.

Keywords: Aromatic polyketide, Oxidative rearrangement reaction, Oxygenase

芳香聚酮是一大类具有复杂化学结构与丰富生物活性的天然产物,是临床药物的重要来源之一,其中涌现了广谱抗生素四环素类、抗肿瘤药物阿霉素(Doxorubicin)等药物^[1-3]。根据其骨架化学结构的不同,可以分为四环类(Tetracyclines)、丁省霉素类(Tetracenomycins)、蒽环类(Anthracyclines)、角蒽环类(Angucyclines)、角形五环类(Pentangular polyphenols)等。芳香聚酮主要由 II 型聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)合成,其生物合成过程首先是最小聚酮合酶(Minimal PKS)催化短链脂肪酸辅酶 A (主要是乙酰辅酶 A 以及由其羧化得到的丙二酸单酰辅酶 A)经过克莱森缩合合成一个线性聚酮长链,再经过酮基还原酶(Ketoreductase)、环化酶(Cyclase)与芳香化酶(Aromatase)等催化形成不同还原位点及不同成环方式的稠合芳香多环骨架中间体^[2-3];随后再由各种后修饰酶进行结构修饰,引入不同的官能团,形成最终的产物结构^[2,4]。主要的后修饰酶可以分为氧化还原酶(如加氧酶、还原酶等)、基团转移酶(如糖基转移酶、甲基转移酶、酰基转移酶、卤化酶、异戊烯基转移酶、氨甲酰基转移酶与氨基转移酶等)、水解酶等^[4]。

一般来说,芳香聚酮的骨架化学结构由不同的环化酶与芳香化酶的组合决定,后修饰酶通常只是在已形成的骨架结构上引入新的官能团,并不改变环的组成方式。然而在长期研究中人们也发现,许多聚酮类天然产物的独特骨架结构是经过氧化碳-碳键断裂与重排反应形成^[5-8]。杰多霉素(Jadomycin)、醌那霉素(Kinamycin)、Gilvocarcin、Lomaiviticin、Fluostatin 等化合物(图 1),尽管骨架

结构各不相同,但是都是从相同的苯并[b]蒽环骨架结构生物合成中间体 Dehydrorabelomycin,经过 B 环氧化开环与重排反应形成的,一个独特的氧化开环酶家族催化这一关键反应^[6,9-13]。

1 氧化开环酶催化 Dehydrorabelomycin 的碳-碳键断裂与重排反应

对非典型角蒽环聚酮生物合成途径的研究,在早期主要集中于杰多霉素与 Gilvocarcin^[6]。杰多霉素是 *Streptomyces venezuelae* ISP5230/ATCC10712 在环境刺激(如热激、乙醇刺激等)下产生的一系列芳香聚酮化合物,具有苯并[b]噁唑菲啶骨架结构; Gilvocarcin 是 *Streptomyces griseoflavus* G63592 及其他链霉菌产生的一系列具有苯并[d]萘[1,2-b]吡喃-6-酮骨架结构的聚酮化合物。通过基因敲除与生物转化实验发现了一系列杰多霉素与 Gilvocarcin 生物合成中间体,如 UWM6、Prejadomycin (也称 2,3-Dehydro-UWM6)、Dehydrorabelomycin 等;通过体内、体外转化实验确定了催化生物合成的关键酶^[14-16]。

对杰多霉素生物合成的研究表明,在 *Streptomyces lividans* 中异源表达其合成基因簇中的最小聚酮合酶 JadABC、酮基还原酶 JadE、环化酶 JadD 和 JadI,可以获得具有典型角蒽环的苯并[b]蒽环骨架的生物合成中间体 UWM6 及其发生脱水与氧化反应的产物 Rabelomycin^[14]。Rix 等在杰多霉素合成基因簇中敲除加氧酶编码基因 *jadF*、*jadH* 或 *jadG* 均导致杰多霉素不再合成,并且积累 Rabelomycin、Prejadomycin、Dehydrorabelomycin

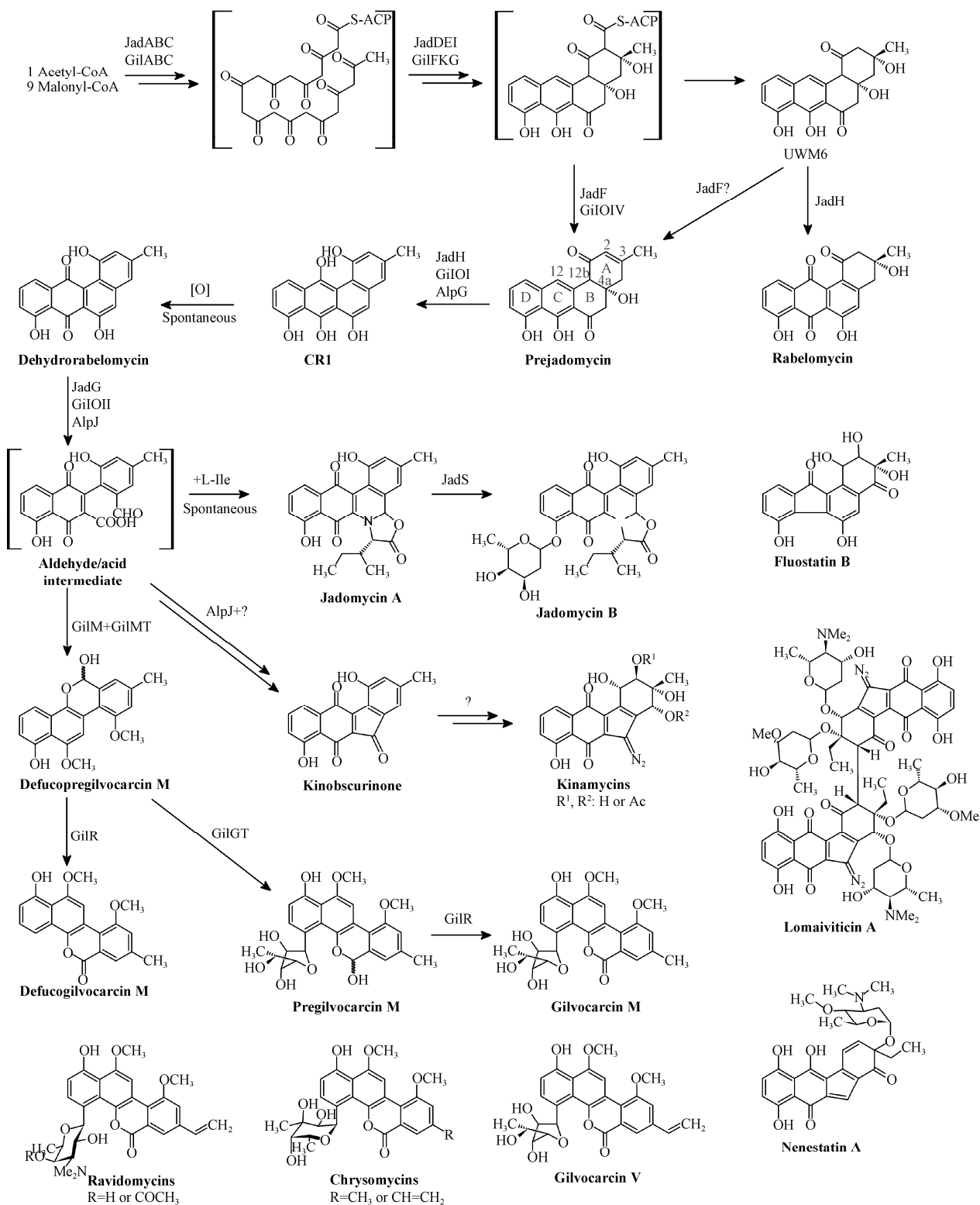


图 1 已知的非典型角萼环聚酮化合物及其生物合成途径
Figure 1 Atypical angucyclines and their biosynthetic pathways

等多种具有苯并[b]萘环骨架的产物(图 1)^[17]。Chen 等在变铅青链霉菌中异源共表达 *jadF*、*jadH* 和 *jadG* 基因, 可以转化 UWM6 或者 Prejadomycin 得到杰多霉素 A, 表明这 3 个加氧酶在杰多霉素的独特骨架生物合成途径中起到至关重要的作用^[15], 推测其中 *JadF* 催化 UWM6 发生 2,3 位脱水反应。Pahari 等对 Defucogilvocarcin M 全酶催化合成的研究显示, 仅使用参与聚酮骨架合成的酶(最小聚酮合酶 *GilAB*+*RavC*、酮基还原酶 *GilF*、丙二酸单酰辅酶 A: 酰基载体蛋白酰基转移酶 *GilP*、环化酶 *JadD* 和 *RavG*)可以合成 UWM6 与 Rabelomycin, 而再加入 *JadF* 可以合成 Prejadomycin, 作者推测 *JadF* 可能作用于仍连接在酰基载体蛋白上的 UWM6 类似物, 并催化其水解与脱羧反应得到 Prejadomycin, 从而是连接聚酮骨架合成与后修饰过程的桥梁^[18]。Chen 等通过体外酶学实验证实, *JadH* 催化 Prejadomycin 发生 12 位羟化与 4a,12b 位脱水反应生成 CR1, CR1 在空气中可以自发氧化生成 Dehydrorabelomycin^[15-16]。*JadF* 与 *JadH* 均属于 FAD 依赖的单加氧酶家族, 在各类聚酮生物合成基因簇中普遍存在^[19-20]; *JadG* 属于一个独特的加氧酶蛋白家族, 主要在非典型角萘环聚酮合成基因簇中存在^[21]。

已有的研究表明, Dehydrorabelomycin 是已知非典型角萘环聚酮生物合成共同的中间体^[6,9-13](图 1), 并且参与生物合成 Dehydrorabelomycin 的所有酶在已知的非典型角萘环聚酮合成基因簇中均保守存在^[13,15,22-31](图 2)。这表明所有的非典型角萘环聚酮化合物共享了相同的早期生物合成途径, 而 Dehydrorabelomycin 发生的 B 环氧化开环及不同的重排反应, 是这一类天然产物各不相同的骨架结构形成的关键步骤(图 1)。

在杰多霉素生物合成过程中, *JadG* 是催化氧化开环反应的关键酶。Chen 等发现, Dehydrorabelomycin 可以被最小聚酮合酶缺失的委内瑞拉链霉菌催化合成杰多霉素 A^[16]。进一步的研究显示, *jadF* 或 *jadH* 基因失活的委内瑞拉链霉

菌突变菌株 VS655 与 VS668 可以催化 Dehydrorabelomycin 生成杰多霉素 A, 而 *jadG* 基因失活的突变菌株 CH62 则不能转化^[9]。体外酶学实验显示, *JadG* 可以催化 Dehydrorabelomycin 发生 B 环氧化开环反应, 随后与 L-异亮氨酸反应生成杰多霉素 A (图 3)。反应需要 FADH₂ 或 FMNH₂ 提供还原力, 其可以利用簇内的黄素还原酶 *JadY* 催化合成, 也可以使用来自大肠杆菌的黄素还原酶 *Fre*, 暗示黄素还原酶并不直接参与氧化开环反应^[9]。*JadG* 催化的氧化开环与氨基酸掺入反应对于氨基酸没有选择性, 使用不同的天然或非天然氨基酸均可以得到相应的产物^[9]。

Tibrewal 等对 *Gilvocarcin* 合成基因簇中的 *JadG* 同源蛋白 *GilOII* 的催化功能展开了研究^[11], 研究结果表明, 在 FADH₂ 提供还原力的情况下, *GilOII* 可以催化 Dehydrorabelomycin 发生相同的氧化开环反应, 生成一个具有羟基己二烯酸内酯环的中间体(图 3), 该中间体在 *GilOII* 以及其他后修饰酶(*GilM*、*GilMT* 与 *GilR*)的辅助/存在下再经过重排过程形成 *Gilvocarcin* 骨架结构的产物 Defucogilvocarcin M; 该反应同样需要 FADH₂ 来提供还原力。Tibrewal 等依据该中间体的结构, 推测 *GilOII* 催化两步单加氧反应, 第一步为典型的苯环上的羟化反应, 第二步为 Baeyer-Villiger 型单加氧反应, 每步反应消耗一个 FADH₂^[11]。

醌那霉素(Kinamycin)是在 1970 年发现的一类具有重氮取代苯并[b]萘骨架的天然产物^[32-34]。1998 年 Gould 等报道了来源于 *Streptomyces murayamaensis* 的醌那霉素合成基因簇(*kin* 簇)的部分序列^[27]; 而完整的醌那霉素合成基因簇(*alp* 簇)直到最近才在 *Streptomyces ambofaciens* 与 *Streptomyces galtieri* SGT26 中被发现, 并通过异源表达得到确认^[26,28,35]。*KinG* 与 *AlpJ* 是已知醌那霉素合成基因簇中的 *JadG* 与 *GilOII* 同源蛋白。本研究组 Wang 等对来源于 *S. ambofaciens* 的 *AlpJ* 进行了功能研究^[10]。结果显示, 敲除 *alpJ* 基因导致醌那霉素 D 不再合成, 同时积累 Dehydrorabelomycin; 异



图 2 已知的非典型角蕈环聚酮类化合物的生物合成基因簇

Figure 2 Biosynthetic gene clusters of atypical angucyclines

注: 基因簇在 NCBI GenBank 数据库中的登录号, 以及在 MIBiG 数据库中的登录号(如果有的话)显示在基因簇说明之后; 基因簇中每个 CDS 的预测功能用不同颜色标识; 红色: 非典型角蕈环聚酮氧化开环酶; 黄色: 参与 Dehydrorabelomycin 生物合成的酶; 青色: 其他后修饰酶; 洋红色: 调控蛋白; 灰色: 与抗性相关的蛋白。

Note: The accession numbers in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database and the Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster (MIBiG) database (if has) were listed for these clusters. The colors represented the functions of each CDS. Red: Atypical angucycline ring opening oxygenases; Yellow: Enzymes involved in the biosynthesis of dehydrorabelomycin; Cyan: Other tailoring enzymes; Magenta: Regulatory proteins; Gray: Proteins related to resistance.

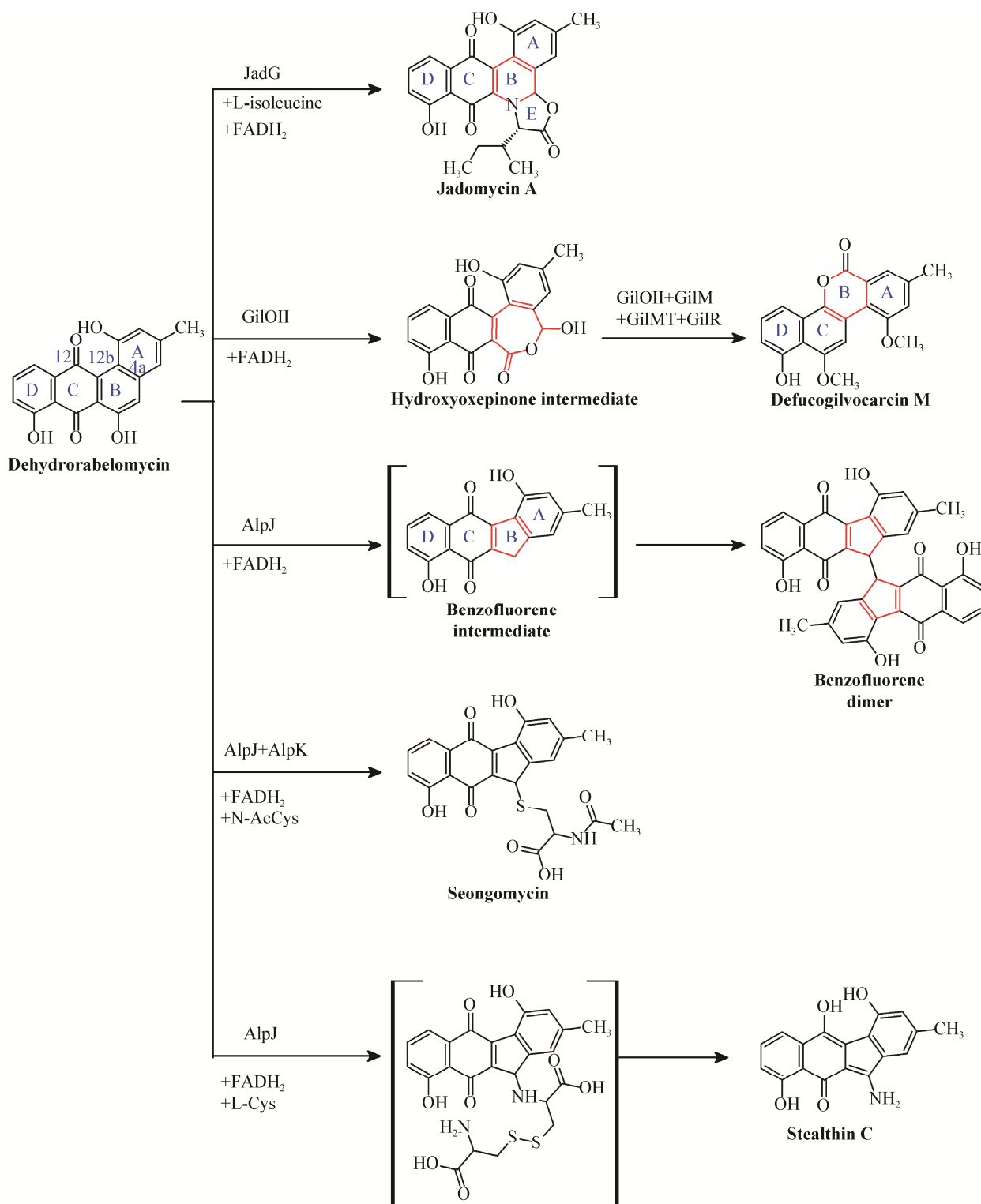


图3 JadG、GilOII及AlpJ催化的反应

Figure 3 The reactions catalyzed by JadG, GilOII or AlpJ

源表达 *alpJ* 基因的 *S. lividans* TK24 菌株可以转化 Dehydrabelomycin 得到一个副产物 PK1 (为苯并[b]茈骨架的三聚体), 而共表达 *alpJ* 及其下游基因 *alpK* (编码 FAD 依赖的单加氧酶家族蛋白, 图 3) 的 TK24 菌株可以转化 Dehydrabelomycin 生成具有苯并[b]茈骨架的副产物 Seongomycin (图 3)。体外酶学实验显示, 在 FADH_2 存在时, AlpJ 催化 Dehydrabelomycin 反应生成具有苯并[b]茈骨架的不稳定产物及其二聚体(图 3); 在 N-乙酰半胱氨酸及 NADPH 存在时, AlpJ 与 AlpK 可以催化 Dehydrabelomycin 反应生成 Seongomycin^[10]。这些结果表明 AlpJ 具有催化 Dehydrabelomycin 的 B 环氧化开环与重排生成苯并[b]茈骨架的能力, AlpK 则可能催化了苯并[b]茈骨架 5 位的羟化反应, 同时引导合成中间体向正确的下游合成酶转移^[10]。此后, Wang 等发现在半胱氨酸与 FADH_2 存在时, AlpJ 可以催化 Dehydrabelomycin 发生氧化开环反应, 并与两分子半胱氨酸反应生成一个加合物中间体, 随后经过非酶催化的硫-氮型 Smiles 重排生成 Stealthin C (图 3)^[12]。Wang 等还使用 ^{15}N 标记的半胱氨酸进行喂养实现, 发现在终产物醌那霉素 D 中并没引入 ^{15}N 标记, 因此 Wang 等怀疑半胱氨酸参与合成的 Stealthin C 可能只是醌那霉素生物合成的支路产物, 而非此前认为的生物合成中间体^[12,36]。进一步的研究表明, 在醌那霉素合成过程中形成重氮基团的两个氮原子, 以乙酰羟胺的形式转移到谷氨酸上, 然后再转移到醌那霉素合成中间体上, 从而排除了 Stealthin C 是醌那霉素合成中间体的可能^[37]。

综上所述, 尽管 JadG、GilOII 与 AlpJ 属于同一个蛋白家族, 并且都能催化 Dehydrabelomycin 的 B 环氧化开环反应, 但是其指导化合物在开环后发生不同的重排反应, 并生成骨架结构各异的产物。

2 氧化开环酶 AlpJ 的晶体结构

BLAST 搜索显示, JadG 等氧化开环酶与不依赖辅因子的蒽酮加氧酶(Cofactor-free anthrone oxygenases) TcmH^[38]、ElmH^[39]、ActVA-Orf6^[40-41] 等表现出较弱的序列相似性。值得注意的是, 蒽

酮加氧酶长度为 110 个氨基酸残基左右, 而 JadG 等氧化开环酶长度则为 200–250 残基, 其长度大致是蒽酮加氧酶的 2 倍, 并且 JadG 等的序列分成具有较弱序列相似性的两部分(序列一致性 17%–26%), 均与蒽酮加氧酶表现出较弱的序列相似性(序列一致性 17%–33%)。这一结果提示, JadG 等氧化开环酶可能起源于基因重复与融合过程。

我们研究组与刘志杰研究组合作测定了氧化开环酶 AlpJ 的晶体结构(PDB 代码 5F9P, 图 4), 显示其整体结构为 Ferredoxin-like 折叠结构二聚体^[21]。AlpJ 的单体晶体结构可以分为两个相似的结构域, N 端结构域与 C 端结构域结构叠合的 $\text{C}\alpha$ -均方根偏差($\text{C}\alpha$ -RMSD)为 0.865 Å, 表明这两个结构域非常相似^[21]。结构比较显示 AlpJ 单体晶体结构与蒽酮加氧酶 ActVA-Orf6 的二聚体晶体结构(PDB 代码 1LQ9)相似($\text{C}\alpha$ -RMSD 为 2.2 Å, 图 4)。静态光散射与分子筛实验表明, AlpJ 在溶液状态以单体形式存在^[21], 而己知 ActVA-Orf6 形成同二聚体^[40]。这些结果表明 AlpJ 在蛋白序列、结构与功能等方面与 ActVA-Orf6 二聚体相当。

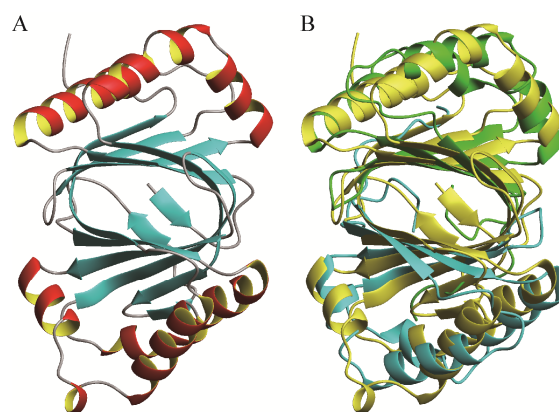


图 4 AlpJ 单体的晶体结构(A)和 AlpJ 单体与 ActVA-Orf6 二聚体结构叠合图(B)

Figure 4 The crystal structure of AlpJ monomer (A) and the superimposition of AlpJ monomer and ActVA-Orf6 dimer structures (B)

注: A: 红色与黄色部分: α -螺旋; 青色: β -折叠; 灰色: 其他; B: 黄色: AlpJ 单体晶体结构; 绿色和青色: ActVA-Orf6 二聚体晶体结构。

Note: A: Red and yellow: α -helices; Cyan: β -sheets; Gray: Others; B: Yellow: The crystal structure of AlpJ monomer; Green and cyan: The crystal structure of ActVA-Orf6 homodimer.

晶体结构与分子对接分析显示,在 AlpJ 的 N 端与 C 端结构域分别存在一个底物结合与催化区域,可能均参与催化过程。分子对接分析表明这两个底物结合口袋可以容纳底物 Dehydrabelomycin (预测结合能分别为-4.6 与-9.1 kcal/mol),但是并不足以容纳 FADH₂ 在此结合。在 N 端结构域(N60A 与 W64A)、C 端结构域(W181A)及 2 个结构域界面(H50A 与 Y178A)上的残基突变均显著影响 AlpJ 的催化活性,导致催化活性几乎完全丧失或者大幅下降,因此我们认为 N 端与 C 端结构域中的底物结合区域均参与催化过程,并且可能存在一定的协同作用^[21]。对 AlpJ 晶体结构的测定与催化关键残基的鉴定,对于氧化开环酶的催化机制研究提供了必要的线索。

3 氧化开环酶同源基因的分布及其进化

利用 BLAST 在 NCBI 的核酸序列数据库(截止到 2018 年 8 月 13 日)中搜索包含 AlpJ 同源蛋白的序列,可以得到 33 条具有较高同源性的序列(e 值小于 1×10^{-9})。序列分析显示其中均包含了 II 型聚酮合成基因簇,包括已知的 12 个非典型角蕈环聚酮生物合成基因簇,如:杰多霉素(JadG)^[42]、Gilvocarcin (GilOII)^[22]、Chrysomycin (ChryOII)^[23]、Ravidomycin (RavOII)^[23]、醌那霉素(AlpJ 及 KinG)^[26-28,35]、Lomaiviticin (Lom28 及其同源蛋白)^[30-31]、Nenestatin (Nes27)^[43]、Fluostatin (Flu17 与 FlsG)^[13,24]等(图 2,其中在 *S. ambofaciens* ATCC 23877 及 DSM 40697 菌株末端重复序列区序列与完整基因组序列中共搜索到 7 个相同的醌那霉素合成基因簇)。此外在典型角蕈环化合物 Hatomarubigin 合成基因簇中也包含一个 AlpJ 同源蛋白 HrbK,其序列相似性较低,具体催化功能也未知^[44]。其他 14 个 AlpJ 同源蛋白也位于 II 型聚酮合成基因簇中,其中两个来源于 *S. venezuelae* 不同菌株的同源蛋白序列与 JadG 完全一致,提示这两个蛋白所在的合成基因簇可能也是杰多霉素的合成基因簇,另外 12 个合成基因簇的产物结构

未知。

利用 MEGA 7 软件^[45]构建这 33 个 AlpJ 同源蛋白的进化树(邻接法),结果如图 5 所示。可以看到 HrbK 与已知的非典型角蕈环聚酮氧化开环酶的序列相似性较低(序列一致性 23%-29%)。考虑到 Hatomarubigin 仍然保留了典型角蕈环聚酮的苯并[b]蕈环骨架结构^[44,46],推测 HrbK 并不具有催化 B 环氧化开环的能力,不属于氧化开环酶。来自于 *Streptomyces actuosus* ATCC 25421 的 DMT42_11755 与 HrbK 序列相似度较高(序列一致性 62.2%),可能来源于相似的聚酮合成基因簇。而其他 AlpJ 同源蛋白则聚集成一个进化分支,表明来源于非典型角蕈环聚酮合成基因簇的氧化开环酶形成了一个独特的蛋白质家族。在其内部又大致可分成 3 个小分支,分别与不同产物骨架类型相对应(图 5)。其中来源于杰多霉素合成基因簇的同源蛋白(图中以红色标示)形成一个小分支,来源于 Gilvocarcin 类聚酮(Gilvocarcin、Chrysomycin 与 Ravidomycin)合成基因簇的同源蛋白(以橙色标示)形成另一个小分支。来源于醌那霉素、Lomaiviticin 以及 Nenestatin 合成基因簇的同源蛋白(以蓝色标示)形成一个较大的分支。这些聚酮化合物都包含了苯并[b]茛骨架,因此推测其中的氧化开环酶的催化功能与 AlpJ 相同,都可催化 Dehydrabelomycin 氧化开环并重排生成苯并[b]茛骨架产物。值得注意的是,来源于 Fluostatin 合成基因簇的氧化开环酶 Flu17 与 FlsG (以绿色标示)也位于该进化分支之中,提示 Flu17 和 FlsG 的催化功能可能与 AlpJ 相似。已有研究提示 Fluostatin 类的苯并[a]茛骨架可能由醌那霉素类的苯并[b]茛骨架经重排形成^[24,47],与我们的进化分析结果相符。

进化分析的结果还有助于推测这些未知 II 型聚酮合成基因簇的可能产物类型。如前所述,来自于 *S. actuosus* ATCC 25421 的 DMT42_11755 与 HrbK 序列相似度较高,因此该基因簇可能也是合

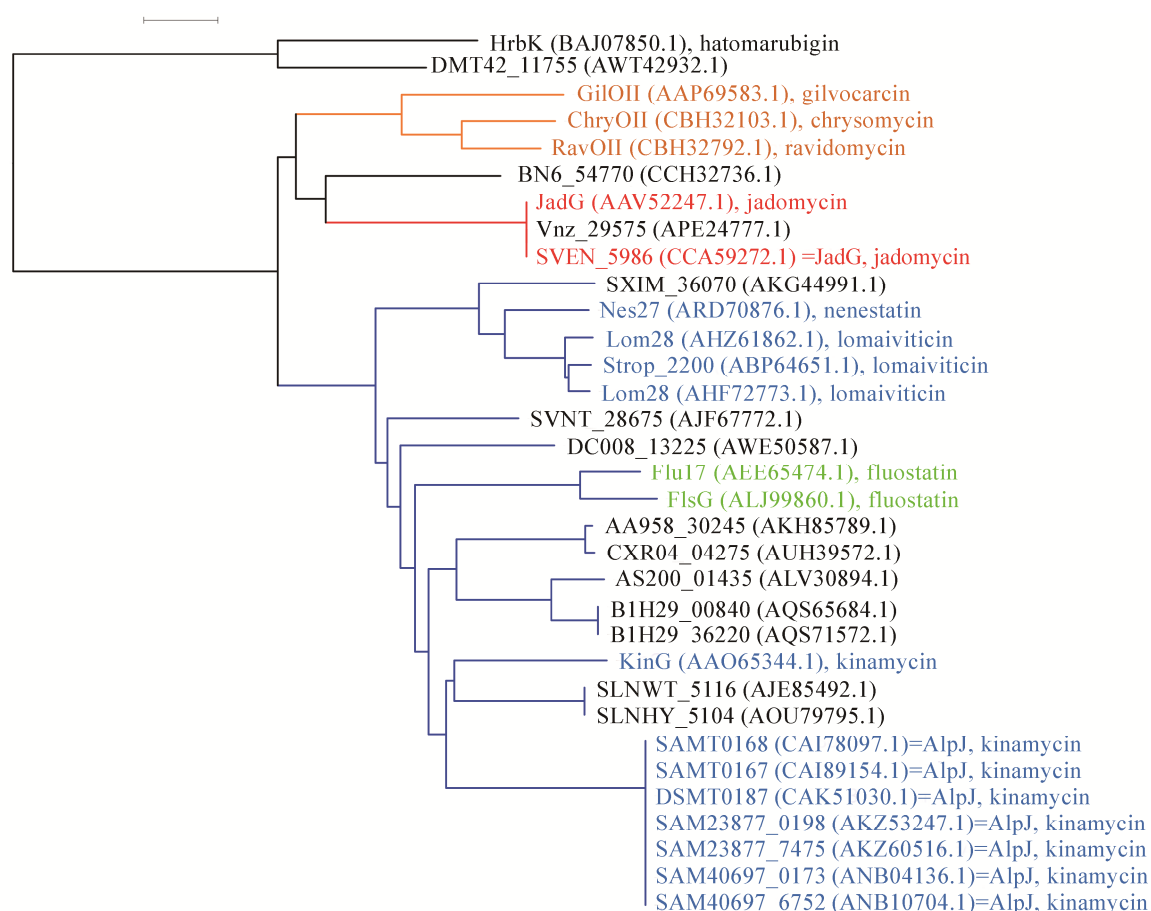


图 5 AlpJ 同源蛋白的进化分析

Figure 5 Phylogenetic analysis of AlpJ homologs

成 Hatomarubigin 类化合物; 来源于委内瑞拉链霉菌 NRRL B-65442 的 Vnz_29575 与 JadG 序列完全相同, 推测其合成产物也是杰多霉素类化合物。此外, 9 个 AlpJ 同源蛋白位于醌那霉素等苯并[b]芴骨架产物这一进化分支之中, 推测这些合成基因簇可能也催化生成这类骨架结构的天然产物。值得注意的是, 来自 *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229 的 BN6_54770 与 JadG、GilOII 等均具有中等的序列相似性(序列一致性 48%–55%), 表明 BN6_54770 可能代表一类新的非典型角蕈环聚酮骨架。对 BN6_54770 所在的生物合成基因簇或者类似基因簇进行深入研究, 有可能发现具有新骨架的芳香聚酮化合物。

4 总结与展望

非典型角蕈环聚酮化合物是经过氧化重排反应形成的一类具有多种骨架结构的芳香聚酮化合物。以 AlpJ、GilOII 与 JadG 为代表的氧化开环酶催化了氧化碳-碳键断裂与重排反应, 是这类化合物骨架结构形成的关键步骤。

尽管这些氧化开环酶属于同一个蛋白质家族, 催化相同的底物发生氧化开环反应, 但是随后的重排反应各不相同, 因而导致了不同骨架结构天然产物的生成。控制发生不同重排反应的关键因素仍然不清楚。在已有 AlpJ 晶体结构的基础上, 对这些酶的催化机制进行深入研究, 有助于揭示它们催化不同重排反应的关键控制因素, 也有

助于增加对于蛋白质序列-结构-功能进化的知识。

非典型角蕈环聚酮氧化开环酶的序列进化与其催化功能及产物结构有着密切联系。在充分认识这种关联的基础上,通过对新发现生物合成基因簇的序列分析,识别可能催化新的重排反应类型的氧化开环酶,也有助于发现具有新型骨架结构的芳香聚酮化合物。

REFERENCES

- [1] Zhang Z, Pan HX, Tang GL. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis[J]. *F1000Research*, 2017, 6: 172
- [2] Zhan JX. Biosynthesis of bacterial aromatic polyketides[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2009, 9(17): 1598-1610
- [3] Das A, Khosla C. Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42(5): 631-639
- [4] Olano C, Méndez C, Salas JA. Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(4): 571-616
- [5] Wang YS, Zhang B, Zhu JP, et al. Molecular basis for the final oxidative rearrangement steps in chartreusin biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(34): 10909-10914
- [6] Kharel MK, Pahari P, Shepherd MD, et al. Angucyclines: biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(2): 264-325
- [7] Gao GX, Liu XY, Xu M, et al. Formation of an angular aromatic polyketide from a linear anthrene precursor via oxidative rearrangement[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(7): 881-891
- [8] Yunt Z, Reinhardt K, Li AY, et al. Cleavage of four carbon-carbon bonds during biosynthesis of the griseorhodin a spiroketal pharmacophore[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(6): 2297-2305
- [9] Fan KQ, Pan GH, Peng XJ, et al. Identification of JadG as the B ring opening oxygenase catalyzing the oxidative C-C bond cleavage reaction in jadomycin biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(11): 1381-1390
- [10] Wang B, Ren JW, Li LY, et al. Kinamycin biosynthesis employs a conserved pair of oxidases for B-ring contraction[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(42): 8845-8848
- [11] Tibrewal N, Pahari P, Wang GJ, et al. Baeyer-Villiger C-C bond cleavage reaction in gilvocarcin and jadomycin biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(44): 18181-18184
- [12] Wang P, Hong GJ, Wilson MR, et al. Production of stealthin C involves an S-N-type Smiles rearrangement[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(8): 2864-2867
- [13] Feng ZY, Kim JH, Brady SF. Fluostatins produced by the heterologous expression of a TAR reassembled environmental DNA derived type II PKS gene cluster[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(34): 11902-11903
- [14] Kulowski K, Wendt-Pienkowski E, Han L, et al. Functional characterization of the *jadI* gene as a cyclase forming angucyclinones[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(9): 1786-1794
- [15] Chen YH, Wang CC, Greenwell L, et al. Functional analyses of oxygenases in jadomycin biosynthesis and identification of JadH as a bifunctional oxygenase/dehydrase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(23): 22508-22514
- [16] Chen YH, Fan KQ, He YZ, et al. Characterization of JadH as an FAD- and NAD(P)H-dependent bifunctional hydroxylase/dehydrase in jadomycin biosynthesis[J]. *ChemBioChem*, 2010, 11(8): 1055-1060
- [17] Rix U, Wang CC, Chen YH, et al. The oxidative ring cleavage in jadomycin biosynthesis: a multistep oxygenation cascade in a biosynthetic black box[J]. *ChemBioChem*, 2005, 6(5): 838-845
- [18] Pahari P, Kharel MK, Shepherd MD, et al. Enzymatic total synthesis of defucogilvocarcin M and its implications for gilvocarcin biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(5): 1216-1220
- [19] Palmu K, Ishida K, Mäntsälä P, et al. Artificial reconstruction of two cryptic angucycline antibiotic biosynthetic pathways[J]. *ChemBioChem*, 2007, 8(13): 1577-1584
- [20] Koskiniemi H, Metsä-Ketelä M, Dobritzsch D, et al. Crystal structures of two aromatic hydroxylases involved in the early tailoring steps of angucycline biosynthesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 372(3): 633-648
- [21] Pan GH, Gao XQ, Fan KQ, et al. Structure and function of a C-C bond cleaving oxygenase in atypical angucycline biosynthesis[J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(1): 142-152
- [22] Fischer C, Lipata F, Rohr J. The complete gene cluster of the antitumor agent gilvocarcin V and its implication for the biosynthesis of the gilvocarcins[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(26): 7818-7819
- [23] Kharel MK, Nybo SE, Shepherd MD, et al. Cloning and characterization of the ravidomycin and chrysomycin biosynthetic gene clusters[J]. *ChemBioChem*, 2010, 11(4): 523-532
- [24] Yang CF, Huang CS, Zhang WJ, et al. Heterologous expression of fluostatin gene cluster leads to a bioactive heterodimer[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(21): 5324-5327
- [25] Jin J, Yang XY, Liu T, et al. Fluostatins M-Q featuring a 6-5-6-6 ring skeleton and high oxidized A-rings from marine *Streptomyces* sp. PKU-MA00045[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(3): 87
- [26] Liu XY, Liu DX, Xu M, et al. Reconstitution of kinamycin biosynthesis within the heterologous host *Streptomyces albus* J1074[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(1): 72-77
- [27] Gould SJ, Hong ST, Carney JR. Cloning and heterologous expression of genes from the kinamycin biosynthetic pathway of *Streptomyces murayamaensis*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1998, 51(1): 50-57
- [28] Pang XH, Aigle B, Girardet JM, et al. Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome[J].

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(2): 575-588
- [29] Bunet R, Song LJ, Mendes MV, et al. Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of kinamycins[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(5): 1142-1153
- [30] Janso JE, Haltli BA, Eustáquio AS, et al. Discovery of the lomaiviticin biosynthetic gene cluster in *Salinispora pacifica*[J]. Tetrahedron, 2014, 70(27/28): 4156-4164
- [31] Kersten RD, Lane AL, Nett M, et al. Bioactivity-guided genome mining reveals the lomaiviticin biosynthetic gene cluster in *Salinispora tropica*[J]. ChemBioChem, 2013, 14(8): 955-962
- [32] Gould SJ. Biosynthesis of the kinamycins[J]. Chemical Reviews, 1997, 97(7): 2499-2510
- [33] Gould SJ, Tamayo N, Melville CR, et al. Revised structures for the kinamycin antibiotics: 5-diazobenzo[b]fluorenes rather than benzo[b]carbazole cyanamides[J]. Journal of the American Chemical Society, 1994, 116(5): 2207-2208
- [34] Itō S, Matsuya T, Omura S, et al. A new antibiotic, kinamycin[J]. The Journal of Antibiotics, 1970, 23(6): 315-317
- [35] Wang B, Guo F, Ren JW, et al. Identification of Alp1U and Lom6 as epoxy hydrolases and implications for kinamycin and lomaiviticin biosynthesis[J]. Nature Communications, 2015, 6: 7674
- [36] Gould SJ, Melville CR, Cone MC, et al. Kinamycin biosynthesis. synthesis, isolation, and incorporation of stealthin C, an aminobenzo[b]fluorene[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1997, 62(2): 320-324
- [37] Wang KKA, Ng TL, Wang P, et al. Glutamic acid is a carrier for hydrazine during the biosyntheses of fosfazinomycin and kinamycin[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3687
- [38] Shen B, Hutchinson CR. Tetracenomycin F1 monooxygenase: oxidation of a naphthacenone to a naphthacenequinone in the biosynthesis of tetracenomycin C in *Streptomyces glaucescens*[J]. Biochemistry, 1993, 32(26): 6656-6663
- [39] Rafanan ER, Le LD, Zhao LL, et al. Cloning, sequencing, and heterologous expression of the *elmGHIJ* genes involved in the biosynthesis of the polyketide antibiotic elloramycin from *Streptomyces olivaceus* Tü2353[J]. Journal of Natural Products, 2001, 64(4): 444-449
- [40] Sciara G, Kendrew SG, Miele AE, et al. The structure of ActVA-Orf6, a novel type of monooxygenase involved in actinorhodin biosynthesis[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(2): 205-215
- [41] Kendrew SG, Hopwood DA, Marsh EN. Identification of a monooxygenase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) involved in biosynthesis of actinorhodin: purification and characterization of the recombinant enzyme[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(13): 4305-4310
- [42] Han L, Yang KQ, Ramalingam E, et al. Cloning and characterization of polyketide synthase genes for jadomycin B biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230[J]. Microbiology, 1994, 140(12): 3379-3389
- [43] Jiang XD, Zhang QB, Zhu YG, et al. Isolation, structure elucidation and biosynthesis of benzo[b]fluorene nenestatin A from deep-sea derived *Micromonospora echinospora* SCSIO 04089[J]. Tetrahedron, 2017, 73(26): 3585-3590
- [44] Kawasaki T, Hirashima R, Maruta T, et al. Cloning and characterization of a gene cluster for hatomarubigin biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain 2238-SVT4[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(13): 4201-4206
- [45] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [46] Hayakawa Y, Ha SC, Kim YJ, et al. Studies on the isotetracenone antibiotics. IV. Hatomarubigins A, B, C and D, new isotetracenone antibiotics effective against multidrug-resistant tumor cells[J]. The Journal of Antibiotics, 1991, 44(11): 1179-1186
- [47] Proteau PJ, Li YF, Chen J, et al. Isoprekinamycin is a diazobenzo[a]fluorene rather than a diazobenzo[b]fluorene[J]. Journal of the American Chemical Society, 2000, 122(34): 8325-8326