

研究报告



阿维菌素起始酰基转移酶的底物特异性

李海伟 张法 郑舰艇*

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

摘要:【背景】阿维菌素起始酰基转移酶(AveAT₀)能够以 2-甲基丁酰-辅酶 A (coenzyme A, CoA) 和异丁酰-CoA 作为起始单元分别合成“a”系列或“b”系列的阿维菌素。【目的】探究 AveAT₀ 对两种底物的偏好性并进行改造。【方法】通过与识别不同底物的起始酰基转移酶(loading acyltransferases, AT₀s)进行序列比对, 找到 AveAT₀ 底物结合重要的氨基酸, 利用活性位点定点突变的方法得到对底物偏好性改变的特定突变体。以 2-甲基丁酰-CoA、异丁酰-CoA 的类似物 2-甲基丁酰-N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteamine, SNAC)和异丁酰-SNAC 为底物, 用 Ellman 测试法检测释放 SNAC 的游离巯基(sulfhydryl, SH), 测定 AveAT₀ 及其突变体的动力学常数, 以此表征 AveAT₀ 及其突变体的底物偏好性。【结果】AveAT₀ 对 2-甲基丁酰 SNAC 的 K_m 值为 0.4 mmol/L, k_{cat} 值为 14.1 min⁻¹, k_{cat}/K_m 为 32.1 L/(mmol·min); 对异丁酰-SNAC 的 K_m 值为 0.8 mmol/L, k_{cat} 值为 6.4 min⁻¹, k_{cat}/K_m 为 7.5 L/(mmol·min)。选定的突变位点为 V224M、Q149L、L121M。按顺序累积突变后发现三突变株 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 对两个底物的偏好性区别最大, 对 2-甲基丁酰 SNAC 的 K_m 值为 0.8 mmol/L, k_{cat} 值为 5.4 min⁻¹, k_{cat}/K_m 为 6.9 L/(mmol·min); 对异丁酰-SNAC 的 k_{cat}/K_m 为 0.1 L/(mmol·min)。【结论】研究发现了 AveAT₀ 识别底物过程中的关键氨基酸, 为改造阿维菌素聚酮合酶酰基转移酶提供了依据。

关键词: 阿维菌素, 起始模块, 酰基转移酶, 底物特异性, 聚酮合酶

Specificity of the loading acyltransferase from avermectin modular polyketide synthase

LI Hai-Wei ZHANG Fa ZHENG Jian-Ting*

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

Abstract: [Background] Under normal conditions *in vivo*, loading acyltransferase from avermectin modular polyketide synthase (AveAT₀) recruits 2-methylbutyryl-coenzyme A (CoA) or isobutyryl-CoA as starter units to synthesize avermectins of “a” series or “b” series, respectively. [Objective] We are aiming to explore the catalytic specificity of AveAT₀ on 2-methylbutyryl-SNAC and isobutyryl-SNAC, as substrate analogues of 2-methylbutyryl-CoA and isobutyryl-CoA and modify its favorability towards the former. [Methods] The protein sequences of several AT₀s were compared and residues playing important roles in

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31570056, 31770068)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34205106; E-mail: jtzheng@sjtu.edu.cn

Received: 26-03-2019; Accepted: 21-05-2019; Published online: 26-08-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31570056, 31770068)

*通信作者: Tel: 021-34205106; E-mail: jtzheng@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-26; 接受日期: 2019-05-21; 网络首发日期: 2019-08-26

protein-substrate identification were uncovered. The mutation experiments were then conducted on AveAT₀ and concentration of free sulfhydryl (SH) released from SNAC was obtained *via* Ellman test to characterize the substrate specificity of mutated enzymes. **[Results]** The K_m value of AveAT₀ towards 2-methylbutyryl-SNAC was 0.4 mmol/L, k_{cat} value was 14.1 min⁻¹ and k_{cat}/K_m value was 32.1 L/(mmol·min); the K_m value of AveAT₀ towards isobutyryl-SNAC was 0.8 mmol/L, k_{cat} value was 6.4 min⁻¹ and the k_{cat}/K_m value was 7.5 L/(mmol·min). The mutation sites were selected as V224M, Q149L and L121M. After trials in combined mutations, the specificity of a triple mutant AveAT₀ V224M/Q149L/L121M for both substrates increased. The K_m value of AveAT₀ V224M/Q149L/L121M towards 2-methylbutyryl SNAC was 0.8 mmol/L, k_{cat} value was 5.4 min⁻¹, and k_{cat}/K_m value was 6.9 L/(mmol·min); the k_{cat}/K_m towards isobutyryl-SNAC was 0.1 L/(mmol·min). **[Conclusion]** This study found key residues in AveAT₀ identification, and provided insight for the rational modification of avermectin polyketide synthase acyltransferase.

Keywords: Avermectin, Loading module, Acyltransferase, Substrate specificity, Polyketide synthase

聚酮(polyketide)是一类由细菌、真菌和植物等产生的次级代谢产物, 具有广泛的生物学和药理学活性, 包括抗细菌、抗肿瘤、抗真菌、抗寄生虫和免疫抑制等。催化聚酮合成的酶称为聚酮合酶(polyketide synthase, PKS), 根据催化中心的不同组织方式, PKS 被划分成多种不同的类型, 模块化 PKS 因结构域的模块化组织方式而得名^[1-3]。聚酮化合物的生物合成类似于脂肪酸的生物合成, 由酰基起始单元与一系列延伸单元缩合形成。与脂肪酸生物合成相比, 模块化 PKS 能够利用更多种类起始和延伸单元, 使其合成的聚酮化合物的结构更具多样性^[4]。最小延伸模块具有 3 个结构域: 酮合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶(acyltransferase, AT)和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)。AT 识别酰基底物并将其通过 ACP 转运至 KS 完成缩合反应。除此之外, 一个模块中还可能含有酮还原酶(ketoreductase, KR)、烯酰基还原酶(enoylreductase, ER)和脱水酶(dehydratase, DH)。

阿维菌素(avermectins, Ave)及其衍生物是畜牧业、农业和人类传染病领域主要的抗寄生虫剂, 由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)发酵产生^[5]。阿维菌素 PKS 是模块化的 PKS, 通过向起始单元上添加丙酸盐或乙酸盐形成阿维菌素起始糖苷配基(aglycone)^[6]。起始糖苷配基经过一系列的修饰产生阿维菌素。在天然状况下, 阿维菌素

PKS 的起始模块能够以 2-甲基丁酰-CoA (2-methylbutyryl-CoA, MB-CoA)或异丁酰-CoA (isobutyryl-CoA, IB-CoA)作为起始单元分别合成“a”系列或“b”系列的阿维菌素(图 1), 底物喂养实验发现阿维链霉菌突变株利用 40 种羧酸作为起始单元产生相应的衍生物, 例如多拉菌素(doramectin)^[7]。天然阿维菌素有 8 种组分, 组分 a 所占比例较大, 大约在 80%以上, 组分 b 则一般不超过 20%, 工业发酵生产过程不易将两者分离^[8]。

在许多大环内酯类抗生素的生物合成过程中, AT₀ 充当“守门人”的作用, 识别并且加载起始单元启动聚酮化合物的合成^[9]。有些聚酮合酶的起始模块与阿维菌素的类似, 只含有 AT₀ 和 ACP₀, 有学者将其称为 AVE 型 AT₀^[4]。与 AVE 型 AT₀ 不同, 超过半数的 PKS 起始模块都含有一个类似于 KS 的 N 末端结构域, 称为 KSQ, 此类 AT₀ 称为 KSQ 型 AT₀。KSQ 与 KS 结构非常相似, 只是催化活性位点的半胱氨酸被谷氨酰胺(Q)取代^[10]。AVE 型聚酮链的起始, 是由 AT₀ 结合酰基-CoA 底物, 将酰基传递到下一模块的 KS, 一般有着较为宽泛的底物特异性, 常见的有乙酰-CoA (acetyl-CoA, A-CoA)、丙酰-CoA (propionyl-CoA, P-CoA)、IB-CoA、MB-CoA 和 3-甲基丁酰-CoA (3-methylbutyryl-CoA, 3-MB-CoA)等。KSQ 型聚酮链的起始是通过 KSQ 催化 AT₀ 结合的二元羧酸的 CoA 进行脱羧反应, 为聚酮化合物的合成提供

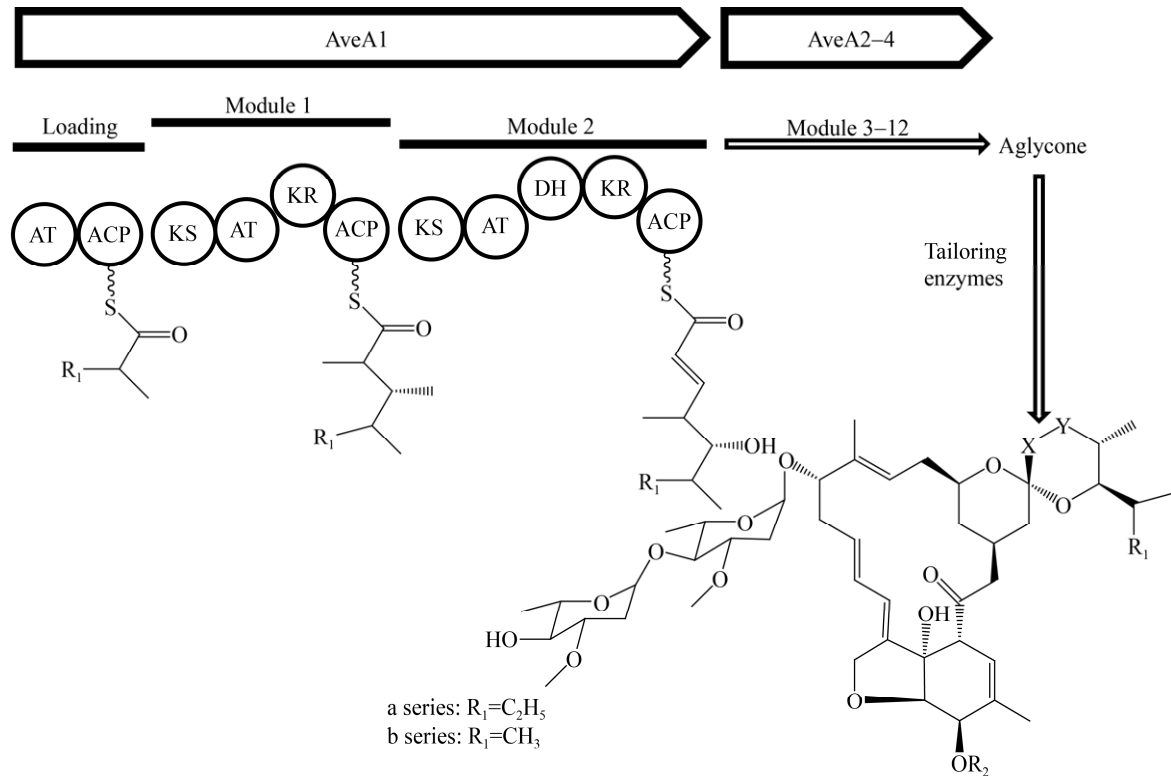


图1 阿维菌素 PKS 起始模块的 AT
Figure 1 Loading AT within avermectin PKS

乙酰或丙酰起始单元^[11]，有着严格的底物特异性，底物一般为丙二酰-CoA (malonyl-CoA, M-CoA) 或者甲基丙二酰-CoA (methylmalonyl-CoA, MM-CoA)。与延伸模块的 AT 类似，KSQ 型的 AT₀ 在其活性位点中含有保守的精氨酸^[12]。常见的 AVE 型 AT₀ 有：识别 MB-CoA 而不识别 IB-CoA 的兰卡霉素(lankamycin, Lkm)的 AT₀^[13]；以 IB-CoA 为起始单元的泰托霉素(tautomycin, Tauto)和脂霉素(lipomycin, Lip)的 AT₀^[14-15]。常见的 KSQ 型 AT₀ 有：以 M-CoA 为起始单元的多杀菌素(spinosyn)^[16] 的 AT₀；以 MM-CoA 为起始单元的莫能菌素(monensin)的 AT₀^[17]。

实验使用结构较简单的酰基-N-乙酰半胱胺(N-acetylcysteamine, SNAC) 即 MB-SNAC 和 IB-SNAC 为底物替代价格较昂贵的 MB-CoA 和 IB-CoA 进行实验^[18]。本研究中将识别不同底物的

AT₀ 进行氨基酸序列比对，找到可能影响 Ave AT₀ 底物选择性的关键氨基酸，并对其进行定点突变，得到单突变体 AveAT₀ V224M、双突变体 AveAT₀ V224M/Q149L 和三突变体 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M。通过测量突变体的水解活性和酶动力学常数，发现三突变对两种底物的偏好性增大。本研究不仅得到了底物偏好性改变的突变体，还为定向改造阿维菌素 PKS 的产物提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

Escherichia coli BL21(DE3)、*E. coli* DH10B 及重组质粒 pET-28a-AveAT₀ 均为本实验室保藏。引物如表 1 所示，由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

表 1 研究中用到的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')
V224M-F	CGCGCATGATCCCGGTGGACATGCCCCGCCACTCCCCCTG
V224M-R	GTCCACCGGGATCATGCGCGTGCACCTGCGCGGGCGG
Q149L-F	TGACGCTTTGGAGCCAGGCACTGACCACCCTTGCCGGGACC
Q149L-R	TGCCTGGCTCCAAAGCGTCACCACGCGTGC GGCGTCGG
L121M-F	GCGCGGTGCTGGGACACAGCATGGGCGAGATCGCGGCAGCC
L121M-R	GCTGTGTCCCAGCACCGCGCACGGCTCGACCCCTTGCG

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶, Thermo Fisher Scientific 公司; 质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 试剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteamine, SNAC)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB], 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 2-甲基丁酰-SNAC 和异丁酰-SNAC 合成及表征已在实验室前期论文^[4]中发表。

1.1.3 主要仪器

微量核酸蛋白分析仪 NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific 公司; 快速蛋白液相色谱 (fast protein liquid chromatography, FPLC)、聚合酶链式核酸扩增仪, Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 AT₀ 序列分析

从 NCBI 查询得到各种 AT₀ 序列, 使用软件 ClustalX 进行序列相似性分析, 并运用 MEGA 5.05 邻接法构建进化树。

1.2.2 定点突变

定点突变初始以 pET-28a-AveAT₀ 为模板, 以表 1 中的 V224M-F 和 V224M-R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×Phanta Max Buffer 25 μL, ddH₂O 19.6 μL, 二甲基亚砷(dimethyl

sulfoxide, DMSO) 2.0 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, 模板(100 ng/μL) 1 μL, 上、下游引物 (100 μmol/L)各 0.2 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μL) 1 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 6 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 Dpn I 内切酶 37 °C 消化处理 1.5 h 后, 转化进 *E. coli* DH10B 感受态细胞, 测序正确后得到单突变质粒 pET-28a-AveAT₀ V224M。以 pET-28a-AveAT₀ V224M 为模板, 表 1 中的 Q149L-F、Q149L-R 为引物构建双突变质粒 pET-28a-AveAT₀ V224M/Q149。最后, 以类似的方法构建三突变质粒 pET-28a-AveAT₀ V224M/Q149/L121M。

1.2.3 蛋白表达纯化

将构建好的表达载体质粒转化进 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 37 °C 培养过夜。挑取转化子于 50 mL LB (卡那霉素, 50 μg/mL)培养基, 37 °C、220 r/min 培养 6–8 h。按 1%的接种量转接到 1 L (卡那霉素, 50 μg/mL) LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养约 2–3 h 至 OD₆₀₀ 为 0.4 时, 将摇床降温至 16 °C, 继续培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 0.15 mmol/L, 16 °C 培养 14–16 h。4 °C、3 000×g 离心 10 min 收集菌体, 结合缓冲溶液[50 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 10% (质量体积比)甘油, pH 7.5]重悬, 超声破碎菌体。4 °C、13 000×g 离心 45 min 除去细胞碎片。上清液倒入镍亲和层析柱中, 冲洗缓冲液(结合缓冲

液加 15 mmol/L 咪唑)除去杂蛋白,洗脱缓冲液(结合缓冲液加 300 mmol/L 咪唑)将目的蛋白洗出。将初步纯化的蛋白用分子排阻 FPLC (Superdex™ 200 Increase 10/300 GL 层析柱)进行进一步纯化,除去多聚体和咪唑。纯化后的蛋白用 SDS-PAGE 检测,确定分子量及纯度。

1.2.4 生化反应

AT 能够将酰基-SNAC 和酰基-CoA 水解,得到游离的 SNAC 和 CoA。CoA 和 SNAC 含有巯基,可以用 Ellman 测试法检测。含巯基化合物与 DTNB 反应,DTNB 的二硫键断裂,产生 2-硝基-5-硫代苯甲酸(TNB⁻),在中性或碱性 pH 条件下离子化,生成 TNB²⁻二价阴离子。这种 TNB²⁻离子呈现黄色,在 412 nm 下有吸收峰。反应液加等体积的 DMSO 终止反应,之后加入等体积的 DTNB 溶液(2 mmol/L, 0.1 mol/L Tris, pH 7.5)室温反应 10 min,然后用 NanoDrop 在 412 nm 下测量的吸光度值。

$$\text{反应速度 } v = (OD_{412} / (14 \times 150 \times 1) \times 4 \times 10^6) / t$$

式中, OD_{412} 为减去对照的吸光值, t 为反应时间^[19]。

1.2.5 AveAT₀ 及突变体水解活性的测定

反应体系如下: 5 μmol/L AveAT₀, 2 mmol/L 的 SNAC 底物, 10% 甘油, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5。37 °C 反应 5 min 后加入等体积的 DMSO 终止反应,之后用 Ellman 测试法检测 OD_{412} 并求出 AveAT₀ 的反应速度 v 和 v/E_0 (E_0 为 AT 的浓度)。每个反应设置 3 个平行,将上述体系中的酶及底物换成相应缓冲液,其余保持相同作为对照。按照上述方法进一步测定单突变 AveAT₀ V224M、双突变 AveAT₀ V224M/Q149L 和三突变 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 的 v/E_0 。

1.2.6 动力学参数的测定

改变待测底物的浓度,其他反应条件与 1.2.5 相同,底物浓度从 15 μmol/L 增加至 2 000 μmol/L。将反应初速度利用软件 GraphPad Prism 6 拟合到米氏公式,得出相应底物的动力学参数。

2 结果与分析

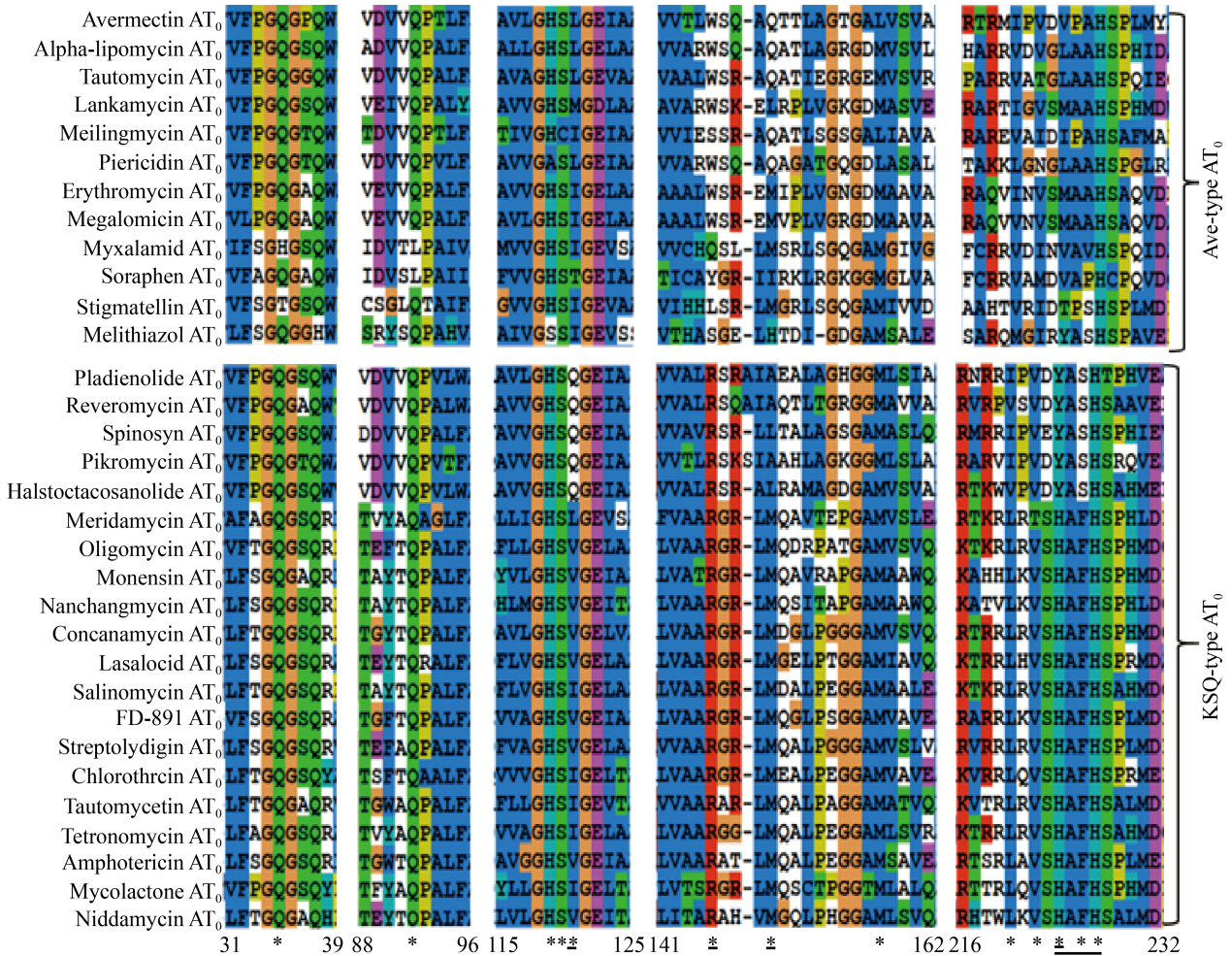
2.1 AT₀ 序列比对与定点突变

AveAT₀ 与底物 MB-SNAC 建模得到了识别底物起关键作用的 13 个氨基酸(Gln35, Gln92, His119, Ser120, Leu121, Trp145, Gln149, Leu158, Ile220, Val222, Val224, Ala226 和 His227)^[4]。使用软件 ClustalX 针对 AT₀ 的 13 个残基进同源性序列比对(图 2)。大多数 KSQ 型 AT₀ 以 M-CoA 或 MM-CoA 为起始单元。与 KSQ 型 AT₀ 相比,AVE 型 AT₀ 的底物识别残基相对不保守。KSQ 型 AT₀ 在底物结合口袋的末端含有精氨酸(145 位点,以 AveAT₀ 编号)和保守的“HAFH”或“YASH”模序(224–227 位点)。精氨酸起到稳定羧基团的作用,“HAFH”或“YASH”帮助丙二酰基或者甲基丙二酰基结合。精氨酸侧链与二羧酸硫酸酯的离子相互作用对底物的结合施加了强烈的空间限制,使得 KSQ 型 AT₀ 有着严格的底物特异性。针对 AveAT₀ 在底物识别过程中起重要作用的 13 个氨基酸,将 AveAT₀ 序列与只识别 MB-CoA 的 LkmAT₀、只识别 IB-CoA 的 TautoAT₀ 和 LipAT₀ 的序列进行比对,发现 Val224、Gln149、Leu121 可能是影响 AveAT₀ 底物选择关键的氨基酸。

系统发育树显示识别 M-CoA 的 KSQ 型 AT₀ 属于同一分支,有着较高的亲缘性;部分 AVE 型 AT₀ 和识别 MM-CoA 的 KSQ 型 AT₀ 有着一定的亲缘性,少部分 AVE 型 AT₀ 独自属于一个分支,与其他 AT₀ 亲缘关系低(图 3)。

2.2 AveAT₀ 表达和纯化

将成功构建的重组质粒 pET-28a-AveAT₀ 或其突变体导入大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中,诱导表达并收集菌体,通过镍柱亲和层析纯化,并利用快速蛋白液相色谱(FPLC)进一步去除多聚体和咪唑,最终得到的蛋白进行 SDS-PAGE 验证(图 4A),发现在约 40 kD 处有一条明显的蛋白条带,与理论大小一致^[4],FPLC 也在约 40 kD 处有单一的吸收峰(图 4B),确定为目的蛋白,表达量约为 8 mg/L。

图 2 AVE 型 AT₀ 与 KSQ 型 AT₀ 的序列比对Figure 2 Amino acid sequence alignments of AVE-type AT₀ and KSQ-type AT₀

注: 序列比对是根据 AveAT₀ 的编号。在底物识别时与酰基直接作用的氨基酸残基用“*”标记; 保守的 HFAH/YASH 和精氨酸以及突变位点用黑线标出。

Note: The alignment was numbered according to AveAT₀. The residues which directly contacted the acyl moiety of the substrate were labeled by “*”; The conserved HFAH/YASH motifs and arginine residue, as well as the mutation sites were underlined by black line.

2.3 AveAT₀ 及突变体水解活性的测定

为了检测定点突变对 AveAT₀ 水解活性的影响, 以 MB-SNAC 和 IB-SNAC 为底物, 在酶浓度已知的情况下, 通过特定的底物浓度(2 mmol/L)测得 AveAT₀ 及各个突变体对 MB-SNAC 和 IB-SNAC 的 v/E_0 。从图 5 中可以看出, 各个突变体对 MB-SNAC 和 IB-SNAC 的水解活性均有较大程度

的下降, 三突变 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 活性下降得最少。AveAT₀ 对 MB-SNAC 的 v/E_0 值是 IB-SNAC 的 2.6 倍, 而三突变 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 对 MB-SNAC 的 v/E_0 值是 IB-SNAC 的 8.7 倍(图 5)。说明三突变 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 在底物浓度为 2 mmol/L 时对 MB-SNAC 的偏好性比 AveAT₀ 强。

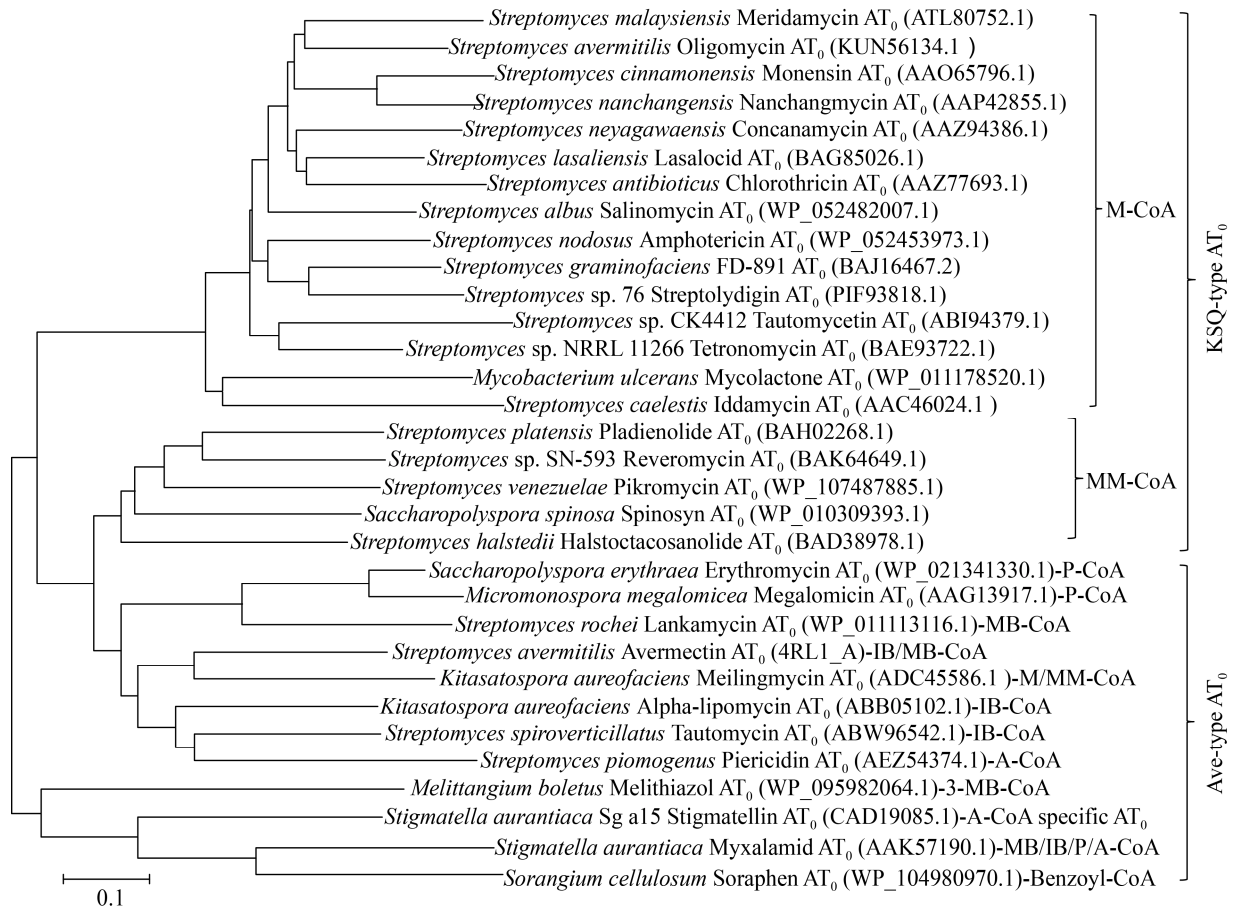


图3 AVE型AT₀与KSQ型AT₀的系统发育树

Figure 3 The phylogenetic tree of AVE-type AT₀ and KSQ-type AT₀

注: 发育树依次列出了蛋白的名称、NCBI的登录号、生物合成的起始单元; 标尺刻度: 10%的序列差异; 酰基-CoA: 底物特异性为此酰基-CoA的AT₀。

Note: The phylogenetic tree listed in turn protein names, NCBI accession numbers and starter units for each of the AT₀ domains; Bar: 10% sequence divergence; Acyl-CoA: Acyl-CoA specific AT₀.

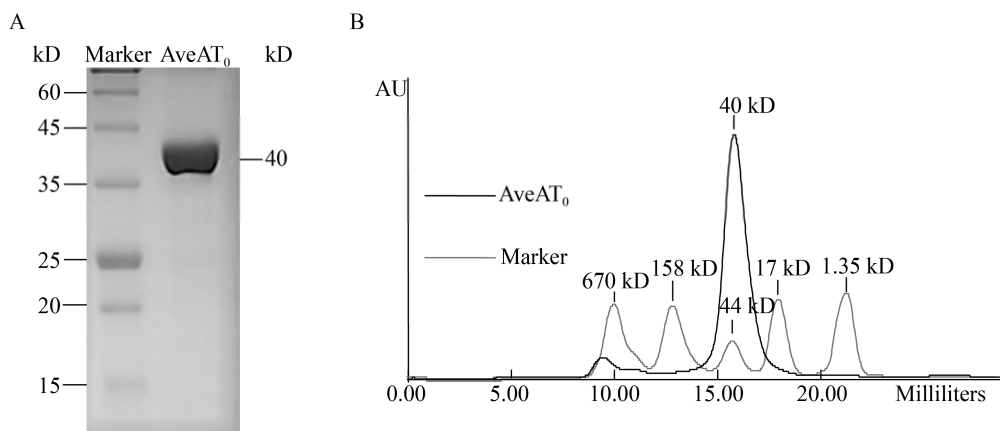


图4 AveAT₀ SDS-PAGE电泳(A)和FPLC分析(B)

Figure 4 SDS-PAGE analysis (A) and FPLC of AveAT₀ (B)

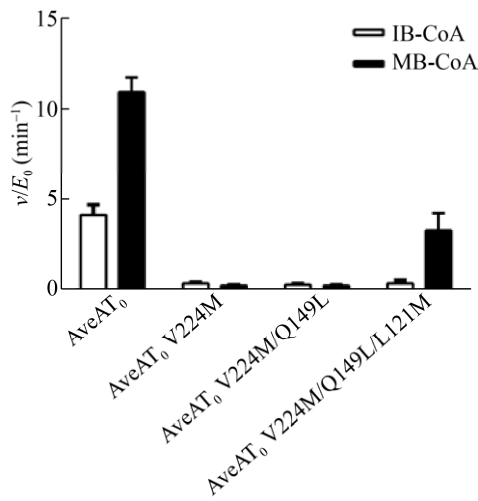


图5 AveAT₀及突变体的水解活性
Figure 5 Rates of hydrolysis by AveAT₀ and mutants

2.4 酶动力学参数

为了进一步比较 AveAT₀ 和三突变 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 对两种底物 MB-SNAC 和 IB-SNAC 的偏好程度, 分别测定了以 MB-SNAC 和 IB-SNAC 为底物时两个酶的动力学参数 (表 2)。AveAT₀ 对 MB-SNAC 的 k_{cat}/K_m 值为 32.1 L/(mmol·min), 是对 IB-SNAC [k_{cat}/K_m 为 7.5 L/(mmol·min)] 的 4.3 倍; 而三突变 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 对 MB-SNAC 的 k_{cat}/K_m 值为 6.9 L/(mmol·min), 是对 IB-SNAC 为底物 [k_{cat}/K_m 为 0.1 L/(mmol·min)] 的 60 多倍。结果显示, 三突变 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M 对 MB-SNAC 和 IB-SNAC 的 k_{cat}/K_m 差异是突变前的 10 倍以上, 对 MB-SNAC 的偏好性较突变前有提高。

表 2 SNAC 底物动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of acyl-SNAC substrates

AT domain	Substrate	k_{cat}/K_m (L/(mol·min))	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (mmol/L)
AveAT ₀	Isobutyryl SNAC	7.5±1.9	6.4±0.6	0.8±0.2
	2-Methylbutyryl SNAC	32.1±3.9	14.1±0.6	0.4±0.05
V224M/Q149L/L121M	Isobutyryl SNAC	0.1±0.03	ND	ND
	2-Methylbutyryl SNAC	6.9±2.1	5.4±0.7	0.8±0.2

注: ND: 未测量出。

Note: ND: Not determined.

3 讨论与结论

聚酮是已知的结构最多多样化的分子之一, 因具有抗菌、免疫抑制和抗癌等生物活性, 其合成机制一直是研究的热点。模块化的 PKS 是研究最多和研究最透彻的 PKS, 对其进行工程化的改造有可能产生各种新颖的化合物。运用较多的方法是进行整个模块的交换, 将其他 PKS 的模块交换于特定的 PKS 起始模块以及延伸模块中^[20]。阿维菌素起始模块成功地被引入到红霉素聚酮合酶 (deoxyerythronolide B synthase, DEBS) 的第一个模块中, 得到杂交的 PKS 基因在 *Saccharopolyspora erythraea* 中成功表达^[21]。也有研究者用来自磷霉素的独特的环己烷羧酸 (cyclohexanecarboxylic, CHC) 起始模块替换了阿维链霉菌中阿维菌素 PKS 的起始模块, 成功地改造出了多拉菌素的替代品^[22-23]。因为 AT 的底物特异性决定了聚酮化合物的侧链结构, 使得对 AT 结构域的改造成为近些年结构生物学的热点, 常用的方法是交换识别不同底物的 AT 和定点突变。例如, 用 NidAT₅ (niddamycin PKS 第 5 模块的 AT, 特异性识别乙基丙二酰-CoA) 替换红色糖多孢菌中 DEBS 上的 EryAT₄ (erythromycin PKS 第 4 模块的 AT, 特异性识别 MM-CoA), 则合成了 C-6 位乙基化的红霉素类似物^[24]。与交换 AT 结构域的改造方法相比, 定点突变因是最小程度地对 PKS 进行改变, 最大限度地减少了对蛋白-蛋白相互作用的有害干扰, 因而成为更合理工程化改造 AT 的方法。

本实验结合了结构生物学、生物信息学和分子生物学的方法进行研究,以达到对 AveAT₀ 的底物特异性进行定向的改造。根据已解出的 AveAT₀ 的结构及与底物识别起关键作用的 13 个氨基酸,我们将识别不同底物的 AT₀ 进行氨基酸序列对比,找到了在底物的识别上关键的氨基酸,并据此对 AveAT₀ 进行了定点突变。最终得到了单突变体 AveAT₀ V224M、双突变体 AveAT₀ V224M/Q149L 和三突变体 AveAT₀ V224M/Q149L/L121M。单突变体和双突变体对 MB-SNAC 和 IB-SNAC 的水解活性均远低于 AveAT₀ 的 10%,三突变对 IB-SNAC 的水解活性远低于 AveAT₀ 的 10%,但对 MB-SNAC 的水解活性可达到 AveAT₀ 的 30%。三突变对 IB-SNAC 的 k_{cat}/K_m 值是 AveAT₀ 的 1.3%,但对 MB-SNAC 的 k_{cat}/K_m 值可达到 AveAT₀ 的 21.5%,对 MB-SNAC 的偏好性较 AveAT₀ 有所提高。

目前工业生产的阿维菌素有 8 种组分。AveAT₀ 识别 MB-SNAC 生成“a”系列,识别 IB-SNAC 生成“b”系列,工业发酵生产过程不易将二者分离^[8]。本实验的研究结果对改造阿维菌素 PKS,使其定向识别预期启动单元 MB-CoA,生成特定的“a”组分的阿维菌素提供了理论基础。之后的工作中,我们计划将得到的对底物识别起重要作用的位点引入到阿维链霉菌体内,以求获得产生“a”组分比例更高的阿维菌素突变菌株。本研究对于提高阿维菌素“a”组分的生产比例,降低纯化成本、商业化生产阿维菌素提供了潜在的价值。

REFERENCES

- [1] Khosla C, Herschlag D, Cane DE, et al. Assembly line polyketide synthases: mechanistic insights and unsolved problems[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(18): 2875-2883
- [2] Xu W, Qiao KJ, Tang Y. Structural analysis of protein-protein interactions in type I polyketide synthases[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 48(2): 98-122
- [3] Dutta S, Whicher JR, Hansen DA, et al. Structure of a modular polyketide synthase[J]. *Nature*, 2014, 510(7506): 512-517
- [4] Wang F, Wang YJ, Ji JJ, et al. Structural and functional analysis of the loading acyltransferase from avermectin modular polyketide synthase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(4): 1017-1025
- [5] Yoon YJ, Kim ES, Hwang YS, et al. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6): 626-634
- [6] Zhuo Y, Zhang T, Wang Q, et al. Synthetic biology of avermectin for production improvement and structure diversification[J]. *Biotechnology Journal*, 2014, 9(3): 316-325
- [7] Dutton CJ, Gibson SP, Goudie AC, et al. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(3): 357-365
- [8] Shoop WL, Mrozik H, Fisher MH. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health[J]. *Veterinary Parasitology*, 1995, 59(2): 139-156
- [9] Crawford JM, Vagstad AL, Whitworth KP, et al. Synthetic strategy of nonreducing iterative polyketide synthases and the origin of the classical “starter-unit effect”[J]. *ChemBioChem*, 2008, 9(7): 1019-1023
- [10] Bisang C, Long PF, Corte's J, et al. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases[J]. *Nature*, 1999, 401(6752): 502-505
- [11] Long PF, Wilkinson CJ, Bisang CP, et al. Engineering specificity of starter unit selection by the erythromycin-producing polyketide synthase[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(5): 1215-1225
- [12] Oefner C, Schulz H, D'Arcy A, et al. Mapping the active site of *Escherichia coli* malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase (FabD) by protein crystallography[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2006, 62(6): 613-618
- [13] Arakawa K, Kodama K, Tatsuno S, et al. Analysis of the loading and hydroxylation steps in lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(6): 1946-1952
- [14] 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[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(42): 28607-28617
- [15] Bihlmaier C, Welle E, Hofmann C, et al. Biosynthetic gene cluster for the polyenoyltetramic acid α -lipomycin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(6): 2113-2121
- [16] Waldron C, Matsushima P, Rosteck Jr PR, et al. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(5): 487-499
- [17] Leadlay PF, Staunton J, Oliynyk M, et al. Engineering of complex polyketide biosynthesis—insights from sequencing of the monensin biosynthetic gene cluster[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 27(6): 613-625

- 360-367
- [18] Dong SS, Wang YJ, Ji JJ, et al. Heterologous expression and characterization of a thermostable acyl-CoA synthetase[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(9): 1477-1485 (in Chinese)
董爽爽, 王衍杰, 季俊杰, 等. 热稳定酯酰辅酶 A 合成酶的异源表达及酶学特性[J]. *微生物学报*, 2016, 56(9): 1477-1485
- [19] Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, 373(4/5): 266-276
- [20] Musiol-Kroll EM, Wohleben W. Acyltransferases as tools for polyketide synthase engineering[J]. *Antibiotics*, 2018, 7(3): 62
- [21] Marsden AFA, Wilkinson B, Cortés J, et al. Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase[J]. *Science*, 1998, 279(5348): 199-202
- [22] Palaniappan N, Kim BS, Sekiyama Y, et al. Enhancement and selective production of phoslactomycin B, a protein phosphatase IIa inhibitor, through identification and engineering of the corresponding biosynthetic gene cluster[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(37): 35552-35557
- [23] Ghatge M, Palaniappan N, Das Choudhuri S, et al. Genetic manipulation of the biosynthetic process leading to phoslactomycins, potent protein phosphatase 2A inhibitors[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, 33(7): 589-599
- [24] Stassi DL, Kakavas SJ, Reynolds KA, et al. Ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(13): 7305-7309



征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物学、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2020 年每册定价 130 元, 全年 1560 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

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

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413