

研究报告

Streptomyces aidingensis CGMCC 4.5739 中环二肽氧化酶 DmtD3_E3 的体外生化功能

姜玥辰, 姚婷婷, 袁伟程, 李文利*

中国海洋大学医药学院 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

姜玥辰, 姚婷婷, 袁伟程, 李文利. *Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739 中环二肽氧化酶 DmtD3_E3 的体外生化功能[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4608-4616

Jiang Yuechen, Yao Tingting, Yuan Weicheng, Li Wenli. *In vitro* biochemical function of cyclodipeptide oxidase DmtD3_E3 from *Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4608-4616

摘要: 【背景】环二肽合酶(cyclodipeptide synthase, CDPS)途径中新颖后修饰酶的挖掘对获得结构新颖活性良好的二酮哌嗪类化合物具有重要意义。前期研究中发现来源于 *Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739 的环二肽合酶基因簇 *dmt3* 中 *dmtA3B3C3* 可编码二酮哌嗪—萜类化合物 drimentines (DMTs), 推测其下游环二肽氧化酶基因 *dmtD3_E3* 也参与了 DMTs 的生物合成, 但其功能一直未鉴定。【目的】对 *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 中环二肽合酶基因簇 *dmt3* 内的环二肽氧化酶 DmtD3_E3 的功能进行表征, 为增加二酮哌嗪类化合物结构多样性提供功能元件。【方法】从 *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 的基因组中克隆环二肽氧化酶基因 *dmtD3_E3*, 构建重组表达质粒 pWL1209, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中可溶性表达。通过建立体外酶促反应, 运用液质联用(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)等方法确定催化产物结构。【结果】环二肽氧化酶 DmtD3_E3 可催化环二肽 *cyclo*-(L-Trp-L-Leu) (cWL) 的 C14–C17 位氧化脱氢形成 *cyclo*-(L-Trp-L- Δ Leu) (cW Δ L)。此外 DmtD3_E3 还可以催化环二肽 *cyclo*-(L-Trp-L-Ala) (cWA) 的 C10–C11 位脱氢生成 *cyclo*-(L-Trp-L- Δ Ala) (c Δ WA), 具有底物宽泛性。【结论】本研究通过对环二肽合酶生物合成途径中新颖环二肽氧化酶的挖掘和表征, 为后续通过组合生物合成及合成生物学手段生成“非天然”二酮哌嗪类化合物衍生物奠定了基础。

关键词: 环二肽氧化酶; *Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739; 二酮哌嗪类化合物; 环二肽合酶生物合成途径

基金项目: 国家自然科学基金(32070054, 31900049, 81991525)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32070054, 31900049, 81991525)

*Corresponding author: E-mail: liwenli@ouc.edu.cn

Received: 2022-03-22; Accepted: 2022-04-19; Published online: 2022-05-10

***In vitro* biochemical function of cyclodipeptide oxidase DmtD3_E3 from *Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739**

JIANG Yuechen, YAO Tingting, YUAN Weicheng, LI Wenli*

Key Laboratory of Marine Drugs of Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

Abstract: [Background] The establishment of cyclodipeptide synthase (CDPS)-associated tailoring enzymes offers particular promise for the generation of diketopiperazines with novel structures and good bioactivities. In the previous studies, coded diketopiperazines of the *dmtA3B3C3* in CDPS gene cluster-terpenoid drimentines (DMTs) was identified in *Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739. It was speculated that *dmtD3-E3* in the downstream of CDPS participated in the biosynthesis of DMTs. However, the function of *dmtD3_E3* has not been characterized. [Objective] To characterize the cyclodipeptide oxidase *dmtD3_E3* in the gene cluster *dmt3* of CDPS in *S. aidingensis* CGMCC 4.5739, and provide functional elements for structural diversity study of diketopiperazines. [Methods] *dmtD3_E3* was cloned from the genome of *S. aidingensis* CGMCC 4.5739, and the recombinant plasmid pWLI209 was constructed and expressed soluble in *Escherichia coli* BL21(DE3). *In vitro* enzymatic reactions were performed, and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) were used to ensure the structure of catalysate. [Results] The cyclodipeptide oxidase *dmtD3_E3* catalyzed the oxidative dehydrogenation of C14–C17 in *cyclo*-(L-Trp-L-Leu) (cWL) to generate cWΔL, and the dehydrogenation of C10–C11 in *cyclo*-(L-Trp-L-Ala) (cWA) to generate cΔWA. The results showed that *dmtD3_E3* demonstrated broad substrate specificity. [Conclusion] This study explored and characterized the novel cyclodipeptide oxidase *dmtD3_E3* in the CDPS biosynthesis pathway, laying a foundation for the further generation of “non-natural” diketopiperazines through strategies of combinatorial biosynthesis and synthetic biology.

Keywords: cyclodipeptide oxidases; *Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739; diketopiperazines; cyclodipeptide synthase biosynthesis pathway

含有二酮哌嗪(diketopiperazine, DKP)骨架的天然产物是重要的药物先导化合物, 自1880年被首次发现以来^[1], 因其具有良好的生物活性和药理活性而受到科学家的广泛关注^[2], 尤其是近年来从环二肽合酶(cyclodipeptide synthase, CDPS)生物合成途径中挖掘了大量结构新颖的 DKP^[3]。环二肽合酶以氨酰-tRNAs (aminoacyl-tRNAs, aa-tRNAs)作为底物缩合形成 DKPs 的核心骨架, 即环二肽^[4], 其后修饰过程发生在环二肽形成之后。在现有的基因组数据库

中, 已经发现多种与 CDPS 基因相邻的编码不同家族的后修饰酶基因, 如环二肽氧化酶(cyclodipeptide oxidase, CDO)^[5]、细胞色素 P450 酶(cytochrome P450s, P450s)^[6]、 α -酮戊二酸/ Fe^{2+} 依赖型双加氧酶(α -ketoglutarate/ Fe^{2+} -dependent dioxygenase, α -KGD)^[7]、异戊烯基转移酶(prenyltransferase, PT)^[8]、甲基转移酶(methyltransferase, MT)^[9]及萜类环化酶(terpene cyclase, TC)^[8]等。功能多样的环二肽后修饰酶在环二肽骨架或后修饰基团上引入各种类型的化学修饰, 极大地丰富了 DKP 类天然产物的结构多样性。

CDO首次由Lautru等在2002年从*Streptomyces noursei*中albonoursin的生物合成途径中鉴定^[5],催化cyclo-(L-Phe-L-Leu)(cFL)依次进行两步 α,β -脱氢,是CDPS生物合成途径中第一个被鉴定的后修饰酶^[10]。除了albonoursin生物合成途径^[5],近年来,在nocazines^[11]、guanitrypmycins^[7]、streptoazines^[12]、purincyclamide^[13]等二酮哌嗪类天然产物生物合成途径中也报道了CDO的存在。CDO通常由2个约为21 kDa和11 kDa的亚单元组成,以下分别称为CDOA和CDOB,CDOA和CDOB的编码基因之间具有20–30个核苷酸重叠,单独的CDOA或CDOB表达并不能产生具有活性的CDO,其催化活性要求CDOA和CDOB的共同参与^[14];CDOA、CDOB和辅因子黄素组装成活性异聚体CDO,并利用分子氧催化CDPs发生 α,β -脱氢。

本课题组前期研究阐明了*S. aidingensis* CGMCC 4.5739中环二肽合酶基因簇*dmt3*中的*dmtA3B3C3*编码drimentine A(DMT A):*dmtB3*编码环二肽合酶DmtB3,催化产生环二肽cyclo-(L-Trp-L-Leu)(cWL);*dmtC3*编码异戊烯基转移酶DmtC3,催化cWL发生“C3-regular”法尼西基化,产生pre-DMT A;*dmtA3*编码萜类环化酶催化pre-DMT A萜烯链环化产生

DMT A^[8]。然而,*dmtA3B3C3*下游2个基因*dmtD3*和*dmtE3*的功能尚未阐明。因此,本文通过体外酶学实验对*S. aidingensis* CGMCC 4.5739中基因簇*dmt3*中的环二肽氧化酶基因*dmtD3*和*dmtE3*进行表征,增加CDPS途径新颖后修饰功能元件,以期通过合成生物学策略和化学酶法进行二酮哌嗪类化合物结构优化、理性设计奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

研究所用到的菌株和质粒及其特征参见表1,表达载体构建所用引物为DmtD3_E3-FP(5'-ggaattccataggtggagccgaccggtgagg-3')和DmtD3_E3-RP(5'-ccgctcgagtcagcccgtccggtgag-3')。

1.2 培养基

LB培养基(g/L):胰蛋白胨10.0,酵母粉5.0,NaCl10.0。固体LB培养基需添加15 g/L琼脂,1×10⁵ Pa灭菌20 min^[15]。

1.3 主要试剂和仪器

1 kb ladder,天根生化科技有限公司;*Pfu*高保真聚合酶,东盛生物科技有限公司;常用限制性内切酶及T4 DNA连接酶,Fermentas公司;质粒提取试剂盒,琼脂糖凝胶回收试剂盒,

表1 本实验使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株与质粒 Strains/Plasmids	相关特性 Genotype/Description	来源 References/Source
<i>E. coli</i> DH5 α	常用于质粒克隆宿主 Host strain for general cloning	Stratagene company
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	蛋白表达宿主 Protein expression host	Novagen company
<i>Streptomyces aidingensis</i> CGMCC 4.5739	Drimentine A产生菌株,包含基因簇 <i>dmt3</i> The strain produced drimentine A harboring the <i>dmt3</i> locus	中国普通微生物菌种保藏管理中心 China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)
pET-28a(+)	Kan ^R , expression vector	Novagen company
pWLI209	pET-28a carrying the <i>dmtD3_E3</i> gene	本研究 This study

Omega 公司; Bradford 蛋白定量试剂盒, BioMed 生物公司; 卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; *cyclo*-(L-Trp-L-Leu) (cWL)、*cyclo*-(L-Trp-L-Ala) (cWA)、*cyclo*-(L-Trp-L-Ile) (cWI)、*cyclo*-(L-Trp-L-Phe) (cWF) 和 *cyclo*-(L-Trp-L-Tyr) (cWY), 上海吉尔生化公司。

生化培养箱, 上海博讯实业有限公司; 台式高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; 凝胶成像系统, Alpha Innotech 公司; 高效液相色谱仪, Agilent 公司; 质谱仪, Waters 公司。

1.4 方法

1.4.1 *dmtD3_E3* 基因表达载体的构建

由于环二肽氧化酶需要 2 个亚基协同发挥作用, 单独一个亚基存在不能发挥氧化脱氢的功能, 因此将 *dmtD3* 和 *dmtE3* 构建到一起进行蛋白表达并命名为 *dmtD3_E3*。以 *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 总 DNA 为模板, 选用引物 DmtD3_E3-FP 与 DmtD3_E3-RP, PCR 扩增 *dmtD3_E3* 基因片段, 将 PCR 产物经电泳检测、胶回收后, 选用内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 对酶切后片段进行纯化, 同样处理载体 pET-28a(+)后, 经 T4 连接酶连接以构建重组表达质粒, 将质粒电转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 以卡那霉素为抗性筛选标记, 将筛选得到的转化子送测序公司测序, 与原序列比对结果, 得到正确的质粒。将测序结果完全正确的质粒电转入 *E. coli* BL21(DE3)蛋白表达宿主中, 得到蛋白表达菌株。

1.4.2 *DmtD3_E3* 表达纯化

将蛋白表达菌株接种在含有 100 μ g/mL 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜, 按照 1%接种量转接至 1 L 的 LB 培养基中, 继续培养到 OD_{600} 值为 0.4–0.6 左右。为了得到可溶性表达的 *DmtD3_E3* 蛋白, 对温度、IPTG 浓度优化后, 最终确立了最适表达条件为: 0.05 mmol/L IPTG, 16 $^{\circ}$ C、220 r/min

诱导过夜。8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 加入适量预冷的 50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl 缓冲液重悬菌体, 并加入 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂, 使用均质机在 4 $^{\circ}$ C 进行破碎约 1.0–1.5 min。4 $^{\circ}$ C、18 000 r/min 离心 60 min, 上清通过 0.22 μ m 微孔滤膜后经蛋白纯化柱纯化, 采用不同浓度的咪唑缓冲液冲洗, 对洗脱组分进行 SDS-PAGE 检测, 把合适的蛋白组分经脱盐浓缩后分装低温保存。

1.4.3 酶催化反应及 HPLC 检测条件

采用高效液相色谱(HPLC)分析法对酶反应产物进行检测。*DmtD3_E3* 体外酶反应条件为: 分别以终浓度为 0.5 mmol/L 的环二肽 *cyclo*-(L-Trp-L-Leu) (cWL)、*cyclo*-(L-Trp-L-Ala) (cWA)、*cyclo*-(L-Trp-L-Ile) (cWI)、*cyclo*-(L-Trp-L-Phe) (cWF)及 *cyclo*-(L-Trp-L-Tyr) (cWY) 为底物, 吩嗪硫酸甲酯作为递氢体(终浓度 1 mmol/L), Tris-HCl (pH 8.0)缓冲体系(终浓度 50 mmol/L), 以煮沸失活的 *DmtD3_E3* 作为对照组, 30 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 用等体积的乙腈终止反应, 振荡 5 min, 13000 r/min 离心 20 min, 取上清进行 HPLC 检测。HPLC 检测条件: Agilent 1260 Infinity 检测系统, 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A C18 (5 μ m, 120 nm, 150 mm \times 4.6 mm), 流动相为乙腈与 ddH₂O。具体条件为: 0–5 min, 5%乙腈; 5–30 min, 5%–50%乙腈; 30–35 min, 100%乙腈, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 260 nm。

2 结果与分析

2.1 基因簇 *dmt3* 中 *dmtD3* 及 *dmtE3* 生物信息学分析

如图 1 和表 2 所示, *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 中的基因簇 *dmt3* 除已报道的萜烯环化酶基因 *dmtA3*、环二肽合酶基因 *dmtB3* 和异戊

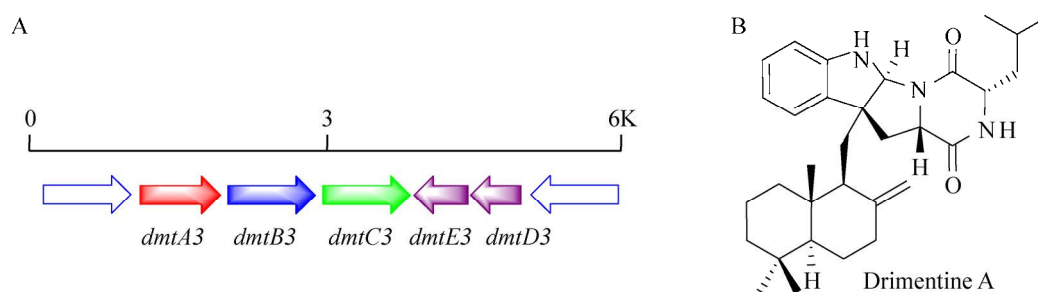


图1 *dmt3* 基因簇示意图及异源表达产物 A: *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 中含有 CDPS 的基因簇 *dmt3* 示意图; B: 异源表达 *dmtA3B3C3* 产物

Figure 1 Organization of *dmt3* gene cluster and its heterologous expression product drimentine A. A: The CDPS-containing locus *dmt3* from *S. aidingensis* CGMCC 4.5739; B: The chemical structure of drimentine A.

表2 *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 中 *dmt3* 基因功能注释

Table 2 Predicted functions of *dmt3* gene cluster from *S. aidingensis* CGMCC 4.5739

Protein	Size (aa)	Proposed function	Homologous	
			Protein/Organism	Accession No. (Identity/Similarity, %)
DmtA3	229	Terpene cyclase	DmtA1/ <i>S. youssoufiensis</i>	MG776357.1 (34/49)
DmtB3	248	Cyclodipeptide synthase	DmtB1/ <i>S. youssoufiensis</i>	MG776357.1 (46/59)
DmtC3	299	Phytoene synthase	DmtC1/ <i>S. youssoufiensis</i>	MG776357.1 (42/54)
DmtD3	123	Hypothetical protein	AlbA/ <i>Streptomyces noursei</i> ATCC 11455	AAN07908.1 (38/46)
DmtE3	177	Nitroreductase family protein	AlbB/ <i>Streptomyces noursei</i> ATCC 11455	AAN07908.1 (42/52)

烯基转移酶基因 *dmtC3* 外, 在其下游存在 2 个共转录基因, 命名为 *dmtD3* 和 *dmtE3*。生物信息学分析表明 *dmtD3* 及 *dmtE3* 编码硝基还原酶家族蛋白, 与已报道的 albonoursin 生物合成途径中环二肽氧化酶 AlbA 和 AlbB 氨基酸序列相似性分别为 46% 和 52%, 推测其共同发挥环二肽氧化酶功能。为了探究 DmtD3 及 DmtE3 的功能, 采用体外酶学实验对其生化功能进行研究。

2.2 DmtD3_E3 的表达载体构建与蛋白纯化

按照上述方法 PCR 扩增 *dmtD3_E3* 基因片段, 大小为 886 bp (图 2A), 成功构建重组表达质粒 pET28a-*dmtD3_E3*, 命名为 pWLI209, 将其转入 *E. coli* BL21(DE3) 后, 得到蛋白表达菌株。按照上述最适表达条件扩大培养体积, 经镍柱纯化、收集, SDS-PAGE 检测如图 2B 所示。与蛋白 Marker 比对, 所得蛋白分子量与预测值

一致, 将 DmtD3_E3 纯化、浓缩后得到 DmtE3 大小为 23.3 kDa 的条带及大小为 12.4 kDa 的 DmtD3 条带。

2.3 DmtD3_E3 的功能鉴定

根据前期研究可知环二肽合酶 DmtB3 催化产生环二肽 *cyclo*-(L-Trp-L-Leu) (cWL, **1**), 因此首先以 cWL (**1**) 为底物, 采用实验方法 1.4.3 中的反应体系进行体外酶反应。如图 3A 所示, 与对照组相比, cWL (**1**) 经 DmtD3_E3 催化生成产物 **2** (图 3B)。化合物 **2** 准分子离子峰为 m/z 298.156 3 $[M+H]^+$ (图 3C), 提示其分子量为 297, 分子式为 $C_{17}H_{19}N_3O_2$, 比环二肽 cWL (**1**) 的分子量 299 少 2 Da (图 3D)。由该结果可知, DmtD3_E3 可以催化环二肽底物 cWL (**1**) 进行氧化反应, 脱去 2 个氢生成化合物 **2**, 然而 DmtD3_E3 催化形成脱氢产物双键的位置仍需进一步的研究。

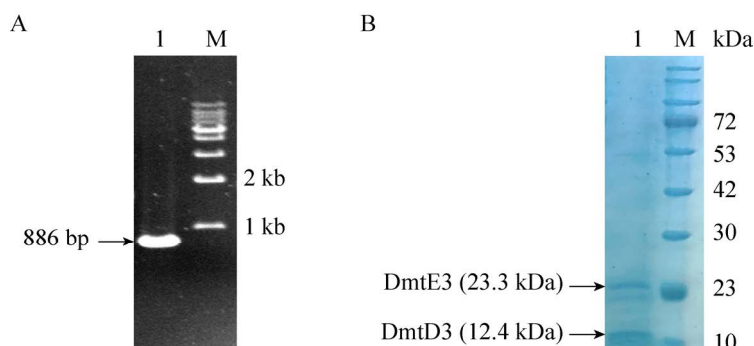


图 2 *dmtD3_E3* 基因片段及 *DmtD3_E3* 蛋白纯化图 A: *dmtD3_E3* 基因片段电泳图, M: 1 kb Marker; 1: *dmtD3_E3* 基因片段 886 bp。B: *DmtD3_E3* 蛋白表达 SDS-PAGE (10%)分析, M: 蛋白 Marker; 1: *DmtE3* 纯化后大小为 23.3 kDa, *DmtD3* 纯化后大小为 12.4 kDa

Figure 2 Electropherogram of *dmtD3_E3* and purification of *DmtD3_E3*. A: Electropherogram of *dmtD3_E3*, M: 1 kb Marker; 1: Gene *dmtD3_E3* (886 bp). B: SDS-PAGE (10%) analysis of *DmtD3_E3*, M: Protein Marker; 1: Purified *DmtE3* with molecular weight of 23.3 kDa, purified *DmtD3* with molecular weight of 12.4 kDa.

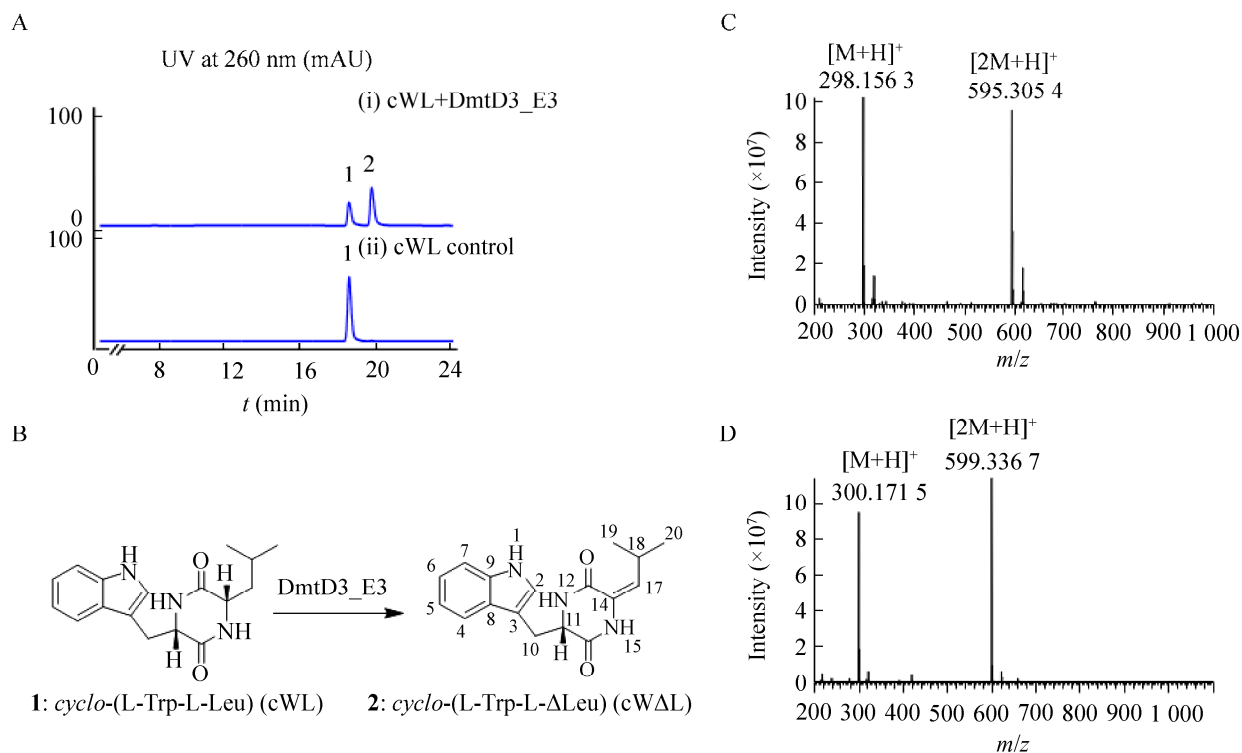


图 3 以 cWL 为底物探究 *DmtD3_E3* 体外功能 A: *DmtD3_E3* 体外酶反应 HPLC 检测, i: cWL+*DmtD3_E3*; ii: cWL+煮沸 *DmtD3_E3* 对照组。B: *DmtD3_E3* 催化 cWL (1)反应示意图。C: 化合物 2 的 HR-ESI-MS。D: 化合物 1 的 HR-ESI-MS

Figure 3 *In vitro* biochemical analysis of *DmtD3_E3* with cWL as substrate. A: HPLC traces of *DmtD3_E3*-catalyzed reactions, i: cWL+*DmtD3_E3*; ii: cWL+boiled *DmtD3_E3* control. B: Schematic diagram of cWL (1) catalyzed by *DmtD3_E3*. C: HR-ESI-MS spectrum of 2. D: HR-ESI-MS spectrum of 1.

2.4 DmtD3_E3 催化形成脱氢产物 2 的结构解析

为了阐明 DmtD3_E3 氧化脱氢产物的结构, 进一步确定化合物 2 双键的位置。首先, 通过扩大酶催化体系至 10 mL, 采用 2 倍体积乙酸乙酯萃取反应产物, 并采用反向 C-18 半制备柱分离纯化得到了化合物 2。化合物 2 为白色粉末, $^1\text{H NMR}$ 数据如下, $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , δ , J/Hz): 8.17 (C-1, s), 6.98 (C-2, d, 2.5), 7.26 (C-4, d, 8.0), 6.92 (C-5, t, 7.5), 7.01 (C-6, m), 7.51 (C-7, d, 7.9), 2.67 (C-10, m), 4.23 (C-11, m), 10.86 (C-12, s), 9.57 (C-15, s), 5.18 (C-17, d), 0.78 (C-19, d, 6.6), 0.51 (C-20, d, 6.6)。以上氢谱数据与已报道文献[14]

一致, 为已知化合物 *cyclo*-(L-Trp-L- Δ Leu) (cW Δ L), 化合物 2 结构及 DmtD3_E3 催化氧化脱氢反应示意图如图 3B 所示。

2.5 DmtD3_E3 底物宽泛性研究

为了探究 DmtD3_E3 对于环二肽底物是否具有一定宽泛性, 选取带有不同芳香族氨基酸和脂肪族氨基酸的环二肽为底物进行底物宽泛性研究。分别以带有脂肪族氨基酸侧链的环二肽 *cyclo*-(L-Trp-L-Ala) (cWA, 3)、*cyclo*-(L-Trp-L-Ile) (cWI) 和带有芳香族氨基酸侧链的环二肽 *cyclo*-(L-Trp-L-Phe) (cWF)、*cyclo*-(L-Trp-L-Tyr) (cWY) 为底物。采用实验方法中的反应体系进行体外酶反应结果如图 4 及图 5 所示。

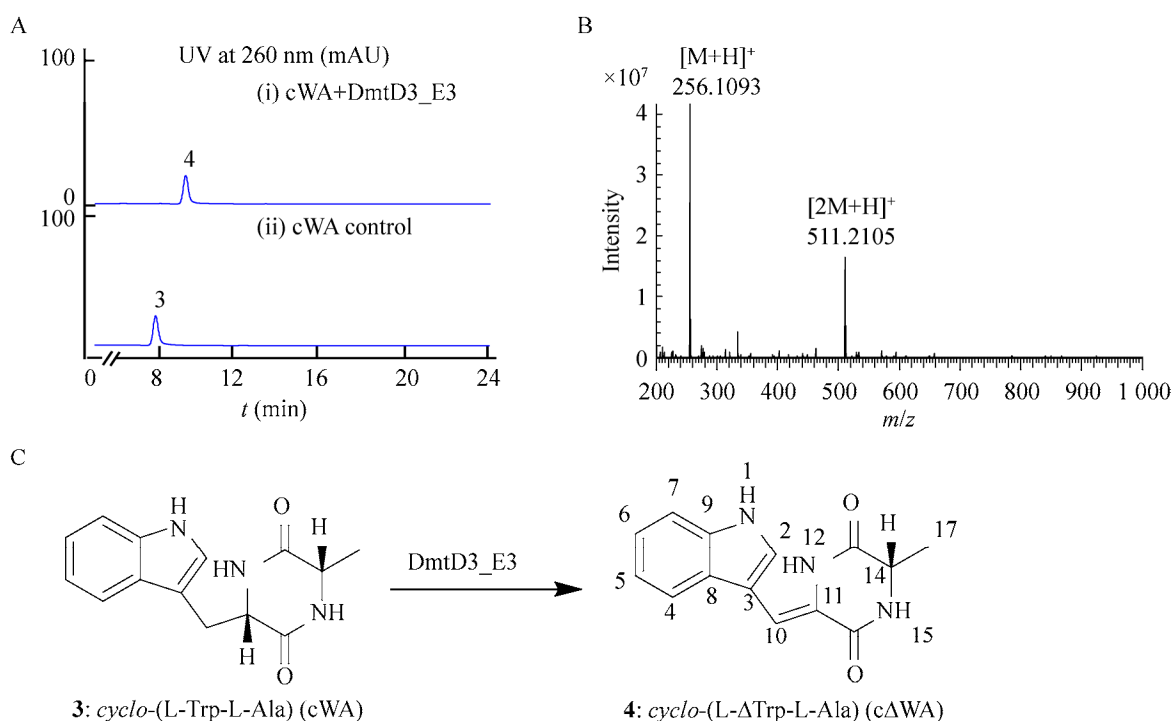


图 4 以 cWA 为底物探究 DmtD3_E3 体外功能 A: DmtD3_E3 与 cWA (3) 酶反应 HPLC 分析, i: cWA+DmtD3_E3; ii: cWA 对照组。B: 化合物 4 的 HR-ESI-MS 化合物。C: DmtD3_E3 催化 cWA (3) 反应示意图

Figure 4 *In vitro* biochemical analysis of DmtD3_E3 with cWA as substrate. A: HPLC traces of DmtD3_E3-catalyzed reactions using cWA (3) as substrate, i: cWA+DmtD3_E3; ii: cWA control. B: HR-ESI-MS spectrum of 4. C: Schematic diagram of cWA (3) catalyzed by DmtD3_E3.

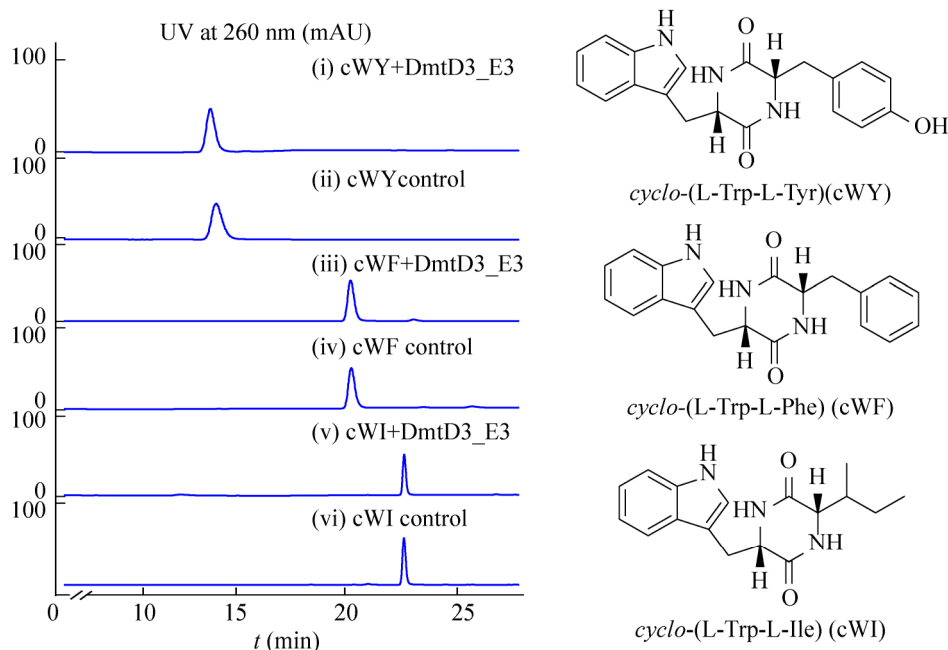


图 5 DmtD3_E3 底物宽泛性 HPLC 分析图

Figure 5 The HPLC analysis of substrate selectivity of DmtD3_E3.

HPLC 检测结果显示, 与对照组相比, cWA (3) 经 DmtD3_E3 催化生成产物 4。正离子 HR-ESI-MS 显示化合物 4 准分子离子峰为 m/z 256.11 $[M+H]^+$ (图 4B), 提示其分子质量为 255, 分子式为 $C_{14}H_{13}N_3O_2$, 比环二肽 cWA (3) 的分子量 257 少 2 Da。化合物 4 为白色粉末, 1H NMR 数据如下: 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ , J/Hz): 8.40 (C-1, s), 6.99 (C-2, br s), 7.28 (C-4, d, 8.0), 6.93 (C-5, t, 7.1), 7.02 (C-6, t, 7.1), 7.54 (C-7, d, 8.0), 8.38 (C-10, s), 10.26 (C-12, s), 4.23 (C-14, m), 10.87 (C-15, s), 1.23 (C-17, s)。以上氢谱数据与已报道文献[16]一致, 为已知化合物 c Δ WA (4)。然而, 相同反应条件下, DmtD3_E3 不可以识别 cWI、cWF 及 cWY (图 5)。该结果说明环二肽氧化酶 DmtD3_E3 既可以识别 *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 中 CDPS 生物合成基因簇 *dmt3* 基因簇编码前体 cWL (1), 又可以识别非 *dmt3* 基因簇来源的环二肽 cWA (3), 具有一定的底物宽泛性。

3 讨论与结论

Drimentines (DMTs) 是一类倍半萜化吲哚二酮哌嗪类化合物, 其二酮哌嗪骨架结构是色氨酸与不同氨基酸缩合而成, 该类化合物化学结构差异主要存在于 DMTs 骨架上的不同修饰, 如甲基化、异戊烯化、环化及氧化脱氢等, 表现出不同程度的生理活性及药理活性。已有文献报道当以大肠杆菌作为异源表达宿主, 将不同来源的环二肽氧化酶与环二肽合酶共同表达时, 可以检测到脱氢之后的环二肽产物, 然而并未对环二肽氧化酶进行体外酶促反应^[14]。

本文采用体外酶学实验, 对 *S. aidingensis* CGMCC 4.5739 中 drimentines 生物合成途径中新颖功能元件进行表征, 阐明了 DmtD3_E3 发挥环二肽氧化酶功能, 其可以识别 *dmt3* 基因簇编码前体 cWL (1), 催化 cWL (1) 的 C14-C17 位形成双键生成 cW Δ L (2)。此外, DmtD3_E3 表现出一定的底物宽泛性, 还可以催化 cWA (3)

的 C10-C11 位形成双键生成脱氢环二肽类化合物 **cΔWA (4)**。值得注意的是, 已报道的 *albonoursin* 生物合成途径中环二肽氧化酶 *AlbA_B* 能够催化 *cyclo*-(L-Phe-L-Leu) (*cFL*) 依次进行两步 α,β -脱氢^[10], 虽然 *DmtD3_E3* 与 *AlbA_B* 具有较高的相似性, 但是在实验过程中并未检测到两步脱氢产物, 推测可能与底物和酶的结合方式不同相关, 具体原因有待进一步研究。根据 *drimentines* 的生物合成机制^[8], 通过对完整的 *dmt3* 基因簇进行异源表达有望获得脱氢 *drimentines* 类化合物, 进而增加 *drimentines* 类的多样性。本研究通过对 CDPS 生物合成途径中关键后修饰酶的挖掘和表征, 增加了 CDPS 生物合成途径中新颖的后修饰功能元件, 为后续通过组合生物合成和合成生物学手段生成“非天然”天然产物奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Gisin BF, Merrifield RB. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. A side reaction in solid-phase peptide synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1972, 94(9): 3102-3106
- [2] Borthwick AD. 2,5-diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(7): 3641-3716
- [3] Harken L, Li SM. Modifications of diketopiperazines assembled by cyclodipeptide synthases with cytochrome P₄₅₀ enzymes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(6): 2277-2285
- [4] Kohn H, Widger W. The molecular basis for the mode of action of bicyclomyacin[J]. *Current Drug Targets Infectious Disorders*, 2005, 5(3): 273-295
- [5] Lautru S, Gondry M, Genet R, Pernodet JL. The *albonoursin* gene cluster of *S. noursei*: biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9(12): 1355-1364
- [6] Sun CH, Luo ZY, Zhang WL, Tian WY, Peng HD, Lin Z, Deng ZX, Kobe B, Jia XY, Qu XD. Molecular basis of regio- and stereo-specificity in biosynthesis of bacterial heterodimeric diketopiperazines[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 6251
- [7] Harken L, Liu J, Kreuz O, Berger R, Li SM. Biosynthesis of guatrypmethine C implies two different oxidases for *exo* double bond installation at the diketopiperazine ring[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(1): 648-654
- [8] Yao TT, Liu J, Liu ZZ, Li T, Li HY, Che Q, Zhu TJ, Li DH, Gu QQ, Li WL. Genome mining of cyclodipeptide synthases unravels unusual tRNA-dependent diketopiperazine-terpene biosynthetic machinery[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4091
- [9] Yao TT, Liu J, Jin EJ, Liu ZZ, Li HY, Che Q, Zhu TJ, Li DH, Li WL. Expanding the structural diversity of *drimentines* by exploring the promiscuity of two N-methyltransferases[J]. *iScience*, 2020, 23(7): 101323
- [10] Gondry M, Lautru S, Fusai G, Meunier G, Ménez A, Genet R. Cyclic dipeptide oxidase from *Streptomyces noursei*. Isolation, purification and partial characterization of a novel, amino acyl α,β -dehydrogenase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(6): 1712-1721
- [11] Giessen TW, Von Tesmar AM, Marahiel MA. Insights into the generation of structural diversity in a tRNA-dependent pathway for highly modified bioactive cyclic dipeptides[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20(6): 828-838
- [12] Liu J, Yang YL, Harken L, Li SM. Elucidation of the streptoazine biosynthetic pathway in *Streptomyces aurantiacus* reveals the presence of a promiscuous prenyltransferase/cyclase[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(12): 3100-3109
- [13] Shi J, Xu X, Zhao EJ, Zhang B, Li W, Zhao Y, Jiao RH, Tan RX, Ge HM. Genome mining and enzymatic total biosynthesis of purincyclamide[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(17): 6825-6829
- [14] Le Chevalier F, Correia I, Matheron L, Babin M, Moutiez M, Canu N, Gondry M, Lequin O, Belin P. *In vivo* characterization of the activities of novel cyclodipeptide oxidases: new tools for increasing chemical diversity of bioproduced 2, 5-diketopiperazines in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 178
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989: 1814-1875
- [16] Couladouros EA, Magos AD. Solid-phase total synthesis of (-)-phenylhistine and (-)-aurantiamine. Synthesis of a diverse dehydro-2, 5-diketopiperazine library. Part II[J]. *Molecular Diversity*, 2005, 9(1/2/3): 111-121