

# 非核糖体肽合成酶(NRPSs)作用机理与应用的研究进展

王世媛

(厦门伯赛基因转录技术有限公司 厦门 361022)

**摘 要** :许多微生物能利用非核糖体肽合成酶(NRPSs)合成结构复杂、种类繁多的生物活性肽。非核糖体肽因其独特的理化特性和药理学特性已被广泛关注,极具商业开发潜力。NRPSs 由多个模块组成,模块的不同空间排列顺序决定其多肽产物的氨基酸序列特异性。NRPSs 以多载体巯基化模板机理进行多肽合成,其底物特异性由腺苷酰化结构域和缩合结构域共同实现。目前,人们已经利用天然的 NRPSs、某些特定结构域、将已知 NRPSs 的模块或特定结构域进行组合甚至杂合组合而构建成的新的 NRPSs 来合成目的多肽。

**关键词** :非核糖体肽,非核糖体肽合成酶,模块,作用机理,应用

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)04-0734-04

在自然界,细菌<sup>[1]</sup>、蓝细菌<sup>[2]</sup>、放线菌<sup>[3]</sup>和真菌<sup>[4]</sup>等微生物,甚至果蝇<sup>[5]</sup>、小鼠<sup>[6]</sup>等动物,能通过非核糖体途径合成一系列低分子量的具有药用价值的多肽类次级代谢产物。这些多肽类物质结构复杂、种类繁多,统称为非核糖体肽(nonribosomal peptides, NRPs)。NRPs 的生物合成是由非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetases, NRPSs)、聚酮合成酶(polyketide synthases, PKSs)、NRPSs/PKSs 杂合酶等多功能蛋白复合体完成。其中, NRPSs 是 NRPs 生物合成的主要酶,也是研究最多最深入的酶,由多个模块(module)组成,各模块的特定结构域具有特定的酶活性。虽然科学家们认识这个酶系已有几十年了,但直到最近才了解 NRPSs 的工作原理,并且开始尝试改变酶的结构,利用生物工程技术合成更多种类的药物<sup>[7]</sup>。本文将叙述与 NRPSs 作用机理和应用相关的研究进展。

## 1 非核糖体肽的生理功能及其应用

除了 20 种蛋白质源的氨基酸外, NRPs 含有大量的稀有氨基酸,目前已经鉴定出 300 多种,包括 D-氨基酸、 $\alpha$ -羟酸、N-/O-甲基氨基酸、犬尿氨酸(kynurenine)等。有些 NRPs 形成环化或杂合环化的分子,有些还被糖基化、酰基化、脂质化等修饰,这些特点赋予了 NRPs 生理功能和生物活性的独特性和多样性<sup>[8]</sup>。

NRPs 具有多种对微生物生存、生长繁殖等所必需的生理功能,概括起来主要有以下几方面:① 抗生素(antibiotics),抑制他种竞争者生长,这是微生物界普遍存在的现象<sup>[8]</sup>;② 铁载体(siderophores),细菌、蓝细菌、真菌等在铁元素成为限制性生长因子时,作为铁离子强螯合剂的铁载体被大量诱导产生,而从环境或(特别是)宿主的铁结合蛋白中获得充足的铁离子<sup>[9]</sup>;③ 毒素(toxins),作为选择性侵染特异宿主的毒力因子,突出的例子是:烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)产生的毒素 gliotoxin 可降低机体防御能力,能引起侵染性曲霉病

(invasive aspergillosis, IA),烟曲霉已成为临床上仅次于白色念珠菌的一种重要的条件致病真菌<sup>[10]</sup>;④ 含氮物质的储存场所,如某些蓝细菌肽(cyanophycin)<sup>[11]</sup>;⑤ 作为调节生长、繁殖和分化的信号分子等<sup>[8]</sup>。

因其独特多样的生物活性,大量的 NRPs 已经得到广泛应用或正处于研发中。应用最多的是多肽类抗生素,如杆菌肽(bacitracin)、万古霉素(vancomycin)、短杆菌肽(S gramicidin S)、Daptomycin 等,尤其是 Daptomycin(商品名:Cubicin)在临床上具有高效的抗多种已产生抗生素抗性的革兰氏阳性病原菌(如 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 等)的能力<sup>[3]</sup>。此外, NRPs 可作为免疫抑制剂药物(immunosuppressants),如环孢霉素(cyclosporine)<sup>[12]</sup>;抗真菌药物,如 fengycin<sup>[13]</sup>;生物表面活性剂(biosurfactants),如 surfactin A<sup>[14]</sup>;以及抗癌药物(anti-tumourals)、细胞生长抑制剂(cytostatic agents)和抗病毒(antiviral compounds)药物等<sup>[15]</sup>。

## 2 非核糖体肽合成酶的作用机理

### 2.1 NRPSs 的组织结构与 NRPs 的合成过程

NRPSs 是目前所发现的最大的酶系,由多个模块(module)按特定的空间顺序排列而成,一个典型的模块由腺苷酰化(adenylation, A)结构域、肽酰载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP)结构域和缩合(condensation, C)结构域 3 个核心结构域组成<sup>[8]</sup>。大多数 NRPSs 的模块数为 3~15 个,最高可达 50 个,模块的数量、种类和排列顺序决定了其最终的产物。

每一个模块负责将一个氨基酸整合到产物的骨架中,肽链延伸的一个反应循环过程(图 1)<sup>[8,16]</sup>:① A 结构域从底物池中选择结合特定的氨基酸,在 ATP 的作用下合成相应的氨酰-AMP 而使氨基酸底物得到活化;② 氨酰-AMP 与 PCP 结构域上的辅因子磷酸泛酰巯基乙胺(4'-phosphopantetheine, Ppant)的巯基结合,形成氨酰-S-载体复合物;③ 分别携带有

作者简介:王世媛(1973-),女,湖北荆州人,工程师,硕士,主要从事基因工程药物研发工作。Tel:36-13003972730;Fax:36-592-6889168;E-mail:tan128ww@163.com

收稿日期:2006-12-12;接受日期:2007-04-04;修回日期:2007-05-22

氨酰基和肽酰基的载体(第一个肽键是两个带有氨酰基的载体)与C结构域上的特定区域结合,氨酰-S-载体复合物上的氨基向肽酰-S-载体复合物上肽酰基的酰基进行亲核攻击,

而形成新肽键,产生延长了一个氨基酸的新的肽酰-S-载体复合物和游离的载体。

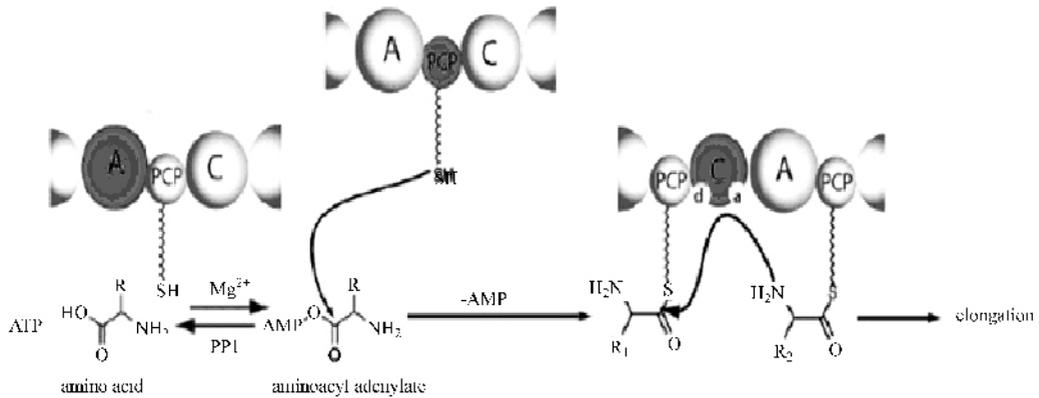


图1 形成一个肽键的反应循环

Fig.1 The reaction cycle for the formation of a peptide bond.

在最后一个模块的C-末端通常有起终止延伸和释放产物功能的硫酯(thioesterase, TE)结构域。PCP上的线性肽转移到TE结构域的活性位点,形成肽-O-TE中间产物,中间产物随后被水解释放出线性肽,或者多数情况下经过分子内亲核攻击而合成环化产物<sup>[17]</sup>。但有些NRPSs的TE结构域缺失或者被依赖于NAD(P)<sup>+</sup>的末端还原酶所替代,越来越多的末端还原酶被发现,暗示着通过还原释放机制来完成链终止反应可能是另一种普遍存在的终止机制<sup>[18]</sup>。此外,差向异构(epimerization, E)结构域、N-甲基化(N-methylation, M)结构域等对底物氨基酸进行修饰;乙酰化、糖基化、脂质化结构域等对多肽骨架进行修饰。如果NRPSs不具有这些结构域,修饰作用则由独立于NRPSs的相应酶催化完成<sup>[16]</sup>。

## 2.2 多载体巯基化模板机理

NRPSs的每一个模块负责编辑一个肽键,模块的不同空间排列顺序决定各种多肽的氨基酸序列特异性,因此NRPSs被称为蛋白质模板(protein template)。第一个多肽抗生素的非核糖体合成系统发现后不久,Lipmann等提出了巯基化模板模型(thio-template model),认为与脂肪酸的生物合成类似,整个NRPSs只有一个装配有辅因子P<sub>pant</sub>的中心载体<sup>[19]</sup>。但随着第一个NRPSs基因的克隆和序列分析,人们发现NRPSs的每一个模块的PCP结构域都具有能与辅因子P<sub>pant</sub>结合的保守性丝氨酸残基,据此提出了多载体模型(multiple carrier model)<sup>[16]</sup>。如图1所示,与每一个模块的PCP结构域结合的辅因子P<sub>pant</sub>均起到摆动长臂(swinging arm)的作用,使下游模块的氨酰-S-载体复合物上的氨基与上游模块的肽酰-S-载体复合物上的肽酰基互相接近,经亲核攻击反应形成一个新肽键而使肽链得到延伸。进一步的研究表明,无活性的脱辅因子apo-PCP和具有活性的holo-PCP均存在两种稳定的构象,这种构象的多样性是指导辅因子P<sub>pant</sub>进行摆动以及与其他蛋白相互作用所必需的<sup>[20]</sup>。因此,根据NRPSs的蛋白质模板功能、多载体和载体巯基化等特点,多肽的非核糖体合成机理可概括为多载体巯基化模板(multiple-carrier thio-template)机理。

## 2.3 共线性与非线性

目前发现的NRPSs可分为3类<sup>[21]</sup>:A型,线性NRPSs,3个核心的结构域以C-A-T的顺序在模块上排列,模块的数量、种类、排列顺序决定产物的一级结构;B型,重复型NRPSs,在多肽合成过程中多次利用它们的模块或结构域;C型,非线性NRPSs,3个核心结构域C、A和T中至少有一个异常排列,模块数与其编码的多肽产物的氨基酸残基数不同,例如合成bleomycin的NRPSs,模块数与产物氨基酸数之比为11:8, nocardicin A为5:3等<sup>[18]</sup>。

## 2.4 底物特异性

NRPSs在合成多肽时,A结构域和C结构域都涉及到底物特异性的问题。其中,A结构域是在每一个反应循环的第一步从底物池中选择特异性的氨基酸,被誉为特异性的“守门者”;C结构域是在肽键形成时对上游(供体)底物氨酰-或肽酰-S-PCP和下游(受体)底物氨酰-S-PCP进行特异性识别与结合。

A结构域的研究早而深入,现在人们可以通过特异性授予残基(specificity-conferring residues)的保守性对A结构域的底物特异性进行预测。Challis等<sup>[22]</sup>将已经通过实验或其他途径确定了特异性的A结构域的相关信息收集起来,建立了特异性授予残基的数据库,可以通过<http://raynam.chm.jhu.edu>网址进行查寻,极大地方便了A结构域特异性的研究和预测。

与A结构域相比,C结构域特异性的研究相对困难,有两方面的原因:其一,反应中的底物和产物均以共价方式与酶结合;其二,形成一个肽键需要两个PCP结构域,即供体和受体。Ehmann等<sup>[23]</sup>采用了小分子底物类似物的策略,用N-乙酰半胱氨酸(NAC)模拟P<sub>pant</sub>的末端部分,人工合成了大量不同的氨酰-S-NAC底物,并通过不同底物的肽键形成率来判断C结构域的底物特异性。他们发现,C结构域的特异性是通过识别供体的L-/D-型构象,以及识别受体的侧链和L-/D-型构象来实现的。Roongsawang等<sup>[15]</sup>发现,在已研究过的NRPSs中只存在C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>型和D<sub>1</sub>C<sub>2</sub>型C结构域,而不存

在<sup>L</sup>C<sub>D</sub>型和<sup>D</sup>C<sub>D</sub>型C结构域。

### 3 非核糖体肽合成酶的应用

活性环肽具有激素、抗生素、离子载体系统、抗真菌素、抗癌制剂等丰富多样的生物活性,而且在生物体内具有较好的抗酶解和抗化学降解特性。有机化学合成环肽面临着产量低、缺乏位点和立体选择性(regio- and stereoselectivity)难以控制寡聚化对环化的影响等难题,然而随着多种NRPSs的TE结构域的发现及其作用机理的研究,有望利用带有TE结构域的NRPSs通过生物合成途径大量生产环肽,或利用某些分离出来的TE结构域对化学合成的多肽底物进行环化,以获得所需的环肽<sup>[8]</sup>。Walsh等<sup>[24]</sup>用PEGA树脂模拟PCP结构域的辅因子P<sub>ant</sub>的功能,先在PEGA树脂上固相合成300多种线性短杆菌酪肽(tyrocidine, Tyc)抗生素的衍生物,然后将这些含有线性肽的树脂与重组表达的TycTE蛋白(环化酶)一起温育,通过环化酶在树脂上催化的环化反应,高效地释放出环肽,从而建立了短杆菌酪肽的环肽文库。他们从环肽文库中筛选到对细菌细胞膜的选择性提高30倍的短杆菌酪肽的环肽,该环肽的价值在于能大大降低短杆菌酪肽引起的溶血副作用。最后,他们根据该环肽的结构,构建基因工程的NRPSs,通过发酵来大规模生产该环肽。

$\alpha$ -天冬酰胺苯丙氨酸甲酯(APM)是一种比蔗糖甜200倍的甜味剂,目前每年通过化工合成达数千吨。但化工合成的步骤繁琐、产量低,因而成本高。 $\alpha$ -L-Asp-L-Phe二肽是APM的前体,极具工业应用价值。Duerfahrt等<sup>[25]</sup>人工设计合成该二肽的杂合NRPSs,他们分别选取来自surfactin(Srf) *Bacillus subtilis*和tyrocidine(Tyc) *B. brevis*相应的模块或结构域,进行了6种不同的杂合组合,结果发现某些组合可以高效生产 $\alpha$ -L-Asp-L-Phe二肽,然而美中不足的是会产生 $\beta$ -L-Asp-L-Phe副产品,如何解决这一问题还有待进一步研究。

近年来,我们公司的相关课题组已成功筛选到几种分别具有抗真菌和抗肿瘤潜力的多肽,并克隆了它们的NRPSs基因,目前,正在进行相关NRPSs的基因工程改造和高效表达的研究工作。

### 4 展望

微生物产生的非核糖体肽,因其结构复杂、种类繁多而具有独特的生理功能和多样化的生物活性。Nougayrède等报道:用大肠杆菌(*Escherichia coli*)B2菌株瞬时感染真核细胞,出现有丝分裂受阻和产生巨红细胞症的现象,进一步研究发现,该现象的产生与在基因组广泛分布的NRPSs和PKSs基因岛相关,杂合的肽-聚酮基因毒素(genotoxins)的发现将使人们对大肠杆菌的共生和致病机理产生新的认识,为相关新药的研发提供新的靶点和新思路<sup>[26]</sup>。

非核糖体肽的药用价值和商业开发潜力一直以来倍受人们的关注。已有大量的研究证实,可以从天然的非核糖体肽库中筛选出极具临床应用前景的新药或新药的前导分子。例如正处于临床研究阶段的抗癌制剂Epothilon(Epo)D就是由NRPSs-PKSs杂合酶产生的非核糖体肽<sup>[27]</sup>。Cubicin因具有高效的抗多种已产生抗生素抗性的革兰氏阳性病原菌的能

力,在临床上已得到广泛应用<sup>[3]</sup>。

多年来,人们积极探索如何利用NRPSs来生产有药用价值的活性肽,并取得了一些重大进展,例如:利用具有NRPSs的微生物通过发酵获得相应的多肽,利用NRPSs的某些特定结构域进行多肽的人工合成或半合成,对单个NRPSs模块或完整NRPSs的基因进行改造,或构建杂合的NRPSs,引入到受体菌,使之能合成我们需要的新的多肽等。但NRPSs的广泛应用仍然面临以下亟待解决的问题:发酵单位大多不高,致使产量太低而限制了其应用;目前基因工程大多局限在产物的氨基酸数较少的NRPSs,对于产物的氨基酸数较多、基因簇巨大的NRPSs基因在操作上仍有相当的难度;人工设计的NRPSs常产生合成效率低或特异性改变的问题;寻找能稳定而高效表达外源NRPSs的合适宿主菌;宿主菌若缺乏氨基酸及肽链修饰酶,则需将相关的酶基因整合到所用的宿主系统中;多肽产物的高效转运和输出等。因此,必须在NRPSs结构、组织模式和作用机理等方面进行更深入的研究,以促进NRPSs的更广泛利用以及非核糖体肽类新药的开发和临床应用。

### 参 考 文 献

- [1] Crosa JH, Walsh CT. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(2): 223 - 249.
- [2] Welker M, von Dohren H. Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, **30**: 530 - 563.
- [3] Miao V, Coeffet-Le Gal MF, Brian P, et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*, 2005, **151**: 1507 - 1523.
- [4] Schwewecke T, Gottling K, Durek P, et al. Nonribosomal peptide synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the architectures of ferrichrome-type siderophore synthetases in fungi. *ChemBioChem*, 2006, **7**: 612 - 622.
- [5] Richardt A, Kemme T, Wagner S, et al. Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 41160 - 41166.
- [6] Kasahara T, Kato T. Nutritional biochemistry: A new redoxcofactor vitamin for mammals. *Nature*, 2003, **422**: 832.
- [7] Gewold J. Working outside the protein-synthesis rules. *Science*, 2002, **295**(5563): 2205 - 2207.
- [8] Grunewald J, Marahiel MA. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, **70**(1): 121 - 146.
- [9] Sharma A, Johri BN. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol Res*, 2003, **158**: 243 - 248.
- [10] Cramer RA Jr, Gamsik MP, Brooking RM, et al. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates

- [ 11 ] Picosi S, Valladares A, Flores E, *et al.* Nitrogen-reulated genes for the metabolism of cyanophycin, a bacterial nitrogen reserve polymer. *J Bio Chem* 2004 **279**( 12 ):11582 – 11592.
- [ 12 ] Liu J, Farmer JD, Lane JWS, *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 1991 **66** :807 – 815.
- [ 13 ] Samel SA, Wagner B, Marahiel MA, *et al.* The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J Mol Biol*, 2006, **359** :876 – 889.
- [ 14 ] Sieber SA, Marahiel MA. Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *J Bacteriol*, 2003, **185** :7036 – 7043.
- [ 15 ] Roongsawang N, Lim SP, Washio K, *et al.* Phylogenetic analysis of condensation domains in the nonribosomal peptide synthetases. *FEMS Microbiology Letters*, 2005 **252** :143 – 151.
- [ 16 ] Henning DM, Mohamed AM. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1997 **1** :543 – 551.
- [ 17 ] Cao SY, Yang YZ, Joyce NL, *et al.* Macrolactonization catalyzed by the terminal thioesterase domain of the nonribosomal peptide synthetase responsible for lichenysin biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005 **15** :2595 – 2599.
- [ 18 ] Becker JE, Moore R, Moore BS. Cloning, sequencing, and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization. *Gene*, 2004, **325** :35 – 42.
- [ 19 ] Lipmann F, Gevers W, Kleinkauf H, *et al.* Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1971, **35** :1 – 34.
- [ 20 ] Koglin A, Mofid MR, Lohr F, *et al.* Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *J Biol Chem*, 2006 **313**( 5771 ) :273 – 276.
- [ 21 ] Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chem Bio Chem* 2002 **3**( 6 ) :490 – 504.
- [ 22 ] Challis GL, Ravel J, Townsend CA. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Bio*, 2000, **7** :211 – 224.
- [ 23 ] Ehmann DE, Trauger JW, Stachelhaus T, *et al.* Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Bio*, 2000, **7** :765 – 772.
- [ 24 ] Kohli RM, Walsh CT, Burkart MD. Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature* 2002 **418** :658 – 661.
- [ 25 ] Duerfahrt T, Doekel S, Sonke T, *et al.* Construction of hybrid peptide synthetases for the production of  $\alpha$ -L-aspartyl-L-phenylalanine, a precursor for the high-intensity sweetener aspartame. *Eur J Biochem* 2003 **270** :4555 – 4563.
- [ 26 ] Nougayr de JP, Homburg S, Boury M, *et al.* *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*, 2006, **313**( 5788 ) :848 – 851.
- [ 27 ] Liu F, Garneau S, Walsh CT. Hybrid nonribosomal peptide-polyketide interfaces in epothilone biosynthesis: minimal requirements at N and C termini of EpoB for elongation. *Chem Bio*, 2004, **11** :1533 – 1542.

## Advances in the study of the mechanism and application of nonribosomal peptide synthetases

WANG Shi-yuan\*

( Xiamen Biosteel Gene Expression Tech. Co., Ltd, Xiamen 361022, China )

**Abstract** Many microorganisms could use nonribosomal peptide synthetases ( NRPSs ) to synthesize various bioactive peptides with complicated structures. Because of their special physical-chemical and pharmacological properties, the nonribosomal peptides ( NRPs ) had been extensively studied, and would have great potential for commercial application. NRPSs are composed of many iterative modules whose different assembling orders determine the specificity of amino acid sequences of their peptide products. The NRPs are assembled by NRPSs via multiple-carrier thio-template mechanism, and the substrate specificity of NRPSs is determined by both adenylation domain and condensation domain. Recently, many expected peptides were synthesized using natural whole NRPSs, some specific domains of NRPSs, or novel NRPSs which were constructed by the combination or hybrid combination of specific modules or domains of some known NRPSs.

**Keywords**: nonribosomal peptides ( NRPs ); nonribosomal peptide synthetases ( NRPSs ); module; mechanism; application

\* Corresponding author. Tel 86-13003972730; Tax 86-592-6889168; E-mail shan128ww@163.com

Received: 12 December 2006 / Accepted: 4 April 2007 / Revised 22 May 2007