



## 蛋白酶体抑制剂 Syrbactins 家族的生物合成

刘晓彤, 许晓坤, 张友明\*, 李爱英\*

微生物技术国家重点实验室, 山东大学微生物技术研究院, 山东大学-亥姆霍兹生物技术研究所,  
山东 青岛 266237

**摘要:** 微生物来源的 syrbactins 属于十二元内酰胺短肽类化合物, 包括丁香霉素(syringolins)、滑杆菌素(glidobactins)、cephafungins 和 luminmycins 等。其中, syringolins、glidobactins、luminmycins 等几个化合物生物合成基因簇已被克隆、测序和异源表达。研究发现它们的十二元内酰胺环骨架都是由非核糖体肽合成酶(NRPS)-聚酮合酶(PKS)复合体采用模块化组装的方式, 将系列底物组装而成。这类化合物因具有优异的蛋白酶体抑制活性而受到广泛关注。本文从 syrbactins 的分子结构、生物合成、作用机理等几个方面进行综述, 介绍了近年来 syrbactins 的研究进展。

**关键词:** Syrbactins, 蛋白酶体抑制剂, 生物合成

Syrbactins 是一类微生物来源的天然产物, 包含四组化合物[syringolins (丁香霉素)、glidobactins (滑杆菌素)、cephafungins 和 luminmycins 等]。作为高效蛋白酶体抑制剂, 这个家族化合物具有多种生物学活性(如诱导植物抗病性、抗菌、抗肿瘤等)。它们共有的母核结构是十二元内酰胺环, 由非核糖体肽合成酶(nonribosomal-peptide-synthases, NRPS)-聚酮合酶(polyketide-synthases, PKS)复合体将底物进行模块化组装而成。本文将重点阐述 syrbactins 的分子结构、生物合成以及它们独特的作用机理, 并介绍近年来 syrbactins 的研究进展。

### 1 Syrbactins 家族成员

“Syrbactins”名称源于最先发现的两组化合物“syringolins”和“glidobactins”单词的组合。Glidobactins A–G 是 1988 年由 Oka 等从 *Polyangium brachysporum* K481-B101 (ATCC 53080)(已重新分类为伯克氏菌目)中分离到<sup>[1-2]</sup>。Syringolin A 是 1998 年由 Dudler 等从丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) B301D-R 中分离得到<sup>[3]</sup>。1999 年和 2012 年由不同课题组分离得到 syringolins B–F 和 syringolins G–H<sup>[4-5]</sup>。第三组 cepafungins I–III 是 1990 年从洋葱伯克氏菌(*Burkholderia*

基金项目: 国家自然科学基金(31670097); 山东省重点研发计划(2015GSF12101); 山东省重大专项(2015ZDJS04001); 山东省自然科学基金(ZR2017MC031)

\*通信作者。张友明, Tel: +86-532-67720918, E-mail: zhangyouming@sdu.edu.cn; 李爱英, Tel: +86-532-67722928, E-mail: ayli@sdu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-08; 修回日期: 2018-07-11; 网络出版日期: 2018-07-19

*cepacia*)中分离到<sup>[6]</sup>(cepafungin II 实际上就是 glidobactin A, 所以 cepafungins 也常常被定义为 glidobactins 的不同组分<sup>[7]</sup>。第四组 luminmycins A–C 是 2012 年由本课题组成员从发光杆菌 (*Photorhabdus luminescens*)中直接克隆沉默基因簇并进行异源表达得到<sup>[8]</sup>; luminmycin D 分离自非共生发光杆菌(*P. asymbiotica*)<sup>[9]</sup>。

Syrbactins 家族化合物的核心结构是由 2 个非蛋白质氨基酸组成的十二元内酰胺环, 环外连一条不饱和脂肪酸或二肽短链。除了开环的 luminmycins B 和 C, syrbactins 家族的其他成员均表现出明显的抗菌和抗肿瘤活性, 这也从侧面证明了十二元内酰胺环是 syrbactins 家族化合物的活

性中心<sup>[8]</sup>(表 1)。

## 2 Syrbaactins 的生物合成

### 2.1 Syrbaactins 生物合成的基因簇和酶复合体

以 syringolins 为例, 其基因簇含有 *syLA–E* 5 个基因, *syLA* 基因编码 LuxR 类型转录激活因子, 负责正向调控 *syLB* 基因和 *syLCDE* 操纵子的表达, 将其突变失活后不再有 syringolin A 产生<sup>[10]</sup>, *syLB* 产物可能负责赖氨酸残基双键的合成, 本课题组成员等通过异源表达不完整的 syringolins 生物合成基因簇 *syLCDE*, 分离得到 2 个赖氨酸饱和的化合物 syringolins G–H, 侧面证明该基因功能<sup>[5]</sup>, *syLE*

表 1. 目前分离得到的 syrbactins 家族化合物  
Table 1. Compounds in syrbactins family isolated so far

| Name              | Structure | Substituent  | Source                          |
|-------------------|-----------|--|---------------------------------|
| Glidobactins A–G  |           | A: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>   | R2=H                            |
|                   |           | B: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH=CH(Z)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub> | R2=H                            |
|                   |           | C: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub>   | R2=H                            |
|                   |           | D: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>                   | R2=H                            |
|                   |           | E: R1=CH <sub>2</sub> -CH(OH)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>                   | R2=H                            |
|                   |           | F: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>   | R2=H                            |
|                   |           | G: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>   | R2=OH                           |
| Syringolins A–H   |           | A: R1=H  | R2=H                            |
|                   |           | C: R1=Me   | R2=H                            |
|                   |           | D: R1=H  | R2=Me                           |
|                   |           | F: R1=Me   | R2=Me                           |
|                   |           | B: R1=H  | R2=H                            |
|                   |           | E: R1=H  | R2=Me                           |
|                   |           | G: R1=Me   | R2=Me                           |
| H: R1=Me          | R2=H      |  |                                 |
| Cepafungins I–III |           | I: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>                      | <i>Burkholderia cepacia</i>     |
|                   |           | II: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>  |                                 |
|                   |           | III: R1=(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>                    |                                 |
| Luminmycins A–D   |           | A: R1=CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   | <i>Photorhabdus luminescens</i> |
|                   |           | D: R1=CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>   | <i>Photorhabdus asymbiotica</i> |
|                   |           | B: R1=CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   |                                 |
|                   |           | C: R1=CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   |                                 |

可能编码转运蛋白, 参与 syringolins 的胞外分泌<sup>[10]</sup>, 而 *syIC* 和 *syID* 是结构基因, *syIC* 编码 1 个 NRPS 模块, *syID* 编码 2 个 NRPS 模块和 1 个 PKS 模块, 负责线性合成 syringolins 的骨架结构<sup>[10]</sup>。每个 NRPS 模块有 3 个功能结构域: 腺苷酰化结构域(adenylation domain, A domain)、缩合结构域(condensation domain, C domain)和肽酰基载体蛋白(peptide carrier protein, PCP), 分别负责氨基酸底物的识别活化、肽键缩合、硫化等反应; 其 PKS 模块也包括 3 个核心结构域: 酮基合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶(acyltransferase, AT)和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP), 分别负责二碳缩合、酰基转移和延伸底物引入。此外, syrbactins 的 PKS 模块中还含有 2 个修饰酮基的功能域: 酮基还原酶(ketoreductase, KR)、脱水酶(dehydratase, DH)以及负责将聚肽-酮杂合链释放和环化的硫化结构域(thioesterase, TE)<sup>[11]</sup>(图 1)。

Glidobactins 生物合成基因簇克隆自伯克氏菌, 共含有 8 个基因 *glbA-H*<sup>[12]</sup>。*glbA* 是正调控基因<sup>[12]</sup>, *glbB* 可能负责赖氨酸的羟基化, 本课题组将该基因敲除后 glidobactin A 消失, 产生去羟基的衍生物 luminmycin A (数据未发表), *glbF* 和 *glbC* 是结构基因, 分别与 *syIC* 和 *syID* 对应, *glbF* 编码 1 个 NRPS 模块, *glbC* 编码 2 个 NRPS 和 1 个 PKS 模块<sup>[12]</sup>, *glbD* 编码转运蛋白, *glbE* 编码一类 MbtH-like 分子伴侣, 可能具有提高 GlbF 稳定性的作用<sup>[12]</sup>, *glbG* 编码酮异构酶, *glbH* 功能未知<sup>[12]</sup>。本课题组将 *glbG* 和 *glbH* 敲除后, glidobactin A 产量明显下降, 同时还有一些类似物产生(数据未发表)(图 1)。

除了上述两种类型的基因簇, 2014 年, Biggins 等从类鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)中发现了 syrbactins 基因簇(SYR), 包含 *syrA-I* 9 个基因, 通过在基因簇前插入诱导型启动子得到 glidobactin C 和 deoxyglidobactin C 两个化合物<sup>[13]</sup>(图 1)。

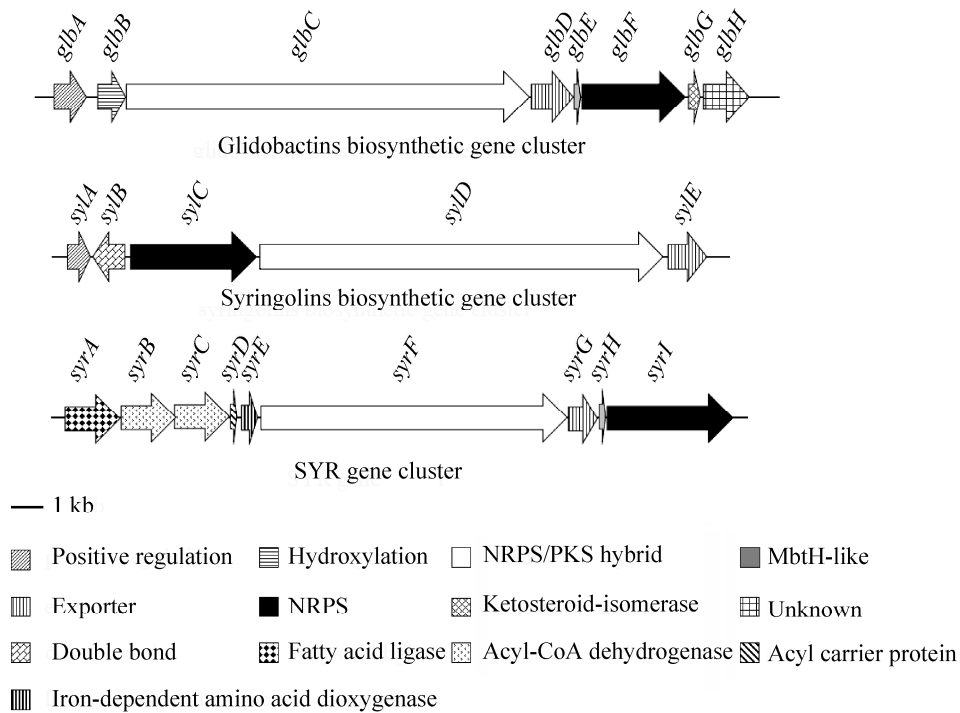


图 1. 几种 syrbactins 的生物合成基因簇示意图  
Figure 1. Biosynthetic gene clusters of syrbactins.

## 2.2 Syrbactins 母核的生物合成过程

研究发现, 虽然 syrbactins 结构不同, 来源不同, 但其母核的生物合成机制非常相似: 十二元内酰胺环母核骨架都是由非核糖体肽合成酶 (NRPS)-聚酮合酶 (PKS) 复合体采用模块化组装的方式, 将系列底物组装而成。下面以 syringolins 和 glidobactins 为例阐述 syrbactins 母核生物合成

过程(图 2)。

母核链的引发和起始: Syringolins 生物合成的起始由 SylC 模块催化完成。2009 年, Dudler<sup>[14]</sup> 和 Wuest<sup>[15]</sup> 课题组通过同位素标记实验证明 SylC 能够活化两分子氨基酸并利用重碳酸盐/CO<sub>2</sub> 形成脲键, 将两分子氨基酸连接在一起, 最终形成特殊的 Val(Ile)-CO-Val(Ile)-S-SylC 起始结构。在

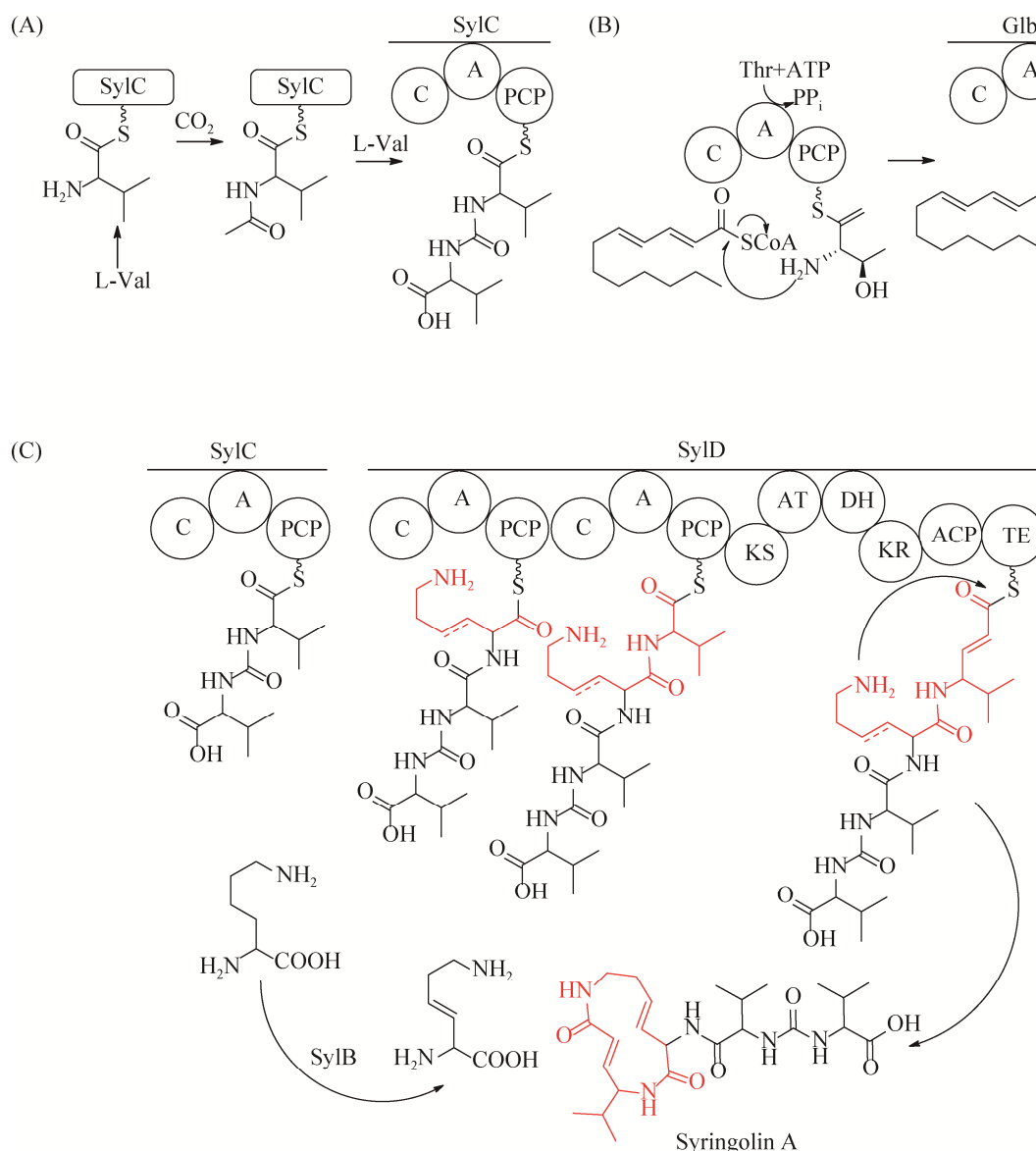


图 2. Syringolin A 的生物合成过程

Figure 2. The biosynthetic pathway of syringolin A. A: SylC catalyzes the ureido dipeptide formation; B: GlbF catalyzes the N-acylation of threonine; C: The NRPS/PKS assembly line of syringolin A.

glidobactins 的生物合成中,链的起始是由 GlbF 模块催化完成的:首先 GlbF 中的 A domain 选择和活化苏氨酸,在 ATP 的参与下形成腺苷化苏氨酸;活化的腺苷化苏氨酸连接到 PCP 的巯基基团上,然后 C domain 利用脂酰辅酶 A 作为供体,将活化的苏氨酸变成脂酰化苏氨酸,形成 fatty acyl-Thr-S-pantetheinyl-GlbF 起始结构<sup>[16]</sup>。

母核链的延伸和转移:与一般的 NRPS 催化机制类似, syrbaactins 生物合成中每一个 NRPS 模块负责将 1 个氨基酸整合到产物的骨架中(经历底物氨基酸的活化、转移及缩合构成新肽键),从而产生延长了 1 个氨基酸的新的肽酰-S-载体复合物和游离的载体。肽链的延伸顺序与基因簇中模块排列顺序一致。当肽链延伸到最后 PKS 模块的 ACP 上,在 KS 模块作用下延长 1 个二碳单位,β 羰基经过 KR、DH 几个模块催化最终形成双键结构。

母核链的终止、释放与环化: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 TE 结构域。最后在 TE 模块作用下中间产物被释放,经过分子内亲核攻击而合成环化产物。

除母核之外,这些化合物基因簇中还有一些推测负责母核的结构修饰(如差向异构化、甲基化、杂环化或氧化等过程)等相关基因,但研究较少。在 glidobactins、cepafungins 和 luminmycins 等化合物结构中的脂酰链的选择以及与母核的结合也鲜有研究<sup>[16]</sup>。

### 3 Syrbaactins 的生物活性和构效优化

#### 3.1 Syrbaactins 作用靶标——蛋白酶体

蛋白酶体是真核生物中普遍存在的酶复合体,它是泛素-蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)的核心组分,是真核细胞高效并高

选择性地降解错误折叠、过量蛋白的主要方式。真核细胞 26S 蛋白酶体包含有 1 个 20S 核心颗粒和 2 个 19S 调节颗粒。所有的 20S 颗粒都是由 4 个七元环按照顺序  $\alpha_{1-7}$ - $\beta_{1-7}$ - $\beta_{1-7}$ - $\alpha_{1-7}$  堆积而成的筒状结构。其中  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  和  $\beta_5$  三种亚基分别具有类胱天蛋白酶(caspase-like)、类胰蛋白酶(tryptic-like)和类胰凝乳蛋白酶(chymotryptic-like)活性<sup>[17]</sup>。它们的 N 末端苏氨酸残基是蛋白酶体的 3 个活性位点,用于蛋白质水解反应<sup>[17]</sup>。

原核生物,主要是放线菌细胞中,也存在类似于真核细胞的蛋白酶体系统——泛素样蛋白-蛋白酶体系统(prokaryotic ubiquitin-like protein-proteasome system, PPS)。在特定环境下,原核类泛素蛋白(prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup)选择性标记胞内蛋白,并介导靶蛋白进入原核蛋白酶体降解。目前对于原核蛋白酶体的研究主要是在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中进行的。结核分枝杆菌 20S 蛋白酶体与真核细胞 20S 蛋白酶体核心颗粒结构相似,同样是由 4 个堆叠的七元环组成。不同的是,结核分枝杆菌 20S 蛋白酶体包含有 14 个相同的  $\alpha$  亚基和 14 个相同的  $\beta$  亚基,且 14 个  $\beta$  亚基均具有胰凝乳蛋白酶活性<sup>[18-19]</sup>。

#### 3.2 Syrbaactins 可作为蛋白酶体抑制剂类抗肿瘤药物

2008 年, Groll 等首次阐明了 syringolin A 和 glidobactin A 作为不可逆蛋白酶体抑制剂与蛋白酶体的相互作用机制,并证明 syringolin A 十二元内酰胺环上 C-4 位置的双键能够与 20S 蛋白酶体 N 末端苏氨酸残基上的羟基发生 Michael 1,4-加成反应,从而对蛋白酶体产生不可逆的抑制<sup>[20]</sup>(图 3)。

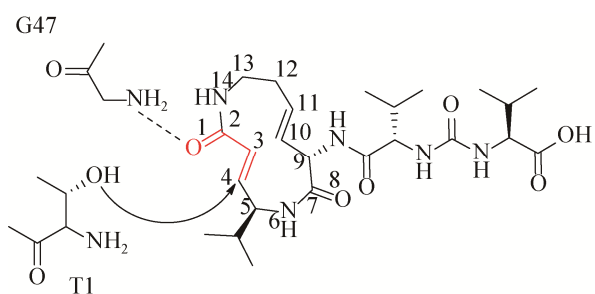


图 3. Syringolin A 与 20S 蛋白酶体相互作用  
Figure 3. Binding mode of syringolin A with 20S proteasome.

肿瘤细胞快速增殖的特性使其基因组不稳定, 更加依赖于蛋白酶体高表达来清除细胞内错误折叠或损伤的蛋白质。事实上, 原发性肿瘤中蛋白酶体水平和活性远高于正常组织<sup>[21]</sup>。所以与正常细胞相比较, 癌细胞对蛋白酶体抑制剂更为敏感。抑制蛋白酶体活性能够促进细胞凋亡, 尤其是处于快速分裂中的癌细胞的凋亡, 这使得蛋白酶体成为抗肿瘤药物筛选的分子靶标<sup>[22-23]</sup>。

Syrbactins 家族化合物作为一类结构新颖的蛋白酶体抑制剂具有优异的抗肿瘤活性, 其对神经母细胞瘤、人类多发性骨髓瘤和卵巢癌细胞均有显著抑制效果<sup>[24-26]</sup>。Cepafungin I 对酵母蛋白酶体的 IC<sub>50</sub> 仅为 4 nmol/L, 是 syrbactins 家族中抗肿瘤活性最高的化合物, 被认为是最有开发潜力的抗癌药物先导化合物之一<sup>[27]</sup>。

### 3.3 Syrbactins 可作为抗感染药物

结核病(tuberculosis TB)是由结核分枝杆菌感染引起的一种严重威胁人类健康的慢性传染病。结核分枝杆菌进入人体后, 能够通过蛋白酶体及时清除由于受到宿主防御系统抵制而损伤的蛋白质, 从而使自身能够在宿主细胞内长期存在。据统计, 全球至少有 20 亿人潜伏感染结核分枝杆菌, 最终患结核病的感染者约占 5%–10%。因此, 如

何抑制这些潜伏的结核分枝杆菌成为结核病防控的重要研究内容。

同哺乳动物蛋白酶体具有 7 类 β-亚基的结构相比, 结核分枝杆菌蛋白酶体的内核仅含有一类 β-亚基, 活性位点更加广泛, 是一种很有潜力但非传统的药物靶标。Syrbactins 家族化合物是结核分枝杆菌 20S 蛋白酶体的选择性抑制剂。2016 年, Totaro 等通过理性设计合成的 syringolin 同系物 1, 减弱了对人 20S 蛋白酶体的抑制, 但却将对结核分枝杆菌 20S 蛋白酶体的抑制活性提高了 70 多倍, 成为结核病药物开发的新起点<sup>[28]</sup>。

### 3.4 对植物抗病性的诱导作用

丁香假单胞菌(*P. syringae*)分泌的 syringolin A 是一种植物抗病诱导剂, 它能够被水稻、小麦等植物识别, 进而激活宿主防御基因, 诱导植物产生获得抗病性(acquired resistance, AR)<sup>[3]</sup>。

### 3.5 Syrbactins 的构效优化

目前几个课题组通过化学合成的方式合成了一系列 syrbactins 的同系物, 希望通过构效优化提高 syrbactins 的抗菌和抗肿瘤活性。

Glidobactin A 衍生物: 1988 年, Oka 等将 glidobactin A 酶解消化得到核心结构——十二元内酰胺环, 然后通过 DCC/HOBt 耦合反应为其加上不同的侧链合成了 30 多种 glidobactins 衍生物。生物活性表明脂肪酸侧链的长度和饱和程度被证明是影响这类化合物生物活性的一个重要因素<sup>[25]</sup>。

Syringolins 衍生物: 2009 年至 2011 年间, Clerc 等先后合成了脂链 syringolin A (sylA-Lip)(2)、聚乙二醇 syringolin A (sylA-PEG)(3) 以及 syringolin A 和 glidobactin A 的杂合化合物 sylA-glbA (4)<sup>[29-31]</sup>。2014 年, Chiba 等基于 syringolin A 合成了系列化合物<sup>[32]</sup>。令人振奋的是,

这些化合物与天然产物相比均有更好的蛋白酶体抑制活性,尤其是 19a-e 这一组化合物对蛋白酶体胰凝乳蛋白酶活性位点的表观抑制常数  $K_i'$  仅为 0.14–1.10 nmol/L (抑制效力是 syringolin A 的 800 倍,是 glidobactin A 的 50 倍),具有良好的蛋白酶体抑制剂开发潜力,具有比天然 syringolin A 更好的抗肿瘤活性,能够抑制人神经母细胞瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌细胞、表皮癌细胞等多种癌细胞的增殖,其中 19a(5)对人骨髓瘤细胞 RPMI8226 的  $IC_{50}$  仅为 2.2 nmol/L,可与已经上市的蛋白酶体抑制剂类抗癌药物硼替佐米相媲美。此外,研究发现 syringolins 侧链的氨基酸构型,尤其是紧连赖氨酸残基的第一个氨基酸的构型对其活性也有影响,侧链为 D 型氨基酸的 syringolin A 比 L 型 syringolin A 的活性低几十倍<sup>[30,33]</sup>(图 4)。

2016 年, Bachmann 等化学合成的 syrbactins 类似物 TIR-199(6)具有选择性作用于肾癌细胞的优异活性,是天然化合物 syringolin A 的 250 多倍,曾被美国国家癌症研究所列入优先研发药物之列,最近该课题组合成了其一系列硫代化合物,提高了其水溶性,而且发现化合物 7 和 8 具有选择性作用于免疫蛋白酶体  $\beta 2$  亚基的抑制活性<sup>[34–35]</sup>(图 4)。

2018 年, Yoshida 等通过一系列实验证明 syringolin 类似物 syringolog-1(5)是 20S 蛋白酶体  $\beta 5$  和  $\beta 2$  两个活性位点的双重抑制剂,它不仅抑制正常多发性骨髓瘤细胞,而且对耐硼替佐米骨髓瘤细胞株表现出显著的抗肿瘤活性<sup>[36]</sup>。这些研究为新一代蛋白酶体抑制剂类抗癌药物的开发提供了理论基础。

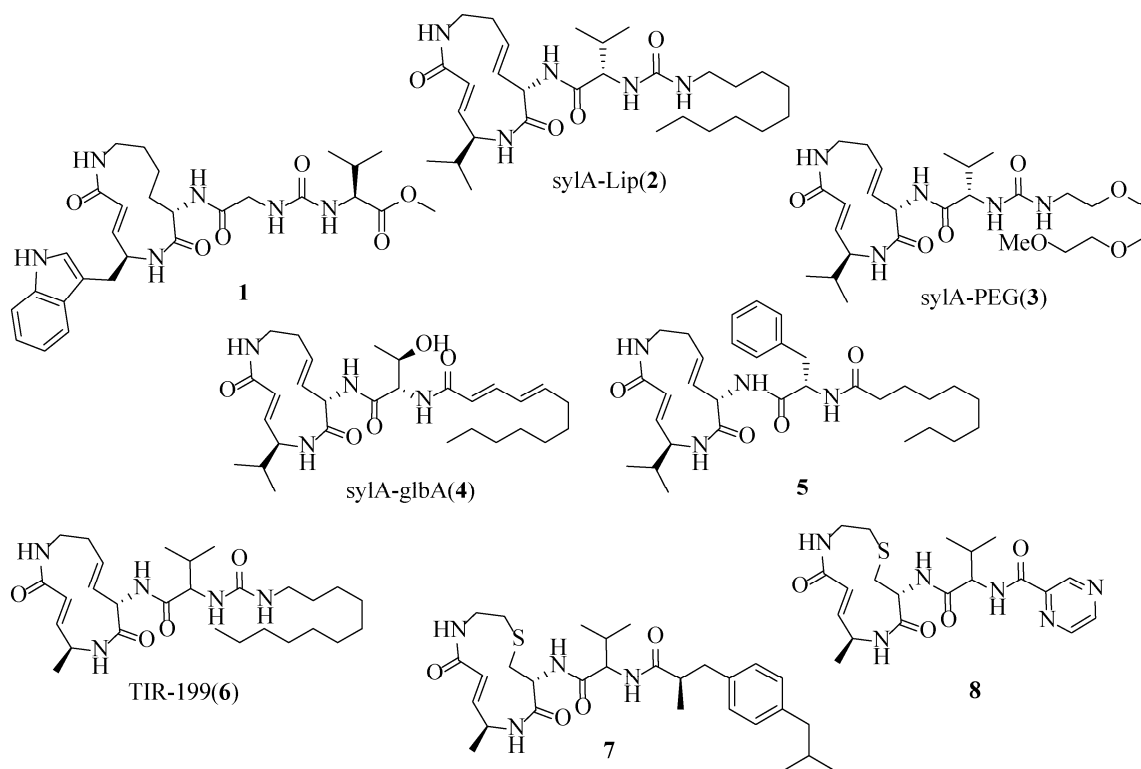


图 4. 几种化学合成的 syrbactins 同系物

Figure 4. Structural diversity of syrbactins analogs.

## 4 合成生物学技术用于 *syrbactins* 生物合成基因挖掘和合成途径改造

### 4.1 GenBank 中 *syrbactins* 生物合成基因簇的挖掘和直接克隆技术(Rec/ET 大片段 DNA 直接克隆技术)

随着越来越多的微生物基因组被测序, GenBank 数据库中大量的细菌基因组及宏基因组信息为发现潜在的 *syrbactins* 化合物生物合成基因提供了重要的数据资源。除了上述这些已经成功表达的 *syrbactins* 生物合成基因簇以外, 本课题组已经在其他菌种如类鼻疽伯克氏菌 (*B. pseudomallei*)、荚壳伯克氏菌 PG1 (*B. glumae* PG1) 中发现与 *syrbactins* 类似的生物合成基因簇, 并尝试对 PG1 中的同源基因簇进行原位激活实验。

*Syrbactins* 产生菌多数难以直接进行遗传操作, 且 *syrbactins* 生物合成基因数量多, 基因簇一般都较长, 很难直接扩增或合成。而本课题组建立的基于大肠杆菌原噬菌体 RecE/RecT DNA 重组酶的“Red/ET 大片段 DNA 直接克隆技术”可以克服这个技术瓶颈<sup>[37-39]</sup>。

“Red/ET 大片段 DNA 直接克隆技术”是指将线性 dsDNA 载体[包括质粒的复制起点(*ori*)、选择性标记基因(*sm*)和相应同源臂与线性化的基因组]

DNA 混合, 共转化到含有 RecE/RecT 重组酶的 *E. coli* 细胞内。RecE/RecT 重组酶可以介导线-线 DNA 同源重组(即线性载体通过末端的同源臂与基因组片段上的靶标 DNA 发生重组, 形成能在 *E. coli* 细胞内复制的质粒)(图 5)。利用该技术, 本课题组从发光杆菌(*P. luminescens*)染色体上克隆了包括 luminmides 和 luminmycins/glidobactins 的沉默基因簇(10-52 kb)<sup>[8,40]</sup>, 从假单胞菌(*P. syringae*)基因组中克隆了 syringolins 的生物合成基因簇(22 kb)<sup>[5,41]</sup>, 并成功地在异源宿主中进行了表达, 表明该技术在天然产物基因簇直接克隆上具有很大优势。

### 4.2 *Syrbactins* 生物合成基因簇异源表达底盘生物的筛选和优化

创新药物的人工生物合成还需要有适配的底盘生物提供一个利于生产的内环境。微生物会通过复杂的系统精细地控制 *syrbactins* 生物合成相关酶系的表达, 从而控制最后活性产物的产量; 在细胞工厂里, 只有通过精细地微调各部分之间的比例才能最大化地释放细胞的合成潜能, 高效地生产目的产物。

已发现从土壤中分离到的伯克氏菌 DSM7029 能够产生聚酮合酶与非核糖体多肽合成酶 (PKS/NRPS) 杂合的化合物 *glidobactin*, 表明该菌

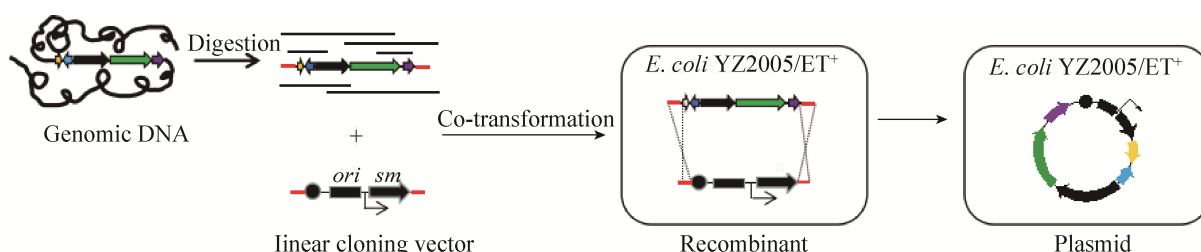


图 5. Red/ET 大片段 DNA 直接克隆示意图  
Figure 5. Diagram of Red/ET DNA direct cloning.



具有合成聚酮类和非核糖体多肽类化合物所必需的基本元件和 PKS/NRPS 激活所需要的因子磷酸泛酰巯基乙胺转移酶。本课题组在该菌株中建立了一套简单高效的遗传操作系统, 并利用该系统实现了 DSM7029 作为天然产物通用底盘菌的改造和优化<sup>[42]</sup>。

此外, 以 *E. coli* Nissle1917 (欧洲市场的一株常用益生菌) 作为底盘细胞, 具有生长速度快、遗传操作方便、可表达天然产物合成基因等优势; 而且 Red/ET DNA 同源重组技术可以在其细胞内高效工作, 在其中直接完成药物基因簇的修饰和表达<sup>[8]</sup>。利用 *E. coli* Nissle1917, 本课题组实现了 luminmides 和 luminmycins/glidobactins 等基因簇的异源表达, 且在 *E. coli* Nissle1917 导入粘细菌来源的磷酸泛酰巯基乙胺转移酶基因 *mtaA* 后, 插入组成型启动子显著提高 glidobactin 的产量(10

倍)<sup>[40]</sup>。这都为优化 syrbactins 人工合成途径和高效适配的底盘宿主打下了良好的基础。

## 5 总结和展望

在中国, 癌症已成为疾病死因之首。抗癌药物研发刻不容缓。用于癌症治疗的蛋白酶体抑制剂品种不多, 主要分为肽类和非肽类(图 6)。肽类中, 最早上市的硼替佐米(Bortezomib)作为一线药物已被用于多发性骨髓瘤、套细胞淋巴瘤治疗, 对胰腺癌、非霍奇金氏淋巴瘤都有抑制效果, 但其副作用明显, 会导致神经退行病症<sup>[43-45]</sup>。卡非佐米(Carfilzomib)对复发难治多发性骨髓瘤具有持久的抗癌活性, 该药物在临床 III 期试验中与地塞米松(Dexamethasone)联合使用能显著延长患者生存期, 但它在使用中会出现中性粒细胞减少症和血小板减少的情况<sup>[46]</sup>。Ixazomib 是 FDA 批准的

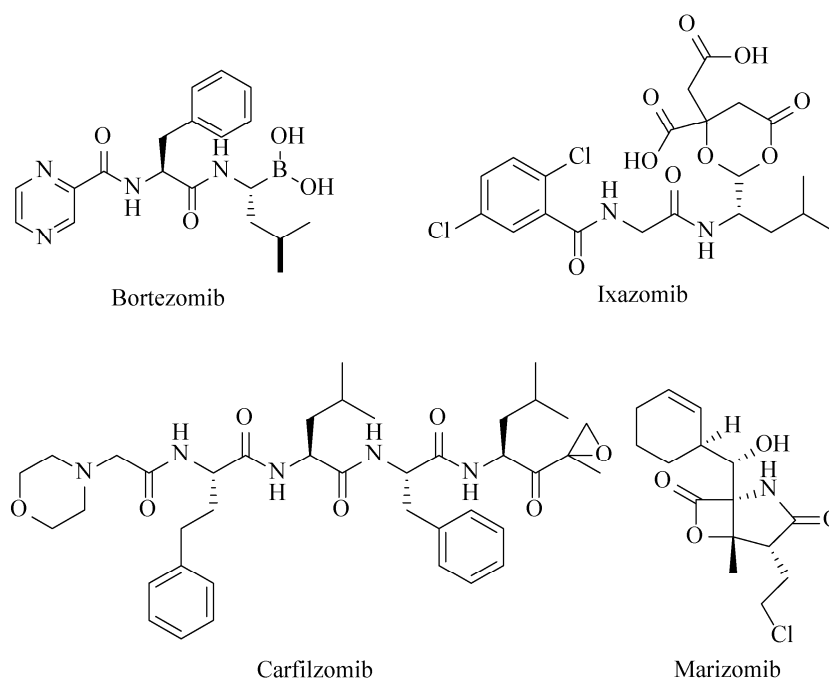


图 6. 已经批准上市的几种蛋白酶体抑制剂抗癌药物

Figure 6. Structures of several proteasome inhibitors that have already been approved to go on the market.

首个可口服的用于治疗多发性骨髓瘤的蛋白酶体抑制剂<sup>[22]</sup>。Marizomib 是一种具有稳定的  $\beta$ -内酯结构的非肽类蛋白酶体抑制剂, 更有利于促进肿瘤细胞凋亡, 2014 年被美国 FDA 授予“孤儿药”资格, 用于治疗复发性恶性胶质瘤<sup>[47]</sup>。还有一些二代肽类蛋白酶抑制剂正在临床前研究中。

在国内, 蛋白酶体抑制剂研发多是集中在药理方面, 生物合成研究鲜见报道, 已经有几家研究机构在进行化合物的化学合成和修饰。目前我国尚无自主知识产权的蛋白酶体抑制剂类抗肿瘤药物。

不同于上述已经用于临床的蛋白酶体抑制剂, syrbactins 家族化合物的十二元内酰胺环活性中心可与蛋白酶体  $\beta$  亚基 N 末端的酶活中心的苏氨酸羟基发生共价加成反应, 这种作用是不可逆的。更重要的是这类化合物独特的化学结构和作用机理使其对蛋白酶体  $\beta$  亚基有更强的选择性, 所以 syrbactins 被认为具有成为新一代抗癌药物先导化合物的潜力。

近年来, 通过化学合成改造 syrbactins 结构来提高其生物活性已经初见成效, 比如 2016 年合成的 syrbactins 类似物 TIR-199 具有选择性作用于肾癌细胞的优异活性, 但其水溶性低的缺点阻碍了其应用, 没有达到治疗肿瘤的理想效果。

除了化学合成, 通过生物技术来对 syrbactins 进行构效优化似乎更加符合临床重大需求。鉴于 syrbactins 的骨架结构是由合成酶的催化模块和功能结构域的排列顺序来决定, 这种模块化的装配催化机制可以允许研究人员对其相关结构域和模块的功能进行重排, 可以人为控制其聚酮或聚肽骨架结构的合成。因此通过合成生物学的方法构建人工的 syrbactins 生物合成途径、在适配底盘细

胞中高效表达、筛选高活性低毒性的蛋白酶体抑制剂将是一个很有前景的研究方向, 有助于推进蛋白酶体抑制剂类抗肿瘤药物的新药研发, 但目前尚未有这方面的报道。

伴随着大片段直接克隆、多片段有序拼接等生物工程技术的成熟, 包括 syringolins、glidobactins、luminmycins 在内的几个 syrbactins 家族化合物的生物合成基因簇已经被克隆和异源表达。可以从 GenBank 等数据库或者相应菌株中挖掘更多的 syrbactins 类似基因簇, 以进一步深入研究其生物合成机制, 为合理设计和改造 syrbactins 化合物积累资源, 提供理论支持。

过去的 30 年中, 人们在 syrbactins 的化学结构、生物活性、作用机理和化学合成等方面的研究取得了一系列重要进展<sup>[48]</sup>。尽管如此, 对于这类化合物的认识仍然存在盲点。继续开展对这类化合物的研究, 对抗肿瘤新药的开发具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Oka M, Yaginuma K, Numata K, Konishi M, Oki T, Kawaguchi H. Glidobactins A, B and C, new antitumor antibiotics. II. Structure elucidation. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(10): 1338–1350.
- [2] Oka M, Ohkuma H, Kamei H, Konishi M, Oki T, Kawaguchi H. Glidobactins D, E, F, G and H; minor components of the antitumor antibiotic glidobactin. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(12): 1906–1909.
- [3] Wäspi U, Blanc D, Winkler T, Rüedi P, Dudler R. Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(8): 727–733.
- [4] Wäspi U, Hassa P, Staempfli AA, Molleyres LP, Winkler T, Dudler R. Identification and structure of a family of syringolin variants: Unusual cyclic peptides from

- Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that elicit defense responses in rice. *Microbiological Research*, 1999, 154(1): 89–93.
- [5] Bian XY, Huang F, Stewart FA, Xia LQ, Zhang YM, Müller R. Direct cloning, genetic engineering, and heterologous expression of the syringolin biosynthetic gene cluster in *E. coli* through Red/ET recombineering. *ChemBioChem*, 2012, 13(13): 1946–1952.
- [6] Shoji J, Hino H, Kato T, Hattori T, Hirooka K, Tawara K, Shiratori O, Terui Y. Isolation of cepafungins I, II and III from *Pseudomonas* species. *The Journal of Antibiotics*, 1990, 43(7): 783–787.
- [7] Terui Y, Nishikawa J, Hino H, Kato T, Shoji J. Structures of cepafungins I, II and III. *The Journal of Antibiotics*, 1990, 43(7): 788–795.
- [8] Bian XY, Plaza A, Zhang YM, Müller R. Luminmycins A–C, cryptic natural products from *Photobacterium luminescens* identified by heterologous expression in *Escherichia coli*. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(9): 1652–1655.
- [9] Theodore CM, King JB, You JL, Cichewicz RH. Production of cytotoxic glidobactins/luminmycins by *Photobacterium asymbiotica* in liquid media and live crickets. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(11): 2007–2011.
- [10] Amrein H, Makart S, Granado J, Shakya R, Schneider-Pokorny J, Dudler R. Functional analysis of genes involved in the synthesis of Syringolin A by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D-R. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(1): 90–97.
- [11] Walsh CT. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*, 2004, 303(5665): 1805–1810.
- [12] Schellenberg B, Bigler L, Dudler R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(7): 1640–1650.
- [13] Biggins JB, Kang HS, Ternei MA, DeShazer D, Brady SF. The chemical arsenal of *Burkholderia pseudomallei* is essential for pathogenicity. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(26): 9484–9490.
- [14] Ramel C, Tobler M, Meyer M, Bigler L, Ebert MO, Schellenberg B, Dudler R. Biosynthesis of the proteasome inhibitor Syringolin A: the ureido group joining two amino acids originates from bicarbonate. *BMC Biochemistry*, 2009, 10: 26.
- [15] Imker HJ, Walsh CT, Wuest WM. SylC catalyzes ureido-bond formation during biosynthesis of the proteasome inhibitor Syringolin A. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(51): 18263–18265.
- [16] Imker HJ, Krahn D, Clerc J, Kaiser M, Walsh CT. N-Acylation during glidobactin biosynthesis by the tridomain nonribosomal peptide synthetase module GlbF. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(10): 1077–1083.
- [17] Borissenko L, Groll M. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chemical Reviews*, 2007, 107(3): 687–717.
- [18] Pearce MJ, Mintseris J, Ferreyra J, Gygi SP, Darwin KH. Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2008, 322(5904): 1104–1107.
- [19] Hu GQ, Lin G, Wang M, Dick L, Xu RM, Nathan C, Li HL. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome and mechanism of inhibition by a peptidyl boronate. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(5): 1417–1428.
- [20] Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK, Lindow S, Kaiser M, Dudler R. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature*, 2008, 452(7188): 755–758.
- [21] Chen L, Madura K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Research*, 2005, 65(13): 5599–5606.
- [22] Śledź P, Baumeister W. Structure-driven developments of 26S proteasome inhibitors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2016, 56(1): 191–209.
- [23] Rentsch A, Landsberg D, Brodmann T, Bülow Leila, Girbig AK, Kalesse M. Synthesis and pharmacology of proteasome inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(21): 5450–5488.
- [24] Coleman CS, Rocetes JP, Park DJ, Wallick CJ, Warn-Cramer BJ, Michel K, Dudler R, Bachmann AS. Syringolin A, a new plant elicitor from the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, inhibits the proliferation of neuroblastoma and ovarian cancer cells and induces apoptosis. *Cell Proliferation*, 2006, 39(6): 599–609.
- [25] Oka M, Numata K, Nishiyama Y, Kamei H, Konishi M, Oki T, Kawaguchi H. Chemical modification of the antitumor

- antibiotic glidobactin. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(12): 1812–1822.
- [26] Archer CR, Koomoa DLT, Mitsunaga EM, Clerc J, Shimizu M, Kaiser M, Schellenberg B, Dudler R, Bachmann AS. Syrbactin class proteasome inhibitor-induced apoptosis and autophagy occurs in association with p53 accumulation and Akt/PKB activation in neuroblastoma. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(2): 170–178.
- [27] Stein ML, Beck P, Kaiser M, Dudler R, Becker CFW, Groll M. One-shot NMR analysis of microbial secretions identifies highly potent proteasome inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(45): 18367–18371.
- [28] Totaro KA, Barthelme D, Simpson PT, Jiang XJ, Lin G, Nathan CF, Sauer RT, Sello JK. Rational design of selective and bioactive inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *ACS Infectious Diseases*, 2017, 3(2): 176–181.
- [29] Clerc J, Groll M, Illich DJ, Bachmann AS, Huber R, Schellenberg B, Dudler R, Kaiser M. Synthetic and structural studies on Syringolin A and B reveal critical determinants of selectivity and potency of proteasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(16): 6507–6512.
- [30] Clerc J, Schellenberg B, Groll M, Bachmann AS, Huber R, Dudler R, Kaiser M. Convergent synthesis and biological evaluation of Syringolin A and derivatives as eukaryotic 20S proteasome inhibitors. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010, 2010(21): 3991–4003.
- [31] Clerc J, Li N, Krahn D, Groll M, Bachmann AS, Florea BI, Overkleeft HS, Kaiser M. The natural product hybrid of Syringolin A and Glidobactin A synergizes proteasome inhibition potency with subsite selectivity. *Chemical Communications*, 2011, 47(1): 385–387.
- [32] Chiba T, Hosono H, Nakagawa K, Asaka M, Takeda H, Matsuda A, Ichikawa S. Total synthesis of Syringolin A and improvement of its biological activity. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(19): 4836–4839.
- [33] Kolodziejek I, Misas-Villamil JC, Kaschani F, Clerc J, Gu C, Krahn D, Niessen S, Verdoes M, Willems LI, Overkleeft HS, Kaiser M, van der Hoorn RAL. Proteasome activity imaging and profiling characterizes bacterial effector Syringolin A. *Plant Physiology*, 2011, 155(1): 477–489.
- [34] Bachmann AS, Opoku-Ansah J, Ibarra-Rivera TR, Yco LP, Ambadi S, Roberts CC, Chang CA, Pirrung MC. Syrbactin structural analog TIR-199 blocks proteasome activity and induces tumor cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(16): 8350–8362.
- [35] Bakas NA, Schultz CR, Yco LP, Roberts CC, Chang CA, Bachmann AS, Pirrung MC. Immunoproteasome inhibition and bioactivity of thiasyrbactins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2018, 26(2): 401–412.
- [36] Yoshida T, Ri M, Kanamori T, Aoki S, Ashour R, Kinoshita S, Narita T, Totani H, Masaki A, Ito A, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Kitahata S, Chiba T, Ichikawa S, Iida S. Potent anti-tumor activity of a syringolin analog in multiple myeloma: a dual inhibitor of proteasome activity targeting  $\beta 2$  and  $\beta 5$  subunits. *Oncotarget*, 2018, 9(11): 9975–9991.
- [37] Fu J, Bian XY, Hu SB, Wang HL, Huang F, Seibert PM, Plaza A, Xia LQ, Müller R, Stewart AF, Zhang YM. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 440–446.
- [38] Wang HL, Li Z, Jia RN, Yin J, Li AY, Xia LQ, Yin YL, Müller R, Fu J, Stewart AF, Zhang YM. ExoCET: exonuclease *in vitro* assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(5): e28.
- [39] Wang HL, Li Z, Jia RN, Hou Y, Yin J, Bian XY, Li AY, Müller R, Stewart AF, Fu J, Zhang YM. RecET direct cloning and Red $\alpha\beta$  recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression. *Nature Protocols*, 2016, 11(7): 1175–1190.
- [40] Bian XY, Huang F, Wang HL, Klefisch T, Müller R, Zhang YM. Heterologous Production of glidobactins/luminmycins in *Escherichia coli* Nissle containing the glidobactin biosynthetic gene cluster from *Burkholderia* DSM7029. *ChemBioChem*, 2014, 15(15): 2221–2224.
- [41] Huang F, Tang JL, He L, Ding XZ, Huang SY, Zhang YM, Sun YJ, Xia LQ. Heterologous expression and antitumor activity analysis of syringolin from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 31.
- [42] Wang X, Zhou HB, Chen HN, Jing XS, Zheng WT, Li RJ, Sun T, Liu JQ, Fu J, Huo LJ, Li YZ, Shen YM, Ding XM, Müller R, Bian XY, Zhang YM. Discovery of recombinases

- enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in Burkholderiales species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(18): E4255–E4263.
- [43] Price CTD, Al-Quadan T, Santic M, Rosenshine I, Kwaik YA. Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science*, 2011, 334(6062): 1553–1557.
- [44] Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade®: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*, 2003, 8(6): 508–513.
- [45] Murray MY, Auger MJ, Bowles KM. Overcoming bortezomib resistance in multiple myeloma. *Biochemical Society Transactions*, 2014, 42(4): 804–808.
- [46] Dimopoulos MA, Goldschmidt H, Niesvizky R, Joshua D, Chng WJ, Oriol A, Orłowski RZ, Ludwig H, Facon T, Hajek R, Weisel K, Hungria V, Minuk L, Feng SB, Zahlten-Kumeli A, Kimball AS, Moreau P. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 2017, 18(10): 1327–1337.
- [47] Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42(3): 355–357.
- [48] Krahn D, Ottmann C, Kaiser M. The chemistry and biology of syringolins, glidobactins and cepafungins (syrbactins). *Natural Product Reports*, 2011, 28(11): 1854–1867.

## Advances in biosynthesis of proteasome inhibitor syrbactins

Xiaotong Liu, Xiaokun Xu, Youming Zhang\*, Aiying Li\*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Microbial Biotechnology Institute, Shandong University-Helmholtz Institute of Biotechnology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong Province, China

**Abstract:** Syrbactins are microbial natural products, mainly composed of syringolins, glidobactins, cepafunins and luminmycins. At present, several biosynthetic gene clusters of syringolins and other compounds have been cloned, sequenced and heterologously expressed. These studies revealed that, despite the structural differences between syrbactins, they are synthesized *in vivo* in a similar mode and share a NRPS-PKS hybrid assembly biosynthetic pathway for the formation of their core skeletons. They have drawn continuous research attentions due to the irreversible proteasome inhibition activity. This review focuses on the research advances in syrbactins and highlights their structure, biosynthesis and mode-of-action.

**Keywords:** syrbactins, proteasome inhibition, biosynthesis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31670097), by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2015GSF12101), by the Major Special Project in Shandong Province (2015ZDJS04001) and by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2017MC031)

\*Corresponding author. Youming Zhang, Tel: +86-532-67720918, E-mail: zhangyouming@sdu.edu.cn; Aiying Li, Tel: +86-532-67722928, E-mail: ayli@sdu.edu.cn

Received: 8 May 2018; Revised: 11 July 2018; Published online: 19 July 2018