



钙霉素聚酮链释放亚基蛋白性质优化及底物选择性

李希希, 王嘉良, 曹卫, 李丹丹, 邓子新, 汪志军, 梁晶丹*

微生物代谢国家重点实验室 代谢与发育科学国际联合实验室 生命科学技术学院 上海交通大学, 上海 200240

李希希, 王嘉良, 曹卫, 李丹丹, 邓子新, 汪志军, 梁晶丹. 钙霉素聚酮链释放亚基蛋白性质优化及底物选择性[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 194-205.

LI Xixi, WANG Jialiang, CAO Wei, LI Dandan, DENG Zixin, WANG Zhijun, LIANG Jingdan. Property optimization and substrate selectivity of a polyketide chain-releasing subunit CalA3 in calcimycin synthesis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 194-205.

摘要:【目的】钙霉素合成酶亚基 CalA3 释放钙霉素合成过程中的聚酮链。获得生物化学性质稳定、蛋白结构性质均一的 CalA3 蛋白, 可用于冷冻电镜(cryo-electron microscopy)结构解析, 以帮助理解装配线型聚酮合酶亚基释放聚酮链的生物化学机理。探究 CalA3 对不同关键结构特征的聚酮链底物的选择性, 可为制备 CalA3 与小分子化合物的复合物提供生化材料, 同时也为进一步挖掘 CalA3 的成酰胺键的应用潜能提供借鉴。【方法】优化 CalA3 蛋白异源表达菌株的培养条件、CalA3 蛋白纯化的生化条件, 利用负染电镜观察蛋白形态, 计算并分析蛋白质结构的性质; 测定 CalA3 对不同结构的直链聚酮类似物的体外催化活性, 利用色谱和质谱分析鉴定 CalA3 催化 N-乙酰半胱氨酸-吡咯-2-丙酸(SNAC-C3)、N-乙酰半胱氨酸-戊酸(SNAC-C5)和月桂酰辅酶 A 等多种不同结构的直链聚酮底物类似物与 3-羟基邻氨基苯甲酸(3-hydroxy anthranilic acid, 3HA)反应的产物。【结果】利用优化后的培养基 PGTy, 不仅实现了高纯度巨型聚酮合酶 CalA3 超量异源表达, 同时, 负染电镜观察、计算分析表明蛋白颗粒的结构性质优异。使用该条件纯化获得的 CalA3 蛋白, 可以用于制备冷冻电镜样品, 进行结构解析。CalA3 催化 SNAC-C3、SNAC-C5 与 3HA 发生氨解反应, 未检测到 CalA3 对月桂酰辅酶 A 底物的催化活性。【结论】蛋白纯化和负染电镜结果显示, 本研究成功建立了 CalA3 异源表达的大肠杆菌培养条件、蛋白纯化生化条件。体外催化实验结果表明 CalA3 对聚酮链底物的结构选择具有宽泛性。这些发现为进一步探究聚酮合酶的结构、功能及应用提供了一定的借鉴。

关键词: 聚酮合酶; 培养基; 钙霉素合成酶 CalA3; 冷冻电镜; 底物特异性; 体外催化; 聚酮类似物; 结构鉴定

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFA0905404, 2021YFA0910501)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905404, 2021YFA0910501).

*Corresponding author. Tel: +86-21-62932943, E-mail: jdliang@sjtu.edu.cn

Received: 2022-04-14; Accepted: 2022-05-15; Published online: 2022-06-30

Property optimization and substrate selectivity of a polyketide chain-releasing subunit CalA3 in calcimycin synthesis

LI Xixi, WANG Jialiang, CAO Wei, LI Dandan, DENG Zixin, WANG Zhijun, LIANG Jingdan*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] CalA3 subunit catalyzes the release of the polyketide chain in the biosynthesis of calcimycin. This study aims to obtain CalA3 proteins with stable biochemical properties and homogeneous structure for cryo-electron microscopy, to understand the mechanism of polyketide chain releasing by the module of the polyketide synthase, and to explore the selectivity of CalA3 to polyketide substrates with different structures, thereby providing biochemical materials for the complexes of CalA3 with small ligands and a reference for further exploring the catalytic potential of CalA3. [Methods] The medium for culturing the heterologous expression strain and the biochemical conditions for CalA3 protein purification were optimized. Then, the CalA3 proteins were analyzed by negative-stain transmission electron microscopy. The reaction products of S-(2-acetamidoethyl)3-(1H-pyrrol-2-yl) propanethioate (SANC-C3), N-(2-(pentylthio) ethyl) acetamide (SNAC-C5), lauroyl-CoA and 3-hydroxy anthranilic acid (3HA) catalyzed by CalA3 were identified by high performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry (LC-MS). [Results] The strains cultured in the optimized medium PGTY, expressed more CalA3 proteins which exhibited featured structures under negative-stain transmission electron microscope. The purified CalA3 proteins were prepared for cryo-electron microscopy for structural determination. CalA3 catalyzed the aminolysis reaction of SNAC-C5 and SNAC-C3 with 3HA. However, the products of lauroyl-CoA and 3HA catalyzed by CalA3 were not detected. [Conclusion] The results of protein purification and negative-stain transmission electron micrographs show that the conditions for culturing *Escherichia coli* for heterologous expression and purifying CalA3 proteins are established. The results of *in vitro* catalytic experiments demonstrate that CalA3 has broad selectivity for the structure of polyketide substrates. These findings provide a reference for further exploring the structure, functions, and application of polyketide synthases. **Keywords:** polyketide synthase; culture medium; calcimycin synthase CalA3; cryo-electron microscopy; substrate specificity; *in vitro* catalysis; polyketide analogues; structure identification

装配线型聚酮合酶(assembly line polyketide synthase, PKS)能够合成生物活性多样的聚酮类天然产物, 包括抗生素、免疫抑制剂、抗寄生虫和抗肿瘤等药物^[1-5]。钙霉素(calcimycin,

A23187)是一种由装配线型PKS合成的抗生素。钙霉素可以从 *Streptomyces chartreusensis* NRRL3882 分离获得, 属于聚醚类抗生素, 其化学结构十分稳定, 主要包含 3 个部分: α -酮

吡咯环、螺旋环和氨基取代的苯丙恶唑环部分(图 1)^[6]。钙霉素可以特异地结合 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 等二价金属阳离子, 因此被广泛应用于阳离子跨膜运输的细胞膜生物特性和钙离子介导的生化通路的研究^[7-8]。钙霉素不仅对革兰氏阳性菌和一些真菌具有显著的抑制作用, 还能够抑制哺乳动物细胞中的 ATPase 活性, 解偶联氧化磷酸化, 激活细胞凋亡的信号系统^[9-11]。

钙霉素合成基因簇大小为 64 kb, 包含有 27 个开放阅读框(open reading frame, ORF)。其中, *calN1*、*calN2* 和 *calN3* 负责形成钙霉素的吡咯环; *calB1*、*calB2*、*calB3* 和 *calB4* 参与苯丙恶唑环前体 3-羟基邻氨基苯甲酸(3HA)的合成;

calA1、*calA2*、*calA4* 和 *calA5* 是不连续的装配线型 PKS 基因, 主要负责合成螺环前体-直链聚酮^[12]。尽管 *calA3* 也属于 PKS 基因, 但是并不参与聚酮链的合成过程。

最近, 我们发现 CalA3 可以催化化合物 N-乙酰半胱氨酸-吡咯-2-十一烷酸(SNAC-N1)与 3HA 发生氨解反应, 或者催化 SNAC-N1 发生水解反应^[13]。SNAC-N1 是通过化学合成的 CalA3 的底物类似物, 以 N-乙酰半胱氨酸为载体, 通过硫酯键加载了一分子吡咯-2-十一烷酸^[14]。该研究结果证实了钙霉素合成酶 CalA3 主要负责催化聚酮中间体与苯丙恶唑环前体化合物 3HA 缩合, 形成 C-N 键^[13](图 1)。

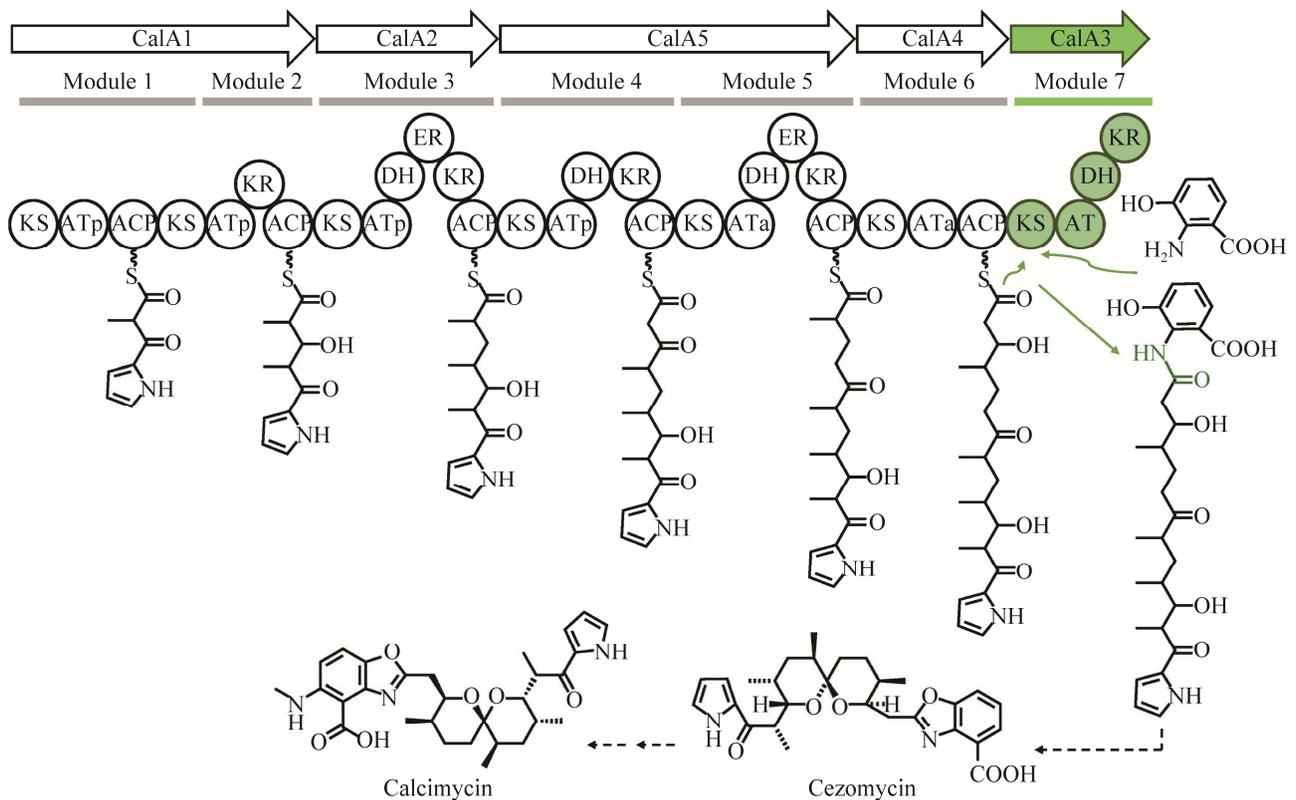


图 1 CalA3 在钙霉素生物合成途径中的功能^[13]

Figure 1 The function of CalA3 in biosynthesis of calcimycin^[13]. The biosynthetic pathway by which CalA1, CalA2, CalA5, CalA4, and CalA3 generates calcimycin. The chain-releasing function of CalA3 is indicated with green arrows. The C-N bonds formed from upstream polyketide chain and 3-HA are highlighted in green. The proposed pathway from the polyketide former to calcimycin is displayed by dotted arrows.

钙霉素合成酶 CalA3 的单体大小为 180 kDa, 主要以二聚体的形式存在^[13]。CalA3 具有 4 个结构域, 分别为酮合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶(acyltransferase, AT)、脱水酶(dehydratase, DH)和酮还原酶(ketoreductase, KR)结构域。生物信息学分析发现, 同其他 CalA 聚酮合酶不同, CalA3 的 AT、DH 和 KR 结构域不具有催化聚酮链延伸的活性部位, 只有 KS 结构域是唯一具有催化功能的结构域, 这表明在钙霉素的生物合成中, CalA3 并不参与聚酮链的合成, 且其主要的催化功能由 KS 结构域负责^[12]。

经典的装配线型 PKS 的 KS 结构域主要负责催化克莱森缩合反应, 形成 C-C 键^[15]。但是 CalA3 的 KS 结构域却能够催化氨解反应, 形成 C-N 键。体内研究发现, CalA3 能够利用多种 3HA 类似物作为氨基供体, 发生氨解反应生成钙霉素的结构类似化合物^[13,16]。但对于不同结构的聚酮链底物, CalA3 是否依旧具有非特异的选择性目前仍未了解。

大肠杆菌具有生长时间短、基因克隆与蛋白表达系统完善和培养操作简单等优势, 常被用作表达蛋白的宿主菌。但是, 由于大肠杆菌缺乏成熟的折叠复性和翻译后修饰系统, 使得外源重组蛋白, 尤其一些巨型蛋白, 容易形成包涵体, 降低活性蛋白的产量。因此, 为了提高可溶性蛋白的产量, 需要筛选合适的表达载体和分子伴侣, 也需要摸索优化大肠杆菌的培养时间、培养温度和培养基成分等条件。

本研究在超级肉汤培养基(terrific broth, TB)的基础上对聚酮合酶 CalA3 的异源表达菌株培养基的营养成分进行了优化, 获得新的 TB 改良培养基-PGTY (phosphate glycerol tryptone yeast extract), 提高了 CalA3 蛋白的产量, 为后续负染电镜和冷冻电镜观察提供了结构完整的高纯度 CalA3 蛋白, 也为 PKS 类大蛋白的异源表达

提供了参考条件。研究同时探索了 CalA3 蛋白对不同结构的聚酮类似物的底物选择性, 利用 SNAC-C3、SNAC-C5、月桂酰辅酶 A 等聚酮类似物作为催化底物, 鉴定了 CalA3 催化 SNAC-C3、SNAC-C5 与 3HA 发生氨解反应的产物, 月桂酰辅酶 A 并不是 CalA3 合适的催化底物。证明了 CalA3 对直链聚酮底物的碳骨架长短和聚酮链末端的吡咯环结构不具有专一的底物选择性, 为进一步挖掘 CalA3 的成酰胺应用潜能提供了参考。以上结果为研究装配线型 PKS 的催化机制提供了一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

实验所用质粒 pET28a-CalA3-cH, pGro7, 菌株大肠杆菌 DH10B、BAP1 为上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保存。

1.1.2 培养基和缓冲液

Luria-Bertani (LB)液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 加去离子水定容至 1 L。

LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 1.5%–2.0%琼脂, 加去离子水定容至 1 L。

10×磷酸缓冲液(g/L): 无水磷酸氢二钾 125.35, 磷酸二氢钾 23.13, 加入去离子水定容至 1 L。

Phosphate-glycerol-tryptone-yeast extracts (PGTY)液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 4%甘油, 加去离子水定容至 900 mL 灭菌备用; 接种时, 补加 100 mL 灭菌后的 10×磷酸缓冲液。

20% L-阿拉伯糖: L-阿拉伯糖 10 g, 去离子水定容至 50 mL, 0.22 μm 滤膜过滤。

20% IPTG: IPTG 10 g, 去离子水定容至 50 mL, 0.22 μm 滤膜过滤。

卡那霉素(50 mg/mL): 卡那霉素 2.5 g, 去离子水定容至 50 mL, 0.22 μm 滤膜过滤。

氯霉素(25 mg/mL): 氯霉素 1.25 g, 无水乙醇溶解至 50 mL, 0.22 μm 滤膜过滤。

Ni 缓冲液 A: Hepes 50 mmol/L, NaCl 700 mmol/L, 5%甘油, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.74。

Ni 缓冲液 B: Hepes 20 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, 5%甘油, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.74。

Ni 缓冲液 C: Hepes 20 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, 5%甘油, 200 mmol/L 咪唑, pH 7.74。

Heparin 缓冲液 A: Hepes 50 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, 5%甘油, pH 7.74。

Heparin 缓冲液 B: Hepes 50 mmol/L, NaCl 500 mmol/L, 5%甘油, pH 7.74。

SEC 缓冲液: Tricine 50 mmol/L, pH 7.60。

1.1.3 试剂

胰蛋白酶、酵母提取物购自 OXOID 公司; 甲醇、甲酸购自 Sigma-Aldrich 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氯霉素、Tricine、月桂酰辅酶 A 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 氯化钠、盐酸、氢氧化钾、无水磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等常规试剂购自国药控股有限公司; 3-羟基邻氨基苯甲酸购于阿拉丁生化科技有限公司; 底物 SNAC-C5、SNAC-C3 由强耀生物公司合成; 卡那霉素购于源叶生物公司; Ni-NTA 树脂、1 mL Heparin 柱、体积排阻色谱柱 Superdex 200 购自 GE healthcare 公司。

1.2 大肠杆菌的转化

将 1 μL pET28a-CalA3cH(160 ng/ μL)和 1 μL pGro7 (100 ng/ μL)的质粒加入 50 μL 的 BAP1 感受态细胞中, 冰上静置 30 min 后, 插入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 热激 45 s。然后迅速放回冰上, 静置 2 min。在超净台中向感受态细胞中加入 1 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基, 轻轻混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床, 振荡 1 h。吸取 1 mL 菌液均匀

涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 固体培养基, 晾干, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养过夜。

1.3 蛋白的诱导表达

挑选合适的单克隆转化子接种于 100 mL 具有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床培养 12–14 h, 作为种子液。量取 20 mL 的种子液, 转接至 1 L 具有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 PGTY 液体培养基后, 加入 5 mL 20% L-阿拉伯糖溶液诱导分子伴侣 GroES 和 GroEL 的表达。菌液 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养, 菌液浓度至 OD_{600} 值为 0.6–1.0 后, 降温至 16 $^{\circ}\text{C}$, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 培养 24 h。4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 将其转移至 50 mL 的离心管, -80°C 冻存备用。

1.4 蛋白的纯化

1.4.1 镍柱亲和层析

用 Ni 缓冲液 A 重悬 5 g 菌体至 20 mL, 细胞破碎机高压破碎菌液, 7.0×10^5 Pa 破碎 5 min。收集破碎后的菌液, 18 000 r/min 离心 40 min, 保留上清液。用 10 mL Ni 缓冲液 A 平衡 5 mL Ni-NTA 树脂, 之后将上清液与树脂充分混合, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷室孵育 1 h。上清液穿过镍树脂后, 用 10 个柱体积的具有 700 mmol/L NaCl 的 Ni 缓冲液 A 清洗, 除去 DNA 和非特异性结合的蛋白, 再加入 5 个柱体积的具有 50 mmol/L NaCl 的 Ni 缓冲液 B 平衡树脂, 降低盐浓度。最后, 用具有 200 mmol/L 咪唑的 Ni 缓冲液 C 洗脱结合的目的蛋白。收集洗脱蛋白用于 Heparin 亲和层析。纯化全程需在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷室中进行。

1.4.2 Heparin 柱亲和层析

首先使用 5 mL 的 1 mol/L NaCl 溶液冲洗 1 mL Heparin 柱, 再用 10 mL 的 Heparin 缓冲液 A 平衡 Heparin 柱。之后, 将镍柱亲和层析收集

的洗脱蛋白上样, 重复进样 2 次后, 用 10 mL 的 Heparin 缓冲液 A 洗去杂蛋白。最后, 用 1 mL Heparin 缓冲液 B 洗脱目的蛋白。收集洗脱蛋白用于凝胶亲和层析。纯化全程需在 4 °C 冷室中进行。

1.4.3 凝胶过滤层析

首先使用 30 mL SEC 缓冲液 A 平衡体积排阻色谱柱 Superdex 200, 将 Heparin 亲和层析获得的蛋白样品浓缩至 1 mL 后进样, 用 30 mL SEC 缓冲液洗脱, 设置流速为 1 mL/min, 收集洗脱峰溶液。纯化全程需要在 4 °C 冰箱里进行。最后用超滤管浓缩蛋白, 加入 10% 的甘油, 置于 -80 °C 保存。

1.5 电镜分析方法

对 CalA3 蛋白的结构观察选择负染电镜, 在 120 KeV 的条件下先进行电镜观测。首先需要对载网进行亲水化处理, 之后采用重金属盐为 2% 的乙酸铀溶液, 运用滴染法制备样品。最后, 将样品转移至透射电子显微镜进行观察。若需保存, 则室温放置于干燥罐中, 避免潮湿环境, 可保存约 4 个月。

研究使用装配了直接电子检测器 Gatan K2 Summit 的电镜 FEI Titan Krios 进行数据收集。研究利用半自动制样仪 Vitrobot 进行冷冻样品的制备, 首先设定 Vitrobot 的制样温度与湿度; 设置乙烷池, 将新鲜液氮过滤后倒入乙烷池预冷, 制备液态乙烷; 剪裁滤纸后放入制样仪中预冷, 并设定吸水时间与力度; 用冷冻制样镊子夹起亲水化处理后的铜网, 在铜网上滴入蛋白质样品 5 μ L, 根据设定的等待时间及其余参数操控滤纸吸去多余蛋白溶液; 迅速插入液态乙烷中, 小心转移至液氮里, 完成冷冻样品制备。样品保存于液氮罐中维持低温状态。制样过程中应小心保持载网的平整度, 避免由于载网破裂导致蛋白质样品漂移, 对后续数据收集造成的影响。

1.6 酶活性检测

CalA3 催化 SNAC-C5/SNAC-C3/月桂酰辅酶 A 活性测定体系为: Tricine (pH 7.60) 25 mmol/L, 3HA 1 mmol/L, SNAC-C5/SNAC-C3/月桂酰辅酶 A 0.5 mmol/L, CalA3 0.5 μ mol/L, 总体积为 100 μ L。30 °C 水浴 20 h, 加入等体积的甲醇终止反应体系。12 000 r/min 离心 20 min, 除去蛋白沉淀, 将上清液移入液相瓶, 用于 HPLC 和 LC-MS 检测。

使用 Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪对 CalA3 催化的反应液进行分析检测。流动相为: 去离子水(0.1%甲酸, A 相)和色谱级甲醇(0.1%甲酸, B 相)。色谱柱型号为 Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 nm \times 250 mm), DAD 检测器进行紫外吸收测定。分析条件: 0–8 min, 75%–85% B; 22 min, 95% B; 29 min, 100% B; 35 min, 100% B; 室温, 流速为 0.4 mL/min。紫外检测波长为 254 nm 或 290 nm。

使用 Agilent 6530 Series Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent technologies)对 CalA3 蛋白催化 SANC-C5 与 3HA 的反应产物进行一级和二级质谱检测分析。使用 Waters Xevo G2-XS QTOF 对 SNAC-C3 和 3HA 的反应产物进行一级二级质谱检测分析。

2 结果与分析

2.1 CalA3 蛋白的异源表达优化

首先, 将 C 端带有组氨酸标签的 CalA3 表达质粒 pET28a-CalA3cH 转化至大肠杆菌 BAP1 中, 在 TB 培养基中进行诱导表达。湿重大约 5 g 的 TB 培养基培养的菌体经过高压破碎仪破碎, 离心收集的上清液经过镍柱亲和层析。蛋白洗脱液通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 洗脱液中具有较多的杂蛋白。TB 培养菌株的蛋白纯度较低的原因可能是 TB 培养基营养比较丰富, CalA3 蛋

白的表达性质不稳定,菌体裂解液与镍树脂孵育后,镍树脂结合了过多的非特异性杂蛋白。

为了提高 CalA3 蛋白的表达量和纯度,遂对 TB 培养基进行了优化,将胰蛋白胨浓度从 12 g/L 降至 5 g/L,将酵母提取物的浓度从 24 g/L 降至 10 g/L,降低了培养基的营养度,并用甘油作为碳源,获得了新的培养基 PGTY。利用湿重约为 5 g 的 PGTY 培养的菌体,并使用上述缓冲液进行纯化,经镍柱亲和层析后,其 CalA3 蛋白的产量与 TB 培养的菌体相似,但杂蛋白含量较低(图 2A,泳道 4)。镍柱洗脱液再经过 Heparin 柱亲和层析和体积排阻层析后,CalA3 蛋白的纯度

进一步提高(图 2A,泳道 6-7)。经检测,由 PGTY 培养的 5 g 菌体,经破碎纯化获得 100 μ L 的蛋白溶液,其浓度能够达到 36 mg/mL。CalA3 蛋白的体积排阻色谱图在 11 mL 位置处呈现出单一对称峰,进一步表明获得了高纯度、高质量的蛋白(图 2B)。

对 CalA3 蛋白形态进行电镜负染观察,负染电镜图像能够清晰地观察到分散良好的蛋白颗粒(图 2C-2D)。对 CalA3 的冷冻电镜结构数据收集,进行 2D 分类处理,显示 CalA3 蛋白的二维平均数据较好,能够观察到不同取向的蛋白颗粒(图 2E)。

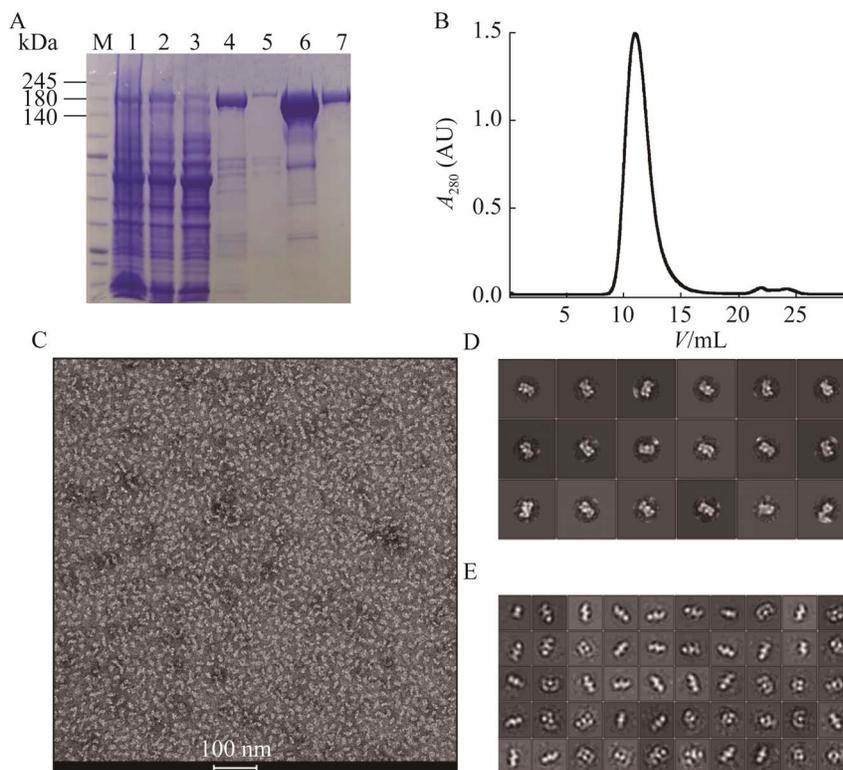


图 2 CalA3 蛋白的纯化和电镜观测

Figure 2 Purification and electron microscopy structure determination of CalA3. A: SDS-PAGE of CalA3 purification at each step. M: Marker; 1: Total proteins; 2: The supernatant; 3: Flowthrough of Ni-NTA affinity chromatography; 4: Elution of Ni-NTA affinity chromatography; 5: Flowthrough of Heparin affinity chromatography; 6: Elution of Heparin affinity chromatography; 7: Size exclusion chromatography. B: Size exclusion chromatography of CalA3 with Superdex 200 column. C: Negative staining electron micrograph of CalA3 protein. Scale bar, 100 nm. D: Representative 2D class averages of CalA3 protein particles from negative staining electron micrographs. E: Representative 2D class averages of CalA3 protein particles from cryo-electron micrographs.

2.2 CalA3 催化 SNAC-C3 和 3HA 发生氨解反应

为了探究 CalA3 对直链聚酮底物碳链长短的特异选择性, 设计合成了直链聚酮底物类似物 SNAC-C3。SNAC-C3 以 N-乙酰半胱氨酸为载体, 加载了一分子吡咯-2-丙酸, 分子式为 $C_{11}H_{16}N_2O_2S$, 分子质量大小为 240.0932。SNAC-C3 与 SNAC-N1 相比, 其碳链缩短, 仅含有 3 个碳原子, 但是碳链末端吡咯环被保留(图 3A)。

利用 HPLC 检测 CalA3 体外催化 SNAC-C3

和 3HA 的反应液。与对照组相比, 在 254 nm 紫外吸收下, CalA3 催化反应液中出现了一个新的产物 Comp 1 (图 3A)。推测 Comp 1 为 SNAC-C3 与 3HA 发生氨解反应的产物, 分子式为 $C_{14}H_{14}N_2O_4$, 分子质量大小为 274.095 4。对产物 Comp 1 进行一级质谱检测, 在正离子模式下, 产物 Comp 1 的质核比为 275.102 4 $[M+H]^+$, 与推测的 SNAC-C3 与 3HA 的氨解产物分子量 275.1032 相符合(图 3B)。之后又对 Comp 1 进行了二级质谱分析, 在正离子模式下, 检测到酰胺键断裂后的具有吡

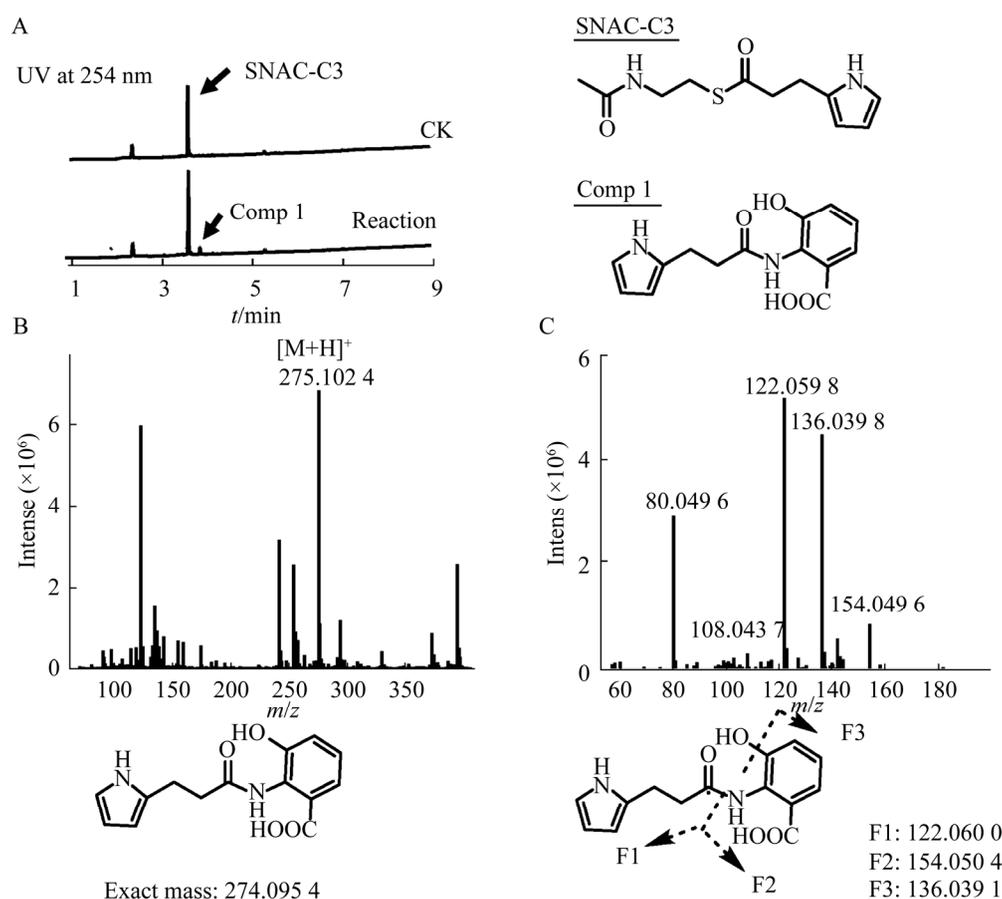


图 3 CalA3 催化 SNAC-C3 与 3HA 生成氨解产物 Comp 1 及其鉴定

Figure 3 Identification of Comp 1 yielded by CalA3-catalyzed aminolysis reaction with SNAC-C3 and 3HA. A: HPLC analysis of aminolysis product at 254 nm. The boiled sample is used as the control. The peak of Comp 1 is eluted at 3.7 min. B: MS spectrum of Comp 1 in positive mode. Comp 1 has experimentally determined m/z $[M+H]^+$ value of 275.102 4. C: MS/MS spectrum of Comp 1. The calculated mass fragments of benzene moieties F2 ($m/z=154.050$ 4), F3 ($m/z=136.039$ 1) and pyrrole moiety F1 ($m/z=122.060$ 0) of Comp 1 are marked.

咯环的特征碎片 122.059 8、酰胺键断裂后的具有苯环的特征碎片 154.049 6 和脱去羟基的苯环碎片 136.039 8 (图 3C)。因为 SNAC-C3 合成底物量少而且不是 CalA3 的天然催化底物, 所以 Comp 1 的产量很低, 无法进行核磁检验。最后, 结合一级和二级质谱分析结果证实 Comp 1 为 SNAC-C3 与 3HA 的氨解产物。与 SNAC-N1 相比, SNAC-C3 缩短了聚酮链, CalA3 能够催化 SNAC-N1、SNAC-C3 与 3HA 发生氨解反应的结果表明 CalA3 对聚酮底物的碳链的长短具有比

较宽泛的选择性。

2.3 CalA3 催化 SNAC-C5 和 3HA 发生氨解反应

为了探究 CalA3 对聚酮底物末端吡咯环是否严格要求, 设计合成了不具有吡咯环的直链聚酮底物的类似物 SNAC-C5。SNAC-C5, 以 N-乙酰半胱氨酸为载体, 通过硫酯键加载一分子戊酸, 分子式为 $C_9H_{17}NO_2S$, 分子质量大小为 203.098 0 (图 4A)。SNAC-C5 与 SNAC-N1 相比, 其碳链末端的吡咯环被去除, 碳链缩短至 5 个碳原子。

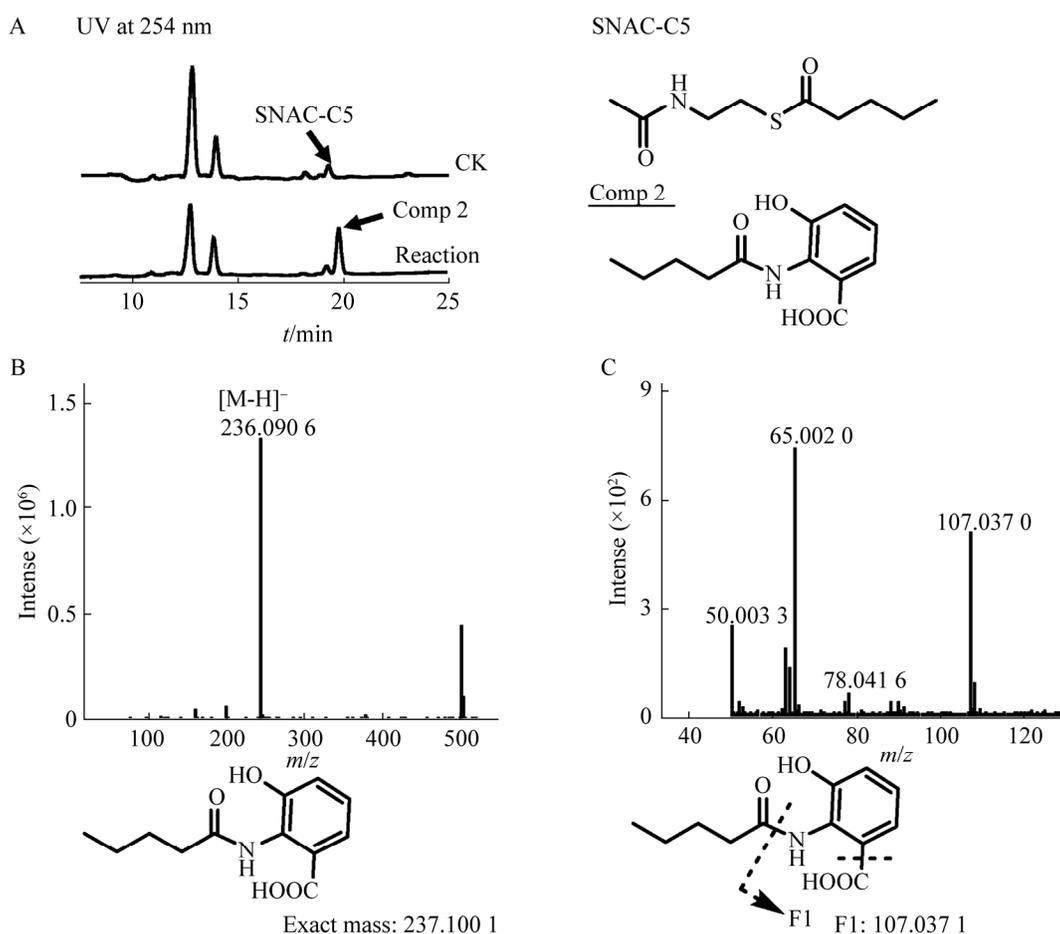


图 4 CalA3 催化 SNAC-C5 与 3HA 生成氨解产物 Comp 2 及其鉴定

Figure 4 Identification of Comp 2 yielded by CalA3-catalyzed aminolysis reaction with SNAC-C5 and 3HA. A: HPLC analysis of aminolysis product of SNAC-C5 and 3HA at 254 nm. The boiled sample is used as the control. The peak of Comp 2 is eluted at 19.9 min. B: MS spectrum of Comp 2 in negative mode. Comp 2 has experimentally determined m/z $[M-H]^-$ value of 236.090 6. C: MS/MS spectrum of Comp 2. The calculated mass fragment of benzene moiety F1 ($m/z=107.037$ 1) of Comp 2 is marked.

利用 HPLC 检测 CalA3 体外催化 SNAC-C5 和 3HA 的反应体系。在 254 nm 紫外吸收的条件下, 出现了一个新的产物峰 Comp 2 (图 4A)。推测该产物 Comp 2 可能是 SNAC-C5 与 3HA 发生氨解反应的产物, 分子式为 $C_{12}H_{15}NO_4$, 分子质量大小为 237.100 1。对 Comp 2 进行一级质谱检测, 在负离子模式下, 产物 Comp 2 的质核比为 236.090 6 $[M-H]^-$, 与预测的 SNAC-C5 与 3HA 的氨解产物分子量 236.092 3 相符合(图 4B)。为了进一步确定产物 Comp 2 的结构, 对 Comp 2 进行了二级质谱分析, 在负离子模式下, 检测到了氨解产物 Comp 2 酰胺键断裂和脱去羧基后的苯环部分的碎片 107.037 0 (图 4C)。由于 Comp 2 的产量很低, 达不到进行核磁的浓度, 所以, 没有进一步进行核磁分析。结合一级和二级质谱分析结果, 证明 CalA3 能够催化无吡咯环的 SNAC-C5 与 3HA 发生氨解反应, 形成新的产物 Comp 2。实验结果表明, CalA3 对聚酮底物末端的吡咯环结构不具有特异的底物选择性。

2.4 钙霉素合成酶 CalA3 与月桂酰辅酶 A

通过体外催化实验, 已经证明钙霉素合成酶 CalA3 对直链聚酮底物的长短和末端的吡咯环结构无专一的选择性, CalA3 对直链聚酮底物具相对宽泛的底物选择性。在此基础上, 选用月桂酰辅酶 A 作为催化底物, 以进一步探究 CalA3 对以辅酶 A 为载体的聚酮底物的催化活性。月桂酰辅酶 A 以辅酶 A 为载体, 通过硫酯键衔接了一分子十二烷酸, 其碳链长度非常接近 SNAC-N1 的碳链长度(图 5)。与 SNAC 载体相比, 辅酶 A 载体具有与酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)相同的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺部分, 所以辅酶 A 是否可以作为聚酮链的载体值得进一步探究。

通过 HPLC 检测 CalA3 催化月桂酰辅酶 A 的反应液, 并未检测到的明显的产物峰(图 5)。但是, 在相同的反应体系下, 通过 HPLC 却能够

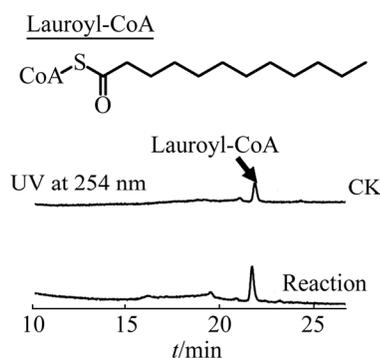


图 5 CalA3 无法催化月桂酰辅酶 A 与 3HA 发生氨解反应

Figure 5 The aminolysis product of lauroyl-CoA and 3HA is not detected by HPLC at 254 nm. The boiled sample is used as the control.

检测到对应的 SNAC-C3、SNAC-C5 与 3HA 的氨解产物峰(2.2 和 2.3 节)。所以, 对于 CalA3, 月桂酰辅酶 A 并不是合适的底物。该研究结果说明, 相较于 SNAC 载体, 辅酶 A 并不是 CalA3 催化底物-聚酮链的理想载体。其主要原因可能是月桂酰辅酶 A 衍生物的水溶性比较低, 无法通过自由扩散进入到 CalA3 的 KS 结构域的底物通道中。

3 讨论与结论

聚酮合酶是一种多功能酶, 负责合成多种天然产物, 其中包括数量众多的抗生素, 例如抗细菌的红霉素、抗真菌的两性霉素和抗癌药物埃博霉素等^[17]。随着合成生物学的兴起, 更多的目光也投注到 PKS 改造上。研究者利用 PKS 的多模块结构特征, 试图将不同功能的模块组合在一起, 以合成新的生物分子或发掘更多新的药用天然产物, 而模块对底物的宽泛选择则是制约 PKS 合成生物学改造成功的关键因素^[18]。

实验室早期所使用的 CalA3 蛋白表达菌株的培养基通常是 LBBS 培养基。但是, LBBS 培养的时间较长, 培养时间为 54 h。而 TB 培养基

培养菌株的 CalA3 蛋白杂蛋白较多。为了缩短表达菌株的培养时间,提高蛋白的产量和纯度,我们对表达菌株的培养基进行了优化,降低了 TB 培养基的营养度,获得了一种新的适合大肠杆菌异源表达的培养基——PGTY 培养基,PGTY 培养基所需培养时间为 24 h。使用 PGTY 培养的菌株,CalA3 蛋白的纯度明显高于 TB 培养的菌株,在负染电镜下能观察到清晰的蛋白颗粒,在冷冻电镜的二维平均图中也可观察到取向不同的蛋白颗粒。

本课题组前期体内实验结果显示,钙霉素合成酶 CalA3 对多种氨基供体均具有催化活性,表明 CalA3 具有较广泛的底物选择性。在此基础上,我们进一步探究了 CalA3 对不同结构聚酮链的底物特异性。通过体外催化实验,结合一级和二级质谱分析结果,证明了 CalA3 能够催化具有 3 个碳原子的聚酮类似物 SNAC-C3 与 3HA 发生氨解反应,产生 Comp 1。所以,CalA3 既可以催化具有 11 个碳原子碳链的 SNAC-N1 与 3HA 发生氨解反应,也可以催化具有 3 个碳原子碳链的 SNAC-C3 与 3HA 发生氨解反应。这表明 CalA3 对聚酮链的长短并无专一的选择性。

同时研究发现,对于不具有吡咯环的化合物 SNAC-C5,CalA3 同样能够催化其与 3HA 发生反应,形成氨解产物 Comp 2。结合我们前期实验结果发现,CalA3 不仅能够催化具有吡咯环的 SNAC-C3 与 3HA 反应,对无吡咯环的 SNAC-C5 也具有催化活性,这表明 CalA3 对吡咯环结构并无专一的底物特异性,并且对不同长度的聚酮链的选择性也比较宽泛。CalA3 能够催化不同聚酮化合物和 3HA 缩合形成氨解产物对合成和挖掘新的含吡咯环的化合物具有十分重要的意义。这些具有吡咯环的化合物具有多种生物活性,可以抗菌、抑制磷酸酶和 ATPase 活性、抑制癌细胞生长等,具有十分重要的药用价值。

此外,本研究也探讨了酰基载体辅酶 A 是否可以替代 SNAC 载体作为 CalA3 的催化底物。对于月桂酰辅酶 A,色谱分析结果显示,CalA3 没有显著的催化活性。该研究结果表明月桂酰辅酶 A 并不是 CalA3 合适的催化底物。我们推测原因可能是月桂酰辅酶 A 衍生物的水溶性较弱,无法进入到底物通道中。

综上所述,本研究在课题组早期研究的基础上,进一步优化了 CalA3 蛋白异源表达菌株的培养基,提高了 CalA3 蛋白的产量和纯度,在负染电镜和冷冻电镜下观察到分散良好结构完整的蛋白颗粒。同时,探究了 CalA3 对直链聚酮底物的非特异选择性,测试了更多的 CalA3 的催化底物。这为后续研究 PKS 的催化机制提供了重要参考,也为以后挖掘新的天然产物和合成新的生物分子提供了一定的基础。

参考文献

- [1] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(3): 311-335.
- [2] SACK U, WALTHER W, SCUDIERO D, SELBY M, AUMANN J, LEMOS C, FICHTNER I, SCHLAG PM, SHOEMAKER RH, STEIN U. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/ β -catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22(18): 3344-3354.
- [3] GREKOV I, POMBINHO AR, KOBETS T, BARTŮNĚK P, LIPOLDOVÁ M. Calcium ionophore, calcimycin, kills *Leishmania* promastigotes by activating parasite nitric oxide synthase[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 1309485.
- [4] ZHAO YX, HO CK, XIE Y, CHEN YH, LI HZ, ZHANG GY, LI QF. Calcimycin suppresses S100A4 expression and inhibits the stimulatory effect of transforming growth factor β 1 on keloid fibroblasts[J]. *Annals of Plastic Surgery*, 2018, 81(2): 163-169.
- [5] KEATINGE-CLAY AT. The uncommon enzymology of *cis*-acyltransferase assembly lines[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(8): 5334-5366.

- [6] CHANEY MO, DEMARCO PV, JONES ND, OCCOLOWITZ JL. Letter: the structure of A23187, a divalent cation ionophore[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1974, 96(6): 1932-1933.
- [7] WANG XY, YAMAMOTO T, KADOWAKI M, YANG YF. Identification of key pathways and gene expression in the activation of mast cells via calcium flux using bioinformatics analysis[J]. *Biocell*, 2021, 45(2): 395-415.
- [8] FRANKLIN JL, AMSLER MO, MESSINA JL. Regulation of glucose responsive protein (*GRP*) gene expression by insulin[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2022, 27(1): 27-35.
- [9] HARA H, KANAZAWA T. Selective inhibition by ionophore A23187 of the enzyme isomerization in the catalytic cycle of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(35): 16584-16590.
- [10] PRESSMAN BC. Biological applications of ionophores[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1976, 45: 501-530.
- [11] MAWATWAL S, BEHURA A, GHOSH A, KIDWAI S, MISHRA A, DEEP A, AGARWAL S, SAHA S, SINGH R, DHIMAN R. Calcimycin mediates mycobacterial killing by inducing intracellular calcium-regulated autophagy in a P2RX7 dependent manner[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 2017, 1861(12): 3190-3200.
- [12] WU QL, LIANG JD, LIN SJ, ZHOU XF, BAI LQ, DENG ZX, WANG ZJ. Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(3): 974-982.
- [13] 汪小杰. Calcimycin 骨架合成相关基因功能和葡萄糖异构酶高效表达研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2020.
- WANG XJ. Study on the function of genes related to Calcimycin skeleton synthesis and the high expression of glucose isomerase[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2020 (in Chinese)
- [14] JENNER M, FRANK S, KAMPA A, KOHLHAAS C, PÖPLAU P, BRIGGS GS, PIEL J, OLDHAM NJ. Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2013, 52(4): 1143-1147.
- [15] WEISSMAN KJ. Uncovering the structures of modular polyketide synthases[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32(3): 436-453.
- [16] GOU LX, WU QL, LIN SJ, LI XM, LIANG JD, ZHOU XF, AN DR, DENG ZX, WANG ZJ. Mutasynthesis of pyrrole spiroketal compound using calcimycin 3-hydroxy anthranilic acid biosynthetic mutant[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8183-8191.
- [17] KEATINGE-CLAY AT. The structures of type I polyketide synthases[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1050-1073.
- [18] YUZAWA S, BACKMAN TWH, KEASLING JD, KATZ L. Synthetic biology of polyketide synthases[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(7): 621-633.