



醌那霉素生物合成中间产物的一锅酶促体系研究

吕丹阳, 高耀杰, 赵宇春, 周洁, 邓子新, 蒋明*

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

吕丹阳, 高耀杰, 赵宇春, 周洁, 邓子新, 蒋明. 醌那霉素生物合成中间产物的一锅酶促体系研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3520-3533.

LÜ Danyang, GAO Yaojie, ZHAO Yuchun, ZHOU Jie, DENG Zixin, JIANG Ming. One-pot enzymatic total synthesis of intermediates in the biosynthesis of kinamycin[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3520-3533.

摘要:【目的】通过一锅酶法在体外无细胞条件下重构醌那霉素的生物合成途径, 实现从原料辅酶 A、乙酰-辅酶 A 和丙二酸到醌那霉素重要中间体的高效转化。【方法】纯化得到 AlpAB、RavC 等 8 个醌那霉素合成相关蛋白和 MCAT、MatB 等 2 个辅助蛋白; 利用一锅酶法进行体外反应, 并用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测反应产物; 利用该体系探究 II 型硫酯酶 AlpS 在合成通路中的功能及作用底物; 利用单一变量法对体系温度、pH、最小聚酮合酶(minimal polyketide synthase, minimal PKS)浓度和 II 型硫酯酶 AlpS 浓度等条件进行优化。【结果】体系所需的聚酮合酶和辅助蛋白均获得可溶性表达; 利用一锅酶法成功合成了醌那霉素的早期重要中间体 SEK15、UWM6、rabelomycin、prejadomycin 和 dehydrorabelomycin; 加入 AlpS 蛋白后以上 5 种产物产量均有不同程度的提高, 其中 prejadomycin 和 dehydrorabelomycin 提高较为显著; 优化后的反应最适条件为: 温度 30 °C、pH 7.0、最小聚酮合酶(AlpA、AlpB 和 RavC)浓度各 2.8 $\mu\text{mol/L}$ 、AlpS 7.2 $\mu\text{mol/L}$; prejadomycin 的产量提高到 302 mg/L。【结论】本研究成功利用一锅酶法在无细胞条件下重构了醌那霉素的早期生物合成途径, 合成了醌那霉素的重要中间体 SEK15、UWM6、rabelomycin、prejadomycin 和 dehydrorabelomycin。研究进一步验证了硫酯酶 AlpS 的链释放功能并推测其作用底物。

关键词: 醌那霉素; 一锅酶法; 体外重构; II 型聚酮化合物

资助项目: 国家自然科学基金(32170076, 31870026); 国家重点研发计划(2021YFC2100600)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170076, 31870026) and the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100600).

*Corresponding author. E-mail: jiangming9722@sjtu.edu.cn

Received: 2022-12-19; Accepted: 2023-03-02; Published online: 2023-03-09

One-pot enzymatic total synthesis of intermediates in the biosynthesis of kinamycin

LÜ Danyang, GAO Yaojie, ZHAO Yuchun, ZHOU Jie, DENG Zixin, JIANG Ming*

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

Abstract: [Objective] To reconstitute the partial biosynthetic pathway of the type II polyketide kinamycin in a cell-free system starting from CoA, acetyl-CoA and malonate. [Methods] The polyketide synthases (PKSs) and two supplemental proteins (MCAT and MatB) were purified and quantitated. The one-pot enzymatic synthesis of kinamycin intermediates was accomplished, and the products were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The system was used to explore the function and exact substrate of the stand-alone thioesterase, AlpS, in the biosynthetic pathway. The parameters including temperature, pH, and the concentrations of minimal PKSs and AlpS were optimized by the single-variable method. [Results] Eight PKSs and two supplemental proteins (MCAT and MatB) were expressed and purified. The intermediates and shunt products in kinamycin biosynthesis were produced *in vitro*, including SEK15, UWM6, rabelomycin, prejadomycin, and dehydrorabelomycin. The yields of these products, especially prejadomycin and dehydrorabelomycin, were all increased when AlpS was added. The optimal conditions were 30 °C, pH 7.0, 2.8 μmol/L minimal PKSs (AlpA, AlpB, and RavC, respectively), and 7.2 μmol/L AlpS, under which the yield of prejadomycin was increased to 302 mg/L. [Conclusion] A one-pot enzymatic synthesis system with high yields of kinamycin-related products including SEK15, UWM6, rabelomycin, prejadomycin, and dehydrorabelomycin was successfully constructed. Furthermore, the chain-release function and substrate specificity of AlpS in the synthetic pathway were investigated.

Keywords: kinamycin; one-pot enzymatic synthesis system; *in vitro* biosynthesis; type II polyketide

聚酮化合物(polyketide, PK)是由微生物(包括细菌、真菌等或高等动植物在次级代谢中产生的一大类天然产物, 主要由聚酮合酶(polyketide synthases, PKS)催化合成。聚酮化合物具有显著的靶向性、高效的药理特性以及多样的化学结构, 可作为抗菌剂、抗癌剂、免疫抑制剂等用于临床治疗^[1-2]。根据聚酮合酶的不同, 可以将聚酮化合物分为I型聚酮化合物(模块型)、II型聚酮化合物(芳香型)和III型聚酮化合物(查尔酮型)。其中II型聚酮化合物(type II

PK)又称为芳香型聚酮化合物或迭代型聚酮化合物, 其天然宿主主要为放线菌。根据化学结构的不同, 可以将II型聚酮化合物分为蒽环类(anthracyclines)、角蒽环类(angucyclines)、金霉酸类(aureolic acids)、四环素类(tetracyclines)和苯并异色烷醌类(benzoisochromanquinones)等^[3-4]。II型聚酮化合物是药物发现的重要来源, 如阿霉素(doxorubicin)和四环素(tetracycline)等已在临床上广泛使用^[5]。作为有着显著生理活性和潜在临床价值的候选药物, II型聚酮化

合物值得更深入的研究。

角蒽环类聚酮化合物属于苯并蒽醌类 (benz[a]anthraquinone) 化合物, 其特点是具有角状环化结构, 一般其环化骨架在后修饰过程中不发生变化。然而在长期研究中人们发现了一类特殊的角蒽环类化合物, 称作非典型角蒽环类聚酮化合物。非典型角蒽环类聚酮化合物合成过程中 B 环会经过碳-碳键的氧化断裂和重排反应, 得到独特的环骨架结构^[6]。此类化合物包括醌那霉素 (kinamycin)、杰多霉素 (jadomycin)、褐黄癌菌素 (gilvocarcin) 和近灰霉素 (ravidomycin) 等^[7]。

醌那霉素属于 II 型非典型角蒽环类聚酮化合物, 最先由 Itō 等^[8]于 1970 年在 *Streptomyces murayamaensis* sp. 的发酵液中分离得到。从结构上看, 醌那霉素具有特殊的苯并茛结构、高度氧化的 A 环和重氮官能团, 其生物活性与这些独特的结构特征相关^[9-10]。研究表明, 醌那霉素 A、B、C、D 对革兰氏阳性菌都具有良好的生物活性, 且醌那霉素 C 对 60 多种癌细胞都表现出抗肿瘤活性^[11]。

近些年来, 醌那霉素的生物合成途径研究取得长足进展, 预测合成途径如图 1 所示^[2,12-15]。完整的醌那霉素生物合成基因簇共包含 62 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 跨越长度约 72 kb。其合成基因簇中包含一个最小聚酮合酶 (minimal PKS), 由酮基合成酶 (ketosynthetase, KS_{α}) AlpA、链长决定因子 (KS_{β} , CLF) AlpB 和酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) AlpC 三部分组成。起始单元在这 3 个酶的作用下通过克莱森缩合反应形成聚酮长链, 经过酮基还原酶 (ketoreductase, KR) AlpD、2 个环化酶 (cyclase, CYC) AlpI 和 AlpE 的催化可得到芳香多环骨架中间体 UWM6, UWM6 不稳定, 可自发生成 rabelomycin。在氧化酶 (oxygenase) AlpF 和 AlpG

的催化下, 可以得到中间产物 prejadomycin 和 dehydrorabelomycin。随后由各种后修饰酶引入不同官能团, 可形成终产物醌那霉素。值得注意的是, 目前已知的非典型角蒽环类聚酮化合物分享了相似的早期生物合成途径, 均可得到共同的合成中间体 dehydrorabelomycin, 且参与合成 dehydrorabelomycin 的聚酮合酶在此类化合物的基因簇中保守存在。Dehydrorabelomycin 后续会在氧化开环酶的催化下以不同方式重新成环, 生成相应的独特骨架, 最终得到具有不同活性的天然产物^[16-19]。

2018 年, Liu 等^[15]从 *Streptomyces galtieri* Sgt26 基因组 BAC 文库中钓取了醌那霉素的完整合成基因簇, 实现了醌那霉素在 *Streptomyces albus* J1074 中的异源表达。同时, Liu 等^[20]也已经成功建立醌那霉素相关前体在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的异源表达体系, 获得高产 dehydrorabelomycin 的菌株 BDhr1。2019 年, Hua 等^[21]在醌那霉素的合成基因簇中找到了一个硫酯酶的编码基因—*alpS*。通过一系列的体内体外实验, 确定了 AlpS 是醌那霉素生物合成所必需的蛋白, 且确定了它的功能是聚酮产物水解而不是纠错, 其催化了聚酮链从酰基载体蛋白上的释放。但该研究只确定了 AlpS 催化环化聚酮链的释放发生在 dehydrorabelomycin 合成之前, 且只使用了模式底物蒽醌-2-羧酸-N-乙酰半胱氨酸 (anthraquinone-2-carboxylic acid-N-acetylcysteamine, Ac-SNAC) 在体外验证了其水解功能, 并未深入研究 AlpS 在合成通路中的真正底物以及在体外通过生化反应验证其聚酮链释放的功能。

以上醌那霉素的合成通路发现和异源表达研究使得其在体外无细胞条件下一锅酶法合成成为可能。一锅酶法将生物催化与传统合成方法相结合, 在一锅串联反应中完成目标产物合

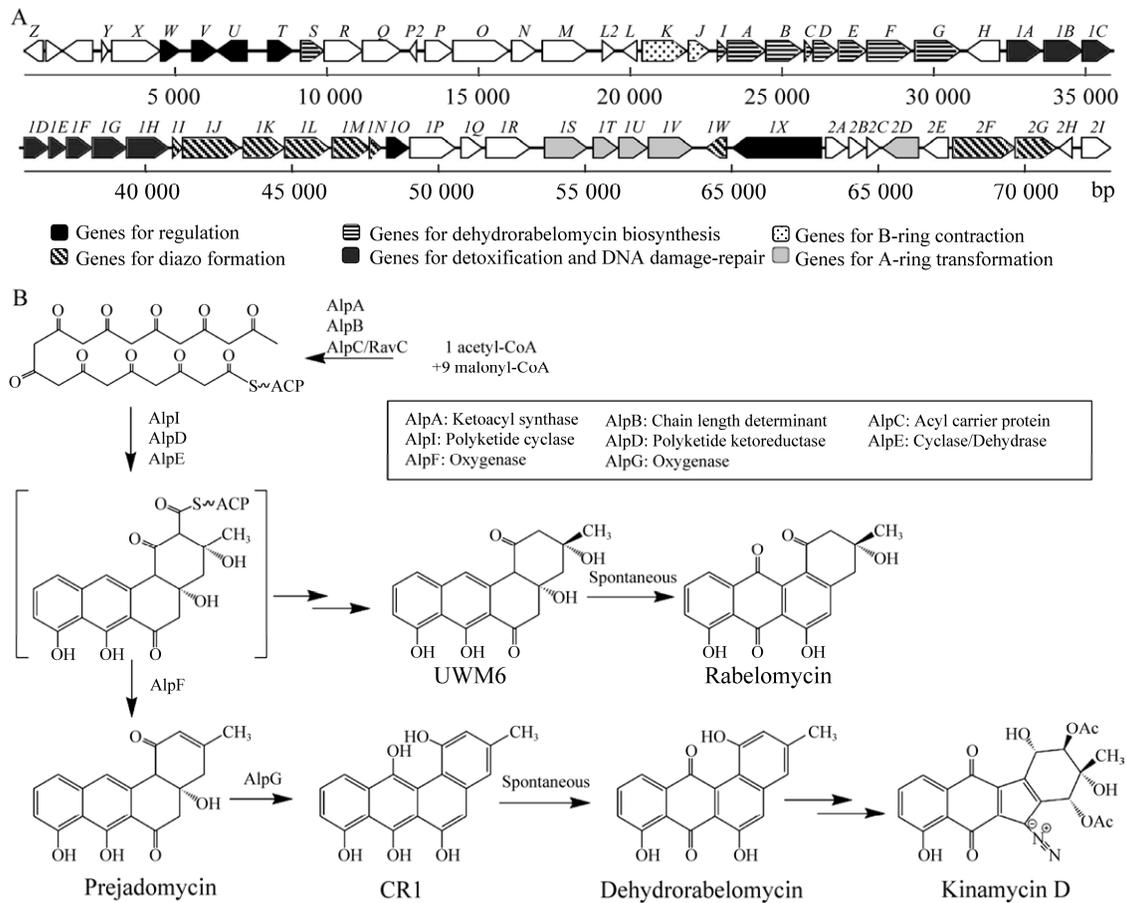


图 1 醌那霉素生物合成基因簇和合成途径^[2]

Figure 1 Biosynthetic gene cluster and biosynthetic pathway of kinamycin^[2]. A: Biosynthetic gene cluster of kinamycin (*alp* cluster). B: The biosynthetic pathway of kinamycin.

成。这一策略在合成化学中备受关注，其优势在于充分利用了化学合成和酶反应各自的长处，反应速度快，省去了中间物的分离和提纯步骤，耗时短，产品得率高。另外，酶催化反应的立体专一性和底物专一性强，产物纯度更高^[22]。2010年，Rohr等^[23]使用 *gilvocarcin*、*ravidomycin* 和 *jadomycin* 生物合成途径的聚酮合酶混合物，完成了从乙酰-辅酶 A 和丙二酰-辅酶 A 开始的 *rabelomycin* 一锅酶促全合成。该研究中 *rabelomycin* 的终产量约为 72 mg/L。2017年，Rohr等^[24]又组合使用 3 种不同类型的 II 型聚酮合酶混合物，一锅酶法合成了蕈环类

抗生素 *steffimycin* 的关键中间体 *presteffimycinone*。使用的 II 型聚酮合酶分别来自金酶酸类聚酮 *mithramycin*、非典型角蕈环类聚酮 *gilvocarcin* 和蕈环类聚酮 *steffimycin* 的合成基因簇。

本研究通过一锅酶法，在 Rohr 等的研究基础上，在无细胞条件下进一步扩大重构 II 型聚酮类天然产物醌那霉素的合成途径，实现了从原料辅酶 A、乙酰-辅酶 A 和丙二酸到 *dehydrabelomycin* 的高效转化。本研究还首次在体外验证了 AlpS 对醌那霉素生物合成途径的作用，分析了其作用底物。最后通过优化反应体系和反应条件，提高了产物转化率和反应效率。

1 材料与amp方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

大肠杆菌 BAP1、BL21(DE3)和 DH10B 均为本实验室保藏。本研究所用质粒见表 1。本研究引物见表 2，由上海擎科生物科技有限公司合成。

1.1.2 培养基

大肠杆菌 BAP1、BL21(DE3)和 DH10B 的固体培养基为 LA，液体培养基为 LB。

LA 固体培养基：酵母提取物 5 g，氯化钠 10 g，胰蛋白胨 10 g，琼脂 15 g，定容至 1 L。121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

LB 液体培养基：酵母提取物 5 g，氯化钠 10 g，胰蛋白胨 10 g，定容至 1 L。121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 蛋白纯化缓冲液

Binding buffer: 5 mmol/L 咪唑，500 mmol/L 氯化钠，50 mmol/L Tris-HCl，10%甘油；

表 1 本研究中所用到的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	Source
pET28a	<i>neo</i> , T7 <i>lac</i> , pBR322 origin, His ₆ -tag plasmid for target gene expression	Novagen
pGro7	GroES-GroEL <i>ori</i> Cm ^r	TaKaRa
pET28a- <i>alpAB</i>	Plasmid for <i>alpAB</i> expression	This study
pET28a- <i>ravC</i>	Plasmid for <i>ravC</i> expression	This study
pET28a- <i>alpI</i>	Plasmid for <i>alpI</i> expression	This study
pET28a- <i>alpD</i>	Plasmid for <i>alpD</i> expression	This study
pET28a- <i>alpE</i>	Plasmid for <i>alpE</i> expression	This study
pET28a- <i>alpF</i>	Plasmid for <i>alpF</i> expression	This study
pET28a- <i>alpG</i>	Plasmid for <i>alpG</i> expression	This study
pET28a- <i>alpS</i>	Plasmid for <i>alpS</i> expression	This study
pET28a- <i>MCAT</i>	Plasmid for <i>MCAT</i> expression	This study
pET28a- <i>matB</i>	Plasmid for <i>matB</i> expression	This lab
Δ <i>alpW</i> -2E9	2E9 BAC containing kinamycin gene cluster with knockout of negative regulator <i>alpW</i>	This lab

表 2 本研究中所用到的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
AlpA- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGAGCGGGCGACGCGTTG
AlpB- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTCAGGCGGCGCGCACGACCA
AlpI- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGCACAGCACGCTGATCGTC
AlpI- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTCAACGGGAGGCCTCCCAGC
AlpD- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGACCGACACCACCCCA
AlpD- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTCAGAAGTTGCCGAGGCCGC
AlpE- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGAGCCTCATGACCACACG
AlpE- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTCAGCCCTTCTTCTGCTCGG
AlpF- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGGCAGCGGACGCCCTG
AlpF- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTCAGCGGGGAGGCCCGAA
AlpG- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGGAAGGGACAGCGGCGG
AlpG- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTCAGCGGGGCGGGCCGAA
MCAT- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGCTCGTACTCGTCGCTC
MCAT- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTCAGGCCTGGGTGTGCTC
AlpS- <i>Nde</i> I-F	AAACATATGGCTTCCCGCTCCAGGGA
AlpS- <i>Hind</i> III- <i>Spe</i> I-R	AAAAAGCTTACTAGTTCACCGGCCGCTCCCGT

Washing buffer: 30 mmol/L 咪唑, 500 mol/L 氯化钠, 50 mmol/L Tris-HCl, 10%甘油;

Elution buffer: 500 mol/L 咪唑, 500 mmol/L 氯化钠, 50 mmol/L Tris-HCl, 10%甘油;

Desalting buffer: 200 mmol/L 氯化钠, 50 mmol/L Tris-HCl, 10%甘油;

调整 pH 至 8.0, 蒸馏水定容至 1 L。

1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 购于上海柏益思生物技术有限公司; Solution I DNA 连接试剂盒、*Taq* 酶, 购于 TaKaRa 公司; Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 高保真酶, 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶, 购于 Thermo Fisher Scientific 公司; Bradford 蛋白定量试剂盒, 购于天根生化科技(北京)有限公司。

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-galactothioglycoside, IPTG)、L-(+)-阿拉伯糖、乙酰-辅酶 A 三锂盐, 购于 Aladdin 公司; 辅酶 A 水合物、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD), 购于 Macklin 公司; 还原型辅酶 I-二钠(reduced coenzyme I-disodium, NADH- Na_2), 购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 还原型辅酶 II(reduced coenzyme II, NADPH), 购于 Ark 公司; 丙二酸钠, 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

蛋白电泳设备、凝胶成像系统、SmartSpec Plus 核酸蛋白测定仪, 购于 Bio-Rad 公司; 色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 150 mm)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪, 购于安捷伦科技有限公司。

1.3 目的基因克隆及重组表达载体的构建

目的基因以 $\Delta alpW$ -2E9 BAC 质粒(含靛那霉素完整基因组)为模板, 以表 2 引物进行 PCR 扩增^[6,19]。*ravC* 基因由公司直接合成得到。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 根据引物 T_m 值设退火温度和时间(通常在 57–62 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 30 s), 根据基因长度设 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时间(通常以 1 kb/min 计算), 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

PCR 产物和表达载体 pET28a 用 *Nde* I/*Hind* III 双酶切处理, 两者胶回收后的片段用 Solution I DNA 连接试剂盒连接。将构建成功的重组质粒转化至 DH10B 感受态细胞, 菌落 PCR 和酶切验证成功后送公司测序, 测序结果正确即重组质粒构建成功。

1.4 蛋白表达、纯化及定量分析

蛋白表达: 将克隆好的载体转入 BL21(DE3)/pGro7(pET28a-*ravC* 转入 BAP1/pGro7)中, 挑选单克隆接种到 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。过夜培养菌以 1:100 (体积比)转接到新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 为 0.6 时, 降温并添加阿拉伯糖(终浓度 3 mmol/L)和 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 16 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中继续培养 24 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 15 min 后收取菌体。

蛋白纯化: 菌体重悬到预冷的 Binding buffer 中, 压力破碎至菌液澄清, 18 000 r/min 离心澄清的裂解液 30 min, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤(Millipore)。将过滤后的裂解液上清加入到镍柱中(Ni-NTA, 5 mL), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 并用玻璃棒搅拌均匀。孵育结束后先用 10 mL Binding buffer 冲洗, 再用 10 mL 30 mmol/L 咪唑浓度的 Washing buffer 冲洗 3 遍, 最后用 5 mL 500 mmol/L 咪唑浓度的 Elution buffer 洗脱目的蛋白。将洗脱下来的目的蛋白由超滤管浓缩至 2.5 mL 后转入 PD10 (GE 17-0851-01)脱盐柱, 待 2.5 mL 蛋白液流尽之后加入 3.5 mL Desalting buffer, 收取 3.5 mL 洗脱液。洗脱液由超滤管浓缩后分装到 EP 管中, 存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 待用。全过程都需在低温条件下进行。

蛋白定量：使用 Bradford 蛋白定量试剂盒进行定量分析。绘制 BSA 标品蛋白浓度-吸光值 (595 nm) 的标准曲线，再根据目的蛋白吸光值大小计算浓度。

共需纯化 10 个蛋白，其中 AlpAB、RavC、AlpI、AlpD、AlpE、AlpF、AlpG 和 AlpS 为酮那霉素合成相关蛋白，MCAT 和 MatB 是辅助蛋白。MatB 是丙二酰-辅酶 A 合成酶，负责体系中丙二酰-辅酶 A 的合成^[25]；MCAT 是丙二酰辅酶 A: 酰基载体蛋白转移酶，负责酰基载体蛋白 ACP 的丙二酰化^[23]。

1.5 一锅法反应

标准反应体系总体积为 200 μL ，全反应共分 3 步。底物、辅因子和蛋白浓度均为加入体系后终浓度。

第一步：体系内快速生成丙二酰-辅酶 A。反应底物及辅因子包括丙二酸 (15 mmol/L)、ATP (5 mmol/L)、CoA (1.5 mmol/L) 和 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5、5 mmol/L MgCl_2 、20% 甘油)。催化酶为 MatB (7.5 $\mu\text{mol/L}$)。30 $^\circ\text{C}$ 反应 0.5 h。

第二步：完成从底物到 prejadomycin 的一锅酶法合成。向第一步体系中继续添加反应底物及辅因子：ATP (5 mmol/L)、乙酰-CoA (0.5 mmol/L)、NADH (2 mmol/L)、NADPH (1 mmol/L) 和 FAD (0.5 mmol/L)。再向体系中添加不同组分的催化酶：AlpAB+RavC+MCAT+MatB (标准体系 1)、AlpAB+RavC+MCAT+MatB+AlpI+AlpD+AlpE (标准体系 2)、AlpAB+RavC+MCAT+MatB+AlpI+AlpD+AlpE+AlpF (标准体系 3)。催化酶的浓度分别为 MCAT (19.1 $\mu\text{mol/L}$)、AlpAB (按 1:1 计算，分别约 15.5 $\mu\text{mol/L}$)、RavC (18.4 $\mu\text{mol/L}$)、AlpI (42.4 $\mu\text{mol/L}$)、AlpD (20.6 $\mu\text{mol/L}$)、AlpE (14.4 $\mu\text{mol/L}$)、AlpF (11.4 $\mu\text{mol/L}$)。30 $^\circ\text{C}$ 反应 2.5 h。

第三步：AlpG 催化 prejadomycin 生成 dehydrabelomycin。向体系中继续添加 NADPH (1 mmol/L) 和 AlpG (10.9 $\mu\text{mol/L}$)，即完成 AlpAB+RavC+MCAT+MatB+AlpI+AlpD+AlpE+AlpF+AlpG (标准体系 4) 反应。30 $^\circ\text{C}$ 反应 2 h。

最后加入 50 μL 乙酸终止反应，再加入 300 μL 乙酸乙酯溶剂进行萃取，萃取 2 次。将萃取完成后的乙酸乙酯溶剂用旋转蒸发仪旋干，加入 60 μL 甲醇重悬，即可用于 HPLC 检测。

1.6 AlpS 蛋白功能探究

向标准反应体系 1、2、3、4 中加入 3.6 $\mu\text{mol/L}$ AlpS 蛋白，按 1.3.3 体系及步骤反应，利用 HPLC 检测产物及产量变化。

向标准体系 3 (该体系产物 prejadomycin 单一稳定，反应简单快速) 依次添加 0、0.9、1.8、3.6、7.2、14.4、21.6、32.4 和 43.2 $\mu\text{mol/L}$ AlpS 蛋白，按 1.3.3 体系及步骤反应，利用 HPLC 检测产物及产量变化。

1.7 一锅法反应条件优化

同样选择标准体系 3，以 prejadomycin 的产量为指标进行条件优化。

最小聚酮合酶 (AlpA、AlpB 和 RavC) 对体系的影响：向标准反应体系 3 中分别添加 0、1.4、2.8、5.6、11.2、22.4 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度 AlpAB 和 RavC 蛋白 (三者等量) 反应，利用 HPLC 检测产物及产量变化。

温度对体系的影响：将标准体系 3 分别在 20、25、30、35、40 $^\circ\text{C}$ 的水浴锅环境中反应，利用 HPLC 检测产物及产量变化。

pH 对体系的影响：将标准体系 3 分别在 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中反应，利用 HPLC 检测产物及产量变化。

1.8 高效液相分析

采用 HPLC 检测产物及产量变化。流动相分别为纯水 (A 相，含 1% 三氟乙酸) 和甲醇 (B 相)。

检测方法: 流速保持 1 mL/min; 0–20 min, 75% A, 25% B, 20 min 内 B 相由 25% 上升至 100%; 20–25 min, 100% B 保持不变; 25–35 min, 75% A, 25% B, 保持不变平衡体系。

对于中间产物 SEK15、UWM6、rabelomycin 和 dehydrorabelomycin, 以 HPLC 的峰面积对比产量变化。对于产物 prejadomycin, 根据不同浓度标品的化合物浓度-峰面积(最大吸收处)绘制标准曲线, 从而计算产量。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白的表达与纯化

将构建好的表达质粒送测序公司进行测序鉴定, 测序结果比对显示全部正确。再将其分别转化至 BL21(DE3)/pGro7 中, 分别诱导培养, 纯化得到了醌那霉素合成所需聚酮合酶 AlpAB、RavC、AlpI、AlpD、AlpE、AlpF 和

AlpG, 以及 2 个辅助蛋白 MACT 和 MatB。纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2 所示。以上蛋白均可在大肠杆菌中可溶性表达, 且蛋白分子量分别与理论值相符^[20]。

2.2 一锅酶法反应体系的构建及产物鉴定

一锅酶法反应结果如图 3 所示。当体系中只存在最小聚酮合酶 AlpA、AlpB 和 AlpC/RavC 时, 2.5 h 后反应液呈浅粉色, 检测到中间产物 SEK15, 其最大吸收波长为 280 nm。在此体系基础上引入 AlpI、AlpD 和 AlpE, 2.5 h 后反应液呈浅黄色, 主要检测到 3 种产物, 其紫外光谱相似, 最大吸收波长均为 408 nm。通过与已有文献和标准品比较, 确定这 3 种产物分别为 UWM6、rabelomycin 和 prejadomycin。其主要产物为 UWM6, 该产物在体外不稳定, 自发反应形成 rabelomycin, 并伴有副产物 prejadomycin 生成。继续引入 AlpF, 2.5 h 后反应液呈亮黄色,

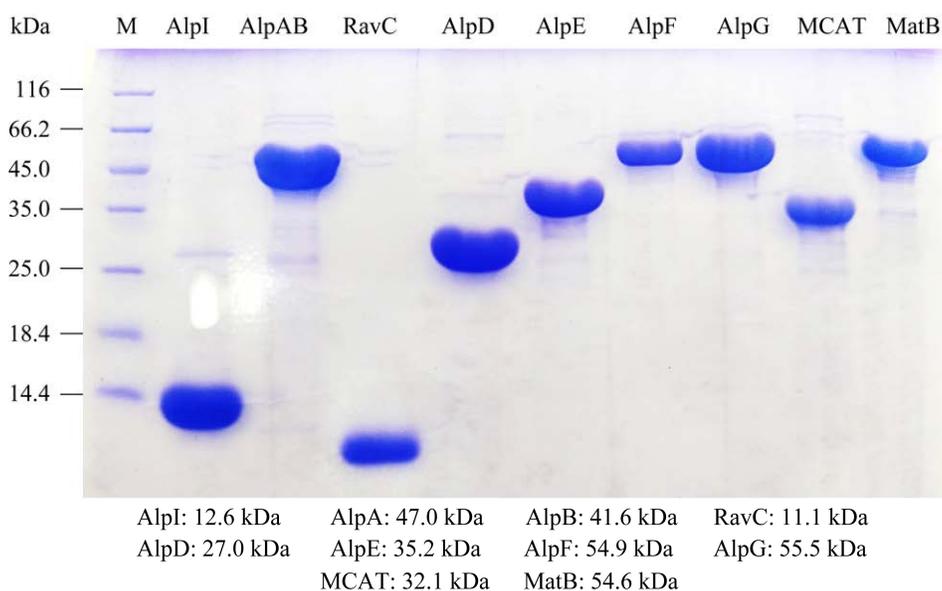


图 2 15% SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达与纯化

Figure 2 15% SDS-PAGE analysis of the protein expression. M: Protein molecular weight marker. AlpI: 12.6 kDa; AlpA: 47.0 kDa; AlpB: 41.6 kDa; RavC: 11.1 kDa; AlpD: 27.0 kDa; AlpE: 35.2 kDa; AlpF: 54.9 kDa; AlpG: 55.5 kDa; MCAT: 32.1 kDa; MatB: 54.6 kDa.

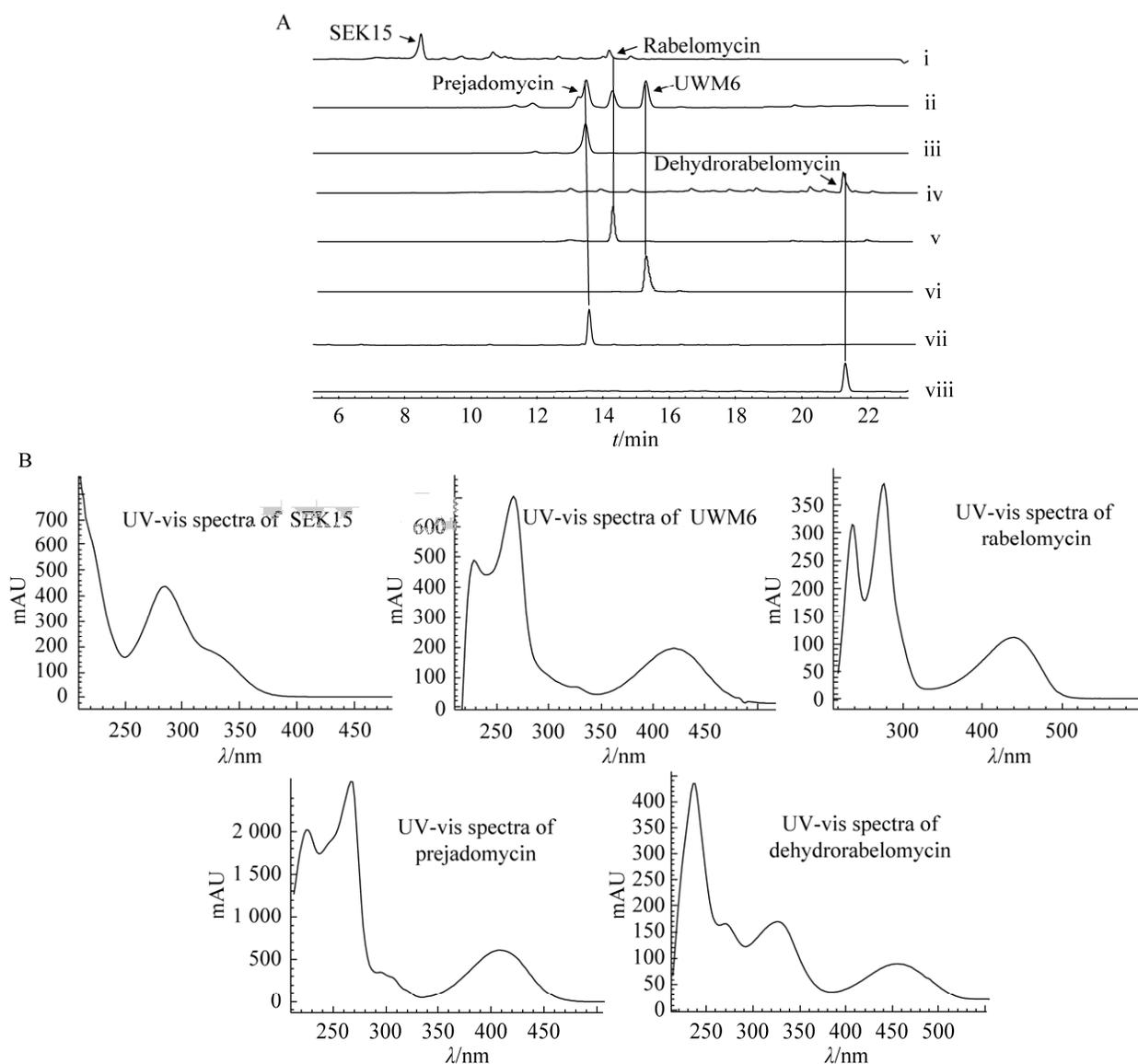


图3 HPLC检测一锅法酶反应产物

Figure 3 HPLC analysis of the products of one-pot enzymatic systems. A: HPLC results at 408 nm. i: Reaction system 1, AlpAB+RavC+MCAT+MatB; ii: Reaction system 2, AlpAB+RavC+MCAT+MatB+AlpI+AlpD+AlpE; iii: Reaction system 3, AlpAB+RavC+MCAT+MatB+AlpI+AlpD+AlpE+AlpF; iv: Reaction system 4, AlpAB+RavC+MCAT+MatB+AlpI+AlpD+AlpE+AlpF+AlpG; v: Rabelomycin standard; vi: UWM6 standard; vii: Prejadomycin standard; viii: Dehydrorabelomycin standard. B: UV absorption of the products of one-pot enzymatic systems.

产物UWM6和rabelomycin消失，得到单一产物 prejadomycin。向该体系直接引入 AlpG 进行一锅反应时，只能得到微量 dehydrorabelomycin。因此尝试采用分步反应单独添加 AlpG (方法见

1.3.3)，反应液由亮黄色转变为黄褐色，此时 prejadomycin 消失，得到产物 dehydrorabelomycin，其最大吸收波长为 460 nm。体外实验结果与体内实验结果一致^[20]。

2.3 AlpS 蛋白功能探究

体内实验已初步证明, II型硫酯酶 AlpS 行使水解功能, 负责催化聚酮化合物的链释放过程^[21]。分别在标准体外反应体系 1、2、3、4 中加入 3.6 $\mu\text{mol/L}$ AlpS, 均可以观察到反应液的颜色加深。各体系产物不变, 但产量均有不同程度的提高。SEK15 (标准体系 1 中)、UWM6 (标准体系 2 中)、rabelomycin (标准体系 2 中)、prejadomycin (标准体系 3 中)和 dehydrorabelomycin (标准体系 4 中)分别提高了 2.3、2.6、3.6、5.1、6.9 倍, prejadomycin 和 dehydrorabelomycin 的产量提高较为明显。值得注意的是, UWM6 在反应体系中可以自发转化生成 rabelomycin, 每次反应后 2 种产物的比例变化较大, 但二者产量相加值相对稳定。体外实验进一步证明了 II型硫酯酶 AlpS 可以通过增加聚酮化合物的链释放效率以提高产量, 也暗示了 AlpS 最可能负责催化 prejadomycin 或 dehydrorabelomycin 从酰基载体蛋白 ACP 上释放下来。

以 prejadomycin 为目标, 观察 AlpS 浓度和产量的关系, 结果如图 4B 所示。当加入少量 AlpS 蛋白时, prejadomycin 的产量先迅速增加, 在 7.2 $\mu\text{mol/L}$ 时产量达到最大值; 继续增加 AlpS 浓度, prejadomycin 的产量逐渐降低。

2.4 一锅法反应条件优化

AlpS 最优浓度(7.2 $\mu\text{mol/L}$)确定后, 需对最小 PKS 浓度、温度和 pH 等条件优化以提高体系效率。

酮那霉素的最小聚酮合酶(minimal PKS)包括 AlpA、AlpB 和 RavC 这 3 个蛋白。这一套模块重复使用, 催化了多轮聚酮链的延伸, 形成了早期聚酮链^[12]。根据图 5B 所示, prejadomycin 的产量会随着 minimal PKS 的添加迅速提高, 在 2.8 $\mu\text{mol/L}$ 时即达到稳定, 后逐渐降低。这可能是由于 minimal PKS 可迭代使用, 少量即满足催化反应要求。但当 minimal PKS 过量时, 体系开始不稳定, 蛋白开始沉淀, 导致产量降低。因此, 选择的最佳 minimal PKS 浓度各为 2.8 $\mu\text{mol/L}$ 。

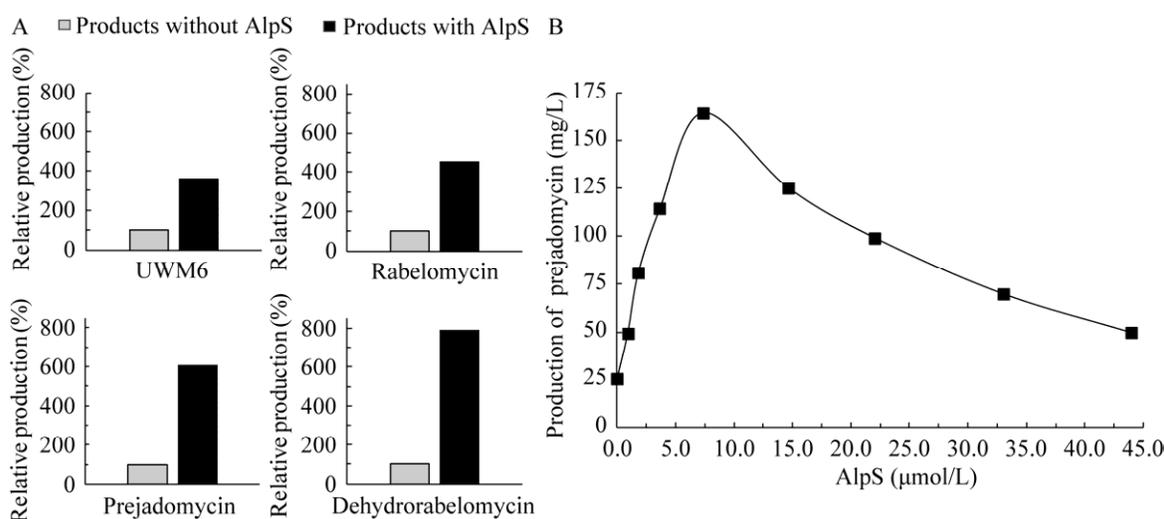


图 4 AlpS 蛋白对体系的影响

Figure 4 Effects of AlpS on one-pot enzymatic systems. A: Comparison of products with and without AlpS protein. The production without AlpS is standardized to 100%. B: Concentration of prejadomycin changing with AlpS.

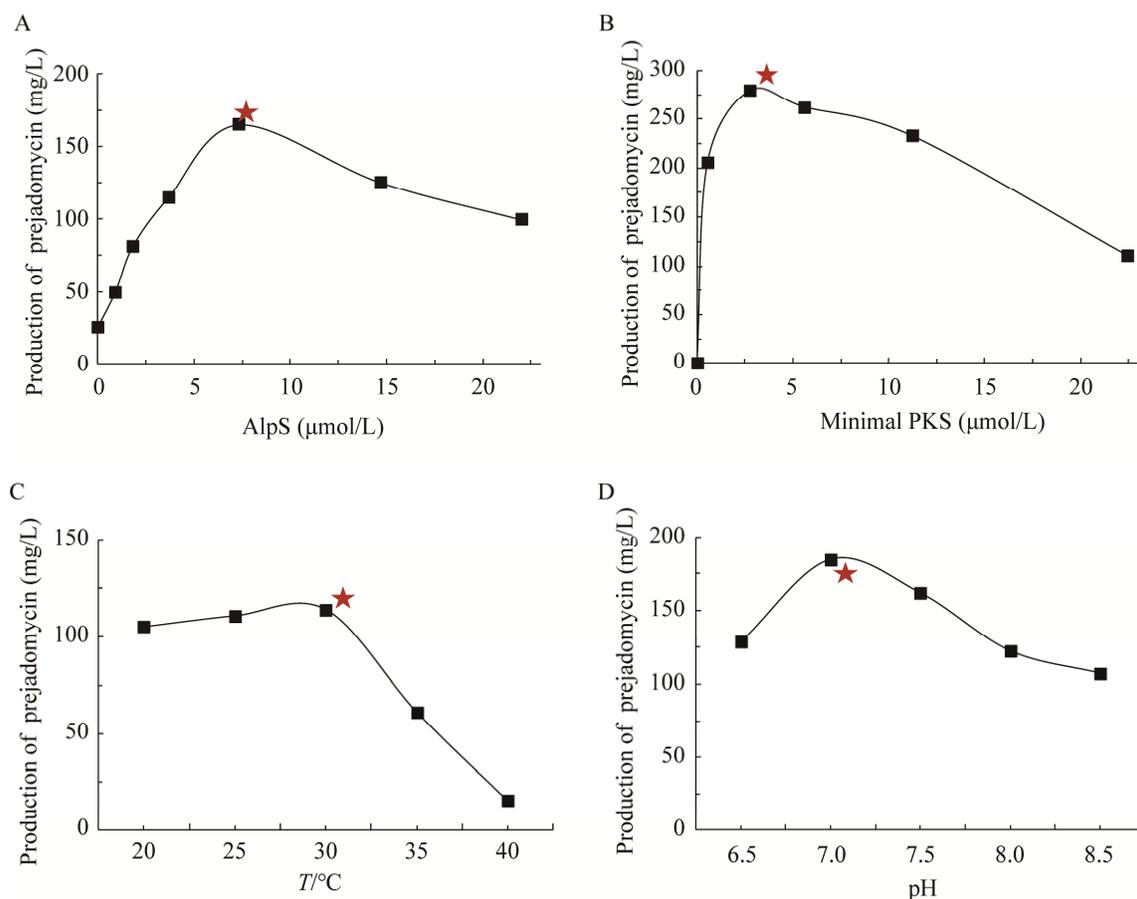


图5 一锅酶法的反应条件优化

Figure 5 Optimization of reaction conditions. A: Optimization of AlpS concentration. B: Optimization of minimal PKS concentration. AlpA, AlpB and RavC are at equal levels. C: Optimization of temperature. D: Optimization of pH.

温度对酶促反应具有重要作用。一方面，温度影响催化效率和反应平衡；另一方面，温度影响催化酶的稳定性和活性。根据图 5C 所示，在 30 °C 时 prejadomycin 产量最高，当温度过高或过低时都会使产量下降。尤其是温度大于 30 °C 时，体系稳定性被严重破坏，产生大量白色沉淀，产量迅速降低。因此，选择的最佳温度为 30 °C。

pH 同样会显著影响酶促反应体系稳定性。一方面，pH 会影响聚酮合酶的解离状态和构象；另一方面，体系中其他组分(如 ATP 等)的

活性状态也受 pH 调节。根据图 5D 所示，随着 pH 不断提高，prejadomycin 产量呈现先上升后下降的趋势。当 pH 为 7.0 时达到顶点，即在中性反应体系中产量最高。因此，选择的最佳 pH 为 7.0。

综上所述，在 AlpS 7.2 μmol/L、minimal PKS 各 2.8 μmol/L、温度 30 °C、pH 7.0 时为最优反应条件。在优化后体系反应，得到 prejadomycin 的产量约为 302 mg/L。与 Jürgen Rohr 等^[23]已有的体系相比，聚酮化合物产量提高了约 3.4 倍。

3 讨论与结论

醌那霉素是由 II 型聚酮合酶系统负责合成的非典型角蕈环类聚酮化合物。由于其独特的结构、良好的生物活性和潜在的临床价值, 引起了广泛的研究热情。本研究尝试利用一锅酶法反应, 在无细胞条件下重构醌那霉素的早期生物合成途径, 成功合成了醌那霉素的重要中间体 SEK15、UWM6、rabelomycin、prejadomycin 和 dehydrorabelomycin。在此基础上重点探究了 II 型硫酯酶 AlpS 的链释放功能, 并发现了 AlpS 对体系产量提升的关键作用。同时, 对于体外合成体系的产量和稳定性有显著影响的因素(温度、pH、最小聚酮合酶浓度和 II 型硫酯酶 AlpS 浓度), 也利用单一变量法进行了优化。

该一锅酶法合成体系为探究 II 型聚酮类化合物生物合成途径中关键基因的功能提供了更为简便的解决方案。聚酮类化合物的生物合成学研究一般是在天然或异源宿主体内进行, 例如使用基因敲除和原位回补技术分析其生物学功能等。体内实验操作复杂, 突变菌株构建和筛选耗时较长, 干扰因素多且难以进行代谢和机理研究。本研究在体外重构的一锅酶系统的组分明晰, 通过聚酮合酶的组合使用可快速研究未知蛋白的功能。AlpS 是目前发现的首个参与芳香聚酮化合物链释放过程的 II 型硫酯酶, 研究其作用机理和位点对于探究芳香聚酮化合物的链释放机制具有重要意义^[21]。从本研究看, AlpS 对于醌那霉素生物合成的中间体或者支路产物 SEK15、UWM6、rabelomycin、prejadomycin 和 dehydrorabelomycin 的体外生成均有促进作用, 不过不能影响所得产物的种类。该结果进一步佐证了 AlpS 负责水解聚酮链, 从而将产物从酰基载体蛋白 ACP 上释放下

来的功能。研究也初步说明, 在体外 AlpS 催化链释放的作用底物并非高度专一。Prejadomycin 和 dehydrorabelomycin 提高较为显著, 因此推测 AlpS 对这些步骤的底物亲和性最强, 水解作用最明显。

该一锅酶法合成体系为 II 型聚酮类化合物的高效合成提供了平台。与 Jürgen Rohr 等^[23]的研究相比, 本研究合成通路更长, 副产物更少, 产量和效率更高。本研究延伸了醌那霉素的生物合成途径, 除 rabelomycin 外进一步得到了重要的中间体 prejadomycin 和 dehydrorabelomycin。体系引入了分子伴侣 GroEL-GroES 辅助折叠, 提高了聚酮合酶(尤其是 AlpAB 复合蛋白)的可溶性, 酶催化效率提高, 产物纯净, 副产物明显减少。同时, 在单一变量法优化后的最适条件下(AlpS 7.2 $\mu\text{mol/L}$ 、minimal PKS 各 2.8 $\mu\text{mol/L}$ 、温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0), prejadomycin 的产量可进一步提高到 302 mg/L, 终产量提升 3.4 倍。产量显著提高最主要来自水解酶 AlpS 的添加。

该一锅酶法合成体系也为 II 型聚酮类化合物的组合生物学研究提供了新的参考。该体系合成的 dehydrorabelomycin 是 jadomycin、gilvocarcin 和 kinamycin 等非典型角蕈环聚酮化合物的共同中间体。在不同氧化开环酶的催化作用下 dehydrorabelomycin 发生重排反应, 生成多种骨架结构的天然产物。因此该系统具有广泛的适用性, 可进一步与不同的后修饰基因偶联, 组合得到不同的具有药物活性的聚酮类天然产物, 也可用于产物的合成途径和作用机制研究。

总体来说, 本研究所构建的一锅酶法合成体系反应条件温和, 操作简单, 无需纯化中间产物, 产物得率较高, 为醌那霉素的实际工业

生产提供了方向。研究所构建的 II 型聚酮化合物体外生产通用平台，不仅可以结合体内实验结果探究天然产物合成通路中关键基因的功能，后续还可以考虑与其他后修饰酶组合使用，合成新的具有良好生物活性的天然产物，具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] HOPWOOD DA. Genetic contributions to understanding polyketide synthases[J]. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2465-2498.
- [2] STAUNTON J, WEISSMAN KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 380-416.
- [3] DAS A, KHOSLA C. Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42(5): 631-639.
- [4] ZHANG Z, PAN HX, TANG GL. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis[J]. *F1000Research*, 2017, 6: 172.
- [5] KHAREL MK, PAHARI P, SHEPHERD MD, TIBREWAL N, NYBO SE, SHAABAN KA, ROHR J. Angucyclines: biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(2): 264-325.
- [6] GAO GX, LIU XY, XU M, WANG YM, ZHANG F, XU LJ, LV J, LONG QS, KANG QJ, OU HY, WANG Y, ROHR J, DENG ZX, JIANG M, LIN SJ, TAO MF. Formation of an angular aromatic polyketide from a linear anthrene precursor via oxidative rearrangement[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(7): 881-891.e4.
- [7] WANG B, REN JW, LI LY, GUO F, PAN GH, AI GM, AIGLE B, FAN KQ, YANG KQ. Kinamycin biosynthesis employs a conserved pair of oxidases for B-ring contraction[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2015, 51(42): 8845-8848.
- [8] ITÖ S, MATSUYA T, OMURA S, OTANI M, NAKAGAWA A. A new antibiotic, kinamycin[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1970, 23(6): 315-317.
- [9] KHDOUR O, SKIBO EB. Quinone methide chemistry of prekinamycins: ¹³C-labeling, spectral global fitting and *in vitro* studies[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(10): 2140-2154.
- [10] COLIS LC, WOO CM, HEGAN DC, LI ZW, GLAZER PM, HERZON SB. The cytotoxicity of (-)-lomaiviticin A arises from induction of double-strand breaks in DNA[J]. *Nature Chemistry*, 2014, 6(6): 504-510.
- [11] HERZON SB, WOO CM. The diazofluorene antitumor antibiotics: structural elucidation, biosynthetic, synthetic, and chemical biological studies[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(1): 87-118.
- [12] METSÄ-KETELÄ M, PALMU K, KUNNARI T, YLIHONKO K, MÄNTSÄLÄ P. Engineering anthracycline biosynthesis toward angucyclines[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(4): 1291-1296.
- [13] WANG B, GUO F, REN JW, AI GM, AIGLE B, FAN KQ, YANG KQ. Identification of Alp1U and Lom6 as epoxy hydrolases and implications for kinamycin and lomaiviticin biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7674.
- [14] WANG KK A, NG TL, WANG P, HUANG ZD, BALSUS EP, van der DONK WA. Glutamic acid is a carrier for hydrazine during the biosyntheses of fosfazinomycin and kinamycin[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3687.
- [15] LIU XY, LIU DX, XU M, TAO MF, BAI LQ, DENG ZX, PFEIFER BA, JIANG M. Reconstitution of kinamycin biosynthesis within the heterologous host *Streptomyces albus* J1074[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(1): 72-77.
- [16] FAN KQ, PAN GH, PENG XJ, ZHENG JT, GAO WB, WANG J, WANG WS, LI Y, YANG KQ. Identification of JadG as the B ring opening oxygenase catalyzing the oxidative C-C bond cleavage reaction in jadomycin biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(11): 1381-1390.
- [17] WANG P, HONG GJ, WILSON MR, BALSUS EP. Production of stealthin C involves an S-N-type smiles rearrangement[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(8): 2864-2867.
- [18] LIU T, KHAREL MK, ZHU LL, BRIGHT SA, MATTINGLY C, ADAMS VR, ROHR J. Inactivation of the ketoreductase *gilU* gene of the gilvocarcin biosynthetic gene cluster yields new analogues with partly improved biological activity[J]. *ChemBioChem*

- a European Journal of Chemical Biology, 2009, 10(2): 278-286.
- [19] TIBREWAL N, PAHARI P, WANG GJ, KHAREL MK, MORRIS C, DOWNEY T, HOU YP, BUGNI TS, ROHR J. Baeyer-Villiger C–C bond cleavage reaction in gilvocarcin and jadomycin biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(44): 18181-18184.
- [20] LIU XY, HUA KM, LIU DX, WU ZL, WANG Y, ZHANG HR, DENG ZX, PFEIFER BA, JIANG M. Heterologous biosynthesis of type II polyketide products using *E. coli*[J]. ACS Chemical Biology, 2020, 15(5): 1177-1183.
- [21] HUA KM, LIU XY, ZHAO YC, GAO YJ, PAN LF, ZHANG HR, DENG ZX, JIANG M. Offloading role of a discrete thioesterase in type II polyketide biosynthesis[J]. mBio, 2020, 11(5): e01334-e01320.
- [22] ZHUANG L, HUANG SH, LIU WQ, KARIM AS, JEWETT MC, LI J. Total *in vitro* biosynthesis of the nonribosomal macrolactone peptide valinomycin[J]. Metabolic Engineering, 2020, 60: 37-44.
- [23] KHAREL MK, PAHARI P, LIAN H, ROHR J. Enzymatic total synthesis of rabelomycin, an angucycline group antibiotic[J]. Organic Letters, 2010, 12(12): 2814-2817.
- [24] WANG GJ, CHEN J, ZHU HN, ROHR J. One-pot enzymatic total synthesis of presteffimycinone, an early intermediate of the anthracycline antibiotic steffimycin biosynthesis[J]. Organic Letters, 2017, 19(3): 540-543.
- [25] WU JJ, DU GC, ZHOU JW, CHEN J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy[J]. Metabolic Engineering, 2013, 16: 48-55.