

## 专论与综述

## 多聚酮的微生物合成及其多样性研究进展

任立成 鲍时翔\*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所/热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

**摘要:** 多聚酮多是由微生物产生的一大类天然产物, 在结构和功能上具有多样性。很多聚酮具有抗菌、抗真菌、抗寄生虫、抗肿瘤等生物活性, 有很大的临床应用价值。随着研究的不断深入, 一方面更多的天然产物聚酮被发现, 另一方面对它们合成相关酶的作用机制研究也更加深入。主要对多聚酮的合成机制以及多聚酮合成类型的多样性展开论述。

**关键词:** 多聚酮, 多聚酮合成酶 (PKS), 天然产物

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0127-05

## Advances on Polyketide Biosynthesis by Microorganism and the Diversity of Polyketide Synthases

REN Li-Cheng BAO Shi-Xiang\*

(State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of tropical Bioscience and Biotechnology,  
Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101)

**Abstract:** Polyketides are very large group of natural products with functional and structural diversity. Most of them are produced by microorganism and have medicinal activities, including antibiotic, anticancer, antifungal and antiparasitic properties. The researches in this area have progressed greatly. More and more polyketides are discovered, on the other hand the mechanisms of biosynthesis of those various polyketides are researched more deeply and clearly. The article reviewed the progress of the research in the diversity of polyketide synthases and the mechanisms of polyketide biosynthesis.

**Key words:** Polyketide, Polyketide synthases (PKS), Natural products

天然产物多聚酮 (polyketide) 多是由微生物产生的一大类群次生代谢产物, 在结构和功能上都具有丰富的多样性, 并具有十分重要的药理学活性, 如抗菌、抗真菌、抗寄生虫、抗肿瘤以及免疫抑制剂等。到目前, 有雷帕霉素 (rapamycin)、竹桃霉素 (olcandomycin)、利福霉素 (rifamycin)、FK506 等数千种聚酮被发现。多聚酮的合成是由多聚酮合成酶 (PKS) 催化完成的, 合成过程与典型的 FAS 途径很相似。但是 FAS 途径的相关酶结构组成一般是固定的, 有基本固定的反应途径; 而 PKS 在不同的生物中, 不同类型的聚酮化合物的合成酶不同, 因此多聚酮合成酶具有丰

富的多样性。多聚酮多样性形成原因, 一方面与合成酶的组成有关, 另一方面与反应的循环数有关, 与起始单位和延伸单位的选择、催化形成产物的立体构型等有关<sup>[1,2]</sup>。

## 1 多聚酮合成酶的基本类型

从多聚酮合成酶 (polyketide synthases, PKS) 的结构和作用机制上看, 多聚酮合成酶 (PKS) 主要分为 3 种基本的类型: 类型 I PKS、类型 II PKS 和类型 III PKS。

**1.1 类型 I PKS** 一般类型 I PKS 是有多个模块组成的多功能酶, 每一个模块有一系列非重复的

\* 通讯作者 Tel: 86-898-66980695, E-mail: bshxhq@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-01-18, 修回日期: 2006-03-28

酶功能域构成, 每一个酶功能域完成相应的催化反应; 每一个模块催化完成一个二碳单位的延伸, 模块中各功能域组成的多样性决定 PKS 合成产物的多样性。典型的例子如催化红霉素前体物 6-dEB 的合成酶 (6-deoxyerythronolide B synthases, DEBS)。最近的研究又发现了许多新的类型。

**1.1.1 重复利用类型 I PKS (Iterative Type I PKS):** 主要参与真菌多聚酮的合成, 如青霉菌产生的 6-甲基水杨酸 (6-methylsalicylic acid, 6-MSA)。Ahlerl 等<sup>[3]</sup>从 *Micromonospora echinospora* 中克隆了合成 calicheamicin 的 PKS 基因簇, 有 KS、AT、DH、和 ACP 功能域构成, 在序列上与 I 型 PKS 有同源性, 证明该 PKS 酶为重复体 I 型 PKS, 是原核微生物重复体 I 型 PKS 合成芳香聚酮的例子, 研究表明单环芳香聚酮 (如, 四环聚酮) 的生物合成可以由重复利用的类型 I PKS 催化合成。Zazopoulos 等<sup>[4]</sup>对萘酸合成相关酶基因的克隆, 其中的一个 PKS 具有和 Ahlerl 报道 PKS 有相同的结构和很高的同源性。Liu 等<sup>[5]</sup>报道了从 *S. carzinostaticus* 中克隆出新制癌菌素 (Neocarzinostatin) 的合成相关基因, 其中的可重复利用的 I 型 PKS 参与新制癌菌素前体物的合成。这些研究表明可重复利用的 I 型 PKS 可以合成多环芳香聚酮。

**1.1.2 可重复利用 AT 酶的类型 I PKS:** Cheng 等<sup>[6]</sup>从 *S. atroolivaceus* 克隆了 leinamycin 的合成相关合成酶 PKS 基因簇, 发现该酶缺少同源的 AT 功能域。在 PKS 的合成过程中是由离散的蛋白 LnmG 来完成酰基的转运, LnmG 在 PKS 的合成途径中扮演酰基转运酶 (AT) 的作用, 不断地为每一个模块转运丙二酸单酰 CoA。这是一种新的 I 型 PKS, 在 PKS 的模块之外有离散的 AT 酶, 能重复使用, 为缺少 AT 的 PKS 各个模块转运丙二酸单酰 CoA。在结构上, DEBS 形成平行二聚体的螺旋结构, 在螺旋结构的转角处为各个模块的 KS 和 AT 功能域形成的四面体, 使得 ACP 功能域靠近另一亚单位的 KS 功能域。显然这种缺少 AT 的 PKS 结构与该模型不相符, 因此在这种 “AT-less” PKS 的结构中 KS 和 ACP 功能域可能形成 PKS 的核心区<sup>[1,2]</sup>。

**1.2 类型 II PKS** 类型 II PKS 典型的例子是 *S. coelicolor* 产生放线菌红素 (actinorhodin) 的聚酮合

成酶。放线菌红素 PKS 的活性位点分布在那些小的、具有单功能的亚单位上, 一般有如下几个酶功能单位构成: 酰基转移酶 (AT)、酰基载体蛋白 (ACP)、酮酰合成酶 (KS)、酮还原酶 (KR)、脱水酶 (DH)、烯酰还原酶 (ER)、硫酯酶酶域 (TE) 及甲基转移酶 (MT) 等。类型 II PKS 的其他类型还有:

**1.2.1 缺少 ACP 的类型 II PKS:** 除了 III 型 PKS 是直接利用乙酰-CoA 外, 一般地其它两种类型的 PKS 是由 ACP 介导形成多聚酮的中间产物。Shen 等<sup>[7]</sup>从 *S. griseus* 克隆了无活菌素 (nonactin) 合成大环内脂酶基因簇, 其中 *nonJKPQU* 编码 5 个离散的 KS 酶, 但没有 ACP 的编码基因。它们的每一个单元完成一次脱羧聚合反应, 因此 3 次聚合反应完成 4 个乙酰 CoA 聚合前体物的合成, 由于缺少 ACP 而是直接利用乙酰 CoA 合成多聚酮。它们一起构成 II 型 PKS 非重复利用的、缺少 ACP 酶的一种新类型。

**1.2.2 催化形成 C-O 的类型 II PKS:** 尽管 PKS 的各种类型的结构与功能机制各不相同, 但是它们合成多聚酮的机制几乎都是通过脱羧聚合, 形成 C-C 键成为多聚酮的 C 骨架。Kwon 等<sup>[8]</sup>报道无活菌素 (nonactin) 的合成相关酶 NonJKPQU, 在催化无活菌素的合成中形成 C-O 键, 其中的 5 个 KS 都与 II 型 PKS 的 KS 有高度的同源性。其中 NonJK 的 KS 与 C-O 键的形成有关。在 FAS 和 PKS 的 KS 功能域都包含有 Cys-His-His/Asn 的氨基酸三联体催化活性中心, 其中的 His-His/Asn 对于使 malonyl-ACP 或 malonyl-CoA 在脱羧时形成相应的 C 阴离子是十分必要的, Cys 残基催化 C 阴离子与酰基-S-KS 形成 C-C 键。而在 NonJK 有 Cys-Tyr/Gly-His 催化的三联体, 表明 NonJK 缺少脱羧活性。NonJK 通过 -OH 的亲核基催化直接形成 C-O, 定点突变证实其中的 Cys 在 C-O 的形成中担当重要角色。

**1.3 类型 III PKS** 多在植物和细菌中发现, 主要有查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS)、1, 2-二苯乙烯合成酶 (stilbene synthase, STS) 和吡啶酮合成酶 (acridone synthase, ACS), 是亲源关系相近的 3 类酶; 后两者是由 CHS 进化而来; 其

中 CHS 和 STS 有 75% 到 90% 的同源性。与其它类型的 PKS 显著不同的是, 类型 III PKS 直接利用 CoA 的硫酯臂对中间体转运, 各种脱羧、聚合、环化以及酯化等反应都是在同一个酶的同一个活性中心完成<sup>[1, 9, 10]</sup>。

多聚酮合成酶类型的多样性, 决定了多聚酮在结构和功能上的多样性, 随着研究的深入, 将会有更多新类型的 PKS 和更多新颖的多聚酮被发现。

## 2 多聚酮合成酶 (域) 的功能及其作用机制

对酶功能域以及模块功能及其作用机制的研究往往是通过定点突变、基因删除以及杂合 PKS 等方法来研究; 有些是在生物体内进行, 以研究 PKS 在原始状态下的功能; 有些是通过表达相关的酶蛋白, 在体外研究其功能; 在体外和体内的研究结果也并非完全一致。杂合 PKS 就是从两个或多个生物的 PKS 部分组合而成, 在理论上揭示多聚酮形成多样性的原因, 提供认识这些酶催化形成立体特异性的机制。定点突变主要通过突变活性中心的氨基酸的编码基因, 以研究相关的酶功能域或模块的功能以及它们的活性位点等。

**2.1 酰基转移酶域 (AT)** 在聚酮合成过程中, AT 参与延伸单位的选择和转运。Del Vecchio 等<sup>[11]</sup>研究发现, AT 的基序与延伸单位的选择密切相关。当 AT 的这种基序在特定的位点改变, 并在 *S. erythraea* 中表达 DEBS1-TE 的双模块, 产生的三聚酮内脂, 在其延伸单位的预期位点可以不再是相应的内酸盐而是乙酸盐。在靠近 C 末端保守区基序 YASH 与 AT 选择延伸单元 methylmalonyl-CoA 相关, HAFH 与选择延伸单元 malonyl-CoA 密切相关, XAGH (X 代表 F、T、V、或 H) 与选择 ethylmalonyl-CoA 或其它以 CoA 为载体的延伸单元有关。在构建的 DEBS1-TE 模块中, 由 HASH 或 HAFH 替换 AT1 域的保守基序 YASH 在 *S. erythraea* 中表达时, 突变型与野生型 AT1 分别结合 malonyl-CoA 和 methylmalonyl-CoA 进入聚酮合成的 C 链延伸中。AT 域的这种保守基序, 位于 AT 的活性位点, 选择聚酮合成的延伸单元。

**2.2 酮还原酶域 (KR)** 短链脱氢/还原酶 (SDRs) 可以比较广泛地催化各种 NAD (P) + / NAD (P) H 依赖型的酮还原作用、脱氢还原作用、脱卤素作用、脱水作用、异构化作用等。SDRs 具有 Rossmann 折叠片, 为辅酶的结合位点, 具有保守的 Tyr-Lys-Ser 氨基酸残基三联体的催化位点, 位于活性中心。Reid 等<sup>[12]</sup> 分别对 KR 的 3 个氨基酸进行替换突变, 构建 DEBS 的 M6 + TE 表达载体, 突变 Tyr-Phe、Lys-Glu 和 Ser-Ala, 在大肠杆菌中表达。体外功能分析表明 KR 失去活性, 因而 M6 + TE 不能合成三聚酮内脂。当突变在完整的 DEBS 中的 M6 上并在 *S. lividans* 表达, Tyr-Phe 替换的定点突变, 完全使 KR6 失活, 导致产生衍生的 3-酮基 6-dEB; 当突变分别为 Ser-Ala 和 Lys-Glu 时, 在产物的 C-3 位点上同时含有还原和非还原的混合体。结果与 SDRs 的功能模型一致, 保守的 Tyr 为催化反应的质子供体。根据 KR 的同源超家族蛋白酶 SDRs 的结构建模, 提出 KR 还原作用的立体控制模型 (图 1), 在不同型 D/L 的 KR 中

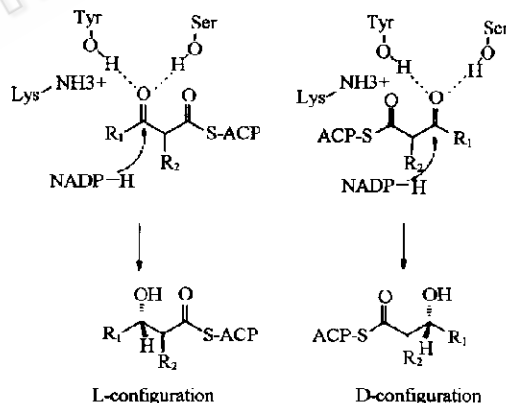


图 1 KR 还原作用的立体控制模型<sup>[12]</sup>

底物以被还原的羰基键为轴旋转的方向与定位也不同, 相近位置的氨基酸残基与 NADPH 共同维持两种不同的立体产物的形成结果。在每一类型的 KR 中只有一种几何活性位点。Asp 处于 KR 还原作用的活性中心, 并产生 D 型构象的产物, 如动物的 FAS 途径和 DEBS 的 KR1; 在产生 L 型构象 C 的 KR 中, 常常缺少 Asp, 如 DEBS 的 KR2、KR5 和 KR6。这一位点与 His112/Tyr100 氨基酸残基一起构成还原作用的调理位点对产物的立体特异性

有控制作用。Asp 可能与处于产生 D 型的 KR 中心的底物相互作用, 干扰底物与产生 L 型的 KR 的结合, 在随后的 AT 脱 H 作用中形成反式双键。因此还原作用的立体化学结果可能对形成双键的几何学特征产生影响。

**2.3 硫酯酶域 (TE)** TE 在 PKS 中主要是催化多聚酮的释放和环化等。DEBS 的 TE 共价结合到 DEBS 的 ACP6 上, ACP6 借助磷酸泛酰巯基乙酰臂将合成的成熟聚酮线性链传递给 TE, TE 模块催化环化作用并释放内脂化的七聚酮。TE 在结构上属于  $\alpha/\beta$  水解酶家族, 具有两个明显的特征: 表面富含疏水的亮氨酸二聚体, 底物通道穿过整个蛋白。催化活性的氨基酸三联体有 Asp<sub>169</sub>-His<sub>259</sub>-Ser<sub>142</sub> 构成, 位于底物通道的中间, 表明底物是穿过整个蛋白酶通道。Tsai 等<sup>[13]</sup> 在对 DEBS 的 TE 晶体结构研究的基础之上, 提出了 TE 催化环化并从 DEBS 上释放成熟多聚酮的机理: ACP6 借助共价键结合到 TE 的 N-面, 在 TE 的精氨酸槽中

与 TE 发生相互作用, 同时多聚酮链被插入到 TE 的底物通道中, ACP6 的磷酸泛酰巯基乙酰臂上转酰基到 TE 活性中心亲核 Ser<sub>142</sub> 的位点上。在活性中心的氨基酸残基与多聚酮上的多个功能基团 (如 C<sub>1</sub> = O、C<sub>3</sub>-OH、C<sub>5</sub>-OH、C<sub>9</sub> = O、C<sub>11</sub>-OH、C<sub>13</sub>-OH) 相互作用使其精确定位。当亲核竞争时, 在活性中心的 N 面外围被整个 DEBS 形成疏水屏蔽, 在 C 面被多聚酮链铆钉, 形成相对稳定的结构。碱性的 His<sub>259</sub> 促使底物 C<sub>13</sub>-OH 去质子化作用, 这种质子的替换使酶催化终产物 6-dEB 的形成。也就是在酶活性中心, 氢键的形成促使底物在 C<sub>1</sub> = O 和 C<sub>13</sub>-OH 之间环化。在释放底物时, TE 蛋白的构象在 C 面发生变化, C 面变宽利于底物的释放, 产物在 TE 的 C 面从底物通道里释放出来。TE 蛋白的这种构象上的变化可能是借助  $\alpha 6$ -螺旋的移动产生。随后酶的构象发生翻转, 重新回到原来的状态, 进一步完成下一轮的催化反应 (图 2)。

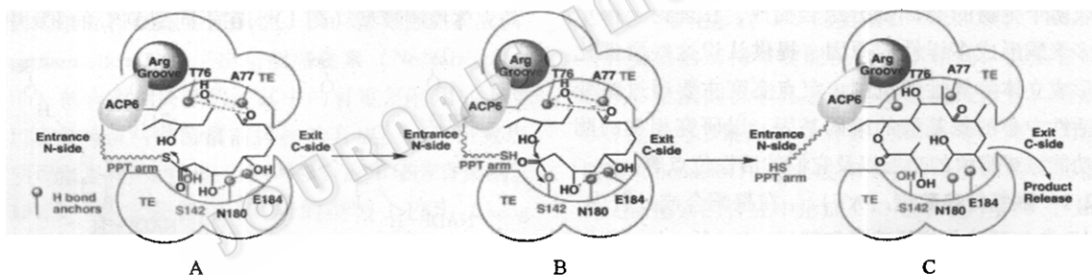


图 2 DEBS-TE 催化七聚酮内脂的环化和释放<sup>[13]</sup>

A ACP6 共价结合 TE 的 N 面, 将多聚酮链被插入到 TE 的底物通道中, B 多聚酮链的多个功能基团与 TE 形成 7 个氢键,

C C<sub>1</sub> = O 被 C<sub>13</sub>-OH 亲核攻击, 形成大环内脂, 终产物在 TE 的 C 面被释放出来

### 3 PKS 基因的系统进化

由于 PKS 的结构与作用机制不同, 产生形式多样的多聚酮天然产物。PKS 的多样性是与编码基因在复制过程中的分化有关, 基因的横向转移机制 (HGT) 是细菌进化的主要动力。I 型 PKS 在放线菌之间的横向转移普遍发生, 可以在放线菌类群中产生大量的同源性 PKS。放线菌不稳定的线性染色体以及环境因子的共同作用使放线菌之间容易基因横向转移<sup>[14]</sup>。在 PKS 与 FAS 长期的共同进化过程中, 模块 PKS 是由细菌 FAS 以及原始的可以重复利用型 PKS 衍生而来<sup>[15]</sup>。基因多拷贝复

制、基因丢失、以及基因横向转移 (HGT) 推动了 PKS 的进化。也正是因为它们有着这种进化关系, 许多 PKS 有共同的作用机制, 可以对 PKS 的基本分型; 也正是因为这种进化关系, PKS 的形式多样。

### 4 展望

多聚酮合成酶 (PKS) 类型丰富多样, PKS 的结构与作用机制具有多样性, 产生了形式多样的聚酮天然产物。由于多聚酮具有形式多样的生物活性可以被人类利用, 一方面对有活性的天然多聚酮的筛选以及合成机制的研究越来越深入; 另

一方面,在对多聚酮合成机制的研究基础之上,进行“非天然”多聚酮的研究,也就是利用基因重组等手段开展对重组聚酮或杂合聚酮等“非天然”多聚酮研究,可以更快地获得一些更为新颖的、具有更好生物活性的“非天然”多聚酮。对多聚酮的筛选以及合成机制的研究是开展组合聚酮研究的基础和前提,因此我们主要是在对有活性聚酮天然产物的筛选基础之上,通过分子生物学的方法对相关合成酶进行遗传型分析,以阐明它们的合成机制。由于分子生物学的方法使基因重组十分的便利快捷,对于组合聚酮的研究越来越多。关于杂合多聚酮的研究进展我们将在今后的综述文献中作进一步的阐述。

### 参考文献

- [1] Staunton J., Weissman K. *J Nat Prod Rep*, 2001, 18 (4): 380 ~ 416.
- [2] Shen B. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7 (2): 285 ~ 295.
- [3] Ahlert J, Shepard E, Lomovskaya N, *et al. Science*, 2002, 297 (5584): 1173 ~ 1176.
- [4] Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, *et al. Nat Biotechnol*, 2003, 21 (2): 187 ~ 190.
- [5] Liu W, Nonaka K, Nie L, *et al. Chem Biol*, 2005, 12 (3): 293 ~ 302.
- [6] Cheng Y Q, Tang G L, Shen B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100 (6): 3149 ~ 3154.
- [7] Shen B, Kwon H J. *Chem Rec*, 2002, 2 (6): 389 ~ 396.
- [8] Kwon H J, Smith W C, Scharon A J, *et al. Science*, 2002, 297 (5585): 1327 ~ 1330.
- [9] Lukacien R, Schreiner S, Silber K, *et al. Phytochem*, 2005, 66 (3): 277 ~ 284.
- [10] Austin M B, Bowman M E, Ferrer J L, *et al. Chem Biol*, 2004, 11 (9): 1179 ~ 1194.
- [11] Del Vecchio F, Potkovic H, Kendrew S G, *et al. J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30 (8): 489 ~ 494.
- [12] Reid R, Pisgentini M, Rodriguez E. *Biochem*, 2003, 42 (1): 72 ~ 79.
- [13] Tsai S C, Miercke L J, Krucinski J. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98 (26): 14808 ~ 14813.
- [14] Ginolhac A, Jarrin C, Robe P, *et al. J Mol Evol*, 2005, 60 (6): 716 ~ 725.
- [15] Jenke K H, Sandmann A, Muller R, *et al. Mol Biol Evol*, 2005, 22 (10): 2027 ~ 2039.

### • 稿件规范化与标准化 •

## 正文

各级标题:正文部分的一级标题通常为“1 材料与方法”,“2 结果与讨论”或“2 结果”、“3 讨论”,此标题左顶格,顺序排列;二、三级标题,例如:“1.1 材料”,“1.1.1 菌种”等,左顶格排。注意:一、二级标题本身占一行,内容另起行,三级标题后的内容用冒号隔开后接排。

图和表:凡用简要文字能讲清楚的内容尽量用文字叙述,否则,用图表表达。但是,图表必须具有自明性,避免重复,制作规范:(1)线图要精绘,照片要清晰、反差适中、黑白分明。正文中的插图应放在适当位置,其下方写图题、图注,电镀照片应在图题后面注明放大倍数。(2)表格设计要注意表述内容的逻辑性和准确性。本刊表格一律使用三线表(表头线和表格起、止线)。(3)图表中量和单位的比值表示数值,即物理量符号(斜体)与单位(正体)之间用斜线隔开。(4)图和表随文排,即先见文字后见图和表。

材料与方法:本部分主要回答:“怎么研究(HOW)”这个问题。文章得出结论主要靠这部分的实验数据予以验证与说明。因此,作者应予以极大重视,撰写时应尊重事实,思路清晰,内容务求客观、科学、完备,让事实和数据说话。另外,有些作者因为申请专利等原因,对实验数据和方法有所保留,严格说来,该论文已不是真正意义上的论文,而仅是消息报道。

结果与讨论:这部分是整篇论文的最后总结,主要回答“研究出什么(WHAT)”,它应该以正文实验中得出的数据、现象和阐述分析作为依据并得出完整、准确、简洁的结论。同时,注意在数据的取舍上不应随意掺入主观成分或妄加猜测,更不应忽视偶发的现象和数据。