

研究报告



斑鸠霉素氧化酶 CftA 体外生物活性研究

金红波^{1,2} 张丽萍¹ 张文军^{1,2} 张光涛¹ 朱义广^{1,2} 刘威¹ 张长生^{*1,2}

1 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 中国科学院海洋微生物中心 广东省海洋药物重点实验室 广东 广州 510301

2 中国科学院大学 北京 100049

摘要:【背景】斑鸠霉素及其氧化衍生物属于多环特特拉姆酸大环内酰胺类化合物,具有良好的生物活性,挖掘更多新颖斑鸠霉素类似物具有重要意义。细胞色素 P450 氧化酶 CftA 被认为能催化斑鸠霉素的氧化反应,但未有相关体外实验数据的报道。【目的】通过体外生化实验鉴定氧化酶 CftA 的功能,并探索其催化斑鸠霉素氧化反应的机制。【方法】利用基因合成的方法直接克隆斑鸠霉素氧化酶基因 *cftA*,于大肠杆菌中诱导表达后,纯化蛋白进行体外酶反应,利用高效液相色谱与高分辨质谱联用技术鉴定酶反应产物。【结果】在体外,氧化酶 CftA 催化斑鸠霉素生成一个新的氧化衍生物 Hydroxyikarugamycin D 和一个已知氧化衍生物 Clifednamide A。【结论】进行了细胞色素 P450 氧化酶 CftA 的体外生化研究,证实其能特异性催化斑鸠霉素 C29 位的两步氧化反应,为进一步探索斑鸠霉素 P450 氧化酶的催化机制,以及通过生物酶催化拓展斑鸠霉素类多环特特拉姆酸大环内酰胺化合物的结构多样性奠定了基础。

关键词: 斑鸠霉素, 多环特特拉姆酸大环内酰胺, 细胞色素 P450, 体外生化

In vitro biochemical characterization of ikarugamycin oxidase CftAJIN Hongbo^{1,2} ZHANG Liping¹ ZHANG Wenjun^{1,2} ZHANG Guangtao¹
ZHU Yiguang^{1,2} LIU Wei¹ ZHANG Changsheng^{*1,2}

1 Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica; Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, RNAM Center for Marine Microbiology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Polycyclic tetramate macrolactams (PoTeMs), especially ikarugamycin and its analogs, display a wide range of antifungal, antibacterial, and cytotoxic activities. The cytochrome P450 CftA was shown to be an ikarugamycin oxidase according to the *in vivo* experiments, however, no *in vitro* evidence was available. [Objective] To study the biochemical function of ikarugamycin oxidase CftA. [Methods] CftA was purified by Ni-NTA affinity chromatography after the overexpression of synthetic

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31630004, 41911530078, 41606193); Key Research Program of Frontier Science of Chinese Academy of Sciences (QYZDJ-SSW-DQC004)

*Corresponding author: E-mail: czhang@scsio.ac.cn

Received: 04-02-2021; Accepted: 12-03-2021; Published online: 27-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31630004, 41911530078, 41606193); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSW-DQC004)

*通信作者: E-mail: czhang@scsio.ac.cn

收稿日期: 2021-02-04; 接受日期: 2021-03-12; 网络首发日期: 2021-04-27

gene *cftA* in *Escherichia coli* BL21(DE3), and was biochemically characterized by *in vitro* enzyme reaction and identification of reaction products through HPLC-HR-ESI-MS/MS. **[Results]** A new ikarugamycin derivative named hydroxyikarugamycin D and a known ikarugamycin derivative, clifednamide A, were observed after incubating CftA and ikarugamycin. **[Conclusion]** The *in vitro* evidence was provided to support that tandem oxidations on ikarugamycin was carried out by CftA at C29. This result paved the way for further researches to study the mechanism of ikarugamycin oxidases and the utilization to develop novel ikarugamycin type of PoTeMs.

Keywords: ikarugamycin, polycyclic tetramate macrolactams, cytochrome P450, *in vitro* enzyme reaction

多环特特拉姆酸大环内酰胺 (Polycyclic Tetramate Macrolactams, PoTeMs) 是一类结构中包含有特特拉姆酸结构单元、多元碳环稠合体系以及大环内酰胺内核的天然产物, 因具有良好的生物活性和独特的生物合成机制, 成为国内外研究的热点化合物类型。斑鸠霉素 (Ikarugamycin) 是首个被分离鉴定的 PoTeM 化合物^[1-2], 已被报道具有良好的抗细菌、抗真菌活性和抑制肿瘤细胞的作用^[1-3], 并被确认为治疗癌症的先导化合物^[4-5]。然而, 广泛的生物活性也使得斑鸠霉素具有潜在毒副作用的风险, 阻碍了其药物开发进程。近些年报道的斑鸠霉素氧化衍生物, 不仅在水溶性上有所改变, 还在生物活性的强度和类型上与斑鸠霉素表现出明显的差异^[6-11]。因此, 挖掘更多斑鸠霉素氧化衍生物具有重要意义。

斑鸠霉素生物合成基因簇高度保守且具有简洁性, 除了包含合成斑鸠霉素骨架必需的 3 个基因 *ikaA*、*ikaB* 和 *ikaC*^[12-14] 外, 往往还包含一个编码细胞色素 P450 氧化酶的基因, 根据 P450 氧化酶基因的类型和排布, 可以将已报道的斑鸠霉素生物合成基因簇分为 3 类, 即含有 *ikaD* 同源基因的第 1 类, 含有 *cftA* 同源基因的第 2 类, 不含 P450 氧化酶基因的第 3 类^[10]。这些氧化酶催化斑鸠霉素生产不同类型的氧化衍生物 (如 IkaD), 经体内和体外实验证明, 可以依次催化斑鸠霉素生产 $\Delta^{7,8}$ 环氧的 Epoxykinamycin, 以及进一步氧化生产 C29 位羟化的 Capsimycin G^[8]; CftA 的体内敲除和过表达实验表明, 只能催化斑鸠霉 C29 的羰基化, 但未经体外生化数

据证实^[9]。CftA 与 IkaD 的氨基酸序列一致性为 52%, 因此, 为了研究 CftA 的催化机制, 开发催化斑鸠霉素氧化衍生的工程酶, 拓展斑鸠霉素类 PoTeM 化合物的多样性, 本研究合成 *Streptomyces purpeofuscus* strain NRRL B-1817 中的斑鸠霉素 P450 氧化酶基因 *cftA*, 并对其进行体外生化研究, 证实 CftA 能特异性催化斑鸠霉素 C29 位的两步氧化反应, 依次生成新化合物 Hydroxyikarugamycin D 和已知化合物 Clifednamide A。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与基因

大肠杆菌 BL21(DE3), 北京全式金生物技术公司; 表达载体 pET-28a(+), 广州天一辉远生物科技有限公司; 细胞色素 P450 氧化酶基因 *cftA* 由天一辉远生物科技有限公司合成; 细胞色素 P450 氧化还原伴侣 *fdx/fdR* (来源于 *Cyanobacterium Synechococcus elongates* PCC7942) 的表达质粒 pET28b-*fdx-1499* 和 pET28b-*fdR-0978*^[15] 由山东大学李盛英教授惠赠。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

引物合成, 北京六合华大基因科技股份有限公司; LA *Taq* DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术公司; 限制性内切酶, Thermo Fisher Scientific 公司; 亲和层析填料 (Ni²⁺-NTA), GE Healthcare 公司; 其他试剂均为分析纯。

PD-10 蛋白脱盐柱, GE Healthcare 公司; 高效液相色谱与高分辨率质谱联用仪 (HPLC-HR-ESI-MS), 其中高效液相色谱仪为 Agilent 公司的 Agilent 1260, 色谱柱为 Luna [5 μ m, C18(2),

10 nm, 150 mm×4.60 mm, 5 Micron, Phenomenex 公司], 质谱仪为 Bruker 公司的超高分辨飞行时间质谱仪 Bruker maXis。

LB 液体培养基(g/L): 酵母提取粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。

1.3 方法

1.3.1 细胞色素 P450 氧化酶基因 *cftA* 的合成

在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索 *Streptomyces purpeofuscus* strain NRRL B-1817 基因组(GenBank 登录号为 NZ_JODS01000001.1), 找到斑鸠霉素生物合成基因簇中的细胞色素 P450 氧化酶基因 *cftA* 序列, 由广州天一辉远生物科技有限公司合成, 直接嵌入到表达载体 pET-28a(+)的 *Nde* I 和 *Bam*H I 位点之间。合成后采用酶切验证, 并设计检测引物(上游引物 *cftA*-F: 5'-ATC GAAGGTCGTCATATGCTCCGGCAGCAC-3'; 下游引物 *cftA*-R: 5'-ACCGCCTGGGATCCTCTAGACTCACCAGGCGATCGGGAG-3')进行 PCR 验证。PCR 反应体系(20 μ L): 5×TransStart Fast *Pfu* Buffer 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.75 μ L, 模板 DNA 1 μ L, Fast *Pfu* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, DMSO 2 μ L, ddH₂O 12.3 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.3.2 CftA、FdR 和 Fdx 的表达与纯化

将重组质粒 pET28a::*cftA* 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态中, 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落接种于 10 mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 作为种子液。将 1% 种子液接种于 200 mL 上述培养基中, 培养至菌体密度 OD_{600} 处于 0.6–0.8 之间, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L 进行诱导表达, 在 16 °C、200 r/min 条件下培养过夜。

培养结束后, 3 800 r/min 离心 10 min, 收集菌体重悬于缓冲液 A (Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, 咪唑 25 mmol/L, 甘油 10%, pH 8.0), 超声破壁(功率 270 W, 运行时间 15 min,

运行 5 s, 停 5 s)后, 于 12 000 r/min 离心 30 min, 上清液即为含目的蛋白的粗酶液。将粗酶液上样于由缓冲液 A 平衡好的 Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱, 然后用洗涤液(Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, 咪唑 47.5 mmol/L, 甘油 10%, pH 8.0)洗涤除去杂蛋白, 再用缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, 甘油 10%, pH 8.0)洗脱目的蛋白, 最后用 SDS-PAGE 分析蛋白纯度。

FdR 与 Fdx 的表达与纯化方法参考文献[16]。

1.3.3 CftA 的体外酶学分析

酶反应体系(100 μ L): Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8.0), 斑鸠霉素 60 μ mol/L, NADPH 1 mmol/L, FdR 5 μ mol/L, Fdx 5 μ mol/L, CftA 5 μ mol/L。于 30 °C 孵育 30 min 后, 加等体积甲醇终止反应, 14 000 r/min 离心 15 min 后, 上清液用 HPLC 检测反应产物。HPLC 分析采用 C18 反相色谱柱, 检测波长 320 nm, 流动相 A 相为 10% 的乙腈/水(含 0.1% 甲酸), B 相为 90% 的乙腈/水, 梯度洗脱程序为 B 相比例 5%–100% (0–25 min), 100% (25–30 min), 100%–5% (30–32 min), 5% (32–40 min), 流速为 1 mL/min。确认有反应产物产生后, 对上清液进行 HPLC-HR-ESI-MS/MS 分析, 鉴定产物。

2 结果与分析

2.1 细胞色素 P450 氧化酶基因 *cftA* 的合成与序列分析

菌株 *Streptomyces purpeofuscus* strain NRRL B-1817 具有生产斑鸠霉素氧化衍生物 Clifednamide A 的能力^[9], 通过在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索其基因组序列, 并通过保守基因 *ikaB* 的 BLAST 分析, 定位到斑鸠霉素生物合成基因簇(图 1A), 基因簇包含起始生物合成的聚酮合酶(PKS)与非核糖体肽合成酶(NRPS)的杂合蛋白基因 *ikaA*, 环化酶基因 *ikaB* 和 *ikaC*, 以及催化斑鸠霉素 C25 位羟化的 *ftdA* 和一个 P450

氧化酶基因 *cftA*。基因 *cftA* 长度为 1 191 bp，编码 396 个氨基酸，推测蛋白分子量和等电点(pI)分别为 44.2 kD 和 5.18。通过 BLASTp 分析可知，CftA 与报道的细胞色素 P450 蛋白 MycG、IkaD 和 CmbD 一致性都在 40%以上，提示 CftA

属于细胞色素 P450 蛋白家族。根据 CftA 与 MycG 氨基酸序列比对结果以及 MycG 蛋白晶体结构数据，推测 CftA 中与血红素结合的氨基酸残基为 His91、Arg95、Arg287、His343 和 Cys345 (图 1B)。

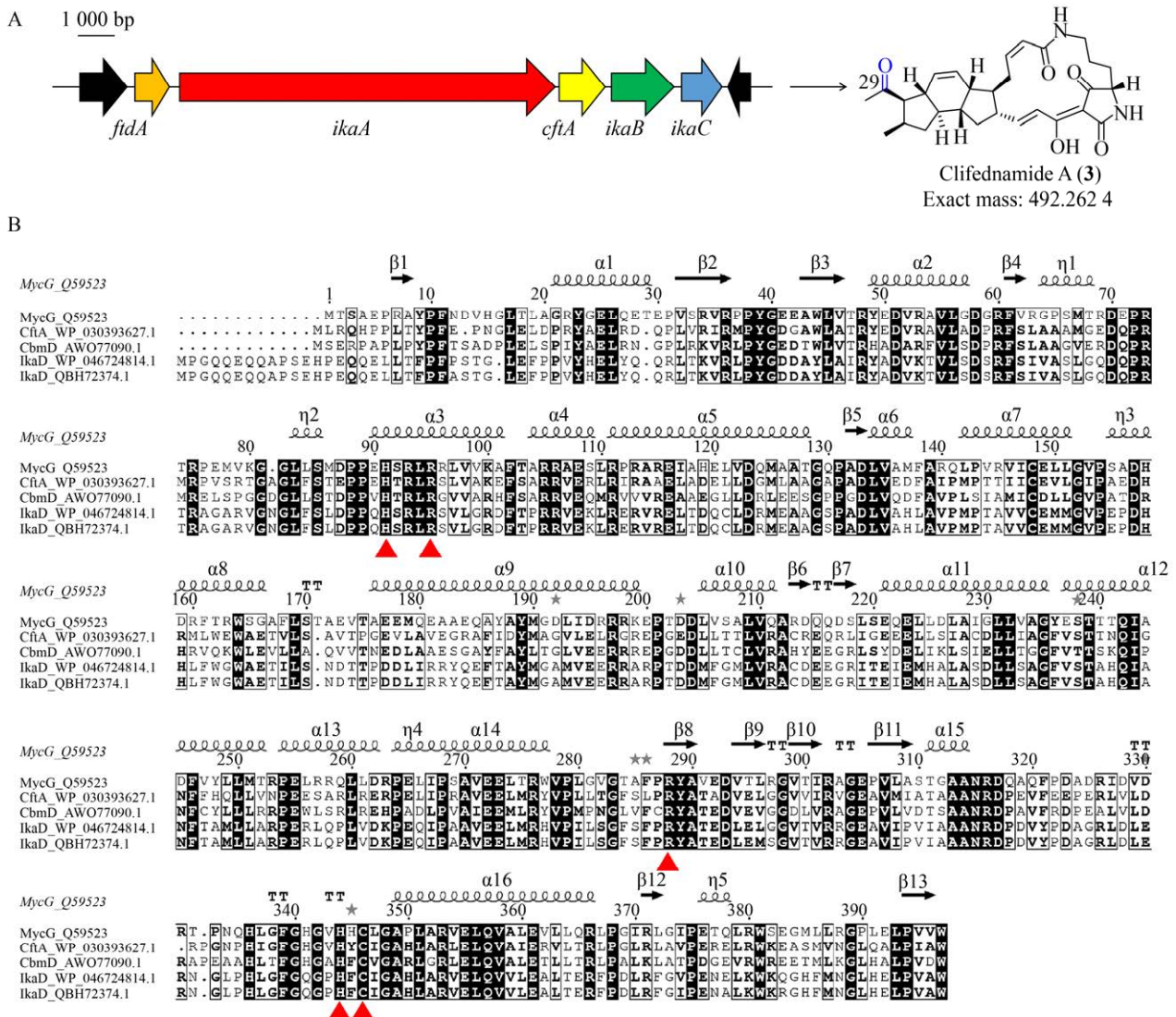


图 1 CftA 与其他细胞色素 P450 蛋白序列比对分析

Figure 1 Multiple alignment of amino acid sequences of CftA and other cytochrome P450s

注：A：菌株 *Streptomyces purpeofuscus* strain NRRL B-1817 中斑鸠霉素生物合成基因簇示意图以及产物 Clifednamide A；B：CftA 与其他细胞色素 P450 蛋白序列比对分析，黑色背景字体代表保守残基，三角形状标示的残基，为推测 CftA 中结合血红素的关键残基 His91、Arg95、Arg287、His343 和 Cys345

Note: A: Organization of the ikarugamycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces purpeofuscus* strain NRRL B-1817 and the product clifednamide A; B: Sequences comparison between CftA and other cytochrome P450, letters on black background represent identical residues, and residues, including His91, Arg95, Arg287, His343 and Cys345, related to heme binding are noted by red triangle

2.2 CftA 的纯化与功能分析

CftA 在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导过表达后, 粗酶液经过亲和层析(Ni^{2+} -NTA), 纯化得到含组氨酸标签的褐色蛋白 His-CftA, 分子量为 46.3 kD (图 2A)。体外生化实验表明, 有且只有在 NADPH、Fdx 和 FdR 同时存在于反应体系中的情况下, His-CftA 可以有效地将底物斑鸠霉素(1)转

化为产物 2 和产物 3, 而且随着反应时间延长, 产物 2 会进一步转变为产物 3 (图 2B)。另外, 通过 HPLC 分析的保留时间可以看出, 化合物 2 和 3 均不是 $\Delta^{7,8}$ 环氧的斑鸠霉素衍生物 Epoxyikarugamycin (4) (图 2B)。通过 HPLC-HR-ESI-MS 分析, 能明显观察到化合物 2 和 3 的分子离子峰和二倍分子离子峰(图 2C、2D), 超高分辨飞行时间质谱仪检测到化

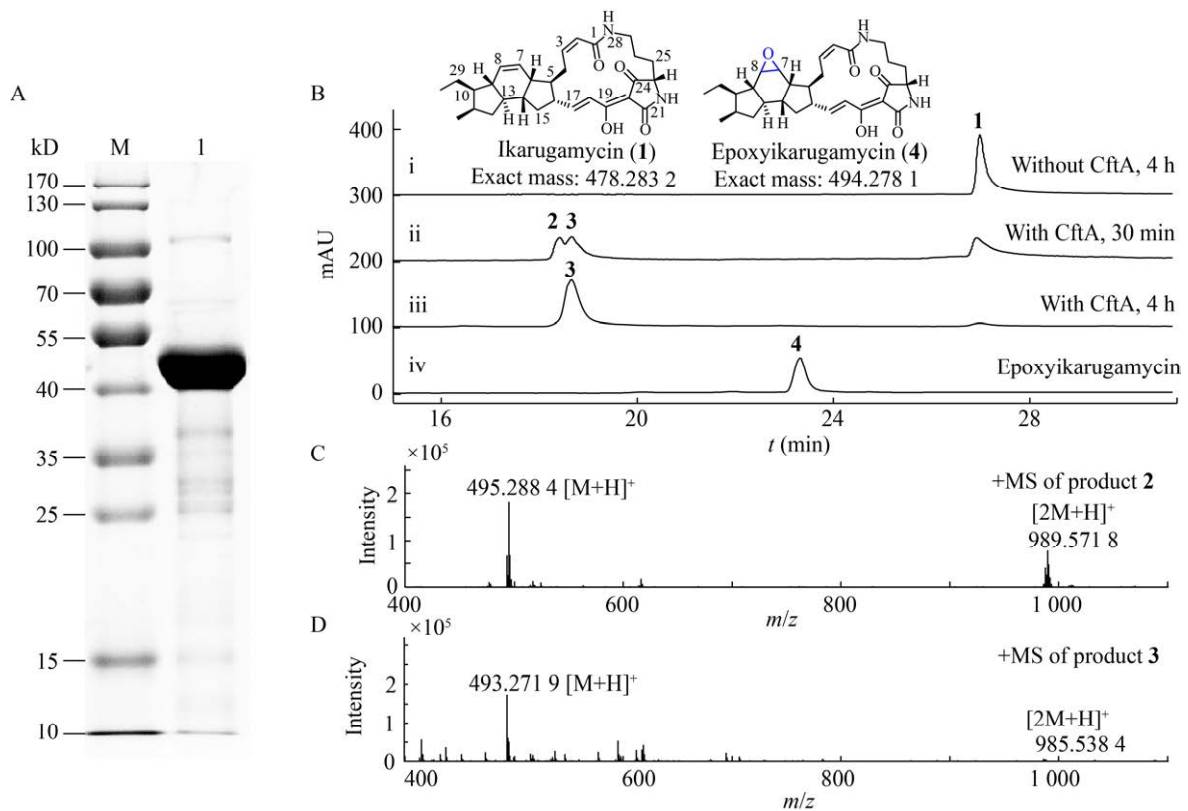


图 2 含组氨酸标签的 CftA 蛋白纯化与体外生化分析图

Figure 2 Purification of His-tag contained CftA and *in vitro* enzyme assays of CftA

注: A: 含组氨酸标签的目的蛋白 His-CftA SDS-PAGE 电泳分析图, 条带指示蛋白大小约为 46 kD。B: His-CftA 体外酶反应分析, 反应条件为 30 °C, 反应体系分别为: i: 负对照, Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8.0), 斑鸠霉素 60 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 1 mmol/L, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$, Fdx 5 $\mu\text{mol/L}$, 反应 4 h; ii: 实验组, Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8.0), 斑鸠霉素 60 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 1 mmol/L, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$, Fdx 5 $\mu\text{mol/L}$, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$, CftA 5 $\mu\text{mol/L}$, 反应 30 min; iii: 实验组, Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8.0), 斑鸠霉素 60 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 1 mmol/L, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$, Fdx 5 $\mu\text{mol/L}$, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$, CftA 5 $\mu\text{mol/L}$, 反应 4 h; iv: Epoxyikarugamycin 标准品对照。C: 产物 2 的高分辨质谱阳离子分析图, 分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质荷比为 495.288 4, 分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_5$ 的计算值为 495.285 3。D: 产物 3 的高分辨质谱阳离子分析图, 分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质荷比为 493.271 9, 分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$ 的计算值为 493.269 7

Note: A: The SDS-PAGE analysis of His-tag contained CftA showed it's molecular weight is around 46 kD. B: Enzyme reaction systems were incubated at 30 °C. i: Negative control, ikarugamycin 60 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 1 mmol/L, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$ and Fdx 5 $\mu\text{mol/L}$ were dissolved in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0), 4 h; ii: Karugamycin 60 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 1 mmol/L, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$, Fdx 5 $\mu\text{mol/L}$ and CftA 5 $\mu\text{mol/L}$ were dissolved in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0), 30 min; iii: Karugamycin 60 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 1 mmol/L, FdR 5 $\mu\text{mol/L}$, Fdx 5 $\mu\text{mol/L}$ and CftA 5 $\mu\text{mol/L}$ were dissolved in Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0), 4 h; iv: Stranded epoxykarugamycin. C: The molecular formula of 2 was determined by HRMS (ESI-TOF): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_5$ 495.285 3, found 495.288 4. D: The molecular formula of 3 was determined by HRMS (ESI-TOF): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$ 493.2697, found 493.271 9

合物 **2** 的分子离子质荷比 m/z $[M+H]^+$ 为 495.288 4, 分子式 $C_{29}H_{39}N_2O_5$ 的计算值为 495.285 3; 检测到化合物 **3** 的分子离子质荷比 m/z $[M+H]^+$ 为 493.271 9, 分子式 $C_{29}H_{37}N_2O_5$ 的计算值为 493.269 7, 因此化合物 **2** 的分子式为 $C_{29}H_{38}N_2O_5$, 化合物 **3** 的分子式为 $C_{29}H_{36}N_2O_5$ 。

2.3 CftA 催化斑鸠霉素的氧化产物结构分析

为了确定产物的结构, 利用 HPLC-HR-ESI-MS/MS 对产物 **2** 和产物 **3** 的碎片离子进行了分析。据文献[8]报道, 斑鸠霉素衍生物 Capsimycin 的结构中包含 C29 位甲氧基以及 $\Delta^{7,8}$ 环氧, 其部分特征碎片离子质荷比 m/z 的计算值分别为 319.169 8 (**a**)、139.087 1 (**b**)、277.159 2 (**c**)和 181.097 7 (**d**) (图 3A)。产物 **2** 的 MS/MS 分析结果显示, 其除了能产生与 Capsimycin 碎片离子 **b** 和 **d** 对应的碎片离子(质荷比分别为 139.086 7 和 181.099 1)外, 还能产生质荷比比 **a** 和 **c** 分别大 2 的碎片离子 321.185 4 和 279.177 6 (图 3B), 考虑到产物 **2** 的分子量比 Capsimycin 少 30, 推测可能是产物 **2** 不含有 C29 位羟基或者 $\Delta^{7,8}$ 环氧, 而通过高效液相色谱分析的保留时间和分子量可以确定产物 **2** 不含有 $\Delta^{7,8}$ 环氧(图 2B)。进一步分析发现, 超高分辨飞行时间质谱仪还检测到质荷比为 477.281 7 的碎片离子 **2a** 以及质荷比比其小 28 的碎片离子 **2b** (449.247 7) (图 3B、3C), 因此推测产物 **2** 为含 C29 位羟基而无 $\Delta^{7,8}$ 环氧的新斑鸠霉素衍生物, 命名为 Hydroxyikarugamycin D。超高分辨飞行时间质谱仪检测到产物 **3** 除了具有与 Capsimycin 对应的碎片离子外, 还检测到质荷比比 **a** 和 **c** 分别大 18 的碎片离子 **3a** (337.179 2)和 **3c** (295.170 7) (图 3D、3E), 这与菌株 *Streptomyces purpeofuscus* strain NRRL B-1817 的产物 Clifednamide A (**3**)具有相同的碎片离子特征^[9], 因此推测产物 **3** 为已知化合物 Clifednamide A (**3**)。将 2 个产物的 MS/MS 谱对比发现, 由于羰基上的氧原子比羟基氧原子难裂解离去, Clifednamide A

(**3**)的特征碎片离子 **3a** (337.179 2)和 **3c** (295.170 7) 分别比 Hydroxyikarugamycin D (**2**)的碎片离子 321.185 4 和 279.177 6 大 16, 而且产物 **2** 能被 CftA 进一步转化为产物 **3**, 更加佐证了其结构分别为图 3C 所示的 Hydroxyikarugamycin D (**2**)和图 3E 所示的 Clifednamide A (**3**)。

2.4 CftA 催化斑鸠霉素的氧化过程分析

体外生化实验表明, P450 氧化酶 CftA 催化斑鸠霉素的氧化反应生成了一个新化合物 Hydroxyikarugamycin D (**2**)和一个已知化合物 Clifednamide A (**3**)。根据 P450 氧化酶的催化机制^[17]和体外生化实验结果, 推测 CftA 首先是在斑鸠霉素的 C29 位氧化引入羟基, 生成新化合物 Hydroxyikarugamycin D (**2**), 随后 C29 位羟基被 CftA 进一步催化成为酮基, 得到化合物 Clifednamide A (**3**) (图 4A)。这与文献报道的 IkaD 的催化过程不同, IkaD 是催化不同位点的依次环氧化反应和羟化反应^[8] (图 4B), 而 CftA 是催化单一位点进行两步氧化反应, 这不仅说明 CftA 具有更高的位点选择性, 也暗示了 CftA 与 IkaD 之间可能存在关键的氨基酸残基差异, 导致了 CftA 不具有催化 $\Delta^{7,8}$ 环氧的能力。

3 讨论

PoTeM 类化合物广泛分布于自然界中, 根据其结构中多元碳环的类型可分为 5/6/5 型、5/5/6 型和 5/5 型等多种类型^[6]。复杂的多环结构不仅赋予了其良好的生物活性, 也成为了有机合成 PoTeM 类化合物的障碍。斑鸠霉素是首个被分离鉴定的 PoTeM 化合物, 属于 5/6/5 型 PoTeMs^[1-2]。研究报道, 若通过有机合成的方法单合成斑鸠霉素结构中的 5/6 碳环就需要 17 步, 而且产率只有 1.3%^[18]。相比于有机合成的烦琐与低效, 微生物合成斑鸠霉素的过程却较为简洁, 只需要 3 个基因 *ikaA*、*ikaB* 和 *ikaC* 的协作即可完成斑鸠霉素的组装。

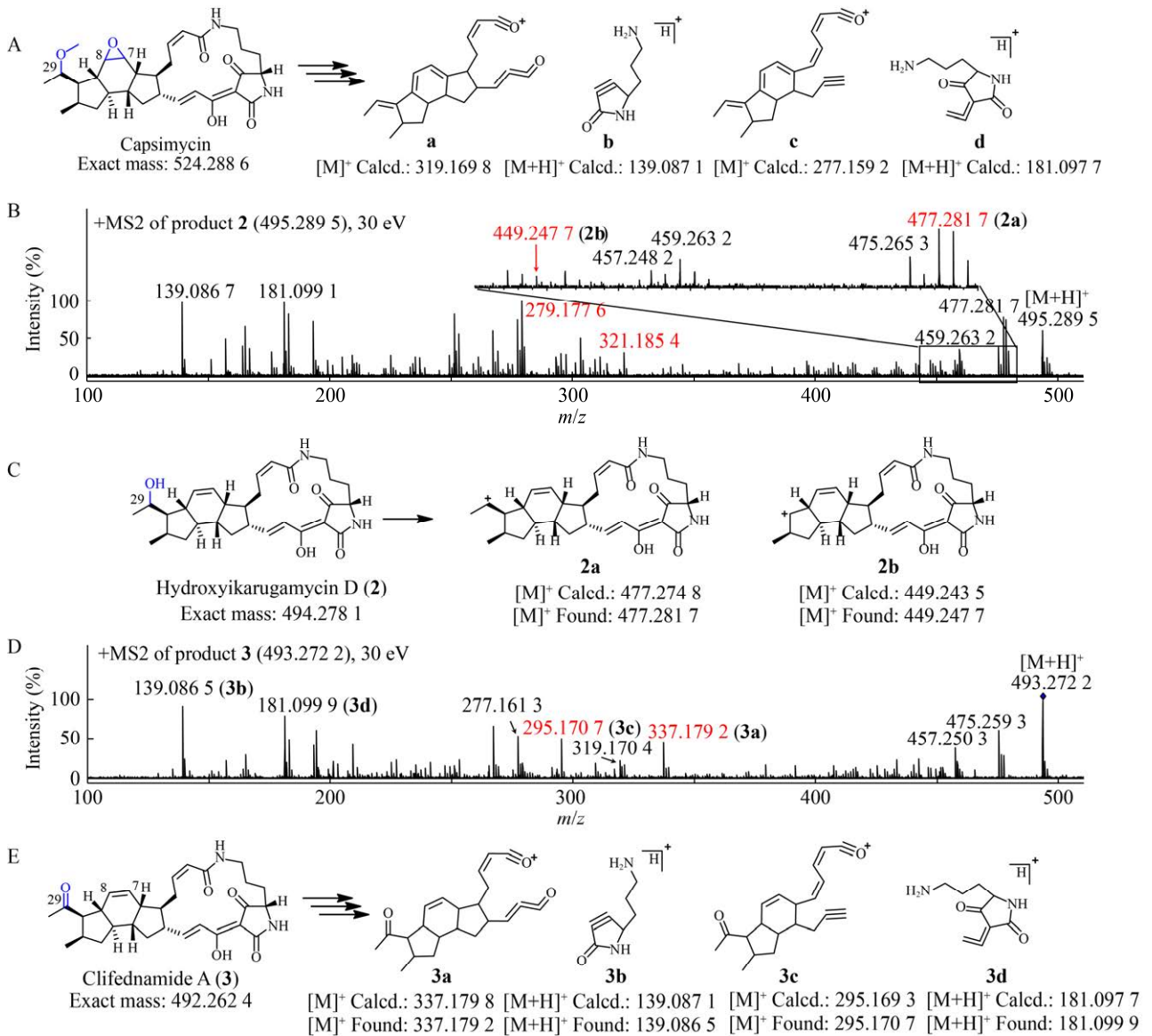


图 3 CftA 催化斑鸠霉素氧化反应产物的 HPLC-HR-ESI-MS/MS 分析图

Figure 3 The HPLC-HR-ESI-MS/MS analysis of products of CftA-catalyzed oxidation of ikarugamycin

注: A: 化合物 Capsimycin 的部分特征碎片离子^[81]; B: 产物 2 的碎片离子分析图; C: 产物 2 及其部分特征碎片离子结构; D: 产物 3 的碎片离子分析图; E: 产物 3 及其部分特征碎片离子结构

Note: A: Fragments of capsimycin as proposed^[81]; B: Fragmentation analysis of product 2; C: Fragments of product 2 and proposed structure of product 2, named hydroxyikarugamycin D; D: Fragmentation analysis of product 3; E: Fragments of product 3 and the structure of clifednamide A (3)

随着对 PoTeM 类化合物挖掘的深入, 越来越多的各类型 PoTeM 化合物及其生物合成基因簇被研究和报道, 如 5/6/5 型斑鸠霉素^[12]和 Clifednamides^[9]的生物合成基因簇, 5/5/6 型 Frontalamides^[19]和 HSAF^[20]的生物合成基因簇,

以及 5/5 型 Combamides^[21]的生物合成基因簇。这些基因簇中往往包含一个 P450 氧化酶基因, 如斑鸠霉素生物合成基因簇中的 *ikaD*^[8], Clifednamids 生物合成基因簇中的 *cftA*^[9], Frontalamides 生物合成基因簇中的 *ftdF*^[19], 以及 Combamides 生物合成

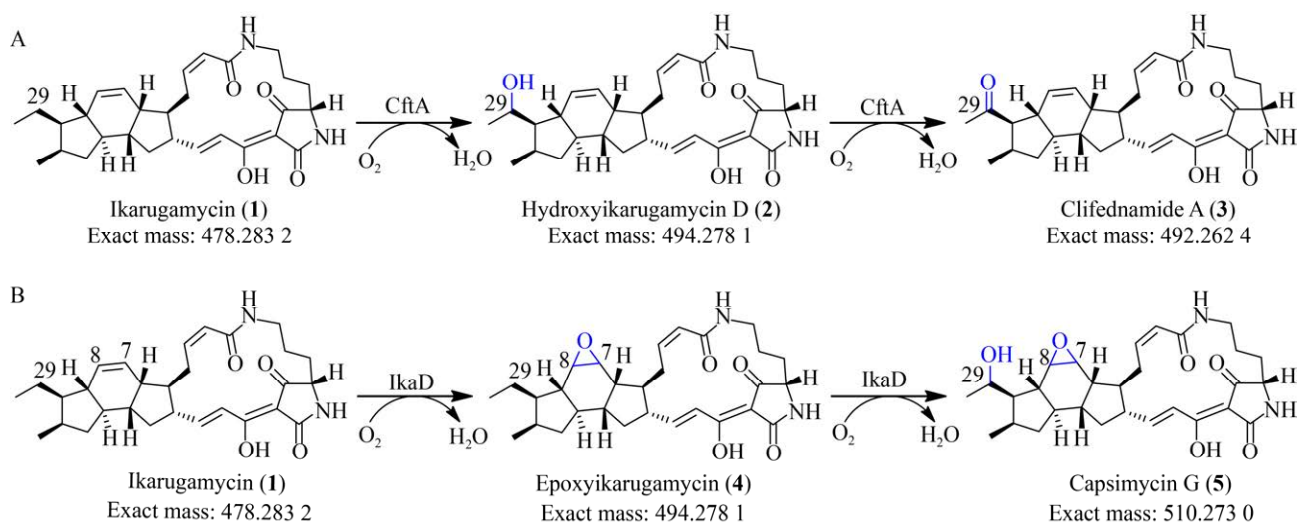


图 4 CftA 与 IkaD 催化斑鸠霉素氧化反应过程的示意图

Figure 4 The conversion of ikarugamycin catalyzed by CftA and IkaD

注: A: 推测的 CftA 催化斑鸠霉素 C29 位两步氧化反应过程; B: 文献报道的 IkaD 催化斑鸠霉素不同位点依次发生环氧和羟化的反应过程

Note: A: The proposed conversion of ikarugamycin (1) to hydroxyikarugamycin D (2), and then to clifednamide A (3); B: The reported IkaD-catalyzed conversion of ikarugamycin (1)

基因簇中 *cmbD*^[21]。不同成环类型的 PoTeMs 生物合成基因簇中都含有 P450 基因, 意味着这些 P450 基因具有不同的底物特异性和/或催化功能。然而除 *ikaD* 外^[8], 大部分 P450 氧化酶基因均未有体外生物化学研究和催化功能验证的报道, 仅有体内实验揭示其催化功能, 如 *cftA* 是通过体内敲除实验证实了其可将斑鸠霉素转化成 Clifednamid A^[9], *cmbD* 也是通过基因敲除揭示了其能够催化 5/5 型 PoTeMs 的氧化^[21]。

本研究通过基因合成以及体外酶学分析的方法, 对 P450 氧化酶 CftA 体外生物化学功能进行了探索, 利用高效液相与高分辨二级质谱联用的技术鉴定了催化产物, 发现 CftA 的催化机制与已报道的 IkaD 的催化机制不同, 前者是催化斑鸠霉素 C29 位两步连续的氧化反应, 而后者是依次催化斑鸠霉素形成 $\Delta^{7,8}$ 环氧和 C29 位的羟基。这意味着其他 PoTeMs 生物合成基因簇中的 P450 可能也具有不同的催化机制。对这些 P450 氧化酶进行更加深入的研究, 有利于通过生物酶法或者组合

生物合成的方法拓展 PoTeM 类化合物的结构多样性, 对于推动 PoTeM 类化合物的药物开发具有重要意义。

4 结论

斑鸠霉素及其氧化衍生物具有良好的生物活性, 挖掘更多类似物对于推动斑鸠霉素类 PoTeM 化合物的药物开发具有重要意义。细胞色素 P450 酶是广泛存在于细胞内并参与多种氧化反应的多功能酶类。本文通过基因组挖掘联合基因合成的方法, 直接克隆并表达了斑鸠霉素生物合成基因簇中的细胞色素 P450 氧化酶 CftA, 并进行了体外生化研究, 发现 CftA 特异性识别并催化斑鸠霉素的 C29 位, 先进行羟化反应生成新化合物 Hydroxyikarugamycin D (2), 随后 C29 位羟基被进一步转化成为酮基, 得到化合物 Clifednamide A (3), 这与文献报道 IkaD 催化斑鸠霉素的氧化过程^[8]明显不同, 意味着 CftA 具有独特的催化机制和更高的位点选择性, 为进一步探索斑鸠霉素 P450 氧化酶的催化机制并通过生物酶催化拓展

斑鸠霉素类 PoTeM 化合物的结构多样性奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Jomon K, Kuroda Y, Ajisaka M, Sakai H. A new antibiotic, ikarugamycin[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1972, 25(5): 271-280
- [2] Ito S, Hirata Y. The structure of ikarugamycin, an acyltetramic acid antibiotic possessing a uniqueas-hydrindacene skeleton[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1977, 50(7): 1813-1820
- [3] Bertasso M, Holzenkämpfer M, Zeeck A, Stackebrandt E, Beil W, Fiedler HP. Ripromycin and other polycyclic macrolactams from *Streptomyces* sp. Tü 6239: taxonomy, fermentation, isolation and biological properties[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2003, 56(4): 364-371
- [4] Popescu R, Heiss EH, Ferik F, Peschel A, Knasmueller S, Dirsch VM, Krupitza G, Kopp B. Ikarugamycin induces DNA damage, intracellular calcium increase, p38 MAP kinase activation and apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2011, 709/710: 60-66
- [5] Cao SG, Blodgett JAV, Clardy J. Targeted discovery of polycyclic tetramate macrolactams from an environmental *Streptomyces* strain[J]. *Organic Letters*, 2010, 12(20): 4652-4654
- [6] Zhang GT, Zhang WJ, Saha S, Zhang CS. Recent advances in discovery, biosynthesis and genome mining of medicinally relevant polycyclic tetramate macrolactams[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 16(15): 1727-1739
- [7] Greunke C, Antosch J, Gulder TAM. Promiscuous hydroxylases for the functionalization of polycyclic tetramate macrolactams: conversion of ikarugamycin to butremycin[J]. *Chemical Communications: Cambridge, England*, 2015, 51(25): 5334-5336
- [8] Yu HL, Jiang SH, Bu XL, Wang JH, Weng JY, Yang XM, He KY, Zhang ZG, Ao P, Xu J, et al. Structural diversity of anti-pancreatic cancer capsimycins identified in mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis* 318 and post-modification via a novel cytochrome P450 monooxygenase[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40689
- [9] Qi YC, Ding E, Blodgett JAV. Native and engineered clifednamide biosynthesis in multiple *Streptomyces* spp.[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(2): 357-362
- [10] Zhang WJ, Zhang GT, Zhang LP, Liu W, Jiang XD, Jin HB, Liu ZW, Zhang HB, Zhou AH, Zhang CS. New polycyclic tetramate macrolactams from marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 40060[J]. *Tetrahedron*, 2018, 74(47): 6839-6845
- [11] Jiao YJ, Liu Y, Wang HX, Zhu DY, Shen YM, Li YY. Expression of the clifednamide biosynthetic pathway in *Streptomyces* generates 27, 28-seco-derivatives[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(9): 2803-2808
- [12] Zhang GT, Zhang WJ, Zhang QB, Shi T, Ma L, Zhu YG, Li SM, Zhang HB, Zhao YL, Shi R, et al. Mechanistic insights into polycycle formation by reductive cyclization in ikarugamycin biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(19): 4840-4844
- [13] Greunke C, Glöckle A, Antosch J, Gulder TAM. Biocatalytic total synthesis of ikarugamycin[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2017, 56(15): 4351-4355
- [14] Antosch J, Schaeffers F, Gulder TAM. Heterologous reconstitution of ikarugamycin biosynthesis in *E. coli*[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(11): 3011-3014
- [15] Sun Y, Ma L, Han DF, Du L, Qi FX, Zhang W, Sun JR, Huang S, Kim ES, Li SY. *In vitro* reconstitution of the cyclosporine specific P450 hydroxylases using heterologous redox partner proteins[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(2): 161-166
- [16] Zhu YG, Zhang QB, Fang CY, Zhang YL, Ma L, Liu ZW, Zhai SL, Peng J, Zhang LP, Zhu WM, et al. Refactoring the concise biosynthetic pathway of cyanogramide unveils spirooxindole formation catalyzed by a P450 enzyme[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2020, 59(33): 14065-14069
- [17] Rudolf JD, Chang CY, Ma M, Shen B. Cytochromes P450 for natural product biosynthesis in *Streptomyces*: sequence, structure, and function[J]. *Natural Product Reports*, 2017, 34(9): 1141-1172
- [18] Loke I, Bentzinger G, Holz J, Raja A, Bhasin A, Sasse F, Köhn A, Schobert R, Laschat S. Synthesis of the AB ring system of clifednamide utilizing Claisen rearrangement and Diels-Alder reaction as key steps[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016, 14(3): 884-894
- [19] Blodgett JAV, Oh DC, Cao SG, Currie CR, Kolter R, Clardy J. Common biosynthetic origins for polycyclic tetramate macrolactams from phylogenetically diverse bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11692-11697
- [20] Li YY, Wang HX, Liu Y, Jiao YJ, Li SR, Shen YM, Du LC. Biosynthesis of the polycyclic system in the antifungal HSAF and analogues from *Lysobacter* enzymogenes[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2018, 57(21): 6221-6225
- [21] Liu Y, Wang HX, Song RT, Chen JN, Li TH, Li YY, Du LC, Shen YM. Targeted discovery and combinatorial biosynthesis of polycyclic tetramate macrolactam combamides A-E[J]. *Organic Letters*, 2018, 20(12): 3504-3508