

肽基载体蛋白结构功能的研究进展

朱晨阳, 吴欣园, 薛永常*

大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

朱晨阳, 吴欣园, 薛永常. 肽基载体蛋白结构功能的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2778-2788

Zhu Chenyang, Wu Xinyuan, Xue Yongchang. Advances in structure and function of peptidyl carrier protein[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2778-2788

摘要: 肽基载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP)是非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)的核心结构域。根据 NRPS 的装配机制, 每个模块都至少包含一个 PCP, PCP 对于非核糖体肽合成中氨基酸残基及多肽在不同催化结构域中的传递起着重要作用, 并为氨基酸残基和多肽向模块内其他修饰酶的转移提供一个平台。本文主要对 PCP 的结构功能、与其他催化结构域的相互作用及重组模块活性降低的问题等方面进行了综述, 期望为重组 NRPS 模块的构建提供理论依据。

关键词: 肽基载体蛋白; 非核糖体肽合成酶; 催化结构域

Advances in structure and function of peptidyl carrier protein

ZHU Chenyang, WU Xinyuan, XUE Yongchang*

School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

Abstract: Peptidyl carrier protein (PCP) is a core module in non-ribosomal peptide synthetase (NRPS). According to the assembly mechanism, each module of NRPS contains at least one PCP domain. PCP plays a role in the delivery of amino acid residues and polypeptides in different catalytic domains, and it serves as a platform to transfer amino acid residues and polypeptides to other internal modification enzymes. This paper reviews the structure, function, interaction with other catalytic domains, and the reduction of recombinant module activity of PCP, aiming to provide a theoretical basis for the construction of recombinant NRPS modules.

Keywords: peptidyl carrier protein; non-ribosomal peptide synthetase; catalytic domain

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20180550858)

Supported by: Natural Science Foundation of Liaoning Province (20180550858)

*Corresponding author: E-mail: xueych@dlpu.edu.cn

Received: 2021-11-29; Accepted: 2022-01-11; Published online: 2022-02-07

非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)是微生物采用非核糖体催化多肽合成的一类酶系,参与多种具有特殊生物活性的天然非核糖体多肽(non-ribosomal peptides, NRPs)的生物合成^[1],目前天然 NRPs 已在生物医药领域得到广泛的应用,如抗癌药物博来霉素、抗生素万古霉素、抗真菌药物棘球菌素和免疫抑制剂环孢菌素等^[2]都是细菌^[3-4]、真菌^[5]及海绵^[6]等通过 NRPS 合成的非核糖体多肽。

NRPS 是由多个模块组成的大型多功能蛋白,其基础模块包括起始模块、延伸模块和终止模块,不同模块的催化结构域在催化单体结合到天然多肽产物的过程中发挥特定作用^[7]。肽基载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP)又称硫化结构域(thiolation domain, T),是 NRPS 的核心结构域,负责在各催化结构域和后修饰酶之间转移产物中间体。NRPS 系统的流水线式装配机制(图 1)^[7-9]主要包括:(1) 在起始模块(A-PCP 模块)中,PCP 被磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(PPT transferase, PPTase)识别,从非激活的 apo 态变为激活的 holo 态;(2) 腺苷化结构

域(adenylation domain, A),负责选择、激活并将特定氨基酸腺苷化后加载到 holo-PCP 上;(3) 延伸模块(C-A-PCP 模块)中的缩合结构域(condensation domain, C),负责催化腺苷化的氨基酸与下游氨基酸之间的肽键形成;(4) 当全长的多肽链到达终止模块,PCP 下游的 C 结构域通常被硫酯酶结构域(thioesterase, TE)取代,将多肽链水解释放或者环化。目前,对 A 结构域及 C 结构域研究较多,但对 PCP 及运用 PCP 构建重组模块的研究较少。本文通过对 PCP 的结构、功能及与其他结构域的相互作用等进行综述,为研究 PCP 与上下游催化结构域的特异性识别及重组 NRPS 模块的构建提供理论依据。

1 PCP——非核糖体肽合成酶的核心结构域

PCP 是由 80–100 个氨基酸残基构成的载体蛋白,约 10 kDa,与聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)和脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)

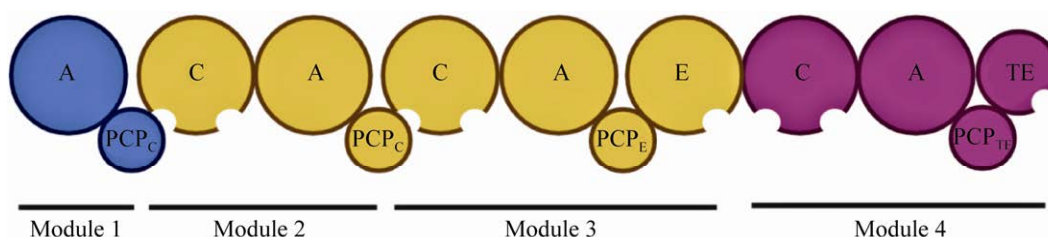


图 1 NRPS 的流水线装配式模块化结构 A: 腺苷化结构域; PCP: 肽基载体蛋白; C: 缩合结构域; E: 异构化结构域; TE: 硫酯酶结构域。PCP 的下标指示下游结构域。在一个 4 模块 NRPS 中,蓝色代表启动模块(A-PCP),黄色代表 2 个延伸模块(C-A-PCP),其中 1 个附加异构化结构域,紫色代表终止模块(C-A-PCP-TE)

Figure 1 The assembly line-like modular structure of NRPS. A: Adenylation domain; PCP: Peptidyl carrier protein; C: Condensation domain; E: Epimerisation domain; TE: Thioesterase domain. The additional subscript label in the PCP domains indicates the downstream domain. Domain architecture of a four module NRPS containing an initiation module (A-PCP domain, blue), two elongation modules, one with an additional epimerisation domain (C-A-PCP domain, yellow) and a termination module (C-A-PCP-TE domain, purple).

中的酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)具有相似的结构和功能^[10]。在不同的合成系统中,激活后的载体蛋白发挥着关键作用,将上游结构域修饰后的氨基酸残基或肽链运输给下游结构域或其他修饰酶^[10-11]。PCP的二级结构(图2)和三级结构(图3)比较保守,由4个反向平行的 α 螺旋及多个环区构成,其中位于 α 螺旋I之前的环区上的脯氨酸残基对于PCP识别上下游结构域及维持PCP结构的稳定性有重要作用^[11]。PCP有2种类型,除了在多模

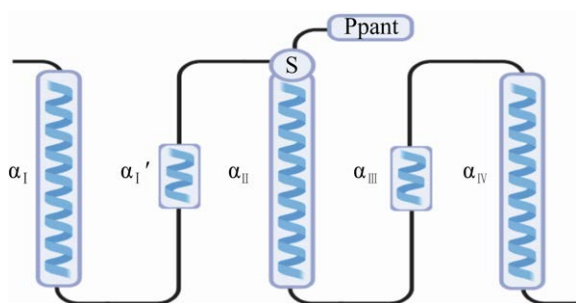


图2 PCP结构域二级结构的线性表示
Figure 2 Linear representation of secondary structure of PCP domain.

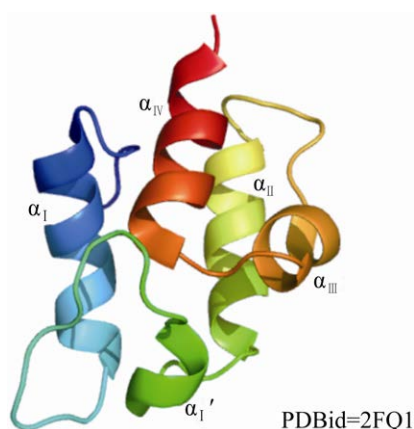


图3 肠杆菌素NRPS系统中PCP结构域的晶体结构
Figure 3 Crystal structure of a PCP domain from enterobactin NRPS system.

块构成的大型蛋白合成酶系中存在I型PCP外,目前还发现了多种游离的II型PCP,包括Blm I^[12]、PltL^[13]和ColA1a^[14]。I型PCP在 α 螺旋II和III之间含有2个酸性氨基酸残基,而II型PCP则含有5-6个氨基酸残基,两类PCP在 α 螺旋II的N末端都有保守的LGGXS基序,其中Ser是结合磷酸泛酰巯基乙胺基(4'-phosphopantetheinyl, Ppant)进而激活PCP的关键残基^[15-17]。

2 PCP结构域的激活及构象变化

PCP的激活需要PPTase将CoA的Ppant辅基硫酸酯化(图4),然后与PCP中高度保守的丝氨酸残基的羟甲基侧链连接^[1,18]。PPTase超家族主要分3类,I型PPTase(AcpS型)、II型PPTase(sfp型)和III型PPTase(结构域型)。目前对于III型PPTase的研究较少,通常以结构域形式融合在FAS或PKS生物合成系统中,位于酶复合体C端^[19-20]。如表1所示,AcpS型和sfp型PPTase的序列长度、高级结构、保守基序和底物谱有较大差异^[19,23]。因为sfp对于来自多个系统的PCP广泛的底物识别能力,有助于重组NRPS系统中对不同来源PCP的激活,所以在NRPs生物合成中通常研究sfp与PCP的相互作用^[24]。在枯草芽孢杆菌sfp/PCP晶体中¹⁰⁷Asp、¹⁰⁹Glu和¹⁵¹Glu与 Mg^{2+} 配位,⁹⁰His与CoA结合,而¹¹²Lys、¹¹⁷Glu和¹²⁰Lys形成PCP结合口袋的环区^[25]。Beld等^[26]对sfp和NRPS中PCP的多序列比对显示sfp形成了一个小的疏水空腔,由第1个 α 螺旋和前一个环以及第3个 α 螺旋和随后的环组成,PCP的 α 螺旋II上的⁴⁶Leu和⁴⁹Met的侧链基团能在这个空腔中与sfp发生疏水相互作用,证实sfp和PCP形成相互作用的疏水位置是高度保守的。

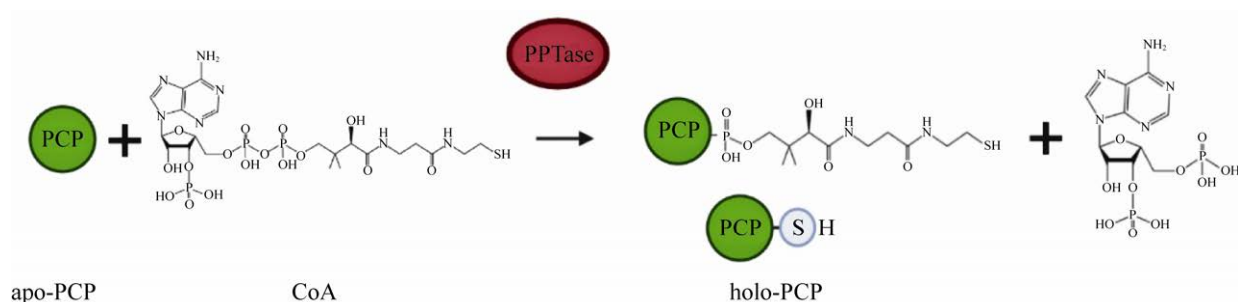


图 4 PPTase 催化 apo-PCP 生成 holo-PCP

Figure 4 PPTase catalyzes the formation of holo-PCP from apo-PCP.

表 1 AcpS 型与 sfp 型 PPTase 的区别

Table 1 The difference between type AcpS and type sfp PPTase

Differences	Type AcpS	Type sfp	References
Length of amino acid sequence	120 aa	240 aa	[21]
Conserved motif	P2 (GxD) P3 [(F/W)(S/T/A)xKE(S/A)xxK]	P1 (PxxP) P2 (GxD) P3 [(F/W)(S/T/A)xKE(S/A)xxK]	[19]
Mg ²⁺ binding site	1	2-3	[19,22]
Spatial structure	A homo-trimeric structure with active sites	A pseudo-dimeric fold with one active site, each monomer resembles AcpS	[16,22]
Substrate	Apo-ACP in type II PKS and type II FAS	Apo-PCP in NRPS Apo-ACP in type II PKS and type II FAS Apo-ACP in type I PKS and type I FAS	[19-20,22]

PCP 在被激活后通常会发生构象的变化, Koglin 等^[27]研究获得了 TycC3-PCP 蛋白, 发现 PCP 有未被激活的 apo 形态(A 构型)和已被激活的 holo 形态(H 构型)等 2 种稳定构型及不稳定的中间构型(A/H 构型); A 构型的 PCP 处于最灵活的构象, α 螺旋 I 和 II 呈展开的状态, 环 III 伸展并位于 α 螺旋 II 和 IV 之间; 当 Ppant 最终连接在 PCP 呈现 H 构型时, α 螺旋 III 展开, 导致 α 螺旋 IV 与 I 平行排列, α 螺旋 II 与活性位点丝氨酸残基被重新定位, 使 Ppant 能够在 PCP 表面大范围移动。此外, Tufar 等^[25]发现在 sfp/PCP 蛋白复合物中只有 A/H 构型和 H 构型的 PCP 能够与 sfp 发生相互作用, A 构型的 PCP 仅显示出能够被 sfp 磷酸化的趋势。

3 PCP 结构域与催化结构域的相互作用

在 NRPS 系统中, NRPs 的生物合成需要 PCP 将氨基酸残基或肽链等中间体在上、下游结构域之间转运。有研究表明, PCP 由 sfp 激活后, HS-Ppant 结合到 α 螺旋 II 高度保守的 Ser 的侧链上, 但 Ppant 未明显地与 PCP 的核心相互作用, PCP 的三级结构也未发生显著变化, 无法解释 PCP 转运中间体的机制^[28]。目前, 解释 PCP 转运中间体的机制(图 5)通常采用“摆臂假说”, 认为 PCP 仅充当一个化学惰性的平台, 氨基酸残基或肽链等中间体可以通过以反应性硫酯的形式临时负载到 holo-PCP 的

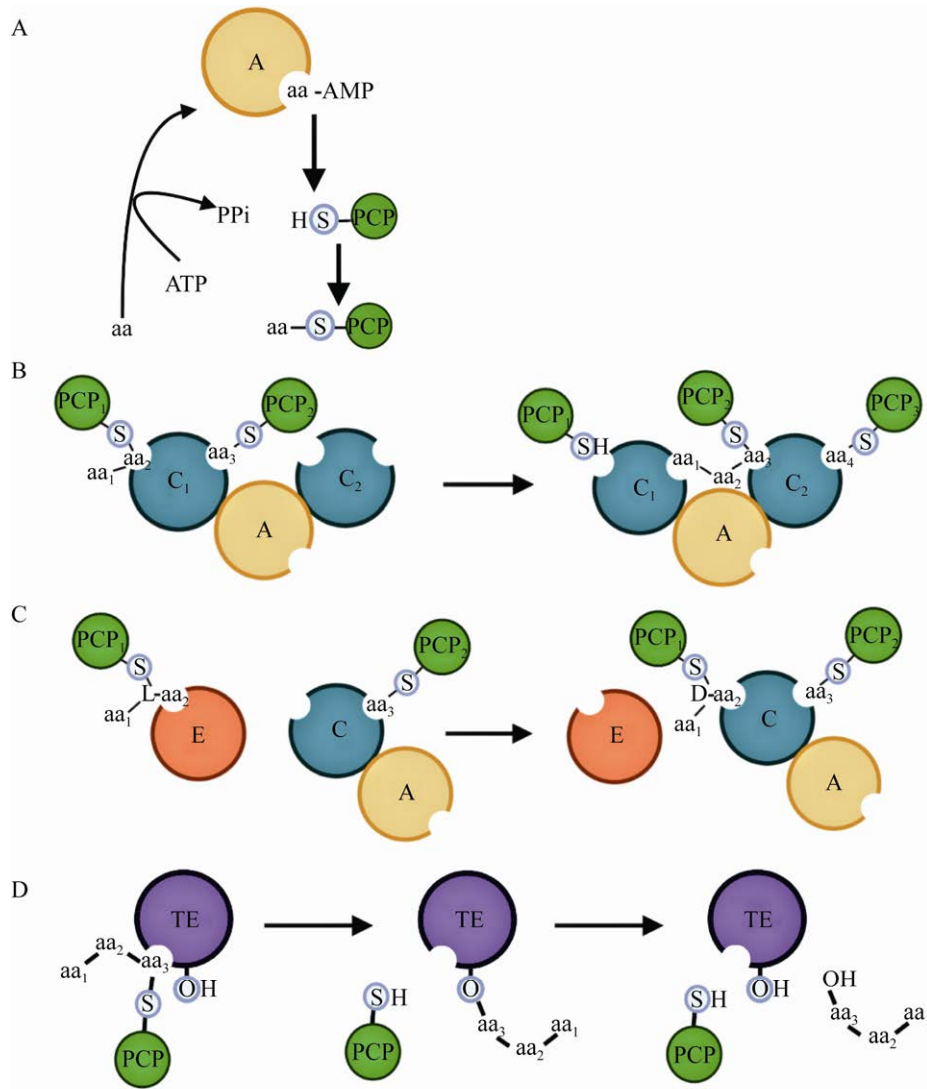


图 5 PCP 结构域转运氨基酸的机制 A: 氨基酸单体的腺苷化是由 A 结构域催化: 经 ATP 选择和腺苷化后, 活化的单体通过硫酯化反应被负载到 PCP 的 Ppant 上; B: C 结构域催化多肽键的形成, 并具有 2 个 PCP 结合位点, 即供体和受体位点, 当 2 个位点都被同源的 PCP 占据时, C 结构域就能够催化 2 个底物之间的肽键的形成; C: E 结构域催化 PCP 结合多肽的 C 末端残基的异构化, 再由相邻的 C 结构域完成后续肽链的延长; D: TE 负责多肽链的释放, 将结合在 PCP 的 Ppant 上的多肽链水解释放

Figure 5 The mechanism of amino acid transfer of PCP domain. A: The adenylation of amino acid monomers is catalyzed by the A domain: after ATP selection and adenylation, the activated monomers are loaded onto the Ppant of PCP through a thiolation reaction; B: The C domain catalyzes the formation of polypeptide bonds and has two PCP binding sites, donor and acceptor sites. When both sites are occupied by homologous PCPs, the C domain can catalyze the formation of peptide bonds between the two substrates; C: The E domain catalyzes the epimerisation of the C-terminal residue of the PCP-binding polypeptide. The neighbouring C domain completes the subsequent extension of the peptide chain; D: TE domain is responsible for the release of the polypeptide chain, and hydrolyzes the polypeptide chain of Ppant bound to PCP to release it.

HS-Ppant 臂上, HS-Ppant 作为柔性臂, 可以将结合的中间体转移至 NRPS 系统内对应催化结构域的活性位点^[16]。

3.1 PCP 结构域与 A 结构域的相互作用

NRPS 系统中 A 结构域由 2 个不同的亚结构域组成: 约 400 个残基的 N 末端亚结构域 A_{core} 和约 100 个残基的 C 末端亚结构域 A_{sub} , 2 个亚结构域由一个铰链状的环区连接^[29]。A 结构域在 Mg^{2+} 存在的条件下, 水解 ATP 催化底物氨基酸, 形成活化的氨酰-AMP 中间体(图 5A), 中间体转移到 PCP 上的过程中, 需要防止活性中间体的释放导致非特异性的蛋白质修饰^[16,30]。从 A-PCP 双结构域复合物 PA1221^[30] 和 EntF^[31] 晶体结构发现 A-PCP 复合蛋白中的一般结合模式(图 6), PCP 结构域的 α 螺旋 II 以疏水及离子相互作用, 通过 A_{core} 的第 11 个 α 螺旋与 PCP 的保守 Ser 上的 Ppant 共价连接^[32], 而位于 PCP 结构域的 α 螺旋 I 和 α 螺旋 II 之间的环区与 A_{sub} 的末端基序构成静电相互作用^[33]。Alfermann 等^[18] 利用米氏硫胺素芽孢杆菌(*Aneurinibacillus migulanus*)的 NRPS 模块 GrsA 中 A-PCP 双结构域设计荧光探针, 以 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 来检测 A 结构域和 PCP 在产物生成时的构象变化, 通过突变 PCP 结构域上高度保守的 Ser 获得 PCP (S573A), Native-PAGE 显示氨基酸残基能结合到探针 apo-A-PCP (S573A) 的 A 结构域上, 但 apo-A-PCP (S573A) 与野生型 holo-A-PCP 的 FRET 有显著差异, 表明突变后 A 结构域和 PCP (S573A) 未发生相互作用。此外, Alfermann 等^[18] 通过将野生型 holo-A-PCP 中结合在 PCP 上的 HS-Ppant 的末端巯基去除而构建脱巯基探针, 脱巯基探针与野生型 holo-A-PCP 也有显著差异, 氨酰-AMP 无法由 A 结构域转移到 PCP 结构域, 这与多项研究^[30-31] 的结果一致。因

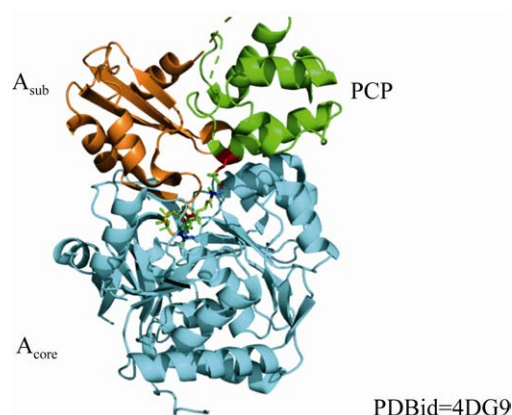


图 6 PCP 与 A 结构域的复合物的晶体结构
Figure 6 Crystal structure of complex formed between PCP and A domain.

此, 氨酰-AMP 由 A 结构域向 PCP 的转移需要 PCP 的激活, sfp 以 CoA 为底物通过硫酯化反应将 HS-Ppant 结合在 PCP 的保守 Ser 的侧链, 然后由 HS-Ppant 与氨酰-AMP 结合完成转移。

3.2 PCP 结构域与下游结构域的相互作用

在顺式结构中, C 和 TE 结构域以及其他修饰酶, 如环化结构域(cyclization domain, Cy)、甲基转移酶(methyl-transferase, Mt)、异构化结构域(epimerization domain, E)等, 都能与 PCP 发生相互作用, 共同参与 NRPs 的合成^[24]。

3.2.1 PCP 结构域与 TE 结构域的相互作用

TE 结构域在 NRPS 系统的生物合成过程中负责催化完整肽链的释放(图 5D), 确保 NRPS 系统能够执行后续的多个催化循环。TE 结构域可以分为两类, I 型 TE 结构域通常是终止模块的最终结构域, II 型 TE 结构域是负责识别错误加载的 PCP 的游离酶^[34-35]。TE 结构域的晶体结构为一个 7 链 β 折叠被 8 个 α 螺旋包围, 其中 2 个 α 螺旋构成自由度较高的“盖子”结构并包含保守基序 GxSxG^[7]。TE 结构域与 PCP 结构通过表面疏水相互作用网络保证结构域之间的有效通信, PCP 位于“盖子”区域与 TE

核心形成的空腔中，“盖子”区域覆盖了 PCP 和 TE 结构域的催化位点(图 7)^[7,9]。Zhou 等^[36]通过突变肠杆菌素合成系统中 EntF 模块内 PCP 的保守氨基酸研究 PCP 与 TE 结构域之间的相互作用，发现位于 PCP 的 α 螺旋 III 的 2 个残基 ¹⁰²⁷Gly 和 ¹⁰³⁰Met 是识别下游 TE 结构域的关键因子，PCP-TE 双域结构围绕接触区域会发生较大的结构变化，这表明“盖子”区域对 PCP 的保守 Ser 和底物特异性的识别有重要作用。

3.2.2 PCP 结构域与 C 和 E 结构域的相互作用

C 结构域蛋白一般呈 V 字形构象，由形似脑叶的两部分构成，分别为 N 末端瓣叶和 C 末端瓣叶。两部分的核心都为一个 β 折叠，两侧为大的 α 螺旋。催化位点基序 HHxxxDG 位于 N 末端瓣叶中 β 链 6 和 α 螺旋 4 之间的环区上，这一基序暴露在由 2 个瓣叶形成的通道的中心(图 8)；当供体和受体的氨酰基结合到对应位点时，HHxxxDG 基序增强了受体 PCP 上氨酰基的亲核性，受体上氨酰基的羰基受到亲核攻击；当肽键形成时，供体上的肽链转移到受体 PCP(图 5B)^[1,16]。E 结构域与 C 结构域同源性

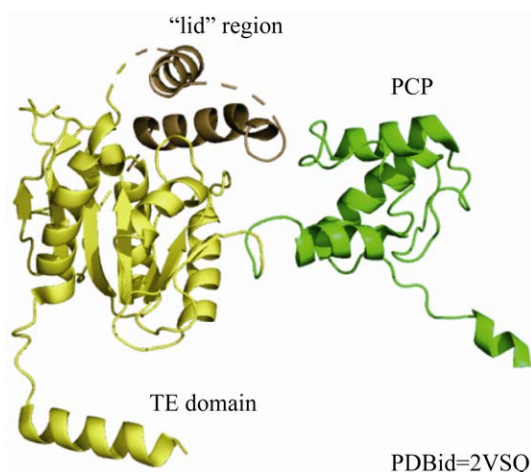


图 7 PCP 与 TE 结构域复合物的晶体结构
Figure 7 Crystal structure of complex formed between PCP and TE domain.

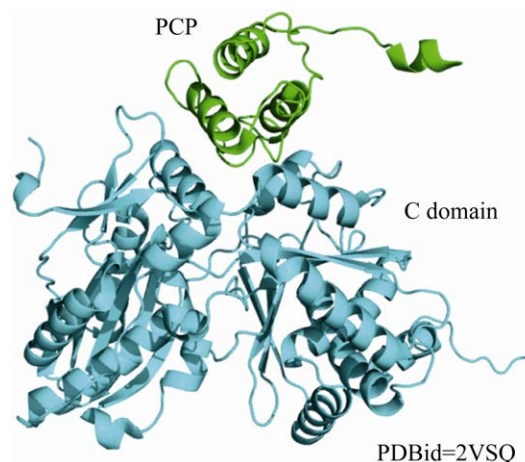


图 8 PCP 与 C 结构域复合物的晶体结构
Figure 8 Crystal structure of complex formed between PCP and C domain.

很低，但也采取近似 C 结构域的 V 字型构象(图 9)，与 PCP 结构域的结合位点同样位于 2 个瓣叶构成的凹槽之间，负责将附加在肽链末端的氨基酸残基由 L 型异构化为 D 型(图 5C)^[1,7-8]。Samel 等^[37]在研究酪氨酸合成酶 TycC 中模块 5 的 PCP 和模块 6 的 C 结构域结合的复合蛋白 PCP-C 的晶体结构时发现，供体和受体 PCP 结合位点位于距离表面约 15 Å 的凹槽两侧末端处，并且在 PCP-C 的复合蛋白中发现了 2 个蛋白簇上的氨基酸侧链之间发生了氢键相互作用。另外 PCP 的催化残基 ⁴³Ser 和 C 结构域的 ²²⁴His 之间距离为 47 Å，远超 HS-Ppant 柔性臂可以接触的范围(约 20 Å)，这一结果与 Lai 等^[38]对肠杆菌素生物合成簇中 EntB 载体蛋白的研究结果一致，PCP 都处于 A/H 型构象可以结合肽链，但是 HS-Ppant 连接位点 Ser 附近的基序远离 C 结构域无法完成肽链的转运。在 Lai 等^[38]的研究中，终止模块中 PCP 上的 HS-Ppant 臂与 C 结构域上与缩合活性具有关键作用的氨基酸残基的距离仅为 16 Å，能够发生疏水相互作用。这些研究表明 PCP 转运

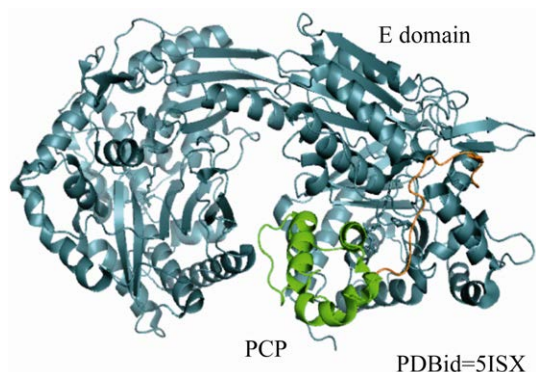


图9 PCP与E结构域复合物的晶体结构
Figure 9 Crystal structure of complex formed between PCP and E domain.

由C结构域缩合的肽链需要PCP处于A/H型或H型构象以及PCP和C结构域之间的特异性识别。

Chen等^[39]纯化了短杆菌素S合成酶GrsA启动模块中A-PCP-E的PCP-E蛋白,其中PCP以A/H构型结合在E结构域上,连接子区域(⁶⁰⁸Ile-⁶²⁷Thr)嵌入E结构域表面凹槽。此外,PCP结合的Ppant臂以一定角度向E结构域2个亚基的活性中心延伸,连接子区域20个氨基酸残基中靠近PCP结构的3个残基与E结构域表面解离,Chen等^[39]认为这有助于PCP朝向E结构域活性中心的取向调整;E结构域表面有2个盐桥,分别由⁶¹³Arg/⁷⁸⁸Asp和⁶¹⁴Arg/⁷⁸⁵Glu形成,提供了静电相互作用将连接子区域定位在E结构域上,这与对EntB^[29,38]的PCP的研究结果一致,PCP的 α 螺旋II和 α 螺旋III完成大多数与E结构域的相互作用。尽管C和E结构域的结构相似,都可以与PCP有效发生结合,但是在E结构域中相互作用方式与C结构域不同,C结构域是通过可伸缩的环区与PCP发生相互作用,而E结构域与PCP的相互作用的本质是通过结构域表面的静电相互作用发生结合。

4 问题及展望

PCP作为NRPS系统中的核心结构域,负责将底物和中间体运输到其他NRPS结构域,在恢复重组NRPS模块作用方面起着重要作用。然而有效地构建NRPS的重组模块不仅是各结构域简单的重新排列,需要对不同结构域有更深入的了解。构建NRPS的重组模块仍然存在很多问题,非同源重组和同源重组中不同上、下游模块之间特异性识别均会导致重组模块的活性降低甚至丧失。Owen等^[40]将2个不同色素NRPS系统中的PCP进行替换重组,异源PCP的取代使重组NRPS模块活性丧失。Linne等^[41]发现重组模块中E结构域的活性受到PCP的HS-Ppant结合位点附近的保守基序的影响。Calcott等^[42]构建了PCP-C-A重组质粒,发现PCP对下游结构域有特异性识别,原本位于TE和E结构域上游的PCP在重组模块中与下游重组的C结构域发生相互作用时活性较低。此外,C结构域进行缩合反应时对受体PCP上的氨基酸残基表现出很强的选择性,阻止用于替代的氨基酸残基被装配到肽链上^[43]。目前非同源重组造成的活性丧失可通过提供合适的正选择压力来恢复部分活性,对结构域之间的特异性识别导致活性降低可以通过对PCP的单点突变来解决^[40,42]。随着CRISPR/Cas基因组编辑技术在放线菌、丝状真菌等的成功应用,深入了解PCP与其他结构域相互作用的机制,运用全新的高通量合成大DNA片段和基因组编辑技术使重组NRPS的构建效率大幅提高^[44],利用人工构建的(DNA-templated NRPS, DT-NRPS)组装到NRPS支架主体上的技术有效提高了NRPs的合成^[45]。随着这些技术的发展,利用PCP等结构域构建重组模块将成为提高NRPs生物合成产量的有效策略。

REFERENCES

- [1] Süßmuth RD, Mainz A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2017, 56(14): 3770-3821
- [2] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(3): 770-803
- [3] Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 12(1): 141-172
- [4] Esmaeel Q, Chevalier M, Chataigné G, Subashkumar R, Jacques P, Leclère V. Nonribosomal peptide synthetase with a unique iterative-alternative-optional mechanism catalyzes amonabactin synthesis in *Aeromonas*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8453-8463
- [5] Zhang JR, Liu N, Cacho RA, Gong Z, Liu Z, Qin WM, Tang C, Tang Y, Zhou JH. Structural basis of nonribosomal peptide macrocyclization in fungi[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(12): 1001-1003
- [6] Woodhouse JN, Fan L, Brown MV, Thomas T, Neilan BA. Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(9): 1842-1851
- [7] 郑宗明, 顾晓波, 俞海青, 梁凤来, 刘如林. 非核糖体肽合成酶主要结构域的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(2): 120-124
Zheng ZM, Gu XB, Yu HQ, Liang FL, Liu RL. Advances in main domains of nonribosomal peptide synthetases[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2005, 30(2): 120-124 (in Chinese)
- [8] 左佃光, 马俊英, 王博, 黄洪波, 刘静, 张云, 鞠建华. 非核糖体肽类化合物的组合生物合成策略研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(3): 168-175
Zuo DG, Ma JY, Wang B, Huang HB, Liu J, Zhang Y, Ju JH. Advances in combinatorial biosynthesis strategies of non-ribosomal peptides[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2012, 37(3): 168-175 (in Chinese)
- [9] 薛永常, 李根. 非核糖体肽合成酶装配机制研究进展[J]. *生命的化学*, 2018, 38(3): 409-414
Xue YC, Li G. Research progress on nonribosomal peptide synthetase assembly mechanism[J]. *Chemistry of Life*, 2018, 38(3): 409-414 (in Chinese)
- [10] Finking R, Mofid MR, Marahiel MA. Mutational analysis of peptidyl carrier protein and acyl carrier protein synthase unveils residues involved in protein-protein recognition[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(28): 8946-8956
- [11] Harden BJ, Frueh DP. Molecular cross-talk between nonribosomal peptide synthetase carrier proteins and unstructured linker regions[J]. *ChemBiochem*, 2017, 18(7): 629-632
- [12] Lohman JR, Ma M, Cuff ME, Bigelow L, Bearden J, Babnigg G, Joachimiak A, Phillips GN, Shen B. The crystal structure of BlmI as a model for nonribosomal peptide synthetase peptidyl carrier proteins[J]. *Proteins*, 2014, 82(7): 1210-1218
- [13] Jaremko MJ, Lee DJ, Opella SJ, Burkart MD. Structure and substrate sequestration in the pyoluteorin type II peptidyl carrier protein PtlL[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(36): 11546-11549
- [14] Ma XY, Wang GY, Liu T, Chi CB, Zhang ZY, Yang DH, Liu W, Ma M. Functional characterization and crystal structure of the type II peptidyl carrier protein ColA1a in collismycins biosynthesis[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2020, 38(9): 963-969
- [15] Jaremko MJ, Davis TD, Corpuz JC, Burkart MD. Type II non-ribosomal peptide synthetase proteins: structure, mechanism, and protein-protein interactions[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(3): 355-379
- [16] Izoré T, Cryle MJ. The many faces and important roles of protein-protein interactions during non-ribosomal peptide synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(11): 1120-1139
- [17] Lai JR, Koglin A, Walsh CT. Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(50): 14869-14879
- [18] Alfermann J, Sun X, Mayerthaler F, Morrell TE, Dehling E, Volkmann G, Komatsuzaki T, Yang H, Mootz HD. FRET monitoring of a nonribosomal peptide synthetase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(9): 1009-1015
- [19] 姚黎栋, 王月月, 樊伟明, 张仁炳, 江辉, 李永泉. 链霉菌磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶对载体蛋白的底物选择性的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(6): 1188-1194

- Yao LD, Wang YY, Fan WM, Zhang RB, Jiang H, Li YQ. Substrate specificity of phosphopantetheinyl transferases to carrier proteins in *Streptomyces*[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(6): 1188-1194 (in Chinese)
- [20] 孟玲宁, 刘锦燕, 赵珺涛, 徐竞竞, 项明洁. 新靶点 PPTase 抗真菌药物的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2019, 29(1): 69-76
- Meng LN, Liu JY, Zhao JT, Xu JJ, Xiang MJ. Progress in the research of PPTase, new target for antifungal drugs[J]. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 29(1): 69-76 (in Chinese)
- [21] 刘祚军, 张部昌, 马清钧. 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(6): 335-338, 360
- Liu ZJ, Zhang BC, Ma QJ. Advances in phosphopantetheinyl transferase[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31(6): 335-338, 360 (in Chinese)
- [22] 孟玲宁, 刘锦燕, 赵悦, 吕婕, 林伊静, 项明洁. 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶在真菌和细菌的研究进展[J]. *中国真菌学杂志*, 2018, 13(5): 305-308
- Meng LN, Liu JY, Zhao Y, Lyu J, Lin YJ, Xiang MJ. Phosphopantetheinyl transferases in fungi and bacteria research[J]. *Chinese Journal of Mycology*, 2018, 13(5): 305-308 (in Chinese)
- [23] Quadri LE, Weinreb PH, Lei M, Nakano MM, Zuber P, Walsh CT. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(6): 1585-1595
- [24] Hur GH, Vickery CR, Burkart MD. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1074-1098
- [25] Tufar P, Rahighi S, Kraas FI, Kirchner DK, Löhr F, Henrich E, Köpke J, Dikic I, Güntert P, Marahiel MA, et al. Crystal structure of a PCP/sfp complex reveals the structural basis for carrier protein posttranslational modification[J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(4): 552-562
- [26] Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, Noel JP, Burkart MD. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(1): 61-108
- [27] Koglin A, Mofid MR, Löhr F, Schäfer B, Rogov VV, Blum MM, Mittag T, Marahiel MA, Bernhard F, Dötsch V. Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases[J]. *Science*, 2006, 312(5771): 273-276
- [28] Goodrich AC, Frueh DP. A nuclear magnetic resonance method for probing molecular influences of substrate loading in nonribosomal peptide synthetase carrier proteins[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(5): 1154-1156
- [29] Drake EJ, Nicolai DA, Gulick AM. Structure of the EntB multidomain nonribosomal peptide synthetase and functional analysis of its interaction with the EntE adenylation domain[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(4): 409-419
- [30] Mitchell CA, Shi C, Aldrich CC, Gulick AM. Structure of PA1221, a nonribosomal peptide synthetase containing adenylation and peptidyl carrier protein domains[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(15): 3252-3263
- [31] Drake EJ, Miller BR, Shi C, Tarrasch JT, Sundlov JA, Leigh Allen C, Skiniotis G, Aldrich CC, Gulick AM. Structures of two distinct conformations of holo-non-ribosomal peptide synthetases[J]. *Nature*, 2016, 529(7585): 235-238
- [32] 薛永常, 张成锁, 李根. 非核糖体肽合成酶基因腺苷酰化结构域序列克隆及分析[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(1): 20-25
- Xue YC, Zhang CS, Li G. Cloning and analysis of the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase gene[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 39(1): 20-25 (in Chinese)
- [33] Sundlov JA, Shi C, Wilson DJ, Aldrich CC, Gulick AM. Structural and functional investigation of the intermolecular interaction between NRPS adenylation and carrier protein domains[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(2): 188-198
- [34] Schneider A, Marahiel MA. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 169(5): 404-410
- [35] 薛永常, 胡泰文. 海洋链霉菌酰基辅酶 A 硫酯酶基因的克隆及分析[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(3): 31-36
- Xue YC, Hu TW. Cloning and analysis of acyl-CoA thioesterase II gene from marine *Streptomyces*[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(3): 31-36 (in Chinese)
- [36] Zhou Z, Lai JR, Walsh CT. Interdomain communication between the thiolation and thioesterase domains of EntF explored by combinatorial mutagenesis and selection[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(8): 869-879
- [37] Samel SA, Schoenafinger G, Knappe TA, Marahiel MA,

- Essen LO. Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase[J]. *Structure*, 2007, 15(7): 781-792
- [38] Lai JR, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT. A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection[J]. *PNAS*, 2006, 103(14): 5314-5319
- [39] Chen WH, Li KH, Guntaka NS, Bruner SD. Interdomain and intermodule organization in epimerization domain containing nonribosomal peptide synthetases[J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 11(8): 2293-2303
- [40] Owen JG, Calcott MJ, Robins KJ, Ackerley DF. Generating functional recombinant NRPS enzymes in the laboratory setting via peptidyl carrier protein engineering[J]. *Cell Chemical Biology*, 2016, 23(11): 1395-1406
- [41] Linne U, Doekel S, Marahiel MA. Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(51): 15824-15834
- [42] Calcott MJ, Ackerley DF. Portability of the thiolation domain in recombinant pyoverdine non-ribosomal peptide synthetases[J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15: 162
- [43] Belshaw PJ, Walsh CT, Stachelhaus T. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis[J]. *Science*, 1999, 284(5413): 486-489
- [44] Tong YJ, Weber T, Lee SY. CRISPR/Cas-based genome engineering in natural product discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(9): 1262-1280
- [45] Huang HM, Stephan P, Kries H. Engineering DNA-templated nonribosomal peptide synthesis[J]. *Cell Chemical Biology*, 2021, 28(2): 221-227.e7