

研究报告

两种黄素蛋白对奴卡霉素化合物的催化

赵燕, 杨松, 莫旭华*

青岛农业大学生命科学学院 山东省应用真菌重点实验室, 山东 青岛 266109

赵燕, 杨松, 莫旭华. 两种黄素蛋白对奴卡霉素化合物的催化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2378-2389.

ZHAO Yan, YANG Song, MO Xuhua. *In vitro* biochemical characterization of catalytic reaction of two flavoproteins toward nocamycin derivatives[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2378-2389.

摘要:【背景】2,4-二酮吡咯烷类化合物奴卡霉素和替达霉素都含有 C-10 酮基结构, 但是该结构是由两种不同的酶短链脱氢酶 NcmD 和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavine adenine dinucleotide, FAD)依赖的脱氢酶 TrdL 分别催化形成的。然而奴卡霉素生物合成基因簇中的 FAD 依赖的酶 NcmL 是否能回补 NcmD 的功能, 以及 TrdL 能否催化奴卡霉素 C-10 酮基的形成, 尚无相关的实验证据。

【目的】通过体外酶催化实验研究 NcmL 和 TrdL 对奴卡霉素 II 和奴卡霉素 F 的 C-10 位羟基的催化作用。【方法】通过克隆 *ncmL* 和 *trdL* 至 pET-28a(+)中, 然后于大肠杆菌中进行诱导表达。诱导后的蛋白经纯化后, 考察了纯化的 NcmL 和 TrdL 对奴卡霉素 II 和奴卡霉素 F 的催化作用, 利用高效液相色谱与高分辨质谱联用技术鉴定了酶反应产物。【结果】NcmL 不能催化奴卡霉素 II 和奴卡霉素 F 的 C-10 位羟基的脱氢反应, TrdL 能催化奴卡霉素 II 和奴卡霉素 F 的 C-10 位羟基脱氢, 分别得到奴卡霉素 I 和奴卡霉素 G。【结论】体外生化研究表明, NcmL 不参与奴卡霉素 C-10 酮基的生物合成反应, TrdL 具有较广的底物谱, 能催化多种奴卡霉素的 C-10 位羟基转化为酮基。

关键词: 黄素蛋白; 奴卡霉素; 替达霉素; 丁香糖丝菌

In vitro biochemical characterization of catalytic reaction of two flavoproteins toward nocamycin derivatives

ZHAO Yan, YANG Song, MO Xuhua*

Shandong Province Key Laboratory of Applied Mycology, School of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: [Background] The tetramic acid derivatives, nocamycins and tirandamycins, possess

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2020MC008)

This work was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2020MC008).

*Corresponding author. E-mail: xhmo@qau.edu.cn

Received: 2022-09-07; Accepted: 2022-10-02; Published online: 2022-11-17

C-10 ketone groups, the formation of which is catalyzed by two different enzymes: a short-chain dehydrogenase NcmD and a FAD-dependent dehydrogenase TrdL, respectively. In the biosynthetic pathway of nocamycins, whether the FAD-dependent oxidase NcmL can complement the function of NcmD remains unknown. Additionally, whether TrdL can catalyze the conversion of C-10 hydroxyl group to C-10 ketone group in nocamycins is also unknown. **[Objective]** To characterize the catalytic roles of NcmL and TrdL in the formation of C-10 ketone groups in nocamycins by using *in vitro* enzymatic assays. **[Methods]** The *trdL* and *ncmL* genes were respectively cloned into the vector pET-28a(+), and the recombinant vectors were then overexpressed in *Escherichia coli* BL21. TrdL and NcmL were purified and then used for the *in vitro* enzymatic assays. Nocamycins F and II were used as substrates and the products generated under the catalysis of NcmL and TrdL were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS). **[Results]** NcmL did not catalyze the dehydrogenation occurred on C-10 hydroxyl group. TrdL catalyzed the hydroxyl dehydrogenation at C-10 position in nocamycins II and F, leading to the generation of nocamycins I and G, respectively. **[Conclusion]** *In vitro* biochemical assays revealed that NcmL is not involved in formation of C-10 ketone group of nocamycins. TrdL shows a broad substrate spectrum and can catalyze the formation of C-10 ketone group in nocamycins.

Keywords: flavoproteins; nocamycins; tirandamycins; *Saccharothrix syringae*

奴卡霉素I (nocamycin I, 1)和奴卡霉素II (nocamycin II, 2)分离自稀有放线菌丁香糖丝菌 (*Saccharothrix syringae*)的发酵产物^[1]。奴卡霉素与利迪链霉素和替达霉素(tirandamycin)的结构最接近,都含有2个特殊的结构:2,4-二酮吡咯烷结构和双缩酮结构(图1)^[2]。奴卡霉素具有优异的抗菌活性,有非常广的抑菌谱,对很多革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抑制作用,对厌氧菌的抑制效果尤为显著^[1,3-5]。动物实验表明,奴卡霉素I对厌氧菌 *Bacteroides fragilis* 引起的小鼠感染具有很好的抑制效果,效力与甲硝唑相当^[5-6]。目前,奴卡霉素的抑菌机理还不清楚,研究者推测其与利迪链霉素和替达霉素具有相同的作用机理,都是细菌 RNA 酶的抑制剂,能有效地抑制转录的起始和延伸^[7-8]。奴卡霉素类化合物因独特的结构和广泛的生物活性引起了越来越多生物化学家和化学家的关注。

2017年,本课题组鉴定了丁香糖丝菌中的奴

卡霉素生物合成基因簇,该基因簇全长约 54 kb,包含 20 个开放阅读框^[9]。整个基因簇包括 4 个聚酮合成酶基因,1 个编码非核糖体肽合成酶基因,1 个 Dieckmann 环化酶基因,7 个与调节和抗性相关基因,6 个可能参与编码后修饰酶的基因,其中包括 2 个细胞色素 P450 氧化酶基因 *ncmG* 和 *ncmO*,1 个编码氧化还原酶基因 *ncmD*,1 个编码糖基水解酶基因 *ncmE*,1 个编码甲基转移酶基因 *ncmP* 和 1 个编码 FAD 依赖的脱氢酶基因 *ncmL*^[9]。随后本研究组通过基因敲除结合体外酶催化实验对 NcmG、NcmP 及 NcmD 的功能进行了研究^[9-11]。

奴卡霉素与替达霉素的 C-10 位酮基结构由脱氢酶催化 C-10 位羟基形成,但是该结构的形成是由两类完全不同的酶催化完成的。在替达霉素的生物合成过程中,FAD 依赖的酶 TrdL 催化 C-10 羟基形成 C-10 位酮基^[12],而在奴卡霉素生物合成过程中,C-10 酮基的结构是由短链脱氢酶 NcmD 催化完成的^[11]。不同于

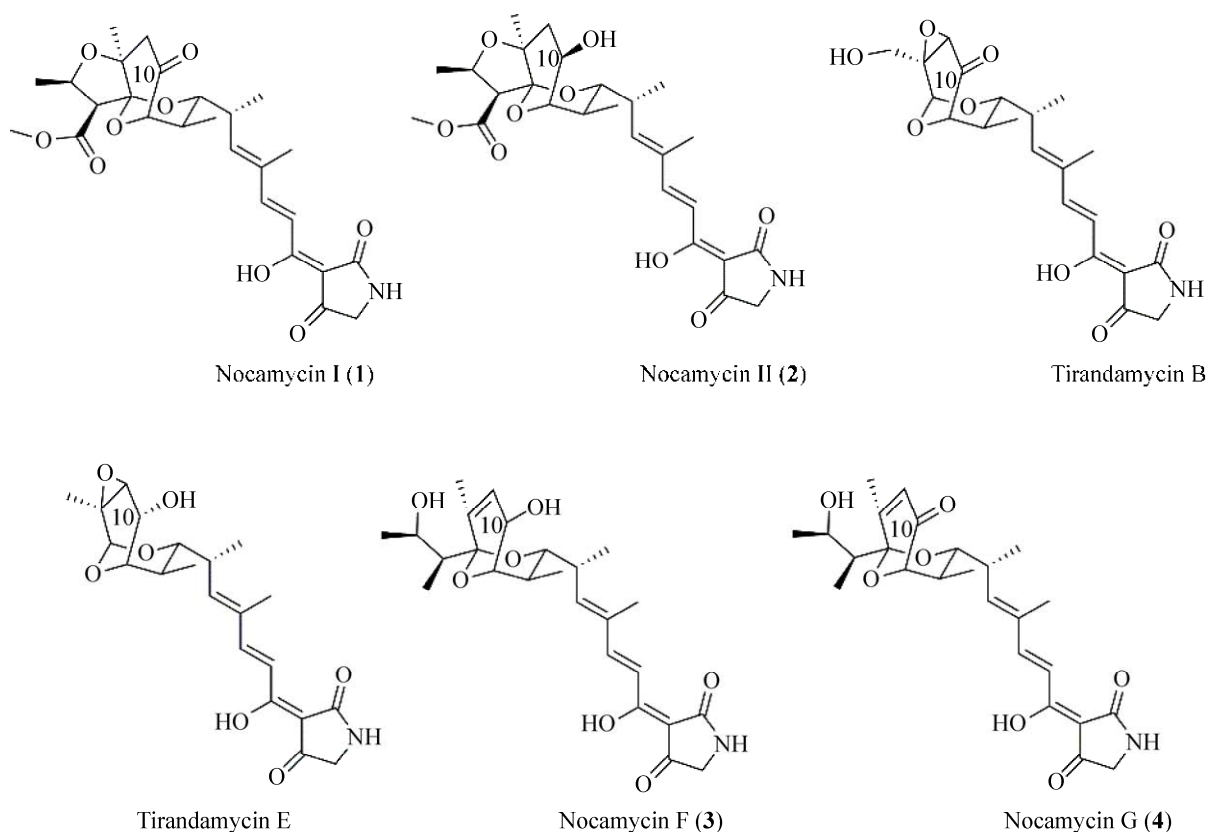


图 1 化合物奴卡霉素及替达霉素的化学结构

Figure 1 The chemical structures of nocamycins and tirandamycins.

TrdL 的是, NcmD 表现出严格的底物特异性, 其只能催化奴卡霉素 F (3) 的 C-10 羟基转变为 C-10 酮基, 而不能催化奴卡霉素 II (2) 中的 C-10 位羟基向酮基的转变^[11]。然而在 *ncmD* 缺失突变株中仍能检测到在奴卡霉素 I (1) 和奴卡霉素 II (2) 的合成, 这表明在丁香糖丝菌的基因组中可能存在一个酶能够回补 NcmD 的功能。

在奴卡霉素 I (1) 的生物合成基因簇中存在 1 个 FAD 依赖的蛋白 NcmL, 其与 TrdL 并未表现出明显的相似性, 前期实验表明, *ncmL* 基因的敲除并不影响奴卡霉素 I (1) 和奴卡霉素 II (2) 的生物合成^[9]。在奴卡霉素 V 的生物合成基因簇中也存在 1 个 NcmL 的同源蛋白位于基因簇

的中间位置^[13]。结合 *ncmD* 基因的敲除实验推测, 如果 NcmL 与 NcmD 具有相似的功能, 它们则能够在奴卡霉素 I (1) 生物合成过程中回补对方的功能, 从而导致敲除 *ncmL* 不会影响奴卡霉素 I (1) 和奴卡霉素 II (2) 的合成。基于此, 本研究通过体外酶催化的实验来阐明 NcmL 在奴卡霉素生物合成中的功能, 同时通过体外酶催化实验研究 TrdL 对奴卡霉素的 C-10 羟基的催化作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

本实验构建的质粒和菌株如表 1 所示。

表 1 本研究所用的质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids/Strains	Description	Sources
Plasmids		
pET-28a(+)	Kan ^R , vector for protein expression	Novagen
p5-C-9	Kan ^R , Amp ^R , source of <i>ncmL</i>	[12]
p2H6	Kan ^R , Amp ^R , source of <i>trdL</i>	[13]
pET-28a(+)- <i>ncmL</i>	Kan ^R , plasmid for overexpression <i>ncmL</i>	This study
pET-28a(+)- <i>trdL</i>	Kan ^R , plasmid for overexpression <i>trdL</i>	This study
Strains		
<i>Escherichia coli</i> Top10	Host strain for general clone	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host strain for protein overexpression	Novagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3):: <i>ncmL</i>	Kan ^R , strain for overexpression of <i>ncmL</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3):: <i>trdL</i>	Kan ^R , strain for overexpression of <i>trdL</i>	This study

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0。固体培养基添加 15 g/L 琼脂粉, 121 °C 灭菌 30 min 备用。大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)于 37 °C 培养。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; Q5 高保真 DNA 聚合酶, New England Biolabs 公司; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Ni-NTA 亲和层析填料, Novagen 公司; PCR 引物, 擎科生物技术有限公司。

PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 冷冻离心机, Sigma 公司; 超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; PD-10 脱盐柱, GE Healthcare 公司; 高分辨质谱仪、紫外-可见分光光度计, 赛默飞世尔科技有限公司; 高效液相色谱仪, Waters 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *ncmL* 和 *trdL* 异源表达质粒的构建

以 *NcmL*-expF (5'-ATATTACCATATG^{GGG}AACATTGCCGACAAAGTG-3', 下划线所示为 *Nde* I 位点)和 *NcmL*-expR (5'-ATCGGATCCC^{TACCGGTTCGGGCGGTTCGGTCTC}-3', 下划线

所示为 *Bam*H I 位点)为引物, 通过 PCR 从质粒 p5-C-9 中扩增得到 *ncmL* 基因片段, 以 *TrdL*-expF (5'-ATATTACCATATGATGAAGCACATCGATT^C-3', 下划线所示为 *Nde* I 位点)和 *TrdL*-expF (5'-ATAAGCTTTCAGGCCGCGGAACCC-3', 下划线所示为 *Hind* III 位点)为引物, 通过 PCR 从质粒 p2H6 中扩增得到 *trdL* 基因片段。PCR 反应体系(50 μ L): 5 \times PCR buffer 10.0 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2.5 μ L, 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 模板(4 ng/ μ L) 0.5 μ L, Q5 高保真酶(NEB) (2 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 6 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 用胶回收试剂盒回收目标片段。回收的目标片段经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 与经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切处理的 pET-28a(+)载体混合, 经 T4 DNA 连接酶连接后, 以化学转化的方式转化到 *E. coli* Top10 中。转化后得到的转化子首先经菌落 PCR 筛选后, 挑取阳性克隆子于添加有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养 14–16 h, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 对质粒中插入的 *ncmL* 片段进行测序, 测序工作由擎科生物技术

有限公司完成。测序正确的质粒分别命名为 pET-28a(+)-*ncmL* 和 pET-28a(+)-*trdL*, 用于下一步的研究。

1.2.2 NcmL 和 TrdL 蛋白的诱导和纯化

通过化学转化的方法将质粒 pET-28a(+)-*ncmL* 和 pET-28a(+)-*trdL* 分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)中, 转化子经菌落 PCR 验证后, 含有目的质粒的菌株分别命名为 *E. coli* BL21(DE3)::*ncmL* 和 *E. coli* BL21(DE3)::*trdL*。分别按照 1%的接种量接种 *E. coli* BL21(DE3)::*NcmL* 和 *E. coli* BL21(DE3)::*trdL* 的过夜培养物于 LB 培养基中 (100 mL/瓶, 10 瓶), 加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6 时加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导, 然后 22 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续培养 12 h 后 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。收集的菌体用 50 mmol/L Tris-HCl 洗涤 2 次后重悬于 35 mL 的结合缓冲液中 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.9), 用于后续的蛋白质分离纯化。菌体经超声破碎仪裂解 (功率 150 W, 运行 15 min, 工作 3 s, 停 3 s) 后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min 去除细胞碎片和不溶性物质后, 将含有蛋白的上清转移到新的离心管。采用 Ni-NTA 重力亲和柱纯化 NcmL 和 TrdL 蛋白, 待过滤完后, 加入 10 mL 冲洗缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑) 洗去与 Ni-NTA 柱相结合的杂蛋白, 最后用 2.5 mL 的洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 500 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑) 将目的蛋白从 Ni-NTA 柱上洗脱下来。2.5 mL 含有目的蛋白的洗脱液经 PD-10 脱盐柱脱盐后, 用 3.5 mL 的贮存缓冲液 (10% glycerol, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 洗脱下来, 再用超滤管浓缩至 1.5 mL, 浓缩后的蛋白质通过

10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测蛋白质的纯度, 用 Bradford 方法测定蛋白质的浓度, 然后分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.3 NcmL 蛋白中辅因子 FAD 的检测

取 600 μL 纯化后的 NcmL 蛋白, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 20 min, 然后 12 000 r/min 离心 15 min 去除变性蛋白后, 上清液经冷冻干燥后, 溶解于 150 mL ddH₂O 中, 用于 HPLC 和紫外-可见分光光度计进行分析。

1.2.4 NcmL 和 TrdL 的体外酶活性分析

分别以奴卡霉素 F (3) 和奴卡霉素 II (2) 为底物, 测试 NcmL 和 TrdL 的催化活性。对于 NcmL 催化体系, 100 μL 的酶反应体系包括: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.05 mmol/L 的底物, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ NcmL, 1 mmol/L 辅因子; 对于 TrdL 催化的反应体系, 100 μL 的酶反应体系包括 50 mmol/L Tris-HCl、0.05 mmol/L 的底物和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ TrdL。分别设立热失活的 NcmL 或者 TrdL 作为对照。30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h 后加入 2 倍体积的冰甲醇, 涡旋振荡 15 s, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清进行 HPLC 分析。

1.2.5 HPLC 和 LC-HR-MS 分析体外酶反应产物

HPLC 的流动相由 A、B 两相组成, 流动相 A 相为 15% 乙腈、85% ddH₂O、0.1% 甲酸, B 相为 85% 乙腈、15% ddH₂O、0.1% 甲酸, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 260 nm 和 355 nm。HPLC 洗脱程序: 0–20 min, 0%–85% B 相; 20–21 min, 85%–100% B 相; 21–26 min, 100% B 相; 26.0–26.1 min, 100%–0% B 相; 26.1–30.0 min, 0% B 相。对确认有反应产物产生的样品, 用 LC-HR-MS 进行分析。HPLC 数据用 Waters Empower 3 色谱数据软件分析, LC-HR-MS 数据用 Thermo Scientific Mass Frontier 7.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 NcmL 蛋白的生物信息学分析

NcmL 基因长 1 538 bp, 位于编码 LuxR 家族的调控蛋白基因 *ncmN* 的上游, 与 *ncmN* 的转录方向相反, 生物信息学分析结果显示 *ncmL* 编码一个 FAD 依赖的氧化酶。*NcmL* 与 *Amycolatopsis* sp. 17SM-2A 中奴卡霉素 V 生物合成途径中的 *NmvL* 具有 65% 的相似性^[13]。此外, *NcmL* 还与 *mithramycin* 生物合成途径中的 *MtmOIV* 有 37% 的相似性^[14], 与 BE-7585A 生物合成途径中的 *BexE* 有 36% 的相似性^[15], 与利福霉素单氧化酶 RIFMO 有 35% 的相似性^[16], 与 *angucycline* 生物合成途径的 *PgaE* 有 33% 的相似性^[17], 与 *oxytetracycline* 途径中的 *OxyS* 有 33% 的相似性^[18]。通过比较发现, *NcmL* 与 *NmvL* 在基因簇中的位置存在较大区别, *NmvL* 位于基因簇中间位置, 而 *NcmL* 则位于基因簇的末端位置^[13]。*NcmL* 的 N 端有 FAD 结合区域 GxGxxG(x)₁₆E/D、GGRS 和 GDAxHxH (图 2)^[17,19], C 端含有一个硫氧还原蛋白结构域。

2.2 NcmL 和 TrdL 蛋白的表达和蛋白纯化

NcmL 和 *TrdL* 经 PCR 克隆至表达载体 pET-28a(+) 载体中, 然后转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行了异源表达。通过 Ni-NTA 亲和层析纯化得到了 *NcmL* 和 *TrdL* 蛋白(图 3A)。与 *TrdL* 蛋白类似, *NcmL* 蛋白也呈黄色, 这表明 *NcmL* 含有辅因子 FAD。为了验证 FAD 是否以共价键与 *NcmL* 蛋白相连, 我们通过水浴加热的方法对 *NcmL* 进行了变性, 发现变性后的 *NcmL* 蛋白经离心后沉淀为无色, 而上清液为黄色。HPLC 分析结果显示上清液中的物质与 FAD 具有相同的保留时间(图 3B), 紫外-可见分光光度计分析表明该物质与 FAD 具有非常相似的吸收谱(图 3C), 在 265、375 和 450 nm 有 3 个明显的紫外吸收峰, 这表明 *NcmL* 的辅因子为

FAD, 并且 FAD 是以非共价键与 *NcmL* 相连的。

2.3 NcmL 对奴卡霉素 F (3) 和奴卡霉素 II (2) 的催化研究

NcmD 已被证实能够催化奴卡霉素 F (3) 的 C-10 羟基转化为 C-10 酮基, 根据前期的实验结果, 我们推测 *NcmL* 可能回补 *NcmD* 的功能。基于此, 我们以奴卡霉素 F (3) 为底物, 考察了 *NcmL* 的催化活性。结果显示, 在辅因子 FAD 存在的情况下, *NcmL* 对奴卡霉素 F (3) 和奴卡霉素 II (2) 都未表现出催化活性(图 4)。生物信息学分析显示 *NcmL* 与苯酚羟化酶有较高的相似性, 我们推测 *NcmL* 可能对奴卡霉素类化合物进行羟基化修饰。已阐明功能的 *NcmL* 的同源蛋白, 如 *MtmOIV*、*BexE*、*PgaE*、*OxyS* 等催化反应时需要还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)或者还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)提供氢, 因此, 我们考察了反应体系中存在 NADPH 或者 NADH 时 *NcmL* 对奴卡霉素 F (3) 和奴卡霉素 II (2) 的催化活性。结果显示, 当反应体系存在 NADPH 或者 NADH 时, *NcmL* 对奴卡霉素 II (2) 和奴卡霉素 F (3) 都无催化作用(图 4)。上述的实验结果表明, *NcmL* 不参与丁香糖丝菌中奴卡霉素的 C-10 位酮基的生物合成。

2.4 TrdL 对奴卡霉素 F (3) 和奴卡霉素 II (2) 的催化研究

FAD 依赖的脱氢酶 *TrdL* 在替达霉素的生物合成过程中催化 C-10 羟基转化为 C-10 酮基且具有较广的底物谱, 而替达霉素类化合物与奴卡霉素类化合物的结构非常相似, 基于此两点, 我们考察了 *TrdL* 对奴卡霉素类化合物 C-10 羟基的催化作用。HPLC 分析结果表明, *TrdL* 对奴卡霉素 II (2) 和奴卡霉素 F (3) 都有催化作用(图 5A)。在 *TrdL* 的作用下, 有约 45% 的奴卡



图2 NcmL与部分已阐明功能同源蛋白的序列比对分析 方框所示部分为与FAD相结合区域,星号为高度保守的氨基酸残基. NvmL来自于 *Amycolatopsis* sp. 17SM-2A 中的奴卡霉素V生物合成基因簇, OxyS来自于 *Streptomyces rimosus* 中的 oxytetracycline 生物合成基因簇, RIFMO来自于 *Nocardia farcinica* 中利福霉素生物合成基因簇, MtmOIV来自于 *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956 中 mithramycin 生物合成基因簇, PgaE来自于 *Streptomyces* sp. PGA64 中的 angucycline 生物合成基因簇, BxeE来自于 *Amycolatopsis orientalis* sp. *vinerea* 中的 BE-7585A 生物合成基因簇

Figure 2 Multiple amino acid sequences alignment of NcmL and its homologues with known function. The residues in red box stand for the FAD binding domains, and the asterisk stands for the conserved amino acid residues. NvmL is from nocamycin V biosynthetic gene cluster (BGC) in *Amycolatopsis* sp. 17SM-2A, OxyS is from oxytetracycline BGC in *Streptomyces rimosus*, RIFMO is from rifampicin BGC in *Nocardia farcinica*, MtmOIV is from mithramycin BGC in *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, PgaE is from angucycline BGC in *Streptomyces* sp. PGA64, BxeE is from BE-7585A BGC in *Amycolatopsis orientalis* sp. *vinerea*.

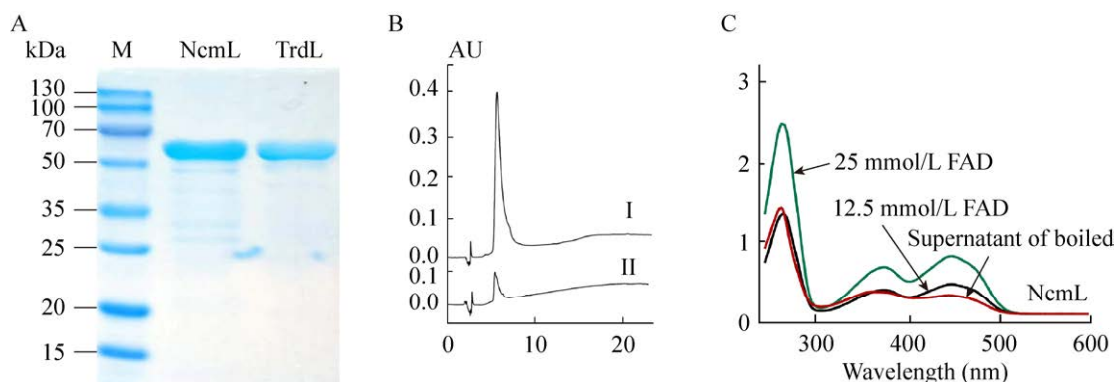


图3 NcmL 和 TrdL 的分析 A: SDS-PAGE 分析 NcmL 和 TrdL 蛋白. M: Protein marker. B: HPLC 分析热变性 NcmL 蛋白上清溶液. I: FAD 标准品(100 mmol/L); II: 热变性 NcmL 蛋白上清溶液. C: 紫外-可见分光光度计分析热变性 NcmL 蛋白上清溶液

Figure 3 Analysis of NcmL and TrdL. A: SDS-PAGE analysis of NcmL and TrdL proteins. M: Protein marker. B: HPLC analysis of the supernatant derived from the heating-boiled NcmL solution. I: FAD standard (100 mmol/L); II: Sample of supernatant derived from the heating-boiled NcmL solution. C: UV-visible spectrophotometer analysis of supernatant derived from the heating-boiled NcmL solution.

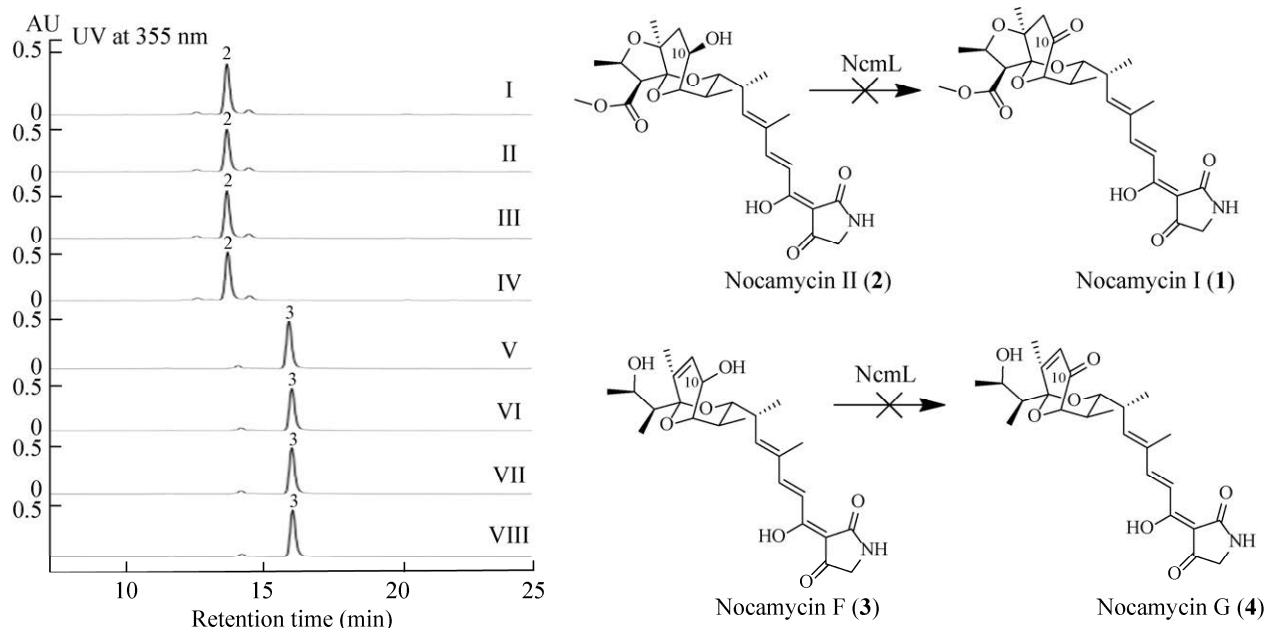


图4 NcmL 体外酶反应的 HPLC 检测 I: 对照组, 热变性失活 NcmL, FAD, 奴卡霉素 II (2); II: NcmL, FAD, 奴卡霉素 II (2); III: NcmL, FAD, NADH, 奴卡霉素 II (2); IV: NcmL, FAD, NADPH, 奴卡霉素 II (2); V: 对照组, 热变性失活 NcmL, FAD, 奴卡霉素 F (3); VI: NcmL, FAD, 奴卡霉素 F (3); VII: NcmL, FAD, NADH, 奴卡霉素 F (3); VIII: NcmL, FAD, NADPH, 奴卡霉素 F (3)

Figure 4 HPLC analyses of the enzymatic assays catalyzed by NcmL. I: Control panel containing boiled NcmL, FAD, nocamycin II (2); II: NcmL, FAD, nocamycin II (2); III: NcmL, FAD, NADH, nocamycin II (2); IV: NcmL, FAD, NADPH, nocamycin II (2); V: Control panel containing boiled NcmL, FAD, nocamycin F (3); VI: NcmL, FAD, nocamycin F (3); VII: NcmL, FAD, NADH, nocamycin F (3); VIII: NcmL, FAD, NADPH, nocamycin F (3).

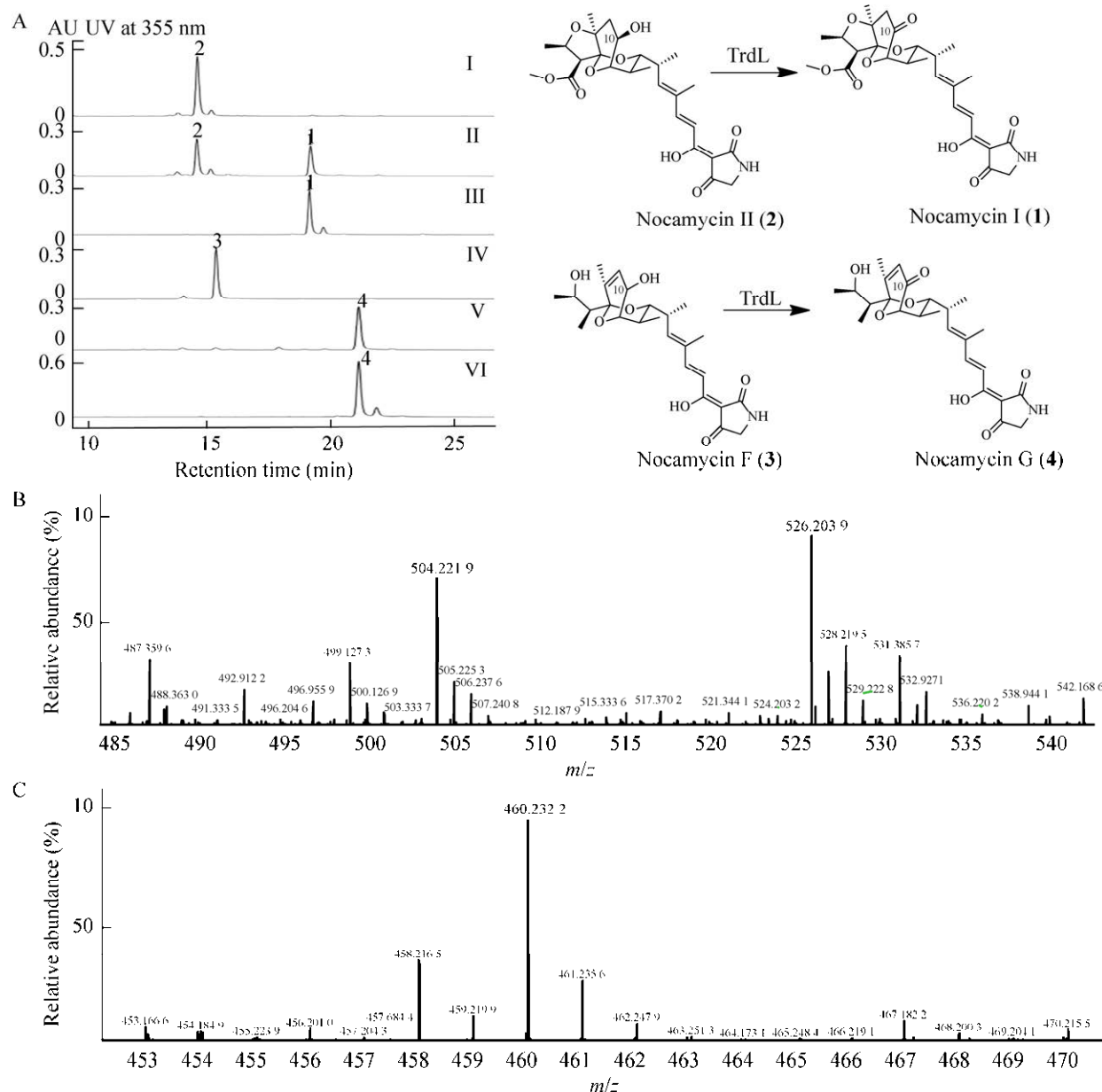


图 5 TrdL 体外酶反应分析 A: TrdL 催化的反应的 HPLC 检测. I: 对照组, 热变性失活 TrdL, 奴卡霉素 II (2); II: TrdL, 奴卡霉素 II (2); III: 奴卡霉素 I (1) 标准品; IV: 对照组, 热变性失活 TrdL, 奴卡霉素 F (3); V: TrdL, 奴卡霉素 F (3); VI: 奴卡霉素 G (4) 标准品. B: TrdL 催化奴卡霉素 II (2) 所得产物 1 的高分辨质谱分析, $m/z=504.221\ 9\ [M+H]^+$, $526.203\ 9\ [M+Na]^+$. C: TrdL 催化的奴卡霉素 F (3) 所得产物 4 的高分辨质谱分析, $m/z=460.232\ 2\ [M+H]^+$

Figure 5 Analyses of enzymatic assays catalyzed by TrdL. A: HPLC analyses of the assays catalyzed by TrdL. I: Control panel containing boiled TrdL, nocamycin II (2); II: TrdL, nocamycin II (2); III: Nocamycin I (1) standard; IV: TrdL, nocamycin II (2); IV: NcmL, nocamycin F (3); V: TrdL, nocamycin F (3); VI: Nocamycin G (4) standard. B: MS profile of the product generated in the assays containing TrdL and nocamycin II (2), $m/z=504.221\ 9\ [M+H]^+$, $526.203\ 9\ [M+Na]^+$. C: MS profile of the product generated in the assays containing TrdL and nocamycin F (3), $m/z=460.232\ 2\ [M+H]^+$.

霉素 II (2)能转化为一个极性更小的化合物, 该化合物与奴卡霉素 I (1)有相同的保留时间, LC-HR-MS 结果表明该化合物的分子量为 503 ($m/z=504.221\ 9\ [M+H]^+$, $526.203\ 9\ [M+Na]^+$) (图 5B), 与奴卡霉素 I (1)的分子量一致, 这表明 TrdL 能催化奴卡霉素 II (2)生成奴卡霉素 I (1)。当以奴卡霉素 F (3)为底物时, TrdL 能将其近 100%转化为一个极性更小的化合物, 该化合物与奴卡霉素 G (4)有相同的保留时间, LC-HR-MS 结果表明该化合物的分子量为 459 ($m/z=460.232\ 2\ [M+H]^+$) (图 5C), 与奴卡霉素 G (4)的分子量一致, 这表明 TrdL 能转化奴卡霉素 F (3)生成奴卡霉素 G (4)。上述实验结果表明, TrdL 能够催化奴卡霉素类化合物 C-10 羟基的脱氢生成 C-10 酮基。

3 讨论与结论

奴卡霉素是自然界中存在的少数含有 2,4-二酮吡咯烷结构和双环缩酮结构的化合物, 该类化合物具有广泛的生物学活性, 阐明该类化合物的生物合成机制引起了生物化学家的极大关注^[2]。本研究通过体外酶催化实验, 研究了两大类不同的黄素蛋白酶 NcmL 和 TrdL 对奴卡霉素 II (2)和奴卡霉素 F (3)的催化作用, 首次发现了替达霉素生物合成基因簇中的脱氢酶 TrdL 能催化奴卡霉素 C-10 位羟基脱氢形成酮基。

黄素蛋白酶在自然界中广泛存在, 能够催化多种类型的化学反应, 如脱氢、羟化和环氧化等^[20-21]。微生物中很多黄素蛋白既在次级代谢产物的生物合成中发挥重要的修饰作用, 也在生物催化中有着重要的应用^[22]。如在 alchivemycin A 的生物合成中, 黄素蛋白酶 AvmO1 能催化一个氧原子插入到酰胺键中, 对该类化合物的重要活性药理基团的形成起着至关重要的作用^[23]; 而在 chlorizidine A 的生物合成过程中, 黄素蛋

白 Tcz9 则能催化二氢吡咯嗪环结构的形成^[24]。现阶段发现的黄素依赖的酶分为两大类^[20-21]: 一种是与辅因子 FAD/FMN 与蛋白质以非共价键结合的酶, 绝大部分发现的黄素蛋白都属于这一类, 本研究中的 NcmL 蛋白即属于这一类; 另一种是辅因子 FAD/FMN 与蛋白质以共价键结合的酶, 这一类黄素蛋白所占比例很小, 如广泛研究的 BBE 家族的黄素蛋白就是通过 His 和 Cys 与 FAD 双共价相连, TrdL 和 Tcz9 即属于这类黄素蛋白^[13,24]。

虽然前期基因敲除实验不能排除 NcmL 能回补短链脱氢酶 NcmD 功能的可能性^[9,11], 但是本研究的蛋白体外酶活性测试结果确切地证实 NcmL 不能回补 NcmD 的功能, 与奴卡霉素的 C-10 酮基的形成无关。鉴于 NcmL 及其类似蛋白 NmvL 在多个类奴卡霉素的基因簇中都存在, 该类蛋白在奴卡霉素类化合物的生物合成过程中是否存在其他的功能依然未知。奴卡霉素和替达霉素结构都存在 C-10 位酮基结构, 但是该酮基结构的形成是由两种完全不同的酶催化形成的。不同于 NcmD 对底物的严格选择性, TrdL 有着较广的底物谱, 其既能催化多种替达霉素的 C-10 羟基脱氢形成 C-10 酮基, 在本研究中也发现其能催化不同奴卡霉素 C-10 位羟基的脱氢反应, TrdL 的宽底物谱特性有可能使其应用于催化相似结构的羟基脱氢反应。鉴于 TrdL 能催化奴卡霉素 II (2)转化为奴卡霉素 I (1), 一方面可以用 TrdL 为标记蛋白, 筛选丁香糖丝菌中可能催化奴卡霉素 II (2)转化为奴卡霉素 I (1)的候选蛋白; 另一方面也可以在丁香糖丝菌中表达 TrdL, 利用 TrdL 的催化特点, 促进奴卡霉素 II (2)更快地转化为奴卡霉素 I (1), 提高奴卡霉素 I (1)的产量。

综上所述, 本研究通过体外酶催化实验表明 FAD 依赖的黄素蛋白 NcmL 不参与奴卡霉素

的 C-10 酮基的形成。同时, 通过体外酶活化实验发现 TrdL 具有较广的底物谱, 能催化不同奴卡霉素 C-10 酮基的形成。

REFERENCES

- [1] BRAZHNKOVA MG, KONSTANTINOVA NV, POTAPOVA NP, TOLSTYKH IV. Physicochemical characteristics of the new antineoplastic antibiotic, nocamycin[J]. Antibiotiki, 1977, 22(6): 486-489.
- [2] MO XH, LI QL, JU JH. Naturally occurring tetramic acid products: isolation, structure elucidation and biological activity[J]. RSC Advances, 2014, 4(92): 50566-50593.
- [3] GAUZE GF, SVESHNIKOVA MA, UKHOLINA RS, KOMAROVA GN, BAZHANOV VS. Formation of a new antibiotic, nocamycin, by a culture of *Nocardiopsis syringae* sp. nov.[J]. Antibiotiki, 1977, 22(6): 483-486.
- [4] TSUKIURA H, TOMITA K, HANADA M, KOBARU S, TSUNAKAWA M, FUJISAWA K, KAWAGUCHI H. Bu-2313, a new antibiotic complex active against anaerobes. I. production, isolation and properties of Bu-2313 A and B[J]. The Journal of Antibiotics, 1980, 33(2): 157-165.
- [5] BANSAL MB, DHAWAN VK, THADEPALLI H. *In vitro* activity of BU-2313B against anaerobic bacteria[J]. Chemotherapy, 1982, 28(3): 200-203.
- [6] TODA S, NAKAGAWA S, NAITO T, KAWAGUCHI H. Bu-2313, a new antibiotic complex active against anaerobes. III. Semi-synthesis of Bu-2313 A and B, and their analogs[J]. The Journal of Antibiotics, 1980, 33(2): 173-181.
- [7] TUSKE S, SARAFIANOS SG, WANG XY, HUDSON B, SINEVA E, MUKHOPADHYAY J, BIRKTOFT JJ, LEROY O, ISMAIL S, CLARK AD JR, DHARIA C, NAPOLI A, LAPTENKO O, LEE J, BORUKHOV S, EBRIGHT RH, ARNOLD E. Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation[J]. Cell, 2005, 122(4): 541-552.
- [8] TEMIAKOV D, ZENKIN N, VASSYLYEVA MN, PEREDERINA A, TAHIROV TH, KASHKINA E, SAVKINA M, ZOROV S, NIKIFOROV V, IGARASHI N, MATSUGAKI N, WAKATSUKI S, SEVERINOV K, VASSYLYEV DG. Structural basis of transcription inhibition by antibiotic streptolydigin[J]. Molecular Cell, 2005, 19(5): 655-666.
- [9] MO XH, SHI CR, GUI C, ZHANG YJ, JU JH, WANG QJ. Identification of nocamycin biosynthetic gene cluster from *Saccharothrix syringae* NRRL B-16468 and generation of new nocamycin derivatives by manipulating gene cluster[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 100.
- [10] MO XH, GUI C, WANG QJ. Elucidation of a carboxylate *O*-methyltransferase NcmP in nocamycin biosynthetic pathway[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(18): 4431-4435.
- [11] MO XH, ZHANG H, DU FY, YANG S. Short-chain dehydrogenase NcmD is responsible for the C-10 oxidation of nocamycin F in nocamycin biosynthesis[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 610827.
- [12] MO X, HUANG H, MA J, WANG Z, WANG B, ZHANG S, ZHANG C, JU J. Characterization of TrdL as a 10-hydroxy dehydrogenase and generation of new analogues from a tirandamycin biosynthetic pathway[J]. Organic Letters, 2011, 13(9): 2212-2215.
- [13] HANSEN KA, KIM RR, LAWTON ES, TRAN J, LEWIS SK, DEOL AS, van ARNAM EB. Bacterial associates of a desert specialist fungus-growing ant antagonize competitors with a nocamycin analog[J]. ACS Chemical Biology, 2022, 17(7): 1824-1830.
- [14] BEAM MP, BOSSERMAN MA, NOINAJ N, WEHENKEL M, ROHR J. Crystal structure of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV, the key enzyme of the mithramycin biosynthetic pathway[J]. Biochemistry, 2009, 48(21): 4476-4487.
- [15] JACKSON DR, YU X, WANG G, PATEL AB, CALVERAS J, BARAJAS JF, SASAKI E, METSÄ-KETELÄ M, LIU HW, ROHR J, TSAI SC. Insights into complex oxidation during BE-7585A biosynthesis: structural determination and analysis of the polyketide monooxygenase BexE[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(4): 1137-1147.
- [16] LIU LK, ABDELWAHAB H, MARTIN DEL CAMPO

- JS, MEHRA-CHAUDHARY R, SOBRADO P, TANNER JJ. The structure of the antibiotic deactivating, *N*-hydroxylating rifampicin monooxygenase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(41): 21553-21562.
- [17] KOSKINIEMI H, METSÄ-KETELÄ M, DOBRITZSCH D, KALLIO P, KORHONEN H, MÄNTSÄLÄ P, SCHNEIDER G, NIEMI J. Crystal structures of two aromatic hydroxylases involved in the early tailoring steps of angucycline biosynthesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 372(3): 633-648.
- [18] WANG P, BASHIRI G, GAO X, SAWAYA MR, TANG Y. Uncovering the enzymes that catalyze the final steps in oxytetracycline biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(19): 7138-7141.
- [19] WESTPHAL AH, TISCHLER D, van BERKEL WJH. Natural diversity of FAD-dependent 4-hydroxybenzoate hydroxylases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2021, 702: 108820.
- [20] MACHEROUX P, KAPPES B, EALICK SE. Flavogenomics: a genomic and structural view of flavin-dependent proteins[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(15): 2625-2634.
- [21] DENG YM, ZHOU Q, WU YZ, CHEN X, ZHONG FR. Properties and mechanisms of flavin-dependent monooxygenases and their applications in natural product synthesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(5): 2622.
- [22] HEINE T, van BERKEL WJH, GASSNER G, van PÉE KH, TISCHLER D. Two-component FAD-dependent monooxygenases: current knowledge and biotechnological opportunities[J]. *Biology (Basel)*. 2018, 7(3): 42.
- [23] ZHU HJ, ZHANG B, WANG L, WANG W, LIU SH, IGARASHI Y, BASHIRI G, TAN RX, GE HM. Redox modifications in the biosynthesis of alchivemycin A enable the formation of its key pharmacophore[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(12): 4751-4757.
- [24] PURDY TN, KIM MC, CULLUM R, FENICAL W, MOORE B. Discovery and biosynthesis of tetrachlorizine reveals enzymatic benzylic dehydrogenation via an ortho-quinone methide[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(10): 3682-3686.