

# 聚酮类抗生素组合生物合成

黄惠娟 乔建军\*

(天津大学化工学院, 天津 300072)

**摘要** 组合生物合成是公认的产生大量“非天然”的天然产物的一种有效方法,也是近年来药物创新与应用的研究热点和重要手段之一。目前,组合生物合成在聚酮类抗生素等生物活性物质的开发应用研究中已经取得了显著的成果。结合文献中的例子,回顾了运用组合生物合成在天然产物的基础上产生更多结构及功能多样性的聚酮类抗生素的方法和思路,并对某些方法所存在的问题与不足进行了讨论。

**关键词** 组合生物合成; 聚酮化合物; 天然产物

组合生物合成是在微生物次级代谢产物生物合成基因和酶学基础上形成的,通过对微生物代谢产物合成途径中涉及到的一些酶的编码基因进行操作(如替换、阻断、重组等)来改变生物合成途径产生新的代谢旁路,利用天然产物生物合成机制获得大量新的“非天然”天然产物的方法。

聚酮化合物是由细菌、真菌、放线菌或植物产生的一大类天然产物,是用于人类疾病治疗的重要药物之一。因其重要的生物活性在临床应用中可以作为抗生素(如红霉素, erythromycin A)、抗癌药物(如多柔比星, doxorubicin)、低胆固醇剂(如洛伐他汀, lovastatin)、抗寄生虫剂(如阿维菌素, avermectins)、抗真菌剂(如两性霉素, amphotericin B)、杀虫剂(如多杀菌素, spinosyn A)以及免疫抑制剂(如雷帕霉素, rapamycin)等。

由于聚酮化合物特殊的结构和合成机制、非凡的多功能性和可塑性使得人们可以通过组合生物合成方法便捷地获得由其他方式难于得到的新化合物<sup>[1]</sup>。因此,应用组合生物合成的方法直接地对聚酮化合物生物合成途径中涉及到的一些酶的编码基因进行操作(如模块/结构域的增加、减少、替换等),产生一些非天然的基因组或者杂合基因而可能改变原有的生物合成途径,从而可以间接地对聚酮化合物的生物合成进行调控,以获得大量新的聚酮化合物或其衍生物<sup>[2,3]</sup>。本文对近年来聚酮类抗生素组合生物合成的研究方法和思路进行了回顾与展望,对某些方法所存在的问题与不足进行了讨论。

碳链结构的一大类天然产物,可以分为两大类:复合聚酮化合物和芳香族聚酮化合物。复合聚酮化合物是低级脂肪酸在缩合反应后经过内酯化成环而产生的一组分子,包括大环内酯类(如红霉素)、聚醚类(如南昌霉素, nanchangmycin)等抗生素。芳香族聚酮化合物是低级脂肪酸在缩合反应后均保持非还原状态,经过折叠和醇醛缩合形成六元环,芳香环随后被脱水还原而产生的一组分子,包括蒽环类(如多柔比星)、苯并异色满醌类(如放线紫红素, actinorhodin)等抗生素。

聚酮化合物是由聚酮生物合酶(polyketide biosynthase, PKS)催化合成的。据国内外新近研究报道<sup>[4]</sup>,目前所发现的PKS可以归为三类:(1) I型PKS也称为模块式PKS,它由若干个多功能多肽组成,每一个多肽上都分别携带有独特的、非重复使用的催化结构域,参与一轮聚酮生物合成反应的所有结构域称为一个合酶单位,编码这个合酶单位的DNA被称为一个模块。如合成红霉素的PKS由3个多肽域(DEBS1、DEBS2和DEBS3)6个模块组成;合成雷帕霉素的PKS由3个多肽域(RAPS1、RAPS2和RAPS3)14个模块组成。I型PKS研究最为透彻,主要由酮基合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶(acyltransferase, AT)、脱氢酶(dehydratase, DH)、烯酰还原酶(enoyl reductase, ER)、酮基还原酶(ketoreductase, KR)和酰基载体蛋白(acyl-carrier protein, ACP)等结构域组成,其中KS、AT、ACP

收稿日期: 2007-01-19 接受日期: 2007-05-18

国家自然科学基金资助项目(No.30570042)

\*通讯作者。Tel: 022-27400388, Fax:022-87402107, E-mail:

jianjunq@tju.edu.cn

## 1 聚酮化合物及其聚酮生物合酶

聚酮化合物是由低级脂肪酸聚合形成的具有长

是聚酮碳链延伸反应的“最小PKS”; (2) II型PKS也称为迭代式或芳香式PKS, 它是一个多酶复合体的迭代体系(至少包含KS和ACP), 通过一套可重复使用的结构域在重复的反应步骤中多次用来催化酚聚酮结构的生成。II型PKS在起始单位和延长单位的选择方面不及I型PKS变化多样, 它的结构多样性主要来源于聚酮合成后的修饰步骤; (3) III型PKS是可重复使用的同源双亚基蛋白, 属于查尔酮(chalcone)合成酶类。III型PKS与前两类PKS截然不同, 它不依赖于作为酰基载体的ACP及其上的4'-磷酸泛酰巯基乙胺, 也不像前两类PKS是通过ACP活化酰基辅酶A的底物, 而是直接作用于酰基辅酶A活化的简单羧酸。尽管不同类型PKS的结构和机制不尽相同, 但是所有类型的PKS都有通过酰基辅酶A脱羧缩合和KS结构域或亚基来催化C-C键形成的功能。

随着分子遗传工程、DNA测序以及生物信息学等技术的发展与创新, 人们对各类型PKS的认知程度逐步加深, 对聚酮化合物生物合成机制有了更深入的理解与掌握。应用组合生物合成方法对聚酮化合物生物合成途径基因进行操作, 可以获得更多新颖的具有生物活性的化合物。

## 2 PKS中模块的组合生物合成

聚酮化合物中碳链骨架的构成单位与催化其形成的PKS模块之间有着——对应的关系。因此, 聚

酮化合物中骨架结构的改进(如更改链长度、环体系等)可以通过组合生物合成方法改变相应的PKS模块来实现。此外, 利用异源单元可以增加聚酮体的多样性, 这样的改变一般并不影响聚酮体链的环化和PKS的后修饰, 可以得到新的终产物。

### 2.1 PKS中模块的减少

在运用组合生物合成方法对PKS中某一个模块进行去除的操作中, 当满足最后一个模块和具有环化功能的酶域可以识别非天然的中间产物的前提时, 则减短后的PKS仍然具有催化形成新的聚酮化合物或其结构类似物的功能。如在红霉素生物合成途径中, 分别将合成红霉素PKS原有的6个模块减少至1个、2个、3个或者5个, 然后将具有环化功能的硫酯酶(thioesterase, TE)结构域分别连于其后, 结果相应减短后的PKS催化合成了二酮、三酮、四酮和六酮化合物<sup>[4-6]</sup>。这说明TE具有广泛的底物特异性, 对聚酮体结构也有一定的宽容性, 因此通过直接改变它的位置可以间接调整产生聚酮化合物的链长度。

### 2.2 PKS中模块的增加

Rowe等<sup>[6]</sup>以合成红霉素和雷帕霉素的PKS为研究对象, 首次成功地实现了模块添加的设想。方法是将合成雷帕霉素的PKS中模块2和模块5分别插入到减短后的DEBS1-TE的模块1和模块2之间, 结果得到了在相应位置多出一个结构单位的四酮化合物(图1); 将合成雷帕霉素的PKS中模块2和模块5分

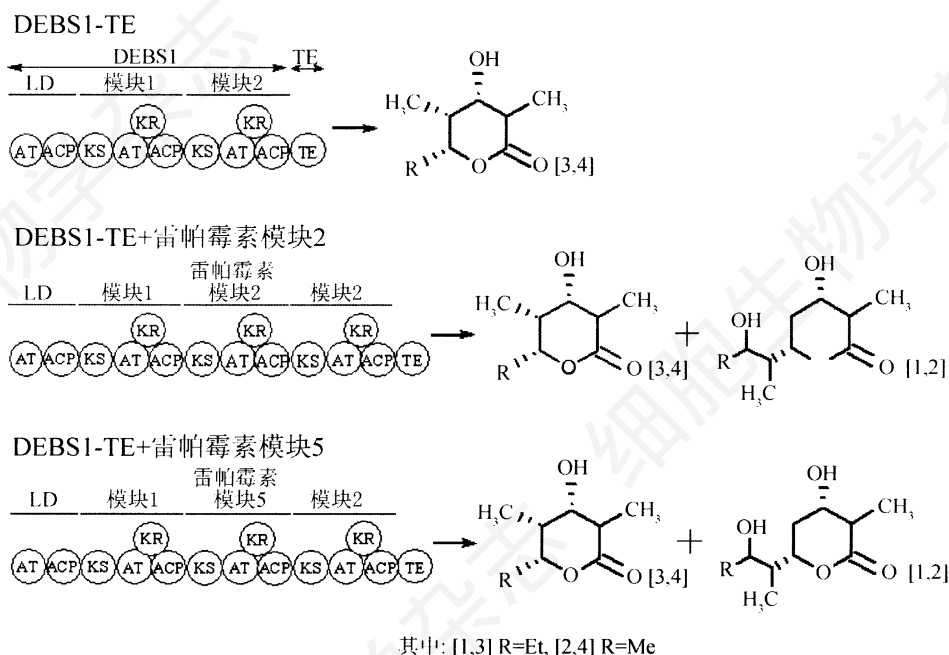


图1 DEBS1-TE与分别插入雷帕霉素模块2或5后的对照<sup>[6]</sup>

别插入到全长的合成红霉素的 PKS 中模块 1 和模块 2 之间, 结果得到了在相应位置多出一个结构单位的十六元环的聚酮化合物。

### 2.3 PKS 中模块的替换

在红霉素 DEBS1 的 N 端有一个称为荷载域 (loading domain, LD) 的 AT 和 ACP 域。LD 是 PKS 基因簇的作用靶点, 它以丙酰辅酶 A 为起始单位通过 ACP 泛酰基转移至 DEBS1 的 KS1 半胱氨酰活化位点。已知不同的 LD 对底物的选择性不同, 利用 LD 对底物的宽容性, 用异源替换原 LD 可以改变所接受的起始单元, 从而获得新的聚酮化合物, 如阿维菌素的 LD 可以加载多达 40 余种不同的化合物作前体<sup>[7]</sup>。将阿维菌素的 LD 移接到红霉素 DEBS1 的 N 端, 改造后的 DEBS1-TE 在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中除产生了新的化合物外, 还能接受阿维菌素生物合成的起始单位异丁酸或 2-甲基丁酸而产生新的三酮体。Marsden 等<sup>[8]</sup>用阿维菌素的 LD 替换红霉素的 LD, 在构建的糖多孢红霉菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 突变体中, 产生了以阿维菌素生物合成起始单位异丁酸和 2-甲基丁酸为起始物的红霉素衍生物, 添加不同的前体则可合成 C-13 位为异丙基、2-丁基等红霉素 A、B 和 D 衍生物。由于有许多支链羧酸可以成为阿维菌素的前体, 因此利用阿维菌素 LD 广泛的底物特异性可以获得多种红霉素衍生物。类似地, Pfeifer 等<sup>[9]</sup>用来源于合成利福霉素的 LD 替换红霉素的 LD 也合成了在 C-13 位结合苯环的红霉素衍生物。

## 3 PKS 模块中结构域的组合生物合成

在不同的模块中减少、增加或者替换结构域是组合生物合成形成新化合物的基因操作重点。

### 3.1 模块中结构域的减少

1991 年, 首次报道了对红霉素生物合成途径中 PKS 结构域进行改造的研究<sup>[9]</sup>, 方法是合成红霉素 PKS 模块 5 的 KR 结构域去掉使其功能失活, 得到了一个 5 位是酮基的新化合物。虽然形成的新化合物不具有生物活性, 但是实验的成功首次证明了可以通过组合生物合成技术定向改造 PKS 产生新的红霉素前体 6-脱氧红霉内酯 B (6-deoxyerythronolide B, 6-dEB) 的类似物。此后又有文献报道可将 TE 结构域直接连接到 DEBS1 上, 缩短后的 PKS 基因依然能够发挥作用, 产生了不同于原有十四元大环内酯的三酮内酯化合物<sup>[10]</sup>。此外, 在以红霉素 PKS 为操作对象

进行的大量试验中也有许多新的化合物产生<sup>[11]</sup>。

### 3.2 模块中结构域的增加

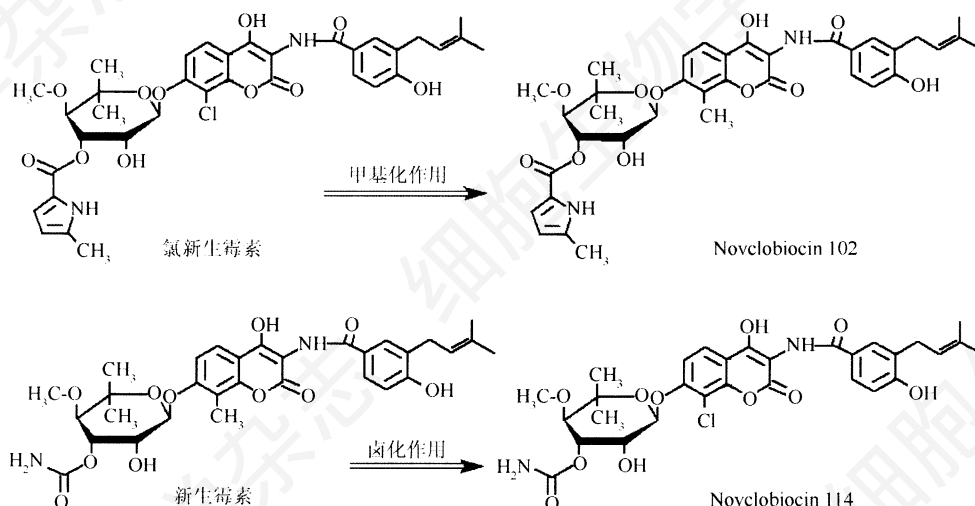
McDaniel 等<sup>[12]</sup>将合成红霉素 PKS 模块 2 的 KR 结构域替换为来自于合成西罗莫司 PKS 模块 4 的 DH-KR 结构域, 与原模块的结构域相比相当于增加了一个 DH 结构域, 得到了一个含有 C=C 双键的化合物。类似地, Kao 等<sup>[13]</sup>将合成红霉素 PKS 模块 2 的 KR 结构域替换为合成西罗莫司 PKS 模块 1 的 DH-ER-KR 结构域, 得到了一个新的八元环化合物。由此可见, KR 结构域对底物的要求较宽容, 可接受许多非天然底物。由于不同来源的结构域没有非常严格的底物特异性, 因此可在不同的 PKS 中发挥相应的酶催化活性。

### 3.3 模块中结构域的替换

不同 PKS 模块选用不同的聚酮链延伸单位, 不同 AT 结构域识别不同的聚酮链延伸单位, 相互替换或者置换 AT 结构域可以导致新的聚酮化合物的产生<sup>[14]</sup>。如用合成雷帕霉素 PKS 模块 2 中具有丙二酰专一性的 AT 2 结构域替换 DEBS1-TE 模块 1 中具有甲基丙二酰专一性的 AT 1 结构域, 产生了两个在内酯环的 C-4 位都缺少一个甲基的新三酮内酯<sup>[15]</sup>。Lin 等<sup>[16]</sup>第一次尝试在全长的 PKS 中进行结构域的替换。他们用合成雷帕霉素 PKS 模块 2 中 AT 结构域替换合成红霉素 PKS 模块 1 中 AT 结构域, 产生了在 C-2 位缺少一个甲基侧链的新化合物。由于 PKS 模块中各个 AT 结构域对底物的结构和立体构型都有相当严格的要求, 因此, 进一步地突变 AT 结构域可以改变其底物特异性, 拓宽创制新化合物的可能性。此外, 对底物特异性要求较宽松的 KR 结构域有时可决定聚酮体上甲基或羟基手性中心的立体构型, 因此, 可以用异源替换原合成红霉素 PKS 模块中的 KR 结构域, 使得 6-dEB 中的羟基构型 (S-型或者 R-型) 发生转变, 进而改变 6-dEB 的立体结构。如用合成雷帕霉素 PKS 模块 2 中的 KR 2 结构域替换合成红霉素 PKS 模块 6 中的 KR 5 结构域, 合成了 3-位羟基差向异构的 6-dEB 衍生物<sup>[17]</sup>。

## 4 聚酮类化合物合成后的修饰

微生物代谢产生的聚酮体一般只有被引入羟基、羰基、双键等结构, 或者与脂肪酸、氨基酸进行酰化后, 或者进行 O-甲基化、N-甲基化、C-甲基化, 或者聚酮体糖苷化后才具有生物活性。因此, 当聚酮化合物中主体碳链骨架形成后, 可以通过进行结构修饰, 如糖基化、氧化和还原 (包括羟基化

图2 氯新生霉素的甲基化作用和新生霉素的卤化作用<sup>[23]</sup>

作用、环氧化作用、羰基或双键的还原和乙醇的氧化等)、甲基化、异戊二烯化、卤化以及酰基化等使其具有生物活性或者使其某些性质逐步最优化,从而更有利于其作为临床药物等的应用。

#### 4.1 糖基化作用

糖基化作用包括体内或体外不同的糖苷化或者不同的糖苷配基化,是最适合于进行组合应用的过程<sup>[18,19]</sup>,参与糖基合成的编码基因均可作为组合生物合成的设计对象。Perez等<sup>[20]</sup>对链霉菌脱氧糖生物合成基因进行重新构建,用于4个D-脱氧糖(D-olivose, D-oliose, D-digitoxose, D-boivinose)的生物合成。在*Streptomyces albus 16F4*中进行这些基因簇的表达,结果有3个糖基化的丁省霉素(tetracenomycins)产生并表现生物活性,其中两个(D-digitoxosyl-tetracenomycin C和D-boivinosyl-tetracenomycin C)都是新的化合物。在近来有关大环内酯类抗生素那波霉素(narbomycin)生物合成途径中desosaminyl转移酶DesVII及其伴随蛋白DesVIII(最佳活性所必需)的研究中,证明了脱氧糖供体和糖苷配基受体间不严格的底物特异性<sup>[21]</sup>,可以使用化学合成产生的非天然供体,产生了19种新的糖基化大环内酯物。

#### 4.2 羟基化作用

PKS催化的聚酮体通常被细胞色素P450单氧化酶氧化,不同PKS基因簇的氧化酶特异性不同,对P450氧化酶特性的深入研究可以拓宽组合生物合成的应用。如在苦霉素(picromycin)picK基因编码的P450氧化酶作用下,那波霉素通过羟基化作用可以转化为苦霉素。这是由于picK羟基化酶识别3位不带糖苷的聚酮体,比红霉素eryK羟基化酶更适合用于

酮内酯类的羟基化。由于酮酯类化合物对大环内酯耐药菌比较有效,C-12位羟基化是酮内酯体进一步被胍基取代的必要过程,因此羟基化作用尤为重要。由*Amycolatopsis mediterranei*发酵得到的天然产物利福霉素B(rifamycin B)不具有口服活性,通过羟基化作用使其芳环上的OCH<sub>2</sub>COOH基团转变为OH基团,同时对羟基邻位引入适当基团,则使其成为口服活性化合物,同时又增强了效力,如临床上使用的利福平(rifampicin)<sup>[22]</sup>。

#### 4.3 甲基化和卤化作用

氯新生霉素(chlorobiotin)和新生霉素(novobiocin)是两种结构类似的芳香糖苷类抗生素,主要区别在于糖基取代作用模式不同。Eustaquio等<sup>[23]</sup>对氯新生霉素进行甲基化作用,将其氯原子用甲基取代;对新生霉素进行卤化作用,将其甲基用氯原子取代,结果分别得到了新的化合物novclobiocin 102和novclobiocin 114(图2)。

## 5 小结与展望

如上述举例所示,借助微生物的多样性和代谢产物的多样性,可以实现产生大量“非天然”天然产物的愿望,而组合生物合成被公认为这方面非常有效的一种方法<sup>[24-26]</sup>。然而,在实际应用中尚有一些问题存在。首先,组合生物合成依赖于生物合成途径中酶的不严格底物特异性,然而由于多数的酶具有较强的底物特异性致使有些预测的结果未能发生;其次,改造后的生物合成途径在合成新的代谢产物的量上通常比野生型合成天然产物的量低。这有可能是因为遗传构造尚未达到最理想的表达形式,加之合成途

径中的酶通常会对结构上改变的底物功效降低所致。再者,就是诸如在不同的宿主中能否表达改变的路径、调控机制对外源基因能否很好地进行调节等问题。此外,聚酮内酯环形成后进行的配糖体糖苷化、内酯环不同C-位甲基化、羟基化或糖C-位酰基化等修饰作用的正确操作方面还需进一步地完善,因为PKS合成产物后的修饰作用对于最终形成的化合物是否具有生物活性或药理活性至关重要。

近年,聚酮化合物作为新药开发中最成功的候选化合物所具有的医用价值和商业价值是显著的<sup>[27]</sup>,通过研究聚酮化合物生物合成途径而发展起来的组合生物合成也有飞速的发展<sup>[28,29]</sup>。通过组合生物合成技术改变次级代谢产物的生物合成途径以产生更多具有生物活性的天然产物,或者是改变天然产物原有的某些生物活性以使其药理学活性增强,进而实现更深入的结构-活性关系研究。聚酮类抗生素的组合生物合成应用体现的尤为明显<sup>[30,31]</sup>。目前,组合生物合成的研究主要集中在以下3个方面<sup>[32]</sup>:(1)对有价值的化合物类似物进行定向操作从而改进其活性或药效;(2)在已有的结构中添加功能性基因从而更好地进行修饰作用;(3)产生高级的中间产物从而用于天然产物的化学合成。

应用组合生物合成技术对天然产物生物合成途径基因进行设计、改造和修饰已使越来越多具有生物活性的化合物产生,这为新药开发和应用研究奠定了物质来源基础。今后,组合生物合成在药物的发现、最优化以及生产等方面仍有巨大的潜力和广阔

的应用前景,其必将是21世纪制药产业的重要方向。

### 参考文献(References)

- [1] Shen B. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, **7**: 285
- [2] Ganesan A. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**: 584
- [3] Floss HG. *J Biotechnol*, 2006, **124**: 242
- [4] Bohm I et al. *Chem Biol*, 1998, **5**: 407
- [5] Xue Q et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 11740
- [6] Rowe CJ et al. *Chem. Biol*, 2001, **8**: 475
- [7] Dutton CJ et al. *J Antibiot*, 1991, **44**: 357
- [8] Marsden AF et al. *Science*, 1998, **279**: 199
- [9] Pfeifer BA et al. *Science*, 2001, **291**: 1790
- [10] Cortes J et al. *Science*, 1995, **268**: 1487
- [11] Li T et al. *Chem Biol*, 2000, **7**: 77
- [12] McDaniel R et al. *J Am Chem Soc*, 1997, **119**: 4309
- [13] Kao CM et al. *J Am Chem Soc*, 1997, **119**: 11339
- [14] Bedford D et al. *Chem Biol*, 1996, **3**: 827
- [15] Oliynyk M et al. *Chem Biol*, 1996, **3**: 833
- [16] Liu L et al. *J Am Chem Soc*, 1997, **119**: 10553
- [17] McDaniel R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 1846
- [18] Yang J et al. *Med Chem*, 2004, **12**: 1577
- [19] Luzhetskyy A et al. *Mol Microbiol*, 2005, **58**: 3
- [20] Perez M et al. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 6644
- [21] Borisova SA et al. *Angew Chem Int Edn Engl*, 2006, **45**: 2748
- [22] Floss HG et al. *Chem Rev*, 2005, **105**: 621
- [23] Eustaquio AS et al. *Chem Biol*, 2004, **11**: 1561
- [24] Staunton J et al. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, **5**: 159
- [25] Walsh CT. *Chembiochem*, 2002, **3**: 125
- [26] Reeves CD. *Crit Rev Biotechnol*, 2003, **23**: 95
- [27] Kira JW et al. *Nat Microbiol*, 2005, **3**: 925
- [28] Weber T et al. *J Biotechnol*, 2003, **106**: 221
- [29] Amnuaykanjanasin A et al. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **251**: 125
- [30] Menzella HG et al. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**: 1171
- [31] Chandran SS et al. *Chem Biol*, 2006, **13**: 469
- [32] McDaniel R et al. *Chem Rev*, 2005, **105**: 543

## The Combinatorial Biosynthesis of Polyketide

Hui-Juan Huang, Jian-Jun Qiao\*

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract** Combinatorial biosynthesis has been accepted as a useful method to produce a larger number of “unnatural” natural products. And it also has received a great attention in innovation and application of new drugs in recent years. It is now feasible to generate biologically active compounds by combinatorial biosynthesis, and some progress has been made with polyketides. Depending on examples of the literature, this paper reviews the opportunities for increasing structural diversity among natural products by combinatorial biosynthesis. Some of the problems and limitations encountered with the approaches are also discussed.

**Key words** combinatorial biosynthesis; polyketide; natural product

Received: January 19, 2007 Accepted: May 18, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570042)

\*Corresponding author. Tel: 86-22-27400388, Fax: 86-22-87402107, E-mail: jianjunq@tju.edu.cn