

• 综述 •

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2017.11.06

II 型硫脂酶与次生代谢产物合成

乔龙亮, 朱 鹏*, 庞建虎

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要 II 型硫脂酶(type II thioesterases, TEII)属于 α/β 水解酶,含有保守的催化三元件(Ser-His-Asp),广泛存在于非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetases, NRPS)和聚酮合成酶(polyketide synthases, PKS)系中。与I型硫脂酶(type I thioesterases, TEI)不同,TEII作为一个独立的蛋白质行使硫脂键水解功能。以往的数据研究发现,合成途径中TEII基因缺失导致聚酮(polyketides, PK)或非核糖体肽(nonribosomal peptide, NRP)的产量显著降低。本文通过对硫酯酶(thioesterases, TE)的聚类分析,显示序列同源性方面TE聚类成两个不同的进化枝,一个含有所有TEI,第二个包含所有TEII。对TEII的多序列比对及结构分析,结果显示TEII序列中的标记序列“GHSMG”为保守序列,结构的差异性导致TEII功能的差异性,综合前期相关数据研究,对TEII在生物合成中的功能途径进行了概括性论述,并对其今后在次生代谢物合成研究中的应用进行了展望,以期加深对TEII的认识和理解。

关键词 聚酮合酶; 非核糖体肽合成酶; II 型硫脂酶; 编辑功能; 次生代谢

中图分类号 Q814.9; Q556; Q71

Type II Thioesterases and Their Role in the Synthesis of Secondary Metabolites

QIAO Long-Liang, ZHU Peng*, PANG Jian-Hu

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

Abstract Type II thioesterases (TEII) belong to α/β hydrolase and contain a conserved catalytic element (Ser-His-Asp), which is widely found in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS) systems. Unlike type I thioesterase (TEI), TEII act as separate protein to perform thioester bond hydrolysis. Previous literature data demonstrated that the absence of the TEII gene in the synthetic pathway leads to a significant reduction in the yield of polyketides (PK) or nonribosomal peptide (NRP). In this paper, clustering analysis of thioesterase (TE) showed that the sequence homology of TE was clustered into two different evolutionary branches, one containing all TEI and the second containing all TEII. The sequence alignment and structure analysis of TEII exhibited that the marker sequence “GHSMG” in the TEII sequence was a conserved sequence, and the different structure leads to the difference in the function of TEII. The functional pathway of TEII in biosynthesis was discussed in detail, and its future application in secondary metabolite synthesis was prospected by previous research to provide readers with a better understanding of the perspective of TEII.

收稿日期: 2017-03-27; 修回日期: 2017-05-10; 接受日期: 2017-05-19

宁波市科技攻关项目(No. 2017C110003); 浙江省公益技术应用研究(No. 2017C33133)和国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. CARS-49)

* 通讯作者 Tel: 057487609572; E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn 1

Received: March 27, 2017; Revised: May 10, 2017; Accepted: May 19, 2017

Supported by Ningbo Science and Technology Research Projects, China (No. 2017C110003) and Zhejiang Provincial Public Welfare Technology Program of China (No. 2017C33133) and the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System, China (No. CARS-49)

* Corresponding author Tel: 057487609572; E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn

Key words polyketide synthases; nonribosomal peptide synthetases; type II thioesterase; editing function; secondary metabolism

在聚酮合酶 (polyketide synthases, PKS) 和非核糖体肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetases, NRPS) 的基因簇中广泛存在着 II 型硫脂酶 (type II thioesterase, TEII) 编码基因^[1-3]。TEII 分子量大约为 25 ~ 29 kD, 氨基酸序列同源性比对显示, TEII 属于 α/β 水解酶超级家族的成员, 具有该家族特征的 Ser-Asp-His 三联体催化活性位点 (catalytic triad)。I 型硫脂酶 (type I thioesterase, TEI) 位于 PKS 和 NRPS 碳末端, 可有效的环化并水解释放完成延伸的聚酮或聚肽链, 而 TEII 作为一个单独的蛋白质行使硫脂键水解功能。

在 PKS 或 NRPS 催化反应过程中, 约 80% 的辅酶 A (CoA), 4'-磷酸泛酰巯基乙胺辅因子的前体, 被乙酰化^[2], 产生大量不能被 PKS 或 NRPS 延伸所利用的中间产物, 例如乙酰基和丙酰基。因此, 需要把这些无用的中间产物通过水解硫脂键从肽载体蛋白 (peptidyl carrier protein; PCP) 或酰基载体蛋白 (acyl carrier protein; ACP) 上清除, 从而确保聚酮 (polyketides, PK) 或非核糖体肽 (nonribosomal peptide, NRP) 生物合成的高效运转。目前已在许多 PKS 或 NRPS 基因簇中发现了 II 型硫脂酶基因, 这正契合了纠正 PKS 或 NRPS 合成过程中潜在错误的需求。2001 年, Heathcote 等通过对 TEII (Tylo) 的研究, 第一次阐明了 TEII 的作用机制。TEII 的作用是水解延伸过程中异常脱羧单元与 ACP 结合的酰基-N-乙酰基半胱胺硫酯 (N-acetylcysteamine

thioester; SNAC), 使得链的延伸能够正常进行^[4]。TEII 基因缺失导致聚酮或非核糖体肽的产量显著降低^[5-7], 推测 TEII 与产物的合成效率相关。在 PKS 和 NRPS 合成途径中, TEII 的纠错编辑功能十分显著, 但在有些 PKS 或 NRPS 基因簇中不存在 TEII 基因^[4, 8], 其原因尚且不明。TEII 作为一个单独的蛋白质行使硫脂键水解功能, 其不仅可以通过纠错编辑作用去除非反应性酰基残基, 还具有其他功能, 例如参与 PKS 或 NRPS 的启动单元控制^[9-11]、释放产物^[12, 13] 以及提供中间体^[7, 14]。

关于硫酯酶在次生代谢物生物合成中的作用研究, 从上世纪末到现在一直备受关注。以 'thioesterase' 为关键词, 在 PubMed 数据库中检索, 从 1997 年到 2017 年, 共发表相关文献 1 177 篇。特别是近 5 年 (2012-2016 年), 发表文献量呈现整体上升趋势, 在 2013 年达到峰值 88 篇 (Fig. 1)。然而, 在众多文献中, 关于 TEII 的报道较少。以 'type II thioesterase' 为关键词, 在 PubMed 数据库中, 只能搜到 94 篇, 占有文献 8%, 国内也鲜有报道。而 TEII 在聚酮或非核糖体肽生物合成中的地位不容忽视。本文结合国内外相关文献, 从进化上对硫酯酶进行了聚类分析, 并在多序列比对以及结构上进行了分析, 并对 TEII 在生物合成途径中的功能途径进行了概括性论述, 最后, 对其今后在次生代谢物合成研究中的应用进行了展望, 以期加深对 TEII 的认识和理解。

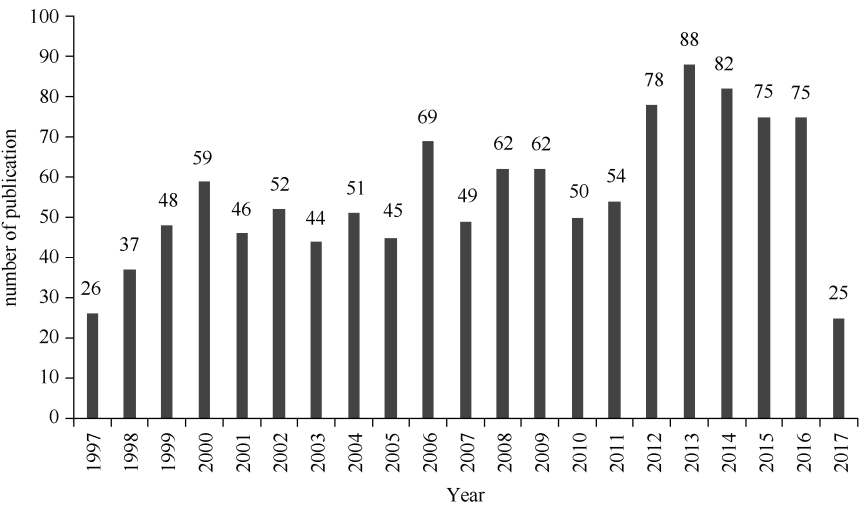


Fig. 1 Summarizes the number of publications related to 'research of thioesterase' from 1997 to 2016 The data were calculated according to the PubMed in NCBI

1 从进化上分析硫酯酶之间的关系

通过 MEGA version 5 软件分析^[15],采用近邻结合法(neighbor-joining, NJ),在硫酯酶蛋白质序列基础上创建了硫酯酶结构域的系统发育树,包括所有已知类型的硫酯酶(PKS,NRPS 和混合 PKS / NRPS 的 I 型水解和环化硫酯酶,以及来自所有 3 个系统

的 II 型 TE)的 34 个蛋白质序列。在这些进化枝内,序列形成的分支通常对应于它们的来源系统(例如,PKS、NRPS 或混合的 PKS-NRPS)。从 Fig. 2 发现,硫酯酶聚类成 2 个不同的进化枝,1 个含有所有 TEI,第 2 个包含所有 TEII。相比 TEI 来源于 NRPS、PKS、混合 PKS / NRPS 系统,TEII 则主要来源于 NRPS 和 PKS 系统,还有一小部分来源于 FAS 系统。

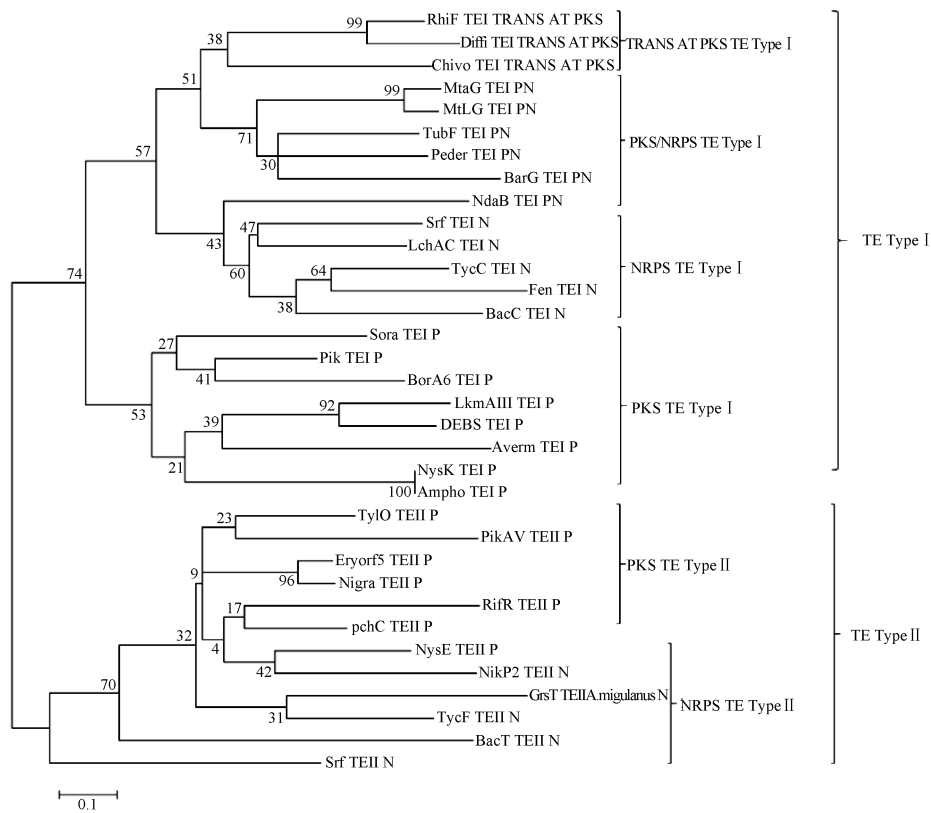


Fig. 2 Analysis of phyletic evolution of thioesterase This analysis included 34 protein sequences representing all known types of TE domains (type I hydrolytic and macrocyclization catalysts from PKS, NRPS and mixed PKS/ NRPS, as well as Phylogenetic tree analysis of various type I and II TE proteins from PKS and NRPS systems generated by neighbor-joining. The designations TEI and TEII reflect whether the thioesterases exist as integral domains within a PKS or NRPS subunit (TEI) or as discrete proteins (TEII). The type of cluster to which each TE belongs is given (P = PKS, N = NRPS, PN = PKS/NRPS hybrid)

2 II 型硫酯酶的多序列比对分析

从 NCBI 下载 5 个 TEI 氨基酸序列和 5 个 TEII 氨基酸序列,各自的 GenBank 为 Srf TEI: 1JMK; DEBS TEI: 1MO2; Pik TEI: 2HFJ; TycC TEI: AAC45930.1; Fen TEI: AAB00093.1; Tylo TEII: AAA21345; RfR TEII: AAG52991; Srf TEII: 2RON; Eryorf5 TEII: AAA26497; NikP2 TEII: CAC11138。通过 The European Bioinformatics Institute(EMBL-EBI)中 Clustal Omega 在线工具对 TEI 和 TEII 氨基酸序列进行比对。从 Fig. 3A 可以看出,不同 TEI 在蛋白

质一级序列上的保守位点数量较少(用黑色星号标出),说明 TEI 之间的总体同源性偏低。同样,从 Fig. 3B 中可以看出,不同 TEII 在蛋白质一级序列上的保守位点数量也较少,但相较于 TEI,TEII 之间的同源性较高。有趣的是,TEI 的标记序列为“GXSXG”,而 TEII 的保守序列为“GHSMG”。在 TEI 和 TEII 序列中存在着经典催化三联体,活性位点包含残基 Ser、Asp 和 His,其中 Ser 残基就分别包含在标记序列“GXSXG”和“GHSMG”中。但有些 TEI 和 TEII 例外^[16, 17],其 Ser 残基被 Cys 残基替代,形成“GXCXG”的保守序列。已有相关文

(Ser86, Asp189, His216)^[24] 仅被短环 (Gln138-Ala144) 部分覆盖。并且与 SrfTEI 相比,变得更容易接近。TEII 和 TEI 的活性位点所在空腔的比较显示,尽管 TEII 的空腔开放得很大,但可用于容纳连接到磷酸泛酰巯基乙胺基团的空间是相当有限的 (Fig. 4C,D)。基于残留电子密度的七肽的建模表明,TEI 空腔能够容纳整个肽,并且实施环化的构象,与 TEI 较深的碗形腔相反,SrfTEII 的活性位点嵌入浅沟槽中,其仅容纳磷酸泛酰巯基乙胺上的小酰基取代基。这对于区别 TEII 和 TEI 在次级代谢通路中所行使的功能有着重要作用。典型的 TE 都

含有保守的催化三元件 (Ser-His-Asp),起到终止反应和释放产物的功能。其中,Asp 对 His 残基有稳定作用,通过 His 接受 Ser 羟基的质子 H,使 Ser 残基的亲核试剂 O 进攻 PCP/ACP-酰硫酯键中羰基碳,最终形成肽/酰-O-TE 中间产物。中间产物可被水解形成线性多肽和小酰基取代基,或被分子内的亲核基团攻击而形成环化产物。因为 TEII 的活性位点嵌入浅沟槽中,浅沟槽提供的疏水环境较 TEI 的碗形腔差,更容易受到外界亲核基团 (水) 的进攻。所以,TEII 只能起到水解功能。而 TEI 既能起到水解功能,又能起到环化功能。

Table 1 Comparison of TEI and TEII

| Type of TE | N- terminus of α-helix | Catalytic triad | An additional helix between Asp and His | Active sitecavities | Function |
|------------|------------------------|-----------------|---|---------------------|-------------------------|
| TEI | Longer | Ser-Asp-His | NO | Wide/deep | Hydrolysis/ cyclization |
| TEII | Shorter | Ser-Asp-His | YES | Shallow | hydrolysis |

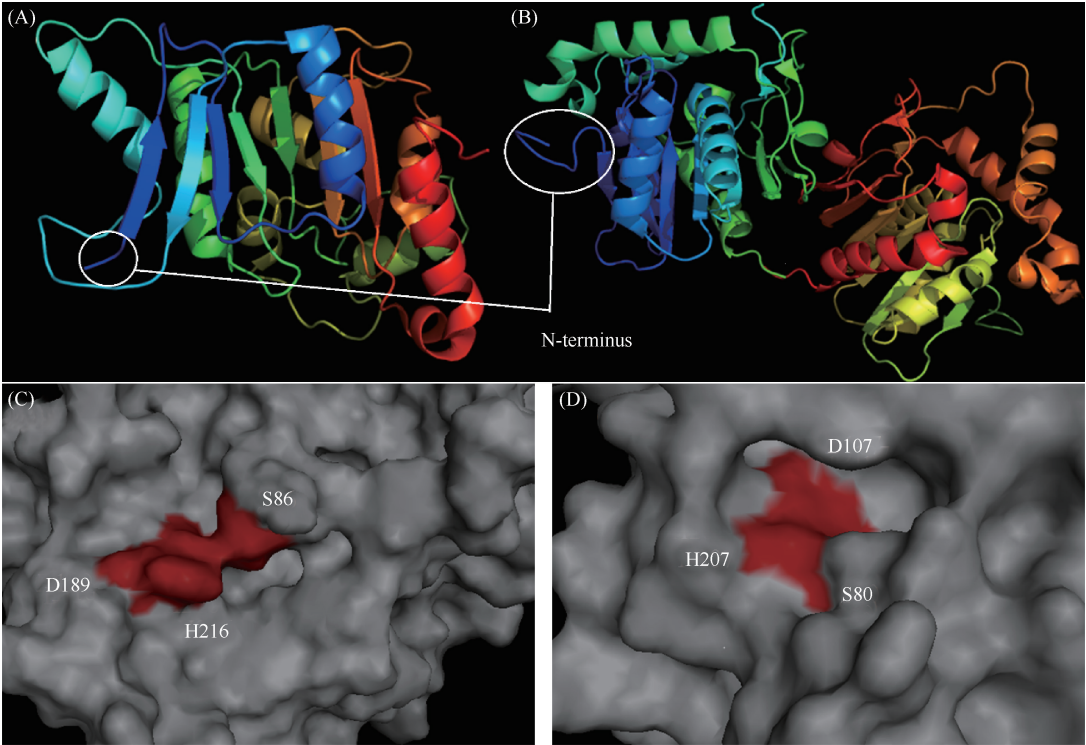


Fig.4 Structural comparison of SrfTEI and SrfTEII The crystal structure of SrfTEI (A); PDB code: 1JMK) compared to SrfTEII (B); PDB code: 2RON) shows significant differences in the N-terminal part including the relative position of the first two β-strands. Both structures are color coded from blue (N-terminus) to red (C-terminus). The active site of the SrfTEII enzyme (C) is located in a shallow groove and is ideally suited to interact with small molecules attached to the phosphopantetheine cofactor of the holo-T domain. The crystal structure of SrfTEI (D) shows a deep and wide cavity that can accommodate the entire peptide attached to the cofactor. The catalytically active residues of both enzymes are colored in red^[23]

在 PDB (Protein Data Bank) 数据库中,Claxton 等成功地获得了利福霉素 TEII (rifamycin TEII,

RifR) 的晶体,RifR 的活性位点是包含残基 Ser94、Asp200 和 His228 的经典催化三联体,RifR 的三联

体残基分别在 α/β 水解酶折叠链 $\beta 4$ (Ser)、 $\beta 6$ (Asp) 和 $\beta 7$ (His)^[1]。在标记序列 Gly92-His93-Ser94-Xaa95-Gly96 内发现的活性位点丝氨酸,位于折叠链 $\beta 4$ 和螺旋链 $\alpha 3$ 之间,并且具有亲核肘型的典型约束几何形状。许多氢键位于催化中心的残基上,值得注意的是,标记序列的 His93 与主链上活性位点 His228 的羰基形成氢键,稳定其三联体内的排列,在次生代谢物产生途径中,TEII 中该残基突变至 Ala 引起产物产量大幅降低,这对于理解 TEII 能够稳定行使其功能具有重要作用。

TEII 在催化三联体残基 Asp 与 His 之间存在 3 个额外的 α 螺旋,它们形成镶嵌在 α/β 水解酶折叠链 $\beta 5$ 和 $\beta 6$ 之间的 α -螺旋“lid”,前 2 个螺旋($\alpha L1$ 和 $\alpha L2$)形成“lid”顶部的短发夹结构,第 3 个螺旋($\alpha L3$)形成“lid”的后部。Lid 反向折叠成“O”构象有利于磷酸泛酰巯基乙胺进入活性位点。Whicher 等通过对 TEII 晶体研究,发现 RifR 和 RedJ 的“lid”结构具有相同的折叠,但它们之间存在小的差异,特别是在 $\alpha L1$ 和“lid”相对于核心的取向上,这些差异导致 RedJ 的疏水口袋比 RifR 的疏水口袋大。因此,TEII 的底物选择性以及它们的功能可以由“lid”区域中的微小变化所决定,其通过序列分析不可检测^[7]。RedJ 在不存在长链配体的情况下, $\alpha L1$ 覆盖疏水口袋约 40% 表面,在长链配体存在下, $\alpha L1$ 向蛋白质外部移动,完全露出疏水口袋。TEII 和 NRPS TE 的晶体与 NMR 结构证明,这些单体 TE 中的“lid”是可移动的,并且可控制底物接近活性位点^[1, 25, 26],RedJ 的晶体结构也显示出“lid”的移动性。来自两个晶体结构的 8 个 RedJ 分子显示底物通道($\alpha L2$ 和 $\alpha L3$)出现 8 种不同构象,包括完全打开和完全关闭。“lid”的移动和“lid loop”的可变通性可影响“疏水口袋”的大小和形状,这对底物的特异性选择发挥重要作用,导致在行使编辑功能时会出现不同的作用途径。

4 II 型硫酯酶编辑功能途径

4.1 去除非反应性酰基残基

在 PKS 或 NRPS 催化反应过程中,产生大量不能被 PKS 或 NRPS 延伸所利用的中间产物,例如乙酰基和丙酰基。其错误机制源于 2 种情况,第 1 种情况,酮基合成酶(ketosynthase, KS)可能在其半胱氨酸活性位点未加载延伸链的情况下催化加载于酰基载体蛋白上的延伸单位(丙二酸单酰或甲基丙二酸单酰)的脱羧反应,从而导致了非聚合的脱羧反

应(noncondensative carboxylation reaction)^[3, 27],这个次级反应导致 ACP 上加载了不能被延伸使用的乙酰基或丙酰基(Fig. 5A)。第 2 种情况,不能被 PKS 或 NRPS 延伸反应所利用的中间产物也可能产生于活化 ACP 或 PCP 的过程。磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(phosphopantetheinyl transferase, PPTase)负责把源自 CoA 的磷酸泛酰巯基乙胺转移到 ACP 或 PCP 的色氨酸活性位点,使得 ACP 或 PCP 成为有生理功能的蛋白质(holo-ACP 或 holo-PCP)^[28]。磷酸泛酰巯基乙胺作为 ACP 的附基,其磷酸基团一端与 ACP 的保守丝氨酸残基呈磷脂键连接,其巯基基团一端与酰基基团形成硫脂键,从而使得 ACP 加载上酰基基团,所以,PPTases 也可以利用乙酰-CoA 作为辅酶,给 ACP 或 PCP 上加载一个乙酰基磷酸泛酰巯基乙胺硫脂,使得不能被 PKS 或 NRPS 延伸过程使用的乙酰基加载于 ACP 或 PCP 上^[24](Fig. 5B)。

表面活性素(surfactin)在菌体中高效表达,主要依赖于 TEII_{surf} 的作用,当 TEII_{surf} 失活后,表面活性素的表达量相对于野生型减少了 84%。Schwarzer 等研究人员^[24]在体外的生化实验中,将 TEII_{surf} 分别与氨酰基-PCP、肽基-PCP 和乙酰基-PCP 混合,结果显示 TEII 更偏向于水解乙酰基-PCP 底物。

FscTE 和 TyIO 作为两个典型的 PKS 途径的 TEII,前者来自杀念菌素(candicidin)合成途径,而后者来自泰勒菌素(tylosin)合成途径^[29]。Zhou 等^[29]将杀念菌素基因簇中的 TEII 基因(*fsc TE*)沉默后,发现 candicidin 产量降低 89%,在体外生化实验中,FscTE 和 TyIO 对 PKS 延伸过程无法利用的乙酰基或丙酰基的硫脂键均表现出显著的水解活性,而对聚酮合成延伸底物丙二酸单酰或甲基丙二酸单酰硫脂键仅有微弱的水解催化活性。tylosin 合成途径中的 TEII(TyIO)可以显著水解酰基-ACP 的模拟底物丙酰基氮-乙酰半胱胺硫脂(propionyl-SNAC)或乙酰基氮-乙酰半胱胺硫脂(acetyl-SNAC)。TyIO 基因的失活使聚酮化合物的产量降低至正常水平的 10-15%。将 TyIO 基因回补至突变个体后又恢复了野生型聚酮化合物的产量。苦霉素(pikromycin)合成途径中的 TEII(PikAV)可以水解丙酰或乙酰-ACP,甚至还可以显著的水解聚酮延伸单位丙二酸单酰-ACP^[3, 30]。

4.2 启动单元的控制

TEII 除了可以在装配线中去除非反应性酰基残基,TEII 还可以从起始模块中 ACP 上除去“不理想的”酰基(Fig. 5C)。丙酸酯(propionate)是 6-脱氧

红霉素内酯 B(6dEB)合成的正确起始单元,它是糖化多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)I 型 PKS 产生的红霉素前体。*TEII* 基因的失活产生 15-去甲红霉素的混合物(15-norerytromycin),但聚酮化合物的总产量仍保持在正常水平的 80% 左右。Hu 等将乙酰基、丙酰基和丁酰基残基分别连接到 *DEBS* 加载模块(ACP_L)和 *DEBS*(ACP_2)作为底物,并用 *TEII* 分别作用底物,发现 *TEII* 仅对与 ACP_L 结合的乙酰基有活性,得出的结论是 *TEII* 参与装载模块对启动单元的控制。*TEII* 可以从起始模块功能域 ACP 上选择性地水解乙酰基而保留丙酰基,从而确保以丙酰基为起始单位的红霉素糖苷配基的合成,与此相对应,缺失该 *TEII* 基因导致以乙酰基为起始单位的红霉素糖苷配基的生成^[9]。

肠毒素(enterocin)是来自海洋放线菌聚酮合酶的产物,苯甲酸甲酯(benzoate)是合成它的正确起始单元。Kalaitzis 等^[10]在体外实验中,酶促合成乙酰基-EncC 和苯甲酰基-EncC,然后分别与 *TEII*(EncL)以等摩尔量孵育,通过 FT-MS 实时监测反应,观察到乙酰基-EncC 快速减少,并伴随 hol-EncC 的产生,相比之下,苯甲酰基-EncC 在相同的时间段内保持不变。这表明,EncL 在水解苯甲酰基-EncC 上优先水解乙酰基-EncC,从而更加支持 *TEII* 在起始单元中所起的编辑作用。EncL 属于 FabD(丙二酰-ACP / CoA 转移酶)同系物,类似于其他 FabD 同系物,如来自 R1128 PKS 的 ZhuC,来自柔红霉素(daunorubicin)PKS 的 DpsD。Tang 和 Castaldo 等也验证了它们通过水解乙酰基残基而用正确起始单元启动 ACP^[31, 32]。

在纳他霉素(natamycin, NTM)生物合成途径中,scn ACP_{0-1} 和 scn ACP_{0-2} 需要加载的正确起始酰基单元是乙酰基。由于丙酰基与乙酰基在结构上最为接近,丙酰基单元会非特异性地加载到 scn ACP_{0-1} 和 scn ACP_{0-2} 。在体外实验中,*TEII*(ScnI)分别水解来自延伸 ACP(甲基丙二酰基-S- ACP_7 和丙二酰基-S- ACP_{10})和来自起始 ACP(乙酰基-S- ACP_{0-1} 和丙酰基-S- ACP_{10})结果显示,ScnI 更易水解丙酰基-S- ACP_{10} ^[11]。

4.3 释放产物

现有研究表明,母体聚酮化合物的制备和随后的氧化环化级联仅发生在 ACP 结合的中间体上。在典型的大环内酯 PKS 中,最初形成的聚酮化合物产物通过专用的顺式作用硫酯酶(TEI)从 PKS 直接释放,形成衍生的大环内酯^[33]。相比之下,聚醚离

子载体抗生素如莫能菌素(monensin)、南昌霉素(nanchangmycin)和尼日利亚霉素(nigericin)PKS 基因簇都缺乏这样的固有的模块化 TEI^[34-36]。每个聚醚的生物合成基因簇具有独立的 II 型 *TE* 基因,负责把成熟聚醚从 ACP 结构域进行反式水解释放^[37]。

Liu 等发现,NanE(*TEII*)可以水解南昌霉素-SNAC^[12]。当南昌链霉菌(*S. nanchangensis*)的 *NanE* 基因缺失时,该突变菌株不产生南昌霉素或任何其它可鉴别的相关聚酮化合物产物。肉桂地链菌(*S. cinnamomensis*)的 MonCII(*TEII*)和两种莫能菌素-SNAC 混合后,也具有类似水解催化功能^[38]。肉桂链霉菌的莫能菌素 PKS 基因簇含有其它两种编码 *TEII* 的基因,即 *monAIX* 和 *monAX*,这些基因的缺失导致莫能菌素产量的适度下降,并且发现 *MonAIX* 可以有效地水解乙酸残基。

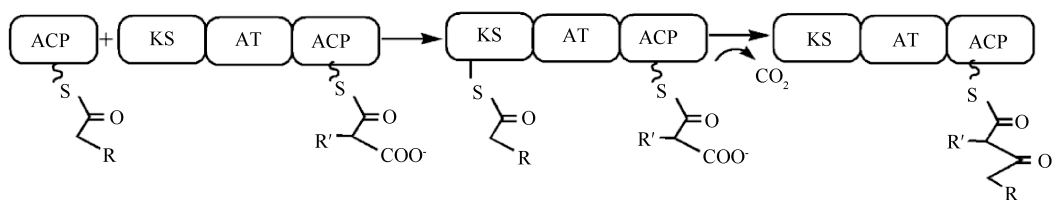
Xu 等发现,土曲霉(*Aspergillus terreus*)的洛伐他汀(lovastatin)生物合成簇中 LovG(*TEII*)具有从 PKS 蛋白释放二氢莫拉菌素 L 酸(dihydromonacolin L acid)和除去异常中间体的作用^[13]。当 *lovG* 基因被沉默后,洛伐他汀产量显著降低,但仍然有少量产生(少于 5%),这主要因为 LovG 可以由土曲霉内源性硫酯酶替代,只是效率较低。

4.4 提供中间体

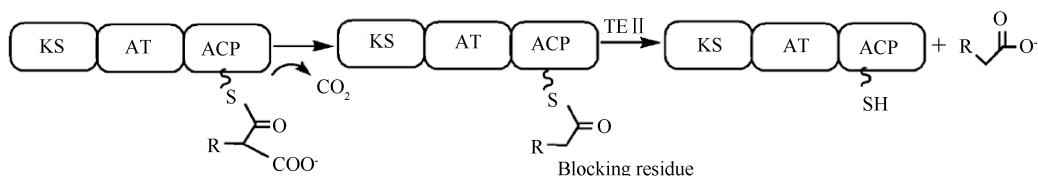
在次级代谢途径中发现,*TEII* 能够从载体结构域释放中间体,使得它们被随后的蛋白质进一步加工。灵杆菌素(prodigines)是一类由链霉菌 A3(2)(*S. coelicolor* A3(2))通过杂合 PKS / NRPS 系统(red gene cluster)合成的生物活性产物,红色基因产物与脂肪酸合成过程中主要代谢酶一同起作用,通过硫酯键连接到 RedQ(ACP)的十二酰基链上。Whicher 等发现,RedJ(*TEII*)有利于将十二酰基从 RedQ 转移到多结构域蛋白质 RedL 上,在多结构域蛋白质 RedL 上进一步延伸,*RedJ* 基因的缺失导致灵杆菌素产量降低 75%^[7]。

在尼克霉素抗生素(nikkomycin antibiotics)生物合成中, β -羟基-His 通过 NikP2(*TEII*)从乳腺 NRPS NikP1 上释放,并进一步转化为在尼克霉素 X/I 中发现的咪唑酮碱。唐德链霉菌(*Streptomyces tendae*Tü901)中 *NikP2* 基因被破坏后,突变株不能产生尼克霉素 X / I,但不影响尼克霉素 Z / J 的生产,尼克霉素 Z / J 中咪唑酮碱基被尿嘧啶碱基替代^[14]。

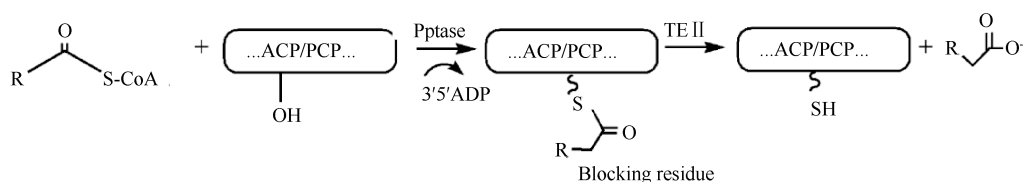
(A) Correct decarboxylative condensation



Incorrect decarboxylative condensation



(B) Mispriming of carrier domain



(C) Control of starter unit

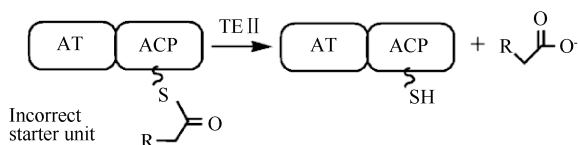


Fig. 5 Roles of type II thioesterases (TEIIs) associated with polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases

Wavy line represents 4'phosphopantetheine (4'PP). KS: ketosynthase, AT: acyltransferase, ACP: acyl carrier protein, PCP: peptidyl carrier protein. (A) Normal polyketide chain elongation starts with a decarboxylative condensation catalyzed by the KS domain. Incorrect decarboxylation of an extender unit without condensation gives rise to an acyl residue attached to the ACP. Editing TEII hydrolyzes the acyl residue and leaves the ACP free to accept a new, dicarboxylated extender unit transferred by the AT domain. (B) ACP and PCP domains are primed with a cofactor 4'PP which is transferred by a 4'PP transferase from coenzyme A (CoA). 4'PP transferases can also accept acyl-CoA as a substrate and misprime carrier domains with acyl-4'PP, thus making the attachment site inaccessible for an extender unit. Editing TEII hydrolyzes the acyl residue and leaves the carrier domain free to accept a correct substrate. (C) TEII influences the choice of the starter unit by specific hydrolysis of some residues attached to the ACP of the loading module. The residue which is not cleaved becomes a starting unit for the polyketide chain

5 问题与展望

大量的抗生素和其他工业上重要的微生物次级代谢物,由 PKS 和 NRPS 合成^[39]。利用合成生物学方法通过重新组合方式,改变 PKS 和 NRPS 结构域的模块组成俨然成为一种趋势,该方法对新化合物合成提出了新的合理设计,尽管在该领域取得了一些进展,但是这种“非天然”产物的产量通常远未实现适用于工业规模生产。许多 PKS 和 NRPS 性能可高效发挥,主要依赖于 TEII,更重要的是,负责中间体或产物释放的 TEII 是不可或缺的。目前,尚不清楚为什么有些 PKS 和 NRPS 必须伴随着 TEII,而有

些不受 TEII 失活影响。可以推测,细胞中游离与酰化的 CoA 的比例和 PPTase 的特异性的变化可能是 ACP(PCP)错误引导频率差异的原因。有意思的是,在有些 PKS 和 NRPS 基因簇中,未发现 *TEII* 基因,而有些却存在多个 *TEII* 基因^[38],它们可能分别具有专门的功能。一般来说,天然或异源 TEII 的共表达能够显著提高最终化合物的产量。然而,也有文献报道,由于正确的底物被 TEII 去除而不利于提高最终化合物的产量。本文建议,在设计由 PKS 和 NRPS 模块构建的人工系统时,应仔细考虑包含适当的 TEII,需要注意的应包括底物特异性和水解速率。另外,TEII 可用于影响起始单元选择。由水解

酶控制链的长度似乎是高度还原性迭代 PKS 的共同特征,可用于产生新化合物。遗憾的是,目前还不能在序列分析的基础上详细地预测 TEII 的特异性,并且它们必须根据实际情况进行研究。TEII 是非常值得作进一步研究,它们在构建新的生物合成机器中具有很大的潜力。

参考文献 (References)

- [1] Claxton H B, Akey D L, Silver M K, *et al.* Structure and functional analysis of RifR, the type II thioesterase from the rifamycin biosynthetic pathway [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284** (8): 5021-5029
- [2] Conti E, Stachelhaus T, Marahiel M A, *et al.* Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S [J]. *EMBO J*, 1997, **16** (14): 4174-4183
- [3] Kim B S, Cropp T A, Beck B J, *et al.* Biochemical evidence for an editing role of thioesterase II in the biosynthesis of the polyketide pikromycin [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (50): 48028-48034
- [4] Heathcote M L, Staunton J, Leadlay P F. Role of type II thioesterases; evidence for removal of short acyl chains produced by aberrant decarboxylation of chain extender units [J]. *Chem Biol*, 2001, **8** (2): 207-220
- [5] Butler A R, Bate N, Cundliffe E. Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae* [J]. *Chem Biol*, 1999, **6** (5): 287-292
- [6] Schneider A, Marahiel M A. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *Arch Microbiol*, 1998, **169** (5): 404-410
- [7] Whicher J R, Florova G, Sydor P K, *et al.* Structure and function of the RedJ protein, a thioesterase from the prodiginine biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor* [J]. *J Biol Chem*, 2011, **286** (25): 22558-22569
- [8] Zhao C, Ju J, Christenson S D, *et al.* Utilization of the methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus for cloning the oxazolomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* JA3453 [J]. *J Bacteriol*, 2006, **188** (11): 4148-4152
- [9] Hu Z, Pfeifer BA, Chao E, *et al.* A specific role of the *Saccharopolyspora erythraea* thioesterase II gene in the function of modular polyketide synthases [J]. *Microbiology*, 2003, **149** (Pt 8): 2213-2225
- [10] Kalaitzis J A, Cheng Q, Meluzzi D, *et al.* Policing starter unit selection of the enterocin type II polyketide synthase by the type II thioesterase Encl [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, **19** (22): 6633-6638
- [11] Wang Y Y, Ran X X, Chen W B, *et al.* Characterization of type II thioesterases involved in natamycin biosynthesis in *Streptomyces chattanoogaensis* L10 [J]. *FEBS Lett*, 2014, **588** (17): 3259-3264
- [12] Liu T, Lin X, Zhou X, *et al.* Mechanism of thioesterase-catalyzed chain release in the biosynthesis of the polyether antibiotic nanchangmycin [J]. *Chem Biol*, 2008, **15** (5): 449-458
- [13] Xu W, Chooi Y H, Choi J W, *et al.* LovG: The thioesterase required for dihydromonacolin L release and lovastatin nonaketide synthase turnover in lovastatin biosynthesis [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, **52** (25): 6472-6475
- [14] Lauer B, Russwurm R, Schwarz W, *et al.* Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin [J]. *Mol Gen Genet*, 2001, **264** (5): 662-673
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28** (10): 2731-2739
- [16] Serino L, Reimann C, Visca P, *et al.* Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 1997, **179** (1): 248-257
- [17] Pullan S T, Chandra G, Bibb M J, *et al.* Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes [J]. *BMC Genomics*, 2011, **12**: 175
- [18] Shaw-Reid C A, Kelleher N L, Losey H C, *et al.* Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization [J]. *Chem Biol*, 1999, **6** (6): 385-400
- [19] Li J, Szittner R, Derewenda Z S, *et al.* Conversion of serine-114 to cysteine-114 and the role of the active site nucleophile in acyl transfer by myristoyl-ACP thioesterase from *Vibrio harveyi* [J]. *Biochemistry*, 1996, **35** (31): 9967-9973
- [20] Linne U, Schwarzer D, Schroeder G N, *et al.* Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis [J]. *Eur J Biochem*, 2004, **271** (8): 1536-1545
- [21] Witkowski A, Naggert J, Witkowska H E, *et al.* Utilization of an active serine 101-cysteine mutant to demonstrate the proximity of the catalytic serine 101 and histidine 237 residues in thioesterase II [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267** (26): 18488-18492
- [22] Cantu D C, Chen Y, Reilly P J. Thioesterases: a new perspective based on their primary and tertiary structures [J]. *Protein Sci*, 2010, **19** (7): 1281-1295
- [23] Koglin A, Löhr F, Bernhard F, *et al.* Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. [J]. *Nature*, 2008, **454** (7206): 907-911
- [24] Schwarzer D, Mootz H D, Linne U, *et al.* Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99** (22): 14083-14088
- [25] Samel S A, Wagner B, Marahiel M A, *et al.* The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: A structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide [J]. *J Mol Biol*, 2006, **359** (4): 876-889
- [26] Koglin A, Löhr F, Bernhard F, *et al.* Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase [J]. *Nature*, 2008, **454** (7206): 907-911
- [27] Heathcote M L, Staunton J, Leadlay P F. Role of type II thioesterases; evidence for removal of short acyl chains produced by aberrant decarboxylation of chain extender units [J]. *Chem Biol*, 2001, **8** (2): 207-220
- [28] Kotowska M, Pawlik K, Butler A R, *et al.* Type II thioesterase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. *Microbiology*, 2002, **148** (Pt 6): 1777-1783
- [29] Zhou Y, Meng Q, You D, *et al.* Selective removal of aberrant extender units by a type II thioesterase for efficient FR-008/candicidin biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain FR-008 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74** (23): 7235-7242
- [30] Chen S, Roberts J B, Xue Y, *et al.* The *Streptomyces venezuelae* pikAV gene contains a transcription unit essential for expression of enzymes involved in glycosylation of narbonolide and 10-deoxymethynolide [J]. *Gene*, 2001, **263** (1-2): 255-264
- [31] Tang Y, Koppisch A T, Khosla C. The acyltransferase homologue from the initiation module of the R1128 polyketide synthase is an acyl-ACP thioesterase that edits acetyl primer units [J]. *Biochemistry*, 2004, **43** (29): 9546-9555
- [32] Castaldo G, Zucko J, Heidelberger S, *et al.* Proposed arrangement of proteins forming a bacterial type II polyketide synthase [J]. *Chem Biol*, 2008, **15** (11): 1156-1165
- [33] Khosla C, Gokhale R S, Jacobsen J R, *et al.* Tolerance and specificity of polyketide synthases [J]. *Annu Rev Biochem*,

1999, **68**: 219-253

[34] Oliynyk M, Stark CB, Bhatt A, *et al.* Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of monB and monC genes in oxidative cyclization [J]. *Mol Microbiol*, 2003, **49**(5): 1179-1190

[35] Harvey B M, Mironenko T, Sun Y, *et al.* Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137 [J]. *Chem Biol*, 2007, **14**(6): 703-714

[36] Sun Y, Zhou X, Dong H, *et al.* A complete gene cluster from *Streptomyces nanchangensis* NS3226 encoding biosynthesis of the polyether ionophore nanchangmycin [J]. *Chem Biol*, 2003, **10**(5): 431-441

[37] Liu T, You D, Valenzano C, *et al.* Identification of NanE as the thioesterase for polyether chain release in nanchangmycin biosynthesis [J]. *Chem Biol*, 2006, **13**(9): 945-955

[38] Harvey B M, Hong H, Jones M A, *et al.* Evidence that a novel thioesterase is responsible for polyketide chain release during biosynthesis of the polyether ionophore monensin [J]. *Chembiochem*, 2006, **7**(9): 1435 - 1442

[39] Boddy C N. Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non-ribosomal peptides [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, **41**(2): 443-450

更正

朱玥荃,王文恭,薛丽香. 一种新型 SUMO E3 连接酶 CBX4 的化学修饰作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, **32**(2): 115-122. 该文 3.2 部分(119 页)“因此这样就形成了一个 CBX4 与底物作用蛋白质之间化学修饰的反馈调节环路(Fig. 4)”更改为“因此这样就形成了一个 CBX4 与底物作用蛋白质之间化学修饰的反馈调节环路(Fig. 2)” ;Fig.4 英文图题及图注(119 页)“**Fig.4 The schematic diagram of CtBP1 sumoylation** CBX4 can be sumoylated through E3 ligase and combine to the H3K28me3, which induces the transcriptional respression. SENP3 maintains a low level of CBX4 through de-sumoylation and guarantees the regular transcription”更正为“**Fig.4 The schematic diagram of CBX4 sumoylation** CBX4 can be sumoylated through E3 ligase and combine to the H3K27me3, which induces the transcriptional respression. SENP2 maintains a low level of CBX4 through de-sumoylation and guarantees the regular transcription”。

Corrections & Amendments

ZHU Yue-Quan, WANG Wen-Gong, XUE Li-Xiang. CBX4 with Chemical Modification as a New Type SUMO E3 Ligase. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biol*, 2016, **32**(2): 115-122. The text in Page 119 “因此这样就形成了一个 CBX4 与底物作用蛋白质之间化学修饰的反馈调节环路(Fig. 4)” should be “因此这样就形成了一个 CBX4 与底物作用蛋白质之间化学修饰的反馈调节环路(Fig. 2)”. Figure legend of Fig. 4 in Page 119 “**Fig. 4 The schematic diagram of CtBP1 sumoylation** CBX4 can be sumoylated through E3 ligase and combine to the H3K28me3, which induces the transcriptional respression. SENP3 maintains a low level of CBX4 through de-sumoylation and guarantees the regular transcription” should be “**Fig. 4 The schematic diagram of CBX4 sumoylation** CBX4 can be sumoylated through E3 ligase and combine to the H3K27me3, which induces the transcriptional respression. SENP2 maintains a low level of CBX4 through de-sumoylation and guarantees the regular transcription”。