

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-080

环番合成酶 PacB 催化 Xye 类核糖体肽翻译后修饰研究

韩沅均^{1,2}, 莫天录¹, 邓子新¹, 张琪², 丁伟¹⁽¹⁾ 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240; ⁽²⁾ 复旦大学化学系, 上海 200243)

摘要: 近年来, 一类含有分子内三残基环番结构的新型核糖体肽引起了广泛关注。这类化合物通常由一类 S-腺苷甲硫氨酸自由基酶催化核心肽中芳香氨基酸的 sp² 碳和相邻第三位氨基酸残基侧链的 sp³ 碳之间形成 C—C 或 C—O 键, 这类酶被称为三残基环番合成酶 (3-CyFEs)。目前发现 Xye 类核糖体肽天然产物生物合成基因簇中普遍含有此类三残基环番合成酶。本文报道从 *Photorhabdus australis* DSM 17609 中发现一个新的 Xye 类核糖体肽生物合成基因簇 *pac*。异源表达和体外活性重建表明其生物合成基因簇编码的三残基环番合成酶 PacB 负责 *pac* peptide 核心肽内的三个分子内环的生成。体内和体外实验结果初步表明 PacB 具有较高的底物容忍性, 三个环番结构相互独立形成, 但形成效率存在明显的差异, 从而初步揭示了三个环番的形成顺序。本研究拓展了对 Xye 类核糖体肽化合物家族翻译后修饰以及三残基环番合成酶催化功能的了解。

关键词: S-腺苷甲硫氨酸自由基酶; 三残基环番合成酶; 核糖体肽; 翻译后修饰

中图分类号: Q936 文献标志码: A

Study on the post-translational modification of RiPPs Xye catalyzed by CyFE PacB

HAN Yuanjun^{1,2}, MO Tianlu¹, DENG Zixin¹, ZHANG Qi², DING Wei¹

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; ⁽²⁾ Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200243, China)

Abstract: Cyclic ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) with macrocycles derived from three amino acid residues have attracted intense interest in recent years. Biosynthesis of these peptides usually involves a radical (S)-adenosylmethionine (rSAM) enzyme that catalyzes the formation of a C—C or C—O bond between an aromatic carbon and a side chain carbon of another residue. Such enzymes are named three-residue cyclophane forming enzymes (3-CyFEs). The rSAM enzyme family is known as one of the largest enzyme super families, which consists of more than 22000 members. rSAM enzymes are widely found in all three life domains as one of the earliest biocatalysts on earth. A large amount of microbial genomic information shows that many RiPPs

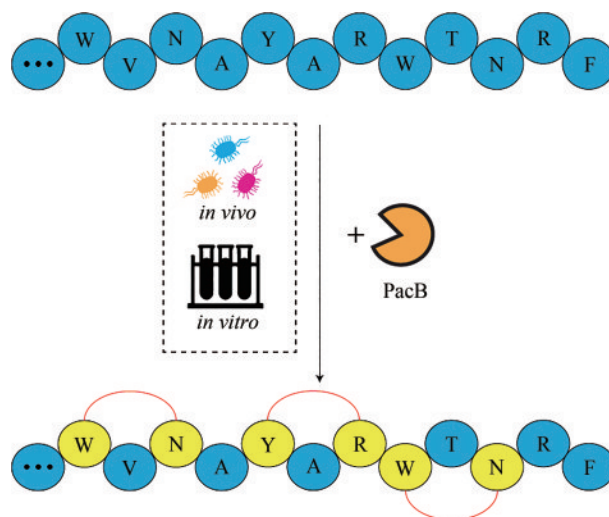
收稿日期: 2021-08-01 修回日期: 2021-08-12

基金项目: 科技部重点研发计划 (2018YFA0900402)

引用本文: 韩沅均, 莫天录, 邓子新, 张琪, 丁伟. 环番合成酶 PacB 催化 Xye 类核糖体肽翻译后修饰研究[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 826-836

Citation: HAN Yuanjun, MO Tianlu, DENG Zixin, ZHANG Qi, DING Wei. Study on the post-translational modification of RiPPs Xye catalyzed by CyFE PacB[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(5): 826-836

biosynthesis gene clusters contain rSAM enzymes. Recently, several 3-CyFEs from Xye gene clusters, which form three cyclizations on the precursor peptides, were reported. In this paper, we report a new Xye RiPP papeptide and its key biosynthetic enzyme PacB from *Photorhabdus australis* DSM 17609. We coexpressed the *pacA* and *pacB* in *Escherichia coli* and reconstituted the activity of heterologously expressed protein to investigate the bioactivity of 3-CyFEs PacB. The high-resolution mass spectrometry assay indicates that PacB indeed led to forming all three cyclophanes of papeptide. Additionally, the mutation of Asn/Arg to Gly on the precursor peptide resulted in only two cyclophane was found, which demonstrated that three cyclization reactions were generated independently with different efficiency. PacB also catalyzed all three cyclophanes formation on the precursor peptide with Asn/Arg mutated to Ala. These results expand our understanding of 3-CyFEs chemistry in natural product biosynthesis and provide insights into the post-modification of cyclic RiPPs with three-residue cyclophanes.



Keywords: rSAM enzyme; 3-CyFEs; RiPPs; post-translational modification

核糖体翻译后修饰肽 (ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides, RiPPs) 存在于所有的生物界中, 构成了具有结构和功能多样性的一大类天然产物家族^[1-2]。随着基因组数据的不断增长, 分析显示大量具有结构多样和活性潜力的RiPPs以及所涉及的生物合成酶仍未被挖掘和鉴定。在大多数RiPPs的生物合成途径中, 核心肽部分氨基酸残基间的环化是一种常见的后修饰方式^[3]。目前为止, 常见的RiPPs的环化的种类有硫醚交联 (lanthipeptide^[4-6] 和 sactipeptide^[7-9])、二硫键 (cystine knot proteins^[10])、N-to-C 环化 (orbitides^[11-13] 和 cyclotides^[14-16])、噻唑和咪唑杂环 (cyanobactins^[17-19]) 或取代吡啶 (thiopeptides^[20])。通常这些环化修饰增加了RiPPs结合亲和性和蛋白

水解稳定性, 导致它们产生多样化的生物活性, 从而具有良好的药物发展前景。

近年来, 含有环番结构的RiPPs化合物相继被发现^[21-22]。这些环番结构通常是由一个氨基酸的芳香族碳与另一个氨基酸的 β -碳交联成为C-C键或C-O键。如 Streptide^[23]、Darobactin^[24] 和 Triceptide-Fxs^[25]。它们在细菌中的生物合成途径通常涉及S-腺苷甲硫氨酸自由基 (rSAM) 酶, 该类酶能够裂解SAM形成5'-脱氧腺苷 (5'-dA) 自由基, 然后攫取底物上的一个氢原子生成底物自由基, 进一步生成结构多样化的最终产物^[26]。Darobactin是Imai等发现的一种新型作用机制的优秀的抗革兰氏阴性菌抗生素, 其是典型的含有环番结构的RiPP (图1)。Xye类核糖体肽因为其主要在

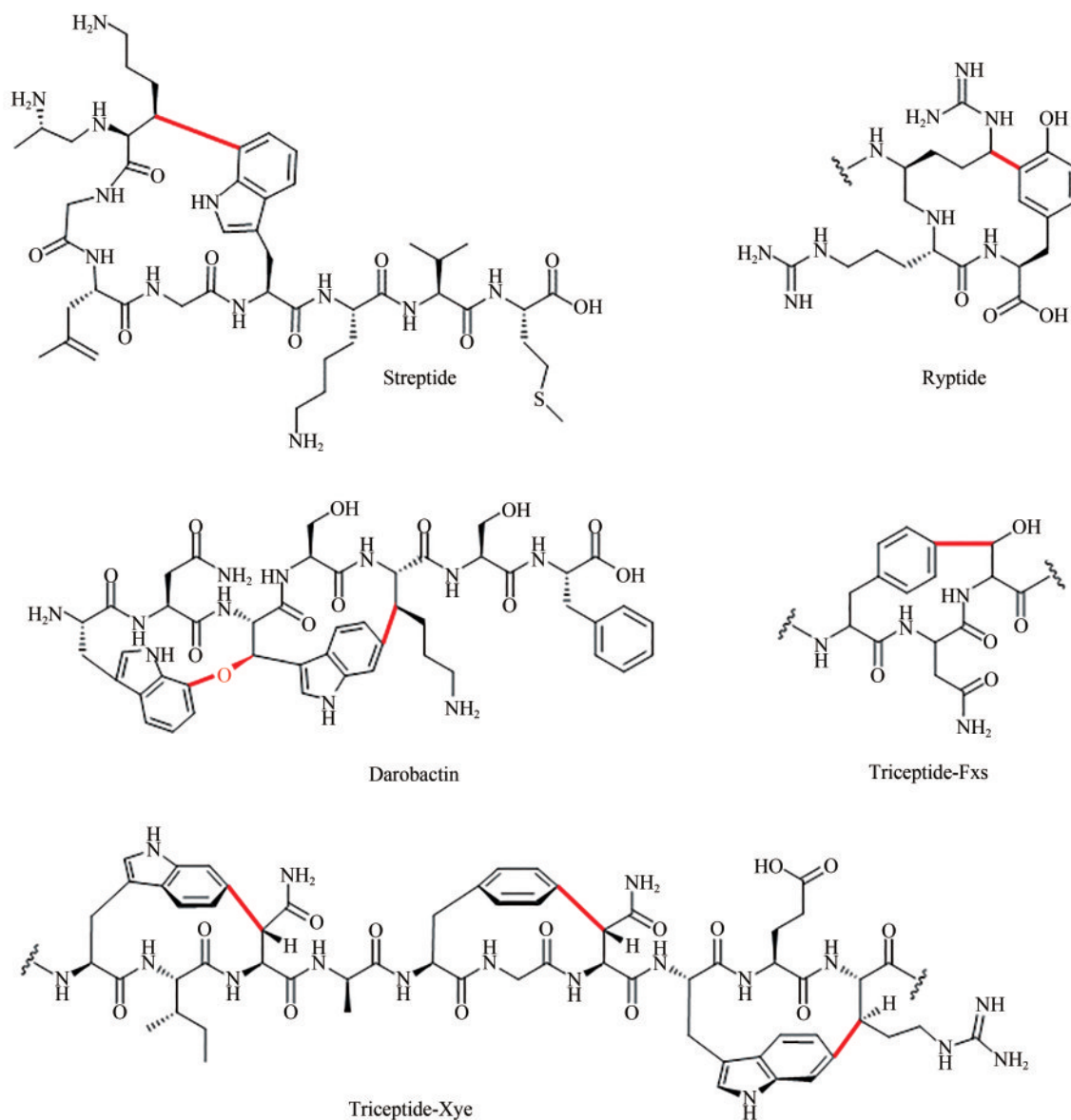


图1 含有环番结构的代表性核糖体肽

Fig. 1 Structures of several RiPPs with cyclophanes

Xenorhabdus、*Yersinia* 和 *Erwinia* 三个属的菌中被发现而得名^[22]。这类 RiPPs 前体肽的核心肽区域和 darobactin 的核心肽均富含芳香氨基酸，但是一般 Xye 基因簇中的 rSAM 酶与 darobactin 的 rSAM 修饰酶序列上差异较大^[22]，预示着二者修饰功能上存在一定的差异，从而导致最终的成熟天然产物的结构具有更大的多样性。Darobactin 是近年来发现的最优异的抗革兰氏阴性耐药菌的药物前体分子，这些吸引着我们探究 Xye 家族核糖体肽化合物的结构、活性以及翻译后修饰方式。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

基因全合成和引物合成由苏州金唯智生物有限公司（表1、表2）；质粒、菌株为课题组所有（表3）。

1.1.2 试剂和培养基

LB 培养基（1 L）：酵母提取物（yeast extract）5 g，NaCl 10 g，蛋白胨（tryptone）10 g。

表1 本工作中所涉及的基因

Tab. 1 Genes used in this study

名称	来源	核酸 accession number	蛋白 accession number
<i>pacA</i>	<i>Photorhabdus australis</i> DSM 17609	NZ_JONO01000005.1	WP_072023203.1
<i>pacB</i>	<i>Photorhabdus australis</i> DSM 17609	NZ_JONO01000005.1	WP_036768348.1

表2 本工作中所用到的相关引物

Tab. 2 Primers used in this study

引物	序列(5'-3')	功能
<i>pacA</i> -Q(-5)K For	TCTGCTCGACAAGATCTCTGGTGGTTGGGT	前体肽引入蛋白酶位点
<i>pacA</i> -Q(-5)K Rev	CACCAGAGATCTTGTCGAGCAGATCTTCTGTTA	前体肽引入蛋白酶位点
MBP- <i>pacA</i> -Q(-5)K-NdeI For	CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCAGCAGCCATCACCATCAT	前体肽表达
MBP- <i>pacA</i> -Q(-5)K-XhoI Rev	GGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTAAAAAGCGTTTGTCCATCTTGCGT	前体肽表达
<i>pacB</i> -NdeI For	CCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGTTAATTCATTAGTTAAGAAAAA	表达蛋白 PacB
<i>pacB</i> -XhoI Rev	GGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTACCAGCAATCGCTTTCATAAT	表达蛋白 PacB
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N3A For	GGTTGGGTGGCTGCTTACGCAAGATGGACA	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N3A Rev	TCTTGCCTAAGCAGCCACCCAACCACCAGAGAC	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-R7A For	GCTTACGCAGCATGGACAAACCGCTTTTAAGAAT	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-R7A Rev	GTTTGTCCATGCTGCGTAAGCATTACCCAAC	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N10A For	AGATGGACAGCCCGCTTTTAAGAATTCGAGCTC	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N10A Rev	TAAAAAGCGGGCTGTCCATCTTGCGTAAGCATTCA	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N3G For	GGTTGGGTGGGTGCTTACGCAAGATGGACAAAC	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N3G Rev	TGCGTAAGCACCACCCAACCACCAGAGATCTT	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-R7G For	GCTTACGCAGGATGGACAAACCGCTTTTAAGAAT	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-R7G Rev	GTTTGTCCATCCTGCGTAAGCATTACCCAAC	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N10G For	AGATGGACAGCCCGCTTTTAAGAATTCGAGCTC	前体肽点突变
<i>pacA</i> -Q(-5)K-N10G Rev	TAAAAAGCGGCCTGTCCATCTTGCGTAAGCATTCA	前体肽点突变

表3 本工作中所用菌株和质粒

Tab. 3 Strains and plasmids used in this study

菌株	功能	质粒	功能
<i>E. coli</i> DH5a	常规克隆用	pRSFduet-1	两基因共表达载体
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	蛋白表达, 基因簇表达	pDB1282	体内铁硫簇装配辅助质粒
		His ₆ -mbp- <i>pacA</i> - <i>pacB</i> -pRSFduet-1	<i>pacA</i> 和 <i>pacB</i> 共表达
		His ₆ -mbp- <i>pacA</i> -pET28a	制备前体肽 PacA
		His ₆ - <i>pacB</i> -pET28a	异源表达 rSAM 酶 PacB

LanA Start Buffer: 20 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.5 (25 °C), 500 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L 咪唑, 20% 甘油。

LanA Buffer 1: 6 mol/L 盐酸胍, 20 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.5 (25 °C), 500 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L 咪唑。

LanA Buffer 2: 4 mol/L 盐酸胍, 20 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.5 (25 °C), 300 mmol/L NaCl,

30 mmol/L 咪唑。

LanA Elution Buffer: 4 mol/L 盐酸胍, 20 mmol/L Tris, pH 7.5 (25 °C), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 咪唑。

分子生物学用的聚合酶、内切酶、连接酶、重组酶、核酸和蛋白 maker、培养基等购置于南京诺唯赞、上海生工、Sigma 和阿拉丁等公司。测序和引物合成由苏州金唯智和上海生工完成, 质粒

提取和凝胶回收试剂盒购置于天根生化。

1.1.3 仪器

赛默飞 Q Exactive HPLC/MS 液相质谱 (LC-MS) 联用仪, 英国赛默飞 Ultimate3000 高效液相色谱 (HPLC) 仪, 美国贝克曼 Avanti J-26S XP 高速冷冻离心机, 美国伯乐 GELDOCXRT 凝胶成像系统, 美国致微 GI80TW 高压灭菌锅, 德国 Eppendorf 5424 离心机, 美国伯乐 T100 PCR 扩增仪, 海尔-80 °C 冰箱, 美国伯乐电泳仪, 苏州净化有限公司 SW-CJ-ID 超净工作台, 移液枪 (梅特勒), 宁波新芝 UP250/JY92-IIN 超声粉碎仪, 摇床 (上海知楚), 上海一恒 DHP-9052/DHG-9070A 电热恒温培养箱, 梅特勒-托利 ME204E 电子天平。

1.2 未知核糖体肽成熟酶系统的大肠杆菌异源表达

Photorhabdus australis DSM 17609 前体肽 PacA 和 rSAM 酶 PacB 的氨基酸序列来源于 NCBI 数据库, 提交苏州金唯智生物有限公司进行基因全合成, 要求针对于大肠杆菌表达宿主进行密码子优化, 最终将基因克隆到表达质粒 pRSFduet-1 的 *Bam*H1/*Eco*RI 和 *Nde*I/*Xho*I 两个位点中。

全合成的表达质粒 (*pacA-pacB-pRSFduet-1*) 和铁硫簇装配辅助质粒 pDB1282 共转入表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 挑取单菌落于 5 mL LB 液体培养基 (Kan 50 μg/mL, Amp 100 μg/mL), 37 °C 过夜培养, 转入 50 mL LB 液体培养基 (Kan 50 μg/mL, Amp 100 μg/mL), 37 °C 培养 3~5 h, 待菌液 OD₆₀₀ 为 0.5 左右时, 先转入 1L LB 液体培养基 (Kan 50 μg/mL, Amp 100 μg/mL), 37 °C 培养 2~3 h, 待菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.4 时, 首先加入 2g/L L-阿拉伯糖, 37 °C 培养 2 h 左右诱导质粒 pDB1282 中铁硫簇装配辅助蛋白的表达; 待菌液浓度 OD₆₀₀ 达到约 0.6 时, 加入 0.1 mmol/L IPTG, 温度降为 18 °C, 摇床速度降到 80 r/min, 诱导表达 20 h。离心 10 min 收集菌体 (11 900g, 4 °C), 弃去上清后, 用 20 mL 的 LanA Start buffer 重悬菌体, 然后超声 30 min (频率 40%, 超 5 s, 暂停 55 s), 4 °C, 11 900g 4 °C 离心 1 h, 再次弃去上清后, 然后用 20 mL LanA Buffer 1 重悬菌体, 11 900g 4 °C 离心

30 min 去除不可溶的沉淀, 然后上清用 0.45 μm 滤器过滤去除不可溶颗粒, 上清流过 5 mL HiTrap-Ni 树脂的亲色谱柱, 用 2 倍柱体积 LanA Buffer 1 和 1 倍柱体积的 LanA Buffer 2 洗去非特异性结合的蛋白后, 用 1~3 倍柱体积的 LanA Elution Buffer 洗脱目标多肽。洗脱的多肽分子量 8000 左右, 少量的洗脱多肽利用透析袋进行脱盐, 经冷冻干燥后存储于 -80 °C 备用。少量多肽溶于 pH 7.6 的磷酸缓冲溶液 (PBS), 进行高效液相色谱质谱联用仪检测目标化合物的分子量, 在 ESI 离子源下高分辨率质量分析器能捕捉到多肽的多电荷分子量。对于化合物结构的进一步鉴定采用 HSEE^[27] 分析方法。对于化合物的 X_ye 预测和计算采用 mMass 分析软件^[28]。

1.3 rSAM 酶 PacB 的表达、纯化和 [4Fe-4S] 簇化学重构

将带有 SAM 自由基酶基因的表达质粒电穿孔转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中。挑选转化子接种在 5 mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 12 h。随后将其全部接种到 1 L 含有相应抗生素的 LB 液体培养基。放置在 37 °C 摇床中, 220 r/min 孵育至 OD₆₀₀ 到达约 0.8 后, 加入 IPTG 到终浓度为 0.2~0.4 mmol/L, 同时加入过滤除菌后的 100 mmol/L Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 溶液至终浓度为 0.1 mmol/L。在 18~20 °C 和 120 r/min 摇床中再孵育 18 h, 5000 r/min 离心 15 min, 弃掉上清收集菌体, 4 °C 直接进行蛋白纯化或储存在 -80 °C 待进一步使用。所有的 SAM 自由基酶蛋白纯化及化学重构操作均能在无氧手套箱中进行, 氧气含量小于 2 mL/m³。将上一步中异源表达目的蛋白的大肠杆菌, 用 lysis 缓冲液洗涤菌体并重新离心收集菌体。再使用 30 mL lysis 缓冲液重悬菌体, 冰水浴中进行超声破碎细胞, 超声工作时间 30 min, 超声 3 s, 间隔 17 s, 功率 250 W 超声完成后, 从手套箱中取出高速离心管, 取出前保证离心管密封防止接触空气, 4 °C 下 12 000 r/min 高速离心 1 h 后, 放回无氧手套箱中, 小心倒出上清。准备一根装有 2 mL 填料的镍柱, 用约 3 倍柱体积 lysis 缓冲液进行柱平衡后, 将收集到的菌体破碎上清, 流过镍

柱, 进行蛋白的装载。用洗脱缓冲液和 lysis 缓冲液配制含有不同咪唑浓度淋洗液, 一般使用含 50 mmol/L 咪唑的淋洗液 10~15 mL, 进行杂蛋白的洗脱。最后使用洗脱缓冲液洗脱约 5 mL, 收集目标组分, 一般为灰黑色的流出液。

对 SAM 自由基酶纯化后, 需要进行 [4Fe-4S] 簇的化学重构, 一般先向体系中缓慢逐滴加入终浓度 10 mmol/L DTT 保证体系处于还原状态, 随后加入蛋白当量 5~10 倍左右的 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$, 由于一般将需要重构蛋白稀释到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时的重构效果较好, 因此一般 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 用量为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。加入 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 后在 4 $^\circ\text{C}$ 下放置 30 min, 再加入与 $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4$ 等物质的量浓度的 Na_2S (一般分 2~3 次缓慢加入, 一边加入一边搅拌防止蛋白沉淀), 低温放置过夜, 完成 [4Fe-4S] 簇的化学重构。在化学重构后, 需要用 PD-10 脱盐柱 (美国 GE 公司) 对体系脱盐, 进行缓冲体系置换。PD-10 脱盐柱先用 5~10 mL 的脱盐缓冲液进行平衡, 随后根据使用说明, 加入固定量 2.5 mL 蛋白溶液进行上样, 弃掉上样时的流出液, 再用 3.5 mL 脱盐缓冲液洗脱, 收集含有 SAM 自由基酶的流出液, 一般为淡棕色或者棕黑色液体, 每 500 μL 封装为一管, -80 $^\circ\text{C}$ 冻存备用。

1.4 rSAM 酶 PacB 体外活性测试

SAM 自由基酶的反应都需要在无氧手套箱中进行, 氧气含量低于 2 mL/m^3 。一个典型的 PacB 酶活反应, 通常将 200 $\mu\text{mol/L}$ 的底物加入到含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 纯化的 PacB 蛋白的缓冲体系 (Tirs-HCl pH 8.0) 中, 随后加入 1~2 mmol/L DTH 在室温中放置 10~15 min, 最后加入 500 $\mu\text{mol/L}$ SAM 到反应体系中, 进行反应的引发。反应体系一般为 100~200 μL , 在室温孵育 2~5 h 后从手套箱中取出反应, 加入体积量为反应体系 5% 的 TFA 对反应进行猝灭。12 000 r/min 高速离心 10 min 后, 弃掉沉淀, 上清直接进行 HPLC 及 LC-HRMS 分析, 或者 -20 $^\circ\text{C}$ 进行冻存以便继续分析。反应中的对照组, 使用煮沸失活的 PacB 上清或者加入 5% TFA 失活的 PacB 上清。

2 结果与分析

2.1 前体肽基因 *pacA* 和 rSAM 酶基因 *pacB* 共表达

根据分析, 3-CyFEs 在进化上和大多功能解析清楚的 RiPPs 环化合成酶的距离很远, 表明其具有特殊的功能和催化机制。通过基因组挖掘, 发现 *Photorhabdus australis* DSM 17 609 基因组中含有一个尚未被报道的新型 Xye 类核糖体肽基因簇。为了将其与同一家族的其他基因簇区分开来, 在此将其称为 *pac*。其含有前体肽基因 *pacA* 和 rSAM 酶基因 *pacB* [图 2(a)]。为了验证前体肽和修饰酶基因的功能, 把前体肽基因 *pacA* 的 N 端组合六组氨酸 (6xHis) 和麦芽糖结合蛋白 (MBP) 标签, 并在 MBP 和前体肽 PacA 之间引入蛋白酶 TEV 限制性位点, 这样 *pacA* 和 *pacB* 共同构建入表达载体 pRSFDuet 中在大肠杆菌中进行共表达。为了获得序列较短的多肽以便于后续的质谱分析, 对非核心肽区域进行了突变, 将 -5 位点的 Gln 替换为 Lys 从而引入胰蛋白酶酶切位点。利用镍亲和色谱纯化前体肽后, 通过 TEV 蛋白酶消化, 获得经过 PacB 修饰的一段多肽 *pacpeptide*。对 *pacA+pacB* 共表达的纯化产物进行了高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 分析, 结果显示修饰后的 PacA 与未修饰比分子量明显减少 (减少了 6) [图 2(b)], 表明可能在前体肽上形成了 3 个 C-C 键。进一步的串联质谱分析证实, 这 3 个键发生在 C 端核心肽内的 WVN、YAR 和 WTN 基序上, 这与 Morinaka 等^[22]报道的其他 Xye 家族的核糖体肽的翻译后修饰方式一致。胰蛋白酶消化共表达产物获得的肽 *pacpeptide*, 观察到 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ 为 996.4891, 分子量损失为 6 的片段 1 (残基 -4 至 12) 作为 C 端肽的主要片段 [图 2(c)]。串联质谱检测到碎片离子 y^{12} 的 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 为 789.3711, y^9 的 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 为 590.7846, y^5 的 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 为 721.3398 (表 4), 表明分别在 WVN (环 A) 和 YAR (环 B) 间发生了脱氢环化, WTN (环 C) 之间的环化也在后续的天冬酰胺突变为丙氨酸后继续发生环化的实验中被进一步证实; 同时串联质谱的检测中, 未发现 Arg7 和 Trp8 之间的

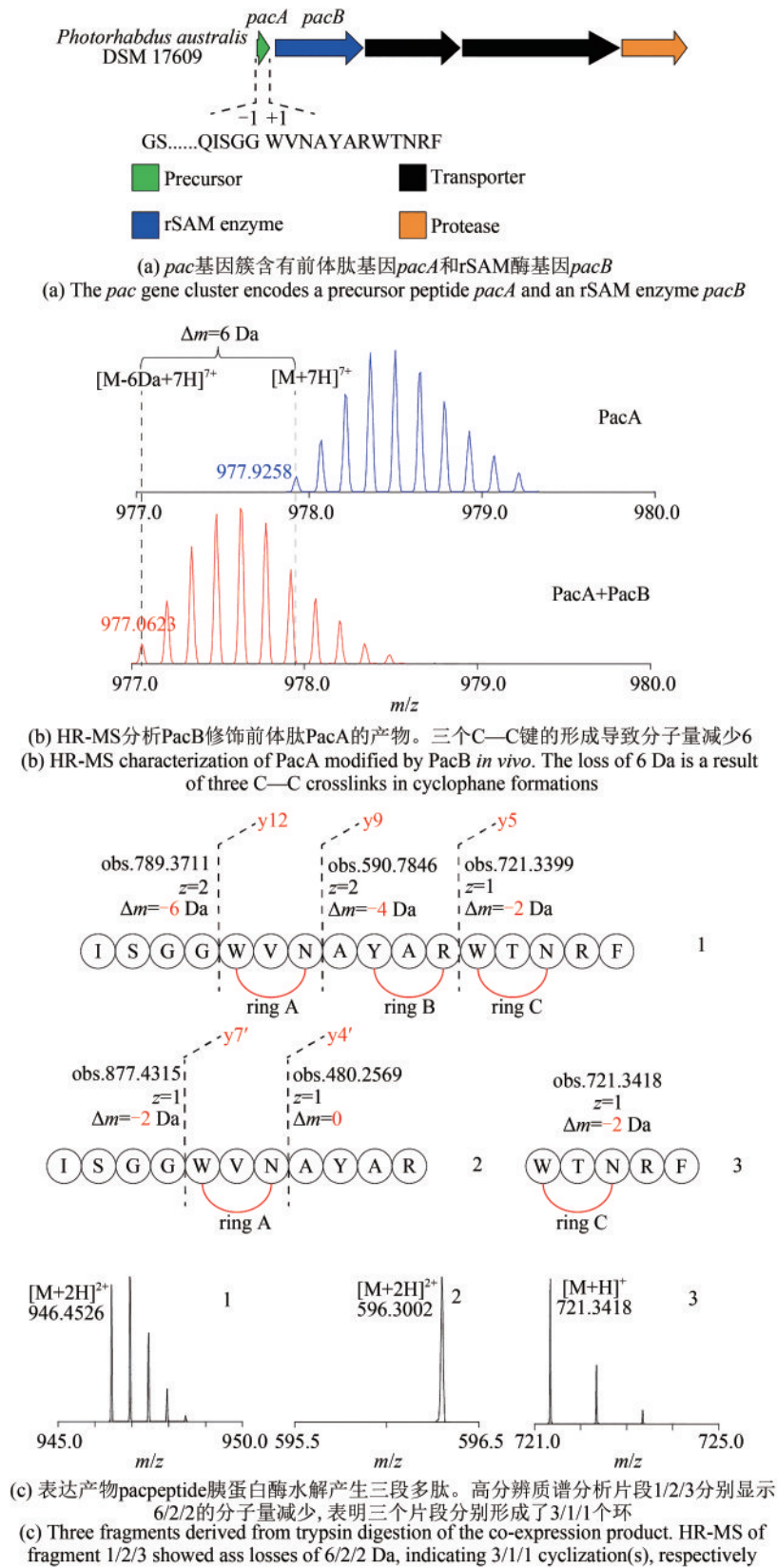


图2 *pac*基因簇和异源表达产物分析

Fig. 2 *Pac* gene cluster and analysis of its coexpression product

肽键水解片段, 表明 YAR 环烷 (环 B) 的形成改变了肽段的拓扑结构从而干扰了胰蛋白酶的水解。在串联质谱数据中同时发现了少量的分子量损失为 2 的片段 2 (残基-4 至 7), 以及分子量损失为 2 的片段 3 (残基 8 至 12)。片段 2 的串联质谱发现分析 y_7' 的 $[M+1H]^+$ 为 877.4315, y_4' 的 $[M+1H]^+$ 为 480.2569 (表 4); 表明分子量损失源自 WVN 环烷 (环 A) 的形成 [图 2(c)]。这两个片段的存​​在表明 PacB 对部分前体肽的后修饰中未生成环 B, 这也解释了胰蛋白酶对片段 2 和 3 之间肽键的良好水解效率的原因。

表 4 修饰后产物串联质谱碎片信息

Tab. 4 MS/MS information of products

碎片离子	未修饰理论特征峰 m/z	z	检测到的特征峰 m/z	修饰
y_3	436.2303	1	N.D.	—
y_4	537.2780	1	N.D.	—
y_4'	480.2567	1	480.2569	—
y_5	723.3573	1	721.3398	-2H
y_6	879.4584	1	N.D.	—
y_7	950.4955	1	N.D.	—
y_7'	879.4491	1	877.4315	-2H
y_8	557.6228	2	556.2618	-4H
y_9	592.8016	2	590.7846	-4H
y_{10}	649.8213	2	N.D.	—
y_{11}	699.3573	2	N.D.	—
y_{12}	792.3969	2	789.3711	-6H
y_{13}	821.1098	2	818.3835	-6H

2.2 rSAM 酶 PacB 的体外功能研究

为了进一步研究 PacB 功能和催化机制, rSAM 酶 PacB 在大肠杆菌中进行异源表达, 在厌氧条件下纯化后进行 [4Fe-4S] 簇的重构, 然后进行脱盐得到体外测活所用蛋白。通过表达纯化 NHis6-MBP-PacA, 经 TEV 蛋白酶消化样品和高温热变性后, 离心去除 MBP 标签, 得到前体肽 PacA。然后进行体外活性测定, 在厌氧条件下, 反应体系中加入前体肽 PacA、PacB 酶以及还原剂和 SAM 情况下, 未检测到 PacA 的环化, 可能的原因是高温可能破坏了前体肽的一些独特的空间结构, 从而使 PacB 不能底物识别而催化形成环化。进一步使用

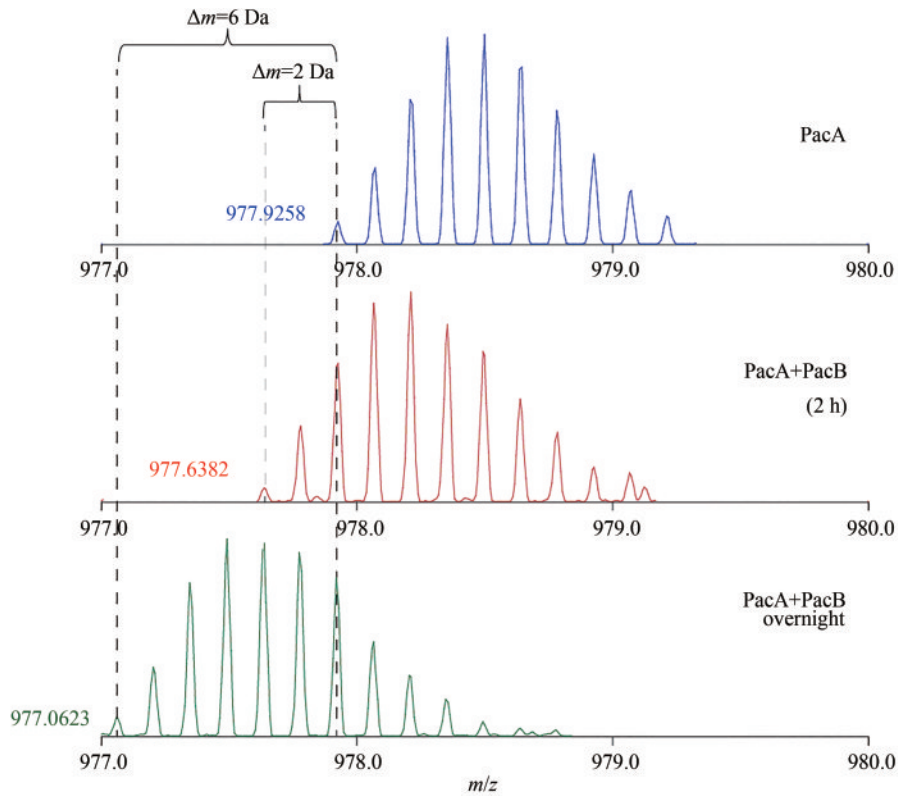
带有 MBP 标签的前体肽作为底物。在相同的厌氧条件下与 PacB 反应约 2 h 后, 将反应体系用 TEV 蛋白酶消化, 加热并离心。观察到与未反应的肽相比分子量损失仅为 2 的新产品 [图 3(a)]。在胰蛋白酶消化后观察到片段 4 [图 3(b)], 而不是片段 3 [图 2(c)], 表明没有 C 环形成。同时, 串联质谱证明片段 2 和 A 环的存在 [图 3(b)]。为了获得更多环化的产物, 将反应时间延长至过夜。尽管几乎看不到分子量损失为 4 的产物, 但观察到分子量损失为 6 的产物 [图 3(a)], 揭示了 PacB 酶的确具有催化 3 个 C—C 键形成的完整体外生物活性。

2.3 rSAM 酶 PacB 的底物选择性研究

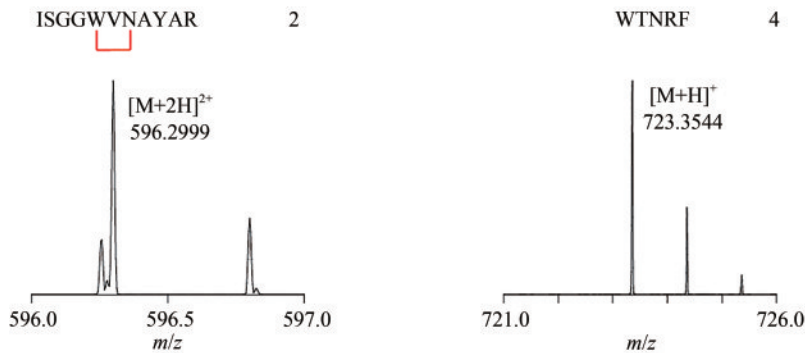
酶的底物多样性是天然产物结构多样性的源泉, PacB 催化芳香氨基酸的 sp^2 碳和相邻第 3 位氨基酸侧链的 sp^3 碳之间形成 C—C 键; 首先将提供 sp^3 碳的 3 个氨基酸 Asn3、Arg7 和 Asn10 分别替换为侧链上只有 1 个甲基的 Ala; 相对应的突变基因 $\Delta pacA$ 分别与 $pacB$ 共表达。LC-MS 分析表明, 与计算值相比, 所有 3 种产物的分子量损失仍为 6 [图 4(a)], 表明 Ala 突变未能阻止任何环化的形成。这一结果揭示了 PacB 对相关氨基酸残基侧链的高度底物耐受性, 显示出巨大的基因工程改造的潜力。上面提到的 3 个位点分别替换为 Gly 后。由于侧链上没有碳原子, 预测应该不能形成环化。共表达实验结果证实 3 个突变位点 (N3G、R7G、N10G) 导致相应 A、B、C 位置的环不能生成, 而所有 3 个突变中都观察到了 4 的分子量减少 [图 4(b)], 串联质谱也证明除了突变位点的环化受到影响, 其他 2 个环化未受影响, 表明 3 个环化是相互独立催化完成的。

2.4 PacB 介导的前体肽 PacA 翻译后修饰顺序

上述的研究结果已证明 PacB 的确能够催化前体肽 3 个环结构的形成, 点突变实验也表明 PacB 对底物具有一定的宽泛性, 3 个位点环化可以独立催化完成, 而不是互为先决条件。尽管如此, PacB 介导的前体肽 PacA 翻译后修饰的体内共表达



(a) 质谱分析PacA经PacB修饰反应2 h和过夜反应的产物
(分子量减少2和6分别预示PacA中1或3个环的生成)
(a) HR-MS characterization of PacA modified by PacB for 2 h and overnight *in vitro*.
(Loss of 2/6 Da results from 1/3 cyclization (s) respectively)



(b) 高分辨质谱分析2和4片段经2 h的胰蛋白酶消化的产物
(分子量减少2和0分别预示中1或0个环的生成)
(b) HR-MS characterization of two fragments digested from 2 hours' reaction system by trypsin.
(Two fragments showed mass loss of 2/0 Da, indicating 1/0 cyclization, respectively)

图3 PacB体外活性测定

Fig. 3 Characterization of the bioactivity of PacB *in vitro*

和体外活性重建实验中, 均发现部分修饰的产物 [图2(c)、图3(a)和图4(b)], 这些结果可以推断出3种环化效率之间的明显差异, A环的形成效率最高, B环的形成效率最低。因此, 对3个环番结构形成顺序做了初步推定: 首先形成环A, 然后是形成C环, 最后形成B环。

3 结论

通过基因组挖掘方法从 *Photorehabdus australis* DSM 17609的基因组挖掘到一个新的Xye类核糖体肽基因簇 *pac*, 通过体内外实验鉴定了rSAM酶PacB催化前体肽后修饰过程中的3个环番结构的生

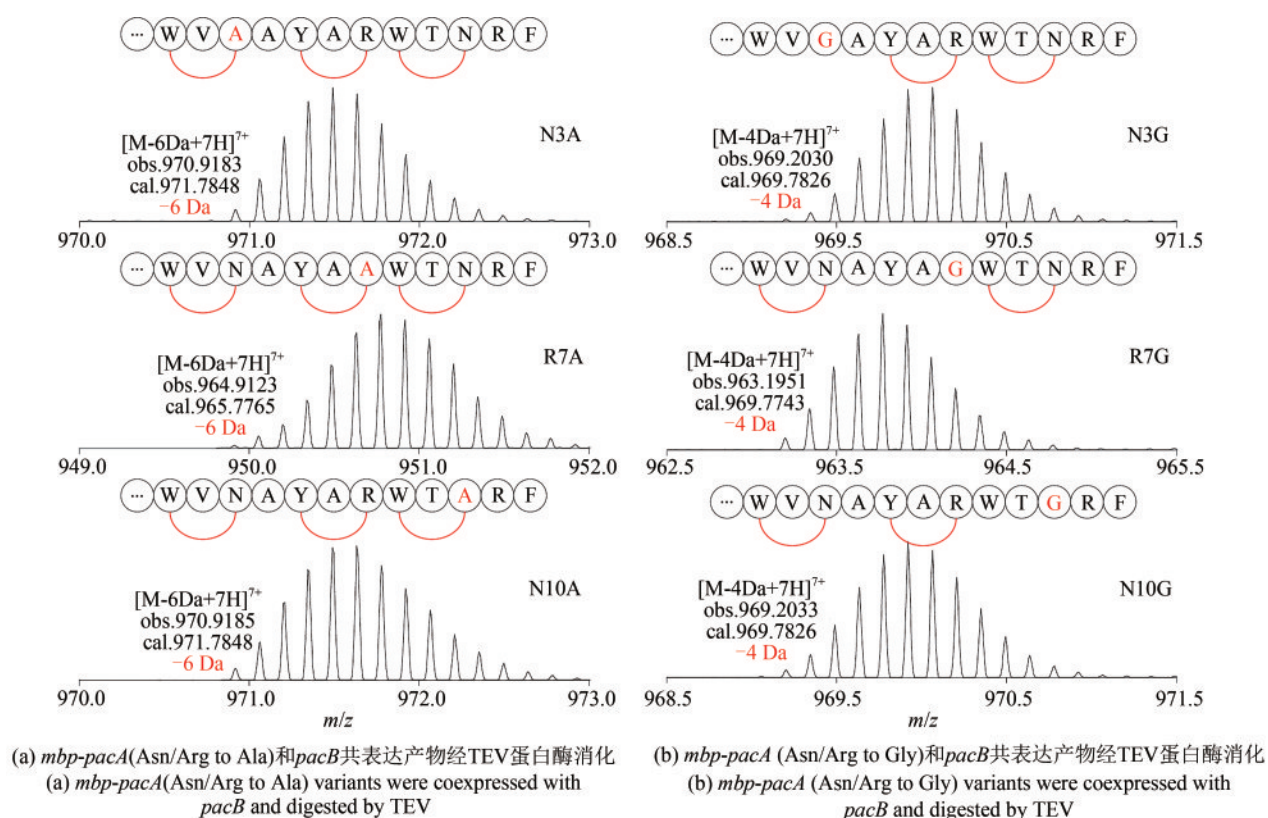


图4 高分辨质谱分析点突变前体肽 $\Delta pacA + pacB$ 共表达产物

Fig. 4 HR-MS analysis of *pacA* variants coexpressed with *pacB*

成, PacB 属于一类新颖的三残基环番合成酶。将 PacB 底物即前体肽 PacA 中提供环番 sp^3 碳的氨基酸替换为 Ala 的突变株能够正常发生 3 个环化, 初步证明了 PacB 对底物有较高的容忍性, 预示着具有通过基因工程改造核心肽氨基酸生成结构多样性的化合物的巨大潜力。前体肽中一个环番 sp^3 碳供体氨基酸突变成 Gly 后, 能够形成 2 个环的实验结果表明 3 个环番可以相互独立形成, 不互为先决条件, 但仍然能够通过这些体内外数据推断出环 A 和环 B 的形成分别具有最高和最低的形成效率, 因此, 初步假设首先形成环 A, 然后是形成 C 环, 最后形成 B 环。与其他报道的 Xye 簇类似, *pacA + pacB* 共表达产品 *pacpeptide* 对大肠杆菌或金黄色葡萄球菌没有表现出明显的抗菌活性。然而, 因为近年来发现的核糖体肽类天然产物 darobactin 已被证明是一种针对革兰氏阴性病原体的强效抗生素, 不能忽视这类酶修饰的新型 RiPPs 化合物潜在的药学活性。对 Xye 类核糖体肽生物合成中三残基环番合成酶催化功能的研究将为此类化合物的深入挖掘和合成生物制造奠定基础。

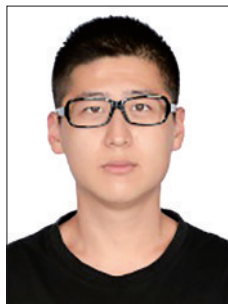
参考文献

- [1] ARNISON P G, BIBB M J, BIERBAUM G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature[J]. *Natural Product Reports*, 2013, 30(1): 108-160.
- [2] MONTALBÁN-LÓPEZ M, SCOTT T A, RAMESH S, et al. New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(1): 130-239.
- [3] LU J X, LI Y Q, BAI Z B, et al. Enzymatic macrocyclization of ribosomally synthesized and posttranslational modified peptides via C-S and C-C bond formation[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(5): 981-992.
- [4] VAN DER DONK W A, NAIR S K. Structure and mechanism of lanthipeptide biosynthetic enzymes[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 29: 58-66.
- [5] ZHANG Q, YU Y, VÉLASQUEZ J E, et al. Evolution of lanthipeptide synthetases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(45): 18361-18366.
- [6] VAN KRAAIJ C, DE VOS W M, SIEZEN R J, et al. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications[J]. *Natural Product Reports*, 1999, 16(5): 575-587.

- [7] FLUHE L, MARAHIEL M A. Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 17(4): 605-612.
- [8] CHEN Y L, WANG J X, LI G Q, et al. Current advancements in sactipeptide natural products[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 595991.
- [9] MO T L, JI X J, YUAN W, et al. Thuricin Z: A narrow-spectrum sactibiotic that targets the cell membrane[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(52): 18793-18797.
- [10] DALY N L, CRAIK D J. Bioactive cystine knot proteins[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, 15: 362-368.
- [11] CHEKAN J R, ESTRADA P, COVELLO P S, et al. Characterization of the macrocyclase involved in the biosynthesis of RiPP cyclic peptides in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(25): 6551-6556.
- [12] BURNETT P G, JADHAV P D, OKINYO-OWITI D P, et al. Glycine-containing flaxseed orbitides[J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78: 681-688.
- [13] SHIM Y Y, YOUNG L W, ARNISON P G, et al. Proposed systematic nomenclature for orbitides[J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78(4): 645-652.
- [14] DE VEER S J, KAN M W, CRAIK D J. Cyclotides: from structure to function[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(24): 12375-12421.
- [15] BURMAN R, GUNASEKERA S, STRÖMSTEDT A A, et al. Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box[J]. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(3): 724-736.
- [16] CRAIK D J, CEMAZAR M, DALY N L. The chemistry and biology of cyclotides[J]. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2007, 10(2): 176-184.
- [17] MARTINS J, VASCONCELOS V. Cyanobactins from cyanobacteria: current genetic and chemical state of knowledge[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(11): 6910-6946.
- [18] HUDSON G A, MITCHELL D A. RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 45: 61-69.[PubMed]
- [19] DONIA M S, RAVEL J, SCHMIDT E W. A global assembly line for cyanobactins[J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(6): 341-343.
- [20] VINOGRADOV A A, SUGA H. Introduction to thiopeptides: biological activity, biosynthesis, and strategies for functional reprogramming[J]. *Cell Chemical Biology*, 2020, 27(8): 1032-1051.
- [21] MA S, CHEN H, LI H, et al. Post-translational formation of aminomalonnate by a promiscuous peptide-modifying radical SAM enzyme[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(36): 19957-19964.
- [22] NGUYEN T Q N, TOO H Y W, SUGIYAMA R, et al. Post-translational formation of strained cyclophanes in bacteria[J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12: 1042-1053.
- [23] SCHRAMMA K R, BUSHIN L B, SEYEDSAYAMDOST M R. Structure and biosynthesis of a macrocyclic peptide containing an unprecedented lysine-to-tryptophan crosslink[J]. *Nature Chemistry*, 2015, 7(5): 431-437.
- [24] KAUR H, JAKOB R P, MARZINEK J K, et al. The antibiotic darobactin mimics a beta-strand to inhibit outer membrane insertase[J]. *Nature*, 2021, 593: 125-129.
- [25] BUSHIN L B, SEYEDSAYAMDOST M R. Guidelines for determining the structures of radical SAM enzyme catalyzed modifications in the biosynthesis of RiPP natural products[J]. *Methods in Enzymology*, 2018, 606: 439-460.
- [26] BENJIDIA A, BALTIC C, BERTEAU O. Radical SAM enzymes in the biosynthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs)[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5: 87.
- [27] ZHANG Q, ORTEGA M, SHI Y X, et al. Structural investigation of ribosomally synthesized natural products by hypothetical structure enumeration and evaluation using tandem MS[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(33): 12031-12036.
- [28] STROHALM M, HASSMAN M, KOSATA B, et al. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22(6): 905-908.



通讯作者: 丁伟(1981—),男,博士生导师,副教授。研究方向为微生物代谢及合成生物学。
E-mail: weiding@sjtu.edu.cn



第一作者: 韩沅均(1998—),博士研究生。研究方向为化学生物学。
E-mail: 20110220118@fudan.edu.cn