

评论

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-084

工程酵母助力真菌嵌合萜类合酶的快速系统挖掘

范震^{1,2}, 潘海学^{1,2}, 唐功利^{1,2}

(¹ 中国科学院大学杭州高等研究院, 化学与材料科学学院, 浙江 杭州 310024; ² 中国科学院上海有机化学研究所, 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: 真菌特有的嵌合萜类合酶(简称为PTTS)由C端异戊烯基转移酶(PT)结构域和N端I型萜类合酶(TS)结构域组成,可直接催化异戊二烯单元产生结构多样的二萜和二倍半萜化合物。自2007年发现第一个PTTS以来,只有约20个PTTS的功能被验证,人们对PTTS的起源和功能进化的认识还十分有限。最近武汉大学刘天罡教授课题组与美国田纳西大学陈峰教授课题组合作,运用高效萜类前体供给的酿酒酵母底盘并结合高通量的自动化平台,对PTTS的起源和功能进化进行了深入系统的探索,扩充了嵌合萜类合酶家族成员的数量,并为萜类化合物的挖掘提供了一个高效的方法。

关键词: 生物合成; 嵌合萜类合酶; 进化; 萜类; 酵母底盘

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Engineered yeast facilitates rapid and systematic mining of fungal chimeric terpene synthases

FAN Zhen^{1,2}, PAN Haixue^{1,2}, TANG Gongli^{1,2}

(¹ School of Chemistry and Materials Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, Zhejiang, China; ² State Key Laboratory of Bio-Organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Chimeric terpene synthases (PTTSs), which consist of C-terminal prenyltransferase (PT) and N-terminal Class I terpene synthase (TS) domains, are unique to fungi for catalyzing the synthesis of structurally diverse diterpenes and sesterterpenes. Since the first PTTS was discovered in 2007, only about 20 PTTSs have been functionally verified, and understanding of the origin and functional evolution of PTTS genes is very limited. Recently, Professor Tiangang Liu's research team at Wuhan University and Professor Feng Chen's research team at the University of Tennessee in the United States have conducted in-depth exploration on the origin and functional evolution of PTTS with an efficient terpene precursor yeast chassis system combined with the high-throughput automatic screening platform. The research not only expands the chimeric terpene synthase family, but also provides an advanced method

收稿日期: 2021-08-13 修回日期: 2021-08-29

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31930002)

引用本文: 范震, 潘海学, 唐功利. 工程酵母助力真菌嵌合萜类合酶的快速系统挖掘[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 666-673

Citation: FAN Zhen, PAN Haixue, TANG Gongli. Engineered yeast facilitates rapid and systematic mining of fungal chimeric terpene synthases[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(5): 666-673

for mining more terpene synthases for the biosynthesis of terpenoids.

Keywords: biosynthesis; chimeric terpene synthase; evolution; terpenoids; yeast chassis

萜类是自然界中数量最庞大的一类天然产物，至今已有超过10万种^[1-2]。萜类存在于所有生命领域中，在植物、真菌和海洋无脊椎动物中最为普遍，萜类化合物在防御、调节和信息交流等方面发挥着重要作用，并被广泛用作药物、香料和调味品等^[3-4]。尽管萜类数量庞大且结构多样，但所有的萜类天然产物骨架都由五碳结构单元二甲基烯丙基焦磷酸（dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP）和异戊烯基焦磷酸（isopentenyl pyrophosphate, IPP）缩合形成，因此萜类也被称为类异戊二烯类化合物^[2]。五碳结构单元DMAPP和IPP在异戊烯基转移酶（PT）的催化下，以常规的头尾连接的方式缩合成不同长度聚异戊二烯基焦磷酸，如FPP（farnesyl diphosphate）、GPP（geranyl diphosphate）、GGPP（geranylgeranyl diphosphate）、GFPP（geranylfranesyl diphosphate）（图1）^[2]。除此之外，PT还可以催化非常规类型的类异戊二烯焦磷酸的缩合，如以非头尾连接方式的碳链缩合^[5]，顺式（Z型）双键的碳链缩合^[6]等，因评论的工作中不涉及该类PT，本文对此不做过多的评述。萜类合酶（TS）利用PT合成的链状前体合成萜类的基本骨架，在萜类化合物的形成和萜类结构的多样性中发挥了至关重要的作用^[2]。PT和TS负责形成的萜类基本骨架，再经过各种修饰，如氧化、官能团引入等，最终生成更加多样的萜类产物。

TS催化萜类基本骨架形成过程中，首先形成高活性的碳正离子中间体，从而引发环化串联反应，该环化串联反应也是自然界中最复杂的反应

之一^[2]。根据TS起始引发碳正离子形成策略的不同，将TS分为I型和II型^[2]。I型萜类合酶含有富含天冬氨酸（Asp）和与金属阳离子配位的两个保守基序DDXXD/E和(N,D)XX(S,T)XXXE，金属离子通过结合聚异戊二烯基焦磷酸链状前体的焦磷酸基团来固定底物，同时促进前体烯丙基焦磷酸基的C—O键的电离，从而产生高活性的碳正离子中间体，进而引发环化串联反应[图2(a)]。而II型萜类合酶通常仅含有呈酸性的DXDD保守基序，通过其中的Asp残基将异戊二烯基中的双键质子化，生成引发环化反应的碳正离子中间体[图2(b)]^[7-9]。

通常情况下TS和PT单独行使其功能，但在一些酶中两个（TS和PT/TS）活性结构域同时存在，构成可连续反应的两个独特活性位点，因此赋予这些酶双功能性^[10]。目前发现的双功能萜类合酶有：I型TS+II型TS酶，II型TS+PT酶，Geosmin合成酶，以及I型TS+PT酶（图3）^[10]。在理论上，这些双功能酶两个活性位点空间上是相互接近的，因此具有增加产物量的优势^[10-12]。

真菌特有的嵌合萜类合酶（PTTS）指的是I型TS+PT酶，包括一个C端PT结构域和一个N端I型TS结构域。这些PTTS可以直接利用IPP和DMAPP作为共底物形成二萜和二倍半萜骨架^[10, 13]。自嵌合二萜合酶PaFS和嵌合二倍半萜合酶AcOS发现以来^[14-15]，仅有约20个PTTS被报道，并且PTTS催化生成的化合物大多具有新颖的碳骨架。根据其催化环化的机制，可将PTTS分为

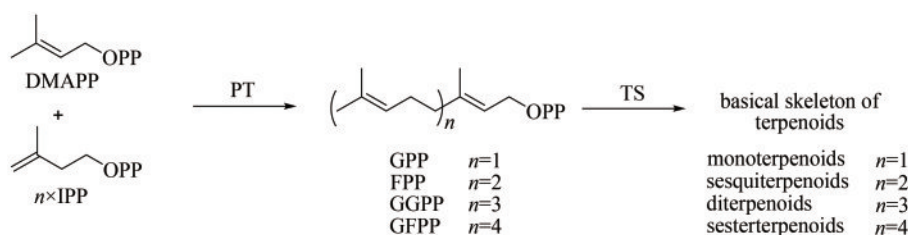


图1 异戊烯基转移酶（PT）和萜类合酶（TS）催化萜类基本骨架形成的简略过程

Fig. 1 Formation of terpenoid skeletons through the catalysis by isopentenyl transferase (PT) and terpene synthase (TS)

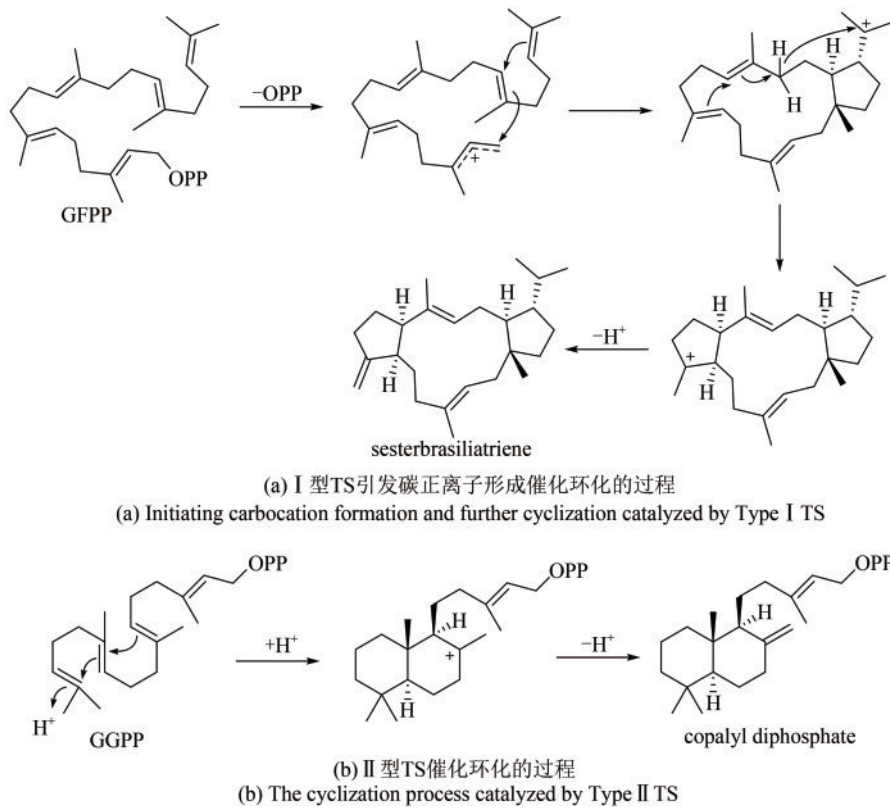


图2 I型和II型萜类合酶(TS)催化环化的过程的两例

Fig. 2 Two cases for cyclization catalyzed by Type I and Type II terpene synthases (TSs)

A型和B型, A型是在GFPP的C1-C11/C10-C14之间环化(C1-IV-V), 形成5~15环系统, B型是在GFPP或GGPP的C1-C15/C14-C18处环化(C1-III-IV), 而生成5~11环系统(图4)^[13]。

随着基因组测序技术的发展, 需要功能鉴定的PTTS数量不断增加, 对PTTS研究产生了一些有待回答的问题, 如PTTS在真菌中是广泛分布的还是局限于某些特定的群体, 以及哪些机制控制着PTTS的功能进化等, 回答这些问题需要对大量的PTTS进行功能表征^[16]。虽然米曲霉(*Aspergillus oryzae*)已经被广泛应用于真菌基因的异源表达, 且该体系表征过多种丝状真菌来源的PTTS^[17-18], 然而受限于米曲霉复杂的遗传操作、较长的培养周期, 这个系统不适合大量未知PTTS功能的快速验证。高效萜类前体供给的大肠杆菌和酿酒酵母底盘, 为法尼烯、紫杉二烯和青蒿酸^[19-21]等的大量生产提供了有效的途径。此外, 以代谢工程改造的酵母来进行药物核心结构骨架的生产, 随后经过简单的化学后修饰可合成最终药品, 极大简化了药物化学合成的过程(图5)^[22-23]。

最近武汉大学刘天罡教授课题组与美国田纳西大学陈峰教授课题组合作, 使用高产萜类前体的酵母系统和高通量自动化平台实现了对PTTS功能的快速验证^[16]。

首先, 合作团队系统分析了NCBI和UniProt数据库中所有真菌来源的基因以及JGI数据库中已经测序的477种真菌的基因组, 共找到了227个PTTS同源基因, 其中包括已经鉴定功能的20个PTTS基因。对这227个PTTS同源基因的生物信息学分析发现, PTTS基因只存在于双核菌亚界(Dikarya), 其中224个分布在子囊菌(*Ascomycota*)中, 另外3个PTTS基因存在于担子菌(*Basidiomycota*)的一个种中。由此作者推测, PTTS基因起源于双核菌亚界, 担子菌中PTTS基因的缺失, 很可能是在进化过程中经历了频繁的基因丢失导致的; 另一种可能性是PTTS基因起源于子囊菌, 担子菌中某些菌含有的PTTS基因是通过基因的水平转移获得的。为了进一步了解这些基因进化的关联性, 研究者对227个PTTS基因进行了系统的进化分析。前期研究报道, PTTS可分

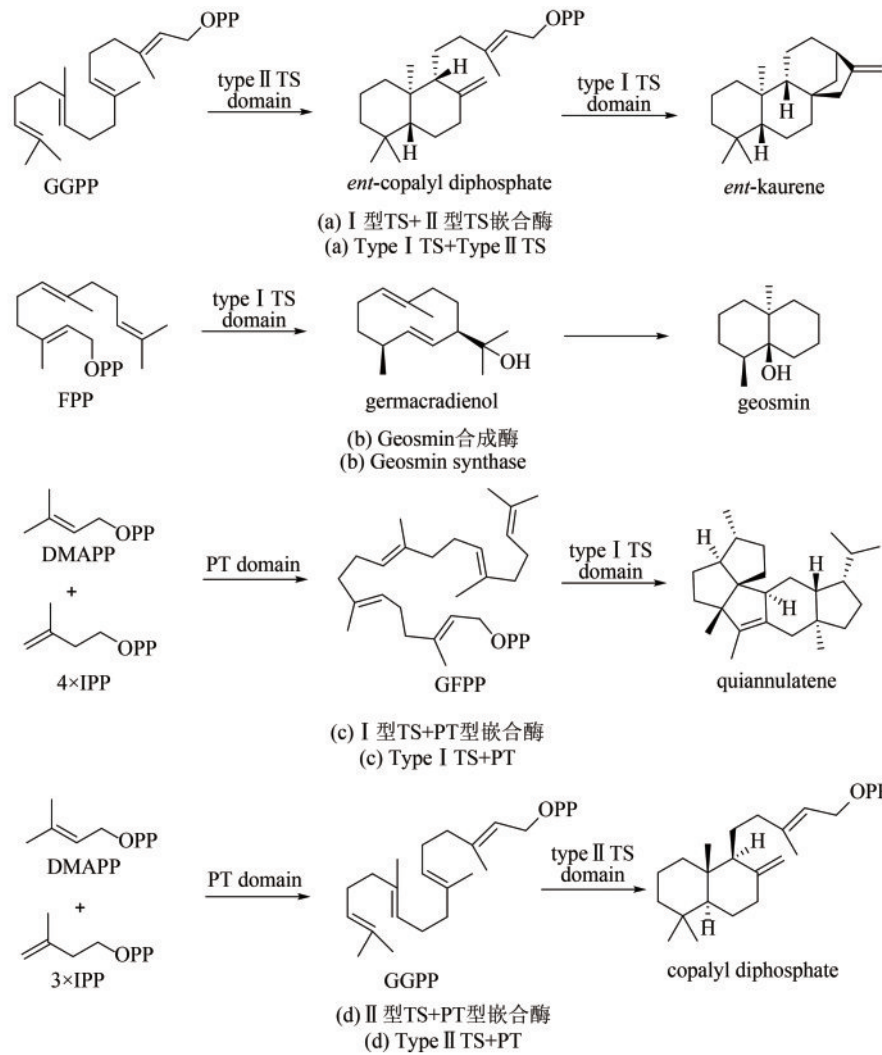


图3 4种嵌合萜类合酶催化反应范例

Fig. 3 Catalytic reactions of 4 chimeric terpene synthases

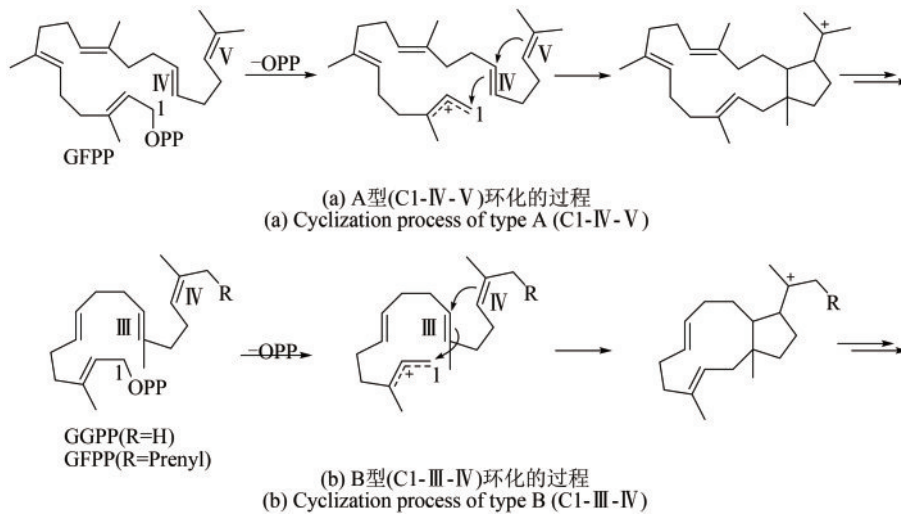


图4 PTTS催化的两种环化类型

Fig. 4 Two cyclization reactions catalyzed by PTTS

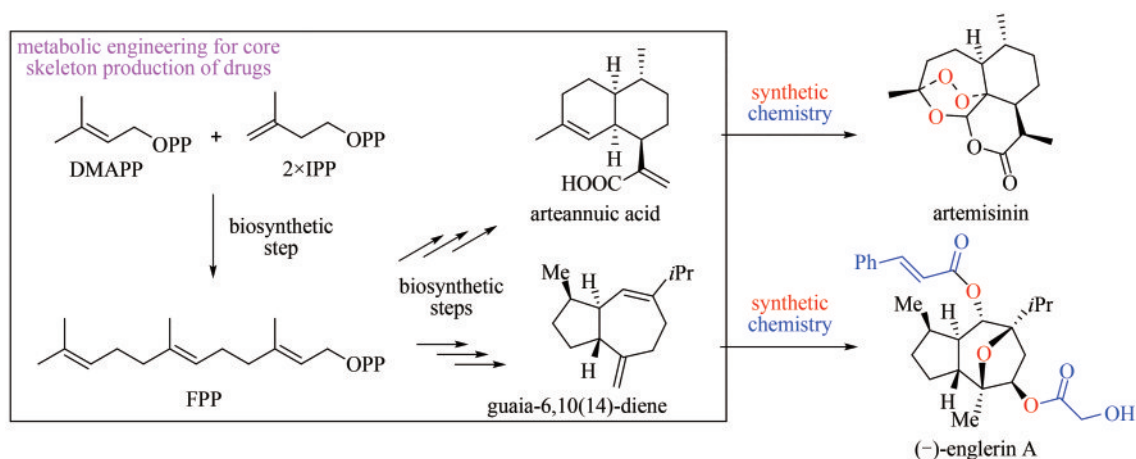


图5 代谢工程结合化学合成的方法合成青蒿素和(-)-englerin A

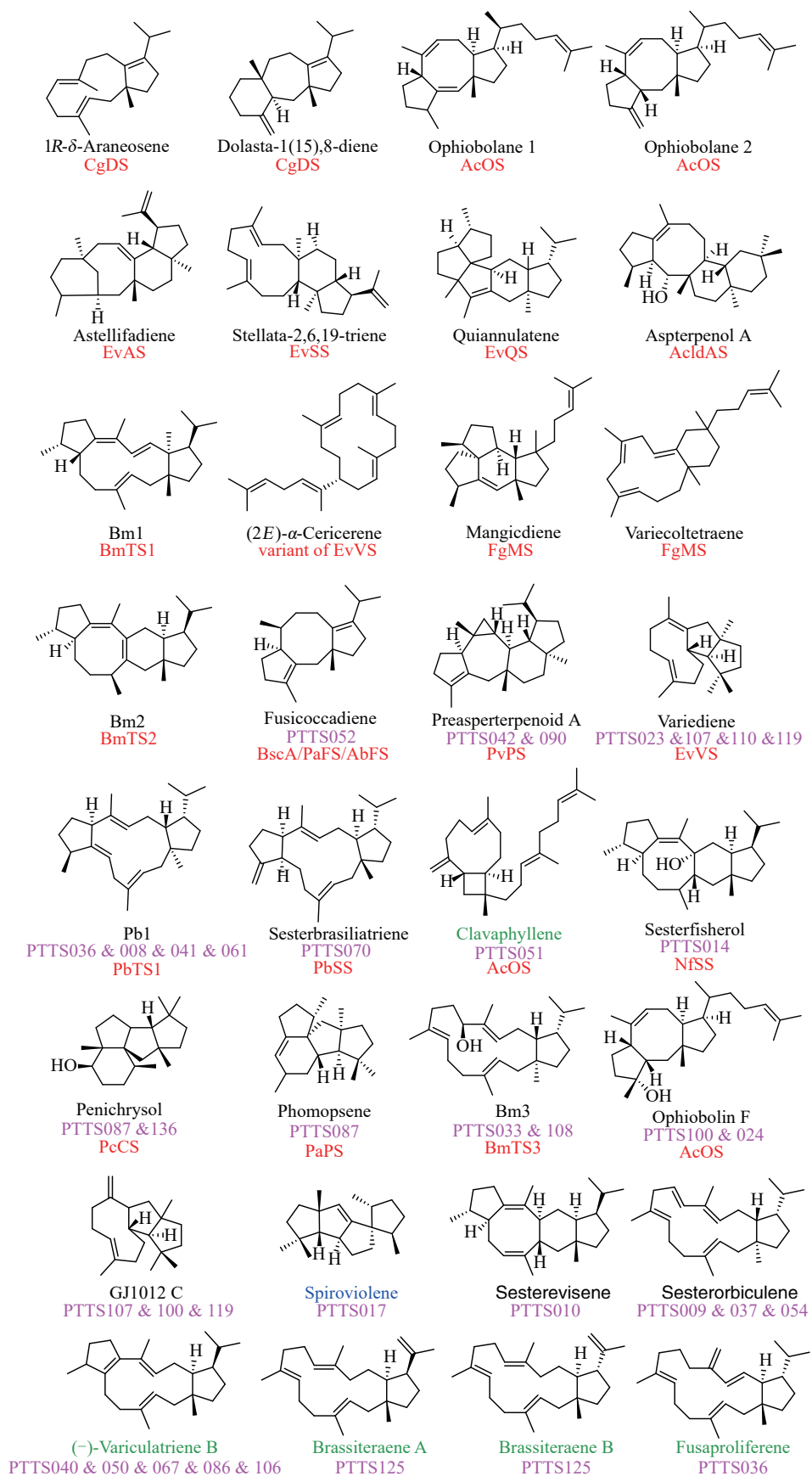
Fig. 5 Synthesis of artemisinin and (-)-englerin A by metabolic engineering combined with synthetic chemistry

为6个分支(A~F)^[10],处于A、E和F亚家族中的基因形成Clade I,催化GFPP的A型(C1-IV-V)环化,其余亚家族的基因形成Clade II,催化GGPP或GFPP的B型(C1-III-IV)环化^[10]。考虑到之前研究PTTS数量较少,信息不够全面,作者对得到的PTTS做了更全面的进化分析,结果显示支持前期研究结果。并且进化分析的结果显示,在A~F这6个PTTS亚家族中,每个亚家族都有90%以上的PTTS基因功能是未知的,表明对PTTS生化功能认识上还存在很大的不足^[16]。

为了获得更多的PTTS催化功能信息,合作团队对上述PTTS进行了功能鉴定。首先依据氨基酸(aa)序列长度(约700 aa)、序列相似性(<80%)、TS结构域DDXXD/E和NSE/DTE以及PT结构域DDXXD/N的保守序列这些特征,对PTTS进行了筛选,从中选出了74个PTTS。因已报道的20个PTTS主要催化二倍半萜的产生,因此研究者在实验室前期构建的高产萜类化合物的酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* YZL141的基础上^[11],又过量表达了GFPP合成酶和PTTS,构建了一个高产二倍半萜的酵母底盘。该底盘一方面增加了GFPP的代谢通量,使得嵌合的二倍半萜合酶的功能可得到快速鉴定,另一方面有助于释放嵌合的二萜合酶利用GFPP的潜力,使得嵌合的二萜合酶在合成二萜的同时还可合成二倍半萜。此外,他们利用高通量自动化平台批量构建了74个PTTS的酵母工程菌株,该平台的应用大大加快了PTTS功能鉴定的进程。利用上述代谢工程策略,合作团

队成功鉴定34个新的有功能的PTTS(图6),鉴定的PTTS的数量超过了目前已知功能PTTS的总数。从34个PTTS的酵母工程菌株中共鉴定了24个二萜和二倍半萜产物(图6),其中2个是结构新颖的二倍半萜 sesterervisene 和 sesterorbiculene。24个产物中有11个是已报道的PTTS的产物(图6),这表明这类酶在功能上进化的一致性。有5个产物是已报道的植物来源二倍半萜合酶的产物(图6),有1个产物是链霉菌(*Streptomyces violens*)来源的二萜合酶产物(图6),显示了真菌、植物和细菌的基因功能趋同进化的特征。54种活性PTTS共产37种不同的萜类产物(图6),以及新化合物的发现和链状产物的产生(图6)都表明PTTS在进化过程中蛋白质序列的变化导致其功能多样性。

采用酵母底盘细胞对PTTS的起源和功能进化进行的系统研究,为读者清晰地呈现了真菌特有的这类PTTS在真菌中存在和进化的基本样貌,描述了这类酶催化功能的多样性,并且大大扩充了这类酶家族成员的数量以及萜类产物库,为后续萜类合成生物学研究提供了丰富的基因元件,也为相关基因簇的挖掘奠定了坚实的基础。另外,该研究不仅为以酵母为底盘进行萜类化合物的挖掘提供了一个可借鉴有效的方法策略,而且也是将天然产物的发现从原始的自然界生物材料中鉴定,转变为从网络基因信息挖掘到人为设计实现生产的一个成功范例。



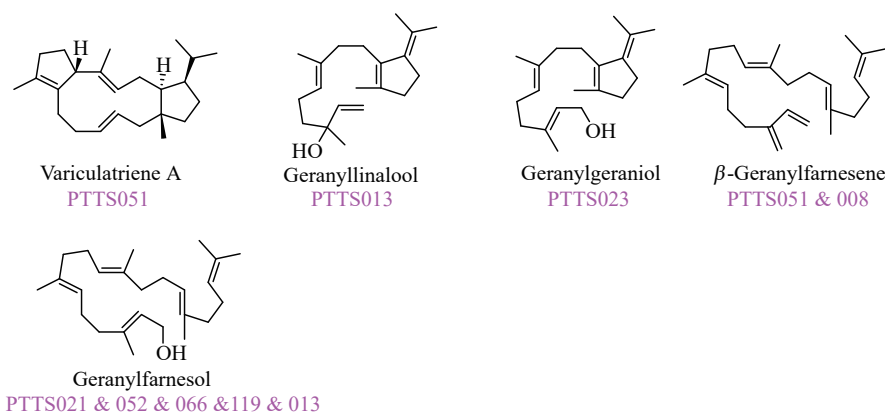


图6 54个PTTS催化合成的萜类化合物及其结构

(红色标记为之前报道的PTTS及其催化合成的化合物结构；粉红色标记为刘天罡课题组新鉴定的24个PTTS及其催化合成的化合物结构，其中黑体加粗标记为新化合物，绿色标记为已报道的植物来源化合物，蓝色标记为已报道的微生物来源化合物)

Fig. 6 Terpenoids and their structures synthesized under the catalysis of 54 PTTSs

(Previously reported PTTSs and resulting products are marked in red, and 24 newly identified PTTSs by Liu Tiangang et al and resulting products are marked in pink. Products from plants and microorganisms are marked in green and blue, respectively)

参 考 文 献

- [1] Dictionary of natural products[EB/OL]. <http://dnp.chemnet-base.com>.
- [2] CHRISTIANSON D W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(17): 11570-11648.
- [3] GERSHENZON J, DUDAREVA N. The function of terpene natural products in the natural world[J]. Nature Chemical Biology, 2007, 3(7): 408-414.
- [4] CHEN M B, CHOU W K W, TOYOMASU T, et al. Structure and function of fusicoccadiene synthase, a hexameric bifunctional diterpene synthase[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(4): 889-899.
- [5] GAO J, KO T P, CHEN L, et al. "Head-to-Middle" and "Head-to-Tail" *cis*-Prenyl transferases: structure of isosquilandulyl diphosphate synthase[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2018, 57(3): 683-687.
- [6] SALLAUD C, RONTEIN D, ONILLON S, et al. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from *Z*, *Z*-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*[J]. The Plant Cell, 2009, 21(1): 301-317.
- [7] CHRISTIANSON D W. Roots of biosynthetic diversity[J]. Science, 2007, 316(5812): 60-61.
- [8] THOLL D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(3): 297-304.
- [9] THOLL D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants[J]. Biotechnology of Isoprenoids, 2015, 148: 63-106
- [10] MITSUHASHI T, ABE I. Chimeric terpene synthases possessing both terpene cyclization and prenyltransfer activities[J]. ChemBioChem, 2018, 19(11): 1106-1114.
- [11] KANG W, MA T, LIU M, et al. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4248.
- [12] FAYLO J L, VAN EEUWEN T, KIM H J, et al. Structural insight on assembly-line catalysis in terpene biosynthesis[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 3487.
- [13] MINAMI A, OZAKI T, LIU C W, et al. Cyclopentane-forming di/esterterpene synthases: widely distributed enzymes in bacteria, fungi, and plants[J]. Natural Product Reports, 2018, 35(12): 1330-1346.
- [14] TOYOMASU T, TSUKAHARA M, KANEKO A, et al. Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(9): 3084-3088.
- [15] CHIBA R, MINAMI A, GOMI K, et al. Identification of ophiobolin F synthase by a genome mining approach: a sesterterpene synthase from *Aspergillus clavatus*[J]. Organic Letters, 2013, 15(3): 594-597.
- [16] CHEN R, JIA Q D, MU X, et al. Systematic mining of fungal chimeric terpene synthases using an efficient precursor-providing yeast chassis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(29): e2023247118.
- [17] YE Y, MINAMI A, MANDI A, et al. Genome mining for sesterterpenes using bifunctional terpene synthases reveals a unified intermediate of di/esterterpenes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(36): 11846-11853.

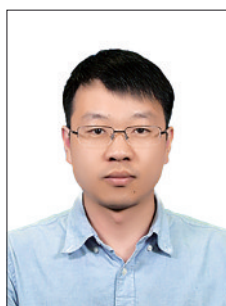
- [18] MATSUDA Y, MITSUHASHI T, LEE S, et al. Astellifadiene: structure determination by NMR spectroscopy and crystalline sponge method, and elucidation of its biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2016, 55(19): 5785-5788.
- [19] ZHU F Y, ZHONG X F, HU M Z, et al. *In vitro* reconstitution of mevalonate pathway and targeted engineering of farnesene overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(7): 1396-1405.
- [20] RO D K, PARADISE E M, OUELLET M. et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [21] KAMPRANIS S C, MAKRIS A M. Developing a yeast cell factory for the production of terpenoids[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2012, 3: e201210006.
- [22] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [23] SIEMON T, WANG Z Q, BIAN G K, et al. Semisynthesis of plant-derived englerin A enabled by microbe engineering of

guaia-6,10(14)-diene as building block[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(6): 2760-2765.



通讯作者: 唐功利(1971—),男,博士,研究员,主要从事天然产物生物合成和化学生物学研究。

E-mail: gltang@sioc.ac.cn



第一作者: 范震(1987—),男,博士,博士后,主要从事天然产物生物合成研究。

E-mail: fanzhen@sioc.ac.cn