

## 埃博霉素(Epothilones)的 PKS/NRPS 杂合基因簇

黎志凤 Etienne Nguimbi 李越中\* 刘巍峰

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要** 埃博霉素是由粘细菌纤维堆囊菌产生的一类具有促微管聚合活性的大环内酯类化合物。埃博霉素生物合成的多酶复合体是一个由多个功能模块组成,同时含有多聚酮合酶(PKS)和非核糖体肽合成酶(NRPS)的大操纵子。根据同位素标记试验结果和合成酶全基因簇功能的推测,埃博霉素的生物合成包括聚酮链的引发、链合成的起始和噻唑环的形成、链的延伸和转移、链合成的终止释放和环化、及产物的后修饰 5 个阶段。埃博霉素的 PKS/NRPS 杂合基因簇是开展组合生物合成研究的良好材料。

**关键词** 埃博霉素,多聚酮合酶(PKS),非核糖体肽合成酶(NRPS),基因簇,组合生物合成

中图分类号 Q933 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)05-0511-05

埃博霉素(Epothilone)是由粘细菌中纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)产生的一类大环内酯类化合物,具有促微管聚合活性,是继紫杉醇(Taxol®)之后发现的 6 种具有促微管聚合活性的化合物(Epothilones, eleutherobins, discodermolide, laulimalide, WS9885B 和 peloruside)中最令人兴奋的研究热点<sup>[1-2]</sup>。埃博霉素不但具有与紫杉醇相似的作用微管的模式,而且比紫杉醇具有更好的水溶性,分子量小,结构简单

(图 1),尤其是对耐紫杉醇类的肿瘤细胞具有高活性,被认为是紫杉醇的更新换代产品。埃博霉素类化合物作为极具潜力的抗癌药激发了科研人员和制药公司的极大热情,埃博霉素的研发由于其生物合成的机制而同时成为基因工程改造合成新的“人工”天然化合物的良好材料,有关工作在最近两三年内取得了令人振奋的进展。本文对近年来埃博霉素生物合成基因簇的研究进行了综述。

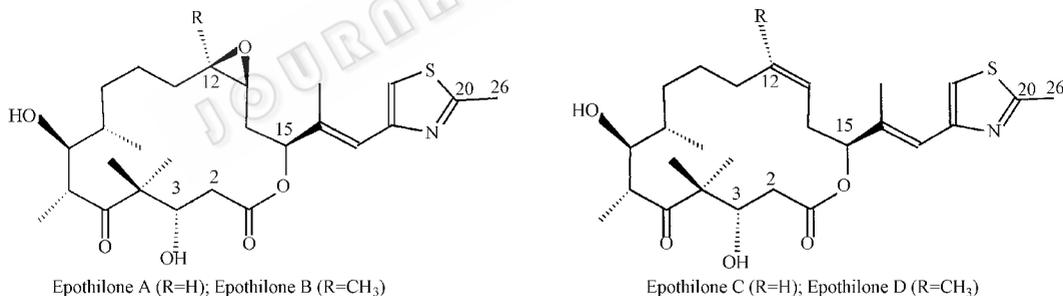


图 1 埃博霉素化学结构

Fig.1 Structures of epothilones

### 1 多聚酮和非核糖体肽的合成酶基因

多聚酮和非核糖体肽是复杂天然药物中的两大重要家族,分别由羧酸和氨基酸单体连续缩合而成<sup>[5]</sup>。其生物合成过程均是在大型的多酶复合体催化下完成的,前者是多聚酮合酶(Polyketide synthase,PKS),后者为非核糖体肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthetase,NRPS)。PKS 和 NRPS 复合酶的基因主要是由连续的重复模块(Module)构成,每个基因模

块的产物可催化多聚酮或多肽链的一轮延伸和可能的修饰。20 世纪 90 年代初的红霉素 PKS 编码基因簇序列的测定揭示了 PKS 基因及其编码蛋白的模块结构性质(图 2A)。PKS 基因簇大小从 10kb 到大于 100kb 不等,一般包括 2~4kb 的负载模块(Loading module)线性组织的多个 4~5.5kb 的中间模块,以及一个小的硫酯酶(TE)或释放域。每个模块均含有 3~6 个功能域,其中酮基合酶(Ketosynthase,KS)酰基转移酶(Acyltransferase,AT)和酰基载体蛋白(Acylcarrier protein,ACP)

收稿日期 2003-01-28, 修回日期 2003-04-23。

基金项目 国家自然科学基金(No. 30070008), 863 青年基金(No. 2001AA628160)和教育部重点基金资助。

\* 通讯作者。 Tel 86-531-8564288; Fax 86-531-8565610; E-mail: lizhenfeng@sdut.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

是聚酮链二碳单元延伸所必需的。此外,模块中还可能有1~3个修饰酮基的功能域:酮基还原酶(KR),KR+脱水酶(DH)或KR+DH+烯酰基还原酶(ER)。PKS中模块的顺序和组成决定了其编码产物的结构,而模块的数量则决定了聚酮链的长度<sup>[4]</sup>。

在NRPS中也有类似的模块结构(图2B),每个模块含有3个必需的功能域:腺苷酰化结构域(Adenylation,A),缩合结

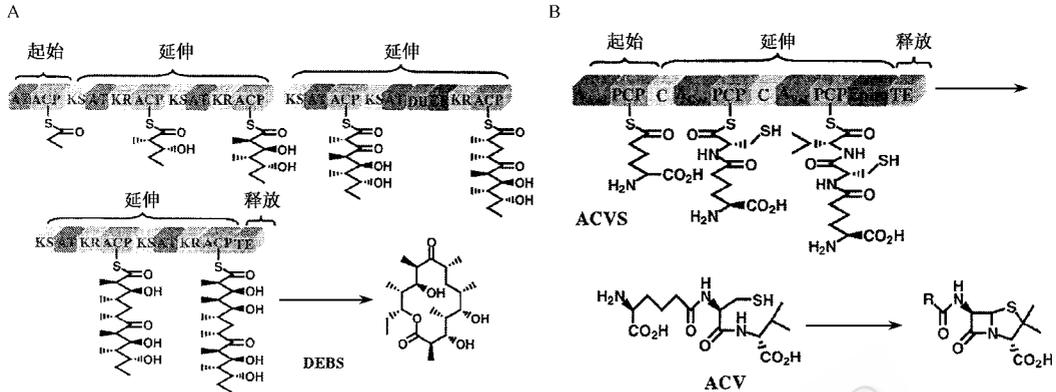


图2 多聚酮和非核糖体肽多酶复合体的模块结构及加工过程<sup>[3]</sup>

Fig.2 Examples of modular structures and biosynthetic processes of (A) polyketide synthases DEBS (Deoxyerythronolide B synthase,合成红霉素的前体) and (B) non-ribosomal peptide synthetases ACV (Aminoacyl-cysteinyI-valine synthetase,合成青霉素和头孢菌素的前体)

## 2 埃博霉素生物合成的酶复合体及其基因簇

2000年Julien等<sup>[6]</sup>和Molnar等<sup>[7]</sup>分别在两株纤维堆囊菌SMP44和So ce90菌株中报道了埃博霉素的全基因簇序列,并提示了其生物合成基因簇的分子模型(图3)。在SMP44和So ce90两株菌中,埃博霉素合成酶的编码基因几乎完全一致,仅间隔序列存在少量的差异。以Clustal软件比较分析的同源性高达98%。

埃博霉素的生物合成主要是由I型聚酮合酶催化完成的,与一般PKS基因簇不同,埃博霉素的复合酶系统中同时含有PKS和NRPS模块,包括1个负载模块,1个非核糖体肽合成酶模块,8个聚酮合酶模块和一个P450环氧酶(Epoxidase)。整个基因簇中有7个转录方向一致的基因,分别编码5个PKS(包括EpoA、EpoB、EpoC、EpoD和EpoE),1个NRPS(即EpoP,位于EpoA和EpoB之间)和1个P450环氧酶(EpoF)。由于*epoA/epoP*,以及*epoB/epoC*中存在基因的重叠现象(即上游基因的终止密码子与下游基因的起始密码子重叠)推测*epoA/epoP*,*epoB/epoC*可能共转录。而在*epoP/epoB*(147bp),*epoD/epoE*(15bp)和*epoE/epoF*(115bp)基因之间短小的间区序列中没有发现转录终止子,这表明所有这些基因构成一个异常大的操纵子(>56kb),而操纵子的启动子序列可能位于*epoA*前端935bp非编码区中AT含量异常丰富的区域,约300bp左右。

## 3 埃博霉素的生物合成过程

埃博霉素合成的前体化合物是脱氧埃博霉素,再经过

域域(Condensation,C)和肽酰载体蛋白结构域(Peptidyl carrier protein,PCP)。这3种酶共同完成氨基酸单元的延伸。此外,各模块中还可能含有差向异构化(Epimerization),N-甲基化(N-methylation)和氧化(Oxidation)3个修饰功能域。与PKSs基因簇相似,NRPSs的模块顺序、组成和数量也分别决定了氨基酸寡肽的性质和长短<sup>[3,5]</sup>。

P450环氧酶的作用将12和13位的C环氧化。以埃博霉素A和B为例,可以把合成过程分成五个阶段,即聚酮链的引发,链的起始和噁唑环合成,链的延伸和转移,链的终止和释放以及终产物的修饰。

### 3.1 链的引发(holo-ACP/PCP的形成)

埃博霉素合成的酶复合体共有10个载体蛋白(9个ACP和1个PCP),各模块中的ACP包含75~90个氨基酸。研究表明,催化埃博霉素生物合成的多功能酶复合体PKS/NRPS在翻译后,载体蛋白需活化后才能发挥作用。在磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(PPTase,即酰基转移酶)的催化下,来自辅酶A的磷酸泛酰巯基乙胺共价结合到载体蛋白结构域中保守的丝氨酸残基上,形成活化的holo-ACP/PCP。ACP/PCP通过-SH与酰基中间体酯合,形成一个灵活的摆臂,可以将合成的中间产物转移到下一个酶的活性中心。

### 3.2 链的起始和噁唑环的形成

埃博霉素合成的特殊起始物——2-甲基噁唑五元杂环是由EpoA和EpoP模块共同催化合成的。EpoA模块中的β酮脂酰合酶(KSQ)催化多聚酮链起始时丙二酰-ACP(malonyl-ACP)的脱羧,进一步酰基转移酶(AT)活化乙酰基(产物埃博霉素A)或丙酰(产物埃博霉素B),并将乙酰或丙酰基团加载到多酶复合物上形成乙酰/丙酰-S-ACP,在链延伸中作为供体来启动埃博霉素的生物合成<sup>[8]</sup>,并最终形成2-甲基噁唑环的一部分(C26和C20)(图1)。通常细菌I型PKS的KSQ是KS活性位点的半胱氨酸被谷氨酸残基取代,但在EpoA中的KSQ是被酪氨酸所取代的;并且典型的ER(烯酰基还原酶)中高度保守的精氨酸在EpoA中也被谷氨酸所取代。因此,它们的确切作用尚有待分析。



酶的相似性很高,该酶催化埃博霉素 C12-C13 之间的环氧化。此外,同源性分析表明,位于埃博霉素基因簇附近的 *orf3* 和 *orf14*(图 3)可能编码转运蛋白,参与次级代谢产物埃博霉素的胞外分泌。

#### 4 埃博霉素的研究现状及其组合生物合成前景展望

目前,埃博霉素已成为化学界、生物界和临床医学研究的热点<sup>[9]</sup>,研究主要集中在以下几个方面:1)化学合成研究:利用化学方法进行埃博霉素全合成的报道非常多且周期短进展快<sup>[10,11]</sup>,但由于生物分子的很多位点都不易进行化学修饰,因此,尽管化学法合成任何一个埃博霉素的衍生物在理论上是可行的,并将继续成为发现新型埃博霉素类化合物的有效途径,但在生产上会受到时间和成本的制约<sup>[6]</sup>;2)传统微生物学研究:利用传统的抗生素发酵方法优化调节菌体发酵条件,不但可以提高埃博霉素的产量<sup>[12]</sup>,还可以改变埃博霉素类化合物的种类<sup>[13]</sup>。但有关工作的报道很少,进一步提升埃博霉素发酵水平的潜力很大。另一方面,采用传统突变方法改变埃博霉素的合成途径,能够获得更多的埃博霉素类似物<sup>[14]</sup>。尽管目前已经分离到 39 种埃博霉素的类似物。但根据其生物合成酶的潜力,可能合成的埃博霉素类似物要远大于此。因此,筛选更广泛的埃博霉素产生菌仍是一条有效的途径<sup>[15]</sup>;3)分子生物学研究:近两三年来埃博霉素的遗传学研究主要在生物合成途径的分析<sup>[8]</sup>、模块基因功能的研究<sup>[6,7]</sup>、异源表达和基因簇的遗传改造方面<sup>[16-17]</sup>。有关工作均刚刚起步;4)临床医学研究:目前瑞士 Novartis 的埃博霉素 E (Epothilone B) 和美国 Squibb 的杂氮埃博霉素 I (Azaepothilone B) 均已进入 II 期临床研究,美国 Kosan 的埃博霉素 D (Epothilone D) 也在进行 I 期临床研究。所受试病例都是紫杉醇治疗无效患者,并已取得很有希望的结果。有关专家预计 3~4 年后该类药品可能上市。

埃博霉素不但结构简单而且是近年来发现的极少数天然 PKS/NRPS 杂合多酶复合体催化合成的生物活性物质之一<sup>[18]</sup>。其杂合生物合成基因簇 PKS/NRPS 的报道为生化医药界利用组合生物合成手段开发新药提供了新颖的思路和独特的材料。由于埃博霉素属于结合氨基酸的 I 型聚酮类化合物,其链长由模块的数量决定,侧链组分由模块中专一性 AT/A 决定,每轮缩合反应中  $\beta$ -酮基的还原程度由每个模块中还原域的多少决定,非核糖体肽的修饰由差向异构化 (Epimerization)、N-甲基化 (N-methylation)、氧化 (Oxidation) 等功能域实现。因此我们有可能以多个方面的遗传改造来获得埃博霉素衍生物:A、起始羧酸的置换,除了乙酸和丙酸单元常用于大环内酯物的生物合成之外,还有更多稀有的起始单元,如已经发现的有异丁酸 (Avermectin)、 $\lambda$  3,4-二氢环己酸 (Rapamycin & FK506) 以及 3-氨基-5-羟基苯甲酸 (Rifamycin),也可以通过整合不同的加载模块到 PKS/NRPS 起始链中从而引入了新的起始羧酸单元;B、功能缺失:由于 KS/C、AT/A 和 ACP/PCP 的功能域对 PKS/NRPS 的每个模块来说都是必需

的,所以有关的功能缺失只涉及加工修饰结构域,如 KR、DH 和 ER 或杂环修饰的结构域 OX 可以被敲除,从而形成新的化合物;C、新功能的获得:新功能的获得可通过添加 1~2 个结构域改变  $\beta$ -酮基还原水平或杂环的修饰程度来实现;D、内酯环大小的改变:通过敲除 PKS/NRPS 链中的模块或改变 TE 结构域在模块中的位置,使聚酮链提前或延迟释放;E、侧链的改变:通过两类专一性的 AT 结构域的置换,如用结合丙二酰 CoA 的 AT 域置换结合甲基丙二酰 CoA 的 AT 域,使原来产物大环内酯环上的甲基侧链被 H 原子所取代;F、生物合成前体的添加:打断上游模块的功能并添加前体物,利用下游模块加工各种不同的前体物质产生许多不同的分子衍生物等等。

尽管通过上述独立的遗传操纵可以产生新的埃博霉素衍生物,但组合生物合成技术将成为埃博霉素未来研究的热点,该技术将上述遗传手段相结合对生物合成基因簇进行多方面改造,并通过质粒表达系统或多质粒系统<sup>[19,20]</sup>等实现各种改造的随机组合,从而产生大量的非天然埃博霉素化合物库,满足大规模活性筛选的需求。近年来,Kosan 生物科学研发公司的科学家建成了 6-DEB 类似物的组合文库,是组合生物合成埃博霉素的里程碑。组合文库的成功构建极大地推进了组合生物合成研究的前进速度和热情<sup>[21,22]</sup>,也预示了埃博霉素研究的诱人前景。

#### REFERENCES (参考文献)

- [1] LI Y (李越中), HU W (胡玮), ZHOU I (周璐). Natural antitumor compounds with activity of promoting microtubule assembly. *Acta Pharm Sinica* (药学报) 2001, **36**(2): 155-160
- [2] Kavallaris M, Verrills N M, Hill B T. Anticancer therapy with novel tubulin-interacting drugs. *Drug Resist Updat*, 2001, **4**(6): 392-401
- [3] Cane D E, Walsh C T, Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*, 1998, **282**(5386): 63-68
- [4] Katz L, McDaniel R. Novel macrolides through genetic engineering. *Med Res Rev*, 1999, **19**(6): 543-558
- [5] Moffitt M C, Neilan B A. The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiol Letters*, 2000, **191**(2): 159-167
- [6] Julien B, Shah S, Ziermann R et al. Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*. *% Gene*, 2000, **249**(1-2): 153-160
- [7] Molnar I, Schupp T, Ono M et al. The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol*, 2000, **7**(2): 97-109
- [8] Gerth K, Steinmetz H, Höfle G et al. Studies on the biosynthesis of epothilones: the biosynthetic origin of the carbon skeleton. *J Antibiot*, 2000, **53**(12): 1373-1377
- [9] Nicolaou K C, Ritzel A, Namoto K. Recent developments in the chemistry, biology and medicine of the epothilones. *Chem Commun*,

- [ 10 ] Nicolaou K C , Winssinger N , Pastor J et al. Synthesis of epothilones A and B in solid and solution phase . Nature , 1997 , 387 ( 6630 ) : 268 - 272
- [ 11 ] Liu Z Y , Chen Z C , Yu C Z et al. Total synthesis of epothilone A through stereospecific epoxidation of the *p*-Methoxybenzyl ether of epothilone C . Chemistry , 2002 , 8 ( 16 ) : 3747 - 3756
- [ 12 ] LI Y Z ( 李越中 ) , Gerth K , Reichenbach H. Nutritional control of epothilone production by *Sorangium cellulosum* strain So ce 90 . Chinese J Antibiot ( 中国抗生素杂志 ) , 1998 , 23 ( 6 ) : 420 - 424
- [ 13 ] Frykman S , Tsuruta H , Lau J et al. Modulation of epothilone analog production through media design . J Ind Microbiol Biotechnol , 2002 , 28 ( 1 ) : 17 - 20
- [ 14 ] Hardt I H , Steinmetz H , Gerth K et al. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum* , strains So ce90/B2 and So ce90/D13 : isolation , structure elucidation , and SAR studies . J Nat Prod , 2001 , 64 ( 7 ) : 847 - 856
- [ 15 ] LI Y Z ( 李越中 ) , HU W ( 胡玮 ) , WU B H ( 吴斌辉 ) et al. Diversity of metabolites and their bioactivities in myxobacterium *Sorangium cellulosum* . Acta Microbiol Sinica ( 微生物学报 ) , 2001 , 41 ( 6 ) : 716 - 722
- [ 16 ] Tang L , Shah S , Chung L et al. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster . Science , 2000 , 287 ( 5453 ) : 640 - 642
- [ 17 ] Arslanian R L , Tang L , Blough S et al. A new cytotoxic epothilone from modified polyketide synthases heterologously expressed in *Mycrococcus xanthus* . J Nat Prod , 2002 , 65 ( 7 ) : 1061 - 1064
- [ 18 ] Silakowski B , Nordsiek G , Kunze B et al. Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase : the myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga151 . Chem Biol , 2001 , 8 ( 1 ) : 59 - 69
- [ 19 ] McDaniel R , Thamchaipenet A , Gustafsson C et al. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products . Proc Natl Acad Sci , 1999 , 96 ( 5 ) : 1846 - 1851
- [ 20 ] Xue Q , Ashley G , Hutchinson C R et al. A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides . Proc Natl Acad Sci , 1999 , 96 ( 21 ) : 11740 - 11745
- [ 21 ] Staunton J , Wilkinson B. Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides . Curr Opin Chem Biol , 2001 , 5 : 159 - 164
- [ 22 ] Kealey J T. Creating polyketide diversity through genetic engineering . Front Biosci , 2003 , 8 : C1 - C13

## The PKS/NRPS Hetero-gene Cluster of Epothilones

LI Zhi-Feng Etienne Nguimbi LI Yue-Zhong\* LIU Wei-Feng

( State Key Laboratory of Microbial Technology , College of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 , China )

**Abstract** Novel macrolides epothilones , produced by cellulolytic myxobacterium *Sorangium cellulosum* , have the activity to promote microtubule assembly , and are considered to be a potential successor to the famous antitumor drug taxol. The biosynthetic genes leading to the epothilones are clustered into a large operon. The multi-enzyme complex is a hetero-gene cluster of polyketide synthase ( PKS ) and non-ribosomal peptide synthetases ( NRPS ) and contains several functional modules , i. e. a loading module , one NRPS module , eight PKS modules , and a P450 epoxidase. The former ten modules biosynthesize desoxyepothilone ( epothilones C and D ) , which is then epoxidized at C12 and C13 and converted into epothilones ( epothilones A and B ) by the P450 epoxidase. The NRPS module is responsible for the formation of the thiazole side chain from cysteine. The biosynthesis procedure of epothilones can be divided into 5 stages , i. e. formation of holo-ACP/PCP , chain initiation and thiazole ring formation , chain elongation , termination and epoxidation , and post-modification. The analysis of the gene cluster and the biosynthetic pathway reveals that novel epothilone analogs could not only be produced by chemical synthesis / modification , traditional microbial technologies , but also can be genetically manipulated through combinatorial biosynthesis approaches.

**Key words** epothilones , polyketide synthase , non-ribosomal peptide synthetase , gene cluster , combinatorial biosynthesis

Received : 01-28-2003

This work was supported by Grants from NSFC ( No. 30070008 ) , 863 ( No. 2001AA628160 ) and Department of Education of China.

\* Corresponding author. Tel : 86-531-8564288 ; Fax : 86-531-8565610 ; E-mail : lilab@sdu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>