

微生物次生代谢产物生物合成中的拜耳-维立格单加氧酶

李阳丽, 杨小雨, 邓子新, 朱冬青

武汉大学 药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071

李阳丽, 杨小雨, 邓子新, 等. 微生物次生代谢产物生物合成中的拜耳-维立格单加氧酶. 生物工程学报, 2019, 35(3): 351–362.

Li YL, Yang XY, Deng ZX, et al. Baeyer-Villiger monooxygenases in the biosynthesis of microbial secondary metabolites. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 351–362.

摘要: 拜耳-维立格单加氧酶是一类可以催化酮生成酯以及硫等杂原子氧化的黄素依赖的单加氧酶, 在合成化学和生物催化等工业领域有重要的应用前景。本文总结了微生物次生代谢产物生物合成途径中涉及的拜耳-维立格反应, 讨论了其反应的特点和催化这些反应的拜耳-维立格单加氧酶的氨基酸序列特征, 为拜耳-维立格单加氧酶的蛋白质工程改造提供参考。

关键词: 生物催化, 生物合成, 黄素依赖的单加氧酶, 拜耳-维立格氧化

Baeyer-Villiger monooxygenases in the biosynthesis of microbial secondary metabolites

Yangli Li, Xiaoyu Yang, Zixin Deng, and Dongqing Zhu

Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract: Baeyer-Villiger monooxygenases, a well-studied class of flavin-dependent enzymes, catalyze the conversion of ketones to lactones or esters and the oxygenation of heteroatoms, which possesses great practical prospect in synthetic chemistry and biocatalysis. In this review, we focus on Baeyer-Villiger oxidations involved in biosynthesis of microbial secondary metabolites and discuss the characteristics of these Baeyer-Villiger oxidations and Baeyer-Villiger monooxygenases, to provide reference for the protein engineering of Baeyer-Villiger monooxygenases.

Keywords: biocatalysis, biosynthesis, flavin-dependent monooxygenase, Baeyer-Villiger oxidation

1899年, 德国化学家阿道夫·冯·拜耳和他的学生维克多·维立格报道了用卡洛酸作为氧化剂, 催化环酮生成相应内酯的反应, 即有机化学中著

名的拜耳-维立格 (Baeyer-Villiger, BV) 氧化反应。反应机理如图 1 所示, 过氧酸亲核进攻羰基碳形成 Criegee 中间体, 连接处两个碳中的一个迁

Received: July 14, 2018; **Accepted:** September 11, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81373305, 31401057), Hubei Provincial Natural Science Foundation of China (No. 2017CFB618).

Corresponding author: Dongqing Zhu. Tel/Fax: +86-27-68756730; E-mail: DZhu2011@whu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 81373305, 31401057), 湖北省自然科学基金 (No. 2017CFB618) 资助。

网络出版时间: 2019-02-27

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190226.1622.001.html>

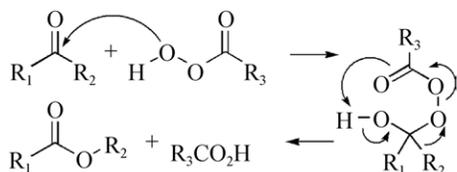


图1 拜耳-维立格氧化反应

Fig. 1 Baeyer-Villiger oxidations.

移到氧上形成酯，同时释放一分子羧酸^[1]。用过酸催化 BV 反应虽然成本相对较低，但在底物选择性、反应的区域选择性和立体选择性等方面并不能满足有机合成的需求，同时过酸的使用会引起生产过程中的安全隐患、废弃物处理以及环境污染等诸多问题。这些有机催化 BV 反应的缺点在下文将要提到的生物催化 BV 反应中是不存在的。

1948 年就已经有报道微生物可以催化 BV 反应^[1]。1976 年催化 BV 反应的拜耳-维立格单加氧酶(BVMO)第一次被分离纯化^[2-3]。1988 年第一个编码 BVMO 的基因从不动杆菌中被克隆^[4]，随后参与碳源分解代谢的环戊酮单加氧酶 (CPMO)、环己酮单加氧酶 (CHMO)、苯基丙酮单加氧酶 (PAMO) 等 BVMO 对应的基因陆续从各种微生物中被克隆并深入研究。目前所发现的 BVMO 都属于黄素依赖的单加氧酶，可以分为 I 型、II 型和 O 型三类。I 型 BVMO 以 FAD 和 NADPH 为辅助因子，蛋白序列上具有一个保守的 motif (FXGXXXHXXXWP)，大部分 BVMO 属于这一类型；II 型 BVMO 以 FMN 和 NAD(P)H 为辅助因子，没有 I 型 BVMO 所具有的保守 motif，此类型相对较少；O 型 BVMO 虽然需要 FAD 和 NAD(P)H 作为辅助因子，但是蛋白序列上不具备 I 型 BVMO 的保守 motif。

与过酸催化 BV 反应相比，BVMO 在催化 BV 反应中表现出了高度的区域选择性和立体选择性，同时反应条件非常温和。分解代谢中的 BVMO 具有较广的底物选择范围，在有机合成领域具有

更大的应用潜力，因此被深入研究和改造。已有不少文献对 BVMO 的研究进展进行了系统的整理，同样偏重于分解代谢中 BVMO 的相关工作^[5-9]。本文仅仅针对微生物次生代谢产物生物合成中的 BVMO 研究进展进行概述。

1 微生物次生代谢产物生物合成途径中的 BV 反应

依据蛋白一级结构所具有的保守结构域，将微生物次生代谢产物生物合成代谢途径中的 BVMO 分为以下 4 类：第 1 类具有 CzcO 结构域 (NCBI 的保守结构域数据库记录号 COG2072，下同)，即 I 型 BVMO；第 2 类具有 SsuD 结构域 (COG2141)，即 II 型 BVMO；第 3 类具有 UbiH 结构域 (COG0654)，即 O 型 BVMO；第 4 类为具有 ABM 结构域 (Pfam: PF03992) 的 BVMO。

1.1 具有 CzcO 结构域的 BVMO

1.1.1 戊丙酯菌素生物合成途径中的 PtlE、PntE 和 PenE

戊丙酯菌素 Pentalenolactone 是链霉菌产生的倍半萜类抗生素。随着重要农用抗生素阿维菌素的产生菌阿维链霉菌基因组的测序完成，与戊丙酯菌素合成相关的基因簇被发现，即 *ptl* 基因簇。2009 年美国布朗大学 David E. Cane 教授课题组确定了此基因簇中的 BVMO 基因 *ptlE* 所编码的蛋白催化 1-deoxy-11-oxopentalenic acid 生成新戊丙酯菌素 D^[10] (图 2A)。而脱叶链霉菌戊丙酯菌素生物合成基因簇 *pen* 中同源基因 *penE* 和沙场链霉菌戊丙酯菌素生物合成基因簇 *pnt* 中同源基因 *pntE* 所编码的酶催化 BV 反应生成的产物则是戊丙酯菌素 D，与 PtlE 相比表现出相反的区域选择性^[11]。

针对这一组同源蛋白进行点突变，实验数据显示 PntE 的 185 位亮氨酸突变成 PtlE 相应位置的丝氨酸后产生的突变体蛋白 PntE (L185S) 催化

生成新戊丙酯菌素 D, 即与 PtlE 催化生成的产物相同^[12]。说明此位置对这一组同源的 BVMO 在催化反应过程中的区域选择性有至关重要的作用。

1.1.2 细胞松弛素生物合成途径中的 CcsB

细胞松弛素 Cytochalasin 是真菌产生的具有抗血管增生活性的次生代谢产物。2011 年美国唐奕教授课题组在棒曲霉中克隆并确定了大约 30 kb 细胞松弛素的生物合成基因簇, 其中包括一个 BVMO 基因 *ccsB*^[13]。深入研究证明 CcsB 首先以 Ketocytochalasin 为底物, 发生第一次氧的插入, 生成 Precytochalasin, 紧接着以 Precytochalasin 为底物发生第二次氧的插入, 生成 Cytochalasin Z₁₆, 如图 2B 所示^[14]。

1.1.3 3,5-二甲基苔色酸衍生的杂萘类化合物生物合成途径中的 AusC、PrhK 和 AndJ

3,5-二甲基苔色酸衍生的杂萘类化合物是由真菌合成的一类天然产物。构巢曲霉产生的 Austinol 和 Dehydroaustinol 属于这类化合物, 其生物合成基因簇于 2012 年确定^[15], 基因簇中的 *ausB* 基因所编码的具有 CzcO 结构域的蛋白被认为催化了生物合成途径中的一步 BV 反应^[15]。但是紧接下来的实验数据推翻了这个结论, 基因簇中另一个同源基因 *ausC* 所编码的蛋白才是真正负责此反应的 BVMO^[16], 如图 2C 所示。

青霉菌来源的同源蛋白 PrhK 和变色曲霉来源的同源蛋白 AndJ 分别在 Paraherquonin 和 Anditomin 生物合成途径中被认为催化一样或者类似的反应^[17]。

1.1.4 毒隐翅虫素生物合成途径中的 PedG

毒隐翅虫共生菌能够产生毒隐翅虫素 Pederin。2002 年其生物合成基因簇被确定, 其中含有一个 BVMO 基因 *pedG*^[18-19]。研究者对 PedG 如何参与毒隐翅虫素的生物合成给出了两种推测 (图 2D): 途径 a, PedF 最后一个模块的 ACP 结构域上连接的中间产物直接被 PedG 催化生成酯, 紧

接着水解生成毒隐翅虫素的主体结构; 途径 b, PedF 催化产生的中间产物继续被 PedH 延伸和释放, 生成 Onnamide 类型的中间体, 在 PedG 催化下生成酯, 然后水解生成毒隐翅虫素的主体结构。

1.1.5 异呋喃萘醌类化合物生物合成途径中的 IfnQ 和 IfqQ

异呋喃萘醌类化合物是植物、真菌和放线菌产生的具有抗氧化和抗疟原虫活性的天然产物^[20]。2016 年在链霉菌 RI-77 中确定了第一个此类化合物的生物合成基因簇^[21]。JBIR-76 和 77 是链霉菌 RI-77 中一个 II 型聚酮合酶基因簇 *ifn* 负责产生的异呋喃萘醌类化合物^[22], 终产物并没有内酯结构, 但是基因簇中包含一个 BVMO 基因 *ifnQ*, 暗示着生物合成途径中可能涉及到 BV 反应和含有内酯的中间产物。*ifnQ* 基因敲除和 IfnQ 的生化反应等实验数据表明其可能负责二环中间体上支链的成酯反应, 如图 2E 所示, 以便后期支链上碳链的缩短和第 3 个环的形成^[21]。

2017 年美国沈奔教授课题组在链霉菌 CB01883 中同样分离到此类化合物, 确定了相关的生物合成基因簇 *ifq*, 与 *ifn* 基因簇同源^[23]。其中 IfqQ 被认为负责与其同源蛋白 IfnQ 相同的反应。

1.2 具有 SsuD 结构域的 BVMO

潮霉素属于萘醌类安莎霉素, 山东大学沈月毛教授课题组于 2014 年从链霉菌中克隆了潮霉素生物合成基因簇。其中 *hgc3* 基因编码的蛋白属于 LLM 家族 FMN 依赖的单加氧酶。依据基因 *hgc3* 敲除实验可以推测 Hgc3 可能以 prohygrocin 为底物, 催化 BV 反应生成 17-dehydroxyhygrocin (图 3)^[24]。

1.3 具有 UbiH 结构域的 BVMO

1.3.1 光辉霉素生物合成途径中的 MtmOIV 和 CmmOIV

临床抗癌药物光辉霉素生物合成途径中的

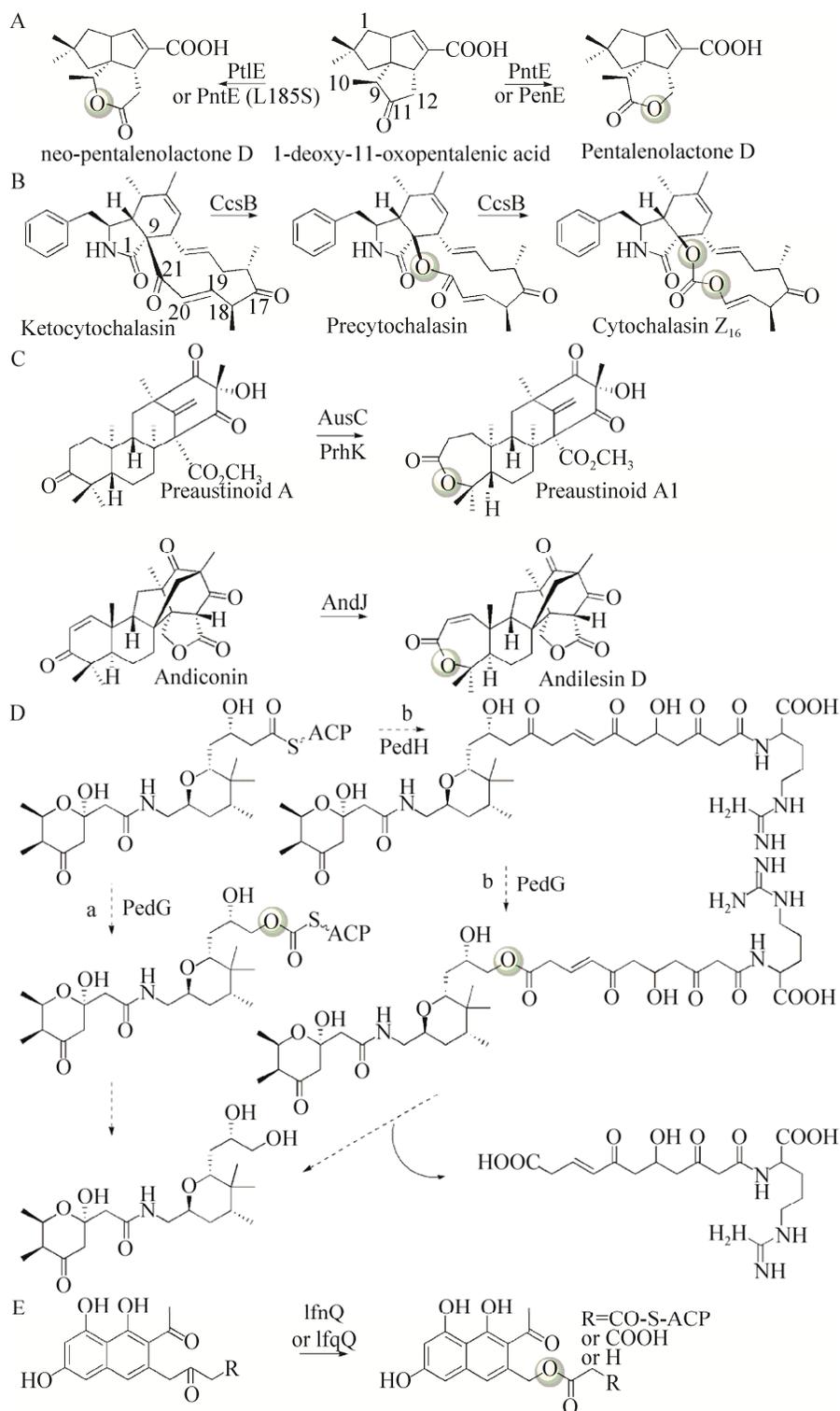


图 2 微生物次生代谢产物生物合成途径中具有 CzcO 结构域的单加氧酶催化的拜耳-维立格反应

Fig. 2 Baeyer-Villiger recations catalysed by BVMOs with CzcO domain in the biosynthesis of microbial secondary metabolites. (A) Pentalenolactone. (B) Cytochalasin. (C) Austinol and anditomin. (D) Pederin. (E) JBIR-76 and JBIR-77.

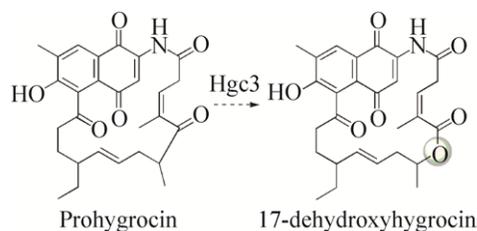


图3 微生物次生代谢产物生物合成途径中具有 SsuD 结构域的单加氧酶催化的拜耳-维立格反应

Fig. 3 Baeyer-Villiger reaction catalysed by BVMOs with SsuD domain in the biosynthesis of microbial secondary metabolites.

MtmOIV 是第一个被研究的已知天然底物的 BVMO。光辉霉素由链霉菌产生, 1996 年其生物合成基因簇被克隆^[25], 随后生物合成途径被逐步研究^[26-27]。光辉霉素的三环核心结构对活性来讲是必需的, 因此生物合成过程中中间体前光辉霉素 B 上第 4 个环的清除显得尤为重要。mtmOIV 编码的单加氧酶能够催化前光辉霉素 B 第 4 个环形成前光辉霉素 B 内酯, 然后水解开环和脱羧生成光辉霉素 DK^[28-30], 如图 4A 所示。通过对 MtmOIV 蛋白三维结构的深入分析, 逐步确认了其 FAD 的结合位点、底物的结合位点, 以及部分 NADPH 的结合位点^[31-33]。

与光辉霉素同一类型的化合物 Chromomycin 的生物合成基因簇中 *cmmOIV* 与 *mtmOIV* 同源, 被认为催化相同的反应^[34]。

1.3.2 苯并夹氧杂蒽类抗生素 FD-594 生物合成途径中的 PnxO4

FD-594 是链霉菌产生的具有抗肿瘤和抗菌活性的化合物, 2011 年其基因簇被克隆^[35], 推测其中含有一个 FAD 依赖的单加氧酶基因 *pnxO4* 所编码的酶催化 BV 反应产生内酯中间体, 如图 4B 所示。紧接着内酯水解、旋转、重新环化, 环氧键打开, 脱羧生成双键。

1.3.3 角环素类抗生素 BE-7585A 生物合成途径中的 BexE 和 BexM

角环素类化合物是一组由 II 型聚酮合酶合成

的天然产物。BE-7585A 是从东方拟无枝酸菌中分离得到, 具有抗癌活性^[36]。基因簇中的两个基因 *bexE* 和 *bexM* 所编码的两个 FAD 依赖的酶被认为参与 BV 反应, 如图 4C 所示, 其中 BexE 实现萜环类骨架转角形成角环素类骨架^[37]。而 BexM 则可能以 BexE 催化的产物为底物, 通过 BV 反应产生内酯中间物, 进而实现迁移碳的羟化。

1.3.4 9,10-菲醌结构生物合成途径中的 MrqO6

Murayaquinone 是链霉菌产生的含有 9,10-菲醌核心结构的化合物。与角环素类骨架形成类似, 9,10-菲醌中所具有的转角结构也是 BVMO 参与形成的。2017 年上海交通大学的陶美凤教授课题组的实验数据显示, 在 3 个氧化还原酶的催化下, 线性的萜烯发生氧化重排生成了具有转角结构的 9,10-菲醌^[38], 这其中处于中心的位置是催化 BV 反应的 MrqO6, 如图 4D 所示。

1.3.5 呋喃酮类化合物生物合成途径中的 Orf8_E837、Orf13_E492 和 AufJ

E-837、E-492 和 E-975 是链霉菌中的 I 型聚酮合酶催化合成的含有呋喃酮结构的天然产物^[39]。两个生物合成基因簇分别含有一个 BV 单加氧酶基因 *orf8_E837* 和 *orf13_E492*。研究者认为聚酮合酶合成的碳链经过环化和释放形成六元环, 羟化后的中间物在 Orf8_E837 或者 Orf13_E492 催化下发生 BV 反应, 如图 4E 所示。紧接着开环脱羧, 在其他酶催化下重新环化生成呋喃酮。

Aurafuron 是从粘细菌中分离到的化合物^[40]。2007 年在橙色标桩粘细菌中克隆了生物合成基因簇, 其中含有一个 FAD 依赖的单加氧酶基因 *aufJ*^[41]。研究者认为 AufJ 参与呋喃酮的形成, 但与 Orf8_E837 和 Orf13_E492 不同, AufJ 催化 AufC 最后一个模块的 ACP 结构域上连接的中间产物生成酯, 水解释放出缩短了碳链的中间产物, 然后环化生成呋喃酮。此推测的途径与毒隐翅虫素生物合成中 PedG 催化的反应途径 a 类似。

1.3.6 吡咯里西啶生物碱生物合成途径中的 PxaB 和 LgnC

吡咯里西啶生物碱是两个五元环形成的含氮杂环化合物，一般由植物产生，用于抵抗植食性昆虫。2015年武汉大学虞沂教授课题组从链霉菌中克隆了 Legonmycin 的生物合成基因簇^[42]。基因簇中的基因 *lgnC* 编码的 FAD 依赖的氧化还原酶以吡咯里西啶中间物为底物，首先催化 BV 反应，实现扩环，随后水解、脱羧和重新环化，生成吡咯里西啶骨架结构，如图 4F 所示。LgnC 有可能催化随后羟化反应。与此同时德国 Bode 教授课题组从致病杆菌中克隆了 Pyrrolizinenamide 的

生物合成基因簇^[43]。基因簇中 *pxaB* 基因编码的蛋白催化与 LgnC 类似的反应，如图 4G 所示，不做赘述。

1.3.7 Lipocyclocarbamate 生物合成途径中的 LpiC 和 BraC

与吡咯里西啶生物碱类似，Lipocyclocarbamate (LCC) 是一组具有吡咯并噁唑骨架结构的天然产物。2013年和2014年在荧光假单胞菌中克隆确定了这类化合物的生物合成基因簇^[44-45]。两个基因簇中的同源基因 *lpiC* 和 *braC* 编码的蛋白不管是识别的底物还是催化的反应都与 PxaB 和 LgnC 非常类似 (图 4F、4G)。

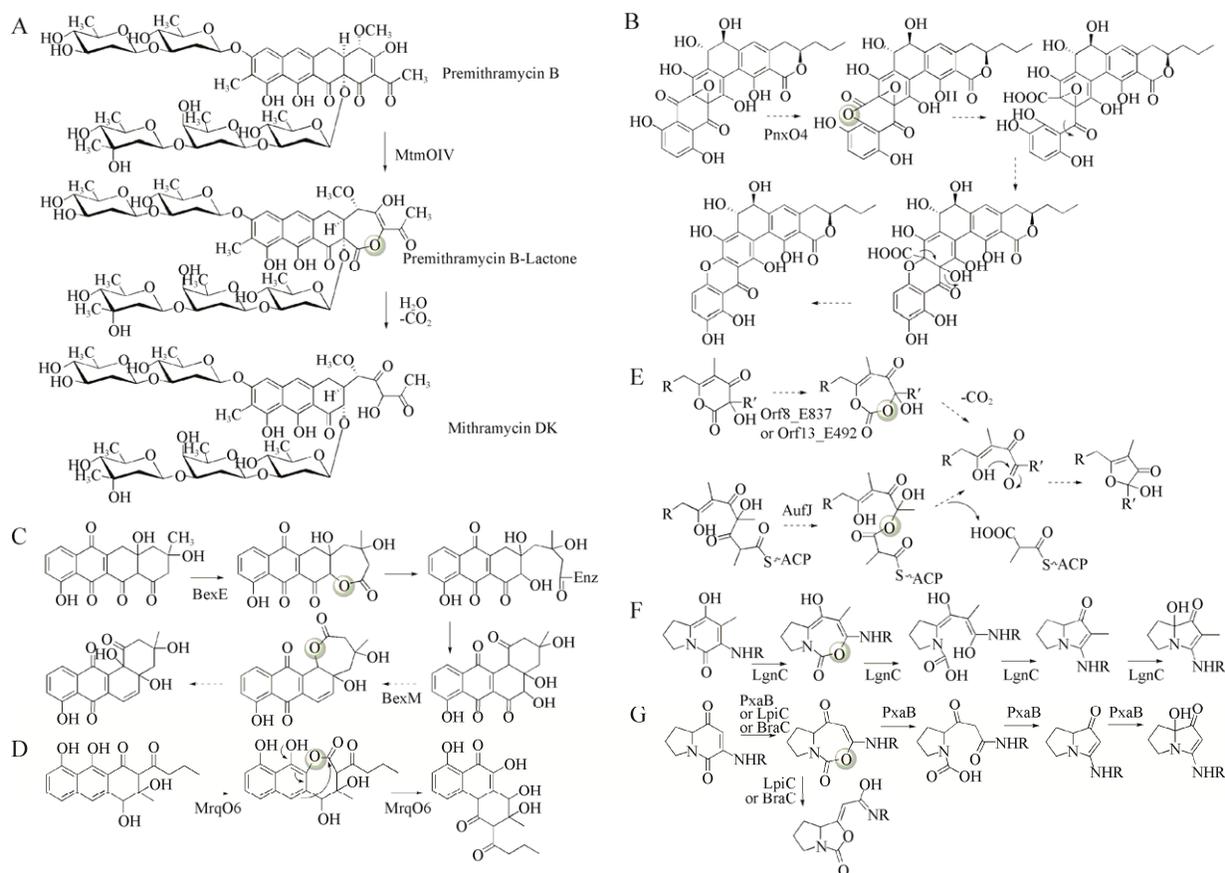


图 4 微生物次生代谢产物生物合成途径中具有 UbiH 结构域的单加氧酶催化的拜耳-维立格反应

Fig. 4 Baeyer-Villiger reactions catalysed by BVMOs with UbiH domain in the biosynthesis of microbial secondary metabolites. (A) Mithramycin. (B) FD-594. (C) BE-7585A. (D) Murayaquinone. (E) E-837, E-492 and aurafuron. (F) Legonmycin. (G) Pyrrolizinenamide and lipocyclocarbamate.

1.4 具有 ABM 结构域的 BVMO

新角萜环类抗生素是一组由 II 型 PKS 合成的具有新角萜环骨架结构的天然产物,其中也包含了一些骨架结构在新角萜环基础上发生了明显改变的化合物,例如 Kinamycin、Jadomycin 和 Gilvocarcin。这些改变都与氧化还原酶参与的 BV 反应相关。2012 年和 2015 年,中国科学院微生物研究所杨克迁教授课题组针对 Jadomycin 和 Kinamycin 生物合成途径中两个同源蛋白 JadG 和 AlpJ(以及 KinG)进行了研究,发现 JadG 和 AlpJ 负责新角萜环骨架中 B 环的开环^[46-47],2017 年 AlpJ 的蛋白结构被解析^[48]。在 Gilvocarcin 生物合成途径中的同源蛋白 GilOII 的研究过程中,一个含内酯的中间产物被分离和确定,如图 5 所示,证明了 B 环的开环与 BV 反应有关^[49]。与之同源的并且可能催化类似反应的还包括 Lomaiviticin 生物合成途径中的 Lom28 (以及 Strop_2200)^[50-51]、Fluostatin 生物合成途径中的 FlsG (以及 Flu_orf17)^[52-53]、Chrysomycin 生物合成途径中的 ChryOII、Ravidomycin 生物合成途径中的 RavOII^[54]。

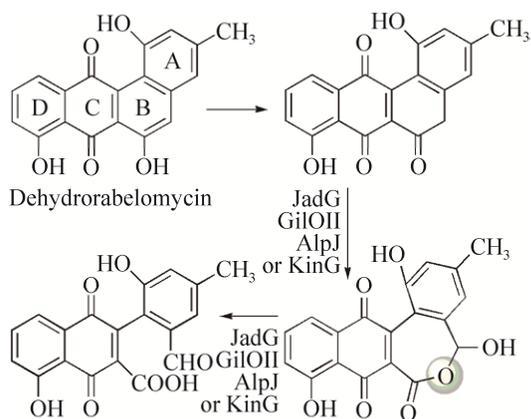


图 5 微生物次生代谢产物生物合成途径中具有 ABM 结构域的单加氧酶催化的拜耳-维立格反应

Fig. 5 Baeyer-Villiger recations catalysed by BVMOs with ABM domain in the biosynthesis of microbial secondary metabolites.

2 BV 反应的特点

针对分解代谢中涉及的 BVMO,研究者往往从生物催化应用的角度出发,选择各种结构简单的含酮化合物作为底物,测定酶的底物选择性和催化活性,以及反应的区域选择性和立体选择性。与分解代谢不同,一般情况下微生物次生代谢产物生物合成途径中的 BVMO 都有相对明确的天然底物,研究工作往往围绕天然底物展开。以上所列举的 BVMO 的天然底物存在巨大的差异,有的 BVMO 识别小分子化合物,也有的 BVMO 可以识别连接在蛋白 (ACP) 上的化合物。而作为底物的小分子也有明显的结构多样性,有相对简单的化合物,例如参与戊丙酯菌素生物合成的 BVMO 所识别的底物为简单的三环化合物 (图 2A);也有相对复杂的化合物,例如参与光辉霉素生物合成的 BVMO 所识别的底物为发生糖基化修饰的稠环芳烃化合物 (图 3A)。

就反应的区域选择性来讲,以上所列大部分 BVMO 遵循有机化学中 BV 反应区域选择性规律,即含氢少的碳发生迁移,生成正常的内酯,例如戊丙酯菌素生物合成中的 PtIE、细胞松弛素生物合成中的 CcsB、3,5-二甲基苔色酸衍生的杂萜类化合物生物合成中的 AusC、PrhK 和 AndJ、潮霉素生物合成中的 Hgc3、角环素类抗生素生物合成中的 BexE 和 BexM、9,10-菲醌结构生物合成中的 MrqO6、咪喃酮类化合物生物合成中的 AufJ。少数 BVMO 并不遵循这一规律,即含氢多的碳发生了迁移,生成非正常内酯,例如戊丙酯菌素生物合成中的 PntE 和 PenE。就反应的立体选择性来讲,戊丙酯菌素生物合成中的 PtIE 和细胞松弛素生物合成中的 CcsB 遵循了有机化学中 BV 反应立体选择性规律,即迁移的碳如果是手性碳,在迁移后都保留了迁移前的手性。其他 BVMO 或者不涉及此问题,或者研究者并没有给出明确的结论。

有的 BVMO 的天然底物中连接羰基碳的并

不都是碳,例如 CcsB 第二次的 BV 反应底物 (图 2B)、Orf8_E837 或者 Orf13_E492 的底物 (图 4E) 以及 LgnC、PxaB、LpiC 和 BraC 的底物 (图 4F, 4G)。这些实验数据说明在 BVMO 在生物催化应用中不仅仅可以用来催化酮生成酯,也有可能催化酯类化合物生成碳酸酯类化合物,催化酰胺类化合物生成胺甲酸酯类化合物。

许多 BVMO 所催化的不仅仅是 BV 反应,往往还伴随着其他后续反应的发生,例如水解、脱羧、分子内重排、羟化等。对于酯来说,发生水解以及脱羧很容易理解。分子内重排的典型例子是 MrqO6 所参与的 9,10-菲醌的形成,这可能与内酯中间产物本身的结构有很大的关系。值得注意的是黄素依赖的蛋白催化碳原子或者杂原子的羟化有很多报道,但是 LgnC 和 PxaB 催化 BV 反应的同时也可以催化碳原子羟化的现象则较为少见。

目前并没有文献报道这些 BVMO 是否能够识别非天然的底物催化 BV 反应或者杂原子的氧化。我们小组在研究戊丙酯菌素生物合成时发现 PntE 能够以环戊酮和环己酮为底物催化 BV 反应生成相应的内酯,但是相对于天然底物, PntE 对非天然底物的转化效率非常低 (未发表)。

3 BVMO 蛋白的特点

利用以上列举的 4 类 BVMO 蛋白的氨基酸序列构建系统发育树,如图 6A 所示,大部分的蛋白根据其具有的保守结构域聚成一群。

1.1 中列举的具有 CzcO 结构域的 BVMO,即 I 型 BVMO,所催化的天然底物在结构上虽然相差很大,但这一组蛋白的氨基酸序列上依然表现出了相对较高的一致性和相似性。首先 I 型 BVMO 具有的保守 motif (FXGXXXHXXXWP),在 BVMO 都能找到,但略有出入,如图 6B 箭头标示位置:第一,大部分蛋白此保守区域的序列是 FXGXXXHXXXWD,即最后一个氨基酸并不是脯氨酸,而是天冬氨酸;第二, AusC、PrhK 和

AndJ 此保守区域的序列为 YXGXXXHXXXWD,即第一个氨基酸并不是苯丙氨酸,而是酪氨酸;第三, PedG 与其他蛋白相比,在一级序列上的相似性和一致性较低,保守的 motif 序列为 FXGXXXHXXXKYK,即最后两个氨基酸不是色氨酸和脯氨酸,而是酪氨酸和赖氨酸。可以造成 PntE 区域选择性发生超过 90% 反转的突变 L185S 就位于此保守 motif 前 15 个氨基酸的位置,如图 6B 左边三角标示位置。而另外一个对 PntE 区域选择性产生大约 30% 反转的突变是 R484L,如图 6B 右边三角标示位置。氨基酸序列同源比对表明此突变所在的区域是通过蛋白质工程对 PAMO 的区域选择性和立体选择性进行改造的重点区域。

与 I 型 BVMO 相比,已发现的 II 型 BVMO 并不多,研究深入的例子是假单胞菌中参与樟脑烷分解代谢的两个二酮樟脑烷单加氧酶:2,5-二酮樟脑烷-1,2-单加氧酶 (2,5-DKMO) 和 3,6-二酮樟脑烷-1,6-单加氧酶 (3,6-DKMO)。3,6-DKMO 是唯一的蛋白质结构被解析的 II 型 BVMO。但通过序列的同源比对,可以发现 3,6-DKMO 活性中心与 FMN 结合相关的氨基酸残基在 2,5-DKMO 中没有表现出保守性。氨基酸水平的序列比对可以发现 3,6-DKMO 活性中心与 FMN 结合相关的氨基酸残基在 Hgc3 中同样没有表现出保守性,系统发育树中 Hgc3 也没有与 3,6-DKMO 和 2,5-DKMO 聚成一群。依据 Hgc3 蛋白具有 SscD 结构域和对 *hgc3* 基因敲除突变株的检测推测其催化 BV 反应是有其合理性的,但是缺乏可作为直接证据的体外生化反应,使得此结论的得出尚存疑虑。

与 1.1 所列举的 I 型 BVMO 相比,1.3 列举的 O 型 BVMO 在蛋白的氨基酸序列水平上的一致性和相似性明显降低。其中 MtmOIV 蛋白的三维结构被深入研究:MtmOIV 有 FAD 结合结构域 (氨基酸残基 10-183 和 276-394 组成)、中间结构域 (氨基酸残基 184-275) 和 C 端结构域 (氨基酸残基 395-510) 3 个结构域。O 型 BVMO 蛋白序列

上并不具备 I 型 BVMO 所具有的保守 motif 序列, 但从序列比对的结果可以看到保守的区域主要有 3 个 (以 MtmOIV 为例说明所处位置), 如图 6C 所示: 第一, MtmOIV 的 15–42 氨基酸区域; 第二, MtmOIV 的 159–182 氨基酸区域; 第三, MtmOIV 的 285–320 氨基酸区域, 即 UbiH 结构域。这 3 个氨基酸序列保守的区域均位于 MtmOIV 的 FAD 结合结构域。蛋白 C 端 (即 MtmOIV 的 477–485 氨基酸区域) 也存在一定的保守性。

到目前为止, 具有合成代谢途径中具有 ABM 结构域的 BVMO 在分解代谢途径中未见报道,

BVMO 分类中也并不包括这一类。系统发育树暗示这一类 BVMO 在进化关系上可能与具有 SsuD 结构域的 II 型 BVMO 相对较近。此类 BVMO 仅有不到 250 个氨基酸残基, 明显小于其他三类。另外, 此类 BVMO 虽然在催化反应时也需要 FAD 或者 FMN 参与, 但蛋白本身与这些辅因子并没有很强的结合能力。已发现的这类蛋白的催化底物基本一致, 所以其在氨基酸序列上具有较高的一致性和相似性。依据已被解析的 AlpJ 的三维结构, Asn60、Trp64 和 Trp181 被认为可能与底物结合相关, His50 和 Tyr178 被认为可能和三维结

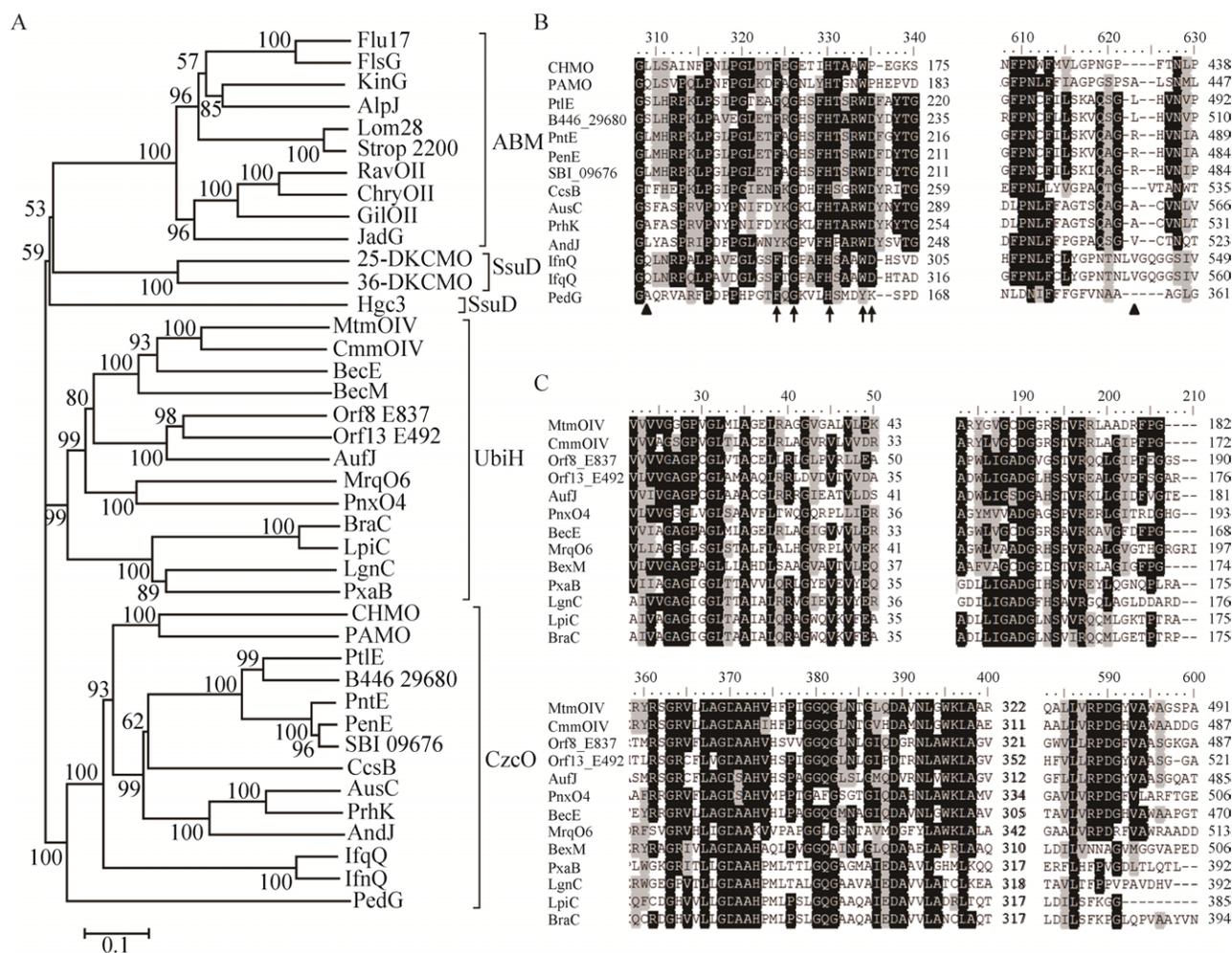


图 6 微生物次生代谢产物生物合成途径中的拜耳-维立格单加氧酶氨基酸序列分析

Fig. 6 Protein sequence analysis of BVMOs in the biosynthesis of microbial secondary metabolites. (A) Phylogenetic analysis. (B) Partial sequence alignment of BVMO proteins with CzcO domain. (C) Partial sequence alignment of BVMO proteins with UbiH domain.

构的稳定相关^[48]。在其他同源蛋白中,这5个氨基酸残基表现出高度的保守性。

需要注意的是当对某一个酶进行氨基酸序列比对时,如果发现其具有以上4种保守结构域中某一种,这并不能说明其必然催化BV反应。例如南京农业大学刘凤权教授课题组所报道的吩嗪类抗生素生物合成途径中的LaPhzNO1,其具有CzcO保守结构域,但催化N的氧化,并非BV反应^[55]。

4 小结

限制酶催化和生物催化在有机合成中应用的因素有很多,其中最重要的有两点:第一,酶作为蛋白质是不稳定的;第二,酶一般具有较窄的底物选择范围。一直以来微生物分解代谢中的CHMO和PAMO因其相对较宽的底物选择范围或相对较高的热稳定性而成为研究和改造的重点关注对象,例如通过蛋白质工程等手段拓宽底物范围,改变区域选择性,改善对映选择性,提高对硫的氧化能力,改变其辅因子,增加稳定性等^[5-9]。从2002年开始出现利用BVMO实现公斤级以上规模生物催化的零星报道,也有固定化酶、固定化细胞、两相催化体系和大规模催化中氧的供给等问题的研究^[6]。这些研究加深了我们对BVMO基础酶学和生物催化的认识,同时也对其工业应用作出了有力的推动。

微生物次生代谢产物是药物的重要来源之一,关注天然产物生物合成的课题组往往把研究重心放在生物合成基因簇的克隆,生物合成途径的推测和验证,酶催化机制的探索,在此基础上通过合成生物学手段获取新的活性化合物。其中相关酶在生物催化领域的潜在应用一般并不作为研究重点。文中针对这一点,总结了微生物次生代谢产物生物合成途径中所涉及的BV反应以及负责催化BV反应的酶,初步分析了反应的特点和相关酶在氨基酸序列上的保守性。希望通过以上总结和分析能够为BVMO的蛋白质工程改造

提供更多的选择,推动其在生物催化领域的应用。

REFERENCES

- [1] Turfitt GE. The microbiological degradation of steroids. *Biochem J*, 1948, 42(3): 376–383.
- [2] Donoghue NA, Norris DB, Trudgill PW. The purification and properties of cyclohexanone oxygenase from *Nocardia globerula* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871. *Eur J Biochem*, 1976, 63(1): 175–192.
- [3] Griffin M, Trudgill PW. Purification and properties of cyclopentanone oxygenase of *Pseudomonas* NCIB 9872. *Eur J Biochem*, 1976, 63(1): 199–209.
- [4] Chen YC, Peoples OP, Walsh CT. *Acinetobacter* cyclohexanone monooxygenase: gene cloning and sequence determination. *J Bacteriol*, 1988, 170(2): 781–789.
- [5] Balke K, Beier A, Bornscheuer UT. Hot spots for the protein engineering of Baeyer-Villiger monooxygenases. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 247–263.
- [6] Bučko M, Gemeiner P, Schenk Mayerová A, et al. Baeyer-Villiger oxidations: biotechnological approach. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(15): 6585–6599.
- [7] Leisch H, Morley K, Lau PCK. Baeyer-Villiger monooxygenases: more than just green chemistry. *Chem Rev*, 2011, 111(7): 4165–4222.
- [8] de Gonzalo G, Mihovilovic MD, Fraaije MW. Recent developments in the application of Baeyer-Villiger monooxygenases as biocatalysts. *Chembiochem*, 2010, 11(16): 2208–2231.
- [9] Pazmiño DET, Dudek HM, Fraaije MW. Baeyer-Villiger monooxygenases: recent advances and future challenges. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(2): 138–144.
- [10] Jiang JY, Tetzlaff CN, Takamatsu S, et al. Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: A biochemical Baeyer-Villiger reaction and discovery of a new branch of the pentalenolactone family tree. *Biochemistry*, 2009, 48(27): 6431–6440.
- [11] Seo MJ, Zhu DQ, Endo S, et al. Genome mining in *Streptomyces*. Elucidation of the role of Baeyer-Villiger monooxygenases and non-heme iron-dependent dehydrogenase/oxygenases in the final steps of the biosynthesis of pentalenolactone and neopentalenolactone. *Biochemistry*, 2011, 50(10): 1739–1754.

- [12] Chen K, Wu SW, Zhu L, et al. Substitution of a single amino acid reverses the regiospecificity of the baeyer-villiger monooxygenase pnte in the biosynthesis of the antibiotic pentalenolactone. *Biochemistry*, 2016, 55(48): 6696–6704.
- [13] Qiao KJ, Chooi YH, Tang Y. Identification and engineering of the cytochalasin gene cluster from *Aspergillus clavatus* NRRL 1. *Metabol Eng*, 2011, 13(6): 723–732.
- [14] Hu YC, Dietrich D, Xu W, et al. A carbonate-forming Baeyer-Villiger monooxygenase. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(7): 552–554.
- [15] Lo HC, Entwistle R, Guo CJ, et al. Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(10): 4709–4720.
- [16] Matsuda Y, Awakawa T, Wakimoto T, et al. Spiro-ring formation is catalyzed by a multifunctional dioxygenase in austinol biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(30): 10962–10965.
- [17] Matsuda Y, Wakimoto T, Mori T, et al. Complete biosynthetic pathway of anditomin: nature's sophisticated synthetic route to a complex fungal meroterpenoid. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(43): 15326–15336.
- [18] Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(22): 14002–14007.
- [19] Piel J, Höfer I, Hui DQ. Evidence for a symbiosis island involved in horizontal acquisition of pederin biosynthetic capabilities by the bacterial symbiont of *Paederus fuscipes* beetles. *J Bacteriol*, 2004, 186(5): 1280–1286.
- [20] Bezabih M, Abegaz BM, Dufall K, et al. Antiplasmodial and antioxidant isofuranonaphthoquinones from the roots of *Bulbine capitata*. *Planta Med*, 2001, 67(4): 340–344.
- [21] Katsuyama Y, Sone K, Satou R, et al. Involvement of the baeyer-villiger monooxygenase IfnQ in the biosynthesis of isofuranonaphthoquinone scaffold of JBIR-76 and -77. *Chembiochem*, 2016, 17(11): 1021–1028.
- [22] Motohashi K, Izumikawa M, Kagaya N, et al. JBIR-76 and JBIR-77, modified naphthoquinones from *Streptomyces* sp. RI-77. *J Antibiot*, 2016, 69(9): 707–708.
- [23] Guo ZK, Pan GH, Xu ZR, et al. New isofuranonaphthoquinones and isoindolequinones from *Streptomyces* sp. CB01883. *J Antibiot*, 2017, 70(4): 414–422.
- [24] Li SR, Wang HX, Li YY, et al. Biosynthesis of hydrocins, antitumor naphthoquinone ansamycins produced by *Streptomyces* sp. LZ35. *Chembiochem*, 2014, 15(1): 94–102.
- [25] Lombó F, Blanco G, Fernández E, et al. Characterization of *Streptomyces argillaceus* genes encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin. *Gene*, 1996, 172(1): 87–91.
- [26] Lombó F, Brana AF, Méndez C, et al. The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol*, 1999, 181: 642–647.
- [27] Remsing LL, Garcia-Bernardo J, Gonzalez A, et al. Ketopremithramycins and ketomithramycins, four new aureolic acid-type compounds obtained upon inactivation of two genes involved in the biosynthesis of the deoxysugar moieties of the antitumor drug mithramycin by *Streptomyces argillaceus*, reveal novel insights into post-PKS tailoring steps of the mithramycin biosynthetic pathway. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(8): 1606–1614.
- [28] Prado L, Fernández E, Weißbach U, et al. Oxidative cleavage of premithramycin B is one of the last steps in the biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *Chem Biol*, 1999, 6(1): 19–30.
- [29] Rodríguez D, Quirós LM, Braña AF, et al. Purification and characterization of a monooxygenase involved in the biosynthetic pathway of the antitumor drug mithramycin. *J Bacteriol*, 2003, 185(13): 3962–3965.
- [30] Gibson M, Nur-e-alam M, Lipata F, et al. Characterization of kinetics and products of the Baeyer-Villiger oxygenase MtmOIV, the key enzyme of the biosynthetic pathway toward the natural product anticancer drug mithramycin from *Streptomyces argillaceus*. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(50): 17594–17595.
- [31] Wang C, Gibson M, Rohr J, et al. Crystallization and X-ray diffraction properties of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV from the mithramycin biosynthetic pathway in *Streptomyces argillaceus*. *Acta Cryst*, 2005, 61: 1023–1026.
- [32] Beam MP, Bosserman MA, Noinaj N, et al. Crystal structure of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV, the key enzyme of the mithramycin biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 2009, 48(21): 4476–4487.
- [33] Bosserman MA, Downey T, Noinaj N, et al.

- Molecular insight into substrate recognition and catalysis of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV, the key frame-modifying enzyme in the biosynthesis of anticancer agent mithramycin. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(11): 2466–2477.
- [34] Menéndez N, Nur-e-Alam M, Braña AF, et al. Biosynthesis of the antitumor chromomycin A₃ in *Streptomyces griseus*: analysis of the gene cluster and rational design of novel chromomycin analogs. *Chem Biol*, 2004, 11(1): 21–32.
- [35] Kudo F, Yonezawa T, Komatsubara A, et al. Cloning of the biosynthetic gene cluster for naphthoxanthene antibiotic FD-594 from *Streptomyces* sp. TA-0256. *J Antibiot*, 2011, 64(1): 123–132.
- [36] Sasaki E, Ogasawara Y, Liu HW. A biosynthetic pathway for BE-7585A, a 2-thiosugar-containing angucycline-type natural product. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(21): 7405–7417.
- [37] Jackson DR, Yu X, Wang G, et al. Insights into complex oxidation during BE-7585A biosynthesis: structural determination and analysis of the polyketide monooxygenase BexE. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(4): 1137–1147.
- [38] Gao GX, Liu XY, Xu M, et al. Formation of an angular aromatic polyketide from a linear anthrene precursor via oxidative rearrangement. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(7): 881–891.e4.
- [39] Banskota AH, McAlpine JB, Sørensen D, et al. Isolation and identification of three new 5-alkenyl-3, 3(2H)-furanones from two *Streptomyces* species using a genomic screening approach. *J Antibiot*, 2006, 59(3): 168–176.
- [40] Kunze B, Reichenbach H, Müller R, et al. Aurafuron A and B, new bioactive polyketides from *Stigmatella aurantiaca* and *Archangium gephyra* (Myxobacteria). *J Antibiot*, 2005, 58(4): 244–251.
- [41] Frank B, Wenzel SC, Bode HB, et al. From genetic diversity to metabolic unity: studies on the biosynthesis of aurafurones and aurafuron-like structures in myxobacteria and streptomycetes. *J Mol Biol*, 2007, 374(1): 24–38.
- [42] Huang S, Tabudravu J, Elsayed SS, et al. Discovery of a single monooxygenase that catalyzes carbamate formation and ring contraction in the biosynthesis of the legonmycins. *Angewand Chem*, 2015, 54(43): 12697–12701.
- [43] Schimming O, Challinor VL, Tobias NJ, et al. Structure, biosynthesis, and occurrence of bacterial pyrrolizidine alkaloids. *Angewand Chem*, 2015, 54(43): 12702–12705.
- [44] Johnston CW, Zvanych R, Khyzha N, et al. Nonribosomal assembly of natural lipocyclocarbamate lipoprotein-associated phospholipase inhibitors. *Chembiochem*, 2013, 14(4): 431–435.
- [45] Schmidt Y, van der Voort M, Crüsemann M, et al. Biosynthetic origin of the antibiotic cyclocarbamate brabantamide A (SB-253514) in plant-associated *Pseudomonas*. *Chembiochem*, 2014, 15(2): 259–266.
- [46] Fan KQ, Pan GH, Peng XJ, et al. Identification of JadG as the B ring opening oxygenase catalyzing the oxidative C-C bond cleavage reaction in jadomycin biosynthesis. *Chem Biol*, 2012, 19(11): 1381–1390.
- [47] Wang B, Ren JW, Li LY, et al. Kinamycin biosynthesis employs a conserved pair of oxidases for B-ring contraction. *Chem Commun*, 2015, 51(42): 8845–8848.
- [48] Pan GH, Gao XQ, Fan KQ, et al. Structure and function of a C-C bond cleaving oxygenase in atypical angucycline biosynthesis. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(1): 142–152.
- [49] Tibrewal N, Pahari P, Wang GJ, et al. Baeyer-Villiger C-C bond cleavage reaction in gilvocarcin and jadomycin biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(44): 18181–18184.
- [50] Janso JE, Haltli BA, Eustáquio AS, et al. Discovery of the lomaiviticin biosynthetic gene cluster in *Salinispora pacifica*. *Tetrahedron*, 2014, 70(27/28): 4156–4164.
- [51] Kersten RD, Lane AL, Nett M, et al. Bioactivity-guided genome mining reveals the lomaiviticin biosynthetic gene cluster in *Salinispora tropica*. *Chembiochem*, 2013, 14(8): 955–962.
- [52] Yang CF, Huang CS, Zhang WJ, et al. Heterologous expression of fluostatin gene cluster leads to a bioactive heterodimer. *Org Lett*, 2015, 17(21): 5324–5327.
- [53] Feng ZY, Kim JH, Brady SF. Fluostatins produced by the heterologous expression of a TAR reassembled environmental DNA derived type II PKS gene cluster. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(34): 11902–11903.
- [54] Kharel MK, Nybo SE, Shepherd MD, et al. Cloning and characterization of the ravidomycin and chrysomycin biosynthetic gene clusters. *Chembiochem*, 2010, 11(4): 523–532.
- [55] Zhao YY, Qian GL, Ye YH, et al. Heterocyclic aromatic N-Oxidation in the biosynthesis of phenazine antibiotics from *Lysobacter antibioticus*. *Org Lett*, 2016, 18(10): 2495–2498.

(本文责编 郝丽芳)