大环内酯类免疫抑制剂他克莫司的生物合成机制研究进展

陈单丹^{a,b} 岑沛霖^a 刘文^b 徐志南^{*,a}^(a) 浙江大学化工系生物工程研究所 杭州 310027)^(b) 中国科学院上海有机化学研究所 生命有机国家重点实验室 上海 200032)

摘要 他克莫司(FK506)是一种来源于土壤链霉菌的大环内酯类免疫抑制剂,由典型的聚酮合酶(PKS)-非核糖体肽合成酶(NRPS)杂合系统负责催化其生物合成。他克莫司的化学结构特殊,包括骨架环的哌啶单元、4-羟基-3-甲氧基环己基官能团,以及甲氧基和烯丙基侧链。近年来,关于他克莫司的生物合成机制,特别是其特殊前体的形成途径的研究发展迅速。对他克莫司生物合成的酶学基础进行了系统性地综述,重点总结了其前体形成机制的研究新进展。

关键词 他克莫司; FK506; 生物合成; 聚酮合酶; 非核糖体肽合成酶; 前体; 途径特异性

Progress in Studying the Biosynthetic Mechanism of the Macrolide Immunosuppressant Tacrolimus

Chen, Dandan^{a,b} Cen, Peilin^a Liu, Wen^b Xu, Zhinan^{*,a}^(a) Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)^(b) State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Science, Shanghai 200032)

Abstract Tacrolimus (FK506), derived from various soil *Streptomyces* species, is a potent macrolide immunosuppressant that is assembled by a typical polyketide synthase (PKS)-nonribosomal peptide synthetase (NRPS) hybrid system. Its chemical structure is unique, with a piperidine unit consisting in the polyketide skeleton, a 4-methoxy, 5-hydroxy-cyclohexyl functional group, as well as methoxyl and allyl side chains. Recently, studies on the biosynthetic mechanism of tacrolimus, particularly for the pathways encoding the unusual precursors, achieved great successes. In this review, we summarize the enzymatic basis in correspondence to the biosynthesis of tacrolimus, and emphasize on the recent progress in understanding the biosynthetic pathways of the unusual precursors 4,5-dihydroxycyclohex-1-enecarboxylic acid (DHCHC), methoxymalonyl-acyl carrier protein (ACP), allylmalonyl-coenzyme A (CoA) and *L*-pipecolic acid.

Keywords tacrolimus; FK506; biosynthesis; polyketide synthase (PKS); nonribosomal peptide synthetase (NRPS); precursor; pathway-specific

他克莫司(Tacrolimus, FK506)是一种二十三元大环内酯类化合物,由日本藤泽制药公司于1981年首次从筑波链霉菌 *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 的代谢产物中提取获得^[1]。他克莫司能与受体蛋白 FKBP12 形成复合物,通过特异地与钙调磷酸酶紧密结合,有效遏制其肽脯氨酰顺反异构酶活性,从而抑制 T 淋巴细胞特异性转录因子(NK-AT)的活化及白细胞介素-2 等细胞因子的合成,达到免疫抑制的药效。他克莫司具有免疫抑制药效强、用药剂量低、急性排斥反应发生率低等优点,

在器官移植和自身免疫系统疾病方面疗效显著^[2]。他克莫司在临床上常用作肾脏、肝脏、胰腺等实体器官移植手术后的免疫抑制剂,也可用于类风湿性关节炎、狼疮性肾炎、特异性皮炎等自身免疫性疾病的治疗。

他克莫司^[1a]与子囊霉素(Ascomycin, FK520)^[3]、雷帕霉素(Rapamycin)^[4]在化学结构上具有很多共同点,属于天然的结构类似物(图 1): 三者的聚酮骨架环都包含相同的哌啶单元,都有一个侧链包含 4-羟基-3-甲氧基环己基结构;而他克莫司与子囊霉素的相似度更高,在相

* E-mail: znxu@zju.edu.cn

Received December 5, 2012; revised January 6, 2013; published online January 11, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20832009, 21176214, 91213303), the National Basic Research Program of China (973 Program, Nos. 2010CB833200, 2012CB721100).

国家自然科学基金(Nos. 20832009, 21176214, 91213303)、国家重点基础研究发展计划(973 计划, Nos. 2010CB833200, 2012CB721100)。

图1 他克莫司、子囊霉素和雷帕霉素的化学结构式

Figure 1 Chemical structures of tacrolimus, ascomycin and rapamycin

同位置都包含两个甲氧基侧链。两者的唯一差别在于他克莫司含有一个罕见的烯丙基侧链，而子囊霉素在相应位置是乙基官能团。

他克莫司、子囊霉素和雷帕霉素都是来源于土壤链霉菌的大环内酯类天然产物，而编码这类次级代谢产物生物合成的相关基因在链霉菌基因组中往往成簇存在。1995年，Leadlay 课题组^[5]首次报道了 *Streptomyces hygroscopicus* NRRL5491 中的雷帕霉素基因簇^[5]；1997年，Motamedi 等^[6]报道了 *Streptomyces* sp. MA6548 中的部分他克莫司基因簇；2000年，Reeves 课题组^[7]首次报道了 *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC-14891 中的子囊霉素基因簇；2011年，Yoon 课题组^[8]报道了三株链霉菌 *Streptomyces* sp. KCTC11604BP, *Streptomyces* sp. ATCC55098(MA6858)和 *Streptomyces kanamyceticus* KCTC9225 中的完整的他克莫司基因簇。这些基因簇信息的获得极大地推进了他克莫司、子囊霉素和雷帕霉素生物合成机制的研究。

1 他克莫司骨架结构的形成机制

他克莫司与子囊霉素、雷帕霉素的生物合成基因簇都能编码典型的 I 型聚酮合酶(PKS)-非核糖体肽合成酶(NRPS)杂合系统^[9]，负责催化骨架内酯环结构的形成。

以他克莫司为例，其骨架结构是由 3 个 I 型 PKS (FkbA, FkbB, FkbC)和 1 个 NRPS (FkbP)催化形成的一个含有酰胺键的二十三元大环内酯(图 2)^[6a]。

I 型 PKS 和 NRPS 都是以模块形式存在的多功能酶。每一模块含有一套独特的、非重复使用的催化功能域，负责完成一轮链延伸反应。由 I 型 PKS 参与合成的天然产物主要是聚酮类化合物，例如红霉素、阿维菌素等^[10]。其延伸模块含有 β -酮基硫酯合成酶(KS)、酰基转移酶(AT)和酰基载体蛋白(ACP)三个基本功能域，可能还包含 β -酮基还原酶(KR)、脱水酶(DH)和烯醇还原酶(ER)功能域。起始模块>Loading module)负责识别起始单元，将其上载至 ACP 形成硫酯。延伸模块中的 AT 识别不同的延伸单元(以丙二酰辅酶 A 和甲基丙二酰辅酶 A 最为常见)，并将其转移至同模块的 ACP 上。各延伸模块的 KS 将上游的聚酮链转移至自身的半胱氨酸活性位点上，并催化同模块中 ACP 上的硫酯脱去二氧化碳形成碳负离子，进而与半胱氨酸残基上的聚酮链上的酰基发生 Claisen 缩合，以完成多轮两碳单位的延伸^[11]。NRPS 主要参与以万古霉素、环孢菌素 A^[12]为代表的聚肽类天然产物的生物合成。其延伸模块包括至少三个催化功能域：缩合(C)结构域、腺苷化(A)结构域、肽酰转蛋白(PCP)。A 功能域负责底物的选择和活化，并将其转移至 PCP 功能域上形成氨酰化硫酯，C 功能域催化 PCP 上氨(肽)酰化硫酯的氨基与上游模块中的硫酯缩合形成肽键^[13]。

在他克莫司基因簇中，编码 3 个 PKS 和 1 个 NRPS 的基因距离紧密。Motamedi 等^[6]最早指出，他克莫司骨架的聚酮长链部分是以 FkbB-FkbC-FkbA 的催化顺序获得的。作为典型的 I 型 PKS, FkbB、FkbC 和 FkbA 分别含有 5 个、2 个和 4 个模块。自 FkbB 的起始模块识别和上载第 1 个前体开始，以硫酯键连接在 ACP 上的聚酮链连续发生 10 轮 Claisen 缩合反应，所获得的全长的线性聚酮链连接于 FkbA 最后一个模块的 ACP 上。作为骨架结构组装体系中唯一的 NRPS, FkbP 负责催化骨架组装的最后步骤。Walsh 课题组^[14]揭示了 FkbP 仅有的模块所含有的特殊 C₁-A-PCP-C₂ 功能域。其中，C₁-A-PCP 功能域能够以特殊的 N7-C6 酰胺键向他克莫司的骨架引入 1 个氨基酸。同时，C₂ 功能域被认为可以在 C(1)—C(26)处形成 C—O 内酯键，从而催化大环内酯骨架的形成。

2 途径特异性前体的生物合成机制

负责组装他克莫司骨架的杂合 PKS/NRPS 系统总共能够识别和上载 12 分子的前体，除了常见的丙二酰辅酶 A(2 分子)和甲基丙二酰辅酶 A(5 分子)外，还包括 1 分子的 4,5-二羟基-1-烯-环己酸(DHCHC)，2 分子的甲氧

图2 他克莫司骨架结构的形成机制
Figure 2 Generation of the macrolide skeleton of tacrolimus

基丙二酰 ACP, 1 分子的烯丙基丙二酰辅酶 A 和 1 分子的哌啶甲酸^[15]。这些特殊前体的引入是致使他克莫司具备独特化学结构和药理活性的最大原因。值得一提的是, 这些特殊的 PKS/NRPS 前体并非直接来源于初级代谢。随着他克莫司生物合成基因簇的报道以及随后对其中各个基因功能的研究, 人们发现编码这 4 种前体的生物合成的相关基因全部位于他克莫司的基因簇中。也就是说, 这 4 种被 PKS/NRPS 杂合系统识别的特殊前体具有途径特异性(pathway-specific)。以下将分别介绍这些途径特异性前体具体的生物合成机制。

2.1 PKS 起始单元 4,5-二羟基-1-烯-环己酸(DHCHC)

他克莫司以及子囊霉素、雷帕霉素的侧链都包含有特殊的 4-羟基-3-甲氧基环己基结构。Paiva 等^[16]在向雷帕霉素产生菌喂养 ^{13}C 标记的莽草酸后, 发现产物相应位置获得标记。Reynolds 等^[17]用 ^{13}C 和 D 标记的莽草酸喂养子囊霉素产生菌, 也得到了被标记的子囊霉素。由此推断, 他克莫司侧链上的相同六元环结构也应该来源于莽草酸。通过序列分析和比对, Lowden 等^[18]指出 PKS 起始模块含有 3 个特殊催化功能域, 分别为羧酸连接酶

(CL), ER 和 ACP。CL 功能域具有三磷酸腺苷(ATP)依赖的连接酶活性, 能够催化形成单磷酸腺苷(AMP)活化的羧酸, 继而将活化的羧酸转移到下游 ACP 上。他们推测他克莫司和子囊霉素、雷帕霉素的真实起始单元应该是游离羧酸形式的。ER 功能域具有还原酶活性, 故上载到 ACP 的结构单元应该是不饱和的。Reynolds 等^[17]的标记实验结果指出莽草酸 C(3)位置的羟基和 C(6)上的一个氢没有转移到最终产物, 故莽草酸的不饱和六元环结构可能先发生 1,4-消除反应脱水, 再通过 1,4-加成反应加氢, 得到在 C(1)—C(2)处呈不饱和烯键的真实起始单元。此外, Motamedi 等^[19]的研究指出, 4-羟基-3-甲氧基环己基侧链上的甲氧基是通过后修饰作用在 O-甲基转移酶的催化下得到的。综合以上分析, Lowden 等^[20]提出, 他克莫司、子囊霉素和雷帕霉素的生物合成起始单元为 4,5-二羟基-1-烯-环己酸(DHCHC)。至此, 4-羟基-3-甲氧基环己基结构的前体已经被确证是 DHCHC (Scheme 1), 但是对 DHCHC 的生物合成机制却并不清楚。

通过基因功能的证实, DHCHC 的形成机制才最终获得确立。Gregory 等^[21]通过基因敲除和回补实验, 在雷帕霉素的基因簇中找到了与 DHCHC 生物合成相关的基

Scheme 1

因 *rapK*. *rapK* 在他克莫司和子囊霉素基因簇中的同源基因是 *fkfO*. *RapK* 和 *FkfO* 曾经被认为能够辅助骨架结构 C(9)位置的氧化反应, 参与酮基的形成^[22]. 为了确证蛋白的催化活性, *Andexer* 等^[23]以莽草酸为底物分别对 *RapK* 和 *FkfO* 进行了体外测活, 结果都没有检测到产物的生成. 由于蛋白序列分析结果提示 *RapK* 和 *FkfO* 与分支酸变位酶具有很高的同源性, 他们尝试以分支酸为底物的体外测活, 成功检测到了 3,4-二羟基-1,5-二烯-环己酸(DCDC)和丙酮酸的产生. 由此证明, DCDC 的生物合成是以分支酸为底物的水解反应, 而不是先前推测的以莽草酸为底物的 1,4-消除反应(Scheme 2). 这与标记实验的结果并不相悖, 因为在初级代谢中, 分支酸是莽草酸的下游代谢产物^[24]. 莽草酸顺次经过莽草酸激酶以 ATP 为共底物的磷酸化、5-烯醇丙酮酰-莽草酸-3-磷酸(EPSP)合酶以磷酸烯醇式丙酮酸为共底物的加成消除和分支酸合酶催化的 1,4-反式消除 3 步反应^[25], 转化成为分支酸. *RapK* 和 *FkfO* 体外活性的检测从根本上阐明了 DHCHC 的生物合成机制, 也拓宽了人们对分支酸后续代谢途径多样性的认识.

2.2 PKS 延伸单元甲氧基丙二酰 ACP

雷帕霉素的骨架结构含有两个氧甲基侧链, *Gregory* 等^[26]的研究表明, 这两个氧甲基是通过 *O*-甲基转移酶 *RapQ* 和 *RapM* 的后修饰获得的. 不同于雷帕霉素,

Byrne 等^[27]通过同位素标记实验证明他克莫司和子囊霉素骨架结构中的两个氧甲基并非来自乙酸单元, 而是来源于具有“乙醇酸”结构的葡萄糖或者甘油. 安丝菌素(*Ansamitocin*)和子囊霉素的骨架结构中都含有甲氧基侧链. *Floss* 课题组^[28]对比两者的生物合成基因簇^[7,28b,29], 发现安丝菌素基因簇中的 *asm13~asm17* 与子囊霉素基因簇中的 *fkfG~fkfK* 具有极高的同源性. 基因序列分析显示, *asm14* 和 *fkfJ* 能够编码 ACP, *asm17* 和 *fkfG* 则能够编码 *O*-甲基转移酶. 他们大胆猜测, 由 5 个连锁基因组成的亚基因簇能够催化形成前体甲氧基丙二酰 ACP.

Kato 等^[28a]为此设计了异源表达实验, 将携带有 *asm13~asm17* 基因的穿梭质粒 pHGF9251 导入到 *Streptomyces lividans* K4.114/pKOS38-187. pKOS38-187 是由 *Reeves* 等^[30]构建的, 携带有改造的 *eryA* 基因. 原始的 *EryA* 能够催化 6-脱氧红霉内酯 B(6-DEB)的合成, 但由于其中第 6 个模块的 AT 被来自 *FkfA* 的 AT8 替换, 6-DEB 的 C2 位置会因为引入不同的 PKS 延伸单元而发生变化. 向异源表达宿主 *S. lividans* K4.114 导入 pKOS38-187 后, 能够检测到 2-脱甲基-6-DEB (1.5 mg/L)和 6-DEB (0.5 mg/L)的生成. 而将 pHGF9251 和 pKOS38-187 共同导入 *S. lividans* K4.114 后, 则只检测到 2-脱甲基-2-甲氧基-6-DEB(3 mg/L)的产生, 而没有 2-脱甲基-2-羟基-6-DEB(图 3). *Kato* 等^[28a]认为, 之所以产

Scheme 2

图3 6-脱氧红霉素酯B系列化合物的化学结构式

Figure 3 Chemical structures of the 6-deoxyerythronide series

生这种现象是因为来自 FkbA 的 AT8 特异地由 Asm13~Asm17(或同源蛋白 FkbG~FkbK)编码的 2-甲氧基丙酸单元, 或者在上载 2-羟基丙酸单元后进一步发生甲基化修饰. 至此, Asm17 和 FkbG 作为 *O*-甲基转移酶的功能已经获得确证, 但其发挥活性是在延伸单元上载前还是上载后仍不得而知. 也就是说, PKS 延伸单元究竟是甲氧基丙二酰 ACP 还是羟基丙二酰 ACP 尚不明确. 为此, Kato 等^[28a]进一步构建了敲除 *asm17* 的 pHGF9251 衍生质粒 pHGF9263, 并将其与 pKOS38-187 共转化到 *S. lividans* K4.114. 产物检测结果与单独导入 pKOS38-187 的情况类似, 没有 2-脱甲基-2-甲氧基-6-DEB 或者 2-脱甲基-2-羟基-6-DEB. 由此可见, Asm17 和 FkbG 是在延伸单元上载前起作用的, PKS 识别的延伸单元是甲氧基丙二酰 ACP, 而非羟基丙二酰 ACP.

基因序列分析 *asm13*~*asm17* 和 *fkbG*~*fkbK* 亚基因簇中的另 3 对同源基因, *asm13* 和 *fkbK* 负责编码 β -羟基酰基辅酶 A 脱氢酶, *asm15* 和 *fkbI* 负责编码酰基辅酶 A 脱氢酶, 而 *asm16* 和 *fkbH* 则编码卤酸脱卤酶(HAD)^[31]. Watanabe 等^[32]通过蛋白结晶和结构解析, 指出 FkbI 识别的底物更可能是酰化 ACP, 而非酰化辅酶 A. 换言之, FkbI 和 Asm15 应该是一种酰基 ACP 脱氢酶, FkbK 和 Asm13 也就有可能是 β -羟基酰基 ACP 脱氢酶. Kato 等^[28a]提出, Soraphen 的生物合成基因簇也含有类似的亚基因簇, 并且除 *asm16* 和 *fkbH* 以外的其它 4 对基因都能在其中找到同源基因或者功能域. 由于 Soraphen 亚基因簇中的 *sorC* 所额外编码的 AT 和 ACP 两个功能域被认为参与底物氨基酸的活化和修饰^[33], 他们推测 Asm16 和 FkbH 也发挥类似的功能. Dorrestein 等^[31]以噁唑霉素(Oxazolomycin)生物合成基因簇中 FkbH 的同源蛋白 OzmB 为研究对象, 检测到了甘油酰转移酶和磷酸酶的双功能, 并证明其作用底物为 1,3-二磷酸甘油酸(1,3-BPG). Chan 等^[34]总结前人工作, 推导了由 FkbG~FkbK 催化的 PKS 延伸单元甲氧基丙二酰 ACP 的生物合成机制(Scheme 3): 首先, FkbH 结合糖酵解途径中间体 1,3-BPG, 使之脱磷后以硫酯键靶定到 ACP 即 FkbJ 上; 随后, FkbK 催化甘油酰 ACP 的氧化, 形成 2-羟基-3-氧代丙酰 ACP; FkbI 进一步氧化 FkbK 的产物得到羟基丙

Scheme 3

二酰 ACP; 最后, FkbG 完成羟基位置的 *O*-甲基化得到甲氧基丙二酰 ACP. 含有甲氧基侧链的聚酮化合物不胜枚举, 甲氧基丙二酰 ACP 生物合成途径的揭示将有助于其它具有类似结构的活性天然产物的研究.

2.3 PKS 延伸单元烯丙基丙二酰辅酶 A

他克莫司 C(21)上的烯丙基侧链十分特殊, 也是其与子囊霉素唯一的结构差别所在. Paiva 等^[35]通过 ¹³C 标记实验证明引入烯丙基单元的前体包含 1 分子丙酸和 1 分子乙酸, 提示这种前体很可能是通过类似 PKS 机制形成的五碳单元. 不同于子囊霉素和雷帕霉素, 他克莫司的基因簇在过去很长一段时间内没有获得完整报道, 已知序列并不包含与五碳单元前体相关的基因. 因此, 五碳单元前体的具体结构及其生物合成机制一直没有得到确立. 直至近年, Petkovic 课题组^[36]和 Yoon 课题组^[8]分别报道了位于 *fkbG*~*fkbK* 亚基因簇上游的另一组 *tcs*(或命名为 *all*)亚基因簇, 对引入烯丙基侧链结构的 PKS 延伸单元的研究才取得突破性进展.

通过基因簇差异分析, Petkovic 课题组^[36]和 Yoon 课题组^[8]在子囊霉素 *fkbG*~*fkbK* 亚基因簇上游负责合成乙基丙二酰辅酶 A 的相应位置发现一组截然不同的基因. Yoon 课题组^[8]还对比了 3 株产生菌的他克莫司基因簇, 指出只有 *tcsA*~*tcsD* (*allA*~*allD*) 4 个基因是五碳单元前体生物合成所必需的, 这一点也被基因敲除实验证明. 从蛋白序列角度看, TcsA(AllA)含有 AT-ACP 双功能域, TcsB(AllK)含有 KS 功能域, 两者很可能协同完成特殊聚酮前体的第一步缩合反应; TcsC(AllR)与巴豆酰辅酶 A 羧化/还原酶(CCR)同源, TcsD(AllD)与 FkbI 类似, 属于酰基 ACP 脱氢酶, 推测参与羧化、还原、脱氢修饰以最终形成引入他克莫司骨架的前体. Petkovic 课题组^[36]采用同框敲除的方法构建了 *allK* 基因失活的突变株. 在不影响周边基因的情况下, 突变株发酵产物中的他克

莫司被完全中断,而副产品子囊霉素的产量基本没有变化.这就说明 *all* 亚基因簇是与他克莫司的生物合成直接相关的,并且极可能负责合成他克莫司中与子囊霉素延伸单元乙基丙二酰辅酶 A 平行的前体.他们化学合成了与酰基-*N*-乙酰半胱氨酸硫酯(SNAC)以硫酯键连接的聚酮前体(图 4),向 *allK* 同框敲除突变株喂养烯丙基丙二酰 SNAC,在发酵产物中检测到了他克莫司.由此证明,由 *all* 亚基因簇催化形成的 PKS 延伸单元极可能是烯丙基丙二酰辅酶 A. Yoon 课题组^[8]的研究采取类似策略,分别构建了 *tcsA*, *tcsB*, *tcsC* 和 *tcsD* 同框敲除突变株,发酵产物的检测显示他克莫司的生物合成都被中断了.向 *tcsA* 同框敲除突变株喂养 3-氧代戊酰 SNAC 或者反式 2-戊烯酰 SNAC 都无法恢复他克莫司的产生,这种情况对 *tcsB* 同框敲除突变株则不然. *TcsA* 具有 AT 和 ACP 双功能域,可以利用 AT 活性将 SNAC 上聚酮链转移到自身的 ACP. 这就是说,由 *TcsA*~*TcsD* 催化的生物合成途径的中间体应该是以硫酯键连接在 ACP 上的聚酮链.换言之, FAS 和 *TcsC* 的作用底物分别是 3-氧代戊酰 ACP 和反式 2-戊烯酰 ACP. 向 *tcsA* 和 *tcsB* 同框敲除突变株喂养丙基丙二酰 SNAC 都无法恢复他克莫司的产生,说明丙基丙二酰辅酶 A 可能无法上载到 *TcsA* 的 ACP 功能域,也提示 *TcsD* 的作用底物应该是丙基丙二酰 ACP. 向 *tcsC* 同框敲除突变株喂养 3-氧代戊酰 SNAC 和反式 2-戊烯酰 SNAC 都无法恢复他克莫司的产生,说明 *TcsC* 的还原羧化活性对烯丙基丙二酰辅酶 A 的生物合成而言必不可少. *tcsD* 同框敲除突变株的发酵产物累积有大量 C(36)—C(37)位置饱和的他克莫司类似物,向其喂养除烯丙基丙二酰 SNAC 外的任何 SNAC 替代物都无法对发酵产物产生显著影响,说明 *TcsD* 应该在 *TcsA*~*TcsC* 之后的最后步骤发挥催化活性的. 由于 *TcsD* 的活性在 *tcsB* 和 *tcsC* 同框敲除突变株中不受影响, C(36)—C(37)位置饱和的他克莫司类似物的出现提示 *TcsD* 是在延伸单元上载到 PKS 前催化形成不饱和烯键的.

图 4 化学喂养的 SNAC 聚酮底物

Figure 4 Polyketide Substrates linked to SNAC for chemical complementation

基于大量实验事实, Yoon 课题组^[8]推导出 PKS 延伸

单元烯丙基丙二酰辅酶 A 的生物合成机制. *TcsA*(*AllA*) 的 AT-ACP 双功能域和 *TcsB*(*AllK*) 的 KS 功能域组成“最小 PKS”, 共同催化 1 分子丙酰辅酶 A 起始单元和 1 分子丙二酰辅酶 A 延伸单元发生 Claisen 缩合, 形成靶定在 ACP 上的 3-氧代戊酸结构. 初始形成的聚酮链经过宿主脂肪酸合成酶(FAS)催化的 β -酮基还原和脱水、*TcsC*(*AllR*) 的还原和羧化修饰以及 *TcsD*(*AllD*) 的脱氢作用得到烯丙基丙二酸结构单元. 烯丙基丙二酸单元极可能通过未知酶的作用从 ACP 转移到辅酶 A, 成为独一无二的 PKS 延伸单元(Scheme 4).

Scheme 4

2.4 NRPS 延伸单元 *L*-哌啶甲酸

大环骨架上的五元哌啶环是他克莫司、子囊霉素和雷帕霉素共有的另一特殊结构. Walsh 课题组^[14]指出, 哌啶结构是由 PKS/NRPS 杂合体系中的 *RapP*(*FkbP*)引入 1 分子非天然氨基酸形成的. Paiva 等^[37]在 *L*-赖氨酸营养缺陷条件下, 分别向雷帕霉素产生菌喂养 ^{13}C 标记的 *L*-赖氨酸和 ^3H 标记的 *D,L*-甲基哌啶, 发酵产物在哌啶环的相应位置都获得同位素标记, 且 *D,L*-甲基哌啶的 ^3H 同位素喂养获得很高的标记比例. 由此可见, 负责引入哌啶结构的 NRPS 延伸单元极可能是来源于 *L*-赖氨酸的哌啶甲酸.

Leadlay 课题组^[5]通过分析雷帕霉素的生物合成基因簇指出, *rapL* 负责编码环化脱氢酶, 很可能负责催化 *L*-赖氨酸直接转变成 *L*-哌啶甲酸. *rapL* 在他克莫司和子囊霉素基因簇中的同源基因是 *fkbL*. Khaw 等^[38]构建了敲除 *rapL* 的突变株, 发现雷帕霉素的生物合成被完全中断, 而向该突变株化学回补 *L*-甲基哌啶则能够恢复雷帕霉素的产生, 由此证明 *RapL*(*FkbL*)直接参与 NRPS 前体 *L*-哌啶甲酸的生物合成. Walsh 课题组^[39]报道了 *RapL*

在体外的赖氨酸环化酶活性,从根本上解决了 *L*-哌啶甲酸的生物合成机制问题.他们结合催化活性已有报道的鸟氨酸环化脱氨酶(OCD),以 *L*-赖氨酸为底物,添加烟酰胺作为辅因子,成功检测到了 *L*-哌啶甲酸的生成.通过测定 RapL 的体外反应动力学数据,他们进一步提出了 RapL 作为 *L*-赖氨酸环化脱氨酶的酶促反应机理是一种“复合物 NAD^+ 依赖的转化”(Scheme 5).首先,氧化态的烟酰胺(NAD^+)与 RapL 蛋白紧密结合,辅助底物 *L*-赖氨酸的氧化,自身转变成还原态(NADH).随后,新生的亚氨基酸在 RapL 蛋白的活性位点实现分子内的成环和脱氨.最后, NADH 作为氢供体辅助环化亚胺的还原,所得产物 *L*-哌啶甲酸可以从蛋白上轻易地解离下来,而循环再生的 NAD^+ 则继续与蛋白结合参与下轮的催化反应.

Scheme 5

3 他克莫司骨架环后修饰

在二十三元聚酮骨架形成之后,还需要两步后修饰最终得到成熟的他克莫司产物: C(9)的酮基化和 C(31)的 *O*-甲基化^[19a]. Shafiee 等^[19b,40]通过基因敲除获得了他克莫司骨架环形成后的中间体 9-脱酮基,31-脱甲基他克莫司和 31-脱甲基他克莫司.他们以 31-脱甲基他克莫司为底物,在测活体系中添加 *S*-腺苷甲硫氨酸(SAM)作为辅因子,成功检测到 FkbM 的氧甲基化活性.为了弄清 C(9)酮基形成的酶学机制,明确他克莫司骨架环后修饰的具体路径,我们针对 FkbD 和 FkbM 进行了研究.在体内利用同框敲除的方法,获得单独或者同时敲除 *fkbD* 和 *fkbM* 的突变株,发酵产物的检测结果提示他克莫司的生物合成后修饰酶 FkbD 和 FkbM 没有严格的作用顺序(Scheme 6).这一实验结果通过体外蛋白的催化活性及相关酶促反应动力学数据的测定得到了确证.我们还在体外成功检测到了由细胞色素 P450 氧化酶 FkbD 负责的连续氧化反应,即催化亚甲基发生羟化继而形成酮基,证实了 FkbD 能够独立催化他克莫司 C(9)位 α -酮基的形成.

比较未成熟中间体与他克莫司的抗真菌活性,可以

发现 9-脱酮基和 31-*O*-脱甲基的中间体的抗真菌活性均有不同程度的降低.正如大多数具有药理、生理活性的天然产物,他克莫司的骨架环后修饰被证明对其生理活性的贡献巨大.

4 总结与展望

他克莫司作为一种具有独特化学结构和重要药理活性的大环内酯类化合物,其化学全合成的研究引起了大化学合成工作者的广泛兴趣,这方面研究报道主要集中在他克莫司大规模发酵生产得以实现之前.由于他克莫司分子量大、手性复杂、结构复杂,现有方法多采用汇聚式合成策略^[41]. Merck 公司的研究人员^[42]于 1989 年首次全合成获得他克莫司,这也是国际上首例三羧基大环内酯类天然产物的全合成报道.他们采用不对称 Evans-Aldol 缩合反应分别合成关键性的片段结构,以 41 步 0.067% 的总产率得到终产物.1990 年, Schreiber 课题组^[43]采用与 Merck 公司相似的合成策略并采用 Ireland-Claisen 重排等新颖的方法,通过更高效率地获得甲基哌啶单元,最终以 32 步 0.21% 的总产率合成了他克莫司.随后, Ireland 课题组^[44]、 Sih 课题组^[45]、 Danishefsky 课题组^[46]、 Smith 等^[47]通过发展新的合成方法、改进部分结构单元的合成路径,丰富和完善了他克莫司的化学合成研究.

时至今日,关于他克莫司生物合成机制的研究已经十分全面、彻底.而其生物合成机制的揭示,特别是途径特异性前体形成机制的阐明,使得科研人员的眼光更多的聚焦到通过基因工程改造的方法获得产量提高、组分优化的新一代他克莫司产生菌上来.例如,我们^[15a]利用位点特异性整合的方法,在他克莫司产生菌的基因组中倍增了与前体甲氧基丙二酰 ACP 和烯丙基丙二酰辅酶 A 生物合成相关的亚基因簇,获得的基因重组菌的他克莫司产量得到约 120% 的提高. Kosec 等^[48]发现 AllR(TcsC)的 CCR 活性也会参与乙基丙二酰辅酶 A 的生物合成而导致发酵成品中出现子囊霉素副产物.他们向敲除 *allR* 基因的突变株喂养烯丙基丙二酰 SNAC,获得的发酵成品中他克莫司的组分比例大大提高.

除此之外,特殊前体生物合成机制的确定为人们获得新型他克莫司结构类似物提供了充分的依据. Moore 课题组^[49]改造了特殊前体烯丙基丙二酰辅酶 A 的体内合成途径,利用海洋链霉菌来源的 Ansalactam A 基因簇中负责编码异丁基丙二酰-ACP 生物合成的 3 个基因 *anlE*~*anlG* 代替他克莫司原本负责编码丙基丙二酰-ACP 生物合成的 *tcsA*~*tcsC*(或名 *allA*~*anlR*),继而在 *tcsD*(或名 *allD*)的脱氢作用下形成异丁酰单元,并最终由 PKS 引入到他克莫司的聚酮结构,形成 C(36)甲基化

Scheme 6

的他克莫司结构类似物。与此同时, 突变合成和化学互补的方法也具有很大的开发潜力。这样的例子在雷帕霉素的结构改造尝试中已有多例成功范本。例如, Lowden等^[50]向敲除 *rapK* 的突变株喂养 DHCHC 类似物, Khaw等^[38]向敲除 *rapL* 的突变株喂养 *L*-哌啶甲酸类似物, 都获得了相应位置发生变化的雷帕霉素结构类似物。同样的方法和策略完全可以应用到他克莫司结构的改造中。

References

- [1] (a) Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1249.
(b) Kino, T.; Hatanaka, H.; Miyata, S.; Inamura, N.; Nishiyama, M.; Yajima, T.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Ochiai, T. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1256.
- [2] Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. *Cell* **1991**, *66*, 807.
- [3] Hatanaka, H.; Kino, T.; Miyata, S.; Inamura, N.; Kuroda, A.; Goto, T.; Tanaka, H.; Okuhara, M. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1592.
- [4] Sehgal, S. N.; Baker, H.; Vézina, C. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 727.
- [5] Schwecke, T.; Aparicio, J. F.; Molnar, I.; König, A.; Khaw, L. E.; Haydock, S. F.; Oliynyk, M.; Caffrey, P.; Cortes, J.; Lester, J. B.; Böhm, G. A.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7839.
- [6] (a) Motamedi, H.; Shafiee, A. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 528.
(b) Motamedi, H.; Cai, S. J.; Shafiee, A.; Elliston, K. O. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244*, 74.
- [7] Wu, K.; Chung, L.; Revill, W. P.; Katz, L.; Reeves, C. D. *Gene* **2000**, *251*, 81.
- [8] Mo, S.; Kim, D. H.; Lee, J. H.; Park, J. W.; Basnet, D. B.; Ban, Y. H.; Yoo, Y. J.; Chen, S.-w.; Park, S. R.; Choi, E. A.; Kim, E.; Jin, Y.-Y.; Lee, S.-K.; Park, J. Y.; Liu, Y.; Lee, M. O.; Lee, K. S.; Kim, S. J.; Kim, D.; Park, B. C.; Lee, S.-g.; Kwon, H. J.; Suh, J.-W.; Moore, B. S.; Lim, S.-K.; Yoon, Y. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 976.
- [9] Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468.
- [10] (a) Cortes, J.; Haydock, S. F.; Roberts, G. A.; Beviitt, D. J.; Leadlay, P. F. *Nature* **1990**, *348*, 176.
(b) MacNeil, D. J.; Occi, J. L.; Gewain, K. M.; MacNeil, T.; Gibbons, P. H.; Ruby, C. L.; Danis, S. J. *Gene* **1992**, *115*, 119.
- [11] Hopwood, D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465.
- [12] (a) Hubbard, B. K.; Walsh, C. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 730.
(b) Lawen, A.; Zocher, R. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11355.
- [13] Marahiel, M. A.; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2651.
- [14] Gatto, G. J.; McLoughlin, S. M.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5993.
- [15] (a) Chen, D. D.; Zhang, Q.; Zhang, Q. L.; Cen, P. L.; Xu, Z. N.; Liu, W. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5093.
(b) Mo, S.; Ban, Y. H.; Park, J. W.; Yoo, Y. J.; Yoon, Y. J. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 1473.
- [16] Paiva, N. L.; Roberts, M. F.; Demain, A. L. *J. Ind. Microbiol.* **1993**, *12*, 423.
- [17] Wallace, K. K.; Reynolds, K. A.; Koch, K.; McArthur, H. A. I.; Brown, M. S.; Wax, R. G.; Moore, B. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1243.

- 116, 11600.
- [18] Lowden, P. A. S.; Bohm, G. A.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 2249.
- [19] (a) Motamedi, H.; Shafiee, A.; Cai, S. J.; Streicher, S. L.; Arison, B. H.; Miller, R. R. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5243.
(b) Shafiee, A.; Motamedi, H.; Chen, T. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 755.
- [20] Lowden, P. A. S.; Wilkinson, B.; Bohm, G. A.; Handa, S.; Floss, H. G.; Leadlay, P. F.; Staunton, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 777.
- [21] Gregory, M. A.; Gaisser, S.; Lill, R. E.; Hong, H.; Sheridan, R. M.; Wilkinson, B.; Petkovic, H.; Weston, A. J.; Carletti, I.; Lee, H. L.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2551.
- [22] Molnar, I.; Aparicio, J. F.; Haydock, S. F.; Khaw, L. E.; Schwecke, T.; Konig, A.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Gene* **1996**, *169*, 1.
- [23] Andexer, J. N.; Kendrew, S. G.; Nur-e-Alam, M.; Lazos, O.; Foster, T. A.; Zimmermann, A.-S.; Warneck, T. D.; Suthar, D.; Coates, N. J.; Koehn, F. E.; Skotnicki, J. S.; Carter, G. T.; Gregory, M. A.; Martin, C. J.; Moss, S. J.; Leadlay, P. F.; Wilkinson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 4776.
- [24] Knaggs, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 119.
- [25] (a) Bornemann, S.; Theoclitou, M.-E.; Brune, M.; Webb, M. R.; Thorneley, R. N. F.; Abell, C. *Bioorg. Chem.* **2000**, *28*, 191.
(b) Du, W.; Wallis, N. G.; Mazzulla, M. J.; Chalker, A. F.; Zhang, L.; Liu, W.-S.; Kallender, H.; Payne, D. J. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 222.
(c) Liu, Q.; Li, Y.; Wu, Y.; Yan, H. *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*, 277.
- [26] Gregory, M. A.; Hong, H.; Lill, R. E.; Gaisser, S.; Petkovic, H.; Low, L.; Sheehan, L. S.; Carletti, I.; Ready, S. J.; Ward, M. J.; Kaja, A. L.; Weston, A. J.; Challis, I. R.; Leadlay, P. F.; Martin, C. J.; Wilkinson, B.; Sheridan, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3565.
- [27] Byrne, K. M.; Shafiee, A.; Nielsen, J. B.; Arison, B.; Monaghan, R. L.; Kaplan, L. *Dev. Ind. Microbiol.* **1993**, *32*, 29.
- [28] (a) Kato, Y.; Bai, L. Q.; Xue, Q.; Revill, W. P.; Yu, T. W.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5268.
(b) Carroll, B. J.; Moss, S. J.; Bai, L. Q.; Kato, Y.; Toelzer, S.; Yu, T. W.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176.
- [29] Yu, T. W.; Bai, L. Q.; Clade, D.; Hoffmann, D.; Toelzer, S.; Trinh, K. Q.; Xu, J.; Moss, S. J.; Leistner, E.; Floss, H. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 7968.
- [30] Reeves, C. D.; Chung, L. M.; Liu, Y. Q.; Xue, Q.; Carney, J. R.; Revill, W. P.; Katz, L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9155.
- [31] Dorrestein, P. C.; Van Lanen, S. G.; Li, W.; Zhao, C.; Deng, Z.; Shen, B.; Kelleher, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10386.
- [32] Watanabe, K.; Khosla, C.; Stroud, R. M.; Tsai, S. C. *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 435.
- [33] (a) Chen, H. W.; Thomas, M. G.; O'Connor, S. E.; Hubbard, B. K.; Burkart, M. D.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **2001**, *40*, 11651.
(b) Chen, H. W.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 301.
- [34] Chan, Y. A.; Boyne, M. T., II; Podevels, A. M.; Klimowicz, A. K.; Handelsman, J.; Kelleher, N. L.; Thomas, M. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 14349.
- [35] Paiva, N. L.; Demain, A. L.; Roberts, M. F. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 167.
- [36] Goranovic, D.; Kosec, G.; Mrak, P.; Fujs, S.; Horvat, J.; Kuscer, E.; Kopitar, G.; Petkovic, H. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14292.
- [37] Paiva, N. L.; Demain, A. L.; Roberts, M. F. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 581.
- [38] Khaw, L. E.; Bohm, G. A.; Metcalfe, S.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 809.
- [39] Gatto, G. J.; Boyne, M. T.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3838.
- [40] Shafiee, A.; Motamedi, H.; Dumont, F. J.; Arison, B. H.; Miller, R. R. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 418.
- [41] Maddess, M. L.; Tackett, M. N.; Ley, S. V. In *Natural Compounds as Drugs*, Vol. 66, Eds.: Petersen, F.; Amstutz, R., Birkhäuser Basel, Berlin, **2008**, p. 13.
- [42] (a) Jones, T. K.; Mills, S. G.; Reamer, R. A.; Askin, D.; Desmond, R.; Volante, R. P.; Shinkai, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1157;
(b) Jones, T. K.; Reamer, R. A.; Desmond, R.; Mills, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2998.
- [43] Nakatsuka, M.; Ragan, J. A.; Sammakia, T.; Smith, D. B.; Uehling, D. E.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5583.
- [44] (a) Ireland, R. E.; Gleason, J. L.; Gegnas, L. D.; Highsmith, T. K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6856.
(b) Ireland, R. E.; Liu, L.; Roper, T. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13221.
(c) Ireland, R. E.; Liu, L.; Roper, T. D.; Gleason, J. L. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13257.
- [45] Gu, R.-L.; Sih, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3287.
- [46] Jones, A. B.; Villalobos, A.; Linde, R. G.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2786.
- [47] Smith, A. B.; Chen, K.; Robinson, D. J.; Laakso, L. M.; Hale, K. J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4271.
- [48] Kosec, G.; Goranovic, D.; Mrak, P.; Fujs, S.; Kuscer, E.; Horvat, J.; Kopitar, G.; Petkovic, H. *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 39.
- [49] Lechner, A.; Wilson, M. C.; Ban, Y. H.; Hwang, J.-y.; Yoon, Y. J.; Moore, B. S. *ACS Synth. Biol.* DOI: 10.1021/sb3001062.
- [50] (a) Gregory, M. A.; Petkovic, H.; Lill, R. E.; Moss, S. J.; Wilkinson, B.; Gaisser, S.; Leadlay, P. F.; Sheridan, R. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 4757.
(b) Goss, R. J. M.; Lanceron, S. E.; Wise, N. J.; Moss, S. J. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4071.
(c) Lowden, P. A. S.; Böhm, G. A.; Metcalfe, S.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 535.

(Lu, Y.)