组合生物合成介导 C-4 羟基异构的新型四环素类化合物的发现

李世杰^a 聂秋玥^b 季珍瑜^b 华会明^{*,a} 唐功利^{*,a,b}^(a) 沈阳药科大学中药学院 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室 沈阳 110016^(b) 中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032

摘要 在四环素类化合物 SF2575 的生物合成中, 4-keto-anhydrotetracycline (4-keto-ATC, **2**) 中 C-4 的羰基先由 SsF 还原为羟基得到 (R)-4-hydroxyl-ATC (**7**), **7** 经过一系列修饰可以得到最终化合物。在之前的研究中, 发现基因簇 *tjh* 介导了一系列新型四环素类化合物的产生, 而且在 $\Delta tjhO5::2R$ 突变株中得到了三个骨架结构与 **7** 类似但 C-4 构型为 S 构型的化合物。生物信息学分析显示 Tjhd2 与 SsF 同源性较高, 它们可能有类似的功能。通过回补 SF2575 生物合成中编码 C-4 酮基还原酶的基因 *ssfF* 到 $\Delta tjhD2$ 突变株中, 成功得到了两个新的四环素类化合物 **15** 和 **16**。这两个化合物的 C-4 都发生了异构, 且化合物 **15** 是 **16** 的苷元。该组合生物合成策略不仅成功获得了两个新的四环素类似物, 同时也证实了 *tjhD2* 的功能。虽然 SsF 和 Tjhd2 在体内展现类似的催化功能, 但其得到的产物构型却相反。这一结果可以应用到四环素类化合物的改造, 同时也为进一步探寻酮基还原酶立体选择性还原的机制奠定了基础。

关键词 组合生物合成; 生物合成; II 型聚酮类化合物; 四环素; 异构

Combinatorial Biosynthesis Mediates the Discovery of Novel Tetracyclines with Isomerized C-4 Hydroxyl

Li, Shijie^a Nie, Qiuyue^b Ji, Zhenyu^b Hua, Huiming^{*,a} Tang, Gongli^{*,a,b}^(a) Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016^(b) Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032

Abstract During the biosynthesis of SF2575, a tetracycline antibiotic, the ketone of C-4 in 4-keto-anhydrotetracycline (4-keto-ATC, **2**) is reduced by SsF to form (R)-4-hydroxyl-ATC (**7**) which can be further transformed to the final product. According to the previous study, gene cluster *tjh* mediates the production of a series of new tetracyclines. Three new compounds in $\Delta tjhO5::2R$ mutant which are structurally similar with 4-keto-ATC but with (S)-C-4 were obtained. Tjhd2 with high similarity with SsF revealed by bioinformatic analysis indicates that these two enzymes may exhibit the similar enzymatic function. Two new tetracyclines via complementation of *ssfF* encoding C-4 ketone reductase into $\Delta tjhD2$ mutant were successfully obtained. C-4 of these two compounds is all isomerized and **15** is the aglycone of **16**. The combinatorial biosynthesis strategy not only successfully discovers two new natural products, but also verifies the function of Tjhd2. Moreover, although Tjhd2 and SsF possess the similar catalytic function, they mediate the production of compounds with different configuration. These results may be applied in modification of tetracyclines and lay the foundation for further exploring the specific mechanism of stereoselective reduction of ketoreductases.

Keywords combinatorial biosynthesis; biosynthesis; type II polyketides; tetracycline; isomerization

四环素类化合物是一类重要的 II 型聚酮类天然产物。以 tetracycline (**4**), oxytetracycline (**5**), chlortetracycline (**6**) 等为代表的四环素类抗生素在临床上已经使用超过 60 年^[1]。四环素类化合物的结构多样性与其生物合成中丰富的后修饰密切相关^[2]。它们通常都有一个共同

的 II 型聚酮合酶形成的芳香聚酮前体 6-methylprete-tramid (**1**), **1** 经过一系列氧化后修饰得到中间体 4-keto-anhydrotetracycline (4-keto-ATC, **2**)。2 可以经过转氨反应形成 4-amino-ATC (**3**), 也可以直接被酮基还原酶 SsF 还原形成 4-hydroxyl-ATC (**7**) (Scheme 1A)^[3]。3 经过不同

* Corresponding authors. E-mail: gltang@sioc.ac.cn; huimhua@163.com

Received March 20, 2021; revised April 19, 2021; published online May 24, 2021.

Project supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901900).

国家重点研发计划(No. 2018YFA0901900)资助项目。

的修饰步骤后可以得到一系列的四环素类同系物 4~6. 而 7 可以由氧化和基团转移等步骤形成 SF2575 (8). SF2575 是一个较为特殊的四环素类抗生素, 其 C-4 由羟基取代而不是氨基, 且为 *R* 构型. 在之前的研究中, 我们成功激活了金色链霉菌 SP-371 (*Streptomyces. aureus suzhouensis* SP-371) 中基因簇 *tjh*, 并且得到了一系列非典型的四环素类化合物^[4]. 根据基因敲除实验结果发现 $\Delta tjhO5::2R$ 突变株可以产生 3 个新的四环素类化合物 12~14, 它们的骨架结构与 7 类似, 但 C-4 构型与 SF2575 中 C-4 构型是相反的 (Scheme 1B). 生物信息学分析表明 TjhD2 与 SsfF 同属于酮基还原酶家族且有着较高的相似性, 所以我们认为这两个酶都可以还原 C-4 羰基但产物立体选择性不同. 我们通过异源回补基因 *ssfF* 到 $\Delta tjhD2$ 突变株中, 成功得到了两个新的四环素类化合物 15 和 16, 核磁数据显示它们的 C-4 构型翻转, 还通过二级质谱确定了 16 是 15 的糖苷. 该研究不仅通过组合生物合成的策略成功改造了四环素, 也进一步证实了该类酮基还原酶的功能.

1 结果与讨论

1.1 回补突变株的构建与发酵

根据之前的研究, *tjhD2* 敲除突变株 ($\Delta tjhD2::2R$) 无法产生四环素类化合物, 这可能是由于酮基中间体 10 不稳定. 生物信息学分析表明 TjhD2 与 SsfF 有 49% 的序列相似性. 因此推测 TjhD2 与 SsfF 功能相似, 都可以将 C-4 位的羰基还原为羟基, 但产物的构型相反 (图 1A).

在突变株 $\Delta tjhD2$ 的基础上回补了正调控基因和 *ssfF*, 并用强启动子 *kasO* 和 *ermE* 来增加 *ssfF* 的表达量, 分别得到了回补突变株 $\Delta tjhD2::2R-ssfF-k$ 和 $\Delta tjhD2::2R-ssfF-e$ (图 1B). 接下来对突变株进行小量发酵, 并用 LC-MS 对发酵产物进行了检测. 结果表明: 与 $\Delta tjhD2::2R$ 相比, 两种回补突变株都可以产生两个分子量分别为 384 和 542 的化合物, 其中 $\Delta tjhD2::2R-ssfF-e$ 的产量更高 (图 1C).

1.2 突变株中新化合物的分离及鉴定

对突变株 $\Delta tjhD2::2R-ssfF-e$ 进行大量发酵 (8 L), 其

图式 1 (A)四环素类天然产物后修饰途径, 以及(B) $\Delta tjhO5::2R$ 的四环素类似物的生物合成途径

Scheme 1 (A) Post-modified pathways of tetracyclines, and (B) proposed biosynthetic pathway of compounds produced by $\Delta tjhO5::2R$

图1 (A)推测的 **15** 的生物合成途径, (B)突变株的构建, 以及(C) $\Delta tjhD2::2R$, $\Delta tjhD2::2R$ -*ssfF*-*e* 和 $\Delta tjhD2::2R$ -*ssfF*-*k* 发酵粗提物 HPLC 图

Figure 1 (A) Proposed biosynthetic pathway of **15**, (B) construction of the mutant strain, and (C) HPLC analysis of fermentation crude extracts of $\Delta tjhD2::2R$, $\Delta tjhD2::2R$ -*ssfF*-*e* and $\Delta tjhD2::2R$ -*ssfF*-*k*

发酵液用乙酸乙酯萃取, 浓缩后得到突变株的发酵粗提物, 并通过 ODS 开放柱和 C18 半制备柱成功获得化合物 **15** (7 mg, t_R = 17.5 min)和 **16** (5 mg, t_R = 17.0 min)。

化合物 **15** 为黄色粉末, 紫外光谱显示在 221, 275 和 420 nm 有强吸收, 符合四环素类化合物紫外特征。高分辨质谱(HR-ESIMS)显示分子式为 $C_{20}H_{16}O_8$ (m/z 383.0770 [$M-H$] $^-$)。

1H NMR 谱(600 MHz, $CDCl_3$)显示, 有四个芳香质子信号 δ_H 7.50 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-7), 7.00 (s, 1H, H-6)和 6.87 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-9); 两个次甲基信号 δ_H 4.94 (s, 1H, H-4)和 3.16 (dt, J = 13.3, 4.9 Hz, 1H, H-4a), 一个亚甲基信号 δ_H 3.39 (dd, J = 17.3, 4.9 Hz, 1H, H-5)和 2.58~2.63 (m, 1H, H-5)。 ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$)中包含 17 个碳信号, 一个羰基碳信号 δ_C 201.0, 十个芳香碳信号(δ_C 165.7, 158.2, 140.1, 134.0, 134.0, 119.0, 118.7, 112.7, 111.9, 108.7), 两个季碳

信号(δ_C 110.0, 78.2), 两个次甲基碳信号(δ_C 70.4, 43.0), 一个甲基碳信号(δ_C 26.7), 一个亚甲基碳信号 (δ_C 26.2)。 1H - 1H COSY 谱中, δ_H 3.16 (H-4a)与 δ_H 4.94 (H-4)和 3.39 (H-5)相关; δ_H 7.50 (H-8)与 δ_H 7.12 (H-7)和 6.87 (H-9)相关。 HMBC 谱中, δ_H 3.16 (H-4a)与 δ_C 134.0 (C-5a), 78.2 (C-12a), 70.4 (C-4)和 26.2 (C-5)相关; δ_H 3.39 (H-5)与 δ_C 134.0 (C-5a), 119.0 (C-6), 108.7 (C-11a), 78.2 (C-12a)和 43.0 (C-4a)相关; δ_H 7.00 (H-6)与 δ_C 140.1 (C-6a), 118.7 (C-7), 112.7 (C-10a), 108.7 (C-11a)和 26.2 (C-5)相关; δ_H 7.12 (H-7)与 δ_C 165.7 (C-11), 158.2 (C-10), 140.1 (C-6a), 119.0 (C-6)和 112.7 (C-10a); δ_H 7.50 (H-8)与 δ_C 158.2 (C-10)和 140.1 (C-6a)相关; δ_H 6.87 (H-9)与 δ_C 158.2 (C-10), 118.7 (C-7)和 112.7 (C-10a)相关; δ_H 2.62 (H-14)与 δ_C 201.0 (C-13)和 110.0 (C-2)相关, 基于以上数据确定了化合物 **15** 的 ABC 环结构及 D 环的 C-2 取代模式, 且与 **13** 完全相同。

依据 HR-ESIMS 结果, **15** 的 ^{13}C NMR 中缺少三个碳信号; 同时, H-4 与 H-4a 有 ^1H - ^1H COSY 相关, 但未能正常裂分, 这可能是由 D 环发生酮-烯醇互变, 使 C-4 位化学环境不稳定引起的^[5]. 为确定缺失的碳信号, 我们用三氟乙酸(TFA)处理化合物 **15**, 并在除去 TFA 后继续用 CDCl_3 对 **15** 进行核磁分析. 此时, 所有碳信号都呈现出来, H-4 裂分明显. 但核磁数据显示化合物 **15** 未能转化成单一化合物, 而是以 isomer 1 和 isomer 2 两种形式按比例 6:4 稳定存在, 且两个异构体化学位移差别主要集中在 D 环. 在 **15**-isomer 1 中, δ_{H} 4.86 (d, $J=4.7$ Hz, 1H, H-4) 与 δ_{C} 194.6 (C-3), 43.2 (C-4a), 26.1 (C-5) 相关; δ_{H} 3.14-3.20 (H-4a) 与 δ_{C} 189.4 (C-1), 134.0 (C-5a), 77.8 (C-12a), 43.2 (C-4a) 和 26.1 (C-5) 相关. 在 **15**-isomer 2 中, δ_{H} 5.04 (d, $J=5.2$ Hz, 1H, H-4) 与 δ_{C} 200.1 (C-3), 43.2 (C-4a), 26.2 (C-5) 相关, δ_{H} 3.14-3.20 (H-4a) 与 δ_{C} 199.2 (C-12), 194.4 (C-1), 77.8 (C-12a) 和 26.2 (C-5) 有相关. 结合两套谱数据, 我们归属了化合物 **15**-isomer 1 和

15-isomer 2 的氢信号和碳信号(表 1), 并确定了化合物 **15** 的两个异构体结构(Scheme 2).

在化合物 **13** 中, C-4 为 *S* 构型, $J_{\text{H-4}}=11.1$ Hz^[4], 而 **15** 的两个异构体中 H-4 的偶合常数分别为 4.7 和 5.2 Hz, 与 11.1 Hz 相差较大, 因此化合物 **15** 的 C-4 构型发生翻转为 *R* 构型.

化合物 **16** 为黄色粉末, 紫外光谱表明在 221, 272 和 425 nm 有强吸收, 显示了与 **15** 类似的紫外特征. HR-ESIMS 显示分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$ (m/z 541.1717 [$\text{M}-\text{H}]^-$). 化合物 **16** 在含有 0.5% 甲酸的甲醇溶液中水解约 1.5 h 后, 其水解产物的保留时间, 光谱信息和质谱数据与 **15** 是完全相同的(图 2). 此外, **16** 的二级质谱碎片峰显示其骨架和糖基分子量都与 **13** 相同. 所以认为 **16** 是 **15** 与糖基相连的产物, 且其糖基与 **13** 的糖基相同.

2 结论

通过向突变株 $\Delta tjd2$ 中异源回补来自 SF2575 生物

表 1 **15** 的核磁共振图谱数据(600/150 MHz, CDCl_3)
Table 1 NMR spectroscopic data of **15** (600/150 MHz, CDCl_3)

Position	Isomer 1		Isomer 2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	189.4		194.4	
2	109.9		110.0	
3	194.6		200.1	
4	71.2	4.86 (d, $J=4.7$ Hz, 1H)	69.0	5.04 (d, $J=5.2$ Hz, 1H)
4a	43.2	3.14~3.20 (m, 1H)	42.7	3.14~3.20 (m, 1H)
5	26.1	3.36 (dd, $J=17.0, 4.9$ Hz); 2.58~2.63 (m, 1H)	26.2	3.42 (dd, $J=17.0, 4.5$ Hz); 2.73~2.77 (m, 1H)
5a	133.8		133.8	
6	119.1	7.00 (s, 1H)	119.1	7.00 (s, 1H)
6a	140.1		140.0	
7	118.8	7.12 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	118.7	7.12 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)
8	134.2	7.51 (t, $J=8.0$ Hz, 1H)	134.2	7.51 (t, $J=8.0$ Hz, 1H)
9	112.0	6.87 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	111.8	6.87 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)
10	158.2		158.1	
10a	112.6		112.7	
11	165.8		165.3	
11a	108.6		108.7	
12	197.3		199.2	
12a	77.8		77.8	
13	201.3		200.7	
14	26.7	2.68 (s, 3H)	26.3	2.56 (s, 3H)

图式 2 化合物 **15** 主要的 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关
Scheme 2 Selective key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compound **15**

图2 (A) 16水解为15的方程式, 以及(B) 16在酸性条件下变成15的HPLC图

Figure 2 (A) Equation of hydrolysis reaction from 16 to 15, and (B) HPLC analysis of transformation from 16 to 15 in acid condition.

合成基因簇中的基因 *ssfF* 成功得到了两个新四环素类化合物 15 和 16. 其中化合物 15 是化合物 16 的苷元, 它们的 C-4 都为 *R* 构型. 除此之外, 侧面验证了酮基还原酶 Tjhd2 的功能. *SsfF* 和 Tjhd2 虽然能够催化相同的酮基还原反应, 但它们催化得到的产物构型却相反, 这也为生物催化和酶学机制的研究提供了材料与基础.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

PCR 扩增仪 Eppendorf Mastercycler, 凝胶成像系统 BioRad Syngene, 质谱仪 Thermo Scientific LCQ Fleet Ion Trap, 高效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000, 高分辨质谱仪 Agilent Technologies 6230 TOF LC/MS, 核磁共振仪 Bruker AVANCE DRX-600, 分析色谱柱 Grace AlltimaTM, 5 $\mu\text{mol/L}$, C18 column, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 半制备柱 YMC-Pack ODS-AQ, 5 μm , C18 column, 10 mm $\times$ 250 mm. 生物试剂购自 New England Biolab、Thermo 和 Takara 公司, 基因合成和 DNA 测序由苏州金唯智公司完成, 国产化学试剂购自上海国药集团有限公司, 百灵威和深圳爱拓化学有限公司, 进口化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司和 TCI 公司, 氘代试剂购自 Cambridge Isotope Laboratories. 链霉菌 *S. aureus suzhouensis* SP-371 由华东理工大学的陶黎明教授提供.

3.2 回补突变株的构建

以分别含 *kasO* 和 *ermE**启动子的 pSET152 为载体, 将外源基因 *ssfF* 和串联强启动子的双拷贝正调控基因 *tjh2R* 借助 T4-DNA 连接酶进行三片段连接, 拿到连接成功的质粒后借助限制性内切酶 *NdeI* 和 *BcuI* 进行酶切验证, 目标条带 1 kb 左右. 然后将验证成功的重组质粒导入 *E.coli* S17-1, 并与目标突变株 $\Delta tjhD2$ 进行接合转移, 通过抗性筛选得到回补突变株.

3.3 突变株的发酵

挑取接合子于含 2 mL 左右的胰酪胨大豆肉汤 (Tryptone soybean broth, TSB) 培养基的试管中[含 50 $\mu\text{g/mL}$ 阿泊拉霉素(Am)和 50 $\mu\text{g/mL}$ 萘啶霉素(NA)], 并在 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 220 r/min 条件下培养 3~4 d, 至菌体摇浓且菌液呈黄绿色. 少量发酵时, 直接将试管内 2 mL 摇好的菌液倒入盛有 50 mL SP-371 发酵培养基的 250 mL 摇瓶里. 大量发酵时从试管中取 1 mL 摇好的菌液转接到装有 100 mL TSB 培养基的 500 mL 摇瓶中摇种子液, 30 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 培养 1 d 左右, 至种子液呈浓黄绿色, 并按 5% 的比例将种子液接到发酵培养基中, 培养 5~6 d. 发酵液离心后, 其上清液用乙酸乙酯萃取三次, 合并乙酸乙酯层, 旋干.

3.4 化合物的检测、分离及鉴定

将发酵提取物溶解在色谱甲醇中, 用 LC-MS 进行分析. 程序为(35 min): $t=0$ min, 24% B; $t=24$ min, 60% B; $t=28$ min, 80% B; $t=30$ min, 95% B; $t=33$ min, 95% B; $t=35$ min, 24% B, HPLC 流速为 1 mL/min. 其中 A 相为含 0.1% HCOOH 的 H_2O , B 相为含 0.1% HCOOH 的 CH_3CN , 使用 254 和 272 nm 作为波长检测. 半制备分离条件: H_2O (含 0.1% HCOOH)和 CH_3CN 作为半制备的 A 和 B 相, 程序为(35 min): $t=0$ min, 35% B; $t=25$ min, 60% B; $t=27$ min, 90% B; $t=30$ min, 90% B; $t=33$ min, 35% B; $t=35$ min, 35% B, 流速为 2.5 mL/min.

致谢 感谢华东理工大学的陶黎明教授提供 *S. aureus suzhouensis* SP-371 菌株.

辅助材料(Supporting Information) 化合物的紫外吸收光谱, HR-ESIMS 和 NMR 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- (a) David, J. N.; Gordon, M. C. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 770.
(b) Das, A.; Khosla, C. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 631.
- (a) Malpartida, F.; Hopwood, D. A. *Nature* **1984**, 309, 462.
(b) Hertweck, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 4688.
(c) Hertweck, C.; Luzhetskyy, A.; Rebets, Y.; Bechthold, A. *Nat.*

- Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162.
- (d) Wang, P.; Kim, W.; Pickens, L. B.; Gao, X.; Tang, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 11136.
- [3] (a) Hatsu, M.; Sasaki, T.; Watabe, H.; Miyadoh, S.; Nagasawa, M.; Shomura, T.; Sezaki, M.; Inouye, S.; Kondo, S. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 320.
- (b) Hatsu, M.; Sasaki, T.; Gomi, S.; Kodama, Y.; Sezaki, M.; Inouye, S.; Kondo, S. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 325.
- (c) Pickens, L. B.; Kim, W.; Wang, P.; Zhou, H.; Watanabe, K.; Gomi, S.; Tang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17677.
- (d) Zhang, W.; Watanabe K.; Cai, X.; Jung, M. E.; Tang, Y.; Zhan, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6068.
- [4] Ji, Z.-Y.; Nie, Q.-Y.; Yin, Y.; Zhang, M.; Pan, H.-X.; Hou, X.-F.; Tang, G.-L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 18046.
- [5] Tero, K.; Karel, D. K.; Gloria, B.; Carmen, M.; Pekka, M.; Juha, H.; Reijo, S.; Petri, T.; Jose, S.; Kristiina, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, *15*, 1818.

(Lu, Y.)