黄素依赖的单加氧酶催化酰胺键的 Bayer-Villiger 反应

汤志军 刘 文*

(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)

A Flavin-Dependent Monooxygenase Catalyzing Bayer-Villiger Reaction in an Amide Bond

Tang, Zhijun Liu, Wen*

(State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

黄素依赖的单加氧酶(flavin-dependent monooxygenases, FPMOs)在自然界广泛存在,是生命体合成代谢和分解代谢中不可或缺的一类关键酶。它们参与天然产物合成、生物质降解以及异质化合物解毒等生化过程^[1-3]。FPMOs 利用还原型的黄素类辅因子活化 O_2 ,生成与辅因子共价连接的过氧物种,然后将其中一个氧原子插入到反应物中,另一个氧原子则通过还原生成水。这类酶催化的化学反应多样,包括羟基化、环氧化、环化、(去)卤化、(去)芳构化和 Baeyer-Villiger 氧化等^[4]。其中 Baeyer-Villiger 氧化是由酮合成酯的重要反应,通过在酮羰基与相邻 C 原子之间插入 O 原子而实现酮类化合物的酯化或者内酯化。目前有较多 Baeyer-Villiger 单加氧酶(Baeyer-Villiger monooxygenases, BVMOs)报道^[5],他们都是黄素依赖的酶,以经典的 FPMOs 催化机制完成 C—C 键之间的插 O 反应,即黄素辅因子(flavin adenine dinucleotide, FAD 或者 flavin mononucleotide, FMN)首先在还原型辅酶 I (reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 或者还原型辅酶 II (reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 作用下得到还原性黄素($FADH_2$ 或者 $FMNH_2$);然后分子 O_2 插入到还原性黄素的 C(4)位,生成黄素-C(4)- OO^- ;该过氧物种是 Baeyer-Villiger 反应的直接 O 原子来源,通过过氧负离子对酮羰基亲核进攻,生成底物-过氧-黄素共价连接的中间体,再发生 C 迁移、O—O 键断裂生成酯基产物,同时释放黄素-C(4)-OH;该辅因子再脱水生成氧化型黄素,完成一轮催化循环。

近期,南京大学生命科学学院谭仁祥和戈惠明课题

组^[6]在抗生素 Alchivemycin A (AVM)的生物合成研究中发现一类新型的 Baeyer-Villiger 单加氧酶,它不是催化经典的 C—C 键之间 O 原子插入,而是催化酰胺化合物 C—N 键之间的 O 原子插入,实现由酰胺化合物到羟胺酯的转化。

AVM 是植物内生放线菌产生的复杂多环聚酮抗生素,具有良好的抗菌活性。结构上具有罕见的羟胺酯结构单元——2H-四氢-4,6-二氧化-1,2-噁嗪(TDO)环,以及包括两个环氧在内的众多氧化后修饰。该研究团队通过体内基因敲除、中间体结构鉴定及体外生化分析等手段,揭示了 AVM 生物合成过程。包括 FAD 依赖的单加氧酶、F420 依赖的氧化还原酶、 α -KG/ Fe^{2+} 依赖的双加氧酶以及细胞色素 P450 在内六种氧化还原酶组成的复杂氧化还原代谢网络,完成了从聚酮中间体 **1** 到活性 AVM 的转化过程(Scheme 1)。此外,还通过活性测试揭

图式 1 AVM 形成过程中的氧化还原后修饰

Scheme 1 Redox post-modification during the formation of AVM

* Corresponding author. E-mail: wliu@sioc.ac.cn. Published online April, 20, 2021

示 AVM 的活性与具有羟胺酯结构的 TDO 环密切相关, AVM 通过与 RNA 合成酶的 β 亚基相互作用产生抗菌活性; 同时, 微生物自身通过靶标修饰赋予 AVM 自抗性。

值得关注的是, 在氧化还原网络的研究中, 该研究团队发现活性基团 TDO 环的合成采用了一条新颖的 Baeyer-Villiger 氧化路径, 即通过一个 FAD 依赖的新型单加氧酶 AvmO1 对酰胺的 C—N 键进行 O 原子插入而实现。通过 *avmO1* 基因敲除, AVM 产生菌积累了 TDO 环未形成的五元内酰胺中间体 **2** 和 **3**, 预示着单加氧酶 AvmO1 可能负责了 TDO 环的形成。以上述内酰胺中间体为底物在体外对 AvmO1 活性进行测试, 得到扩环的羟胺酯产物 **4** 和 **5**, 表明 AvmO1 催化了酰胺键的插氧反应, 是一个新型的 Baeyer-Villiger 单加氧酶。 $^{18}\text{O}_2$ 同位素标记实验显示 TDO 环中羟胺酯的氧来源于分子 O_2 , 表

明 AvmO1 与传统的 BVMOs 可能采用相似的机制, 即黄素-C(4)-过氧物种(FADH-OO^-)作为亲核试剂进攻酰胺键的羰基, 再发生 C—N 键迁移及 O—O 键断裂, 形成具有羟胺酯结构的 TDO 环(Scheme 2)。

酰胺键的电子密度很高, 在其 C—N 键中进行插氧反应极其困难, 目前还没有直接的化学方法报道。对酰胺插氧产物羟胺酯的合成, 主要采用分步法完成, 通过酰胺水解, 将其中的氨基氧化成羟胺, 羟胺再与羧基缩合得到形式上的酰胺键插氧产物。AvmO1 的发现, 为直接从酰胺一步得到羟胺酯提供了有效方法。此外, 对黄素依赖的单加氧酶而言, 拓展了其催化酰胺键修饰的新功能, 为通过基因挖掘获得更多新型 Baeyer-Villiger 氧化酶创造了条件。

图式 2 AvmO1 催化酰胺 Baeyer-Villiger 反应的催化机制
Scheme 2 Possible catalytic mechanism of AvmO1

References

- [1] Huijbers, M. M.; Montersino, S.; Westphal, A. H.; Tischler, D; Van Berkel, W. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *544*, 2.
- [2] Walsh, C. T; Wenciewicz, T. A. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 175.
- [3] Teufel, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *632*, 20.
- [4] Romero, E.; Gomez Castellanos, J. R.; Gadda, G.; Fraaije, M. W; Mattevi, A. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1742.
- [5] Tolmie, C.; Smit, M. S.; Opperman, D. J. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 326.
- [6] Zhu, H. J.; Zhang, B.; Wang, L.; Wang, W.; Liu, S. H.; Igarashi, Y.; Bashiri, G.; Tan, R. X.; Ge, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 4751.

(Zhao, C.)