

· 成果快报 ·

# 吡咯吡啶霉素生物合成途径中酶促 Diels-Alder 反应的生化机制研究

郑庆飞<sup>1</sup> 刘 文<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院上海有机化学研究所生命有机化学国家重点实验室, 上海 200030;

2. 湖州生物制造创新中心, 湖州 313000)

[关键词] Diels-Alder 反应; 酶促反应; 生物合成; 吡咯吡啶霉素; 协同反应; 过渡态

Diels-Alder(D-A)反应是一类能够直接形成 C-C 键的重要有机反应类型, 可以高效地构筑杂环、手性螺环和桥环等复杂结构, 广泛地应用于合成化学领域<sup>[1]</sup>; 近年来一些特殊的 D-A 反应还被开发为“点击化学”(click chemistry)和“生物正交化学”(bioorthogonal chemistry), 并应用于材料科学和生命科学的研究中<sup>[2,3]</sup>。通过对天然产物生源合成途径的分析, 诸多天然产物的骨架构筑过程中可能涉及到 D-A 反应, 因此 D-A 反应也经常巧妙地应用于天然产物的仿生合成研究中<sup>[4]</sup>。随着分子前线轨道理论的发展, 合成化学家开发了一系列能够促进 D-A 反应的小分子催化剂<sup>[5]</sup>; 另一方面, 基于著名化学家鲍林的酶催化理论(生物大分子在催化过程中可以通过主-客体相互作用稳定底物小分子的反应过渡态), 人工筛选、制备的可识别底物反应过渡态的抗体酶或核酶也能够一定程度上催化分子间的 D-A 反应<sup>[6,7]</sup>。然而, 天然产物的生物合成过程中所涉及到的 D-A 反应是否由酶催化完成以及相应的催化机制目前尚不为人知。前期所报道的天然酶促 D-A 反应均存在较大争议, 这些反应或缺乏体外酶学实验的证据, 或可在无酶条件下自发发生, 或经历了复杂的底物转化过程<sup>[8,9]</sup>, 因此都不是用于研究酶促 D-A 反应生化机制的理想体系。

吡咯吡啶霉素(pyrrouindomycin, PYR)是一类来源于链霉菌(*Streptomyces rugosporus*)的螺环乙酰乙酸内酰胺类抗生素, 其对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素的肠球菌(VRE)均有较强的杀伤作用; 另外该分子结构中含有一个[6,

6]并环和一个[6,5]螺环, 这样两个可能由酶促 D-A 反应构筑的结构单元引起了合成化学家和生物化学家们极大的兴趣(图 1)。在前期的工作中我们课题组在国际上首次报道了 PYR 的生物合成基因簇, 并通过分析认为这两个结构单元均由分子内的 D-A 反应得到<sup>[10]</sup>。此后, 我们又通过体内、体外实验相结合, 首次阐述了 PYR 生物合成中这样两步连续的酶促 D-A 反应, 依次构建了 PYR 骨架中的[6,6]并环和[6,5]螺环(图 1)<sup>[11]</sup>。与此前的研究相比, 这两步[4+2]环合反应是天然产物生物合成中首次发现的能够独立催化(不涉及到其他任何副反应)并且绝对酶依赖的 D-A 反应, 这样的体系为研究酶促 D-A 反应的机制研究提供了良好契机。最近, 我们对于催化 PYR 中[6,5]螺环结构的 D-A 酶(Pyri4)进行了结构生物学解析, 在国际上首次报道了此类酶与小分子底物的复合物晶体结构<sup>[12]</sup>, 并以 D-A 反应为代表提出了酶促协同反应的普适催化机理<sup>[13]</sup>。

## 1 吡咯吡啶霉素的生物合成途径

吡咯吡啶霉素是一类结构复杂且具有良好生物活性的天然产物, 通过分析其生物合成基因簇, 我们发现经过聚酮-非核糖体聚肽合成酶(PKS-NRPS)催化形成的 PYR 线性中间体经过分子内 D-A 反应、氧化、糖基化、酰基化等复杂的后修饰最终生成成熟的 PYR 分子(图 1)<sup>[10]</sup>。将之与分子结构特征相似的乙酰乙酸内酯类天然产物的生物合成基因簇进行对比, 我们发现了两个序列保守但功能未曾准确归属的基因(在 PYR 生物合成基因簇中的对应编

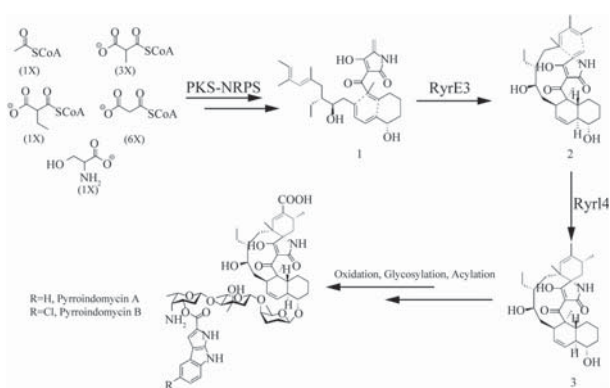


图1 吡咯啉毒素的化学结构与其生物合成途径，由 PyrE3 和 PyrI4 分别催化形成的[6,6]并环和[6,5]螺环结构分别用蓝色和红色标注

号为 *pyrE3* 和 *pyrI4*)。通过基因敲除,我们从突变株  $\Delta pyrE3$  中成功分离得到了极不稳定的 PYR 线性中间体(1),证实了此前的推测。我们表达并纯化了 PyrE3 蛋白,将中间体 1 作为底物进行了体外酶学活性测试,发现 PyrE3 能够以非常高的效率催化 1 发生分子内 D-A 反应并形成具有 [6,6] 并环结构的中间体 2。后续的生化研究表明,PyrI4 能够以很高的效率继续催化 2 反应生成具有 [6,5] 结构的化合物 3,3 已经具有了 PYR 分子母核刚性五环的结构特征。通过一系列系统性的生化实验,我们发现 PYR 生物合成途径中两步 D-A 反应的顺序是受到严格控制的,PyrE3 作用在 PyrI4 之前,[6,6] 并环结构优先于 [6,5] 螺环结构的形成<sup>[11]</sup>。

## 2 PyrE3 与 PyrI4 两个天然 D-A 酶的催化机制

*pyrE3* 和 *pyrI4* 的同源基因普遍存在于具有 [6,6] 并环和 [6,5] 螺环结构的乙酰乙酸内酯(内酰胺)天然产物的生物合成基因簇中,这表明此前我们阐明的由两步酶促 D-A 反应构筑刚性五环分子结构的生物合成逻辑在此类天然产物中是普适的。通过进一步的生物信息学分析,我们发现 PyrE3 具有保守的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)依赖的单氧化酶的结构,对于蛋白质性质的分析也确证了 PyrE3 中确实牢固地结合着氧化态的 FAD,然而在其所催化的反应中却没有涉及到任何氧化还原过程,根据一些使用 PyrE3 点突变蛋白的初步生物化学测试和圆二色谱表征,我们认为 PyrE3 中的 FAD 辅因子并没有参与到反应中,可能只用于维持蛋白三维构象的正确折叠和与底物的非共价结合。动力学实验表明,PyrE3 能够极为高效地催化化合物 1 向 2 的转化,但是其中详

细的酶学催化机制还需要后续研究的进一步阐明<sup>[11]</sup>。

另一方面,生物信息学分析并没有为 PyrI4 的结构提供任何信息,其同源蛋白的晶体结构也尚无报道。因此我们首先对于 PyrI4 的蛋白晶体结构进行了解析,发现其具有类似于绿色荧光蛋白(GFP)的  $\beta$ -桶状结构(图 2),这样的结构极为坚固,同时也解释了为何加热到 100℃ 后 PyrI4 仍然能够保持 50% 以上的催化的活性。但是在 apo-PyrI4 的晶体结构中,N 端 22 个氨基酸无法通过 X 射线衍射数据搭建出来,我们分析这可能是源于这部分结构柔性过大,在晶体中的排布不固定,因此没有得到有效的衍射数据;通过蛋白核磁(NMR)技术,我们进一步确认了 PyrI4 结构中 N 端前 22 个氨基酸的柔性和无序性。为了进一步获得 PyrI4 催化空腔的信息,我们分别使用其底物 2 和产物 3 与蛋白一起进行了复合物晶体的筛选工作;大量的条件筛选之后,我们发现在反应底物 2 与 PyrI4 孵育的条件下能够筛选得到复合物晶体,然而该晶体中的小分子却已经完全转化为了 3,而且柔性的 N 端结构也因为小分子配体的诱导作用而形成了一个由  $\alpha$ -螺旋构成的“盖状”结构并与蛋白主体的  $\beta$ -桶状结构之间形成了大量的盐键和氢键(图 2)。基于这样的晶体结构,我们通过计算机分子模拟给出了底物 2 与 PyrI4 的复合物结构,发现小分子配体与蛋白之间多为较弱的疏水作用,仅保守残基 Q115 与小分子的五元环内酰胺部分形成了氢键作用,而失去该作用的突变株蛋白 PyrI4-Q115A 仍然能够催化 D-A 反应的完成,但效率要低于野生型蛋白。

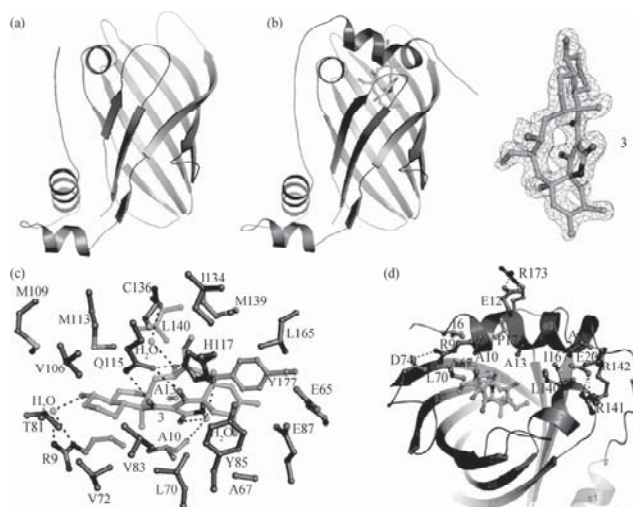


图2 PyrI4 的蛋白晶体结构(a)及其与化合物 3 的复合物晶体结构(b),蛋白  $\beta$ -桶空腔中氨基酸残基与小分子配体的相互作用(c),由小分子诱导而形成的 N 端盖状结构与  $\beta$ -桶结构之间所形成的盐键与氢键(d)

通过进一步的生化实验分析和量子化学计算,我们认为 Pyr14 作为催化 PYR[6,5]螺环结构形成过程中 D-A 反应的高效催化剂,主要发挥在如下几个方面作用:(1) 作为“熵陷阱”(entropy trap),有效地将长链底物中二烯体和亲二烯体两部分结构折叠成能够有利于发生 D-A 反应的构象(即 D-A 反应的过渡态构象);(2) 活性位点处的 Q115 氨基酸残基能够通过和底物亲双烯体部分形成双氢键,降低该部分的 LUMO 能量,从而促进反应的发生;(3) 活性空腔中富含酸性氨基酸,酸性的空腔能够实现质子转移,防止 pKa 较低的酸性底物带有负电荷(由 Klopman 方程可知,二烯体处负电荷的引入会使得 D-A 反应更难发生,即 LUMO 能量被升高);(4) 由底物诱导的 N 端“盖状”结构能够通过和蛋白残基之间形成大量氢键和盐键而释放能量,从而稳定蛋白-小分子复合物的结构,并将原本对反应不利的熵减效应转化为对反应有利的焓效应(图 3)<sup>[12]</sup>。

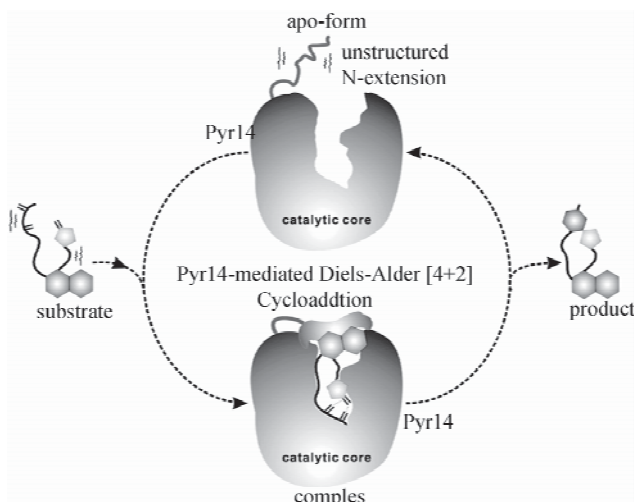


图 3 Pyr14 的催化循环卡通示意图

上述关于 D-A 酶 Pyr14 催化机制的部分研究成果已发表在 *Cell* 子刊 *Cell Chemical Biology* 杂志上<sup>[12]</sup>;对于本研究,国际上研究 D-A 酶的先驱,日本北海道大学的 Hideaki Oikawa 教授,在 *Cell Chemical Biology* 杂志上以“Nature’s Strategy for Catalyzing Diels-Alder Reaction”为题发表了专文评述<sup>[14]</sup>。

### 3 小结与展望

在前期的研究中,国际上仅有两例[4+2]环加成酶的晶体结构被报道<sup>[15,16]</sup>,却都因为缺乏底物-蛋白复合物的结构而未能阐明其催化机制;另外,这两例报道也都存在较大的争议,其中一例涉及到底物多步复杂的反应过程,D-A 反应仅可能是复杂转化过程中的一步<sup>[15]</sup>,另外一例底物能够自发反应且

保持立体专一性,酶的存在仅能在一定程度上加速该反应的进行<sup>[16]</sup>。因此,长期以来国际上对于酶促 D-A 反应的真实存在性和反应机制一直存在争议。

我们选取吡咯吡啶霉素作为研究体系,对于绝对酶依赖的 D-A 反应进行了全面的生化机制研究,并首次在国际上系统性地提出了此类酶促反应的机理,我们认为酶与底物结合放出能量后,两者相互的构象诱导使得小分子的构象与 D-A 反应过渡态的构象极为相似,由此降低了活化能( $E_a$ )并大大促进了反应的速率,而这一切正源于自然界中蛋白质与小分子的共同进化。通过与螺醇缩酮类天然产物生物合成途径的对比,我们将此类“底物过渡态构象折叠”酶的反应机制推广到更多的酶促协同反应中<sup>[13]</sup>。在漫长的进化过程中,不同类型的底物分子虽然发生了相同的协同反应但是却选择了不同骨架结构的酶,然而这样一种普适的生化反应机制却为我们今后人工设计、开发协同反应的生物大分子催化剂提供了重要的研究基础和方向,据此设计的人工酶也将在未来的合成化学和合成生物学研究中发挥重要的作用。

**致谢** 本工作受到了国家自然科学基金(项目批准号:31430005,21520102004,31300064)、科技部(项目批准号:2012AA02A706)以及上海市科委(项目批准号:14JC1407700,15JC1400400)的资助。

### 参 考 文 献

- [1] Brieger G, Bennett JN. The intramolecular Diels-Alder reaction. *Chem Rev*, 1980, 80: 63—97.
- [2] Anseth KS, Klok HA. Click chemistry in biomaterials, nanomedicine, and drug delivery. *Biomacromolecules*, 2016, 17: 1—3.
- [3] Jewett JC, Bertozzi CR. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 1272—1279.
- [4] Nicolaou KC, Snyder SA, Montagnon T, Vassilikogiannakis G. The Diels-Alder reaction in total synthesis. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 1668—1698.
- [5] Corey EJ. Catalytic enantioselective Diels-Alder reactions: methods, mechanistic fundamentals, pathways, and applications. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 1650—1667.
- [6] Gouverneur VE, Houk KN, de Pascual-Teresa B, Beno B, Janda KD, Lerner, RA. Control of the exo and endo pathways of the Diels-Alder reaction by antibody catalysis. *Science*, 1993, 262: 204—208.
- [7] Seelig B, Jäschke A. A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem Biol*, 1999, 6: 167—176.
- [8] Oikawa H, Tokiwano T. Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products. *Nat Prod Rep*, 2004, 21: 321—352.
- [9] Kim HJ, Ruzsyczky MW, Liu H-w. Current developments and challenges in the search for a naturally selected Diels-Alderase. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 124—131.

- [10] Wu Q, Wu Z, Qu X, Liu W. Insights into pyrroindomycin biosynthesis reveal a uniform paradigm for tetramate/tetronate formation. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 17342—17345.
- [11] Tian Z, Sun P, Yan Y, Wu Z, Zheng Q, Zhou S, Zhang H, Yu F, Jia X, Chen D, Mándi A, Kurtán T, Liu W. An enzymatic [4 + 2] cyclization cascade creates the pentacyclic core of pyrroindomycins. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 259—265.
- [12] Zheng Q, Guo Y, Yang L, Zhao Z, Wu Z, Zhang H, Liu J, Cheng X, Wu J, Yang H, Jiang H, Pan L, Liu W. Enzyme-dependent [4 + 2] cycloaddition depends on lid-like interaction of the N-terminal sequence with the catalytic core in PyrI4. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 352—360.
- [13] Zheng Q, Tian Z, Liu W. Recent advances in understanding the enzymatic reactions of [4 + 2] cycloaddition and spiroket-alization. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 31: 95—102.
- [14] Oikawa H. Nature's Strategy for Catalyzing Diels-Alder Reaction. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 429—430.
- [15] Ose T, Watanabe K, Mie T, Honma M, Watanabe H, Yao M, Oikawa H, Tanaka I. Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase. *Nature*, 2003, 422: 185—189.
- [16] Fage C D, Isiorho E A, Liu Y, Wagner D T, Liu H-w, and Keatinge-Clay A T. The structure of SpnF, a standalone enzyme that catalyzes [4 + 2] cycloaddition. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 256—258.

### Biochemical mechanism studies of enzymatic Diels-Alder reactions involved in the biosynthetic pathway of pyrroindomycins

Zheng Qingfei<sup>1</sup>    Liu Wen<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032; 2. Huzhou Center of Bio-Synthetic Innovation, Huzhou 313000)

**Key words** Diels-Alder reaction; enzymatic reaction; biosynthesis; pyrroindomycin; concerted reaction; transition state

• 资料信息 •

## 我国学者在高血压发生的免疫炎症机制研究领域取得重要进展

近日,大连医科大学附属第一医院李汇华研究组在高血压发生的病理生理机制研究领域取得重要进展。该研究发现,骨髓来源趋化因子受体 CXCR2 阳性细胞通过加剧血管炎症、氧化应激、舒张功能异常及血管重塑,参与高血压的发生发展过程。研究成果以“Genetic and Pharmacologic Inhibition of the Chemokine Receptor CXCR2 Prevents Experimental Hypertension and Vascular Dysfunction(趋化因子受体 CXCR2 基因敲除与药物抑制实验性高血压和血管功能障碍)”为题于 2016 年 9 月 27 日在线发表于 *Circulation*(论文链接:<http://circ.ahajournals.org/content/early/2016/09/27/CIRCULATIONAHA.115.020754>)。该研究得到了国家自然科学基金(项目批准号 81330003)等项目资助。

大量研究证实,免疫炎症反应参与高血压的发生发展。免疫炎症细胞趋化到血管壁是高血压免疫炎症反应的重要过程,趋化因子及其受体是介导免疫炎症细胞趋化过程的关键因子。然而,哪种趋化因子/受体参与这个趋化过程,目前仍不清楚。李汇华研究组发现,在血管紧张素 II(Ang II)诱导的高血压模型中,血管组织中骨髓来源的 CXCR2 阳性炎症细胞明显增多;CXCR2 基因敲除和应用 CXCR2 抑制剂均可明显降低 Ang II 及 DOCA/盐诱导的血压升高,抑制血管炎症细胞浸润、炎症因子释放及氧化应激反应,减轻血管胶原沉积和增厚,改善血管舒张功能。将 CXCR2 基因敲除骨髓移植到野生小鼠体内可明显减轻 Ang II 诱导的高血压,而将野生型骨髓移植给 CXCR2 基因敲除小鼠则升高 CXCR2 敲除鼠血压,这进一步证实了骨髓来源的 CXCR2 阳性细胞在高血压发生的病理生理过程中起关键作用。更为重要的是,应用 CXCR2 抑制剂可明显逆转由 Ang II 和 DOCA/盐诱导的高血压。研究人员进一步发现,高血压患者血液中 CXCR2 阳性细胞较正常人明显增多,这与高血压的发生密切相关。

该研究成果不仅拓展了高血压发生的病理生理机制,也为高血压的治疗提供了新的思路。*Circulation* 还针对该研究同期刊发了题为“Is Hypertension a Bone Marrow Disease(高血压是一种骨髓疾病吗)”的特邀述评,指出该研究证实了趋化因子受体 CXCR2 在高血压发生发展中具有重要作用,抑制导致高血压的“有害细胞”可能是治疗高血压新的靶点。

(供稿:医学科学部 朱元贵 郭峻莉 江虎军)