

微型述评

非核糖体多肽合成酶研究进展

明镇寰* 潘建伟 朱睦元

(浙江大学生命科学院, 杭州 310012)

摘要 细菌和真菌采用非核糖体系统合成一些重要的多肽类物质。近年来的研究表明, 在该系统中发挥关键作用的是一类分子巨大的非核糖体多肽合成酶。它们由顺序排列的组件构成, 酶分子结构本身即蕴涵着多肽合成的信息。对非核糖体多肽合成酶结构和功能的了解, 使人们期望可以通过对这类酶的修饰和重组来合成一些新的多肽类物质。

关键词 多肽合成, 非核糖体多肽合成酶, 结构

学科分类号 Q71

按照 mRNA 提供的信息, 以 tRNA 作为携带工具, 用 20 种氨基酸作为原料, 在核糖体上进行蛋白质和多肽的合成, 这是蛋白质生物合成中普遍遵循的原则。但在细菌和真菌中, 一些重要多肽类物质的合成可以绕开核糖体, 可以使用 20 种氨基酸以外的其他化合物, 不以 mRNA 作为模板, 也不需 tRNA 作为携带工具, 在这一特殊的多肽合成系统中起关键作用的是一类特殊的酶——非核糖体多肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetase, NRPSs)。对这一现象虽然早有所知, 但只是近 10 年来对 NRPSs 及其结构进行的一系列的研究工作, 尤其是今年 3 月发表的关于该酶 Te 结构域的研究工作^[1~3], 才使人们对非核糖体多肽合成系统如何行使其功能在分子水平上有基本的了解。

1 非核糖体合成系统和非核糖体多肽合成酶

细菌和真菌在其体内多肽的生物合成中, 会利用一种特殊的非核糖体多肽合成系统, 生成一些重要的多肽类物质, 包括青霉素、万古霉素、放线菌素 D、杆菌肽和环孢菌素 A 等。这些多肽类物质在结构上往往与核糖体系统合成的多肽不同, 它们的组成中包括一些非蛋白质源的氨基酸甚至一些其他的化合物, 结构上往往是环化的。这种特殊的结构有利于它们在生物体内的稳定和特定功能的发挥。

非核糖体多肽合成系统通过一种由模板指导、

但不依赖于核酸模板的非核糖体机制进行运作, 其中发挥关键作用的非核糖体多肽合成酶 (NRPSs) 是一类自然界中存在的分子质量最大的酶, 它们能识别特定的氨基酸并将其直接相连形成多肽链。

NRPSs 由一系列的组件 (module) 顺次排列组成, 大多数 NRPSs 的组件数为 4~10 个, 但也有高达 50 个的。一个典型的组件由大约 1 000 个氨基酸残基组成。每一个组件负责一个反应循环, 包括对选择性底物 (氨基酸或其他化合物) 的识别并将其活化成相应的腺苷酸化合物, 共价中间物的固定和肽键的形成。所以, 该酶中依序排列的组件即构成了该酶所合成多肽的一种模板。

每一个组件在结构上又是由 3 个结构域组成, 它们是腺苷酸化结构域 A、巯基化结构域 T 和缩合结构域 C。腺苷酸化结构域的作用是对特定底物的识别和通过 ATP 对底物的活化, 巯基化结构域负责对反应中间物硫酯的固定, 而缩合结构域负责催化两个紧邻组件上, 已活化的反应中间物 (分别结合着氨酰基和肽酰基) 之间肽键的形成 (图 1)。

由于 NRPSs 分子巨大, 难于对其整个结构进行分析, 所以研究者采取了将其分解, 从研究其各个亚基的结构域入手。多年来研究的结果使人们对该酶的结构有了较深入的了解。

* 通讯联系人。

Tel: 0571-88273604, E-mail: zhming@mail.hz.zj.cn

收稿日期: 2002-04-15, 接受日期: 2002-04-29

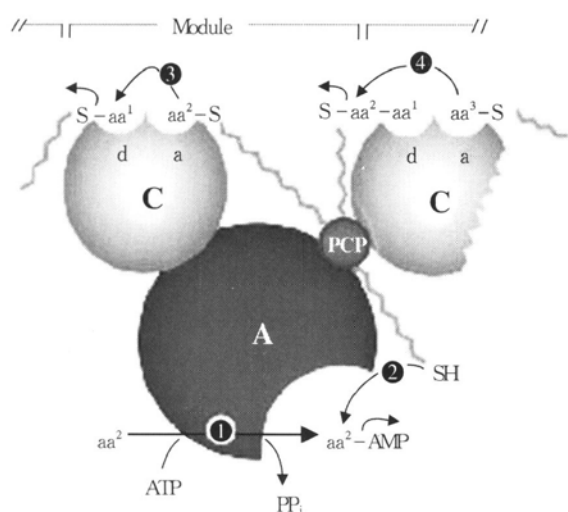


Fig. 1 Diagram of the composition and function for one module of nonribosomal peptide synthetase

图1 非核糖体多肽合成酶的一个组件的组成及功能示意图
①A 结构域上底物的腺苷酸化; ②巯基化结构域上硫酯的形成; ③上游 C 结构域上肽键的形成; ④下游 C 结构域上肽键的形成。

2 非核糖体多肽合成酶的结构

2.1 腺苷酸化结构域 A

腺苷酸化结构域是 NRPSs 组件 3 个结构域中研究得最详细的。1997 年德国 Marburg Philipps 大学的 Marahiel 研究小组在《EMBO》上报了对短芽孢杆菌中短杆菌肽 S 合成酶 I 的研究, 他们对该酶第一个组件的腺苷酸化结构域进行了详细的分析。这是一个能特定地活化苯丙氨酸的结构域 (PheA), 由 556 个氨基酸残基组成, 它能将底物苯丙氨酸活化成苯丙氨酰腺苷酸。这与核糖体多肽合成系统执行的功能相同, 但 PheA 与 I 类或 II 类 tRNA 合成酶无序列的同源性。PheA 在结构上又是由两个主要的亚结构域组成: 小的 C 端亚结构域和大的 N 端结构域。除了 C 端结构域的 Lys517 外, 大多数与底物识别有关的残基位于 N 端结构域。1999 年 Marahiel 和 Stachelhaus 等通过对 PheA 的晶体结构和 160 种不同的腺苷酸化结构域序列的比较, 发现该结构域中由 10 个残基组成的结合袋 (binding pocket) 在底物的识别中起着关键的作用。在这 10 个残基中, 负责稳定羧基的 Lys517 和固定底物氨基的 Asp235 (氨基酸残基所处位置以 PheA 而言) 是非常保守的, 3 个疏水残基位点具有中等程度的保守性, 而在底物侧链识别中起主要作用的 5 个残基具有极大的可变性。

与核糖体合成系统应用精确的校正机制明显地不同, 非核糖体系统多肽合成中对底物的选择和整

合不那么严谨。如环 10 肽短杆菌酪肽是在 2 个位点上有变化的 4 种化合物的混合物, 而 11 肽的免疫抑制剂环孢菌素已知有大约 30 种变体^[4]。

2.2 巯基化结构域 T

巯基化结构域处于腺苷酸化结构域的下流, 又称为肽酰载体蛋白 (peptidyl carrier protein, PCP) 结构域。该结构域负责将活化的氨基酸或其他底物进行共价固定, 为下一步肽键的形成做准备。巯基化结构域由大约 80 个氨基酸残基以反平行的 4 螺旋束组成, 其中前两个螺旋间有 1 个由 18 个氨基酸残基组成的突环。在突环和第二个螺旋的界面上有一个在所有研究过的 NRPS 中保守性很强的丝氨酸残基, 它是 PCP 与其辅因子 4' 磷酸泛酰巯基乙胺相连的位点^[4]。4' 磷酸泛酰巯基乙胺由辅酶 A 衍生而来, 是翻译后在 4' 磷酸泛酰巯基乙胺转移酶的作用下加到 PCP 上的。该转移酶的作用是特异的, 每一种 NRPS 需要各自独特的转移酶。辅因子的加入激活了 PCP 结构域, 是 NRPS 功能发挥所必需的。事实上, 巯基化结构域在功能上与脂肪酸合成酶的酰基载体蛋白类同, 紧邻保守的丝氨酸残基的序列也与酰基载体蛋白的具有同源性, 而且整体折叠上也与之相似。4' 磷酸泛酰巯基乙胺在活化氨酰基的固定 (巯基化)、递送和形成的肽酰基转移中发挥着关键性的作用。

2.3 缩合结构域 C

缩合结构域处于腺苷酸化结构域的上游, 是非核糖体多肽合成系统中肽键形成和肽链移位的部位。它由大约 450 个氨基酸残基组成, 该结构域上有两个位点: 氨酰基受体位点和肽酰基供体位点。氨酰基受体位点接受同一组件中 PCP 辅因子上固定的活化氨酰基, 形成的氨酰-S-PCP 亲核进攻结合在肽酰基供体位点上的肽酰-S-PCP, 形成的新肽酰-S-PCP 接着被移位到紧邻下游组件缩合结构域的肽酰基供体位点。业已证明, 该结构域对进入的氨酰-S-PCP 亲核受体具有很高的底物选择性, 但对肽酰-S-PCP 亲电子供体缺乏专一性。

2.4 硫酯酶结构域

非核糖体多肽合成酶的最后一个组件中还有一个特别的结构域, 处于合成酶肽链的最下游, 称为硫酯酶结构域 Te。它与合成结束后多肽从合成酶体系上释放下来有关, 有时还涉及多肽分子的环化。枯草菌脂肽合成酶的 Te 结构域由 235 个氨基酸残基组成, 是一个具有特殊碗形的疏水空穴, 其 C 端能束缚住与 NRPSs 最后一个组件的 PCP 结构

域辅因子 4' 磷酸泛酰巯基乙胺相连的全长多肽, 催化硫酯键的断裂而使多肽释出并可容纳其在空穴内折叠形成环状结构^[1].

3 非核糖体多肽合成酶的修饰和重组

在对非核糖体多肽合成酶结构了解的基础上, 人们进行了对其结构进行修饰和改造的尝试. 通过对组成腺苷酸化结构域结合袋的关键氨基酸残基的修饰, 能够预期地改变腺苷酸化结构域识别的底物, 如通过对识别苯丙氨酸的腺苷酸化结构域关键氨基酸残基的修饰, 使其转而识别亮氨酸. 但利用这种修饰方法改变 NRPSs 去产生新的多肽产物是相当麻烦的过程. 相对简单的是采用重组的方法, 即利用替换非核糖体多肽合成酶的组成组件、改变酶的组件序列从而产生新的多肽. 如短杆菌酪肽合成酶是一个由 10 个组件组成的 NRPS, 有人将其第 1 个组件 (识别 D-苯丙氨酸) 及第 2 个组件 (识别 L-脯氨酸) 分别与第 9 个组件 (识别 L-鸟氨酸 (Orn), 一种非天然氨基酸) 或第 10 个组件 (识别 L-亮氨酸) 重组并在最后的组件上融入 Te 结构域, 2 种重组的 NRPSs 分别合成了 3 肽 D-Phe-Pro-Orn 和 D-Phe-Pro-Leu.

4 非核糖体多肽合成酶的研究展望

尽管对非核糖体多肽合成酶的研究近年来有了突飞猛进的发展, 人们对它在新肽类物质合成中的作用充满了希望, 但要将其真正付诸实施还有几个问题有待解决.

首先是对缩合结构域的结构和功能的了解. 目前, 实验已证实了该结构域在肽链延长中的重要性, 但对它在肽链形成中的催化机制至今尚不清楚. 对

缩合结构域的结构以及它在组件中与腺苷酸化结构域和巯基化结构域的相互作用的研究, 将是 NRPSs 研究中下一个重要的内容. 这方面的进展有赖于对整个 NRPSs 组件进行结晶方法学上的突破.

其次, 由于 NRPSs 合成的多肽中有许多不寻常的氨基酸, 它们是由在细胞中通常不存在的酶所合成的. 所以在研究者进行体内实验中设计新的 NRPSs 前, 必须将能制造这些不寻常氨基酸的酶基因插入到所用的宿主系统中.

再则, 某些 NRPSs 的结构也并非完全由标准的组件组成, 如合成丁香霉素的假单胞杆菌 *syringae* 的 NRPS, 编码前 8 个氨基酸的组件依次排列, 但编码的第 9 个氨基酸却是由位于不同蛋白质上的结构域 A 所添加^[5]. 这表明要改变某些 NRPSs 实际上可能比目前理解的更困难些. 但这种结构上的复杂性, 从某种角度讲可能也是一件好事, 因为它意味着 NRPSs 在功能的发挥上可能比人们原先想象的更加灵活.

参 考 文 献

- 1 Bruner S D, Weber T, Kohli R M, *et al.* Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure*, 2002, **10** (3): 301~310
- 2 Kohli R M, Takagi J, Walsh C T. The thioesterase domain from a nonribosomal peptide synthetase as a cyclization catalyst for integrin binding peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (3): 1247~1252
- 3 Chiu H T, Hubbard B K, Shah A N, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (15): 8548~8553
- 4 Weber T, Marahiel M A. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*, 2001, **9** (1): R3~R9
- 5 Gewold J. Working outside the protein-synthesis rules. *Science*, 2002, **295** (5563): 2205~2206

Progress in Nonribosomal Peptide Synthetases

MING Zhen-Huan*, PAN Jian-Wei, ZHU Mu-Yuan
(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract Some important peptides of bacterial or fungal origin are synthesized via a template-directed, nucleic acid-independent nonribosomal mechanism. Recent studies revealed that there is a special kind of macroenzymes, nonribosomal peptide synthetases, which plays a key role in the alternative system. Nonribosomal peptide synthetases are composed of modules, the sequences of which contain the message for peptide synthesis. The understanding of the structure and function of nonribosomal peptide synthetases enables scientists believe that some new peptides can be produced by modifying or recombining these special enzymes.

Key words peptide synthesis, nonribosomal peptide synthetases, structure

* Corresponding author. Tel: 86-571-88273604, E-mail: zhming@mail.hz.zj.cn

Received: April 15, 2002 Accepted: April 29, 2002