



苏氨酸醛缩酶的结构与功能及其在药物合成中的应用*

何远志 冯 雁**

(上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

摘要 β -羟基- α -氨基酸(β -hydroxy- α -amino acids, HAAs)是一类广泛应用于制药工业的重要手性中间体。由于其含有双手性中心(C_α 和 C_β),探索其严格立体选择性的生物合成方法备受关注。苏氨酸醛缩酶(threonine aldolase, TA)可在温和条件下催化不同类型的醛与氨基酸缩合构筑丰富的HAAs产物库,显示了工业应用潜力。由于目前表征的TA普遍存在对 C_β 立体选择性不严格、活性较低以及催化机制不清晰等问题,为其在HAAs合成中的应用带来了挑战。本文综述了TA在新酶挖掘、结构与催化机理解析、蛋白质工程以及合成应用等方面的研究进展,为推动酶催化绿色、高效合成手性药物提供参考。

关键词 苏氨酸醛缩酶, β -羟基- α -氨基酸, 晶体结构, 立体选择性, 蛋白质工程

中图分类号 Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0147

β -羟基- α -氨基酸(β -hydroxy- α -amino acids, HAAs)是构筑多种高活性天然产物和药物分子的重要手性砌块,在抗菌、抗肿瘤和免疫抑制等方面具有广泛应用^[1-3](图1)。例如:L-苏式-4-甲磺基苯丝氨酸(L-threo-4-methylsulfonylphenylserine, L-threo-4-MTPS)是合成抗感染药物甲磺霉素和氟苯尼考的重要手性前体^[4-5];屈西多巴(L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine, L-threo-3,4-DOPS)是临床治疗帕金森病的药物^[6-7];L-苏式-4-硝基苯丝氨酸(L-threo-4-nitrophenylserine, L-threo-4-NOPS)可作为中间体合成氯霉素^[8];L-苏式-4-硝基苯乙基丝氨酸(L-threo-4-phenylethylserine)是新型抗生素 obafloxacin 合成的重要中间体^[9]。由于绝大部分的HAAs药物分子及其前体具有双手性中心,在药物合成工业中如何精准控制双手性中心的立体选择性是目前研究的重点和难点。

目前合成HAAs主要有化学法和生物法。手性拆分和不对称有机合成是目前合成HAAs主要的化学方法,但都存在立体选择性控制困难和官能团的相容性较差等问题^[10-12]。相对于化学法,生物法具有反应条件温和、绿色高效和专一性强等特点,

在HAAs合成中具有很大的优势^[13-15]。酶分子作为一种高效的生物催化剂,拥有不同于一般催化剂的显著特点:酶对底物具有高度特异性、高催化效率和高度可调节性^[16-19]。随着酶分子的挖掘和蛋白质工程的发展,多种酶分子已经成为合成HAAs等非天然氨基酸的生物催化剂^[3, 20-24]。苏氨酸醛缩酶(threonine aldolase, TA)是一类磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)依赖的折叠酶,能一步可逆催化 α -氨基酸和醛缩合形成C—C键并产生具有两个相邻手性中心的HAAs化合物,同时其底物谱宽泛,可催化不同类型的醛和氨基酸缩合构筑HAAs产物库,在手性氨基酸药物合成工业中具有很大的潜力^[25-29]。TA还可偶联其他酶建立多酶体系用于药物分子的合成,例如TA偶联脱水酶进一步可将HAAs转化为芳香乙醇胺等高活性化合物^[30]。

目前报道的绝大多数野生型TA普遍存在活性

* 国家重点研发计划(2020YFA0907700)和国家自然科学基金(32271306)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-34207189, E-mail: yfeng2009@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2023-04-13, 接受日期: 2023-04-25

较低、立体选择性不严格以及热稳定性较差等问题, 这些因素限制了其在 HAAs 合成中的应用^[31-34]。近年来, 通过新酶挖掘、晶体结构解析以及酶分子改造策略获得了一系列催化性能改善的 TA, 这些酶分子在高效合成 HAAs 及其药物分子前体中也表现出了更好的催化性能和潜在的工业应用价值^[4, 20, 35-38]。但由于缺乏非天然底物和产物与酶分子的共晶结构, 调控其立体选择性的关键位点

和机制还尚未清楚; 同时提升其多种催化性能也是目前研究所面临的挑战。本文综述了目前 TA 在新酶挖掘、结构解析、催化机制、高通量筛选方法、分子改造以及合成应用等方面的最新研究进展, 也对 TA 工业应用所面临的问题和未来的研究思路进行了讨论和分析, 为更多的 TA 的分子改造和工业合成应用提供了理论基础和新的视角。

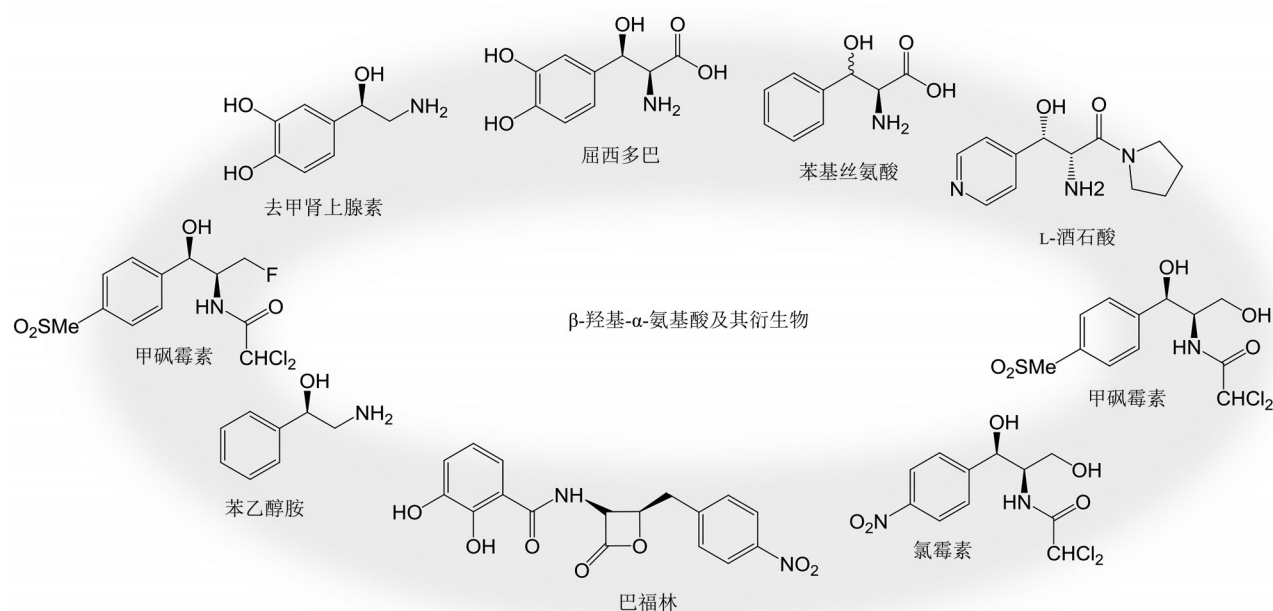


Fig. 1 The application of threonine aldolase for synthesis of β -hydroxy- α -amino acid and its derivatives

图1 苏氨酸醛缩酶在 β -羟基- α -氨基酸及其衍生物合成中的应用

1 苏氨酸醛缩酶的分类与来源

TA 分布广泛并在进化过程中形成了不同的类型^[25] (图 2a)。根据对天然底物的特异性, TA 可以分为 L-TA (L-threonine aldolase, L-TA) 和 D-TA (D-threonine aldolase, D-TA), 它们分别可逆催化 L-苏氨酸和 D-苏氨酸生成甘氨酸和乙醛^[27, 30, 39-40] (图 2b)。L-TA 属于天冬氨酸氨基转移酶超家族, 为 PLP 依赖的 I 型折叠酶; D-TA 属于丙氨酸消旋酶超家族, 为 PLP 依赖的 II 型折叠酶^[41-42]。根据对天然底物立体化学偏好性可进一步将 TA 分为 L-TA (EC 4.1.2.5)、L-*allo*-TA (EC 4.1.2.49)、low-specificity L-TA (EC 4.1.2.48) 和 D-TA (EC 4.1.2.42)^[31, 41, 43-45], 其中 L-TA 偏好 L-苏氨酸底物, L-*allo*-TA 偏好 L-*allo*-苏氨酸底物,

low-specificity L-TA 无明显的底物偏好性^[46] (图 2a)。值得注意的是, 虽然 low-specificity L-TA 被认为是“低特异性”酶, 实际上它们在羟醛缩合反应中对 C_α 也同样具有严格的立体选择性。进一步通过序列相似性网络和系统发育树分析发现, L-TA 和 D-TA 属于同簇上的不同进化分支^[47]。有趣的是, L-TA 可细分为两个不同进化分支上的亚家族, cluster A 和 cluster B, 其中 cluster A 包括原核和真核来源的 L-TA, 而 cluster B 仅包含原核来源的 L-TA^[46-47]。虽然两个不同簇的 L-TA 在进化分支上存在不同, 但它们均具有相同的保守氨基酸功能位点, 并具有相似的蛋白质结构, 这也进一步证明了它们是从同一个家族趋同进化而来^[47]。在催化机制方面, L-TA 和 D-TA 均以保守的赖氨酸残基, 通过席夫碱交换机制进行催化; 活性中心的多种相

相互作用（氢键、盐桥和共轭等）共同稳定辅因子PLP的空间构象。其中D-TA催化过程需要二价金属离子（如Mn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺和Mg²⁺等）参与，而L-TA不需要金属离子参与反应^[48-49]。

TA广泛存在于各种生物体中，在动物、植物、细菌以及真菌均有报道^[20, 25-26, 50]。目前，已表征

的L-TA来源于小鼠肝脏、大肠杆菌^[51]、利什曼虫^[52]、假单胞菌^[53]、海栖热袍菌^[54]、酿酒酵母^[55]、天蓝色链霉菌^[7]和简氏气单胞菌^[43]等。D-TA的报道相对较少，已鉴定的D-TA来源于丝状微菌属^[39]、木糖氧化无色杆菌^[45]、绿藻^[56-57]、木糖氧化产碱菌^[49]和节杆菌属^[58]等。

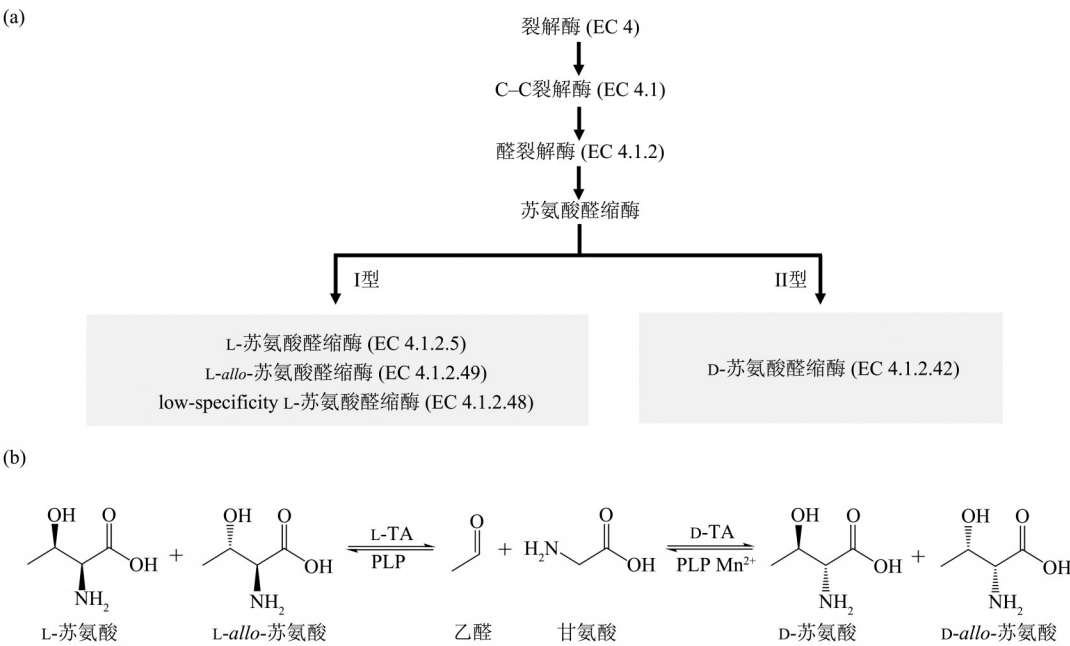


Fig. 2 Classification and natural reactions of threonine aldolases

图2 苏氨酸醛缩酶的分类与天然反应

(a) 苏氨酸醛缩酶的分类；(b) 苏氨酸醛缩酶催化的天然反应。PLP：磷酸吡哆醛；TA：苏氨酸醛缩酶。

2 苏氨酸醛缩酶的结构及催化机理

L-TA 和 D-TA 属于不同酶家族，它们在结构和催化机理上也存在明显不同。目前已解析了多种来源 TA 的晶体结构（表1），比如大肠杆菌^[48, 59]、假单胞菌^[60]、海栖热袍菌^[61]、简氏气单胞菌^[43]和利士曼原虫^[35]等。除了apo形式以外，也报道

了多个氨基酸与蛋白质的共晶结构，例如甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸等。通过对它们的结构特征、辅因子和底物结合位点进行分析，确定了蛋白质与辅因子PLP结合以及底物识别的关键位点。同时基于计算机辅助工具等技术手段对它们的催化过程进行了研究并提出了催化机理^[36, 39, 62]。

Table 1 Crystal structure of resolved threonine aldolases

表1 已解析的苏氨酸醛缩酶的晶体结构

酶	菌种	PDB 编号	配体	分辨率/Å	参考文献
L-TA	硕大利什曼原虫 (<i>Leishmania major</i>)	1SVV	PLP	2.1	[63]
	凡巴林分枝杆菌 (<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>)	7W0I	无	1.75	[64]
	大肠杆菌KTE79 (<i>Escherichia coli</i> KTE79)	4RJY	PLP/Ser	2.1	[51]

续表1

酶	菌种	PDB 编号	配体	分辨率/Å	参考文献
L-allo-TA	简氏气单胞菌DK-39 (<i>Aeromonas jandaei</i> DK-39)	3WGB	PLP-Gly	2.6	[61]
		3WGC	PLP-Gly	2.5	
	海栖热袍菌 (<i>Thermatoga maritima</i>)	2FM1	PLP	2.3	[54]
	海栖热袍菌 (<i>Thermatoga maritima</i>)	1LW4	PLP-Thr	1.9	
		1LW5	PLP-Gly	2.1	[65]
		1M6S	PLP	1.8	
low specificity L-TA	海栖热袍菌 (<i>Thermatoga maritima</i>)	1JG8	PLP	1.8	[66]
	大肠杆菌K-12 (<i>Escherichia coli</i> K-12)	3WLX	PLG	2.5	[67]
	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)	5VYE	PLR	2.3	[4]
	大肠杆菌WV_060327 (<i>Escherichia coli</i> WV_060327)	4LNJ	PLR	2.1	[48]
		4LNM	PLP-Gly	2.1	
		4LNL	PLP-Thr	2.1	
D-TA	木糖氧化产碱菌 (<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>)	4V15	PLP	1.5	[49]
	海洋线状微球菌 (<i>Filomicrobium marinum</i>)	7DIB	PLP	2.2	[39]
	绿藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	7YQA	PLP	1.85	[56]

2.1 L-TA的结构与催化机理

2001年, Kielkopf等^[65]解析了第一个TA的晶体结构(PDB ID: 1JG8), 该酶是来源于海栖热袍菌(*Thermatoga maritima*)的低特异性的L-TA。随后, Kielkopf等^[65]也解析了该菌种来源的L-TA(PDB ID: 1M6S)以及与L-allo-苏氨酸(PDB ID: 1LW4)和甘氨酸(PDB ID: 1LW5)的复合物晶体结构。此外, Di Salvo等^[48]也陆续报道了来源于大肠杆菌的低特异性L-TA的晶体结构, 包括与甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的共晶结构(PDB ID: 4LMJ、4LMN和4LNL)。对来源于大肠杆菌的L-TA结构分析表明, 其整体结构呈同源四聚体, 每条单链由一个大结构域和小结构域组成, 每3个单体形成1个活性中心, 辅因子PLP结合在3个单体形成的界面上, 并与B链上的Lys197形成内席夫碱形式(内部醛亚胺), 此时处于非催化状态(图3a, b)。辅因子PLP与蛋白质相互作用分析表明: A链上的His83的咪唑基平行于PLP的吡啶环的 re 面并形成 π - π 共轭相互作用稳定着PLP的空间构象; 位于B链上的Ala168与PLP在 si 面产生疏水相互作用; 同时Asp166的羧基和Asp169的胍基分别与PLP吡啶环上亚胺基和羟基形成氢键相互作用^[48]; 为了稳定PLP的磷酸基团, B链上的Gly58和Thr59氨基酸侧链与磷酸基团分别形成氢键相互作用; 同时B链上的Ser196和Gly204以及C链上的Lys222通过水分子介导的氢键相互作用共同稳定着PLP磷酸基团^[48](图3c)。该酶与甘氨酸的共

晶结构表明, 当甘氨酸进入活性中后, 通过置换活性中心的赖氨酸Lys197形成醌类中间体(外部醛亚胺)^[48], 其中B链上带正电的氨基酸Arg169/Ar308和电中性Ser6分别与甘氨酸的羧基形成盐桥和氢键相互作用保持构象的稳定。该酶与苏氨酸的复合物晶体结构中, 活性中心的两个水分子结合在底物羧基和PLP磷酸基团之间, 它们形成氢键网络共同稳定底物和辅因子PLP的空间构象^[65]。此外, 在底物识别和立体特异性方面, 氨基酸His83和His126通过与活性中心水分子产生相互作用并靠近L-allo-苏氨酸, 表明它们可能在底物识别方面具有重要的作用, 同时氨基酸Tyr87的侧链大小可能影响酶分子的底物立体特异性识别^[65]。

进一步的, 在L-TA与PLP-Gly复合物结构的基础上, 当醛底物进入活性中心后, 中间体PLP-Gly上的 C_{α} 质子转移至酶活性中心的广义碱并产生共振阴离子, C_{α} 通过亲核进攻醛基生成C—C键, 产物通过席夫碱交换机制被释放出酶活性中心, PLP则从产物转移到活性中心保守的赖氨酸并重新形成内部醛亚胺, 完成了羟醛缩合反应的完整循环^[2, 20, 51](图4a)。此外, Rocha等^[2]通过过渡态能量计算表明, 醛底物质子化可能是通过水分子介导的碱性基团完成的, 活性中心的多个水分子在底物构象稳定和催化中也有着重要的作用。由于L-TA活性中心口袋较大, 小分子醛底物在活性口袋存在多种构象, 导致产物立体选择性较差, 这也为分子改造提升L-TA立体选择性带来了挑战。

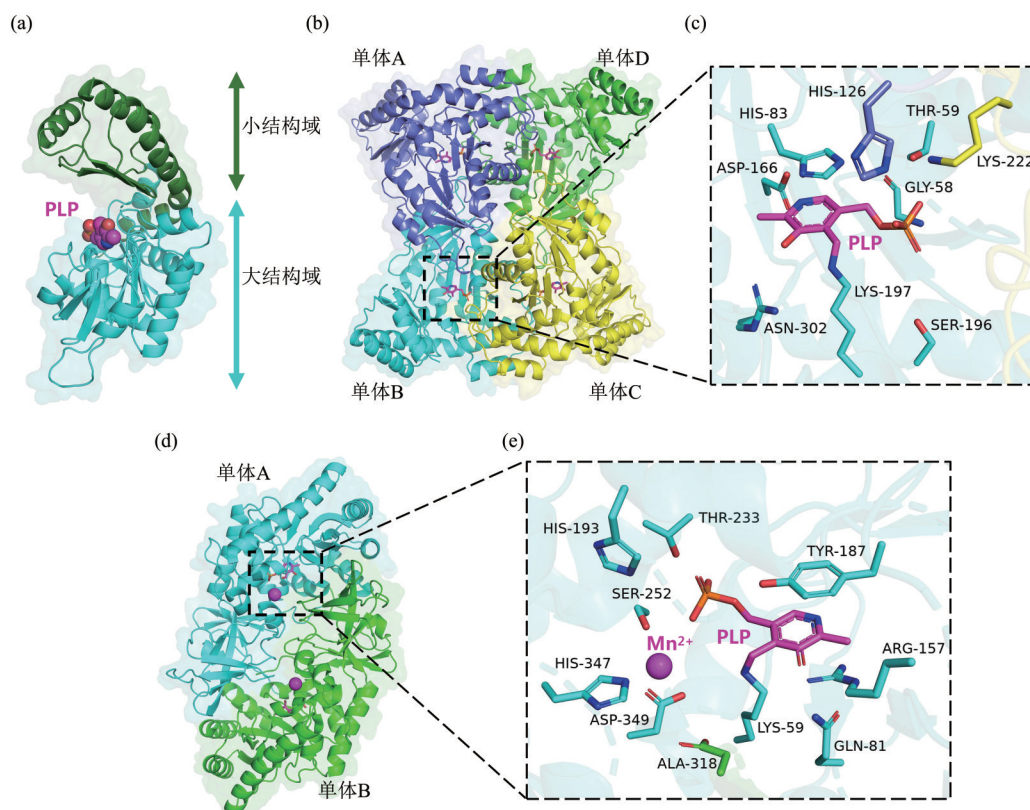


Fig. 3 The crystal structure of threonine aldolases

图3 TA的晶体结构

(a) L-苏氨酸醛缩酶的单体结构；(b) L-苏氨酸醛缩酶的整体结构（PDB ID: 4LNJ）^[48]；(c) L-苏氨酸醛缩酶活性中心氨基酸位点；(d) D-苏氨酸醛缩酶的整体结构（PDB ID: 4V15）^[49]；(e) D-苏氨酸醛缩酶活性中心氨基酸位点。

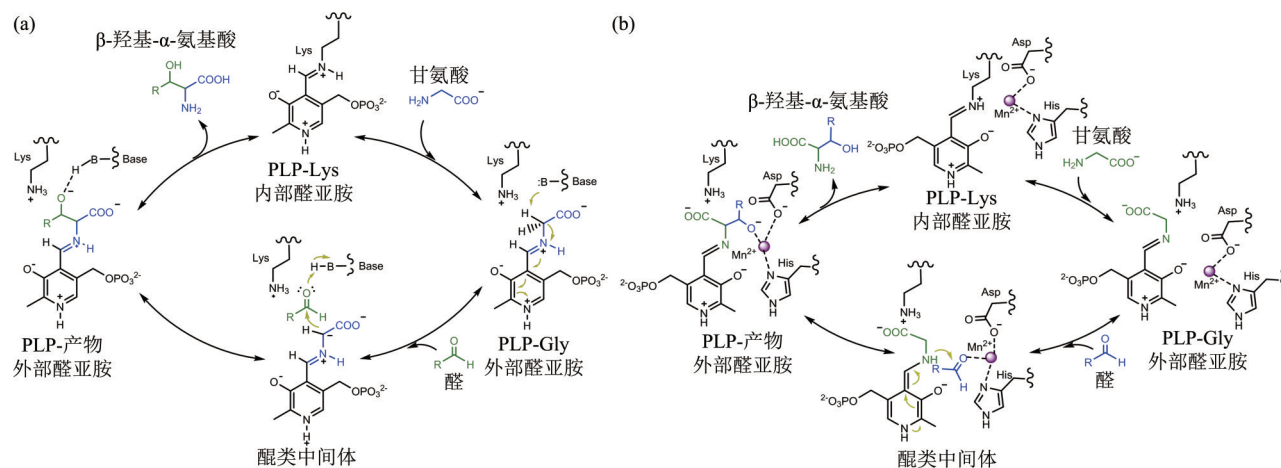


Fig. 4 The proposed catalytic mechanism of threonine aldolase

图4 苏氨酸醛缩酶的催化机制

(a) L-苏氨酸醛缩酶的催化机制；(b) D-苏氨酸醛缩酶的催化机制。PLP: 磷酸吡哆醛。

L-TA 对 C_α 具有严格的立体选择性，但对 C_β 的立体选择性则不严格。探究调控 C_β 立体选择性的关键结构基序和调控机制将为其分子改造提升立体

选择性提供理论基础和指导。Zheng 等^[35-36, 38, 62]提出了“双通道路径假说”，醛底物分别从两个不同的路径（顺式通道和反式通道）进入活性中心，

C_α 从 si 和 re 面进攻醛基,从而产生对应的立体构型产物(图5)。基于此假说,通过“增强和减弱”不同通道的醛底物结合来调控L-TA对 C_β 的立体选择性。此外,有研究表明在丙酮酸依赖的醛缩酶和磷酸果糖醛缩酶中,由于底物受到活性中心微环境和相互作用力的影响,可以反转形成不同的构象进而产生不同构型产物^[68-69]。因此对于L-TA,当底物从同一通道进入活性中心时,底物在活性口袋中可能会翻转形成不同的构象进而表现出对 C_β 不同的立体选择性。为了进一步探究L-TA对 C_β 的立体选择性调控机制,未来还需要结合L-TA与非天然底物或产物的复合物共晶结构以及借助计算机辅助工具继续探究其催化奥秘。

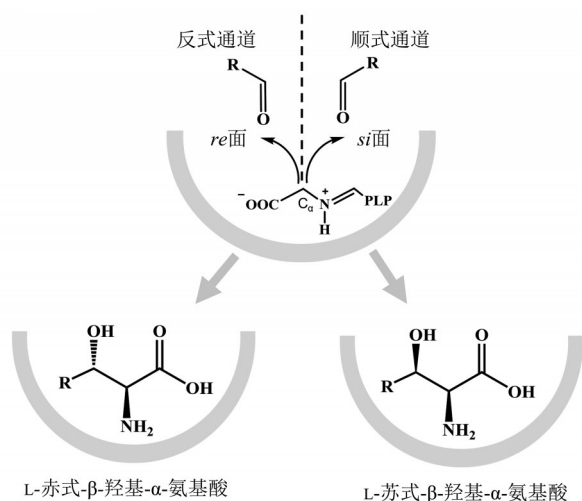


Fig. 5 Schematics of path hypothesis for diastereoselectivity control in L-threonine aldolase^[36, 62]

图5 L-苏氨酸醛缩酶非对映立体选择性调控的路径假说^[36, 62]

2.2 D-TA的结构与催化机理

D-TA晶体结构的报道较少。目前仅解析了3个不同来源的D-TA的晶体结构(表1),它们分别来源于木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*) (PDB ID: 4V15)^[49]、海洋线状球菌属(*Filomicrobium marinum*) (PDB ID: 7DIB)^[39]和莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) (PDB ID: 7YQA)^[57, 70]。2015年,Uhl等^[49]报道了第一个D-TA的晶体结构,该酶来源于木糖氧化无色杆菌(PDB ID: 4V15),并对其催化机制进行研究。该酶整体呈同源二聚体结构,每个单体由8个 α/β 折叠形成的丙氨酸消旋酶结构域、1个N端和C端残

基组成的 β 结构域组成(图3d)。辅因子PLP结合在两个单体之间并与Lys59形成内部醛亚胺。其中,二价金属离子 Mn^{2+} 结合在PLP附近并与活性中心的水分子、3个天冬氨酸(Asp59、Asp321、Asp349)和His347形成氢键相互作用网络^[49](图3e)。在催化机制方面,D-TA依赖二价金属离子 Mn^{2+} ,通过Lewis酸形式与供体底物配位,并通过水分子介导的碱性残基对底物质子化而获得烯醇化的烯二醇亲核体,进而催化形成C—C键^[39, 71](图4b)。由于目前尚未获得D-TA与底物的复合物晶体结构,因此对其催化机理和选择性机理还需进一步研究。

3 苏氨酸醛缩酶分子改造和在 β -羟基- α -氨基酸合成中的应用

HAAs是一类重要的非天然氨基酸,它具有相邻的两个手性中心,是一系列天然产物和活性分子的重要中间体。通过对R基团、氨基、羧基以及羟基进一步修饰能合成多种手性药物,比如氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和屈西多巴等。TA可在温和的条件下一步催化醛和氨基酸缩合合成HAAs;同时该酶具有广泛的醛底物谱,能催化多种类型的醛分子(如芳香醛、杂环醛和脂肪醛等)和氨基酸发生反应,产物丰富多样,展现了潜在的工业应用价值(图6)。由于天然的TA存在对非天然底物的活性较低、立体选择性不严格以及热稳定性差等问题,限制了其在非天然氨基酸药物中的应用。近年来,随着蛋白质工程、高通量筛选方法以及结构生物学的发展,为TA的分子改造提升其催化性能奠定了一定的基础。鉴于芳香基团在药物分子中的普遍存在以及TA对芳香醛底物的良好兼容性,绝大部分分子改造工作都围绕非天然芳香醛底物和氨基酸缩合反应(表2)。

3.1 高通量筛选方法

针对TA的定向进化,目前已建立了多种针对活性和立体选择性改造的高通量筛选方法,包括醛底物显色法、菌体生长偶联和多酶偶联法等。醛分子在室温下能与多种试剂发生反应并在特定的波长下具有最大吸收值,比如3-甲基-2-苯并噻唑烷(MBTH)、2,4-二硝基苯肼(DNPH)、4-氨基-5-肼基-1,2,4-三唑-3-硫醇(Purpald)和乙酰丙酮(Nash)等,可通过显色法检测醛底物的消耗速率来快速筛选突变体^[72-76]。同时,研究人员还设计了基于多酶偶联对TA突变体进行筛选。TA催化

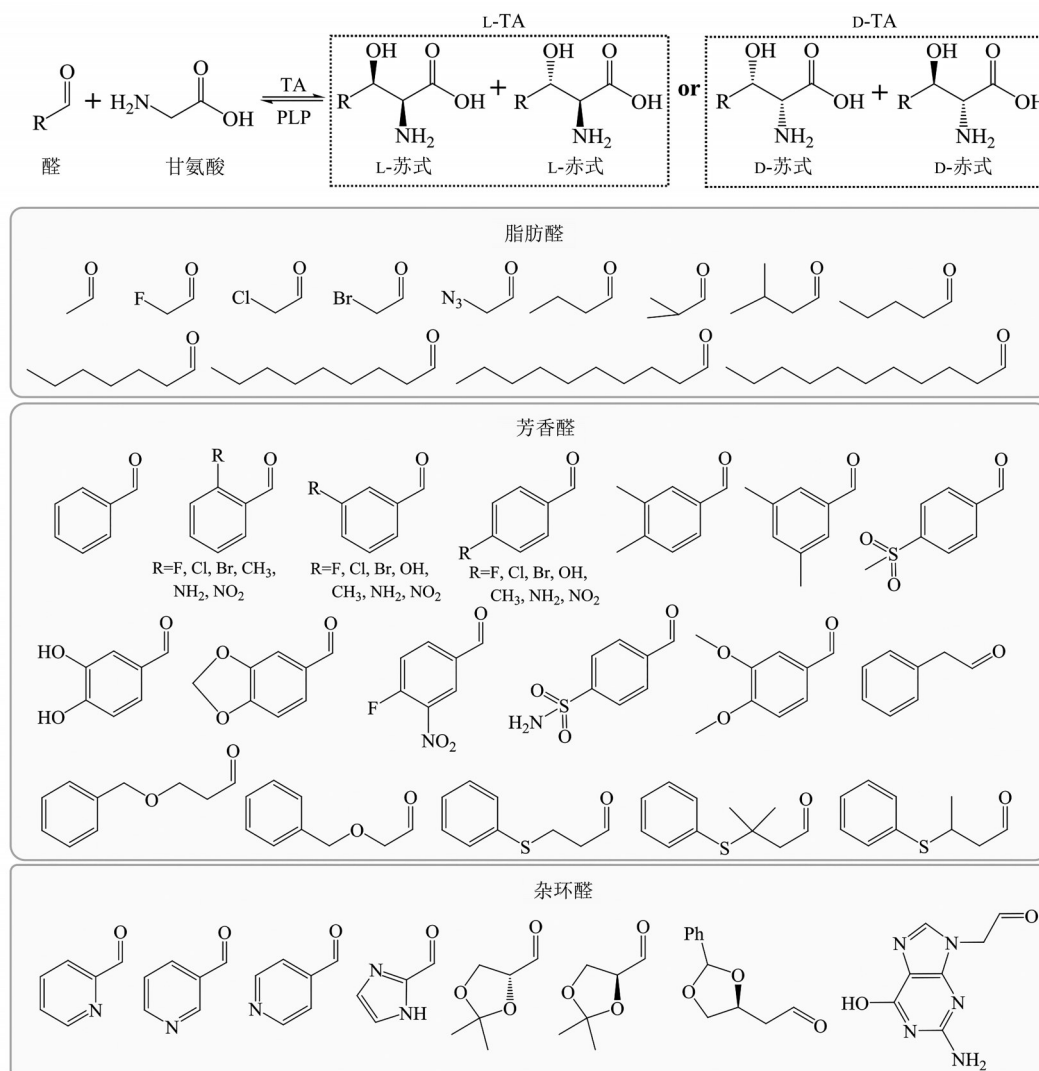


Fig. 6 A part of substrate scope of characterized threonine aldolases

图6 已报道苏氨酸醛缩酶的部分醛底物谱

TA: 苏氨酸醛缩酶; PLP: 磷酸吡哆醛。

HAAs发生羟醛裂解反应生产甘氨酸和醛，醇脱氢酶（ADH）可将醛分子转化为醇，此过程消耗还原型辅酶I NADH（nicotinamide adenine dinucleotide）产生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD^+ ，同时NADH在340 nm下具有最大吸光度值，可通过测定340 nm下吸光度值变化来筛选TA突变体的活性^[26, 77-78]（图7a）。此外，还建立了基于宿主菌生长偶联的高通量筛选方法。通过失活或敲除宿主大肠杆菌体内甘氨酸合成途径上的苏氨酸醛缩酶（TA）、丝氨酸羟甲基转移酶（GLYA）、苏氨酸脱氢酶（TDH）和2-氨基-3-丁酮酸裂解酶（KBL）基因构建营养缺陷型宿主菌，使该缺陷型大肠杆菌在没有外源添加甘氨酸的情况下，不能在基础培养

基上生长^[79]，通过营养缺陷型培养基来测试异源TA降解HAAs合成甘氨酸的活力来对突变体进行筛选（图7b）。

虽然这些方法可用于TA突变体的活性筛选，但它们无法对突变体立体选择性进行分析。针对这个缺陷，Chen等^[46, 80]通过巧妙的设计，将来源于伯克霍尔德菌（*Paraburkholderia xenovorans*）的苯丝氨酸脱水酶（Phenylserine dehydratase, PSDH）与TA进行偶联，建立了基于TA活性和立体选择性高通量筛选方法（图7c）。其中，L-PSDH能特异性地降解L-苏式-苯丝氨酸合成苯基酮酸，而对L-赤式-苯丝氨酸无活性；同理，D-PSDH能特异性地降解D-苏式-苯丝氨酸合成苯基酮酸，而对

D-赤式-苯丝氨酸无活性, 生成的苯基酮酸可与 Fe^{3+} 在酸性条件下形成稳定的螯合物, 并在 640 nm 的波长下具有最大吸收值。基于 TA 的催化特性, 它们的产物仅为一对非对映体, 通过两步催化即可对

反应中醛底物和酮酸进行定量, 进而计算突变体的活性和立体选择性, 这为高通量筛选 TA 突变体提供了一种新的普适性方法^[80]。

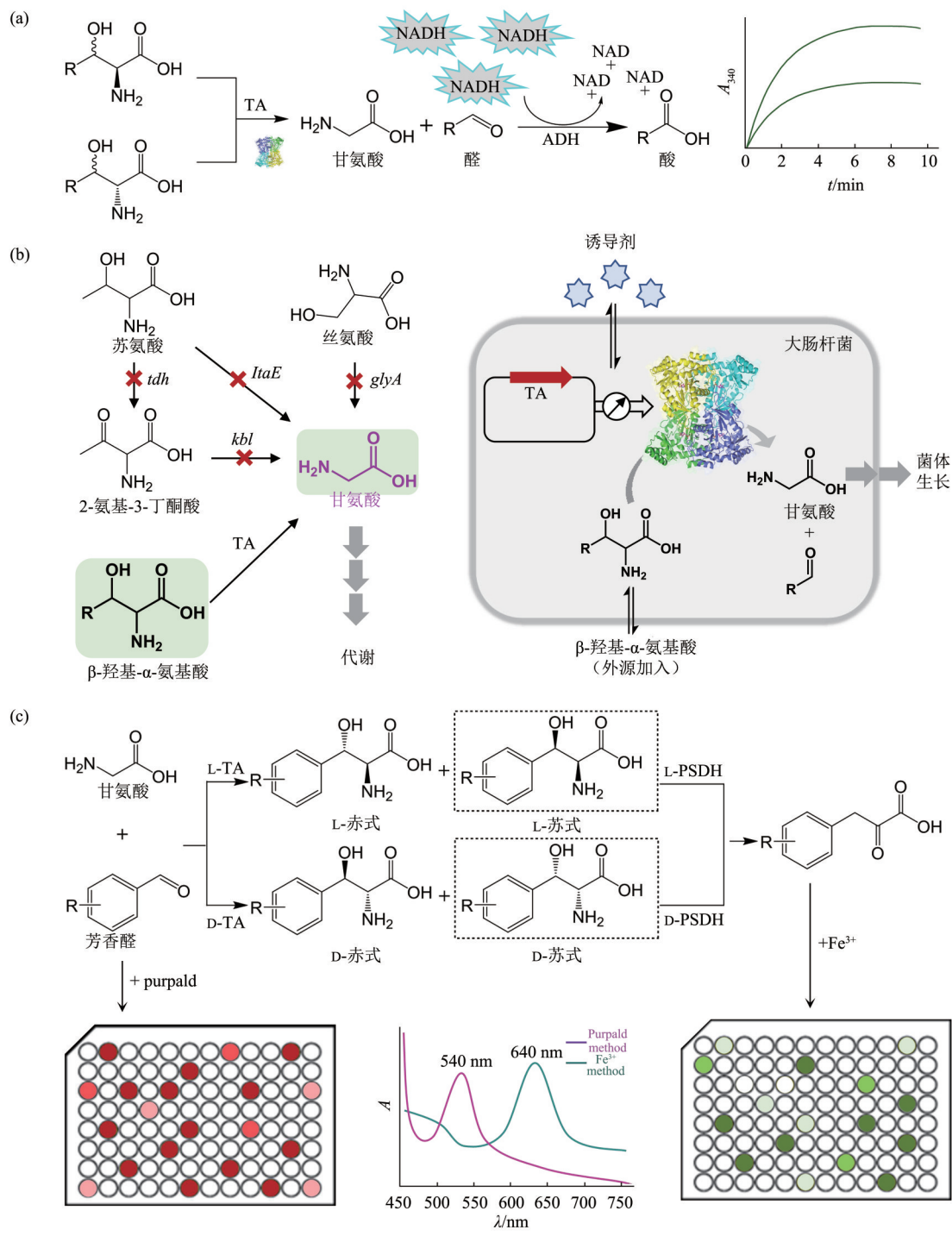


Fig. 7 Screening methods for directed evolution of threonine aldolases

图 7 苏氨酸醛缩酶定向进化的筛选方法

(a) 基于辅酶的活性筛选方法^[77]; (b) 基于生长偶联的活性筛选方法; ^[79] (c) 基于双酶偶联的活性和立体选择性筛选方法^[80]。

3.2 L-TA的分子改造与合成应用

野生型L-TA往往存在活性低、立体选择性差等问题,限制了其在HAA合成中的应用。为了改善L-TA的催化性能,目前也开发了一系列突变策略对L-TA进行定向进化以提升其催化性能。

在活性改造方面, Lee等^[34]根据乙醛等醛分子对大肠杆菌的抑制作用,设计了基于大肠杆菌生长的L-TA筛选体系,获得了更高催化活性的突变体。在合成反应方向, L-TA通过消耗醛底物,促进了大肠杆菌的生长,从而筛选到具有高活性的突变体。作者选择来自于铜绿假单细胞(*P. aeruginosa*)的L-TA,通过易错PCR策略获得了约20 000个突变体库,在含有20 mmol/L的乙醛下进行筛选,获得了对乙醛耐受性提升的突变体。与野生型相比,最佳突变体LTA-S2的活性提升了2.1倍。

在热稳定性改造方面, Baik等^[7]以来源于天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3的L-TA为研究对象,为了提升该酶的热稳定性,他们采用了易错PCR策略构建了含有大约15 000个突变体的文库,在65℃下处理这些突变体并测定其裂解L-苏氨酸合成乙醛和甘氨酸的活力。通过筛选,他们获得了8个相比野生型具有更好热稳定性的单点突变体。其中最佳突变体H177Y在60℃下加热20 min后仍保持了初始活性的86%,而在相同条件下,野生型仅保留了11%的残留活性。更重要的是,在提升热稳定性的同时,蛋白质的活性并没有受到影响。作者采用全细胞催化策略,使用最佳突变体H177Y在水相中进行了20个连续循环的反应,成功合成了4 g/L屈西多巴。

为了改善L-TA对C_β的立体选择性,研究人员通过蛋白质结构、计算机模拟以及定点突变等技术手段对其进行设计,以提升其在HAA合成中的立体选择性^[35-36, 62, 81]。酶的活性口袋对于酶分子的催化性能有着重要的影响。基于此, Lin团队^[4]对来源于草张状珊瑚状放线菌*Actinocorallia herbida*的L-TA的活性口袋进行改造,来提升其对重要性药物中间体L-苏式-4-MTPS合成的立体选择性,成功将该酶的 de 值(diastereomeric excess, 非对映体过量百分率)从58%提升至81%^[5]。在此基础上,该团队通过分子动力学模拟和结合自由能计算等手段对获得的突变体进行理性设计,进一步将该酶的 de 值提升至93.7% (表2)。Zheng等^[36, 62]基于“双底物通道假设理论”并结合蛋白质结构对不同来源的L-TA进行半理性设计,以催化4-甲砒基

苯甲醛和甘氨酸缩合合成重要药物前体L-苏式-4-MTPS为模式反应,成功获得了多个突变体实现了该化合物的严格立体选择性合成($de>99\%$)。

L-苏式-4-NOPS是合成抗生素氯霉素的重要前体化合物, Cai等^[8]通过计算机辅助的定向进化,对来源于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的L-TA进行分子改造,大幅度提升了L-苏式-4-NOPS合成的立体选择性,其中最佳突变体的 de 值从32%提升至85% (表2)。屈西多巴是2014年FDA批准的一种治疗帕金森病的强效药物^[6-7]。然而,含有富电子邻苯二酚基团的底物3,4-二羟基苯甲醛在羟醛缩合反应中不活跃,导致L-TA在催化中的活性和对C_β非对映选择性较差,酶促合成收率低。Zhao等^[63]从黑熊的肠道微生物菌群中克隆了一种新型L-TA (命名为Sz-1-2),并对该酶Arg318位点进行定点饱和突变,其中最佳突变体R318L催化合成L-苏式-3,4-DOPS的 de 值达到了84.9%,与野生型相比显著提升。此外, Zha等^[82]通过氨基酸虚拟突变发现了L-TA中的调控催化性能的关键位点His128,通过饱和突变获得了一个对屈西多巴合成具有良好非对映体立体选择性的突变体H128N,其 de 值达92.9%。随后作者以该突变体的全细胞为生物催化剂,在1 h内合成了1.6 g/L的产物,其 de 值达到了95.4%,是目前报道合成该化合物立体选择性最好的L-TA。作者随后通过计算机模拟表明,增加His128位点残基的体积对氢供体的活化是不利的,适当增加氢受体可以增强底物结合,从而提高转化率^[82] (表2)。

虽然目前在L-TA立体选择性改造方面取得了一定的进展,但绝大部分突变体在提升立体选择性的同时,活性都出现了较大幅度的下降,同时提升活性和立体选择性仍是目前所面临的挑战。因此,挖掘更高活性的天然L-TA和开发更高效的突变策略是解决这些缺陷的重要手段。笔者基于进化关系分析和微生物生长特性分析,成功挖掘到了一个来源于海洋嗜油微生物海神单胞菌(*Neptunomonas marina*)的新型L-TA,它在催化合成重要药物分子前体L-苏式-4-MTPS中同时表现出良好的活性(64.8 U/mg)和非对映体立体选择性(89.5% de)^[83]。进一步通过晶体学和计算机模拟等研究,精确定位了该酶负责调控立体选择性的关键结构基序,建立了以结构指导的底物构象调控适配新策略,同时结合氨基酸定点饱和突变和迭代组合突变技术,成功获得了对L-苏式-4-MTPS合成活性和非

对映体立体选择性双提升的三点突变体 N18S/Q39R/Y319L, 其 $de>99\%$, 催化活性达到 95.7 U/mg , 是目前报道催化合成 L-苏式-4-MTPS 活性最高的 L-TA。该突变体在克级别制备 L-苏式-4-MTPS 反应中的时空产率高达 $216\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 表明了其作为生物催化剂在合成 HAAs 具有重要的工业应用潜力。同时, 笔者基于结构分析、定点突变以及计算机模拟等研究, 发现了该酶的“双构象”非对映体立体选择性调控机制, 并锚定了调控该酶立体选择性的关键结构基序, 这为更多 L-TA 改造提供了理论指导, 也为加快 L-TA 在生物技术等工业领域的应用奠定了基础^[83]。

3.3 D-TA的分子改造与合成应用

D-TA 催化醛和氨基酸合成的产物为 D-苏式和 D-赤式构型^[84]。针对 D-TA 的分子改造和应用, 目前也开展了一系列的研究。与 L-TA 相比, D-TA 在 HAAs 合成中对 C_p 拥有更加严格的立体选择性, 这是因为 D-TA 在热力学和动力学控制中达到平衡的时间较长导致。因此, 可通过调节反应条件(温度、酶量和有机溶剂等)来降低产物的合成速率, 从而获得更好的立体选择性^[46]。基于此, Chen 等^[85] 以来源于戴尔福特菌 RIT313 (*Delftia* sp. RIT313) 的 D-TA 为研究对象, 通过调控反应温度、有机溶剂、酶量和反应时间使该酶催化处于动力学控制下, 成功实现了 D-苏式-2-氟苯丝氨酸和 D-苏式-2-硝基苯丝氨酸的高活性和立体选择性合成, 其转化率和 de 值均大于 90% 。此外, 作者以该酶全细胞为催化剂, 在手性拆分 D/L-苏式-苯丝氨酸和 D/L-苏式-4-MTPS 中也表现出了严格立体选择性 ($e.e.>99\%$)^[85]。Park 等^[39] 挖掘到了一个来源于海洋线状微球菌 (*Filomicrobium marinum*) 的在合成 D-苏氨酸中具有高活性和高立体选择性的 D-TA。作者解析了该酶的晶体结构并对其催化机理进行了全面的分析。作者利用以结构和机制为指导的蛋白质工程对该酶进行理性设计, 成功获得了对 D-苏氨酸严格立体选择性的突变体 G179A/S312A, 其 de 值高达 99.5% , 同时该突变体对非天然底物也表现出良好的活性和立体选择性, 可应用

于 β -羟基 α -D-氨基酸的生物合成。
D-赤式-2-氨基-3-羟基-3-(4吡啶基)-丙酸是合成 β -羟基氨基酰胺酒石酸盐的关键中间体^[84]。Goldberg 等^[84] 分别测试了来源于木糖氧化产碱菌 (*Alcaligenes xylosoxidans*) 和节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) 的两个 D-TA 催化吡啶 4-吡咯甲醛和甘氨酸缩合合成 D-赤式-2-氨基-3-羟基-3-(4吡啶基)-丙酸的活性和立体选择性, 获得了催化活性较好的 D-TA。随后作者通过发酵工艺和实验条件优化, 显著改善了该酶的稳定性和催化活性, 实现了对目标化合物的严格立体选择性合成 ($de>99\%$) (表 2)。同时, 在此基础上, 作者设计了多步反应用于合成 β -羟基氨基酰胺酒石酸。巧妙的是, 该化合物的等电点由于接近反应体系的 pH, 在反应过程中能从混合物中结晶出来且具有良好的纯度, 这极大地降低了后续分离纯化的成本。最后, 作者对温度、pH、底物浓度和酶量进行了优化, 显著地提升了合成效率, 在 100 L 制备级反应中成功高效绿色地合成了该目标化合物^[17]。

D-TA 不仅可以催化醛氨缩合合成 HAAs, 还可催化羟醛裂解反应, 这也为 D-TA 在动力学拆分上获得单一构型化合物提供了一种巧妙和经济的策略。D-TA 催化 β -羟基- α -D-氨基酸裂解合成甘氨酸和醛, 可以作为合成 β -羟基- α -L-氨基酸的原料。目前几种 D-TA 已经被用于手性拆分合成临床药物中间体, 比如屈西多巴和 L-苏式-4-MTPS 等^[46]。虽然 D-TA 已可应用于 HAAs 的手性拆分, 但其工业应用仍面临瓶颈, 例如醛底物在水相中的溶解度较差限制了反应物的浓度以及存在底物回收困难等问题。Liu 等^[86] 开发了基于 D-苏式-4-MTPS 良好溶解性的两相离子溶剂 [BMIM] [BF₄], 以来源于 *Alcaligenes xylosoxidans* IFO 12669 的 D-TA 为研究对象, 使用该酶拆分 D/L-苏式-4-MTPS 获得了高纯度的 L-苏式-4-MTPS, 其 $e.e.>99\%$, 产率为 41.7% , 由于该体系适用于水溶性较差的醛底物, 成功避免了拆分后的底物通过羟醛缩合反应可逆合成 D-赤式-4-MTPS。

Table 2 Applications of threonine aldolases for the synthesis of β -hydroxy- α -amino acids
表2 苏氨酸醛缩酶在 β -羟基- α -氨基酸合成中的应用

酶	菌种	野生型或突变体	底物	转化率/ %	立体选择性/ %	比活力/ (U·mg ⁻¹)	参考 文献
L-TA	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	WT	4-硝基苯甲醛 (100 mmol/L)	79.0	24 (苏式)	—	[3]
		V200I	4-甲氧基苯甲醛 (100 mmol/L)	54.0	71 (苏式)	—	[81]

续表2

酶	菌种	野生型或突变体	底物	转化率/ %	立体选择性/ %	比活力/ (U·mg ⁻¹)	参考 文献
D-TA	尼尔森杆菌	Y31H/N305R	4-甲磺基苯甲醛 (100 mmol/L)	87.2	93.1 (苏式)	1.2	[38]
	(<i>Bacillus nealsonii</i>)	Y8H/Y31H/N305R/I143R		73.2	>99 (苏式)	—	[62]
	草张状珊瑚状放线菌	WT	4-甲磺基苯甲醛 (300 mmol/L)	75.0	61 (苏式)	2.5	[28]
	(<i>Actinocorallia herbida</i>)	Y314R		70.0	81 (苏式)	—	[4]
		N16A/E98S/Y314R		90.2	93.7 (苏式)	—	[5]
	肠道微生物	WT	3,4-二羟基苯甲醛 (60 mmol/L)	—	31.2 (苏式)	—	[63]
	(<i>Microbiome</i>)	R318L/H128N	3,4-二羟基苯甲醛 (120~160 mmol/L)	—	95.4 (苏式)	—	[82]
	假单胞菌	D93H/E147D	2-氯苯甲醛 (100 mmol/L)	91.0	71.0 (苏式)	—	[80]
	(<i>Pseudomonas</i> sp.)	D93H/E147D	苯甲醛 (100 mmol/L)	36.0	74.0 (赤式)	—	
	硕大利什曼原虫	WT	4-甲磺基苯甲醛 (100 mmol/L)	53.2	26.8 (苏式)	17.4	[35]
	(<i>Leishmania major</i>)	Y45H/V321W/Y319F		56.4	96.3 (苏式)	12.1	
	栖瘤胃解纤维素菌	WT	4-甲磺基苯甲醛 (100 mmol/L)	61.3	37.0 (苏式)	46.3	[36]
	(<i>Cellulosilyticum</i> sp.)	H305L/Y8H/V143R		62.2	>99 (苏式)	9.3	
		H305Y/Y8L/W307E		58.5	97.2 (赤式)	54.2	
	海神单胞菌	WT	4-甲磺基苯甲醛 (100 mmol/L)	78.5	89.5 (苏式)	64.8	[83]
	(<i>Neptunomonas marine</i>)	N18S/Q39R/Y319L		76.8	>99 (苏式)	95.7	
	恶臭假单胞菌	WT	4-硝基苯甲醛 (60 g/L)	24.8	31.5 (苏式)	—	[8]
	(<i>Pseudomonas putida</i>)	EM-ALDO031*	4-硝基苯甲醛 (150 g/L)	90.0	85.0 (苏式)	—	
	木糖氧化产碱菌	WT	D/L-苏式-3,4-亚甲二氧基 苯丝氨酸 (174.36 mmol/L)	41.7%	99.0 (<i>e.e.</i>)	—	[86]
	(<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>)						
	节杆菌 (<i>Arthrobacter</i> sp.)	WT	吡啶4-吡咯甲醛 (4% v/v)	99.8%	—	—	[84]
	戴尔福特菌RIT313	WT	2-氟苯甲醛 (100 mmol/L)	92.8%	97.8 (苏式)	—	[85]
	(<i>Delftia</i> sp. RIT313)		3-硝基苯甲醛 (100 mmol/L)	92.2%	93.2 (苏式)	—	
	海洋线状微球菌	WT	乙醛 (100 mmol/L)	51%	40.0 (苏式)	150	[39]
	(<i>Filomicrobium marinum</i>)	G179A/S312A		47%	93.0 (苏式)	<150	
		G179A/S312A	苯甲醛 (17.2 mmol/L)	1.30%	97.3 (苏式)	—	

*为D16E/A19N/ G38S/T42M/L45I/P91H/R132S/A218S/S241I/M247H/E288T/G291W/L302M/A305P/G316K/Y318G/H319Y/D320E。

4 总结与展望

HAAs是一类重要的药物分子合成的手性中间体,可用于抗感染药物甲磺霉素、氟苯尼考和氯霉素等的合成,还可直接作为药物分子屈西多巴治疗帕金森病,在抗菌、抗肿瘤和免疫活性抑制等方面都具有重要应用,是药物工业合成中一类重要目标化合物。由于HAAs含有相邻的双手性碳原子,探索其严格立体选择性合成是研究的重点和难点。TA是一类PLP依赖的I型折叠酶,能在温和的条件下一步可逆催化羟醛缩合反应合成HAAs,在手性氨基酸药物工业合成中具有重大应用潜力。本文综述了TA在新酶挖掘、结构-催化机理解析、分子改造以及在HAAs中的合成应用等方面的研究进展。虽然目前在TA的研究方面取得了较大的进展,但仍存在一定的不足和缺陷。例如:目前绝大多数突

变体在改善某一方面催化性能时会大幅度影响其他酶催化特性,如何平衡各种催化特性和多维度提升TA催化性能仍具挑战性;TA尚无法实现对多种HAAs的高效和严格立体选择性合成。基于人工智能辅助和机器学习指导的定向进化,探索序列和结构特征与底物偏好性之间的关系,有利于开发更高效进化策略进一步提升TA在手性药物合成中的应用。此外,可通过酶固定化技术开发纳米酶等稳定性好的工业生物催化剂,并结合多酶级联反应一锅法合成更多高价值手性氨基酸药物,以保证工业合成的绿色、高效和经济性。

参 考 文 献

- [1] Liu J, Ito S, Dai T, *et al.* Low-specificity L-threonine aldolase of *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558 purification, characterization and its application to beta-hydroxy-alpha-amino acid synthesis.

- Appl Microbiol Biot, 1998, **49**: 702-708
- [2] Rocha J F, Sousa S F, Cerqueira N M F S A. Computational studies devoted to the catalytic mechanism of threonine aldolase, a critical enzyme in the pharmaceutical Industry to synthesize β -hydroxy- α -amino acids. ACS Catal, 2022, **12**(9): 4990-4999
- [3] Steinreiber J, Fesko K, Reisinger C, *et al.* Threonine aldolases—an emerging tool for organic synthesis. Tetrahedron, 2007, **63**(4): 918-926
- [4] Wang L, Xu L, Su B, *et al.* Improving the C _{β} -stereoselectivity of L-threonine aldolase for the synthesis of L-threo-4-methylsulfonylphenylserine by modulating the substrate-binding pocket to control the orientation of the substrate entrance. Chemistry, 2021, **27**(37): 9654-9660
- [5] Wang L C, Xu L, Su B M, *et al.* An effective chemo-enzymatic method with an evolved L-threonine aldolase for preparing L-threo-4-methylsulfonylphenylserine ethyl ester of high optical purity. Mol Catal, 2022, **525**: 112355
- [6] Baik S H, Gwon H J, Lim S Y, *et al.* Enhanced diastereoselective synthesis of L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine by low-specific L-threonine aldolase mutants. FASEB J, 2008, **22**(1): 1219-1225
- [7] Baik S H, Yoshioka H, Harayama S. Synthesis of L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) with thermostabilized low-specific L-threonine aldolase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Microbiol Biotechnol, 2007, **17**(5): 721-727
- [8] Cai B, Bocola M, Zhou A, *et al.* Computer-aided directed evolution of L-threonine aldolase for asymmetric biocatalytic synthesis of a chloramphenicol intermediate. Bioorgan Med Chem, 2022, **68**: 116880
- [9] Schaffer J E, Reck M R, Prasad N K, *et al.* beta-Lactone formation during product release from a nonribosomal peptide synthetase. Nat Chem Biol, 2017, **13**(7): 737-744
- [10] Makino K, Goto T, Hiroki Y, *et al.* Stereoselective synthesis of anti- β -hydroxy- α -amino acids through dynamic kinetic resolution. Angew Chem Int Ed, 2004, **116**(7): 900-902
- [11] Nagamitsu T, T. Sunazuka, Tanaka H, *et al.* Total synthesis of (+)-lactacystin. J Am Chem Soc, 1996, **118**: 3584-3590
- [12] Soucy F, Grenier L, Behnke M L, *et al.* A novel and efficient synthesis of a highly active analogue of clasto-lactacystin β -Lactone. J Am Chem Soc, 1999, **121**(43): 9967-9976
- [13] Schmidt N G, Eger E, Kroutil W. Building bridges: biocatalytic C – C-bond formation toward multifunctional products. ACS Catal, 2016, **6**(7): 4286-4311
- [14] Savile C K, Janey J M, Mundorff E C, *et al.* Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. Science, 2010, **329**(5989): 305-309
- [15] Ma S K, Gruber J, Davis C, *et al.* A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. Green Chem, 2010, **12**(1): 81-86
- [16] Song W, Chen X, Wu J, *et al.* Biocatalytic derivatization of proteinogenic amino acids for fine chemicals. Biotechnol Adv, 2020, **40**: 107496
- [17] Lancaster L, Abdallah W, Banta S, *et al.* Engineering enzyme microenvironments for enhanced biocatalysis. Chem Soc Rev, 2018, **47**(14): 5177-5186
- [18] Wu S, Snajdrova R, Moore J C, *et al.* Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications. Angew Chem Int Ed, 2021, **60**(1): 88-119
- [19] Bell E L, Finnigan W, France S P, *et al.* Biocatalysis. Nat Rev Methods Primers 2021, **1**(1): 46
- [20] Franz S E, Stewart J D. Threonine aldolases. Adv Appl Microbiol, 2014, **88**: 57-101
- [21] Lovelock S L, Turner N J. Bacterial *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase: a biocatalyst with broad substrate specificity. Bioorgan Med Chem, 2014, **22**(20): 5555-5557
- [22] Maier T H. Semisynthetic production of unnatural L-alpha-amino acids by metabolic engineering of the cysteine-biosynthetic pathway. Nat Biotechnol, 2003, **21**(4): 422-427
- [23] Mathew S, Yun H. ω -transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. ACS Catal, 2012, **2**(6): 993-1001
- [24] Scott T A, Heine D, Qin Z, *et al.* An L-threonine transaldolase is required for L-threo- β -hydroxy- α -amino acid assembly during obafuorin biosynthesis. Nat Commun, 2017, **8**(1): 15935
- [25] Duckers N, Baer K, Simon S, *et al.* Threonine aldolases-screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic β -hydroxy- α -amino acids. Appl Microbiol Biot, 2010, **88**(2): 409-424
- [26] Fesko K. Threonine aldolases: perspectives in engineering and screening the enzymes with enhanced substrate and stereo specificities. Appl Microbiol Biot, 2016, **100**(6): 2579-2590
- [27] Fesko K. Comparison of L-threonine aldolase variants in the aldol and retro-aldol reactions. Front Bioeng Biotech, 2019, **7**: 119
- [28] Wang L C, Xu L, Xu X Q, *et al.* An L-threonine aldolase for asymmetric synthesis of β -hydroxy- α -amino acids. Chem Eng Sci, 2020, **226**: 115812
- [29] Fesko K, Strohmeier G A, Breinbauer R. Expanding the threonine aldolase toolbox for the asymmetric synthesis of tertiary alpha-amino acids. Appl Microbiol Biot, 2015, **99**: 9651-9661
- [30] Fesko K, Gruber-Khadjawi M. Biocatalytic methods for C-C bond formation. ChemCatChem, 2013, **5**(6): 1248-1272
- [31] Liu J Q, Dairi T, Itoh N, *et al.* Diversity of microbial threonine aldolases and their application. J Mol Catal B-Enzym, 2000, **10**(1-3): 107-115
- [32] Kataoka M, Wada M, Nishi KI, *et al.* Purification and characterization of L-allo-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39. FEMS Microbiol Lett, 1997, **151**(2): 245-248
- [33] Kimura T, Vassilev V P, Shen G J, *et al.* Enzymic synthesis of β -hydroxy- α -amino acids based on recombinant D- and L-threonine aldolases. J Am Chem Soc, 1997, **119**: 11734-11742
- [34] Lee S, Kang H, Lee Y. High-throughput screening methods for selecting L-threonine aldolases with improved activity. J Mol Catal B Enzym, 2003, **26**: 265-272
- [35] Zheng W, Pu Z, Xiao L, *et al.* Substrate access path-guided engineering of L-threonine aldolase for improving

- diastereoselectivity. Chem Commun, 2022, **58**(59): 8258-8261
- [36] Zheng W, Pu Z, Xiao L, *et al.* Mutability-landscape-guided engineering of L-threonine aldolase revealing the prelog rule in mediating diastereoselectivity of C-C bond formation. Angew Chem Int Ed, 2023, **62**(2): e202213855
- [37] Wieteska L, Ionov M, Szemraj J, *et al.* Improving thermal stability of thermophilic L-threonine aldolase from *Thermotoga maritima*. J Biotechnol, 2015, **199**: 69-76
- [38] Zheng W, Chen K, Wang Z, *et al.* Construction of a highly diastereoselective aldol reaction system with L-threonine aldolase by computer-assisted rational molecular modification and medium engineering. Org Lett, 2020, **22**(15): 5763-5767
- [39] Park S H, Seo H, Seok J, *et al.* C_β-selective aldol addition of D-threonine aldolase by spatial constraint of aldehyde binding. ACS Catal, 2021, **11**(12): 6892-6899
- [40] Stocklein W, Schmidt H. Evidence for L-threonine cleavage and allo-threonine formation by different enzymes from *Clostridium pasteurianum*: threonine aldolase and serine hydroxymethyltransferase. Biochem J, 1985, **232**: 621-622
- [41] Paiardini A, Contestabile R, D'aguanno S, *et al.* Threonine aldolase and alanine racemase: novel examples of convergent evolution in the superfamily of vitamin B₆-dependent enzymes. Biochim Biophys Acta, 2003, **1647**(1-2): 214-219
- [42] 黎军, 张志雄, 杨金亮, 等. 苏氨酸醛缩酶的研究进展. 生物技术通讯, 2019, **30**(3): 442-448
- Li J, Zhang Z X, Yang J L, *et al.* Lett Biotechnol, 2019, **30**(3): 442-448
- [43] Liu J, Dairi T, Kataoka M, *et al.* L-allo-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39 gene cloning, nucleotide sequencing, and identification of the pyridoxal 5'-phosphate-binding lysine residue by site-directed mutagenesis. J Bacteriol, 1997, **179**(11): 3555-3560
- [44] Liu J Q, Nagata S, Dairi T, *et al.* The GLY1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-allo-threonine and L-threonine to glycine. Eur J Biochem, 1997, **245**(2): 289-293
- [45] Liu J Q, Odani M, Yasuoka T, *et al.* Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* and its application for production of a key intermediate for parkinsonism drug. Appl Microbiol Biot, 2000, **54**: 44-51
- [46] 陈启佳, 陈曦, 郝建雄, 等. 苏氨酸醛缩酶的催化机理、分子改造及合成应用. 生物工程学报, 2021, **37**(12): 4215-4230
- Chen Q J, Chen X, Hao J X, *et al.* Chin J Biotechnol, 2021, **37**(12): 4215-4230
- [47] Liu G, Zhang M, Chen X, *et al.* Evolution of threonine aldolases, a diverse family involved in the second pathway of glycine biosynthesis. J Mol Evol, 2015, **80**(2): 102-107
- [48] Di Salvo M L, Remesh S G, Vivoli M, *et al.* On the catalytic mechanism and stereospecificity of *Escherichia coli* L-threonine aldolase. FEBS J, 2014, **281**(1): 129-145
- [49] Uhl M K, Oberdorfer G, Steinkellner G, *et al.* The crystal structure of D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* provides insight into a metal ion assisted PLP-dependent mechanism. PLoS One, 2015, **10**(4): e0124056
- [50] Liu J Q, Dairi T, Itoh N, *et al.* Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1998, **255**(1): 220-226
- [51] Remesh S G, Ghatge M S, Ahmed M H, *et al.* Molecular basis of *E. coli* L-threonine aldolase catalytic inactivation at low pH. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, **1854**(4): 278-283
- [52] Hol W G J, Robien M A. Initial structural analysis of *Leishmania major* threonine aldolase. Protein Data Bank, 2004. doi: 10.2210/pdb2211SVV/pdb
- [53] Liu J Q, Ito S, Dairi T, *et al.* Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the Low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 10558. Appl Environ Microb, 1998, **64**(2): 549-554
- [54] Jcsg. Crystal structure of L-allo-threonine aldolase (tm1744) from *Thermotoga maritima* at 2.25 Å resolution. Protein Data Bank, 2006. doi: 10.2210/pdb2212FM2211/pdb
- [55] Liu J Q, Nagata S, Dairi T, *et al.* The GLY1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-allo-threonine and L-threonine to glycine. Eur J Biochem, 1997, **245**(2): 289-293
- [56] Hirato Y, Goto M, Mizobuchi T, *et al.* Structure of pyridoxal 5'-phosphate-bound D-threonine aldolase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2023, **79**(1): 31-37
- [57] Hirato Y, Goto M, Tokuhisa M, *et al.* Crystallization and X-ray analysis of D-threonine aldolase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Acta Crystallogr F, 2017, **73**(Pt 2): 86-89
- [58] Kataoka M, Ikemi M, Morikawa T, *et al.* Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. Eur J Biochem, 1997, **248**(2): 385-393
- [59] Qin H M, Imai F L, Miyakawa T, *et al.* Crystal structure of low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. Protein Data Bank, 2013. doi: 10.2210/pdb2213WLX/pdb
- [60] Beaudoin S F, Burg M J, Stewart J D. Crystal structure of L-threonine aldolase from *Pseudomonas putida*. Protein Data Bank, 2017. doi: 10.2210/pdb2215VYE/pdb
- [61] Qin H M, Imai F L, Miyakawa T, *et al.* L-allo-threonine aldolase with an H128Y/S292R mutation from *Aeromonas jandaei* DK-39 reveals the structural basis of changes in substrate stereoselectivity. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, **70**: 1695-1703
- [62] Zheng W, Yu H, Fang S, *et al.* Directed evolution of L-threonine aldolase for the diastereoselective synthesis of β-hydroxy-α-amino acids. ACS Catal, 2021, **11**(6): 3198-3205
- [63] Zhao W, Yang B, Zha R, *et al.* A recombinant L-threonine aldolase with high diastereoselectivity in the synthesis of L-threo-dihydroxyphenylserine. Biochem Eng J, 2021, **166**: 107852

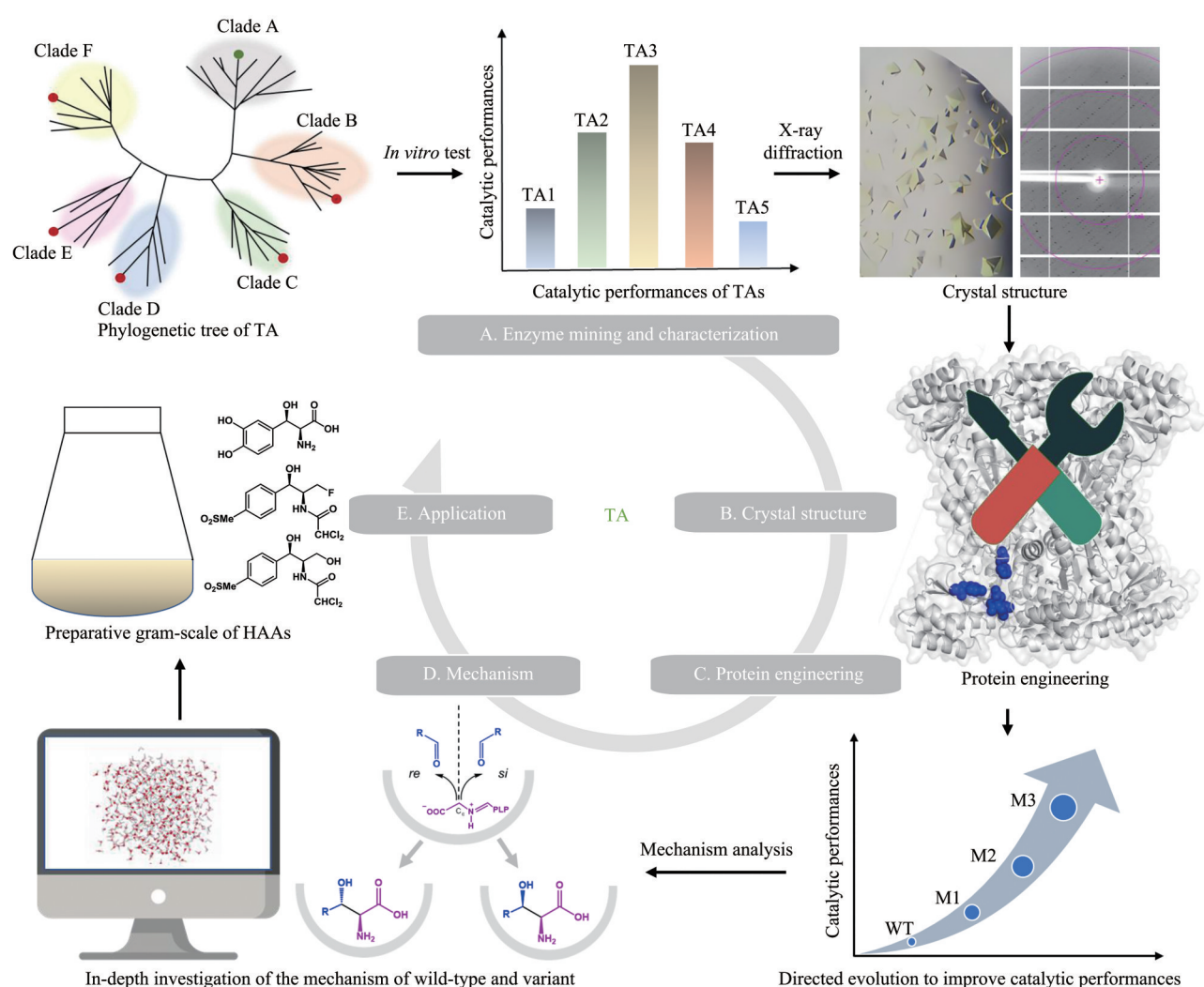
- [64] Wu B. Crystal structure of threonine aldolase from *Mycobacterium vanbaalenii*. Protein Data Bank, 2021. doi: 10.2210/pdb2217W22101/pdb
- [65] Kielkopf C, Burley S. X-ray structures of threonine aldolase complexes: structural basis of substrate recognition. *Biochemistry*, 2002, **41**: 11711-11720
- [66] Kielkopf C L, Bonanno J, Ray S, *et al.* Crystal structure of threonine aldolase (low-specificity). Protein Data Bank, 2001. doi: 10.2210/pdb2211JG2218/pdb
- [67] Qin H M, Imai F L, Miyakawa T, *et al.* Crystal structure of low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. Protein Data Bank, 2013. doi: 10.2210/pdb2213WLX/pdb
- [68] Coincon M, Wang W, Sygusch J, *et al.* Crystal structure of reaction intermediates in pyruvate class II aldolase: substrate cleavage, enolate stabilization, and substrate specificity. *J Biol Chem*, 2012, **287**(43): 36208-36201
- [69] Samuel J, Luo Y, Morgan P M, *et al.* Catalysis and binding in L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase: a comparison with L-fucose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry*, 2001, **40**(49): 14772-14780
- [70] Hirato Y, Goto M, Mizobuchi T, *et al.* Structure of pyridoxal 5'-phosphate-bound D-threonine aldolase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Cryst*, 2023, **79**(2): 31-37
- [71] Machajewski T D, Wong C H. The catalytic asymmetric aldol reaction. *Angew Chem Int Ed*, 2000, **39**(8): 1352-1374
- [72] Zurek G, Karst U. Microplate photometric determination of aldehydes in disinfectant solutions. *Analytica Chimica Acta*, 1997, **351**(1-3): 247-257
- [73] Gong L, Xu G, Cao X, *et al.* High-throughput screening method for directed evolution and characterization of aldol activity of D-threonine aldolase. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021, **193**(2): 417-429
- [74] Jander G, Norris S R, Joshi V, *et al.* Application of a high-throughput HPLC-MS/MS assay to *Arabidopsis* mutant screening; evidence that threonine aldolase plays a role in seed nutritional quality. *Plant J*, 2004, **39**(3): 465-475
- [75] Li J, O W, Li W, *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*, 2013, **14**(12): 24438-24475
- [76] Compton B J, Purdy W C. The mechanism of the reaction of the Nash and the Sawicki aldehyde reagent. *Can J Chem*, 1980, **58**(21): 2207-2211
- [77] Reisinger C, Van Assema F, Schürmann M, *et al.* A versatile colony assay based on NADH fluorescence. *J Mol Catal B Enzym*, 2006, **39**(1-4): 149-155
- [78] Barig S, Funke A, Merseburg A, *et al.* Dry entrapment of enzymes by epoxy or polyester resins hardened on different solid supports. *Enzym Microb Technol*, 2014, **60**: 47-55
- [79] Giger L, Toscano M D, Bouzon M, *et al.* A novel genetic selection system for PLP-dependent threonine aldolases. *Tetrahedron*, 2012, **68**(37): 7549-7557
- [80] Chen Q, Chen X, Feng J, *et al.* Improving and inverting C_β-stereoselectivity of threonine aldolase *via* substrate-binding-guided mutagenesis and a stepwise visual screening. *ACS Catal*, 2019, **9**(5): 4462-4469
- [81] Liu Z, Chen X, Chen Q, *et al.* Engineering of L-threonine aldolase for the preparation of 4(methylsulfonyl) phenylserine, an important intermediate for the synthesis of florfenicol and thiamphenicol. *Enzyme Microb Tech*, 2020, **137**: 109551
- [82] Zha R, Lei B, Ma J, *et al.* Improving the C_β stereoselectivity of L-threonine aldolase for the preparation of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine, a powerful anti-Parkinson's disease drug. *Biochem Eng J*, 2023, **191**: 108766
- [83] He Y, Li S, Wang J, *et al.* Discovery and engineering of the L-threonine aldolase from *Neptunomonas marine* for efficient synthesis of β-hydroxy-α-amino acids *via* C-C formation. *bioRxiv*, 2023: 536162
- [84] Goldberg S L, Goswami A, Guo Z, *et al.* Preparation of β-hydroxy-α-amino acid using recombinant D-threonine aldolase. *Org Process Res Dev*, 2015, **19**(9): 1308-1316
- [85] Chen Q, Chen X, Cui Y, *et al.* A new D-threonine aldolase as a promising biocatalyst for highly stereoselective preparation of chiral aromatic β-hydroxy-α-amino acids. *Catal Sci Technol*, 2017, **7**(24): 5964-5973
- [86] Liu F, Shi Z, Zhu J, *et al.* Highly selective kinetic resolution of D/L-syn-p-sulfone phenylserine catalyzed by d-threonine aldolase in two-phase ionic solvent. *Green Chem Eng*, 2022. doi: 10.1016/j.gce.2022.10.002

Structure and Function of Threonine Aldolase and Its Application in Pharmaceutical Synthesis*

HE Yuan-Zhi, FENG Yan**

(School of Life Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China (2020YFA0907700) and The National Natural Science Foundation of China (32271306).

** Corresponding author.

Tel: 86-21-34207189, E-mail: yfeng2009@sjtu.edu.cn

Received: April 13, 2023 Accepted: April 25, 2023

Abstract β -Hydroxy- α -amino acids (HAAs) are a class of important chiral intermediates and have a wide range of uses in the pharmaceutical industry. Due to its adjacent chiral centers, it has attracted much attention to exploring strictly stereoselective biosynthesis methods. Threonine aldolase (TA) can catalyze the aldol reaction in one step for the synthesis of HAAs under mild conditions. TAs also exhibit a broad substrate spectrum and can catalyze the condensation of various aldehydes and amino acids, thereby constructing rich HAA libraries with immense potential for industrial applications. In this review, we have summarized the research progress of TA, including new enzyme mining, structure, catalytic mechanism analysis, high-throughput screening methods, protein engineering, and synthesis applications. Notably, we mainly focus on the research achievements of TA in structure-function relationship, mechanism analysis, and protein engineering. Currently, the catalytic process of TA has been elucidated, where it catalyzes the aldol reaction through the Schiff base exchange mechanism. Additionally, researchers have proposed diastereoselectivity regulating mechanisms of TA such as the “pathway hypothesis” and “dual conformation hypothesis”, which provide a foundation for unraveling the mystery of TA diastereoselectivity regulation. Moreover, significant progress has been made in TA molecular evolution, with multiple mutants obtained that showed strict diastereoselectivity synthesis for various chiral HAAs and their intermediates. Furthermore, we have discussed the current challenges and prospects of TA, which will guide for accelerating the industrial application of TAs as tool enzymes for synthesizing high-value HAAs compounds.

Key words threonine aldolase, β -hydroxy- α -amino acid, crystal structure, stereoselectivity, protein engineering

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0147