

天然产物的糖基化及糖基侧链改造*

刘 骏 陈 敏**

(山东大学微生物技术国家重点实验室 国家糖工程技术研究中心 济南 250100)

摘要 抗生素和抗癌药物等多种天然产物的活性都依赖于其糖基侧链,糖基侧链结构的变化对母体化合物的生物活性、底物适应性及药理学性质具有重要影响。糖基侧链结构变化多端,修饰、改变天然产物的糖基侧链已成为获得临床候选药物的重要方法。利用化学法和酶法,研究者创造了多种改造天然产物糖基化的方法。详细介绍了天然产物的糖基化过程,并从组合生物学、糖基转移酶改造、糖类随机化及新型糖类随机化和糖基转移酶可逆性四方面阐述了糖基侧链的改造方法。

关键词 天然产物糖基化 糖基化改造 组合生物学 糖基转移酶

中图分类号 Q819

天然产物是许多人类药物和农业药物前体化合物的重要来源,尤其是含有糖基修饰的天然产物^[1],如万古霉素(vancomycin)、蝴蝶霉素(rebeccamycin)、红霉素(erythromycin)、卡奇霉素(calicheamicin)等(图1)。糖基侧链结构多样,大大提高了天然产物的结构多样性。不同种类、数目的糖基,甚至区域及立体选择性不同的糖基都会产生不同结构的产物^[2]。

天然产物的糖基化具有重要作用,总结起来主要体现在以下四方面:(1)增加化合物的水溶性,亲水性的糖类衍生物结合到糖苷配基上,可以增加终产物的亲水性利于活性的发挥;(2)增加化合物分泌性,A40926生物合成途径中的甘露糖基转移酶(mannosyltransferase)特异性识别 manno-syl-PP-C55 作为糖供体,使糖基化的抗生素利于分泌^[3];(3)糖基化是产生菌的一种自我保护机制,多种大环内酯类化合物产生菌通过糖基化 desosaminyl-2'-OH 使产物失活得以自我保护^[4];(4)影响天然产物的反应活性、识别特异性,有的糖基直接参与反应。如,庆大霉素的脱氧糖残基利用其羟基和氨基结合某些细菌的 16S rRNA,阻止核糖体的形成,最终引起这些细菌的死亡^[5]。天然产物糖基侧链的改变或修饰都能通过上述四点影响终

产物甚至产生新活性的物质,因此,利用化学或生物技术改变天然产物的糖基化模式以获得多样化的天然产物衍生物成为热点研究方向^[6-13]。本文介绍了天然产物的糖基化过程及几种主要的糖基侧链改造方法。

1 天然产物的糖基化过程

天然产物的糖基化过程如图2所示。

1.1 单糖的活化

单糖在能被利用之前必须经过核苷单磷酸化(NMP)或核苷二磷酸化(NDP)。大部分 NDP-糖由有机体初级代谢产物衍生而来,如果糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸^[14]。典型的单糖活化过程是在核苷转移酶(nucleotidyltransferase)作用下,将 NTP 的 NMP 部分偶联至糖-1-磷酸上生成 NDP-糖。糖-1-磷酸可由单糖在相应激酶作用下形成,或者由单糖-6-磷酸经变位酶作用产生。

1.2 糖基转移酶(glycosyltransferases, GTs)的结构和作用机制

糖基转移酶是糖基化过程中的关键酶,催化 NDP-糖和糖苷配基的反应,将糖基连接至受体的 N(N-连接的糖基化)、O(O-连接的糖基化)或 C(C-连接的糖基化)、S(S-连接的糖基化)上完成糖基化。比较 GTs 的晶体结构可将其分为 GT-A、GT-B 两个超家族。几乎所有的细菌天然产物的 GTs 都属于 GT-B 家族^[15]。GT-B

收稿日期:2011-11-10 修回日期:2011-12-19

* 国家自然科学基金资助项目(31070824)

**通讯作者,电子邮箱:chenmin@sdu.edu.cn

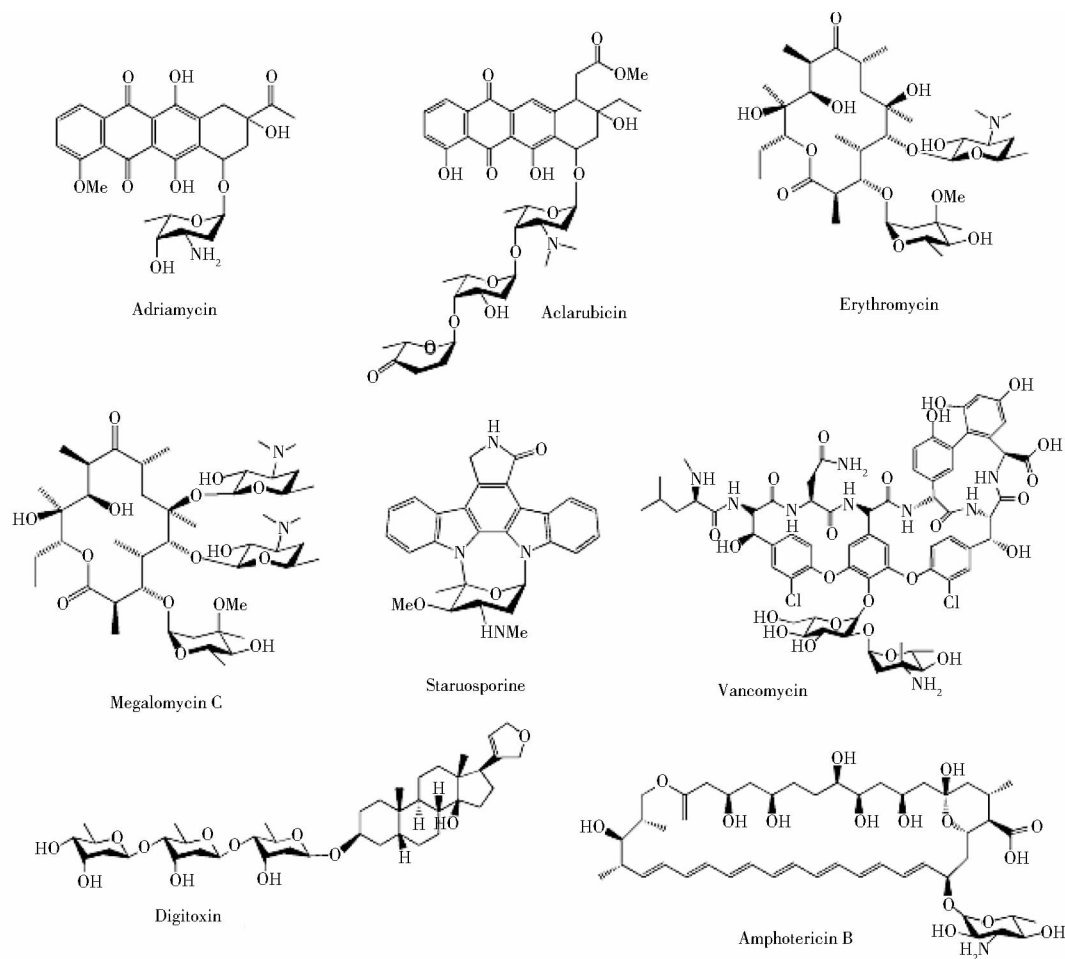


图1 典型糖基化修饰的抗生素

Fig.1 Typical antibiotics with modification of glycosylation

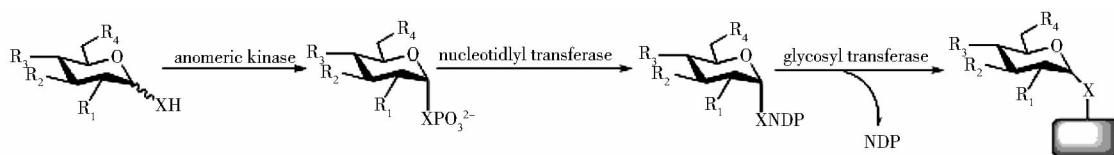


图2 天然产物糖基化过程

Fig.2 Glycosylation process of natural products

超家族的 GTs 含有两个相似的罗斯曼式卷曲 (Rossmann-like fold), 其中 N-端结构域提供受体结合位点, C-端结构域提供供体结合位点。两个结构域由中间的连接臂连接, 活性位点也位于两结构域之间^[16-19]。

根据催化反应的立体化学性质, GTs 可分为两类: 翻转型糖基转移酶 (invertin-GTs) 和保持性糖基转移酶 (retaining-GTs)^[20]。作用机制见图 3^[2]。目前已有数据表明翻转型糖基转移酶催化的反应实质是 S_N2 反

应: GTs 的侧链基团充当一个碱性催化位点使受体去质子化, 随后去质子化的受体亲核攻击 NDP-糖的 C1, 取代-ONDP 完成糖基化, 最终改变异头碳的构象。关于保持性糖基转移酶的反应机制目前仍有争议, Koshland^[21]于 1953 年首次提出双取代反应解释这一现象: 首先 GTs 提供亲核中心, 攻击 NDP-糖的 C1, 形成糖基-GTs 复合物, 随后, 经 GTs 去质子化的受体亲核攻击糖基上的 C1, 形成异头碳构象不变的糖基化产物。Withers 等^[22]则认为保持性糖基转移酶的反应实质是

一个 S_N1 反应。

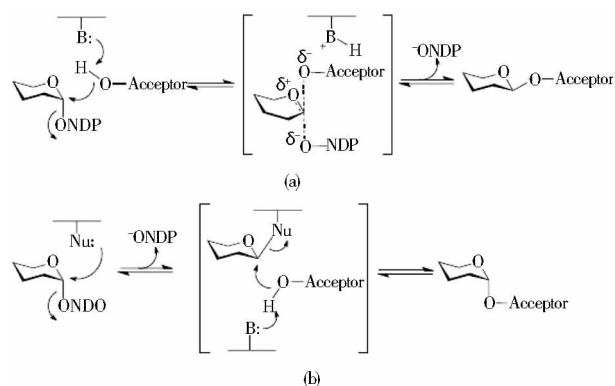


图3 两种 GTs 作用机制: (a) Inverting-GTs 作用机制和 (b) Retaining-GTs 作用机制

Fig. 3 Mechanism of GTs: (a) Inverting-GTs mechanism and (b) Retaining-GTs mechanism

2 糖基侧链改造

鉴于糖基所起到的重要作用,尤其是在含糖抗生素中的药理学作用,糖基侧链的改造成为发现新药物的重要方法。其方法有组合生物学法,GTs 改造,体外糖类随机化,新型糖类随机化以及利用 GTs 的可逆性进行的糖基侧链改造等。

2.1 组合生物学

组合生物学是将来自不同宿主代谢产物合成途径的相关基因重新组合,最终得到目标产物的方法。近几年,随着对糖基合成及糖基化过程研究的不断深入,大量涉及此过程的基因序列、功能得到明确阐释,为组合生物学在糖基侧链改造的应用提供了保障。组合生物学也成为目前应用最多的糖基侧链改造方法。

Salas 等^[23]最近利用组合生物学方法重新组合了蝴蝶霉素 (rebbecamycin) 的合成基因与星形孢菌素 (staurosporine) 的合成基因,并在异源菌白色链霉菌 (*Streptomyces albus*) 中进行表达,成功合成了 30 多种吡啶唑啉生物,其中多种具有糖基化结构。Hong 等^[24]则对脱氧糖的合成进行了改造。他们敲除了委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) TDP-D-脱氧糖胺的合成基因,替换为竹桃霉素 (oleandomycin) 脱氧糖合成途径中 TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖的合成基因和乌达霉素 (urdamycin) 脱氧糖合成途径中 TDP-D-橄榄糖 (TDP-D-olivos) 的合成基因,产生了多种糖供体 (图 4a)^[25]。随后利用糖基转移酶 Des VII/Des VIII 将这些糖供体成功连接至糖苷配基 10-deoxymethylolide 和 narbonolide 上 (图 4b)^[25]。

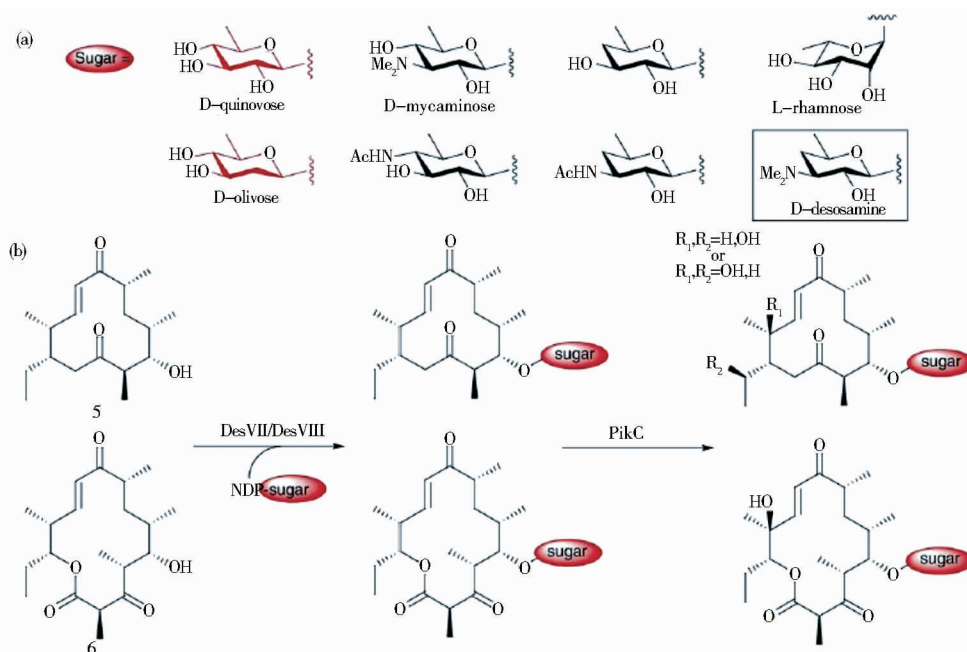


图4 组合生物学改造糖基侧链: (a) 组合生物学合成多种糖供体和 (b) 糖基转移酶 DesVII/DesVIII催化的糖基化反应

Fig. 4 Modification of sugar donors by combinatorial biosynthesis: (a) Synthesis of different sugar donors by combinatorial biosynthesis and (b) Glycosylation catalyzed by DesVII/DesVIII

2.2 GTs 改造技术

组合生物学技术能得以成功应用,原因之一是 GTs 具有一定的底物灵活性。某些 GTs 不仅对不同糖供体有适应性,而且可以识别不同的糖苷配基^[25]。如 2.1 节中提到的糖基转移酶 Des VII 和 Des VIII^[24]。但是对于某些底物灵活性较差的 GTs 来说,已成为充分发挥组合生物学优势的瓶颈。因此 GTs 改造技术应运而生,随机突变 (random mutagenesis)、定向进化 (directed evolution)、结构域交换法 (domain exchange) 都是 GTs 改造的策略。

首个成功的 GT 改造来自对乌达霉素 (urdamycin) 合成过程中的糖基转移酶 UrdGT1b 和 UrdGT1c 的研究。虽然 UrdGT1b 和 UrdGT1c 氨基酸序列相似度达 91%,但是两个酶却有不同底物特异性:UrdGT1c 识别 dNDP-L-夹竹桃糖 (dNDP-L- rhodnose), 通过 α (1-

3) 糖苷键连接至 D-橄榄糖 (D-olivose) 的 C-3 羟基上, 而 UrdGT1b 通过一个 β (1-4) 糖苷键将 D-橄榄糖 (D-olivose) 连接至 L-夹竹桃糖 (L-rhodnose) 的 C-4 羟基上^[26]。比较发现 UrdGT1b 和 UrdGT1c 序列中一个长度为 31 个氨基酸的区域极有可能控制着两个酶的底物特异性。对这一区域进行改造有可能改变酶的底物灵活性。Hoffmeister 等^[27] 利用饱和突变 (saturated mutagenesis) 获得了底物灵活性提高的 GTs——GT 1707, 该酶能将 D-橄榄糖 (D-olivose) 通过 β (1-4) 糖苷键连接至 12b-derhodinosyl-urdamycin G 中的 D-olivose 上形成新化合物 urdamycin P (图 5)。Thorson 等^[28] 结合荧光检测得到了多个竹桃霉素的糖基转移酶 OleD 突变体,在检测的 22 种底物中,突变体 P767/S132F/A242V 可以识别 15 种,其中 12 种是野生型 OleD 所不能识别的。

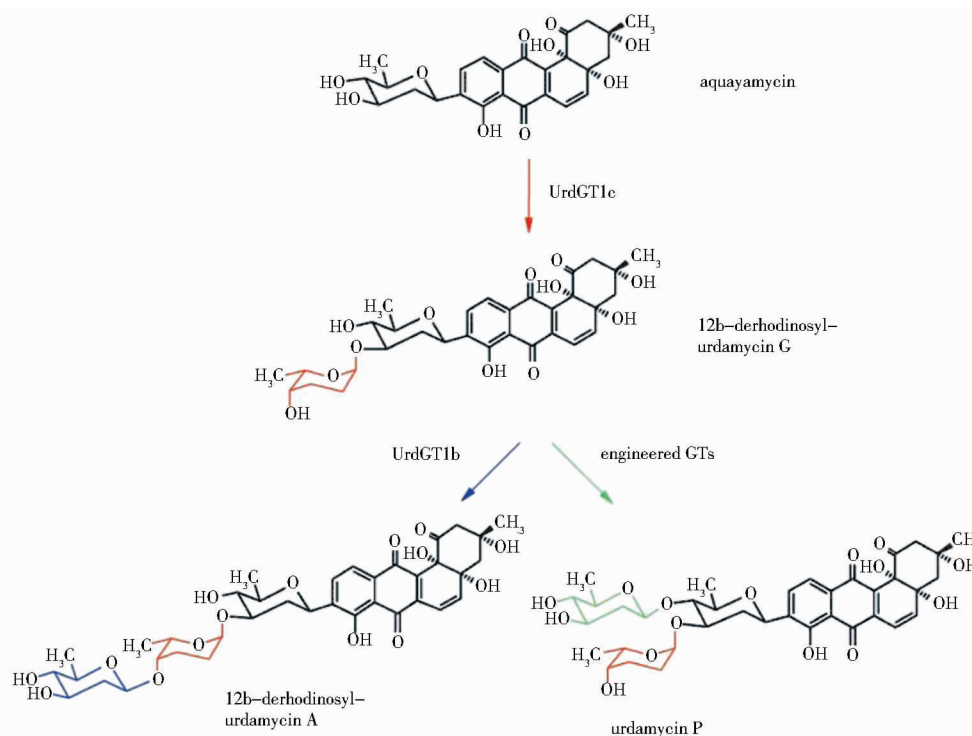


图 5 乌达霉素 P 的合成过程

Fig. 5 Synthesis of urdamycin P

结构域替换 (domain swapping) 最初用于研究具有四级结构的蛋白质,如人的血红蛋白由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成,利用其它蛋白的某个亚基对 α 或 β 亚基进行替换构成杂交蛋白可用于研究蛋白质的结构功能关系。大部分 GTs 只由一个亚基组成没有四级结构,但如上文所述,GTs 的三级结构由 N-结构域, C-结

构域和一个连接臂组成,从一定意义上说 GTs 的三级结构类似于四级结构,因此,部分学者将结构域替换法应用于对 GTs 的改造。

Kim 等^[29] 则对 KanF 和 GtfE 进行了改造, KanF 是卡那霉素 (kanamycin) 的 GT, 以 2-deoxystreptamine (2-DOS) 作为受体, UDP-N-acetylglucosamine 为糖供体。

GtfE 是万古霉素 (vancomycin) 的 GT, 以 dTDP-glucose 为糖供体, heptapeptide 为受体。利用人工设计的连接臂, kim 等将 KanF 的 N-domain 与 GtfE 的 C-domain 融合为杂交蛋白 KE, KE 可以成功催化 dTDP-glucose 于 2-DOS 的反应。结构域替换的关键是设计合理的连接臂, 这对 GTs 晶体结构信息依赖性较大。目前已发布晶体结构的 GTs 种类很少, 因此这种方法更多应用于对蛋白的结构功能研究。

2.3 体外糖类随机化与新型糖类随机化

体外糖类随机化 (*in vitro* glycorandomization, IVG) 与新型糖类随机化 (neoglycorandomization) 是两个相互补充的糖类随机化方法, 体外糖类随机化是 Thorson 等^[30]提出的结合化学合成和酶催化的糖类随机化方法, 即把通过化学法合成的多种糖基, 在具有底物识别性广的糖基激酶、核苷转移酶和糖基转移酶的级联催化下, 体外转移到多种糖苷配基上, 从而大量合成多种具有新结构、新活性的衍生物。

新型糖类随机化催化含有羟基胺基团的糖苷配基与还原糖之间形成 N-连接的糖苷键 (图 6)。与传统方法相比, 新型糖类随机化可以直接利用未活化的还原糖^[31]。Thorson 等^[32]在酸性条件下催化 39 种还原糖与 2 β /2 α -洋地黄毒苷 (2 β /2 α -digitoxin) 反应生成了 78 种

洋地黄毒苷衍生物。

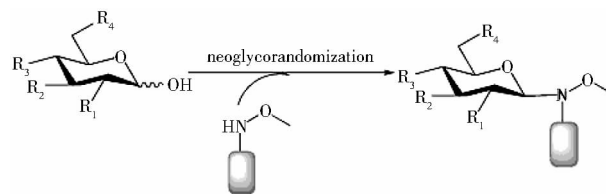


图 6 新型糖类随机化

Fig. 6 Neoglycorandomization

2.4 GTs 可逆性的应用

2005 年, Eguchi 等^[33]发现在 TDP 存在下 VinC 可以催化 vicanistatine 的去糖基化反应生成 TDP-vicanisamine。此反应中只需一步酶催化便生成了活化的糖——NDP-糖, 这个发现为天然产物的多样化提供了新的思路: GTs 的逆向反应产生的 NDP-糖和糖苷配基可以作为底物与其它糖苷配基和 NDP-糖反应合成具有新结构新活性的物质 (图 7)。确实, 当向上述反应液中加入 5 种新的糖苷配基 (neovicenilactam, brefeldin, β -estradiol, pregnolone, β -zearealenol) 后成功生成各自的糖基化产物。这种“一锅式”的“糖苷配基替换”反应多样化天然产物的同时为 GTs 对糖苷配基的灵活性研究提供了新方法。

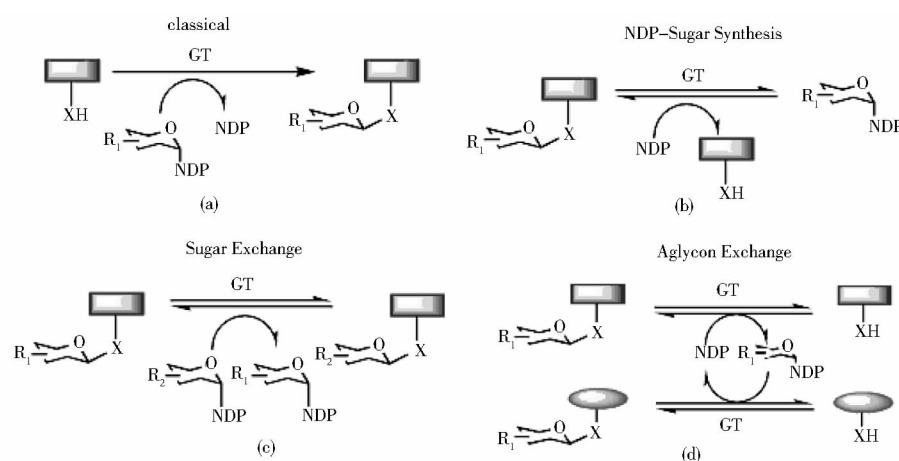


图 7 糖基转移酶催化反应

(a) 典型的糖基转移酶催化 NDP-糖转移到糖苷配基上 (b) 利用糖基转移酶的可逆性合成 NDP-糖
(c) 糖基转移酶催化的糖基替换反应 (d) 糖基转移酶催化的糖苷配基替换反应

Fig. 7 Schematic of glycosyltransferase catalysis

(a) The classical GT catalyzed sugar transfer from an NDP-sugar donor to an acceptor to form a glycosidic bond (b) NDP-sugar synthesis via reverse glycosyltransferase (c) The GT catalyzed sugar exchange reaction (d) A generalized scheme for an aglycon exchange reaction wherein a sugar is excised from one natural product (as an NDP-sugar) and subsequently attached to a distinct aglycon acceptor

“糖基替换”也可以进行“一锅式”反应,利用卡奇霉素中的糖基转移酶 CalG1 可逆性,填入 10 种不同的糖后也得到相应产物。令人惊讶的是,当加入 8 种不同的 calicheamycin 及 10 种不同 TDP-糖时更是产生了 70 多种新的卡奇霉素衍生物。此外,两个不同的 GTs 也可以同时作用生成新的衍生物,如 CalG1 与 GtfE(万古霉素的糖基转移酶)作用于万古霉素衍生物和卡奇霉素的糖苷配基时生成了新的卡奇霉素衍生物^[34]。

3 小结与展望

天然产物糖基侧链的生物学功能研究已取得重大进展,改造糖基侧链构建新型天然产物衍生物是获得候选药物的重要方式。本文总结了天然产物糖基化过程,同时介绍了几种糖基侧链改造的方法,每种方法都有各自的优势与缺点。

随着越来越多的基因组或生物合成基因簇成功测序,以生物发酵为基础的组合生物学成为方便快捷地改造天然产物糖基侧链的重要方法。因此,糖激酶、核苷转移酶、糖基转移酶等涉及生物合成途径的关键酶的作用机制及底物灵活性的研究成为关键。GTs 的定向进化研究较早,但是一直缺乏高通量灵敏的筛选方法,结构域替换是新发展起来的 GTs 改造方式,但是需要 GTs 的晶体结构数据以合理设计结构域之间的连接臂。对体外糖类随机化与新型糖类随机化来说还原糖的获得是关键。GTs 可逆性的应用也是依据于 GTs 的底物灵活性。总之,酶的底物灵活性及还原糖的获得是各种糖基侧链改造实验的基础,发掘和定向改造糖激酶,核苷转移酶和 GTs 以及寻找新方法构造还原糖库是未来研究的重点,随之而来的改造糖基侧链合成新型天然产物衍生物也将迎来迅速发展。

参考文献

- [1] Newman D J, Cragg G M, Snader K M, et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1022-1037.
- [2] Thibodeaux C J, Melancon C E, Liu H W, et al. Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification. *Nature*, 2007, 446: 1008-1016.
- [3] Sosio M, Stinchi S, Beltrametti F, et al. The gene cluster for the biosynthesis of the glycopeptide antibiotic A40926 by nonomuraea species. *Chem Biol*, 2003, 10(6): 541-549.
- [4] Langenhan J M, Griffith B R, Thorson J S, et al. Neoglycorandomization and chemoenzymatic glycorandomization: Two complementary tools for natural product diversification. *J Nat Prod*, 2005, 68: 1696-1711.
- [5] Thibodeaux C J, Liu H W. Manipulating nature's sugar biosynthetic machineries for glycodiversification of macrolides: Recent advances and future prospects. *Pure Appl Chem*, 2007, 79(4): 785-799.
- [6] Leadlay P F. Combinatorial approaches to polyketide biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1997, 1: 162-166.
- [7] Floss H G. Antibiotic biosynthesis: from natural to unnatural compounds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001, 27: 183-194.
- [8] Méndez C, Salas J A. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends in Biotechnology*, 2001, 19(11): 449-456.
- [9] Fu X, Albermann C, Jiang J, et al. Antibiotic optimization via *in vitro* glycorandomization. *Nature Biotechnology*. 2003, 21: 1467-1469.
- [10] Yang J, Hoffmeister D, Liu L, et al. Natural product glycorandomization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12: 1577-1584.
- [11] Rupprath C, Schumacher T, Elling L, et al. Nucleotide deoxysugars: essential tools for the glycosylation engineering of novel bioactive compounds. *Curr Med Chem*, 2005, 12(14): 1637-1675.
- [12] Melann C E, Thibodeaux C J, Liu H W, et al. Glyco-stripping and glyco-swapping. *ACS Chemical Biology*, 2006, 1(8): 499-504.
- [13] Salas J A, Mendez C. Engineering the glycosylation of natural products in actinomycetes. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(5): 219-232.
- [14] Alexander C. Weymouth-Wilson. The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Nat Prod Rep*, 1997, 14: 99-110.
- [15] Hu Y, Walker S. Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem Biol*, 2002, 9(12): 1287-1296.
- [16] Mulichak A M, Losey H C, Garavito R M, et al. Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure*, 2001, 9: 547-557.
- [17] Mulichak A M, Losey H C, Garavito R M, et al. Structure of the TDP-epi-vancosaminyltransferase GtfA from the chloroeremomycin biosynthetic pathway. *PNAS*, 2003, 100(16): 9238-9243.
- [18] Mulichak A M, Losey H C, Garavito R M, et al. Crystal structure of vancosaminyltransferase GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway: Interactions with acceptor and nucleotide ligands.

- Biochemistry, 2004, 43: 5170-5180.
- [19] Hu Y, Chen L, Walker S, et al. Crystal structure of the MurG: UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. PNAS, 2003, 100(3): 845-849.
- [20] Sinnott M L. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. Chem Rev, 1990, 90: 1171-1202.
- [21] Koshland D E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. Biol Rev Camb Phil Soc, 1953, 28(4): 416-436.
- [22] Withers S G, Lairson L L, Henrissat B, et al. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 521-555.
- [23] Salas J A, Sanchez C, Zhu L, et al. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. PNAS, 2005, 102(2): 461-466.
- [24] Hong Jay Sung Joong, Park S H, Yoon Y J, et al. New olivosyl derivatives of methymycin/pikromycin from an engineered strain of *Streptomyces venezuelae*. FEMS Microbiology Letters, 2004, 238: 391-399.
- [25] Blanchard S, Thorson J S. Enzymatic tools for engineering natural product glycosylation. Current Opinion in Chemical Biology 2006, 10: 263-271.
- [26] Hoffmeister D, Ichinose K, Bechthold A. Two sequence elements of glycosyltransferases involved in urdamycin biosynthesis are responsible for substrate specificity and enzymatic activity. Chemistry & Biology, 2007, 8(6): 557-567.
- [27] Hoffmeister D, Wilkinson B, Ichinose K, et al. Engineered urdamycin glycosyltransferases are broadened and altered in substrate specificity. Chem & Biology, 2002, 9: 287-295.
- [28] Thorson J S, Williams G J, Zhang C, et al. Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution. Nat Chem Biol, 2007, 3(10): 657-662.
- [29] Kim B G, Park S H, Park H Y, et al. Reconstitution of antibiotics glycosylation by domain exchanged chimeric Glycosyltransferase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 60: 29-35.
- [30] Thorson J S, Griffith B R, Langenhan J M, et al. 'Sweetening' natural products via glycorandomization. Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16: 622-630.
- [31] Chisholm J D, Van Vranken D L. Regiocontrolled Synthesis of the Antitumor Antibiotic AT2433-A1. J Org Chem, 2000, 65: 7541-7553.
- [32] Thorson J S, Langenhan J M, Peters N R, et al. Enhancing the anti-cancer properties of cardiac glycosides via neoglycorandomization. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(35): 12305-12310.
- [33] Educhi T, Minami A, Kakinuma K, et al. Aglycon switch approach toward unnatural glycosides from natural glycoside with glycosyltransferase VinC. Tetrahedron Lett, 2005, 46(37): 6187-6190.
- [34] Zhang C, Griffith B R, Thorson J S, et al. Exploiting the reversibility of natural product glycosyltransferase-catalyzed reactions. Science, 2006, 313: 1290-1294.

Natural Product Glycosylation and Aglycone Diversification

LIU Jun CHEN Ming

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Jinan 250100, China)

(National Glycoengineering Research Center, Jinan 250100, China)

Abstract The bioactivity of many natural products including antibiotics and anticancer therapeutics depends on their sugar moieties. Changes in the structures of these sugars can deeply influence the biological activity, specificity and pharmacological properties of the parent compounds. A unique characteristic of sugar moieties is their structural diversity which is greater than that of many other biological compounds. Modification of these parts has become an important strategy to achieve many clinical drug candidates. Research groups have focused upon the development of chemical and enzymatic tools to diversity natural product glycosylation. The glycosylation process of natural products and four strategy to diversity glycosylation were discussed in detail.

Key words Glycosylation of natural products Diversity of glycosylation Combinatorial biology Glycosyltransferase