

FgaPT2 酶催化合成 C-4 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪和定向诱变增强收率

张弘弛^{1,2}, 刘 瑞^{1,2*}, 高志慧², 李 慧², 杨 阳²

(1. 山西大同大学 生命科学学院 山西 大同 037009; 2. 山西大同大学 应用生物技术研究所 山西 大同 037009)

摘要: 在二甲基烯丙基二磷酸存在下, 通过 FgaPT2 酶催化合成了一系列 C-4 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪, 测试了其生物活性, 对生物活性最高的产物, 探讨了通过定点诱变提高酶合成的可行性。结果表明, FgaPT2 酶催化合成了 7 个 C-4 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪, FgaPT2 对底物具有一定的选择性, 环-L-色氨酸-L-酪氨酸 (I e) 异戊烯基化催化效果最好, 产物环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-酪氨酸 (II e) 收率达 36.1%。C-4 异戊烯基化显著提高了吲哚二酮哌嗪的生物活性, 尤其是环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-酪氨酸 (II f) 对 A549 和 MCF-7 细胞达到 50% 抑制效果时抑制剂的浓度 (IC₅₀ 值) 分别为 54.6 和 30.7 μmol/L, 对测试细菌和真菌的最低抑制浓度 (MIC 值) 在 0.5~4 mg/L, 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除活性的 IC₅₀ 值为 98 μmol/L。Arg-244 的定点诱变表明, 在 19 个突变体中, 52.6% 的 FgaPT2 突变体提高了 II f 收率, 动力学参数验证了环-L-色氨酸-L-酪氨酸 (I f) 与突变 FgaPT2 之间的相互作用, 可以提高 II f 收率, 其中 R244M 对 I f 的亲合力最高, Michaelis-Menten 常数 (K_M) 为 0.14 mmol/L, 转化数 (k_{cat}) 为 0.0647 1/s, k_{cat}/K_M 为 462.14 L/(s·mmol), 产物收率最高, 为 36.9%±1.2%。

关键词: 吲哚二酮哌嗪; 异戊二烯色氨酸合成酶; 生物活性; 定向诱变; 精细化工中间体

中图分类号: O629.3; TQ251.3; TQ426 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 03-0633-11

FgaPT2 enzymatic synthesis of C-4 isopentenylated indole diketopiperazines and directed mutagenesis enhanced yield

ZHANG Hongchi^{1,2}, LIU Rui^{1,2*}, GAO Zhihui², LI hui², YANG Yang²

(1. College of Life Science, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi, China; 2. Applied Biotechnology Institute, Shanxi Datong University, Datong 037009, Shanxi, China)

Abstract: In the presence of dimethylallyl diphosphate, a series of C-4 isopentenylated indole diketopiperazines were synthesized by FgaPT2 enzymatic catalysis. The bioactivity of the products was tested. For the product with the highest biological activity, the feasibility of site-directed mutagenesis to increase the yield of enzyme synthesis was studied. The results showed that seven C-4 isopentenylated indole diketopiperazines were obtained. FgaPT2 exhibited certain selectivity for substrates, and had the best catalytic effect on cyclo-L-tryptophan-L-tyrosine (I e), the product cyclo-L-4-dimethylallyl-Trp-L-Tyr (II e) had a yield of 36.1%. C-4 isopentenylation significantly improved the biological activity of indole diketopiperazine. Especially, for cyclo-L-4-dimethylallyl-Trp-L-Trp (II f), the IC₅₀ [half maximal (50%) inhibitory concentration] values on A549 and MCF-7 cells were 54.6 and 30.7 μmol/L, respectively, the MIC (minimum inhibitory concentration) values of test bacteria and fungi were 0.5~4 mg/L, and the IC₅₀ value of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity was 98 μmol/L. Site-directed mutagenesis of Arg-244 showed that among nineteen mutants, 52.6% of FgaPT2 mutants increased the yield of II f. Kinetic parameters verified the interaction between cyclo-L-Trp-L-Trp (I f) and mutant of FgaPT2, which

收稿日期: 2021-08-25; 定用日期: 2021-11-10; DOI: 10.13550/j.jxhg.20210862

基金项目: 山西省应用基础研究计划 (201801D221240); 山西省高等学校科技创新项目 (2020L0485); 山西大同大学科研基金 (2019K15)

作者简介: 张弘弛 (1980—), 男, 副教授, E-mail: zhanghclw@163.com. 联系人: 刘 瑞 (1982—), 女, 教授, E-mail: liurlw@163.com.

could increase the yield of II f. Among them, R244M had the highest affinity to I f, the Michaelis-Menten constant (K_M) was 0.14 mmol/L, conversion number (k_{cat}) was 0.0647 1/s, k_{cat}/K_M was 462.14 L/(s·mmol), and the product obtained the highest yield of 36.9%±1.2%.

Key words: indole diketopiperazines; dimethylallyl tryptophan synthase; bioactivities; site-directed mutagenesis; fine chemical intermediates

异戊烯基化吲哚二酮哌嗪是存在于多种生物体中的一大类天然产物^[1-2]。异戊二烯基可以通过与膜相关蛋白质的相互作用改善生物膜的亲和力^[3], 进而提高异戊烯基化吲哚二酮哌嗪的生物活性, 如抗真菌、抗细菌、抗病毒、抗寄生虫、抗炎、抗肿瘤、抗雌激素活性和化学预防作用等^[4]。目前, 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪的合成方法包括: 对映选择性合成法、区域选择性合成法、氨基酸缩合法、Pictet-Spengler 法和固相合成法, 但这些合成策略涉及无水或厌氧条件, 使用对环境有害的化学物质以及极端温度^[5-6], 还需要额外的步骤来保护和脱保护官能团^[7]。因此, 需要一种更高效, 更温和的合成策略。

酶催化合成被认为是理想的途径之一, 真菌细胞内, 异戊二烯基转移酶 (DMATS) 参与此类天然产物的生物合成, 通过 Friedel-Crafts 烷基化反应将异戊二烯基从不同的供体转移至各种受体^[8]。迄今为止, 已报道的 DMATS 有 50 多个^[9]。DMATS 基本都使用二甲基烯丙基二磷酸 (DMAPP) 作为供体, L-色氨酸或含色氨酸的环状二肽作为受体。例如, CdpC2PT^[10]、AnaPT^[11]、FgaPT2^[12]、5-DMATS^[13]、6-DMATSSv^[14]和 7-DMATS^[15]催化区域分别在 L-色氨酸吲哚环的 C-2、C-3、C-4、C-5、C-6 和 C-7 位。但 DMATS 在自然条件下活性较低, 传统研究主要集中在通过优化条件来提高酶活性^[16]。近年来, 酶的位点饱和和诱变成为增强或改变催化活性的研究点, 如 FtmPT1 的 Tyr205 突变体与未突变 FtmPT1 相比, C-3 异戊烯基化衍生物的活性明显增加^[17]。FgaPT2 在 Glu89, Thr102, Lys174 和 Arg-244 这 4 个位点突变后的酶对 L-色氨酸和 L-酪氨酸产生了差异性的酶催化活性^[18-19]。

本课题组完成了 C-7 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪的相关研究^[20], 目前又聚焦 C-4 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪的酶合成。本研究拟考察 FgaPT2 对不同底物异戊烯基化的影响, 通过多种生物活性模型, 拟筛选出具有更高活性的 C-4 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪, 采用分子模型分析 FgaPT2 中与异戊烯基化活性相关的关键残基, 基于此建立位点饱和诱变, 进而探讨突变的 FgaPT2 与底物之间相互作用的分子影响, 为深入研究异戊烯基化吲哚二酮哌嗪的生物

合成提供理论支撑。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

各种氨基酸, 国药集团化学试剂有限公司; Ni-NTA 琼脂糖树脂、pGEM-T、pQE60、pIU18 (用作 FgaPT2 过量生产的载体, 并用作定点诱变的 DNA 模板), 德国 Qiagen 公司; 高效液相色谱 (HPLC) 的所有化学药品, 上海星可生化有限公司; 烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* B5233 (ATCC 13073) 的 UniZAP XR 预制文库, 美国 Stratagene 公司; 大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 和大肠杆菌 XL1-Blue MRF', 德国 Invitrogen 公司, 分别用于克隆和表达实验; PCR 长模板链 (用作 PCR 扩增反应), 德国罗氏有限公司; 测试微生物, 革兰氏阳性细菌: *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermis*、*Staphylococcus simulans*; 革兰氏阴性细菌: *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus mirabilis*、*Pseudomonas aeruginosa*; 医学真菌: *Aspergillus flavus*、*Candida albicans*、*Cryptococcus gastricus*、*Trichophyton rubrum*; 农业真菌: *Fusarium oxysporum*、*Rhizoctonia solani*、*Penicillium expansum*、*Alternaria brassicae*, 中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC); HeLa 和 HepG2 细胞, 第四军医大学 (西安) 细胞中心; A549 和 MCF-7 细胞, 中国科学院 (上海)。

LCQ Fleet 型离子阱液质联用仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; AVANCE III 500 MHz 核磁共振波谱仪, 德国 Bruker 公司; Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 美国 Hewlett-Packard 公司; BIO-RAD 680 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 制备方法

1.2.1 酶催化合成

1.2.1.1 DMAPP 和底物的合成

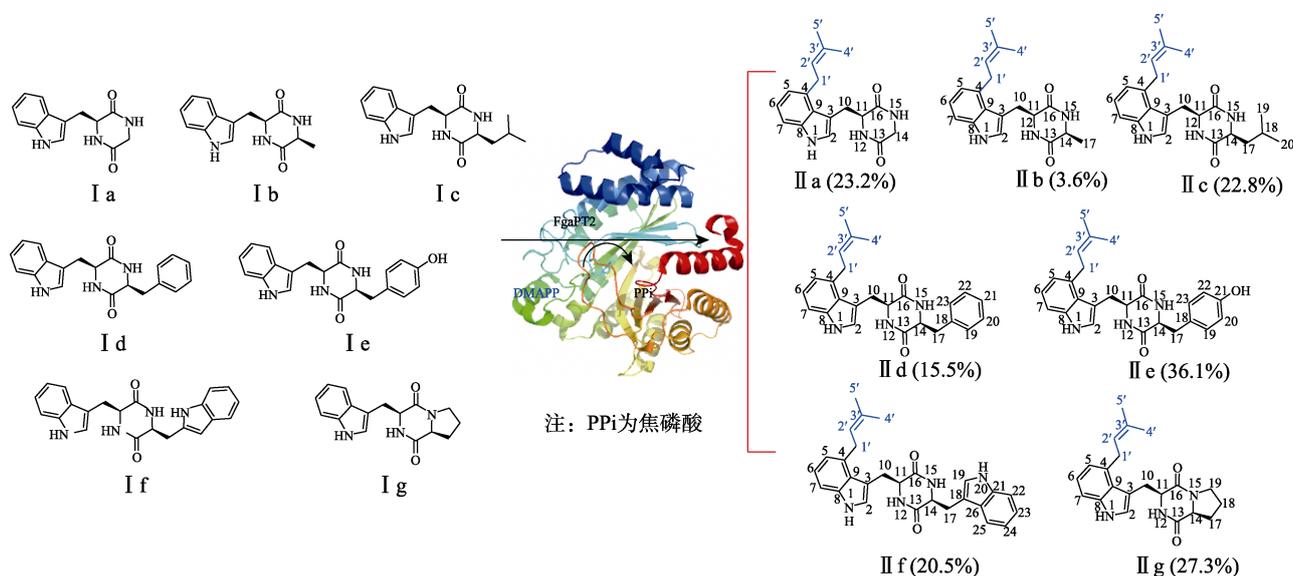
按照文献 [21] 合成二甲基烯丙基二磷酸 (DMAPP), 经 HPLC 测定, 纯度为 96%; 按照文献 [22] 合成反应底物 (I a~I g), 结构如下所示, 纯度为 81%~92%。

1.2.1.2 FgaPT2 的表达和纯化

如文献 [23] 所述, 进行 FgaPT2 在大肠杆菌中过

量生产, 将 pLysS 转化至大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 中, 重组子形成后, 接种于含液态 LB 培养基中, 补充羧苄青霉素 (终质量浓度 50 mg/L), 37 °C 下生长至在波长 600 nm 处的吸光度 (OD_{600}) 达 0.6。加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.8 mmol/L, 37 °C 将细胞再培养 16 h。离心收集菌体, 沉淀以 2~5 g/mL 的质量浓度重悬浮于裂解缓冲液中, 加溶菌酶 (终质量浓度 1 g/L), 冰浴孵育 30 min, 以 200 W 的频率超声处理 6 次, 每次 10 s, 裂解液在 4 °C 以 1.4×10^4 r/min 离心 30 min。用 Ni-NTA 琼脂糖树脂进行亲和层析, 纯化重组融合蛋白, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 收集得 FgaPT2。

1.2.1.3 C-4 异戊烯基化吡啶二酮哌嗪的酶催化合成



C-4 异戊烯基化吡啶二酮哌嗪的酶催化合成如下所示。以环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-甘氨酸 (II a) 的合成为例。在微量反应瓶中分别加入 1 mL DMAPP (1 mmol/L 去离子水溶液), 8 mL 1 mmol/L 环-L-色氨酸-L-甘氨酸 (I a) 水溶液, 100 μ g 纯化 FgaPT2, 0.5 μ g $MgCl_2$, 充分溶解后, 加入 0.5 mL 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) -HCl (50 mmol/L) 缓冲液调解 pH 至 7.5, 在 37 °C 下反应 12 h 后, 添加 2 mL 甲醇终止反应。离心 (1.3×10^4 r/min, 20 min, 4 °C) 去除蛋白质后, 经真空冷冻干燥器 (-20 °C) 干燥 6 h, 得到酶反应产物, 收率 23.2%。其余酶催化产物的制备方法同上, 只需加入对应的底物, 设置反应时间 6~16 h。

1.2.1.4 酶产物的 HPLC 分析、分离和结构鉴定

使用 Multospher 120 RP-18 色谱柱 (250 mm \times 4 mm \times 5 μ m), 1 mL/min 流速, 通过 HPLC 分析酶产物, 流动相由水和甲醇组成。线性梯度洗脱 20 min, 甲醇体积分数从 30% 升至 100% (每 4 min 甲醇体积分数提高 20%), 甲醇洗脱 5 min, 体积分数 30% 甲醇水溶液再平衡 5 min。酶反应产物的收率通过产物的峰面积与在 277 nm 处检测到的产物和底物峰面积总和之比计算得出。酶产物分离使用 COSMOSIL 5C₁₈ MS-II 反相柱 (250 mm \times 10 mm \times 5 μ m), 流速 2.5 mL/min, 在 50~80 min 内, 甲醇体积分数的线性洗脱梯度从 60% 到 100% (每 10 min 甲醇体积分数提高 20%), 甲醇洗涤 10 min 后, 体积分数 60% 甲醇水溶液平衡色谱柱 10 min。¹H NMR 鉴定其结构, 电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 鉴定其相对分子质量。

1.2.2 生物活性测试

1.2.2.1 抗肿瘤活性测试

噻唑蓝溴化四唑 (MTT) 测定法^[24]用于确定底

物 I a~I g 和 C-4 异戊烯基化产物 II a~II g [设置浓度范围 12.5~100 μ mol/L, 溶于二甲基亚砜 (DMSO)] 的抑制作用, HeLa, HepG2, A549 和 MCF-7 作为测试细胞系。酶标仪测量 570 nm 处的吸光度, 测定达到 50% 抑制效果时抑制剂的浓度 (IC_{50} 值), 根据式 (1) 计算抑制率:

$$\text{抑制率} / \% = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_{control} 和 A_{test} 分别为对照组 (只含有 MTT, 未加测试样品的细胞培养体系) 和测试组的吸光度, 测定重复 3 次, 取平均值。

1.2.2.2 抗细菌活性测试

按照文献[25]所述的方法, 设置 I a~I g 和 II a~II g 质量浓度范围为 0.5~1024 mg/L, 细菌浓度为 1.5×10^6 CFU/mL, 采用微孔板测定细菌的生长状况。含有细菌细胞和 DMSO 而不含任何测试化合物的样品作为对照 (生长对照) 和仅含有生长培养基的样品用作对照 (无菌对照), 氨苄西林和环丙沙星用作阳性对照, 测试重复 3 次, 通过肉眼和在 630 nm 处

测量吸光度来观察生长, 没有观察到浑浊的测试化合物的最低浓度记录为 MIC。

1.2.2.3 抗真菌活性测试

按照文献[26-27]所述的方法, 设置 I a~I g 和 II a~II g 质量浓度范围为 0.5~1024 mg/L, 真菌浓度为 $(0.5\sim 2.5)\times 10^4$ CFU/mL。含有真菌细胞和 DMSO 而不含任何测试化合物的样品作为对照(生长对照)和仅含有生长培养基的样品用作对照(无菌对照), 两性霉素 B 和多菌灵分别用作医学真菌和农业真菌的阳性对照, 测试重复 3 次, 通过肉眼和在测量吸光度观察生长, 没有观察到浑浊的测试化合物的最低浓度记录为 MIC。

1.2.2.4 抗氧化活性测试

按文献[28]测量样品对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)的清除活性, DPPH·清除率(R)按式(2)进行计算:

$$R/\% = 1 - \frac{A_j - A_i}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 为等体积 DPPH 溶液和溶剂的吸光度; A_j 为等体积测试样品和溶剂的吸光度; A_i 为等体积 DPPH 溶液和测试样品的吸光度, 测试重复 3 次, 取平均值。

1.2.3 饱和位点诱变提高酶催化效率

1.2.3.1 分子对接的方法

FgaPT2 (蛋白质数据库 PDB 编号: 3I4X) 的高级结构用作分子对接的模板, 考虑底物结合袋中的氢键网络, 在模型构建过程中还包括了两种底物分子。LeDock (<http://www.Lephar.com>) 软件因其高速度和准确性而用于对接研究^[29]。在优化过程中, 产物分子和结合位点周围的侧链原子被视为柔性, 具有最低对接能量的结合姿势用作预测的结合模式。使用 PyMOL 1.5 (<http://www.pymol.org>) 分析和可视化对接结果。

1.2.3.2 定点诱变的操作

含有 FgaPT2 的质粒用作 PCR 诱变的 DNA 模板, 为了在所需基因位点获得特定或全部突变体(变性), 根据文献[18-19]中所述的定点诱变方案设计引物, 并由杰顿生物科技有限公司(中国上海)合成。PCR 扩增程序中, FgaPT2 的退火温度为 62 °C, 延伸时间为 8 min 以适应热曲线。

1.2.3.3 动力学参数测定

将 100 μg 纯化重组 FgaPT2 或突变体与 0.5 μg CaCl₂、1 mL DMAPP (浓度 2 mmol/L) 和 4 mL I f (浓度梯度 0.01、0.025、0.05、0.10、0.25、0.50、1.0、2.5 和 5.0 mmol/L) 混合, 在 37 °C 下进行培养 60~120 min, 实验重复 3 次, 通过每 mg 重组蛋白每 min 异戊烯基化吡啶二酮哌嗪的形成量来评估酶活

性。根据 Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf 和 Eadie-Hofstee 图^[30]计算出 Michaelis-Menten 常数 (K_M , mmol/L), 转化数 (k_{cat} , 1/s) 和 k_{cat}/K_M 。

2 结果与讨论

2.1 C-4 异戊烯基化吡啶二酮哌嗪的酶催化合成

FgaPT2 酶催化合成了 7 个 C-4 异戊烯基化吡啶二酮哌嗪, 合成收率和 HPLC 分析表明, FgaPT2 对底物具有一定的选择性。根据 ESI-MS 数据分析, 产物的相对分子质量均比各自底物的相对分子质量大 68, 而单异戊烯基相对分子质量为 68, 因此表明其结构中存在单异戊烯基团。II 系列产品(II a~II g) 的保留时间都比其底物(I a~I g) 长, 证明单异戊二烯取代了非极性基团。从酶合成产物的 ¹HNMR 数据可以发现, 异戊烯基氢的信号, δ : 3.76~3.65 (d 或 dd, H-1'), 5.33~5.29 (t, H-2'), 1.84~1.72 (s, 3H, H-4') 和 1.82~1.70 (s, 3H, H-5'); 而 H-1' 的化学位移证明了异戊烯基与芳族 C 原子的连接^[31-32]; 同时吡啶环的氢信号中可以发现 3 个耦合质子, 比无取代的吡啶氢信号少了 1 个耦合质子, 表明异戊烯基化发生在吡啶部分。所有产物的 ¹HNMR 与其底物的 ¹HNMR 比较, 明显发现, 吡啶环 H-4 信号消失了, 证明异戊烯基取代位置在吡啶的 C-4 位^[31-33], 产物的结构表征如下:

环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-甘氨酸(II a): 白色固体, 收率 23.2%; ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃), δ : 8.21 (s, 1H, 1-NH), 7.10 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 6.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-5), 7.16 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-6), 7.27 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-7), 3.84 (dd, $J = 14.7$ 、3.0 Hz, 1H, H-10a), 3.15 (dd, $J = 14.7$ 、10.0 Hz, 1H, H-10b), 4.23 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-11), 5.92 (s, 1H, 12-NH), 3.92 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H, H-14a), 3.79 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H, H-14b), 5.72 (s, 1H, 15-NH), 3.76 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-1'), 5.32 (t, $J = 7.2$ 、1.4 Hz, 1H, H-2'), 1.75 (s, 3H, H-4'), 1.72 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, H-5'); ESI-MS [M+H]⁺, m/z : 实测值(计算值) 312.4 (312.2)。

环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-丙氨酸(II b): 白色固体, 收率 3.6%; ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃), δ : 8.21 (s, 1H, 1-NH), 7.10 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 6.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-5), 7.16 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-6), 7.27 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-7), 3.84 (dd, $J = 14.7$ 、3.0 Hz, 1H, H-10a), 3.15 (dd, $J = 14.7$ 、10.0 Hz, 1H, H-10b), 4.24 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-11), 5.99 (s, 1H, 12-NH), 3.96 (dd, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-14), 5.75 (s, 1H, 15-NH), 0.36 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-17), 3.74 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-1'), 5.33 (t, $J = 7.2$ 、1.4 Hz, 1H, H-2'), 1.76 (s, 3H, H-4'), 1.73 (s, 3H, H-5'); ESI-MS [M+H]⁺, m/z : 实测值(计算值) 326.5 (326.2)。

环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-亮氨酸(II c):

白色固体, 收率 22.8%; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ : 8.17 (s, 1H, 1-NH), 7.12 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 6.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-5), 7.20 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-6), 7.22 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-7), 3.88 (dd, $J = 15.0$ 、 3.0 Hz, 1H, H-10a), 3.05 (dd, $J = 15.0$ 、 10.5 Hz, 1H, H-10b), 4.23 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H-11), 6.02 (s, 1H, 12-NH), 4.01 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-14), 5.88 (s, 1H, 15-NH), 1.85 (m, 1H, H-17a), 1.54 (m, 1H, H-17b), 1.81 (m, 1H, H-18), 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-19), 0.94 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-20), 3.82 (dd, $J = 15.5$ 、 6.6 Hz, 1H, H-1'a), 3.72 (dd, $J = 15.5$ 、 6.6 Hz, 1H, H-1'b), 5.36 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-2'), 1.77 (s, 3H, H-4'), 1.75 (s, 3H, H-5'); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/Z : 实测值 (计算值) 368.5 (368.2)。

环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-苯丙氨酸 (II d): 白色固体, 收率 15.5%; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ : 8.16 (s, 1H, 1-NH), 6.92 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 6.97 (dd, $J = 7.5$ 、 1.0 Hz, 1H, H-5), 7.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-6), 7.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7), 3.68 (dd, $J = 15.0$ 、 2.5 Hz, 1H, H-10a), 2.30 (dd, $J = 15.0$ 、 11.0 Hz, 1H, H-10b), 4.12 (m, 1H, H-11), 5.89 (s, 1H, 12-NH), 4.29 (m, 1H, H-14), 5.74 (s, 1H, NH-15), 3.27 (dd, $J = 13.8$ 、 4.2 Hz, 1H, H-17a), 2.94 (dd, $J = 13.8$ 、 8.4 Hz, 1H, H-17b), 7.20 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-19), 7.38 (m, 1H, H-20), 7.32 (m, 1H, H-21), 7.36 (m, 1H, H-22), 7.22 (m, 1H, H-23), 3.74 (dd, $J = 17.0$ 、 6.0 Hz, 1H, H-1'a), 3.71 (dd, $J = 13.5$ 、 7.0 Hz, 1H, H-1'b), 5.30 (t, $J = 6.8$ 、 1.5 Hz, 1H, H-2'), 1.76 (s, 3H, H-4'), 1.74 (s, 3H, H-5'); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/Z : 实测值 (计算值) 402.5 (402.2)。

环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-酪氨酸 (II e): 白色粉末, 收率 36.1%; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ : 10.88 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 1-NH), 6.86 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 6.72 (dd, $J = 7.6$ 、 1.0 Hz, 1H, H-5), 6.96 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-6), 7.18 (dd, $J = 7.6$ 、 1.0 Hz, 1H, H-7), 3.10 (dd, $J = 14.6$ 、 3.5 Hz, 1H, H-10a), 2.03 (dd, $J = 14.6$ 、 9.0 Hz, 1H, H-10b), 3.82 (t, $J = 8.5$ 、 3.0 Hz, 1H, H-11), 7.93 (s, 1H, 12-NH), 4.01 (dd, $J = 7.0$ 、 4.5 Hz, 1H, H-14), 7.51 (s, 1H, 15-NH), 2.70 (dd, $J = 13.5$ 、 4.5 Hz, 1H, H-17a), 2.56 (dd, $J = 13.5$ 、 5.5 Hz, 1H, H-17b), 6.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-19), 6.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-20), 6.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-22), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-23), 3.65 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-1'), 5.29 (t, $J = 7.0$ 、 1.5 Hz, 1H, H-2'), 1.72 (s, 3H, H-4'), 1.70 (s, 3H, H-5'); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/Z : 实测值 (计算值) 418.3 (418.2)。

环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-色氨酸 (II f): 白色粉末, 收率 20.5%; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ : 8.23 (s, 1H, 1-NH), 7.08 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 6.92 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-5), 7.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H,

H-6), 7.20 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-7), 3.54 (dd, $J = 14.5$ 、 3.0 Hz, 1H, H-10a), 1.82 (dd, $J = 14.5$ 、 11.0 Hz, 1H, H-10b), 4.04 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-11), 5.97 (s, 1H, 12-NH), 4.35 (m, 1H, H-14), 5.67 (s, 1H, 15-NH), 3.30 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-17a), 3.29 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H, H-17b), 6.03 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-19), 8.03 (s, 1H, 20-NH), 7.41 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-22), 7.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-23), 7.25 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-24), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-25), 3.70 (dd, $J = 11.5$ 、 5.5 Hz, 2H, H-1'), 5.30 (t, $J = 6.5$ 、 1.5 Hz, 1H, H-2'), 1.84 (s, 3H, H-4'), 1.82 (s, 3H, H-5'); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/Z : 实测值 (计算值) 441.3 (441.2)。

环-L-4-二甲基烯丙基-色氨酸-L-脯氨酸 (II g): 白色针状晶体, 收率 27.3%; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ : 8.18 (s, 1H, 1-NH), 7.08 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-2), 6.92 (dd, $J = 7.7$ 、 1.0 Hz, 1H, H-5), 7.15 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-6), 7.26 (dd, $J = 7.7$ 、 1.0 Hz, 1H, H-7), 3.99 (dd, $J = 15.4$ 、 3.5 Hz, 1H, H-10a), 3.00 (dd, $J = 15.4$ 、 11.5 Hz, 1H, H-10b), 4.31 (dd, $J = 11.5$ 、 2.0 Hz, 1H, H-11), 5.84 (s, 1H, 12-NH), 4.10 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-14), 3.67 (m, 2H, H-17), 2.11 (m, 2H, H-18), 2.35 (m, 1H, H-19a), 1.95 (m, 1H, H-19b), 3.76 (dd, $J = 16.5$ 、 6.8 Hz, 1H, H-1'a), 3.73 (dd, $J = 16.5$ 、 6.8 Hz, 1H, H-1'b), 5.33 (t, $J = 6.8$ 、 1.5 Hz, 1H, H-2'), 1.77 (s, 3H, H-4'), 1.75 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, H-5'); ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/Z : 实测值 (计算值) 352.2 (352.2)。

2.2 C-4 异戊烯基化吡啶二酮哌嗪的生物活性

2.2.1 抗肿瘤结果分析

如表 1 所示, 在 $<100 \mu\text{mol/L}$ 时, I a~I g 没有显示出抗肿瘤细胞的增殖活性。而 II a~II g 对 4 种癌细胞系均显示出较高的毒性, 推测可能的原因是, 吡啶环上的 C-4 位置被单异戊烯基取代, 增加了吡啶二酮哌嗪的疏水性, 提高了 II a~II g 与肿瘤细胞膜蛋白质的亲和作用, 继而影响细胞增殖。对 MCF-7 细胞, II a~II g 的 IC_{50} 值处于较低至中等的微浓度范围, 对 A549 细胞, 其 IC_{50} 值处于中等的微浓度范围, 对 HeLa 和 HepG2 细胞, 其 IC_{50} 值处于较高的微浓度范围。II a~II g 对 MCF-7 细胞具有最高的抑制活性, IC_{50} 值为 $30.7\sim 50.9 \mu\text{mol/L}$ 。其中, II f 对所有测试癌细胞系都展现了最高活性, 尤其是对 A549 和 MCF-7 细胞, 其 IC_{50} 值分别为 54.6 和 $30.7 \mu\text{mol/L}$ 。II f 活性较高, 可能与其双吡啶环结构有关。

如图 1 所示, 评估了不同浓度 II a~II g 对人癌细胞 HeLa、HepG2、A549 和 MCF-7 的增殖抑制率。化合物 II f 在不同浓度下, 都显示出对 4 种癌细胞的最显著的抗癌活性。在 $100 \mu\text{mol/L}$ 下, II f 对 HeLa、HepG2、A549 和 MCF-7 细胞的抑制率分别为 81.06% 、 75.57% 、 87.92% 和 99.20% 。

表 1 I a~I g 和 II a~II g 对 HeLa、HepG2、A549 和 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 值
Table 1 IC₅₀ values of I a~I g and II a~II g against HeLa, HepG2, A549 and MCF-7 cells

IC ₅₀ 值/(μmol/L)											
HeLa		HepG2		A549		MCF-7					
底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物		
I a	—	II a	91.4	I a	—	II a	97.3	I a	—	II a	43.2
I b	—	II b	85.4	I b	—	II b	91.5	I b	—	II b	50.9
I c	—	II c	90.7	I c	—	II c	91.9	I c	—	II c	41.4
I d	—	II d	83.5	I d	—	II d	80.4	I d	—	II d	36.5
I e	—	II e	74.6	I e	—	II e	82.0	I e	—	II e	47.4
I f	—	II f	70.8	I f	—	II f	74.8	I f	—	II f	30.7
I g	—	II g	81.1	I g	—	II g	85.3	I g	—	II g	41.5

注：“—”为没有显示出抗肿瘤细胞的增殖活性。

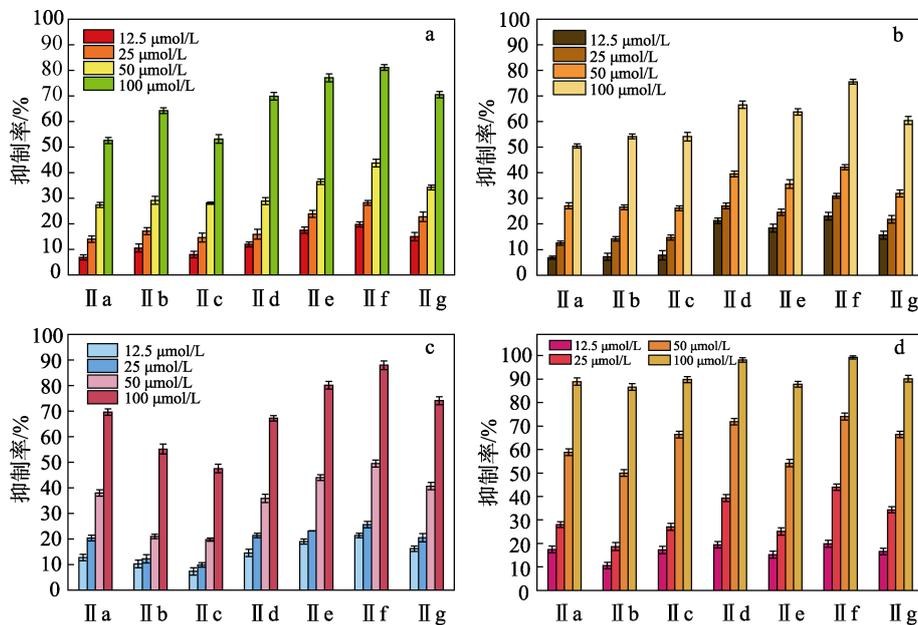


图 1 II a~II g 对 HeLa (a)、HepG2 (b)、A549 (c) 和 MCF-7 (d) 细胞的抑制率
Fig. 1 Inhibition rates of II a~II g to HeLa (a), HepG2 (b), A549 (c) and MCF-7 (d) cells

2.2.2 抗细菌测试结果分析

如表 2、3 所示，底物和 C-4 异戊烯基化产物对革兰氏阳性菌和阴性菌的 MIC 值呈现一定差异性。除 I c 和 II c 对 *Staphylococcus epidermis* 没有活性，制备的 C-4 异戊烯基化产物都显示出比其底物更高的抗菌活性。大多数底物的抑菌活性与标准抗生素氨苄西林相当，但远低于环丙沙星，II d 和 II f 的活性高于或者相当于丙沙星。C-4 位置取代单异戊烯基提高了 II a~II g 对细菌扩增关键酶的作用，继而影响细菌的扩增。革兰氏阳性菌株均对合成产物表现出较高的敏感性，MIC 值为 0.5~64 mg/L，II f 对 *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermis* 和 *Staphylococcus simulans* 表现出显著活性，MIC 值分别为 0.5、0.5、2 和 2 mg/L。革兰氏阴性菌

株对合成产物的敏感性不同，MIC 值为 1~256 mg/L，II f 对 *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus mirabilis* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 表现出显著活性，MIC 值分别为 2、2、4 和 2 mg/L，活性数据值明显高于或者等于对照环丙沙星的。特别地，II f 的抗菌活性比底物 I f 大大提高，其对 *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus simulans*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 的 MIC 值分别为 I f 的 1/16、1/32、1/64、1/128、1/128 和 1/128。I f 对 *Staphylococcus epidermis* 和 *Proteus mirabilis* 没有活性，而 II f 对其的 MIC 值为 2 和 4 mg/L。II f 与 I f 抑制细菌活性的巨大差异性，验证了 C-4 异戊烯基对于吡喹酮生物活性提高的关键性。

表 2 I a~I g 和 II a~II g 对革兰氏阳性菌的 MIC 值
Table 2 MIC values of I a~I g and II a~II g against Gram-positive bacteria

MIC 值/(mg/L)															
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Staphylococcus epidermis</i>		<i>Staphylococcus simulans</i>							
底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物				
I a	32	II a	16	I a	32	II a	16	I a	128	II a	46	I a	32	II a	8
I b	16	II b	8	I b	8	II b	8	I b	32	II b	16	I b	32	II b	8
I c	256	II c	32	I c	128	II c	16	I c	—	II c	—	I c	128	II c	32
I d	4	II d	1	I d	8	II d	2	I d	4	II d	1	I d	16	II d	2
I e	32	II e	16	I e	64	II e	8	I e	8	II e	2	I e	32	II e	4
I f	8	II f	0.5	I f	16	II f	0.5	I f	—	II f	2	I f	128	II f	2
I g	32	II g	8	I g	16	II g	2	I g	—	II g	64	I g	64	II g	8
氨苄西林 64		128				64		—							
环丙沙星 2		2				2		4							

注：“—”为没有显示出抑制细菌的活性。

表 3 I a~I g 和 II a~II g 对革兰氏阴性菌的 MIC 值
Table 3 MIC values of I a~I g and II a~II g against Gram-negative bacteria

MIC 值/(mg/L)															
<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物				
I a	16	II a	4	I a	16	II a	8	I a	32	II a	16	I a	128	II a	32
I b	4	II b	1	I b	16	II b	4	I b	16	II b	4	I b	32	II b	8
I c	512	II c	64	I c	—	II c	128	I c	—	II c	256	I c	—	II c	256
I d	8	II d	1	I d	16	II d	4	I d	16	II d	4	I d	16	II d	2
I e	32	II e	2	I e	64	II e	4	I e	64	II e	16	I e	16	II e	4
I f	256	II f	2	I f	256	II f	2	I f	—	II f	4	I f	256	II f	2
I g	512	II g	64	I g	256	II g	32	I g	—	II g	128	I g	128	II g	64
氨苄西林 128		—				64		256							
环丙沙星 1		4				4		2							

注：“—”为没有显示出抑制真菌的活性。

2.2.3 抗真菌测试结果分析

如表 4 和 5 所示, 底物和 C-4 异戊烯基化产物对 8 种真菌的 MIC 值有很大差异性, 所有制备的 C-4 异戊烯基化产物均显示出比底物更高的抗真菌活性。大部分底物对医学真菌的活性远低于标准杀菌剂两性霉素 B, 而测试的 II a、II b、II d 和 II f 的活性高于或者与两性霉素 B 相当。II f 对 *Aspergillus flavus*、*Candida albicans*、*Cryptococcus gastricus* 和 *Trichophyton rubrum* 表现出极其显著的活性, MIC 分别为 4、4、1 和 2 mg/L。对农业真菌, 大部分产物的抗真菌活性高于多菌灵, II f 对 *Fusarium oxysporum*、*Rhizoctonia solani*、*Penicillium expansum* 和 *Alternaria brassicae* 表现出突出的活性, MIC 值分别为 2、0.5、1 和 4 mg/L。II f 的抗真菌活性显著提高, 其对 *Aspergillus flavus*、*Candida albicans*、*Cryptococcus gastricus*、*Trichophyton rubrum*、

Fusarium oxysporum、*Rhizoctonia solani*、*Penicillium expansum* 和 *Alternaria brassicae* 的 MIC 值为 I f 的 1/16、1/32、1/64、1/32、1/32、1/32、1/16 和 1/64。与抗细菌活性类似, II f 与 I f 抑制真菌活性的巨大差异性, 再次证明了 C-4 异戊烯基化对吡啶二酮哌嗪生物活性提高的关键性。

2.2.4 抗氧化测试结果分析

如表 6 所示, II a~II g 均显示出增强的 DPPH·清除活性。对照 V_C 的 IC₅₀ 值为 116 μmol/L, 与其相比, II e、II b 和 II f 具有很强的抗氧化活性, IC₅₀ 值分别为 25、89 和 98 μmol/L。C-4 异戊烯基化产物的 DPPH·清除能力的大小顺序为 II e>II b>II f>V_C>II c>II d>II g>II a。如图 2 所示, 梯度实验中, 这些化合物抗氧化活性呈现出浓度依赖性, 随着每个样品浓度的增加, 抗氧化活性也随之增强。在浓度<640 μmol/L 时, II e、II b 和 II f 的清除作用高于 V_C。

表 4 I a~I g 和 II a~II g 对医学重要真菌的 MIC 值
Table 4 MIC values of I a~I g and II a~II g against medically important fungi

MIC 值/(mg/L)											
<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Candida albicans</i>				<i>Cryptococcus gastricus</i>		<i>Trichophyton rubrum</i>			
底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物		
I a	32	II a	8	I a	16	II a	8	I a	16	II a	8
I b	32	II b	16	I b	8	II b	4	I b	16	II b	4
I c	16	II c	16	I c	16	II c	8	I c	-	II c	256
I d	32	II d	4	I d	16	II d	4	I d	4	II d	2
I e	256	II e	64	I e	256	II e	64	I e	512	II e	64
I f	64	II f	4	I f	128	II f	4	I f	64	II f	2
I g	32	II g	16	I g	64	II g	32	I g	64	II g	16
两性霉素 B 512		16				8		8			

表 5 I a~I g 和 II a~II g 对农业重要真菌的 MIC 值
Table 5 MIC values of I a~I g and II a~II g against agriculturally important fungi

MIC 值/(mg/L)											
<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>				<i>Penicillium expansum</i>		<i>Alternaria brassicae</i>			
底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物	底物	产物		
I a	32	II a	32	I a	8	II a	4	I a	16	II a	8
I b	32	II b	16	I b	4	II b	0.5	I b	4	II b	1
I c	8	II c	4	I c	32	II c	8	I c	32	II c	4
I d	2	II d	1	I d	2	II d	1	I d	4	II d	1
I e	64	II e	64	I e	64	II e	16	I e	32	II e	16
I f	64	II f	2	I f	16	II f	0.5	I f	16	II f	1
I g	16	II g	2	I g	16	II g	8	I g	8	II g	4
多菌灵 8		16				32		32			

表 6 I a~I g 和 II a~II g 的 DPPH•清除活性
Table 6 Scavenging activity of I a~I g and II a~II g against DPPH•

IC ₅₀ 值/(μmol/L)			
底物	产物	底物	产物
I a	6900	II a	1349
I b	700	II b	89
I c	1800	II c	185
I d	3900	II d	472
I e	400	II e	25
I f	800	II f	98
I g	5300	II g	829
		V _c	116

根据上述研究, 吡啶环上的 C-4 位置取代单异戊烯基, 其生物活性明显增加。吡啶二酮哌嗪是一种天然特殊结构的化合物, 具有与多种受体结合的能力。它们可以以高亲和力结合各种受体, 并显示出广泛的生物学活性。在 II a~II g 中, 异戊烯基与吡啶环 C-4 连接增加了吡啶二酮哌嗪的疏水性。与未异戊烯基化分子相比, 异戊烯基化提高了它们对生物膜的亲和力, 同时也增强了与蛋白质的相互作用。因此, 吡啶二酮哌嗪的 C-4 异戊烯基化显著提高了其抗肿瘤, 抗细菌, 抗真菌和抗氧化活性。

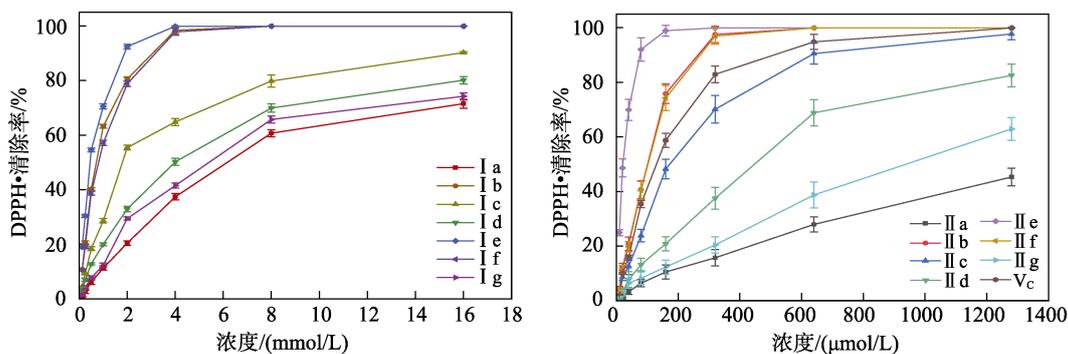


图 2 不同浓度的 I a~I g 和 II a~II g 的 DPPH•清除活性
Fig. 2 Scavenging activities of I a~I g and II a~II g with different concentrations against DPPH•

2.3 饱和位点诱变提高 FgaPT2 酶催化效率的研究

2.3.1 对 Arg-244 进行定点诱变, 增加对环-L-色氨酸-L-色氨酸 (I f) 的 C-4 异戊烯基化活性

上述研究发现, I f 在体外具有最佳的生物活性, 但 I f 在酶催化合成反应中产量却不高, 前期以 I f 的产量为指标, 对 FgaPT2 酶催化条件进行了优化, 但产量增量效果并不明显 (在 27~37 °C 之间, 收率差异只有 3.1%。在反应缓冲液的 pH 范围 4.0~6.0、6.0~8.0、7.0~9.0 和 10.0~11.0 体系中, 收率差异只有 2.4%, 不同的二价阳离子对终产物的收率差异只有 4.2%)。因此, 本研究集中于 FgaPT2 酶位点突变以实现提高产物产量。为了解 FgaPT2 对环-L-色氨酸-L-色氨酸 (I f) 的催化机制, 建立了包括 FgaPT2、DMAPP 和 I f 的分子模型 (图 3)。根据该模型分析, Tyr-189、Thr-102、Glu-89、Ser-91、Arg-100、Try-345、Try-261 (绿色) 通过氢键参与结合磷酸基团, Leu-81 和 Ile-80 (红色) 趋于稳定侧链, Met-328 和 Ieu-263 (黄色) 参与了与二甲基烯丙基部分的相互作用, 这一结果与已有的研究结果一致^[34]。已有关于 FgaPT2 酶位点突变的研究表明, Lys-174 (蓝色) 和 Arg-244 (红色) 都参与提取 C-4 质子的中间体的构建, 该中间体用于在 C-4 攻击异戊烯基阳离子, 而 ZHENG 等^[34]选择了 3 个相关氨基酸残基 Thr-102、Lys-174 和 Arg-244 作为定点诱变的热点, 结果表明, Arg-244 是影响 FgaPT2 酶活性的关键位点, 其定点诱变可以大大提高 L-色氨酸的异戊烯基化产量。因此, 结合已有研究, 本文也选择

Arg-244 作为增加 FgaPT2 酶催化活性的突变位点。

2.3.2 FgaPT2 中 244 位的位点饱和诱变导致对 I f 的不同催化能力

FgaPT2 以及 19 个突变体 (R244A、R244N、R244D、R244C、R244Q、R244E、R244G、R244H、R244I、R244L、R244K、R244M、R244F、R244P、R244S、R244T、R244W、R244Y 和 R244V) 在预设的研究条件下的表达水平相当, 说明单一位点的突变, 对异戊烯基转移酶的表达水平几乎没有影响, 这为研究 FgaPT2 及其突变体对 I f 的催化能力提供稳定的基础条件。在 1 mL DMAPP (2 mmol/L) 存在的情况下, 将 I f 分别与 20 μg FgaPT2 以及 19 个突变体混合, 在 100 μL 酶体系中于 37 °C 下进行 16 h 反应, 反应混合物经 HPLC 分析表明, 不同突变的重组 FgaPT2 对 I f 的催化活性有很大的差异性, 结果见图 4。如图 4 所示, 在 19 个 Arg-244 突变体中, 有 10 个比 FgaPT2 对 I f 有更强的接受能力 (占比 52.6%), R244M 催化的产物收率为 36.9%±1.2%, 约是 FgaPT2 的 1.8 倍。R244G 催化的产物收率为 33.1%±1.6%, 其次是 R244Y 为 32.5%±1.4%, 约是 FgaPT2 的 1.7 倍和 1.6 倍。4 个突变体对 I f 的异戊烯基化能力与 FaPT2 相似, 产物收率在 20.6%~21.3% 之间。5 个突变体显示对 I f 催化活性低于 FgaPT2, 产品收率在 18.8%~13.4% 范围内。通过 Arg-244 的定点诱变后产生系列的突变 FgaPT2 酶, 与原酶比较, 52.6% 的突变体显示出高于 FgaPT2 的催化活性。

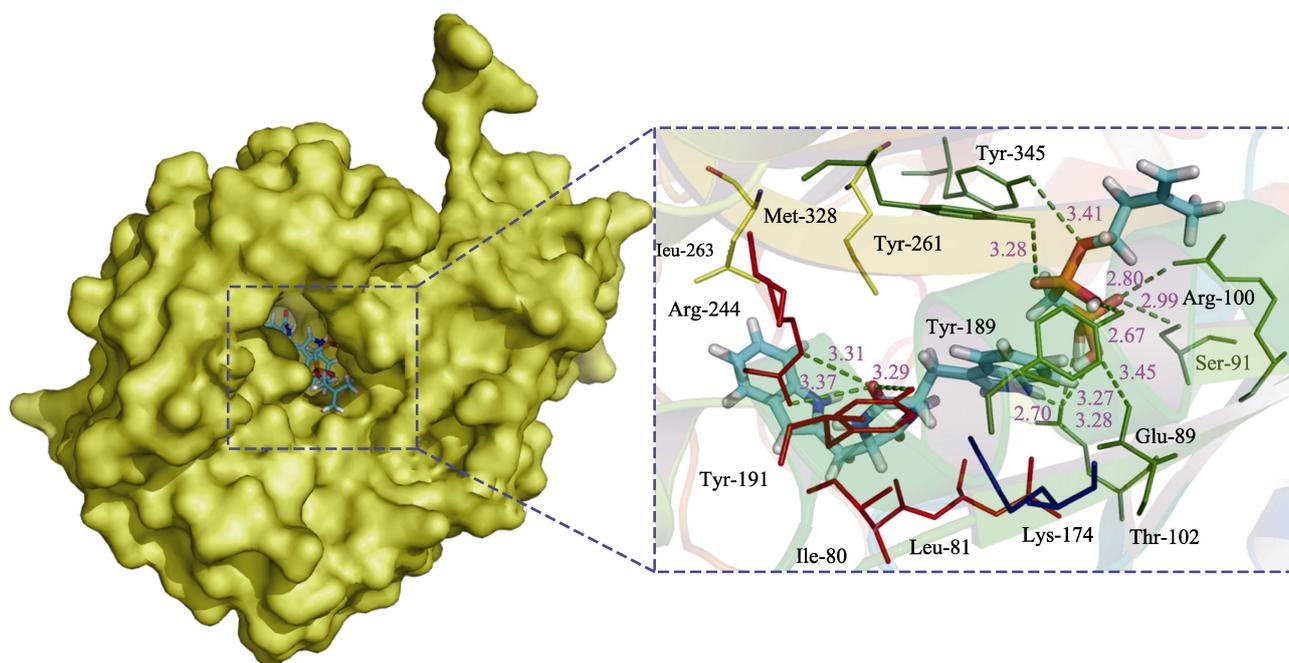


图 3 FgaPT2 催化模型 [使用 DMAPP 将 I f 建模为 FgaPT2 的晶体结构 (PDB 编号: 3I4X)]

Fig. 3 Model of FgaPT2 catalysis [I f was modelled into the crystal structure of FgaPT2 (PDB entry: 3I4X) with DMAPP]

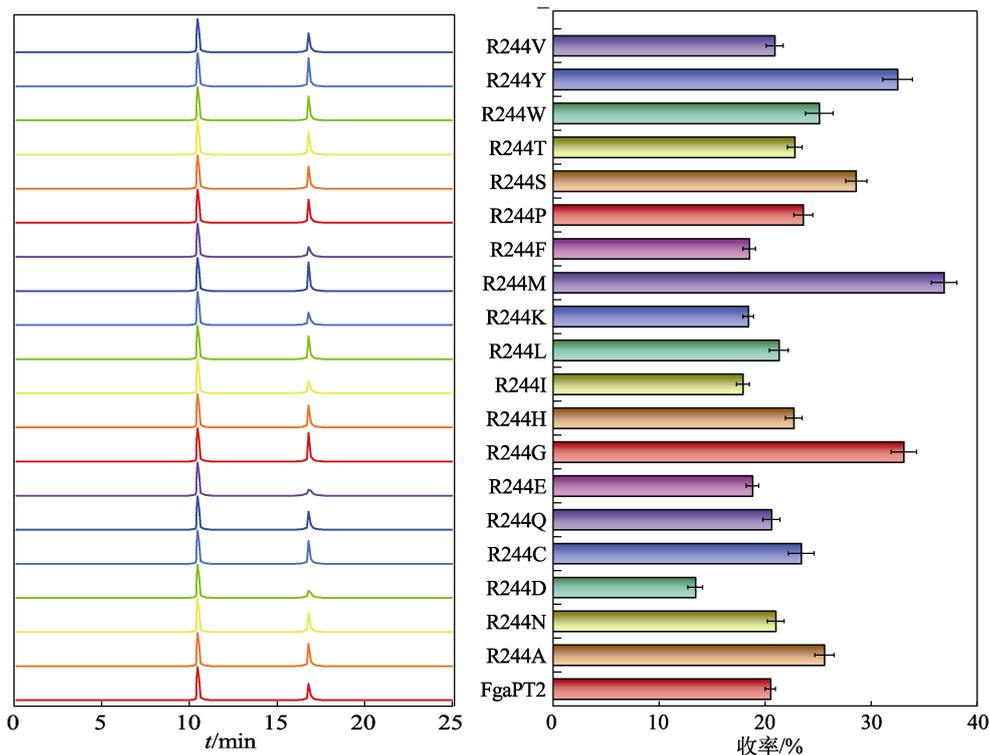


图 4 FgaPT2 和 R244X 突变体对 If 的活性

Fig. 4 Activities of FgaPT2 and R244X mutants toward If

2.3.3 动力学参数的分析

通过动力学参数分析 (表 7) FgaPT2 和 R244X 突变酶的 K_M , k_{cat} 和 k_{cat}/K_M 。

表 7 FgaPT2 和 R244X 突变蛋白的动力学参数
Table 7 Kinetic parameters of FgaPT2 and R244X mutated proteins

酶	K_M /(mmol/L)	k_{cat} /(1/s)	k_{cat}/K_M /[L/(s·mmol)]	(相对 k_{cat}/K_M)/%
FgaPT2	0.42	0.0045	10.17	2.20
R244A	0.26	0.0394	151.54	32.79
R244N	0.48	0.0127	26.46	5.73
R244D	0.73	0.0036	4.93	1.07
R244C	0.38	0.0227	59.74	12.93
R244Q	0.41	0.0098	23.90	5.17
R244E	0.48	0.0073	15.21	3.29
R244G	0.17	0.0551	324.12	70.13
R244H	0.41	0.0188	45.85	9.92
R244I	0.62	0.0045	7.26	1.57
R244L	0.47	0.0116	24.68	5.34
R244K	0.59	0.0051	8.64	1.87
R244M	0.14	0.0647	462.14	100.00
R244F	0.54	0.0044	8.15	1.76
R244P	0.32	0.0233	72.81	15.76
R244S	0.24	0.0347	144.58	31.29
R244T	0.39	0.0205	52.56	11.37
R244W	0.29	0.0318	109.66	23.73
R244Y	0.19	0.0528	277.89	60.13
R244V	0.45	0.0112	24.89	5.39

其中, 相对 k_{cat}/K_M 为其他 k_{cat}/K_M 值与最大 k_{cat}/K_M 值 (设为 100) 的比值。发现 R244X 突变酶对于 If 的 K_M 在 0.17~0.73 mmol/L 范围内, 与 FgaPT2 的 K_M 相当。但是, 与 FgaPT2 相比, 突变酶的 k_{cat} 在 0.0036~0.0647 1/s, 约是 FgaPT2 的 0.8~14.4 倍。在测试的 R244X 突变酶中, R244M 对 If 的亲和力最高, K_M 为 0.14 mmol/L, k_{cat} 为 0.0647 1/s, k_{cat}/K_M 为 462.14 L/(s·mmol), 产物收率最高, 为 36.9%±1.2%。接下来活性较好的是 R244G、R244Y、R244S、R244A 和 R244W。对应的产物收率分别为 33.1%±1.6%、32.5%±1.4%、28.6%±1.0%、25.6%±0.9% 和 25.1%±1.8%。这些数据表明, 通过 Arg-244 的位点饱和诱变, 与 FgaTP2 相比, 对 If 催化能力增强的酶占 FgaTP2 突变体的 52.6%, 对 If 具有相似催化能力的酶占 FgaTP2 突变体的 21.1%, 根据本研究的结果, 可以将 Arg-244 视为提高 FgaPT2 对 If 催化效率的突变位点。

3 结论

在 FgaPT2 的作用下, 利用二甲基烯丙基二磷酸, 将 7 个含色氨酸的环二肽转换为 C-4 异戊烯基化产物。HPLC 分析, 发现 FgaPT2 对底物具有一定的选择性。生物活性测定表明, 所制备的 C-4 异戊烯基化产物显示出比底物更高的活性。因而, 吡啶二酮哌嗪的 C-4 异戊烯基化可以显著提升其抗肿

瘤、抗细菌、抗真菌和抗氧化活性。其中, 环-L-4-二甲氨基丙基-色氨酸-L-色氨酸表现出最高的综合生物学活性。基于分子模型和关键残基, 确定 Arg-244 为 FgaPT2 的异戊烯基化活性的饱和诱变位点。诱变结果显示, 52.6%的 FgaPT2_R244X 突变体可以增强对环-L-色氨酸-L-色氨酸的催化能力, 而 21.1%的突变体具有与 FgaPT2 相似的催化能力。环-L-色氨酸-L-色氨酸和突变的氨基酸之间的动力学参数分析也支持这一结论。这意味着所获得的具有较高催化效率的突变体可以作为生产 C-4 异戊烯基化吲哚二酮哌嗪的有效催化剂。

参考文献:

- [1] LI S M. Prenylated indole derivatives from fungi: Structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27: 57-78.
- [2] RUIZ-SANCHIS P, SAVINA S A, ALBERICIO F, *et al.* Structure, bioactivity and synthesis of natural products with hexahydropyrrolo[2,3-*b*] indole[J]. *Chemistry*, 2011, 17: 1388-1408.
- [3] HAYNES S W, GAO X, TANG Y, *et al.* Complexity generation in fungal peptidyl alkaloid biosynthesis: A two-enzyme pathway to the hexacyclic MDR export pump inhibitor ardeemin[J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8: 741-748.
- [4] HAARMANN T, ROLKE Y, GIESBERT S, *et al.* Ergot: From witchcraft to biotechnology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2009, 10: 563-577.
- [5] JAIN H D, ZHANG C C, ZHOU S, *et al.* Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, a potent inhibitor of breast cancer resistance protein[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, 16: 4626-4651.
- [6] ZHAO L, MAY J P, HUANG J, *et al.* Stereoselective synthesis of brevianamide E[J]. *Organic Letters*, 2012, 14: 90-93.
- [7] DE BRUIJN W J C, LEVISSON M, BEEKWILDER J, *et al.* Plant aromatic prenyltransferases: Tools for microbial cell factories[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38: 917-934.
- [8] MORI T, ZHANG L H, AWAKAWA T, *et al.* Manipulation of prenylation reactions by structure-based engineering of bacterial indolactam prenyltransferases[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10849.
- [9] NAGIA M, GAID M, BIEDERMANN E, *et al.* Sequential regioselective gem-diprenylation of tetrahydroxyxanthone by prenyltransferases from *Hypericum* sp.[J]. *New Phytologist*, 2019, 222: 318-334.
- [10] MUNDT K, LI S M. CdpC2PT, a reverse prenyltransferase from *Neosartorya fischeri* with distinct substrate preference from known C2-prenyltransferases[J]. *Microbiology*, 2013, 159: 2169-2179.
- [11] YIN W B, XIE X L, MATUSCHEKA M, *et al.* Reconstruction of pyrrolo[2,3-*b*] indoles carrying an α -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using recombinant enzymes[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2010, 8: 1133-1141.
- [12] UNSÖLD I A, LI S M. Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*[J]. *Microbiology*, 2005, 151: 1499-1505.
- [13] YU X, LIU Y, XIE X L, *et al.* Biochemical characterization of indole prenyltransferases: Filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus clavatus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287: 1371-1380.
- [14] WINKELBLECH J, LIEBHOLD M, GUNERA J, *et al.* Tryptophan C5-, C6- and C7-prenylating enzymes displaying a preference for C-6 of the indole ring in the presence of unnatural dimethylallyl diphosphate analogues[J]. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 2015, 357: 975-986.
- [15] WUNSCH C, ZOU H X, LINNE U, *et al.* C7-prenylation of tryptophanyl and O-prenylation of tyrosyl residues in dipeptides by an *Aspergillus terreus* prenyltransferase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99: 1719-1730.
- [16] LIU R, ZHANG H C, WU W Q, *et al.* C7-prenylation of tryptophan-containing cyclic dipeptides by 7-dimethylallyl tryptophan synthase significantly increases the anticancer and antimicrobial activities[J]. *Molecules*, 2020, 25: 3676.
- [17] ZHOU K, ZHAO W, LIU X Q, *et al.* Saturation mutagenesis on Tyr205 of the cyclic dipeptide C2-prenyltransferase FtmPT1 results in mutants with strongly increased C3-prenylating activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 9943-9953.
- [18] FAN A L, ZOCHER G, STEC E, *et al.* Site-directed mutagenesis switching a dimethylallyl tryptophan synthase to a specific tyrosine C3-prenylating enzyme[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290: 1364-1373.
- [19] FAN A L, LI S M. Saturation mutagenesis on Arg-244 of the tryptophan C4-prenyltransferase FgaPT2 leads to enhanced catalytic ability and different preferences for tryptophan-containing cyclic dipeptides[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 5389-5399.
- [20] LIU R (刘瑞), ZHANG H C (张弘弛), LI H (李慧), *et al.* C-7 prenylation of indole diketopiperazine alkaloids by 7-dimethylallyl tryptophan synthase[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica (西北农业学报)*, 2021, 30(3): 413-421.
- [21] WOODSIDE A B, HUANG Z, POULTER C D. Trisammonium geranyl diphosphate[J]. *Organic Syntheses*, 1988, 66: 211-215.
- [22] JEEDIGUNTA S, KRENISKY J M, KERR R G. Diketopiperazines as advanced intermediates in the biosynthesis of ecteinaoscidins[J]. *Tetrahedron*, 2000, 56: 3303-3307.
- [23] MAI P, ZOCHER G, STEHLE T, *et al.* Structure-based protein engineering enables prenyl donor switching of a fungal aromatic prenyltransferase[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2018, 16: 7461-7469.
- [24] LIU J Y, PANG Y, CHEN J, *et al.* Hyperbranched polydiselenide as a self-assembling broad spectrum anticancer agent[J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 7765-7774.
- [25] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Document M100-S12[S]. NCCLS: Wayne, PA, USA, 2002.
- [26] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Document M38-A2[S]. CLSI: Wayne, PA, USA, 2008.
- [27] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Document M27-S4[S]. CLSI: Wayne, PA, USA, 2012.
- [28] LIU Z Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110: 5675-5691.
- [29] WANG Z, SUN H Y, YAO X J, *et al.* Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, 18: 12964-12975.
- [30] RAASAKKA A, MYLLYKOSKI M, LAULUMAA S, *et al.* Determinants of ligand binding and catalytic activity in the myelin enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16520.
- [31] WOLLINSKY B, LUDWIG L, HAMACHER A, *et al.* Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22: 3866-3869.
- [32] WINKELBLECH J, LI S M. Biochemical investigations of two 6-DMATS enzymes from *Streptomyces* reveal new features of L-tryptophan prenyltransferases[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15: 1030-1039.
- [33] POCKRANDT D, SACK C, KOSIOL T, *et al.* A promiscuous prenyltransferase from *Aspergillus oryzae* catalyses C-prenylations of hydroxynaphthalenes in the presence of different prenyl donors[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 4987-4994.
- [34] ZHENG L J, MAI P, FAN A L, *et al.* Switching a regular tryptophan C4-prenyltransferase to a reverse tryptophan-containing cyclic dipeptide C3-prenyltransferase by sequential site-directed mutagenesis[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2018, 16: 6688-6694.