

卤代酶与生物卤化反应进展

耿召良^{1,2,3}, 王浩鑫¹, 赵沛基¹, 郝小江¹, 曾 英¹

(1 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳 550003)

摘要: 卤化物在生物圈内广泛存在, 许多天然卤化物广泛应用在药理学领域。根据催化机理, 催化形成 C-X 键的卤代酶 (halogenases) 主要分为两大类型: 卤代过氧化物酶 (haloperoxidases) 和黄素依赖型卤代酶 (flavin-dependent halogenases), 另外还有非血红素 Fe(II)-酮戊二酸盐依赖型卤代酶 (non-heme Fe^{II}-keto-glutarate (aKG)-dependent halogenases)、甲基卤代转移酶 (methyl halide transferases) 和氟化酶 (fluorinases) 等。本文综述了目前已知的卤代酶的发现、分子作用机制和生物催化潜力。近年来, 卤代酶在生物卤化过程中的重要生物学功能已经引起了广泛关注。利用组合生物合成、定向进化等现代生物技术合成有价值的天然卤代衍生物将有广阔的应用前景。

关键词: 卤代酶; 生物卤化; 卤化物

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2009) 03-269-10

Research Development on Halogenases and Biological Halogenation

GENG Zhao-Liang^{1,2,3}, WANG Hao-Xin¹, ZHAO Pei-Ji¹, HAO Xiao-Jiang¹, ZENG Ying^{1**}

(1 *State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China*; 2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*; 3 *Tobacco Research Institute of Guizhou, Guiyang 550003, China*)

Abstract: Halogenated molecules are widely distributed in the biosphere with a variety of uses in pharmacology. Halogenating enzymes have been identified for the biosynthesis of halogenated compounds by catalyzing the formation of carbon-halogen bond. According to their different reaction mechanisms, halogenating enzymes are divided into two main groups, haloperoxidases and flavin-dependent halogenases. In addition, other halogenases including non-heme Fe^{II}-ketoglutarate (KG)-dependent halogenases, methyl halide transferases and fluorinase were recently discovered. This review concentrates on the occurrence, mechanism and biocatalytic potential of the halogenating enzymes that are currently known. The biological importance of halogenating enzymes in biohalogenation has aroused wide concern. Meanwhile, using modern biotechnology, for example, combinatorial biosynthesis and directed evolution, the prospects for generating halogenated derivatives of valuable natural products would therefore appear very bright.

Key words: Halogenase; Biological halogenation; Halogen compound

1896 年, Drechsel (1896) 从海洋菌株中分离得到了第一个含卤素的天然产物 3, 5-二碘酪氨酸 (3, 5-diiodotyrosin)。但人们一直认为卤化

天然产物在自然界中含量稀少, 其大量发现是在近十余年才开展起来的。据统计, 人们已经从细菌、真菌、海洋生物、植物、昆虫和哺乳动物等

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30430020)

通讯作者: Author for correspondence; E-mail: biochem@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2008-12-04, 2009-04-02 接受发表

作者简介: 耿召良 (1978-) 男, 博士研究生, 主要从事微生物次生代谢研究。E-mail: ZhaoliangGeng@mail.kib.ac.cn

生物体内分离得到 4 500 余种具有广泛结构多样性的卤化天然产物 (Gribble, 2004), 其中氯化 and 溴化天然产物占大部分。从分布上看, 溴化物主要由海洋生物产生, 大量氯化物多在陆生生物中发现 (Zhang 等, 1994; Carter-Franklin and Butler, 2004)。氯化 and 溴化天然产物相对丰富, 可能是因为这两种卤素原子在陆地和海洋代谢有机体微环境中的含量相对较丰富。

由于天然卤化物在生理和生物化学上具有重要作用, 其在药理学上有广泛地应用, 如氯化物类的万古霉素 (vancomycin), 金霉素 (chlorotetracycline), 氯霉素 (chloramphenicol), 蝴蝶霉素 (rebeccamycin), 刺孢霉素 (calicheamycin) 和 ambigol A 等, 可以作为抗生素或抗肿瘤、抗 HIV 药物等。海洋特殊的生境是许多特异、新颖的生物活性物质的丰富来源, 其中很大一部分为有机溴化物, 抗真菌抗生素硝吡咯菌素 (pyrolnitrin) 是其中的代表化合物 (Burkholder 等, 1966)。在碘化天然产物中, 以土壤放线菌产生的抗肿瘤抗生素 calicheamicin 和哺乳动物合成的甲状腺素 (tetraiodothyronine, T₄) 为人们所知 (Bergman, 1973; Fukuzawa and Kurosawa, 1979)。氯化物 4-chloroindolyl-3-acetic acid 和 thienodolin 等还可以作为植物生长调节剂 (Marumo 等, 1968; Kanbe 等, 1993)。总之, 有机卤化物已经广泛应用于医药、杀菌剂、激素、信号分子及有机合成等各个领域。

自然界中存在卤化天然产物, 揭示了必然存在可以催化形成 C-X 键的酶。随着人们对卤化天然产物分离、鉴定和生物合成途径的研究不断深入, 更多的甚至是新类型的卤代酶不断被发现, 其参与的生物卤化反应机理逐渐被揭示, 同时, 早期的一些错误观点也逐渐被更正。目前, 卤代酶主要分为两大类型: 卤代过氧化物酶 (haloperoxidases) 和黄素依赖型卤代酶 (flavin-dependent halogenases), 另外还有非血红素 Fe^{II}-酮戊二酸盐依赖型卤代酶 (non-heme Fe^{II} a-ketoglutarate (aKG)-dependent halogenases)、甲基卤代转移酶 (methyl halide transferases) 和氟化酶 (fluorinases) 等。虽然人们已经发现了许多卤代酶, 但有证据显示自然界中还有其他类型的卤代酶和反应机理尚未被发现。本文就目前发现的主要卤代酶及反应机理和生物催化潜力进行综述。

1 卤代酶

人们在 1959 年发现了第一个卤代酶 - 氯代过氧化物酶 (chloroperoxidases, CPO) (Shaw and Hager, 1961)。研究早期, 普遍认为卤代过氧化物酶是催化生物卤代反应的主要酶类, 但现阶段研究表明, 黄素依赖型卤代酶才是参与卤代反应的主要卤代酶类, 因此近代对卤代酶的研究也主要集中在后者上。另外, 有许多证据表明黄素依赖型卤代酶基因在很多 NRPS (nonribosomal peptide synthetases) 和 PKS (polyketide synthases) 基因簇中被发现 (Dorrestein 等, 2005), 在许多抗生素生物合成过程中扮演了后修饰酶的角色。

1.1 卤代过氧化物酶

人们在研究卡尔里霉素 (caldariomycin) 的生物合成途径时, 在 *Caldariomyces fumago* 的细胞提取物里首次发现了将单氯双甲酮催化为双氯双甲酮的氯代过氧化物酶, 并且该反应可以通过分光光度法加以检测 (Morris and Hager, 1966)。该方法可以不必确定底物而对酶活性进行研究, 这种便利性导致了更多卤代过氧化物酶的发现。其中, 氯代过氧化物酶研究最深入, 可以催化碘、溴和氯元素的卤化; 溴代过氧化物酶 (bromoperoxidase) 可以催化碘、溴元素的卤化; 而碘代过氧化物酶 (iodoperoxidase) 只能催化碘元素的卤化反应 (Morrison and Schonbaum, 1976)。氟原子不可能被过氧化氢氧化, 所以上述的卤代过氧化物酶不能在含氟代谢产物生物合成中应用。目前, 根据辅因子不同, 可以将卤代过氧化物酶分为 3 类: 亚铁血红素依赖型, 金属依赖型和无辅因子过氧化氢酶。

1.1.1 含亚铁血红素卤代过氧化物酶

含亚铁血红素的卤代过氧化物酶 (heme-containing haloperoxidases) 可以催化 P450 类型的反应。在早期, 研究者用标记的氯化物对 *Caldariomyces fumago* 菌丝体处理获得的可溶性提取物检测到了其氯化活性。实际上该酶是由两个酶组成, 其中一个为葡糖氧化酶, 以生产另一个酶, 即氯过氧化物酶所需要的过氧化氢, 以完成其对卡尔里霉素生物合成中间体的氯代作用 (Shaw 等, 1959)。进一步对该酶进行纯化和晶体衍射的研究表明, 该酶是一个以原卟啉 IX 为辅基, 分子量达 42 kD 的单体、胞外血红素糖基化酶 (Morris and Hager, 1966)。从 *Pseudomonas aureofaciens* 分离到的

结构第一次对该类酶的钒结合元件及酶活性位点进行了阐述 (Messerschmidt and Wever, 1996)。该催化结构域含约 150 个氨基酸, 其中包括与金属配位的 His 残基, 同时为了结构稳定的需要, 还有数个氨基酸的氢键和钒酸盐的氧原子相连。在褐藻 (*A. nodosum*) (Weyand 等, 1999) 和红藻 (*Corallina officinalis*) (Isupov 等, 2000) 中分离的此类酶的结构已经得到确认。这 3 种卤代过氧化物酶的同源性很低, 但在 C 端的金属离子结合位点和活性中心呈现了高度同源性。

研究者对含钒卤代过氧化物酶反应的分子机理进行了推测 (图 2) (van Pee and Unversucht, 2003; Raugei and Carloni, 2006)。不同质子化状态的研究表明, 该酶含有一个部分钒酸盐阴离子 $H_2VO_4^-$, 一个羟基位于其轴线上, 过氧化氢攻击该羟基, 形成过氧化氢中间体, 该中间体迅速被质子化形成一个过氧复合物-HVO₂ (O₂), 然后卤离子和该复合物发生反应, 产生次卤化钒酸盐, 和亚铁血红素卤代过氧化物酶类似, 形成的次卤酸作为真正的卤化剂导致了非酶卤化作用, 同样导致了该卤代反应缺乏底物专一性和区域选

择性 (Isupov 等, 2000; Raugei and Carloni, 2006)。

1.1.3 过氧化氢酶 早期的研究者从细菌中分离到一种卤代酶, 该酶在有过氧化氢存在时可以表现“卤代过氧化物酶活性”, 但却并非传统意义上真正的过氧化物酶。研究表明, 它们没有血红素辅基, 也不含任何金属离子, 应该被归类于过氧化氢酶 (perhydrolases)。其一级结构与水解酶和酯酶有较高的相似性 (Ozaki 等, 1995), 基本上都是由分子量为 31 kD 的相同亚单位组成, 自然状态下为二聚体或三聚体不等。

在醋酸缓冲液中加入过氧化氢的反应条件下, 这类卤代酶能够使单氯双甲酮发生溴代反应 (Picard 等, 1997), 同时对该类酶进行三维结构研究的结果揭示, 它们有一个由 Ser、His 和 Asp 残基组成的催化三元体 (Hecht 等, 1994)。因此, 推测该反应机理应该是酶活性位点的 Ser 残基和醋酸形成酯键, 该酯被过氧化氢氧化形成过氧化乙酸, 再由过氧化乙酸氧化卤素离子, 形成作为真正卤化剂的次卤酸, 因此同样没有底物特异性和区域选择性。

该类过氧化氢酶最初被归于卤代过氧化物酶。但根据酶三维结构及反应机理的研究结果,

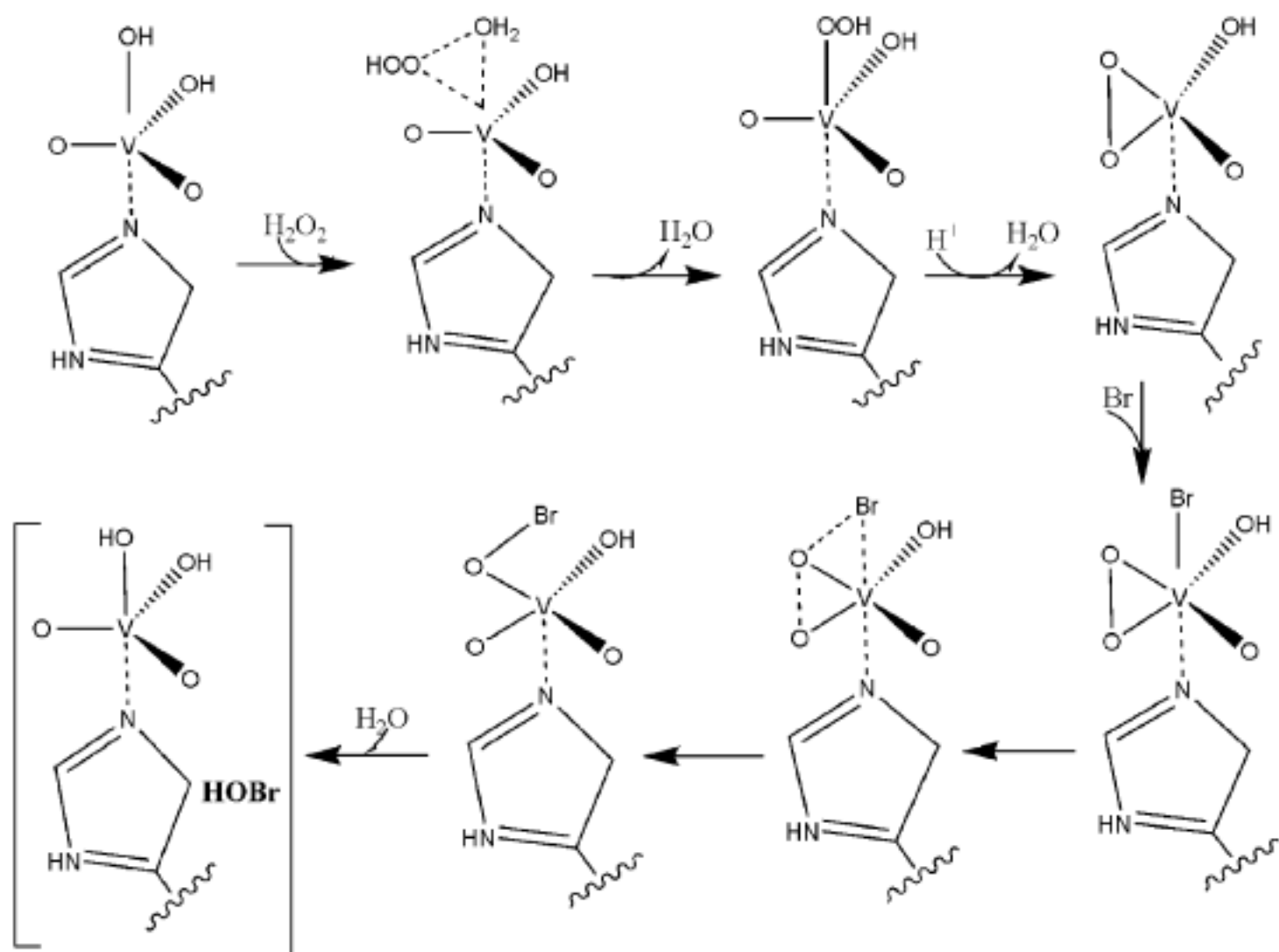


图 2 推定的含钒卤代过氧化物酶的反应机理 (参考 van Pee and Unversucht, 2003; Raugei and Carloni, 2006)

Fig. 2 Proposed reaction mechanism of the vanadium-containing haloperoxidases (van Pee and Unversucht, 2003; Raugei and Carloni, 2006)

现在已经公认它们实际上并没有直接参与卤化物的生物合成过程, 其作用方式和过氧化氢酶类似, 同时, 因其含有和 水解酶一样的催化三元体, 目前将其归类于水解酶家族。

1.2 黄素依赖型卤代酶

直到 1995 年, 人们一直广泛认同“卤代过氧化物酶是催化生物卤代反应的主要卤代酶类”这一观点。然而, 随着更多复杂的卤化天然产物陆续被发现, 揭示仅仅依靠卤代过氧化物酶显然是不够的。随着金霉素生物合成基因簇的克隆 (Dairi 等, 1995) 及随后硝吡咯菌素生物合成途径被阐明以后, 一种新类型的卤代酶 - 黄素依赖型卤代酶 (flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent halogenase) 被发现了 (Hammer 等, 1997)。

Hammer 等 (1997) 从产生抗真菌化合物硝吡咯菌素的 *Pseudomonas fluorescens* 中鉴定了两个相关基因 *prnA* 和 *prnC*, 它们分别编码两个对应的卤代酶, 其中 *PmA* 为色氨酸-7-卤代酶 (Trp-7-halogenase), 负责催化色氨酸的碳 7 位发生区域选择性的氯化作用; *PrnC* 为单去氯氨基硝吡咯菌素卤代酶 (monodechloroaminopyrrolnitrin halogenases)。进一步的研究表明, 另一种被鉴定为黄素还原酶 (flavin oxidoreductase) 的蛋白也是必须的, 黄素作为 NADH 和 O₂ 的电子载体, 可以催化产生卤代反应实际需要的 FADH₂ (van Pee and Patallo, 2006), 因此该类酶也被称为 FADH₂ 依赖性卤代酶 (FADH₂-dependent halogenases)。虽然在许多重要活性物质, 尤其是在许多抗生素的生物合成基因簇中发现了许多该类卤代酶基因, 但目前研究者只对其中的少数进行了体外表达的活性研究 (表 1)。其中, 最近进行的 *hrmQ* 的体外表达及活性检测研究较令人感兴趣 (Heide 等,

2008)。*hrmQ* 是在产生具有抗菌作用的细胞间信号物质多肽内酯 Hormamycin 的菌株 *Streptomyces griseoflavus* W-384 中发现的, 作者将该基因在产生具有抑制 DNA 促旋酶活性的抗生素 clorobiocin 的 *Streptomyces roseochromogenes* var. *oscitans* DS12.976 的突变菌株中进行了异源表达和活性检测, 结果发现了两个新的 clorobiocin 同系物, 同时表明 HrmQ 的底物可能是一种吡咯-2-羧基-S-(酰基转运蛋白) 硫酯, 这可能是首次用组合生物合成技术使卤代酶作用于由酰基转运蛋白连接的底物。

在一级结构上, FADH₂ 依赖性卤代酶和卤代过氧化物酶几乎没有相似性。研究表明, 这类酶有两个保守区, 一个位于序列 N 端, 为 FADH₂ 的结合位点 (GXGXXG); 另一个在序列中间 (GWTWXIP), 包含两个色氨酸残基 (Hammer 等, 1999), 据推测该序列一级结构的相似性与酶反应底物的专一性有关。根据底物的不同, FADH₂ 依赖性卤代酶至少可以分为两个亚类, 第一亚类底物为吡咯或色氨酸衍生物, 第二亚类底物为苯环或吡咯衍生物。值得一提的是, 生产 FADH₂ 依赖性卤代酶菌株中的黄素还原酶可以被其它黄素还原酶, 如从大肠杆菌中分离到的核糖核苷酸复合物 (ribonucleotide reductase complex, Fre) 等替代 (Keller 等, 2000)。这揭示了黄素还原酶和卤代酶双组分系统之间并非是专一性的。一般来说, 二者之间的氨基酸序列同源性不高, 即使是在卤代酶氨基末端的绝对保守区 (GXGXXG) 也仅在少数黄素还原酶中出现。

虽然从一些抗生素的生物合成途径中已经获知了很多信息, 但人们对该类酶反应机理的研究却一直不尽如人意。最近, *PrnA* 等蛋白晶体结构的相继被揭示, 为研究 FADH₂ 依赖性卤代酶

表 1 体外表达研究的 FADH₂ 依赖性卤代酶

Table 1 Halogenating activity *in vitro* of the FADH₂-dependent halogenases

卤化物 Halogen compound	FADH ₂ 依赖性卤代酶 FADH ₂ -dependent halogenase	表达菌株 Expression strain	参考文献 Reference
pyrrolnitrin	PrnA、PrnC	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BI915	Hammer 等, 1997
clorobiocin	HrmQ	<i>Streptomyces roseochromogenes</i> var. <i>oscitans</i> DS12.976	Heide 等, 2008
pyoluteorin	PltA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	Nowak-Thompson 等, 1999
pentachloropseudilin	HalB	<i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 33002	Wynands and van Pee, 2004
rebeccamycin	RebH	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	Yeh 等, 2005
pyrroindomycin	PyrH	<i>Streptomyces rugosporus</i>	Zehner 等, 2005
thienodolin	Thal	<i>Streptomyces albobrisesolus</i>	Seibold 等, 2006

的反应机理带来了新的曙光 (Dong 等, 2005; van Pee and Patallo, 2006)。PrnA 蛋白的晶体结构显示, 该酶是一个二聚体, 每个单体都是一个独立的结构域, 单体形状类似于一个其中一面粘着一个“金字塔”的“盒子”, 其中“盒子”为 FAD 结合位点模块 (FAD binding module), FAD 结合于其中的一个凹槽中, 由两个 β -折叠片控制, 结构上和单加氧酶——*p*-羟基苯甲酸酯羟化酶 (*p*-hydroxybenzoate hydroxylase, PHBH) 较类似; Cl^- 结合口袋 (Cl^- binding pocket) 位于 FAD 异咯嗪环的一面上, Cl^- 位于口袋内, 并和苏氨酸 (T348) 和甘氨酸 (G349) 残基的氨基氮原子相连。底物 Trp (或产物 7-chlorotryptophan) 以氢键或盐键的形式和“金字塔”上的氨基酸残基相连, 该区域为底物结合位点模块 (substrate binding module)。FAD 和 Cl^- 被限制于酶的另一位置, 但和底物结合位点的距离超过了 10 Å, 这对于 Cl^- 和底物接合的距离显然太长了。

根据 PrnA 的晶体结构, 不少研究者提出了该类卤代酶反应的分子机理, 代表学者是 van Pee、Walsh 和 Naismith (Keller 等, 2000; Dong 等, 2005; Dorrestein 等, 2005; Yeh 等, 2005), 但

最近由 RebH 蛋白的结构和反应动力学获得的研究结果对由 PrnA 暗示的反应机理提出了挑战 (Yeh 等, 2007)。其中, 前两者的理论未解决上述 PrnA 晶体结构中氯离子和底物结合位点之间 10 Å 距离的问题。根据 Naismith 推定的反应机理, PrnA 晶体结构中的 FAD 和底物 Trp 之间有一个通道, 该通道终止于 Trp 的碳 7 位。反应中首先是 FAD 和 NADH 产生 FADH_2 , FADH_2 和 O_2 反应形成关键中间产物——氢过氧基黄素中间体 (FAD-OOH), 位于 FAD 异咯嗪环上的氯离子对 FAD-OOH 发动亲核攻击, 形成羟基化 FAD 和 HOCl , HOCl 沿着上述通道移动 10 Å 的距离接近底物 Trp, 并对 Trp 的碳 7 位发动亲核攻击, 形成 Wheland 中间体, 随后发生去质子化形成最终产物 7-chlorotryptophan (图 3)。据推测, 由保守的 FAD 结合位点形成 HOCl 并参与卤代反应, 这在所有的 FADH_2 依赖型卤代酶反应中均存在。需要指出的是, 溶液中自由存在的 HOCl 并不能使 Trp 发生氯代反应 (Dong 等, 2005; Yeh 等, 2005), 同时, PrnA 结构中的两个重要氨基酸 K79 和 E346 通过氢键等方式对 HOCl 进行空间控制和相互作用, 这是反应中对底物区域选择性卤化的基础。

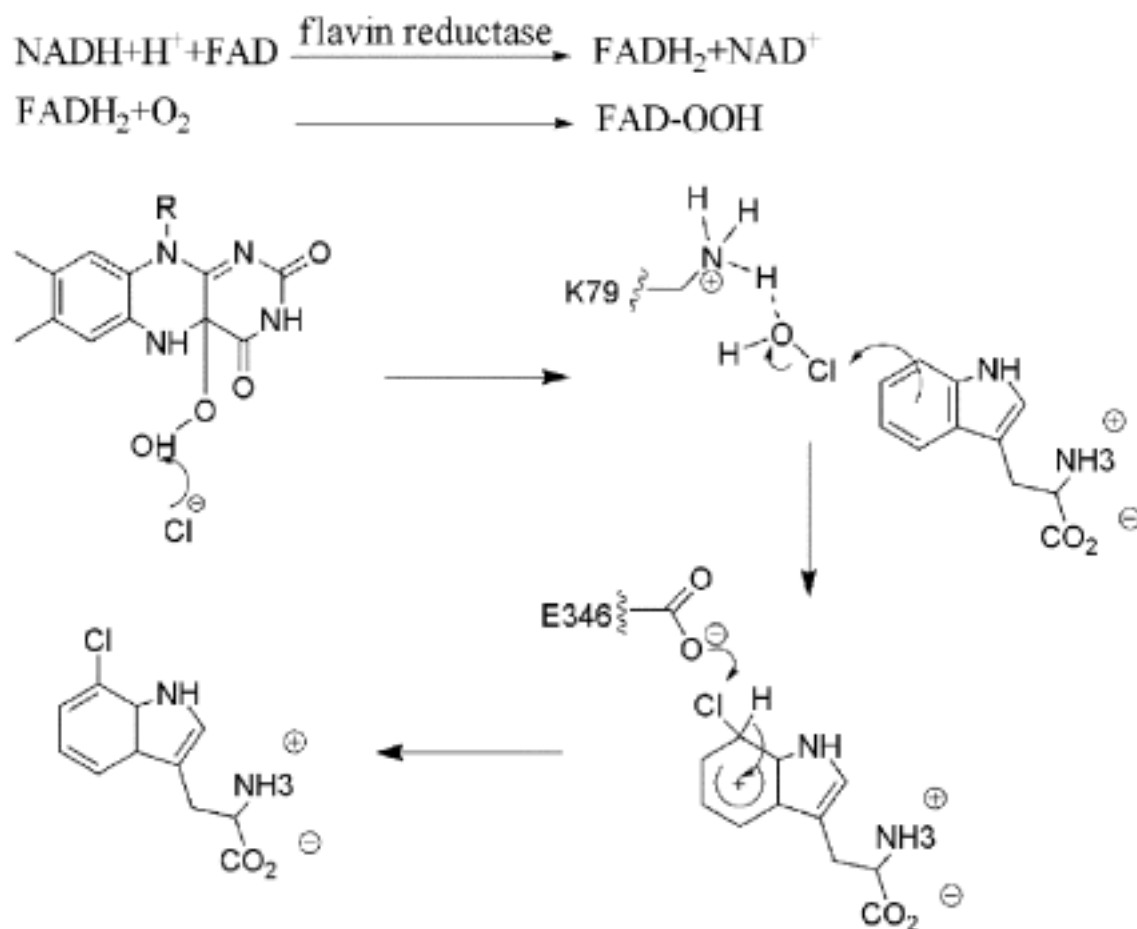


图 3 色氨酸-7-卤代酶 (PrnA) 推定的反应机理 (参考 Dong 等, 2005; Yeh 等, 2005)

根据上述机理, F^- 也可以参与类似的卤代反应, 但迄今为止没有 Trp 等底物被氟化或碘化的报道。这暗示该类酶不仅表现出了底物专一性, 对卤离子也表现了一定的选择性, 这可能是由于卤离子的大小或亲核性质强弱的不同所致。PmA 除了其天然底物 Trp 以外, 还接受许多吲哚和苯基吡咯衍生物, 只是在以色氨酸为底物时, 该类酶表现的区域选择性较严格, 一般对 C-7 位卤化, 但最近也有研究者发现合成 pyrroindomycin B 的卤代酶可以催化生成 5-氯色氨酸产物 (Zehner 等, 2005)。当该类酶与其它底物进行反应时, 则对底物的区域选择性不太严格, 可以在吲哚或 Trp 衍生物的 2, 3 位进行氯化 (Hlzer 等, 2001)。

蓝细菌 *Microcystis* 菌株具有产生多种氯化肽系列产物的能力, 是近年研究的一个热点。最近的研究表明 (Cadel-Six 等, 2008; Frangeul 等, 2008), 催化这些氯化反应的酶和 FAD 依赖型卤代酶的同源性较高, 而这些特有的卤代酶基因是和两个特定的 NRPS 基因簇 (分别产生 aeruginosins 和 cyanopeptolins 系列产物) 紧密相关的, 并且正是由于卤代酶基因的缺失或者功能失调造成了菌株中后续的一系列非氯化肽同系物的产生, 而氯化肽同系物的产生与此相反。研究者对其中一些卤代酶的系统演化进行了研究, 推测蓝细菌中这些普遍的卤代酶基因在系统发生上来自进化中的水平基因转移, 随后这些基因在蓝细菌细胞体系中进行复制, 推测可能是靠这些重复基因的缺失来调配卤代酶基因在两个 NRPS 基因簇之间的分配, 从而解释了蓝细菌 *Microcystis* 菌株中无规则地产生氯化或非氯化同系物的原因。

1.3 非血红素 Fe^{II} -酮戊二酸盐依赖型卤代酶

根据某些卤代天然产物生物合成基因簇的测序结果, 在推定的读码框中并没有发现任何卤代过氧化物酶或 $FADH_2$ 依赖型卤代酶的基因, 这暗示可能有新类型卤代酶存在。例如, 在对丁香霉素 E (syringomycin E) (Grgurina and Mariotti, 1999) 和抗肿瘤活性物质 barbamide (Sitachitta 等, 1998) 生物合成研究时, 同位素标记研究显示前者的合成源于 Thr, 后者源于 Leu, 将二者的生物合成基因簇和 $FADH_2$ 依赖型卤代酶基因相比较并没有发现相似性, 且从合成机理上分析,

barbamide 的 3 个氯原子可能是通过自由基机制结合的。barbamide 合成基因簇中推定的负责氯化反应的 BarB1 BarB2 和丁香霉素 E 合成基因簇的 SyrB2 相似, 这些蛋白同属于一类新的非血红素 Fe^{II} -酮戊二酸盐依赖型卤代酶 (non-heme Fe^{II} -ketoglutarate (KG)-dependent halogenases)。该类卤代酶在许多非核糖体肽 (non-ribosomal peptide) 起源的化合物生物合成途径中较常见 (Blasiak 等, 2006; Galonic 等, 2006, 2007)。

研究者证实了 SyrB2 对应的卤代活性, 并揭示了该蛋白的晶体结构 (Blasiak 等, 2006)。根据其三维结构推断, 该类酶反应的初期首先形成一个 $ClFe^{IV}$ -oxo 的中间体, 该中间体从底物中提取一个氢原子而使底物激发产生底物自由基 (substrate radical), 同时产生 $ClFe^{III}$ -OH 复合体, 底物的氯化是由氯的自由基 (chloride radical) “回弹”所推进的 (Galonic 等, 2007; Krebs 等, 2007)。

值得一提的是, barbamide 合成基因簇是一个 PKS-NRPS 杂合系统, 即同时具有 PKS 和 NRPS 两种酶系, 因此其活性产物也是 PKS-NRPS 的杂合系统产物 (Chang 等, 2002)。该类型卤代酶也参与了植物毒素冠毒素 (coronatine) 的生物合成 (Vaillancourt 等, 2005)。

1.4 甲基卤代转移酶

负责合成甲基卤化物的一种特殊类型的酶被称为甲基卤代转移酶 (methyl halide transferases), 但严格来说它们实际上不是“卤化”酶, 而是“甲基化”酶。研究者通过对细胞提取液的研究鉴定了该种甲基转移酶, 它们可以使 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 转移一个甲基到氯离子、溴离子和碘离子上。目前, 在真菌和海藻中均已发现了该类酶。

Svendsen (1994) 从细菌 CC495 中还分离出一种二硫化物甲基卤代转移酶。该酶以卤代甲烷作为唯一碳源和能量来源, 通过类咕啉连接一个钴原子, 以卤代甲烷作为甲基供体, 以卤离子作为甲基受体, 因而具有转移卤原子的活性。甲基卤代转移酶还参与了刺革菌科真菌 (hymenochaetaceae) 甲基氯化物的形成 (Harper and Kennedy, 1988)。另外, 甲基氯化物还可以在苹果木层孔菌 *Phellinus pomaceus* 的苯甲酸甲基酯生物合成及苯酚和丁酸盐甲基化反应中作为一种甲

基供体 (McNally and Haper, 1991)。

1.5 氟化酶

相比其他卤素, 氟元素在地壳中含量最丰富, 但由于其多以矿物质形式存在而不能为生物体所用。因此, 氟化天然产物种类稀少就不足为奇了。尽管推定的 $FADH_2$ 依赖型卤代酶的反应机理似乎允许氟代反应的发生, 但关于支持氟化酶 (fluorinase) 催化氟代反应的证据并不多。目前所知的少量氟化天然产物, 是由一些高等植物和链霉菌所产生的。

从链霉菌 *Streptomyces calvus* 中分离到的一种抗生素核杀菌素 (nucleocidin) 是第一个从微生物中分离到的有机氟化物。从链霉菌 *S. cattleya* 中分离到的 5-Fluoro-5'-deoxyadenosine (5'-FDA) synthase 是第一个报道的氟化酶, 同时研究者发现该菌株也可以产生氟乙酸盐和 4-氟苏氨酸, 这为研究 C-F 键的形成机理提供了便利 (Sanada 等, 1986; Schaffrath 等, 2003)。有意思的是, nucleocidin 的结构和氟乙酸盐并没有相似性, 似乎在两种细菌中应该是由不同的氟化酶催化形成的, 然而进一步的研究表明, 合成二者的前体却很相似。最近通过基因工程手段的研究结果可以推测, *S. calvus* 中的核杀菌素和 *S. cattleya* 中的氟乙酸盐可能是由相似的反应机理合成的。

2 结语与展望

自然界中的大多数卤化物是通过化学合成的方式得到的, 但化学合成的条件要求相对苛刻且不能精细控制反应过程, 有可能使很大一部分产物或副产物危害环境和人类健康。生物体内的卤代反应则相对温和且可以有程度不一的底物和区域选择性, 可以对产物性质进行一定的控制。因此, 研究生物卤化反应的途径, 尤其是 C-X 键形成的酶学反应机制, 可能会提供一种便利的合成卤化有机物的新方法。在过去的几年中, 人们对卤代酶的发现和生物卤化反应机理的理解已经取得了相当大的进步。

目前, 人们已经发现并研究了许多卤代酶, 但遗憾的是对该类酶参与卤代反应的机理却仍然不甚明了, 其中体外测量酶活性的主要障碍是对催化底物结构知识的了解不够。尽管如此, 近年来人们已经开始了卤代酶在生物技术方面的应用

研究。利用定向进化技术 (directed evolution) 通过区域选择性地作用底物, 以控制生产系列目标产物的理论在氯代过氧化物酶中得到了验证 (Rai 等, 2001)。另外, 利用组合生物合成 (combinatorial biosynthesis) 等手段可以构建一些生产强生物活性卤代天然产物或其衍生物的生物突变体, 这对于有医疗意义的抗生素生产有很大意义。

现代生物技术的迅猛发展, 如宏基因组技术 (metagenome)、功能或序列驱动的高通量筛选技术、定向进化技术等, 为卤代酶基因的发现、功能确定及定向结构改造提供了极大便利。最近, 也有研究者以遗传算法 (genetic algorithm, GA) 对优化卤代酶活性进行了有益探索 (Muffler 等, 2007)。耿召良等 (2009) 及 Wang 等 (2008) 采用 $FADH_2$ 依赖型卤代酶的保守区序列设计引物, 通过 PCR、亚克隆等方法对其研究组构建的首个滑桃树 (*Trewia nudiflora*) 植物内生菌宏基因组文库中的 75000 个单克隆, 通过逐级 PCR 的方法进行了筛选, 并对获得的数个卤代酶基因阳性克隆通过亚克隆和步移测序的方法获得了两个 $FADH_2$ 依赖型卤代酶基因全长 63D9Hal、64E9Hal (GenBank 注册号: FJ493227 和 FJ493228)。目前正在对这两个新卤代酶基因继续进行异源表达和体外活性检测等方面的研究。相信随着人们对卤代酶的底物结构和反应机理了解的不断深入, 利用可以人为控制的生物卤化反应合成有机卤化物, 必将在创新药物和先导化合物研究等领域有广阔的应用前景。

【参 考 文 献】

- 耿召良, 2009. 几个微生物次生代谢后修饰基因功能探索 (博士学位论文) [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所
- Almeida M, Filipe S, Humanes M *et al.*, 2001. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family [J]. *Phytochemistry*, 57 (5): 633
- Bergman RGV, 1973. Reactive 1, 4-dehydroaromatics [J]. *Accounts of Chemical Research*, 6: 25
- Blasiak LC, Vaillancourt FH, Walsh CT *et al.*, 2006. Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis [J]. *Nature*, 440 (7082): 368
- Burkholder PR, Pfister RM, Leitz FP, 1966. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium [J]. *Applied Microbiology*, 14: 694

- Cadel-Six S, Dauga C, Castets AM *et al.*, 2008 . Halogenase genes in nonribosomal peptide synthetase gene clusters of *Microcystis* (cyanobacteria): sporadic distribution and evolution [J] . *Molecular Biology and Evolution*, 25 (9): 2031
- Carter-Franklin JN, Butle A, 2004 . Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products [J] . *Journal of the American Chemical Society*, 126 (46): 15060
- Chang Z, Flatt P, Gerwick WH *et al.*, 2002 . The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit [J] . *Gene*, 296 (1-2): 235
- Dairi T, Nakano T, Aisaka K *et al.*, 1995 . Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline [J] . *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59 (6): 1099
- Dong C, Flecks S, Unversucht S *et al.*, 2005 . Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination [J] . *Science*, 309 (5744): 2216
- Dorrestein PC, Yeh E, Garneau-Tsodikova S *et al.*, 2005 . Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH₂-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis [J] . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (39): 13843
- Drechsel E, 1896 . Contribution to the chemistry of a sea animal [J] . *Zeitschrift fur Biologie*, 33: 85—107
- Frangoul L, Quillardet P, Castets AM *et al.*, 2008 . Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium [J] . *BMC Genomics*, 9: 274
- Fukuzawa A, Kurosawa E, 1979 . Laurallene, new bromoallene from the marine red alga *Laurencia nipponica* Yamada [J] . *Tetrahedron Letters*, 30: 2797
- Galonic DP, Barr EW, Walsh CT *et al.*, 2007 . Two interconverting Fe (IV) intermediates in aliphatic chlorination by the halogenase CytC3 [J] . *Nature Chemical Biology*, 3 (2): 113
- Galonic DP, Vaillancourt FH, Walsh CT, 2006 . Halogenation of unactivated carbon centers in natural product biosynthesis: trichlorination of leucine during barbamide biosynthesis [J] . *Journal of the American Chemical Society*, 128 (12): 3900
- Grgurina I, Mariotti F, 1999 . Biosynthetic origin of syringomycin and syringopeptin 22, toxic secondary metabolites of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv . *syringae* [J] . *FEBS Letters*, 462 (1-2): 151
- Gribble GW, 2004 . Natural organohalogens: a new frontier for medicinal agents [J] . *Journal of Chemical Education*, 81 (10): 1441
- Hammer PE, Hill DS, Lam ST, 1997 . Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin [J] . *Applied and Environment Microbiology*, 63 (6): 2147
- Hammer PE, Burd W, Hill DS *et al.*, 1999 . Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains [J] . *FEMS Microbiology Letters*, 180 (1): 39
- Harper DB, Kennedy JT, 1988 . Hamilton J T G . Chloromethane biosynthesis in poroid fungi [J] . *Phytochemistry*, 27: 3147
- Hecht HJ, Sobek H, Haag T *et al.*, 1994 . The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an alpha beta hydrolyase fold [J] . *Natural Structural Biology*, 1 (8): 532
- Heide L, Westrich L, Anderle C *et al.*, 2008 . Use of a halogenase of hormaomycin biosynthesis for formation of new clorobiocin analogues with 5-chloropyrrole moieties [J] . *ChemBiochem*, 9 (12): 1992
- H lzer M, Burd W, Reig HU *et al.*, 2001 . Substrate specificity and regioselectivity of tryptophan 7-halogenase from *Pseudomonas fluorescens* BL915 [J] . *Advanced Synthesis and Catalysis*, 343: 591
- Isupov MN, Dalby AR, Brindley AA *et al.*, 2000 . Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis* [J] . *Journal of Molecular Biology*, 299 (4): 1035
- Kambe K, Naganawa H, Nakamura KT *et al.*, 1993 . Thienodolin, a new plant growth-regulating substance produced by a Streptomyces strain . II: Structure of thienodolin [J] . *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57 (4): 636
- Keller S, Wage T, Hohaus K *et al.*, 2000 . Purification and partial characterization of tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens* [J] . *Angewandte Chemie International Edition*, 39 (13): 2300
- Krebs C, Galonic FD, Walsh CT *et al.*, 2007 . Non-heme Fe (IV)-oxo intermediates [J] . *Accounts of Chemical Research*, 40 (7): 484
- Lambeir AM, Dunford HB, 1983 . A steady state kinetic analysis of the reaction of chloroperoxidase with peracetic acid, chloride, and 2-chlorodimedone [J] . *Journal of Biological Chemistry*, 258 (22): 13558
- Marumo S, Hattori H, Abe H *et al.*, 1968 . Isolation of 4-chloroindolyl-3-acetic acid from immature seeds of *Pisum sativum* [J] . *Nature*, 219 (5157): 959
- McNally KJ, Harper DB, 1991 . Methylation of phenols by chloromethane in the fungus *Phellinus pomaceus* [J] . *Journal of General Microbiology*, 137: 1029
- Messerschmidt A, Wever R, 1996 . X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* [J] . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1): 392
- Morris DR, Hager LP, 1966 . Chloroperoxidase . I . Isolation and properties of the crystalline glycoprotein [J] . *Journal of Biological Chemistry*, 241 (8): 1763
- Morrison M, Schonbaum GR, 1976 . Peroxidase-catalyzed halogenation [J] . *Annual Review of Biochemistry*, 45: 861
- Muffler K, Retzlaff M, van Pee KH *et al.*, 2007 . Optimisation of halogenase enzyme activity by application of a genetic algorithm [J] . *Journal of Biotechnology*, 127 (3): 425
- Nowak-Thompson B, Chaney N, Wing JS *et al.*, 1999 . Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 [J] . *Journal of Bacteriology*, 181 (7): 2166

- Ozaki E, Sakimae A, Numazawa R, 1995 . Nucleotide sequence of the gene for a thermostable esterase from *Pseudomonas putida* MR-2068 [J] . *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59 (7): 1204
- Picard M, Gross J, Lübbert E *et al.*, 1997 . Metal-free bacterial haloperoxidases as unusual hydrolases: activation of H₂O₂ by the formation of peracetic acid [J] . *Angewandte Chemie International Edition*, 36 (11): 1196
- Rai GP, Sakai S, Florez AM *et al.*, 2001 . Directed evolution of chloroperoxidase for improved epoxidation and chlorination catalysis [J] . *Advanced Synthesis and Catalysis*, 343: 638
- Raugei S, Carloni P, 2006 . Structure and function of vanadium haloperoxidases [J] . *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (8): 3747
- Sanada M, Miyano T, Iwadare S *et al.*, 1986 . Biosynthesis of fluorothreonine and fluoroacetic acid by the thienamycin producer, *Streptomyces cattleya* [J] . *Journal of Antibiotics*, 39 (2): 259
- Schaffrath C, Deng H, O Hagan D, 2003 . Isolation and characterisation of 5-fluorodeoxyadenosine synthase, a fluorination enzyme from *Streptomyces cattleya* [J] . *FEBS Letters*, 547 (1-3): 111
- Seibold C, Schnerr H, Rumpf J *et al.*, 2006 . A flavin-dependent tryptophan 6-halogenase and its use in modification of pyrrolnitrin biosynthesis [J] . *Biocatalysis and Biotransformation*, 24: 401
- Shaw PD, Hager LP, 1961 . Biological chlorination vi . chloroperoxidase: a component of the -keto adipate chlorinase system [J] . *Journal of Biological Chemistry*, 236: 1626
- Shaw PD, Beckwith JR, Hager LP, 1959 . Biological chlorination . II . The biosynthesis of 5-chlorolevulinic acid [J] . *Journal of Biological Chemistry*, 234: 2560
- Sitachitta N, Rossi J, Roberts MA, 1998 . Biosynthesis of the marine cyanobacterial metabolite barbamide . 1 . origin of the trichloromethyl group [J] . *Journal of the American Chemical Society*, 120 (28): 7131
- Sundaramoorthy M, Turner J, Poulos TL, 1998 . Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies [J] . *Chemistry & Biology*, 5 (9): 461
- Svendsen A, 1994 . Lipases: Their Structure, Biochemistry and Applications [M] . Cambridge: Cambridge Univ . Press
- Vaillancourt FH, Yeh E, Vosburg DA *et al.*, 2005 . Cryptic chlorination by a non-haem iron enzyme during cyclopropyl amino acid biosynthesis [J] . *Nature*, 436 (7054): 1191
- van Pee KH, Unversucht S, 2003 . Biological dehalogenation and halogenation reactions [J] . *Chemosphere*, 52 (2): 299
- van Pee KH, Patallo EP, 2006 . Flavin-dependent halogenases involved in secondary metabolism in bacteria [J] . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70 (6): 631
- Vilter H, 1983 . Peroxidases from Phaeophyceae . Part IV: Fractionation and location of peroxidase enzymes [J] . *Botanica Marina*, 26: 451
- Wang HX, Geng ZL, Zeng Y *et al.*, 2008 . Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction [J] . *Environmental Microbiology*, 10 (10): 2684
- Weyand M, Hecht H, Kiess M *et al.*, 1999 . X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution [J] . *Journal of Molecular Biology*, 293 (3): 595
- Wynands I, van Pee KH, 2004 . A novel halogenase gene from the pentachloropseudilin producer *Actinoplanes* sp . ATCC 33002 and detection of *in vitro* halogenase activity [J] . *FEMS Microbiology Letters*, 237 (2): 363
- Yeh E, Garneau S, Walsh CT, 2005 . Robust *in vitro* activity of RebF and RebH, a two-component reductase halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis [J] . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (11): 3960
- Yeh E, Blasiak LC, Koglin A *et al.*, 2007 . Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases [J] . *Biochemistry*, 46 (5): 1284
- Zhang HP, Kamano Y, Kizu H *et al.*, 1994 . Convolutamines A-E, novel -phenylethylamine alkaloids from marine bryozoan *Amathia convolute* [J] . *Chemistry Letters*, 23: 2271
- Zehner S, Bister B, Sussmuth RD *et al.*, 2005 . A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005 [J] . *Chemistry & Biology*, 12 (4): 445