



塞克肽类(Sactipeptide)天然产物的研究进展*

陈允亮¹⁾ 李国权²⁾ 杨云鹏³⁾ 贾卫东¹⁾ 施爱平^{1)**} 张琪^{4)**}⁽¹⁾ 江苏大学农业装备工程学院, 镇江 212013; ⁽²⁾ 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013;⁽³⁾ 中国科学院神经科学研究所实验动物平台, 上海 200031; ⁽⁴⁾ 复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 塞克肽是一类重要的核糖体肽天然产物, 具有多种生物活性, 它们的共同特征是存在由半胱氨酸硫基与受体氨基酸的 α -碳原子连接的分子内硫醚键. 本篇综述总结了近年来塞克肽的发现、活性、生物合成、作用机制等多方面的工作, 详细讨论了由SAM自由基酶介导的硫醚键形成机制.

关键词 塞克肽, 核糖体肽, 硫醚键, SAM自由基酶

中图分类号 Q5, Q7, Q93, O62

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0069

核糖体肽 (ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides, RiPPs) 天然产物是近十几年来发现的一大类多肽天然产物. 这类天然产物广泛地分布于自然界中, 具有极为丰富的化学结构和生物活性多样性^[1-3]. 尽管RiPPs具有丰富多样的结构特征, 该类天然产物遵循普遍的生物合成逻辑 (图1), 即由基因翻译出含有N端前导肽和C端核心肽的前体肽 (precursor peptide), 经过一系列修饰、转运、切割等步骤形成具有成熟活性的肽类天然产物. 塞克肽 (sactipeptide, sulfur-to- α carbon thioether crosslinked peptides) 是近10多年来新发现的一类RiPPs^[1]. 其中具有抗菌活性的塞克肽被称为Sactibiotic (sulphur to α carbon antibiotic)^[4]. 与传统的羊毛硫肽类化合物类似^[5-7], 塞克肽也含有由Cys残基和另一氨基酸残基相连的分子内硫醚键. 然而与羊毛硫肽的S-C β 键不同, 塞克肽中来源于Cys的硫原子连接在另一氨基酸残基的 α -碳原上 (图2)^[1, 8]. 此结构在天然产物中非常罕见, 并且目前还没有有效的化学手段进行合成. 目前尽管已知的塞克肽数目不多, 研究表明这类化合物具有多种生理活性^[9-13]. 本文就塞克肽类天然产物的发现、分布、生物活性、结构鉴定、合成机制、应用前景等方面进行综述.

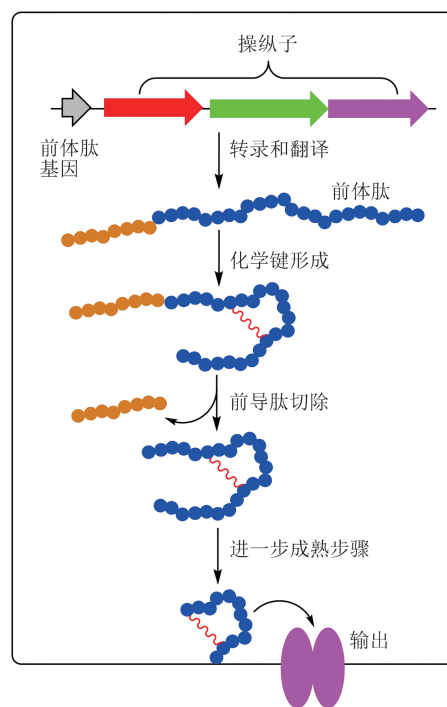


Fig. 1 Biosynthetic pathway of RiPPs
图1 核糖体肽类天然产物的生物合成途径

* 国家自然科学基金(31400083、21822703)、镇江市重点研发计划(NY2018015)、丹徒区重点研发计划(NY2017001)资助项目.

** 通讯联系人.

施爱平. Tel: 15952866677, E-mail: shap@ujs.edu.cn

张琪. Tel: 13916164327 E-mail: qizhang@sioc.ac.cn

收稿日期: 2020-03-14, 接受日期: 2020-05-15

1 塞克肽的发现和分布

Subtilosin A 来源于 *Bacillus subtilis* 168, 于 1985 年被发现, 是第一个被发现的塞克肽^[14], 而在此 18 年后 Subtilosin A 分子内 3 组硫醚桥键的特殊化学结构才通过核磁共振波谱法得到确定^[9, 15]. 此后的 10 多年时间里, 另外的 4 种塞克肽陆续被发现与鉴定. 这些塞克肽均来自于好氧菌芽孢杆菌属, 分别是产孢杀伤因子 (sporulation killing factor, SKF)^[13]、thurincin H^[12, 16] 和 thuricin CD (一类双组分塞克肽)^[11, 17] (图 2, 3). 近年来, 随着生物信息学分析手段和基因组测序技术的进步, 越来越多的塞克肽类天然产物被发

现并鉴定. 2014 年, Christian Hertweck 研究组借助 anti-SMASH^[18-19]、BAGEL3^[20]、BLAST 等生物信息学分析软件对已知基因组序列的厌氧菌进行 RiPPs 基因组挖掘 (genome mining), 结果显示在 211 株厌氧菌中发现 59 株 (占比 28%) 含有 RiPPs 基因簇. 进一步对上述 59 株菌中的 81 个 RiPPs 基因簇进行分析, 发现其中包含 16 个塞克肽类基因簇, 其中除变形菌门 (Proteobacteria) 和热袍菌门 (Thermotogae) 各有 1 个塞克肽类产生菌, 其余 14 个塞克肽均分布于厚壁菌门 (Firmicutes), 而厚壁菌门中的 14 个塞克肽类有 8 个分布于梭菌属 (*Clostridium*)^[21]. 这些研究结果表明, 塞克肽类主要分布与厚壁菌门的好氧菌芽孢杆菌和厌氧菌梭菌两个种属.

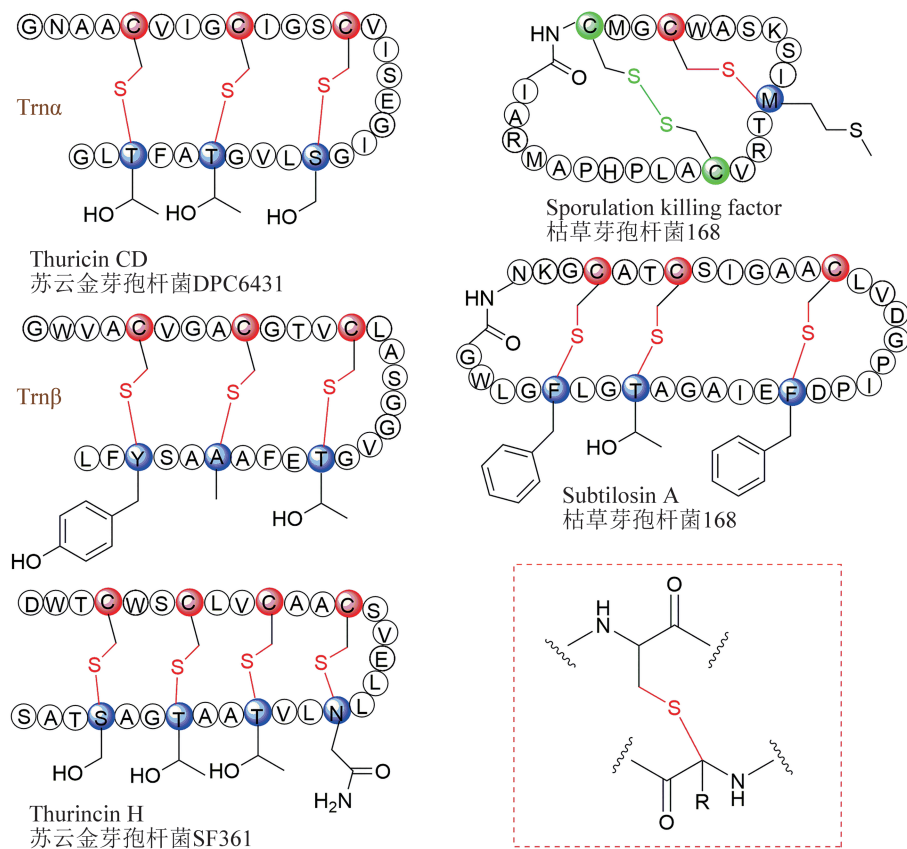


Fig. 2 Schematic representation of sactipeptides
图2 塞克肽的结构及关键分子特征

2015 年, Azevedo 等^[22] 对 224 株瘤胃细菌 (ruminal bacteria) 及 5 株瘤胃古菌 (ruminal archaea) 进行了细菌素 (bacteriocin, 是某些细菌在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一类具有抑菌活性的多肽或前体多肽) 生物合成基因簇分布

及多样性的基因组探矿研究, 通过初步的生物信息学分析, 在这 229 株瘤胃微生物中, 有 51 株瘤胃微生物基因组包含潜在塞克肽类基因簇 68 个. 以基因组上邻近前体肽 20 kb 区域内包含 ABC 转运子和 SAM 自由基蛋白 (radical S-adenosylmethionine

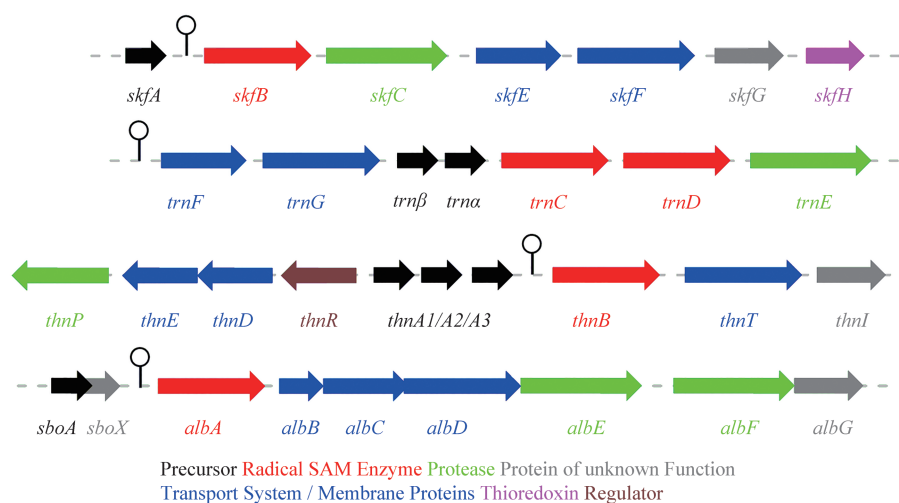


Fig. 3 The biosynthetic gene clusters of the early-discovered sactipeptides

图3 早期发现的塞克肽的生物合成基因簇. 发夹符号表示mRNA水平上的茎环结构

protein, rSAM) 为选择标记, 进一步分析表明不同细菌基因组中含有 11 个塞克肽类基因簇, 基因簇大小从 5.1 kb (*Butyrivibrio hungatei* XBD2006) 到 10.1 kb (*Peptostreptococcus anaerobius* C) 不等. 同年, Walsh 等^[23] 基于人类微生物组计划基因组数据对人类胃肠道中的细菌素基因簇进行鉴定,

在厚壁菌门、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、梭杆菌门 (Fusobacteria) 和互养菌门 (Synergistetes) 的 59 个独特成员中鉴定到 74 个细菌素基因簇 (图 4), 其中就包含了 7 个塞克肽基因簇. 以上研究进一步揭示了塞克肽类在不同微生物种属间广泛分布.

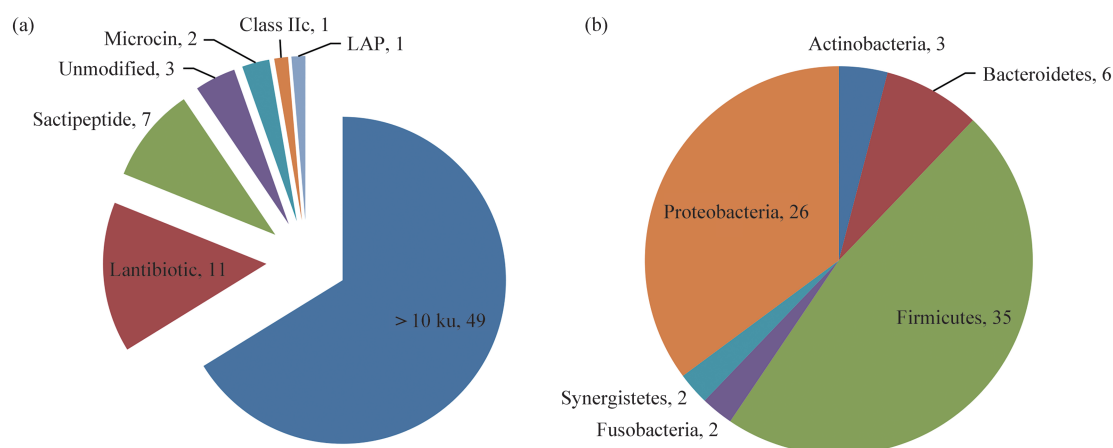


Fig. 4 (a) Frequency of bacteriocin class and (b) producing phylum among the 74 PBGCs identified by Walsh *et al.*^[23] in 2015

图4 2015年Walsh等^[23]鉴定到的74个RiPP生物合成基因簇. 不同类别出现频率 (a) 及其产生菌所属门类分布 (b)

2016 年, Zhao 等^[24] 对芽孢杆菌目 (Bacillales) 的 57 个物种合计 328 株已测序菌株进行潜在抗菌化合物基因组挖掘分析, 发现在芽孢杆菌目的 15 个物种合计 187 株菌基因组中存在 87 个可能的塞克肽基因簇, 其中多数属于 3 类已报道的

塞克肽: 即来源于 *B. subtilis*、*B. atrophaeus*、*B. Simthii* 和 *Bacillus sp.* 菌株的 subtilosin A, 来源于 *B. atrophaeus*、*B. pumilus* 和 *B. subtilis* 菌株的 SKF, 以及来源于 *B. Thuringiensis* 和 *B. Cereus* 的 thuricins, 如 thuricin H 和 thuricin CD^[9, 11, 16, 25-26].

此外, 在 *Bacillus clausii*、*Geobacillus stearothermophilus*、*Brevibacillus laterosporus*、*Paenibacillus larvae*、*Paenibacillus odorifer*、*Paenibacillus graminis*、*Paenibacillus riograndensis* 和 *Paenibacillus sp.* 的基因组中发现数个可能的塞克肽基因簇, 这些基因簇与已报道的塞克肽具有有限的同源性, 需要进行进一步实验验证。

2017年, Carson等^[27]对来源于牛奶的26个物种合计441株非金黄色葡萄球菌 (*non-aureus staphylococci*, NAS) 进行了细菌素基因组挖掘分析, 并对其进行抗奶牛金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 活性测试, 具有抗菌活性的菌株则进一步进行抗人耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*methicillin-resistant S. aureus*, MRSA) 活性测试。在受试的22株头皮葡萄球菌 (*S. capitis*) 中, 有一株菌仅含有1个塞克肽类细菌素, 却同时具有抗 *S. aureus* 和抗 MRSA 的活性。2019年 De Montijo-Prieto等^[28]对分离自开菲尔 (Kefir, 一种酒精性发酵乳饮料) 的植物乳杆菌 C4 (*Lactobacillus plantarum* C4) 进行全基因组测序, 分析其基因组中也含有塞克肽基因簇。2019年, Fagundes等^[29]对羊毛硫抗生素 (lantibiotic) Agneticin 3682 的产生菌阿涅蒂斯葡萄球菌 3682 (*S. agnetis* 3682) 进行全基因组测序并分析了其细菌素基因簇, 发现除了 Agneticin 3682 的基因簇外, 基因组中还含有1个塞克肽基因簇, 与葡萄球菌中第一个描述的塞克肽 Hyicin 4244 具有相似性^[30]。

2 塞克肽天然产物的生理功能和生物活性

除了产孢杀伤因子 SKF, 多数塞克肽类天然产物在其产生菌中的生理功能仍然未知。SKF 由 *B. subtilis* 168 *skf* 操纵子 (operon) 产生, 在 *B. subtilis* 168 产孢子过程中起关键作用。当 *B. subtilis* 种群开始经历营养缺乏时, 调控蛋白 Spo0A 激活 *skf* 和 *sdp* 操纵子表达, 分别产生产孢杀伤因子 SKF 和产孢延迟蛋白 SDP (sporulation delay protein)。化合物 SKF 和 SDP 被外排至胞外, 种群中那些 Spo0A 蛋白失活的细胞则开始裂解。这一行为给那些具备活化 Spo0A 的 *B. Subtilis* 亚种群释放额外的营养, 使其延迟产孢进程^[13, 31-32]。

由 *B. thuringiensis* DPC 6431 产生的 thuricin CD 对病原菌艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 表现出窄谱抗菌活性^[11, 33-34]。进一步的研究表明: thuricin CD 可结合到细菌的细胞膜, 造成细胞膜电

位破坏, 并且这种情况即使在膜电位复极化的条件下也无法逆转。此外, thuricin CD 对细胞膜的去极化效应还伴随细菌细胞的尺寸和粒径, 以及菌体细胞生理形态发生变化, 因此推测 thuricin CD 的裂解活性是由于 thuricin CD 多肽插入靶细菌细胞膜形成孔道, 导致细胞膜通透、胞内离子流出细胞膜, 而引起细胞膜去极化而引起菌体死亡^[35]。2019年, Mo等^[36]研究证明: 由 *B. thuringiensis* serovar huazhongensis 产生的塞克肽 Thuricin Z 也表现出窄谱抗菌活性, 该化合物同样通过作用于细胞膜, 引起靶细菌细胞膜通透性改变引起菌体死亡。

Subtilisin A 是由 *B. subtilis* 168 产生, 表现出广谱的抗革兰氏阳性和革兰氏阴性菌活性, 包括厌氧菌和好氧菌^[37], subtilisin A 的 T6I 突变体还显示出溶血活性^[10]。推测 subtilisin A 抗菌活性源于作用并干扰磷脂双分子层 (如细胞膜) 的正常功能^[38]。此外, subtilisin A 还展示出杀精子活性^[39-40]。

Thurincin H 是一类由 *B. thuringiensis* SF361 产生的塞克肽, 对芽孢杆菌 (*Bacillus spp.*)、微球菌 (*Micrococcus spp.*)、李斯特菌 (*Listeria spp.*) 如单核细胞增多性李斯特氏菌 (*L. monocytogenes*) 等物种具有很强的抗菌活性, *L. monocytogenes* 是人类李斯特菌病的主要致病菌^[12, 16, 41]。同时, thurincin H 可作为一种食品防腐剂, 用于食品源革兰氏阳性病原菌防治^[16, 42]。与其他几类塞克肽如 subtilisin A 和 thuricin CD 作用于细胞的机制不同, Wang等^[43]2014年的研究证实 thurincin H 引起靶细菌的形态改变, 并非通过影响细胞膜的通透性改变来实现。

2019年, 法国巴黎萨克雷大学 Alhosna Benjdia 研究组报道了由人肠道共生菌活泼瘤胃球菌 (*Ruminococcus gnavus*) 产生的塞克肽 RumC 同时具有抗革兰氏阳性菌 (产气荚膜梭菌 *E. Faecalis* 和 *B. subtilis*) 和革兰氏阴性菌 *E. coli* 活性, 推测其抗菌活性作用靶点并非细胞包膜^[44]。同年, 来自法国的格勒诺布尔大学 Victor Duarte 研究组也报道了 RumC 这一分子, 他们的研究表明 RumC 具有较为广谱的抗菌活性, 对多种致病菌和多重耐药菌都具有很好的抑制效果, 进一步形态学研究显示, RumC 的作用机制类似于甲硝哒唑 (metronidazole)。甲硝哒唑是一类抑制核酸合成的抗生素, 虽然其影响核酸合成的具体机制目前还不清楚。推测 RumC 很可能也是通过影响细菌的核酸合成而发挥其抗菌活性^[45-46]。

3 塞克肽类天然产物的结构鉴定、生物合成及酶催化机制

和一般 RiPPs 天然产物合成类似, 塞克肽类生物合成过程中一般先由塞克肽合成酶 (sactionine synthase) 通过识别 N 端前导肽 (leader peptide) 序列来结合相应前体肽, 然后对 C 端核心肽进行翻译后修饰, 形成 S-C α 硫醚键. 此后前导肽序列会被移除, 通常还会伴随一些其他的酶促后修饰反应产生最终成熟的塞克肽. 塞克肽生物合成基因簇中除了前体肽和修饰酶基因外, 一般还会有蛋白酶、膜蛋白/转运系统、调控因子、硫氧还蛋白等辅助基因. 基于每个塞克肽基因簇中至少编码一个 SAM 自由基 (rSAM) 酶负责催化形成硫醚键. rSAM 负责硫醚键形成最早在 subtilisin A 和 SKF 的体外研究中得到证实^[46-47]. rSAM 酶的一个基本特征是还原性断裂 S-adenosylmethionine (SAM) 生成甲硫氨酸和 5'-脱氧腺苷自由基 (5'-deoxyadenosyl (5'-dA) radical) (图 5a)^[48-50]. 产生的 5'-dA 自由基通过掘氢反应进而引发种类多样的酶催化反应^[48, 51-54]. rSAM 酶通常含有一个 CXXXCXXC 特征基序 (motif) 参与结合一个 [4Fe-4S] 簇 (cluster)^[48-49]. 3 个 Cys 残基与 [4Fe-4S] 簇中的 3 个 Fe 原子配位. 剩余单独的 Fe 原子与 SAM 配位, 并对其还原性断裂^[55].

3.1 Subtilisin A

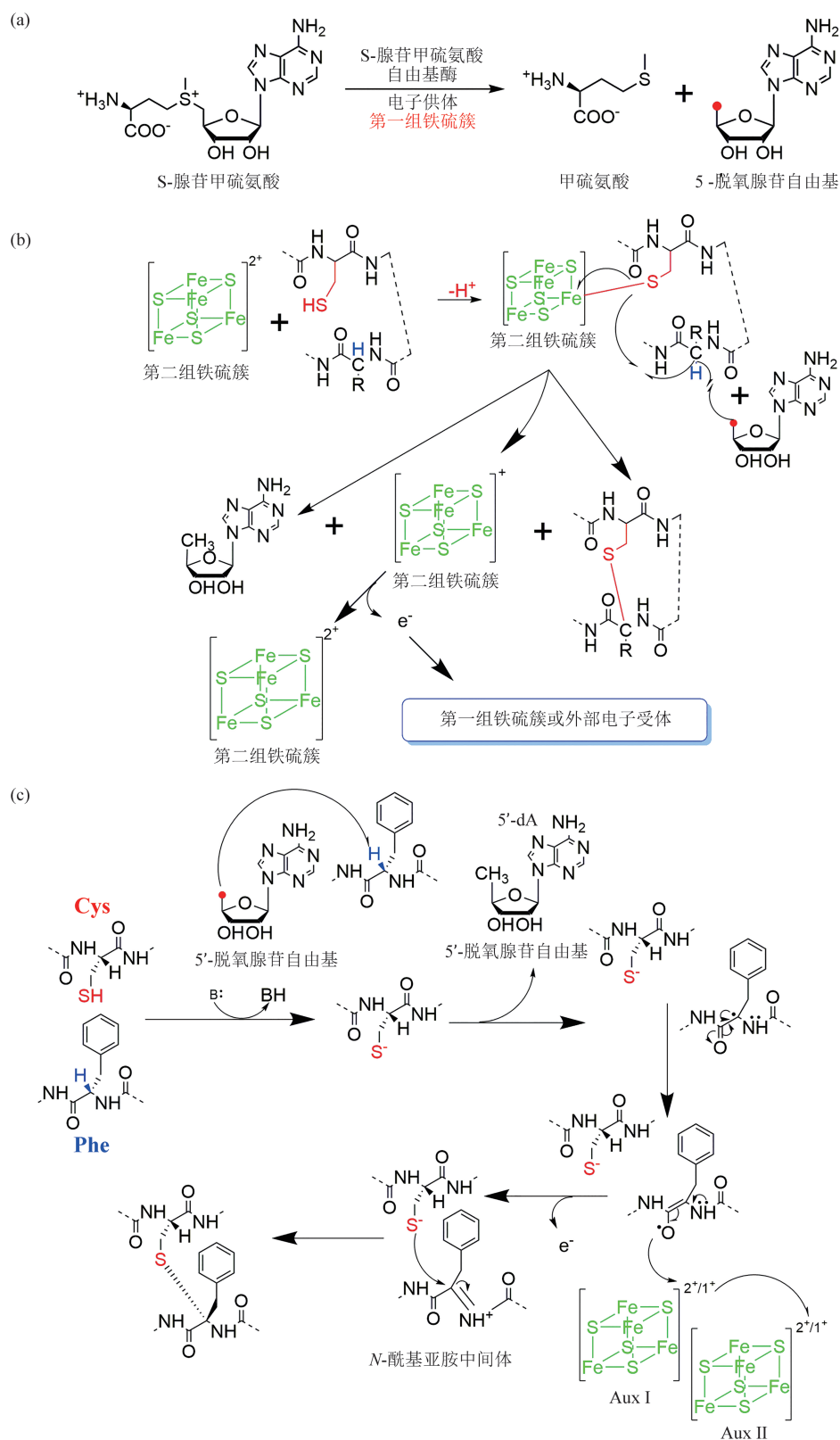
Subtilisin A 是由 *B. subtilis* 168 的 *sbo-alb* 基因簇编码产生的 35 氨基酸头尾相连的大环肽 (图 2, 3)^[46]. 体外研究表明 rSAM 酶 AlbA 包含两个 [4Fe-4S] 簇, 并催化线性前体肽 SboA 形成分子内硫醚键, 且该反应发生依赖于前导肽^[47]. 生化、突变和生物物理实验表明 [4Fe-4S] 簇对于 AlbA 的生物活性都是至关重要的. 当参与第一个 [4Fe-4S] 簇的配位特征性基序 "CXXXCXXC" 中的半胱氨酸 (Cys129、Cys133 和 Cys136) 被突变成丙氨酸时, 该突变体将不能催化 SAM 裂解为甲硫氨酸和 5'-dA. 第二个 [4Fe-4S] 簇位于 SPASM (subtilisin A/pyrroloquinoline quinone/anaerobic sulfatase/mycofactocin maturation enzymes) 结构域内^[56], 由 Cys408、Cys414 和 Cys417 参与配位形成. 当参与第二个 [4Fe-4S] 簇的半胱氨酸发生突变时, 该突变体仍能催化裂解 SAM, 但却不能催化硫醚键形成. 体内实验分析了另外 10 个前体肽 SboA 的突变体, 包括 3 个供体半胱氨酸分别突

变为丙氨酸 (C4A、C7A、C13A)、3 个受体氨基酸分别突变为丙氨酸 (F22A、T28A、F31A)、受体位的 F31Y 保守突变和 3 个供体半胱氨酸分别突变为丝氨酸 (C4S、C7S、C13S). 通过这些突变体探索 SAM 自由基酶 AlbA 在硫醚键形成过程中对供体 (C4S、C7S、C13S) 和受体 (F22A、T28A、F31A、F31Y) 氨基酸的容忍性和区域选择性. 结果表明, 只有 SboA 的 F31Y 突变体能够形成和野生型 subtilisin A 类似的含有 3 组分子内硫醚键. 供体位半胱氨酸突变成丙氨酸和丝氨酸均不能被催化形成 subtilisin A 的衍生物. 此外, 硫醚键形成似乎对于受体氨基酸具有选择性, 当将底物受体氨基酸分别突变成丙氨酸 (F22A、T28A 和 F31A) 时, 则无法被催化形成成熟的 subtilisin A 类似物. AlbA 仅能容忍底物保守突变如 F31Y, 表明修饰酶对受体位点结构相似氨基酸具有有限的容忍性.

AlbA 催化 SboA 形成硫醚键的一种可能机制如图 5a, b^[47, 57-58]. 前体肽中参与形成硫醚键的 Cys 的巯基与第二个 [4Fe-4S] 簇的配位. 由第一个 [4Fe-4S] 簇产生的 5'-dA 自由基在受体氨基酸的 α -碳原子上掘取 1 个氢原子产生 1 个 α -碳自由基, 该自由基攻击与 [4Fe-4S] 簇配位的硫原子生成 C-S 键. 被单电子还原第二个 [4Fe-4S] 簇可转移 1 个电子至第一个 [4Fe-4S] 簇或外部电子受体实现活化 (图 5a, b).

3.2 SKF (sporulation killing factor)

SKF 含有 26 氨基酸残基 (图 2), 在宿主孢子形成过程中起着至关重要的作用^[13, 31]. SKF 包含连接 Cys4 和 Met12 的硫醚键, Cys1 和 Cys16 之间的二硫键以及头尾相连的酰胺键. *skf* 基因簇负责 SKF 的生物合成, 由前体肽基因 *skfA*、修饰酶基因 *skfB* (rSAM 酶)、*skfC* (推测蛋白酶)、*skfH* (推测硫氧还蛋白) 和 *skfE/skfF* (转运/免疫蛋白) 组成, *skfG* 的功能未知^[31]. 与 AlbA 相似, SkfB 是具有 2 个 [4Fe-4S] 簇的 rSAM 酶, 负责形成分子内硫醚键^[46]. 突变和生化研究表明, 底物 SkfA 中供体和受体氨基酸的位置在 SkfB 催化的反应中起着重要作用. 对于受体位氨基酸 Met12 进行相应突变表明疏水氨基酸最被容忍, 亲水氨基酸的耐受性中等或完全不耐受. 与 AlbA 一样, SkfB 对底物 SkfA 的前导肽也具有依赖性^[46]. Bruender 等^[59] 研究证实 SkfB 利用裂解 SAM 产生的 5'-dA 自由基掘取了底物 SkfA 受体氨基酸 α -碳原子上的氢原子, 催化机制与 AlbA 类似 (图 5a, b). Benjdia 等^[60] 推测



AlbA 可能含有三个 [4Fe-4S] 簇, 即一个催化 SAM 断裂的 [4Fe-4S] 簇和两个辅助 [4Fe-4S] 簇 (Aux I) 和 (Aux II). AlbA 直接催化掘取受体氨基酸 α -碳原子上的氢原子, 并推测了一种新的硫醚键形成机制, 即认为通过供体 Cys 的硫醇与受体氨基酸的酮亚胺 (ketoimine) 中间体发成亲核加成而形成 (图 5c)^[61-63]. 目前, 精确的硫醚键形成机制还不完全清楚, 有待于进一步实验证实.

3.3 Thurincin H

2009 年, Lee 等^[16] 研究表明 thurincin H 是由蜂蜜中分离到的 *B. thuringiensis* SF361 产生, 具有很强抑制 *B. cereus* F4552 的活性, 实验测得 thurincin H 的分子质量为 3.14 ku. Thurincin H 生物合成基因簇因簇由 10 个 ORF 组成, 包含了 3 个串联重复结构基因 *thnA1*、*thnA2* 和 *thnA3*, 后者序列完全一致. 2011 年 John C. Vederas 研究组^[12] 运用质谱和核磁共振波谱法解析了 thurincin H 结构, 证实 thurincin H 分子内部含有 4 组硫醚键, 分别为 Cys4-Ser28、Cys7-Thr25、Cys10-Thr22、Cys13-Asn19, 并进一步证实参与形成硫醚键的受体氨基酸 Asn19、Thr22、Thr25 和 Ser28 均为 D-构型. 2016 年, Mozolewska 等^[64] 通过计算与模拟, 认为 thurincin H 分子内的 4 组硫醚键对 thurincin H 的正确折叠很重要, 而第 4 组硫醚键 (Cys13-Asn19) 的形成似乎对 thurincin H 的正确折叠似乎没多大帮助, 其作用可能在于稳定环装结构并阻止蛋白质水解.

2015 年, Wieckowski 等^[65] 对 thurincin H 分子中硫醚键的形成机制进行了研究, 与 AlbA、SkfB 类似, rSAM 酶 ThnB 可以结合 2 个 [4Fe-4S] 簇, N 端的 [4Fe-4S] 簇具备催化 SAM 断裂活性, C 端的 [4Fe-4S] 簇对硫醚键的形成起关键作用, 而由 ThnB 蛋白 N 端的 89 氨基酸残基构成的 PqqD-like 功能域在硫醚键形成过程中也是必须的. 尽管此 PqqD-like 功能域中不含任何催化性氨基酸 (如铁硫簇氨基酸), 其在前体肽和自身活性催化中心正确识别、结合过程中可能扮演重要的作用.

3.4 Thurincin CD

Thurincin CD 是一种双组份抗菌剂, 对人类致病菌 *C. difficile* 具有纳摩尔级别的抗菌活性. 2010 年, Rea 等^[11] 最早报道 thurincin CD 是由人类粪便中分离到的 *B. thuringiensis* DPC 6431 产生, 为两个不同的多肽 Trn- α 和 Trn- β , 两者协同作用, 能够杀死临床上分离的多种 *C. difficile*. 通过串联质谱分

析, 这 2 个多肽分别在 21 位、25 位和 28 位氨基酸残基上发生了翻译后修饰. 进一步的核磁共振研究证实 Trn- α 中 Ser21-Cys13、Thr25-Cys9、Thr28-Cys5 之间形成了 3 组硫醚键; Trn- β 中 Thr21-Cys13、Ala25-Cys9、Tyr28-Cys5 之间形成了 3 组硫醚键. 在此基础上, 2011 年, John C. Vederas 研究组基于核磁共振数据, 通过结构计算最终确定参与硫醚键形成 Trn- α 中 Ser21 (α -R)、Thr25 (α -R)、Thr28 (α -S) 和 Trn- β 中 Thr21 (α -R)、Ala25 (α -R)、Tyr28 (α -S) 的氨基酸残基均为 LLD 构型异构体^[17].

3.5 RumC

Ruminococcus gnavus 是栖息于人类消化道内的共生菌, 能够和其他一些细菌一起降解宿主的黏蛋白和聚糖^[66]. Ruminococcin C (RumC) 是由 *R. Gnavus* 产生的一种新型塞克肽, 也是首例从人类微生物组中发现的塞克肽^[44]. RumC 的生物合成基因簇包含一组复杂的基因重复和重排现象^[67] (图 6a). 值得注意的是基因簇里包括 5 个前体肽基因 C1~C5, 长度为 63 个氨基酸, 这些多肽之间的序列相似性为 70%~87%, 4 个严格保守的 Cys 残基及高度保守的 C 端区域 (图 6b). MC1 和 MC2 是基因簇中两个修饰酶, 两者之间的相似性 >95%, 并且都含有属于 SPASM-功能域 rSAM 家族成员的保守 Cys 基序, 即 CX3CX2C 和 CX13GX4CX36CX2CX5CX2CX18C. 由于在宿主菌 *R. Gnavus* 中 *c1* 和 *c2* 基因表达水平显著, 研究者选择前体肽 C1 和 C2 作为研究对象, 在异源表达体系里结合共表达 rSAM 酶 MC1 和 MC2 实验. 研究显示, 在 *E. coli* 异源表达体系里, 单独表达纯化的前体肽 C1 和 C2 比计算的分子质量减少 4 u, 提示分子内 4 个 Cys 形成了 2 组二硫键. 将 C1 与 MC1、C2 与 MC2 进行共表达, 获得纯度很高的 2 个新的多肽, 分别命名为 C1_{MC1} 和 C2_{MC2}, 通过质谱检测发现 C1_{MC1} 和 C2_{MC2} 的分子质量都比相应的线性多肽减少了 8 u, 暗示在其分子内分别形成了 4 组硫醚键. 随后研究者进一步通过串联质谱对 C1_{MC1} 和 C2_{MC2} 进行分析, 分别鉴定到 C1_{MC1} 修饰残基位点为 Ala31、Asn35、Arg53、Lys61; C2_{MC2} 修饰残基位点为 Glu31、Asn35、Arg53、Arg61. 在异源共表达体系里, 很奇怪的是 C2_{MC2} 事实上生成量很少, 而共表达体系里 C1 则能被 MC1 完全修饰. 考虑到两个前体肽、两个修饰酶之间分别具有很高的序列相似性, 因此研究者对两组前体肽和修饰酶进行了交叉共表达实验, 即 C1

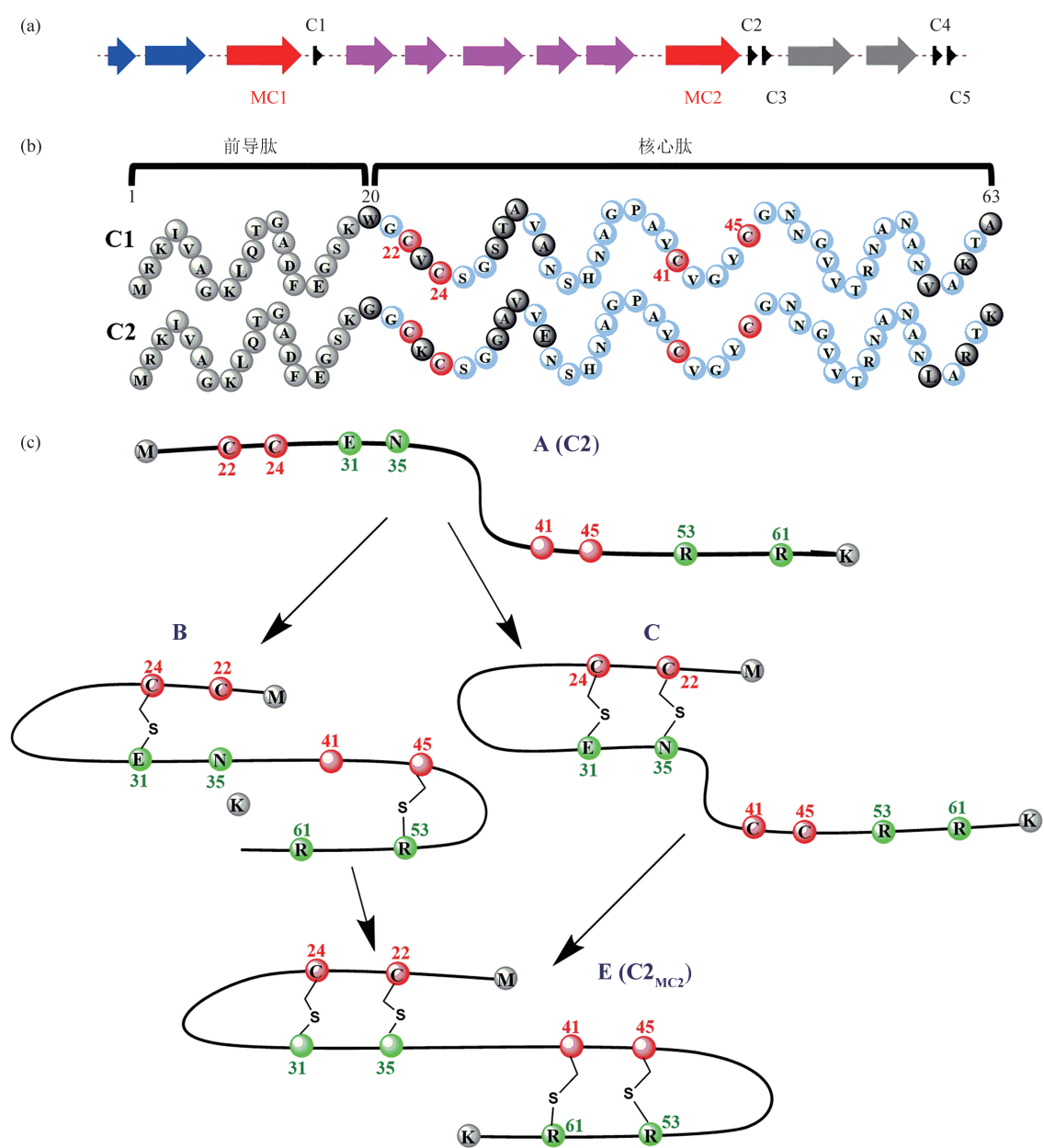


Fig. 6 Expression of the C1/C2 peptide alone or with the radical SAM enzyme MC1/MC2 (C1MC1/ C2MC2) in *E. coli*

图6 在大肠杆菌体内单独表达或与rSAM酶MC1/MC2共表达C1/C2前体肽 (C1MC1/C2MC2)

(a) RumC生物合成基因簇. 黑色, *c1-c5*, 前体肽基因; 红色, *mc1*和*mc2*, 后修饰rSAM酶; 紫色, 推测为免疫相关基因; 蓝色和灰色, 外排蛋白. (b) C1和C2多肽序列. 灰色为推测的前导肽氨基酸残基序列. 核心序列中淡蓝色为保守氨基酸残基, 黑色为非保守氨基酸残基. 红色为四个保守Cys残基. 数字表示在序列中相对位置. (c) 推测的RumC2中硫醚桥键形成顺序. 起始于前体肽A, 第一组硫醚桥键 (也就是Cys24-Glu31和lys45-Arg53) 被安装在每个发夹结构域 (中间体B). 随后形成第二组硫醚桥键, Cys22-Asn35 (中间体C) 和Cys41-Arg61, 助力产生具有两个发夹结构域的成熟多肽C2MC2 (物种E).

和MC2、C2与MC1在*E.coli*里进行共表达. 体内实验结果显示MC1无法修饰C2; 而MC2尽管比MC1效率低些, 却能有效地修饰C1. 有意思的是C1_{MC2}和C1_{MC1}具有相同的波谱学特征, 表明两个多肽包含相同的翻译后修饰. 随后研究者以C2的3个

突变体C2_{A22A24}、C2_{A41A45}、C2_{A24}为研究对象, 以rSAM酶MC2对其进行了体外催化实验. 通过系列质谱检测, 确定C2_{MC2}的硫醚键成键位置分别为Cys22-Asn35、Cys24-Glu31、Cys41-Arg61、Cys45-Arg53. 该结果表明, 不同于以往的塞克肽,

RumC2 包含了2个发夹结构, 即 Cys22 和 Cys24 连接到 Glu31 和 Asn35 构成第一个发夹结构, Cys41 和 Cys45 连接到 Arg53 和 Arg61 构成第二个发夹结构 (图 6c). MC2 的 N 端截短 (C_{28-63}) 及其突变体 ($C_{28-63}A41$ 、 $C_{28-63}A45$) 作为反应底物, 催化结果表明在第二个发夹结构中内侧 Cys45-Arg53 的硫醚键形成顺序要早于外侧的 Cys41-Arg61. 进一步的反应动力学测试表明, 前体肽中 N 端区域和 C 端区域硫醚键的形成相对独立, 且硫醚键的形成由 N 端方向至 C 端的方向进行. 通过同位素标记盐酸 (DCI) 的水解实验证实, 4 组参与硫醚键形成的受体氨基酸残基均为 L 构型^[44]. 同年, Victor Duarte 研究组也报道了 RumC 方面的类似研究结果, 稍微不同的是他们综合运用了同位素标记结合核磁共振检测方法鉴定 RumC1 的分子结构, 但两个研究组的结论是一致的^[45].

2019 年, Mo 等^[36] 在 *Bacillus thuringiensis* serovar huazhongensis 中鉴定了新的塞克肽 Thuricin Z, Thuricin Z 的生物合成基因 (*thz* 基因簇) 由 7 个基因构成, 分别是编码 2 拷贝前体肽的基因 *thzA*, 两个编码潜在 rSAM 酶基因 *thzC* 和 *thzD*, *thzE* 和 *thzG* 编码 2 个 ATP 结合盒转运蛋白 (ABC transporters), 和 *thzF* 编码透性酶 (图 7a). 值得注

意的是, *Thz* 基因簇中包含两个前体肽基因和两个 rSAM 合成酶基因, 这和 Thuricin CD 的基因簇很相似 (图 7b), 包含两个 rSAM 合成酶 TrnC 和 TrnD 分别负责催化合成 Trn- α 和 Trn- β ; 但和 Thuricin CD 的基因簇不同的是 *Thz* 基因簇中两个前体肽基因 *thzA* 编码两个完全一致的前体肽 ThzA, 有趣的是两个 rSAM 酶 ThzC 和 ThzD 之间的同源性却很低, 其比对 BlastP E-value 为 $1E-7$ (E 值就是对同源性序列比对值 S 值可靠性的评价. 它表明在随机的情况下, 其他序列与目标序列相似度要大于 S 值的可能性. E 值越低, 同源性分析可靠性越高; E 值越高, 同源性分析可靠性越低). 这一发现也提出一个有意思的问题, 即为何两个关系远离的酶却参与催化同一个前体肽的成熟过程. 随后, 体外实验表明, 在进行 ThzC 和 ThzD 均能以相同的方式独立地催化底物形成硫醚键, 成熟 ThnZ 的 4 组硫醚键成键位置为 Cys16-Asp26、Cys12-Thr30、Cys8-Tyr34、Cys4-His38 (图 7b), 而且 S-C α 硫醚键形成的进行方向为从 N 端到 C 端, 这与上述 RumC 中硫醚键形成顺序类似^[36, 44]. 同年, Hudson 等^[68] 报道从相同宿主菌的培养基提取物中分离到该类塞克肽, 命名为 Huazacin, 其化学结构与 ThnZ 完全一致.

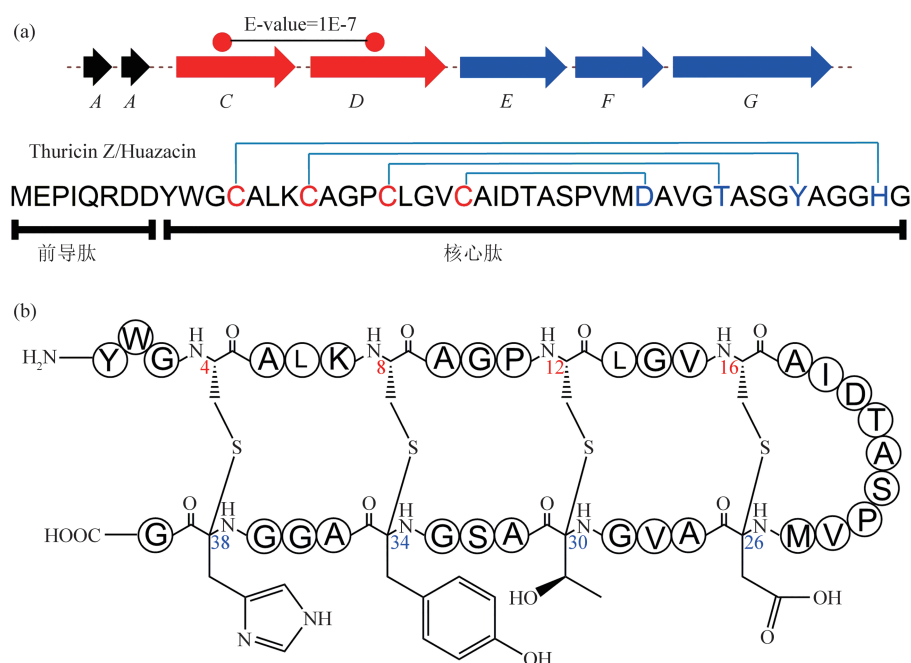


Fig. 7 Biosynthesis and structural characterization of thuricin Z/Huazacin

图7 Thuricin Z/Huazacin的生物合成和分子结构描述

(a) *thz* 基因簇的组织结构. 黑色, *thzA*, 前体肽基因; 红色, *thzC/D*, 后修饰 rSAM 酶; 蓝色, *thzE/F/G*, 转运和外排蛋白. (b) Thuricin Z/Huazacin 的分子结构.

3.6 Ranthipeptide (radical non- α -carbon thioether peptides)、Thermocellin和Freyrasin

Haft 等^[69]通过生物信息学在线搜索 rSAM 酶及其靶向翻译后修饰的前体肽时, 在梭菌属 (*Clostridia*) 中发现有一大类独特的前体肽, 命名为 SCIFF (six cysteines in forty-five residues), 其主要特征为在前体肽的 45 氨基酸残基序列中, 在其保守的 C 端区域平均有 6 个 Cys 残基. Thermocellin 是最早在梭菌中研究报道的 SCIFF 类塞克肽, 2016 年, Vahe Bandarian 研究组^[61]最早报道在 *Caldanaerobacter subterraneus* 的亚种 *tengcongensis* MB4 中克隆到 SCIFF 前体肽 *tte1186a* 及其修饰酶 *tte1186* 基因. 后续体外催化结合质谱鉴定实验表明, rSAM 酶 Tte1186 能够催化前体肽 Tte1186a 在其 Cys32 与 Thr37 之间形成硫醚键. 2017 年, Albert A. Bowers 研究组报道了另一类来自于热纤梭菌 (*C. thermocellum*) 中 Thermocellin, 其前体肽 CteA 与 Tte1186a 在 C 端区域具有很高的序列一致性, rSAM 酶 CteB 对 CteA 体外催化实验结合质谱检测表明, CteA 分子内部形成的硫醚键数目及位置和 Tte1186a 的完全一致^[70]. 然而, 最近 Hudson 等^[68]团队在大肠杆菌体内对 CteB-CteA 进行共表达实验, 其中 CteA 中 Thr 残基的 α 和 β 位均为重氢 (^3H) 同位素标记, γ 位氢原子为未标记的 ^1H , 质谱检测显示, 和原始底物相比, 经修饰后 CteA 的分子质量减少了 2 u, 而不是 3 u, 清楚地表明 CteA 分子内所形成了 Cys-Thr (S-C γ) 硫醚键. 此外, Hudson 等^[68]还发现, 在异源表达体内体系中参与硫醚键形成的氨基酸为 Cys32-Thr34, 与此前报道的结果 Cys32-Thr37 不一致, 由于此前结果来自于体外催化实验, 所以也不能排除这种差异是否归因于体内外不同反应体系.

Hudson 等^[68]还报道了来自于 *Paenibacillus*

polymyxa 中的另一类 SCIFF, 命名为 Freyrasin, 对前体肽 PapA 和 rSAM 酶 PapB (同源于 QhpD, QhpD 在醌血红蛋白氨基脱氢酶翻译后修饰过程中起作用, 参与 Cys-Asp (S-C β) 和 Cys-Glu (S-C γ) 硫醚键形成) 在大肠杆菌体内进行共表达, 结合生物信息学分析、质谱及核磁检测, 最后鉴定 Freyrasin 分子内包含 6 组由 Cys-Asp (S-C β) 硫醚键 (图 8). 至此, 系列实验结果表明 SCIFFs 不属于塞克肽范畴, 取而代之的是硫醚键形成于 Cys 供体与受体氨基酸的 β 或 γ 碳原子. 为了更好地反映其依赖于 rSAM 的生物合成过程及其与羊毛硫肽 (S-C β 硫醚键) 的关联性, Hudson 等^[68]将这一类 RiPP 命名为 Ranthipeptides. 在随后的研究报道中, 他们在体外实验中证实 rSAM 酶 PapB 能够催化 PapA 完全生成 6 组 (S-C β) 硫醚键, 此外, 对前体肽 PapA 中 6 个供体 Cys 和 6 个受体 Asp 进行一系列单一突变, 检测 rSAM 酶 PapB 对底物的容忍性, 结果显示: a. 当将 PapA 中每个 Asp 单独突变为 Ala 时, 相比于野生型, 突变位置的 Ala 不能与相应的 Cys 形成硫醚键, 修饰后前体肽分子内只能形成 5 组 Cys-Asp (S-C β) 硫醚键; b. 当将 PapA 中每个 Asp 单独突变为 Asn 时, 结果与上述情况一致, 综合表明受体的氨基酸侧链羧基可能对修饰酶的识别是必要的; c. 当将 PapA 中每个 Asp 单独突变为 Glu 时, 和野生型一致具有类似的拓扑结构, 修饰后多肽能够完全形成 6 组硫醚键, 分别为 5 组 Cys-Asp (S-C β) 和 1 组 Cys-Glu (S-C γ) 硫醚键, 这也进一步说明形成硫醚键受体氨基酸的羧基结构对于修饰酶的识别是必须的; d. 在天然状况下 rSAM 酶 PapB 识别底物的基序为 Cys-X3-Asp, 当在此基序中增加一个氨基酸残基时 (Cys-X4-Asp), rSAM 酶 PapB 则完全不能催化此基序形成硫醚键, 当减少一个氨基酸残基时 (Cys-X2-Asp), rSAM 酶

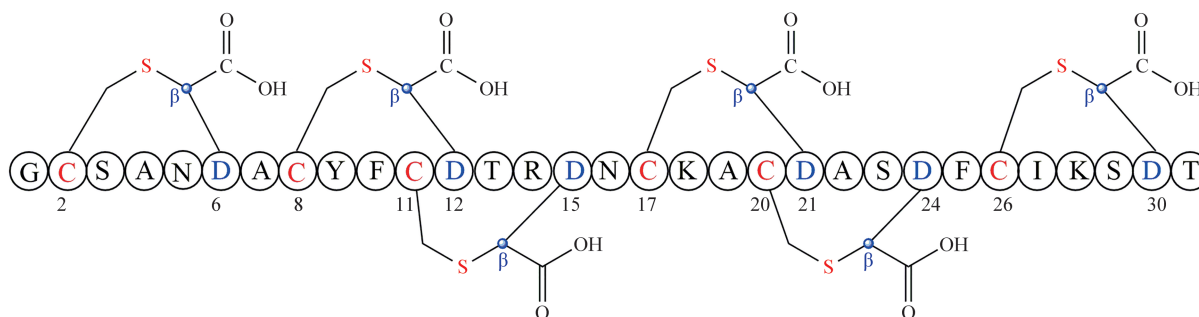


Fig. 8 Structure of Freyrasin

图8 Freyrasin的分子结构

PapB 多数不能催化底物形成硫醚键, 只有极小部分底物形成硫醚键, 由此可见, rSAM 酶 PapB 对催化底物中 Cys-X3-Asp 基序的识别是较为严格的^[71].

4 塞克肽类天然产物的应用前景

最近 20 年来, 生物学家和化学家对塞克肽类 RiPPs 展开了系统深入地研究, 包括结构鉴定、活性测试、合成机制解析等. 作为多肽类大分子, 塞克肽类在生物防治、食品防腐、临床医学等多个方面具有良好的应用前景. 比如, 有些塞克肽对人类致病多重耐药菌具有显著的抑制活性, 又因其抗菌谱专业、对哺乳动物细胞无害、不产生耐药性, 具备开发为新型临床抗菌剂的良好潜质. 中国作为人口大国, 目前食品、调味品等保鲜、防腐基本以化学防腐剂(如苯甲酸钠、山梨酸钾等)为主, 有必要开发一些环保、安全、生物相容性更好的塞克肽类生物防腐剂(如 Thuricin H 分离至蜂蜜, RumC 由人类肠道共生微生物产生)应用于食品工业, 提高食品安全等级. 再比如, 苏云金芽孢杆菌是中国最早应用于农林生物防治的芽孢杆菌活菌. 近年来, 随着国民生活水平整体提高以及人们健康意识增强, 中国农业主管部门大力提倡化肥农药减量使用, 以生物有机肥、活性生物菌剂等逐步替代化肥农药的使用, 优化农业生态环境, 降低农产品农药残留, 不断提高农副产品品质. 作为厚壁菌门的一大类重要组成, 芽孢杆菌种类繁多, 能够产生包括塞克肽在内的多种多样的抗菌肽, 其在功能性(抗菌、防病、除虫等)生物有机肥发酵、生物菌肥创制等方面具备天然的优势. 对于塞克肽类天然产物的进一步开发和研究, 有望在农业、食品、医疗卫生等各个行业得到应用.

参 考 文 献

- [1] Arnison P G, Bibb M J, Bierbaum G, *et al.* Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep*, 2013, **30**(1): 108-160
- [2] McIntosh J A, Donia M S, Schmidt E W. Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. *Nat Prod Rep*, 2009, **26**(4): 537-559
- [3] Cotter P D, Ross R P, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*, 2013, **11**(2): 95-105
- [4] Murphy K, O'sullivan O, Rea M C, *et al.* Genome mining for radical SAM protein determinants reveals multiple sactibiotic-like gene clusters. *Plos One*, 2011, **6**(7): e20852
- [5] Zhang Q, Yu Y, Velasquez J E, *et al.* Evolution of lanthipeptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(45): 18361-18366
- [6] 莫天录, 薛林贵, 张琪. 羊毛硫肽类化合物(Lanthipeptide)生物合成新进展. *微生物学报*, 2016, **56**(3): 373-382
- [7] Mo T L, Xue L G, Zhang Q. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, **56**(3): 373-382
- [7] Repka L M, Chekan J R, Nair S K, *et al.* Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Chem Rev*, 2017, **117**(8): 5457-5520
- [8] Fluhe L, Marahiel M A. Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, **17**(4): 605-612
- [9] Kawulka K, Sprules T, McKay R T, *et al.* Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(16): 4726-4727
- [10] Huang T, Geng H, Miyyapuram V R, *et al.* Isolation of a variant of subtilisin A with hemolytic activity. *J Bacteriol*, 2009, **191**(18): 5690-5696
- [11] Rea M C, Sit C S, Clayton E, *et al.* Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(20): 9352-9357
- [12] Sit C S, Van Belkum M J, McKay R T, *et al.* The 3D solution structure of thurincin H, a bacteriocin with four sulfur to alpha-carbon crosslinks. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, **50**(37): 8718-8721
- [13] Liu W T, Yang Y L, Xu Y, *et al.* Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(37): 16286-16290
- [14] Babasaki K, Takao T, Shimonishi Y, *et al.* Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem*, 1985, **98**(3): 585-603
- [15] Kawulka K E, Sprules T, Diaper C M, *et al.* Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. *Biochemistry*, 2004, **43**(12): 3385-3395
- [16] Lee H, Churey J J, Worobo R W. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, **299**(2): 205-213
- [17] Sit C S, McKay R T, Hill C, *et al.* The 3D structure of thuricin CD, a two-component bacteriocin with cysteine sulfur to alpha-carbon cross-links. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(20): 7680-7683
- [18] Medema M H, Blin K, Cimermanic P, *et al.* antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome

- sequences. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(Web Server issue): W339-346
- [19] Blin K, Medema MH, Kazempour D, *et al.* antiSMASH 2.0 — a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(Web Server issue): W204-212
- [20] Van Heel A J, De Jong A, Montalban-Lopez M, *et al.* BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(Web Server issue): W448-453
- [21] Letzel A C, Pidot S J, Hertweck C. Genome mining for ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) in anaerobic bacteria. *BMC Genomics*, 2014, **15**: 983
- [22] Azevedo A C, Bento C B, Ruiz J C, *et al.* Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. *Appl Environ Microbiol*, 2015, **81**(20): 7290-7304
- [23] Walsh C J, Guinane C M, Hill C, *et al.* In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. *BMC Microbiol*, 2015, **15**: 183
- [24] Zhao X, Kuipers O P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 2016, **17**(1): 882
- [25] Allenby N E, Watts C A, Homuth G, *et al.* Phosphate starvation induces the sporulation killing factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2006, **188**(14): 5299-5303
- [26] Favret M E, Yousten A A. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*, 1989, **53**(2): 206-216
- [27] Carson D A, Barkema H W, Naushad S, *et al.* Bacteriocins of non-aureus *Staphylococci* isolated from bovine milk. *Appl Environ Microbiol*, 2017, **83**(17): e01015-17
- [28] De Montijo-Prieto S, Castro D J, Reina J C, *et al.* Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* C4 (CECT 9567), a potential probiotic strain isolated from kefir. *Arch Microbiol*, 2019, **201**(3): 409-414
- [29] Fagundes P C, Francisco M S, Sousa Santos I N, *et al.* Draft genome sequence of *Staphylococcus agnetis* 3682, the producing strain of the broad-spectrum lantibiotic agneticin 3682. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019, **19**: 50-52
- [30] Duarte A F S, Ceotto-Vigoder H, Barrias E S, *et al.* Hyicin 4244, the first sactibiotic described in staphylococci, exhibits an anti-staphylococcal biofilm activity. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, **51**(3): 349-356
- [31] Gonzalez-Pastor J E, Hobbs E C, Losick R. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 2003, **301**(5632): 510-513
- [32] Engelberg-Kulka H, Hazan R. Microbiology. Cannibals defy starvation and avoid sporulation. *Science*, 2003, **301**(5632): 467-468
- [33] Rea M C, Dobson A, O'sullivan O, *et al.* Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108** Suppl 1: 4639-4644
- [34] Mathur H, Rea M C, Cotter P D, *et al.* The efficacy of thuricin CD, tigecycline, vancomycin, teicoplanin, rifampicin and nitazoxanide, independently and in paired combinations against *Clostridium difficile* biofilms and planktonic cells. *Gut Pathog*, 2016, **8**: 20
- [35] Mathur H, Fallico V, O'connor P M, *et al.* Insights into the mode of action of the sactibiotic thuricin CD. *Front Microbiol*, 2017, **8**: 696
- [36] Mo T, Ji X, Yuan W, *et al.* Thuricin Z: a narrow-spectrum sactibiotic that targets the cell membrane. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(52): 18793-18797
- [37] Shelburne C E, An F Y, Dholpe V, *et al.* The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J Antimicrob Chemother*, 2007, **59**(2): 297-300
- [38] Thennarasu S, Lee D K, Poon A, *et al.* Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. *Chem Phys Lipids*, 2005, **137**(1-2): 38-51
- [39] Sutyak K E, Anderson R A, Dover S E, *et al.* Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilisin. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2008, **2008**: 540758
- [40] Silkin L, Hamza S, Kaufman S, *et al.* Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilisin A. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(10): 3103-3106
- [41] Wang G, Manns D C, Guron G K, *et al.* Short communication: homologous expression of recombinant and native thuricin H in an engineered natural producer. *J Dairy Sci*, 2014, **97**(7): 4120-4126
- [42] Lee H, Churey J J, Worobo R W. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int J Food Microbiol*, 2008, **126**(1-2): 240-244
- [43] Wang G, Feng G, Snyder A B, *et al.* Bactericidal thuricin H causes unique morphological changes in *Bacillus cereus* F4552 without affecting membrane permeability. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, **357**(1): 69-76
- [44] Balty C, Guillot A, Fradale L, *et al.* Ruminococcin C, an anti-clostridial sactipeptide produced by a prominent member of the human microbiota *Ruminococcus gnavus*. *J Biol Chem*, 2019, **294**(40): 14512-14525
- [45] Chiumento S, Roblin C, Kieffer-Jaquinod S, *et al.* Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont. *Sci Adv*, 2019, **5**(9): eaaw9969
- [46] Fluhe L, Burghaus O, Wieckowski B M, *et al.* Two [4Fe-4S] clusters containing radical SAM enzyme SkfB catalyze thioether bond formation during the maturation of the sporulation killing factor. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(3): 959-962
- [47] Fluhe L, Knappe T A, Gattner M J, *et al.* The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nat Chem Biol*, 2012, **8**(4): 350-357
- [48] Frey P A, Hegeman A D, Ruzicka F J. The Radical SAM Superfamily. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2008, **43**(1): 63-88
- [49] Sofia H J, Chen G, Hetzler B G, *et al.* Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization

- using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(5): 1097-1106
- [50] Roach P L. Radicals from S-adenosylmethionine and their application to biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, **15**(2): 267-275
- [51] Atta M, Arragain S, Fontecave M, *et al*. The methylthiolation reaction mediated by the Radical-SAM enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1824**(11): 1223-1230
- [52] Mehta A P, Hanes J W, Abdelwahed S H, *et al*. Catalysis of a new ribose carbon-insertion reaction by the molybdenum cofactor biosynthetic enzyme MoaA. *Biochemistry*, 2013, **52**(7): 1134-1136
- [53] Ding W, Li Q, Jia Y, *et al*. Emerging diversity of the cobalamin-dependent methyltransferases involving radical-based mechanisms. *ChemBiochem*, 2016, **17**(13): 1191-1197
- [54] Ding W, Ji X, Zhong Y, *et al*. Adenylation reactions catalyzed by the radical S-adenosylmethionine superfamily enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, **55**: 86-95
- [55] Nicolet Y, Amara P, Mouesca J M, *et al*. Unexpected electron transfer mechanism upon AdoMet cleavage in radical SAM proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(35): 14867-14871
- [56] Grell T A, Goldman P J, Drennan C L. SPASM and twitch domains in S-adenosylmethionine (SAM) radical enzymes. *J Biol Chem*, 2015, **290**(7): 3964-3971
- [57] Ding W, Li Y, Zhang Q. Substrate-controlled stereochemistry in natural product biosynthesis. *ACS Chem Biol*, 2015, **10**(7): 1590-1598
- [58] Zhang Q, Yu Y. Thioether crosslinkages created by a radical SAM enzyme. *ChemBiochem*, 2012, **13**(8): 1097-1099.
- [59] Bruender N A, Bandarian V. SkfB abstracts a hydrogen atom from calpha on SkfA to initiate thioether cross-link formation. *Biochemistry*, 2016, **55**(30): 4131-4134
- [60] Benjdia A, Balty C, Berteau O. Radical SAM enzymes in the biosynthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Front Chem*, 2017, **5**: 87
- [61] Bruender N A, Wilcoxon J, Britt R D, *et al*. Biochemical and spectroscopic characterization of a radical S-adenosyl-L-methionine enzyme involved in the formation of a peptide thioether cross-link. *Biochemistry*, 2016, **55**(14): 2122-2134
- [62] Benjdia A, Guillot A, Lefranc B, *et al*. Thioether bond formation by SPASM domain radical SAM enzymes: calpha H-atom abstraction in subtilisin A biosynthesis. *Chem Commun (Camb)*, 2016, **52**(37): 6249-6252
- [63] Mahanta N, Hudson G A, Mitchell D A. Radical S-adenosylmethionine enzymes involved in RiPP biosynthesis. *Biochemistry*, 2017, **56**(40): 5229-5244
- [64] Mozolewska M A, Sieradzan A K, Niadzvedstki A, *et al*. Role of the sulfur to alpha-carbon thioether bridges in thurincin H. *J Biomol Struct Dyn*, 2017, **35**(13): 2868-2879
- [65] Wieckowski B M, Hegemann J D, Mielcarek A, *et al*. The PqqD homologous domain of the radical SAM enzyme ThnB is required for thioether bond formation during thurincin H maturation. *FEBS Lett*, 2015, **589**(15): 1802-1806
- [66] Owen C D, Tailford L E, Monaco S, *et al*. Unravelling the specificity and mechanism of sialic acid recognition by the gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 2196
- [67] Pujol A, Crost E H, Simon G, *et al*. Characterization and distribution of the gene cluster encoding RumC, an anti-*Clostridium perfringens* bacteriocin produced in the gut. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, **78**(2): 405-415
- [68] Hudson G A, Burkhardt B J, Dicaprio A J, *et al*. Bioinformatic mapping of radical S-adenosylmethionine-dependent ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides identifies new calpha, cbeta, and cgamma-linked thioether-containing peptides. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(20): 8228-8238
- [69] Haft D H, Basu M K. Biological systems discovery in silico: radical S-adenosylmethionine protein families and their target peptides for posttranslational modification. *J Bacteriol*, 2011, **193**(11): 2745-2755
- [70] Grove T L, Himes P M, Hwang S, *et al*. Structural insights into thioether bond formation in the biosynthesis of sactipeptides. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(34): 11734-11744
- [71] Precord T W, Mahanta N, Mitchell D A. Reconstitution and substrate specificity of the thioether-forming radical S-adenosylmethionine enzyme in freyrasin biosynthesis. *ACS Chem Biol*, 2019, **14**(9): 1981-1989

Current Advancements in Sactipeptide Natural Products*

CHEN Yun-Liang¹⁾, LI Guo-Quan²⁾, YANG Yun-Peng³⁾, JIA Wei-Dong¹⁾,
SHI Ai-Ping^{1)**}, ZHANG Qi^{4)**}

¹⁾*School of Agricultural Equipment Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;*

²⁾*School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University Zhenjiang 212013, China;*

³⁾*Laboratory Animal Platform, Institute of Neuroscience, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;*

⁴⁾*Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200031, China)*

Abstract Sactipeptides represent an emerging class of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides with diverse bioactivities. The common hallmark of sactipeptides is intramolecular thioether bond that crosslinks the sulfur atom of a cysteine and an α -carbon of an acceptor amino acid. This review summarizes recent achievements in many aspects of sactipeptides, including discovery, activity, biosynthesis, and mode of action, with a particular focus on the common enzymology of radical SAM chemistry leading to the unusual S-to-C α thioether linkages.

Key words sactipeptide, RiPPs, thioether bond, radical SAM enzyme

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0069

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31400083, 21822703), Key R&D plan of Zhenjiang city (NY2018015) and Key R&D plan of Dantu district (NY2017001).

** Corresponding author.

SHI Ai-Ping. Tel: 86-15952866677, E-mail: shap@ujs.edu.cn

ZHANG Qi. Tel: 86-13916164327 E-mail: qizhang@sioc.ac.cn

Received: March 14, 2020 Accepted: May 15, 2020