

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 豐原素合成酶之功能研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 90-2320-<sup>8</sup>8-041-014

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

計畫主持人：林翠品

執行單位：嘉南藥理科技大學 保健營養系

中華民國九十一年十月十六日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 90-2320-8-041-014

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：林翠品 嘉南藥理科技大學 保健營養系

## 一、中文摘要

豐原素合成基因 *fenD* 是豐原素合成酶操縱子的第二個基因，可以做出 289 kDa 的蛋白質參與豐原素的非核糖體合成機制。這個蛋白質含有兩個活化胺基酸的時間區，FenD1 及 FenD2。以大腸桿菌表現系統將這兩個活化胺基酸的時間區的蛋白質表現，再經由 Nickel 親和性管柱純化並且以 ATP-PPi exchange 方法證明 FenD1 的 adenylation 功能區可以活化 L-tyrosine，FenD2 的 adenylation 功能區可以活化 L-threonine。根據 FenC，FenD，FenE 及 FenB 所活化的胺基酸的結果認為豐原素合成酶操縱子的基因排列次序與豐原素胺基酸組成的次序是呈線性關係。

關鍵詞：豐原素，肽合成酶，非核糖體合成機制

## Abstract

The Second gene in the fengycin synthetase operon, *fenD*, encodes a peptide synthetase of 289 kDa, which is involved in the nonribosomal synthesis of fengycin. This protein contains two amino acid activation modules, FenD1 and FenD2.

The adenylation domain of each module was expressed in *Escherichia coli* and was purified by affinity chromatography with a His-bind column. ATP-PP<sub>i</sub> exchange assay revealed that the adenylation domain of FenD1 activates L-Tyr and the same domain in FenD2 activates L-Thr, indicating that FenD activates the third and the fourth amino acids in fengycin. The studies on the amino acids activated by FenC, FenD, FenE and FenB suggest that the genes in the fengycin synthetase operon are colinear with the amino acids in fengycin.

Keywords: Fengycin, Peptide synthetase, Nonribosomal peptide synthesis

## 二、緣由與目的

目前對於脂肽類抗生素的合成機制並不清楚，只知道肽部分是由非核糖體方式合成，但是肽合成酶如何開始、延長及終止肽合成並不明瞭。所以以豐原素合成的機制為模型，可以進一步了解脂肽類抗生素中肽及脂肪酸組成的合成方式，以利於這類抗生素的開發。

## 三、結果

### (一) *fenD* 序列

*fenD* 是豐原素合成酶操縱子的第二個基因，它的序列長度有 7716 bp，可以做出 289 kDa 的蛋白質 (FenD)，FenD 含有兩對胜肽合成酶中 condensation 功能區，adenylation 功能區及 thiolation 功能區的高度保留的序列 (表一)，所以認為 FenD 含有兩個活化胺基酸的間隔區。此外在 C 端區域含有 epimerization 功能區。

### (二) FenD1 及 FenD2 蛋白質表現及純化

以 PCR 方式合成 n.t. 9202-10796 及 n.t. 12302-13895 的 *fenD* DNA 片段，這兩個片段分別可以合成 FenD1 及 FenD2 的 adenylation 功能區。此外也合成 n.t.7872-11045 的 *fenD* DNA 片段，這個片段可以合成 FenD1 的 condensation，adenylation 及 thiolation 功能區。將這三個 DNA 片段選殖至 pDEST17 質體，分別得到 pTD1A，pTD2A 及 pDCATD1 三個質體，這些質體都具有 T7 啟動子及可以轉譯成六個 histidine 的 DNA 序列。將這三個轉形至 *E.coli* BL(DE3)-SI，再經由 NaCl 誘導，結果 *E.coli* BL(DE3)-SI(pTD1A) 選殖株可以表現 FenD1 的 adenylation 功能區 (AD-FenD1)，*E.coli* BL(DE3)-SI(pTD2A) 選殖株可以表現 FenD2 的 adenylation 功能區 (AD-FenD2)，分子量都為 58.52 kDa。*E.coli* BL(DE3)-SI(pTCATD1) 選殖株可以表現 FenD1 的 condensation，adenylation 及 thiolation 功能區 (CAT-FenD1)，大小為 115.94 kDa。AD-FenD1 蛋白質是不可溶的 (圖 1-A, lane 3)，AD-FenD2 及 CAT-FenD1 蛋白質是具有可溶性 (圖 1-B, lane 4 及 lane 8)。進一步將可溶性的 AD-FenD2 及 CAT-FenD1 蛋白質以 Nickel 親和性管柱純化，得到純化的 AD-FenD2

及 CAT-FenD1 蛋白質 (圖 1-B, lane 5 及 1-A lane 9)。

### (三) Adenylation 功能區活性

將純化的 AD-FenD2 及 CAT-FenD1 蛋白質以豐原素組成的八個胺基酸進行 ATP-PPi exchange 實驗測試催化活性，結果 AD-FenD2 蛋白質在加入 L-threonine 活性最高，顯示 AD-FenD2 蛋白質可以活化 L-threonine (圖 2-B)。當加入 L-tyrosine CAT-FenD1 蛋白質的 ATP-PPi exchange 的活性比其它胺基酸強 20 倍，顯示 CAT-Fen1 蛋白質可以活化 L-tyrosine (圖 2-A)。

### (四) CAT-FenD1 蛋白質生化特性

將 10  $\mu$ g CAT-FenD1 蛋白質和 4 mM L-tyrosine 在 pH 5 及不同溫度下進行反應 (10-55 $^{\circ}$ C)，結果反應最佳溫度是 25 $^{\circ}$ C。在不同 pH 值下測試，發現在 pH 7.5 活性最高 (圖 3)。

## 四、討論

在以前研究證明豐原素的組成是 R•L-Glu•D-Orn•L-Tyr•D-allo-Thr•L-Glu•D-Ala(D-Val)•L-Pro•L-Glu•D-Tyr•L-Ile (3)。也發現豐原素合成是由豐原素合成酶操縱子 *fenC-fenD-fenE-fenA-fenB* 負責 (1)。本計畫證明 FenD1 活化 L-tyrosine 及 FenD2 活化 L-threonine，也就是 FenD 活化豐原素組成的第三個及第四個胺基酸。在以前研究也證明 FenC, FenE 及 FenD 分別活化 L-glutamic acid, L-ornithine (4), L-glutamic acid, L-alanine(L-valine) (5) 及 L-leucine (6)，也就是活化豐原素組成的第一二，四，五及第八個胺基酸。所以認為豐原素合成酶操縱子的基因排列次序與豐原素胺基酸組成的次序是呈線性關係。這個結果

將有助於對非核糖體合成機制的了解。

### 五、計畫成果自評

豐原素合成酶 FenD 功能研究與原計畫相符，達預期目標的百分之八十。證明豐原素合成酶 FenD 活化那一個胺基酸，將有助於了解豐原素如何合成，也可以更深入明瞭非核糖體合成機制，如此將有利於新抗生素的開發。這個研究成果將於近期發表。

### 六、參考文獻

- Chen, C. L., L. K. Chang, Y. S. Chang, S. T. Liu, and J. S. Tschen. 1995. Transposon mutagenesis and cloning of the genes encoding the enzymes of fengycin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 248:121-125.
- Vanittanakom, N. 1985. Antifungal antibiotics of *Bacillus subtilis* F-29-3: Studies on Bacilysin and Fengymycin, A newly Described lipopeptide. Dissertation, zur Erlangung des Grades eines Doktors, der Naturwissenschaften. Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen, Germany.
- Koch, U. 1988. Fengycin: Strukturaufklärung eines mikroheterogenen Lipopeptidantibiotikums. Dissertation, zur Erlangung des Grades eines Doktors, der Naturwissenschaften. Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen, Germany.
- Lin, T. P., C. L. Chen, L. K. Chang, J. S. Tschen, and S. T. Liu. 1999. Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*.

*J. Bacteriol.* 181:5060-5067.

5. Shu, H. Y., G. L. Lin, Y. C. Wu, J. S. Tschen, and S. T. Liu. 2002. Amino acids activated by Fengycin synthetase FenE.

*BioChem. Biophys. Res. Commu.* 292:789-793.

6. Lin, G. H., C. L. Chen, J. S. Tschen, S. S. Tsay, Y. S. Chang, and S. T. Liu. 1998. Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene *fenB* from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180:1338-1341.

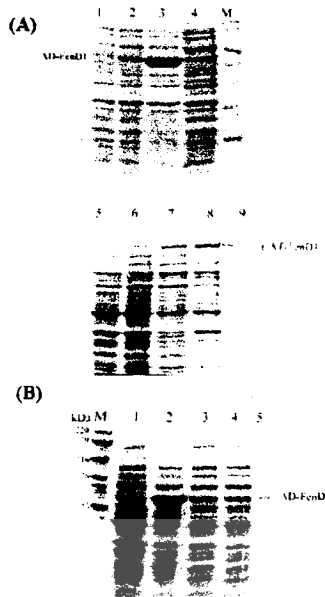
7. Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* 97:2651-2673.

### 七、圖表

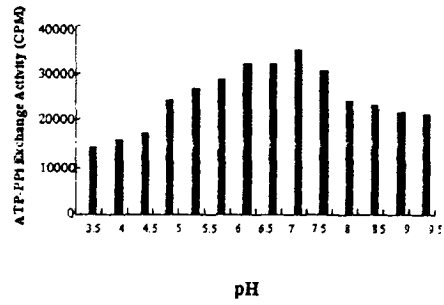
TABLE I. Conserved sequences in fengycin cyclotransferase FenD

Domain	Cons	Sequence conserved in <i>Bacillus subtilis</i> <sup>a</sup>	Sequence in FenD	Motifs in FenD	Position
Adaptation	A1	L (R/S) DAKL	RYRQSL	D1	7959-7971
	A2	LKAGKXK (W/L) P (L/I) I	YKAGKXKPLD	D2	12407-12434
	A3	L (P) Y (R) S (K) R (E) P (L) R (E) R (E)	LKAGKXKPLD	D3	7980-7987
	A4	K (R) S	LAKL (Y) Y (R) S (K) R (E) R (E)	D4	9765-9768
	A5	R (E) P (L) T (E)	P (R) Y (R) S (K) R (E) R (E)	D5	12794-12802
	A6	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D6	9904-9911
	A7	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D7	12809-12816
	A8	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D8	12823-12830
	A9	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D9	12837-12844
	A10	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D10	12851-12858
	A11	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D11	12865-12872
	A12	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D12	12879-12886
	Thiolase	T	D (R) Y (K) S (K) R (E) P (L) R (E)	YKAGKXKPLD	D13
D14		R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D14	12918-12925
D15		R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D15	12932-12939
D16		R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D16	12946-12953
D17		R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D17	12960-12967
D18		R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D18	12974-12981
D19		R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D19	12988-12995
Dy domain	D20	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D20	13002-13009
	D21	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D21	13016-13023
	D22	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D22	13030-13037
	D23	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D23	13044-13051
	D24	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D24	13058-13065
	D25	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D25	13072-13079
	D26	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D26	13086-13093
Condensation	C1	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D27	13100-13107
	C2	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D28	13114-13121
	C3	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D29	13128-13135
	C4	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D30	13142-13149
	C5	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D31	13156-13163
	C6	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D32	13170-13177
	C7	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D33	13184-13191
	C8	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D34	13198-13205
	C9	R (E) P (L) T (E)	R (E) P (L) T (E)	D35	13212-13219

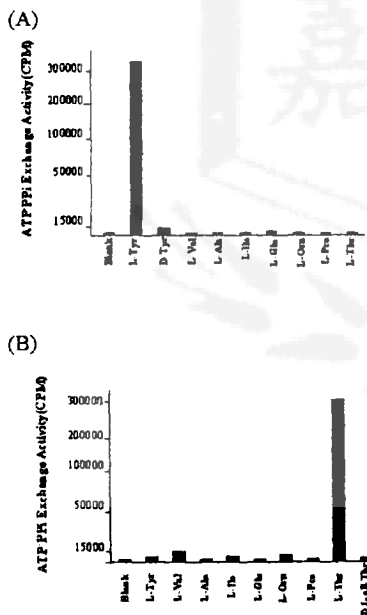
<sup>a</sup> Motif and Position (UPP)



**FIG. 1.** Over-expression and purification of recombinant proteins. Proteins were purified from cell lysate expressing AD-FenD1 (A, lanes 1 to 4), CAT-FenD1 (A, lanes 5 to 9), AD-FenD2 (B, lanes 1-5). Cell extracts were prepared before (lanes A-1, 5 and B-1) and after (lanes A-2, 6 and B-2) HcI selection. Cell extracts were centrifuged and separated into small (lanes A-3, 7, B-3) and supernatant (lanes A-4, 8 and B-4) fractions. Recombinant CAT-FenD1 and AD-FenD2 were further purified with a His-tag column. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (lanes A-5, B-5). The molecular size markers (MD) are shown on the left.



**FIG. 3.** ATP-PP<sub>i</sub> exchange activity of CAT-FenD1 with 2 mM L-Tyr in various pH buffers.



**FIG. 2.** ATP-PP<sub>i</sub> exchange activity of CAT-FenD1 (A) and AD-FenD2 (B). The ATP-PP<sub>i</sub> exchange reaction was performed with amino acids of 5mg/ml.