

# 毒隐翅虫素生物合成的分子基础

刘志萍, 王进军\*

(西南大学植物保护学院 昆虫学及害虫控制工程重庆市市级重点实验室, 重庆 400716)

**摘要:** 毒隐翅虫素 (pederin) 是毒隐翅虫属昆虫在体内生物合成的一种动物毒素, 用以抵御天敌。Pederin 接触到人或动物的皮肤时可引起线性皮炎, pederin 可抑制细胞的有丝分裂, 阻碍蛋白质与 DNA 的生物合成, 在癌症治疗与细胞生物学研究方面具有重要意义。目前认为 pederin 可能是通过两条途径合成, 现就这两条合成途径进行详细的介绍, 但其中的部分基因簇及基因迄今仍不为所知。

**关键词:** 毒隐翅虫素; 生物合成; *ped* 基因; 基因簇

中图分类号: R282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)03-0500-04

## Molecular basis of pederin biosynthesis

LIU Zhi-ping, WANG Jin-jun

(Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Key words:** pederin; biosynthesis; *ped* gene; gene cluster

毒隐翅虫是鞘翅目 (Coleoptera) 隐翅虫科 (Staphylinidae) 毒隐翅虫属 (*Paederus* Fabricius) 昆虫的总称, 以其鲜艳的警戒色易与其他隐翅虫相区别<sup>[1]</sup>。毒隐翅虫属目前已已知有 621 种, 其中 35 种在其血淋巴中含有或可能含有毒隐翅虫素 (pederin)<sup>[2]</sup>。这种毒素可引起人或动物的线性皮炎及多种并发症<sup>[3,4]</sup>。毒隐翅虫可利用 pederin 保护自己免受天敌的攻击<sup>[5]</sup>。现代医学发现 pederin 可抑制细胞的有丝分裂, 阻碍蛋白质与 DNA 的合成<sup>[6]</sup>, 可医治慢性坏死溃疡湿疹、神经性皮炎, 甚至肿瘤等, 在癌症治疗及细胞生物学研究中有重要意义, 现已成为一种试验性抗菌素<sup>[7]</sup>。近年来, 尽管国内对 pederin 的研究有少量报道<sup>[7-10]</sup>, 但具体就 pederin 生物合成的分子基础研究却鲜有报道。为更好地在国内利用 pederin, 本文就近些年国内外在该领域的研究进展进行综述。

### 1 Pederin 的结构特征

Pavan 等<sup>[11]</sup>首次从收集的 2 500 万头梭毒隐翅虫 *Paederus fuscipes* Curtis 中分离出一种复杂的非蛋白昆虫毒素<sup>[11]</sup>, 并将其命名为毒隐翅虫素 (pederin)。对 pederin 的空间结构与立体化学经 X 射线晶体学研究后发现<sup>[12-16]</sup>, 其是带有 2 个四氢吡喃环的酰胺及脱氢的酰胺<sup>[17]</sup> (图 1)。令人惊讶的是, 从海绵动物体内也分离出大量结构和功能上与 pederin 非常相似的化合物<sup>[18]</sup>, 如 mycalamide A 和 onnamide A (图 1)。这些从海绵中分离出的化合物, 因与 pederin 含有相同的母核结构<sup>[19,20]</sup>; pederic acid (图 1), 而被统称为 pederin 家族<sup>[21]</sup>。在亲源关系上如此遥远的两个物种, 在活性物

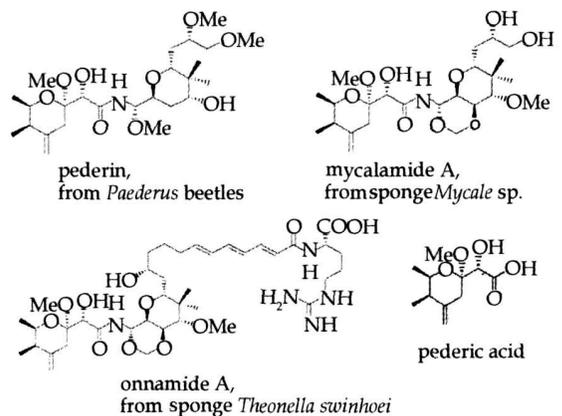


图 1 毒隐翅虫素、mycalamide A、onnamide A 和 pederic acid 的结构

Fig. 1 Structures of pederin, mycalamide A, onnamide A, and pederic acid

质的结构与功能上却具有如此大的相似性, 引起了科研人员的强烈兴趣<sup>[22]</sup>。

### 2 Pederin 的细胞毒性

2.1 对细胞形态的影响: 经体外培养的不同细胞系的实验证明<sup>[23]</sup>, pederin 在 1.5 ng/mL 的质量浓度下即可抑制所有细胞系中细胞的生长; 对于中度敏感的 EUE 细胞系, pederin 在 0.3 ng/mL 的极低质量浓度下仍可有效抑制细胞的生长。用 100 ng/mL 的 pederin 处理培养细胞 0~24 h, 50 min 后观察到细胞有丝分裂活动明显降低; 3h 后细胞质中观察

\* 收稿日期: 2008-10-09

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (2007BB1364)

作者简介: 刘志萍 (1976), 女, 在职博士生, 主要从事昆虫分类学及昆虫分子生态学研究。

E-mail: lzpezna@126.com

\* 通讯作者 王进军 E-mail: jjw ang7008@yahoo.com

到一些散在的高密度点状物质,随后染色体有丝分裂在中期被阻断;5 h 后细胞核开始降解;22 h 后细胞核成为碎片,之后细胞彻底消散。表明 pederin 具有强大的细胞毒性。

2.2 对大分子物质合成的影响:用<sup>3</sup>H-胸苷和<sup>14</sup>C-亮氨酸作为示踪分子来研究 pederin 对大分子物质生物合成的影响<sup>[23]</sup>。发现 1.5 ng/mL pederin 可立即阻碍蛋白质与 DNA 的生物合成,为普通抗生素的 10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> 倍。后期的实验表明,pederin 对 DNA 复制的阻碍作用与对蛋白质合成的阻碍作用几乎同时发生,但在程度上前者要轻微一些;在 1.5 ng/mL 与 100 ng/mL 两个浓度下,均未观察到 pederin 对 RNA 的影响。

### 3 Pederin 生物合成的分子基础

Pederin 对细胞有丝分裂强大的抑制作用,以及可专一性地抑制蛋白质与 DNA 合成,使得它在抗肿瘤治疗、生物医学和细胞生物学研究领域均有良好的应用前景<sup>[24]</sup>。为了得到高纯度的 pederin,前期研究人员做了一系列的化学合成研究工作<sup>[18,25,26]</sup>,但其费用昂贵,技术复杂。之后虽对其化学合成路径进行了优化,减少了反应步骤,提高了生产效率<sup>[27]</sup>,但仍有大量副反应发生,依旧无法与昆虫的生物合成路径相媲美。

Pederin 为多聚酮化合物,在生物体内被一种称为多聚酮合成酶(polyketide synthases, PKSs)/非核糖体蛋白合成酶(nonribosomal peptide synthetases, NRPSs)的多功能巨型酶(megaenzymes)催化合成。PKSs 是由多个催化结构域组成的大型、多功能的合成酶。每个结构域对应着多聚酮化合物相应的官能团。通常 PKSs 中最小的催化结构域由酮合成酶(ketosynthase, KS)、氨基转移合成酶(acyltransferase, AT)和氨基转移蛋白(acylcarrier protein, ACP)结构域组成。其中 KS 催化聚合反应;AT 选择正确的乙酰~CoA;ACP 在媒介之间形成共价键。而更进一步复杂的修饰反应,比如酮基之间或双键之间的缩合反应、脱水反应或甲基化反应,被另外的起修饰作用的结构域来催化。在多数情况下,PKSs 中的每个结构域均能监控合成产物的最后结构。有了这样的“线性规律”(colinear rule)的存在,就可以通过分析 PKSs 的基因序列从而对合成产物基本结构进行预测<sup>[28]</sup>。

为了研究 pederin 的生物合成机制,用来自不同栖息地的梭毒隐翅虫中的 12 个带毒隐翅虫的全 DNA 构建了含有 80 000 个克隆的宏基因组粘粒文库<sup>[29]</sup>,用 PKSs 中保守序列 KS 的基因作为专一性探针扫描文库,发现了 8 个阳性粘粒位点,找到了约为 53.8 kb 的开放阅读框(ORF),其与 iv 型 PKSs 基因之间具有较高的同源性,所有扩增的 KS 序列均能在该段 ORF 上找到。Piel<sup>[28]</sup> 把这段 ORF 命名为 ped 基因(ped gene),它编码了一种 PKSs/NRPSs 的混合蛋白模块。

“ped 基因”由 ped A~ped H 共 8 个基因簇组成,其中 ped F 和 ped H 的结构最为复杂,分别由 7~6 个模块组成。它们的产物分别是由 8 601 和 6 266 个氨基酸组成的蛋白质,这两个蛋白质同时具有类似于 PKSs 和 NRPSs 的结构特征。与其他的 iv 型 PKSs 相比较,这两个蛋白缺失包括

GHS 活性位点在内的约 300 个氨基酸的 AT 结构域,这表明在 ped F 和 ped H 中缺少编码 AT 的基因。将 ped F 中的第一模块 ped F1 与其同源片段——阿维菌素(avermectin)合成基因中的一段——AVES2-1 比较(图 2),可以清楚地看出,ped F1 中编码 AT 的基因片段被删除了,且无任何其他同源片段来代替。

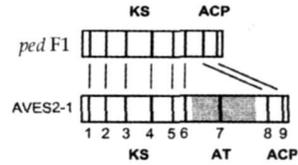


图 2 ped F1 与 AVES2-1 的比较

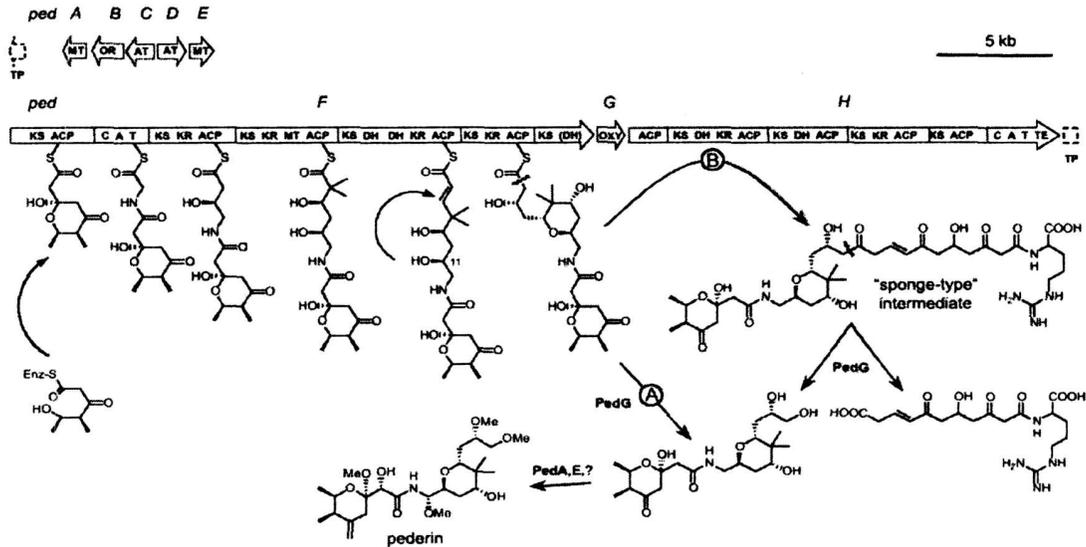
Fig. 2 Comparison of ped F1 and AVES2

AT 在产物链的延伸过程中起重要作用,选择乙酰~CoA 基团连到正确的 ACP 上,那么 ped F 在缺失这一重要基因的情况下是如何组装 pederin 分子的呢?在 ped F 的上游,发现了 ped C 和 ped D 两个独立的基因,表达产物与 AT 具有很高的同源性。这样 ped C、ped D 可能通过反式作用弥补了 ped F 和 ped H 中缺失 AT 基因的缺陷;在 ped C 和 ped D 的上游是 ped B,产物与氧化还原酶有很近的亲缘关系,以黄素单核苷酸(FMN)作为协调因子。氧化还原酶在 ped B 中的大量出现,表明 ped B 在早期的生物合成阶段起了重要作用,推测可能涉及到了小分子前体的供给。

Pederin 的生物合成过程(图 3):由 ped B 提供的带有乙酰~CoA 的小分子前体在 ped C 和 ped D 表达的 AT 的帮助下,与 ped F1 的表达产物 ACP 连接;ped F2 的结构很特殊,它与 NRPSs 的基因有同源性,表达产物催化了蛋白源与非蛋白源氨基酸的连接。在这里 ped F2 的表达产物催化氨基乙酸与小分子前体以肽键的方式连接;ped F4 中出现了较为少见的甲基转移酶(methyltransferase, MT)基因,同样的结构出现在耶耳森菌素(yersiniabactin)<sup>[30]</sup>和环氧聚微管素(epothilone)<sup>[31]</sup>的合成基因中,在这两者的生物合成过程中,MT 催化生成了成对的甲基基团,在 pederin 的合成过程中,ped F4 中的 MT 可能发挥了同样的作用,在第 14 位 C 原子处催化生成了成对的甲基基团;ped F5 中出现了重复的脱水酶(dehydratase, DH)基因。[类似的结构在无活菌素(nonactin)<sup>[32]</sup>的合成基因出现过。只不过在无活菌素合成过程中,两个拷贝的 DH 基因编码在一个单独的基因上,而且催化产物是无活菌素中的五元环],在 pederin 的合成过程中,ped F5 中重复的 DH,可能通过脱水反应和随后发生在第 11 位碳原子上羟基的米氏增加反应催化了二甲基四氢吡喃环的闭合反应。

从图 3 中可以看出,ped F 的每个模块具有不同的催化活性,几乎可以合成 pederin 分子的大部分骨架,且 ped F 的各模块与 pederin 分子中的每个基因基本对应,遵循“线性规则”。

但是,ped F 中缺失硫酯酶基因,其合成的产物链是如何释放的?ped H 位于 ped F 的下游,编码 PKSs 与 NRPSs



TP: 转座酶假基因; MT: 甲基转移酶; OR: 氧化还原酶; OXY: 加氧酶; C: 非核糖体蛋白合成酶(NRPS) 凝聚区; A: NRPS 腺苷酰化区; T: NRPS 硫化区; DH: 推测的非功能性脱水酶区

T.P: transposase pseudogene; MT: methyltransferase; OR: oxidoreductase; OXY: oxygenase; C, NRPS condensation domain; A, NRPS adenylation domain; T, NRPS thiolation domain; DH: putative nonfunctionaldehydratase domain

图 3 *ped* 基因的序列图及 *pederin* 的假定的生物合成途径

Fig. 3 Sequence of *ped* genes and biosynthesis pathway of proposed *pederin*

混合蛋白的产物,含有硫酯酶基因,可释放合成的产物链,且 *ped H* 中含有与编码丁香霉素(*syringomycin*)<sup>[33]</sup>和微囊藻素(*microcystin adenylation*)<sup>[34]</sup>的基因相似的单元,可在产物末端形成精氨酸残基或腺嘌呤基团。因而,*ped H*可能进一步延伸了由 *ped F*合成的 *pederin*型前体,生成了一个带有多个聚酮侧链和精氨酸残基的“海绵型”中间产物(“sponge-type” intermediate),随后在硫酯酶的作用下,释放了这个中间产物。按照“线性规则”,*ped F*与 *ped H*应该是连在一起的大型基因。但是,*ped G*插入到了 *ped F*与 *ped H*之间,这可能是在进化过程中,基因发生了重组或重排。*ped G*的功能还不太清楚,推测可能是氧化还原酶,类似于 FAD 依赖型单加氧酶<sup>[29]</sup>。

目前,对于 *pederin* 生物合成通常认为可能存在两条路径<sup>[29]</sup>。路径 A: *ped F* 基因首先合成了 *pederin* 前体,但是在进化过程中,氧化酶基因 *ped G* 的插入,破坏了基因的完整性,导致了产物链的延伸过程在 *ped F6* 处提前结束。因为 *ped F* 中缺失硫酯酶基因,无法合成硫酯酶释放已合成的产物链,所以产物链会一直与 *ped F6* 基因连接,直到在 *ped G* 处经氧化还原反应被切除下来。这可以解释为什么 *ped G* 会出现在 *ped* 基因的这个位置,以及 *pederin* 分子末端为什么会出氧化了的 C 原子。路径 B: *pederin* 前体在 *ped G* 处未被切除,而是跳过 *ped G* 经 *ped H* 催化合成了带有多个聚酮长链和精氨酸残基末端的类似 *onnamide A* 的中间产物,这个中间产物在 *ped H6* 处被硫酯酶切除,随后在 *ped G* 产物催化的 Baeyer-Villiger 氧化反应过程中<sup>[35]</sup>,被切割成 *pederin* 前体和一段长链次级片段。最后经路径 A、B 生成的 *pederin* 前体,在具有 MT 功能的 *ped A*、*ped E* 作用下,在碳链

末端连接两个甲基基团,生成最终产物 *pederin*。

*ped* 基因模型虽然较好地解释了 *pederin* 合成的主要路径,但是根据“线性规则”推测,还有大量的涉及到 *pederin* 合成的小基因没有找到。而且 *ped B*、*ped G* 等基因簇的功能还处于假设阶段,彻底阐明其具有功能还需进行缺失基因功能的研究。

#### 4 结语

毒隐翅虫素(*pederin*)对于癌症预防和治疗有着潜在的应用价值,国外学者已做了大量的尝试,*pederin*的合成是关键。在化学合成路径陷入困境时,生物合成路径是取得高纯度 *pederin* 的最佳方法。在阐明 *pederin* 的生物合成机制之后,通过生物技术,利用生物反应器可以大量合成 *pederin*。目前 iv 型 PKSs 基因在大肠杆菌 *Escherichia coli*<sup>[36]</sup> 中的成功表达已经使人们有能力进行此项研究。另外,通过对 *pederin* 与海绵次生代谢产物,如 *onnamide A* 和 *mycalamide A* 的研究,可能会进一步阐明陆地无脊椎动物与海绵动物之间的亲源进化关系。鉴于仍有大量的合成基因未从宏基因文库中找到,未来研究的一个重要目标就是进一步发展为快捷的方法,以便可从复杂的基因文库中对目标基因进行快速克隆。

#### 参考文献:

- [1] Frank J H, Kanamitsu K. *Paederus*, sensu lato (Coleoptera: Staphylinidae): natural history and medical importance [J]. *J Med Entomol*, 1987, 24(2): 155-191
- [2] Frank J H. *Paederus*, sensu lato (Coleoptera: Staphylinidae): an index and review of the taxa [J]. *Insecta Mundi*, 1988, 2(2): 97-159
- [3] Omid Z, Arash K A, Fateme F, et al. *Paederus dermatitii* in northern Iraq: a report of 156 cases [J]. *Int J Dermatol*, 2003, 42(8): 608-612

- [4] Morsy T A, Arafa M A, Younis T A, *et al*. Studies on *Paederus alfieri* Koch (Coeptera: Staphylinidae) with special reference to the medical importance [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 1996, 26(2): 337-351
- [5] Borroni G, Brazzelli V, Rosso R, *et al*. *Paederus fuscipes* dermatitis: A histopathological study [J]. *Am J Dermatopathol*, 1991, 13(5): 467-474
- [6] Brega A, Falaschi A, Carli L, *et al*. Studies on the mechanism of action of pederine [J]. *J Cell Biol*, 1968, 36: 485-496
- [7] 郑发科 毒隐翅虫研究进展 2 毒素及其在医学上的重要意义 [J]. 四川师范学院学报, 1989, 10(1): 17-23
- [8] 蒋三俊 隐翅虫的毒害与毒素的利用 [J]. 特种经济动植物, 2002, 5(5): 10
- [9] 王香萍, 雷朝亮, 牛长缨. 昆虫的体外化学防卫物质简介 [J]. 昆虫知识, 2001, 38(5): 392-395
- [10] 刘昌利, 梁俊. 毒隐翅虫的毒素 [J]. 安徽教育学院学报, 2003, 21(6): 62-63
- [11] Pavan M, Bo G. Pederin, toxic principle obtained in the crystalline state from the beetle *Paederus fuscipes* Curt [J]. *Physiol Comput Oecol*, 1953, 3: 307-312
- [12] Quilico A, Cardani C, Ghiringhelli D, *et al*. Pederinae pseudopederina [J]. *Chim Ind*, 1961, 43: 1434-1436
- [13] Cardani C, Ghiringhelli D, Mondelli R, *et al*. The structure of pederin [J]. *Tetrahedron Lett*, 1965, 29: 2537-2545
- [14] Cardani C, Ghiringhelli D, Mondelli R, *et al*. Propriétés biologiques et composition chimique de lapédérine [J]. *Ann Soc Entomol Fr. (NS)*, 1965, 1: 813-816
- [15] Matsuda F, Yanagiya M, Matsumoto T, *et al*. Total synthesis of pederine: A simple synthetic method for *N*-amides [J]. *Tetrahedron Lett*, 1982, 23: 4043-4046
- [16] Matsumoto T, Yanagiya M, Maeno S, *et al*. A revised structure of pederin [J]. *Tetrahedron Lett*, 1968, 60: 6297-6300
- [17] Adam M A, Duggan A J, Smalano J, *et al*. Total synthesis of (±)-pederamide [J]. *J Am Chem Soc*, 1979, 101(18): 5364-5370
- [18] Narquizian R, Kocienski P J. The pederin family of antitumor agents: structures, synthesis and biological activity [J]. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 2000, 32: 25-26
- [19] Piel J, Butzke D, Fusetani N, *et al*. Exploring the chemistry of uncultivated bacterial symbionts: antitumor polyketides of the pederin family [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(3): 472-479
- [20] Kellar T A. The pederin family: a synthetic overview [D]. Pittsburgh: University of Pittsburgh, 2006
- [21] 许静, 徐俊. 海洋共附生微生物天然产物生物合成基因研究进展 [J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 975-979
- [22] Piel J, Hui D, Wen G, *et al*. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* [J]. *PNAS*, 2004, 101(46): 16222-16227
- [23] Brega A, Falaschi A, Carli L, *et al*. Studies on the mechanism of action of pederine [J]. *J Cell Biol*, 1968, 36: 485-496
- [24] Alejandro M, Mayer S, Hamann M T. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action [J]. *Comp Biochem Physiol Part C*, 2002, 132: 315-339
- [25] Meinwald J. An approach to the synthesis of pederin [J]. *Pure Appl Chem*, 1977, 49: 1275-1290
- [26] Kocienski P, Narquizian R, Raubo P, *et al*. Synthetic studies on the pederin family of antitumor agents [J]. *J Chem Soc Per Transact*, 2000, 1(15): 2357-2384
- [27] Jewett J C, Rawal V H. Total synthesis of pederin [J]. *Angew Chem Int*, 2007, 46(34): 6502-6504
- [28] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 285-295
- [29] Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles [J]. *PNAS*, 2002, 99(22): 14002-14007
- [30] Miller D A, Walsh C T, Luo L S J. G-methyltransferase and cyclization domain activity at the intraprotein PK/NPP switch point of yersiniabactin synthetase [J]. *Am Chem Soc*, 2001, 123: 8434-8435
- [31] Molnar I, Schupp T, Ono M, *et al*. The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce 90 [J]. *Chem Biol*, 2000, 7(2): 97-109
- [32] Woo A J, Strohl W R, Priestley N D. Nonactin biosynthesis: the product of *nonS* catalyzes the formation of the furan ring of nonactin acid [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 1999, 43(7): 1662-1668
- [33] Zhang J H, Quigley N B, Gross D C. Analysis of the *syrB* and *syrc* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thioesterase mechanism [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(14): 4009-4020
- [34] Tillett D, Dittmann E, Erhard M, *et al*. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system [J]. *Chem Biol*, 2000, 7(10): 753-764
- [35] Banskota A H, McAlpine J B, Sorensen D, *et al*. Isolation and identification of three new 5-alkenyl-3, 3(2H)-furanones from two *Streptomyces* species using a genomic screening approach [J]. *J Antibiot*, 2006, 59(3): 168-176
- [36] Pfeifer B A, Admirall S J, Gramajo H, *et al*. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli* [J]. *Science*, 2001, 291: 1790-1792

## 欢迎订阅《中草药》杂志 1996-2008 年增刊

为了扩大学术交流,提高新药研究水平,经国家新闻出版主管部门批准,我部从 1996 年起,每年出版增刊一册。

1996-2008 年增刊 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性较强,欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行,邮局订阅《中草药》不含增刊,但能提供订阅凭证者,购买增刊 7 折优惠,款到寄刊。

地址:天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编:300193 网址:www.tjpr.com  
 电话:(022)27474913 23006821 传真:(022)23006821 E-mail:zcyzjbj@sina.com