天然产物生物合成与抗肿瘤药物 合成生物学研究

潘海学, 袁华, 蹇晓红, 唐功利*

中国科学院上海有机化学研究所, 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032

* 联系人, E-mail: gltang@sioc.ac.cn

收稿日期: 2015-02-13; 接受日期: 2015-03-19

国家自然科学基金(批准号: 31330003)和国家自然科学基金委员会-中国科学院学科发展战略研究合作项目(批准号: L1222037)资助
doi: 10.1360/N052015-00049

摘要 结构复杂多样的天然产物是现代药物的重要组成部分和新药发现的重要源泉. 天然产物的生物合成研究, 是从基因和蛋白水平阐明天然产物的合成途径, 通过酶催化的化学反应将基因与化合物的结构单元建立一种对应关系, 从而理解自然界神奇的化学合成、生物拮抗及生理调控过程. 天然产物的合成生物学研究核心是通过在发酵友好、高效的微生物中设计、构建目标化合物的生物合成途径, 经系统地调控和优化重组微生物, 从而发酵生产来源稀缺的天然产物类药物、前体或新化合物. 本文结合相关领域的进展, 对本研究组近年来关于抗肿瘤天然产物生物合成及抗癌药物合成生物学的工作进行系统的介绍.

关键词天然产物
生物合成
合成生物学
药物发现与生产

作为 20 世纪最伟大的科技成就之一, 青霉素的发现及临床应用开创了天然产物药物的新篇章. 目前的临床抗感染药物中有 70% 以上直接或间接地来源于微生物源天然产物; 而在肿瘤化疗中源于天然产物的药物也超过 50%^[1,2]. 天然产物的生物合成研究开始于 20 世纪 80 年代中期, 90 年代基因组研究、生物信息学及生物技术的进步大大促进了该学科的发展. 其核心是从基因和蛋白水平阐明天然产物的生物全合成途径, 通过酶催化的化学反应将基因与化合物的结构单元建立一种对应关系, 从而理解自然界神奇的化学合成、生物拮抗及生理调控过程^[3,4]. 进入新世纪以来, 生命科学的进步、新药发现的困难以及对传统学科的反思使得人们对于天然产物有了新的认识, 而天然产物的生物合成研究正是顺应了

这一历史潮流. 同时, 建立在基因工程及代谢工程、合成化学、基因组学、系统生物学等学科基础上的合成生物学研究对于结构复杂的天然产物类药物研究有特殊意义: (i) 将微生物作为细胞工厂来获得来源稀缺、结构复杂天然产物类药物可以实现复杂药物的高效制备^[5-7]; (ii) 以生物合成和组合生物合成研究为基础, 合成生物学研究在天然产物药物研究所关注的新化合物发现与创造方面也具有独特的优势^[8,9]. 目前, 合成生物学无论是在学术研究还是在工业领域, 对于天然产物创新、发展及新药开发的重大影响正逐渐为科学家们所认同. 它的成功运用, 关键是在基因和蛋白功能水平上认识和理解复杂天然产物的生物合成机制, 以化学、生物的知识为指导, 通过合理设计在发酵友好的微生物中实现生物合成

引用格式: 潘海学, 袁华, 蹇晓红, 等. 天然产物生物合成与抗肿瘤药物合成生物学研究. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 1027-1039

Pan H X, Yuan H, Jian X H, et al. Biosynthesis of natural products and synthetic biology of antitumor drugs. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 1027-1039, doi: 10.1360/N052015-00049

途径的重构, 进而通过系统优化实现目标化合物的高效生物合成。

1 来源稀缺、结构复杂的抗肿瘤药物的定向合成生物学

复杂天然产物发展成为药物的瓶颈之一是化合物的高效制备和稳定供给, 这对于海洋天然产物、极端环境微生物或其他来源稀缺的复杂天然产物来说, 是药物研发需要解决的首要问题。近年来出现的天然产物合成生物学是以生物合成研究为基础, 通过在微生物中设计、构建目标化合物的生物合成途径, 经系统地调控和优化重组微生物, 从而发酵生产来源稀缺的天然产物类药物或前体^[5-7]。该方法是不远的将来解决药物来源、成本以及与环境、资源协调问题最好的途径之一, 也是解决海洋天然产物或特殊生境微生物药物面临的如何持续供应化合物这一个瓶颈问题的最佳选择。这方面最成功的例子是 Keasling 团队^[10,11]关于抗疟药青蒿素(artemisinin)的合成生物学研究: 结合了前体青蒿酸的微生物发酵高效生产(25 g/L), 辅以 4 步可放大的化学半合成(40%~45%的总收率)。这一里程碑式的工作前后经过十多年的努力, 包括比尔及梅林达·盖茨基金会等数千万美元的持续投入, 目前该路线已于 2013 年在赛诺非公司成功投产。

自 2003 年秋季本研究组建立时就开展了以番红霉素 A(saframycin A, SFM-A)为代表的四氢异喹啉家族抗肿瘤生物碱的生物合成研究(图 1)。迄今为止, 该家族已报道的成员有 60 余例, 其典型的核心结构特征是至少拥有 1 个由 4 个六元环构成的并环体系, 并且其中包含 1 个四氢异喹啉环结构单元^[12]。然而, 该家族化合物中最引人注目的明星分子 ecteinascidin-743(ET-743)是海洋生物加勒比海海鞘(*Ecteinascidia turbinata*)(该海鞘共生的微生物)的代谢产物(图 1)。它直接作用于肿瘤细胞中 DNA 短支的缺口, 影响并抑制蛋白质的合成, 从而在基因水平上抑制肿瘤细胞的分裂和成长。由于其优良的抗肿瘤活性(半抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC_{50}) <1 pmol/L, 半数致死剂量(median lethal dose, LD_{50}) 0.2~0.6 nmol/L, 活性比抗肿瘤药物紫杉醇(taxol)高约 50 倍)和独特的抗肿瘤机制, 即使在其他抗肿瘤药物无效的情况下仍然能够发挥作用。ET-743 作为抗

肿瘤新药于 2007 年在欧洲上市(商品名 Yondelis[®])^[13,14], 用于治疗晚期软组织肉瘤, 这是近 20 年来批准的唯一一个治疗软组织肉瘤的新药。随后在阿根廷、委内瑞拉、韩国和俄罗斯等 46 个国家也已获准用于治疗软组织肉瘤。至 2009 年 ET-743 在全球已经治疗超过 2000 例, 该药以较高的肿瘤控制率为软组织肉瘤患者提供了非常有希望的选择。2009 年 9 月 ET-743 在欧洲和菲律宾被批准用于治疗复发性卵巢癌; 目前该药在美国已进入 III 期临床, 它是第一例来源于海洋天然产物的抗肿瘤新药^[15,16]。

四氢异喹啉家族化合物因其独特的化学结构和优良的生物活性, 长期以来备受生物学、药物化学和有机化学的广泛关注。化学家可以通过化学全合成获得少量的 ET-743 化合物^[12,17,18], 但由于结构复杂性使得反应步骤长(一般超过 40 步)、产率低(<<1%), 不可能实现工业化生产; 天然分离代价巨大(1 g/吨海鞘), 且受环境资源限制。目前所需的药物生产主要通过两条途径: (i) 海鞘的人工养殖, 但受极低的化合物含量、过长的生长周期和特定的生长条件限制难以推广; (ii) 利用微生物发酵产生结构类似物番红菌素(safracin, SAC), 进而通过化学半合成获得^[19,20]。但由于 SAC 与最终化合物 ET-743 的结构差距较大, 半合成路线仍然步骤长(21 步)、产率低(1%), 造成该药生产成本过高, 价格昂贵, 难以大规模推广和普及。因此, 本课题组以来源稀缺的复杂天然产物类新药为终极目标, 以来源于微生物的具有类似化学结构和良好生物活性的同家族天然产物为对象, 通过生物合成研究获得基因资源、生化材料和知识积累; 在此基础上利用合成生物学的理念和方法在微生物中重构类似物的生物合成途径, 通过微生物发酵结合简短的化学半合成制备海洋抗肿瘤药物 ET-743(图 1)。鉴于该家族化合物的结构复杂性, 这将是一个长期、充满挑战性但无疑具有重要科学意义和潜在应用价值的课题。

1.1 番红霉素的生物合成研究

来源于链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)的番红霉素 A(SFM-A)是四氢异喹啉家族代表性化合物, 具有显著的抗肿瘤活性(如 SFM-A 对 L1210 的 ID_{50} 是 5.6 nmol/L)^[21]。根据前人标记实验中酪氨酸、甘氨酸及丙氨酸构成骨架前体的事实^[22], 推测其生物合成很可能由非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide

synthetase, NRPS)催化; 于是采用基于腺苷化结构域(A domain)保守序列的简并性引物 PCR 的方法克隆了其生物合成基因簇。然而, 正在全面开展研究时, 西班牙 PharmaMar 的研究人员于 2005 年报道了来源于假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)A2-2 的番红菌素(SAC)的生物合成基因簇及推测的生物合成途径^[23]。于是本课题组开展了系统深入的体内基因敲除、互补和体外生化及基因异源表达研究, 通过体外生化实验证明了 SFM-A 家族四肽骨架的合成中采用的 NRPS 机理: 其中 SfmA-A1 识别并激活丙氨酸, SfmB-A2 识别并激活甘氨酸, SfmC-A3 识别并激活 5-甲基-3-羟基-*O*-甲基酪氨酸(3-OH-5-Me-OMe-Tyr); 提出了模块 SfmC 不同于传统的 NRPS 单次使用机制, 采用重复使用两次的方式完成一轮肽链的延伸, 纠正了之前文献报道的假单胞菌中 SAC-B 生物合成推测的错误(图 2)^[24]。同时, 以结构较为简单的 SAC-B 产生体系假单胞菌为基础, 通过后修饰基因的补入

和重组, 构建了结构较为复杂的代谢途径, 从而为利用简单原核体系生产结构更为复杂、生物活性更好的类似化合物创造了条件。随后, 通过体内基因敲除获得的 $\Delta sfmO2$ 突变菌株产生 SFM-A 的结构类似物, 说明 SfmO2 之后的系列后修饰酶具有较为宽泛的底物识别特性, 而 SfmO2 的功能是 SFM-A 中左侧第一个芳环的氧化^[25]。

1.2 萘啶霉素的生物合成途径研究

四氢异喹啉家族首例成员萘啶霉素(naphthridinomycin, NDM)是 1974 年从土壤来源的葡萄牙链霉菌(*Streptomyces lusitanus*)AYB-1206 的次级代谢产物中分离得到的^[26]。该化合物不仅具有显著的抗肿瘤活性, 其抗感染活性尤其引人注目, 特别是对一些临床的抗生素耐药菌仍然具有优良的杀伤效果(对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的最低抑菌浓度(minimum

图 1 四氢异喹啉生物碱家族代表性化合物

图 2 番红霉素 A(SFM-A)的生物合成途径

inhibitory concentration, MIC)是 4~15 ng/mL)^[27]. 本课题组采取类似的策略克隆了 NDM 的生物合成基因簇, 并以此为基础开展了一系列遗传与生化研究, 发现了若干新奇的生物合成机制. 通常情况下 NRPS 催化的装配体系中催化模块与终产物结构的单元组成是一一对应的; 然而 NDM 基因簇编码的 NRPS 中包含多余的 4 个模块, 对应合成的 $C_{13}H_{27}CO-Ala-Ala-Ala$ -结构在终产物中并不出现. 但是失活相应的基因却完全中断了 NDM 的生成, 说明这些基因均是 NDM 生物合成中不可或缺的. 结合体内遗传与体外生化实验的结果, 本课题组提出并初步证明了一种核糖体肽生物合成常用的前导肽介导的非核糖体肽的生物合成机制: 当完全修饰的前体形成后, 膜蛋白 NapG 将前导肽切除从而释放出终产物 NDM(图 3)^[28]. 该工作发表后很快被作为热点所关注, 而包括这种前导肽介导的非核糖体肽生物合成在内的 NRPS 催化的非常规装配模式也日益引起生物合成研究的关注^[29].

1.3 特殊二碳延伸单位的来源及生物合成机制

在非核糖体肽的生物合成中, NRPS 通常以氨基酸、氨基酸代谢中间体或衍生物为前体合成分子骨架; 特殊情况下脂肪酸及其衍生物或者聚酮生物合成的前体或中间体也可以被 NRPS 用来作为合成原料. 前期的标记实验表明, NDM 分子骨架来源于酪氨酸、鸟

氨酸和甘氨酸/丝氨酸, 甲基来源于甲硫氨酸, 3-甲基酪氨酸和 3-甲基-5-羟基酪氨酸也能进入骨架结构, 但 C9-C9'来源一直是个谜^[30]; 同时在四氢异喹啉家族中奎诺卡星(quinocarcin, QNC)和 ET-743 也存在相同的问题(图 4A). NDM 和 QNC 生物合成基因簇的克隆和比较研究使得研究者们有机会和材料来探索这一独特的 2C 单位的生物合成来源、途径及相关酶学机制. 经过 6 年的努力, 通过体内基因敲除、同源/异源互补, 标记前体喂养, 体外生化相结合的系统研究发现并阐明了这一独特的 2C 单位来源于酮糖. 大自然采取一种丙酮酸脱氢酶类似的转酮酶(transketolase, TKase)-非核糖体肽合成酶(NRPS)杂合体系, 以木酮糖-5-磷酸(xylulose 5-phosphate, X-5-P)、果糖-6-磷酸(fructose-6-phosphate, F-6-P)或景天庚糖-7-磷酸(sedoheptulose-7-phosphate, S-7-P)为供体底物, 通过辅基硫辛酰胺介导、进而硫酯交换将羟基乙酰 2C 单位直接转到酰基-载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)上形成硫脂, 从而为进一步的 NRPS 提供一种独特的延伸单元(图 4)^[31]. 该独特生化机制的阐明揭示了该家族化合物中多年来一直未解决的问题, 预示着 ET-743 也采取类似的机制. 同时, 该研究不仅是对 NRPS 催化生物合成中延伸单元和转酮酶功能的丰富, 也为进一步四氢异喹啉家族化合物生物合成基因簇重组、设计并创造 ET-743 的合成生物学研究奠定了基础.

图 3 萘啶霉素(NDM)的生物合成途径(网络版彩图)

1.4 非蛋白源氨基酸前体的生物制造

在 NRPS 催化的生物合成体系中, 非蛋白源氨基酸经常作为底物被用于最终骨架的合成. 四氢异喹啉家族中许多化合物含有非蛋白源氨基酸 3-羟基-5-甲基-O-甲基酪氨酸(3-OH-5-Me-OMe-Tyr, 3h5mOm-Tyr), 其生物合成途径包含 C-甲基化、O-甲基化和芳环羟化. 芳环氨基酸羟化反应主要包括喋呤依赖的酪氨酸羟化酶、铜离子依赖的酪氨酸酶及黄素依赖的双组分羟化酶, 3 类蛋白均是以氧气为氧化剂发生单加氧反应. 体内数据显示, SfmD 催化 Tyr 衍生物芳环的羟化, 然而生物信息学分析显示 SfmD 与目前已知的几类芳环羟化酶均没有明显的同源性, 也没有任何典型的保守功能域或辅因子结合域. 结合定点突变及系列生物物理学方法发现了 SfmD 是一类特殊的血红素依赖的, 以过氧化氢为氧化剂, 过氧化酶类类似的 Tyr 芳环羟化酶(图 5)^[32]. 该酶催化 3mTyr 到

3h5mTyr 的转化, 也可催化 Tyr 及 D-Tyr 的羟化, 而 Tyr 羟基一旦被甲基化保护则不能识别. 通过体外生化实验也证实了 SfmM2 催化酪氨酸芳环 C-甲基化. 除了 SFM-A 外, SAC-B 及 NDM 也采取类似的机制形成酪氨酸的衍生物作为 NRPS 的底物. 通过在异源宿主菌 *P. putida* KT2440 或者天蓝色链霉菌中异源表达 *sfmD/sfmM2/sfmM3* 或 *sacD/sacF/sacG* 均可实现该非蛋白源氨基酸 3h5mOmTyr 的生物合成^[33]; 然而目前的产量只有十几毫克每升, 还需要进一步的优化提高.

作为天然产物家族中著名的一类分子, 以 ET-743 为代表的四氢异喹啉生物碱一直吸引着化学、生物学及药学研究领域的广泛关注^[112], 因此其生物合成研究也是充满竞争和挑战的^[34,35]. 除了本研究组外, 日本的 Oikawa 研究组^[36]阐明了 SFM-A 核心骨架形成的特殊 Pictet-Spengler(P-S)反应机制, 最近他们

图 4 萘啉霉素(NDM)生物合成研究中揭示的特殊 NRPS 二碳前体的来源及其形成机制(网络版彩图)

Primary metabolism: 初级代谢; Secondary metabolism: 次级代谢

图 5 SFM-A 及 SAC-B 生物合成途径中非蛋白源氨基酸 3h5mOmTyr 的生物合成(网络版彩图)

发文阐明了 QNC 的生物合成途径^[37]; 美国的 Sherman 研究组^[38]采用宏基因组的方法获得了 ET-743 的大部分生物合成基因, 根据与该家族其他化合物基因簇的比较初步提出了可能的生物合成途径。尽管如此, 还有若干的生物合成问题需要进一步深入研究, 产生的新化合物将有助于发展该家族其他的创新药物; 而获得的材料与知识将为构建来源稀缺的海洋抗肿瘤药物的合成生物学研究及高效制备创造条件。

2 复杂抗肿瘤天然产物的生物合成与新化合物的发现与制备

如何发现及获得新结构的化合物是天然产物研究领域面临的主要挑战之一。随着越来越多的天然产物被鉴别, 传统的从动植物或微生物来源的生物材料中分离活性物质、发现具有新型结构和活性的化合物变得越来越困难, 尤其是一些已知的天然产物严重干扰了对于未知化合物的发现。以生物合成研究为基础, 通过对微生物生物合成途径的改造或类似化合物生物合成基因的重组得到突变菌株作为微生物“细胞工厂”, 产生“非天然”天然产物, 这是组合生物合成的核心^[39,40]。另外, 随着天然产物生物合成研究的发展, 通过与相似基因簇的比较和序列分析, 一种从基因到产物的全新的天然产物的发现模式——基因组挖掘应运而生^[41]。该方法最大的优势就

是可以排除已知化合物的干扰; 同时, 结合生物合成研究积累的知识, 通过异源表达、途径特异或全局性调控基因等的遗传改造激活沉默基因簇, 可以发现以往难以发现的全新天然产物。基于新化合物创造与发现方面, 本研究组主要从事结构复杂、抗肿瘤活性显著的微生物来源的天然产物的生物合成研究。

2.1 环肽 YM-216391 的生物合成研究

YM-216391 是 2005 年日本科学家从链霉菌的发酵液中分离得到的由聚噁唑-噻唑为主构成的环肽类天然产物, 具有良好的抗肿瘤活性(对 HeLa S3 肿瘤细胞的 IC_{50} 为 14 nmol/L)^[42]。初步的活性机制研究发现 YM-216391 既不是端粒酶的抑制剂, 也不同于已知的其他抗肿瘤药物, 因此 YM-216391 可能通过一种新的作用机制来表现出抗肿瘤活性。以 454 基因组测序获得基因组的精细图, 通过基因组挖掘获得了 YM-216391 的生物合成基因簇。生物信息分析显示, YM-216391 的生物合成是核糖体编码前体肽, 经过系列后修饰完成(图 6)。由于该产生菌的遗传转移十分困难, 本研究组通过基因簇的异源表达得到了确证; 通过对基因簇中基因的敲除研究发现了一个可能的负调控基因 *ymR3*, 其敲除的突变基因簇 $\Delta ymR3$ 的异源表达株产量提高了 20 倍^[43]。在此基础上本研究组提出了 YM-216391 的生物合成途径(图 6), 为下一步系统研究包括 p450 羟化、异构化、前体肽 N-端

图 6 环肽类天然产物 YM-216391 的生物合成途径(网络版彩图)

和 C-端剪切环合等独特的酶学机制、组合生物合成获得类似物及进一步活性机制研究获得创造了条件.

2.2 谷田霉素的生物合成研究

谷田霉素(yatakemycin, YTK)是 2003 年从链霉菌的发酵液中分离得到的多卡霉素家族天然产物新成员,也是该家族目前抗肿瘤活性最好的成员(IC_{50} 为 3 pM)^[44]. 其抗烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)及新型隐球菌(*Cryptococcus Neofonmans*)等病原真菌的活性比临床药物两性霉素 B 和伊曲康唑强;对不同的肿瘤细胞具有很好的细胞毒性,比丝裂霉素强 3 个数量级. 该分子最显著的结构特征是多卡霉素和 CC-1065 的杂合体:具有与多卡霉素相同的活性三元环核心结构,其右臂与多卡霉素类似,左臂却与 CC-1065 的右臂相似,但含有极少见的甲基硫酯结构. 研究表明,该家族化合物不仅可以对游离的 DNA 双螺旋发生烷基化修饰,还可以高效地对核小体颗粒中的 DNA 进行烷基化修饰,甚至是几乎全部被组蛋白包围的 DNA^[45,46]. 因此这类化合物为研究真核细胞染色体中 DNA-组蛋白的动力学识别及 DNA 损伤导致的生物效应提供了有力的工具.

谷田霉素的生物合成是一个全新而富有挑战性的课题,由于该家族化合物的生物合成没有任何可以借鉴的知识,本研究采取了多种策略克隆谷田霉素的生物合成基因簇均未获得成功. 最后,以 Solexa 基因组测序获得基因组的精细图,以此为基础的基因组挖掘获得了谷田霉素的生物合成基因簇. 在生物信息学分析的基础上挖掘所有的次生代谢基因,重点搜寻可能的酪氨酸衍生化、甲基化、基于三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate, ATP)活化的 CoA 连接酶,最终获得了涵盖约 34 kb 的谷田霉素生物合成基因簇. 通过基因敲除结合生物信息学分析确定了基因簇边界. 通过体内基因敲除获得了系列突变体,其中 $\Delta ytkT$ 突变菌株产生中间体化合物 YTM-T;进而在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达、纯化了自由基依赖的 C-甲基化酶 YtkT,体外生化证实该酶催化 YTM-T 的甲基化,产生三元环合成的关键中间体(或副产物)(图 7)^[47]. 这是此类蛋白催化自由基甲基化反应的首例报道. 该工作发表后被 *Natural Product Reports* 作为热点所关注(Highlighted in “Hot off the press”^[48]). 在此基础上提出了 YTM 的生物合成途径,为下一步系统研究非蛋白源芳香族氨基酸的生物合成、独特肽键的形成、特殊甲基硫酯、三元环丙烷结构的生物合成途径、独特的抗性机制及结构类似物的获得创造了

图 7 谷田霉素(yatakemycin)的生物合成研究(网络版彩图)

条件。

谷田霉素家族化合物属于 DNA 烷基化试剂, 典型的结构特征是吡咯啉环上的环丙烷结构。其生物活性源于分子与 DNA 双螺旋的小沟中富含 AT 区域的识别, 进而三元环活性中心对腺嘌呤 A 碱基发生 DNA 烷基化修饰引起 DNA 链断裂。因此这类化合物的产生菌如何保护自身的 DNA, 如何避免烷基化损伤一直是关注的重点之一。通过体内基因敲除、互补、异源表达及体外生化研究, 发现了第一例来源于微生物次级代谢的糖基水解酶 YtkR2 参与的碱基剪切修复机制(图 7), 其生理功能是参与 YTM 的自身抗性机制, 从而保护产生菌免受 YTM 这一高活性 DNA 烷基化剂自身的伤害; 与中国科学院上海有机化学研究所的王任小研究组^[49]合作, 通过计算机同源建模的方法模拟了酶(YtkR2)-化合物(YTM)-DNA 的三元复合物结构; 以此为指导对参与识别的关键氨基酸残基进行了系统突变研究, 揭示了参与产物释放的关键疏水空腔对酶功能的影响。这一独特自我保护机制的发现也引起了同行关注^[50]。

2.3 FR901464 的生物合成研究

FR901464 是假单胞菌产生的、结构独特的高活性抗肿瘤天然产物(对多种人癌细胞体外的 IC_{50} 为 0.6~3.4 nmol/L)^[51], 引起了有机合成、药物化学等多

方面的关注^[52]; 进一步的化学生物学研究发现其具有全新机制: 作用于 mRNA 剪接体系的 SF3b 复合物, 通过抑制 mRNA 的剪接成熟而发挥抗肿瘤活性^[53]。目前, 以该机制为靶体、包括 FR901464 类似物在内的 mRNA 剪接体抑制剂已成为抗肿瘤新药发现的一个新方向^[54]。本研究组经过 3 年多的努力, 采用 PCR 克隆特异的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶(3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A synthetase, HCS)基因的方法从假单胞菌 *P. sp. No. 2663* 中克隆了完整的 FR901464 生物合成基因簇。该基因簇包含 20 个基因, 编码 5 个“AT-less”聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)、1 个杂合的聚酮合酶/非核糖体肽合成酶(PKS/NRPS)、1 个非核糖体肽合成酶(NRPS)、3 个独立的酰基转移酶(AT), 4 个聚酮骨架 β -烷基化相关蛋白、4 个后修饰酶、2 个调控蛋白。通过体内基因敲除和体外生化实验相结合, 初步阐明了 FR901464 独特的生物合成途径: 采用高度杂合的“AT-less”PKS-NRPS-HCS 三元体系, 以甘油作为 PKS 的起始单元, 揭示了自然界聚酮天然产物生物合成中复杂多样的生物合成机理(图 8)^[55]。随后的体外生化实验初步提出了聚酮合酶(PKS)模块中一个氧化酶功能域的生理功能是以聚酮链-S-ACP 为底物发生可能的 B-V 氧化反应, 进而引发聚酮链解离^[56]。

I 型 PKS 催化的生物合成中, 通常由酮缩合酶

图 8 FR901464 的生物合成研究及新生化机制的发现(网络版彩图)

(ketosynthase, KS)催化 C-C 键的形成,脱水酶(dehydratase, DH)催化 β -羟基脱水形成双键,硫酯水解酶(thioesterases, TE)催化聚酮链的水解或者环化.本研究组^[57]首次证实,在FR901464聚酮链延伸过程中,位于PKS内部的一个TE功能域催化了顺式双键的生成;而位于TE功能域下游的KS可以选择性地将脱水之后的聚酮链转移到后续的酰基载体蛋白ACP上,进而进行下一步的链延伸(图8).该结果不仅表明PKS功能域可能具有全新的功能,同时也揭示了聚酮天然产物中顺式双键形成的一种全新机制.工作发表后很快被*Natural Product Reports*作为热点所关注(Highlighted in “Hot off the press”^[58]);同时被《有机化学》作为亮点介绍^[59].最近,以FR901464的生物合成研究为契机,系统解析了聚酮化合物生物合成中以甘油为起始单元,经过独特的 α - β 脱水、异构成丙酮酸硫酯,进而经 α -酮基还原成手性羟基的酶学机制(图8)^[60].这种独特的聚酮三碳起始单元生成途径的阐明为进一步组合生物合成提供了新的选择,在一定程度上也为基因组挖掘发现新的聚酮化合物提供了依据.

通过FR901464生物合成基因簇的分析,在一株部分基因组测序的条件致病菌中发现了一个高度同源的基因簇;以此为基础,美国的Cheng研究组^[61]从该菌株中发现了该家族的结构类似物,显示良好的生物活性.最近,美国Pfizer公司的科研人员对该家族化合物开展了全面系统的生物合成研究,对该家族生物合成中的链解离与成环进行了全新的阐述^[62];同时他们还发现了一些具有潜在新药研究价

值的新化合物^[63].

2.4 芳香聚酮的生物合成研究

芳香聚酮类肿瘤治疗药在肿瘤药物市场中占有重要地位,包括的成员主要有柔红霉素、阿霉素、表阿霉素等;同时该家族的四环素及其半合成的衍生物目前仍是重要的临床抗感染药物.越野他汀(kosinostatin, KST)是从海洋小单孢菌(*Micromonospora*)中分离得到的芳香聚酮类天然产物,对革兰氏阳性菌具有优异的抗菌活性(MIC为39 ng/mL)和显著的抗肿瘤活性(IC₅₀为20 nmol/L~0.6 μ mol/L),是人DNA拓扑异构化酶的抑制剂^[64].与其他芳环抗生素相比结构十分奇特:四环骨架通过一个独特的螺环结构与吡咯-吡咯并环相连,同时糖基边链上含有一个十分罕见的以C-C键相连的乙酰基.本研究克隆了完整的生物合成基因簇(包括55个基因),通过体外生化实验证明了独立存在的、单功能NRPS的A功能域特定地识别烟酸,通过ATP活化后形成AMP复合物,进而转移到独立存在的、单功能NRPS的PCP功能域形成硫酯.经过系列修饰后形成特殊的氨基取代的氮杂五元环硫酯,进而与五碳糖发生系列特殊的修饰生成氮杂双五元并环硫酯中间体;然后与II型PKS催化形成的萘环中间体反应形成螺环中间体;最后经糖基化进一步后修饰完成KST的生物合成(图9)^[65].这一阶段性结果为下一步深入研究新的酶催化反应、揭示特殊的生化机制奠定了基础.期待将该分子中特殊糖基的生物合成途径引入抗肿瘤药物柔红霉素及阿霉素的生物合成体系中获得全

图9 芳香聚酮化合物越野他汀的生物合成研究(网络版彩图)

新的化合物, 为其升级改造提供分子多样性奠定了基础。

3 结语与展望

天然产物是大自然亿万年进化的结果, 不仅为有机化学的研究提供了不可或缺的素材, 同时也是人类新药发现的重要源泉。天然产物的产生蕴涵着丰富的化学与生物学信息, 其生物合成研究涉及有机化学与化学生物学、微生物生理与生化、天然药物化学等多门学科, 是典型的化学与生物学交叉融合。而合成生物学的兴起无疑对于天然产物的生物合成研究产生了巨大的推动力, 提出了更高的要求。人们只有在充分认识、理解的基础上才有可能自主设计。

类比于有机全合成, 化学家可以根据需要设计多条合成路线来合成任何自然界存在的(甚至理论存在的)复杂分子。经过 30 年的发展, 人们对于天然产物的生物合成途径及相关酶催化反应的理解已经有了长足进步, 然而还远没有达到自主设计的要求。天然产物中的很多结构单元依靠现有生物化学知识人们还无法推测其生物合成途径, 更不要说设计其生物合成路线。因此, 对含有独特化学结构和具有生物活性的天然产物进行生物合成研究, 增加对于天然产物生物合成酶学机制的理解将在很大程度上为合成生物学提供知识、材料和方法。本研究组 10 年来一直致力于这方面的研究, 希望坚持与努力能够为相关学科领域的发展和天然药物的发现与创新贡献微薄之力。

参考文献

- 1 Newman D J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery. *J Med Chem*, 2008, 51: 2589–2599
- 2 Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 2012, 75: 311–335
- 3 Walsh C T, Fischbach M A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 2469–2493
- 4 Koehn F E. Biosynthetic medicinal chemistry of natural product drugs. *Med Chem Commun*, 2012, 3: 854–865
- 5 Chang M C, Keasling J D. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 674–681
- 6 Prather K L, Martin C H. *De novo* biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19: 468–474
- 7 Weeks A M, Chang M C. Constructing *de novo* biosynthetic pathways for chemical synthesis inside living cells. *Biochemistry*, 2011, 50: 5404–5418
- 8 Winter J M, Tang Y. Synthetic biological approaches to natural product biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23: 736–743
- 9 Baltz R H. Combinatorial biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics: a model for synthetic biology to accelerate the evolution of secondary metabolite biosynthetic pathways. *ACS Synth Biol*, 2012, doi: 10.1021/sb3000673
- 10 Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440: 940–943
- 11 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496: 528–532
- 12 Scott J D, Williams R M. Chemistry and biology of the tetrahydroisoquinoline antitumor antibiotics. *Chem Rev*, 2002, 102: 1669–1730
- 13 Grosso F, Jones R L, Demetri G D, et al. Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet Oncol*, 2007, 8: 595–602
- 14 Carter N J, Keam S J. Trabectedin: a review of its use in the management of soft tissue sarcoma and ovarian cancer. *Drugs*, 2007, 67: 2257–2276
- 15 Li J W, Vederas J C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, 2009, 325: 161–165
- 16 Molinski T F, Dalisay D S, Lievens S L, et al. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 69–85
- 17 Siengalewicz P, Rinner U, Mulzer J. Recent progress in the total synthesis of naphthyridinomycin and leptomycin tetrahydroisoquinoline antitumor antibiotics (TAAs). *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 2676–2690
- 18 Liao X W, Dong W F, Liu W, et al. Synthetic progress of the tetrahydroisoquinoline antitumor alkaloids. *Chinese J Org Chem*, 2010, 30: 317–329
- 19 Cuevas C, Pérez M, Martín M J, et al. Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafrafrin B. *Org Lett*, 2000, 2:

2545–2548

- 20 Cuevas C, Francesch A. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat Prod Rep*, 2009, 26: 322–337
- 21 Arai T, Takahashi K, Ishiguro K, et al. Increased production of saframycin A and isolation of saframycin S. *J Antibiot (Tokyo)*, 1980, 33: 951–960
- 22 Mikami Y, Takahashi K, Yazawa K, et al. Biosynthetic studies on saframycin A, a quinone antitumor antibiotic produced by *Streptomyces lavendulae*. *J Biol Chem*, 1985, 260: 344–348
- 23 Velasco A, Acebo P, Gomez A, et al. Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *Pseudomonas fluorescens* A2-2: designing new cytotoxic compounds. *Mol Microbiol*, 2005, 56: 144–154
- 24 Li L, Deng W, Song J, et al. Characterization of the saframycin A gene cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL 11002 revealing a NRPS system for assembling the unusual tetrapeptidyl skeleton in an iterative manner. *J Bacteriol*, 2008, 190: 251–263
- 25 Peng C, Tang Y M, Li L, et al. *In vivo* investigation of the role of SfmO₂ in saframycin A biosynthesis by structural characterization of the analogue saframycin O. *Sci China Chem*, 2012, 55: 90–97
- 26 Kluepfel D, Baker H A, Piattoni G, et al. Naphthyridinomycin, a new broad-spectrum antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975, 28: 497–502
- 27 Beman V S, Montenegro D A, Korshalla J D, et al. Bioxalomycins, new antibiotics produced by the marine *Streptomyces* sp. LL31F508: taxonomy and fermentation. *J Antibiot (Tokyo)*, 1994, 47: 1417–1424
- 28 Pu J Y, Peng C, Tang M C, et al. Naphthyridinomycin biosynthesis revealing the use of leader peptide to guide nonribosomal peptide assembly. *Org Lett*, 2013, 15: 3674–3677
- 29 潘海学, 唐功利. 非核糖体肽合成酶催化的非常规装配模式. *微生物学通报*, 2013, 40: 1783–1795
- 30 Zmijewski M J, Mikolajczak M, Viswanatha V, et al. Biosynthesis of the antitumor antibiotic naphthyridinomycin. *J Am Chem Soc*, 1982, 104: 4969–4971
- 31 Peng C, Pu J Y, Song L Q, et al. Hijacking a hydroxyethyl unit from a central metabolic ketose into a nonribosomal peptide assembly line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 8540–8545
- 32 Tang M C, Fu C Y, Tang G L. Characterization of SfmD as a heme peroxidase that catalyzes the regioselective hydroxylation of 3-Me-Tyr to 3-OH-5-Me-Tyr in saframycin A biosynthesis. *J Biol Chem*, 2012, 287: 5112–5121
- 33 Fu C Y, Tang M C, Peng C, et al. Biosynthesis of 3-hydroxy-5-methyl-O-methyltyrosine in the saframycin/safracin biosynthetic pathway. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19: 439–446
- 34 唐满成, 唐功利. 抗肿瘤活性四氢异喹啉类抗生素的生物合成研究进展. *有机化学*, 2012, 32: 1568–1576
- 35 Koketsu K, Minami A, Watanabe K, et al. Pictet-Spenglerase involved in tetrahydroisoquinoline antibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16: 142–149
- 36 Koketsu K, Watanabe K, Suda H, et al. Reconstruction of the saframycin core scaffold defines dual Pictet-Spengler mechanisms. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 408–410
- 37 Hiratsuka T, Koketsu K, Minami A, et al. Core assembly mechanism of quinocarcin/SF-1739: bimodular complex nonribosomal peptide synthetases for sequential mannich-type reactions. *Chem Biol*, 2013, 20: 1523–1535
- 38 Rath C M, Janto B, Earl J, et al. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 1244–1256
- 39 Olano C, Méndez C, Salas J A. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep*, 2009, 26: 628–660
- 40 Olano C, Méndez C, Salas J A. Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from perspective of combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 571–616
- 41 Challis G L. Genome mining for novel natural product discovery. *J Med Chem*, 2008, 51: 2618–2628
- 42 Sohda K Y, Nagai K, Yamori T, et al. YM-216391, a novel cytotoxic cyclic peptide from *Streptomyces nobilis*. I. fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 2005, 58: 27–31
- 43 Jian X H, Pan H X, Ning T T, et al. Analysis of YM-216391 biosynthetic gene cluster and improvement of the cyclopeptide production in a heterologous host. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 646–651
- 44 Igarashi Y, Futamata K, Fujita T, et al. Yatakemycin, a novel antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* sp. TP-A0356. *J Antibiot (Tokyo)*, 2003, 56: 107–113
- 45 Parrish J P, Kastrinsky D B, Wolkenberg S E, et al. DNA alkylation properties of yatakemycin. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 10971–10976
- 46 Trzupek J D, Gottesfeld J M, Boger D L. Alkylation of duplex DNA in nucleosome core particles by duocarmycin SA and yatakemycin. *Nat*

- Chem Biol, 2006, 2: 79–82
- 47 Huang W, Xu H, Li Y, et al. Characterization of yatakemycin gene cluster revealing a radical SAM-dependent MT and highlighting spirocyclopropane biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8831–8840
- 48 Hill R A, Sutherland A. Hot off the press. *Nat Prod Rep*, 2012, 29: 617–621
- 49 Xu H, Huang W, He Q L, et al. Self-resistance to antitumor antibiotic: a DNA glycosylase triggers the base excision repair system in yatakemycin biosynthesis. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 10532–10536
- 50 Goodman C. Biomaterials: in living color. *Nat Chem Biol*, 2012, 8: 873
- 51 Nakajima H, Sato B, Fujita T, et al. New antitumor substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 1996, 49: 1196–1203
- 52 Albert B J, Sivaramakrishnan A, Naka T, et al. Total syntheses, fragmentation studies, and antitumor/antiproliferative activities of FR901464 and its low picomolar analogue. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 2648–2659
- 53 Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, et al. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 576–583
- 54 Webb T R, Joyner A S, Potter P M. The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer. *Drug Discov Today*, 2013, 18: 43–49
- 55 Zhang F, He H Y, Tang M C, et al. Cloning and elucidation of the FR901464 gene cluster revealing a complex AT-less PKS using glycerate as starter units. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 2452–2462
- 56 Tang M C, He H Y, Zhang F, et al. Baeyer-Villiger oxidation of ACP-tethered thioester to ACP-linked thiocarbonate catalyzed by a monooxygenase domain in FR901464 biosynthesis. *ACS Catal*, 2013, 3: 444–447
- 57 He H Y, Tang M C, Zhang F, et al. *Cis*-Double bond formation by thioesterase and transfer by ketosynthase in FR901464 biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 4488–4491
- 58 Hill R A, Sutherland A. Hot off the press. *Nat Prod Rep*, 2015, 32: 1364–1368
- 59 亮点介绍(4)篇. *有机化学*, 2014, 34: 1034–1035
- 60 He H Y, Yuan H, Tang M C, et al. An unusual dehydratase acting on glycerate and a ketoreductase stereoselectively reducing α -ketone in polyketide starter unit biosynthesis. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 113151–113159
- 61 Liu X, Biswas S, Berg M G, et al. Genomics-guided discovery of Thailanstatins A, B, and C as pre-mRNA splicing inhibitors and antiproliferative agents from *Burkholderia thailandensis* MSMB43. *J Nat Prod*, 2013, 76: 685–693
- 62 Eustáquio A S, Janso J E, Ratnayake A S, et al. Spliceostatin hemiketal biosynthesis in *Burkholderia* spp. is catalyzed by an iron/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E3376–3385
- 63 He H, Ratnayake A S, Janso J E, et al. Cytotoxic spliceostatins from *Burkholderia* sp. and their semisynthetic analogues. *J Nat Prod*, 2014, 77: 1864–1870
- 64 Furumai T, Igarashi Y, Higuchi H, et al. Kosinostatin, a quinocycline antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. *J Antibiot (Tokyo)*, 2002, 55: 128–133
- 65 Ma H M, Zhou Q, Tang Y M, et al. Unconventional origin and hybrid system for construction of pyrrolopyrrole moiety in kosinostatin biosynthesis. *Chem Biol*, 2013, 20: 796–805

Biosynthesis of Natural Products and Synthetic Biology of Antitumor Drugs

PAN HaiXue, YUAN Hua, JIAN XiaoHong & TANG GongLi

*State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry,
Shanghai Institutes of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*

Natural products are major sources of the currently available clinical drugs and serve as an important start point for the discovery of new drugs. Biosynthetic studies center on the genetic and biochemical characterization of gene clusters, biosynthetic pathways, and enzymatic mechanisms, which will establish the biosynthetic logic between genes and chemical structures. Thus, these studies will aid in furthering the understanding of natural product synthesis, physiological resistance, and biological regulation. Synthetic biology studies pertaining to natural products have been focused on the design and assembly of biosynthetic pathways in fermentation-friendly microbial hosts to produce medicinal natural products, precursors, or new compounds. This review describes the major progresses of our laboratory with respect to the biosynthesis of antitumor natural products and synthetic biology studies centering on anticancer drugs.

natural product, biosynthesis, synthetic biology, drug discovery and production

doi: 10.1360/N052015-00049