基于生物合成机制的天然产物结构多样性研究

钟冠男, 陈明, 刘文*

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: wliu@mail.sioc.ac.cn

收稿日期: 2016-09-26; 接受日期: 2016-11-20; 网络版发表日期: 2017-05-02

国家自然科学基金(批准号: 31430005, 21520102004, 21472231)、上海市科学技术委员会(批准号: 14JC1407700, 15JC1400400)和中国科学院战略性先导科技专项(B类)(批准号: XDB20020200)资助

摘要 天然产物尤其是次级代谢产物在药物化学和化学生物学中扮演重要角色. 基于天然产物获得结构多样性的类似物对于新药的筛选和医学研究具有重要意义. 天然产物均由生物体代谢产生, 在了解其生物合成机制的基础上, 对生物合成过程进行合理化改造, 可以极大地丰富天然产物的结构多样性, 获得许多具有重要生理活性和有机化学不易合成的天然产物类似物. 本文以硫肽类抗生素中的硫链丝菌素和聚酮聚肽类化合物为例, 对生物合成方法在天然产物结构多样性中的应用进行总结和展望.

关键词 天然产物, 次级代谢, 生物合成机制, 结构多样性

天然产物尤其是次级代谢产物, 是现代药物的重要源泉. 在1981~2010年批准上市的1073种小分子药物中, 约有64%直接来源于天然产物或与天然产物相关, 特别在抗感染和抗肿瘤药物中, 这一比例分别高达69%和75%^[1]. 然而, 生物体产生天然产物的目的并非为人类服务, 而是参与和调节自身细胞内的生化反应或抵抗外源侵害^[2], 因此并非所有的天然产物均可作为药物. 在针对天然产物的生物学活性研究中发现, 分子结构的微小改变往往会导致其活性的显著变化. 以天然产物为起点, 获得结构多样性的类似物, 不仅可以丰富化合物的种类, 更可能同时赋予天然产物新的生物学活性, 在新药的发现和筛选以及生物医学基础研究中发挥关键作用. 本文以本研究组的工作为主,

分别针对硫肽类抗生素、聚酮聚肽类抗生素两种生物合成途径截然不同的化合物展开讨论, 总结了在了解它们生物合成机制的基础上对其进行结构多样性研究所取得的成果, 对今后可能的发展方向进行展望.

1 天然产物结构多样性的意义及挑战

天然产物分子结构的微小变化不仅会导致生物活性强度的显著差异, 而且还可能引起生物活性的改变, 从而导致其药用价值发生变化. 以大环内酯类抗生素红霉素(erythromycin)和雷帕霉素(rapamycin)为例. 天然的红霉素主要包括A, B, C, D 4种组分, 其结构差异仅在于C12或(和) C2''的取代基略有不同(图1). 然而,

引用格式: 钟冠男, 陈明, 刘文. 基于生物合成机制的天然产物结构多样性研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 482–495
Zhong G N, Chen M, Liu W. Structural diversity research of natural products based on biosynthetic mechanism. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 482–495, doi: [10.1360/N052016-00291](https://doi.org/10.1360/N052016-00291)

它们的生物活性却相差甚远, 其中A组分活性最好, B组分活性明显降低, C和D组分的活性甚至不到A组分的1/2^[3]. 天然的雷帕霉素具有抗真菌和免疫抑制活性, 1999年被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用作免疫抑制剂(sirolimus). 对雷帕霉素C43位的羟基进行化学修饰, 可以获得4种药物 everolimus, temsirolimus, ridaforolimus 和 zotarolimus (图1), 前3种可以用于多种癌症的治疗, 最后1种可以用于治疗血管再狭窄. 对雷帕霉素的共轭三烯结构进行化学修饰所获得的化合物 ILS-920 目前正用于中风治疗的研究^[4].

自从人工合成尿素以来, 有机合成经过近190年的

发展, 如今已非常成熟. 有机化学家不仅可以合成目前已知的所有天然产物, 而且可以创造出任何一种自然界中尚未发现但结构合理的化合物, 是当前最重要的新物质创造手段. 使用有机合成的方法, 对天然产物分子的特定官能团进行改造, 可以获得多种天然产物的类似物, 极大地丰富化合物的种类, 扩展天然产物的结构多样性. 在此基础上进行生物学活性测试和药物筛选, 发现了许多新型药物和先导化合物. 对于自然界中含量很低、提取成本高昂的天然产物, 有机合成显现出巨大的优势. 但是有机合成同样存在一些不足: 需要使用大量的有机溶剂, 对环境污染较大; 不可避免地需要使用有毒有害、高度活泼的化学试剂和

图1 红霉素和雷帕霉素及其类似物的结构

苛刻的反应条件, 危险性大; 保护基的引入和脱除使得原子经济性较差; 对于结构复杂的天然产物, 有机合成成本高昂, 难以进行工业化生产. 以上因素均制约了有机合成在天然产物结构多样性方面的应用.

天然产物来源于生物体, 由生物体中特定的基因经过转录翻译后形成相关的生物合成酶, 生物合成酶以初级代谢中使用和产生的氨基酸、羧酸和糖基等常见的小分子为原料, 催化底物发生生化反应形成最终的次级代谢产物. 因此, 所谓生物合成, 就是在基因、酶、化合物3个层面研究天然产物在生物体内的合成过程, 寻找天然产物的生物合成基因簇, 确定与生物合成相关的酶的功能和催化顺序, 确定各个生化反应中间体的结构. 通过对天然产物生物合成机制的研究, 不仅可以探索和发现新型的酶学机制, 而且可以对天然产物的生物合成过程进行改造, 创造“非天然”的天然产物, 从而拓展天然产物的结构多样性. 与有机合成相比, 生物合成反应条件温和、对环境污染小、原子经济性高, 非常符合绿色化学的要求, 因此, 利用生物合成方法进行天然产物结构多样性的研究具有极大的优势.

2 以生物合成机制为导向的硫肽类抗生素结构多样性研究

硫肽类抗生素是一类富含硫原子且高度修饰的大环多肽类天然产物. 从结构上看, 硫肽类抗生素包含多个噻唑(噻唑)或噻唑啉(噻唑啉)环、多个脱水氨基酸以及该家族化合物所特有的含氮六元杂环. 许多硫肽类抗生素对多种耐药病原菌表现出良好的生物活性, 包括对甲氧西林具有耐药性的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、对青霉素具有耐药性的肺炎双球菌(penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, PRSP)、对万古霉素具有耐药性的粪肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VRE)^[5]. 下面以硫链丝菌素(thiostrepton, TSR)为例说明以生物合成为导向的硫肽类抗生素结构多样性研究以及取得的成果.

2.1 TSR的生物合成途径

TSR是一种典型的双环硫肽类抗生素, 除了硫肽类抗生素所共有的大环骨架之外, 还包含一个由喹啉

啶酸(quinaldic acid, QA)和4个氨基酸残基所构成的侧环结构. 研究表明, TSR可以同时结合23S rRNA和核糖体蛋白L11, 从而发挥抗菌活性, 其中QA可以与23S rRNA的A1067相结合, 对TSR的抗菌活性影响较大^[6]. 不仅如此, TSR还具有抗癌^[7]和抗疟活性^[8].

硫肽类抗生素属于核糖体肽(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs)家族. 比较硫肽类抗生素的生物合成基因簇可以发现, 7个基因参与了大环骨架的生物合成. 对于TSR而言, 前体肽基因*tsrH*经过转录翻译之后形成前体肽(precursor peptide), 在Ocin-ThiF家族的蛋白(TsrN)、环化脱水酶(TsrO)和脱氢酶(TsrM)的催化下将核心肽(core peptide)中的Cys转化为噻唑(噻)环. 之后脱水酶(TsrJ, K或S)催化Ser或Thr的脱水反应, 形成脱水丝氨酸(dehydroalanine, Dha)或脱水苏氨酸(dehydrobutyrine, Dhb). 最后该线性中间体在TsrL的催化下发生[4+2]环加成反应形成氮杂六元环, 完成大环骨架的形成(图2A)^[9].

在本研究组前期的研究中, 发现QA单元是由L-色氨酸(L-Trp)作为起始底物, 通过独立于前体肽的生物合成途径转化而来. TsrT (S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)依赖的甲基转移酶)首先催化L-Trp的C2位, 发生甲基转移反应, 之后吡啶环发生氧化重排形成喹啉啶酮, 最终形成QA单元(图2B)^[10]. 目前对于核心氮杂环的形成和QA单元上载的先后顺序还不清楚, 在此之后先导肽(leader peptide, LP)被切除并完成侧环的关环, 形成双环骨架. 最后TsrB (α/β 水解酶)催化C端的羧酸甲酯水解形成羧基, 氨基转移酶(TsrC)催化羧基的氨基转移反应形成酰胺, 获得TSR分子(图2A)^[11]. 基于对TSR生物合成过程的了解, 可以从QA单元和核心肽两方面对其分子结构进行改造, 以获得不同的结构类似物.

2.2 TSR结构多样性研究——QA单元的结构改造

TsrT参与了QA单元的生物合成过程, 敲除*tsrT*基因的突变株(Δ *tsrT*)因阻断QA单元的生物合成而不再产生TSR, 向该突变株中喂养化学合成的QA类似物(化合物1, 2, 4, 5), 获得了相应的TSR类似物(图2C).

喂养化合物4后获得的TSR类似物7'-F-TSR与TSR的结构差别较大, 因7'位被氟原子取代, 导致TSR的侧环无法形成, 且Ile1和Val2丢失, Dha3转化为1,2-二酮结构. 虽然由于侧环结构的缺失, 7'-F-TSR不具有抗菌

图2 TSR及其类似物的结构和生物合成途径

A: TSR的生物合成; B: QA的生物合成; C: QA类似物的突变株喂养(红色)及Ile1(粉红)、Ala2(蓝色)、Ala4(紫色)、Thr7(绿色)定点突变获得的类似物

活性,但如果对其1,2-二酮结构进行化学修饰,该化合物或许可以作为一种新型的小分子探针^[12].

喂养化合物1,2,5后所获得的TSR类似物5'-F-TSR, 6'-F-TSR和12'-CH₃-TSR与TSR的结构差别较小,但它

们的水溶性却得到了极大改善, 有助于克服TSR因溶解度小而难以成药的缺点. 使用MRSA, PRSP, VRE以及部分革兰氏阴性的多黏菌素抗性菌对上述3种TSR类似物进行抗菌活性测试, 发现3种化合物均显示出比TSR和万古霉素更好的抗菌活性^[13]. 此外, TSR及其类似物在体外抗菌活性测试中对海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*, 结核分枝杆菌的研究模型), 分别显示出比红霉素和异烟肼(isoniazid)高25~200倍的抗菌活性. 在使用海分枝杆菌感染的斑马鱼(*Danio rerio*)幼鱼对TSR及其类似物进行体内抗菌活性测定时, 同样发现3种TSR类似物的抗菌活性均优于TSR, 且化合物本身的毒性较低, 表明QA单元结构修饰后的TSR类似物极有可能成为抗结核分枝杆菌的先导化合物. 进一步的研究结果表明, TSR及其类似物除了与致病菌的rRNA结合产生抗菌活性之外, 还具有诱导宿主细胞自噬的作用, 且12'-CH₃-TSR诱导细胞自噬的能力最强. TSR是目前已知的唯一一种主动作用于致病菌和宿主细胞, 从而产生抗菌活性的抗生素^[14]. 以上结果表明, 基于生物合成机制对QA单元进行合理化改造, 增加TSR的结构多样性, 可以大大提高TSR本身的成药潜力.

在对TsrB的研究中发现, 敲除*tsrB*基因后可以产生C端甲基化的TSR (C-terminally methylated TSR, CmTSR), 抗菌活性测试显示该化合物比TSR活性更好^[11]. 因此, 在 Δ *tsrB*突变株的基础上敲除*tsrT*基因, 获得了 Δ *tsrB/T*双敲除突变株, 向该突变株中喂养化合物1, 2, 3, 5和6分别获得了C端甲酯化和QA单元修饰的TSR类似物5'-F-CmTSR, 6'-F-CmTSR, 6'-Cl-CmTSR, 12'-CH₃-TSR和12'-deCH₃-TSR (图2C). 选择包括MRSA, PRSP和VRE在内的9种致病菌对上述化合物进行抗菌活性测试显示, 除6'-Cl-CmTSR之外, 其他几种TSR类似物的抗菌活性均优于CmTSR和TSR, 说明对TSR进行C端和QA单元的双位点修饰可以获得相比单位点修饰更好的抗菌活性. 6'-Cl-CmTSR的抗菌活性较低, 可能是因为氯原子的诱导和位阻效应破坏了QA单元和23S rRNA的A1067位之间的相互作用^[15].

综上, 使用QA单元的类似物对TSR突变株进行喂养, 共获得了9种结构类似物, 其中7种表现出更好的抗菌活性. 此外, 通过对TSR类似物的研究发现了TSR抗菌活性的一种新机制——诱导宿主细胞发生自噬. 由此可见, 天然产物结构多样性研究具有重要的意义, 不仅可以构建新型结构类似物, 改善化合物活性, 同

时还有助于发现新的作用靶点以及作用机制, 为进一步的药物开发奠定基础. 在了解天然产物生物合成机制的基础上进行突变株喂养, 是天然产物结构多样性研究中的一种行之有效的方法.

2.3 TSR结构多样性研究——前体肽定点突变

在TSR的生物合成过程中, 前体肽包含一个含有41个氨基酸残基的先导肽(N端)和一个含有17个氨基酸残基的核心肽(C端). 对比核心肽和TSR中的氨基酸结构, 发现17个核心肽氨基酸中只有Ala2, Ala4和Thr7不需要进行翻译后修饰, 因而推测上述3个位点可以定点突变为其他氨基酸, 从而改变TSR的分子结构^[16].

对Thr7进行定点突变, 发现Thr7Ser可以形成成熟分子, 但产量太低而难以分离. 将Thr7定点突变为Ala或Val, 除了可以产生正常的TSR类似物Thr7Ala和Thr7Val之外, 还分别产生化合物Thr7Ala-2和Thr7Val-2. 这两种化合物的侧环结构均没有形成, Ile1和Val2丢失, Dha3转化为1,2-二酮结构, 与上文提到的7'-F-TSR结构较为类似(图2C). 研究表明, TSR的Thr7残基与23S rRNA有较强的相互作用, 对TSR的抗菌活性非常重要^[7], 而Thr7Ala, Thr7Val, Thr7Ala-2和Thr7Val-2抗菌活性的丧失进一步证实了该观点. 此外, 对于Thr7Ala-2和Thr7Val-2, 侧环结构的缺失可能会导致QA单元的构象错误, 无法有效地与核糖体结合, 进一步降低这两种化合物的抗菌活性^[17].

对Ala4进行饱和和定点突变, 获得了16种TSR类似物(图2C)^[16,18]. 将Ala4突变为Ser和Thr时, Ser和Thr可以被脱水酶催化发生脱水, 最终得到Ala4Dha, Ala4Dhb和少量的Ala4Ser, 没有检测到Ala4Thr的产生. 将Ala4突变为Cys时, Cys4可以与Dha17的碳碳双键发生Michael加成, 最终得到Ala4Cys F1和F2. 对于极性氨基酸Asp, Glu, Lys, Arg和具有较大空间位阻的Pro, 定点突变后无法形成成熟分子. 除此之外, 其他定点突变氨基酸均获得了正常的TSR类似物. 与TSR相比, 这16种化合物的抗菌活性均有所降低, 而体外抑制蛋白翻译活性大致相当, 说明Ala4突变不会影响其与核糖体的结合能力, 可能是影响了化合物的代谢稳定性和细胞膜的通透性从而导致抗菌活性降低^[18].

对Ala2进行饱和和定点突变, 获得了8种TSR类似物(图2C)^[19,20]. 其中Ala2Gly, Ala2Met, Ala2Phe和Ala2Tyr均为正常的TSR类似物. 与Ala4相似, 将Ala2突变为

Ser和Thr, 得到Ala2Dha和Ala2Dhb. 令人惊讶的是, 将Ala2突变为Ile和Val时, 获得的产物Ala2Ile- Δ Ile1和Ala2Val- Δ Ile1均缺失了Ile1. 推测产生这种现象的原因是负责切除先导肽的肽酶对底物识别的特异性较低, 在切除先导肽时将Ile1作为先导肽的一部分而切除, 2位突变后的Ile或Val代替Ile1完成侧环的关环. 此外, 肽酶也可以在Ala2和Dha3之间切除先导肽, 从而形成上文提及的7'-F-TSR, Thr7Ala-2和Thr7Val-2. 除Ala2Ile- Δ Ile1和Ala2Val- Δ Ile1之外, 其他化合物的抗菌活性均得到一定的保持^[20].

将Ile1定点突变为Val, 获得了Ile1Val, 这表明虽然Ile1参与了先导肽的脱除和侧环形成, 但依然可以通过定点突变获得TSR的类似物(图2C)^[19]. 在此基础上, 对Ile1进行饱和点突变, 获得6种新型TSR类似物: Ile1Leu, Ile1Met, Ile1Ala, Ile1Phe, Ile1Trp和Ile1Pro. 对Ile1和Ala2进行双突变, 获得了另外两种TSR类似物, 其中Ile1Val-Ala2Dha为TSR的天然类似物盐屋霉素(siomycin, SIO), 另一种为Ile1Val-Ala2Ser(SIO-Dha2Ser). 所有Ile1定点突变的TSR类似物的抗菌活性均有所降低. SIO-Dha2Ser虽然抗菌活性较低, 却有很强的诱导细胞自噬的作用^[21].

综上, 对TSR的核心肽进行定点突变, 一共获得36种TSR类似物, 显现出该方法在天然产物尤其是硫肽类抗生素结构多样性改造中的巨大优势. 虽然绝大多数类似物的抗菌活性均有所降低, 但上述结果也为TSR分子与靶点之间的构效关系研究提供了大量的支持.

2.4 其他硫肽类抗生素的结构多样性研究

Nosiheptide (NOS)是另一种双环硫肽类抗生素, NOS结构中包含一个独特的3-甲基-2-吡啶酸(3-methyl-2-indolic acid, MIA)单元, 与QA均来源于L-Trp, 研究发现, 喂养5-F-Trp可以产生5'-F-NOS^[22]. 此外, 对Ser13进行定点突变, 获得了Ser13Thr-1, Ser13Thr-2, Ser13Gly-1, Ser13Gly-2, Ser13Ala-1, Ser13Ala-2, Ser13Asp和Ser13Glu共8种NOS类似物(图3A)^[23]. 最近有文献报道对L-Trp生物合成相关的酶进行改造, 可以获得多种含有 β 甲基的L-Trp类似物^[24], 将这种方法应用于TSR和NOS, 或许可以通过L-Trp生物合成的改造, 从而获得TSR和NOS的类似物.

单环硫肽类抗生素GE37468和Thiocillin也有相似的研究. 对于GE37468, 通过核心肽定点突变的方法获得了29种类似物(图3B)^[25]. 对于Thiocillin, 通过定点突变获得结构类似物的种类非常多^[26], 并依据类似物的抗菌活性得出了Thiocillin的构效关系^[27]. 通过删除Thr3或在Thr3和Thr4之间引入1~3个L-Gly, 获得了环大小分别为23, 29, 32和35的Thiocillin类似物. Cys2Ser, Cys9Ser或在Ser1和Cys2, Cys9和Ser10之间插入Ser也可以获得不同环大小的类似物(图3C)^[28]. 最近, Young研究组^[29]向Thiocillin体系中引入非天然氨基酸, 获得了45种含有非天然氨基酸的类似物.

3 生物合成在PKs, NRPs结构多样性中的研究

聚酮类(polyketides, PKs)、非核糖体肽类(non-ribosomal peptides, NRPs)及其杂合的化合物是一大类分布广泛、具有良好生物活性的天然产物. 其中许多化合物, 如阿维菌素(PK)、万古霉素(NRP)、雷帕霉素(PK-NRP)等已经应用于农业或临床治疗. PKs是由聚酮合酶(polyketide synthases, PKSs)催化小分子羧酸发生Claisen缩合形成, NRPs是由非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs)催化氨基酸缩合形成酰胺键而产生^[30]. 因此, 对这一类化合物的结构多样性研究可以从组成化合物的结构单元入手, 改变小分子羧酸和氨基酸的结构, 获得结构多样性的PKs, NRPs化合物.

3.1 复用组合生物合成在抗霉素结构多样性中的应用

抗霉素(antimycin, ANT)是一类含有九元环双内酯的NRP-PK杂合天然产物, 能够抑制线粒体的电子传递, 具有抗真菌、抗昆虫及抗线虫的活性. ANT的结构中包含一个独特的来源于L-Trp的起始单元3-甲酰胺基水杨酸(formamidosalicylic acid, FSA), 在AntC(NRPs)的催化下与L-Thr和2-羟基丙酸缩合形成第一个酯基. 然后在AntD(PKS)催化下连接烷基丙二酸单酰CoA, 羰基还原后关环形成9元内酯骨架, 最后酰基转移酶(AntB)催化酰基转移形成ANT分子(图4A)^[31]. 目前已经发现的天然ANT分子有46种, 主要区别在于R₂和R₃取代基的不同, C7位的R₂基团由AntE(crotonyl-

图3 NOS (A), GE37468 (B)和部分Thiocillin (C)的结构类似物

CoA reductase, CCR)和AntD负责, C8位的R₃基团由AntB负责, 表明这几种酶对底物的容忍性非常大。

向抗霉素产生菌中喂养3-氟代邻氨基苯甲酸和4-氟代邻氨基苯甲酸^[32](或6-F-L-Trp^[33]), 可以获得4'-F-ANT和5'-F-ANT. 向 $\Delta antB$ 突变株中喂养含有不同取代基的脂肪酸(或同时喂养6-F-L-Trp), 一共获得13种C8缺少酰基化的ANT, 表明AntE可以识别多种不同种类的反应物^[34,35]. 以13种C8缺少酰基化的ANT和不同种类的酰基CoA为底物, 对AntB进行体外酶学反应, 共获得380种ANT的类似物, 其中356种为新化合物, 并引入了许多化学活性基团(如末端炔基)和药物活性基团(如CF₃). 其中很多类似物的生物活性优于天然的ANT, 且含有末端炔基的ANT类似物可以与叠氮化合

物发生click反应, 作为一种小分子探针介入疾病的治疗(图4b)^[34].

在对AntE进行晶体结构解析的基础上, 对其进行定点突变改造, 发现Val350Gly可以进一步拓宽底物范围, 在ANT的C7位引入甲基和噻吩基等芳香基团^[36]. 此外, 对ANT生物合成的部分基因和炔基生物合成的部分基因在大肠杆菌中进行共表达, 也可以在体内获得C7位含有炔基的ANT类似物(图4b)^[37].

Splenicin (SPN)是ANT的天然类似物, 主要区别在于SPN的C7位是一个苄基. 所有ANT的产生菌因缺少苯丙氨酸氨裂解酶(phenylalanine ammonia-lyase, PLA), 故无法产生SPN, 将SPN产生菌中的 $encP$ (PLA)导入ANT产生菌, 从而使得ANT产生菌也可以产生C7位

为苺基的ANT类似物(SPN-J) (图4c)^[38].

综上, ANT是一种利用生物合成方法研究天然产物结构多样性的优良模型, 可以同时利用基因改造、中间体喂养和体外酶学反应等多种手段实现天然产物的“复用组合生物合成”(multiplex combinatorial biosynthesis). 采用该策略, 极大地丰富了ANT的种类, 获得了大量具有良好生物活性和功能的类似物.

3.2 林可霉素的结构性多样性研究

林可霉素(lincomycin)是一种由林可链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)所产生的林可酰胺类抗生素, 主要包含A和B两种组分. 林可霉素A的结构包含两部分, 一部分称为甲硫林可酰胺(methylthiolincosamide, MTL), 另一部分称为氮-甲基-4-正丙基-L-脯氨酸(*N*-methylated 4-propyl-L-proline, PPL), 两部分在生物体内分别独立合成(图5A)^[39]. 研究发现, 林可霉素A对革兰氏阳性菌具有很好的抑制作用, 已经应用于临床治疗. 林可霉素B的脯氨酸部分为氮-甲基-4-乙基-L-脯氨酸(*N*-methylated 4-ethyl-L-proline, EPL), 与林可霉素A相比, 林可霉素B的抗菌活性较低, 毒性较大^[40].

研究发现, PPL形成之后可以在腺苷化酶(LmbC)催化下发生羧基的腺苷化^[41], 之后转移到肽酰基载体蛋白LmbN (peptidyl carrier proteins, PCP), 然后在独立的缩合功能域(LmbD)的催化下发生缩合形成酰胺键, 完成MTL和PPL的连接(图5A)^[42]. 林可霉素B的产生说明, 上述3种酶对PPL单元正丙基侧链的链长有一定的容忍性. 向 $\Delta lmbX$ (编码差向异构酶, 参与PPL生物合成)突变株中喂养4-正丁基-L-脯氨酸(4-butyl-L-proline, BUPL)和4-正戊基-L-脯氨酸(4-pentyl-L-proline, PEPL), 分别可以产生相应的林可霉素A类似物4-正丁基-4-脱正丙基林可霉素(4-butyl-4-depropyllincomycin, BULIN)和4-正戊基-4-脱正丙基林可霉素(4-pentyl-4-depropyllincomycin, PELIN), 且PELIN对葡萄球菌的抗菌活性比林可霉素A更好^[43]. 在此基础上喂养PPL单元的其他类似物, 推测也可以获得相应的林可霉素类似物.

天青菌素(celesticetin, CCB)和Bu-2545与林可霉素同属林可酰胺类抗生素, 三者结构相近. 天青菌素和林可霉素的区分之一为硫原子的取代基不同, 研究发现, LmbF和同源蛋白CcbF分别催化了两种不同的反应, 前者催化C-S键的断裂, 后者催化氧化脱羧脱氢的反应, 导致天青菌素和林可霉素形成不同的硫取代基,

且体外实验发现, LmbF和CcbF的底物可以相互交换, 在林可霉素生物合成后续蛋白LmbG (SAM依赖的甲基转移酶)及天青菌素生物合成后续蛋白Ccb4 (SAM依赖的甲基转移酶)、Ccb5 (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form, NADPH)依赖的还原酶)等酶的催化下可以获得Bu-2545以及多种林可霉素或天青菌素的类似物, 实现了这一类抗生素的结构性多样性^[44]. 在此基础上, 可以进一步使用体外酶学实验或者林可霉素、天青菌素体内基因置换的方法获得更多种类的含有天青菌素结构单元的林可霉素类似物(图5B).

在林可霉素的生物合成过程中, 涉及两个小分子硫醇麦角硫因(ergothioneine, EGT)和mycothiol (MSH)的转换. 其中LmbT和LmbV均为糖基转移酶, LmbT催化八碳糖由GDP转移到EGT, 在此基础上发生MTL和PPL的缩合, 之后LmbV催化八碳糖由EGT到MSH的转移反应. 两个小分子硫醇分别起到不同的作用, EGT作为一个特殊的小分子载体, 介导MTL和PPL单元的缩合反应, 而MSH作为林可霉素硫原子的供体, 参与了林可霉素的原子构建^[42]. 在PKs和NRPs的催化过程中, 酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)和PCP分别介导了聚酮和聚肽的缩合反应^[45]. 在林可霉素的生物合成过程中, 只有PPL上载到PCP和八碳糖上载到EGT时, 才能在LmbD的催化下发生酰胺键的缩合, 说明EGT有可能作为一种特殊的糖基载体, 起到对糖基的转运和活化的作用^[46]. 推测对八碳糖结构进行部分修饰, 或许也可以上载到EGT, 进而发生酰胺键的缩合获得MTL部分结构性多样性的林可霉素类似物.

3.3 吡咯吡啶霉素和氯丝菌素的结构性多样性研究

吡咯吡啶霉素(pyrroindomycin, PYR)是一种由*Streptomyces rugosporus*所产生的螺环乙酰乙酸内酰胺类化合物. 生物合成研究发现, 该化合物为PK-NRP杂合的天然产物, 8个PKS基因和1个NRPS基因共同形成含有5个碳碳双键的线性中间体^[47], 之后靠近内酰胺的羟基发生乙酰化和消除反应产生第6个碳碳双键^[48], 形成两对1,3-二烯和单烯, PyrE3和PyrI4分别催化一对1,3-二烯和单烯的[4+2]环加成反应, 区域和立体专一性地形成两个环己烯单元, 其中PyrE3催化endo型的双烷基十氢萘环的形成, PyrI4催化exo型螺环的形成^[49], 经过后续的修饰反应最终形成PYR分子

图5 林可霉素及其类似物的结构和生物合成过程

A: 林可霉素的生物合成途径; B: 天青菌素、Bu-2545及其他类似物的生物合成途径

(图6A).

螺环乙酰乙酸内酯类化合物的结构和PYR相似,

其中氯丝菌素(chlorothricin, CHL), Tetrocarcin (TCA), Lobophorin (LOB), Kijanimitin (KIJ)和Versipelostatit

(VST)中均含有双烷基十氢萘环和螺环乙酰乙酸内酯结构(图6B), 且生物合成基因簇中均含有*pyrE3*和*pyrI4*的同源基因, 推测上述化合物的生物合成过程中也存在与PYR相似的双[4+2]环加成反应^[49,50]. 使用*pyrE3*和*pyrI4*在CHL生物合成基因簇中的同源基因*chlE3*和*chlL*分别回补到 Δ *pyrE3*和 Δ *pyrI4*的突变株中, 发现两者均能恢复PYR的产生. 同理, 使用*pyrE3*和*pyrI4*分别回补到 Δ *chlE3*和 Δ *chlL*的突变株中, 两者也均能恢复CHL的产生^[49]. 由此说明, *PyrE3*和*PyrI4*及*ChlE3*和*ChlL*对底物的容忍性较大, 不仅可以催化自身的反应物, 也能够催化其他分子的线性中间体发生双[4+2]环加成反应, 为PYR及CHL的结构多样性改造提供了理论基础.

此外, 在部分螺环乙酰乙酸内酯类化合物中, 存在*exo*型的双烷基十氢萘环或*endo*型的螺环乙酰乙酸内酯单元, 与PYR和CHL的立体构型相反, 说明不同来源的酶催化[4+2]环加成反应的立体选择性并不完全一致, 因此可以将*PyrE3*, *PyrI4*或*ChlE3*, *ChlL*替换为立体选择性相反的酶, 从而获得立体构型相反的PYR

或CHL类似物.

4 总结与展望

在了解生物合成机制的基础上对天然产物的形成过程进行改造, 可以获得结构多样性的“非天然”天然产物, 大大扩展天然产物的用途. 而对生物合成途径的改造需要建立在对天然产物生物合成机制或者说生物体遗传与生化的详细研究和了解之上. 包含TSR, ANT, 林可霉素, PYR和CHL在内的所有次级代谢产物, 其生物合成所使用的原料均来自于初级代谢, 这说明生物体中初级代谢和次级代谢是密不可分的. 目前通过生物合成手段, 还无法随心所欲地获得任何一种天然产物类似物, 但随着生物科学与技术的不断发展, 未来的生物合成或许可以通过对天然产物生物合成路线以及基因和蛋白特定位点的合理化改造, 创造出人类所需要的所有化合物, 在人类的生产和生活中发挥更为重要的作用.

参考文献

- 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
- Traxler M F, Kolter R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Nat Prod Rep*, 2015, 32: 956–970
- 陈单丹, 吴杰群, 刘文. 以生物合成为基础的红霉素A的产量提高和结构改造. *生物工程学报*, 2015, 31: 939–954
- Cragg G M, Grothaus P G, Newman D J. New horizons for old drugs and drug leads. *J Nat Prod*, 2014, 77: 703–723
- Zhang Q, Liu W. Biosynthesis of thiopeptide antibiotics and their pathway engineering. *Nat Prod Rep*, 2013, 30: 218–226
- Harms J M, Wilson D N, Schlutzen F, et al. Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococcin. *Mol Cell*, 2008, 30: 26–38
- Kwok J M M, Myatt S S, Marson C M, et al. Thiostrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 2022–2032
- Schoof S, Pradel G, Aminake M N, et al. Antiplasmodial thiostrepton derivatives: proteasome inhibitors with a dual mode of action. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 3317–3321
- Hudson G A, Zhang Z, Tietz J I, et al. *In vitro* biosynthesis of the core scaffold of the thiopeptide thiomuracin. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 16012–16015
- Duan L, Wang S, Liao R, et al. Insights into quinaldic acid moiety formation in thiostrepton biosynthesis facilitating fluorinated thiopeptide generation. *Chem Biol*, 2012, 19: 443–448
- Liao R, Liu W. Thiostrepton maturation involving a deesterification-amidation way to process the C-terminally methylated peptide backbone. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 2852–2855
- Zheng Q, Wang S, Liao R, et al. Precursor-directed mutational biosynthesis facilitates the functional assignment of two cytochromes P450 in thiostrepton biosynthesis. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 2673–2678
- Wang S, Zheng Q, Wang J, et al. Target-oriented design and biosynthesis of thiostrepton-derived thiopeptide antibiotics with improved pharmaceutical properties. *Org Chem Front*, 2015, 2: 106–109
- Zheng Q, Wang Q, Wang S, et al. Thiopeptide antibiotics exhibit a dual mode of action against intracellular pathogens by affecting both host and microbe. *Chem Biol*, 2015, 22: 1002–1007
- Wang S, Zheng Q, Wang J, et al. Concurrent modifications of the C-terminus and side ring of thiostrepton and their synergistic effects with respect

- to improving antibacterial activities. *Org Chem Front*, 2016, 3: 496–500
- 16 Li C, Zhang F, Kelly W L. Heterologous production of thiostrepton A and biosynthetic engineering of thiostrepton analogs. *Mol Biosyst*, 2011, 7: 82–90
- 17 Li C, Zhang F, Kelly W L. Mutagenesis of the thiostrepton precursor peptide at Thr7 impacts both biosynthesis and function. *Chem Commun*, 2012, 48: 558–560
- 18 Zhang F, Kelly W L. Saturation mutagenesis of TsrA Ala4 unveils a highly mutable residue of thiostrepton A. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 998–1009
- 19 Guo H, Wang J, Li Y, et al. Insight into bicyclic thiopeptide biosynthesis benefited from development of a uniform approach for molecular engineering and production improvement. *Chem Sci*, 2014, 5: 240–246
- 20 Zhang F, Li C, Kelly W L. Thiostrepton variants containing a contracted quinaldic acid macrocycle result from mutagenesis of the second residue. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 415–424
- 21 Duan P, Zheng Q, Lin Z, et al. Molecular engineering of thiostrepton via single “base”-based mutagenesis to generate side ring-derived variants. *Org Chem Front*, 2016, 3: 1254–1258
- 22 Zhang Q, Li Y, Chen D, et al. Radical-mediated enzymatic carbon chain fragmentation-recombination. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 154–160
- 23 Liu W, Ma M, Xue Y, et al. The C-terminal extended serine residue is absolutely required in nosiheptide maturation. *ChemBioChem*, 2013, 14: 573–576
- 24 Herger M, van Roye P, Romney D K, et al. Synthesis of β -branched tryptophan analogues using an engineered subunit of tryptophan synthase. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 8388–8391
- 25 Young T S, Dorrestein P C, Walsh C T. Codon randomization for rapid exploration of chemical space in thiopeptide antibiotic variants. *Chem Biol*, 2012, 19: 1600–1610
- 26 Acker M G, Bowers A A, Walsh C T. Generation of thiocillin variants by prepeptide gene replacement and *in vivo* processing by *Bacillus cereus*. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 17563–17565
- 27 Bowers A A, Acker M G, Koglin A, et al. Manipulation of thiocillin variants by prepeptide gene replacement: structure, conformation, and activity of heterocycle substitution mutants. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 7519–7527
- 28 Bowers A A, Acker M G, Young T S, et al. Generation of thiocillin ring size variants by prepeptide gene replacement and *in vivo* processing by *Bacillus cereus*. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 10313–10316
- 29 Luo X, Zambaldo C, Liu T, et al. Recombinant thiopeptides containing noncanonical amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 3615–3620
- 30 Pang B, Wang M, Liu W. Cyclization of polyketides and non-ribosomal peptides on and off their assembly lines. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 162–173
- 31 Liu J, Zhu X, Kim S J, et al. Antimycin-type depsipeptides: discovery, biosynthesis, chemical synthesis, and bioactivities. *Nat Prod Rep*, 2016, 33: 1146–1165
- 32 Schoenian I, Paetz C, Dickschat J S, et al. An unprecedented 1,2-shift in the biosynthesis of the 3-aminosalicylate moiety of antimycins. *Chem-BioChem*, 2012, 13: 769–773
- 33 Yan Y, Zhang L, Ito T, et al. Biosynthetic pathway for high structural diversity of a common dilactone core in antimycin production. *Org Lett*, 2012, 14: 4142–4145
- 34 Yan Y, Chen J, Zhang L, et al. Multiplexing of combinatorial chemistry in antimycin biosynthesis: expansion of molecular diversity and utility. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 12308–12312
- 35 Sandy M, Rui Z, Gallagher J, et al. Enzymatic synthesis of dilactone scaffold of antimycins. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 1956–1961
- 36 Zhang L, Mori T, Zheng Q, et al. Rational control of polyketide extender units by structure-based engineering of a crotonyl-CoA carboxylase/reductase in antimycin biosynthesis. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 13462–13465
- 37 Zhu X, Liu J, Zhang W. *De novo* biosynthesis of terminal alkyne-labeled natural products. *Nat Chem Biol*, 2014, 11: 115–120
- 38 Chang C, Huang R, Yan Y, et al. Uncovering the formation and selection of benzylmalonyl-CoA from the biosynthesis of splenocin and enterocin reveals a versatile way to introduce amino acids into polyketide carbon scaffolds. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 4183–4190
- 39 Spízek J, Rezanka T. Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63: 510–519
- 40 Spízek J, Rezanka T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64: 455–464
- 41 Kadlčík S, Kučera T, Chalupská D, et al. Adaptation of an *L*-proline adenylation domain to use 4-propyl-*L*-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis. *PLoS One*, 2013, 8: e84902
- 42 Zhao Q, Wang M, Xu D, et al. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature*, 2015, 518: 115–119
- 43 Ulanova D, Novotna J, Smutna Y, et al. Mutasynthesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant staphylococci. *Antimicrob*

- [Agents Chemother](#), 2010, 54: 927–930
- 44 Wang M, Zhao Q, Zhang Q, et al. Differences in PLP-dependent cysteinyl processing lead to diverse *S*-functionalization of lincosamide antibiotics. [J Am Chem Soc](#), 2016, 138: 6348–6351
- 45 Fischbach M A, Walsh C T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. [Chem Rev](#), 2006, 106: 3468–3496
- 46 Wang M, Zhao Q, Liu W. The versatile low-molecular-weight thiols: beyond cell protection. [BioEssays](#), 2015, 37: 1262–1267
- 47 Wu Q, Wu Z, Qu X, et al. Insights into pyrroindomycin biosynthesis reveal a uniform paradigm for tetramate/tetronate formation. [J Am Chem Soc](#), 2012, 134: 17342–17345
- 48 Kanchanabancha C, Tao W, Hong H, et al. Unusual acetylation-elimination in the formation of tetronate antibiotics. [Angew Chem Int Ed](#), 2013, 52: 5785–5788
- 49 Tian Z, Sun P, Yan Y, et al. An enzymatic [4+2]cyclization cascade creates the pentacyclic core of pyrroindomycins. [Nat Chem Biol](#), 2015, 11: 259–265
- 50 Pang B, Zhong G, Tang Z, et al. Enzymatic [4+2]cycloadditions in the biosynthesis of spirotetramates and spirotetronates. [Method Enzymol](#), 2016, 575: 39–63

Structural diversity research of natural products based on biosynthetic mechanism

ZHONG GuanNan, CHEN Ming & LIU Wen

*State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*

Natural products (NPs), often referred to as secondary metabolites produced by living organisms, are known to play a critical role in both medicinal chemistry and chemical biology. The diversification of their structures is significant for new drug screening and medical research. On the basis of the biosynthetic mechanism of NPs, their biosynthetic pathway could be rationally reconstructed to obtain diverse NP analogues that have distinct physiological activities and are difficult to synthesize. With primary focus on thiopeptides, polyketides and non-ribosomal peptides, in this study, we selected specific examples to highlight and find strategies to design and develop novel analogues of NPs based on the understanding, development, and utilization of compatible biosynthetic machinery.

natural products, secondary metabolites, biosynthetic mechanism, structural diversity

doi: [10.1360/N052016-00291](https://doi.org/10.1360/N052016-00291)