

放线菌环二肽类活性天然产物生物合成研究进展

黄运红¹, 黎金祖¹, 陈思敏¹, 刘文慧¹, 吴妙尔¹, 朱笃^{1,2}, 谢运昌^{1,2*}

1 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源与保护利用重点实验室, 江西 南昌 330022

2 江西科技师范大学 江西省有机功能分子重点实验室, 江西 南昌 330013

黄运红, 黎金祖, 陈思敏, 刘文慧, 吴妙尔, 朱笃, 谢运昌. 放线菌环二肽类活性天然产物生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4497-4516.

HUANG Yunhong, LI Jinzu, CHEN Simin, LIU Wenhui, WU Miaoer, ZHU Du, XIE Yunchang. Advances in the biosynthesis of cyclodipeptide type natural products derived from actinomycetes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4497-4516.

摘 要: 环二肽(cyclodipeptide, CDP)是一类由 2 个 α -氨基酸缩合而成的最小环肽分子, 也可称为二酮哌嗪类化合物(diketopiperazines, DKPs)。CDP 具有稳定的 DKP 环状骨架结构, 活性广泛而显著, 药用前景良好, 发掘意义重大。放线菌是重要的 CDP 生产菌, 同时具有非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)与环二肽合酶(cyclodipeptide synthase, CDPS)两种 DKP 骨架合成催化酶, 并从中发现多种骨架结构修饰酶, 研究开发价值巨大。本文系统介绍了放线菌 CDP 类活性化合物的 DKP 骨架合成途径及其结构修饰机制两方面的研究工作, 以期为新型 CDP 类天然产物的发掘、新颖 CDP 分子生物合成机制的阐明及合成生物学设计与应用等领域研究与实践提供参考。

关键词: 环二肽; 放线菌; 非核糖体肽合酶; 环二肽合酶; 骨架结构修饰

资助项目: 国家自然科学基金(32060021)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060021).

*Corresponding author. E-mail: xieyunchang@jxnu.edu.cn

Received: 2023-02-02; Accepted: 2023-04-23; Published online: 2023-08-21

Advances in the biosynthesis of cyclodipeptide type natural products derived from actinomycetes

HUANG Yunhong¹, LI Jinzu¹, CHEN Simin¹, LIU Wenhui¹, WU Miaoer¹, ZHU Du^{1,2}, XIE Yunchang^{1,2*}

1 Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

2 Jiangxi Key Laboratory of Organic Chemistry, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

Abstract: Cyclodipeptide (CDP) composed of two amino acids is the simplest cyclic peptide. These two amino acids form a typical diketopiperazine (DKP) ring by linking each other with peptide bonds. This characteristic stable ring skeleton is the foundation of CDP to display extensive and excellent bioactivities, which is beneficial for CDPs' pharmaceutical research and development. The natural CDP products are well isolated from actinomycetes. These bacteria can synthesize DKP backbones with nonribosomal peptide synthetase (NRPS) or cyclodipeptide synthase (CDPS). Moreover, actinomycetes could produce a variety of CDPs through different enzymatic modification. The presence of these abundant and diversified catalysis indicates that actinomycetes are promising microbial resource for exploring CDPs. This review summarized the pathways for DKP backbones biosynthesis and their post-modification mechanism in actinomycetes. The aim of this review was to accelerate the genome mining of CDPs and their isolation, purification and structure identification, and to facilitate revealing the biosynthesis mechanism of novel CDPs as well as their synthetic biology design.

Keywords: cyclodipeptide; actinomycetes; nonribosomal peptide synthetase (NRPS); cyclodipeptide synthase (CDPS); skeleton modification

环二肽(cyclodipeptide, CDP)是由 2 个氨基酸组成的最简环肽,因含氨基酸缩合形成的 2,5-二酮哌嗪(2,5-diketopiperazine)骨架结构而统称为二酮哌嗪(diketopiperazines, DKPs) (图 1)^[1-3]。CDP 的常规命名依据为 DKP 的氨基酸组型,写法通常是氨基酸三字母缩写加上绝对构型前缀,并在顺次排列的氨基酸名称与构型前加上 *cyclo* 注明是环肽结构,且可依据氨基酸的单字母缩写进行简化。以 2 个 L-Trp 形成的 CDP 为例,书写方式为 *cyclo*(L-Trp-L-Trp)或 *cyclo*-L-Trp-L-Trp,简写为 *cWW*^[1-2]。

CDP 稳定的 DKP 六元环骨架含 2 个氢键供

体与氢键受体,具有良好的蛋白结合与功能活性调节特性,并因此成为一个典型的药化与药效基团,表现出显著且广泛的生物学活性^[4-5]。此外 DKP 骨架本身及缩合的氨基酸所携侧链活性基团具有良好的可塑性,可通过(酶)催化修饰进一步生成大量结构新颖、活性多样的 CDP 类药物先导化合物,如:含 12,15-N-二甲酰-*cyclo*(L-4-NO₂-Trp-L-Phe)特殊骨架植物毒素 thaxtomin A^[6-7]、在 cFL 上修饰生成的抗菌分子白诺氏菌素(albonoursin)和 cLI 上修饰生成的转录终止因子 Rho 抑制型抗革兰氏阴性细菌分子双环霉素(bicylomycin)^[8-10],以及近期发掘的含吡啶并吡

啶结构的 cWW 二聚化神经保护活性分子 tetratryptomycin 等(图 1)^[11]。

放线菌是重要的 CDP 类活性天然产物生产菌, 在当前多学科交叉融合发展与研究技术手段不断创新的驱动下, 放线菌 CDP 类分子的发掘更加高效可行。因此, 本文从放线菌源 CDP 分子 DKP 骨架结构的生物合成及后修饰方面进行了系统归纳与总结, 以为放线菌活性 CDP 类产物的研究与开发提供详细而全面的借鉴与参考。

1 放线菌 DKP 的生物合成途径

放线菌 CDP 类产物的 DKP 骨架生成途径依据酶促反应机制的不同, 大致分为非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)和环二肽合酶(cyclodipeptide synthase, CDPS)催化两大类型, 且在放线菌中以后者为主^[1,12-16]。

1.1 放线菌 DKP 的 NRPS 催化生成途径

NRPS 是一个模块化的复合体, 每个独立模块常含有多个结构域并负责一个氨基酸单元的

活化、传递与加载, 多个模块间有序协同完成肽链组装; 模块的主要结构域有腺苷酰化结构域(adenylation domain, a domain)、肽酰载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP 或 T)和缩合结构域(condensation domain, C domain)^[17]。其中 A 结构域识别并腺苷酰活化(消耗 1 分子 ATP)氨基酸及其衍生物或结构类似物, 且该结构域具有一定的底物宽泛性, 可在同一位点上加载不同的氨基酸及其衍生物或结构类似物, 生成结构多样的同系物; 经 A 结构域活化的底物会传递给 PCP 形成氨酰化硫酯, 而 C 结构域则催化所在模块腺苷酰化后在 PCP 上形成的氨酰化硫酯的氨基与上一模块结合的氨(肽)酰化硫酯的羧基缩合形成肽键, 从而使得肽链不断延伸成熟^[17]。除上述 3 种结构域外, NRPS 最后一个模块往往含有硫酯酶结构域(thioesterase domain, TE domain), 催化完成组装的肽链环化与释放; 此外, 部分模块中可能选择性含有一些特殊的修饰结构域, 如: 催化 N 甲基化的甲基转移酶结构域(methyltransferase domain, MT domain)^[17]。

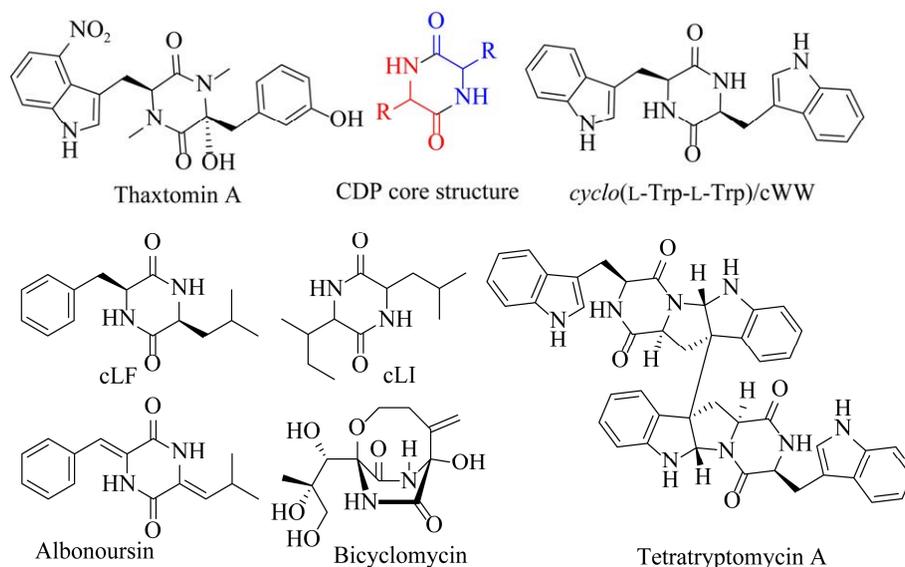


图 1 代表性活性环二肽类化合物的化学结构^[1-11]
Figure 1 Chemical structures of several typical CDPs^[1-11].

而负责放线菌 CDP 生物合成的 NRPS 通常只含 2 个模块,且模块缺少 TE 结构域,而由 C 结构域催化 2 个结构单元环化成 DKP 结构^[18]。如酸疮痂链霉菌(*Streptomyces acidiscabies*)中 thaxtomin 生物合成途径中的 NRPS 组装链就由 2 个独立蛋白模块 TxtAB 组成,且每个模块的结构域组合均为 A-MT-PCP-C,其中 TxtB 活化加载 L-4-NO₂-Trp 分子, TxtA 识别活化 L-Phe,二者协同完成 DKP 分子 thaxtomin D 的缩合生成(图 2A)^[18-20]。

除上述特异性途径外, Schultz 等发现海洋稀有放线菌沙盐孢菌(*Salinispora arenicola*) CNS-205 中含 7 个模块的 CymA 催化组装 cyclomarins 时,前 2 个模块可组合生产 2 个 CDP 支路代谢产物 cyclomarazines A 与 B。其中模块 1 识别活化吲哚 N 异戊烯基化的 L-Trp 而生成氨酰 N-(1,1-dimethyl-1-allyl)-Trp,而模块 2 可识别活化 δ -OH-L-Leu,并与前一模块的氨酰产物缩合,再经由 II 型硫酸酯酶 CymQ 催化解离,并环化生成具有 DKP 骨架的 cyclomarazines A 与 B,前者 DKP 骨架 N 甲基化修饰由模块 2 上 MT 结

构域催化(图 2B)^[21-22]。可见,传统多模块 NRPS 也可合成 CDP 分子,但当前报道的放线菌 NRPS 类 CDP 生成研究仅有上述 2 例,有待后续不断发掘。

1.2 CDPS 催化的放线菌 DKP 生物合成途径

CDPS 是含 200–300 个氨基酸残基的小型合酶,缩合 2 分子氨酰-tRNA (aa-tRNA) 装载的天然氨基酸生成 CDP 分子。与 NRPS 不同,CDPS 基本不识别氨基酸衍生物或结构类似物,也无需消耗 ATP 活化氨基酸分子,但可因过度竞争 aa-tRNA 而影响细胞多肽链翻译过程^[1-3,12-16]。上述 CDPS 可依据底物是否含 L-Trp,大致分为识别利用 L-Trp 的类型和不识别 L-Trp 的类型,后者包括首个被鉴定的 CDPS 蛋白 AlbC。

1.2.1 不识别 L-Trp 的 CDPS

AlbC (PDB ID: 3OQV) 发掘于诺尔丝链霉菌(*Streptomyces noursei*),含 239 个氨基酸残基,可缩合 L-Phe 与 L-Leu 生成 albonoursin 的骨架分子 cFL (图 3A)^[23-25]。AlbC 推测为 I 型 aa-tRNA 合成酶进化而来,但无对应的 tRNA 结合结构域,仅依靠蛋白表面 2 个结合口袋(surface-

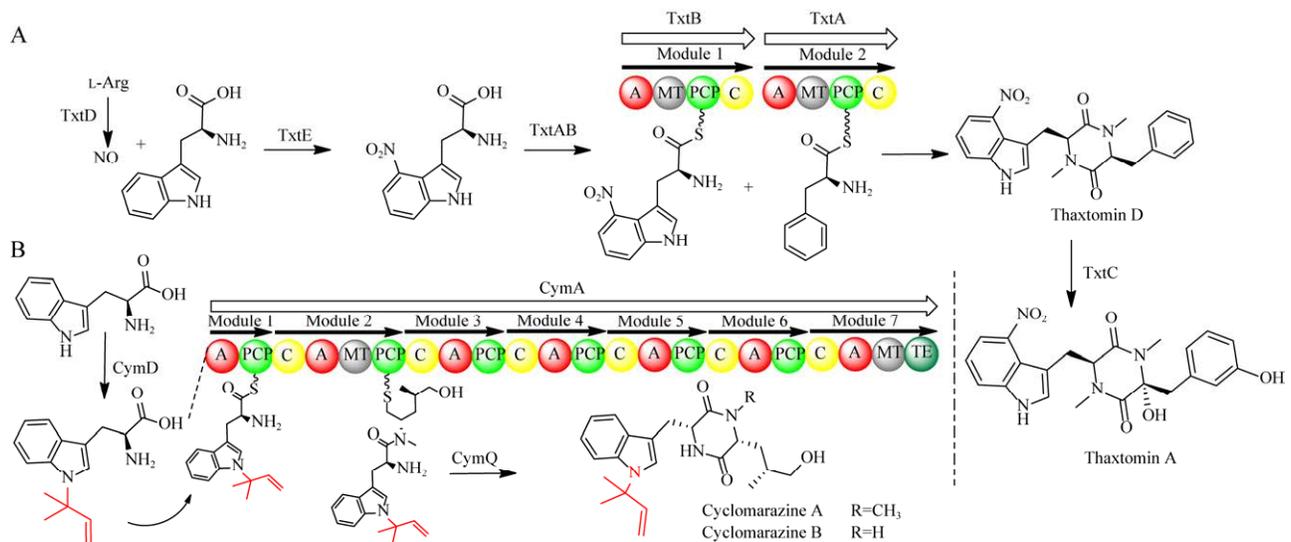


图 2 Thaxtomin 和 cyclomarazines (A-B) 的生物合成机制^[18-22]

Figure 2 The biosynthesis mechanism of thaxtomin and cyclomarazines (A-B)^[18-22].

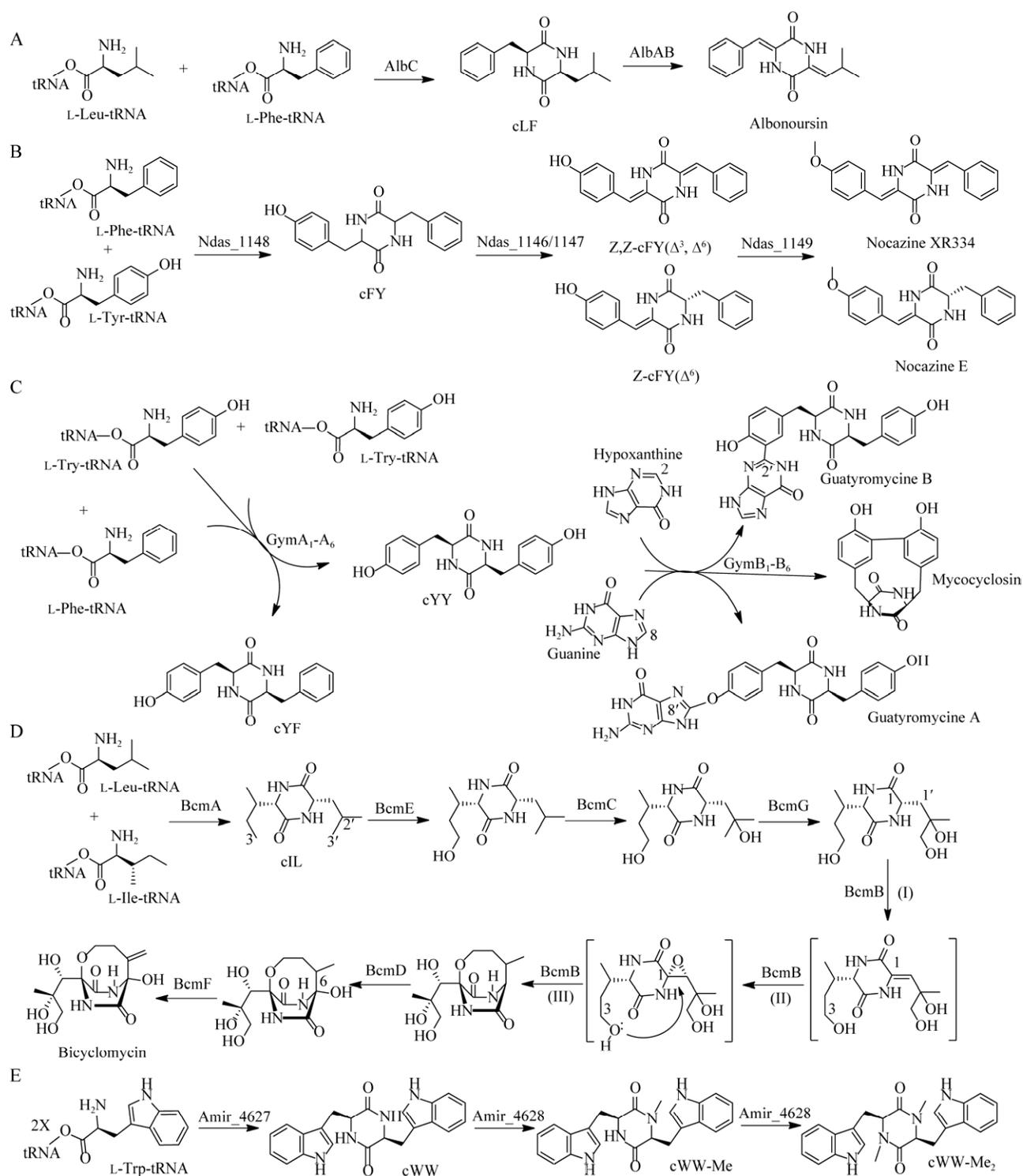


图3 Albonoursin (A)^[23-25]、nocazine (B)^[30]、guatyromycin 和 mycocyclusin (C)^[31]、bicyclomycin (D)^[32-33]和 cWW-Me/Me₂ (E)^[37]的生物合成机制

Figure 3 The biosynthesis mechanism of albonoursin (A)^[23-25], nocazine (B)^[30], guatyromycin and mycocyclusin (C)^[31], bicyclomycin (D)^[32-33], and cWW-Me/Me₂ (E)^[37].

assessible pocket) P1 与 P2 经连续的“乒乓反应”酶促催化机制串联识别缩合 Phe-tRNA^{Phe} 与 Leu-tRNA^{Leu} 组装成 cFL^[24-25]。此外研究发现 P2 也可与 P1 一样识别 Phe-tRNA^{Phe}, 进而生成另一个产物 cFF^[25]。

AlbC 的底物专一性较高, 仅可识别 L 型氨基酸, 且优先识别疏水性氨基酸, 不能识别带电或极性氨基酸, 但 P1/P2 口袋的底物识别特异性机制存在明显差异, 前者取决于底物的氨酰基部分, 后者除参考其氨酰基结构外, 还会识别底物 tRNA 上的氨基酸接受茎 1-73 位碱基序^[25-26]。此外 P1 与 P2 口袋内的关键氨基酸残基是酶识别底物的基础, 对应位点突变可导致底物识别调整和产物结构变化, 例如 P1 的 L200Q 突变, 产物即由 cFL 转变为 cYL^[26-29]。

基于 AlbC 研究的指导, 研究人员发掘了达松维尔拟诺卡氏菌(*Nocardiosis dassonville*)中以 L-Phe、L-Tyr 和 L-Leu 为底物的酶 Ndas_1148, 该酶主要生产 cFY (nocazine 骨架前体)和 cFF, 以及少量的 cFL (图 3B)^[30]。近期李书明团队在 6 株链霉菌中发现了 6 个高度同源的小型基因簇 *gym*, 且簇中均含有 1 个能识别利用 L-Tyr 和 L-Phe 生成 cYY 和 cFY 的酶 GymA₁-GymA₆, 其中 cYY 可经后续催化生成 mycocyclosin 和 guatyromycine (图 3C)^[31]。此外, 研究人员在肉桂链霉菌(*Streptomyces cinnamoneus*)中定位了 bicyclomycin 的生物合成基因簇 *bcm*, 并从中鉴定了 1 个不利用芳香族氨基酸而只识别 L-Leu、L-Ile 与 L-Val 并生成 cIL (bicyclomycin 骨架前体)与 cVL 的酶 BcmA (图 3D)^[32-33]。

1.2.2 识别利用 L-Trp 的 CDPS

L-Trp 侧链吲哚环可修饰性强, 因此含 L-Trp 的 DKP 骨架可经多类型后修饰催化生成包括吡咯并吲哚结构在内的各类 CDP 衍生活性产物, 而相应识别加载 L-Trp 的 CDPS 分布广泛, 发掘

前景光明^[14,34-36]。奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*)中的 Amir_4627 是首个被鉴定的以 L-Trp 为底物的 CDPS, 该酶可识别 2 个 L-Trp 分子并生成 cWW 用于后续甲基化修饰(图 3E)^[37]。随后研究人员在 *Nocardiosis* sp. CMB-M0232 中发现定位于 2 个不同基因簇上催化生成 cWW 的 2 个 CDPS, NcdA 和 NozA, 二者氨基酸序列组成相似性为 53%, 虽然进化关系上显著不同, 却具有相同催化功能并共存于同一宿主, 这种现象极为罕见, 对 CDPS 的起源、进化与分布规律研究意义重大(图 4A)^[38-39]。李文利团队从海洋放线菌尤索夫链霉菌(*Streptomyces youssoufiensis*) OUC6819 内 drimentine 生物合成途径中发现了 1 个可催化 L-Trp 与 L-Val、L-Pro、L-Leu、L-Ile 和 L-Ala 缩合, 生成主产物 cWV 和其余 4 种 CDP 分子 cWP、cWL、cWI 和 cWA 的催化酶 DmtB1 (图 4B); 后续的酶学机制研究揭示其位于底物结合口袋 P1 与 P2 中的关键位点, 特别是 P1 中的 M65 与 L185 及 P2 中的 V205 与底物的识别密切相关, 对应位点的突变会改变主要产物结构类型, 并同步揭示了 DmtB1 的同源酶 DmtB2 在识别利用 L-Trp 中的催化特征^[40]。同年, 李书明团队从 8 株链霉菌中发掘了 9 个以 L-Trp 为底物的新 CDPS, 含 5 个单一产物酶, 分别为生产 cWW 的 CWWS1_{NB5414} (重命名为 GutA₅₄₁₄)、CWWS1_{NB5737} (重命名为 GutA₅₇₃₇)、CWWS1_{NB2774} (重命名为 GutA₂₇₇₄); 生产 cWP 的 CWPS1_{NS1816} (重命名为 AspA); 生产 cWL 的 CWLS1_{NF5053}; 此外还有 2 个双产物酶, 如主产物为 cWP, 少量生成 cWL 的 CWPS1_{NF5123}, 主要生成 cWA, 也可较高效生成 cWP 的 cWXS1_{NS1868}^[41]。尤其该研究首次发现了 2 个可合成 6 种 CDP 的多功能 CDPS (重命名为 GutA₂₄₃₀₉)和 CWXS1_{NB3589} (重命名为 GutA₃₅₈₉), 二者均可生成主要产物 cWY, 也可生成 cWW、

cWA、cWF、cWM 和首次发现的 cWV^[41]。

上述研究充分表明放线菌具有 L-Trp 类 CDP 生物合成的巨大潜能,新鉴定的各类 CDPS 即可作为重要的分子标记应用于 CDP 类活性天然产物发掘,如李书明团队基于 GutA_{5414/5737/2774/24309/3589} 发掘了 cWW/cWY 嘌呤取代产物 guanitrypmycin,其中 guanitrypmycin A2-2 与同期经由 *pcm* 基因簇(含 cWY 生成酶 PcmA)发掘的 purincyclamide 结构一致^[42-45]。此后研究人员陆续在 CDP 类活性产物生物途径中发现以 L-Trp 为底物的 CDPS,如 naseseazine 生物合成途径中主产物为 cWP 的 NascA/NasA/AspA/NznA/NzeA^[46-49];产物为 cWM 的 guatrypmethine C 生物合成酶 GtmA^[50]; *stsp* 基因簇中产物为 cWW 的 StspCDPS^[51];以及 tetratrptomycin、cycettrptomycin、streptoazine 和 griseocazine 生物合成中的产物为 cWW 的 TtpA1/TtpA2/CttpA/SazA/SasA/GczA^[11,52-55]。

上述 CDPS 的不断发现与鉴定,极大促进了相关活性产物的生物合成机制解析;种类丰富的 CDPS 序列也可作为优良的生物探针或标记应用于放线菌 CDP 类天然产物的基因组挖掘^[12]。

2 放线菌 DKP 骨架的结构修饰

DKP 骨架往往需要经过一系列的结构修饰改造而最终形成结构多样、种类丰富的 CDP 类活性产物,这些修饰包括非天然氨基酸或结构类似物的修饰合成、DKP 合成同步修饰与 DKP 骨架后修饰^[1-2]。前二者主要发生在 NRPS 催化的 DKP 合成途径中,这是因为 NRPS 的 A 结构域具有较为宽泛的底物识别能力,往往可以活化非天然氨基酸及其衍生物^[17]。此外 NRPS 部分模块中嵌合有多种修饰结构域,尤其是 MT 结构域,可在 NRPS 催化 DKP 成环中完成 N 甲基化

修饰^[17]。而 CDPS 往往只能识别少数天然氨基酸形成 aa-tRNA,对应的产物生成修饰反应发生于 DKP 成型之后^[13-15,34-35]。

2.1 NRPS 催化合成 DKP 的结构修饰

NRPS 催化的 DKP 结构修饰主要体现在产物分子结构中的非天然氨基酸单元的来源及生成机制,且不同产物间差异显著。

2.1.1 Thaxtomin 生物合成中的结构修饰

Thaxtomin 的 DKP 骨架中的非天然氨基酸 L-4-NO₂-Trp 生成于细胞色素 P450 单氧化酶 (cytochrome P450 monooxygenase, CYP450 monooxygenase) TxtE 催化的 L-Trp 有氧硝基化反应;该反应的硝基供体为 NO,来源于 NO 合酶 TxtD 催化的 L-Arg 的侧链胍基解离过程^[56]。TxtAB 各含有 1 个独立 MT 结构域,可催化 L-4-NO₂-Trp 和 L-Phe 生成具有 N,N'-二甲基 DKP 骨架的 thaxtomin D,后者再经由 CYP450 蛋白 TxtC 在 DKP 骨架 L-Phe 部分进行两步串联羟化反应,生成最终的产物 thaxtomin A (图 2A)^[57-58]。

2.1.2 Cyclomarazines 生物合成中的结构修饰

Cyclomarazines 的生产同样始于 L-Trp 类非天然氨基酸的生成,即经由异戊烯基转移酶 CymD 催化 L-Trp 侧链吡啶环 N 原子的异戊烯基化修饰生成 N-(1,1-dimethyl-1-allyl)-Trp^[22,59]。Cyclomarazines 所含的另一个非天然氨基酸 δ -OH-L-Leu 上的羟基则与葡萄糖分解代谢密切相关,但其生成机制尚不明确;在 DKP 骨架组装过程中,CymA 的模块 2 中的 MT 结构域则可进一步催化 δ -OH-L-Leu 部分的 N 甲基化,生成终产物 cyclomarazine A (图 2B)^[21]。

2.2 CDPS 催化 DKP 生成后的结构修饰

CDPS 利用天然氨基酸生成的 DKP 结构还保留有许多活泼的氨基酸侧链及基团,可修饰程度更加丰富,如甲基转移酶催化的多位点甲基

化、异戊烯基转移酶催化的异戊烯基化及偶联成环、环二肽氧化酶的氧化脱氢及 CYP450 催化的多类型修饰等^[13-15,34-35]。尤其可依据 DKP 上 L-Trp 吡啶环 C3 位的取代反应类型,将上述修饰反应产物分为非吡咯并吡啶结构生成后修饰与生成吡咯并吡啶结构后修饰两大类^[35]。

2.2.1 不含吡咯并吡啶结构产物的生成途径

这一类分子 DKP 骨架不含有 L-Trp,或 L-Trp 吡啶环 C3 位未发生取代反应。

(1) Albonoursin 生物合成中的结构修饰

该分子起始骨架 cFL 可经由一组底物特异性较低的黄素依赖型 α,β -脱氢酶 AlbAB 催化 DKP 环上 L-Phe/L-Leu 中 C₂-C₃ 脱氢反应而最终生成 albonoursin (图 3A)^[23]。AlbAB 也称为环二肽氧化酶(cyclic dipeptide oxidase, CDO),具有保守的 FMN 结合位点,其中 AlbA 底物识别较为宽泛,可催化多种同时具有脂肪族和芳香族侧链的 CDP 分子的脱氢反应;但独立的 AlbA 不具活性,需结合 AlbB 才可完成底物脱氢,推测 AlbB 可能发挥电子传递受体或 AlbA 活性结构调节功能,辅助 AlbA 完成生物催化,但二者的具体反应机理有待进一步确定^[8,23]。

(2) Nocazine 生物合成中的结构修饰

Nocazine 的生物合成基因簇中也含有 2 个 CDO,即与 AlbAB 同源的 Ndas_1146/1147,组合后分步催化 cFY 的 C₂-C₃ 脱氢反应,产生 Z-cFY(D⁶)/(Z,Z)-cFY(D³,D⁶),并进一步由 SAM 依赖型 O-甲基化酶 Ndas_1149 催化酚羟基位点的 O 甲基化修饰生成 nocazine E 和 XR334 (图 3B)^[30]。基于上述反应,研究人员推测 cFY 经 Ndas_1146/1147 脱氢氧化可产生多种产物,这些产物由已鉴定 Ndas_1149 和预测功能同为甲基化的 Ndas_1145 进行多种组合的修饰,进而生成不同类型的 nocazine 产物,例如 cFY 单位点脱氢后产物 Z-cFY(D⁶)的异构体, E-cFY(D⁶)也可被

Ndas_1149 甲基化修饰成另一类 nocazine 产物^[30]。

(3) Guatyromycin/mycocyclosin 的同步生成

发掘于 6 株链霉菌中的 *gym* 是一类双基因微型基因簇,可编码 cYY 生成酶 GymA₁-GymA₆ 和 CYP450 氧化酶 GymB₁-B₆,后者可将 cYY 氧化成结构迥异的两类次级代谢产物,一类是 cYY 碱基取代产物,包括于 L-Tyr 酚羟基经 C-C 键连接鸟嘌呤(C8)的化合物 guatyromycin A,以及以 C-C 键将次黄嘌呤(C2)加载于 L-Tyr 酚羟基碳邻位碳原子的 guatyromycin B;另一类是 cYY 上 2 个 L-Tyr 酚羟基碳邻位碳原子成 C-C 环化的 mycocyclosin (图 3C)^[31]。*gym* 与结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)中 Rv2275/2276 组成 mycocyclosin 生物合成基因簇极其相似,尤其 GymB₁-B₆ 与 Rv2276 的序列一致性高达 60%,但前者催化功能更加多样,既能完成与 Rv2276 一致的分子内环化,又可催化 2 个位点上不同碱基的取代加载,且对应的同源蛋白分布广泛,发掘空间较大^[31]。

(4) Bicyclomycin 生物合成中的结构修饰

具有高度氧化双环结构的 bicyclomycin 的生物合成基因簇 *bcm* 可编码 cIL 生成酶 BcmA 和一组 6 个氧化酶,这些氧化酶包括 5 个 α -酮戊二酸/Fe²⁺依赖性双加氧酶 BcmBCEFG 和 1 个 CYP450 单加氧酶 BcmD^[32-33]。其中 BcmECG 分别在 cIL 骨架上的 C3、C2'和 C3'位点进行羟基化修饰,随后 BcmB 催化上述羟化中间体 C1-C1' 间脱氢环氧化,随后 C3 位的羟基攻击 C1-C1' 间的环氧并与 C1 共价连接生成八元氧杂桥环,但该成环反应是否自发或酶催化尚未明确。随后唯一的 CYP450 蛋白 BcmD 羟基化修饰新生成的双环产物的 sp³杂化的 C6 位点羟化, BcmF 催化脱氢生成环外双键并最终生成终产物 bicyclomycin (图 3D)^[33]。

(5) cWW-Me/Me₂生物合成中的结构修饰

A. *mirum* 中 cWW-Me/Me₂生物合成基因簇可编码 1 个 cWW 合酶 Amir_4627 和首个鉴定的 S 腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM) 依赖型 DKP 环 N-甲基转移酶 Amir_4628。Amir_4628 可分步甲基化修饰 cWW 上 DKP 环的 2 个 N 原子, 生成单甲基化的 cWW-Me 与双甲基化的 cWW-Me₂(图 3E)^[37]。此外 Amir_4628 还可催化 cFF、cFY、cFM 和 cFL 这 4 种含 L-Phe 的 DKP 环 N 甲基化, 其中 cFF 和 cFY 也可被催化生成单 N 及双 N 甲基化的产物, 而 cFM 和 cFL 仅可被 Amir_4628 催化生成单 N 甲基化产物^[37]。

2.2.2 吡咯并吡啶结构产物的生成催化

若 CDP 分子中含有 1 或 2 个 L-Trp, 其吡啶

环 C3/C3'若发生取代反应, 可促使环上 N 原子形成一个亚胺中心, 相邻 C2/C2'则可成为缺电子中心, 进而由 DKP 环上的 N 原子经亲核反应形成 C-N 键闭合的新五元环, 生成 6-5-5-6 的四环或 6-5-5-6-5-5-6 的七环的吡咯并吡啶结构。上述途径中的取代反应主要有异戊烯基/甲基化取代和 CYP450 催化的芳香基团取代, 后者包括吡啶嘌呤等基团取代以及复杂的吡咯并吡啶二聚化反应等。这些不同的催化反应及其催化酶也是 CDP 类产物多样性的物质基础^[14,34-35]。

(1) Nocardioazine 生物合成推导(甲基化/异戊烯基化双吡咯并吡啶结构)

Nocardioopsis sp. CMB-M0232 中界定的 nocardioazine 生物合成基因簇 *noz* 经异源表达仅

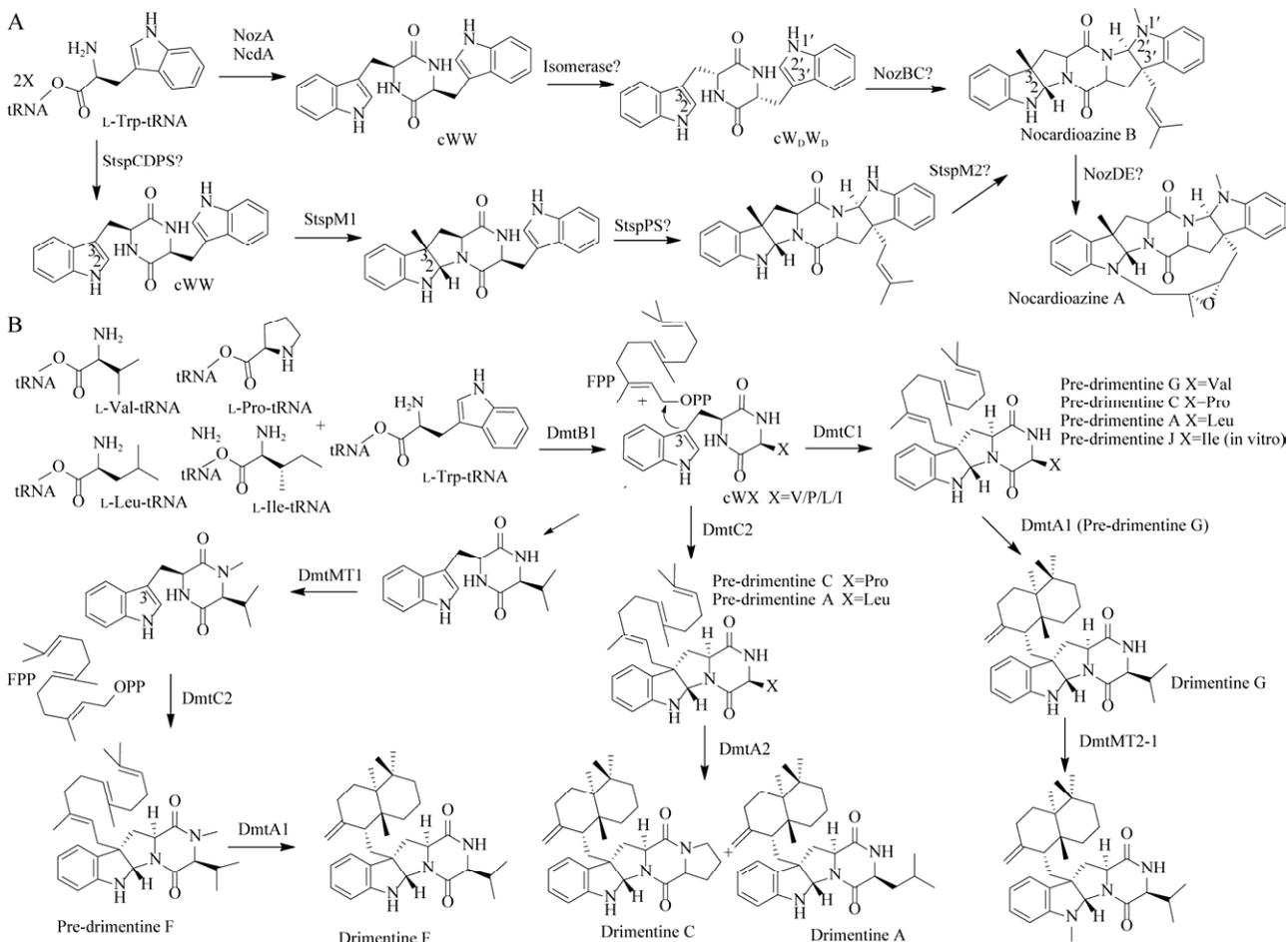


图 4 Nocardioazine (A)^[38-39,51]和 drimentine (B)^[40,60]的生物合成机制

Figure 4 The biosynthesis mechanism of nocardioazine (A)^[38-39,51] and drimentine (B)^[40,60].

可生产 cWW 分子;结合有机合成中间体与发酵产物的比较分析,研究人员推测菌株胞内存在 1 个异构酶催化 cWW 氨基酸构型由 L 型转变为 D 型而生成 cW_DW_D,并进而由 NozB 催化 C3-S 构型甲基化和 N1'甲基化修饰, NozC 催化 C3'-R 构型异戊烯基化生成产物 nocardioazine B,并经由 CYP450 酶 NozDE 催化后续分子内环化生成终产物 nocardioazine A (图 4A)^[38-39]。但上述甲基化酶与异戊烯基转移酶组合生成七环吡咯并吡啶结构的催化机理,及后续分子内环化机制尚不明确,有待后续研究。

近期研究发现 *Streptomyces* sp. HPH0547 中存在 1 个与 *noz* 相似,可编码 2 个甲基转移酶 StspM1/M2 和 1 个异戊烯基转移酶 StspPS 的基因簇 *stsp*;其中 StspM1 经酶学鉴定可催化 cWW/cWY 吡啶环 C3 位甲基化修饰,并进而生成具有吡咯并吡啶结构的产物;该酶是首个报道的 CDP 吡啶 C3 甲基转移酶,也是继 PsmD 之后第 2 个发掘的吡啶 C3 甲基化酶,其催化产物推测可进一步经由 StspM2/StspPS 催化后续的 N 甲基化与 C3'异戊烯基化修饰生成 nocardioazine B,但相关催化途径也需后续验证(图 4A)^[51]。

(2) Drimentine 的生物合成组装机制(含 C3 异戊烯基取代反应)

基于基因组学分析,李文利团队发现 3 个同源的疑似 drimentine 生物合成基因簇,分别为 *dmt1* (*S. youssoufiensis* OUC6819)、*dmt2* (*Streptomyces* sp. NRRL F-5123)和 *dmt3* [艾丁湖链霉菌 CGMCC 4.5739 (*Streptomyces aidingensis* CGMCC 4.5739)]^[40]。这些基因簇核心区均可编码 1 个 CDPS 蛋白 DmtB1-3、1 个异戊烯基转移酶 DmtC1-3 和 1 个膜结合的萜环化酶 DmtA1-3;DmtB1 是一类底物宽泛性 CDPS,主产物为 cWV,少量的 cWP、cWL、cWI 和极少量的

cWA;而 DmtC1 则将法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)转移至 cWV、cWP、cWL、cWI 的吡啶 C3 位,生成具有吡咯并吡啶结构的 pre-drimentine G、pre-drimentine C、pre-drimentine A 和 pre-drimentine J 这 4 个前体或中间产物(图 4B),并推测膜上的萜环化酶 DmtA1 可催化上述前 3 个中间体 C3 位加载的 FPP 组分环化而生成终产物 drimentine G/C/A^[40]。然而 *dmt1* 的异源表达分析发现 DmtC1 体内与体外的催化并不完全一致,*dmtB1C1* 体内表达并不生产 pre-drimentine J,只生成 pre-drimentine G、pre-drimentine C 和 pre-drimentine A;而当 *dmtA1B1C1* 组合表达时,DmtA1 仅催化 pre-drimentine G 分子 C3 位取代的 FPP 环化生成产物 drimentine G;而对 *dmt2* 的异源表达分析发现基因 *dmtB2C2* 组合只生产 pre-drimentine C 和 pre-drimentine A,进一步加载 *dmtA2* 可环化上述 2 个中间体生成产物 drimentine C/A,该结果表明 DmtA1/A2 在胞内底物识别特异性完全不同(图 4B);此外针对 DmtA1 的点突变分析进一步确定其关键的催化残基包括 E60、D214、D94、E133、N56、W29、W59、Y33 和 Y217。针对 *dmt3* 表达分析发现 *dmtB3C3* 仅生成 pre-drimentine A,然而 *dmtA3* 的添加却无任何产物生成,说明 *dmt3* 并非 drimentine 的主要生物合成基因簇^[40]。

后续研究进一步在 *dmtA1B1C1* 下游 0.56 Mb 处和 *dmtA2* 上游紧邻处分别发掘了 1 个 N-甲基转移酶 DmtMT1 和 DmtMT2-1;对 DmtMT1 与 DmtMT2-1 的功能验证发现前者是 DKP 环 N 甲基化酶,可催化 DmtB1 产物 cWV 上 L-Val 的 N 原子甲基化,并进而由 DmtC1A1 催化生成 drimentine F;而 DmtMT2-1 可催化 pre-drimentine 和 drimentine 的吡啶 N 原子的甲基化生成多种 drimentine 同系物(图 4B)^[60]。

(3) Streptoazine 的生物合成结构修饰机制 (含 C3 异戊烯基取代修饰)

李文利团队发现 Streptoazine 生物合成途径中存在一个包含 SAM 依赖型甲基转移催化结构域和二甲基烯丙基焦磷酸盐 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 依赖型异戊烯基转移酶结构域的独特双功能催化酶 SazB, 该酶具有严格的底物识别特异性, 仅以 cWW 为底物并且仅可利用 DMAPP 作为异戊烯基供体, 完成 cWW 上 C3 与 C3' 的异戊烯基化取代, 进而依次生成 C3-R 单一取代的四环结构的中间体和 C3-R 与 C3'-R 双取代的七环结构的产物 streptoazine A^[53]。随即 SazB 进一步以 streptoazine A 为底物, 顺序催化 2 个吡咯环 N1 与 N1' 位点的甲基化, 生成单甲基化产物 streptoazine B 和双甲基化的终产物 streptoazine C (图 5A)^[53]。SazB 作为一个新颖的 CDP 吡咯 C3 异戊烯基转移/N1 甲基化双功能酶, 对 CDP 活性分子的结构修饰研究意义重大, 既可定向进化改造应用, 其序列也可作为标记进行基因组挖掘, 发掘更多的活性分子与特异催化酶。同期李书明团队发现了另一个由独立的异戊烯基转移酶 SasB 与 N 甲基转移酶 SasC 组成 Streptoazine 生物合成途径, 尤其 SazB 具有较为宽泛的底物识别能力, 可应用于获取多种异戊烯基修饰的 CDP 新产物(图 5A)^[55]。

(4) Griseocazine 的生物合成机制(立体专一性异戊烯基化)

Griseocazine 是由钱培元团队近期发掘的一类具有多元异戊烯基化修饰的良好神经保护活性产物; 该化合物生物合成基因簇 *gcz* 发掘于灰肉链霉菌(*Streptomyces griseocarneus*) 132, 包含 3 个功能基因, 编码 cWW 生成催化酶 GczA 和 2 个异戊烯基转移酶 GczBC^[54]。通过基因簇的异源表达结合底物生物转化与产物结构鉴定发现 GczB 是一个立体选择性异戊烯基转移酶, 可催化 cWW 分子吡咯环 C3/C3'-S 构型异戊烯基取代生成四环吡咯并吡咯产物 griseocazine A1 及七环吡咯并吡咯产物 griseocazine B^[54]。GczC 是一个独特的异戊烯基转移酶, 具有不同长度异戊烯基底物的识别利用能力和不同立体构型催化选择性, 可将香叶基焦磷酸(geranyl pyrophosphate, GPP)或 FPP 加载于 griseocazine A1 吡咯环 C2' 分别生成 griseocazine C1 和 griseocazine D1; 也能够将 GPP 或 FPP 以 C3'-R 构型加载于 griseocazine A1 上分别生成 griseocazine C2 和 griseocazine D2; 并同时以 C3'-S 构型加载 FPP 生成产物 griseocazine D3 (图 5B)^[54]。GczBC 加载异戊烯基而赋予产物分子独特生物学活性, 既丰富了生物催化研究, 也极大促进了神经性疾病药物的研发。

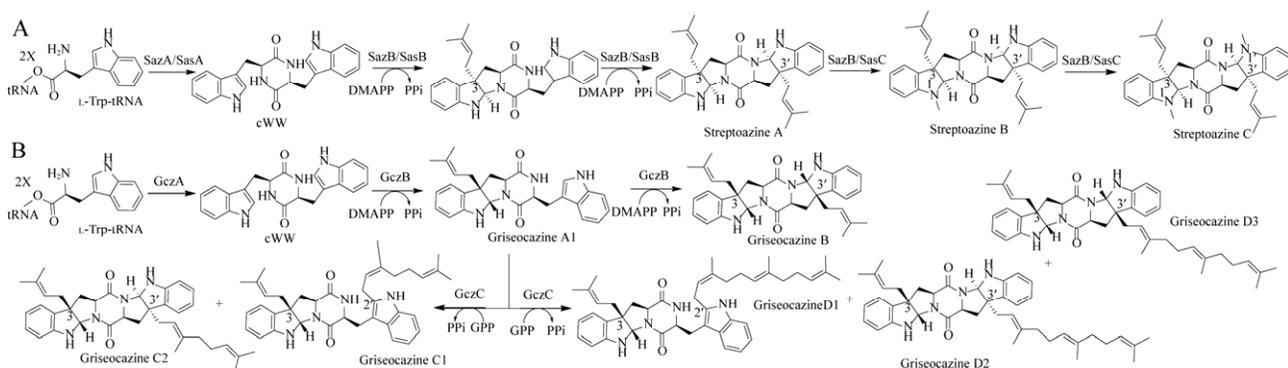


图 5 Streptoazine (A)^[53]和 griseocazine (B)^[54]的生物合成机制

Figure 5 The biosynthesis mechanism of streptoazine (A)^[53] and griseocazine (B)^[54].

(5) Guanitrypmycin/guatrypmethine 生物合成(含 CYP450 催化的 C3 嘌呤取代)

李书明团队发现来自 3 株不同链霉菌的 CYP450 催化酶, 即源自紫色链霉菌(*Streptomyces purpureus*) NRRL B-5737 的 GutD₅₇₃₇, 黄暗色链霉菌(*Streptomyces xanthophaeus*) NRRL B-5414 的 GutD₅₄₁₄ 和淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) NRRL B-2774 中的 GutD₂₇₇₄, 具有相同的催化能力, 可将鸟嘌呤加载于 cWW 吡啶环 N1 位形成 C-N 键(N1-C8') 而生成 guanitrypmycin C3-1 分子^[42-43]。此外 GutD₅₄₁₄ 与 GutD₂₇₇₄ 还可催化次黄嘌呤加载于吡啶环 C2 形成 C-N 键(C2-N1') 生成 guanitrypmycin C3-3; 除生成上述产物外, GutD₅₄₁₄ 与 GutD₂₇₇₄ 还可催化鸟嘌呤与次黄嘌呤加载 cWW 吡啶环 C3, 分别

生成 C3-S 构型嘌呤取代的吡咯并吡啶化合物 guanitrypmycin C3-2/C3-4。可见 GutD₅₄₁₄ 与 GutD₂₇₇₄ 具有显著的立体选择性多元催化能力, 发掘研究与应用价值巨大(图 6A)^[42-43]。

Guanitrypmycin A/B 的生物合成基因簇 *gut*₂₄₃₀₉ 和 *gut*₃₅₈₉ 由李书明团队发掘于单霉素链霉菌(*Streptomyces monomycini*) NRRL B-24309 和变形链霉菌(*Streptomyces varsoviensis*) NRRL B-3589; 上述 2 个基因簇(各含 5 个关键功能基因)可各编码 1 个 CDPS (GutA_{24309/3589})并催化生成骨架 cWF 和 cWY^[44-45]。这 2 个 CDP 分子可被一组 CDO (GutBC_{24309/3589})氧化生成苯环外双键, 并接着由关键的 CYP450 功能酶 GutD_{24309/3589} 催化区域/立体特异性 C3 位-3 鸟嘌呤化(C3-C8'), 进而生成吡咯并吡啶中间产物

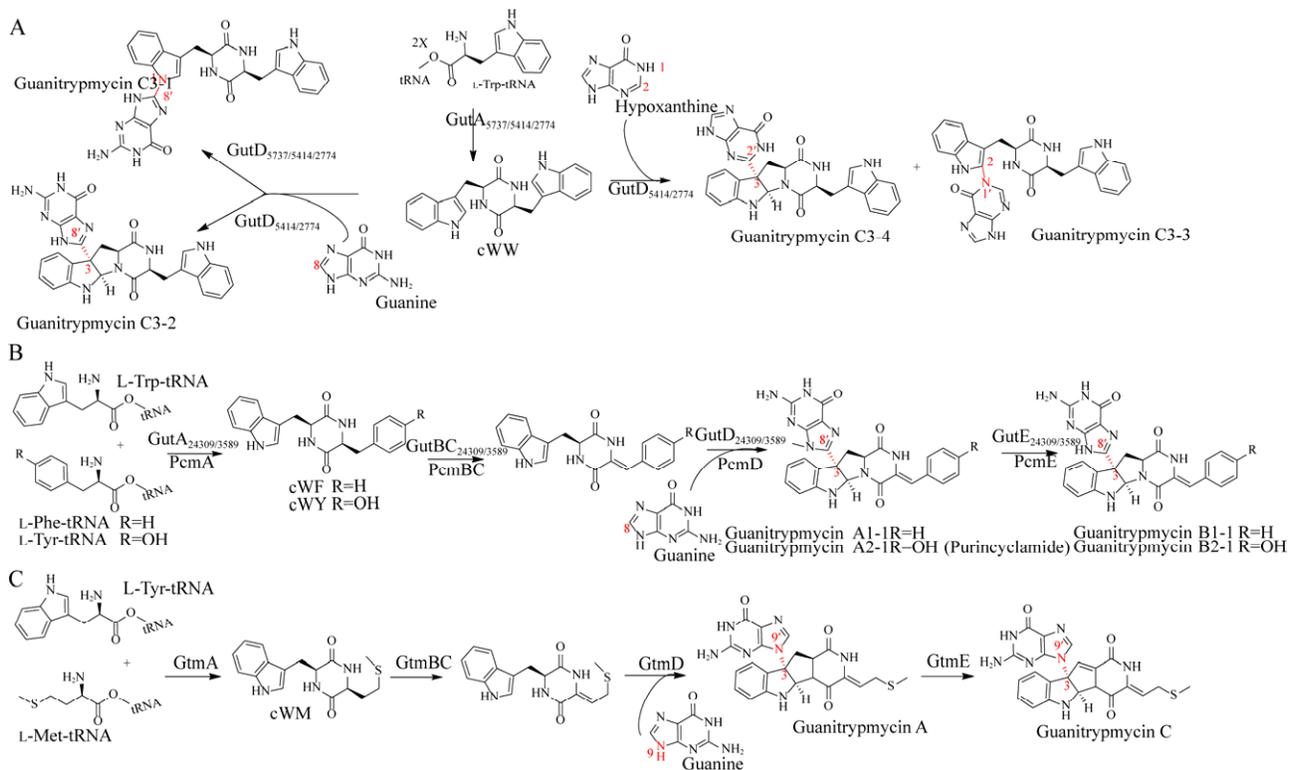


图 6 Guanitrypmycin/purincyclamide (A, B)^[42-45]和 guatrypmethine (C)^[50]的生物合成机制

Figure 6 The biosynthesis routes of guanitrypmycin/purincyclamide (A, B)^[42-45] and guatrypmethine (C)^[50].

guanitrypmycin B1-1/B2-1 (可自发反应生成异构体 guanitrypmycin B1-2/B2-2), 上述中间体再经由 N 甲基转移酶 GutE_{24309/3589} 催化生成终产物 guanitrypmycin A1-1/A2-1 (也可自发反应生成异构体 guanitrypmycin A1-2/A2-2) (图 6B)^[44-45]。此外体内基因表达同时也发现 GutD₂₄₃₀₉ 可直接将鸟嘌呤加载于 cWF 生成 C3-S 构型取代(C3-C8') 产物 guanitrypmycin C1-1。在上述工作开展同期, 戈惠明团队在冠霉素链霉菌(*Streptomyces chrestomyceticus*) NA4264 中发现与 *gut*_{24309/3589} 基本一致的基因簇 *pcm*, 该基因簇体内表达仅可生成 guanitrypmycin A2-1, 并在同期命名为 purincyclamide (图 6B)^[44-45]。

Guatrypmethine 是李书明团队激活沉默基因簇 *gtm* 而发掘的一类鸟嘌呤 C3-S 构型取代的吡咯并吡啶活性分子^[50]。*gtm* 与 *gut*_{24309/3589} 及 *pcm* 结构类似, 可编码 GtmA (CDPS, 主产物罕见含 S 分子 cWM)、一组 CDO 蛋白 GtmBC、关键的 CYP450 嘌呤取代催化酶 GtmD 以及 Fe^{II}/α-ketoglutarate 依赖的氧化酶 GtmE。待 cWM 骨架合成后, GtmBC 催化环上 L-Met 组分的脱氢反应, 产物并经由 GtmD 催化吡啶环 C3-S 构型取代反应生成 C-N 键(C3-N9')连接鸟嘌呤的关键中间产物 guatrypmethine A (可发生自发异构反应生成产物 guatrypmethine B), 并经由 GtmE 催化吡咯环氧化反应生成终产物 guatrypmethine C (图 6C)^[50]。从上述反应中可看出 GtmD 和 GutD_{24309/3589} 在催化功能上具有显著不同的区域选择性特异性, 而 GtmBC 和 GtmE 负责的先后氧化过程也使得终产物 guatrypmethine C 具有典型 *exo* 双键 DKP 环结构^[44,50]。

(6) Nasesezaine 生物合成(含 CYP450 催化的 C3-CDP 吡啶取代与 C-N 键二聚化)

Nasesezaine 是一类由 2 分子 CDP 组装而成的活性天然产物, 其生物合成基因簇 *nasc* 由瞿

旭东团队发现于 *Streptomyces* sp. CMB-MQ030 中, 主要编码 cWP 生成酶 NascA 和关键的 CYP450 催化酶 NascB; 后者可催化分子间自由基介导的串联反应生成 2 个 cWP 分子以 C3-C6' (2*S*,3*R*)结合的产物 nasesezaine C (图 7A)^[46]。而且 NascB 具有较为宽泛的底物识别特异性, 因此 Qu 团队利用该酶混杂的催化能力, 构建该酶的全细胞生物转化体系, 并添加一系列合成 CDP 底物获取 30 个新型 nasesezaine 结构类似物, 这 30 个产物大致可分为 I 型 C3-C7' (2*R*,3*S*)、II 型 C3-C7' (2*S*,3*R*)、III 型 C3-C6' (2*S*,3*R*)和 IV 型 C3-C6' (2*R*,3*S*), 部分产物表现出强效的神经保护活性^[46]。

随后瞿旭东团队进一步鉴定并发现了 *Streptomyces* sp. CMB-MQ030 中仅含 2 个基因的基因簇 Locus 2 除编码 1 个 CDPS 外, 还可编码 1 个 CYP450 功能酶 NasbB (Sherman 团队命名为 NznB), 该酶表现出与 NascB 不一样的区域/立体选择性催化, 可识别 2 个 cWP 分子, 生成 C3-C7' (2*R*,3*S*)构型 C3 吡啶取代产物 nasesezaine B, 也可催化 1 个 cWP 分子通过 C3-C7' (2*R*,3*S*)构型的 C-C 键取代于 cWA 分子 C3 位生成 nasesezaine A (图 7B)^[48-49]。上述研究表明 nasesezaine 的同系物可由胞内不同基因簇编码底物特异性显著差异的 CYP450 分别生成。相同机制也由李书明团队在 *Streptomyces* NRRL S-1868 内发现, 该菌株胞内基因簇 *asp/nas* 可编码底物特异性显著差异的 CYP450 酶 AspB (Nas_{S1686})/NasB, 其中 AspB 可组装 2 分子 cWP 成少量的 nasesezaine C、iso-nasesezaine B (C3-C6'; 2*R*,3*S*)和具有 N1-C7'连接二聚体结构的大量主产物 aspergilazine A (图 7C); NasB 与 NasbB 一致性高达 96%, 因此也可生成主产物 nasesezaine A 和少量 nasesezaine B, 此外 NasB 也表现出与 AspB 一致的 C-N 键生成催化能力

并生成产物 aspergilazine A, 更为特殊的是该酶还可以组装 2 分子 cWA 生成 naseesezina D (C3-C7'; 2R,3S) 和极少量的新产物 NAS-1 (C3-C6'; 2S,3R) (图 7D)^[47]。针对 AspB 和 NasbB 的 C-C/C-N 键多元催化, Qu 团队构建了二者的 *M. smegmatis* 生物催化体系, 并添加合成的多种 CDP 底物, 开发出 5 个强效神经保护分子在内的 12 个新颖产物^[61]。

随后瞿旭东与 Sherman 团队几乎同期鉴定

了 *Streptomyces* sp. NRRL F-5053 中与 NascB 和 AspB (Nas_{S1686}) 高度同源, 同样具有 C-C/C-N 二聚化催化能力, 且生成 naseesezina B/C 和 aspergilazine A 的 CYP450 功能酶 Nas_{F5053} (Sherman 团队命名为 NzeB) (图 7D); 获得了该酶及酶与底物的晶体结构, 再基于结构分析确定了决定酶催化专一性的关键氨基酸残基为 Gln65、Ala86、Ser284 和 Val288, 并可通过突变改造获得特定产物专一性高产工具酶, 实现目

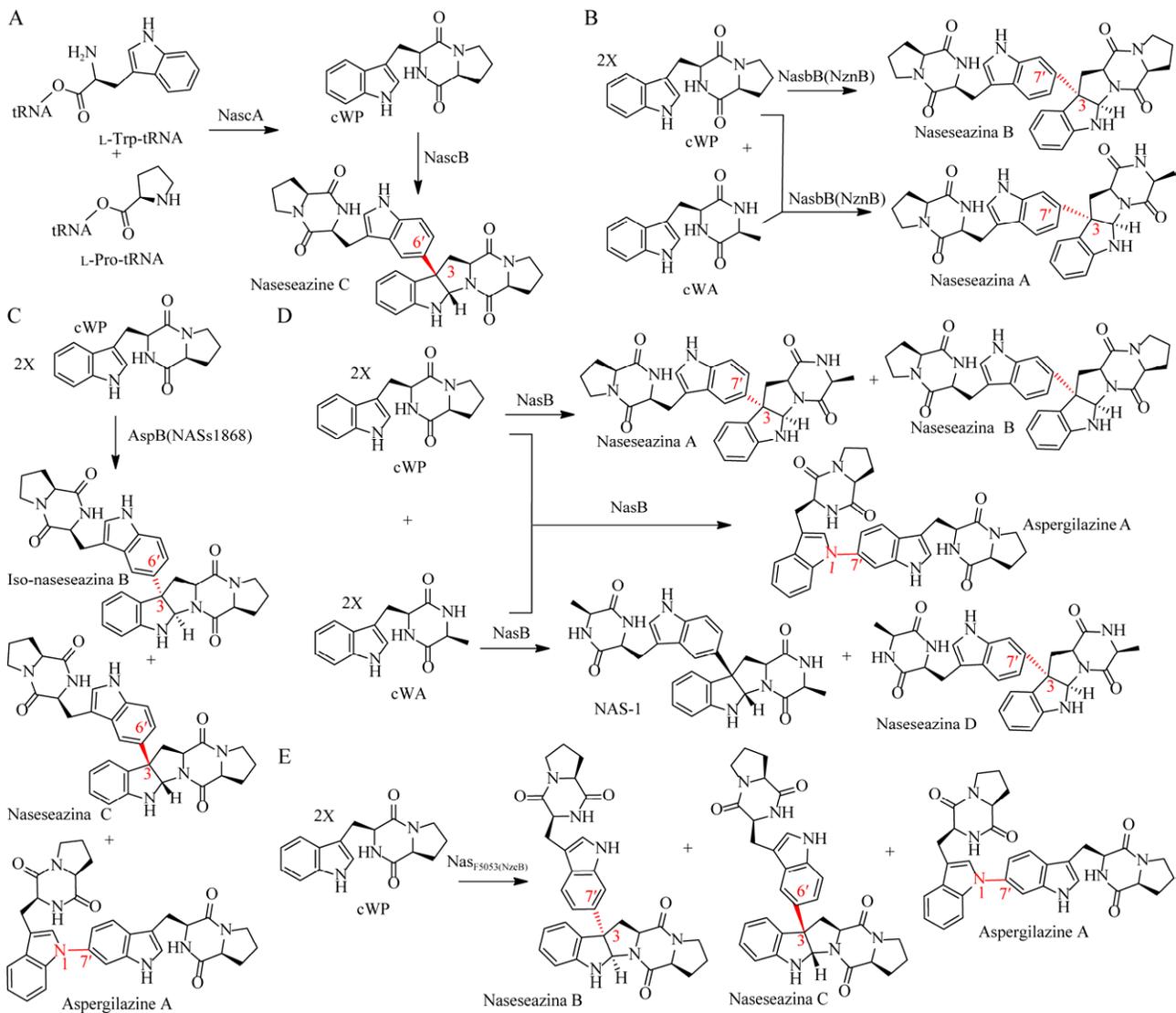


图 7 Naseesezine 的生物合成机制^[46-49]

Figure 7 The biosynthesis mechanism of naseesezine^[46-49].

标产物可控生产催化^[48-49]。尤其是通过对比 $\text{Na}_s\text{F}_{5053}$ 及同步获得的 2 个突变体 $\text{Na}_s\text{F}_{5053}$ Q65I-A86G/S284A-V288A 结构特征和分子动力学分析结果, 研究人员推测酶催化生成 naseezazine 机制, 即 CDP 底物分子进入酶催化中心后, 吡啶环 N1 位靠近 CYP450 活性中心的血红素辅基, 可形成稳定的自由基起始状态, 随后该自由基电子会迁移至 C3 位, 并经由 N10 与 C2 分子间曼尼希(Mannich)加成反应形成吡咯并吡啶结构; 而 C3 位的自由基再经由傅-克烷基化反应(Friedel-Crafts acylation)释放, 并同步形成 C3-C6'和 C3-C7'分子间 C-C 键进而生成不同 naseezazine 类产物^[48-49]。

(7) Tetratryptomycin 与 cycetryptomycin 生物合成(含 CYP450 催化的 C3 吡啶取代与吡咯并吡啶二聚化)

李书明团队分析杀菌糖多孢菌 (*Saccharopolyspora antimicrobica*) 基因组后, 发现了分别编码 cWW 合酶 TtpA1/A2 的基因簇 *ttp1/ttp2*, 前者可编码 2 个 CYP450 酶 TtpB1 与 TtpC1, 后者仅编码 1 个 CYP450 酶 TtpB2; *ttp1/ttp2* 异源表达分析发现 TtpB2 可催化 2 分子 cWW 生成首个细菌 CDP 分子 C3-N1' 聚合的吡咯并吡啶结构的产物 tetratryptomycin B, 及

C3-C3' 二聚化吡咯并吡啶结构产物 tetratryptomycin C; 而 TtpB1 则可催化 2 分子 cWW 生成另一个 C3-C3' 二聚化吡咯并吡啶结构产物 tetratryptomycin A, 可见 TtpB1/B2 的区域/立体专一性催化显著不同, 此外体内分析并未发现 TtpC1 的明确催化功能(图 8)^[52]。

钱培元团队从多毛糖多孢菌 (*Saccharopolyspora hirsute*) DSM 44795 中界定 1 个与 *ttp1* 结构类似的基因簇 *cttp*, 后者同样可编码 cWW 生成酶 CttpA 和 2 个 CYP450 蛋白 CttpBC; 胞内分析发现 CttpB 表现出 TtpB1/B2 的组合催化效力, 具有 C3-C3' 与 C3-N1' 区域选择性组装能力并催化 cWW 分别生成主产物 tetratryptomycin A 和少量的 tetratryptomycin B; 而与 TtpC1 高度相似的 CttpC 则表现出前者所不具有的吡咯并吡啶二聚化能力, 催化 tetratryptomycin A 生成具有大环环化的二聚体 cycetryptomycin A/B, 推测该环化机制是 CttpC 利用血红素辅基夺取 tetratryptomycin A 上 N20/N20' 的氢原子使之产生自由基, 而 N20' 上的自由基可迁移至 C18', 并促使 C18' 与 C19 形成 C-C 环化成产物 cycetryptomycin A, 而 N20 可与具有自由基的 C18' 成 C-N 环化成产物 cycetryptomycin B (图 8)^[11]。

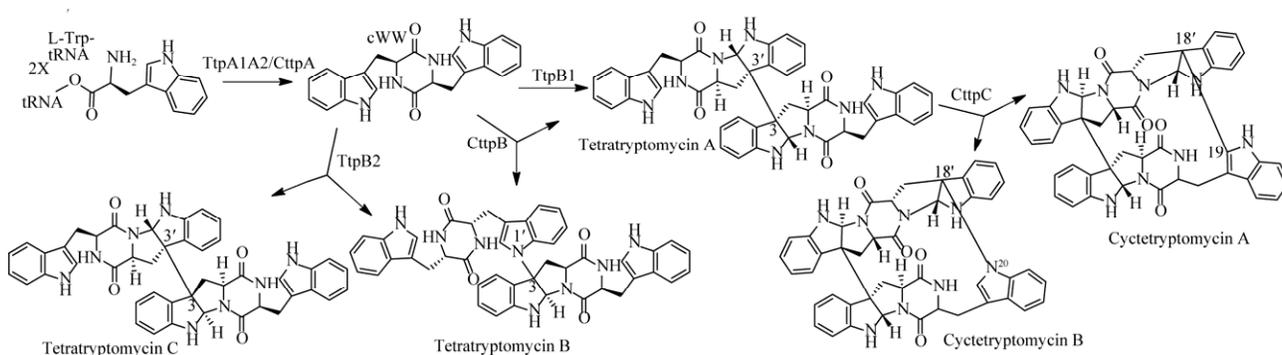


图 8 Tetratryptomycin^[52]与 cycetryptomycin^[11]的生物合成机制

Figure 8 The biosynthesis mechanism of tetratryptomycin^[52] and cycetryptomycin^[11].

综上所述, CDPS 串联多样化结构修饰是放线菌 CDP 天然产物的主要生物合成途径, 这些种类丰富的修饰酶, 特别是具有强大的复杂结构催化生成能力的 CYP450, 既是重要的 CDP 产物基因组挖掘指示序列, 同时也可作为宝贵的工具酶进行结构改造和功能开发, 研究价值巨大。

3 总结与展望

放线菌 CDP 类天然产物结构独特, 种类繁多, 活性广泛而优良, 迄今为止研究人员已从放线菌中分离纯化了多类型活性 CDP 分子, 揭示了其 NRPS 与 CDPS 并存的骨架合成途径, 发现并解析了首个 CDPS 的结构与催化机制, 鉴定分析了一系列 CDP 结构修饰酶, 建立起全面的放线菌 CDP 研究与开发体系, 并推动放线菌 CDP 的研究与开发在以下工作中不断拓展。

(1) 利用多元信息指导发掘新型 CDP 天然产物。天然产物发掘始于获得优良出发菌株, 随着对自然界放线菌资源的深入调查, 研究人员获取菌株的渠道更加宽泛, 海量优异的海洋放线菌、植物根际放线菌和动物内生放线菌等被陆续发掘利用^[62]。这些丰富的菌株资源保障了发酵分离菌株的持续供应, 避免了因反复发酵相同或相近菌株而导致的已知化合物重复分离; 另一方面也实现了放线菌资源的最优配置使用^[62]。此外随着高通量基因组测序技术的发展, 研究人员可以短时间内获取海量菌株基因组信息, 并以特征性 NRPS、CDPS 或其他酶或功能蛋白的序列为参考, 精准挑选出蕴含 CDP 产物的目标菌株; 此外, 基于蛋白功能序列信息, 建立起 NRPS 中 A 结构域与底物、CDPS 中 P1 和 P2 口袋与底物的关联信息, CDP 结构修饰酶与产物特征的偶联信息等, 推导产物结构类型, 指导目标菌株后续的发酵分离, 避免了盲目发酵而导致的物力与时间的浪费及无目标分离带来的随机性、偶

然性等局限, 有的放矢地发掘 CDP 天然产物^[63-67]。基于上述理念, 笔者团队开展了江西省特有的国家二级保护植物东乡野生稻生境放线菌资源的基因组发掘, 并利用放线菌 CDP 生物合成特征序列作为探针进行针对性逐级筛选, 获得一系列待开发的优良菌株及其相关基因(簇)信息。

(2) 结合先进的化合物分离纯化、全合成与活性评价体系, 筛选药用 CDP 先导化合物。利用单菌多产物策略(one strain many compounds, OSMAC)^[68], 结合天然生物活性分子去重策略和方法, 靶向激活并挖掘放线菌内的 CDP 活性产物, 例如笔者团队利用盐胁迫策略, 成功地激活了链霉菌 DSM 40136 的环二肽生产潜能^[69]。此外, 针对其中的微量活性产物, 结合化学全合成技术获取足量的纯品。将具有优良活性的纯品化合物, 应用于诸如抗感染、抗肿瘤与免疫治疗等体内与体外的高通量筛选分析平台, 遴选优良 CDP 类药用化合物。

(3) 依据生化研究进展, 阐明新颖的 CDP 生物合成机制。分析 CDP 产物生物合成基因簇, 定位关键功能基因, 表达纯化其中的催化酶与功能蛋白, 培养蛋白晶体, 解析蛋白三维结构并利用生化分析方法揭示其关键催化机理。尤其着重开展 NRPS 的 A 结构域的底物识别机制、CDPS 的 P1 与 P2 口袋底物识别机理、结构修饰酶的催化机制这三方面的工作^[63-68], 既可全面研究 CDP 产物的结构组装与修饰机制等, 又可为产物发掘与鉴定提供必要的参考信息, 也可进一步作为功能基因元件用于基因组信息发掘与合成基因线路设计。

(4) 优选合成生物元件, 设计 CDP 产物生产细胞工厂。依据当前合成生物学理念, 筛选已有良好研究的功能基因, 组装基因线路, 设计开发 CDP 产物; 此外也可基于 CDPS 蛋白的结构信息进行定向改造, 或利用新型分子元件将不同

NRPS 模块进行二元组合, 设计出可生成新型 DKP 骨架结构的 CDPS 和 NRPS, 创新开发 CDP 产物。同步筛选优良的放线菌底盘细胞, 并导入设计的基因线路构建 CDP 生产细胞工厂; 最后利用代谢工程技术手段, 从细胞水平提高氨基酸等底物的供应水平, 消除反馈抑制, 改良菌株生产条件, 提高产物生产效价, 实现优良活性 CDP 产物的高效生产与人工设计开发。

REFERENCES

- [1] 李文利, 夏娟. 二酮哌嗪类化合物生物合成研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 111-121.
LI WL, XIA J. Recent advances in diketopiperazines biosynthesis[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 111-121 (in Chinese).
- [2] BORTHWICK AD. 2,5-diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products[J]. Chemical Reviews, 2012, 112(7): 3641-3716.
- [3] GIESSEN TW, MARAHIEL MA. The tRNA-dependent biosynthesis of modified cyclic dipeptides[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 14610-14631.
- [4] BALACHANDRA C, PADHI D, GOVINDARAJU T. Cyclic dipeptide: a privileged molecular scaffold to derive structural diversity and functional utility[J]. ChemMedChem, 2021, 16(17): 2558-2587.
- [5] MOSETTI V, ROSETTI B, PIERRI G, BELLOTTO O, ADORINNI S, BANDIERA A, ADAMI G, TEDESCO C, CROSERA M, MAGNANO GC, MARCHESAN S. Cyclodipeptides: from their green synthesis to anti-age activity[J]. Biomedicine, 2022, 10(10): 2342.
- [6] ZHANG HB, NING X, HANG H, RU XY, LI HC, LI YH, WANG LZ, ZHANG X, YU SJ, QIAO YY, WANG X, WANG PG. Total synthesis of thaxtomin A and its stereoisomers and findings of their biological activities[J]. Organic Letters, 2013, 15(22): 5670-5673.
- [7] CLARKE CR, KRAMER CG, KOTHA RR, LUTHRIA DL. The phytotoxin thaxtomin A is the primary virulence determinant for scab disease of beet, carrot, and radish caused by *Streptomyces scabiei*[J]. Phytopathology®, 2022, 112(11): 2288-2295.
- [8] GONDRY M, LAUTRU S, FUSAI G, MEUNIER G, MÉNEZ A, GENET R. Cyclic dipeptide oxidase from *Streptomyces noursei*. Isolation, purification and partial characterization of a novel, amino acyl alpha, beta-dehydrogenase[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(6): 1712-1721.
- [9] KOHN H, WIDGER W. The molecular basis for the mode of action of bicyclomycin[J]. Current Drug Target-Infectious Disorders, 2005, 5(3): 273-295.
- [10] WANG WJ, ZHU XL, LUO H, WANG Z, HONG AJ, ZENG J, LI L, WANG D, DENG XM, ZHAO XL. Bicyclomycin activity against multidrug-resistant Gram-negative pathogens[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(1): e03790-22.
- [11] MALIT JLL, LIU WC, CHENG AF, SAHA S, LIU LL, QIAN PY. Global genome mining reveals a cytochrome P450-catalyzed cyclization of crownlike cyclodipeptides with neuroprotective activity[J]. Organic Letters, 2021, 23(17): 6601-6605.
- [12] LIU J, LI SM. Genomics-guided efficient identification of 2,5-diketopiperazine derivatives from actinobacteria[J]. ChemBioChem, 2023, 24(3): e202200502.
- [13] 张京星, 姚婷婷, 刘晶, 李花月, 李文利. 环二肽合酶生物合成途径研究进展[J]. 有机化学, 2019, 39(2): 328-338.
ZHANG JX, YAO TT, LIU J, LI HY, LI WL. Recent advances in cyclodipeptide synthases-dependent biosynthetic pathway[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2019, 39(2): 328-338 (in Chinese).
- [14] CANU N, MOUTIEZ M, BELIN P, GONDRY M. Cyclodipeptide synthases: a promising biotechnological tool for the synthesis of diverse 2,5-diketopiperazines[J]. Natural Product Reports, 2020, 37(3): 312-321.
- [15] MOUTIEZ M, BELIN P, GONDRY M. Aminoacyl-tRNA-utilizing enzymes in natural product biosynthesis[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(8): 5578-5618.
- [16] BELIN P, MOUTIEZ M, LAUTRU S, SEGUIN J, PERNODET JL, GONDRY M. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways[J]. Natural Product Reports, 2012, 29(9): 961-979.
- [17] KATSUYAMA Y, MIYANAGA A. Recent advances in the structural biology of modular polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2022, 71: 102223.
- [18] HEALY FG, WACH M, KRASNOFF SB, GIBSON DM, LORIA R. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and

- pathogenicity[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(4): 794-804.
- [19] JIANG GD, ZHANG YC, POWELL MM, ZHANG PL, ZUO R, ZHANG Y, KALLIFIDAS D, TIEU AM, LUESCH H, LORIA R, DING YS. High-yield production of herbicidal thaxtomins and thaxtomin analogs in a nonpathogenic *Streptomyces* strain[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(11): e00164-18.
- [20] WANG LQ, WANG MY, FU YD, HUANG PJ, KONG DK, NIU GQ. Engineered biosynthesis of thaxtomin phytotoxins[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(8): 1163-1171.
- [21] SCHULTZ AW, OH DC, CARNEY JR, WILLIAMSON RT, UDWARY DW, JENSEN PR, GOULD SJ, FENICAL W, MOORE BS. Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(13): 4507-4516.
- [22] SCHULTZ AW, LEWIS CA, LUZUNG MR, BARAN PS, MOORE BS. Functional characterization of the cyclomarin/cyclomarazine prenyltransferase CymD directs the biosynthesis of unnatural cyclic peptides[J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73(3): 373-377.
- [23] LAUTRU S, GONDRY M, GENET R, PERNODET JL. The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9(12): 1355-1364.
- [24] GONDRY M, SAUGUET L, BELIN P, THAI R, AMOUROUX R, TELLIER C, TUPHILE K, JACQUET M, BRAUD S, COURÇON M, MASSON C, DUBOIS S, LAUTRU S, LECOQ A, HASHIMOTO SI, GENET R, PERNODET JL. Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(6): 414-420.
- [25] SAUGUET L, MOUTIEZ M, LI Y, BELIN P, SEGUIN J, LE du MH, THAI R, MASSON C, FONVIELLE M, PERNODET JL, CHARBONNIER JB, GONDRY M. Cyclodipeptide synthases, a family of class-I aminoacyl-tRNA synthetase-like enzymes involved in non-ribosomal peptide synthesis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(10): 4475-4489.
- [26] JACQUES IB, MOUTIEZ M, WITWINOWSKI J, DARBON E, MARTEL C, SEGUIN J, FAVRY E, THAI R, LECOQ A, DUBOIS S, PERNODET JL, GONDRY M, BELIN P. Analysis of 51 cyclodipeptide synthases reveals the basis for substrate specificity[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 721-727.
- [27] MOUTIEZ M, SEGUIN J, FONVIELLE M, BELIN P, JACQUES IB, FAVRY E, ARTHUR M, GONDRY M. Specificity determinants for the two tRNA substrates of the cyclodipeptide synthase AlbC from *Streptomyces noursei*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(11): 7247-7258.
- [28] MOUTIEZ M, SCHMITT E, SEGUIN J, THAI R, FAVRY E, BELIN P, MECHULAM Y, GONDRY M. Unravelling the mechanism of non-ribosomal peptide synthesis by cyclodipeptide synthases[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5141.
- [29] SCHMITT E, BOURGEOIS G, GONDRY M, ALEKSANDROV A. Cyclization reaction catalyzed by cyclodipeptide synthases relies on a conserved tyrosine residue[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 7031.
- [30] GIESSEN TW, von TESMAR AM, MARAHIEL MA. Insights into the generation of structural diversity in a tRNA-dependent pathway for highly modified bioactive cyclic dipeptides[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20(6): 828-838.
- [31] LIU J, HARKEN L, YANG YL, XIE XL, LI SM. Widely distributed bifunctional bacterial cytochrome P450 enzymes catalyze both intramolecular C–C bond formation in *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr and its coupling with nucleobases[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(21): e202200377.
- [32] PATTESON JB, CAI WL, JOHNSON RA, SANTA MARIA KC, LI B. Identification of the biosynthetic pathway for the antibiotic bicyclomycin[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(1): 61-65.
- [33] MENG S, HAN W, ZHAO J, JIAN XH, PAN HX, TANG GL. A six-oxidase cascade for tandem C–H bond activation revealed by reconstitution of bicyclomycin biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(3): 719-723.
- [34] HARKEN L, LI SM. Modifications of diketopiperazines assembled by cyclodipeptide synthases with cytochrome P₄₅₀ enzymes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(6): 2277-2285.
- [35] SUN CH, TIAN WY, LIN Z, QU XD. Biosynthesis of pyrroloindoline-containing natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(9): 1721-1765.
- [36] GARCÍA-DOMÍNGUEZ P, AREAL A, ALVAREZ R, de LERA AR. Chemical synthesis in competition with global genome mining and heterologous expression for

- the preparation of dimeric tryptophan-derived 2,5-dioxopiperazines[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(6): 1172-1225.
- [37] GIESSEN TW, von TESMAR AM, MARAHIEL MA. A tRNA-dependent two-enzyme pathway for the generation of singly and doubly methylated ditryptophan 2,5-diketopiperazines[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(24): 4274-4283.
- [38] JAMES ED, KNUCKLEY B, ALQAHTANI N, PORWAL S, BAN JS, KARTY JA, VISWANATHAN R, LANE AL. Two distinct cyclodipeptide synthases from a marine actinomycete catalyze biosynthesis of the same diketopiperazine natural product[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 547-553.
- [39] ALQAHTANI N, PORWAL SK, JAMES ED, BIS DM, KARTY JA, LANE AL, VISWANATHAN R. Synergism between genome sequencing, tandem mass spectrometry and bio-inspired synthesis reveals insights into nocardioazine B biogenesis[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2015, 13(26): 7177-7192.
- [40] YAO TT, LIU J, LIU ZZ, LI T, LI HY, CHE Q, ZHU TJ, LI DH, GU QQ, LI WL. Genome mining of cyclodipeptide synthases unravels unusual tRNA-dependent diketopiperazine-terpene biosynthetic machinery[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4091.
- [41] LIU J, YU HL, LI SM. Expanding tryptophan-containing cyclodipeptide synthase spectrum by identification of nine members from *Streptomyces* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4435-4444.
- [42] YU HL, XIE XL, LI SM. Coupling of guanine with *cyclo*-L-Trp-L-Trp mediated by a cytochrome P450 homologue from *Streptomyces purpureus*[J]. *Organic Letters*, 2018, 20(16): 4921-4925.
- [43] YU HL, XIE XL, LI SM. Coupling of *cyclo*-L-Trp-L-Trp with hypoxanthine increases the structure diversity of guanitryptamycins[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(22): 9104-9108.
- [44] LIU J, XIE XL, LI SM. Guanitryptamycin biosynthetic pathways imply cytochrome P450 mediated regio- and stereospecific guaninyl-transfer reactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(33): 11534-11540.
- [45] SHI J, XU X, ZHAO ER JUAN, ZHANG B, LI W, ZHAO Y, JIAO RUI HUA, TAN REN XIANG, GE HUI MING. Genome mining and enzymatic total biosynthesis of purincyclamide[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(17): 6825-6829.
- [46] TIAN WY, SUN CH, ZHENG M, HARMER JR, YU MJ, ZHANG YN, PENG HD, ZHU DQ, DENG ZX, CHEN SL, MOBLI M, JIA XY, QU XD. Efficient biosynthesis of heterodimeric C3-aryl pyrroloindoline alkaloids[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4428.
- [47] YU HL, LI SM. Two cytochrome P450 enzymes from *Streptomyces* sp. NRRL S-1868 catalyze distinct dimerization of tryptophan-containing cyclodipeptides[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(17): 7094-7098.
- [48] SHENDE VV, KHATRI Y, NEWMISTER SA, SANDERS JN, LINDOVSKA P, YU FG, DOYON TJ, KIM J, HOUK KN, MOVASSAGHI M, SHERMAN DH. Structure and function of NzeB, a versatile C—C and C—N bond-forming diketopiperazine dimerase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(41): 17413-17424.
- [49] SUN CH, LUO ZY, ZHANG WL, TIAN WY, PENG HD, LIN Z, DENG ZX, KOBE B, JIA XY, QU XD. Molecular basis of regio- and stereo-specificity in biosynthesis of bacterial heterodimeric diketopiperazines[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 6251.
- [50] HARKEN L, LIU J, KREUZ O, BERGER R, LI SM. Biosynthesis of guatriptamethine C implies two different oxidases for *exo* double bond installation at the diketopiperazine ring[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(1): 648-654.
- [51] LI HX, QIU Y, GUO CX, HAN M, ZHOU YY, FENG Y, LUO SZ, TONG YG, ZHENG GJ, ZHU SZ. Pyrroloindoline cyclization in tryptophan-containing cyclodipeptides mediated by an unprecedented indole C3 methyltransferase from *Streptomyces* sp. HPH0547[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(58): 8390-8393.
- [52] LIU J, XIE XL, LI SM. Increasing cytochrome P450 enzyme diversity by identification of two distinct cyclodipeptide dimerases[J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(75): 11042-11045.
- [53] ZHANG YQ, YAO TT, JIANG YC, LI HY, YUAN WC, LI WL. Deciphering a cyclodipeptide synthase pathway encoding prenylated indole alkaloids in *Streptomyces leeuwenhoekii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(11): e02525-20.
- [54] MALIT JLL, WU CH, TIAN XY, LIU WC, HUANG DL, SUNG HHY, LIU LL, WILLIAMS ID, QIAN PY. Griseocazines: neuroprotective multiprenylated

- cyclodipeptides identified through targeted genome mining[J]. *Organic Letters*, 2022, 24(16): 2967-2972.
- [55] LIU J, YANG YL, HARKEN L, LI SM. Elucidation of the streptoazine biosynthetic pathway in *Streptomyces aurantiacus* reveals the presence of a promiscuous prenyltransferase/cyclase[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(12): 3100-3109.
- [56] BARRY SM, KERS JA, JOHNSON EG, SONG LJ, ASTON PR, PATEL B, KRASNOFF SB, CRANE BR, GIBSON DM, LORIA R, CHALLIS GL. Cytochrome P450-catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtomin phytotoxin biosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(10): 814-816.
- [57] HEALY FG, KRASNOFF SB, WACH M, GIBSON DM, LORIA R. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(7): 2019-2029.
- [58] ALKHALAF LM, BARRY SM, REA DA, GALLO A, GRIFFITHS D, LEWANDOWSKI JR, FULOP V, CHALLIS GL. Binding of distinct substrate conformations enables hydroxylation of remote sites in thaxtomin D by cytochrome P450 TxtC[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(1): 216-222.
- [59] ROOSE BW, CHRISTIANSON DW. Structural basis of tryptophan reverse N-prenylation catalyzed by CymD[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(30): 3232-3242.
- [60] YAO TT, LIU J, JIN EJ, LIU ZZ, LI HY, CHE Q, ZHU TJ, LI DH, LI WL. Expanding the structural diversity of drimentines by exploring the promiscuity of two N-methyltransferases[J]. *iScience*, 2020, 23(7): 101323.
- [61] SUN CH, PENG HD, ZHANG WL, ZHENG M, TIAN WY, ZHANG YN, LIU HH, LIN Z, DENG ZX, QU XD. Production of heterodimeric diketopiperazines employing a *Mycobacterium*-based whole-cell biocatalysis system[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2021, 86(16): 11189-11197.
- [62] GENILLOUD O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics[J]. *Natural Product Reports*, 2017, 34(10): 1203-1232.
- [63] GONDROY M, JACQUES IB, THAI R, BABIN M, CANU N, SEGUIN J, BELIN P, PERNODET JL, MOUTIEZ M. A comprehensive overview of the cyclodipeptide synthase family enriched with the characterization of 32 new enzymes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 46.
- [64] SKINNIDER MA, JOHNSTON CW, MERWIN NJ, DEJONG CA, MAGARVEY NA. Global analysis of prokaryotic tRNA-derived cyclodipeptide biosynthesis[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 1-11.
- [65] CANU N, BELIN P, THAI R, CORREIA I, LEQUIN O, SEGUIN J, MOUTIEZ M, GONDROY M. Incorporation of non-canonical amino acids into 2,5-diketopiperazines by cyclodipeptide synthases[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(12): 3118-3122.
- [66] BROCKMEYER K, LI SM. Mutations of residues in pocket P1 of a cyclodipeptide synthase strongly increase product formation[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(11): 2917-2922.
- [67] SUTHERLAND E, HARDING CJ, CZEKSTER CM. Active site remodelling of a cyclodipeptide synthase redefines substrate scope[J]. *Communications Chemistry*, 2022, 5: 101.
- [68] FOULSTON L. Genome mining and prospects for antibiotic discovery[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 51: 1-8.
- [69] 吴贵贵, 韩萍, 钟素珍, 谢运昌, 朱笃. *Streptomyces albovinaceus* DSM 40136 中环二肽的盐胁迫发掘[J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 46(3): 247-250.
- WU GG, HAN P, ZHONG SZ, XIE YC, ZHU D. The mining of the cyclodipeptide from *Streptomyces albovinaceus* DSM 40136 through salt stress[J]. *Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2022, 46(3): 247-250 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)