

二酮哌嗪类化合物生物合成研究进展

李文利* 夏娟

(中国海洋大学 医药学院 教育部海洋药物重点实验室 山东 青岛 266003)

摘要：二酮哌嗪类化合物(Diketopiperazines, DKPs)的特征结构是由两个氨基酸通过肽键缩合而成的环二肽(Cyclic dipeptides), 稳定的六元环骨架结构使 DKPs 在药物化学中成为一个重要的药效团, 表现出多种生物活性与药理活性, 日益引起人们的极大关注。随着现代生物技术和高通量测序技术的飞速发展, 人们对 DKPs 生物合成的分子机制与酶学机理的认识不断深入, DKPs 中氨基酸缩合的分子机制主要有两种: 非核糖体肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs)途径和环二肽合成酶(Cyclodipeptide synthetases, CDPSs)途径。本文就近年来 DKPs 的生物合成相关研究进展进行了综述。

关键词：二酮哌嗪类化合物, 非核糖体肽合成酶, 环二肽合成酶

Recent advances in diketopiperazines biosynthesis

LI Wen-Li* XIA Juan

(Key Laboratory of Marine Drugs, Chinese Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: Diketopiperazines (DKPs) are derivatives of cyclodipeptides resulted from the condensation of two amino acids. The conformationally constrained six-membered ring makes DKP an attractive pharmacophore in medicinal chemistry. Recently, there has been increasing interest in the natural DKPs due to their diverse bioactivities and pharmacological activities. Advances in modern biotechnologies and high throughput sequencing technologies have promoted our understanding of DKPs biosynthesis both on enzymatic and genetic levels. Biosynthesis of DKPs can be achieved either by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) or cyclodipeptide synthetases (CDPSs). This paper provides a brief overview of recent progresses on DKPs biosynthesis.

Keywords: Diketopiperazines, Non-ribosomal peptide synthetases, Cyclodipeptide synthetases

二酮哌嗪类化合物(Diketopiperazines, DKPs)的特征结构是由两个氨基酸通过肽键缩合而成的最小的环肽, 即环二肽(Cyclic dipeptides)。DKPs 稳定的六元环骨架结构使其在药物化学中成为一

个重要的药效团(图 1A), 表现出了抗菌^[1-2]、抗真菌^[3-4]、抗病毒^[5]、抗肿瘤^[6-7]、免疫抑制^[8]、神经保护^[9]、抗疟疾^[10]、抗朊病毒^[11]、抗高血糖^[12]等多种显著的生物活性和药理活性。有些 DKPs

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31171201, 31070072); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(No. NCET-09-0717)

*通讯作者: Tel: 86-532-82081813; 信箱: liwener@gmail.com

收稿日期: 2013-02-20; 接受日期: 2013-04-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

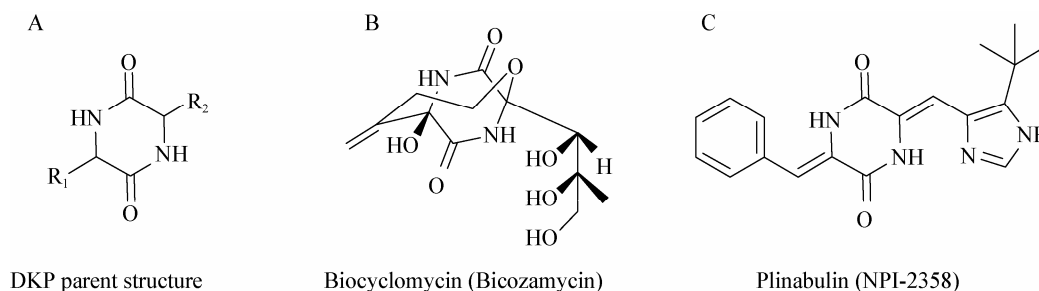


图1 DKP 的基本结构(A)、Biocyclomycin (Bicozamycin) (B)和 Plinabulin (NPI-2358) (C)的结构
Figure 1 Structures of parent DKP (A), Biocyclomycin (Bicozamycin) (B) and Plinabulin (NPI-2358) (C)

是细胞-细胞之间交流的信号分子,能够激活或抑制细菌 LuxR 介导的群体感应,被认为是通过干扰微生物之间信息交流来控制生物膜形成的潜在新型抗感染药物^[13]。由日本 Fujisawa 公司上市的环二肽类抗生素 Biocyclomycin (Bicozamycin) (图 1B)是 Rho 转录终止因子的特异性抑制剂,能够有效地治疗痢疾^[2]。因此,DKPs 目前已经引起了人们的极大关注。

DKPs 主要是由微生物产生的,特别是近年来国内外科学家相继从来源于海洋的细菌、放线菌和真菌中分离到大量具有 DKPs 结构的活性天然产物^[14]。其中,来源于海洋真菌 *Aspergillus* sp.的环二肽 Phenylahistin (PLH, Halimide)的衍生物 Plinabulin (NPI-2358) (图 1C)作为一种新型的肿瘤血管破坏剂(Vascular disrupting agent, VDA),已经进入临床 II 期研究阶段^[15]。基于 DKPs 广泛的生物活性与潜在的成药性,近年来人们在 DKPs 有机合成方面开展了大量的研究工作,建立了组合化学、固相合成和液相合成等一系列方法与技术,并成功获得了具有多种药理活性的 DKPs^[16-19]。

然而,与有机合成相比,有关 DKPs 生物合成的研究报道却屈指可数。随着现代生物技术和高通量测序技术的飞速发展,人们对 DKPs 生物合成的分子机制与酶学机理的认识不断深入。研究表明,DKPs 生物合成机制主要分为两大类:非核糖体肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthases, NRPSs)途径和环二肽合成酶(Cyclodipeptide synthases, CDPSs)途径^[20]。二者的关键差异在于氨基酸前体的

活化方式不同。到目前为止,多数报道的 DKPs 是通过 NRPS 途径合成或是 NRPS 途径中的副产物,相比之下,CDPS 途径是新近发现的一种 NRPS 非依赖性非核糖体合成途径,目前只报道了 3 种 DKPs 是通过该方式合成的(图 2)。本文就近年来报道的 DKPs 的生物合成相关研究进展进行了综述。

1 NRPS 途径合成 DKPs

目前所报道的绝大多数 DKPs 都是由非核糖体肽合成酶催化组装而成的。典型的 NRPS 是以模块形式存在的、大的多功能复合酶体系,每一模块含有一套独特的、非重复使用的催化功能域:缩合结构域(Condensation domain, C domain)、腺苷化结构域(Adenylation domain, A domain)和肽酰载体蛋白结构域(Peptide carrier protein, PCP),其中 A domain 负责底物氨基酸的识别与活化,并将活化后的氨基酸转移至 PCP domain 上形成氨酰化硫酯,C domain 催化 PCP 上的氨(肽)酰化硫酯的氨基与上游模块中 PCP 上的氨酰化硫酯的羧基缩合形成肽键。此外,某些模块还包含其它修饰功能域,如异构化酶结构域(Epimerization domain, E domain)和甲基化酶结构域(Methylation domain, M domain),最后通常由硫酯酶(Thioesterase, TE)将聚肽链从 PCP 上解离下来^[21]。

1.1 由专门的 NRPS 负责合成

到目前为止,多数报道的 DPKs 是由专门的 NRPS 负责合成的,如吡啶二酮哌嗪生物碱

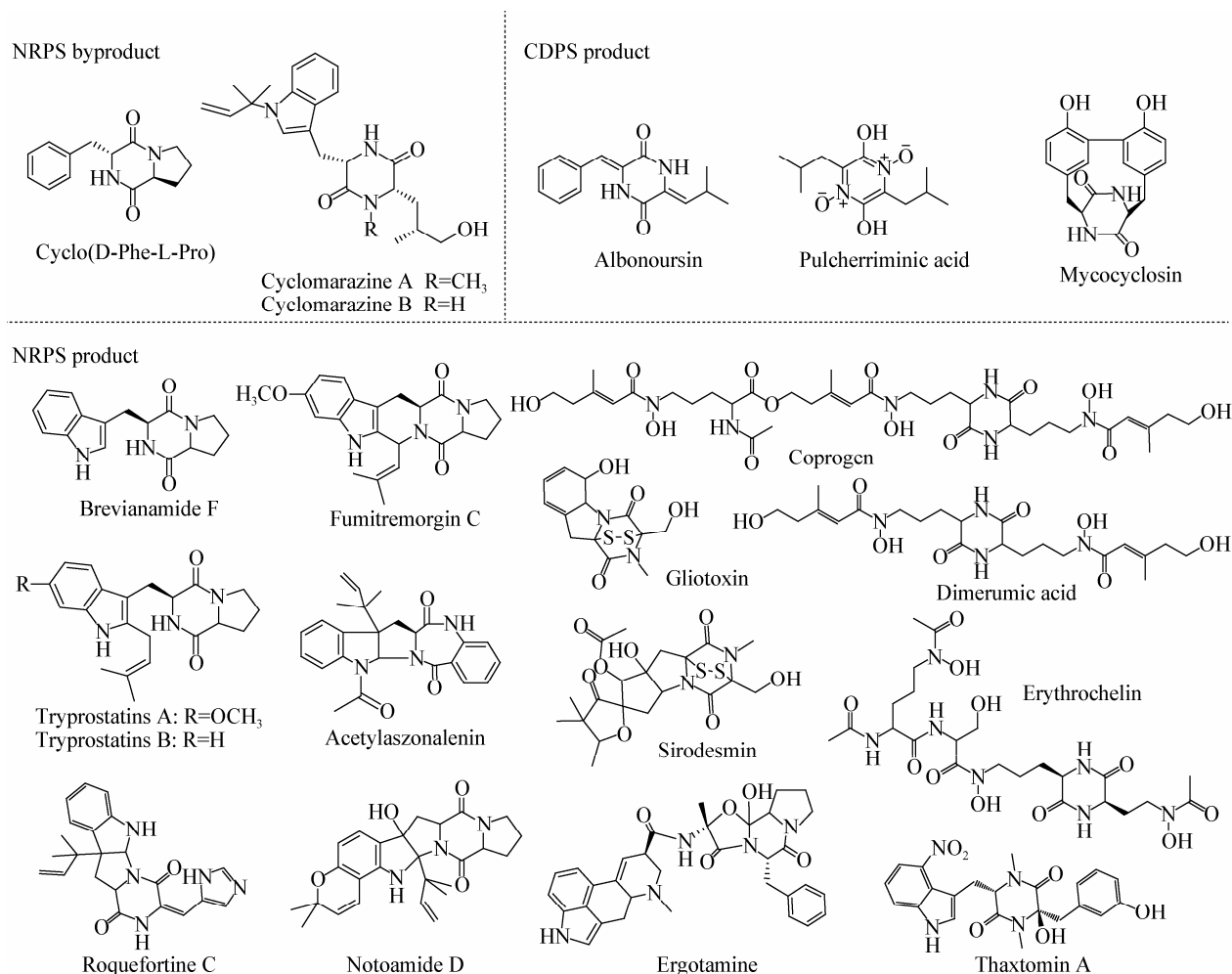


图2 经不同途径合成的 DKPs 化合物

Figure 2 Structures of DKPs compounds biosynthesized through different pathways

(Tryprostatins^[22], Fumitremorgins^[23], Acetylaszonalenin^[24], Notoamides^[25]和 Roquefortine C^[26])、多硫代二氧基哌嗪 (Epipolythiodioxopiperazines, ETP) 化合物 (Gliotoxin^[27] 和 Sirodesmin^[28])、铁载体 (Dimerumic acid^[29], Erythrochelin^[30] 和 Coprogens^[31])、植物毒素 Thaxtomin^[32] 及具有多种重要药理活性的麦角肽碱 (Ergopeptine)^[33] 等 (图 2)。

最初, 人们主要采用设计简并引物、异源探针、染色体步移等传统策略来克隆 DKPs 生物合成相关基因。2000 年, Healy 等首次从马铃薯疮痂病原菌 *Streptomyces acidiscabies* 中克隆到了植物毒素 Thaxtomins 合成酶基因 *txtAB*; TxtA 和 TxtB 除了含有 A-PCP-C 基本结构域外, 在 A-PCP 之间还

存在一个 M domain, 缺失 *txtA* 基因导致突变株丧失 PCP-C-A-PCP 结构域, *psyl* 基因突变株能够正常产生 Gliotoxin, 但是丧失了 Dimerumic acid 的合成能力, 在低铁条件下生长微弱^[29]。2003 年, Correia 等通过对黑麦角菌 (*Claviceps purpurea*) 中二甲基烯丙基色氨酸合成酶 (Dimethylallyl tryptophan synthase, DMATS) 基因 *cpd1* 的两侧进行失对马铃薯的致病性^[32]。2001 年, Wilhite 等利用 A domain 保守序列从绿木霉 (*Trichoderma virens*) 中克隆得到了铁载体 Dimerumic acid 合成酶的基因 *psyl* 的部分片段, 所编码产物含有行染色体步移分析, 得到了 Ergopeptines 生物合成基因簇, 其中包括 2 个 NRPS 基因 *cpys1* 和 *cpys2*; Cpps2(LPS2) 含有

A-PCP-C 结构域,负责 D-麦角酸的活化和参入,Cpps1(LPS1)含有 A-PCP-C-A-PCP-C-A-PCP-Cyc 结构域,负责三肽 Ala-Phe-Pro 的组装,Cyc 结构域(Cyclization domain)比典型的 C 或 Cy domain(Heterocyclization domain)短大约 70 个氨基酸,推测可能参与了 D-麦角酸肽内酰胺的形成与释放^[33]。

基因组测序技术的迅速发展大大推动了微生物特别是真菌的次级代谢产物生物合成研究的进程。在玉米病原菌 *Cochliobolus heterostrophus* 的基因组中有 11 个可能的 NRPS 基因簇,其中只有 *NPS6* 缺失能够导致 *C. heterostrophus* 的毒力降低和对 H₂O₂ 敏感性增强^[34];在小麦病原菌 *Fusarium graminearum* 和拟南芥病原菌 *Alternaria brassicicola* 中缺失 *NPS6* 的同源基因也出现同样表型,研究发现 *NPS6* 负责编码含有 DKP 结构的铁载体 Coprogens,其实际作用是病原菌提供营养元素铁,而化合物本身并非植物毒素^[31]。由真菌产生的 ETPs 家族化合物主要通过二硫键发挥作用,巯基与靶蛋白交联进而使之灭活,并能产生具有毒害的活性氧,引起细胞凋亡和坏死;2004 年 Howlett 研究组通过表达序列标签和 Cosmid 序列分析,从能够引起加拿大油菜黑腿病的油菜茎基溃疡病菌 *Leptosphaeria maculans* 中克隆了第一个 ETP 化合物 Sirodesmin 的生物合成基因簇^[28],并且通过比较基因组学方法在人类条件致病菌烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)的基因组中定位了另外一个 ETP 化合物 Gliotoxin 的基因簇^[27];两个基因簇中的 SirP/GliP 为双模块 NRPS,分别催化了环二肽中间体 Phomamide 和 Cyclo(L-Phe-L-Ser)的形成^[27,35-36]。

除了 Gliotoxin 外,*A. fumigatus* 还能产生一系列具有广泛药理活性的吡咯二酮哌嗪类化合物,如 Fumitremorgin C 是乳腺癌抗药蛋白(Brest cancer resistance protein,BCRP)的抑制剂^[37],其合成前体 Tryprostatin A 和 B 能够抑制微管的聚合,干扰细胞分裂^[38]。2006 年,通过功能基因组和比较基因组策略,Li 研究组从 *A. Fumigatus* Af293 中发现了 Fumitremorgins 的生物合成基因簇,其中

ftmA/ftmPS 基因编码了双模块 NRPS 合酶 *ftmA* 基因缺失导致突变株丧失 Fumitremorgins 的合成能力,而在 *A. fumigatus* 或异源宿主构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中高表达 *ftmA*,结果积累了 Cyclo(L-Trp-L-Pro)即 Brevianamide F,证明 FtmA 负责催化 Brevianamide F 的合成^[23](图 3);将 Fumitremorgins 合成基因置于 *alcA* 启动子之下,然后导入 *A. nidulans* 之中,Fumitremorgins 合成的前两步反应成功得到了表达,且 Tryprostatin B 的产量达到 250 mg/L^[22]。随后,运用基因组采掘策略德国 Li 研究组、美国 Sherman 研究组和西班牙 Martin 研究组相继分别从费希新萨托菌(*Neosartorya fischeri*)、海洋来源的 *Asperigillus* sp. 及产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)的基因组中定位了异戊二烯吡咯 DKPs 化合物 Acetylaszonalenin^[22]、Notoamides^[25]及 Roquefortine C^[26]的基因簇。

与典型的 NRPS 相比,负责 DKPs 生物合成的 NRPS 在羧基端往往缺少 TE 功能域,取而代之的是 C domain。我们将真菌来源的 DKPs 与 NRPSs 中的 C domains 进行了序列比对和进化分析,结果如图 4 所示,将它们分为两类:一类为普通性 C domains,它们的 C3 motif 都具有保守序列 HH×××D××S^[39];另一类为羧基端 C domains,除了 Acetylaszonalenin 的 NRPS AnaPS-C2 外,其它羧基端 C domains 的 C3 motif 在保守序列处均发生改变,这暗示着它们可能具有不同的活性,参与了线性二肽的环化与释放。

1.2 NRPS 途径的副产物

在长肽链合成过程中,有时线性肽链中间体会发生分子内环化,形成 NRPS 组装途径中的环二肽副产物,这类 DKPs 往往含有空间位阻较大的氨基酸残基,在线性二肽-PCP 硫酯中倾向于形成 *cis* 构象肽键,从而有利于 DKP 六元环的生成。如,在蜡样芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)中十肽 Gramicidin S 的合成是在 NRPS GrsAB 催化下首先形成线性五肽,然后头尾相接形成二聚体,十肽 Tyrocidine A

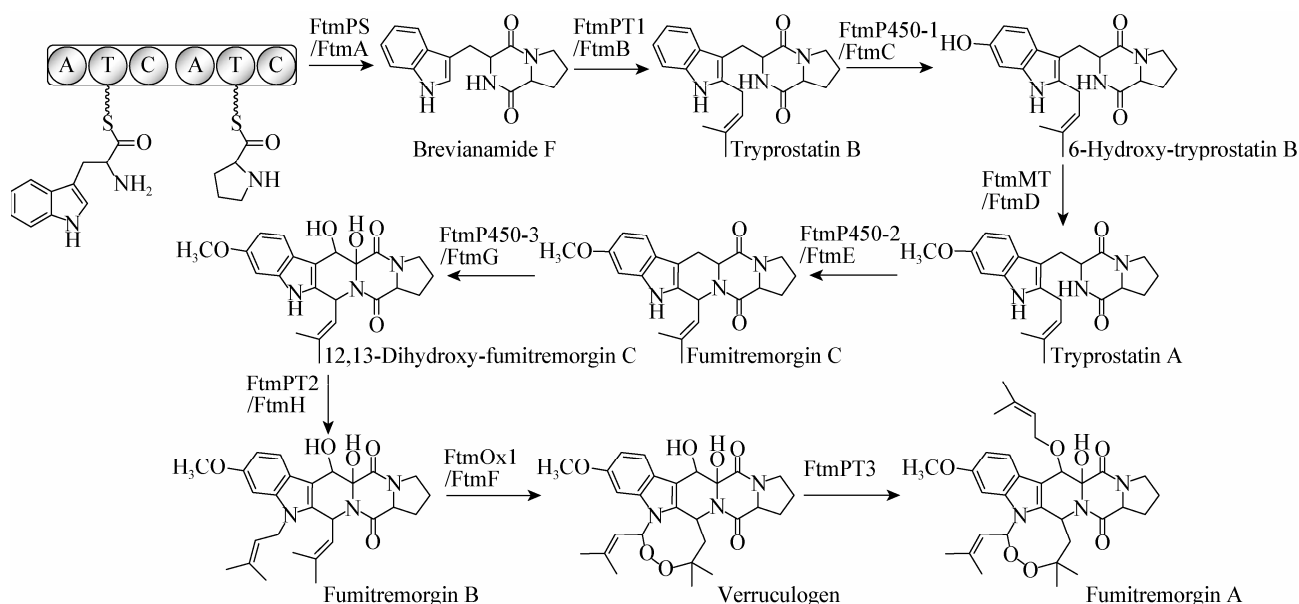


图3 Fumitremorgins 的生物合成途径
Figure 3 The biosynthetic pathway of Fumitremorgins

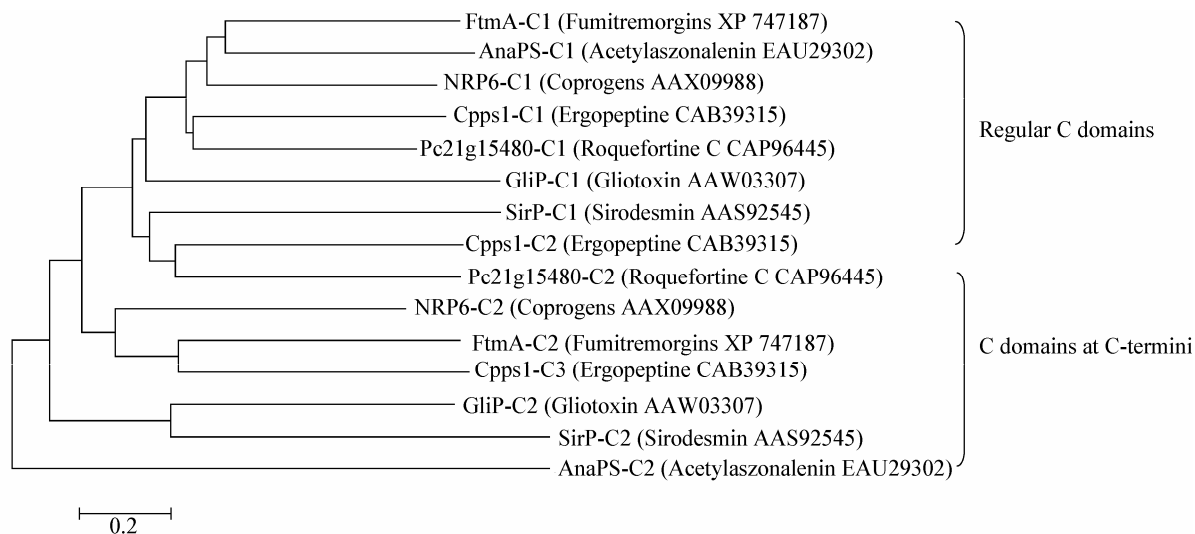


图4 不同 DKPs NRPS 中 C 结构域的进化分析
Figure 4 Phylogenetic analysis of the C domains of different DKPs NRPSs

则是在 NRPS TycABC 催化下形成线性十肽, 然后环化, 二者合成的第一步反应均为 D-Phe 和 L-Pro 的缩合; 有意思的是, 当缺失下一步延伸反应的氨基酸底物时, 在两个合成体系中都能够形成 Cyclo(D-Phe-L-Pro) 中间体, 推测可能是 D-Phe 的氨基对 L-Pro 的羧基进行攻击发生分子内环化, 从

NRPS 体系中解离下来而形成的^[40-41]; Stachelhaus 研究组在大肠杆菌中表达了 Tyrocidine A 合成酶的前两个模块 TycA/TycB1, 结果在培养基中成功分离到 Cyclo(D-Phe-L-Pro) 且产量达到 9.2 mg/L^[41]。2008 年, Moore 研究组发现在海洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS-205 基因组中 NRPS 基

因簇 *cym* 同时编码了两类化合物——环七肽 Cyclomarins 和环二肽 Cyclomarazines A 和 B, 基因簇中 NRPS CymA 的前两个模块和异戊烯基转移酶 CymD 催化合成了 Cyclomarazines A 和 B, 他们推测肽链延伸过程中二肽的释放可能是由具有编辑功能的 II 型 TE 所催化, 抑或是由于下一步延伸步骤的低效所导致的非酶促反应^[42]。

2 非 NRPS 型途径——CDPS 途径合成 DKPs

最近研究结果揭示了一种由 CDPSs 催化的非 NRPS 型非核糖体肽合成途径^[43]。与 NRPSs 不同的是 CDPSs 本身不具备活化氨基酸的催化活性, 而是直接以细胞内已活化的氨基酸氨酰 tRNAs (aa-tRNAs) 为底物催化 DKPs 中两个肽键的形成。因此, CDPSs 的底物只限于细胞内 20 种 aa-tRNAs; 相比之下, NRPS 的底物则广泛得多, 如, Acetylsonnaphthol NRPS 能够催化安息香酸^[24]、Thaxtomin NRPS 能够催化 4-硝基色氨酸^[44]。目前研究结果表明, 在细菌、真菌、原生动物甚至动物中都发现了 CDPSs, 但它们的功能大多数处于推测阶段^[20]。截止目前为止, 由 CDPSs 合成的化合物仅报道了 3 例: 诺尔斯氏链霉菌(*Streptomyces noursei*)产生的 Albonoursin 即 Cyclo(L-Phe-L-Leu) 衍生物^[45]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产生的铁载体 Pulcherriminic acid 即 Cyclo(L-Leu-L-Leu) 衍生物^[43,46-48]和结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)产生的 Mycrocyclosin 即 Cyclo(L-Tyr-L-Tyr) 衍生物^[45,49-52](图 2, 图 5)。

2002 年, Pernodet 研究组首次发现在 *S. noursei* 中 Albonoursin 的合成是由仅具有 239 个氨基酸的酶 AlbC 所催化形成的中间体 Cyclo(L-Phe-L-Leu) 脱氢而来^[45]。最初, 从酶的一级结构他们并没有获得任何功能信息, AlbC 的活性是完全通过体外生化实验证实的^[43]。采用 *in silico* 搜寻, 他们分别从厚壁菌门(Firmicutes)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*), 放线菌门

(Actinobacteria)的棒杆菌属(*Corynebacterium*)和分枝杆菌属(*Mycobacterium*), 以及 γ -变形菌门(Proteobacteria)的变形菌属(*Photobacterium*)等细菌的基因组中找到了 9 个与 AlbC 大小相似且序列有相似性的 CDPSs 蛋白基因, 然后在大肠杆菌中进行了表达。结果发现这些 CDPSs 能够以 aa-tRNAs 为底物, 催化环二肽中肽键的形成, 每个 CDPS 主要催化一种环二肽的合成, 其中来自 *B. subtilis* 的 YvmC 主要合成 Cyclo(L-Leu-L-Leu), 而来自 *M. tuberculosis* 的 Rv2275 主要合成 Cyclo(L-Tyr-L-Tyr)。有趣的是, 它们都具有底物多样性, 能够同时生成少量其它结构环二肽^[43,53]。一级结构比对结果表明, 除了同是来源于 *Bacillus* 的 3 个 CDPSs 的氨基酸序列的一致性达到 69%–76% 外, 其它的 CDPSs 的序列同源性都很低, 一致性仅有 19%–27%, 没有氨基酸保守序列, 但发现了与 tRNA 结合密切相关的 7 个严格保守氨基酸残基^[20]。然而, AlbC (PDB id: 3OQV)^[54], Rv2275 (PDB id: 2X9Q)^[51]和 YvmC-Blic (PDB id: 3OQH, 3OQI, 3OQJ 和 3S7T)^[46]的晶体结构研究表明, 它们的 3D 结构能够很好的重叠。AlbC 和 YvmC-Blic 是单体, 而 Rv2275 是同型二聚体。三者具有一个相似的表面可及口袋(Surface-accessible pocket), 包含了 7 个保守氨基酸中的 5 个, 其中 4 个(Gly35, Ser37, Tyr178 和 Glu182)完全吻合, 另外一个 Tyr202 则构象不同, 它们的整体结构与 I 型氨基酸-tRNA 合成酶(Class I aminoacyl-tRNA, aaRSs)很相似。进一步他们又从 50 个细菌和 5 个真核生物的基因组中找到了 49 个可能的 CDPSs 基因, 其中 18 个新基因具有 CDPS 活性所必需的所有特征。通过分析发现含有 CDPSs 的细菌中有相当一些营寄生生活, 如 *M. tuberculosis*、植物尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*、丛枝菌根真菌伴生细菌 *Glomeribacter gigasporarum* 和棘阿米巴原虫病原菌 *Candidatus Odysella thessalonicensis*, 推测环二肽可能有助于病原菌在寄主体内生活^[20,55]。

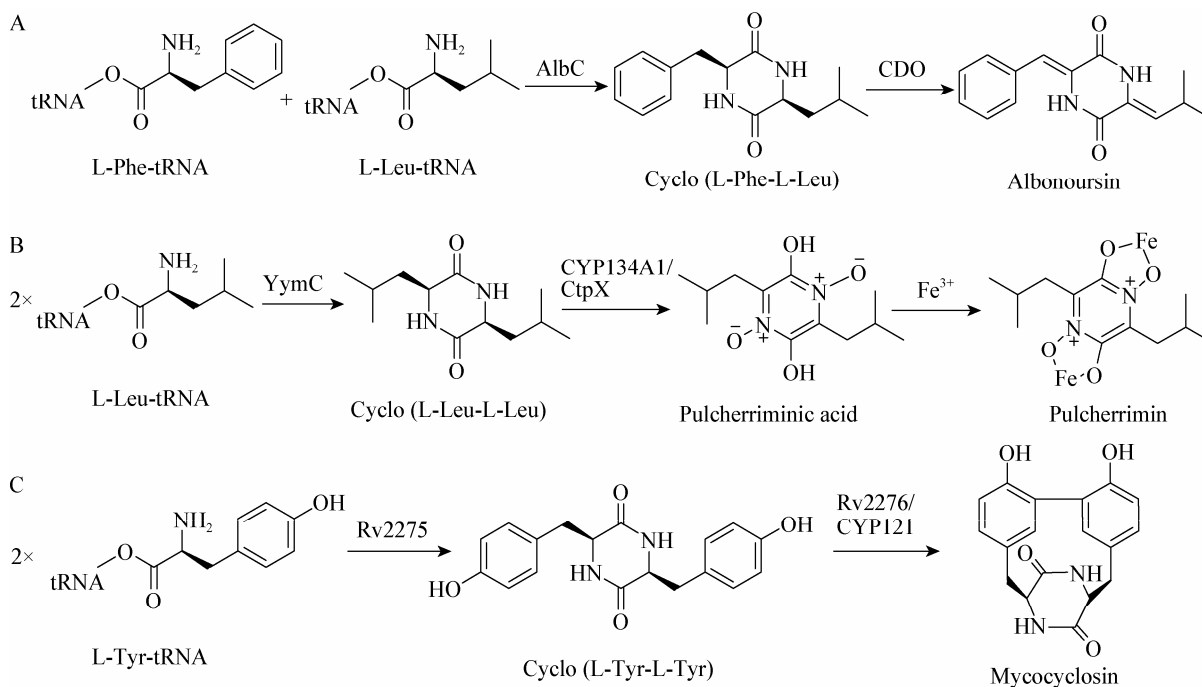


图5 Albonoursin 1 (A)、Pulcherrimin 3 (B)和 Mycocyclusin (C)的生物合成途径

Figure 5 The biosynthetic pathways of Albonoursin 1 (A), Pulcherrimin 3 (B) and Mycocyclusin (C)

3 DKPs 生物合成的修饰反应

DKPs 往往具有不同的、与生物活性息息相关的修饰基团。在 CDPSs 途径中,酶只能识别 aa-tRNA,化学修饰必须发生在 DKPs 骨架形成之后;而在 NRPSs 途径中酶不仅可以识别经修饰的氨基酸,而且负责修饰功能的结构域还能够嵌合在 NRPS 之中,在组装过程中进行修饰,如负责合成 Thaxtomin^[32]及 Cyclomarazines^[42]的 NRPS 中都含有一个 M domain,负责 Erythrochelin^[30]合成的 NRPS 含有一个 E domain。因此,相比之下经 NRPS 途径合成的 DKPs 结构更为复杂多样。

3.1 经 NRPS 途径合成的 DKPs 的修饰反应

经 NRPS 途径合成的 DKPs 的修饰反应主要包括异戊烯基化(如异戊二烯吡啶生物碱 Fumitremorgins^[56-58]、Acetylaszonalenin^[24]、Roquefortine C^[26]、Sirodesmin PL^[28,59]、Cyclomarazines^[42,60]等)、脱氢(如 Roquefortine C^[26])、甲基化(如 Tryprostatin A^[57]、Roquefortine C^[26]、

Gliotoxin^[36]),乙酰化(如 Acetylaszonalenin^[24]、Sirodesmin PL^[36])或羟基化(如 Thaxtomins^[61]、Fumitremorgin C^[62])。负责催化这些反应的修饰酶基因通常情况下与 DKPs 合成酶基因成簇存在,反应可能发生在 NRPS 组装之前或之后。

异戊烯基能够提高化合物与生物膜的亲和力,进而增强化合物和靶点之间的相互作用,提高生物活性^[63],异戊烯基化是目前为止研究最多的 DKPs 化合物修饰反应。异戊烯基化有的发生在 NRPS 组装之前,如 Sirodesmin PL^[59]和 Cyclomarazines^[60]生物合成途径先是由异戊烯基转移酶(Prenyltransferases, PTs) SirD 和 CymD 分别催化异戊烯基转移至底物 L-Tyr 的酚羟基和 L-Trp 的吡啶 N 之上,然后进行 NRPS 组装。多数异戊烯基化发生于 NRPS 组装之后,如 Tryprostatins, Fumitremorgins A、B 和 C, Verruculogen, Notoamides 等。异戊二烯 DKPs 生物碱的生物合成的第一步是由双模块 NRPS 催化形成 Cyclo(L-Trp-L-Pro)即 Brevianamide F,然后再发生

异戊烯基化、羟基化、甲基化、氧化等一系列后修饰反应(图 3)。在 *A. fumigatus* Af293 和 A1163 及 *N. fischeri* 基因组中 Fumitremorgins 的基因簇内含有 2 个 DMATS 超家族异戊烯基转移酶基因,其中 FtmPT1/FtmB 为单体,催化 Brevianamide F 吲哚环的 C2 位异戊烯基化,形成 Tryprostatin B^[57]; FtmPT2/FtmH 催化 DMADP 转移至 12,13-二羟基-Fumitremorgin C 的吲哚环的 N1 位生成 Fumitremorgin B^[58];最近, Li 研究组采用化学、生物信息学和生物化学组合策略从 *N. fischeri* 基因组中 Fumitremorgins 基因簇之外的区域发现了 O-异戊烯基转移酶 FtmPT3,该酶催化了 Verruculogen 上 C13 位羟基的异戊烯基化形成 Fumitremorgin A(图 3)^[56]。越来越多的生化实验表明,DMATS 超家族 PTs 具有底物广谱性,可以接受不同的芳香族底物,能够在吲哚环上不同位置发生顺式或反式异戊烯基化,异戊烯基化位点具有高度的立体选择性,是运用化学酶法进行化合物结构多样性研究的重要工具酶^[64-65]。

另一大类催化 DKPs 修饰反应的酶为氧化酶。在 Fumitremorgins 类 DKPs 生物合成过程中有 4 个氧化酶参与^[62,66],其中细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 氧化酶 FtmP450-1/FtmC 负责 Tryprostatin B 的芳香环 C-6 位的羟基化; FtmP450-2/FtmE 负责催化吲哚环上 C-2 位与哌嗪环上 N-8 位发生闭环反应生成 Fumitremorgin C;紧接着 FtmP450-3/FtmG 催化 Fumitremorgin C 双羟基化生成 12,13-双羟基 Fumitremorgin C; α -酮戊二酸依赖性双加氧酶 FtmOx1/FtmF 则催化 Verruculogen 中过氧化桥的形成(图 3)。在植物毒素 Thaxtomins 的生物合成中涉及两个 CYPs,其中 TxtC 催化了 NRPS 组装之后 Thaxtomin A 二酮哌嗪六元环的羟基化^[61],而 TxtE 则催化了 NRPS 组装之前 L-Trp 中芳香环 C4 位的硝基化,该酶反应具有很强的立体选择性,序列比对揭示 TxtE 中与功能相关的重要区域和其它 P450 氧化酶的相应区域都存在差异,是 P450 超家族中新发现的一种独特的酶,有望作为生物催化剂取代有机合成中吲哚

的硝基化反应^[67]。

3.2 经 CDPS 途径合成的 DKPs 的修饰反应

到目前为止,经 CDPS 途径合成的 DKPs 的修饰反应主要有 α 、 β -脱氢、DKP 六元环氧化和 C-C 偶联 3 种反应。如图 5A 所示, AlbC 催化形成环二肽中间体 Cyclo(L-Phe-L-Leu)之后,经环二肽氧化酶(Cyclodipeptide oxidase, CDO)催化脱氢,才能生成 Albonoursin^[43]; CDO 由 *albA* 和 *albB* 两个基因编码, AlbA 表达量是 AlbB 的 10 倍,二者对活性缺一不可;研究表明 CDO 具有底物广谱性,但倾向于催化具有芳香侧链(如 Phe 或 Trp)的 DKPs; Gondry 等通过在大肠杆菌中共表达 AlbC 和 CDO,成功在培养基中得到了 Albonoursin^[20]。2006 年,根据转录谱(Transcriptional profiling)分析结果, Berka 研究组发现与 *yvmC* 共转录的细胞色素 P450 氧化酶基因 *cypX* 参与了铁载体 Pulcherriminic acid 的合成^[48];接着, Cryle 等在体外证实 CypX 负责将 YvmC 催化形成的 Cyclo(L-Leu-L-Leu)进一步氧化形成 Pulcherriminic acid(图 5B),并发现该酶除了催化 Cyclo(L-Leu-L-Leu)氧化外,还能与其它由 Leu 和具有大的疏水基团的氨基酸组成的 DKPs 有效地结合^[47]。到目前为止研究最多的环二肽修饰酶是结核分枝杆菌中的 CYP121A1(Rv2276)^[49-50,52,68],最初人们认为 CYP121A1 可能参与了分枝杆菌的脂代谢,在 CDPS Rv2275 的功能被证实之后,人们推测位于同一操纵子之中的 CYP121A1 基因可能参与了同一代谢途径,并且通过体外生化实验验证在铁氧还蛋白和铁氧还蛋白还原酶存在的条件下, CYP121A1 能够催化 Cyclo(L-Tyr-L-Tyr)之中两个 Tyr 酚羟基的邻位发生分子内 C-C 键偶联,从而生成 Mycrocyclosin^[68](图 5C)。

4 总结与展望

二酮哌嗪类化合物的显著生物活性引起了人们极大的关注,与其简单的结构相比,其生物合成机制却相对复杂,目前发现的多数 DKPs 化合物是经 NRPS 途径合成的,而 CDPS 途径是近几年新发

现的能够利用 aa-tRNA 的非核糖体肽途径,到目前为止只有 3 种 CDPSs 研究得较为清楚。随着越来越多的不同来源,特别是海洋微生物来源的 DKPs 的发现与分离,人们对 DKPs 生物合成的认识将进一步深入与拓宽,新的 DKPs 生物合成分子机制和酶反应机理将不断被揭示和阐明。NRPSs 的模块式结构、CDPSs 的底物广谱性、修饰步骤的多样性及修饰酶的新颖酶学机制,一方面为采用组合生物合成、代谢工程和化学酶法等技术进行化合物多样性研究、理性设计和创造出具有新结构和新活性的 DKPs 提供了良好契机;另一方面这些功能基因构成了元件库,为在底盘细胞中开展合成生物学研究,大量生产和制造目标 DKPs 奠定了必要的基础。在未来 DKPs 生物合成研究中,不仅将继续致力于发现与阐明 DKPs 生物合成的分子基础,包括生物合成基因功能及其表达调控,而且将着重于理解关键酶的分子作用机理及其精细表达,认识生物合成所涉及的各关键酶之间的分子相互作用,为通过合理的元件组合与适配表达来设计和构建生物合成途径,实现人为创造和生产高活性 DKPs 化合物提供重要的理论依据。

参 考 文 献

- [1] de Carvalho MP, Abraham WR. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(21): 3564-3577.
- [2] Kohn H, Widger W. The molecular basis for the mode of action of bicyclomycin[J]. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2005, 5(3): 273-295.
- [3] Musetti R, Polizzotto R, Vecchione A, et al. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: an ultrastructural study[J]. *Micron*, 2007, 38(6): 643-650.
- [4] Strom K, Sjogren J, Broberg A, et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4322-4327.
- [5] Rodriguez PL, Carrasco L. Gliotoxin: inhibitor of poliovirus RNA synthesis that blocks the viral RNA polymerase 3Dpol[J]. *Journal of Virology*, 1992, 66(4): 1971-1976.
- [6] Kanoh K, Kohno S, Katada J, et al. Antitumor activity of phenylahistin *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 63(6): 1130-1133.
- [7] Kanzaki H, Yanagisawa S, Nitoda T. Enzymatic synthesis of dehydro cyclo(His-Phe)s, analogs of the potent cell cycle inhibitor, dehydrophenylahistin, and their inhibitory activities toward cell division[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68(11): 2341-2345.
- [8] Waring P, Beaver J. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines[J]. *General Pharmacology*, 1996, 27(8): 1311-1316.
- [9] Cornacchia C, Cacciatore I, Baldassarre L, et al. 2,5-diketopiperazines as neuroprotective agents[J]. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 2012, 12(1): 2-12.
- [10] Perez-Picaso L, Olivo HF, Argotte-Ramos R, et al. Linear and cyclic dipeptides with antimalarial activity[J]. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, 2012, 22(23): 7048-7051.
- [11] Bolognesi ML, Hoang NAT, Staderini M, et al. Discovery of a class of diketopiperazines as antiprion compounds[J]. *ChemMedChem*, 2010, 5(8): 1324-1334.
- [12] Song MK, Hwang IK, Rosenthal MJ, et al. Anti-hyperglycemic activity of zinc plus cyclo (His-Pro) in genetically diabetic Goto-Kakizaki and aged rats[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2003, 228(11): 1338-1345.
- [13] Abraham WR. Controlling pathogenic gram-negative bacteria by interfering with their biofilm formation[J]. *Drug Design Reviews-Online*, 2005, 2(1): 13-33.
- [14] Huang R, Zhou X, Xu T, et al. Diketopiperazines from marine organisms[J]. *Chemistry and Biodiversity*, 2010, 7(12): 2809-2829.
- [15] Cancer Resources. Available online: (<http://www.cancerresources.com/tag/plinabulin/>) (accessed on 03 Feb 2013).
- [16] Borthwick AD. 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(7): 3641-3716.
- [17] Fischer PM. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry[J]. *Journal of Peptide Science*, 2003, 9(1): 9-35.
- [18] O'Neill JC, Blackwell HE. Solid-phase and microwave-assisted syntheses of 2,5-diketopiperazines: small molecules with great potential[J]. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2007, 10(10): 857-876.
- [19] van der Merwe E, Huang D, Peterson D, et al. The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines[J]. *Peptides*, 2008, 29(8): 1305-1311.
- [20] Belin P, Moutiez M, Lautru S, et al. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(9): 961-979.
- [21] Strieker M, Tanovic A, Marahiel MA. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics[J]. *Current Opinion Structural Biology*, 2010, 20(2): 234-240.
- [22] Maiya S, Grundmann A, Li SM, et al. Improved tryprostatin B production by heterologous gene expression in *Aspergillus nidulans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(5): 436-440.

- [23] Maiya S, Grundmann A, Li SM, et al. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase[J]. ChemBioChem, 2006, 7(7): 1062-1069.
- [24] Yin WB, Grundmann A, Cheng J, et al. Acetylazonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(1): 100-109.
- [25] Ding Y, de WJR, Cavalcoli J, et al. Genome-based characterization of two prenylation steps in the assembly of the stephacidin and notoamide anticancer agents in a marine-derived *Aspergillus* sp.[J]. Journal of American Chemical Society, 2010, 132(36): 12733-12740.
- [26] Garcia-Estrada C, Ullan RV, Albillos SM, et al. A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrins in *Penicillium chrysogenum*[J]. Chemistry and Biology, 2011, 18(11): 1499-1512.
- [27] Gardiner DM, Howlett BJ. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 248(2): 241-248.
- [28] Gardiner DM, Cozijnsen AJ, Wilson LM, et al. The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(5): 1307-1318.
- [29] Wilhite SE, Lumsden RD, Straney DC. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5055-5062.
- [30] Lazos O, Tosin M, Slusarczyk AL, et al. Biosynthesis of the putative siderophore erythrochelin requires unprecedented crosstalk between separate nonribosomal peptide gene clusters[J]. Chemistry and Biology, 2010, 17(2): 160-173.
- [31] Oide S, Moeder W, Krasnoff S, et al. *NPS6*, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes[J]. Plant Cell, 2006, 18(10): 2836-2853.
- [32] Healy FG, Wach M, Krasnoff SB, et al. 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.
- [33] Correia T, Grammel N, Ortel I, et al. Molecular cloning and analysis of the ergopeptine assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*[J]. Chemistry and Biology, 2003, 10(12): 1281-1292.
- [34] Lee BN, Kroken S, Chou DYT, et al. Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, *NPS6*, involved in virulence and resistance to oxidative stress[J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(3): 545-555.
- [35] Balibar CJ, Walsh CT. GliP, a multimodular nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus*, makes the diketopiperazine scaffold of gliotoxin[J]. Biochemistry, 2006, 45(50): 15029-15038.
- [36] Fox EM, Howlett BJ. Biosynthetic gene clusters for epipolythiodioxopiperazines in filamentous fungi[J]. Mycological Research, 2008, 112(2): 162-169.
- [37] Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, et al. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein[J]. Cancer Research, 2000, 60(1): 47-50.
- [38] Steffan N, Grundmann A, Yin WB, et al. Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16(2): 218-231.
- [39] Konz D, Marahiel MA. How do peptide synthetases generate structural diversity[J]? Chemistry & Biology, 1999, 6(2): 39-48.
- [40] Stachelhaus T, Mootz HD, Bergendahl V, et al. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(35): 22773-22781.
- [41] Gruenewald S, Mootz HD, Stehmeier P, et al. *In vivo* production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3282-3291.
- [42] Schultz AW, Oh DC, Carney JR, et al. Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin[J]. Journal of American Chemical Society, 2008, 130(13): 4507-4516.
- [43] Gondry M, Sauguet L, Belin P, et al. Cyclodipeptide synthetases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes[J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(6): 414-420.
- [44] Johnson EG, Krasnoff SB, Bignell DRD, et al. 4-nitrotryptophan is a substrate for the non-ribosomal peptide synthetase TxtB in the thaxtomin A biosynthetic pathway[J]. Molecular Microbiology, 2009, 73(3): 409-418.
- [45] Lautru S, Gondry M, Genet R, et al. The albonoursin gene cluster of *S. noursei*. Biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases[J]. Chemistry and Biology, 2002, 9(12): 1355-1364.
- [46] Bonnefond L, Arai T, Sakaguchi Y, et al. Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2011, 108(10): 3912-3917.
- [47] Cryle MJ, Bell SG, Schlichting I. Structural and biochemical characterization of the cytochrome P450 CypX (Cyp134A1) from *Bacillus subtilis*: a cyclo-L-Leucyl-L-Leucyl dipeptide oxidase[J]. Biochemistry, 2010, 49(34): 7282-7296.
- [48] Tang MR, Sternberg D, Behr RK, et al. Use of transcriptional profiling & bioinformatics to solve production problems: eliminating red pigment production in a *Bacillus subtilis* strain producing hyaluronic acid[J]. Industrial Biotechnology, 2006, 2(1): 66-74.
- [49] Leys D, Mowat CG, McLean KJ, et al. Atomic structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 to 1.06 Å reveals novel features of cytochrome P450[J]. Journal of

- Biological Chemistry, 2003, 278(7): 5141-5147.
- [50] Seward HE, Roujeinikova A, McLean KJ, et al. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* P450 CYP121-fluconazole complex reveals new azole drug-P450 binding mode[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(51): 39437-39443.
- [51] Vetting MW, Hegde SS, Blanchard JS. The structure and mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* cyclodityrosine synthetase[J]. Nature Chemical Biology, 2010, 6(11): 797-799.
- [52] McLean KJ, Carroll P, Lewis DG, et al. Characterization of active site structure in CYP121: a cytochrome P450 essential for viability of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(48): 33406-33416.
- [53] Seguin J, Moutiez M, Li Y, et al. Nonribosomal peptide synthesis in animals: the cyclodipeptide synthase of *Nematostella*[J]. Chemistry and Biology, 2011, 18(11): 1362-1368.
- [54] Sauguet L, Moutiez M, Li Y, et al. 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.
- [55] Aravind L, de Souza RF, Iyer LM. Predicted class-I aminoacyl tRNA synthetase-like proteins in non-ribosomal peptide synthesis[J]. Biology Direct, 2010, 5: 48-58.
- [56] Mundt K, Wollinsky B, Ruan HL, et al. Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches[J]. ChemBioChem, 2012, 13(17): 2583-2592.
- [57] Grundmann A, Li SM. Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*[J]. Microbiology, 2005, 151(7): 2199-2207.
- [58] Grundmann A, Kuznetsova T, Afiyatullof SS, et al. FtmPT2, an *N*-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyzes the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B[J]. ChemBioChem, 2008, 9(13): 2059-2063.
- [59] Kremer A, Li SM. A tyrosine O-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL[J]. Microbiology, 2010, 156(1): 278-286.
- [60] Schultz AW, Lewis CA, Luzung MR, et al. 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.
- [61] Healy FG, Krasnoff SB, Wach M, et al. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(7): 2019-2029.
- [62] Kato N, Suzuki H, Takagi H, et al. Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*[J]. ChemBioChem, 2009, 10(5): 920-928.
- [63] Telloa M, Kuzuyamab T, Heidec L, et al. The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(10): 1459-1463.
- [64] Yin S, Yu X, Wang Q, et al. Identification of a brevianamide F reverse prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* with a broad substrate specificity towards tryptophan-containing cyclic dipeptides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 97(4): 1649-1660.
- [65] Li SM. Applications of dimethylallyltryptophan synthases and other indole prenyltransferases for structural modification of natural products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(4): 631-639.
- [66] Steffan N, Grundmann A, Afiyatullof S, et al. FtmOx1, a non-heme Fe(II) and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*[J]. Organic & Bimolecular Chemistry, 2009, 7(19): 4082-4087.
- [67] Barry SM, Kers JA, Johnson EG, et al. Cytochrome P450-catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtomin phytotoxin biosynthesis[J]. Natural Chemical Biology, 2012, 8(10): 814-816.
- [68] Berlin P, Le DMH, Fielding A, et al. Identification and structural basis of the reaction catalyzed by CYP121, an essential cytochrome P450 in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2009, 106(18): 7426-7431.