



海绵来源链霉菌 S52-B 中氨酰胺天然产物的分离与鉴定

张馨元 王晓政 黄婷婷* 林双君 李志勇

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 教育部代谢与发育科学国际合作联合实验室
上海 200240

摘要:【背景】海洋微生物是复杂海洋生态环境中重要的生物资源之一。海洋微生物所产生的活性天然产物极为丰富，是药物或药物先导化合物的重要来源。【目的】探索海洋中海绵来源链霉菌 *Streptomyces* sp. S52-B 的优势生长条件，挖掘其次级代谢产物，以期分离具有良好生物活性的天然产物。【方法】根据“One Strain Many Compounds” (OSMAC)策略，寻找利于 *Streptomyces* sp. S52-B 生长和次级代谢产物产生的优势培养基，结合质谱及特征性的紫外吸收谱图，选择培养基进行大量发酵。利用正相硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶柱色谱和制备型高效液相色谱等进行分离纯化，并应用高分辨质谱和核磁共振光谱进行化合物结构解析。【结果】确定培养基 A–D 为海洋链霉菌 S52-B 的优势培养基，基于紫外吸收光谱与质谱分析，从培养基 A 的大量发酵物中分离鉴定 3 个具有吡咯并 [4,3,2-*de*]喹啉核心结构的含氯化合物，属于氨酰胺类天然产物，其中 Ammosalic acid 为新结构化合物。【结论】已知含有吡咯并喹啉母核的氨酰胺类家族化合物具有优良的抗癌活性。本研究从海绵来源链霉菌 S52-B 中分离鉴定了 3 个氨酰胺类化合物，其中一个是新结构化合物，不仅丰富了此类化合物家族的结构类型，也为研究其生物合成途径中的未知机理奠定了基础，还有利于结合培养条件和基因组信息从这株海绵来源链霉菌中挖掘新结构的活性天然产物。

关键词：海洋链霉菌，海绵，氨酰胺类天然产物，吡咯并喹啉，结构鉴定

Ammosamide natural products from sponge-derived *Streptomyces* sp. S52-B

ZHANG Xinyuan WANG Xiaozheng HUANG Tingting* LIN Shuangjun LI Zhiyong

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Laboratory on Metabolic & Developmental Sciences, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Marine microorganisms are one of the important biological resources in the complex marine ecological environment. The natural products produced by marine microorganisms are extremely abundant, which are the rich source of drug discovery. [Objective] Exploration of the optimal

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2019YFC0312501); National Natural Science Foundation of China (21632007); Startup Fund for Youngman Research at Shanghai Jiao Tong University

*Corresponding author: E-mail: tingwing82@sjtu.edu.cn

Received: 20-04-2021; Accepted: 22-05-2021; Published online: 03-06-2021

基金项目：国家重点研发计划(2019YFC0312501)；国家自然科学基金(21632007)；上海交通大学“新进青年教师启动计划”

*通信作者：E-mail: tingwing82@sjtu.edu.cn

收稿日期：2021-04-20；接受日期：2021-05-22；网络首发日期：2021-06-03

growth conditions of *Streptomyces* sp. S52-B, a sponge-derived *Streptomyces*, and excavation of its secondary metabolites in order to isolate new bioactive natural products. **[Methods]** According to the “One Strain Many Compounds” strategy, we optimized the cultural conditions of sponge-derived *Streptomyces* sp. S52-B which are suitable for mycelium growth as well as the production of secondary metabolites. Combining mass spectrometry and characteristic UV absorption spectra, one medium is selected for large scale fermentation. After purification by column chromatography and preparative high performance liquid chromatography (HPLC), the structure of the compounds were elucidated by high-resolution mass spectrometry (HR-MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **[Results]** The optimal medium of marine *Streptomyces* sp. S52-B was determined. Based on UV absorption spectroscopy and mass spectrometry analysis, three compounds with pyrrolo [4,3,2-*de*] quinolone were isolated and identified from a large scale fermentation using medium A. The chlorinated compounds with the pyrrolo [4,3,2-*de*] quinolone core structure belongs to the natural product of aminoamides, among which ammosalic acid is a new structure compound. **[Conclusion]** The aminosamide family compounds are known to have excellent anti-cancer activity. Three aminoamide compounds have been isolated and identified from the sponge-derived *Streptomyces* sp. S52-B, which not only enriches the structural types of such compounds, but also provides opportunity to combining culture conditions and genomic information to mine new structural active natural products from this strain.

Keywords: marine *Streptomyces*, sponge, ammosamides, pyrroloquinolone, structure elucidation

海洋天然产物结构新颖、数量庞大,大多具有抗菌、抗病毒、抗癌或抗凝等特殊生物活性,展现出强大的药物开发潜力,在新药开发领域也具有重要地位^[1-2]。已有多种天然产物直接或作为药物前体应用于临床,如研究人员从美国佛罗里达州海域的海绵中分离的海绵阿糖尿苷,是最早应用于临床的抗病毒药物阿糖腺苷 Ara-A (Vidarabine[®])的先导化合物^[3]。此外,除了海鞘素(Ecteinascidin-743),曲贝替定(Trabectedin, Yondelis[®])、甲磺酸艾日布林(Eribulin mesylate, Halavens[®])等已上市的药物外,还有大量海洋天然产物进入临床试验阶段^[4]。在海洋天然产物的来源中,海洋微生物具有极为丰富的遗传多样性、化学多样性和代谢多样性,对这种优势海洋生物资源的研究、开发和利用,将为海洋来源药物先导物的发现提供良好机遇。尤其是20世纪90年代,海洋微生物次级代谢产物的研究进入高速发展期^[5-6]。

海洋来源微生物的生长和次级代谢产物产生的条件具有特殊性。因此,在实验室培养条件下,通过添加人工海水以补充钠、钾、镁、钙等离子及微量元素满足微生物生长所需,同时改变外源理化生长条件,从而刺激微生物产生新颖结构的

化合物,如“One Strain Many Compounds”的策略(即OSMAC策略),即使用改变微生物外部的营养条件,改变微生物外部的物理参数,共培养策略,外源添加酶抑制剂等,实现不同次级代谢产物的产生^[7]。例如:改变培养基中的盐浓度,从海洋真菌绮丽穗霉(*Spicaria elegans*) KLA-03中分离得到新化合物 Spicochalsin A 和 Aspochalsins M-Q^[8];改变发酵培养基中的碳源,成功分离到十二元大环的细胞松弛素 Z7、Z8 和 Z9 以及长链细胞松弛素 Z10-Z15^[9-10];在真菌常用的大米培养基中添加溴化物 KBr,刺激真菌 *Isaria feline* KMM 4639 产生具有抗癌活性的异沙利酮类化合物^[11]。

在复杂的海洋生态系统中,海绵是研究较为深入的多细胞海洋底栖生物,其独特的孔状主体结构是许多海洋微生物的优良栖息宿主^[12-13]。海绵共附生微生物几乎包括所有微生物家族,涵盖古菌、细菌、真菌等多种门类,占海绵本体干重的70%。在环境生存竞争中,海绵利用其体表和体内大量共附生微生物产生具有化学防御功能的次级代谢产物来保护自己。因此,许多研究者认为海绵中活性有效成分的真正产生者是其共附生的微生物。近年来,从海绵共附生微生物中分离并

鉴定出多种类型的次级代谢产物,表现出抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗病毒等显著的生物活性^[3]。吡咯并[4,3,2-*de*]喹啉类生物碱是一类具有成药潜力的天然产物,目前主要发现于海洋放线菌和海绵(图1),如 Ammosamide A 和 Ammosamide B^[14],对人类结肠癌细胞 HCT-116 有较好的抑制作用^[15]。

本研究以分离自中国南海海绵的共附生链霉菌——*Streptomyces* sp. S52-B 为研究对象,证实该菌株在多种含有人工海水的丰富培养基中生长良好,选择一种优势生长培养基进行大量发酵,结合一系列分离纯化手段及核磁技术确定其化学结构,成功获得 3 个含有吡咯并喹啉核心结构的酰胺类化合物 Ammosamide A (1)、Ammosamide B (2) 和新化合物 Ammosalic acid (3) (图 1)。来源于海绵共附生链霉菌中酰胺类次级代谢产物的发现,为研究生物合成途径中的未知催化机理,进行结构衍生用于药物高通量筛选提供了研究平台。

1 材料与方法

1.1 菌株

研究中使用的菌株 *Streptomyces* sp. S52-B 为

海绵共附生链霉菌,分离自中国南海 5–10 m 深度海域采集的海绵样本,由上海交通大学李志勇教授课题组提供^[16]。

1.2 培养基

种子培养基和产孢培养基均为添加 3.8% 海盐的 ISP2 培养基(g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 4.0, 海盐 38.0, pH 7.0; 固体培养基添加 20.0 g/L 青岛琼脂。

用于生长情况测试的培养基: 培养基 A (g/L): 可溶性淀粉 30.0, 黄豆饼粉 10.0, 酵母提取物 2.5, CaCO₃ 3.0, pH 7.0; 培养基 B (g/L): 可溶性淀粉 20.0, 葡萄糖 10.0, Bacto 蛋白胨 5.0, 酵母抽提物 5.0, CaCO₃ 5.0, pH 7.0; 培养基 C (g/L): 可溶性淀粉 20.0, KNO₃ 1.5, NaCl 0.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.05, MnSO₄·7H₂O 8.5×10⁻³, pH 7.5; 培养基 D (g/L): 玉米淀粉 10.0, 燕麦粉 10.0, 麦芽抽提物 2.0, 酵母抽提物 1.0, pH 7.2; 培养基 E (g/L): 黄豆饼粉 20.0, 甘露醇 20.0, 自来水 1.0 L, pH 7.0; 培养基 F (g/L): 玉米淀粉 30.0, 黄豆饼粉 7.0, KNO₃ 1.5, K₂HPO₄ 0.5, pH 7.5; 培养基 G (g/L): ISP4

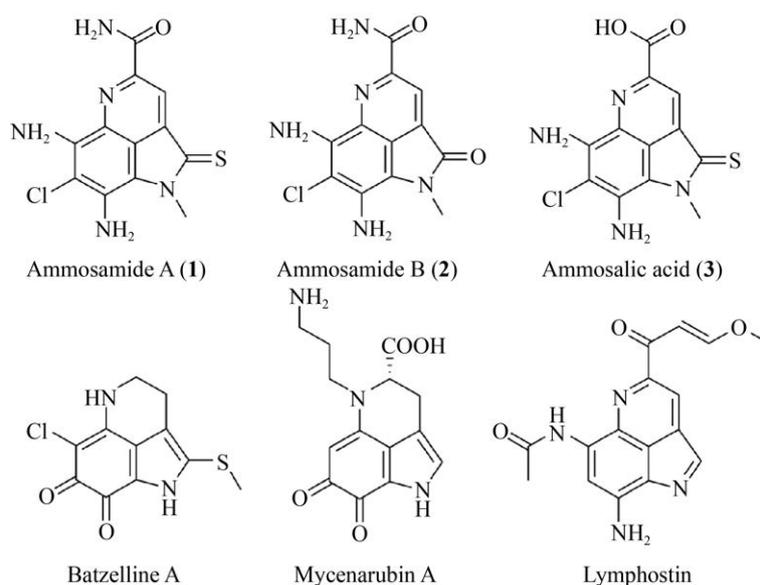


图 1 含吡咯并[4,3,2-*de*]喹啉核心结构化合物的化学结构

Figure 1 The chemical structure of pyrrolo [4,3,2-*de*] quinolone containing compounds

培养基粉末(BD) 37.0, 自然 pH; 培养基 H (g/L): 麦芽抽提物 40.0, 酵母抽提物 4.0, 葡萄糖 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0, pH 6.0; 培养基 I (g/L): 葡萄糖 20.0, KNO_3 1.5, NaCl 0.5, K_2HPO_4 0.28, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 7.5; 培养基 J (g/L): 葡萄糖 10.0, 黄豆饼粉 10.0, 玉米浆 10.0, 甘油 5.0, 酵母粉 5.0, NaCl 5.0, CaCO_3 2.0。以上培养基中添加海盐的终浓度均为 3.8%, 固体培养基添加青岛琼脂至 20.0 g/L。大批量发酵时使用的培养基为培养基 A。

1.3 主要试剂和仪器

乙酸乙酯、甲醇、正己烷、二甲亚砜(DMSO), 国药集团化学试剂有限公司; 色谱纯乙腈, 上海麦克林生化科技有限公司; 海盐, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 正相柱层析硅胶, 青岛海洋化工有限公司; 凝胶色谱填料, GE 公司。

冷冻干燥机, LABCONCO 公司; 高效液相色谱仪、超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪, 安捷伦科技(中国)公司; 700 MHz 核磁共振波谱仪, 布鲁克公司。

1.4 基于 16S rRNA 基因序列的菌株系统进化树构建

用 ClustalW 软件进行序列比对, 用 MEGA-X 构建基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树, 系统进化树中所用的放线菌 16S rRNA 基因序列来源于 NCBI 数据库。

1.5 菌株的培养和发酵

将甘油保藏的链霉菌 S52-B 菌种划线接种于固体产孢平板进行活化, 30 °C 恒温培养箱中避光培养, 培养 4 d 平板上长出少许密点状灰色孢子, 7 d 左右大量产孢, 从产孢良好的固体平板上刮取 1 cm² 的孢子, 接种到含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 将其置于 30 °C、220 r/min 的摇床中振荡培养 3 d; 取出种子液, 以 10% 接种量接种在装有 500 mL 发酵培养基的 2 L 三角瓶中, 置于 30 °C、220 r/min 的摇床中避光振荡培养 7 d, 共计液体发酵 13 L。

1.6 次级代谢产物的提取和检测

收集发酵所得混合物, 经 6 000 r/min 离心 15 min 后将所得上清与菌体沉淀分别处理: 发酵液上清用 2 倍体积的乙酸乙酯进行常温萃取, 充分振荡待发酵液分层后收集上层乙酸乙酯相。对上清进行 2 次反复萃取, 合并萃取获得的有机相进行减压蒸馏, 获得发酵液上清粗提物; 菌体内的化合物用丙酮进行萃取, 丙酮重悬菌体后, 超声仪(300 W, 40 kHz)超声处理 15 min, 滤纸过滤超声后的悬浮液收集丙酮相。合并 4 次萃取菌体后的丙酮相并进行减压蒸馏, 获得菌体粗提物。将发酵液与菌体萃取粗提物合并, 共获得 23.85 g 用于后续化合物分离。

分别取发酵液上清与菌体的少量粗提物复溶于甲醇中进行高效液相色谱 HPLC 检测, HPLC 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A 相) 和乙腈 (B 相)。HPLC 分离柱为 Phenomenex C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 梯度洗脱条件为: 0–5 min, B 相 5%; 5–40 min, B 相 5%–70%; 40–45 min, B 相 70%–100%; 45–50 min, B 相 100%; 50–51 min, B 相 100%–5%; 51–60 min, B 相 5%。流速为 0.4 mL/min, 检测波长为 210 和 254 nm。

1.7 次级代谢产物的分离纯化和结构鉴定

首先使用正相硅胶色谱柱进行分离。取 600 g 硅胶(200–300 目)悬浮于正己烷中, 然后装于直径约 8 cm 的柱中, 沉降完全后待用。粗提物用乙酸乙酯溶解后用约 120 g 硅胶(100–200 目)拌样后采用干法上样。分离条件为洗脱体系(正己烷→正己烷:乙酸乙酯=5:1→正己烷:乙酸乙酯=2:1→正己烷:乙酸乙酯=1:2→乙酸乙酯→乙酸乙酯:甲醇=10:1→乙酸乙酯:甲醇=2:1→甲醇)逐级洗脱, 流速约 10 mL/min, 分步收集不同洗脱组分同时进行薄层层析(TLC)和 HPLC 分析, 合并含有相近化合物的组分为 FrA, 减压蒸馏后得到深紫色固体残渣, 用 4 mL 甲醇复溶后采用湿法上样, Sephadex LH-20 层析柱(柱长 200 cm, 直径 2.5 cm)进一步纯化,

用甲醇洗脱。对分步收集的洗脱液进行 HPLC 检测, 根据检测结果将含有目标化合物的组分合并为 FrA-1 和 FrA-2。重复上述分离步骤, 对 FrA-2 进行第 2 次分离得到 FrA-2-1 和 FrA-2-2。

利用制备型高效液相色谱对经过两步纯化的组分进行分离, HPLC 检测方法与条件: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为乙腈。采用 ACE 5 C18 柱(10 mm×250 mm, ACE)进行分离。洗脱条件为梯度洗脱: 0–5 min, B 相 5%; 5–10 min, B 相 5%–30%; 10–20 min, B 相 30%–44%; 20–21 min, B 相 44%–100%; 21–26 min, B 相 100%; 26–27 min, B 相 100%–5%; 27–32 min, B 相 5%。流速为 2 mL/min, 以 210、254 nm 为检测波长。经制备液相分离、浓缩后, 从 FrA-2-1 组分中得到化合物 **1**, 从 FrA-1 组分中得到化合物 **2**, 从 FrA-2-2 组分中得到化合物 **3**。使用超高效液相-四级杆飞行时间质谱检测样品的高分辨质谱, 样品溶解于 0.5 mL 氘代 DMSO, 进行 700 Hz 核磁共振光谱(NMR)分析。

2 结果与分析

2.1 基于 16S rRNA 基因序列对链霉菌 S52-B 进行系统发育分析

以链霉菌 S52-B 的基因组 DNA 为模板, 利用细菌的 16S rRNA 基因通用引物对(F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; R: 5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3')进行 PCR 扩增获得其 16S rRNA 基因序列, 测序比对后确认与文献报道序列(JX007976)一致^[16]。在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源比对显示该菌株与 *Streptomyces chumphonensis* (NR126175)的亲缘关系最为接近(序列一致性为 99.86%)。利用邻近法构建基于放线菌 16S rRNA 基因序列的系统发育树表明, 海洋来源的链霉菌 S52-B 与其他已经报道的氨酰胺类化合物产生菌处于不同的系统发育分支, 是新的氨酰胺类化合物产生菌(图 2)。

2.2 筛选链霉菌 S52-B 的发酵培养基

培养基的组成成分决定了微生物的生长状态和次级代谢产物的产生情况。链霉菌 S52-B 在补充 3.8% 海盐的固体 ISP2 平板上生长良好, 孢子细密呈灰色, 由此作为种子培养基。随后, 基于碳氮源的类型选择了 10 种链霉菌常用发酵培养基, 并补加海盐以模拟海水的盐浓度环境进行菌株培养。固体平板的培养结果显示, 菌株 S52-B 在补加海盐的多数固体培养基上生长状态良好, 其中培养基 A–D 中菌丝体生长和产孢都非常好, 培养基 E–G 中的菌丝体生长很好而产孢稍弱, 而在培养基 H–J 中生长状态很差甚至完全不长。通过对培养基成分的分析发现, 含有可溶性淀粉、玉米淀粉或燕麦粉等迟效碳源的培养基有利于菌丝体的生长; 酵母提取物或麦芽提取物作为混合碳氮源的同时, 还能提供生长因子, 因而有利于菌丝体生长; 但在含有速效碳源葡萄糖的培养基中, 菌丝体和产孢情况都较差(培养基 H–J)(图 3)。

2.3 目标化合物的分离和纯化

根据菌株在固体培养基上的生长状态, 最终选择使用菌丝体生长和产孢情况均很好的培养基 A 进行大量发酵。发酵 5 d 左右发酵液即开始呈现蓝紫色。乙酸乙酯萃取发酵 7 d 的培养物后经 HPLC 分析, 发现 3 个 HPLC 峰呈现出较为特殊的紫外吸收光谱, 暗示其对应的代谢物可能含有特殊共轭结构(图 4A)。进一步高分辨质谱分析发现这 3 个峰对应的分子离子峰分别为 $[M+H]^+$ 292.060 3、308.036 8 和 309.020 5, 在分子离子峰旁分别有 M+2 片段 294.057 7、310.035 1 和 311.018 0, 而且强度相当于分子离子峰的 1/3, 可能是源于 ³⁵Cl 同位素, 这表明 3 个具有特殊结构的化合物中含有氯原子。含氯化修饰的天然产物通常具有良好的生物活性和成药潜力, 因此我们将发酵液中含氯原子的特殊结构化合物选定为目标进行后续分离。

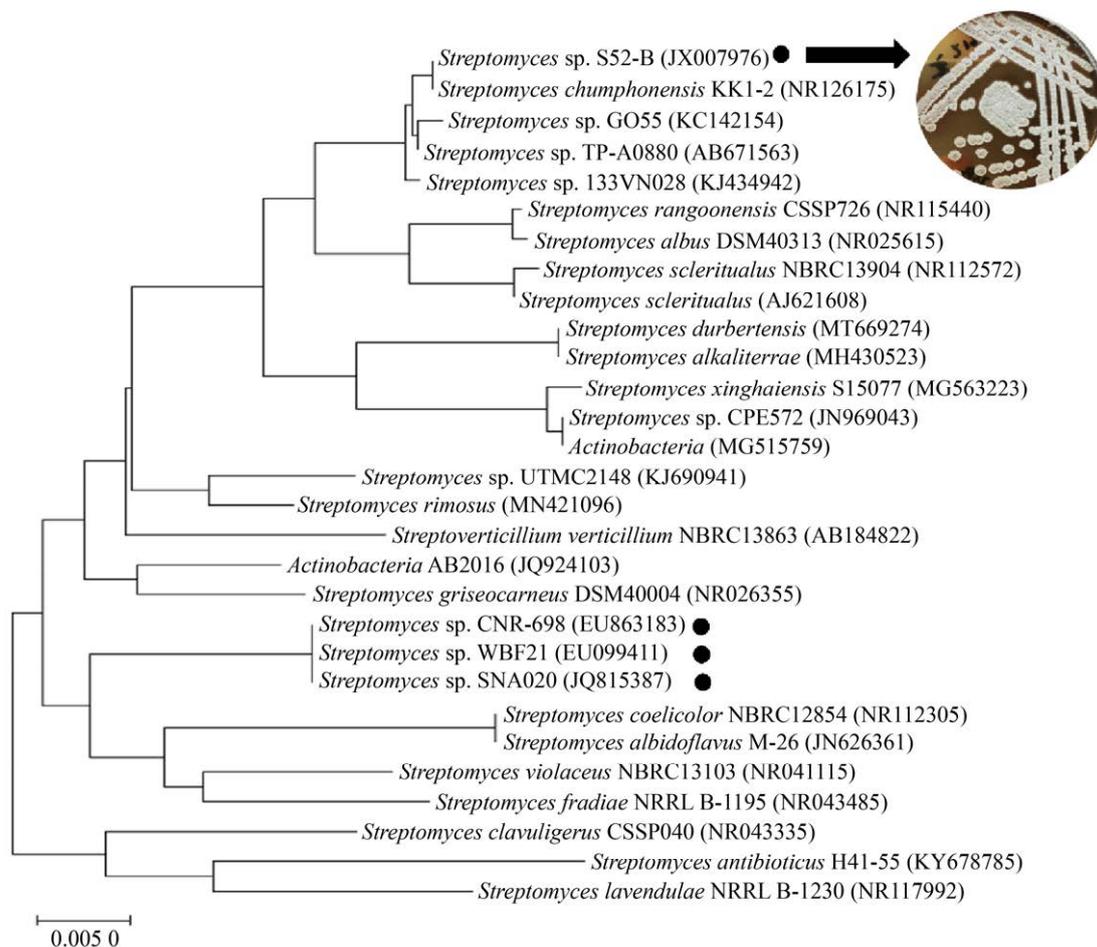


图 2 邻近法构建基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA genes sequence using neighbor-joining method

注: ●: 标注已报道的氨酰胺类天然产物产生菌; 括号中为相应菌株的序列登录号

Note: ●: The producers of ammosamides natural products; Accession numbers are shown in brackets

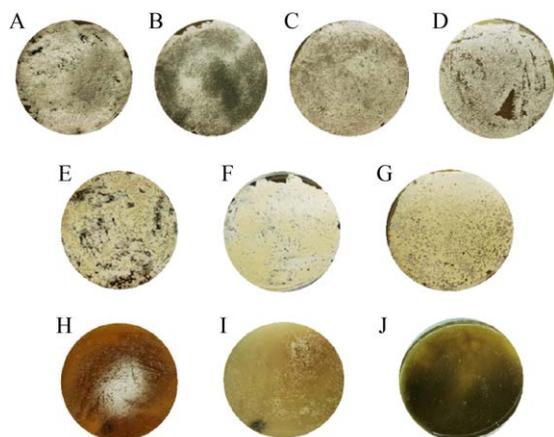


图 3 链霉菌 S52-B 在不同固体培养基中的生长情况

Figure 3 The growth of *Streptomyces* sp. S52-B on different culture medium

发酵液(13 L)经乙酸乙酯萃取、浓缩后获得粗提物 FrA, 依次由正相硅胶、葡聚糖凝胶和制备型高效液相色谱进行分离纯化, 从组分 FrA-2-1 中分离得到化合物 1 (4 mg), 从组分 FrA-1 中分离得到化合物 2 (2.6 mg), 从组分 FrA-2-2 中分离得到化合物 3 (1.6 mg)。3 个化合物的紫外吸收图谱相近, 但分子量不同, 推测为结构相似的化合物(图 4B-4D)。

2.4 Ammosamides 类化合物的结构解析

化合物 1 为蓝色片状晶体, 易溶于 DMSO。进行正离子模式下其分子离子峰为 308.036 8, 理论分子量为 308.030 3, 确定其分子式为 $C_{12}H_{10}ClN_5OS$ 。核磁共振分析 1H -NMR (700 MHz,

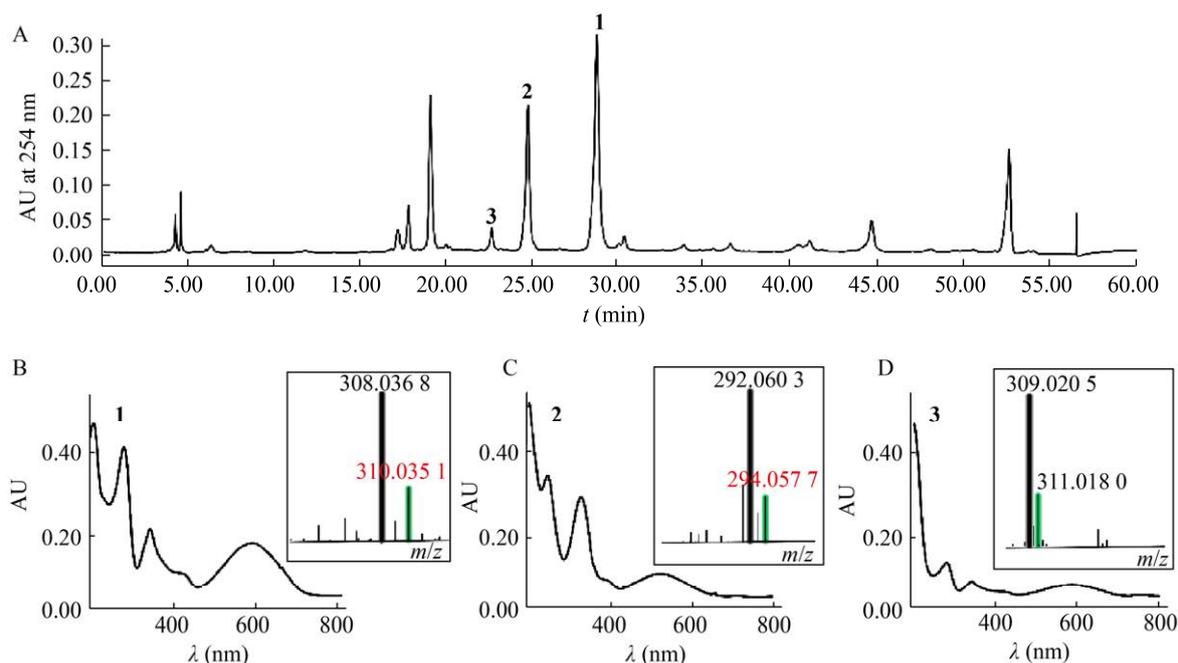


图 4 培养基 A 发酵粗提物的 HPLC 检测、特征吸收和质谱数据

Figure 4 The chromatographic data of crude extract of medium A

注: A: 发酵粗提物的 HPLC 检测图谱; B: 化合物 1 的紫外吸收和质谱; C: 化合物 2 的紫外吸收和质谱; D: 化合物 3 的紫外吸收和质谱

Note: A: The HPLC profile of crude extract; B: The UV-vis spectra and MS data of compound 1; C: The UV-vis spectra and MS data of compound 2; D: The UV-vis spectra and MS data of compound 3

DMSO): δ : 8.91 (1H, brs, CONH₂), 7.66 (1H, brs, CONH₂), 8.49 (1H, s, H-3), 7.14 [2H, brs, NH₂(C-6)], 6.86 [2H, brs, NH₂(C-8)], 4.04 (3H, rs, H-1a); 碳谱 ¹³C-NMR (175 MHz, DMSO): δ : 177.7 (C-2), 166.6 (C-4a), 145.2 (C-4), 143.3 (C-8), 137.4 (C-6), 135.4 (C-5a), 133.2 (C-2a), 120.3 (C-5b), 117.7 (C-3), 111.1 (C-8a), 103.6 (C-7), 33.8 (C-1a)。其波谱数据与文献报道一致, 因此化合物 1 鉴定为 Ammosamide A (1), 核磁数据与已报道文献[14]一致。

化合物 2 为深粉色片状晶体, 易溶于二甲亚砜(DMSO)。对该化合物进行液相质谱(LC-MS)分析显示, 正离子模式下其分子离子峰为 292.0603, 理论分子量为 292.0604, 确定其分子式为 C₁₂H₁₀CIN₅O₂。将化合物 2 溶解在 0.5 mL 中氘代

DMSO 中, 进行核磁测试。¹H-NMR (700 MHz, DMSO)波谱数据: δ : 8.88 (1H, brs, CONH₂), 7.63 (1H, brs, CONH₂), 8.34 (1H, s, H-3), 6.70 (2H, brs, NH₂(C-6)), 6.15 (2H, brs, NH₂(C-8)), 3.59 (3H, rs, H-1a); ¹³C-NMR(175 MHz, DMSO) 数据: δ : 166.6 (C-4a), 164.4 (C-2), 145.2 (C-4), 141.0 (C-8), 132.9 (C-6), 131.3 (C-5a), 131.1 (C-2a), 119.5 (C-5b), 116 (C-3), 106.8 (C-8a), 105.0 (C-7), 29.1 (C-1a)。其波谱数据与文献报道一致, 因此化合物 2 确定为 Ammosamide B (2), 核磁数据与已报道文献[14]一致。

化合物 3 为紫色片状晶体, 易溶于 DMSO。正离子模式下其分子离子峰为 309.0205, 分子式为 C₁₉H₉CN₄O₂S, 不饱和度为 10。结合紫外吸收谱图推测 3 与 1、2 属于一类化合物。仔细比较化

合物 **3** 与 **1** 和 **2** 的 ^{13}C -NMR 谱, 发现三者的谱图信号几乎完全一致(表 1), 推测 **3** 也是氨酰胺类化合物。根据化合物 **3** 的分子量比化合物 **1** 大 1, 因此推测 **3** 中的一个氨基被羟基替代。比对两者的 ^1H -NMR 谱图发现, 化合物 **3** 缺少了 8.88 (1H, brs, CONH_2)、7.63 (1H, brs, CONH_2) 这 2 个酰胺的氨基信号, 而 7.01 [2H, brs, $\text{NH}_2(\text{C}-6)$]、6.86 (2H, brs, $\text{NH}_2(\text{C}-8)$) 和 6.98 (2H, brs, $\text{NH}_2(\text{C}-8)$) 的氨基信号仍然存在, 从而推测化合物 **3** 是化合物 **1** 的羧酸形式, HSQC 和 HMBC 谱也佐证了这一推测(图 5)。由此确定化合物 **3** 为新的化合物结构, 命名为 Ammosalic acid (**3**)。

表 1 化合物 **3** 的核磁数据(700 MHz, DMSO)
Table 1 NMR spectral data of compound **3** (700 MHz, DMSO)

No.	δ_{H} (mult, J/Hz) ^a	δ_{C} (DEPT) ^b
1a	4.04 (s)	33.9 (q)
2		177.6 (s)
2a		133.3 (s)
3	8.47 (s)	119.1 (s)
4		143.3 (s)
4a		166.3 (s)
5a		135.9 (s)
5b		120.5 (s)
6		137.4 (s)
7		103.9 (s)
8		142.5 (s)
8a		111.2 (s)
$\text{NH}_2(\text{C}-6)$	7.01 (brs)	
$\text{NH}_2(\text{C}-8)$	6.97 (brs)	

Note: ^a: 700 MHz; ^b: 175 MHz

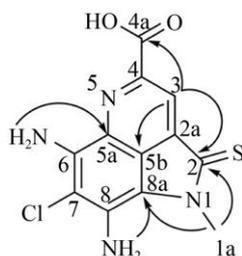


图 5 化合物 **3** 的 HMBC 图
Figure 5 Key HMBC of compound **3**

3 讨论与结论

本研究对海绵来源链霉菌 *Streptomyces* sp. S52-B 的次级代谢产物进行了探索, 运用 OSMAC 策略确定优势培养基类型, 结合高效液相、质谱与核磁谱图数据解析, 成功分离和鉴定 3 个氨酰胺类化合物, 其中化合物 **3** 为新化合物 Ammosalic acid。

氨酰胺类化合物具有吡咯并喹啉的母核结构, 如 Ammosamide A 和 Ammosamide B 对人结肠癌细胞系具有良好的细胞毒性^[17], 利用前体导向的方法, 加入不同取代基的氨类前体可获得更好活性的衍生化合物^[9]; Lymphostin 系列天然产物则对细胞生长和增殖的调节因子有抑制作用^[18]。因此氨酰胺类化合物为抗癌药物的研发提供了具有成药潜力的先导化合物。对其生物合成机制研究表明, 吡咯并喹啉的母核来源于色氨酸, 其余氮原子则来源于天冬氨酸。由此我们推测, 核糖体肽合成方式形成含有吡咯并喹啉母核的中间体 **4** 后, 再经 F420 依赖的氧化酶氧化、氮甲基化、氧化形成 **1** 和 **2**, 或直接水解后经后修饰步骤形成 **3** (图 6)。基于 16S rRNA 基因的系统进化分析可见, 目前已报道的此类化合物产生菌均为亲缘关系非常相近的放线菌, 而本研究使用的海绵来源链霉菌 *Streptomyces* sp. S52-B 则位于亲缘关系较远的分支(图 2)。本研究丰富了 Ammosamides 类化合物结构和来源, 也为研究其生物合成途径中未知的酶催化反应和获得新结构衍生物奠定基础。

海绵不仅是海洋生态环境中仅次于珊瑚的第二大生物体, 也是海洋微生物栖居的良好环境。种类繁多、数量庞大的海绵共附生微生物不仅构成了海绵的骨架, 还会产生丰富的活性物质帮助海绵抵御海水中病原微生物的威胁, 维持海绵自身的生存和宿主的健康。链霉菌 S52-B 是分离自中国南海的海绵共附生链霉菌, 具有特殊性, 其基因组信息也显示出产生新结构化合物的代谢潜力。在后续工作中, 我们将在优化培养基和培养条件的基础上, 结合基因组信息和遗传学工具进行挖掘, 获得新颖的活性天然产物。

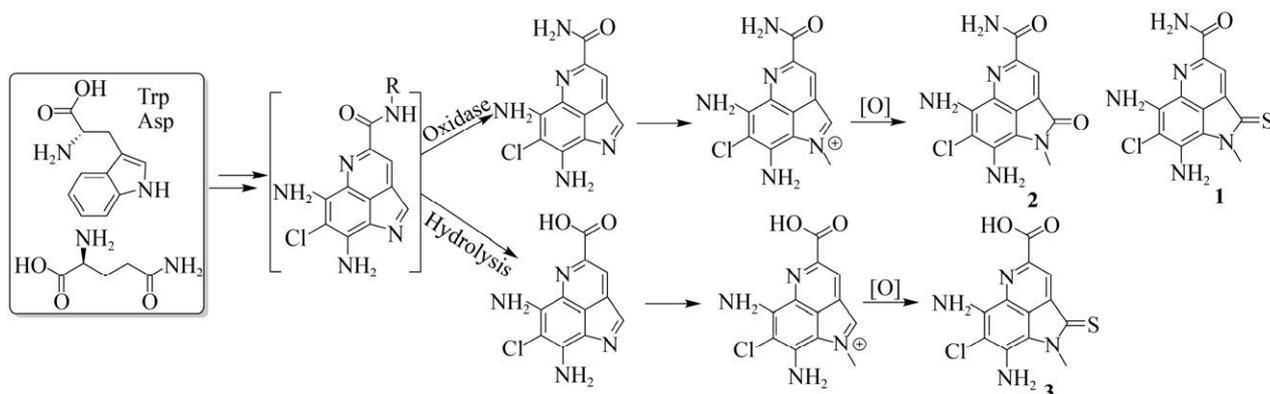


图6 推测的氨酰胺化合物生物合成途径

Figure 6 Proposed biosynthetic route for the ammosamide biosynthesis

REFERENCES

- [1] Li XW. Chemical ecology-driven discovery of bioactive marine natural products as potential drug leads[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(11): 837-838
- [2] Lane AL, Nam SJ, Fukuda T, Yamanaka K, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W, Moore BS. Structures and comparative characterization of biosynthetic gene clusters for cyanosporasides, enediyne-derived natural products from marine actinomycetes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(11): 4171-4174
- [3] Barbosa F, Pinto E, Kijjoa A, Pinto M, Sousa E. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2020, 56(1): 106005
- [4] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(3): 629-661
- [5] Sun WW, Wu WH, Liu XL, Zaleta-Pinet DA, Clark BR. Bioactive compounds isolated from marine-derived microbes in China: 2009–2018[J]. Marine Drugs, 2019, 17(6): 339-365
- [6] Yang CF, Qian R, Xu Y, Yi JX, Gu YW, Liu XY, Yu HB, Jiao BH, Lu XL, Zhang W. Marine actinomycetes-derived natural products[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2019, 19(31): 2868-2918
- [7] Reimer D, Hughes CC. Thiol-based probe for electrophilic natural products reveals that most of the ammosamides are artifacts[J]. Journal of Natural Products, 2017, 80(1): 126-133
- [8] Hughes CC, Fenical W. Total synthesis of the ammosamides[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(8): 2528-2529
- [9] Pan ED, Oswald NW, Legako AG, Life JM, Posner BA, MacMillan JB. Precursor-directed generation of amidine containing ammosamide analogs: Ammosamides E–P[J]. Chemical Science, 2013, 4(1): 482-488
- [10] Zurwerra D, Wullschlegler CW, Altmann KH. Treasures from the sea: discovery and total synthesis of ammosamides[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 49(39): 6936-6938
- [11] Yang SW, Wang CM, Tang KX, Wang JX, Sun LP. An efficient approach to the total synthesis of ammosamide B[J]. European Journal of Organic Chemistry, 2016, 2016(5): 1050-1053
- [12] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2020, 37(2): 175-223
- [13] Kobayashi J. Search for new bioactive marine natural products and application to drug development[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2016, 64(8): 1079-1083
- [14] Hughes C, MacMillan JB, Gaudêncio S, Jensen PR, Fenical W. The ammosamides: structures of cell cycle modulators from a marine-derived *Streptomyces* species[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2009, 48(4): 725-727
- [15] Reddy PVN, Jensen KC, Mesecar AD, Fanwick PE, Cushman M. Design, synthesis, and biological evaluation of potent quinoline and pyrroloquinoline ammosamide analogues as inhibitors of quinone reductase 2[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 55(1): 367-377
- [16] Sun W, Zhang FL, He LM, Karthik L, Li ZY. Actinomycetes from the South China Sea sponges: isolation, diversity, and potential for aromatic polyketides discovery[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1048
- [17] Hughes C, MacMillan J, Gaudêncio S, Fenical W, La Clair J. Ammosamides A and B target myosin[J]. Angewandte Chemie International ed. in English, 2009, 48(4): 728-732
- [18] Miyayama A, Janso JE, McDonald L, He M, Liu HB, Barbieri L, Eustáquio AS, Fielding EN, Carter GT, Jensen PR, et al. Discovery and assembly-line biosynthesis of the lymphostin pyrroloquinoline alkaloid family of mTOR inhibitors in *Salinispora* bacteria[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(34): 13311-13313