



戊二酰亚胺类天然产物生物合成研究进展

张博 戈惠明*

南京大学生命科学学院功能生物分子研究所 医药生物技术国家重点实验室 江苏 南京 210023

摘要: 微生物天然产物是天然药物的重要组成部分, 而天然产物的良好生物活性很大程度上取决于发挥药效的结构基团。这些特殊药效基团的生物合成, 通常是利用小分子羧酸、氨基酸等结构简单的初级代谢产物, 经过复杂的生物化学过程, 最终合成结构复杂活性多样的天然产物。戊二酰亚胺类天然产物是一类重要的细菌来源天然产物, 它们具有良好的生物活性, 是潜在的先导化合物, 部分化合物已被开发成分子探针。本文综述了近年来微生物来源的戊二酰亚胺类天然产物及其生物合成研究, 包括 Iso-Migrastatin、Lactimidomycin、Cycloheximide、Streptimidone、Gladiostatins、Sesbanimide 等, 对戊二酰亚胺类天然产物的生物合成研究, 将有效促进通过基因组挖掘策略寻找新型戊二酰亚胺类天然产物。

关键词: 戊二酰亚胺, AT-less 聚酮合酶, 生物合成, 天然产物

Research progress of glutarimide-containing natural products biosynthesis

ZHANG Bo GE Huiming*

State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Institute of Functional Biomolecules, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210023, China

Abstract: Microbial natural products are important component of natural product derived drugs, and the excellent biological activities of natural products mainly depend on the pharmacophore groups with special structures. The biosynthesis of these special pharmacophores usually uses small molecules, like carbohydrates, amino acids and other simple primary metabolites. After specific and complex biosynthetic pathways, the simple metabolites were assembled to synthesize natural products with complex structures and diverse activities. Glutarimide containing natural products are an important class of natural products isolated from bacteria. As the potential lead compounds, they show excellent biological activity and have been developed as molecular probes. This article reviews the glutarimide containing natural products isolated from microorganisms and related biosynthetic pathways characterized in recent years, including iso-migrastatin, lactimidomycin, cycloheximide, streptimidone, gladiostatins, sesbanimide. Based on the biosynthetic study of glutarimide moiety, we expect to identify more glutarimide containing natural products through genome mining strategies.

Keywords: glutarimide, AT-less polyketide synthase, biosynthesis, natural product

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81803380, 81991524); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180333)

*Corresponding author: Tel: 86-25-89681109; E-mail: hmge@nju.edu.cn

Received: 12-03-2021; Accepted: 28-03-2021; Published online: 01-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(81803380, 81991524); 江苏省自然科学基金(BK20180333)

*通信作者: Tel: 025-89681109; E-mail: hmge@nju.edu.cn

收稿日期: 2021-03-12; 接受日期: 2021-03-28; 网络首发日期: 2021-04-01

天然产物是药物开发的源泉，而复杂天然产物的优良活性，通常取决于其关键药效基团^[1]。戊二酰亚胺 (Glutarimide)，也称作 2,6-哌啶二酮 (2,6-Piperidinedione) 是有机合成中重要的活性药效基团^[2-5]，虽然其具体作用机制尚未明确，但是由于其理化性质与尿嘧啶及其衍生物高度相似，戊二酰亚胺药效团被认为可作为载体分子，与尿嘧啶和胸腺嘧啶核苷转运受体相互作用，进而更容易穿过包括核膜在内的各种细胞膜，甚至血脑屏障^[6]。

微生物是戊二酰亚胺类天然产物的主要来源，迄今已有超过 50 余种戊二酰亚胺类天然产物被分离鉴定(图 1)。它们大多是在戊二酰亚胺结构单元 β 位连接上一条长短不同的聚酮侧链。由于该家族天然产物具有抗细菌、抗病毒、抗肿瘤、抗细胞迁移以及免疫抑制等多种生物活性，自发现伊始就吸引研究人员对其生物合成过程进行研究和探索。本文对近十余年间微生物来源戊二酰亚胺类天然产物生物合成的研究和发展现况进行综述。

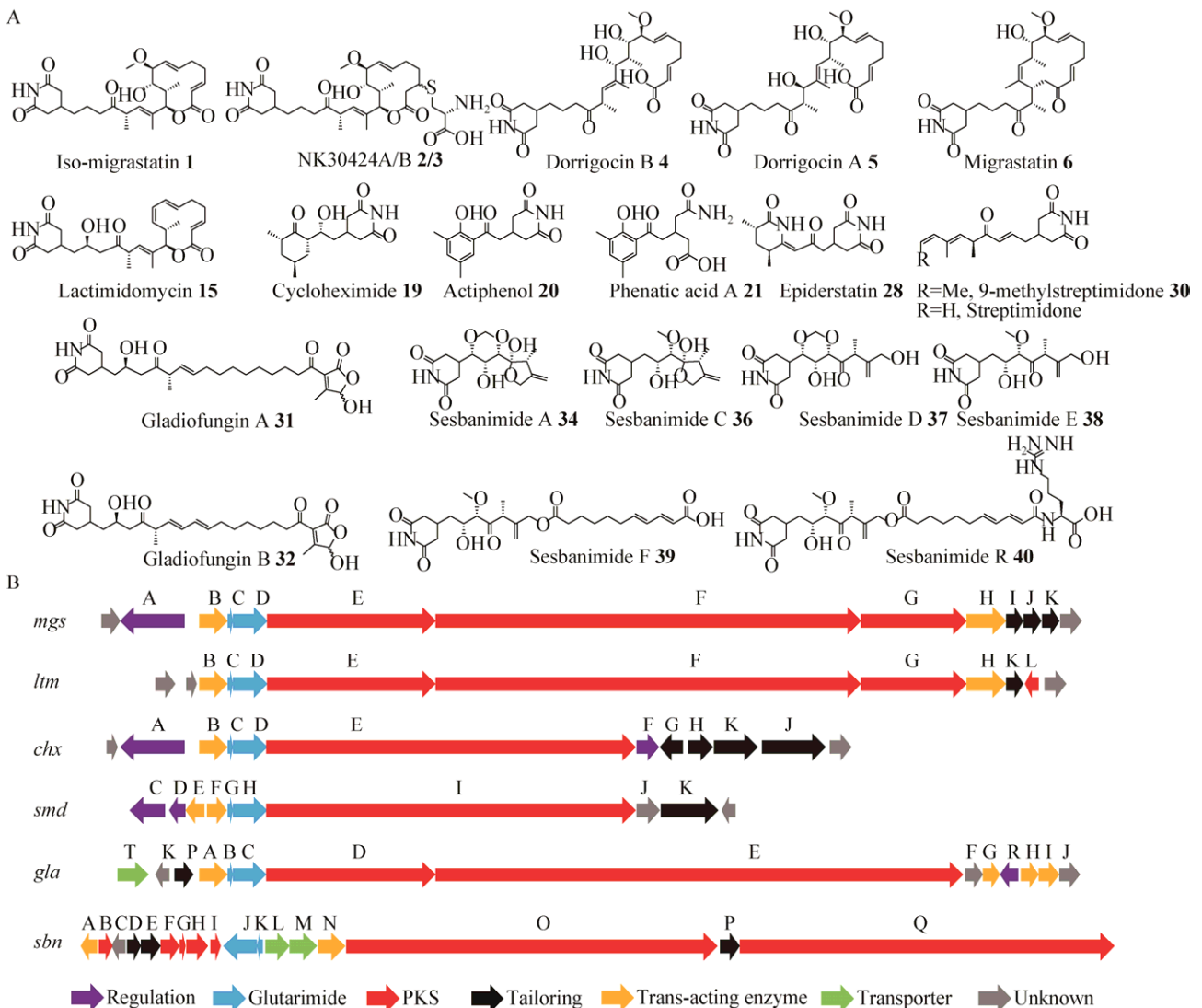


图 1 代表性戊二酰亚胺类天然产物及其生物合成基因簇

Figure 1 Representative glutarimide-containing natural products and biosynthetic gene clusters

注: *mgs*: Iso-migrastatin 基因簇; *ltm*: Lactimidomycin 基因簇; *chx*: Cycloheximide 基因簇; *smd*: Streptimidone 基因簇; *gla*: Gladiostatin 基因簇; *sbn*: Sesbanimide 基因簇

Note: *mgs*: Gene cluster of iso-migrastatin; *ltm*: Gene cluster of lactimidomycin; *chx*: Gene cluster of cycloheximide; *smd*: Gene cluster of streptimidone; *gla*: Gene cluster of gladiostatin; *sbn*: Gene cluster of sesbanimide

1 Iso-Migrastatin 的生物合成研究

Migrastatin (MGS) 是一类含有十四元大环内酯的戊二酰亚胺类天然产物, 于 2000 年首次分离自 *Streptomyces* sp. MK929-43F1^[7]。2 年后, MGS 及其类似物 Iso-Migrastatin (Iso-MGS) 以及 Dorrigin (DGN) 又从 *Streptomyces platensis* NRRL 18993 中分离并鉴定^[8]。由于该类化合物具有很强的抗细胞迁移活性, 因此而得名并受到广泛关注^[9]。2005 年沈奔教授课题组通过同位素标记技术证明 Migrastatin 和 Dorrigin 是 Iso-Migrastatin 的降解产物, 属于同一条生物合成途径, 由此开始了对于戊二酰亚胺类天然产物生物合成的研究^[10]。2009 年, 沈奔教授课题组从 *S. platensis* NRRL 18993 中分离并鉴定出首条戊二酰亚胺类生物合成基因簇 *mgs*^[11], 发现 Iso-MGS 是由 AT-Less I 型聚酮合酶(PKS)所产生的。与经典 I 型聚酮合酶相比, AT-Less I 型聚酮合酶中每一个“模块”都缺少了经典 PKSs 中必不可少的酰基转移酶结构域(AT Domain), 而是利用了聚酮合酶外的游离 AT 来提供酰基底物^[12-13]。早在 20 世纪 90 年代, 科研人员就从多株细菌中, 观测到了这种现象, 但是由于测序技术不发达, 普遍认为该类基因簇可能是没有功能的^[14-16]。2002 年 Piel 课题组在鉴定 Pederin 生物合成基因簇时发现其聚酮合酶外存在游离型的 AT, 进而提出游离在 PKS 之外的 AT 可能为整个聚酮合酶提供底物的假设^[17]。最终, 沈奔教授课题组在对 Leinamycin 进行生物合成研究时, 首次通过体内基因敲除、基因回补以及体外酶学证明游离 AT 酶能够为缺少 AT 结构域聚酮合酶提供酰基底物, 并将该类缺少酰基转移酶结构域的聚酮合酶称为 AT-Less PKS^[18]。

MGS 的生物合成基因簇包括: 一个调控基因 *mgsA*, 一个编码游离酰基转移酶(AT)和氧化还原酶双结构域的基因 *mgsH*, 一个编码 II 型硫酯酶和 AT 双结构域蛋白基因 *mgsB*, 3 个聚酮合酶基因

mgsE-G, 3 个后修饰酶基因 *mgsI*、*mgsJ* 和 *mgsK* 以及一个编码游离 II 型 ACP 基因 *mgsC* 和氨基转移酶基因 *mgsD*^[11]。通过生物信息学分析, 发现 MgsD 与天冬酰胺合成酶具有较高的序列相似性, 结合敲除 *mgsC* 和 *mgsD* 完全废除了 MGS 的产生, 研究人员推测 MgsC 和 D 负责将特征的戊二酰亚胺单元整合到聚酮链上。此外, 通过序列比对发现, 在模块 3 的 KS 与 ACP 之间存在着一个未知功能的结构域, 但其作用是什么, 以及戊二酰亚胺单元形成的具体催化机制仍未明确^[11]。

2014 年 Hertweck 课题组在对含有特征 δ -内酯结构单元的 Rhizoxin 进行生物合成研究时, 发现其基因簇中同样存在着 KS-B-ACP 模块^[19]。随后, 研究人员体外表达了相关结构域蛋白, 利用连接 SNAC 的底物类似物来进行体外酶学重构, 并通过高分辨质谱成功检测到预期产物分子量, 从而证明含有该特殊结构域(B Domain)的 KS 并未催化常规克莱森缩合反应, 而催化迈克尔加成反应形成 β 侧链(图 2)^[19]。此外, 研究人员利用不含有羟基的结构类似物来进行相关反应, 证明 KS-B 和 ACP 这 2 个蛋白通过共价键进行了交联(图 2C), 而同位素标记实验则证明羟基会特异性地进攻 KS 的硫酯键, 从而解离并关环形成 δ -内酯单元(图 2B)^[19]。此外研究人员还解析出 KS-B 双结构的蛋白晶体结构, 结合点突变实验发现, B 结构域并未直接催化 δ -内酯的形成, 而仅作为结构单元来推动 KS 行使侧链化过程^[19]。由于 MGS 基因簇中也存在着 KS-B-ACP 的结构特征, Hertweck 课题组又对戊二酰亚胺单元的合成过程进行了研究。研究人员发现 KS-B-ACP 模块可以利用不同底物进行 β 侧链化、环化形成特征六元内酯或内酰胺环, 并且来源于不同生物合成途径中的 B 结构域可以进行相互置换并发挥相同功能^[20]。至此, *mgsC*、*D* 以及特殊 B Domain 组成了合成戊二酰亚胺单元的最少组成部分。

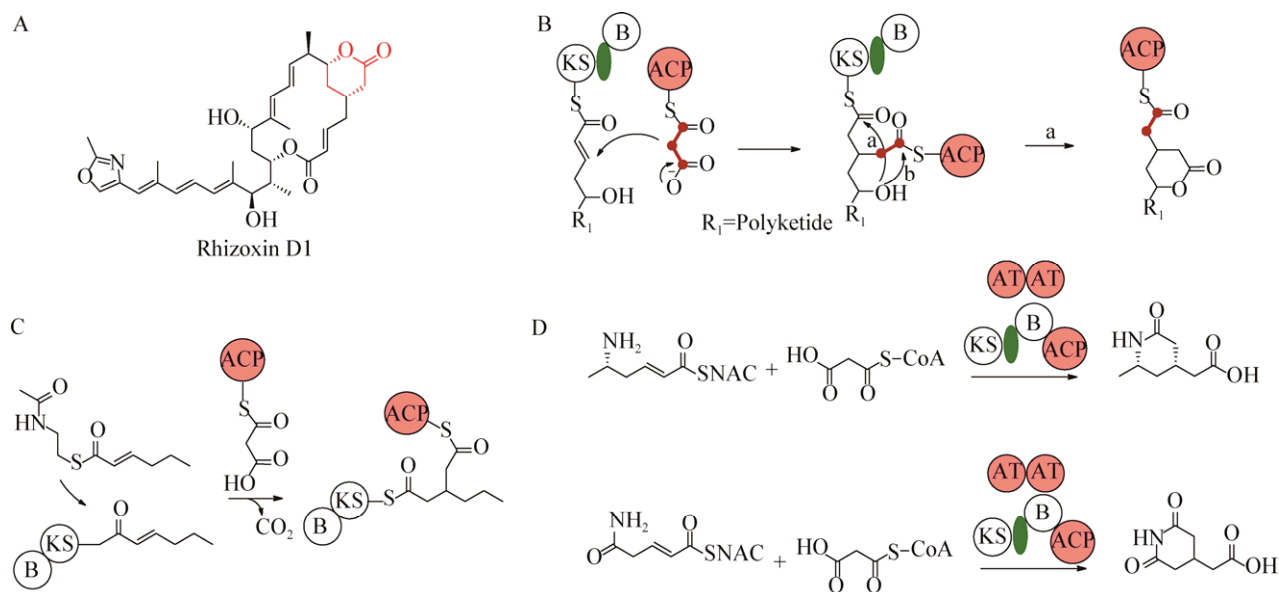


图 2 δ -内酯和戊二酰亚胺单元生物合成过程

Figure 2 Biosynthetic process of δ -lactone and glutarimide moiety

注：A：含有 δ -内酯结构单元的 Rhizoxin；B： δ -内酯体外酶催化和同位素标记图示；C：蛋白共价结合图示；D：戊二酰亚胺结构单元体外酶催化图示

Note: A: Rhizoxin containing the characteristic δ -lactone moiety; B: *in vitro* enzymatic reaction for formation of δ -lactone moiety; C: Model of interaction between KS-B and ACP domain; D: *in vitro* enzymatic reaction for formation of glutarimide moiety

在确定 Iso-MGS 生物合成基因簇后，沈奔教授课题组对 Iso-MGS 生物合成途径中后修饰酶的功能进行了详细功能研究^[21]。通过体内基因敲除及中间产物的分离鉴定，表明氧化还原酶 MgsI 负责 C16/17 位的双键还原；P450 氧化酶 MgsK 负责 C8 位羟基化；甲基转移酶 MgsJ 负责在 C8 位羟基上引入甲基基团^[21]。在所有后修饰基因的敲除突变株中，主要积累了化合物 7 和 8，而且 C16/17 双键产物 8 占到 95% 以上，这就暗示着一个未被鉴定出来的脱水酶负责了双键的形成。通过后续特定结构域点突变失活和体外酶催化验证，研究人员鉴定出 Iso-MGS 生物合成基因簇中模块 10 中的脱水酶结构域，能够催化罕见的聚酮链远端脱水功能，进一步完善了 *mgs* 的生物合成途径^[22]。Iso-MGS 在水溶液条件中会快速被水进攻，进而扩环或开环形成 MGS 和 DGN 类化合物，将其他生物合成中间体置于水溶液环境中，同样会获得相对应的扩环和开环产物(图 3)^[10,23]。此

外，在与半胱氨酸孵育时则会发生非酶促迈克尔加成反应，半胱氨酸巯基进攻 1 的 C3 位而产生相应衍生物 NK30424，这些非酶促反应为扩展戊二酰亚胺类天然产物多样性提供了新的思路。

2 Lactimidomycin 的生物合成研究

Lactimidomycin (LTM)，于 1992 年从 *Streptomyces amphibiosporus* ATCC 53964 的发酵液中被分离并鉴定，通过同位素标记实验首次对戊二酰亚胺单元的生物合成来源进行了探究，并表明戊二酰亚胺结构单元属于聚酮来源^[24]。结构上，LTM 与 Iso-MGS 高度相似，侧链同为十二元大环内酯，差异在于 LTM 的 C7/8 位为双键而 C17 位为羟基。活性上来看，LTM 除同样具有抑制细胞迁移功能外，还可在真核生物蛋白翻译的起始阶段，结合未被 tRNA 占据的核糖体 E-site 来阻止易位步骤的发生，从而发挥对多种肿瘤细胞的强大细胞毒活性^[25-27]。

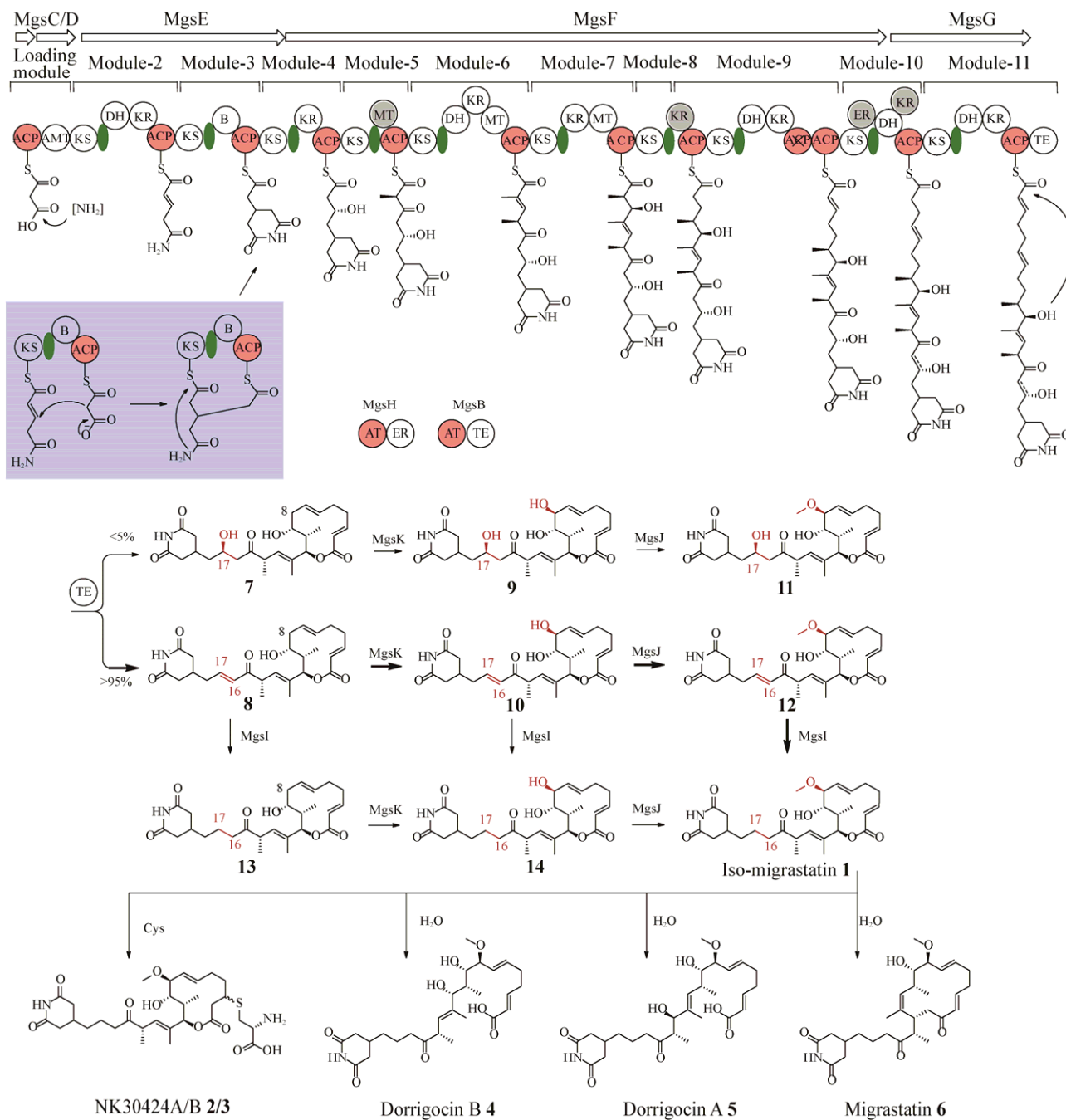


图 3 Iso-MGS 生物合成途径

Figure 3 Biosynthetic pathway of iso-MGS

注: 灰色功能域代表生物合成途径中缺失结构域; 蓝色阴影表明 B domain 介导的戊二酰亚胺单元合成过程。AT: 酰基转移酶; KS: 酮基合成酶; KR: 酮基还原酶; DH: 脱水酶; ER: 烯醇还原酶; ACP: 酰基载体蛋白; MT: 甲基转移酶; TE: 硫酸酯酶

Note: Gray domains represent the missing domain in the biosynthetic pathway; Blue shadow represent the biosynthetic process of glutarimide catalyzed by B domain. AT: Acyltransferase; KS: Ketosynthase; KR: Ketoreductase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreductase; ACP: Acyl carrier protein; MT: Methyltransferase; TE: Thioesterase

LTM 的生物合成基因簇与 Iso-MGS 同样高度相似, 聚酮合酶部分主要差别在于模块 8 中缺少 1 个 ACP 结构域, 很有可能利用模块 9 中的双 ACP 结构域进行聚酮链延伸(图 4)。LTM 基因簇中仅存在一个 P450 后修饰酶 LtmK (图 1B), 与 MgsK 的 C9 羟基化功能不同, LtmK 作为去饱和酶, 高度立体选择性和区域选择性的催化 LTM 中 C8/9 位顺式双键的形成。通过组合生物合成策略, 将 MGS 生物合成途径中的后修饰酶 MgsJK 导入到 LtmK 的缺失突变株中, 成功产生了 LTM 和 MGS 的杂合产物 16 和 17^[28]。通过对分离得到 LTM 和 MGS 类天然产物进行构效关系研究, 发现与 14 元扩环产物相比, 12 元大环内酯类天然产物具有更好的生物活性; C8/C9 位的双取代基团会降低其活性; 最后含

有 C17 羟基的戊二酰亚胺类天然产物比 C16/C17 双键天然产物展示出了更强的生物活性^[28-30]。在 MGS 生物合成过程中 C17 位的脱水反应是由模块 10 中的 DH 结构域负责, 序列比对表明 Mgs-DH10 的 HxxxGxxxxP 保守 Motif 被 22 个氨基酸形成的特殊 loop 所分割开, 而 Ltm-DH10 与常规脱水酶结构域相类似并不含有这 22 个氨基酸, 说明 LTM-DH10 仅能催化常规近端脱水, 而无法进行远端脱水功能, 所以在发酵液中并未分离得到 C16/C17 脱水产物。

3 Cycloheximide 的生物合成研究

放线菌酮(Cycloheximide, CHX)于 1947 年从灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)中分离得到^[31], 是首个戊二酰亚胺类天然产物, 其结构直到

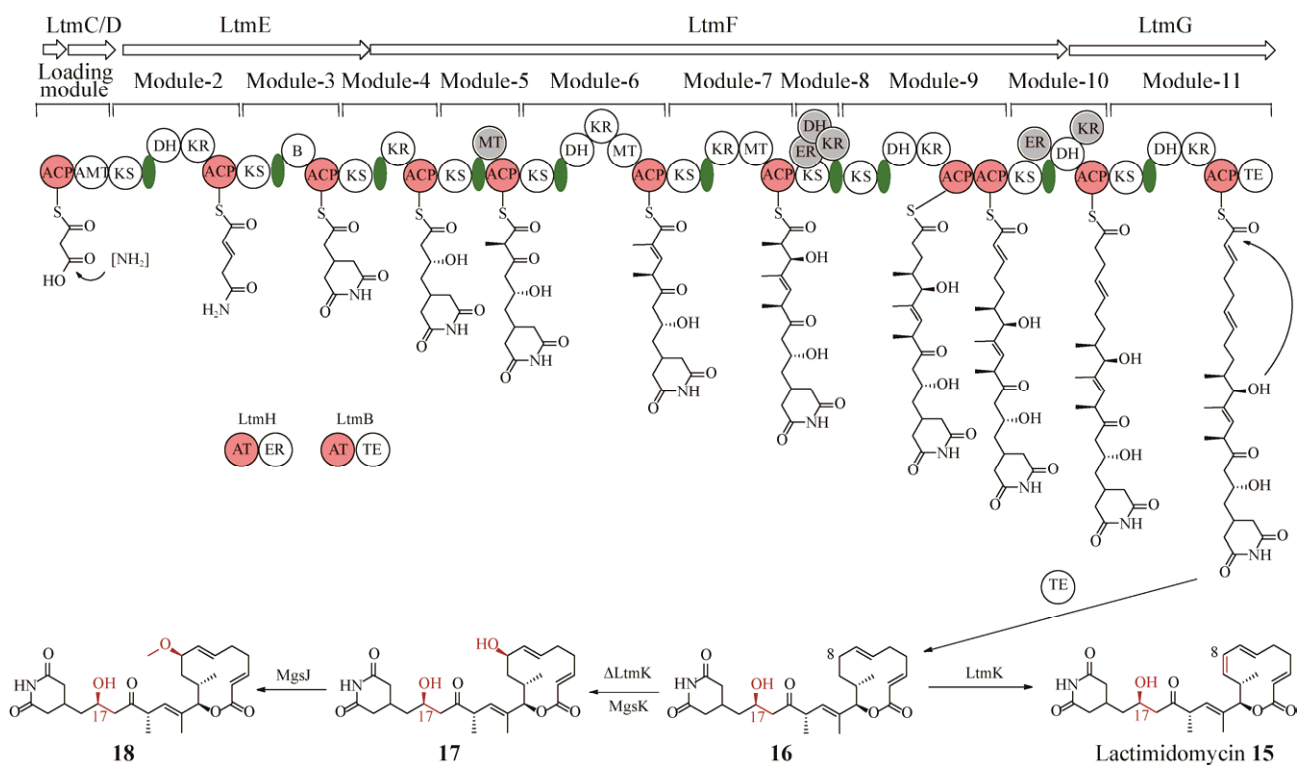


图 4 LTM 生物合成途径

Figure 4 Biosynthetic pathway of LTM

注: 灰色功能域代表生物合成途径中缺失结构域。AT: 酰基转移酶; KS: 酮基合成酶; KR: 酮基还原酶; DH: 脱水酶; ER: 烯醇还原酶; ACP: 酰基载体蛋白; MT: 甲基转移酶; TE: 硫酯酶

Note: Gray domains represent the missing domain in the biosynthetic pathway. AT: Acyltransferase; KS: Ketosynthase; KR: Ketoreductase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreductase; ACP: Acyl carrier protein; MT: Methyltransferase; TE: Thioesterase

1949 年才被 Kornfeld^[32]等确定。随后放线菌酮及其结构类似物放线菌酚(Actiphenol)在多株放线菌中被分离得到。生化和晶体学研究表明放线菌酮能够结合真核生物核糖体 80S 大亚基的 E 位点,从而阻止 tRNA 从 E 位点离开,最终阻止真核生物的蛋白翻译过程^[25,33]。虽然 LTM 具有类似作用机制,但由于其十二元环结构较大,无法与已被 tRNA 占据的核糖体 E 位点相结合,所以只能在翻译起始阶段结合处于空置状态的核糖体 E 位点。这就使得 LTM 只能作用在翻译起始的核糖体上,而 CHX 能作用在翻译中的所有核糖体。真核生物蛋白翻译通常以 AUG 作为起始密码子^[34],但也存在着除 AUG 外的其他翻译起始位点^[35],由于这些特殊的翻译起始位点无法通过常规序列分析的方式进行预测,所以必须依靠实验的手段对真核生物蛋白复制的起始位点进行鉴定。基于 CHX 和 LTM 对于核糖体的不同阻断机制,结合转录组测序技术后,研究人员开发了 GTI (Global Mapping of Translation Initiation Sites)测序技术,以高达单碱基分辨率来监控哺乳动物细胞各个阶段蛋白表达的实时情况,并获得蛋白翻译的直接信息^[26-27]。

2015 年沈奔教授课题组从放线菌(*Streptomyces* sp. YIM56141)分离、鉴定了 CHX 的生物合成基因簇,证明放线菌酮和放线菌酚分享同一生物合成路线^[36]。该基因簇中同样含有保守的戊二酰亚胺单元合成基因,整体来看其聚酮合酶的前 5 个模块同 *ltm* 和 *mgs* 几乎一致,而 *chx* 基因簇中仅有 1 个游离的 AT 蛋白,并不具有 ER 或 TE 的功能。基于戊二酰亚胺类天然产物的前期研究基础和 *chx* 基因簇信息,研究人员推测了 CHX 的生物合成途径,装配好的聚酮链被 ChxE 的硫酯酶结构域水解后,可产生羧酸中间体 **23**。如图 4 所示,含有酰基 CoA 连接酶(AL)、酰基载体蛋白(ACP)、还原酶(R) 3 个结构域的蛋白 ChxJ 中的 AL 结构域可活化 **23** 连接到 ACP 上,在还原酶的作用下,通过双电子还原将羧基还原成醛基形成中间体 **24**。经过 P450 氧化酶 ChxI 的作用后,C8 被氧化成羰基,进而发生分

子间羟醛缩合、烯醇互变以及脱水,最终形成放线菌酮(**20**)^[36]。当敲除基因簇中 *chxG* 和 *chxH* 这 2 个基因后,就只能检测到放线菌酚而无法检测到放线菌酮(**19**),研究人员推测黄素依赖的氧化还原酶 ChxG 可行使去芳构化的功能,将 **20** 还原成 **22**,但是该步骤的具体催化机制尚未明确。最后通过体内基因敲除和体外酶反应,证明 NADPH 依赖的酮基还原酶 ChxH 可催化最后一步还原反应,将 **22** 的 C8 位羰基再次还原成羟基,进而完成放线菌酮合成(**19**)^[36]。此外,通过基因簇中调控基因的交叉回补策略,研究人员将 MGS 和 CHX 生物合成途径中的调控基因 *mgsA* 和 *chxA* 导入到没有调控基因的 LTM 产生菌中,将 LTM 的产量提高了 5 倍,达到 100 mg/L^[37]。与放线菌酮相类似的结构还有 1989 年分离鉴定的 Epiderstatin (**28**)^[38-39],虽然其生物合成途径尚未被解析,我们通过其结构特征,推测其整体生物合成过程可能与 CHX 类似,但是最后一个模块 5 中含有额外的 ER 结构域,在类似 ChxI 的 P450 氧化酶的作用下,将 C8 位氧化成醛基,随后该聚酮链的末端羧酸部分未被还原,而直接经过氨基转移酶的作用形成中间体 **27**,最终通过大环内酰胺化形成最终化合物 **28**。

4 Streptimidone 的生物合成研究

Streptimidone 和 9-Methylstreptimidone (SMD) 属于含有末端双键的链状戊二酰亚胺类天然产物,具有抗病毒、抗真菌以及抗肿瘤活性^[40-41]。鞠建华教授课题组在对 Himastatin 进行生物合成研究时,发现其产生菌 *S. himastatinicus* ATCC 53653 也可以产生 9-Methylstreptimidone,最终鉴定 SMD 生物合成基因簇^[42]。如图 5 所示,负责 SMD 生物合成的聚酮合酶同样含有与 *chx* 相同的 5 个模块,但是在模块 5 中并不含有硫酯酶 TE 结构域。SMD 聚酮骨架含有 14 个碳,共需进行 6 轮聚酮链的延伸,所以研究人员推测,不同于 CHX 在模块 5 直接水解下来,在 SMD 的生物合成过程中,模块 5 会进行迭代使用,并被游离的 II 型硫酯酶 SmdE 水解形成

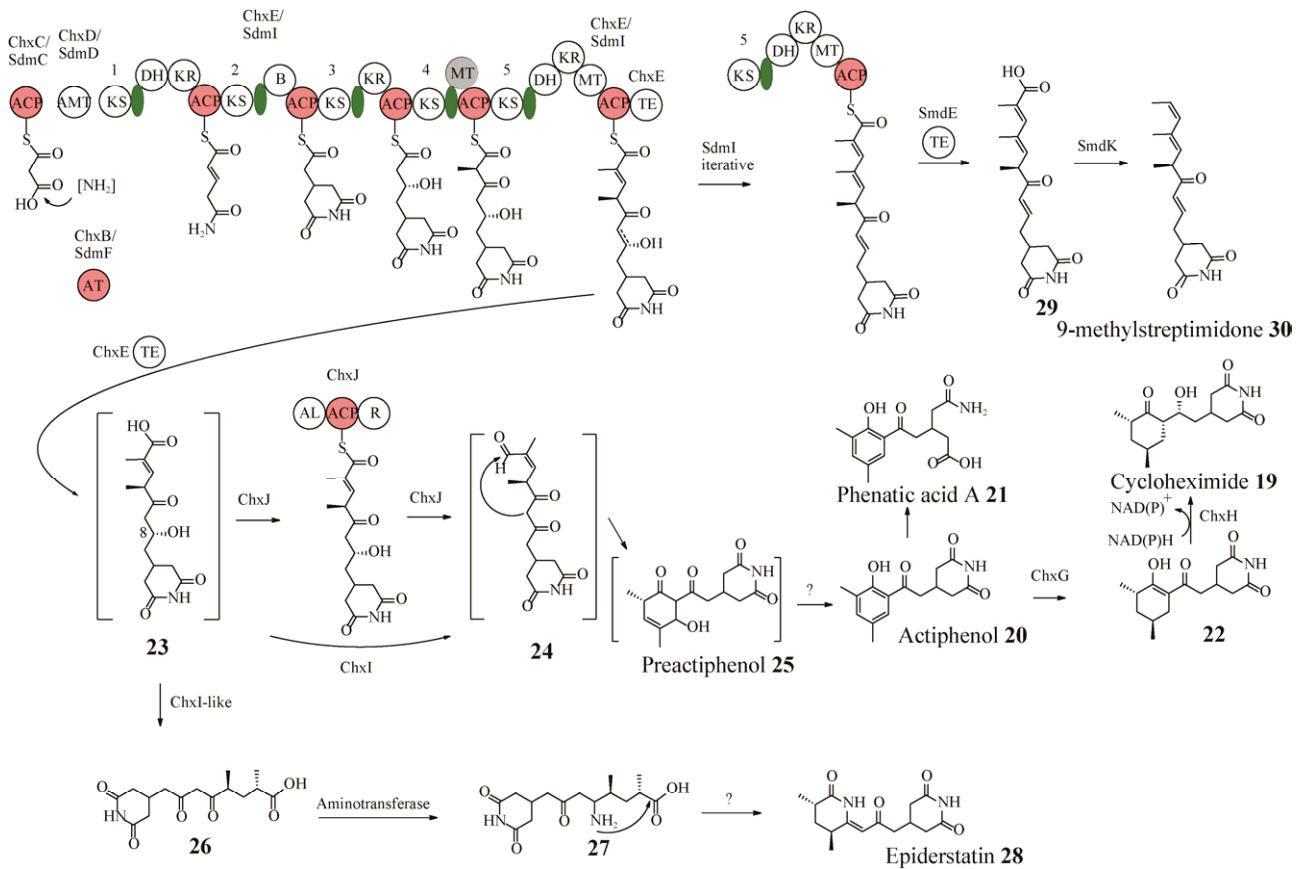


图5 CHX 和 SMD 生物合成途径

Figure 5 Biosynthetic pathways of CHX and SMD

注：灰色功能域代表生物合成途径中缺失结构域。AT：酰基转移酶；KS：酮基合成酶；KR：酮基还原酶；DH：脱水酶；ACP：酰基载体蛋白；MT：甲基转移酶；TE：硫酯酶

Note: Gray domains represent the missing domain in the biosynthetic pathway. AT: Acyltransferase; KS: Ketosynthase; KR: Ketoreductase; DH: Dehydratase; ACP: Acyl carrier protein; MT: Methyltransferase; TE: Thioesterase

羧酸产物 **29**^[42]。最后通过脱羧酶 SmdK 的作用将末端羧基脱掉，形成 9-Methylstreptimidone (**30**)。由于 Streptimidone 和 9-Methylstreptimidone 的区别仅限于 9 位甲基是否存在，所以在 Streptimidone 生物合成过程中，迭代作用的模块 5 中的甲基转移酶结构域很有可能没有发挥其功能，从而生成了 Streptimidone^[42]。

5 Gladiostatin/Gladiofungin 的生物合成研究

分析已鉴定的戊二酰亚胺类生物合成基因簇可发现，它们聚酮合酶的前 5 个模块几乎一致，主要差别在于模块 5 之后的模块和迥异的后修饰基因，这也为从海量基因组数据中挖掘戊二酰亚胺

类天然产物提供了基础。2020 年，Hertweck 和 Challis 课题组先后通过基因组挖掘的手段，从伯克霍尔德菌中鉴定出新型戊二酰亚胺类天然产物 Gladiostatin/Gladiofungin^[43-44]。以 Gladiostatin (GLA) 为例，研究人员在对甲虫内生菌 *Burkholderia gladioli* HKI0739 进行基因组分析时发现了一条 AT-Less 聚酮合酶编码基因，其内部含有戊二酰亚胺的合成基因，但整个基因簇中没有催化链解离的硫酯酶编码基因，而是被 A 因子合成酶(AfsA)基因所取代^[43]。由于 AfsA 可催化糖酵解产物，二羟丙酮磷酸(DHAP)与酰基脂肪链聚合生成 A 因子，所以研究人员推测该特殊 AfsA 结构域可能催化新

颖的链终止反应; 经过生物信息学分析, 研究人员预测了该基因簇潜在产物结构, 通过高分辨质谱和 MS/MS 分析确认了戊二酰亚胺单元的存在, 最终经过大规模发酵分离、鉴定出 2 个含有特殊丁烯内酯单元的新型戊二酰亚胺类天然产物 Gladiostatin A 和 B^[43]。由于 **31** 和 **32** 之间的差异在于 C14/15 位双键的有无, 所以该反应可能由基因簇中游离的烯醇还原酶 GlaG 负责, 在将该基因敲除后, **31** 不再产生而 **32** 得到了积累。结合对 AfsA 结构域的敲除实验, 研究人员推测了 GLA 的生物合成途径, 经过聚酮合酶和含有 ER 结构域的游离蛋白 GlaA 和 GlaG 的作用, 形成装载在末端 ACP 上的聚酮 **33**, AfsA 结构域催化 DHAP 进攻 **33** 的硫酯键, 使聚酮链从聚酮合酶上解离下来并经过分

子内羟醛缩合和脱水形成丁烯内酯单元, 但该 AfsA 结构域是否同 TE 类似, 共价结合聚酮链底物目前尚未经过实验验证。经过去磷酸化酶 GlaP 的作用以及未知的羟基易位过程, 最终形成 GLA 类天然产物(图 6)^[43]。

6 Sesbanimide 的生物合成研究

Sesbanimide (SBN)是从田菁属豆科植物的种子中分离得到的戊二酰亚胺类天然产物, 具有明显的抗肿瘤活性^[45-46]。长久以来被认为是植物来源的天然产物, 直到 1998 年, 研究人员从海洋农杆菌属细菌 *Agrobacterium* PH-103 和 PH-A034C 中分别分离得到 SBN A 和 C, 暗示 Sesbanimide 可能是一类微生物来源的戊二酰亚胺类天然产物^[47]。近期在对基因组数据分析时表明, 发现除上述链

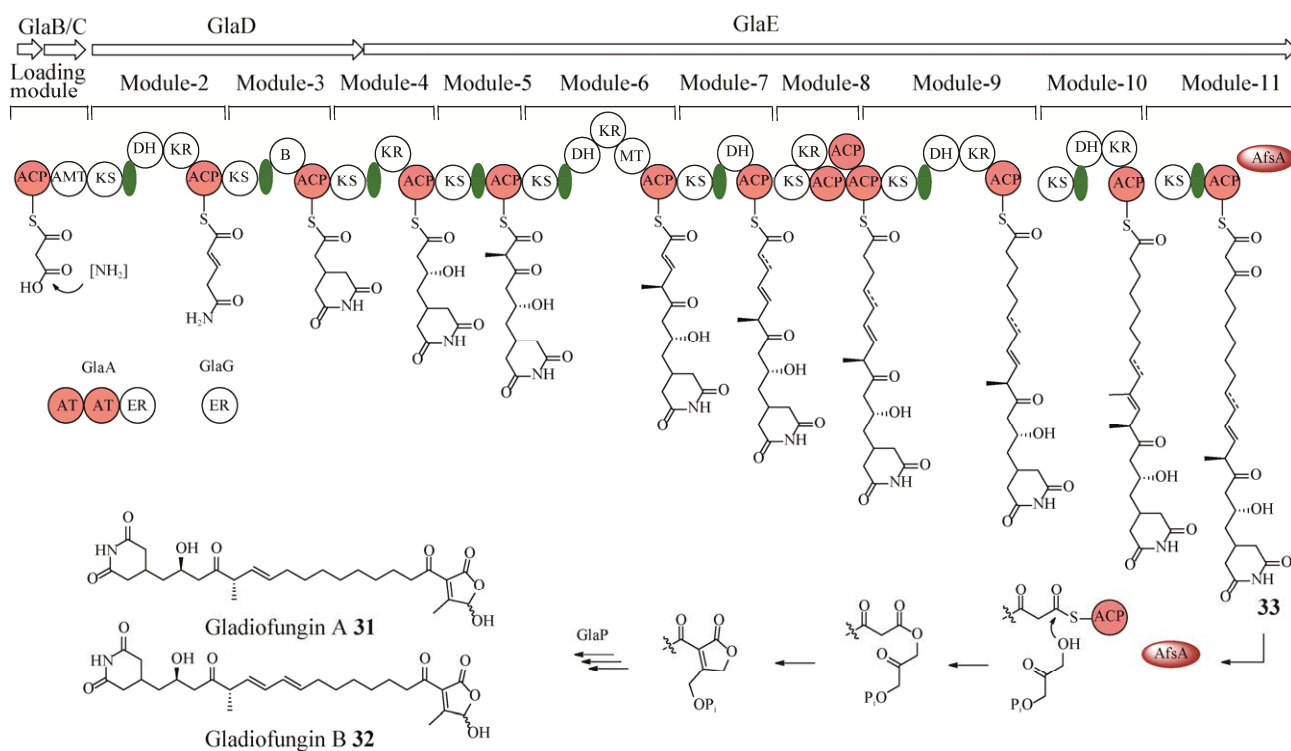


图 6 GLA 生物合成途径

Figure 6 Biosynthetic pathways of GLA

注: 灰色功能域代表生物合成途径中缺失结构域。AT: 酰基转移酶; KS: 酮基合成酶; KR: 酮基还原酶; DH: 脱水酶; ER: 烯醇还原酶; ACP: 酰基载体蛋白; MT: 甲基转移酶; TE: 硫酯酶; AfsA: A 因子合成结构域

Note: Gray domains represent the missing domain in the biosynthetic pathway. AT: Acyltransferase; KS: Ketosynthase; KR: Ketoreductase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreductase; ACP: Acyl carrier protein; MT: Methyltransferase; TE: Thioesterase; AfsA: A-factor-biosynthesis domain

霉菌和伯克霍尔德菌含有戊二酰亚胺合成基因外, 变形菌门细菌中同样存在着保守的戊二酰亚胺合成基因, 而且这类基因簇中聚酮合酶被黄素依赖的单加氧酶所分隔开, 同时最后一个模块是 NRPS 生物合成相关模块, 表明其可能产生含有氨基酸单元的新型戊二酰亚胺类天然产物。最终 García 课题组从变形菌门细菌 *Stappia indica* PHM037 和 *Labrenzia aggregata* PHM038 分别分离得到了 **34/37** 和 **36/38/39**^[48]。

基于生物信息学分析, 研究人员推测了 SBN 的生物合成途径(图 7)。首先与其他戊二酰亚胺类天然产物相类似, 同样是由戊二酰亚胺核心酶催

化产生了戊二酰亚胺结构单元, 随后在 SbnF-I 这 4 个酶的辅佐作用下, 聚酮合酶模块 6 催化了 β 侧链的形成^[48]。在模块 7 催化聚酮链再次延伸后, 黄素依赖的拜耳-维立格氧化酶 SbnP 催化聚酮链的插氧反应。经过后续聚酮链延伸过程, 在最后一个 NRPS 模块中, 催化了精氨酸与聚酮链的缩合形成 **41**, 硫酯酶水解后可能形成中间体 **42**, 经过后修饰 P450 氧化酶 SbnE 和甲基转移酶 SbnD 的先后作用形成化合物 **40**。随后在自发或酶促水解反应作用下, 逐步形成 **39** 和 **38**, 通过未知 P450 酶的作用, 羟基化并进一步形成醚桥, 产生化合物 **37**, 最终 **37** 和 **38** 经过半缩酮反应形成 **34** 和 **36**, 然而

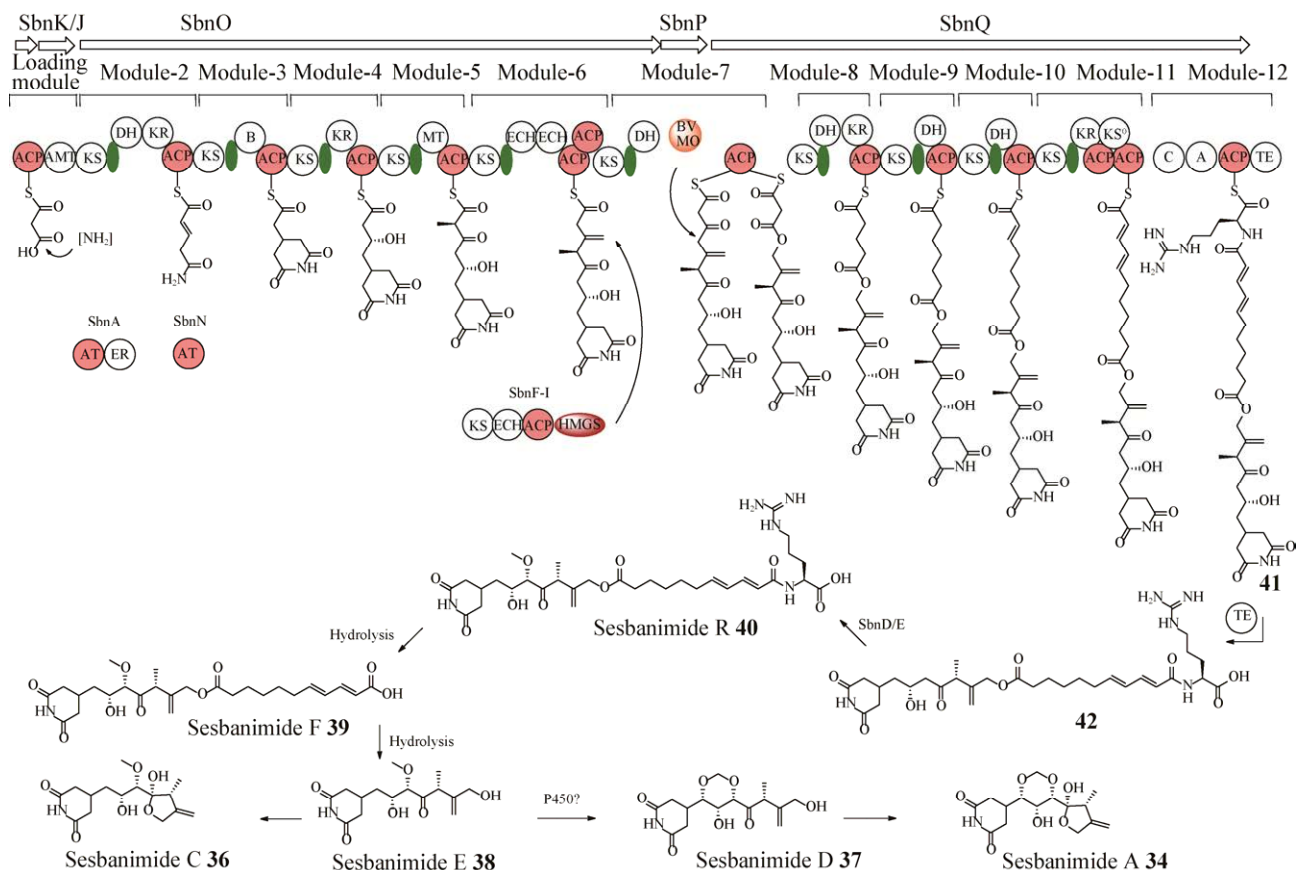


图 7 SBN 生物合成途径

Figure 7 Biosynthetic pathways of SBN

注: AT: 酰基转移酶; KS: 酮基合成酶; KR: 酮基还原酶; DH: 脱水酶; ER: 烯醇还原酶; ACP: 酰基载体蛋白; MT: 甲基转移酶; TE: 硫酯酶; BVMO: 拜耳-维立格单加氧酶; HMGS: 羟甲基戊二酰合酶; ECH: 烯酰辅酶 A 水合酶

Note: AT: Acyltransferase; KS: Ketosynthase; KR: Ketoreductase; DH: Dehydratase; ER: Enolreductase; ACP: Acyl carrier protein; MT: Methyltransferase; TE: Thioesterase; BVMO: Baeyer-Villiger monooxygenase; HMGS: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl synthase; ECH: Enoyl-CoA hydratase

作者并未分离得到化合物 **40** 来证明聚酮合酶的真正产物^[48]。同期, Müller 课题组在对变形菌门、趋磁细菌进行基因组分析时同样发现类似含有戊二酰亚胺合成基因的基因簇, 通过大规模发酵, 分离鉴定了化合物 **40**, 命名为 Sesbanimide R 并发现其对多种癌细胞系具有较强细胞毒性, IC_{50} 在 14–300 nm 之间^[49]。该类天然产物的分离及生物合成研究, 不仅丰富了戊二酰亚胺类天然产物的种类, 同时也修正了 Sesbanimide 的生物起源, 其很有可能是豆科植物种子的共生微生物所产生。

7 总结与展望

戊二酰亚胺类天然产物具有抑制细胞迁移、抑制细胞增殖、抑制真核蛋白转录、抗真菌、抗病毒等多种生物活性, 是微生物活性天然产物的重要组成部分之一。2009 年 MGS 生物合成基因簇的鉴定, 标志着戊二酰亚胺生物合成研究的开始, 仅十余年间, 科研人员对该类天然产物生物

合成研究取得了长足的进步, 研究对象也从最初的放线菌逐渐拓展到伯克霍尔德菌和变形菌门细菌。在确认戊二酰亚胺单元的核心生物合成基因后, 利用基因组挖掘策略先后鉴定出新型戊二酰亚胺类天然产物 Gladiostatins 和 Gladiofungin, 此外在鉴定出 Sesbanimide 的潜在真实产生菌株外, 还分离了一系列具有良好生物活性的 Sesbanimide 天然产物。然而, 随着公共基因组信息的倍数增加, 利用基因组挖掘策略, 有望发现更多具有新颖结构和良好活性的戊二酰亚胺类天然产物。譬如, 在 *Kitasatospora medicidica* KCTC 9733 菌株中就存在着一条含有戊二酰亚胺合成核心基因的基因簇, 但除前 6 个模块属于 AT-Less 聚酮合酶, 之后的 4 个模块都属于非核糖体肽合成酶(NRPS), 表明该 PKS/NRPS 杂合基因簇极有可能产生戊二酰亚胺结构单元的多肽天然产物(图 8)。综上所述, 作为重要的药效基团戊二酰亚胺单元的生物合成

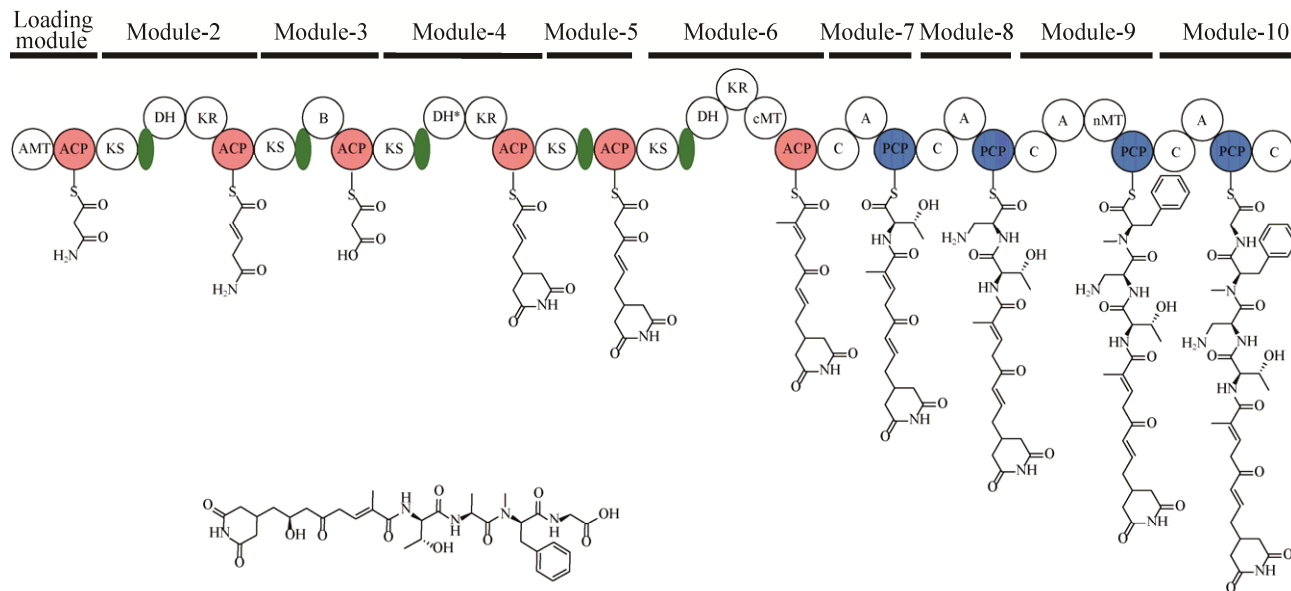


图 8 *Kitasatospora medicidica* KCTC 9733 中戊二酰亚胺类天然产物基因簇可能编码的分子

Figure 8 Putative biosynthetic pathways of glutarimide containing natural products in *Kitasatospora medicidica* KCTC 9733

注: 灰色功能域代表生物合成途径中缺失结构域。AT: 酰基转移酶; KS: 酮基合成酶; KR: 酮基还原酶; DH: 脱水酶; ER: 烯醇还原酶; ACP: 酰基载体蛋白; MT: 甲基转移酶; A: 腺苷化结构域; C: 缩合结构域; PCP: 肽载体蛋白

Note: Gray domains represent the missing domain in the biosynthetic pathway. AT: Acyltransferase; KS: Ketosynthase; KR: Ketoreductase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreductase; ACP: Acyl carrier protein; MT: Methyltransferase; A: Adenylation; C: Condensation; PCP: Peptide carrier protein

途径已被清楚解析,但目前戊二酰亚胺单元多作为起始单元来合成复杂天然产物,是否有作为中间合成砌块的天然产物存在,仍然值得深入探讨。此外,随着公共数据库中基因组信息的倍数增加,基因组挖掘策略有望从不同类型微生物中鉴定出新颖戊二酰亚胺类天然产物。

REFERENCES

- [1] Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules[J]. *Nature*, 2004, 432(7019): 829-837
- [2] Blake Bartlett J, Dredge K, Dalgleish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4(4): 314-322
- [3] Popa D, Loghin F, Imre S, Curea E. The study of codeine-gluthetamide pharmacokinetic interaction in rats[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 32(4/5): 867-877
- [4] Ji XY, Zhong ZJ, Xue ST, Meng S, He WY, Gao RM, Li YH, Li ZR. Synthesis and antiviral activities of synthetic glutarimide derivatives[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 58(11): 1436-1441
- [5] Porey A, Santra S, Guin J. Highly enantioselective synthesis of functionalized glutarimide using oxidative N-heterocyclic carbene catalysis: a formal synthesis of (-)-paroxetine[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2019, 84(9): 5313-5327
- [6] Michalska D, Morzyk B, Bienko DC, Wojciechowski W. Glutarimide: a carrier transporting drug through cell membranes[J]. *Medical Hypotheses*, 2000, 54(3): 472-474
- [7] Karwowski JP, Jackson M, Sunga G, Sheldon P, Poddig JB, Kohl WL, Kadam S. Dorrigocins: novel antifungal antibiotics that change the morphology of ras-transformed NIH/3T3 cells to that of normal cells. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and biological activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(8): 862-869
- [8] Woo EJ, Starks CM, Carney JR, Arslanian R, Cadapan L, Zavala S, Licari P. ChemInform abstract: Migrastatin and a new compound, isomigrastatin, from *Streptomyces platensis*[J]. *ChemInform*, 2010, 33(33): no
- [9] Gaul C, Njardarson JT, Shan DD, Dorn DC, Wu KD, Tong WP, Huang XY, Moore MAS, Danishefsky SJ. The migrastatin family: discovery of potent cell migration inhibitors by chemical synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(36): 11326-11337
- [10] Ju JH, Lim SK, Jiang H, Shen B. Migrastatin and dorrigocins are shunt metabolites of *Iso-migrastatin*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(6): 1622-1623
- [11] Lim SK, Ju JH, Zazopoulos E, Jiang H, Seo JW, Chen YH, Feng ZY, Rajski SR, Farnet CM, Shen B. *Iso-Migrastatin*, migrastatin, and dorrigocin production in *Streptomyces platensis* NRRL 18993 is governed by a single biosynthetic machinery featuring an acyltransferase-less type I polyketide synthase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(43): 29746-29756
- [12] Keatinge-Clay AT. The structures of type I polyketide synthases[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1050-1073
- [13] Rawlings BJ. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A: Erythromycin biosynthesis)[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(2): 190-227
- [14] Scotti C, Piatti M, Cuzzoni A, Perani P, Tognoni A, Grandi G, Galizzi A, Albertini AM. A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases[J]. *Gene*, 1993, 130(1): 65-71
- [15] Paitan Y, Alon G, Orr E, Ron EZ, Rosenberg E. The first gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Mycococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 286(2): 465-474
- [16] Huang GZ, Zhang LH, Birch RG. A multifunctional polyketide-peptide synthetase essential for albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2001, 147(Pt 3): 631-642
- [17] Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(22): 14002-14007
- [18] Cheng YQ, Tang GL, Shen B. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(6): 3149-3154
- [19] Bretschneider T, Heim JB, Heine D, Winkler R, Busch B, Kusebauch B, Stehle T, Zocher G, Hertweck C. Vinylogous chain branching catalysed by a dedicated polyketide synthase module[J]. *Nature*, 2013, 502(7469): 124-128
- [20] Heine D, Bretschneider T, Sundaram S, Hertweck C. Enzymatic polyketide chain branching to give substituted lactone, lactam, and glutarimide heterocycles[J]. *Angewandte Chemie: International ed. in English*, 2014, 53(43): 11645-11649
- [21] Ma M, Kwong T, Lim SK, Ju JH, Lohman JR, Shen B. Post-polyketide synthase steps in *Iso-migrastatin* biosynthesis, featuring tailoring enzymes with broad substrate specificity[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(7): 2489-2492
- [22] Zhang B, Xu ZR, Teng QH, Pan GH, Ma M, Shen B. A long-range acting dehydratase domain as the missing link for C17-dehydration in *Iso-migrastatin* biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie: International ed. in English*, 2017, 56(25): 7247-7251
- [23] Ju JH, Lim SK, Jiang H, Seo JW, Shen B. *Iso-migrastatin* congeners from *Streptomyces platensis* and generation of a glutarimide polyketide library featuring the dorrigocin, lactimidomycin, migrastatin, and NK30424 scaffolds[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(34): 11930-11931
- [24] Sugawara K, Nishiyama Y, Toda S, Komiyama N, Hatori M, Moriyama T, Sawada Y, Kamei H, Konishi M, Oki T.

- Lactimidomycin, a new glutarimide group antibiotic. Production, isolation, structure and biological activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1992, 45(9): 1433-1441
- [25] Schneider-Poetsch T, Ju JH, Eyler DE, Dang YJ, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(3): 209-217
- [26] Lee S, Liu B, Lee S, Huang SX, Shen B, Qian SB. Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(37): E2424-E2432 DOI:10.1073/pnas.1207846109
- [27] Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VTK, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H, et al. Decoding human *Cytomegalovirus*[J]. *Science*, 2012, 338(6110): 1088-1093
- [28] Seo JW, Ma M, Kwong T, Ju JH, Lim SK, Jiang H, Lohman JR, Yang CY, Cleveland J, Zazopoulos E, et al. Comparative characterization of the lactimidomycin and *Iso*-migrastatin biosynthetic machineries revealing unusual features for acyltransferase-less type I polyketide synthases and providing an opportunity to engineer new analogues[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(49): 7854-7865
- [29] Ju JH, Rajsiki SR, Lim SK, Seo JW, Peters NR, Hoffmann FM, Shen B. Lactimidomycin, *Iso*-migrastatin and related glutarimide-containing 12-membered macrolides are extremely potent inhibitors of cell migration[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(4): 1370-1371
- [30] Ju JH, Rajsiki SR, Lim SK, Seo JW, Peters NR, Hoffmann FM, Shen B. Evaluation of new migrastatin and dorrigincon congeners unveils cell migration inhibitors with dramatically improved potency[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(22): 5951-5954
- [31] Leach BE, Ford JH, Whiffen AJ. Actidione, an antibiotic from *Streptomyces griseus*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1947, 69(2): 474
- [32] Kornfeld EC, Jones RG, Parke TV. The structure and chemistry of actidione, an antibiotic from *Streptomyces griseus*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1949, 71(1): 150-159
- [33] Klinge S, Voigts-Hoffmann F, Leibundgut M, Arpagaus S, Ban N. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6[J]. *Science*, 2011, 334(6058): 941-948
- [34] Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation[J]. *Gene*, 2002, 299(1/2): 1-34
- [35] Morris DR, Geballe AP. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(23): 8635-8642
- [36] Yin M, Yan YJ, Lohman JR, Huang SX, Ma M, Zhao GR, Xu LH, Xiang WS, Shen B. Cycloheximide and actiphenol production in *Streptomyces* sp. YIM56141 governed by single biosynthetic machinery featuring an acyltransferase-less type I polyketide synthase[J]. *Organic Letters*, 2014, 16(11): 3072-3075
- [37] Zhang B, Yang D, Yan YJ, Pan GH, Xiang WS, Shen B. Overproduction of lactimidomycin by cross-overexpression of genes encoding *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(5): 2267-2277
- [38] Sonoda T, Osada H, Uramoto M, Uzawa J, Isono K. Epiderstatin, a new inhibitor of the mitogenic activity induced by epidermal growth factor. II. Structure elucidation[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1989, 42(11): 1607-1609
- [39] Osada H, Sonoda T, Kusakabe H, Isono K. Epiderstatin, a new inhibitor of the mitogenic activity induced by epidermal growth factor. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1989, 42(11): 1599-1606
- [40] Frohardt RP, Dion HW, Jakubowski ZL, Ryder A, French JC, Bartz QR. Chemistry of streptimidone, A new antibiotic[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1959, 81(20): 5500-5506
- [41] Saito N, Kitame F, Kikuchi M, Ishida N. Studies on a new antiviral antibiotic, 9-methylstreptimidone. I[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1974, 27(3): 206-214
- [42] Wang B, Song YX, Luo MH, Chen Q, Ma JY, Huang HB, Ju JH. Biosynthesis of 9-methylstreptimidone involves a new decarboxylative step for polyketide terminal diene formation[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(6): 1278-1281
- [43] Niehs SP, Kumpfmüller J, Dose B, Little RF, Ishida K, Flórez LV, Kaltenpoth M, Hertweck C. Insect-associated bacteria assemble the antifungal butenolide gladiofungin by non-canonical polyketide chain termination[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2020, 59(51): 23122-23126
- [44] Nakou IT, Jenner M, Dashti Y, Romero-Canelón I, Masschelein J, Mahenthalingam E, Challis GL. Genomics-driven discovery of a novel glutarimide antibiotic from *Burkholderia gladioli* reveals an unusual polyketide synthase chain release mechanism[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(51): 23145-23153
- [45] Powell RG, Smith CR Jr, Weisleder D Jr. Sesbanimide A and related tumor inhibitors from *Sesbania drummondii*: structure and chemistry[J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(12): 2789-2796
- [46] Powell RG, Smith CR, Weisleder D, Matsumoto G, Clardy J, Kozłowski J. Sesbanimide, a potent antitumor substance from *Sesbania drummondii* seed[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105(11): 3739-3741
- [47] Acebal C, Alcazar R, Cañedo LM, De La Calle F, Rodriguez P, Romero F, Fernandez Puentes JL. Two marine *Agrobacterium* producers of sesbanimide antibiotics[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1998, 51(1): 64-67
- [48] Kačar D, Cañedo LM, Rodríguez P, Gonzalez E, García JL. Identification of trans-AT polyketide clusters in two marine bacteria reveals cryptic similarities between distinct symbiosis factors[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(5): 64-67
- [49] Awal RP, Haack PA, Bader CD, Riese CN, Müller R. Sesbanimide R, a novel cytotoxic polyketide produced by magnetotactic bacteria[J]. 2021, 12(3): e00591-21