



微生物肽类次级代谢产物研究进展

席雪冬 张晓东 于志国*

沈阳农业大学植物保护学院微生物次级代谢产物实验室 辽宁 沈阳 110866

摘要: 微生物肽类次级代谢产物是一类重要的天然产物,因含有稀有氨基酸而具有丰富的化学结构和生物活性。随着微生物天然产物分离纯化技术的发展,新型肽类产品层出不穷,在微生物次级代谢产物的研究领域扮演了重要的角色。本文综述近年来发现的来自细菌和真菌的微生物肽类代谢产物,以及采用基因挖掘等手段人工合成的新型肽类产品,并结合近年来本团队昆虫病原线虫共生菌肽类产物的研究积累,分析微生物肽类产品研究存在的问题及可能的解决方案,以期为微生物导向的新型活性肽类产物的深入发掘和应用研究提供参考。

关键词: 非核糖体肽, 化学结构, 生物合成, 基因挖掘

Research progress on peptides produced by microorganisms

XI Xuedong ZHANG Xiaodong YU Zhiguo*

Laboratory of Microbial Secondary Metabolites, Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

Abstract: Microbial peptide secondary metabolites, which usually contain rare amino acids, are a series of natural products with rich chemical structures and biological activities. With the development of separation and purification technologies, a great number of new peptide products have been discovered, which play an important role in the exploration of microbial natural products. This paper reviews the microbial peptide metabolites from bacteria and fungi, as well as the new peptide products obtained by gene mining and other bioengineering methods in recent years. Combined with our team's research experiences of peptide products from entomopathogenic nematode symbiotic bacteria, this paper analyzes the existing problems and possible solutions in the research of microbial peptide products. We hope it could provide a reference for the further exploration and application of new active peptide products.

Keywords: non-ribosomal peptide, chemical structure, biosynthesis, genome mining

微生物来源的肽类天然产物丰富又广泛,往往因具有稀有的氨基酸单元而产生一些独特的活性。近年来,肽越来越受到制药业的关注。肽类产品可能缩小小分子和蛋白质药物之间的差距,结合 2 个分子世界的优势。已经成功应用的代表性肽类包括

临床用的抗生素杆菌肽(Bacitracin),棘白菌素类(Echinocandins),达托霉素(Daptomycin),多粘菌素(Polymyxin)和万古霉素(Vancomycin),抗癌药物博来霉素(Bleomycin)和免疫抑制剂(Cyclosporine)等^[1]。肽类产品主要的微生物来源包括细菌、真菌

*Corresponding author: Tel: 86-24-88487148; E-mail: zyu@syau.edu.cn

Received: 11-02-2021; Accepted: 25-04-2021; Published online: 07-05-2021

*通信作者: Tel: 024-88487148; E-mail: zyu@syau.edu.cn

收稿日期: 2021-02-11; 接受日期: 2021-04-25; 网络首发日期: 2021-05-07

以及近年来兴起的以基因组挖掘技术为背景的基因工程菌等。天然产物肽类因其多样性的结构和微生物次级代谢产物的特性,从而具有复杂的生物合成机制。生物合成过程涉及原料的前体供应、多酶协同催化、合成过程中环境因素以及操纵基因的全局和单基因调控^[2]。

肽类天然产物包括核糖体合成和翻译后修饰肽(Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides, RiPPs)以及多模块合成的非核糖体肽(Non-Ribosomal Peptide, NRP)^[3]。具有复杂结构的非核糖体肽是自然界中分布最广、结构最多样的抗生素之一,由大结构域、模块化和多功能的非核糖体肽合成酶(Non-Ribosomal Peptide Synthetase, NRPS)合成。NRPS 由自上而下的簇—模块—结构域组合而成,具有典型的流水线催化活性。近年来的肽类产物研究的进展集中于模块化生物合成领域,并且 NRPS 常与聚酮合酶系统(Polyketide Synthase, PKS)协同合成更高级结构的肽类产物^[4]。不同 NRPS 组件的拼接组合往往能合成新型的肽类产物,而且随着新型 NRPS 组件的发掘和研究,有希望创造更多新型组合结构的肽类产物。除了蛋白源性氨基酸外, NRPS 还可以结合非蛋白源性氨基酸,如 D-氨基酸(D-aa),从而显著扩展化学空间导致的新型生物活性^[5-6]。多样性的肽类组合产物能够产生丰富的活性也被认为具有作为抗生素基础分子的巨大潜力^[7]。本文综述了近年来化学分离和生物合成的微生物肽类产物的研究进展,以期为该微生物产物的研究提供借鉴。

1 天然合成的新型肽类产物

1.1 来源于细菌的肽类产物

作为能合成极丰富的天然产物的类群,放线菌是主要的肽类天然产物合成来源(图 1)。大量的天然产物和成型的药物分离自源于土壤的放线菌,一方面表明放线菌次级代谢的多样性,另一方面也使得近年来从放线菌分离得到重复产物的概率大大提升。为了开发特异的新型肽类产物,近年来研

究微生物与昆虫、真菌和植物等的互作关系为天然产物的研究提供了有吸引力的菌种来源。另外,稀有放线菌的发现和新型化学结构鉴定技术的开发也为全新天然产物发掘提供了有效的研究思路。Pan 等从稀有放线菌 *Amycolatopsis* sp. 26-4 中发现了一系列含硫的环脂肽 Thioamycolamides A-E (1-5), 这些肽还包括噻唑啉、硫醚环和脂肪酸等特异的单元^[8]。Um 等从粪甲虫三开蛻螂 *Copris tripartitus* 肠道分离了一株链霉菌 SNU533, 以该菌发酵获得 Coprisamide (6), 是一种含有不寻常单元 β -甲基天冬氨酸和 2,3-二氨基丙酸的七肽^[9]。Shin 等从腐肉甲虫肠道中分离的一株稀有放线菌 *Microbacterium* sp. 能够合成 Nicrophorusamides A (7)和 B (8), 这 2 个氯代环六肽含有不常见的氨基酸单元 5-氯-L-色氨酸和 D-苏氨酸- β -羟天冬酰胺/D-天冬酰胺^[10]。Son 等从 *Streptomyces* sp. KCB14A132 中分离了 2 个新环脂肽 Enamidonins B (10)和 C (11), 具有稀有的烯酰胺组合键。仔细检查抽提中产物, 研究者发现丙酮抽提步骤导致 2 个化合物形成了 Enamidonin 家族化合物的 N,N-丙酮单位。活性研究表明二甲基咪唑啉酮单位的形成赋予了化合物 Enamidonin 的抗菌活性^[11]。为研究蚂蚁-真菌-细菌的三元共生关系, Wyche 等从真菌褐赤刺革菌 *Hymenochaete rubiginosa* 共生的链霉菌中分离得到一个多环刚性球状的肽 Tryptorubin A (12), 并通过基因组测序获得该肽的主要骨架合成基因^[12]。Bekiesch 等从雪山药用植物雪绒花根际细菌 *Streptomyces* sp. S4.7 分离了具有半胱苷酸特征的脂肽 Viennamycins 并鉴定了其生物合成基因簇^[13]。Son 等分析了 *Streptomyces* sp. KCB13F003 的基因组, 发现一个隐形 NRPS 簇。利用更换多种培养基的方法, 研究者分离得到了 2 种新的氯化环六肽 Ulleungmycins A (13)和 B (14), 这 2 个肽具有 5-氯-L-色氨酸和 D-高亮氨酸的特色单元^[14]。Jang 等从 *Streptomyces* sp. RK85-270 分离得到 2 个环八肽, 这 2 个肽具有抑制恶性疟原虫的活性, 无细胞毒性^[15]。

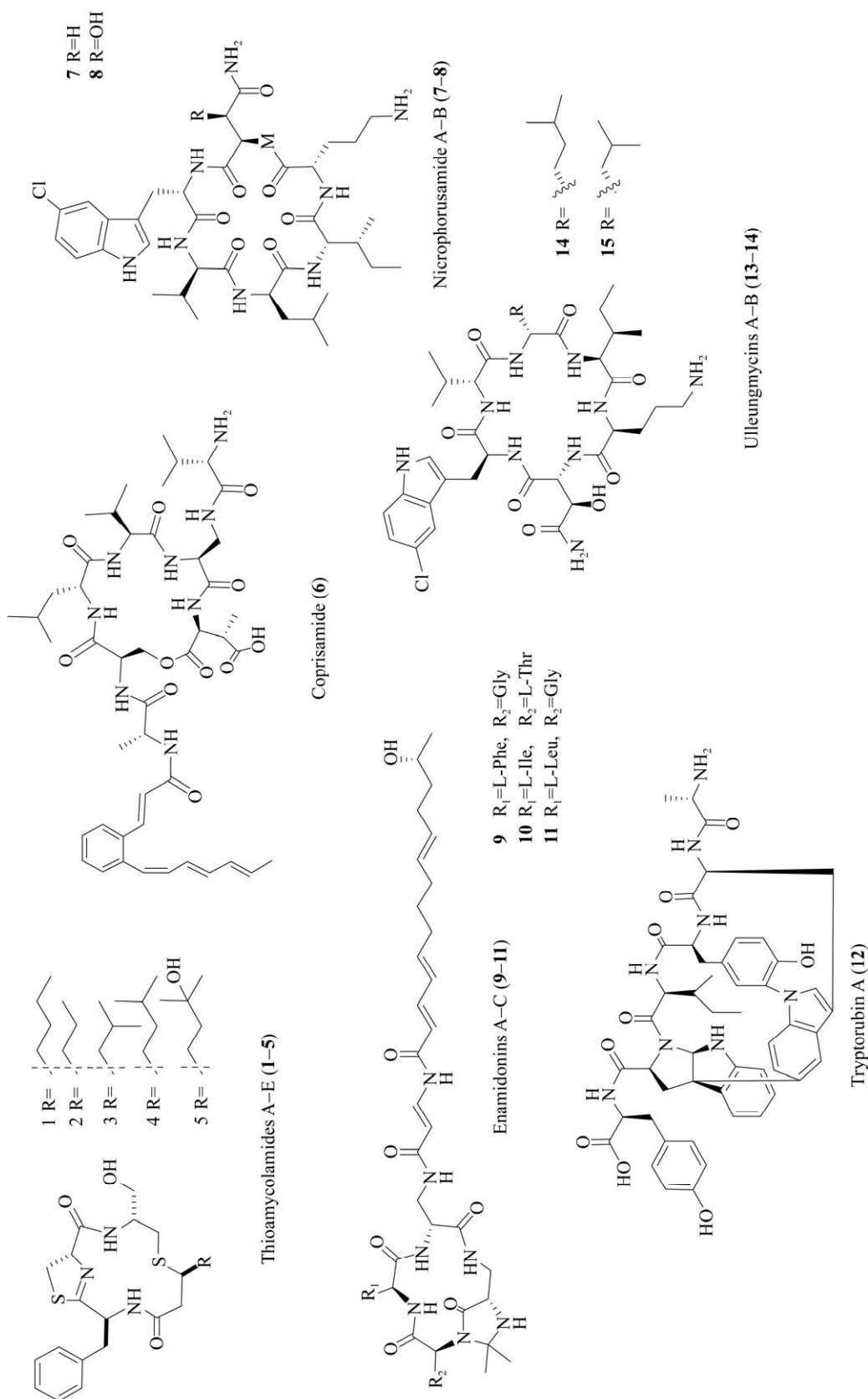


图 1 来源于放线菌的部分肽类产物结构
Figure 1 Structures of some peptides from actinomycetes

此外,也有很多肽类分离自其他类型的细菌(图 2)。Patteson 等以群体感应分子诱导致病菌铜绿假单胞菌,分离出了一种含氮杂环丁烷的天然肽产物 Azabicyclene (**15**),该研究利用群体感应策略实现了新型天然产物的诱导合成^[16]。与含有分枝菌酸的细菌 *Tsukamurella pulmonis* TPB0596 共培养,短链游动菌属菌 *Catenuloplanes* sp. RD067331 合成了 2 种杂环肽 Catenulobactins A (**16**)和 B (**17**),其 B 结构对小鼠白血病细胞具有中度细胞毒性^[17]。Kim 等从 *Bacillus safensis* KCTC 12796BP 中分离了 4 个双环肽 Seongsanamides A–D (**18–21**),4 个肽均含有异二酪氨酸残基^[18]。Tareq 等从采集自海洋的枯草芽孢杆菌中分离到了 2 个新型的环脂肽 Bacilotetrins A (**22**)和 B (**23**)^[19]。为了解决金黄色葡萄球菌日益增长的耐药性,Liu 等从枯草芽孢杆菌中分离得到一个新的脂七肽 Bacaucin (**24**),该肽对革兰氏阳性菌显示出广泛的抗菌活性,但也具有溶血副作用和细胞毒性。研究人员进一步衍生化 Bacaucin 开发了开环七肽 Bacaucin-1 (**25**)。Bacaucin-1 消除了细胞毒性,并仍对革兰氏阳性菌具有良好的抑菌活性^[20]。Dashti 等从囊性纤维化患者的肺部分离了椰毒致病型伯克霍尔德菌 *Burkholderia gladioli* BCC0238,该菌可以合成 2 个新型脂肽 Bolagladin A (**26**)和 B (**27**),2 个肽具有特别的柠檬酸衍生脂肪酸和稀有的脱氢- β -丙氨酸残基^[21]。同时 Dose 等利用基因挖掘技术从 *Burkholderia gladioli* pv. *Cocovenenans* 基因组中发现了一条独立的 NRPS 簇。利用基因敲除主要结构基因 *BolH*,并对比野生菌和敲除突变株,证实了 Bolagladin A 和 B 的生物合成途径^[22]。Marnier 等利用分子网络技术从假单胞菌里分离到一系列环脂肽 Stechlisins,Stechlisins 属于两性毒素的家族成员^[23]。

蓝细菌是近年来海洋中肽类产物的重要发现源,是脂肽类天然产物的重要合成微生物之一(图 3)。根据对 2019 年天然产物的最新统计,从蓝

细菌中发现的 55 种化合物有 36%均为线肽或环肽^[24]。作为合成脂肽的明星微生物品种,*Okeania* 属的海洋蓝细菌能够合成一系列结构新颖的肽类化合物。Sumimoto 等从 *Okeania hirsuta* 中分离到脂肽 Minnamide A (**28**),对 HeLa 细胞生长具有抑制活性, IC_{50} 值为 0.17 $\mu\text{mol/L}$,在浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时迅速诱导细胞死亡。Minnamide A 还能诱导铜介导的活性氧的积累^[25]。Iwasaki 等从海洋蓝细菌 *Okeania* sp.中分离到了结构新颖的 O-酰基转移酶甾醇(SOAT)抑制剂 Biseokeaniamides A–C (**29–31**)^[26]和对 HL60 细胞中等毒性的环缩肽 Kohamamides A–C (**32–34**)^[27]。Sueyoshi 等从 *Okeania* sp.中分离得到含吡咯烷酮的 Ypaoamides B–C (**35–36**),其中 Ypaoamides B (**35**)可以激活 AMP 活化蛋白激酶^[28]。Ozaki 等从 *Okeania* sp.中分离得到了脂肽 Mabuniamide (**37**),Mabuniamide 具有抗疟活性^[29]。Iwasaki 等同样从 *Okeania* sp.中分离得到了另一个具有强烈抗疟活性的脂肽 Ikoamide (**39**)^[30]。

Kurisawa 等从海洋蓝细菌 *Dapis* sp.中分离了 3 个新型线肽 Iheyamides A–C,其中 A (**38**)化合物对布氏锥虫具有显著的抑制活性^[31]。Levert 等从法属波利尼西亚收集的海洋蓝细菌 *Lyngbya majuscula* 中分离得到 3 种新型环状缩肽 Tiahuramides A–C (**40–42**),3 种肽可以抑制海胆受精卵的第一次分裂,而且流式细胞仪检测表明 B、C 对人类 SH-SY5Y 成神经瘤细胞具有致死的细胞毒性^[32]。Iwasaki 等从蓝细菌 *Caldora penicillata* 中分离到了抗疟疾原虫和非洲昏睡病病原布氏锥虫的活性肽 Hoshinoamide A–C (**43–45**)^[33–34]。Almaliti 等从海洋蓝细菌 *Moorea producens* 中分离到 4 个环缩肽 Dudawalamides A–D (**46–47**、**51–52**)。4 个环肽具有罕见的 2,2-二甲基-3-羟基-7-辛酸(Dhoya)单元,并且具有广谱的抗寄生虫活性^[35]。Kanamori 等从分类学上特异的蓝细菌 *Cyanobacterium* 中分离了 2 个肽 Izenamides A (**48**)和 B (**49**),这 2 个肽

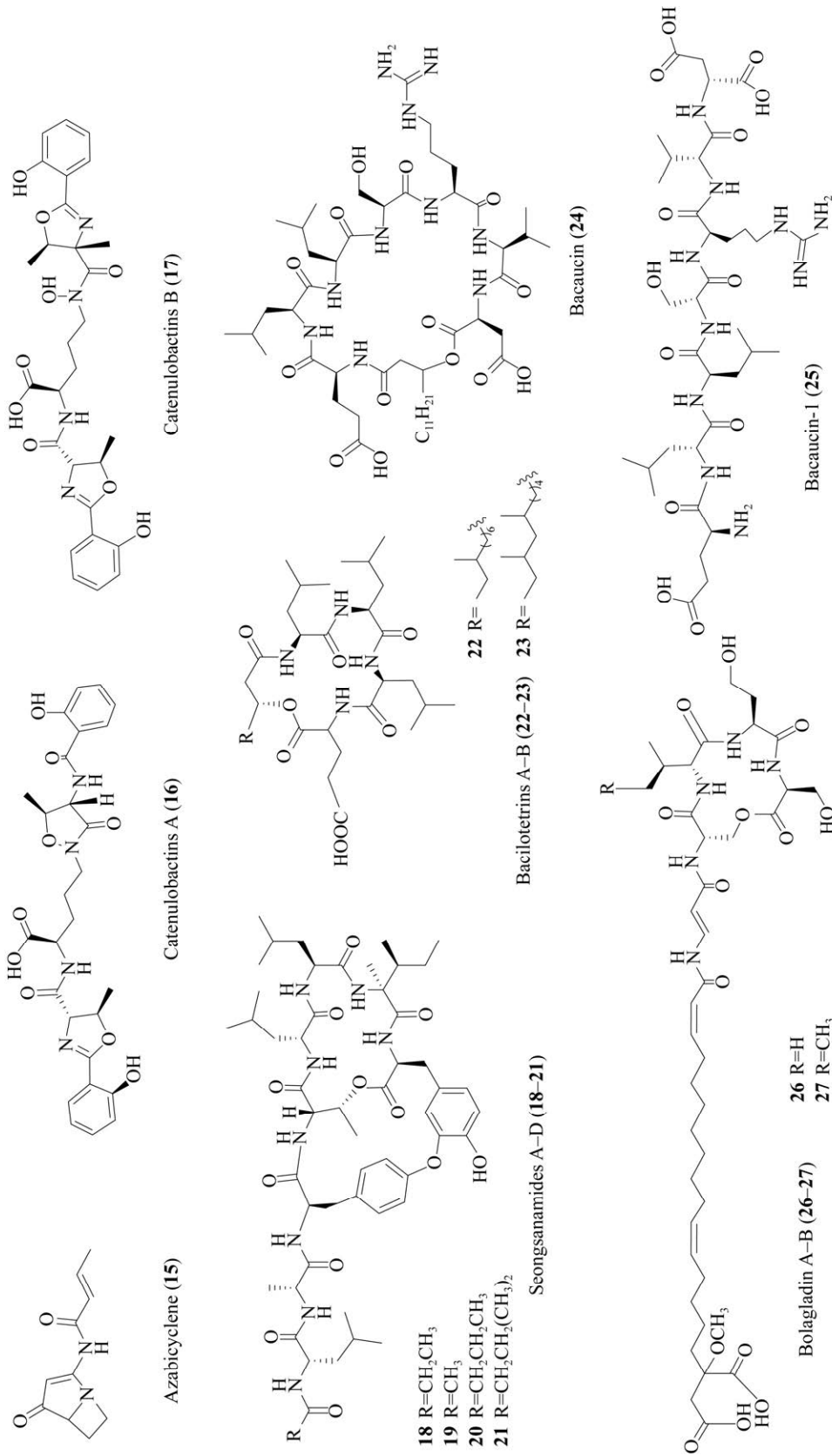


图 2 来源于其他细菌的肽
 Figure 2 Peptides from other bacteria

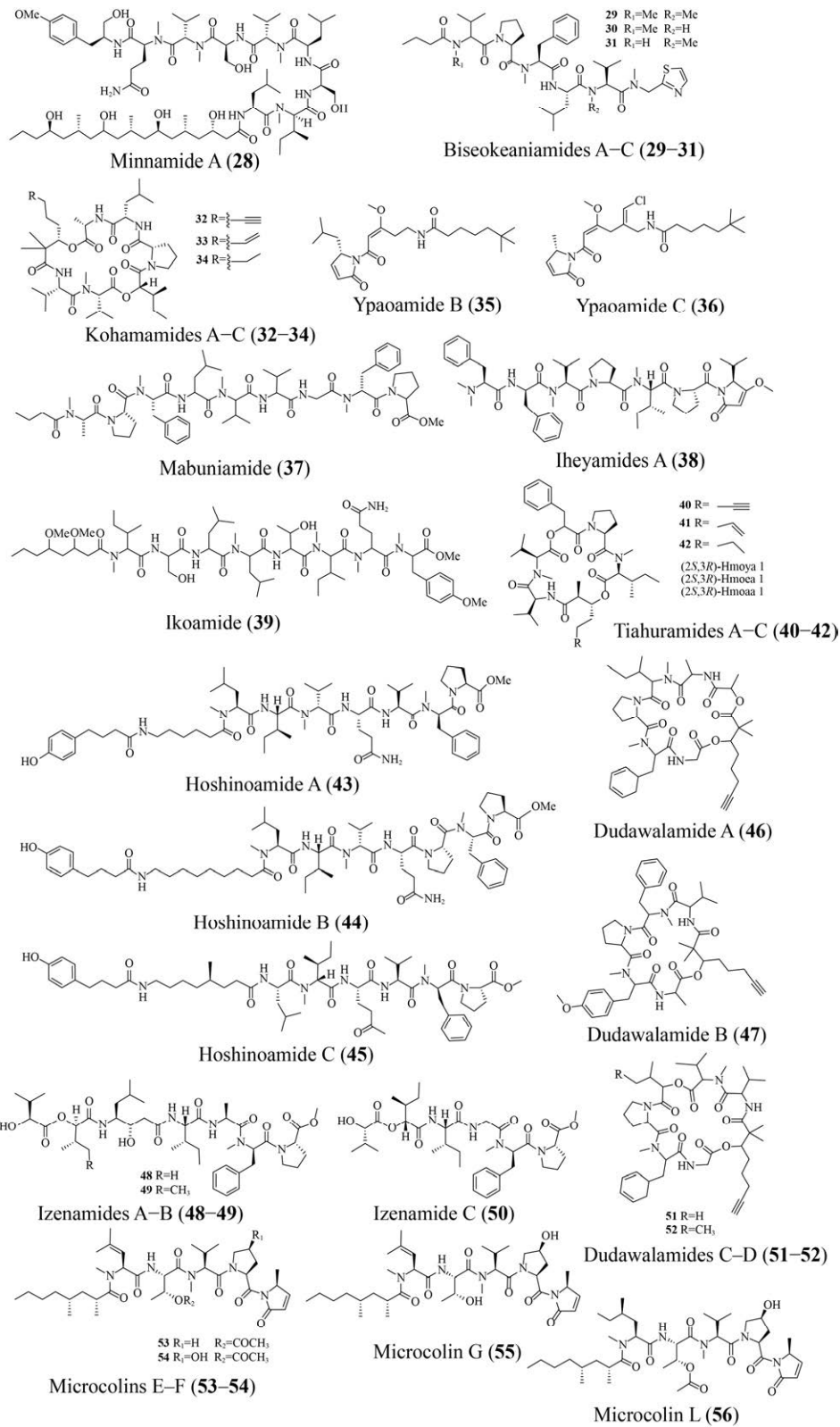


图 3 来源于蓝细菌的肽

Figure 3 Peptides from cyanobacteria

含有结构他汀部分[(3S,4S)-4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸],并能抑制组织蛋白酶D(一种天冬氨酸肽酶)的活性^[36]。Yu等利用分子网络和生物活性为导向的方法也从 *Moorea producens* 中分离到9个新型的线性脂肽 Microcolins E-M, 其中化合物 E-G (53-55)及 L (56)具有4-甲基-2-(甲胺基)戊-3-烯酸(Mpe)和2-氨基-4-甲基己酸(N-Me-高异亮氨酸)的特别单元。这些化合物对H-460人类肺癌细胞具有显著的细胞毒性^[37]。Natsume等从蓝细菌中分离到 Majusculamides A和B, 这2个肽在MC3T3-E1细胞中诱导成骨细胞分化,其甲基化数量影响成骨活性^[38]。

1.2 来源于昆虫病原线虫共生菌的肽类产物

异小杆线虫和斯氏线虫是昆虫大蜡螟体内寄生的病原线虫,发光杆菌属 *Photobabdus* 和致病杆菌属 *Xenorhabdus* 是共生于这2类线虫的主要细菌。产自这2类细菌的丰富天然产物,可以作为昆虫毒素、线虫食物信号和异种线虫抗生素作用于昆虫和线虫的病原寄生体系,有望成为农业生防的潜力化合物^[39]。已有多种活性肽类产物分离自这2类群(图4)。致病杆菌 *Xenorhabdus innexi* DSM 16336能合成7个新型的RXP(Rhabdopeptide/Xenortide-Like Peptides)肽(57),7个肽对于布氏锥虫和恶性疟原虫具有良好的抑生活性^[40]。Crawford等分析了来自致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* 的环肽产物 Xenematide 的合成基因簇,并分离到了3个新的 Xenematide B-D (58-60)^[41]。

基于沈阳农业大学植物保护平台,本课题组也长期从事昆虫病原共生菌致病杆菌和发光杆菌的

天然产物分离鉴定研究。此前分离到多个结构新颖的化合物,其中就包括来自致病杆菌 *Xenorhabdus budapestensis* 的2个环肽 Xenematide F和G (61和62),其中G具有特别的 α -氨基庚酸结构单元和中等的临床病原菌抑制活性^[42]。另外,有研究也从致病杆菌中分离到一系列新型聚甲基化缬氨酸RXP肽,该类肽对危害大豆生产非常严重的根结线虫有良好的抑生作用^[43]。RXP肽是一种由缬氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸等氨基酸为重复单元,结合色胺、苯乙胺、酪胺和胍丁胺等小分子尾巴构成的模式统一、结构多样的线肽。随着线肽结构单元的增多和氨基酸氮端N-甲基化结构单元的修饰,该类肽对致病原生动物的抑生活性也有明显的变化,其甲基修饰过程与生物合成的辅酶甲基化功能域密切相关^[44]。由于其已经明确的活性相关生物合成机制和可模块化操作的生物合成优势,可进一步研究其生物合成规律和机理调控下合成的可能性。

1.3 来源于真菌的肽类天然产物

除了已广泛研究的细菌肽类化合物,丰富多样的真菌也是近年来肽类天然产物发现的主要来源之一(图5)。据统计,过去5年从海洋真菌门微生物中发现的天然产物数量超过了其他所有海洋门类^[24]。多种肽类化合物的发现从最初研究较为广泛的曲霉逐渐延伸至多种特异性的真菌。禾谷镰刀菌的毒力和广泛的宿主范围与其分泌植物毒性次级代谢产物的能力有关,Bahadoor等从禾谷镰刀菌中分离了2个可增强在玉米上毒性的环脂肽 Gramillin A (63)和B (64),2个肽均具有稠合的双环结构^[45]。Wang等从夏威夷得到的一株黄曲霉

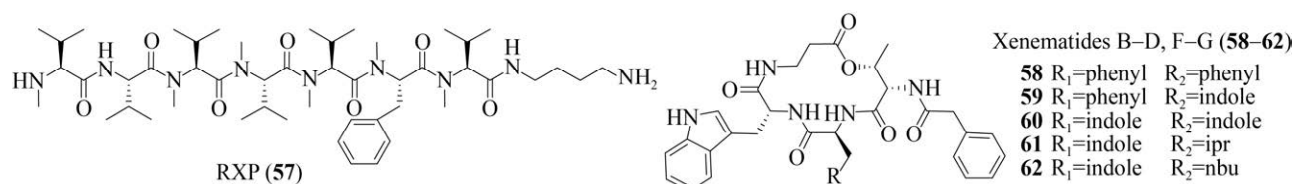


图4 来源于致病杆菌的肽

Figure 4 Peptides from *Xenorhabdus*

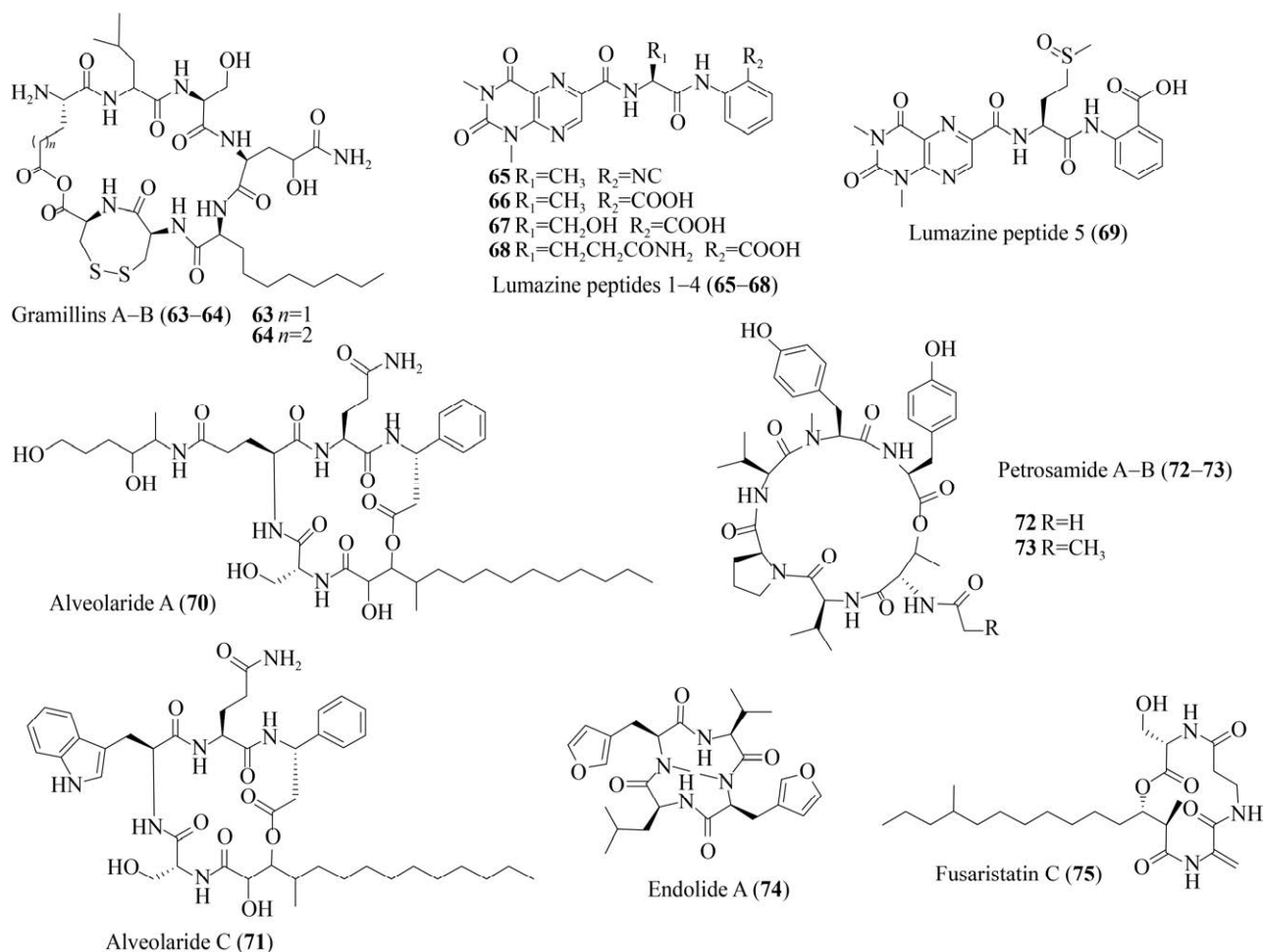


图5 来自真菌的部分肽类产品结构

Figure 5 Structures of some peptides from fungi

Aspergillus flavipes 真菌 FS888 发酵产物中分离出 5 个新的 2,4-二羟基蝶啶(Lumazine)噁肽(65–69), 其中化合物 65 是罕见的含有异氰基的天然产物^[46]。Fotso 等从真菌 *Microascus alveolaris* PF1466 中分离得到含有稀有的 2,3-二羟基-4-甲基十四酸单元和一个 β -苯丙氨酸氨基酸残基单元的 Alveolarides A (70)和 C (71), 活性测试表明 A 对稻瘟病、小麦酵母菌和玉米黑粉菌具有较强的体外抗菌活性^[47]。Tang 等从海绵内生真菌 *Aspergillus* sp. 151304 中分离得到环己肽 Petrosamides A (72), B (73)和 C, Petrosamides 具有剂量依赖性胰脂肪酶(PL)抑制活性^[48]。Almeida 等从海洋真菌 *Stachylidium* sp.中发现了 2 个非常罕见的 N-甲基

化四肽 Endolide A (74)和 B, 2 个肽都含有稀有的氨基酸 3-(3-咪唑基)-丙氨酸, 其中 A 具有加压素受体的亲和性^[49]。Yoshimura 等从真菌 *Myrothecium roridum* F27113 中分离得到一个长达 20 个氨基酸单位的链肽 Myropeptin A1, 具有抗真菌和溶血的作用^[50]。Guo 等从红树林分离的真菌 *Sarocladium kiliense* HDN11-112 中得到 2 个肽 Saroclides A 和 B, 这 2 个肽具有降脂的作用^[51]。Helaly 等从线虫内生真菌 *Ophiosphaerella* 中分离得到一个新的环脂肽 Ophiotine, Ophiotine 对宿主线虫 *Heterodera filipjevi* 有中等杀线虫活性^[52]。Soe 等从水生丝孢菌 *Clavariopsis aquatica* 中分离得到环缩肽 Clavariopsins C–I, 化合物具有 α -羟基酸单

元,并具有拮抗植物病原真菌的作用^[53]。Zhou 等利用 HPLC-DAD 技术从蘑菇致病真菌 *Cladobotryum varium* 中分离到了 Cladoamides A-C, 并利用改进的 Marfey 方法确定了它们的结构。Cladoamides 具有特别的 N-甲基苯丙氨酸单元^[54]。MacIntyre 等从加勒比八角珊瑚 *Eunicea fusca* 内生真菌 *Pithomyces* sp. RKDO 1698 中分离到肽 Fusaristatin C (75), 其具有 3-羟基-2,11-二甲基十四酸(HDMT) 单元结构^[55]。

2 基因挖掘技术驱动人工生物合成的新型肽类产物

除了丰富的天然产物资源,微生物同样蕴含着海量的基因库资源。随着微生物次级代谢产物生物合成的深入研究和基因组大规模测序的开展,生物信息学展示了大量隐藏的生物合成基因簇资源^[56-58]。基于此,一种全新的天然产物发现模式——基因组导向天然产物的挖掘(Genomics-Driven Natural Product Discovery)技术逐渐建立和成熟起来^[59-60]。基因组数据获取和相关性的进步使得预测聚酮和非核糖体多肽合成酶的产物结构准确性越来越高^[61-62]。如何让这些沉默的基因簇发挥其合成新型次级代谢产物的作用,近年来诞生了沉默基因簇激活、合成基因簇异源表达催化、基因挖掘后固相合成、高通量激活和重编程等多种新兴的研究方法。

2.1 基因挖掘结合激活沉默簇产生的新型肽类产物

微生物所包含的合成环境和能量系统最适宜自身次级代谢产物的合成,微生物自身的沉默基因簇往往是因为启动子或调控系统的抑制造成的。在激活沉默基因簇的几种策略中,操纵转录调控因子是最有效的方法^[63-64]。敲除阻遏因子或过表达特异性途径基因,以及激活全局正调控因子也能够激活沉默生物合成基因簇合成相应的产物^[65-69]。利用沉默基因簇激活合成了多种隐性肽(图 6)。利用更换启动子的策略, Bode 等激活了截至目前最大的包含连续 15 个模块的 NRPS 酶(*Kol* 基因,

49.1 kb), 并利用这个 NRPS 合成了此前在发光杆菌 *Photorhabdus luminescens* TT01 中未曾检测到的巨型非核糖体肽 Kolossin A (76)。因为生物合成量不足,所以研究者结合基因功能预测,采用放射性标记氨基酸和化学合成的方法研究了该肽的立体构型^[70]。在假单胞菌属中, GacS/GacA 双组分系统是一个高度保守的全局调控系统。活化的 GacA 蛋白与 sRNA 基因启动子区结合合成小 RNA *rsmX-Z*, 这些小 RNA 能够结合转录抑制因子 RsmA 和 RsmE。利用同源重组更换假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 中因点突变失活的 *gacA* 基因, 成功解除了 RsmA/RsmE 的转录抑制。抑制的解放促使 Pf0-1 合成了假单胞菌属中一类新家族脂肽产物 Gacamide A (77)^[71]。基因组测序表明 *Streptomyces* sp. KO-7888 中有一个与全新 NRPS 簇关联的代谢特异性调节基因 *speR*, Koomsiri 等在野生型菌株中过表达该调节基因直接促使合成 2 个新的脂肽 Sarpeptins A (78)和 B (79)^[72]。Chen 等利用从伯克霍尔德里德菌株中发现的新型噬菌体重组酶系统 Red α 7029 重组技术失活了帕拉伯克霍尔德里德属 *Paraburkholderia rhizoxinica* 菌的 *rhi* 调控基因。通过比较野生菌和 Δrhi 的代谢组, 发现激活了的 NRPS 簇 *holA*, 并获得了 13 个新型链状脂肽 Holrhizins E-Q。研究表明, Holrhizins 肽的多样性来自 A₄、A₅、A₆ 以及 C 结构域的亚基灵活可变性^[73]。Li 等用强启动子 P-HSAF 替换的方法激活溶杆菌中含有 6 个模块的沉默 NRPS 簇后, 从中鉴定出 3 个新肽 Le-Pyrrolopyrazines A-C^[74]。

2.2 基因挖掘结合异源表达合成的新型肽类产物

随着微生物大片段克隆技术的逐渐成熟,异源表达沉默的次级代谢产物 NRPS 基因簇是另外一种有效的激活方法,该方法同样可以合成此前未检测到的肽类产物(图 7)。利用原核表达来源于致病杆菌中的 NRPS 簇 *kj12ABC*, Zhao 等合成了 7 个新的含甲硫氨酸 RXP 肽, RXP 对于原生动植物寄

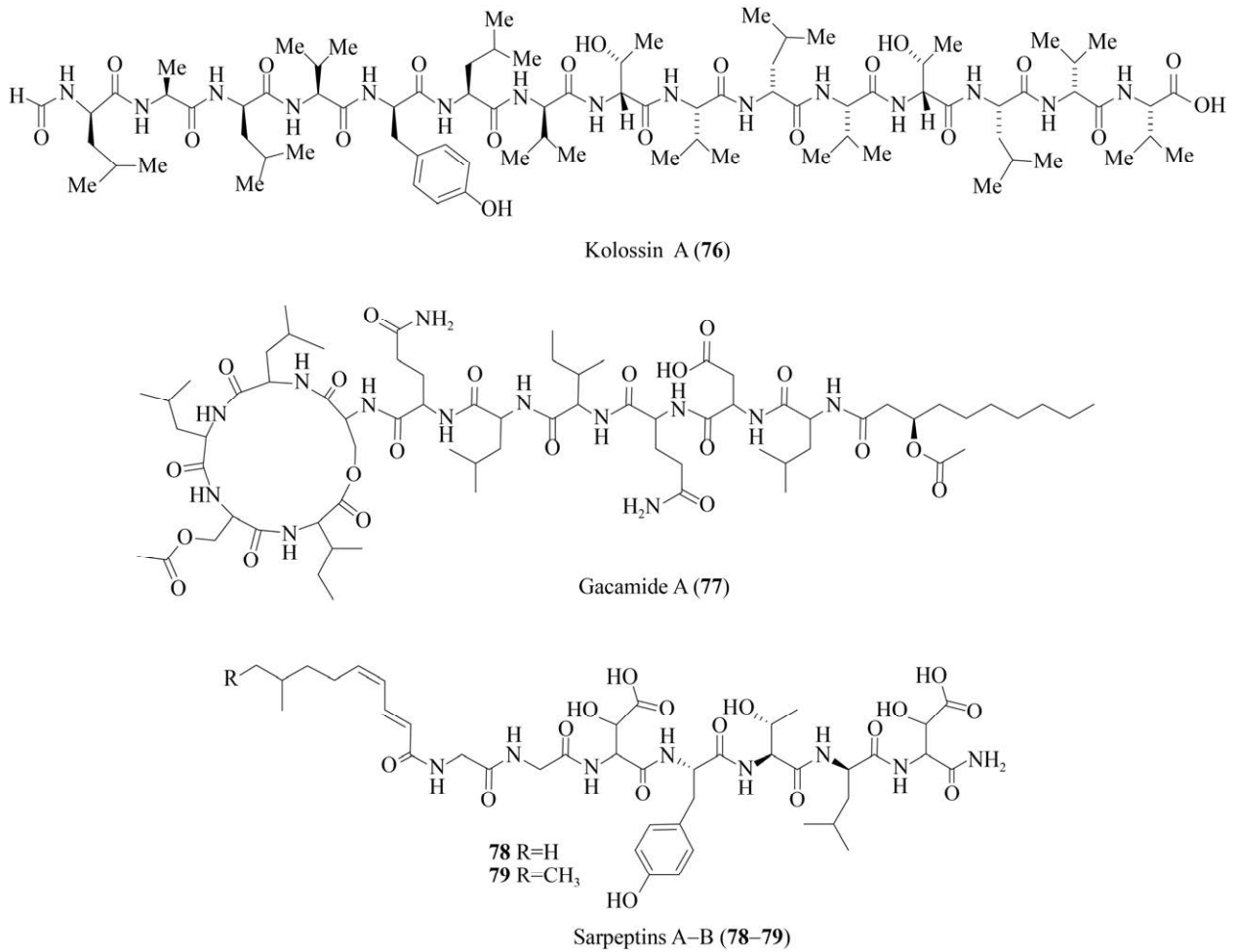


图 6 沉默基因簇激活合成肽
Figure 6 Synthetic peptides by activates silencing gene cluster

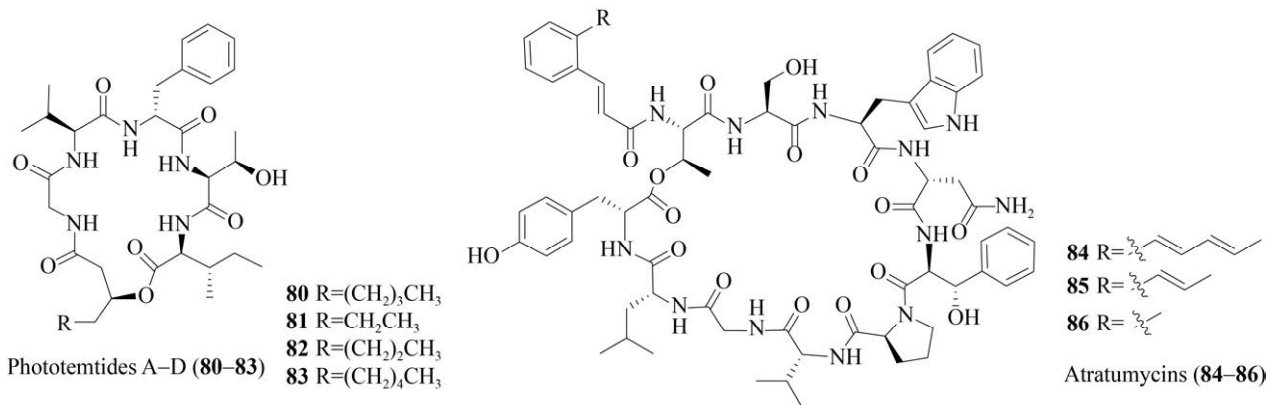


图 7 基因挖掘结合异源表达合成的肽
Figure 7 Peptides synthesized by heterologous expression from genome mining

生虫具有显著的抑制作用^[75]。在大肠杆菌中表达了来源于发光杆菌 *Photorhabdus temperata* Meg1 的基因簇 *pttABC* 后, 组合催化获得了一个脂肽 Phototemtide A (**80**), 并以 HPLC-MS 检测到了 Phototemtides B-D (**81-83**)的衍生结构, 其中 A 结构对烈性疟原虫具有良好的抑制活性^[76]。Cheung-Lee 等利用 Lasso 多肽基因组挖掘方法从乌邦伯克霍尔德菌基因组 *Burkholderia ubonensis* 克隆到基因簇 *uboA-D*, 异源表达该基因簇催化合成了套索肽 Ubonodin, Ubonodin 在体外抑制 RNA 聚合酶, 并对 *Burkholderia* 属的几种致病性成员具有强大的抗菌活性^[77]。Yang 等构建了来自 *Streptomyces atrovirens* LQ13 的 Cosmid 23A3, 该 Cosmid 的克隆序列覆盖了 Atrovimycin 生物合成基因簇中从 *avm4* 到 *avm29* 的区域, 相关基因编码调节子和肉桂酸生物合成模块蛋白的基因序列; 随后, 研究者利用修饰过的 Cosmid 23A3 构建了 *S. atratus* 工程菌, 发酵工程菌获得 2 个含有肉桂酰侧链的新肽 Atratamycins B 和 C (**84** 和 **85**), 这 2 个肽对结核分枝杆菌具有良好的抑制作用^[78]。

2.3 其他利用基因挖掘方法合成的新型肽类产品

分子网络技术(Molecular Networking)也是加快分离工作流程的有效手段。具有类似构造的天然产物分子, 在相同的质谱分离条件下会产生相似的质谱碎片离子。计算机可以根据系统的算法对进入高分辨质谱后形成的二级质谱碎片进行相似度计算, 根据计算结果片段相似度的高低, 而后依照相似度将质谱碎片图整合为一种可视化的网络图谱。应用该网络图谱技术可以有效排除重复发现的化学分子量, 并锁定未发现分子量的化合物。随着高分辨率质谱的逐步应用, 基因挖掘技术结合分子网络技术将为天然产物的发现提供崭新的技术工具^[79-81]。结合基因挖掘, 利用多种新型手段发现的肽类产品见图 8。为发现阳离子非核糖体肽的潜在生物合成能力, Li 等利用 antiSMASH 分析结合肽相似分子网络技术分析了 7 395 个细菌的基因组,

从 *Brevibacillus laterosporus* DSM25 和 ATCC9141 识别并分离出 2 种具有抗生素耐药性革兰氏阴性致病菌的新肽 Brevicidine (**87**)和 Laterocidine (**88**); 这 2 个肽含有阳离子氨基酸鸟氨酸和 D-鸟氨酸, 对耐药革兰氏阴性菌(如铜绿假单胞菌和耐黏菌素 Colistin 大肠杆菌)具有杀菌活性, 而且耐药风险明显较低^[82]。根据生物合成基因簇进行生物信息学挖掘和推测, 建立虚拟结构并化学合成相关产物, 是另外一种获得新型肽类产物的新兴策略。Vila-Farres 等分析和精选了一系列细菌基因组后, 从收集的基因簇中预测了多个肽类产物, 利用固相方法合成了这些肽, 并对病原菌进行抑制活性检测, 获得具有革兰氏阳性菌抑菌活性的 Syn-BNP 1 (**89**)和具有真菌抑菌活性的 Syn-BNP 2 (**90**)^[83]。利用基因挖掘技术比较 2 株假单胞菌的基因组序列, 高通量激发子筛选方法和氮谱法也是发现微生物肽类的有效方法。Kirchner 等发现了一条高度同源的 NRPS 序列, 通过比较 2 株菌的表达, 发现了一个新型八脂肽 Thanafactin A^[84]。Zhang 等利用高通量激发子筛选(HiTES)从 *Streptomyces ghanaensis* 中诱导出含有独特单元 2-甲基肉桂酰基的环缩肽 Cinnapeptin (**91**)^[85]。利用基因挖掘和 ¹H/¹⁵N HSQC-TOCSY 谱的方法从 *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089 分离到 2 个肽 Incarnatapeptins A (**92**)和 B (**93**), 其中 B 对 LNCaP 前列腺癌细胞具有体外细胞毒性^[86]。

2.4 重编程方式合成新型肽类产品

因为采用模块化结合流水线的组合催化合成方式, NRPS 具有可工程化的天然优势。通过排列组合不同的 NRPS 模块和功能结构域, 并采用异源表达结合底物饲喂的方式使得工程化合成新型 NRP 成为可能。RXP 肽类是发光杆菌/致病杆菌中存在最广泛的一类肽。Cai 等通过分别表达和组合表达来自不同发光杆菌和致病杆菌菌系的 NRPS, 研究了 RXP 合成的催化规律, 并利用该规律异源合成了之前多种未合成的新型 RXP 肽

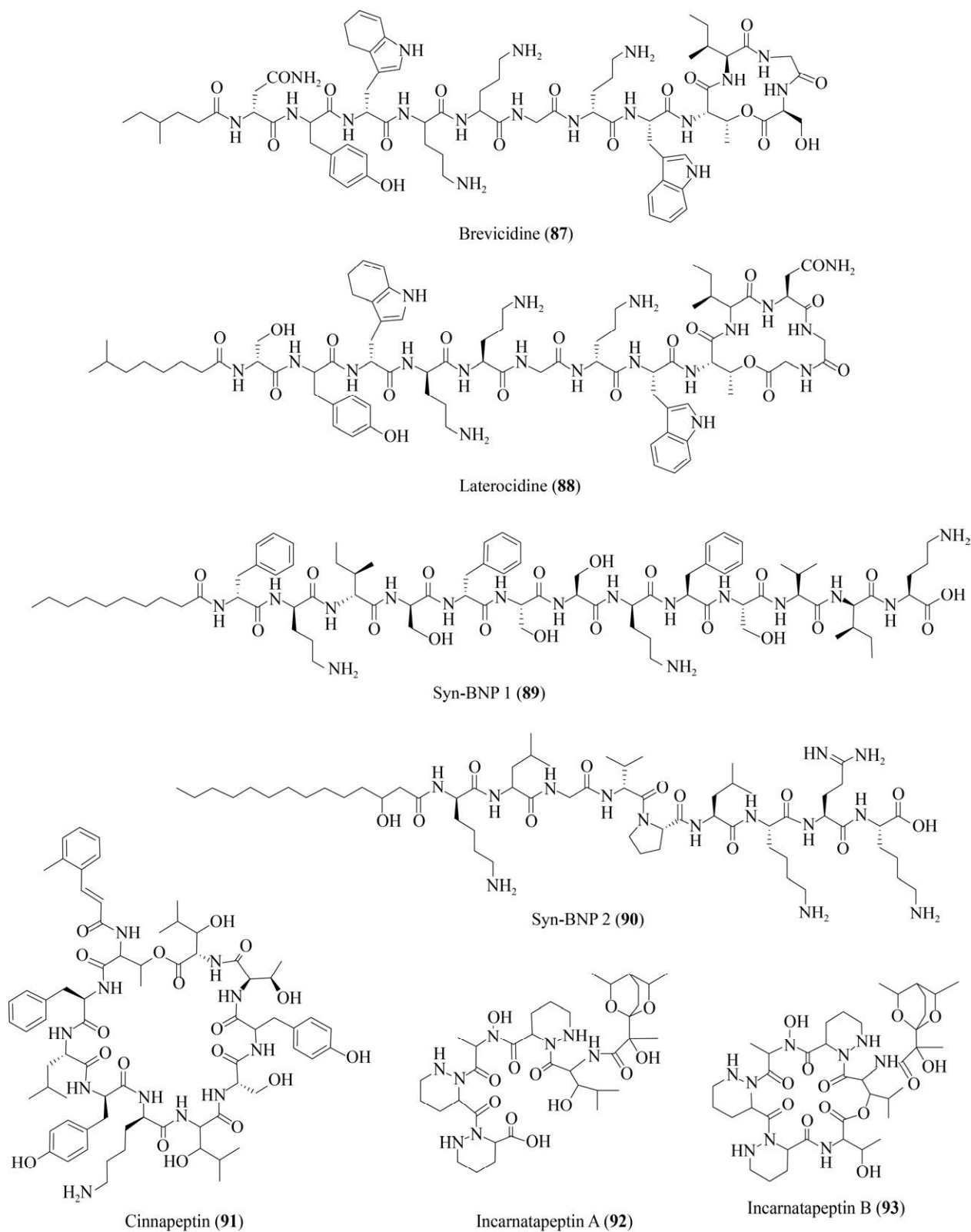


图 8 其他利用基因挖掘方法合成的肽类产品

Figure 8 Other peptide products synthesized by genome mining methods

肽类;其研究表明通过更换模块和结构域组合催化体系,可以使得 RXP 的结构单元、长度、甲基化修饰等产生多样性的组合变化,从而能合成出多种 RXP 肽^[44]。Hühner 等以不同的组合方式重新串联表达了来自曲霉的 A-T-TE 多种结构基因,该结构可以催化 α -酮羧酸的二聚反应,不同组合催化形成了羟基苯醌或内酯结构^[87]。Bozhüyük 等描述了 NRPS 缩合域内的一个新的融合点,其导致交换单元凝聚域概念的发展,能够高效地生产肽,甚至包含非天然氨基酸,可能适用于未来多肽生产的优化和生物活性肽衍生物的鉴定^[88]。成对的对接结构域(Docking Domains, DDs)介导相邻的非核糖体肽合成酶之间的选择性相互作用,通过交换不同 NRPS 的对接结构域可以合成新型的 RXP 类型的肽。在构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 中利用组合结构域的 NRPS 催化合成肽基底,随后利用工程化的甲基转移酶和异戊烯转移酶的组合催化, Van Dijk 等进行了肽类天然产物的甲基化修饰和戊基化催化反应,合成了一系列新型肽类化合物^[89]。

3 总结和展望

肽类天然产物是源于微生物的生物活性小分子,因其兼具生物化学的氨基酸基础和有机化学的结构多样性,所以具备天然产物生物亲和性和生物活性多样性。本文总结了近年来新发现的微生物肽类产物,包括以传统的放线菌为主的新型天然产物,也包括以蓝细菌和昆虫病原线虫共生菌为代表的多种新型特色微生物产物。真菌发酵合成的肽类产物来源则以曲霉为代表向多种真菌产物发展。肽类产物由以氨基酸为基础的单元构成,可以引入多种以肽键为纽带的基础结构,使得肽类产物组合结构繁花似锦。因此产生出诸多的包括抗临床病原菌、抗植物病害真菌、抗疟疾、抗癌等有益活性,为新药的开发和应用提供了广泛的结构和活性基础。肽类化合物作用于微生物的机制独特性在于其不易脱靶的性质,使得肽类化合物成为有效的抵御病原微生物的抗生素前体^[7]。虽然有着不可比拟的

优势,以往的研究工作表明,肽类产物的发掘也存在一定问题。问题在于其有限的生物活性、过于相似的结构和较低的产量。RXP 线型肽的活性有较多的不可控因素,例如甲基化辅酶的不稳定催化影响。相似的结构则导致产物分离的极大困难,由于产量并不高,反复分离导致的最终产量仅能勉强供给生物活性测定。为了解决这一问题,应对的主要手段是研究其生物合成过程机理,在明确机制指导下的可控表达或者异源表达催化合成该类产物是稳定获得成品的期望策略。

多种新型肽类产物的发现过程表明,天然产物的发掘逐渐从以化学分离的传统手段向基因组挖掘的新兴手段变化。不论从天蓝色链霉菌到发光杆菌和致病杆菌,以及曲霉基因簇挖掘,还是基因簇为背景的天然产物研究探索,正在以从活性小分子本身逐渐导向更加深入的合成机理,凸显出生物化学及分子生物学的基础类研究对天然产物化学研究的指导意义。近年来,在工程化生物合成新型非核糖体肽天然产物方面取得了重大研究进展。前体定向的生物合成和诱变已经成功地拓宽了非核糖体肽的化学多样性。对非核糖体肽进行体内修饰,并在其天然合成簇外应用新的糖基化、卤化和硫酸化酶均可以得到良好的修饰效果。

虽然已经有很多成功的实例证明微生物肽类产物的工程化前景,但是该领域仍然发展缓慢。早期交换 NRPS 功能域和模块的尝试显示出好坏参半的结果,虽然取得了一些重大成功,但在更多例子中,使用同一方法的效果并不理想。很多工程化的肽难以达到野生型的活性,究其原因是研究者往往尝试去获得自然进化选择性隐蔽的肽类基因簇。但是随着 DNA 编辑和组装技术的进步,产生更多更丰富的合成突变体成本会逐渐下降。随着新型模块的发现和功能的优化,组合表达策略会更加成熟并彻底改变肽类产物的合成。

未来的肽类天然产物探索,必将以基因组层面的指导结合和传统化学分离的手段交叉融通,创造

出更加激动人心的研究成果,为天然产物药类的开发提供更多更优良的前体化合物。

REFERENCES

- [1] Süßmuth RD, Mainz A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects[J]. *Angewandte Chemie: International ed. in English*, 2017, 56(14): 3770-3821
- [2] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(2/3): 155-176
- [3] Dang T, Süßmuth RD. Bioactive peptide natural products as lead structures for medicinal use[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50(7): 1566-1576
- [4] Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms[J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(8): 3468-3496
- [5] Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu YF, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, et al. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D1091-D1097
- [6] Cava F, Lam H, Pedro MA, Waldor MK. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(5): 817-831
- [7] Liu Y, Ding SY, Shen JZ, Zhu K. Nonribosomal antibacterial peptides that target multidrug-resistant bacteria[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(4): 573-592
- [8] Pan CQ, Kuranaga T, Liu C, Lu S, Shinzato N, Kakeya H. Thioamylomides A-E, sulfur-containing cyclic lipopeptides produced by the rare actinomycete *Amycolatopsis* sp.[J]. *Organic Letters*, 2020, 22(8): 3014-3017
- [9] Um S, Park SH, Kim J, Park HJ, Ko K, Bang HS, Lee SK, Shin J, Oh DC. Coprisamides A and B, new branched cyclic peptides from a gut bacterium of the dung beetle *Copris tripartitus*[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(5): 1272-1275
- [10] Shin YH, Bae S, Sim J, Hur J, Jo SI, Shin J, Suh YG, Oh KB, Oh DC. Nicrophorusamides A and B, antibacterial chlorinated cyclic peptides from a gut bacterium of the carrion beetle *Nicrophorus concolor*[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(11): 2962-2968
- [11] Son S, Ko SK, Kim SM, Kim E, Kim GS, Lee B, Ryoo IJ, Kim WG, Lee JS, Hong YS, et al. Antibacterial cyclic lipopeptide enamidonins with an amide-linked acyl chain from a *Streptomyces* species[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(11): 2462-2469
- [12] Wyche TP, Ruzzini AC, Schwab L, Currie CR, Clardy J. Tryptorubin A: a polycyclic peptide from a fungus-derived streptomycete[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(37): 12899-12902
- [13] Bekiesch P, Zehl M, Domingo-Contreras E, Martín J, Pérez-Victoria I, Reyes F, Kaplan A, Rückert C, Busche T, Kalinowski J, et al. Viennamycins: lipopeptides produced by a *Streptomyces* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(8): 2381-2389
- [14] Son S, Hong YS, Jang M, Heo KT, Lee B, Jang JP, Kim JW, Ryoo IJ, Kim WG, Ko SK, et al. Genomics-driven discovery of chlorinated cyclic hexapeptides ulleungmycins A and B from a *Streptomyces* species[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(11): 3025-3031
- [15] Jang JP, Nogawa T, Futamura Y, Shimizu T, Hashizume D, Takahashi S, Jang JH, Ahn JS, Osada H. Octaminomycins A and B, cyclic octadepsipeptides active against *Plasmodium falciparum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(1): 134-140
- [16] Patteson JB, Lescalette AR, Li B. Discovery and biosynthesis of azabicyclene, a conserved nonribosomal peptide in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(13): 4955-4959
- [17] Hoshino S, Ozeki M, Awakawa T, Morita H, Onaka H, Abe I. Catenulobactins A and B, heterocyclic peptides from culturing *Catenuloplanes* sp. with a mycolic acid-containing bacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(9): 2106-2110
- [18] Kim GJ, Li X, Kim SH, Yang I, Hahn D, Chin J, Nam SJ, Nam JW, Nam DH, Oh DC, et al. Seongsanamides A-D: antiallergic bicyclic peptides from *Bacillus safensis* KCTC 12796BP[J]. *Organic Letters*, 2018, 20(23): 7539-7543
- [19] Tareq FS, Shin HJ. Bacilotetrins A and B, anti-staphylococcal cyclic-lipotetrapeptides from a marine-derived *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(11): 2889-2892
- [20] Liu Y, Ding SY, Dietrich R, Märklbauer E, Zhu K. A biosurfactant-inspired heptapeptide with improved specificity to kill MRSA[J]. *Angewandte Chemie: International ed. in English*, 2017, 56(6): 1486-1490
- [21] Dashti Y, Nakou IT, Mullins AJ, Webster G, Jian XY, Mahenthalingam E, Challis GL. Discovery and biosynthesis of bolagladins: Unusual lipodepsipeptides from *Burkholderia gladioli* clinical isolates[J]. *Angewandte Chemie: International ed. in English*, 2020, 59(48): 21553-21561
- [22] Dose B, Ross C, Niehs SP, Scherlach K, Bauer JP, Hertweck C. Food-poisoning bacteria employ a citrate synthase and a Type II NRPS to synthesize bolaamphiphilic lipopeptide antibiotics[J]. *Angewandte Chemie: International ed. in English*, 2020, 59(48): 21535-21540
- [23] Marner M, Patras MA, Kurz M, Zubeil F, Förster F, Schuler S, Bauer A, Hammann P, Vilcinskas A, Schäberle TF, et al. Molecular networking-guided discovery and characterization of stechlisins, a group of cyclic lipopeptides from a *Pseudomonas* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(9): 2607-2617
- [24] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(2): 362-413
- [25] Sumimoto S, Kobayashi M, Sato R, Shinomiya S, Iwasaki A,

- Suda S, Teruya T, Inuzuka T, Ohno O, Suenaga K. Minnamide A, a linear lipopeptide from the marine cyanobacterium *Okeania hirsuta*[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(4): 1187-1190
- [26] Iwasaki A, Tadenuma T, Sumimoto S, Ohshiro T, Ozaki K, Kobayashi K, Teruya T, Tomoda H, Suenaga K. Biseokeaniamides A, B, and C, sterol O-acyltransferase inhibitors from an *Okeania* sp. marine cyanobacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(4): 1161-1166
- [27] Iwasaki A, Shiota I, Sumimoto S, Matsubara T, Sato T, Suenaga K. Kohamamides A, B, and C, cyclic depsipeptides from an *Okeania* sp. marine cyanobacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(6): 1948-1952
- [28] Sueyoshi K, Yamada M, Yamano A, Ozaki K, Sumimoto S, Iwasaki A, Suenaga K, Teruya T. Ypaoamides B and C, linear lipopeptides from an *Okeania* sp. marine cyanobacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(4): 1103-1107
- [29] Ozaki K, Iwasaki A, Sezawa D, Fujimura H, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Suenaga K, Teruya T. Isolation and total synthesis of mabuniamide, a lipopeptide from an *Okeania* sp. marine cyanobacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(10): 2907-2915
- [30] Iwasaki K, Iwasaki A, Sumimoto S, Matsubara T, Sato T, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Suenaga K. Ikoamide, an antimalarial lipopeptide from an *Okeania* sp. marine cyanobacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(2): 481-488
- [31] Kurisawa N, Iwasaki A, Jeelani G, Nozaki T, Suenaga K. Iheyamides A-C, antitrypanosomal linear peptides isolated from a marine *Dapis* sp. cyanobacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(5): 1684-1690
- [32] Levert A, Alvaríño R, Bornancin L, Abou Mansour E, Burja AM, Genevière AM, Bonnard I, Alonso E, Botana L, Banaigs B. Structures and activities of tiahuramides A-C, cyclic depsipeptides from a Tahitian collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(6): 1301-1310
- [33] Iwasaki A, Ohtomo K, Kurisawa N, Shiota I, Rahmawati Y, Jeelani G, Nozaki T, Suenaga K. Isolation, structure determination, and total synthesis of hoshinoamide C, an antiparasitic lipopeptide from the marine cyanobacterium *Caldora penicillata*[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(1): 126-135
- [34] Iwasaki A, Tadenuma T, Sumimoto S, Shiota I, Matsubara T, Saito-Nakano Y, Nozaki T, Sato T, Suenaga K. Hoshinoamides A and B, acyclic lipopeptides from the marine cyanobacterium *Caldora penicillata*[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(11): 2545-2552
- [35] Almaliti J, Malloy KL, Glukhov E, Spadafora C, Gutiérrez M, Gerwick WH. Dudawalamides A-D, antiparasitic cyclic depsipeptides from the marine cyanobacterium *Moorea producens*[J]. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(6): 1827-1836
- [36] Kanamori Y, Iwasaki A, Sumimoto S, Matsubara T, Sato T, Suenaga K. Izenamides A and B, statine-containing depsipeptides, and an analogue from a marine cyanobacterium[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(7): 1673-1681
- [37] Yu HB, Glukhov E, Li YY, Iwasaki A, Gerwick L, Dorrestein PC, Jiao BH, Gerwick WH. Cytotoxic microcolin lipopeptides from the marine cyanobacterium *Moorea producens*[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(9): 2608-2619
- [38] Natsume N, Ozaki K, Nakajima D, Yokoshima S, Teruya T. Structure-activity relationship study of majusculamides A and B and their analogues on osteogenic activity[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(8): 2477-2482
- [39] Shi YM, Bode HB. Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria-nematode-insect interactions[J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(4): 309-335
- [40] Zhao L, Kaiser M, Bode HB. Rhabdopeptide/xenortide-like peptides from *Xenorhabdus innexi* with terminal amines showing potent antiprotozoal activity[J]. *Organic Letters*, 2018, 20(17): 5116-5120
- [41] Crawford JM, Portmann C, Kontnik R, Walsh CT, Clardy J. NRPS substrate promiscuity diversifies the xenematides[J]. *Organic Letters*, 2011, 13(19): 5144-5147.
- [42] Xi XD, Lu XZ, Zhang XD, Bi YH, Li XC, Yu ZG. Two novel cyclic depsipeptides Xenematides F and G from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus budapestensis*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2019, 72(10): 736-743
- [43] Bi YH, Gao CZ, Yu ZG. Rhabdopeptides from *Xenorhabdus budapestensis* SN84 and their nematicidal activities against *Meloidogyne incognita*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(15): 3833-3839
- [44] Cai XF, Nowak S, Wesche F, Bischoff I, Kaiser M, Fürst R, Bode HB. Entomopathogenic bacteria use multiple mechanisms for bioactive peptide library design[J]. *Nature Chemistry*, 2017, 9(4): 379-386
- [45] Bahadour A, Brauer EK, Bosnich W, Schneiderman D, Johnston A, Aubin Y, Blackwell B, Melanson JE, Harris LJ. Gramillin A and B: cyclic lipopeptides identified as the nonribosomal biosynthetic products of *Fusarium graminearum*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(48): 16783-16791
- [46] Wang C, Wu XH, Bai HL, Zaman KAU, Hou SB, Saito J, Wongwiwatthanakit S, Kim KS, Cao SG. Antibacterial and NF- κ B inhibitory lumazine peptides, aspochalasin, γ -butyrolactone derivatives, and cyclic peptides from a Hawaiian *Aspergillus flavipes*[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(7): 2233-2240
- [47] Fotso S, Graupner P, Xiong QB, Gilbert JR, Hahn D, Avila-Adame C, Davis G, Sumiyoshi K. Alveolarides: antifungal peptides from *Microascus alveolaris* active against phytopathogenic fungi[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(1): 10-15

- [48] Tang WZ, Liu JT, Hu Q, He RJ, Guan XQ, Ge GB, Han H, Yang F, Lin HW. Pancreatic lipase inhibitory cyclohexapeptides from the marine sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. 151304[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(7): 2287-2293
- [49] Almeida C, Maddah FE, Kehraus S, Schnakenburg G, König GM. Endolides A and B, vasopressin and serotonin-receptor interacting N-methylated peptides from the sponge-derived fungus *Stachylidium* sp.[J]. *Organic Letters*, 2016, 18(3): 528-531
- [50] Yoshimura A, Nishimura S, Suzuki T, Hattori A, Dohmae N, Kato T, Kakeya H. Isolation, structure elucidation, and conformational regulation of myropeptides, lipopeptides from the fungus *Myrothecium roridum*[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(18): 7524-7528
- [51] Guo WQ, Wang S, Li N, Li F, Zhu TJ, Gu QQ, Guo P, Li DH. Saroclides A and B, cyclic depsipeptides from the mangrove-derived fungus *Sarocladium kiliense* HDN11-112[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(4): 1050-1054
- [52] Helaly S, Ashrafi S, Teponno RB, Bernecker S, Dababat AA, Maier W, Stadler M. Nematicidal cyclic lipodepsipeptides and a xanthocillin derivative from a phaeosphaeriaceous fungus parasitizing eggs of the plant parasitic nematode *Heterodera filipjevi*[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(10): 2228-2234
- [53] Soe TW, Han CG, Fudou R, Kaida K, Sawaki Y, Tomura T, Ojika M. Clavariopsins C-I, antifungal cyclic depsipeptides from the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatica*[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(7): 1971-1978
- [54] Zhou T, Katsuragawa M, Xing T, Fukaya K, Okuda T, Tokiwa T, Tashiro E, Imoto M, Oku N, Urabe D, et al. Cyclopeptides from the mushroom pathogen fungus *Cladobotryum varium*[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(2): 327-338
- [55] MacIntyre L, Marchbank DH, Correa H, Kerr RG. Fusaristatin C, a cyclic lipodepsipeptide from *Pithomyces* sp. RKDO 1698[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(12): 2768-2772
- [56] Pawlik K, Kotowska M, Chater KF, Kuczek K, Takano E. A cryptic type I polyketide synthase (*cpk*) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Archives of Microbiology*, 2007, 187(2): 87-99
- [57] Challis GL. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(2): 219-232
- [58] Nett M, Ikeda H, Moore BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(11): 1362-1384
- [59] Ziemert N, Alanjary M, Weber T. The evolution of genome mining in microbes: a review[J]. *Natural Product Reports*, 2016, 33(8): 988-1005
- [60] Choi SS, Katsuyama Y, Bai LQ, Deng ZX, Ohnishi Y, Kim ES. Genome engineering for microbial natural product discovery[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 45: 53-60
- [61] Medema MH, Van Raaphorst R, Takano E, Breitling R. Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(3): 191-202
- [62] Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, Takano E, Weber T. antiSMASH 2.0: a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(W1): W204-W212
- [63] Rutledge PJ, Challis GL. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 509-523
- [64] Chen YH, Smanski MJ, Shen B. Improvement of secondary metabolite production in *Streptomyces* by manipulating pathway regulation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(1): 19-25
- [65] Chen RD, Zhang QB, Tan B, Zheng LJ, Li HX, Zhu YG, Zhang CS. Genome mining and activation of a silent PKS/NRPS gene cluster direct the production of totopotensamides[J]. *Organic Letters*, 2017, 19(20): 5697-5700
- [66] Kontnik R, Crawford JM, Clardy J. Exploiting a global regulator for small molecule discovery in *Photorhabdus luminescens*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2010, 5(7): 659-665
- [67] Cai XF, Teta R, Kohlhaas C, Crüsemann M, Ueoka R, Mangoni A, Freeman MF, Piel J. Manipulation of regulatory genes reveals complexity and fidelity in hormaomycin biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20(6): 839-846
- [68] Zhou ZX, Xu QQ, Bu QT, Guo YY, Liu SP, Liu Y, Du YL, Li YQ. Genome mining-directed activation of a silent angucycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces chattanoogensis*[J]. *Chembiochem*, 2015, 16(3): 496-502
- [69] Du DY, Katsuyama Y, Onaka H, Fujie M, Satoh N, Shin-Ya K, Ohnishi Y. Production of a novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08[J]. *Chembiochem*, 2016, 17(15): 1464-1471
- [70] Bode HB, Brachmann AO, Jadhav KB, Seyfarth L, Dauth C, Fuchs SW, Kaiser M, Waterfield NR, Sack H, Heinemann SH, et al. Structure elucidation and activity of Kolossin A, the D-/L-pentadecapeptide product of a giant nonribosomal peptide synthetase[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2015, 54(35): 10352-10355
- [71] Jahanshah G, Yan Q, Gerhardt H, Pataj Z, Lämmerhofer M, Pianet I, Josten M, Sahl HG, Silby MW, Loper JE, et al. Discovery of the cyclic lipopeptide gacamide A by genome mining and repair of the defective GacA regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(2): 301-308
- [72] Koomsiri W, Inahashi Y, Leetanasaksakul K, Shiomi K,

- Takahashi Y, Omura S, Samborskyy M, Leadlay PF, Wattana-Amorn P, Thamchaipenet A, et al. Sarpeptins A and B, lipopeptides produced by *Streptomyces* sp. KO-7888 overexpressing a specific SARP regulator[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(8): 2144-2151
- [73] Chen HN, Zhou HB, Sun T, Xu JY, Tu Q, Yang J, Zhang YM, Bian XY. Identification of holrhizins E-Q reveals the diversity of nonribosomal lipopeptides in *Paraburkholderia rhizoxinica*[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(2): 537-541
- [74] Li SR, Wu XL, Zhang LM, Shen YM, Du LC. Activation of a cryptic gene cluster in *Lysobacter enzymogenes* reveals a module/domain portable mechanism of nonribosomal peptide synthetases in the biosynthesis of pyrrolopyrazines[J]. *Organic Letters*, 2017, 19(19): 5010-5013
- [75] Zhao L, Cai XF, Kaiser M, Bode HB. Methionine-containing rhabdopeptide/xenortide-like peptides from heterologous expression of the biosynthetic gene cluster kj12ABC in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(10): 2292-2295
- [76] Zhao L, Vo TD, Kaiser M, Bode HB. Phototemtide A, a cyclic lipopeptide heterologously expressed from *Photorhabdus temperata* Meg1, shows selective antiprotozoal activity[J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(9): 1288-1292
- [77] Cheung-Lee WL, Parry ME, Zong CH, Cartagena AJ, Darst SA, Connell ND, Russo R, Link AJ. Discovery of ubonodin, an antimicrobial lasso peptide active against members of the *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Chembiochem*, 2020, 21(9): 1335-1340
- [78] Yang ZJ, Sun CL, Liu ZY, Liu Q, Zhang T, Ju JH, Ma JY. Production of antitubercular depsipeptides via biosynthetic engineering of cinnamoyl units[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(5): 1666-1673
- [79] Nguyen DD, Wu CH, Moree WJ, Lamsa A, Medema MH, Zhao XL, Gavilan RG, Aparicio M, Atencio L, Jackson C, et al. MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(28): E2611-E2620
- [80] Watrous J, Roach P, Alexandrov T, Heath BS, Yang JY, Kersten RD, Van Der Voort M, Pogliano K, Gross H, Raaijmakers JM, et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(26): E1743-E1752
- [81] Fox Ramos AE, Evanno L, Poupon E, Champy P, Beniddir MA. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(7): 960-980
- [82] Li YX, Zhong Z, Zhang WP, Qian PY. Discovery of cationic nonribosomal peptides as Gram-negative antibiotics through global genome mining[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3273
- [83] Vila-Farres X, Chu J, Inoyama D, Ternei MA, Lemetre C, Cohen LJ, Cho W, Reddy BVB, Zebroski HA, Freundlich JS, et al. Antimicrobials inspired by nonribosomal peptide synthetase gene clusters[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(4): 1404-1407
- [84] Kirchner N, Cano-Prieto C, Schulz-Fincke AC, Gütschow M, Ortlieb N, Moschny J, Niedermeyer THJ, Horak J, Lämmerhofer M, Van Der Voort M, et al. Discovery of thanaactin A, a linear, proline-containing octalipopeptide from *Pseudomonas* sp. SH-C52, motivated by genome mining[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(1): 101-109
- [85] Zhang C, Seyedsayamdost MR. Discovery of a cryptic depsipeptide from *Streptomyces ghanaensis* via MALDI-MS-guided high-throughput elicitor screening[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2020, 59(51): 23005-23009
- [86] Morgan KD, Williams DE, Patrick BO, Remigy M, Banuelos CA, Sadar MD, Ryan KS, Andersen RJ. Incarnatapeptins A and B, nonribosomal peptides discovered using genome mining and 1H/15N HSQC-TOCSY[J]. *Organic Letters*, 2020, 22(11): 4053-4057
- [87] Hühner E, Öqvist K, Li SM. Design of α -keto carboxylic acid dimers by domain recombination of nonribosomal peptide synthetase (NRPS)-like enzymes[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(2): 498-502
- [88] Bozhüyük KAJ, Linck A, Tietze A, Kranz J, Wesche F, Nowak S, Fleischhacker F, Shi YN, Grün P, Bode HB. Modification and *de novo* design of non-ribosomal peptide synthetases using specific assembly points within condensation domains[J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(7): 653-661
- [89] Van Dijk J, Wang CCC. Expanding the chemical space of nonribosomal peptide synthetase-like enzymes by domain and tailoring enzyme recombination[J]. *Organic Letters*, 2018, 20(17): 5082-5085