



## 细菌源吡咯里西啶类生物碱的发现及生物合成研究进展

李赛男<sup>1</sup> 段燕文<sup>1,2,3</sup> 黄勇<sup>\*1,3</sup>

1 中南大学湘雅国际转化医学联合研究院 湖南 长沙 410013

2 组合生物合成与天然产物药物湖南省工程研究中心 湖南 长沙 410011

3 新药组合生物合成国家地方联合工程研究中心 湖南 长沙 410011

**摘要:** 吡咯里西啶类生物碱(Pyrrolizidine Alkaloids, PAs)在高等植物中分布广泛, 目前超过6 000种植物产生了650余个PAs。源于细菌的PAs发现较少, 其中Clazamycin A和Clazamycin B由Umezawa等在1979年报道。近年来在微生物基因组和合成生物学发展的驱动下, 细菌源PAs的发现和生物合成的研究方兴未艾。截至目前, 已发现12类(60余个)源于细菌的PAs, 包括波米西亚胺、Azetidomonamides和Brabantamides, 以及含有PAs结构单元的多烯大环内酰胺Ciromicins和Heronamides。对这些结构多样、活性优异的细菌源PAs的研究发现, 多数PAs依赖于一对独特的非核糖体多肽合成酶(Non-Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs)/拜耳-维利格单加氧酶(Bayer-Villiger Monooxygenase)生物合成其吡咯双烷基本骨架; 而含有 $\beta$ -氨基酸的多烯大环内酰胺中吡咯双烷的形成则可能通过一个高度非对映选择性的电子重排反应途径。微生物基因组挖掘揭示了细菌中有大量沉默的PAs生物合成基因簇, 说明细菌PAs在细菌进化和其环境/宿主的适应性中起着重要作用。

**关键词:** 吡咯里西啶类生物碱, 非核糖体多肽合成酶, 拜耳-维利格单加氧酶, 基因组挖掘

## Discovery and biosynthesis of bacterial pyrrolizidine alkaloids

LI Sainan<sup>1</sup> DUAN Yanwen<sup>1,2,3</sup> HUANG Yong<sup>\*1,3</sup>

1 Xiangya International Academy of Translational Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China

2 Hunan Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis and Natural Product Drug Discovery, Changsha, Hunan 410011, China

3 National Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis for Drug Discovery, Changsha, Hunan 410011, China

**Abstract:** Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are widely distributed among higher plants, with over 650 PAs produced by more than 6 000 plants. Only a limited number of PAs of bacterial origins are discovered. For example, clazamycin A and B, reported by Umezawa in 1979 were among the firstly discovered bacterial PAs. In recent years, driven by microbial genomics and synthetic biology, the discovery and study of bacterial PAs and their biosynthetic mechanisms have made impressive progresses. To date, 12 types of PAs (~60) derived from bacteria have been identified, including bohemamines, azetidomonamides, and

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (81473124)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-731-82650539; E-mail: jonghuang@csu.edu.cn

**Received:** 24-01-2021; **Accepted:** 03-03-2021; **Published online:** 30-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(81473124)

\*通信作者: Tel: 0731-82650539; E-mail: jonghuang@csu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-24; 接受日期: 2021-03-03; 网络首发日期: 2021-03-30

brabantamides, as well as polyene macrolactam ciromicins and heronamides containing PA structural units. The biosynthetic study of several PAs results in the identification of a unique pair of non-ribosomal peptide synthetase/Bayer-Villiger monooxygenase responsible for the formation of the pyrrolizidine skeleton. In contrast, the formation of the pyrrolizidine unit in  $\beta$ -amino acids polyene macrolactams might involve a highly diastereoselective electrocyclization process. Further, microbial genome mining reveals a lot of silent PAs biosynthetic gene clusters in bacteria, indicating that PAs play an important role in bacterial evolution and adaptation of their environment/hosts.

**Keywords:** pyrrolizidine alkaloids, non-ribosomal peptide synthetase, Bayer-Villiger monooxygenase, genome mining

## 1 吡咯里西啉类生物碱及其生物合成

吡咯里西啉类生物碱(Pyrrolizidine Alkaloids, PAs)是一大类含吡咯双烷结构的生物碱(图 1)。截

至目前, 已知有超过 6 000 种植物产生 650 多个 PAs<sup>[1-2]</sup>。植物源 PAs 的基本骨架一般由 4 氢吡咯环和 1 位羟甲基取代的 4 氢吡咯环稠和而成, 而且

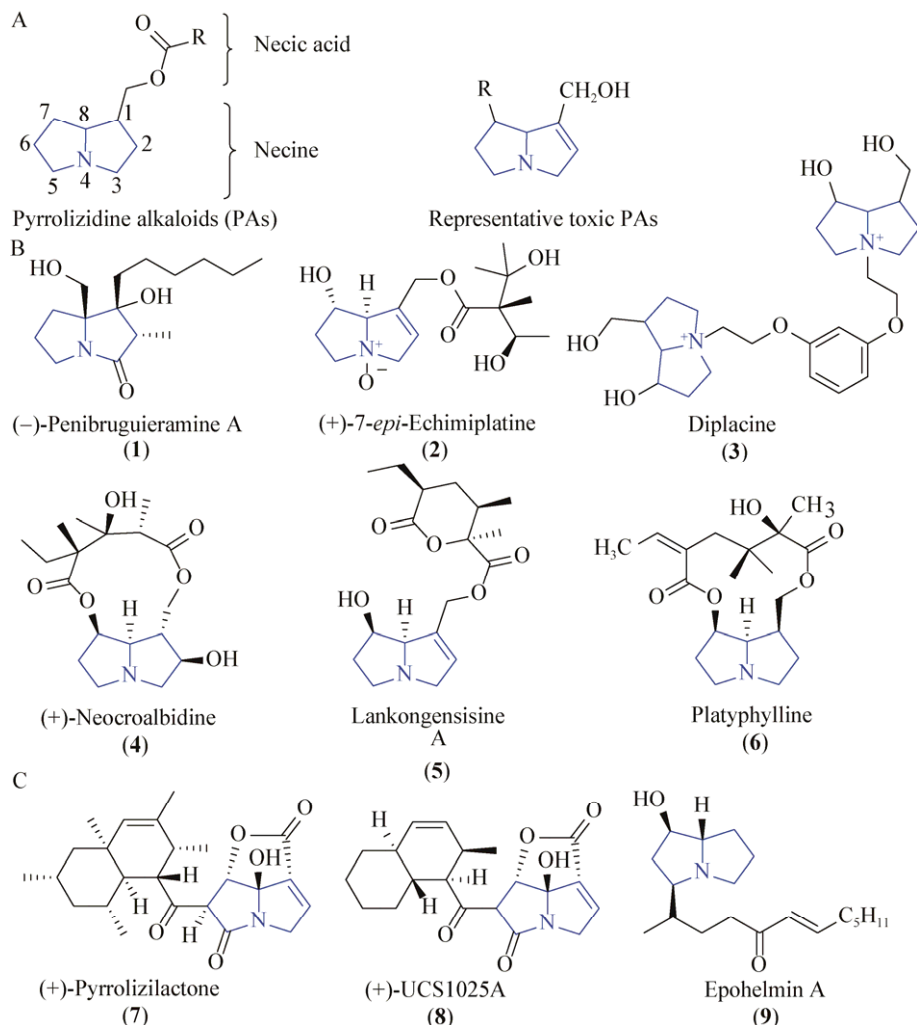


图 1 吡咯里西啉类生物碱

Figure 1 Pyrrolizidine alkaloids

注: A: 吡咯里西啉类生物碱基本骨架; B: 植物中代表性吡咯里西啉类生物碱; C: 真菌中代表性吡咯里西啉类生物碱

Note: A: The pyrrolizidine alkaloid skeleton; B: Representative pyrrolizidine alkaloids from plants; C: Representative pyrrolizidine alkaloids from fungi

绝大多数 PAs 在其双环结构上通过酯化、羟基化、脱氢、N-甲基化或氧化、桥头碳-氮键断裂等修饰, 形成了结构多样、生物活性独特的生物碱<sup>[3]</sup>。与植物来源的 PAs 相比, 细菌和真菌中产生的 PAs 数目较少。Bohemamines 和 Clazamycins 是最早在细菌中发现的 2 种吡咯里西啶类生物碱。

植物和细菌中吡咯里西啶类生物碱的生物合成途径存在较大差异。在植物中, 吡咯里西啶骨架由鸟氨酸或精氨酸通过分解和脱羧反应而转化成 1,4-丁二胺; 然后, 2 分子的 1,4-丁二胺在高精胺合酶(Homospermine Synthase)的催化下生成高精胺, 并经过氧化脱氢和曼尼希缩合反应形成吡咯双烷基本骨架<sup>[3-4]</sup>; 在此基础上, 进一步后修饰而形成千里光碱(Platyphylline)和 Diplacine 等生物碱(图 2)<sup>[3]</sup>。大部分细菌源吡咯里西啶类生物碱通过非核糖体多肽合成酶(Non-Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs)及其后修饰酶合成。负责细菌源吡咯里西啶类生物碱的 NRPS 一般包括由缩合结构域(Condensation Domain, C)、丝氨酸及脯氨酸特异性氨基酸腺苷化结构域(Adenylation Domain, A)和硫酯化结构域(Thiolation Domain, T)的 2 个模块组成, 并在其 C 端包含一个负责硫酯键水解即吡咯里西啶(Indolizidine)形成的硫酯水解酶结构域

(Thioesterase Domain, TE)。一个氨基酸序列高度保守的黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin Adenine Dinucleotide, FAD)依赖型单加氧酶(Bayer-Villiger Monooxygenase, BVMO)通过拜耳-维利格(Bayer-Villiger)氧化重排反应, 将吡啶里西啶通过扩环、脱酸和环化级联反应, 形成吡咯里西啶类骨架。在此基础上, 进一步后修饰而形成 Bohemamine、Legonmycins、Jenamidines 和 Pyrrolizixenamides 等。

由于吡咯里西啶类生物碱在植物中分布较广泛, 也是目前已知引起肝脏中毒的主要植物性成分(图 1A)<sup>[5]</sup>, 因此对其分离、合成及毒性的综述较多。例如, 从 1982-1995 年, Robins 每年均对吡咯里西啶类生物碱进行评述<sup>[6-7]</sup>; Liddell 也总结了植物源吡咯里西啶类生物碱, 尤其是与动物相关的化学生态学意义<sup>[8]</sup>。在 2008 年由于德泉院士和孙汉董院士主编的天然产物化学丛书出版; 其中, 在王锋鹏主编的《生物碱化学》专著中, 由兰州大学程东亮和高坤详细阐述了植物吡咯里西啶类生物碱的结构分类、生源关系、理化性质、化学合成、构效关系和其生物活性等<sup>[3]</sup>。近年来, Tamariz、Moreira 和 Schrenk 相继对吡咯里西啶类生物碱进行评述, 其中 Moreira 等从化学、药理、毒理学和食品安全

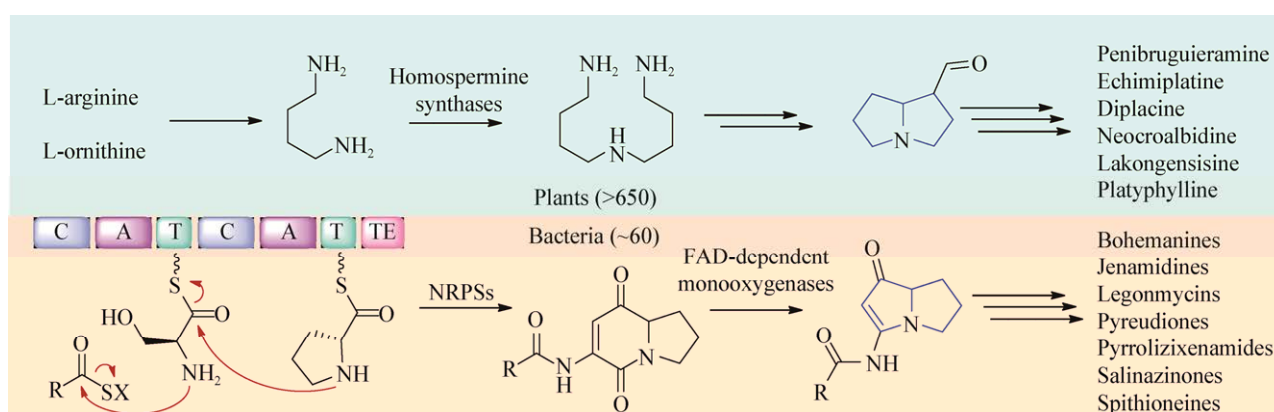


图 2 植物和细菌中代表性吡咯里西啶类生物碱的生物合成

Figure 2 Biosynthesis of representative pyrrolizidine alkaloids in plants and bacteria

注: C: 缩合结构域; A: 氨基酸腺苷化结构域; T: 硫酯化结构域; TE: 硫酯水解酶结构域

Note: C: Condensation domain; A: Adenylation domain; T: Thiolation domain; TE: Thioesterase domain

角度进行了讨论, 而 Schrenk 等总结了其毒性<sup>[9-12]</sup>。2017 年, Robertson 等较全面地总结了 PAs 的发现以及其生物合成和化学合成<sup>[13]</sup>。很多中文综述主要评述了吡咯里西啶类生物碱的毒性研究。如 2018 年, 国家食品药品监督管理总局药品评价中心王涛等从该类生物碱的肝损伤流行情况、毒性机制、临床诊断及治疗、风险因素和安全用药建议这 5 个方面进行了阐述<sup>[14]</sup>。2019 年, 武汉大学孙潇翔等概述了近年来对 PAs 的毒性机制、解毒途径及其典型毒性作用的研究进展<sup>[15]</sup>。随着高通量测序和微生物组学研究的兴起, 近年来有较多的关于细菌源吡咯里西啶类生物碱的研究, 但尚未见关于细菌源吡咯里西啶类生物碱的发现及其生物合成的中英文专题综述。据我们统计, 从细菌中发现的吡咯里西啶类生物碱有 12 种约 60 余个。因此, 本文主要综述截止 2020 年年底所报道的细菌源吡咯里西啶类生物碱及其类似物的结构, 并对其生物合成机制以及生物活性进行概述。

## 2 细菌源吡咯里西啶类生物碱

### 2.1 基于非核糖体肽合成酶的吡咯里西啶类生物碱

#### 2.1.1 Legonmycins

2015 年, Huang 等从土壤链霉菌 MA37 中发现

了 2 个新吡咯里西啶类生物碱, 分别命名为 Legonmycin A (**10**)和 Legonmycin B (**11**) (图 3)<sup>[16]</sup>。为了研究 Legonmycins 的生物合成, Huang 等将链霉菌 MA37 中可能负责 Legonmycins 生物合成的 *lgn* 基因簇导入了白色链霉菌进行异源表达而获得菌株 *S. albus*:7G1, 并产生了 **10** 和 **11**, 在 *S. albus*:7G1 中的基因敲除实验进一步验证了 II 型硫酸酯水解酶 LgnA、NRPSs LgnB 和 LgnD 以及 BVMO LgnC 是 Legonmycins 生物合成所必需的<sup>[16]</sup>。在 *S. albus*:7G1 中, 敲除 *lgnC* 不再产生 **10** 和 **11**, 而积累了 Legonindolizidine A (**12**)和 Legonindolizidine B (**13**), 这说明 Legonmycins 的生物合成前体是 L-脯氨酸、L-苏氨酸和短链脂肪酸<sup>[16]</sup>。在 FAD、NADPH 和氧气的存在下, LgnC 可以催化从 **12-13** 向 **10-11** 的转化, 并可以观察到反应中间体 **14-17**, 因此, LgnC 是在细菌源吡咯里西啶类生物合成过程中发现的第一个 BVMO 类型的生物合成酶, 可以催化一系列罕见的包括对吡咯里西啶中间体(如 **12-13**)的扩环、水解和缩环而形成吡咯双烷基本结构<sup>[16]</sup>。LgnC 的发现是对可以催化拜尔-维利格氧化重排反应的 BVMO 酶家族的又一扩充, 并对研究细菌源吡咯里西啶类生物碱的生物合成和进化具有重要价值。

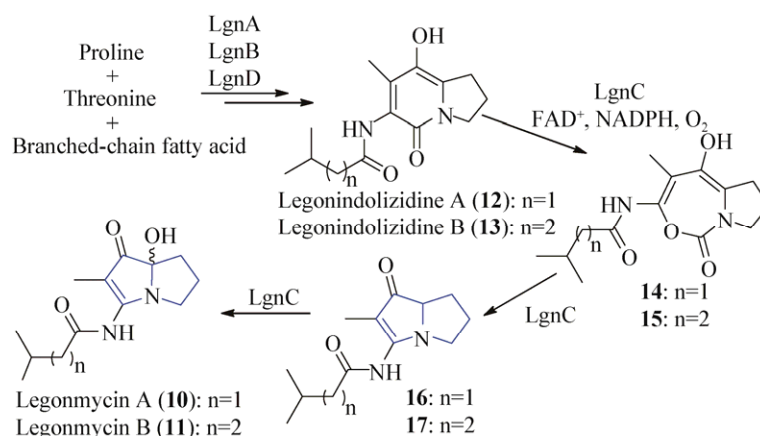


图 3 Legonmycins 生物合成途径

Figure 3 The biosynthetic pathway of legonmycins

### 2.1.2 波米西亚胺(Bohemamines, BHM)s

1980年, Nettleton等在筛选放线菌代谢产物对肿瘤细胞的毒性时, 从海洋来源的 *Actinosporangium bohemicum* C36145 (ATCC 31127) 中发现了波米西亚胺(Bohemamine, BHM) A (18)<sup>[17-18]</sup> (图4)。2003年, Zhang等从链霉菌 UMA-044 中也分离到 18, 同时发现了 BHM 的同系物 NP-25302 (19)<sup>[19]</sup>。2006年, Bugni等分离了一株海洋来源的放线菌 CNQ-583, 该菌株不仅产生了 18 和 19, 也产生了 3 个新的吡咯里西啶类生物碱, BHM B (20)、BHM C (21) 和 5-Cl-Bohemamine C (23)<sup>[20]</sup>。2016年, Fu等从海洋来源链霉菌 *S. spinoverrucosus* 中发现了非小细胞肺癌细胞 A549 具有优异细胞毒性的二聚体 Dibohemamines A-C (25-27), 并利用 BHM 单体和甲醛通过半合成进一步确定其结构<sup>[21]</sup>。在此基础上, 一系列具有一定细胞毒性的 Dibohemamine 类似物可通过 BHM 单体与其他芳香醛或烷基醛缩合制备<sup>[21]</sup>。Fu等同时还发现了 BHM D (22) 和其他含有 1,3-恶嗪-6-酮结构的 BHM 类似物<sup>[22]</sup>。2017年,

Jiang等从链霉菌 CICC 200497 中也发现了 Bohemamine 二聚体 Dibohemamines D-F (28-30)<sup>[23]</sup>。2018年, Jiang等再次从该菌株中发现了包含喹啉酮/BHM 的杂合天然产物 Quinohemanine (31)<sup>[24]</sup>。

Komaki等在2015年对波米西亚胺的产生菌株链霉菌 TP-A0873 进行了全基因组测序, 但未报道其生物合成基因簇<sup>[25]</sup>。2020年, Liu等利用核糖体工程技术对链霉菌 CB02009 进行耐受抗生素利福霉素的筛选, 并激活了该菌株中沉默的 BHM 生物合成基因簇(Biosynthetic Gene Cluster, BGC), 在耐利福霉素的突变菌株 CB02009-R-5 中积累了化合物 18 和 20-21 (图5)<sup>[26]</sup>。Bhm 基因簇与已报道的生物合成吡咯里西啶类生物碱 Legonmycins 和 Pyrrolizixenamides 的 BGCs 相似, 包含保守的 NRPS BhmJ 和 BMVO BhmK<sup>[16,27]</sup>。通过基因敲除、回补以及异源表达实验, 分别确定了 BhmJ、BhmK 和 C-甲基转移酶的功能。最后, 通过同位素标记实验及前体喂养, 发现(2*S*,5*S*)-5-甲基-脯氨酸是 BHM 生物合成所必需的非天然氨基酸。BHM 的

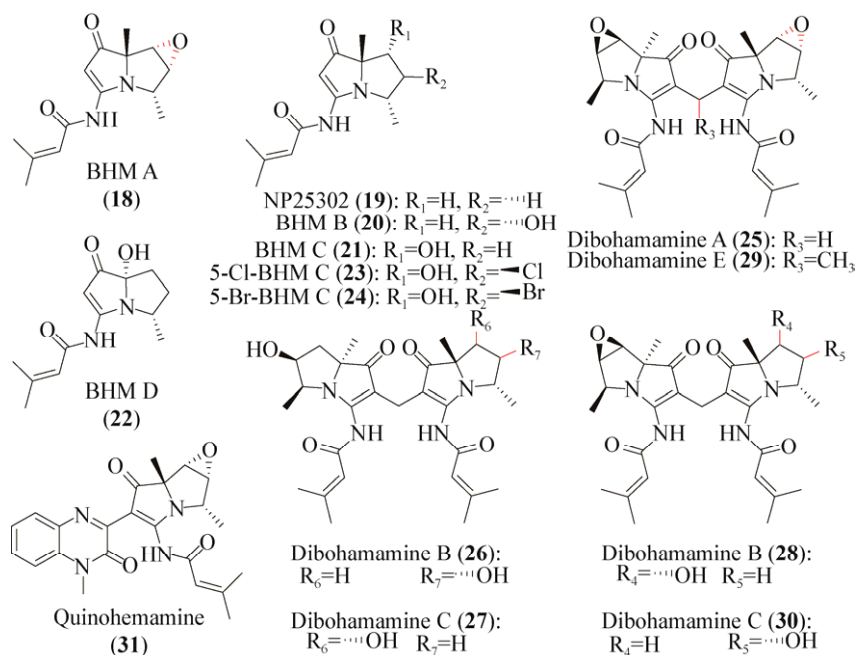


图4 Bohemamines 化学结构

Figure 4 The structures of bohemamines

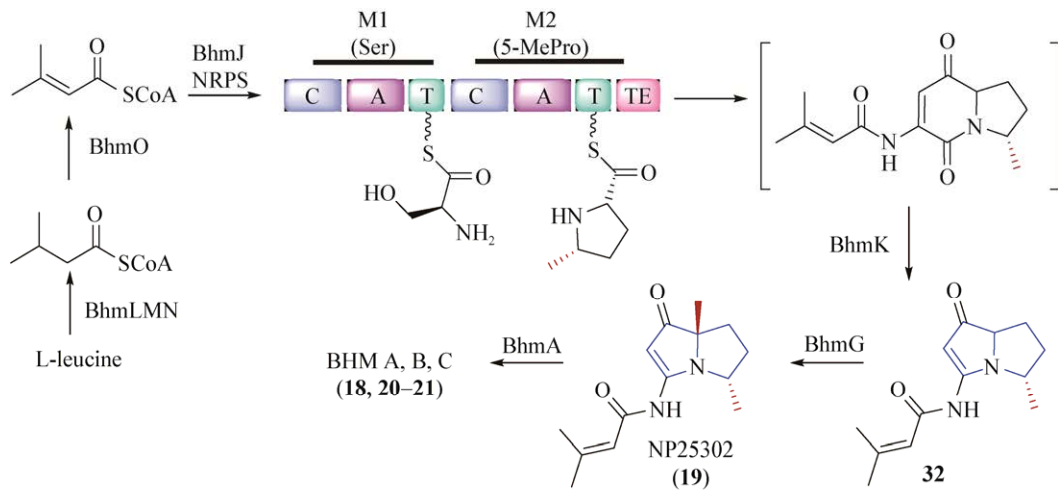


图5 波米西胺的生物合成途径

Figure 5 The biosynthetic pathway of bohemamines

生物合成可能以(2*S*,5*S*)-5-甲基-脯氨酸和丝氨酸为底物,在 BhmJ 的催化下生成不稳定的叫噪里西啶中间体;该中间体在 BhmK 的作用下形成具有吡咯双烷骨架的 **32**,经由 BhmG 介导的吡咯双烷桥头碳的甲基化而形成 **19**;最后 BHM A-C (**18**、**20-21**)可能由一个具有多重功能的细胞色素 P450 单加氧酶(Cytochrome P450 Monooxygenase) BhmA 负责合成。

### 2.1.3 Clazamycins

Clazamycins 是从细菌中发现的首类吡咯里西啶类生物碱。1979 年, Horiuchi 等从链霉菌 MF990-BF4 的发酵液中分离到 2 个含氯抗生素 Clazamycin A (**33**)和 Clazamycin B (**34**) (图 6), 同年, Nakamura 等对 **33** 的结构进行确认<sup>[28-29]</sup>。1980 年, Dolak 等从链霉菌 NRRL 11160 中也分离到 **33**, 并在动物实验中发现其具有抗肿瘤和抗疱疹病毒活性<sup>[30]</sup>。1984 年, Hori 等在对大肠杆菌的研究中发现, Clazamycins 通过作用于细胞膜上的靶点而影响营养物质的跨膜运输和 DNA 复制<sup>[31]</sup>。

1987 年, Buechter 等报道了 **33** 和 **34** 之间的转化关系(图 6): Clazamycins 在水溶液中以 2 个同分异构体, 即 **33** 和 **34** 的混合物形式存在, 而其比例与溶液的酸碱性和 pH 相关; 当 pH 为中性时, Clazamycin A (**33**)是主要成分<sup>[32]</sup>。化合物 **33** 和 **34** 的转化途径可能包括亚胺离子的形成(路径 I), 或

形成氮杂环辛烯酮中间体(路径 II)。目前尚无对 Clazamycins 的生物合成的报道<sup>[32]</sup>。

### 2.1.4 Jenamidines

2003 年, Hu 等从链霉菌 HKI0297 中分离得到 3 个新的生物碱, 命名为 Jenamidines A-C<sup>[33]</sup>。然而在 2005 年, Snider 等通过全合成将 Jenamidines 的结构修正为吡咯里西啶类生物碱 Jenamidines A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> (**35/36**)、B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> (**37/38**)和 C (**39**) (图 7)<sup>[34]</sup>。2006 年, Duvall 等推测了上述化合物的生物合成中的后修饰步骤, 即通过对前体化合物 **40** 不同位置的羟基化来形成 **35-39** (图 7)<sup>[35]</sup>。

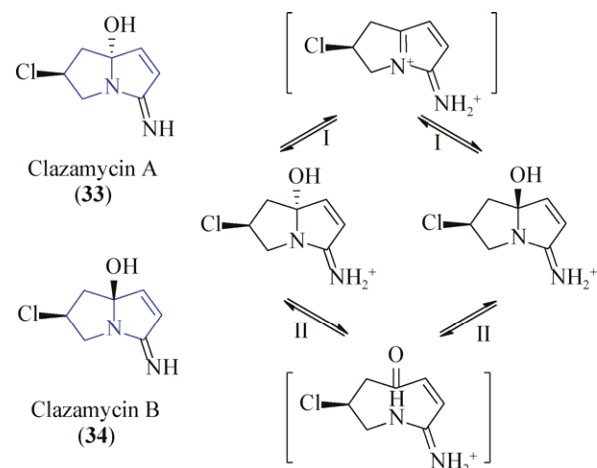


图6 Clazamycins A 和 Clazamycins B 结构及其转换关系  
Figure 6 The structures of clazamycins A and clazamycins B and their conversion

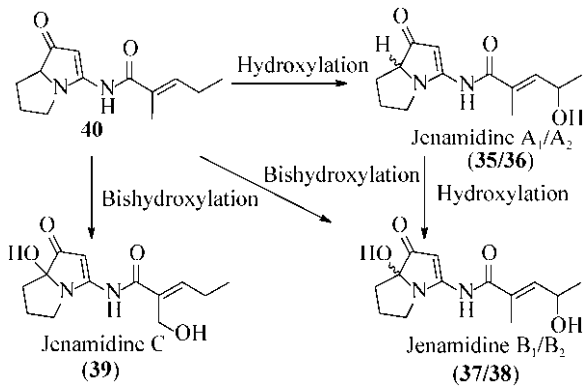


图 7 Jenamidines 生物合成中的后修饰

Figure 7 The tailoring steps in the biosynthesis of jenamidines

### 2.1.5 Pyreudiones

Klapper 等通过荧光假单胞菌 HKI0770 与变形虫共培养产生对变形虫有毒性的新菌株, 荧光假单胞菌 HKI0770 与变形虫共培养后抑制了变形虫的生长, 并导致其细胞的裂解, 通过液体培养发现产生了 Pyreudiones A–D (41–44)<sup>[36]</sup>。Klapper 等推测一个 3.9 kb 的单模块 Pys (Pyreudione Synthetase) NRPS 可能负责 41–44 的生物合成<sup>[37]</sup>(图 8)。Pys 包含 C、T、TE 以及 A 这 4 个结构域。通过同源重组敲除了荧光假单胞菌 HKI0770 中的 *pys* 基因后, 突变菌株不再产生 Pyreudiones。在 Pyreudiones 的生物合成中, Pys 的 C 结构域负责催化 L-脯氨酸和  $\beta$ -酮酸的缩合, 而该结构域具有较宽泛的底物特异性, 因为不同链长和饱和度的 4 种  $\beta$ -酮酸均可以参与反应。Klapper 等发现 Pys 的 A 结构域的“NRPS Code”(即 A 的氨基酸指纹)是 D-M-L-V-M-G-V-F-A-K, 这与一般的 L-脯氨酸特异性的 A 结构域的氨基酸指纹(D-V-Q-L-I-A-H-V-V-K)不同; ATP/[<sup>32</sup>P]焦磷酸置换实验表明 L-脯氨酸是 Pys A 结构域的底物, 但 Pys A 也可识别绝大多数 L-脯氨酸的类似物。因此, 通过在荧光假单胞菌 HKI0770 的培养基中添加 L-哌啶酸或 L-羟基脯氨酸/L-羰基脯氨酸, 产生了一系列 Pyreudiones 的同系物 45–51<sup>[37]</sup>。Pys 的 TE 结构域可能催化 Dieckmann 类型的环化反应, 从而

形成吡咯双烷结构<sup>[37]</sup>。

### 2.1.6 Pyrrolizixenamides

2015 年, Schimming 等在嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus stockiae*) 的基因组中发现了一个孤儿基因簇, 该 BGC 编码一个含有双模块的 NRPS (PxaA) 和一个 BMVO 酶 (PxaB); *Pxa* 基因簇被通过酵母同源重组克隆策略从 *X. stockiae* DSM 17904 中克隆到大肠杆菌中异源表达, 然后分离到 Pyrrolizixenamides A–C (52–54); 一种较新颖的二维核磁差异分析 (Differential Analysis by 2D NMR, DANS) 技术被用于比较含有或不含有 *pxaA* 和 *pxaB* 的大肠杆菌菌株的次级代谢产物, 这加速了 Pyrrolizixenamides 的结构鉴定<sup>[27]</sup>。Pyrrolizixenamides 的生物合成与 Legonmycins 类似, 即包括由 PxaA 催化的吡咯里西啶中间体的形成和 PxaB 催化的吡咯双烷结构的形成(图 9)<sup>[16]</sup>。

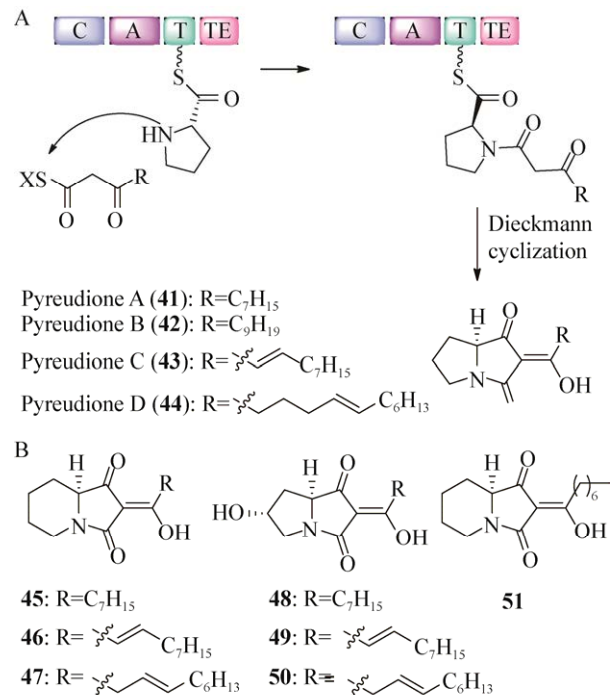


图 8 Pyreudiones 生物合成途径(A)和前期喂养生物合成产生的 Pyreudiones 的同系物(B)

Figure 8 The biosynthetic pathway of pyreudiones (A) and precursor-directed biosynthesis of pyreudione congeners (B)

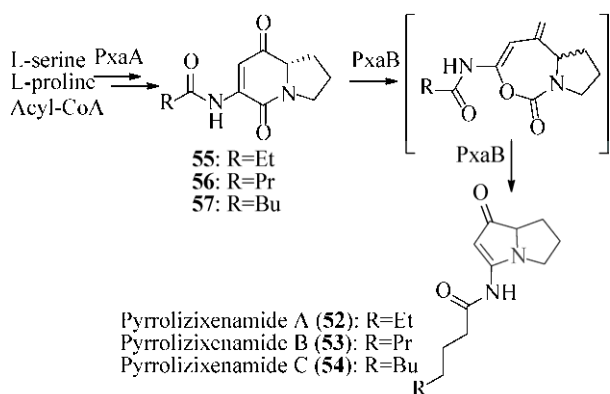


图9 Pyrrolizixenamides 生物合成途径

Figure 9 The biosynthetic pathway of pyrrolizixenamides

### 2.1.7 Spithioneines

Fu 等从海洋来源的链霉菌 SNB-048 的发酵提取物中观察到与 Bohemamine 相似的紫外吸收, 进而分离出 2 个新的 Bohemamine 类型生物碱, 即 Spithioneines A (58) 和 Spithioneines B (59) (图 10); 化合物 58 能通过一个源于组氨酸的麦角硫氨酸 (Ergothioneine) 从 18 的背面亲核进攻环氧基团而形成, 而 59 则通过对 58 的氧化后形成含有亚砷键的杂合波米西亚胺/麦角硫氨酸生物碱<sup>[38]</sup>。

## 2.2 基于聚酮合酶并通过周环反应形成的吡咯里西啶类生物碱

### 2.2.1 Ciromicins

共培养是激活沉默天然产物基因簇的有效手段, Derewacz 等将诺卡氏放线菌 *Nocardopsis*

FU40 编码细胞凋亡素 (Apoptolidin) 的 BGC 中聚酮合酶基因 *apoS8* 敲除后, 获得具有干净次级代谢产物背景的 *Nocardopsis* FU40  $\Delta apoS8$ ; 通过该突变菌株与红球菌 *Rhodococcus wratis* 共培养, 发现其产生了多烯大环内酰胺 Ciromicin A (60) 和 Ciromicin B (61) (图 11); 由于 61 的产量很低, 并未从共培养的发酵产物中大量获得, 但是 60 的甲醇溶液在硼硅酸盐玻璃管中暴露于环境日光下 2 h 后, 基本转化为 61; 随后, Derewacz 等利用 LC/MS 确定了 60 转化的波长依赖性及其光催化的环化效率, 即在 400 nm 波长下主要产生 61, 而在 300 nm 下 60 的转化效率最高, 但伴有少量其他异构体的生成<sup>[39]</sup>。

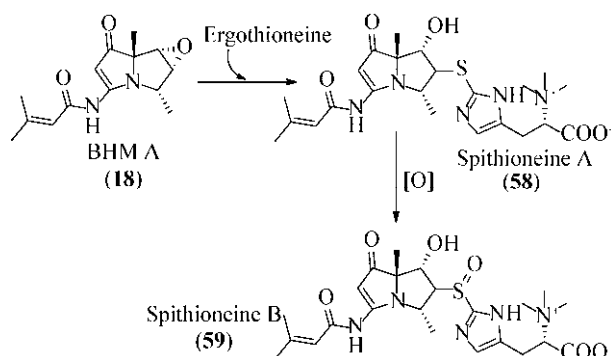


图10 Spithioneines A 和 B 生物合成途径

Figure 10 The biosynthetic pathway of spithioneines A and B

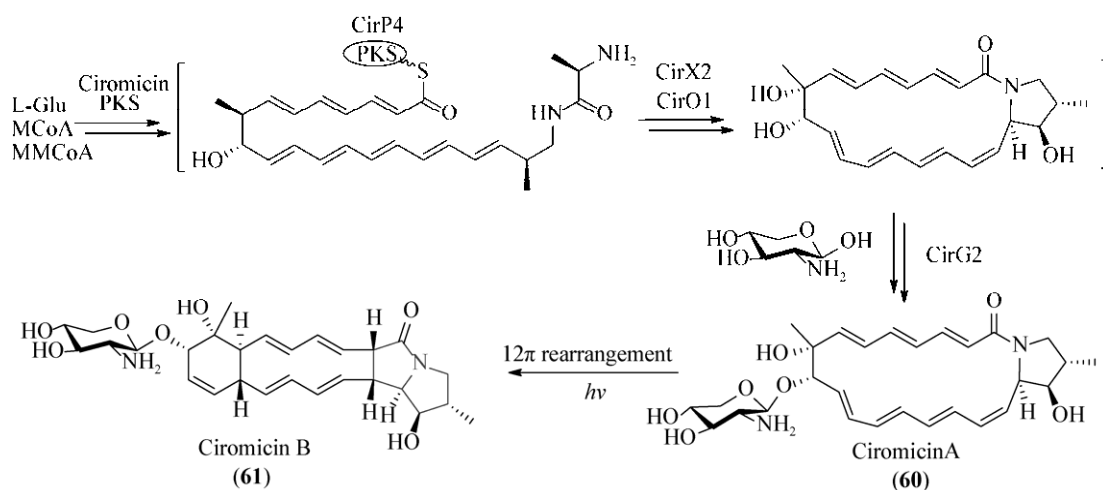


图11 Ciromicins 生物合成途径

Figure 11 The biosynthetic pathway of ciromicins



由于 Ciromicin A (**60**)的结构与早期报道的多烯大环内酰胺 Vicenistatin 高度相似, 而且在 *Nocardiosis* FU40 中也有一个与 Vicenistatin 生物合成类似的 I 型聚酮合酶 BGC, Derewacz 等推测 **60** 的生物合成途径与 Vicenistatin 也相似<sup>[39-41]</sup>。化合物 **60** 的初始化单元是由谷氨酸异构而来的 3-氨基-2-甲基丙酸, 通过 NRPS 机制与 L-丙氨酸缩合; 然后在 Ciromicin 聚酮合酶 (Polyketide Synthase, PKS)的催化下, 经过一系列克莱森缩合反应, 可以形成由 3-氨基-2-甲基丙酸酯保护的 22 元共轭多烯骨架; 在肽水解酶 CirX2 介导的 3-氨基-2-甲基丙酸酯保护基的水解和环化后, 并在氧化酶 CirO1 催化的顺反异构以及糖基转移酶 CirG2 催化的糖基化而最终形成 **60**, 化合物 **61** 可能经由光诱导的、高度非对映选择性的  $12\pi$  重排反应而获得<sup>[39]</sup>。

## 2.2.2 Heronamides

含  $\beta$ -氨基酸的多烯大环内酰胺( $\beta$ -Amino Acid Polyene Macrolactams,  $\beta$ -PMs)是近年来发现的一类具有多种生物活性的天然产物<sup>[42]</sup>。2010 年, Raju 等从源于澳大利亚 Heron 岛的浅海沉积物中分

离到链霉菌 CMB-M0406, 并从其发酵液中发现了  $\beta$ -PMs 类天然产物 Heronamides A-C (**62-64**) (图 12), 而且推测一个高度协同的  $6\pi+6\pi$  及  $4\pi+6\pi$  的级联周环反应分别从 **64** 合成了 **62-63**<sup>[43]</sup>。2014 年, Sugiyama 等在放线菌中再次发现了 **62**, 并重新确定了 **62** 的立体结构<sup>[44]</sup>。2014 年, Zhang 等从深海链霉菌 SCSIO 03032 中发现了 Heronamides D-F (**65-67**)<sup>[45]</sup>。化合物 **65-67** 与 **62-64** 的区别是其不饱和侧链含有末端甲基而不是丙基, Yu 等使用密度泛函理论模拟了 **62** 的生物合成, 认为 **62** 的生物合成存在一个 [6+4] 的周环反应<sup>[46]</sup>。Komaki 等进一步对产 **64** 的链霉菌 TP-A0871 进行了全基因组测序, 但并未报道其生物合成基因簇<sup>[47]</sup>。Zhu 等首次报道了 Heronamides 在链霉菌 SCSIO 03032 的 BGC, 提出了其生物合成假设并表征了负责 Heronamides C-8 羟基化的细胞色素 P450 单加氧酶 HerO (图 12)<sup>[48]</sup>。2016 年, Kanoh 等进行了 **62-64** 的全合成, 同时还证明了从 **64** 向 **62-63** 的转化是非酶催化形成的<sup>[49]</sup>。同年, Booth 等也提出 **64** 向 **62-63** 的转化是通过 2 个自发途径完成的<sup>[50]</sup>。2020 年, Zhang 等利用密度泛函计算了 Heronamides

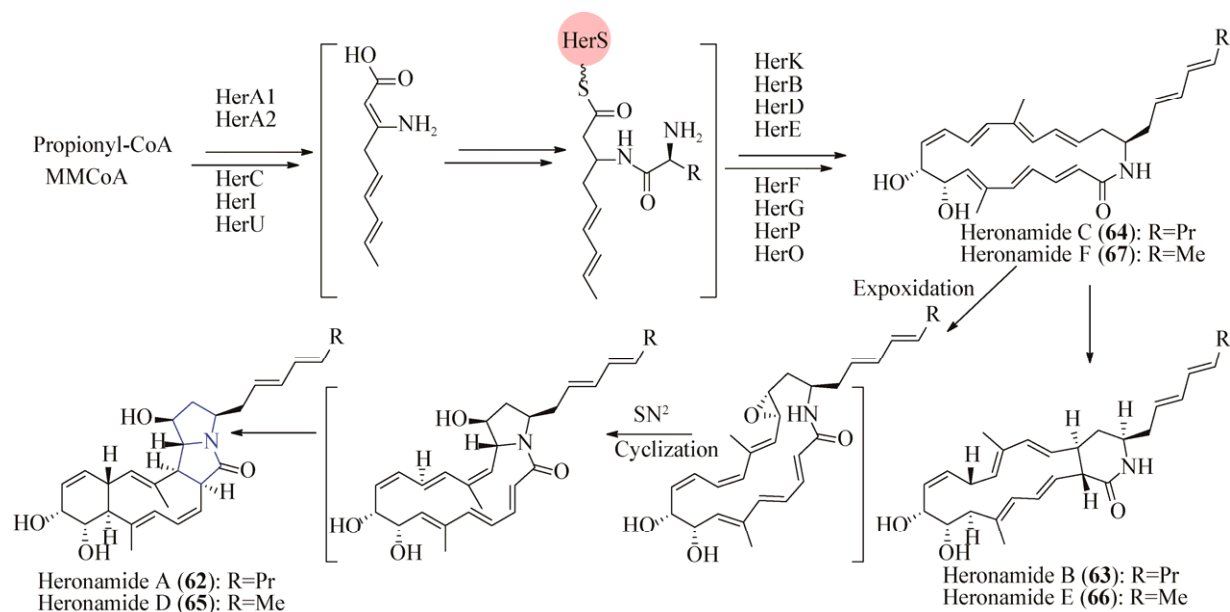


图 12 Heronamides 生物合成途径

Figure 12 The biosynthetic pathway of heronamides

的形成过程, 并认为在气相和水相均有利于[6+4]产物的形成<sup>[51]</sup>。该类化合物虽可与哺乳动物细胞的细胞膜结合, 但其对细胞的影响有限; 化合物 **64** 对酵母细胞有一定抑制作用, 其最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 为 0.27 mmol/L<sup>[45,52]</sup>。

### 3 细菌源吡咯里西啶类生物碱类似物的发现及生物合成

#### 3.1 Azetidomonamide/Azabicyclene

2018 年底, Hong 等报道了从铜绿假单胞菌 PAO1 筛选出耐受粘菌素的菌株 *P. aeruginosa* AB16.2, 发现一个在已测序的铜绿假单胞菌基因组中均存在且高度保守的 NRPS 基因簇, 该基因簇包含了 10 个基因 PA3326–PA3335; Hong 等通过实时荧光定量 PCR 实验发现, 该基因簇受假单胞菌喹诺酮信号 (*Pseudomonas* Quinolone Signal) 的群体感应调控; 通过对比 AzeB NRPS (PA3327) 基因敲除菌株 AB16.2D27 和原始菌株 AB16.2 的代谢产物图谱, 发现了结构新颖的氮杂稠环生物碱 Azetidomonamides<sup>[53]</sup>。Azetidomonamide A (**68**) 具有独特的 [5.2.0] 双环氨基甲酸酯结构, 而

Azetidomonamide B (也称 Azabicyclene, **69**) 则具有氮杂环丁烷并吡咯琳 (Azetidopyrroline) 骨架。Azetidomonamides 的生物合成与前述波米西亚胺和 Legonmycins 等类似, 通过 AzeB/AzeC 这一对 NRPS/BVMO 核心酶负责其核心结构吡咯里西啶骨架的形成和拜尔-维利格氧化重排而形成 (图 13)。

Patteson 等在 2019 年利用群体感应信号分子酰基高丝氨酸内酯激活铜绿假单胞菌 PAO1 (*P. aeruginosa* PAO1) 的基因簇 PA3326–PA3335, 并进一步通过对比 *azeB* 敲除菌株与 *P. aeruginosa* PAO1 代谢产物的差异, 也发现了化合物 **69** (被命名为 Azabicyclene); 此外, Patteson 等通过 MultiGeneBlast 工具发现在含有 2 500 个假单胞菌基因组数据库中, 全部 1 600 个铜绿假单胞菌的基因组均含有基因簇 PA3326–PA3335, 而仅有 12 个其他假单胞菌含有该基因簇<sup>[54]</sup>。这与 Hong 等的研究一致, 说明该基因簇可能对铜绿假单胞菌的致病性有重要作用, 例如该基因簇功能缺失的铜绿假单胞菌 AB16.2D27 对毛虫 *Galleria mellonella* 的感染性和致死性均降低, 意味着 PA3326–PA3335 在铜绿假单胞菌对宿主的周期性感染有一定作用<sup>[53]</sup>。

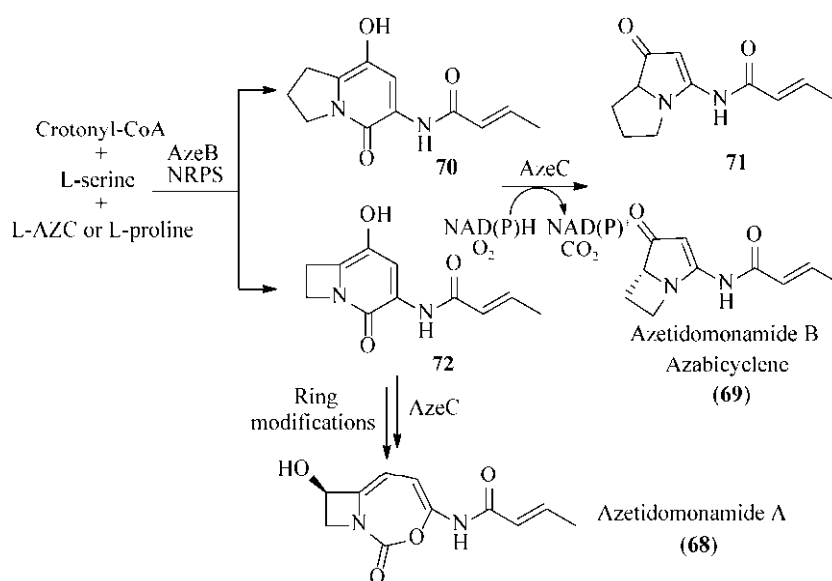


图 13 Azabicyclene 生物合成途径

Figure 13 The biosynthetic pathway of azabicyclene

Hong 等对 *aze* 基因簇中的关键基因系统敲除时发现  $\Delta azeJ$  突变菌株产生了化合物 **71**, 其原因是 *AzeJ* 属于 SAM 依赖型酶, 负责非天然氨基酸氮杂环丁烷-2-羧酸(Azetidine 2-Carboxylic Acid, AZC) 的形成; 在 *azeJ* 敲除后, *AzeB* 上的 AZC 特异性的 A 结构域在没有 AZC 底物的情况下, 也可利用 L-脯氨酸参与 *AzeB/AzeC* 催化的吡咯里西啶的生物合成; Hong 等进一步表达并纯化了组氨酸标签的 *AzeB*, 发现其在催化过程中可以产生吡咯里西啶中间体 **70** 和 **72**<sup>[53]</sup>。

### 3.2 Salinazinones

Kim 等从韩国阿菲岛的一个太阳能盐场分离出链霉菌 KMF-004, 并发现了 2 个 1,3-恶嗪-6-酮化合物 Salinazinones A (**73**)、Salinazinones B (**74**) 和 BHM D (**22**) (图 14); 化合物 **22** 可能是生物合成 **73** 和 **74** 的关键前体, 其酰胺上的氧作为亲核试剂进攻吡咯环上的酮基碳, 在 C-C 键断裂后形成了恶嗪酮中间体, 氧化后形成 **73**; 化合物 **73** 的羟基化导致了 **74** 的形成<sup>[55]</sup>。Salinazinones 中恶嗪酮的形成可能包括了环化/C-C 键断裂过程, 其生物合成过程有待进一步研究。

### 3.3 SB-253514

2000 年, SmithKline Beecham 制药公司首次从荧光假单胞菌 DSM 11579 (*P. fluorescens* DSM 11579) 中分离得到了含有 5,5-二环氨基甲酸酯结

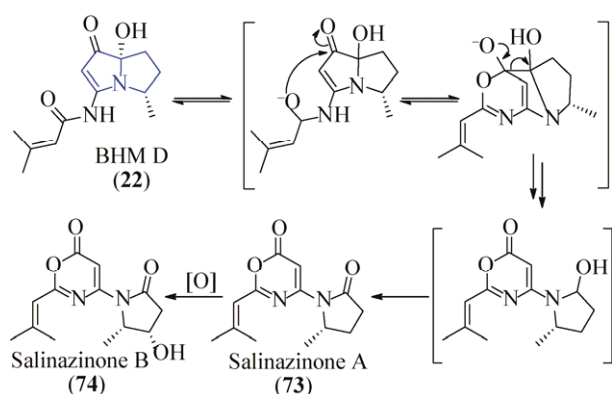


图 14 Salinazinones 生物合成途径

Figure 14 The biosynthetic pathway of salinazinones

构和鼠李糖的糖苷化合物 SB-253514 (Brabantamine A, **75**) (图 15)<sup>[56]</sup>。2012 年, 该化合物也从油菜假单胞菌中被分离, 同时被证明具有抗真菌活性<sup>[57]</sup>。2014 年, Schmidt 等从产 Thanamycin 的根际假单胞菌 SH-C52 中再次发现 **72** 及其同系物 Brabantamide B (**76**) 和 Brabantamide C (**77**), 同时在 *P. fluorescens* DSM 11579 中分别敲除编码 NRPS 和 BVMO 的 *lpiB* 和 *lpiC* 后, 突变菌株不再产生 Brabantamines 这类化合物; Schmidt 等通过利用不同氨基酸和  $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]\text{-ATP}$  在 BraB (即 *LpiB*) A-T 双结构域催化下的置换反应, 发现 L-丝氨酸是其底物; 进一步通过在根际假单胞菌 SH-C52 中喂养  $^{13}\text{C}$  标记的 L-脯氨酸、L-丝氨酸和醋酸盐, 发现 L-脯氨酸也是 **75-77** 的生物合成底物<sup>[58]</sup>。最后, Schmidt 等认为 **75-77** 的生物合成如图 15 所示, 包括 BraB 催化的 3-OH-肉豆蔻酸、脱氢丙氨酸(由丝氨酸脱水产生)和脯氨酸的缩合成线性脂肽, 并在其 TE 结构域催化下生成 5,6-双环中间体; BraC BVMO 催化该中间体发生拜尔-维利格重排反应扩环可以生成 SB-315021 (**78**) 双环内酯, 在脱羧并环化后产生了 5,5-二环氨基甲酸酯中间体, 进一步重排后产生 **75**。

## 4 细菌源吡咯里西啶类生物碱的活性

在发现植物吡咯里西啶类生物碱是导致肝中毒的主要化学成分后, 大量的研究集中在其毒性和化学结构方面。这些研究发现吡咯里西啶类生物碱本身没有细胞毒性, 但其在体内形成的“代谢吡咯”对哺乳动物具有很高的致癌性和毒性。其原因是吡咯里西啶类生物碱在被动物摄取之后, 部分化合物被代谢成中间体 **80** (图 16), 并在微粒体氧化下生成代谢吡咯中间体, 如 **81** 和 **82** 等。这些不稳定的化合物易与体内的核酸、酶、球蛋白等发生不可逆的亲核取代反应后形成交联, 导致细胞毒性、肝脏中毒和畸形等毒性<sup>[13]</sup>。

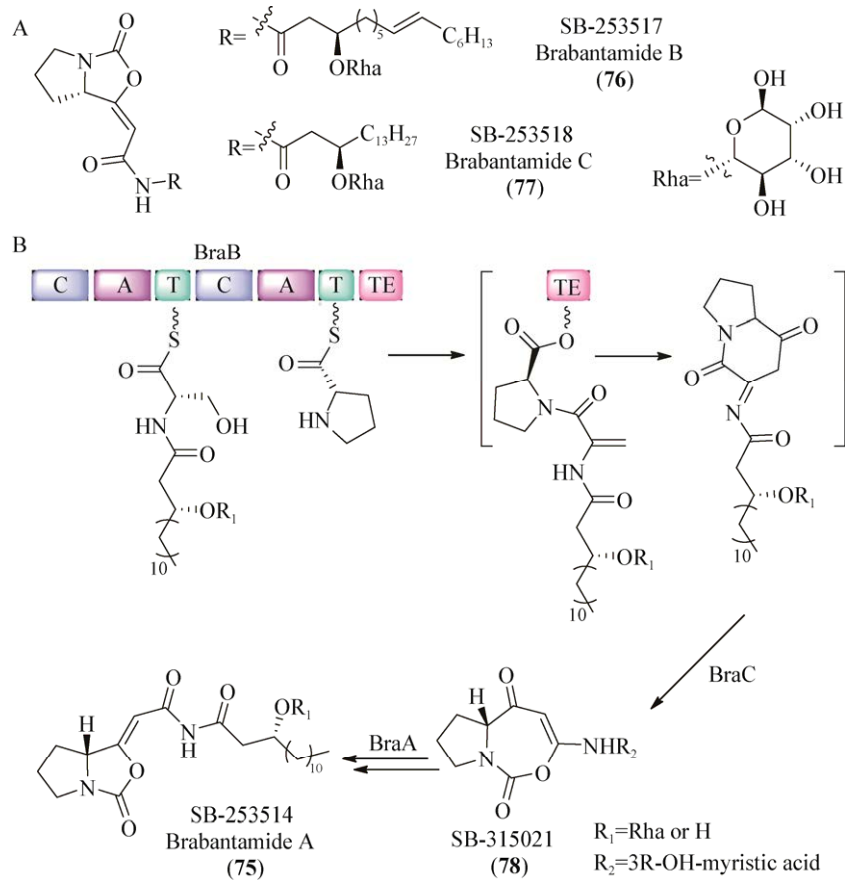


图 15 Brabantamide 结构(A)和 Brabantamide A (B)生物合成途径

Figure 15 The structures of brabantamides (A) and the biosynthetic pathway of brabantamides A (B)

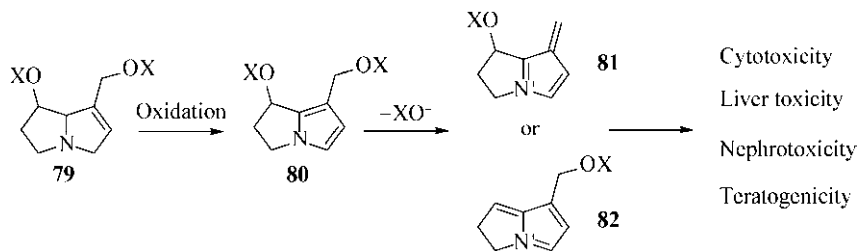


图 16 吡咯里西啶类生物碱代谢导致的毒性

Figure 16 The toxic effects of pyrrolizidine alkaloids due to metabolisms

细菌源吡咯里西啶类生物碱具有多种生物活性, 例如抗菌活性或对肿瘤细胞的毒性(表 1)。波米西亚胺的单体化合物, 如 Bohemamine A (18)对肝癌细胞 HepG2 和白血病细胞 HL60 的  $IC_{50}$  均不到  $30 \mu\text{mol/L}$ , 而 NP25302 (19)对白血病细胞 HL60 的  $IC_{50}$  也仅有  $24 \mu\text{mol/L}$ ; 但是波米西亚胺的二聚体

如 26 和 27 对人非小细胞肺癌 A549 具有优异的细胞毒性, 其  $IC_{50}$  分别为  $0.140 \mu\text{mol/L}$  和  $0.145 \mu\text{mol/L}$ ; 化合物 26 对人非小细胞肺癌细胞株 HCC1171 的  $IC_{50}$  为  $1.2 \mu\text{mol/L}$ 。这说明波米西亚胺的二聚化可以大幅度提升其对肿瘤细胞的毒性。Clazamycin A (33)和 B (34)对强致病菌炭疽杆菌的 MICs 分别为

6.5  $\mu\text{g/mL}$  和 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 而对福氏志贺氏菌和伤寒杆菌的 MIC 均为 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 。化合物 Jenamidine A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> (**39/40**) 对人慢性髓原白血病细胞 K-562 的  $GI_{50}$  为 1.9  $\mu\text{g/mL}$ 。Salinazinone B (**74**) 对小鼠小胶质细胞 BV-2 的  $IC_{50}$  为 17.7  $\mu\text{mol/L}$ 。

化合物 Ciromicin A (**60**) 和 B (**61**) 对人髓性单核细胞白血病细胞 MV-4-11 的  $IC_{50}$  分别为 8.1  $\mu\text{mol/L}$  和 9.3  $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 Brabantamide A-C (**75-77**) 对包括金黄色葡萄球菌在内的多种致病菌的抑菌活性一般, 其 MIC 在 6.5–25.0  $\mu\text{g/mL}$  之间。

表 1 吡咯里西啶类生物碱活性

Table 1 The biological activity of pyrrolidine alkaloids

Compounds	$IC_{50}$	MIC
BHMA ( <b>18</b> ) <sup>[20,24]</sup>	HepG: 29.7 $\mu\text{mol/L}$ HL60: 27.0 $\mu\text{mol/L}$	–
NP25302 ( <b>19</b> ) <sup>[49]</sup>	HL60: 24.0 $\mu\text{mol/L}$	–
Dibohemamine B ( <b>26</b> ) <sup>[22]</sup>	NSCLC A549: 0.140 $\mu\text{mol/L}$	–
Dibohemamine C ( <b>27</b> ) <sup>[22]</sup>	NSCLC A549: 0.145 $\mu\text{mol/L}$ HCC1171: 1.2 $\mu\text{mol/L}$	–
Clazamycin A ( <b>33</b> ) <sup>[29]</sup>	–	<i>Bacillus anthracis</i> : 6.5 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>Shigella flexneri</i> 4b JS11811: 12.5 $\mu\text{g/mL}$
Clazamycin B ( <b>34</b> ) <sup>[29]</sup>	–	<i>Bacillus anthracis</i> : 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>Salmonella typhi</i> T-63: 12.5 $\mu\text{g/mL}$
Jenamidine A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub> ( <b>39/40</b> ) <sup>[33]</sup>	K-562 $GI_{50}$ =1.9 $\mu\text{g/mL}$	–
Pyreudione A ( <b>41</b> ) <sup>[59]</sup>	<i>D. discoideum</i> AX2: 4 $\mu\text{g/mL}$	<i>M. vaccae</i> 10670 M4: 25 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>M. aurum</i> SB66: 50 $\mu\text{g/mL}$
Pyreudione B ( <b>42</b> ) <sup>[59]</sup>	<i>D. discoideum</i> AX2: 1 $\mu\text{g/mL}$	<i>M. vaccae</i> 10670 M4: 3.12 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>S. aureus</i> MRSA 134/94 R9: 25 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>M. aurum</i> SB66: 6.25 $\mu\text{g/mL}$
Pyreudione C ( <b>43</b> ) <sup>[59]</sup>	<i>D. discoideum</i> AX2: 1 $\mu\text{g/mL}$	<i>M. vaccae</i> 10670 M4: 1.56 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>S. aureus</i> MRSA 134/94 R9: 50 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>M. aurum</i> SB66: 3.12 $\mu\text{g/mL}$
Pyreudione D ( <b>44</b> ) <sup>[59]</sup>	<i>D. discoideum</i> AX2: 5 $\mu\text{g/mL}$	<i>M. vaccae</i> 10670 M4: 0.78 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>S. aureus</i> MRSA 134/94 R9: 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>M. aurum</i> SB66: 3.12 $\mu\text{g/mL}$
Ciromicin A ( <b>60</b> ) <sup>[39]</sup>	MV-4-11: 8.1 $\mu\text{mol/L}$	–
Ciromicin B ( <b>61</b> ) <sup>[39]</sup>	MV-4-11: 9.3 $\mu\text{mol/L}$	–
Heronamide B ( <b>63</b> ) <sup>[47]</sup>	–	<i>Fission yeast</i> MIC=50 $\mu\text{mol/L}$
Heronamide C ( <b>64</b> ) <sup>[47]</sup>	–	<i>Fission yeast</i> MIC=0.27 $\mu\text{mol/L}$
Salinazinone B ( <b>74</b> ) <sup>[55]</sup>	BV-2: 17.7 $\mu\text{mol/L}$	–
Brabantamide A ( <b>75</b> ) <sup>[59]</sup>	–	<i>Bacillus</i> : 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>Staphylococcus aureus</i> SG511: 25 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>A. crystallopoietes</i> DSM 20117: 12.5 $\mu\text{g/mL}$
Brabantamide B ( <b>76</b> ) <sup>[59]</sup>	–	<i>M. luteus</i> : 12.5 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>B. megaterium</i> : 12.5 $\mu\text{g/mL}$
Brabantamide C ( <b>77</b> ) <sup>[59]</sup>	–	<i>M. luteus</i> : 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ; <i>B. subtilis</i> 168: 6.25 $\mu\text{g/mL}$

注: –: 截至目前暂时未有文献报道其  $IC_{50}$  或 MIC

Note: -: No literature report on its  $IC_{50}$  or MIC so far

## 5 细菌源吡咯里西啶类生物碱的基因组邻域网络 (Genome Neighborhood Network Analysis, GNN) 分析

大部分细菌源吡咯里西啶类生物碱的生物合成依赖于对具有双模块的 NRPS 和 BVMO 酶。该 NRPS 可以催化缩合 L-丝氨酸/L-苏氨酸以及 L-脯氨酸/L-脯氨酸类似物, 并在特异性硫酯水解酶结构域的作用下形成吡咯里西啶中间体; BVMO 酶可以进一步催化该中间体的拜耳-维利格重排,

形成吡咯双烷骨架或其他活性中间体；在经过多种后修饰酶，如细胞色素 P450、甲基转移酶等作用下，可以形成最终的天然产物。随着高通量测序技术的成熟和微生物组学研究的发展，细菌基因组中蕴含的吡咯里西啶类生物碱及其类似物的潜力也逐渐被揭示。因此，我们初步对 GenBank 中含有可能生物合成吡咯里西啶类生物碱的 NRPS/BVMO 进行了基因组邻域网络(Genome Neighborhood Network Analysis, GNN)分析(图 17)。以波米希亚胺基因簇中的 BhmJ NRPS 为探针，筛选与 BhmJ 氨基酸序列有大于 55%的相同的蛋白序列，一共发现了 49 条(截止到 2020 年 11 月 5 日)；进一步对这 49 个 NRPS 所在的生物合成基

因簇进行手动分析，筛选出 15 个 BGC 同时包含 BVMO 酶；随后利用 BLAST 2.9.0+对这 15 个 BGCs 以及其他 3 个 PAs (Azetidomonamides/Azabicyclene、Pyreudiones 和 Pyrrolizinenamides) 的 BGCs 进行聚类，并在 Cytoscape 3.7.2 中进行可视化，用于研究氨基酸序列相近的蛋白聚类情况。从图 17 可以看出，生物合成基因簇已被报道的 6 类化合物(Bohemamines、Legonmycins、Pyreudiones、Pyrrolizinenamides、Azetidomonamide/Azabicyclene 和 Brabantamines/SB-253514)相关的 NRPS 和 BVMO 聚类在一起；其他 9 个孤儿 BGCs 中也有相应的 NRPSs 和 BVMOs 与已知的 NRPS 和 BVMO 聚类。说明这些基因簇具有产生吡咯里西啶类生物碱的潜力。

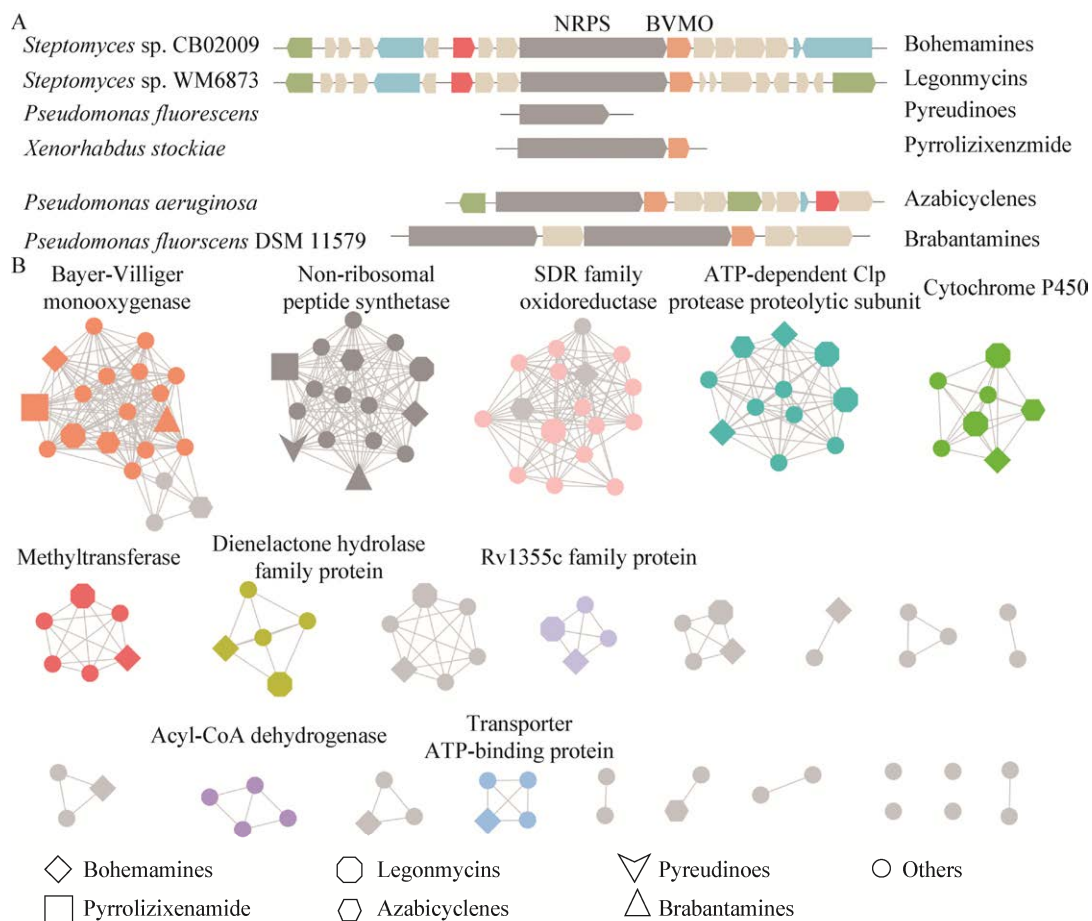


图 17 代表性细菌源吡咯里西啶类生物碱的基因簇(A)和细菌源吡咯里西啶类生物碱的基因组邻域网络分析(B)  
Figure 17 Selected BGCs of pyrrolizidine alkaloids (A) and GNN analysis of BGCs of bacterial pyrrolizidine alkaloids (B)

## 6 结论与展望

截至目前,人们已经报道了11类60余个源于细菌的吡咯里西啶类生物碱。部分生物碱对肿瘤细胞具有优异的细胞毒性,并有一定的抗菌活性(表1)。基于5,5-二环氨基甲酸酯 Brabantamiden A (SB-253514)的类似物,也被用作脂蛋白相关的磷脂酶(Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, A2Lp-PLA2)的抑制剂用于非甾体抗炎药的开发。基因组挖掘发现了较多沉默的吡咯里西啶类生物碱 BGCs(图17),这说明细菌有生物合成该类生物碱的较大潜力。在后基因组时代,天然产物发现的又一黄金时代已经来临<sup>[60]</sup>。随着微生物基因组学和合成生物学技术的发展,我们相信将有更多生物活性优异、结构多样的吡咯里西啶类生物碱被发现。

对部分吡咯里西啶类生物碱的生物合成研究揭示了多种具有独特催化机制的生物合成酶:I型 NRPSs 和 II型 NRPSs, I型 NRPSs 即常规的线性 NRPSs,每个模块都参与多肽合成中氨基酸的装载、传递和缩合,并且是按照基因簇模块的顺序而来;而 II型 NRPSs 大多为离散型且多含有特殊结构域。I型 NRPSs(包括 AzeB、BhmJ 和 PxaB)及 II型 NRPSs(LgnA、LgnB 和 LgnD)可以催化形成吡咯里西啶中间体。一类独特的 BVMO 酶(如 LgnC、AzeC 和 BhmJ)可以催化吡咯里西啶中间体向吡咯双烷骨架的转化。这一罕见的催化过程包括了一个级联的扩环/水解/缩环等级联反应,并且部分的酶催化中间体可以被检测或分离。2种非天然的氨基酸,包括氮杂环丁烷-2-羧酸和(2S,5S)-5-甲基脯氨酸也分别用于 Azetidomonamide/Azabicyclene 或波米西酰胺的生物合成。这些新发现的生物合成机制和生物合成酶有可能成为合成生物学研究中的重要元件。

最后,2个课题组独立通过生物信息分析和基因组挖掘发现了 Azetidomonamide/Azabicyclene,并报道基因簇 PA3326-PA3335 在已测序的铜绿假单胞菌的基因组(1 600 个)中均存在<sup>[54]</sup>。铜绿假单胞菌

AB16.2D2 对毛虫 *Galleria mellonella* 的感染实验表明,该基因簇在铜绿假单胞菌对宿主的周期性感染中有一定作用<sup>[53]</sup>。这些原创性研究为探索细菌源吡咯里西啶类生物碱的化学生态学意义具有借鉴价值。由于铜绿假单胞菌属于世界卫生组织公布的难以治疗的“优先病原菌”,缺乏有效的抗生素。对这一在铜绿假单胞菌保守的基因簇的调控和功能的研究,也将对开发强效、窄谱的铜绿假单胞菌特异性抗生素有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Roeder E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids[J]. *Die Pharmazie*, 1995, 50(2): 83-98
- [2] Fu PP, Xia QS, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine alkaloids—genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2004, 36(1): 1-55
- [3] Wang FP. Alkaloid Chemistry[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 53-69 (in Chinese)  
王锋鹏. 生物碱化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 53-69
- [4] Li L, Tang MC, Tang SB, Gao SS, Soliman S, Hang L, Xu W, Ye T, Watanabe K, Tang Y. Genome mining and assembly-line biosynthesis of the UCS1025A pyrrolizidinone family of fungal alkaloids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(6): 2067-2071
- [5] Ahmad L, He Y, Hao JC, Semotiuk A, Liu QR, Mazari P. Toxic pyrrolizidine alkaloids provide a warning sign to overuse of the ethnomedicine *Arnebia benthamii*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 210: 88-94
- [6] Robins DJ. The pyrrolizidine alkaloids[J]. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe*, 1982, 41: 115-203
- [7] Robins DJ. Pyrrolizidine alkaloids[J]. *Natural Product Reports*, 1995, 12(4): 413
- [8] Liddell JR. Pyrrolizidine alkaloids[J]. *Natural Product Reports*, 2002, 19(6): 773-781
- [9] Moreira R, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Pyrrolizidine alkaloids: chemistry, pharmacology, toxicology and food safety[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1-22
- [10] Tamariz J, Burgueño-Tapia E, Vázquez MA, Delgado F. Pyrrolizidine alkaloids[J]. *The Alkaloids Chemistry and Biology*, 2018, 80: 1-314
- [11] Schrenk D, Gao L, Lin G, Mahony C, Mulder PPJ, Peijnenburg A, Pfuhler S, Rietjens IMCM, Rutz L, Steinhoff B, et al. Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: Occurrence, exposure, toxicity, mechanisms, and risk assessment: a review[J]. *Food and Chemical Toxicology*,

- 2020, 136: 111107
- [12] Schrenk D. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 135: 110938
- [13] Robertson J, Stevens K. Pyrrolizidine alkaloids: occurrence, biology, and chemical synthesis[J]. Natural Product Reports, 2017, 34(1): 62-89
- [14] Wang T, Song HB. Research progress and risk analysis on hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids[J]. Herald of Medicine, 2018, 37(9): 1033-1037 (in Chinese)  
王涛, 宋海波. 吡咯里西啶类生物碱肝毒性研究进展及风险分析[J]. 医药导报, 2018, 37(9): 1033-1037
- [15] Sun XX, Xiang E, Qiu SK, Wang H, Guo Y. Research progress on toxicity of pyrrolizidine alkaloids[J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2019, 16(2): 76-80 (in Chinese)  
孙潇翔, 向娥, 邱帅凯, 汪晖, 郭喻. 吡咯里西啶生物碱毒性作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(2): 76-80
- [16] Huang S, Tabudravu J, Elsayed SS, Travert J, Peace D, Tong MH, Kyeremeh K, Kelly SM, Trembleau L, Ebel R, et al. Discovery of a single monooxygenase that catalyzes carbamate formation and ring contraction in the biosynthesis of the legonmycins[J]. Angewandte Chemie: International Ed in English, 2015, 54(43): 12697-12701
- [17] Nettleton DE Jr, Balitz DM, Doyle TW, Bradner WT, Johnson DL, O'Herron FA, Schreiber RH, Coon AB, Moseley JE, Myllymaki RW. Antitumor agents from bohemian acid complex, III. the isolation of marcellomycin, musettamycin, rudolphomycin, mimimycin, collinmycin, alcindoromycin, and bohemamine[J]. Journal of Natural Products, 1980, 43(2): 242-258
- [18] Doyle TW, Nettleton DE, Balitz DM, Moseley JE, Grulich RE, McCabe T, Clardy J. Isolation and structure of bohemamine (1a.beta.,2.alpha.,6a.beta.,6b.beta.)-3-methyl-N-(1a,6,6a,6b-tetrahydro-2,6a-dimethyl-6-oxo-2H-oxireno[a]pyrrolizin-4-yl)-2-butenamide[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1980, 45(7): 1324-1326
- [19] Zhang QL, Schrader KK, ElSohly HN, Takamatsu S. New cell-cell adhesion inhibitors from *Streptomyces* sp. UMA-044[J]. The Journal of Antibiotics, 2003, 56(8): 673-681
- [20] Bugni TS, Woolery M, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Bohemamines from a marine-derived *Streptomyces* sp.[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(11): 1626-1628
- [21] Fu P, Legako A, La S, MacMillan JB. Discovery, characterization, and analogue synthesis of bohemamine dimers generated by non-enzymatic biosynthesis[J]. Chemistry: Weinheim an Der Bergstrasse, Germany, 2016, 22(10): 3491-3495
- [22] Fu P, La S, MacMillan JB. 1,3-oxazin-6-one derivatives and bohemamine-type pyrrolizidine alkaloids from a marine-derived *Streptomyces spinoverrucosus*[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(3): 455-462
- [23] Jiang BY, Zhao W, Li SF, Liu HY, Yu LY, Zhang YX, He HW, Wu LZ. Cytotoxic dibohemamines D-F from a *Streptomyces* species[J]. Journal of Natural Products, 2017, 80(10): 2825-2829
- [24] Jiang BY, Zhao W, Li SF, Liu HY, Yu LY, Niu WX, He HW, Wu LZ. Quinoxalinone-bohemamine hybrid compound from *Streptomyces* sp. CPCC 200497[J]. The Journal of Antibiotics, 2018, 71(11): 965-967
- [25] Komaki H, Ichikawa N, Hosoyama A, Fujita N, Igarashi Y. Draft genome sequence of marine-derived *Streptomyces* sp. TP-A0873, a producer of a pyrrolizidine alkaloid bohemamine[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e00008-e00015
- [26] Liu L, Li SN, Sun RZ, Qin XJ, Ju JH, Zhang CS, Duan YW, Huang Y. Activation and characterization of bohemamine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. CB02009[J]. Organic Letters, 2020, 22(12): 4614-4619
- [27] Schimming O, Challinor VL, Tobias NJ, Adihou H, Grün P, Pöschel L, Richter C, Schwalbe H, Bode HB. Structure, biosynthesis, and occurrence of bacterial pyrrolizidine alkaloids[J]. Angewandte Chemie: International Ed in English, 2015, 54(43): 12702-12705
- [28] Nakamura H, Iitaka Y, Umezawa H. Crystal and molecular structure of clazamycin A[J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32(7): 765-767
- [29] Horiuchi Y, Kondo S, Ikeda T, Ikeda D, Miura K, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H. New antibiotics clazamycins A and B[J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32(7): 762-764
- [30] Dolak LA, DeBoer C. Clazamycin B is antibiotic 354[J]. The Journal of Antibiotics, 1980, 33(1): 83-84
- [31] Hori M, Naito K, Sakata N, Uehara Y, Umezawa H. Inhibition of DNA replication and membrane transport of some nutrients by clazamycin in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Antibiotics, 1984, 37(3): 260-266
- [32] Buechter DD, Thurston DE. Studies on the pyrrolizidine antitumor agent, clazamycin: interconversion of clazamycins A and B[J]. Journal of Natural Products, 1987, 50(3): 360-367
- [33] Hu JF, Wunderlich D, Thiericke R, Dahse HM, Grabley S, Feng XZ, Sattler I. Jenamidines A to C: unusual alkaloids from *Streptomyces* sp. with specific antiproliferative properties obtained by chemical screening[J]. The Journal of Antibiotics, 2003, 56(9): 747-754
- [34] Snider BB, Duvall JR. Synthesis of jenamidines A1/A2[J]. Organic Letters, 2005, 7(20): 4519-4522
- [35] Duvall JR, Wu FH, Snider BB. Structure reassignment and synthesis of jenamidines A1/A2, synthesis of (+)-NP25302, and formal synthesis of SB-311009 analogues[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2006, 71(22): 8579-8590
- [36] Klapper M, Götze S, Barnett R, Willing K, Stallforth P. Bacterial alkaloids prevent amoebal predation[J]. Angewandte Chemie: International Ed in English, 2016, 55(31): 8944-8947
- [37] Klapper M, Braga D, Lackner G, Herbst R, Stallforth P. Bacterial alkaloid biosynthesis: structural diversity via a minimalistic nonribosomal peptide synthetase[J]. Cell Chemical Biology, 2018, 25(6): 659-665.e9
- [38] Fu P, MacMillan JB. Spithioneines A and B, two new bohemamine derivatives possessing ergothioneine moiety



- from a marine-derived *Streptomyces spinoverrucosus*[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(12): 3046-3049
- [39] Derewacz DK, Covington BC, McLean JA, Bachmann BO. Mapping microbial response metabolomes for induced natural product discovery[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(9): 1998-2006
- [40] Shinohara Y, Kudo F, Eguchi T. A natural protecting group strategy to carry an amino acid starter unit in the biosynthesis of macrolactam polyketide antibiotics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(45): 18134-18137
- [41] Miyanaga A, Iwasawa S, Shinohara Y, Kudo F, Eguchi T. Structure-based analysis of the molecular interactions between acyltransferase and acyl carrier protein in vicenistatin biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7): 1802-1807
- [42] Kudo F, Miyanaga A, Eguchi T. Biosynthesis of natural products containing  $\beta$ -amino acids[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(8): 1056-1073
- [43] Raju R, Piggott AM, Conte MM, Capon RJ. Heronamides A-C, new polyketide macrolactams from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. A biosynthetic case for synchronized tandem electrocyclization[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(20): 4682-4689
- [44] Sugiyama R, Nishimura S, Matsumori N, Tsunematsu Y, Hattori A, Kakeya H. Structure and biological activity of 8-deoxyheronamide C from a marine-derived *Streptomyces* sp.: heronamides target saturated hydrocarbon chains in lipid membranes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(14): 5209-5212
- [45] Zhang WJ, Li SM, Zhu YG, Chen YC, Chen YL, Zhang HB, Zhang GT, Tian XP, Pan Y, Zhang S, et al. Heronamides D-F, polyketide macrolactams from the deep-sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 03032[J]. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(2): 388-391
- [46] Yu PY, Patel A, Houk KN. Transannular [6+4] and ambimodal cycloaddition in the biosynthesis of heronamide A[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(42): 13518-13523
- [47] Komaki H, Ichikawa N, Hosoyama A, Fujita N, Igarashi Y. Draft genome sequence of *Streptomyces* sp. TP-A0871, a producer of heronamide C[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): DOI:10.1128/genomea.01429-15
- [48] Zhu YG, Zhang WJ, Chen YL, Yuan CS, Zhang HB, Zhang GT, Ma L, Zhang QB, Tian XP, Zhang S, et al. Characterization of heronamide biosynthesis reveals a tailoring hydroxylase and indicates migrated double bonds[J]. *Chembiochem*, 2015, 16(14): 2086-2093
- [49] Kanoh N, Itoh S, Fujita K, Sakanishi K, Sugiyama R, Terajima Y, Iwabuchi Y, Nishimura S, Kakeya H. Asymmetric total synthesis of Heronamides A-C: stereochemical confirmation and impact of long-range stereochemical communication on the biological activity[J]. *Chemistry: Weinheim an Der Bergstrasse, Germany*, 2016, 22(25): 8586-8595
- [50] Booth TJ, Alt S, Capon RJ, Wilkinson B. Synchronous intramolecular cycloadditions of the polyene macrolactam polyketide heronamide C[J]. *Chemical Communications: Cambridge, England*, 2016, 52(38): 6383-6386
- [51] Zhang C, Wang X, Chen Y, He ZL, Yu PY, Liang Y. Dynamical trajectory study of the transannular [6+4] and ambimodal cycloaddition in the biosynthesis of heronamides[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2020, 85(14): 9440-9445
- [52] Fujita K, Sugiyama R, Nishimura S, Ishikawa N, Arai MA, Ishibashi M, Kakeya H. Stereochemical assignment and biological evaluation of BE-14106 unveils the importance of one acetate unit for the antifungal activity of polyene macrolactams[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(7): 1877-1880
- [53] Hong ZL, Bolard A, Giraud C, Prévost S, Genta-Jouve G, Deregnacourt C, Häussler S, Jeannot K, Li YY. Azetidines-containing alkaloids produced by a quorum-sensing regulated nonribosomal peptide synthetase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2019, 58(10): 3178-3182
- [54] Patteson JB, Lescallete AR, Li B. Discovery and biosynthesis of azabicyclene, a conserved nonribosomal peptide in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(13): 4955-4959
- [55] Kim MC, Lee JH, Shin B, Subedi L, Cha JW, Park JS, Oh DC, Kim SY, Kwon HC. Salinazinones A and B: pyrrolidinyl-oxazinones from solar saltern-derived *Streptomyces* sp. KMF-004[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(20): 5024-5027
- [56] Thirkettle J, Alvarez E, Boyd H, Brown M, Diez E, Hueso J, Elson S, Fulston M, Gershater C, Morata ML, et al. SB-253514 and analogues; novel inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A2 produced by *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579. I. Fermentation of producing strain, isolation and biological activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2000, 53(7): 664-669
- [57] Andersson PF, Levenfors J, Broberg A. Metabolites from *Pseudomonas brassicacearum* with activity against the pink snow mould causing pathogen *Microdochium nivale*[J]. *BioControl*, 2012, 57(3): 463-469
- [58] Schmidt Y, Van Der Voort M, Crüsemann M, Piel J, Josten M, Sahl HG, Miess H, Raaijmakers JM, Gross H. Biosynthetic origin of the antibiotic cyclocarbamate brabantamide A (SB-253514) in plant-associated *Pseudomonas*[J]. *Chembiochem*, 2014, 15(2): 259-266
- [59] Klapper M, Paschold A, Zhang SB, Weigel C, Dahse HM, Götz S, Pace S, König S, Rao ZG, Reimer L, et al. Bioactivity and mode of action of bacterial tetramic acids[J]. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(8): 1693-1697
- [60] Shen B. A new golden age of natural products drug discovery[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1297-1300