

基于生物合成的双环硫肽类抗生素结构改造进展

张鄂^a 陈单丹^b 王守锋^{*,a} 刘文^{*,b,c}^(a) 济南大学化学化工学院 山东省氟化学化工材料重点实验室 济南 250022)^(b) 中国科学院上海有机化学研究所 生命有机化学国家重点实验室 上海 200032)^(c) 中国科学院上海有机化学研究所 湖州生物制造中心 浙江湖州 313000)

摘要 硫肽类抗生素是一类由微生物次级代谢产生的富含硫元素且结构被高度修饰的聚噻(噁)唑多肽类天然产物,具有良好的生物活性。由于水溶性差以及生物利用度低等问题,导致该类抗生素在临床上的应用受到限制。在了解其生物合成机制的基础上,通过合理的生物工程改造来获得硫肽类似物的方法成了生物学家们关注的焦点。以双环硫肽家族中的硫链丝菌素和那西肽为代表,综述了双环硫肽类抗生素结构改造的进展。

关键词 生物合成; 硫链丝菌素; 那西肽; 结构改造

Progress in Structural Modification of Bicyclic Thiopeptide Antibiotics Based on Biosynthesis

Zhang, E^a Chen, Dandan^b Wang, Shoufeng^{*,a} Liu, Wen^{*,b,c}^(a) Shandong Provincial Key Laboratory of Fluorine Chemistry and Chemical Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022)^(b) State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)^(c) Huzhou Center of Bio-Synthetic Innovation, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Huzhou, Zhejiang 313000)

Abstract Thiopeptide antibiotics are a class of natural products with polythiophene (oxazol) polypeptides, which are rich in sulfur and highly modified. They are produced by secondary metabolism of microorganisms and have good biological activities. Developing thiopeptides into clinic is currently a challenge partly due to their low aqueous solubility and associated poor bioavailability. On the basis of understanding the mechanism of their biosynthesis, the method of obtaining thiopeptide analogues via reasonable bioengineering has become the research focus of biologists. In this paper, the advances in structural modifications of bicyclic thiopeptides by taking thiostrepton and nosiheptide as representatives are reviewed.

Keywords biosynthesis; thiostrepton; nosiheptide; structural modifications

天然产物由于其丰富多样的化学结构以及良好的生理活性,成为活性药物分子的重要来源之一^[1]。根据基本组成砌块的不同,主要可以分为四类:萜类(terpenoids)、生物碱(alkaloids)、聚酮(polyketides)和聚肽(polypeptides)。按照生源途径的不同,聚肽类天然产物

可进一步划分为非核糖体肽(non-ribosomal peptides, NRPs)^[2]和核糖体合成和翻译后修饰肽(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs)^[3]。

RiPPs 类天然产物分布广泛,在土壤、海洋来源的

* Corresponding authors. E-mail: chm_wangsf@ujn.edu.cn; wliu@mail.sioc.ac.cn

Received May 26, 2020; revised June 20, 2020; published online July 8, 2020.

Dedicated to Professor Henry N. C. Wong on the occasion of his 70th birthday.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31972850, 21750004, 21520102004), the Shandong Key Research Program (No. 2019GSF108223), the Chinese Academy of Sciences (Nos. QYZDJ-SSW-SLH037, XDB20020200), the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 17JC1405100), the Youth Innovation Promotion Association of the Chinese Academy of Sciences (No. 2017303), and the K. C. Wong Education Foundation.

国家自然科学基金(Nos. 31972850, 21750004, 21520102004)、山东省重点研发计划(No. 2019GSF108223)、中国科学院(Nos. QYZDJ-SSW-SLH037, XDB20020200)、上海市科委(No. 17JC1405100)、中国科学院青年创新促进会(No. 2017303)和王宽诚教育基金会资助项目。

微生物中均发现了它们的踪迹^[1,4]。根据化学结构特征的差异,人们把该家族天然产物分为二十多个亚家族^[5],其中硫肽类抗生素(thiopeptide antibiotics)因其具有复杂的化学结构和优良生物活性而得到了研究人员的广泛关注。近年来,随着基因测序技术的高速发展,硫肽类抗生素的生物合成机制逐渐被解析,为利用生物合成方法拓展硫肽类抗生素的结构与功能多样性提供了导向。

1 双环硫肽类抗生素的化学结构

硫肽类抗生素是富含硫元素,以氮杂六元环为核心,并且包含多个噻(噁)唑和脱水氨基酸单元的核糖体肽类抗生素。1948年,人们发现了第一例硫肽类抗生素 Micrococcin P^[6],此后该家族一百多个成员又被相继报道^[4,7]。根据核心氮杂六元环取代方式及氧化程度的差异,一般将硫肽分为五类^[8]。根据骨架结构中大环的个数,可将其分为单环硫肽(monocyclic thiopeptide)和双环硫肽(bicyclic thiopeptides):典型的单环硫肽有 thiocillin、sulfomycin,双环硫肽有那西肽(nosiheptide, NOS)、硫链丝菌素(thiostrepton, TSR)。根据侧环结构中前体单元的不同,双环硫肽又包含以 NOS 为代表的含有吡啶酸单元(MIA)的亚型,如 nocathiacin I (NOC I)、thiazomycin、philipimycin;以 TSR 为代表的含有喹啉酸单元(QA)的亚型,如 thiopeptin (TPP)、Sch 40832、siomycin A (SIO)(图 1)^[9]。1955年,人们在远青链霉菌(*Streptomyces azureus*)中发现 TSR^[10],继而在劳伦链霉菌(*Streptomyces laurentii*)^[11]中发现并分离得到 TSR。1983年,TSR 的结构得到完全确定^[12]。NOS 最早由法国学者在活跃链霉菌(*Streptomyces actuosus*) 40037 中分离得到^[13],随后我国科学家在海洋菌株 *Streptomyces* sp. SCSIO 1682 中也分离得到了 NOS。1977年,其化学结构得到确定^[14]。

2 双环硫肽类抗生素的生物活性

硫肽类抗生素被报道具有良好的抗革兰氏阳性菌^[4]、抗癌^[15]、抗疟^[16]等活性。尤其是对多种耐药性的致病菌,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、耐青霉素肺炎链球菌(Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae*, PRSP)、多种耐药性的粪肠球菌(Multi-Drug Resistant *Enterococcus faecium*, MREF)等具有很好的抑制作用。硫肽类抗生素在发挥抗菌作用时,主要以核糖体为靶点,抑制蛋白质的合成达到对抗胞外菌的目的^[17]。作为硫肽类抗生素家族的明星分子,NOS 和 TSR 的抗菌机制被研究得最为充分:分子与 50S 亚基的 23S rRNA/L11

蛋白复合物结合,阻止或促进 L11 蛋白构象的变化,导致 aa-tRNA·Ef-Tu·GTP 复合物不能被很好地识别,同时影响延伸因子的 GTPase 活性,从而抑制生物体内蛋白质的合成(图 2A)^[18]。另外,研究表明:双环硫肽 TSR 与蛋白复合物结构 23S rRNA/L11 作用时,大环、侧环、尾巴对抗菌活性的贡献率分别为 60%、14%、26%^[18e]。其中侧环中的 QA 部分与 23S rRNA 上的 A1067 碱基有明显的相互作用,距离<0.4 nm,很可能发生 π - π 堆积或者静电作用^[18e],因此,TSR 中 QA 部分对其发挥抗菌作用起到关键作用。我们在研究 TSR 抗胞内结核杆菌模式菌海洋分支杆菌(*Mycobacterium marinum*)活性时发现,其对海洋分支杆菌及其宿主具有双重作用模式(mode of action, MOA),一方面直接与病原菌核糖体直接作用,另一方面通过引发宿主细胞体内的内质网应激(ER-stress)介导的自噬,达到抗菌目的^[19]。

3 双环硫肽类抗生素生物合成研究

硫肽类抗生素具有良好的抗菌活性,在成药方面潜力巨大,但由于其水溶性差和胃肠道吸收性差,在临床上还没有得到应用。了解硫肽类抗生素特别是双环硫肽的生物合成机制,就能够辅助人们更有效地利用化学和生物学结合的方法来获取其结构类似物。

3.1 核糖体来源

在 20 世纪的很长一段时间,人们普遍认为硫肽类抗生素属于 NRPs 类天然产物。上世纪八、九十年代, Floss 等通过喂养同位素标记的天然氨基酸实验发现, NOS^[20]和 TSR^[21]的分子骨架均来源于天然氨基酸(图 3)。其中核心氮杂六元环来源于丝氨酸,氮杂五元环来源于半胱氨酸或丝氨酸,脱水丙氨酸和脱水丁氨酸分别来源于丝氨酸和苏氨酸, NOS 侧环结构中的 MIA 单元和 TSR 侧环结构中的 QA 单元均来源于 L-色氨酸。

2009 年,我们利用与硫肽结构中特殊噻唑单元生物合成相关的环化脱水酶保守序列设计简并性引物,对化合物产生菌的总 DNA 文库筛选,获得了 NOS^[22]和 TSR^[23]的生物合成基因簇。同年, Morris 等^[24]通过 GE2270A 分子大环骨架中的氨基酸排列设计简并引物筛选基因文库获得其生物合成基因簇。在它们的生物合成基因簇中,有一个编码几十个氨基酸的小肽的基因,其碳端的氨基酸序列与硫肽分子骨架中氨基酸完全吻合。至此,人们完全证实了硫肽类抗生素属于 RiPPs 类天然产物。

3.2 共性化后修饰

比较目前已经报道的十几例硫肽家族成员的生物合成基因簇可以发现,该家族化合物的编码基因具有一

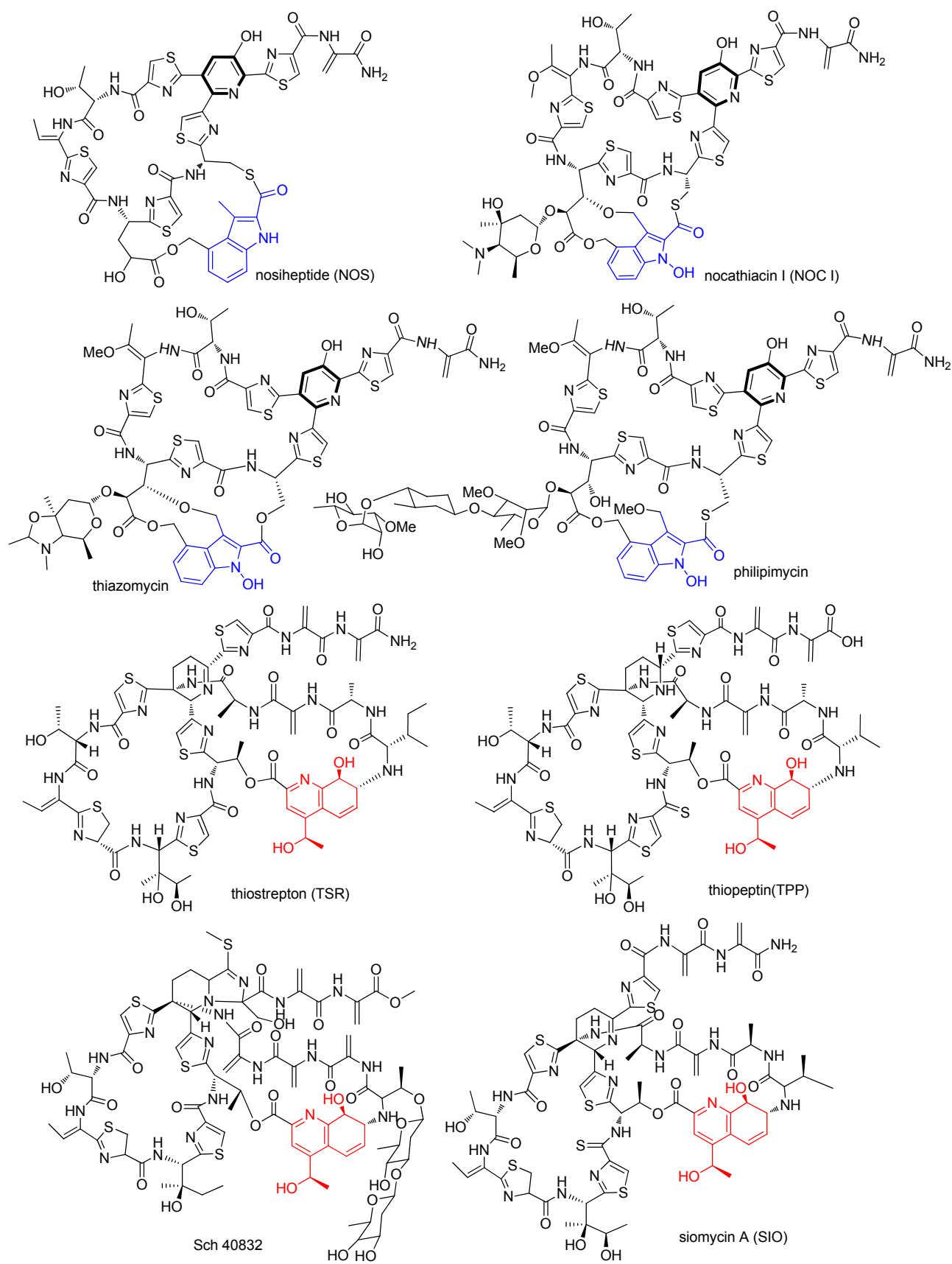


图1 硫肽类抗生素的化学结构及分类

Figure 1 Classification and representatives of thiopeptides
MIA units are marked in blue, and QA units are marked in red

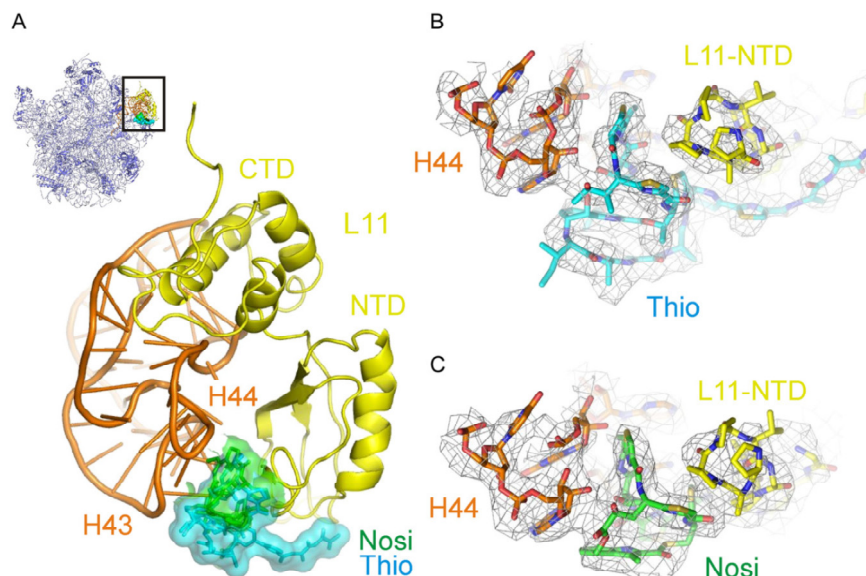
图2 硫肽类抗生素抗菌作用机制^[18e]

Figure 2 Antibacterial mechanisms of thiopeptides

(A) Interface view of the 50S subunit with the thiopeptide binding site boxed. Enlargement of boxed region reveals that the thiopeptides Thio (cyan) and Nosi (green) bind within a cleft between the N-terminal domain (NTD) of r-protein L11 (yellow) and the 23S rRNA H43 and H44 (orange). (B) Difference electron density maps with Thio, L11-NTD, and H44 colored as in A. (C) Difference electron density maps with Nosi, L11-NTD, and H44 colored as in A.

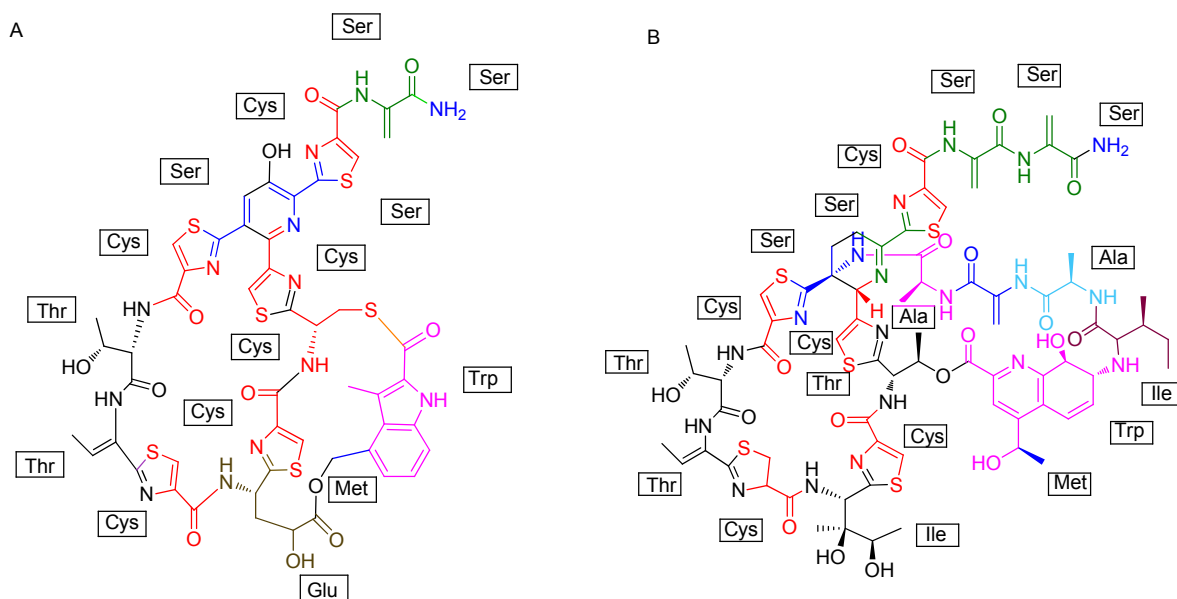


图3 TSR 和 NOS 的同位素标记

Figure 3 Isotope labeling of TSR and NOS

(A) Isotope labeling of NOS; (B) Isotope labeling of TSR

定共性: 除了包含一个前体肽基因, 至少还包括 6 个后修饰基因参与大环骨架的生物合成。在针对硫肽类抗生素的生化实验以及结构生物学研究过程中, 我们知道该类化合物在成熟过程中, 首先在核糖体中编码一段前体肽 (precursor peptide), 前体肽一般包含先导肽 (leader peptide) 和核心肽 (core peptide) 部分, 然后再经过后修饰酶对核心肽进行一系列的翻译后修饰 (post-translational

modifications) 最终形成成熟的硫肽分子。翻译后修饰包含一些普适的共性化后修饰步骤: 噻唑(啉)或噁唑(啉)、脱水氨基酸、氮杂六元环的形成。2015 年, van der Donk 小组对单环硫肽分子 thiomuracin 的大环骨架的体外重构实验表明, 硫肽共性化大环骨架的形成是按照形成噻唑环、脱水氨基酸、氮杂六元环的顺序进行的^[25]。

3.3 与侧环形成相关的个性化后修饰

硫肽类抗生素除了共有的大环骨架结构, 还有大量的个性化后修饰, 包括糖基化、侧环化、羟化、甲基化、末端酰胺化等. 双环硫肽类抗生素含有复杂的侧环结构, 引入的结构单元有 QA 和 MIA, 它们独立于前体肽之外, 由 *L*-色氨酸通过不同的催化机制转化为不同的单元上载到大环骨架上. 双环硫肽这样特殊的侧环形成机制使其成为生物学家们研究的热点.

在 NOS 体系中, 我们团队于 2011 年通过体外重构实验得到, 吲哚酸经自由基 *S*-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosyl-methionine, SAM)甲基化酶 NosL 催化而来, 并阐明了其自由基形式的催化机制^[26]. 2016 年, Nicolet 小组对其催化机制做了进一步研究. 首先, NosL 催化 SAM 得到的 5'-dA 自由基拔出色氨酸上的氢, 形成色氨酸氨基自由基前体^[27]. 随后该自由基前体一方面经过路径 1 发生 $C\alpha-C\beta$ 键断裂, 得到 3-甲基吲哚和乙醛酸; 另一方面, 经过路径 2 发生 $C\alpha-C$ 断裂和羧基转移等形成 MIA 单

元. 该侧环单元的上载过程经过了漫长的研究. 2009 年, 我们将自由基 SAM 甲基化酶基因 *nosN* 敲除后, 得到了侧环开环的 NOS 类似物. 2017 年, Nicolet 小组又发现: 前体肽环化脱水形成多噻唑环后, 在 α/β 水解酶 NosK 的作用下, MIA 单元上载, 与 8 位半胱氨酸的巯基作用形成硫醚键^[28]. 2019 年, 我们完成了 NOS 的体外重构: MIA 上载之后, NosN 催化 MIA 的 4 位甲基化, 并促使其与 6 位谷氨酸相连完成侧环的环化, 然后脱水酶 NosDE 催化脱水氨基酸的形成, 最后由大环化酶 NosO 催化得到核心氮杂六元环结构(图 4)^[29]. 这是双环硫肽类抗生素首次在体外得到重构. 同年, Booker 课题组对 NosN 的催化机制做了推测(图 4)^[30]. 首先, 一个 SAM 还原裂解得到的 5'-dA[•]从另一个 SAM 甲基中攫取一个氢原子, 得到亚甲基自由基 SAM. 然后 MIA 单元转移一个电子到这个亚甲基自由基形成芳基自由基中间体. 随后碱拔取 MIA 4 位碳上的氢. 同时消除 SAH, 得到环外亚甲基中间体 II. 接下来 $[4Fe-4S]^{2+}$ 从中间体 II

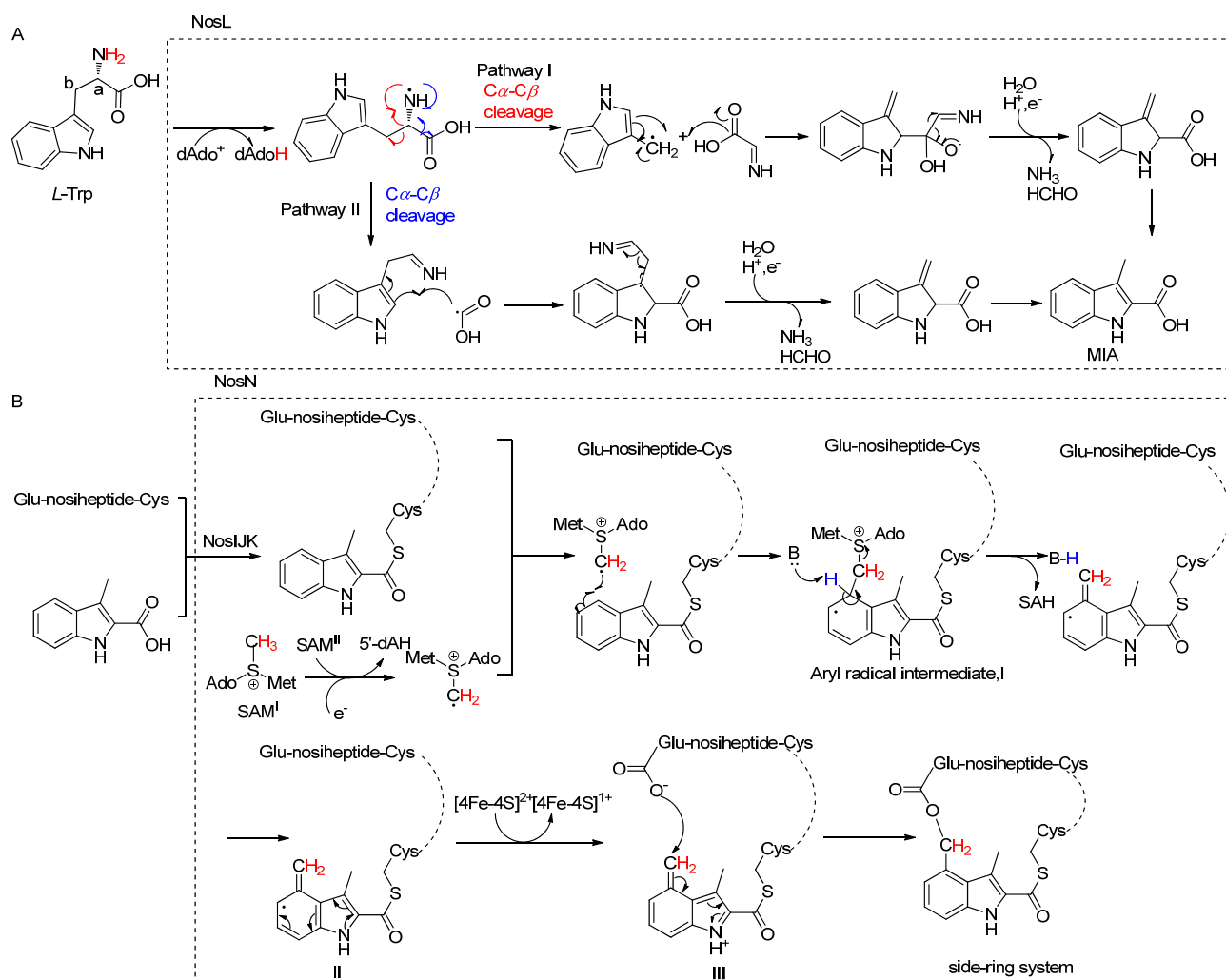


图 4 NOS 侧环单元的形成和上载机制

Figure 4 Formation and upload mechanism of NOS side loop unit
(A) Formation mechanism of MIA unit; (B) Upload mechanism of MIA unit

中捕获一个电子, 然后 Glu6 中的羧基进攻环外亚甲基完成侧环关环。

在 TSR 体系中, QA 的形成机制已经基本明确。首先是色氨酸在自由基 SAM 甲基化酶的催化下 2 位进行甲基化, 随后 2-甲基色氨酸在磷酸吡哆醛(Pyridoxal5-phosphatemonohydrate, PLP)依赖的氨基转移酶 TsrA 的作用下得到 2-甲基吲哚丙酮酸, 然后 FAD 依赖的蛋白 TsrE 催化其开环重排得到 QA 单元, 最后通过还原、氧化等步骤上载到大环骨架上。2016 年, 我们对 QA 单元的上载机制做了部分解答。双功能酶 α/β -水解酶 TsrI 催化与核心肽 1 位异亮氨酸相连的前导肽脱落, 然后再催化形成的氨基进攻 QA 上的环氧环^[21,31], 完成侧环的关环。但是, QA 另一端酯的形成机制目前尚未知晓(图

5)。

4 TSR 和 NOS 的生物学改造

硫肽类抗生素复杂的化学结构同样引起了化学家们的广泛兴趣, 但是在化学全合成过程中, 实验操作复杂、效率低下和成本昂贵等原因导致其不能进行工业化生产; 在化学半合成过程中, 固有可修饰位点、反应条件苛刻等因素限制了该方向的发展。近年来, 对硫肽类抗生素的生物合成路径的探索以及它们抗菌机制的研究为生物科学家们从生物合成角度改造硫肽类抗生素提供了新思路。作为核糖体来源的多肽类抗生素, 越来越多的硫肽类抗生素的基因簇被报道, 生物合成途径被

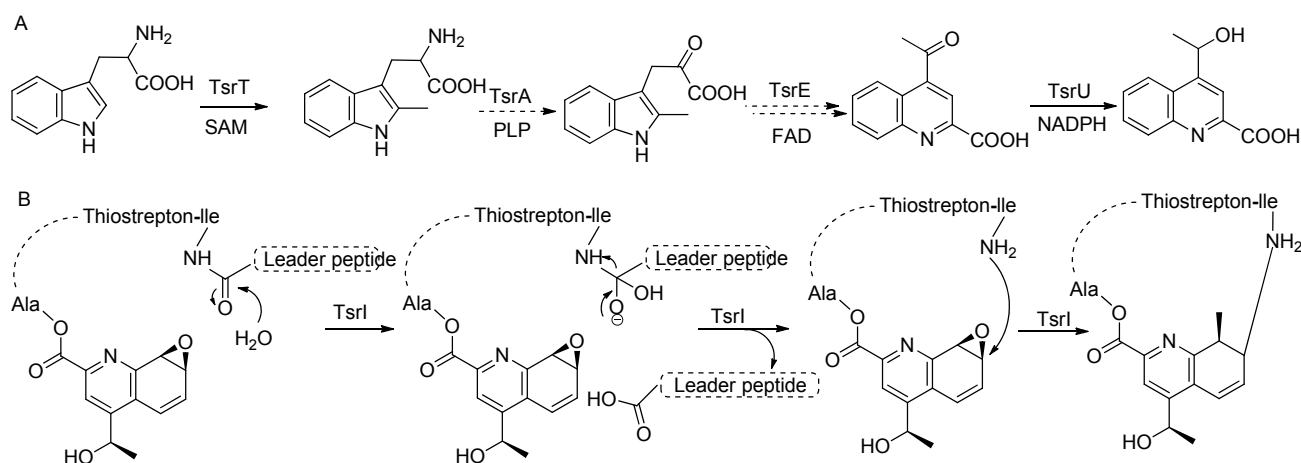


图 5 TSR 侧环单元的形成和上载机制

Figure 5 Formation and upload mechanism of TSR side loop unit
(A) Formation mechanism of QA unit; (B) Upload mechanism of QA unit

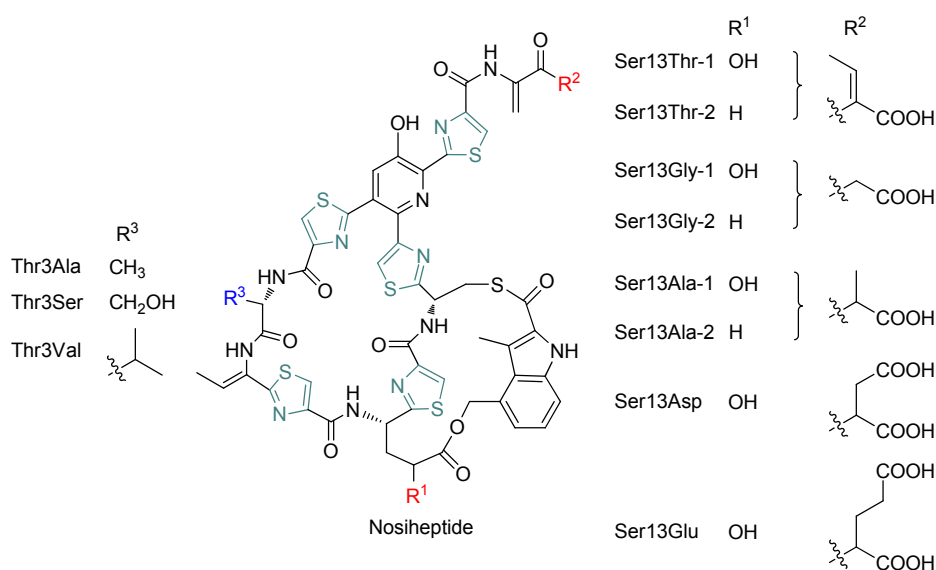


图 6 NOS 前体肽定点突变获得 NOS 类似物

Figure 6 NOS analogues obtained by site-directed mutation of NOS precursor peptide

解析. 在此基础上, 进行合理的基因操作可以获得结构改造的硫肽类似物. 目前主要的结构改造方法有: 前体肽定点突变、翻译后修饰改造和侧环结构单元突变合成三种手段.

4.1 前体肽定点突变

在 NOS 体系中, 由前体肽基因 *nosM* 编码的前体肽共包含 50 个氨基酸, 其中 37 个氨基酸残基为先导肽, 其它 13 个为核心肽^[22]. 对编码核心肽的基因进行定点突变可以获得 NOS 类似物. 2013 年, 陈依军课题组对 13 位丝氨酸(标注为 Ser13)进行定点突变, 获得了 8 种成熟 NOS 类似物. Ser13 突变为苏氨酸、甘氨酸和丙氨酸时, 在发酵体系中检测到了六种 NOS 类似物: Ser13Thr-1、Ser13Thr-2; Ser13Gly-1、Ser13Gly-2; Ser13Ala-1、Ser13Ala-2. 突变为酸性氨基酸天冬氨酸和谷氨酸时得到了两种 NOS 类似物: Ser13Asp 和 Ser13Glu. 但当他们尝试将 Ser13 突变为半胱氨酸时, 没有得到任何 NOS 类似物, 这可能是因为半胱氨酸的引入导致前体肽转录受阻或影响后修饰酶的修饰过程(图 6)^[32]. 从 Ser13 的点突变结果可以看出, NosA 对碳末端丝氨酸有较高的特异性, Ser13 残基发生任何变化, NosA 都不能催化其发生酰胺脱烷基化. 2016 年, 该课题组对 Thr3 进行定点突变, 得到了三种 NOS 类似物, 生物活性测试发现它们的抗菌活性均有所保持. 他们还尝试将 NOS 骨架中参与形成噻唑的半胱氨酸突变为丝氨酸, 但均没有得到任何 NOS 相关类似物(图 6)^[33], 这说明 NosG&F 不能正确识别突变的前体肽 NosM 或者形成噻唑的线性前体肽不能被下游后修饰酶进一步识别.

在 TSR 体系中, 大环部分在其发挥抗菌作用时发挥重要贡献, 并且大环结构中高度保守的 Thr7 与 23S rRNA 之间有着关键相互作用^[34], 对其进行定点突变可以获得结构和生物活性改变的 TSR 类似物. 2012 年 Li 等^[35]对 Thr7 进行定点突变, 获得了两种成熟的 TSR 类似物 Thr7Ala 和 Thr7Val(图 7A), 另外还获得了两种侧环结构未形成的副产物 Thr7Ala-2 和 Thr7Val-2(图 7B). 进一步研究表明, 它们的抗菌活性均丧失, 从而证明了 Thr7 在 TSR 的抗菌活性中具有重要地位. TSR 大环中 Thr7 上的羟基和侧环中 QA 单元上的羟基可以形成分子内氢键, 从而固定 QA 单元的构象, 而 Thr7Ala-2 和 Thr7Val-2 中羟基的丧失使 QA 构象发生改变, 从而阻碍后修饰酶的作用, 导致侧环难以形成, 进一步降低这两种化合物的抗菌活性.

2015 年, Zhang 等^[36]对另外两种保守氨基酸 Ala2 和 Ala4 做了饱和点突变(图 7A). 在 Ala2 的点突变实验中, 得到了 6 种成熟的 TSR 类似物 Ala2Dha、

Ala2Dhb、Ala2Gly、Ala2Met、Ala2Phe 和 Ala2Tyr, 2 种侧环缩环产物 Ala2Ile-ΔIle1 和 Ala2Val-ΔIle1(图 7D). 除了 2 种缩环产物之外, 其它 TSR 类似物的抗菌活性一定程度上保持, 这表明 TSR 与核糖体 50S 亚基相互作用时形成的复合体对 TSR 的 2 位氨基酸的结构具有一定的容忍度. 但是侧环的大小对 TSR 的抗菌效力影响较大, 这可能是因为缩环结构限制了 TSR 中双环的构象变化, 从而阻碍 TSR 与 23S Rrna/L11 蛋白复合物以最优角度结合. 此外, 这 8 种 TSR 类似物对 20S 蛋白酶体的抑制作用相较 TSR 提高或一定程度保持. 在 Ala4 的点突变实验中^[37], Ala4 不能突变为 Asp、Glu、Lys、Arg 和 Pro, 突变为其它 14 种氨基酸, 得到了 16 种 TSR 类似物. 其中 Aal4 突变为 Ser 时得到了 Ala4Ser 和 Ala4Dha 两种化合物. 突变为 Cys 时, Cys4 上的巯基与 Dha17 上的碳碳双键通过 Michael 加成反应形成硫醚键, 得到非对映异构体 Ala4CysF1 和 Ala4CysF2(图 7C). 通过生物活性测试发现, 除 Ala4CysF1 和 Ala4CysF2 外, 其它 14 种 TSR 类似物的抗菌活性均得到保持. 而这 16 种化合物的体外抑制蛋白翻译活性实验发现, 与 TSR 相比, 它们的活性保持或略有增加. 因此, TSR 中 4 位氨基酸的结构变化不会影响其与核糖体的结合, 其抗菌能力的下降可能是由化合物的稳定性和细胞膜通透性改变导致的.

2014 年, 我们将与前导肽的脱除和侧环关闭相关的 Ile1 突变为 Val, 得到了抗菌活性提高的 Ile1Val(图 7A)^[38]. 由此可见, 催化侧环形成的后修饰酶对 1 位氨基酸残基的结构具有一定容忍性. 在此基础上, 对其进行饱和和突变, 只有突变为非极性氨基酸时才能获得 TSR 类似物: Ile1Leu、Ile1Met、Ile1Ala、Ile1Phe、Ile1Trp 和 Ile1Pro. 对 Ile1 和 Ala2 进行双突变, 得到了两种化合物 Ile1Val-Ala2Dha(SIO) 和 Ile1Val-Ala2Ser(SIO-Dha2Ser). 生物活性实验表明, 除了 SIO 抗菌活性提高, 其它 5 种化合物活性均下降. 另外, SIO-Dha2Ser 可以诱导细胞自噬, 从而达到抗肿瘤的作用^[39].

4.2 翻译后修饰改造

由于生物合成途径的连续性, 翻译后修饰酶的功能缺失会阻断中间体化合物的进一步成熟, 因此, 敲除化合物成熟后期的翻译后修饰基因可能会得到具有核心分子骨架的硫肽类似物.

在 NOS 体系中, NOS 成熟后期的酰胺化酶 NosA 和 P450 氧化还原酶 NosB、NosC 分别负责碳末端酰胺脱烷基化、Glu6 羟化和核心吡啶环羟化. 2013 年, 陈依军课题组通过基因敲除手段对这三个基因作用顺序进行

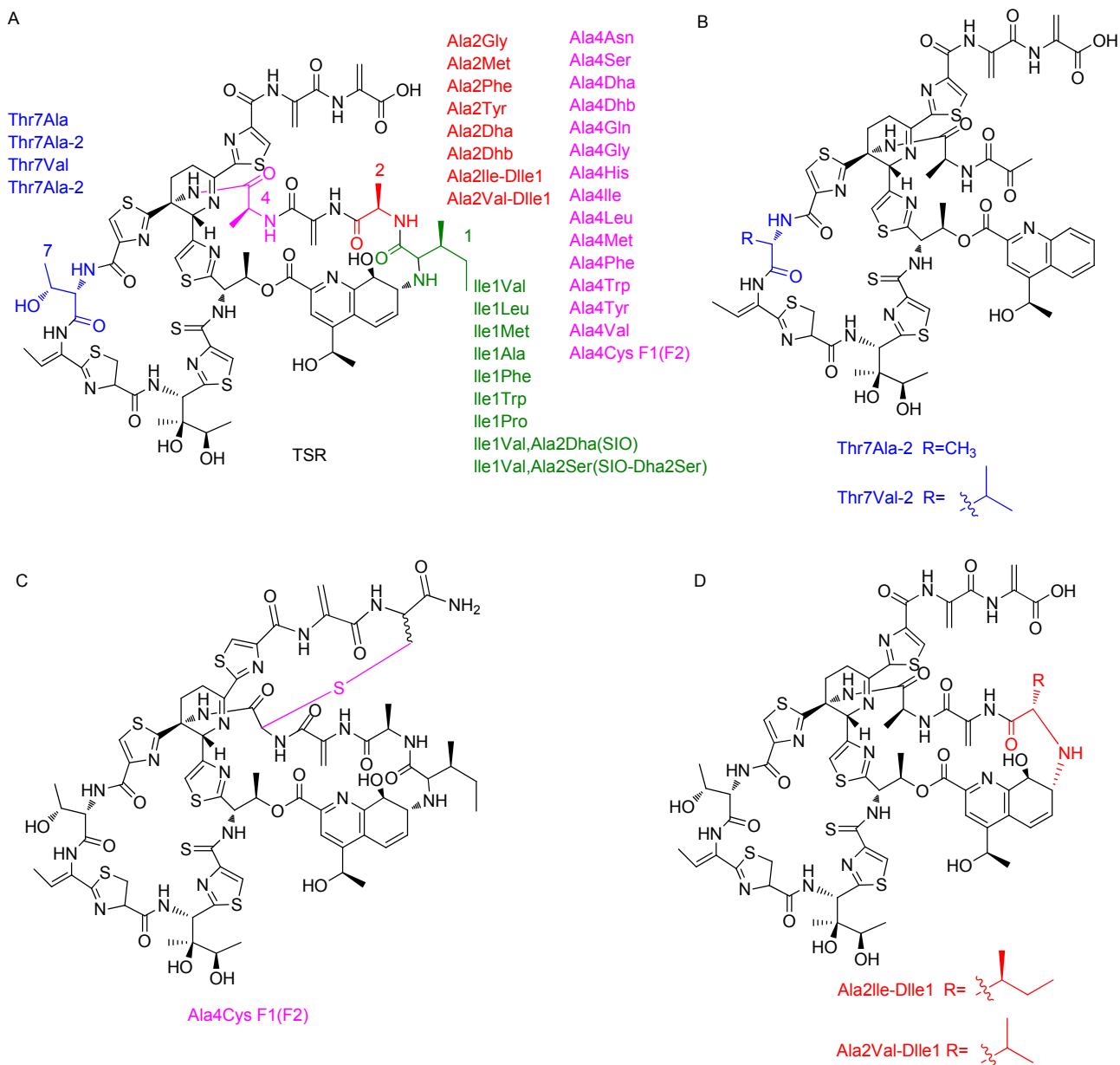


图7 TSR前体肽定点突变获得的TSR类似物。绿色表示1位异亮氨酸的点突变,红色表示2位丙氨酸的点突变,玫红色表示4位丙氨酸的点突变,蓝色表示7位苏氨酸的点突变。

Figure 7 TSR analogues obtained by site-directed mutation of TSR precursor peptide. The point mutation of isoleucine at position 1 is shown in green, the point mutation of alanine at position 2 is shown in red, the point mutation of alanine at position 4 is shown in plum red, and the point mutation of threonine at position 7 is shown in blue

了研究,并得到了5种NOS类似物2、3、4、5和6(图8A)^[40]。其中,NosC的缺失将完全阻断NosA功能的发挥,说明核心吡啶环上的羟化发生在末端酰胺形成之前,而Glu6上的羟化可以在上述两个后修饰过程中交叉进行。

NOCs和NOS具有高度相似的分子骨架,但NOCs产生菌对传统的遗传操作具有抗性,因此限制了对NOCs的生物合成途径的研究。2020年,我们将

P450氧化还原酶NocV在敲除*nosABC*的NOS突变株中进行异源表达,得到了两种NOS类似物NOS-V1(图8B)和NOS-V2(图8C),从它们的结构推测,NocV经过两步氧化使Glu6与MIA单元之间形成醚键。在生物活性测试中发现,NOS-V1和NOS-V2的抗菌活性虽然比NOS有所降低,但NOS-V2的活性明显优于NOS-V1,这表明分子刚性的提高对NOC I的生物活性具有积极影响^[41]。

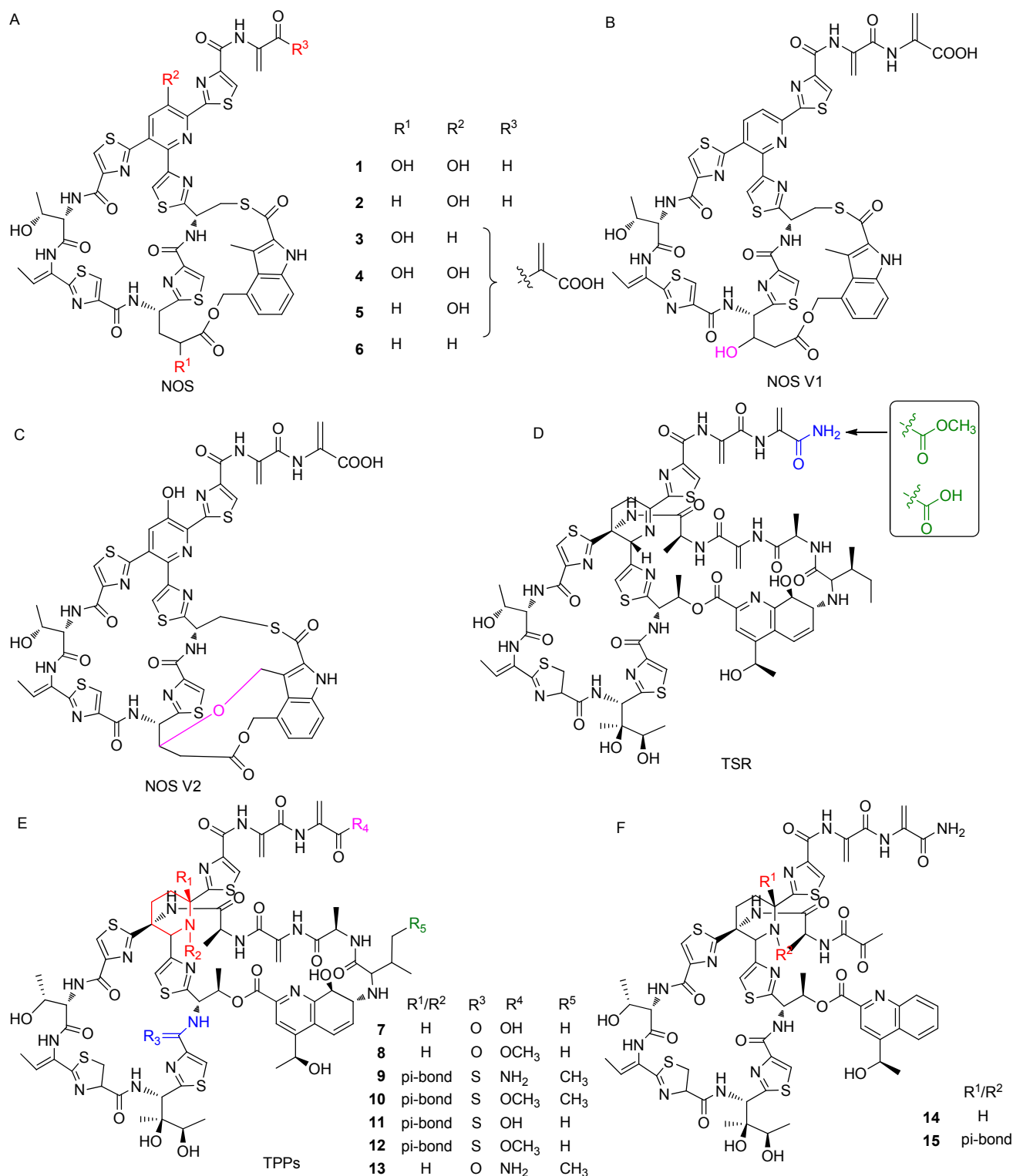


图8 翻译后修饰酶改造获得 NOS、TSR 以及 TPP 类似物

Figure 8 Modification of post-translational modification enzymes to obtain NOS, TSR and TPP analogs

在 TSR 体系中, 2011 年, 我们敲除了酯水解酶 TsrB 得到了末端甲酯化的 TSR 类似物, 敲除末端酰胺化酶 TsrC 后得到了末端为羧酸的 TSR 类似物(图 8D)。抗菌活性和水溶性测试表明, 甲酯化类似物活性提高了 8 倍, 但溶解度降低为 TSR 的 1/16; 羧酸类似物活性降低为

TSR 的 1/8, 但溶解度提高了 1.5 倍^[42]。这表明 TSR 的碳末端在 TSR 发挥抗菌作用时具有重要影响。

TPP 与 TSR 具有高度相似的分子骨架, 其分子骨架中含有一个特殊的硫酰胺结构。2019 年, 我们将 YcaO 蛋白 TppX₂ 敲除之后得到了化合物 7 和 8, 并将 TfuA 蛋

白 TppX₁ 与 TppX₂ 在 *tsrWT* 菌株中共表达, 得到具有硫酰胺结构的 TSR 类似物 **9**, 它们在突变株 *ΔtsrB* 中共表达时得到化合物 **10**^[43]. 在 TPP 基因簇中, F₄₂₀H₂ 依赖的还原酶 TppX₄ 负责核心吡啶环的形成, 我们将其敲除之后得到了以脱氢吡啶环为核心的化合物 **11** 和 **12**(图 8E). 为了拓宽 TppX₄ 的底物范围, 我们以双环 TSR 和单环 TSR 类似物 **14** 为底物, 对其进行活性测试分别得到了化合物 **13** 和 **15**(图 8F)^[44].

4.3 侧环单元的突变生物合成

TSR 和 NOS 的侧环分别含有 QA 和 MIA 单元, 它们独立于前体肽氨基酸序列之外, 由 *L*-色氨酸经过不同的个性化后修饰引入. 因此, 可以通过喂养氨基酸衍生物的方法获得相应的双环硫肽类似物.

TSR 体系中, 敲除催化 QA 单元形成的自由基 SAM 甲基化酶基因 *tsrT* 可以阻断 TSR 的产生^[31]. 2015 年, 我们向突变株 *ΔtsrT* 中喂养 QA 衍生物 5-F-QA、6-F-QA 和 12-CH₃-QA, 获得了三种成熟 TSR 类似物 5'-F-TSR、6'-F-TSR 和 12'-CH₃-TSR. 生物活性实验发现, 它们的抗菌活性和水溶性均比 TSR 有了明显提高(图 9D)^[45]. TSR 是一种同时作用于胞内菌和宿主细胞的抗生素. 使用 TSR 及其类似物在体外对海分枝杆菌进行测活, 发现它们的活性比红霉素和异烟肼(isoniazid)高 25~200 倍, 活性顺序为 5'-F-TSR≈6'-F-TSR>12'-CH₃-TSR>TSR. 使用 TSR 及其类似物对海分枝杆菌感染的斑马鱼幼鱼进行体内测活, 发现它们具有低细胞毒性, 同样

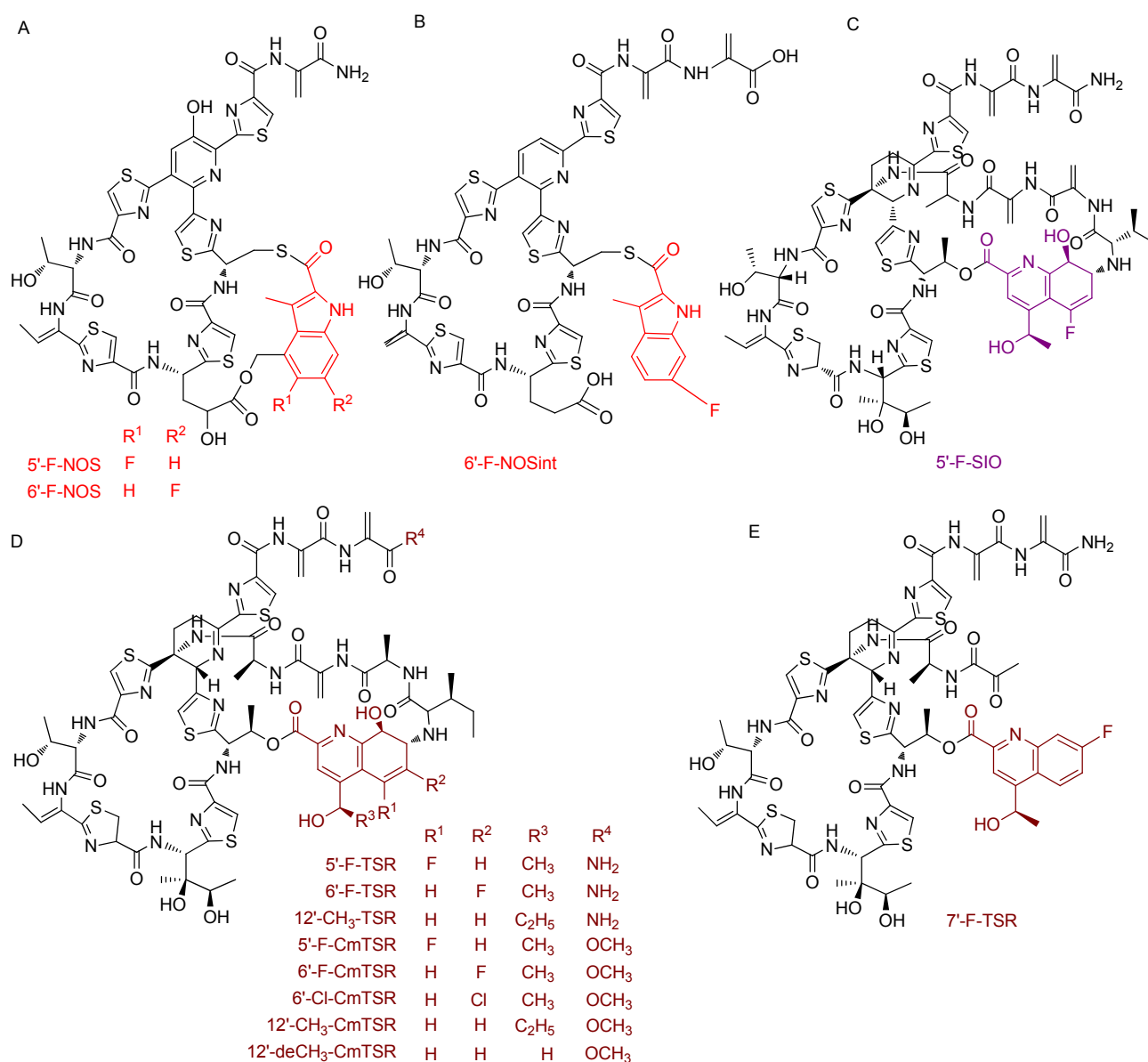


图9 化学喂养获得 NOS 和 TSR 类似物

Figure 9 NOS and TSR analogs obtained by chemical feeding

TSR 类似物具有更高的抗菌活性, 但体内生物活性顺序为 $12'\text{-CH}_3\text{-TSR} > 5'\text{-F-TSR} \approx 6'\text{-F-TSR} > \text{TSR}$, 这说明对 QA 单元的微调可以得到抗菌活性提高的 TSR 类似物^[19]. 2019 年, 我们在敲除 *tsrT* 的 TSR 突变株的基础上, 向其回补 SIO 前体肽基因 *sioH*, 发酵喂养 5-F-QA 得到了化合物 5'-F-SIO(图 9C). 抗菌活性和水溶性测试表明: 5'-F-SIO 的水溶性由于亲水性的氟原子的引入, 使得其水溶性有显著的提升. 在针对典型的口腔致龋菌和牙周致病菌的抗菌实验发现, 5'-F-SIO 的对抗致龋菌的活性和 5'-F-TSR 相当, 均优于母体化合物 TSR^[46]. 在对抗牙周致病菌方面, 5'-F-SIO 也具有一定的活性, 使得其具有潜在的作为辅助用药参与牙周病治疗的价值.

水解酶 TsrB 作用于 TSR 成熟后期, 将 *tsrB* 基因敲除后可得到抗菌活性提高的尾部末端为甲酯的 TSR 类似物^[42]. 因此, 在 $\Delta\text{tsrB/T}$ 双敲除突变株中喂养 QA 衍生物, 理论上可以得到 C 末端甲酯化和 QA 单元修饰的 TSR 类似物. 2016 年, 我们向该突变株中喂养 5-F-QA、6-F-QA、6-Cl-QA、12-CH₃-QA 和 12-de-CH₃-QA, 分别得到了对应的 TSR 类似物(图 9D). 生物活性测试中发现, 除 6'-Cl-TSR 之外的化合物的抗菌活性均明显提高, 这可能是因为氯原子的诱导和位阻效应影响了 QA 单元与 23S rRNA 的 A 1067 之间的相互作用^[47]. 随后他们又向 ΔtsrT 突变株喂养了 7-F-QA 和 8-F-QA, 仅得到侧环未形成的 7'-F-TSR, 该化合物 Ile1 和 Val2 丢失, Dha3 转化为 1,2-二酮结构(图 9E)^[44b].

NOS 体系中, 2011 年, 我们向 NOS 产生菌活跃链霉菌喂养 5-F-色氨酸, 得到了抗菌活性明显提高的 5'-F-NOS(图 9A)^[26]. 2020 年, 我们又向 MIA 合成阻断的突变株 ΔnosL 中喂养 6-F-MIA, 得到了双环 6'-F-NOS(图 9A)和单环中间产物 6'-F-NOSint(图 9B), 但它们的活性较 NOS 均有所下降^[48], 这可能是由于 MIA 单元 6 位取代基的改变导致了后修饰酶的催化功能.

在生物合成途径认识的基础上, 对 MIA 单元和 QA 单元进行合理化修饰, 可获得活性改善的新化合物. 值得关注的是, 通过对 TSR 类似物的研究发现了 TSR 抗菌活性的一种新机制——诱导宿主细胞发生自噬. 由此可见, 天然产物结构多样性研究具有重要的意义, 不仅可以构建新型结构类似物, 改善化合物活性, 同时还有助于发现新的作用靶点以及作用机制, 为进一步的药物开发奠定基础. 在了解天然产物生物合成机制的基础上进行突变株喂养, 是天然产物结构多样性研究中的一种行之有效的方法.

5 总结与展望

TSR 与 NOS 复杂的化学结构使它们具有比单环硫

肽更优异的生物活性以及更多样的可修饰结构单元. 随着它们的生物合成途径以及生物作用机制的逐步明朗, 人们开发出了以上三种生物改造方式, 获得了大量 TSR 及 NOS 类似物, 其中不乏生理活性提高的化合物, 这对天然产物多样性发展具有重要的指导意义. 由此可见, 在掌握了硫肽类抗生素生物合成路径以及成熟的生物学改造手段之后, 人们可以通过菌种遗传操作对硫肽类抗生素进行合理的工程改造, 从而得到更有利于人类发展的化合物.

References

- [1] Arnison, P. G.; Bibb, M. J.; Bierbaum, G.; Bowers, A. A.; Bugni, T. S.; Bulaj, G.; Camarero, J. A.; Campopiano, D. J.; Challis, G. L.; Clardy, J.; Cotter, P. D.; Craik, D. J.; Dawson, M.; Dittmann, E.; Donadio, S.; Dorrestein, P. C.; Entian, K. D.; Fischbach, M. A.; Garavelli, J. S.; Goransson, U.; Gruber, C. W.; Haft, D. H.; Hemscheidt, T. K.; Hertweck, C.; Hill, C.; Horswill, A. R.; Jaspars, M.; Kelly, W. L.; Klinman, J. P.; Kuipers, O. P.; Link, A. J.; Liu, W.; Marahiel, M. A.; Mitchell, D. A.; Moll, G. N.; Moore, B. S.; Muller, R.; Nair, S. K.; Nes, I. F.; Norris, G. E.; Olivera, B. M.; Onaka, H.; Patchett, M. L.; Piel, J.; Reaney, M. J.; Rebuffat, S.; Ross, R. P.; Sahl, H. G.; Schmidt, E. W.; Selsted, M. E.; Severinov, K.; Shen, B.; Sivonen, K.; Smith, L.; Stein, T.; Sussmuth, R. D.; Tagg, J. R.; Tang, G. L.; Truman, A. W.; Vederas, J. C.; Walsh, C. T.; Walton, J. D.; Wenzel, S. C.; Willey, J. M.; van der Donk, W. A. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 108.
- [2] Walsh, C. T. *Science* **2004**, 303, 1805.
- [3] Yang, X.; van der Donk, W. A. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 7662.
- [4] Bagley, M. C.; Dale, J. W.; Merritt, E. A.; Xiong, X. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 685.
- [5] Ortega, M. A.; van der Donk, W. A. *Cell Chem. Biol.* **2016**, 23, 31.
- [6] Tl, S. U. *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, 29, 473.
- [7] Li, C.; Kelly, W. L. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 153.
- [8] Hensens, O. D.; Albers-Schönberg, G. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 3649.
- [9] Li, J.; Qu, X.; He, X.; Duan, L.; Wu, G.; Bi, D.; Deng, Z.; Liu, W.; Ou, H. *PLoS One* **2012**, 7, e45878.
- [10] Vandeputte, J.; Dutcher, J. D. *Antibiot. Annu.* **1955~1956**, 560.
- [11] Trejo, W. H.; Dean, L. D.; Pluscec, J.; Meyers, E.; Brown, W. E. *J. Antibiot (Tokyo)* **1977**, 30, 639.
- [12] (a) Anderson, B.; Hodgkin, D. C.; Viswamitra, M. A. *Nature* **1970**, 225, 233.
(b) Hensens, O. D.; Albers-Schönberg, G. *J. Antibiot (Tokyo)* **1983**, 36, 814.
(c) Hensens, O. D.; Albers-Schönberg, G. *J. Antibiot (Tokyo)* **1983**, 36, 832.
(d) Hensens, O. D.; Albers-Schönberg, G.; Anderson, B. F. *J. Antibiot (Tokyo)* **1983**, 36, 799.
- [13] Benazet, F.; Cartier, M.; Florent, J.; Godard, C.; Ninet, L. *Experientia* **1980**, 36, 414.
- [14] Depaire, H.; Thomas, J. P.; Brun, A.; Olesker, A.; Lukacs, G. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 18, 1397.
- [15] Bhat, U. G.; Halasi, M.; Gartel, A. L. *PLoS One* **2009**, 4, e6593.
- [16] Rogers, M. J.; Cundliffe, E.; Mccutchan, T. F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 715.
- [17] (a) Naidu, B. N.; Sorenson, M. E.; Zhang, Y.; Kim, O. K.; Matiskeella, J. D.; Wichtowski, J. A.; Connolly, T. P.; Li, W.; Lam, K. S.; Bronson, J. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5573.
(b) Zhang, C.; Herath, K.; Jayasuriya, H.; Ondeyka, J. G.; Zink, D. L.; Occi, J.; Birdsall, G.; Venugopal, J.; Ushio, M.; Burgess, B. J. *Nat. Prod.* **2009**, 72, 841.
(c) Zhang, C.; Occi, J.; Masurekar, P.; Barrett, J. F.; Zink, D. L.; Smith, S.; Onishi, R.; Ha, S.; Salazar, O.; Genilloud, O. *J. Am.*

- Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12102.
- [18] (a) Xing, Y.; Draper, D. E. *Biochemistry* **1996**, *35*, 1581.
 (b) Blyn, L. B.; Risen, L. M.; Griffey, R. H.; Draper, D. E. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1778.
 (c) Wimberly, B. T.; Guymon, R.; McCutcheon, J. P.; White, S. W.; Ramakrishnan, V. *Cell* **1999**, *97*, 491.
 (d) Lentzen, G.; Klinck, R.; Matassova, N.; Aboul-ela, F.; Murchie, A. I. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769.
 (e) Harms, J. M.; Wilson, D. N.; Schlutzenzen, F.; Connell, S. R.; Fucini, P. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 26.
 (f) Bo, T. P.; Leviev, I.; Mankin, A. S.; Garrett, R. A. *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 391.
 (g) Gonzalez, R. L.; Chu, S.; Puglisi, J. D. *RNA (New York, N. Y.)* **2007**, *13*, 2091.
- [19] Zheng, Q.; Wang, Q.; Wang, S.; Wu, J.; Gao, Q.; Liu, W. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1002.
- [20] Houck, D. R.; Chen, L. C.; Keller, P. J.; Beale, J. M.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5800.
- [21] Houck, D. R.; Chen, L. C.; Keller, P. J.; Beale, J. M.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7992.
- [22] Yu, Y.; Duan, L.; Zhang, Q.; Liao, R.; Ding, Y.; Pan, H.; Evelyn, W. P.; Tang, G. L.; Shen, B.; Liu, W. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 855.
- [23] (a) Liao, R.; Duan, L.; Lei, C.; Pan, H.; Ding, Y.; Zhang, Q.; Chen, D.; Shen, B.; Yu, Y.; Liu, W. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141.
 (b) Kelly, W. L.; Pan, L.; Li, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327.
- [24] Morris, R. P.; Leeds, J. A.; Naegeli, H. U.; Oberer, L.; Memmert, K.; Weber, E.; LaMarche, M. J.; Parker, C. N.; Burrer, N.; Esterow, S.; Hein, A. E.; Schmitt, E. K.; Krastel, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946.
- [25] Hudson, G. A.; Zhang, Z.; Tietz, J. I.; Mitchell, D. A.; van der Donk, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 16012.
- [26] Zhang, Q.; Li, Y. X.; Chen, D. D.; Yu, Y.; Duan, L.; Shen, B.; Liu, W. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 154.
- [27] Sicoli, G.; Mouesca, J. M.; Zeppieri, L.; Amara, P.; Martin, L.; Barra, A. L.; Fontecilla Camps, J. C.; Gambarelli, S.; Nicolet, Y. *Science* **2016**, *351*, 1320.
- [28] Qiu, Y. P.; Du, Y. N.; Zhang, F.; Liao, R. J.; Zhou, S. X.; Peng, C.; Guo, Y. L.; Liu, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18186.
- [29] Qiu, Y. P.; Du, Y. N.; Wang, S. F.; Zhou, S. X.; Guo, Y. L.; Liu, W. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1502.
- [30] Wang, B.; LaMattina, J. W.; Marshall, S. L.; Booker, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5788.
- [31] Duan, L.; Wang, S.; Liao, R.; Liu, W. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 443.
- [32] Liu, W. Y.; Ma, M.; Xue, Y. J.; Liu, N.; Wang, S. Z.; Chen, Y. J. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 573.
- [33] Wang, S. Z.; Zheng, X. L.; Pan, Q.; Chen, Y. J. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 94643.
- [34] Kwok, M. M.; Myatt, S. S.; Marson, C. M.; Coombes, R. C.; Constantinidou, D.; Lam, W. F. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 2022.
- [35] Li, C.; Zhang, F.; Kelly, W. L. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 558.
- [36] Zhang, F.; Li, C.; Kelly, W. L. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *11*, 415.
- [37] Zhang, F.; Kelly, W. L. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 998.
- [38] Guo, H.; Wang, J.; Li, Y. M.; Yu, Y.; Zheng, Q. F.; Wu, J. Q.; Liu, W. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 240.
- [39] Duan, P. P.; Zheng, Q. F.; Lin, Z.; Wang, S. F.; Chen, D. D.; Liu, W. *Org. Chem. Front.* **2016**, *3*, 1254.
- [40] Liu, W. Y.; Xue, Y. J.; Ma, M.; Wang, S. Z.; Liu, N.; Chen, Y. J. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1544.
- [41] Bai, X. B.; Guo, H.; Chen, D. D.; Yang, Q.; Tao, J.; Liu, W. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7*, 584.
- [42] Liao, R. J.; Liu, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2852.
- [43] Liu, J.; Lin, Z.; Li, Y.; Zheng, Q.; Chen, D.; Liu, W. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 3727.
- [44] (a) Liu, J.; Lin, Z.; Chen, H.; Guo, H.; Tao, J.; Liu, W. *Chin. J. Chem.* **2019**, *37*, 35.
 (b) Zheng, Q. F.; Wang, S. F.; Liao, R. J.; Liu, W. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2673.
- [45] Wang, S. F.; Zheng, Q. F.; Wang, J. F.; Zhao, Z. X.; Li, Q. Y.; Yu, Y. S.; Wang, R. X.; Liu, W. *Org. Chem. Front.* **2015**, *2*, 106.
- [46] Wang, J.; Lin, Z.; Bai, X. B.; Tao, J.; Liu, W. *Org. Chem. Front.* **2019**, *6*, 1194.
- [47] Wang, S. F.; Zheng, Q. F.; Wang, J. F.; Chen, D. D.; Yu, Y. S.; Wen, L. *Org. Chem. Front.* **2016**, *3*, 496.
- [48] Zhang, E.; Guo, H.; Chen, D.; Yang, Q.; Fan, Y.; Yin, Y.; Wang, W.; Chen, D.; Wang, S.; Liu, W. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 4051.

(Lu, Y.)