

真菌三萜及甾体的生物合成研究进展

高铄晖 王高乾 黄蕙芸 高昊 姚新生 胡丹*

(暨南大学药学院 中药及天然药物研究所 广州 510632)

摘要 三萜和甾体是由六个异戊二烯单元组成的一大类天然产物, 具有复杂多样的化学结构和广泛的生物活性. 真菌是三萜和甾体化合物发现的重要源泉, 但与植物相比, 目前从真菌中发现的三萜骨架类型仍然很少, 仍有较大的研究空间. 基因组挖掘已成为后基因组时代发现新颖天然产物的重要手段, 其主要通过与相似功能基因的比较来发现新功能基因. 随着高通量测序技术和生物信息技术的飞速发展, 一些具有重要生物活性的真菌三萜或甾体的生物合成途径逐渐被阐明, 这为利用基因组挖掘手段从真菌中发现新颖三萜或甾体化合物奠定了基础. 重点介绍近年来在真菌三萜或甾体生物合成方面的研究进展情况.

关键词 三萜; 甾体; 真菌; 生物合成; 基因组挖掘

Biosynthesis of Fungal Triterpenoids and Steroids

Gao, Yaohui Wang, Gaoqian Huang, Huiyun Gao, Hao Yao, Xinsheng Hu, Dan*
(Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract Triterpenoids and steroids are one of the largest classes of natural products composed of six isoprene units, with various chemical structures as well as wide range of biological activities. Fungi serves as important sources for triterpenoids and steroids. However, compared with plants, the types of triterpenoid skeletons discovered in fungi are much fewer, suggesting that there is a large research space. Genome mining has become an important method of discovering novel natural products in the post-genomic era, which uses the genes with similar functional to identify the target genes with new functions. With the rapid development of high-throughput sequencing and biological information technology, biosynthetic pathways of some triterpenoids and steroids with important biological activities have been elucidated in recent years, which build the foundations for the discovery of new triterpenoids or steroids from fungi via genome mining. The recent advances in the biosynthesis of fungal triterpenoids and steroids are mainly introduced.

Keywords triterpenoids; steroids; fungi; biosynthesis; genome mining

1 结构多样且活性广泛的天然产物三萜和甾体

三萜是由六个异戊二烯单元形成的一大类天然产物, 广泛分布于自然界, 在细菌、真菌、植物和动物中均有发现. 同时, 三萜也是结构多样性最为丰富的天然产物之一, 截止到2013年, 人们从自然界中分离获得的三萜类化合物已达22000多个^[1]. 虽然三萜在化学结构上具有高度的多样性, 但它们却都是来源于同一底物2,3(S)-环氧角鲨烯(图1). 造成三萜结构多样的根本原因在于环氧角鲨烯环化酶(OSC)的多样性, 其能通过椅式-船式-椅式或者椅式-椅式-椅式两种折叠方式, 将2,3(S)-环氧角鲨烯环化形成不同的碳骨架, 如羊毛甾

烷、环阿吨烷、葫芦烷、达玛烷、巴查烷、羽扇豆烷、乌苏烷、齐敦果烷等^[2]. 然后, 不同的碳骨架在氧化酶、酰化酶、脱水酶、糖基转移酶等后修饰酶的作用下进一步生成结构多样的三萜化合物^[2]. 其中, 甾体是在羊毛甾醇(真菌和动物)或环阿吨醇(植物)三萜骨架的基础上, 通过脱去3个甲基而形成一类具有环戊烷骈多氢菲骨架的天然产物. 从这一角度看, 甾体可以被认为是一个重要亚群^[3].

由于三萜和甾体在化学结构上的多样性, 使它们具备了广泛的生物学功能. 一方面它们在维持宿主自身的生理活动中发挥着不可或缺的作用. 如胆固醇、 β -谷甾

* Corresponding author. E-mail: thudan@jnu.edu.cn

Received June 20, 2018; revised July 6, 2018; published online July 16, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31670036).

国家自然科学基金(No. 31670036)资助项目.

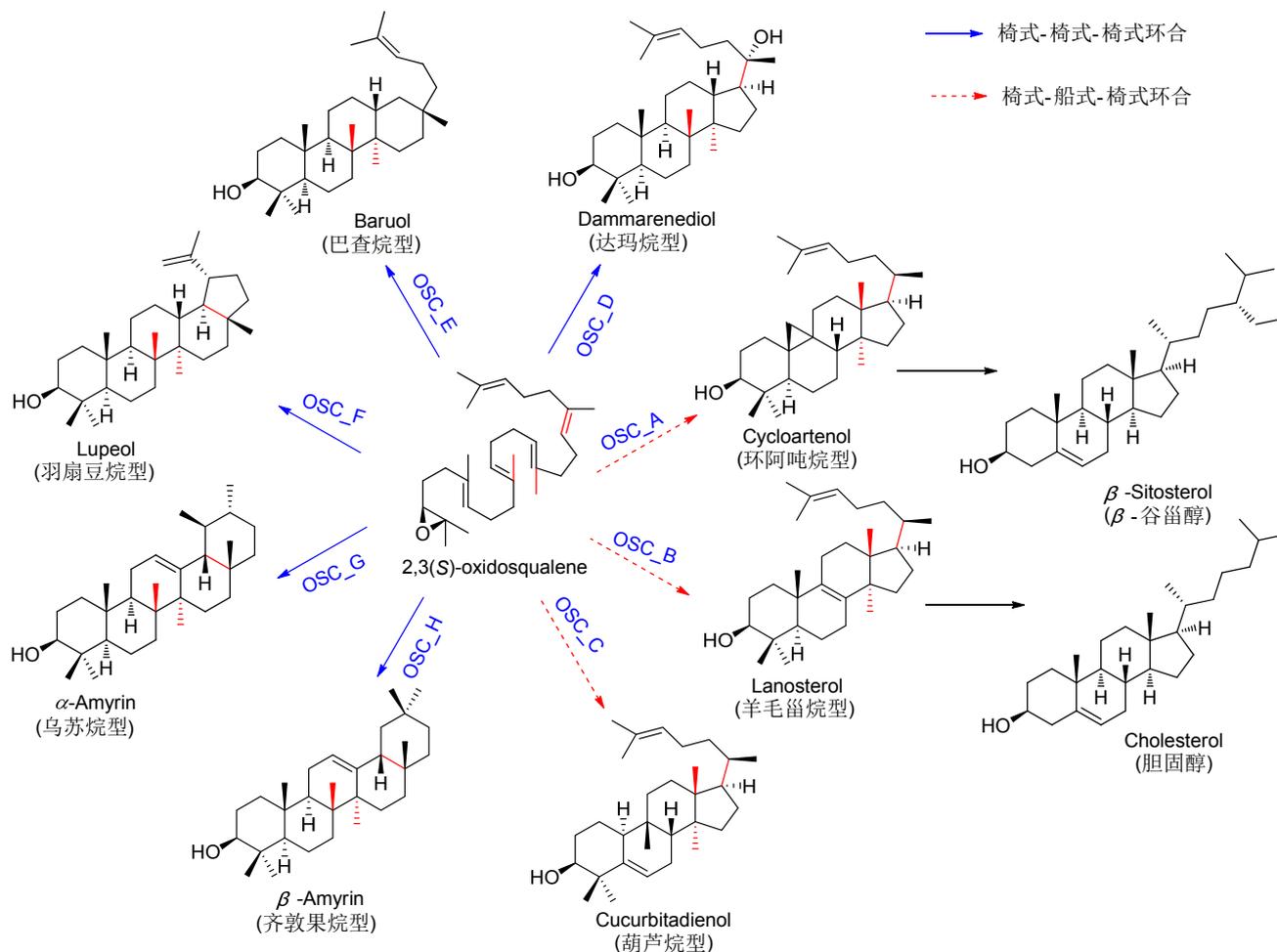


图1 2,3(S)-环氧角鲨烯在不同的环化酶 OSC 作用下形成不同的碳骨架

Figure 1 Diverse triterpenoid skeletons derived from a single substrate 2,3(S)-oxidosqualene

醇以及麦角甾醇分别是动物、植物和真菌细胞膜的重要组成部分,直接影响细胞膜的流动性,在维持细胞渗透压、细胞识别和细胞信号调节方面具有重要作用^[4,5]。哺乳动物分泌的甾体激素,包括皮质激素和性激素,在维持机体盐水平衡、调节免疫以及性征发育中发挥着重要作用^[6-8]。另一方面,三萜和甾体具有多样的药理活性,也是新药发现的重要来源,如人参中的人参皂苷 Rg3^[9]、桦木中分离获得的桦木酸^[10]、洋地黄中的洋地黄毒苷^[11]、甘草中的甘草酸^[12]、灵芝中的灵芝酸^[13]等都已作为临床上广泛使用的药物或已进入临床研究。因此,从自然界不断发掘新型三萜或甾体化合物具有重要意义。

2 三萜和甾体化合物的重要来源

自 1889 年, Tanret 等^[14]首次从麦角真菌中分离到麦角甾醇以来,人们已经从真菌中发现了大量的三萜和甾体化合物。然而,这些化合物从三萜骨架来源来看,仅仅只有少数的几类,远远低于植物中发现的 100 多种三萜骨架。其中,最多的是羊毛甾醇骨架来源的衍生物,

包括由 30 个碳原子组成的羊毛甾烷类、28 个碳原子组成的麦角甾烷类、27 个碳原子组成的胆甾烷类、29 个碳原子组成的豆甾烷类、21 个碳原子组成的孕甾烷类以及特殊的 19~20 个碳原子组成的雄甾烷类;其次为原萜烯醇骨架来源的衍生物,主要包括梭链孢烷抗生素;最后是只在少数真菌中存在的羊齿烷骨架来源的衍生物。

2.1 羊毛甾醇骨架来源的衍生物

2.1.1 羊毛甾烷类

羊毛甾烷类三萜是一类由 30 个碳原子组成的四环三萜,其特点是 C(13)位的甲基处于 β 位, C(14)位的甲基处于 α 位,且 C(17)位连接 β 构型的侧链。其中,最具代表性的化合物为羊毛甾醇(lanosterol, **1**),它是合成麦角甾醇(ergosterol, **10**)、豆甾醇(stigmasterol)等甾体化合物的关键中间体。此外,一些大型真菌以羊毛甾醇为底物,通过氧化、乙酰化、甲基化、脱水、开环等反应,形成一系列结构多样的羊毛甾烷类三萜(**2~7**)(图2)^[15],如从茯苓中发现的 poricoic acid B (**2**)和 pachymic acid (**3**)、从

硫磺菌中发现的 sulfurenic acid (**4**)、从白桦茸中发现的 inotodiol (**5**)、从樟芝中分离到的 methyl antcinatate B (**6**) 以及从 *Elfvigia applanata* 中分离到的 elfvingic acid B (**7**)，这些化合物都具有突出的抗肿瘤活性。其中最具代表性的化合物为从灵芝中发现的灵芝酸 A (ganoderic acid A, **8**)和灵芝酸 B (ganoderic acid B, **9**)^[16]。

2.1.2 麦角甾烷类

麦角甾烷类化合物是在羊毛甾醇的基础上，通过脱去 C(14)和 C(4)位的三个甲基，并在 C(24)位引入一个甲基而形成的一类天然产物，在真菌中分布最为广泛，既存在于较低等的接合菌门和半知菌门的真菌中，也是高等的子囊菌门、担子菌门真菌主要的甾醇成分^[17]。其中，麦角甾醇(**10**)是大多数真菌细胞膜的重要组成成分，在维持真菌生命活动中发挥着重要作用。因此，抑制麦角甾醇的生物合成已成为开发抗真菌药物的重要手段。同样，除了麦角甾醇及其生物合成的中间体，如粪甾醇 fecosterol (**11**)、表甾醇 episterol (**12**)外，人们也从真菌中发现了一系列麦角甾醇发生氧化、碳碳断裂、扩环或者缩环的产物(图 3)。Hirotani 等^[18]从姬松茸 (*Agaricus blazei*)培养的菌丝体中分离获得了首个降 A 环的麦角甾烷类化合物 blazeispirol (**13**)。Kikuchi 等从杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*)的子实体中分离获得 B 环开裂的 eringiactal A (**14**)^[19]、C 环开裂的化合物 **15**^[20]以及罕见的 C 环开裂并与 B 环重排的产物 pleurocin A (**16**)^[21]。Hu 等^[22]从拟茎点霉属真菌 (*Phomopsis* sp.)中分离到了一个稀有的 B 环开裂并与 A 环重排的产物 phomosterone A (**17**)以及 C, D

环开裂的产物 phomosterone B (**18**)。Han 等^[23]从一株褐褶菌属真菌中分离到了两个 C, D 发生开裂并重排的产物 gloeophyllins A (**19**)和 B (**20**)。最近，Luo 等^[24]从灵芝属真菌 *Ganoderma theaecolum* 中分离得了一个 A, B, C 环开裂并重排的产物 **21**。由此可见，麦角甾醇不仅是真菌细胞膜的重要组成成分，也是形成多种活性甾类次生代谢产物的重要前体。

2.1.3 胆甾烷类以及豆甾烷类

一直以来，人们认为所有真菌中的甾醇都是以麦角甾醇为主，就像哺乳动物的甾醇以胆固醇为主一样。然而，随后的一些研究表明，壶菌门等一些低等的真菌主要以胆固醇(cholesterol, **22**)或者 24-甲基胆固醇(**23**)作为主要甾醇(图 4)^[25]。*Taphrina* 和 *Protomyces* 属的一些子囊菌则以菜籽甾醇(brassicasterol, **24**)为主要的甾类成分^[17]。此外，人们还在一些高等的子囊菌和担子菌中检测到了 24-乙基胆甾醇类成分。如在子囊菌门的小麦白粉菌(*Blumeria graminis*)检测到了 24-乙基胆固醇^[26]，在柄锈菌目真菌中发现主要的甾醇为 24-乙基-胆甾-7,24(28)-二烯醇(**25**)和 24-乙基-胆甾-7-烯醇(**26**)，但是这些甾醇中的 24 位乙基是否与植物甾醇一样都是 α 构型仍不清楚。以上研究表明不同的真菌具有不同结构类型的甾醇。但随着真菌的进化，真菌甾醇普遍表现出从胆甾醇向麦角甾醇转变的趋势^[17]。

2.1.4 孕甾烷类

孕甾是在胆固醇的基础上通过 C(20)—C(22)断裂形成的一类化合物，通常由 21 个碳原子组成，通常具有十

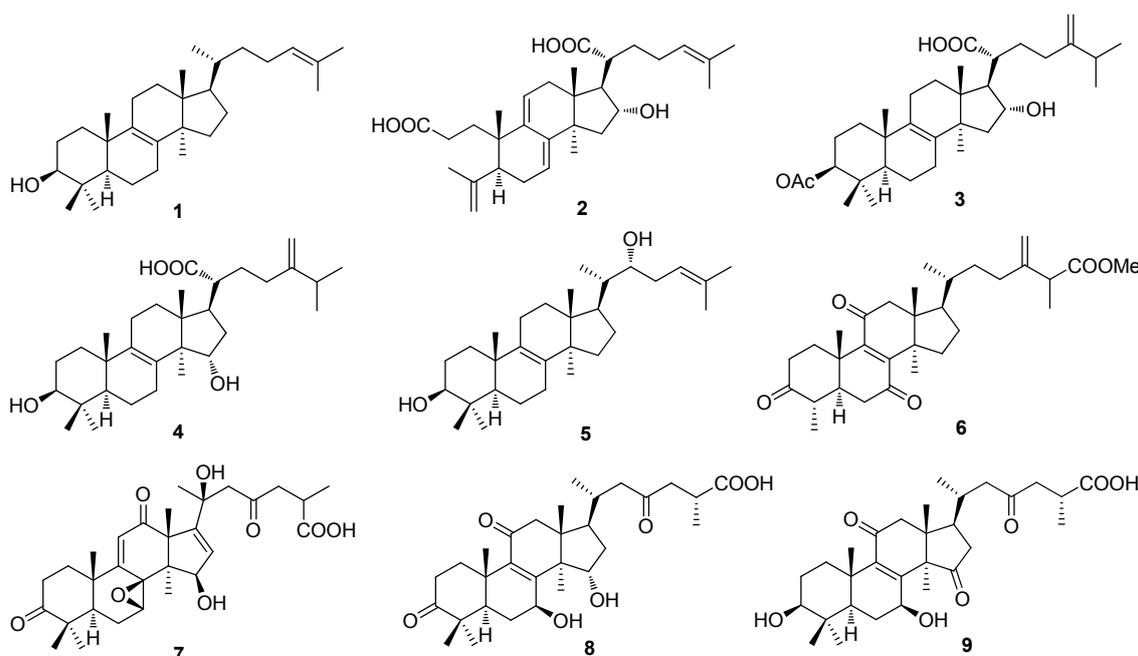


图 2 真菌中代表性的羊毛甾烷类化合物
Figure 2 Representative lanostanoids from fungi

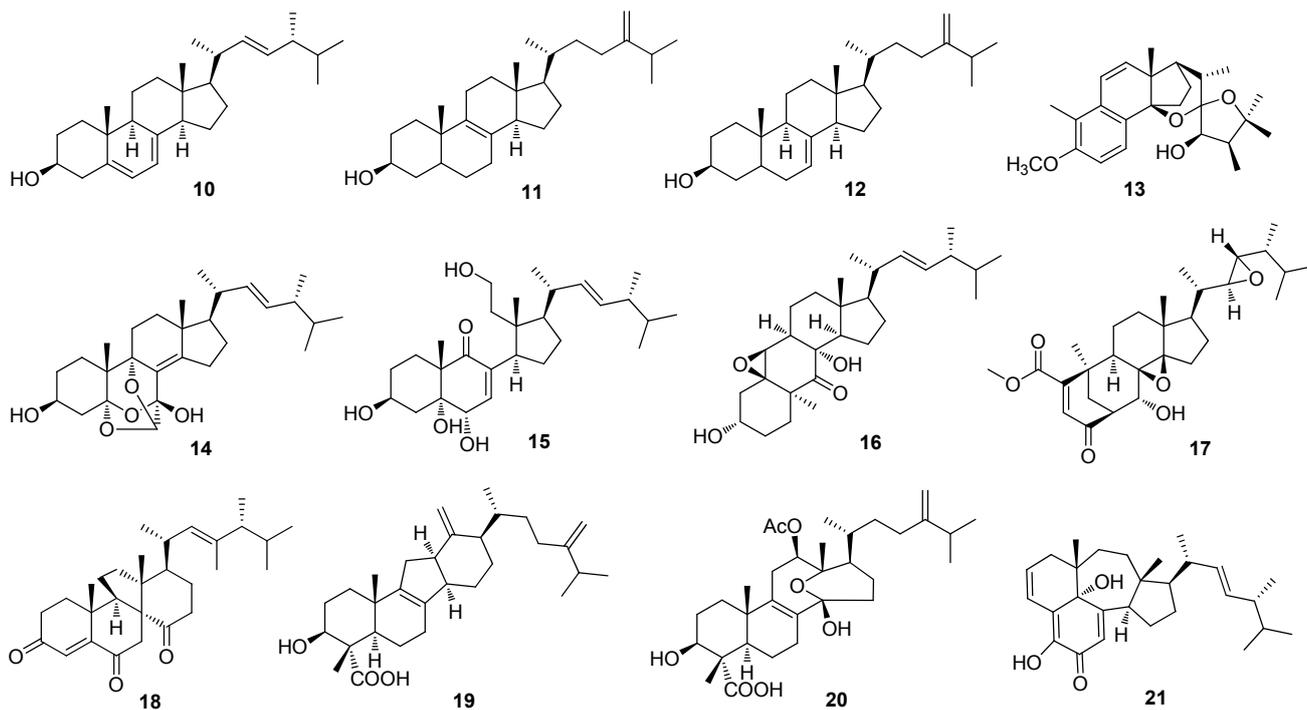


图3 真菌中代表性的麦角甾烷类化合物
Figure 3 Representative ergosteroids from fungi

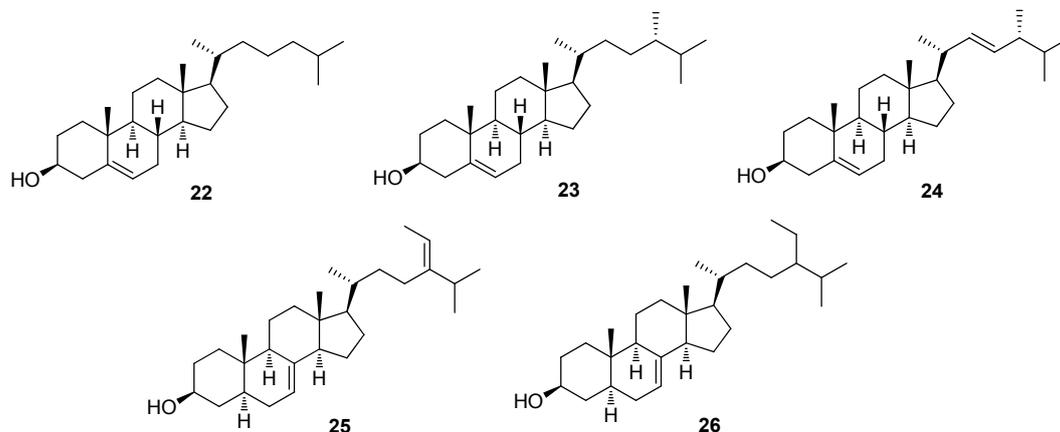


图4 真菌中其它代表性甾醇
Figure 4 Other representative sterols from fungi

分重要的生物活性。其中，孕烯醇酮(pregnenolone, 27)是哺乳动物中合成孕酮、糖皮质激素、盐皮质激素以及性激素的关键前体(图5)。在真菌中，人们也发现了一系列孕烯醇酮的衍生物 28~29^[27]。此外，人们还从真菌中发现了一系列具有特殊结构的孕甾类化合物。Elsebai等^[28]从海洋红藻的共生真菌 *Phaeosphaeria spartinae* 中发现了 4 α -羧基孕甾类化合物 spartopregnenolone (30)。本课题赵琴等^[29]从一株多节孢属真菌 *Nodulisporium* sp. 中分离获得了 4 α -甲基孕甾(31)及其开裂产物 32。1986年，人们从绿粘帚霉(*G. virens*)中分离得到一个 C(4)—C(6)桥合了呋喃环的孕甾类化合物 virone (33)^[30]。随后，

人们又从拟白膜盘菌(*H. pseudoalbidus*)发现了其 3-羰基的还原产物 3-dihydrovirone (34)^[31]。最近，Ding等^[32]从雷公藤内生真菌(*T. wortmannii* LGT-4)中又发现两个呋喃孕甾类化合物 secovironolide (35)和 epoxyvirone (36)，其中化合物 35 是首次发现的 B 环环合的呋喃孕甾化合物。

2.1.5 雄甾烷类

雄甾是在孕甾的基础上进一步发生 C(17)—C(20)断裂而形成的一类甾体化合物。目前从真菌中发现的雄甾可以分为两类：一类是 C(4)—C(6)之间桥合呋喃环的呋喃甾

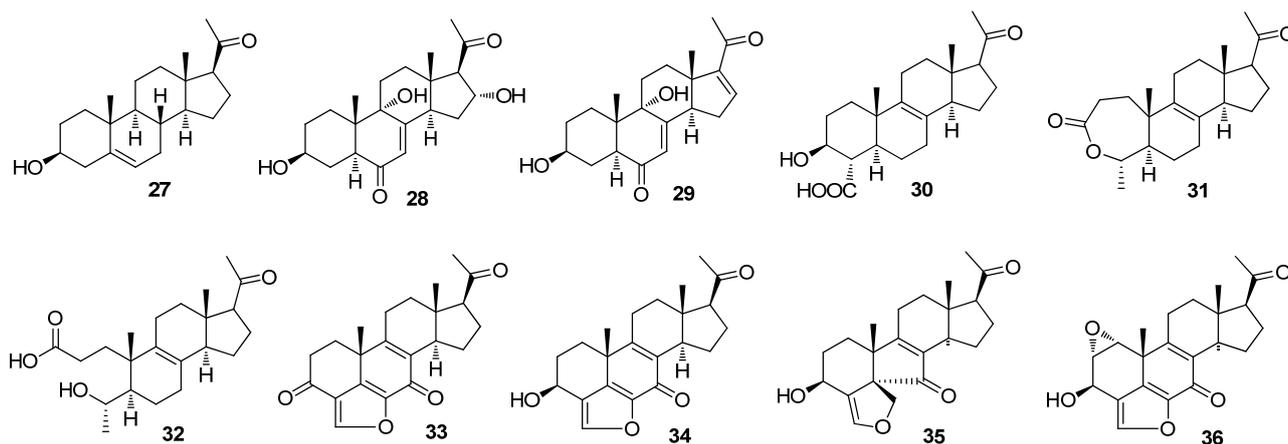


图5 真菌中代表性的孕甾烷类化合物

Figure 5 Representative pregnane-type steroids from fungi

甾体化合物(furanosteroids), 另一类是 B 环发生缩环的雄甾。呋甾体是一类具有重要生物活性的真菌次生代谢产物, 其代表性化合物包括绿胶霉素(viridin, **37**)、绿毛菌醇(viridiol, **38**)、去甲氧绿胶霉素(demethoxyviridin, **39**)、去甲氧绿毛菌醇(demethoxyviridiol, **40**)以及渥曼青霉素(wortmannin, **41**)(图 6)^[30]。它们具有抗细菌、抗真菌以及抗炎等多种生物活性, 特别是这类化合物能在 nmol 浓度下抑制磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol3-kinase, PI3K)^[30]。其中, 渥曼青霉素已经作为 PI3K 抑制剂被广泛用于分子生物学研究。最近, 以渥曼青霉素为原型开发出的抗肿瘤药 PX-886 已经进入 II 期临床^[33]。我们^[34]前期的研究还发现绿胶霉素类化合物能显著改善老年痴呆(AD)果蝇的学习记忆能力和抑制 A β ₄₂ 的聚集, 提示其有望开发成新的抗 AD 药物。除了呋甾体外, Cao 等^[35]从维管束植物内生真菌 (*Asterogyne martiana*)还发现了一类与普通雄甾化合物 6/6/6/5 四环骨架不同的 6/5/6/5 骨架的特殊雄甾类化合

物 asterogynins (**42**~**43**)(图 6)。

2.2 原萜烯醇骨架来源的化合物

原萜烯醇(**44**, protostadienol)与羊毛甾醇一样, 都是 2,3(S)-环氧角鲨烯以椅式-船式-椅式构型环化而成, 但与羊毛甾醇不同, 在形成 C(20)碳正离子之后, 原萜烯醇不发生任何 Wagner-Meerwei 重排, 而是直接脱去 C(17)的氢形成 C(17)=C(20)双键(图 7)。梭链孢烷抗生素是从真菌中发现的唯一一类以原萜烯醇为母核的三萜化合物, 它们的共同点是在原萜烯醇骨架的基础上脱去了 C(4 β)甲基, C(16 β)位连接有乙酰氧基, C(20)位甲基被氧化成羧基, 形成梭链孢烷骨架。其代表性的化合物有三个, 分别是夫西地酸(**45**, fusidic acid)、烟曲霉酸(**46**, helvolic acid)以及头孢菌素 P₁ (**47**, cephalosporin P₁)(图 7)。这类化合物是从真菌中发现最早的一类三萜抗生素, 具有突出的抗革兰氏阳性菌活性, 在临床上被广泛用于治疗耐药性金黄色葡萄球菌感染^[36]。

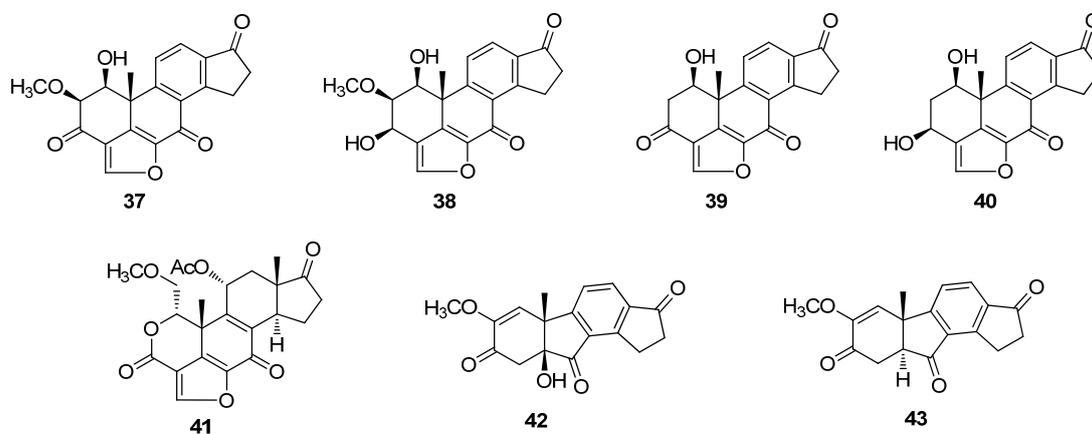


图6 真菌中代表性的雄甾烷类化合物

Figure 6 Representative androstane-type steroids from fungi

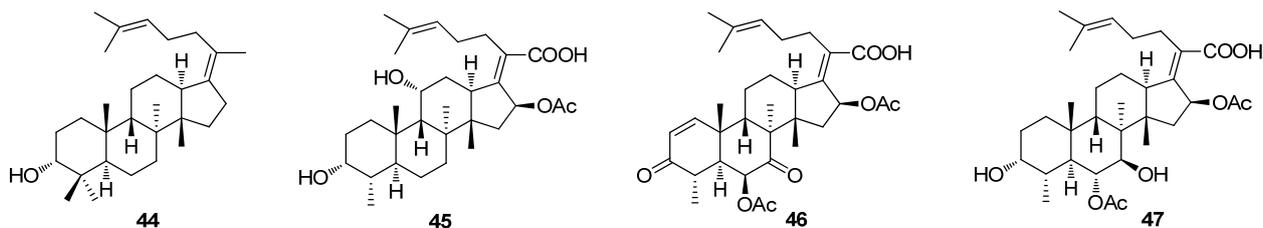


图7 真菌中代表性的原萜烯醇类化合物

Figure 7 Protostadienol-derived triterpenoids from fungi

2.3 羊齿烷骨架来源的化合物

羊齿烷(49, fernanes)是在何柏烷(48, hopanes)碳正离子的基础上,发生重排形成的一类五环三萜化合物,只存在于极少数的真菌中^[37-40]. Shigematsu 等^[40]从真菌 F11605 (FERM BP-1730)中分离到了首个羊齿烷类化合物 WF11605 (50). 随后,人们又从从真菌 *Hormonema* sp.和 *Humicola fuscoatra* NRRL 22980 中分别发现了化合物 enfumafungin (51)^[39]和化合物 fuscoatroside (52)^[38]. 最近, Deyrup 等^[37]又从碳角菌属真菌 *Xylaria* sp.中分到的化合物 kolokoside A (53, 图8). 这类化合物具有突出的抗真菌活性,但目前关于这类化合物的生物合成机制还不清楚.

最近,人们从海绵共生真菌 *Neosartorya fennelliae* KUFA 0811 和 *Neosartorya tsunodae* KUFC 9213 中分得到一类五环结构的三萜化合物 54^[41],其结构属于何柏烷骨架来源的三萜化合物. 何柏烷是羊齿烷的前体,这类骨架类型的化合物在真菌中极少发现.

由此可见,目前从真菌中发现的三萜骨架类型较少,表明有较大的研究空间. 基因组挖掘已成为后基因组时代发现新颖天然产物的重要手段,然而当前关于真菌三萜和甾体的生物合成研究仍处于起步阶段.

3 真菌三萜及甾体的生物合成

3.1 麦角甾醇的生物合成

麦角甾醇是大多数真菌细胞膜的主要组成成分. 多年来,人们以酿酒酵母为模型系统研究了麦角甾醇的生物合成途径,阐明了了从 2,3(S)-环氧角鲨烯开始合成麦角甾醇的催化过程^[42](Scheme 1). (1)首先是在羊毛甾醇合成酶 ERG7 (lanosterol synthase)的催化下, 2,3(S)-环氧角鲨烯折叠成椅式-船式-椅式构象,并发生质子化形成 C(20)碳正离子,再经过一系列重排反应形成 C(8)碳正离子,最后 C(9)脱去质子形成羊毛甾醇(lanosterol)^[42]. (2)随后,在 ERG11 即细胞色素氧化酶 CYP51 的作用下,以甲酸的方式脱去 C(14)的甲基^[43]. ERG11 属于细胞色素氧化酶 CYP450 家族,其介导的 C(14)位去甲基过程是一个三步反应,首先在 ERG11 的催化下 C(14)位甲基首先氧化为醇,随后氧化为醛,最后以甲酸的方式离去,并在 C(14)=C(15)形成双键,每一步的反应均需要 1 分子氧和辅酶还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 NADPH 的参与^[44]. 目前市面上许多经典的抗真菌药物如酮康唑、氟康唑都是通过抑制 ERG11 从而抑制麦角甾醇的生物合成,发挥抗真菌作用^[45]. (3) ERG24 介导 C(14)=C(15)双键还原, ERG24 即甾体 C(14)还原酶,属于氧化

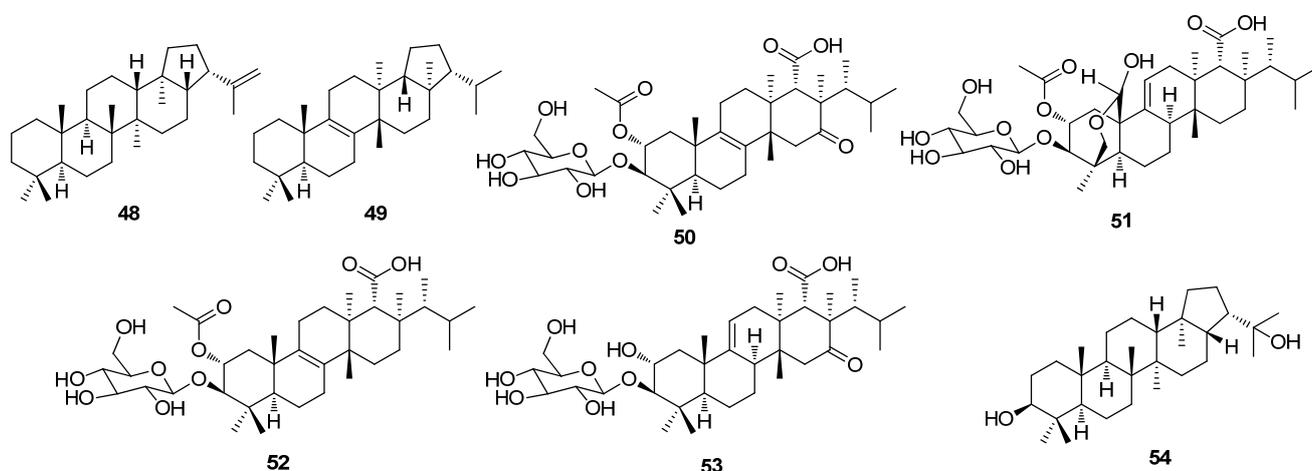


图8 羊齿烷骨架来源的三萜化合物

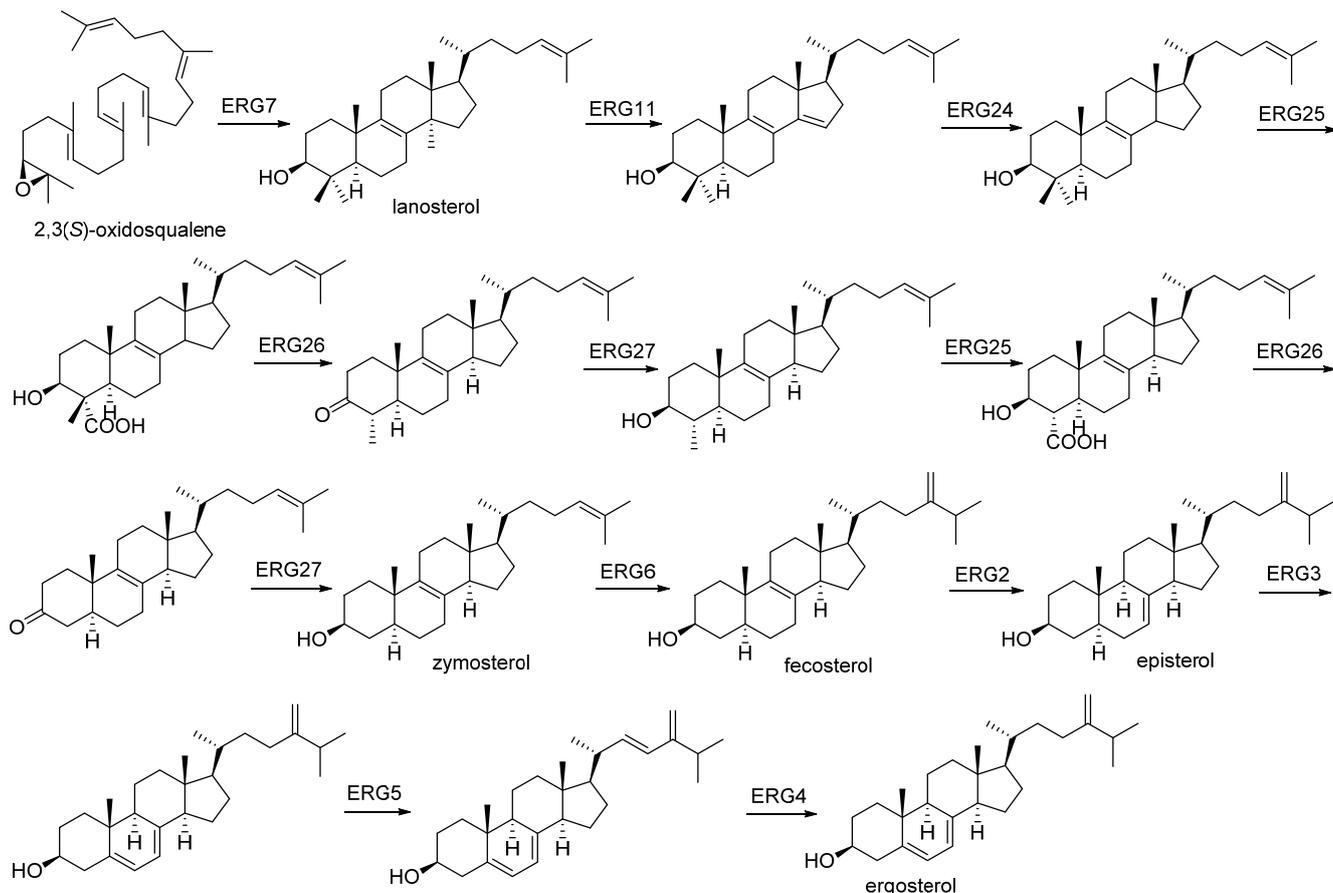
Figure 8 Fernane-derived triterpenoids

还原酶家族, 以 NADPH 为辅酶, 催化 Δ^{14} 双键还原^[46]. ERG24 也是抗真菌药物重要的作用靶点, 在农业中常用的杀菌剂丁苯吗啉就是 ERG24 的抑制剂^[47]. (4) ERG25/26/27 催化的 C(4)位两个甲基的脱去. ERG25 属于氧化还原酶家族, 具有 3 个富含组氨酸的序列, 在 ERG25 作用下, 首先是 C(4 α)甲基氧化成羧基^[48]; 随后 ERG26 [C(4)脱羧酶]催化 C(3 β)羟基氧化为羰基, 从而发生 β 脱羧反应, 脱去 C(4)位的羧基, 同时剩余的 β 甲基转移到 α 位; 最后, ERG27 催化 C(3)羰基还原 β 羟基. 随后, ERG25/26/27 再次发挥作用, 脱去剩余的 C(4 α)甲基, 生成 zymosterol^[49,50]. 有研究表明, 该步骤还需要 ERG28 的参与, 其能维系 ERG26 和 ERG27 之间的相互作用^[51], 并作为连接下一步反应的桥梁^[52]. (5) ERG6(甾醇 C(24)甲基转移酶)介导 C(24)位的甲基化, 形成 $\Delta^{24(28)}$ 双键, 使酵母甾醇转化为 fecosterol. (6) C(8)的双键在 ERG2 的催化下发生异构, 使 Δ^8 双键变为 Δ^7 双键, 形成 episterol^[53]. (7) ERG3 介导的 C(5)脱氢, ERG3(去饱和酶)是一种膜结合蛋白, 和 ERG25 相似具有三个富含组氨酸的保守序列, 其催化反应需要 1 分子氧和 NADPH 或 NADH 的参与, 介导 episterol B 环上的 C(5)位发生脱氢,

形成 $\Delta^{5,7}$ 共轭二烯结构^[54]. (8) ERG5 介导的 C(22)脱氢. ERG5 属于细胞色素氧化酶 CYP450 家族, 具有 Δ^{22} 去饱和酶活性和异生物质代谢活性, 在 ERG5 催化下 C(22)发生脱氢形成麦角甾-5,7,22,24(28)-四烯-3-醇^[55]. (9)麦角甾醇合成的最后一步是 C(24)双键的还原, 在 ERG4 即 C-24 还原酶的催化下形成终产物麦角甾醇(10)^[56]. 在酵母中, 参与麦角甾醇生物合成的 ERG 基因并不是成簇存在的, 而且 ERG 基因多为单拷贝基因, 而在丝状真菌中, ERG 基因存在多个同源基因的现象, 如产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)含有两个编码 ERG25 的基因 *Pcerg25A* 和 *Pcerg25B*^[57], 烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)含有两个编码 ERG4 的基因 *erg4A* 和 *erg4B* 基因^[58]. 此外, 一些研究表明, 在一些丝状真菌中, 麦角甾醇的生物合成途径也与酵母中的不同^[59]. 如在玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis*)中, 24 位的甲基化紧接在羊毛甾醇形成之后, 然后再脱去 C(14)位甲基^[60].

3.2 灵芝酸的生物合成

灵芝酸是从中国传统药用真菌灵芝 (*Ganoderma lucidum*)中分离得到的一类具有重要生物活性的三萜化



图式 1 酿酒酵母中麦角甾醇的生物合成途径

Scheme 1 Biosynthetic pathway of ergosterol from *Saccharomyces cerevisiae*

合物,在灵芝的子实体、菌丝体和孢子中均有分布.灵芝酸具有很高的生物活性和药用价值,研究表明,灵芝酸类化合物具有抑制胆固醇合成及调控血脂的作用^[61].此外,灵芝酸类化合物还具有抑制肿瘤生长的作用^[62].

由于其重要的生物活性,人们对灵芝酸的生物合成进行了大量研究.早期研究利用同位素喂养实验证明了灵芝酸来源于羊毛甾醇^[63],但在基因水平一直未能突破.2007年,Pan等^[64]首次报道了灵芝中编码角鲨烯合成酶的基因 *GI-SQS*.2008年又完成了灵芝中编码甲羟戊酸单辅酶 A 还原酶基因 *GI-HMGR* 的克隆和表征^[65].利用 *HMGR* 缺陷酵母菌,Li等^[66]证明了 *GI-HMGR* 编码的蛋白确实具有 HMG-CoA 还原酶活性.随后,人们又陆续在灵芝中鉴定了与羊毛甾醇生物合成相关的一系列基因:编码焦磷酸甲戊二羧酸脱羧酶的基因 *GI-mvd*^[66],编码法尼基焦磷酸合成酶的基因 *GI-FPS*^[67],负责编码羊毛甾醇合成酶的基因 *GI-LS*(或 *GI-OSC*)^[68].

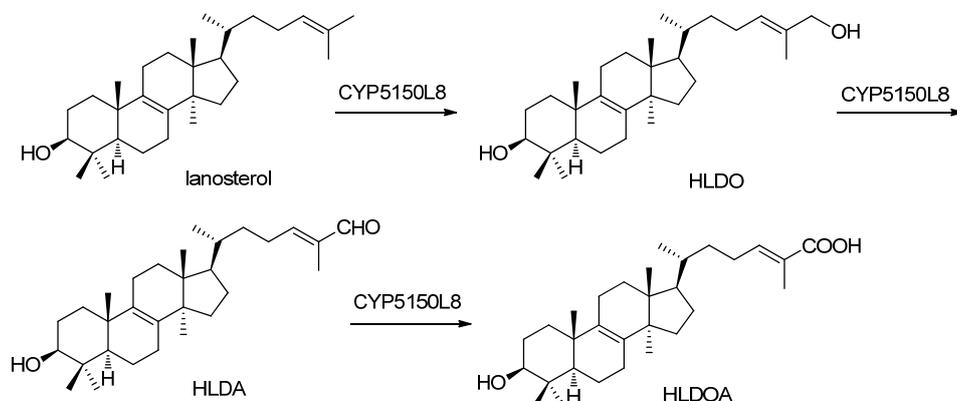
虽然灵芝酸生物合成早期的相关基因,特别是与羊毛甾醇合成相关的基因已经被阐明^[63],但是从羊毛甾醇合成灵芝酸的具体途径仍不清楚.由于灵芝酸的氧化程度很高,推测其生物合成过程中可能有多个 CYP450 酶参与.2012年,Wang等^[69]在前期完成灵芝全基因组测序的基础上,从灵芝的 218 个 CYP450 基因中筛选出了 78 个与羊毛甾醇合成酶基因 *LS* 共表达的基因.通过酵母异源表达和微粒体酶催化实验,他们发现了首个参与羊毛甾醇转化为灵芝酸的 P450 酶 CYP5150L8(基因 ID: *GL248833*)^[70].CYP5150L8 可将羊毛甾醇转化为 3-羟基-羊毛甾-8,24-二烯-26-酸(HLDOA).该反应为一个三步催化反应,首先是羊毛甾醇 C26 氧化成 3-羟基-羊毛甾-8,24-二烯-26-醇(HLDO),随后进一步氧化为 3-羟基-羊毛甾-8,24-二烯-26-醛(HLDA)和 HLDOA^[70].这是迄今为止发现的第一个参与灵芝酸生物合成的后修饰基因(Scheme 2),为发现更多灵芝酸生物合成相关基因奠定

了基础.

3.3 梭链孢烷抗生素的生物合成

梭链孢烷抗生素是一类来源于真菌的在原萜烯醇(*protostadienol*)的基础上通过脱去 C(4 β)甲基、C(16 β)位连接乙酰氧基、C(20)位甲基氧化成羧基等一系列反应形成的具有抗革兰氏阳性菌活性的四环三萜化合物^[71,72],其代表性的化合物有三个,分别是烟曲霉酸^[73]、夫西地酸^[74]与头孢菌素 P₁^[75].其中,夫西地酸的活性最为突出,目前已在临床上用于治疗细菌性皮肤病等.研究人员通过化学方法及生物转化方法对梭链孢烷抗生素进行了一系列的结构改造,但至今尚未获得具有更强抗菌活性的类似物.由于其突出的抗菌活性,人们很早就对其生物合成进行了研究,但一直未能在基因水平进行阐明.

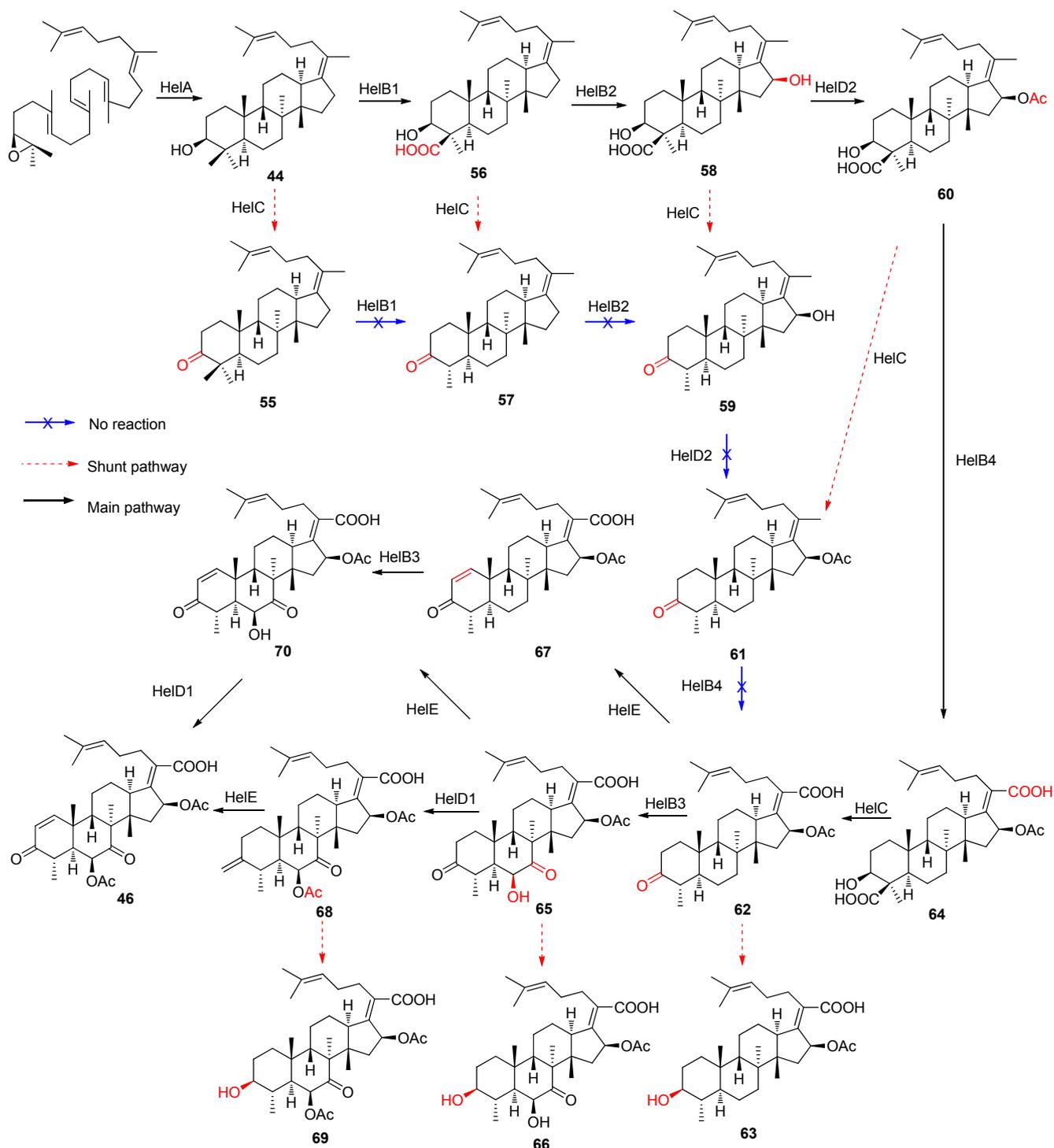
2009年,Ebizuka 课题组^[76]从 *Aspergillus fumigatus* af293 的基因组信息中发现了一个含有九基因的基因簇,包括一个环化酶基因 *helA*、四个 P450 氧化酶基因 *helB1-4*、一个短链脱氢还原酶基因 *helC*、两个乙酰转移酶基因 *helD1-2* 以及一个甾酮脱氢酶基因 *helE*,并推测这个基因簇可能负责烟曲霉酸的生物合成.他们利用酵母表达系统对其中的三个基因进行了初步研究,发现环化酶 *HelA* 可将 2,3-环氧角鲨烯环化形成原萜烯醇(**44**),短链脱氢还原酶 *HelC* 负责原萜烯醇 C(3 β)羟基脱氢形成羰基,P450 氧化酶 *HelB1* 可将原萜烯醇 C(4 β)甲基氧化成羧基.然而,烟曲霉酸的生物合成依然存在很多问题有待于解决:首先,文献推测的含有九基因的基因簇是否就是完整的烟曲霉酸的生物合成基因簇,如果是,基因簇中剩余六个未知基因如何发挥修饰作用;其次,在烟曲霉酸的生物合成中是否存在比烟曲霉酸抗菌活性更强的化合物.最近,本课题组系统地开展了烟曲霉酸的生物合成研究,并全面揭示了梭链孢烷抗生素的生物合成机制^[36].



图式 2 CYP5150L8 介导的灵芝酸 C(26)位氧化过程
Scheme 2 CYP5150L8-mediated oxidation of C(26)

我们首先采用四营养缺陷的米曲霉 *Aspergillus oryzae* NSAR1 作为异源表达宿主, 将基因簇中的九个基因全部导入到米曲霉中, 结果从含有九基因的转染菌株的代谢产物中分离获得了烟曲霉酸(46), 从而证明文献推测的含有九基因的基因簇就是烟曲霉酸的生物合成基因簇。随后在米曲霉系统中采用基因逐步导入的方

法系统地阐明了烟曲霉酸的生物合成途径, 如 Scheme 3 所示: 首先, 环化酶 HelA 将 2,3(S)-环氧角鲨烯环化形成原萜烯醇(44); 接着, 短链脱氢还原酶 HelC 将化合物 44 的 C(3 β)羟基氧化成羰基生成化合物 55, 同时 P450 氧化酶 HelB1 将化合物 44 的 C(4 β)甲基氧化成羧基生成化合物 56; HelC 与 HelB1 共同作用形成脱甲基产物 57; HelC 与 HelB1 共同作用形成脱甲基产物 57; HelC 与 HelB1 共同作用形成脱甲基产物 57;



图式 3 烟曲霉酸的生物合成研究
Scheme 3 Biosynthetic pathway of helvolic acid

随后, P450 氧化酶 HelB2 氧化 C(16)形成含有 C(16 β)羟基的化合物 **58**; 乙酰转移酶 HelD2 将 C(16 β)羟基乙酰化形成化合物 **60**; P450 氧化酶 HelB4 将 C(20)甲基氧化成羧基形成化合物 **64**; 然后短链脱氢还原酶 HelC 催化氧化脱羧反应形成化合物 **62**. 在此之后, P450 氧化酶 HelB3 氧化 C(6)与 C(7)位分别形成 C(6 β)羟基与 C(7)羧基的化合物 **65**; 乙酰转移酶 HelD1 将 C(6 β)羟基乙酰化形成化合物 **68**; 最后甾酮脱氢酶 HelE 使化合物 **68** 的 C(1)与 C(2)脱氢形成双键从而形成了烟曲霉酸(**46**).

此外, 我们还发现 HelC 在辅酶 NAD⁺的参与下可以作用于多个同时含有 C(3 β)羟基与 C(4 β)羧基的底物 **56**, **58**, **60** 与 **64**, 使得 C(3 β)羟基脱氢生成羧基, 从而引发氧化脱羧反应形成相应的产物 **57**, **59**, **61** 与 **62**. 除此之外, 我们还发现 HelC 在 NADH 的参与下还可将含有 C(3)羧基的 **62**, **65** 与 **68** 特异性地还原为含有 C(3 β)羟基的 **63**, **66** 与 **69**. 另外还验证了 P450 氧化酶 HelB1, HelB2 与 HelB4 无法将含有 C(3)羧基的底物 **55**, **57** 与 **61** 分别转化成 **57**, **59** 与 **62**, 说明 HelB1, HelB2 与 HelB4 无法作用于含有 C(3)羧基的底物. 利用米曲霉异源表达体系, 我们的研究首次系统地揭示了烟曲霉酸的生物合成途径, 为利用组合生物合成技术获取具有更高活性的梭链孢烷抗生素奠定了基础^[36].

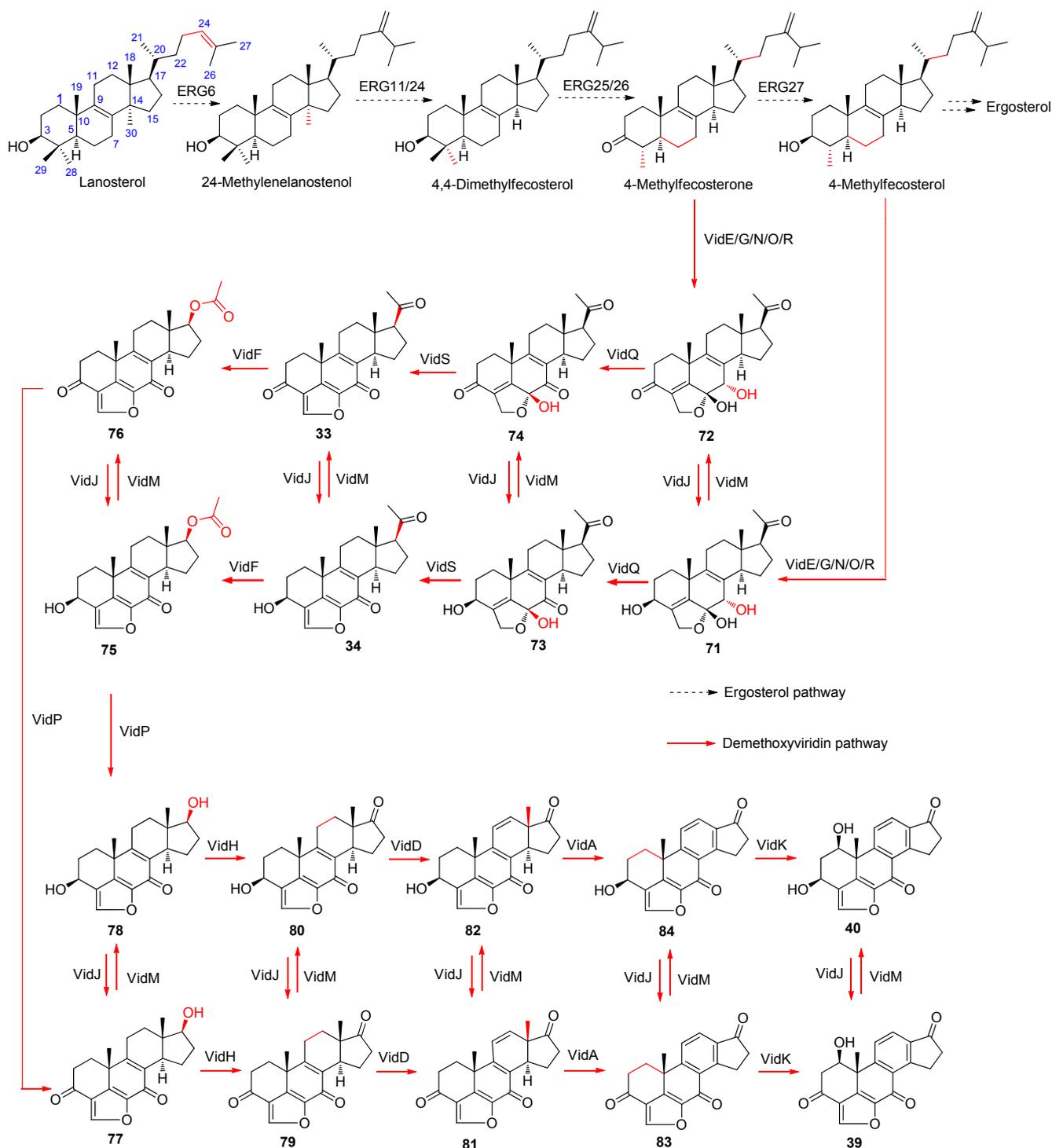
3.4 绿胶霉素类化合物的生物合成

绿胶霉素类化合物是一类结构特殊的甾体, 在甾体骨架的 C(4)和 C(6)位联合一个呋喃环, 代表性的化合物包括渥曼青霉素(wortmannin)、绿胶霉素(viridin)及去甲氧绿胶霉素(demethoxyviridin). 这类化合物具有广谱的抗真菌、抗炎以及抗菌活性, 尤其他们还是纳摩尔级别的 PI3K 基酶抑制剂. 由于这类化合物结构特殊, 而且活性广泛, 很早就引起人们的广泛关注, 自 20 世纪 60 年代开始, 人们便开始对绿胶霉素类化合物的生物合成机制展开研究. 通过喂养 ¹³C 标记的化合物 mevalonate 或 acetate, 首次证明了绿胶霉素不是来自二萜途径, 而是源于甾体^[77-79]. 随后, Golder 等^[80]通过喂养 ¹⁴C 标记的羊毛甾醇, 证明绿胶霉素化合物的生物合成前体和麦角甾醇一样都是羊毛甾醇, 且绿胶霉素类化合物是从麦角甾醇生物合成途径分支而来. Hanson 等又从产去甲氧绿胶霉素的菌株中进一步发现了一系列麦角甾醇侧链衍生物 C(6)和 C(7)醇, 提示 C(24)甲基化可能发生在麦角甾醇合成途径的前期^[81], 这一结论也在烟曲霉 *A. fumigatus* 麦角甾醇生物合成途径中得到验证^[82], 推测由 ERG6 [甾醇 C(24)甲基转移酶]首先介导羊毛甾醇 C(24)位甲基化, 随后, 继续进行麦角甾醇合成途径, 包括 ERG11 介导的 C(14)去甲基, ERG24 介导的 C(14)双键还原, ERG25/26/27 催化的 C(4)脱甲基过程.

由于绿胶霉素化合物均保留了一个 C(4)位甲基, 所以我们认为分支很可能发生在脱去第二个 C(4)甲基之前, 但究竟是什么反应阻止第二个 C(4)甲基的脱去, 引发绿胶霉素类化合物的生物合成目前仍不清楚. 我们课题组前期从一株去甲绿胶霉素高产真菌 *Nodulisporium* sp. (65-12-7-1)中分到的一系列 4 甲基孕甾类化合物也暗示了 C(20)-C(22)位断裂是从麦角甾醇途径发生分枝生成绿胶霉素类化合物的关键一步^[29]. 我们通过对 *Nodulisporium* sp. (65-12-7-1)进行全基因测序, 通过寻找 P450 酶成簇区域, 并结合差异表达分析和 CRISPR-Cas9 基因敲除法, 我们首次鉴定了去甲绿胶霉素的生物合成基因簇, 共包含 19 个基因. 通过对其中的 15 个基因进行敲除, 并结合米曲霉 *A. oryzae* NSAR1 异源表达, 我们首次阐明了去甲绿胶霉素的生物合成途径. 如 Scheme 4 所示: 首先, 3 个 P450 氧化酶(VidE, VidG, VidR)和一个 SDR 氧化还原酶(VidO)、一个未知蛋白(VidN)共同作用生成化合物 **71** 或 **72**, 乙二醛酶 VidQ 氧化 C(7)位生成 7 位为羧基的化合物 **73** 或 **74**, 未知蛋白(VidS)能够发生 1,4 脱水反应, 使 C(6)位羟基脱去生成呋喃环. 随后 Baeyer-Villiger 单氧化酶(VidF)、酯酶(VidP)和脱氢酶(VidH)使 C(17)-C(20)侧链发生断裂, 生成 17 位为羧基的化合物 **79** 或 **80**, 然后两个 P450 氧化酶(VidD 和 VidA)使 C 环芳香化, 最后 P450 氧化酶(VidK)发生 1 位羟化反应最终生成去甲氧绿胶霉素 **39**, 其中氧化酶(VidJ)和 C-3 甾醇脱氢酶(VidM)在整个途径中参与 3 位羟基的氧化和还原反应. 本研究首次通过实验证实了真菌中孕甾侧链断裂由三个酶参与: Baeyer-Villiger 单氧化酶(VidF)氧化 20 位酮羰基形成乙酰化产物, 酯酶(VidP)水解乙酰化产物形成 17 位为羟基的产物, 接着脱氢酶(VidH)使 17 位羟基发生脱氢反应生成 17 位酮羰基产物, 并且发现该断裂途径在真菌中普遍存在, 并且具有保守性. 同时还发现 C 环芳香化是由两个 P450 酶 VidD 和 VidA 参与, 首先 VidD 氧化 11, 12 位形成双键, VidA 使 13 位甲基脱去, 形成芳香环 C 环, 这类类似于在雌激素 estrogen 生物合成途径中 A 环芳香化机制. 研究中还发现 1 位特异性羟化酶 P450 酶 VidK, 能够特异的羟化 1 位, 生成活性更强的 1 位羟化产物. 这些发现将会为甾体生物转化, 获得活性更强的化合物提供基础^[83].

4 总结

真菌中含有丰富的三萜和甾体化合物, 是发现新颖三萜或甾体的重要资源宝库. 自然界中真菌种类繁多, 所知的不过数万种. 而且, 与植物相比, 目前从真菌中发现的三萜或者甾体化合物从结构骨架来看, 种类仍然



图式 4 去甲氧绿胶霉素的生物合成途径
 Scheme 4 Biosynthetic pathway of demethoxyviridin

很少, 提示从真菌中发现新颖三萜仍有较大的空间. 因此, 高效地利用现代高通量测序技术和生物信息分析技术将成为后基因组时代开发真菌三萜资源的重要手段.

References

- [1] Hill, R. A.; Connolly, J. D. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 90.
- [2] Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O'Maille, P.; Osbourn, A. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, *65*, 225.
- [3] Schaller, H. In *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, Oxford, **2010**, pp. 755~787.
- [4] Arora, A.; Raghuraman, H.; Chattopadhyay, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *318*, 920.
- [5] Beck, J. G.; Mathieu, D.; Loudet, C.; Buchoux, S.; Dufourc, E. J. *FASEB J.* **2007**, *21*, 1714.
- [6] Frye, C. A. *Minerva Ginecol.* **2009**, *61*, 541.

- [7] Funder, J. W.; Krozowski, Z.; Myles, K.; Sato, A.; Sheppard, K. E.; Young, M. *Recent Prog. Horm. Res.* **1997**, *52*, 247 ~ 260; discussion 261 ~ 262.
- [8] Schaaf, M. J.; Cidlowski, J. A. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *83*, 37.
- [9] Sun, M.; Ye, Y.; Xiao, L.; Duan, X.; Zhang, Y.; Zhang, H. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 507.
- [10] Ali-Seyed, M.; Jantan, I.; Vijayaraghavan, K.; Bukhari, S. N. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, *87*, 517.
- [11] Zhang, H. F.; Semenza, G. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, E27.
- [12] Ming, L. J.; Yin, A. C. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 415.
- [13] Bishop, K. S.; Kao, C. H. J.; Xu, Y. Y.; Glucina, M. P.; Paterson R. R. M.; Ferguson, L. R. *Phytochemistry* **2015**, *114*, 56.
- [14] Tanret, C. C. R. *Seances Acad. Sci.* **1889**, *108*, 98.
- [15] Rios, J. L.; Andujar, I.; Recio, M. C.; Giner, R. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 2016.
- [16] Xu, J. W.; Zhao, W.; Zhong, J. J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 457.
- [17] Weete, J. D.; Abril, M.; Blackwell, M. *PLoS One* **2010**, *5*, e10899.
- [18] Hirotoni, M.; Hirotoni, S.; Takayanagi, H.; Yoshikawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 329.
- [19] Kikuchi, T.; Masumoto, Y.; In, Y.; Tomoo, K.; Yamada, T.; Tanaka, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 4645.
- [20] Kikuchi, T.; Maekawa, Y.; Tomio, A.; Masumoto, Y.; Yamamoto, T.; In, Y.; Yamada, T.; Tanaka, R. *Steroids* **2016**, *115*, 9.
- [21] Kikuchi, T.; Horii, Y.; Maekawa, Y.; Masumoto, Y.; In, Y.; Tomoo, K.; Sato, H.; Yamano, A.; Yamada, T.; Tanaka, R. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 10611.
- [22] Hu, Z.; Wu, Y.; Xie, S.; Sun, W.; Guo, Y.; Li, X. N.; Liu, J.; Li, H.; Wang, J.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 258.
- [23] Han, J. J.; Bao, L.; Tao, Q. Q.; Yao, Y. J.; Liu, X. Z.; Yin, W. B.; Liu, H. W. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2538.
- [24] Luo, Q.; Tu, Z. C.; Yang, Z. L.; Cheng, Y. X. *Fitoterapia* **2018**, *125*, 273.
- [25] Weete, J. D.; Fuller, M. S.; Huang, M. Q.; Gandhi, S. *Exp. Mycol.* **1989**, *13*, 183.
- [26] Muchembled, J.; Alh, S.; Grandmouginferjani, A.; Sancholle, M. *Can. J. Bot.* **2000**, *78*, 1288.
- [27] Chepkirui, C.; Sum, W. C.; Cheng, T.; Matasyoh, J. C.; Decock C.; Stadler, M. *Molecules* **2018**, *23*.
- [28] Elsebai, M. F.; Kehraus, S.; Konig, G. M. *Steroids* **2013**, *78*, 880.
- [29] Wang, G. Q.; Chen, G. D.; Hu, D.; Li, X. X.; Guo, L. D.; Li, Y.; Yao, X. S.; Gao, H. *Steroids* **2015**, *102*, 101.
- [30] Blight, M. M.; Grove, J. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1986**, 7, 1317.
- [31] Andersson, P. F.; Bengtsson, S.; Cleary, M.; Stenlid, J.; Broberg, A. *Phytochemistry* **2013**, *86*, 195.
- [32] Ding, H. E.; Yang, Z. D.; Sheng, L.; Zhou, S. Y.; Li, S.; Yao, X. J.; Zhi, K. K.; Wang, Y. G.; Zhang, F. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6754.
- [33] Jimeno, A.; Bauman, J. E.; Weissman, C.; Adkins, D.; Schnadig, I.; Beauregard, P.; Bowles, D. W.; Spira, A.; Levy, B.; Seetharamu, N. *Oral Oncol.* **2015**, *51*, 383.
- [34] Zhao, Q.; Chen, G. D.; Feng, X. L.; Yu, Y.; He, R. R.; Li, X. X.; Huang, Y.; Zhou, W. X.; Guo, L. D.; Zheng, Y. Z. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1221.
- [35] Cao, S.; Ross, L.; Tamayo, G.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4661.
- [36] Lv, J.-M.; Hu, D.; Gao, H.; Kushiro, T.; Awakawa, T.; Chen, G.-D.; Wang, C.-X.; Abe, I.; Yao, X.-S. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1644.
- [37] Deyrup, S. T.; Gloer, J. B.; O'Donnell, K.; Wicklow, D. T. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 378.
- [38] Joshi, B. K.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1734.
- [39] Schwartz, R. E.; Smith, S. K.; Onishi, J. C.; Mainz, M.; Kurtz, M.; Giacobbe, R. A.; Wilson, K. E.; Liesch, J.; Zink, D.; Horn, W.; Morris, S.; Cabello, A.; Vicente, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4882.
- [40] Shigematsu, N.; Tsujii, E.; Kayakiri, N.; Takase, S.; Tanaka, H.; Tada, T. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1992**, *45*, 704.
- [41] Kumla, D.; Shine, A. T.; Buttachon, S.; Dethoup, T.; Gales, L.; Pereira, J. A.; Inácio, Á.; Costa, P. M.; Lee, M.; Sekeroglu, N. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 375.
- [42] Kristan, K.; Rizner, T. L. *J. Steroid Biochem.* **2012**, *129*, 79.
- [43] Kalb, V. F.; Woods, C. W.; Turi, T. G.; Dey, C. R.; Sutter, T. R.; Loper, J. C. *DNA* **1987**, *6*, 529.
- [44] Lepesheva, G. I.; Waterman, M. R. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2004**, *215*, 165.
- [45] Ghannoum, M. A.; Rice, L. B. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 501.
- [46] Lai, M. H.; Bard, M.; Pierson, C. A.; Alexander, J. F.; Goebel, M.; Carter, G. T.; Kirsch, D. R. *Gene* **1994**, *140*, 41.
- [47] Akins, R. A.; Sobel, J. D. *Med. Mycol.* **2017**, 347.
- [48] Blosser, S. J.; Merriman, B.; Grahl, N.; Chung, D.; Cramer, R. A. *Microbiol.* **2014**, *160*, 2492.
- [49] Aaron, K. E.; Pierson, C. A.; Lees, N. D.; Bard, M. *Fems Yeast Res.* **2001**, *1*, 93.
- [50] Daum, G.; Lees, N. D.; Bard, M.; Dickson, R. *Yeast* **1998**, *14*, 1471.
- [51] Mo, C.; Valachovic, M.; Randall, S. K. J.; Nickels, T.; Bard, M. *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9739.
- [52] Mo, C. Q.; Bard, M. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 1991.
- [53] Keon, J. P.; James, C. S.; Court, S.; Baden-Daintree, C.; Bailey, A. M.; Burden, R. S.; Bard, M.; Hargreaves, J. A. *Curr. Genet.* **1994**, *25*, 531.
- [54] Taton, M.; Husselstein, T.; Benveniste, P.; Rahier, A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 701.
- [55] Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Corran, A. J.; Baldwin, B. C.; Parks, L. W.; Kelly, D. E. *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 217.
- [56] Zwegtyck, D.; Hrastnik, C.; Kohlwein, S. D.; Daum, G. *FEBS Lett.* **2000**, *470*, 83.
- [57] Wang, F.-Q.; Zhao, Y.; Dai, M.; Liu, J.; Zheng, G.-Z.; Ren, Z.-H.; He, J.-G. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *287*, 91.
- [58] Long, N.; Xu, X.; Zeng, Q.; Sang, H.; Lu, L. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, 83.
- [59] Barrett-Bee, K.; Dixon, G. *Acta Biochim. Pol.* **1995**, *42*, 465.
- [60] Ragsdale, N. N. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *380*, 81.
- [61] Hajjaj, H.; Mace, C.; Roberts, M.; Niederberger, P.; Fay, L. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3653.
- [62] Gao, J. J.; Min, B. S.; Ahn, E. M.; Nakamura, N.; Lee, H. K.; Hattori, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 837.
- [63] Shi, L. A.; Ren, A.; Mu, D. S.; Zhao, M. W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 1243.
- [64] Zhao, M.-W.; Liang, W.-Q.; Zhang, D.-B.; Wang, N.; Wang, C.-G.; Pan, Y.-J. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17*, 1106.
- [65] Shang, C.-H.; Zhu, F.; Li, N.; Ou-yang, X.; Shi, L.; Zhao, M.-W.; Li, Y.-X. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 1333.
- [66] Shi, L.; Qin, L.; Xu, Y. J.; Ren, A.; Fang, X.; Mu, D. S.; Tan, Q.; Zhao, M. W. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 6149.
- [67] Ding, Y.-X.; Ou-yang, X.; Shang, C.-H.; Ren, A.; Shi, L.; Li, Y.-X.; Zhao, M.-W. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 1571.
- [68] Shang, C.-H.; Shi, L.; Ren, A.; Qin, L.; Zhao, M.-W. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 974.
- [69] Chen, S.; Xu, J.; Liu, C.; Zhu, Y.; Nelson, D. R.; Zhou, S.; Li, C.; Wang, L.; Guo, X.; Sun, Y.; Luo, H.; Li, Y.; Song, J.; Henrissat, B.; Lavesseur, A.; Qian, J.; Li, J.; Luo, X.; Shi, L.; He, L.; Xiang, L.; Xu, X.; Niu, Y.; Li, Q.; Han, M. V.; Yan, H.; Zhang, J.; Chen, H.; Lv, A.; Wang, Z.; Liu, M.; Schwartz, D. C.; Sun, C. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 913.
- [70] Wang, W.-F.; Xiao, H.; Zhong, J.-J. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 1842.
- [71] Von Daehne, W.; Godtfredsen, W. O.; Rasmussen, P. R. *Adv. Appl. Microbiol.* **1979**, *25*, 95.
- [72] Caspi, E.; Mulheirn, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 404.
- [73] Chain, E.; Florey, H. W.; Jennings, M. A.; Williams, T. I. *Brit. J. Exp. Pathol.* **1943**, *24*, 108.
- [74] Godtfredsen, W. O.; Jahnsen, S.; Lorck, H.; Roholt, K.; Tybring, L. *Nature* **1962**, *193*, 987.

- [75] Burton, H. S.; Abraham, E. P. *Biochem. J.* **1951**, *50*, 168.
- [76] Mitsuguchi, H.; Seshime, Y.; Fujii, I.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6402.
- [77] Simpson, T. J.; Lunnion, M. W.; MacMillan, J. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 931.
- [78] Hanson, J. R.; Wadsworth, H. J. B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 360.
- [79] Grove, J. F. *J. Chem. Soc.* **1969**, *C*, 549.
- [80] Golder, W. S.; Watson, T. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1980**, 422.
- [81] Hanson, J. R.; O'Leary, M. A.; Wadsworth, H. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1983**, 871.
- [82] Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E.; Garcia-Effron, G.; Lopez, J. F.; Grimalt, J. O.; Cuenca-Estrella, J. M.; Rodriguez-Tudela, J. L. *Steroids* **2008**, *73*, 339.
- [83] Wang, G-Q.; Chen, G-D.; Qin, S.-Y.; Hu, D.; Awakawa, T.; Li, S.-Y.; Lv, J.-M.; Wang, C.-X.; Yao, X.-S.; Abe, I.; Gao, H. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1838.

(Cheng, F.)