

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-056

天然产物中炔基的生物合成机制研究及其应用

吕建明¹, 赵欢², 胡丹¹, 高昊¹(¹暨南大学药学院, 中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632; ²暨南大学中医学院, 广东 广州 510632)

摘要: 炔基是许多药物、活性天然产物以及功能材料等的重要官能团, 因此, 开发高效的炔类化合物合成策略具有重要意义。传统的合成策略包括通过化学反应直接制备, 或以简单的炔类前体为底物, 通过生物转化获得。随着合成生物学技术的飞速发展, 从头生物合成有望成为炔类化合物合成的新策略。该策略绿色环保, 易于操作, 是对传统化学合成以及生物转化策略的有效补充。炔类化合物从头生物合成的关键是阐明天然产物中炔基的生物合成机制, 获得炔基合成酶。本文重点总结了不同天然产物中炔基的生物合成研究进展, 包括脂肪酸、聚酮、聚酮-非核糖体肽杂合体、氨基酸以及杂萜, 并介绍了炔基合成酶在炔类化合物从头生物合成中的应用。尽管炔基的生物合成研究近年来取得了长足发展, 但在炔基合成酶的种类挖掘及其底物特异性拓展方面还有待进一步加强, 从而为炔类化合物的从头生物合成提供更多可供选择的酶工具。

关键词: 炔基; 从头生物合成; 乙炔酶; 磷酸吡哆醛依赖的裂解酶; 细胞色素P450氧化酶

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Biosynthesis of alkyne moiety in natural products and application of alkyne biosynthetic machineries

LYU Jianming¹, ZHAO Huan², HU Dan¹, GAO Hao¹

(¹Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China; ²College of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China)

Abstract: Alkyne is a biologically significant moiety in many drugs and natural products, which is also a versatile building block in modern chemistry. Therefore, it is of great importance to efficiently synthesize alkyne-containing products in the fields of medicinal chemistry, organic chemistry, chemical biology and so on. Generally, alkyne-containing products are obtained *via* chemical synthesis, but this strategy often suffers from high cost, low efficiency and harsh reaction conditions. Alternatively, microbial biotransformation can be performed through feeding alkyne-containing precursors, but it is still challenging since these precursors are not easily accessible. Inspired by the advancement of synthetic biology, *de novo* biosynthesis is expected to be a promising approach for producing acetylenic products, which is environmentally friendly and industrially tractable. Great efforts have thus been devoted

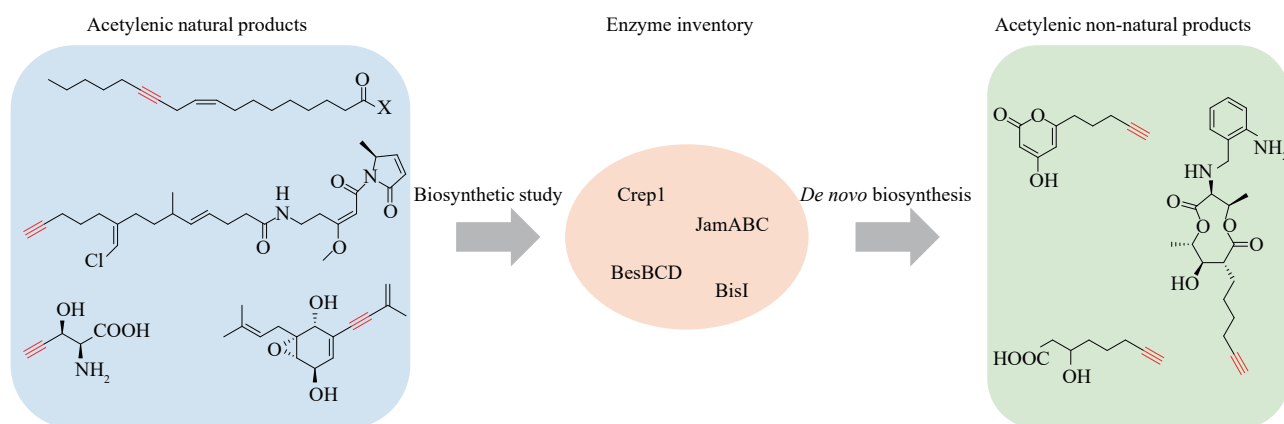
收稿日期: 2021-05-07 修回日期: 2021-07-25

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0903200/2018YFA0903201)

引用本文: 吕建明, 赵欢, 胡丹, 高昊. 天然产物中炔基的生物合成机制研究及其应用[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 734-750

Citation: LYU Jianming, ZHAO Huan, HU Dan, GAO Hao. Biosynthesis of alkyne moiety in natural products and application of alkyne biosynthetic machineries [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(5): 734-750

to elucidating the biosynthetic machinery of alkyne moiety in natural products so as to provide efficient enzymatic tools for the *de novo* biosynthesis of acetylenic products. In this review, we comment recent progress in biosynthesis of alkynes in different natural products. In unsaturated fatty acids, a special family of desaturases serve as acetylenases, converting olefinic bonds to triple bonds *via* O₂-dependent dehydrogenation with the use of a diiron active site. In polyketides, although lots of work has been done in revealing the biosynthetic routes of enediyne antibiotics, the genetic basis for synthesizing acetylenic bonds in their core backbones remains enigmatic. In polyketide-non ribosomal peptide hybrid molecules, the three-gene cassette encoding the ligase, acyl carrier protein (ACP) and acetylenase is responsible for the formation of the terminal alkyne-labeled fatty acyl-ACP, which is then used as the starting unit to be incorporated into the assembly line. In amino acids, the halogenase catalyzes the side-chain halogenation followed by the oxidase-mediated side-chain cleavage, and then the lyase catalyzes the elimination reaction to convert resulted alkene to the terminal triple bond. In meroterpenoids, the cytochrome P450 oxidase can consecutively catalyze two rounds of dehydrogenation to provide the internal alkyne in the prenyl chain. Moreover, we also introduce *de novo* biosynthesis of the terminal-alkyne tagged polyketides and proteins on the basis of the characterized biosynthetic machineries of alkynes. Despite the great progress in alkyne biosynthesis, it needs to be further strengthened in exploring the types of alkyne synthases as well as expanding their substrate specificity, so as to provide more enzymatic tools for the *de novo* biosynthesis of alkyne-containing products.



Keywords: alkyne; *de novo* biosynthesis; acetylenase; pyridoxal phosphate-dependent lyase; cytochrome P450 oxidase

炔基是许多临床一线药物的重要功能基团^[1], 如FDA批准的第1个口服避孕药Enovid[®]^[2]以及用于治疗艾滋病毒感染的第1代非核苷类逆转录酶抑制剂Sustiva[®]^[3]等的主要成分都是含有炔基的小分子化合物^[4-7]。自然界中也存在大量具有广泛生物活性的炔类天然产物^[8-11], 如从箭毒蛙的皮肤中分离获得的histrionicotoxin类生物碱是烟碱型乙酰胆碱受体的非竞争性抑制剂^[12], 从多种伞形科植物中分离获得的falcarinol类聚炔化合物具有抗肿瘤、抗炎以及抗菌等活性^[13-14], 从细菌中分离获得的烯

二炔类抗生素能够显著抑制肿瘤细胞生长^[15-16]。此外, 炔基还可参与一系列的化学反应^[17-21], 是重要的化学合成模块, 广泛用于活性天然产物^[22-23]以及功能材料^[24]等的合成。特别是基于末端炔基与叠氮化物的环加成反应(即点击化学反应), 在药物筛选、化学生物学以及蛋白组学等研究领域发挥着重要的作用^[25]。

由于炔基是一个非常重要的结构单元, 因此开发高效的炔类化合物合成策略具有重要的意义。目前最常用的策略是通过化学方法直接制备含有

炔基的目标产物，但其不足之处是反应条件严苛、成本高以及反应效率低等^[26-27]。另一策略是生物转化，即将炔类化合物作为底物添加到微生物培养体系中或在体外与酶共孵育，通过生化反应把炔基整合到目标化合物中^[28-31]。但是由于炔类前体通常不易获得，该策略存在一定的局限性。合成生物学是指基于工程化设计思路，通过构建标准化的元器件和模块来改造天然系统或从头合成全新的人工生命体系，其能将结构简单、易于获得、廉价的起始原料高效地转化成不同的高附加值产品，而且操作简单、绿色环保，在化学品合成领域有极大的应用潜力^[32-33]。因此，基于合成生物学技术的从头合成有望成为对传统化学合成以及生物转化策略的有效补充，但其成功实施的前提是获得催化天然产物中炔基形成的酶，即炔基合成酶。近年来，研究人员开展了不同炔类天然产物的生物合成研究，以期成为炔类化合物的生物制造提供丰富的酶工具。本文综述了不同天然产物中炔基的生物合成研究现状，然后介绍了不同炔基合成酶在炔类化合物从头生物合成方面的应用情况。

1 天然产物中炔基的生物合成

人们从动物、植物与微生物中分离鉴定了大量不同类型的炔类天然产物^[8, 34-35]，包括脂肪酸类、聚酮类、聚酮-非核糖体肽杂合体类、氨基酸类、杂萜类等，而且炔基在同一类天然产物中的位置也各不相同，提示自然界中可能存在多种炔基形成机制。

1.1 脂肪酸中炔基的生物合成

炔类脂肪酸是目前分离鉴定数量最多的炔类

天然产物，在昆虫^[36]、植物^[10]与微生物^[10]中均有发现。20世纪60年代，针对不饱和脂肪酸中炔基的生物合成，研究人员提出了两种可能的机制，分别是氧化脱氢机制与烯醇消除机制。其中，氧化脱氢机制指的是脂肪酸中的顺式双键直接脱氢生成炔基[图1(a)]^[37]。对于烯醇消除机制，研究人员推测脂肪酸首先经焦磷酸化形成焦磷酸烯醇式中间体，然后发生脱羧反应生成炔基[图1(b)]^[38]。

1998年，Lee等^[39]首先通过体外实验发现高山还阳参(*Crepis alpina*)种子的微粒体蛋白可以在含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的反应体系中将¹⁴C标记的亚油酸酯(linoleate, **1**)转化成含有炔基的还阳参油酸酯(crepenynate, **2**)。而且作者发现当反应体系中加入一氧化碳或P450还原酶抗体后，依然可以检测到还阳参油酸酯的生成，因此推测催化脂肪酸中炔基合成的酶并非P450氧化酶，可能是一类与催化脂肪酸中碳碳单键脱氢形成双键的去饱和酶(desaturase)类似的酶。随后，作者从*C. alpina*种子的cDNA中找到候选基因*Crep1*，其编码的蛋白与拟南芥中的 $\Delta 12$ 去饱和酶有56%的相似性。最后，作者通过在酿酒酵母以及拟南芥中异源表达证实*Crep1*可以将亚油酸酯C-12与C-13之间的双键脱氢转化成炔键(图2)，并将这类特殊的可以催化炔基生成的去饱和酶命名为乙炔酶(acetylenase)。此后，研究人员又陆续从其他植物、昆虫以及微生物中鉴定了多个乙炔酶(表1)。进一步的研究显示乙炔酶不仅可以催化脂肪链中的顺式双键脱氢生成炔基，还可像普通的脂肪酸去饱和酶一样催化双键的形成，如乙炔酶*Crep1*可以催化油酸酯(oleate)脱氢生成(Z,E)-9,12-十八碳二烯酸酯[9(Z),12(E)-octadecadienoate]与(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸酯[9(Z),12(Z)-octadecadienoate]^[40]。

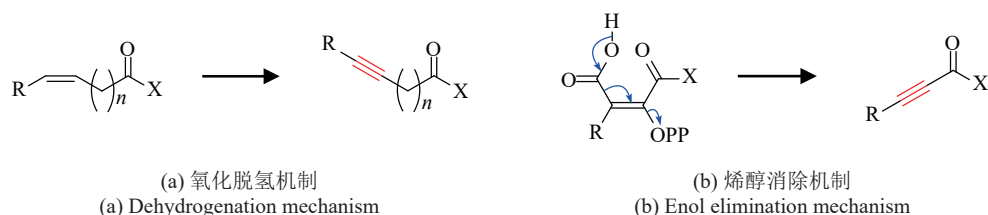


图1 脂肪酸中炔基形成的两种假说

Fig. 1 Two hypotheses for the biosynthesis of acetylenic bonds in fatty acids

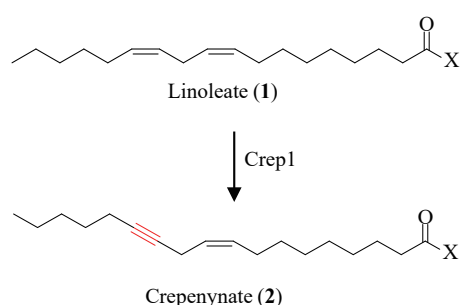


图2 Crep1催化还阳参油酸酯中炔基的形成


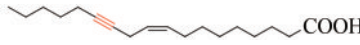






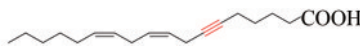



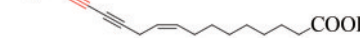
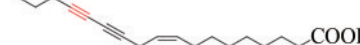

Fig. 2 Crep1-mediated formation of acetylenic bond in crepenynate

虽然研究人员对乙炔酶的认识较晚，但是早在20世纪60年代人们已经开始了脂肪酸去饱和酶的研究^[51]。去饱和酶是一类在有氧条件下通过二

铁活性中心作用于脂肪链碳碳单键的脱氢酶，分为可溶性型和膜结合型^[52-54]。其中，可溶性的去饱和酶主要以连接在酰基载体蛋白（ACP）上的脂肪酸为底物，而膜结合的去饱和酶主要作用于与辅酶A、甘油或磷酸连接的脂肪酸。乙炔酶作为一类特殊的去饱和酶也无法直接作用于游离的脂肪酸，而是以脂肪酸酯为底物进行氧化脱氢^[39, 48, 50]。但与普通的去饱和酶不同，目前已鉴定的乙炔酶，包括以连接在酰基载体蛋白CayD上的脂肪酸为底物的乙炔酶CayB与CayC^[50]，均属于膜结合蛋白。2015年，Bai等^[55]解析了小鼠来源的膜结合型的硬脂酰辅酶A（stearoyl-CoA）去饱和酶SCD1的蛋

表1 已鉴定的参与炔类脂肪酸生物合成的乙炔酶

Tab. 1 Acetylenases identified for the biosynthesis of acetylenic fatty acids

序号	来源	乙炔酶名称与NCBI登录号	产物	文献	
1	植物	<i>Crepis alpina</i>	Crep1 (CAA76158)	 COOH	[39-40]
2		<i>Petroselinum crispum</i>	PcACET (AAB80697)	 COOH	[41]
3		<i>Hedera helix</i>	HhACET (AAO38031)	 COOH	[41]
4		<i>Helianthus annuus</i>	HaACET (AAO38032)	 COOH	[41]
5		<i>Calendula officinalis</i>	CoACET (CAB64256)	 COOH	[41]
6		<i>Daucus carota</i>	DCAR_013552 (XP_017247320)	 COOH	[42]
7		<i>Daucus carota</i>	DCAR_017011 (XP_017253817)	 COOH	[42]
8		<i>Daucus carota</i>	DCAR_013548 (XP_017246930)	 COOH	[42]
9		<i>Solanum lycopersicum</i>	ACET1a/b	 COOH	[43]
10		<i>Ceratodon purpureus</i>	CpAcet6 (Q9LEN0)	 COOH	[44]
11		<i>Bidens pilosa</i>	BPFAA (MF318525)	未知	[45-46]
12	昆虫	<i>Thaumetopoea pityocampa</i>	Tpi-PGFAD (ABO43722)	 COOH	[47]
13		<i>Chauliognathus lugubris</i>	CL10 (AFJ66832)	 COOH	[48]
14		<i>Chauliognathus lugubris</i>	CL2-1 (AFJ66828)	 COOH	[48]
15		<i>Chauliognathus lugubris</i>	CL2-2 (AFJ66829)	 COOH	[48]
16	微生物	<i>Cantharellus formosus</i>	CfACET (ADK24720)	 COOH	[49]
17		<i>Burkholderia caryophylli</i>	CayB (AIG53817)	未知	[50]
18		<i>Burkholderia caryophylli</i>	CayC (AIG53820)	未知	[50]

白晶体结构，发现SCD1中共有9个保守的组氨酸负责与活性中心的两个金属铁离子结合，包括H¹¹⁶XXXXH¹²¹、H¹⁵³XXH¹⁵⁶H¹⁵⁷、H²⁹⁴XXH²⁹⁷H²⁹⁸与His265。此外，Asn261也可通过一分子水结合其中的一个金属离子。将已报道的乙炔酶与SCD1进行氨基酸序列比较，结果显示乙炔酶中也有负责与铁离子结合的保守组氨酸残基，此外，有些乙炔酶也如SCD1一样含有保守的天冬酰胺，但该天冬酰胺在一些乙炔酶中会变为苏氨酸（图3）。此外，CayC与CpAcet6仅含有8个保守的组氨酸

残基，另外1个被谷氨酰胺取代（图3），推测这两个乙炔酶可能像可溶性的去饱和酶一样通过谷氨酰胺以及组氨酸与铁离子进行结合^[56]。为了阐明乙炔酶催化的碳碳双键脱氢是同步进行还是分步进行，Reed等^[57]将²H标记的亚油酸喂养到可以表达*Crep1*的酿酒酵母中，通过动力学同位素效应实验发现*Crep1*首先拔去底物C-12位上的氢（ $k_H/k_D=14.6\pm 3.0$ ），然后C-13位上的氢再快速离去（ $k_H/k_D=1.25\pm 0.8$ ）（图4），这与去饱和酶催化碳碳双键形成的过程类似^[58]。

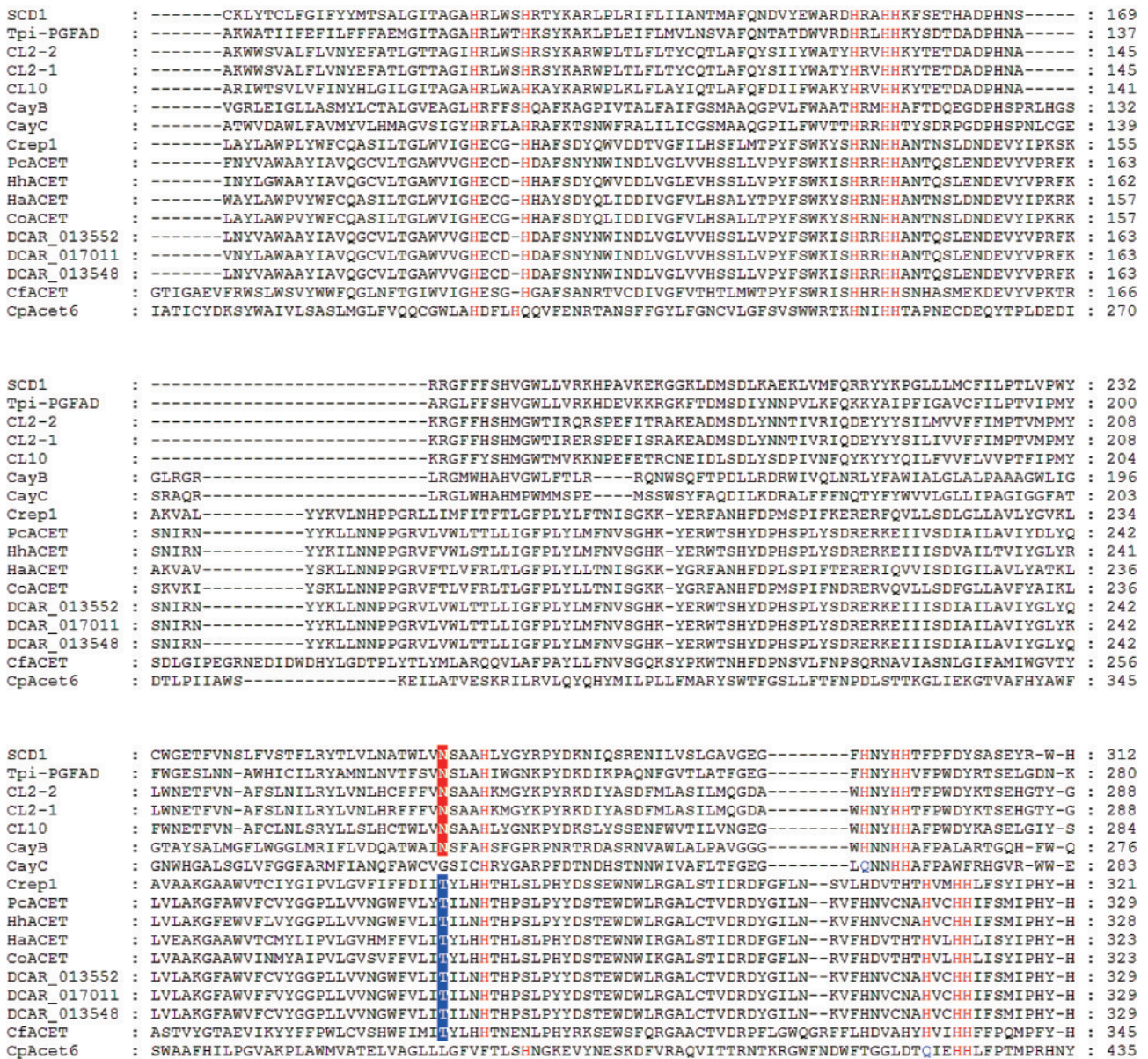


图3 乙炔酶与SCD1的氨基酸序列对比

Fig. 3 Sequence alignment of acetylenases with SCD1

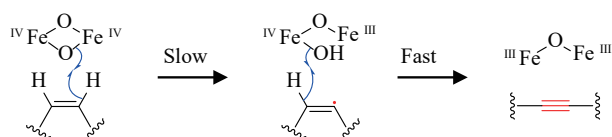


图4 乙炔酶催化机制

Fig. 4 Proposed catalytic mechanism for acetylenases

1.2 聚酮化合物中内部炔基的生物合成

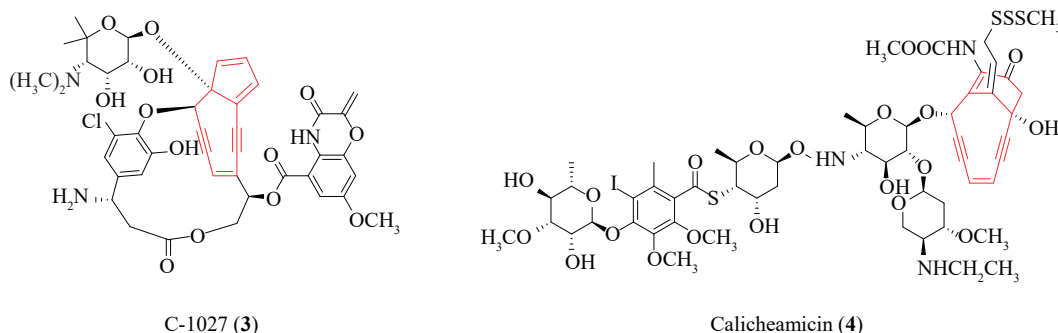
烯二炔 (enediynes) 是一类微生物来源的炔基聚酮化合物, 其核心骨架中含有两个炔键与同一双键共轭的独特结构。根据核心骨架的差异, 此类化合物分为九元烯二炔与十元烯二炔^[59-60]。九元烯二炔是由以双环 [7.3.0] 十二碳烯二炔 (bicyclo [7.3.0] dodecadiynene) 为核心的发色团与辅基蛋白组成的, 其中辅基蛋白主要用于稳定发色团, 同时将发色团转运至胞外, 如 C-1027(3) (图5)。十元烯二炔是以双环 [7.3.1] 十三碳烯二炔 (bicyclo [7.3.1] tridecadiynene) 为核心骨架, 此类化合物比较稳定, 不需要与辅基蛋白结合, 如 calicheamicin (4) (图5)。不论是九元烯二炔还是十元烯二炔, 其核心骨架均可发生重排反应形成苯环双自由基, 然后夺取 DNA 脱氧核糖结构上的氢, 从而诱导 DNA 双链发生断裂, 因此, 烯二炔类化合物具有极强的抗肿瘤活性^[59-60]。目前, 基于多聚物载体系统或抗体偶联的烯二炔类药物已在肿瘤治疗中取得了一定的成功, 如聚(苯乙烯-马来酸)-neocarzinostatin 于 1994 年在日本批准上市用于治疗肝癌^[61], CD33 单克隆抗体-calicheamicin 于 2000 年在美国被 FDA 批准上市用于治疗白血病^[62]。

早期关于烯二炔类抗生素的生物合成研究主要采用同位素示踪的方法。Hensens 等^[63] 通过向 neocarzinostatin 生产菌株 *Streptomyces carzinostaticus*

喂养 ¹³C 与 ¹⁴C 标记的醋酸钠来探究其生源, 结果显示 neocarzinostatin 的烯二炔核心结构来源于首尾相连的乙酸单元。作者推测其核心结构可能是由油酸酯在脂肪酸乙炔酶的作用下脱氢生成炔基, 然后再发生碳碳键断裂以及环化而形成的。Lam 等^[64] 通过向 *Actinomadura verrucosospora* 喂养同位素标记的醋酸钠, 发现烯二炔 esperamicin A₁ 核心骨架上的所有碳原子均来源于醋酸钠, 但是作者发现该菌株无法将油酸酯转化成 esperamicin A₁。尽管同位素标记实验显示烯二炔化合物的核心骨架来源于首尾相连的乙酸单元, 但是无法准确判断其到底是来源于脂肪酸途径还是聚酮途径^[65]。直到 2002 年, Liu 等^[66] 与 Ahlert 等^[67] 在同一时间分别找到了 C-1027 与 calicheamicin 的生物合成基因簇, 并通过基因敲除实验发现一类重复使用的 I 型聚酮合酶 SgcE 与 CalE8 分别参与它们核心骨架的形成。随后, Zhang 等^[68] 发现 SgcE 以及硫酯酶 SgcE10 在大肠杆菌中共同表达可催化生成 1,3,5,7,9,11,13-pentadecaheptaene(5) (图6)。同样地, Kong 等^[69] 通过体外酶催化反应发现 CalE8 与硫酯酶 CalE7 可催化生成 3,5,7,9,11,13-pentadecen-2-one(6) (图6)。由此可见, 烯二炔核心骨架的形成还需要其他修饰酶的参与。尽管 Kong 等^[69] 在 calicheamicin 的生物合成基因簇中发现了一个潜在的去饱和酶基因 calU15, 但将其与 calE8 以及 calE7 一起共表达后并未检测到新的产物。目前, 烯二炔抗生素核心骨架中炔基的生物合成机制仍不清楚。

1.3 聚酮-非核糖体肽杂合体中末端炔基的生物合成

海洋生物, 特别是蓝藻可以合成一类结构特殊



C-1027 (3)

Calicheamicin (4)

图5 典型的烯二炔抗生素的化学结构

Fig. 5 Chemical structures of typical enediyne antibiotics

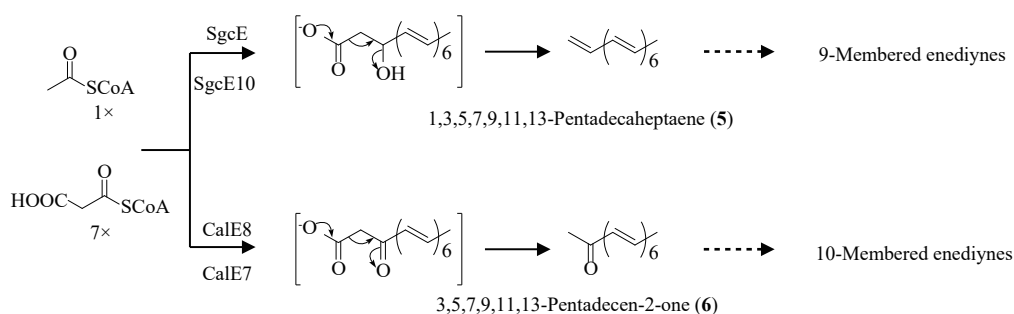


图6 推测的九元与十元烯二炔抗生素的生物合成途径

Fig. 6 Proposed routes for biosynthesizing 9-membered and 10-membered enediyne antibiotics

的连有末端炔基的肽类化合物^[35, 70]。2004年, Edwards等^[71]从一株蓝藻 *Lyngbya majuscula* JHB 中找到了聚酮-非核糖体肽杂合体 jamaicamide B (7) (图7) 的生物合成基因簇, 发现该基因簇中含有脂肪酰辅酶A连接酶基因 *jamaA*, 脂肪酸去饱和酶基因 *jamb* 以及酰基载体蛋白编码基因 *jamC*, 因此推测 JamABC 可能负责 jamaicamide B 中末端炔基的合成。2011年, Jones等^[72]发现 *carmabin A* (8) (图7) 的生物合成基因簇中含有与 *jamABC* 相似的3个基因 *camABC*。直到2015年, Zhu等^[73]首次阐明了 jamaicamide B 中末端炔基的生物合成机制。首先连接酶 JamA 将5-己烯酸(5-hexenoic acid, 9)与酰基载体蛋白 JamC 连接形成 5-hexenoyl-JamC (10), 然后 JamB 催化 5-hexenoyl-JamC 中末端的碳

碳双键脱氢生成 5-hexynoyl-JamC (11) (图8), 最后作为起始单元在聚酮合酶以及非核糖体肽合成酶的作用下引入到 jamaicamide B 中。此外, 作者还对乙炔酶 JamB 的底物宽泛性进行了系统研究, 发现 JamB 对脂肪链的长度, 碳碳双键的位置以及酰基载体蛋白 JamC 均有严格的要求。为了获得底物特异性不同于 JamABC 的酶工具, 以期将不同长度的含有末端炔基的脂肪链引入到聚酮化合物或聚酮-非核糖体肽杂合体中, Zhu等^[74]以 JamABC 为探针在 IMG/JGI 数据库中进行了基因挖掘, 然后筛选到11个候选的三基因表达盒。作者通过一系列的体外与体内实验发现来源于 *Teredinibacter turnerae* T7901 的 *ttuABC* 可活化 9-癸烯酸 (9-decenoic acid) 并将其转化成 9-decynoyl-TtuC。

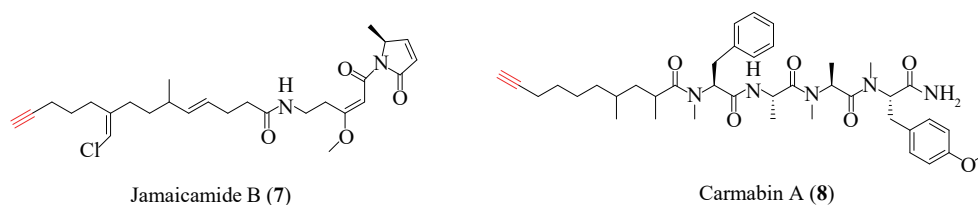


图7 典型的含有末端炔基的聚酮-非核糖体肽杂合体的化学结构

Fig. 7 Chemical structures of typical terminal alkyne tagged PKS-NRPS hybrids

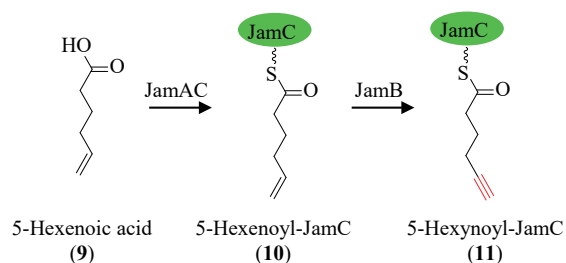


图8 Jamaicamide B 中末端炔基的生物合成途径

Fig. 8 Biosynthetic pathway of terminal alkyne in jamaicamide B

1.4 氨基酸中末端炔基的生物合成

炔基氨基酸在细菌与真菌中均有发现，其炔基既可位于氨基酸侧链的末端，也可位于侧链的内部^[75-78]。2019年，考虑到此前报道的脂肪酸以及聚酮-非核糖体肽杂合体中的炔基均是由一类特殊的去饱和酶（乙炔酶）催化形成的，Marchand等^[79]推测L- β -ethynylserine (β es, **12**)中的末端炔基可能也是由这类酶催化形成的。但是，作者发现当敲除 β es生产菌株*Streptomyces cattleya*中的去饱和酶基因后，该菌株仍可合成 β es，提示 β es中的炔基是由其他酶催化形成的。随后，作者将包括*S. cattleya*在内的两株可以合成含有末端炔基氨基酸的链霉菌与其他26株链霉菌进行比较基因组分析，获得了潜在的 β es生物合成基因簇。通过基因敲除与体外酶催化实验，作者阐明了 β es的生物合成途径（图9）。首先，卤化酶BesD作用于L-lysine (**13**)，在其C₄位上连接一个氯原子形成4-Cl-L-lysine (**14**)。然后，氧化酶BesC催化4-Cl-L-lysine发生碳碳单键断裂生成4-Cl-allylglycine (**15**)。裂解酶BesB通过催化消除反应将4-Cl-allylglycine转化成含有末端炔基的L-propargylglycine (Pra, **16**)。氨基酸连接酶BesA可以将谷氨酸连接到Pra的氨基上形成二肽化合物 γ -L-glutamyl-L-Pra (**17**)，其可在羟化酶BesE的作用下转化成 γ -L-glutamyl-L- β es (**18**)。最后，在水解酶的作用下， γ -L-glutamyl-L- β es脱去谷氨酸生成终产物 β es。

为了深入了解BesB是如何催化消除反应形成炔基，作者将4-Cl-allylglycine、BesB以及辅因子

磷酸吡哆醛（PLP）添加至含有氘代水的缓冲溶液中进行反应，最后发现生成的Pra的分子量增加了2，表明在BesB催化末端炔基形成的过程中发生了两次质子化反应。人们在前期研究Pra对PLP依赖的胱硫醚- γ -裂解酶（cystathionine γ -lyase, CSE）的抑制作用时，推测Pra先与CSE中的辅因子PLP结合，然后末端的炔基异构形成联烯结构，最后再与CSE中的酪氨酸发生反应从而抑制CSE的功能^[80-81]。因此，作者推测4-Cl-allylglycine进入到BesB的活性口袋后先与PLP结合形成4-Cl-allylglycine-aldimine，然后依次脱去C _{α} 与C _{β} 位上的质子形成4-Cl-allylglycine-ketamine，继续脱去氯离子形成联烯化合物（图10）。该中间体脱去C _{δ} 位上的质子后，再依次在C _{β} 与C _{α} 位上发生质子化便可形成Pra（图10）。

1.5 杂萜中内部炔基的生物合成

真菌中含有一类特有的异戊烯链中带有炔基的杂萜化合物^[8]，此类化合物还易与其他化合物发生聚合形成结构更为复杂的聚合物^[82-85]。前期，研究人员通过同位素标记实验发现此类化合物的非萜部分来源于莽草酸途径^[86]，但是其剩余的生物合成途径，特别是异戊烯链中炔基的生物合成机制一直未被阐明。直到2020年，Lü等^[87]与Chen等^[88]分别解析了炔基杂萜biscognienyne B (**19**)以及asperpentyn (**20**)的生物合成途径，发现此类化合物中的炔基是由P450酶催化形成（图11）。

Lü等^[87]从一株地衣内生真菌*Biscogniauxia* sp.

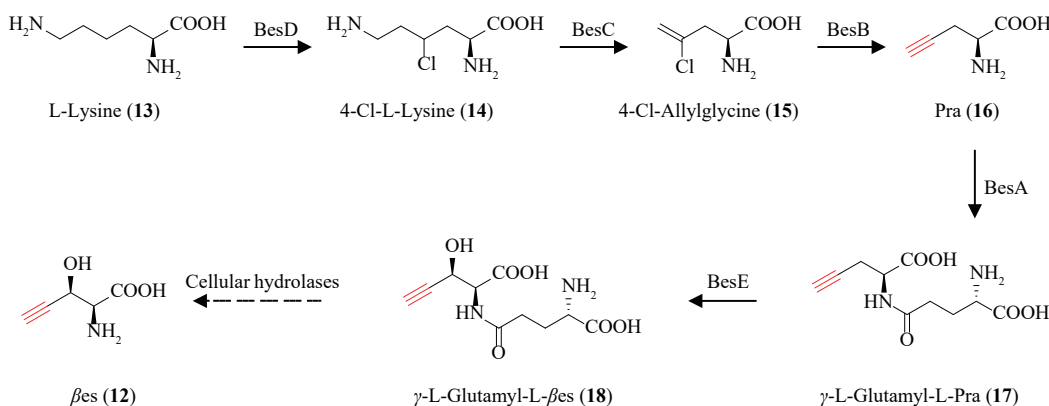


图9 L- β -ethynylserine的生物合成途径

Fig. 9 The biosynthetic pathway of L- β -ethynylserine

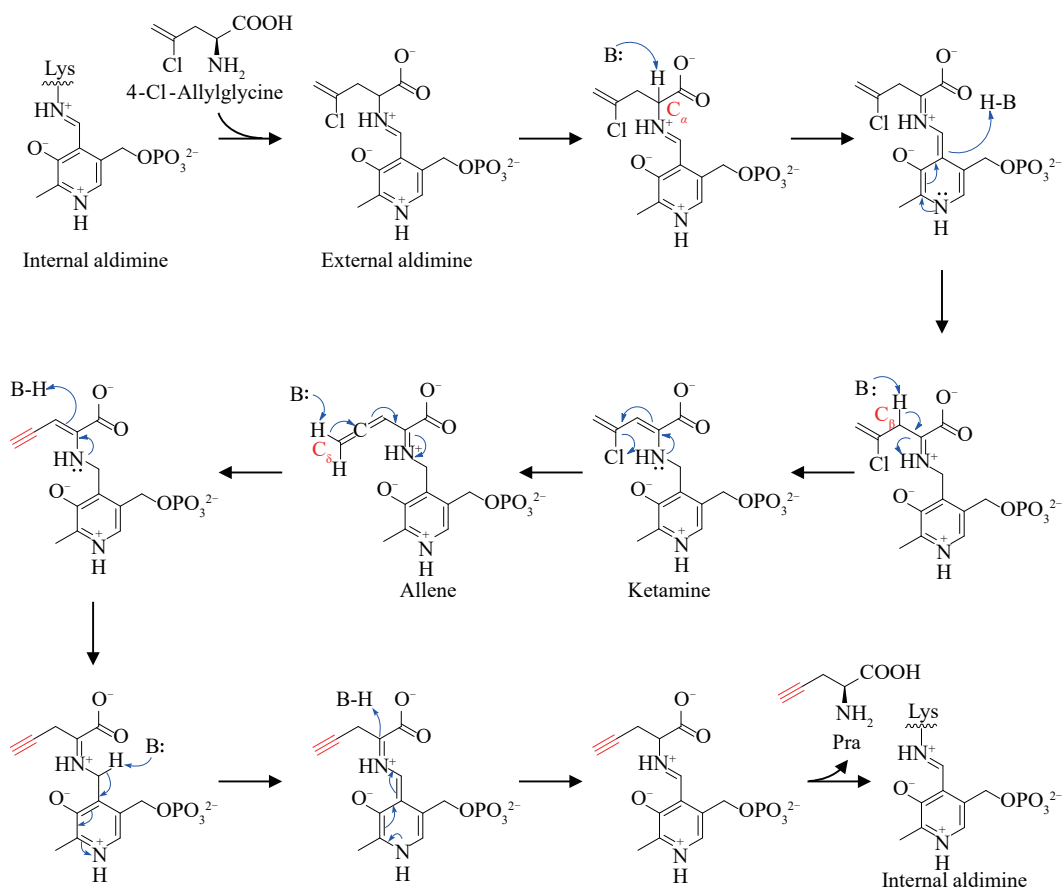


图10 BesB催化的末端炔基形成机制

Fig. 10 Mechanism for the biosynthesis of terminal alkyne catalyzed by BesB

(71-10-1-1)中找到了biscognienyne B的生物合成基因簇，并利用米曲霉异源表达体系阐明了biscognienyne B的生物合成途径(图11)。首先，对羟基苯甲酸(4-HBA, **21**)在异戊烯基转移酶BisJ的作用下连接一个C₅异戊烯链转化成4-hydroxy-3-prenylbenzoic acid (**22**)，其可被P450氧化酶BisI催化生成含有炔基的化合物eutypinic acid (**23**)。然后，氧化脱羧酶BisD催化氧化脱羧反应将eutypinic acid转化成siccayne (**24**)。异戊烯基转移酶BisB可连接另一条C₅异戊烯链到siccayne上从而生成pestalodiol E (**25**)，最后在含有cupin结构域的氧化酶BisC与短链脱氢还原酶BisF的作用下生成终产物biscognienyne B。为了能够检测到BisI催化炔基形成过程中可能存在的中间体，阐明异戊烯链中炔基的形成机制，作者通过化学方法制备了甲基化的底物**26**，并将其喂养至单独表达BisI的米曲霉转染菌株中。最后，作者从培养体系中分离获得了脱氢产物**27**与羟化产物**28** [图12(a)]，提示BisI

可能先催化异戊烯链发生脱氢反应生成具有(E)-1,3-diene结构的中间体，然后继续催化反式双键脱氢形成炔基。但是，通过体外反应以及喂养实验，作者发现BisI无法将反式双键转化成炔基。同一时间，Chen等^[88]从*Aspergillus* sp. PSU-RSPG185中找到了asperpentyn的生物合成基因簇，包含有UbiA型异戊烯基转移酶基因 $atyB$ ，P450氧化酶基因 $atyI$ ，氧化脱羧酶基因 $atyG$ ，核黄素依赖的氧化还原酶基因 $atyA$ ，含有cupin结构域的氧化酶基因 $atyE$ ，短链脱氢还原酶基因 $atyC$ ，乙醛还原酶基因 $atyD$ 等，并推测了asperpentyn的生物合成途径(图11)。通过在酿酒酵母中异源表达，作者证实P450氧化酶AtyI确实负责asperpentyn中炔基的形成(图11)。随后，作者合成了一系列的底物类似物，并喂养到单独表达AtyI的酿酒酵母菌株中。喂养结果显示AtyI同样无法作用于反式双键，但是可以将化合物**29**中的顺式双键脱氢转化成炔基，从而生成**30** [图12(b)]。综上所述，P450氧化酶

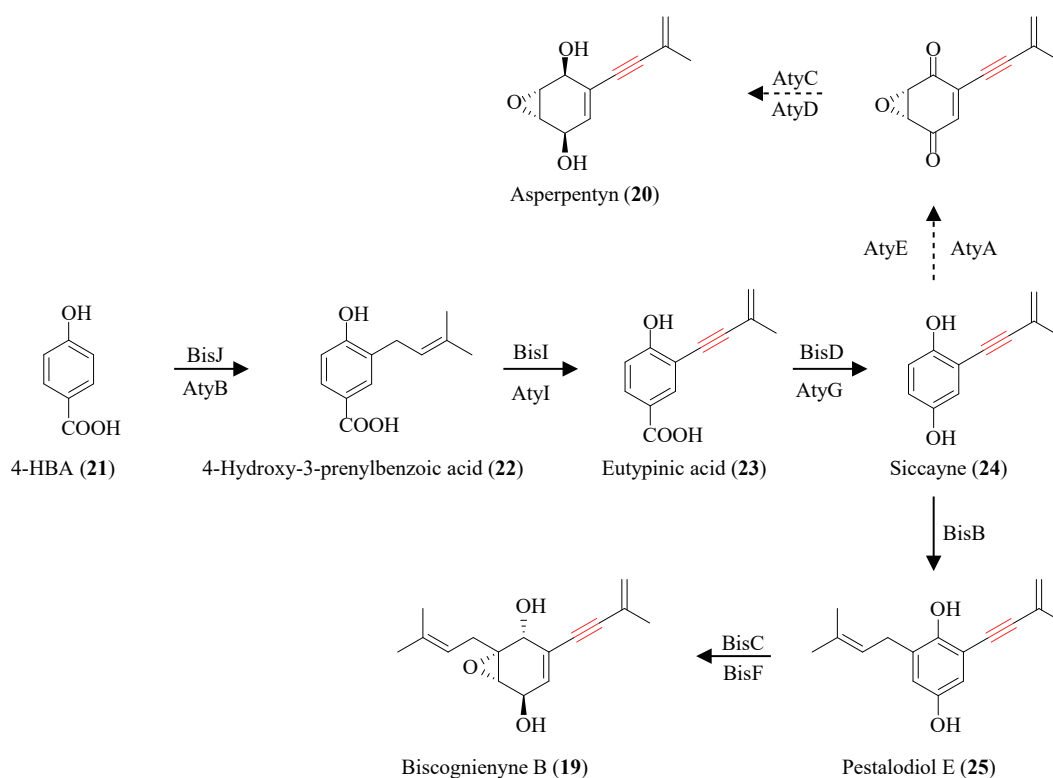
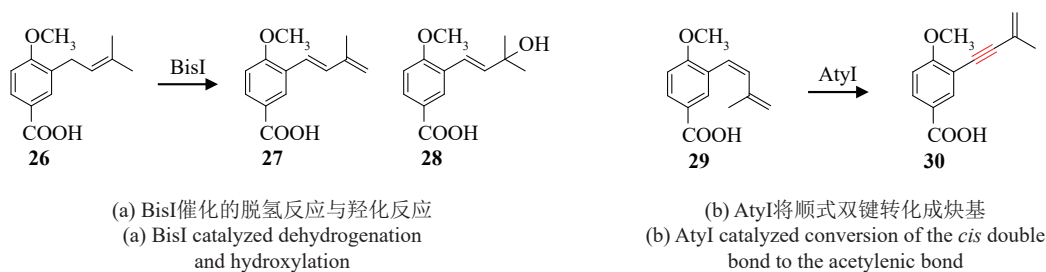


图 11 炔类杂萜 biscognienyne B 与 asperpentin 的生物合成途径

Fig. 11 Routes for the biosynthesis of acetylenic meroterpenoids biscognienyne B and asperpentin



(a) BisI催化的脱氢反应与羟化反应
(a) BisI catalyzed dehydrogenation and hydroxylation

(b) AtyI将顺式双键转化成炔基
(b) AtyI catalyzed conversion of the *cis* double bond to the acetylenic bond

图 12 BisI 与 AtyI 功能研究

Fig. 12 Functional analysis of BisI and AtyI

BisI 与 AtyI 能够以 4-hydroxy-3-prenylbenzoic acid 为底物催化羟化反应与脱氢反应，生成羟基化产物 **31**，以及具有 (*E*)-1,3-diene 或 (*Z*)-1,3-diene 结构的脱氢产物 **32** 与 **33**，然后再将 (*Z*)-1,3-diene 结构中的顺式双键转化成炔基（图 13）。由此可见，P450 酶催化的异戊烯链内部炔键的形成机制与去饱和酶催化的脂肪酸链内部炔键的形成机制类似，均是通过脱去顺式双键上的两个氢而形成的，我们推测这是由于底物在酶口袋中无法自由转动，因此酶的金属中心只能拔去双键同侧的两个氢。此外，Lü 等^[87]发现 BisI 对底物中异戊烯链的长度没有严格

的要求，可识别连有 C₅ 或 C₁₅ 异戊烯链的底物。

2 非天然炔类化合物的从头生物合成

炔类天然产物的生物合成研究为从头生物合成非天然的炔类化合物提供了必要的酶工具，而且部分炔基合成酶已被用于非天然炔类化合物的构建。

2.1 非天然炔类聚酮的从头生物合成

Zhu 等^[73]发现 *jamABC* 三个基因可以将 5-己烯

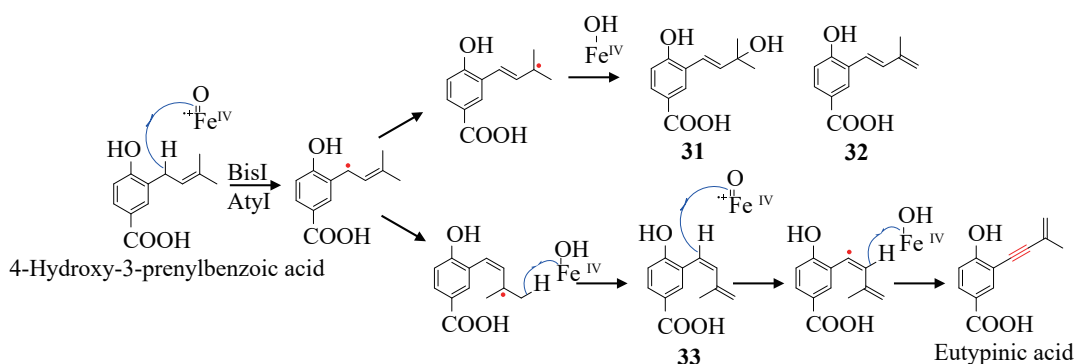


图13 BisI或AtyI催化的炔基杂萜中炔基的生物合成机制

Fig. 13 Mechanism of alkyne biosynthesis in acetylenic meroterpenoids catalyzed by BisI or AtyI

酸转化成 5-hexynoyl-JamC (图8), 然后作为起始单元被聚酮合酶与非核糖体肽合成酶利用生成 jamaicamide B。为了考察 *jamABC* 是否可以用于构建含有末端炔基的非天然聚酮化合物, 作者将 *jamABC* 与 *Huperzia serrate* 来源的可以识别不同起始单元的 III 型聚酮合酶基因 *hspks1*^[89] 一同导入到大肠杆菌 *Escherichia coli* BAP1。由于没有向大肠杆菌中导入 5-己烯酸的合成元件, 作者在发酵培养基中添加了 5-己烯酸, 以期 *jamABC* 与 *hspks1* 可以利用培养基中的 5-己烯酸以及大肠杆菌提供的其他原料合成炔基标记的聚酮化合物。经过两天的培养, 作者从培养液中检测到了聚酮化合物 **34** (图14), 首次实现了非天然炔基化合物的从头生物合成。

Zhu 等^[73] 和 Porterfield 等^[90] 还研究了 *jamABC* 与 I 型聚酮合酶基因的组合。抗霉素是一类以九元双内酯结构为核心的聚酮-非核糖体肽杂合体, 具有多种重要的生物活性^[91-92]。前期, 研究人员主要通过向培养体系中添加含有炔基的底物来获得炔基标记的抗霉素^[29-30]。考虑到抗霉素生物合成途径中的巴豆酰辅酶 A 羧化酶/还原酶 AntE 以及聚酮合酶 AntD 具有宽泛的底物特异性^[29], 可以引入不同的延伸单元, Zhu 等^[73] 将 *antD*、*antE* 以及剩余 4 个负责抗霉素核心结构生物合成的基因 (非核糖体肽合成酶基因 *antC*, 酰基辅酶 A 连接酶基因 *antF*, 酰基载体蛋白基因 *antG*, 还原酶基因 *antM*) 与 *jamABC* 一并导入到 *E. coli* BAP1 中。同样地, 由于宿主菌株不含有 5-己烯酸与邻氨基苯甲酸的

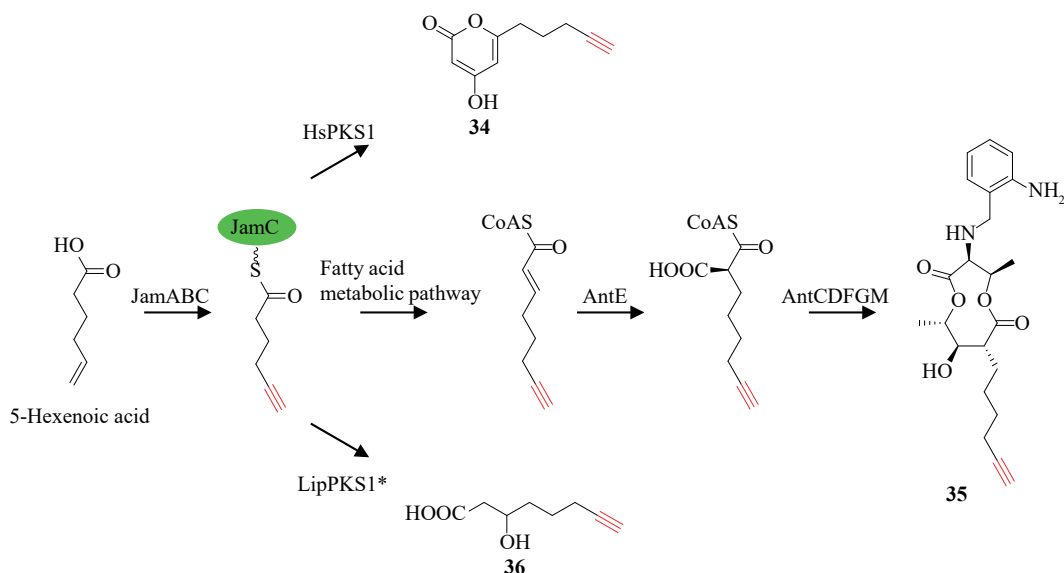


图14 非天然炔基聚酮的从头生物合成

Fig. 14 De novo biosynthesis of non-natural acetylenic polyketides

合成元件，作者就在培养基中添加了5-己烯酸与邻氨基苯甲酸，结果显示 AntCDEFGM 与 JamABC 确实可以利用上述原料以及大肠杆菌提供的其他原料合成抗霉素 35 (图 14)。

LipPKS1 是脂霉素生物合成的第 1 个模块，由 6 个结构域组成，包括负责装载起始单元的酰基转移酶(AT)结构域与 ACP 结构域，负责装载延伸单元的 AT 结构域，酮基还原酶(KR)结构域与 ACP 结构域，以及负责将起始单元与延伸单元缩合的酮基合酶(KS)结构域^[93]。为了将 *LipPKS1* 与 *jamABC* 进行组合，研究人员移除了 LipPKS1 中负责识别与连接起始单元的 AT 与 ACP 结构域^[90]，并将负责以甲基丙二酸单酰辅酶 A 作为延伸单元的 AT 结构域换成可以识别丙二酸单酰辅酶 A 的 AT 结构域，最后在模块的末端增加一个硫酯酶 (TE) 结构域^[94]。Porterfield 等^[90] 通过体外酶催化反应发现 JamABC 与改造后的 LipPKS1 (LipPKS1*) 组合后可生成 3-hydroxy-7-octynoic acid (36) (图 14)。

上述研究初步证明负责炔基合成的三基因表达盒 *jamABC* 可以与具有宽泛底物特异性的聚酮合酶基因组合从而合成炔类聚酮化合物。基于此，为了实现炔类聚酮化合物的高效从头生物合成，将 *jamABC* 与其他所需的聚酮化合物合成元件一起导入到特定的底盘菌株后，一方面可以对三基因合成元件 *jamABC* 进行优化^[90, 95]，另一方面也可对底盘细胞与目标化合物合成途径的适配性进行优化^[96]。

2.2 非天然炔类蛋白质的从头生物合成

蛋白质中引入连有活泼基团的非蛋白氨基酸在理解蛋白质结构与功能的关系、控制与观察蛋白质在细胞中的定位等方面有重要的应用^[97]。早期，人们通过对蛋白质中的半胱氨酸、赖氨酸等进行化学修饰来实现非蛋白氨基酸的引入^[98]，但是该策略通常只适用于体外分离纯化获得的蛋白，无法用于体内蛋白的修饰^[99]。因此，研究人员开发了基因密码子拓展技术，该技术主要是通过对氨酰-tRNA 合成酶 (aminoacyl-tRNA synthetase) 的改造来获得可以识别非蛋白氨基酸的氨酰-tRNA，然后在蛋白质合成过程中，新的氨酰-

tRNA 可以将非蛋白氨基酸运输到特定的密码子位点^[100]。利用该技术，研究人员已在大肠杆菌、酵母菌以及哺乳动物细胞中实现了连有非蛋白氨基酸的蛋白质的合成^[101]。但是，由于此前一直未阐明含有炔基的氨基酸的生物合成途径，研究人员采取直接向培养体系中添加炔类氨基酸来制备炔基标记的蛋白质^[97, 102]。Marchand 等^[79] 在阐明了炔类氨基酸 β es 的生物合成途径的基础上，将负责中间体 Pra 合成的 *besBCD* 三个基因，以及经改造的氨酰-tRNA 合成酶基因导入到大肠杆菌，即将炔类氨基酸合成模块与新的翻译工具合成模块同时导入到大肠杆菌，以期在不添加炔类氨基酸的情况下利用重组大肠杆菌合成炔基标记的蛋白质。培养两天后，作者将菌株的蛋白粗提物与 TAMRA-azide 荧光染料进行点击化学反应，然后通过 SDS-PAGE 对反应产物进行分析并用荧光观察，结果发现 Pra 确实参与了蛋白质的合成。未来可以对炔类氨基酸合成模块 *besBCD* 进行改造优化，拓宽其底物宽泛性，以期获得更多不同的炔类氨基酸，然后利用基因密码子拓展技术合成含有不同炔类氨基酸的蛋白质，为人类在医药、健康等领域的发展提供新的原料。

3 总结与展望

炔基不仅是许多临床药物与活性天然产物的关键功能基因，同时也是在化学反应中被广泛使用的重要结构单元。但是，目前所采用的基于化学合成或底物喂养的炔类化合物合成策略均存在一定的局限性，限制了炔基在药物化学、有机合成以及化学生物学等领域的应用。在合成生物技术的推动下，从头生物合成被认为是一种可以弥补传统策略的不足，具有广阔应用前景的新的炔类化合物制备技术，其核心要素是需明确天然产物中炔基的形成机制。因此，研究人员开展了一系列炔类天然产物的生物合成研究，以期获得多样的炔基合成酶，为从头生物合成炔类化合物提供酶工具。经过 20 多年的努力，人们已从自然界中发现了 4 种针对不同类型天然产物的炔基形成方式，包括：①在脂肪酸中，乙炔酶催化碳碳双键脱氢形成炔基；②在聚酮-非核糖体肽杂合体中，

连接酶先将一条带有末端双键的脂肪酸链与酰基载体蛋白结合,随后乙炔酶将其末端双键脱氢转化成炔基,最后作为起始单元引入到聚酮-非核糖体肽合成体中;③在氨基酸中,卤化酶先催化卤化反应使氨基酸的侧链连接一个卤原子,然后氧化酶使氨基酸的侧链发生断裂生成末端双键,最后裂解酶脱去氨基酸侧链的卤原子从而形成末端炔基;④在杂萜中,P450氧化酶连续两次催化异戊烯链发生脱氢反应生成炔基。在此基础上,研究人员利用部分炔基合成酶实现了非天然炔类聚酮化合物以及炔基标记蛋白质的从头生物合成。然而,为了更好地满足不同炔类化合物的从头生物合成的需求,研究人员仍需加强多方面的研究工作。

首先,自然界中存在多种结构类型的炔类天然产物,目前仅找到了4种不同的负责炔基合成的基因元件,仍有一些炔类天然产物的炔基形成机制未被阐明,如烯二炔类抗生素核心骨架中的两个炔基以及 *histrionicotoxin* 类生物碱中的炔基等,因此有必要继续开展其他炔类天然产物的生物合成研究,为炔类化合物的生物制造提供种类丰富的酶工具。其次,天然来源的炔基合成酶的底物特异性通常比较严格,无法用于制备结构多样的炔类化合物,因此有必要积极开展炔基合成酶的蛋白晶体结构研究,为拓展其底物特异性提供理论基础。除此之外,炔基合成酶在异源宿主或体外的催化效率问题同样值得关注。尽管上述研究工作仍存在不小的挑战,但是随着基因测序技术、生物信息学技术、基因编辑技术、蛋白晶体学技术等的不断发展,这些瓶颈问题终将会被解决,从头生物合成策略也有望在未来可以广泛地用于炔类化合物的制造,从而与传统的化学合成以及底物喂养策略相互补充,推动炔基在各领域的应用。

参 考 文 献

- [1] TALELE T T. Acetylene group, friend or foe in medicinal chemistry[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63(11): 5625-5663.
- [2] CHRISTIN-MAITRE S. History of oral contraceptive drugs and their use worldwide[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 27(1): 3-12.
- [3] RAKHMANINA N Y, VAN DEN ANKER J N. Efavirenz in the therapy of HIV infection[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2010, 6(1): 95-103.
- [4] TAN F H, PUTOCZKI T L, STYLLI S S, et al. Ponatinib: a novel multi-tyrosine kinase inhibitor against human malignancies[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2019, 12: 635-645.
- [5] JIRSCHLE K, SAND P K. Oxybutynin: past, present, and future[J]. *International Urogynecology Journal*, 2013, 24(4): 595-604.
- [6] SHEAR N H, VILLARS V V, MARSOLAIS C. Terbinafine: an oral and topical antifungal agent[J]. *Clinics in Dermatology*, 1991, 9(4): 487-495.
- [7] CHANDRARATNA R A S. Tazarotene: the first receptor-selective topical retinoid for the treatment of psoriasis[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1997, 37(2 pt 3): S12-S17.
- [8] KUKLEV D V, DOMB A J, DEMBITSKY V M. Bioactive acetylenic metabolites[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(13): 1145-1159.
- [9] ZHOU Z F, MENNA M, CAI Y S, et al. Polyacetylenes of marine origin: Chemistry and bioactivity[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(3): 1543-1596.
- [10] NEGRI R. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances[J]. *Fitoterapia*, 2015, 106: 92-109.
- [11] CHRISTENSEN L P. Bioactive C₁₇ and C₁₈ acetylenic oxylipins from terrestrial plants as potential lead compounds for anticancer drug development[J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2568.
- [12] DALY J W. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin[J]. *Journal of Natural Products*, 1998, 61(1): 162-172.
- [13] CHRISTENSEN L P. Aliphatic C₁₇-polyacetylenes of the falcarinol type as potential health promoting compounds in food plants of the Apiaceae family[J]. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2011, 3(1): 64-77.
- [14] DAWID C, DUNEMANN F, SCHWAB W, et al. Bioactive C₁₇-polyacetylenes in carrots (*Daucus carota* L.): Current knowledge and future perspectives[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(42): 9211-9222.
- [15] NICOLAOU K C, CHEN J S, DALBY S M. From nature to the laboratory and into the clinic[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(6): 2290-2303.
- [16] SHAO R G. Pharmacology and therapeutic applications of enediyne antitumor antibiotics[J]. *Current Molecular Pharmacology*, 2008, 1(1): 50-60.
- [17] TYKWINSKI R R. Evolution in the palladium-catalyzed cross-coupling of sp²- and sp³-hybridized carbon atoms[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(12): 2152-2160.

- wandte Chemie International Edition, 2003, 42(14): 1566-1568.
- [18] KOSCHKER P, BREIT B. Branching out: Rhodium-catalyzed allylation with alkynes and allenes[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2016, 49(8): 1524-1536.
- [19] GODOI B, SCHUMACHER R F, ZENI G. Synthesis of heterocycles *via* electrophilic cyclization of alkynes containing heteroatom[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(4): 2937-2980.
- [20] ZENG X M. Recent advances in catalytic sequential reactions involving hydroelement addition to carbon-carbon multiple bonds[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(8): 6864-6900.
- [21] PATEL M, SAUNTHWAL R K, VERMA A K. Base-mediated hydroamination of alkynes[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50(2): 240-254.
- [22] TROST B M, MASTERS J T. Transition metal-catalyzed couplings of alkynes to 1, 3-enynes: modern methods and synthetic applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(8): 2212-2238.
- [23] TADROSS P M, STOLTZ B M. A comprehensive history of arynes in natural product total synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(6): 3550-3577.
- [24] JURÍČEK M, KOUWER P H J, ROWAN A E. Triazole: a unique building block for the construction of functional materials[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(31): 8740-8749.
- [25] THIRUMURUGAN P, MATOSIUK D, JOZWIAK K. Click chemistry for drug development and diverse chemical-biology applications[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(7): 4905-4979.
- [26] HABRANT D, RAUHALA V, KOSKINEN A M. Conversion of carbonyl compounds to alkynes: general overview and recent developments[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(6): 2007-2017.
- [27] SHAW R, ELAGAMY A, ALTHAGAFI I, et al. Synthesis of alkynes from non-alkyne sources[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2020, 18(20): 3797-3817.
- [28] DUPUIS S N, ROBERTSON A W, VEINOT T, et al. Synthetic diversification of natural products: Semi-synthesis and evaluation of triazole jadomycins[J]. *Chemical Science*, 2012, 3(5): 1640-1644.
- [29] YAN Y, CHEN J, ZHANG L H, et al. Multiplexing of combinatorial chemistry in antimycin biosynthesis: Expansion of molecular diversity and utility[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(47): 12308-12312.
- [30] SANDY M, ZHU X J, RUI Z, et al. Characterization of AntB, a promiscuous acyltransferase involved in antimycin biosynthesis[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(13): 3396-3399.
- [31] HARVEY C J, PUGLISI J D, PANDE V S, et al. Precursor directed biosynthesis of an orthogonally functional erythromycin analogue: Selectivity in the ribosome macrolide binding pocket[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(29): 12259-12265.
- [32] 林章凛, 张艳, 王霄, 等. 合成生物学研究进展[J]. *化工学报*, 2015, 66(8): 2863-2871.
- LIN Z L, ZHANG Y, WANG X, et al. Recent advances in synthetic biology[J]. *CIESC Journal*, 2015, 66(8): 2863-2871.
- [33] KEASLING J D. Synthetic biology for synthetic chemistry[J]. *ACS Chemical Biology*, 2008, 3(1): 64-76.
- [34] MINTO R E, BLACKLOCK B J. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products[J]. *Progress in Lipid Research*, 2008, 47(4): 233-306.
- [35] CHAI Q Y, YANG Z, LIN H W, et al. Alkynyl-containing peptides of marine origin: a review[J]. *Marine Drugs*, 2016, 14(11): 216.
- [36] MEINWALD J, MEINWALD Y C, CHALMERS A M, et al. Dihydropyridinone acid: Acetylenic acid secreted by soldier beetle[J]. *Science*, 1968, 160(3830): 890-892.
- [37] BU'LOCK J D, SMITH G N. The origin of naturally-occurring acetylenes[J]. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1967, 332-336.
- [38] FLEMING I, HARLEY-MASON J. Enol elimination reactions (I): a new synthesis of acetylenic acids[J/OL]. *Journal of the Chemical Society*, 1963: 4771-4777. https://cn.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=5Uql7uEJ&id=853D9431E5FD4CDCAC75A932C42E72F36729D947&thid=OIP.5Uql7uEJ1xbUyr_-yZCzyQHs&mediurl=https%3a%2f%2fpubs.rsc.org%2fen%2fimage%2fget%3fimageInfo.ImageType%3dGA%26imageInfo.ImageIdentifier.ManuscriptID%3dJR9630004771%26imageInfo.ImageIdentifier.Year%3d1963&cdnurl=https%3a%2f%2ftse1-mm.cn.bing.net%2fth%2fid%2fR-C.e54aa5ee109d716d4cabffec990b3c9%3frik%3dR9kpZ%252fNyLsQyqQ%26pid%3dImgRaw%26r%3d0&exph=655&expw=500&q=enol+elimination+reactions+i&simid=607992233410701701&FORM=IRPRST&ck=7D5B10BF8DF7FBE406CF4E280217CA91&selectedIndex=0&qpv=enol+elimination+reactions+i&ajaxhist=0&ajaxserp=0
- [39] LEE M, LENMAN M, BANAS A, et al. Identification of non-heme diiron proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation[J]. *Science*, 1998, 280(5365): 915-918.
- [40] CARLSSON A S, THOMAEUS S, HAMBERG M, et al. Properties of two multifunctional plant fatty acid acetylenase/desaturase enzymes[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(14): 2991-2997.
- [41] CAHOON E B, SCHNURR J A, HUFFMAN E A, et al. Fungal responsive fatty acid acetylenases occur widely in evolutionarily distant plant families[J]. *The Plant Journal*, 2003, 34(5): 671-683.
- [42] BUSTA L, YIM W C, LABRANT E W, et al. Identification of genes encoding enzymes catalyzing the early steps of carrot polyacetylene biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2018, 178(4): 1507-1521.

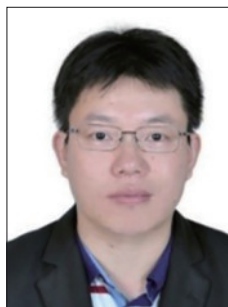
- [43] JEON J E, KIM J G, FISCHER C R, et al. A pathogen-responsive gene cluster for highly modified fatty acids in tomato[J]. *Cell*, 2020, 180(1): 176-187.
- [44] SPERLING P, LEE M, GIRKE T, et al. A bifunctional Δ^6 -fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*. a new member of the cytochrome b5 superfamily[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(12): 3801-3811.
- [45] CHEN P Y, HSIEH M J, TSAI Y T, et al. Transformation and characterization of Δ^{12} -fatty acid acetylenase and Δ^{12} -oleate desaturase potentially involved in the polyacetylene biosynthetic pathway from *Bidens pilosa*[J]. *Plants*, 2020, 9(11): 1483.
- [46] CHUNG H H, TING H M, WANG W H, et al. Elucidation of enzymes involved in the biosynthetic pathway of bioactive polyacetylenes in *Bidens pilosa* using integrated omics approaches[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(2): 525-541.
- [47] SERRA M, PIÑA B, ABAD J L, et al. A multifunctional desaturase involved in the biosynthesis of the processionary moth sex pheromone[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(42): 16444-16449.
- [48] HARITOS V S, HORNE I, DAMCEVSKI K, et al. The convergent evolution of defensive polyacetylenic fatty acid biosynthesis genes in soldier beetles[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 1150.
- [49] BLACKLOCK B J, SCHEFFLER B E, SHEPARD M R, et al. Functional diversity in fungal fatty acid synthesis: the first acetylenase from the Pacific golden chanterelle, *Cantharellus formosus*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(37): 28442-28449.
- [50] ROSS C, SCHERLACH K, KLOSS F, et al. The molecular basis of conjugated polyene biosynthesis in phytopathogenic bacteria[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(30): 7794-7798.
- [51] BLOOMFIELD D K, BLOCH K. The formation of Δ^9 -unsaturated fatty acids[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1960, 235: 337-345.
- [52] SHANKLIN J, CAHOON E B. Desaturation and related modifications of fatty acids[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 611-641.
- [53] BUIST P H. Fatty acid desaturases: Selecting the dehydrogenation channel[J]. *Natural Product Reports*, 2004, 21(2): 249-262.
- [54] SHANKLIN J, GUY J E, MISHRA G, et al. Desaturases: emerging models for understanding functional diversification of diiron-containing enzymes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(28): 18559-18563.
- [55] BAI Y, MCCOY J G, LEVIN E J, et al. X-ray structure of a mammalian stearoyl-CoA desaturase[J]. *Nature*, 2015, 524(7564): 252-256.
- [56] LINDQVIST Y, HUANG W, SCHNEIDER G, et al. Crystal structure of Δ^9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(16): 4081-4092.
- [57] REED D W, POLICHUK D R, BUIST P H, et al. Mechanistic study of an improbable reaction-alkene dehydrogenation by the Δ^{12} acetylenase of *Crepis alpina*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(35): 10635-10640.
- [58] BEHROUZIAN B, FAUCONNOT L, DALIGAULT F, et al. Mechanism of fatty acid desaturation in the green alga *Chlorella vulgaris*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(12): 3545-3549.
- [59] VAN LANEN S G, SHEN B. Biosynthesis of enediynes antitumor antibiotics[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, 8(6): 448-459.
- [60] LIANG Z X. Complexity and simplicity in the biosynthesis of enediyne natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(4): 499-528.
- [61] MAEDA H, SAWA T, KONNO T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS[J]. *Journal of Controlled Release*, 2001, 74(1-3): 47-61.
- [62] DAMLE N K, FROST P. Antibody-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2003, 3(4): 386-390.
- [63] HENSENS O D, GINER J L, GOLDBERG I H. Biosynthesis of NCS Chrom A, the chromophore of the antitumor antibiotic neocarzinostatin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111(9): 3295-3299.
- [64] LAM K S, VEITCH J A, GOLIK J, et al. Biosynthesis of esperamicin A₁, an enediyne antitumor antibiotic[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1993, 115(26): 12340-12345.
- [65] THORSON J S, SHEN B, WHITWAM R E, et al. Enediyne biosynthesis and self-resistance: a progress report[J]. *Bioorganic Chemistry*, 1999, 27(2): 172-188.
- [66] LIU W, CHRISTENSON S D, STANDAGE S, et al. Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1170-1173.
- [67] AHLERT J, SHEPARD E, LOMOVSKAYA N, et al. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1173-1176.
- [68] ZHANG J, VAN LANEN S G, JU J H, et al. A phosphopantetheinylating polyketide synthase producing a linear polyene to initiate enediyne antitumor antibiotic biosynthesis[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(5): 1460-1465.
- [69] KONG R, GOH L P, LIEW C W, et al. Characterization of a carbonyl-conjugated polyene precursor in 10-membered en-

- ediyne biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(26): 8142-8143.
- [70] RIVAS L, ROJAS V. Cyanobacterial peptides as a *tour de force* in the chemical space of antiparasitic agents[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 664: 24-39.
- [71] EDWARDS D J, MARQUEZ B L, NOGLE L M, et al. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*[J]. *Chemistry & Biology*, 2004, 11(6): 817-833.
- [72] JONES A C, MONROE E A, PODELL S, et al. Genomic insights into the physiology and ecology of the marine filamentous cyanobacterium *Lyngbya majuscula*[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(21): 8815-8820.
- [73] ZHU X J, LIU J, ZHANG W J. *De novo* biosynthesis of terminal alkyne-labeled natural products[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(2): 115-120.
- [74] ZHU X J, SU M, MANICKAM K, et al. Bacterial genome mining of enzymatic tools for alkyne biosynthesis[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(12): 2785-2793.
- [75] POTGIETER H C, VERMEULEN N M J, POTGIETER D J J, et al. A toxic amino acid, 2(*S*),3(*R*)-2-amino-3-hydroxypent-4-ynoic acid from the fungus *Sclerotium rolfsii*[J]. *Phytochemistry*, 1977, 16(11): 1757-1759.
- [76] SANADA M, MIYANO T, IWADARE S. β -Ethylnylserine, an antimetabolite of L-threonine, from *Streptomyces cattleya*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1986, 39(2): 304-305.
- [77] KURODA Y, OKUHARA M, GOTO T, et al. FR-900130, a novel amino acid antibiotic (II): Isolation and structure elucidation of the acetyl derivative of FR-900130[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1980, 33(2): 132-136.
- [78] HATANAKA S I. Amino acids from mushrooms[J]. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1992, 59: 1-140.
- [79] MARCHAND J A, NEUGEBAUER M E, ING M C, et al. Discovery of a pathway for terminal-alkyne amino acid biosynthesis[J]. *Nature*, 2019, 567(7748): 420-424.
- [80] SUN Q X, COLLINS R, HUANG S F, et al. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine γ -lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(5): 3076-3085.
- [81] ABELES R H, WALSH C T. Acetylenic enzyme inactivators. Inactivation of γ -cystathionase, *in vitro* and *in vivo*, by propargylglycine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1973, 95(18): 6124-6125.
- [82] ZHAO H, CHEN G D, ZOU J, et al. Dimericbiscognienyne A: A meroterpenoid dimer from *Biscogniauxia* sp. with new skeleton and its activity[J]. *Organic Letters*, 2017, 19(1): 38-41.
- [83] ZHAO H, WANG M Z, CHEN G D, et al. Dimericbiscognienynes B and C: new diisoprenyl-cyclohexene-type meroterpenoid dimers from *Biscogniauxia* sp. [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2019, 30(1): 51-54.
- [84] PAN Y Y, LIU L, GUAN F F, et al. Characterization of a prenyltransferase for iso-A82775C biosynthesis and generation of new congeners of chloropestolides[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(3): 703-711.
- [85] KIM G, KIM M J, CHUNG G, et al. (+)-Dimericbiscognienyne A: total synthesis and mechanistic investigations of the key heterodimerization[J]. *Organic Letters*, 2018, 20(21): 6886-6890.
- [86] SIEBERTZ R, PROKSCH P, WITTE L. Accumulation and biosynthesis of the chromenes precocene I and II in *Ageratum houstonianum*[J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(7): 2135-2138.
- [87] LÜ J M, GAO Y H, ZHAO H, et al. Biosynthesis of biscognienyne B involving a cytochrome P450-dependent alkynylation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(32): 13531-13536.
- [88] CHEN Y R, NARESH A, LIANG S Y, et al. Discovery of a dual function cytochrome P450 that catalyzes enyne formation in cyclohexanoid terpenoid biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(32): 13537-13541.
- [89] MORITA H, YAMASHITA M, SHI S P, et al. Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(33): 13504-13509.
- [90] PORTERFIELD W B, POENATEETA N, ZHANG W J. Engineered biosynthesis of alkyne-tagged polyketides by type I PKSs[J]. *iScience*, 2020, 23(3): 100938.
- [91] HUANG L S, COBESSI D, TUNG E Y, et al. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc₁ complex: A new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 351(3): 573-597.
- [92] SCHWARTZ P S, MANION M K, EMERSON C B, et al. 2-Methoxy antimycin reveals a unique mechanism for Bcl-x_L inhibition[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, 6(7): 2073-2080.
- [93] BIHLMAIER C, WELLE E, HOFMANN C, et al. Biosynthetic gene cluster for the polyenoyltetramic acid α -lipomycin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(6): 2113-2121.
- [94] YUZAWA S, DENG K, WANG G, et al. Comprehensive *in vitro* analysis of acyltransferase domain exchanges in modular polyketide synthases and its application for short-chain ketone production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(1): 139-147.
- [95] ZHU X J, SHIEH P, SU M, et al. A fluorogenic screening plat-

- form enables directed evolution of an alkyne biosynthetic tool[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(75): 11239-11242.
- [96] 谢泽雄, 陈祥荣, 肖文海, 等. 基因组再造与重排构建细胞工厂[J]. *化工学报*, 2019, 70(10): 3712-3721.
XIE Z X, CHEN X R, XIAO W H, et al. Cell factory construction accelerated by genome synthesis and rearrangement[J]. *CI-ESC Journal*, 2019, 70(10): 3712-3721.
- [97] LANG K, CHIN J W. Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(9): 4764-4806.
- [98] BOUTUREIRA O, BERNARDES G J L. Advances in chemical protein modification[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(5): 2174-2195.
- [99] SAKAMOTO S, HAMACHI I. Recent progress in chemical modification of proteins[J]. *Analytical Sciences*, 2019, 35(1): 5-27.
- [100] 付宪, 林涛, 张帆, 等. 基因密码子拓展技术的方法原理和前沿应用研究进展[J]. *合成生物学*, 2020, 1(1): 103-119.
FU X, LIN T, ZHANG F, et al. Progress in the study of genetic code expansion related methods, principles and applications[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(1): 103-119.
- [101] LIU C C, SCHULTZ P G. Adding new chemistries to the genetic code[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 413-444.
- [102] TRUONG F, YOO T H, LAMPO T J, et al. Two-strain, cell-selective protein labeling in mixed bacterial cultures[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(20): 8551-8556.



通讯作者: 高昊(1979—), 男, 博士, 教授。研究方向为天然药物化学。
E-mail: tghao@jnu.edu.cn



通讯作者: 胡丹(1979—), 男, 博士, 研究员。研究方向为天然产物的生物合成。
E-mail: thudan@jnu.edu.cn



第一作者: 吕建明(1985—), 男, 博士, 副研究员。研究方向为真菌天然产物的生物合成。
E-mail: ljm21@jnu.edu.cn