

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-080

真菌源非核糖体肽类药物生物合成及代谢工程

陈锡玮, 张华然, 邹懿

(西南大学药学院, 重庆 400715)

摘要: 真菌源非核糖体肽类 (NRP) 药物因其活性优异、结构多样而备受关注。至今美国食品药品监督管理局 (FDA) 已批准了数十种真菌 NRP 药物, 包括环孢菌素、头孢菌素和棘白菌素等重磅药物。这些 NRP 药物均由非核糖体肽合成酶 (NRPS) 催化形成, 其多样化的结构域和模块数量决定了产物骨架的多样性, 从而为天然源活性 NRP 的开发提供了广阔的空间。此外, 骨架结构上的特殊后修饰过程往往为 NRP 药物提供了强效的药效基团, 进一步扩充了 NRP 结构与活性的多样性。本文综述了真菌 NRP 药物的研究进展, 主要涵盖药物活性、生物合成途径、酶学机理和代谢工程改造等。深入了解真菌 NRP 药物生物合成途径不仅有助于理解相关的酶学组装机制, 还有望为新型真菌 NRP 药物及其衍生物的深度开发提供重要的指导和参考。

关键词: 真菌非核糖体肽; 非核糖体肽合成酶; 生物合成; 酶学组装机制; 代谢工程

中图分类号: R93; Q936 **文献标志码:** A

Biosynthesis and metabolic engineering of fungal non-ribosomal peptides

CHEN Xiwei, ZHANG Huaran, ZOU Yi

(College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: As natural products, non-ribosomal peptides (NRPs) exhibit biological activities with a broad spectrum, including anticancer, antibiotic and immunosuppression. Among U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved drugs, fungal NRPs are a major category of pioneering pharmacological agents like immunosuppressive cyclosporine, antibacterial cephalosporin and antifungal echinocandins. Under the catalysis of complicated multimodular enzyme complexes known as non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), NRPs are synthesized with three core domains: adenylation (A), thiolation domain/peptidyl carrier protein (T/PCP) and condensation (C), which collectively form repetitive modules responsible for activating and incorporating specific amino acids or hydroxycarboxylic acid building blocks into the growing peptide chains. Beyond the core domains, optional domains are exemplified by epimerization (E), heterocyclization (Cy) and oxidation (Ox), facilitating the customization of the building blocks. These domains and the variability in the number of modules with NRPs significantly contribute to the structural diversity of the skeletons. Furthermore, post-modifications to the structural skeletons yield potent pharmacological groups for NRPs, contributing

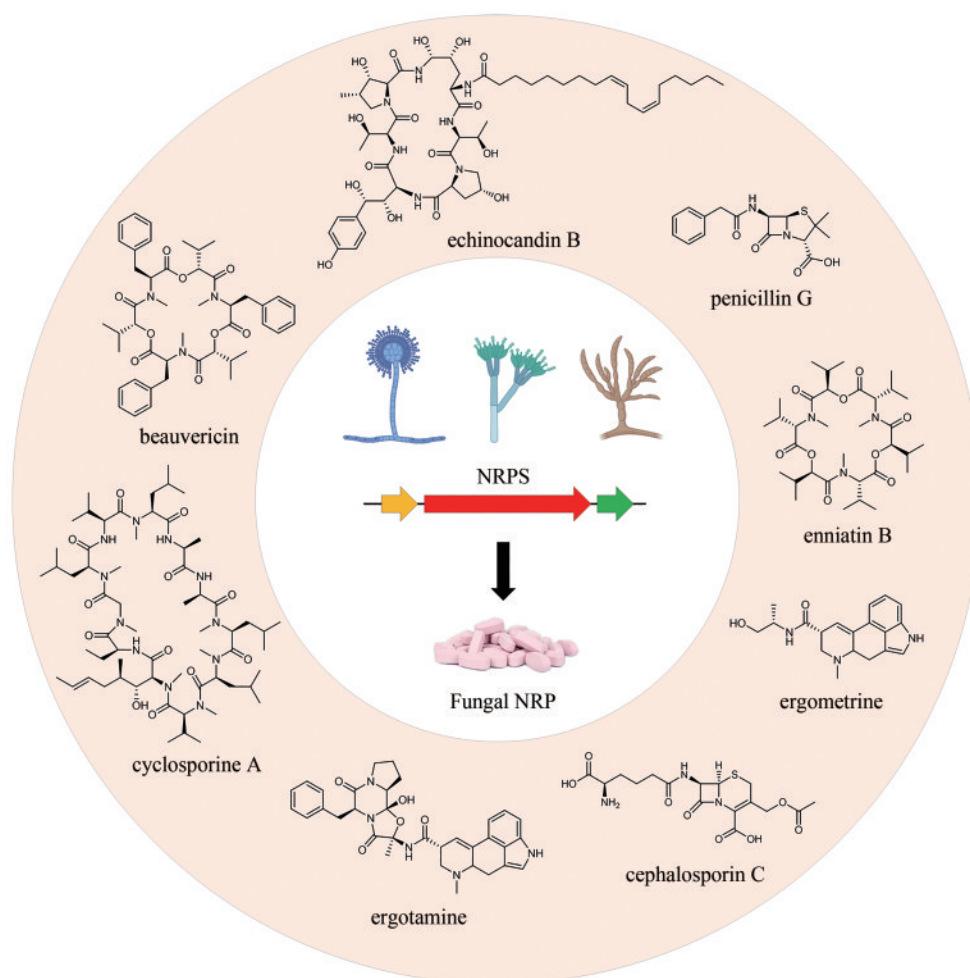
收稿日期: 2023-11-20 修回日期: 2024-01-05

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (22307105); 重庆市博士后研究项目 (2212013361956563)

引用本文: 陈锡玮, 张华然, 邹懿. 真菌源非核糖体肽类药物生物合成及代谢工程[J]. 合成生物学, 2024, 5(3): 571-592

Citation: CHEN Xiwei, ZHANG Huaran, ZOU Yi. Biosynthesis and metabolic engineering of fungal non-ribosomal peptides[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(3): 571-592

significantly to their structural diversity and biological activities, which not only provide opportunities for discovering naturally sourced and active NRPs, but also opens avenues for modifications to create non-natural NRPs via synthetic biological technology. To date, numerous strategies have been employed for developing NRPs, including heterologous expression, transcriptional factor activation, precursor-directed biosynthesis, mutasynthesis, combinatorial biosynthesis and enzyme engineering. This review summarizes the progress in research on fungal NRPs, encompassing their bioactivities, biosynthetic pathways, enzymatic reaction mechanisms and metabolic engineering. A comprehensive understanding of fungal NRPs biosynthesis not only benefits for deciphering the corresponding enzymatic assembly mechanism, but also serves as a guidance for advancing novel fungal NRPs and their derivatives, thereby paving the way for developing potential drug candidates from NRPs.



Keywords: fungal non-ribosomal peptide; non-ribosomal peptide synthetase; biosynthesis; enzymatic reaction mechanism; metabolic engineering

真菌天然产物在药物研发领域扮演着至关重要的角色，被誉为药物开发的重要源泉^[1-2]。其中，真菌产生的大量天然化合物中肽类化合物尤

为引人注目，其为医药界贡献了众多知名的药物，如青霉素（penicillin）、头孢菌素（cephamycin）和环孢菌素（cyclosporine）等，成为治疗真菌或

细菌感染、免疫抑制的有力工具^[3]。肽类药物之所以备受瞩目，主要归功于：①小分子肽（小于1000 Da）可以精准地结合靶点，从而实现高度特异性的药理作用；②大于1000 Da的大分子肽在体内可以展现类似于蛋白质互作的作用，从而实现多样化的生物效应^[4-5]；③肽类药物通常具有较好的人体相容性和药物代谢属性，从而能更好地被利用和吸收^[6]；④肽类化合物侧链为化学和生物合成提供了大量修饰位点，可改善药物的性质和拓宽应用范围，如提高稳定性、增强药效和减少副作用等^[7-8]。综上，真菌肽类化合物的药用价值和结构可塑性决定了其在药物开发领域的特殊地位。

根据生物合成机制，真菌源肽类药物分为核糖体肽（ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide, RiPP）和非核糖体肽（non-ribosomal peptide, NRP）两大类^[9-10]。在药物开发方面，NRP相较于RiPP具有独特的优势，主要体现在结构的多样性和丰富的后修饰，这些优势与NRP特殊的生物合成机制密切相关。首先，NRP结构中通常含有非蛋白源氨基酸，赋予了其骨架结构中更加丰富的结构单元，多样性的合成砌块（building block）使得NRP在药物开发中具有更广泛的应用空间^[11]。其次，通过水平转移和独立进化获得的多样化后修饰基因赋予了NRP广泛的生物活性和药理学效应^[12-13]。另外，NRP具有更高的蛋白酶稳定性、膜渗透性和靶点结合能力^[5, 14]。NRP骨架由非核糖体肽合成酶（non-ribosomal peptide synthetase, NRPS）催化合成，其组装过程包括结构单元加载、肽链延伸和产物释放、线上修饰^[15-17]。后修饰如二聚、氧化和多环化等进一步丰富产物的结构类型^[18-19]。NRPS除了单独合成多肽骨架以外，其可以与聚酮合酶（polyketide synthase, PKS）或萜环化酶（terpene cyclase, TC）等多种生物合成途径杂合形成更复杂的结构类型，为药物研发提供了更广阔的空间^[20-23]。本文综述了代表性的真菌源NRP药物的结构及活性，重点论述了其生物合成酶学组装机制及代谢工程，并展望了真菌NRP的发展趋势。本文将为真菌NRP药物研发提供借鉴，并为其分子结构创新打下坚实的基础。

1 真菌非核糖体肽类药物

NRP具有广泛的抗炎、抗真菌、抗细菌、抗结核和抗肿瘤等药理活性^[2, 21]。据统计，截至2017年大约有30个天然来源的NRP作为药物被批准上市，为化学和制药行业带来了巨大的经济利益^[24]。临床上已有大量细菌来源的多肽药物，如抗革兰氏阳性菌的脂肽类抗生素达托霉素（daptomycin, **1**）、抗肿瘤的糖肽类抗生素博来霉素A2（bleomycin A2, **2**）和抗革兰氏阳性菌的环状肽类抗生素短杆菌肽S（gramicidin S, **3**）等[图1(a)]。真菌NRP作为创新药物的主要来源，已广泛用于各种疾病的治疗和预防[图1(b)]。例如β-内酰胺类抗生素，其作为目前最常用的抗生素类型之一占据了大约65%的抗生素市场^[25-26]。β-内酰胺类抗生素按照母核结构可分为青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类（carbapenem）、氧头孢烯类（oxacephalosporin）和单环β-内酰胺类（monobactam）^[26]。青霉素类的代表天然产物青霉素G（penicillin G, **4**）主要来源于青霉菌属（*Penicillium*），其结构与维持细菌细胞壁的黏肽末端结构丙氨酰丙氨酸相似，所以其能取代丙氨酰丙氨酸与转肽酶结合来阻止细菌细胞壁的合成，从而致使细菌死亡^[27]。动物细胞没有细胞壁，故β-内酰胺类抗生素成为了治疗细菌感染的理想药物并沿用至今。另一大类天然来源的β-内酰胺类抗生素为头孢菌素类，由于母核结构的差异，其可以抵抗青霉素酶，从而具有更广的抗菌谱，如顶头孢霉（*Acronium chrysogenum*）来源的头孢菌素C（cephalosporin C, **5**）^[28]。β-内酰胺类抗生素作为最典型的化学半合成肽类药物，目前已研发至第五代，如头孢吡普（ceftobiprole, **6**）对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA）具有良好的抑制作用^[29]。碳青霉烯类抗生素与青霉素相比，结构中噻唑环上的硫原子被碳原子取代，同时还具有一个碳碳双键，结构的改变赋予了其更强的抗菌活性，如亚胺培南（imipenem, **7**）^[30]。氧头孢烯类抗生素结构特点为头孢菌素母核上的硫原子被氧原子取代，如氟氧头孢（flomoxef, **8**）^[31]。此外，还有用于治疗革兰氏阴性菌感染的单环β-内

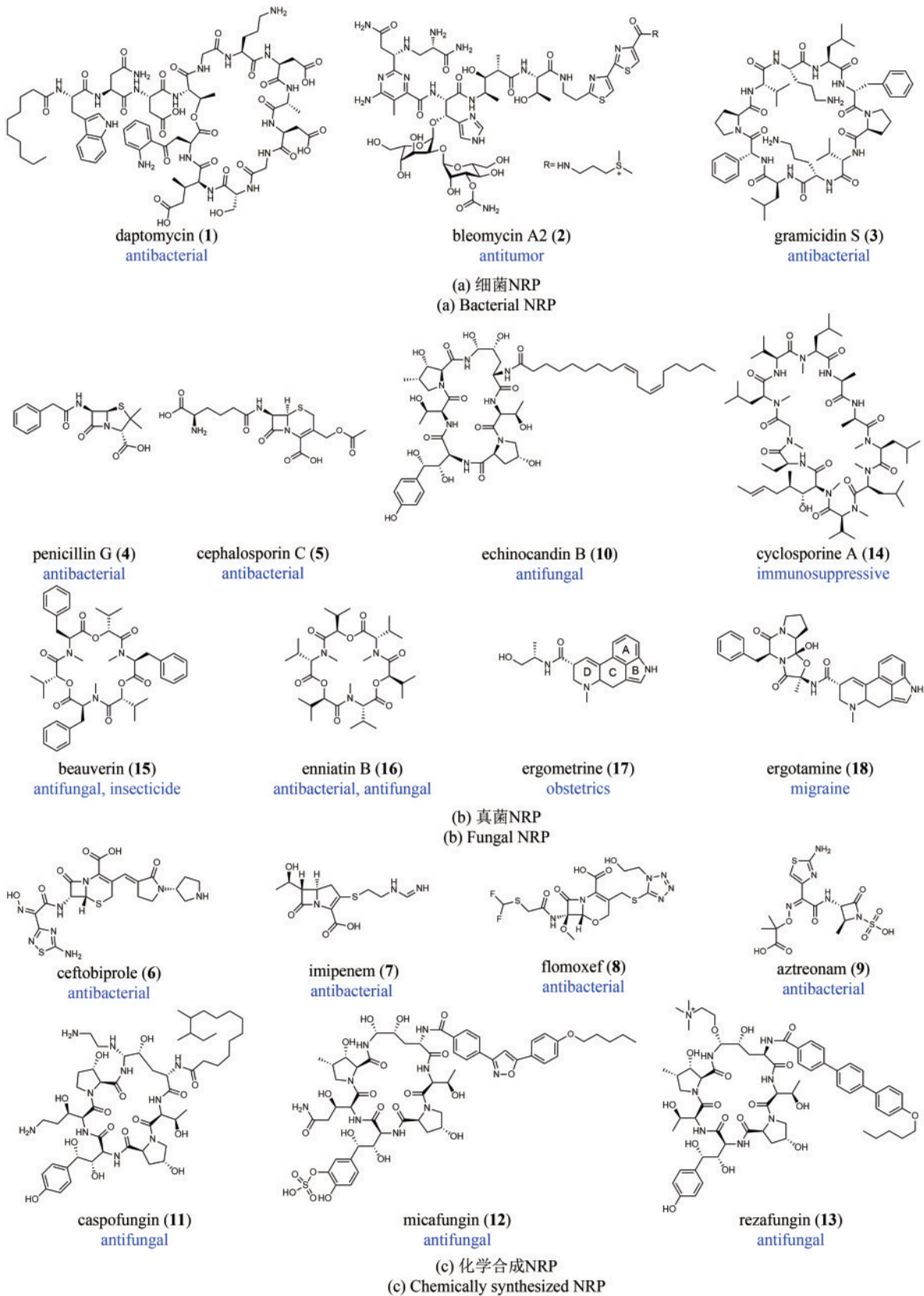


图1 代表性非核糖体肽类药物

Fig. 1 Typical NRP drugs

酰胺类抗生素, 如氨曲南 (aztreonam, **9**)^[32]。

棘白菌素类(芬净类)抗生素作为第一类靶向真菌细胞壁的抗真菌药物, 能抑制 β -1,3-D-葡聚糖合成酶活性来阻止真菌细胞壁组成成分 β -1,3-D-葡聚糖的合成, 从而致使真菌细胞破裂和死亡^[33]。棘白菌素类抗生素结构由多个羟基化的非蛋白源氨基酸和一条脂肪链组成^[34]。至今, 已报道了数十种天然来源的棘白菌素类抗生素, 如 pneumocandin Ao、pneumocandin Bo、FR901379 和 echinocandin B (**10**) 等, 其结构的主要区别在于脂肪链的不同^[34-35]。由于天然源的棘白菌素类抗生素具有溶血的副作用, 从而阻碍了其成药性^[36]。目前, 市面上广泛应用的棘白菌素类抗生素均来源于化学半合成, 如卡泊芬净 (casposfungin, **11**)、米卡芬净 (micafungin, **12**)、雷扎芬净 (rezafungin, **13**) 和阿尼芬净 (anidulafungin), 前两种衍生于 pneumocandin Bo 和 FR901379, 后二种衍生于 echinocandin B^[37-40]。

脂肽类抗生素环孢菌素 A (cyclosporine A, CsA, **14**) 首次从膨大弯颈霉 (*Tolypocladium inflatum*) 中分离鉴定, 随后发现 CsA 也存在于曲霉属 (*Aspergillus* sp.)、镰刀菌属 (*Fusarium* sp.)、白僵菌属 (*Beauveria* sp.) 和木霉菌属 (*Trichoderma* sp.) 中^[41]。CsA 结构中包含 11 个疏水氨基酸残基, 其中 7 个存在 *N*-甲基化^[42]。1983 年 CsA 被 FDA 批准上市, 用于器官移植后的免疫抑制治疗^[43]。CsA 作为应用最广泛的免疫抑制剂之一, 其主要作用靶点为 T 细胞中催化脯氨酸肽键顺反异构的亲环素 (cyclophilin)。CsA 结合亲环素后会抑制钙调磷酸酶的活性, 从而抑制白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2) 的产生和释放, 阻断 T 细胞的激活和增殖以达到免疫抑制的作用^[43]。此外, CsA 还具有抗病毒、抗真菌、抗寄生虫、抗炎和抗肿瘤等多种药理活性^[44]。基于 CsA 骨架的化学衍生物伏环孢素 (voclosporin) 具有更强的药效和代谢速率, 用于治疗狼疮性肾炎^[45]。

恩镰孢菌素 (enniatin, ENN) 和白僵菌素 (beauverin, BEA, **15**) 属于非核糖体六环缩酚酸肽真菌毒素, 其结构由 D-羟基羧酸和 *N*-甲基-L-氨基酸通过交替形成酰胺键和内酯键而成。1947 年, 报道了直喙镰孢 (*F. orthoceras*) 来源的第一个

ENN^[46]。ENN 除了主要产生菌 *Fusarium* 以外, 其还存在于链格孢菌 (*Alternaria*)、海球菌 (*Halosarpheia*) 和轮枝菌 (*Verticillium*) 中^[47-48]。至今, 已研究报道了 29 个天然来源的 ENN 类似物, 最常见的是恩镰孢菌素 (enniatin) A、恩镰孢菌素 A₁、恩镰孢菌素 B (**16**) 和恩镰孢菌素 B₁^[49]。enniatin B 具有多种生物活性, 包括促进 K⁺ 和 Na⁺ 的跨膜运输、体外降血脂活性、抗细菌、杀虫和除草活性^[50]。由多种 ENN 组分构成的夫沙芬净 (fusafungine) 能下调细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 和抑制促炎细胞因子的产生, 从而用于治疗一系列上呼吸道疾病, 包括鼻窦炎、鼻炎、鼻咽炎、心绞痛、喉炎和气管炎等^[51]。1969 年, 首次从 *B. bassiana* 中分离鉴定了 BEA 的结构, 此后在 *Fusarium*、*Trichoderma* 和棒束孢菌 (*Isaria*) 中也发现了该化合物的存在^[52-53]。BEA 及其类似物已超过 20 个, 其具有杀虫、抗肿瘤、抑菌、抗病毒、抗惊厥和抗结核等生物活性^[54]。

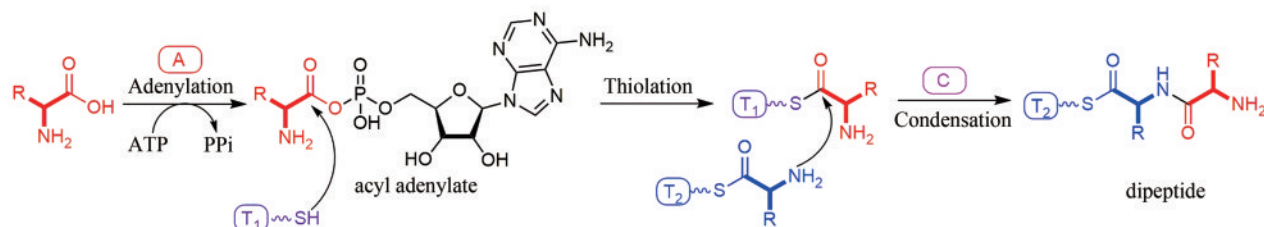
麦角生物碱 (ergot alkaloids, EAS) 是由子囊菌 (*Ascomycota*) 产生的一类结构复杂的吲哚衍生物, 包括麦角菌 (*Claviceps*)、*Aspergillus*、香柱菌 (*Epichloe*)、绿僵菌 (*Metarhizium*) 和 *Penicillium* 等^[55-58]。EAS 结构特征为四环麦角碱环, 其中 A 和 B 环来源于 L-色氨酸 (L-Trp), C 和 D 环来源于二甲基烯丙基二磷酸 (DMAPP) 和 L-Trp 的环化, 如麦角新碱 (ergometrine, **17**) [图 1(b)]。EAS 结构主要分为 ergoclavine、ergoamide (简单麦角酸酰胺衍生物) 和 ergopeptine (麦角酸肽衍生物) 三大类^[59]。天然来源的 EAS 因其显著的药理活性而广泛应用于临床, 比如治疗炎症性肠病和动脉粥样硬化的 fumigaclavine C、治疗产后子宫出血的 ergometrine 和治疗偏头痛的麦角胺 (ergotamine, **18**)。

2 非核糖体肽合成酶的酶学机制

真菌 NRP 药物结构各异, 但其多肽核心骨架均由 NRPS 催化合成。NRPS 是一类由多模块 (module) 组成的多功能酶, 每个模块中的不同结构域 (domain) 催化不同生化反应, 包括底物识别和装载、肽链延伸和产物释放等, 从而将简单

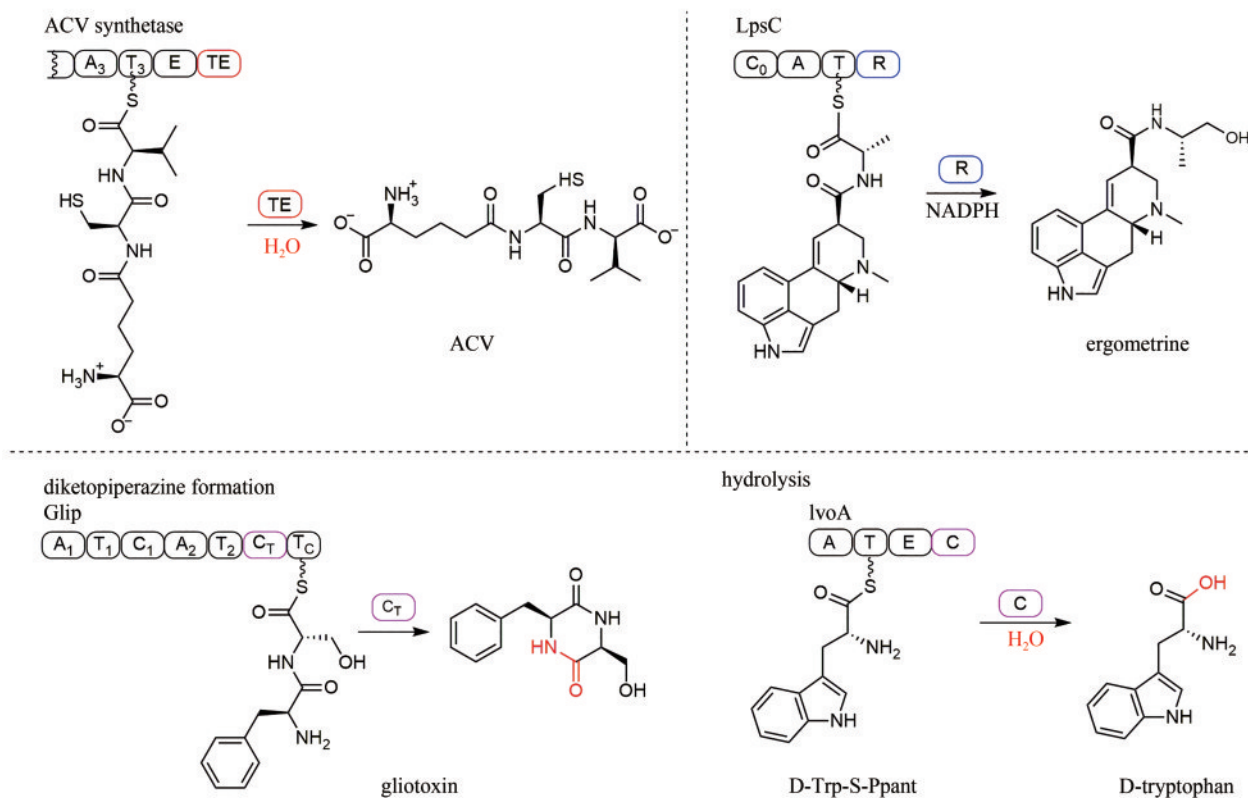
的合成砌块组装成复杂的多肽产物。NRP的基本骨架由20种天然L-氨基酸、非蛋白源氨基酸、脂肪酸、 α -羟酸、 α -酮酸和杂环等组成，多样化的线上修饰（如还原、氧化和甲基化等）进一步丰富了产物的结构类型^[3, 60]。NRPS基本模块包括3个催化结构域，腺苷化结构域（A domain）、巯基化结构域（T domain）/肽酰载体蛋白（PCP domain）和缩合结构域（C domain），基本催化机制如图2（a）^[61-62]。A结构域用于识别和激活底物，在腺嘌呤核苷三磷酸（ATP）作用下该结构域选择性识别氨基酸并将其转化为氨酰腺苷酸中间体。T结构域从非活化的

*apo*形式转化为活化的*holo*形式，然后利用其磷酸泛酰巯基乙胺臂上的末端硫醇以硫酯键共价结合的方式承载氨酰基底物。C结构域通常位于每个延伸模块的N端，该结构域催化下游受体氨酰基底物的 α -氨基亲核进攻上游供体氨酰基的硫酯基团形成酰胺键。NRPS除了3个基本结构域以外还具有其他修饰结构域，包括差向异构酶结构域（E domain）、甲基化结构域（MT domain）、杂环化结构域（Cy domain）、氧化结构域（Ox domain）和甲酰化结构域（F domain）等，这些结构域分别催化氨基酸的L-型到D-型的异构、N或者C上的甲



(a) 基本组装机制

(a) Reactions for synthesizing the skeletons of NRPs



(b) NRP的代表性释放方式

(b) Releasing different NRP products

图2 非核糖体肽的酶学组装机制

Fig. 2 Enzymatic assembly mechanism of NRP

基化、噻唑或噁唑环的形成、杂环的氧化以及甲酰化反应等^[61-62]。

在NRP组装过程中肽链延伸的终止和释放由末端的硫酯结构域(TE domain)、还原结构域(R domain)或C结构域催化[图2(b)]。TE结构域催化多肽释放形成游离酸、内酯或内酰胺。R结构域通常催化形成的产物为醇或者醛。C结构域除了催化形成常规的酰胺键以外还具有多样化功能,例如 β -内酰胺的形成、脱水、水解、环加成、PS环化(Pictet-Spengler)和迪克曼缩合等^[63]。真菌NRPS分为非迭代型和迭代型,非迭代NRPS按顺序应用每个模块且仅运行一次,如CsA和棘白菌素;迭代NRPS重复应用完整模块或部分结构域,如ENN和BEA。NRP生物合成过程中肽链延伸除了传统延伸机制以外,还存在逆向延伸机制,例如来源于 α -变形菌的thalassospiramide A由3个生物合成酶(*ttcA-C*)的6个模块共同催化而成,其中当肽链延伸至模块4时,C结构域TtcB-C₂催化模块4上的中间体返回模块2,再经过模块3~6组装形成终产物^[64]。NRPS多样化的结构域和模块数量造就了多肽结构的多样性,从而为天然源活性NRP的开发提供了广阔的空间。

3 真菌非核糖体肽药物的生物合成

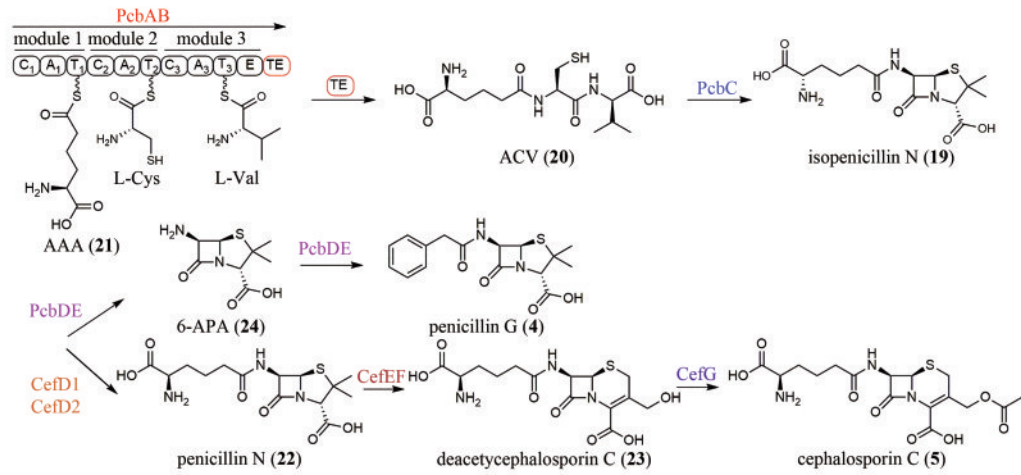
3.1 β -内酰胺类化合物

青霉素和头孢菌素均属于 β -内酰胺类抗生素,其骨架结构分别为[4,5]环和[4,6]环,二者均来源于共同前体异青霉素N(isopenicillin N, **19**)^[65]。 β -内酰胺类抗生素的生物合成主要分为3个阶段(图3):①NRPS催化线性三肽前体L- α -氨基己二酰-L-半胱氨酰-D-缬氨酸(ACV, **20**)的形成;②异青霉素合成酶(isopenicillin N synthase, PcbC)催化ACV关环形成**19**;③**19**结构中的 α -氨基己二酸侧链经酰胺水解替换为苯乙酰结构单元,从而得到青霉素G(**4**),或**19**经异构、扩环和乙酰化反应得到头孢菌素C(**5**)^[25, 65]。

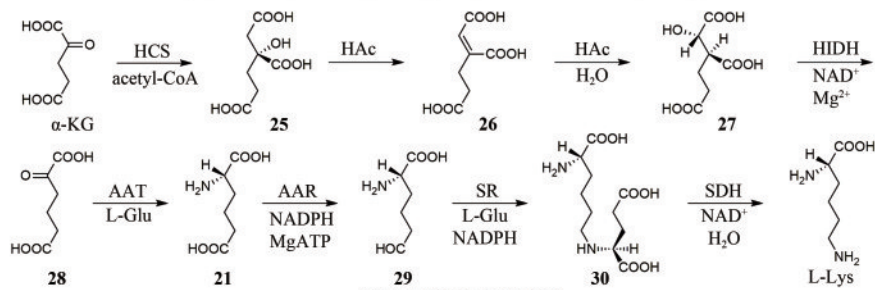
产黄青霉(*P. chrysogenum*)来源的三模块ACV合成酶(ACV synthetase)由基因*pcbAB*编码,其结构域组成为C₁-A₁-T₁-C₂-A₂-T₂-C₃-A₃-T₃-E-TE,其

中A₁、A₂和A₃分别识别非蛋白源氨基酸L- α -氨基己二酸(L- α -aminoadipic acid, AAA, **21**)、L-Cys和L-Val, E结构域催化L-Val异构化为D-Val, TE结构域催化多肽水解释放[图3(a)]^[66-67]。真菌中,前体AAA是以 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)作为起始原料,经4步酶促反应催化形成^[68]。首先,高柠檬酸合酶(homocitrate synthase, HCS)催化乙酰-CoA和 α -KG发生羟醛缩合形成高柠檬酸-CoA,其进一步水解为高柠檬酸(**25**)。随后,顺乌头酸酶超家族的高乌头酸酶(homoaconitate hydratase, HAc)催化**25**的 β -羟基异构至 α 位形成高异柠檬酸(**27**),期间经历脱水的高乌头酸中间体(**26**)。紧接着,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)依赖的高异柠檬酸脱氢酶(homoisocitrate dehydrogenase, HIDH)催化**27**氧化脱羧形成 α -酮己二酸(**28**)。最后,PLP依赖的 α -酮己二酸转氨酶(α -aminoadipate aminotransferase, AAT)以L-Glu作为氨基供体催化**28**的 α -酮转氨形成AAA^[69]。此外,AAA还可以依次在 α -氨基己二酸还原酶(α -aminoadipate reductase, AAR)、酵母氨酸还原酶(saccharopine reductase, SR)和酵母氨酸脱氢酶(saccharopine dehydrogenase, SDH)的作用下继续转化为赖氨酸(L-Lys),期间经过化合物**29**和**30**^[69]。

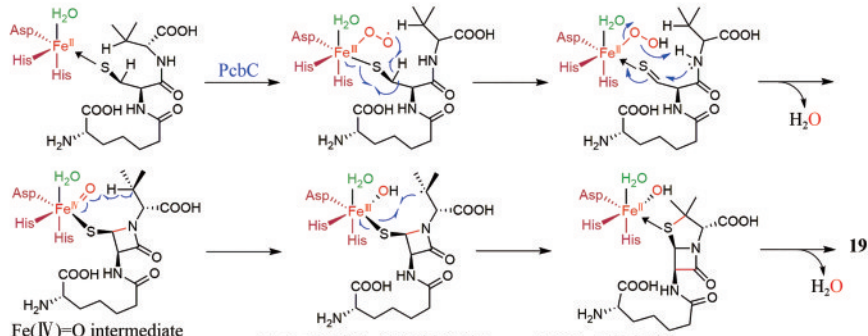
线性三肽ACV形成 β -内酰胺骨架还需经过闭环反应,该过程由PcbC催化完成。PcbC属于非血红素依赖的铁加氧酶家族蛋白,其催化ACV氧化闭环形成具有 β -内酰胺并噻唑环骨架**19**的酶学机理如图3(c)^[70]。首先,在静息状态下Fe²⁺活性中心与H214、H270、D216和E330的侧链配位。随后,底物ACV进入活性口袋后,其半胱氨酸中的硫原子与Fe²⁺配位,并根据活性口袋中的氨基酸作用力摆放成近似于 β -内酰胺的空间构象。然后,Fe²⁺与O₂结合生成Fe³⁺与过氧自由基,其攫取半胱氨酸 β 位的氢原子,触发Fe—S配位键均裂猝灭自由基形成C—S双键。紧接着,过氧根攫取Val酰胺上的氢离子,通过内环电子转移,脱水释放四价铁氧中间体,从而形成内酰胺环。最后,高价铁氧中心继续攫取Val的 β 位氢,引发Fe—S配位键第二次均裂闭环形成关键中间体**19**^[71-72]。PcbC的催化机制充分体现了非血红素依赖的铁加氧酶



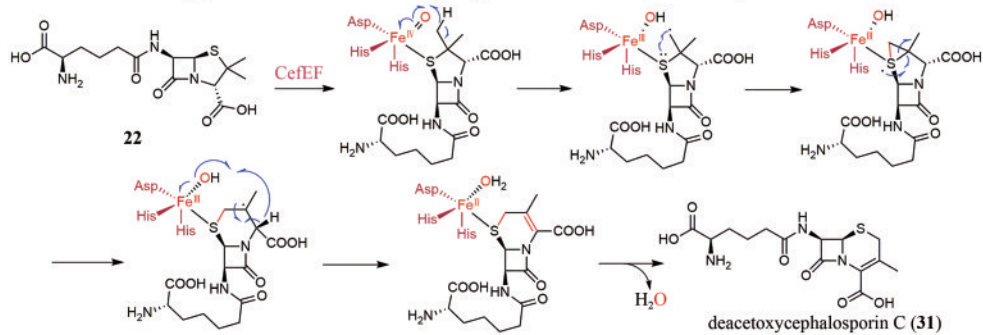
(a) The biosynthesis pathways of penicillin G and cephalosporin C



(b) The pathway of AAA



(c) Mechanism of PcbC catalyzing the conversion of ACV to isopenicillin N



(d) Mechanism of CefEF catalyzing the conversion of penicillin N to deacetoxycephalosporin C

图3 青霉素G和头孢菌素C生物合成

Fig. 3 Biosynthesis of penicillin G and cephalosporin C

在催化多环结构合成方面的优势。研究表明 PcbC 具有较高的底物宽泛性，其能催化 ACV 类似物形成多种环系产物，从而拓宽了酶法合成 β -内酰胺类抗生素的发展潜力^[73]。

青霉素和头孢菌素合成途径的分支点为 **19**，在青霉素 G 的生物合成途径中，基因 *pcbDE* 编码的异青霉素 N 酰基转移酶 (isopenicillin N acyltransferase, IAT) PcbDE 具有酰胺水解和酰基转移双功能，其催化 AAA 侧链水解形成工业生产中化学半合成所使用的原料 6-氨基青霉烷酸 (6-aminopenicillanic acid, 6-APA, **24**)，并在相同位置利用苯乙酰-CoA 替换 AAA^[74]。苯乙酸的 CoA 化由基因簇外的酰基-CoA 连接酶负责合成，其与 PcbDE 同处于过氧化物酶体中，从而有利于酰基化反应的进行^[75-76]。侧链替换后形成的产物青霉素 G 抗菌谱和对 β -内酰胺酶稳定性显著高于异青霉素。

头孢菌素生物合成途径与青霉素在侧链修饰方面有着显著的差异，即 AAA 侧链不水解替换，而是从 L-型异构化为 D-型，形成青霉素 N (penicillin N, **22**)。细菌中催化该反应为磷酸吡哆醛 (pyridoxal-phosphate, PLP) 依赖的酶，然而真菌中使用的是脂肪酰 CoA 连接酶 CefD1 和酰基-CoA 消旋酶 CefD2 双酶体系^[75-78]。首先，CefD1 活化 AAA 的 α -羧基为 CoA 形式；其次，CefD2 催化 CoA 化底物异构化；最后，非特异性的硫酯酶水解 CoA 形成 **22**^[78-80]。

在外排泵膜蛋白 CefM 的作用下 **22** 从过氧化物酶内腔转运到细胞质中进一步合成 **23**。头孢菌素的扩环反应和羟基化反应由双功能 α -KG 依赖的氧化酶 CefEF 负责催化，其酶学机制如图 3(d)^[81]：①在 O₂ 和 α -KG 脱羧的驱动下 Fe²⁺ 形成 Fe⁴⁺ 铁氧中心，并结合 **22** 形成酶底物复合物；②Fe⁴⁺ 铁氧中心攫取 β -甲基上的氢原子形成亚甲基自由基，促使硫原子的一个孤电子与亚甲基自由基成键形成 [4,5,3] 三环中间体；③三元环进一步开环形成六元环，孤电子转移至 Val 的 β 位；④CefEF 继续攫取 Val 的 α -H，与 β 位的碳自由基形成双键，从而得到去氧乙酰头孢菌素 C (deacetoxycephalosporin C, **31**)；⑤CefEF 催化 **31** 的甲基羟化形成去乙酰头孢菌素 C (deacetycephalosporin C, **23**)^[25, 82]。CefEF 催化的反应总共涉及三次攫取氢原子和一次氧回补，

是生物合成中特殊的催化案例。最后，乙酰转移酶 CefG 以乙酰-CoA 作为酰基供体催化 **23** 的侧链羟基乙酰化形成终产物头孢菌素 C (**5**) [图 3(a)]^[83-84]。

3.2 棘白菌素类化合物

目前，生物合成基因簇已被报道的棘白菌素类化合物包括 echinocandin B (**6**)、pneumocandin Bo (**32**) 和 FR901379 (**33**)^[85-87]。这些化合物具有相似的生物合成途径，主要包括三个部分：①非天然氨基酸前体的合成；②多肽链的组装；③环六肽的羟化和磺基化后修饰 (图 4)。

棘白菌素类化合物结构中的非天然氨基酸前体包括 3*S*-羟基-L-脯氨酸 (3-Hyp)、4*R*-羟基-L-脯氨酸 (4-Hyp)、3*S*-羟基-4*S*-甲基-L-脯氨酸 (4-Me-3-Hyp)、3*S*,4*S*-二羟基-L-高酪氨酸 (3hHyt)、3*R*-羟基-L-谷氨酰胺 (3-Hyg) 和 4*R*,5*R*-二羟基-L-鸟氨酸 (L-Orn)。3-Hyp 和 4-Hyp 由 α -KG 依赖的加氧酶 (脯氨酸-3-羟化酶或脯氨酸-4-羟化酶) 催化 L-Pro 羟化形成，而 4-Me-3-Hyp 的合成底物为 L-Leu，经关环、还原及羟化三步形成 (图 4)^[88]。3hHyt 由异丙基苹果酸合酶 (HtyA)、转氨酶 (HtyB)、异丙基苹果酸脱氢酶 (HtyC)、顺乌头酸酶 (HtyD) 和 α -KG 依赖的氧化酶 (EcdG) 共同催化形成^[85, 89]。根据 HtyA-D 的体内敲除实验推测 L-高酪氨酸 (**38**) 的合成步骤：①HtyA 催化 4-羟基-苄基丙酮酸 (**34**) 与乙酰-CoA 羟醛缩合，然后释放 CoA 形成 (2*S*)-2-(4-羟基苄基)-苹果酸 (**35**)；②HtyD 催化脱水和水合反应将羟基异构至邻位形成 **36**；③HtyC 以 NAD⁺ 为辅因子催化 **36** 氧化脱羧形成 α -酮酸 (**37**)；④HtyB 催化 **37** 转氨形成 **38**^[85]。体外生化实验证明 EcdG 催化 **38** 的 C-3 位羟基化形成 3hHyt^[89]。

棘白菌素类化合物骨架由高度同源的 NRPS 和脂酰-AMP 连接酶催化合成，其负责不完全保守的氨基酸和脂肪链的装载。echinocandin B 多肽骨架由六模块 NRPS EcdA 催化形成，每个模块的结构域组成均为 C-A-T，6 个 A 结构域分别识别 L-Orn、苏氨酸 (L-Thr)、4-Hyp、3hHyt、L-Thr 和 4-Me-3-Hyp。pneumocandin Bo 和 FR901379 的核心多肽骨架分别由 GLNRPS4 和 McfA 催化形成，与 EcdA 的

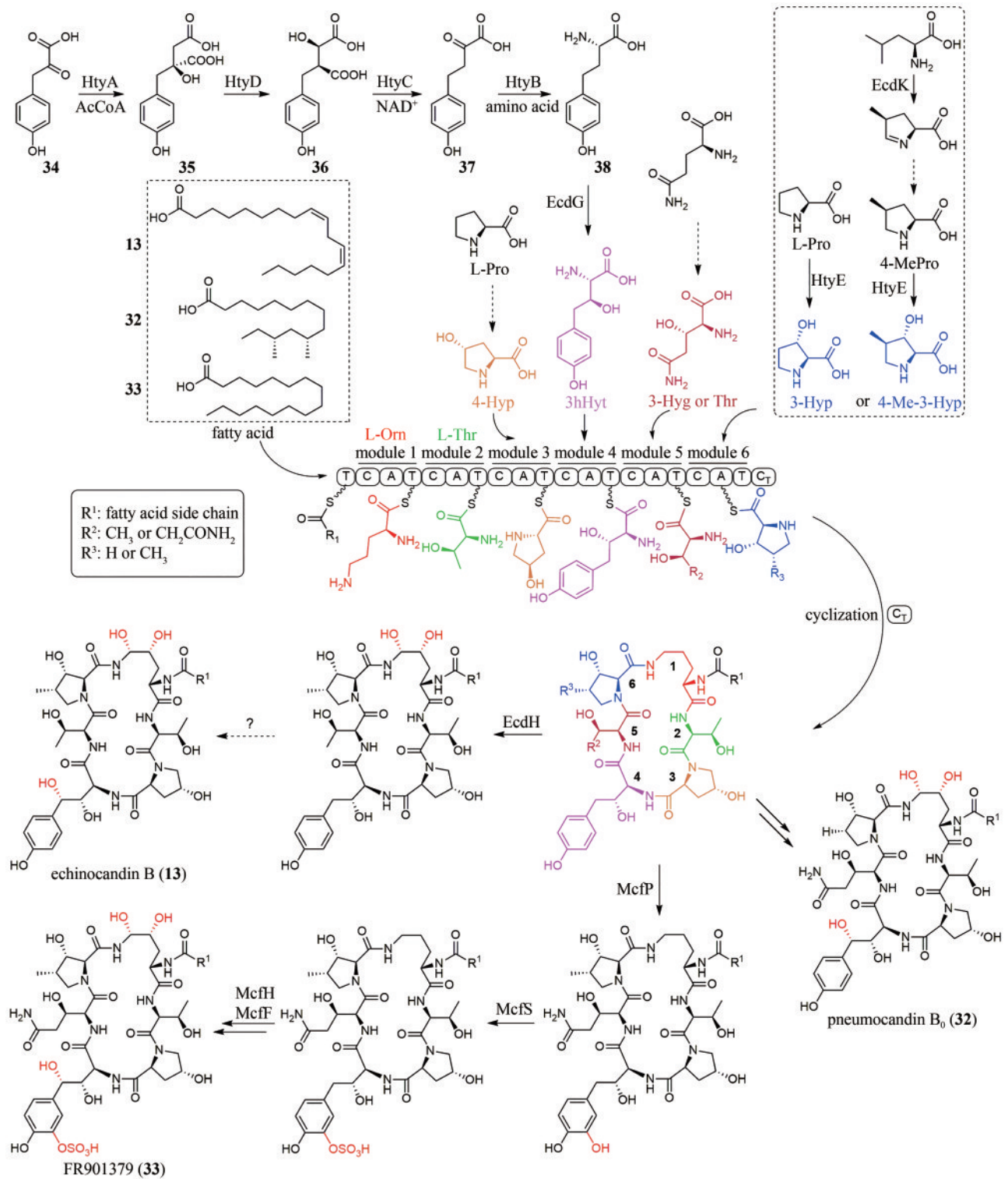


图4 棘白菌素类化合物生物合成途径

Fig. 4 Overview of the echinocandin biosynthesis

区别在于活化的氨基酸种类不同，GLNRPS4中结构域GLNRPS4-A₅和GLNRPS4-A₆分别活化3-Hyg和3-Hyp，而McfA-A₅和McfA-A₆分别识别3-Hyg

和4-Me-3-Hyp。三种NRPS的C端和N端均含有额外的缩合结构域C_T和T结构域。C端缩合结构域C_T用于大环化，N端T结构域用于接收脂酰-AMP连

接酶 (EcdI、McfI 或 Glligase) 活化的脂肪酸链^[85, 90]。echinocandin B 和 FR901379 的脂肪酸直接来源于初级代谢, 而 pneumocandin Bo 中的脂肪酸由聚酮合酶 GLPKS4 (KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP) 催化合成^[86]。

环六肽骨架形成之后将经过多步羟基化或磺酸化修饰, 形成更加复杂的结构单元。环六肽骨架中的 L-Orn 结构单元在细胞色素 P450 单氧化酶 EcdH 或 McfH 催化下形成保守的 4R, 5R-二羟基-L-Orn^[89-90]。FR901379 与其他棘白菌素类化合物相比具有额外的磺酸基团, 使其表现出优异的水溶性, 从而显著提高了其半合成药物的药理功效和药代动力学特性^[91]。在 FR901379 途径中, 环六肽骨架中 L-高酪氨酸 C-3 磺基化由细胞色素 P450 单加氧酶 McfP 和磺基转移酶 McfS 共同催化完成。首先, McfP 催化芳环 C-3 位羟化; 其次, McfS 以 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS) 作为磺基供体催化 C-3 羟基磺基化^[90]。最后, 细胞色素 P450 单氧化酶 McfF 催化磺酸化的 L-高酪氨酸羟基化形成 FR901379。将基因 *mcfS* 和 *mcfP* 共同导入 pneumocandin Bo 的生产菌 *Glarea lozoyensis* 中产生了 pneumocandin Bo 的羟基化和磺基化产物、pneumocandin F 及其羟化产物, 其中 pneumocandin B₀ 的磺基化产物在不影响最小抑菌浓度 (MIC) 活性的情况下, 其水溶性大于 480 mg/mL, 是原始产物的 4000 倍。棘白菌素类化合物具有多个羟基, 通过化学方式磺酸化难度较大, 故 McfS 和 McfP 可以作为芬净类药物磺基化的生物酶^[90]。

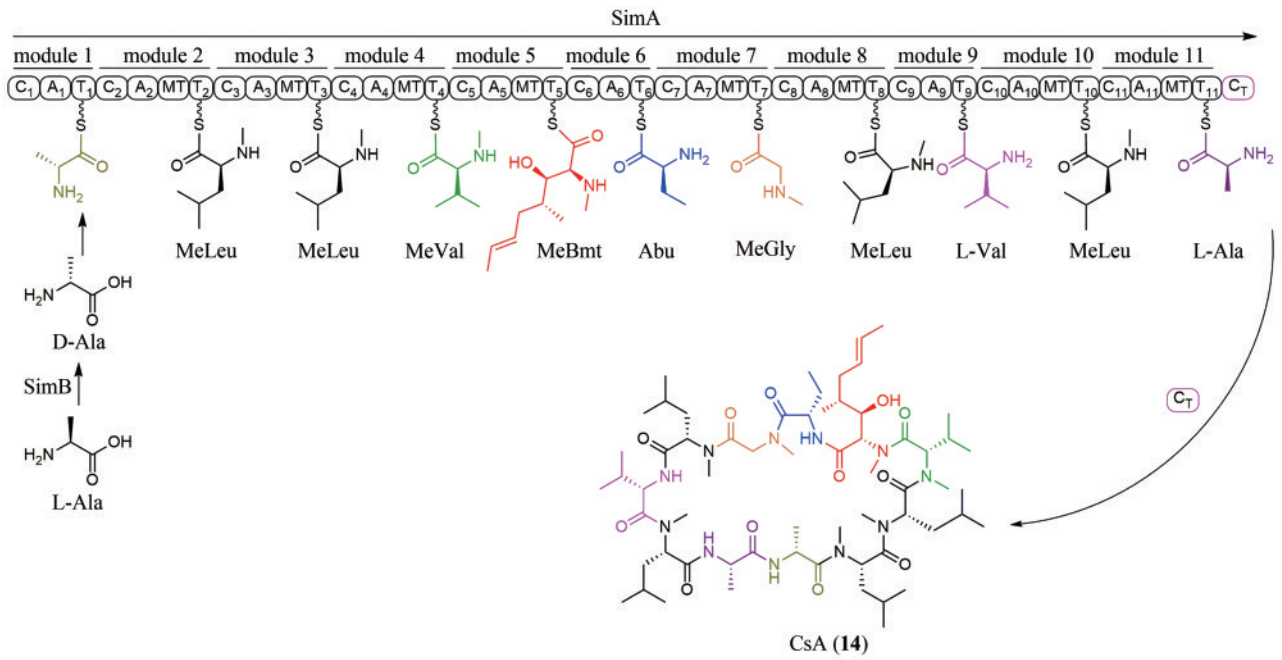
3.3 环孢菌素 A

CsA 生物合成包括非蛋白源氨基酸前体的合成和 NRPS 催化的肽链组装两个部分 [图 5(a) 和 (b)]。两个非蛋白源氨基酸为 D-丙氨酸 (D-Ala) 和 (4R)-4-[(E)-2-丁烯]-4-甲基-L-苏氨酸 (Bmt)。CsA 生物合成基因簇 (*Sim*) 含有 12 个基因 *SimA*~*SimL*, 其中 PLP-依赖的丙氨酸异构酶 (*SimB*) 能够催化 L-Ala 异构化形成 D-Ala, 但体内 D-Ala 的合成具有一个复杂的生物合成网络^[41, 92-93]。体内基因敲除和底物化学喂养证明了 type II 型聚酮合酶 (*SimG*)、细胞色素 P450 (*SimI*) 和氨基转移酶

(*SimJ*) 与 Bmt 的形成有关, 从而提出了 Bmt 可能的合成路径 [图 5(b)]^[93]。首先, *SimG* (KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP) 催化 1 分子乙酰-CoA、3 分子丙二酰-CoA 和 1 分子 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 形成 3R-羟基-4R-甲基-6E-辛烯酸 (39); 随后, *SimI* 和 *SimJ* 依次催化 39 的 α 位发生氧化和转氨反应形成 Bmt, 期间经过中间体 40 和 41。NRPS (*SimA*) 由 11 个模块组成, 其中模块 1、6 和 9 的结构域组成为 C-A-T, 其余模块还存在 N-甲基转移酶结构域负责对应氨基酸的 N-甲基化, 而末端缩合结构域 *SimA-C₇* 催化肽链成环释放^[94-95]。通过基因敲除提出了转录调控因子 (*SimL*)、亲环素蛋白 (*SimC*) 和 ABC 转运蛋白 (*SimD*) 的功能^[93]。*SimL* 控制整个基因簇的转录。*SimC* 与人体中的 CsA 直接靶点 CypA 具有 62% 的高度同源性, 其缺失后菌株生长变慢, 故 *SimC* 可能是 CsA 的自抗性基因。*SimD* 缺失后体内 CsA 产量升高, 而培养基中产量降低, 故菌株可能以外排的方式达到自抗性效果。

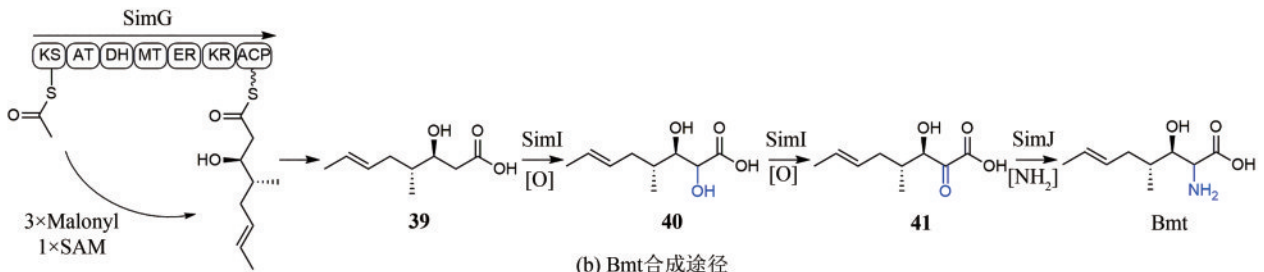
3.4 恩镰孢菌素和白僵菌素

ENN 和 BEA 结构均是由非天然源氨基酸 D-2-羟基异戊酸 (D-Hiv) 和 N-甲基-L-氨基酸交替缩合形成。D-Hiv 合成的起始原料 2-酮异戊酸 (2-ketoisovalerate, 2-Kiv) 来源于 L-Val 或丙酮酸。2-Kiv 还原酶 KivR (EC 1.2.7.7) 以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 为辅因子催化 2-Kiv 还原形成 D-Hiv^[96]。ENN 和 BEA 结构中的环六肽骨架分别由双模块 NRPS *Esyn1* (*F. oxysporum*) 和 *BbBEAS* (*B. bassiana*) 催化形成, 其结构域组成均为 C₁-A₁-T₁-C₂-A₂-MT-T_{2a}-T_{2b}-C₃^[97-98]。*Esyn1* 催化形成 enniatin B 的酶学组装过程为: 首先 *Esyn1*-A₁ 识别 D-Hiv 上载到 *Esyn1*-T₁, *Esyn1*-A₂ 识别 L-Val 上载到 *Esyn1*-T_{2a} 后经 N-甲基转移酶结构域催化 N-甲基化形成 N-Me-L-Leu; 随后 *Esyn1*-C₂ 催化两个硫酯单元缩合形成二肽醇 D-Hiv-MeVal-S-T_{2a}, 其转移至 *Esyn1*-T_{2b}; *Esyn1*-C₃ 可能催化 3 分子二肽醇缩合和环化后释放终产物 (图 6)。*Esyn1*-C₁ 和 *Esyn1*-C₃ 的催化活性位点均为 SHxxxD, 其在 ENN 合成中的详细催化作用还不清楚。虽然 *BbBEAS* 催化形成



(a) SimA 组装机制

(a) Formation of cyclosporine A under the catalyzation of SimA



(b) Bmt 合成途径

(b) Biosynthesis of Bmt

图5 环孢菌素 A 生物合成途径

Fig. 5 Biosynthesis pathway of cyclosporine A

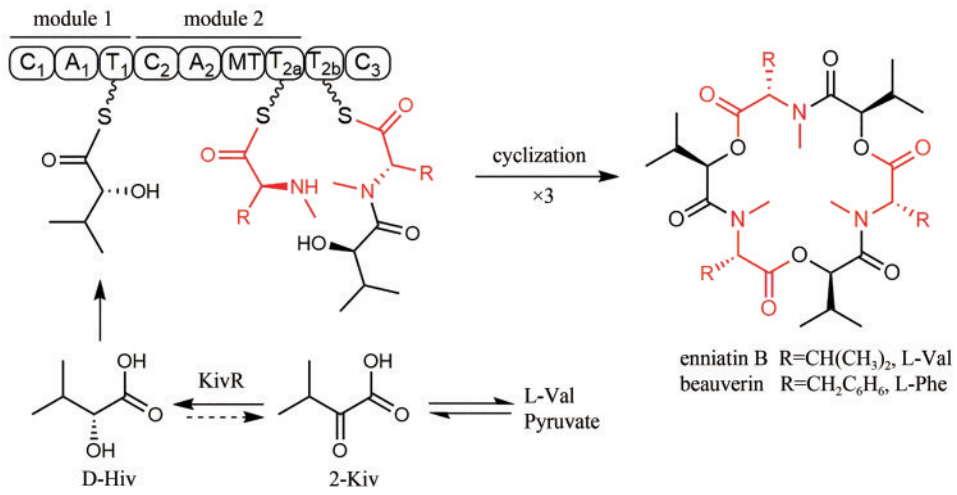


图6 Enniatin B 和 beauverin 生物合成途径

Fig. 6 Biosynthesis pathways of enniatin B and beauverin

BEA的酶学组装机制与Esyn1相同，但是其中A结构域识别的不同底物决定了产物结构的显著性差异。Esyn1-A₁和BbBEAS-A₁主要识别D-Hiv，但其也能激活D-2-羟基-3-甲基-戊酸（D-Hmp）。Esyn1-A₂能够识别L-亮氨酸（L-Leu）、L-异亮氨酸（L-Ile）、L-Val或L-酪氨酸（L-Tyr），但是BbBEAS-A₂更加偏好于苯丙氨酸（L-Phe），其也能激活L-Leu、去甲基亮氨酸和L-Ile。Esyn1和BbBEAS良好的底物宽泛性造就了产物结构的多样化。虽然负责ENN和BEA的NRPS已被鉴定，但其中二肽醇缩合和环化形成六环肽的酶学组装机制还需进一步深入研究。

3.5 麦角新碱和麦角胺

来源于麦角菌（*C. purpurea* 20.1）的麦角生物

碱生物合成基因簇由13个基因组成，包括4个NRPS（*lpsB*、*lpsC*、*lpsA1*和*lpsA2*）、1个异戊烯基转移酶（*dmaW*）、3个氧化酶（*cloA*、*easC*和*easH1*），4个氧化还原酶（*easA*、*easD*、*easE*和*easG*）和1个甲基转移酶（*easF*）^[99]。麦角碱的生物合成共用中间体D-麦角酸（DLA，42）由8个生物酶催化L-色氨酸（L-Trp）形成，包括DmaW、EasF、EasC、EasE、EasD、EasA、EasG和CloA [图7(a)]^[100]。首先，异戊烯基转移酶DmaW以DMAPP为异戊烯基供体催化L-Trp的C-4位异戊烯基化形成4-二甲烯丙基-L-色氨酸（DMAT，43），甲基转移酶EasF以SAM为辅因子催化DMAT转化为4-二甲烯丙基-L-红豆碱（4DMA，44）。随后，核黄素依赖的氧化还原酶EasE和过氧化氢酶/脱羧酶EasC催化4DMA环化、脱羧和羟基化形成三环化

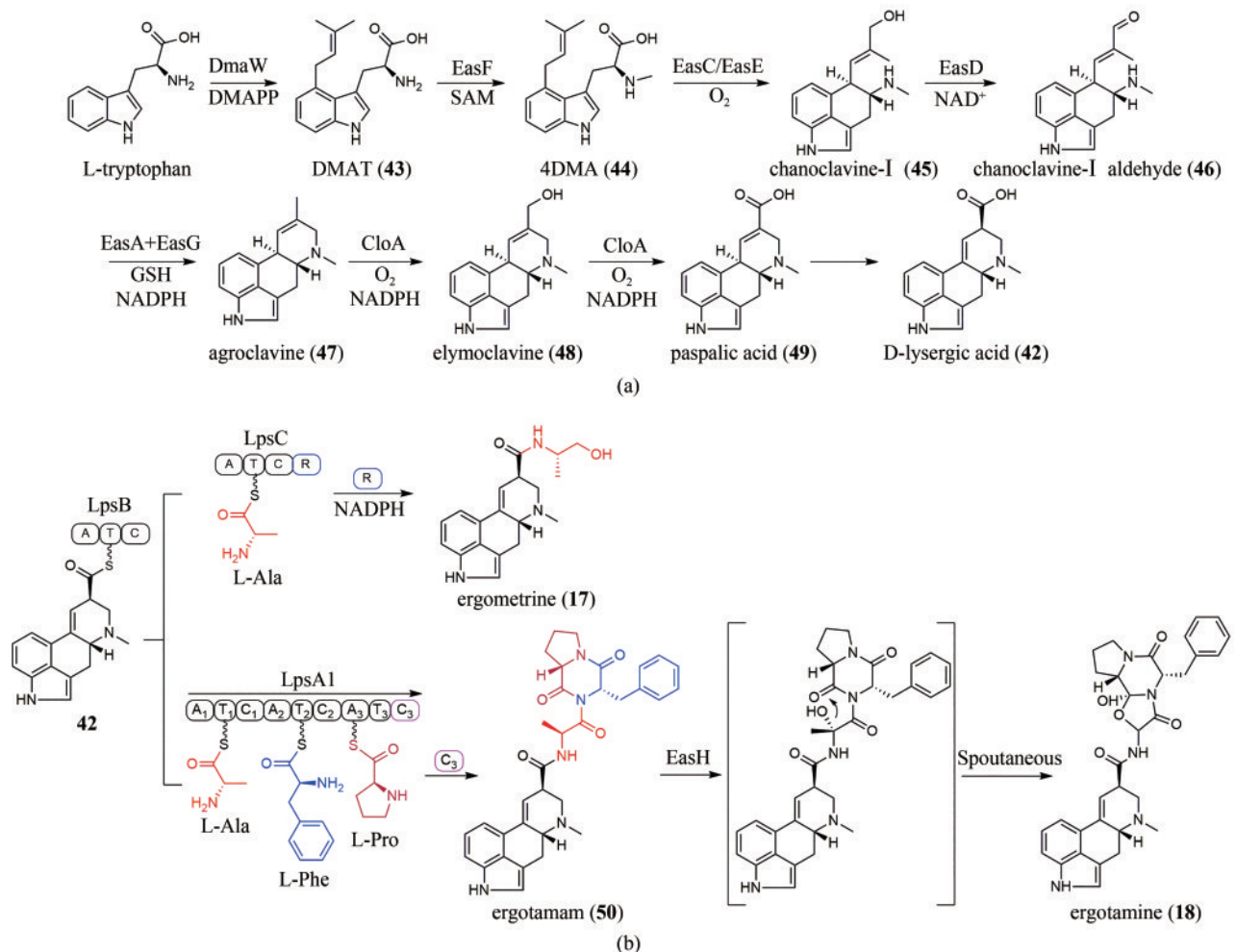


图7 Ergometrine 和 ergotamine 生物合成途径

Fig. 7 Biosynthesis pathways of ergometrine and ergotamine

合物 chanoclavine- I (45)^[103-104]。最后, 在NAD⁺存在下短链脱氢还原酶EasD催化45的羟基氧化形成chanoclavine- I-aldehyde (46)^[105]。以上途径中, DmaW、EasF、EasE、EasC和EasD在烟曲霉(*A. fumigatus*)中的同源蛋白分别为FgaPT2、FgaMT、FgaOx1、FagCat和FgaDH^[106]。

EasA和EasG以还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)为辅因子共同催化46中NH进攻羰基形成C—N键并脱水形成C-8和C-9位为双键的agroclavine (47)^[107]。此外, 在体外不存在EasA条件下, EasG作为一个氧化还原酶能够以GSH和NADPH为辅因子独立催化希夫碱还原生成47^[107]。在NADPH和O₂的条件下, 细胞色素P450单加氧酶CloA催化47连续发生三步氧化反应形成paspalic acid (49), 其经过羟化中间体elymoclavine (48), 49的双键自发移位形成42^[108]。

ergometrine和ergotamine为NRPS以42为合成砌块进一步延伸而成。ergometrine (17)由单模块NRPS LpsB和LpsC共同催化形成, 其结构域组成分别为A-T-C和A-T-C-R [图7(b)]^[109-112]。首先, LpsB-A和LpsC-A分别识别底物DLA和L-Ala, 随后LpsB-C催化二者缩合形成酰胺键, 最后LpsC-R以NADPH为辅因子催化肽链还原释放形成ergometrine。LpsC-C可能与LpsC-R共同作用参与产物释放, 但是其具体生化功能还需要进一步研究。ergotamine (18)骨架结构ergotamam (50)由LpsB和LpsA1共同催化形成^[111]。三模块NRPS LpsA1的结构域组成为A₁-T₁-C₁-A₂-T₂-C₂-A₃-T₃-C₃, 其中A结构域分别识别L-Ala、L-Phe和L-Pro。LpsA1-C₃催化线性四肽链DLA-Ala-Phe-Pro中Phe-NH进攻硫酯羰基碳形成β-内酰胺。最后, α-KG依赖的双加氧酶EasH催化50结构中氨酰基的α-C羟化, 其与末端内酰胺羰基自发环化形成终产物ergotamine (8)^[112]。

4 非核糖体肽代谢工程

NRP多样性结构和良好的药理活性吸引了研究者开发新型NRP及其衍生物的广泛研究兴趣。生物方法作为获得NRP的有效手段之一, 其主要包括基因组指导下的新型NRP挖掘技术(如转录

调控因子过表达和基因簇异源表达), 以及基于生物合成理论的药物分子改造或高产技术(前体导向和突变生物合成、组合生物合成和化学酶法等)^[113]。针对在常规实验室培养条件下沉默的真菌NRPS基因簇, 若其含有全局调控因子(*hdaA*、*VeA*或*LaeA*), 可对其进行过表达以激活基因簇, 获得新生多肽产物。例如, 敲除*Calcarisporium arbuscular*中编码组氨酸去乙酰化酶(HDAC)的基因*hdaA*成功激活了42个基因簇, 从中获得了2个新生环肽arbumycin和arbumelin^[114]。此外, 利用异源表达系统对真菌NRP进行生产是挖掘新型NRP或提高产量的重要手段, 包括原核生物表达系统(*Escherichia coli*)、酵母表达系统(*Saccharomyces cerevisiae*)及丝状真菌表达系统(*A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. niger*和*Neurospora crassa*)。将土曲霉(*A. terreu*)来源的NRPS-like (PgnA)在*A. nidulans*中异源表达产生二肽产物phenguignardic acid^[115]。在*A. niger*中异源表达尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)来源的Esyn1, 成功使enniatin的产量高达5 g/L^[116]。

前体导向的生物合成则通过向生产菌株中添加化学合成的前体类似物, 从而定向合成多肽类似物。1989年, 在*T. infatum*体内喂养非蛋白源氨基酸DL-α-丙基甘氨酸(DL-α-allylglycine)、L-β-环己基丙氨酸(L-β-cyclohexylalanine)和D-Ser成功合成了3个CsA类似物, 分别为[Allyglyl²]CsA、[MeCyclohexylala¹]CsA和[D-Ser⁸]CsA, 其中[D-Ser⁸]CsA具有较强的免疫抑制活性^[117]。同样, 在*V. hemipterigenum*中喂养L-Leu积累了产物enniatins H和enniatins I, 喂养L-Ile产生MK1688^[118]。此外, 在*B. bassiana* ATCC 7159菌中喂养30个D-2-Hiv和L-Phe类似物, 成功获得了6个新颖的BEA类似物beauvericins H_{1,3}和beauvericins G_{1,3}, 其中beauvericins G_{1,3}的抑制细胞迁移活性和细胞毒活性均下降, 而beauvericins H_{1,3}提高了细胞毒活性^[119]。

前体导向生物合成存在喂养的前体与天然底物有竞争关系, 导致目标产物产量低和分离难度较大等问题, 难以实现量产。然而, 突变合成技术阻断了天然底物的生产, 作为组合生物合成中最成功的方法之一, 其已用于NRP的生物合成^[120]。体内敲除*B. bassiana* ATCC 7159中基因

kivR 消除了天然前体 D-Hiv 的产生, 组合喂养 4 个非同源羟基羧酸 (D-Hbu, D-Hmv, L-2-F-Phe 和 L-3-F-Phe) 获得了 14 个非天然 BEA 类似物, 其中一些化合物具有良好的抗增殖活性^[121]。此外, 突变菌株 *GlareaG lozoyensis-ΔGLPKS4* 中分别喂养不同链长的脂肪酸底物, 包括十四烷酰 (myristoyl)、十五烷酰 (pentadecanoyl) 和棕榈酰 (palmitoyl), 成功合成了 4 个不同链长的 pneumocandin 类似物 pneumocandin H-K (51~54), 其中 52 与 pneumocandin B 具有相似的溶血性, 但其具有更高的抗真菌活性 [图 8(a)]^[122]。将委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) 中催化合成对氨基苯丙酮酸 (*p*-aminophenylpyruvate) 的三个基因 (*papA~C*) 导入分支酸途径缺陷的白纹羽菌 (*Rosellinia* sp.) 中, 使对氨基苯丙酮酸转化为对氨基苯乳酸 (*p*-amino-phenyllactate) 和对硝基苯乳酸 (*p*-nitrophenyllactate), 从而合成了 4 个 PF1002 类似物, 包括 PF1022-220、PF1022-260、PF1022-268 和 PF1022-269^[123]。

基于 NRPS 结构域的功能及组装机制, 其蛋白结构改造手段包括: ①A 结构域或 A-T 结构域的替换; ②A 结构域底物结合口袋的氨基酸残基定向突变; ③结构域 C-A、C-A-T 或 T-C-A 的替换、缺失和插入^[124-126]。通过酶工程改造将 PF1022 合成酶 PSYN (*Rosellinia abscondita*) 中识别 β -OH-Ala 和 β -OH-Phe 的模块 1 分别与 Esyn1 和 BbBEAS 中识别 D-Hiv 的模块 1 进行互换得到人工合成酶 hPESYN 和 hPBEAS, 从而合成了 4 个 ENN 和 2 个 BEA 类似物, 包括 [PheLac]-ENN (55) 和 [PheLac]-BEAS (56) 等 [图 8(b)]^[127]。末端缩合结构域 C_T 催化不同链长的多肽大环化, 故不同 NRPS 的 C_T 互换可以实现不同数量单体的 NRP 合成。应用 Bassianolide 合酶 (BaSYN) 的 C_T 替换 BbBEAS- C_T 形成 BbBEAS-Ba C_T 合酶和 BbBEAS-Ba $T_{26}C_T$, 其均催化合成 Octa-beauvericin (Hiv-Phe $\times 4$)^[128]。此外, 应用整个 BaSYN 替换 BbBEAS- C_T 的得到 BeBaSYN2, 其同样产生 Octa-beauvericin。应用 BaSYN 替换 Esyn1- C_T 得到 EnSYN-Ba C_T 和 EnSYN-Ba $T_{26}C_T$, 其催化形成 Octa-enniatin B (Hiv-Val $\times 4$)^[128]。

NRPS 生物合成途径的体外重组和工程化可以有效地合成复杂的 NRP 衍生物。应用体外化学酶

法或 *bbBeas* 的 *E. coli* 表达菌株的全细胞生物酶法合成了 11 个新的 BEA 类似物^[129]。利用 tyrocidine 的 NRPS-TE 结构域 (TycC-TE) 的底物宽泛性, 成功合成了 300 多种线性 tyrocidine 类似物 [图 8(c)]^[130]。体外重组土曲霉 (*A. terreus*) 来源的 PKS-NRPS 中单独 NRPS 模块以不同的氨基酸和游离硫醇为底物合成了 60 多个 thiopyrazine 化合物^[131]。NRPS 模块中的 KR 结构域催化化学合成的 SNAC-前体与 α -酮异己酸形成 cryptophycin 类似物^[132]。NRPS-like 酶 IvoA (A-T-E-R) 能够催化吡啶环上各种取代的色氨酸类似物立体异构化为 D-构型产物^[133]。

5 总结与展望

结构复杂和活性多样的真菌 NRP 是创新药物研究与开发历史长河中最重要的来源之一, 如 β -内酰胺类抗生素已作为临床一线抗感染药物使用近百年, 而 CsA、BEA、ENN、棘白菌素和麦角生物碱等在治疗真菌或细菌感染、器官移植、肿瘤和神经疾病等领域发挥着重要作用。随着病原菌耐药性的广泛传播和肿瘤细胞发病率不断上升, 现有多肽药物开发速度远不能满足社会的需求^[134]。此外, 尽管通过发酵分离技术持续发现新型 NRP, 但较难获得新颖 NRP 骨架药物, 限制了 NRP 药物开发速率。而利用化学修饰活性 NRP 骨架存在着非蛋白源氨基酸的不可得性、肽环化效率低、官能团相容性差、耗时长和构效难以控制等诸多问题和挑战。因此开发高效合成 NRP 衍生物的生物酶法至关重要。

真菌 NRP 药物生物合成的研究对于揭示复杂结构的组装过程和新型生物酶的酶学机制至关重要。目前, 通过基因组挖掘、靶向基因敲除、同位素标记、体内化学喂养、异源宿主表达和体外酶生化表征等手段阐明了众多真菌 NRP 药物完整的生物合成途径, 包括 β -内酰胺类抗生素、CsA 和麦角生物碱。随着真菌 NRP 生物合成的不断研究, 大量天然来源的具有新型催化作用的生物酶被揭示, 如非血红素依赖的铁加氧酶 PcbC、 α -KG 依赖的氧化酶 CefEF、磺基转移酶 McfS 和氧化还原酶 EasG 等。新型生物酶的发现为生物酶法合成新型 NRP 衍生物提供了更多的酶选择性, 有助于开发

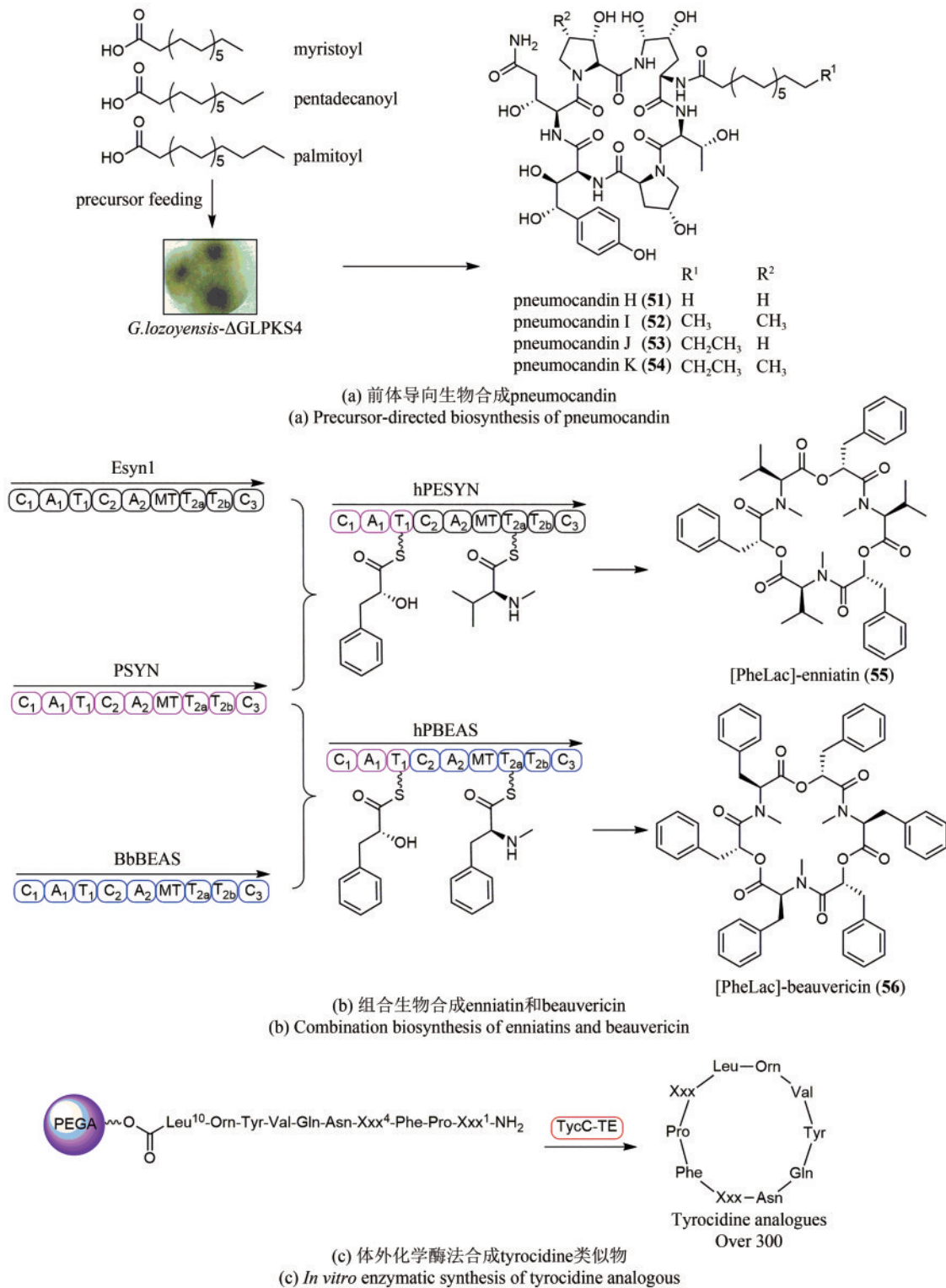


图8 非核糖体肽的代谢工程
Fig. 8 Metabolic engineering of NRP

新的生物活性药物或药效更优的药物先导化合物。此外，新功能生物酶的发现有助于解决化学合成中无法完成的反应。通过生物酶的定向进化，突

破限速酶限制，结合组合生物合成改造途径，实现NRP衍生物的绿色合成与高效创制。

随着基因组测序技术的跨越式发展，研究报

道了大量的真菌基因组序列，其中大部分NRP生物合成基因簇仍处于沉默状态，仅鉴定了部分NRP的结构，因此大量潜在的新型多肽化合物资源未被充分挖掘。未来，通过生物信息学分析工具对NRP基因簇产物进行预测，可以定向开发具有特定结构或者活性的NRP。利用合成生物技术如转录调控因子过表达、启动子工程及异源系统表达等激活沉默基因簇，从而挖掘和开发新型天然源NRP。虽然应用生物手段（前体导向和突变生物合成、NRPS工程化改造）获得了大量的非天然NRP，但是并未得到很好的发展。真菌NRPS结构域工程化改造还处于初步研究阶段，未来NRPS的结构和酶学组装机制的深入研究将有助于理解各模块之间或结构域之间的相互作用关系，从而实现新型人工NRP药物分子的定向设计和高效创制。

参 考 文 献

- [1] SCHUEFFLER A, ANKE T. Fungal natural products in research and development[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(10): 1425-1448.
- [2] EVIDENTE A, KORNIENKO A, CIMMINO A, et al. Fungal metabolites with anticancer activity[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(5): 617-627.
- [3] SÜSSMUTH R D, MAINZ A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(14): 3770-3821.
- [4] ANGELINI A, CENDRON L, CHEN S Y, et al. Bicyclic peptide inhibitor reveals large contact interface with a protease target[J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(5): 817-821.
- [5] SOHRABI C, FOSTER A, TAVASSOLI A. Methods for generating and screening libraries of genetically encoded cyclic peptides in drug discovery[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2020, 4(2): 90-101.
- [6] BRIAN CHIA C S. A review on the metabolism of 25 peptide drugs[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2021, 27(2): 1397-1418.
- [7] LIU Y, DING S Y, SHEN J Z, et al. Nonribosomal antibacterial peptides that target multidrug-resistant bacteria[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(4): 573-592.
- [8] ZORZI A, DEYLE K, HEINIS C. Cyclic peptide therapeutics: past, present and future[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 38: 24-29.
- [9] ONGPIPATTANAKUL C, DESORMEAUX E K, DICAPRIO A, et al. Mechanism of action of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(18): 14722-14814.
- [10] VASSAUX A, MEUNIER L, VANDENBOL M, et al. Nonribosomal peptides in fungal cell factories: from genome mining to optimized heterologous production[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(8): 107449.
- [11] EHINGER F J, NIEHS S P, DOSE B, et al. Analysis of rhizonin biosynthesis reveals origin of pharmacophoric furylalanine moieties in diverse cyclopeptides[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(42): e202308540.
- [12] THEOBALD S, VESTH T C, ANDERSEN M R. Genus level analysis of PKS-NRPS and NRPS-PKS hybrids reveals their origin in *Aspergilli*[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 847.
- [13] KHALDI N, COLLEMARE J, LEBRUN M H, et al. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi[J]. *Genome Biology*, 2008, 9(1): R18.
- [14] ZHANG H Y, CHEN S Y. Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001–2021) [J]. *RSC Chemical Biology*, 2022, 3(1): 18-31.
- [15] CHEN X W, RAO L, CHEN J L, et al. Unexpected assembly machinery for 4(3*H*)-quinazolinone scaffold synthesis[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6522.
- [16] RAO L, SHI H C, ZOU Y. A fungal nonribosomal peptide-polyketide hybrid synthase synthesizes 2-pyrrolidinone alkaloid [J]. *Tetrahedron*, 2022, 125: 133060.
- [17] ZHANG H R, ZHANG C Y, LI Q L, et al. Metabolic blockade-based genome mining reveals lipochain-linked dihydro- β -alanine synthetases involved in autucedine biosynthesis[J]. *Organic Letters*, 2022, 24(30): 5535-5540.
- [18] BAHADOOR A, BRAUER E K, BOSNICH W, et al. Gramillins A and B: cyclic lipopeptides identified as the nonribosomal biosynthetic products of *Fusarium graminearum* [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(48): 16783-16791.
- [19] LI C S, HU Y F, WU X H, et al. Discovery of unusual dimeric piperazyl cyclopeptides encoded by a *Lentzea flaviverrucosa* DSM 44664 biosynthetic supercluster[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(17): e2117941119.
- [20] BERGMANN S, SCHÜMANN J, SCHERLACH K, et al. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(4): 213-217.
- [21] MA J Y, HUANG H B, XIE Y C, et al. Biosynthesis of ilamycins featuring unusual building blocks and engineered production of enhanced anti-tuberculosis agents[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 391.
- [22] WU Y Q, WANG M, LIU L W. Advances on structure,

- bioactivity, and biosynthesis of amino acid-containing *trans*-AT polyketides[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 262: 115890.
- [23] FISCHBACH M A, WALSH C T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms[J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(8): 3468-3496.
- [24] USMANI S S, BEDI G, SAMUEL J S, et al. THPdb: database of FDA-approved peptide and protein therapeutics[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181748.
- [25] HAMED R B, GOMEZ-CASTELLANOS J R, HENRY L, et al. The enzymes of β -lactam biosynthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2013, 30(1): 21-107.
- [26] ELANDER R P. Industrial production of β -lactam antibiotics [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(5): 385-392.
- [27] WAXMAN D J, STROMINGER J L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1983, 52: 825-869.
- [28] LIU L, CHEN Z, LIU W Y, et al. Cephalosporin C biosynthesis and fermentation in *Acremonium chrysogenum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(19/20): 6413-6426.
- [29] LEVENTOGIANNIS K, MOUKTAROUDIM, GIAMARELLOS-BOURBOULIS E J. Clinical evidence supporting ceftaroline fosamil and ceftibiprole for complicated skin and soft tissue infections[J]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2023, 36(2): 89-94.
- [30] DRAWZ S M, BABIC M, BETHEL C R, et al. Inhibition of the class C β -lactamase from *Acinetobacter* spp.: insights into effective inhibitor design[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(2): 329-340.
- [31] MURAKAMI K, TAKASUKA M, MOTOKAWA K, et al. 1-oxacephalosporins: enhancement of β -lactam reactivity and antibacterial activity[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1981, 24(1): 88-93.
- [32] SYKES R B, BONNER D P. Aztreonam: the first monobactam [J]. *The American Journal of Medicine*, 1985, 78(2A): 2-10.
- [33] ZHAO C R, YOU Z L, CHEN D D, et al. Structure of a fungal 1,3- β -glucan synthase[J]. *Science Advances*, 2023, 9(37): eadh7820.
- [34] HÜTTEL W. Echinocandins: structural diversity, biosynthesis, and development of antimycotics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(1): 55-66.
- [35] ZAMBIAS R A, HAMMOND M L, HECK J V, et al. Preparation and structure-activity relationships of simplified analogs of the antifungal agent cilofungin: a total synthesis approach[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1992, 35(15): 2843-2855.
- [36] BALKOVEC J M, HUGHES D L, MASUREKAR P S, et al. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS[®])—a case study[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(1): 15-34.
- [37] DEBONO M, TURNER W W, LAGRANDEUR L, et al. Semisynthetic chemical modification of the antifungal lipopeptide echinocandin B (ECB): structure-activity studies of the lipophilic and geometric parameters of polyarylated acyl analogs of ECB[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995, 38(17): 3271-3281.
- [38] BOUFFARD F A, ZAMBIAS R A, DROPINSKI J F, et al. Synthesis and antifungal activity of novel cationic pneumocandin Bo derivatives[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1994, 37(2): 222-225.
- [39] TOMISHIMA M, OHKI H, YAMADA A, et al. FK463, a novel water-soluble echinocandin lipopeptide: synthesis and antifungal activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1999, 52(7): 674-676.
- [40] SYED Y Y. Rezafungin: first approval[J]. *Drugs*, 2023, 83(9): 833-840.
- [41] BUSHLEY K E, RAJA R, JAISWAL P, et al. The genome of *Tolyocladium inflatum*: evolution, organization, and expression of the cyclosporin biosynthetic gene cluster[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(6): e1003496.
- [42] BOREL J F, FEURER C, GUBLER H U, et al. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent[J]. *Agents and Actions*, 1994, 43(3/4): 179-186.
- [43] FISCHER G, WITTMANN-LIEBOLD B, LANG K, et al. Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins[J]. *Nature*, 1989, 337(6206): 476-478.
- [44] SURVASE S A, KAGLIWAL L D, ANNAPURE U S, et al. Cyclosporin A—a review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(4): 418-435.
- [45] ABDEL-KAHAAR E, KELLER F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of voclosporin[J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2023, 62(5): 693-703.
- [46] GÄUMANN E, ROTH S, ETTLINGER L, et al. Enniatin, ein neues, gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum[J]. *Experientia*, 1947, 3(5): 202-203.
- [47] SUPOTHINA S, ISAKA M, KIRTIKARA K, et al. Enniatin production by the entomopathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2004, 57(11): 732-738.
- [48] LIN Y, WANG J, WU X, et al. A novel compound enniatin G from the mangrove fungus *Halosarpheia* sp. (strain #732) from the South China Sea[J]. *Australian Journal of Chemistry*, 2002, 55(3): 225-227.

- [49] SY-CORDERO A A, PEARCE C J, OBERLIES N H. Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65(11): 541-549.
- [50] PROSPERINI A, BERRADA H, RUIZ M J, et al. A review of the mycotoxin enniatin B[J]. *Frontiers in Public Health*, 2017, 5: 304.
- [51] GERMAN-FATTAL M. Fusafungine, an antimicrobial with anti-inflammatory properties in respiratory tract infections[J]. *Clinical Drug Investigation*, 2001, 21(9): 653-670.
- [52] HAMILL R L, HIGGINS C E, BOAZ H E, et al. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*[J]. *Tetrahedron Letters*, 1969, 10(49): 4255-4258.
- [53] KRÍŽOVÁ L, DADÁKOVÁ K, DVOŘÁČKOVÁ M, et al. Feedborne mycotoxins beauvericin and enniatins and livestock animals[J]. *Toxins*, 2021, 13(1): 32.
- [54] URBANIAK M, WAŚKIEWICZ A, STĘPIEŃ Ł. *Fusarium* cyclodepsipeptide mycotoxins: chemistry, biosynthesis, and occurrence[J]. *Toxins*, 2020, 12(12): 765.
- [55] HULVOVÁ H, GALUSZKA P, FRÉBORTOVÁ J, et al. Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(1): 79-89.
- [56] GAO Q, JIN K, YING S H, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(1): e1001264.
- [57] KOZLOVSKÍĀ G, ZHELIFONOVA V P, ANTIPOVA T V, et al. Physiological and biochemical characteristics of fungi of the genus *Penicillium* as producers of ergot alkaloids and quinocitrinins[J]. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, 2011, 47(4): 469-473.
- [58] GE H M, YU Z G, ZHANG J, et al. Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(4): 753-755.
- [59] SCHARDL C L, PANACCIONE D G, TUDZYNSKI P. Ergot alkaloids-biology and molecular biology[J]. *The Alkaloids Chemistry and Biology*, 2006, 63: 45-86.
- [60] WALSH C T, O'BRIEN R V, KHOSLA C. Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(28): 7098-7124.
- [61] CONDURSO H L, BRUNER S D. Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1099-1110.
- [62] HUR G H, VICKERY C R, BURKART M D. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1074-1098.
- [63] DEKIMPE S, MASSCHELEIN J. Beyond peptide bond formation: the versatile role of condensation domains in natural product biosynthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(10): 1910-1937.
- [64] ZHANG J J, TANG X Y, HUAN T, et al. Pass-back chain extension expands multimodular assembly line biosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(1): 42-49.
- [65] RABE P, KAMPS J A G, SCHOFIELD C J, et al. Roles of 2-oxoglutarate oxygenases and isopenicillin N synthase in β -lactam biosynthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(8): 735-756.
- [66] THEILGAARD H B, KRISTIANSEN K N, HENRIKSEN C M, et al. Purification and characterization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Penicillium chrysogenum* [J]. *The Biochemical Journal*, 1997, 327(Pt 1): 185-191.
- [67] VAN DER LENDE T R, VAN DE KAMP M, BERG M, et al. δ -(L- α -Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 37(1): 49-55.
- [68] ZABRISKIE T M, JACKSON M D. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2000, 17(1): 85-97.
- [69] XU H Y, ANDI B, QIAN J H, et al. The α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2006, 46(1): 43-64.
- [70] TAMANAHA E, ZHANG B, GUO Y S, et al. Spectroscopic evidence for the two C-H-cleaving intermediates of *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(28): 8862-8874.
- [71] ROACH P L, CLIFTON I J, FÜLÖP V, et al. Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes[J]. *Nature*, 1995, 375(6533): 700-704.
- [72] ROACH P L, CLIFTON I J, HENSGENS C M, et al. Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation[J]. *Nature*, 1997, 387(6635): 827-830.
- [73] BALDWIN J E, BRADLEY M. Isopenicillin N synthase: mechanistic studies[J]. *Chemical Reviews*, 1990, 90(7): 1079-1088.
- [74] WHITEMAN P A, ABRAHAM E P, BALDWIN J E, et al. Acyl coenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans*[J]. *FEBS Letters*, 1990, 262(2): 342-344.
- [75] MARTÍN J F, ULLÁN R V, GARCÍA-ESTRADA C. Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis [J]. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(3): 285-299.
- [76] KIEL J A, VAN DEN BERG M A, FUSETTI F, et al. Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-

- producing *Penicillium chrysogenum* cells[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2009, 9(2): 167-184.
- [77] SHEN Y Q, WOLFE S, DEMAINE A L. Enzymatic conversion of the unnatural tripeptide delta-(D-alpha-aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine to beta-lactam antibiotics[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1984, 37(9): 1044-1048.
- [78] ULLAN R V, CASQUEIRO J, BANUELOS O, et al. A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(48): 46216-46225.
- [79] KNIHINICKI R D, DAY R O, WILLIAMS K M. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs—II racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1991, 42(10): 1905-1911.
- [80] ULLÁN R V, CASQUEIRO J, NARANJO L, et al. Expression of *cefD2* and the conversion of isopenicillin N into penicillin N by the two-component epimerase system are rate-limiting steps in cephalosporin biosynthesis[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272(5): 562-570.
- [81] SAMSON S M, DOTZLAF J E, SLISZ M L, et al. Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis[J]. *Nature Biotechnology*, 1987, 5(11): 1207-1214.
- [82] BARENDS T R M, YOSHIDA H, DIJKSTRA B W. Three-dimensional structures of enzymes useful for beta-lactam antibiotic production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(4): 356-363.
- [83] LEJON S, ELLIS J, VALEGÅRD K. The last step in cephalosporin C formation revealed: crystal structures of deacetylcephalosporin C acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum* in complexes with reaction intermediates[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(3): 935-944.
- [84] GUTIÉRREZ S, VELASCO J, FERNANDEZ F J, et al. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase [J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(9): 3056-3064.
- [85] CACHO R A, JIANG W, CHOOI Y H, et al. Identification and characterization of the echinocandin B biosynthetic gene cluster from *Emericella rugulosa* NRRL 11440[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(40): 16781-16790.
- [86] CHEN L, YUE Q, ZHANG X Y, et al. Genomics-driven discovery of the pneumocandin biosynthetic gene cluster in the fungus *Glarea lozoyensis*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 339.
- [87] WEI T Y, ZHENG Y, WAN M Y, et al. Analysis of FR901379 biosynthetic genes in *Coleophoma impetri* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-based genomic manipulation[J]. *ACS Chemical Biology*, 2022, 17(8): 2130-2141.
- [88] MATTAY J, HOUWAART S, HÜTTEL W. Cryptic production of *trans*-3-hydroxyproline in echinocandin B biosynthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(7): e02370-17.
- [89] JIANG W, CACHO R A, CHIOU G, et al. EcdGHK are three tailoring iron oxygenases for amino acid building blocks of the echinocandin scaffold[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(11): 4457-4466.
- [90] MEN P, GENG C, ZHANG X, et al. Biosynthesis mechanism, genome mining and artificial construction of echinocandin O-sulfonation[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 74: 160-167.
- [91] IWAMOTO T, FUJIE A, NITTA K, et al. WF11899A, B and C, novel antifungal lipopeptides. II. Biological properties[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(10): 1092-1097.
- [92] DI SALVO M L D, FLORIO R, PAIARDINI A, et al. Alanine racemase from *Tolypocladium inflatum*: a key PLP-dependent enzyme in cyclosporin biosynthesis and a model of catalytic promiscuity[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, 529(2): 55-65.
- [93] YANG X Q, FENG P, YIN Y, et al. Cyclosporine biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment[J]. *mBio*, 2018, 9(5): e01211-18.
- [94] WEBER G, LEITNER E. Disruption of the cyclosporin synthetase gene of *Tolypocladium niveum*[J]. *Current Genetics*, 1994, 26(5-6): 461-467.
- [95] LAWEN A, ZOCHER R. Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(19): 11355-11360.
- [96] ZHANG T, JIA X P, ZHUO Y, et al. Cloning and characterization of a novel 2-ketoisovalerate reductase from the beauvericin producer *Fusarium proliferatum* LF061[J]. *BMC Biotechnology*, 2012, 12: 55.
- [97] ZOCHER R, KELLER U, KLEINKAUF H. Enniatin synthetase, a novel type of multifunctional enzyme catalyzing depsipeptide synthesis in *Fusarium oxysporum*[J]. *Biochemistry*, 1982, 21(1): 43-48.
- [98] XU Y Q, OROZCO R, KITHSIRI WIJERATNE E M, et al. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(9): 898-907.
- [99] HAARMANN T, MACHADO C, LÜBBE Y, et al. The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: extension of the cluster sequence and intra species evolution[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(11): 1312-1320.
- [100] CHEN J J, HAN M Y, GONG T, et al. Recent progress in ergot alkaloid research[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(44): 27384-27396.

- [101] GEBLER J C, POULTER C D. Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992, 296(1): 308-313.
- [102] RIGBERS O, LI S M. Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. Overproduction and biochemical characterization of a 4-dimethylallyltryptophan *N*-methyltransferase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(40): 26859-26868.
- [103] GOETZ K E, COYLE C M, CHENG J Z, et al. Ergot cluster-encoded catalase is required for synthesis of chanoclavine- I in *Aspergillus fumigatus*[J]. Current Genetics, 2011, 57(3): 201-211.
- [104] LORENZ N, OLISOVSKÁ J, SULC M, et al. Alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes chanoclavine I synthase, a flavin adenine dinucleotide-containing oxidoreductase mediating the transformation of *N*-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine I[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1822-1830.
- [105] WALLWEY C, MATUSCHEK M, LI S M. Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine- I to chanoclavine- I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase *FgaDH*[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(2): 127-134.
- [106] NIERMAN W C, PAIN A, ANDERSON M J, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Nature, 2005, 438(7071): 1151-1156.
- [107] CHENG J Z, COYLE C M, PANACCIONE D G, et al. Controlling a structural branch point in ergot alkaloid biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(37): 12835-12837.
- [108] HAARMANN T, ORTEL I, TUDZYNSKI P, et al. Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways[J]. ChemBioChem, 2006, 7(4): 645-652.
- [109] ORTEL I, KELLER U. Combinatorial assembly of simple and complex D-lysergic acid alkaloid peptide classes in the ergot fungus *Claviceps purpurea*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(11): 6650-6660.
- [110] CORREIA T, GRAMMEL N, ORTEL I, et al. Molecular cloning and analysis of the ergopeptide assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*[J]. Chemistry & Biology, 2003, 10(12): 1281-1292.
- [111] HAARMANN T, LORENZ N, TUDZYNSKI P. Use of a nonhomologous end joining deficient strain ($\Delta ku70$) of the ergot fungus *Claviceps purpurea* for identification of a nonribosomal peptide synthetase gene involved in ergotamine biosynthesis[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(1): 35-44.
- [112] HAVEMANN J, VOGEL D, LOLL B, et al. Cyclolization of D-lysergic acid alkaloid peptides[J]. Chemistry & Biology, 2014, 21(1): 146-155.
- [113] ZHANG L W, WANG C, CHEN K, et al. Engineering the biosynthesis of fungal nonribosomal peptides[J]. Natural Product Reports, 2023, 40(1): 62-88.
- [114] MAO X M, XU W, LI D H, et al. Epigenetic genome mining of an endophytic fungus leads to the pleiotropic biosynthesis of natural products[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(26): 7592-7596.
- [115] SUN W W, GUO C J, WANG C C C. Characterization of the product of a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene using the doxycycline dependent Tet-on system in *Aspergillus terreus*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 89: 84-88.
- [116] RICHTER L, WANKA F, BOECKER S, et al. Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites [J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2014, 1: 4.
- [117] TRABER R, HOFMANN H, KOBEL H. Cyclosporins: new analogues by precursor directed biosynthesis[J]. The Journal of Antibiotics, 1989, 42(4): 591-597.
- [118] NILANONTA C, ISAKA M, CHANPHEN R, et al. Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum*: isolation and studies on precursor-directed biosynthesis[J]. Tetrahedron, 2003, 59(7): 1015-1020.
- [119] XU Y Q, ZHAN J X, KITHSIRI WIJERATNE E M, et al. Cytotoxic and antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen *Beauveria bassiana* ATCC 7159[J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(9): 1467-1471.
- [120] SÜSSMUTH R, MÜLLER J, VON DÖHREN H, et al. Fungal cyclooligomer depsipeptides: from classical biochemistry to combinatorial biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(1): 99-124.
- [121] XU Y Q, KITHSIRI WIJERATNE E M, ESPINOSA-ARTILES P, et al. Combinatorial mutasynthesis of scrambled beauvericins, cyclooligomer depsipeptide cell migration inhibitors from *Beauveria bassiana*[J]. ChemBioChem, 2009, 10(2): 345-354.
- [122] CHEN L, LI Y, YUE Q, et al. Engineering of new pneumocandin side-chain analogues from *Glarea lozoyensis* by mutasynthesis and evaluation of their antifungal activity[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(10): 2724-2733.
- [123] YANAI K, SUMIDA N, OKAKURA K, et al. Para-position derivatives of fungal anthelmintic cyclodepsipeptides engineered with *Streptomyces venezuelae* antibiotic biosynthetic genes[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(7): 848-855.
- [124] KRIES H, WACHTEL R, PABST A, et al. Reprogramming nonribosomal peptide synthetases for “clickable” amino acids [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(38):

- 10105-10108.
- [125] THIRLWAY J, LEWIS R, NUNNS L, et al. Introduction of a non-natural amino acid into a nonribosomal peptide antibiotic by modification of adenylation domain specificity[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(29): 7181-7184.
- [126] BOZHÜYÜK K A J, LINCK A, TIETZE A, et al. Modification and *de novo* design of non-ribosomal peptide synthetases using specific assembly points within condensation domains[J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(7): 653-661.
- [127] ZOBEL S, BOECKER S, KULKE D, et al. Reprogramming the biosynthesis of cyclodepsipeptide synthetases to obtain new enniatins and beauvericins[J]. *ChemBioChem*, 2016, 17(4): 283-287.
- [128] STEINIGER C, HOFFMANN S, SÜSSMUTH R D. Probing exchange units for combining iterative and linear fungal nonribosomal peptide synthetases[J]. *Cell Chemical Biology*, 2019, 26(11): 1526-1534.e2.
- [129] MATTHES D, RICHTER L, MÜLLER J, et al. *In vitro* chemoenzymatic and *in vivo* biocatalytic syntheses of new beauvericin analogues[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(45): 5674-5676.
- [130] KOHLI R M, WALSH C T, BURKART M D. Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics[J]. *Nature*, 2002, 418(6898): 658-661.
- [131] QIAO K J, ZHOU H, XU W, et al. A fungal nonribosomal peptide synthetase module that can synthesize thiopyrazines[J]. *Organic Letters*, 2011, 13(7): 1758-1761.
- [132] DING Y S, RATH C M, BOLDUC K L, et al. Chemoenzymatic synthesis of cryptophycin anticancer agents by an ester bond-forming non-ribosomal peptide synthetase module[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(37): 14492-14495.
- [133] HAI Y, JENNER M, TANG Y. Complete stereoinversion of

L-tryptophan by a fungal single-module nonribosomal peptide synthetase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(41): 16222-16226.

- [134] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(3): 200-216.



通讯作者: 邹懿(1983—),男,教授,博士生导师。研究方向为真菌天然药物生物合成与酶催化机理、真菌天然药物合成生物学与分子创新。

E-mail: zouyi31@swu.edu.cn



第一作者: 陈锡玮(1991—),男,博士,博士后。研究方向为真菌天然产物生物合成与酶催化机理、真菌新型非核糖体肽基因组挖掘。

E-mail: chenxw20226023@swu.edu.cn



第一作者: 张华然(1993—),男,博士,讲师。研究方向为真菌活性次级代谢产物生物合成与酶学机制、真菌新颖次级代谢产物基因组挖掘。

E-mail: aifyui@126.com