

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-089

双嵌入家族抗肿瘤非核糖体肽的生物合成研究进展

施鑫杰, 杜艺岭

(浙江大学基础医学院微生物系, 药物生物技术研究, 浙江 杭州 310058)

摘要: 双嵌入家族 (bisintercalator) 非核糖体肽是一类由放线菌产生的C2中心对称的环状肽类化合物, 能够通过其结构中两个独特的发色基团插入到DNA分子中, 因此具有良好的抗菌和抗肿瘤等生物活性。这些家族化合物的结构多样性主要源于芳香杂环、氨基酸种类和数量以及修饰基团的不同。这些结构差异不仅导致其抗菌和抗肿瘤活性的强度和选择性的不同, 还赋予了它们抗真菌、抗疟、抗病毒等其他活性。本文总结了双嵌入家族非核糖体肽的结构与活性和生物合成途径, 展望了其未来发展方向以及面临的挑战。双嵌入家族非核糖体肽的分子结构复杂, 化学合成非常具有挑战性, 微生物发酵是生产此家族化合物的主要方法。近年来, 双嵌入非核糖体肽类家族的生物合成途径得到了较为系统的研究, 该家族主要代表性分子的肽链骨架组装、起始单元的生物合成以及后修饰过程已被基本阐明。这些研究成果不仅揭示了一系列微生物次级代谢中新颖的生物合成酶家族和酶催化机理, 也为通过合成生物技术对该家族分子进行分子结构创新提供了珍贵的生物催化组件。这些生物合成的理论知识将进一步推动这一具有前景的天然产物家族的精准发现与后续的药物开发研究。

关键词: 非核糖体肽; 双嵌入家族; 天然产物; 抗肿瘤化合物; 生物合成

中图分类号: Q936 文献标志码: A

Research advances in the biosynthesis of nonribosomal peptides within the bisintercalator family as anticancer drugs

SHI Xinjie, DU Yiling

(Institute of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Microbiology, School of Basic Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: Natural products with the bisintercalator family are a group of C2-symmetric cyclic non-ribosomal peptides produced by actinobacteria, possessing potent antimicrobe, antitumor and other bioactivities. Bisintercalators can be divided into two groups based on the size of their macrocycles: the minor and major scaffold types with eight and ten amino acid residues, respectively. Structure diversity with bisintercalators arises from variations in aromatic heterocycles, amino acid residue identities and quantities, and post-assembly line modifications. The major scaffold

收稿日期: 2023-11-28 修回日期: 2024-02-29

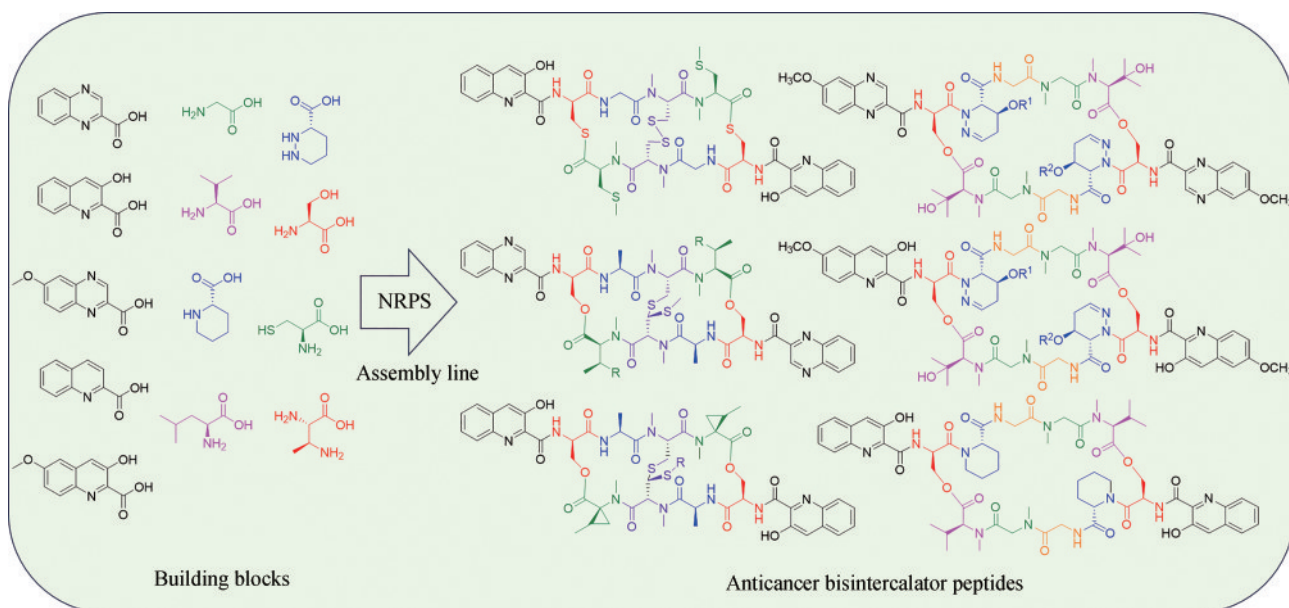
基金项目: 国家自然科学基金 (32122005, 32370051)

引用本文: 施鑫杰, 杜艺岭. 双嵌入家族抗肿瘤非核糖体肽的生物合成研究进展[J]. 合成生物学, 2024, 5(3): 593-611

Citation: SHI Xinjie, DU Yiling. Research advances in the biosynthesis of nonribosomal peptides within the bisintercalator family as anticancer drugs [J].

Synthetic Biology Journal, 2024, 5(3): 593-611

type bisintercalators harbor two structurally rigid six-membered nitrogen heterocycle-containing amino acids, which can further undergo oxidative and acylation tailorings. The minor scaffold type bisintercalators seemingly derive their rigidity from disulfide or thioacetal bridges formed by sulfhydryls of two cysteines, and the thioacetal bridges allow variable *S*-alkyl elongation and conversion of *S*-alkyl sulfur into sulfoxide moiety. In addition, bisintercalators also exhibit differences in other amino acid identities, which further contribute to their diverse activities, including antimicrobial, antitumor, antifungal, anti-malarial, or antiviral effects. The chemical synthesis of these nonribosomal peptides is complex due to their intricate architectures, making microbial fermentation a more efficient production method. On the other hand, structural optimization can be achieved for bisintercalators through combinatorial and precursor-guided biosynthesis. Therefore, understanding the biosynthetic pathways of bisintercalators is crucial for yield enhancement *via* the pathway-specific regulation and also offering biocatalytic parts for structural modifications. This knowledge will facilitate future discovery and drug development for this promising natural product family.



Keywords: nonribosomal peptides; bisintercalator family; natural products; antitumor agents; biosynthesis

1 双嵌入家族非核糖体肽简介

在细菌和真菌中，存在着一种不用核糖体催化、不以 mRNA 为模板、不以 tRNA 为转运工具，利用氨基酸及其他化合物合成肽类的特殊多肽合成系统^[1]，其中的关键酶称为非核糖体肽合成酶（nonribosomal peptide synthetase, NRPS），它合成的产物称为非核糖体肽（nonribosomal peptide, NRP）。抗感染药万古霉素^[2]和青霉素^[3]、免疫抑制剂环孢菌素^[4]、抗肿瘤药博来霉素^[5]等重要的

药用天然产物都属于 NRP。

一些放线菌可以产生一类中心对称或近似中心对称的环状非核糖体肽。这类化合物可以以两侧的含氮芳杂环同时插入 DNA 双螺旋相邻的两个小沟中，影响 DNA 的复制、转录等多个过程，最终导致细胞死亡，因此被称为双嵌入家族（bisintercalator family）非核糖体肽^[6-7]。从 1954 年第 1 个化合物棘霉素（Echinomycin）被发现至今^[8-9]，该类化合物共有三十余种，分布于多个科属的放线菌中。

双嵌入家族非核糖体肽一般由两条相同的肽

链通过酯键彼此首尾相连构成环肽（图1）。每条肽链含有四个或五个氨基酸结构单元，因此可以根据其所含氨基酸的数量，将双嵌入家族的化合物分为两类，即十肽类（the major scaffold type）和八肽类（the minor scaffold type）^[10]。其中吕宋肽菌素（Luzopeptins）^[11-12]、江西肽菌素（Jiangxipeptins）^[13]、Sandramycin^[14]、Quinaldopeptin^[15]、Quinoxapeptins^[16]和Korkormicins^[17]属于十肽类，其他双嵌入家族化合物属于八肽类。八肽类化合物可以根据结构的相似性进一步分为棘霉素、SW-163和Thiocoraline三类。

双嵌入家族化合物具有良好的抗肿瘤和其他生物活性，展现出较好的药物开发前景，已经有该家族的分子进入过临床研究。2019年，辉瑞公

司研究了以双嵌入家族化合物作为小分子部分的抗体偶联药物的稳定性和有效性，证明了此类化合物具有开发成抗体偶联药物的潜能^[18]。由模块化NRPS催化不同氨基酸结构单元聚合成双嵌入家族非核糖体肽的生物合成机理的阐明，使合成生物技术有望成为该家族化合物分子结构创新和药物研发的有效工具。

2 双嵌入家族非核糖体肽的结构与活性

基于双嵌入家族非核糖体肽的结构特征，可以将十肽类化合物每条肽链的氨基酸从N端开始编为氨基酸A~E（图1）。氨基酸B是类似于脯氨酸的环状 α -亚氨基酸，而八肽类化合物没有氨基酸B。每条肽链的N端有一个含氮芳杂环与氨基酸A的 α -氨基以肽键相连，其结构一般是3-羟基喹啉-2-羧酸（3HQA）或喹喔啉-2-羧酸（QXCA）。这个杂环正是双嵌入家族化合物用以嵌入DNA的关键结构^[19-23]。氨基酸A一般是D-丝氨酸，与另一条肽链的氨基酸E形成酯键，从而使两条相同的肽链首尾相连形成环肽。氨基酸C是甘氨酸或L-丙氨酸。氨基酸D是N-甲基-L-半胱氨酸或肌氨酸（N-甲基甘氨酸）。氨基酸E种类较多，差异较大。

2.1 棘霉素类

棘霉素（Echinomycin）是第一个被发现的双嵌入家族非核糖体肽（图2）。棘霉素在放线菌中分布十分广泛，仅在1954年、1957年、1961年，

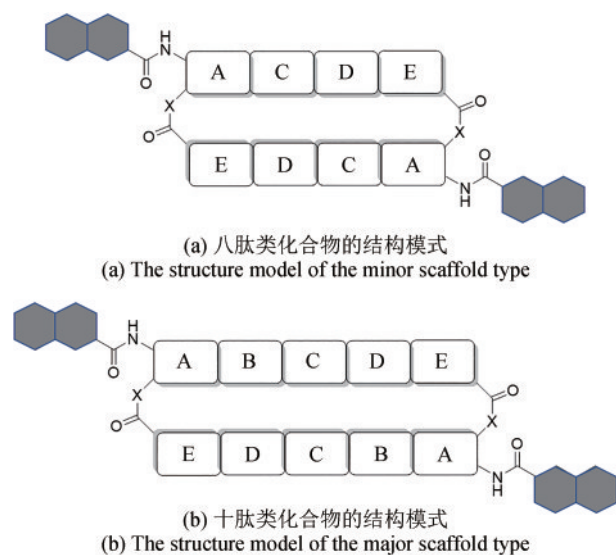
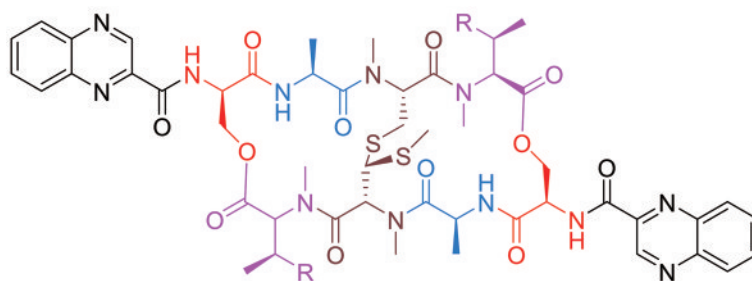


图1 双嵌入家族非核糖体肽结构模式

Fig. 1 Structure models of bisintercalator NRPs



Echinomycin (Quinomycin A): R=Me
Quinomycin B: R=Et
Quinomycin C: R=*i*-Pr
Streptomyces No.732等

图2 棘霉素及其类似物的结构

Fig. 2 Structures of Echinomycin and its analogs

就4次在不同地点被分离纯化^[8-9, 24-25]。之后的结构研究表明,这4个化合物是同一化合物^[26]。接下来的60年里,又有许多研究人员从各种不同的放线菌中分离到棘霉素^[27-31]。

棘霉素的肽链组成为QXCA、D-丝氨酸、L-丙氨酸、*N*-甲基-L-半胱氨酸和*N*-甲基-L-缬氨酸。其中,两个*N*-甲基-L-半胱氨酸的侧链形成了硫缩醛桥(thioacetal bridge)^[32]。棘霉素又名Quinomycin A。Quinomycin B中两个氨基酸E是*N*-甲基-L-别异亮氨酸,Quinomycin C中则是*N*, γ -二甲基-L-别异亮氨酸(图2)^[25, 33-34]。此外,还有一些棘霉素类似物的两条肽链中氨基酸E不同。如Quinomycin B₀中氨基酸E是*N*-甲基-L-缬氨酸和*N*, γ -二甲基-L-别异亮氨酸,Quinomycin D中氨基酸E是*N*-甲基-L-缬氨酸和*N*-甲基-L-别异亮氨酸,Quinomycin E中氨基酸E是*N*, γ -二甲基-L-别异亮氨酸和*N*-甲基-L-别异亮氨酸^[35]。不过,因为硫缩醛桥本身已经使得分子结构不对称,两个不同的氨基酸E可以有两种不同的排布方式,但是Quinomycin B₀和D的真正结构并没有报道。有研究表明,早先分离到的Quinomycin E是两种异构体的混合物^[36]。

棘霉素有很强的抗肿瘤活性^[24],曾经进入II期临床试验^[37]。棘霉素的抗肿瘤活性不仅来源于它对DNA的双嵌入作用,还来源于它对低氧诱导因子1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)的选择性抑制^[38]。棘霉素对HIF-1的抑制活性使它还能够抑制异位骨化^[39]。棘霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、耐万古霉素粪肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus*

faecalis)等革兰氏阳性菌有很好的抑制活性^[40-42]。棘霉素还对流感病毒和HIV有一定的抑制活性^[43-45],对恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)和溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)两种寄生虫有很好的抑制活性^[46-47]。棘霉素的氨基酸E侧链的延长会降低生物活性,导致Quinomycin系列化合物的抗菌活性和抗肿瘤活性A>B>C>E^[29]。

2018年,日本Yoichi Hayakawa课题组从日本土壤的链霉菌*Streptomyces* sp. RAL404中分离到了两种特殊的棘霉素类似物Quinomycin H1和H2(图3)^[48]。它们两条肽链的芳杂环不一样,一个是3HQ,另一个是QXCA。而硫缩醛桥的存在使得棘霉素的结构本身就不对称,因此3HQ和QXCA位置互换就产生了Quinomycin H1和H2这两种异构体。绝大多数双嵌入家族化合物都只含有3HQ和QXCA中的一种,生物合成途径已知的双嵌入家族化合物的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC)中也只有用以合成3HQ和QXCA中其中一种的一系列酶^[10]。而*Streptomyces* sp. RAL404中Quinomycin H1和H2的BGC可能同时含有合成3HQ和QXCA的酶。考虑到合成3HQ和QXCA只有两个酶的差距,*Streptomyces* sp. RAL404通过基因水平转移额外获得合成3HQ的两个酶是很有可能。Quinomycin H1和H2的细胞毒性总体上与棘霉素相当,但是对肿瘤细胞系的选择性有所不同^[48]。

2015年,朱平课题组从南海海绵共生菌*Streptomyces* sp. LS298中发现了另一种棘霉素类似物Quinomycin G^[49]。它的两条肽链没有首尾相连,在其中一处本应形成酯键的地方,对应的D-丝氨酸脱水形成了脱氢丙氨酸(图4)。如果没有硫缩

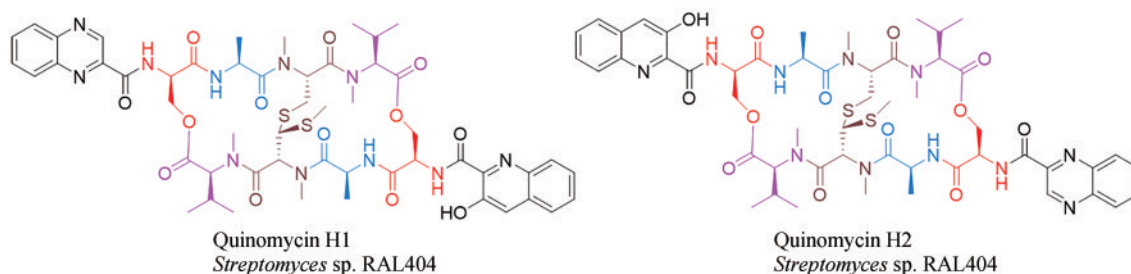


图3 Quinomycin H1和H2的结构

Fig. 3 Structures of Quinomycin H1 and H2

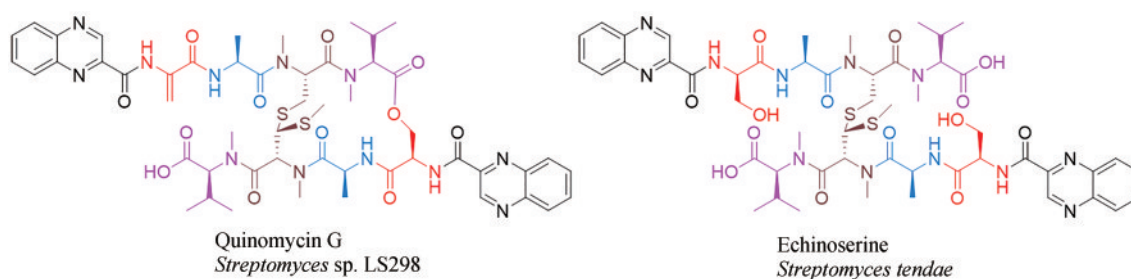


图4 Quinomycin G和Echinoserine的结构

Fig. 4 Structures of Quinomycin G and Echinoserine

醛桥的存在，Quinomycin G 仅是一个线型八肽。棘霉素的类似物不仅有缺少一个酯键的，还有缺少两个酯键的。澳大利亚土壤链霉菌 *Streptomyces tendae* Tü4031 产生的 Echinoserine 中，两条肽链仅以硫缩醛桥相连，相当于棘霉素两个酯键水解的产物（图4）^[50]。Quinomycin G 的抗肿瘤和抗菌活性均稍弱于棘霉素^[49]，而 Echinoserine 只有微弱的抗菌活性^[50]，说明棘霉素的两处酯键对生物活性至关重要。

棘霉素硫缩醛桥的甲硫基的硫原子还可以被氧化形成亚砷结构（图5）。西藏土壤分离出来的 *Streptomyces* sp. 2215、广西红树林分离出来的 *Micromonospora* strain B475、安徽土壤分离出来的 *Streptomyces* sp. HCCB11876 都可以产生单亚砷棘霉素（monosulfoxide Quinomycin），也就是形成亚砷结构的棘霉素（Quinomycin A）^[27, 29, 51]。*Streptomyces* sp. HCCB11876 还可以产生含亚砷结构的 Quinomycin B 和 Quinomycin C，称为 Quinomycin I 和 Quinomycin J（图5）。单亚砷棘霉素的细胞毒性和抗菌活性弱于棘霉素，Quinomycin I 和 Quinomycin J 的活性也弱于 Quinomycin B 和 Quinomycin C，说明甲硫基

硫原子的氧化会降低生物活性^[29, 51]。

三骨菌素 A（Triostin A）是 *Streptomyces triostinicus*、*Streptomyces aureus* S-2-210-L 等链霉菌产生的棘霉素类似物，不含硫缩醛桥，只在对应位置含有二硫键（图6），同样有很强的抗肿瘤和抗菌活性^[32, 52-53]。三骨菌素 B 和 C 与 Quinomycin B 和 C 的结构也是仅有此处不同。实际上，三骨菌素 A 就是棘霉素（Quinomycin A）的生物合成前体。两个 *N*-甲基-L-半胱氨酸先形成二硫键，然后经过甲基化和重排反应进一步转化为硫缩醛桥^[54-56]。

2.2 SW-163类

SW-163 C~G 这 5 个化合物由 *Streptomyces braegensis* subsp. *japonicus* 和 *Streptomyces* sp. SNA15896 两种链霉菌产生（图7）^[57-59]。SW-163C 的结构与三骨菌素 A 有两处区别：SW-163C 的芳杂环是 3HQ，且氨基酸 E 是 2-甲基-1-甲氨基环丙烷-1-羧酸，又称为 *N*-甲基-去甲基冠烷酸（*N*-methyl-norcoronamic acid）。SW-163D 则是在 SW-163C 的基础上将二硫键转化为硫缩醛桥，类似于

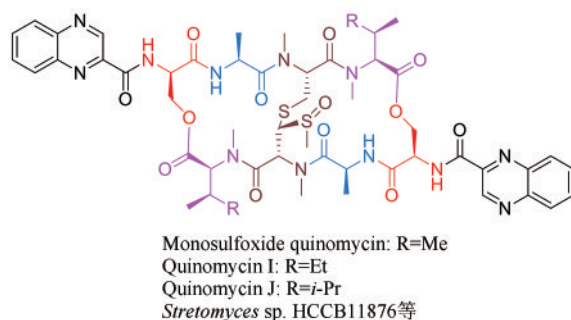
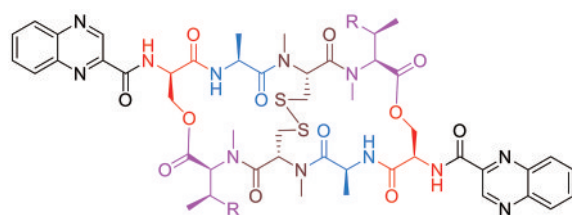


图5 单亚砷棘霉素、Quinomycin I和J的结构

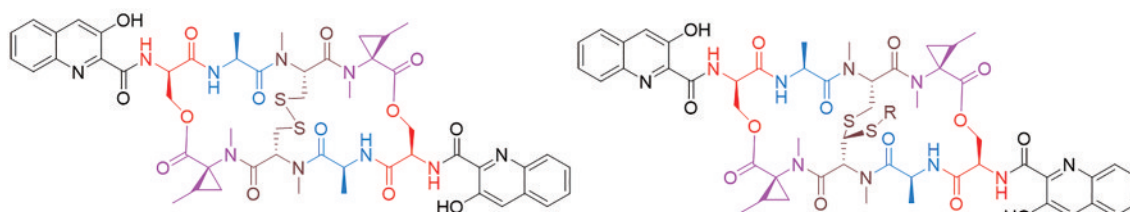
Fig. 5 Structures of monosulfoxide quinomycin, quinomycin I and J



Triostin A: R=Me
 Triostin B: R=Et
 Triostin C: R=*i*-Pr
Streptomyces aureus S-2-210-L等

图6 三骨菌素A~C的结构

Fig. 6 Structures of triostins A~C



SW-163C
Streptomyces sp. SNA 15896

SW-163D: R=Me
 SW-163E: R=Et
 SW-163F: R=*i*-Pr
 SW-163G: R=*sec*-Bu
Streptomyces sp. SNA15896等

图7 SW-163C~G的结构

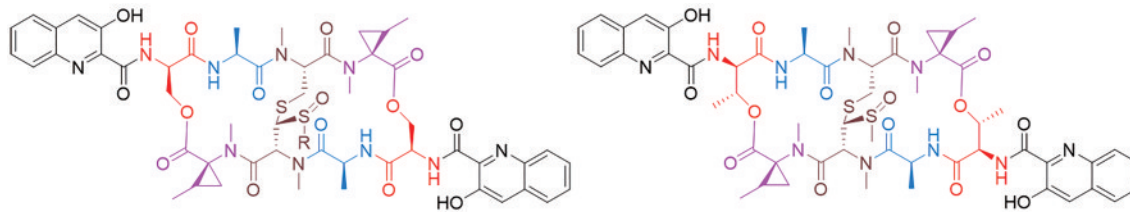
Fig. 7 Structures of SW-163C~G

棘霉素的结构。延长 SW-163D 硫缩醛桥上的 S 烷基就得到了 SW-163E (S 上为乙基)、SW-163F (S 上为异丙基) 和 SW-163G (S 上为仲丁基)。

SW-163 在体外对许多肿瘤细胞系有很强的抗肿瘤活性^[58-59]。其中, SW-163C 活性最弱, 含有硫缩醛桥的 SW-163D 活性强于 SW-163C; 随着硫缩醛桥硫原子上的烷基的延长, 从 SW-163D 到 SW-163G, 抗肿瘤活性逐渐增强。SW-163 还对牛莫拉氏菌 (*Moraxella bovis*)、草分枝杆菌 (*Mycobacterium*

phlei)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 等革兰氏阳性菌有很强的抑制活性^[58-59]。在辉瑞公司进行的抗体偶联药物研究中, SW-163D 与抗 Her2 抗体形成的抗体偶联药物药效和稳定性都很强, 可以进行进一步开发^[18]。

SW-163 也有亚砷类似物 (图 8)。日本土壤链霉菌 *Streptomyces* sp. RK88-1355 不仅可以产生 SW-163D, 还可以 SW-163D 和 SW-163E 的亚砷类似



RK-1355A: R=Me
 RK-1355B: R=Et
Streptomyces sp. RK88-1355

Retimycin A
Salinispora arenicola CNT-005.

图8 RK-1355A、RK-1355B 和 Retimycin A 的结构

Fig. 8 Structures of RK-1355A, RK-1355B and retimycin A

物，称为 RK-1355A 和 RK-1355B^[60]。但是 RK-1355A 和 RK-1355B 的抗肿瘤活性和抗菌活性均弱于 SW-163D，且 RK-1355A 活性弱于 RK-1355B^[60]。这说明亚砷的形成会使得生物活性降低，这个规律在 SW-163 系列和 Quinomycin 系列中是一致的。斐济海域分离到的放线菌 *Salinispora arenicola* CNT-005 可以产生含亚砷结构的双嵌入家族化合物 Retimycin A^[61]。它和 RK-1355A 区别只有一处：RK-1355A 的氨基酸 A 是 D-丝氨酸，Retimycin A 的氨基酸 A 是 D-别苏氨酸。Retimycin A 对 HCT-116 细胞系的细胞毒性与棘霉素相当^[61]。*Salinispora arenicola* CNT-005 还可以产生分子量比 Retimycin A 大 14 的类似物，但是目前结构未知。

2.3 Thiocoraline 类

Thiocoraline 由 *Micromonospora* sp. ML1 和 *Micromonospora* sp. ACM2-092 两种小单孢菌产生 (图 9)，有很强的抗肿瘤和抗菌活性^[62-65]。其肽链组成为 3HQA、D-半胱氨酸、甘氨酸、N-甲基-D-半胱氨酸、N,S-二甲基-L-半胱氨酸。由于氨基酸 A 不是 D-丝氨酸而是 D-半胱氨酸，Thiocoraline 的两条肽链不是以酯键首尾相连，而是形成了硫酯键。和三骨菌素一样，Thiocoraline 用两个 N-甲基-

L-半胱氨酸形成了二硫键。

Thiocoraline 的类似物包括 22'-deoxythiocoraline 和 12'-sulfoxythiocoraline (图 9)^[66]。这两个化合物由 *Verrucosipora* sp. strain WMMA107 产生。22'-Deoxythiocoraline 的一个芳杂环是 3HQA，另一个是没有 3 位羟基喹啉-2-羧酸 (quinaldic acid, QA)。12'-sulfoxythiocoraline 含有亚砷结构。RK-1355A、RK-1355B、Retimycin A、单亚砷棘霉素的亚砷结构都位于硫缩醛桥的甲硫基上，而 Thiocoraline 只有二硫键而没有硫缩醛桥，12'-sulfoxythiocoraline 的亚砷结构位于其中一条肽链的 N,S-二甲基-L-半胱氨酸的甲硫基上。12'-sulfoxythiocoraline 的抗肿瘤活性弱于 22'-deoxythiocoraline，而 22'-deoxythiocoraline 的活性弱于 Thiocoraline^[66]。

Verrucosipora sp. strain WMMA107 还可以产生只有一条肽链的 Thiocoraline 类似物 Thiochondrilline A~C (图 10)^[66]。Thiochondrilline A 和 B 是一对无法分离的肽键顺反异构体，其氨基酸组成为 3HQA、S-甲基-D-半胱氨酸、甘氨酸、N,S-二甲基-L-半胱氨酸、N,S-二甲基-L-半胱氨酸甲酯。Thiochondrilline C 的氨基酸组成为 3HQA、D-半胱氨酸、甘氨酸、N-甲基-L-半胱氨酸、N,S-二甲基-L-半胱氨酸甲酯，其中 D-半胱氨酸和 N-甲

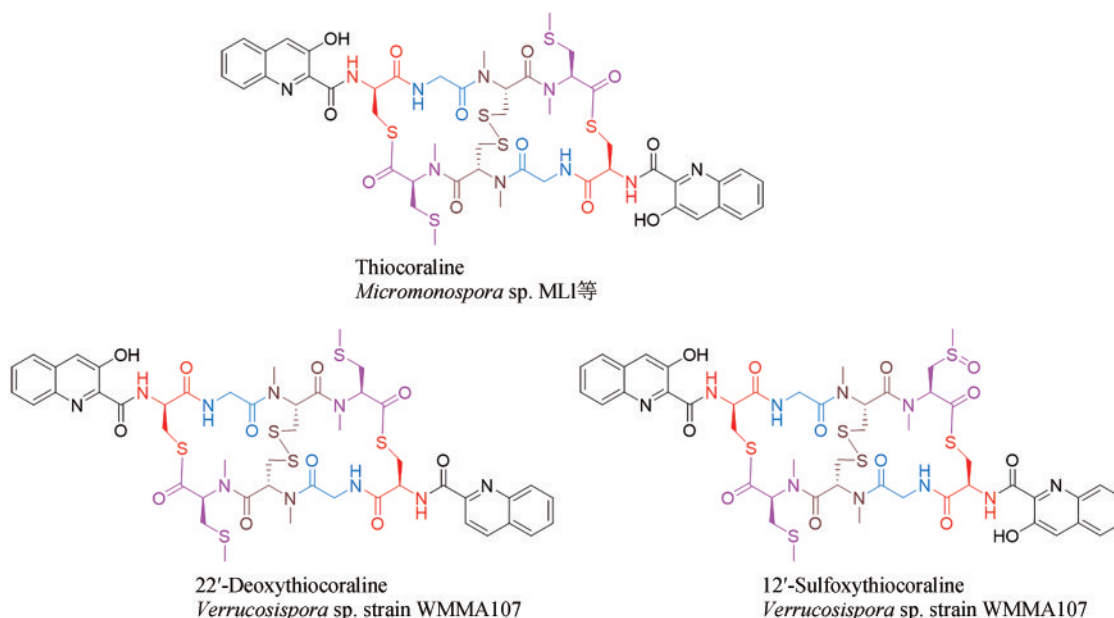


图 9 Thiocoraline、22'-deoxythiocoraline 和 12'-sulfoxythiocoraline 的结构

Fig. 9 Structures of thiocoraline, 22'-deoxythiocoraline and 12'-sulfoxythiocoraline

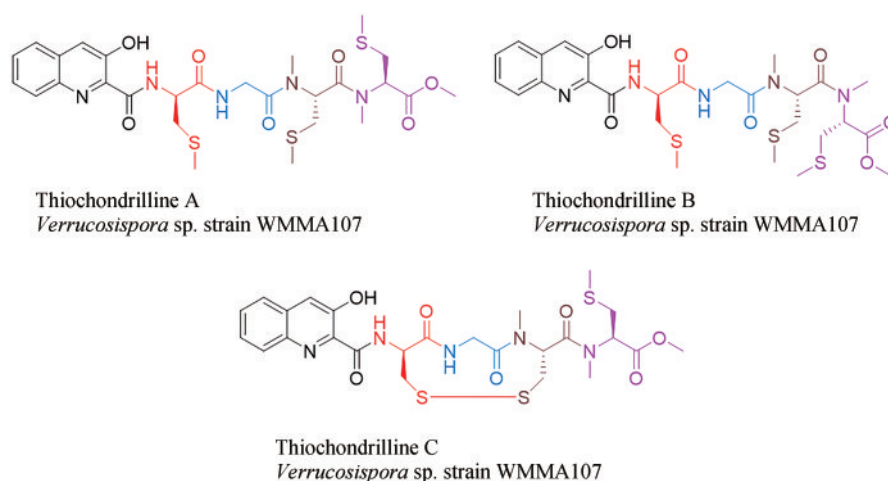


图10 Thiochondrillines A~C的结构

Fig. 10 Structures of thiochondrillines A~C

基-D-半胱氨酸的侧链巯基会形成二硫键。按照双嵌入家族化合物的定义，Thiochondrilline A~C不属于双嵌入家族化合物，但显然其生源与Thiocoraline密切相关。Thiocoraline中形成硫酯键的巯基和羧基在Thiochondrilline A~C中都发生了甲基化，而没有形成硫酯键。Thiochondrilline A~C也是唯一一类分离到的只有一条肽链的双嵌入家族化合物类似物。它们的抗肿瘤活性弱于12'-sulfoxythiocoraline。

Thiocoraline的类似物还有Verrucosamide和BE-22179（图11）。Verrucosamide由*Verrucospora* sp. CNX-026产生，它没有在三条肽链之间形成二硫键^[67]。Verrucosamide的同一条肽链的氨基酸C和氨基酸D的侧链以硫醚键连在一起，形成了1,4-硫氮杂环庚烷（1,4-thiazepane）结构。据推测，Verrucosamide的氨基酸D和BE-22179一样是N-甲基脱氢丙氨酸，而氨基酸C即N-甲基-L-半胱氨酸的侧链巯基没有形成二硫键而是亲核进攻N-甲基

脱氢丙氨酸的β碳，从而形成1,4-硫氮杂环庚烷结构。Verrucosamide是唯一一种不含二硫键或硫缩醛桥的八肽类双嵌入家族化合物，具有一定的抗肿瘤活性。BE-22179由*Streptomyces* sp. A22179产生^[68]，它和Thiocoraline的区别在于BE-22179的氨基酸D是N-甲基脱氢丙氨酸。BE-22179是很强的拓扑异构酶II抑制剂^[68-69]。

2.4 十肽类

十肽类化合物的显著特征是包含氨基酸B。氨基酸B是含六元氮杂环结构的氨基酸，在Sandramycin、Quinaldopeptin、江西肽菌素（Jiangxipeptins）中是哌啶酸（Pipicolinic acid, Pip），在吕宋肽菌素（Luzopeptins）、Quinoxapeptins、Korkormicins中是4-羟基-2,3,4,5-四氢吡嗪-3-羧酸（4-hydroxyl-dehydropiperazic acid, 4OHdPiz）

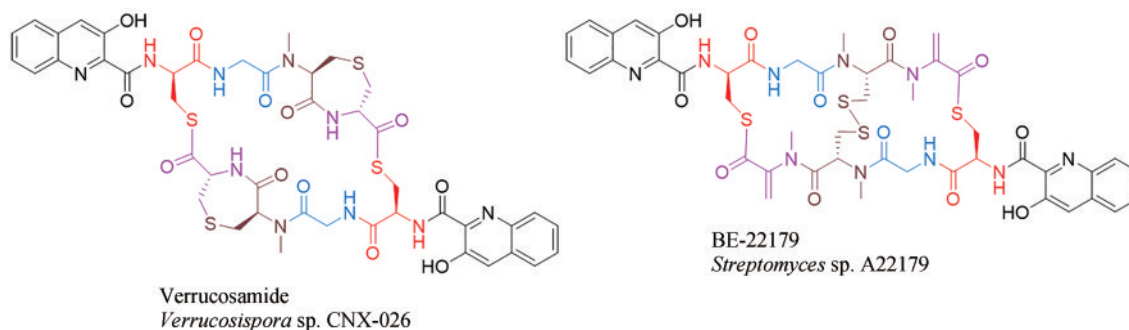


图11 Verrucosamide和BE-22179的结构

Fig. 11 Structures of verrucosamide and BE-22179

(图12)。Pip和dPip都可以像脯氨酸一样引发肽链转角，因此它们在十肽类双嵌入家族化合物中的作用可能是增加结构刚性^[70-71]。而八肽类化合物绝大多数是用二硫键或硫缩醛桥来加固大环结构，Verrucosamide用1,4-硫氮杂环庚烷结构来加固大环结构。

Sandramycin由*Kribbella sandramycini*产生，其氨基酸组成为3HQA、D-丝氨酸、L-Pip、甘氨酸、肌氨酸、N-甲基-L-缬氨酸^[14]。Sandramycin除了抗肿瘤和抗菌活性外还是HIV-1逆转录酶抑制剂^[14, 72]。Quinaldopeptin由*Streptoverticillium album* Q132-6产生，其氨基酸组成为3HQA、D-2,3-二氨基丁酸、L-Pip、甘氨酸、肌氨酸、L-Pip，与Sandramycin仅有两处不同^[15]。其中D-2,3-二氨基丁酸的存在使得Quinaldopeptin的两条肽链不是以

酯键首尾相连，而是形成了肽键。Quinaldopeptin对致病真菌新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)有很好的活性，除此之外的生物活性与Sandramycin类似^[15]。

江西肽菌素由*Lentzea jiangxiensis*产生^[13]，它的两个芳杂环都是QA，是仅有的不含3HQA或QXCA结构的双嵌入家族化合物。江西肽菌素A的氨基酸组成为QA、D-丝氨酸、(3*S*,5*R*)-L-3,5-二羟基哌啶酸(diOHPip)、甘氨酸、肌氨酸、(2*S*,3*S*)-L-β-羟基-N,γ-二甲基别异亮氨酸。江西肽菌素B和C是diOHPip的3位羟基上有异丁酰化修饰的江西肽菌素A。

吕宋肽菌素由*Actinomadura luzonensis*产生^[11-12]，Korkormicin由*Micromonospora* sp. ATCC 55011产生^[17]，Quinoxapeptin由*Nocardioform actinomycete*

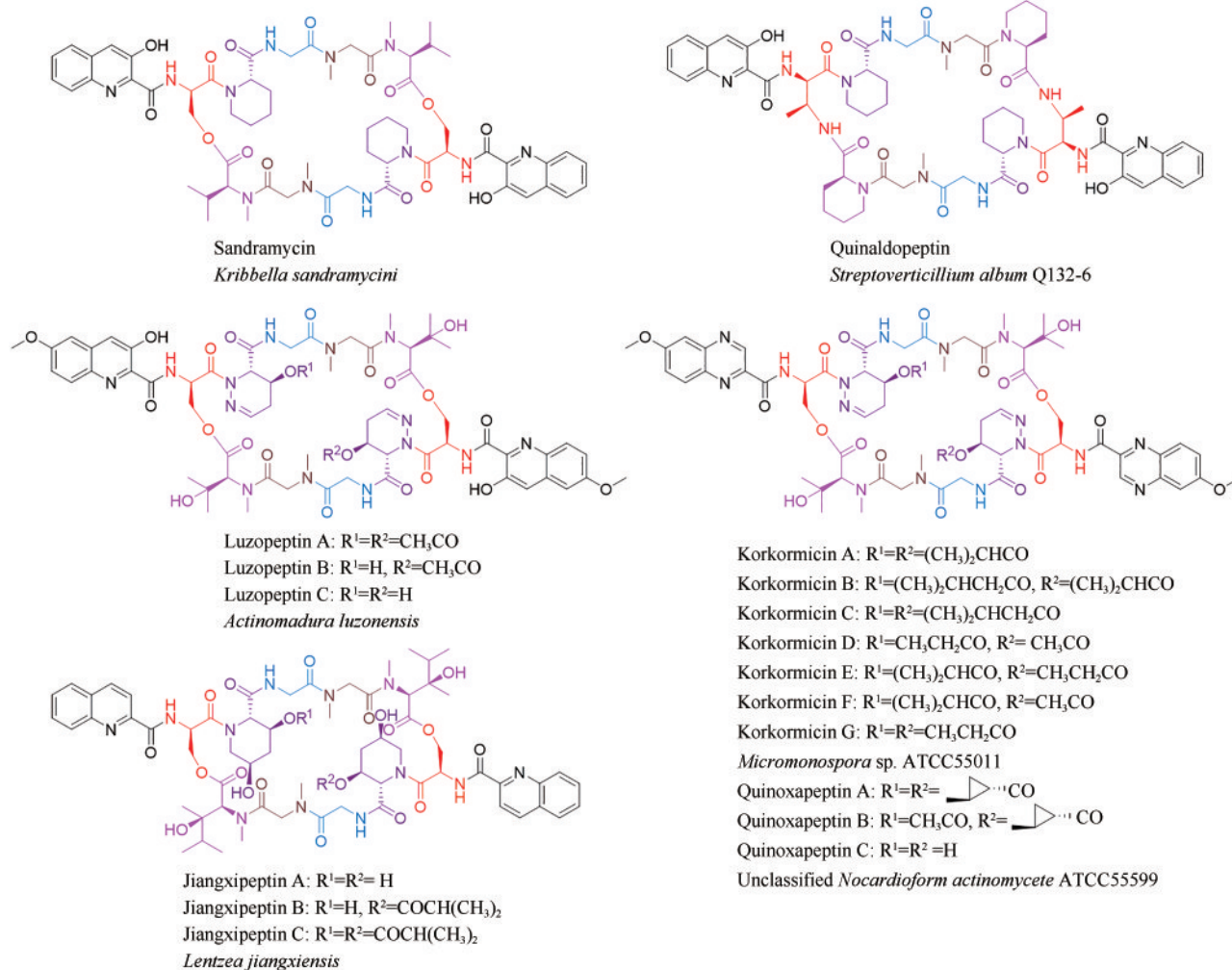


图12 十肽类双嵌入家族化合物的结构

Fig. 12 Structures of the major scaffold type of bisintercalators

ATCC55599产生^[16]。这三组化合物的芳杂环上有额外的6位甲氧基修饰。吕宋肽菌素C的氨基酸组成为6-甲氧基-3HQA、D-丝氨酸、4-羟基-2,3,4,5-四氢吡嗪-3-羧酸(4-hydroxyl-dehydropiperazic acid, 4OHdPiz)、甘氨酸、肌氨酸、L- β -羟基-N-甲基缬氨酸^[11-12]。吕宋肽菌素B和吕宋肽菌素A相当于单乙酰化和双乙酰化的吕宋肽菌素,乙酰化的位置是4OHdPiz结构的羟基。实际上4OHdPiz的4位羟基在整个分子中的相对位置相当于江西肽菌素diOHPip的3位羟基,4OHdPiz的脞结构的碳原子的相对位置相当于江西肽菌素diOHPip有羟基修饰的5位碳,4OHdPiz可以看做是多一个氮原子并发生脱水的diOHPip。

Quinoxapeptin、Korkormicin的芳杂环是6-甲氧基-QXCA,其氨基酸A~E除了4OHdPiz上的酰基化修饰外与吕宋肽菌素C完全一致^[16-17]。实际上Quinoxapeptins A、B和Korkormicin可以看做是酰基化的Quinoxapeptin C。但是Quinoxapeptin C是人工合成的产物^[73]。从生物合成角度讲,Quinoxapeptin C是Quinoxapeptins A、B和Korkormicin的前体,但是目前还未有人从细菌中分离到Quinoxapeptin C。Korkormicins A~G中4OHdPiz上的酰基包括了乙酰基、丙酰基、异丁酰基、异戊酰基,说明Korkormicin的BGC中的酰基转移酶底物选择性较为宽泛。Quinoxapeptin A中4OHdPiz上的酰基是两个2-甲基环丙烷-1-羧酸的酰基,Quinoxapeptin B则含有一个乙酰基。

Korkormicin A在小鼠模型中有很好的抗肿瘤活性,对革兰氏阴性菌没有活性,对革兰氏阳性菌有抑菌活性^[17]。吕宋肽菌素和棘霉素一样,对恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)有很好的活性^[74]。吕宋肽菌素、Quinoxapeptin除了有抗菌和抗肿瘤活性外都是HIV-1逆转录酶抑制剂^[16, 45, 75]。构效关系研究表明,4OHdPiz上的乙酰化程度对活性有显著影响^[73, 75]。吕宋肽菌素中,双乙酰化的吕宋肽菌素A细胞毒性最强,而没有乙酰化的吕宋肽菌素C最弱;人工合成的没有乙酰化的Quinoxapeptin C的细胞毒性同样弱于Quinoxapeptin A和B。对多种细菌的抑菌活性同样是吕宋肽菌素A强于吕宋肽菌素B,而吕宋肽菌素C最弱。对HIV-1逆转录酶的抑制活性却是吕宋肽菌素C

最强,而吕宋肽菌素A最弱;Quinoxapeptin C的HIV-1逆转录酶抑制活性同样强于Quinoxapeptin A和B。

2.5 结构和活性总结

双嵌入家族化合物的结构多样性主要来源于芳杂环的差异、氨基酸种类和数量的差异以及修饰的差异。芳杂环大部分情况下是3HQA或QXCA,有时候会出现QA、6-甲氧基-3HQA或6-甲氧基-QXCA,个别化合物的两处芳杂环不同。十肽类化合物中六元氮杂环的氨基酸B增加了结构刚性,八肽类化合物虽然没有氨基酸B,但氨基酸D都是半胱氨酸,两个半胱氨酸的侧链巯基可以形成二硫键,或进一步转化为硫缩醛桥,这可能是另一种增强结构刚性的方法。Verrucosamide是唯一一种不含二硫键或硫缩醛桥的八肽类化合物,它的同一条肽链上氨基酸C和氨基酸D的侧链以硫醚键连在一起,形成了特殊的1,4-硫氮杂环庚烷结构。十肽类化合物的氨基酸B上还可以发生氧化和酰基化修饰,八肽类化合物的硫缩醛桥上S-烷基也可以延伸到不同的长度,硫原子还可以被氧化成亚砷结构。此外,氨基酸A、C、E也各有差异,连接两条肽链的酯键也可以发生水解。以上这些因素都使得双嵌入家族化合物的结构更加多样化。

双嵌入家族非核糖体肽以分子内的两个芳杂环嵌入DNA双螺旋相邻的两个小沟之中,干扰DNA的复制、转录等过程,因而具有良好的生物活性。所有双嵌入家族化合物都有良好的抗肿瘤活性。其中,棘霉素曾经进入治疗软组织肉瘤的II期临床试验^[37]。双嵌入家族化合物的抗菌活性则主要针对革兰氏阳性菌,因为分子太大使得它们难以进入革兰氏阴性菌细胞内^[67],比如棘霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐万古霉素粪肠球菌都有很强的抗菌效果^[40-42]。此外,一些双嵌入家族化合物还有抗真菌、抗疟、抗病毒等额外的活性。

双嵌入家族化合物的结构差异使得它们在抗菌和抗肿瘤活性上的强弱和选择性有所不同。八肽类化合物中酯键的水解、亚砷结构的形成都使得分子结构更加新颖,却使得生物活性降低。棘

霉素氨基酸E侧链烷基延长也会导致活性下降，这应该也是在 Quinomycin 系列化合物中棘霉素产量最高的原因。SW-163 系列化合物中硫缩醛桥结构的形成可以增强生物活性，硫原子上烷基的延长可以进一步提高活性。Thiocoraline 的只含一条肽链的类似物活性显著弱于 Thiocoraline。十肽类化合物普遍具有 HIV-1 逆转录酶抑制活性，氨基酸B上的酰基化修饰也对生物活性有重大影响。

3 双嵌入家族非核糖体肽的生物合成途径

双嵌入家族非核糖体肽分子结构复杂，化学合成困难，微生物发酵是生产此类化合物的重要方法。因此，研究它们的生物合成途径有重大意义。目前，已经有很多双嵌入家族化合物的生物

合成基因簇被报道，其中已知八肽类的基因簇包括 *Streptomyces griseovariabilis* subsp. *bandungensis* 中棘霉素的BGC (*qui* 基因簇)^[30], *Streptomyces lasaliensis* 中棘霉素的BGC (*ecm* 基因簇)^[76], *Micromonospora* sp. ML1 中 Thiocoraline 的 BGC (*tio* 基因簇)^[63], *Streptomyces triostinicus* 中三骨菌素的BGC (*trs* 基因簇)^[55], *Streptomyces* sp. SNA15896 中 SW-163 的 BGC (*swb* 基因簇)^[77] (图 13); 已知十肽类的基因簇包括 *Actinomadura luzonensis* 中吕宋肽菌素的 BGC (*luz* 基因簇)^[13], *Micromonospora* sp. ATCC 55011 中 Korkormicins 的 BGC (*kor* 基因簇)^[13], *Lentzea jiangxiensis* 中江西肽菌素的 BGC (*jxp* 基因簇)^[13], *Kribbella sandramycini* 中 Sandramycin 的 BGC (*sdm* 基因簇)^[13] (图 14)。经过大量的研究，这些化合物的生物合成途径已经基本得到阐明。与这些化合物的结构相似性相对应，它们的基因簇以及生物合成途径也存在许多共同之处^[10]。

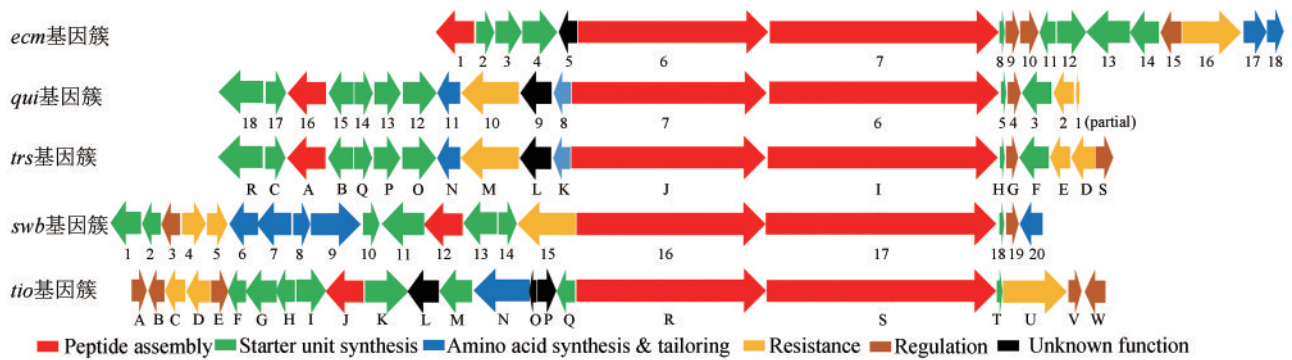


图 13 八肽类双嵌入家族化合物生物合成基因簇

Fig. 13 BGCs of the bisintercalators belong to the minor scaffold type family

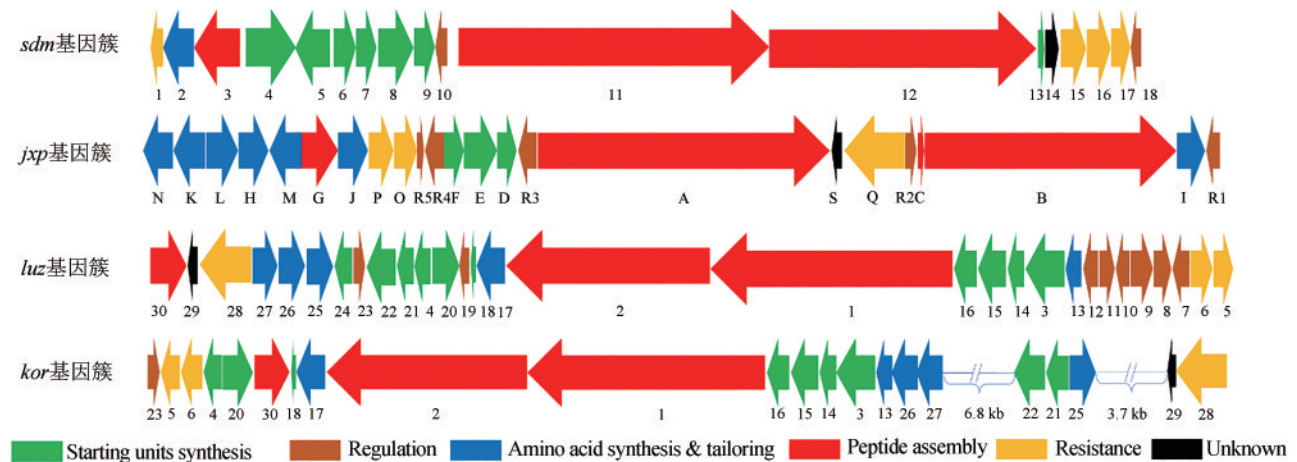


图 14 十肽类双嵌入家族化合物生物合成基因簇

Fig. 14 BGCs of the bisintercalators belong to the major scaffold type family

3.1 肽链的装配

双嵌入家族化合物的肽链由NRPS组装。NRPS可以在同一个酶中包含一个或多个结构域，一个或多个NRPS组成一条包含多个结构域的装配线（assembly line），负责一条肽链的合成^[1]。NRPS装配线中相邻的若干个结构域组成一个模块，每个模块负责将一个氨基酸连到肽链C端。每个模块含有3个基本的结构域：硫醇化结构域（thiolation domain, T结构域），其活性位点的丝氨酸残基侧链的羟基会被磷酸泛酰巯基乙胺（phosphopantethein）修饰，磷酸泛酰巯基乙胺的巯基通过与氨基酸形成硫酯键使氨基酸或延伸中的肽链结合在T结构域上；腺苷化结构域（adenylation domain, A结构域），可以特异性地活化氨基酸，并将其结合到T结构域上；缩合结构域（condensation domain, C结构域），催化上一个模块T结构域上的肽链与本模块T结构域上的氨基酸形成肽键，使肽链延长。NRPS装配线的最后一般有一个硫酯酶结构域（thioesterase domain, TE结构域），负责通过水解或肽链内亲核基团引发的环合来使延伸完成的肽链从最后一个T结构域上解离下来。NRPS装配线的每个模块中都有可能存在C、A、T三个结构域以外的修饰结构域，如差向异构化结构域（epimerization domain, E结构域）和N-甲基转移酶结构域（methyltransferase domain, M结构域）。E结构域可以将L构型的氨基酸转化为D构型，M结构域可以催化氨基酸的N-甲基化。

八肽类双嵌入家族化合物的肽链合成起始于3HQA和QXCA这两种芳杂环^[10]。3HQA或QXCA在连接酶（TioJ、Swb12、TrsA、Ecm1、Qui16）催化下，结合到参与脂肪酸生物合成的酰基载体蛋白FabC上（图15）。*qui*基因簇、*ecm*基因簇、*tio*基因簇、*trs*基因簇、*swb*基因簇中都有两个巨大的NRPS，即Qui7和Qui6、Ecm6和Ecm7、TioR和TioS、TrsI和TrsJ、Swb16和Swb17，这些NRPS均含两个模块，模块数量及其中的结构域分布符合相应化合物的肽链结构。其中第一个模块的C结构域催化FabC上的3HQA或QXCA与第一个模块T结构域上的丝氨酸或半胱氨酸形成肽键，然后经过两个NRPS的其余模块的催化形成完整的肽链，而Qui6、Ecm7、TioS、TrsJ、Swb17末端的TE结构域催化肽链的二聚，形成双嵌入家族化合物基本的中心对称大环结构。

十肽类化合物的BGC中也有两个巨大的NRPS，即Luz1和Luz2、Kor1和Kor2、JxpA和JxpB、Sdm11和Sdm12（图14）。其中Luz2、Kor2、JxpB和Sdm12的结构域组成与来源于八肽类化合物BGC的Qui6、Ecm7、TioS、TrsJ和Swb17完全相同，而Luz1、Kor1、JxpA和Sdm11的结构域组成是C-A-T-E-C-A-T-C-A-T，相比Qui7、Ecm6、TioR、TrsI、Swb16在中间多了一个模块，这一模块应当是对应氨基酸B的组装^[13]。此外，不同于八肽类化合物，目前已知的十肽类化合物作为肽链合成起始单元的芳杂环包括6-甲氧基-QXCA、6-甲氧基-3HQA、QA和3HQA四种。但是这些芳

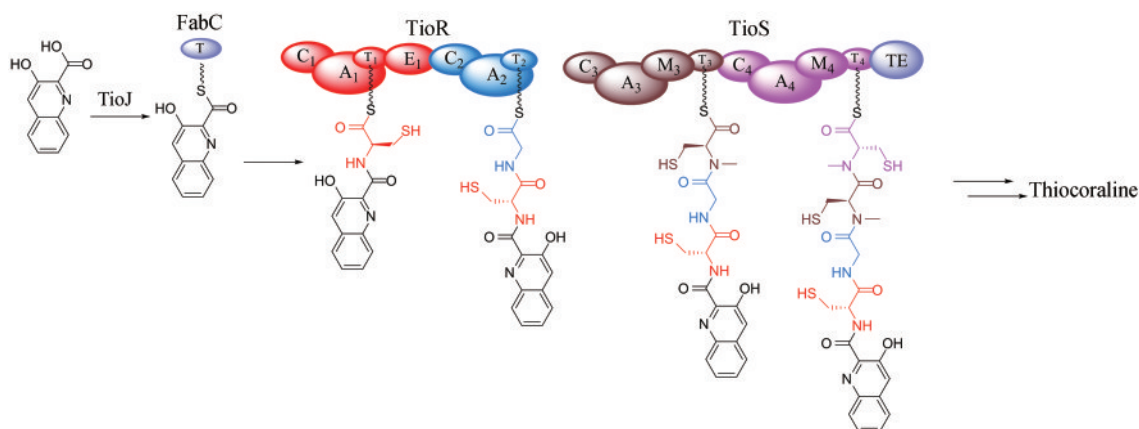


图15 Thiocoraline生物合成途径中的肽链组装过程

Fig. 15 Peptide assembly in the thiocoraline biosynthetic pathway

杂环的活化以及后续肽链的组装、二聚、释放应该与八肽类化合物类似。

3.2 起始单元的生物合成

3HQA 和 QXCA 这两种芳杂环都由 L-色氨酸转化而来 (图 16)^[10]。TioK、Swb11、TrsR、Ecm13、Qui18 是包含一个 A 结构域和一个 T 结构域的 NRPS，它会用 A 结构域将 L-色氨酸活化并连接到 T 结构域上^[30]。细胞色素 P450 (TioI、Swb13、TrsB、Ecm12、Qui15) 催化 L-色氨酸的 β -羟化。之后，只含一个 TE 结构域的 NRPS (TioQ、Swb14、TrsQ、Ecm2、Qui14) 催化 L- β -羟基色氨酸与 T 结构域形成的硫酯键的水解，得到游离的 L- β -羟基色氨酸。色氨酸双加氧酶 (TioF、Swb10、

TrsC、Ecm11、Qui17) 催化 L- β -羟基色氨酸的吲哚环的氧化开环，形成 *N*-醛基- β -羟基犬尿氨酸，再经 *N*-甲酰基的水解形成 β -羟基犬尿氨酸^[78]。在 SW-163 和 Thiocoraline 的生物合成中， β -羟基犬尿氨酸先经犬尿氨酸转氨酶 (TioG、Swb1) 催化转氨环合，形成 3,4-二羟基喹啉-2-羧酸，再在氧化还原酶 (TioH、Swb2) 的催化下，脱去 4 位羟基形成 3HQA。在三骨菌素、棘霉素的生物合成中， β -羟基犬尿氨酸经氧化重排、脱氢、环合、脱羧、芳香化，形成 QXCA。在 3HQA 的生物合成中， β -羟基犬尿氨酸的 β -羟基最终转化为 3HQA 中的 3 位羟基^[78]。江西肽菌素的芳杂环是 QA，没有 3 位羟基，原因是 *jxp* 基因簇中缺少催化 L-色氨酸的 β -羟化的三个酶^[13]。

吕宋肽菌素、Quinoxapeptin、Korkormicin 的

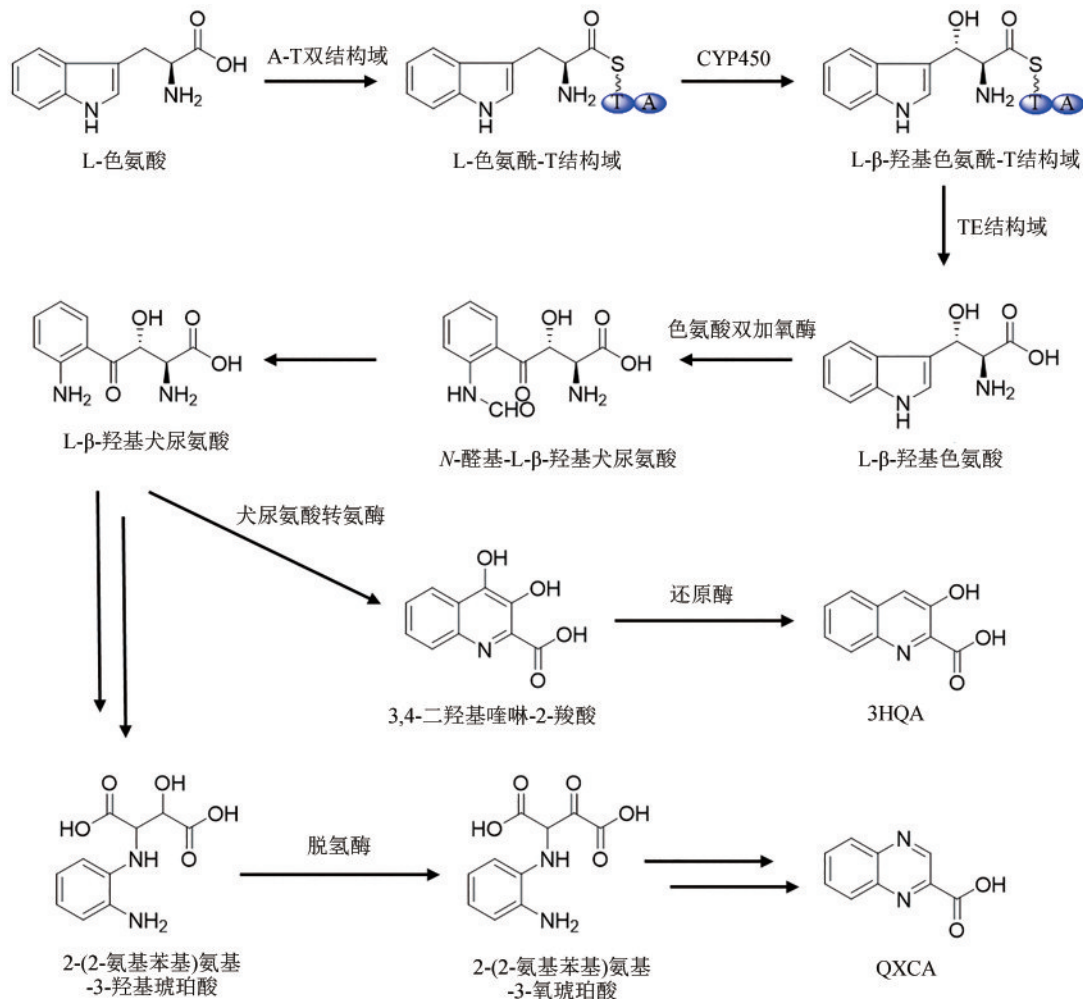


图 16 3HQA 和 QXCA 的生物合成途径

Fig. 16 Biosynthetic pathways for 3HQA and QXCA

芳杂环是6-甲氧基-3HQA或6-甲氧基-QXCA，它们的生物合成同样起始于L-色氨酸（图17）。首先是新型的血红素依赖的色氨酸-5-羟化酶（Luz15、Kor15）将L-色氨酸转化为L-5-羟基色氨酸，然后甲基转移酶（Luz16、Kor16）将L-5-羟基色氨酸转化为L-5-甲氧基色氨酸^[79]。之后的反应几乎与3HQA和QXCA的生物合成途径一致。吕宋肽菌素和Korkormicin的BGC中有TioK、TioI、TioQ、TioE的同源蛋白（Luz3和Kor3、Luz20和Kor20、Luz4和Kor4、Luz14和Kor14），将L-5-甲氧基色氨酸经 β -羟化和开环氧化转化为N-醛基-L- β -羟基-5-甲氧基犬尿氨酸，进而水解得到L- β -羟基-5-甲氧基犬尿氨酸。在吕宋肽菌素的生物合成中，TioG、TioH的同源蛋白Luz22和Luz21将 β -羟基-5-甲氧基犬尿氨酸转化为6-甲氧基-3HQA；在Korkormicin的生物合成中， β -羟基-5-甲氧基犬尿氨酸则转化为6-甲氧基-QXCA。Quinoxapeptin的BGC目前还未鉴定，但可以推测Quinoxapeptin、Korkormicin的起始单元生物合成、肽链组装过程完全一致。

3.3 肽链形成后的修饰过程

NRPS催化大环结构形成后，肽链上还会发生进一步的修饰，如Thiocoraline、三骨菌素、SW-163C中会形成二硫键^[54, 63, 77]。三骨菌素A中二硫键经甲基化转化为硫缩醛桥就形成了棘霉素，而SW-163C中二硫键变为硫缩醛桥则形成SW-163D，SW-163D的进一步甲基化会形成SW-163E~G^[54, 77]。

在江西肽菌素（Jiangxipeptin）、吕宋肽菌素（Luzopeptin）、Quinoxapeptin、Korkormicin的生物合成中，后修饰发生在氨基酸B（Piz或Pip）和氨基酸E上，由细胞色素P450（cytochrome P450，CYP450）和酰基转移酶催化^[13]。在吕宋肽菌素和Korkormicin的生物合成中，CYP450酶Luz25和Kor25催化两个氨基酸E（缬氨酸）的 β -羟化，双功能酶Luz26和Kor26催化 β -羟化和脱氢反应将两个Piz转化为4OHdPiz^[13]。江西肽菌素的BGC同样有多个CYP450，催化两个氨基酸E（ γ -甲基别异亮氨酸）的 β -羟化以及两个Pip上的四处羟化，而且Pip上羟化的位置刚好对应Piz羟化和脱氢的位置（图18）^[13]。之后，酰基转移酶（Luz27、Kor27、

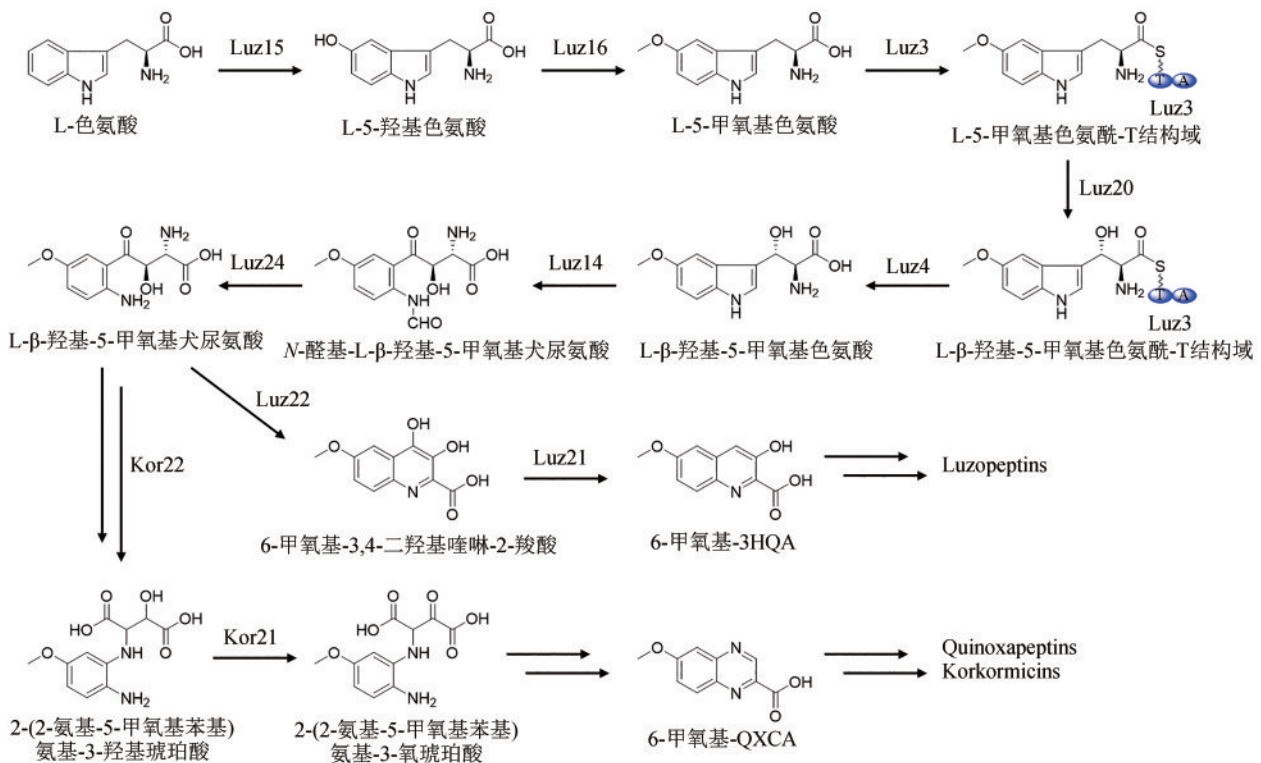


图17 推测的6-甲氧基-3HQA和6-甲氧基-QXCA的生物合成途径

Fig. 17 Proposed biosynthetic pathways for 6-MeO-3HQA and 6-MeO-QXCA

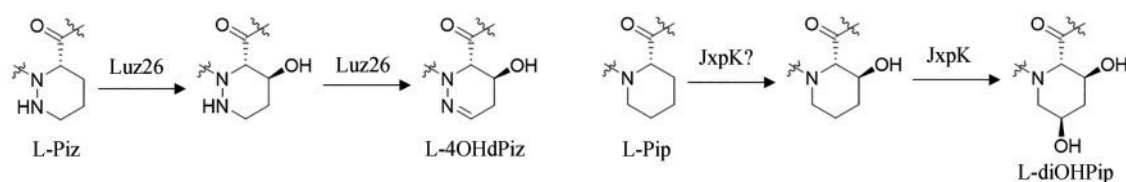


图 18 推测的 4OHdPiz 和 diOHPip 结构的形成过程

Fig. 18 Proposed reactions for the formation of 4OHdPiz and diOHPip moieties

JxpN) 催化 4OHdPiz 和 diOHPip 上 β -羟基的酰基化。Luz27 特异性地使用乙酰辅酶 A 催化乙酰化反应, JxpN 特异性地催化异丁酰化反应, 而 Kor27 对酰基辅酶 A 的选择性较差。

4 挑战与展望

双嵌入家族化合物是一类来源于放线菌的具有独特结构和良好生物活性的非核糖体肽。良好的抗肿瘤活性使该类化合物有望开发成为药物。双嵌入家族化合物的结构差异既使得它们在抗菌和抗肿瘤活性上的强弱和选择性有所不同, 又赋予了它们抗真菌、抗疟、抗病毒等额外的活性。双嵌入家族非核糖体肽分子结构复杂, 化学合成困难, 微生物发酵是生产此类化合物的重要方法, 组合生物合成以及前体导向的生物合成都是对此类化合物进行结构改进的重要方法。而生物合成途径的解析有助于通过控制调控基因提高产量, 并为结构改造提供基础元件。目前, 已经有很多双嵌入家族化合物的生物合成途径得到研究, 肽链组装、起始单元(芳杂环)的生物合成、后修饰过程已基本阐明。其中, 芳杂环由色氨酸经过修饰和氧化开环、合环等过程转化而来; 肽链的合成需要 NRPS 以及脂肪酸生物合成过程中的酰基载体蛋白 FabC 的参与, 并由 TE 结构域实现二聚; 而后修饰过程在八肽类化合物和十肽类化合物中截然不同, 前者主要是二硫键和硫缩醛桥的形成, 后者主要是含六元氮杂环结构的氨基酸 B 上的修饰。

但是, 目前双嵌入家族化合物的生物合成仍有许多地方不清楚, 比如 QXCA 的合成过程、十肽类化合物的酰基化机理、Verrucosamide 的 1,4-硫氮杂环庚烷结构的形成机理。这些问题仍然亟

待回答, 从而彻底阐明双嵌入家族化合物的生物合成途径。这一过程既可以为双嵌入家族化合物的结构改造奠定基础, 又可以帮助发现一些具有全新催化活性的酶。

微生物天然产物的组合生物合成是增加化合物多样性从而获取活性更好、副作用更小的化合物的重要方法。有关于非核糖体肽的组合生物合成的研究非常多, 但是极少有关于双嵌入家族化合物的组合生物合成的报道。近年来新发现的十肽类化合物的 BGC 极大丰富了双嵌入家族化合物的生物合成元件, 为组合生物合成奠定了良好的基础。未来有望通过这种方法高效增加双嵌入家族化合物的多样性。而已有的关于构效关系的知识可以指导组合生物合成的方向。

除了组合生物合成, 自然界的演化也可以增加化合物的多样性。传统的菌株发酵和分离方法会导致已知化合物的反复分离, 如棘霉素光是在公开报道中就被分离了近 20 次。随着双嵌入家族化合物的生物合成途径的解析, 在数据库的基因组数据中进行靶向挖掘可以提高发现新化合物的效率, 提前排除已知化合物, 从而发现更多大自然为人们准备的双嵌入家族化合物。江西肽菌素的发现就是这样一个案例。通过靶向挖掘和组合生物合成增加双嵌入家族化合物的种类, 将有力推动这类化合物开发成药。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] LEE K S, LEE B M, RYU J H, et al. Increased vancomycin production by overexpression of MbtH-like protein in *Amycolatopsis orientalis* KFCC10990P[J]. Letters in Applied

- Microbiology, 2016, 63(3): 222-228.
- [3] 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.
- [4] LAWEN A. Biosynthesis of cyclosporins and other natural peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase inhibitors[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1850(10): 2111-2120.
- [5] SHEN B, DU L, SANCHEZ C, et al. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2001, 27(6): 378-385.
- [6] ZOLOVA O E, MADY A S A, GARNEAU-TSODIKOVA S. Recent developments in bisintercalator natural products[J]. Biopolymers, 2010, 93(9): 777-790.
- [7] DAWSON S, MALKINSON J P, PAUMIER D, et al. Bisintercalator natural products with potential therapeutic applications: isolation, structure determination, synthetic and biological studies[J]. Natural Product Reports, 2007, 24(1): 109-126.
- [8] UEDA M, TANIGAWA Y, OKAMI Y, et al. A new toxic antibiotic, actinoleukin, produced by a streptomycete[J]. The Journal of Antibiotics, 1954, 7(4): 125-126.
- [9] CARTER H E, SCHAFFNER C P, GOTTLIEB D. Levomycin. I. Isolation and chemical studies[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1954, 53(1): 282-293.
- [10] FERNÁNDEZ J, MARÍN L, ALVAREZ-ALONSO R, et al. Biosynthetic modularity rules in the bisintercalator family of antitumor compounds[J]. Marine Drugs, 2014, 12(5): 2668-2699.
- [11] KONISHI M, OHKUMA H, SAKAI F, et al. BBM-928, a new antitumor antibiotic complex. III. Structure determination of BBM-928 A, B and C[J]. The Journal of Antibiotics, 1981, 34(2): 148-159.
- [12] KONISHI M, OHKUMA H, SAKAI F, et al. Structures of BBM-928 A, B, and C. Novel antitumor antibiotics from *Actinomadura luzonensis*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1981, 103(5): 1241-1243.
- [13] SHI X J, HUANG L M, SONG K H, et al. Enzymatic tailoring in luzopeptin biosynthesis involves Cytochrome P450-mediated carbon-nitrogen bond desaturation for hydrazone formation[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(36): 19821-19828.
- [14] MATSON J A, COLSON K L, BELOFSKY G N, et al. Sandramycin, a novel antitumor antibiotic produced by a *Nocardioidea* sp. II. Structure determination[J]. The Journal of Antibiotics, 1993, 46(1): 162-166.
- [15] TODA S, SUGAWARA K, NISHIYAMA Y, et al. Quinaldopeptin, a novel antibiotic of the quinomycin family[J]. The Journal of Antibiotics, 1990, 43(7): 796-808.
- [16] LINGHAM R B, HSU A H M, O'BRIEN J A, et al. Quinoxapeptins: novel chromodepsipeptide inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase. I. The producing organism and biological activity[J]. The Journal of Antibiotics, 1996, 49(3): 253-259.
- [17] LAM K S, GUSTAVSON D R, HESLER G A, et al. Korkormicins, novel depsipeptide antitumor antibiotics from *Micromonospora* sp C39500: fermentation, precursor directed biosynthesis and biological activities[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1995, 15(1): 60-65.
- [18] RATNAYAKE A S, CHANG L P, TUMEY L N, et al. Natural product bis-intercalator depsipeptides as a new class of payloads for antibody-drug conjugates[J]. Bioconjugate Chemistry, 2019, 30(1): 200-209.
- [19] WARING M J, WAKELIN L P G. Echinomycin: a bifunctional intercalating antibiotic[J]. Nature, 1974, 252(5485): 653-657.
- [20] TAKUSAGAWA F. The role of the cyclic depsipeptide rings in antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 1985, 38(11): 1596-1604.
- [21] RACKHAM B D, HOWELL L A, ROUND A N, et al. Non-covalent duplex to duplex crosslinking of DNA in solution revealed by single molecule force spectroscopy[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2013, 11(48): 8340-8347.
- [22] MAZZITELLI C L, CHU Y J, RECZEK J J, et al. Screening of threading bis-intercalators binding to duplex DNA by electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007, 18(2): 311-321.
- [23] CHEN H, PATEL D J. Solution structure of a quinomycin bisintercalator-DNA complex[J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 246(1): 164-179.
- [24] CORBAZ R, ETTLINGER L, GÄUMANN E, et al. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 7. Mitteilung. Echinomycin[J]. Helvetica Chimica Acta, 1957, 40(1): 199-204.
- [25] YOSHIDA T, KATAGIRI K, YOKOZAWA S. Studies on quinoxaline antibiotics. II. Isolation and properties of quinomycins A, B and C[J]. The Journal of Antibiotics, 1961, 14: 330-334.
- [26] KATAGIRI K, SHOJI J, YOSHIDA T. Identity of levomycin and quinomycin A (echinomycin) [J]. The Journal of Antibiotics, 1962, 15: 273.
- [27] LU Q P, YE J J, HUANG Y M, et al. Exploitation of potentially new antibiotics from mangrove Actinobacteria in Maowei Sea by combination of multiple discovery strategies [J]. Antibiotics, 2019, 8(4): 236.

- [28] STEINEROVÁ N, LIPAVSKÁ H, STAJNER K, et al. Production of quinomycin A in *Streptomyces lasaliensis*[J]. Folia Microbiologica, 1987, 32(1): 1-5.
- [29] YANG Z J, SHAO L, WANG M X, et al. Two novel quinomycins discovered by UPLC-MS from *Streptomyces* sp. HCCB11876[J]. The Journal of Antibiotics, 2019, 72(3): 164-168.
- [30] ZHANG C, KONG L X, LIU Q, et al. *In vitro* characterization of echinomycin biosynthesis: formation and hydroxylation of L-tryptophanyl-S-enzyme and oxidation of (2S, 3S) β -hydroxytryptophan[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56772.
- [31] LIU H M, QIN S, WANG Y X, et al. Insecticidal action of quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2243-2248.
- [32] MARTIN D G, MIZSAK S A, BILES C, et al. Structure of quinomycin antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 1975, 28(4): 332-336.
- [33] SHOJI J I, TORI K, OTSUKA H. Configuration of *N*, β -dimethylleucine, a constituent amino acid of triostin C[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1965, 30: 2772-2776.
- [34] OTSUKA H, SHOKI J. Configuration of the *N*-methylisoleucine, a constituent amino acid of triostin B and quinomycin B[J]. The Journal of Antibiotics, 1965, 18: 134.
- [35] YOSHIDA T, KATAGIRI K. Influence of isoleucine upon quinomycin biosynthesis by *Streptomyces* sp. 732[J]. Journal of Bacteriology, 1967, 93(4): 1327-1331.
- [36] SHOJI J, KONAKA R, KAWANO K, et al. Presence of isomers in quinomycin E[J]. The Journal of Antibiotics, 1976, 29(11): 1246-1248.
- [37] GRADISHAR W J, VOGELZANG N J, KILTON L J, et al. A phase II clinical trial of echinomycin in metastatic soft tissue sarcoma. An Illinois Cancer Center Study[J]. Investigational New Drugs, 1995, 13(2): 171-174.
- [38] KONG D H, PARK E J, STEPHEN A G, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity[J]. Cancer Research, 2005, 65(19): 9047-9055.
- [39] ZIMMERMANN S M, WÜRGLER-HAURI C C, WANNER G A, et al. Echinomycin in the prevention of heterotopic ossification-an experimental antibiotic agent shows promising results in a murine model[J]. Injury, 2013, 44(4): 570-575.
- [40] KIM J B, LEE G S, KIM Y B, et al. *In vitro* antibacterial activity of echinomycin and a novel analogue, YK2000, against vancomycin-resistant enterococci[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 24(6): 613-615.
- [41] SOCHA A M, LAPLANTE K L, RUSSELL D J, et al. Structure-activity studies of echinomycin antibiotics against drug-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19(5): 1504-1507.
- [42] PARK Y S, SHIN W S, KIM S K. *In vitro* and *in vivo* activities of echinomycin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 61(1): 163-168.
- [43] MINOR P D, DIMMOCK N J. Selective inhibition of influenza virus protein synthesis by inhibitors of DNA function [J]. Virology, 1977, 78(2): 393-406.
- [44] JAYASURIYA H, ZINK D L, POLISHOOK J D, et al. Identification of diverse microbial metabolites as potent inhibitors of HIV-1 Tat transactivation[J]. Chemistry & Biodiversity, 2005, 2(1): 112-122.
- [45] BOGER D L, ICHIKAWA S, TSE W C, et al. Total syntheses of thiocoraline and BE-22179 and assessment of their DNA binding and biological properties[J]. Journal of the American Chemical Society, 2001, 123(4): 561-568.
- [46] CASTILLO U, HARPER J K, STROBEL G A, et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 224(2): 183-190.
- [47] ESPINOSA A, SOCHA A M, RYKE E, et al. Antiamoebic properties of the actinomycete metabolites echinomycin A and tirandamycin A[J]. Parasitology Research, 2012, 111(6): 2473-2477.
- [48] HAYAKAWA Y, SONE R, AOKI H, et al. Quinomycins H1 and H2, new cytotoxic antibiotics from *Streptomyces* sp. RAL404[J]. The Journal of Antibiotics, 2018, 71(10): 898-901.
- [49] ZHEN X, GONG T, LIU F, et al. A new analogue of echinomycin and a new cyclic dipeptide from a marine-derived *Streptomyces* sp. LS298[J]. Marine Drugs, 2015, 13(11): 6947-6961.
- [50] BLUM S, FIELDER H P, GROTH I, et al. Biosynthetic capacities of actinomycetes. 4. Echinoserine, a new member of the quinoxaline group, produced by *Streptomyces tendae*[J]. The Journal of Antibiotics, 1995, 48(7): 619-625.
- [51] 黄麟, 许严伟, 匡岩巍, 等. 土壤放线菌 *Streptomyces* sp. 2215 代谢物的分离鉴定及抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(2): 235-238.
- HUANG L, XU Y W, KUANG Y W, et al. Purification and identification of antitumor secondary metabolites from soil *Streptomyces* sp. 2215[J]. Natural Product Research and Development, 2009, 21(2): 235-238.
- [52] SHOJI J I, KATAGIRI K. Studies on quinoxaline antibiotics. II. New antibiotics, triostins A, B and C[J]. The Journal of Antibiotics, 1961, 14: 335-339.

- [53] OTSUKA H, SHOJI J. The structure of triostin C[J]. *Tetrahedron*, 1965, 21(10): 2931-2938.
- [54] SATO M, NAKAZAWA T, TSUNEMATSU Y, et al. Echinomycin biosynthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(4): 537-545.
- [55] PRASEUTH A P, WANG C C C, WATANABE K, et al. Complete sequence of biosynthetic gene cluster responsible for producing triostin A and evaluation of quinomycin-type antibiotics from *Streptomyces triostinicus*[J]. *Biotechnology Progress*, 2008, 24(6): 1226-1231.
- [56] HOTTA K, KEEGAN R M, RANGANATHAN S, et al. Conversion of a disulfide bond into a thioacetal group during echinomycin biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(3): 824-828.
- [57] NAKAYA M, OGURI H, TAKAHASHI K, et al. Relative and absolute configuration of antitumor agent SW-163D[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(12): 2969-2976.
- [58] KUROSAWA K, TAKAHASHI K, TSUDA E. SW-163C and E, novel antitumor depsipeptides produced by *Streptomyces* sp. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2001, 54(8): 615-621.
- [59] RANCE M J, RUDDOCK J C, PACEY M S, et al. UK-63, 052 complex, new quinomycin antibiotics from *Streptomyces braeagensis* subsp. *Japonicus*; taxonomy, fermentation, isolation, characterisation and antimicrobial activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1989, 42(2): 206-217.
- [60] LIM C L, NOGAWA T, URAMOTO M, et al. RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2014, 67(4): 323-329.
- [61] DUNCAN K R, CRÜSEMANN M, LECHNER A, et al. Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species[J]. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(4): 460-471.
- [62] PEREZ BAZ J, CAÑEDO L M, FERNÁNDEZ PUENTES J L, et al. Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical properties and structure determination[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50(9): 738-741.
- [63] LOMBÓ F, VELASCO A, CASTRO A, et al. Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species[J]. *ChemBioChem*, 2006, 7(2): 366-376.
- [64] NEGRI A, MARCO E, GARCÍA-HERNÁNDEZ V, et al. Antitumor activity, X-ray crystal structure, and DNA binding properties of thiocoraline A, a natural bisintercalating thiodepsipeptide[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 50(14): 3322-3333.
- [65] ERBA E, BERGAMASCHI D, RONZONI S, et al. Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with anti-tumour activity[J]. *British Journal of Cancer*, 1999, 80(7): 971-980.
- [66] WYCHE T P, HOU Y P, BRAUN D, et al. First natural analogs of the cytotoxic thiodepsipeptide thiocoraline A from a marine *Verrucosispora* sp[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2011, 76(16): 6542-6547.
- [67] NAIR V, KIM M C, GOLEN J A, et al. Verrucosamide, a cytotoxic 1,4-thiazepane-containing thiodepsipeptide from a marine-derived actinomycete[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(11): 549.
- [68] OKADA H, SUZUKI H, YOSHINARI T, et al. A new topoisomerase II inhibitor, BE-22179, produced by a streptomycete. I. Producing strain, fermentation, isolation and biological activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(2): 129-135.
- [69] YOSHINARI T, OKADA H, YAMADA A, et al. Inhibition of topoisomerase II by a novel antitumor cyclic depsipeptide, BE-22179[J]. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 1994, 85(5): 550-555.
- [70] CIUFOLINI M A, XI N. Synthesis, chemistry and conformational properties of piperazic acids[J]. *Chemical Society Reviews*, 1998, 27(6): 437-445.
- [71] HANDY E L, SELLO J K. Structure and synthesis of conformationally constrained molecules containing piperazic acid[M/OL]// LUBELL W D. *Topics in heterocyclic chemistry: peptidomimetics I*. Cham: Springer International Publishing, 2015: 97-124[2023-12-01]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/7081_2015_185.
- [72] BOGER D L, CHEN J H, SAIONZ K W, et al. Synthesis of key sandramycin analogs: systematic examination of the intercalation chromophore[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1998, 6(1): 85-102.
- [73] BOGER D L, LEDEBOER M W, KUME M, et al. Total synthesis and comparative evaluation of luzopeptin A-C and quinoxapeptin A-C[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(49): 11375-11383.
- [74] LEE S, INSELBURG J. *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to drugs that bind DNA or inhibit its synthesis[J]. *The Journal of Parasitology*, 1993, 79(5): 780-782.
- [75] OHKUMA H, SAKAI F, NISHIYAMA Y, et al. BBM-928, a new antitumor antibiotic complex. I. Production, isolation, characterization and antitumor activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1980, 33(10): 1087-1097.

- [76] WATANABE K, HOTTA K, PRASEUTH A P, et al. Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli*[J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(8): 423-428.
- [77] WATANABE K, HOTTA K, NAKAYA M, et al. *Escherichia coli* allows efficient modular incorporation of newly isolated quinomycin biosynthetic enzyme into echinomycin biosynthetic pathway for rational design and synthesis of potent antibiotic unnatural natural product[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(26): 9347-9353.
- [78] HIROSE Y, WATANABE K, MINAMI A, et al. Involvement of common intermediate 3-hydroxy-L-kynurenine in chromophore biosynthesis of quinomycin family antibiotics[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(1): 117-122.
- [79] SHI X J, ZHAO G Y, LI H, et al. Hydroxytryptophan biosynthesis by a family of heme-dependent enzymes in bacteria [J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(11): 1415-1422.



通讯作者: 杜艺岭(1983—),男,研究员,博士生导师。研究方向为微生物次级代谢的生物化学机理、微生物药源分子的发现与生物合成、微生物合成生物学与化学生物学等。

E-mail: yldu@zju.edu.cn



第一作者: 施鑫杰(1996—),男,博士。研究方向为微生物天然产物生物合成。

E-mail: xjshi@zju.edu.cn