

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-099

## 自抗性基因导向的活性天然产物挖掘

宋永相<sup>1,2,3</sup>, 张秀凤<sup>1,2,3</sup>, 李艳芹<sup>1,2,3</sup>, 肖华<sup>1,2,3</sup>, 闫岩<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省海洋药物重点实验室, 中国科学院南海生态环境工程创新研究院, 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301; <sup>2</sup>三亚海洋生态环境工程研究院, 海南 三亚 572000; <sup>3</sup>中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 天然产物是医药与农药的重要来源。基因组测序和生物信息学分析技术的飞速发展, 揭示了大量功能未知的天然产物生物合成基因簇, 利用生物信息学工具, 从这些庞大的基因簇数据中挖掘活性天然产物已经成为发现新型天然药物的重要途径。天然产物的生产者利用自抗性基因所表达的自抗性酶来保护自身, 这种自抗性酶是体内一些初级代谢途径中管家酶的变体, 不但对于活性天然产物具有较好的耐受性, 还可以在生产活性天然产物的同时确保宿主体内代谢的正常进行。因而, 自抗性基因指导的天然产物研究有效地将活性导向和基因组导向的天然产物发掘策略桥连起来, 为精准发掘具有目标活性的新型天然产物提供了有效策略。本文对利用自抗性基因作为探针进行天然产物发掘的代表性研究工作进行了整理和总结, 并对研究趋势进行了展望, 主要包括: ①对于活性已知的天然产物, 利用其自抗性基因来定位生物合成基因簇的研究; ②以天然产物生物合成基因簇中的自抗性基因为线索, 预测产物的作用靶点的研究; ③利用天然产物自抗性机制, 将具有已知作用机制的活性分子进行快速排重的研究; ④利用自抗性基因与天然产物及其活性的内在联系, 以目标靶点导向的活性天然产物基因组挖掘; ⑤自抗性基因导向的基因组数据挖掘工具的发展情况。

**关键词:** 天然产物; 自抗性基因; 基因组挖掘; 生物合成; 基因簇

中图分类号: Q819 文献标志码: A

## Resistance-gene directed discovery of bioactive natural products

SONG Yongxiang<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Xiufeng<sup>1,2,3</sup>, LI Yanqin<sup>1,2,3</sup>, XIAO Hua<sup>1,2,3</sup>, YAN Yan<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, Innovation Academy of South China Sea Ecology and Environmental Engineering, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China; <sup>2</sup>Sanya Institute of Ocean Eco-Environmental Engineering, Sanya 572000, Hainan, China; <sup>3</sup>University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Natural products play a crucial role as sources of therapeutic agents for human being and agricultural pesticides. With the development of sequencing technologies, genome mining employing various bioinformatic tools

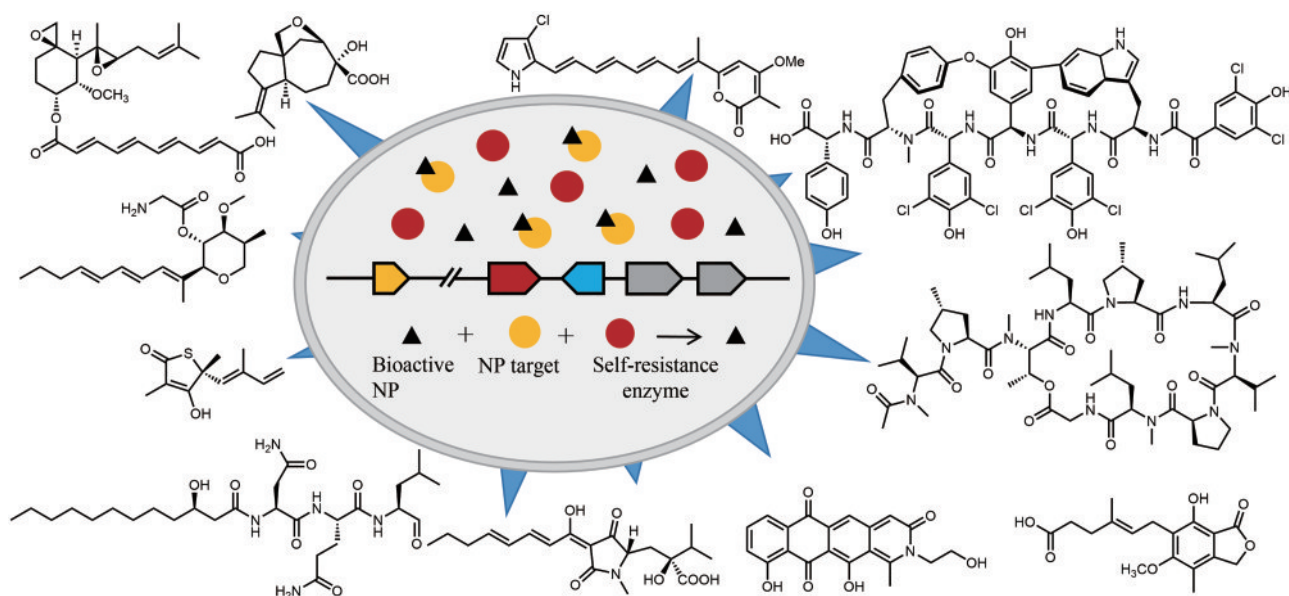
收稿日期: 2023-12-01 修回日期: 2024-03-08

基金项目: 国家自然科学基金 (32000044); 国家重点研发计划 (2022YFC2805000); 海南省科技计划三亚崖州湾科技城联合项目 (2021CXLH0013)

引用本文: 宋永相, 张秀凤, 李艳芹, 肖华, 闫岩. 自抗性基因导向的活性天然产物挖掘[J]. 合成生物学, 2024, 5(3): 474-491

Citation: SONG Yongxiang, ZHANG Xiufeng, LI Yanqin, XIAO Hua, YAN Yan. Resistance-gene directed discovery of bioactive natural products[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(3): 474-491

has become an important approach for discovering more natural products. Due to the large number of natural product biosynthetic gene clusters, screening those capable of generating the most potent bioactive molecules has gained significance. To avoid self-destruction, some bioactive molecule producers have evolved with self-resistance enzymes, which are slightly mutated versions of original enzymes, but not sensitive to the bioactive compounds. The presence of self-resistance enzymes in the biosynthetic gene cluster of natural products serves as an indicator for the biosynthesis of bioactive compounds. On the other hand, the biosynthetic gene clusters of natural products could be located using information with their structures and activities as probes, *e.g.* the accumulating knowledge on antibiotic resistance mechanisms has facilitated the discovery of new antibiotics. Moreover, dereplication of natural products with known resistance mechanisms has been achieved by using indicator strains expressing the resistance genes. While these approaches have successfully utilized self-resistance genes to connect molecules with their biological activities, a more impactful application is to accurately link biological activity with genomic information through target-guided mining of natural products. The concept is to use a self-resistance gene as a predictive tool to screen and identify biosynthetic gene clusters encoding compounds that inhibit specific targets. Recent breakthroughs in self-resistance gene identification have bridged the gap between activity-guided and genome-driven approaches for natural product discovery and functional assignment. This review summarizes progress in bioactive natural product discovery guided by self-resistance genes, as well as its applications, which include the following points: 1) locating biosynthetic gene clusters based on self-resistance genes, 2) predicting the targets of secondary metabolites through self-resistance genes, 3) rapid dereplication of bioactive compounds with self-resistance mechanisms, 4) genome mining of bioactive natural products guided by the target and the internal connection with self-resistance genes, and 5) the development of genome data mining tools directed by self-resistance genes.



**Keywords:** natural products; self-resistance genes; genome mining; biosynthesis; biosynthetic gene clusters

天然产物 (natural product, NP) 是由包括微生物、植物与动物等生物体产生的小分子有机化合物 (分子量通常小于 1500 Da), 这些小分子在

人类的医疗健康以及动植物的疾病防治中发挥着不可替代的重要作用。在漫长的进化过程中, 天然产物也随着生物体的进化而不断进行结构优化,

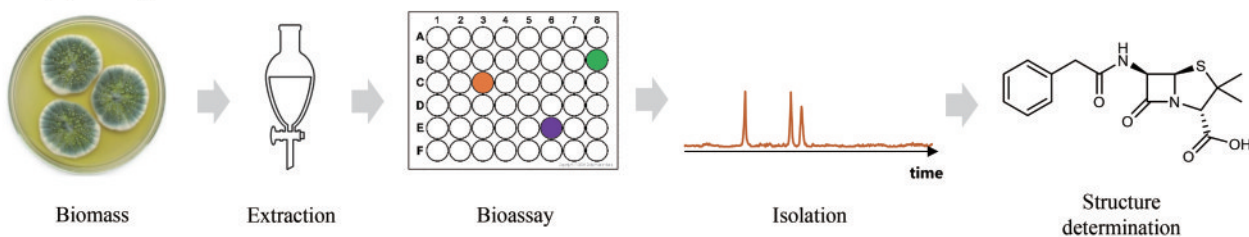
可以精准高效地与生物大分子如核酸和蛋白质结合,进而调节生理代谢。这些化合物大多结构复杂,由多个手性中心和复杂的环系构成,同时有多种官能团作为药效基团,用来通过氢键、静电相互作用、疏水作用等与生物靶点进行精准结合。因此天然产物在为化学、生物学和药学等研究领域提供了研究灵感的同时,也是发现创新药物的源泉。据统计,1981—2019年间,美国食品药品监督管理局共批准1881个新型药物,其中天然产物来源的占比高达32%±9%<sup>[1-2]</sup>。同时,天然产物及其衍生物在农药制剂的应用中也占有重要比例,仅1997—2010年间就达到36%<sup>[3-6]</sup>。随着海洋微生物天然产物的发展,其在农业中的应用也越来越多,Song等<sup>[7]</sup>2021年统计了海洋天然产物在杀虫活性方面的研究进展,在72个具有杀虫活性的化合物中有29个来自于海洋微生物,占比超40%。

基于生物学活性导向的天然产物发掘策略是将生物样本中的目标活性组分通过提取和多步的分离纯化来进行富集,结合生物活性测试进行活性成分跟踪,最终获得目标活性化合物的过程<sup>[8]</sup>。在20世纪,基于生物活性分析与化学分离技术的飞速发展,科学家们发现了大量具有良好药效活性的天然产物<sup>[9-15]</sup>。以著名抗生素药物青霉素的发现为代表,在近一个世纪的时间里,基于生物学

活性导向的天然产物发掘策略是支撑天然产物研究发展并引领其进入黄金时期的根本策略<sup>[16]</sup>(图1)。

随着基因测序技术的飞速发展,人们发现在微生物中用来编码复杂天然产物生物合成酶的基因通常情况下在染色体上是连锁成簇存在的,这些基因的成簇分布有利于各个功能相关基因的同时调控、表达以及在不同物种间的横向转移<sup>[17]</sup>。通过对已测序的微生物基因组中天然产物生物合成骨架基因如聚酮合酶<sup>[18-19]</sup>、非核糖体聚肽合成酶<sup>[18,20]</sup>和萜烯环化酶<sup>[21-22]</sup>等的分析,揭示了成千上万的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC)<sup>[23-26]</sup>。在这众多的生物合成基因簇中,据估计仅有不足10%的功能及其产物是已知的,多数生物合成基因簇的功能以及其所产生的“隐秘产物”仍然有待科学家们通过实验证实<sup>[27]</sup>。导致这些基因簇功能未知的原因很多,例如:①许多天然产物的生物合成受到诸多未知环境因子的调控,而这些调控因子在实验室培养环境中很难进行模拟,导致大量的“隐秘产物”难以生产;②有些天然产物在极低的浓度下就可以发挥功效,因而产量很低,难以进行有效的分离和鉴定;③有些天然产物作用机制较为特殊,目前还没有建立有效的活性筛选方法,在通过活性导向的策略发掘的过程中被忽视等。因此,对于这些基因簇功能、隐秘活性产物发掘的需求,推动着天然产物研究

#### Activity guided approach



#### Genome guided approach

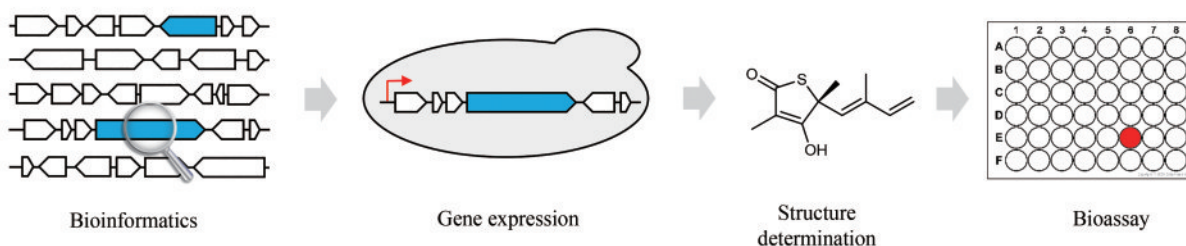


图1 天然产物发掘的策略流程图

Fig. 1 Workflow for natural product discovery

方法的变革<sup>[28-29]</sup>, 将成为医药与农业制剂研发的潜在源泉。

自21世纪初至今的20多年间, 基因组指导的天然产物发现策略成为探索大量的隐秘天然产物的有效途径<sup>[30]</sup>。通过综合运用包括途径特异性转录因子的过表达或敲除、表观遗传调节染色质结构、在模式底盘细胞中的异源表达等合成生物学方法, 越来越多结构新颖的隐秘天然产物被科学家们发现, 大大拓宽了天然产物的化学空间<sup>[25, 31-33]</sup> (图1)。尽管基于基因组的挖掘策略指导科学家们发现了许多结构新颖的隐秘天然产物, 由于基因组导向的挖掘是以发现含有特定药效基因或骨架的天然产物为目标, 缺乏在基因组序列水平上对于产物活性的预测与筛选, 最终导致难以有效地确定这些隐秘产物的生物学活性与分子靶点<sup>[34-35]</sup>。随着基因组序列数据量的日趋庞大, 科学家们面临的重要挑战之一是如何从庞杂的基因组数据中精准地挖掘到具有高活性和药用价值的天然产物<sup>[36-37]</sup>。基因自抗性导向的活性天然产物挖掘, 不仅可以利用基因组序列来预测天然产物的生物活性, 还可以使天然产物挖掘更为精准有效, 已逐步成为解决这一挑战的有效方法。本文将重点介

绍利用自抗性基因指导天然产物研究的多种策略, 以及运用这些研究策略所取得的研究进展。

## 1 自抗性基因指导的生物合成基因簇定位

活性天然产物通常可以作为“小分子武器”被其生产者所利用, 结合竞争者体内重要代谢途径中的靶标(酶、核酸等), 从而抑制甚至杀死竞争者。与此同时, 活性天然产物生产者需启用有效的自我保护机制以避免其产物伤及自身, 如: 通过外排泵将毒性分子转运到细胞外; 依靠体内的抗性蛋白来对毒性分子进行捕捉或修饰, 使之失去毒性; 利用修饰酶将毒性分子的靶点进行化学修饰, 使毒性分子无法与被修饰过的靶点进行结合等<sup>[38-40]</sup>。

除此之外, 另一种有趣的解毒机制是通过将天然产物所结合的靶点酶进行小幅度的突变成为自抗性酶, 使突变体既保留原代谢酶的功能, 又不会被有毒的化合物所结合, 从而保护生产者不受活性天然产物的伤害<sup>[41-42]</sup> [图2(a)]。为了在天

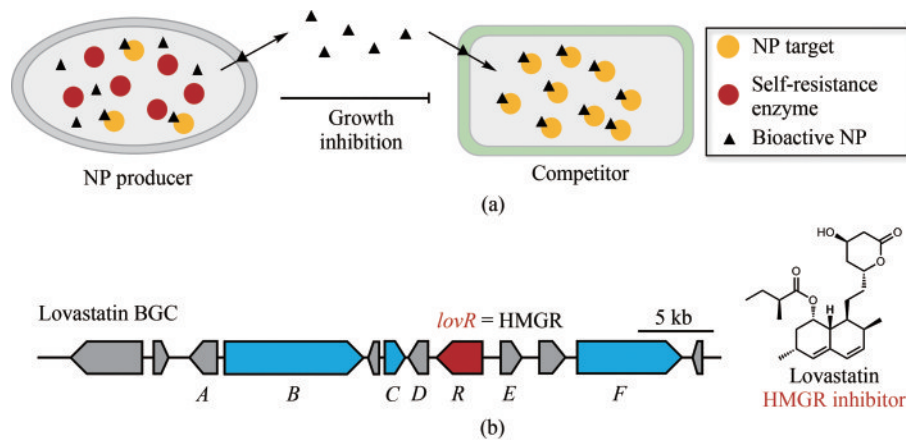


图2 天然产物生物合成基因与自抗性基因的连锁

(a) 微生物通过产生活性天然产物(NP, 黑色三角)来抑制竞争者体内的重要代谢酶(黄色圆), 同时天然产物的生产者能够产生与产物靶点(黄色圆)同源的自抗性酶(红色圆), 这个自抗性酶具有靶蛋白的功能却不能够被天然产物抑制, 在天然产物存在时保障生产者不受毒害; (b) 在洛伐他汀的生物合成基因簇(BGC)中天然产物生物合成的核心基因(蓝色)与自抗性基因 $lovR$ (红色)在生产者土曲霉基因组上的连锁现象

Fig. 2 Simultaneous localization of genes encoding core biosynthetic enzymes and for self-resistance

(a) Microorganisms produce natural products (black triangles) as a strategy to kill competitors by inhibiting their essential metabolic enzymes (yellow balls). To ensure their own survival, these microorganisms express the self-resistance enzymes (red balls) capable of complementing the functions of those targeted metabolic enzymes; (b) Simultaneous localization of the core enzymes for lovastatin biosynthesis (blue) and the self-resistance genes encoding HMG-CoA reductase within lovastatin biosynthetic gene cluster (BGC). This gene cluster includes another copy of HMGR encoded by  $lovR$  (red).

然产物生物合成过程中时刻保护生产者, 这种编码自抗性酶的基因通常在基因组中是与天然产物的生物合成基因连锁存在的, 这样便于调控合成基因与抗性基因的同步转录, 以确保当活性天然产物在细胞内积累时, 自抗性酶可以同时表达, 并发挥解毒作用。编码自抗性酶的基因通常在基因组中是以第二拷贝编码靶点蛋白管家基因 (housekeeping gene) 的形式存在, 并且自抗性酶与管家酶 (housekeeping enzyme) 具有较高的同源性<sup>[41-42]</sup>。例如土曲霉来源的降脂药物洛伐他汀 (lovastatin) 的作用靶点为3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGR), 在其生物合成基因簇中有一个负责编码HMGR的自抗性基因, 用来在洛伐他汀产生时进行解毒<sup>[43-45]</sup> [图2(b)]。这种利用自抗性基因进行解毒的自我保护策略在细菌和真菌中广泛存在, 目前已证实的采用这种自抗性机制的天然产物解毒策略, 其分子靶点涉及DNA复制、蛋白质合成与降解、脂类代谢、糖和能量代谢、氨基酸与核苷酸代谢、外毒素降解等多种细胞代谢途径<sup>[40]</sup>。

对于分子靶点已知的天然产物, 自抗性机制对于基因组导向的天然产物基因簇检索具有重要的指导意义, 可以利用自抗性基因作为探针, 在基因组中准确定位天然产物的生物合成基因簇。例如, 放线菌 *Streptomyces rishiriensis* 来源的DNA旋转酶 (gyrase) 抑制剂 coumermycin A1 的生物合成基因簇就是利用了结构基因 dTDP-葡萄糖 4, 6-脱水酶和自抗性基因 *gyrB* 作为探针而准确定位的, 这在一定程度上受到了其结构类似物 novobiocin 生物合成基因簇中存在自抗性基因现象的启发<sup>[46-47]</sup> [图3(a)]。由真菌 *Penicillium brevicompactum* 产生的肌苷-5'-单磷酸脱氢酶 (inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH) 抑制剂霉酚酸 (mycophenolic acid) 作为主要的免疫抑制剂治疗移植器官引起的急性排异反应<sup>[48]</sup>。由于在研究初期, 其生物合成机制尚不明确, 难以通过结构基因来定位生物合成基因簇。研究人员认为在霉酚酸的生物合成基因簇中可能包含着一个 IMPDH 同源基因作为自抗性基因用来防止霉酚酸对于产生菌体内 IMPDH 的抑制作用, 于是通

过利用这个自抗性基因为探针, 成功发现了霉酚酸的生物合成基因簇<sup>[49]</sup> [图3(b)]。此外, 在定位2型甲硫氨酸氨基肽酶 (MetAP2) 抑制剂烟曲霉素 (fumagillin) 的过程中, 研究人员通过定位烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 基因组中的第二拷贝甲硫氨酸氨基肽酶, 成功揭示了烟曲霉素的生物合成基因簇<sup>[50-52]</sup> [图3(c)]。对于分子靶点已知的天然产物, 在生物合成结构基因难以确定时, 利用这种自抗性基因可以在生产者基因组中有效地定位生物合成基因簇。

此外, 对于分子靶点已知的天然产物, 寻找相应的基因簇还可以不依赖于原始文献报道中的目标天然产物的产生菌, 通过直接在基因组数据库中挖掘含有所报道靶点同源基因的次级代谢产物基因簇就可以定位到目标化合物的基因簇。羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶 (CYP51) 是开发抗真菌药物的重要靶点, 真菌来源的天然产物 restricticin 及其衍生物是唯一已知靶向 CYP51 的天然产物抑制剂<sup>[53-54]</sup>。Tang 教授团队<sup>[55]</sup> 猜想在 restricticin 的生物合成基因簇中可能存在基因组中第二拷贝的 CYP51 作为自抗性基因。尽管 restricticin 及其衍生物的产生菌株尚未进行基因组测序, 但是任何能够产生 restricticin 类天然产物的生物合成基因簇都有可能具有与 CYP51 同源度较高的自抗性基因。因此通过在真菌基因组数据库中搜索含有 CYP51 同源基因的次级代谢产物生物合成基因簇, 成功地在一株尚未报道能够产生 restricticin 及其类似物的曲霉 *Aspergillus nomius* 基因组中定位到了目标基因簇 [图3(d)]。通过将该基因簇进行异源表达, 成功得到了 restricticin 及一个相应的衍生物<sup>[55]</sup>。这项研究证实了自抗性基因、生物合成基因簇和天然产物之间存在着紧密的内在联系, 可以为新型天然产物的发掘提供有效的指导。

## 2 自抗性基因导向的天然产物靶点确认

除了定位分子靶点已知的天然产物生物合成基因簇外, 对于作用机制未知的天然产物, 在生物合成基因簇中出现的自抗性基因也可以为揭示天然产物的分子靶点提供重要线索。例如, 假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 来源的 kalimantacin A 对

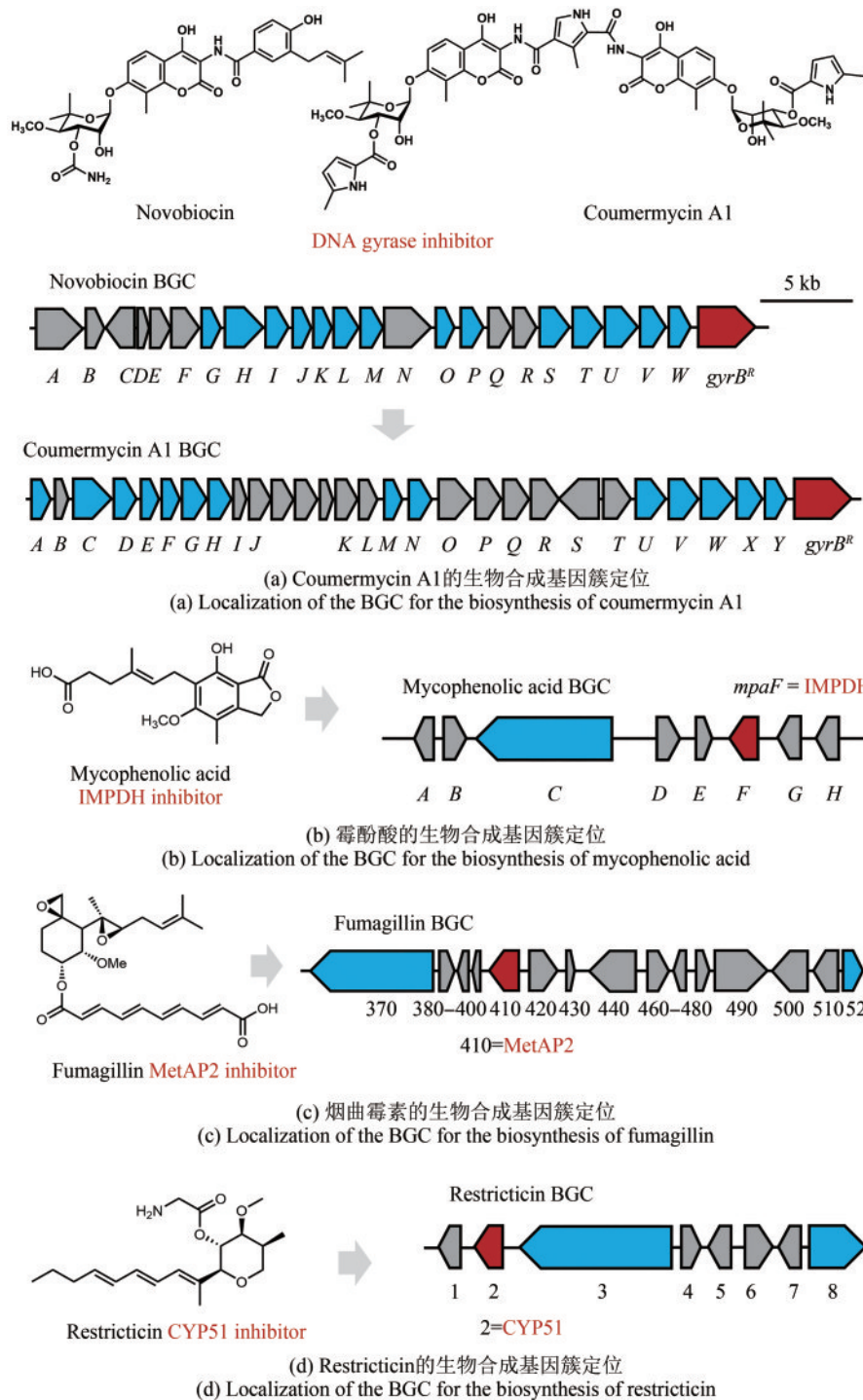


图3 自抗性基因指导的生物合成基因簇定位

(生物合成基因簇中的蓝色开放阅读框表示生物合成母核基因，红色开放阅读框表示与天然产物作用靶点同源的自抗性基因，灰色开放阅读框表示其他相关的生物合成基因)

Fig. 3 Self-resistance gene directed localization of the biosynthetic gene clusters (BGCs) for the production of natural products (The biosynthetic core genes, self-resistance genes and other related genes are shown in blue, red and grey, respectively.)

葡萄球菌具有高度的选择抑制活性，而作用机制尚不明确<sup>[56]</sup>。在解析 kalimantacin A 生物合成基因簇中的基因功能过程中，研究人员发现，将基因

簇中编码 FabI 同源蛋白的 *batG* 基因敲除时，并未对 kalimantacin A 的产量造成影响，然而在敏感宿主中异源表达 BatG 却能够赋予宿主抵抗 kalimantacin

A的能力<sup>[56]</sup> [图4(a)]。FabI负责催化反式-2-烯酰基-载体蛋白的还原,是脂肪酸合成途径中的重要代谢酶<sup>[57]</sup>。因此,这个自抗性基因揭示出kalimantacin A的作用靶点为FabI,而同源蛋白BatG可以在毒性分子产生并抑制FabI时弥补FabI的生理功能,保障生产者体内的脂肪酸合成依然能够正常进行。这里出现了一个值得深入思考的现象:原始生产者假单胞菌在将batG基因敲除后,并没有受到产物kalimantacin A的生长抑制作用,这可能是生产者体内的FabI管家酶在长期与kalimantacin A的共存过程中,逐渐进化成了具有自抗性的酶<sup>[56]</sup>。因此,采用自抗性酶来解毒这种策略,并非一定需要除管家基因外的另外一个第二拷贝的自抗性基因来进行解毒,生产者仅需将管家基因进行一定程度的进化,就可以实现自抗性基因的功能。

来源于链霉菌的环肽分子浅灰霉素(griselimycin)具有广谱的抗菌活性,特别是对于结核杆菌具有良好的生长抑制活性,然而这个分子较差的药物代谢动力学严重阻碍了其进一步开发成为新型抗结核药物<sup>[58]</sup>。尽管科学家们曾尝试合成多种浅灰霉素的类似物以提高其成药性,然而由于更为高效的新一代抗结核药物利福平(rifampin)的上市,基于浅灰霉素分子骨架的开发最终被终止了<sup>[59]</sup>。这主要是因为浅灰霉素分子靶点和作用机制未知的情况下,设计并通过化学合成来获得成药性更为优异的衍生物具有较大的挑战性。Müller教授研究团队<sup>[60]</sup>确证了浅灰霉素生物合成基因簇中一个能够编码DNA聚合酶滑动夹DnaN蛋白的自抗性基因griR,从而揭示了浅灰霉素完全不同于已知抗结核药物的新型作用机制,具有开发成为新型抗结核药物的前景 [图4(b)]。这些研究再次表明,天然产物的生物合成基因簇中不仅仅包含了生物合成途径信息,同时也能够为揭示天然产物的作用机制提供重要线索。

Tang教授团队在研究由植物益生菌哈茨木霉(*Trichoderma afroharzianum*)产生的具有促进植物生长和抑制真菌的天然产物哈茨酸<sup>[61]</sup>(harzianic acid)的生物合成过程中,发现其生物合成基因簇在多个不同属来源的真菌中具有较高的保守性,并且在这些生物合成基因簇中,均含有一个能够

编码支链氨基酸合成途径中的重要代谢酶乙酰羟酸合成酶<sup>[62]</sup>(acetoxyacid synthase, AHAS)的开放阅读框AHAS<sup>M</sup><sup>[63-64]</sup> [图4(c)]。由于AHAS<sup>M</sup>与其他真菌中的AHAS管家基因的同源性接近73%,因此他们推测这个基因为哈茨酸的自抗性基因,而AHAS正是哈茨酸的分子靶点。随后的体外生化和体内异源表达实验均证实,管家酶AHAS对于哈茨酸比较敏感,而与之相反,AHAS<sup>M</sup>完全不会受到哈茨酸的抑制。有趣的是,在哈茨木霉中,哈茨酸生物合成基因簇中的AHAS<sup>M</sup>基因相比其他菌种来源的AHAS<sup>M</sup>明显截短了,因而丧失了自抗性基因的功能,而其基因组中的管家基因却突变成了AHAS<sup>M</sup>从而行使自抗性基因的功能。值得一提的是,尽管哈茨酸能够有效抑制真菌来源的AHAS,却不会影响植物来源AHAS的活性,这种天然的选择性使哈茨木霉在农业生产中能够专一性地抑制真菌而不伤害作物<sup>[63, 65]</sup>。

近期,胡教授研究团队<sup>[66]</sup>在揭示真菌来源的聚酮化合物rumbrin和衍生物12E-rumbrin的生物合成途径时,发现在其生物合成基因簇中包含了一个能够编码人类硫酸酯酶II(hTE)的基因 [图4(d)]。据报道,这类人类硫酸酯酶II可以和人类免疫缺陷性病毒HIV-Nef蛋白相互作用,从而降低CD4 T细胞的内存作用,促进HIV病毒对人体细胞的侵染<sup>[67-69]</sup>。由于在rumbrin的生物合成基因簇中存在人类硫酸酯酶II的同源基因,因此作者推测这个基因可能发挥着自抗性基因的作用,而rumbrin能够通过和人类硫酸酯酶II结合抑制其活性。随后对于化合物12E-rumbrin的生物学活性研究表明,它可以通过阻断病毒与细胞的结合,从而有效抑制HIV-1的复制<sup>[66]</sup>。尽管Nef蛋白与人类硫酸酯酶II的作用机制较为复杂,可能影响多个生理途径,至今有待进一步的研究,生物合成基因簇中潜在的自抗性基因仍为揭示rumbrin抗HIV病毒活性提供了重要的启示。

### 3 基于自抗性基因的天然产物排重

天然产物发掘过程中经常遇到的问题是大量已知天然产物的重复分离,如何有效地在分离之前就对已知的天然产物进行识别和排重,然

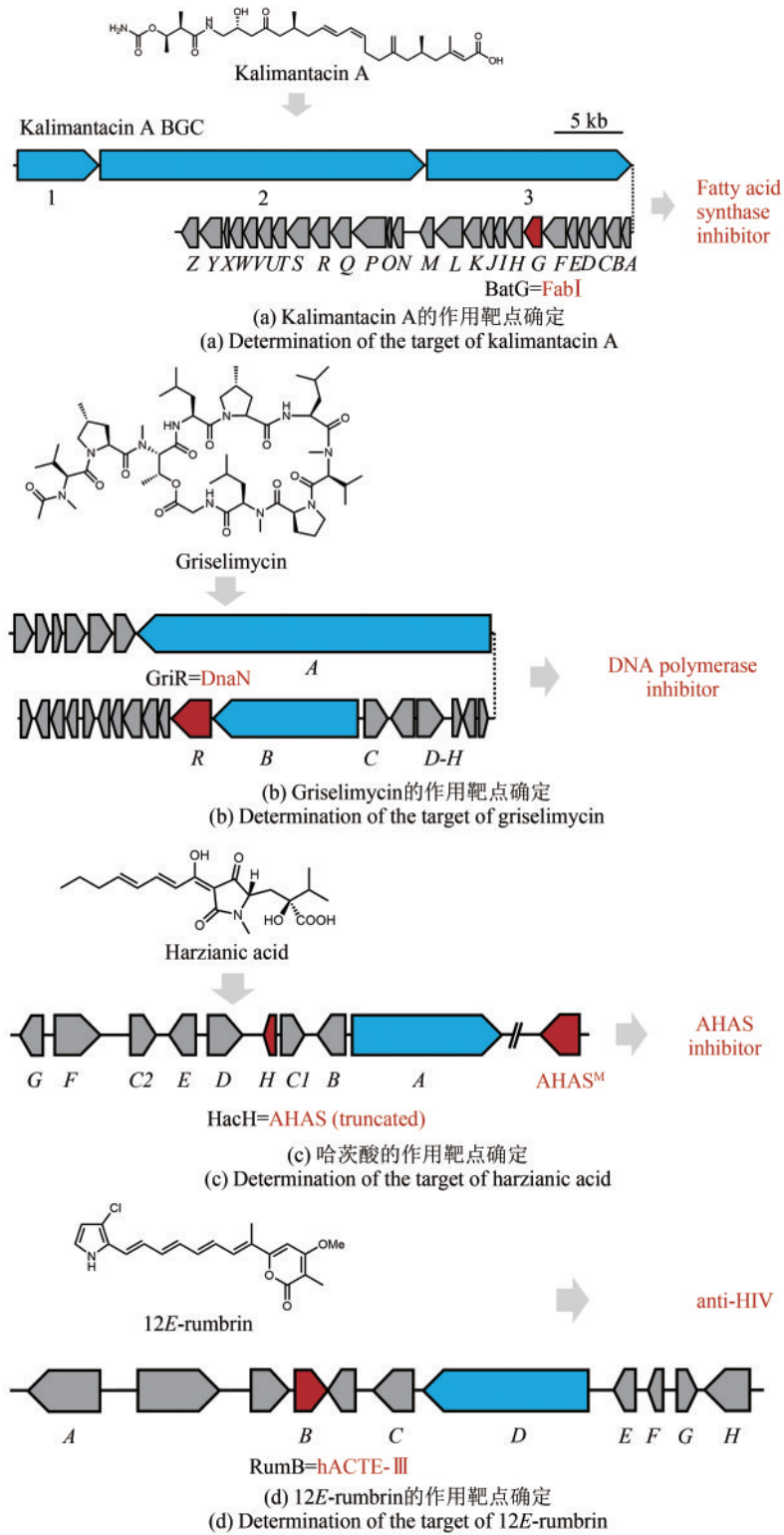


图4 抗性基因导向的作用机制与分子靶点确定

(生物合成基因簇中的蓝色开放阅读框表示生物合成母核基因，红色开放阅读框表示与天然产物作用靶点同源的自抗性基因，灰色开放阅读框表示其他相关的生物合成基因)

Fig. 4 Determination of the target of natural products through their resistance genes

(Biosynthetic core genes, self-resistance genes and other related genes are shown in blue, red and grey, respectively.)

后针对新的化合物进行分离，是天然产物研究领域面临的主要挑战之一<sup>[70]</sup>。为了避免对于已知化合物的重复分离，从生物样品提取物中排除已知天然产物的过程不仅需要烦琐的实验步骤（包括化合物分离、结构解析等）来进行排重，同时也耗费了大量的资源<sup>[2, 71]</sup>。为解决此问题，Wright教授团队<sup>[72-73]</sup>挑选了100多个已知抗生素的自抗性基因，并在大肠杆菌底盘细胞中表达，构建了相应的100多个针对单一抗生素具有抗性的大肠杆菌菌株，组成了抗生素抗性筛选菌株平台，成功地用于对已知活性天然产物进行排重（图5）。不需要对生物样品提取物中的组分进行逐一分离和分析，每个携带不同抗性基因的大肠杆菌菌株就可以直接指示出样品中的已知活性化合物。通过快速地将生物样品中的已知化合物进行排重，可以排除50%以上的抗生素产生菌，从而筛选出新型抗生素的产生菌。在这些菌株中，相继发现了可以产生新型棘霉素衍生物以及具有新型作用机制的抗生素 angucycline 与 mayamycin<sup>[72]</sup>。

交叉抗性曾被有效地用于排除已知抗生素，随着科学家们对于抗生素自抗性机制的深入研究，这种基于自抗性基因异源表达的平台对于已知抗生素的排重能力将会得到进一步的提升。同时该平台还可以快速检测添加剂对于天然产物敏感性的增益效应，因而此平台也可以用于高效筛选和评价天然产物对于已知抗生素的辅助效应，从而获得高效助剂<sup>[72]</sup>。这种抗生素抗性筛选菌株平台虽然可以有效地用来筛选生物样品中的天然产物，但这种方法依然依赖于菌种的生长以及其中天然产物生物合成基因的高效表达，对于不可培养菌种、沉默和隐秘天然产物仍然难以进行有效的发掘。

#### 4 目标靶点（自抗性基因）导向的活性天然产物挖掘

虽然自抗性基因可以有效地关联天然产物与

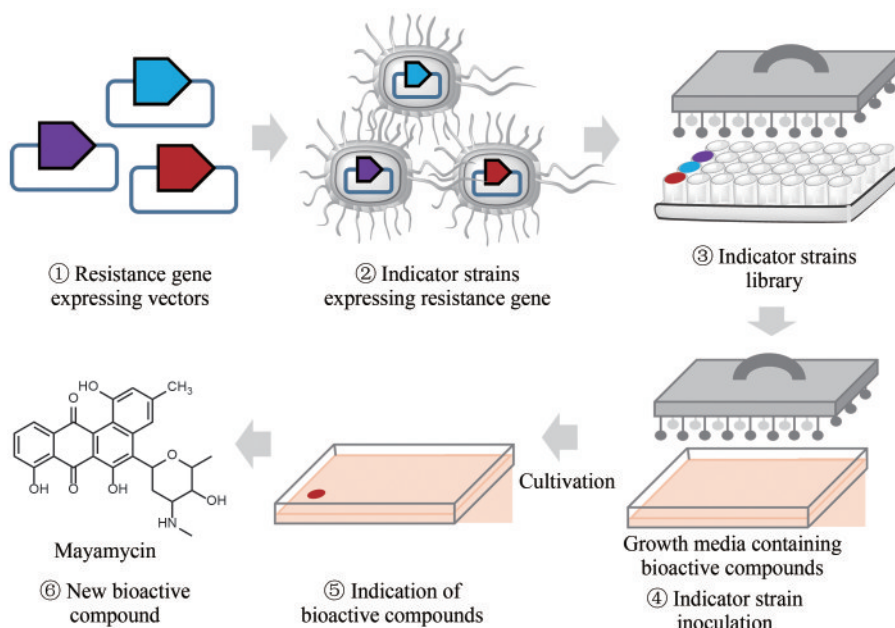


图5 基于自抗性基因的天然产物排重流程图

①构建表达已知抗生素抗性基因的载体；②将表达抗性基因的载体导入大肠杆菌中构建抗性基因指示菌株；③构建多种指示菌株，并组合成为指示菌株文库；④将提前准备好的含有目标菌株发酵产物的培养基进行指示菌株的接种；⑤培养指示菌株，通过指示菌株的生长状况来判断发酵产物的种类，并对已知的产物进行排重；⑥分离获得具有新型作用机制的天然产物

Fig. 5 Workflow of the resistance gene directed dereplication of natural products

① Construction of vectors expressing a known antibiotic resistance gene; ② Construction of strains capable of indicating the presence of known bioactive compounds; ③ Construction of a library of indicator strains; ④ Inoculation of the indicator strains to media containing bioactive natural products; ⑤ Identification of natural products with new modes of action; ⑥ Isolation of natural products with new modes of action

生物活性，然而面临大数据的挑战，自抗性基因更为重要的意义是在基因组导向的天然产物挖掘中，可以精准关联天然产物的生物合成基因与分子靶点<sup>[70]</sup>。这种基因组挖掘策略的研究理念在于，运用自抗性基因作为预测产物活性的窗口，来对大量功能未知的基因簇进行辨认和评估，可以给予活性为导向的发现策略和以基因为导向的基因组挖掘策略二者之间有效地搭建桥梁<sup>[40, 74]</sup>。目标靶点（自抗性基因）导向的基因组挖掘策略可以大致总结如下：①选择一个在微生物中具有较高保守程度的管家代谢酶作为基因组挖掘的抓手（医药或农药靶点）；②在基因组数据库中搜索同时包含靶点基因和目标产物骨架合成基因（聚酮、聚肽、萜烯等）的次级代谢基因簇；③使用合成生物学工具将目标基因簇表达，获得产物；④运用分析化学方法分离和鉴定所激活产物的结构；⑤通过体外酶学反应比较产物对于靶点代谢酶和自抗性酶的抑制活性，或者通过对产物敏感的底盘细胞中异源表达管家基因和自抗性基因的方法，检测表达宿主对于产物的敏感性。这是利用基因组学数据库开展自抗性基因导向的基因组挖掘的一种具有普适性的实验方案。

首次详细阐述自抗性基因导向的标志性挖掘研究工作是由 Moore 教授团队<sup>[75]</sup>在 2015 年报道的。该团队以第二拷贝的脂肪酸酶为自抗性基因，成功地发掘了一系列的脂肪酸合酶 II<sup>[76-77]</sup>（fatty acid synthase II, FASII）的抑制剂。他们首先在 86 个盐孢菌基因组中基于同源基因的组群分析得到 12 372 个孤儿基因，其中 2707 个在所有盐孢菌种基因组中保守。接下来根据保守孤儿基因进行功能分类，并且筛选具有双拷贝的孤儿基因，作者在脂肪酸合成途径相关的孤儿基因中发现一个 FAS II，它与一个功能未知的基因簇 PKS44 相连锁。将 PKS44 在天蓝色链霉菌底盘细胞中异源表达后，产生了一系列 FAS II 天然产物抑制剂 thiolactomycins<sup>[78]</sup>，随后作者也证实了自抗性基因确实可以帮助敏感宿主在 thiolactomycins 存在的条件下生存 [图 6(a)]。这项研究工作首次系统而且详细地证实了自抗性基因导向的挖掘研究方法对于发掘目标活性天然产物具有较好的实用性。

在另一项天然产物基因组挖掘研究工作中，

Oakley 教授团队<sup>[79-80]</sup>在对构巢曲霉进行新型天然产物的基因组挖掘过程中，发现在一个非核糖体聚肽的生物合成基因簇中包含了一个负责编码蛋白酶体 C5 亚基的基因 *inpE*，因此他们推测这个基因簇产生的产物可能是蛋白酶体的抑制剂 [图 6(b)]。随后，通过一系列启动子的替换将这个基因簇激活，获得了脂肽化合物 fellutamide B，而这个化合物恰好是个已知的蛋白酶体抑制剂<sup>[81]</sup>。最后他们通过将自抗性基因 *inpE* 进行异源表达证实了它的确可以帮助宿主抵抗化合物 fellutamide B 的毒性。

尽管在上述研究工作中提出并运用了自抗性基因导向的策略进行新型化合物的发掘，然而最终得到的都是分子靶点已知的天然产物。随着该策略在天然产物研究领域的普及，近年也涌现出对于未知分子靶点天然产物挖掘的研究工作，从实践上证实了自抗性基因导向基因组挖掘策略对于新型天然产物发掘具有巨大应用潜力。例如，基于在天然产物 DNA 旋转酶抑制剂 albicidin 和 cystobactamid 的生物合成基因簇中存在编码靶向拓扑异构酶的五肽重复序列蛋白（topoisomerase-targeting pentapeptide repeat protein, TTPRP）的自抗性基因，这个五肽重复序列蛋白可以通过结合拓扑异构酶而避免被活性天然产物抑制<sup>[82-83]</sup>。Müller 教授团队<sup>[84]</sup>利用这种五肽重复序列蛋白作为自抗性基因探针进行基因组挖掘，筛选新型拓扑异构酶抑制剂。他们在黏菌（*Pyxidicoccus fallax*）基因组中发现一个能够编码聚酮类天然产物的生物合成基因簇中含有编码五肽重复序列蛋白的基因 [图 6(c)]。通过将聚酮合酶基因的启动子突变而将这个基因簇激活，他们获得了两个新型天然产物 pyxidicycline A 和 pyxidicycline B。随后的生物学活性研究确证了这两个化合物具有选择性地抑制拓扑异构酶的活性。虽然在这项研究中所利用的自抗性基因并非一个天然产物分子靶点蛋白的突变体，但这项研究再次证实了利用自抗性基因发掘新型天然产物具有巨大的潜力。

除利用医药靶点为探针进行基因组挖掘外，农药靶点也可以作为探针来进行自抗性基因导向的活性天然产物的挖掘<sup>[4, 85]</sup>。支链氨基酸（branched chain amino acid, BCAA）如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸是植物生长必需的营养成分，其生物合成

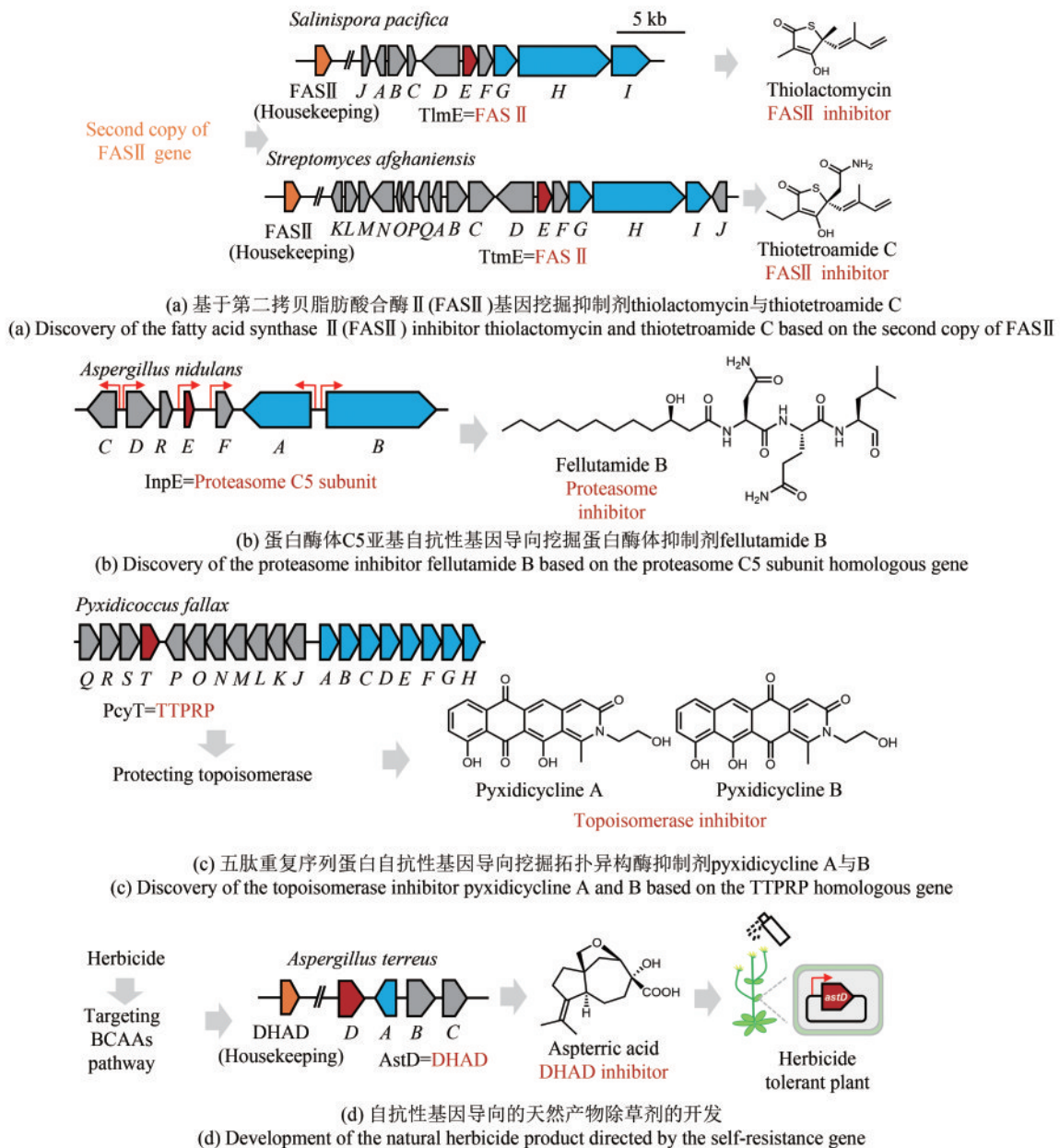


图6 目标靶点导向的活性天然产物挖掘

(生物合成基因簇中的蓝色开放阅读框表示生物合成母核基因，红色开放阅读框表示与天然产物作用靶点同源的自抗性基因，灰色开放阅读框表示其他相关的生物合成基因)

Fig. 6 Discovery of bioactive natural products guided by their resistance genes

(Biosynthetic core genes, self-resistance genes and other related genes are shown in blue, red and grey, respectively.)

途径由三个酶组成：乙酰乳酸合酶、乙酰羟酸异构还原酶和二羟酸脱水酶 (dihydroxyacid dehydratase, DHAD)<sup>[86]</sup>。其中，DHAD 在支链氨基酸合成途径中催化  $\alpha, \beta$ -二羟酸脱水反应生成亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的前体  $\alpha$ -酮酸。这个参与植物必需氨基酸合成的酶 DHAD 在不同的植物物种中高度保守，即使在进化远端的植物中依然有 80% 的同源

性。哺乳动物体内不存在支链氨基酸生物合成途径，它们依靠食物摄取这三种必需氨基酸，因此 DHAD 被认为是理想广谱除草剂的靶点<sup>[86-87]</sup>。早在 20 年前科学家们就曾成功地设计出了针对 DHAD 的小分子抑制剂，并试图用它们来开发新型除草剂。这些人为设计的化学合成抑制剂虽然能够抑制 DHAD 的活性，然而当将其施用植物

体时，这些抑制剂却无法抑制植物的生长<sup>[88]</sup>。

天然产物与生物体在自然界中共同进化而产生具有能够干预特定细胞代谢途径的生物学活性，因此在自然界中有可能存在抑制这个生物体必需氨基酸合成途径上 DHAD 的天然抑制剂。基于这一假设，Tang 教授团队<sup>[85]</sup>推测这样的天然抑制剂生物合成基因簇必然包含一个编码 DHAD 同源蛋白的基因。通过筛查已公开的所有真菌的基因组，他们找到了一个与 DHAD 同源基因和天然产物合成基因连锁的保守基因簇。该基因簇有四个基因，分别编码倍半萜环化酶同源蛋白 AstA、两个细胞色素 P450 氧化酶 AstB 和 AstC、DHAD 的同源蛋白 AstD [图 6(d)]。通过异源表达 *astA*、*astB*、*astC* 基因，产生了生物学活性未知的 *aspterric acid*<sup>[89]</sup>。随后，经过对于包括模式植物拟南芥、代表性的单子叶植物玉米和双子叶植物番茄的抑制实验，他们证实了 *aspterric acid* 对于植物生长具有广谱的抑制活性，同时也证明了 AstD 虽具有 DHAD 的功能却对 *aspterric acid* 具有极高的耐受性。随后，他们通过对于 DHAD 全酶结构的解析，结合计算化学手段，阐明了 *aspterric acid* 与酶活性中心的结合机制，以及 AstD 具有 *aspterric acid* 耐受性的分子机制。为进一步使 *aspterric acid* 在除草的同时不影响作物的生长，Tang 教授团队<sup>[85]</sup>将抗性基因 AstD 在模式植物拟南芥中表达，并成功获得可以耐受高浓度 *aspterric acid* 的转基因植株，证明了人们可以利用 AstD 抗性基因来开发具有 *aspterric acid* 耐受性作物，从而实现利用 *aspterric acid* 进行专一性除草，而不伤害作物的功效。该研究不仅为人们挖掘基因组寻找天然产物提供了新的方法和启示，同时也为探索农业生产中开发新型除草剂提供了范例。

## 5 自抗性基因导向的基因组挖掘工具

为了高效发现包含自抗性基因的天然产物生物合成基因簇，根据自抗性基因导向的挖掘理念开发出的生物信息学分析工具实现了生物信息学分析过程的自动化。例如，Ziemert 团队<sup>[90]</sup>在 2017 年开发了一个在线分析平台 Antibiotic Resistant Target Seeker (ARTS)。用户只要输入基因组序

列，分析平台就可以将可能产生抑制特定分子靶点的天然产物基因簇作为输出，以动态图表的形式显示出来。ARTS 分析基因组数据的步骤如下：① 利用 antiSMASH (antibiotics and secondary metabolite analysis shell) 自动分析骨架合成基因<sup>[91-92]</sup>；② 显示出基于管家基因拷贝数和进化树推测的自抗性基因；③ 以可视化的表格输出结果，总结出所有含有自抗性基因的天然产物基因簇。ARTS 目前已经升级到 2.0 版本<sup>[93]</sup>，可以对多个基因组序列或宏基因组序列进行分析，但是基因序列的来源仍然仅限于细菌，相信在不久的将来，ARTS 的性能将进一步升级以兼容更多的真核物种。

另一个可以挖掘含有自抗性基因的天然产物生物合成基因簇的软件是由 Challis 教授团队<sup>[94]</sup>开发的 clusterTools。这款基因组挖掘软件可以通过特殊基因元件如天然产物骨架合成基因、后修饰基因、抗性基因和调控基因等的隐马尔可夫模型 (hidden Markov models) 来挖掘生物合成基因簇<sup>[95]</sup>。与 ARTS 相比，这个软件可以对目标骨架和活性的天然产物生物合成基因组实现更为精确的挖掘。

## 6 未来研究趋势与展望

基因组测序技术的飞速发展天然产物的基因组挖掘研究带来了契机<sup>[26, 36]</sup>。基因组的天然产物自抗性基因与生物合成基因的连锁现象是它们之间共同进化的结果。自抗性基因可以指导科学家们利用基因序列来预测天然产物的生物学活性，深入地研究自抗性酶产生耐受性的分子机制，将揭示自然界是如何对于高活性分子进化出相应的耐受性机制的<sup>[40, 70]</sup>。然而，目前我们对于自抗性机制认识的局限性，仍然有可能会产生自抗性基因及天然产物活性的错误预测。例如 pyranonigrin A 的生物合成基因簇中存在一个编码 IMPDH 的基因，同时这个基因在基因组中也是第二拷贝，这些表面上都预示着这个基因是 pyranonigrin A 生物合成基因组中的自抗性基因，而进一步的验证表明 pyranonigrin A 并没有抑制 IMPDH 的活性<sup>[74]</sup> [图 7(a)]。因此，一个第二拷贝的管家基因有可

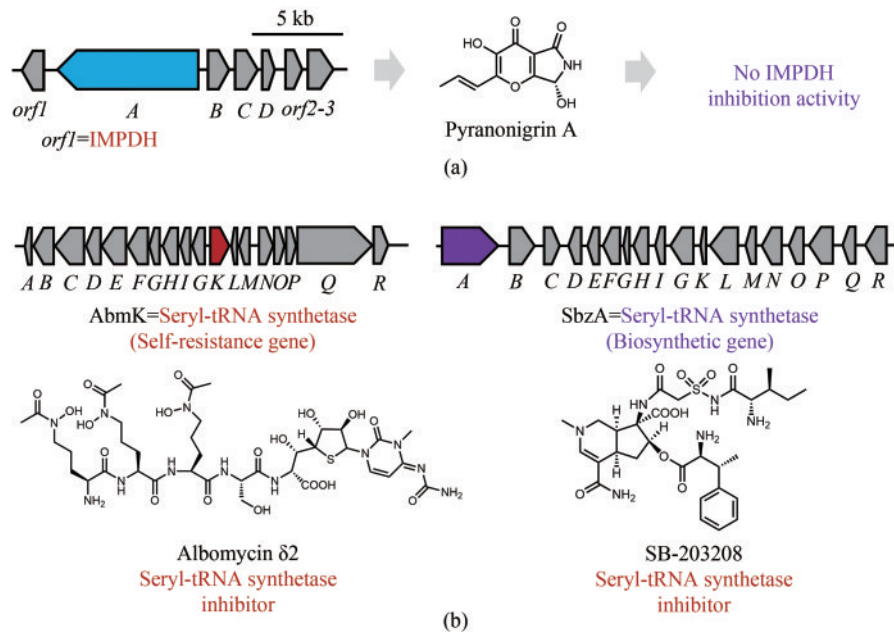


图7 天然产物生物合成基因簇中“假”的自抗性基因

(生物合成基因簇中的蓝色开放阅读框表示生物合成母核基因，红色开放阅读框表示与天然产物作用靶点同源的自抗性基因，灰色开放阅读框表示其他相关的生物合成基因)

(a) Pyranonigrin A 的生物合成基因簇中存在一个编码 IMPDH 的基因，然而 pyranonigrin A 无 IMPDH 抑制活性 (紫色)；(b) 丝氨酸氨酰 tRNA 合成酶抑制剂分子 albomycin  $\delta_2$  的生物合成基因簇，丝氨酸氨酰 tRNA 合成酶抑制剂分子 SB-203208 的生物合成基因簇，其中的“假”自抗性基因紫色标注

Fig. 7 “False positive” resistance genes in the biosynthetic gene clusters of natural products

(Biosynthetic core genes, self-resistance genes and other related genes are shown in blue, red and grey, respectively.)

(a) An IMPDH was localized with the biosynthetic genes of pyranonigrin, which exhibit no IMPDH inhibition activity (purple); (b) Albomycin  $\delta_2$  is an inhibitor of seryl-tRNA synthetase (red), however the seryl-tRNA synthetase homolog is encoded in the BGC with another inhibitor of seryl-tRNA synthetase SB-203208, which functions as a core enzyme (purple) encoded by the biosynthetic gene.

能会恰巧在天然产物的生物合成基因簇中出现，但它的功能却不是自抗性基因。

除此之外，一个管家基因的同源基因可能会出现在天然产物的生物合成基因簇中，但其功能有可能不是产生抗性，而是负责天然产物的生物合成。例如，albomycin  $\delta_2$  的作用分子靶点为丝氨酸氨酰 tRNA 合成酶<sup>[96]</sup>，在 albomycin  $\delta_2$  的生物合成基因簇中的一个基因负责编码微生物染色体上的第二拷贝丝氨酸氨酰 tRNA 合成酶来为微生物提供自抗性<sup>[97]</sup> [图 7(b)]。与之相类似，在 valanimycin 的生物合成基因簇中也含有一个编码丝氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (seryl-tRNA synthase) 的基因，然而进一步的研究证明，这个丝氨酸氨酰 tRNA 合成酶实际上负责催化 valanimycin 合成途径中一步丝氨酸氨酰转移反应<sup>[98]</sup>。这可能是由于 valanimycin 并不具有丝氨酸氨酰 tRNA 合成酶的抑制活性，因而不需要基因簇中存在另一拷贝的丝氨酸氨酰 tRNA 合成

酶作为自抗性基因。而在另外一项研究中，Abe 教授团队在研究异亮氨酸氨酰 tRNA 合成酶抑制剂 SB-203208 时<sup>[99]</sup>，通过自抗性基因异亮氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (SbzA) 成功地定位到了抑制剂的生物合成基因簇，然而意料之外的是实验数据表明这个被他们所认为的自抗性基因 *sbzA*，其真正的功能却是用来催化 SB-203208 的生物合成<sup>[100]</sup> [图 7(b)]。

由于自抗性机制与天然产物的内在联系在新型天然产物的进化中也起着重要的作用，基于自抗性基因进化树分析的挖掘策略，也因此成为发掘新活性天然产物的一条有效路线。Wright 教授研究团队<sup>[101]</sup>通过这种策略高效地发现了新型糖肽抗生素。该团队通过筛选环境中对于万古霉素不敏感的菌株，将能够产生糖肽类抗生素的微生物进行富集。随后对于这些菌株中的糖肽类抗生素生物合成核心基因进行进化树分析，结果表明多数

的生物合成基因簇是合成万古霉素 (vancomycin) 和替考拉宁 (teicoplanin) 类天然产物的。而通过对于进化树上其他分支中少数不属于这两类的新型糖肽类抗生素生物合成基因簇的进一步研究, Wright 教授研究团队成功发现了新型糖肽类抗生素 pekiskomycin, 虽然这个化合物与万古霉素的作用靶点相同, 这种研究策略却为具有已知作用机制的新型类似物的发掘提供了有效方法。与之相反, Wright 教授研究团队<sup>[102]</sup>利用自抗性基因的进化树分析, 通过发现与不同于已知自抗性特征的抗性基因, 成功挖掘到了作用机制新颖的糖肽类抗生素。他们在 71 个具有多样化非核糖体聚肽合成酶中的缩合结构域的糖肽类生物合成基因簇中, 基于对各个基因簇中自抗性基因 *vanHAX* 与 *vanY* 的进化树分析, 筛选到两种可能具有不同于已知自抗性基因特征的生物合成基因簇分支。对于含有新

型自抗性基因的天然产物基因簇进行异源表达, 得到了两个通过结合肽聚糖而抑制细菌生长过程的肽聚糖重塑, 从而抑制革兰氏阳性菌的新糖肽类抗生素 corbomycin 和 complestatin (图 8)。证明了自抗性机制与天然产物内在的紧密联系不仅可以帮助新型天然产物的发掘, 而且推动着天然产物研究思路和策略的进步。

综上, 目前虽然对于自抗性基因的准确预测仍然具有很大的挑战性, 特别是如何区分生物合成基因与自抗性基因, 但相信随着科学家们对越来越多新型自抗性机制的发现和天然产物生物合成酶学机制研究的深入, 将会有更多基于自抗性机制的天然产物挖掘新策略被科学家们揭示。同时, 随着 AI 技术的发展, 在新一代自动化生物信息学分析工具的协助下, 自抗性基因导向的天然产物发掘策略可以将传统的以活性为导向的策略

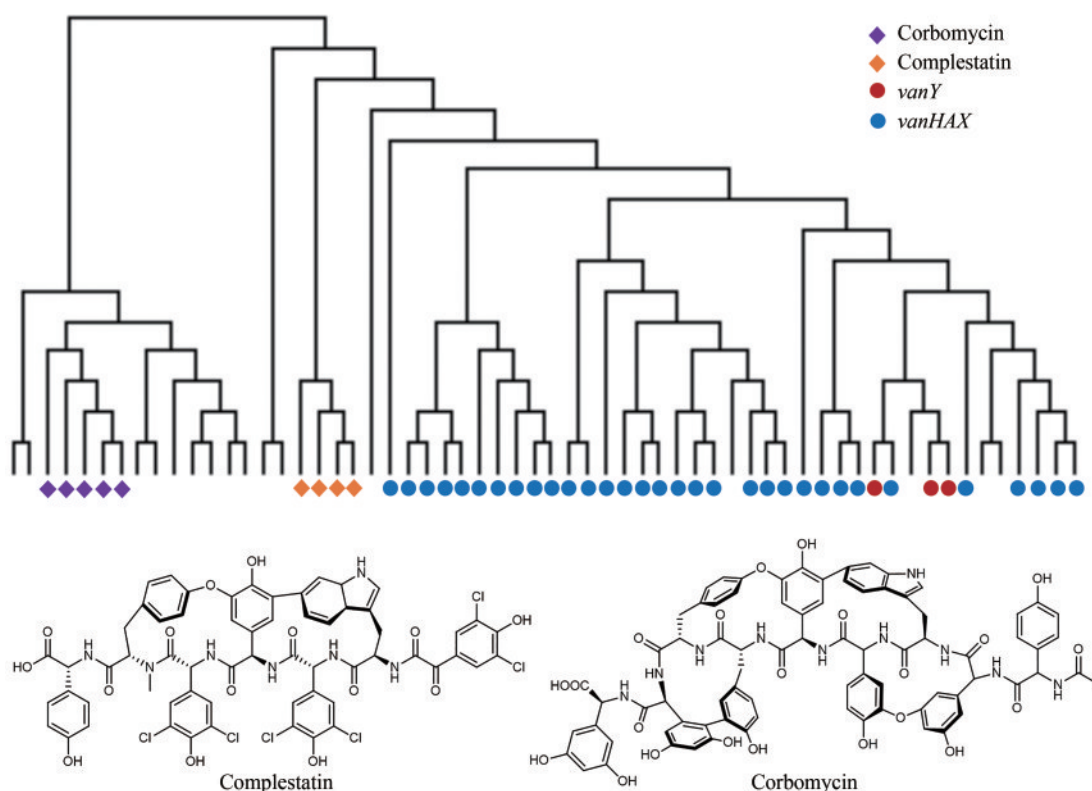


图 8 自抗性基因与进化树分析相结合的基因组挖掘

(在 71 个具有多样化的糖肽类生物合成基因簇中, corbomycin 与 complestatin 的生物合成基因簇中的自抗性基因特征与已知的抗性基因 *vanY* 和 *vanHAX* 处于不同的进化树分支)

Fig. 8 Discovery of new antibiotics guided by the resistance gene phylogeny

(Among 71 BGCs for the biosynthesis of glycopeptides, the self-resistance determinants of complestatin and corbomycin are different from the known determinants *vanY* and *vanHAX* in the phylogeny.)

和基因组指导的天然产物发掘策略进行有效的桥联, 弥补两种方法各自的局限性, 以更高效地挖掘新型天然产物, 从而为天然药物的研发提供助力。

### 参 考 文 献

- [1] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(3): 770-803.
- [2] 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.
- [3] CANTRELL C L, DAYAN F E, DUKE S O. Natural products as sources for new pesticides[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(6): 1231-1242.
- [4] YAN Y, LIU Q K, JACOBSEN S E, et al. The impact and prospect of natural product discovery in agriculture: new technologies to explore the diversity of secondary metabolites in plants and microorganisms for applications in agriculture[J]. *EMBO Reports*, 2018, 19(11): e46824.
- [5] DAYAN F E, DUKE S O. Natural compounds as next-generation herbicides[J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(3): 1090-1105.
- [6] DAYAN F E, OWENS D K, DUKE S O. Rationale for a natural products approach to herbicide discovery[J]. *Pest Management Science*, 2012, 68(4): 519-528.
- [7] SONG C G, YANG J, ZHANG M Z, et al. Marine natural products: the important resource of biological insecticide[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2021, 18(5): e2001020.
- [8] HENKE M T, KELLEHER N L. Modern mass spectrometry for synthetic biology and structure-based discovery of natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2016, 33(8): 942-950.
- [9] DUKE S O, ROMAGNI J G, DAYAN F E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action[J]. *Crop Protection*, 2000, 19(8-10): 583-589.
- [10] DAYAN F E, CANTRELL C L, DUKE S O. Natural products in crop protection[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(12): 4022-4034.
- [11] CRAGG G M, NEWMAN D J, SNADER K M. Natural products in drug discovery and development[J]. *Journal of Natural Products*, 1997, 60(1): 52-60.
- [12] MULLOWNEY M W, DUNCAN K R, ELSAYED S S, et al. Artificial intelligence for natural product drug discovery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(11): 895-916.
- [13] CHOPRA B, DHINGRA A K. Natural products: a lead for drug discovery and development[J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(9): 4660-4702.
- [14] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(3): 311-335.
- [15] NEWMAN D J, CRAGG G M, SNADER K M. The influence of natural products upon drug discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2000, 17(3): 215-234.
- [16] LOBANOVSKA M, PILLA G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? [J]. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2017, 90(1): 135-145.
- [17] NÜTZMANN H W, SCAZZOCCHIO C, OSBOURN A. Metabolic gene clusters in eukaryotes[J]. *Annual Review of Genetics*, 2018, 52: 159-183.
- [18] 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.
- [19] ROBBINS T, LIU Y C, CANE D E, et al. Structure and mechanism of assembly line polyketide synthases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 41: 10-18.
- [20] SÜSSMUTH R D, MAINZ A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(14): 3770-3821.
- [21] CHRISTIANSON D W. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(17): 11570-11648.
- [22] RUDOLF J D, CHANG C Y. Terpene synthases in disguise: enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(3): 425-463.
- [23] KIM H U, BLIN K, LEE S Y, et al. Recent development of computational resources for new antibiotics discovery[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 39: 113-120.
- [24] MEDEMA M H, FISCHBACH M A. Computational approaches to natural product discovery[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(9): 639-648.
- [25] RUTLEDGE P J, CHALLIS G L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 509-523.
- [26] CIMERMANCIC P, MEDEMA M H, CLAESEN J, et al. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters[J]. *Cell*, 2014, 158(2): 412-421.
- [27] WALSH C T, FISCHBACH M A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(8): 2469-2493.
- [28] HARVEY A L, EDRADE-EBEL R, QUINN R J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(2):

- 111-129.
- [29] VAN LANEN S G, SHEN B. Microbial genomics for the improvement of natural product discovery[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(3): 252-260.
- [30] LAUTRU S, DEETH R J, BAILEY L M, et al. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining[J]. *Nature Chemical Biology*, 2005, 1(5): 265-269.
- [31] CLEVENGER K D, BOK J W, YE R, et al. A scalable platform to identify fungal secondary metabolites and their gene clusters [J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(8): 895-901.
- [32] ZHANG J J, TANG X Y, MOORE B S. Genetic platforms for heterologous expression of microbial natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(9): 1313-1332.
- [33] HOPWOOD D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases[J]. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2465-2498.
- [34] SCHERLACH K, HERTWECK C. Mining and unearthing hidden biosynthetic potential[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3864.
- [35] BAUMAN K D, BUTLER K S, MOORE B S, et al. Genome mining methods to discover bioactive natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(11): 2100-2129.
- [36] ZIEMERT N, ALANJARY M, WEBER T. The evolution of genome mining in microbes—a review[J]. *Natural Product Reports*, 2016, 33(8): 988-1005.
- [37] 杨谦, 程伯涛, 汤志军, 等. 基因组挖掘在天然产物发现中的应用和前景[J]. *合成生物学*, 2021, 2(5): 697-715.
- YANG Q, CHENG B T, TANG Z J, et al. Applications and prospects of genome mining in the discovery of natural products[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(5): 697-715.
- [38] GALM U, HAGER M H, VAN LANEN S G, et al. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin[J]. *Chemical Reviews*, 2005, 105(2): 739-758.
- [39] WEISBLUM B. Erythromycin resistance by ribosome modification[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39(3): 577-585.
- [40] YAN Y, LIU N, TANG Y. Recent developments in self-resistance gene directed natural product discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(7): 879-892.
- [41] ALMABRUK K H, DINH L K, PHILMUS B. Self-resistance of natural product producers: past, present, and future focusing on self-resistant protein variants[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(6): 1426-1437.
- [42] O'NEILL E C, SCHORN M, LARSON C B, et al. Targeted antibiotic discovery through biosynthesis-associated resistance determinants: target directed genome mining[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2019, 45(3): 255-277.
- [43] STANCU C, SIMA A. Statins: mechanism of action and effects [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2001, 5(4): 378-387.
- [44] CHAMILOS G, LEWIS R E, KONTOYIANNIS D P. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(1): 96-103.
- [45] HUTCHINSON C R, KENNEDY J, PARK C, et al. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 78(3-4): 287-295.
- [46] STEFFENSKY M, MÜHLENWEG A, WANG Z X, et al. Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(5): 1214-1222.
- [47] WANG Z X, LI S M, HEIDE L. Identification of the coumermycin A(1) biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(11): 3040-3048.
- [48] BENTLEY R. Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant[J]. *Chemical Reviews*, 2000, 100(10): 3801-3826.
- [49] REGUEIRA T B, KILDEGAARD K R, HANSEN B G, et al. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(9): 3035-3043.
- [50] LIN H C, CHOOI Y H, DHINGRA S, et al. The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of  $\beta$ -transbergamotene[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(12): 4616-4619.
- [51] BIRCH A J, HUSSAIN S F. Studies in relation to biosynthesis. Part XXXVIII. A preliminary study of fumagillin[J]. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1969(11): 1473.
- [52] LIU S, WIDOM J, KEMP C W, et al. Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin[J]. *Science*, 1998, 282(5392): 1324-1327.
- [53] CAMPOY S, ADRIO J L. Antifungals[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 133: 86-96.
- [54] DA SILVA FERREIRA M E, COLOMBO A L, PAULSEN I, et al. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Medical Mycology*, 2005, 43(Suppl 1): S313-S319.
- [55] LIU N, ABRAMYAN E D, CHENG W, et al. Targeted genome mining reveals the biosynthetic gene clusters of natural product CYP51 inhibitors[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(16): 6043-6047.
- [56] MATTHEUS W, MASSCHELEIN J, GAO L J, et al. The kalimantacin/batumin biosynthesis operon encodes a self-resistance isoform of the FabI bacterial target[J]. *Chemistry &*

- Biology, 2010, 17(10): 1067-1071.
- [57] HEATH R J, ROCK C O. A triclosan-resistant bacterial enzyme [J]. *Nature*, 2000, 406(6792): 145-146.
- [58] TOYOHARA M. Aspects of the antituberculous activity of 27753-RP, a new semisynthetic derivative of griselimycine[J]. *Annales de L'Institut Pasteur Microbiology*, 1987, 138(6): 737-744.
- [59] HOAGLAND D T, LIU J Y, LEE R B, et al. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 102: 55-72.
- [60] KLING A, LUKAT P, ALMEIDA D V, et al. Antibiotics. Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins[J]. *Science*, 2015, 348(6239): 1106-1112.
- [61] VINALE F, FLEMATTI G, SIVASITHAMPARAM K, et al. Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(11): 2032-2035.
- [62] LONHIENNE T, LOW Y S, GARCIA M D, et al. Structures of fungal and plant acetohydroxyacid synthases[J]. *Nature*, 2020, 586(7828): 317-321.
- [63] XIE L N, ZANG X, CHENG W, et al. Harzianic acid from *Trichoderma afroharzianum* is a natural product inhibitor of acetohydroxyacid synthase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021: , 143(25): 9575-9584.
- [64] MCCOURT J A, DUGGLEBY R G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids[J]. *Amino Acids*, 2006, 31(2): 173-210.
- [65] JASTRZĘBOWSKA K, GABRIEL I. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents[J]. *Amino Acids*, 2015, 47(2): 227-249.
- [66] ZHONG B F, WAN J, SHANG C H, et al. Biosynthesis of rumbrins and inspiration for discovery of HIV inhibitors[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(11): 4193-4203.
- [67] LIU L X, MARGOTTIN F, LE GALL S, et al. Binding of HIV-1 Nef to a novel thioesterase enzyme correlates with Nef-mediated CD4 down-regulation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(21): 13779-13785.
- [68] PALMEIRA J D F, ARGANÁRAZ G A, DE OLIVEIRA G X L M, et al. Physiological relevance of ACOT8-Nef interaction in HIV infection[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2019, 29(5): e2057.
- [69] STAUDT R P, ALVARADO J J, EMERT-SEDLAK L A, et al. Structure, function, and inhibitor targeting of HIV-1 Nef-effector kinase complexes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(44): 15158-15171.
- [70] HOBSON C, CHAN A N, WRIGHT G D. The antibiotic resistome: a guide for the discovery of natural products as antimicrobial agents[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(6): 3464-3494.
- [71] GAUDÊNCIO S P, PEREIRA F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32(6): 779-810.
- [72] COX G, SIERON A, KING A M, et al. A common platform for antibiotic dereplication and adjuvant discovery[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(1): 98-109.
- [73] ZUBYK H L, COX G, WRIGHT G D. Antibiotic dereplication using the antibiotic resistance platform[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(152): e60536.
- [74] TANG M C, ZOU Y, YEE D, et al. Identification of the pyranonigrin A biosynthetic gene cluster by genome mining in *Penicillium thymicola* IBT 5891[J]. *AIChE Journal*, 2018, 64(12): 4182-4186.
- [75] TANG X Y, LI J, MILLÁN-AGUIÑAGA N, et al. Identification of thiotetronic acid antibiotic biosynthetic pathways by target-directed genome mining[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(12): 2841-2849.
- [76] WHITE S W, ZHENG J, ZHANG Y M, et al. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 74: 791-831.
- [77] YAO J W, ROCK C O. How bacterial pathogens eat host lipids: implications for the development of fatty acid synthesis therapeutics[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(10): 5940-5946.
- [78] SASAKI H, OISHI H, HAYASHI T, et al. Thiolactomycin, a new antibiotic. II. Structure elucidation[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1982, 35(4): 396-400.
- [79] YEH H H, AHUJA M, CHIANG Y M, et al. Resistance gene-guided genome mining: serial promoter exchanges in *Aspergillus nidulans* reveal the biosynthetic pathway for fellutamide B, a proteasome inhibitor[J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 11(8): 2275-2284.
- [80] RODRIGUEZ-VILARIÑO S, ARRIBAS J, ARIZTI P, et al. Proteolytic processing and assembly of the C5 subunit into the proteasome complex[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(9): 6592-6599.
- [81] HINES J, GROLL M, FAHNESTOCK M, et al. Proteasome inhibition by fellutamide B induces nerve growth factor synthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(5): 501-512.
- [82] BAUMANN S, HERRMANN J, RAJU R, et al. Cystobactamids: myxobacterial topoisomerase inhibitors exhibiting potent antibacterial activity[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(52): 14605-14609.
- [83] VETTING M W, HEGDE S S, ZHANG Y, et al. Pentapeptide-repeat proteins that act as topoisomerase poison resistance factors have a common dimer interface[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2011, 67(Pt 3): 296-302.
- [84] PANTER F, KRUG D, BAUMANN S, et al. Self-resistance

- guided genome mining uncovers new topoisomerase inhibitors from myxobacteria[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(21): 4898-4908.
- [85] YAN Y, LIU Q K, ZANG X, et al. Resistance-gene-directed discovery of a natural-product herbicide with a new mode of action[J]. *Nature*, 2018, 559(7714): 415-418.
- [86] AMORIM FRANCO T M, BLANCHARD J S. Bacterial branched-chain amino acid biosynthesis: structures, mechanisms, and drugability[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(44): 5849-5865.
- [87] HALL C J, MACKIE E R R, GENDALL A R, et al. Review: amino acid biosynthesis as a target for herbicide development [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(12): 3896-3904.
- [88] FLINT D H, NUDELMAN A. Studies on the active site of dihydroxy-acid dehydratase[J]. *Bioorganic Chemistry*, 1993, 21(4): 367-385.
- [89] TSUDA Y, KANEDA M, TADA A, et al. Aspterric acid, a new sesquiterpenoid of the carotane group, a metabolite from *Aspergillus terreus* IFO-6123. X-Ray crystal and molecular structure of its *p*-bromobenzoate[J]. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1978(4): 160.
- [90] ALANJARY M, KRONMILLER B, ADAMEK M, et al. The Antibiotic Resistant Target Seeker (ARTS), an exploration engine for antibiotic cluster prioritization and novel drug target discovery[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W42-W48.
- [91] BLIN K, WOLF T, CHEVRETTE M G, et al. antiSMASH 4.0-improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W36-W41.
- [92] WEBER T, BLIN K, DUDELA S, et al. antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W237-W243.
- [93] MUNGAN M D, ALANJARY M, BLIN K, et al. ARTS 2.0: feature updates and expansion of the Antibiotic Resistant Target Seeker for comparative genome mining[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(W1): W546-W552.
- [94] DE LOS SANTOS E L C, CHALLIS G L. clusterTools: proximity searches for functional elements to identify putative biosynthetic gene clusters[EB/OL]. *bioRxiv*, 2017, 119214. (2017-12-12) [2023-12-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/119214v2>.
- [95] EDDY S R. What is a hidden Markov model? [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(10): 1315-1316.
- [96] BRAUN V, PRAMANIK A, GWINNER T, et al. Sideromycins: tools and antibiotics[J]. *BioMetals* 2009, 22(1): 3-13.
- [97] ZENG Y, KULKARNI A, YANG Z Y, et al. Biosynthesis of albomycin  $\delta_2$  provides a template for assembling siderophore and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitor conjugates[J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(9): 1565-1575.
- [98] GARG R P, QIAN X L, ALEMANY L B, et al. Investigations of valanimycin biosynthesis: elucidation of the role of seryl-tRNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(18): 6543-6547.
- [99] STEFANSKA A L, CASSELS R, READY S J, et al. SB-203207 and SB-203208, two novel isoleucyl tRNA synthetase inhibitors from a *Streptomyces* sp. I. Fermentation, isolation and properties[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2000, 53(4): 357-363.
- [100] HU Z J, AWAKAWA T, MA Z J, et al. Aminoacyl sulfonamide assembly in SB-203208 biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 184.
- [101] THAKER M N, WANG W L, SPANOGIANNOPOULOS P, et al. Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(10): 922-927.
- [102] CULP E J, WAGLECHNER N, WANG W L, et al. Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling[J]. *Nature*, 2020, 578(7796): 582-587.



通讯作者: 闫岩(1986—),男,博士,研究员。研究方向为海洋活性天然产物的挖掘与合成生物学智造。

E-mail: [yyan@scsio.ac.cn](mailto:yyan@scsio.ac.cn)



第一作者: 宋永相(1980—),男,博士,副研究员。研究方向为海洋微生物活性物质的发掘与应用。

E-mail: [songx@scsio.ac.cn](mailto:songx@scsio.ac.cn)