

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-037

## 含氨基乙烯半胱氨酸核糖体肽的生物合成与化学合成

谢向前<sup>1</sup>, 郭雯<sup>1</sup>, 王欢<sup>1</sup>, 李进<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 南京大学化学与生物医药创新研究院, 配位化学国家重点实验室, 南京大学化学化工学院, 江苏省先进有机材料重点实验室, 江苏 南京 210093; <sup>2</sup> 南京药石科技股份有限公司, 江苏 南京 210032)

**摘要:** 核糖体肽是一类拥有化学结构和生物活性多样性的多肽天然产物家族, 在药物开发方面具有巨大的发展潜力。氨基乙烯半胱氨酸 (AviCys) 是部分核糖体肽类天然产物中存在的一种特殊 C 末端交联结构单元。含有 AviCys 单元的核糖体肽类天然环肽往往具有优良的抗菌或抗肿瘤活性, 且 AviCys 大环结构对其生物活性至关重要。本文围绕此类天然环肽的生物合成和化学合成进行了总结: ①羊毛硫肽、lipolanthines、linaridins 和 thioamitides 四类核糖体肽天然产物中 AviCys 结构单元的生物合成研究进展, 主要包括 C 末端半胱氨酸的氧化脱羧反应, 丝氨酸/苏氨酸或半胱氨酸脱水或脱硫反应, 以及 AviCys 环化反应; ②针对含 AviCys 结构单元环肽的化学合成方法, 包括自由基硫醇-炔偶联、氧化脱羧/脱羧、酰胺与缩醛缩合等。本综述同时对相关研究中存在的若干挑战和尚待解决的问题进行了梳理和总结, 包括生物合成过程中尚未得到深入解析的环化步骤、化学合成中尚未解决的立体选择性和化学兼容性等。综上, 对含 AviCys 结构单元天然环肽的生物合成途径全面解析及化学合成方法的开发, 有望为此类生物功能环肽及其衍生物的制备与生物工程改造奠定基础, 推动该类功能环肽在生命科学和药物科学领域的应用。

**关键词:** 核糖体肽; 天然产物; 氨基乙烯半胱氨酸; 生物合成; 化学合成

中图分类号: Q936 文献标志码: A

## Biosynthesis and chemical synthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides containing aminovinyl cysteine

XIE Xiangqian<sup>1</sup>, GUO Wen<sup>1</sup>, WANG Huan<sup>1</sup>, LI Jin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Chemistry and Biomedicine Innovation Center of Nanjing University, Jiangsu Key Laboratory of Advanced Organic Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China; <sup>2</sup> PharmaBlock Sciences (Nanjing), INC., Nanjing 210032, Jiangsu, China)

**Abstract:** Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) are a major class of peptide natural products that often contain noncanonical amino acids and structural motifs with promising potential as drug

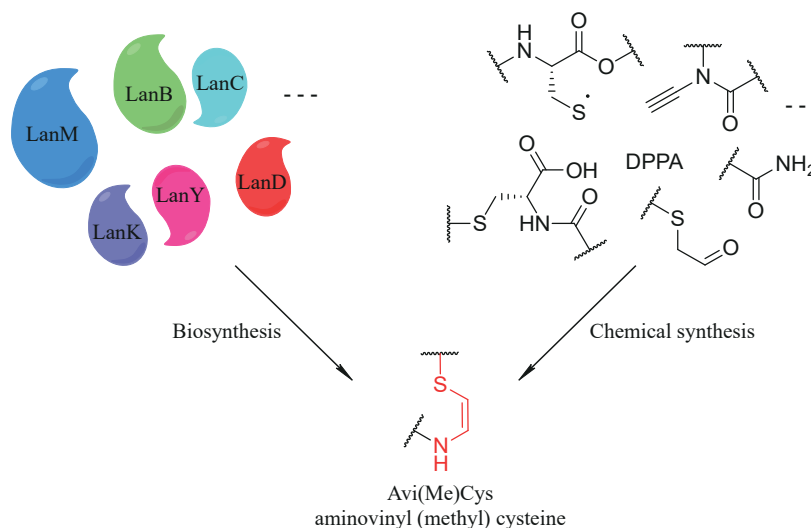
收稿日期: 2024-04-17 修回日期: 2024-07-26

基金项目: 国家自然科学基金 (22325702)

引用本文: 谢向前, 郭雯, 王欢, 李进. 含氨基乙烯半胱氨酸核糖体肽的生物合成与化学合成[J]. 合成生物学, 2024, 5(5): 981-996

Citation: XIE Xiangqian, GUO Wen, WANG Huan, LI Jin. Biosynthesis and chemical synthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides containing aminovinyl cysteine[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(5): 981-996

leads. One unique structural unit found in RiPPs is the C-terminal *S*-[(*Z*)-2-aminoethenyl]-D-cysteine (AviCys) or (2*S*, 3*S*)-*S*-[(*Z*)-2-aminoethenyl]-3-methyl-D-cysteine (AviMeCys). Avi(Me)Cys-containing RiPPs usually exhibit potent antimicrobial or anticancer activities, which strictly require the presence of the C-terminal AviCys motifs. Despite the potential of Avi(Me)Cys-containing RiPPs as drug leads, lack of synthetic methods and biosynthetic systems to access these type of cyclic peptides impede the application of Avi(Me)Cys-containing peptides in medicinal chemistry. In this review, we summarize the current understanding of the biosynthesis of Avi(Me)Cys-containing peptides and the progress made in the development of chemical methods to synthesize Avi(Me)Cys motifs and derivatives. This review contains two following major sections: ① The biosynthetic process of Avi(Me)Cys motifs in the different families of Avi(Me)Cys-containing RiPPs, including lanthipeptides, lipolanthines, linaridins and thioamitides, are introduced with three essential enzymatic steps: first, a cysteine decarboxylase oxidatively decarboxylated the C-terminal cysteine, generating a highly reactive enethiol; subsequently, distinct enzymes catalyze the dehydration of a serine/threonine (Ser/Thr) residue or the dethiolation of a Cys residue in the precursor peptide by incorporating a dehydroalanine (Dha) or dehydrobutyrine (Dhb) residue; finally, a putative cyclase catalyzes the Michael-type addition between the enethiol group and a Dha/Dhb residue to yield the Avi(Me)Cys motif. Detailed enzymatic investigation of these biosynthetic steps are introduced. ② The chemical synthesis of the Avi(Me)Cys building block and their analogues via diverse synthetic methodology, including the radical thiol-yne coupling, the oxidative decarboxylation/decarbonylation, and the condensation of amides with acetals. Overall, further elucidation of the complete biosynthetic pathway for Avi(Me)Cys motifs in related RiPPs, along with advancements in the chemical synthesis of Avi(Me)Cys-containing natural product peptides, will facilitate the effective utilization of these bioactive peptide natural products.



**Keywords:** RiPPs; natural products; aminovinyl cysteine; biosynthesis; chemical synthesis

核糖体肽 (ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide, RiPP) 是一类数量庞大且结构多样的天然产物家族, 具有广泛的生物学活性和药用前景<sup>[1-2]</sup>。典型的 RiPP 的生物合成途径首先由核糖体对前体肽进行合成, 前体肽在经历一系列翻译后修饰酶 (posttranslational

modification enzyme, PTM enzyme) 的加工后, 生成具有生物活性的核糖体肽产物。常见的酶促翻译后修饰包括脱水、糖基化、环化、卤化等<sup>[3]</sup>。核糖体肽中的 C 端 *S*-[(*Z*)-2-氨基乙烯基]-D-半胱氨酸 (AviCys) 或 (2*S*, 3*S*)-*S*-[(*Z*)-2-氨基乙烯基]-3-甲基-D-半胱氨酸 (AviMeCys) 是一类独特的结构

单元, 主要发现于羊毛硫肽、linaridins、thioamitides 和 lipolanthines 等四个核糖体肽亚家族<sup>[4-5]</sup>。这些含有 Avi(Me)Cys 的核糖体环肽往往表现出对葡萄球菌、链球菌、肠球菌和梭菌等病原菌的强力抗菌活性<sup>[6]</sup>, 以及对肿瘤细胞的细胞毒性<sup>[7]</sup>等(表1)。含有 Avi(Me)Cys 的核糖体肽往往还含有其他非天然氨基酸, 如 2,3-脱氢丙氨酸(Dha)、(Z)-2,3-脱氢丁氨酸(Dhb)、D型氨基酸、羊毛硫氨酸(Lan)、甲基羊毛硫氨酸(MeLan)和 avionin(Avi)等(图1)<sup>[3, 6, 18]</sup>。这些经过翻译后修饰过程形成的非天然氨基酸组分和结构单元均对相应核糖体肽的结构和生物功能具有重要影响<sup>[19]</sup>。

尽管含有 Avi(Me)Cys 的核糖体环肽表现出

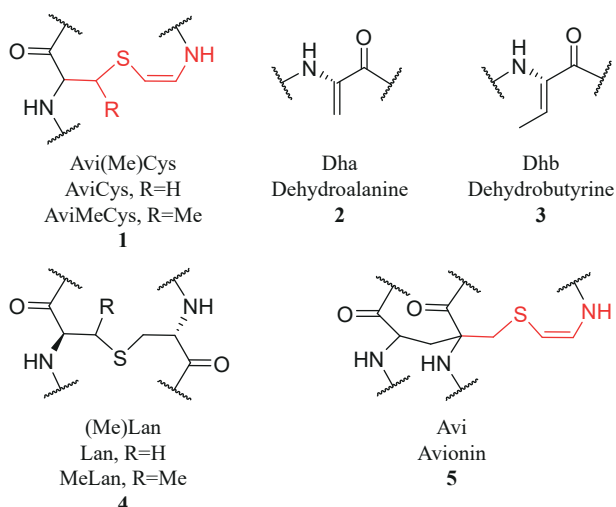
展为药物的潜力, 但目前对这类天然产物的生物合成途径解析仍不完善, 同时也缺乏有效的途径实现 Avi(Me)Cys 结构单元的化学合成, 尚未有报道关于含有 Avi(Me)Cys 核糖体环肽的成功全合成策略<sup>[20-25]</sup>。这些因素限制了这类化合物的高效获得, 阻碍了其向临床应用的发展。本篇综述全面总结和讨论了含有 Avi(Me)Cys 结构的核糖体肽天然产物在生物合成和化学合成两方面的进展。

## 1 Avi(Me)Cys 结构单元的生物合成

前期研究认为, Avi(Me)Cys 结构单元的生物

**表1** 含有 Avi(Me)Cys 结构单元天然产物的产生菌株及其生物活性  
**Table 1** Bacterial producers and bioactivity of Avi(Me)Cys-containing peptides

亚家族	天然产物	产生菌株	生物活性
羊毛硫肽	Microbisporicins <sup>[8]</sup>	<i>Microbispora</i> ATCC PTA-5024	对 MRSA、 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 等有抗菌活性
	Epidermin <sup>[9]</sup>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tü 3298	对 <i>Mariniluteicoccus flavus</i> 、 <i>Staphylococcus simulans</i> 等有抗菌活性
	Mersacidin <sup>[10]</sup>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	对 <i>Staphylococcus aureus</i> 、MRSA 等有抗菌活性
	Lexapeptide <sup>[11]</sup>	<i>Streptomyces rochei</i> Sal35	对 MRSA、MRSE 等有抗菌活性
Lipolanthines	Microvionin <sup>[12]</sup>	<i>Microbacterium arborescens</i>	对 MRSA、 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 等有抗菌活性
	Nocavionin <sup>[12]</sup>	<i>Nocardia terpenica</i>	尚未报道
	Goadvionins <sup>[13]</sup>	<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0584	对 <i>Staphylococcus aureus</i> 、 <i>Bacillus subtilis</i> 等有抗菌活性
	Lipoavitides <sup>[14]</sup>	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-1521	溶血活性
Linaridins	Cypemycin <sup>[15]</sup>	<i>Streptomyces</i> sp. OH-4156	对 P388 白血病细胞有细胞毒性, 对 <i>Micrococcus luteus</i> 等有抗菌活性
	Salinipeptins <sup>[16]</sup>	<i>Streptomyces</i> sp. strain GSL-6C	对 <i>Streptococcus pyogenes</i> MIT1 等有抗菌作用
Thioamitides	Thioviridamide <sup>[7]</sup>	<i>Streptomyces olivoviridis</i> NA005001	诱导细胞凋亡
	Thioholgamides <sup>[17]</sup>	<i>Streptomyces malayseiense</i>	抗增殖活性、细胞毒性



**图1** 含 Avi(Me)Cys 结构的核糖体肽中常见的结构单元

**Fig. 1** Chemical structures of the noncanonical amino acids commonly found in Avi(Me)Cys-containing peptides

合成涉及前体肽的三步翻译后修饰，分别为C末端半胱氨酸的氧化脱羧形成烯硫醇、丝氨酸/苏氨酸/半胱氨酸的脱水/脱硫形成Dha或Dhb、烯硫醇与Dha/Dhb间通过Michael加成反应形成Avi(Me)Cys结构单元。本节将围绕含Avi(Me)Cys单元核糖体肽的不同亚家族分别进行生物合成的介绍，主要围绕上述关键翻译后修饰过程中涉及的酶化学过程进行总结与分析。

### 1.1 羊毛硫肽中Avi(Me)Cys单元的生物合成

1928年，羊毛硫肽的典型代表nisin被发现，并作为抗生素得到广泛应用<sup>[26]</sup>。截至目前，超过100例羊毛硫肽天然产物得到发现、分离、结构和功能鉴定。该家族天然产物的结构特点是含有由硫醚键交联形成的(Me)Lan环结构。根据(Me)Lan环结构生物合成中羊毛硫肽合成酶的特点，已知的羊毛硫肽可分为五类(I~V)(图2)<sup>[1, 27]</sup>。Avi(Me)Cys结构单元在部分羊毛硫肽亚家族中存在，包括：第I类羊毛硫肽中的microbisporicin<sup>[8]</sup>、epidermin等<sup>[9]</sup>；第II类羊毛硫肽中的mersacidin等<sup>[10]</sup>；第V类羊毛硫肽中的lexapeptide等<sup>[11]</sup>(图3)。这些含Avi(Me)Cys结构的羊毛硫肽表现出优良的抗革兰氏阳性菌活性，包括多重耐药的表皮葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE)和金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)<sup>[28]</sup>，并通常通过与

细胞壁合成的重要前体lipid II结合发挥抗菌作用。例如，microbisporicin可以形成与lipid II的复合物，阻断细胞壁的生物合成，使得细胞内渗透压增高，最终导致细胞结构完整性受损并裂解<sup>[29-32]</sup>。epidermin与lipid II形成的复合物可以插入细菌细胞膜磷脂双分子层并形成穿孔，提供了细胞组分泄漏至周质的可渗透通道，进而导致细胞渗透压损失和细胞死亡<sup>[33-34]</sup>。mersacidin与lipid II中的GlcNAc(N-乙酰葡萄糖胺)结构单元具有亲和力，同样通过整合lipid II抑制细胞壁的生物合成发挥其抗生素功能<sup>[35]</sup>。Kruszewska等<sup>[36]</sup>的研究发现，mersacidin可以有效治愈小鼠鼻腔中的MRSA感染。第V类羊毛硫肽lexapeptide对革兰氏阳性菌表现出较好的抗菌活性，具有治疗耐药菌感染的潜力<sup>[11]</sup>。

#### 1.1.1 烯硫醇单元的酶促形成

在羊毛硫肽类天然产物的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC)中，通常编码了一个黄素依赖的氧化脱羧酶(LanD)。LanD属于同源寡聚半胱氨酸脱羧酶(HFCD)超家族蛋白，以黄素单核苷酸(FMN)或黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)作为辅因子<sup>[37-39]</sup>。尽管不同来源LanD的氨基酸序列同源性有限，但这些蛋白均能形成复杂的同源十二聚体结构。它们的整体结构高度相似，黄素结合区域结构保守，而底物结合钳在缺乏多肽底物的情况下高度无序。在含有Avi(Me)Cys结构的羊毛硫肽生物合成过程中，LanD负责催化

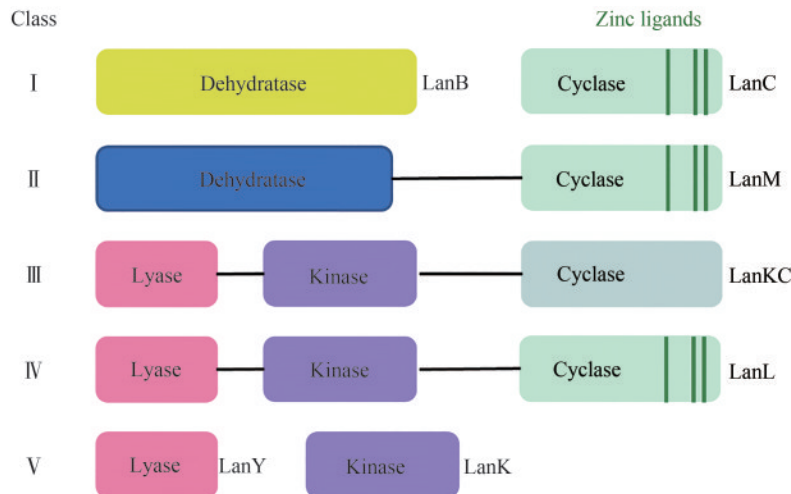


图2 第I~V类羊毛硫肽合成酶的结构域组成

Fig. 2 Domain organization of the enzyme(s) that produce lanthipeptides from Class I - V

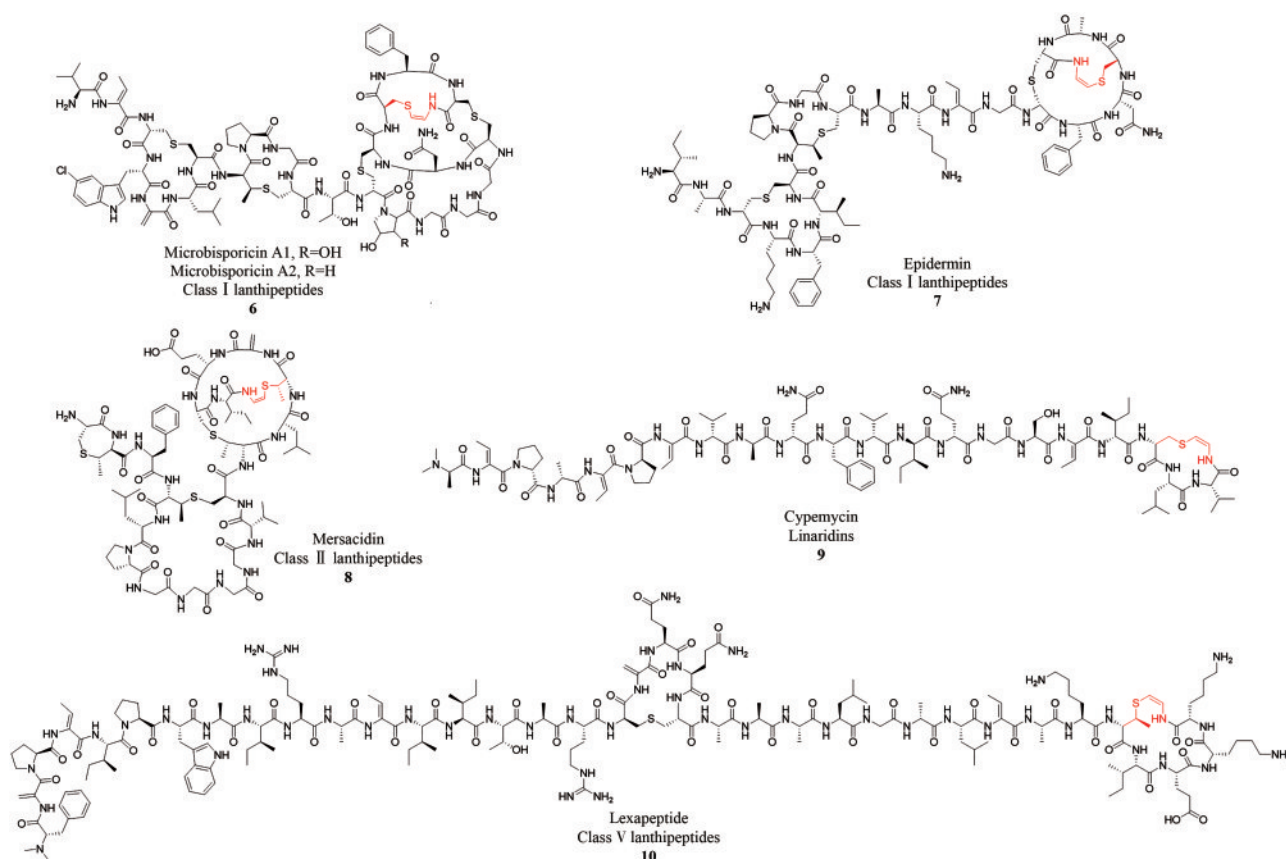


图3 含 Avi(Me)Cys 结构的代表性核糖体肽天然产物

Fig. 3 Chemical structures of representative ribosomal peptide natural products containing Avi(Me)Cys

前体肽 LanA 中 C 末端半胱氨酸的氧化脱羧反应。目前认为, 该催化过程首先由半胱氨酸的巯基经过黄素介导的氧化反应形成相应的硫醛物种 **A**, 然后硫醛自发脱羧形成烯硫醇中间体 **B** (图4)<sup>[37-38, 40]</sup>。

目前, 对 LanD 催化机制的理解主要来源于对 epidermin 生物合成途径中氧化脱羧酶 EpiD 的研究。EpiD 与五肽底物的复合物晶体结构显示, FMN 与 C 末端半胱氨酸巯基之间存在相互作用, 但与羧基间不存在相互作用, 这说明脱羧反应是巯基氧化间接导致的。EpiD 的 His67 在催化氧化脱羧反应中起着至关重要的作用, 可能通过增加半胱氨酸巯基质子的酸度促进反应发生<sup>[37]</sup>。突变体 EpiD<sub>His67Asn</sub> 与五肽底物的复合物晶体结构及生化实验表明, 其可以在不影响底物结合的情况下丧失脱羧活性<sup>[37]</sup>。EpiD 中 Asn117 的侧链羰基与多肽底物 Cys-C $\beta$  质子之间的氢键相互作用促进了 C $\beta$  的去质子化, 从而生成硫醛中间体。随后由于半胱氨酸 C $\alpha$  质子被 Ile151 空间阻断, 发生脱羧反应而不

是 C $\alpha$  去质子化。由于 Cys 的羧基暴露于溶剂中, 使产物二氧化碳高效离开活性位点, 进一步促进了脱羧以形成 Avi(Me)Cys 中的碳碳双键<sup>[37]</sup>。由于 Asn117 与 Cys-C $\beta$  质子间的相互作用使 Cys-巯基旋转到相对于 Cys-N $\alpha$  的反式构象, 这在 Avi(Me)Cys 结构中选择性形成 (Z)-烯炔提供了依据。当多肽底物结合在酶的活性位点时, C 末端 Cys 位于黄素 re 面, 巯基朝向黄素的 C4a 与 N5。然后硫醛的形成将硫原子定位到质子化的 Asn117, 脱羧生成 (Z)-烯炔<sup>[37]</sup>。在 Avi(Me)Cys 结构形成时发挥关键作用的 Asn117 在其他 LanD 结构中是保守的, 例如 MrsD 中的 Asn125<sup>[38]</sup>。TvaF 等 LanD 酶的结构也已得到解析<sup>[41]</sup>, 进一步为后续更详尽的机制解析与结构改造提供了基础。

LanD 对前体肽 LanA 的识别和修饰不依赖于前导肽序列的存在, 因此是非前导肽依赖型修饰酶。EpiD 展现出很高的多肽底物宽泛性, 可以催化长度为 4~52 个氨基酸的非天然多肽底物的氧化脱

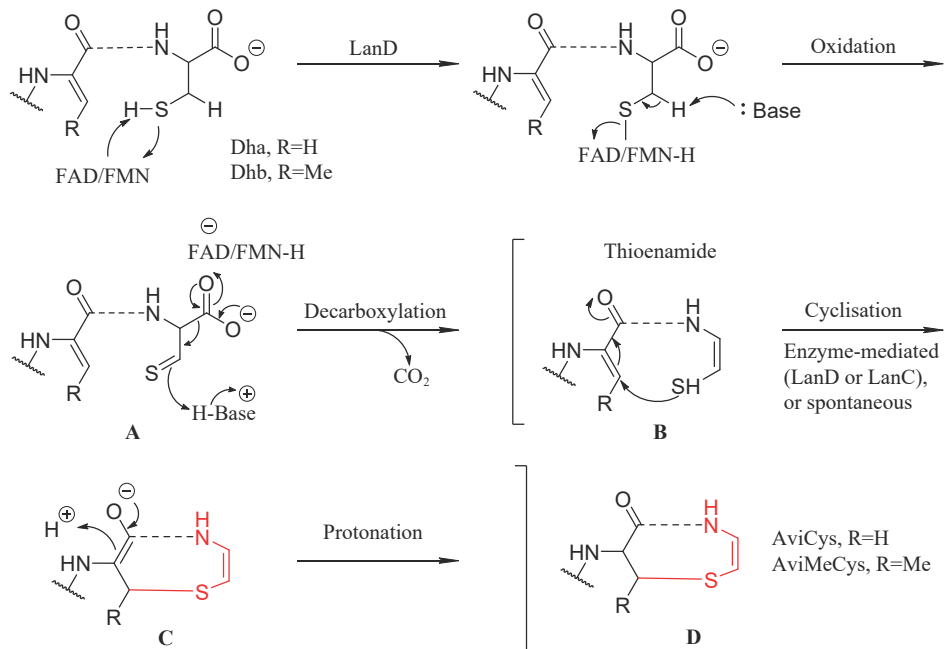


图4 由LanD催化的C末端半胱氨酸的氧化脱羧

Fig. 4 Oxidative decarboxylation of a C-terminal cysteine-bearing peptide, catalyzed by LanD

羧。EpiD对多肽底物的序列要求仅限于其C端的三肽序列：AA<sub>1</sub>-AA<sub>2</sub>-Cys，其中AA<sub>1</sub>=Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr或Trp，AA<sub>2</sub>=Ala、Ser、Val、Thr、Cys、Ile或Leu<sup>[42]</sup>。此外，Kupke等<sup>[42]</sup>证明了EpiD对C末端半胱氨酸巯基乙烷基化的多肽底物没有脱羧活性，并基于此推测为脱羧反应先于C末端硫醚环化发生<sup>[40]</sup>。

值得注意的是，LanD修饰产生的多肽C末端烯基硫醇单元在中性水溶液中可异构化为具有高度亲电性的硫醛基团。近期，王欢课题组<sup>[43]</sup>利用MicD等氧化脱羧酶作为酶工具在多肽末端引入硫醛基团，并通过羟胺等亲核试剂与硫醛反应，实现了多肽和蛋白质的C末端位点选择性生物偶联和官能团化。

#### 1.1.2 脱氢丙氨酸(Dha)与脱氢丁氨酸(Dhb)的酶促形成

在第I类羊毛硫肽的生物合成中，脱水酶LanB利用tRNA<sup>Glu</sup>通过酯交换反应对前体肽中丝氨酸/苏氨酸的侧链羟基进行谷氨酰化，然后攫取α-C上质子发生β-消除生成Dha/Dhb（图2和图5）<sup>[27, 44]</sup>。tRNA<sup>Glu</sup>类似物5'-磷酸脱甲基谷氨酰胺（PDG）与谷氨酰化蛋白TbtB的共晶结构及生化实验揭示了谷氨酰化结构域中的Arg197、Lys201及Arg22

等为关键催化氨基酸<sup>[45]</sup>。NisB<sub>Val169Cys}</sub>与NisA-Ser3Dap<sup>Glu</sup>-Ser(-12)Cys的共价复合物结构及关键氨基酸的突变实验为消除结构域中的催化机制提供了分子水平的证据：NisB中的Arg786与谷氨酸的侧链羧基之间存在静电相互作用稳定底物位置，His961位于α-氢附近，很可能充当催化碱，这个氢原子通过Dap羰基与Arg826侧链之间的相互作用而被酸化<sup>[45]</sup>。与第I类不同，第II、III、IV、V类羊毛硫肽的生物合成中是通过在丝氨酸/苏氨酸的侧链羟基上发生磷酸化，再进行消除生成Dha/Dhb的（图5）。第II类羊毛硫肽由双功能的羊毛硫肽合成酶LanM的N端ATP依赖的脱水酶结构域执行脱水功能，其与LanB无同源性。CylM与腺苷酸单磷酸（AMP）的复合物结构显示Asp252、His254、Val272、Val301和Ile354负责与ATP结合，His349可能接受底物多肽中Ser/Thr的质子，而Asp347可能定向Ser/Thr的氧原子以对ATP的γ-磷酸亲核进攻。此外，CylM中的Asn352和Asp364在LanM家族酶中高度保守，作为二价金属Mg<sup>2+</sup>的结合位点；Asp252、His254、Arg506和Thr512位于磷酸化位点附近，对消除反应至关重要<sup>[46-47]</sup>。在第III类或第IV类羊毛硫肽中，由第III类LanKC或第IV类羊毛硫肽合成酶LanL负责催化

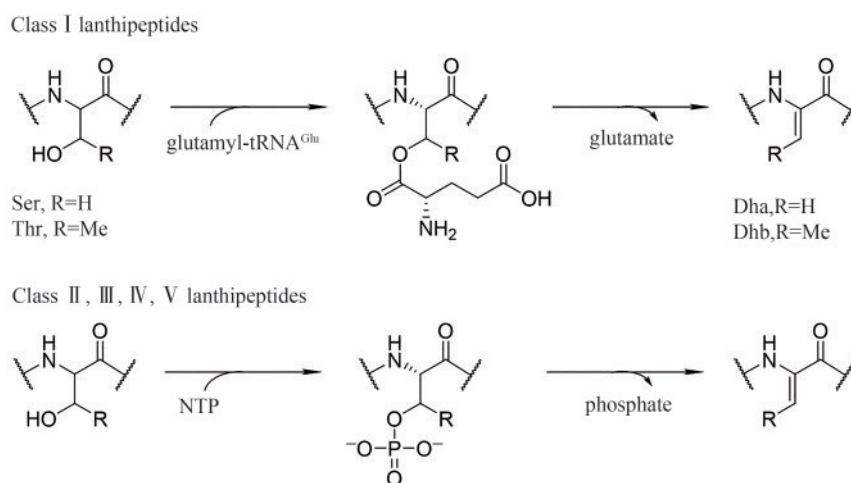


图5 通过谷氨酰化或磷酸化中间体形成 Dha/Dhb

Fig. 5 Formation of Dha/Dhb residues through glutamylated or phosphorylated intermediates

Dha/Dhb 的形成。这两种酶结构组成相似，均由裂解酶结构域、激酶结构域和环化酶结构域组成，主要区别在于 LanKC 环化酶结构域中缺乏 LanL 中的  $Zn^{2+}$  结合位点。这两类酶通过激酶结构域对前体肽中丝氨酸/苏氨酸进行磷酸化，再通过裂解结构域催化磷酸根的消除反应，生成 Dha/Dhb。第 III 类羊毛硫肽合成酶 CurKC<sup>[48]</sup>、ThurKC<sup>[49]</sup> 与第 IV 类羊毛硫肽合成酶 CurL<sup>[50]</sup> 的部分或完整结构已得到解析，但尚未获得与多肽底物的共晶结构，其底物识别和催化机制在分子水平上有待进一步研究。在第 V 类羊毛硫肽的生物合成中，独立的激酶 LanK 和裂解酶 LanY 协同催化 Dha/Dhb 的形成，两者的结构尚未被解析，但序列比对及生化实验初步揭示了磷酸化与消除反应的关键催化位点<sup>[51-52]</sup>，具体催化机制仍待进一步研究。

### 1.1.3 Avi(Me)Cys 单元的环化

尽管羊毛硫肽中 Avi(Me)Cys 单元的形成过程普遍被认为通过烯硫醇与 Dha/Dhb 之间的 Michael 加成反应实现<sup>[27]</sup> (图 4)，但该过程是酶促过程或非酶促过程，尚未得到明确解析。如果该环化过程为酶促过程，是 LanD 或羊毛硫肽合成酶负责此关键生物合成步骤的催化也没有得到确认，分子水平的酶催化机制也没有得到解析。已有研究推测，在第 I、II 和 IV 类羊毛硫肽生物合成中，Avi(Me)Cys 环化可能由 LanC 环化酶或 LanM/LanL 中的环化酶结构域催化。这三类羊毛硫肽合成酶的环化酶结构域均含有高度保守的  $Zn^{2+}$  结合位点。

在催化 Lan 硫醚环形成时， $Zn^{2+}$  能够与半胱氨酸侧链的硫醇基团结合，活化其反应活性，加速 Michael 加成过程，同时通过控制 enolate 中间体质子化的步骤，对 Lan 结构单元的手性进行控制<sup>[53-57]</sup>。如第 I、II 和 IV 类羊毛硫肽合成酶通过环化酶结构域催化 Avi(Me)Cys 单元的形成，其  $Zn^{2+}$  催化中心也可能以相似的方式活化烯硫醇基团，推动 Michael 加成反应的进行。在含有 Avi(Me)Cys 单元的第 V 类羊毛硫肽 BGC 中，不存在注释为环化酶的编码基因，但存在一个未知功能的 LanX 酶，其与 APH 家族蛋白具有低同源性，可能参与 Avi(Me)Cys 结构的环化过程。2024 年，Zhao 课题组<sup>[14]</sup> 通过基因组挖掘发现了一组 lipolanthine 类化合物 lipoavitides，其 N 端为独特的 4-羟基-2,4-二甲基戊酰 (HMP) 结构，C 端为 Avi(Me)Cys 结构，具有一定的溶血活性。Lipoavitides 完整的生物合成途径亟待解析，值得注意的是，其 BGC 中存在第 V 类羊毛硫肽合成酶 LanK、LanY 及氧化脱羧酶 LanD，但不存在 LanX。

## 1.2 lipolanthine 中 avionin 单元的生物合成

2018 年，Sussmuth 团队<sup>[12]</sup> 分离获得了来源于 *Microbacterium arborescens* 的 microvionin 和来源于 *Nocardia terpenica* 的 nocavionin 这两例带有 N 端脂肪链修饰的环肽天然产物。这两例天然产物的多肽结构单元含有独特的 C 端 AviCys-labionin 杂合大环结构单元，命名为 avionin。基于该类天然产物

的结构特点, Sussmuth 等将其命名为 lipolanthine 类天然产物。其中, N 端含有双甲基胍基脂肪酸链修饰的 microvionin 对 MRSA 和肺炎链球菌都显示出强大的抗菌活性, 具有治疗抗生素耐药细菌感染的潜力。2020 年, Onaka 团队<sup>[13]</sup>表征了 8 种新的 lipolanthines, 命名为 goadvionins。goadvionins 具有抗革兰氏阳性菌活性, 但其抗菌的确切机制尚不清楚。已有研究表明, lipolanthine 类化合物中 avionin 结构的生物合成由第 III 类羊毛硫肽合成酶与 LanD 酶共同完成。例如, microvionin 中 avionin 结构可由 FAD 依赖的半胱氨酸脱羧酶 MicD 和第 III 类羊毛硫肽合成酶 MicKC 在体外共同催化形成(图 6)<sup>[58-59]</sup>。但具体的酶修饰过程, 包括修饰顺序和 avionin 环化步骤的机制, 尚未得到完整解析。值得注意的是, 与第 I、II 和 IV 类羊毛硫肽合成酶相比, 第 III 类羊毛硫肽合成酶 LanKC 的环化酶结构域中缺少保守的  $Zn^{2+}$  结合位点。因此, 如果 LanKC 催化了 avionin 的环化步骤, 其催化机制可能与其他羊毛硫肽合成酶不同。

### 1.3 linaridin 中 Avi(Me)Cys 单元的生物合成

1993 年, Ōmura 团队<sup>[15]</sup>从 *Streptomyces* sp. OH-4156 中分离出一种新的核糖体肽类天然产物 cypemycin, 具有对黄体微球菌的抗菌活性和对小鼠 P388 白血病细胞的细胞毒性。cypemycin 结构上具有多个 D 型氨基酸、4 个 Dhb、2 个 L-别异亮氨酸、1 个二甲基化的 N 端丙氨酸和 1 个位于 C 末端的 AviCys 环<sup>[15, 60-61]</sup>(图 3)。由于 Dhb 和 AviCys 结构的存在, cypemycin 最初被归类为羊毛硫肽。直到 2010 年, Claesen 等鉴定了 cypemycin 的生物合成基因簇, 其中不存在编码典型的羊毛硫肽合成酶的基因, 包括脱水酶和环化酶, 因此将其归类为一个新的核糖体肽亚家族 linaridins<sup>[15, 62]</sup>。迄今为止, 该家族已有 cypemycin<sup>[15]</sup>、grisemycin<sup>[63]</sup>、legonaridin<sup>[16]</sup>、salinipeptins A~D<sup>[16]</sup>、mononaridin<sup>[64]</sup>、pegvadin A 和 pegvadin B<sup>[65]</sup> 等 10 个天然产物得到分离和表征。

近年来, linaridin 类天然产物的生物合成研究取得了若干重要进展。早期的研究主要集中于以 CypD 为代表的氧化脱羧酶 LinD 催化 C 末端半胱氨

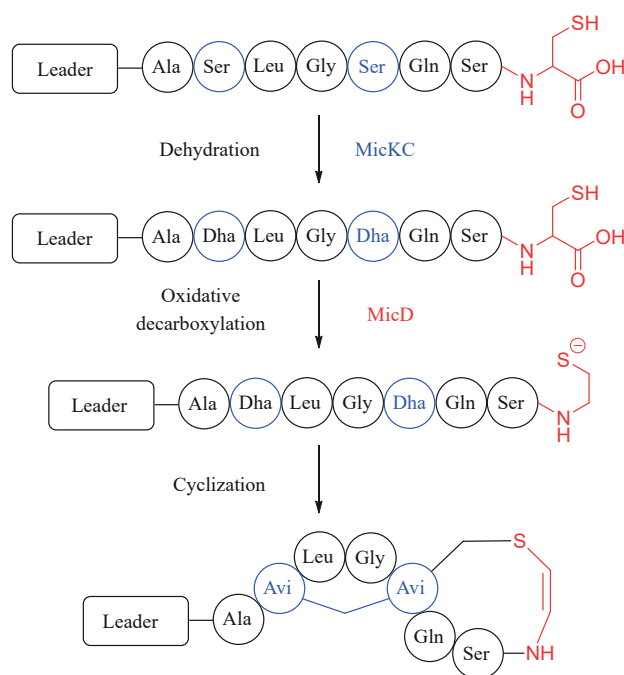


图 6 microvionin 中 avionin 结构可能的生物合成途径  
Fig. 6 Proposed biosynthetic pathway of the avionin unit in microvionin

酸的氧化脱羧, 生成烯硫醇中间体。2023 年, 刘文课题组<sup>[60-61]</sup>在对 cypemycin 开展研究时发现, 膜蛋白 CypH 和 CypL 协作催化了前体肽 CypA 中参与 AviCys 结构生成的第 19 位 Cys 的脱硫反应, 生成 Dha。CypH 是一个双结构域蛋白, 包括一个 N 端的水平转移跨膜  $\alpha$  螺旋 (HTTM) 结构域和一个 C 端的  $\alpha/\beta$  水解酶结构域。在某些 linaridin 基因簇中, CypH 可能分为两个独立的蛋白 LinG 和 LinE。CypL 是一个未知功能蛋白, 含有 N 端信号肽。异源表达实验显示, 除脱硫反应外, CypH 和 CypL 还能够协同催化脱水、异构化和前导肽移除等反应。由于 linaridin 的生物合成基因簇中不编码已知类型的环化酶, AviCys 结构生物合成中的环化步骤仍然不清楚, 需要进一步研究。

### 1.4 thioamitide 中 Avi (Me) Cys 单元的生物合成

2006 年, Shin-ya 团队<sup>[7]</sup>从 *Streptomyces olivoviridis* 中分离出了第一个 thioamitide 类天然产物 thioviridamide, 其结构上具有 5 个骨架硫代酰胺键、1 个  $\beta$ -羟基-N1,N3-二甲基组氨酸及一个 AviCys

环，对腺病毒致癌基因转化的大鼠成纤维细胞具有强大的细胞毒性。目前，多种含有 Avi(Me)Cys 结构的 thioamitide 类天然产物被表征，其中 thioholgamide A 与 thioviridamide 活性类似，都可以靶向 ATP 合成酶，引发综合应激反应，使癌细胞进入静息状态<sup>[17]</sup>。thioamitide 中 Avi(Me)Cys 结构的生物合成途径与第 V 类羊毛硫肽类似，由 LanC、LanD、LanE、LanF 四种翻译后修饰酶参与，分别负责丝氨酸/苏氨酸残基的脱水、半胱氨酸脱羧以及环化。此外，王欢课题组<sup>[66]</sup>报道了一组处于 thioamitide 生物合成基因簇外的第 III 类羊毛硫肽合成酶也可以对 thioamitide 前体肽进行脱水修饰，并与 LanD 形成复合物后，共同催化 Avi(Me)Cys 结构的合成。

## 2 Avi(Me)Cys 结构的化学合成

尽管已经报道了含有脱水氨基酸 (Dha/Dhb) 和 (Me)Lan 环多肽的制备方法<sup>[67-68]</sup>，但含 Avi(Me)Cys 结构天然产物的全化学合成仍然具有挑战性。目前，可用于在短肽片段中 Avi(Me)Cys 结构合成的化学方法包括自由基硫醇-炔偶联<sup>[20]</sup>、氧化脱羧/脱羧<sup>[21-22, 25]</sup>以及酰胺与缩醛的缩合<sup>[23-24]</sup>等。然而，每种合成路线仅能以双键 E/Z 混合物的形式，产生低至中等产率的 Avi(Me)Cys 结构产物。由于 Avi(Me)Cys 结构的化学不稳定性，对这些含 Avi(Me)Cys 短肽进一步化学修饰的研究尚未有报道。总之，至今尚未有任何含有 Avi(Me)Cys 结构的活性天然产物全化学合成报道。

### 2.1 自由基硫醇-炔偶联

在一项合成 thioviridamide 的研究中，Castle 团队<sup>[20]</sup>采用自由基硫醇-炔反应来制备 AviCys 的砌块类似物，其中骨架保护的半胱氨酸衍生物可以与各种炔酰胺发生偶联。在这一合成路线中，自由基引发剂 2,2'-偶氮二(2-甲基丙腈) (AIBN) 首先提取巯基质子，生成巯基自由基，该自由基随后与富电子的炔烃发生反应，再通过另一个巯基上的氢原子转移 (HAT) 猝灭产生的烯炔自由基 [图 7(a)]。初步研究表明，在空间阻碍最小的一

侧 HAT 能够快速猝灭烯炔自由基，使得 (Z)-烯炔成为动力学上更有利的产物。在这种反应条件下，小底物表现良好，成功地以良好的收率合成了目标异构体 **13**。然而，当该方法应用于更复杂和更具有应用价值的炔酰胺砌块 (例如 **15**) 时，并未能获得目标产物 [图 7(b)]。因此，尽管该方法对小分子有效，但对于将 Avi(Me)Cys 结构引入到更复杂的底物可能并不适用。

### 2.2 氧化脱羧/脱羧

2012 年，VanNieuwenhze 等<sup>[21]</sup>报道了合成 mersacidin 的脱羧基/脱羧策略，研究重点在于模拟天然产物生物合成途径，以制备含有 Avi(Me)Cys 结构的砌块和肽片段。使用 Ni(COD)<sub>4</sub> 和噻吩-2-甲酸亚铜 (I) (CuTC) 催化体系对含半胱氨酸的硫酯衍生物进行脱羧反应，立体选择性地合成了相应的 Avi(Me)Cys 衍生物。经过合成方法优化，成功将化合物 **16** 以完全 Z 选择性合成为产物 **18**，收率达到 75%。然而，随着底物复杂性的增加，产量降低，从 **17** 合成 **19** 的收率为中等水平 [图 8(a)]。目前尚未有文献报道将含有 Avi(Me)Cys 结构的氨基酸 (例如 **18** 或 **19**) 引入肽中的方法，这表明利用构建砌块的方法合成含 Avi(Me)Cys 的肽可能面临一定的挑战。

VanNieuwenhze 等<sup>[22]</sup>还报道了一种类似的方法，用于合成 Mersacidin 的 C 末端 D 环片段的保护片段。环状底物 **20** 是通过液相合成制备的，利用了与三氟乙酸 (TFA) 介导的 C 末端羧基脱保护正交的保护基团。通过文献报道的方法制备 MeLan 砌块并掺入至延伸的肽链中，然后进行内酰胺化以产生 **20**。初步尝试使用二苯基膦酰叠氮化物 (DPPA) 与甲苯中的 Et<sub>3</sub>N 对 **20** 进行脱羧以生成 **21** 的实验取得了一定成效但收率较低。对该路线优化后，利用 DPPA 与 1,4-二氮杂双环 [2.2.2] 辛烷 (DABCO) 在二氧六环中回流过夜，使 Z-异构体 **21** 的收率增加至 25%~30% [图 8(b)]。这种合成方法被认为经历了 Curtius 重排反应，随后是异氰酸酯的分子内捕获和形成的六元环的断裂 [图 8(c)]。由此生成的保护衍生物 **21** 仍然是迄今为止合成的最大的含有 Avi(Me)Cys 结构的底物，然而，该片段

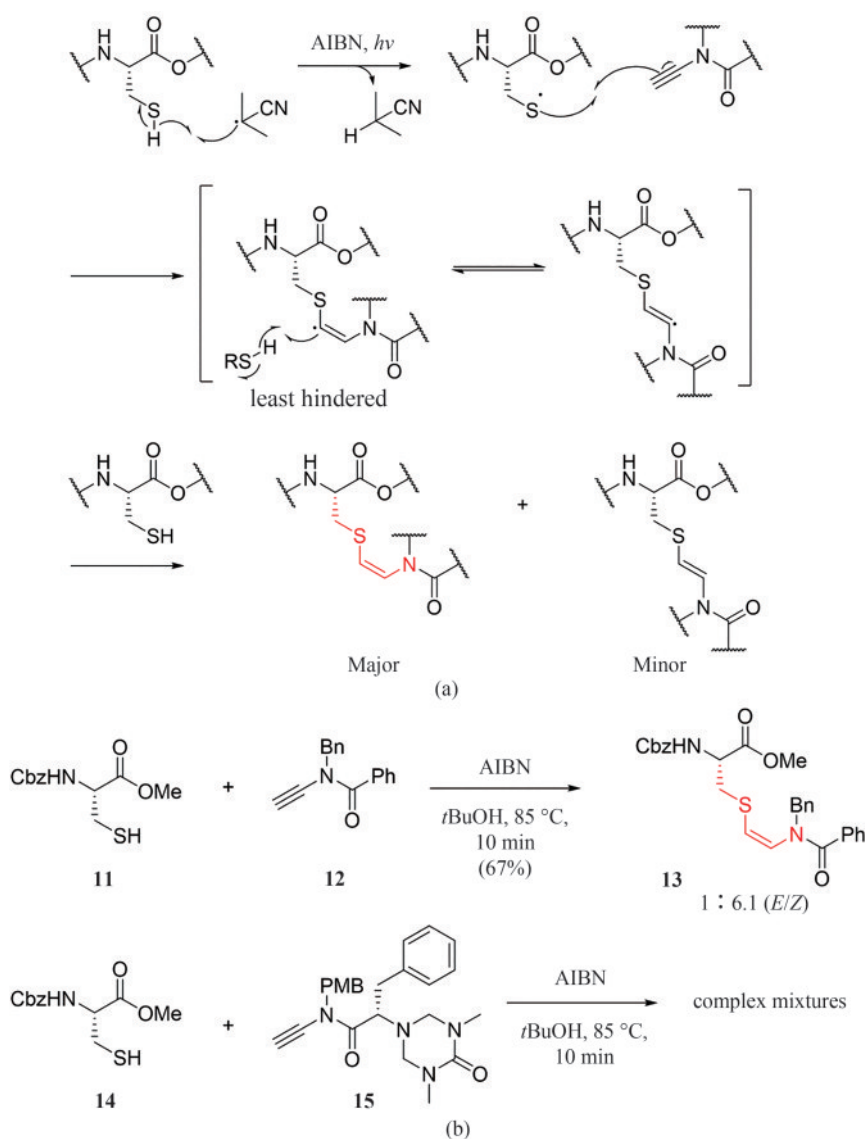


图7 自由基硫醇-炔偶联的可能机制 (a) 和半胱氨酸衍生物与炔酰胺的自由基硫醇-炔偶联反应 (b)

AIBN—2,2'-偶氮二(2-甲基丙腈); Cbz—羧基苄基; PMB—对甲氧基苄基

Fig. 7 Postulated mechanism for radical thiol-yne reaction for the synthesis of an AviCys derivative by Castle et al. (a) and

Attempted radical thiol-yne coupling of cysteine derivative with ynamides by Castle et al. (b)

AIBN—2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile); Cbz—Carboxybenzyl; PMB—*para*-Methoxybenzyl

的去保护和/或连接用于全部或部分合成 mersacidin 的方法尚未有报道。

2022年, Takayuki等<sup>[25]</sup>利用1% (摩尔分数) 的中性曙红Y作为光催化剂, 在Hantzsch酯的存在下, 以-40 °C的温和条件, 原位实现了*N*-羟基邻苯二甲酰亚胺酯的脱羧硒醚化反应。随后, 通过一锅法进行了N,Se-缩醛的β-消除反应, 以较好的收率合成了AviMeCys结构单元。值得一提的是, Cbz、Teoc、Boc和Fmoc等保护基团在该反应条件

下均表现出了良好的耐受性。

### 2.3 酰胺与缩醛缩合

Taylor等<sup>[23]</sup>开发了一种独特的合成策略, 用于制备*Z*-硫代酰胺及含AviCys结构衍生物。该策略基于酰胺与缩醛的缩合, 然后进行β氢消除。优化反应条件后, 使用温和的Lewis酸B(OH)<sub>3</sub>在甲苯中回流催化半胱氨酸衍生物22与乙酰胺的缩合,

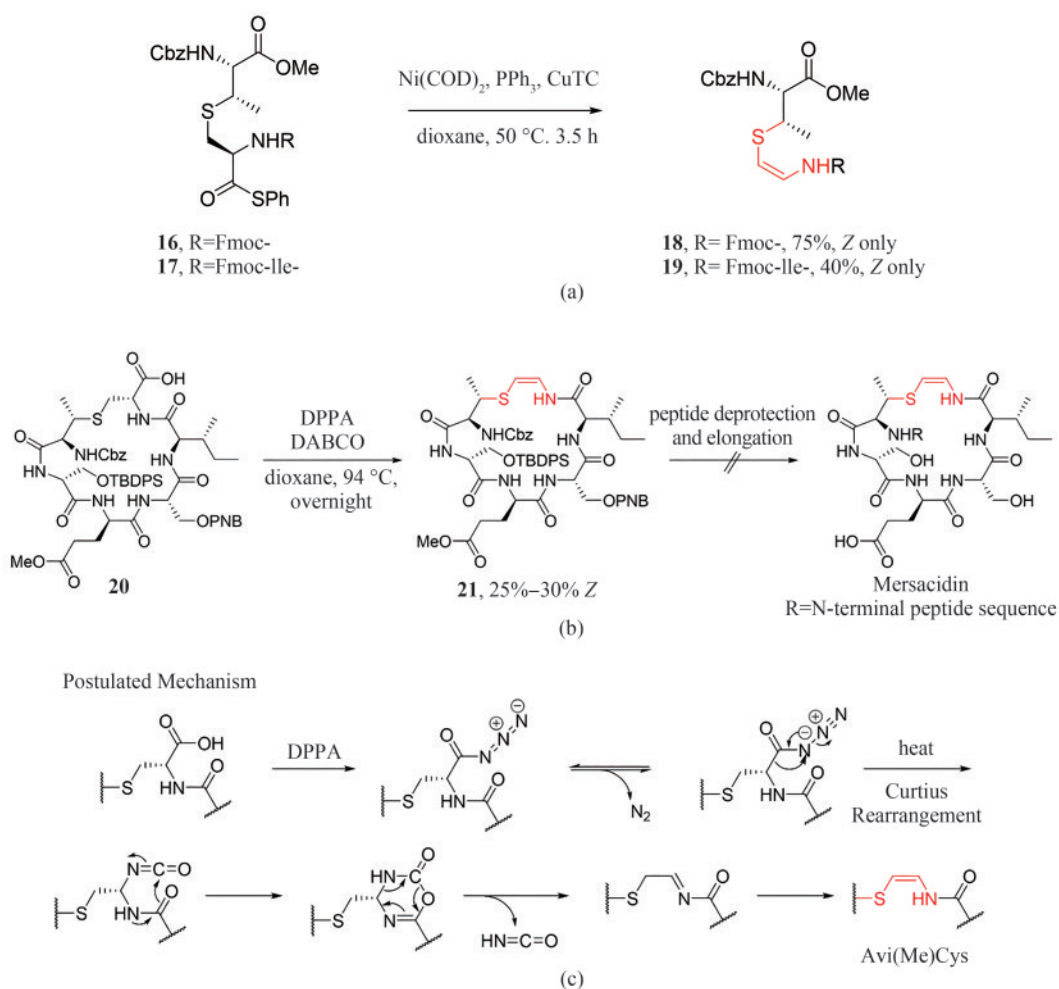


图8 硫酯的脱羰基反应 (a), 氧化脱羧/脱羰反应构建 mersacidin 的 C 末端环 (b) 和氧化脱羧/脱羰反应的可能机制 (c)

$\text{Ni(COD)}_2$ —双(1,5-环辛二烯)镍(0);  $\text{CuTC}$ —硫代苯-2-甲酸铜(I);  $\text{Cbz}$ —羧苄基

Fig. 8 Decarbonylation of thioesters to give AviMeCys derivatives and building blocks (a). Oxidative decarboxylation/decarbonylation of the C-terminal ring of mersacidin by VanNieuwenhze et al (b). Postulated mechanism of oxidative decarboxylation/decarbonylation (c)

$\text{Ni(COD)}_2$ —Bis(1,5-cyclooctadiene)nickel(0);  $\text{CuTC}$ —Copper(I) Thiophene-2-carboxylate;  $\text{Cbz}$ —Carboxybenzyl

能够以中等收率和高立体选择性得到(Z)-AviCys衍生物 **23** [图9(a)]。

2020年, 这种方法成功应用于合成所有已知的 *linaridin* 家族成员的 AviCys 末端大环结构<sup>[24]</sup>。首先, 利用 Dess-Martin 高碘烷将 **24** 中的伯醇氧化成醛 **25**, 收率高达 84%。在 Lewis 酸  $\text{B(OH)}_3$  存在下, 将 **25** 与 (Tcp)Val-NH<sub>2</sub> (Tcp 即 3,4,5,6-四氯邻苯二甲酰亚胺) 缩合, 以 1:8 的 *E/Z* 比例得到含 AviCys 结构的化合物 **26**, 收率高达 68%。先前的研究表明, **26** 中的 Tcp 基团可以在乙二胺的存在下与 Pht (邻苯二甲酰亚胺) 基团一起脱除, 然而, 除去 **26** 中的 Tcp 会导致生成复杂的混合物。

后续的研究发现, 用等量的胍处理可以生成单一产物: 开环酰胍中间体 **27** 在 HCl 水溶液中水解为游离胺, 然后使用 EDC·HCl 和 HOBt 将 Boc-Leu-OH 偶联得到 **28** [图8(b)]。最后一步是去除 N 和 C 末端的保护基团, 但由于硫代酰胺的敏感性, 需要对标准反应条件进行改善。使用 TFA 和茴香硫醚实现了 **28** 的 N 端脱保护, 这是由于使用更常见的三乙基硅烷时, 硫代酰胺的双键会被部分还原, 故使用茴香硫醚替代。对于 C 末端的脱保护, 尝试使用钯(0)和巴比妥酸作为烯丙基受体的脱保护条件未能成功, 这会导致硫代酰胺上的硫氧化为相应的亚砷。随后, 使用硫代水杨酸作为烯丙基

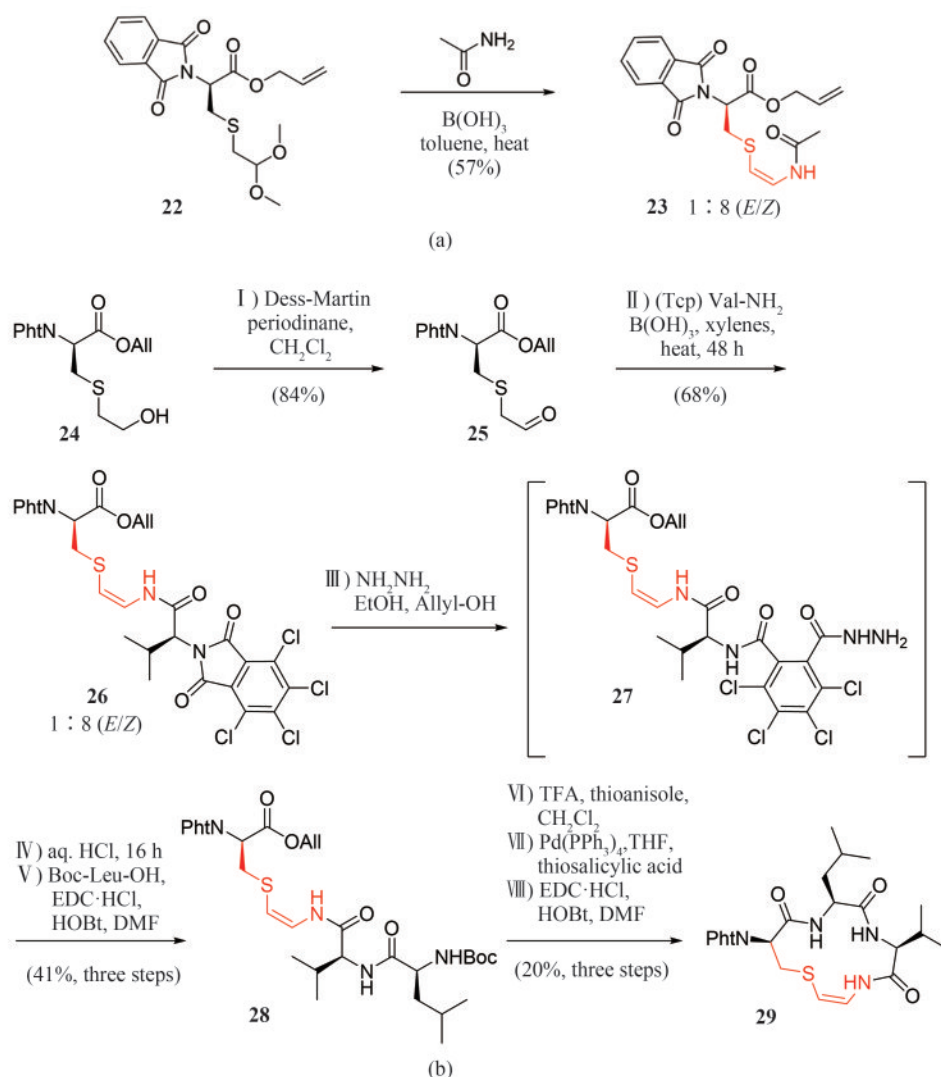


图9 通过乙酰胺与缩醛 **22** 缩合合成 AviCys 衍生物 (a) 和通过醛 **25** 与酰胺 (Tcp) Val-NH<sub>2</sub> 缩合及肽链延伸、内酰胺化合成 cypemycin 中的 AviCys 结构 (b)

Pht—邻苯二甲酰亚胺; Tcp—3,4,5,6-四氯邻苯二甲酰亚胺

Fig. 9 Synthesis of AviCys derivatives *via* condensation of acetamide upon acetal **22** in the presence of a mild lewis acid (a) and Synthesis of the AviCys-containing ring of cypemycin *via* condensation of aldehyde **25** with amide (Tcp) Val-NH<sub>2</sub>, followed by elongation of the peptide chain and lactamization to give **29** in 4.6% yield from **25** (b)

Pht—Phthalimide; Tcp—3,4,5,6-Tetrachlorophthalimide

受体和牺牲还原剂成功地实现了 C 端的脱烯丙基化。最终, 使用 EDC/HOBt 进行内酰胺化, 获得了单一构型的含 AviCys 结构的肽 **29** (从 **24** 开始的总收率为 4.6%) [图 9(b)]。

### 3 讨论与展望

含有 Avi(Me)Cys 环状结构的 RiPP 往往具有优良的抗菌或抗肿瘤活性, 这表明 Avi(Me)Cys 结构

具有重要的生物功能相关性。但含有 Avi(Me)Cys 天然环肽的生物功能机制研究尚未系统开展, 这一特殊环状结构如何参与和介导天然环肽与生物学靶标相互作用的过程尚待解析, 是值得开展的研究方向。

在生物合成方面, Avi(Me)Cys 结构的生物合成酶学逻辑十分保守, 步骤包括 C 末端半胱氨酸的氧化脱羧、丝氨酸/苏氨酸或半胱氨酸的脱水或脱硫以及最终的大环化。在生物合成途径中, 黄素

依赖的氧化脱羧酶起着关键作用，负责催化末端半胱氨酸氧化脱羧生成烯硫醇中间体，对多个氧化脱羧酶及与底物复合物结构的解析提升了人们对氧化脱羧机制的认知。同时，结构生物学的助力使得不同类型脱水酶的催化机制愈加清晰，但像第V类羊毛硫肽脱水酶的催化机制等仍有待进一步的结构验证。目前，对环化步骤的研究仍不全面，诸如LanC蛋白/环化结构域在Avi(Me)Cys结构生物合成中的具体作用等问题尚待解答。此外，在cypemycin等linaridin的生物合成中，Avi(Me)Cys结构的形成机制仍然不清楚。对这类天然产物生物合成途径的全面解析将有助于相关化合物的组合生物学发展与工程化改造，促进生物活性肽天然产物的有效应用。

Avi(Me)Cys的化学合成目前依然具有挑战性。至今已经提出了几种针对Avi(Me)Cys结构的合成策略，包括自由基硫醇-炔偶联、氧化脱羧/脱羧、酰胺与缩醛缩合等。尽管这些方法还没有能够支撑含Avi(Me)Cys结构的天然环肽的全合成，但VanNieuwenhze和Taylor等在合成mersacidin和linaridin中取得了若干阶段性成功和宝贵经验，相信在不久的将来含Avi(Me)Cys的生物活性环肽的化学合成将得以实现，并于生物工程改造等技术一道推进该类环肽在生物医药领域的应用。

## 参 考 文 献

- [1] ARNISON P G, BIBB M J, BIERBAUM G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature[J]. *Natural Product Reports*, 2013, 30(1): 108-160.
- [2] MONTALBÁN-LÓPEZ M, SCOTT T A, RAMESH S, et al. New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(1): 130-239.
- [3] SCHEIDLER C M, KICK L M, SCHNEIDER S. Ribosomal peptides and small proteins on the rise[J]. *Chembiochem*, 2019, 20(12): 1479-1486.
- [4] CHENG B T, XUE Y Q, DUAN Y T, et al. Enzymatic formation of an aminovinyl cysteine residue in ribosomal peptide natural products[J]. *ChemPlusChem*, 2024, 89(6): e202400047.
- [5] GRANT-MACKIE E S, WILLIAMS E T, HARRIS P W R, et al. Aminovinyl cysteine containing peptides: a unique motif that imparts key biological activity[J]. *JACS Au*, 2021, 1(10): 1527-1540.
- [6] DISCHINGER J, BASI CHIPALU S, BIERBAUM G. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(1): 51-62.
- [7] HAYAKAWA Y, SASAKI K, ADACHI H, et al. Thioviridamide, a novel apoptosis inducer in transformed cells from *Streptomyces olivoviridis*[J]. *Journal of Antibiotics*, 2006, 59(1): 1-5.
- [8] CASTIGLIONE F, LAZZARINI A, CARRANO L, et al. Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(1): 22-31.
- [9] ALLGAIER H, JUNG G, WERNER R G, et al. Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1986, 160(1): 9-22.
- [10] CHATTERJEE S, CHATTERJEE S, LAD S J, et al. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization[J]. *Journal of Antibiotics*, 1992, 45(6): 832-838.
- [11] XU M, ZHANG F, CHENG Z, et al. Functional genome mining reveals a class V lanthipeptide containing a D-amino acid introduced by an  $F_{420}H_2$ -dependent reductase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(41): 18029-18035.
- [12] WIEBACH V, MAINZ A, SIEGERT M A J, et al. The anti-staphylococcal lipolanthines are ribosomally synthesized lipopeptides[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(7): 652-654.
- [13] KOZAKAI R, ONO T, HOSHINO S, et al. Acyltransferase that catalyses the condensation of polyketide and peptide moieties of goadvionin hybrid lipopeptides[J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12(9): 869-877.
- [14] REN H Q, HUANG C S, PAN Y W, et al. Non-modular fatty acid synthases yield distinct N-terminal acylation in ribosomal peptides[J/OL]. *Nature Chemistry*, 2024. (2024-03-25) [2024-04-01]. <https://doi.org/10.1038/s41557-024-01491-3>.
- [15] KOMIYAMA K, OTOGURO K, SEGAWA T, et al. A new antibiotic, cypemycin. Taxonomy, fermentation, isolation and biological characteristics[J]. *Journal of Antibiotics*, 1993, 46(11): 1666-1671.

- [16] SHANG Z, WINTER J M, KAUFFMAN C A, et al. Lanipeptins: integrated genomic and chemical approaches reveal unusual D-amino acid-containing ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) from a great salt lake *Streptomyces* sp[J]. ACS Chemical Biology, 2019, 14(3): 415-425.
- [17] DAHLEM C, SIOW W X, LOPATNIUK M, et al. Thioglycamide A, a new anti-proliferative anti-tumor agent, modulates macrophage polarization and metabolism[J]. Cancers, 2020, 12(5): 1288.
- [18] ONGEY E L, NEUBAUER P. Lanipeptides: chemical synthesis versus *in vivo* biosynthesis as tools for pharmaceutical production[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 97.
- [19] ONGEY E L, YASSI H, PFLUGMACHER S, et al. Pharmacological and pharmacokinetic properties of lanipeptides undergoing clinical studies[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(4): 473-482.
- [20] BANERJEE B, LITVINOV D N, KANG J, et al. Stereoselective additions of thyl radicals to terminal ynamides [J]. Organic Letters, 2010, 12(11): 2650-2652.
- [21] GARCÍA-REYNAGA P, CARRILLO A K, VANNIEUWENZHE M S. Decarbonylative approach to the synthesis of enamides from amino acids: stereoselective synthesis of the (Z)-aminovinyl-D-cysteine unit of mersacidin[J]. Organic Letters, 2012, 14(4): 1030-1033.
- [22] CARRILLO A K, VANNIEUWENZHE M S. Synthesis of the AviMeCys-containing D-ring of mersacidin[J]. Organic Letters, 2012, 14(4): 1034-1037.
- [23] LUTZ J A, SUBASINGHEGE DON V, KUMAR R, et al. Influence of sulfur on acid-mediated enamide formation[J]. Organic Letters, 2017, 19(19): 5146-5149.
- [24] LUTZ J A, TAYLOR C M. Synthesis of the aminovinylcysteine-containing C-terminal macrocycle of the linaridins[J]. Organic Letters, 2020, 22(5): 1874-1877.
- [25] KUMASHIRO M, OHSAWA K, DOI T. Photocatalyzed oxidative decarboxylation forming aminovinylcysteine containing peptides[J]. Catalysts, 2022, 12(12): 1615.
- [26] ROGERS L A, WHITTIER E O. Limiting factors in the lactic fermentation[J]. Journal of Bacteriology, 1928, 16(4): 211-229.
- [27] REPKA L M, CHEKAN J R, NAIR S K, et al. Mechanistic understanding of lanipeptide biosynthetic enzymes[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(8): 5457-5520.
- [28] GENG M X, SMITH L. Improving the attrition rate of Lanipeptide discovery for commercial applications[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2018, 13(2): 155-167.
- [29] BAKHTIARY A, COCHRANE S A, MERCIER P, et al. Insights into the mechanism of action of the two-peptide lantibiotic lactacin 3147[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(49): 17803-17810.
- [30] BREUKINK E, DE KRUIJFF B. Lipid II as a target for antibiotics[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2006, 5(4): 321-323.
- [31] BRÖTZ H, JOSTEN M, WIEDEMANN I, et al. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(2): 317-327.
- [32] HSU S T D, BREUKINK E, TISCHENKO E, et al. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2004, 11(10): 963-967.
- [33] DICKMAN R, MITCHELL S A, FIGUEIREDO A M, et al. Molecular recognition of lipid II by lantibiotics: synthesis and conformational studies of analogues of nisin and mutacin rings A and B[J]. Journal of Organic Chemistry, 2019, 84(18): 11493-11512.
- [34] POKHREL R, BHATTARAI N, BARAL P, et al. Molecular mechanisms of pore formation and membrane disruption by the antimicrobial lantibiotic peptide Mutacin 1140[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2019, 21(23): 12530-12539.
- [35] HSU S T D, BREUKINK E, BIERBAUM G, et al. NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(15): 13110-13117.
- [36] KRUSZEWSKA D, SAHL H G, BIERBAUM G, et al. Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 54(3): 648-653.
- [37] BLAESSE M, KUPKE T, HUBER R, et al. Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate[J]. EMBO Journal, 2000, 19(23): 6299-6310.
- [38] BLAESSE M, KUPKE T, HUBER R, et al. Structure of MrsD, an FAD-binding protein of the HFCD family[J]. Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography, 2003, 59(Pt 8): 1414-1421.
- [39] MO T L, YUAN H, WANG F T, et al. Convergent evolution of the Cys decarboxylases involved in aminovinyl-cysteine (AviCys) biosynthesis[J]. FEBS Letters, 2019, 593(6): 573-580.

- [40] SIT C S, YOGANATHAN S, VEDERAS J C. Biosynthesis of aminovinyl-cysteine-containing peptides and its application in the production of potential drug candidates[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(4): 261-268.
- [41] LU J X, LI J, WU Y, et al. Characterization of the FMN-dependent cysteine decarboxylase from thioviridamide biosynthesis[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(12): 4676-4679.
- [42] KUPKE T, KEMPTER C, JUNG G, et al. Oxidative decarboxylation of peptides catalyzed by flavoprotein EpiD. Determination of substrate specificity using peptide libraries and neutral loss mass spectrometry[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(19): 11282-11289.
- [43] XIA Y Z, YI Y C, SHI Y, et al. Enzymatic generation of thioaldehyde motifs by flavin-dependent cysteine decarboxylases for peptide bioconjugation and macrocyclization[J]. *Organic Letters*, 2023, 25(32): 6035-6039.
- [44] WANG S, WU K W, TANG Y J, et al. Dehydroamino acid residues in bioactive natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2024, 41(2): 273-297.
- [45] BOTHWELL I R, COGAN D P, KIM T, et al. Characterization of glutamyl-tRNA-dependent dehydratases using nonreactive substrate mimics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(35): 17245-17250.
- [46] CHATTERJEE C, MILLER L M, LEUNG Y L, et al. Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(44): 15332-15333.
- [47] DONG S H, TANG W X, LUKK T, et al. The enterococcal cytolysin synthetase has an unanticipated lipid kinase fold[J]. *eLife*, 2015, 4: e07607.
- [48] HUANG S Q, WANG Y, CAI C X, et al. Discovery of a unique structural motif in lanthipeptide synthetases for substrate binding and interdomain interactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(45): e202211382.
- [49] HERNANDEZ GARCIA A, NAIR S K. Structure and function of a class III metal-independent lanthipeptide synthetase[J]. *ACS Central Science*, 2023, 9(10): 1944-1956.
- [50] SIGURDSSON A, MARTINS B M, DÜTTMANN S A, et al. Discovery of the lanthipeptide curvocidin and structural insights into its trifunctional synthetase CuvL[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(23): e202302490.
- [51] LIANG H Q, LOPEZ I J, SÁNCHEZ-HIDALGO M, et al. Mechanistic studies on dehydration in class V lanthipeptides [J]. *ACS Chemical Biology*, 2022, 17(9): 2519-2527.
- [52] XUE Y Q, LI M, HU L, et al. Mechanistic investigations into the catalytic mode of a dehydratase complex involved in the biosynthesis of lantibiotic cacaoidin[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2023, 41(24): 3579-3586.
- [53] LI B, YU J P, BRUNZELLE J S, et al. Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis[J]. *Science*, 2006, 311(5766): 1464-1467.
- [54] MUKHERJEE S, VAN DER DONK W A. Mechanistic studies on the substrate-tolerant lanthipeptide synthetase ProcM[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(29): 10450-10459.
- [55] THIBODEAUX C J, HA T, VAN DER DONK W A. A price to pay for relaxed substrate specificity: a comparative kinetic analysis of the class II lanthipeptide synthetases ProcM and HalM2[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(50): 17513-17529.
- [56] YANG X, VAN DER DONK W A. Michael-type cyclizations in lantibiotic biosynthesis are reversible[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(5): 1234-1238.
- [57] YU Y, MUKHERJEE S, VAN DER DONK W A. Product formation by the promiscuous lanthipeptide synthetase ProcM is under kinetic control[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(15): 5140-5148.
- [58] LU J X, LI Y Q, BAI Z B, et al. Enzymatic macrocyclization of ribosomally synthesized and posttranslational modified peptides *via* C—S and C—C bond formation[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(5): 981-992.
- [59] WIEBACH V, MAINZ A, SCHNEGOTZKI R, et al. An amphipathic alpha-helix guides maturation of the ribosomally-synthesized lipolanthines[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(38): 16777-16785.
- [60] CHU L X, CHENG J D, ZHOU C Z, et al. Hijacking a linaridin biosynthetic intermediate for lanthipeptide production [J]. *ACS Chemical Biology*, 2022, 17(11): 3198-3206.
- [61] XUE Y Q, WANG X F, LIU W. Reconstitution of the linaridin pathway provides access to the family-determining activity of two membrane-associated proteins in the formation of structurally underestimated cypemycin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(12): 7040-7047.
- [62] CLAESEN J, BIBB M. Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(37): 16297-16302.
- [63] CLAESEN J, BIBB M J. Biosynthesis and regulation of

- grisemycin, a new member of the linaridin family of ribosomally synthesized peptides produced by *Streptomyces griseus* IFO 13350[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10): 2510-2516.
- [64] WANG F T, WEI W Q, ZHAO J F, et al. Genome mining and biosynthesis study of a type B linaridin reveals a highly versatile  $\alpha$ -N-methyltransferase[J]. *CCS Chemistry*, 2020, 3(3): 1049-1057.
- [65] GEORGIU M A, DOMMARAJU S R, GUO X R, et al. Bioinformatic and reactivity-based discovery of linaridins[J]. *ACS Chemical Biology*, 2020, 15(11): 2976-2985.
- [66] LU J X, WU Y, LI Y Q, et al. The utilization of lanthipeptide synthetases is a general strategy for the biosynthesis of 2-aminovinyl-cysteine motifs in thioamitides[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(4): 1951-1958.
- [67] DENOËL T, LEMAIRE C, LUXEN A. Progress in lanthionine and protected lanthionine synthesis[J]. *Chemistry*, 2018, 24(58): 15421-15441.
- [68] JIMÉNEZ J C, BAYÓ N, CHAVARRÍA B, et al. Synthesis of

peptides containing  $\alpha$ ,  $\beta$ -didehydroamino acids. Scope and limitations[J]. *Letters in Peptide Science*, 2002, 9(2): 135-141.



**通讯作者:** 李进(1987—),男,研究员,执行总监。研究方向为非天然氨基酸分子砌块的合成与应用。

E-mail: li\_jin@PharmaBlock.com



**第一作者:** 谢向前(1997—),男,博士研究生。研究方向为天然产物的生物合成等。

E-mail: dg21240123@smail.nju.edu.cn