

色氨酸以及由色氨酸衍生形成的分子经常作为组成模块参与到天然产物的生物合成中,分析并总结色氨酸在天然产物生物合成中的修饰与衍生模式,可以增加我们对天然产物结构多样性的认识和对天然产物生物合成机制的理解。

林双君

## 色氨酸,天然产物生物合成中的重要结构单元

徐飞 邓子新 林双君\*

(上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200030)

**摘要:** 氨基酸作为生物体内组成生命物质的小分子化合物,在天然产物生物合成中扮演了非常重要的作用。色氨酸含有一个独特的吲哚环,相对复杂的吲哚环平面结构使得色氨酸相比其他氨基酸具有更多的修饰空间。在微生物天然产物生物合成研究中,色氨酸及其衍生物经常作为组成模块参与到天然产物的生物合成中,本文概述了色氨酸几种不同的生物修饰方式,包括烷基化修饰、卤化修饰、羟基化修饰、以及吲哚环的开环重排反应等。分析并总结色氨酸在天然产物生物合成中的作用,可以增加我们对天然产物结构多样性的认识 and 推动天然产物生物合成机制的研究。

**关键词:** 色氨酸,生物合成,天然产物,生物修饰

## Tryptophan, an important starting material in biosynthesis of microbial natural products

XU Fei DENG Zi-Xin LIN Shuang-Jun\*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** Amino acids, natural small molecules that are important materials for constituting

基金项目: 教育部科学研究重大项目(No. 311018); 国家自然科学基金项目(No. 31070057, 31121064)

\*通讯作者: Tel: 86-10-34206722; ✉: linsj@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-02-17; 接受日期: 2013-04-16

living organisms, play important roles in natural products biosynthesis. Tryptophan has a unique indole ring structure which possesses more modification sites than other amino acids. In studies on microbial natural products biosynthesis, tryptophan and its derivatives often serve as structural moieties that are incorporated into the natural products structures. Here, we summarize different modification patterns of tryptophan, including alkylation, halogenation, hydroxylation, indole ring-open and rearrangement reactions. Analyzing and summarizing the enzymatic modifications of tryptophan could help us understand the structure diversities of natural products and lay the foundation for our study of the mechanism of the novel natural product biosynthesis.

**Keywords:** Tryptophan, Biosynthesis, Natural product, Modification

近 30 年来, 有超过 300 多个微生物来源的天然产物生物合成基因簇被成功克隆并报道, 其中蕴含的基因结构和功能也得以预测和阐明。多种多样的结构基因负责形成了天然产物的结构多样性。在这其中, 氨基酸作为生物体内组成生命物质的小分子化合物, 在结构多样的天然产物生物合成中扮演了非常重要的角色, 如在非核糖体聚肽类(NRPS)抗生素, 核糖体肽类(RPS)抗生素, 聚酮-非核糖体聚肽(PKS-NRPS), 以及核苷类抗生素等一系列天然产物生物合成中, 氨基酸往往作为重要的结构单元或起始原料参与到这些复杂化合物的生物合成中。有机体内的氨基酸首先被不同的酶通过不同的机制活化, 进而被后续的酶识别并完成天然产物分子的生物合成<sup>[1-6]</sup>。色氨酸以及色氨酸修饰衍生的分子经常作为组成模块参与到天然产物的生物合成中。不同的天然产物化学结构, 色氨酸衍生模块的修饰程度和活化方式各不相同。分析并总结色氨酸在天然产物生物合成中所起的作用可以加深我们对天然产物结构多样性的理解。根据色氨酸活化和上载机制的不同, 我们以色氨酸为例, 对氨基酸在天然产物生物合成中的作用进行了初步的说明和总结。

## 1 色氨酸在多种微生物天然产物生物合成中扮演的角色

L-色氨酸是组成蛋白质的常见 20 种氨基酸中的一种, 是哺乳动物的必需氨基酸和生糖氨基酸。色氨酸是植物体内生长素生物合成重要的前体物质, 其结构与吲哚-3-乙酸(IAA)相似, 在高等植物中普遍存在, 参与了多种植物天然产物生物碱(Alkaloid)的生物合成<sup>[7-9]</sup>。作为天然氨基酸中 3 个芳香族氨基酸之一, 与苯丙氨酸和酪氨酸相比较, 色氨酸含有一个独特的吲哚环, 这样相对复杂的芳香环平面结构使得色氨酸相比其他氨基酸具有更多的修饰空间, 同时, 色氨酸在生物体内的生物合成和生物代谢途径与其他氨基酸都有较大区别, 这使得色氨酸合成和代谢的一些中间体或中间体衍生物也经常作为合成模块, 参与到天然产物生物合成中(图 1)。

## 2 色氨酸在天然产物生物合成中修饰的多样性

色氨酸及其衍生而来的结构单元是很多天然产物生物合成的组成单元。色氨酸以其本身作为合成单元组装到天然产物中, 通常是出现

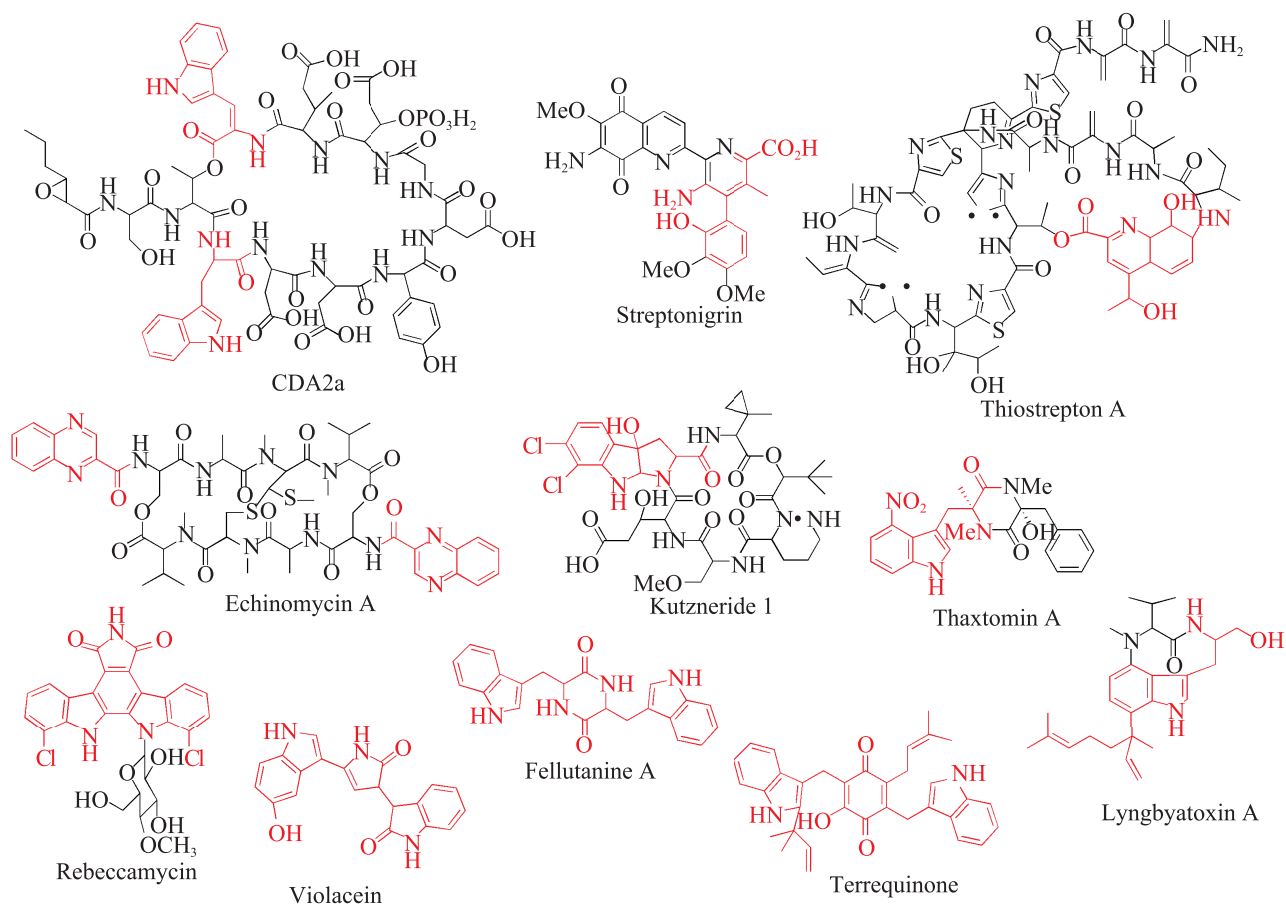


图 1 含有不同修饰色氨酸衍生模块的微生物天然产物

Fig. 1 Microbial natural products with the moieties derived from tryptophan

注: 红色标示为色氨酸衍生模块。

Note: Red labeling indicating the moieties derived from tryptophan.

在通过 NRPS 机制合成的非核糖体肽类天然产物中。在这个过程中, 色氨酸首先被 NRPS A domain (腺苷功能域) 利用 ATP 活化并上载到载体蛋白 (Peptidyl carrier protein, PCP) 上, 然后经缩合功能域 (Condensation domain, C) 催化进行延伸最后形成完整的肽链结构, 例如临床使用的抗阳性菌抗生素 Daptomycin 及类似物 CDA 和 A54145 等都是利用 NRPS 机制将未被任何修饰的色氨酸组装到最终的聚肽化合物结构中<sup>[10-12]</sup>。其他的一些环肽类抗生素如 Skyllamycin 和 Fellutanine A 等同样利用 NRPS 机制在天然产物生物合成中引入了未被修饰的色氨酸<sup>[13]</sup>。

然而, 在多数天然产物中, 色氨酸是以衍生物的形式存在的, 这种衍生有的是发生在活化之前, 有的则发生在色氨酸被活化之后, 甚至有的是在天然产物的骨架结构组装完成之后作为后修饰反应发生的。根据不同的生物合成机制, 对色氨酸进行结构修饰的反应也呈现出多种多样。我们将天然产物生物合成中常见的色氨酸的结构修饰反应归纳为以下几类: A: 形成含有  $\alpha, \beta$  不饱和双键的色氨酸; B: 形成含有烷基化修饰的色氨酸; C: 形成含有羟化修饰的色氨酸; D: 形成含有硝基化修饰的色氨酸; E: 形成含有卤化修饰的色氨酸; F: 通过环化和重排

形成如喹啉环、吡咯环等特殊结构; G: 双色氨酸母核结构天然产物生物合成。

## 2.1 形成含有 $\alpha,\beta$ 不饱和双键的色氨酸结构

色氨酸的修饰方式多种多样, 在不同的天然产物中, 有的色氨酸只存在一种修饰现象, 有的天然产物则两种或者多种同时存在。酯肽类抗生素 CDA 化学结构中有 2 个色氨酸模块, 一个色氨酸模块被 A domain 识别上载后没有任何的修饰, 而另外一个含有  $\alpha,\beta$  不饱和双键的色氨酸模块。从相应的 A domain 的底物识别位点推测色氨酸首先被 A domain 活化后连接到相应的肽酰基载体蛋白 PCP 上。后续的脱氢形成  $\alpha,\beta$ -不饱和色氨酸的反应可能发生于 PCP-担载的色氨酸或者是 CDA 被组装完成之后, 目前仍然不明确<sup>[14]</sup>。然而, 同位素标记 3-氘代色氨酸的喂养实验确定了脱氢方向, 同时形成的 2,3 位双键的构型也通过 NMR 技术确定为反式。推测 FAD 可能作为氢受体被还原成 FADH<sub>2</sub>, 并生成最终的(Z)-2,3-脱氢色氨酸<sup>[15-16]</sup>。类似的反应在 Undecylprodigiosin 和 Clorobiocin 中已经被证实<sup>[17-18]</sup>。

参照从脯氨酸形成吡咯-2-羧酸的反应机制, 我们可以推测 CDA 中的  $\alpha,\beta$ -不饱和色氨酸很可能遵循相同的反应机制, 就是色氨酸被活化连接到 PCP 上, 然后以 FAD 为氢受体进行直接脱氢形成  $\alpha,\beta$ -不饱和色氨酸, 但是该单元仍然连接在载体蛋白 PCP 上, 进而直接进入 NRPS 的组装链。

## 2.2 形成含有烷基化修饰的色氨酸

天然产物中的色氨酸还具有多种烷基化修饰, 最具有代表性的就是甲基化和吲哚环上的异戊烯基化。硫肽类抗生素是由一段前体肽经一系列后修饰过程形成的富含硫原子的一类抗生素, 这类抗生素中有的含有色氨酸衍生的结构单元, 如硫链丝菌素(Thiostrepton A)、Siomycin

A、Nosiheptide、Nocathiacin I<sup>[19]</sup>。它们均以色氨酸为起始原料, 但是转化途径却不同, 因而形成了不同的结构单元。在硫链丝菌素和 Siomycin A 中可能首先都经过一步色氨酸的甲基化过程。在硫链丝菌素(Thiostrepton A)生物合成基因簇中, TsrM 编码一个含有四铁四硫簇和钴胺素结合位点的 SAM 依赖的自由基甲基转移酶。体外实验证实 TsrM 负责色氨酸吲哚环的 2 位甲基化, 作为硫链丝菌素中喹哪啶酸模块的生物合成的第一步。不同于一般的 SAM 依赖的甲基转移酶, 它并不是通过产生 5'-脱氧腺苷自由基来完成甲基化上载反应, 而是以 SAM 作为甲基供体, 以甲基钴胺素作为辅因子催化的甲基化修饰反应, 并释放出 SAH(图 2)<sup>[20]</sup>。TsrM 负责的是色氨酸吲哚环上的甲基化修饰, 在链黑菌素(Streptonigrin)生物合成中, 色氨酸也是链黑菌素生物合成的起始模块。同位素喂养实验证实一分子色氨酸的  $\beta$ -位侧链被甲基化修饰<sup>[21]</sup>, 形成  $\beta$ -甲基色氨酸并参与到链黑菌素联芳环结构的生物合成中, 这步反应被进一步的无细胞体系实验证实<sup>[22]</sup>。

除了甲基化修饰以外, 常见的还有色氨酸异戊烯基化修饰。色氨酸异戊烯基化修饰常见于真菌及植物生物碱类天然产物的生物合成中。在原核微生物天然产物中也有报道, 如在 Lyngbyatoxin A、Cyclopiazonic acid、Acetylaszonalenin 和 Terrequinone A 的生物合成中, 色氨酸上载到 NRPS 模块形成母核后, 基因簇内的异戊烯基转移酶催化二甲基丙烯基焦磷酸(DMAPP)转移一分子异戊烯基到色氨酸上并释放出一分子焦磷酸, 但是加载异戊烯基的位点则各不相同<sup>[23-24]</sup>。其中 Lyngbyatoxin A 和 Cyclopiazonic acid 的异戊烯基化修饰位点分别是色氨酸吲哚环的 C7 和 C4 位<sup>[25-26]</sup>, 而 Acetylaszonalenin 和 Terrequinone A 的异戊烯基化修饰位点则分别是色氨酸吲哚环的 C3 和 C2 位<sup>[27-28]</sup>。此外, 异戊烯基连接色氨酸单元的方

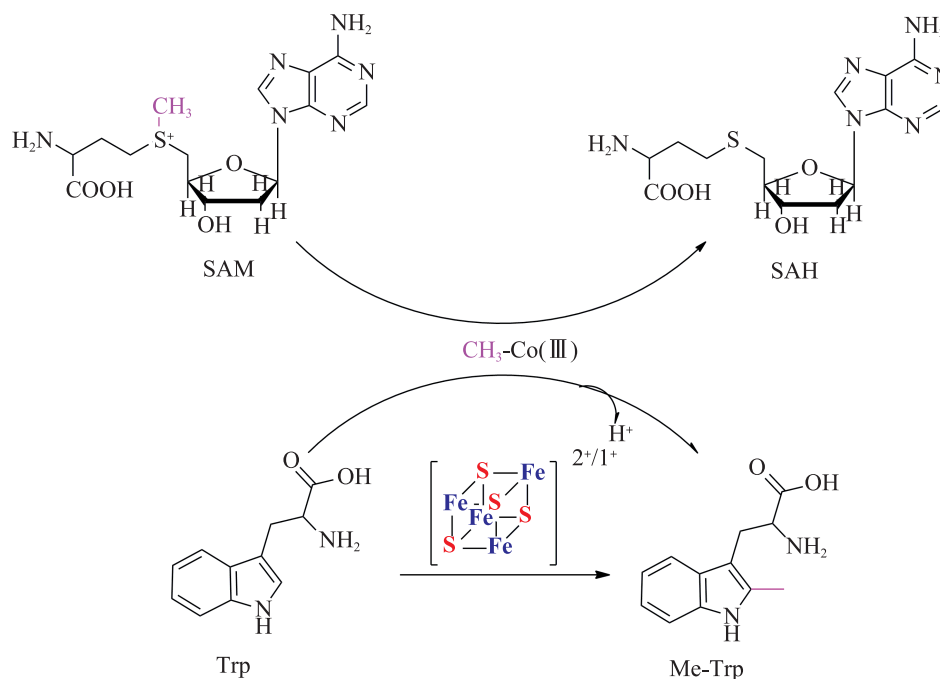


图 2 TsrM 的催化机制

Fig. 2 The catalytic mechanism of TsrM

式也有所不同,当异戊烯基的碳-1 (C-1)与色氨酸单元相连,成为正常的异戊烯基化(Regular prenyltransfer),而当异戊烯基的碳-3 (C-3)与色氨酸单元相连,成为反异戊烯基化(Reverse prenyltransfer)。Lyngbyatoxin A、Acetylazonalenin 和 Terrequinone A 的异戊烯基化均属于反异戊烯基化<sup>[26-28]</sup>,而只有 Cyclopiazonic acid 是以正常异戊烯基化的方式来对色氨酸结构单元进行修饰的<sup>[25]</sup>。

### 2.3 形成含有羟基化修饰的色氨酸

除了烷基化修饰以外,色氨酸的羟基化修饰在多种天然产物中也陆续被发现。其中,同氨基香豆素(Amino coumarin)家族抗生素和万古霉素(Vancomycin)家族抗生素中存在的酪氨酸的  $\beta$ -位羟基化类似,色氨酸的  $\beta$ -位羟基化在 NRPS 天然产物 Echinomycin 家族中已经被报道,是作为起始单元喹啉-2-羧酸形成的第一步<sup>[29]</sup>。类似的组氨酸  $\beta$ -位羟基化反应在尼可霉

素(Nikkomycin)生物合成中被阐明<sup>[30]</sup>。

在 Echinomycin 生物合成中,起始单元喹啉-2-羧酸起源于色氨酸,而色氨酸的  $\beta$ -位羟基化则是形成喹啉-2-羧酸的第一步反应<sup>[29]</sup>。同其他氨基酸的  $\beta$ -羟基化反应类似,在 Echinomycin 生物合成途径中色氨酸首先被一个双结构域(A-PCP)的 NRPS Ecm13,识别、活化,并加载到 PCP 上,之后由 Ecm12,一个细胞色素 P450 氧化酶完成羟基化反应,并被基因簇中的 Ecm2,一个硫酯酶(TEII)所水解释放出游离的(2S,3S)- $\beta$ -羟基色氨酸并参与后续的反应中,最终以喹啉-2-羧酸的形式进入 Echinomycin 生物合成的 NRPS 装配线<sup>[31]</sup>(图 3A)。

除了在色氨酸侧链上的羟基化修饰以外,在色氨酸吲哚环上的羟基化修饰则更为常见。5-羟色胺,色氨酸脱羧羟基化的产物,是一种信号分子,在动植物生长发育中影响其记忆和

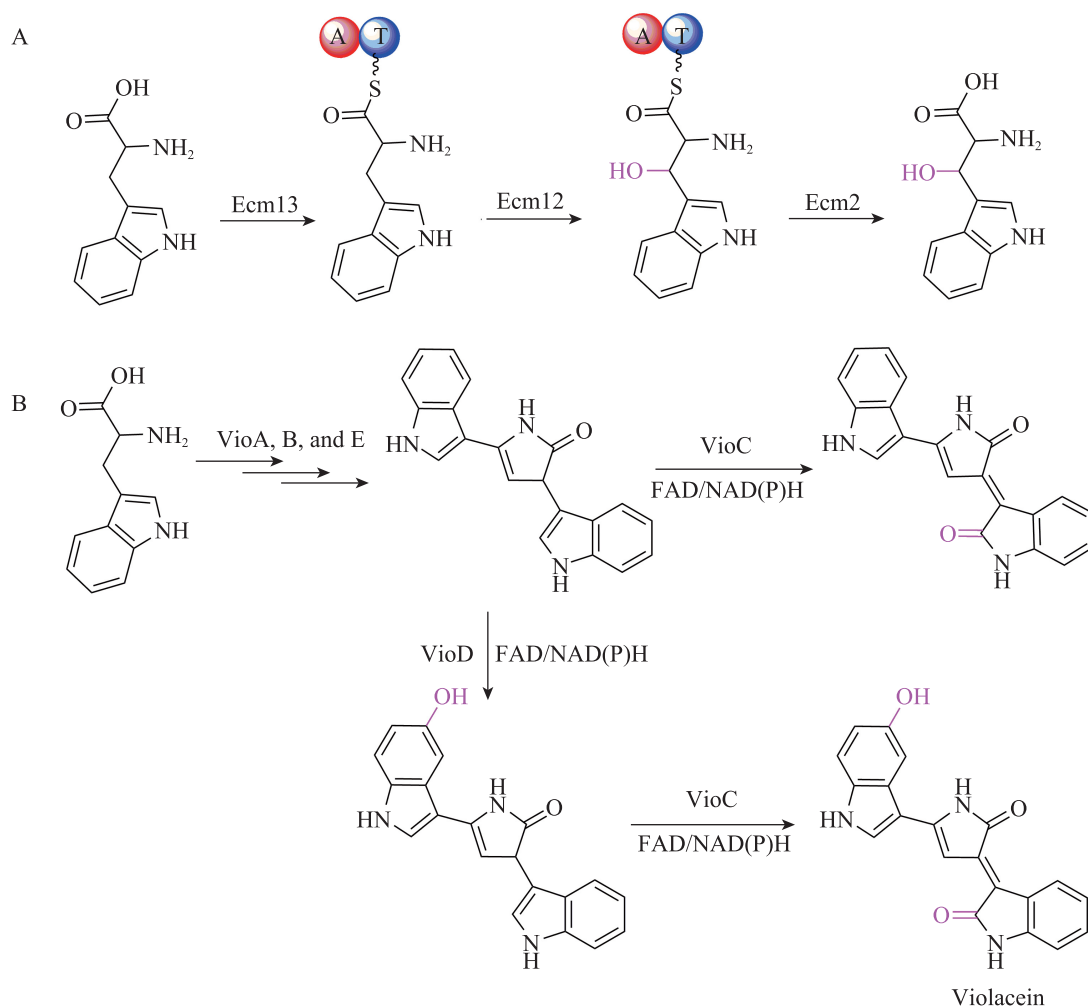


图3 Echinomycin 中色氨酸  $\beta$ -羟基化途径(A)和 Violacein 中吲哚环 C2 和 C5 羟基化修饰

Fig. 3 The biosynthetic pathway of  $\beta$ -hydroxy tryptophan in Echinomycin (A) and the hydroxylations at C2 and C5 of the indole ring of Violacein

学习功能, 此外也是动、植物等高等生物体内形成天然产物的一个前体分子。在微生物天然产物中, 色氨酸吲哚环上羟基化修饰可分为由 FAD 依赖的单加氧酶催化的单羟基化, 和由 Rieske 类型的双氧化酶催化的双羟基化反应。在 Violacein 生物合成中, VioC 和 VioD 在 NAD(P)H 存在下以 FAD 为辅酶能够分别在 Violacein 的一个色氨酸吲哚环的 C2 和另一个色氨酸吲哚环的 C5 位进行羟基化反应, 并且羟基化顺序具有一定的选择性。VioC 可以催化母核的 C2-羟基化,

也能够识别 VioD 产物进行羟基化反应, 而 VioD 只能识别母核完成 C5-位羟基化, 却不能够识别 VioC 催化的产物(图 3B), 可见 VioC 比 VioD 具有更宽泛的底物选择性<sup>[32]</sup>。

#### 2.4 形成含有硝基化修饰的色氨酸

硝基化修饰是一种特殊的色氨酸修饰。在高等生物中, 氨基酸的硝基化修饰是在过氧化物酶的作用下, 以亚硝酸根离子  $\text{NO}_2^-$  作为氮供体, 转化至氨基酸骨架结构上。亚硝酸根离子在体内具有很强的氧化性和毒性, 因此这是一

种细胞内清除亚硝基的保护机制。这种保护机制的特点是能够在多种氨基酸如色氨酸、酪氨酸和半胱氨酸等骨架上上载硝基, 并且随着亚硝基-NO<sub>2</sub> 浓度的不同, 其上载修饰硝基的位点也有所不同<sup>[33]</sup>。而在微生物天然产物 Thaxtomin A 的生物合成中, 细胞色素(P450)氧化酶 TxtE, 以 NO 分子作为氮供体, 特异性的在色氨酸吡啶环 C4 位完成硝基化反应, 形成 Thaxtomin A 生物合成的前体 4-硝基色氨酸。同位素标记实验证实, 形成硝基中的氧是来源于空气 O<sub>2</sub>, 从而给我们提出了依赖血红素铁的以过氧自由基催化形成 C-N 键的分子机制<sup>[34]</sup> (图 4)。

## 2.5 形成含有卤化修饰的色氨酸

卤化修饰在天然产物生物合成中是一类非常重要的修饰反应, 几乎绝大多数的天然产物在经过卤化修饰以后, 其生物活性和功能都有所增强, 因此卤化酶是生物合成研究的重点之一<sup>[35-36]</sup>。天然产物的卤化修饰根据卤代元素的不

同分为氟代、氯代、溴代和碘代, 其中氟化酶是专一性作用于 C-F 键的形成<sup>[37]</sup>, 而其他的卤化酶则会作用 C-Cl 和 C-Br 键的形成。已经报道的色氨酸的卤化反应都是氯代反应, 色氨酸的氯代反应分为单氯代和双氯代两种。在蝴蝶霉素 (Rebeccamycin)、Thienodolin 和 Pyrroindomycin 生物合成中, 分别报道了色氨酸吡啶环 C7、C6 和 C5 位的卤化反应<sup>[36]</sup>。以 Rebeccamycin 生物合成中的 C7 位卤化酶 RebH 为例, 它是一种黄素依赖的卤化酶(Flavin- dependent halogenase), 在 Flavin 和 O<sub>2</sub> 的作用下将 Cl 负离子氧化成带有正电性的 HO-Cl, 并在酶的作用下加载到底物对应的 C 原子上, 这种催化作用需要辅酶 NAD(P)H 依赖的 Flavin 还原酶还原 FAD 至 FADH<sub>2</sub>, 而 FADH<sub>2</sub> 被氧化成 FAD-O-OH, 用以活化 Cl<sup>-</sup><sup>[38]</sup> (图 5)。而双氯代反应在 Kutznerides 生物合成中有报道, KtzQ 和 KtzR 在 KtzS 的辅助下, 依次在色氨酸的 C7 和 C6 位完成双氯化, 形

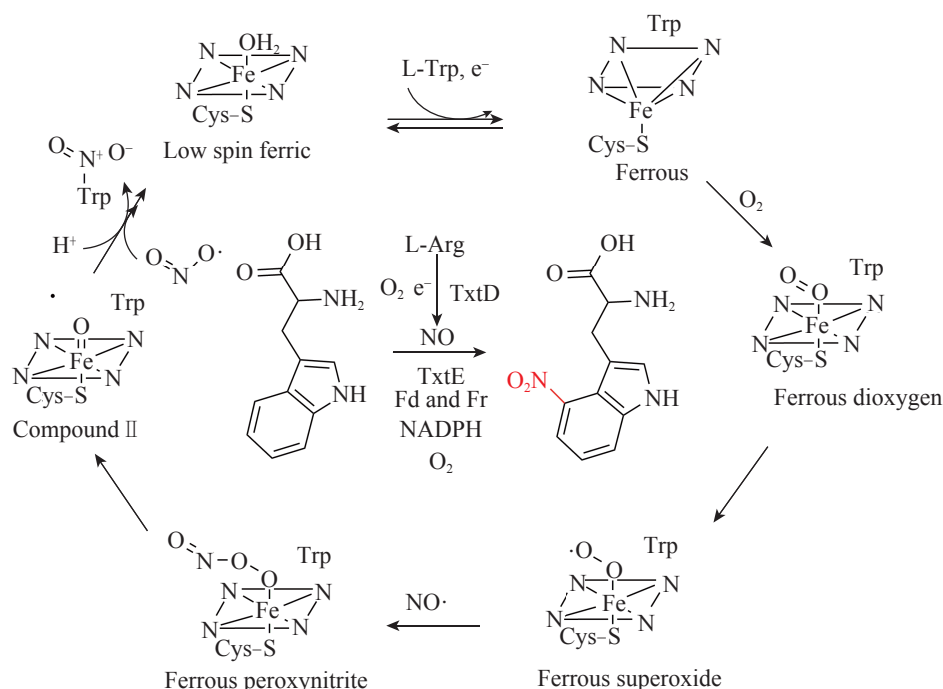


图 4 Thaxtomin A 中 4-硝基色氨酸的形成机理

Fig. 4 The detailed mechanism of the 4-nitrotryptophan formation in Thaxtomin A biosynthesis

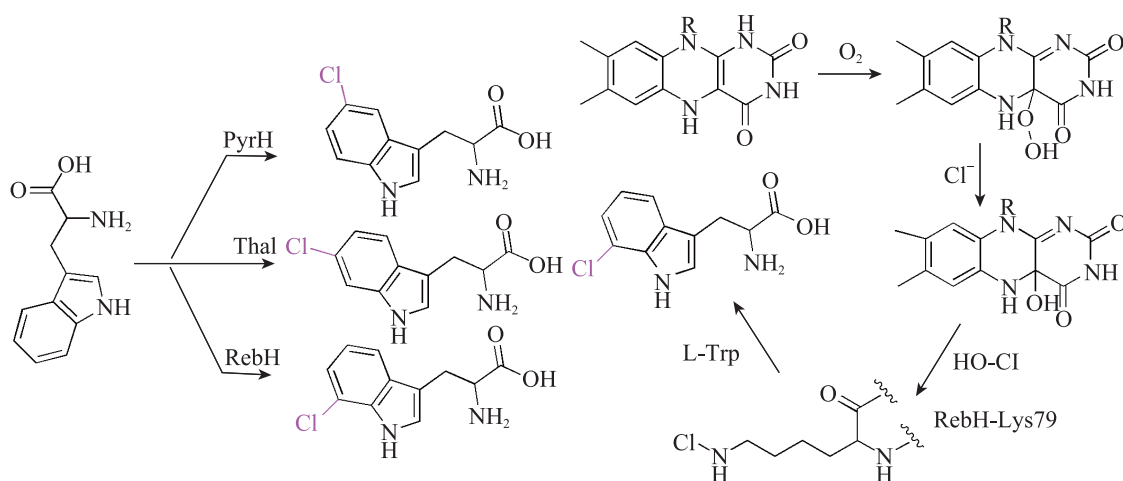


图 5 色氨酸不同的卤化修饰位点和 RebH 的卤化机制

Fig. 5 The different halogenated positions of tryptophan and the enzymatic mechanism of RebH halogenase

成 6,7-二氯色氨酸<sup>[39]</sup>。其中 KtzQ 和 KtzR 属于 Flavin-dependent halogenase, 而 KtzS 则为 Flavin reductase。体外酶学研究表明在 Kutznerides 中色氨酸的双氯代反应机制与 RebH 催化的单氯代反应机制相类似。

## 2.6 通过环化和重排形成如喹啉环、吡咯环等特殊结构

通过 NRPS 机制形成的天然产物含有某些特殊模块, 这些特殊的生物合成模块以色氨酸作为起始分子, 经过一系列的后修饰过程最终形成。其中以 Echinomycin 家族的自然产物为代表, 该类化合物生物合成的起始模块分为两种, 一种是以 Echinomycin 为代表的以喹啉-2-羧酸作为起始模块, 另一种则是以 Thiocoraline 为代表的以喹啉-2-羧酸作为起始模块<sup>[40]</sup>。这两个合成单元都以色氨酸作为起始分子, 经过不同的后修饰过程, 最终形成不同的结构。

在推测 Echinomycin 生物合成途径中, 色氨酸首先在双结构域(A-PCP)的 NRPS Ecm13 和 P450 氧化酶 Ecm12 的作用下进行  $\beta$ -羟基化形成  $\beta$ -羟基色氨酸<sup>[29]</sup>, 之后在一个 II 型 TE Ecm2 的作用下水解, 并以游离状态完成一系列

的后修饰和重排反应形成最终的喹啉-2-羧酸, 并被起始模块的 A domain 所识别上载到 NRPS 装配线上, 从而开启 Echinomycin 环肽骨架的生物合成。其中,  $\beta$ -羟基化色氨酸在色氨酸 2,3-双氧化酶作用下开环, 并在甲酰胺酶作用下将开环后的甲酰胺基水解, 之后在 Ecm4 的作用下发生重排, 形成 N-邻氨基苯取代的  $\alpha$ -氨基- $\beta$ -羟基丁二酸, 这是最后形成喹啉-2-羧酸的核心步骤(图 6A)。

而在 Thiocoraline 生物合成中, 推测喹啉-2-羧酸的形成首先是经过相同的机制在双结构域的 NRPS TioK 和 P450 氧化酶 TioI 的作用下形成  $\beta$ -羟基色氨酸<sup>[41]</sup>, 然后被 II 型 TE TioQ 催化水解从 PCP 上释放下来<sup>[42]</sup>。之后, 色氨酸 2,3-双氧化酶同样催化  $\beta$ -羟基色氨酸开环并去甲酰化。后续的生物合成途径则与喹啉-2-羧酸的形成不同: 色氨酸在氨基转移酶催化下脱氨形成  $\alpha$ -羰基, 并与去甲酰化后苯环上的氨基缩合环化, 完成喹啉环的初步形成, 这一步反应则是整个途径中的核心步骤。随后经过一系列的氧化脱水等后修饰, 形成了最终的 3-羟基喹啉-2-羧酸起始单元参与到 NRPS 装配线中<sup>[43]</sup>。



色氨酸形成的喹啉环结构除了在 Thiocoraline 家族天然产物中出现, 在核糖体肽类(RPS)抗生素中也有报道。其中硫肽类抗生素 Thiostrepton 和 Siomycin 同样含有喹啉羧酸模块, 同样以色氨酸作为起始分子, 但是其推测的生物合成途径则与 Thiocoraline 等化合物中的喹啉羧酸生物合成途径不同。以 Thiostrepton 中喹啉羧酸为例, 色氨酸首先参与的反应不是  $\beta$ -羟甲基化, 而是在甲基转移酶 TsrM 的作用下在 C2 位上载一个甲基, 之后在氨基转移酶 TsrA 的作

用下脱氨, 形成 2-甲基吲哚丙酮酸, 然后在 TsrE 的作用下开环, 此时开环的位置不再是色氨酸 2,3-双氧化酶催化的 C2-C3 位开环, 而是吲哚环 N1-C2 位的开环。后续反应与 Thiocoraline 中喹啉羧酸成环类似, Thiostrepton 中开环后形成的苯环氨基同样与脱氨后的  $\alpha$ -羰基缩合成环, 并经过羰基还原反应, 形成最终的组成模块<sup>[44-45]</sup> (图 6B)。

在硫肽类抗生素天然产物生物合成中, 色氨酸除了参与 Thiostrepton 和 Siomycin 的生物

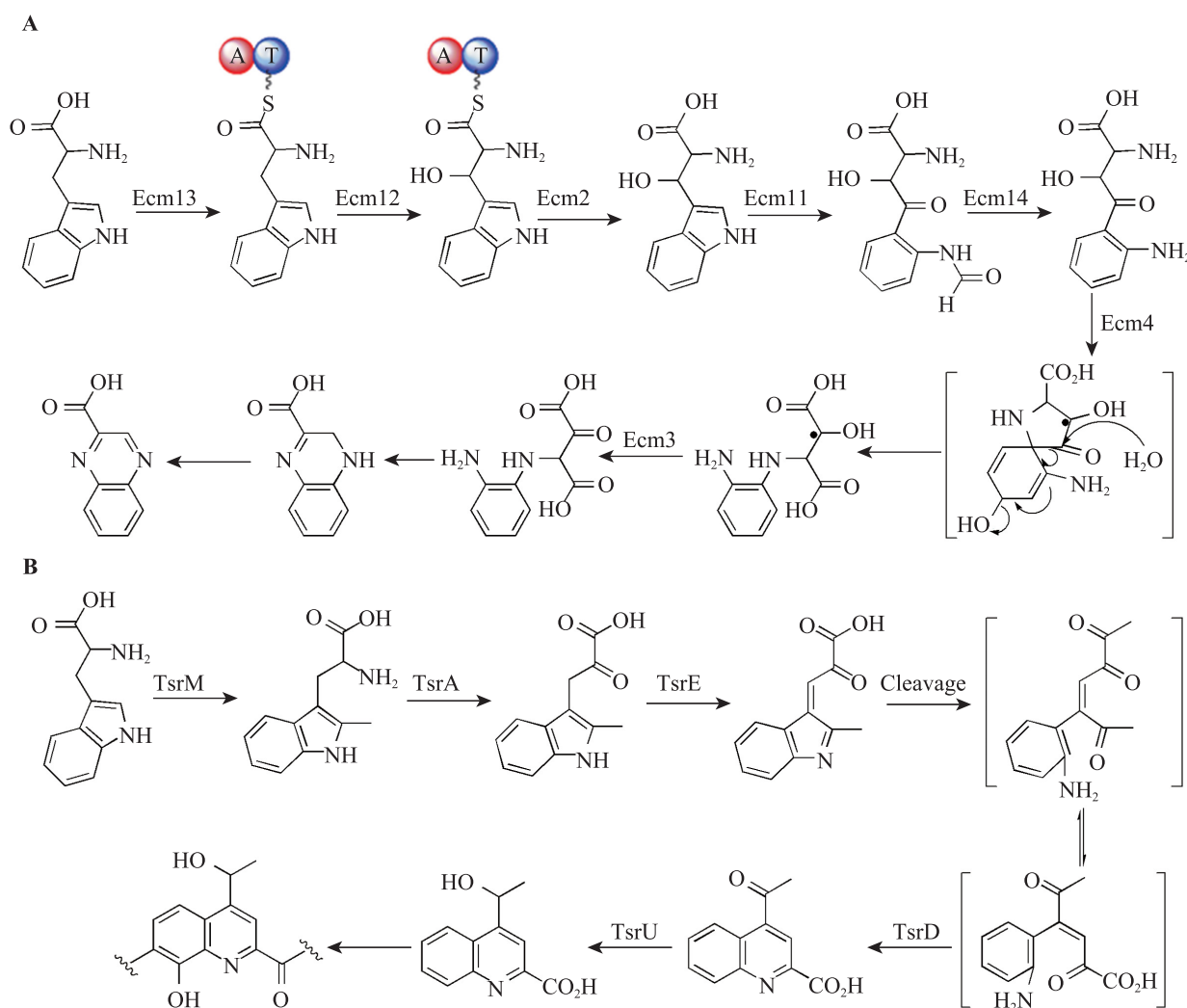


图 6 推测的 Echinomycin 中喹啉环(A)和 Thiostrepton 中喹啉环(B)的生物合成途径

Fig. 6 The proposed biosynthetic pathway of the quinoxaline and quinoline moiety in echinomycin (A) and thiostrepton (B)

合成之外, 还参与了 Nosiheptide 和 Nocathiacin 中 3-甲基吲哚-2-羧酸模块的生物合成。与 Thiostrepton 中喹啉羧酸模块需要多个酶经过一系列修饰反应才能完成喹啉羧酸生物合成不同, Nosiheptide 和 Nocathiacin 中的吲哚羧酸生物合成则是由一个 SAM 依赖的酶催化色氨酸吲哚环侧链的自由基重排形成的。NosL 是一个 SAM 依赖的酶, 这类酶自身含有一个  $[4Fe-4S]^{2+}$  的结合位点, 一般是在厌氧条件下, 利用还原型铁硫簇提供电子, 使 SAM 分解形成腺苷自由基(Ado $\cdot$ )和甲硫氨酸, 并以腺苷自由基进行单电子传递来完成反应。推测 NosL 首先催化色氨酸侧链 C $\alpha$ -C $\beta$  键的断裂, 形成 3-亚甲基吲哚和甘氨酸自由基, 之后形成的甘氨酸自由基再次进攻吲哚环 C2 位, 形成最终的产物 3-甲基吲哚-2-羧酸<sup>[46-47]</sup>。这个过程推测可能有两种途径, 一种是形成甘氨酸自由基直接进攻吲哚环 C2 位, 另一种是由甘氨酸自由基断裂形成的羧基自由基进攻 C2 位。它们的共同之处是都经历甘氨酸自由基这个中间过程, 并初步经过了化学衍生实验的证实。

## 2.7 双色氨酸母核结构天然产物生物合成

在结构多样的微生物天然产物中, 有一些天然产物的骨架结构完全是由两个色氨酸(吲哚)缩合形成的。这种以双分子色氨酸(吲哚)组成母核的天然产物被统称为双吲哚(Bisindole)类化合物<sup>[48]</sup>。这类化合物都有着良好的生物学活性, 并且其生物合成已经有详细的报道。其中有以蝴蝶霉素(Rebeccamycin)为代表, 包括 AT2433-A1、Staurosporine、K252 在内的同家族结构类似物(非 NRPS 机制合成), 还有 Violacein、Terrequinone A 和 Fellutanine A 等天然产物, 其中 Terrequinone A 和 Fellutanine A 是由 NRPS 机制生物合成的<sup>[48]</sup>。这 3 个化合物有着共同的结构特点, 都是 2 个色氨酸的吲哚环在化合物的两侧, 而中间则是由 2 个色氨酸的

侧链通过不同的酶催化反应形成的五元或六元环。对这类化合物生物合成的研究, 可以使我们进一步认识色氨酸在天然产物生物合成中的重要性 and 多样性<sup>[49]</sup>。

Rebeccamycin 家族的化合物, 其母核是由 2 个色氨酸分子缩合形成的 Indolo-(2,3-a)-pyrrolo-(3,4-c)-carbazole, 其中 Rebeccamycin 母核形成的是双醌吡咯环而 Staurosporine 则形成的是单醌吡咯环。以 Rebeccamycin 和 Staurosporine 的生物合成途径为例, 氯代色氨酸或色氨酸首先在氨基酸氧化酶 RebO/StaO 的作用下, 被氧化成亚胺, 之后经过关键酶 RebD/StaD 的催化, 完成吡咯环的形成<sup>[50-51]</sup>, 并进一步由 RebP/StaP 催化形成母核 Indolo-(2,3-a)-pyrrolo-(3,4-c)-carbazole<sup>[52-53]</sup>, 然后依次进行后续的后修饰过程如氧化、糖基化、甲基化反应, 形成最终的化合物<sup>[54-56]</sup> (图 7A)。

Violacein 生物合成起始步骤与 Rebeccamycin 类化合物起始步骤类似, 先由一个氨基酸氧化酶 VioA 氧化形成亚胺色氨酸, 2 分子亚胺色氨酸在 VioB 和 VioE 的作用下, 脱羧环化形成吡咯环, 而不遵循 Rebeccamycin 和 Staurosporine 生物合成途径中的两个吲哚环的 C2-C2 键相连形成咪唑环, 最后依此经过 VioD 和 VioC 的氧化, 形成 Violacein<sup>[32]</sup> (图 7B)。

Terrequinone A 和 Fellutanine A 在结构上也属于 Bisindole 类化合物, 尤其与 Violacein 的化学结构十分相似, 但是其生物合成机制却与 Violacein 以及 Rebeccamycin 类化合物不同, 是以 NRPS 机制催化形成母核。Terrequinone A 与 Fellutanine A 合成母核的区别是 Terrequinone A 首先是色氨酸发生转氨反应形成吲哚丙酮酸, 之后 2 分子吲哚丙酮酸连接形成 C-C 键并环化最终形成核心芳香醌环结构, 而 Fellutanine A 则是色氨酸直接被 NRPS 活化并环化形成哌嗪二酮结构<sup>[28,57]</sup>。

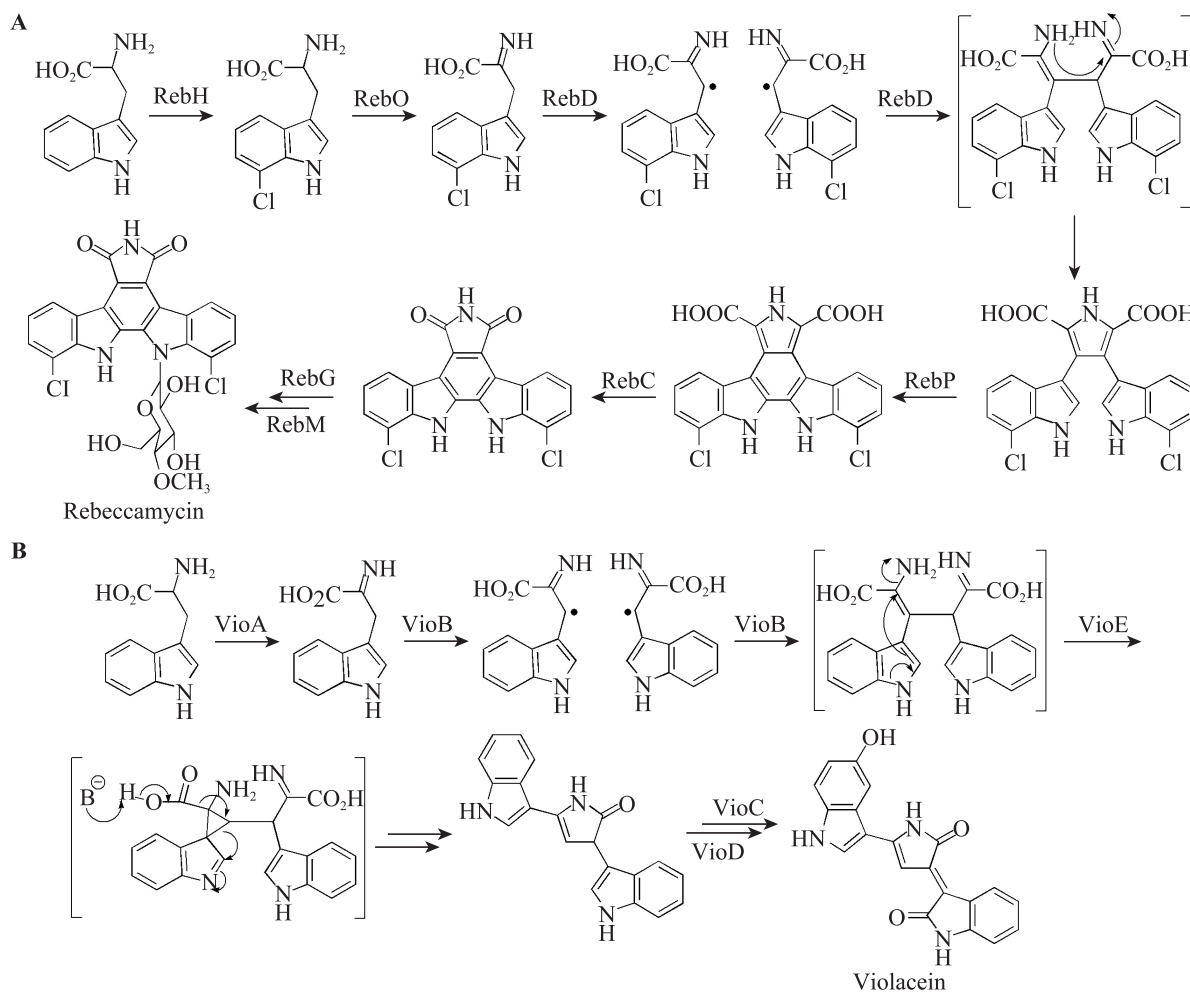


图 7 推测的 Rebecamycin (A)和 Violacein (B)的生物合成途径

Fig. 7 The proposed biosynthetic pathway of Rebecamycin (A) and Violacein (B)

### 3 总结与展望

色氨酸作为 20 种天然氨基酸之一，不仅是构成生命物质蛋白质所必须的氨基酸，而且在天然产物生物合成中又是非常重要的结构单元。由于其具有多个官能基团，如羧基、氨基和吲哚基团，所以色氨酸经过修饰之后可以形成多种不同的结构单元，而这些修饰过程通常是由不同的酶催化反应来完成的，因此全面深入了解色氨酸的生物修饰过程及酶催化机理，有利于我们理解天然产物结构多样性形成

的本质和构建多样的生物合成元件或模块，有利于指导我们利用合成生物学的理念和技术构建结构多样的新化合物，为新药研究与开发提供新的技术与方法。

### 参考文献

- [1] Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. Nonribosomal peptides: from genes to products[J]. *Natural Product Reports*, 2003, 20(3): 275-287.
- [2] Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms[J].

- Chemical Reviews, 2006, 106(8): 3468.
- [3] Arndt HD, Schoof S, Lu JY. Thiopeptide antibiotic biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(37): 6770–6773.
- [4] Du L, Sánchez C, Shen B. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules[J]. *Metabolic Engineering*, 2001, 3(1): 78–95.
- [5] Chatterjee C, Paul M, Xie L, et al. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics[J]. *ChemInform*, 2005, 36(24): 633–684.
- [6] Pag U, Sahl HG. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics?[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8(9): 815–833.
- [7] Somei M, Yamada F. Simple indole alkaloids and those with a non-rearranged monoterpenoid unit[J]. *Natural Product Reports*, 2005, 22(1): 73–103.
- [8] Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 735–769.
- [9] Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2001, 52(1): 29–66.
- [10] Robbel L, Marahiel MA. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(36): 27501–27508.
- [11] Strieker M, Marahiel MA. The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics[J]. *ChemBioChem*, 2009, 10(4): 607–616.
- [12] Baltz RH, Miao V, Wrigley SK. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics[J]. *Natural Product Reports*, 2005, 22(6): 717–741.
- [13] Pohle S, Appelt C, Roux M, et al. Biosynthetic gene cluster of the non-ribosomally synthesized cyclodepsipeptide skylamycin: deciphering unprecedented ways of unusual hydroxylation reactions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(16): 6194–6205.
- [14] Hojati Z, Milne C, Harvey B, et al. Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9(11): 1175–1187.
- [15] Amir-Heidari B, Thirlway J, Micklefield J. Stereochemical course of tryptophan dehydrogenation during biosynthesis of the calcium-dependent lipopeptide antibiotics[J]. *Organic Letters*, 2007, 9(8): 1513–1516.
- [16] Amir-Heidari B, Micklefield J. NMR confirmation that tryptophan dehydrogenation occurs with *Syn* stereochemistry during the biosynthesis of CDA in *Streptomyces coelicolor*[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2007, 72(23): 8950–8953.
- [17] Smith DDS, Wood NJ, Hodgson DA. Interaction between primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): role of pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase[J]. *Microbiology*, 1995, 141(7): 1739–1744.
- [18] Garneau S, Dorrestein PC, Kelleher NL, et al. Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A1 biosynthesis[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 44(8): 2770–2780.
- [19] Zhang Q, Liu W. Biosynthesis of thiopeptide antibiotics and their pathway engineering[J]. *Natural Product Reports*, 2013, 30(2): 218–226.
- [20] Pierre S, Guillot A, Benjdia A, et al. Thiostrepton tryptophan methyltransferase expands the chemistry of radical SAM enzymes[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8: 957–959.
- [21] Gould SJ, Chang CC. Streptonigrin biosynthesis. 1. Origin of the 4-phenylpicolinic acid moiety[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1977, 99(16): 5496–5497.
- [22] Hartley DL, Speedie MK. A tryptophan C-methyltransferase involved in streptonigrin biosynthesis in *Streptomyces flocculus*[J]. *Biochemical Journal*, 1984, 220(1): 309.
- [23] Li SM. Applications of dimethylallyltryptophan synthases and other indoleprenyl transferases for structural modification of natural products[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(4): 631–639.
- [24] Li SM. Prenylatedindole derivatives from fungi:

- structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(1): 57–78.
- [25] Edwards DJ, Gerwick WH. Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(37): 11432–11433.
- [26] Liu X, Walsh CT. Characterization of cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan dimethylallyltransferase in cyclopiazonic acid biosynthesis: substrate promiscuity and site directed mutagenesis studies[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2009, 48(46): 11032–11044.
- [27] Yin WB, Grundmann A, Cheng J, et al. Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri* identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(1): 100–109.
- [28] Balibar CJ, Howard-Jones AR, Walsh CT. Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(9): 584–592.
- [29] Watanabe K, Hotta K, Praseuth AP, et al. Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli*[J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(8): 423–428.
- [30] Chen H, Hubbard BK, O'Connor SE, et al. Formation of  $\beta$ -hydroxyhistidine in the biosynthesis of nikkomycin antibiotics[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9(1): 103–112.
- [31] Koketsu K, Oguri H, Watanabe K, et al. Identification and stereochemical assignment of the  $\beta$ -hydroxytryptophan intermediate in the echinomycin biosynthetic pathway[J]. *Organic Letters*, 2006, 8(21): 4719–4722.
- [32] Balibar CJ, Walsh CT. *In vitro* biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2006, 45(51): 15444–15457.
- [33] Roncone R, Barbieri M, Monzani E, et al. Reactive nitrogen species generated by heme proteins: mechanism of formation and targets[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2006, 250(11): 1286–1293.
- [34] Barry SM, Kers JA, Johnson EG, et al. Cytochrome P450—catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtominyphytoxin biosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(10): 814–816.
- [35] Vaillancourt FH, Yeh E, Vosburg DA, et al. Nature's inventory of halogenation catalysts: oxidative strategies predominate[J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(8): 3364.
- [36] Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. Halogenation strategies in natural product biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(2): 99–109.
- [37] Deng H, O'Hagan D, Schaffrath C. Fluorometabolite biosynthesis and the fluorinase from *Streptomyces cattleya*[J]. *Natural Product Reports*, 2004, 21(6): 773–784.
- [38] Yeh E, Garneau S, Walsh CT. Robust *in vitro* activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(11): 3960–3965.
- [39] Heemstra Jr JR, Walsh CT. Tandem action of the O<sub>2</sub>-and FADH<sub>2</sub>-dependent halogenases KtzQ and KtzR produce 6,7-dichlorotryptophan for kutzneride assembly[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(43): 14024–14025.
- [40] Zolova OE, Mady ASA, Garneau-Tsodikova S. Recent developments in bisintercalator natural products[J]. *Biopolymers*, 2010, 93(9): 777–790.
- [41] Zolova OE, Garneau-Tsodikova S. Importance of the MbtH-like protein TioT for production and activation of the thiocoraline adenylation domain of TioK[J]. *MedChemComm*, 2012, 3: 950–955.
- [42] Mady AS, Zolova OE, Millán MÁ, et al. Characterization of TioQ, a type II thioesterase from the thiocoraline biosynthetic cluster[J]. *Molecular BioSystems*, 2011, 7(6): 1999–2011.
- [43] 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.
- [44] Liao R, Duan L, Lei C, et al. Thiopeptide biosyn-

- thesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications[J]. *Chemistry & Biology*, 2009, 16(2): 141–147.
- [45] Kelly WL, Pan L, Li C. Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(12): 4327.
- [46] Zhang Q, Li Y, Chen D, et al. Radical-mediated enzymatic carbon chain fragmentation-recombination[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(3): 154–160.
- [47] Zhang Q, Chen D, Lin J, et al. Characterization of NocL involved in thiopeptide nocathiacin I biosynthesis: a [4Fe-4S] cluster and the catalysis of a radical S-adenosylmethionine enzyme[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(24): 21287–21294.
- [48] Ryan KS, Drennan CL. Divergent pathways in the biosynthesis of bisindole natural products[J]. *Chemistry & Biology*, 2009, 16(4): 351–364.
- [49] Sánchez C, Zhu L, Braña AF, et al. Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(2): 461–466.
- [50] Howard-Jones AR, Walsh CT. Enzymatic generation of the chromopyrrolic acid scaffold of rebeccamycin by the tandem action of RebO and RebD[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 44(48): 15652–15663.
- [51] Onaka H, Taniguchi SI, Igarashi Y, et al. Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2002, 55(12): 1063.
- [52] Howard-Jones AR, Walsh CT. Nonenzymatic oxidative steps accompanying action of the cytochrome P450 enzymes StaP and RebP in the biosynthesis of staurosporine and rebeccamycin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(36): 11016–11017.
- [53] Makino M, Sugimoto H, Shiro Y, et al. Crystal structures and catalytic mechanism of cytochrome P450 StaP that produces the indolocarbazole skeleton[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(28): 11591–11596.
- [54] Onaka H, Asamizu S, Igarashi Y, et al. Cytochrome P450 homolog is responsible for CN bond formation between aglycone and deoxysugar in the staurosporine biosynthesis of *Streptomyces* sp. TP-A0274[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(9): 1753–1759.
- [55] Howard-Jones AR, Walsh CT. Staurosporine and rebeccamycinaglycones are assembled by the oxidative action of StaP, StaC, and RebC on chromopyrrolic acid[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(37): 12289–12298.
- [56] Salas AP, Zhu L, Sánchez C, et al. Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumourindolocarbazolestaurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(1): 17–27.
- [57] Kozlovsky A, Vinokurova N, Adanin V. Diketopiperazine alkaloids from the fungus *Penicillium piscarium* Westling[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2000, 36(3): 271–275.