



## 源于微生物的海鞘天然产物

陈雷 杜爽 王光玉\*

哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院生物工程系 山东 威海 264209

**摘要:** 海洋动物是具有生物活性海洋天然产物的重要来源。海鞘中含有丰富的微生物类群,如细菌、放线菌、真菌和蓝细菌。越来越多的直接或间接证据表明,一些从海鞘中分离的天然产物并不是海鞘本身产生的,而是由其共生微生物产生的。本文对近些年来的海鞘天然产物的微生物来源的研究方法进行综述,包括可培养细菌的分离、不可培养细菌的粗提物检测、宏基因组学、全基因组测序等直接方法,以及化合物结构比对的间接方法。通过对海鞘-微生物共生体中天然产物生物合成来源的研究,不仅可以从根本上解决动物药源的问题,而且可为研究海鞘与微生物共生关系提供有力证据。

**关键词:** 海鞘, 天然产物, 微生物来源, 共生

## Microbial origin of natural products isolated from ascidians

CHEN Lei DU Shuang WANG Guang-Yu\*

Department of Bioengineering, School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China

**Abstract:** Marine animals are important sources of marine natural products with biological activity. Ascidians harbor rich microbial communities, including bacteria, actinobacteria, fungi, and cyanobacteria. More and more direct or indirect evidence suggests that some natural products isolated from ascidians are not produced by ascidian themselves, but by their symbiotic microorganisms. In this review, we present the research methods of microbial origin of ascidians natural products in recent years, including direct methods, such as the isolation of culturable bacteria, crude extract detection of non-culturable bacteria, metagenomics, whole genome sequencing, as well as indirect methods of the comparison of compound structures. The study of biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-ascidians assemblages, can solve problem of crude drug from animal sources, and provide the evidence for symbiotic relationship between ascidians and microorganisms.

**Keywords:** Ascidian, Natural product, Microbial origin, Symbiosis

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31300009); Natural Scientific Research Innovation Foundation in Harbin Institute of Technology (HIT.NSRIF.2014127); Discipline Construction Guide Foundation in Harbin Institute of Technology at Weihai (WH20150204, WH20160205)

\*Corresponding author: E-mail: wanggy18\_2007@163.com

Received: 20-05-2019; Accepted: 03-09-2019; Published online: 10-10-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31300009); 哈尔滨工业大学科研创新基金(HIT.NSRIF.2014127); 哈尔滨工业大学威海校区学科建设引导基金(WH20150204, WH20160205)

\*通信作者: E-mail: wanggy18\_2007@163.com

收稿日期: 2019-05-20; 接受日期: 2019-09-03; 网络首发日期: 2019-10-10

海鞘(ascidians)是海洋天然产物的重要来源,已经从海鞘中分离到大约 1 000 种化合物<sup>[1]</sup>,具有结构新颖和抗病毒、抗肿瘤、抗菌、抗感染等多种生理活性<sup>[2]</sup>,如 ET-743 和 Didemnin B<sup>[3]</sup>。由于从海鞘中分离的化合物与来自微生物的化合物结构相同或相似,人们开始怀疑这些海鞘天然产物的真正来源。近年来,越来越多的证据表明,从海鞘中分离到的化合物不是海鞘本身产生的,而是由与其共生的微生物产生的<sup>[4]</sup>。由于海洋无脊椎动物的采集或水产养殖存在着一定的困难,从海洋动物中直接进行化合物的分离与纯化面临高成本以及动物原料不足的问题。微生物资源的利用具有很多便利条件,如果能够证实海鞘天然产物是微生物来源的,就可以有效地解决药源问题,对药物的开发具有重要意义。

从 20 世纪 80 年代起人们开始研究海鞘天然产物的微生物来源,目前已经通过直接或间接证据表明约有 8% 的海鞘天然产物是由与海鞘共生的微生物产生的,代表性化合物见表 1 和表 2<sup>[1,4-31]</sup>。目前这方面的研究还处于起步阶段,虽然已经有一些科学家做了很好的尝试,但是还没有通用的有效方法可以直接借鉴。因此本文综述了海鞘天然产物微生物来源的相关研究方法,如海鞘来源可培养细菌的分离、海鞘来源不可培养细菌的粗提物检测、宏基因组学、全基因组测序等直接方法,以及将海鞘天然产物与非海鞘来源可培养细菌分到的化合物进行结构比对的间接方法。另外还可借鉴海绵等其他海洋动物化合物的微生物来源的证明方法,如原位杂交和多种方法联用等。本文还进一步分析了天然产物生物合成基因在确定天然产物的真正来源以及新药物发现方面的重要作用,为今后系统研究海鞘天然产物的微生物来源提供参考。

## 1 海鞘天然产物微生物来源的直接证据

### 1.1 海鞘来源可培养细菌的分离

Tambjamines 是一种吡咯生物碱类化合物,从

海鞘 *Atapozoa* sp.、苔藓虫及其捕食者中都可分离,推测其可作为化学防御物质用于抵抗动物的捕食<sup>[32-33]</sup>。Tambjamines 以前还从陆生放线菌 *Streptomyces* sp. BE18591 中分离到<sup>[34]</sup>,它与多种细菌产生的灵杆菌素类生物碱(prodigiousin-type alkaloids)的结构非常相似<sup>[35]</sup>,因此推测 tambjamines 可能来源细菌。研究者从采集自瑞典的成年海鞘 *Ciona intestinalis* 的体表分离到海洋细菌 *Pseudoalteromonas tunicata*,从这种细菌中虽然没有分离到化合物 tambjamines,但是得到了 Tambjamines 的衍生物 YP1,因此证实了 Tambjamines 的细菌来源<sup>[5]</sup>。

目前从海鞘中分离到的可培养微生物的数量还很有限。除了 Tambjamines 以外,海鞘来源化合物直接通过分离海鞘微生物进而再次得到相同化合物的例子非常有限。因此今后需加强新颖而有效的海洋动物来源微生物分离培养方法的研究<sup>[36]</sup>。

### 1.2 海鞘来源不可培养细菌的粗提物检测

研究人员已经从 *Didemnidae* 科的海鞘,也称为 Didemnid 海鞘中分离到很多结构新颖且具有较好药理活性的化合物,如 C<sub>11</sub> 环戊烯酮类化合物(cyclopentenones)。还有科学家从蓝细菌中也分离到 C<sub>11</sub> 化合物。由于 *Didemnidae* 科中有很多属种的海鞘(如 *Lissoclinum* sp.和 *Diplosoma* sp.)都与蓝细菌(如原绿藻 *Prochloron* sp.)共生,所以猜想 C<sub>11</sub> 化合物可能是由蓝细菌产生的。由于海鞘的共生体蓝细菌 *Prochloron* sp.无法获得纯培养,所以 Takayuki 等通过挤压浮游生物网(squeezing through the plankton net)的方法将海鞘 *Diplosoma virens* 与其体内的蓝细菌 *Prochloron* sp.分离,在分离的 *Prochloron* sp.丙酮提取物的 <sup>1</sup>H-NMR 图谱中找到了与 C<sub>11</sub> cyclopentenones 相同的峰,证实了这种海鞘天然产物 C<sub>11</sub> 化合物的共生微生物来源<sup>[7]</sup>。

Bistramides 是从热带海鞘 *Lissoclinum bistratum* 中分离出来的化合物<sup>[6]</sup>。这种海鞘中存在共生体蓝细菌 *Prochloron* sp.,通过人工将 *Prochloron* sp.

表 1 海鞘及其他海洋动物来源化合物微生物来源的直接证据  
**Table 1 Direct evidence of microbial sources of ascidians and other marine animal derived compounds**

序号 No.	天然产物 Natural product	海洋动物宿主 <sup>a</sup> Host marine animal <sup>a</sup>	最相似化合物 The most similar compounds	最相似化合物的来源微生物及采样地点 The most similar compounds isolated from microorganism and sampling sites	直接证据的试验方法 Research method of direct evidence	直接证据的微生物来源 Microbial origin of direct evidence	参考文献 References
1	Tambjamines	Atapozoa sp.	Tambjamines	<i>Streptomyces</i> sp.	海鞘来源可培养细菌分离 Culturable bacteria isolated from ascidians	<i>Pseudoalteromonas tunicate</i> (ascidian <i>Ciona intestinalis</i> in Sweden)	[5]
2	Bistramides	<i>Lissoclinum bistratum</i>	Pederin	<i>Paederus fuscipes</i>	海鞘来源不可培养细菌的粗提物 Crude extracts of unculturable bacteria isolated from ascidians	<i>Prochloron</i> sp.	[6]
3	C11 Cyclopentenones	<i>Diplosoma virens</i>	Nakienones	<i>Synechocystis</i> sp. (coral <i>Acropora</i> sp.)	海鞘来源不可培养细菌的粗提物 Crude extracts of unculturable bacteria isolated from ascidians	<i>Prochloron</i> sp.	[7]
4	Palmerolide	<i>Synoicum adareanum</i>	Archazolid	<i>Cystobacter violaceus</i> (soil)	宏基因组学 Metagenomics	Genus <i>Pseudovibrio</i> and <i>Microbulbifer</i>	[8]
5	Patellazoles	<i>Lissoclinum patella</i>	Archazolid	<i>Cystobacter violaceus</i> (soil)	宏基因组学 Metagenomics	<i>Candidatus Endolissoclinum faulkneri</i>	[9]
6	Ecteinascidins	<i>Ecteinascidia turbinata</i> and <i>E. thurstoni</i>	Safracins	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (soil)	宏基因组学 Metagenomics	<i>Candidatus Endoecteinascidia frumentensis</i>	[10]
7	Didemnin B	<i>Trididemnum solidum</i>	Didemnin B	<i>Tistrella mobilis</i> (Red Sea)	全基因组测序 Whole genome sequencing	<i>Tistrella mobilis</i>	[11]
8	MAAs	<i>Lissoclinum patella</i>	None	None	全基因组测序 Whole genome sequencing	<i>Prochloron</i> sp.	[12]
9	Patellamides	<i>Lissoclinum patella</i>	Prenylagaramides	<i>Oscillatoria agardhii</i> (Lake Kasumigaur)	全基因组测序 Whole genome sequencing	<i>Prochloron didemni</i>	[13]
10	Calyculin A	<i>Disodermia calyx</i> (sponge)	None	None	原位杂交 In situ hybridization	Genus <i>Entotheonella</i>	[14]
11	Bryostatins	<i>Bugula neritina</i> (bryozoan)	None	None	原位杂交 In situ hybridization	<i>Candidatus Endobugula sertula</i>	[15]
12	Polytheonamides	<i>Theonella swinhoei</i> (sponge)	None	None	多种方法联用 Combination of multiple methods	Genus <i>Entotheonella</i>	[16]

注: <sup>a</sup>: 表格中如果宿主是海鞘的, 不用单独说明; 如果宿主是其他海洋动物的, 在圆括号中标注出海洋动物的名字。

Note: <sup>a</sup>: In the table, if the host is ascidian, there is no need to explain. If the host is other marine animals, the name of the marine animal is indicated in parentheses.

表 2 海鞘天然产物微生物来源的间接证据

序号	天然产物	海鞘宿主	最相似化合物	最相似化合物	最相似化合物的来源微生物及采样地点	参考文献
No.	Natural product	Host ascidian	The most similar compounds	The most similar compounds	The most similar compounds isolated from microorganism and sampling sites	References
1	Biselides	<i>Didemniidae</i> sp.	FR177391 (13)	<i>Serratia liquefaciens</i> (soil)	[17]	
2	Enterocins	<i>Didemnum</i> sp.	Enterocins	<i>Enterococcus faecium</i> ( <i>Lolium multiflorum</i> Lam.)	[18]	
3	Haterumalide B	<i>Lissoclinum</i> sp.	Haterumalide NA	<i>Serratia phymathica</i> (soil)	[17]	
4	Iejmalides	<i>Eudistoma cf. rigida</i>	Iejmalide A	Cyanobacteria (Okinawan)	[19]	
5	Lissoclinolide	<i>Lissoclinum tunicate</i>	Tetrenolin	<i>Micropolyspora venezuelensis</i> (soil)	[20]	
6	Lobatamides	Unidentified	Salicylhalamides	<i>Haliclona</i> sp. (sponge)	[4]	
7	Namenamicin	<i>Polysyncranton lithostrotum</i>	Calicheamicin	<i>Micromonospora echinospora</i> (none)	[21]	
8	Sagittamides	<i>Didemnid tunicate</i>	Zwittermicin	<i>Bacillus cereus</i>	[22]	
9	Shishijimicins	<i>Didemnum proliferum</i>	Calicheamicin	<i>Micromonospora echinospora</i> (none)	[23]	
10	Cyclohexazoline	<i>Lissoclinum bistratum</i>	Aeruginosamide	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Rutland Lake)	[4]	
11	Diazonamide	<i>Diazonia</i> sp.	Thiopeptide	<i>Bacillus cereus</i> (sponge <i>Polymastia jancirensis</i> )	[24]	
12	Tamandarins	Unidentified	Didemnin B	<i>Tistrella mobilis</i> (Red Sea)	[25]	
13	Trunkamide	<i>Lissoclinum</i> sp.	Prenylagaramides	<i>Oscillatoria agardhii</i> (Lake Kasumigaur)	[4]	
14	Vitilevuamide	<i>Polysyncranton lithostrotum</i> and <i>Didemnum cuculliferum</i>	Lantibiotics	<i>Lactobacillus</i> spp. (Raw milk and cheese)	[26]	
15	Virenamicins	<i>Diplosoma virens</i>	Aeruginosamide	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Rutland Lake)	[27]	
16	Westellamide	<i>Lissoclinum bistratum</i>	Aeruginosamide	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Rutland Lake)	[4]	
17	Pibocins	<i>Eudistoma</i> sp.	Festuclavines	<i>Penicillium roqueforti</i> (Uglich Bioworks)	[28]	
18	Staurosporines	<i>Eudistoma toetalensis</i>	Staurosporines	<i>Streptomyces roseoflavus</i> (sediment)	[1]	
19	Tubercidins	<i>Didemnum voeltzkowi</i>	Tubercidins	<i>Streptomyces tubercidicus</i> ( <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill)	[29]	
20	Ritterazines	<i>Ritterella tokioka</i>	Cephalostatins	<i>Cephalodiscus gilchristi</i> (marine worm <i>Cephalodiscus gilchristi</i> )	[30]	
21	Adenosin	<i>Styela plicata</i>	2'-Deoxyadenosin	<i>Penicillium</i> sp. ( <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> )	[31]	

与宿主海鞘分开, 然后从各自的提取物中分离化合物 Bistramides, 研究表明 Bistramides 类化合物在 *Prochloron* 中比在海鞘中的含量高, 说明 Bistramides 可能是蓝细菌产生的<sup>[6]</sup>。

### 1.3 宏基因组学方法

Riesenfeld 等<sup>[8]</sup>采用宏基因组学方法对采自南极洲的海鞘 *Synoicum adareanum* 中分离出的一种聚酮类化合物 Palmerolide A 的生物来源进行研究, 在显微镜下可以观察到海鞘的被囊内存在着很多微生物, 通过变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和 16S rRNA 基因克隆文库法分析了微生物的多样性, 发现  $\alpha$ -和  $\gamma$ -变形杆菌纲的细菌约占 75%, 以 *Pseudovibrio* 和 *Microbulbifer* 属居多; 以这种海鞘和海鞘体内的微生物为模板, 对 I 型 PKS (polyketide synthase)的酮基合成酶(ketosynthase, KS)结构域进行 PCR 扩增, 对扩增出的 KS 基因进行了 BLAST 同源性和系统发育分析, 发现其与微生物(*Candidatus Endobugula sertula*)来源的苔藓抑素(bryostatins)的生物合成基因有较高的相似性, *Microbulbifer* 属的菌株和 *Candidatus Endobugula sertula* 的系统发育关系较密切并且同属于  $\gamma$ -变形杆菌纲交替单胞菌目(*Alteromonadales*)的成员, 因此推断化合物 Palmerolide A 可能是由海鞘体内的  $\gamma$ -变形杆菌纲的共附生微生物产生。该研究虽然证明了 Palmerolide A 的微生物来源, 但是还需要进一步研究这个 KS 基因与 Palmerolide A 生物合成之间的关系, 以及到底是哪种微生物含有这个 KS 基因。

海鞘 *Lissoclinum patella* 是一种复海鞘, 是由一个共同的被膜包裹着许多小的个体(zoid)构成的。Patellazoles 是分离自这种海鞘的一类具有较强细胞毒活性的聚酮类化合物。采用宏基因组测序和构建 DNA 克隆文库的方法来寻找 Patellazoles 的生物合成基因的来源, 发现并不在预想的海鞘 *Lissoclinum patella* 或者共生的蓝细菌 *Prochloron didemni* 中, 而是存在于与每个小个体(zoid)共生的一种新的  $\alpha$ -变形杆菌纲的细菌 *Candidatus*

*Endolissoclinum faulkneri* 中。研究发现 Patellazole 的生物合成基因 *ptz* 是 *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* 基因组中唯一的次级代谢产物基因, 通过多种化学和生物学方法进一步证实了 *ptz* 基因与 Patellazoles 生物合成的一致性; 这种共生细菌 *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* 已经对基因组进行了精简, 去掉了一些无用的基因, 导致这种细菌离开宿主海鞘无法独立生存<sup>[9]</sup>, 这也证实了次级代谢产物 Patellazoles 对于维持海鞘与细菌的共生关系具有重要作用。

Ecteinasidin 743 (ET-743)是一种四氢异喹啉生物碱类化合物, 分离自加勒比海鞘 *Ecteinasidia turbinata*, 已经通过欧盟认证在临床上用于软组织肉瘤和卵巢癌的治疗<sup>[2]</sup>。研究发现, ET-743 与其他 3 种细菌来源的天然产物 Saframycin A (来源于 *Streptomyces lavendulae*)、Saframycin Mx1 (来源于 *Myxococcus xanthus*) 和 Safracin B (来源于 *Pseudomonas fluorescens*)的结构相似性很高, 因此研究者开始怀疑并着手研究 ET-743 的真正来源<sup>[10]</sup>。通过基于下一代测序的宏基因组学方法, 首先从整个动物体入手, 找到 ET-743 的生物合成基因簇, 之后通过宏基因组 DNA 的提取、测序、组装分析等过程将生物合成基因簇定位于一种  $\gamma$ -变形杆菌纲的细菌 *Candidatus Endoecteinasidia frumentensis* 的基因组中, 从而证实了化合物 ET-743 的微生物来源<sup>[10]</sup>。

### 1.4 全基因组测序

通过对海鞘体内的目标菌株进行全基因组测序可以发现海鞘天然产物的真正来源。来自加勒比海鞘 *Trididemnum solidum* 的 Didemnin B 是第一个进入临床试验的海洋来源抗肿瘤药物。现已证实 Didemnin B 是由海洋  $\alpha$ -变形杆菌纲的细菌 *Tistrella mobilis* 产生的<sup>[25]</sup>。通过对细菌 *Tistrella mobilis* KA081020-065 的全基因组测序发现了 Didemnin B 的生物合成基因簇, 并提出前体化合物 Didemnin X 和 Y 可在该细菌中转化为 Didemnin B 的假设<sup>[11]</sup>。

与海鞘共生的细菌中,最有代表性的细菌是原绿藻属(*Prochloron*)的细菌<sup>[37]</sup>。在海鞘被膜中发现了类菌孢素氨基酸(mycosporine-like amino acid, MAA)可以保护海鞘体内的蓝藻免受紫外线的伤害,在对海鞘 *Lissoclinum patella* 的全基因组测序分析发现,MAA 的生物合成基因簇存在于蓝细菌 *Prochloron* 的基因组中,从而证实了 MAA 的微生物来源<sup>[12]</sup>。

一千多种海鞘天然产物中近一半都分离自 *Didemnidae* 科的海鞘,其中最具代表性的是海鞘 *Lissoclinum patella*<sup>[38]</sup>。*Lissoclinum patella* 是一种生活在热带印度洋-太平洋地区的复海鞘,是研究共生关系的理想模型<sup>[8]</sup>。目前已知的分离自 *Lissoclinum patella* 的大约 70 种化合物都是由其共生的微生物产生的,并且大多数都是由共生蓝细菌 *Prochloron didemni* 产生的<sup>[38]</sup>。Patellamides 是从 *Didemnidae* 科海鞘中分离出来的一系列环肽类化合物。通过对来自帕劳的海鞘 *Lissoclinum patella* 样品以及与其共生的蓝细菌 *Prochloron didemni* 分别进行全基因组测序,发现化合物 patellamide A 和 C 的生物合成基因簇并不在宿主海鞘中,而是存在于与其共生的蓝细菌中<sup>[13]</sup>,证明了化合物 Patellamides 的微生物来源。研究者把 Patellamide A 和 C 的生物合成基因簇在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行异源表达,并在重组后的大肠杆菌提取物中获得了这两种化合物<sup>[39]</sup>。

## 2 海鞘天然产物微生物来源的间接证据

一些海鞘天然产物与非海鞘来源可培养微生物分离的化合物结构相似,可以间接表明海鞘天然产物可能是微生物来源的。

聚酮类化合物是海鞘天然产物中重要的一类。一些分离自海鞘的聚酮类化合物与其他来源(如土壤、附生植物、海绵等)细菌分离到的化合物结构具有高度的相似性,所以推测这些海鞘天然产物可能是微生物来源的(表 2)。除了化合物 Bistramides 之外,这些化合物的生物合成途径高度

相似,结构基因都是结构化排列的,都具有相似的假定起始单元,接着是 0-2 个氨基酸,然后是 16-26 个碳的聚酮链,包括 13-24 个原子的大环结构;化合物 Bistramides 中的氨基酸位置不在起始位置,而是在化合物的中间<sup>[4,17]</sup>。

从海鞘中分离到许多肽类化合物,一些具有抗肿瘤活性的肽类化合物已经应用于临床,如 ET-743、Didemnin B 和 Aplidine 等<sup>[2]</sup>。许多海鞘分离到的肽类化合物与其他细菌来源化合物的结构高度相似(表 2)。聚酮类化合物和非核糖体肽类化合物多是由微生物生成的,混合聚酮-肽类化合物的生物合成也只在细菌和低等真核生物中被发现,这也间接证明了海鞘来源的这些化合物潜在的共生微生物来源<sup>[25]</sup>。

从海鞘 *Eudistoma toaealensis* 中分离到的一系列属于吡啶并咪唑类生物碱的星形孢菌素(staurosporine)类化合物,最早发现是由陆生链霉菌产生的。由于星形孢菌素具有较强的细胞毒活性,已经进入 I/II 期临床试验用于癌症的治疗<sup>[1]</sup>。海鞘中分离的生物碱类化合物 Pibocins 与真菌来源的化合物 Festuclavines 的结构高度相似<sup>[28]</sup>。从海鞘 *Didemnum voeltzkowi* 中分离到的 Tubercidin 类似物,在其他来源的可培养放线菌中也获得了类似的化合物<sup>[29]</sup>。从海鞘 *Ritterella tokioka* 中分离到的赭类化合物 Ritterazines 与海洋寄生虫 *Cephalodiscus gilchristi* 中获得的化合物 Cephalostatins 表现出惊人的结构相似性,因此有人提出该化合物可能来源于微生物<sup>[30]</sup>。从皱瘤海鞘 *Styela plicata* 中分离到的一种腺嘌呤核糖核苷化合物,与红树植物内生真菌 *Penicillium* sp. 中分离得到的化合物 2'-脱氧腺苷的结构高度相似<sup>[31]</sup>。这些证据都间接表明了这些化合物可能是微生物来源的。

## 3 非海鞘天然产物微生物来源的直接证据

### 3.1 原位杂交

与海鞘一样,海绵、苔藓虫等海洋无脊椎动物也是海洋天然产物的重要来源,从这些海洋动

物中分离到的化合物也有共生微生物来源的。Calyculin A 是从海绵 *Disodermia calyx* 中分离到的一种具有抗肿瘤活性的聚酮类化合物, 通过构建 *Disodermia calyx* 的宏基因组 DNA 文库, 并筛选 Trans-AT 聚酮合成酶的保守结构域 KS 的基因序列, 成功得到了该化合物的 *cal* 生物合成基因簇, 并利用 PCR 和荧光原位杂交法验证了海绵中 *Entotheonella* 属的共生细菌是 *cal* 生物合成基因簇的真正来源, 也证实了化合物 Calyculin A 的微生物来源<sup>[14]</sup>。

苔藓抑素(bryostatins)是分离自海洋苔藓虫 *Bugula neritina* 的具有抗肿瘤活性的天然产物, 是由 I 型聚酮合酶(PKS-I)催化合成的大环内酯类聚酮化合物。在苔藓虫中发现有一种不可培养的  $\gamma$ -变形菌纲的共生细菌 *Candidatus Endobugula sertula*。Davidson 等<sup>[15]</sup>从苔藓虫 *Bugula neritina* 中提取总 DNA 并克隆 PKS-I 基因片段, 然后用特异性的引物 KSa 来扩增 KSa 基因, 研究发现 KSa RNA 探针特异性结合在苔藓虫幼虫的共生细菌 *Candidatus Endobugula sertula* 中, 而不是结合在苔藓虫细胞中; 在实验室苔藓虫的养殖实验中, 如果用抗生素抑制苔藓虫中共生细菌的生长, 则会导致 KSa 基因表达以及 Bryostatins 的生成量下降, 从而证实了 Bryostatins 是共生细菌生成的; 同时还从苔藓虫中直接克隆化合物 Bryostatin 的生物合成基因, 然后用这个基因在异源宿主细菌中进行了 Bryostatin 的表达<sup>[15]</sup>。

### 3.2 多种方法联用

在研究海洋动物分离化合物微生物来源的时候, 可以通过多种方法的联用来证明。化合物 Polytheonamide 是从海绵 *Theonella swinhoei* 中分离到的一种结构复杂的线性多肽, 由 49 个氨基酸残基组成, 首先通过对整个海绵的总 DNA 文库进行筛选, 确定了这种化合物是由 *poy* 基因簇编码的<sup>[16]</sup>, 然后需要在这种海绵丰富的微生物群中找到化合物 Polytheonamide 的真正生产者。通过对海绵细胞进行分离、差速离心和荧光激活细胞分选法 (fluorescence-activated cell sorting, FACS), 将单个

细菌和宿主的颗粒分离到微孔板中, 并进行全基因组扩增<sup>[16]</sup>。基于 Polytheonamide 和通用 16S rRNA 基因序列的 PCR 筛选结果表明, *poy* 基因簇存在于 *Candidate Entotheonella* 属的一种丝状多细胞细菌(a filamentous multicellular bacterium)中, 通过对离心富集的细菌部分进行宏基因组测序也证实了这个结果, 从而表明 *Candidate Entotheonella* 属的细菌是 Polytheonamide 类化合物的真正生产者<sup>[16]</sup>。后来又将这个属分为 *Candidatus Entotheonella factor* 和 *Candidatus Entotheonella gemina*, 它们属于一个新的门(*Tectomicrobia*), 目前该属尚无可以纯培养的菌株<sup>[16]</sup>。除了 *poy* 基因簇外, 在 *Entotheonella* 属的菌株中还发现了很多聚酮和肽类天然产物的基因簇, 可以合成很多之前从海绵中分离出来的化合物, 如 Onnamides、Cyclotheonamides、Keramamides、Konbamides、Nazumamides、Pseudotheonamides 和 Theopederins 等, 因此具有极其重要的开发前景<sup>[16]</sup>。

## 4 天然产物生物合成基因的运用

天然产物生物合成基因的测定在确定天然产物的真正来源以及新药物发现方面具有重要作用。通过对微生物的基因组进行测序, 然后利用生物信息学预测出可能产生次级代谢产物的生物合成基因簇, 进一步对基因簇进行活化或者异源表达, 预测产物的理化性质, 最终分离并鉴定目的产物<sup>[40]</sup>。

对于编码次级代谢产物的功能基因的发现是确定天然产物来源的重要依据。目前研究较多的基因如聚酮合酶(polyketide synthases, PKS)基因和非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases, NRPS)基因, 此外还有核糖体合成的翻译后修饰肽(ribosomally synthesized post-translationally modified peptides, RiPPs)基因以及参与萜类化合物合成的萜环化酶基因和异戊二烯转移酶基因等<sup>[41]</sup>。通过对编码这些化合物的生物合成基因簇的克隆和分析, 可为海鞘天然产物微生物来源的研究提供有利证据。

基因组测序技术的快速发展揭示了海鞘来源微生物中含有丰富的次级代谢产物基因簇,这远远超过了从海鞘和微生物中分离到的次级代谢产物的数量。因此如何激活这些“沉默的”基因簇对于海洋新药的研发具有重要意义。目前已经在研究的激活微生物中沉默的次级代谢产物基因簇的方法,有可调节启动子与途径特异性转录因子的融合、去除异染色质形成所需的基因、与微生物共培养来模拟自然条件、一株菌多种化合物策略(one strain many compounds, OSMAC)等,其中大多数方法都是在对真菌 *Aspergillus nidulans* 研究中发展起来的,因为这种模式生物具有高效的基因靶向系统<sup>[42]</sup>。但上述方法并非完全适用于其他类型微生物,因此开发新型、高效的激活方法对于海鞘微生物及其化合物的研究将具有重要的推动作用。

目前大多数海鞘天然产物的真正来源微生物是不可培养的。如果能够实现海鞘天然产物生物合成基因的异源表达,不仅可以为找到其真正来源微生物提供有利证据,还可以通过异源表达激活一些沉默的基因,从而促进新化合物的发现<sup>[43]</sup>。现在常用的异源表达的宿主有链霉菌(*Streptomyces*)、曲霉菌(*Aspergillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)等<sup>[43-44]</sup>。Shrestha等<sup>[45]</sup>将来自 *Streptomyces clavuligerus* 的4种克拉维酸(clavulanic acid, CA)的生物合成基因在菌株 *Streptomyces venezuelae* YJ028 中进行异源表达,得到3种克拉维酸的中间体Deoxygaunidinoproclavaminic acid、Guanidinoproclavaminic acid和Dihydroclavaminic acid,并通过培养基优化等方法提高克拉维酸的产量和实现工业化生产。

## 5 展望

目前已经从海鞘中分离到超过1000种化合物,从海鞘来源细菌分离到150种化合物<sup>[2]</sup>,其中有很多化合物是相同的。现在已有多种方法应用于海鞘天然产物潜在微生物来源的研究,可以直

接或间接证明一些从海鞘分离到的化合物实际上是由与其共生的细菌产生的。这些研究还只是冰山一角,随着研究方法的不断进步,以后还会有更多的海鞘天然产物生物合成途径得到阐述。不仅仅是细菌和蓝细菌,以后可能还会有更多的微生物类群会被鉴定为海鞘天然产物的真正生产者。

目前虽然对海鞘与细菌(尤其是蓝细菌)之间的共生关系有了一定的研究,但对于海鞘与共生微生物以及次生代谢产物间的很多生物学问题尚不十分清楚。海鞘天然产物对这种共生关系有哪些影响?控制这种共生关系的因素有哪些?海鞘次生代谢产物通常是有毒的,它对于海鞘本身、周围的生态环境以及不同物种间的相互作用有哪些影响?这些化合物是否真的是用于海鞘的防御?研究化合物的真正生物来源是一个很好的突破口,可以从遗传物质的角度阐述其合成途径,进而探讨其对宿主和微生物的生理作用,这对于从根本上解析海鞘与微生物间的共生关系具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Steinert G, Taylor MW, Schupp PJ. Diversity of actinobacteria associated with the marine ascidian *Eudistoma toaleansis*[J]. *Marine Biotechnology*, 2015, 17(4): 377-385
- [2] Chen L, Hu JS, Xu JL, et al. Biological and chemical diversity of ascidian-associated microorganisms[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(10): 362
- [3] Chen L, Fu CM, Wang GY. Microbial diversity associated with ascidians: a review of research methods and application[J]. *Symbiosis*, 2017, 71(1): 19-26
- [4] Schmidt EW, Donia MS. Life in cellulose houses: symbiotic bacterial biosynthesis of ascidian drugs and drug leads[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(6): 827-833
- [5] Burke C, Thomas T, Egan S, et al. The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3): 814-818
- [6] Degnan BM, Hawkins CJ, Lavin MF, et al. Novel cytotoxic compounds from the ascidian *Lissoclinum bistratum*[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1989, 32(6): 1354-1359
- [7] Ogi T, Margiastuti P, Teruya T, et al. Isolation of C<sub>11</sub> cyclopentenones from two didemnid species, *Lissoclinum* sp. and *Diplosoma* sp.[J]. *Marine Drugs*, 2009, 7(4): 816-832



- [8] Riesenfeld CS, Murray AE, Baker BJ. Characterization of the microbial community and polyketide biosynthetic potential in the palmerolide-producing tunicate *Synoicum adareanum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(11): 1812-1818
- [9] Kwan JC, Donia MS, Han AW, et al. Genome streamlining and chemical defense in a coral reef symbiosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(50): 20655-20660
- [10] Rath CM, Janto B, Earl J, et al. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743[J]. *ACS Chemical Biology*, 2011, 6(11): 1244-1256
- [11] Xu Y, Kersten RD, Nam SJ, et al. Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anti-cancer agents[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(20): 8625-8632
- [12] Donia MS, Fricke WF, Partensky F, et al. Complex microbiome underlying secondary and primary metabolism in the tunicate-*Prochloron* symbiosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(51): E1423-E1432
- [13] Schmidt EW, Nelson JT, Rasko DA, et al. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinium patella*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(20): 7315-7320
- [14] Yang XG, Wang GJ, Li X. Advances in the biosynthesis of polyketides derived by *trans*-AT polyketide synthases in marine sponges[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1531-1541 (in Chinese)  
杨晓歌, 王国君, 李霄. 海绵体动物中 *trans*-AT 聚酮合成酶来源的聚酮化合物的生物合成[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1531-1541
- [15] Davidson SK, Allen SW, Lim GE, et al. Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the bryozoan *Bugula neritina*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10): 4531-4537
- [16] Freeman MF, Vagstad AL, Piel J. Polytheonamide biosynthesis showcasing the metabolic potential of sponge-associated uncultivated '*Entotheonella*' bacteria[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 31: 8-14
- [17] Kigoshi H, Hayakawa I. Marine cytotoxic macrolides haterumalides and biselides, and related natural products[J]. *The Chemical Record*, 2007, 7(4): 254-264
- [18] Kang H, Jensen PR, Fenical W. Isolation of microbial antibiotics from a marine ascidian of the genus *Didemnum*[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1996, 61(4): 1543-1546
- [19] Kobayashi J, Cheng J, Ohta T, et al. Iejimalides A and B, novel 24-membered macrolides with potent antileukemic activity from the Okinawan tunicate *Eudistoma cf. rigida*[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1988, 53(26): 6147-6150
- [20] Richardson AD, Ireland CM. A profile of the *in vitro* antitumor activity of lissoclinolide[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 195(1): 55-61
- [21] McDonald LA, Capson TL, Krishnamurthy G, et al. Namenamicin, a new enediyne antitumor antibiotic from the marine ascidian *Polysyncrator lithostrotum*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118: 10898-10899
- [22] Schuetz A, Junker J, Leonov A, et al. Stereochemistry of sagittamide A from residual dipolar coupling enhanced NMR[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(49): 15114-15115
- [23] Oku N, Matsunaga S, Fusetani N. Shishijimicins A-C, novel enediyne antitumor antibiotics from the ascidian *Didemnum proliferum*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(8): 2044-2045
- [24] Nicolaou KC, Chen DYK, Huang X, et al. Chemistry and biology of diazonamide A: first total synthesis and confirmation of the true structure[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(40): 12888-12896
- [25] Watters DJ. Ascidian toxins with potential for drug development[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(5): 162
- [26] Edler MC, Fernandez AM, Lassota P, et al. Inhibition of tubulin polymerization by vitilevuamide, a bicyclic marine peptide, at a site distinct from colchicine, the vinca alkaloids, and dolastatin 10[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 63(4): 707-715
- [27] Carroll AR, Feng Y, Bowden BF, et al. Studies of Australian ascidians. 5. Virenamides A-C, new cytotoxic linear peptides from the colonial didemnid ascidian *Diplosoma virens*[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1996, 61(12): 4059-4061
- [28] Makarieva TN, Ilyin SG, Stonik VA, et al. Pibocin, the first ergoline marine alkaloid from the Far-Eastern ascidian *Eudistoma* sp.[J]. *Tetrahedron Letters*, 1999, 40: 1591-1594
- [29] Mitchell SS, Pomerantz SC, Concepcion GP, et al. Tubercidin analogs from the ascidian *Didemnum voeltzkowi*[J]. *Journal of natural products*, 1996, 59(10): 1000-1001
- [30] Moser BR. Review of cytotoxic cephalostatins and ritterazines: isolation and synthesis[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(3): 487-491
- [31] You GH, Zhang YP, Hong Z, et al. Studies on the chemical constituents of *Styela plicata*[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2017, 36(1): 83-86 (in Chinese)  
游桂红, 张怡评, 洪专, 等. 皱瘤海鞘化学成分研究[J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(1): 83-86
- [32] Paul VJ, Lindquist N, Fenical W. Chemical defenses of the tropical ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators *Nembrotha* spp.[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1990, 59: 109-118
- [33] Lindquist N, Fenical W. New tamjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators. Origin of the tamjamins in *Atapozoa*[J]. *Experientia*, 1991, 47(5): 504-506
- [34] Nakajima S, Kojiri K, Suda H. A new antitumor substance,

- BE-18591, produced by a *Streptomyces*. II. Structure determination[J]. The Journal of Antibiotics, 1993, 46(12): 1894-1896
- [35] Williamson NR, Fineran PC, Leeper FJ, et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(12): 887-899
- [36] Chen L, Bi HY, Wang WY, et al. Novel approaches for isolation and cultivation of microorganisms associated with marine animals[J]. Microbiology China, 2018, 45(9): 2035-2042 (in Chinese)  
陈雷, 毕洪玉, 王婉莹, 等. 海洋动物来源微生物分离培养的新方法[J]. 微生物学通报, 2018, 45(9): 2035-2042
- [37] Qu WY, Chen L, Wang GY, et al. Symbiosis between ascidian and cyanobacteria[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 458-464 (in Chinese)  
曲文颖, 陈雷, 王光玉, 等. 海鞘与蓝藻的共生关系[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 458-464
- [38] Schmidt EW. The secret to a successful relationship: lasting chemistry between ascidians and their symbiotic bacteria[J]. Invertebrate Biology, 2015, 134(1): 88-102
- [39] Donia MS, Ravel J, Schmidt EW. A global assembly line to cyanobactins[J]. Nature Chemical Biology, 2008, 4(6): 341-343
- [40] He Q, Li QL, Wang LF, et al. Strategies of genome mining for novel natural products[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2012, 39(1): 1-6,25 (in Chinese)  
何庆, 李青连, 王丽非, 等. 基于微生物基因组的新型天然产物发现策略[J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(1): 1-6,25
- [41] Li WL, Zhan GH, Zheng H. Advances on actinomycetic terpenoid biosynthesis[J]. Hereditas (Beijing), 2011, 33(10): 1087-1092 (in Chinese)  
李文利, 湛桂花, 郑华. 放线菌萜类化合物生物合成研究进展[J]. 遗传, 2011, 33(10): 1087-1092
- [42] Yaegashi J, Oakley BR, Wang CCC. Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(2): 433-442
- [43] Wang M, Wang Q, Yue CW. Advances in heterologous expression of biosynthesis gene clusters of *Streptomyces* secondary metabolites[J]. Guizhou Medical Journal, 2018, 42(7): 803-805 (in Chinese)  
王苗, 王倩, 岳昌武. 链霉菌次级代谢产物生物合成基因簇异源表达研究进展[J]. 贵州医药, 2018, 42(7): 803-805
- [44] Huang Y, Zhao C, Guan X, et al. Recent developments towards the heterologous expression of microbial compound biosynthetic gene clusters[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(9): 133-138,146 (in Chinese)  
黄颖, 赵晨, 关雄, 等. 微生物源化合物合成基因簇异源表达研究进展[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(9): 133-138,146
- [45] Shrestha B, Dhakal D, Darsandhari S, et al. Heterologous production of clavulanic acid intermediates in *Streptomyces venezuelae*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 22(4): 359-365