

微生物来源 Diels-Alder 型加合物生物合成研究进展

张敏, 戴均贵*

(中国医学科学院 北京协和医学院 药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室 天然药物生物合成卫计委重点实验室, 北京 100050)

[摘要] 许多天然产物的生物合成中涉及 Diels-Alder 环加成反应, 构建新的 C—C 键及环系, 从而产生结构新颖、复杂多样的天然产物。自然界已经进化到由天然酶负责该反应的发生, 引起了科学家的关注, 但其研究仍是难点和热点。近年来, 随着基因组测序、生物信息学及分子生物学等技术的发展, 许多天然产物生物合成途径中 Diels-Alder 反应的相关基因及其酶功能已被鉴定, 取得了一些突破性进展。综述微生物来源 Diels-Alder 型加合物的生物合成, 重点介绍涉及催化 Diels-Alder 反应的基因及其酶学机制。

[关键词] Diels-Alder 反应; 微生物 Diels-Alder 加合物; 生物合成

[中图分类号] RR914.5;O621.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-5094 (2018) 01-0021-18

Progress in the Biosynthesis of Diels-Alder Adducts of Microbial Origin

ZHANG Min, DAI Jungui

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products of National Health and Family Planning Commission, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

[Abstract] Diels-Alder cycloaddition is involved in the biosynthesis of many natural products to construct new C—C bonds and ring systems, resulting in the formation of structurally novel, complex and diverse natural products. Although natural enzymes have been evolved in nature to catalyze this reaction and also received great attention from scientists, researches in this field are still hot topics and facing many difficult and challenging issues. In recent years, with the development of technologies in genome sequencing, bioinformatics and molecular biology, the genes and corresponding enzymes related to Diels-Alder reaction in the biosynthetic pathways of many natural product have been identified and some breakthroughs have been made. This review focuses on the biosynthesis of Diels-Alder adducts from microbial sources, especially the genes and enzymatic mechanisms involved in the Diels-Alder reaction.

[Key words] Diels-Alder reaction; microbial Diels-Alder adduct; biosynthesis

Diels-Alder (DA) 反应^[1], 即 [4+2]-环加成反应中协同的周环反应, 是指含有一个活泼双键或叁键的化合物(亲双烯体)与共轭二烯类化合物(双烯体)发生 1,4-加成, 生成六元环状化合物的反应(见图 1), 反应过程中不存在中间体, 仅有单一的周环过渡态存在。该

反应由德国化学家 Diels 和他的学生 Alder 发现并命名, 他们也因此获得了 1950 年度诺贝尔化学奖。DA 反应容易发生且具有较强的位置和立体选择性, 是有机合成中构建碳碳键及新环系的重要及常用反应之一^[2]。

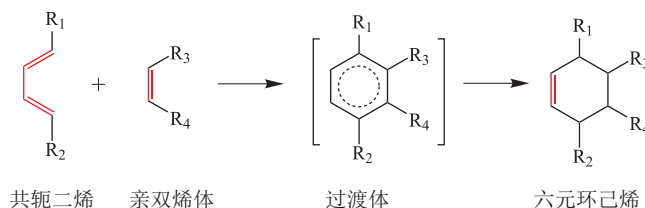


图 1 Diels-Alder 环加成反应^[1]

Figure 1 Diels-Alder cycloaddition

接受日期: 2017-12-04

项目资助: 国家自然科学基金 (No. 81773607)

*** 通讯作者:** 戴均贵, 研究员, 博士生导师;

研究方向: 天然药物生物合成与生物催化;

Tel: 010-63165195; **E-mail:** jgdai@imm.ac.cn

在自然界中已经发现了众多环系复杂、类型多样的天然 Diels-Alder 型加合物 (Diels-Alder adducts, DA 加合物), 如放线菌的代谢产物多杀菌素 (spinosyns)、真菌来源的洛伐他汀 (lovastatin) 及细胞松弛素类化合物 (cytochalasins) 等聚酮、萜类、生物碱类化合物等;

植物中也有大量的 DA 加合物, 如桑中发现的黄酮、查耳酮、苯并呋喃类 DA 加合物^[3]。这些天然产物生物合成中涉及的 DA 反应是其关键的一步反应, 引起了科学家们长期以来的关注。近些年, 随着基因组测序技术以及生物信息学的迅猛发展, 越来越多的微生物转录组、基因组信息不断被解读, 一些微生物来源的 DA 加合物 (1~12, 见图 2) 的生物合成途径越来越清晰, 陆续报道了其生物合成中催化 [4+2]-环加成反应的酶^[4-10]。由于难以证明催化的 [4+2]-环加成反应是协同的周环反

应, 这些酶不一定是真正的 Diels-Alderase (DAase, DA 酶), 但这些酶可以提高 [4+2]-环加成反应速率, 并对加合物的立体构型进行严格控制。尽管 [4+2]-环化酶 ([4+2]-cyclase) 的研究才刚刚起步, 但近年的研究进展也使人们对 [4+2]-环化酶的认识逐渐加深。由于植物来源的 DA 加合物的生物合成途径研究尚少见相关报道, 因此本文就目前报道的微生物来源 DA 加合物的生物合成研究进展进行综述, 特别是其中涉及的 [4+2]-环化酶。

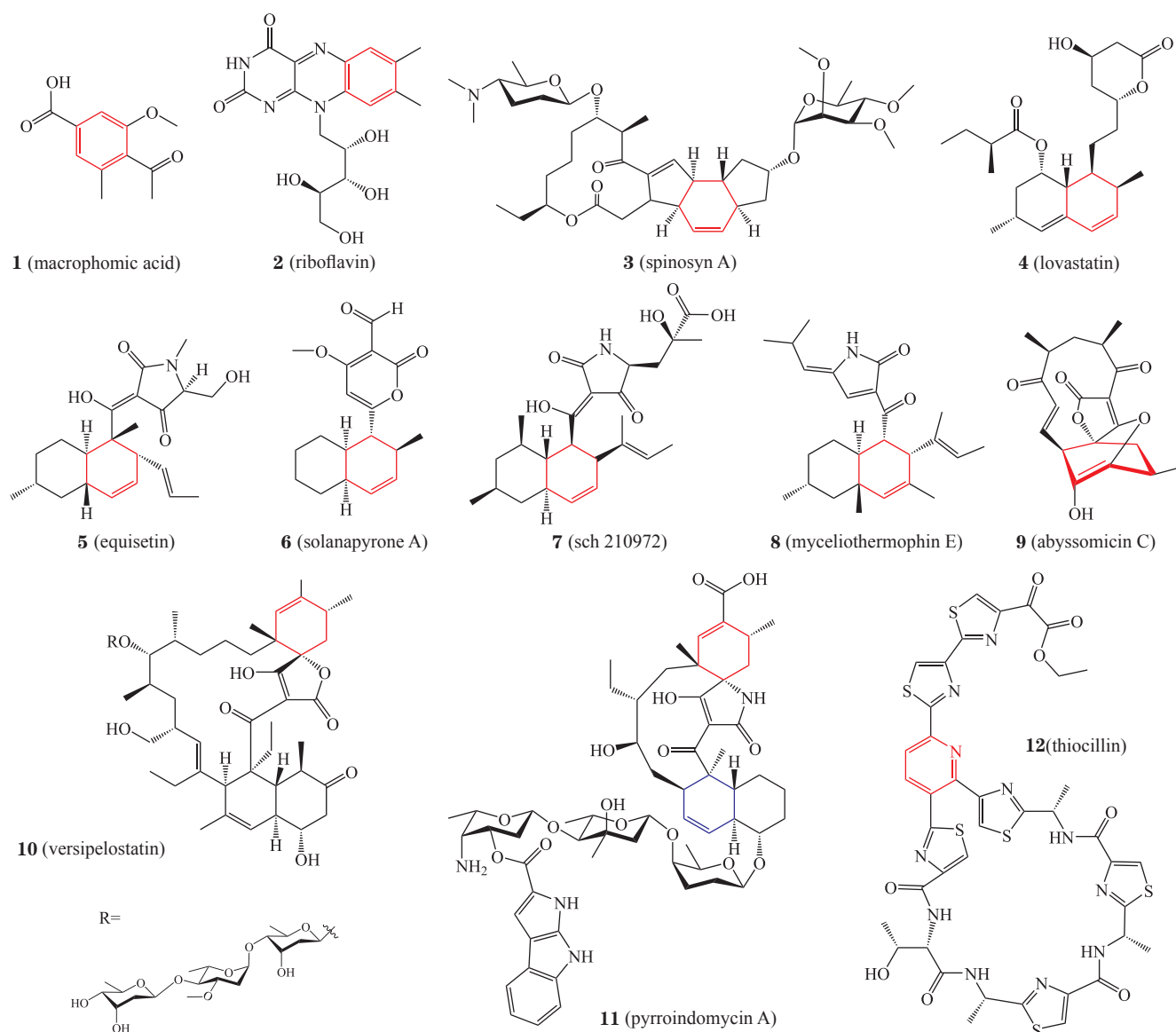


图 2 微生物来源的代表性 Diels-Alder 加合物

Figure 2 Representative Diels-Alder adducts from microorganisms

1 Macrohomic acid 和 riboflavin 的生物合成

Macrohomic acid (1) 是大茎点霉 (*Macrophoma*

commelinae) 转化 2-吡喃酮 (2-pyrone, 13) 的代谢产物^[11]。Oikawa 等^[12-13] 首先提出 macrohomic acid (1)

是由 macrophomate 合酶 (MPS) 催化 2-吡喃酮 (**13**) 和草酰乙酸 (oxaloacetate, **14**) 发生 DA 反应生成加合物, 继而脱羧、脱水形成。随后, 基于推定的 DA 环化反应, Ose 等^[14] 建立了底物分子和 MPS 蛋白晶体的结合模型, 为 MPS 催化 DA 反应提供了进一步的认识基础。然而, Guimarães 等^[15] 通过量子力学和分子力学 (quantum mechanics/molecular mechanics, QM/MM)

的研究发现, 2 步的 Michael-aldol 反应机制比 DA 反应模型更稳定。Serafimov 等^[16] 研究的生化反应结果表明 MPS 是 1 个高效的醛缩酶, 这进一步支持了 Guimarães 等发现的 Michael-aldol 反应机制。随着认识的逐渐深入, 发现 MPS 并不是真正的 DA 酶, macrophomic acid 系通过逐步 Michael-aldol 反应生成 (见图 3)。

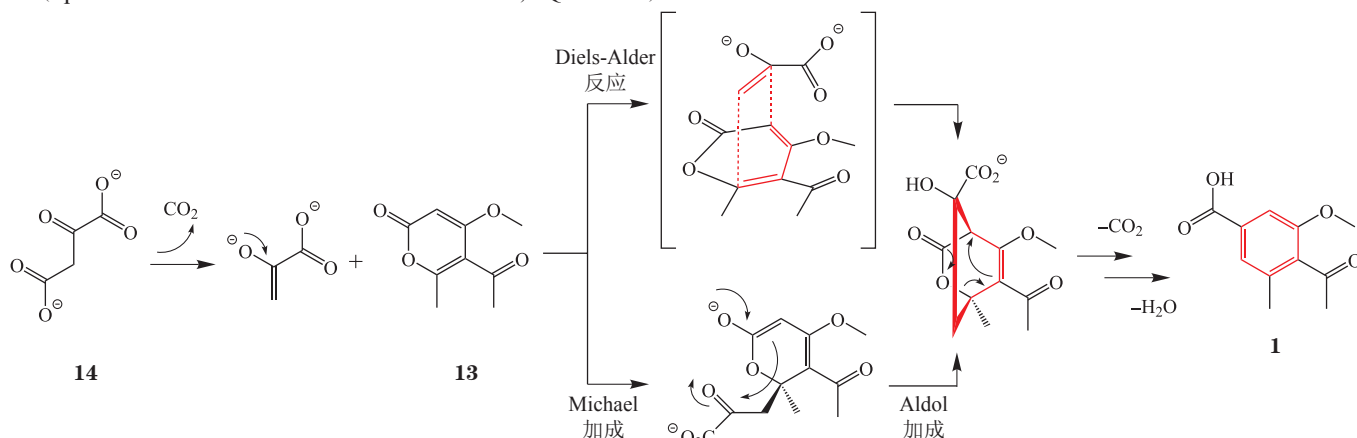


图 3 Macrophomic acid 的生物合成途径^[10]
Figure 3 Biosynthetic pathway of macrophomic acid

核黄素 (riboflavin, **2**), 又称维生素 B₂, 在人体内以黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 和黄素单核苷酸 (FMN) 2 种形式参与氧化还原反应, 是机体中一些重要氧化还原酶的辅基。核黄素 (**2**) 是由核黄素合酶 (riboflavin synthase)^[17] 催化 2 分子 6, 7-二甲基-8-核糖醛酸 (6, 7-dimethyl-8-ribityllumazine, **15**) 发生歧化作用 (disproportionation) 而形成。Illarionov 等^[18-19] 在核黄素合酶的催化循环中分离并鉴定了五环中间体化合物 (**16**), 其中心环己烯环显示在核黄素生物合成中可能存在 DA 反应: 首先, 1 分子化合物 **15** 去质子化后经 Cannizzaro 型歧化反应形成化合物 **17**, 随后化合物 **17** 与 **18** 经 DA 反应生成加合物 **2** (见图 4)。Illarionov 等认为核黄素合酶即为催化该 DA 反应发生的 DA 酶, 然而并没有实验数据支持该结论。Breugst 等^[20] 通过密度泛函理论 (density functional theory, DFT) 计算了亲核催化 (nucleophilic catalysis)、氢化转移 (hydride transfer) 及随后的 DA 反应、氢原子转移 (hydrogen atom transfer) 和亲核加成 (nucleophilic addition) 等机制所需的反应能量, 他们发现虽然 DA 反应机制不能被排除, 但由于亲核加成机制具有更低的反应能量因而更有可能。因此, 关于核黄素的生物合成还有很多问题需要解决。

2 Spinosyn A 的生物合成

Spinosyn A (多杀菌素 A, **3**) 是刺糖多胞菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 产生的大环内酯类化合物, 与 spinosyn D 组成的混合物是生物杀虫剂多杀菌素的主要活性成分^[21]。Spinosyn A 含有 21 个碳所组成的独特的 5/6/5/12 环系结构, C-9 位和 C-17 位分别连有三氧甲基鼠李糖和福乐氨糖^[22], 中心的环己烯结构显示 spinosyn A 生物合成过程可能涉及酶催化的 DA 反应。Spinosyn A 的生物合成途径已被解析^[23-24] (见图 5): 其骨架结构是由基因簇 *spn* 编码的模块化 I 型聚酮合酶 (modular type I polyketide synthase) SpnA-E 催化 1 分子丙酰辅酶 A (propionyl-CoA)、9 分子丙二酸单酰辅酶 A (malonyl-CoA) 和 1 分子甲基丙二酸单酰辅酶 A (methylmalonyl-CoA) 结合而成; 随后, SpnJ 将 15-OH 氧化为羰基得到化合物 **19**, SpnM 催化化合物 **19** 脱水生成化合物 **20**, 继而在 SpnF 催化的 [4+2]-环加成反应中形成化合物 **21**; 化合物 **21** 在鼠李糖转移酶 SpnG 作用下糖基化, 并由 SpnL 催化形成化合物 **22**, 最终由 SpnP 催化引入福乐氨糖; 鼠李糖单元上的羟甲基化是在福乐氨糖引入之前由 SpnH、I、K 逐步催化完成。

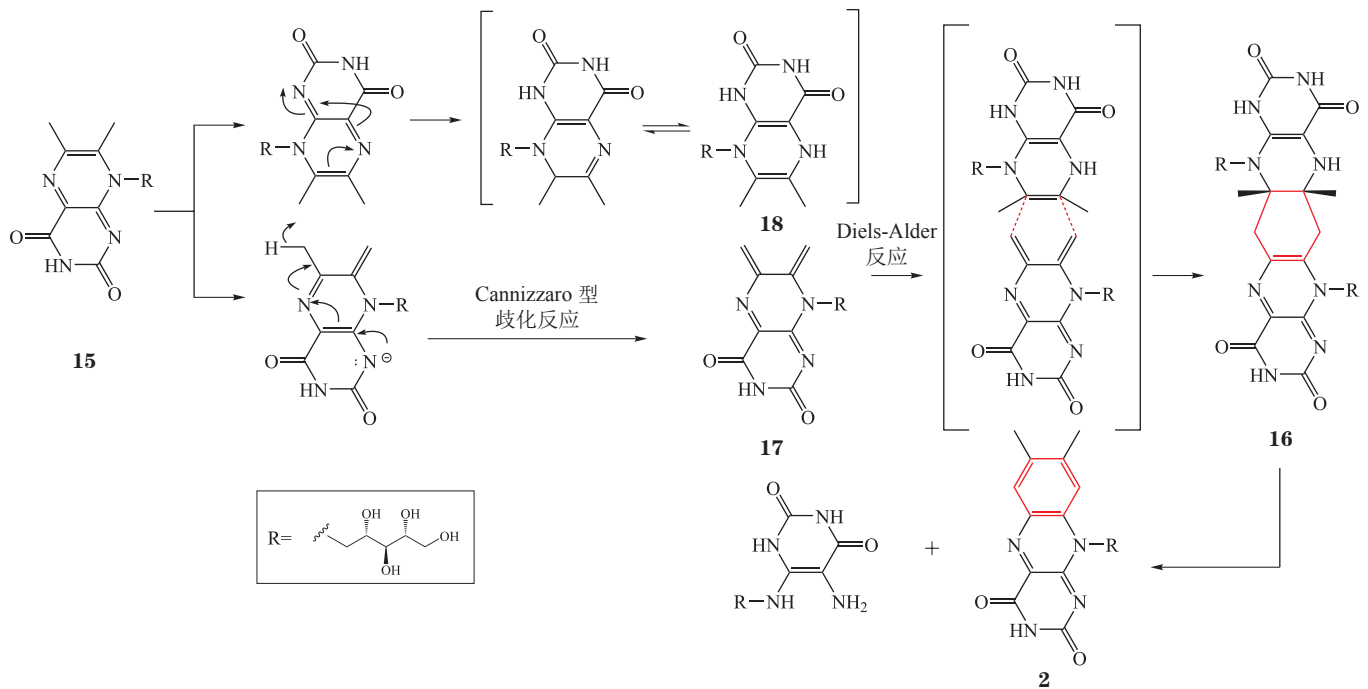


图 4 Riboflavin 的生物合成途径^[10]

Figure 4 Biosynthetic pathways of riboflavin

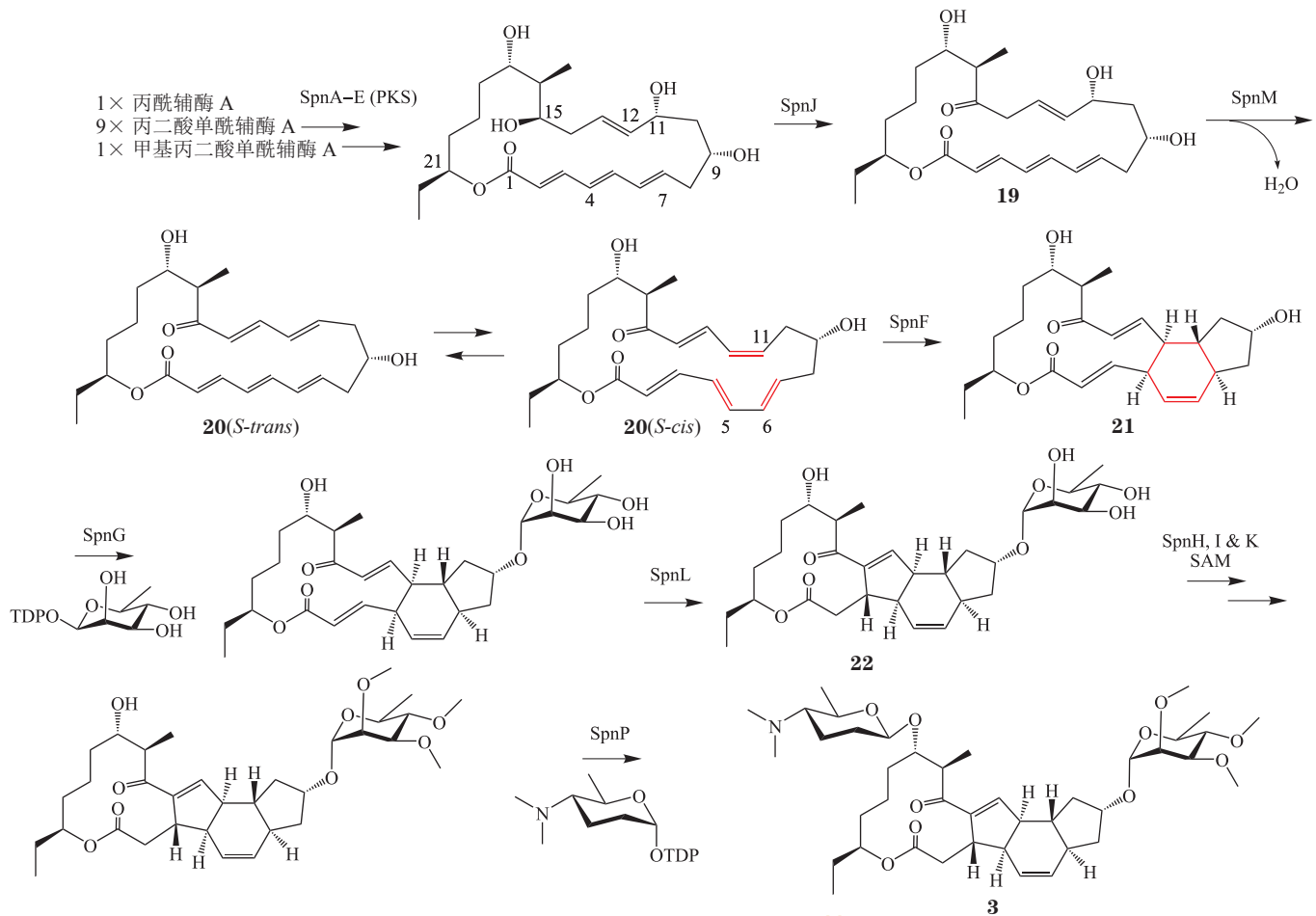
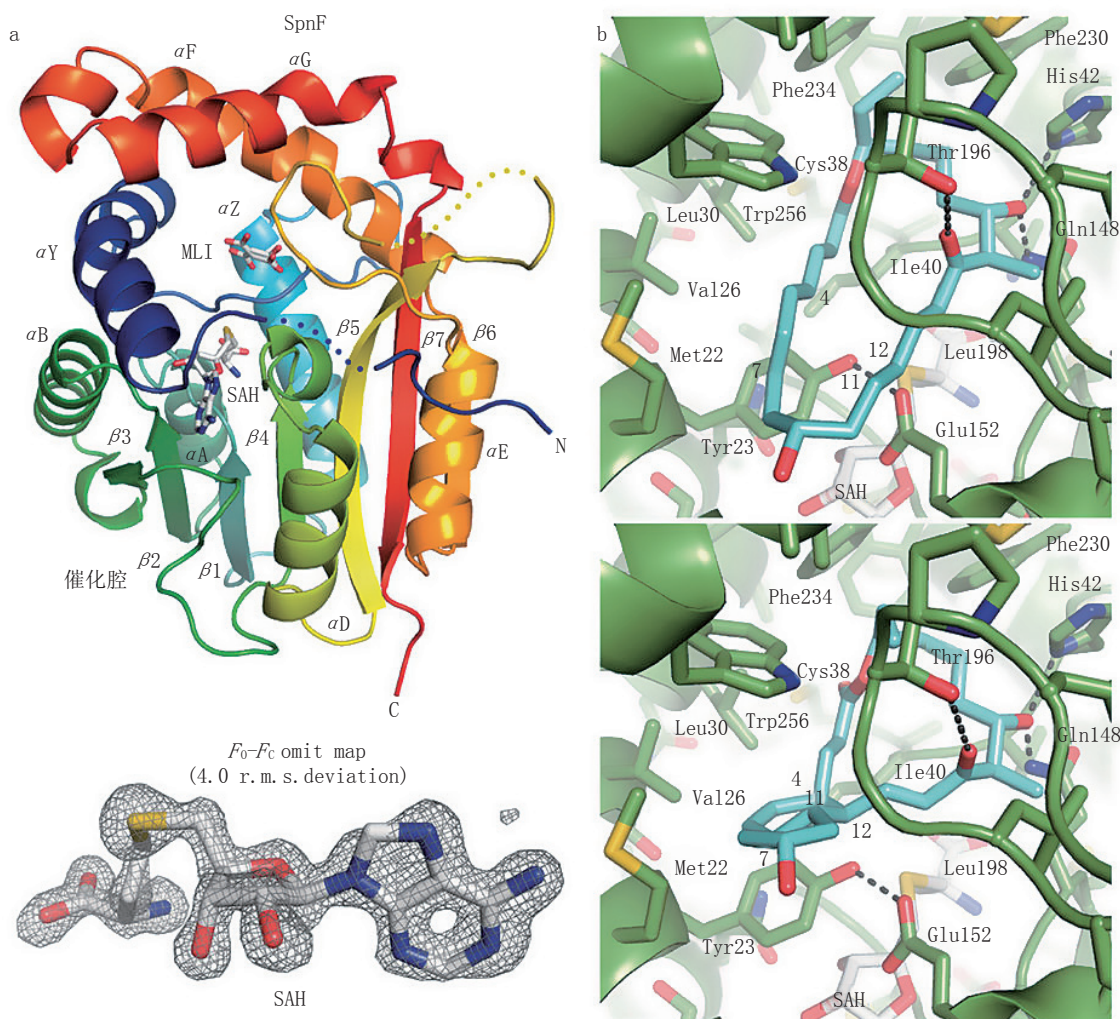


图 5 Spinosyn A 的生物合成途径^[4]

Figure 5 Biosynthetic pathway of spinosyn A^[4]

SpnF 是首个由实验证实的可以催化分子内 [4+2]-环加成反应的单功能酶。虽然该步反应可以自发进行, 但 SpnF 可以将反应速率提高约 500 倍^[24]。SpnF 蛋白晶体结构显示其活性位点位于 α 螺旋围绕的 β 折叠片中, 其中包裹着 1 分子 *S*-腺苷高半胱氨酸 (*S*-adenosyl homocysteine, SAH)。底物与蛋白的对接实验表明,

底物主要通过疏水作用与酶的活性位点结合; Thr196 与 15 位羰基形成氢键可以活化 $C_{11}=C_{12}$ 亲二烯体; Arg181-Leu202 组成的柔性环状结构 (flexible loop), 像一个“盖子”将底物封闭在活性位点处, 使其形成易于发生环化反应的构象 (见图 6)^[25]。



a: SpnF 晶体结构 (SAH 结合到 SpnF 的每个单体中); b: 底物和产物分别与 SpnF 催化腔的对接

图 6 SpnF 晶体结构及其与底物和产物对接^[25]

Figure 6 Crystal structure of SpnF and its docking with substrate and product

对于该步非酶促 [4+2] 反应机制, 目前有 Diels-Alder (DA)、bis-pericyclic (BPC)、biradical (BR) 和 alternative Diels-Alder (altDA) 4 种推测的反应路径 (见图 7)^[26-29]。Patel 等^[28]的量子化学计算提出化合物 **20** 经 [6+4]-环加成反应形成化合物 **23**, 再由 Cope 重排形成化合物 **21** (即 BPC 路径)。Medvedev 等^[29]的计算结果表明 BPC 路径占据了水相反应中的 83%, 而 DA 路径只占据了 17%。DA 和 BPC 机制可能是

SpnF 活性中心的催化机制, 但考虑到 BPC 路径的中间体更加紧凑和稳定, 该路径更有可能是酶促反应机制^[29]。

3 Decalin 型 Diels-Alder 加合物的生物合成

含有“十氢化萘” (decalins) 结构的天然产物主要发现于微生物次级代谢产物中, 由真菌和放线菌产生。它通常与高度多功能化或结构复杂的结构单元相连, 从而表现出惊人的结构和功能多样性, 引起了人们

对于其化学合成、生物合成深入研究的兴趣。Decalin 骨架化合物主要来源于类异戊二烯和聚酮 2 种不同的生物合成途径^[30]。类异戊二烯来源的 decalins 通常属于天然倍半萜类和二萜类化合物; 聚酮来源的 decalins

被认为是由酶催化的分子内 Diels-Alder (intramolecular Diels-Alder, IMDA) 环加成反应生成。迄今已有潜在或可能的 DA 酶被报道, 值得指出的是在生物体系中非酶促形成 decalin 环也是可能的。

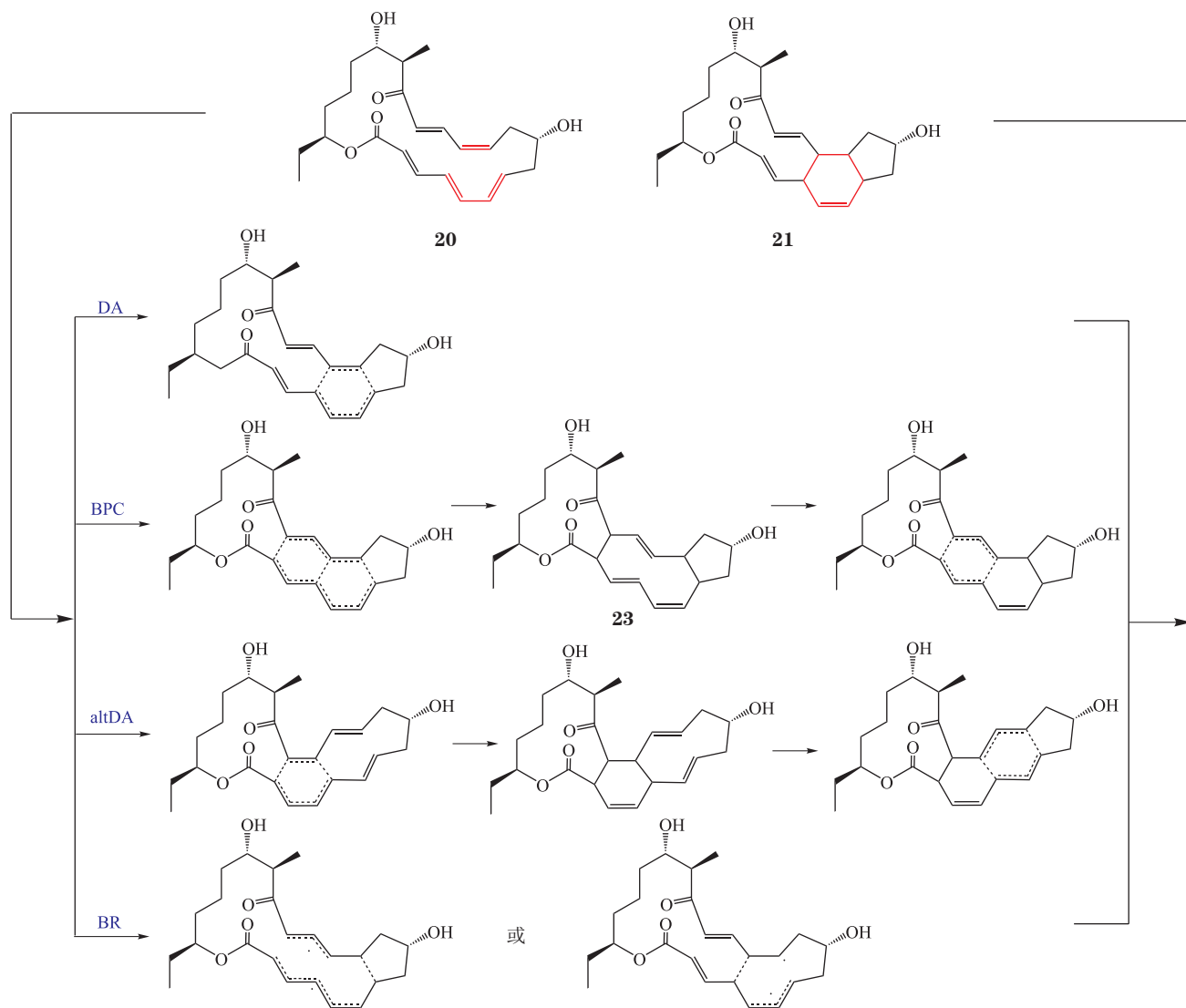


图 7 所有推测的 Spinosyn A 环化机制^[29]

Figure 7 All the proposed cyclization mechanism of spinosyn A

3.1 Lovastatin

洛伐他汀 (lovastatin, 又称 monacolin K、mevinolin, **4**) 是从红曲霉 (*Monascus ruber*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 分离得到的聚酮化合物^[31-32], 它可以抑制羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxy methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶活性, 是治疗高血脂症以及预防心血管疾病的重要药物。洛伐他汀生物合成基因簇最先在土曲霉中阐明, 其中聚酮合酶 LovB 和 LovF 分别负责 18 碳片段 (nonaketide) 与 4 碳片段 (diketide) (2-

甲基丁酸酯, 2-methylbutyrate) 的合成^[33-34]。LovB (也称 LNKS) 与 LovC 共同催化 1 分子乙酰辅酶 A 和 8 分子丙二酸单酰辅酶 A (malonyl-CoA) 产生以硫酯键与 LovB 结合的中间体二氢莫纳可林 L (dihydromonacolin L, 见图 8)^[34-35]。随后, 二氢莫纳可林 L (**24**) 在 LovG 催化下从 LovB-酰基载体模块水解释放^[36], 由 P450 单加氧酶 LovA 催化产生莫纳可林 J^[37] (**25**), 同时乙酰转移酶 LovD 催化 4 碳片段从 LovF 释放^[38], 最终与化合物 **25** 连接形成洛伐他汀 (**4**)。

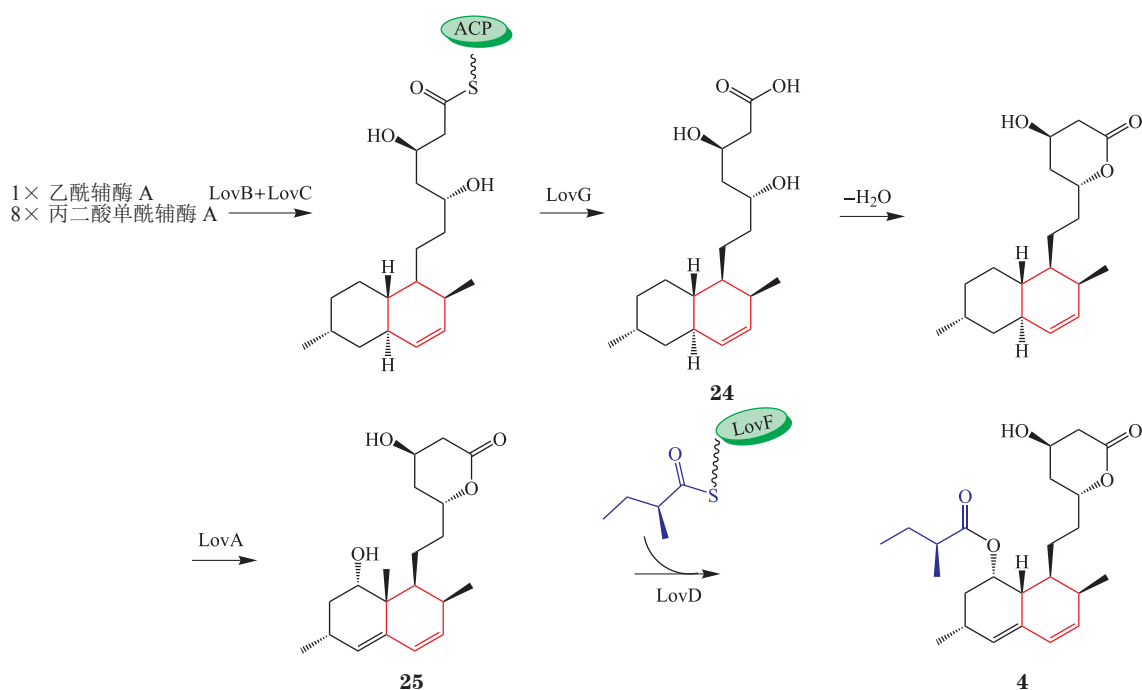
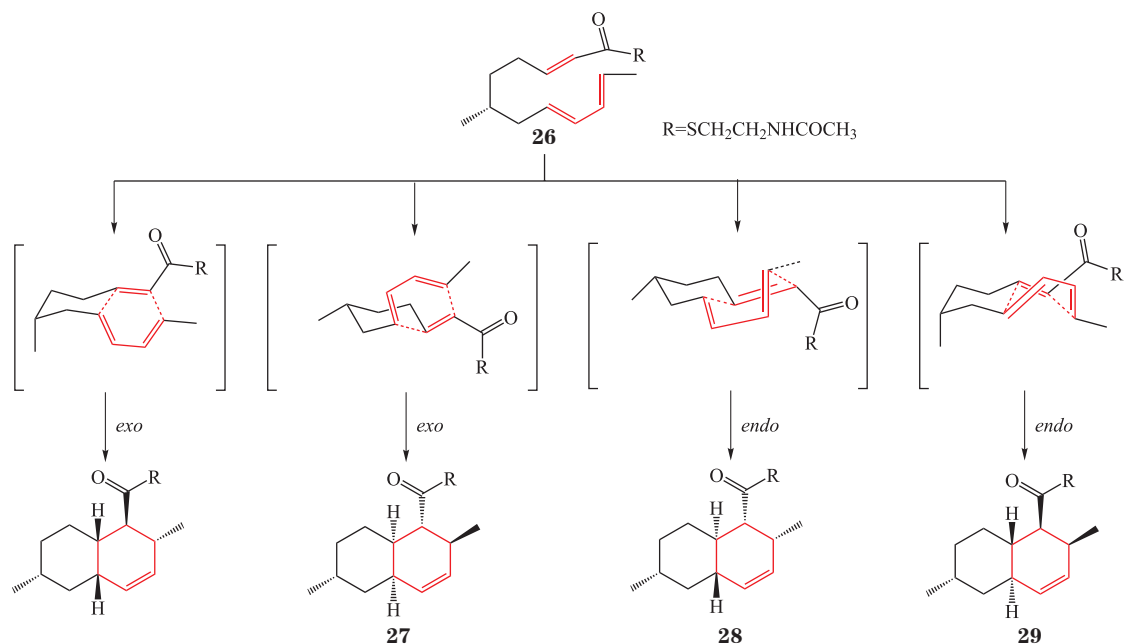
图 8 Lovastatin 的生物合成途径^[34-38]

Figure 8 Biosynthetic pathway of lovastatin

洛伐他汀分子中 decalin 结构单元被认为是酶催化的 [4+2]-环加成反应形成。Witter 等^[39] 制备了环加成产物的中间体类似物 **26**, 发现化合物 **26** 在甲苯中加热时可以环化得到顺式和反式异构体混合物 **27** 和 **28** (1:1, 见图 9), 但产物的构型与化合物 **24** 不一致。然而, 当 Auclair 和同事在 Tris 缓冲液中用纯化的 LovB 孵育化合物 **26** 时观察到环化速率明显加快, 并

且产生了与化合物 **24** 构型一致的反式化合物 **29** (化合物 **29/28/27** 比例为 1:15:15)^[40]。虽然 Lewis 酸也可以加快环化速率^[39], 但 LovB 在增加环化速率的同时, 对 [4+2]-环加成反应中的立体化学控制也起着重要作用。然而, LovB 作为聚酮合酶可以催化近 40 个反应, 这似乎与酶催化活性的专一性不符。因此, LovB 作为 [4+2]-环化酶的催化机制还有待深入研究。

图 9 LovB 体外催化实验^[39-40]Figure 9 The *in vitro* catalysis of LovB

3.2 Equisetin

伊快霉素 (equisetin, **5**) 是木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*) 产生的抗生素, 除作用于细菌之外, 还能抑制 HIV-I 整合酶的活性^[41-42]。Kato 等^[43] 通过基因敲除技术在 *Fusarium* sp. FN080326 中鉴定了伊快霉素的生物合成基因簇。1 分子乙酰辅酶 A、7 分子丙二酸单酰辅酶 A、2 分子 *S*-腺苷甲硫氨酸和 1 分子丝氨酸在聚酮合酶-非核糖体肽合成酶杂合酶 (polyketide synthases-

nonribosomal peptide synthetases hybrids, PKS-NRPS 杂合酶) Fas1、*trans*-ER Fas3 和 [4+2]-环化酶 Fas2 的催化下合成 tricosetin (**30**), 随后在甲基转移酶 Fas4 催化下引入 *N*-甲基形成 equisetin (**5**, 见图 10)。在 Δ fas2 敲除菌株中, equisetin 产量显著降低, 同时分离到 *cis*-decalin 类似物 **31**。由此他们认为 Fas2 控制 *trans*-decalin 的形成, 可能为选择性的内型 DA 酶, 但相关结论还需要通过酶催化功能实验来验证。

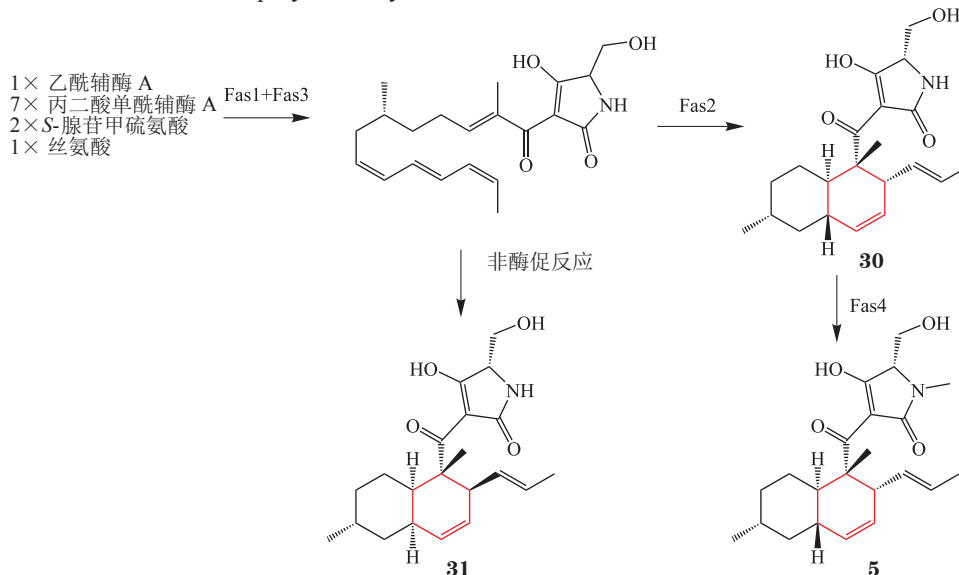


图 10 Equisetin 的生物合成途径^[43]

Figure 10 Biosynthetic pathway of equisetin

3.3 Solanapyrones

Solanapyrones A-E 是由植物病原性链格孢属真菌 (*Alternaria solani*) 和壳二孢属真菌 (*Ascochyta rabiei*) 产生的植物毒素家族, 在马铃薯和番茄中会引起早期枯萎病^[44-45]。Solanapyrones 是聚酮化合物, 其生物合成的 *sol* 基因簇已被鉴定^[46]。首先, 1 分子乙酰辅酶 A、7 分子丙二酸单酰辅酶 A 和 1 分子 *S*-腺苷甲硫氨酸 (*S*-adenosyl methionine, SAM) 在 I 型聚酮合酶 Sol1 的催化下结合成化合物 **32**, 然后由 *O*-甲基转移酶 Sol2 引入甲基产生 prosolanapyrone I (**33**), 在细胞色素 P450 单加氧酶 Sol6 作用下产生 prosolanapyrone II (**34**), 最后由黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)-依赖的氧化酶 Sol5 催化氧化反应和外型 [4+2]-环加成形成 solanapyrone A (**6**); 外型加成产物 solanapyrone A (**6**) 和内型加成产物 solanapyrone D (**35**) 分别在脱氢酶 Sol3 催化下生成 solanapyrone B (**36**) 和 solanapyrone E (**37**, 见图 11)。

Sol1 虽然与 LovB 同源, 但它并不催化环加成反应。当 Sol1 在米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中表达时其产物

是聚酮长链分子化合物 **32**。Sol5 是 FAD-依赖的氧化酶, Kasahara 等^[46] 在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达并纯化了重组 Sol5, 能催化化合物 **34** 生成 (-)-solanapyrone A, 表明 Sol5 作为双功能酶可催化氧化及后续环加成反应。Sol5 虽然可以控制加成产物的立体化学, 然而其催化的反应是否为协同的周环反应还需要大量的实验研究。

3.4 Sch210972

Sch 210972 (**7**) 是从球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) 菌液中分离得到的聚酮-氨基酸杂合物, 对趋化因子受体 5 (CC chdivokine receptor 5, CCR-5) 的 IC₅₀ 为 79 nmol·L⁻¹, 是潜在的抗 HIV 药物先导分子^[47]。该化合物聚酮部分含有 decalin 环, 氨基酸单元为非天然氨基酸 (**38**)。Sch 210972 由 *cgh* 基因簇负责合成, 8 分子丙二酸单酰辅酶 A 和 3 分子 SAM 在 PKS-NRPS 杂合酶 CghG 和 ER CghC 作用下结合成聚酮长链分子; 同时, CghB 结合 2 分子的 pyruvic acid (**39**) 形成化合物 **40** 并经转氨作用形成化合物 **38**, 后者与聚酮长链分子在 CghG 还原酶结构域作用下通过 Dieckmann 缩合, 经 CghA 催

化的 [4+2] 环加成形成化合物 **7** (见图 12) [48]。该研究显示, 在 $\Delta cghA$ 中, 化合物 **7** 的产量明显减小且生成了立体异构体 **41**, 当回补 $cghA$ 后, 化合物 **7** 恢复生成而化合物 **41** 不再生成, 这说明 CghA 控制环加成反应的立体构型生成化合物 **7**, 同时抑制非酶促反应形成化合物 **41**;

将 $cghA$ 、 $cghB$ 、 $cghC$ 和 $cghG$ 导入构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans* A1145), 检测到化合物 **7** 的生成, 然而只导入 $cghB$ 、 $cghC$ 和 $cghG$ 时亦检测到了化合物 **7** 和 **41**, 从而证实了上述结论。所以, CghA 特异性地控制内型加成产物 **7** 的形成, 可能为选择性的内型 DA 酶。

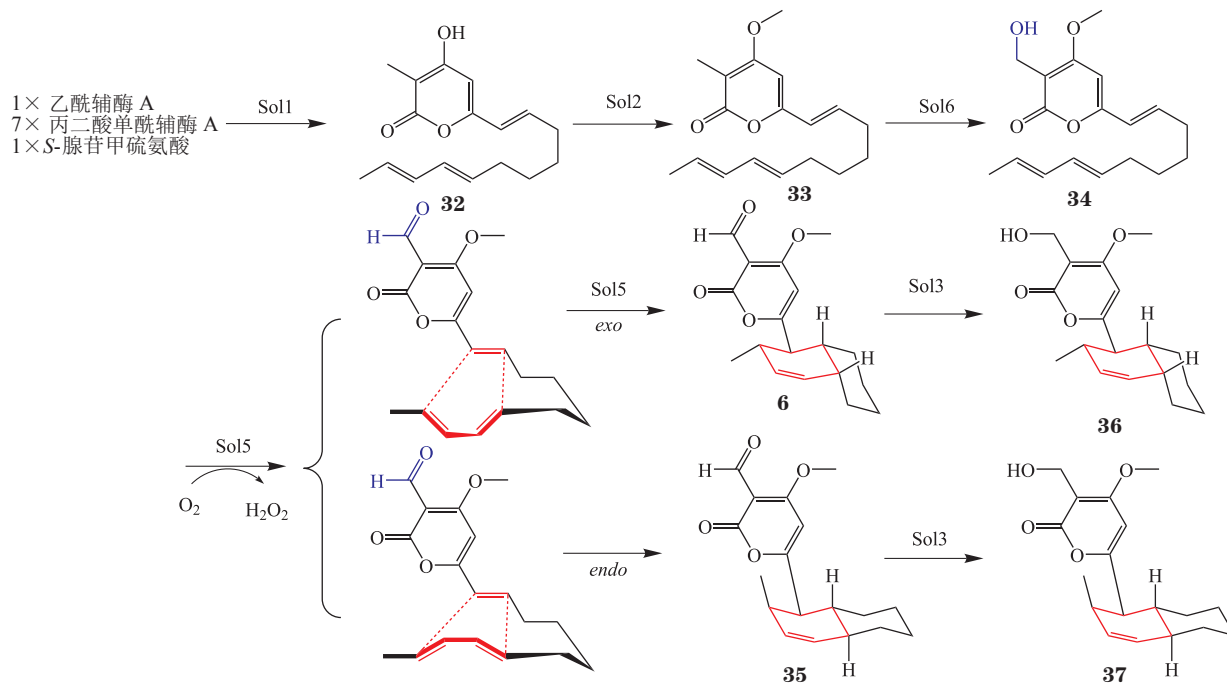


图 11 Solanapyrones 的生物合成途径 [46]

Figure 11 Biosynthetic pathway of solanapyrones

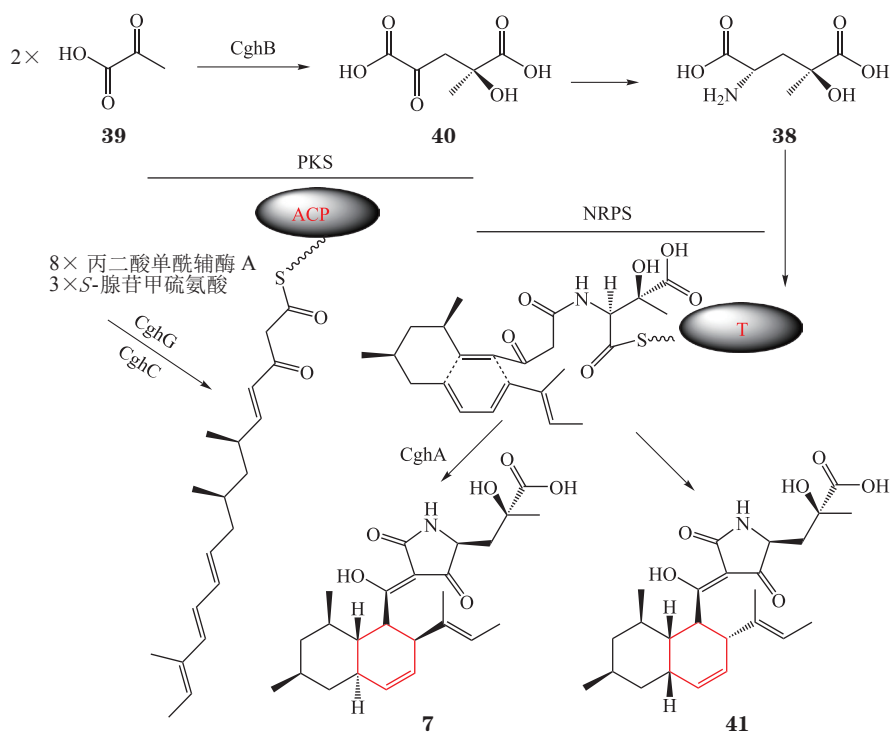


图 12 Sch 210972 的生物合成途径 [48]

Figure 12 Biosynthetic pathway of Sch 210972

3.5 Myceliothermophins

Myceliothermophins 是从嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 中分离出的具细胞毒活性的化合物, 其中 myceliothermophin E (**8**) 对多种肿瘤细胞系 (HepG2、Hep3B、A-549、MCF-7) 的 IC_{50} 小于 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [49]。Li 等 [50] 从 *M. thermophila* ATCC 42462 中鉴定了化合物 **8** 的生物合成基因簇 *myc*, 其中的 3 个基因 *mycA-C* 即可完成该化合物的合成 (见图 13)。MycA 是 PKS-NRPS 基因, *mycC* 是 ER 基因, 两者共同负责由 1 分子乙酰辅酶 A、7 分子丙二酸单酰辅酶 A、4 分子 SAM 和 1 分子亮氨酸加工结合成聚酮-氨基酸长链分子, 经 Knoevenagel 缩合脱水形成化合物 **42**; 化合物 **42** 电子重排后形成化合物 **43**, 继而被空气中的 O_2 氧化形成化合物 **44**, 最终由 MycB 催化分子内 DA 反应生成化合物 **8**。这些基因的功能由基因敲除、异源表达和 (或) 体外酶催化实验共同验证。MycA、C 注释为 PKS-NRPS 基因, $\Delta mycA$ 不能生成化合物 **8** 及其

类似物, 而导入 *mycA* 和 *mycC* 的构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* A1145 可以生成化合物 **43**, 由此证明了两者的功能。MycB 与可能的 DA 酶 CghA 具有 36% 一致性, 敲除 *mycB* 菌株不能生成所有的 DA 环化形式代谢产物但可以生成无环化合物 **44**, 同时导入 *mycABC* 3 基因的 *A. nidulans* 可以生成环化产物 **8** 和 **45**, 由此证实了 MycB 为 DA 酶。体外酶催化实验发现 MycB 可以特异性催化化合物 **44** 环化为化合物 **8**, 但不能催化化合物 **43** 环化为化合物 **45**。作者推测化合物 **42** 是 MycB 的天然底物, 环化产物 **46** 中羰基由于烯醇互变形成化合物 **45**, 随后被空气中的 O_2 氧化生成化合物 **8**。上述转化反应的合理性通过密度泛函理论 (DFT) 的计算进一步得到了证实。因此, myceliothermophin E 是由简约的 3 酶途径生物合成的, 其中 MycB 是首个通过生化特性加以证实的真核生物来源的 DA 酶, 这为 decalin 型天然产物生物合成途径中 DA 酶的寻找提供了新的依据。

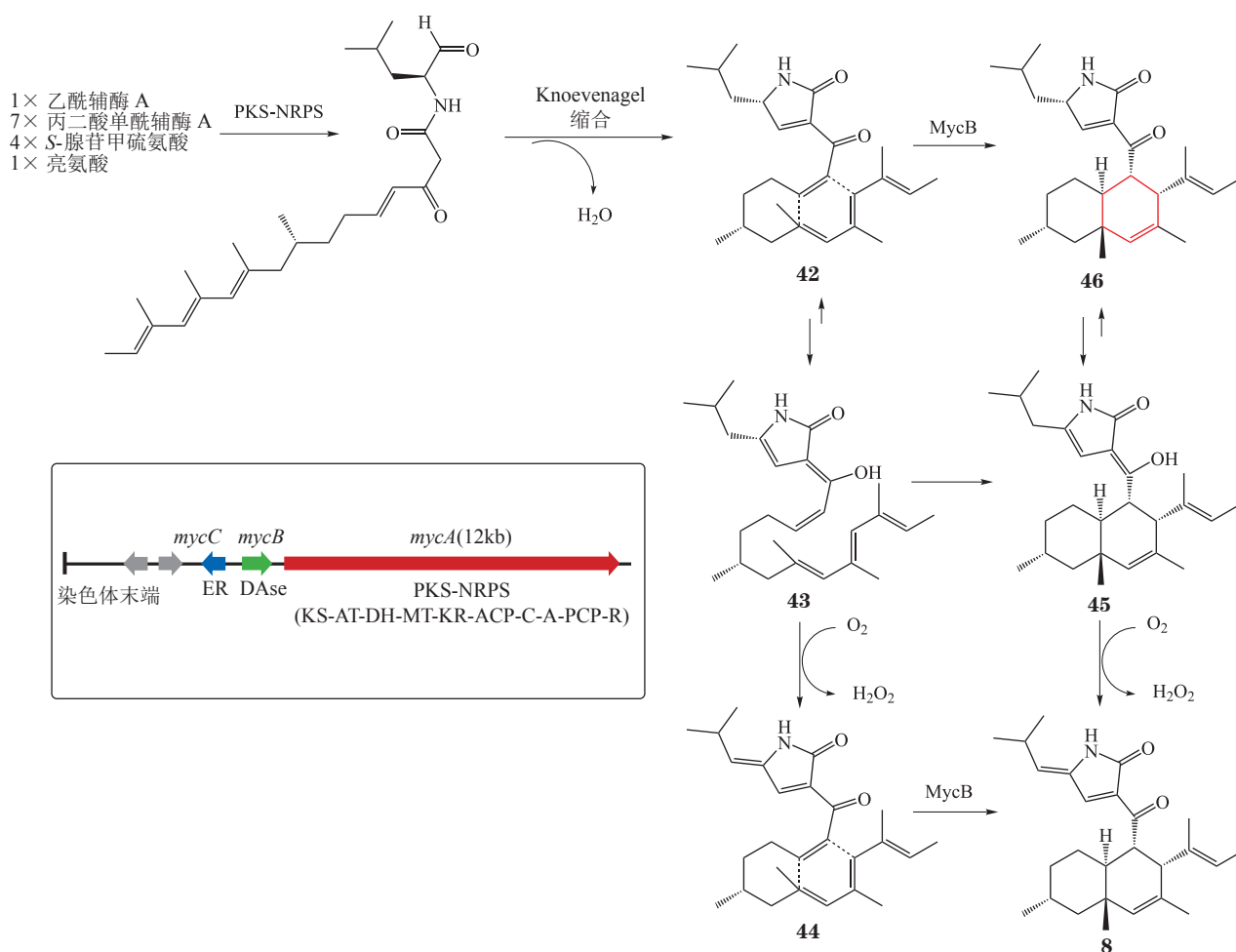


图 13 Myceliothermophin E 的生物合成途径 [50]

Figure 13 Biosynthetic pathway of myceliothermophin E

3.6 Leporin B

Leporin B (**47**) 最早是从一株未鉴定的真菌中分离得到的己糖激酶 II 基因诱导剂 (hexokinase II gene inducing agent) [51], 其生物合成基因簇 *lep* 通过基因敲除、基因异源表达在黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 中发现 [52-53]。首先, 1 分子乙酰辅酶 A、5 分子丙二酸单酰辅酶 A、1 分子 SAM 和 1 分子苯丙氨酸在 PKS-NRPS LepA、ER LepG 结合成聚酮-氨基酸长链分子, 再在细胞色素 P450 酶 LepH 催化下扩环形成化合物 **48**, 后者被短链脱水酶/还原酶 (short chain dehydrogenase/

reductase, SDR) LepF 还原为化合物 **49**。随后, LepI 可以催化 3 步反应: 1) 化合物 **49** 立体选择性脱水成化合物 **50**; 2) 化合物 **50** 分子内 DA 反应形成化合物 **51** 以及杂原子参与的 DA 反应 (hetero-DA, HDA) 形成化合物 **52**; 3) 化合物 **51** 发生逆-Claisen 重排形成化合物 **52**。最终化合物 **52** 在细胞色素 P450 酶 LepD 催化下生成化合物 **47** (见图 14) [53]。值得一提的是, 作为多功能酶 LepI 的催化活性依赖于 SAM, 且其催化的反应都可以自发进行。

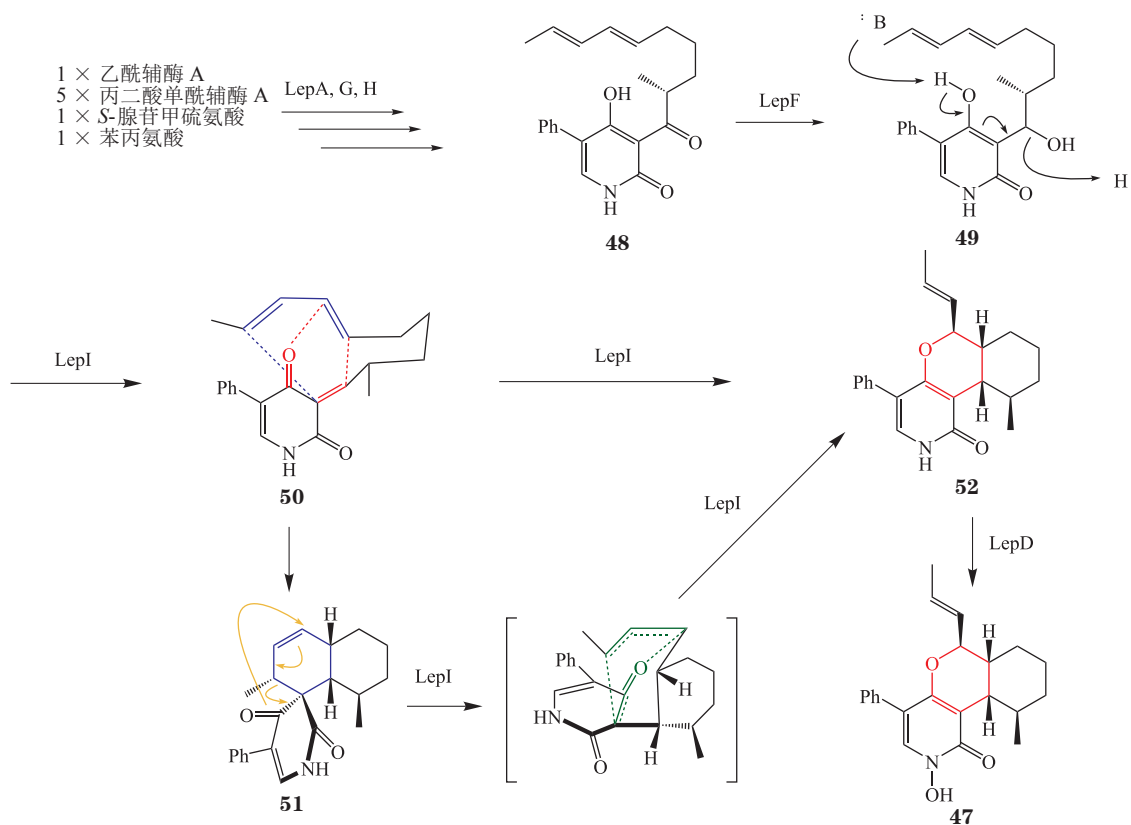


图 14 Leporin B 的生物合成途径 [53]

Figure 14 Biosynthetic pathway of leporin B

4 螺环 Diels-Alder 加合物的生物合成

4.1 Abyssomicin C

Abyssomicin C (**9**) 是链霉菌 *Verrucosipora maris* AB-18-032 产生的分支酸和对氨基苯甲酸代谢途径抑制剂, 并对 G^+ 菌有较强的抑制作用 [54]。其生物合成基因簇 *aby* 长 57 kb, 其中 24 个编码蛋白可能参与 abyssomicin 生物合成, 包括模块化 PKS I 基因 (*abyB1*, *B2*, *B3*) 组装聚酮-氨基酸长链分子, *abyA1*-*A5* 组装 tetronic acid 基团, 其余基因编码氧化酶或推测的调节、转运因子 [55]。AbyU 可能为催化分子中 DA 反应的酶基

因, Byrne 等 [56] 在 *E. coli* B834(DE3) 中表达并纯化了 AbyU, 其可以催化化合物 **53** 的类似物 **54** 环化为 DA 加合物 **55**, 这比非酶促反应速率提高了 4×10^4 倍, 同时可以催化化合物 **56** 形成化合物 **57** (见图 15)。该步反应在非酶条件下不能自发发生, 说明 AbyU 是催化 [4+2] 环化反应的酶。晶体结构 (见图 16) 研究表明, AbyU 催化腔由 8 股反向平行 β 桶状 (β barrel) 结构组成, 每个 β 桶状结构的中心管道一端由 Glu19-Arg122 形成的盐桥封闭, 另一端由 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 连接形成的疏水环关闭。底物分子对接分析表明, Tyr76 与底物内酯羰基形

成氢键, 决定底物的特异性。量子力学/分子力学 (QM/MM) 研究表明, 由化合物 **53** 到 **58** 的 [4+2] 环加成反应是异步协同 (asynchronous and concerted) 的 DA

反应, 酶的主要催化功能是提供一个结合底物反应性构象的预组织活化位点, 使得反应以相对较低的自由能垒发生^[56]。

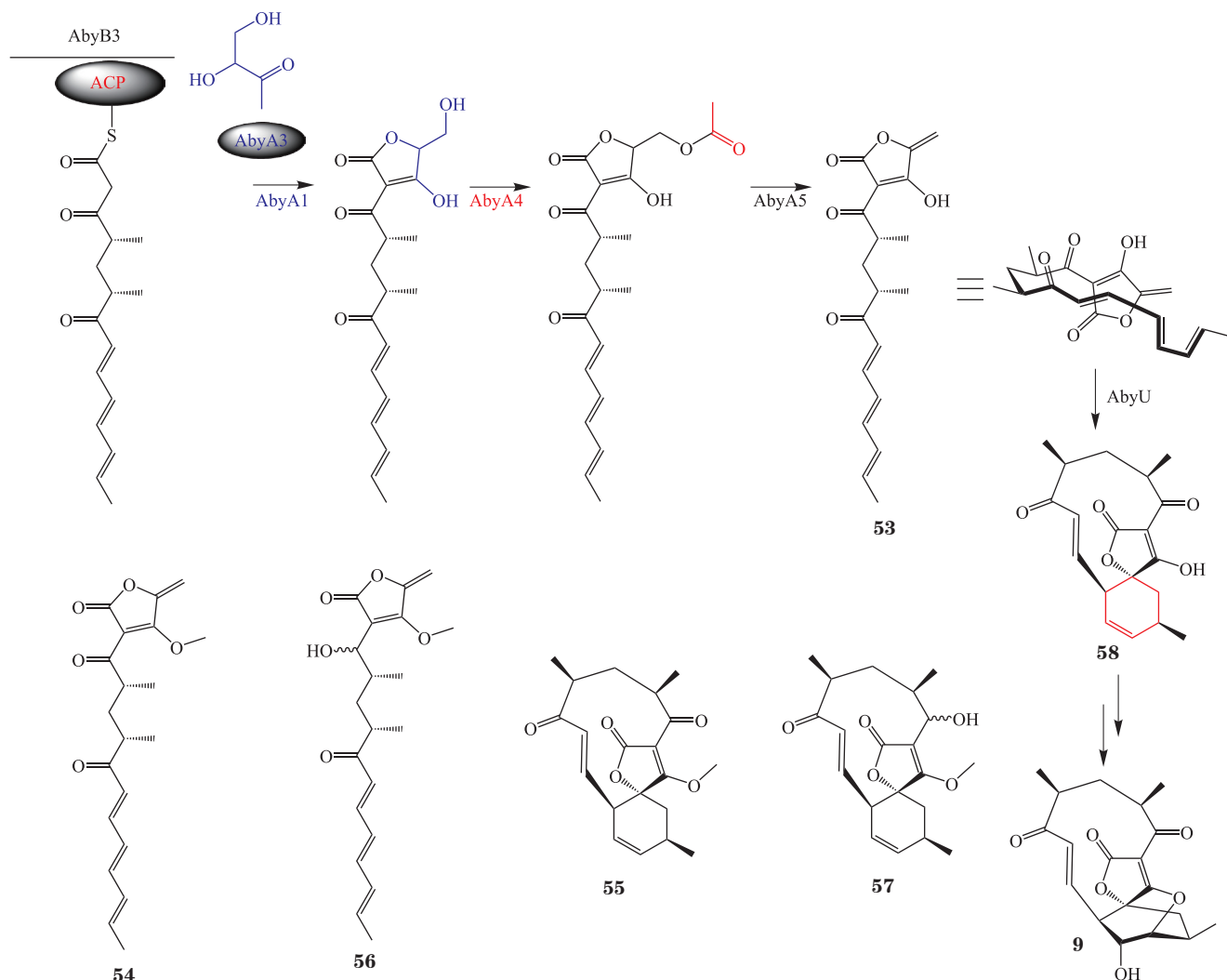
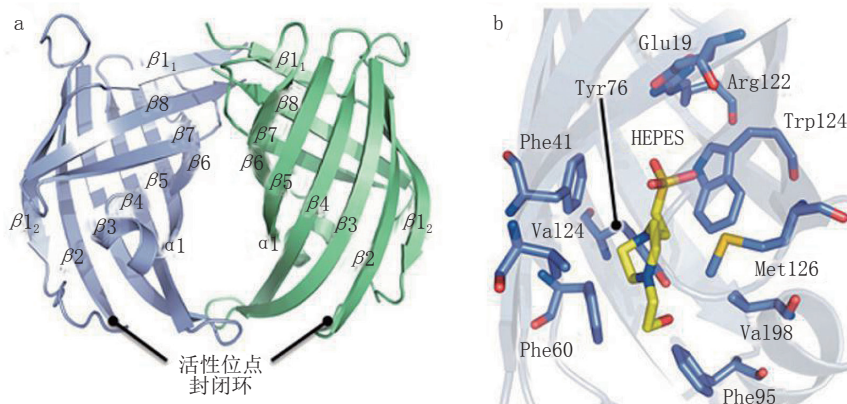


图 15 Abyssomicin C 的生物合成途径^[56]

Figure 15 Biosynthetic pathway of abyssomicin C



a: AbyU 的晶体结构; b: 底物与 AbyU 对接模型, Tyr76 与底物内酯羰基形成氢键; HEPES: *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid), 4-羟乙基哌嗪乙磺酸。

图 16 AbyU 晶体结构及其与底物对接模型^[56]

Figure 16 Crystal structure of AbyU and model of molecular docking with substrate

4.2 Versipelostatin

Versipelostatin (VST, **10**) 是链霉菌 *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 产生的含有 spirotetronate 17 元大环聚酮糖苷化合物, 为一个选择性 GRP78/Bip 分子伴侣下调因子^[57]。Hashimoto 等^[58] 从基因组中发现了生物合成基因簇 *vst*, 其功能通过非生产菌株白色链霉菌 (*Streptomyces albus*) 中重建得以确认。基因簇中含有 5 个 PKS 基因 (*vstA1-A5*), 组装 5 分子丙二酸单酰辅酶 A, 7 分子甲基丙二酸单酰辅酶 A, 2 分子乙基丙二酸单酰辅酶 A, 经 VstC1-C5 催化形成化合物 **59**, 随后在 VstJ 的作用下发生 DA 反应形成化合物

60, 最终在 VstD、E 作用下发生羟基化反应形成 VST 苷元 **61**; 橄榄糖 (olivose) 和洋地黄毒糖 (digitoxose) 的引入与修饰是在 VstB1-B8 催化下完成 (见图 17)^[58]。VstJ 是一个单功能的 DA 酶, 当 *vstJ* 敲除后, versipelostatin 不能生成, 同时积累了化合物 **59**; 体外催化实验发现化合物 **59** 可以被 VstJ 催化为 37-deoxy VSTaglycone (**60**), 且该反应不能自发进行。因而, VstJ 是 spirotetronate 骨架形成中立体选择性的 [4+2]-环化酶, 然而该步催化的反应是否是协同的 DA 反应需要更多实验证据。

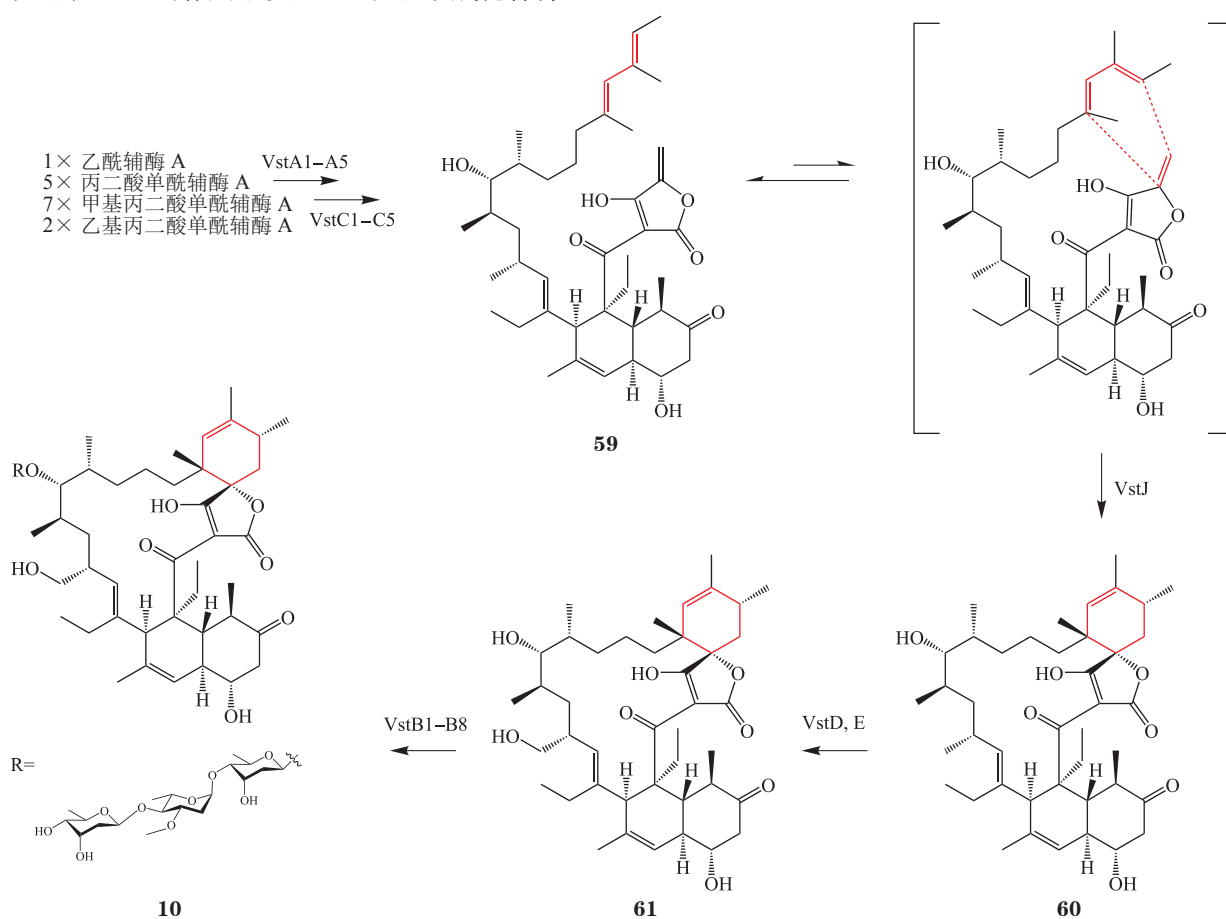


图 17 Versipelostatin 的生物合成途径^[58]

Figure 17 Biosynthetic pathway of versipelostatin

4.3 Pyrroindomycin A

吡咯啉毒素 (pyrroindomycins, PYR) 是链霉菌 *Streptomyces rugosporus* 产生的螺环乙酰乙酸内酰胺类抗生素, 具有潜在的抗菌活性^[59]。该类化合物的结构特点在于分子中环己烯环与 tetronic acid (4-羟基乙酰乙酸内酯) 以螺环方式相连, 并与萘环单元组成大环

聚酮骨架, 再经糖基化修饰而成。在其生物合成基因簇 *pyr* 中^[60], 8 个 I 型聚酮合酶 PyrA1-A8 以乙酰辅酶 A 为起始单元, 丙二酸单酰辅酶 A、甲基丙二酸单酰辅酶 A 和乙基丙二酸单酰辅酶 A 为延伸单元连续进行 10 次缩合反应形成聚酮中间产物, 接着与 NRPS PyrB 上的丝氨酸缩合、环化将聚酮中间产物从酶体上解离下来,

经羟基脱水形成化合物 **62**^[60], 发生 2 次不同的 DA 反应构造环己烯环与萘环单元的中间产物, 再经几步糖基化修饰, 最后引入吡咯吡啶结构单元完成 PYR-A (**11**) 的生物合成 (见图 18)^[61]; PyrE3 负责萘环 DA 反应

形成化合物 **63**, PyrI4 负责螺环 DA 反应形成化合物 **64**, 其功能通过体内基因敲除技术和体外酶催化实验得以验证^[61]。

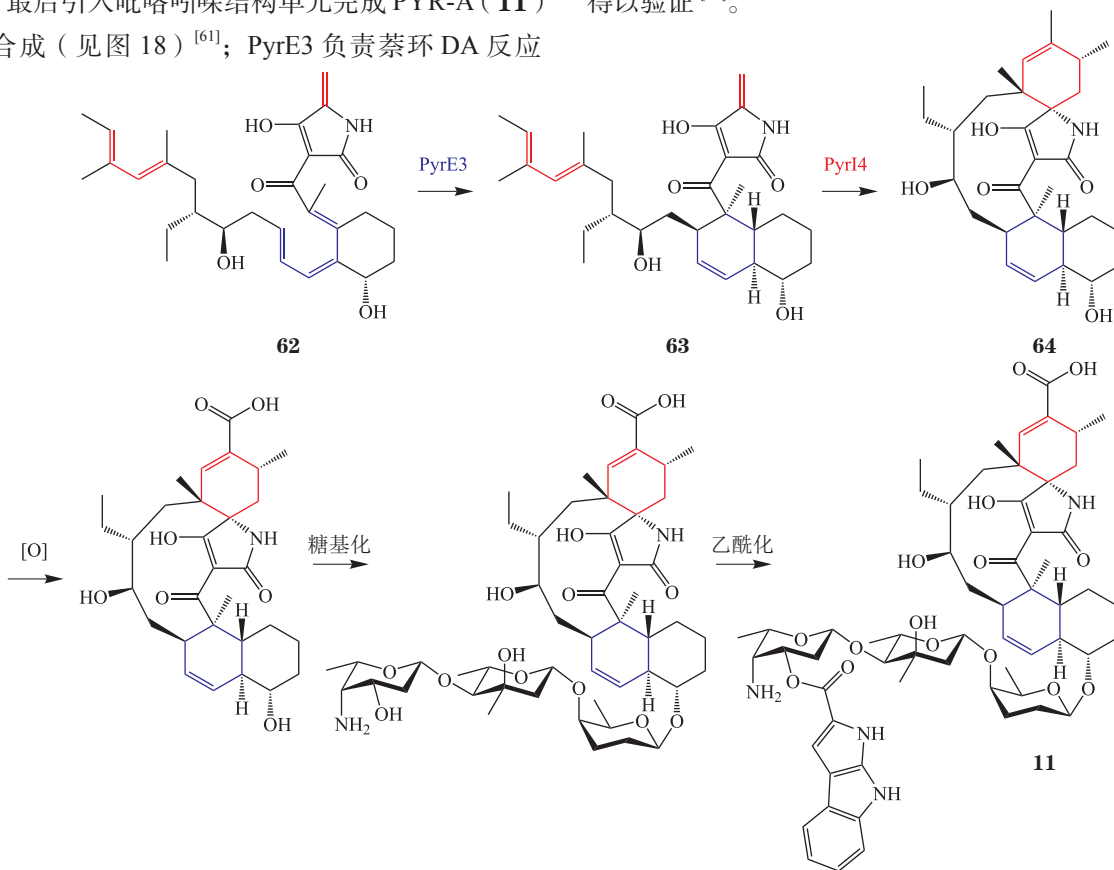
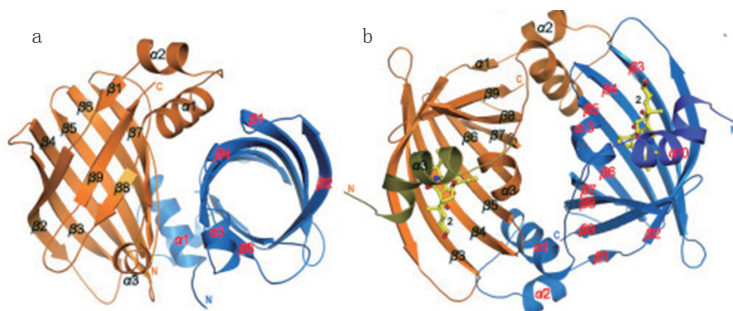


图 18 Pyrroindomycin A 的生物合成途径^[61]

Figure 18 Biosynthetic pathway of pyrroindomycin A

PyrI4 催化机制已被解析 (见图 19)^[62]。PyrI4 蛋白具有对称的二聚体结构, 2 个单体呈空间垂直, 每个单体由 9 个 β 折叠股和 1 个 α 螺旋 ($\alpha 3$) 构成 β 桶状活性腔; 2 个 α 螺旋 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$) 位于 N 端 22 个非结构化氨基酸序列 (unstructured sequence) 中, 其中 $\alpha 1$ 对于二聚体的形成非常重要; 底物与蛋白共结晶后, 底物完全转化为产物; 蛋白 N 端的前 22 个氨基酸柔性很大,

当底物存在时该序列可以识别底物分子, 并诱导自身形成一个特殊的 α 螺旋结构 ($\alpha 0$ -helix), 像一个“盖子”将底物分子挤压到 β 桶状结构的活性腔中从而使得反应发生^[62]。PyrI4 是目前唯一获得酶与底物/产物晶体复合物的研究实例, 它的结构解析向我们展示了天然酶如何捕获柔性底物小分子, 并稳定过渡态促使 DA 反应的发生。



a: PyrI4 的晶体结构; b: PyrI4 与底物复合物的晶体结构。

图 19 PyrI4 及其与底物复合物的晶体结构^[62]

Figure 19 Crystal structures of PyrI4 alone and its complex with substrate

5 氮杂 Diels-Alder 加合物的生物合成

硫肽类抗生素 thiocillins (**65**) 是由核糖体来源的前体肽经保守翻译后修饰而形成的聚肽类化合物。该分子内大环结构是由吡啶环连接而成, 其中吡啶环的形成推测是经 DA 反应形成。在其产生菌蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* ATCC 14579) 中, *tcl* 基因簇上的 *TclM* 敲除后的突变株不能产生吡啶环环化形式的 thiocillins^[63]。Wever 等^[64] 在 *E. coli* 中过表达并纯化了 *tclM* 基因产

物, 为 *TclM* 的 [4+2]-杂环化酶活性提供了直接证据 (见图 20)。他们首先采用组合化学-生物学策略合成了 thiocillin (**12**) 的无环前体类似物 **66**, 当纯化的 *TclM* 在体外与化合物 **66** 共孵育时, 形成了完全芳构化的吡啶环, 环化形成大环, 前导肽被裂解。由此可见, *TclM* 可能是一类新的可以催化氮杂环 [4+2]-环加成反应的酶, 然而该步反应是逐步的还是协同的有待于进一步的实验研究。

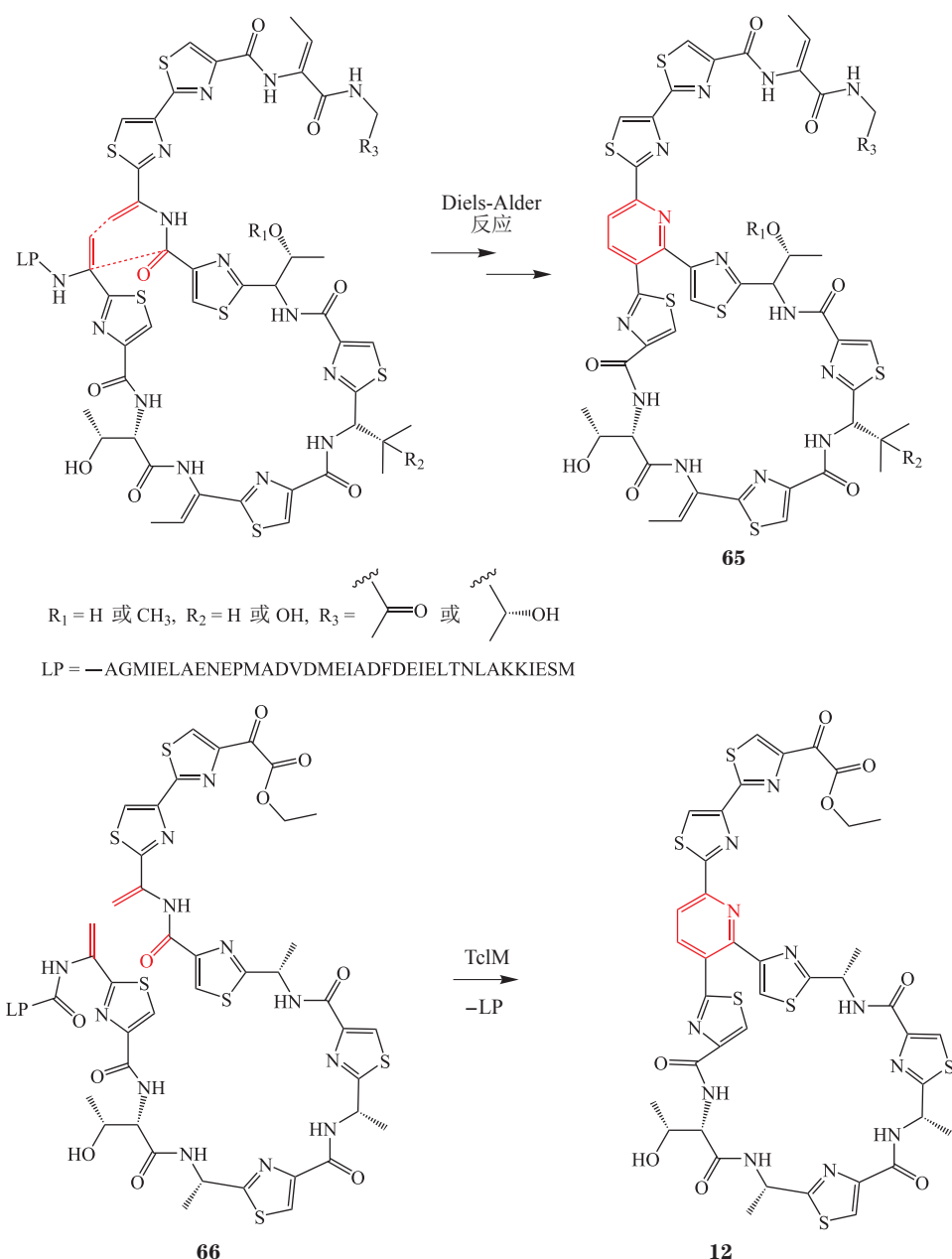


图 20 *TclM* 催化的氮杂环 [4+2] 环加成反应^[64]

Figure 20 Aza-[4+2] cycloaddition catalyzed by *TclM*

6 结语

在微生物次级代谢产物中, 有很多被认为是经酶催化的 DA 反应形成的加合物, 然而天然 DA 酶的研究至今仍面临着诸多挑战^[10]。首先, DA 加合物往往具有复杂的结构且不稳定, 使得用于候选酶功能表征的底物难以获得; 其次, 许多酶是多功能酶, 它可以作为一个“触发点”推动非酶促 DA 反应的发生, 使得难以确定该酶本身是否具有 DA 酶的活性, 如 LovB 和 Sol5 都是多功能酶。这些研究结果表明 DA 加合物的生物合成途径可以包括多样化的 [4+2]-环加成反应^[4], 在引发的 [4+2]-环加成反应中, 多功能酶活性位点中的预组织可以对引发步骤后的环化施加立体化学约束甚至加速环化反应, 然而在进化中酶的引发活性可能不再是必需的并最终丢失, 导致其作为单功能的 [4+2]-环化酶而存在, 如 VstJ、PyrE3 和 PyrI4。因此, [4+2]-环化酶的研究可能为生物合成途径的演变 (evolution) 及多样化 (diversification) 研究提供新的机会^[4]。

目前, 关于 [4+2]-环化酶的催化机制仍知之甚少。SpnF、PyrE3 和 AbyU 的结构研究为人们提供了初步的认识。这些酶通过诱导契合结合底物以形成封闭的 Michaelis 复合物, 在酶的封闭疏水口袋中, 二烯体和亲双烯体被挤压呈低体积构象以促进环化反应的发生。同时, 静电效应可能有助于二烯体和亲双烯体的极化, 并且稳定过渡态的电荷分布, 从而降低活化焓^[4]。

综上所述, 尽管近几年有关 [4+2]-环化酶的研究取得了很大的进展, 但仍然刚刚开始, 关于其生物学进化起源、催化机制、分子间 [4+2]-环化反应以及植物来源天然产物生物合成中的 [4+2]-环化反应相关酶等许多科学问题依然悬而未决, 亦是未来 [4+2]-环化酶研究中令人兴奋的领域。相信随着科学技术的飞速发展和多学科交叉融合的逐步加强, 上述科学问题会逐渐得到解决, 越来越多的酶将被发现, 结合蛋白质工程, 这些酶将在合成复杂结构活性化合物及其结构多样化的衍生物中发挥重要的理论及应用价值。

[参考文献]

- [1] Huisgen R. Cycloadditions—definition, classification, and characterization[J]. *Angew Chem Int Ed*, 1968, 7(5): 321-328.
- [2] Nicolaou K C, Snyder S A, Montagnon T, et al. The Diels-Alder reaction in total synthesis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41(10): 1668-1698.
- [3] Oikawa H, Tokiwano T. Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products[J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21(3): 321-352.
- [4] Jeon B, Wang S A, Ruzsyczky M W, et al. Natural [4+2]-cyclases[J]. *Chem Rev*, 2016, 117(8): 5367-5388.
- [5] Minami A, Oikawa H. Recent advances of Diels-Alderase involved in natural product biosynthesis[J]. *J Antibiot*, 2016, 69(7): 500-506.
- [6] Hashimoto T, Kuzuyama T. Mechanistic insights into Diels-Alder reactions in natural product biosynthesis[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 35: 117-123.
- [7] Oikawa H. Nature's strategy for catalyzing Diels-Alder reaction[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(4): 429-430.
- [8] Zheng Q, Tian Z, Liu W. Recent advances in understanding the enzymatic reactions of [4+2] cycloaddition and spiroketalization[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 31: 95-102.
- [9] Klas K, Tsukamoto S, Sherman D H, et al. Natural Diels-Alderase: elusive and irresistible[J]. *J Org Chem*, 2015, 80(23): 11672-11685.
- [10] Kim H J, Ruzsyczky M W, Liu H. Current developments and challenges in the search for a naturally selected Diels-Alderase[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16(1): 124-131.
- [11] Sakurai I, Suzuki H, Shimizu S, et al. Novel biotransformation of a 2-pyrone to a substituted benzoic acid[J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 5141-5143.
- [12] Oikawa H, Yagi K, Watanabe K, et al. Biosynthesis of macrophomic acid: plausible involvement of intermolecular Diels-Alder reaction[J]. *Chem Commun*, 1997 (1): 97-98.
- [13] Oikawa H, Watanabe K, Yagi K, et al. Macrophomate synthase: unusual enzyme catalyzing multiple reactions from pyrones to benzoates[J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40(38): 6983-6986.
- [14] Ose T, Watanabe K, Mie T, et al. Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase[J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 185-189.
- [15] Guimaraes C R W, Udier-Blagović M, Jorgensen W L. Macrophomate synthase: QM/MM simulations address the Diels-Alder versus Michael-aldol reaction mechanism[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(10): 3577-3588.
- [16] Serafimov J M, Gillingham D, Kuster S, et al. The putative Diels-Alderase macrophomate synthase is an efficient aldolase[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(25): 7798-7799.
- [17] Harvey R A, Plaut G W E. Riboflavin synthetase from yeast [J]. *J Biol Chem*, 1966, 241(9): 2120-2136.

- [18] Illarionov B, Eisenreich W, Bacher A. A pentacyclic reaction intermediate of riboflavin synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(13): 7224-7229.
- [19] Kim R R, Illarionov B, Joshi M, *et al.* Mechanistic insights on riboflavin synthase inspired by selective binding of the 6, 7-dimethyl-8-ribityllumazine exomethylene anion[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(9): 2983-2990.
- [20] Breugst M, Eschenmoser A, Houk K N. Theoretical exploration of the mechanism of riboflavin formation from 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine: nucleophilic catalysis, hydride transfer, hydrogen atom transfer, or nucleophilic addition?[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(17): 6658-6668.
- [21] Kirst H A. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research[J]. *J Antibiot*, 2010, 63(3): 101-111.
- [22] Kirst H A, Michel K H, Martin J W, *et al.* A83543A-D, unique fermentation-derived tetracyclic macrolides[J]. *Tetrahedron Lett*, 1991, 32(37): 4839-4842.
- [23] Waldron C, Matsushima P, Rosteck P R, *et al.* Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*[J]. *Chem Biol*, 2001, 8(5): 487-499.
- [24] Kim H J, Ruszczycky M W, Choi S, *et al.* An enzyme-catalyzed [4+2] cycloaddition is a key step in the biosynthesis of spinosyn A[J]. *Nature*, 2011, 473(7345): 109-112.
- [25] Fage C D, Isiorho E A, Liu Y, *et al.* The structure of SpnF, a standalone enzyme that catalyzes [4+2] cycloaddition[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(4): 256-258.
- [26] Gordeev E G, Ananikov V P. Computational study of a model system of enzyme-mediated [4+2] cycloaddition reaction[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0119984.
- [27] Hess B A, Smentek L. Concerted, highly asynchronous, enzyme-catalyzed [4+2] cycloaddition in the biosynthesis of spinosyn A; computational evidence[J]. *Org Biomol Chem*, 2012, 10(37): 7503-7509.
- [28] Patel A, Chen Z, Yang Z, *et al.* Dynamically complex [6+4] and [4+2] cycloadditions in the biosynthesis of spinosyn A[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(11): 3631-3634.
- [29] Medvedev M G, Zeifman A A, Novikov F N, *et al.* Quantifying possible routes for SpnF-catalyzed formal Diels-Alder cycloaddition[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(11): 3942-3945.
- [30] Li G, Kusari S, Spittler M. Natural products containing 'decalin' motif in microorganisms[J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(9): 1175-1201.
- [31] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species[J]. *J Antibiot*, 1979, 32(8): 852-854.
- [32] Alberts A W, Chen J, Kuron G, *et al.* Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(7): 3957-3961.
- [33] Hendrickson L, Davis C R, Roach C, *et al.* Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene[J]. *Chem Biol*, 1999, 6(7): 429-439.
- [34] Kennedy J, Auclair K, Kendrew S G, *et al.* Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1368-1372.
- [35] Ames B D, Nguyen C, Bruegger J, *et al.* Crystal structure and biochemical studies of the trans-acting polyketide enoyl reductase LovC from lovastatin biosynthesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(28): 11144-11149.
- [36] Xu W, Chooi Y H, Choi J W, *et al.* LovG: the thioesterase required for dihydromonacolin L release and lovastatin nonaketide synthase turnover in lovastatin biosynthesis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(25): 6472-6475.
- [37] Barriuso J, Nguyen D T, Li J W H, *et al.* Double oxidation of the cyclic nonaketide dihydromonacolin L to monacolin J by a single cytochrome P450 monooxygenase, LovA[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(21): 8078-8081.
- [38] Xie X, Meehan M J, Xu W, *et al.* Acyltransferase mediated polyketide release from a fungal megasynthase[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(24): 8388-8389.
- [39] Witter D J, Vederas J C. Putative Diels-Alder-catalyzed cyclization during the biosynthesis of lovastatin[J]. *J Org Chem*, 1996, 61(8): 2613-2623.
- [40] Auclair K, Sutherland A, Kennedy J, *et al.* Lovastatin nonaketide synthase catalyzes an intramolecular Diels-Alder reaction of a substrate analogue[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(46): 11519-11520.
- [41] Burmeister H R, Bennett G A, Vesonder R F, *et al.* Antibiotic produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1974, 5(6): 634-639.
- [42] Singh S B, Zink D L, Goetz M A, *et al.* Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase[J]. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39(16): 2243-2246.
- [43] Kato N, Nogawa T, Hirota H, *et al.* A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(2): 210-215.

- [44] Ichihara A, Tazaki H, Sakamura S. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*[J]. *Tetrahedron Lett*, 1983, 24(48): 5373-5376.
- [45] Alam S S, Bilton J N, Slawin A M Z, *et al.* Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(10): 2627-2630.
- [46] Kasahara K, Miyamoto T, Fujimoto T, *et al.* Solanapyrone synthase, a possible Diels-Alderase and iterative type I polyketide synthase encoded in a biosynthetic gene cluster from *Alternaria solani*[J]. *ChemBioChem*, 2010, 11(9): 1245-1252.
- [47] Yang S W, Mierzwa R, Terracciano J, *et al.* Chemokine receptor CCR-5 inhibitors produced by *Chaetomium globosum*[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(7): 1025-1028.
- [48] Sato M, Yagishita F, Mino T, *et al.* Involvement of lipocalin-like CghA in decalin-forming stereoselective intramolecular [4+2] cycloaddition[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(16): 2294-2298.
- [49] Yang Y L, Lu C P, Chen M Y, *et al.* Cytotoxic polyketides containing tetramic acid moieties isolated from the fungus *Myceliophthora thermophila*: elucidation of the relationship between cytotoxicity and stereoconfiguration[J]. *Chem Eur J*, 2007, 13(24): 6985-6991.
- [50] Li L, Yu P, Tang M C, *et al.* Biochemical characterization of a eukaryotic decalin-forming Diels-Alderase[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(49): 15837-15840.
- [51] Zhang C, Jin L, Mondie B, *et al.* Leporin B: a novel hexokinase II gene inducing agent from an unidentified fungus[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(8): 1433-1435.
- [52] Cary J W, Uka V, Han Z, *et al.* An *Aspergillus flavus* secondary metabolic gene cluster containing a hybrid PKS-NRPS is necessary for synthesis of the 2-pyridones, leporins[J]. *Fungal Genet Biol*, 2015, 81: 88-97.
- [53] Ohashi M, Liu F, Hai Y, *et al.* SAM-dependent enzyme-catalysed pericyclic reactions in natural product biosynthesis[J]. *Nature*, 2017, 549(7673): 502-506.
- [54] Riedlinger J, Reicke A, Zähler H, *et al.* Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032[J]. *J Antibiot*, 2004, 57(4): 271-279.
- [55] Gottardi E M, Krawczyk J M, von Suchodoletz H, *et al.* Abyssomicin biosynthesis: formation of an unusual polyketide, antibiotic-feeding studies and genetic analysis[J]. *ChemBioChem*, 2011, 12(9): 1401-1410.
- [56] Byrne M J, Lees N R, Han L C, *et al.* The catalytic mechanism of a natural Diels-Alderase revealed in molecular detail[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(19): 6095-6098.
- [57] Park H R, Furihata K, Hayakawa Y, *et al.* Versipelostatin, a novel GRP78/Bip molecular chaperone down-regulator of microbial origin[J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(39): 6941-6945.
- [58] Hashimoto T, Hashimoto J, Teruya K, *et al.* Biosynthesis of versipelostatin: identification of an enzyme-catalyzed [4+2]-cycloaddition required for macrocyclization of spirotetronate-containing polyketides[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(2): 572-575.
- [59] Ding W, Williams D R, Northcote P, *et al.* Pyrroindomycins, novel antibiotics produced by *Streptomyces rugosporus* sp. LL-42D005[J]. *J Antibiot*, 1994, 47(11): 1250-1257.
- [60] Wu Q, Wu Z, Qu X, *et al.* Insights into pyrroindomycin biosynthesis reveal a uniform paradigm for tetramate/tetronate formation[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(42): 17342-17345.
- [61] Tian Z, Sun P, Yan Y, *et al.* An enzymatic [4+2] cyclization cascade creates the pentacyclic core of pyrroindomycins[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(4): 259-265.
- [62] Zheng Q, Guo Y, Yang L, *et al.* Enzyme-dependent [4+2] cycloaddition depends on lid-like interaction of the N-terminal sequence with the catalytic core in Pyr14[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(3): 352-360.
- [63] Bowers A A, Walsh C T, Acker M G. Genetic interception and structural characterization of thiopeptide cyclization precursors from *Bacillus cereus*[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(35): 12182-12184.
- [64] Wever W J, Bogart J W, Baccile J A, *et al.* Chemoenzymatic synthesis of thiazolyl peptide natural products featuring an enzyme-catalyzed formal [4+2] cycloaddition[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(10): 3494-3497.



【专家介绍】戴均贵: 理学博士, 中国医学科学院 & 北京协和医学院药物研究所研究员, 博士生导师, 国家“百千万人才工程”人选, 协和学者特聘教授, *Acta Pharmaceutica Sinica B* 杂志编委。研究方向为天然药物的生物合成与生物催化, 在活性天然产物的糖基化及异戊烯基化等研究领域取得了突破性成果。已在国际学术期刊 *Nature Chemical Biology*, *Angewandte Chemie International Edition*, *Organic Letters*, *The Journal of Biological Chemistry*, *Advanced Synthesis & Catalysis*, *Chemistry-A European Journal* 等上发表 SCI 论文 100 余篇; 申请专利 9 项, 获得授权 3 项; 参编著作 6 部。