

文章编号: 1004-0374(2011)09-0891-09

# 天然产物类药物的合成生物学研究

黄 伟, 王健博, 唐功利\*

(中国科学院上海有机化学研究所, 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

**摘 要:** 结构复杂多样的天然产物是现代药物的重要组成部分和新药发现的重要源泉。建立在基因工程及代谢工程、合成化学、基因组学、系统生物学等学科基础上的合成生物学研究对于结构复杂的天然产物类药物研究有特殊的意义。核心是通过在发酵友好、高效的微生物中设计、构建目标化合物的生物合成途径, 经系统地调控和优化由重组微生物发酵生产来源稀缺的天然产物类药物或前体。该方法是不远的将来解决来源、成本与环境、资源协调问题最好的途径之一, 也是解决海洋天然产物或特殊生境微生物药物面临的如何持续供应化合物这一个瓶颈问题的最佳选择。该文将对天然产物类药物合成生物学研究涉及的主要策略和重要进展进行阐述。

**关键词:** 天然产物; 合成生物学; 生物合成; 基因簇; 异源表达

**中图分类号:** O621.33; R914.2      **文献标志码:** A

## Synthetic biology toward medicinal natural products

HUANG Wei, WANG Jian-Bo, TANG Gong-Li\*

(State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry,  
Shanghai Institutes of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** Natural products are the major sources of current clinical drugs and further discovery of new drugs. Based on genetic engineering, metabolic engineering, chemical synthesis, genomics and systematic biology, synthetic biology provide a significant driving force to develop complex drugs originated from natural products. Efforts have been focused on the design, assembly of biosynthetic pathways and heterologous expression the artificial gene cluster in fermentation-friendly hosts to produce medicinal natural products or precursors. This method offered a framework, maybe the best choice, for the supplement of complex natural products, especially for the trace compounds from marine or microorganisms in special ecotope. This review describes the major strategies and recent developments of synthetic biology toward medicinal natural products.

**Key words:** natural product; synthetic biology; biosynthesis; pathway; gene cluster; heterologous expression

### 1 天然产物药物、合成化学与合成生物学

自青霉素发现并作为药物用于治疗以来, 天然产物药物就逐步成为现代药物的重要组成部分和新药发现的主要源泉, 同时成为有机化学、药物化学及近年来发展的化学生物学的重要组成部分。据统计, 超过 40% 的现代临床药物直接或间接地来源于天然产物<sup>[1-2]</sup>, 而目前临床应用的抗感染药物中有 70% 以上直接或间接地来源于微生物源天然产物, 如以青霉素和头孢菌素为代表的  $\beta$ -内酰胺类、以红霉素为代表的大环内酯类、以万古霉素为代表

的糖肽类等<sup>[3]</sup>。在抗肿瘤药物中源于天然产物的药物也超过 50% 的比例<sup>[1-2]</sup>, 著名的, 如紫杉醇、以柔红霉素为代表的蒽环类、以博来霉素为代表的聚酮/聚肽类及卡利霉素为代表的烯二炔类等。另外著名的免疫抑制剂环孢素 A、降血脂药物洛伐他丁及调节血糖药物阿卡波糖等其他生理功能药物的发现及临床应用为天然产物的发现与开发展现了美好

收稿日期: 2011-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(21072214)

\*通信作者: E-mail: gltang@sioc.ac.cn

的前景。除医药行业外,天然产物在农业、畜牧业、养殖业中也得到广泛应用,取得了重大效益。著名的农用抗生素,如以灭瘟素 S 为代表的核苷类、以井冈霉素为代表的氨基糖苷类、以阿维菌素和多杀菌素为代表的大环内酯类及盐霉素为代表的聚醚类天然产物等。另外,各种维生素及其衍生物是医药和营养保健药物的重要组成部分,以甾体和多肽天然产物为代表的激素类药物也在现代医药中发挥不可替代的作用。而与天然产物类药物研究直接相关的诺贝尔奖包括至少五届化学奖和三届生理学或医学奖:胆酸结构的确定(Wieland HO, 1927 年化学奖);维生素 D 的发现(Windaus A, 1928 年化学奖);维生素 C 的结构与合成(Haworth WH, 1937 年化学奖);性激素的结构与转化(Ruzicka L 和 Butenandt A, 1939 年化学奖);青霉素的发现及其结构修饰(Fleming A, Chain EB 和 Florey HW, 1945 年生理学或医学奖);肾上腺皮质激素及其结构和生理效应(Kendall EC, Reichstein T 和 Hench PS, 1950 年生理学或医学奖);链霉素的发现(Waksman SA, 1952 年生理学或医学奖);生物碱、抗菌素、酶和其他天然化合物的立体化学(Prelog V, 1975 年化学奖);前列腺素及相关的生物活性物质的发现(Bergström SK, Samuelsson BI 和 Vane JR, 1982 年生理学或医学奖)。

自 1828 年德国化学家 Wöhler 合成尿素以来,“有机合成”逐渐成为有机化学的中心<sup>[4]</sup>。有机合成是通过一系列有规划的反应把几个简单易得的有机物原料转化成另一特定有机物的过程,是有机化学研究不可缺少的手段和内容,也是现代有机化学工业的基础,是药物、材料等领域的重要组成部分<sup>[5]</sup>。一个多世纪以来与天然产物的合成直接相关的诺贝尔化学奖包括:生物碱的合成(Robinson R, 1947);多肽激素的合成(du Vigneaud V, 1955);胆固醇、维生素 B12、叶绿素等复杂天然化合物全合成(Woodward RB, 1965);复杂天然产物的合成及反合成分析理论的建立(Corey EJ, 1990);而一些关键有机反应的发现对于天然产物及药物合成发挥了巨大的推动作用,这方面代表性的诺贝尔化学奖,如双烯合成反应(Piels OPH 和 Alder K, 1950)、多肽固相合成(Merrifield RB, 1984)、手性催化反应和不对称合成(Knowle WS, Sharpless KB 和 Noyori R, 2001)、烯炔复分解反应(Chauvin Y, Grubbs RH 和 Schrock RR, 2005)及钯催化的交叉偶联(Heck RF, Negishi E-I 和 Suzuki A, 2010)。

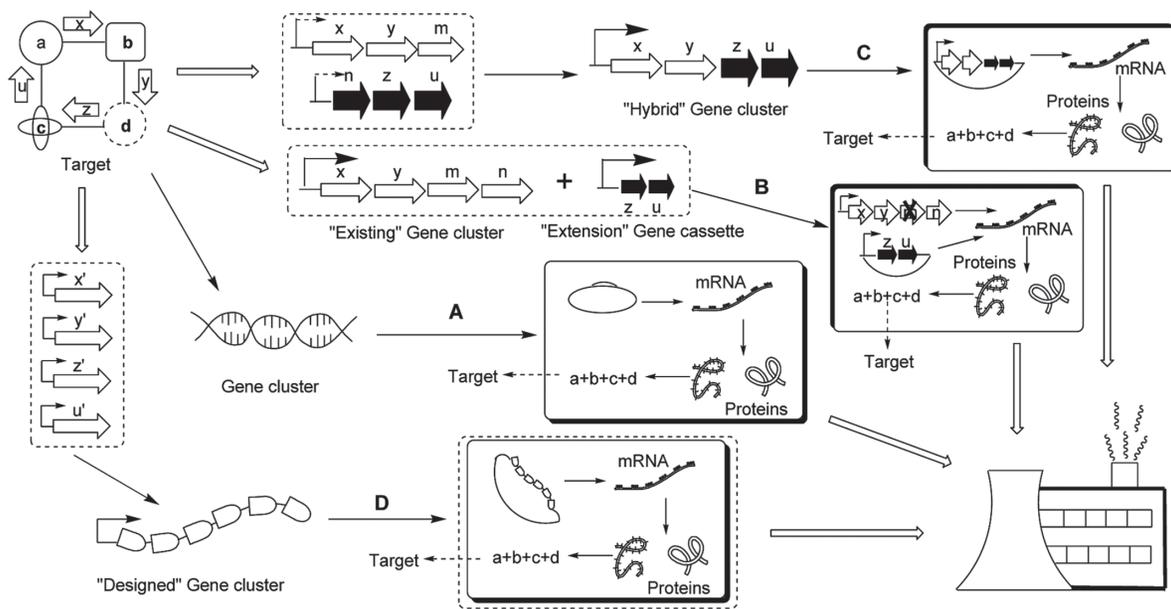
尽管有机合成化学已经取得了辉煌的成就,人们不仅能够合成自然界存在的几乎任何天然化合物,还可以合成若干理论存在但自然界中还未发现的设想的理论分子,但是在结构复杂、多手性中心的天然产物全合成中也普遍存在一些问题。具体表现在合成路线长(几十步)、产率低(通常低于 1%)、需要昂贵试剂或苛刻的反应条件,难以实现大量合成或生产等。如目前临床应用的复杂天然产物药物 $\beta$ -内酰胺、大环内酯、糖肽类、紫杉醇、萜环类、烯二炔类等均是天然分离辅以简单的化学半合成或衍生。如果能够同时拥有有机合成的创造力和自然界合成天然产物的高效性,通过生长快速的微生物作为细胞工厂来实现复杂天然产物类药物的大量合成或生产,必将为有机合成和天然产物药物研究创造更加光辉灿烂的前景,而近年来出现的合成生物学正好可以满足这一需求。而以天然产物生物合成为基础的合成生物学研究对于来源稀缺(包括海洋和稀有物种),天然含量低,组份复杂且难以完全分离的天然产物尤其重要,该方法可能是将来解决来源、成本与环境、资源协调问题最好的途径之一。

## 2 天然产物类药物的合成生物学

目前,合成生物学无论是在学术研究还是工业领域,对于天然产物创新、发展及新药开发的重大影响正逐渐为科学家们所认同<sup>[6-8]</sup>。它的成功运用,关键是在基因和蛋白功能水平上认识和理解复杂天然产物的生物合成机制,以化学、生物的知识为指导,通过合理设计在发酵友好的微生物中实现生物合成途径的重构,进而通过系统优化实现目标化合物的高效生物全合成。它主要的策略和方法主要包括四种:(1)目标天然产物的生物合成基因簇在发酵友好的微生物宿主中异源表达;(2)引入新的功能基因或元件实现原生物合成途径的延伸或分支;(3)异源表达几个代谢途径的杂合生物合成途径;(4)设计、构建目标化合物的人工生物合成基因簇,进而在发酵友好的微生物宿主中异源表达(图 1)<sup>[9]</sup>。近年来,国际上针对天然产物的合成生物学研究突飞猛进,许多催化复杂化学反应的生物催化体系或基因元件被发现或成功构建,几个特色的天然产物药物生物合成基因簇成功实现了异源表达,几个来源受限的天然产物类药物的合成生物学研究也获得了显著进展。

### 2.1 基因簇异源表达

在获得目标天然产物生物合成基因簇的基础



**A:** 克隆目标天然产物的生物合成基因簇, 在发酵友好的微生物宿主中异源表达; **B:** 利用宿主中部分已有的生物合成途径, 通过引入新的功能基因或元件实现原生物合成途径的延伸或分支, 从而生物合成目标化合物; **C:** 通过自然界已存在的几个代谢途径的重组构建新的生物合成途径, 进而在发酵友好的微生物宿主中异源表达; **D:** 根据目标化合物的结构、生物合成知识和日益积累的基因、基因簇或元件通过设计、构建目标化合物的生物合成基因簇, 进而在发酵友好的微生物宿主中异源表达。

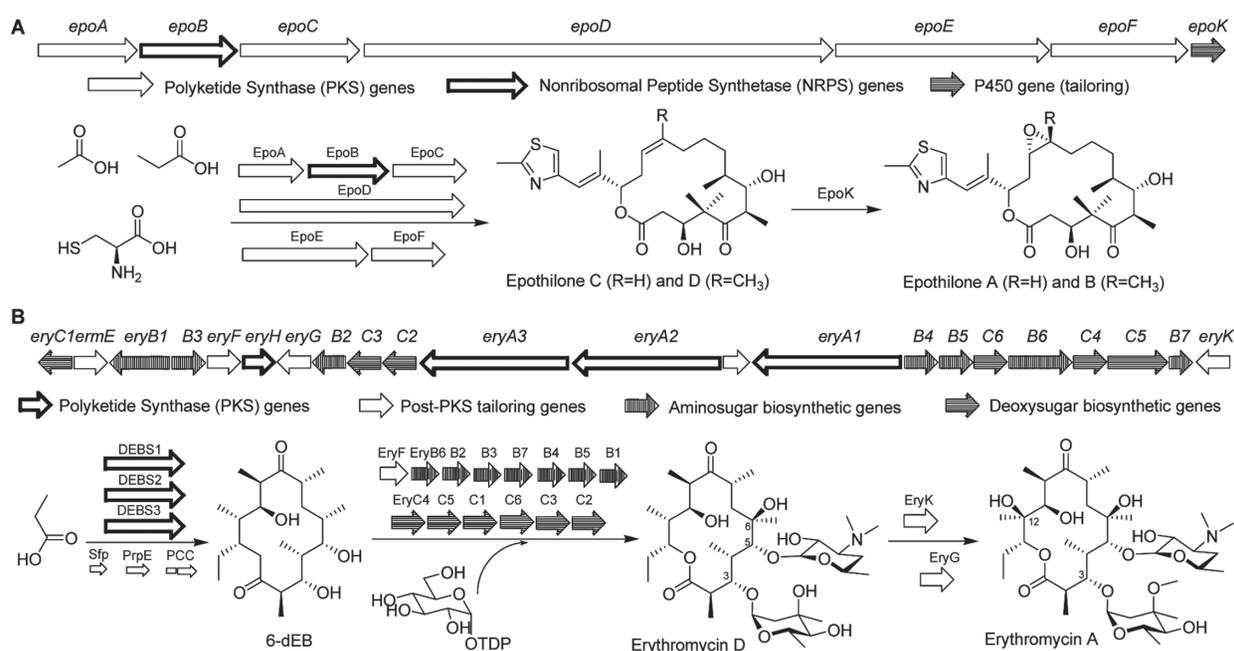
**图1 天然产物药物合成生物学研究涉及的主要策略和方法<sup>[9]</sup>**

上, 通过发酵友好的微生物宿主实现异源表达是近年来天然产物生物合成研究领域中的重要内容之一<sup>[10]</sup>, 也是合成生物学中相对简单的一种策略。埃博霉素 (Epothilone, 图 2A) 是一类黏细菌亚目的纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 产生的大环内酯类化合物, 与紫杉醇具有相同的抑制肿瘤细胞生长的作用机制, 且对多重耐药肿瘤细胞和耐紫杉醇的肿瘤细胞均表现强大的抗癌活性, 同时较紫杉醇具有更好的水溶性, 是一种很有发展潜力的抗肿瘤药。目前至少一种半合成类似物 (ixabepilone, BMS-247550) 已被美国 FDA 批准用于乳腺癌的治疗, 还有至少六种埃博霉素类化合物进入了不同阶段的临床试验。尽管多个实验室完成了埃博霉素的全合成<sup>[11]</sup>, 但由于过长的步骤和较低的产率, 目前所需的药物生产和开发还必须依赖于微生物发酵获得。但由于纤维堆囊菌培养过程难、产量低, 且发酵生产周期长、提取困难, Kosan 公司的科研人员克隆了其生物合成基因簇 (图 2A) 并转入天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)<sup>[12]</sup> 和黄色黏细菌 (*Myxococcus xanthus*)<sup>[13]</sup> 中成功实现了异源表达。虽然初步的产量没有显著提高, 但发酵时间大大缩短。随后, 他们又根据大肠杆菌密码子的偏好性将埃博

霉素的生物合成基因簇进行了重新设计和合成, 继而在大肠杆菌中实现了异源表达<sup>[14]</sup>, 虽然产量也没有得到提高, 但大肠杆菌易于培养、生长迅速也是一定的优势。

大肠杆菌是分子生物学最常用的异源表达宿主之一, 因其生长迅速、遗传背景清楚、操作简单成熟而广受欢迎。为了实现聚酮类天然产物生物合成基因簇在大肠杆菌中的异源表达, 人们对大肠杆菌进行了系列改造: 引入聚酮合成酶 (PKS) 的修饰酶 (Sfp) 和前体的合成酶 (PrpE 和 PCC) (图 2B)<sup>[15]</sup>。随后将聚酮天然产物药物的代表分子红霉素 (erythromycin) 的生物合成基因簇导入该改造后的大肠杆菌成功实现了异源表达 (图 2B)<sup>[15-16]</sup>。

许多因素可以影响天然产物生物合成基因簇的异源表达的成败和产量高低, 而宿主的选择往往是首先需要考虑的。除了上文提到的天蓝色链霉菌和大肠杆菌外, 一些其他链霉菌<sup>[10,17]</sup> 也是经常被考虑的, 而有时工业用的链霉菌<sup>[18]</sup> 也会收到意想不到的效果。人们一直渴望获得一种通用、高效、发酵友好的超级宿主用于天然产物生物合成基因簇的异源表达或天然产物药物的发酵生产。最近, 日本科学家将农用抗生素阿维菌素产生菌基因组 (9.02 Mb)



A: 埃博霉素(Epothilone)的生物合成基因簇及其生物合成途径;

B: 红霉素(Erythromycin)的生物合成基因簇及其生物合成途径。

图2 通过在异源宿主中表达聚酮类天然产物药物的生物合成基因簇

中其他基因簇敲除后构建了基因组缺失 1.4 Mb 的新型宿主, 对几种外源天然产物生物合成基因簇的异源表达获得了较高的产量<sup>[19]</sup>。为了实现天然产物生物合成基因簇的异源表达人们也发展了大片段基因克隆载体, 如大肠杆菌-链霉菌穿梭人工染色体载体<sup>[20]</sup>; 为了实现大片段拼接发展了 Red/ET 体内重组克隆技术<sup>[21]</sup>; 为了提高产量从前体、调控、组学等多个层次优化异源表达<sup>[22]</sup>。

## 2.2 利用部分生物合成基因簇的生物合成途径延伸

如果将天然产物生物合成基因簇的异源表达理解为仅仅利用异源宿主的基础代谢产物合成目标化合物, 那么利用宿主中部分已有的生物合成途径, 通过引入新的功能基因或元件实现原生物合成途径的延伸或分支, 从而生物合成新的目标化合物则相当于化学合成中的半合成。该策略是天然产物生物合成研究领域目前成果显著的部分, 已经在复杂天然产物类药物的生产中显示了巨大的优越性和广阔的前景。

以青霉素(Penicillin)和头孢菌素(Cephalosporin)为代表的 $\beta$ -内酰胺类抗生素是目前临床最重要的抗生素药物之一, 其中头孢菌素性能优于青霉素。然而, 头孢菌素产生菌产黄头孢霉(*Acromonium chrysogenum*)生产能力较低, 因此, 临床应用的头

孢菌素大多是通过发酵提取青霉素家族天然产物进而经半合成获得的。由于青霉素的产生菌产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)经过几十年的选育成为最为成熟、高效的生产菌种之一(目前青霉素的发酵产量已经达到 70 g/L)。利用该菌株中青霉素的主要生物合成途径, 荷兰帝斯曼(DSM)公司的科研人员将产黄头孢霉中的扩环酶(CefE)和假单胞菌中编码酰基转移酶(AT)的编码基因转入青霉素的产生菌产黄青霉(图 3A), 在添加己二酸盐的条件下培养, 该菌株可以以较高效率通过一步发酵产生己二酰化-7-氨基-3-去乙酰氧基头孢烷酸(ad-7-ADCA)<sup>[23]</sup>; 提取获得的 ad-7-ADCA 再经过两步体外酶催化转化头孢氨苄(Cephalexin, 先锋霉素 IV)。而如果要通过化学半合成实现相应的转化则需要 13 步, 因此, 这一合成生物学方法的应用显著降低了成本和能耗<sup>[24]</sup>。

氢化可的松(Hydrocortisone)是主要的肾上腺糖皮质激素, 也是合成其他甾体激素的重要中间体, 市场需求量非常大, 其化学全合成是 1952 年完成的, 需要 40 步反应。现在合成氢化可的松的生产大多采用提取的甾体类天然产物经化学半合成获得(需要 9 步, 包括一些生物转化步骤)。2003 年, 法国、德国科学家与企业界合作, 采用合成生物学的思路

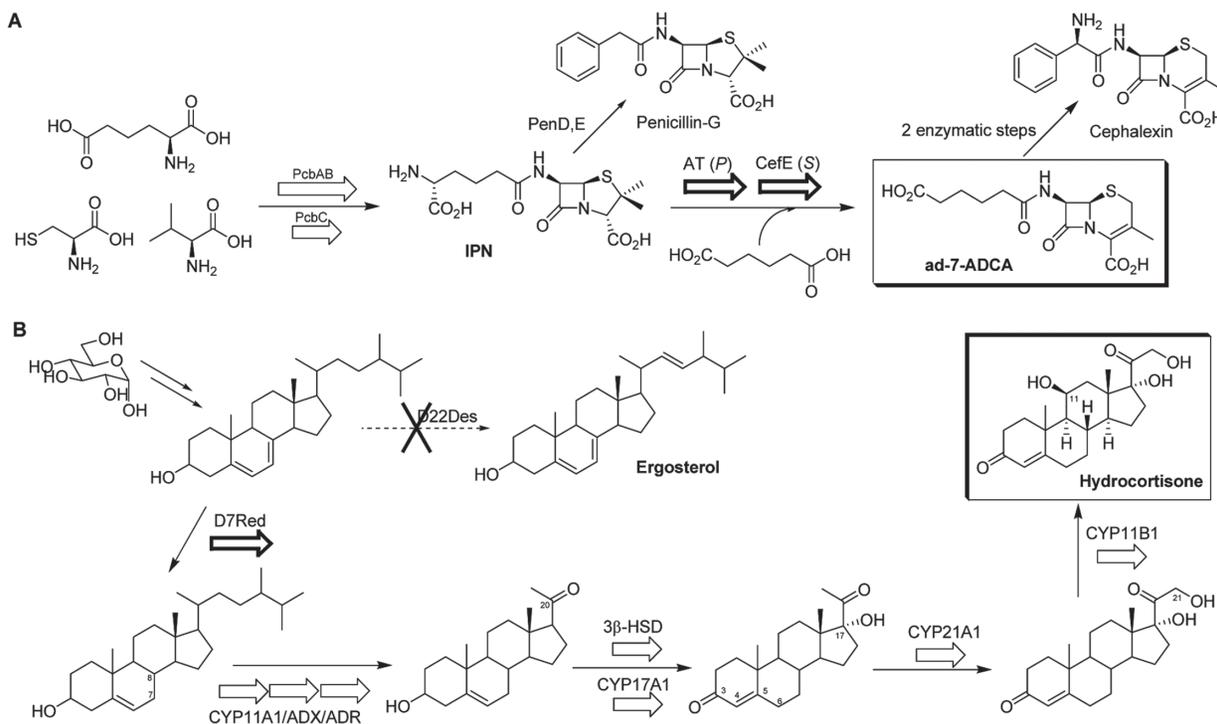
和方法首次在酵母中实现了氢化可的松的发酵全合成<sup>[25-26]</sup>。酵母本身可以以葡萄糖等简单的含碳化合物为原料合成胆固醇类似物麦角甾醇(Ergosterol)。他们首先阻断麦角甾醇的合成途径, 通过表达植物来源的 $\Delta 7$ -甾醇还原酶( $\Delta 7$ -Red)将酵母内源性固醇合成重新定向, 以合成与哺乳动物细胞合成的固醇类似的分子, 这种分子可以作为整合后的外源性酶的底物。通过表达哺乳动物来源的细胞色素P450边链裂解酶(CYP11A1)、相关电子传递体系(ADX/ADR)、 $3\beta$ -羟基类固醇脱氢酶( $3\beta$ -HSD)、 $17\alpha$ -类固醇羟化酶(CYP17A1)、 $21$ -类固醇羟化酶(CYP21A1)及 $11\beta$ -类固醇羟化酶(CYP11B1)等7个蛋白催化由甾醇到氢化可的松的转化(图3B)。转化过程中两个不必要的侧链反应(孕烯醇酮的酯化反应和 $17$ 羟孕酮的酮还原反应)被去除(负责这两个反应的酵母内源性基因被失活)。改造后的重组酵母工程菌通过简单原料发酵生产药物氢化可的松, 可以大大降低生产成本, 有可能取代该药物的化学合成。

### 2.3 通过生物合成基因/簇的重组在异源宿主中构建生物合成途径

植物来源的天然产物也一直是被关注的重点之

一, 如著名的抗癌药物青蒿素、抗肿瘤药物紫杉醇、喜树碱等。对于此类结构复杂、含量较低的天然产物药物在某种程度上存在一定的来源与环境协调问题, 特别是当需求量巨大而野生资源却远远不能满足世界范围内日益增长的需求时, 这一问题将尤其突出。同时, 作为天然产物的一个重要来源, 海洋天然产物一直是药物化学家关注的重点之一, 如一种来源于僧帽芋螺(*Conus magus*)的毒素肽Ziconotide和一种来源于加勒比海鞘(*Ecteinascidia turbinata*)的生物碱Trabectedin分别于2004年和2007年被批准上市, 作为真正来源于海洋天然产物的镇痛和抗肿瘤新药<sup>[27]</sup>。近年来, 随着新结构活性化合物需求的增加和常规微生物来源新化合物的减少, 使得人们进一步拓宽筛选来源, 如海洋放线菌及寄生、共生菌等<sup>[28]</sup>。然而, 发展海洋天然产物或特殊来源微生物(如寄生、共生等)药物面临的一个瓶颈是来源问题: 即使化合物活性很好, 可以作为药物使用, 但如何持续供应大量的化合物是必须解决的现实问题。

如果将上文提及的两种合成生物学策略对于天然产物类药物的推动理解为“锦上添花”, 那么对于解决来源稀缺的复杂天然产物类药物的供应问题



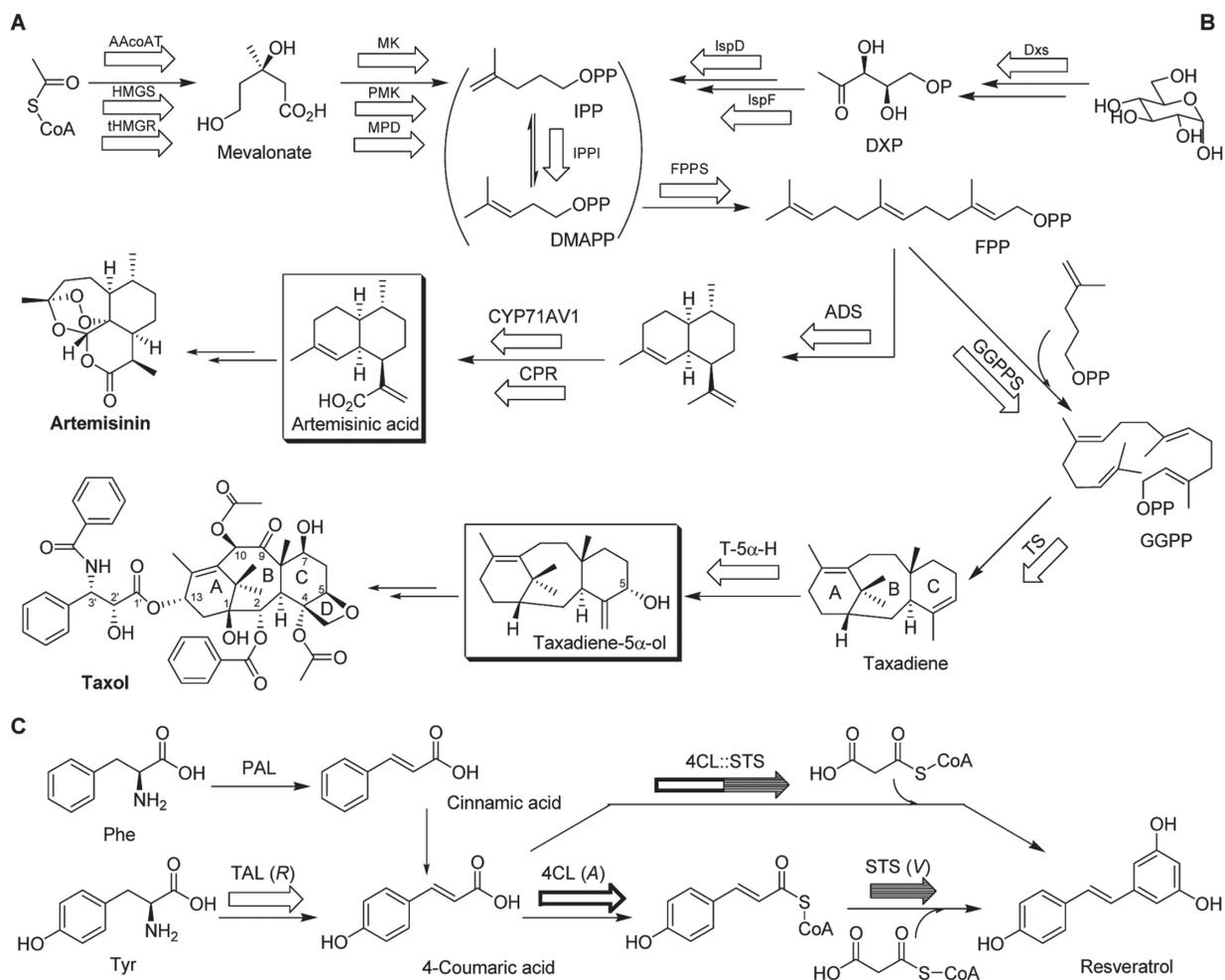
A: 在青霉素生产菌种产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)中构建头孢氨苄(Cephalexin)的前体7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(ad-7-ADCA)的合成途径; B: 在酵母中实现氢化可的松(Hydrocortisone)的生产。

图3 利用宿主菌部分生物合成途径通过合成生物学策略产生天然产物类药物

合成生物学则完全是“雪中送炭”。为了解决环境和来源问题并进一步降低成本,对于青蒿素这一重要的植物来源的抗疟药,Keasling 教授多年来一直致力于其合成生物学研究,希望通过微生物发酵来生产<sup>[6]</sup>。他们首先将来源于酵母的甲羟戊酸类异戊二烯 (mevalonate isoprenoid) 途径和合成的紫穗槐二烯 (amorphaadiene) 合成酶基因 *ADS* 重组入大肠杆菌,可以产生萜类化合物紫穗槐二烯<sup>[29]</sup>。同理,将紫穗槐二烯合成酶基因 *ADS* 和一个编码细胞色素 P450 氧化酶的基因 *CYP71AV1/CPR* 重组入酵母,同时通过强化限速步、阻塞代谢支路等代谢工程方法使得重组酵母菌以 100 mg/L 的产量产生青蒿素的前体青蒿酸 (图 4A)<sup>[30]</sup>。随着基因工程技术和现代分子生物学的飞速发展,通过生物学家、化学家和工程师学家的共同努力,利用生物发酵法生产青蒿素的商

业化将成为现实,从而有可能从根本上解决青蒿素原料不足的状况。

紫杉醇 (Taxol) 是从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 树皮中分离得到具有萜类环状结构的复杂天然产物,是迄今世界上最主要、最畅销的抗癌药。由于紫杉醇在植物体内的含量相当低 (目前公认含量最高的短叶红豆杉树皮中也仅有 0.069%), 加之红豆杉本身资源很贫乏,且红豆杉属植物生长缓慢,对紫杉醇的开发利用造成了很大的困难。化学合成尽管已经完成,但由于产量低,费用高,不具有商业意义。目前的临床药物主要是通过植物中提取相对含量较高的前体巴可亭 (Baccatin)III 或 10- 去乙酰巴可亭 III 经化学半合成制备的,但其主要合成原料必须从紫杉树中分离得到,这种基于植物的加工过程非常困难而且费时,因此,紫杉醇仍然十分昂



**A:** 在酵母中构建的青蒿素前体青蒿酸 (Artemisinic acid) 的生物合成途径; **B:** 在大肠杆菌中构建的紫杉醇前体 5α-羟基紫杉二烯 (Taxadiene-5α-ol) 的生物合成途径; **C:** 在酵母或大肠杆菌中构建白藜芦醇 (Resveratrol) 的生物合成途径。

**图4 通过代谢途径的重新组装在异源宿主中构建天然产物药物或前体的生物合成途径**

贵。如果能够通过微生物发酵实现紫衫醇的大量供应则将具有无比的优越性。最近,美国科学家根据紫衫醇生物合成通路中两个最先的步骤,采用合成生物学的策略在大肠杆菌中设计、构建了紫衫醇前体 5 $\alpha$ -羟基紫杉二烯(Taxadiene-5 $\alpha$ -ol)的生物合成途径(图 4B)<sup>[31]</sup>。通过仔细优化大肠杆菌中与前体 IPP 和 DMAPP 合成相关的几个关键酶的表达水平和活性增加前体供应;通过优化两个太平洋红豆杉(*Pacific yew*)来源的编码 GGPP 合成酶(GGPPS)和紫杉二烯合成酶(TS)基因的密码子并删去了前导肽;通过改变启动子强弱、质粒拷贝数和表型筛选等系统平衡上下游使得紫杉二烯的产量大大提高(达到 1 g/L)。随后,一个来源于红豆杉、经过改造后在大肠杆菌中具有紫杉二烯 5 $\alpha$ -羟基化活性的嵌合酶导入上述工程菌,通过发酵可以以 60 mg/L 的产量产生 5 $\alpha$ -羟基紫杉二烯<sup>[31-32]</sup>。这无疑是一个巨大的进步,为人们找到廉价有效的制造紫衫醇的方法带来了曙光,也为解决类似复杂天然产物药物的来源问题提供了思路。

20 世纪 80 年代,世界卫生组织调查发现,尽管法国人偏爱奶酪等高脂肪食物,但冠心病发病率和死亡率低于其他西方国家,其原因可能是与法国人常饮含白藜芦醇(Resveratrol)的葡萄酒有关。作为一种植物来源的天然抗氧化剂,白藜芦醇具有抗癌、保护心血管、抗菌、抗炎、抗自由基等多种生理效应,特别是近年来其抗衰老机制的发现和阐明<sup>[33-36]</sup>使得白藜芦醇市场需求与日剧增,被广泛应用于食品、医药、保健品、化妆品等领域。在广阔的需求推动下,自然提取的低收率、环境和生态压力日益显现,人们渴望通过合成生物学的策略实现微生物发酵大量生产这一天然产物。研究表明:白藜芦醇的生物合成首先起始于苯丙氨酸(Phe),Phe 在苯丙氨酸氨解酶(PAL)的催化下脱氨产生桂皮酸(Cinnamic acid),随后被羟基化产生 4-香豆酸(4-Coumaric acid),然后在辅酶连接酶(4CL)的催化下生成芪类合成酶(STS)所需的起始单元,在 STS 催化下与三分子丙二酰单酰辅酶 A 发生克莱森(Claissen)缩合生成终产物。自然界中也存在一类酪氨酸氨解酶(TAL)可以催化酪氨酸(Tyr)脱氨直接产生 4-香豆酸(图 4C)。于是人们将球型红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)来源的 TAL 编码基因、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的 4CL 编码基因和葡萄(*Vitis vinifera*)来源的 STS 编码基因转入酵母,发酵产物中可以检测到

白藜芦醇的生成;随后人们发现当将 4CL 基因和 TAL 基因融合在一起构建融合蛋白时,催化效率明显提升(图 4C)<sup>[37]</sup>。随后采用类似的策略也实现了通过大肠杆菌作为异源宿主经发酵生成白藜芦醇及其类似物<sup>[38]</sup>。

#### 2.4 设计的生物合成途径

天然产物类药物的合成生物学最高层次是根据化合物的结构需要,在工程学思想的指导下,根据化学原理,完全通过设计并构建新的生物合成元件或组件(Parts)和设备(Devices),进而从头设计并构建新的生物合成途径(Pathway)和系统(Systems),并在改造好的高效微生物宿主中实现单一目标化合物的生物全合成<sup>[39-41]</sup>。这是一种理想状态,或者说是将来的发展方向。但天然产物类药物大多比较复杂(有的甚至需要几十步酶催化反应),局限于人们对天然产物生物合成知识的理解和微生物代谢调控的认识还比较有限,目前的天然产物类药物的合成生物学研究还大多处于上述三个方面。而对于目标化合物比较简单、酶反应不太复杂的生物燃料则发展得相对较为迅速并取得了初步成果<sup>[42-44]</sup>。但不同背景、不同学科科学家也在不同的侧面和方向为了这一更高层次而努力,并取得了初步进展,如新功能酶的设计成功<sup>[45]</sup>;为了实现目标化合物的高效合成而设计的控制代谢流的人工蛋白支架用于代谢途径中相关几个酶的组装<sup>[46-47]</sup>;相应于化学全合成中反合成分析理论的“反生物合成分析”<sup>[48]</sup>和计算机信息指导的生物合成路线设计<sup>[49]</sup>等。

综上所述,天然产物类药物的合成生物学研究是有有机合成化学的思想借助生物体的延伸,不是以创造人造生命为目的的“全合成生物学”;而是通过设计、重构目标化合物的高效生物合成途径,借助改造后宿主的大部分或全部基础代谢通过发酵生产目标化合物的“半合成生物学”,可以有效地弥补有机合成化学在复杂天然产物类药物生产方面的不足,为来源稀缺的复杂天然产物类药物的发现和开发提供持续、稳定、经济的原料供给。

### 3 结语和展望

有机化学经过一百多年的发展,化学家可以合成任何自然界存在的(甚至理论存在的)复杂分子。人们甚至可以根据需要设计多条合成路线,任何一步反应和一个化学键的形成均有若干的方法可以选择。天然产物的生物合成也是一个从简单的小分子前体到终产物形成的多步骤反应,每一步反应都有

特定的酶催化。虽然经过二十多年的发展,但目前人们对于天然产物的生物合成的理解还处于初级阶段。自然界存在许多天然产物,其中的很多结构单元依靠现有生物化学知识人们还无法推测其生物合成途径,更不要说设计其生物合成路线。因此,对含有独特化学结构和生物活性的天然产物进行生物合成研究,增加对于天然产物生物合成酶学机制的理解将在很大程度上为合成生物学提供知识、材料和方法。另外,随着来源广泛的大量天然产物生物合成基因簇的克隆和测序,在合适的异源宿主内表达生物合成基因簇和建立异源操作平台也为合成生物学提供有力的工具。同时,优良的宿主、合适的载体及启动子、多基因的协同优化表达、细胞的代谢平衡及产物耐受性等是需要解决的基本问题。另外,为各种生物装置设定一种可靠的标准以便于描述、加工或信息共享对于合理有效的合成生物学设计是很有帮助的。随着生命科学的发展,我们有理由相信合成生物学能够在创造新型微生物、生产新型生物能源材料和天然产物类药物等方面提供稳定、经济、持久的途径。人们也渴望能够像有机合成化学一样,根据需要设计、重组、构建并优化新的生物合成途径,利用微生物为细胞工厂,产生自然界来源受限的包括复杂天然产物类药物在内的有用物质。

#### [参 考 文 献]

- [1] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Nat Prod Rep*, 2007, 70(3): 461-77
- [2] Newman DJ. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery. *J Med Chem*, 2008, 51(9): 2589-99
- [3] Nussbaum F, Brands M, Hinzen B, et al. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(31): 5072-129
- [4] Noyori R. Synthesizing our future. *Nat Chem*, 2009, 1(1): 5-6
- [5] Nicolaou KC, Vourloumis D, Winssinger N, et al. The art and science of total synthesis at the dawn of the twenty-first century. *Angew Chem Int Ed*, 2000, 39(1): 44-122
- [6] Chang MCY, Keasling JD. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(12): 674-81
- [7] Yeh BJ, Lim WA. Synthetic biology: lessons from the history of synthetic organic chemistry. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(9): 521-5
- [8] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(1): 64-76
- [9] Jones Prather KL, Martin C. *De novo* biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Curr Opin Biotechnol*, 2008, 19(5): 468-74
- [10] Galm U, Shen B. Expression of biosynthetic gene clusters in heterologous hosts for natural product production and combinatorial biosynthesis. *Expert Opin Drug Discov*, 2006, 1(5): 409-37
- [11] Nicolaou KC, Roschangar F, Vourloumis D. Chemical biology of epothilones. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37(15): 2014-45
- [12] Tang L, Shah S, Chung L, et al. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science*, 2000, 287(5453): 640-2
- [13] Lau J, Frykman S, Regentin R, et al. Optimizing the heterologous production of epothilones D in *Myxococcus xanthus*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78(3): 280-8
- [14] Mutka SC, Carney JR, Liu Y, et al. Heterologous production of epothilones C and D in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2006, 45(4): 1321-30
- [15] Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, et al. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, 2001, 291(5509): 1790-2
- [16] Zhang H, Wang Y, Wu J, et al. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host. *Chem Biol*, 2010, 17(11): 1232-40
- [17] Baltz RH. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(8): 759-72
- [18] Li C, Hazzard C, Florova G, et al. High titer production of tetracenomycins by heterologous expression of the pathway in a *Streptomyces cinnamonensis* industrial monensin producer strain. *Metabolic Eng*, 2009, 11(3): 319-27
- [19] Komatsu M, Uchiyama T, Ōmura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(6): 2646-51
- [20] Liu H, Jiang H, Haltli B, et al. Rapid cloning and heterologous expression of the meridamycin biosynthetic gene cluster using a versatile *Escherichia coli-Streptomyces* artificial chromosome vector, pSBAC. *J Nat Prod*, 2009, 72(3): 389-95
- [21] Wenzel SC, Gross F, Zhang Y, et al. Heterologous expression of a *Myxobacterial* natural products assembly line in *Pseudomonads* via Red/ET recombineering. *Chem Biol*, 2005, 12(3): 249-56
- [22] Zhang H, Boghigian BA, Armando J, et al. Methods and options for the heterologous production of complex natural products. *Nat Prod Rep*, 2010, 28(1): 125-51
- [23] Thykaer J, Nielsen J. Metabolic engineering of  $\beta$ -lactam production. *Metabolic Eng*, 2003, 5(1): 56-69
- [24] Singh R. Facts, growth, and opportunities in industrial biotechnology. *Org Process Res Dev*, 2011, 15(1): 175-9
- [25] Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(2): 143-9
- [26] Kelly D, Kelly S. Rewiring yeast for drug synthesis. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(2): 133-4

- [27] Li JWH, Vederas JC. Drug discovery and natural product: end of an era or an endless frontier? *Science*, 2009, 325(5937): 161-5
- [28] Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep*, 2004, 21(4): 519-38
- [29] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796-802
- [30] Ro D-K, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-3
- [31] Ajikumar PK, Xiao W-H, Tyo KEJ, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70-4
- [32] Liu T, Khosla C. A balancing act for taxol precursor pathway in *E. coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 44-5
- [33] Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 2003, 425(6954): 191-6
- [34] Wood JG, Rogina B, Lavu S, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 2004, 430(7000): 686-9
- [35] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 2006, 444(7117): 337-42
- [36] Milne JC, Lambert PD, Schenk S, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 2007, 450(7170): 712-6
- [37] Zhang Y, Li SZ, Li J, et al. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(40): 13030-1
- [38] Katsuyama Y, Funa N, Miyahisa I, et al. Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem Biol*, 2007, 14(6): 613-21
- [39] Leonard E, Nielsen D, Solomon K, et al. Engineering microbes with synthetic biology frameworks. *Trend Biotechnol*, 2008, 26(12): 674-81
- [40] Canton B, Labno A, Endy D. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 787-93
- [41] Martin CH, Nielsen DR, Solomon KV, et al. Synthetic metabolism: engineering biology at the protein and pathway scales. *Chem Biol*, 2009, 16(3): 277-86
- [42] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451(7174): 86-90
- [43] Zhang K, Sawaya MR, Eisenberg DS, et al. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20653-8
- [44] Bond-Watts BB, Bellerose RJ, Chang MCY. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(4): 222-7
- [45] Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, et al. *De novo* computational design of retro-aldol enzymes. *Science*, 2008, 319(5868): 1387-91
- [46] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753-9
- [47] Delisa MP, Conrado RJ. Synthetic metabolic pipelines. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 728-9
- [48] Bachmann BO. Biosynthesis: is it time to go retro? *Nat Chem Biol*, 2010, 6(6): 390-3
- [49] Bayer TS. Transforming biosynthesis into an information science. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(12): 859-61