

· 综述 ·

# 化学表观遗传修饰方法在真菌次级代谢产物研究中的应用<sup>△</sup>

张伟, 陈敏, 邵长伦, 王长云\*

(中国海洋大学 海洋药物教育部重点实验室, 医药学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 真菌产生的次级代谢产物是新药开发的重要资源, 其生物合成过程受到众多因素的调控。化学表观遗传操作是利用小分子化学物质抑制真菌中影响表观遗传的酶类, 激活沉默的生物合成基因, 诱导真菌产生未知的次级代谢产物。化学表观遗传修饰已成为 1 种简单有效的发现结构新颖的活性次级代谢产物的新方法。本文综述了化学表观遗传修饰调控真菌次级代谢产物的研究进展, 并对该方法用于海洋来源真菌次级代谢产物的研究进行了展望。

**关键词:** 真菌; 次级代谢调控; 化学表观遗传修饰; 沉默基因

中图分类号: R931 文献标志码: A 文章编号: 1002-3461(2014)05-083-09

DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2014.05.013

## The application of chemical epigenetic modification method in the research of secondary metabolites from fungi

ZHANG Wei, CHEN Min, SHAO Chang-lun, WANG Chang-yun\*

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry Education of China, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Fungi have proven to be the significant resources for development of new drugs. The biosynthesis of secondary metabolites in fungi is regulated by various factors. Chemical epigenetic manipulation is an approach that chemical small molecules are introduced to inhibit the fungal enzymes which influence the epigenetics. This method can activate the silence genes in fungi for the purpose of gaining access to hitherto unknown secondary metabolites. Therefore, chemical epigenetic modification has become a new method to obtain structurally novel and biologically active natural products simply and effectively. In this paper, the applications of chemical epigenetic modification method in the research of secondary metabolites from fungi were reviewed. And the perspective for the study on secondary metabolites from marine-derived fungi by this method was also prospected.

**Key words:** fungi; secondary metabolite regulation; chemical epigenetic modification; silence gene

全基因组测序工程研究发现真菌中存在大量能编码的化合物的数量远大于目前从中分离得到的编码化合物的基因, 某些物种拥有的这些基因所 的化合物数量<sup>[1-3]</sup>。微生物次级代谢产物的生物

<sup>△</sup>基金项目: 国家自然科学基金 (81172977; 41322037) 资助

作者简介: 张伟 (1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋天然产物化学。

\* 通讯作者: 王长云 (1965-), 男, 教授、博士生导师, 研究方向: 海洋药用生物资源中药物先导化合物的发现。E-mail: changyun@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-04-28

合成过程受到众多因素的调控。研究发现,微生物的许多基因在实验室培养条件下处于沉默状态<sup>[2]</sup>。因此,微生物沉默基因的表达以及新的代谢产物的发现已成为天然产物研究的热点和难点<sup>[4]</sup>。通过改变培养方式、分子水平的基因操作<sup>[5]</sup>和化学表观遗传修饰等方法<sup>[6]</sup>,可激活微生物沉默基因,从而表达新的次级代谢产物。但是,依赖于培养方式变化来影响次级代谢的方法存在一些问题,如大规模筛选导致工作强度的加大,效率的降低,实验预期的非定向性以及较差的可重复性。而分子水平的基因操作尽管具有广阔的发展前景,但仍存在一些有待解决的问题,如高效遗传操作系统的缺乏,目的基因定位与克隆的准确性差,基因转化效率普遍较低,以及宿主细胞的不兼容性等<sup>[6]</sup>。鉴于上述原因,近年来化学表观遗传修饰方法被引入到微生物沉默基因调控研究中。研究表明,在丝状真菌的表观遗传现象中,染色体状态的变化能够激活沉默基因的表达,从而影响真菌次级代谢产物的生物合成<sup>[7-8]</sup>。

组蛋白的乙酰化和去乙酰化可以影响染色体的状态。乙酰化由组蛋白乙酰基转移酶(HAT)催化,去乙酰化由组蛋白去乙酰化酶(HDAC)催化,组蛋白依靠这2种酶来维持乙酰化的水平<sup>[9-10]</sup>。正常情况下,由于组蛋白去乙酰化酶的作用,组蛋白赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基上乙酰化水平很低,赖氨酸残基上的氨基存在质子化现象,使得组蛋白带正电荷,与带负电荷的DNA因静电效应而紧密结合,当乙酰基转移酶将乙酰基转移到赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基上时,氨基上的正电荷被消除, DNA分子由于本身的负电荷使核小体结构变得松弛,利于转录因子及协同转录因子与DNA分子的接触,因此可以激活特定基因的转录过程<sup>[11-13]</sup>。

DNA的甲基化也可以影响染色体的状态。DNA甲基化是由S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体在DNA甲基转移酶(DNMTs)的作用下,将DNA链上CpG二核苷酸中胞嘧啶的5位碳甲基化,成为5-甲基胞嘧啶<sup>[14]</sup>。这一变化直接干扰了转录因子与基因启动子中特异识别位点的结合,同时由于胞嘧啶5位引入了甲基使分子结构发生了变化,DNA与蛋白质的结合也随之发生变化,引起基因转录的抑制,最终导致基因沉默<sup>[13,15]</sup>。

Cichewicz等最早提出设想运用外源的小分

子化学物质来抑制真菌中影响表观遗传的酶类从而达到影响代谢产物的效果<sup>[6]</sup>。目前已有化学表观遗传修饰方法应用于真菌次级代谢产物研究的相关报道,已有报道主要集中在有限的昆虫内生真菌和植物内生真菌的应用中。在海洋来源真菌次级代谢产物研究中的应用也有成功的报道。本文对化学表观遗传修饰在真菌次级代谢产物研究中的应用进行综述,以期将为化学表观遗传修饰的方法应用于海洋真菌次级代谢产物研究提供参考。

运用化学表观遗传操作对真菌次级代谢产物进行研究时,主要用到2类抑制剂:一类是组蛋白去乙酰化酶抑制剂,包括辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)、辛二酰二异羟肟酸(suberoylbis-hydroxamic acid, SBHA)、烟酰胺(nicotinamide)和丁酸钠(sodium butyrate)等,能够结合到组蛋白去乙酰化酶的活性位点,抑制该酶的活性,从而使组蛋白乙酰化水平升高,核小体结构松弛利于转录因子及协同转录因子与DNA分子的结合,提高转录水平激活沉默基因的表达<sup>[13,16]</sup>。另一类为DNA甲基化转移酶抑制剂,包括5-氮杂胞苷(5-azacytidine)、5-氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine)、RG-108和西奈芬净(sinefungin)等<sup>[17]</sup>,能够与DNA甲基化转移酶共价结合,竞争性抑制胞嘧啶与尿嘧啶的甲基化<sup>[18-19]</sup>,降低DNA分子的甲基化水平,增加基因中启动子与转录调控因子识别位点的特异性,从而激活基因的转录和表达<sup>[20]</sup>。下面分别就这两类化学表观遗传修饰剂在真菌次级代谢产物研究中的应用进行阐述。

## 1 组蛋白去乙酰化酶抑制剂在真菌次级代谢产物研究中的应用

国际上,Asai研究组运用化学表观遗传修饰调控真菌次级代谢产物的报道较多。该研究组在2011年将化学表观遗传修饰的方法分别应用于2株昆虫内生真菌*Torrubiella luteostrata*和*Cordyceps annullata*。将真菌*T. luteostrata*在含有组蛋白去乙酰化酶抑制剂SBHA(1 mmol/L)的培养基中培养,发酵产物指纹图谱分析发现,与不加抑制剂的对照组相比,添加组多出3个色谱峰,追踪分离获得3个结构新颖的色氨酸

异戊二烯类化合物 luteorides A - C (1~3), 以及 2 个已知化合物 terezine D (4) 和 paecilodepsipeptide A (5)<sup>[21]</sup> (见图 1)。其中 3 个新化合物均含有天然产物中罕见的脲基官能团。将真菌 *C. annullata* 在含 SBHA (500  $\mu\text{mol/L}$ ) 的培养基中培养, 发现与对照组相比, 菌株次级代谢产物种类明显变得丰富。从添加组粗浸膏中获得 4 个

新的二氢苯并咪唑类化合物 annullatins A - D (6~9) 和 1 个新的芳香聚酮类化合物 annullatin E (10)<sup>[22]</sup> (见图 1)。其中化合物 6 显示很强的大麻素 CB1 受体和 CB2 受体激动剂活性, 化合物 7 和 9 显示出 CB1 受体激动剂活性和 CB2 受体拮抗剂活性。

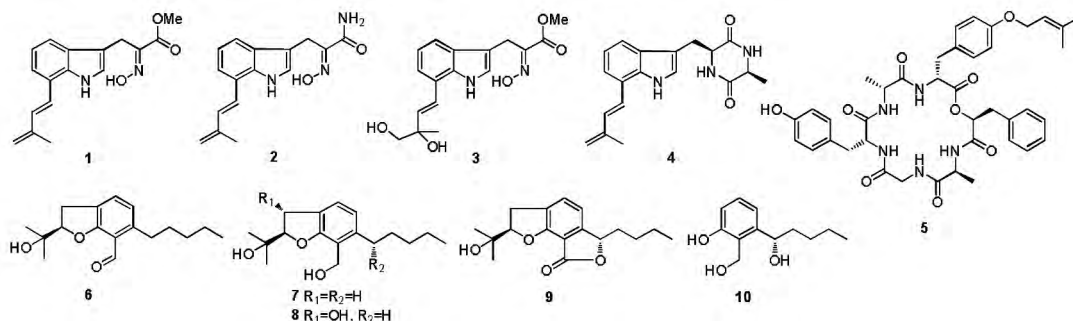


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1~10

2012 年, Asai 研究组又运用 1 mmol/L 的 SBHA 刺激 1 株昆虫内生真菌 *Cordyceps indigotica*, 从该菌的发酵培养液中分离获得 6 个骨架新颖的芳香聚酮类化合物 indigotides C - F (11~14), 13-hydroxyindigotide A (15) 和 8-O-methylindigotide B (17), 以及 2 个已知化合物 indigotide A (16) 和 B (18)<sup>[23]</sup> (见图 2)。其中新化合物 11~13 属于聚酮二聚体新骨架, 可能是通过 [4 + 2] 环加成或者 Michael 加成反应合成而来。同年, 该研究组分别运用 3 种不同组蛋白去乙酰

化酶抑制剂 (烟酰胺, sirtinol 和 splitomycin) 对 1 株真菌 *Chaetomium mollipilium* 进行培养, 发现在含有 100  $\mu\text{mol/L}$  烟酰胺的培养基中, 次级代谢产物最为丰富。继而从该粗提物中分离获得了 5 个骨架新颖的 13 碳链状聚酮类化合物 mollipilins A - E (19~23), 此外还获得 2 个已知化合物 mollipilin F (24) 和 (-)-aureonitol (25)<sup>[24]</sup> (见图 2)。其中化合物 19 和 20 对 HCT-116 细胞显示中等强度的生长抑制活性,  $\text{GI}_{50}$  分别为 1.8  $\mu\text{mol/L}$  和 3.7  $\mu\text{mol/L}$ 。

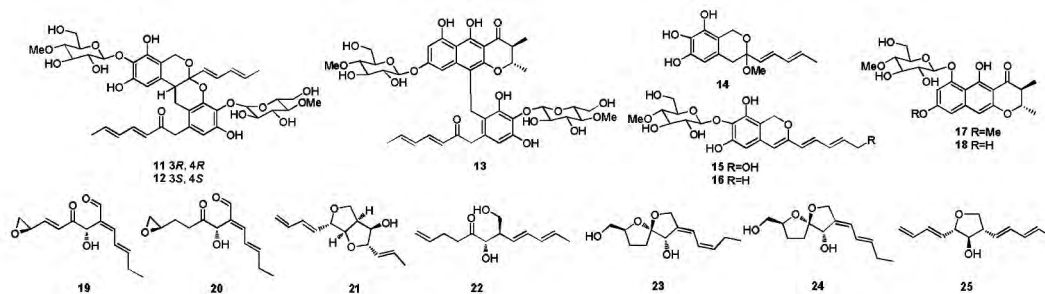


图 2 化合物 11~25 的结构

Fig. 2 Structures of compounds 11~25

Asai 研究组除将化学表观遗传修饰法运用于昆虫内生真菌次级代谢产物的研究外, 还将该方法运用于植物内生真菌次级代谢产物的研究中。2013 年, 该研究组用含有 10  $\mu\text{mol/L}$  烟酰胺的培

培养基发酵 1 株来源于芍药 *Paeonia lactiflora* 叶片的真菌 *Graphiopsis chlorocephala*, HPLC 分析发现添加组次级代谢产物的丰富程度相比对照组明显提高。从添加组中分离获得一系列骨架新颖

的二苯甲酮类化合物 cephalanones A - F (26~31)和1个已知化合物 2-(2,6-dihydroxy-4-methylbenzoyl)-6-hydroxybenzoic acid (32)<sup>[25]</sup> (见图3)。2013年, Asai 研究组发现, 当丝状真菌 *Chaetomium indicum* 在添加有 500  $\mu\text{mol/L}$  SBHA 的培养基中发酵, 能产生一系列新的 chaetophenols 类化合物<sup>[26]</sup>, 其中化合物 chaetophenols C - E (35~37)具有新颖的多环骨架。此外还发

现参与 chaetophenols 类化合物合成的 2 个基因 (*pksCH-1* 和 *pksCH-2*)的表达与组蛋白乙酰化水平的高低密切相关。同年, 该研究组再次将该菌用含 500  $\mu\text{mol/L}$  SBHA 的培养基大规模发酵, 除获得上述的 chaetophenols 类化合物外, 还发现了 2 个少量的骨架新颖的螺内酯类聚酮化合物 spiroindicumides A 和 B(39, 40)<sup>[27]</sup> (见图3)。

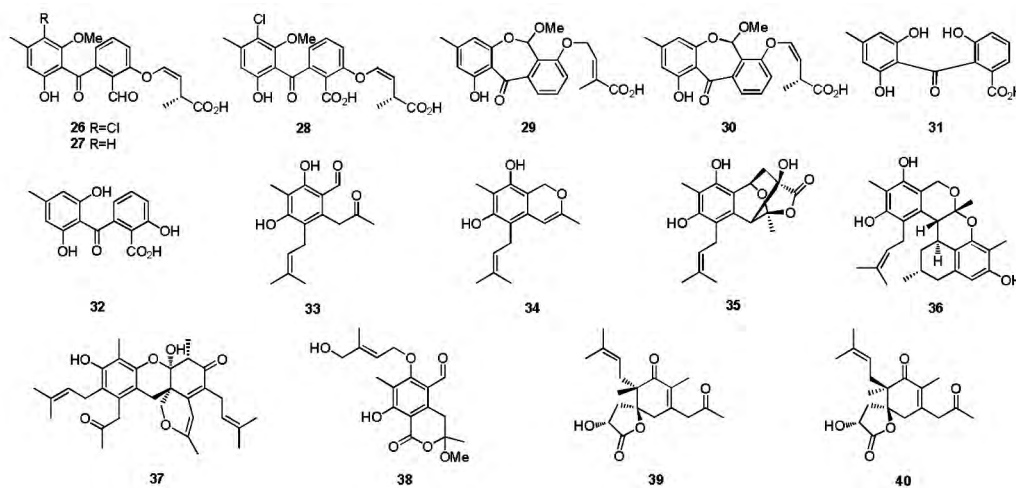


图3 化合物 26~40 的结构

Fig. 3 Structures of compounds 26~40

2009年, Henrikson 等将 1 株来源于土壤的黑曲霉 *Aspergillus niger* 在含有 10  $\mu\text{mol/L}$  SAHA 的半固体培养基中培养, 得到 1 个具有 1-苯基吡啶-4-酮母核的新化合物 nygerone A (41)<sup>[28]</sup> (见图4)。2011年, Vervoort 等用 SAHA 刺激 1 株海洋沉积物来源真菌 *Microascus* sp.。当 SAHA 的量为  $10^{-4}$  mol/L 时, 从中分离发现 1 个由混源生物合成途径产生的骨架新颖的环缩酚酸肽 EGM-556 (42)<sup>[29]</sup> (见图4)。该化合物的生物合成一部分经过 NRPS 途径另一部分经过 PKS 途径。该研究是运用化学表观遗传修饰激活沉默基因获得混源途径来源天然产物的 1 个范例。2012年, Beau 等为了提高红树林来源真菌 *Leucostoma persoonii* 次级代谢产物 cytosporones B - E (43, 45, 46) 的产量, 用加入丁酸钠的培养基来发酵培养, 化合物 cytosporones B - E 的产量明显提高, 同时在发酵产物中还分离得到了 1 个新化合物 cytosporone R (44)<sup>[30]</sup> (见图4), 以 1 对外消旋对映体的形式存在。化合物 46 显示了良好的生物活性, 对疟原虫 *Plasmodium falciparum* 的  $\text{IC}_{90}$

为 13  $\mu\text{mol/L}$ , 而对细胞 A549 的细胞毒活性  $\text{IC}_{90}$  为 437  $\mu\text{mol/L}$ , 表明化合物 46 属于高效低毒类化合物。该化合物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 也有较好的抗菌活性, 最小抑制浓度为 75  $\mu\text{mol/L}$ 。2013年, Chung 等用含有 0.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> SAHA 的天然培养基发酵 1 株丝状真菌 *Beauveria feline*, 指纹图谱分析发现比对照组多出 4 个色谱峰, 追踪分离获得一系列环缩酚酸类化合物, 包括 3 个新化合物 desmethylisaridin E (47), desmethylisaridin C2 (49) 和 isaridin F (51), 以及 5 个已知化合物<sup>[31]</sup> (见图4)。化合物 51 含有在天然多肽中罕见的 N-甲基丁氨酸片段。活性测试显示, 化合物 47 能够抑制超氧化物阴离子的产生 ( $\text{IC}_{50} = 10.00 \pm 0.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 化合物 49 能够阻止弹性蛋白酶的释放 ( $\text{IC}_{50} = 10.01 \pm 0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。化合物 47 和 49 均显示强的抗炎活性。2013年, Chen 等将 1 株分离自药用植物 *Datura stramonium* L 中的内生真菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. 在含有 500  $\mu\text{mol/L}$  SBHA 的土豆固体培养基中培养, 粗浸膏指纹图谱分析

与对照相比增加了 2 个色谱峰,分离鉴定发现 2 个新的镰孢菌酸类衍生物 5-butyl-6-oxo-1,6-dihydropyridine-2-carboxylic acid (**55**)和 5-(but-9-enyl)-6-oxo-1,6-dihydropyridine-2-carboxylic acid (**56**)<sup>[32]</sup>(见图 4)。同年,Yang 等运用含 2 种组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SBHA (500  $\mu\text{mol/L}$ )和烟酰胺 (50  $\mu\text{mol/L}$ )的土豆培养基来培养 1 株植物内生真菌 *Stagonospora nodorum*,从粗浸膏中分离获得 1 个结构新颖的丁酰基苯类化合物 (+)-4-methoxy-(2S)-methylbutyrophenone (**57**)和 2 个已知的聚酮化合物 alternariol (**58**)和 (-)-(3R)-mellein methyl ether (**59**)<sup>[33]</sup>(见图 4)。活性测试显示这 3 个化合物对真菌 *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus* 和 *Candida albi-*

*cans* 显示中等强度的抗菌活性。2014 年,Miao 等将 1 株分离自海藻 *Sargassum fusiforme* 组织中的曲霉真菌 *Aspergillus wentii* 在含有 20  $\mu\text{mol/L}$  SAHA 的固体土豆平板培养基中培养,分离获得 2 个新的芳香二萜类化合物 aspewentins A (**60**)、B(**61**)和 1 个已知的氧化衍生物 aspewentin C (**62**)<sup>[34]</sup>(见图 4)。活性测试显示,这 3 个化合物对海洋来源的浮游藻类及卤虫都显示强的生长抑制活性。化合物 **60** 对微藻 *Chattonella marina* 和 *Heterosigma akashiwo* 的  $\text{LC}_{50}$  分别为 0.81  $\mu\text{mol/L}$  和 2.88  $\mu\text{mol/L}$ ;化合物 **62** 对微藻 *Alexandrium* sp. 的  $\text{LC}_{50}$  为 8.73  $\mu\text{mol/L}$ ;化合物 **61** 对卤虫 *Artemia salina* 的  $\text{LC}_{50}$  为 6.36  $\mu\text{mol/L}$ 。

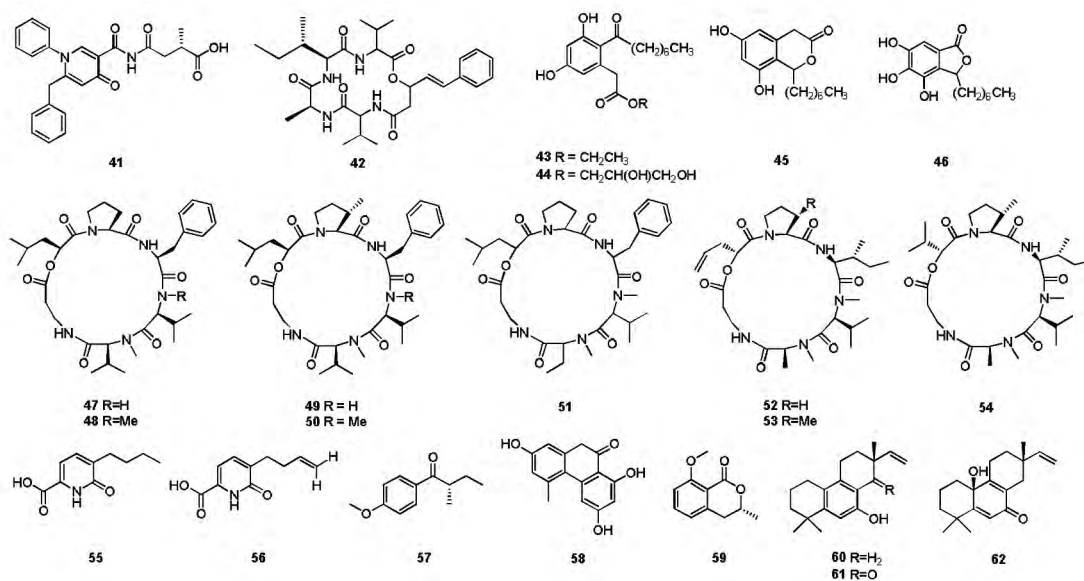


图 4 化合物 41~62 的结构

Fig. 4 Structures of compounds 41~62

## 2 DNA 甲基化转移酶抑制剂在真菌次级代谢产物研究中的应用

2010 年,Wang 等将 1 株分离自大西洋沿岸土壤中的真菌 *Penicillium citreonigrum* 在含有 5-氮杂胞苷 (50  $\mu\text{mol/L}$ )的大米培养基中培养,真菌表面的水珠颜色由原来的无色变为红色,分析发现次级代谢产物比对照组丰富。从添加组中分离获得 9 个化合物,包括 2 个新的 meroterpenes 类化合物 atlantinones A (**71**)和 B (**72**),6 个嗜氮酮类化合物 sclerotiorin (**63**), sclerotioramine (**64**), ochrephilone (**65**), dechloroisochromophilone III (**66**), dechloroisochromophilone IV

(**67**), 6-((3E, 5 E)-5, 7-dimethyl-2-methylenenona-3, 5-dienyl)-2, 4-dihydroxy-3-methylbenzaldehyde (**68**), pencolide (**69**)及其衍生物 **70**<sup>[35]</sup>(见图 5)。抗菌测试显示,化合物 **63** 和 **64** 对金黄色葡萄球菌 *S. epidermidis* 的生长显示中等强度的抑制作用。2011 年,Asai 研究组从昆虫内生真菌 *Cordyceps indigotica* 普通培养基中分离获得 1 个新的芳香聚酮糖苷类化合物 indigotide A (**73**),同时还得到了 5 个缩肽类化合物 destruxins A, A<sub>2</sub>, B, B<sub>2</sub>和 E (**75~79**)以及 1 个聚酮类化合物 NG-393 (**80**)。当用含有 100  $\mu\text{mol/L}$  5-氮杂胞苷的土豆液体培养基重新发酵该菌时,发现该菌在产生

上述化合物的同时,又产生了 1 个新的芳香聚酮糖 苜类化合物 indigotide B (74)<sup>[36]</sup>(见图 5)。

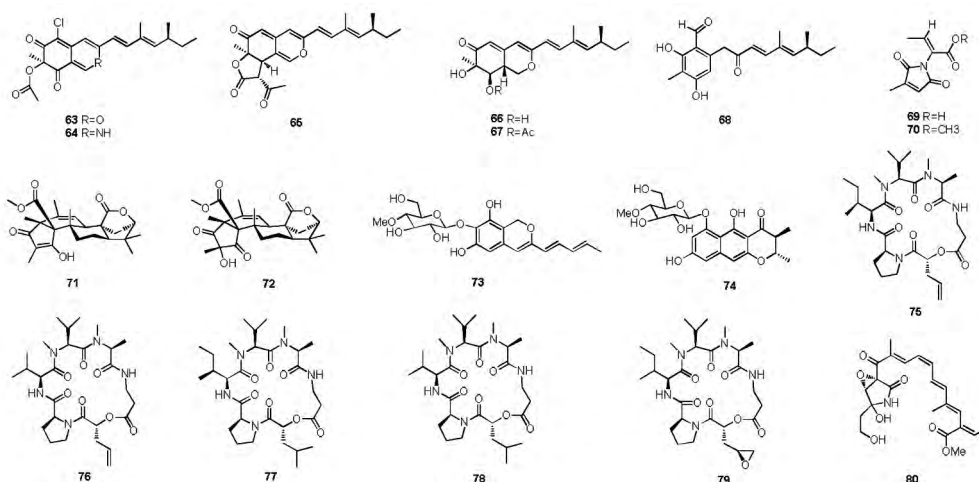


图 5 化合物 63~80 的结构

Fig. 5 Structures of compounds 63~80

2013 年, Chung 等发现 1 株来自海洋沉积物的黑曲霉 *Aspergillus sydowii* 在普通培养条件下的发酵产物经 HPLC 分析仅出现 2 个色谱峰。而该菌在培养过程中加入 100  $\mu\text{mol/L}$  5-氮杂胞苷时, 发酵产物经分离获得了 3 个新的没药烷倍半萜类化合物 (7S)-(+)-7-O-methylsydonol (81), (7S, 11S)-(+)-12-hydroxysydonic acid (82), 7-deoxy-7, 14-didehydrosydonol (85) 和 8 个已知化合物<sup>[37]</sup>(见图 6)。化合物 83 显示强的抗炎活性, 能够抑制超氧化物阴离子的产生 ( $\text{IC}_{50} = 5.23 \pm$

0.55  $\mu\text{mol/L}$ ), 阻止弹性蛋白酶的释放 ( $\text{IC}_{50} = 16.39 \pm 1.64 \mu\text{mol/L}$ ); 同时在脂肪细胞中具有促进葡萄糖降解和抑制脂肪积累的作用, 具有潜在的抗糖尿病作用。2014 年, Yang 等从植物 *Fragaria chiloensis* 叶片中分离得到 1 株内生真菌 *Pestalotiopsis crassiuscula*, 将该菌在含有 500 mmol/L 5-氮杂胞苷的土豆液体培养基中培养, 代谢产物与对照组相比明显增加, 经分离获得 1 个新的香豆素类化合物 coumarin (92) 和 6 个已知化合物(93~98)<sup>[38]</sup>(见图 6)。

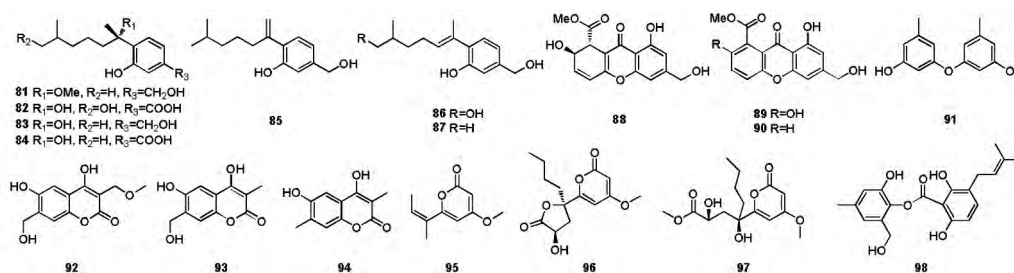


图 6 化合物 81~98 的结构

Fig. 6 Structures of compounds 81~98

### 3 两类抑制剂共同作用在真菌次级代谢产物研究中的应用

2012 年, Asai 研究组发现 1 株来源于昆虫的内生真菌 *Gibellul a formosana* 在普通培养条件下, 其发酵粗浸膏的指纹图谱几乎没有显示任何次级代谢产物。而将该菌在同时含有组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SBHA 和 DNA 甲基化转移酶抑制剂 RG-108 培养基中培养, 分离获得次级代谢产物

13 个, 包括 2 个新的高度氧化的麦角固醇 formosterols A (99) 和 B (101), 5 个新的 isariotin 类衍生物 12'-O-acetylisariotin A (102), 1-epi-isariotin A (105), isariotins K-M (110, 108, 109), 以及 6 个已知化合物 22, 23-epoxy-3, 12, 14, 16-tetrahydroxyergosta-5, 7-dien-11-one (named formosterol C) (101), isariotins A, C, E (103, 110, 107), TK-57-164A (104) 和 beauvericin

(111)<sup>[39]</sup>(见图 7)。其中化合物 99~101 中含有顺式的环氧化结构,在天然甾醇及三萜类化合物中非常少见。同年,该研究组同时将组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SBHA 和 DNA 转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷加入昆虫内生真菌 *Isaria tenuipes* 的培养

基中,从发酵液中分离获得 1 个骨架新颖的四元环螺酮缩醇化合物 tenuipyron (112),另外还得到了 2 个已知的 10 碳链聚酮化合物 cephalosporolides B (113)和 F (114)<sup>[40]</sup>(见图 7)。

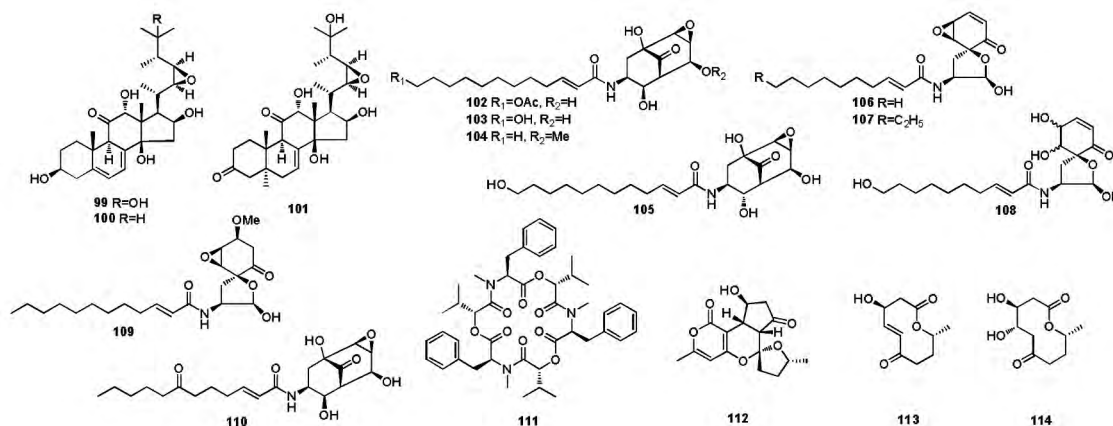


图 7 化合物 99~114 的结构

Fig. 7 Structures of compounds 99~114

2013 年, Yang 等将 1 株植物内生真菌 *Ustilago maydis* 在同时含有 500  $\mu\text{mol/L}$  SBHA 和 500  $\mu\text{mol/L}$  5-氮杂胞苷的土豆培养基中培养,粗浸膏的指纹图谱分析与对照组比较发现多出 2 个色谱峰,从中分离获得 1 个结构新颖的糖脂酸 glycolipid ustilagic acid C (115)和 1 个已知的糖脂酸 ustilagic acid B (116)<sup>[41]</sup>(见图 8)。化合物 115 和 116 显示中等强度的抗真菌活性,对真菌 *Aspergillus terreus* 和 *Candida albicans* 的 MIC 值在 50  $\mu\text{g/mL}$  到 100  $\mu\text{g/mL}$  范围之内。同年,该研究组将 1 株植物内生真菌 *Pestalotiopsis acaciae* 在含有 500  $\mu\text{mol/L}$  SBHA 和 500  $\mu\text{mol/L}$  5-

氮杂胞苷的土豆培养基中培养,发现次级代谢产物的种类增多且产量提高,分离鉴定获得 3 个新的芳香化合物 2'-hydroxy-6'-hydroxymethyl-4'-methylphenyl-2, 6-dihydroxy-3-(2-isopentenyl) benzoate(117), 4,6-dihydroxy-7-hydroxymethyl-3-methylcoumarin (118), 4,6-dihydroxy-3,7-dimethylcoumarin (119),以及 5 个已知的聚酮化合物 endocrocin (120), pestalotiollide B (121), pestalotiopyrone G (122), scirpyrone A (123)和 7-hydroxy-2-(2-hydroxypropyl)-5-methylchromone (124)<sup>[42]</sup>(见图 8)。

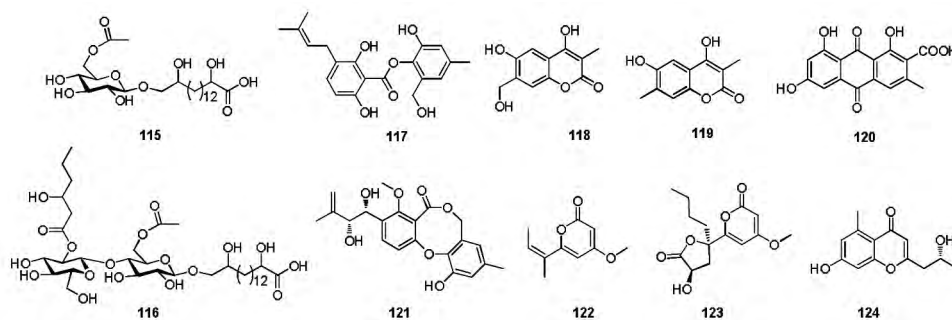


图 8 化合物 115~124 的结构

Fig. 8 Structures of compounds 115~124

#### 4 结语

上述研究充分表明,化学表观遗传修饰剂在调控真菌次级代谢产物的表达上具有重要的作用。化学表观遗传修饰在真菌次级代谢产物研究中具有很多的优点。首先,该方法为快速挖掘和获得真菌中潜在的次级代谢产物提供了一个有力的工具,提高了发现新化合物的机率;其次,该方法运用于天然产物研究,具有实验周期短、操作简单、成本低、效率高等特点,既可用于模式真菌又可对遗传背景不清楚的真菌进行修饰,不受实验条件的限制,在大多数实验室中都能实现,应用范围广阔。无可否认,化学表观遗传修饰对真菌次级代谢产物的改变具有不定向性,并且通过这种方法实现的表观遗传在真菌传代中很不稳定,重复性较差。作者认为,将基于分子水平的基因操作技术和表观遗传修饰方法结合起来可提高定向性和稳定性,即先使用小分子抑制剂来测试表观遗传修饰是否能影响次级代谢产物的生物合成,然后通过分子水平操作来定向改变表观遗传酶类的表达,稳定提高目的代谢产物的表达水平,从而获取新的化合物。尽管真菌的化学表观遗传修饰研究尚处于起始阶段,可喜的是,对海洋来源真菌的化学表观遗传修饰研究已有多项尝试,并取得了一定的进展。随着相关学科的相互渗透,化学表观遗传修饰在海洋来源真菌沉默基因的表达及新颖结构活性次级代谢产物的发现研究中将不断发展和完善,从而为海洋新药研究开发提供更多的先导结构。

#### 参考文献

- [1] Wilkinson B, Micklefield J. Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(7): 379-386.
- [2] Scherlach K, Hertweck C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms [J]. *Org Biomol Chem*, 2009, 7(9): 1753-1760.
- [3] Zerikly M, Challis G L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining [J]. *Chem Bio Chem*, 2009, 10(4): 625-633.
- [4] Chiang Y M, Chang S L, Oakley B R, et al. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(1): 137-147.
- [5] Gross H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2007, 75(2): 267-277.
- [6] Williams R B, Henrikson J C, Hoover A R, et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome [J]. *Org Biomol Chem*, 2008, 6(11): 1895-1897.
- [7] Bok J W, Noordermeer D, Kale S P, et al. Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans* [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(6): 1636-1645.
- [8] Shwab E K, Bok J W, Tribus M, et al. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(9): 1656-1664.
- [9] Trojer P, Brandtner E M, Brosch G, et al. Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(14): 3971-3981.
- [10] Brosch G, Loidl P, Graessle S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(3): 409-439.
- [11] Grewal S I S, Bonaduce M J, Klar A J S. Histone deacetylase homologs regulate epigenetic inheritance of transcriptional silencing and chromosome segregation in fission yeast [J]. *Genetics*, 1998, 150(2): 563-576.
- [12] Biel M, Wascholowski V, Giannis A. Epigenetics-an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44(21): 3186-3216.
- [13] Cole P A. Chemical probes for histone-modifying enzymes [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(10): 590-597.
- [14] Singal R, Ginder G D. DNA Methylation [J]. *Blood*, 1999, 93(12): 4059-4070.
- [15] Zhou Y, Cambareri E B, Kinsey J A. DNA methylation inhibits expression and transposition of the *Neurospora* Tad retrotransposon [J]. *Mol Genet Genomics*, 2001, 265(4): 748-754.
- [16] Takahashi J A, Teles A P C, Bracarense A A P, et al. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi [J]. *Phytochem Rev*, 2013, 12(4): 773-789.
- [17] Cichewicz R H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(1): 11-22.
- [18] Momparler R L. Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine [J]. *Pharmacol Ther* 1985, 30(3): 287-299.
- [19] Liacouras A S, Anderson E P. Uridine-cytidine kinase. IV. Kinetics of the competition between 5-azacytidine and the two natural substrates [J]. *Mol Pharmacol* 1979, 15(2): 331-340.
- [20] Cheng J C, Matsen C B, Gonzales F A, et al. Inhibition of DNA Methylation and reactivation of silenced genes by zebularine [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(5): 399-409.
- [21] Asai T, Yamamoto T, Oshima Y. Histone deacetylase in-



- hibitor induced the production of three novel prenylated tryptophan analogs in the entomopathogenic fungus, *Torrubielia luteorostrata* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2011, 52(52): 7042-7045.
- [22] Asai T, Luo D, Obara Y, et al. Dihydrobenzofurans as cannabinoid receptor ligands from *Cordyceps annullata*, an entomopathogenic fungus cultivated in the presence of an HDAC inhibitor [J]. *Tetrahedron Lett*, 2012, 53(17): 2239-2243.
- [23] Asai T, Yamamoto T, Oshima Y. Aromatic polyketide production in *Cordyceps indigotica*, an entomopathogenic fungus, induced by exposure to a histone deacetylase inhibitor [J]. *Org Lett*, 2012, 14(8): 2006-2009.
- [24] Asai T, Morita S, Shirata N, et al. Structural diversity of new C<sub>13</sub>-polyketides produced by *Chaetomium mollipilium* cultivated in the presence of a NAD<sup>+</sup> dependent histone deacetylase inhibitor [J]. *Org Lett*, 2012, 14(21): 5456-5459.
- [25] Asai T, Otsuki S, Sakurai H, et al. Benzophenones from an endophytic fungus, *Graphiopsis chlorocephala*, from *Paeonia lactiflora* cultivated in the presence of an NAD<sup>+</sup>-dependent HDAC inhibitor [J]. *Org Lett*, 2013, 15(8): 2058-2061.
- [26] Asai T, Yamamoto T, Shirata N, et al. Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression [J]. *Org Lett*, 2013, 15(13): 3346-3349.
- [27] Asai T, Taniguchi T, Yamamoto T, et al. Structures of spiroindicumides A and B, unprecedented carbon skeletal spiro lactones, and determination of the absolute configuration by vibrational circular dichroism exciton approach [J]. *Org Lett*, 2013, 15(17): 4320-4323.
- [28] Henrikson J C, Hoover A R, Matthew Joyner P, et al. A chemical epigenetics approach for engineering the *in situ* biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger* [J]. *Org Biomol Chem*, 2009, 7(3): 435-438.
- [29] Vervoort H C, Drašković M, Crews P. Histone deacetylase inhibitors as a tool to up-regulate new fungal biosynthetic products-isolation of EGM-556, a cyclodepsipeptide, from *Microascus* sp. [J]. *Org Lett*, 2011, 13(3): 410-413.
- [30] Beau J, Mahid N, Burda W N, et al. Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma personii* [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(4): 762-774.
- [31] Chung Y M, El-Shazly M, Chuang D W, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(7): 1260-1266.
- [32] Chen H J, Awakawa T, Sun J Y, et al. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2013, 3(1): 20-23.
- [33] Yang X L, Awakawa T, Wakimoto T, et al. Induced biosyntheses of a novel butyrophenone and two aromatic polyketides in the plant pathogen *Stagonospora nodorum* [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2013, 3(4): 141-144.
- [34] Miao F P, Liang X R, Liu X H, et al. Asperwentins A-C, norditerpenes from a cryptic pathway in an algicolous strain of *Aspergillus wentii* [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(2): 429-432.
- [35] Wang X, Sena Filho J G, Hoover A R, et al. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an Atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(5): 942-948.
- [36] Asai T, Yamamoto T, Chung Y M, et al. Aromatic polyketide glycosides from an entomopathogenic fungus, *Cordyceps indigotica* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2012, 53(3): 277-280.
- [37] Chung Y M, Wei C K, Chuang D W, et al. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(13): 3866-3872.
- [38] Yang X L, Huang L, Ruan X L. Epigenetic modifiers alter the secondary metabolite composition of a plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* obtained from the leaves of *Fragaria chiloensis* [J]. *J Asia Nat Prod Res*, 2014, 16(4): 412-417.
- [39] Asai T, Chung Y M, Sakurai H, et al. Highly oxidized ergosterols and isariotin analogs from an entomopathogenic fungus, *Gibellula formosana*, cultivated in the presence of epigenetic modifying agents [J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(29): 5817-5823.
- [40] Asai T, Chung Y M, Sakurai H, et al. Tenuipyronone, a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers [J]. *Org Lett*, 2012, 14(2): 513-515.
- [41] Yang X L, Awakawa T, Wakimoto T, et al. Induced production of the novel glycolipid ustilagic acid C in the plant pathogen *Ustilago maydis* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54(28): 3655-3657.
- [42] Yang X L, Awakawa T, Wakimoto T, et al. Induced production of novel prenyldepside and coumarins in endophytic fungi *Pestalotiopsis acaciae* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2013, 54(43): 5814-5817.