



真菌次生代谢产物挖掘策略研究进展

雷红梅, 赵沛基*

云南大学省部共建生物资源保护与利用国家重点实验室&生命科学学院, 昆明 650091

* 联系人, E-mail: pjzhao@ynu.edu.cn

收稿日期: 2019-05-12; 接受日期: 2019-06-09; 网络版发表日期: 2019-07-02

摘要 真菌是最具生物多样性的类群之一,也是一系列小分子活性化合物的重要来源.近年来,发现新结构、新活性的次生代谢产物超过50%来源于真菌.因此深度挖掘真菌中天然活性化合物,既是研究热点,也将为药物研发提供必要的基础,并具有重要的科学意义.基于基因组测序技术及信息生物学的发展,结合传统方法,深入了解近几年挖掘真菌次生代谢产物的策略,了解相关真菌次生代谢的生物合成及调控机制,可以为新活性、新骨架化合物的发现以及隐性次级代谢物的激活提供理论基础.最终可以精准研究或多种策略结合,对目标菌株开展深入系统地研究.

关键词 真菌, 次生代谢产物, 生物合成基因簇, 调控

远古的人类很早就有意或无意地用到一些真菌,并关注到其次生代谢产物(secondary metabolites, SM)可能的生物学功能^[1].而在中国古代药学书籍中,如《神农本草经》、《新修本草》和《本草纲目》等,都有将真菌作为药材的记载^[2].自弗莱明从青霉属(*Penicillium*)真菌中发现青霉素并广泛应用以来,真菌次生代谢产物成为药物分子的重要来源^[3].如在医药工业中产生的一些非常重要的天然药物分子:抗细菌药物青霉素类(来自*Penicillium*属)、免疫抑制剂环孢菌素(来自*Trichoderma*和*Tolypocladium*属)、具治疗心血管疾病的洛伐他汀类药物(来自*Aspergillus*等属).随着抗生素的广泛使用,病原菌的耐药性日益增强,使原有抗生素的疗效大幅降低.同时新的疾病不断出现,使得寻找具有新型作用机制的先导化合物成为迫切需要.

随着测序技术的快速发展,据不完全统计,截止到

2019年5月6日,NCBI Genome数据库中已提交真菌基因组数据4684个,其中完整水平的基因组52个,染色体水平的735个,Scaffold水平有2818个.然而,真菌大部分基因簇在常规的培养条件下是“沉默”的,这表明大量潜在的、具有新颖结构的活性化合物隐藏在“沉默”基因簇中未被鉴定出来^[3,4].因此,挖掘真菌可能蕴藏的潜在新化合物正成为国内外研究热点.围绕这一问题,本文主要对近几年应用较多的基于培养条件、转录调控、异源表达等策略进行综述.

1. 基于培养条件的挖掘真菌次生代谢产物策略

1.1 OSMAC(one strain many compounds)策略

在微生物发酵研究中,微生物的培养条件对于次

引用格式: 雷红梅, 赵沛基. 真菌次生代谢产物挖掘策略研究进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 865–873

Lei H M, Zhao P J. Advances in research on mining fungal secondary metabolites (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 865–873, doi: [10.1360/SSV-2019-0091](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0091)

生代谢产物的数量和丰度至关重要。Zeeck实验室^[5]将这种方法定义为: 单菌多个次级代谢产物(one strain many compounds, OSMAC), 即通过对培养基条件的改变(包括培养基的组成成分、溶氧量、培养状态、添加酶抑制剂等)来实现从单个菌种中挖掘多种次生代谢产物(图1)。近年来, 通过OSMAC策略, 从真菌中分离鉴定了一系列结构新颖、具有多种活性的化合物。对毛韧革菌(*Stereum hirsutum*)进行培养基筛选后, 从发酵产物中分离鉴定了4个倍半萜和氨基酸杂合的季铵盐Stereumamides A-D (1~4), 这类化合物具有一定的抗菌活性^[6]。Meng等人^[7]从一株海洋内生真菌(*P. brocae* MA-231)中获得了二酮哌嗪类化合物Spirobrocazine A(5)和Brocazine G(6), Brocazine G具有很强的抗金黄色葡萄球菌的活性(MIC 0.25 $\mu\text{g/mL}$)和细胞毒活性(对细胞系A2780和A2780 CisR cells的 IC_{50} 分别为664和661 nmol L^{-1})。近几年通过类似的策略分离鉴定了大量的化合物, 并总结出相应的一些主要可变培养条件^[8]。小分子诱导物通常为DNA甲基化酶抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、低聚糖、有机溶剂和重金属离子^[9]。Williams等人^[10]用5-氮杂胞苷(一种DNA甲基化酶抑制剂)处理*Diatrype* sp.得到了两个新的聚酮Lunalides A(7)和B(8)。Henrikson等人^[11]通过SAHA-异羟肟酸, 一种组蛋白去乙酰化酶, 处理黑曲霉(*Aspergillus niger*)得到了化合物Nygerone A(9)。

通过对基因组数据分析, 可以发现真菌基因组蕴含着大量次生代谢产物生物合成基因簇。从NCBI公布

的基因组中选取了18个真菌菌株, 并且尽量选取不是专性寄生真菌或病原真菌, 用antiSMASH 5.0^[12]预测了这些菌株的次生代谢产物类型。这些真菌的基因组大小一般在28~52 Mb, 预测可能的次生代谢产物生物合成基因簇数目在23~85之间, 多数真菌的次生代谢产物生物合成基因簇数目在40个左右。Nielsen等人^[4]对青霉属的9株真菌进行分析, 结果表明, 这9株真菌具有大量的聚酮类和非核糖体肽化合物类型的生物合成基因簇, 但是只有16%的基因簇产生了相应的次生代谢产物。这些数据说明, 大多数真菌可能具有产生丰富次生代谢产物的潜能。OSMAC策略操作较为简单, 也容易获得一些意想不到的结果。但实验结果往往具有较大的不确定性, 其应用具有一定的局限性: (1) 尽管NCBI公布了4684个真菌基因组, 但与已鉴定和还未鉴定的大量真菌相比, 还未到1%的数量, 因此这种策略适用于没有基因组测序真菌的次生代谢产物的研究和挖掘; (2) 适用于一些还未建立(或很难进行)遗传操作方法的真菌, 如多核异核的、不易产生孢子的担子菌。

1.2 真菌与其他生物的共培养

次生代谢产物对产生生物的生长和发育并非必需, 但一般认为次生代谢产物是生物与环境(包括其他生物)互作的产物^[13~15]。真菌一般都生活在一个复杂的生态系统中, 与生态系统中的其他生物, 如细菌、其他真菌、藻类、原生动物、植物和小型后生动物产生着

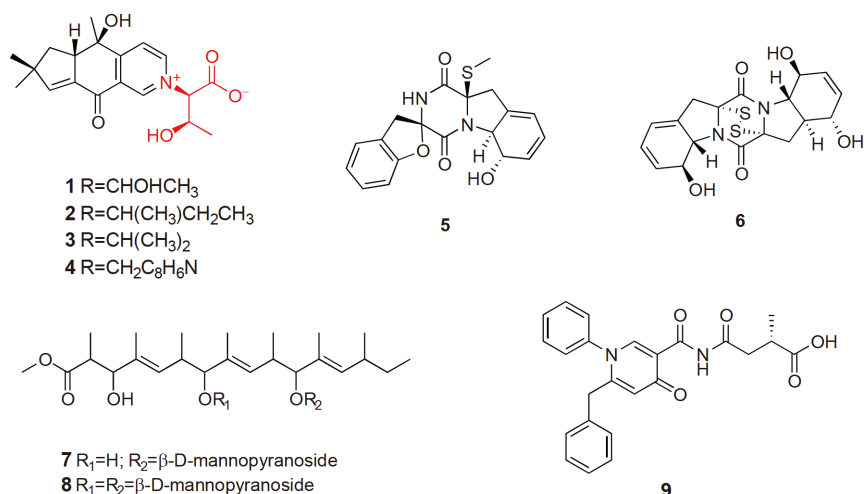


图1 通过培养条件筛选获得的一些代表性化合物

Figure 1 Selective compounds from the screening of culture conditions

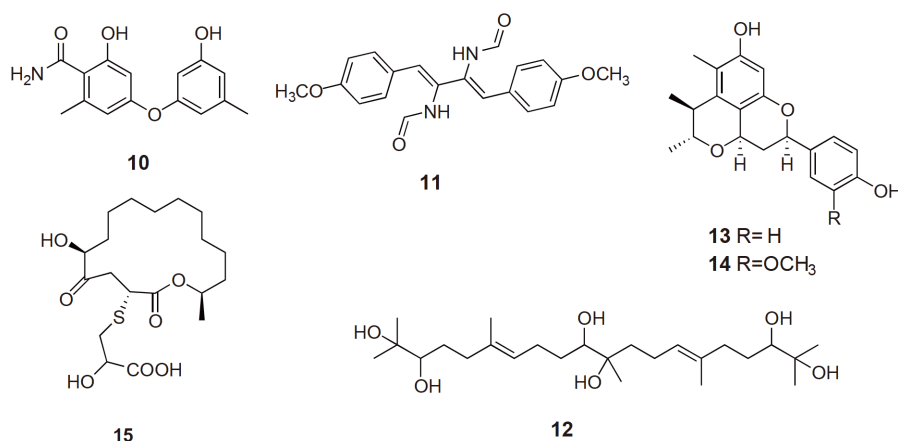


图 2 通过微生物共培养获得的一些代表性化合物

Figure 2 Selective compounds from microbial co-culture

复杂的相互作用或影响^[16~19].不同物种之间的共培养,是人工模拟自然条件下的一种生物互作,因此共培养将是一个挖掘具有活性功能次生代谢产物的有效方法(图2)^[20,21]. Ebrahim等人^[22]将内生真菌*Aspergillus australaficanus*与*Bacillus subtilis*或*Streptomyces lividans*共培养后,分离鉴定了一个共培养产物Australamide(**10**).另外, Zuck等人^[23]将真菌*Aspergillus fumigatus*与链霉菌*Streptomyces peucetius*共培养,分离到两个生物碱类化合物,其中N,N'-((1Z,3Z)-1,4-bis(4-methoxyphenyl)buta-1,3-diene-2,3-diyl)di-formamide(**11**)具有较好的细胞毒活性,其对不同的细胞系的IC₅₀在0.65~1.70 μmol L⁻¹. 糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)与另外一株真菌*Trametes robiniophila*共培养后,产生二倍半萜类化合物Postrediene A(**12**),具有较好的抗真菌活性, MIC在1-32 μg/mL^[24]. Meng等人^[25]从来源于海洋的真菌(*P. citrinum*)与另一株真菌(*Beauveria felina*)的共培养体系的发酵产物中分离鉴定了两个新的具有抗菌活性的Citritrin衍生物Citritrifelins A(**13**)和B(**14**). Stierle等人^[26]将两株青霉素真菌*P. fuscum*和*P. camembertii*共培养,获得8个结构新颖的大环内酯(Berkeleylactones A-H),其中Berkeleylactone A(**15**)具有较好的抗菌活性(MIC为1-2 μg/mL).

在病原菌(或寄生菌)和宿主的相互作用过程中,病原菌(或寄生菌)产生的次生代谢产物往往在侵染过程中起着关键作用^[13]. 如氧脂素(Oxylipins)是广泛存在动植物致病菌和腐生真菌中的一类化合物. 研究表明,氧脂素既可以作为信号分子调节有性孢子和无性

孢子的比例,也可能调节菌株次生代谢过程,或直接作为某些次生代谢产物的前体^[27]. 植物病原真菌根霉属(*Rhizopus*)会导致水稻幼苗枯萎,这种特征性症状是由从根霉菌培养物中分离到的大环聚酮化合物代谢产物引起的. 研究结果显示, Rhizoxin不是由真菌本身合成,而是由其内共生的、生存于细胞内的生物——*Burkholderia*属的细菌产生. 这个意外发现揭示了一种非常复杂的共生致病关系,它将真菌-植物二者之间的相互作用扩展到真菌-植物-细菌三者之间,细菌为三者互作的关键参与者^[16]. Estrada等人^[28]发现玉米的内生菌轮状镰刀霉菌(*Fusarium verticillioides*)可以拮抗玉米的病原菌玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*),通过LC-MS检测发现,在对峙培养过程中,玉米黑粉菌次生代谢产物产生变化非常明显.

2 真菌次生代谢基因簇的调控因子

转录调控因子大量存在基因组中,功能基因的转录和表达,往往由转录调控因子控制,对特定转录因子进行调控可以发现新的次生代谢产物^[29,30]. 调控因子一般可以分为全局性调控因子和特异调控因子.

2.1 全局调控因子

全局性调控因子可以对真菌的生长、繁殖、发育等多数生理功能以及多个次级代谢产物生物合成途径进行调控. Bok和Keller^[31],在构巢曲霉(*A. nidulans*)中发现了一个新的细胞核蛋白LaeA,该蛋白作为一个全

局调控因子在曲霉中对次生代谢产物起着重要的调控作用, 敲除*LaeA*可抑制许多次生代谢产物基因簇的表达, 过表达*LaeA*则相应地激活了这些基因簇的表达. *LaeA*作为一个甲基转移酶, 不仅能够全局性调控抗生素和真菌毒素等已知次级代谢产物的合成, 影响真菌形态分化, 还能通过激活沉默基因的表达调控未知代谢产物的产生^[32].

Velvet家族蛋白是在多种丝状真菌中具有高度保守结构域蛋白的统称^[33], 因突变株的形态似绒状而将其命名为“Velvet”. Velvet蛋白家族包括VeA, VelB, VosA和VelC四个成员, 均具有真菌特异的Velvet结构域^[34], 主要调控真菌生长、发育与次生代谢产生, 并且受到光、温度等环境因素影响. VeA是最早被发现的Velvet蛋白, VeA蛋白的核定位受核定位信号NLS控制^[35]. 很多研究表明, VeA参与丝状真菌次生代谢生物合成的调控, *veA*缺失突变株中一些代谢产物的产生受到了明显的抑制, 说明VeA起到正向调控的作用^[36]. VelB与其他Velvet成员形成聚合物来调控发育和次生代谢的过程, VelB蛋白缺少核定位信号位点, VelB核转运时需要VeA蛋白协同运输. VosA蛋白的C端具有转录激活结构域, 功能类似于转录因子. VelC在部分真菌中参与调节有性生殖和无性生殖, VelC蛋白通常作为一个激活剂, 正调控有性生殖, 抑制无性生殖, 在有性生殖的早期发挥重要的调控作用^[37]. *LaeA*蛋白和两个Velvet家族VeA, VelB蛋白以三聚复合物形式存在, 并协同调控真菌的次生代谢及生长发育过程^[38]. 在真菌体内, VeA以桥梁形式分别连接VelB和*LaeA*, 但是*LaeA*与VelB之间不能相互作用. VelB-VeA二聚体在细胞质中形成, 而后转运进入细胞核. VelB/VeA/*LaeA*三聚复合物定位在细胞核中, Velvet与*LaeA*蛋白通过自身蛋白之间及与其他光受体蛋白之间形成复杂的聚合物协同调控真菌发育与次生代谢^[38].

丝状真菌次级代谢与其基因簇所处的表观遗传状态有着密切的关系^[38,39]. 组蛋白修饰, 如乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化和类泛素化等, 可以通过改变染色质的结构而影响相关基因的转录水平, 也是另外一类全局调控因子^[40]. *AflRmtA*和*RmtA*是黄曲霉中两个精氨酸甲基转移酶基因, 调控分生孢子的形成、菌核发育、Aflatoxin B₁及其他次生代谢产物的合成和应激反应^[41,42]. 烟曲霉(*A. fumigatus*)中的*hdaA*基因, 其相应的蛋白产物为组蛋白脱乙酰酶HdaA, 其参与Glio-

toxin及其他次生代谢产物的调节, 并且是孢子正常萌发和菌丝营养生长所必需的^[43].

2.2 特异转录调控因子

特异性转录因子根据其结构不同主要分为Zn₂Cys₆和Cys₂His₂两种类型. 真菌最常见的特异性转录因子是Zn₂Cys₆类型特异性DNA结合蛋白, 但Cys₂His₂类型在真菌中也普遍存在^[43,44].

*AflR*是研究较早且较清楚的Zn₂Cys₆的特异性转录因子, *AflR*的编码基因*aflR*位于构巢曲霉的Aflatoxin生物合成基因簇内^[45]. 研究发现, 其作为一种转录激活蛋白可促进Aflatoxin和Sterigmatocystin基因簇的表达, *aflR*基因的突变或过表达对主要代谢产物Aflatoxin和Sterigmatocystin的合成影响明显^[46]. 在构巢曲霉中, 通过诱导表达*apdR*成功激活PKS/NRPS杂合生物基因簇的表达, 产生了具有中度细胞毒活性的Aspyridones类化合物^[47], 这是首次运用过表达途径特异性转录因子的方法激活沉默基因簇而获得其代谢产物的实例.

在真菌中最早报道的Cys₂His₂类型转录因子的次级代谢调控因子是MRTRI6和Tri6, 分别在植物病原菌棉花焦斑病(*Myrothecium roridum*)和拟枝孢镰孢菌(*F. sporotrichioides*)中调控Trichothecene和Mycotoxin的生物合成^[48,49]. BcYOH1和Sda1是在*Botrytis cinerea*和*F. verticillioides*菌株中发现的两个特异调控因子, 可以调节Botrydial, Botcinic acid和Fumonisin B1的生物合成, 研究表明这两个转录因子对菌株的其他生理过程也有一定的影响^[50,51].

有些特异转录因子能够同时调控两个或多个次级代谢产物生物合成基因簇, 并最终影响多种次级代谢产物的生成. Bergmann等人^[47]发现, 构巢曲霉中*inp*和*afo*基因簇的调控存在一种相互调控现象, 证明一个转录因子可能同时控制多个生物合成基因簇的表达. 采用诱导型乙醇脱氢酶基因(*alcA*)启动子诱导*scpR*基因表达后, 激活其所在沉默*inp*基因簇表达的同时, *scpR*基因表达产物ScpR能够与*afo*基因簇中特异性转录因子*afoA*的启动子相结合, 进而激活*afo*基因簇的表达^[52]. *mcrA*基因的编码产物是一种转录调控因子, 具有一定的保守性. 对构巢曲霉中的*mcrA*进行敲除、过表达等处理, 随后对敲除菌株、过表达菌株和野生型三者的代谢产物进行比较, 证明了在构巢曲霉中*mcrA*至少参与了10种次生代谢产物基因簇的调控^[53].

3 真菌生物合成基因簇异源表达

大量真菌基因组测序后, 通过对基因组数据的分析可以发现真菌基因组蕴含着大量次生代谢产物生物合成基因簇. 通过次生代谢产物基因簇预测网站antiSMASH 5.0对18个真菌菌株进行分析, 结果表明(表1), 这些菌具有较大的产生次生代谢产物的潜能. 相关文献显示, 在实验室培养条件下, 只有10%~20%次生代谢产物生物合成基因簇能从其发酵粗提物中检测到相应的产物^[4]. 近期, 利用或开发一个成熟的遗传转化系统、分子操作容易的异源宿主来表达单个生物合成基因或者完整的基因簇受到关注, 这一策略已经成为真菌次生代谢产物挖掘的重要工具.

3.1 原核生物表达系统

原核生物表达系统由于其培养条件简单、生长周期短、遗传背景清晰, 成为异源表达的理想宿主. 在真菌天然产物的研究中, 多数原核表达系统用于真菌天然产物生物合成途径中单基因的表达. 灰黄霉素产生

菌(*P. patulum*)中编码6-甲基水杨酸(6-Methylsalicylic acid)合成的PKS基因在大肠杆菌(*E. coli*)中表达, 并获得成功^[54]. 此外, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)也作为真菌天然产物的异源宿主, Zobel等人^[55]成功地在枯草芽孢杆菌中表达了来自尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)的非核糖体环缩肽恩镰孢菌素(Enniatin).

3.2 酵母表达系统

酵母是单细胞真核生物, 作为表达系统具有生长快速、培养条件简单和基因操作技术成熟等特点, 广泛应用于基因工程、蛋白表达及遗传学分析等研究领域. 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是分子和细胞生物学中的真核模式生物, 遗传背景清楚. 酿酒酵母在真菌天然产物生物合成途径解析和新型天然产物开发等方面均显示其优势^[56].

Zabala等人^[57]在研究蛋白质转运抑制剂Brefeldin A的生物合成时, 推定HR-PKS和其他数个P450基因可能参与Brefeldin A生物合成. 将Bref-PKS和Bref-TH基

表 1 18株真菌基因组信息和antiSMASH预测的次生代谢生物合成基因簇

Table 1 Genomic information of 18 fungi and secondary metabolic biosynthesis gene clusters predicted by antiSMASH

菌种	株系	基因组大小(Mbp)	基因数目	GC含量(%)	GenBank登录号	预测的次生代谢产物生物合成基因簇
<i>Alternaria alternata</i>	SRC11rK2f	32.99	13,577	51.4	LXPP000000000.1	32
<i>Amanita muscaria</i>	Koide BX008	35.83	18,091	47.5	JMDV000000000.1	23
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af293	29.81	9,916	49.8	AAHF000000000.1	37
<i>Aspergillus flavus</i>	NRRL3357	39.91	13,487	48.4	AAIH000000000.2	72
<i>Chaetomium globosum</i>	CBS 148.51	34.34	11,232	55.6	AAFU000000000.1	40
<i>Cordyceps fumosorosea</i>	ARSEF 2679	33.49	10,061	53.5	AZHB000000000.1	34
<i>Epicoccum nigrum</i>	ICMP 19927	34.6	12,190	52.0	NCTX000000000.1	32
<i>Fusarium longipes</i>	NRRL 20695	35.31	11,421	48.2	PXOG000000000.1	39
<i>Ganoderma sinense</i>	ZZ0214-1	48.96	15,478	55.6	AYKW000000000.1	34
<i>Pestalotiopsis fici</i>	W106-1	51.86	15,413	48.7	ARNU000000000.1	75
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	170	44.22	14,318	49.5	LSBJ000000000.2	47
<i>Penicillium camemberti</i>	FM 013	34.01	14,515	48.2	CBVV000000000.1	67
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ASM71027v1	32.52	11,460	49.0	JMSF000000000.1	56
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	PLFJ-1	38.53	11,850	57.9	LSBI000000000.1	37
<i>Stereum hirsutum</i>	FP-91666	45.65	14,453	51.3	AEGX000000000.1	43
<i>Trichoderma virens</i>	Gv29-8	39.02	12,405	49.2	ABDF000000000.2	59
<i>Trichoderma harzianum</i>	CBS 226.95	40.96	14,294	47.6	MBGI000000000.1	56
<i>Xylaria hypoxylon</i>	DSM 108379	42.84	11,038	47.1	SKBN000000000.1	85

因的cDNA克隆到两个载体中,并在酿酒酵母(*S. cerevisiae* BJ5464-NpgA)中异源表达。虽然没有获得Brefeldin A,但获得了Brefeldin A的非环化前体,从而证明了该基因簇中Bref-PKS和Bref-TH两个基因编码的酶参与Brefeldin A的合成。2014年,Xu等人^[58]把来自不同真菌的聚酮类苯二酚内酯(Benzenediol lactone)生物合成途径的聚酮合酶进行组合,依靠酵母异源表达系统,产生出结构多样的聚酮类化合物。Chooi等人^[59]在研究小麦病原真菌(*Parastagonospora nodorum*)毒力因子时,发现在病原真菌感染过程中,PR-PKS基因SN477表达水平上调,把SN477基因的cDNA在酿酒酵母中表达,验证其表达蛋白催化合成(R)-Mellein所需的酶。而2018年,斯坦福大学Hillenmeyer实验室^[60],构建了酿酒酵母异源表达体系“HEX”,对41个来自不同真菌的基因簇进行异源表达,有22个基因簇检测到表达产物。

3.3 丝状真菌表达系统

随着分子技术的发展,丝状真菌被开发作为异源蛋白和小分子化合物的表达宿主,与大肠杆菌和酵母异源宿主相比,丝状真菌最明显的优势在于能够表达真菌天然产物生物合成的完整基因簇,且在克隆基因簇时,不需要去除基因的内含子,丝状真菌宿主大多就能正确地来完成来自其他真菌次级代谢产物基因的内含子剪接工作,成功产出目的产物^[61~64]。

来自土曲霉(*A. terreus*)的Asperfuranone生物合成基因簇在经改造的构巢曲霉中成功表达,并分离鉴定了产物,进一步揭示出Asperfuranone的合成机制^[65]。

2013年,Yin等人^[66]利用构巢曲霉成功表达了皮肤癣菌(来自*Trichophyton*属和*Arthroderma*属)的沉默基因簇,产生具免疫抑制活性的聚酮类化合物Neosartori-cins。Ye^[67]于2015年将费希新萨托菌(*Neosartorya fischeri*)的二倍半萜Sesterfisherol萜烯合酶基因(*NfSS*)和细胞色素P450单加氧酶基因(*NfP450*)在米曲霉(*A. oryzae*)中异源表达,获得Sesterfisherol和Sesterfisheric acid,并解析出这些基因的生物学功能。

4 结语

近年来,在已批准和即将上市的药物中,大约60%是来源于次生代谢产物。进入21世纪以来,已有超过50%的微生物源新结构、新活性化合物来源于丝状真菌^[68]。因此深度挖掘真菌中天然活性化合物,既是国际上的研究热点,也将为药物研发提供必要的基础,并具有重要的科学意义。但由于传统方法的限制性、微生物资源的开发程度不足等因素的存在,使得新天然产物的开发速度越来越慢。随着药物的广泛使用,药物耐药性日益增强,使原有药物的疗效大幅降低;新的疾病不断出现,使得寻找具有新型作用机制的先导化合物成为迫切需要。随着基因组测序技术越来越成熟,越来越多的真菌基因组测序完成,对这些真菌的基因组数据的信息进行分析和预测,可以基于Genome mining策略有目的地发现新的次生代谢产物。以上提及到的各种策略都具有其优势和不足,取决于目标菌的相关信息:该菌是否可(或易)培养?是否已经测过基因组数据以及基因组数据的质量?遗传转化是否建立等?

参考文献

- 1 Bassett E J, Keith M S, Armelagos G J, et al. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*, 1980, 209: 1532-1534
- 2 Yang S D, Bao H Y, Wang H, et al. The history and application of Chinese statutory fungal drugs (in Chinese). *Guide of China Medicine*, 2018, 16: 195-197 [杨树东, 包海鹰, 王辉, 等. 中国法定菌物药的历史沿革及应用. *中国医药指南*, 2018, 16: 195-197]
- 3 Raja H A, Miller A N, Pearce C J, et al. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *J Nat Prod*, 2017, 80: 756-770
- 4 Nielsen J C, Grijseels S, Prigent S, et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 17044
- 5 Bode H B, Bethe B, Höfs R, et al. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 2002, 3: 619-627

- 6 Duan Y C, Feng J, Bai N, et al. Four novel antibacterial sesquiterpene- α -amino acid quaternary ammonium hybrids from the mycelium of mushroom *Stereum hirsutum*. *Fitoterapia*, 2018, 128: 213–217
- 7 Meng L H, Wang C Y, Mándi A, et al. Three diketopiperazine alkaloids with spirocyclic skeletons and one bithiodiketopiperazine derivative from the mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231. *Org Lett*, 2016, 18: 5304–5307
- 8 Romano S, Jackson S A, Patry S, et al. Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Mar Drugs*, 2018, 16: 244
- 9 Pettit R K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotech*, 2011, 4: 471–478
- 10 Williams R B, Henrikson J C, Hoover A R, et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org Biomol Chem*, 2008, 6: 1895–1897
- 11 Henrikson J C, Hoover A R, Joyner P M, et al. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org Biomol Chem*, 2009, 7: 435–438
- 12 Blin K, Shaw S, Steinke K, et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res*, 2019, 79
- 13 Spiteller P. Chemical ecology of fungi. *Nat Prod Rep*, 2015, 32: 971–993
- 14 Aminov R I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*, 2009, 11: 2970–2988
- 15 Sun J, Leng B, Sheng G, et al. Biosynthesis and functions of metabolites. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 1280–1282
- 16 Partida-Martinez L P, Hertweck C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, 2005, 437: 884–888
- 17 Kobayashi D Y, Crouch J A. Bacterial/Fungal interactions: from pathogens to mutualistic endosymbionts. *Annu Rev Phytopathol*, 2009, 47: 63–82
- 18 Bonfante P, Anca I A. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol*, 2009, 63: 363–383
- 19 Grube M, Berg G. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biol Rev*, 2009, 23: 72–85
- 20 Adnani N, Rajski S R, Bugni T S. Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery. *Nat Prod Rep*, 2017, 34: 784–814
- 21 Marmann A, Aly A H, Lin W, et al. Co-cultivation—A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Mar Drugs*, 2014, 12: 1043–1065
- 22 Ebrahim W, El-Neketi M, Lewald L I, et al. Metabolites from the Fungal Endophyte *Aspergillus austroafricanus* in Axenic Culture and in Fungal–Bacterial Mixed Cultures. *J Nat Prod*, 2016, 79: 914–922
- 23 Zuck K M, Shipley S, Newman D J. Induced Production of *N*-Formyl Alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by Co-culture with *Streptomyces peucetius*. *J Nat Prod*, 2011, 74: 1653–1657
- 24 Shen X T, Mo X H, Zhu L P, et al. Unusual and highly bioactive sesterterpenes synthesized by *Pleurotus ostreatus* during the co-culture with *Trametes robiniophila* Murr. *Appl Environ Microbiol*, 2019
- 25 Meng L H, Liu Y, Li X M, et al. Citrifelins A and B, Citrinin Adducts with a Tetracyclic Framework from Cocultures of Marine-Derived Isolates of *Penicillium citrinum* and *Beauveria felina*. *J Nat Prod*, 2015, 78: 2301–2305
- 26 Stierle A A, Stierle D B, Decato D, et al. The Berkeleylactones, antibiotic macrolides from fungal coculture. *J Nat Prod*, 2017, 80: 1150–1160
- 27 Tsitsigiannis D I, Keller N P. Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends Microbiol*, 2007, 15: 109–118
- 28 Rodriguez Estrada A E, Hegeman A, Corby Kistler H, et al. In vitro interactions between *Fusarium verticillioides* and *Ustilago maydis* through real-time PCR and metabolic profiling. *Fungal Genets Biol*, 2011, 48: 874–885
- 29 Brakhage A A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 21–32
- 30 Yin W, Keller N P. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J Microbiol*, 2011, 49: 329–339
- 31 Bok J W, Keller N P. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp.. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3: 527–535
- 32 Jain S, Keller N. Insights to fungal biology through LaeA sleuthing. *Fungal Biol Rev*, 2013, 27: 51–59
- 33 Sarikaya-Bayram A, Palmer J M, Keller N, et al. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front Microbiol*, 2015, 6
- 34 Martín J F. Key role of LaeA and velvet complex proteins on expression of β -lactam and PR-toxin genes in *Penicillium chrysogenum*: cross-talk regulation of secondary metabolite pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44: 525–535
- 35 Stinnett S M, Espeso E A, Cobeco L, et al. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light. *Mol Microbiol*, 2007, 63: 242–255
- 36 Rauscher S, Pacher S, Hedtke M, et al. A phosphorylation code of the *Aspergillus nidulans* global regulator VelvetA (VeA) determines specific functions. *Mol Microbiol*, 2016, 99: 909–924

- 37 Kopke K, Hoff B, Bloemendal S, et al. Members of the *Penicillium chrysogenum* velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of Penicillin biosynthesis and conidiation. [Eukaryotic Cell](#), 2013, 12: 299–310
- 38 Bayram O, Krappmann S, Ni M, et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. [Science](#), 2008, 320: 1504–1506
- 39 Aghcheh R K, Kubicek C P. Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 2015, 99: 6167–6181
- 40 Pfannenstiel B T, Keller N P. On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. [Biotech Adv](#), 2019
- 41 Li Y, He Y, Li X, et al. Histone methyltransferase *afIrmA* gene is involved in the morphogenesis, mycotoxin biosynthesis, and pathogenicity of *Aspergillus flavus*. [Toxicon](#), 2017, 127: 112–121
- 42 Satterlee T, Cary J W, Calvo A M. RmtA, a putative arginine methyltransferase, regulates secondary metabolism and development in *Aspergillus flavus*. [PLoS ONE](#), 2016, 11: e0155575
- 43 Lee I, Oh J H, Keats Shwab E, et al. HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. [Fungal Genets Biol](#), 2009, 46: 782–790
- 44 Macheleidt J, Mattern D J, Fischer J, et al. Regulation and role of fungal secondary metabolites. [Annu Rev Genet](#), 2016, 50: 371–392
- 45 Woloshuk C P, Foutz K R, Brewer J F, et al. Molecular characterization of *afIR*, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. [Appl Environ Microb](#), 1994, 60: 2408–2414 doi: 8074521
- 46 Price M S, Yu J, Nierman W C, et al. The aflatoxin pathway regulator AfIR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. [FEMS Microbiol Lett](#), 2006, 255: 275–279
- 47 Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, et al. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. [Nat Chem Biol](#), 2007, 3: 213–217
- 48 Trapp S C, Hohn T M, McCormick S, et al. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. [Mol General Genets MGG](#), 1998, 257: 421–432
- 49 Hohn T M, Krishna R, Proctor R H. Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. [Fungal Genets Biol](#), 1999, 26: 224–235
- 50 Simon A, Dalmais B, Morgant G, et al. Screening of a *Botrytis cinerea* one-hybrid library reveals a Cys2His2 transcription factor involved in the regulation of secondary metabolism gene clusters. [Fungal Genets Biol](#), 2013, 52: 9–19
- 51 Malapi-Wight M, Smith J, Campbell J, et al. Sda1, a Cys2-His2 zinc finger transcription factor, is involved in polyol metabolism and fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*. [PLoS ONE](#), 2013, 8: e67656
- 52 Sørensen J L, Hansen F T, Sondergaard T E, et al. Production of novel fusarielins by ectopic activation of the polyketide synthase 9 cluster in *Fusarium graminearum*. [Environ Microbiol](#), 2012, 14: 1159–1170
- 53 Oakley C E, Ahuja M, Sun W W, et al. Discovery of McrA, a master regulator of *Aspergillus* secondary metabolism. [Mol Microbiol](#), 2017, 103: 347–365
- 54 Kealey J T, Liu L, Santi D V, et al. Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1998, 95: 505–509
- 55 Zobel S, Kumpfmüller J, Süßmuth R D, et al. *Bacillus subtilis* as heterologous host for the secretory production of the non-ribosomal cyclodepsipeptide enniatin. [Appl Microbiol Biotechnol](#), 2015, 99: 681–691
- 56 Bond C, Tang Y, Li L. *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for mining, studying and engineering fungal polyketide synthases. [Fungal Genets Biol](#), 2016, 89: 52–61
- 57 Zabala A O, Chooi Y H, Choi M S, et al. Fungal polyketide synthase product chain-length control by partnering thiohydrolase. [ACS Chem Biol](#), 2014, 9: 1576–1586
- 58 Xu Y, Zhou T, Zhang S, et al. Diversity-oriented combinatorial biosynthesis of benzenediol lactone scaffolds by subunit shuffling of fungal polyketide synthases. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 12354–12359
- 59 Chooi Y H, Krill C, Barrow R A, et al. An *In Planta*-Expressed Polyketide Synthase Produces (R)-Mellein in the Wheat Pathogen *Parastagonospora nodorum*. [Appl Environ Microbiol](#), 2015, 81: 177–186
- 60 Harvey C J B, Tang M, Schlecht U, et al. HEx: A heterologous expression platform for the discovery of fungal natural products. [Sci Adv](#), 2018, 4:

caar5459

- 61 Anyaogu D C, Mortensen U H. Heterologous production of fungal secondary metabolites in *Aspergilli*. *Front Microbiol*, 2015, 6: 77
- 62 He Y, Wang B, Chen W, et al. Recent advances in reconstructing microbial secondary metabolites biosynthesis in *Aspergillus* spp.. *Biotech Adv*, 2018, 36: 739–783
- 63 Ma Z H, Li W, Yin W B. Progress in heterologous expression of fungal natural products (in Chinese). *Acta Microbiol Sin*, 2016, 56: 429–440 [马紫卉, 李伟, 尹文兵. 真菌天然产物异源生产研究进展. *微生物学报*, 2016, 56: 429–440]
- 64 Li W, Yu J, Li Z, et al. Rational design for fungal laccase production in the model host *Aspergillus nidulans*. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 84–94
- 65 Chiang Y M, Szewczyk E, Davidson A D, et al. A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a Polyketide, Asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2965–2970
- 66 Yin W B, Chooi Y H, Smith A R, et al. Discovery of Cryptic Polyketide Metabolites from Dermatophytes Using Heterologous Expression in *Aspergillus nidulans*. *ACS Synth Biol*, 2013, 2: 629–634
- 67 Ye Y, Minami A, Mandi A, et al. Genome mining for sesterterpenes using bifunctional terpene synthases reveals a unified intermediate of di/sesterterpenes. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 11846–11853
- 68 Patridge E, Gareiss P, Kinch M S, et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 2016, 21: 204–207

Advances in research on mining fungal secondary metabolites

LEI Hongmei & ZHAO Peiji

*State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan & School of Life Sciences,
Yunnan University, Kunming 650091, China*

Fungi are one of the most biologically diverse groups and an important source of active compounds. In recent years, more than 50% of new structural and active secondary metabolites have been identified in fungi. Therefore, mining naturally active compounds in fungi is not only a research hotspot but also provides the necessary foundation for drug research and development. Based on the development of genome sequencing technology and information biology combined with traditional methods, an in-depth understanding of the strategies of mining secondary metabolites of fungi in recent years, elucidation of the biosynthesis and regulation of the secondary metabolism of related fungi, new active and new skeleton compound discovery, and activation of recessive secondary metabolites provide a theoretical basis. Thus, it is possible to carry out in-depth systematic research on target fungi by combining specific or multiple strategies.

Fungus, secondary metabolites, biosynthetic gene cluster, regulation

doi: 10.1360/SSV-2019-0091