

# 天然产物中 $\beta$ -位甲基化氨基酸单元的生物合成研究进展

张玉阳, 林双君\*

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

\* 联系人, E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

2017-03-23 收稿, 2017-06-26 修回, 2017-07-03 接受, 2017-10-12 网络版发表

**摘要** 相对于组成蛋白质大分子的20种标准氨基酸, 更多的非标准氨基酸(将近500种)被引入天然产物的生物合成中, 后者对于天然产物发挥独特的生物学功能具有至关重要的作用.  $\beta$ -位甲基化氨基酸作为一类非标准氨基酸, 在一些活性天然产物的生物合成中及初级代谢中也有很多报道. 它们的生物合成主要通过3种方式: (1) 谷氨酸变位酶催化; (2) 甲基转移酶和氨基转移酶联合催化; (3) S-腺苷甲硫氨酸自由基酶催化. 本文综述了近年来文献中报道的天然产物中 $\beta$ -位甲基氨基酸单元的生物合成方式, 通过代谢工程、合成生物学及酶工程的手段, 将有助于提高含有该单元的活性天然产物的产量, 同时有助于创造更多含有该单元的非天然-天然产物.

**关键词** 非标准氨基酸,  $\beta$ -位甲基化氨基酸, 天然产物, 生物合成

天然产物一般是由植物、微生物和动物产生的小分子化合物. 天然产物源于自然, 其化学结构是经历长期进化筛选的结果, 相对于众多化学合成小分子, 天然产物具有与特定靶点专一性结合的特性, 是疾病治疗的重要药物和先导化合物的重要来源<sup>[1-3]</sup>. 氨基酸是许多天然产物的重要组成结构单元, 除了组成蛋白质大分子的20种标准氨基酸外, 更多的非天然氨基酸被引入到天然产物的生物合成中. 据统计, 截至目前, 约500种非天然氨基酸被鉴定, 天然氨基酸的比例只占总数的4%<sup>[4]</sup>. 大多数非天然氨基酸都是通过非核糖体肽合成酶(NRPS)的催化进入到天然产物的骨架中, 并对后者发挥重要的生物活性具有至关重要的作用<sup>[4]</sup>.

$\beta$ -位甲基化氨基酸是一种非天然氨基酸, 在一些活性天然产物的结构及某些初级代谢的通路中也有发现, 其中一些天然产物已经成为上市药物或重要的临床药物前体, 如达托霉素(Daptomycin)<sup>[5]</sup>、尼可霉素Z(Nikkomycin Z)<sup>[6]</sup>、甘露霉素(Manno-peptimycin)<sup>[7]</sup>、Friulimicin B<sup>[8]</sup>以及吲哚霉素(Indolmycin)<sup>[9]</sup>等(图1). 通过揭示天然产物的生物合成代谢途径, 可以为产量的提高及结构的优化提供指导. 近20年来, 随着基因测序技术的飞速发展及大规模普及, 从基因组水平分析目标天然产物的生物合成基因簇并阐明它们的生物合成途径, 逐渐成为一个主要的发展趋势. 当前, 关于含有 $\beta$ -位甲基氨基酸单元的天然产物的生物合成, 已经有比较系统的报道, 但却没有相应的综述性文章. 本文拟通过调研整理国内外最新的研究成果, 提出在代谢工程、合成生物学、酶工程方面利用 $\beta$ -位甲基化氨基酸的研究方向.

天然产物中存在的、生物合成方式已经明确的 $\beta$ -位甲基化氨基酸单元主要有以下8种: (1)  $\beta$ -甲基天冬氨酸( $\beta$ -methylaspartic acid,  $\beta$ -me-Asp); (2)  $\beta$ -甲基谷氨酸( $\beta$ -methylglutamic acid,  $\beta$ -me-Glu); (3)  $\beta$ -甲基缬氨酸( $\beta$ -methylvaline, 3-me-Val); (4)  $\beta$ -甲基亮氨酸( $\beta$ -methylleucine,  $\beta$ -me-Leu); (5)  $\beta$ -甲基苯丙氨酸( $\beta$ -methylphenylalanine,  $\beta$ -me-Phe); (6)  $\beta$ -甲基色氨酸

**引用格式:** 张玉阳, 林双君. 天然产物中 $\beta$ -位甲基化氨基酸单元的生物合成研究进展. 科学通报, 2017, 62: 3561-3575

Zhang Y Y, Lin S J. Biosynthetic study of  $\beta$ -methyl amino acid building blocks involved in natural products (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 3561-3575, doi: 10.1360/N972017-00335

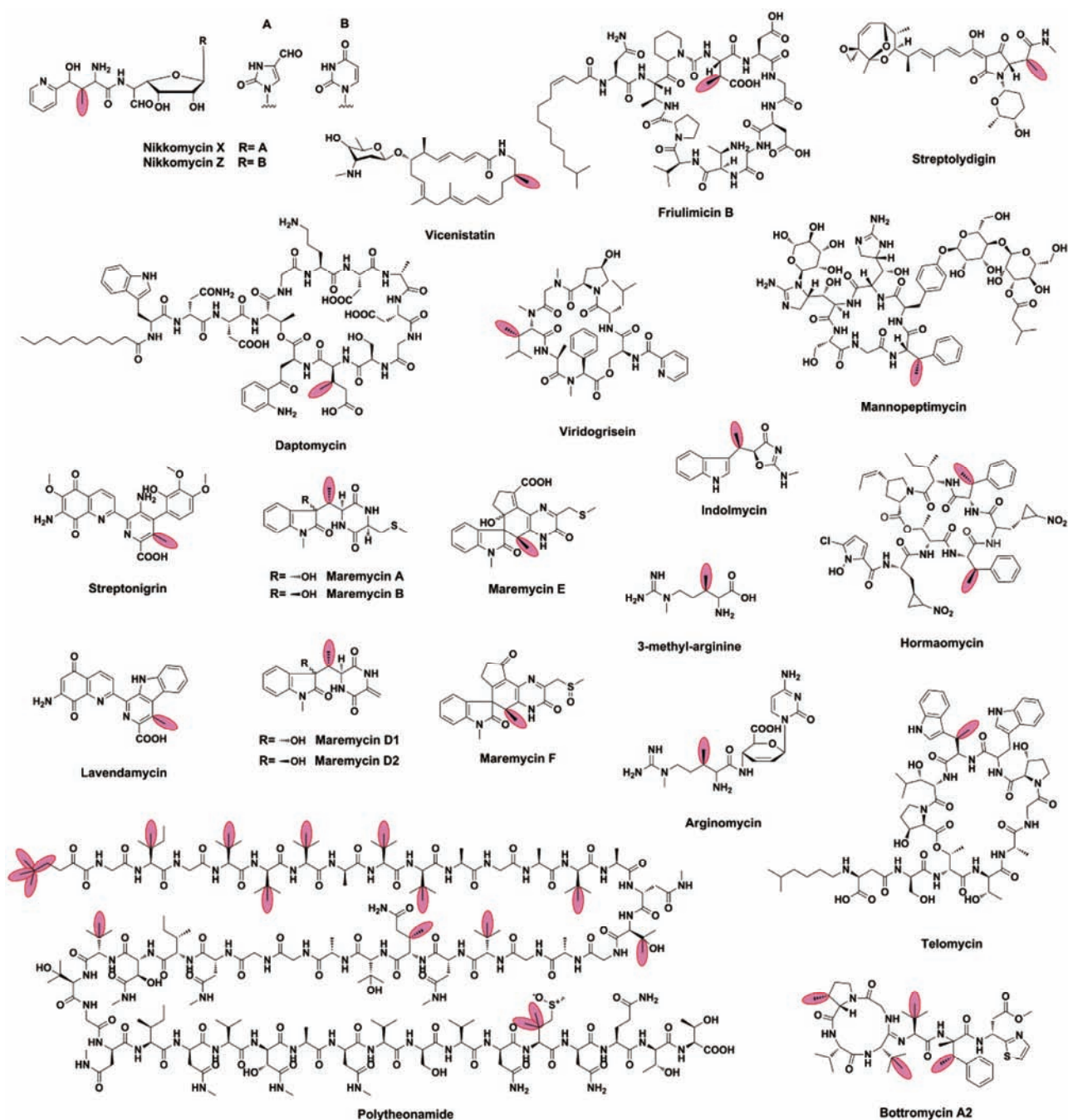


图1 (网络版彩图)含有 $\beta$ -甲基化氨基酸单元的天然产物

Figure 1 (Color online)  $\beta$ -methyl amino acid group containing natural products

( $\beta$ -methyltryptophan,  $\beta$ -me-Trp); (7)  $\beta$ -甲基精氨酸( $\beta$ -methylarginine,  $\beta$ -me-Arg); (8)  $\beta$ -甲基脯氨酸( $\beta$ -methylproline,  $\beta$ -me-Pro). 虽然以上8种氨基酸都存在 $\beta$ 位的甲基化现象, 但它们相应的生物合成方式并不是单一的. 从化学角度分析, 氨基酸的 $\beta$ 位属于非活化的脂肪碳, 因此很难像一般的甲基转移反应

一样, 形成亲核体, 然后进攻甲基供体S-腺苷甲硫氨酸(SAM)上的甲基基团, 从而实现甲基转移到氨基酸的 $\beta$ 位. 在生物合成中, 当前主要有3种 $\beta$ 位甲基化的策略: (1)  $B_{12}$ 依赖的谷氨酸变位酶催化形成; (2) 甲基转移酶和氨基转移酶联合催化形成; (3)  $B_{12}$ -radical SAM依赖的甲基转移酶催化形成. 下面将根据这3种

不同的 $\beta$ 位甲基氨基酸的形成方式,进行梳理和总结.

## 1 谷氨酸变位酶催化的 $\beta$ -甲基氨基酸单元的形成

$B_{12}$ 依赖的谷氨酸变位酶(coenzyme  $B_{12}$ -dependent glutamate mutase, GLM)催化一分子的谷氨酸(*L*-glutamic acid, *L*-Glu)重排形成一分子的 $\beta$ -me-Asp. 在早期的研究中,这类酶被发现存在于一些梭菌(*Clostridium*)的*L*-Glu降解途径<sup>[10]</sup>. GLM是一种异源四聚体蛋白,由两种亚基 $\delta$ (15 kDa左右)和 $\epsilon$ (55 kDa左右)组成 $\delta_2\epsilon_2$ 形式, $B_{12}$ 位于两种亚基之间并与小亚基结合,而大亚基包含活性氨基酸位点. GLM催化*L*-Glu形成 $\beta$ -me-Asp的酶学机制如下(图2): (1) 辅因子上的碳钴键首先发生均裂,产生二价钴胺素和5'-脱氧腺苷自由基(5'-dA自由基); (2) 形成的5'-dA自由基从底物的 $\gamma$ 位上夺取1个氢原子,形成5'-dA和底物自由基; (3) 底物自由基发生 $\beta$ 和 $\gamma$ 位碳-碳键断裂并重排, $\beta$ 位产生甲基自由基; (4) 新产生的底物自由基从5'-dA上获得1个氢原子,完成一轮酶催化循环,形成 $\beta$ -me-Asp<sup>[11]</sup>. GLM存在于Nikkomycin X/Z, Friulimicins, Streptolydigin和Vicenistatin的生物合成途径中<sup>[12-15]</sup>,而这几种活性天然产物都含有 $\beta$ -me-Asp单元(图1). 下面分别简述一下相应的生物合成方式.

### 1.1 Nikkomycins中 $\beta$ -me-Asp单元的生物合成

Nikkomycins是由链霉菌(*Streptomyces*)产生的一类肽核苷抗生素,其化学结构比较接近二磷酸化-氮-乙酰葡萄糖胺(diphosphate-*N*-acetylglucosamine),是几丁质合成酶的强竞争性抑制剂,并且具有显著的抗真菌、杀虫和杀螨活性. Nikkomycins由多种成份组成,其中X和Z是主要成分. 从*Streptomyces tendae* Tü901和*Streptomyces ansochromogenes*中克隆和鉴定出了Nikkomycins的生物合成基因簇,二者的序列及结构基本一致,主要由NRPS和一些修饰酶组成. 来源于*Streptomyces tendae* Tü901的Nikkomycins基因簇中含有2个与*L*-Glu变位酶同源的基因,*nikU*(编码小亚基, 155 aa)和*nikV*(编码大亚基, 423 aa). Lauer等人<sup>[12]</sup>对该基因簇中的*nikV*基因进行敲除后,发现突变株*nikV*-KO丧失产生Nikkomycins的能力,但积累了含有天冬氨酸(Asp)单元的Nikkomycin Oz和Ox,这表明*nikV*基因确实参与了Nikkomycins中 $\beta$ -me-Asp单元的生物合成. 来源于*Streptomyces ansochromo*

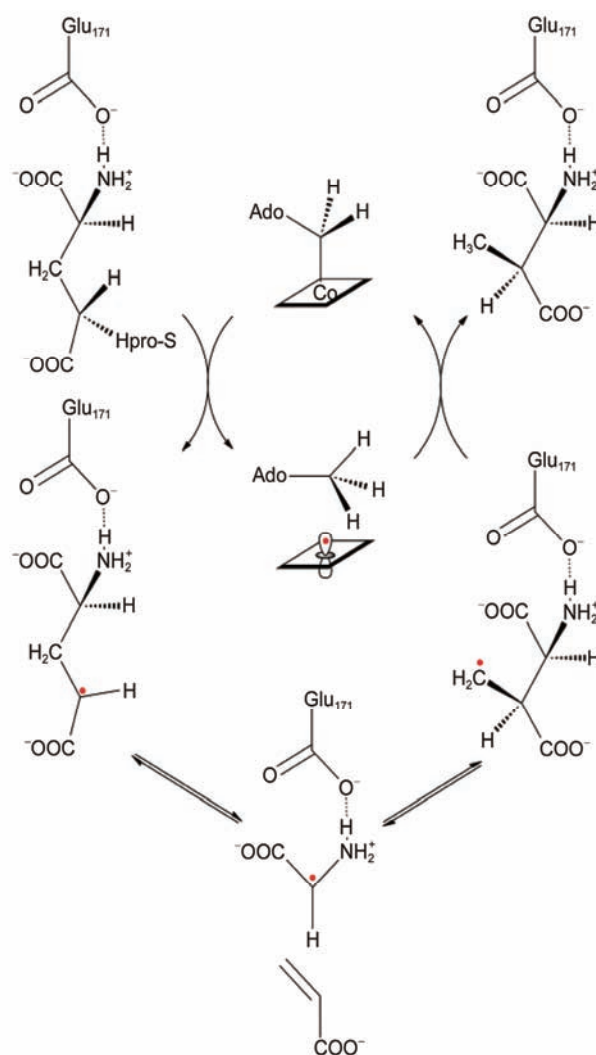


图2 (网络版彩色)谷氨酸变位酶催化的 $\beta$ -甲基天冬氨酸单元形成机制

Figure 2 (Color online) The formation mechanism of  $\beta$ -methylaspartic acid catalyzed by glutamate mutase

*genes*的Nikkomycins基因簇中同样含有2个*L*-Glu变位酶同源基因,*sanU*(编码小亚基, 155 aa)和*sanV*(编码大亚基, 423 aa). Li等人<sup>[16]</sup>将2个基因编码的蛋白SanU和SanV分别克隆表达纯化出来,进行体外酶学试验,发现单独的SanU或SanV都没有*L*-Glu变位酶的活性,按一定比例混合的SanU和SanV也没有检测到酶学活性.但在2个蛋白的复合物中添加了辅酶 $B_{12}$ 后,新的复合物才具有转化*L*-Glu形成 $\beta$ -me-Asp的能力,这表明 $B_{12}$ 可能有助于SanU和SanV形成具有天然构象的酶复合体,也可能是上述两个蛋白在单独纯化过程中,损失了大部分的 $B_{12}$ ,需要外加一定量的辅因子才能形成天然复合体.



## 1.2 Friulimicins中 $\beta$ -me-Asp单元的生物合成

Friulimicins是由游动放线菌(*Actinoplanes friuliensis*)产生的酸性酯肽类抗生素,对多重耐药的肠球菌和葡萄球菌有良好的抑制活性,是一种潜在的药物前体. Friulimicins由1个10分子氨基酸形成的大环和1个连有脂肪链的环外氨基酸组成,根据脂肪酸链的结构不同,分为A~D 4种组分. 在氨基酸形成的大环中存在 $\beta$ -me-Asp单元. Muller等人<sup>[13]</sup>报道了Friulimicins的完整合成基因簇,由编码NRPS和其他修饰酶等的24个基因组成,其中存在负责 $\beta$ -me-Asp单元合成的GLM同源基因, *glmA*(编码小亚基, 145 aa)和*glmB*(编码大亚基, 415 aa). Heinzmann等人<sup>[17]</sup>在大肠杆菌中对2个基因进行了克隆以及蛋白的表达纯化,然而*GlmA*为包涵体,并且不能获得*GlmB*蛋白;在链霉菌中进行2个蛋白的表达时,虽然*GlmB*能够被纯化出可溶性蛋白,但无法获得*GlmA*蛋白;最后该研究者将2个蛋白利用一段柔性氨基酸((Gly-Gln)<sub>5</sub>-Gly)连接成融合蛋白,在链霉菌中进行共表达,得到了可溶性蛋白,并在体外反应中进行了生化表征.

## 1.3 Streptolydigin中 $\beta$ -me-Asp单元的生物合成

Streptolydigin(利迪链菌素)是由利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*)产生的一种聚酮和非核糖体肽杂合类抗生素,能够特异性抑制细菌RNA聚合酶 $\beta$ 亚基的活性,同时也能抑制真核生物DNA聚合酶末端脱氧核苷酰转移酶的活性,因此被广泛关注. Olano等人<sup>[14]</sup>从利迪链霉菌里克隆和鉴定了Streptolydigin的生物合成基因簇,80.8 Kb DNA序列由38个开放阅读框组成,其中29个可能直接参与了Streptolydigin的生物合成. 在该基因簇中存在2个GLM同源基因, *slgE1*(编码小亚基, 153aa)和*slgE2*(编码大亚基, 449aa). Gomez等人<sup>[18]</sup>对*slgE1*和*slgE2*进行了同时敲除,发现突变株SLME1E2丧失了产生Streptolydigin的能力,但积累了2个紫外吸收与之相似的新化合物(Streptolydigin B和Streptolydigin C). Streptolydigin B结构中含有L-Glu而非 $\beta$ -me-Asp. Streptolydigin C是Streptolydigin B的衍生物. 该结果表明*slgE1*和*slgE2*确实参与了Streptolydigin结构中 $\beta$ -me-Asp单元的生物合成,它们缺失后,合成代谢途径中后续的酶可能具有底物宽泛性,能够引入L-Glu单元.

## 1.4 Vicenistatin中 $\beta$ -me-Asp单元的生物合成

Vicenistatin是由*Streptomyces halstedii*产生的一种20元环大环内酰胺类化合物,环外含有一个稀有的氨基糖, Vicenisamine. Vicenistatin是一个优异的抗肿瘤抗生素,能诱导哺乳动物细胞源于核内体的液泡的形成<sup>[19]</sup>. Ogasawara等人<sup>[15]</sup>报道了Vicenistatin的合成基因簇,由20个分别编码聚酮合酶(PKS)和其他一些修饰酶的基因组成,含有GLM同源基因, *vinH*(编码小亚基, 165aa)和*vinI*(编码大亚基, 469aa). Ogasawara等人<sup>[20]</sup>随后对基因簇中的*vinI*进行了敲除,发现突变株*vinI*-KO丧失了产生Vicenistatin的能力,但积累了一种脱甲基的新化合物. 通过结构鉴定,发现Vicenistatin中 $\beta$ -me-Asp单元被替换成Asp. 同时,他们还将 $\beta$ -me-Asp喂养到*vinI*-KO中,发现它又重新恢复了Vicenistatin的产生能力. 以上结果表明, *vinH*和*vinI*确实负责Vicenistatin中 $\beta$ -me-Asp单元的形成,但当该基因被中断后,生物合成代谢后期的酶也可以利用Asp作为底物.

## 2 甲基转移酶和氨基转移酶联合催化 $\beta$ -甲基氨基酸单元的形成

氨基酸的 $\beta$ 位属于非活化的脂肪碳,因此一般的甲基转移酶很难在这个位置直接引入甲基,但与氨基酸相对应的 $\alpha$ -酮酸,在相同的位置却可以形成共振稳定的具有亲核性的烯醇异构体,从而被甲基转移酶引入甲基. 大自然通过长期的进化筛选,克服了该位置反应惰性的问题,形成了一种不通过自由基,在氨基酸的 $\beta$ 位引入甲基的方式,如图3所示. (1) 首先利用氨基转移酶催化氨基酸产生相应的 $\alpha$ -酮酸; (2) 然后利用甲基转移酶对 $\alpha$ -酮酸的 $\beta$ 位进行甲基化,产生相应的 $\beta$ 位甲基化 $\alpha$ -酮酸; (3) 最后再利用一次氨基转移酶催化新产生的甲基化 $\alpha$ -酮酸的氨基化,产生相应的 $\beta$ 位甲基化氨基酸. 通过这种迂回方式产生的 $\beta$ 位甲基化氨基酸单元在天然产物的生物合成中很普遍,常见于多种活性化合物. 如含有 $\beta$ -me-Glu的Daptomycin, 钙依赖抗生素(calcium-dependent antibiotic, CDA)和A54145; 含有 $\beta$ -me-Leu的Viridogrisein; 含有 $\beta$ -me-Phe的Manopectimycins和Hormaomycin; 含有 $\beta$ -me-Trp的Telomycins, 链黑菌素(Streptonigrin), Maremycins和Indolmycin; 以及含有 $\beta$ -me-Arg的 $\beta$ -methylarginine和Arginomycin等(图1). 下面,将根

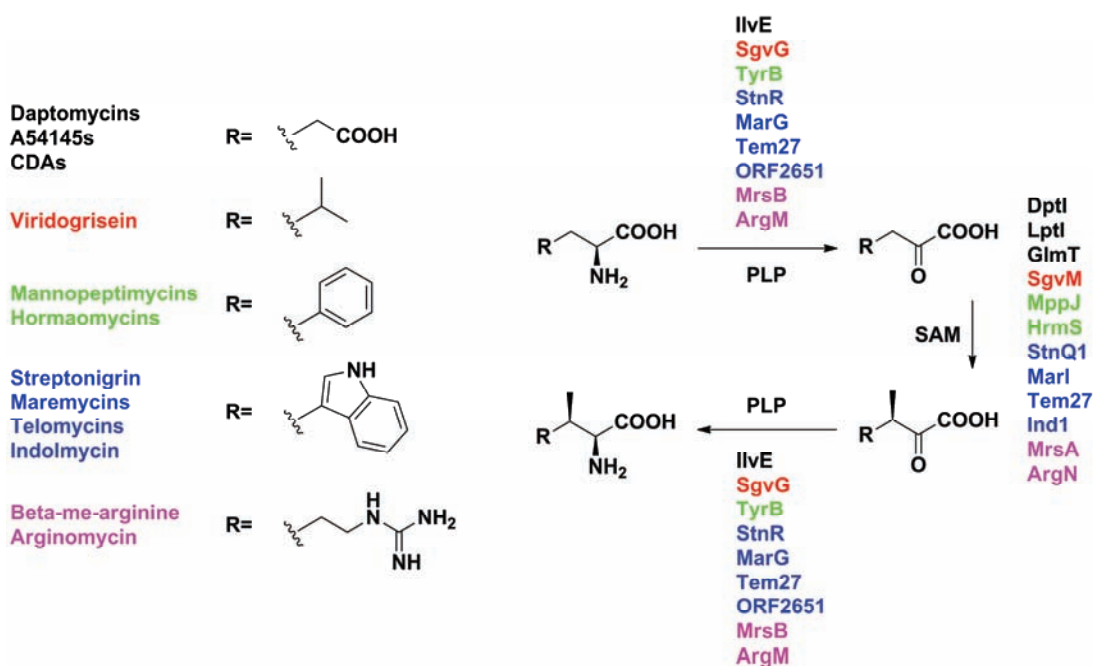


图3 (网络版彩色)甲基转移酶和氨基转移酶联合催化的 $\beta$ -甲基化氨基酸单元的形成机制

Figure 3 (Color online) The formation mechanism of  $\beta$ -methyl amino acid catalyzed by cooperation of aminotransferase and methyltransferase

据不同的 $\beta$ -位甲基化氨基酸生物合成的报道,进行分别阐述。

## 2.1 $\beta$ -me-Glu单元的生物合成

Daptomycin, CDA和A54145都是大环脂肽类抗生素,隶属于酸性酯肽类家族,作用机制类似。以Daptomycin的作用机制为例<sup>[21]</sup>,在与 $\text{Ca}^{2+}$ 形成1:1混合物的情况下,Daptomycin可以产生14~16个单体组成的微胶团;在局部较高浓度条件下,该微胶团接近细胞膜并发生解散,Daptomycin分子在脂肪链尾部的帮助下插入到脂质双分子层中;随后在双分子层中寡聚化,引起细胞膜穿孔;整个过程中可能会导致细胞内钾离子外排和细胞膜去极化,最终造成细胞死亡。目前,仅在Daptomycin, CDA和A54145 3种天然产物中发现含有 $\beta$ -me-Glu单元,它们的生物合成方式都已经报道。

Daptomycin由玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)产生,属于A21978C家族的成员<sup>[22]</sup>(由13个氨基酸单元形成大环的含有酯键环肽,环外有3个氨基酸单元,其中1个通过酰胺键连接1分子脂肪酸)。Daptomycin是一种通过在A21978C产生菌的发酵过程中,添加正癸酸生物转化产生的非天然-天然产

物<sup>[23]</sup>,目前已经上市,作为治疗革兰氏阳性细菌引起的皮肤感染以及菌血症的药物。A21978C的生物合成基因簇由3个NRPS编码基因以及其他修饰基因组成,其中存在1个甲基转移酶编码基因*dptI*<sup>[21]</sup>。Ngyen等人<sup>[24]</sup>将*dptI*回补到*dptGHJ*-KO的突变株后,后者恢复了含有 $\beta$ -me-Glu单元的A21978C系列化合物的产生;而回补其他基因,如*dptG*, *dptH*或*dptJ*,都不能达到这种效果。该实验结果表明,*dptI*基因与Daptomycin中 $\beta$ -me-Glu单元的生物合成直接相关。

A54145是由弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)产生的一组环酯肽的统称,由13个氨基酸单元形成的大环酯肽,环外含有3个氨基酸和1个脂肪酸分子组成的末端基团。Miao等人<sup>[25]</sup>报道了这组化合物的生物合成基因簇,由NRPS编码基因及一些修饰酶编码基因组成,其中含有1个*dptI*的同源基因*lptI*。该基因的编码区含有1个稀有的TTA密码子,这在*lpt*基因簇中是唯一的一个。TTA一般出现在菌株生长后期表达的一些基因中,与含有 $\beta$ -me-Glu单元的A54145组分通常产生在发酵的后期一致,推测可能与该基因在发酵后期才转录表达有关。由于*lptI*与Daptomycin和CDA基因簇中的同源基因序列太相似,该研究没有做进一步实验验证。

CDA是由天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)产生的一组环酯肽的统称,由10个氨基酸单元形成大环酯肽,环外含有1分子丝氨酸通过酰胺键连接1分子2,3-环氧己酸组成. CDA的合成基因簇<sup>[26]</sup>也是由NRPS及一些修饰酶编码基因组成,其中含有1个*dptI*同源基因*glmT*. Milne等人<sup>[27]</sup>首先对CDA和Daptomycin中的 $\beta$ -me-Glu绝对构型进行了测定,确定它们都含有3*R*-me-Glu单元;接下来对*glmT*的突变株分别喂养3*R*-me-Glu和3*S*-me-Glu,发现喂养终浓度为50  $\mu\text{g/mL}$ 的3*R*-me-Glu能够使得*glmT*-KO菌株恢复产生CDA组分,而喂养更高浓度(300  $\mu\text{g/mL}$ )的3*S*-me-Glu却不能使该突变株恢复CDA组分的产生. 在喂养两种 $\beta$ -me-Glu的同时,该研究小组还喂养了 $\beta$ 位甲基化的 $\alpha$ -酮酸( $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -酮戊二酸),发现3-me-KG同样能使*glmT*-KO恢复产生CDA的能力. 该研究推测, CDA的产菌里可能存在某种氨基转移酶,能够催化3-me-KG转氨生成3*R*-me-Glu,从而供应到CDA的生物合成代谢中. 以上实验结论确证, *glmT*参与了CDA中3*R*-me-Glu的生物合成. Mahlert等人<sup>[28]</sup>对*glmT*, *dptI*, *lptI*进行了基因克隆与蛋白表达. 体外生化实验结果表明, *GlmT*不能识别游离的*L*-Glu, *D*-Glu以及含有Glu单元的CDA,同样不能识别PCP(肽基载体蛋白)连接的*L*-Glu和*D*-Glu,但能够催化 $\alpha$ -KG发生 $\beta$ -位甲基化,形成3-me-KG. *DptI*和*LptI*同样能催化相同的反应. 这是第一次有体外生化证据表明, *GlmT*及其同源蛋白能够催化 $\alpha$ -KG的 $\beta$ -位甲基化. 接下来,他们从CDA产生菌中克隆了一种氨基酸转移酶*IlvE*,添加缬氨酸(*L*-Valine)作为氨基供体时,可以催化3-me-KG形成 $\beta$ -me-Glu;同时*GlmT*和*IlvE*组合反应也能够转化 $\alpha$ -KG形成 $\beta$ -me-Glu. 该产物的绝对构型被确定为3*R*-me-Glu,与之前的报道中*glmT*-KO的喂养结果一致,也与CDA, Daptomycin及A54145中 $\beta$ -me-Glu单元的绝对构型一致. 鉴于*glmT*, *dptI*, *lptI*高度同源,推测它们应该具有相同的功能,另外3种抗生素的合成基因簇中都没有氨基转移酶编码基因,因此CDA, Daptomycin及A54145的生物合成很可能与相应产生菌中的初级代谢发生了对话交流.

## 2.2 $\beta$ -me-Leu单元的生物合成

Viridogrisein(灰绿菌素),又名etamycin,是由*Streptomyces griseoviridis*(灰绿链霉菌)产生的一类环酯肽类抗生素,属于链阳霉素家族,能够与核糖体50S

亚基结合从而终止肽链的延伸,而显示出抑菌活性. 该化合物大环结构中含有3*S*-me-Leu单元. Xie等人<sup>[29]</sup>克隆了Viridogrisein的生物合成基因簇,其由编码NRPS及修饰酶的若干基因组成,含有2个位置临近、分别编码甲基转移酶(*sgvG*)和氨基转移酶(*sgvM*)的基因,并且二者位于1个操纵子. *SgvM*与*IlvE*类型的氨基转移酶具有高的相似性(一致性53%,相似性68%),推测这2个基因可能联合参与了Viridogrisein中3*S*-me-Leu单元的生物合成.

## 2.3 $\beta$ -me-Phe单元的生物合成

Mannopectimycins是由*Streptomyces hygroscopicus*(吸水链霉菌)产生的一类含有糖基的酯肽类抗生素,在体内和体外实验中,对甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌(MRSA)、万古霉素抗性的肠球菌(VRE)和盘尼西林抗性的肺炎链球菌(PRS)具有非常好的抑制活性,其作用机制是阻止革兰氏阳性菌细胞壁合成中的转糖基化反应,但不会与万古霉素类抗生素产生交叉抗性. Mannopectimycins的一种半合成结构类似物, AC98-6446, 比其天然母体活性更好,对MRSA, VRE和PRS的活性达到MIC(最小抑菌浓度)15~60 ng/mL,因此该类化合物逐渐成为一种潜在的治疗药物<sup>[30]</sup>. Mannopectimycins化学结构中含有3*S*-me-Phe单元. Magarvey等人<sup>[31]</sup>克隆了该系列化合物的生物合成基因簇,由编码NRPS和一些修饰酶等的基因组成,其中只有1个甲基转移酶编码基因, *mppJ*. 随后的敲除实验表明, *mppJ*-KO丧失了产生Mannopectimycins的能力,但积累了微量的线性去甲基化Mannopectimycins类似物. 该结果一定程度上说明*mppJ*参与了 $\beta$ -me-Phe的生物合成. Huang等人<sup>[32]</sup>在体外克隆并表达了MppJ蛋白,体外酶学试验显示, MppJ不能转化游离的*L*-Phe或*D*-Phe,但能够催化苯丙酮酸(Ppy)产生3-me-Ppy. 为了明确MppJ作用的是游离底物还是挂载到蛋白上的底物,该研究测试了MppJ对PCP-Ppy(Ppy上载到肽基载体蛋白上)的活性,结果发现没有任何产物产生,这表明MppJ的直接底物是游离的Ppy. 虽然Mannopectimycins的合成基因簇中含有潜在的2个氨基转移酶, MppP和MppQ,但它们都不能在体外转化3-me-Ppy形成 $\beta$ -me-Phe. 于是, Huang等人<sup>[32]</sup>从大肠杆菌中克隆表达了Tyrosine氨基转移酶TyrB,体外酶学实验表明, TryB可以将Phe转化生成Ppy,也可以将3-me-Ppy转化生成 $\beta$ -me-



Phe; 由于无法从Mannopectimycins的产生菌中获得TryB的同源蛋白信息(当时该菌没有基因组测序), 所以仅利用细胞裂解液做了前面的转化实验, 都能得到相应的产物, 因此推测Mannopectimycins的产生菌中应该有TryB或类似的氨基转移酶存在. 以上结果从体外证实了MppJ与 $\beta$ -me-Phe的生物合成相关. Zou等人<sup>[33]</sup>对MppJ的晶体结构进行了解析, 该蛋白是一个特殊的含有非血红素铁结合的甲基转移酶, 三价铁离子( $\text{Fe}^{3+}$ )介导了Ppy发生 $\beta$ 位甲基化的过程, MppJ是第1例结构被解析的催化氨基酸 $\beta$ -位甲基化的甲基转移酶. 通过分析底物和蛋白复合物结构, 并结合体外生化实验, 确定MppJ催化产物的构型是3R构型, 但在与TyrB联合反应中, 由于异构的作用(原因可能来自于3-me-Ppy在溶液中的异构作用或酶的作用), 随反应时间的延长先后产生3R-me-Phe和3S-me-Phe, 而后者会被Mannopectimycins生物合成途径中其他的酶筛选, 最终进入该物质的化学骨架中.

Hormaomycin是由灰黄链霉菌(*Streptomyces griseoflavus*)产生的一类结构高度修饰的环酯肽. 这类化合物抗菌谱极窄, 仅对拟棒状放线菌有抑制活性, 它们主要是作为一种细菌激素, 来调节菌丝体的形态分化以及诱导活性次级代谢产物的产生. 有研究表明, 在多种放线菌中, 纳摩尔级的该物质就可以诱导抗生素的产生以及菌丝体的分化. Hofer等人<sup>[34]</sup>报道了该物质的生物合成基因簇, 由编码NRPS和一些修饰酶的基因组成, 其中含有一个MppJ同源蛋白的基因(一致性52%, 相似性67%), *hrmS*. 该研究通过喂养与 $\beta$ -me-Phe单元类似的氨基酸, 初步证实了*hrmS*在Hormaomycin生物合成中的作用. 喂养结果显示, L型酪氨酸(L-Tyr)及苯丙甘氨酸不能进入Hormaomycin的骨架中; 邻位及间位氟代苯丙氨酸能够进入Hormaomycin的骨架中; 对位氟代、氯代、溴代及硝化苯丙氨酸都不能进入Hormaomycin的骨架中, 并会抑制Hormaomycin中 $\beta$ -me-Phe的形成, 代之以Phe单元. 喂养对位取代的苯丙氨酸类似物可能会抑制HrmS或与之相配合的氨基转移酶, 从而导致上述现象, 但还需要进一步证实.

## 2.4 $\beta$ -me-Trp单元的生物合成

Streptonigrin是由绒毛链霉菌(*Streptomyces flocculus*)产生的一种氨基苯醌类生物碱, 具有很好的抗病毒、抗肿瘤及抑制细菌与真菌的活性. Streptonigrin

及其类似物(如淡紫醌霉素(Lavendamycin)等)曾被作为一种潜在药物用于抗肿瘤临床测试, 可以诱导DNA单链和双链的断裂, 也可以通过抑制II型拓扑异构酶的活性而阻断DNA和RNA的合成, 但由于毒性太强, 没有通过完整的临床实验. 对于Streptonigrin生物合成的早期研究表明, 该物质结构中的4-苯基吡啶甲酸单元来源于 $\beta$ 位甲基化的色氨酸, 并且从其发酵液中分离得到了3R-me-Trp, 因此很久以来, 3R-me-Trp被认为是Streptonigrin的合成前体<sup>[35]</sup>. Xu等人<sup>[36]</sup>克隆了该物质的完整合成基因簇, 由一系列的修饰酶编码基因组成, 其中含有3个连续开放阅读框组成的基因盒, *stnQ1-stnK3-stnR*, 分别编码甲基转移酶、异构酶和氨基转移酶. Kong等人<sup>[37]</sup>对*stnQ1*进行基因敲除实验发现, *stnQ1*-KO丧失了产生Streptonigrin的能力, 但积累了一个新的化合物, 经核磁共振波谱(NMR)确证为脱甲基的Streptonigrin. 同时, Kong对该突变株的喂养实验表明, 3S-me-Trp, 而不是之前一直认为的3R-me-Trp, 能进入Streptonigrin的分子骨架中. 通过体外生化实验, 发现StnQ1和StnR可以联合产生3R-me-Trp, 而StnQ1, StnK3和StnR 3个蛋白联合可以产生3S-me-Trp, 其中StnR更倾向于以3S-me-Ipy为底物. 因此, 以上实验结果表明, 3S-me-Trp才是真正进入Streptonigrin生物合成的直接前体, 3R-me-Trp只是一个支路产物.

Maremycins是由海洋链霉菌(*Streptomyces* sp. B9173)产生的一系列氧吡啶类生物碱的统称, 含有3-羟基-2-氧吡啶单元的Maremycin A, B, C1, C2, D1和D2<sup>[38,39]</sup>, 以及含有螺环共轭氧吡啶单元的Maremycin E, F和G<sup>[39,40]</sup>. 氧吡啶类天然产物通常具有良好的生物活性, 如抗肿瘤、抗人类免疫缺陷病毒、抗结核分枝杆菌、抗高血压等. 近年来, 氧吡啶单元越来越受到化学合成方面的关注, 大量含有氧吡啶结构的化合物被报道, 许多已经成为药物及药物前体. 两类Maremycin化合物结构中都含有3S-me-Trp单元. Zou等人<sup>[41]</sup>克隆了该系列化合物的生物合成基因簇, 通过边界敲除, 将其合成基因锁定在17个开放阅读框内, 其中含有与Streptonigrin基因簇中*stnQ1-stnK3-stnR*高度同源的基因盒, *marG*(与*stnR*有64%的一致性), *marH*(与*stnK3*有83%的一致性), *marI*(与*stnQ1*有64%的一致性). 对编码甲基转移酶的*marI*敲除发现, *marI*-KO丧失了产生Maremycin系列化合物的能力, 同时也没有积累任何中间产物, 但喂养3S-me-Trp,

而不是3*R*-me-Trp, 能够恢复该突变株产生Maremycins, 说明与Streptonigrin相似, 3*S*-me-Trp才是这类化合物的直接前体. 同时, Zou等人<sup>[41]</sup>分别对MarI, MarH和MarG进行蛋白表达, 体外实验证实MarI是吡啶丙酮酸(Ipy)甲基转移酶, MarH是β位甲基化吡啶丙酮酸(3-me-Ipy)异构酶, MarG是Ipy和3-me-Ipy氨基转移酶, MarI和MarG组合可以产生3*R*-me-Trp而MarI, MarH和MarG 3个蛋白的组合可以生成3*S*-me-Trp.

Telomycin是由链霉菌(*Streptomyces canus* C159)产生的一类环酯肽类抗生素的统称, 对革兰氏阳性病原菌, 如盘尼西林抗性的金黄色葡萄球菌具有优良的抑制活性. Fu等人<sup>[42]</sup>克隆和鉴定了Telomycin的完整生物合成基因簇, 其由34个可阅读框组成, 包含编码NRPS及一些修饰酶的基因, 其中含有1个编码氨基转移酶(N端)和甲基转移酶(C端)双结构域的基因, *tem27*. *Tem27*的甲基转移酶结构域与Streptonigrin基因簇中的StnQ1具有较高序列相似性(一致性达39%, 相似性达54%). 该研究通过对该基因进行敲除发现, *tem27*-KO丧失产生所有Telomycin类似物的能力, 由于当前还没有该蛋白的体外生化实验数据, 所以还不能完全确定Telomycin中的β-me-Trp单元的生物合成与该基因有关. 根据Maremycins和Streptonigrin中3*R*-me-Trp生物合成的报道, 该物质的体外酶反应中仅需要MarI/MarG和StnQ1/StnR两个组合即可, 不需要添加额外氨基供体, 这之前报道的β-me-Glu和β-me-Phe的合成是不同的, 因此通过研究底物Trp在2个蛋白间如何传递及最终如何生成3*R*-me-Trp的酶学机制将是非常有趣的科学问题. 要实现该设想, 最需要的就是阐明2个蛋白的晶体复合结构, 可是2个蛋白的结晶性质很大程度上是不同的, 因此推测很难做到. 但是, 由于Telomycin中*tem27*基因编码的是一个特殊的氨基转移酶与甲基转移酶融合蛋白, 所以利用该蛋白进行晶体或晶体与底物Trp复合物的筛选, 将是一个不错的材料.

吡啶毒素(Indolmycin)是一种生物碱, 在陆生及海洋来源的细菌发酵物中都有发现, 如*Streptomyces griseus* ATCC 12648(一种灰色链霉菌)及藤黄紫假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas luteoviolacea*). 作为一种Trp的结构类似物, Indolmycin更多地被用作色胺酰-tRNA合成酶抑制剂, 但当前还没有相关测试在人体上进行. 最近有研究发现, Indolmycin对各种人源病原菌, 如幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)和莫匹罗

星、甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 具有很强的抑制活性<sup>[43,44]</sup>. 在早期关于Indolmycin的生物合成研究中发现, 同位素标记的Trp及3-me-Ipy可以进入该物质的结构骨架中, 另外Speedie等人<sup>[45]</sup>证实*Streptomyces griseus* ATCC 12648的细胞破碎物上清液中存在一组甲基转移酶和氨基转移酶, 联合催化Trp形成3-me-Ipy. Du等人<sup>[46]</sup>从*Streptomyces griseus* ATCC 12648中克隆得到Indolmycin的完整生物合成基因簇, 由一些修饰酶组成, 其中*ind1*编码碳-甲基转移酶, *ind2*编码脱氢酶, *ind4*和*ind8*编码氨基转移酶. 基因敲除结果显示, *ind1*-KO和*ind2*-KO都丧失了产生Indolmycin的能力; 而*ind4*-KO不能产生Indolmycin但积累吡啶毒素, *ind8*-KO继续产生Indolmycin. 该敲除结果说明, *ind4*和*ind8*与3-me-Ipy的形成无关, 体外生化结果也证明了这一点. 体外生化结果表明, Ind1可以将Ipy转化生成3-me-Ipy, 而Ind2可以将后者还原生成吡啶毒素. 通过对Indolmycin产生菌的基因组信息进行分析, 该研究小组找到2个Maremycin基因簇中的氨基转移酶MarG同源的基因, *orf2651*和*orf4725*. 相应蛋白的体外生化实验表明, ORF2651和ORF4725都可以催化Trp转氨基反应产生Ipy, 但荧光实时定量DNA聚合酶链式反应(RT-PCR)表明, 只有*orf2651*的转录水平与Indolmycin中各合成基因同步, 因此推测, *orf2651*, 而不是*orf4725*, 直接参与了Indolmycin的生物合成. 接下来的Ind1-Ind2-ORF2651联合反应也证实, 可以将Trp转化生成吡啶毒素.

## 2.5 β-me-Arg单元的生物合成

β-me-Arg是由一种丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93)产生的游离的非天然氨基酸, 可以高效抑制与其产生菌近源的大豆病原菌*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*的生长, 但这种抑制可以被外源添加的L-Arg解除, 但不能被其他氨基酸解除. 该实验结果表明, (1) 以上两种假单胞菌在生态链上可能具有竞争关系; (2) β-me-Arg可能是Arg生物合成途径或Arg利用途径中的一种抑制剂. Braun等人<sup>[47]</sup>报道了β-me-Arg的生物合成基因簇, 主要包括3个基因, 编码甲基转移酶*mrsA*, 编码氨基转移酶*mrsB*和编码外排泵*mrsC*. *mrsA*敲除后, 不再产生β-me-Arg, 但将*mrsA*-*mrsB*-*mrsC*共同回补到该突变株后, 其又恢复了产生β-me-Arg的能力; 同时, *mrsA*-



*mrsB-mrsC*在大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中的异源表达中也能产生 $\beta$ -me-Arg. 以上实验数据说明, *mrsA-mrsB-mrsC*组成的基因簇与 $\beta$ -me-Arg的形成直接相关. 在体外酶学实验中, Braun等人<sup>[47]</sup>克隆和表达了MrsA蛋白, 发现该蛋白可以高效地转化Arg的 $\alpha$ -酮酸(5- guanidino-2-oxo-pentanoic acid, Gop)形成 $\beta$ 位甲基化的3-me-Gop, 但不能利用丙酮酸(pyruvate, Py)、 $\alpha$ -KG和Ppy作为底物. 据此推测, MrsA是一种专一的碱性氨基酸的 $\alpha$ -酮酸 $\beta$ 位甲基转移酶.

Arginomycin是由链霉菌*Streptomyces arginensis* NRRL 15941产生的肽核苷类抗生素, 对某些真菌及革兰氏阳性细菌, 如草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)显示生物活性. 该物质在化学结构上与农用抗生素杀稻瘟菌素S(Blasticidin S)具有很大相似性, 但对老鼠显示更低的毒性. 较早的喂养实验表明, Arginomycin中的 $\beta$ -me-Arg单元来自于Arg. Feng等人<sup>[48]</sup>报道了Arginomycin的生物合成基因簇, 由14个可阅读框编码的一系列修饰酶组成, 其中*argM*编码氨基转移酶(与TryB具有30%的一致性, 43%的相似性), *argN*编码甲基转移酶(与MppJ具有25%的一致性, 37%的相似性). 将*argM-argN*在大肠杆菌BL21(DE3)中进行异源表达, 检测到了 $\beta$ -me-Arg的产生, 并利用核磁共振谱确定了产物的甲基为*R*构型. 通过相应基因的克隆和蛋白表达和体外酶学实验表明, ArgM特异性地以*L*-Arg为底物, 而不能利用*D*-Arg, 高精氨酸(*L*-homoarginine)和*N*-甲基精氨酸(*N*-methylarginine); 同时 ArgM-ArgN可以联合转化*L*-Arg生成3*R*-me-Arg, 但氨基供体只能是天冬氨酸.

### 3 S-腺苷甲硫氨酸自由基酶催化的 $\beta$ -甲基氨基酸单元的形成

利用甲基转移酶/氨基转移酶组合, 通过间接的方式, 可以在氨基酸非活化的 $\beta$ 位引入甲基. 此外, 大自然还进化出另一种直接引入甲基的方式, 那就是借助B<sub>12</sub>-radical SAM依赖的甲基转移酶. 这类酶在抗生素的生物合成中非常普遍, 如Carbapenem<sup>[49]</sup>, Chondrochloren<sup>[50]</sup>, Clorobiocin<sup>[51]</sup>, 福提霉素(Fortimicin)<sup>[52]</sup>、磷霉素(Fosfomycin)<sup>[53]</sup>、庆大霉素(Gentamicin)<sup>[54]</sup>、丝裂霉素(Mitomycin)<sup>[55]</sup>、默诺霉素(Moenomycin)<sup>[56]</sup>、复活霉素(Novobiocin)<sup>[57]</sup>、密旋霉素(Pactamycin)<sup>[58]</sup>和草胺磷(*L*-phosphinothricin)<sup>[59]</sup>等,

然而对它们催化机制的研究却很少, 而且充满争议. 当前, 也只有为数不多的几例体外实验的研究被报道, 即来自Phosalacine的PhpK<sup>[59]</sup>, 来自硫链丝菌素(Thiostrepton A)的TsrM<sup>[60]</sup>, 来自Gentamicin的GenK<sup>[54]</sup>, 来自沙纳霉素(Thienamycin)的ThnK<sup>[49]</sup>和来自Polytheonamide的PoyC<sup>[61]</sup>. 这5种酶作用的底物类型不相同, PhpK对磷原子进行甲基化, TsrM对sp<sup>2</sup>的碳原子进行甲基化, 而GenK, ThnK和PoyC都是对sp<sup>3</sup>的碳原子进行甲基化, 因此其催化机制也不尽一致. 对于在氨基酸的 $\beta$ 位引入甲基的情况, 有生物合成机制报道的只有2例, 分别来自波卓霉素(Bottromycin)和Polytheonamide(图1), 下面作简单介绍.

#### 3.1 Bottromycin中 $\beta$ -me-Val, $\beta$ -me-Pro和 $\beta$ -me-Phe单元的生物合成

波卓霉素(Bottromycin)首先发现于波卓链霉菌(*Streptomyces bottropensis*)的发酵液中, 是一类高度修饰的核糖体肽类抗生素, 对甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌和万古霉素抗性的肠球菌都有很好的抑制活性. 其作用机制如下: 该化合物可以与核糖体50S亚基的A位点(氨酰-tRNA结合位点)发生相互作用, 从而抑制蛋白质的合成<sup>[62]</sup>. 在当前临床应用中, 还没有抗生素以核糖体50S亚基的A位点为靶点, 因此Bottromycin被认为是一种潜在的新型抗感染药物, 但它的缺点是在血液中的半衰期很短, 需待改进<sup>[63]</sup>. Bottromycin含有4个甲基化的氨基酸单元, 即 $\beta$ -me-Val,  $\beta$ -me-Pro,  $\beta$ -me-Phe和氧甲基化的Asp. 几乎在同一时间, Crone等人<sup>[64]</sup>和Huo等人<sup>[65]</sup>分别报道了从*Streptomyces scabies*和*Streptomyces* sp. BC16019中克隆得到的Bottromycin生物合成基因簇, 后者在*Streptomyces coelicolor*中实现了异源表达, 包含13个开放阅读框, 其中含有3个编码B<sub>12</sub>-radical SAM依赖的甲基转移酶的基因(*botRMT1*, *botRMT2*和*botRMT3*), 以及1个氧甲基转移酶编码基因(*botOMT*). 分别对4个基因在异源表达菌株中进行敲除, 通过质谱检测积累产物的分子量, 并与野生型进行对比, 最终确定了*botRMT1*负责 $\beta$ -me-Phe的形成, *botRMT2*负责 $\beta$ -me-Val的形成, *botRMT3*负责 $\beta$ -me-Pro的形成, *botOMT*负责氧甲基化的Asp形成.

#### 3.2 Polytheonamide中 $\beta$ -me-Val单元的生物合成

Polytheonamide是从一种海绵*Theonella swinhoei*

中分离得到的一类高度修饰的核糖体肽类抗生素. Piel 课题组<sup>[66]</sup>克隆和分析了该物质的生物合成基因簇,发现它来源于一种与海绵共生的、不可培养的 *Entotheonella*, 包含前体肽编码基因和其他修饰酶编码基因在内的12个可阅读框,其中含有 *poyB* 和 *poyC* 两个  $B_{12}$ -radical SAM 依赖的甲基转移酶编码基因. Parent 等人<sup>[61]</sup>分别对 *PoyB* 和 *PoyC* 两个蛋白在大肠杆菌中进行表达,然而刚开始均已失败告终. 根据之前关于这类酶表达纯化的报道,他们对2个蛋白在辅因子钴胺素(cobalamin)、硫化物(sulfide)和铁离子存在的情况下,进行了重构,最终得到了 *PoyC* 的可溶性蛋白,但 *PoyB* 仍然在沉淀中. 经纯化得到的 *PoyC* 蛋白在260~270 nm有较强紫外吸收,在420和464 nm有较弱吸收,表明该蛋白结合铁硫簇,与该蛋白的生物信息学预测结果一致. 通过厌氧条件下的铁硫簇重建, *PoyC* 的紫外吸收有所改变,最大吸收迁移到280 nm,其420 nm的吸收有所升高,而此时的铁硫含量表明该蛋白含有3个四铁四硫簇,与其序列中含有的11个保守的半胱氨酸残基一致. 为了保护体外反应中 *PoyC* 结合的钴胺素辅因子,测试了多种还原剂体系,发现在  $B_{12}$ -radical SAM 依赖的甲基转移酶反应中使应用的还原剂都不起作用. 最后发现,曾经在  $B_{12}$  依赖的甲硫氨酸合成酶中应用的柠檬酸钛还原体系对 *PoyC* 有效果,在底物 *PoyA* 和 SAM 同时存在的情况下,成功检测到了 SAH(S-腺苷同型半胱氨酸)和 5'-dA(5'-脱氧腺苷). 在体外反应中使用甲基全氘代 SAM( $CD_3$ -SAM)为底物时,高分辨率质谱结果显示,产物的分子量比底物 *PoyA* 大17 Da,表明在 *PoyC* 作用下,一分子  $CD_3$ -SAM 上的氘代甲基成功转移到了底物上. 同时,Parent 等人<sup>[61]</sup>又利用 LC-MS/MS 对产物的碎片进一步分析,发现甲基基团最终转移到了 *PoyA* 第14个 *L*-Val 上. 由于 Polytheonamide 的成熟肽在该位置是 *D*-Val,为了明确 *PoyC* 的底物是何种构型的氨基酸以及它是否有底物宽泛性,Parent 等人<sup>[61]</sup>又测试了 *PoyA*<sub>1-15</sub>V<sub>D</sub>,但没有发现甲基化产物的生成,说明 Polytheonamide 在产生过程中, *PoyC* 催化的  $\beta$  位甲基化先于 *L*-Val 的构型变化. 对 *PoyC* 上结合  $B_{12}$  的分析发现,蛋白中结合两类钴胺素,腺苷钴胺素(AdoCbl)和甲基钴胺素(MeCbl)比例约为4:1,在酶催化循环中,该比例保持恒定. 同时,在添加  $CD_3$ -SAM 的反应中,MeCbl 几乎全部转化为  $CD_3$ -Cbl,说明钴胺素辅因子在酶催化过程中可以循环使用. 基于以

上实验结果和其他关于  $B_{12}$ -radical SAM 依赖的甲基转移酶的报道,Parent 等人<sup>[61]</sup>提出一种可能的氨基酸  $\beta$ -位甲基化机制如图4所示. (1) *PoyC* 催化一分子 SAM 的还原性裂解,产生 5'-dA 自由基; (2) 5'-dA 自由基拔取氨基酸  $\beta$  位上的1个氢原子,自身形成 5'-dA 分子,同时产生氨基酸  $\beta$  位自由基; (3) *PoyC* 催化另一分子 SAM 产生 SAH,一分子甲基基团转移到 Cbl(I) 上,形成 MeCbl(III); (4) MeCbl(III) 随后发生均裂,形成甲基自由基和 Cbl(II); (5) 甲基自由基与氨基酸  $\beta$  位自由基发生相互淬灭,形成  $\beta$  位甲基氨基酸; (6) Cbl(II) 经还原作用形成 Cbl(I),后者再与 SAM 反应形成 MeCbl,进入新一轮的酶催化.

## 4 展望

$\beta$ -甲基化氨基酸单元作为一种独特的非天然氨基酸,对天然产物发挥其生物活性具有十分重要的作用. 研究证明,含有  $\beta$ -me-Glu 单元的 A21978C (Daptomycin 的天然类似物),比相同位置含有 Glu 单元的 A21978C 衍生物,最小抑菌浓度要低4~8倍<sup>[24]</sup>;含有  $\beta$ -me-Glu 单元的 A54145 要比含有 Glu 单元的类似物活性更强<sup>[25]</sup>. 基于当前关于  $\beta$ -甲基化氨基酸单元生物合成方式的报道,有必要利用代谢工程、合成生物学和酶工程等多学科手段对其加以利用,以扩大其应用价值. 未来这方面的工作应该主要从以下几个方向展开.

(1) 通过代谢工程手段提高产量. 除了生物活性方面的重要性,  $\beta$  位甲基化氨基酸单元的供应量,对于最终成熟天然产物的产量也具有重要影响. Li 等人<sup>[16]</sup>在 Nikkomycin 的产生菌中过表达负责  $\beta$ -me-Asp 单元形成的 *sanU/sanV* 后, Nikkomycin 的产量提高到原来的1.8倍. Gomez 等人<sup>[18]</sup>在 Streptolydigin 的产生菌中过表达负责  $\beta$ -me-Asp 单元形成的 *slgE1/slGE2*,相应抗生素的产生提高到原来的5.5倍. 以上结果说明,  $\beta$  位甲基化氨基酸单元在原产菌中的供应量,显然是不足的,因此利用代谢工程的手段进行产量改造的空间很大. 未来可以从两个途径展开研究: (i) 除了在抗生素原产菌中提高相应合成基因的拷贝数,也可以通过提高前体氨基酸或其  $\alpha$ -酮酸的供应量来实现. 提高该供应量,可以采取以下两种方式: 对于廉价或容易获得的前体,可以直接在发酵液中喂养; 对于价格昂贵且不容易分离得到的前体,可以通过对产生菌的代谢通路进行改造,将代谢流导向该前体

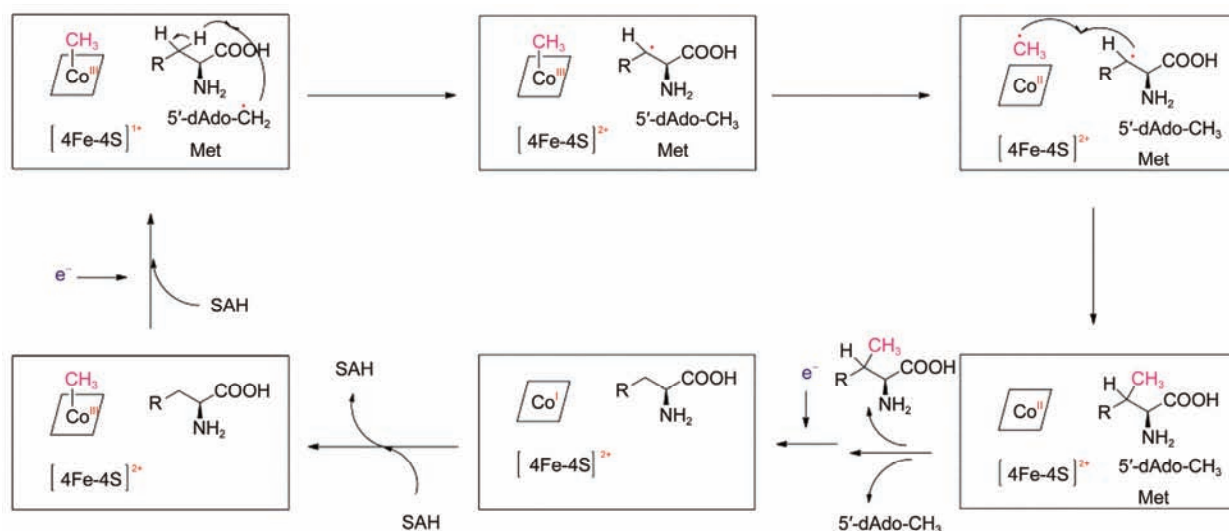


图4 (网络版彩色)S-腺苷甲硫氨酸自由基酶PoyC催化的 $\beta$ -甲基化氨基酸单元形成机制

Figure 4 (Color online) The formation mechanism of  $\beta$ -methyl amino acid catalyzed by  $B_{12}$ -radical SAM dependent methyltransferase, PoyC

的产生。(ii) 如果途径(i)的改造效果不明显或者很难再将产量提高到一个新的水平, 可以将负责 $\beta$ 位甲基化氨基酸单元合成的基因模块在异源宿主(比如大肠杆菌、酵母菌等代谢旺盛的模式生物)里进行表达, 分离提纯得到相应的产物, 再喂养到抗生素产生菌中, 以提高最终产量。途径(ii)已经普遍应用于很多重要天然药物的产量提高中, 如通过在酵母中改造青蒿酸的代谢, 在大肠杆菌中改造紫杉烯的代谢, 从而分别提高了终产物青蒿素和紫杉醇的产量<sup>[67]</sup>。因此, 通过改造宿主细胞的代谢流, 以提高前体的供应量, 是促进 $\beta$ 位甲基化氨基酸单元产量提高的方式之一。

(2) 通过合成生物学手段创新。芳香族的 $\beta$ -甲基化氨基酸通常被作为一种手性工具, 引入到一些活性肽中, 如促黑激素( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)<sup>[68]</sup>、强啡肽(Dynorphin)<sup>[69]</sup>、胰高血糖素(Glucagon)<sup>[70]</sup>、催产素(Oxytocin)<sup>[71]</sup>、八肽胆囊收缩素(CCK-8)<sup>[72]</sup>和阿片肽(Opoid)<sup>[73]</sup>等, 以研究相应的氨基酸与其靶点在结合部位的三维取向信息, 从而辅助药物设计。在活性肽中引入 $\beta$ -甲基化氨基酸的方式, 通常是化学合成。然而, 由于氨基酸的 $\beta$ 位属于非活化的脂肪碳, 化学合成一般比较困难复杂, 特异性不强, 而通过生物合成的方式引入将是方便快捷的。可以通过两种方式实现生物合成直接引入: (i) 利用酶法在体外合成游离芳香族 $\beta$ 位甲基化氨基酸单元, 再利用固相肽合成的方式组装成相应的

活性多肽; (ii) 直接利用芳香族 $\beta$ -甲基化氨基酸单元合成酶, 如 $B_{12}$ -radical依赖的 $\beta$ -me-Phe合成酶(将来也可以通过蛋白结构改造的方式, 让该酶能识别Trp或Tyr单元), 对活性肽的特定位点进行 $\beta$ 位甲基化修饰。在生物体内, 蛋白酶一般通过识别相应多肽底物的特征氨基酸序列, 进行切割和降解, 是造成某些多肽类药物体内半衰期很短的原因之一。 $\beta$ -甲基化氨基酸作为一种非标准氨基酸, 将来如果被引入到多肽药物的生物合成或化学合成中, 或许可以减弱体内蛋白酶的降解作用, 延长持效期。

(3) 通过酶工程的方式大量获得。近期, 有报道通过定向改造色氨酸合成酶, 使其能够特异地催化苏氨酸和吡啶的缩合, 产生3S-甲基化色氨酸, 是一个突破性的成果, 比生物合成中3个酶联合作用更加高效, 便于大规模应用<sup>[74]</sup>。虽然类似色氨酸合成酶这样的材料并不多见, 并且存在其自身的局限性(只能产生3S-甲基化色氨酸, 而不能产生3R-甲基化色氨酸), 决定该方式不能被广泛应用于其他 $\beta$ -甲基化氨基酸的合成, 但为该领域的研究提供了一个全新的思路, 即通过对当前已经鉴定的3类 $\beta$ -甲基化氨基酸合成酶进行酶结构的定向改造, 以扩大其底物宽泛性、改变其底物特异性、提高酶催化效率, 或许可以得到更多非天然的 $\beta$ -甲基化氨基酸, 成为化学合成重要化学品的前体。当然, 这种特殊修饰的氨基酸单元的应用潜力一定还有很大, 期待众多的科技人员一起努力进行共同挖掘。



## 参考文献

- 1 Li J W H, Vederas J C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science*, 2009, 325: 161–165
- 2 Mishra B B, Tiwari V K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem*, 2011, 46: 4769–4807
- 3 Cragg G M, Newman D J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830: 3670–3695
- 4 Walsh C T, O'Brien R V, Khosla C. Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 7098–7124
- 5 Gonzalez-Ruiz A, Seaton R A, Hamed K. Daptomycin: An evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections. *Infect Drug Resist*, 2016, 9: 47–58
- 6 Stenland C J, Lis L G, Schendel F J, et al. A practical and scalable manufacturing process for an anti-fungal agent, Nikkomycin Z. *Org Process Res Det*, 2013, 17: 265–272
- 7 Koehn F E. New strategies and methods in the discovery of natural product anti-infective agents: The mannopeptimycins. *J Med Chem*, 2008, 51: 2613–2617
- 8 Wecke T, Zuhlke D, Mader U, et al. Daptomycin versus Friulimicin B: In-depth profiling of *Bacillus subtilis* cell envelope stress responses. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 1619–1623
- 9 Williams T L, Yin Y W, Carter C W J. Selective inhibition of bacterial tryptophanyl-tRNA synthetases by indolmycin is mechanism-based. *J Biol Chem*, 2016, 291: 255–265
- 10 Buckel W, Barker H A. Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J Bacteriol*, 1974, 117: 1248–1260
- 11 Gruber K, Kratky C. Coenzyme B<sub>12</sub> dependent glutamate mutase. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6: 598–603
- 12 Lauer B, Russwurm R, Schwarz W, et al. Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety and assembly of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Mol Gen Genet*, 2001, 264: 662–673
- 13 Muller C, Nolden S, Gebhardt P, et al. Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic Friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 1028–1037
- 14 Olano C, Gomez C, Perez M, et al. Deciphering biosynthesis of the RNA polymerase inhibitor streptolydigin and generation of glycosylated derivatives. *Chem Biol*, 2009, 16: 1031–1044
- 15 Ogasawara Y, Katayama K, Minami A, et al. Cloning, sequencing, and functional analysis of the biosynthetic gene cluster of macrolactam antibiotic vicenistatin in *Streptomyces halstedii*. *Chem Biol*, 2004, 11: 79–86
- 16 Li Y, Ling H, Li W, et al. Improvement of nikkomycin production by enhanced copy of *sanU* and *sanV* in *Streptomyces ansochromogenes* and characterization of a novel glutamate mutase encoded by *sanU* and *sanV*. *Metab Eng*, 2005, 7: 165–173
- 17 Heinzelmann E, Berger S, Puk O, et al. A glutamate mutase is involved in the biosynthesis of the lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 447–457
- 18 Gomez C, Horna D H, Olano C, et al. Amino acid precursor supply in the biosynthesis of the RNA polymerase inhibitor streptolydigin by *Streptomyces lydicus*. *J Bacteriol*, 2011, 193: 4214–4223
- 19 Nishiyama Y, Ohmichi T, Kazami S, et al. Vicenistatin induces early endosome-derived vacuole formation in mammalian cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80: 902–910
- 20 Ogasawara Y, Kakinuma K, Eguchi T. Involvement of glutamate mutase in the biosynthesis of the unique starter unit of the macrolactam polyketide antibiotic vicenistatin. *J Antibiot*, 2005, 58: 468–472
- 21 Robbel L, Marahiel M A. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J Biol Chem*, 2010, 285: 27501–27508
- 22 Wang L, Zhao Y, Liu Q, et al. Improvement of A21978C production in *Streptomyces roseosporus* by reporter-guided *rpsL* mutation selection. *J Appl Microbiol*, 2012, 112: 1095–1101
- 23 Penn J, Li X, Whiting A, et al. Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33: 121–128
- 24 Nguyen K T, Kau D, Gu J Q, et al. A glutamic acid 3-methyltransferase encoded by an accessory gene locus important for daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*. *Mol Microbiol*, 2006, 61: 1294–1307
- 25 Miao V, Brost R, Chapple J, et al. The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33: 129–140
- 26 Hojati Z, Milne C, Harvey B, et al. Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol*, 2002, 9: 1175–1187

- 27 Milne C, Powell A, Jim J, et al. Biosynthesis of the (2*S*,3*R*)-3-methyl glutamate residue of nonribosomal lipopeptides. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 11250–11259
- 28 Mahlert C, Kopp F, Thirlway J, et al. Stereospecific enzymatic transformation of alpha-ketoglutarate to (2*S*,3*R*)-3-methyl glutamate during acidic lipopeptide biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 12011–12018
- 29 Xie Y, Wang B, Liu J, et al. Identification of the biosynthetic gene cluster and regulatory cascade for the synergistic antibacterial antibiotics griseoviridin and viridogrisein in *Streptomyces griseoviridis*. *ChemBioChem*, 2012, 13: 2745–2757
- 30 Petersen P J, Wang T Z, Dushin R G, et al. Comparative *in vitro* activities of AC98-6446, a novel semisynthetic glycopeptide derivative of the natural product mannopeptimycin alpha, and other antimicrobial agents against gram-positive clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 739–746
- 31 Magarvey N A, Haltli B, He M, et al. Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drug-resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 2167–2177
- 32 Huang Y T, Lyu S Y, Chuang P H, et al. *In vitro* characterization of enzymes involved in the synthesis of nonproteinogenic residue (2*S*,3*S*)-beta-methylphenylalanine in glycopeptide antibiotic mannopeptimycin. *ChemBioChem*, 2009, 10: 2480–2487
- 33 Zou X W, Liu Y C, Hsu N S, et al. Structure and mechanism of a nonhaem-iron SAM-dependent C-methyltransferase and its engineering to a hydratase and an O-methyltransferase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70: 1549–1560
- 34 Hofer I, Crusemann M, Radzom M, et al. Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem Biol*, 2011, 18: 381–391
- 35 Hartley D L, Speedie M K. A tryptophan C-methyltransferase involved in streptonigrin biosynthesis in *Streptomyces flocculus*. *Biochem J*, 1984, 220: 309–313
- 36 Xu F, Kong D, He X, et al. Characterization of streptonigrin biosynthesis reveals a cryptic carboxyl methylation and an unusual oxidative cleavage of a N–C bond. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 1739–1748
- 37 Kong D, Zou Y, Zhang Z, et al. Identification of (2*S*,3*S*)-beta-methyltryptophan as the real biosynthetic intermediate of antitumor agent streptonigrin. *Sci Rep*, 2016, 6: 20273
- 38 Balk-Bindseil W, Helmke E, Weyland H, et al. Maremycin A and B, new diketopiperazines from a marine *Streptomyces* sp. *Eur J Org Chem*, 1995, 1995: 1291–1294
- 39 Tang Y, Sattler I, Thiericke R, et al. Maremycins C and D, new diketopiperazines, and Maremycins E and F, novel polycyclic spiro-indole metabolites isolated from *Streptomyces* sp. *Eur J Org Chem*, 2001, 2001: 261–267
- 40 Lan Y, Zou Y, Huang T, et al. Indole methylation protects diketopiperazine configuration in the maremycin biosynthetic pathway. *Sci China Chem*, 2016, 59: 1224–1228
- 41 Zou Y, Fang Q, Yin H, et al. Stereospecific biosynthesis of beta-methyltryptophan from (*L*)-tryptophan features a stereochemical switch. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 12951–12955
- 42 Fu C, Keller L, Bauer A, et al. Biosynthetic studies of telomycin reveal new lipopeptides with enhanced activity. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 7692–7705
- 43 Kanamaru T, Nakano Y, Toyoda Y, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of TAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 2455–2459
- 44 Hurdle J G, O'Neill A J, Chopra I. Anti-staphylococcal activity of indolmycin, a potential topical agent for control of staphylococcal infections. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54: 549–552
- 45 Speedie M K, Hornemann U, Floss H G. Isolation and characterization of tryptophan transaminase and indolepyruvate C-methyltransferase. Enzymes involved in indolmycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Biol Chem*, 1975, 250: 7819–7825
- 46 Du Y L, Alkhalaf L M, Ryan K S. *In vitro* reconstitution of indolmycin biosynthesis reveals the molecular basis of oxazolinone assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 2717–2722
- 47 Braun S D, Hofmann J, Wensing A, et al. Identification of the biosynthetic gene cluster for 3-methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 2500–2508
- 48 Feng J, Wu J, Gao J, et al. Biosynthesis of the beta-methylarginine residue of peptidyl nucleoside arginomycin in *Streptomyces arginensis* NRRL 15941. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 5021–5027
- 49 Marous D R, Lloyd E P, Buller A R, et al. Consecutive radical S-adenosylmethionine methylations form the ethyl side chain in thienamycin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 10354–10358
- 50 Rachid S, Scharfe M, Blocker H, et al. Unusual chemistry in the biosynthesis of the antibiotic chondrochlorens. *Chem Biol*, 2009, 16: 70–81
- 51 Westrich L, Heide L, Li S M. CloN6, a novel methyltransferase catalysing the methylation of the pyrrole-2-carboxyl moiety of clorobiocin. *ChemBioChem*, 2003, 4: 768–773

- 52 Dairi T, Ohta T, Hashimoto E, et al. Organization and nature of fortimicin A (astromicin) biosynthetic genes studied using a cosmid library of *Micromonospora olivasterospora* DNA. *Mol Gen Genet*, 1992, 236: 39–48
- 53 Woodyer R D, Li G, Zhao H, et al. New insight into the mechanism of methyl transfer during the biosynthesis of fosfomycin. *Chem Commun*, 2007, (4): 359–361
- 54 Kim H J, McCarty R M, Ogasawara Y, et al. GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: Isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 8093–8096
- 55 Mao Y, Varoglu M, Sherman D H. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem Biol*, 1999, 6: 251–263
- 56 Ostash B, Walker S. Moenomycin family antibiotics: Chemical synthesis, biosynthesis, and biological activity. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 1594–1617
- 57 Steffensky M, Muhlenweg A, Wang Z X, et al. Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44: 1214–1222
- 58 Kudo F, Kasama Y, Hirayama T, et al. Cloning of the pactamycin biosynthetic gene cluster and characterization of a crucial glycosyl-transferase prior to a unique cyclopentane ring formation. *J Antibiot*, 2007, 60: 492–503
- 59 Werner W J, Allen K D, Hu K, et al. *In vitro* phosphinate methylation by PhpK from *Kitasatospora phosalacinea*. *Biochemistry*, 2011, 50: 8986–8988
- 60 Pierre S, Guillot A, Benjdia A, et al. Thiostrepton tryptophan methyltransferase expands the chemistry of radical SAM enzymes. *Nat Chem Biol*, 2012, 8: 957–959
- 61 Parent A, Guillot A, Benjdia A, et al. The B12-radical SAM enzyme poyc catalyzes valine cbeta-methylation during polytheonamide biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 15515–15518
- 62 Gouda H, Kobayashi Y, Yamada T, et al. Three-dimensional solution structure of bottromycin A2: A potent antibiotic active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococci*. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60: 169–171
- 63 Kobayashi Y, Ichioka M, Hirose T, et al. Bottromycin derivatives: Efficient chemical modifications of the ester moiety and evaluation of anti-MRSA and anti-VRE activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 6116–6120
- 64 Crone W J K, Leeper F J, Truman A W. Identification and characterisation of the gene cluster for the anti-MRSA antibiotic bottromycin: Expanding the biosynthetic diversity of ribosomal peptides. *Chem Sci*, 2012, 3: 3516–3521
- 65 Huo L, Rachid S, Stadler M, et al. Synthetic biotechnology to study and engineer ribosomal bottromycin biosynthesis. *Chem Biol*, 2012, 19: 1278–1287
- 66 Freeman M F, Vagstad A L, Piel J. Polytheonamide biosynthesis showcasing the metabolic potential of sponge-associated uncultivated “Entotheonella” bacteria. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 31: 8–14
- 67 Marienhagen J, Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J Biotechnol*, 2013, 163: 166–178
- 68 Haskell-Luevano C, Toth K, Boteju L, et al.  $\beta$ -Methylation of the Phe7 and Trp9 melanotropin side chain pharmacophores affects ligand-receptor interactions and prolonged biological activity. *J Med Chem*, 1997, 40: 2740–2749
- 69 Lung F D, Meyer J P, Lou B S, et al. Effects of modifications of residues in position 3 of dynorphin A(1-11)-NH<sub>2</sub> on kappa receptor selectivity and potency. *J Med Chem*, 1996, 39: 2456–2460
- 70 Azizeh B Y, Shenderovich M D, Trivedi D, et al. Topographical amino acid substitution in position 10 of glucagon leads to antagonists/partial agonists with greater binding differences. *J Med Chem*, 1996, 39: 2449–2455
- 71 Lebl M, Toth G, Slaninova J, et al. Conformationally biased analogs of oxytocin. *Int J Pept Protein Res*, 1992, 40: 148–151
- 72 Kovér K E, Jiao D, Fang S, et al. Conformational analysis of four  $\beta$ -methylphenylalanine stereoisomers in a bioactive peptide by z-filtered relay NMR spectroscopy. *Mag Res Chem*, 1993, 31: 1072–1076
- 73 Toth G, Ioja E, Tomboly C, et al. Beta-methyl substitution of cyclohexylalanine in Dmt-Tic-Cha-Phe peptides results in highly potent delta opioid antagonists. *J Med Chem*, 2007, 50: 328–333
- 74 Herger M, van Roye P, Romney D K, et al. Synthesis of  $\beta$ -branched tryptophan analogues using an engineered subunit of tryptophan synthase. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 8388–8391



Summary for “天然产物中 $\beta$ -位甲基化氨基酸单元的生物合成研究进展”

## Biosynthetic study of $\beta$ -methyl amino acid building blocks involved in natural products

ZHANG YuYang & LIN ShuangJun\*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

\* Corresponding author, E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

Natural products are an important source of pharmaceuticals or drug leads for the human lives. The biosynthetic studies on these small chemical molecules can offer the possibilities to improve the titers and produce a lot of non-natural natural products with enhanced biological activity. Amino acids are a type of important building blocks of natural products, and apart from twenty proteinogenic amino acids, about five hundred nonproteinogenic amino acids were found to be involved into the biosynthesis of natural products. These nonproteinogenic amino acid units in natural products have been confirmed to play crucial roles in their stabilities and biological activities.  $\beta$ -methyl amino acid is one kind of nonproteinogenic amino acids and has been found in many bioactive secondary metabolites, including daptomycin, streptonigrin, indolemycin and so on, and as well as several primary metabolites such as 3-methyl-glutamate in fermentation process of several *Clostridium* sp. The  $\beta$ -carbon of amino acids is not an active position for methylation, therefore the methylation at the  $\beta$ -position is still chemically very challenging. Recently, the biosynthetic studies of microbial natural products revealed many novel enzymatic reactions or pathways for amino acid modifications including the  $\beta$ -methylation of amino acids. Up to now, three different biosynthetic pathways for  $\beta$ -methyl amino acids have been reported, including B<sub>12</sub>-dependent glutamate aminomutase, combination of a methyltransferase and an aminotransferase, and B<sub>12</sub>-dependent radical SAM methyltransferase. B<sub>12</sub>-dependent glutamate aminomutase catalyzes the rearrangement of glutamate to generate  $\beta$ -methyl aspartic acid, a building block of Nikkomycins and other natural products. Combination of a methyltransferase and an aminotransferase uses the aminotransferase to generate  $\alpha$ -keto acids as the active substrates for the methylation catalyzed by the methyltransferase from amino acids while B<sub>12</sub>-dependent radical SAM methyltransferase can catalyze the direct methylation at the  $\beta$ -carbon of amino acids via a radical manner. There have been many reviews that summarized the enzymatic modifications of amino acids, but there has been none of literatures covering this type of interesting and useful nonproteinogenic amino acids. This review summarized the recent advances in the biosynthesis of  $\beta$ -methyl amino acids as the building blocks of several natural products and discussed the biosynthetic or enzymatic mechanisms involved in the  $\beta$ -methylation of amino acids in detail. Based on the mechanisms of the biosynthesis of these  $\beta$ -methyl amino acids, the application of  $\beta$ -methyl amino acids was proposed in this review. This study may provide new strategies and useful information for improving the yields of the valuable natural products containing  $\beta$ -methyl amino acids and introducing these building blocks into more chemical scaffolds by metabolic engineering, synthetic biology and enzyme engineering methods.

**nonproteinogenic amino acid,  $\beta$ -methyl amino acid, natural products, biosynthesis**

doi: 10.1360/N972017-00335