

蛹虫草虫草素合成代谢网络及其 关键节点的研究进展

曾家鹏, 吕梦迪, 郑倩望, 林俊芳, 叶志伟, 魏韬*

(华南农业大学食品学院, 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510642)

摘要: 虫草素 (Cordycepin) 是虫草属 (*Cordyceps*) 真菌产生的核心高附加值次级代谢产物之一。与其他工业菌种相比, 蛹虫草在腺苷结构类似物 (如虫草素) 合成方面有天然的代谢通量优势。近年, 随着组学分析技术和蛹虫草基因编辑技术的发展, 蛹虫草虫草素合成代谢网络, 尤其是关键的底物合成途径得到了完整的解析。因此, 该综述对目前已知的蛹虫草虫草素合成代谢网络进行了模块化梳理, 将其划分为中心碳代谢途径、单磷酸肌苷 (Inosinate, IMP) 途径和虫草素底物合成途径, 并分析了前体物质组成和多个分散途径、关键节点对虫草素合成的影响, 系统阐述了 IMP 物质的合成与流向, 佐证了 IMP 的合成与代谢是虫草素合成的关键节点, 为未来通过代谢工程与合成生物学策略优化蛹虫草虫草素代谢网络、构建稳定高产虫草素的蛹虫草菌株提供相对详实的背景参考。

关键词: 蛹虫草; 虫草素; 合成代谢网络; 关键节点

文章编号: 1673-9078(2023)09-371-379

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1165

Research Progress on the Metabolic Network of Cordycepin in *Cordyceps militaris* and Its Key Nodes

ZENG Jiapeng, LYU Mengdi, ZHENG Qianwang, LIN Junfang, YE Zhiwei, WEI Tao*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Research Center for Microecological Agents of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Cordycepin is one of the core high-value-added secondary metabolites produced by fungi belonging to the genus *Cordyceps*. Compared with other industrial strains, *Cordyceps militaris* benefits from the innate metabolic flux in the synthesis of adenosine analogs such as cordycepin. In recent years, with the development of omic analysis technology and *Cordyceps militaris* gene-editing technology, the metabolic network of cordycepin synthesis, particularly the key substrate synthesis pathway, has been completely analyzed. Therefore, this review, the known metabolic network of cordycepin is modularized, dividing it into the central carbon metabolic pathway, inosinate (IMP) pathway, and substrate biosynthesis pathway, completely describing its metabolic network. The composition of cordycepin precursor and the influence of multiple dispersion pathways and key nodes on the synthesis of cordycepin have been analyzed, and the synthesis and flow direction of IMP substances have been systematically elaborated. This shows that the synthesis and metabolism of IMP is the essential node in cordycepin synthesis. These discoveries provide a comprehensive foundation for optimizing the metabolism network of *Cordyceps militaris* through metabolic engineering and synthetic biology strategies, for developing a stable and high-yielding *Cordyceps militaris* strain in the future.

Key words: *Cordyceps militaris*; cordycepin; metabolic network; key node

引文格式:

曾家鹏, 吕梦迪, 郑倩望, 等. 蛹虫草虫草素合成代谢网络及其关键节点的研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 371-379

ZENG Jiapeng, LYU Mengdi, ZHENG Qianwang, et al. Research progress on the metabolic network of cordycepin in *Cordyceps militaris* and Its Key Nodes [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 371-379

收稿日期: 2022-09-14

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目区域联合基金-青年基金项目 (2019A1515110609); 广东省教育厅科研平台项目 (2020KTCX019); 广州市科技协会青年人才托举工程 (C20190101019); 广东省自然科学基金-面上项目 (2022A1515010057)

作者简介: 曾家鹏 (2000-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 食用菌合成生物学, E-mail: zengjp@stu.scau.edu.cn; 共同第一作者: 吕梦迪 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 食用菌合成生物学, E-mail: 1007361907@qq.com

通讯作者: 魏韬 (1989-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食用菌合成生物学, E-mail: weitao@scau.edu.cn

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 又称虫草花、北冬虫夏草, 是虫草科、虫草属真菌, 是一种在东亚地区受到广泛欢迎的食药两用真菌。蛹虫草在我国分布广泛, 野生的蛹虫草以寄生为主, 常寄生于鳞翅目幼虫的茧和蛹上或者寄生于昆虫上, 产生子座 (子实体部分) 形成虫蛹复合物, 而其子实体是蛹虫草主要食药两用部位。蛹虫草中含有高丰度的虫草素 (Cordycepin)、多糖、虫草酸等多种生物活性物质, 它们所具有的药理特性使蛹虫草的应用场景从食品行业扩大到医疗保健品、医药行列中。虫草素作为蛹虫草产生的核心价值成分之一, 也是重要的次级代谢产物, 具有抗癌、抗肿瘤、抗病毒等多种生物活性功能。目前虫草素的原材料主要通过蛹虫草液体静置发酵后提取纯化获得, 相关菌种选育工作仍停留在采用自然选育等传统研究策略的阶段。经过 40 余年的发展, 蛹虫草子实体培养、

液体静置发酵技术已经得到了较好的发展, 但随着工业化与产业化虫草素的需求逐渐增大, 获得高产虫草素的蛹虫草菌株成为了更高效、更可靠的途径。近年, 随着组学分析技术和食用菌基因组编辑技术的发展, 蛹虫草虫草素代谢途径得到了不同程度的解析, 这为构建蛹虫草虫草素合成代谢网络以及蛹虫草代谢工程的理性改造提供了研究基础。因此, 本综述对目前已知的蛹虫草虫草素合成代谢网络进行了模块化梳理, 将其划分为中心碳代谢途径、单磷酸肌苷 (Inosinate, IMP) 途径和虫草素底物合成途径, 并分析了前体物质组成和多个分散途径、关键节点对虫草素合成的影响, 系统阐述了 IMP 物质的合成与流向, 佐证了 IMP 的合成与代谢是虫草素合成的关键节点, 旨在为蛹虫草虫草素代谢工程改造提供理论支持。

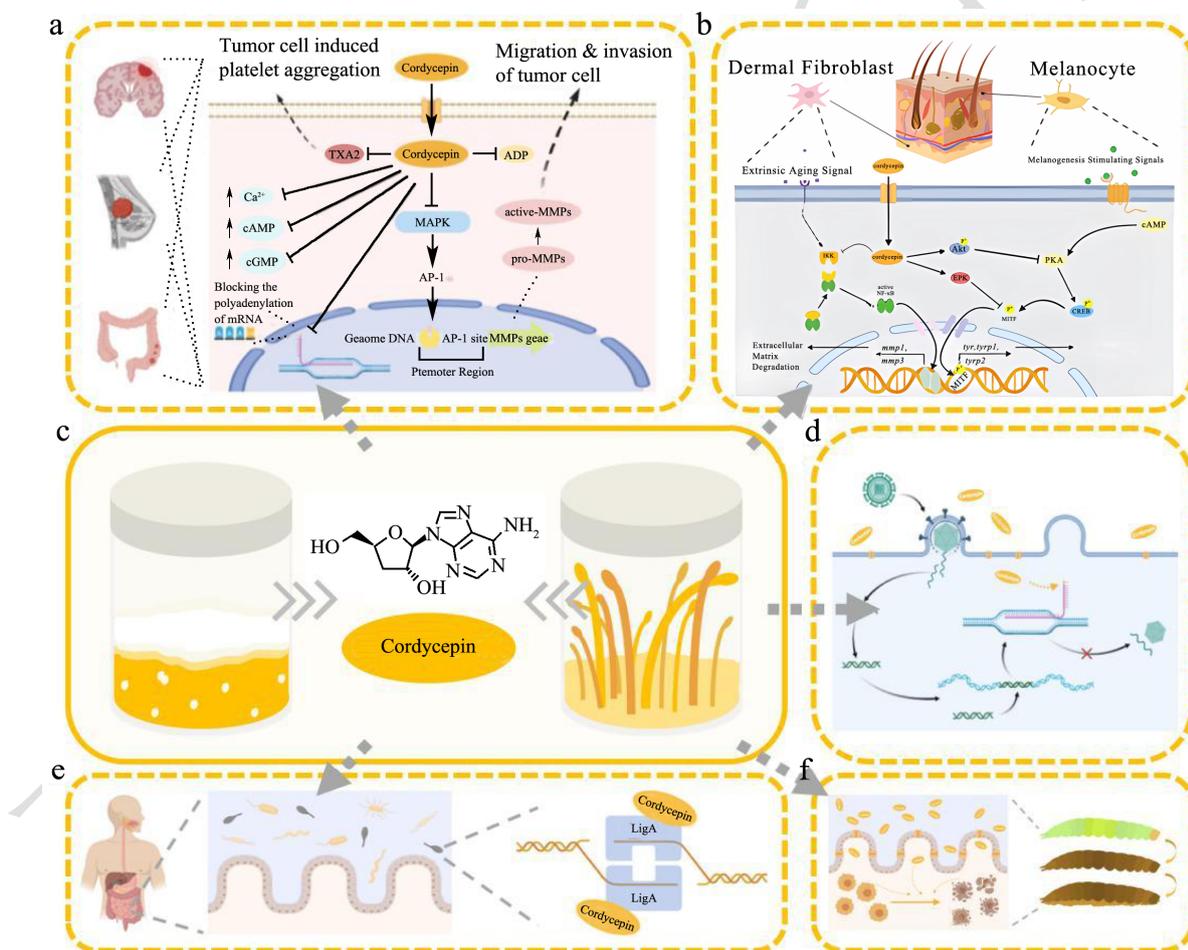


图 1 虫草素多样化的生物学活性功能

Fig.1 The biological activity function of cordycepin diversity

注: a.抗癌及抗肿瘤效应; b.抗衰老机理; c.虫草素常见的合成方法; d.抗病毒功效; e.抑制肠道病原菌增殖; f.潜在杀虫剂。

1 虫草素基本概述

虫草素又称蛹虫草素、虫草菌素, 化学名为 3'-脱氧腺苷, 分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_3$, 最早于 1951 年由

Bentley 等^[1]从蛹虫草中分离获得。过往研究发现虫草素具有多种生物活性功能, 因而是虫草属真菌所产生的最具价值的次生代谢产物之一^[2]。虫草素通过阻断 mRNA 的延长影响细胞周期正常运转, 导致白血病、

乳腺癌等疾病中的病变细胞凋亡(图 1a),从而表现出较好的潜在临床应用价值^[3];虫草素还可通过抑制 NF- κ B 途径,激活蛋白酶 B 和胞外信号调节激酶,起到抗光老化的作用(图 1b)^[4,5]。基于相同阻断作用,虫草素可抑制病毒复制(图 1d)^[6,7]。此外,虫草素还被发现可通过与 LigA DNA 连接酶的强大结合作用,显著抑制梭状芽胞杆菌等肠道致病菌的增殖,却不会对双歧杆菌、植物乳杆菌等益生菌的增殖造成影响(图 1e)^[6],符合我国大健康产业发展的需求。基于胃毒作用等潜在机制,虫草素还可对小菜蛾等夜蛾科的农业害虫起到较强的杀灭作用(图 1f)^[6],有被开发为针对草地贪夜蛾、甜菜夜蛾等其他种类农业害虫的生防制剂的潜能。随着市场上以虫草素为核心成分的保健产品逐渐被开发,虫草素的价值和市场价格近年来逐步攀升。目前,市场上纯度为 90%以上的虫草素的原料价格已高达 25 000 元/kg。

目前获得虫草素的原材料主要有两个途径,一是化学合成,二是生物原材料提取。其中,化学合成法最早由 Raylo 化学有限公司于 2000 年成功开发^[8]。由于存在分离手段复杂、生物活度低、底物利用率低(仅

为 20%)等问题,该法难以满足原料市场的需求^[9]。目前已知可天然合成虫草素的物种有蛹虫草(*Cordyceps militaris*)^[10,11]、九州虫草(*Cordeceps kyusyuensis*)^[12,13]、雪峰虫草(*Ophiocordyceps xuefengensis*)^[14,15]等。其中,目前对雪峰虫草转录组分析并没有找到所有与虫草素生物合成途径相关的基因^[16]。蛹虫草在《卫生部关于批准蛹虫草为新资源食品的公告(2009 年第 3 号)》和《关于批准塔格糖等 6 种新食品原料的公告(2014 年第 10 号)》中被认定为新资源食品和新食品原料。同时,相关研究表明蛹虫草基因组中未发现任何对人有毒的霉菌毒素基因^[17],证实了其作为食品的安全性和可食用性。此外,在下表中展示了现有报道的虫草素发酵产量(见表 1),不难发现,在静置发酵的条件下,蛹虫草菌株虫草素产量最高可达 6.84 g/L。相较于需要精密高密度发酵设备以及存在高额电费、补料培养基费用的常见代谢工程模式菌株^[18],蛹虫草在虫草素产量、生产成本、操作简便度等方面均具有较大的工业化生产潜力。目前,包括知名化学试剂供应商 Sigma 和中国药品生物制品检定所生产的虫草素产品,均是从蛹虫草中提取获得^[19]。

表 1 现有报道的虫草素发酵产量

Table 1 Fermentation yield of cordycepin in current studies

菌种名称	培养方式	虫草素产量	文献
<i>C. militaris</i> CICC 14014	液体静置发酵	5 290 mg/L	[20]
<i>C. militaris</i> GACP08Y5	液体静置发酵	3 005.83 mg/L	[21]
<i>C. militaris</i> CGMCC2459	液体静置发酵	2 008.48 mg/L	[22]
<i>C. militaris</i> NBRC 9787	液体静置发酵	6 840 mg/L	[23]
<i>C. militaris</i> NBRC 9787	液体静置发酵	2 370 mg/L	[24]
<i>C. militaris</i> NBRC 9787	液体静置发酵	640 mg/L	[25]
<i>C. militaris</i> SIP2	液体静置发酵	2 835 mg/L	[26]
<i>C. militaris</i> ZA10-C4	液体静置发酵	357 mg/g	[27]
<i>C. militaris</i>	深层发酵	346.10 mg/L	[28]
<i>C. militaris</i>	深层发酵	345.40 mg/L	[29]
<i>Cordyceps kyushuensis</i>	液体静置发酵	978.25 μ g/g	[30]
<i>Ophiocordyceps xuefengensis</i> HACM 001	固体发酵	37.10 μ g/g	[31]
<i>Y. lipolytica</i>	摇瓶发酵	3 249 mg/L	[18]

过往受制于寄生宿主的数目和生长环境的特殊性,天然的蛹虫草子实体是难以获得的。直到 80 年代末,人工培养蛹虫草才获得成功^[19]。其后经过 40 余年的发展,培养基组成、培养条件等参数得到完善^[32,33],静置菌丝体发酵、振荡菌丝体发酵、固体子实体培养等多种蛹虫草人工培养技术趋于成熟^[34,35]。至 2015 年,我国蛹虫草大规模工厂化种植产量已达到 7.4 万 t^[36],并形成了全球 75%的蛹虫草相关专利。

蛹虫草子实体是作为终端商品销售的主要形式,

但其栽培过程存在培养周期长、培养基配制成本高、光照培养周期切换模式复杂等问题^[37]。利用人工栽培的蛹虫草子实体来提取虫草素的综合成本仍较高。而蛹虫草液体发酵技术在维持接近室温的恒温条件下培养处于菌丝体状态的蛹虫草,具有培养基配制成本低、培养条件简单、培养周期短、不涉及光照周期诱导“菌丝体-子实体”生长形态切换等优点,可在较短时间内高效生产虫草素。因此,蛹虫草液体静置发酵是目前虫草素原料的主要获得方式。

为了进一步提高蛹虫草的虫草素合成效率，虫草素合成代谢网络的解析至关重要。1976年，Kunhorm等^[38]利用基于[U-¹⁴C]腺苷和[3-³H]的同位素示踪法分析了蛹虫草虫草素上游生物合成路径，明确了腺苷是虫草素合成的关键前体物。其后，Zheng等^[17]在2011年首次对蛹虫草进行了全基因组序列测定及标注，CM01菌株从此成为蛹虫草基因组研究的模式株系。在此基础上，有学者^[39,40]不仅通过转录组测序、蛋白质组测定、代谢组测定等多种组学方法，获得了以葡萄糖、木糖等基础性碳源为前体的虫草素上游及中游合成途径，还通过构建光响应的基因调控网络，验证了光对虫草素合成关键基因的影响。然而即便如此，从腺苷到虫草素的关键底物合成途径在较长时间内仍是未知的。直到2017年，Xia等^[10]通过在蛹虫草中进行基因敲除，并结合靶DNA序列在酵母中的异源表达等多种策略，才完成了以腺苷为前体的虫草素底物通道路解析，成功补完蛹虫草虫草素合成代谢网络。

随着代谢工程与合成生物学的发展，基于天然合成代谢网络的自上而下的菌株改造研究已成为热点。

近年来，以蛹虫草为材料的DNA元件挖掘、基因编辑技术及基因组代谢模型的开发已取得一定程度的进步^[41-43]。这使得基于蛹虫草和虫草素为核心的代谢工程研究成为可能。而在代谢工程研究中，代谢网络的模块化分割是协助理解和后续改造的核心底层策略。其中，模块间及模块内部引起前体物质分流的分散途径、反馈调节机制的作用位点、易受培养条件改变所影响的柔性节点等，都是菌种改造中的关键目标。本综述结合过往大量的虫草素合成代谢网络分析结果，首次结合代谢工程策略，对蛹虫草虫草素合成代谢网络进行人为分割，并针对各个分隔模块及其中的关键节点进行分析和阐述，并对其未来的改造工作进行了展望。

2 蛹虫草虫草素合成代谢网络解析

根据现有大量蛹虫草虫草素合成代谢网络研究结果，本综述将虫草素合成代谢网络分为3个模块进行阐述（图2），分别是中心碳代谢途径（红色）、IMP途径（蓝色）和虫草素底物合成途径（金色）。

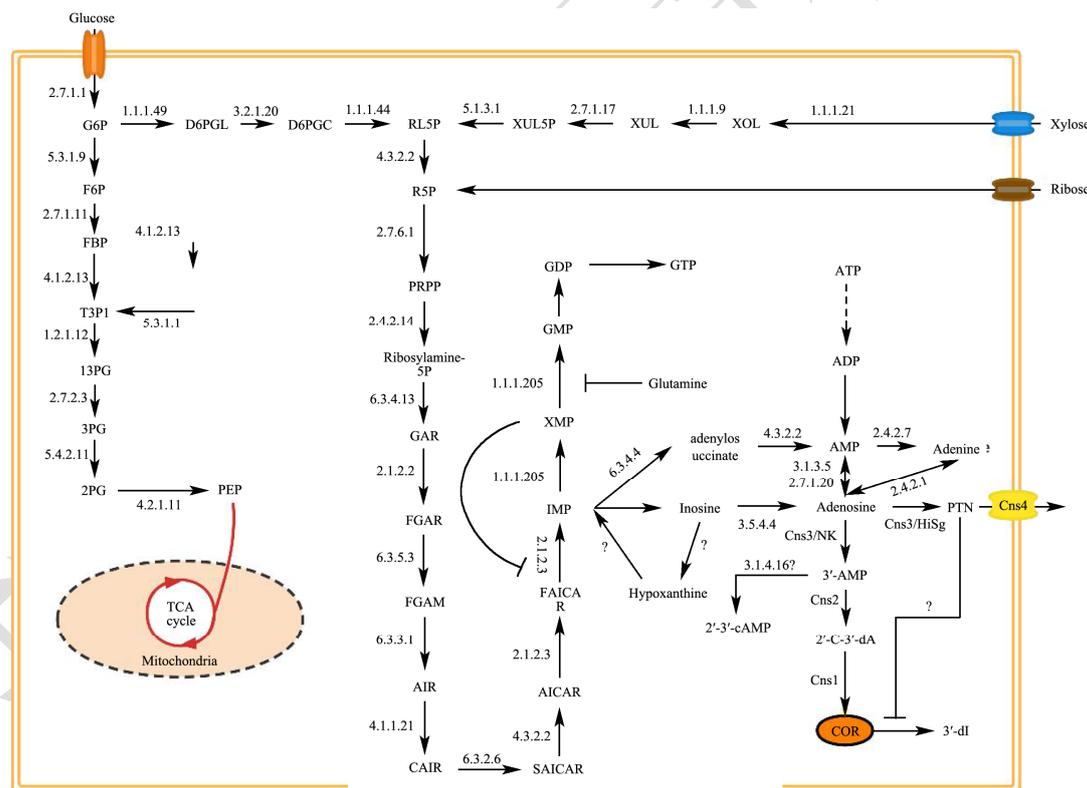


图2 蛹虫草虫草素合成代谢网络

Fig.2 Cordycepin metabolic network in *C. militaris*

2.1 中心碳代谢途径

现有研究表明，蛹虫草可利用多种糖类分子，如葡萄糖、木糖、核糖等作为前体，经由糖酵解途径、磷酸戊糖途径等途径，最终转化形成虫草素^[39,44]。参

照代谢工程细分学科的惯用命名方式，我们将蛹虫草以葡萄糖、核糖和木糖为碳源进行分解代谢获得5-磷酸核糖的过程，命名为中心碳代谢途径^[45]。

2.1.1 糖酵解途径

现有大量研究结果显示，虫草素合成代谢途径的

初始前体为葡萄糖^[39,44]。葡萄糖被转运至蛹虫草胞内,经磷酸化反应生成 6-磷酸葡萄糖。形成 6-磷酸葡萄糖后,其有两个流向,一部分进入了磷酸戊糖途径,另一部分 6-磷酸葡萄糖经磷酸葡萄糖异构酶催化,转变为 6-磷酸果糖 (Fructose-6-Phosphate, F6P)。F6P 进一步磷酸化生成 1,6-二磷酸果糖后,酶催化生成 3-磷酸甘油醛,再通过糖酵解途径中的唯一一个脱氢反应,氧化为 1,3-二磷酸甘油酸。1,3-二磷酸甘油酸脱去磷酸基形成 3-磷酸甘油酸,并经过基团转移形成 2-磷酸甘油酸。2-磷酸甘油酸脱水形成磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP), PEP 在丙酮酸激酶的作用下转变为丙酮酸,进入三羧酸循环,为蛹虫草细胞生长提供能量。

2.1.2 磷酸戊糖途径

在糖酵解途径中间生成的另一部分 6-磷酸葡萄糖进入了磷酸戊糖途径,并且进行脱氢生成 6-磷酸葡萄糖酸内酯,并进一步水解生成 6-磷酸葡糖酸。以 NADP^+ 作为氧化反应受体,6-磷酸葡糖酸氧化脱羧生成 5-磷酸核糖。

除了葡萄糖向 5-磷酸核糖的多步骤直接转化外,蛹虫草还可以从外界吸收核糖,并通过一步磷酸化反应,直接转化为磷酸戊糖途径的中间产物 5-磷酸核糖^[39]。此外, Raethong 等^[46]研究发现蛹虫草可从外界吸收木糖,经过木糖醇脱氢酶、木酮糖激酶等催化反应,转化获得另一磷酸戊糖代谢途径的中间代谢产物 5-磷酸核酮糖 (Ribulose 5-Phosphate, RL5P)。虽然以木糖作为前体时,蛹虫草生长受限,生物量相比以葡萄糖为碳源时较低,但是虫草素产量显著提高^[46]。这一结果提示,转化步骤更少、分支途径更少、代谢流通量更为集中的虫草素合成途径,可能具备更高的虫草素合成效率。

2.2 IMP 途径

本综述将上游的磷酸戊糖途径代谢产物 5-磷酸核糖逐步转化为单磷酸肌苷的过程,以及下游的 IMP 代谢分散途径,统称为 IMP 途径。IMP 经多步转化,可形成腺苷,进入虫草素底物合成途径。而 IMP 在形成腺苷的同时,还可能被分流至 GTP 合成途径和肌苷合成途径。因此,掌握 IMP 途径的代谢分流情况,有助于通过改造其分支途径提高虫草素合成水平。

磷酸戊糖途径的产物 5-磷酸核糖,在酶的作用下生成 5-磷酸核糖-1-焦磷酸,再与谷氨酰胺反应生成 5-磷酸核糖胺^[17,39]。5-磷酸核糖胺由 ATP 供能,与甘氨酸结合生成甘氨酰胺核糖核苷酸。甘氨酰胺核糖核苷酸经甲酰化生成甲酰甘氨酰胺核糖核苷酸,并由谷氨

酰胺提供酰胺基及由 ATP 供能,转变为甲酰甘氨酰胺核糖核苷酸 (Formylglycinamide Ribonucleotide, FGAM)。FGAM 同样在 ATP 存在的条件下,经氨基咪唑核糖核苷酸酶的作用转变为 5-氨基咪唑核糖核苷酸 (5-Aminoimidazole Ribonucleotide, AIR)。AIR 在咪唑环上进一步装配嘌呤第二个环,生成羧基氨基咪唑核糖核苷酸后,进一步反应生成 N-琥珀酸-5-氨基咪唑-4-羧酰胺核糖核苷酸 (N-succino-5-Aminoimidazole-4-Carboxamide, SAICAR)。SAICAR 脱去延胡索酸,生成 5-氨基咪唑-4-羧酰胺核糖核苷酸 (5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide, AICAR),并经甲酰化生成 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸 (N-Formamidoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide, FAICAR)。FAICAR 在次黄嘌呤核苷酸合酶作用下脱水环化生成单磷酸肌苷。

IMP 合成后,分别进入腺苷酸琥珀酸、肌苷和黄苷酸 (Xanthylic Acid, XMP) 三条分散途径^[44,47]。在单磷酸黄苷 (Xanthoside Monophosphate, XMP) 途径中,IMP 转化为 XMP 后,会进一步转化为单磷酸鸟苷 (Guanosine Monophosphate, GMP) 和二磷酸鸟苷 (Guanosine Diphosphate, GDP),并最终被转化为三磷酸鸟苷 (Guanosine Triphosphate, GTP)。由于 GTP 是细胞内部的能源物质,为蛋白合成等生理生化反应供能,无法作为底物直接参与虫草素的合成。因此,XMP 途径是虫草素合成途径的旁支途径,将分流部分前体 IMP。此外,IMP 可转化为腺苷酸琥珀酸,并最终在虫草素底物通道的催化下,转化为虫草素。IMP 还可被转化为肌苷。由于肌苷可重新被转化为 IMP,形成循环回路,因此肌苷途径在虫草素合成代谢网络中起到“蓄水池”的作用,并不会分流 IMP。

2.3 虫草素底物合成途径

在真核生物基因组中,物理距离上邻近的合成基因簇并不常见,而 *cns123* 基因簇均处在蛹虫草第七号染色体的 1707816 至 1717012 区间内,其编码的酶蛋白可最终将腺苷转化为虫草素。因此,我们将腺苷至虫草素的多反应催化步骤合称为“虫草素底物合成途径”。

在上述提到的 IMP 的其中一条分散途径中,IMP 将与天冬氨酸结合,并在 XMP 途径最终转化生成的 GTP 供给能量的情况下,生成了腺苷酸琥珀酸,并进一步反应生成单磷酸腺苷 (Adenosine Monophosphate, AMP)。除了来源于腺苷酸琥珀酸,AMP 还可以由 ATP 转化为二磷酸腺苷 (Adenosine Diphosphate, ADP) 后,再进一步脱去磷酸基团生成。在此过程中,磷酸基团从 ATP 上二次脱离释放的能量,也可为腺苷酸转运激酶促进 ADP 向 AMP 的转变供能。AMP 经可逆

酶促反应生成腺苷和腺嘌呤，而后再度进入分散途径。生成的腺苷可分别转化为肌苷、喷司他丁和 3'-AMP。3'-AMP 由 Cns3 蛋白的 NK 结构域催化获得，后经 Cns2 转化生成 2'-C-3'-dA，再经 Cns1 转化获得虫草素。Cns3 的 HisG 结构域则完成另一反应，将腺苷转化为喷司他丁。霍春红等^[48]通过异源表达 *Cns1* 和 *Cns2*、陈柏雄等^[49]通过敲除 *Cns1-3* 基因簇，验证了 *Cns1-3* 对虫草素合成的关键作用。

3 蛹虫草虫草素代谢工程改造关键节点

现有研究表明，通过改变培养条件中的单一因素，即可显著改变蛹虫草虫草素的产量^[44,50]。这一发酵表征提示，蛹虫草虫草素合成代谢网络易受外部条件扰动，因而可能存在柔性节点和关键的代谢节点。依照现有的代谢工程策略，目标产物的代谢网络中常见的关键节点主要包括限速步骤、分流节点和反馈抑制节点等。然而，蛹虫草本身具有极易退化、鲁棒性较差的特点，会造成的代谢流分析结果不稳定、通过异源基因表达难验证等问题。因此，目前尚难以确定蛹虫草虫草素代谢网络中的限速步骤。相对而言，基于组学分析所得的分流节点和反馈节点较为明确，本文将其视为蛹虫草虫草素合成代谢网络中潜在的关键改造节点。

3.1 分流节点

3.1.1 前体物质组成的分流效应

除以葡萄糖为前体外，核糖（Ribose）、木糖（Xylose）等多种单糖也可作为蛹虫草合成虫草素的前体^[39,46]。这一相对较宽的前体谱可能与蛹虫草自然生境中的营养物质成分的复杂性是对应的。然而，多样化的前体谱可能同时造成更多的副反应终端产物积累、非必须合成代谢负担和关键合成途径通量下降，这对于提高虫草素产量的目标是不利的。换句话说，

多样化的前体、转化步骤冗余复杂的前体，都会在蛹虫草虫草素合成代谢网络的源头上造成不必要的分流，这也提示了，阻断代谢负荷较大的前体途径，或提高核心前体途径的通量，有望减少菌体代谢负担，提高虫草素的单位产量。

3.1.2 IMP 分流节点

SAICAR 经酶促反应获得的 AICAR，是虫草素关键前体物质 IMP 的前体。但是，现有研究也表明，在培养基中添加的多种氨基酸被转化为组氨酸后，可进一步转化生成 AICAR，参与虫草素的合成^[22]。因此，AICAR 的合成是由多种前体物质汇聚得到的。

当 AICAR 经两步反应被转化为 IMP 后，由于 IMP 会进入三条分散途径，且仅有部分 IMP 会被用于虫草素的合成，因此本综述将 5-磷酸核糖经多步反应转化进入三条分散途径的整体途径模块重命名为 IMP 途径。三条分散途径中，XMP 途径合成供能物质，与细胞生长相关；腺苷酸琥珀酸途径经多步反应转化为虫草素，是虫草素底物合成途径的上游核心途径；肌苷途径内部循环，并不与细胞生长或虫草素合成直接相关，因此，IMP 是虫草素合成的一个关键分流节点。

而在宏观发酵层面，蛹虫草的细胞生长与虫草素合成已被证实是部分偶联关系^[51]。在菌丝对数生长期，虫草素合成较为缓慢；待细胞干重越过峰值拐点后，腺苷、IMP 等前体物质快速消耗，虫草素快速积累^[24,44]。这一特性提示，在菌丝对数生长期，蛹虫草可能采取了优先保证菌丝生长的策略，将大部分 IMP 分流至 GMP 途径；而在对数期结束后，细胞整体代谢转为以虫草素合成为主。然而，目前三条分散途径在不同培养方式、不同培养时间时的代谢流通量及变化机制尚属未知。

3.2 反馈节点

3.2.1 IMP 的双重反馈抑制机制

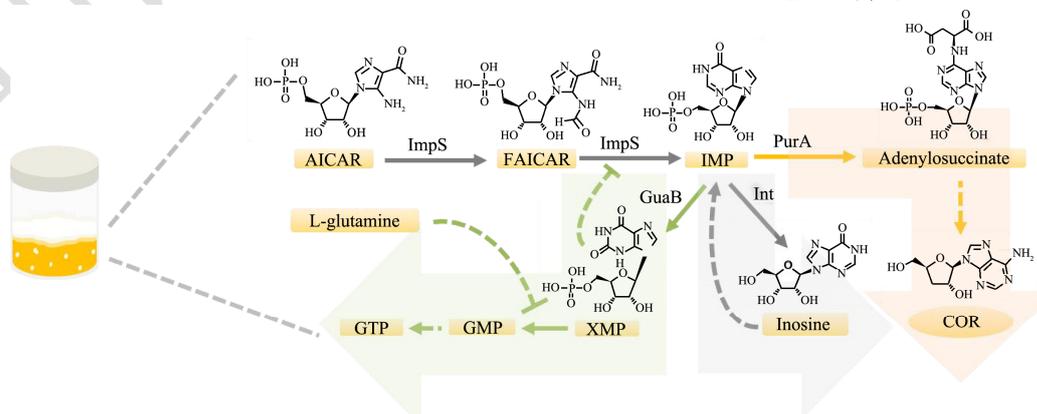


图3 蛹虫草 IMP 分散途径分子调节机制图

Fig.3 Molecular regulation mechanism of IMP dispersion pathway in *C. militaris*

在 XMP 途径中, XMP 作为 IMP 转化获得 GTP 的中间产物, 会抑制 IMP 环化脱水酶活性, 从而抑制 IMP 的合成(图 3)^[52]。此外, 高丰度的谷氨酰胺也会进一步抑制 IMP 脱水酶 GuaB 的活性, 使得 XMP 无法转化为 GMP, 锁死 IMP 的合成, 从而减少虫草素的合成^[52]。由于上述双重反馈抑制机制是由蛹虫草天然演化获得的, 且三大分散途径分别与细胞生长和次级代谢产物合成有关, 因此推测 IMP 的合成与代谢可能是蛹虫草调节自身虫草素合成速率的关键节点^[1]。

此外, 现有研究表明, 人、酵母等物种中, IMP 环化脱水酶为 IMP 途径中的关键限速步骤^[53,54]。但由于缺少代谢流检测、异源表达等实验证明, 该结论尚未在蛹虫草得到验证。

3.2.2 虫草素合成的 Protector-Protégé 反馈机制

在蛹虫草生长周期的大部分时间里, 喷司他丁在胞内通过抑制脱氨酶的活性, 保证虫草素的合成及其在胞内的低丰度存在^[10,55]。现有研究表明, 蛹虫草合成所得的虫草素, 大部分会排至胞外, 因此胞内虫草素浓度相对较低。但当蛹虫草胞内虫草素积累过多, 产生胞内毒性时, 细胞启动对喷司他丁的外排^[10]。随着胞内喷司他丁含量的下降, 脱氨酶活性恢复, 脱去虫草素的氨基并转化获得 3'-dl, 从而降低虫草素胞内含量过高所产生的胞内毒性^[1]。蛹虫草利用喷司他丁调节虫草素胞内浓度的机制, 与抗生链霉菌中的机制相似, 被称为 Protector-Protégé 机制^[10]。

分别由 IMP 和腺苷转化得到的肌苷, 既可经酶促反应生成次黄嘌呤(Hypoxanthine), 也可由次黄嘌呤重新转化为腺苷, 并最终合成虫草素^[39]。由于尚未有确切的代谢流分析数据表明肌苷转化所得的次黄嘌呤和腺苷的比例, 因此上述分散途径仍可被视为前体途径。

3.3 虫草素底物合成途径中的多反应动态平衡

在 IMP 转化获得虫草素的多步反应中, AMP 与腺苷、腺苷与腺嘌呤(Adenine)、肌苷与腺苷等物质之间的转化均为可逆反应^[39]。然而同样的是, 此类途径信息是由组学比对分析所得到的。在缺乏代谢流检测、基因敲除、异源表达等实验结果的情况下, 上述可逆反应在蛹虫草中的平衡偏好性是未知的。这些可逆反应的存在, 造成了蛹虫草虫草素合成网络的鲁棒性低下。在培养基成分、培养条件出现变化时, 前体合成途径中的多步反应都可能成为柔性节点, 从而使得代谢流变化较大。这一情况在生产工艺的扩大化和异地重现方面是不利的。因此, 简化蛹虫草虫草素底物合成途径, 增大核心途径的通量, 可能是构建稳定高产的产虫草素蛹虫草菌株的重要方式。

4 结论与展望

虫草素现已被证实具有抗病毒、抗癌、抗肿瘤等多种生物活性功能, 是虫草属真菌最受关注的次级代谢产物。本综述对蛹虫草虫草素代谢网络进行了模块化, 划分为中心碳代谢途径、IMP 途径和虫草素底物合成途径 3 个模块, 并对每个模块进行了分段式阐述, 细致描绘和分析了蛹虫草虫草素代谢网络的代谢流走向。此外, 本文还对虫草素代谢网络中的多个关键点, 如分流节点和反馈节点进行了深入的剖析, 为蛹虫草代谢工程改造提供理论性指引。

随着根瘤农杆菌介导转化法、split-marker、CRISPR-Cas9 等蛹虫草基因组编辑技术的建立, 蛹虫草基因组精准编辑已成为了可能, 这也为继续深入探究及改造蛹虫草虫草素代谢网络铺平了道路。前期同位素示踪及组学研究中获得的蛹虫草虫草素合成代谢网络中上游潜在基因靶点, 均可利用新近开发的蛹虫草 CRISPR-Cas9-TRAMA 基因组编辑技术, 通过典型的“三部曲”基因功能验证实验(靶基因的敲除、过表达和回补)进行“基因型-表型”关系分析。而通过迭代基因编辑, 有望构建高产虫草素或其他腺苷衍生物的蛹虫草工程菌株, 从而发挥蛹虫草液体静置培养体系的生产成本及操作简便性优势, 将蛹虫草进一步开发成新型食品安全级的细胞工厂。

参考文献

- [1] Bentley H R, Cunningham K G, Spring F S. 509. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part II. The structure of cordycepin [J]. Journal of the Chemical Society, 1951: 2301-2305.
- [2] 刘静明, 钟裕容, 杨智, 等. 蛹虫草化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 10: 32-33, 63.
- [3] Dong J, Li Y, Xiao H, et al. Cordycepin sensitizes breast cancer cells toward irradiation through elevating ROS production involving Nrf2 [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2019, 364: 12-21.
- [4] Das S, Masuda M, Hatashita M, et al. A new approach for improving cordycepin productivity in surface liquid culture of *Cordyceps militaris* using high-energy ion beam irradiation [J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(6): 534-538.
- [5] Jin M L, Park S Y, Kim Y H, et al. Suppression of α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2012, 29(1): 119-124.

- [6] Qin P, Li X, Yang H, et al. Therapeutic potential and biological applications of cordycepin and metabolic mechanisms in cordycepin-producing fungi [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 24(12): 2231.
- [7] 杜静, 阚伟京, 杨健, 等. 腺苷受体及蛹虫草虫草素在新冠肺炎防治中相关的药理机制[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(3): 573-584.
- [8] Aman S, Anderson D J, Connolly T J, et al. From adenosine to 3'-deoxyadenosine: Development and scale up [J]. *Organic Process Research & Development*, 2000, 4(6): 601-605.
- [9] Yang L, Li G, Chai Z, et al. Synthesis of cordycepin: current scenario and future perspectives [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 143: 103431.
- [10] Xia Y, Luo F, Shang Y, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin [J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(12): 1479-1489.
- [11] 殷东林, 陈琼, 孙伟. 蛹虫草虫草素提取工艺的研究[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(18): 4560-4562.
- [12] 赵璇. 九州虫草微生物组学分析及基于系统药理学的生物活性初步研究[D]. 济南: 山东大学微生物技术研究院, 2019.
- [13] Zhao X, Zhang G, Li C, et al. Cordycepin and pentostatin biosynthesis gene identified through transcriptome and proteomics analysis of *Cordyceps kyushuensis* Kob [J]. *Microbiological Research*, 2019, 218: 12-21.
- [14] 钟灿, 金剑, 刘浩, 等. 雪峰虫草的研究现状、问题及展望[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(4): 107-114.
- [15] 张水寒, 蔡萍, 陈林, 等. 高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱分析雪峰虫草化学成分[J]. *中草药*, 2015, 46(6): 817-821.
- [16] Jin J, Kang W, Zhong C, et al. The pharmacological properties of *Ophiocordyceps xuefengensis* revealed by transcriptome analysis [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 219: 195-201.
- [17] Zheng P, Xia Y, Xiao G, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(11): R116.
- [18] Duan X Y, Tian Y, Song Z Q, et al. High-level de novo biosynthesis of cordycepin by systems metabolic engineering in *Yarrowia lipolytica* [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127862.
- [19] 杨杰, 陈顺志. 虫草素研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2008, 29(6): 414-417.
- [20] Tang J, Qian Z, Wu H. Enhancing cordycepin production in liquid static cultivation of *Cordyceps militaris* by adding vegetable oils as the secondary carbon source [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 268: 60-67.
- [21] Wen T, Long F, Kang C, et al. Effects of additives and bioreactors on cordycepin production from *Cordyceps militaris* in liquid static culture [J]. *Mycosphere*, 2017, 8(7): 886-898.
- [22] Kang C, Wen T, Kang J, et al. Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture [J]. *The Scientific World Journal*, 2014, ID 510627.
- [23] Das S K, Masuda M, Hatashita M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation [J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(1): 129-132.
- [24] Masuda M, Urabe E, Honda H, et al. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2007, 39(5): 641-646.
- [25] Masuda M, Urabe E, Sakurai A, et al. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(4): 641-646.
- [26] Kunhorm P, Chueaphromsri P, Chaicharoenaudomrung N, et al. Enhancement of cordycepin production from *Cordyceps militaris* culture by epigenetic modification [J]. *Biotechnology Letters*, 2022, 44(4): 581-593.
- [27] Lin P J, Ye Z W, Wei T, et al. Cross breeding of novel *Cordyceps militaris* strains with high contents of cordycepin and carotenoid by using *MAT* genes as selectable markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 290: 110492.
- [28] Mao X B, Zhong J J. Significant effect of NH_4^{++} on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(3-4): 343-350.
- [29] Mao X B, Eksriwong T, Chauvatcharin S, et al. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1667-1672.
- [30] Wang Y, Zhang G, Zhao X, et al. Genome shuffling improved the nucleosides production in *Cordyceps kyushuensis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 260: 42-47.
- [31] Jin J, Zhong C, Qin Y, et al. A new cordycepin-producing caterpillar fungus *Ophiocordyceps xuefengensis* with artificial infection to the host, cultivation of mycelia and stromata [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(20): 181.

- [32] 汤佳鹏.提高食用蛹虫草子实体中虫草素含量的两步发酵培养研究[J].轻工科技,2020,36(10):9-11,20.
- [33] 王菊凤.蛹虫草培养及其生理活性物质研究[D].长沙:中南林业科技大学,2006.
- [34] 刘然,曲亮璠,王祥河,等.蛹虫草菌丝体液体发酵条件的优化研究[J].食品工程,2019,3:31-34,42.
- [35] 朱丽娜,高新华,刘艳芳,等.蛹虫草液体发酵菌丝体和固体栽培子实体中活性成分的比较[J].上海农业学报,2019,35(4):57-62.
- [36] 鲍大鹏,刘敏祥,汪滢,等.运用交配型基因分子标记辅助蛹虫草亲和配对[J].核农学报,2017,31(11):2113-2120.
- [37] 赵星月,李倩,刘文静,等.蛹虫草菌生物合成虫草素的研究进展[J].生物工程学报,2020,36(7):1293-1304.
- [38] Kunhorm P, Chaicharoenaudomrung N, Noisa P. Enrichment of cordycepin for cosmeceutical applications: culture systems and strategies [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(4): 1681-1691.
- [39] Vongsangnak W, Raethong N, Mujchariyakul W, et al. Genome-scale metabolic network of *Cordyceps militaris* useful for comparative analysis of entomopathogenic fungi [J]. Gene, 2017, 626: 132-139.
- [40] In-on A, Thananusak R, Ruengjitchachawalya M, et al. Construction of light-responsive gene regulatory network for growth, development and secondary metabolite production in *Cordyceps militaris* [J]. Biology, 2022, 11(1): 71.
- [41] Chen B X, Wei T, Ye Z W, et al. *Cordyceps militaris* efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1157.
- [42] Lou H, Ye Z, Yun F, et al. Targeted gene deletion in *Cordyceps militaris* using the split-marker approach [J]. Molecular Biotechnology, 2018, 60(5): 380-385.
- [43] Raethong N, Wang H, Nielsen J, et al. *Cordyceps militaris* optimizing cultivation of for fast growth and cordycepin overproduction using rational design of synthetic media [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 1-8.
- [44] Fan D D, Wang W, Zhong J J. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 60: 30-35.
- [45] Liu Q, Yu T, Li X, et al. Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4976.
- [46] Raethong N, Laoteng K, Vongsangnak W. Uncovering global metabolic response to cordycepin production in *Cordyceps militaris* through transcriptome and genome-scale network-driven analysis [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 9250.
- [47] Yin Y, Yu G, Chen Y, et al. Genome-wide transcriptome and proteome analysis on different developmental stages of *Cordyceps militaris* [J]. Plos One, 2012, 7(12): e51853.
- [48] 霍春红,李鸿宇,李倩,等.产虫草素酿酒酵母工程菌株的构建与发酵优化[J].生物工程学报,2021,37(9):3334-3347.
- [49] Chen B X, Xue L N, Wei T, et al. Multiplex gene precise editing and large DNA fragment deletion by the CRISPR-Cas9-TRAMA system in edible mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15: 2982-2991.
- [50] Mao X B, Zhong J J. Hyperproduction of cordycepin by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors [J]. Biotechnology Progress, 2004, 20(5): 1408-1413.
- [51] 汤佳鹏,柳依婷,赵强,等.蛹虫草发酵产虫草素的培养条件研究[J].食品工业科技,2012,33(21):181-183,187.
- [52] Wolan D, Cheong C, Greasley S, et al. Structural insights into the human and avian IMP cyclohydrolase mechanism via crystal structures with the bound XMP inhibitor [J]. Biochemistry, 2004, 43(5): 1171-1183.
- [53] Shaw R, Wilson J, Smith K, et al. Regulation of an IMP dehydrogenase gene and its overexpression in drug-sensitive transcription elongation mutants of yeast [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(35): 32905-32916.
- [54] Szabados E, Manthey M, Wilson P, et al. Inosine-5'-monophosphate analogues as inhibitors of human IMP cyclohydrolase and cellular growth [J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1998, 44(3): 617-623.
- [55] Wu P, Wan D, Xu G, et al. An unusual protector-protégé strategy for the biosynthesis of purine nucleoside antibiotics [J]. Cell Chemical Biology, 2017, 24(2): 171-181.