

聚酮化合物及其组合生物合成

孙宇辉^{1,2} 邓子新^{1,*}

(1 上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心 生命科学技术学院, 上海 200030;
2 江西农业大学生物工程系, 南昌 330045)

摘要: 聚酮化合物的组合生物合成是当前国际化学与生物学交叉学科研究的热点之一, 也正在发展成为药物创新超常规的重要手段。本文对近十年来聚酮化合物, 特别是 I 型聚酮化合物的组合生物合成的常用技术和方法学发展进行了回顾和展望。

关键词: 聚酮化合物; 聚酮合酶; 组合生物合成

中图分类号: O632.4 **文献标识码:** A

Polyketides and combinatorial biosynthetic approaches

Sun Yu-Hui^{1,2} and Deng Zi-Xin^{1,*}

(1 Bio-X Life Science Research Center, and School of Life Science & Biotechnology,
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030;
2 Department of Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

ABSTRACT Polyketide compounds and their biosynthesis by combinatorial approaches had received great attention as a cross-disciplinary subject in a new filed of chemical biology for its importance and great potential to create brand new drug in future. In this review, we hope to summarize methods and technologies which had been developed over past ten years or so for the imaginative discovery of novel polyketide compounds by combinatorial biosynthesis, which incorporate genetic, chemical and biochemical, bioinformatic and biotechnological approaches.

KEY WORDS Polyketide; Polyketide synthase; Combinatorial biosynthesis

1 聚酮化合物及其聚酮合酶

聚酮化合物是一大类由细菌、真菌和植物将低级羧酸通过连续的缩合反应产生的天然产物, 它包括许许多多具有抑制细菌(如红霉素、四环素)、真菌(如灰黄霉素、两性霉素)、寄生虫(如 avermectin、奈马克丁)、癌症(如多柔比星、enediynes)等活性的化合物, 有些抗真菌聚酮化合物同时还具有免疫抑制剂的活性(如雷帕霉素、FK506), 它被广泛地应用于医药、畜牧和农业。如今, 这一化合物越来越为人们所重视, 这主要是由于该化合物具有: (1) 无可比拟的生物学活性使之具有巨大的新药物开发潜力和商业价值, 聚酮化合物所形成的药物已用于几乎所有重要的疾病治疗, 每年的销售额超过了 100 亿美元; (2) 独特的结构和合成机制为人们研究酶催化的分子机制、分子识别和

蛋白质的相互作用提供了空前的契机; (3) 聚酮合酶所具有的可塑性可以使人们方便地通过组合生物合成手段来获得新的化合物^[1]。目前已发现了不少于 10000 种聚酮化合物, 而由之衍生出的新产物更是难以计数。

聚酮化合物是功能和结构最多样化的天然产物之一, 它们的合成包括酰基辅酶 A 活化羧酸的一系列重复的醇醛缩合而形成有一定长度的聚酮链骨架, 然后经过环化或者芳香化、或者与脱氧糖等结构单位连接等过程。尽管聚酮化合物的结构和特性千差万别, 总的来说它可以分为两大类: 芳香族聚酮化合物和复合聚酮化合物。前者是乙酸通过缩合(起始单位除外)形成的大部分 β -酮基在酰基链的延伸和完成后都一直保持非还原状态, 经过折叠和醇醛缩合形成六元环, 芳香环随后被脱水还原, 如放线紫红素、柔红霉素、四环素。复

收稿日期: 2005-09-16

作者简介: 孙宇辉, 男, 生于 1967 年, 博士, 副教授。 * 通讯作者。

合聚酮化合物比芳香族聚酮化合物在结构变化上大的多,其构成单位有乙酸、丙酸和丁酸等,而且由于与芳香族聚酮化合物在合成化学、 β -酮基还原过程、侧链的空间位阻上的本质差别,许多不经过折叠和芳香化,而是通过内酯化成环,还有一部分仍保持酰基链,如大环内酯抗生素红霉素和螺旋霉素、抗真菌抗生素雷帕霉素和两性霉素、聚醚类抗生素莫能霉素和南昌霉素、抗寄生虫抗生素 avermectin 等。

聚酮化合物是通过聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)催化形成的,其催化过程类似于脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)催化的脂肪酸生物合成,即通过酰基-CoA 活化的底物之间的重复脱羧缩合而合成^[2,3],但两者在合成单位的选择(包括起始单位和延伸单位)、链装配过程中每个酮基还原程度的控制、以及芳香聚酮或复合聚酮链长的决定等方面也存在着明显的差异,主要体现在:(1)FAS 一般以乙酸作为起始单位,而 PKS 往往使用不同的起始单位,最为常用的有乙酸、丙酸,此外还有丁酸,杀假丝菌素使用的对氨基苯甲酸等,而 avermectin 所利用的起始单位可多达 40 余种;(2)FAS 一般只用乙酸为链延伸单位,而 PKS 除了利用乙酸作为链伸长单位外,还可利用丙酸或丁酸,在终产物中相应生成甲基或乙基侧链;(3)PKS 可以通过酮基选择性地还原和脱水,从而在终产物的相应位置形成酮基、羟基、双键或亚甲基等功能团,同时也决定了手性中心的立体化学构型。

目前已经揭示的聚酮合酶可以分为三类:I 型、II 型和 III 型^[4]。研究和报道最多和较为透彻的是 I 型 PKS,它是由几个多功能的多肽组成,每一个多肽上都分别携带有参与聚酮生物合成所必需的各种酶的结构域(domain),每个结构域只参与整个聚酮碳链构建中的一步生化反应(noninteractive),而参与一轮聚酮生物合成反应的所有结构域称为一个合成酶单位(SU, synthase unit),编码这个合成酶单位的 DNA 称为一个模块(module)。I 型模块结构的 PKS 就犹如在轨道上行驶的一列火车,在起点由特定的“搬运工”——酰基转移酶(acyl transferase, AT)把不同的起始单位装车后,通过“装配工”——酮脂酰-ACP 合成酶(ketoacyl-ACP synthase, KS)经过缩合反应将不同的“原料”——羧酸起始或延伸单位进行组装,随着火车的运行,不断地从一个“停靠装配站”——酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)到下一个,聚酮链也不断地得到延伸,中途根据模块组成的不同和指令要求,在其它不同的“特殊工种装配工”——脱水酶(dehydratase, DH)、烯醇还原酶(enoyl reductase, ER)的作

用下相应地进行还原(形成 β -羟酯键)或脱水(形成 α 、 β -烯醇酯键)或进一步还原(形成饱和的亚甲基),直至到达终点,在“装卸工”硫酯酶(thioesterase, TE)的帮助下,完成最后的工序并将聚酮前体产物从 PKS 上卸载下来。这种 PKS 模块结构的发现有其非同寻常的意义。尽管各种聚酮化合物结构各异,PKS 模块的底物特异性决定了 I 型 PKS 对起始单位和延长单位的选择,而 PKS 每个模块上还原结构域的种类则使聚酮产物得到不同程度的还原。复合聚酮化合物结构的多样性来自聚酮骨架组成单位的多样性和每个碳单位的不同还原程度,这意味着聚酮抗生物的结构具有相当大的可塑性,故可通过模块内或模块间的合理重组,设计出新基因(簇)组成或新的生物合成途径,这也是 I 型 PKS 作为组合生物学主要研究对象的重要原因之一。

II 型 PKS 是一个多功能酶复合体,只包含一套可重复使用(iterative)的结构域,每一结构域在重复的反应步骤中被多次地用来催化相同的反应,其首次报道是在 1984 年^[5]。来自 *S. glaucescens* 的芳香族聚酮化合物 tetracenomycin C 研究的较多^[6],尽管已经发现了影响链长的两个链长决定因子(CLF)KS $_{\alpha}$ 和 KS $_{\beta}$,但确切机制仍然不是十分清楚。对 II 型 PKS 的研究近年来也取得了一些进展,如 Bao 等^[7]对柔红霉素产生菌 *S. peuceitius* 的研究结果显示, *dpsC* 基因决定了生物合成的起始单位, DpsC 专一性地使用丙酰-CoA 为起始单位,一般来说, II 型 PKS 的起始单位均为乙酰-CoA。另外, Bisang 等^[8]找到了 I 型 PKS 和 II 型 PKS 的链长因子之间的共同点,这是 I 型和 II 型 PKS 有机联系的一个切入点。他们发现 I 型 PKS 的 KSQ(被认为可能是 I 类 PKS 的链长因子)及 II 型 PKS 的 CLF 和 I 型 PKS 的 KS 结构域类似,惟一的区别是 KS 的活性中心残基半胱氨酸被高度保守的谷氨酰胺代替,这个氨基酸对这一结构域的脱羧酶活性以及聚酮化合物的合成具有重要的作用。和 I 型 PKS 相比较, II 型 PKS 在起始单位和延长单位的选择方面变化不大,所以它的结构多样性主要是来自于聚酮合成后的修饰步骤。

1999 年,日本东京大学的 Funa 等^[9]发现了一种类似苯基苯乙烯酮合成酶的 PKS(chalcone synthase-like PKS)——RppA,后来被称为 III 型 PKS。RppA 是一个在链霉菌中发现的与芳香族聚酮化合物苯基苯乙烯酮合成相关的酶,它是一种同二聚体酶并可重复进行缩合反应(iterative),催化芳香族聚酮化合物淡黄霉素(flavolin)生物合成。催化苯基苯乙烯酮(许多黄酮类化合物的前体物)形成的苯基苯乙烯酮合成酶被

认为是植物所特有的,然而来自 *S. griseus* 的 *rppA* 基因所编码的一个 372 个氨基酸的蛋白却与苯基苯乙烯酮有着很大的同源性,它以丙酰-CoA 作为起始物,进行 4 个延伸反应将五肽释放和环化成为 1,3,6,8-四羟基萘(THN),THN 将会被氧化成淡黄霉素,然后聚合成各种有色的化合物。由 RppA 催化合成的 THN 不仅是黑色素还是各种含萘醌环的次级代谢产物的中间产物。

Ⅲ型 PKS 和其它两种 PKS 迥然不同,它们不依赖于作为酰基载体的 ACP 及其上的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺。I 型和 II 型 PKS 常常通过 ACP 活化酰基-CoA 的底物,而 III 型 PKS 直接作用于酰基-CoA 活化的简单羧酸。尽管结构和机制不相同,但所有类型的 PKS 都是通过酰基-CoA 的脱羧缩合和 KS 结构域或亚基催化 C-C 键的形成。在进化关系上 III 型 PKS 与其它 PKS 及已知的 FAS 也相距甚远。

在过去的十年里,随着生物合成基因簇克隆方法的创新以及 DNA 测序技术和生物信息学的不断发展和研究成果的不断积累,人们对于 PKS 的认识越来越全面,也越来越深入,但人们不禁还是想知道我们究竟对 PKS 了解多少? 如今越来越多的报道显示 I 型、II 型和 III 型 PKS 并不能完全囊括不断涌现出的新的聚酮合酶^[4]。从结构的角度来看,有些 I 型 PKS 的结构域也可以是被重复使用的,如 AviM、CalO5、NcsB、SgcE 和 CalE8 等;有些 II 型 PKS 的结构域也可以是不能被重复使用的,如 NonJKPQU;有些 PKS 似乎是 I 型 PKS 和 II 型 PKS 的杂合体,如 LnmIJ/LnmG 和 PedFG/PedCD。从机制的角度来看,有些 PKS 依赖 ACP,而有些 PKS 不依赖 ACP。从合成的角度来看,有些 PKS 即可以催化形成 C-C 键,也可以催化形成 C-O 键,如 NonJK。也许,我们眼前所发现和利用的 PKS 只是整个 PKS 庞大家族中的小小一员,更多精彩的内容正等待人们去揭示。

2 聚酮合酶的组合生物合成

自从以英国约翰英纳斯中心(John Innes Centre)的 David A Hopwood 为先驱的研究人员在链霉菌模式菌种——天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中建立和发展遗传操作系统以来,链霉菌的分子遗传学一直成为国际生命科学领域的一个热点。经过三十年广泛而深入的研究,其中抗生素生物合成基因的克隆在抗生素领域已产生了深远的影响。首先,这些基因的克隆和测序使我们对抗生素的特征有了新的认识,例如,对抗生素生物合成基因成簇排列规律的发现极大地帮助了新基因簇的克隆和分析。现代分子生物学技

术使人们对抗生素有了更深入的了解的第二个方面是对聚酮类抗生素的认识。已知抗生素结构种类繁多,然而它们当中的最庞大的一类,包括大环内酯类、聚醚类、多烯类、萜环类等都是通过聚酮合酶途径合成的,聚酮链合成的底物选择、还原程度和产物的立体化学构型都是由 PKS 上相应模块中的结构域决定的,每个结构域的功能都一一对应在最终产物的结构上,这种多功能模块化 PKS 中催化活性中心和化学合成步骤及终产物化学结构的一一对应关系,使得通过编辑生物合成基因来设计杂合产物成为可能,并由此产生出一个崭新的研究领域——聚酮合酶的组合生物学。

聚酮合酶的组合生物学就是通过基因工程等相关技术人为地对产生抗生素等微生物次级代谢产物合成途径进行合理的改造,由此产生非天然的杂合基因或基因簇,从而形成新的非天然天然聚酮化合物;与传统组合化学的主要区别是它是在基因水平上由微生物来合成自然界原本并不存在的新化合物,而且这种化合物的数量是惊人的。可以从理论上推算一下通过聚酮合酶的组合生物学所衍生的聚酮化合物的潜力(CP,combinatory potential)^[10]。

$$CP = AT_L [AT_E \times 4]^M$$

AT_L 代表负责加载不同起始合成单位的 AT 结构域;AT_E 代表负责加载不同延伸合成单位的 AT 结构域;4 代表由 β-酮基的经不同结构域催化形成产物的可能性;M 代表基因簇中模块的数目。这还不包括 AT 两种立体化学可能性、KR 结构域两种立体化学可能性、加尾酶等其它可能增加产物数量可能性的因素。以一个像红霉素这样典型的包含 6 个模块的 PKS 基因簇为例,若含有 3 种类型的 AT(识别加载丙二酰-CoA,甲基丙二酰-CoA,乙基丙二酰-CoA),那么可能形成的聚酮化合物的理论值就接近 10000000,这就为聚酮库的建立奠定了坚实的理论基础。

纵览聚酮合酶特别是 I 型 PKS 组合生物学近十年来的发展,归纳起来采用技术有如下几种^[11~32]。

2.1 聚酮合酶中模块的减少

聚酮链的构成单位与催化它形成的 PKS 模块是一一对应的,因此,聚酮链的长度可以通过改变延长单位模块的数目来完成,前提是最后一个模块和环化酶结构域必须能够识别非天然的中间产物。如前所述,在红霉素 PKS 中,除了融合于模块 1 中的两个起始加载结构域(AT-L 和 ACP-L)和模块 6 中的 TE 结构域外,有六个链延伸模块分别位于 DEBS1、DBS2 和 DEBS3 中,红霉素合成过程中内酯环的大小由 DEBS 中模块数决定,利用基因工程方法重新调整 TE 的位

置,使 TE 重新和一个、两个、三个或五个 DEBS 模块组合,结果产生了新的截短了的 PKS,并合成了预期的二酮、三酮、四酮和六酮化合物,除二酮外,其它的几个聚酮化合物都以内酯环形式存在^[18,33-36](图 1)。这些实验表明,环化酶具有较广的底物特异性,它的重新定位可以产生各种链长的聚酮。

2.2 聚酮合酶中模块的增加

在基因中添加模块直至 2001 年才获得成功。Rowe 等将来自 *S. hygroscopicus* 合成雷帕霉素 PKS 的模块 2、模块 5 分别插入截短的 DEBS1-TE 模块 1 和模块 2 之间,合成了在相应位置多出一个结构单位的四酮化合物;将雷帕霉素 PKS 的模块 2、模块 5 分别插入全长 DEBS 的模块 1 和模块 2 之间,则合成了多出一个结构单位十六元环的聚酮化合物^[36](图 2)。

2.3 聚酮合酶中模块的替换

在红霉素 DEBS1 模块 1 的 N-端,存在两个起始加载结构域(AT-L 和 ACP-L),它们负责红霉素合成第一步反应——6-dEB 生物合成起始物丙酰-CoA 的选择和加载,因此这两个结构域也被称为起始加载模块 (loading module, LM)。已知不同的起始加载模块对底物的选择性不同,avermectin 的起始加载模块对起始物要求非常宽松,它可加载多达 40 余种不同化合物作前体^[37]。Marsden 用 avermectin 的起始加载模块取代红霉素的起始加载模块构建的糖多孢红霉菌突变体,通过添加不同的前体合成了新的 C13 位为异丙基、2-丁基等红霉菌 A、B 和 D 衍生物^[38](图 3)。

Pfeifer 用来源于合成利福霉素的起始加载模块替换红霉素的起始加载模块也合成了在 C13 位结合苯环的红霉菌衍生物^[39](图 3)。

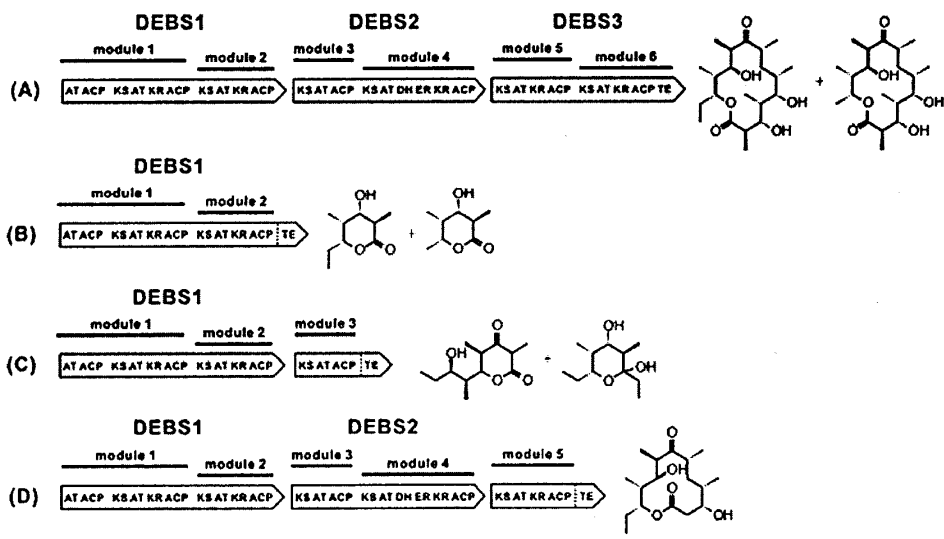
2.4 模块中结构域的减少

关于 PKS 基因工程改造的第一例成功的报道就是对红霉素 PKS 模块 5 中 KR 结构域的缺失失活。在红霉素 PKS 模型提出时,为验证模型的正确性,Donadio 等通过同源重组同框缺失 DEBS3 中模块 5 的 KR5 结构域的 80 个氨基酸,正如预料的那样,突变体合成了新的在 C5 位是酮基的红霉素衍生物 5,6-dideoxy-3 α -mycarosyl-5-oxo-erythronolide B^[39](图 4)。这不仅证实了 6-dEB 生物合成模型的正确性,还给人们以极大的启示:在 DEBS 中结构域的功能和结构是相对应的;DEBS 以及 6-dEB 后修饰酶对底物的要求并不十分严格,突变产生的中间产物能被下游的结构域有效的加工利用。

另一个类似的实验是针对 DEBS2 模块 4 中烯酰基还原酶结构域(ER4)的功能失活,它衍生的大环内酯中 C6-C7 由单键变成了双键^[40](图 4)。此外,还有一些关于使结构域功能丧失的成功报道,但主要是集中于与还原功能有关的 KR、ER、DH 结构域,这是因为它们决定了相应碳单位不同的还原程度,通过改变 β -酮基的还原程度可以产生更多的杂合聚酮。

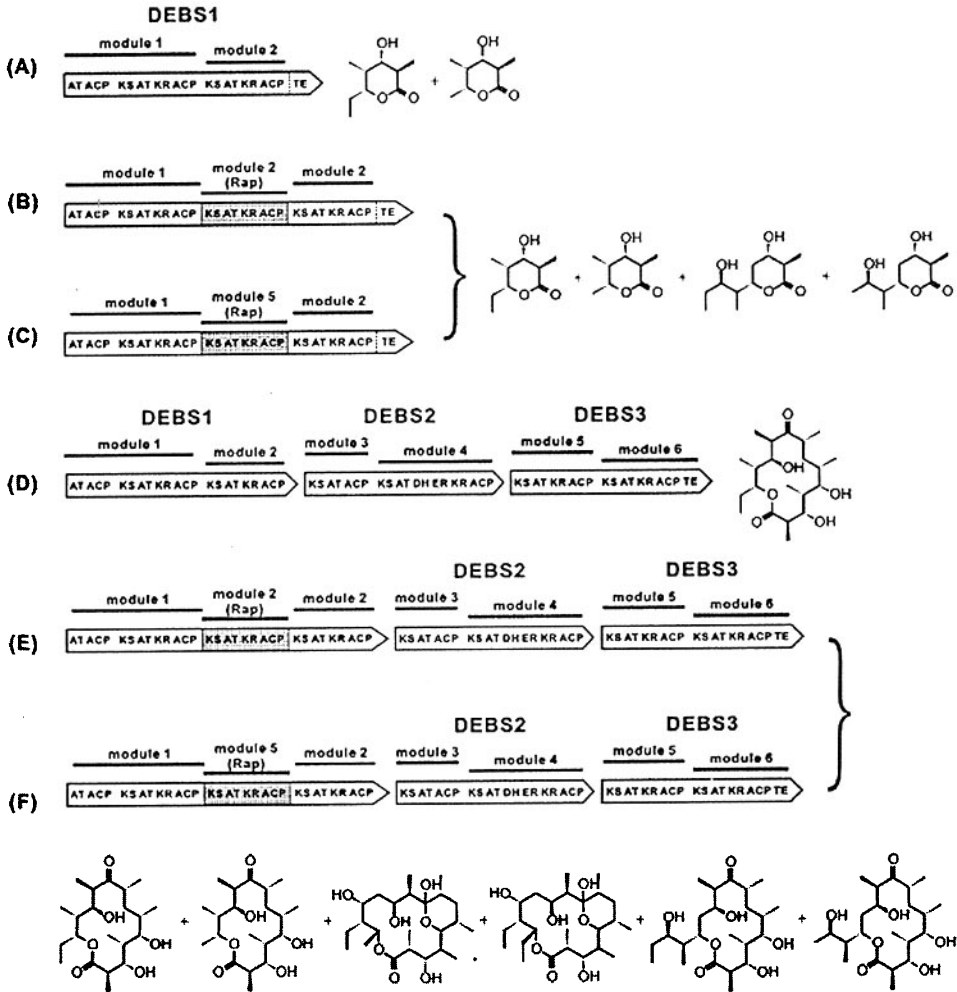
2.5 模块中结构域的增加

β -酮基的还原程度不但影响聚酮碳骨架的多样性,而且影响内酯化的方式和以羟基为中介进行的其



A: 红霉素全长 DEBS; B: 只包含模块 1、2 和 TE 结构域的截短了的红霉素 DEBS; C: 只包含模块 1、2、3 和 TE 结构域的截短了的红霉素 DEBS; D: 只包含模块 1、2、3、4、5 和 TE 结构域的截短了的红霉素 DEBS

图 1 聚酮合酶中模块减少示意图



A: 只包含模块 1、2 和 TE 结构域的截短了的红霉素 DEBS; B: 在截短了的红霉素 DEBS 模块 1、2 之间增加了一个来自雷帕霉素 PKS 的模块 2(灰色区); C: 在截短了的红霉素 DEBS 模块 1、2 之间增加了一个来自雷帕霉素 PKS 的模块 5(灰色区); D: 红霉素全长 DEBS; E: 在全长红霉素 DEBS 模块 1、2 之间增加了一个来自雷帕霉素 PKS 的模块 2(灰色区); F: 在全长红霉素 DEBS 模块 1、2 之间增加了一个来自雷帕霉素 PKS 的模块 5(灰色区)

图 2 聚酮合酶中模块增加示意图

它官能团与聚酮的结合。KR 结构域的增加或 KR-DH 结构域的增加或 KR-DH-ER 结构域的增加,都有可能影响 β -酮基的不同程度的还原而改变其它基团连接以及改变内酯环化的位点。McDaniel 等将红霉素 PKS 的模块 2 的 KR 替换为来自于雷帕霉素 PKS 的模块 4 的 DH-KR,相当于模块 2 比原来多增加了一个 DH 结构域,使原有的羟基发生了脱水,形成了 C=C 双键^[16](图 5)。同样,Kao 等将 DEBS 模块 2 的 KR 替换为雷帕霉素 PKS 模块 1 的 DH-ER-KR 也得到了一个新的八元环化合物。

用来自雷帕霉素 PKS 的模块 4 的 DH4-KR4 双结构域(灰色区)替换只包含模块 1、2、3 和 TE 的截短了的红霉素 DEBS 的 KR2 结构域。

2.6 模块中结构域的替换

不同 PKS 模块选用不同的聚酮链延伸单位,延伸单位的选择是由每个模块的 AT 结构域控制的,AT 结构域的替换也可以导致新的聚酮化合物的产生^[41],例如,用 RAPS 模块 2 中具有丙二酰-CoA 特异性的 AT2 替代 DEBS1-TE 中模块 1 中具有甲基丙二酰-CoA 特异性的 AT1,产生了预期的两个新的三酮内

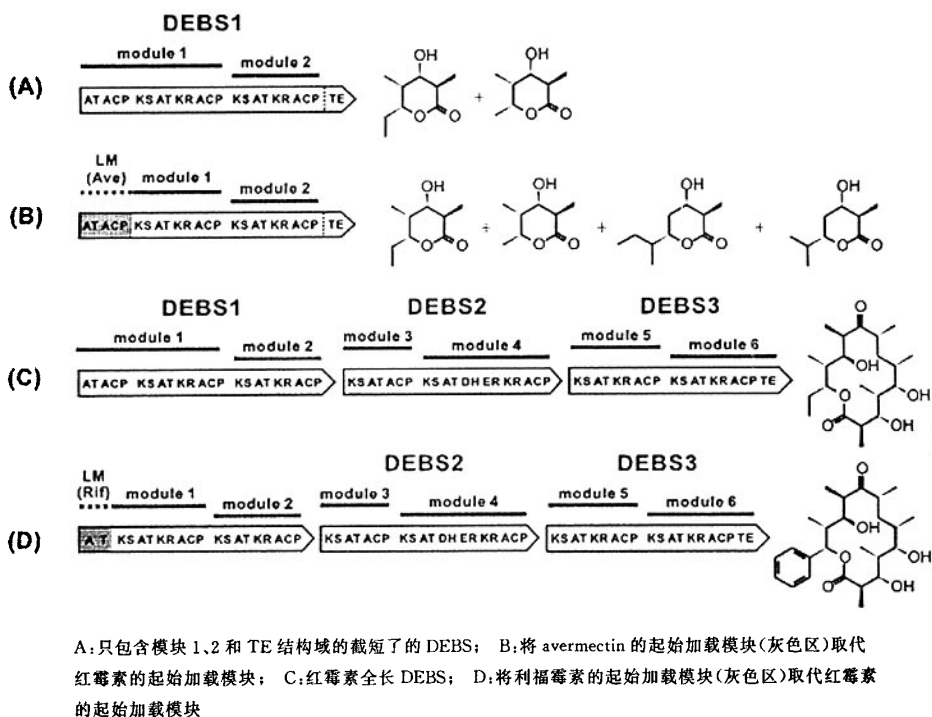


图 3 聚酮合酶中模块替换示意图

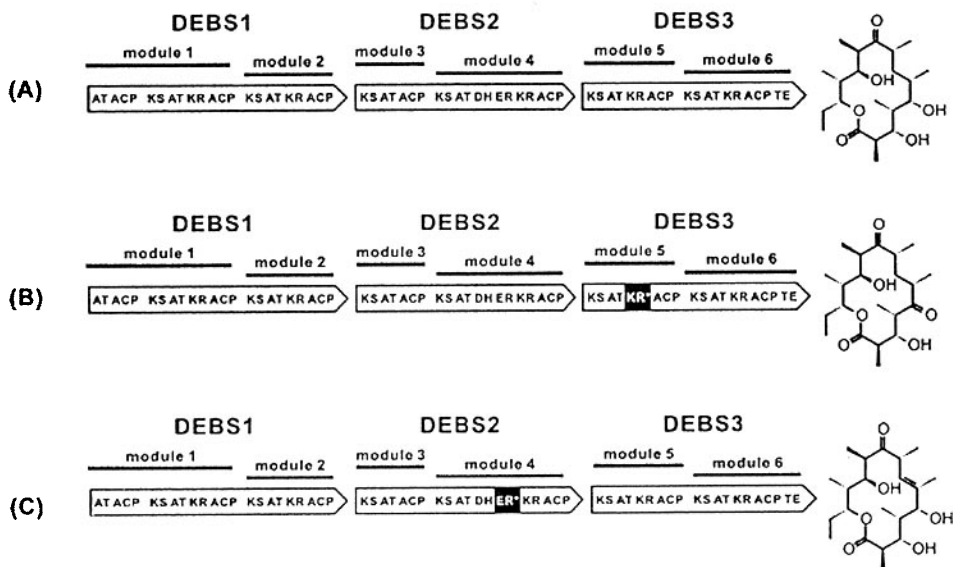


图 4 聚酮合酶模块中结构域减少示意图

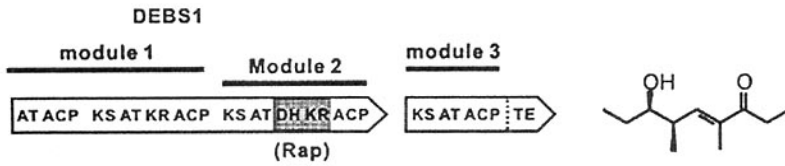


图 5 聚酮酶模块中结构域增加示意图

酯,这两个新产物在内酯环的C-4位都缺少了一个甲基^[42]。在另外一个实验中,用丙二酰-CoA 特异性的三个异源 AT 结构域来替代甲基丙二酰-CoA 特异性的 DEBS AT1 或 AT2 结构域,也产生了新的红霉素衍生物。Lin 等第一次尝试在全长的 PKS 中进行结构域的替换,他们将红霉素 PKS 模块 6 的甲基丙二酰专一性 AT 替换成来自于雷帕霉素 PKS 模块 2 的丙二酰专一性 AT,结果在产物中产生在 C2 位缺少一个甲基侧链的新化合物(图 6)。在 6-dEB 的立体结构中,其羟基有 S-和 R-两种构型,而羟基的构型由相应模块中的 KR 酶域决定,通过替换 KR 酶域可以改变 6-dEB 的立体结构。例如用雷帕霉素 KR2 替换红霉素 DEBS3 中的 KR6 合成了 3-位羟基差向异构的 6-dEB 衍生物^[22]。

2.7 前体指导下的新聚酮化合物的合成

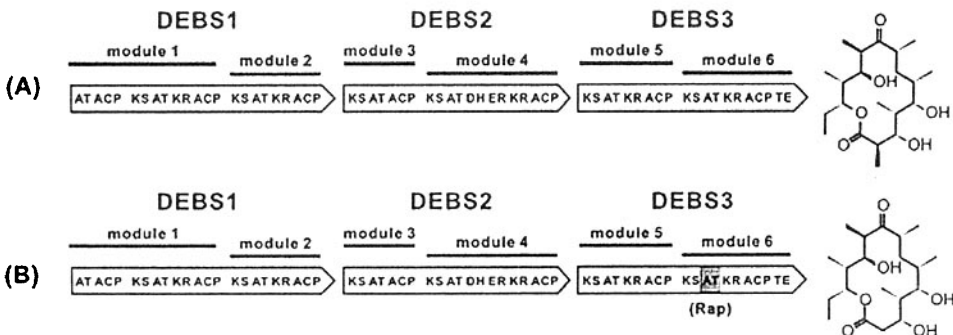
除上述方法外,还可用破坏 PKS 模块 1 的 KS 结构域活性,再通过添加适当前体合成新的聚酮化合物^[43,44]。

Jacobsen 等尝试了用不同前体产生化合物的构想^[44],他们首先获得了红霉素合成途径中第一步缩合步骤被阻断的突变株,然后再通过外加不同的人工合成的小分子化合物,得到不同的聚酮化合物(图 7)。

3 展望

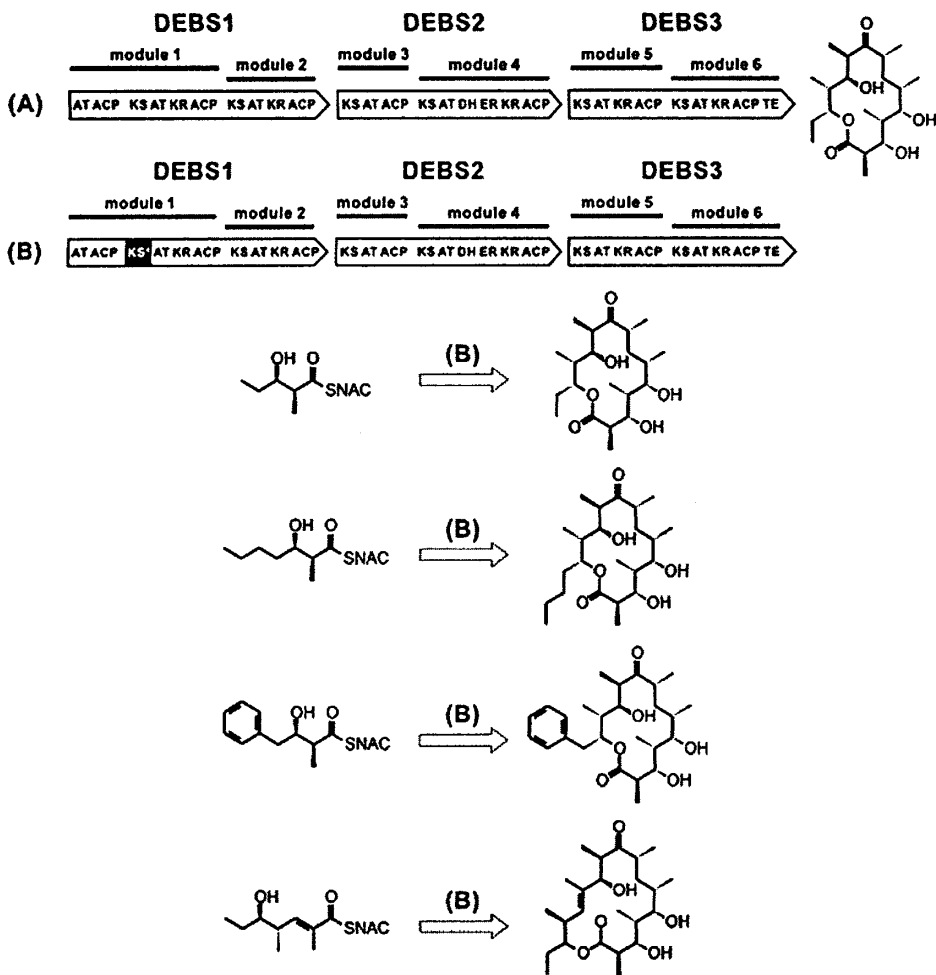
自 1990 和 1991 年英国剑桥大学的 Peter Leadlay 和美国 Abbott 实验室的 Leonard Katz 在红霉素生物合成途径中第一次揭示基因和酶所具有的模块特征以来^[45,46],通过遗传工程对模块 PKS 基因进行可预测的人工改造已被各国研究人员所证实,利用模块或结构域增加、减少、替换等多种组合生物学手段设计和改造基因簇,形成一系列非天然天然性化合物,在药物创新方面取得了一系列突破,这种突破不仅具有其重要的基础理论的价值,也具有潜在的应用前景,但仍然存在许多未解之谜和艰难挑战值得人们进行更深入研究和探索。

一个重要的挑战就在于尽管目前人们可以有的放矢地对 PKS 模块或结构域进行基因的定向操作,但要面临和解决的问题是这些发生了生物合成途径变化所产生的新的结构中间体如何被下游的模块或结构域或后修饰基因所“一视同仁”予以接纳而发挥作用? 这直接影响整个流水线的顺利运转和最后产量。随着人们的努力,越来越多的呈模块结构的聚酮生物合成途径被发现,但仍然还不清楚哪些模块或结构域必须存在于同一个多肽中才能发挥作用? 哪些模块或结构域可以以单个蛋白的形式来发挥功能? 在这样一条装配



A: 红霉素全长 DEBS; B: 将红霉素 PKS 模块 6 的甲基丙二酰专一性 AT6 替换成来自于雷帕霉素 PKS 模块 2 的丙二酰专一性 AT2(灰色区)

图 6 聚酮酶模块中结构域替换示意图



A:红霉素全长 DEBS; B:红霉素 DEBS1 模块 1 中 KS1 结构域被失活(黑色区)

图 7 前体指导下的新聚酮化合物的合成

线上,如果可以装配的单个部件越多,那么可以想象通过排列组合所形成的产品的种类就越丰富。尽管如此,某个改造的特定的生物合成途径目前只能产生一个或少数若干个新的产物,它仍然属于低通量,还无法“随心所欲”、“轻而易举”地产生一整套包含多个不同突变的 PKS,从而一次性地获得结构特定而且种类繁多的新的聚酮化合物库,这还有待于人们对聚酮中间物在 PKS 不同模块之间转运规律的深入揭示。此外,许多聚酮化合物在合成的初期往往是没有生物学活性的,只有当其从 PKS 装配线上释放下来后经过一系列不同的后修饰,如氧化、糖基化等过程才最终完成。因此,这也为通过组合生物合成创造新产物提供了机会,例如可以通过改造和替换相应的后修饰基因来实现产物创新。

除了对现有基因的人为改造之外,人们还在继续

从自然界中寻找更多、结构更新颖、活性更特别的新的“原材料”,在这些新的原材料发现的同时,也可能伴随着新的生物合成途径的揭示,这无疑也为新的非天然“天然产物”的创造带来新的设计蓝图。另一个挑战来自于从技术和应用的角度可用于聚酮化合物高效表达的宿主系统的发展和运用。

参 考 文 献

[1] McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood D A, *et al.* Engineered biosynthesis of novel polyketides [J]. *Science*, 1993,262:1546

[2] Hopwood D A, Sherman D H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis [J]. *Annu Rev Genet*,1990,24:37

[3] Katz L, Donadio S. Polyketide synthesis; prospects for

- hybrid antibiotics [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47: 875
- [4] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 285
- [5] Malpartida F, Hopwood D A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host [J]. *Nature*, 1984, 309: 462
- [6] Malpartida F, Hallam S E, Kieser H M, et al. Homology between *Streptomyces* genes coding for synthesis of different polyketides used to clone antibiotic biosynthetic genes [J]. *Nature*, 1987, 325: 818
- [7] Bao W, Sheldon P J, Hutchinson C R. Purification and properties of the *Streptomyces peucetius* DpsC beta-ketoacyl: acyl carrier protein synthase III that specifies the propionate-starter unit for type I polyketide biosynthesis [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 9752
- [8] Bisang C, Long P F, Cortes J, et al. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases [J]. *Nature*, 1999, 401: 502
- [9] Funa N, Ohnishi Y, Fujii I, et al. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms [J]. *Nature*, 1999, 400: 897
- [10] Carreras C W, Santi D V. Engineering of modular polyketide synthases to produce novel polyketides [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9: 403
- [11] Leadlay P F. Combinatorial approaches to polyketide biosynthesis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1: 162
- [12] Walsh C T, Gehring A M, Weinreb P H, et al. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1: 309
- [13] Khosla C. Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases [J]. *Chem Rev*, 1997, 97: 2577
- [14] Katz L. Manipulation of modular polyketide synthases [J]. *Chem Rev*, 1997, 97: 2557
- [15] Hopwood D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases [J]. *Chem Rev*, 1997, 97: 2465
- [16] McDaniel R, Kao C M, Hwang S J, et al. Engineered intermodular and intramodular polyketide synthase fusions [J]. *Chem Biol*, 1997, 4: 667
- [17] Cane D E, Walsh C T, Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations [J]. *Science*, 1998, 282: 63
- [18] Bohm I, Holzbaur I E, Hanefeld U, et al. Engineering of a minimal modular polyketide synthase, and targeted alteration of the stereospecificity of polyketide chain extension [J]. *Chem Biol*, 1998, 5: 407
- [19] Staunton J. Combinatorial biosynthesis of erythromycin and complex polyketides [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2: 339
- [20] Ranganathan A, Timoney M, Bycroft M, et al. Knowledge-based design of bimodular and trimodular polyketide synthases based on domain and module swaps: a route to simple statin analogues [J]. *Chem Biol*, 1999, 6: 731
- [21] Keating T A, Walsh C T. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3: 598
- [22] McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, et al. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1846
- [23] Carreras C W, Ashley G W. Manipulation of polyketide biosynthesis for new drug discovery [J]. *EXS*, 2000, 89: 89
- [24] Floss H G. Antibiotic biosynthesis: from natural to unnatural compounds manipulation of polyketide biosynthesis for new drug discovery [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, 27: 183
- [25] Rodriguez E, McDaniel R. Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4: 526
- [26] Du L, Shen B. Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2001, 4: 215
- [27] Staunton J, Wilkinson B. Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 159
- [28] Du L, Sanchez C, Shen B. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules [J]. *Metab Eng*, 2001, 3: 78
- [29] Katz L. Engineering polyketide synthases [J]. *Sci World J*, 2002, 2: 127
- [30] Behal V. Hybrid antibiotics [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2003, 48: 17
- [31] Liou G F, Khosla C. Building-block selectivity of polyketide synthases [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 279
- [32] Kealey J T. Creating polyketide diversity through genetic engineering [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: c1
- [33] Jacobsen J R, Keatinge-Clay A T, Cane D E, et al. Precursor-directed biosynthesis of 12-ethyl erythromycin [J]. *Bioorg Med Chem*, 1998, 6: 1171

(下转第 18 页)

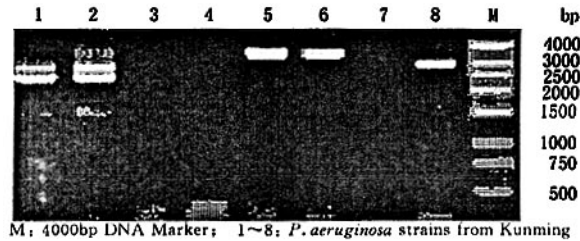


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of integrated gene cassettes among *P. aeruginosa* strains from Kunming

整合子的存在是细菌多重耐药形成和传播的主要内在机制,而抗生素的选择压力是导致细菌耐药性存在、发展的主要客观因素。如何合理使用抗生素,控制细菌耐药性形成是 21 世纪临床医学迫在眉睫的任务。

参 考 文 献

- [1] Hall R M, Collis C M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 15(4): 593
- [2] Rowe-Magnus D A, Guerout A M, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1657
- [3] 郭庆兰. 耐药性播散机制进展——整合子-基因匣子系统 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24(4): 203
- [4] 张宏梅, 石磊, 李琳, 等. 细菌耐药基因盒的捕获和表达机理的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(11): 703
- [5] Rosser S J, Young H K. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1999, 44(1): 11
- [6] 张宏梅, 石磊, 李琳, 等. 沙门菌中第一类整合子的鉴定及特性分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(3): 214
- [7] Mazel D, Dychinco B, Webb V A, et al. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(6): 1568
- [8] Xue Q, Ashley G, Hutchinson C R, et al. A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11740
- [9] Kao C M, Pieper R, Cane D E, et al. Evidence for two catalytically independent clusters of active sites in a functional modular polyketide synthase [J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 12363
- [10] Rowe C J, Bohm I U, Thomas I P, et al. Engineering a polyketide with a longer chain by insertion of an extra module into the erythromycin-producing polyketide synthase [J]. *Chem Biol*, 2001, 8: 475
- [11] Dutton C J, Gibson S P, Goudie A C, et al. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1991, 44: 357
- [12] Marsden A F, Wilkinson B, Cortes J, et al. Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase [J]. *Science*, 1998, 279: 199
- [13] Pfeifer B A, Admiraal S J, Gramajo H, et al. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli* [J]. *Science*, 2001, 291: 1790
- [14] Donadio S, McAlpine J B, Sheldon P J, et al. An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7119
- [15] Bedford D, Jacobsen J R, Luo G, et al. A functional chimeric modular polyketide synthase generated via domain replacement [J]. *Chem Biol*, 1996, 3: 827
- [16] Oliynyk M, Brown M J, Cortes J, et al. A hybrid modular polyketide synthase obtained by domain swapping [J]. *Chem Biol*, 1996, 3: 833
- [17] Kinoshita K, Williard P G, Khosla C, et al. Precursor-directed biosynthesis of 16-membered macrolides by the erythromycin polyketide synthase [J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 2495
- [18] Jacobsen J R, Hutchinson C R, Cane D E, et al. Precursor-directed biosynthesis of erythromycin analogs by an engineered polyketide synthase [J]. *Science*, 1997, 277: 367
- [19] Cortes J, Haydock S F, Roberts G A, et al. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Nature*, 1990, 348: 176
- [20] Donadio S, Staver M J, McAlpine J B, et al. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis [J]. *Science*, 1991, 252: 675