

微生物药物生物合成途径解析与优化

白林泉¹ 毛旭明² 李永泉² 王浩鑫³ 沈月毛³ 孙宇辉⁴

(1 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2 浙江大学生命科学院, 杭州 310058;

3 山东大学生命科学院, 济南 250100; 4 武汉大学药学院, 武汉 430072)

doi:10.3969/j.issn.1674-0319.2015.06.006



作者简介

白林泉, 上海交通大学生命科学技术学院教授。主要从事抗肿瘤安丝霉素、抗水稻纹枯病井冈霉素和抗真菌杀念菌素等的生物合成机理研究、合成生物学结构改造和比较功能基因组研究。

E-mail:bailq@sjtu.edu.cn

天然微生物药物的生物合成存在产量低、组分复杂、周期长、严谨调控等特征, 同时与药物生物合成相关的催化基因、调节基因、抗性基因和外排基因等成簇排列, 初具模块化特征。在充分挖掘、解析和优化多种生物合成元件、模块、系统及高效底盘的基础上, 合成生物学整合工程学理念, 采用先设计、后实验的策略, 修补和强化微生物药物合成机器, 高效对接优良底盘, 实现微生物药物合成的高产、高效、降耗和减排, 最终推动微生物药物产业升级。

微生物药物被广泛用于临床疾病治疗、农牧林渔业病害防治和环境保护, 在保障人类健康和生活质量中发挥着重要作用。目前临床上使用的药物中, 有一半以上直接来自于微生物天然产物或是其结构修饰衍生物, 被用于防治细菌或真菌感染、肿瘤、糖尿病、免疫性疾病等^①。放线菌、真菌、假单胞菌、芽孢杆菌等是主要的药物产生菌, 其中笔者所研究的以链霉菌属为主的放线菌是微生物药物的主要来源, 产生了包括以利福霉素为代表的安莎类、以庆大霉素为代表的氨基糖苷类、以那他霉素为代表的多烯大环内酯类、以井冈霉素为代表的氨基环醇类等多种结构类型的天然生

物活性物质。

放线菌等微生物作为土壤、海洋等环境中复杂微生物区系的成员, 产生的活性物质具有一定的生态学意义。一是具有保护自身免受周围其他病原侵染的作用, 二是作为微生物间的信号分子传递种群信息^②。因此, 微生物天然活性物质的产生存在产量低、多菌共存、调控信号复杂、结构多样、产生菌依附于固体基质表面等自然属性。而将其放入发酵罐作为微生物药物细胞工厂后, 其生物技术特征应该是产量高、组分单一、单菌发酵、调控单一有效、大规模液体发酵。长期的常规育种和工艺优化, 以及基于生物合成机理研究的代谢工程改

造,使得微生物药物的发酵生产有了长足的改善,实现了产业化和临床应用。但是,对多种重要的临床药物来讲,尤其是与大宗初级代谢生物产品相比,其产量仍然太低,还存在多组分并存、基质利用率低、有机质排放量大、得率低等瓶颈问题,制约着微生物药物生产的全面升级。

功能基因组学基础上的系统生物学研究使得我们对微生物药物合成的反应、途径、调控、产生菌与发酵环境互作等有了全面的认识。但只有合成生物学新领域的诞生,才能够打破菌种甚至物种的界限,广泛收集与微生物药物合成的催化、辅因子、调控、外排、抗性等相关的元件与模块,并改造和利用优势明显的底盘宿主,系统考虑元件、模块、系统和底盘等的适配性、鲁棒性、进行性,定向实现单一组份微生物药物的高效、绿色生产,大幅降低生产成本。接下来,笔者以安莎类和氨基糖苷类的生物合成催化元件挖掘、那他霉素和达托霉素调控网络解析与改造、井冈霉素产生菌为基础的底盘改造等为主来阐述这几类微生物药物的合成生物学进展。

1 安莎类药物生物合成催化元件的挖掘和适配性研究

安莎类是一类重要的大环内酰胺类活性化合物,其中最著名的有抗结核病的利福霉素、抗肿瘤的格尔德霉素和美登木素。安莎类化合物以特殊的3-氨基-5-羟基苯甲酸为起始单元,经由I型聚酮途径装配,通过独特的酰胺合酶进行聚酮链的释放与环化。安莎类化合物的

生物合成基因可以划分为3个相对独立的模块:起始单元与延伸单元合成模块、聚酮延伸模块和后修饰模块^①。这种模块化结构使得通过合成生物学方法制造新安莎药物成为可能。深度解析已知安莎类化合物的生物合成、调控机制,发掘自然界中存在的其他安莎类产物,建立相应的生物合成元件库,并在此基础上通过对功能元件与调控元件的兼容性及其适配性优化,才可能实现人工设计制造新的安莎类产物,从而获得具有药用开发价值的候选药物。

安莎类化合物的多样性主要源自其生物合成的3个层次:延伸单元数目和类型的变化、萘环形成与否、多样的后修饰过程。目前,对已知安莎类化合物生物合成与调控的研究后,已发现许多催化元件和调控元件,具体包括负责AHBA起始单元合成、不同聚酮链延伸单元(乙基、丙基、丁基、异丁基丙二酰CoA和甲氧基丙二酰ACP)合成与加载、延伸和修饰的相关功能元件;参与萘环形成和聚酮链环化释放的功能元件;多样的后修饰元件(甲基化、羟基化、卤化、酰基化、糖基化、环氧化、氧化断裂和脱水等)。基于高特异性和保守性的AHBA合酶基因序列对自然界中的安莎类化合物多样性进行估计,显示自然界中仍存在数量可观的安莎类化合物资源。在AHBA合酶基因序列的指导下,笔者成功发现了两类新骨架安莎类化合物。Zhang等^②从链霉菌LC6中首次发现了二聚化的5酮安莎霉素juanlimycin A和juanlimycin B。Li等^③通过组成型表达沉默安莎类化合物基因簇中的正调控基

① 参考文献

Koehn F, Carter G. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 206-220.

② 参考文献

Liu G, Chater K F, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77: 112-143.

③ 参考文献

Kang Q, Shen Y, Bai L. Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Nat Prod Rep*, 2012, 29: 243-263.

④ 参考文献

Zhang J, Qian Z, Wu X, et al. Juanlimycins A and B, ansamycin macrodilactams from *Streptomyces* sp. *Org Lett*, 2014, 16: 2752-2755.

⑤ 参考文献

Li S, Li Y, Lu C, et al. Activating a cryptic ansamycin biosynthetic gene cluster to produce three new naphthalenic octaketide ansamycins with *n*-pentyl and *n*-butyl side chains. *Org Lett*, 2015, 17:2706-2709.

⑥ 参考文献

Kase H, Odakura Y, Nakayama K. Sagamicin and the related aminoglycosides: fermentation and biosynthesis. I. Biosynthetic studies with the blocked mutants of *Micromonospora sagamiensis*. *The Journal of Antibiotics*, 1982, 35:1-9.

⑦ 参考文献

Unwin J, Standage S, Alexander D, et al. Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex. *The Journal of Antibiotics*, 2004, 57: 436-445.

⑧ 参考文献

Kharel M K, Basnet D B, Lee H C, et al. Molecular cloning and characterization of a 2-deoxystreptamine biosynthetic gene cluster in gentamicin-producing *Micromonospora echinospora* ATCC15835. *Molecules and Cells*, 2004, 18: 71-78.

⑨ 参考文献

Park J W, Hong J S, Parajuli N, et al. Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105: 8399-8404.

⑩ 参考文献

Li D, Li H, Ni X, et al. Construction of a gentamicin C1a-overproducing strain of *Micromonospora purpurea* by inactivation of the *gacD* gene. *Microbiological Research*, 2013, 168: 263-267.

⑪ 参考文献

Kim H J, Mccarty R M, Ogasawara Y, et al. The 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.

⑫ 参考文献

Shao L, Chen J, Wang C, et al. Characterization of a key aminoglycoside phosphotransferase in gentamicin biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23: 1438-1441.

⑬ 参考文献

Guo J, Huang F, Huang C, et al. Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis. *Chem Biol*, 2014, 21:608-618.

⑭ 参考文献

Huang C, Huang F, Moison E, et al. Delineating the biosynthesis of gentamicin x2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex. *Chem Biol*, 2015, 22: 251-261.

因,从链霉菌LZ35中发现了新的8酮萘安莎neoansamycins A-C,该安莎类化合物具有独特的长链烷烃延伸单元。这两类新安莎类化合物的发现,增加了催化安莎二聚化、长链烷烃延伸单元加载的功能元件,扩展了安莎类化合物的设计空间。

尽管研究者们通过对十余种安莎类化合物生物合成途径的解析,发现并鉴定了一系列生物合成元件,但是迄今为止尚未实现用合成生物学手段成功获得新安莎类化合物,主要困难是人造合成体系的适配性问题。要解决不适配问题,还需更深入地理解安莎类化合物的生物合成机制,包括萘安莎中的萘环形成、酰胺合酶催化的链释放与环化、复杂后修饰等。这些机理的阐明,将使制造任意大小环系的安莎类化合物成为可能,极大地扩展结构空间,实现结构修饰的多元化。简言之,在深度解析生物合成机理的基础上,充分考察安莎类化合物合成途径中各元件的兼容性,并进一步利用计算手段进行辅助设计和改造,同时兼顾重构途径与底盘生物的适配性,才有可能真正实现新安莎类药物的定向制造。

2 氨基糖苷类庆大霉素的生物合成解析

庆大霉素是典型的氨基糖苷类抗生素,其抗菌谱广,抗菌活性强,多用于与其他抗菌药物联合用药治疗革兰阴性杆菌或耐药革兰阳性菌所致的严重感染,曾在临床上得到广泛应用。对庆大霉素生物合成的探究始于各药用组分及

中间产物的分离。通过对小单孢菌及其突变株的大量发酵和产物分析,逐步鉴定出了庆大霉素A、A1、A2、A3、B、X2、JI-20A以及JI-20B等含量较低的氨基糖苷类化合物。Tilley和Nakayama等^⑥基于代谢缺陷型突变株的一系列底物喂养实验,提出了庆大霉素可能的生物合成路线,其中庆大霉素X2位于分支点的位置,之后涉及一系列的氧化、还原、转氨、C-和N-甲基化及从单糖上脱去两个羟基等的反应。

2004年,Wellington等^⑦三个研究组分别完成了庆大霉素生物合成基因簇的克隆及测序,并通过生物信息学比对预测了各基因可能的功能。Sohng研究组^⑧在大肠杆菌中表达了GtmA,通过体外酶学实验确证了其可将葡萄糖-6-磷酸转化为2-DOI,并且发现含有*gtmJ*的变铅青链霉菌表现出对庆大霉素的抗性;4年后,Yoon研究组^⑨在不产生氨基糖苷类抗生素的委内瑞拉链霉菌中,实现了庆大霉素生物合成部分基因的异源表达,确证了从葡萄糖-6-磷酸到庆大霉素A2的生物合成路径;夏焕章研究组^⑩同框敲除了野生型中的*genK*,从而阻断了庆大霉素X2到G418的转化,且使终产物C2、C2a和C1消失,再次确证了*genK*的功能;刘鸿文研究组^⑪以重组GenK蛋白进行了体外酶学实验,确证了GenK催化庆大霉素X2上6'-C的甲基化形成G418的过程,并通过定量分析和动力学监测,对GenK的体外催化机制进行了探讨;刘文研究组和陈代杰研究组^⑫合作,使用GenP蛋白进行体外催化卡那霉素和阿米卡星,表明GenP负责3'-OH的磷酸化,由此推测GenP参与庆大霉素生物合成中二号环位脱羟基过程。

2014年,笔者课题组与Leadlay研究组^⑩合作,通过体内和体外实验,系统地揭示了由中间体G418到JI-20A和JI-20B的转化过程,以及相应的*genQ*和*genB1*的功能,同时证明了GenB2催化庆大霉素C2和C2a之间的相互转化,并对脱氢酶GenB3和GenB4的功能进行了详细的探究^⑪。另外,笔者课题组还严密地从分子遗传学、生物化学和化学生物学的角度解析了由庆大霉素A2到最终庆大霉素C复合物的关键共同中间体——庆大霉素X2的生物合成机制。即在氧化还原酶GenD2和转氨酶GenS2连续催化下,庆大霉素A2 C-3"位的仲醇首先转变成了胺。随后,SAM依赖型N-甲基转移酶GenN促使胺发生特异性甲基化,形成了庆大霉素A。最后,在SAM依赖型和钴胺素酶GenD1的催化下,C-4"位发生C-甲基化形成了庆大霉素X2。这一结果为后续庆大霉素完整生物合成机制的全面破解奠定了基础^⑫。

庆大霉素从被发现至今已历经50余年,其大部分的生物合成途径已被阐明,但仍有部分关键的合成步骤有待破解。彻底阐明其长久以来悬而未决的生物合成机制将对人们通过合成生物学进行高效、安全的氨基糖苷类抗生素的定向优化和创新提供重要依据。

3 微生物药物合成调控网络解析与理性重组

生物体内启动子是基因表达的开关和调节器,对启动子的理性组合和改造可以人为控制下游基因的表达强度并可预测生物体的生理行为。在大肠杆菌中,研究者利用乳糖操纵子启动子、四环素操纵子启动子和BAD启动子,采用

自下而上的思路人工构建了基因表达调控回路。不同的启动子组合与诱导物诱导强度可人为控制多种形式的基因表达调控形式,包括非调控型、激活型、抑制型、同时激活抑制型等。这种人工设计和改造的调控通路为改造和预测更大规模的体内生物行为奠定了基础。笔者在此基础上构建了基因表达浓度梯度调控技术,用于改造那他霉素合成酶之间的适配性,利用合成元件的模块化,建立了合成过程前体供应、高速合成、高效转运等过程的耦合技术,全面优化了那他霉素的生物合成途径,结合补料分批发酵,使那他霉素的生产达到国际领先水平^⑬。

笔者在环脂肽类抗生素达托霉素的生产菌玫瑰孢链霉菌中,利用基因簇启动子dptEp筛选到了达托霉素生物合成的调控因子AtrA,并发现其受保守的A-因子信号途径调控,以此改造达托霉素的转录调控途径,构建了产量提高2.5倍的高产菌株^⑭。同时筛选到一个ArsR家族负调控因子和一个TetR家族正调控因子,这两个调控因子与AtrA都结合在dptEp的不同位点,表明它们通过介导不同的转录调控机制来调节达托霉素生物合成^⑮。据此,通过组合遗传策略利用合成生物学技术对调控途径进行了理性重组,构建了高产基因工程菌,建立了发酵工艺优化,在华东医药中试车间完成了中试放大,发酵单位达2.5g/L以上,有效促进了达托霉素的产业化。

4 井冈霉素生物合成的多元调控及底盘改造

抗水稻纹枯病的井冈霉素(又称有

⑬ 参考文献

Yu P, Liu S, Bu Q, et al. WblACh, a pivotal activator of natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis* L10, is positively regulated by AdpA. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 6879-6887.

⑭ 参考文献

Mao X, Luo S, Zhou R, et al. Transcriptional regulation of the daptomycin gene cluster in *Streptomyces roseosporus* by an autoregulator. *AtrA*. *J Biol Chem*, 2015, 290(12): 7992-8001.

⑮ 参考文献

Wang F, Ren N, Luo S, et al. DptR2, a DeoR-type auto-regulator, is required for daptomycin production in *Streptomyces roseosporus*. *Gene*, 2014, 544: 208-215.

⑯ 参考文献

Flatt P M, Mahmud T. Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Nat Prod Rep*, 2007, 24: 358-392.

⑰ 参考文献

Wu H, Qu S, Lu C, et al. Genomic and transcriptomic insights into the thermo-regulated biosynthesis of validamycin in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *BMC Genomics*, 2012, 13:337.

⑱ 参考文献

Tan G Y, Bai L, Zhong J J. Exogenous 1,4-butyrolactone stimulates A-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 2984-2993.

⑲ 参考文献

Tan G Y, Peng Y, Lu C, et al. Engineering validamycin production by tandem deletion of γ -butyrolactone receptor genes in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Metab Eng*, 2015, 28: 74-81.

⑳ 参考文献

Qu S, Kang Q, Wu H, et al. Positive and negative regulation of GlnR in validamycin A biosynthesis by binding to different loci in promoter region. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99:4771-4783.

效霉素)和糖尿病治疗药物阿卡波糖都属于氨基环醇类,包含几十种天然活性产物。氨基环醇类天然产物结构中的C₇N氨基环醇结构都来自于7-磷酸景天庚酮糖的环化,并共享最初几步催化反应,而且氨基都来源于谷氨酸,因此在生物合成上具有明显的共性。而其他修饰反应(如糖基化、磷酸化、羟化、环氧化等)的存在,使得氨基环醇类的结构和活性多元化,从而成为合成生物学研究的良好材料^⑧。井冈霉素由吸水链霉菌井冈变种5008及其衍生菌株产生,工业产生菌的产量高达30g/L,产率达到15g/(L·d),几乎是所报道的产率最高的微生物药物。从井冈霉素的化学结构来看,超常的高产率说明井冈霉素产生菌具有高效的磷酸无糖代谢途径,以提供大量的7-磷酸景天庚酮糖前体物,也应该具有很高的有机氮源(如谷氨酸等氨基酸)含量,同时井冈霉素结构中存在葡萄糖基,表明该菌株中UDP-葡萄糖的合成能力也很强。因此,井冈霉素产生菌具有成为氨基环醇类天然产物异源生产所需的底盘宿主的优良特征。

笔者解析了井冈霉素野生型产生菌5008的基因组,并开展了37℃发酵条件下的转录组分析,初步揭示了井冈霉素高产的生理遗传基础及温度调控机制。在37℃条件下,7.5%的蛋白编码基因的表达得到显著提高,展现出特异性的转录谱变化。首先,基因缺失发现催化谷氨酸脱氢生成 α -酮戊二酸的谷氨酸脱氢酶参与了井冈霉素

的合成,并证实谷氨酸是井冈霉素生物合成的直接氮来源。其次,基因缺失、回补与转录分析识别了1个链霉菌抗生素调控蛋白SARP基因负责井冈霉素生物合成的温度调控。另外,通过1个与逆性调节有关的sigma因子和2个heat-shock蛋白的基因缺失实验,发现井冈霉素生物合成与链霉菌的heat-shock调控系统紧密相关^⑨。

通过序列分析发现,在井冈霉素生物合成基因簇的启动子区域存在全局性调控因子AdpA和GlnR的可能结合位点,暗示井冈霉素的生物合成除了受到高温的严谨调控外,还受到群体响应信号分子A-因子类似物和胞内氮代谢水平的影响。深入研究发现,1,4-丁内酯通过刺激吸水链霉菌井冈亚种的类A因子级联调控系统进而加强基因簇的转录,从而提高了井冈霉素的合成效率;全局调控蛋白AdpA-H通过与井冈霉素基因簇中启动子区域相结合直接控制结构基因的转录,从而实现井冈霉素生物合成的调控^⑩;在5008的多套*afsA-arpA*同源基因系统中,ShbR1与ShbR3能时序性地负调控*adpA-H*的转录,同时缺失*shbR1*和*shbR3*可解除*adpA-H*的转录抑制,使其转录位于较高水平,进而通过提高井冈霉素合成基因簇的转录水平实现抗生素的高产^⑪。另外,分别对井冈霉素生物合成基因簇启动子区域的两个GlnR结合位点进行了定点突变。GlnR结合位点I突变后,井冈霉素的产量提高150%,但是位点II突变却使井冈霉素的产量减少了

50%,表明GlnR通过与启动子区域两个不同位点结合,对井冈霉素的生物合成同时进行正调控和负调控。在工业菌株中高表达基因*glnR*,48h井冈霉素的产量也增加了40%左右^⑫。

上述研究不但揭示了井冈霉素的多元调控机制和高产机理,而且通过对多个全局性调节基因和双向启动子的改造,在构建氨基环醇类药物异源高产所需的底盘宿主和高效启动子方面走出了坚实的一步。对阿卡波糖等氨基环醇生物合成基因簇的异源表达研究正在开展之中。

5 总结与展望

安莎类、氨基糖苷类、多烯大环内酯类、氨基环醇类微生物药物种类繁多,但各类的生物合成核心过程类似,同时又具有多元的结构衍生反应,成为合成生物学不可多得的研究材料。在充分解析生物合成及其调控机理的基础上,合成生物学指导下的结构和活性改造又能产生多样而充足的新结构衍生物,为临床鉴定和治疗提供源源不断的药物先导物。微生物药物工业近50年的发展积累了多个药物的高产菌株,为不同类型药物的异源高产提供了候选底盘宿主。在不久的将来,用于氨基环醇类、安莎类、氨基糖苷类、多烯类等的特定底盘及其配套的启动子、辅因子、外排泵、前体合成等元件和模块库将十分充足,最终实现这些类型药物的结构多元化及高产。