

多烯大环内酯抗生素的结构改造与高产

齐震, 白林泉*

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: bailq@sjtu.edu.cn

2017-03-10 收稿, 2017-06-26 修回, 2017-06-26 接受, 2017-10-16 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2012CB721005)和国家高技术研究发展计划(2012AA02A76)资助

摘要 多烯大环内酯抗生素是一类重要的高效广谱抗真菌药物, 被广泛用于治疗真菌感染与食品防腐, 但多烯大环内酯抗生素的进一步应用因其细胞毒副作用而被限制. 多烯大环内酯抗生素的药理性质提升与产量提高是目前亟待解决的问题. 本文总结了多烯大环内酯抗生素多烯区域、环外羧基、多元醇区域及糖基配体四方面的结构改造工作, 系统阐释了多烯大环内酯抗生素的活性作用机制与构效关系. 同时, 总结了用于多烯大环内酯抗生素产量提高的调控基因改造、群体感应信号通路改造及前体供给优化等基因工程改造策略, 指出了多烯大环内酯抗生素结构改造及产量提高面临的挑战与尚待解决的问题.

关键词 多烯大环内酯抗生素, 结构改造, 产量提高, 基因工程

系统性真菌感染是一种严重的免疫系统缺陷并发症. 近年来, 随着免疫系统缺陷患者数量的增加、社会老龄化的加剧以及真菌病原体耐药性的迅速积累, 系统性真菌感染的病发率与致死率均显著增加^[1-3]. 多烯大环内酯抗生素能够结合真菌细胞膜内的麦角甾醇, 形成亲水离子通道, 破坏真菌细胞极性, 是一类高效广谱的抗真菌药物^[4,5]. 其中, 常用抗真菌多烯药物主要以两性霉素B、制霉菌素A1、杀念菌素/抗生素FR-008 III及匹马霉素(又称纳他霉素)为代表(图1). 虽然多烯大环内酯抗生素具有较为严重的毒副作用, 如与哺乳动物细胞膜内胆固醇相互作用引起的溶血毒性等, 但其高效广谱的抗真菌活性与较低的耐药性, 使多烯大环内酯抗生素依然成为临床应用中最重要的抗真菌药物之一. 此外, 多烯大环内酯抗生素还对包膜病毒与朊病毒蛋白病原体具有良好抑制活性^[6], 这也进一步提高了多烯大环内酯抗生素的研究及经济价值.

多烯大环内酯抗生素主要由链霉菌等放线菌产

生, 其中, 两性霉素^[7]、制霉菌素^[8]、杀念菌素/抗生素FR-008^[9,10]及匹马霉素^[11,12]的生物合成基因簇均已被报道. 多烯大环内酯骨架由I型聚酮合酶(PKS)催化合成, 一般经环外羧基化、糖基合成及加载与羧基化/环氧化三类PKS后修饰, 形成完整的多烯大环内酯抗生素. 近年来, 人们通过化学衍生或基因工程改造, 成功获得了一系列具有优良药理性质的多烯大环内酯衍生物^[13,14]. 多烯大环内酯抗生素结构改造的系统性研究, 为深入解析多烯大环内酯抗生素的结构化学、生物合成机制、作用机制及构效关系提供了重要依据. 同时, 为降低多烯大环内酯抗生素的发酵生产成本, 国内外多个课题组还通过转录调控基因改造、群体感应信号通路改造及前体供给优化等策略^[14,15], 实现了多烯大环内酯抗生素产量的大幅提高.

本文综述了多烯大环内酯抗生素结构改造及产量提高的相关研究内容, 总结了多烯大环内酯抗生素的结构改造、构效关系及产量提高策略, 为后续多

引用格式: 齐震, 白林泉. 多烯大环内酯抗生素的结构改造与高产. 科学通报, 2017, 62: 3533-3547

Qi Z, Bai L Q. Structural modifications and yield improvements of polyene macrolide antibiotics (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 3533-3547, doi: 10.1360/N972017-00240

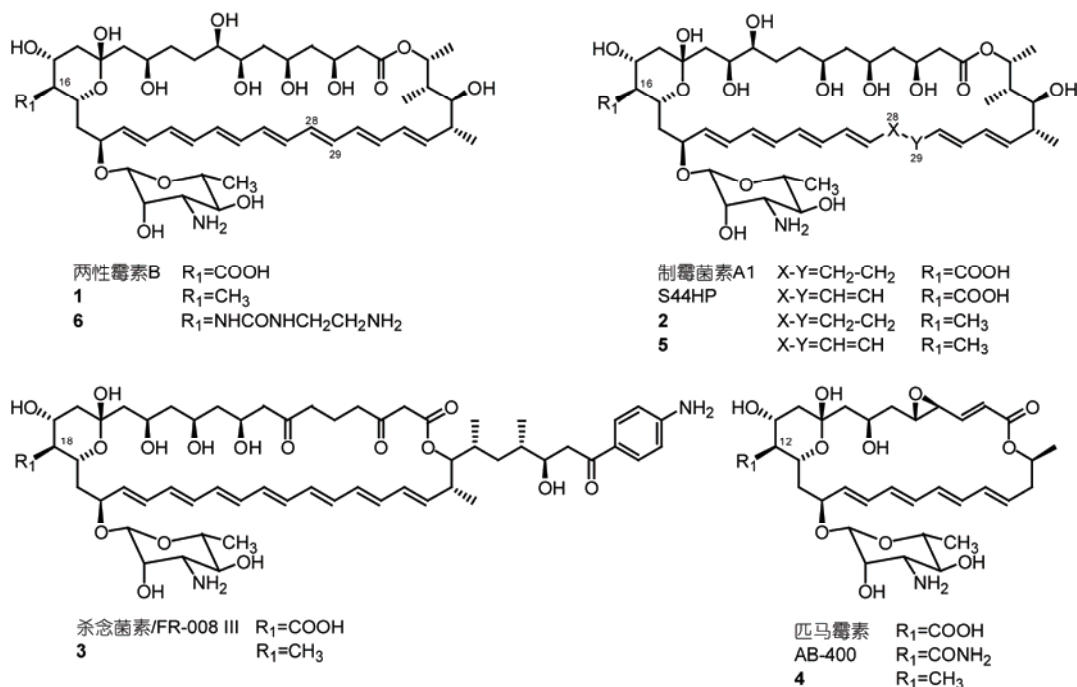


图1 主要多烯大环内酯抗生素及其衍生物的化学结构

Figure 1 Chemical structures of polyene macrolide antibiotics and their modified derivatives in polyene region and exocyclic carboxyl group

烯大环内酯抗生素的理性结构改造及产量提高提供了参考与建议。

1 多烯大环内酯抗生素的结构改造

严重的溶血毒性及极差的水溶性是限制多烯大环内酯抗生素临床应用的主要因素。近年来,人们对多烯大环内酯抗生素的多烯区域、环外羧基、多元醇区域及糖基配体进行了一系列结构改造,并成功获得了多种溶血毒性降低、抗真菌活性或水溶性提高的多烯大环内酯衍生物。

1.1 多烯大环内酯多烯区域结构改造

多烯大环内酯抗生素的内酯环上通常具有3~8个共轭双键,共轭双键的数量与多烯大环内酯抗生素的抗真菌活性密切相关。两性霉素B为七烯抗生素,制霉菌素A1为“2+4”烯抗生素,虽然二者化学结构非常相似,但其抗真菌活性与溶血毒性却相差10倍以上。挪威Zotchev课题组^[16]通过失活制霉菌素PKS基因 $nysC$ 中负责催化C28-C29饱和键形成的烯酰基还原酶5(ER5)结构域,成功获得了制霉菌素A1的七烯衍生物S44HP(图1)。体外活性及毒性实验表明,S44HP的抗真菌活性及溶血毒性与两性霉素B相似,

但其水溶性较两性霉素B提高了约10倍(表1)^[17]。因此,在S44HP的基础上,继续进行其他结构改造,有可能获得药理性质更加优良的多烯大环内酯衍生物。根据多烯离子通道模型,多烯区域是多烯大环内酯抗生素与麦角甾醇发生疏水作用的主要区域。S44HP较制霉菌素A1抗真菌活性与溶血毒性的大幅提高,暗示多烯内酯环上共轭双键数量的增加能够有效增强多烯大环内酯抗生素与细胞膜内甾醇的相互作用。

1.2 多烯大环内酯环外羧基结构改造

常用多烯大环内酯抗生素的化学结构中均具有保守的环外羧基功能团。内酯环甲基侧链的羧基化,由第一类P450单加氧酶(AmphN, NysN, FscP及ScnG)负责催化,被普遍认为是多烯大环内酯抗生素生物合成途径中最先发生的PKS后修饰反应^[34]。多烯大环内酯抗生素的环外羧基在稳定抗生素分子内构象^[35]、抗生素分子间相互作用^[4]及抗生素分子与甾醇相互作用^[18]中均发挥了重要作用。因此,国内外众多课题组对多烯大环内酯抗生素的环外羧基进行了结构改造。

根据多烯大环内酯抗生素的生物合成机制,多个课题组通过失活第一类P450单加氧酶基因($amphN$,

表1 多烯大环内酯抗生素结构改造策略及其生物活性^{a)}

Table 1 Strategies for structural modifications and bioactivities of polyene macrolide antibiotics

化合物	原始多烯分子	改造策略	抗真菌活性	溶血毒性	参考文献
多烯区域结构改造					
S44HP	制霉菌素A1	ER5失活	提高约10倍	提高约33倍	[16,17]
环外羧基结构改造					
1	两性霉素B	$\Delta amphN$	相似	下降约1倍	[18]
2	制霉菌素A1	$nysN$ 失活	相似	下降约1倍	[19]
3	杀念菌素/抗生素FR-008	$\Delta fscP$	下降约10倍	下降约80倍	[20]
4	匹马霉素	$scnG$ 失活	提高约1倍	下降约3.5倍	[21]
5	S44HP	$nysN$ 失活	提高约2倍	下降约1.5倍	[19]
AB-400	匹马霉素	$pcsB$ 表达	提高约4倍	相似	[22]
6	两性霉素B	化学衍生	相似	下降约100倍	[23]
多元醇区域结构改造					
7	两性霉素B	$\Delta amphL$	稍有下降	—	[24]
8	制霉菌素A1	$\Delta nysL$	相似	—	[25]
9	匹马霉素	$\Delta pimD$	下降约10倍	—	[26]
10	S44HP	$\Delta nysL$	相似	—	[27]
11	匹马霉素	$\Delta pimD/nysL$ 表达	下降约10倍	—	[28]
14	匹马霉素	$scnG$ 失活	下降约1倍	大幅下降	[21]
15	匹马霉素	$scnG$ 失活	几乎无活性	几乎无毒性	[21]
16	制霉菌素A1	DH15失活	下降约4倍	下降约2倍	[19]
17	S44HP	DH15失活	下降约60倍	下降约200倍	[27]
18	S44HP	KR16失活	下降约4倍	下降约1倍	[19]
19	S44HP	KR17失活	下降约2倍	下降约1倍	[19]
20	两性霉素B	化学衍生	下降约8倍	大幅下降	[29]
糖基配体结构改造					
23	两性霉素B	$\Delta amphDIII/perDII$ 表达	相似	相似	[30]
26	两性霉素B	$\Delta amphLInppY$ 表达	相似	下降约1倍	[31]
28	两性霉素B	化学衍生	提高10倍以上	下降约2.5倍	[32]
29	两性霉素B	化学衍生	相似	大幅下降	[33]

a) “—”表示该化合物的溶血毒性未测定

nysN, *fscP*及*scnG*), 成功获得了相应多烯大环内酯抗生素的环外脱羧-甲基衍生物^[18-21,36]. 16-脱羧-16-甲基两性霉素B(1)、16-脱羧-16-甲基制霉菌素A1(2)、18-脱羧-18-甲基杀念菌素/抗生素FR-008 III(3)及12-脱羧-12-甲基匹马霉素(4)如图1所示. 其中, 衍生物1, 2及4的抗真菌活性与原抗生素分子相似或稍有提高, 但溶血毒性明显降低; 衍生物3的抗真菌活性较杀念菌素/抗生素FR-008 III下降了约10倍, 溶血毒性下降了约80倍. 在制霉菌素A1七烯衍生物S44HP的产生菌中, 进一步失活P450单加氧酶基因*nysN*, 可以获得S44HP的脱羧-甲基衍生物5(图1). 与S44HP相比,

衍生物5的抗真菌活性提高约2倍, 而溶血毒性下降约1.5倍(表1)^[19]. 此外, 西班牙Malpartida课题组^[22]在匹马霉素产生菌*Streptomyces* RGU5.3中发现并鉴定了一种多烯羧胺合酶PcsB. PcsB可以催化匹马霉素环外羧基发生羧胺化, 产生匹马霉素羧胺衍生物AB-400(图1). 与之相似, 激活*S. diastaticus* var. 108中多烯羧胺合酶基因*pcsA*的表达, 则可以获得匹马霉素类似物龟裂霉素及CE-108的羧胺衍生物^[37]. 体外活性及毒性实验表明, 多烯羧胺衍生物的溶血毒性与原抗生素分子相似, 但抗真菌活性提高了约4倍(表1)^[38]. 进一步的环外羧基化学衍生实验表明, 多

烯大环内酯抗生素的环外羧基当加载有长度适中并具有一定亲水基团(如羟基、氨基及羧基等)的侧链时,可以维持抗真菌活性基本不变,但是溶血毒性显著降低^[39-41]。例如,两性霉素B环外羧基衍生物**6**的抗真菌活性与两性霉素B相似,但其溶血毒性下降约100倍(表1)^[23]。与多烯大环内酯抗生素相似,环外羧基衍生物同样存在较低而缓慢的病菌耐药性^[23],为后续低毒安全多烯衍生物的研发提供了依据。

多烯大环内酯抗生素环外羧基的取代或衍生,可以明显降低衍生物的溶血毒性,却不会对抗真菌活性造成明显影响。这暗示环外羧基并不是多烯大环内酯抗生素抗真菌活性的必需功能团,但环外羧基的取代或衍生可以有效提高多烯大环内酯抗生素对麦角甾醇的选择性。爱尔兰Caffrey课题组^[18]认为,在多烯离子通道模型中,环外羧基通过氢键与氨基海藻糖的C3'位氨基、水分子及甾醇中的羟基形成紧密的强亲水作用网络,并使抗生素分子对麦角甾醇或胆固醇表现出相似的强结合能力。当环外羧基被取代或衍生时,这一亲水作用网络被减弱,抗生素分子通过其他作用方式(如疏水作用)更加特异地结合麦角甾醇而非胆固醇,从而表现出溶血毒性的下降。虽然多烯大环内酯抗生素的环外羧基衍生物具有良好的药理性质,但如何实现环外羧基衍生物的高效

生物合成,仍是目前亟待解决的问题。

1.3 多烯大环内酯多元醇区域结构改造

多烯大环内酯抗生素多元醇区域中的亲水基团,一方面源于PKS延伸模块中还原结构域(酮基还原酶KR、脱水酶DH及烯酰基还原酶ER)的选择性还原修饰;另一方面来自于PKS后修饰途径中第二类P450单加氧酶(AmphL, NysL及ScnD)催化的羟基化或环氧化^[34]。据此,国内外众多课题组通过改造PKS还原结构域或第二类P450单加氧酶基因,获得了一系列多烯大环内酯抗生素多元醇区域的结构改造衍生物。

通过失活多烯大环内酯抗生素生物合成基因簇中的第二类P450单加氧酶基因(*amphL*, *nysL*及*pimD/scnD*),可以成功获得8-去羟基两性霉素B(**7**)^[24]、10-去羟基制霉菌素A1(**8**)^[25]、4,5-去环氧匹马霉素(**9**)^[26]及10-去羟基S44HP(**10**)^[27](图2)。其中,衍生物**8**或**10**的抗真菌活性分别与制霉菌素A1或S44HP相似,衍生物**7**的抗真菌活性较两性霉素B稍有下降,而衍生物**9**的抗真菌活性较匹马霉素下降10倍左右(表1)。德国Bornscheuer课题组^[28]利用P450单加氧酶的底物宽泛性,将制霉菌素P450单加氧酶基因*nysL*导入匹马霉素的*pimD*缺失菌株,并成功检测到4,5-去环氧-6-羟基匹马霉素(**11**)的产生(图2)。体外活性实验表明,

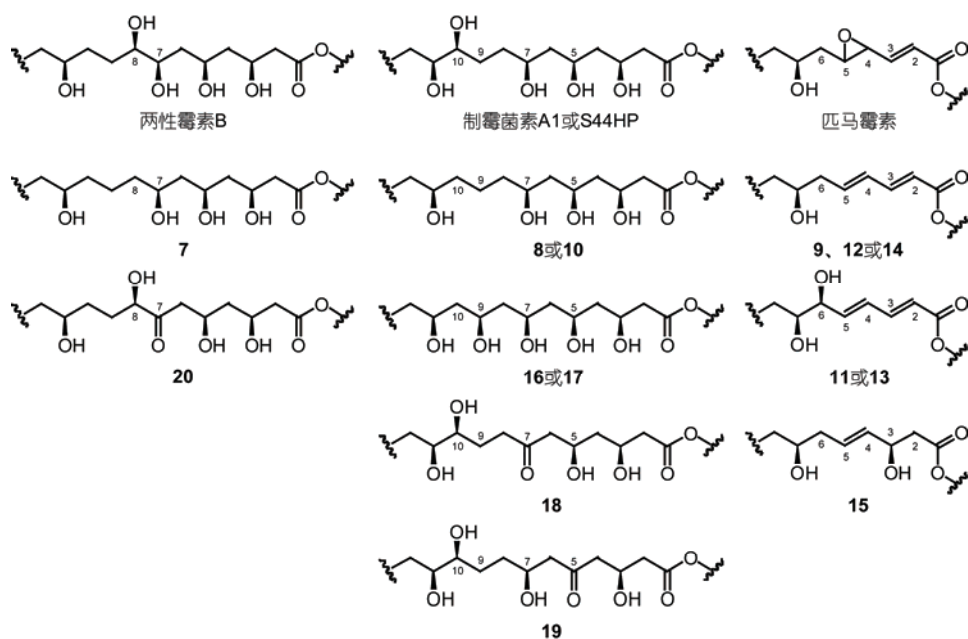


图2 多烯大环内酯衍生物的多元醇区域化学结构

Figure 2 Chemical structures in polyol region of polyene macrolide derivatives

衍生物**11**的抗真菌活性较衍生物**9**稍有下降(表1)。而同时将P450单加氧酶基因 $nysL$ 及多烯羧胺合酶基因 $pcsA$ 导入 $pimD$ 缺失菌株,则可以进一步检测到4,5-去环氧匹马霉素羧胺衍生物(**12**)及4,5-去环氧-6-羟基匹马霉素羧胺衍生物(**13**)的产生^[28](图2)。此外,在匹马霉素产生菌*S. chattanoogensis*中失活P450单加氧酶基因 $scnG$ ^[21],除检测到12-脱羧-12-甲基匹马霉素(**4**)的产生,还可以检测到4,5-去环氧-12-脱羧-12-甲基匹马霉素(**14**)及2-氢-3-羟基-4,5-去环氧-12-脱羧-12-甲基匹马霉素(**15**)的产生,其多元醇区域化学结构如图2所示。与衍生物**4**相比,衍生物**14**的抗真菌活性及溶血毒性均明显下降,而衍生物**15**则几乎完全丧失了抗真菌活性与溶血毒性(表1)。

除失活或异源表达第二类P450单加氧酶基因外,还可以通过PKS结构域改造获得多烯大环内酯抗生素多元醇区域的结构改造衍生物。在制霉菌素产生菌*S. noursei*中,失活PKS基因 $nysJ$ 中的DH15结构域,可以产生9-羟基-10-去羟基制霉菌素A1(**16**),其C9位羟基的存在导致P450单加氧酶 $NsyL$ 无法进一步催化C10位羟基的形成^[19]。体外活性及毒性实验表明,衍生物**16**的抗真菌活性较制霉菌素A1下降约4倍,溶血毒性下降约2倍(表1)。在制霉菌素A1七烯衍生物S44HP产生菌中,失活PKS基因 $nysJ$ 中的DH15结构域、KR16结构域或KR17结构域,则可以分别检测到9-羟基-10-去羟基S44HP衍生物**17**^[27]、7-酮基-7-去羟基S44HP衍生物**18**^[19]及5-酮基-5-去羟基S44HP衍生物**19**^[19]的产生,其多元醇区域化学结构如图2所示。与S44HP相比,衍生物**17**的抗真菌活性下降约60倍,溶血毒性下降200倍以上;衍生物**18**与**19**的抗真菌活性下降2~4倍,溶血毒性下降约1倍(表1)。此外,Zotchev课题组^[42]还尝试通过替换PKS起始模块结构域,试图获得新型多烯大环内酯衍生物。虽然部分替换菌株可以产生少量已有的多烯大环内酯抗生素,但所有替换菌株中均没有检测到新型结构衍生物的产生。然而,随着人们对I型PKS结构^[43,44]及底物选择性^[45,46]研究的不断深入,PKS结构域的理性替换及改造很可能成为获得新型多烯大环内酯衍生物的新策略之一。

除利用基因工程改造策略外,多个课题组还利用化学手段获得了多种多元醇区域的结构改造衍生物^[29,47,48]。与上述衍生物的药理性质相似,化学方法获得的衍生物的抗真菌活性与溶血毒性同样存在不

同程度的降低。例如,化学衍生获得的7-酮基-7-去羟基两性霉素B(**20**)在溶血毒性大幅下降的同时,其抗真菌活性同样较两性霉素B下降了约8倍(表1)^[29]。综合七烯抗生素的多元醇区域结构改造数据可以发现,当衍生物C8及C9位或C7及C10位为羟基时,衍生物抗真菌活性相对较高;当衍生物C7及C9位为羟基时,衍生物抗真菌活性则相对较低^[29,40]。

目前已报道的多烯大环内酯抗生素多元醇区域结构改造衍生物的抗真菌活性及溶血毒性均低于相应出发抗生素分子。根据多烯离子通道模型,多烯大环内酯抗生素多元醇区域位于离子通道内侧。多元醇区域亲水基团的改变不仅会影响离子通道特性,还会影响抗生素分子内的氢键网络及抗生素分子构象,从而影响了多烯大环内酯抗生素的药理性质^[29]。

1.4 多烯大环内酯糖基配体结构改造

虽然多烯大环内酯抗生素包括糖基化及非糖基化两大类,但目前临床应用中常用的抗真菌多烯药物均为糖基化多烯大环内酯抗生素,并且两性霉素、制霉菌素、杀念菌素/抗生素FR-008及匹马霉素的糖基配体均为氨基海藻糖^[34]。氨基海藻糖在维持多烯大环内酯抗生素分子构象^[35]、抗生素分子与甾醇相互作用^[47]及提高抗生素水溶性^[13]等方面均具有重要作用。晶体数据显示,氨基海藻糖C3'位氨基与环外羧基形成的盐桥及氨基海藻糖C2'位羟基与C13位羟基通过水分子形成的氢键能够有效稳定两性霉素B的分子构象^[35]。并且,氨基海藻糖C3'位氨基还可以通过甾醇羟基及相邻抗生素分子环外羧基的极性作用,稳定亲水离子通道的形成^[47]。体外活性及毒性实验证明,多烯大环内酯抗生素的去糖基衍生物几乎完全丧失了抗真菌活性及溶血毒性^[5,9,49]。

多烯大环内酯抗生素生物合成过程中,氨基海藻糖的生物合成及加载被认为发生在内酯环环外羧基化之后,多元醇区域羟基化或环氧化之前^[34]。其中,氨基海藻糖是在GDP- α -D-甘露糖-4,6-脱水酶(AmphDIII, NysDIII, FscMIII及ScnJ)、自发或未知异构化酶及GDP-海藻糖胺合酶(AmphDII, NysDII, FscMII及ScnC)的催化下由GDP- α -D-甘露糖转化而来(图3)^[30,49,50]。氨基海藻糖最终在糖基转移酶(AmphDI, NysDI, FscMI及ScnK)的催化下加载至多烯大环内酯骨架,糖基转移酶基因的缺失可以导致多烯大环内酯糖苷配体的产生^[9,49]。在杀念菌素/抗生素FR-008

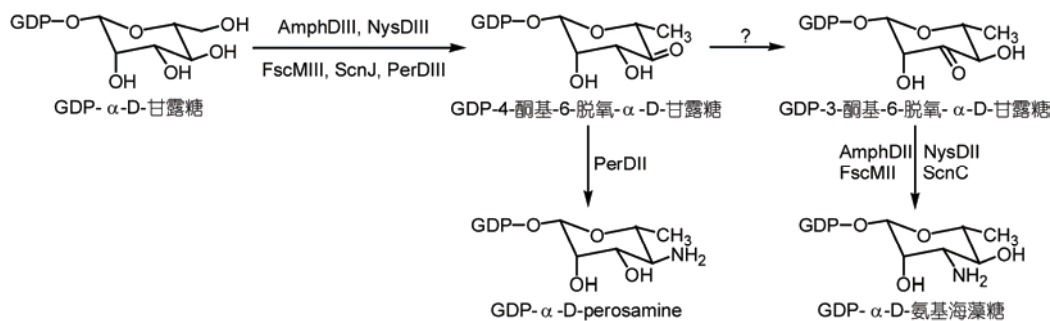


图3 推测的氨基海藻糖及perosamine生物合成途径

Figure 3 Proposed biosynthetic pathways of mycosamine and perosamine

产生菌 *Streptomyces* sp. FR-008 中, 缺失 GDP-海藻糖胺合酶基因 *fscMII*, 可以产生 C21 位加载 3-酮基-6-脱氧-D-甘露糖的衍生物 **21**^[9]; 失活 PKS 基因 *fscD* 中的 DH11 结构域, 则可以产生氨基海藻糖加载于 C23 位的六烯衍生物 **22**^[51] (图4)。此外, Caffrey 课题组还利用糖基转移酶的底物宽泛性, 将真菌毒素生物合成基因簇中的 perosamine 合酶基因 *perDII* 转入两性霉素 B 的 *amphDII* 缺失菌株中, 成功检测到了活性与两性霉素 B 相似的 19-*O*-perosamine-两性霉素 B (**23**) (图3,

4)。并且, 通过融合两性霉素 B 糖基转移酶 AmphDI 的 N 端与真菌毒素糖基转移酶 PerDI 的 C 端, 可以大大提高衍生物 **23** 的产量^[30]。AmphDI-PerDI 融合糖基转移酶的成功改造, 也暗示了通过定向改造糖基转移酶获得目标多烯大环内酯衍生物的可行性。

除单糖多烯大环内酯抗生素外, 越来越多的新型二糖多烯大环内酯抗生素被发现。韩国 Kim 课题组^[52] 在菌株 *Pseudonocardia autotrophica* KCTC9441 中成功发现并鉴定了一种新型制霉菌素 A1 二糖衍生

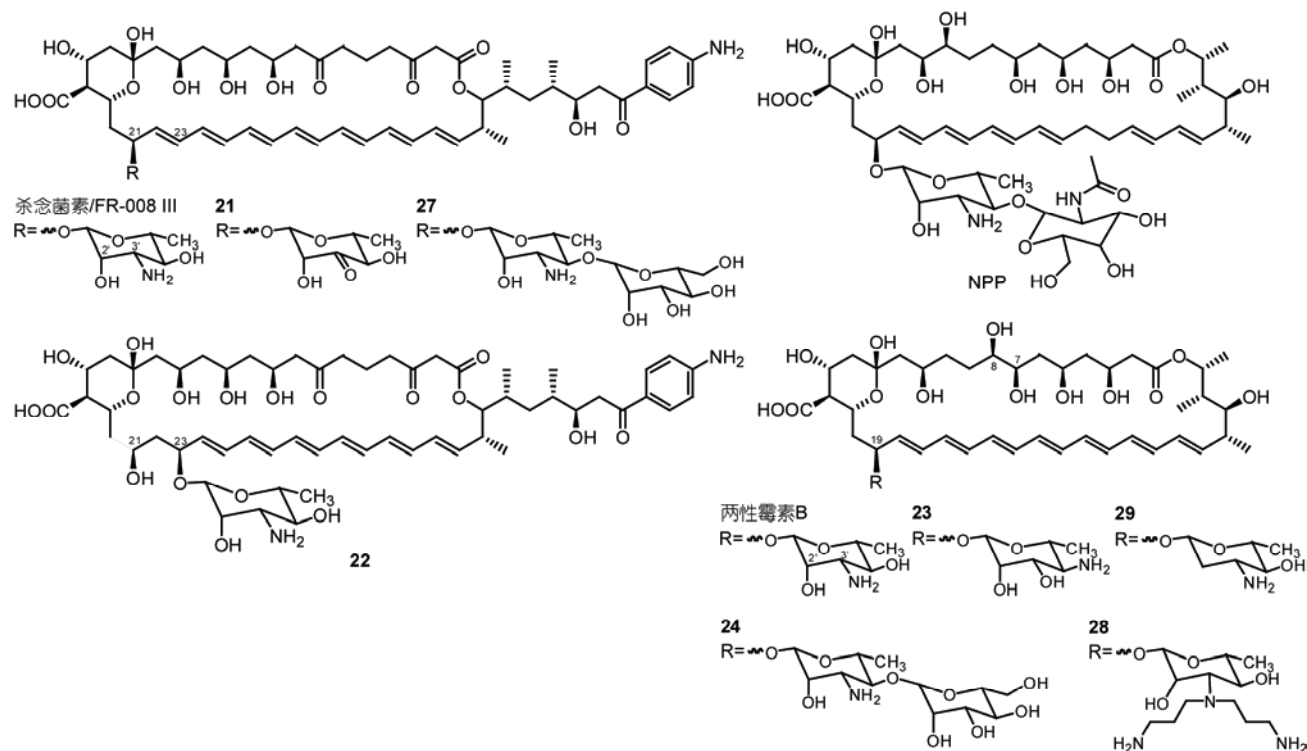


图4 多烯大环内酯糖基配体结构改造衍生物的化学结构

Figure 4 Chemical structures of polyene macrolide derivatives modified in sugar moieties

物NPP, 其糖基配体为氨基海藻糖-(α 1-4)-*N*-乙酰氨基葡萄糖(图4)。NPP的药理性质明显优于制霉菌素A1, 其抗真菌活性约为制霉菌素A1的50%, 但溶血毒性下降约10倍, 水溶性提高300倍以上。体内及体外实验表明, NPP的糖基加载分两步进行, 糖基转移酶NppDI(NysDI同源蛋白)催化第一步氨基海藻糖的加载, 糖基转移酶NppY催化第二步*N*-乙酰氨基葡萄糖的加载^[53]。考虑到糖基转移酶的底物宽泛性, 糖基转移酶基因*nppY*被导入多种多烯大环内酯抗生素的产生菌, 以期获得新型多烯大环内酯二糖衍生物。例如, 将基因*nppY*导入两性霉素产生菌*S. nodosus*, KR16结构域失活或基因*amphL*缺失菌株, 可以分别产生4'-甘露糖两性霉素B(24)^[54]、7-酮基-4'-甘露糖两性霉素B(25)^[54]及8-去羟基-4'-甘露糖两性霉素B(26)^[31]。此外, NppY及其同源蛋白PegA^[55]还可以将杀念菌素/抗生素FR-008 III转化为4'-甘露糖衍生物27^[54](图4)。其中, 衍生物26的抗真菌活性与两性霉素B相似, 但溶血毒性下降约50%(表1)。

由于氨基海藻糖C3'位氨基与C2'位羟基对多烯大环内酯抗生素的药理性质至关重要, 国内外众多课题组对这两个基团进行了化学衍生或取代。其中, 氨基海藻糖C3'位氨基的化学衍生往往能够有效降低多烯大环内酯抗生素的溶血毒性^[56], 尤其是C3'位氨基的二(氨基丙烷基)衍生(如两性霉素B衍生物28, 图4)可以使衍生物的抗真菌活性提高10倍以上, 而溶血毒性下降2.5倍左右(表1)^[32]。环外羧基衍生与C3'位氨基衍生相结合, 能够进一步提高多烯大环内酯衍生物的抗真菌活性, 并降低其溶血毒性^[57]。氨基海藻糖C2'位羟基立体构象的改变对衍生物抗真菌活性的影响并不明显^[58], 但C2'位去羟基化(如两性霉素B衍生物29, 图4)却可以使衍生物特异结合麦角甾醇, 从而在维持相近抗真菌活性的前提下, 大幅降低溶血毒性(表1)^[33]。

多烯大环内酯抗生素环外羧基与糖基配体的结构改造结果, 使我们对多烯大环内酯抗生素的构效关系有了更深刻的认识。之前人们普遍认为, 多烯大环内酯抗生素直接通过亲水或疏水作用与麦角甾醇或胆固醇结合, 其中环外羧基与氨基海藻糖参与的亲水作用网络对抗生素与麦角甾醇或胆固醇的结合均至关重要。环外羧基或氨基海藻糖的结构改造能够减弱这一亲水作用网络, 使抗生素通过其他作用方式更加特异地结合麦角甾醇而非胆固醇, 从而使

多烯衍生物的溶血毒性下降^[18]。但是考虑到麦角甾醇与胆固醇化学结构的相似性, 这种差别影响的可能性并不大。由于环外羧基、氨基海藻糖C3'位氨基与C2'位羟基可以通过氢键或盐桥稳定抗生素分子构象^[23,59], 因此, 目前人们更认同另一种多烯大环内酯抗生素的作用模型^[60]。多烯大环内酯抗生素维持天然构象时, 其与麦角甾醇或胆固醇的结合能力相似, 从而同时表现出抗真菌活性与溶血毒性。但当环外羧基或氨基海藻糖被修饰时, 氢键或盐桥作用被破坏, 多烯衍生物的分子构象发生变化^[33,61]。这一新分子构象使多烯衍生物对胆固醇的结合能力大幅下降, 但对麦角甾醇的结合能力基本维持不变, 从而使多烯衍生物对麦角甾醇的选择特异性提高, 溶血毒性下降。

2 多烯大环内酯抗生素的高产

多烯大环内酯抗生素的工业化生产主要通过链霉菌等放线菌发酵实现, 因此, 提高产生菌的发酵产量能够有效降低多烯大环内酯抗生素的生产成本。工业生产中, 提高抗生素产量的常规方法主要包括: 连续随机诱变及筛选^[62]、发酵培养基优化^[63]及发酵条件优化^[64]等。随着多烯大环内酯抗生素生物合成途径及转录调控机制解析的不断深入, 通过基因工程改造实现多烯大环内酯抗生素高产的研究越来越多。

2.1 途径特异性调控基因改造实现抗生素高产

途径特异性调控基因位于抗生素生物合成基因簇内, 通过直接调节生物合成基因的转录水平来影响抗生素的产生。两性霉素^[65]、制霉菌素^[66,67]及杀念菌素/抗生素FR-008^[68,69]途径特异性调控的研究较为有限, 匹马霉素的途径特异性调控机制研究则较为系统。在菌株*S. natalensis*中, 匹马霉素的生物合成受两个途径特异性正调控基因*pimR*^[70]及*pimM*^[71]的级联调控。*PimR*可以结合*pimM*的启动子区域, 并激活*pimM*的转录^[72]; 基因*pimM*的产物PimM直接与8个匹马霉素生物合成基因的启动子区域结合, 正调控匹马霉素的产生^[73]。西班牙Aparicio课题组^[71,74]发现, 在匹马霉素、两性霉素、菲律宾菌素或龟裂霉素的产生菌中过表达基因*pimM*, 均可以提高相应多烯大环内酯抗生素的产量, 暗示多烯大环内酯抗生素的途径特异性调控具有一定的相似性与普适性。

浙江大学李永泉课题组^[12]在菌株*S. chattanoo-gensis*中鉴定了匹马霉素的另外一对途径特异性正调

控基因*scnRI*及*scnRII*. 系统发生学分析表明, 调控基因*scnRI*与*scnRII*分别是基因*pimR*与*pimM*的同源基因. 与*PimM*类似, *ScnRII*的N端含有PAS结合结构域, C端含有LuxR家族HTH结构域. 在*S. chattanoogensis*中过表达正调控基因*scnRII*, 可以使匹马霉素产量提高3.3~4.6倍, 但对细胞生长及分化没有明显影响, 暗示*scnRII*的确是匹马霉素生物合成的途径特异性调控基因. 北京市农林科学院刘伟成课题组^[75]则在

新分离的匹马霉素产生菌*S. lydicus* A02中鉴定了正调控基因*pimM*与*scnRII*的另一同源基因*slnM2*. 他们利用基因*slnM2*的天然启动子、红霉素抗性基因启动子*PermE**及二者组合启动子分别过表达正调控基因*slnM2*, 可以使匹马霉素的产量分别提高1.9, 2.4及3.0倍. 途径特异性调控是天然产物生物合成调控网络中最基础的一部分, 过表达途径特异性正调控基因是提高目标抗生素产量的有效方法之一(表2).

表 2 多烯大环内酯抗生素产量提高策略及其产量^{a)}
Table 2 Strategies for production improvement and yields of polyene macrolide antibiotics

基因工程改造策略	产生菌株	多烯大环内酯	抗生素产量	参考文献
途径特异性调控基因改造				
<i>amphRIV</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. nodosus</i>	两性霉素B	提高4倍	[65]
<i>pimM</i> 过表达(NP)	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高2.4倍	[71]
<i>pimM</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. nodosus</i>	两性霉素B	提高60%	[74]
<i>pimM</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. avermitilis</i>	菲律宾菌素	提高1倍	[74]
<i>pimM</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. rimosus</i>	龟裂菌素	提高24%	[74]
<i>scnRII</i> 过表达(NP)	<i>S. chattanoogensis</i>	匹马霉素	提高4.6倍	[12]
<i>slnM2</i> 过表达(NP)	<i>S. lydicus</i>	匹马霉素	提高1.9倍	[75]
<i>slnM2</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. lydicus</i>	匹马霉素	提高2.4倍	[75]
<i>slnM2</i> 过表达(NP+ <i>PermE*</i>)	<i>S. lydicus</i>	匹马霉素	提高3.0倍	[75]
多效性调控基因改造				
<i>phoP</i> 或 <i>phoR-phoP</i> 基因缺失	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高80%	[76]
<i>wblA_{ch}</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. chattanoogensis</i>	匹马霉素	提高30%	[77]
<i>whiG_{ch}</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. chattanoogensis</i>	匹马霉素	提高26%	[78]
群体感应信号通路改造				
<i>sngA</i> 过表达(NP)	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高1.7倍	[79]
<i>sngR</i> 基因缺失	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高4.6倍	[80]
添加PI因子(300 nmol/L)	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高33%	[81]
添加甘油(100 mmol/L)	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高2.5倍	[82]
添加甘油(100 mmol/L)	<i>S. noursei</i>	制霉菌素	提高90%	[82]
添加甘油(100 mmol/L)	<i>S. griseus</i>	杀念菌素	提高2.7倍	[82]
产黄青霉发酵提取物	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高3倍	[83]
<i>pimE</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高72%	[84]
前体供给优化及其他方法				
添加丙醇(0.2%)	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高17%	[85]
添加乙酸与丙酸(7:1, 2g/L)	<i>S. natalensis</i>	匹马霉素	提高2.5倍	[86]
<i>ttmRIV</i> 基因缺失	<i>S. ahyscopicus</i>	制霉菌素	提高1.1倍	[87]
<i>ttmSI</i> 基因缺失	<i>S. ahyscopicus</i>	制霉菌素	提高10倍	[88]
<i>schPPT</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. chattanoogensis</i>	匹马霉素	提高40%	[89]
<i>vgb</i> 过表达(<i>PermE*</i>)	<i>S. gilvosporus</i>	匹马霉素	提高1.8倍	[90]

a) NP为天然启动子, *PermE**为红霉素抗性基因启动子

2.2 多效性调控基因改造实现抗生素高产

与途径特异性调控基因不同,多效性调控基因可以同时调控多种天然产物的生物合成并可能影响产生菌的生长及形态分化^[91]。近年来,国内外多个课题组对影响多烯大环内酯抗生素(尤其是匹马霉素)产量的多效性调控基因进行了研究与改造,提高了相应抗生素的产量。例如,匹马霉素产生菌*S. natalensis*通过PhoR-PhoP二元系统感应环境中的无机磷酸盐,并抑制匹马霉素的生物合成。10 mmol/L无机磷酸盐即可完全抑制匹马霉素生物合成基因及途径特异性正调节基因的转录。单独缺失基因

phoP

或双缺失基因

phoR-phoP

均可以使匹马霉素的产量提高80%,并同时降低菌株对磷酸盐抑制的敏感度^[76]。

李永泉课题组^[92]对菌株*S. chattanoogensis*中影响匹马霉素产量的多效性调控基因进行了系统研究与改造。首先,在*S. chattanoogensis*中克隆到了AraC/XylS家族多效性调控基因

adpA_{ch}

。基因

adpA_{ch}

的缺失不仅会导致气生菌丝稀疏及产孢缺陷,还会造成匹马霉素及黄色素产生的完全丧失,因此,基因

adpA_{ch}

是匹马霉素生物合成的正调控基因。反转录PCR(RT-PCR)及DNA凝胶迁移实验(EMSA)分析表明,AdpA_{ch}不仅可以间接调控匹马霉素途径特异性正调控基因

scnRI

的转录,还可以直接正调控多效性调控基因

wblA_{ch}

的转录^[77]。多效性调控基因

wblA_{ch}

的启动子区域具有AdpA_{ch}的特异结合位点。WblA_{ch}继而通过正调控其他

whi

(WhlB-like)基因的表达影响菌株形态分化,并正调控匹马霉素的生物合成。利用红霉素抗性基因启动子

PerME*

过表达多效性调控基因

wblA_{ch}

,可以将匹马霉素的产量提高30%^[77]。其次,李永泉课题组^[78]还在*S. chattanoogensis*中克隆到了III型Sigma因子编码基因

whiG_{ch}

,其同样为多效性调控基因。

WhiG_{ch}

通过直接与匹马霉素生物合成基因

scnC

与

scnD

的启动子区域结合,正调控匹马霉素的生物合成。基因

whiG_{ch}

缺失可以使匹马霉素产量下降约30%,并通过延缓细胞生长使匹马霉素的产生时间延迟24小时。过表达基因

whiG_{ch}

则可以使匹马霉素的产量提高约26%^[78]。

2.3 群体感应信号通路改造实现抗生素高产

群体感应是一种微生物间的通讯机制,细胞分泌的胞外信号分子(也称为自诱导因子)被其他细胞

感知,并通过激活或抑制特定基因的表达作出响应。在放线菌中,细胞的形态分化及次级代谢产物的生物合成均受到群体感应信号的调控。因此,我们可以通过改造产生菌的群体感应信号通路,实现相应多烯大环内酯抗生素的高产。

γ -丁内酯(2,3-双取代- γ -丁内酯,GBL)是链霉菌中常见的自诱导因子,虽然还存在一定争议,GBL也被认为是群体感应因子的一种。GBL受体蛋白能够与特定基因启动子区域结合,并阻碍这一基因的转录;而相应自诱导因子与GBL受体蛋白的结合能够使受体蛋白与目标DNA解离,进而启动目标基因的转录。GBL受体蛋白属于TetR超家族转录调控因子^[93]。在匹马霉素产生菌*S. natalensis*中,基因

sngA

编码蛋白SngA参与GBL生物合成^[79],基因

sngR

则负责编码GBL受体蛋白^[80]。过表达基因

sngA

可以使匹马霉素的产量提高1.7倍^[79],而缺失基因

sngR

可以将匹马霉素的产生时间提前6 h,并使其产量提高4.6倍^[80]。此外,基因

sngA

的过表达可以减弱菌株产孢能力,基因

sngR

的缺失可以增强菌株产孢能力,因此,基因

sngA

与

sngR

均为多效性调控基因。在*S. chattanoogensis*中,基因

scgA

与

scgX

编码蛋白共同参与GBL生物合成,基因

scgR

及其同源基因

sprA

则负责编码GBL受体蛋白^[94]。ScgR与SprA均可以结合基因

scgA

的启动子区域并抑制其转录, SprA还可以直接抑制基因

scgR

的转录。基因

scgA

、

scgX

或

sprA

的缺失均会造成细胞形态分化缺陷并降低匹马霉素产量,因此,基因

scgA

、

scgX

及

sprA

均为匹马霉素生物合成的多效性正调控基因,它们的过表达则有可能进一步提高匹马霉素的产量。

匹马霉素产生菌*S. natalensis*中还存在一类新型的诱导因子(2,3-二氨基-2,3-双(羟甲基)-1,4-丁二醇,又称PI因子),额外添加PI因子可以使匹马霉素的产量提高33%左右^[81]。*S. natalensis*中合成的PI因子由氨基酸外排蛋白PimT排出细胞,胞外PI因子通过与细胞膜上的受体蛋白结合调节匹马霉素的生物合成^[95]。除PI因子外,额外添加甘油、乙二醇、丙二醇或真菌发酵提取物同样能够提高匹马霉素及其他多烯大环内酯抗生素的产量^[82]。额外添加100 mmol/L甘油,可以将制霉菌素、杀念菌素/抗生素FR-008及匹马霉素的产量分别提高90%、2.7倍及2.5倍;额外添加真菌*P. chrysogenum* AS 3.5163的发酵提取物则可以使匹马霉素的产量提高~3倍,并能够降低产生菌的生

物量^[83]. 匹马霉素生物合成基因簇中, 基因负责编码胆固醇氧化酶^[96]. 合成的胆固醇氧化酶被分泌到胞外, 通过感知外界真菌压力, 激活匹马霉素的生物合成. 基因的缺失会导致匹马霉素的消除, 而其过表达则可以将匹马霉素产量提高约72%^[84](表2).

2.4 前体供给优化及其他方法实现抗生素高产

通过优化前体供给实现目标抗生素高产是一种非常有效的基因工程改造策略^[97]. 多烯大环内酯抗生素属于I型聚酮化合物, 主要以丙二酰CoA或甲基丙二酰CoA为前体完成聚酮骨架组装^[34]. 此外, 链霉菌基因组中往往存在数十个生物合成基因簇, 其生物合成所需前体也往往具有一定相似性, 暗示不同生物合成途径间可能存在前体竞争. 因此, 可以通过增加前体供给及敲除竞争途径的方法, 提高多烯大环内酯抗生素的产量. 发酵培养过程中, 直接添加小分子前体化合物, 可以有效提高多烯大环内酯抗生素的产量. 例如, 在匹马霉素发酵过程中, 直接添加0.2%丙醇^[85]或以7:1比例添加2 g/L乙酸与丙酸^[86], 可以使匹马霉素的产量分别提高17%或2.5倍. 除增加前体供给外, 还可以通过抑制或中断竞争途径提高多烯大环内酯抗生素的产量. 菌株*S. ahysgroscopicus*同时产生四霉素及制霉菌素, 敲除四霉素的途径特异性正调控基因 $ttmRIV$ ^[87]或生物合成基因 $ttmSI$ ^[88], 均可以完全消除四霉素的产生, 同时使制霉菌素的产量分别提高1.1倍或10倍(表2).

此外, 还可以通过其他基因工程改造方法提高多烯大环内酯抗生素的产量. 磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(PPTase)负责PKS或NRPS中载体蛋白(ACP或PCP)的活化, PPTase的表达水平能够直接影响PKS或NRPS载体蛋白的活化效率. 匹马霉素产生菌*S. chattanoogensis*中存在两个PPTase基因, 其中, 匹马霉素PKS中ACP的活化由 $schPPT$ 负责. 过表达基因 $schPPT$ 可以加速匹马霉素的产生及菌株产孢, 并使匹马霉素的产量提高40%^[89]. 匹马霉素的生物合成成为好氧过程并受细胞氧供给量的影响, 因此, 还可以通过优化产生菌胞内氧化还原网络来调控匹马霉素

的生物合成. 例如, 在菌株*S. gilvosporeus*中过表达透明颤菌属(*Vitreoscilla*)血红蛋白基因 vgb , 可以使匹马霉素的产量提高1.8倍左右^[90], 暗示异源血红蛋白基因的过表达可以有效缓解匹马霉素生物合成过程中的氧供给不足问题(表2).

3 展望

多烯大环内酯抗生素的结构改造不仅为我们提供了一系列具有优良药理性质的抗真菌候选药物, 同时也完善了我们对多烯大环内酯抗生素构效关系的理解. 但需要注意的是, 大部分药理性质突出的衍生物均来自于化学衍生, 基因工程改造获得的优良衍生物十分有限, 且发酵产量较低. 因此, 如何实现具有突出药理性质的衍生物的高效生物合成, 是目前亟待解决的问题之一. 同时, 多烯大环内酯抗生素的结构多样性主要来源于聚酮链延伸过程中前体选择及 β 碳还原程度的多样性. 目前获得多烯大环内酯衍生物的基因工程策略, 却局限于PKS还原结构域失活或PKS后修饰基因改造. 因此, 在深入解析PKS结构域底物选择性的基础上, 通过PKS结构域改造获得具有新型聚酮骨架结构的多烯大环内酯衍生物, 是一项非常具有前景的工作.

此外, 虽然匹马霉素的生物合成调控机制已经被解析得较为清楚, 但是两性霉素、制霉菌素及杀念菌素/抗生素FR-008的调控机制研究却十分有限. 多烯大环内酯抗生素产量提高的相关工作也同样以匹马霉素作为主要研究对象. 因此, 两性霉素、制霉菌素及杀念菌素/抗生素FR-008的调控机制及产量提高策略均有待进一步深入研究. 并且, 除本文综述的4种基因工程改造策略外, 我们还可以尝试通过解除抗生素生物合成途径中的关键限速步骤、缓解或解除抗生素对产生菌的反馈抑制、有效整合多种基因工程改造策略的方法, 进一步提高多烯大环内酯抗生素的产量. 近年来, 人们对多烯大环内酯抗生素生物合成机制及构效关系的解析已经取得长足进展, 这也必将推动多烯大环内酯抗生素结构改造与产量提高的进一步深入.

参考文献

- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin Infect Dis, 2003, 37: 1172-1177

- 2 Tan D H, Sigler L, Gibas C F, et al. Disseminated fungal infection in a renal transplant recipient involving *Macrophomina phaseolina* and *Scytalidium dimidiatum*: Case report and review of taxonomic changes among medically important members of the *Botryosphaeria*-*ceae*. *Med Mycol*, 2008, 46: 285–292
- 3 Wilson L S, Reyes C M, Stolpman M, et al. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health*, 2002, 5: 26–34
- 4 Zotchev S B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 211–223
- 5 Anderson T M, Clay M C, Cioffi A G, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 400–406
- 6 Lemke A, Kiderlen A F, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68: 151–162
- 7 Caffrey P, Lynch S, Flood E, et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: Deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem Biol*, 2001, 8: 713–723
- 8 Brautaset T, Sekurova O N, Sletta H, et al. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: Analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem Biol*, 2000, 7: 395–403
- 9 Chen S, Huang X, Zhou X, et al. Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chem Biol*, 2003, 10: 1065–1076
- 10 Campelo A B, Gil J A. The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology*, 2002, 148: 51–59
- 11 Aparicio J F, Colina A J, Ceballos E, et al. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J Biol Chem*, 1999, 274: 10133–10139
- 12 Du Y L, Chen S F, Cheng L Y, et al. Identification of a novel *Streptomyces chattanoogensis* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator ScnR11. *J Microbiol*, 2009, 47: 506–513
- 13 Kong D, Lee M J, Lin S, et al. Biosynthesis and pathway engineering of antifungal polyene macrolides in actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40: 529–543
- 14 Caffrey P, De Poire E, Sheehan J, et al. Polyene macrolide biosynthesis in *Streptomyces* and related bacteria: Recent advances from genome sequencing and experimental studies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 3893–3908
- 15 Aparicio J F, Barreales E G, Payero T D, et al. Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: Biosynthesis and its regulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 61–78
- 16 Borgos S E, Sletta H, Fjaervik E, et al. Effect of glucose limitation and specific mutations in the module 5 enoyl reductase domains in the nystatin and amphotericin polyketide synthases on polyene macrolide biosynthesis. *Arch Microbiol*, 2006, 185: 165–171
- 17 Treshchalin I D, Sletta H, Borgos S E, et al. Comparative analysis of *in vitro* antifungal activity and *in vivo* acute toxicity of the nystatin analogue S44HP produced via genetic engineering. *Antibiot Khimioter*, 2005, 50: 18–22
- 18 Carmody M, Murphy B, Byrne B, et al. Biosynthesis of amphotericin derivatives lacking exocyclic carboxyl groups. *J Biol Chem*, 2005, 280: 34420–34426
- 19 Brautaset T, Sletta H, Nedal A, et al. Improved antifungal polyene macrolides via engineering of the nystatin biosynthetic genes in *Streptomyces noursei*. *Chem Biol*, 2008, 15: 1198–1206
- 20 Chen S, Mao X, Shen Y, et al. Tailoring the P450 monooxygenase gene for FR-008/candicidin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 1778–1781
- 21 Qi Z, Kang Q, Jiang C, et al. Engineered biosynthesis of pimaricin derivatives with improved antifungal activity and reduced cytotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 6745–6752
- 22 Miranzo D, Seco E M, Cuesta T, et al. Isolation and characterization of *pcsB*, the gene for a polyene carboxamide synthase that tailors pimaricin into AB-400. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 1809–1819
- 23 Davis S A, Vincent B M, Endo M M, et al. Nontoxic antimicrobials that evade drug resistance. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 481–487
- 24 Byrne B, Carmody M, Gibson E, et al. Biosynthesis of deoxyamphotericins and deoxyamphoteronolides by engineered strains of *Streptomyces nodosus*. *Chem Biol*, 2003, 10: 1215–1224
- 25 Volokhan O, Sletta H, Ellingsen T E, et al. Characterization of the P450 monooxygenase NysL, responsible for C-10 hydroxylation during biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 2514–2519
- 26 Mendes M V, Recio E, Fouces R, et al. Engineered biosynthesis of novel polyenes: A pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*. *Chem Biol*, 2001, 8: 635–644
- 27 Brautaset T, Sletta H, Degnes K F, et al. New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 6636–6643
- 28 Santos A J. Exploration of the substrate promiscuity of biosynthetic tailoring enzymes as a new source of structural diversity for polyene macrolide antifungals. *ChemCatChem*, 2015, 7: 490–500

- 29 Yamamoto T, Umegawa Y, Tsuchikawa H, et al. Role of polyol moiety of amphotericin B in ion channel formation and sterol selectivity in bilayer membrane. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 5782–5788
- 30 Hutchinson E, Murphy B, Dunne T, et al. Redesign of polyene macrolide glycosylation: Engineered biosynthesis of 19-*O*-perosaminyl-amphoteronolide B. *Chem Biol*, 2010, 17: 174–182
- 31 Walmsley S, De Poire E, Rawlings B, et al. Engineered biosynthesis and characterisation of disaccharide-modified 8-deoxyamphoteronolides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 101: 1899–1905
- 32 Paquet V, Carreira E M. Significant improvement of antifungal activity of polyene macrolides by bisalkylation of the mycosamine. *Org Lett*, 2006, 8: 1807–1809
- 33 Wilcock B C, Endo M M, Uno B E, et al. C2'-OH of amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 8488–8491
- 34 Aparicio J F, Caffrey P, Gil J A, et al. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61: 179–188
- 35 Gagos M, Kaminski D, Arczewska M, et al. Spectroscopic evidence for self-organization of *N*-iodoacetyl amphotericin B in crystalline and amorphous phases. *J Phys Chem B*, 2012, 116: 12706–12713
- 36 Liu S P, Yuan P H, Wang Y Y, et al. Generation of the natamycin analogs by gene engineering of natamycin biosynthetic genes in *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Microbiol Res*, 2015, 173: 25–33
- 37 Seco E M, Miranzo D, Nieto C, et al. The *pcsA* gene from *Streptomyces diastaticus* var. 108 encodes a polyene carboxamide synthase with broad substrate specificity for polyene amides biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 1797–1807
- 38 Seco E M, Cuesta T, Fotso S, et al. Two polyene amides produced by genetically modified *Streptomyces diastaticus* var. 108. *Chem Biol*, 2005, 12: 535–543
- 39 Preobrazhenskaya M N, Olsufyeva E N, Solovieva S E, et al. Chemical modification and biological evaluation of new semisynthetic derivatives of 28,29-didehydronystatin A1 (S44HP), a genetically engineered antifungal polyene macrolide antibiotic. *J Med Chem*, 2009, 52: 189–196
- 40 Tevyashova A N, Olsufyeva E N, Solovieva S E, et al. Structure-antifungal activity relationships of polyene antibiotics of the amphotericin B group. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 3815–3822
- 41 Janout V, Schell W A, Thevenin D, et al. Taming amphotericin B. *Bioconj Chem*, 2015, 26: 2021–2024
- 42 Heia S, Borgos S E, Sletta H, et al. Initiation of polyene macrolide biosynthesis: Interplay between polyketide synthase domains and modules as revealed via domain swapping, mutagenesis, and heterologous complementation. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 6982–6990
- 43 Dutta S, Whicher J R, Hansen D A, et al. Structure of a modular polyketide synthase. *Nature*, 2014, 510: 512–517
- 44 Alekseyev V Y, Liu C W, Cane D E, et al. Solution structure and proposed domain domain recognition interface of an acyl carrier protein domain from a modular polyketide synthase. *Protein Sci*, 2007, 16: 2093–2107
- 45 Bailey C B, Pasman M E, Keatinge-Clay A T. Substrate structure-activity relationships guide rational engineering of modular polyketide synthase ketoreductases. *Chem Commun*, 2016, 52: 792–795
- 46 Fiers W D, Dodge G J, Li Y, et al. Tylosin polyketide synthase module 3: Stereospecificity, stereoselectivity and steady-state kinetic analysis of beta-processing domains via diffusible, synthetic substrates. *Chem Sci*, 2015, 6: 5027–5033
- 47 Gray K C, Palacios D S, Dailey I, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2234–2239
- 48 Davis S A, Della Ripa L A, Hu L, et al. C3-OH of amphotericin B plays an important role in ion conductance. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 15102–15104
- 49 Nedal A, Sletta H, Brautaset T, et al. Analysis of the mycosamine biosynthesis and attachment genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 7400–7407
- 50 Nic Lochlainn L, Caffrey P. Phosphomannose isomerase and phosphomannomutase gene disruptions in *Streptomyces nodosus*: Impact on amphotericin biosynthesis and implications for glycosylation engineering. *Metab Eng*, 2009, 11: 40–47
- 51 Lei X, Kong L, Zhang C, et al. *In vivo* investigation of the substrate recognition capability and activity affecting amino acid residues of glycosyltransferase FscMI in the biosynthesis of candicidin. *Mol Biosyst*, 2013, 9: 422–430
- 52 Lee M J, Kong D, Han K, et al. Structural analysis and biosynthetic engineering of a solubility-improved and less-hemolytic nystatin-like polyene in *Pseudonocardia autotrophica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95: 157–168
- 53 Kim H J, Kim M K, Lee M J, et al. Post-PKS tailoring steps of a disaccharide-containing polyene NPP in *Pseudonocardia autotrophica*. *PLoS One*, 2015, 10: e0123270
- 54 De Poire E, Stephens N, Rawlings B, et al. Engineered biosynthesis of disaccharide-modified polyene macrolides. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 6156–6159

- 55 Stephens N, Rawlings B, Caffrey P. Versatility of enzymes catalyzing late steps in polyene 67-121C biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77: 880–883
- 56 Boros-Majewska J, Salewska N, Borowski E, et al. Novel nystatin A1 derivatives exhibiting low host cell toxicity and antifungal activity in an in vitro model of oral candidosis. *Med Microbiol Immunol*, 2014, 203: 341–355
- 57 Paquet V, Volmer A A, Carreira E M. Synthesis and *in vitro* biological properties of novel cationic derivatives of amphotericin B. *Chemistry*, 2008, 14: 2465–2481
- 58 Croatt M P, Carreira E M. Probing the role of the mycosamine C2'-OH on the activity of amphotericin B. *Org Lett*, 2011, 13: 1390–1393
- 59 Ganis P, Avitabile G, Mechlini W, et al. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the *N*-iodoacetyl derivative. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 4560–4564
- 60 Fowler B S, Laemmerhold K M, Miller S J. Catalytic site-selective thiocarbonylations and deoxygenations of vancomycin reveal hydroxyl-dependent conformational effects. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 9755–9761
- 61 Duggan K C, Hermanson D J, Musee J, et al. *R*-Profens are substrate-selective inhibitors of endocannabinoid oxygenation by COX-2. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 803–809
- 62 Wang Y, Tao Z, Zheng H, et al. Iteratively improving natamycin production in *Streptomyces gilvosporeus* by a large operon-reporter based strategy. *Metab Eng*, 2016, 38: 418–426
- 63 Chen G Q, Lu F P, Du L X. Natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus* based on statistical optimization. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 5057–5061
- 64 Liang J, Xu Z, Liu T, et al. Effects of cultivation conditions on the production of natamycin with *Streptomyces gilvosporeus* LK-196. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 42: 145–150
- 65 Sweeney P, Murphy C D, Caffrey P. Exploiting the genome sequence of *Streptomyces nodosus* for enhanced antibiotic production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 100: 1285–1295
- 66 Jeon H G, Seo J, Lee M J, et al. Analysis and functional expression of NPP pathway-specific regulatory genes in *Pseudonocardia autotrophica*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38: 573–579
- 67 Volokhan O, Sletta H, Sekurova O N, et al. An unexpected role for the putative 4'-phosphopantetheinyl transferase-encoding gene *nysF* in the regulation of nystatin biosynthesis in *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 249: 57–64
- 68 Zhang P, Zhao Z, Li H, et al. Production of the antibiotic FR-008/candicidin in *Streptomyces* sp. FR-008 is co-regulated by two regulators, FscRI and FscRIV, from different transcription factor families. *Microbiology*, 2015, 161: 539–552
- 69 Wang T, Bai L, Zhu D, et al. Enhancing macrolide production in *Streptomyces* by coexpressing three heterologous genes. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 50: 5–9
- 70 Anton N, Mendes M V, Martin J F, et al. Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol*, 2004, 186: 2567–2575
- 71 Anton N, Santos-Aberturas J, Mendes M V, et al. PimM, a PAS domain positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Microbiology*, 2007, 153: 3174–3183
- 72 Santos-Aberturas J, Vicente C M, Payero T D, et al. Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: PimR modulates pimarin production via the PAS-LuxR transcriptional activator PimM. *PLoS One*, 2012, 7: e38536
- 73 Santos-Aberturas J, Vicente C M, Guerra S M, et al. Molecular control of polyene macrolide biosynthesis: Direct binding of the regulator PimM to eight promoters of pimarin genes and identification of binding boxes. *J Biol Chem*, 2011, 286: 9150–9161
- 74 Santos-Aberturas J, Payero T D, Vicente C M, et al. Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis. *Metab Eng*, 2011, 13: 756–767
- 75 Wu H, Liu W, Dong D, et al. *SlnM* gene overexpression with different promoters on natamycin production in *Streptomyces lydicus* A02. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41: 163–172
- 76 Mendes M V, Tunca S, Anton N, et al. The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of *phoR* reduces the negative phosphate regulation of pimarin biosynthesis. *Metab Eng*, 2007, 9: 217–227
- 77 Yu P, Liu S P, Bu Q T, et al. WblACh, a pivotal activator of natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis* L10, is positively regulated by AdpACh. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80: 6879–6887
- 78 Liu S P, Yu P, Yuan P H, et al. Sigma factor WhiGch positively regulates natamycin production in *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 2715–2726
- 79 Lee K M, Lee C K, Choi S U, et al. Functional analysis of a BarX homologue (SngA) as a pleiotropic regulator in *Streptomyces natalensis*. *Arch Microbiol*, 2008, 189: 569–577
- 80 Lee K M, Lee C K, Choi S U, et al. Cloning and *in vivo* functional analysis by disruption of a gene encoding the γ -butyrolactone auto-regulator receptor from *Streptomyces natalensis*. *Arch Microbiol*, 2005, 184: 249–257

- 81 Recio E, Colinas A, Rumbero A, et al. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarinic acid production in *Streptomyces natalensis*. *J Biol Chem*, 2004, 279: 41586–41593
- 82 Recio E, Aparicio J F, Rumbero A, et al. Glycerol, ethylene glycol and propanediol elicit pimarinic acid biosynthesis in the PI-factor-defective strain *Streptomyces natalensis* npi287 and increase polyene production in several wild-type actinomycetes. *Microbiology*, 2006, 152: 3147–3156
- 83 Wang D, Yuan J, Gu S, et al. Influence of fungal elicitors on biosynthesis of natamycin by *Streptomyces natalensis* HW-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 5527–5534
- 84 Wang M, Wang S, Zong G, et al. Improvement of natamycin production by cholesterol oxidase overexpression in *Streptomyces gilvosporeus*. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26: 241–247
- 85 Li M, Chen S, Li J, et al. Propanol addition improves natamycin biosynthesis of *Streptomyces natalensis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172: 3424–3432
- 86 Elsayed E A. Improvement in natamycin production by *Streptomyces natalensis* with the addition of short-chain carboxylic acids. *Process biochemistry*, 2013, 48: 1831–1838
- 87 Cui H, Ni X, Shao W, et al. Functional manipulations of the tetramycin positive regulatory gene *ttrRIV* to enhance the production of tetramycin A and nystatin A1 in *Streptomyces ahyscopicus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42: 1273–1282
- 88 Ren J, Cui Y, Zhang F, et al. Enhancement of nystatin production by redirecting precursor fluxes after disruption of the tetramycin gene from *Streptomyces ahyscopicus*. *Microbiol Res*, 2014, 169: 602–608
- 89 Jiang H, Wang Y Y, Ran X X, et al. Improvement of natamycin production by engineering of phosphopantetheinyl transferases in *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 3346–3354
- 90 Wang S, Liu F, Hou Z, et al. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*). *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30: 1369–1376
- 91 Hesketh A, Chen W J, Ryding J, et al. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biol*, 2007, 8: R161
- 92 Du Y L, Li S Z, Zhou Z, et al. The pleiotropic regulator AdpA is required for natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis*. *Microbiology*, 2011, 157: 1300–1311
- 93 Gottelt M, Hesketh A, Bunet R, et al. Characterisation of a natural variant of the γ -butyrolactone signalling receptor. *BMC Res Notes*, 2012, 5: 379
- 94 Du Y L, Shen X L, Yu P, et al. Gamma-butyrolactone regulatory system of *Streptomyces chattanoogensis* links nutrient utilization, metabolism, and development. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 8415–8426
- 95 Vicente C M, Santos-Aberturas J, Guerra S M, et al. PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimarinic-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis*. *Microb Cell Fact*, 2009, 8: 33
- 96 Mendes M V, Recio E, Anton N, et al. Cholesterol oxidases act as signaling proteins for the biosynthesis of the polyene macrolide pimarinic acid. *Chem Biol*, 2007, 14: 279–290
- 97 Lu C, Zhang X, Jiang M, et al. Enhanced salinomycin production by adjusting the supply of polyketide extender units in *Streptomyces albus*. *Metab Eng*, 2016, 35: 129–137

Summary for “多烯大环内酯抗生素的结构改造与高产”

Structural modifications and yield improvements of polyene macrolide antibiotics

QI Zhen & BAI LinQuan^{*}

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

^{*} Corresponding author, E-mail: bailq@sjtu.edu.cn

Polyene macrolide antibiotics, which selectively bind ergosterols in fungal membranes, are important antifungal agents for the treatment of both superficial and invasive fungal infections. But severe side effects, such as nephrotoxicity, are caused by their binding to cholesterol in mammalian membranes and undermine their therapeutic values. Nevertheless, because of their excellent fungicidal efficacy, broad spectrum of activities and minimal resistance development, polyene macrolide antibiotics continue to command interest. Therefore, the pharmacological and yield improvement of polyene macrolide antibiotics becomes urgent. In past few decades, much attention was paid on the genetic and chemical modifications of polyene macrolides, and a variety of genetic engineering strategies were applied to improve the yield of polyene macrolides.

Based on the literature, we summarized the structural modifications of polyene macrolides in polyene region, polyol region, exocyclic carboxyl group and sugar moiety. The heptaene nystatin analog S44HP shows considerably higher antifungal activity than that of nystatin and equal to that of amphotericin B. While the exocyclic carboxyl modifications of polyene macrolides usually led to comparable or slightly improved antifungal activity and significantly reduced hemolytic toxicity, most of alterations in polyol region resulted in decreased antifungal activity and hemolytic toxicity. Furthermore, the polyene macrolides harboring a di-sugar moiety exhibited reduced hemolytic toxicity and improved water solubility, and the modifications in C3' amino group or C2' hydroxyl group considerably improved the pharmacological properties. Moreover, the action mechanisms and structure-activity relationship of polyene macrolide antibiotics were elucidated, according to the data of structural modifications. It indicated that the modifications in exocyclic carboxyl group, C3' amino group or C2' hydroxyl group disrupt the intramolecular polar interactions and thus favor a shift to an alternate conformer that selectively binds ergosterol rather than cholesterol.

In addition, the strategies for yield improvement of polyene macrolide antibiotics were summarized, including the engineering of pathway-specific and pleiotropic regulatory genes, engineering of quorum-sensing communication, and optimization of precursor supply. Although transcriptional regulation has been investigated for amphotericin, nystatin and candididin/FR-008 biosynthesis, most detailed genetic engineering strategies for yield improvement were only carried out on pimaricin. The yield of pimaricin was improved via the overexpression of pathway-specific or pleiotropic positive regulatory genes and GBL biosynthetic genes, the disruption of pathway-specific or pleiotropic negative regulatory genes and GBL receptor encoding genes, and the addition of inducing compounds or small molecular precursors.

Finally, we pointed out the challenges and problems in the structural modifications and yield improvement of polyene macrolide antibiotics, such as the possibility to obtain more modified polene analogs with exocyclic carboxyl or C3' amino group via genetic engineering, combinational strategies for further yield improvement of polyene macrolides, and so on.

polyene macrolide antibiotics, structural modifications, yield improvement, genetic engineering

doi: 10.1360/N972017-00240