

多杀菌素生物合成途径及改造策略

李月¹, 常城^{1*}, 杨克迁^{2*}

¹兰州大学生命科学学院, 兰州 730000

²中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要:多杀菌素是一类由刺糖多孢菌产生的新型大环内酯类化合物, 是绿色农用抗生素的杰出代表。本文简要总结了多杀菌素生物合成过程, 并对其生物合成调控的关键位点进行了分析, 提出用合成生物学手段组装多杀菌素细胞工厂的策略。

关键词:多杀菌素, 刺糖多孢菌, 合成途径, 代谢调控, 合成生物学

中图分类号: Q9.5 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)11-1431-09

多杀菌素 (spinosad) 是土壤放线菌刺糖多孢菌 (*Saccharopolyspora spinosa*) 产生的一类新型大环内酯类农用抗生素, 应用极为广泛。其产生菌是由礼来公司一位研究人员于 1982 年在维尔群岛一个甘蔗制甜酒厂附近的土壤样品中首次分离出来的。天然多杀菌素类化合物由 1 个四核大环内酯 (21 个碳组成), 1 个中性糖 (鼠李糖) 和 1 个胺糖 (福乐糖) 构成。这些化合物均可由 *Sac. spinosa* 发酵产生, 其主要差异为聚酮 C₆ 位和福乐糖胺 C2', C3', C4' 位取代基不同。多杀菌素产品的主要活性成分是多杀菌素 A 和多杀菌素 D, 其中多杀菌素 A 占总活性物质的 85% 左右。

多杀菌素具有新颖独特的作用机理, 能有效控制鳞翅目、双翅目和缨翅目等害虫, 同时对鞘翅目、直翅目、膜翅目等某些特定种类的害虫也有一定的毒杀作用。多杀菌素主要靶标是烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChRs) 和 γ -氨基丁酸受体 (GABARs), 但其烟碱受体作用机理不同于现有烟碱类杀虫剂诸如吡虫

啉等, 与 γ -氨基丁酸受体的作用机理亦不同于现有的阿维菌素类、氟虫腈类杀虫剂。它主要通过激活相关害虫中央神经系统的神经细胞而引起非功能性的肌肉收缩和震颤, 使中央神经系统广泛超活化以致死亡^[1]。多杀菌素独特的杀虫机理表现出生物农药的安全性和化学农药的快速性。此外, 多杀菌素易降解, 对环境、农作物和哺乳动物无害。1999 年, 多杀菌素获美国“总统绿色化学品挑战奖”。

在日益重视环保和食品安全的今天, 多杀菌素作为新一代农用抗生素的杰出代表, 在农业杀虫防虫中起着越来越重要的作用。以多杀菌素为主要成分的各类新型产品层出不穷, 如 Tracer, Naturalyte^[1], Entrust, Elector^[2-3] 及应用于杀死人类头虱的 Natrova^[4], 还有产量相对较高的丁烯基多杀菌素^[5]。目前, 我国在对多杀菌素的基础和应用研究刚刚起步, 国外的前期研究不仅阐明了多杀菌素部分生物合成基因的功能, 并且其应用研究的成果均已申请了专利保护。我国尚没有掌握多杀菌素的

基金项目: 国家自然科学基金资助 (NSFC30770240)

* 通信作者。杨克迁, Tel/Fax: +86-40-64807459, E-mail: yangkq@im.ac.cn; 常城, Tel: +86-931-8913671, E-mail: ccheng@lzu.edu.cn

作者简介: 李月 (1985-), 女 (蒙古族), 河北承德人, 硕士研究生, 从事抗生素生物合成及相关调控等方面的研究。E-mail: liyue200906@163.com

收稿日期: 2011-04-15; 修回日期: 2011-05-19

生产技术,必须依赖进口来满足其市场需求。因此,我国应加强多杀菌素的基础与应用研究。本文将阐述多杀菌素生物合成途径和可能的调控过程,并针对工程菌改造过程中遇到的一些问题提出合成生物学手段组装多杀菌素细胞工厂的策略。

1 多杀菌素生物合成途径

1.1 聚酮链合成过程

刺糖多孢菌的聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 由 SpnA-SpnE 组成, SpnA 上包含 1 个装载模块 (loading module) 和 1 个延伸模块 (elongation module), SpnB-SpnE 上包含 9 个延伸模块。多杀

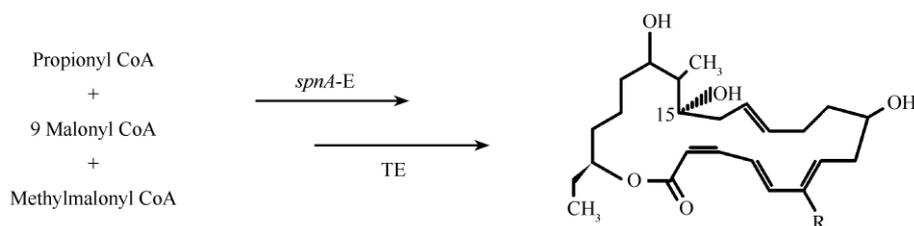


图 1 多杀菌素聚酮链合成过程

Fig. 1 The biosynthesis of spinosyn polyketide chain.

1.2 聚酮分子内交联过程

多杀菌素中的聚酮链环化后发生交联反应,这在 I 型聚酮中是比较少见的。交联反应可能由 *spnF*、*spnM* 和 *spnL* 等基因催化,但它们的具体功能还不明确。当删除这 3 个基因时,菌株内不产生或产生很低量多杀菌素,在培养基中加入多杀菌素配糖体 (Aglycone, AGL) 后,突变株可以将配糖体转化为多杀菌素 A,所以推测这些基因有可能在交联过程中起着重要的作用。

Kim 等研究发现聚酮的交联是从 C-15 位羟基的氧化起始的 (如图 2), C-15 位羟基氧化为酮基, C-14 位去质子化形成了 C3/C14 交联桥,随后发生“Diels-Alder”式交联反应, C3/C14 的连接被认为是交联反应的第一步^[8]。Kim 等还证实 SpnL 是一种单功能黄素依赖型氧化酶,它将 C-15 位的羟基氧化成酮基,引起一系列的质子位移,在环内形成 3 个 C=C 键并在 C3-C14、C4-C12 及 C7-C11 之间形成交联桥,从而形成 1 个四核大环内酯核^[8]。这也是多杀菌素的聚酮部分区别于红霉素、雷帕霉素、泰乐菌素等大多数 I 型聚酮的地方。

菌素由典型的 I 型聚酮合成途径合成,它在 PKS 的作用下,在起始单位丙酸上按 A-A-P-A-A-A-A-A-A (A-乙酰, P-丙酰) 的顺序添加 10 个延伸单位缩合成碳链骨架。SpnA 装载模块上的酮合成酶 (β -ketoacyl synthase, KS) 氨基端第 172 位的 cys 由一个 glu 代替,所以不具备 β -酮合成酶功能,据报道被 glu 替代了的 KS 可使丙二酰-ACP 脱羧,是聚酮链合成的起始因子^[6],在红霉素和雷帕霉素等聚酮合成途径中并未发现 172 位含有 glu 的起始模块^[7]。SpnE 上含有硫酯酶 (thioesterase, TE) 功能域,它可使聚酮链从 ACP 上解离下来并环化 (图 1)。目前对多杀菌素聚酮合成的研究已经取得很多进展。

1.3 鼠李糖合成及修饰过程

鼠李糖是由多杀菌素生物合成基因簇外的 *gtt*, *gdh*, *epi*, *kre* (分别编码的 TDP-葡萄糖合酶、4- β -葡萄糖脱水酶、3',5'-差相异构酶和 4-酮还原酶) 等 4 个基因以葡萄糖-1-磷酸为最初底物依次催化合成的,然后经多杀菌素生物合成基因簇内的 *spnG* 编码的鼠李糖转移酶将 TDP-鼠李糖转移到多杀菌素配糖体的 C-9 位上形成鼠李糖 AGL (图 3-A)。

鼠李糖不仅参与多杀菌素的合成,还是合成细胞壁脂多糖的组分 (如图 3-A),这两个途径共用一套合成基因。经 *gtt* 和 *gdh* 编码的 TDP-葡萄糖合酶和 4- β -葡萄糖脱水酶催化生成 TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖,是次级代谢脱氧六碳糖的共同前体,也是多杀菌素合成过程中鼠李糖和福乐糖胺的共同前体。Pan 等用两个红霉素启动子 (*ermEp*) 分别控制 *gtt* 和 *gdh* 串联过表达,使多杀菌素产量大幅度提高, qPCR (Real-time Quantitative PCR) 结果显示 *gtt* 和 *gdh* 转录水平分别是野生型的 4.8 和 5.7 倍^[9]。序列比对发现这两个基因在多种细菌中都高度保守,它们既不在抗生素合成簇内也不相邻,操纵单个基

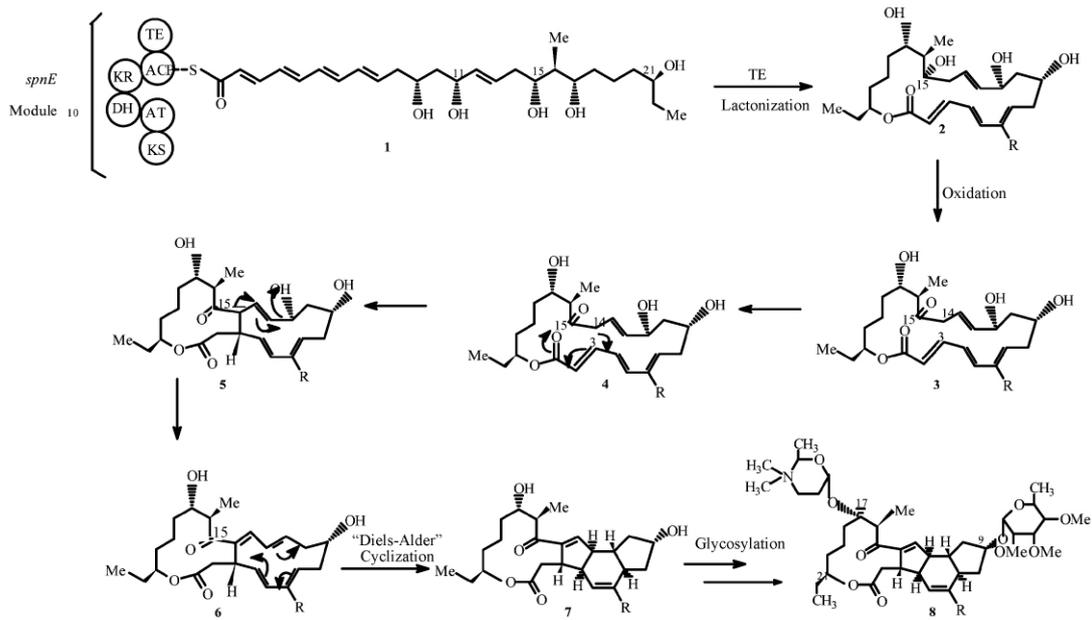


图 2 聚酮交联机制

Fig.2 The cross-linking mechanism of spinosyn polyketide.

因不能使多杀菌素产量提高,敲除 *gdh* 时菌体几乎是致死的^[10],这说明部分脱氧六碳糖是细胞生命必需的(如鼠李糖是合成细胞壁的组分)。Chen 等还在体外实验证实 Gdh 是 NAD^+ 依赖的酶,在 2 mM NAD^+ 存在的情况下 Gdh 活性提高了 3.5 倍^[11]。

spnG 编码鼠李糖转移酶,它可以将 TDP-鼠李糖转移到多杀菌素配糖体 AGL 上,Chen 等研究发现 SpnG 对底物有一定的宽容性^[11],它能够接受不同的 NDP-糖,如它可转移 TDP-Glc 代替 TDP-鼠李糖,但在催化效率上却降低了 36 倍。研究还发现,SpnG 上的 Asp13, His13 和 Asp316 与基因的活性密切相关,它们的定点突变会造成 SpnG 失活。

在鼠李糖转移到配糖体上形成鼠李糖 AGL 后,再经 *spnI*, *spnK*, *spnH* 编码的 S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM) 依赖的氧甲基转移酶分别在鼠李糖的 2', 3', 4' 位转移上甲基形成 9-拟配糖体(9-Pseudoaglycone, PSA) (如图 3-B)。Kim 等对鼠李糖甲基化途径进行了深入研究,证实了 SpnI, SpnK, SpnH 是 SAM 依赖的氧甲基转移酶,分别作用于 O-2', O-3', O-4' 位^[12]。从 *spnI*, *spnK*, *spnH* 所在位置和分别具有不同的启动子区来看,这三个基因的表达调控着鼠李糖的甲基化水平。Kim 等还通过体内体外实验证实(如图 3-B), 1-2-3-4 是鼠李糖甲基化的主要途径(先合成鼠李糖-AGL 再进行鼠李

糖甲基化), 1-2-7-4 在某种程度上来讲也是可行的。Huang 等证实 SpnH 是催化鼠李糖甲基化的最后一步,表达纯化 SpnH 可以催化多杀菌素 K 转化为多杀菌素 A^[13],他们还证实通过降低 SpnH 的浓度或者增加多杀菌素 K 的浓度可以提高 PSA 的产量。

1.4 福乐糖胺合成及修饰过程

福乐糖胺的合成及转移过程主要由簇内 6 个紧邻的基因 *spnO*, *spnN*, *spnQ*, *spnR*, *spnS*, *spnP* 所编码的酶催化完成,这 6 个基因的表达都是具有时序性的。如图 4,福乐糖胺和鼠李糖合成的共同前体 1 (TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖)经 *spnO* 编码的 2,3-脱水酶催化脱水生成 2,2 在 3-酮还原酶(*spnN* 编码)和 3-脱水酶(*spnQ* 编码)的作用下生成 4,4 经转氨酶(*spnR* 编码)和 SAM 依赖的 N,N-甲基转移酶(*spnS* 编码)催化生成 TDP-二甲基福乐糖胺。福乐糖胺转移酶(*spnP* 编码)可将 TDP-二甲基福乐糖胺转移到 9-拟配糖体 PSA 上形成多杀菌素 A。

据报道, *spnO* 编码的 2,3-脱水酶和 *spnS* 编码的 N,N-二甲基转移酶都形成二聚体,而 *spnN* 编码的 3-酮还原酶则是一个单体。对于这 3 种酶的功能已经基本清楚。Hong 等发现 *spnN* 内部 N 端包含有随机的 AGG(Arg) 密码子,它可以极大的降低蛋白的表达水平并提升移码突变的几率。定点突变 AGG 密码子后发现 SpnN 蛋白表达量大幅度提高^[14]。

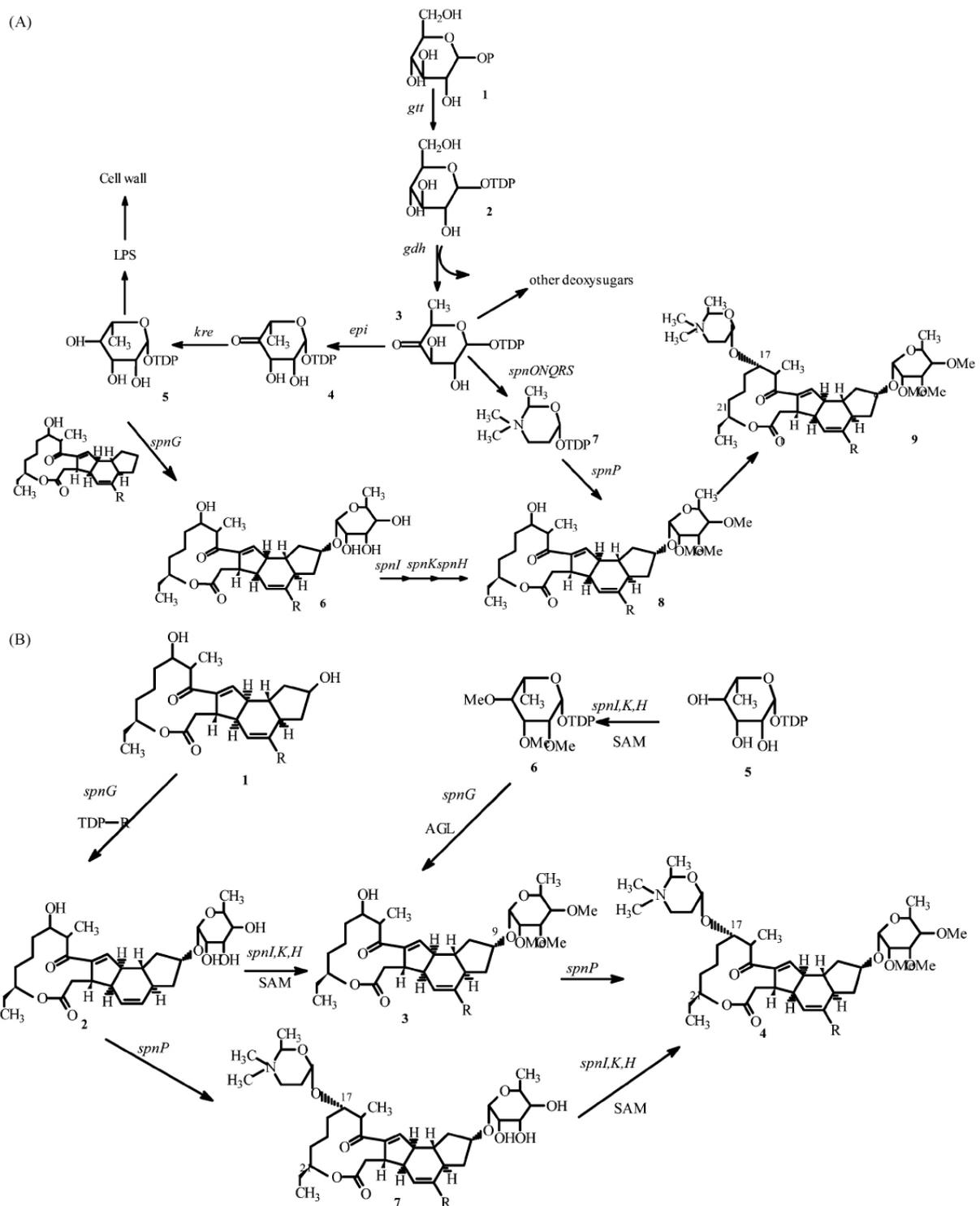


图3 鼠李糖合成途径(A)和甲基化途径(B)

Fig. 3 Biosynthetic pathway (A) and methylation pathway (B) of rhamnose.

Hong 等还证实 SpnN 是一个 NADPH 依赖的酮还原酶;而 SpnS 的活性需要 Mg^{2+} , 当 $MgCl_2$ 的浓度为 2 mmol/L 时催化活性最高。

SpnQ 是 B6 依赖的 3,4-脱水酶,关于 SpnQ, Hong 等经酶学实验发现它有一个有趣的特点。在缺失电子源和存在 L-谷氨酸盐的情况下, SpnQ 竟然

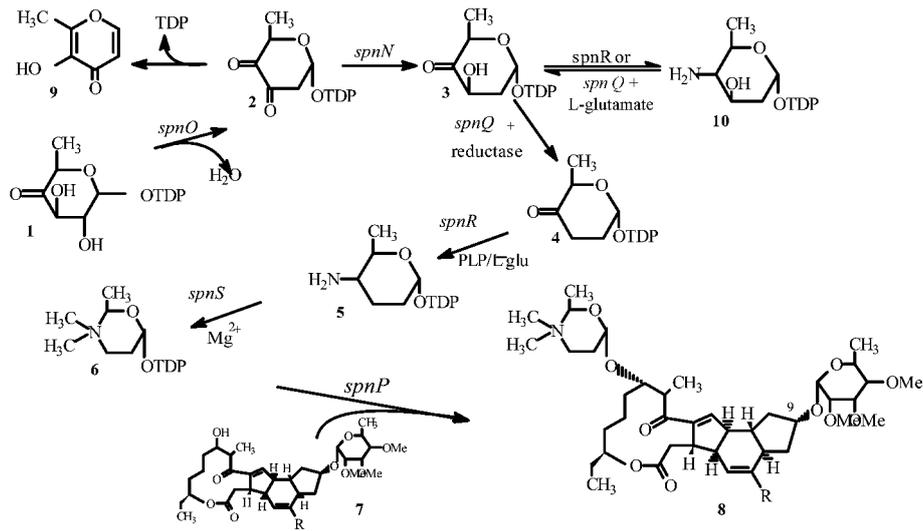


图4 福乐糖胺合成途径

Fig. 4 Forosamine biosynthetic pathway.

可以起到转氨基的作用,可转化3(TDP-4-氨基-2,4,6-三脱氧-D-葡萄糖)到10^[14]。而催化底物4的SpnR已被确认是磷酸吡哆醛依赖的氨基转移酶,主要转移L-Glu,它利用L-Glu的效率是L-Asp的20倍之多^[15]。Zhao等进一步确认了TDP-二甲基福乐糖胺的合成过程是先将C-3位羟基还原为酮基,再经3,4-脱水酶作用后在氨基转移酶作用下进行氨基转移^[16]。

多杀菌素生物合成基因簇内大部分基因的表达都具有一定的时序性,在发酵早期菌株内积累了大量的PSA,此时PSA是缺少福乐糖胺的,这说明福乐糖胺的合成及转移是一个限速步骤。Madduri K等将结构基因*spnO*、*spnN*、*spnQ*、*spnR*、*spnS*、*spnP*连接到质粒上导入到*E. coli* S17-1,将这些基因通过接合转移导入刺糖多孢菌,同源重组后这些基因增加了一个拷贝,这时几乎所有的PSA都转化为多杀菌素A、D^[17]。这说明多杀菌素的产生时间提前了,但最终的产量相比野生型并没有提高。此外用NTG诱变得到高产PSA的菌株,它们比母菌株积累了两倍之余的PSA量,然而整合到配糖体上的总脱氧糖量却没有任何改变。究其原因可能是与共同前体1的不协调密切相关。

2 多杀菌素合成基因表达调控分析

对多杀菌素生物合成调控的认识,是指导理性

改造的前提,但目前尚是空白,国内外没有相关调控因子的报道。Waldron等^[18]对多杀菌素生物合成基因簇的几个侧翼基因进行了序列比对和研究。ORF-L15的表达产物被推断与天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中的短链氧化还原酶相似性较高,敲除ORF-L15对多杀菌素的合成没有影响。ORF-L16基因与天蓝色链霉菌中可能的LysR家族转录调控子或其家族的其它成员相似性较高。敲除ORF-L16后对多杀菌素产生也没有任何影响。ORF-R1编码一个199氨基酸的小蛋白,它和天蓝色链霉菌中一个未知功能基因相似。ORF-R2基因产物与肺炎衣原体、沙眼衣原体、结核分枝杆菌中的可能的*recD*基因产物脱氧核糖核酸外切酶V相似。敲除ORF-R2对多杀菌素合成也没有影响,从而说明这几个侧翼基因与多杀合成无关。

我们通过对发酵过程中不同时间点多杀菌素基因簇中各结构基因表达的qPCR分析,初步表明这些基因表达在生长的平台后期启动,而在对数期是沉默的,所以我们认为应该有相关反式作用元件对多杀菌素生物合成的关键启动子行使着时序调控。

经过序列分析我们发现刺糖多孢菌的*bldD*与同属中的红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*) NRRL2338的*bldD*有着94%的同源性。Chng等已证实*bldD*是*Sac. erythraea*中红霉素合成的正调控子,调控红霉素的合成和形态分化^[19],*BldD*与红霉素基因簇中5个含有启动子的区域

(*eryCI-ermE*, *eryBI-BIII*, *eryAI-BIV*, *eryBVI*, and *eryK*) 都结合(这5个启动子区分别控制着C3转氨酶、葡萄糖苷酶和甲基转移酶、4-酮还原酶、2,3-脱水酶、C-12羟化酶以及聚酮的合成),其中与*eryAI-BIV*和*eryBVI*探针结合能力最强。经过分析发现,*Sac. Erythraea*中*BldD*结合序列与天蓝色链霉菌^[20]中一致,为AGTGC(n)mTCGAC。我们根据*BldD*结合DNA的一致序列,用MeMe-Chip软件(http://meme.sdsc.edu/meme4_6_0/cgi-bin/meme-chip.cgi)分析多杀菌素生物合成基因簇,发现簇内存在的AGCGGGTTCGAG序列可能是*BldD*的结合位点,所以我们认为多杀菌素生物合成可能受*BldD*调控。

另外,在多杀菌素合成过程中鼠李糖和福乐糖胺的前体TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖的供应是非常关键的一点,它同时也是其他脱氧六碳糖的生物合成的共同前体。所以我们认为从TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖到鼠李糖或福乐糖胺的代谢流应该受到严

格调控,另外鼠李糖在对数期应该是大量存在,因为细胞增长合成细胞壁需要脂多糖,这一时期为什么没有参与合成多杀菌素也是值得探究的,可能鼠李糖基转移酶*SpnG*控制着这一开关。我们的分析还表明刺糖多孢菌中的*gdh*、*kre*基因分布位置与红色糖多孢菌类似^[10],鼠李糖合成基因*epi*、*glt*和*gdh-kre(kde)*分布在基因组内3个不同的地方。如图5所示,刺糖多孢菌*gdh*右侧两个基因序列与*LytR*家族转录调控子相似性较高,而在红色糖多孢菌的相应位置的*sace6481*和*sace6482*,也是*LytR*家族转录调控子,且相应相似性分别为76%和78%。推测这两个基因可能对*gdh*的转录起调控作用。此外,这两个基因(我们暂且将其命名为*lytR1*、*lytR2*)还与细胞膜相关转录衰减子有一定相似性,可能它会起到转录衰减的作用,阻碍某些基因的转录。我们构建了几种有效的biosensor,希望可以直接捕获到调控蛋白。目前关于这些方面的认识我们正在进一步研究中。

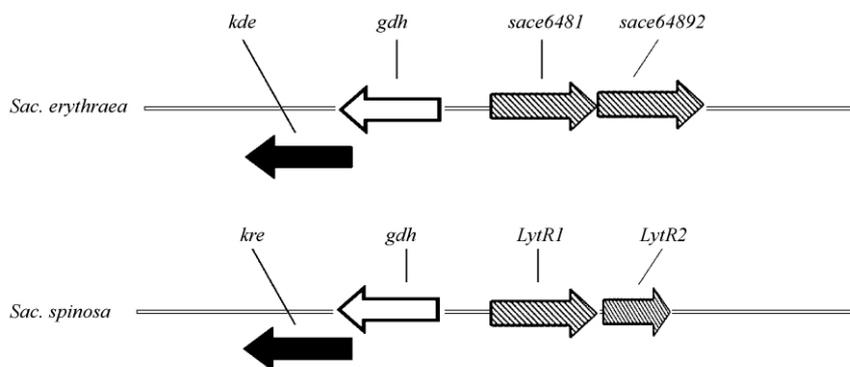


图5 红色糖多孢菌 *kde*、*gdh* 与刺糖多孢菌 *kre*、*gdh* 侧翼基因比较

Fig. 5 A graphical illustration of flanking genes comparison between *kde*、*gdh* in *Sac. erythraea* and *kre*、*gdh* in *Sac. spinosa*.

3 展望

多杀菌素是一种非常重要的抗生素类杀虫剂,它毒杀害虫迅速,杀虫范围广,对保证农业生产安全具有重大的意义。然而野生刺糖多孢菌产生的多杀菌素发酵产量低,我国还没有掌握高产技术,同时刺糖多孢菌遗传操作困难,不易改造。目前,该产品主要靠进口Dow AgroSciences的商品来满足农业防害的需求。所以,我国迫切需要建立自主的多杀菌素生产技术,不断探索能够提高多杀菌素产量的方法和途径。

目前,多杀菌素生物合成调控基因的研究尚属空白,而通过操纵相关调控基因来提高一些次生代谢物的产量是代谢工程改造的重要途径之一^[21]。所以通过发现多杀菌素调控基因和充分认识多杀菌素代谢途径都是代谢工程改造的前提。我们通过生物信息学手段和部分实验数据预测出了可能的调控基因*bldD*和*gdh*右侧调控基因*lytR1*、*lytR2*,希望通过操纵调控基因的方法有效提高多杀菌素的产量。

刺糖多孢菌存在着生长缓慢产孢时间较晚、可利用的培养基成分不具有多样性且利用效率低,接合转移困难导致遗传操作较为困难、合成簇内无调

控基因不能直接调节控制、产多杀菌素量较低等诸多难以解决的问题。为了建立自主的多杀菌素生产技术,我们试图运用合成生物学的思想,在异源宿主中人工设计组装多杀菌素生物合成基因簇,向人工从头合理组装次级代谢簇基因、构建全新细胞工厂迈出崭新的一步。

21世纪刚刚兴起的合成生物学旨在通过工程学的手段改造具有遗传功能的元件^[22](包括启动子,调节基因,核糖体结合位点,结构基因和其它调控区等),并将它们整合到细胞回路中,从而创造出具有新功能的生物系统,使其发挥更重要的作用^[23-24]。我们的构想如下(如图6所示)。

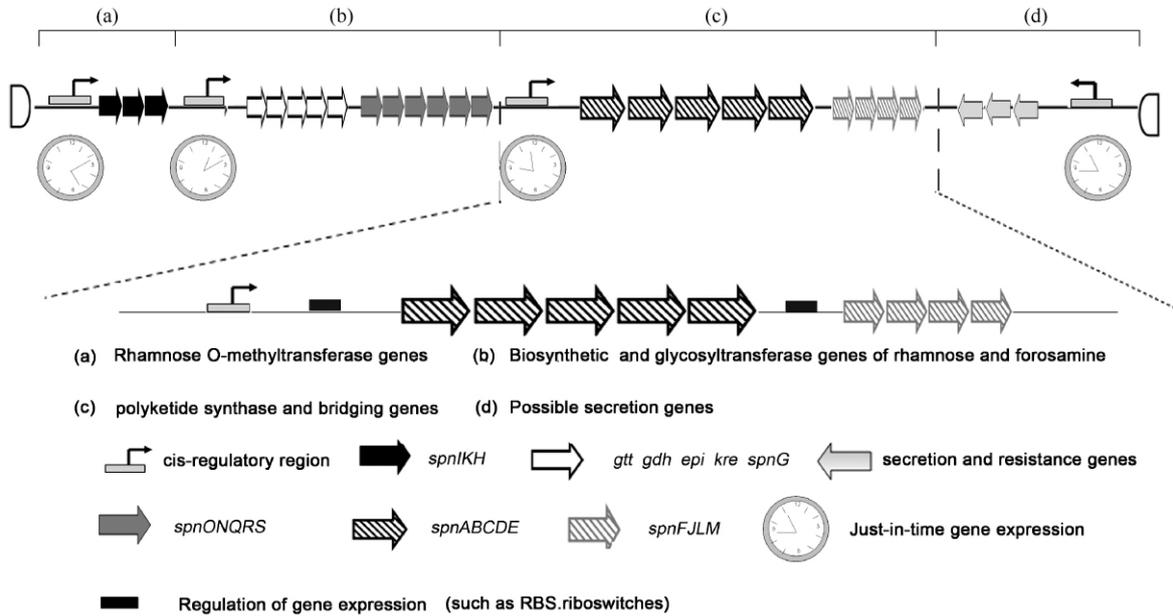


图6 基于合成生物学方法在多杀菌素合成中的构想

Fig. 6 A new biosynthetic conceptualization of spinosyn base on Synthetic biology.

我们建立多杀菌素细胞工厂的首选宿主是研究背景较为清楚、生长迅速能够快速表达、利用培养基范围广利用效率高的大肠杆菌或者天蓝色链霉菌,我们将多杀菌素合成途径中的相关基因,按功能分类,如分类为聚酮合成基因、聚酮交联基因、鼠李糖合成及转移基因、福乐糖胺合成及转移基因、鼠李糖氧甲基转移酶基因、分泌蛋白基因^[25]。将各类基因与高效的受调控的顺式作用元件分别连接在一起,让它们按照合成顺序时序性转录。同时在翻译过程中添加翻译水平调控元件,如RBS、riboswitches等进行相应的微调。再合理构建外排、分泌等相关的基因等最终构建成一个全新的细胞工厂。

我们所设计的各个合成模块都有相应的转录和翻译元件控制,可以逐一监测和调节其表达水平,在各个环节来控制 and 检测多杀菌素合成过程的中间产物产生情况,以保证各个步骤的有效性。这样就可以使该细胞工厂能够按照人们的意愿大量产生多杀菌素,克服了刺糖多孢菌自身背景不够清楚、遗传操

作困难、生长缓慢等一些缺点,同时理性、可控的组建了合成途径中各个小合成模块,建立了有自主知识产权的多杀菌素生产技术。我们应用合成生物学方法所构建的细胞工厂策略是高效、系统、理性、较为智能的,它对创建多杀菌素高产技术和进一步推动农业发展具有重要意义。

致谢 非常感谢中国科学院微生物研究所的朱宝利老师及其实验室的潘元龙同学提供刺糖多孢菌部分未发表序列信息,非常感谢本实验室王为善同学在修改方面给出的良好建议和帮助。

参考文献

[1] Sparks TC, Crouse GD, Durst G. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Management Science*, 2001, 57: 896 - 905.

- [2] White WH, Hutchens DE, Jones C, Firkins LD, Paul AJ, Smith LL, Snyder DE. Therapeutic and persistent efficacy of spinosad applied as a pouron or a topical spray against natural infestations of chewing and sucking lice on cattle. *Veterinary Parasitology*, 2007, 143: 329-336.
- [3] White WH, McCoy CM, Meyer JA, Winkle JR, Plummer PR, Kemper CJ, Starkey R, Snyder DE. Knockdown and mortality comparisons among spinosad-, imidacloprid-, and methomyl-containing baits against susceptible *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, 2007, 100:155-163.
- [4] Mougabure Cueto G, Zerba EN, Picollo MI. Permethrin-resistant head lice (Anoplura: Pediculidae) in Argentina are susceptible to spinosad. *Journal of medical entomology*, 2006, 43:634-635
- [5] Hahn DR, Gustafson G, Waldron C, Bullard B, Jackson JD, Mitchell J. Butenyl-spinosyns, a natural example of genetic engineering of antibiotic biosynthetic genes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33:94-104.
- [6] Bisang C, Lonq P, Cortes J, Westcott J, Crosby J, MatharuA-L, Cox RJ, Simpson TJ, Staunton J, Leadlay PF. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature*, 1999, 401: 502-505.
- [7] Aparicio JF, Molnar I, Schwecke T, Konig A, Haydock SF, Khaw LE. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, 1996, 169:9-16.
- [8] Kim HJ, Pongdee R, Wu QQ, Hong L, Liu HW. The biosynthesis of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*: synthesis of the cross-bridging precursor and identification of the function of SpnJ. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129 (47): 14582-14584.
- [9] Pan HX, Li JA, He NJ, Chen JY, Zhou YM, Shao L, Chen DJ. Improvement of spinosad production by overexpression of gtt and gdh controlled by promoter PermE* in *Saccharopolyspora spinosa* SIPI-A2090. *Biotechnology Letters*, 2010, 33 (4): 733-739.
- [10] Madduri K, Waldron C, Merlo DJ. Rhamnose Biosynthesis Pathway Supplies Precursors for Primary and Secondary Metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(19): 5632-5638.
- [11] Chen YL, Chen YH, Lin YC, Tsa KC, Chiu HT. Functional Characterization and Substrate Specificity of Spinosyn Rhamnosyltransferase by in Vitro Reconstitution of Spinosyn Biosynthetic Enzymes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (11): 7352-7363.
- [12] Kim HJ, White-Phillip JA, Ogasawara Y, Shin N, Isiorho EA, Liu HW. Biosynthesis of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*: synthesis of permethylated rhamnose and characterization of the functions of SpnH, SpnI, and SpnK. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132 (9): 2901-2903.
- [13] Huang KX, Zahn J, Han L. SpnH from *Saccharopolyspora spinosa* encodes a rhamnosyl 4'-O-methyltransferase for biosynthesis of the insecticidal macrolide, spinosyn A. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35 (12): 1669-1676.
- [14] Hong L, Zhao Z, Melancon III CE, Zhang H, Liu HW. In vitro characterization of the enzymes involved in TDP-D-fofosamine biosynthesis in the spinosyn pathway of *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130 (14): 4954-4967.
- [15] Hong L, Zhao ZB, Liu HW. Characterization of SpnQ from the spinosyn biosynthetic pathway of *Saccharopolyspora spinosa*: mechanistic and evolutionary implications for C-3 deoxygenation in deoxysugar biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128 (44): 14262-14263.
- [16] Zhao ZB, Hong L, Liu HW. Characterization of protein encoded by spnR from the spinosyn gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*: mechanistic implications for forosamine biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127 (21): 7692-7693.
- [17] Madduri K, Waldron C, Matsushima P, Broughton MC, Crawford K, Merlo DJ, Baltz RH. Genes for the biosynthesis of spinosyns: applications for yield improvement in *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001, 27 (6): 399-402.
- [18] Waldron C, Matsushima P, Rosteck PR Jr, Broughton MC, Turner J, Madduri K, Crawford KP, Merlo DJ, Baltz RH. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chemistry & Biology*, 2001, 8 (5): 487-499.
- [19] Chng C, Lum AM, Vroom JA, Kao CM. A key developmental regulator controls the synthesis of the

- antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(32):11346-11351.
- [20] den Hengst CD, Tran NT, Bibb MJ, Chandra G, Leskiw BK, Buttner MJ. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(2):361-379.
- [21] Chen Y, Smanski MJ, Shen B. Improvement of secondary metabolite production in *Streptomyces* by manipulating pathway regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(1):19-25.
- [22] Burbelo PD, Ching KH, Han BL, Klimavicz CM, Ladarola MJ. Synthetic biology for translational research. *American Journal of Translational Research*, 2010, 2(4):381-389.
- [23] Khalil AS, Collins JJ. Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(5):367-379.
- [24] Dellomonaco C, Fava F, Gonzalez R. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9:3.
- [25] Medema MH, Breitling R, Bovenberg R, Takano E. Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(2):131-137.

Biosynthetic pathway and synthetic strategy of spinosad— A review

Yue Li¹, Cheng Chang^{1*}, Keqian Yang^{2*}

¹School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

²State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Spinosad is a novel macrolide insecticide produced by *Saccharopolyspora spinosa*, widely used in agriculture. Here its biosynthetic pathway, and key regulatory nodes were reviewed and analyzed. A synthetic strategy to reprogram spinosad biosynthetic pathway was proposed.

Keywords: spinosad, *Saccharopolyspora spinosa*, biosynthetic pathway, metabolic regulation analysis, synthetic biology

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (NSFC30770240)

* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-10-64807459, E-mail: yangkq@im.ac.cn; Tel: +86-931-8913671, E-mail: ccheng@lzu.edu.cn

Received: 15 April 2011 / Revised: 19 May 2011