

组合生物学技术合成他克莫司类似物的研究进展

张薇¹ 王月月² 吴晖¹ 李永泉^{2,3} 张仁炳^{4*} 江辉^{2,3*}

(1. 杭州中美华东制药有限公司 浙江 杭州 310011)

(2. 浙江大学 生命科学学院 浙江 杭州 310058)

(3. 浙江省微生物生化与代谢工程重点实验室 浙江 杭州 310058)

(4. 浙江大学校医院 浙江 杭州 310058)

摘要: 近年来组合生物学技术在开发抗生素类似物的研究中发挥着越来越重要的作用, 在他克莫司类似物的组合生物合成中, 通过应用外源合成前体取代烯丙基丙二酸单酰基和 4,5-二羟基-1-烯-环己甲酸, 以及应用模块化合成元件取代 AM 合成元件和改造后修饰合成元件, 已经生产出 11 个他克莫司类似物, 这些研究拓宽了人们对标准化合成前体和模块化合成元件的认识, 为通过组合生物合成手段进行抗生素的更新换代提供指导。

关键词: 他克莫司, 合成前体, 合成元件, 合成途径

Biosynthesis of FK506 analogs by combinatorial biological techniques

ZHANG Wei¹ WANG Yue-Yue² WU Hui¹ LI Yong-Quan^{2,3} ZHANG Ren-Bing^{4*}
JIANG Hui^{2,3*}

(1. Hangzhou Zhongmei Huadong Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310011, China)

(2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(3. Key Laboratory of Microbial Biochemistry and Metabolism Engineering of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(4. Hospital of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: More and more antibiotic analogs are biosynthesized by combinatorial biological techniques. Eleven FK506 analogs are biosynthesized through replacement of allylmalonyl group and 4,5-dihydroxycyclohexa-1,5-dienecarboxylic acid group with heterologous building blocks, and replacement of allylmalonyl biosynthetic elements with heterologous modular biosynthetic elements. These studies will expand our understanding of heterologous building blocks and modular biosynthetic elements and may help us generate more new antibiotic analogs.

Keywords: FK506, Building block, Biosynthetic element, Biosynthetic pathway

长期以来,一直是合成化学家主导抗生素分子结构的改造用于合成药物先导化合物,近年来随着合成生物学的飞速发展,合成生物学家应用组合生物学技术合成抗生素类似物取得成功的例子越来越

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31200600); 浙江省教育厅项目(No. Y201016179)

*通讯作者: 张仁炳: Tel: 86-571-87952581; ✉: zrb94276@zju.edu.cn

江辉: Tel: 86-571-88208569; ✉: jianghuisioc@zju.edu.cn

收稿日期: 2013-06-21; 接受日期: 2013-08-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

越多,如毒副作用较低的抗肿瘤药物表柔红霉素(Epirubicin)^[1]、细胞膜通透性更高的达托霉素类似物等^[2]。

他克莫司(FK506)是日本藤泽制药公司于1987年从筑波链霉菌(*Streptomyces tsukubaensis*)发酵液中分离得到的次级代谢产物(图1)^[3-4],可以与细胞内FKBP12结合,抑制钙调蛋白依赖型细胞因子的活性进而阻断T细胞的活化抑制其增殖^[5],在临床上主要用于抑制肝移植、肾移植及其他器官移植后的免疫排斥反应^[6-7],另外还具有很好的抗真菌活性可以用于牛皮癣等皮肤炎症的治疗^[8-9]。由于他克莫司巨大的应用前景和 market 价值,人们一直努力生产活性更高疗效更佳的他克莫司类似物。本文以他克莫司类似物的组合生物合成为例子,着重介绍应用外源合成前体和模块化合成元件生产他克莫司类似物的研究进展,希望拓宽人们对标准化合成前体和模块化合成元件的认识,为通过组合生物合成手段进行抗生素的更新换代提供指导。

1 他克莫司合成元件与合成前体

链霉菌中次级代谢产物的合成元件、转运元件、调控元件的编码基因常成簇排列^[10-12],合成元件中聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)和非核糖体肽合成酶(Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)合成元件必须由磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(Phosphopantetheinyl transferase, PPTase)催化从脱辅基形态转化为全辅基形态后才具有活性, PPTase基因往往不在基因簇内^[13-14]。在多个链霉菌中发现了他克莫司及其合成基因簇,如筑波链霉菌NRRL18488、卡那霉素链霉菌(*S. kanamyceticus*)KCTC9225、*S. sp.* KCTC11604BP、*S. sp.* ATCC55098(MA6858)、*S. sp.* MA6548^[15-20]。他克莫司合成基因簇内的基因产物按其功能可以分为:PKS合成元件、NRPS合成元件、4,5-二羟基-1-烯-环己甲酸(4,5-Dihydroxycyclohexa-1,5-dienecarboxylic acid, DHCHC)合成元件、甲氧基丙二酸单酰基(Methoxymalonyl, MOM)合成元件、烯丙基丙二酸单酰基(Allylmalonyl, AM)合成元件、哌啶甲酸

(Pipelicolic acid)合成元件、后修饰合成元件和调控元件(图1)。

他克莫司分子结构属于大环内酯类抗生素,它的生物合成前体包括丙二酸单酰基(Malonyl)、甲基丙二酸单酰基(Methylmalonyl, MM)、DHCHC、MOM、AM、哌啶甲酸。合成前体Malonyl和MM来源于初级代谢,AM、DHCHC、MOM和哌啶甲酸的合成元件及合成途径将在下文进行介绍。他克莫司分子骨架由PKS合成元件和NRPS合成元件合成^[15-16]:起始模块中羧酸-辅酶A连接酶(Carboxylic acid:CoA liagse, CL)功能域活化并转移合成前体DHCHC到酰基载体蛋白(Acyl carrier protein, ACP)功能域上,烯酰还原酶(Enoyl reductase, ER)功能域还原DHCHC中的双键;I型PKS 10个延伸模块中酰基转移酶(Acyl transferase, AT)功能域分别将2分子的Malonyl、5分子的MM、2分子的MOM和1分子AM转移到同模块中ACP上,同模块中酮基合酶(Ketoacyl synthase, KS)功能域将上游的中间体链转移到自身中Cys侧链上,并催化同模块中ACP上的合成前体与中间体链之间的脱羧基缩合反应将骨架延长2个碳原子,同模块中酮基还原酶(Keto reductase, KR)功能域、脱水酶(Dehydratase, DH)功能域、烯酰还原酶(ER)功能域对新延长的2个碳原子进行修饰;NRPS模块活化并转移合成前体哌啶甲酸到同模块中肽基载体蛋白(Peptidyl carrier protein, PCP)功能域上,第一个缩合功能域(Condensation domain 1, C1)催化哌啶甲酸中氨基与上游中间体链形成酰氨键,最后第2个缩合功能域(C2)催化中间体的C26位羟基与C1位羧基酯化成环同时将中间体从合成元件上解离下来(图1)。

2 外源合成前体取代 AM 或模块化合成元件取代 AM 合成元件合成他克莫司类似物

2.1 AM 合成元件及合成途径

他克莫司合成元件除了合成他克莫司还合成其同系物子囊霉素(FK520)^[15-16],两者在分子结构上的差异在于C21位上的烯丙基被乙基所取代(图1),即合成前体AM被乙基丙二酸单酰基所取代,

基于后者的活性远不如他克莫司,可见C21位上的基团对其活性至关重要。迄今,在其它天然产物中未发现AM,因此他克莫司合成元件中AM合成元件就成为研究AM合成途径的唯一对象。

不同生产菌株中他克莫司合成基因簇内都存在一个AM合成基因亚簇,相对于基因簇内其它基因在同源性和共线性(Synteny)上的高度保守性,AM合成基因亚簇的差异性较高,卡那霉素链霉菌KCTC9225和*S. sp.* ATCC55098中AM合成基因亚簇只包括4个基因(*tcsA*、*tcsB*、*tcsC*和*tcsD*),而*S. sp.* KCTC11604B和筑波链霉菌NRRL 18488中AM合成基因亚簇包括9个基因(*tcsA/allA*、*tcsB/allK*、*tcsC/allR*、*tcsD/allD*、*tcs1/allM*、*tcs2/allN*、*tcs3/allP*、

*tcs4/allO*和*tcs5/allS*)^[15-16]。2010年,Goranovic等^[16]通过基因敲除及喂养实验证实了筑波链霉菌NRRL 18488中AllK参与AM的合成。2011年,Mo等^[15]在*S. sp.* KCTC 11604BP中对AM合成元件和合成途径做了更详尽的体内实验和体外生化实验研究,结果表明:TcsA(AT-ACP)、TcsB(酮基合成酶-链长因子,KS-CLF)、TcsC(还原型羧基化酶,CCR)和TcsD(脱氢酶,Dehydrogenase,Deh)对AM的合成不可或缺,而Tcs1(甲硫氨酸裂解酶)、Tcs2(调控因子,Reg)、Tcs3(P450)、Tcs4(氧化还原酶)和Tcs5(KR)的功能可以被菌株中同源蛋白所回补或者它们并没有参与AM的合成。基于实验结果和对蛋白功能的预测,Mo等^[15]提出了AM的合成机

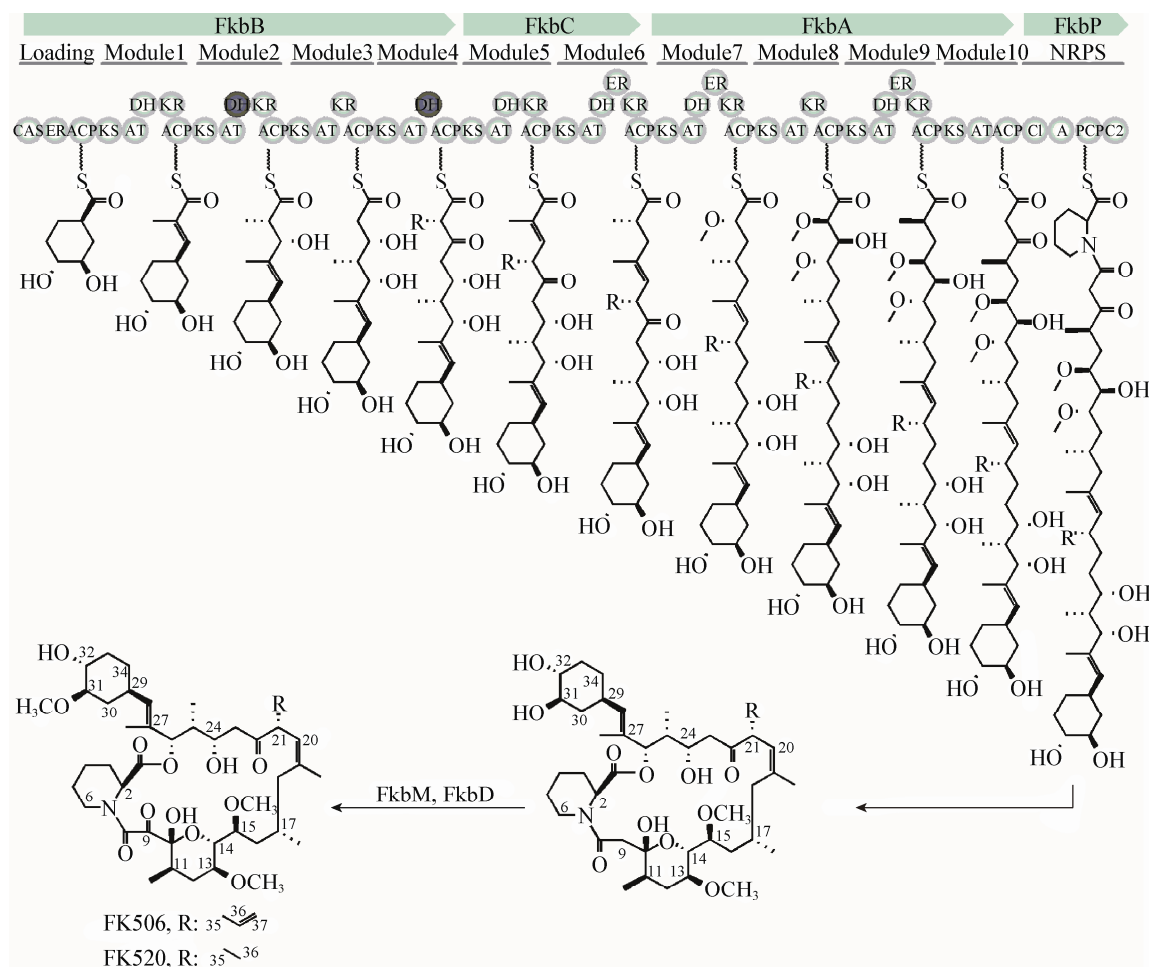


图1 他克莫司合成元件合成他克莫司分子骨架的途径

Figure 1 The biosynthetic pathway of FK506 catalyzed by FK506 biosynthetic elements

制:TcsA中AT将Malonyl从辅酶A上转移到TcsA中ACP上生成Malonyl-TcsA;TcsB催化Malonyl-TcsA与丙基辅酶A的缩合反应生成3-酮基-戊酰基-TcsA;Tcs5(或者脂肪酸合酶中KR)催化酮基的还原生成3-羟基-戊酰基-TcsA,然后通过脱水反应生成2-烯-戊酰基-TcsA;TcsC催化烯基的还原同时引入羧基生成丙基丙二酸单酰基-TcsA;TcsD催化脱氢反应生成AM-TcsA(图2A)。

2.2 外源合成前体取代AM合成他克莫司类似物

2010年,Goranovic等^[16]发现以筑波链霉菌NRRL 18488为基础构建的 $\Delta allK$ 敲除株不能生产他克莫司但仍然可以生产子囊霉素,在该敲除株中喂养AM单硫酯和AM双硫酯都可以恢复他克莫司的生产,该结果证实了通过喂养合成前体取代AM以合成他克莫司类似物的可行性。

2011年,Mo等^[15]发现以*S. sp.* KCTC 11604BP为基础构建的 $\Delta tcsB$ 敲除株同样不能生产他克莫司,但仍然可以生产子囊霉素,同时该敲除株生产出35-脱甲基-子囊霉素(1);在该敲除株中喂养AM单硫酯、戊酰单硫酯、2-烯-戊酰单硫酯或3-酮基-戊酰单硫酯都可以恢复他克莫司的生产,并且生产出35-脱甲基-子囊霉素;在该敲除株中喂养丙基丙二酸单硫酯可以生产出36,37-二氢-他克莫司(2);在该敲除株中喂养反-2-烯-己酸可以生产出36,37-二氢-37-甲基-他克莫司(3);在该敲除株中喂养4-甲基-戊酸可以生产出36-甲基-他克莫司(4);在该敲除株中喂养4-氟-反式丁烯酸可以生产出36-氟-子囊霉素(5)。通过体外测活,5的促进神经轴生长效果比他克莫司高约20%,而免疫抑制活性不变,意味着5可能成为疗效更高的药物(图3)。

2.3 模块化合成元件取代AM合成元件合成他克莫司类似物

鉴于5的活性较高,而通过向 $\Delta tcsB$ 敲除株添加外源合成前体生产该类似物的产率极低(0.06 mg/L),人们试图开发出模块化合成元件在体内直接生成合成前体异丁烯基丙二酸单酰基(Isobutenylmalonyl, ibeM)取代AM,从而生产5。

合成前体异丁基丙二酸单酰基(Isobutyrylmalonyl, ibM)存在于多个链霉菌次级代谢产物的分子结构中,如*S. sp.* CNH189中的Ansalactam、*S. sp.* HKI0576中的Germicidin等,这些次级代谢产物的合成基因簇中都存在ibM合成基因亚簇(*anlE/divR*、*anlF/divS*和*anlG/divT*)^[21-24]。2011年Xu等^[21]通过生物信息学分析和异源表达提出了ibM的合成途径:AnlF/DivS(KS)催化Malonyl-ACP与异丁基辅酶A的缩合反应生成4-甲基-3-酮基-戊酰基-ACP;AnlG/DivT(Deh)催化酮基的还原生成4-甲基-3-羟基-戊酰基-ACP,然后进行脱水反应生成4-甲基-2-烯-戊酰基-ACP;AnlE/DivR还原烯基同时引入羧基生成ibeM-ACP(图2B)。

2012年,Lechner等^[25]在 $\Delta tcsB$ 敲除株中导入*S. sp.* CNH189中ibM的合成基因(*anlE*、*anlF*和*anlG*),由于ibM合成元件与AM合成元件的底物选择性不同,产生了一条全新的ibeM合成途径:AnlF、AnlG和AnlE催化生成ibeM-ACP以后,TcsD催化ibeM-ACP的脱氢反应生成ibeM-ACP(图2B),ibeM被PKS合成元件引入到他克莫司分子骨架中得到5,产率比外源合成前体添加法提高了10倍(0.60 mg/L)。

3 外源合成前体取代DHCHC合成他克莫司类似物

他克莫司的起始合成前体为DHCHC,目前只被发现存在于他克莫司、子囊霉素和雷帕霉素(Rapamycin)的分子结构之中^[26-29]。1993-2001年间,Paiva等^[30]、Wallace等^[31]和Lowden等^[32-33]分别在雷帕霉素生产菌株和子囊霉素生产菌株中喂养¹³C和D标记的莽草酸,发现DHCHC可能来自于莽草酸的代谢。直到2011年Andexer等^[26]通过体内实验和体外生化反应阐明了DHCHC合成途径的第一步反应,同源蛋白RapK(雷帕霉素合成元件)和FkbO(他克莫司/子囊霉素合成元件)催化分支酸(Chorismate)的水解生成丙酮酸和4,5-二羟基-1,5-二烯-环己甲酸(4,5-Dihydroxycyclohexa-1,5-dienecarboxylic acid, DCDC),DCDC被还原为DHCHC(图2C)。2005年,

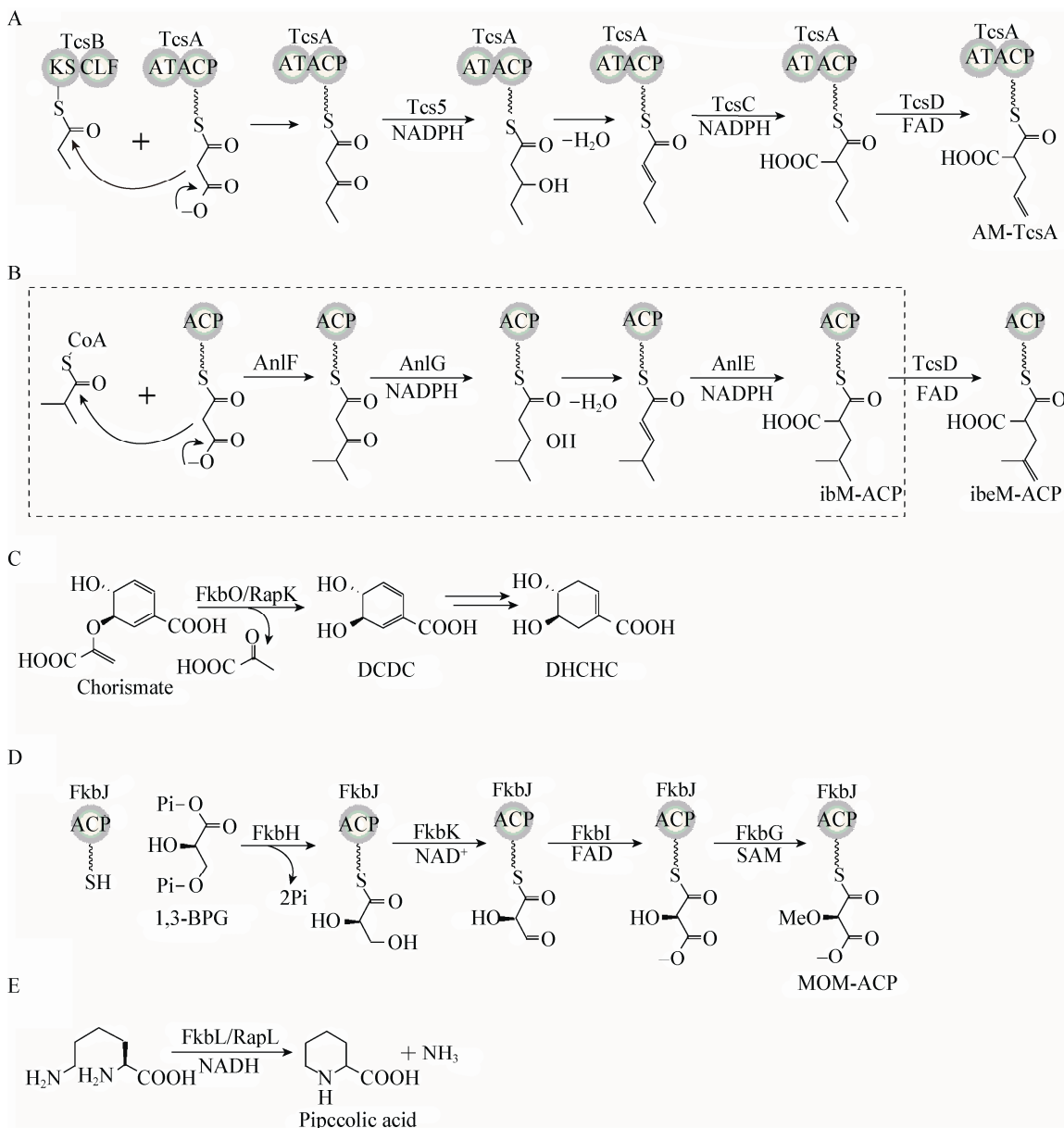


图 2 他克莫司合成前体的合成途径

Figure 2 The biosynthetic pathway of building blocks of FK506

注：A：AM 合成途径；B：ibeM 合成途径；C：DHCHC 合成途径；D：MOM 合成途径；E：哌啶甲酸合成途径。

Note: A: The biosynthetic pathway of AM; B: The biosynthetic pathway of ibeM; C: The biosynthetic pathway of DHCHC; D: The biosynthetic pathway of MOM; E: The biosynthetic pathway of pipecolic acid.

Gregory等^[34]发现在雷帕霉素生产菌株吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*) NRRL5491中同时敲除*rapK*等8个基因后菌株不能生产雷帕霉素,在敲除株中喂养DHCHC的类似物可以生产出4个雷帕霉素类似物,该结果表明在生物合成途径中DHCHC可以被其它合成前体所取代。

2013年, Ban等^[35]以*S. sp.* KCTC 11604BP为基础构建了不能生产他克莫司的 $\Delta fkbO$ 敲除株,在该敲除株中喂养3-烯-环己甲酸后可以生产32-脱羟基-他克莫司(6)。有趣的是6虽然免疫抑制活性大为降低,但是促进神经轴生长效果保持不变,意味着该类似物可能成为促神经生长药物。2013年, Kim等^[36]以他克莫司高产菌株*S. sp.* GT110507为基础构建了不能生产他克莫司的 $\Delta fkbO$ 敲除株,在该敲除株中喂养4-羟基-环己甲酸后可以生产31-脱甲基-他克莫司(7),在该敲除株中喂养3-羟基-苯甲酸后可以生产32-脱羟基-31-*O*-脱甲基-29,31,33-三烯-他克莫司(8)(图3)。

4 敲除后修饰合成元件合成他克莫司类似物

他克莫司分子骨架从合成元件上解离下来形成环状内酯以后,还需要经过C31位上羟基的甲基化和C9位的氧化最终生成他克莫司。1996年, Motamedi等^[19]通过基因敲除实验提出了FkbD(氧化还原酶)催化他克莫司C9位的氧化, FkbM(*O*-甲基转移酶)催化C31位羟基的甲基化。2013年, Chen等^[37]通过体外生化反应和基因敲除实验得出了与Motamedi等一致的结论,并且提出了环状内酯的氧化与甲基化反应没有严格的先后顺序,见图1。

Motamedi等^[19]和Chen等^[37]通过构建 $\Delta fkbD$ 敲除株得到了9-脱氧-他克莫司(9);通过构建 $\Delta fkbM$ 敲除株得到了31-*O*-脱甲基-他克莫司(10);通过构建 $\Delta fkbDM$ 双敲除株得到了9-脱氧-31-*O*-脱甲基-他克莫司(11)(图3)。Chen等对10进行了抗真菌活性的测定,结果该类似物的抗真菌活性大为下降。

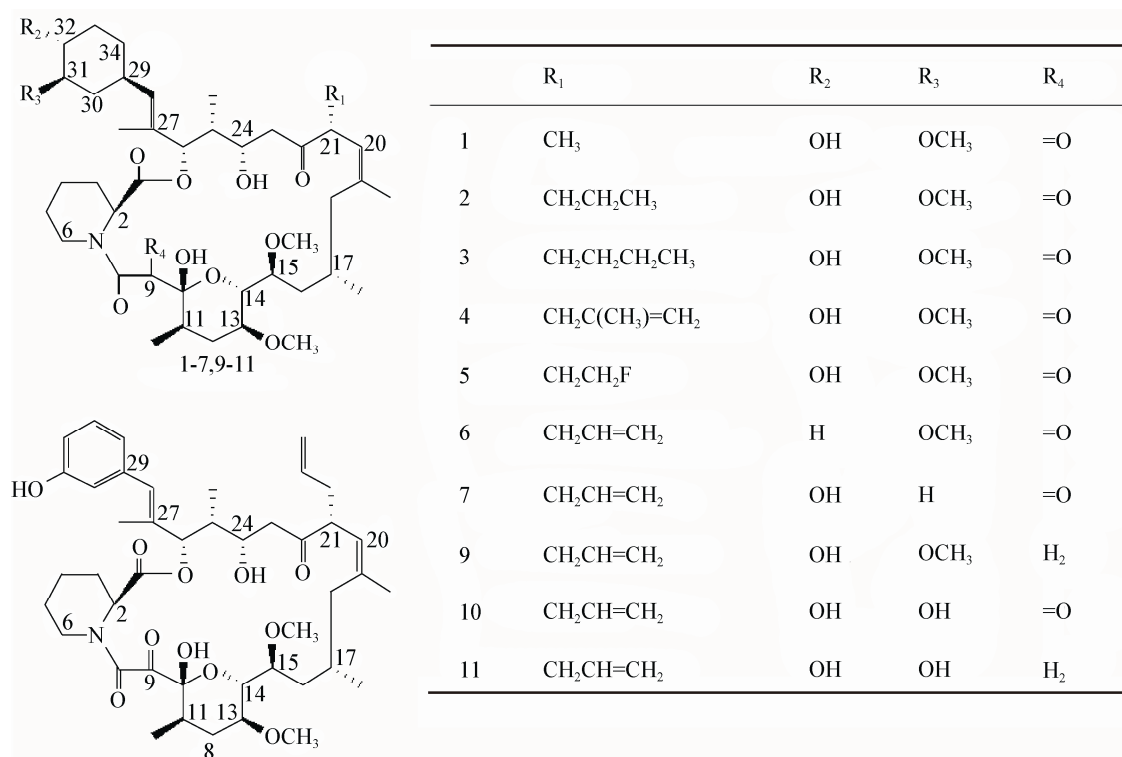


图3 他克莫司类似物的分子结构

Figure 3 The molecular structures of FK506 analogs

5 展望

5.1 外源合成前体取代 MOM 或模块化合成元件取代 MOM 合成元件合成他克莫司类似物

他克莫司分子C13位和C15位上的甲氧基来自于合成前体MOM, MOM存在于多个链霉菌次级代谢产物中, 如子囊霉素、恶唑霉素(Oxazolomycin)和Soraphen A等^[29,38]。不同菌株中他克莫司合成基因簇内都存在一个MOM合成基因亚簇(*fkbG*、*fkbH*、*fkbl*、*fkblJ*和*fkblK*), 它们与吸水链霉菌 var. *ascofeticus* ATCC 14891中子囊霉素合成基因簇内MOM合成基因亚簇(*fkblG*、*fkblH*、*fkblI*、*fkblJ*和*fkblK*) 在同源性和同线性上都高度相似。1998年Hill等^[39]通过同位素喂养实验支持了Soraphen A中的MOM来自于初级代谢中的甘油衍生物。2000年Wu等^[29]通过蛋白功能预测推测了子囊霉素中MOM的合成途径, 2006年Dorrestein等^[40]通过体外生化实验证实了在恶唑霉素中MOM合成途径中OzmB和OzmE的功能和催化机制, 实验结果与Wu等推测途径一致: OzmB/FkbH (甘油酰基转移酶-磷酸酶)催化1,3-二磷酸-甘油酸(1,3-BPG)的脱磷酸反应并将甘油酸转移到OzmE/FkbJ (ACP)上生成甘油酰-ACP; OzmG/FkbK (脱氢酶)和OzmD/FkbI (脱氢酶)依次催化甘油酰-ACP上C3位羟基的氧化, 最终生成羟基-malonyl-ACP; OzmF/FkbG (甲基转移酶)转移甲基到羟基-malonyl-ACP上生成MOM-ACP (图2D)。2002年, Kato等^[41]在宿主菌中将红霉素合成元件中特异性识别MM的AT6替换为子囊霉素合成元件中特异性识别MOM的FkbA-AT8, 同时导入子囊霉素合成元件中的MOM合成元件, 结果成功得到了预期产物, 即红霉素骨架相应位置的甲基被甲氧基取代的产物, 表明MOM合成元件可以成为模块化合成元件用于新化合物的生物合成。

基于研究者们已经阐明了MOM合成途径中大部分步骤, 可以通过在MOM合成基因敲除株中喂养类似于MOM的合成前体, 或者在敲除株中引入模块化合成基因以生产他克莫司类似物。

5.2 外源合成前体取代哌啶甲酸合成他克莫司类似物

他克莫司、子囊霉素和雷帕霉素分子结构中都存在哌啶甲酸基团, 1993年Paiva等^[42]通过同位素喂养实验提出了哌啶甲酸来源于赖氨酸, 2006年Gatto等^[43]通过体外生化实验证实了RapL/FkbL的功能是催化赖氨酸的环化脱氨生成哌啶甲酸(图2E)。1998年Khaw等^[44]发现: 在基于雷帕霉素生产菌株构建的 $\Delta rapL$ 敲除株中喂养哌啶甲酸、脯氨酸和4-羟基脯氨酸, 分别有利于雷帕霉素、脯氨酰雷帕霉素、4-羟基脯氨酰雷帕霉素的生产, 表明合成前体哌啶甲酸可以被类似物所取代得到新的化合物, 该实验结果提示人们可以通过同样的策略, 在他克莫司生产菌株中敲除 $\Delta fkbL$ 后喂养哌啶甲酸类似物生产出他克莫司类似物。

随着基因组测序、生物信息学、生物化学、功能蛋白组学的发展, 人们对生物合成前体、合成元件、合成途径的认识越来越深入, 同时分子遗传学、基因工程、异源表达体系的发展使人们设计外源合成前体和模块化合成元件的能力越来越强, 为应用组合生物学手段合成抗生素结构类似物提供了理论和技术的可行性, 组合生物学将像组合化学一样成为人们创造新抗生素的有力手段。

参考文献

- [1] Madduri K, Kennedy J, Rivola G, et al. Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(1): 69-74.
- [2] Baltz RH. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(12): 1533-1540.
- [3] Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics[J]. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1987, 40(9): 1249-1255.
- [4] Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*[J]. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1987, 40(9): 1256-1265.
- [5] Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, et al. The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes[J]. *Journal of Immunology*,

- 1989, 143(2): 718-726.
- [6] Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes[J]. *Cell*, 1991, 66(4): 807-815.
- [7] Kunz J, Hall MN. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1993, 18(9): 334-338.
- [8] Foor F, Parent SA, Morin N, et al. Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast[J]. *Nature*, 1992, 360(6405): 682-684.
- [9] Heitman J, Koller A, Kunz J, et al. The immunosuppressant FK506 inhibits amino acid import in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(8): 5010-5019.
- [10] Liu G, Chater KF, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 112-143.
- [11] Procopio RE, Silva IR, Martins MK, et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*[J]. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2012, 16(5): 466-471.
- [12] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(2): 285-295.
- [13] Jiang H, Wang YY, Ran XX, et al. Improvement of natamycin production by engineering of phosphopantetheinyl transferases in *Streptomyces chattanoogensis* L10[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(11): 3346-3354.
- [14] Lu YW, San Roman AK, Gehring AM. Role of phosphopantetheinyl transferase genes in antibiotic production by *Streptomyces coelicolor*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(20): 6903-6908.
- [15] Mo S, Kim DH, Lee JH, et al. Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(4): 976-985.
- [16] Goranovic D, Kosec G, Mrak P, et al. Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(19): 14292-14300.
- [17] Motamedi H, Shafiee A. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 256(3): 528-534.
- [18] Motamedi H, Cai SJ, Shafiee A, et al. Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 244(1): 74-80.
- [19] Motamedi H, Shafiee A, Cai SJ, et al. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(17): 5243-5248.
- [20] Shafiee A, Motamedi H, Chen T. Enzymology of FK-506 biosynthesis. Purification and characterization of 31-O-desmethylFK-506 O:methyltransferase from *Streptomyces* sp. MA6858[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 225(2): 755-764.
- [21] Xu Z, Ding L, Hertweck C. A branched extender unit shared between two orthogonal polyketide pathways in an endophyte[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(20): 4667-4670.
- [22] Ding L, Maier A, Fiebig HH, et al. Divergolides A-D from a mangrove endophyte reveal an unparalleled plasticity in ansa-macrolide biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(7): 1630-1634.
- [23] Wilson MC, Nam SJ, Gulder TA, et al. Structure and biosynthesis of the marine *Streptomyces* ansamycin ansalactam A and its distinctive branched chain polyketide extender unit[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(6): 1971-1977.
- [24] Chemler JA, Buchholz TJ, Geders TW, et al. Biochemical and structural characterization of germicidin synthase: analysis of a type III polyketide synthase that employs acyl-ACP as a starter unit donor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(17): 7359-7366.
- [25] Lechner A, Wilson MC, Ban YH, et al. Designed biosynthesis of 36-methyl-fk506 by polyketide precursor pathway engineering[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(7): 379-383. DOI: 10.1021/sb3001062.
- [26] Andexer JN, Kendrew SG, NureAlam M, et al. Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(12): 4776-4781.
- [27] Aparicio JF, Molnar I, Schwecke T, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase[J]. *Gene*, 1996, 169(1): 9-16.
- [28] Molnar I, Aparicio JF, Haydock SF, et al. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase[J]. *Gene*, 1996, 169(1): 1-7.
- [29] Wu K, Chung L, Revill WP, et al. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units[J]. *Gene*, 2000, 251(1): 81-90.
- [30] Paiva NL, Roberts MF, Demain AL. The cyclohexane moiety of rapamycin is derived from shikimic acid in *Streptomyces hygroscopicus*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1993, 12(6): 423-428.
- [31] Wallace KK, Reynolds KA, Koch K, et al. Formation of the (1R,3R,4R)-3,4-dihydroxycyclohexanecarboxylic acid-derived moiety[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(25): 11600-11601.
- [32] Lowden PAS, Wilkinson B, Bohm GA, et al. Origin and true nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, 40(4): 777-779.
- [33] Lowden PAS, Böhm GA, Staunton J, et al. The nature of the starter unit for the rapamycin polyketide synthase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1996, 35(19): 2249-2251.
- [34] Gregory MA, Petkovic H, Lill RE, et al. Mutasynthesis of rapamycin analogues through the manipulation of a gene

- governing starter unit biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(30): 4757-4760.
- [35] Ban YH, Lee JH, Gu GR, et al. Mutational biosynthesis of a FK506 analogue containing a non-natural starter unit[J]. *Molecular Biosystems*, 2013, 9(5): 944-947.
- [36] Kim DH, Ryu JH, Lee KS, et al. Mutational biosynthesis of tacrolimus analogues by *fkbO* deletion mutant of *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(13): 5881-5892.
- [37] Chen D, Zhang Q, Cen P, et al. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(15): 5093-5103.
- [38] Zhao C, Ju J, Christenson SD, et al. Utilization of the methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus for cloning the oxazolomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* JA3453[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 4142-4147.
- [39] Hill AM, Harris JP, Siskos AP. Investigation of glycerol incorporation into soraphen A[J]. *Chemical Communications*, 1998(21): 2361-2362.
- [40] Dorrestein PC, Van Lanen SG, Li W, et al. The bifunctional glyceryl transferase/phosphatase *OzmB* belonging to the HAD superfamily that diverts 1,3-bisphosphoglycerate into polyketide biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(32): 10386-10387.
- [41] Kato Y, Bai L, Xue Q, et al. Functional expression of genes involved in the biosynthesis of the novel polyketide chain extension unit, methoxymalonyl-acyl carrier protein, and engineered biosynthesis of 2-desmethyl-2-methoxy-6-deoxyerythronolide B[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(19): 5268-5269.
- [42] Paiva NL, Demain AL, Roberts MF. The immediate precursor of the nitrogen-containing ring is free pipercolic acid[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(7): 581-585.
- [43] Gatto GJ Jr, Boyne MT 2nd, Kelleher NL, et al. Biosynthesis of pipercolic acid by *RapL*, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(11): 3838-3847.
- [44] Khaw LE, Bohm GA, Metcalfe S, et al. Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygrosopicus* NRRL 5491 disrupted in *rapL*, encoding a putative lysine cyclodeaminase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(4): 809-814.



栏目介绍

生物实验室

“生物实验室”栏目刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度，深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果，交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室，以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。