

盐霉素在白色链霉菌中的生物合成及代谢调控研究进展

郭松松, 孙羽, 杨怡萱, 余怡铨, 朱振洪*

浙江中医药大学生命科学学院, 浙江 杭州 310053

郭松松, 孙羽, 杨怡萱, 余怡铨, 朱振洪. 盐霉素在白色链霉菌中的生物合成及代谢调控研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 732-742.

GUO Songsong, SUN Yu, YANG Yixuan, YU Yicheng, ZHU Zhenhong. Research progress on biosynthesis and metabolic regulation of salinomycin in *Streptomyces albus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 732-742.

摘要: 盐霉素(salinomycin)作为一种被广泛应用于畜牧业领域的重要抗生素,是具有抗肿瘤干细胞效果的一种潜在药物,其生物合成和代谢调控机制日益受到人们的关注。本文综述了白色链霉菌(*Streptomyces albus*)中盐霉素的生物合成机制及其次级代谢调控研究的新进展,旨在通过对盐霉素生物合成基因簇关键蛋白、聚酮骨架链合成关键酶和调控因子的分析,提出通过次级代谢调控技术提高盐霉素产量的若干策略,为进一步开发盐霉素高产工业菌株提供参考。

关键词: 盐霉素; 白色链霉菌; 生物合成; 代谢调控

Research progress on biosynthesis and metabolic regulation of salinomycin in *Streptomyces albus*

GUO Songsong, SUN Yu, YANG Yixuan, YU Yicheng, ZHU Zhenhong*

School of Life Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

Abstract: Salinomycin, an important antibiotic widely used in animal husbandry, is a potential drug with anti-tumor stem cell effect. Its biosynthesis and metabolic regulation mechanism have received increasing attention. In this paper, we reviewed the biosynthesis mechanism of salinomycin in *Streptomyces albus* and the recent progress in the study of its secondary metabolism regulation, aiming to propose some strategies to improve salinomycin production through secondary metabolism regulation technology by analyzing the key proteins of salinomycin biosynthesis gene cluster, key enzymes and regulatory factors of polyketone skeleton chain synthesis. It provides reference for further development of high-yield

*Corresponding author. E-mail: zzh2008@zcmu.edu.cn

Received: 2023-07-29; Accepted: 2023-10-18; Published online: 2023-11-24

salinomycin industrial strains.

Keywords: salinomycin; *Streptomyces albus*; biosynthesis; metabolic regulation

盐霉素 (salinomycin) 是由白色链霉菌 (*Streptomyces albus*)^[1]及其衍生菌株产生的一种单羧基聚醚类抗生素(图 1)^[2]。在畜牧业中,盐霉素广泛应用于抗球虫治疗和生长促进剂,长期以来一直被视为抗球虫药物,以提高反刍动物和猪的营养吸收和饲料效率^[3]。盐霉素选择性地与疏水基质中的金属离子螯合并将其转运至细胞膜内,破坏细胞内的生理离子梯度,从而引起细胞死亡^[4]。近年来的研究表明,盐霉素对多种肿瘤干细胞具有选择性靶向作用^[5-6]。癌症干细胞是一种独特的癌症细胞亚群,存在于许多肿瘤中,它们对各种治疗具有耐药性,并驱动肿瘤的发生、进展、转移和复发^[7-8]。盐霉素不仅能够杀死小鼠乳腺癌干细胞,还能抑制新肿瘤细胞的生成,并减缓现有肿瘤的生长^[9],这些研究结果显示盐霉素作为抗肿瘤药物具有良好的应用前景。

目前国际上盐霉素的工业发酵产量可达 100 g/L^[10],我国盐霉素工业菌株最高产量为 60–70 g/L,实验室摇瓶发酵产量约 5–20 g/L,仍有较大的提升空间。本文对盐霉素生物合成机制及调控途径最新研究进展进行综述,旨在

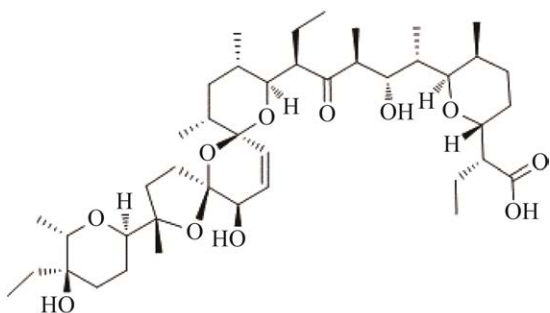


图 1 盐霉素的分子结构^[11]

Figure 1 Molecular structure of salinomycin^[11].

为通过调控技术进一步开发盐霉素高产工业菌株和提高盐霉素产量提供参考。

1 盐霉素的生物合成机制

1.1 盐霉素的生物合成基因簇

由于盐霉素生产菌株已进行了全基因组测序,所以盐霉素生物合成基因簇已在多个菌株中得到解析。如 2011 年 Jiang 等^[11]通过构建基因组 fosmid 文库和高通量测序技术,得到了白色链霉菌(*S. albus*) XM211 中完整的盐霉素生物合成的基因簇序列,其结果显示盐霉素生物合成基因簇全长约为 127 kb,包括 49 个开放阅读框(open reading frame, ORF),并通过基因缺失和回补实验确定了盐霉素生物合成基因簇的边界。2012 年 Yurkovich 等^[1]也在白色链霉菌(*S. albus*) DSM 41398 中克隆得到了盐霉素的生物合成基因簇并进行了注释。这两种菌株中对盐霉素合成基因簇各基因的命名尽管不同,但基因序列基本一致(表 1)。

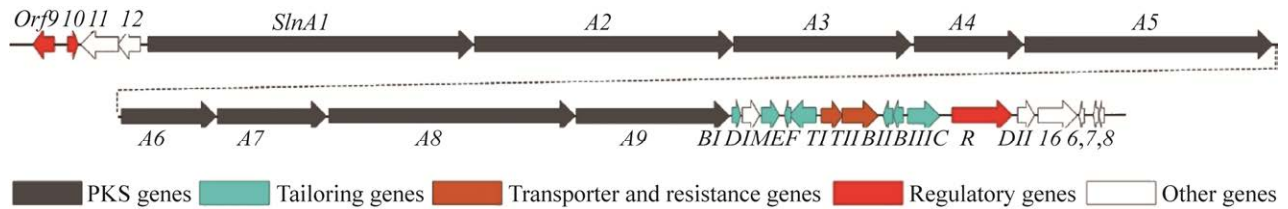
1.2 盐霉素聚酮骨架链合成关键酶

盐霉素的基因簇是典型的 I 型聚酮合酶 (polyketide synthases, PKS),其中有 9 个相邻的大基因(*slnA1–slnA9*)按照线性进行排列(图 2)。这些基因利用 1 个乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)、5 个丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA, M-CoA)、6 个甲基丙二酰辅酶 A (methylmalonyl-CoA, MM-CoA) 和 3 个乙基丙二酰辅酶 A (ethylmalonyl-CoA, EM-CoA) 进行 14 步缩合,从而合成盐霉素的聚酮骨架^[11]。

辅酶 A (coenzyme A, CoA) 是一种酰基载体,在聚酮化合物的生物合成过程中通常具有 2 个不同的功能^[12]。首先,作为酰基载体蛋白

表 1 *Streptomyces albus* XM211 和 *Streptomyces albus* DSM 41398 盐霉素生物合成基因簇对比Table 1 Comparison of the gene clusters of salinomycin biosynthesis from *Streptomyces albus* XM211 and *Streptomyces albus* DSM 41398

Gene in <i>S. albus</i> XM211	Gene in <i>S. albus</i> DSM 41398	Function
<i>orf9</i>	<i>salN</i>	Putative regulator
<i>orf10</i>	<i>salO</i>	Putative regulator
<i>orf11</i>	<i>salP</i>	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, HADH
<i>orf12</i>	<i>salQ</i>	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase, mitochondrial
<i>slnA1</i>	<i>salAI</i>	Polyketide synthase KSQ, AT, ACP, KS, AT, DH, KR ACP, KS, AT, DH, ER, KR, ACP
<i>slnA2</i>	<i>salAII</i>	Polyketide synthase KS, AT, DH, KR, ACP, KS, AT, DH, ER, KR, ACP
<i>slnA3</i>	<i>salAIII</i>	Polyketide synthase KS, AT, ACP, KS, AT, KR, ACP
<i>slnA4</i>	<i>salAIV</i>	Polyketide synthase KS, AT, KR, ACP
<i>slnA5</i>	<i>salAV</i>	Polyketide synthase KS, AT, DH, ER, KR, ACP, KS, AT, KR, ACP
<i>slnA6</i>	<i>salAVI</i>	Polyketide synthase KS, AT, DH, ACP
<i>slnA7</i>	<i>salAVII</i>	Polyketide synthase KS, AT, KR, ACP
<i>slnA8</i>	<i>salAVIII</i>	Polyketide synthase KS, AT, KR, ACP, KS, AT, DH, ER, KR, ACP
<i>slnA9</i>	<i>salAIX</i>	Polyketide synthase KS, AT, KR, ACP, KSX
<i>slnBI</i>	<i>salBIII</i>	Epoxide hydrolase/cyclase
<i>slnDI</i>	<i>salGI</i>	Putative type II thioesterase
<i>slnM</i>	<i>salE</i>	Putative O-methyltransferase
<i>slnC</i>	<i>salC</i>	Epoxidase
<i>slnE</i>	<i>salF</i>	Ferredoxin
<i>slnR</i>	<i>salJ</i>	Regulatory
<i>slnF</i>	<i>salD</i>	Cytochrome P450
<i>slnTI</i>	<i>salH</i>	Putative salinomycin export
<i>slnTII</i>	<i>salI</i>	Putative salinomycin export
<i>slnBII</i>	<i>salBI</i>	Epoxide hydrolase/cyclase
<i>slnBIII</i>	<i>salBII</i>	Epoxide hydrolase/cyclase
<i>slnDII</i>	<i>salGII</i>	Putative type II thioesterase
<i>orf16</i>	<i>salX</i>	Non-ribosomal peptide synthase C, PCP

图 2 盐霉素生物合成基因簇的排布^[11]Figure 2 Arrangement of gene clusters for salinomycin biosynthesis^[11].

(acyl carrier protein, ACP)翻译后修饰的底物, 产生活化的底物结合状态酰基载体蛋白; 其次, 辅酶 A 还可以作为聚酮合酶的延伸单元^[12]。因此, 本文介绍 3 种辅酶 A 类前体, 分别是丙

二酰辅酶 A、甲基丙二酰辅酶 A 和乙基丙二酰辅酶 A。

1.2.1 丙二酰辅酶 A

在众多微生物中, 丙二酰辅酶 A 的合成是

脂肪酸生物合成的初始步骤。一般而言,微生物菌体中形成丙二酰辅酶 A 的途径有两种:

(1) 乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)催化乙酰辅酶 A 生成 M-CoA (图 3); (2) M-CoA 合成酶催化丙二酸(propanedioic acid)直接形成 M-CoA, 其中途径 1 是主要的 M-CoA 合成途径。

ACC 催化的羧化反应是一种生物素/ATP 依赖的反应^[14]。分子遗传学实验的研究表明, 丙二酰辅酶 A 合成酶能直接催化缩合丙二酸和辅酶 A 形成 M-CoA; 丙二酸是嘧啶降解过程中产生的代谢产物, 经过 M-CoA 合成酶的作用能转变为 M-CoA, 发生脱羧反应生成乙酰辅酶 A, 同时释放二氧化碳^[15]。有研究者^[16-17]在三叶草根瘤菌(*Rhizobium trifolii*)中发现了含有丙二酰辅酶 A 脱羧酶(malonyl-CoA decarboxylase)基因、M-CoA 合成酶基因和二羧酸转运蛋白基因的基因簇, 提示这些基因簇可能参与了丙二酸的胞内运输和 M-CoA 的合成反应。

1.2.2 甲基丙二酰辅酶 A

聚酮化合物的生物合成中, MM-CoA 是一种常见的延伸单元。它主要通过 4 种途径进行合

成(图 3): (1) 丙酰辅酶 A (propionyl coenzyme A, Propionyl-CoA)的羧化; (2) 琥珀酰辅酶 A (succinyl coenzyme A, Succinyl-CoA)的重排和差向异构化; (3) 缬氨酸的分解代谢; (4) 乙酰乙酰辅酶 A (acetoacetyl coenzyme A, Acetoacetyl-CoA)的多步转化。

Propionyl-CoA 一般由脂肪酸的 β 氧化、氨基酸分解和胆固醇的分解得到^[18]; 同时也可由辅酶 A 对胞内丙酸盐的硫酸化产生。Propionyl-CoA 合成后可通过丙酰辅酶 A 羧化酶(propionyl-CoA carboxylase, PCC)的催化转化为 MM-CoA^[19]。PCC 的组成和反应机制与 ACC 基本相似。三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)的中间代谢产物 Succinyl-CoA 是生成 MM-CoA 的重要前体。Succinyl-CoA 转化为 MM-CoA 经历两步反应。首先, 在甲基丙二酰辅酶 A 变位酶(methylmalonyl coenzyme A mutase, MCM)的催化下, Succinyl-CoA 生成(2R)-MM-CoA, 然后通过甲基丙二酰辅酶 A 消旋酶(methylmalonyl coenzyme A racemase, MCR)的催化, (2R)-MM-CoA 转变为(2S)-MM-CoA, 进而可用于后续的聚酮链加载反应^[12]。

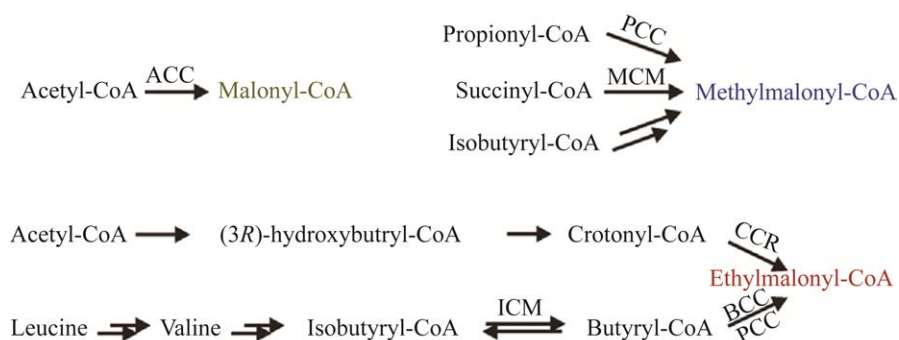


图 3 盐霉素生物合成中前体的生物合成途径^[13] ACC: 乙酰辅酶 A 羧化酶; PCC: 丙酰辅酶 A 羧化酶; BCC: 丁酰辅酶 A 羧化酶; MCM: 甲基丙二酰辅酶 A 变位酶; CCR: 巴豆酰辅酶 A 还原酶; ICM: 异丁酰辅酶 A 变位酶

Figure 3 The biosynthetic pathway of precursors in salinomycin biosynthesis^[13]. ACC: Acetyl-CoA carboxylase; PCC: Propionyl-CoA carboxylase; BCC: Butyryl-CoA carboxylase; MCM: Methylmalonyl-CoA mutase; CCR: Crotonyl-CoA reductase; ICM: Isobutyryl coenzyme A mutase.

1.2.3 乙基丙二酰辅酶 A

在 I 型聚酮合酶基因簇合成的化合物中, 有些化合物在聚酮链上含有丁酰基团, 如盐霉素^[11]。而且在 III 型聚酮合酶基因簇合成的吡喃酮类抗生素 germicidin 中也发现了具有丁酰基结构的化合物^[20]。事实上, 这种丁酰基结构来自聚酮合酶合成的第三类型延伸单元, 即 EM-CoA。一般而言, 微生物菌体中的 EM-CoA 由丁酰辅酶 A (butyryl coenzyme A, BCoA) 的羧化产生, 而 BCoA 又可以通过缬氨酸的分解、Acetoacetyl-CoA 的转化和长链脂肪酸的 β 氧化合成。

缬氨酸的分解代谢在 EM-CoA 生物合成过程中发挥着重要的作用。缬氨酸的分解会产生异丁酰辅酶 A (isobutyryl coenzyme A, IBCoA), 其可以进一步生成 EM-CoA, 或者在异丁酰辅酶 A 变位酶(isobutyryl coenzyme A mutase, ICM) 的作用下生成 BCoA^[13]。另外, 还存在一条产生 EM-CoA 的途径, 该途径始于 Acetoacetyl-CoA, 形成中间产物巴豆酰辅酶 A (crotonyl coenzyme A, Crotonyl-CoA), 并在巴豆酰辅酶 A 还原酶 (crotonyl coenzyme A reductase, CCR) 的催化作用下最终生成 EM-CoA^[13] (图 3)。

1.3 前体及生物量对盐霉素生物合成的影响

盐霉素合成前体的生物合成已经被清晰阐述, 对于其中的关键酶, 如 ACC 和 CCR 可以作为代谢工程改造的靶点, 以增强菌株对前体的供应能力, 进而提高盐霉素的产量。此外, 上述前体的生物合成均直接或者间接来源于乙酰辅酶 A。通常, 生物体内的乙酰辅酶 A 有两种合成途径: (1) 糖酵解; (2) 脂肪酸的 β 氧化。研究发现在白色链霉菌 DSM 41398 和 ZD11 中存在多拷贝的基因, 参与脂肪酸 β 氧化形成乙酰辅酶 A 的过程, 并且甘油三酯水解和脂肪酸生物合成均得到增强^[13,21]。同时, 最近的研究

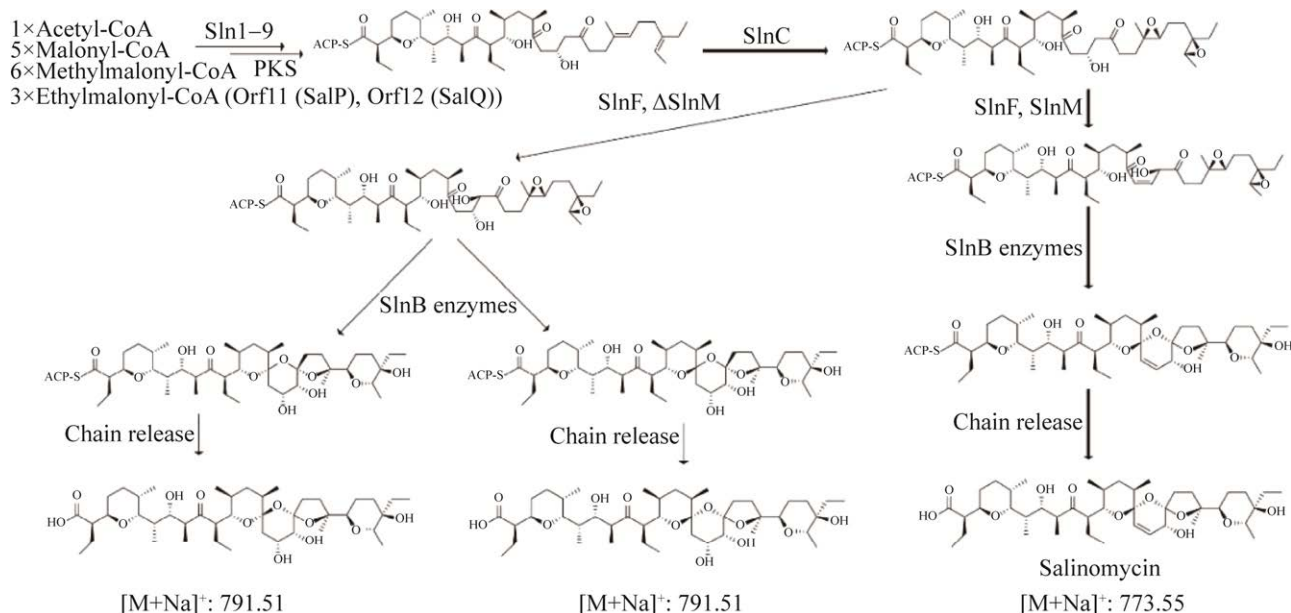
证实了嗜油型白色链霉菌 ZD11 在增强 β 氧化途径的条件下能够产生丰富的酰基辅酶 A 前体, 用于盐霉素的生物合成^[22], 这解释了通过添加豆油使盐霉素产量增加的机制。

在盐霉素的生物合成过程中, 培养基中脂质组成发生了显著变化。在发酵过程中, 甘油三酯的含量显著降低, 从 96.0% 降至 2.3%; 脂肪酸组成的主要变化趋势是饱和脂肪酸(软脂酸和硬脂酸)和多不饱和脂肪酸(亚油酸)含量增加, 单不饱和脂肪酸(油酸)含量减少; 在获得盐霉素的过程中, 磷脂含量增加^[23]。所以在盐霉素的生物合成过程中, 建议使用高含量的饱和脂肪酸, 以提供更高的膜脂流动性和最终产品的质量。

通常生物量的增加和抗生素合成之间存在竞争关系。若将菌体生物量增加的相关基因进行弱化, 即通过对三羧酸循环中基因进行敲除, 弱化初级代谢, 仅保持能够合成抗生素的最高有效浓度, 使更多的豆油和营养物质能够充分用于盐霉素合成。研究者们通过对白色链霉菌 BK3-25 基因组的分析, 筛选了柠檬酸合酶编码基因(*gltA*)和苹果酸合酶编码基因(*fum*), 并分别对 *gltA* 基因和 *fum* 基因的拷贝进行组合缺失, 结果显示, 在相同豆油添加水平上, 组合缺失株的生物量有了一定程度上的弱化, 而盐霉素产量有了较为明显的提高^[24]。

1.4 盐霉素的生物合成途径及关键蛋白

盐霉素的生物合成途径已经获得解析^[3,25-26] (图 4)。在这个过程中, SlnA4、SlnA6、SlnA7、SlnA7 和 SlnA9 各自催化一个延伸模块, 而另外 5 种酶(SlnA1、SlnA2、SlnA3、SlnA5 和 SlnA8) 编码两个延伸模块; SlnDI 和 SlnDII 蛋白具有硫酯酶活性, 以避免错误延伸单元的加载; 初步形成的碳骨架经环氧化酶 SlnC 催化在 C24-C25 和 C28-C29 之间形成环氧键, 随后环氧化水解酶 SlnBII 和 SlnBIII 催化环氧键打开和再次环化

图4 盐霉素的生物合成途径^[27]Figure 4 The proposed biosynthetic pathway of salinomycin^[27].

的级联反应；细胞色素 P450 SlnF 在铁氧还蛋白 SlnE 的辅助下在 C20 位置加载羟基，随后 SlnBI 催化呋喃环的形成和链的释放；释放下来的链经过 SlnM 的催化在 C18-C19 上形成双键，同时生成三元螺环结构^[28]。除了上述基因外，其他一些基因在盐霉素的生物合成中也起着至关重要的作用^[1,11]。*orf9* (*salN*)和 *orf10* (*salO*)属于 MarR 家族调控因子，位于 PKS 基因上游，对盐霉素生物合成有特定的调节作用^[28]。*orf11* (*salP*)和 *orf12* (*salQ*)参与了盐霉素生物合成 EM-CoA 延伸单元的形成，研究表明 *salP* 和 *salQ* 的失活使盐霉素的产量分别比野生型降低了 10%和 36%^[29]。

位于 PKS 基因下游的基因簇编码的蛋白包括：两个离散型(II 型)硫酯酶(SlnDI 和 SlnDII)、细胞色素 P450 (SlnF)、铁氧化还原蛋白(SlnE)、三种环氧键水解活性的酶(SlnBI、SlnBII 和 SlnBIII)、环氧化酶(SlnC)、一个途径特异性调控因子(SlnR)以及两个 ABC 转运蛋白(SlnTI 和

SlnTII)；生物信息学分析显示，SlnTI 和 SlnTII 与盐霉素或其中间产物的转运高度相关^[28]。SlnR 已被证实是参与盐霉素生物合成的途径特异性正调控因子^[11]。Orf16 (*SalX*)是一种双功能蛋白，具有非核糖体合成酶缩合结构域和肽基载体蛋白结构域，可能参与酰基载体蛋白的氧化环化过程^[27]。SlnM 蛋白参与盐霉素合成的最后一步^[26]，其缺失突变株不再生成盐霉素。

2 通过代谢调控技术提高盐霉素产量

2.1 盐霉素生物合成前体物质的调控

在白色链霉菌中，抗生素的合成前体通常与初级代谢有关。前体供应的增加是一种有效提高抗生素产量的方法。然而通过对代谢通路进行调控，阻断非目标代谢产物的合成也是一种有助于抗生素合成增加的方法^[30]。盐霉素生物合成的前体底物，如 M-CoAs、MM-CoAs 和 EM-CoAs 与其他聚酮类化合物的生物合成共

享,所以阻断其他 PKS 模块的功能有利于增加前体物质进入盐霉素合成途径的比例;研究表明,在阻断白色链霉菌中其他 7 个 PKS/PKS-NRPS 模块条件下,盐霉素产量显著提高;然而 PKS-NRPS-2 和 PKS-6 的双阻断突变株中,其产量并未进一步提高,但前体物质 M-CoA 和 MM-CoA 的积累量处于较高水平^[13](图 5)。

2.2 盐霉素生物合成基因簇关键酶的调控

某些酶催化反应在抗生素的生物合成过程中成为限速步骤,为提高产物的合成效率可以采取多种策略。一种方法是通过增加基因的拷贝数实现产量的提高。例如,EM-CoA 的合成主要依赖于 CCR,为了提高 EM-CoA 的合成效率,研究人员通过调节聚酮添加物供给并在 PKS-NRPS-2 和 PKS-6 双阻断突变株中过表达 *ccr* 基因的方法,使得盐霉素产量提高近 10 倍^[13]。此外,通过定点突变和优化酶的活性也可以实现关键结构基因的高表达或对关键酶进行改进。在盐霉素的生物合成基因簇中, SlnA1-A9

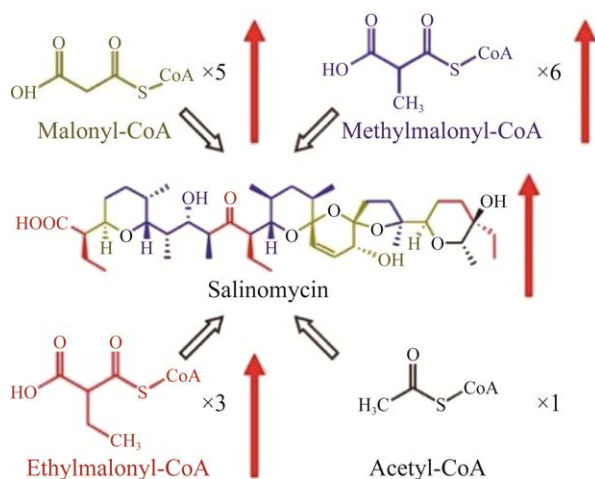


图 5 盐霉素生物合成中前体的调控示意图 红色箭头表示积累量或产量增加^[24]

Figure 5 Schematic diagram of precursor regulation in salinomycin biosynthesis. The red arrows indicate increase in precursor accumulation or salinomycin yield^[24].

编码的蛋白是典型的 I 型聚酮合酶,而其他 12 个基因编码的蛋白参与聚酮链的环化、修饰以及产物外排等关键步骤。

2.3 盐霉素生物合成基因簇的转录调控

抗生素生物合成基因簇的表达通常受到簇内调控基因编码的调控因子和/或全局性调控因子的有序控制,这些调控子能够选择性地激活或抑制抗生素的合成。通过揭示它们在调控抗生素合成中的作用机制,能够实现对抗生素生物合成过程的精细调控,例如高表达或敲除这些基因。

在盐霉素生产菌中, *slnR* 基因被证实为盐霉素合成基因簇中的途径专一性正向调控基因^[11]。进一步的研究表明, SlnR 能够激活盐霉素基因簇中大多数基因的转录^[28],敲除 *slnR* 基因将导致白色链霉菌(野生型菌株)盐霉素生产几乎丧失,在 *slnR* 基因缺失株中回补 *slnR* 基因可使盐霉素产量恢复^[11]。SlnR 通过与 *slnA1-slnQ*、*slnF-slnT1*、*slnC-slnB3* 等基因间隔区启动子间的相互作用调控盐霉素的生物合成,这些启动子具有保守的定向重复序列(5'-ACCCCT-3')^[28]。另外,在盐霉素合成基因簇上游还有两个 MarR 家族的调控因子(SlnN 和 SlnO),研究证实与野生型菌株相比, *slnN* 基因的缺失使盐霉素的生产水平提高了 35%左右,而 *slnN* 基因的过表达则导致盐霉素产量下降达 43%左右,说明 SlnN 对盐霉素的合成具有负调控作用^[31],但机制尚不明确。另外有研究表明 *slnO* 基因的过表达对盐霉素的生产具有促进作用,与野生型菌株相比,过表达 *slnO* 基因使盐霉素产量增加了约 28%; RT-qPCR 显示,在 *slnN* 基因缺陷株中, *slnO* 基因被上调;而在 *slnO* 基因的过表达株中, *slnN* 基因被下调,这两个基因间似乎存在对盐霉素的正负调控作用^[32],但具体机制还需要深入研究。

2.4 其他调控途径

为防止或降低胞内合成的代谢产物对自身细胞的毒性作用,链霉菌通常利用抗生素外排泵将其及时排出。因此,通过提高抗生素外排蛋白的表达水平能有效降低细胞内抗生素浓度,减弱因细胞内抗生素浓度过高引起的反馈抑制作用,进而间接促进相关抗生素基因簇的过量表达。根据生物信息学分析,*SlnTI*和*SlnTII*是与盐霉素外排相关的ABC转运蛋白;*SlnTI*编码的ATP结合亚基与*SlnTII*编码的跨膜亚基会形成异源二聚体,从而形成功能完整的ABC转运蛋白,负责盐霉素或其中间产物的外排^[33]。刘静等^[34]研究发现,在敲除白色链霉菌的外排基因*slnTI*和*slnTII*后,盐霉素的产量显著下降,这是因为由*slnTI*和*slnTII*编码的ABC转运蛋白缺失,从而导致盐霉素的外排减少;然而当这两个基因进行串联过量表达时,ABC转运蛋白的合成上调,导致盐霉素的产量提高了14.6%。在盐霉素的发酵过程中,胞内过量积累的盐霉素会对细胞的生长和生理活动造成负面影响。此时,细胞的保护机制将会中断盐霉素的进一步合成。在最近的研究中,通过对不同豆油添加条件下发酵液转录组数据的比较,白林泉等^[35]找到了8个与盐霉素外排有关的基因*SLNHY_0929*、*SLNHY_1893*、*SLNHY_3363*、*SLNHY_4037*、*SLNHY_0199*、*SLNHY_0818*、*SLNHY_6316*和*SLNHY_6652*;在白色链霉菌BK3-25中分别过量表达上述内源转运蛋白基因,得到高产盐霉素的突变株^[35]。该方法通过增强转运蛋白编码基因的转录水平提高了盐霉素的外排效率,减少了其在胞内的积累,进而降低对宿主的负面影响,解除相关合成酶的反馈抑制,最终提高了盐霉素产量。

研究人员还通过其他一系列实验来提高盐霉素产量并揭示其相应的调控机制。首先单独敲

除了链霉菌DSM 41398中的7个PKS/PKS-NRPS基因簇,导致盐霉素产量显著提高^[4]。其次,研究人员对高产菌株进行了定向改造。他们发现在BK3-25菌株中分别敲除PKS-NRPS-2和PKS-4可以将盐霉素产量提高到20.8 g/L和22.9 g/L^[24]。此外,在野生型菌株中,通过同时缺失一个75 kb的区域和PKS-6基因簇,盐霉素产量从2.60 g/L增加到9.50 g/L,占BK3-25总产量的53%^[24]。这可能是由于PKS/PKS-NRPS的缺失和PKS-6基因簇的中断导致了前体代谢流的重新分配,使较多聚酮合成的前体物质转入盐霉素的生物合成途径,从而提高了盐霉素的产量。

3 盐霉素生物合成基因簇的异源表达

在不同的宿主中异源表达目标的生物合成基因簇,可以激活潜在的基因簇和消除原宿主中负调控因子或相关阻遏物(repressor)的负调控作用^[36]。Yin等^[29]利用Red/ET技术将盐霉素基因簇(*slnO-orf18*)的3个片段组装成完整的基因簇(106 kb),并成功在异源宿主天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)中实现表达。最近,Jiang等^[27]设计了一个106 kb的人工盐霉素基因簇,并分别在天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) CH999、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) K4-114和白色链霉菌(*S. albus*) J1074这3个宿主中实现了高效的异源表达。由于所有的操纵子都是由强启动子驱动,对于含有人工基因簇的K4-114和J1074,摇瓶培养的盐霉素产量分别为14.3 mg/L和19.3 mg/L,其产量分别比原产菌白色链霉菌DSM 41398高出1.3倍和1.7倍,但含有天然基因簇的K4-114和J1074的盐霉素产量分别是0 mg/L和0.5 mg/L;含有人工基因

簇的 CH999 盐霉素产量为 10.3 mg/L, 是 DSM 41398 产盐霉素水平的 92%^[3]。

此外, 也可运用核糖体工程^[37]、特定基因的全局或通路特异性调控^[38-39]、CRISPR/Cas9 基因组编辑^[40]、高通量启动子筛选(HiTES)^[41]和微生物共培养^[42]等方法来增强白色链霉菌中盐霉素的产量。更重要的是, 鉴于链霉菌在各种培养条件下表现出的复杂多样性, 发展更高效策略以激活这些处于沉默状态的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC), 对于新天然产物的发现至关重要。

4 总结与展望

尽管在盐霉素生物合成过程中已经解析了其生物合成机制并发现了一些调控因子, 但调控因子间的相互协作调控机制仍然缺乏。未来的研究可以采用多种策略来进一步推动白色链霉菌中盐霉素的生物合成和调控机制的研究。例如, 将系统生物学的方法与计算模拟和模型构建相结合, 建立动态模型来模拟盐霉素生物合成和调控过程, 从而预测和优化其产量。同时, 可以整合多种盐霉素高产方法构建更高产的菌株。为降低生产成本, 理论上可以通过基因工程定向改造白色链霉菌的碳源偏好, 使用发酵成本较低的原料, 如淀粉取代豆油。此外, 还值得关注与盐霉素相似的其他天然产物的研究。

REFERENCES

- [1] YURKOVICH ME, TYRAKIS PA, HONG H, SUN YH, SAMBORSKY M, KAMIYA K, LEADLAY PF. A late-stage intermediate in salinomycin biosynthesis is revealed by specific mutation in the biosynthetic gene cluster[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2012, 13(1): 66-71.
- [2] MIYAZAKI Y, SHIBUYA M, SUGAWARA H, KAWAGUCHI O, HIROSE C, NAGATSU J, ESUMI S. Salinomycin, a new polyether antibiotic[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1974, 27(11): 814-821.
- [3] ZHANG XJ, LU CY, BAI LQ. Mechanism of salinomycin overproduction in *Streptomyces albus* as revealed by comparative functional genomics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(11): 4635-4644.
- [4] ZHU DQ, WANG YP, ZHANG MM, IKEDA H, DENG ZX, CANE DE. Product-mediated regulation of pentalenolactone biosynthesis in *Streptomyces* species by the MarR/SlyA family activators PenR and PntR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(6): 1255-1266.
- [5] CHANG JC. Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(1 Suppl 1): S20-S25.
- [6] SMALLEY M, ASHWORTH A. Stem cells and breast cancer: a field in transit[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(11): 832-844.
- [7] TYAGI M, PATRO BS. Salinomycin reduces growth, proliferation and metastasis of cisplatin resistant breast cancer cells via NF- κ B deregulation[J]. *Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association With BIBRA*, 2019, 60: 125-133.
- [8] VERSINI A, COLOMBEAU L, HIENZSCH A, GAILLET C, RETAILLEAU P, DEBIEU S, MÜLLER S, CAÑEQUE T, RODRIGUEZ R. Salinomycin derivatives kill breast cancer stem cells by lysosomal iron targeting[J]. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 2020, 26(33): 7416-7424.
- [9] DEWANGAN J, TANDON D, SRIVASTAVA S, VERMA AK, YAPURI A, RATH SK. Novel combination of salinomycin and resveratrol synergistically enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human breast cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(10): 1246-1259.
- [10] LUHAVAYA H, WILLIAMS SR, HONG H, GONZAGA de OLIVEIRA L, LEADLAY PF. Site-specific modification of the anticancer and antituberculosis polyether salinomycin by biosynthetic engineering[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2014, 15(14): 2081-2085.
- [11] JIANG CY, WANG HG, KANG QJ, LIU J, BAI LQ. Cloning and characterization of the polyether salinomycin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces albus* XM211[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(4): 994-1003.
- [12] CHAN YA, PODEVELS AM, KEVANY BM, THOMAS MG. Biosynthesis of polyketide synthase extender units[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(1): 90-114.

- [13] LU CY, ZHANG XJ, JIANG M, BAI LQ. Enhanced salinomycin production by adjusting the supply of polyketide extender units in *Streptomyces albus*[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 35: 129-137.
- [14] TONG L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005, 62(16): 1784-1803.
- [15] POHL NL, HANS M, LEE HY, KIM YS, CANE DE, KHOSLA C. Remarkably broad substrate tolerance of malonyl-CoA synthetase, an enzyme capable of intracellular synthesis of polyketide precursors[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(24): 5822-5823.
- [16] AN JH, KIM YS. A gene cluster encoding malonyl-CoA decarboxylase (MatA), malonyl-CoA synthetase (MatB) and a putative dicarboxylate carrier protein (MatC) in *Rhizobium trifolii*. Cloning, sequencing, and expression of the enzymes in *Escherichia coli*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 257(2): 395-402.
- [17] KOO JH, KIM YS. Functional evaluation of the genes involved in malonate decarboxylation by *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 266(2): 683-690.
- [18] van der GEIZE R, YAM K, HEUSER T, WILBRINK MH, HARA H, ANDERTON MC, SIM E, DIJKHUIZEN L, DAVIES JE, MOHN WW, ELTIS LD. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(6): 1947-1952.
- [19] HORSWILL AR, ESCALANTE-SEMERENA JC. *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(18): 5615-5623.
- [20] SONG LJ, BARONA-GOMEZ F, CORRE C, XIANG LK, UDWARAY DW, AUSTIN MB, NOEL JP, MOORE BS, CHALLIS GL. Type III polyketide synthase beta-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(46): 14754-14755.
- [21] LI H, WEI JX, DONG JX, LI YD, LI YQ, CHEN YH, GUAN WJ. Enhanced triacylglycerol metabolism contributes to efficient oil utilization and high-level production of salinomycin in *Streptomyces albus* ZD11[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): e00763-20.
- [22] WEI JX, CHEN BB, DONG JX, WANG XY, LI YQ, LIU YC, GUAN WJ. Salinomycin biosynthesis reversely regulates the β -oxidation pathway in *Streptomyces albus* by carrying a 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase gene in its biosynthetic gene cluster[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(12): 2890-2904.
- [23] CHUCHKOV BS, ANTOVA GA. Changes of lipid composition from culture fluid during the production of antibiotic salinomycin[J]. *Food Science and Applied Biotechnology*, 2023, 6(1): 167.
- [24] 张晓洁. 盐霉素高产机制解析及菌株改造[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2017.
- ZHANG XJ. Mechanism of salinomycin over-production and metabolic engineering of high-yield strains[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2017 (in Chinese).
- [25] IZUMIKAWA M, MURATA M, TACHIBANA K, EBIZUKA Y, FUJII I. Cloning of modular type I polyketide synthase genes from salinomycin producing strain of *Streptomyces albus*[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, 11(16): 3401-3405.
- [26] JIANG CY, QI Z, KANG QJ, LIU J, JIANG M, BAI LQ. Formation of the $\Delta^{18,19}$ double bond and bis(spiroacetal) in salinomycin is atypically catalyzed by SlnM, a methyltransferase-like enzyme[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2015, 54(31): 9097-9100.
- [27] JIANG CJ, ZHOU HB, SUN HL, HE RT, SONG CY, CUI TQ, LUAN J, FU J, ZHANG YM, JIAO NZ, WANG HL. Establishing an efficient salinomycin biosynthetic pathway in three heterologous *Streptomyces* hosts by constructing a 106-kb multioperon artificial gene cluster[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(12): 4668-4677.
- [28] ZHU ZH, LI H, YU P, GUO YY, LUO S, CHEN ZB, MAO XM, GUAN WJ, LI YQ. SlnR is a positive pathway-specific regulator for salinomycin biosynthesis in *Streptomyces albus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1547-1557.
- [29] YIN J, HOFFMANN M, BIAN XY, TU Q, YAN F, XIA LQ, DING XZ, FRANCIS STEWART A, MÜLLER R, FU J, ZHANG YM. Direct cloning and heterologous expression of the salinomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* DSM41398 in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J].

- Scientific Reports, 2015, 5: 15081.
- [30] REN J, CUI YQ, ZHANG F, CUI H, NI XP, CHEN F, LI L, XIA HZ. Enhancement of nystatin production by redirecting precursor fluxes after disruption of the tetramycin gene from *Streptomyces ahygroscopicus*[J]. Microbiological Research, 2014, 169(7/8): 602-608.
- [31] 朱振洪, 李函, 李永泉. *slnN* 基因在盐霉素生物合成中的调控功能分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(4): 632-641.
- ZHU ZH, LI H, LI YQ. Regulation of *slnN* gene in salinomycin biosynthesis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(4): 632-641 (in Chinese).
- [32] ZHANG HR, CHEN WW, WANG XY, LI YQ, ZHU ZH. Positive regulation of the MarR-type regulator *slnO* and improvement of salinomycin production by *Streptomyces albus* by multiple transcriptional regulation[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2022, 68(3): 157-163.
- [33] ZHANG KP, MOHSIN A, DAI YC, CHEN ZB, ZHUANG YP, CHU J, GUO MJ. Combinatorial effect of ARTP mutagenesis and ribosome engineering on an industrial strain of *Streptomyces albus* S12 for enhanced biosynthesis of salinomycin[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 212.
- [34] 刘静, 姜春艳, 张部昌, 白林泉. ABC 转运蛋白基因 *slnTI* 和 *slnTII* 与盐霉素生物合成的相关性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 58-66.
- LIU J, JIANG CY, ZHANG BC, BAI LQ. Correlation of ABC transporter genes *slnTI* and *slnTII* with salomycin biosynthesis[J]. Microbiology China, 2014, 41(1): 58-66 (in Chinese).
- [35] 白林泉, 刘先. 增强转运蛋白基因的表达以提高盐霉素发酵水平的方法: CN113846041A[P]. 2023-06-06.
- BAI LQ, LIU X. Method for improving salinomycin fermentation level by enhancing expression of transporter gene: CN113846041A[P]. 2023-06-06 (in Chinese).
- [36] PAIT IGU, KITANI S, ROSLAN FW, ULANOVA D, ARAI M, IKEDA H, NIHIRA T. Discovery of a new diol-containing polyketide by heterologous expression of a silent biosynthetic gene cluster from *Streptomyces lavendulae* FRI-5[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(2): 77-87.
- [37] LI D, ZHANG JH, TIAN YQ, TAN HR. Enhancement of salinomycin production by ribosome engineering in *Streptomyces albus*[J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(2): 276-279.
- [38] ALBERTI F, LENG DJ, WILKENING I, SONG LJ, TOSIN M, CORRE C. Triggering the expression of a silent gene cluster from genetically intractable bacteria results in scleric acid discovery[J]. Chemical Science, 2019, 10(2): 453-463.
- [39] LU C, LIAO GJ, ZHANG JH, TAN HR. Identification of novel tylosin analogues generated by a *wblA* disruption mutant of *Streptomyces ansochromogenes*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 173.
- [40] ZHANG MM, WONG FT, WANG YJ, LUO SW, LIM YH, HENG E, YEO WL, COBB RE, ENGHAD B, ANG EL, ZHAO HM. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(6): 607-609.
- [41] XU F, NAZARI B, MOON K, BUSHIN LB, SEYEDSAYAMDOST MR. Discovery of a cryptic antifungal compound from *Streptomyces albus* J1074 using high-throughput elicitor screens[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(27): 9203-9212.
- [42] PISHCHANY G, MEVERS E, NDOUSSE-FETTER S, HORVATH Jr DJ, PALUDO CR, SILVA-JUNIOR EA, KOREN S, SKAAR EP, CLARDY J, KOLTER R. Amycomycin is a potent and specific antibiotic discovered with a targeted interaction screen[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(40): 10124-10129.