

• 综 述 •

## 放线菌核糖体工程的发展与应用

谢运昌<sup>1</sup>, 姚仕杰<sup>1</sup>, 李炜<sup>1</sup>, 单润润<sup>2</sup>, 吴贵贵<sup>1</sup>, 童图强<sup>2</sup>, 陈奇<sup>2</sup>

1 江西师范大学 生命科学学院 南昌市鄱阳湖湿地微生物资源与利用重点实验室, 江西 南昌 330022

2 安徽医科大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230032

谢运昌, 姚仕杰, 李炜, 单润润, 吴贵贵, 童图强, 陈奇. 放线菌核糖体工程的发展与应用. 生物工程学报, 2022, 38(2): 546-564.

XIE YC, YAO SJ, LI W, SHAN RR, WU GG, TONG TQ, CHEN Q. Development and application of ribosomal engineering in actinomycetes. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 546-564.

**摘 要:** 核糖体工程 (ribosome engineering) 是一项利用靶点位于细菌 RNA 聚合酶及核糖体功能因子的抗生素诱导细菌产生抗性突变, 进而提升菌株次级代谢生产潜能的技术。该方法无需依赖菌株完善的遗传操作体系, 可应用于发掘几乎所有放线菌菌株中潜在的宝贵活性次级代谢产物, 并广泛应用于放线菌基因组挖掘和次级代谢产物增产优化。核糖体工程效果显著, 迄今为止, 已从百余种放线菌菌株中发掘了 10 余种新结构分子和提升近 30 种活性次级代谢产物的生产效价。鉴于此, 文中从核糖体工程的发展角度出发, 对该技术的建立与优化, 及其作用机制的阐明进行了系统的归纳与总结; 同时也全面分析探讨了该技术在放线菌次级代谢产物开发中的推广应用, 以期核糖体工程的发展完善及放线菌次级代谢产物的综合开发提供借鉴与参考。

**关键词:** 放线菌; 核糖体工程; 次级代谢产物; 基因组挖掘; 抗生素

**Received:** February 21, 2021; **Accepted:** June 21, 2021; **Published online:** July 1, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (41806158, 32060021); Jiangxi Provincial Natural Science Foundation, China (20202BAB203021); Provincial Natural Science Research Project of Anhui Colleges and Universities, China (KJ2017A177); the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Anhui Medical University, China (0805017103)

**Corresponding author:** CHEN Qi. Tel: +86-551-65172130; E-mail: chenqi@ahmu.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (41806158, 32060021); 江西省自然科学基金 (20202BAB203021); 安徽省高校自然科学研究项目 (KJ2017A177); 安徽医科大学 2019 年大学生创新创业训练计划项目 (0805017103)

# Development and application of ribosomal engineering in actinomycetes

XIE Yunchang<sup>1</sup>, YAO Shijie<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, SHAN Runrun<sup>2</sup>, WU Guigui<sup>1</sup>, TONG Tuqiang<sup>2</sup>, CHEN Qi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation & Utilization from Poyang Lake Wetland of Nanchang, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

<sup>2</sup> School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China

**Abstract:** Ribosomal engineering is a technique that can improve the biosynthesis of secondary metabolites in the antibiotics-resistant mutants by attacking the bacterial RNA polymerase or ribosome units using the corresponding antibiotics. Ribosomal engineering can be used to discover and increase the production of valuable bioactive secondary metabolites from almost all actinomycetes strains regardless of their genetic accessibility. As a consequence, ribosomal engineering has been widely applied to genome mining and production optimization of secondary metabolites in actinomycetes. To date, more than a dozen of new molecules were discovered and production of approximately 30 secondary metabolites were enhanced using actinomycetes mutant strains generated by ribosomal engineering. This review summarized the mechanism, development, and protocol of ribosomal engineering, highlighting the application of ribosomal engineering in actinomycetes, with the aim to facilitate future development of ribosomal engineering and discovery of actinomycetes secondary metabolites.

**Keywords:** actinomycetes; ribosomal engineering; secondary metabolite; genome mining; antibiotics

放线菌具有生产多种结构新颖且活性优良的次级代谢产物 (secondary metabolite) 的巨大潜能, 也是创新药物研发的重要源泉<sup>[1-5]</sup>。据不完全统计, 临床中约 70% 的抗生素及其衍生物来源于放线菌<sup>[6-9]</sup>。然而这些只是放线菌次级代谢生产潜能的“冰山一角”, 大量宝贵的活性分子的生物合成基因 (簇) 在常规条件下都是以沉默 (silent) 状态存在, 无法生产相应产物; 此外, 大量野生型菌株具有长期进化形成的严谨调控体系, 限制其次级代谢产物的生产效率<sup>[10-12]</sup>。如何有效解决上述制约, 并实现菌株巨大基因资源与产物合成潜能的充分挖掘, 成

为当前放线菌次级代谢研究工作中亟待解决的核心问题。

在此背景下, 一种新颖放线菌次级代谢产物发掘策略——核糖体工程 (ribosomal engineering) 技术应运而生。该技术是由日本科学家 Kozo Ochi (以下简称 Ochi) 及其研究团队创建, 其主要方法为利用多种作用靶点位于放线菌 RNA 聚合酶和核糖体等细菌转录翻译元件上的抗生素胁迫处理菌株 (图 1), 促使菌株的 RNA 聚合酶及核糖体发生相应抗生素的抗性突变后, 调控胞内基因 (簇) 表达并激活菌株合成相关活性次级代谢产物<sup>[13-16]</sup>。该方法无需建

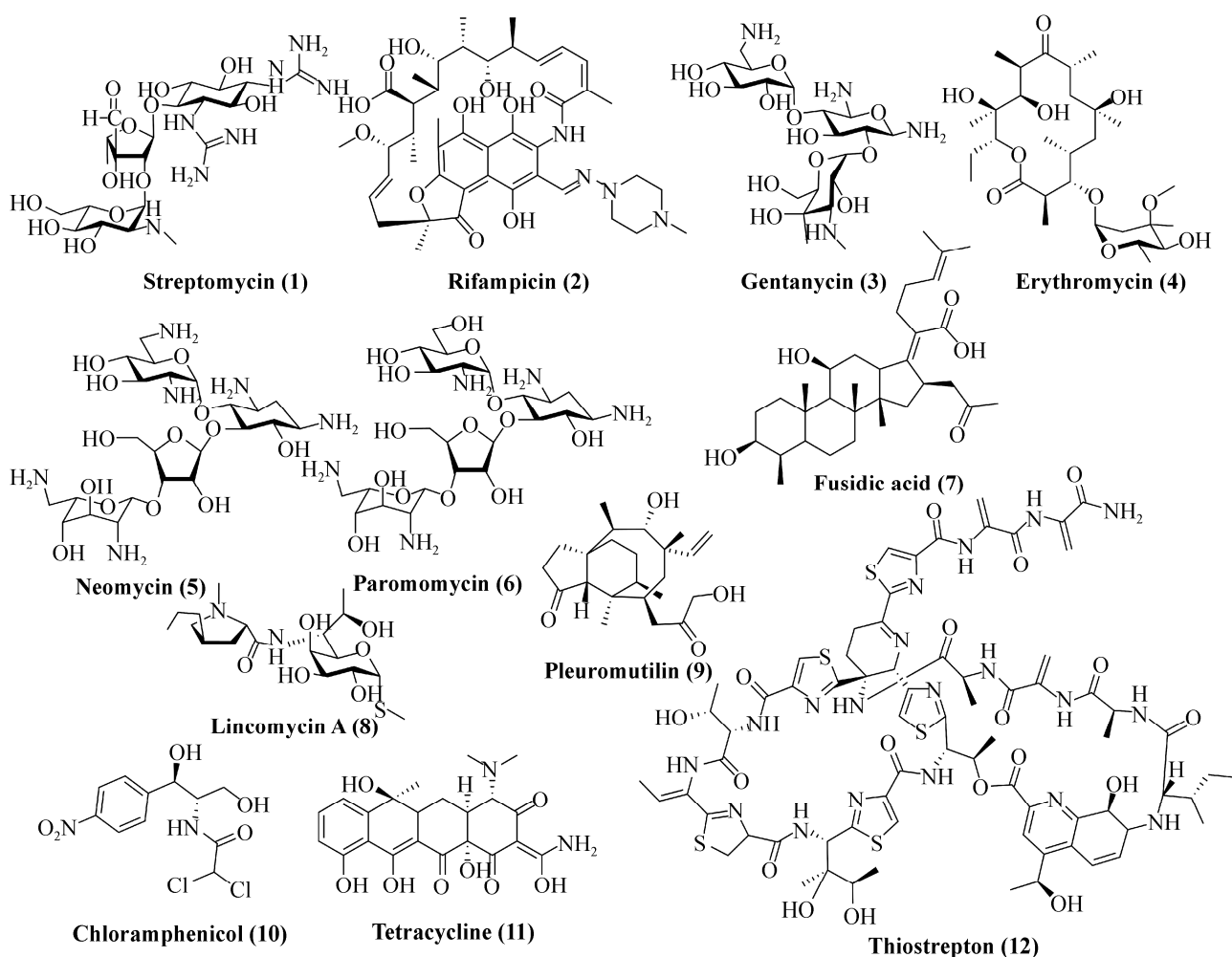


图1 核糖体工程常用抗生素的化学结构<sup>[13-19]</sup>

Figure 1 Structures of the common antibiotics used in ribosomal engineering<sup>[13-19]</sup>.

立全面的菌株遗传操作体系，且可作用于几乎所有放线菌菌株；同时相较于紫外诱变、等离子体诱变和常规化学诱变剂处理等传统方法，其目标更加明确，突变效率高且突变效果好，更能够精准地激活放线菌的次级代谢生物合成途径，实现放线菌次级代谢产物的针对性开发<sup>[16-19]</sup>。作为一种简便高效的新型放线菌次级代谢产物定向发掘方法，核糖体工程具有重要的研究开发价值，且已广泛应用于包括基因组挖掘 (genome mining) 在内的放线菌新颖活性次级代谢产物的发掘与生产优化<sup>[19-21]</sup>。鉴于此，本

文着重从放线菌核糖体工程的起源、发展与应用方面进行系统归纳与总结，以期核糖体工程的后续发展及放线菌源活性次级代谢产物的发掘提供详细借鉴和全面参考。

## 1 放线菌核糖体工程的建立

核糖体工程本质上是一种抗生素胁迫目标菌株发生定向突变的微生物育种技术<sup>[13-21]</sup>。该技术源于微生物分子遗传与育种研究的深化与拓展，特别是对细菌严谨反应 (stringent response) 机理的深入研究<sup>[13-15,19]</sup>，其创建过程

大致经历了 3 个阶段。

### 1.1 技术的萌芽——放线菌严谨反应激活自身次级代谢现象的发现

严谨反应是细菌面临氨基酸营养匮乏时的一种环境适应性基因表达调控机制，通过产生一类高度磷酸化的鸟苷四磷酸 (ppGpp) 或鸟苷五磷酸 (pppGpp) 信号分子 (薄层层析中呈明显斑点, 也称为魔斑), 并作用于自身的 RNA 聚合酶, 从全局水平调控菌株的基因表达<sup>[22]</sup>。Ochi 首次发现放线菌种的次级代谢产物的生物合成与胞内 ppGpp 的合成及含量水平呈正相关, 当胞内的 ppGpp 合成受阻或含量骤降时, 抗生素产量也同步剧减<sup>[14]</sup>。这个划时代意义的发现首次表明放线菌严谨反应极有可能正调控菌株的次级代谢。

后续研究发现以 actinorhodin/Act 为代表的多种次级代谢产物的生产, 依赖于菌株合成 ppGpp, 且相关的 ppGpp 合成缺陷突变菌株也可以通过回补关键基因以修复并生成 ppGpp, 进而最终重启次级代谢产物的生物合成。这些研究结果进一步地证明了严谨反应可有效激活放线菌的次级代谢, 而 ppGpp 则是激活通路中的信号分子 (图 2)<sup>[14]</sup>。

### 1.2 技术的初创——基于放线菌严谨反应机制的激活用抗生素筛选

ppGpp 的作用靶点位于细菌 RNA 聚合酶的  $\beta$  亚基, 且该位点又紧邻 Rifampicin/Rif (2) 结合区, 而这个 Rif 结合区域中的 Rif-cluser I 又包含在 RNA 聚合酶的活性位点中<sup>[23]</sup>。因此 Ochi 研究团队选择利用 Rif 处理目标放线菌菌株, 诱使菌株产生相应的抗性突变, 因该突变位点紧邻 ppGpp 的靶点且能够产生相同的次级代谢激活效应, 从而以一种“迂回”方式实现了严谨反应对放线菌次级代谢的调控 (图 3)<sup>[14]</sup>。抗性诱变所采用的 Rif 可添加于各类微生物发酵培养基中, 且用量可控, 诱导产生的抗性突变也可稳定遗传。这种新颖的育种策略, 不仅达到了严谨反应调控次级代谢的相同效果, 而且避免苛刻培养条件带来的生长限制, 在放线菌的次级代谢产物发掘中应用价值巨大。

此后 Ochi 进一步发现放线菌中编码核糖体蛋白 S12 的基因 *rpsL* 因 streptomycin/Str 等抗生素诱导而产生的一系列抗性突变的同时, 也同样激活了菌株中的次级代谢<sup>[14]</sup>。利用上述抗生素诱导菌株产生相应的基因突变后, 能够在获得抗生素抗性的基础上有效激活并提升自身的

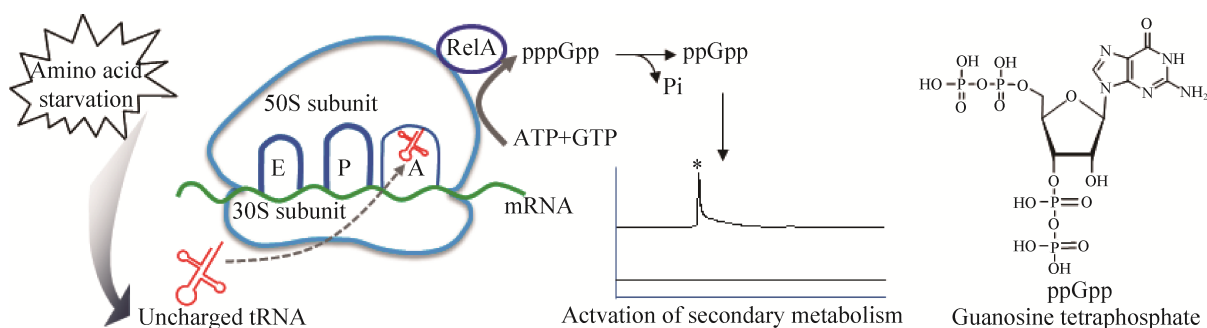


图 2 严谨反应激活放线菌次级代谢的机制示意图<sup>[14]</sup>

Figure 2 Mechanism of the stringent-response-activated secondary metabolism in actinomycetes<sup>[14]</sup>.

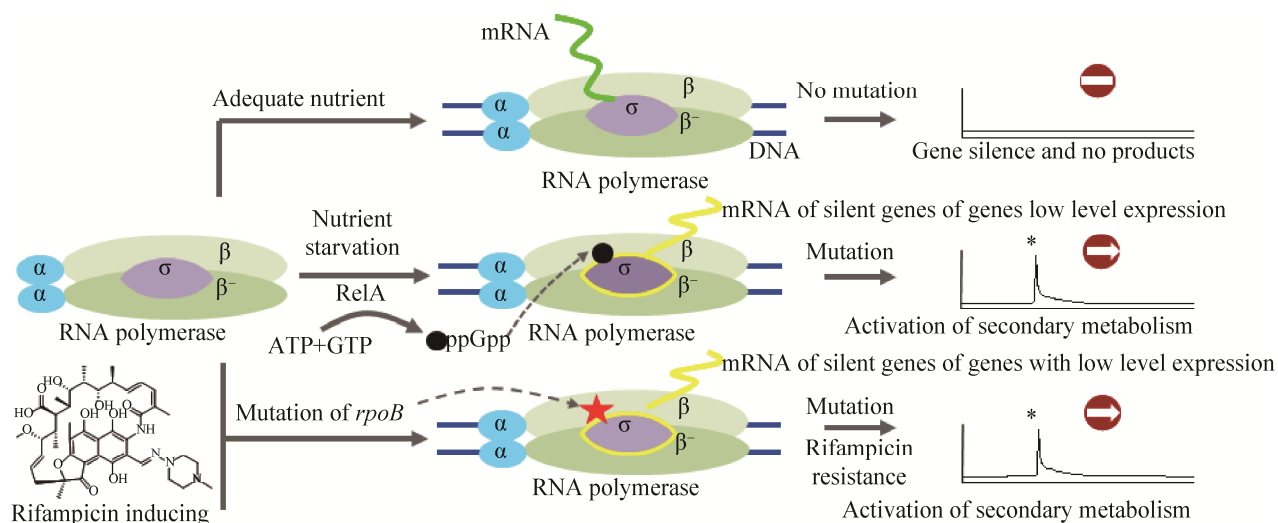


图3 Rifampicin 和 ppGpp 诱导激活放线菌次级代谢的机制示意图<sup>[14]</sup>

Figure 3 Mechanism of the rifampicin- and ppGpp-activated secondary metabolism in actinomycetes<sup>[14]</sup>.

次级代谢能力而获得更多目标产物,且该方法相比传统诱变育种,作用靶点更加明确,可操作性更强,在放线菌次级代谢产物开发中已有良好应用。因相关研究起源于探究放线菌严谨反应,进而筛选出 Rif;并且以 Str 为代表的其他抗生素均是以核糖体各元件为作用靶点,于是 Ochi 等将该技术体系命名为 ribosome engineering<sup>[13-16,19]</sup>。

### 1.3 技术的成熟——抗生素抗性诱变机制的逐步揭示及新颖活性产物的发掘

确立技术体系后, Ochi 团队进一步解析了尚未明确的抗性突变的机制,并发现当 *rpsL* 基因突变后引起核糖体蛋白 S12 上 88 位的 Lys 突变为 Glu (K88E) 时,参与构成的 70S 核糖体的结构更加稳定,能够耐受氨基酸营养匮乏和低镁离子浓度的环境胁迫,同时也增强了菌体进入生长后期时被激活次级代谢途径中功能蛋白的表达合成,从而显著提升了目标产物的生产效率<sup>[14,24-25]</sup>。此外 K88E 突变也能提高翻译因子 RRF (ribosome recycling factor) 的含量并最终

促进次级代谢产物生物合成途径中的功能蛋白的表达与合成 (图 4)<sup>[14]</sup>。

此外 Ochi 团队证实 Str 诱导放线菌往往会产一类弱抗性 (low-level) 突变株,这类突变频率 ( $10^{-5}$ – $10^{-7}$ ) 相对较高,并导致菌株自身的 16S rRNA 甲基转移酶的编码基因 *rsmG* 发生了突变而失活,而 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 合成酶 MetK 的活性则显著增强并提升胞内的 SAM 的含量<sup>[24]</sup>。SAM 是常见的酶促甲基化反应的甲基供体,同样也是一类启动放线菌次级代谢的信号分子,当胞内 SAM 含量上升时,一些次级代谢产物的生物合成可以被有效激活<sup>[14,19]</sup>。

依据上述机制模型,一系列以细菌核糖体为靶标的抗生素被陆续发掘应用于核糖体工程,如同为氨基糖苷类抗生素,作用于细菌核糖体 30S 小亚基的 gentamicin/Gen (3)、paromomycin/Par (6)和 neomycin/Neo (5);作用于细菌核糖体 50S 大亚基的大环内酯类的 erythromycin/Ery (4)、林可酰胺类的 lincomycin/Lin (8),以及

tetracycline (11)、chloramphenicol/Chlo (10) 和二萜烯类的 pleuromutilin/Ple (9); 作用于翻译延伸因子 EF-G 的 thiostrepton/Thi (12) 和 fusidic acid/Fus (7) 等 (图 1)<sup>[14,16,19]</sup>。

随后 Ochi 研究团队选取 Rif、Str、Gen, 首次成功发掘了 1 组 8 个新颖抗菌环肽分子 piperidamycin A-F/Pip A-F (14), 并证明突变后的 RNA 聚合酶的启动子序列识别特异性发生了变化, 能够有效识别原先沉默的生物合成基因 (簇) 的启动子, 并激活表达而高效合成产物 Pip<sup>[15]</sup>。相关分子机制的揭示, 表明核糖体工程可从分子水平上“唤醒”潜在的基因资源并激活生产新颖产物稳定生产。这些新产物的发现与新机制的揭示标志着 Ochi 等研究开发的核糖体工程日趋成熟, 既可用于已知活性产物生产效价的提升, 同时也能够用于未知产物的探索发掘, 应用价值巨大且前景广阔!

## 2 放线菌核糖体工程的应用

核糖体工程的主要技术路线为, 通过明确目标菌株可用抗生素的最小抑制浓度 (minimum inhibition concentration, MIC), 再用不同 MIC 比率的抗性平板培养目标菌株, 获得具有相应抗生素抗性的突变菌株 (突变率约为  $10^{-9}$ – $10^{-10}$ ), 并用于后续的产物分析与分离鉴定<sup>[13-16,19]</sup>。该方法简便易行, 除选取抗生素对应的天然抗性菌株外, 可应用于几乎所有放线菌菌株, 且无需全面系统的菌株遗传操作体系支撑。因而核糖体工程广泛应用于放线菌源次级代谢产物的优化增产和新颖化合物的发掘 (表 1, 图 5), 并逐步形成了利用单一抗生素诱导 (单位点突变和多位点突变) 或多种抗生素组合诱导的两种基本技术体系<sup>[14]</sup>。

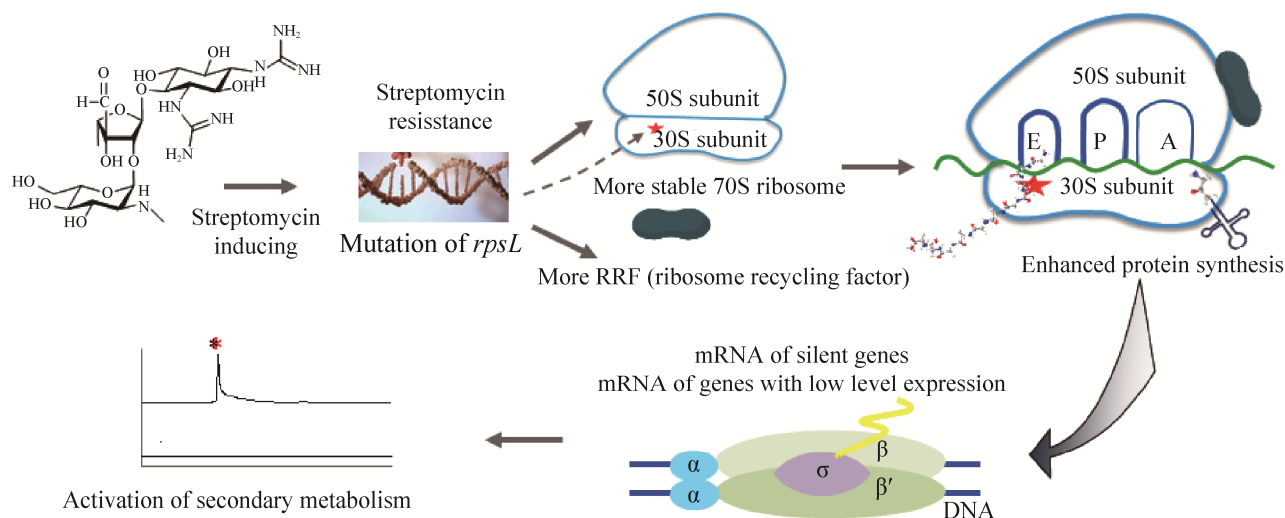


图 4 Streptomycin 诱导激活具有显著抗性的放线菌的次级代谢的机制示意图<sup>[14]</sup>

Figure 4 Mechanism of the streptomycin-activated secondary metabolism in streptomycin-resistant actinomycetes<sup>[14]</sup>.

## 2.1 利用单一抗生素诱导激活放线菌生产新颖活性化合物和增产目标产物

在放线菌核糖体工程的应用中,已有 10 余种抗生素得以推广应用,而其中尤以 Rif 和 Str 应用最广,也是机制研究最为透彻的两种。

### 2.1.1 Rifampicin

Rif 诱导放线菌产生的最常见突变位于 *rpoB* 编码的 RNA 聚合酶 $\beta$ -亚基保守的第 437 位的 His/H,该位点容易突变为 Tyr/Y、Asp/D、Arg 和 Leu/L 等(表 1),且该位点的突变极易激活菌株中的沉默基因簇而发掘新颖代谢产物。例如: Hosaka 等诱导获取的苯胺紫链霉菌(*Streptomyces mauvecolor*)中 *rpoB* H437L 和 H437D 突变菌株能生产 Pip 类代谢产物<sup>[15]</sup>; Thong 等从 1 株具有 *rpoB* H437D 突变的链霉菌中分离鉴定一类新型 methylbenzene-containing polyketides (**17**),又从另 1 株具有 *rpoB* H437Y 突变的链霉菌中获取了一类新型 isoindolinone-containing

tetracyclic polyketides: isoindolinomycin (**18**) 与 lactonamycin (**19**)<sup>[25-26]</sup>。此外该位点的突变也能够显著提升菌株目标产物的生产效率,例如:

*S. antibioticus* 中的 *rpoB* H437R 突变能够显著提升 actinomycin D/AcnD (**28**) 的产量 4–10 倍,而糖多孢红霉菌(*Saccharopolyspora erythraea*)中出现同样突变时, Ery 的产量显著提升了 3 倍,达到了 (0.163±0.034) g/L<sup>[27]</sup>;此外 *S. diastatochromogenes* 中 toyocamycin/Toy (**24**) 则在菌株获得 *rpoB* H437Y 突变后产量提升 3.5 倍,达到 0.68 g/L<sup>[28]</sup>。

除常见的 437 位 His 易发生突变外,近年来还发现 Rif 还容易诱使 *rpoB* 的 433 位与 442 位的 Ser、422 位的 Leu、424 位的 Gln/Q 以及 427 位的 Asp 和 440 位的 Arg 发生相应突变,从而激活沉默的次级代谢途径。例如: *S. lividns* 中的 *rpoB* 的 S433L、S433P 以及 R440C (Cys) 等突变都能激活原先培养条件下沉默的 Act 生物合

表 1 核糖体工程应用于放线菌的实例汇总 (截至 2021 年 2 月)

Table 1 Summary of the application of ribosomal engineering in actinomycetes (Up to 02. 2021)

| Antibiotics                | Strains              | Mutations                                              | Significant change*                 | Time | References |
|----------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|------|------------|
| Actinorhodin ( <b>13</b> ) | <i>S. coelicolor</i> | Str/ <i>rpsL</i> (K88E)                                |                                     | 1996 | [29]       |
|                            |                      | Str/ <i>rpsL</i> (K88E, K88R)                          | 15 folds, 2.8 g/L                   | 1997 | [30-31]    |
|                            |                      | Par/ <i>rpsL</i> (P91S)                                | 5–21 folds, 2.1 g/L                 | 2000 | [32]       |
|                            |                      | Str/ <i>rpsL</i> (K88E), Gen, Rif/ <i>rpoB</i> (H437Y) | 48 folds, 6.88 g/L                  | 2001 | [33]       |
|                            |                      | Rif/ <i>rpoB</i> (R440H, Q424L)                        | >93 folds, 2.79 g/L                 | 2002 | [34]       |
|                            |                      | Str/ <i>rpsL</i> (K88E)                                |                                     | 2006 | [35]       |
|                            |                      | Str/ <i>rsmG</i> deletion                              |                                     | 2007 | [36]       |
|                            |                      | Str, Gen, Rif, Par, Gnt, Fus, Tsp, Lin                 | 180 folds, 1.63 g/L                 | 2008 | [37]       |
|                            |                      | Str/ <i>rpsL</i> (K88E, R86P)                          | 55–106 folds, (0.133 8±0.007 0) g/L | 2009 | [38]       |
|                            |                      | Str/ <i>rpsL</i> (K88E-GI92), Par                      |                                     | 2009 | [39]       |
|                            |                      | Ery                                                    |                                     | 2012 | [40]       |
|                            |                      | Rif/ <i>rpoB</i> (S433L)                               | 42.0–55.5 folds, (28.7±1.3) g/L     | 2013 | [27]       |

(待续)



(续表 1)

|                                           |                                    |                                        |                                                        |           |
|-------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------|
|                                           | <i>S. lividns</i>                  | Str/ <i>rpsL</i> (K88E)                |                                                        | 1996 [29] |
|                                           |                                    | Rif/ <i>rpoB</i> (R440C)               |                                                        | 2002 [41] |
|                                           |                                    | Rif/ <i>rpoB</i> (S433L, S433P)        |                                                        | 2002 [42] |
|                                           |                                    | Str/ <i>rpsL</i> (L90K, R94G)          |                                                        | 2003 [43] |
|                                           |                                    | Str/ <i>rsmG</i> mutation              |                                                        | 2007 [36] |
|                                           |                                    | Ery                                    | 6–8 folds, 3 g/L                                       | 2012 [40] |
| Actinorhodin related compounds            | <i>S. coelicolor</i>               | Rif                                    | <b>New compounds not detected in WT strains</b>        | 2013 [27] |
| Actinomycin D (28)                        | <i>S. antibioticus</i>             | Str                                    | 5.2 folds, 0.063 g/L                                   | 1998 [44] |
|                                           |                                    | Gen                                    | 4.1 folds, 0.05 g/L                                    | 2008 [45] |
|                                           |                                    | Str/ <i>rpsL</i> (K88R)                | 7–10 folds, (0.047 1±0.004 4) g/L                      | 2009 [38] |
|                                           |                                    | Rif/ <i>rpoB</i> (H437R)               | 5–11 folds, (0.086±0.016) g/L                          | 2013 [27] |
|                                           | <i>S. parvulus</i>                 | Str/ <i>rpsL</i> (K88R)                | 2–10 folds, (0.032 8±0.008 6) g/L                      | 2009 [38] |
|                                           |                                    | Rif/ <i>rpoB</i> (D427V)               | 1.0–2.2 folds, (0.010±0.001) g/L                       | 2013 [27] |
| Avermectin (23)                           | <i>S. avermitilis</i>              | <i>frr</i> overexpression              | 3.0–3.7 folds, >0.8 g/L                                | 2010 [46] |
| Avilamycin                                | <i>S. viridochromogenes</i>        | Str/ <i>rpsL</i> (K43N)                | 36.8 folds, 1.4 g/L                                    | 2013 [47] |
| A21978C                                   | <i>S. roseosporus</i>              | Str/ <i>rpsL</i> (K43N)                | ( <sup>60</sup> Co g-ray, GS) 2.2 folds, >0.12 g/L (i) | 2018 [48] |
| Caerulomycin A (20)                       | <i>Actinoalloteichus</i> sp.       | Gen                                    | 14.6 folds, (0.011 4±0.008 0) g/L (UV, RSM, ii)        | 2020 [49] |
| Chloramphenicol (10)                      | <i>S. coelicolor</i> (HE)          | Str, Rif                               | 20–40 folds                                            | 2011 [50] |
| Congocidine                               | <i>S. coelicolor</i> (HE)          | Str, Rif                               | 20–40 folds                                            | 2011 [50] |
| 2-aminobenzamide derivatives              | <i>Streptomyces</i> sp.            | Rif                                    | <b>New compounds</b>                                   | 2019 [51] |
| Daptomycin (25)                           | <i>S. roseosporus</i>              | Ple/ <i>rplC</i> (G152V)               | 1.3 folds, >0.8 g/L                                    | 2013 [52] |
|                                           |                                    | Par, Rif, Neo, Gen                     | 4 folds, 0.324 g/L (GS)                                | 2018 [53] |
| Erythromycin (4)                          | <i>Saccharopolyspora erythraea</i> | Str/ <i>rpsL</i> (K43N)                | 2 folds, 0.15 g/L                                      | 2009 [38] |
|                                           |                                    | Rif/ <i>rpoB</i> (H437R)               | 4 folds, (0.163±0.034) g/L                             | 2013 [27] |
| Formycin A (21)                           | <i>S. lavendulae</i>               | Rif/ <i>rpoB</i> (R440H)               | 2.4–4.6 folds, (0.055±0.014) g/L                       | 2013 [27] |
| Fredericamycin A (20)                     | <i>S. chattanoogaensis</i>         | Str                                    | 26 folds, 0.26 g/L                                     | 1998 [44] |
|                                           | <i>S. somaliensis</i>              | Rif/ <i>rpoB</i> (R444H)               | 3 folds, (0.679 5±0.015 8) g/L (RSM)                   | 2015 [54] |
| GE2270                                    | <i>Planobispora rosea</i>          | Str, Gen, Rif                          | 1.8 folds                                              | 2006 [55] |
| Inducamides A-C (16)                      | <i>Streptomyces</i> sp.            | Rif/ <i>rpoB</i> (S442F)               | <b>New compounds</b>                                   | 2014 [56] |
| Isoindolinomycin (18) & Lactonamycin (19) | <i>Streptomyces</i> sp.            | Rif/ <i>rpoB</i> (H437Y)               | <b>New compounds</b>                                   | 2018 [25] |
| Methylbenzene-containing polyketides (17) | <i>Streptomyces</i> sp.            | Rif/ <i>rpoB</i> (H437D)               | <b>New compounds</b>                                   | 2016 [26] |
| Milbemycin                                | <i>S. bingchenggensis</i>          | Str                                    | 1.8 folds, 1.45 g/L (UV, CM)                           | 2009 [57] |
| Mutaxanthenes (15)                        | <i>Nocardiopsis</i> sp.            | Str, Rif/ <i>rpoB</i> (G3280A in gene) | <b>New compounds</b>                                   | 2013 [58] |

(待续)



(续表 1)

|                              |                                 |                                                                    |                                                                            |           |
|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Norvancomycin                | <i>Amycolatopsis orientalis</i> | Str, Rif                                                           | 1.4 folds ( <b>HEB</b> )                                                   | 2006 [59] |
| Nosiheptide ( <b>27</b> )    | <i>S. actuosus</i>              | Str/ <i>rpsL</i> (K88R)                                            | 9.2 folds, 1.54 g/L<br>( <sup>60</sup> Co g-ray, <b>GS</b> , <b>LiCl</b> ) | 2014 [60] |
| Oligomycin ( <b>34</b> )     | <i>S. avermitilis</i>           | Str/ <i>rpsL</i> (K43M)                                            | 20–40 folds,<br>1.064 g/L                                                  | 2009 [38] |
| Piperidamycins ( <b>14</b> ) | <i>S. mauvecolor</i>            | Str/ <i>rpsL</i> (K88R), Gen,<br>Rif/ <i>rpoB</i> (H437D or H437L) | <b>New compounds</b>                                                       | 2009 [15] |
| Rabelomycin                  | <i>S. dengpaensis</i>           | Str                                                                | 7.8 folds,<br>(0.015 7 ± 0.000 5) g/L<br>( <b>UV</b> , <b>F</b> )          | 2020 [61] |
| Rimocidin ( <b>33</b> )      | <i>S. rimosus</i>               | Gen, Rif                                                           | 1.6 folds, 0.673 1 g/L                                                     | 2019 [62] |
| Saquayamycin B1              | <i>S. dengpaensis</i>           | Str                                                                | 11.4 folds,<br>(0.039 9 ± 0.000 5) g/L<br>( <b>UV</b> , <b>F</b> )         | 2020 [61] |
| Salinomycin ( <b>29</b> )    | <i>S. albus</i>                 | Str/ <i>rpsL</i> (K88R), Gen, Rif                                  | 2.3 folds, 23 g/L                                                          | 2003 [63] |
|                              |                                 | Tet, Chlo                                                          | 2 folds, 34.712 g/L<br>( <b>ARTP</b> )                                     | 2019 [64] |
|                              |                                 | Str/ <i>rsmG</i> mutation                                          | ≈2 folds, >0.2 g/L                                                         | 2019 [65] |
|                              |                                 | Str/ <i>rsmG</i> mutation                                          | 5.1 folds, >0.4 g/L ( <b>iii</b> )                                         | 2020 [66] |
| Sinefungin                   | <i>S. incarnatus</i>            | Rif/ <i>rpoB</i> (D447G)                                           | 35 folds, >0.05 g/L ( <b>iv</b> )                                          | 2010 [67] |
| Streptomycin ( <b>1</b> )    | <i>S. griseus</i>               | Gen                                                                | 10 folds, 0.3 g/L                                                          | 2008 [45] |
|                              |                                 | Rif/ <i>rpoB</i> (Q424K)                                           | 2.4–6.0 folds,<br>(0.178±0.027) g/L                                        | 2013 [27] |
| Tiancimycin A ( <b>31</b> )  | <i>Streptomyces</i> sp.         | Rif/ <i>rpoB</i> (L422P)                                           | 40 folds,<br>(0.022 5±0.003 1) g/L                                         | 2018 [68] |
|                              |                                 | Str/ <i>rpsL</i> (K43N)                                            | 45 folds,<br>(0.013 7±0.000 3) g/L                                         | 2019 [69] |
|                              |                                 | Gen, Str/ <i>rsmG</i> deletion                                     | 1.6 folds,<br>(0.002 08±0.000 40) g/L<br>( <b>GS</b> )                     | 2020 [70] |
| Tiancimycin D ( <b>32</b> )  | <i>Streptomyces</i> sp.         | Str/ <i>rpsL</i> (K43N)                                            | 109 folds,<br>(0.019 2±0.000 4) g/L                                        | 2019 [69] |
| Toyocamycin ( <b>24</b> )    | <i>S. diastatochromogenes</i>   | <i>frr</i> overexpression                                          | 1.5 folds, >0.6 g/L                                                        | 2014 [71] |
|                              |                                 | Rif/ <i>rpoB</i> (H437Y)                                           | 4.5 folds, 0.68 g/L                                                        | 2016 [28] |
| Vancomycin ( <b>26</b> )     | <i>A. orientalis</i>            | Rif/ <i>rpoB</i> (S442Y)                                           | 2.6–3.4 folds<br>(0.270±0.017) g/L                                         | 2013 [27] |
| Virginiamycin                | <i>S. virginiae</i>             | Str                                                                | 11.6 folds, 0.251 g/L<br>( <b>UV</b> , <b>MW</b> , <b>GS</b> )             | 2018 [72] |
| 6'-deoxy-bleomycin Z         | <i>S. flavoviridis</i>          | Str, Gen, Rif                                                      | 7 folds, 0.07 g/L ( <b>UV</b> )                                            | 2018 [73] |

**ARTP**: atmospheric and room temperature plasma; **CM**: chemical mutation; **F**: fermentation optimization; **GS**: genome shuffling; **HE**: heterologous expression; **HEB**: hard electron beam; **MW**: microwave mutagenesis; **RSM**: response surface methodology; **UV**: ultraviolet mutagenesis; **i**: reporter-guided selection system; **ii**: cofactor engineering; **iii**: complementation with a mini-gene cluster; **iv**: rest cell system. \*: **Significant change** including the titer increasing folds, the finally highest titer and other improvement strategies. Ery, Fus, Gen, Gnt, Kan, Lin, Par, Rif, Str, and Thi indicate resistance to erythromycin, fusidic acid, gentamicin, geneticin, kanamycin, lincomycin, paromomycin, rifampicin, streptomycin, and thiostrepton, respectively. *rpsL* and *rpoB* indicate the genes coding for the ribosomal protein S12 and the RNA polymerase  $\beta$ -subunit, respectively.

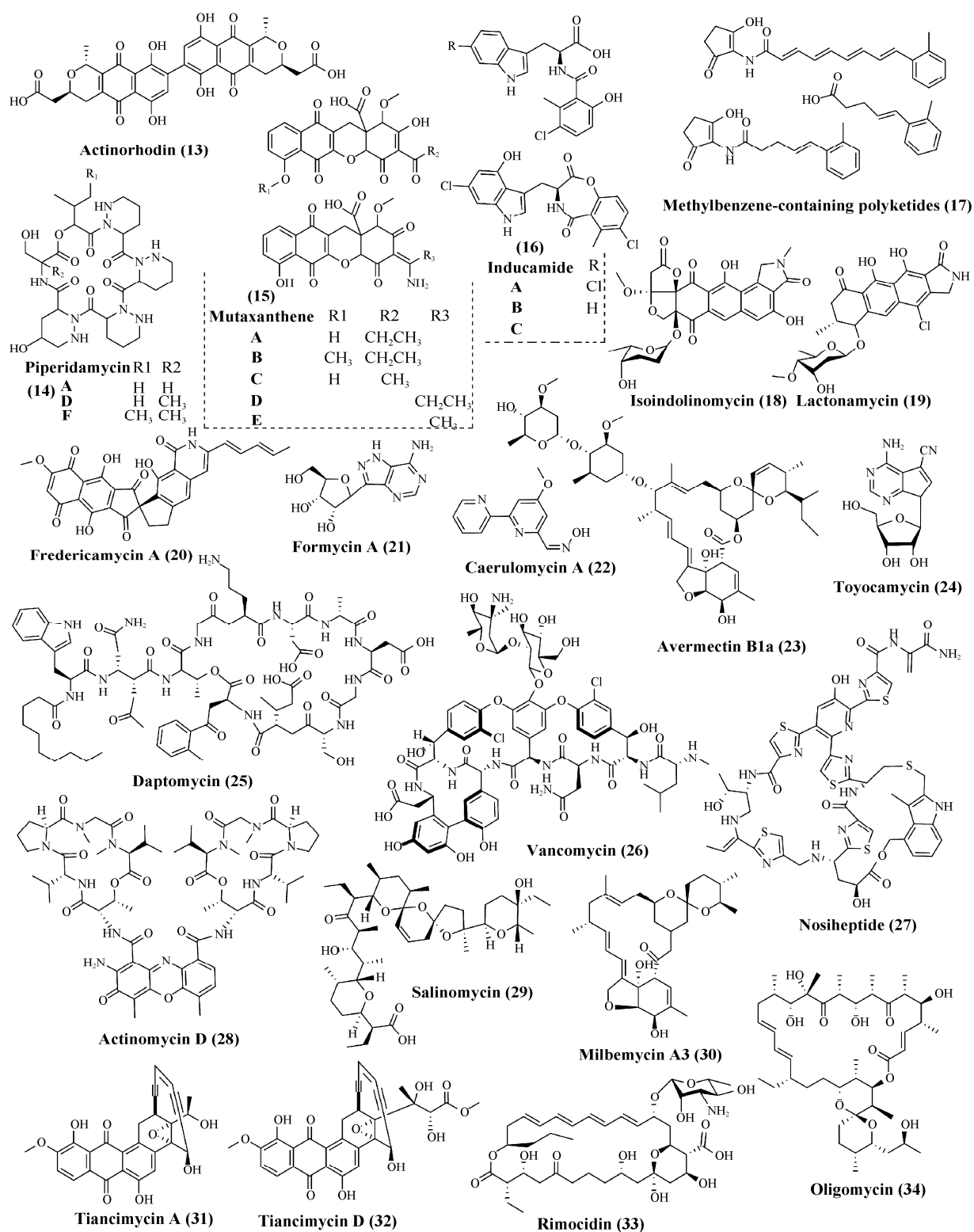


图 5 经由核糖体工程发掘或优化产量的放线菌源活性次级代谢产物<sup>[13-19]</sup>

Figure 5 Structures of the actinomycetic bioactive secondary metabolites discovered or developed by ribosomal engineering<sup>[13-19]</sup>.

成途径<sup>[41-42]</sup>；尤其 Hosaka 等筛选获得的 *rpoB* S442W (Trp) 突变株也同上述其他 Rif 抗性突变株一样能够生产 Pip 类化合物<sup>[15]</sup>，而 Fu 等诱导获得的具有 *rpoB* S442F (Phe) 突变的链霉菌则被激活生产一类新骨架结构分子 *inducamides* A-C (**16**)<sup>[56]</sup>。此外上述位点的突变，也能显著提升菌株的产物生产效率，例如 *S. coelicolor* 中 *rpoB* R440H 和 Q424L 突变将菌株中 Act 的生产效价提高至原效价的 93 倍以上，达到 2.79 g/L 水平，而另一个 *rpoB* S443L 突变则将菌株的 Act 的生产效价提高到原来的 42–55.5 倍，高达 (28.7±1.3) g/L<sup>[34,27]</sup>；具有良好生物学活性的烯二炔分子 *tiancimycin* A/Tia A (**31**) 的生产菌经诱导产生 *rpoB* L422P 突变后产量提升约为野生型产量的 40 倍<sup>[68]</sup>。此外 Acn D 生产突变株菌 *S. parvulus* *rpoB* D427V (Val)、Formycin A 生产突变株菌 *S. lavendulae* *rpoB* R440H 和 Vancomycin (**26**) 生产突变株东方拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis orientalis*) *rpoB* S442Y 在获得 Rif 抗性的同时，相关产物的产量均有 1–5 倍左右的增加<sup>[27]</sup>。除上述常见的保守位点突变外，*rpoB* 的一些菌株特异性突变也能够有效激活菌株潜在产物的生物合成途径，如 *fredericamycin* A/Fre A (**20**) 因菌株获得了 *rpoB* R444H 抗性突变后得以激活生产<sup>[44]</sup>。这些独特的突变位点的揭示及相关应用实例充分表明 Rif 是一个高效、效应广泛且显著的核糖体工程可用抗生素。

### 2.1.2 Streptomycin

Str 诱导放线菌产生的突变更集中，常见于 *rpsL* 编码的核糖体蛋白 S12 的 2 个保守突变位点：第 88 位和第 43 位的 Lys。常见的突变形式为 K88E、K88R (Arg) 和 K43N (Asn)。例如：*S. coelicolor* 和 *S. lividns* 中 *rpsL* K88E 突变能够激活原先培养下沉默的 Act 生物合成<sup>[29,35]</sup>；而具有 *rpsL* K88E、K88R 双位点突变的

*S. coelicolor* 菌株中 Act 的生产效价则显著提升了 14 倍，达到 2.8 g/L 的水平<sup>[30-31]</sup>；而带有 *rpsL* K88R 突变的 *S. antibioticus* 和 *S. parvulus* 菌株则能分别将 Acn D 的生产效价提升为出发菌株的 7–10 倍和 2–10 倍<sup>[38]</sup>。此外具有 *rpsL* K43N 突变的放线菌菌株，代谢产物生产提升同样显著，例如：具有上述突变的 Tia 生产菌中 Tia A、Tia D 的产率分别较出发菌株提升了 45 倍和 109 倍；而 *S. erythraea* 中出现同样突变时，Ery 的产量提升了 1 倍，达到了 0.15 g/L<sup>[38,69]</sup>。

除上述常见的保守突变外，经 Str 诱导的放线菌往往也能够产生一些独特的效应突变，例如：具有罕见的 *rpsL* L90K、R94G 突变的 *S. lividns* 同样可以激活原培养条件下沉默的 Act 的生物合成<sup>[43]</sup>；具有 *rpsL* K43M (Met) 突变的 *S. avermitilis* 能够有效提升其 *oligomycin* (**34**) 的产量至出发菌株的 20–40 倍，达到 1 g/L 以上<sup>[38]</sup>。此外 Str 还会诱发放线菌中的 *rsmG* 基因发生突变，从而产生一类弱抗性突变株。具有这类突变的 *S. coelicolor* 和 *S. lividns* 同样能够激活处于沉默状态的 Act 生物合成基因 (簇)<sup>[36]</sup>；而当 *rsmG* 基因发生突变时 *S. albus* 也能够提升其 *salinomycin*/Sal (**29**) 产量达到 0.2 g/L 以上的水平<sup>[65]</sup>。综上所述，Str 同样也是一种效应显著的核糖体工程用抗生素。

### 2.1.3 Gentamicin 及其他抗生素

Gen 是一类诱导机制及突变效应尚不明确的核糖体工程用抗生素，但作为常用抗生素之一，其对放线菌次级代谢的激活与提升效果同样明显，例如：Hosaka 等同样获取了具有单一 Gen<sup>r</sup> 抗性的 Pip 生产菌株<sup>[15]</sup>；Hu 等利用 Gen 处理 *S. antibioticus* 和 *S. griseus* 后筛选获得了 Acn D 和 Str 的高产菌株<sup>[45]</sup>。

除上述 3 种常见抗生素外，在 Act 的生物

合成研究中 Ochi 研究团队发现利用 Par 诱导 *S. coelicolor* 产生 *rpsL* (Pro) P91S (Ser) 突变能够有效提升 Act 产率至出发菌株的 5–21 倍, 产量最高可达 2.1 g/L<sup>[32]</sup>; 而利用 Ery 诱导 *S. coelicolor* 可激活出发菌株中沉默的 Act 生物合成基因簇, 而诱导 *S. lividns* 则有效提升出发菌株中 Act 的生产效价 5–7 倍, 最高达到 3 g/L 水平<sup>[40]</sup>; 此外, Li 等针对 daptomycin/Dap (25) 生产菌株 *S. roseosporus*, 首次选用 Ple 进行诱导处理, 在获得独特的 *rplC* (Gly) G152V 抗性突变后, Dap 产率提升为出发菌株的 1.3 倍, 达到 0.8 g/L 以上水平<sup>[52]</sup>。上述工作表明, 核糖体工作技术体系可用抗生素类型广泛, 通过优选抗生素丰富其技术体系的同时, 也能够获取生产多种不同活性产物的优良工程菌株。

## 2.2 利用抗生素组合诱导激活放线菌生产新颖活性化合物和增产目标产物

通过选择多种效用抗生素串联组合获取的双抗、多抗突变菌株同样也能够生产多种新颖活性化合物并实现目标产物的高效增产, 而且往往这类菌株中增产效率数倍于其单一抗性突变株。例如: Derewacz 筛选获得的含有罕见 *rpoB* 突变位点 (G3280A 基因突变) 的 Rif<sup>r</sup>、Str<sup>r</sup> 双抗性突变 *Nocardiosis* 菌株则能够生产一类含氧杂蒽骨架的新的 II 型聚酮 mutaxanthenes<sup>[58]</sup>。Wang 等首次使用了 8 种抗生素处理 *S. coelicolor* 菌株, 获取的具有 8 种抗性的突变菌株中 Act 产量创纪录地提升为出发菌的 180 倍<sup>[37]</sup>; 而具有 Rif<sup>r</sup>、Str<sup>r</sup>、Gen<sup>r</sup> 三抗性的 GE2270 与 Sal 生产菌株, 其目标产物的产量均有显著提升<sup>[55]</sup>。除了原始生产菌株外, 利用核糖体工程构建的 Rif<sup>r</sup>、Str<sup>r</sup> 双抗性 *S. coelicolor* M1154 突变菌株, 异源表达生产 Chlo 与 congocidine, 产量均提升 20–40 倍<sup>[50]</sup>。

基于多重抗生素的核糖体工程往往能够产

生综合诱变效应与事半功倍的诱导效果。这类抗生素组合策略已全面普及, 尤其所获得的突变菌株可作为下游其他生物学技术处理的出发菌株, 促进放线菌次级代谢产物的深入发掘。

## 2.3 核糖体工程与其他生物学技术组合运用

核糖体工程具有良好的菌株适用性, 近年来研究人员将核糖体工程与其他菌株改良方法组合使用, 从而实现菌株次级代谢能力与目标产物生产效率的最优提升。与核糖体工程组合运用的菌株改良技术主要有传统的菌株诱变技术, 包括物理诱变 (紫外与射线) 及化学试剂诱变; 新型高效菌株诱变技术, 例如: DNA 重排 (shuffling) 和等离子诱变技术 (atmospheric and room temperature plasma, ARTP); 以及培养基优化和添加化学诱导剂等 (表 1)。且在实际工作中, 研究人员往往不会局限于使用 1–2 种改良方法, 而是尽可能多地组合各种可行的菌株诱变改良技术。

### 2.3.1 核糖体工程与传统菌株诱变技术的组合运用

传统诱变技术同样也具有良好的菌株适用性, 且操作简便, 通过与核糖体工程组合实用, 结合高效的筛选验证可以达到更大程度的菌株诱变效果, 从而获取更加优良的次级代谢激活优化菌株。其中实验室利用最为常规的是紫外诱变 (可利用超净工作台紫外灯) 结合核糖体工程诱导获取优良出发突变菌株, 基于最优的发酵培养条件, 可实现目标代谢产物的快速直接增产, 例如: Zhu 等筛选了菌株生产 6'-deoxy-bleomycin/Ble 的最优条件后, 再串联使用紫外诱变和核糖体工程改良相应的生产菌株, 最终将产物效价提升至出发菌株的 7 倍, 达到 0.07 g/L<sup>[73]</sup>; Li 等利用紫外诱变和核糖体工程诱导获取了具有 Str<sup>r</sup> 的 *S. dengpaensis* 类突

变株, 该突变株在优化培养条件下自身 angucycline 类抗生素: rabelomycin/Rab 与 saquayamycin B1/Saq B1 的产量分别提升为出发菌株的 7.8 倍与 11.4 倍<sup>[61]</sup>; 此外本研究团队针对激活生产 caerulomycin A/Cae A (22) 的具有 Gen<sup>r</sup> 突变的海洋 *Actinoalloteichus* sp. 类菌株进行紫外诱变, 将产物的效价进一步提升 85%, 并作为后续深入改良的出发菌株<sup>[49]</sup>。此外, 紫外诱变也可以和传统的化学诱变组合使用, 结合核糖体工程达到菌株的最佳优化, 例如: Wang 等利用紫外和化学试剂组合诱变具有 Str<sup>r</sup> 的来源于核糖体工程的 milbemycins (30) 生产菌株, 获取了 1 株具有 1.8 倍增长, 单个分子效价最高达到 1.45 g/L 的高产菌株<sup>[57]</sup>。

除常用的紫外诱变外, 利用其他射线诱变与核糖体工程相结合也能够获取优良的高产突变菌株, 例如: 针对生产 norvancomycin 的具有 Rif<sup>r</sup>、Str<sup>r</sup> 双抗性的核糖体工程诱导突变株, 王耀耀等进一步利用高能电子诱变 (hard electron beam) 进行处理, 并最终将产物的效价提升为原菌株的 1.4 倍<sup>[59]</sup>; Lv 等利用 <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray 诱变处理获取最优的 avilamycin/Avi 生产出发突变株, 用于核糖体工程开发<sup>[47]</sup>; 同样 Wang 等也利用 <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray 诱变, 并结合 LiCl 化学诱变获取了可用于后续核糖体工程开发的 nosiheptide/Nos (27) 生产优化突变株<sup>[60]</sup>; Tong 等为提升 *S. virginiae* 中 virginiamycin/Vir 的产率, 首先使用紫外诱变结合微波诱变, 获取用于随后核糖体工程与基因组重排 (genome shuffling) 处理的出发菌株<sup>[72]</sup>。可见传统的菌株诱变技术与核糖体工程可互补契合、效果显著。

### 2.3.2 核糖体工程与新型高效菌株诱变技术的组合运用

传统诱变技术虽然操作简便易行, 但存在严重的局限性, 而一些新型高通量菌株诱变技

术, 能够有效弥补传统技术中的突变率低、可操纵性有限等不足, 从而实现更高效的菌株诱变, 并与核糖体工程有机结合, 实现放线菌活性次级代谢产物的有利发掘。例如: 利用具有成本低、操作方便且诱变机制多样而又无环境污染损害的 ARTP 技术处理经核糖体工程诱导获得的具有 Tet<sup>r</sup>、Chlo<sup>r</sup> 双抗性的 *S. albus* 突变菌株, Zhang 等成功地筛选到 1 株 Sal 产量提升为原菌株 2 倍、效价高达 34.71 g/L 的高产菌株<sup>[64]</sup>。除上述 ARTP 外, 另一种基于 DNA 重排思路改进, 借助传统方法与细胞融合技术相结合, 对微生物细胞进行基因组重组的高效诱变技术基因组重排也被运用于组合核糖体工程, 从而实现放线菌次级代谢途径的发掘与优化。例如: Lv 与 Wang 分别将射线诱变获取的最优出发菌株用于基因组重排同步 Str 胁迫诱导处理, 分别获取了具有 *rpsL* K43N 位点突变的产量提升为野生型菌株 36.8 倍, 达到了 1.4 g/L 水平的 Avi 高产菌和具有 *rpsL* K88R 位点突变的 Nos 产量提升至 1.54 g/L, 约 9.2 倍于出发菌株的优良突变株<sup>[47,60]</sup>。此外, 基因组重排还应用于其他类型抗生素生产菌的核糖体工程组合诱变中, 例如: Yu 等利用组合抗生素诱变, 获取了具有 Par<sup>r</sup>、Rif<sup>r</sup>、Neo<sup>r</sup>、Gen<sup>r</sup> 四种抗性的 *S. roseosporus* 突变菌株, 并进一步利用基因组重排诱导使得菌株中 Dap 的产量提升至 0.324 g/L, 4 倍于出发菌株<sup>[53]</sup>; Tong 等利用基因组重排结合 Str 胁迫的条件处理紫外与微波诱导获取的 *S. virginiae* 突变菌株, 进而获取了具有 Str<sup>r</sup> 抗性的突变株中 Vir 效价达到 0.251 g/L (11.6 倍于野生菌株)<sup>[72]</sup>; Liu 等利用核糖体工程与基因组重排交替处理菌株, 最终获取了 1 株具有 Gen<sup>r</sup> 与 Str<sup>r</sup> (*rsmG* deletion) 的双抗性突变株, 并将活性优良的十元烯二炔 Tia A 产量提升至出发菌株的 1.6 倍<sup>[70]</sup>。综上所述, 利用新型高效菌株诱变技

术结合核糖体工程,是切实可行的优良放线菌次级代谢产物生产菌选育策略。

### 2.3.3 核糖体工程结合基因工程技术改良目标菌株

随着基因工程技术的发展,利用成熟的放线菌遗传操作体系直接达到核糖体工程的诱导效果或与核糖体工程组合使用也已有广泛应用。最具代表性的就是基于 Str 诱导产生的 *rpsL* K88E 突变能够提高核糖体再循环因子 (ribosome recycling factor) 的含量,进而有效激活放线菌自身次级代谢的效应机制,在菌株中原位 (超) 表达自身 ribosome recycling factor 的编码基因 *frr*,在不经由抗生素直接诱变的情况下直接获取具有核糖体工程诱导效果的基因过表达突变株,从而提升菌株次级代谢产物的生产效价。例如:Li 等利用 *ermEp* 强启动子在 *S. avermitilis* 中过表达 *frr* 基因,将阿维菌素 (avermectin) 提升至出发菌株的 3–3.7 倍,生产效价增值 0.8 g/L 以上<sup>[46]</sup>; 同样 Ma 等通过 *frr* 基因的过表达,有效提升了核苷类抗生素 Toy 产量至 0.6 g/L 以上,增至出发菌株的 1.5 倍水平<sup>[71]</sup>。

除直接的 *frr* 基因过表达外, Wang 等利用目标化合物生物合成必需功能基因的启动子结合新霉素磷酸转移酶 (neomycin phosphotransferase) 编码基因构建了一套针对 *rpsL* 突变的 reporter-guided 检测系统,快速精准地筛选到了 A21978C, 效价达到 0.12 g/L 以上,至少为出发菌株 2.2 倍增长且具有 *rpsL* K43N 突变的 *S. roseosporus* 高产 Str<sup>r</sup> 抗性突变株<sup>[48]</sup>; Li 等为提升 Sal 产量,将其原有的 100 kb 以上的生物合成基因簇 *sal* 进行改造,获取了一个极简的 mini-cluster,并导入具有 *rsmG* 突变且具 Str<sup>r</sup> 抗性的 *S. albus* 底盘菌株中,从而有效地提升菌株 Sal 的生产效价至 0.4 g/L 以上,达到野生型菌株的 5.1 倍水平<sup>[66]</sup>。本研究团队针对 Cae A 生物合成途径中

需要多个关键黄素辅酶参与骨架分子的修饰这一现象,依据近年来兴起的辅因子工程 (cofactor engineering) 技术,在已激活生产 Cae A 且经由紫外诱变提升其生产效价的突变菌株中过表达黄素辅因子前体核黄素生物合成的关键功能基因 *ribA*,以提高菌株中核黄素含量水平促进黄素辅酶的生物合成,所获取的突变株中 Cae A 的生产效价再次提升了约 45%<sup>[49]</sup>。基因工程技术能够有的放矢地作用于目标产物的生物合成途径,因而其与核糖体工程组合使用时,针对性强、效用显著,能更加有效地提高放线菌次级代谢产物的生产效率。

### 2.3.4 核糖体工程与其他方法的结合运用

在放线菌次级代谢产物发掘中,基于产物结构特征与生物合成机制,可针对性地优化菌株的发酵培养基组分和配比,以及相关的发酵过程的理化参数,从而在不直接改变菌株遗传特性的基础上,最大程度地促进相关产物的代谢生产。作为最基本的优化策略,发酵优化可以先于抗生素诱导等菌株处理方法,也可以在获取最佳突变菌株后,进行针对性的优化。例如在 Rab、Saq B1 与 6'-deoxy-ble Z 的紫外与核糖体工程组合诱导前,研究人员针对出发菌株进行了相应的发酵培养优化<sup>[61,73]</sup>; 而 Zhang 等基于响应面优化法 (response surface methodology),建立起适合 Rif 诱导激活的 Fre A 生产突变株的最佳培养基组分,将该化合物的生产效价提升至原培养条件的 3 倍<sup>[54]</sup>; 本研究团队,针对获取的最优 Cae A 生产突变株,同样利用响应面优化法筛选出了最适的培养基配方,后续发酵分析发现突变株中 Cae A 生产效价在该培养基配方下提升至最初配方的 5.4 倍<sup>[49]</sup>。除常规的发酵培养优化外, Fukuda 等通过在培养基中添加 10 mmol/L L-Arg, 利用静息细胞技术系统 (resting cell system), 将具有 *rpoB* D447G 突变的

Rif<sup>r</sup> 突变株中的西奈芬净 (sinefungin) 的生产效率提升至 0.05 g/L 以上<sup>[67]</sup>。

综上所述, 各种类型的技术方法建立及效用机制的揭示, 一方面完善了核糖体工程的应用体系, 促进核糖体工程的不断完善与进步; 另一方面开发出多种类型的高产突变菌株及其相应的活性产物, 丰富了放线菌活性次级代谢产物库, 也为放线菌次级代谢产物的研究与开发提供了良好的借鉴与参考。

### 3 总结与展望

核糖体工程对菌株遗传背景要求低, 且无需完善菌株遗传操作体系作为支撑; 此外该技术既无外源遗传物质的导入, 也不会改变菌株基因组的组成, 完全符合当前生物安全法律法规要求, 因而具有极为广泛的应用范围和推广空间。核糖体工程经过 30 余年的发展, 已先后在放线菌体系内发掘了 10 余类新颖结构分子, 优化了包括链霉菌及多种稀有放线菌在内的近百株放线菌菌株, 有力地促进了放线菌次级代谢的深入研究与活性次级代谢产物的开发利用。此外核糖体工程的不断完善, 也为以放线菌为代表的微生物分子遗传学等学科提供了类型丰富的研究样本, 拓展其研究范围, 促进了学科交叉融合发展。

然而当前放线菌核糖体工程仍存在较多局限, 如多种抗生素效用机制不明、诱变效率有限等, 会对其应用带来一定限制。因此核糖体工程技术仍有待进一步的发展完善, 主要体现在以下 4 个方面。

1) 发掘更多可用的抗生素: 当前放线菌核糖体工程已有 10 余种可选抗生素, 进一步发掘其他可用抗生素, 一方面在遇到具有特定抗生素抗性的野生型菌株时, 能够自如地调整实验方案; 另一方面也有效拓展了放线菌核糖体工

程的“武器库”, 使其运用更加灵活, 便于开展多种方案的组合抗性诱导激活操作。

2) 深入解析多种抗生素的作用机制及确定对应的作用靶点: 除 Rif 与 Str 外, 包括 Gen 在内的绝大部分抗生素诱导机制与作用靶点尚不明确。针对特定抗生素诱导激活的突变菌株, 探究其相应的突变机制及定位关键的抗性靶标<sup>[74]</sup>, 揭示各种抗生素的诱导激活的具体机制, 奠定核糖体工程的理论基础并建立机理模型, 从而系统地完善放线菌核糖体工程。

3) 基于抗生素诱导激活机制在分子水平上实现菌株的定向突变: 基于抗生素诱导激活机制和抗性靶标, 研究人员可在目标菌株的基因组上实现分子水平的定向改造, 而直接获取具有抗性的产物生产激活或高产突变株, 例如: 广泛应用的 *frr* 过表达技术, 直接获取 Str<sup>r</sup> 菌株用于产物后续的发掘开发<sup>[59,71]</sup>。此外也可以针对 *ropB* 与 *rpsL* 等抗性靶标基因, 利用可行的分子克隆技术在菌株中构建诸如 *rpoB* H437D 与 *rpsL* K88E 等突变, 而直接用于后续代谢产物的分析<sup>[75]</sup>。这种技术路线源于核糖体工程, 而又不完全依赖抗生素的直接诱导, 可避免冗长且不可控的菌株抗性诱变与筛选过程。尤其该方法可直接获取目标突变株, 避免了抗性诱导带来的不确定性, 由被动获取突变株变成主动创造突变株, 极大地提高了放线菌次级代谢产物生产的激活与提升效率。

4) 利用菌株基因组信息为指导, 快速筛选目标突变菌株: 随着基因组学的发展, 研究人员可在短时间内获取放线菌菌株的全基因组序列并界定其中全部的次级代谢产物生物合成基因簇, 因此利用各基因簇中的特征基因设计基因表达分析引物, 利用高通量的基因表达分析技术, 直接筛选核糖体工程获取的各种抗性突变菌株, 有的放矢地挑选目标化合物激活生产



或目标基因(簇)激活表达的突变菌株,而无需依赖大规模的菌株发酵及产物分析等过程。例如本研究团队,在界定的Cae A生物合成基因簇 $cam$ 中定位了其骨架合成关键催化酶的编码基因 $camE$ ,并通过设计基因对应的定量PCR引物,仅通过1次定量PCR反应就挑选出了最优的Cae A激活生产突变菌株,而无需将大量的突变菌株进行耗时费力且成本较高的同步发酵及产物对比分析<sup>[62]</sup>。通过建立起基因(簇)-化合物的关联关系,利用经济高效的基因表达筛选,实现目标突变株的特异性筛选而直接获取最优出发菌株。

此外,核糖体工程作为一项优良的细菌次级代谢开发策略,可以与其他更多类型的生物学方法技术进行有机整合与高效组合,实现事半功倍的放线菌次级代谢产物的高效发掘,例如本研究团队首次将辅因子代谢通路优化策略整合于放线菌紫外诱变-核糖体工程串联使用当中,进一步提升了菌株中Cae A的生产效价<sup>[62]</sup>。综上所述,随着基因组学、分子遗传学、分子克隆技术及天然产物研究与开发策略的不断发展,放线菌核糖体工程必将进入一个崭新的发展空间,开创放线菌来源创新药物开发的新局面!

## REFERENCES

- [1] Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Taxonomy physiology and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015, 80(1): 1-43.
- [2] Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(10): 1203-1232.
- [3] Nepal KK, Wang G. Streptomycetes: surrogate hosts for the genetic manipulation of biosynthetic gene clusters and production of natural products. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 1-20.
- [4] Liu R, Deng Z, Liu T. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metab Eng*, 2018, 50: 74-84.
- [5] Palazzotto E, Tong Y, Lee SY, et al. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(6): 107366.
- [6] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*, 2016, 79(3): 629-661.
- [7] Hug JJ, Bader CD, Remškar M, et al. Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7(2): 44.
- [8] Durand GA, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: history methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents*, 2019, 53(4): 371-382.
- [9] Pishchany G. Applying microbial ecology to antimicrobial discovery. *Curr Opin Microbiol*, 2020, 57: 7-12.
- [10] Abdelmohsen UR, Grkovic T, Balasubramanian S, et al. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6 Pt 1): 798-811.
- [11] Rutledge PJ, Challis GL. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(8): 509-523.
- [12] Ochi K. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017, 70(1): 25-40.
- [13] 蔡成平, 王远山, 郑裕国. 核糖体工程与微生物次级代谢产物合成. *生物技术通报*, 2012(9): 51-58.  
Cai CP, Wang YS, Zheng YG. Ribosome engineering and microorganism secondary metabolite production. *Biotechnol Bull*, 2012(9): 51-58 (in Chinese).
- [14] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(6): 1373-1386.
- [15] Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, et al. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(5): 462-464.
- [16] Ochi K, Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(1): 87-98.
- [17] Mao D, Okada BK, Wu Y, et al. Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 45: 156-163.
- [18] Baral B, Akhgari A, Metsä-Ketelä M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: avenues and challenges. *Synth Syst Biotechnol*, 2018, 3(3): 163-178.
- [19] Zhu S, Duan Y, Huang Y. The Application of ribosome engineering to natural product discovery and yield

- improvement in *Streptomyces*. *Antibiotics* (Basel), 2019, 8(3): 133.
- [20] Tan GY, Liu T. Rational synthetic pathway refactoring of natural products biosynthesis in actinobacteria. *Metab Eng*, 2017, 39: 228-236.
- [21] Foulston L. Genome mining and prospects for antibiotic discovery. *Curr Opin Microbiol*, 2019, 51: 1-8.
- [22] Irving SE, Corrigan RM. Triggering the stringent response: signals responsible for activating (p)ppGpp synthesis in bacteria. *Microbiology*, 2018, 164(3): 268-276.
- [23] Artsimovitch I, Patlan V, Sekine S, et al. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell*, 2004, 117(3): 299-310.
- [24] Okamoto S, Lezhava A, Hosaka T, et al. Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 2003, 185(2): 601-609.
- [25] Thong WL, Shin-ya K, Nishiyama M, et al. Discovery of an antibacterial isoindolinone-containing tetracyclic polyketide by cryptic gene activation and characterization of its biosynthetic gene cluster. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(9): 2615-2622.
- [26] Thong WL, Shin-ya K, Nishiyama M, et al. Methylbenzene-containing polyketides from a *Streptomyces* that spontaneously acquired rifampicin resistance: structural elucidation and biosynthesis. *J Nat Prod*, 2016, 79(4): 857-864.
- [27] Tanaka Y, Kasahara K, Hirose Y, et al. Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes. *J Bacteriol*, 2013, 195(13): 2959-2970.
- [28] Ma Z, Luo S, Xu XH, et al. Characterization of representative *rpoB* gene mutations leading to a significant change in toyocamycin production of *Streptomyces diastatochromogenes* 1628. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(4): 463-471.
- [29] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 1996, 178(24): 7276-7284.
- [30] Hesketh A, Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *J Antibiot*, 1997, 50(6): 532-535.
- [31] Ochi K, Zhang D, Kawamoto S, et al. Molecular and functional analysis of the ribosomal L11 and S12 protein genes (*rplK* and *rpsL*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet*, 1997, 256(5): 488-498.
- [32] Okamoto-Hosoya Y, Sato T, Ochi K. Resistance to paromomycin is conferred by *rpsL* mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot*, 2000, 53(12): 1424-1427.
- [33] Hu H, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1885-1892.
- [34] Xu J, Tozawa Y, Lai C, et al. Rifampicin resistant mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic productivity to *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces griseus*. *Mol Gen Genet*, 2002, 268(2): 179-189.
- [35] Hosaka T, Xu J, Ochi K. Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant. *Mol Microbiol*, 2006, 61(4): 883-897.
- [36] Nishimura K, Hosaka T, Tokuyama S, et al. Mutations in *rsmG*, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 2007, 189(10): 3876-3883.
- [37] Wang G, Hosaka T, Ochi K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(9): 2834-2840.
- [38] Tanaka Y, Komatsu M, Okamoto S, et al. Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(14): 4919-4922.
- [39] Wang G, Inaoka T, Okamoto S, et al. A novel insertion mutation in *Streptomyces coelicolor* ribosomal S12 protein results in paromomycin resistance and antibiotic overproduction. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(3): 1019-1026.
- [40] Imai Y, Fujiwara T, Ochi K, et al. Development of the ability to produce secondary metabolites in *Streptomyces* through the acquisition of erythromycin resistance. *J Antibiot*, 2012, 65(6): 323-326.

- [41] Lai C, Tozawa Y, Xu J, et al. Genetic and physiological characterization of *rpoB* mutations that activate antibiotic production in *Streptomyces lividans*. Microbiology, 2002, 148(Pt 11): 3365-3373.
- [42] Hu H, Zhang Q, Ochi K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase beta subunit) of *Streptomyces lividans*. J Bacteriol, 2002, 184(14): 3984-3991.
- [43] Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S, Ochi K. Development of antibiotic-overproducing strains by site-directed mutagenesis of the *rpsL* gene in *Streptomyces lividans*. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(7): 4256-4259.
- [44] Hosoya Y, Okamoto S, Muramatsu H, et al. Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(8): 2041-2047.
- [45] 胡海峰, 张琴, 朱宝泉. 诱导对庆大霉素的低水平抗性加强微生物合成抗生素的能力. 中国天然药物, 2008, 6(2): 146-152.  
Hu HF, Zhang Q, Zhu BQ. Enhanced antibiotic production by inducing low level of resistance to gentamicin. Chin J Nat Med, 2008, 6(2): 146-152 (in Chinese).
- [46] Li L, Guo J, Wen Y, et al. Overexpression of ribosome recycling factor causes increased production of avermectin in *Streptomyces avermitilis* strains. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010, 37(7): 673-679.
- [47] Lv XA, Jin YY, Li YD, et al. Genome shuffling of *Streptomyces viridochromogenes* for improved production of avilamycin. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(2): 641-648.
- [48] Wang L, Zhao Y, Liu Q, et al. Improvement of A21978C production in *Streptomyces roseosporus* by reporter-guided *rpsL* mutation selection. J Appl Microbiol, 2012, 112(6): 1095-1101.
- [49] Xie Y, Chen J, Wang, B, et al. Activation and enhancement of caerulomycin A biosynthesis in marine-derived *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 by combinatorial genome mining strategies. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 159.
- [50] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. Microb Biotechnol, 2011, 4(2): 207-215.
- [51] 齐欢, 马正, 薛正莲, 等. 利福霉素抗性突变菌 *Streptomyces* sp.HS-NF-1046R 中的两个新化合物. 药学报, 2019, 54(1): 117-121.  
Qi H, Ma Z, Xue ZL, et al. Two new compounds from rifamycin resistant mutant strain *Streptomyces* sp. HS-NF-1046R. Acta Pharm Sin, 2019, 54(1): 117-121 (in Chinese).
- [52] Li LL, Ma TM, Liu Q, et al. Improvement of daptomycin production in *Streptomyces roseosporus* through the acquisition of pleuromutilin resistance. Biomed Res Int, 2013, 2013: 479742.
- [53] Yu G, Hui M, Li R, et al. Enhancement of daptomycin production by the method of combining ribosome engineering and genome shuffling in *Streptomyces roseosporus*. Appl Biochem Microbiol, 2018, 54(6): 611-615.
- [54] Zhang Y, Huang H, Xu S, et al. Activation and enhancement of fredericamycin A production in deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 by using ribosome engineering and response surface methodology. Microb Cell Fact, 2015, 14: 64.
- [55] Beltrametti F, Rossi R, Selva E, et al. Antibiotic production improvement in the rare actinomycete *Planobispora rosea* by selection of mutants resistant to the aminoglycosides streptomycin and gentamycin and to rifamycin. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(4): 283-288.
- [56] Fu P, Jamison M, La S, et al. Inducamides A-C, chlorinated alkaloids from an RNA polymerase mutant strain of *Streptomyces* sp.. Org Lett, 2014, 16(21): 5656-5659.
- [57] Wang XJ, Wang XC, Xiang WS. Improvement of milbemycin-producing *Streptomyces bingchenggensis* by rational screening of ultraviolet- and chemically induced mutants. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25(6): 1051-1056.
- [58] Derewacz DK, Goodwin CR, McNeese CR, et al. Antimicrobial drug resistance affects broad changes in metabolomic phenotype in addition to secondary metabolism. PNAS, 2013, 110(6): 2336-2341.
- [59] 王耀耀, 刘云清, 朱研研, 等. 组合链霉素和利福平抗性突变去甲基万古霉素高产菌株的选育. 中国抗生素杂志, 2006, 31(4): 243-246.  
Wang YY, Liu YQ, Zhu YY, et al. Screening of high yield norvancomycin producing strain by streptomycin and rifampicin resistant mutation. Chin J Antibio, 2006, 31(4): 243-246 (in Chinese).
- [60] Wang Q, Zhang D, Li Y, et al. Genome shuffling and ribosome engineering of *Streptomyces actuosus* for high-yield nosiheptide production. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 173(6): 1553-1563.

- [61] Li YM, Li JY, Ye ZM, et al. Enhancement of angucycline production by combined UV mutagenesis and ribosome engineering and fermentation optimization in *Streptomyces dengpaensis* XZHG99<sup>T</sup>. *Prep Biochem Biotechnol*, 2021, 51(2): 173-182.
- [62] Zhao YF, Song ZQ, Ma Z, et al. Sequential improvement of rimocidin production in *Streptomyces rimosus* M527 by introduction of cumulative drug-resistance mutations. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(5): 697-708.
- [63] Tamehiro N, Hosaka T, Xu J, et al. Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(11): 6412-6417.
- [64] Zhang KP, Mohsin A, Dai YC, et al. Combinatorial effect of ARTP mutagenesis and ribosome engineering on an industrial strain of *Streptomyces albus* S12 for enhanced biosynthesis of salinomycin. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 212.
- [65] Li D, Zhang JH, Tian YQ, et al. Enhancement of salinomycin production by ribosome engineering in *Streptomyces albus*. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(2): 276-279.
- [66] Li D, Tian YQ, Liu X, et al. Reconstitution of a mini-gene cluster combined with ribosome engineering led to effective enhancement of salinomycin production in *Streptomyces albus*. *Microb Biotechnol*, 2020, 10.1111/1751-7915.13686.
- [67] Fukuda K, Tamura T, Ito H, et al. Production improvement of antifungal, antitrypanosomal nucleoside sinefungin by *rpoB* mutation and optimization of resting cell system of *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109(5): 459-465.
- [68] Liu L, Pan J, Wang Z, et al. Ribosome engineering and fermentation optimization leads to overproduction of tiancimycin A, a new enediyne natural product from *Streptomyces* sp. CB03234. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(3): 141-151.
- [69] Zhuang ZK, Jiang CZ, Zhang F, et al. Streptomycin-induced ribosome engineering complemented with fermentation optimization for enhanced production of 10-membered enediynes tiancimycin-A and tiancimycin-D. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(6): 1304-1314.
- [70] Liu H, Jiang C, Lin J, et al. Genome shuffling based on different types of ribosome engineering mutants for enhanced production of 10-membered enediyne tiancimycin-A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(10): 4359-4369.
- [71] Ma Z, Tao LB, Bechthold A, et al. Overexpression of ribosome recycling factor is responsible for improvement of nucleotide antibiotic-toyocamycin in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(11): 5051-5058.
- [72] Tong QQ, Zhou YH, Chen XS, et al. Genome shuffling and ribosome engineering of *Streptomyces virginiae* for improved virginiamycin production. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2018, 41(5): 729-738.
- [73] Zhu X, Kong J, Yang, H, et al. Strain improvement by combined UV mutagenesis and ribosome engineering and subsequent fermentation optimization for enhanced 6'-deoxy-bleomycin Z production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(4): 1651-1661.
- [74] Mukai K, Kobayashi M, Hoshino K, et al. Lincomycin-induced secondary metabolism in *Streptomyces lividans* 66 with a mutation in the gene encoding the RNA polymerase beta subunit. *Curr Microbiol*, 2020, 77(10): 2933-2939.
- [75] Koshla O, Lopatniuk M, Borys O, et al. Genetically engineered *rpsL* merodiploidy impacts secondary metabolism and antibiotic resistance in *Streptomyces*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(4): 62.

(本文责编 郝丽芳)