

链霉菌磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶对载体蛋白的底物选择性的研究进展

姚黎栋¹ 王月月² 樊伟明¹ 张仁炳^{3*} 江辉^{2,4*} 李永泉^{2,4}

(1. 浙江震元制药有限公司 浙江 绍兴 312000)

(2. 浙江大学 生命科学学院 浙江 杭州 310058)

(3. 浙江大学 校医院 浙江 杭州 310058)

(4. 浙江省微生物生化与代谢工程重点实验室 浙江 杭州 310058)

摘要: 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)催化脂肪酸合酶(FAS)、聚酮合酶(PKS)和非核糖体肽合成酶(NRPS)中载体蛋白从脱辅基形态转化为全辅基形态,对脂肪酸、PKS 产物和 NRPS 产物的生物合成起着不可或缺的作用。本文介绍并总结了链霉菌 PPTase 对载体蛋白底物选择性的最新研究进展: III型 PPTase 特异性催化同一个多肽链中 ACP 的辅基化; II型 PPTase 倾向于催化 I 型 PKS 中 ACP 和 NRPS 中 PCP 的辅基化; I 型 PPTase 倾向于催化 II 型 PKS 中 ACP 和 II 型 FAS 中 ACP 的辅基化; 编码基因位于基因簇内的 I 型/II 型 PPTase 倾向于催化编码基因位于同基因簇内的 PKS/NRPS 中 ACP/PCP 的辅基化; 这些研究结果为阐明并改造链霉菌辅基化网络以提高特定次级代谢产物的产量提供了参考和借鉴。

关键词: 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶, 载体蛋白, 聚酮合酶, 非核糖体肽合成酶

Substrate specificity of phosphopantetheinyl transferases to carrier proteins in *Streptomyces*

YAO Li-Dong¹ WANG Yue-Yue² FAN Wei-Ming¹ ZHANG Ren-Bing^{3*} JIANG Hui^{2,4*}
LI Yong-Quan^{2,4}

(1. Zhejiang Zhenyuan Pharmaceutical Co. Ltd., Shaoxing, Zhejiang 312000, China)

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

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

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

Abstract: Phosphopantetheinyl transferases (PPTases) play essential role in the biosynthesis of fatty acids, polyketides, and nonribosomal peptides. PPTases phosphopantetheinylate carrier proteins in polyketide synthases (PKSs), fatty acid synthases (FASs) and nonribosomal peptide

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: ☐: zrb94276@zju.edu.cn;

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

收稿日期: 2013-06-28; 接受日期: 2013-07-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

synthetases (NRPSs). In this review, we discuss current studies on the substrate specificities of PPTases to carrier proteins in *Streptomyces*. The substrates of type III PPTases are acyl carrier proteins (ACPs) which locate within the same PKSs. The favorite substrates of type I PPTases are ACPs in type II FASs and type II PKSs. The favorite substrates of type II PPTases are ACPs in type I PKSs and peptidyl carrier proteins (PCPs) in NRPSs. The favorite substrates of a type I / II PPTase, whose encoding gene locates in a gene cluster, are ACPs/PCPs whose encoding genes locate in the same gene cluster.

Keywords: Phosphopantetheinyl transferase, Carrier protein, Polyketide synthase, Nonribosomal peptide synthetase

许多链霉菌生产的次级代谢产物在药物、农业和食品领域得到了广泛的应用,产生了巨大的经济价值和社会效益,其中大部分是由聚酮合酶(PKS)、非核糖体肽合成酶(NRPS)或者 PKS/NRPS 杂合体合成的^[1-2]。酰基载体蛋白(ACP)是脂肪酸合酶(FAS)和 PKS 中关键功能域,肽基载体蛋白(PCP)是 NRPS 中关键功能域,磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)催化磷酸泛酰巯基乙胺基从辅酶 A 转移到 ACP 和 PCP 的活性丝氨酸的残基上,从而将 ACP 和 PCP 从无活性的脱辅基形态(apo-)转化为有活性的全辅基形态(holo-)(图 1)^[3-7]。PPTase 作为 FAS、PKS 和 NRPS 的活性开关,对 PKS 产物和 NRPS 产物的生物合成起着不可或缺的作用^[3,8-10],因此,研究链霉菌 PPTase 对载体蛋白的底物选择性,一方面可以揭示 PPTase 催化 FAS、PKS 和 NRPS 中 ACP/PCP 的辅基化网络,从而为改造辅基化网络提高特定次级代谢产物的产量奠定基础,另一方面可以揭示 PPTase 的结构与功能之间的关系,为构建标准合成元件库提供理论依据,具有重要的理论意义和应用价值。

从结构上可以将 PPTase 分为 3 类: I 型 PPTase

(holo-ACP synthase 型, ACPS 型)由约 120 个氨基酸构成,3 个亚基形成同源三聚体,每个亚基含有 P2 (GxD)和 P3 [(F/W)(S/T/A)xKE(S/A)xxK]两个保守结构域,含有 1 个 Mg^{2+} 结合位点^[5,11-12]; II 型 PPTase (sfp 型)由约 240 个氨基酸构成,含有 P1 (PxxP)、P2 和 P3 三个保守结构域,高级结构为单聚体并形成一个伪二聚体结构,含有 2 个或者 3 个 Mg^{2+} 结合位点^[13-16]; III 型 PPTase 作为一个结构域融合在 PKS 或者 FAS 上,其高级结构尚不清楚^[17-19]。

一个链霉菌可以生产多个次级代谢产物,每个次级代谢产物的合成相关基因在基因组上常成簇排列称为基因簇,基因簇主要包括合成基因(PKS 基因、NRPS 基因、前体合成酶基因、后修饰酶基因等)、转运基因、调控基因等,大多数基因簇内不包括 PPTase 基因^[1-2,20]。一个链霉菌中包括至少 1 个 I 型 PPTase 和至少 1 个 II 型 PPTase,但总数远远小于需要 PPTase 参与的合成途径数量,如天蓝色链霉菌中需要 PPTase 参与的合成途径数量近 20 个,但是只含有 3 个 PPTase 基因,表明一个 PPTase 应该催化多个次级代谢产物合成途径的 PKS/NRPS 中 ACP/PCP 的辅基化,构成一个复杂

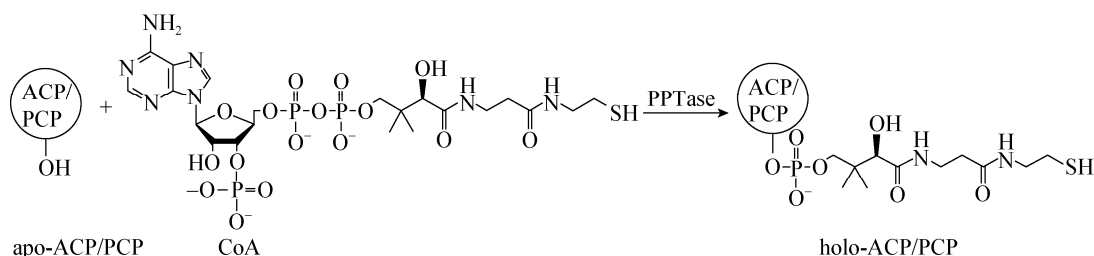


图 1 PPTase 将磷酸泛酰巯基乙胺基从辅酶 A 转移到脱辅基 ACP/PCP 上生成全辅基 ACP 和 PCP

Figure 1 PPTase transfers 4'-phosphopantetheine moiety from CoA to apo-ACP/PCP to produce holo-ACP/PCP

的辅基化网络^[21-22]。本文将详细介绍链霉菌中 PPTase 底物选择性的最新研究进展,为阐明 PPTase 催化的 PKS/NRPS 辅基化网络以及揭示 PPTase 结构与功能之间的关系提供参考和借鉴。

1 III 型 PPTase

烯二炔类抗生素是目前抗肿瘤活性最高的天然产物,其中加里刹霉素(Calicheamicin, CAL)和新制癌菌素(Neocarzinostatin, NCS)已经应用于临床治疗。烯二炔类抗生素的 9 元环或者 10 元环核心骨架由迭代式 I 型聚酮合酶(Iterative type I PKS)合成,Zhang 等^[23]和 Murugan 等^[24]分别独立发现烯二炔类抗生素 PKS 的 C 端融合了一个 III 型 PPTase。Zhang 等^[23]对球孢链霉菌(*Streptomyces globisporus*)中烯二炔类抗生素 C-1027 的 PKS (SgcE)中 III 型 PPTase 进行了系统的研究,体外生化实验结果显示:在大肠杆菌中异源生产 SgcE 中的 ACP,只有在该 III 型 PPTase 存在的情况下,得到的 ACP 才为全辅基形态,缺乏该 PPTase 或者将该 PPTase 进行点突变失活,得到的 ACP 均为脱辅基形态;体内实验结果显示通过点突变失活 SgcE 中 PPTase 导致菌株不能生产 C-1027,以上结果说明烯二炔类抗生素 PKS 中的 III 型 PPTase 功能是催化该 PKS 中 ACP 的辅基化,且该 PPTase 的功能不能被球孢链霉菌和大肠杆菌中的其它 PPTase 所回补。

2 II 型 PPTase

由于 III 型 PPTase 与 PKS/FAS 融合在一条多肽链上,其底物选择性比较容易被预测;而 II 型 PPTase 和 I 型 PPTase 的底物选择性较难被预测,尤其是编码基因不在基因簇内的 PPTase。

2.1 恰塔努加链霉菌中 SchPPT

纳他霉素(NTM)是一种被广泛用于食品防腐剂的 14 元大环内酯类抗真菌抗生素,它可以由纳塔努链霉菌(*S. natalensis*)、褐黄孢链霉菌(*S. gilvosporeus*)和恰塔努加链霉菌(*S. chattanoogensis*)生产^[25-26],在纳塔努链霉菌和恰塔努加链霉菌中

NTM 合成基因簇包括: I 型 PKS 基因、后修饰酶基因、转运基因和调控基因,但不包括 PPTase 基因^[26]。笔者^[27]对纳他霉素工业生产菌株恰塔努加链霉菌进行了全基因组测序,通过生物信息学分析发现基因组中含有 NTM 基因簇(*scn* PKS, I 型 PKS)、Migrastatin 基因簇(*scm* PKS, I 型 PKS)、未知化合物基因簇 I (PKSIa, I 型 PKS)、孢子色素基因簇(*scw* PKS, II 型 PKS)和未知化合物基因簇 II (PKSIc, II 型 PKS)、一个 II 型 PPTase 基因(*schPPT*)和一个 I 型 PPTase 基因(*schACPS*),*schPPT* 和 *schACPS* 均不与任何次级代谢产物基因簇靠近;*schPPT* 敲除株不能生产 NTM,支持了 NTM 合成酶中 ACP 的辅基化只能由 SchPPT 催化;通过生化反应表征了 SchPPT 对恰塔努加链霉菌中 5 个 PKS 和 FAS (II 型 FAS)中 ACP 的活性,结果显示 SchPPT 可以催化 *scn* PKS、*scm* PKS、PKSIa、*scw* PKS 和 PKSIc 中 ACP 的辅基化,但不能催化 FAS 中 ACP 的辅基化,说明 SchPPT 的功能是催化 I 型 PKS 和 II 型 PKS 中 ACP 的辅基化。

2.2 天蓝色链霉菌中十一烷基灵菌红素基因簇内 RedU

灵菌红素(Prodiginine)是一大类红色的含有三吡咯分子结构的抗生素,具有免疫抑制剂和抗肿瘤活性,由多种链霉菌和真细菌生产,模式菌株天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)生产的灵菌红素主要成分是十一烷基灵菌红素(RED)^[28-29]。天蓝色链霉菌是第一个被全基因组测序的链霉菌^[22],RED 基因簇含有 I 型 PKS 基因、II 型 PKS 基因、NRPS 基因、后修饰酶基因、调控基因以及一个 II 型 PPTase 基因(*redU*)。由于 *redU* 位于 RED 基因簇内,Cerdeno 等^[28]推测 RedU 催化 RED 合成酶(RedQ、RedO、RedN 和 RedL)中的 6 个 ACP/PCP 的辅基化,Stanley 等^[29]和 Lu 等^[21]发现 *redU* 敲除株不能生产 RED,支持了 RedU 催化 RED 合成酶中 ACP/PCP 辅基化的结论。Cerdeno 等^[28]和 Stanley 等^[29]曾经推测 RED 的合成途径为:RedO (PCP)等酶以脯氨酸为合成前体合成中间体 1;RedN 和 RedL 等酶以中间体 1、丙二酸单酰基辅酶 A 和丝氨酸为合成前

体合成双吡咯中间体 2; RedQ 和 RedN 等酶以乙酰基辅酶 A 和丙二酸单酰基辅酶 A 为合成前体合成单吡咯中间体 3; 2 和 3 偶联形成 RED。Stanley 等^[29]发现 *redU* 敲除株单吡咯中间体 3 的产量有所提高, 在敲除株中喂养中间体 1 或双吡咯中间体 2 都可以恢复 RED 的生产, 以上结果说明: 中间体 1 的合成酶 RedO (PCP) 的辅基化只能被 RedU 催化; 而 RedQ、RedN 和 RedL 中的 ACP/PCP 的辅基化可以被 RedU 催化也可以被其它 PPTase 催化(最可能的是 2.3 中所述的 SCO6673)。

2.3 天蓝色链霉菌中 SCO6673

天蓝色链霉菌生产的众多次级代谢产物中包括钙依赖型脂肽类抗生素(CDA), CDA 基因簇包括 NRPS 基因、前体合成酶基因、后修饰酶基因、转运基因和调控基因, 但不包括 PPTase 基因^[30-31]。天蓝色链霉菌基因组中除了 *redU*, 还含有一个 II 型 PPTase 基因(SCO6673), SCO6673 不与任何次级代谢产物基因簇靠近。Lu 等^[21]发现 SCO6673 敲除株不能生产 CDA, 在 SCO6673 敲除株中回补 SCO6673 可以恢复 CDA 的生产, 说明 CDA 合成酶中 PCP 的辅基化只能由 SCO6673 催化。

2.4 轮枝链霉菌中 Svp

博莱霉素(BLM)是一种由轮枝链霉菌(*S. verticillus*)生产的, 已经应用于临床的广谱抗肿瘤药物, BLM 合成基因簇包括 PKS 基因、NRPS 基因、后修饰酶基因和调控基因, 但不包括 PPTase 基因^[32-33]。Sanchez 等^[18]根据 II 型 PPTase 保守结构域 P1 和 P3 的序列设计简并引物, 通过 PCR 在轮枝链霉菌基因组中克隆得到了一个 II 型 PPTase 基因(*svp*), *svp* 不与任何次级代谢产物基因簇靠近; 通过生化反应表征了 Svp 对 BLM 合成酶中 NRPS/PKS 中 PCP/ACP 的活性, 结果显示 Svp 可以催化 BLM 合成酶中多个 PCP 和 ACP 的辅基化(Blm I -PCP、Blm VIII-ACP、Blm VII-PCP、Blm VX-PCP); 还通过生化反应表征了 Svp 对 TcmM (*S. glaucescens* 中合成特曲霉素的 PKS 中 ACP, II 型 PKS)的活性, 结果显示 Svp 也可以催化 TcmM。

3 I 型 PPTase

3.1 灰色链霉菌中菲特霉素基因簇内的 I 型 PPTase

菲特霉素(Fredericamycin, FDM)是由灰色链霉菌(*S. griseus*)生产的具有抗肿瘤活性的抗生素, FDM 基因簇包括 II 型 PKS 基因、后修饰酶基因和一个 I 型 PPTase 基因(*fdmW*)^[34]。Huang 等^[17]发现 *fdmW* 敲除株中 FDM 的产量下降到野生型菌株的 7%, 在 *fdmW* 敲除株中回补 *fdmW* 可以使 FDM 的产量恢复到野生型菌株的水平, 支持了 FdmW 催化 FdmH (合成 FDM 的 PKS 中 ACP, II 型 PKS) 辅基化的结论。Huang 等^[17]通过生化反应表征了 FdmW 对不同来源 ACP 的催化活性: FdmH、TcmM、LnmJ-ACP5 (*S. atroolivaceus* 中合成 Leinamycin 的 PKS 中第 5 个模块中 ACP, I 型 PKS) 和 DEBS-ACP1 (红色糖多孢菌中合成红霉素的 PKS 中第 1 个模块中 ACP, I 型 PKS), 结果显示 FdmW 对编码基因在同基因簇内的 FdmH 活性最高, 对 LnmJ-ACP5 和 TcmM 的活性次之, 对 DEBS-ACP1 的活性最低。以上结果说明 FdmW 的功能是催化基因簇内 ACP 的辅基化, 但它的功能可以部分地被其它 PPTase 所回补, 最可能回补它功能的是灰色链霉菌中催化 FAS 中 ACP 辅基化的 I 型 PPTase。

3.2 恰塔努加链霉菌中 SchACPS

SchACPS 是恰塔努加链霉菌中的 I 型 PPTase, 笔者^[27]通过生化反应表征了 SchACPS 对恰塔努加链霉菌中 5 个 PKS 和 FAS 中 ACP 的活性, 结果表明 SchPPT 可以催化 *scw* PKS、PKSIIc 和 FAS 中 ACP 的辅基化, 但是不能催化 *scn* PKS、*scm* PKS 和 PKS Ia 中 ACP 的辅基化。笔者还观察到 *scwPKS* 敲除株或者 *scwACP* 敲除株均不能生产孢子色素, 确证了 *scw* ACP 参与孢子色素的合成, 而 *SchPPT* 敲除株仍然可以生产孢子色素, 表明尽管 SchPPT 可以催化 *scw* ACP 的辅基化, 但是在体内 SchPPT 缺失的情况下 SchACPS 完全可以互补 SchPPT 的功能。以上结果说明 SchACPS 与 SchPPT

的底物选择性有所不同, SchPPT 可以催化 I 型 PKS 和 II 型 PKS 中 ACP 的辅基化, 而 SchACPS 的功能是催化 II 型 PKS 和 II 型 FAS 中 ACP 的辅基化, 两者的功能在催化 II 型 PKS 中 ACP 辅基化上是可以互补的。

3.3 天蓝色链霉菌中 SCO4744

放线菌紫素(ACT)是由天蓝色链霉菌生产的苯并异色烷醌家族抗生素, ACT 基因簇包括 II 型 PKS 基因、后修饰酶基因、转运基因和调控基因, 但不包括 PPTase 基因^[35-36]。天蓝色链霉菌基因组中除了 *redU* 和 *SCO6673*, 还有一个 I 型 PPTase 基因(*SCO4744*), *SCO4744* 不与任何次级代谢产物基因簇靠近。Cox 等^[37]通过生化反应表征了 *SCO4744* 对不同来源 ACP 的催化活性: *S. coel.* FAS-ACP (天蓝色链霉菌中 FAS 中 ACP, II 型 FAS)、*act* ACP (天蓝色链霉菌中合成 ACT 的 PKS 中 ACP, II 型 PKS)、*E. coli* FAS-ACP (大肠杆菌中 FAS 中 ACP, II 型 FAS)、*otc* ACP (龟裂链霉菌中合成土霉素的 PKS 中 ACP, II 型 PKS)、*rat* FAS-ACP (大鼠中 FAS 中 ACP, I 型 FAS)和 NSAS-ACP (寄生曲霉中合成 *Norsolorinic acid* 的 PKS 中 ACP, I 型 PKS), 结果表明 *SCO4744* 可以催化以上 6 个 ACP 的辅基化。另外 Lu 等^[21]发现 *SCO6673* 敲除株、*redU* 敲除株和 *SCO6673/redU* 双敲除株都可以生产 ACT, 表明 *SCO6673* 和 *RedU* 对催化 *act* ACP 和 *S. coel.* FAS-ACP 都是非必需的, 证实了 *SCO4744* 对催化 *act* ACP 和 *S. coel.* FAS-ACP 的辅基化起不可或缺的作用。综合以上

结果, 说明 *SCO4744* 的功能是催化天蓝色链霉菌中 *act* ACP 和 FAS-ACP 的辅基化。

4 链霉菌中 FAS/PKS/NRPS 辅基化网络的阐明与应用

4.1 天蓝色链霉菌中 FAS/PKS/NRPS 辅基化网络

基于 2.2、2.3 和 3.3 的内容, 总结出天蓝色链霉菌中 FAS/PKS/NRPS 辅基化网络为: *SCO4744* 催化 FAS-ACP 的辅基化, *RedU* 催化合成 RED 的 PKS/NRPS 中 ACP/PCP 的辅基化, *SCO6673* 催化合成 CDA 的 NRPS 中 PCP 的辅基化, *SCO4744*、*RedU* 和 *SCO6673* 协同催化放线菌素(ACT)合成酶的辅基化(图 2A)。Lu 等^[21]发现: *SCO6673* 敲除株中 RED 的产量提高了约 5 倍, 而 ACT 的产量下降约 20%; *redU* 敲除株中 ACT 的产量下降约 40%, 而 *SCO6673/redU* 双敲除株中 ACT 的产量提高了约 20%, 这是首次在天蓝色链霉菌中通过改造辅基化网络来改变代谢流, 最终提高特定次级代谢产物产量的例子。

4.2 恰塔努加链霉菌中 PPTase 催化的 FAS/PKS 辅基化网络

基于 2.1 和 3.2 的内容, 笔者^[27]总结出恰塔努加链霉菌中 FAS/PKS 辅基化网络为: SchPPT 的功能是催化 I 型 PKS 和 II 型 PKS 中 ACP 的辅基化, 而 SchACPS 的功能是催化 II 型 PKS 和 II 型 FAS 中 ACP 的辅基化(图 2B)。将 *schPPT* 在恰塔努加链霉菌中进行高表达, 结果 NTM 的产量提高约 40%, 发酵周期提前约 24 h, 这是首次将改造辅基化网络应用于工业链霉菌最终提高抗生素产量的例子。

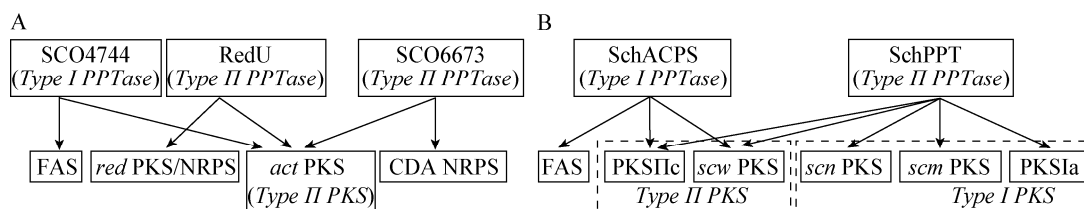


图 2 天蓝色链霉菌中的辅基化网络(A)和恰塔努加链霉菌中的辅基化网络(B)^[27]

Figure 2 Phosphopantetheinylation network in *Streptomyces coelicolor* (A) and *S. chattanoogensis* (B)^[27]

5 总结与展望

基于以上 PPTase 功能的研究, 可以总结出 PPTase 对 PKS/NRPS 的底物选择性为: III 型 PPTase 特异性催化同一个多肽链中的 ACP 的辅基化, 它们的功能往往不能被其它 PPTase 所互补; II 型 PPTase 倾向于催化 I 型 PKS 中 ACP 和 NRPS 中 PCP 的辅基化(I 型 PKS 中 ACP 和大多数 PCP 是融合型蛋白), I 型 PPTase 倾向于催化 II 型 PKS 中 ACP 和 II 型 FAS 中 ACP 的辅基化(链霉菌 II 型 FAS 中 ACP 与 II 型 PKS 中 ACP 都是独立的蛋白), I 型 PPTase 和 II 型 PPTase 对 II 型 PKS 中 ACP 的选择性上有一定的重叠; 编码基因在基因簇内的 PPTase 对编码基因在同基因簇内的 PKS/NRPS 具有较高的选择性, 但是它们的功能可以被其它同类型的 PPTase 所互补。

随着全基因组测序的普及和蛋白质组学、生物信息学的发展, 对 PPTase 功能的研究必将从研究一个 PPTase 催化一个底物发展到研究一个菌株中所有 PPTase 组催化 PKS 组和 NRPS 组, 完整地揭示次级代谢和初级代谢合成酶的辅基化网络; 在此基础上通过基因改造 PPTase 使代谢流转向有利于目标代谢产物的方向, 比如敲除某个 PPTase 基因使下游多个合成酶失活以消除多个代谢产物杂质, 提高或提前启动某个 PPTase 的活性以提高或提前启动下游合成酶的活性, 最终提高和提前目标代谢产物的生产。对 PPTase 功能研究的另一个方向是构建一系列标准 PPTase 元件, 分别适用于 I 型 PKS 中 ACP、II 型 PKS 中 ACP、NRPS 中 PCP 等不同的底物, 为合成生物学提供高效专一的合成元件。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Procopio RE, Silva IR, Martins MK, et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*[J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2012, 16(5): 466-471.
- [3] Sunbul M, Zhang K, Yin J. Chapter 10 using phosphopantetheinyl transferases for enzyme posttranslational activation, site specific protein labeling and identification of natural product biosynthetic gene clusters from bacterial genomes[J]. Methods in Enzymology, 2009, 458: 255-275.
- [4] Walsh CT, Gehring AM, Weinreb PH, et al. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 1997, 1(3): 309-315.
- [5] Dall'aglio P, Arthur CJ, Williams C, et al. Analysis of *Streptomyces coelicolor* phosphopantetheinyl transferase, AcpS, reveals the basis for relaxed substrate specificity[J]. Biochemistry, 2011, 50(25): 5704-5717.
- [6] Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, et al. A new enzyme superfamily-the phosphopantetheinyl transferases[J]. Chemistry & Biology, 1996, 3(11): 923-936.
- [7] Pavlidou M, Pross EK, Musiol EM, et al. The phosphopantetheinyl transferase KirP activates the ACP and PCP domains of the kirromycin NRPS/PKS of *Streptomyces collinus* Tu 365[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 319(1): 26-33.
- [8] Mejean A, Mann S, Vassiliadis G, et al. *In vitro* reconstitution of the first steps of anatoxin-a biosynthesis in *Oscillatoria* PCC 6506: from free L-proline to acyl carrier protein bound dehydroproline[J]. Biochemistry, 2010, 49(1): 103-113.
- [9] Sugihara S, Orikasa Y, Okuyama H. The *Escherichia coli* highly expressed *entD* gene complements the *pfaE* deficiency in a *pfa* gene clone responsible for the biosynthesis of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 307(2): 207-211.
- [10] Owen JG, Copp JN, Ackerley DF. Rapid and flexible biochemical assays for evaluating 4'-phosphopantetheinyl transferase activity[J]. Biochemical Journal, 2011, 436(3): 709-717.
- [11] Mootz HD, Finking R, Marahiel MA. 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(40): 37289-37298.
- [12] Chirgadze NY, Briggs SL, McAllister KA, et al. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* acyl carrier protein synthase: an essential enzyme in bacterial fatty acid biosynthesis[J]. EMBO Journal, 2000, 19(20): 5281-5287.
- [13] Quadri LE, Weinreb PH, Lei M, et al. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases[J]. Biochemistry, 1998, 37(6): 1585-1595.
- [14] Roberts AA, Copp JN, Marahiel MA, et al. The *Synechocystis* sp. PCC6803 Sfp-type phosphopantetheinyl transferase does not possess characteristic broad-range activity[J]. Chembiochem, 2009, 10(11): 1869-1877.
- [15] Bunkoczi G, Pasta S, Joshi A, et al. Mechanism and

- substrate recognition of human holo ACP synthase[J]. Chemistry & Biology, 2007, 14(11): 1243-1253.
- [16] Finking R, Solsbacher J, Konz D, et al. Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(52): 50293-50302.
- [17] Huang Y, Wendt-Pienkowski E, Shen B. A dedicated phosphopantetheinyl transferase for the fredericamycin polyketide synthase from *Streptomyces griseus*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(40): 29660-29668.
- [18] Sanchez C, Du L, Edwards DJ, et al. Cloning and characterization of a phosphopantetheinyl transferase from *Streptomyces verticillus* ATCC15003, the producer of the hybrid peptide-polyketide antitumor drug bleomycin[J]. Chemistry & Biology, 2001, 8(7): 725-738.
- [19] Weissman KJ, Hong H, Oliynyk M, et al. Identification of a phosphopantetheinyl transferase for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. ChemBiochem, 2004, 5(1): 116-125.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Bentley SD, Chater KF, Cerdano-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Nature, 2002, 417(6885): 141-147.
- [23] Zhang J, Van Lanen SG, Ju J, et al. A phosphopantetheinylating polyketide synthase producing a linear polyene to initiate enediyne antitumor antibiotic biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(5): 1460-1465.
- [24] Murugan E, Liang ZX. Evidence for a novel phosphopantetheinyl transferase domain in the polyketide synthase for enediyne biosynthesis[J]. FEBS Letters, 2008, 582(7): 1097-1103.
- [25] Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E, et al. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(15): 10133-10139.
- [26] Du YL, Chen SF, Cheng LY, et al. Identification of a novel *Streptomyces chattanoogensis* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator ScnRII[J]. Journal of Microbiology, 2009, 47(4): 506-513.
- [27] 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.
- [28] Cerdano AM, Bibb MJ, Challis GL. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes[J]. Chemistry & Biology, 2001, 8(8): 817-829.
- [29] Stanley AE, Walton LJ, Kourdi Zerikly M, et al. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxaldehyde, an intermediate in prodiginine biosynthesis[J]. Chemical Communications (Cambridge), 2006(38): 3981-3983.
- [30] Hojati Z, Milne C, Harvey B, et al. Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*[J]. Chemistry & Biology, 2002, 9(11): 1175-1187.
- [31] Yang H, An Y, Wang L, et al. Autoregulation of hpdR and its effect on CDA biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*[J]. Microbiology, 2010, 156(Pt9): 2641-2648.
- [32] Du L, Shen B. Identification and characterization of a type II peptidyl carrier protein from the bleomycin producer *Streptomyces verticillus* ATCC 15003[J]. Chemistry & Biology, 1999, 6(8): 507-517.
- [33] Du L, Sanchez C, Chen M, et al. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7(8): 623-642.
- [34] Wendt-Pienkowski E, Huang Y, Zhang J, et al. Cloning, sequencing, analysis, and heterologous expression of the fredericamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces griseus*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(47): 16442-16452.
- [35] Okamoto S, Taguchi T, Ochi K, et al. Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster[J]. Chemistry & Biology, 2009, 16(2): 226-236.
- [36] Kendrew SG, Hopwood DA, Marsh EN. Identification of a monooxygenase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) involved in biosynthesis of actinorhodin: purification and characterization of the recombinant enzyme[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(13): 4305-4310.
- [37] Cox RJ, Crosby J, Daltrop O, et al. *Streptomyces coelicolor* phosphopantetheinyl transferase: a promiscuous activator of polyketide and fatty acid synthase acyl carrier proteins[J]. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 2002(14): 1644-1649.