

达托霉素是一种新型环脂肽类抗生素，由于其强大的抗菌活性以及较低的抗药性而在国际市场具有巨大的潜力。达托霉素的结构在环脂肽类抗生素中具有较好的典型性，对其结构形成的生物学机制进行充分研究，可以为达托霉素的高效生物合成，降低生产成本提供理论依据，并且为达托霉素进行结构改造优化，进一步获得更强抗菌活性和更低毒性的新型抗生素打下基础。

毛旭明

达托霉素生物合成研究进展

谢祥茂^{1,3} 王凤^{2,3} 陈俊勇^{1,3} 张宇锴^{1,3} 毛旭明^{2,3*} 李永泉^{2,3}

(1. 杭州华东医药集团生物工程研究所有限公司 浙江 杭州 310011)

(2. 浙江大学 生命科学学院 生物化学研究所 浙江 杭州 310058)

(3. 浙江省微生物生化与代谢工程重点实验室 浙江 杭州 310058)

摘要: 达托霉素是由玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)生产的一种环脂肽类抗生素，具有强大的抗革兰氏阳性致病细菌的作用，是继“抗生素最后一道防线”万古霉素后的新型抗生素。本文主要对达托霉素的结构、作用机制、合成基因簇及合成机制等当前的研究成果进行综述，并且总结了利用组合生物学对达托霉素进行结构改造的策略，以此来研究结构与活性之间的关系，并寻找更广谱高效的抗生素。最后，总结了提高达托霉素产量的策略，为工业上降低达托霉素生产成本提供理论参考。

关键词: 达托霉素，非核糖体肽合成酶(NRPS)，衍生物，组合生物学，调控蛋白

Advances in daptomycin biosynthesis

XIE Xiang-Mao^{1,3} WANG Feng^{2,3} CHEN Jun-Yong^{1,3} ZHANG Yu-Kai^{1,3}
MAO Xu-Ming^{2,3*} LI Yong-Quan^{2,3}

(1. Hangzhou Huadong Medicine Group Biotechnology Institute Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310011, China)

基金项目：“重大新药创制”科技重大专项项目(No. 2011ZX09202-101-11)

*通讯作者: Tel: 86-571-88208569; 信箱: xmmao@zju.edu.cn

收稿日期: 2013-03-20; 接受日期: 2013-07-02

- (2. Institute of Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)
(3. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Microbial Biochemistry and Metabolic Engineering, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

Abstract: Daptomycin, produced by *Streptomyces roseosporus*, is a novel cyclic lipopeptide antibiotic against Gram-positive pathogenic bacteria. It is regarded as a potent antibiotic following vancomycin, the last defense line of antibiotics. This review summarizes the research advances of daptomycin in recent years, mainly including structure, action mechanism, biosynthesis and genes involved in biosynthesis of daptomycin. The strategies of combinatorial biosynthesis are also reviewed to study the relationship between structure and the anti-microbial activity to find potent daptomycin derivatives with a wider spectrum and higher anti-microbial activities. Finally, some strategies to improve daptomycin yields are also introduced, which will be the basis to reduce the daptomycin cost in industrial production.

Keywords: Daptomycin, Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), Derivatives, Combinatorial biosynthesis, Regulatory proteins

达托霉素最初是在玫瑰孢链霉菌的发酵液中分离到的环脂肽类新型抗生素。2003年美国Cubist公司将其研制成新型抗革兰氏阳性细菌药物。达托霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)和耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)等高致病性耐药菌具有很好的杀菌效果,因此被美国FDA批准用于治疗革兰氏阳性菌引起的复杂皮肤感染和结构性皮肤感染,以及金黄色葡萄球菌引起的心脏感染及菌血症^[1-2]。

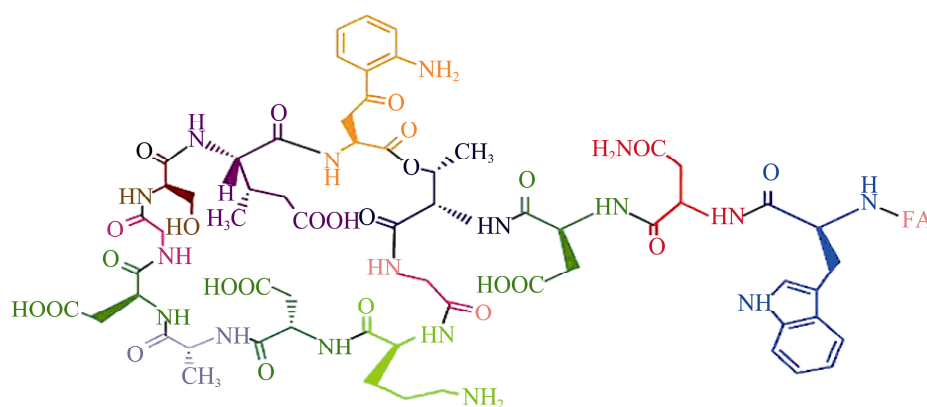
达托霉素在临床上的显著优势,以及其全新的结构类别,使得环脂肽类化合物成为当今新抗生素筛选的热点。达托霉素及其它结构类似抗生素合成基因簇的成功克隆与测序以及合成机制的深入阐释,为继化学法和化学-酶合成法之后的组合生物合成技术合成达托霉素的结构类似物提供了理论基础。对达托霉素的结构进行修饰,可得到达托霉素衍生物的化合物文库,对其活性的筛选可以找到更高效广谱的抗生素。

目前国际上达托霉素发酵单位已接近2 g/L^[3],而国内整体发酵单位远低于这一水平,

针对发酵产量低的现状,国内已经有部分相关研究来提高其产量,但在基因水平上进行定向改造来提高达托霉素的产量报道不多,本文在达托霉素合成基因簇分析,以及玫瑰孢链霉菌对癸酸耐受机理研究的基础上,总结基因定向改造的方法来构建达托霉素高产菌株。

1 达托霉素的结构及理化性质

玫瑰孢链霉菌的天然发酵产物除达托霉素外,还有一组包含不同长度脂酰基侧链的环脂肽复合物,主要有A21978C1-3,结构见图1。这些组分共有的结构为由13个氨基酸构成的肽,其中Kyn₁₃的羧基和Thr₄的羟基之间形成酯键,构成含有10个氨基酸的环状结构,在环外还有3个氨基酸构成的尾链。Trp残基氨基上连有一个脂酰基侧链,达托霉素的脂酰基侧链为正癸酰基,而A21978C1-3分别含有反异十一烷酰基、异十二烷酰基和反异十三烷酰基,因此这些杂质成分都是达托霉素的同系物^[4]。作为环脂肽类抗生素,达托霉素分子结构中既含有亲水性氨基酸,又含有脂链以及疏水性氨



Daptomycin: FA=CO(CH₂)₈CH₃, *n*-decanoyl

A21978C1: FA=CO(CH₂)₆CH(CH₃)CH₂CH₃, *anteiso*-undecanoyl

A21978C2: FA=CO(CH₂)₈CH(CH₃)₂, *iso*-dodecanoyl

A21978C3: FA=CO(CH₂)₈CH(CH₃)CH₂CH₃, *anteiso*-tridecanoyl

图 1 A21978C 的结构^[4-5]

Fig. 1 Structures of A21978C^[4-5]

基酸,这就决定了其具有很好的水溶性及一定的脂溶性。脂溶性使之容易与细菌的磷脂层反应,因而有良好的抗菌效果^[6]。

2 达托霉素的作用机制

达托霉素的抗菌作用机制还没有彻底阐明。最新报道的作用机制模型认为,达托霉素与 Ca²⁺以 1:1 的比例结合后,达托霉素构象发生改变并聚集形成一个包含 14-16 个单体的微团,随后微团接近细菌的细胞膜。当微团非常靠近磷脂双分子层时会发生解离,在脂肪酸尾链的作用下,达托霉素插入到磷脂双分子层中,使磷脂双分子层形成孔洞,导致钾离子外流,细胞膜去极化,最终导致细胞死亡^[7]。达托霉素特殊的结构决定其作用机制比较特殊,较少与其他抗生素产生交叉耐药的问题,因此在临床上具有较高的应用价值^[6]。

3 天然达托霉素的生物合成

3.1 达托霉素生物合成基因簇

Tn5096 和 Tn5099 转座突变分析表明,达托

霉素合成基因簇(图 2)位于距线性染色体末端约 400 kb 的位置。该基因簇已经通过 BAC 载体成功克隆并测序。进一步的生物信息学,基因敲除及回补实验验证了基因簇内部分基因的功能(表 1)^[8]。环脂肽类的抗生素是由不依赖于核糖体的非核糖体肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)合成。达托霉素合成基因簇内, *dptA*、*dptBC* 和 *dptD* 分别编码达托霉素合成酶 NRPS 的 3 个亚基 DptA、DptBC 和 DptD。*dptA* 基因上游为 *dptE* 和 *dptF*, 分别编码环脂肽类抗生素合成过程中酰基-辅酶 A 连接酶(DptE)和酰基载体蛋白(DptF), 这 2 个蛋白与脂肪酸的活化相关,是达托霉素起始合成模块^[9]。基因簇还包含达托霉素抗性、转运、修饰和调控等相关基因。*dptI* 编码甲基转移酶,催化 MeGlu₁₂ 的合成。*dptJ* 编码色氨酸 2,3-双加氧酶,参与 Kyn₁₃ 的形成过程^[8]。*dptG* 编码 MbtH 的同源蛋白,可能参与氨基酸的修饰过程,但是在达托霉素合成过程中的具体作用还没有深入的研究报道^[10]。DptH 在达托霉素合成过程中起到纠错作用,清除错误引入的前体,以提高合成的正确性^[11]。将 *dptP*

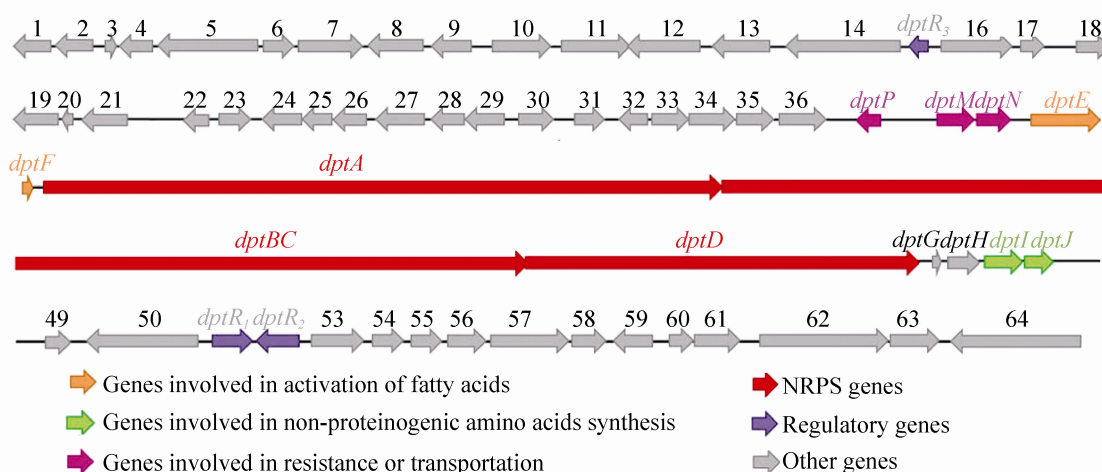


图 2 达托霉素的合成基因簇^[4]

Fig. 2 Daptomycin biosynthetic gene cluster^[4]

表 1 达托霉素合成基因簇中部分基因的功能		
Table 1 Functions of partial genes in daptomycin biosynthetic gene cluster		
基因簇上开放阅读框序号 ORF	基因 Gene	功能 Function
37	<i>dptP</i>	与对达托霉素的抗性或转运有关
38	<i>dptM</i>	ABC 转运蛋白, ATP 结合蛋白
39	<i>dptN</i>	ABC 转运蛋白, 渗透酶
40	<i>dptE</i>	酰基辅酶 A 连接酶
41	<i>dptF</i>	酰基载体蛋白(ACP)
42	<i>dptA</i>	肽合成酶
43	<i>dptBC</i>	肽合成酶
44	<i>dptD</i>	肽合成酶
45	<i>dptG</i>	MbtH 的同源蛋白(功能未知)
46	<i>dptH</i>	硫酯酶
47	<i>dptI</i>	甲基转移酶
48	<i>dptJ</i>	色氨酸 2,3-双加氧酶
51	<i>dptR₁</i>	调控蛋白
52	<i>dptR₂</i>	调控蛋白

基因转到对达托霉素敏感的生二素链霉菌后, 能够使之对达托霉素产生抗性, 说明 DptP 与玫瑰孢链霉菌对达托霉素的抗性或转运有关。DptP 是否和 DptM 及 DptN (*dptM/dptN* 编码 ABC 转运蛋白)共同对达托霉素进行转运还没有进行研究^[8]。*dptR₁*、*dptR₂* 及 *dptR₃* 可能参与

达托霉素合成的基因表达调控过程^[4]。

3.2 达托霉素的生物合成(图 3)

3.2.1 非蛋白质源氨基酸的合成: 达托霉素分子结构包含 13 个氨基酸, 其中 3 个 D-氨基酸是在 E 结构域(见下文)的作用下将 L-氨基酸异构化为 D-构型的产物。此外还有 Orn₆、MeGlu₁₂

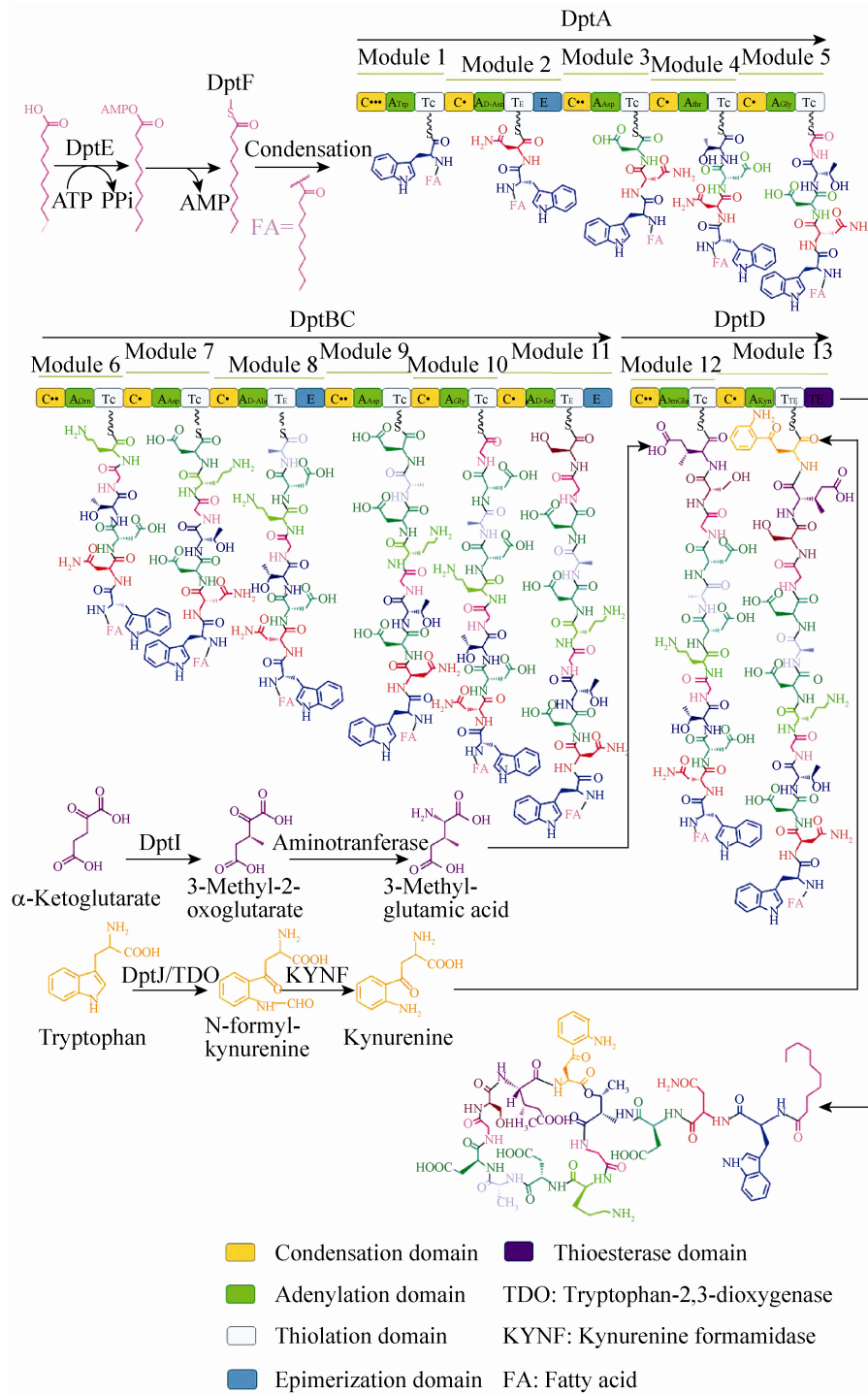


图3 达托霉素 NRPS 结构域模式图及其生物合成过程^[7,12]

Fig. 3 Domain organization of daptomycin NRPS and daptomycin biosynthesis^[7,12]

和 Kyn₁₃ 3 个非蛋白质源的氨基酸。达托霉素的合成基因簇上并没有 Orn₆ 合成基因, 说明初级代谢能够提供足够的 Orn 来合成达托霉素^[8]。DptI 是一个依赖于 SAM 的甲基转移酶, 将 SAM 上的甲基转移到 α -酮戊二酸上将其催化生成 3-甲基-2-酮戊二酸, 随后通过转氨酶的转氨基作用生成甲基谷氨酸^[7]。Kyn 是 L-Trp 犬尿氨酸降解途径中的一个中间产物, Trp 在色氨酸-2,3-双加氧酶(DptJ)的催化下先形成 N-甲酰犬尿氨酸, 随后通过犬尿氨酸甲酰胺酶去掉甲酰基形成 Kyn。研究表明, 增加一个拷贝的 *dptJ* 基因可使达托霉素的产量提高到原来的 110%^[12]。

3.2.2 酰基化作用: 环脂肽类抗生素含有不同的脂肪酸侧链, 这些脂肪酸在合成到环脂肽之前必须先经过活化, DptE 与 DptF 即起到脂肪酸活化的作用。DptE 利用 ATP 将脂肪酸活化为脂酰-AMP, 随后将脂酰基转移到 holo-DptF 上的磷酸泛酰巯基乙胺基的巯基上(DptF 已由无活性的脱辅酶形式 apo-DptF 转化为有活性的全酶形式 holo-DptF), 从而起始环脂肽类抗生素的合成^[9]。

3.2.3 NRPS 途径合成环脂肽: 达托霉素作为一种环脂肽类抗生素, 其肽链由不依赖于核糖体的非核糖体肽合成酶(NRPS)合成。达托霉素的 NRPS 包括 DptA、DptBC 和 DptD 3 个亚基, 这 3 个亚基分别包括 5、6 和 2 个模块, 每个模块负责将一个特定氨基酸依次添加到正在合成的肽链上。一个典型的 NRPS 模块含有 3 个催化结构域: 识别并活化氨基酸底物的 A 结构域(Adenylation domain), 结合活化氨基酸残基的 T 结构域(Thiolation domain), 以及催化肽键形成的 C 结构域(Condensation domain)^[4]。达托霉素生物合成的 NRPS 有 10 种不同类型的 A 结构域。氨基酸的活化分为两步化学反应, 首先 A 结构域结合相应的氨基酸后, 在 Mg²⁺存在的条

件下, 消耗 ATP 形成氨酰基-AMP, 随后将氨酰基转移到 T 结构域的磷酸泛酰巯基乙胺基的巯基上^[13]; 达托霉素 NRPS 的 C 结构域有 3 种: CI、CII 和 CIII。CI 是最常见的一种, 位于 T 结构域之后, 催化被活化的 L-氨基酸与正在延长的肽链之间的缩合; CII 位于 E 结构域之后或亚基起始, 位于 E 结构域之后的 CII 结构域负责被活化的 D-氨基酸与正在延长的肽链之间的缩合; CIII 为 DptA 的起始结构域, 催化被活化的脂肪酸与活化的第一个氨基酸之间的缩合^[4]。起肽基载体蛋白(PCP)作用的 T 结构域在磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的作用下使其中一个特定的 Ser 残基与磷酸泛酰巯基共价连接, 使得 T 结构域由无活性的脱辅基形式转化为有活性的全酶形式。T 结构域位于 A 结构域之后, 为正在延伸的肽链及已经被活化但还没缩合的氨基酸提供附着位点^[2]。生物化学和 BLAST_P 分析表明 T 结构域也有 3 种类型: T_C、T_E 和 T_{Te}。这 3 种类型 T 结构域除了与上游的 C 结构域及 A 结构域相互作用外, 还分别与下游的 C 结构域、E 结构域或 TE 结构域相互作用(E 结构域/TE 结构域的功能见下文)。这 3 个结构域以 C-A-T 方式排列, 这些结构域的特异性赋予了每个模块催化氨基酸种类的特异性^[15]。此外, 在达托霉素 NRPS 的 DptA、DptBC 亚基中, 第 2、8、11 个模块 C-A-T 后还各有一个起差向异构作用的 E 结构域(Epimerization domain), 分别负责将 L-Asn₂、L-Ala₈、L-Ser₁₁ 转化为 D-Asn₂、D-Ala₈、D-Ser₁₁。在 DptD 最后一个模块中还有一个将最终产物释放及环化的 TE 结构域(Thioesterase domain)^[16]。

达托霉素的脂肪酸侧链为正癸酰基, 被 DptE、DptF 活化后通过 DptE、DptF 与 DptA 的相互作用, 在 DptA 第一个 CIII 结构域的催化下与第一个 T 结构域上的氨基酸 Trp₁ 之间发生

缩合^[9]。经过重复的 C-A-T 或 C-A-T-E 催化, 形成一个通过硫酯键连接在 NRPS 上的链状脂肽, 最后 TE 结构域催化 Kyn₁₃ 与 Thr₄ 之间形成酯键, 将达托霉素从 NRPS 上释放下来^[14]。

4 达托霉素结构改造

达托霉素是第一个被批准应用于临床的环脂肽类抗生素, 因其结构及作用机制比较特殊而引发广泛关注。虽然在体外实验中达托霉素对肺炎链球菌有很强的抗菌活性, 但是由于肺部气道具有独特组织构造, 含有复杂的蛋白和脂类混合物构成的表面活性剂, 因此达托霉素对肺炎链球菌引起的支气管肺泡肺炎模型无效^[17-18]。很多研究者对达托霉素结构进行改造, 通过对达托霉素及其衍生物抗菌活性的比较来研究结构与活性之间的关系, 并期望得到抗菌活性更高, 同时毒性较低的达托霉素结构类似物。

4.1 半合成修饰法

达托霉素起初是作为 A21978C 混合物的一个组分被分离出来的。A21978C 的脂肪酸侧链被去酰化酶水解后剩下一个有自由氨基的十三肽, 然后用一系列脂酰基重新对其酰基化。当用正癸酰基进行酰基化时, 即合成达托霉素^[4]。由于 Orn 有一个游离的氨基, 也能够被酰基化, 所以在去酰基化前先用二碳酸二叔丁酯对其保护, 最后再用三氟乙酸去除保护作用。此外, 去酰基化的十三肽其 N-端环外的两个氨基酸可以通过 Edman 降解去掉, 随后再与 N-端癸酰基化的 L-Trp-D-Asn 或 L-Trp-L-Asn 二肽连接。通过二者生物活性的比较可研究 Asn₂ 的构型与达托霉素抗菌活性的关系。类似的方法已经被用来去掉环外的 3 个氨基酸来合成更多达托霉素的同系物^[4-5,7]。

半合成修饰法只局限于环外氨基酸的改造, 虽然固相合成策略和化学-酶合成法可快速合成

目标分子, 并且可对环内氨基酸进行修饰或改造^[6], 但是 3mGlu 的缺乏给固相合成策略及化学-酶合成法改造达托霉素带来困难^[11]。相对来说, 组合生物合成技术就表现出较好的优越性。

4.2 组合生物合成技术

为了方便基因工程改造菌株和实现组合生物合成, 在染色体的不同位点表达 NRPS 基因是一种重要的途径。通过把 2 个 NRPS 基因分别插入到不同载体中, 该载体可以把 2 个 NRPS 基因分别整合到宿主 Φ C31 *attB* 位点和 IS117 *attB* 位点, 并使它们在强启动子 *ermEp** 下进行表达, 形成异位回补系统。该系统的有效性已经通过 *dptA*、*dptD* 等基因的异位表达得以验证^[8]。A54145、CDA 与达托霉素有相似的结构, 都是由 NRPS 合成, NRPS 模块的排列顺序决定环脂肽抗生素氨基酸的排列顺序, 且三者合成基因簇都得以克隆。NRPS 合成机制的研究以及异位回补系统的构建是利用组合生物合成技术来合成达托霉素同系物的基础。对亚基、结构域或模块的替换可对达托霉素的结构进行改造, 得到多种不同生物活性达托霉素的衍生物^[5,17,19]。

4.2.1 亚基替换: 将 A54154 的 *lptD* 或 CDA 的 *cdaPS3* 基因替换达托霉素的 *dptD* 基因, 可获得第 13 个氨基酸为 Ile 或 Trp 的达托霉素衍生物。这 2 种衍生物的产量分别是原达托霉素产量的 25% 和 50%。产量的降低可能是由于 *dptBC* 与替换的基因交流受阻造成的^[11]。另一方面, 这些达托霉素的衍生物也可以被 *LptD* 或 *CdaPS3* 的 TE 结构域有效环化。

4.2.2 模块或结构域替换: 达托霉素的 NRPS 中, 包含 CA_{Ala}TE 的第 8 个模块及包含 CA_{Ala}TE 的第 11 个模块, 其结构域是高度同源的, 使两者之间进行模块替换成为可能。利用 λ 噬菌体 RED 重组系统, 用编码第 11 个模块中 CA_{SerT} 的 DNA 序列来替换编码 CA_{Ala}T 的 DNA 序列,

从而完成结构域 CA_{Ala}T 对 CA_{Ser}T 的替换。同样, 也可以利用结构域 CA_{Ser}T 对 CA_{Ala}T 进行替换。虽然这两种衍生物的产量下降, 但是与达托霉素相比, 抗菌活性没有明显改变^[2]。

此外, 以同样的方法用 A54145 NRPS 中 LptC 亚基的 CA_{Asn}T 结构域来替换达托霉素第 8 个模块的 CA_{Ala}T 或第 11 个模块的 CA_{Ser}T, 可以得到含有 D-Asn₈ 或 D-Asn₁₁ 的达托霉素的衍生物, 这也可以通过 CA_{Asn}TE 整个模块的替换而获得, 并且通过 CA_{Asn}T 替换得到衍生物的产量较 CA_{Asn}TE 替换得到的衍生物的产量要高, 这可能是由于 E 结构域处于原来位置会更有利于蛋白之间的交流。同时可以说明第 8 和第 11 个模块的 E 结构域可以催化 L-Ala, L-Ser 和 L-Asn 形成相应的 D-构型的氨基酸。生物活性分析发现, 含 D-Asn₁₁ 衍生物的活性与达托霉素活性相差不大, 但是, 含 D-Asn₈ 衍生物的活性显著下降^[2]。用 LptD 的 CA_{Ile13}T 或 CdaPS3 的 CA_{Trp13}T 模块来替换 DptD 的 CA_{Kyn13}T 模块, 也可以得到含有 Ile₁₃ 或 Trp₁₃ 的达托霉素衍生物, 但是相对于 DptD 整个亚基的替换而得到的衍生物有更高的产率, 这可能也是因为 DptBC 与 DptD 亚基之间有更好的相互作用^[18]。可见, 保证亚基之间或模块之间最有利的相互作用对同系物的产量是比较重要的。用 LptC 的 CA_{Asn11} 结构域替换 DptD 的 CA_{Kyn13} 结构域, 可以产生含 Asn₁₃ 的新型衍生物。综合比较用 Trp、Ile 及 Asn 代替 Kyn₁₃ 而得到的衍生物的抗菌活性, 用 Trp 代替 Kyn₁₃ 不会增加抗菌活性, 而用 Asn 代替 Kyn₁₃ 会使生物活性降低, Ile 替换 Kyn₁₃ 导致抗菌活性下降到了 25%, 说明引进脂肪酸残基而非芳香族残基或许会干扰达托霉素微团形成过程中分子间的 π - π 堆叠作用, 而微团的形成对达托霉素的体内生物活性有很大作用^[20]。

此外, 通过多模块的替换得到达托霉素衍

生物的方法也有研究。利用 A54145 的 LptC 亚基的 4 个模块 D-Lys₈-OmAsp₉-Gly₁₀-D-Asn₁₁ 来替换达托霉素合成酶中的 D-Ala₈-Asp₉-Gly₁₀-D-Ser₁₁ 相应模块, 可以得到包括 D-Lys₈-Asp₉-Gly₁₀-D-Asn₁₁ 的衍生物, 虽然 D-Lys₈ 替换 D-Ala₈ 而使整个分子带电量从 -3 变为 -2, 但是此衍生物的活性并没有较大变化^[2]。

4.2.3 利用前体控制发酵工艺: 玫瑰孢链霉菌发酵液中除了 A21978C1-3 外还含有许多杂质, 因此, 达托霉素在玫瑰孢链霉菌天然发酵产物中含量很低^[3,14]。目前通过流加癸酸进行发酵可以提高达托霉素的发酵单位。卢文玉等对高产突变株 LC-KS-54 进行癸酸流加发酵, 达托霉素发酵效价较不加癸酸的对照组提高 21%^[21]。此外, 添加 Val 可以提高发酵液中 A21978C2 的产量, 添加 Ile 可以提高 A21978C1 和 A21978C3 含量, 添加 Leu 则可以生成 2 种新的衍生物(含有异癸酰基和异十三烷酰基)^[8]。因此在培养基中添加脂肪酸或氨基酸前体可以改变环脂肽类抗生素肽尾上的脂肪酸和特定位置的氨基酸, 以提高其目标组分产率或生成新的衍生物^[18]。

4.2.4 基因敲除: 将负责编码甲基转移酶的 *dptI* 基因敲除后, 所得产物中 3mGlu₁₂ 变为 Glu₁₂, 此衍生物的抗菌活性明显降低, 说明 3mGlu 对抗菌活性是重要的^[11]。

综上所述, 亚基、模块及结构域的替换与 *dptI* 敲除以及脂肪酸侧链的替换这几种手段可以相互结合, 共同对达托霉素结构进行改造。这几种遗传手段的综合运用, 可以建立一个达托霉素类似物的组合库来进一步筛选抗菌活性更好的分子^[2]。表 2 总结了部分达托霉素衍生物的生物活性。

5 提升达托霉素产量的策略

国内通过对发酵工艺的优化来提高达托

表 2 达托霉素衍生物的抗菌活性^[18]
Table 2 Antibacterial activities of daptomycin derivatives^[18]

第 8 位 Position 8	第 11 位 Position 11	第 12 位 Position 12	第 13 位 Position 13	最小抑菌浓度 Minimal inhibitory concentration (MIC) (mg/L)
D-Ala	D-Ser	3mGlu	Kyn	0.5–1.0
D-Ala	D-Ser	Glu	Kyn	8.0
D-Ala	D-Ser	3mGlu	Trp	1.0
D-Ala	D-Ser	3mGlu	Ile	4.0
D-Ala	D-Ser	3mGlu	Asn	128.0
D-Ser	D-Ser	3mGlu	Kyn	1.0
D-Asn	D-Ser	3mGlu	Kyn	8.0
D-Asn	D-Ser	3mGlu	Ile	16.0
D-Asn	D-Ser	Glu	Kyn	128.0
D-Ala	D-Ala	3mGlu	Kyn	0.5–1.0
D-Ala	D-Asn	3mGlu	Kyn	1.0
D-Ala	D-Asn	3mGlu	Ile	4.0
D-Ala	D-Asn	Glu	Kyn	32.0
D-Lys	D-Asn	3mGlu	Kyn	1.0

注：第一行是指达托霉素，加粗字体表示 8, 11, 12, 13 位氨基酸替换，所有的衍生物脂肪酸侧链为反异十一烷酰基。MIC: 对 *S. aureus* ATTC 29213 的最小抑菌浓度。

Note: The first row represents daptomycin. Variations from daptomycin at amino acid positions 8, 11, 12, or 13 are shown in bold. All of the daptomycin analogs have the lipid side chain *anteiso*-undecanate. MIC: Minimal inhibitory concentration against *S. aureus* ATTC 29213.

霉素的产量已经有了较为详细的研究，包括前体物癸酸的补加策略及发酵培养基成分的优化^[22–24]。此外，对于达托霉素另一个研究热点是对达托霉素高产菌株的选育，通过抗性筛选、诱变突变提高达托霉素产量或通过提高玫瑰孢链霉菌对癸酸的耐受性来间接提高达托霉素产量也有较多报道^[21,25]。但诱变突变的方法是随机的，也伴随着筛选工作量大，周期长等问题。

最近，癸酸对玫瑰孢链霉菌的毒性及玫瑰孢链霉菌应答癸酸毒性的模型已经被提出：癸酸插入到玫瑰孢链霉菌的细胞膜，导致细胞膜的流动性受到干扰，从而抑制电子传递链及活性氧的生成。玫瑰孢链霉菌采取多种方式来应答癸酸毒性，包括提高细胞膜支链脂肪酸与直链脂肪酸的比率来降低细胞膜的流动性及通透性；通过激活抗氧化酶的表达来应对氧化损害；

此外细胞通过合成大量海藻糖和丙酮酸盐来减少活性氧的毒性等^[26]。在此模型基础上，通过对相关基因的定向改造，可以提高玫瑰孢链霉菌对癸酸的耐受性，进而可以在发酵过程中加入癸酸来提高达托霉素的产量。

此外，达托霉素作为一种由 NRPS 合成的次级代谢产物，其生物合成过程也受到复杂的代谢调控网络的调控。在天蓝色链霉菌中对 CDA 生物合成的调控作用，小分子化合物如 ppGpp、N-乙酰葡萄糖胺等参与的调控过程，以及途径特异性调控基因的调控机制已经有所研究。天蓝色链霉菌中 CDA 合成过程的调控研究对研究达托霉素的生物合成调控过程具有很大的指导意义^[14]。在达托霉素合成基因簇上有 3 个可能的调控基因：*dptR*₁、*dptR*₂ 和 *dptR*₃，初步研究发现 *dptR*₂ 对于达托霉素的产量起着正调

控作用, 因此通过高表达 *dptR₂*, 理论上可以提高达托霉素的产量。*dptM/N/P* 与玫瑰孢链霉菌对达托霉素的抗性或转运有关。对达托霉素合成过程的调控机制以及与抗性或转运等有关基因的研究, 同样提供了对生产菌株进行定向改造的基础。定向改造可以与诱变突变相结合来对玫瑰孢链霉菌进行改造, 来构建达托霉素的高产菌株。

6 展望

随着达托霉素合成基因簇上更多基因功能和达托霉素生物合成调控网络的深入研究, 越来越多达托霉素的衍生物将会被合成, 并且选育达托霉素高产菌株的方法也会越来越多, 如高表达 *dptJ* 基因提高达托霉素的产量。但是, 目前所研究的利用组合生物所得到的达托霉素衍生物的产量都降低。一旦高活性的达托霉素的同系物被筛选到, 发酵工艺优化及选育达托霉素高产菌株的方法或许可以为提高这些高活性化合物的产量提供参考。

参考文献

- [1] 刘伯宁, 石磊, 蒋沁. 环脂肽类抗生素研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(9): 520-524.
- [2] Nguyen KT, Ritz D, Gu JQ, et al. Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics related to daptomycin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(46): 17462-17467.
- [3] 王建平. 达托霉素菌种诱变及发酵条件研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2007.
- [4] Miao V, Coëffet-LeGal MF, Brain P, et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: Cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry[J]. Microbiology, 2005, 151(5): 1507-1523.
- [5] Baltz RH, Miao V, Wrigley SK, et al. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics[J]. Natural Product Reports, 2005, 22(6): 717-741.
- [6] 史丽娟, 石磊. 新型抗革兰阳性菌药物-达托霉素[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(7): 1100-1102.
- [7] Robbel L, Marahiel MA. Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(36): 27501-27508.
- [8] Baltz RH. Biosynthesis and genetic engineering of lipopeptide antibiotics related to daptomycin[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2008, 8(8): 618-638.
- [9] Wittmann M, Linne U, Pohlmann V, et al. Role of DptE and DptF in the lipidation reaction of daptomycin[J]. The FEBS Journal, 2008, 275(21): 5343-5354.
- [10] Baltz RH. Function of MbtH homologs in nonribosomal peptide biosynthesis and applications in secondary metabolite discovery[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(11): 1747-1760.
- [11] 万涛, 齐海山, 陈云琳, 等. 达托霉素及其衍生物生物合成的研究进展[J]. 化工进展, 2012(7): 1581-1586.
- [12] Liao GJ, Wang L, Liu Q, et al. Manipulation of kynurenine pathway for enhanced daptomycin production in *Streptomyces roseosporus*[J]. Biotechnology Progress, 2013, DOI: 10.1002/btpr.1740.
- [13] Sieber SA, Marahiel MA. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics[J]. Chemical Reviews, 2005, 105(2): 715-738.
- [14] Liao GJ, Shi TY, Xie JP. Regulation mechanisms underlying the biosynthesis of daptomycin and related lipopeptides[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2012, 113(3): 735-741.
- [15] Baltz RH. Combinatorial biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics: a model for synthetic biology to accelerate the evolution of secondary metabolite biosynthetic pathways[J]. ACS Synthetic Biology, 2012, DOI: 10.1021/sb300055e.
- [16] Doekel S, Coëffet-Le Gal MF, Gu JQ. Non-ribosomal peptide synthetase module fusions to produce derivatives of daptomycin in *Streptomyces roseosporus*[J]. Microbiology, 2008, 154(9): 2872-2880.
- [17] 王玮. 从天然产物到药物-达托霉素的发展历程[J]. 国外医药抗生素分册, 2009, 30(2): 59-62.
- [18] Baltz RH. Biosynthesis and genetic engineering of

- lipopeptides in *Streptomyces roseosporus*[J]. *Methods in Enzymology*, 2009, 458: 511–531.
- [19] Baltz RH. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(12): 1533–1540.
- [20] 顾觉奋, 张瑜. 达托霉素制备及结构改造研究进展[J]. *抗感染药学*, 2011, 8(3): 149–153.
- [21] 卢文玉, 闻建平, 范晶华, 等. 癸酸抗性突变株流加发酵法生产达托霉素[J]. *天津大学学报*, 2006, 39(z1): 20–24.
- [22] 吴旻, 王文轶, 王泽根, 等. 达托霉素发酵过程中前体癸酸的添加策略研究[J]. *药物生物技术*, 2012(2): 142–145.
- [23] 祝宇松, 陈国胜, 吴旻, 等. 达托霉素发酵培养基的响应面法优化[J]. *中国医药工业杂志*, 2010, 41(3): 183–186.
- [24] 何美儒, 金志华, 胡升, 等. 补加葡萄糖对玫瑰孢链霉菌发酵产达托霉素的影响[J]. *中国医药工业杂志*, 2012, 43(8): 662–665.
- [25] 卢文玉, 闻建平, 范晶华, 等. 激光诱变玫瑰孢链霉菌结合链霉素抗性筛选法选育达托霉素高产菌株[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 114–117.
- [26] Liao GJ, Liu Q, Xie JP. Transcriptional analysis of the effect of exogenous decanoic acid stress on *Streptomyces roseosporus*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 19.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. *微生物实验教程*[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. *核农学进展*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2013-00-00; 接受日期: 2013-00-00

(下转 p.1795)