

林可霉素生物合成的研究进展

刘瑞华*

(新宇药业股份有限公司 安徽 宿州 234000)

摘要: 林可霉素是林可链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)产生的林可酰胺类抗生素,它抑制细菌细胞的蛋白质合成,临床上主要用于治疗革兰氏阳性菌引起的感染性疾病。林可霉素生物合成基因簇已被克隆和测序。近年来,围绕林可酰胺和丙基脯氨酸的生物合成、调控等进行了深入研究,其硫化反应取得了突破性成果,本文综述了林可霉素生物合成的新进展。

关键词: 林可霉素, 生物合成, 丙基脯氨酸, 林可酰胺, 林可链霉菌

Proceedings of lincomycin biosynthesis

LIU Rui-Hua*

(Xinyu Pharmaceutical Co. Ltd., Suzhou, Anhui 234000, China)

Abstract: Lincomycin, produced by *Streptomyces lincolnensis*, is a lincosamide antibiotic, which inhibits the protein biosynthesis of bacteria, and widely used to treat the infectious diseases caused by the Gram positive bacteria in clinic. Lincomycin biosynthetic gene cluster (*lmb*) was cloned and sequenced. Biosynthesis and regulation of lincosamide and propylproline were extensively elusive with the breakthrough of S-functionalization of lincomycin. This article reviewed the recent proceedings and achievements on the process of lincomycin biosynthesis.

Keywords: Lincomycin, Biosynthesis, Propylproline, Lincosamide, *Streptomyces lincolnensis*

林可霉素(图 1)是林可链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)产生的林可酰胺类抗生素,作用于敏感菌核糖体,通过与 50S 亚基 23S rRNA 基因的中心环相结合,阻止肽链的延长,从而抑制细菌细胞的蛋白质合成。临床上,林可霉素主要用于治疗革兰氏阳性菌引起的感染性疾病。林可霉素还用于半合成制备克林霉素,是林可霉素的半合成的氯化衍生物,适用于革兰氏阳性菌和厌氧菌引起的各种感染性疾病,也可以用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

引起的感染。克林霉素抗感染能力强、治疗范围广,被认为是 20 种最重要的抗生素之一^[1]。从结构上看,林可霉素是由林可酰胺(Lincosamide, LSM)和丙基脯氨酸(Propylproline, PPL)两部分缩合并后修饰而成。近年来,林可霉素生物合成机理研究取得了实质性成果,生物合成途径日渐清晰。

1 林可霉素生物合成基因簇的组织结构

1995 年德国 Peschke 等克隆并测序了高产菌株林可链霉菌 78-11 的林可霉素生物合成基因簇

*Corresponding author: Tel: 86-557-3621247; E-mail: liuruihua001@wbm.com.cn

Received: December 08, 2017; Accepted: February 12, 2018; Published online (www.cnki.net): February 13, 2018

*通信作者: Tel: 86-557-3621247; E-mail: liuruihua001@wbm.com.cn

收稿日期: 2017-12-08; 接受日期: 2018-02-12; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-02-13

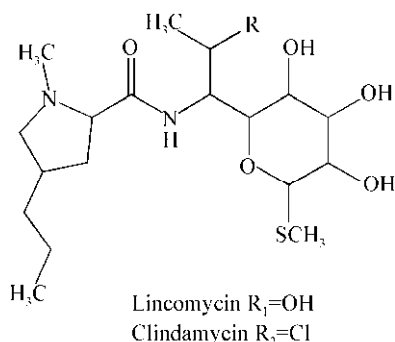


图1 林可霉素和克林霉素分子结构

Figure 1 Structure of lincomycin and clindamycin

(Lincomycin biosynthetic gene cluster, *lmb*)^[2]。2008 年捷克 Koběrská 等对林可链霉菌 ATCC25466 的 *lmb* 进行测序^[3], 2017 年上海交通大学白林泉等公开了林可链霉菌 NRRL2936 的基因组测序和 *lmb* 序列^[4]。这 3 个菌株的 *lmb* 组织结构是基本一致的, 有 25 或 26 个功能基因和调节基因、3 个抗性基因, 如图 2 所示。序列分析显示, ATCC25466 与 NRRL2936 中 *lmb* 的序列相似性为 99%, 但与林可链霉菌 78-11 相比, 大多数 *lmb* 基因编码产物差异较小, 个别基因差异很大。在林可链霉菌 ATCC25466 中 *lmbI* 和 *lmbH* 基因融合为一个基因 *lmbIH*, *lmbN*、*lmbT* 和 *lmbW* 基因序列变长了, *lmbR* 在 5'-端截断而变短, 而 *lmbD* 和 *lmbZ* 基因编码的氨基酸序列差异达 11%。

通过生物信息学分析、催化功能、遗传学研究, 已经明确了 *lmb* 的部分基因功能, 汇总结果见表 1。

2 LSM 的生物合成

研究者对 LSM 生物合成做了很多研究。1984 年 Brahme 等^[5]通过同位素标记饲喂实验结合自旋偶联方法, 提出由 1 个 5-磷酸戊糖和 1 个 7-磷酸景天庚酮糖经过碳链断裂和转移, 生成 1 个 4-磷酸赤藓糖和 8-磷酸辛酮糖, 而后 8-磷酸辛酮糖经过多步反应而生成甲硫基林可酰胺(Methylthiolincosamide, MTL)。1995 年 Peschke 等^[2]通过对 *lmb* 的生物信息学分析, 提出了可能参与 MTL 合成的基因。2012 年 Sasaki 等^[6]采用体外酶催反应确定了 LSM 合成中重要反应步骤及产物的构型。第一步由转醇醛酶 LmbR 催化, C5 受体 5-磷酸 D-核糖和 C3 供体 6-磷酸果糖或 7-磷酸景天庚糖的缩合, 生成 8-磷酸辛酮糖。第二步由 C1-C2 异构化酶 LmbN 催化, 生成中间产物 8-磷酸辛糖。磷酸激酶 LmbP 催化 8-磷酸辛糖的 C1 位羟基磷酸化, 转化为 1,8-双磷酸辛糖。2014 年 Lin 等^[7]对 LmbK 和 LmbO 蛋白进行了催化反应功能研究, 磷酸酶 LmbK 催化 1,8-双磷酸辛糖脱磷酸转化为 1-磷酸辛糖; 再经过 *lmbO* 编码的 1-磷酸鸟苷酸转移酶将其转化为 GDP-辛糖。随后发生转氨(LmbS)、脱水(LmbM)、还原(LmbZ)等反应, 但还没有得到生化反应的证实。LSM 生物合成途径见图 3。

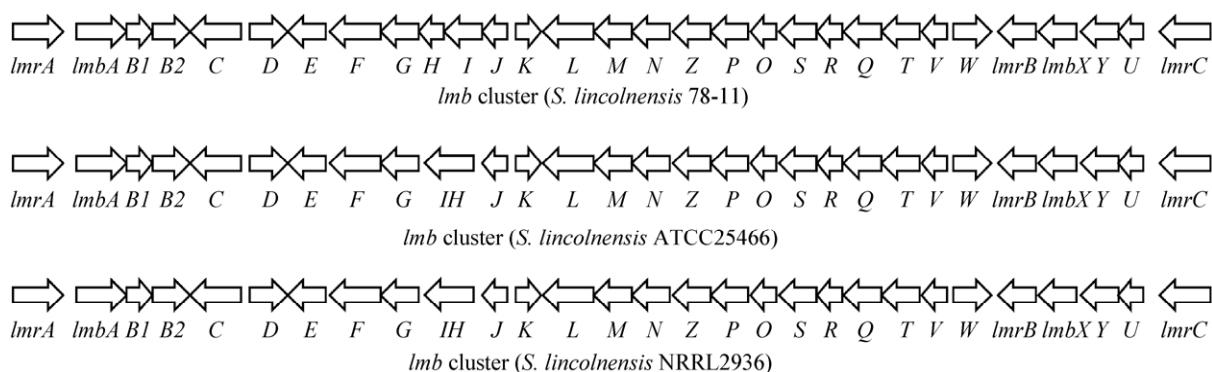


图2 林可霉素的生物合成基因簇

Figure 2 The lincomycin biosynthetic gene clusters

表 1 林可霉素生物合成基因及功能

Table 1 Genes and putative functions of lincomycin biosynthetic gene cluster

生物合成 Biosynthesis	基因名称 Gene name	功能 Function
LSM	<i>lmbR</i>	Transaldolase, generating octulose
	<i>lmbN</i>	Bio-functional enzyme, 1,2-isomerase, generating 8-phosphate D-octose
	<i>lmbP</i>	Phosphate kinase, generating 1,8-biphosphate octose
	<i>lmbK</i>	Phosphatase, generating 1-phosphate octose
	<i>lmbO</i>	Guanylyl transferase, generating GDP-octose
	<i>lmbL</i>	Putative UDP-glucose dehydrogenase
	<i>lmbM</i>	Putative glucose 4,6-dehydrase
	<i>lmbS</i>	Putative aminotransferase
	<i>lmbZ</i>	Putative oxidoreductase
PPL	<i>lmbB2</i>	L-tyrosine-3-hydroxylase, generating L-dopa
	<i>lmbB1</i>	L-dopa-2,3-dioxygenase, catalysing ring extradiol cleavage and intramolecular cyclization
	<i>lmbW</i>	C-methyltransferase, key to formation of lincomycin A
	<i>lmbA</i>	Glutamyltransferase, possibly catalyzing C–C bond cleavage
	<i>lmbX</i>	Putative isomerase
	<i>lmbY</i>	Putative F-420-dependent reductase
	<i>lmbJ</i>	N-methyltransferase for N-methylation of PPL or N-demethyl-LSM
Condensation and post modification	<i>lmbC</i>	Adenylyltransferase for activation of PPL with ATP
	<i>lmbT</i>	Glycosyltransferase for activation of LSM by EGT
	<i>lmbN</i>	Peptidyl carrier protein, condensation scaffold
	<i>lmbD</i>	Condensation enzyme for assembly of activated PPL and LSM
	<i>lmbF</i>	Pyridoxal-5'-phosphate -dependent lyase, S–C bond cleavage
	<i>lmbV</i>	Glycosyltransferase, replacing EGT with MSH
	<i>lmbE</i>	Amidase, converting MSH S-conjugate into GlcN-Ins and mercapturic acid derivative
	<i>lmbG</i>	S-methyltransferase, S-methylation of lincosamide
Resistance	<i>lmrA</i>	Transmembrane transporter, invovled in secretion of lincomycin
	<i>lmrB</i>	23S rRNA methyltransferase, increasing resistance of ribosome
	<i>lmrC</i>	ABC transporters, involved in exflux of lincomycin
Regulation	<i>lmbU</i>	Positive regulation confirmed by genetic experiment
	<i>lmbIH</i>	Putative regulation
	<i>lmbQ</i>	Putative regulation

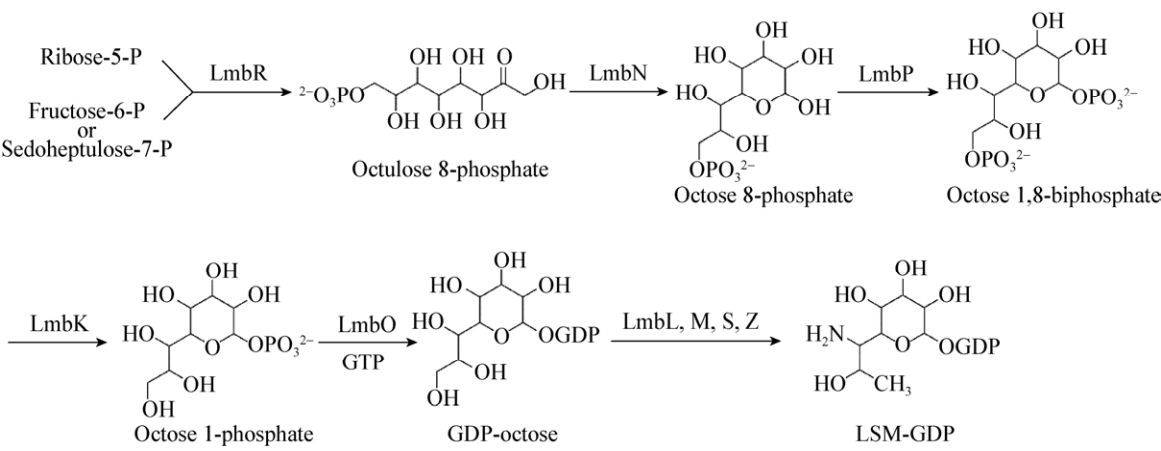


图 3 LSM 生物合成途径

Figure 3 LSM biosynthetic pathway

3 PPL 的生物合成

碳同位素标记显示, L-酪氨酸是 PPL 的合成前体。安曲霉素、托马霉素、西伯里亚霉素、胞诺斯霉素、侯马霉素结构中含有丙基脯氨酸(Propylproline, PPL)或其类似结构, 由于具有较高的氨基酸同源性, 推测 *lmbA*、*lmbB1*、*lmbB2*、*lmbW*、*lmbX*、*lmbY* 等参与 PPL 合成。

LmbB2 是一种亚铁血红素型的 L-酪氨酸羟化酶^[8], 催化 PPL 合成途径第一步反应, 使 L-酪氨酸 3 位羟基化, 转变成 L-多巴^[9]。LmbB1 是 L-多巴邻位双加氧酶, 催化 PPL 反应的第二步反应, 使 L-多巴 2,3 位加氧裂解开环^[10]。Colabroy 等^[11]通过停流技术、前稳定态、进度曲线等进一步研究了 L-多巴双加氧酶的动力学四步反应机制。L-多巴首先被 LmbB1 酶催化成线性的半醛, 然后环化为终产物, 但遗憾是没有鉴定出该产物的结构^[11-12]。

天津大学赵广荣教授课题组^[13]通过基因敲除和回补实验表明, LmbW 是第一个甲基转移酶, 负责 PPL 中侧链的甲基转移反应。缺失 *lmbW* 的菌株, 只能合成林可霉素 B, 没有林可霉素 A。可见 *lmbW* 是林可霉素 A 和林可霉素 B 组分的决定基因。LmbY 是氧化还原酶, 参与 PPL 途径中双键的还原反应。敲除 *lmbX* 基因后, 突变菌株不产林可霉素, 其 PPL 的侧链中出现了不饱和双键; 而加入 PPL

后, 菌株又恢复了合成林可霉素的能力; 加入丁基-脯氨酸和戊烷基-脯氨酸后, 能合成丙基林可霉素和丙基戊烷基林可霉素^[14]。Jiraskova 等^[15]对敲除 *lmbA*、*lmbX* 和 *lmbY* 基因菌株的中间代谢物进行了分析和结构鉴定, 推定了可能的生化反应。如 LmbW 催化底物可能是脯氨酸双氢丙酮酸, LmbA 可能催化醛酸链 C-C 键的裂解反应, LmbX 可能是异构酶。综合截至目前的研究进展, 提出了 PPL 的生物合成的基本途径(图 4)。

4 LSM 与 PPL 的缩合及其后修饰

早期的研究推测是 MTL 与 PPL 缩合生成林可霉素, 但近几年的实验显示, 更有可能是 LSM 与 PPL 的缩合, 然后是修饰。中国科学院上海有机化学研究所刘文教授课题组^[16]研究了两种小分子硫醇分子的功能, 解决了长期以来八碳糖单元是如何被活化、转移、硫来源及其修饰等问题。麦角硫因(Ergothioneine, EGT)作为载体, 被转移酶 LmbT 催化, 发生亲核置换反应, 将林可酰胺从 GDP 上转移到 EGT 上^[16], 生成 EGT S-林可酰胺, 使 LSM 成为缩合的活性形式。PPL 被活化成 PPL-AMP, 进入缩合反应。

LSM 与 PPL 的缩合反应很独特, 催化该反应的酶是非核糖体多肽酶^[17]。*lmbC* 基因编码的 LmbC 是腺苷化蛋白^[18], 使 PPL 活化形成 PPL-AMP。*lmbD* 基因编码的蛋白是缩合酶。LmbN 蛋白在 N 末端

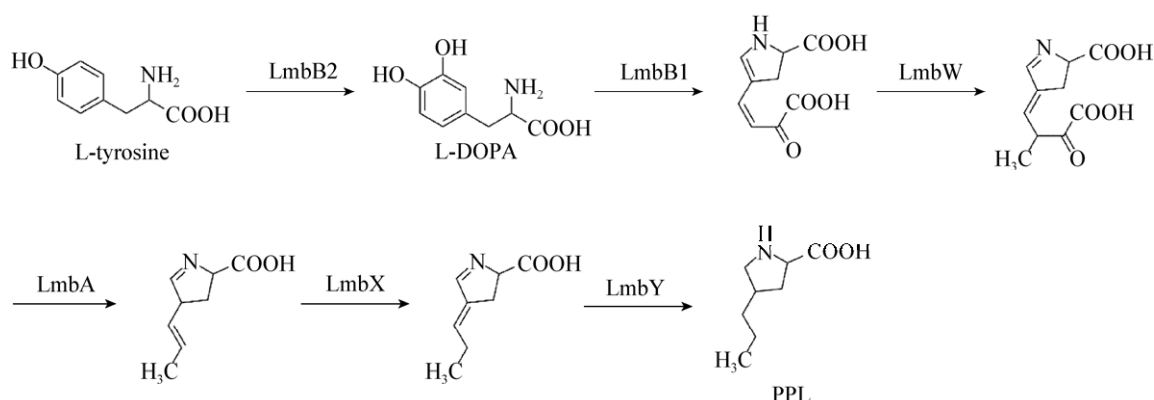


图 4 PPL 生物合成途径

Figure 4 PPL biosynthetic pathway

有一个肽酰载蛋白结构域,起缩合反应载体支架的作用。分别敲除 *lmbC*、*lmbN* 和 *lmbD* 基因,发酵产物均为 PPL 和 EGT-S 林可酰胺。*LmbC* 激活了 PPL 和 ATP,并转移到 *LmbN* 的肽酰载蛋白结构域上。再由 *LmbD* 催化 PPL 和 EGT S-林可酰胺的缩合^[16],生成 EGT S-结合物。

lmbV 编码的蛋白属于 DinB-2 超级家族,拥有保守的类似 DinB-2 的结构域,参与不同低分子量硫醇的反应。敲除 *lmbV* 基因,突变菌株不再产林可霉素,而回补菌株一定程度上恢复了生产林可霉素的能力。由于 *LmbV* 蛋白难以纯化出来,用 *LmbV* 的同源蛋白 *CcbV* (存在于天青菌素生物合成基因簇中,相似性 57%)以缩合产物 EGT S-结合物为底物,与放线硫醇(Mycothiols, MSH)进行体外反应实验,生成的产物为 MSH S-结合物。由此可见 *LmbV* 是转移酶,将 EGT 置换为 MSH^[16]。MSH 为林可霉素的合成提供了硫元素。

LmbE 是一种酰胺酶, *lmbE* 基因的敲除使突变菌株合成林可霉素的能力大大降低,但积累了 MSH S-林可霉素衍生物。通过基因组分析和回补实验表明,林可霉素生物合成基因簇外的 *lmbE3457* 是 *lmbE* 的同功基因,其编码酶水解 MSH S-结合物,生成硫醇尿酸基 S-结合生物,释放氨基葡萄糖-肌醇(GlcN-Ins)。这证实了 *LmbE* 酶的水解作用,参与了 MSH 的再生过程^[16]。硫醇尿酸基 S-结合物如何脱去乙酰基生成半胱氨酰 S-结合物仍然不清楚。

LmbJ 是第二个甲基转移酶,失活 *lmbJ* 基因,阻断了突变株 N-去甲基林可霉素的合成^[19]。最近研究表明^[20]以 SAM 为甲基供体, *LmbJ* 催化生成半胱氨酰 S-结合物中 PPL 的 N-甲基化反应,生成 N-甲基丙基脯氨酸(N-methylpropylproline)。

LmbF 是磷酸吡哆醛依赖性酶^[21-22],催化半胱氨酸 S-结合物的 S-C 键切割反应,生成了高反应活性的硫醇中间体(去甲基林可霉素)以及副产物丙酮酸和氨。最后一步,在甲基转移酶 *LmbG* 催化

下^[21-22],以 SAM 为甲基供体,对巯基甲基化生成林可霉素 A。LSM 和 PPL 缩合及其后修饰生成林可霉素 A 的过程见图 5。

5 生物合成调控与抗性

林可霉素生物合成基因簇中除了结构基因,还包括 3 个可能的调控基因 *lmbU*、*lmbQ* 和 *lmbIH*,以及 3 个抗性基因 *lmrA*、*lmrB* 和 *lmrC*。

lmbU 基因是一个正调控基因,与氨基香豆素类抗生素生物合成基因簇中的 *novE*、*couE* 有一定的同源性。华东理工大学张惠展教授研究组^[23]敲除林可链霉菌中的 *lmbU* 基因,菌株不再产生林可霉素,表明 *lmbU* 基因是一个正调控基因。*LmbU* 能激活 *lmbA*、*lmbC*、*lmbJ* 和 *lmbW* 基因的转录,阻遏 *lmbK* 和 *lmbU* 转录,是一个复杂的调控因子。由于 *lmbIH*、*lmbQ* 基因编码产物难以通过生物信息学预测其催化功能,从而推测可能具有调节功能^[24]。

LmrA 蛋白属于 MFS 超家族(Major facilitator superfamily),包括 12 个可能的跨膜疏水区域^[25],负责将胞内合成的抗生素分泌到发酵液中。在变铅青霉菌中过表达 *lmrA* 基因,菌株能够产生林可霉素抗性。*LmrB* 蛋白与核糖体 50S 亚基的 23S rRNA 基因的腺嘌呤 N⁶ 上的单甲基化或双甲基化酶具有高度的相似性^[25],可加强核糖体 rRNA 修饰,提高产生菌的自身抗性。*LmrC* 蛋白属于 ABC 转运蛋白家族,包括 2 个 ATP 结合位点。我们实验证明了 *lmrC* 是抗性相关基因^[26],当敲除 *lmrC* 后林可霉素产量显著下降,同时降低了抗性;而过表达 *lmrC* 能显著增强林可霉素的抗性。

6 结语与展望

借助于基因敲除和过表达的体内研究策略,结合生化反应的离体研究,建立了林可霉素生物合成途径基本框架。林可霉素的两个直接前体林可酰胺和丙基脯氨酸合成过程的关键反应、缩合、硫来源、甲基化等已经明确,为林可霉素高产和高品质育种提供了理论指导。

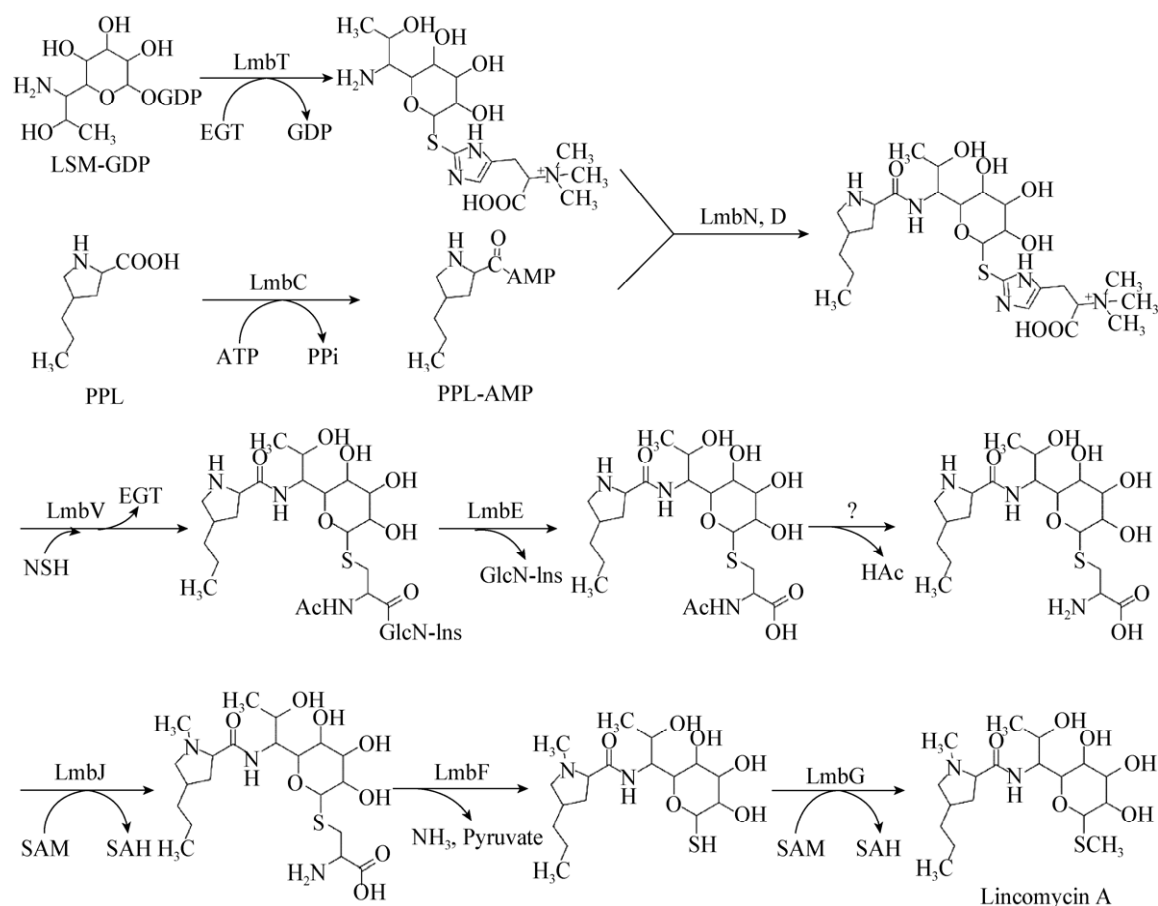


图5 林可霉素A生物合成途径

Figure 5 Lincomycin A biosynthetic pathway from LSM and PPL

在抗生素菌种改良中, 增加主路通量和阻断支路是非常有效的策略。在磷酸戊糖和糖酵解途径的交汇处生成了林可霉素的两种前体。以 5-磷酸核糖和 6-磷酸果糖或 7-磷酸景天庚酮糖为底物, 发生转醛醇反应, 生成磷酸辛酮糖, 是整个林可酰胺合成的限制性步骤。相应地, 4-磷酸赤藓糖和磷酸烯醇式丙酮酸缩合的芳香氨基酸途径合成了丙基脯氨酸。由于 1 分子林可酰胺和 1 分子丙基脯氨酸发生缩合反应, 从糖代谢角度看, 如何通过发酵平衡调控这两个前体合成是很具挑战性的工艺研究工作。已有研究表明^[27]发酵培养基中添加丙酮酸和三甲胺, 分别抑制了丙酮酸激酶基因和色氨酸生物合成基因的转录, 提高了林可霉素产量。因此, 丙酮酸激酶基因、色氨酸和苯丙氨酸生物合成支路基因,

可作为高产林可霉素菌种改造的有效靶点。

林可霉素 B 的活性只有林可霉素 A 的 25%, 且毒性较大, 是发酵的副产物, 也是产品的杂质。国家药典规定, 林可霉素 B 的含量超过林可霉素总含量的 5% 则不能用于药品生产。LmbW 催化的甲基化反应是林可霉素 A 合成的决定性步骤, 过表达 *lmbW* 和腺苷甲硫氨酸合成酶基因 *metK*, 不仅提高了林可霉素 A 的产量, 同时有效降低了林可霉素 B 的含量^[13]。

林可霉素生物合成基因簇中有 3 种抗性基因, 其作用机理不同。我们研究表明^[28]过表达 3 个抗性基因, 都能提高林可霉素产量。因此, 针对工业生产菌种增加抗性基因拷贝数, 将是提高产量的一条有效技术途径。

林可霉素发酵过程, 加大供氧不仅增加能耗, 而且使酪氨酸生成黑色素, 减少了林可霉素前体的供应。我们采用基因替换技术^[29], 将透明颤菌血红蛋白基因取代黑色素合成基因, 不仅提高了产量, 而且简化下游除色素的工艺。

BldD 是链霉菌中普遍存在的形态分化及抗生素合成的正调控因子^[30], 糖多孢红霉菌 *bldD* 基因不仅可提高红霉素产量^[31], 还能提高跳跃链霉菌合成诺西肽的产量^[32]。已有林可链霉菌基因组被测序, 但全局调控因子未见报道。

在未来的研究中, 需要鉴定出包括 BldD 在内的全局转录调控因子, 确认 LmbIH 和 LmbQ 的途径调控功能, 从全局和途径特异性两个维度研究林可霉素生物合成的调控机理。深度解析林可霉素生物合成过程的精细生化反应机理, 如在 PPL 合成中的 LmbW 和 LmbA、在 LSM 合成中的 LmbLMSZ、PPL 和 LSM 缩合后的修饰反应。针对林可霉素工业发酵过程特点和技术需求, 采用新兴的合成生物学技术, 通过基因组的精准编辑, 把前体供应、抗性、供氧、层级调控等关键基因进行多效叠加, 将理论研究成果应用于企业实际, 可望减少林可霉素 B 组分, 进一步提高我国林可霉素产量和质量。

REFERENCES

- [1] Spizek J, Rezanka T. Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 133: 20-28
- [2] Peschke U, Schmidt H, Zhang HZ, et al. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 16(6): 1137-1156
- [3] Koběrská M, Kopecký J, Olšovská J, et al. Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466[J]. *Folia Microbiologica*, 2008, 53(5): 395-401
- [4] Meng ST, Wu H, Wang L, et al. Enhancement of antibiotic productions by engineered nitrate utilization in actinomycetes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(13): 5341-5352
- [5] Brahme NM, Gonzalez JE, Mizesak S, et al. Biosynthesis of the lincomycins. 2. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1984, 106(25): 7878-7883
- [6] Sasaki E, Lin CI, Lin KY, et al. Construction of the octose 8-phosphate intermediate in lincomycin A biosynthesis: characterization of the reactions catalyzed by LmbR and LmbN[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(42): 17432-17435
- [7] Lin CI, Sasaki E, Zhong AS, et al. *In vitro* characterization of *lmbK* and *lmbO*: identification of GDP-D-erythro- α -D-glucose as a key intermediate in lincomycin A biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(3): 906-909
- [8] Novotná J, Olšovská J, Novák P, et al. Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e79974
- [9] Neusser D, Schmidt H, Spizček J, et al. The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 169(4): 322-332
- [10] Novotná J, Honzátko A, Bednář P, et al. L-3,4-dihydroxyphenyl alanine-extradial cleavage is followed by intramolecular cyclization in lincomycin biosynthesis[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(18): 3678-3683
- [11] Colabroy KL, Smith IR, Vlahos AHS, et al. Defining a kinetic mechanism for L-DOPA 2,3 dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from *Streptomyces lincolnensis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1844(3): 607-614
- [12] Colabroy KL, Hackett WT, Markham AJ, et al. Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 479(2): 131-138
- [13] Pang AP, Du L, Lin CY, et al. Co-overexpression of *lmbW* and *metK* led to increased lincomycin A production and decreased byproduct lincomycin B content in an industrial strain of *Streptomyces lincolnensis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(4): 1064-1074
- [14] Ulanova D, Novotná J, Smutná Y, et al. Mutasynthesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant *Staphylococci*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(2): 927-930
- [15] Jirasková P, Gazak R, Kameník Z, et al. New concept of the biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin, hormaomycin, and pyrrolbenzodiazepines: Could a γ -glutamyltransferase cleave the C-C Bond?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 276
- [16] Zhao QF, Wang M, Xu DX, et al. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A[J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 115-119
- [17] Janata J, Kadlcik S, Koberska M, et al. Lincosamide synthetase-a unique condensation system combining elements of nonribosomal peptide synthetase and mycothiol metabolism[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118850
- [18] Kadlčík S, Kučera T, Chalupská D, et al. Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e0084902
- [19] Najmanová L, Kutejová E, Kadlec J, et al. Characterization of *N*-demethylincosamide methyltransferases LmbJ and CcbJ[J]. *ChemBioChem*, 2013, 14(17): 2259-2262

- [20] Kamenik Z, Kadlcik S, Radojevic B, et al. Deacetylation of mycothiol-derived 'waste product' triggers the last biosynthetic steps of lincosamide antibiotics[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(1): 430-435
- [21] Wang M, Zhao QF, Zhang QL, et al. Differences in PLP-dependent cysteinyl processing lead to diverse S-functionalization of lincosamide antibiotics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(20): 6348-6351
- [22] Ushimaru R, Lin CI, Sasaki E, et al. Characterization of enzymes catalyzing transformations of cysteine S-conjugated intermediates in the lincosamide biosynthetic pathway[J]. *ChemBioChem*, 2016, 17(17): 1606-1611
- [23] Hou BB, Lin YW, Wu HZ, et al. The novel transcriptional regulator *lmbU* promotes lincomycin biosynthesis through regulating expression of its target genes in *Streptomyces lincolnensis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(2): e00447-17
- [24] Janata J, Najmanová L, Novotná J, et al. Putative *lmbI* and *lmbH* genes form a single *lmbIH* ORF in *Streptomyces lincolnensis* type strain ATCC25466[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001, 79(3/4): 277-284
- [25] Zhang HZ, Schmidt H, Piepersberg W. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11[J]. *Molecular Microbiology*, 1992, 6(15): 2147-2157
- [26] Xu JJ, Wu H, Meng ST, et al. Functional analysis of lincomycin transporter gene *lmrC* in *Streptomyces lincolnensis* LC-G[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2014, 48(2): 159-163 (in Chinese)
徐晶晶, 吴杭, 孟思童, 等. 林可霉素转运蛋白基因 *lmrC* 的功能分析[J]. *上海交通大学学报*, 2014, 48(2): 159-163
- [27] Zhang HD, Ye RF, Mao QG, et al. Lincomycin fermentation in response to alanine and trimethylamine application and transcription level of related gene[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30(5): 1003-1009 (in Chinese)
张海丹, 叶蕊芳, 毛全贵, 等. 丙氨酸和三甲胺对林可霉素发酵的影响及部分相关基因的转录水平[J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(5): 1003-1009
- [28] Du L, Liu RH, Ying L, et al. An efficient intergeneric conjugation of DNA from *Escherichia coli* to mycelia of the lincomycin-producer *Streptomyces lincolnensis*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(4): 4797-4806
- [29] Yang HT, Liu RH, He JY, et al. Cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene and its expression in *Streptomyces lincolnensis*[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2009, 26(8): 657-662 (in Chinese)
杨洪涛, 刘瑞华, 何建勇, 等. 透明颤菌血红蛋白基因的克隆及其在林可链霉菌中的表达[J]. *沈阳药科大学学报*, 2009, 26(8): 657-662
- [30] Chng CP, Lum AM, Vroom JA, et al. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(32): 11346-11351
- [31] He JJ, Huang XD, Song P, et al. Effect of *bldD* gene overexpression on erythromycin output and spore formation of *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Bulletin of the Academy of Military Sciences*, 2010, 34(3): 251-254 (in Chinese)
何晶晶, 黄训端, 宋平, 等. *bldD* 基因过量表达对红色糖多孢菌红霉素产量及孢子形成的影响[J]. *军事医学科学院院刊*, 2010, 34(3): 251-254
- [32] Qin HJ, Huang XD, Yuan L, et al. Effects of *bldD* gene from *Saccharopolyspora erythraea* on nosiheptide production in *Streptomyces actuosus*[J]. *Military Medicine Sciences*, 2012, 36(11): 847-850 (in Chinese)
秦汉俊, 黄训端, 袁莉, 等. 糖多孢红霉菌 *bldD* 基因提高活跃链霉菌诺西肽产量的研究[J]. *军事医学*, 2012, 36(11): 847-850