



专论与综述

顺式和反式-AT 型聚酮合酶研究进展及应用

南春利 薛永常*

大连工业大学生物工程学院 辽宁 大连 116034

摘要: 聚酮类化合物因广泛应用于医药等方面而被大家所熟知, I 型聚酮合酶(Polyketide Synthase, PKS)在催化聚酮类化合物的生物合成中起着重要的作用。根据不同的酰基转移酶(Acyltransferase, AT)结构域, I 型 PKS 可分为顺式-AT (*cis*-Acyltransferase, *cis*-AT)型 PKS 和反式-AT (*trans*-Acyltransferase, *trans*-AT)型 PKS, 目前 *cis*-AT 型 PKS 研究得比较透彻, *trans*-AT 型 PKS 相关研究成为当今热点。本文总结了 *cis*-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 的联系与区别、工程进展、相关应用以及目前存在的问题, 以期了解 *cis*-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 在聚酮化合物合成中的作用提供参考。

关键词: I 型聚酮合酶, 酰基转移酶, 顺式-AT 型聚酮合酶, 反式-AT 型聚酮合酶

Research progress and application of *cis*-AT and *trans*-AT polyketide synthase

NAN Chunli XUE Yongchang*

School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China

Abstract: Type I polyketide synthases (PKS) play an important role in catalyzing the biosynthesis of polyketides, which is widely used in medicine and other fields. According to different acyltransferase (AT) domains, type I PKS can be divided into *cis*-Acyltransferase (*cis*-AT) PKS and *trans*-Acyltransferase (*trans*-AT) PKS, the former has been studied more thoroughly at present, and the related research of the latter has become a hot spot. In this paper, the connections and differences between *cis*-AT PKS and *trans*-AT PKS, as well as engineering progresses, related applications and currently existing problems are reviewed, to provide a reference for understanding the role of *cis*-AT PKS and *trans*-AT PKS in the biosynthesis of polyketides.

Keywords: type I PKS, AT, *cis*-AT PKS, *trans*-AT PKS

聚酮类化合物是重要的微生物次生代谢物, 是人类医药的重要来源之一, 临床上常用的红霉素 A 和利福霉素 S^[1]、蒽环类的抗肿瘤药物多柔比星^[2]、

降低冠心病患者死亡率及致残率的降脂类药物洛伐他汀^[3]、生物杀虫剂阿维菌素^[4-5]等均来源于微生物产生的聚酮类化合物。聚酮类化合物结构多种多样

Foundation item: Natural Science Foundation of Liaoning Province (20180550858)

***Corresponding author:** E-mail: xueych@dlpu.edu.cn

Received: 19-02-2021; **Accepted:** 19-04-2021; **Published online:** 09-05-2021

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20180550858)

***通信作者:** E-mail: xueych@dlpu.edu.cn

收稿日期: 2021-02-19; **接受日期:** 2021-04-19; **网络首发日期:** 2021-05-09

样,核心结构均由简单脂肪酸在聚酮合酶(Polyketide Synthase, PKS)催化下经过类似长链脂肪酸的合成途径生成,经过氧化、糖基化和甲基化后才能赋予代谢物生物活性;PKS 根据结构及其性质可分成 I 型 PKS (又称模块型)、II 型 PKS (又称迭代型)和 III 型 PKS (又称查尔酮型)三大类,放线菌中发现的主要是含有酰基转移酶域(Acyltransferase, AT)的 I 型 PKS 和 II 型 PKS,其中又以 I 型 PKS 的研究最为透彻^[6]。多烯大环内酯类抗生素均由 I 型 PKS 催化合成,如四霉素、菲律宾菌素、龟裂菌素等^[7]。I 型 PKS 进一步又可以分为顺式-AT (*cis*-Acyltransferase, *cis*-AT)型 PKS 和反式-AT (*trans*-Acyltransferase, *trans*-AT)型 PKS, *trans*-AT 型 PKS 也被称作 AT-Less 型 PKS^[8]。*cis*-AT 型 PKS 的研究相对比较透彻,对于 *trans*-AT 型 PKS 研究较少,近期发现广泛存在于细菌群中的 PKS 约 40% 归属于 *trans*-AT 型 PKS,其聚酮产物构成了主要

类别的天然产物。

1 I 型 PKS 的主要类型

1.1 *cis*-AT 型和 *trans*-AT 型 PKS

I 型 PKS 是一种大型多结构域酶复合物,每个模块专用于一轮链延伸及其特定中间体的后续加工,模块阵列就好比一条生产线,中间产物按顺序传递。在 I 型 PKS 模块中,聚酮化合物合成链延伸的单个周期所需的基本催化域包括用于单体选择的酰基转移酶(AT)、用于底物活化和穿梭的酰基载体蛋白(Acyl Carrier Protein, ACP),以及用于脱羧缩合的酮合酶(Ketoacylsynthase, KS)^[9]。在聚酮链延伸之后,可以通过酮还原酶(Ketoreductase, KR)^[10]、脱水酶(Dehydratase, DH)和烯醇还原酶(Enoylreductase, ER)等结构域对中间产物进行修饰。如负责红霉素 A 生物合成的 PKS 模块与产物有一一对应关系(图 1),这种共线性原理可帮助将每

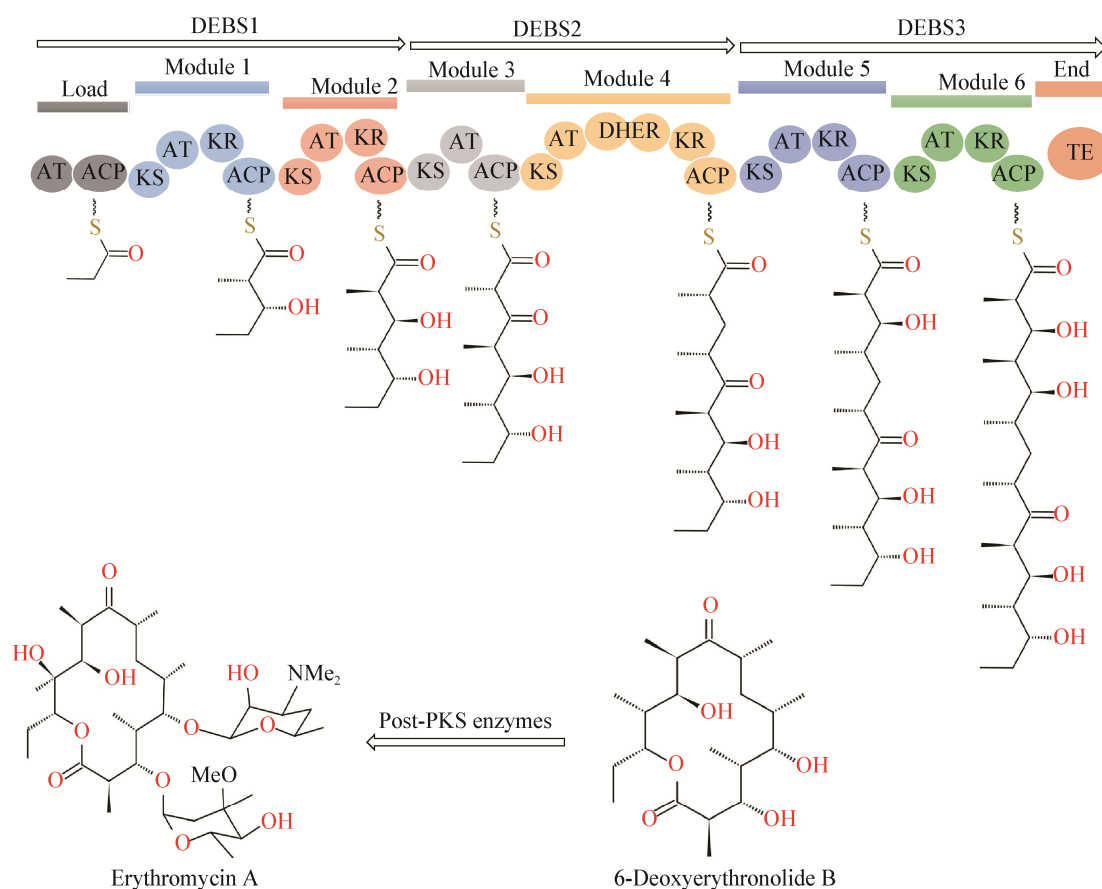


图 1 红霉素 A 生物合成途径

Figure 1 Biosynthesis pathway of erythromycin A

种产物分配给其合成酶^[11-12]。*cis*-AT 型 PKS 每个模块中都存在一个完整的 AT 域,其在 I 型 PKS 中占大部分;然而 *trans*-AT 型 PKS 是 I 型 PKS 的一种结构变体,其模块缺乏 AT 结构域,在每一个延伸步骤中 AT 活性是通过一个或几个独立的蛋白在聚酮生物合成基因簇内部或外部编码的^[13-14]。*trans*-AT 型 PKS 通常包含非规范模块和新的酶域,这导致在使用上述共线性规则时,基因簇的生物同步性分配较差^[15]。*trans*-AT 型 PKS 系统约占 I 型 PKS 的 40%^[16-17],代表了一个主要但特征不明确的酶类,与新型药物的发现密切相关。

1.2 *cis*-AT 型和 *trans*-AT 型 PKS 的区别

cis-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 是通过不同的机制进化而来。*cis*-AT 型 PKS 由模块复制和域多样化指导为垂直机制进化, *trans*-AT 型 PKS 由细菌间水平基因转移引导为水平机制进化^[8]。

尽管 *cis*-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 的进化起源不同,但它们都采用相同的生物同步原理来组装聚酮产品,在模块比较中二者最大的区别在于 *cis*-AT 域是集成的,而 *trans*-AT 域是离散的;此外,针对 KS 域而言, *cis*-AT 型 PKS 的 KS 域系统发育

分析表明它们具有很高的相似性,而 *trans*-AT 型 PKS 具有底物特异性,如来自 Psymberin 和 Bacillaene 途径的 6 个 *trans*-AT 型 PKS 的 KS 域的底物特异性表明 PsyA-KS1 天然底物是乙酰基链,尤其对 2-氨基乙酰基绝对偏好, BaeJ-KS2 和 BaeL-KS5 都倾向于含有较长酰基链的底物^[18-19]。在聚酮合成过程中 2 种 PKS 存在一些修饰上的不同,如 β -分支多存在于 *trans*-AT 型 PKS 路径中,少数存在于 *cis*-AT 型 PKS 路径^[20]。甲基基团的添加 *cis*-AT 型 PKS 可以直接利用其 AT 域,而 *trans*-AT 型 PKS 则需要 S-腺苷甲硫氨酸的辅助^[8] (表 1)。

2 *cis*-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 的工程化进展

虽然聚酮类化合物在治疗人类疾病方面有着稳固的作用,但近年来聚酮类药物的发现和开发力度有所减弱^[21]。截至目前,对 PKS 进行工程操作的目的是了解分子结构、产生新的分子化合物、生产已知化合物的类似物及提高产品活性或产率,这种工程操作是制备功能更加优越的聚酮类化合物的一种很有前景的方法^[22-23]。

表 1 顺式-AT 型 PKS 和反式-AT 型 PKS 的区别

Table 1 The differences between *cis*-AT PKS and *trans*-AT PKS

Differences	<i>cis</i> -AT PKS	<i>trans</i> -AT PKS	References
甲基 Methyl group	AT 将甲基基团添加到碳骨架上 AT adds methyl groups to the carbon framework	甲基转移酶(Methyltransferase, MT) S-腺苷甲硫氨酸 (SAM)衍生的甲基基团添加到碳骨架中 MT adds S-adenosylmethionine (SAM)-derived methyl groups to the carbon framework	[8]
吡喃环 Pyran ring	由 DH 结构域催化形成 Catalysed by DH	由吡喃合成酶(Pyran synthase, PS)催化形成 Catalysed by PS	[17]
AT	PKS 模块的一部分 A part of the PKS	由一个或两个独立基因编码的离散型 AT A discrete AT encoded by one or two independent genes	[18]
KS	具有很高的相似性 Have high similarity	具有底物特异性 Have specificity for their substrates	[19]
KS ₀	罕见 Rare	常见 common	[19]
β -branch	罕见 Rare	常见 common	[20]
ACP	一个 <i>cis</i> -AT 只作用于一个 ACP A <i>cis</i> -AT acts on one ACP	一个 <i>trans</i> -AT 作用于多个 ACP A <i>trans</i> -AT acts on multiple ACPs	[21]

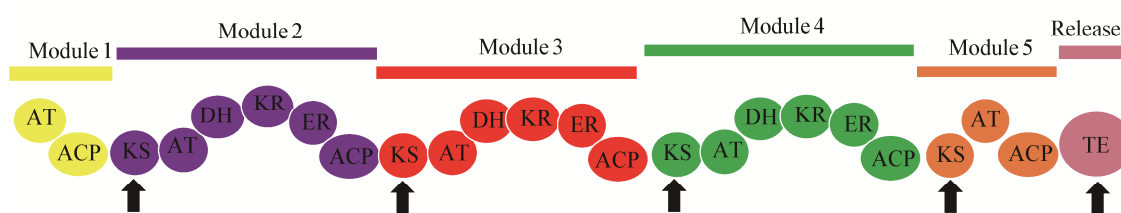
生物合成基因簇的进化可为 PKS 工程提供参考。多年来, I 型 PKS 模块的概念被广泛使用, 其结构为 KS+AT (+DH+ER+KR)+ACP(+TE)。通过研究产生氨基多元醇的美迪霉素、新美迪霉素、ECO-02301 和新四纤霉素的 PKS 模块, 发现 KS 域位于每个模块加工酶的下游而不是上游^[24]。于是建议重新定义 PKS 模块为 AT+(DH+ER+KR)+ACP+KS^[25](图 2), 尽管该模型仍需与 PKS 演化的其他当前模型相联系, 但越来越多的证据表明, 修订后的模块有利于工程研究, 生物信息学分析也表明该模块同样适用于 *trans*-AT 型 PKS^[26-27]。

随着研究者的深入研究, PKS 工程也取得了相应进展, 如通过定点突变 PikAT5 和 PikAT6 (皮克罗霉素的 AT 域) 第 1 次使用 2 个非天然延长剂单元合成全长聚酮^[28]; 通过交叉互补使用亲合的 KirCII (一种 *trans*-AT) 将烯丙基和炔丙基官能团引入基罗霉素^[29], 炔丙基的引入使合成生物学和合成化学相结合, 实现天然产物结构的多样化; 通过截断 PKS 模型系统 LipPKS1-TE (脂霉素 PKS 的第 1 个模块融合来自 DEBS 的 TE) 中的还原影响立体化学从反式到合成式的变化^[30]; 用 Borrelidin DH2 域替换了己二酸 PKS 组装线中的 DH 域, 实现己二酸的产生, 目前该研究正试图通过 PKS 工程

来实现化学品己二酸的体外生产^[31]。

PKS 工程研究中也有了一些新的发现。例如: (1) *trans*-AT 保留了 *cis*-AT 同系物具有的独特 2 个亚域 α/β 水解酶铁氧体蛋白域折叠, 并且存在 2 个酶家族共有的底物特异性的决定因素, 所以许多控制 *cis*-AT 的分子工具可适用于 *trans*-AT^[32-33]。(2) 与 *cis*-AT 不同, 在 *trans*-AT 型 PKS 系统中, *trans*-AT 作用于多个 ACP, 如雷纳霉素^[34]和艰难梭菌素^[21], 这表明在整个聚酮化合物内可以使用不同的延长剂单元。因此, 通过 *trans*-AT 结构域的靶向诱变产生多个变异、非天然的聚酮类化合物具有很大的潜力。(3) β -分支在 *trans*-AT 聚酮类化合物中普遍存在, 但在 *cis*-AT 型聚酮类化合物中较少观察到。最近的一项研究表明, 在已知存在 β -分支的聚酮类化合物莫匹罗星合成中, ACP 中有一个保守序列用于 β -分支的形成^[35]。因此, 为了在聚酮链内的指定位置产生 β -分支, 可将与 β -分支形成相关的 ACP 重新定位到其起始 PKS 的替代模块中, 或将其他 HCS 盒(与 β -分支形成相关的一组酶的统称)转移到异源系统中。此外, 一组独特的结构域 KS-B-ACP 位于一个合酶模块中, 可以催化分支的形成, 因此 KS-B-ACP 在聚酮产品中引入单个 β -分支可能比使用 HCS 盒更具吸引力。

A Traditional modules



B Redefined modules

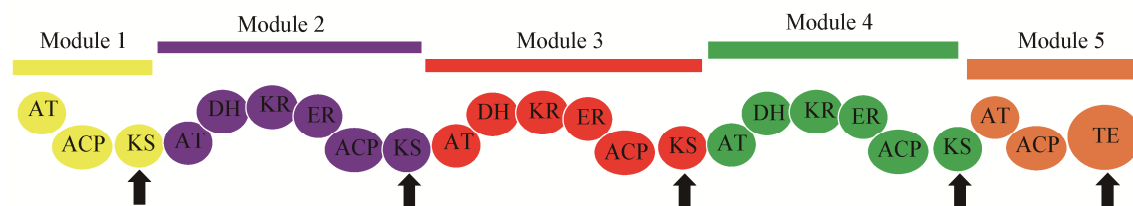


图 2 I 型聚酮合成酶模块定义的修正

Figure 2 The revision of type I PKS module definition

对生物合成途径的研究表明, 抗生素是通过 *cis*-AT/*trans*-AT 型 PKS 和非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal Peptide Synthetase, NRPS) 的独特组合合成的^[36], 从海洋放线菌中可以扩增得到^[37-38]。综合相关文献发现, 截至目前, 通过杂交合成了多种聚酮类化合物, 已经观察到结合 *trans*-AT 型 PKS 和 NRPS 的杂交途径, 例如 Spliceostatin^[39]。此外, 还发现了 *cis*-AT/*trans*-AT 型 PKS 的杂交产物, 尽管 *cis*-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 的进化起源不同, 但它们都采用相同的生物同步原理来组装聚酮产品。因此, 在同一个聚酮合酶中 *cis*-AT 和 *trans*-AT 延伸模块的共存无明显障碍。最近, 这种杂交的 *cis*-AT/*trans*-AT 型 PKS 已经被发现, 如 Kirromycin^[36]和 Enacyloxin^[40]基因簇也都包含编码 *cis*-AT 型和 *trans*-AT 型 PKS 模块的开放阅读框。因此, *trans*-AT 型 PKS 系统通过基因工程可以将 *cis*-AT 型 PKS 元素结合起来在自然界中共同作用。

3 *cis*-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 的应用

cis-AT 型 PKS 装配线目前已经研究得相对透彻, 其模块组成类似红霉素的生成模式, 而 *trans*-AT

型 PKS 逐渐成为当今的研究热点。此外, 杂交的 *cis*-AT/*trans*-AT 型 PKS 已经被发现, 在实际应用中越来越广泛。

3.1 *trans*-AT 型 PKS 的应用

唐菖蒲昔 (Gladiolin) 是一种新型大环内酯类抗生素 (图 3), 可以抑制 RNA 聚合酶 (RNA 聚合酶是结核分枝杆菌的有效药物靶点) 活性, 对结核分枝杆菌 H₃₇Rv 具有强力的抗菌活性, 而且对哺乳动物细胞毒性较低^[41]。Etnangien 是一种高度不稳定的抗生素, 其共轭的无环己烯部分易发生光诱导异构化和快速氧化降解^[42], 唐菖蒲昔具有较短且更饱和的 C-21 侧链 (含有己烯部分) 而优于 Etnangien, 因此它是一种潜在的候选药物^[41]。

唐菖蒲蛋白基因簇包含 6 个编码 *trans*-AT 型 PKS 的基因, 命名为 *gbn* D1-D6, 其两侧是编码聚酮加工酶和相关蛋白的多个基因; 基因簇中 *gbn*B、*gbn*N 和 *gbn*P 编码形成 3 种 *trans*-AT 酶, *Gbn*N 和 *Gbn*P 对丙二酰辅酶 A 有特异性, 但 *Gbn*B 对唐菖蒲琥珀酰辅酶 A 具有特异性^[41]; 唐菖蒲昔的生物合成是通过 *Gbn*B 催化琥珀酰基从琥珀酰辅酶 A 转移

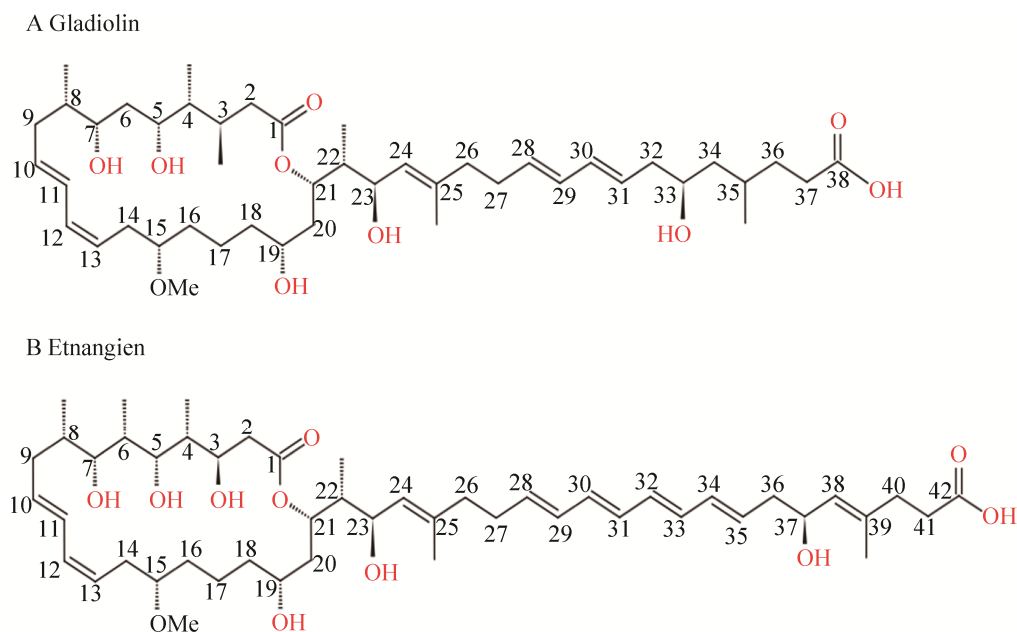


图 3 唐菖蒲昔(A)和 Etnangien (B)结构的比较

Figure 3 Comparison of the structure of gladiolin (A) and etnangien (B)

到 KS 结构域下游的任一 ACP 结构域,随后将琥珀酰单元反向转移到 KS 的活性位点 Cys 上,在琥珀酰起始单元通过与丙二酰扩链剂单元的脱羧基缩合延伸之后,丙二酰扩链剂单元被 GbnN 加载到 KS 结构域下游的一个 ACP 结构域上^[43]。此外,由 *gbnG*、*gbnF*、*gbnH* 和 *gbnI-J/gbnR-S* 编码的羟甲基戊二酰辅酶 A 合成酶被分配到模块 1 和模块 6 中形成 β -甲基分支^[35]。唐菖蒲苷生物合成途径具有 20 个 KS 结构域,但是从琥珀酰辅酶 A 起始单元和 16 个丙二酰辅酶 A 延伸单元组装聚酮链只需要 17 个链延伸反应^[41]。因此,其中 3 个 KS 结构域必须充当 AT 的功能,将聚酮链从一个 ACP 转移到另一个 ACP。在其他 *trans*-AT 型 PKS 途径中,这种转酰基反应通常由 KS₀ 结构域催化,KS₀ 结构域缺少 HGTGT 基序的组氨酸残基,而 HGTGT 基序是催化链延伸所必需的^[44]。

3.2 杂合 *cis*-AT/*trans*-AT PKS 的应用

依那昔洛辛(Enacyloxin)是一种独特的多羟基多烯类黄色抗生素,最初从 C-变形杆菌 *Frateruria* sp. W-315 中分离得到^[45],其通过抑制核糖体释放 EF-Tu-GDP 来抑制肽的生物合成,从而对 G⁺ 和 G⁻ 细菌具有较强抑菌活性,同时对真菌也有较弱活性,但对酵母无显著影响^[46]。

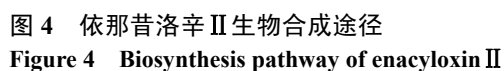
Enacyloxin 基因簇编码一个 *cis*-AT/*trans*-AT 型 PKS,包含 21 个基因^[47],其中基因 *ena5920-ena5925* 负责模块化 PKS,包括 1 个加载模块和 9 个链延伸模块(图 4)。在 Enacyloxin II 生物合成途径中,加载模块中的类 N-乙酰基转移酶结构域(GNAT)催化甲基丙二酰辅酶 A 脱羧,在 GNAT 相邻的 ACP 结构域上生成起始单元丙酰辅酶 A;链延伸模块中的 AT 域仅存在于模块 1 和 6 中,而在模块 2-5 和 7-10 中缺失,同时其他基因簇内也不编码 AT^[47]。因此,在模块 1 和 6 的 AT 域可能负责将丙二酰辅酶 A 延长剂单元转移到 ACP 结构域上。

bamb_6476 和 *bamb_0998* 位于 Enacyloxin 基因簇之外,是编码可能有助于 Enacyloxin 合成的结构

域的候选基因,二者在 Enacyloxin 诱导条件下表达^[48],因此,Enacyloxin 的生物合成可能以复杂的方式涉及各种反式 AT 酶。Enacyloxin II 具有异构体,通过 PKS 模块 10 内酮基的还原和水的消除,产生了具有 $\Delta^{4,5}$ 几何构型的 Enacyloxin IIa 异构体的混合物;模块 10 内还有一个 KS₀ 域,该域催化聚酮链从模块 10 转移到由 *ena5917* 编码的另一个 ACP 域,之后,共线聚酮与(1S,3R,4S)-3,4-二羟环己烷羧酸(简称 DHCCA)的 C-3 羟基缩合,通过聚酮链释放的不寻常机制形成前依那昔洛辛^[49]。DHCCA 由莽草酸合成,莽草酸是芳香族氨基酸生物合成的中间产物,通过 *ena5916*、*ena5914*、*ena5912* 和 *ena5918* 编码的酶合成^[47]。前依那昔洛辛通过卤代酶的严格反应转化为去甲酰氧基 Enacyloxin IVa 和异癸甲酰烯丙氧基 Enacyloxin IVa;然后,去甲酰氧基 Enacyloxin IVa 经 *ena5930* 编码的氨甲酰转移酶催化生成 Enacyloxin IVa;Enacyloxin IVa 通过氧合酶的催化转化为 Enacyloxin IIa^[50]。

4 目前存在的问题与展望

虽然目前 I 型 PKS 已应用于生物燃料和工业化学品等方面,但依旧存在一些难以解决的问题:(1) 许多 KS 域具有严格的底物特异性,转化后异源模块杂交 PKS 的上游模块的 ACP 与其非同源性的 KS 结构域之间新生酰基链的转移效率发生改变,导致聚酮化合物合成的失败或效率降低^[24,51-52];(2) KR 结构域被描述为 PKS 装配线的“立体化学主力”。然而,截至目前仅在截断模型系统中证明了实现立体化学变化的 KR 结构域交换,即:要获得有效的酮还原和甲基立体化学的改变,需要在 PKS 系统之间交换完整的模块,而不仅仅是负责的 KR 结构域^[53];(3) 对 PKS 中模块化边界和各种蛋白质-蛋白质相互作用的理 解还不够深入,导致 I 型 PKS 模块替换可能会显著改变整个催化结构域或造成模块结构的稳定性被破坏,从而损害 PKS 的所有催化功能^[10,54]。



细胞生物合成的策略扩大了合理设计新 PKS 的范围^[57]；最近开发的计算工具 ClusterCAD 也可用于 PKS 和模块从头生成感兴趣的化合物^[58]，这些新颖的方法和技术都表明 *cis*-AT 型 PKS 和 *trans*-AT 型 PKS 工程的前景仍十分光明。

REFERENCES

- [1] Fan RL, Chen K, Zhu JW, Yu LJ. Preparation of rifamycin S by oxidation of rifamycin SV[J]. Chemical Engineering (China), 2018, 46(10): 51-55 (in Chinese)
范若兰, 陈葵, 朱家文, 于丽君. 利福霉素 SV 氧化制备利福霉素 S 工艺研究[J]. 化学工程, 2018, 46(10): 51-55
- [2] Liu J, Zhao ZH, Qiu NS, Zhou Q, Wang GW, Jiang HP, Piao Y, Zhou ZX, Tang JB, Shen YQ. Co-delivery of IOX1 and doxorubicin for antibody-independent cancer chemo-immunotherapy[J]. Nature Communications, 2021, 12: 2425
- [3] Wang L, Yuan MJ, Zheng JT. Crystal structure of the condensation domain from lovastatin polyketide synthase[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4(1): 10-15
- [4] Li ZY, Su LJ, Wang HZ, An SH, Yin XM. Physicochemical and biological properties of nanochitin — abamectin conjugate for Noctuidae insect pest control[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-05015-1>
- [5] Hu MJ, Xia HY, Qin CJ. Effects on productivity of avermectin by knockout of 10 polyketide biosynthetic gene clusters in *Streptomyces avermitilis* genome[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1471-1476 (in Chinese)
胡敏杰, 夏海洋, 覃重军. 除虫链霉菌 10 个聚酮类抗生素生物合成基因簇的敲除对阿维菌素产量的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1471-1476
- [6] Weissman KJ. Genetic engineering of modular PKSs: from combinatorial biosynthesis to synthetic biology[J]. Natural Product Reports, 2016, 33(2): 203-230
- [7] Zhang B, Zhou YT, Huang K, Fan LG, Liu ZQ. Research progress of regulators in polyene macrolide antibiotic biosynthetic gene clusters[J]. Microbiology China, 2019, 46(1): 172-183 (in Chinese)
张博, 周奕腾, 黄恺, 樊林鸽, 柳志强. 多烯大环内酯类抗生素生物合成基因簇中调控因子的研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(1): 172-183
- [8] Zhang B, Xiang WS. Advances in *cis*-AT and *trans*-AT polyketide synthases and their special domains[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2016, 47(1): 87-92 (in Chinese)
张博, 向文胜. *Cis*-AT 和 *Trans*-AT 聚酮合酶及其特殊功能域研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(1): 87-92
- [9] Feng JF, Zhou RC, Guo XT, Zhang Y. Polyketide and its application[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2011(3): 24-26 (in Chinese)
冯健飞, 周日成, 郭兴庭, 张扬. 聚酮类化合物及其应用[J]. 现代农业科技, 2011(3): 24-26
- [10] Druvva EE, Hix EG, Bailey CB. Site directed mutagenesis as a precision tool to enable synthetic biology with engineered modular polyketide synthases[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 5(2): 62-80
- [11] Kapur S, Lowry B, Yuzawa S, Kenthirapalan S, Chen AY, Cane DE, Khosla C. Reprogramming a module of the 6-deoxyerythronolide B synthase for iterative chain elongation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(11): 4110-4115
- [12] Koryakina I, Kasey C, McArthur JB, Lowell AN, Chemler JA, Li SS, Hansen DA, Sherman DH, Williams GJ. Inversion of extender unit selectivity in the erythromycin polyketide synthase by acyltransferase domain engineering[J]. ACS Chemical Biology, 2017, 12(1): 114-123
- [13] Piel J. Biosynthesis of polyketides by *trans*-AT polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, 2010, 27(7): 996-1047
- [14] Cheng YQ, Tang GL, Shen B. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(6): 3149-3154
- [15] Jenner M, Afonso JP, Bailey HR, Frank S, Kampa A, Piel J, Oldham NJ. Acyl-chain elongation drives ketosynthase substrate selectivity in *trans*-acyltransferase polyketide synthases[J]. Angewandte Chemie: International Ed in English, 2015, 54(6): 1817-1821
- [16] Wright GD. Christopher Walsh: Pioneer and innovator in antibiotic and natural product chemical biology[J]. The Journal of Antibiotics, 2014, 67(1): 5-6
- [17] Wagner DT, Zhang ZC, Meoded RA, Cepeda AJ, Piel J, Keatinge-Clay AT. Structural and functional studies of a pyran synthase domain from a *trans*-acyltransferase assembly line[J]. ACS Chemical Biology, 2018, 13(4): 975-983
- [18] Jenner M, Frank S, Kampa A, Kohlhaas C, Pöplau P, Briggs GS, Piel J, Oldham NJ. Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases[J]. Angewandte Chemie: International Ed in English, 2013, 52(4): 1143-1147
- [19] Kohlhaas C, Jenner M, Kampa A, Briggs GS, Afonso JP, Piel J, Oldham NJ. Amino acid-accepting ketosynthase domain from a *trans*-AT polyketide synthase exhibits high selectivity for predicted intermediate[J]. Chemical Science, 2013, 4(8): 3212-3217
- [20] Helfrich EJN, Piel J. Biosynthesis of polyketides by *trans*-AT polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, 2016, 33(2): 231-316
- [21] Al-Dhelaan R, Russo PS, Padden SE, Amaya A, Dong DW, You YO. Condensation-incompetent ketosynthase inhibits *trans*-acyltransferase activity[J]. ACS Chemical Biology,

- 2019, 14(2): 304-312
- [22] Porterfield WB, Poenateetai N, Zhang WJ. Engineered biosynthesis of alkyne-tagged polyketides by type I PKSs[J]. *iScience*, 2020, 23(3): 100938
- [23] Miyazawa T, Hirsch M, Zhang ZC, Keatinge-Clay AT. An *in vitro* platform for engineering and harnessing modular polyketide synthases[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 80
- [24] Zhang LH, Hashimoto T, Qin B, Hashimoto J, Kozono I, Kawahara T, Okada M, Awakawa T, Ito T, Asakawa Y, et al. Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2017, 56(7): 1740-1745
- [25] Keatinge-Clay AT. Polyketide synthase modules redefined[J]. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2017, 56(17): 4658-4660
- [26] Nivina A, Yuet KP, Hsu J, Khosla C. Evolution and diversity of assembly-line polyketide synthases[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(24): 12524-12547
- [27] Vander Wood DA, Keatinge-Clay AT. The modules of trans-acyltransferase assembly lines redefined with a central acyl carrier protein[J]. *Proteins*, 2018, 86(6): 664-675
- [28] Kalkreuter E, CroweTipton JM, Lowell AN, Sherman DH, Williams GJ. Engineering the substrate specificity of a modular polyketide synthase for installation of consecutive non-natural extender units[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(5): 1961-1969
- [29] Musiol-Kroll EM, Zubeil F, Schafhauser T, Härtner T, Kulik A, McArthur J, Koryakina I, Wohlleben W, Grond S, Williams GJ, et al. Polyketide bioderivatization using the promiscuous acyltransferase KirCII[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(3): 421-427
- [30] Eng CH, Yuzawa S, Wang G, Baidoo EEK, Katz L, Keasling JD. Alteration of polyketide stereochemistry from anti to syn by a ketoreductase domain exchange in a type I modular polyketide synthase subunit[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(12): 1677-1680
- [31] Hagen A, Poust S, Rond TD, Fortman JL, Katz L, Petzold CJ, Keasling JD. Engineering a polyketide synthase for *in vitro* production of adipic acid[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(1): 21-27
- [32] Yuzawa S, Keasling JD, Katz L. Bio-based production of fuels and industrial chemicals by repurposing antibiotic-producing type I modular polyketide synthases: opportunities and challenges[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2017, 70(4): 378-385
- [33] Till M, Race PR. Progress challenges and opportunities for the re-engineering of *trans*-AT polyketide synthases[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(5): 877-888
- [34] Pan GH, Xu ZR, Guo ZK, Hindra, Ma M, Yang D, Zhou H, Gansemans Y, Zhu XC, Huang Y, et al. Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(52): E11131-E11140
- [35] Haines AS, Dong X, Song ZS, Farmer R, Williams C, Hothersall J, Płoskoń E, Wattana-Amorn P, Stephens ER, Yamada E, et al. A conserved motif flags acyl carrier proteins for β -branching in polyketide synthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(11): 685-692
- [36] Robertsen HL, Musiol-Kroll EM, Ding L, Laiple KJ, Hofeditz T, Wohlleben W, Lee SY, Grond S, Weber T. Filling the gaps in the kirromycin biosynthesis: Deciphering the role of genes involved in ethylmalonyl-CoA supply and tailoring reactions[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3230
- [37] Xue YC, Zhang CS, Li G. Cloning and analysis of the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetase gene[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 39(1): 20-25 (in Chinese)
- 薛永常, 张成锁, 李根. 非核糖体肽合成酶基因腺苷酰化结构域序列克隆及分析[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(1): 20-25
- [38] Li G, Xue YC. Cloning of nonribosomal peptide synthetase gene condensation domain fragment[J]. *Industrial Microbiology*, 2017, 47(2): 37-42 (in Chinese)
- 李根, 薛永常. 非核糖体肽合成酶缩合结构域基因片段克隆[J]. *工业微生物*, 2017, 47(2): 37-42
- [39] Eustáquio AS, Janso JE, Ratnayake AS, O'Donnell CJ, Koehn FE. Spliceostatin hemiketal biosynthesis in *Burkholderia* spp. is catalyzed by an iron/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(33): E3376-E3385
- [40] Risser F, Collin S, Dos Santos-Moraes R, Gruez A, Chagot B, Weissman KJ. Towards improved understanding of intersubunit interactions in modular polyketide biosynthesis: Docking in the enacyloxin IIa polyketide synthase[J]. *Journal of Structural Biology*, 2020, 212(1): 107581
- [41] Song LJ, Jenner M, Masschelein J, Jones C, Bull MJ, Harris SR, Hartkoorn RC, Vocat A, Romero-Canelon I, Coupland P, et al. Discovery and biosynthesis of gladiolin: A *Burkholderia gladioli* antibiotic with promising activity against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(23): 7974-7981
- [42] Altendorfer M, Raja A, Sasse F, Irschik H, Menche D. Modular synthesis of polyene side chain analogues of the potent macrolide antibiotic etnangien by a flexible coupling strategy based on hetero-bis-metallated alkenes[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013,

- 11(13): 2116-2139
- [43] Nguyen T, Ishida K, Jenke-Kodama H, Dittmann E, Gurgui C, Hochmuth T, Taudien S, Platzer M, Hertweck C, Piel J. Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(2): 225-233
- [44] Huang Y, Tang GL, Pan GH, Chang CY, Shen B. Characterization of the ketosynthase and acyl carrier protein domains at the LnmI nonribosomal peptide synthetase-polyketide synthase interface for leinamycin biosynthesis[J]. *Organic Letters*, 2016, 18(17): 4288-4291
- [45] Watanabe T, Sugiyama T, Takahashi M, Jun SM, Yamashita K, Izaki K, Furihata K, Seto H. New polyenic antibiotics active against Gram-positive and Gram-negative bacteria. IV. Structural elucidation of enacyloxin IIa[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1992, 45(4): 470-475
- [46] Cetin R, Krab IM, Anborgh PH, Cool RH, Watanabe T, Sugiyama T, Izaki K, Parmeggiani A. Enacyloxin IIa, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu and the ribosome[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(10): 2604-2611
- [47] Mahenthiralingam E, Song LJ, Sass A, White J, Wilmot C, Marchbank A, Boaisa O, Paine J, Knight D, Challis GL. Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *Burkholderia ambifaria* genomic island[J]. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(5): 665-677
- [48] Kosol S, Gallo A, Griffiths D, Valentini TR, Masschelein J, Jenner M, De Los Santos ELC, Manzi L, Sydor PK, Rea D, et al. Structural basis for chain release from the enacyloxin polyketide synthase[J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(10): 913-923
- [49] Masschelein J, Sydor PK, Hobson C, Howe R, Jones C, Roberts DM, Yap ZL, Parkhill J, Mahenthiralingam E, Challis GL. A dual transacylation mechanism for polyketide synthase chain release in enacyloxin antibiotic biosynthesis[J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(10): 906-912
- [50] Chen HN, Bian ZL, Ravichandran V, Li RJ, Sun Y, Huo LJ, Fu J, Bian XY, Xia LQ, Tu Q, et al. Biosynthesis of polyketides by *trans*-AT polyketide synthases in Burkholderiales[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2019, 45(2): 162-181
- [51] Keatinge-Clay AT. Stereocontrol within polyketide assembly lines[J]. *Natural Product Reports*, 2016, 33(2): 141-149
- [52] Murphy AC, Hong H, Vance S, Broadhurst RW, Leadlay PF. Broadening substrate specificity of a chain-extending ketosynthase through a single active-site mutation[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(54): 8373-8376
- [53] Annal T, Paris C, Leadlay PF, Jacob C, Weissman KJ. Evaluating ketoreductase exchanges as a means of rationally altering polyketide stereochemistry[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(9): 1357-1364
- [54] Yuzawa S, Deng K, Wang G, Baidoo EEK, Northen TR, Adams PD, Katz L, Keasling JD. Comprehensive *in vitro* analysis of acyltransferase domain exchanges in modular polyketide synthases and its application for short-chain ketone production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(1): 139-147
- [55] Tong YJ, Weber T, Lee SY. CRISPR/Cas-based genome engineering in natural product discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(9): 1262-1280
- [56] Klaus M, D'Souza AD, Nivina A, Khosla C, Grininger M. Engineering of chimeric polyketide synthases using SYNZIP docking domains[J]. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(3): 426-433
- [57] Huang HM, Stephan P, Kries H. Engineering DNA-templated nonribosomal peptide synthesis[J]. *Cell Chemical Biology*, 2021, 28(2): 221-227.e7
- [58] Eng CH, Backman TWH, Bailey CB, Magnan C, García Martín H, Katz L, Baldi P, Keasling JD. ClusterCAD: a computational platform for type I modular polyketide synthase design[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D509-D515