

研究报告

莫西霉素高产菌株的构建

祝青越^{1,2}, 王立军², 李栋^{2,3}, 范可强², 任晋玮⁴, 曹广祥¹, 潘国辉^{2,3}

1 山东第一医科大学(山东省医学科学院) 生物医学科学学院(省医药生物技术研究中心), 山东 济南 250117

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学存济医学院, 北京 101408

4 中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

祝青越, 王立军, 李栋, 范可强, 任晋玮, 曹广祥, 潘国辉. 莫西霉素高产菌株的构建[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3597-3613.

ZHU Qingyue, WANG Lijun, LI Dong, FAN Keqiang, REN Jinwei, CAO Guangxiang, PAN Guohui. Construction of high-producing strains of kirromycin[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3597-3613.

摘要:【背景】莫西霉素(kirromycin)是由山丘链霉菌(*Streptomyces collinus*) Tü 365 产生的一种复杂线性聚酮-非核糖体肽类化合物, 可与细菌延伸因子 EF-Tu 相互作用, 阻碍蛋白质合成, 具有窄谱抑菌活性。目前莫西霉素作为实验试剂用于核糖体结构和功能研究。近年来有研究报道, 莫西霉素及其类似物抗沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)活性优于注册药物多西环素, 有望成为治疗丝状线虫感染的新先导化合物。【目的】运用组合代谢工程方法, 构建莫西霉素高产菌株, 实现莫西霉素产量的提升。【方法】基于莫西霉素生物合成基因簇以及生物合成途径分析, 利用组成型启动子 *kasOp** 过表达或组合过表达莫西霉素生物合成基因簇内的巴豆酰辅酶 A 还原酶编码基因 *kirN*、天冬氨酸-1-脱羧酶编码基因 *kirD*、磷酸泛酰巯基乙胺转移酶编码基因 *kirP*、转运蛋白超家族外排泵编码基因 *kirTI* 和 *kirTII*、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)中乙酰辅酶 A 羧化酶编码基因 *acc* 等, 实现莫西霉素产量的提升。【结果】过表达/组合过表达上述基因对莫西霉素产量均有一定提升效果, 其中, 单独过表达 *acc* 及组合过表达 *kirD*、*kirN*、*kirP*、*kirTI* 和 *kirTII* 的效果更好, 莫西霉素产量较野生型菌株分别提高了 57.8% 和 65.6%, 达到 198.3 mg/L 和 208.1 mg/L。此外, 通过在公开的细菌基因组数据库中搜索莫西霉素生物合成酶的同源蛋白编码基因, 发现 31 个预测可以合成莫西霉素类天然产物的生物合成基因簇。【结论】本研究运用代谢工程方法有效提升了莫西霉素的产量, 为进一步推动莫西霉素的应用开发奠定了基础。

关键词: 次级代谢产物; 莫西霉素; 聚酮-非核糖体肽; 代谢工程; 产量提升

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2303100); 国家自然科学基金(32270081)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2303100) and the National Natural Science Foundation of China (32270081).

*Corresponding author. E-mail: panguohui@im.ac.cn

Received: 2024-04-14; Accepted: 2024-04-30; Published online: 2024-05-28

Construction of high-producing strains of kirromycin

ZHU Qingyue^{1,2}, WANG Lijun², LI Dong^{2,3}, FAN Keqiang², REN Jinwei⁴,
CAO Guangxiang¹, PAN Guohui^{*2,3}

1 Biomedical Sciences College & Shandong Medicinal Biotechnology Centre, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

4 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] Kirromycin is a complex linear polyketide-nonribosomal peptide compound produced by *Streptomyces collinus* Tü 365, which interacts with the bacterial elongation factor EF-Tu, thereby inhibiting protein synthesis and exhibiting narrow-spectrum antibacterial activity. Currently, kirromycin is widely used as an experimental reagent in studying ribosomal structure and function. Recent studies have reported that kirromycin and its analogs exhibit superior activity against *Wolbachia* compared to the registered drug doxycycline, making them potential lead compounds for treating filarial worm infections.

[Objective] Combinatorial metabolic engineering methods were used to construct high-production strains of kirromycin to enhance kirromycin production and lay the foundation for further applications. **[Methods]** Based on the kirromycin biosynthetic gene cluster and biosynthetic pathways analysis, overexpression or co-overexpression of the genes encoding crotonyl CoA reductase (*kirN*), aspartate-1-decarboxylase (*kirD*), phosphopantetheinyl transferase (*kirP*), efflux pump proteins of the major facilitator superfamily (*kirTI* and *kirTII*), and acetyl-CoA carboxylase (*acc*) from *Streptomyces coelicolor* A3(2) under the control of constitutive promoter *kasOp** were performed to increase kirromycin production in *S. collinus*.

[Results] Overexpression or co-overexpression of the aforementioned genes had a certain effect on increasing kirromycin production. Better results were observed from the overexpression of the *acc* gene and co-overexpression of *kirD*, *kirN*, *kirP*, *kirTI*, and *kirTII* genes. Compared to the wild-type strain, kirromycin production increased by 57.8% and 65.6%, reaching 198.3 mg/L and 208.1 mg/L, respectively. A systematic search for homologous proteins-coding genes of kirromycin biosynthetic enzymes in publicly available bacterial genome databases revealed 31 biosynthetic gene clusters potentially synthesizing kirromycin-like natural products. **[Conclusion]** This study effectively increased kirromycin production in *S. collinus* using metabolic engineering methods, laying a solid foundation for further applications and development of kirromycin.

Keywords: secondary metabolites; kirromycin; polyketide-nonribosomal peptide; metabolic engineering; yield improvement

链霉菌能够产生大量结构多样、活性显著的次级代谢产物,目前已从中开发出一系列抗生素、抗肿瘤药物和免疫抑制剂等,在临床治疗、畜牧业和植物作物保护等方面发挥着重要作用^[1-4]。莫西霉素^[5-7](mocimycin, 又名 kirromycin)是由山丘链霉菌(*Streptomyces collinus*) Tü 365 产生的一种具有窄谱抑菌活性的抗生素。莫西霉素属于 elfamycin 家族抗生素,其作用机制是通过与细菌延伸因子 EF-Tu 结合,阻止 EF-Tu:GDP 与核糖体解离,进而中断细菌蛋白质的合成^[8-9],对部分链球菌(*Streptococci* sp.)、肠球菌(*Enterococci* sp.)、淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus*

influenzae)有较强的抑制活性^[10]。目前莫西霉素被广泛用作实验试剂,在核糖体结构和功能研究中发挥着重要作用^[11-12]。此外,研究发现莫西霉素及其同系物具有抑制线状丝虫内共生菌沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)的活性,其半数抑制浓度为 0.25–1.08 nmol/L,优于具有抗沃尔巴克氏体活性的注册药物多西环素(152 nmol/L),有望成为治疗丝状线虫感染的新先导化合物^[13]。

莫西霉素是线性的聚酮-非核糖体肽杂合分子,分子内含有吡啶酮环、四氢呋喃环和类糖部分(sugar-like moiety, 也称为 goldinonic acid)。莫西霉素的生物合成途径已基本解析(图 1),来源于山丘链霉菌的莫西霉素生物合成基因簇约

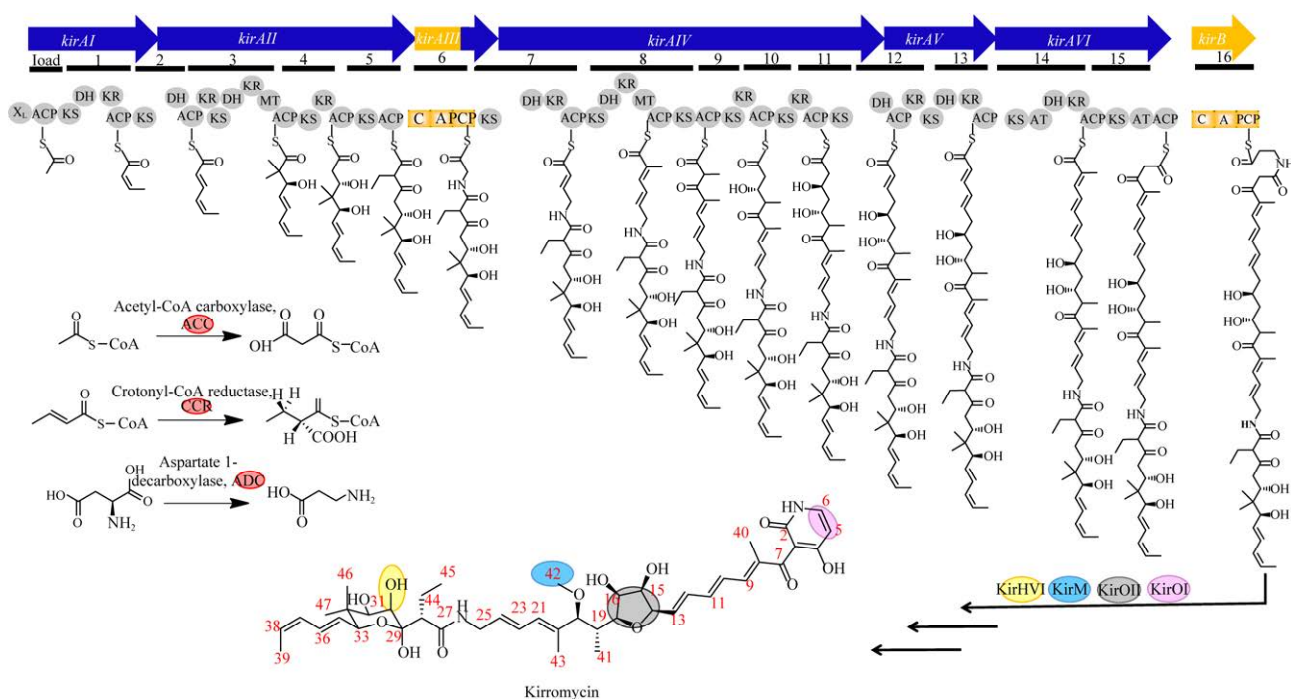


图 1 莫西霉素的生物合成途径^[18] X_L: 未知功能; ACP: 酰基载体蛋白; KS: 酮基合酶; DH: 脱水酶结构域; KR: 酮基还原酶; MT: 甲基转移酶; C: 缩合; A: 腺苷酰化; PCP: 肽基载体蛋白; AT: 酰基转移酶

Figure 1 Biosynthetic pathway of kirromycin^[18]. X_L: Unknown function; ACP: Acyl carrier protein domain; KS: Ketosynthase; DH: Dehydratase; KR: Ketoreductase; MT: Methyltransferase; C: Condensation; A: Adenylation; PCP: Peptidyl carrier protein; AT: Acyltransferase.

为 82 kb, 含有 28 个基因^[14-16]。负责莫西霉素生物合成的核心酶包括由 *kirAI-kirAVI* 和 *kirB* 编码的聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)及非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS), 共含有 1 个起始模块和 16 个延伸模块^[12]。其中上游的 *KirAI-KirAV* 属于模块中缺少酰基转移酶(acyltransferase, AT)结构域的 *trans*-AT PKS, 由独立的酰基转移酶 *KirCI*^[17]和 *KirCII*^[18-19]分别识别并转移丙二酸单酰辅酶 A、乙基丙二酸单酰辅酶 A 作为延伸单元; *KirAVI* 是装配线上唯一的 *cis*-AT PKS, 含有 2 个模块; *KirAIII* 与 *KirB* 分别含有 1 个 NRPS 模块, 负责在聚酮骨架上引入甘氨酸与 β -丙氨酸。基因簇内多个基因编码的蛋白参与莫西霉素前体的生物合成, 如巴豆酰辅酶 A 还原酶(crotonyl CoA reductase, CCR) *KirN*^[14,20]参与合成乙基丙二酸单酰辅酶 A; 天冬氨酸-1-脱羧酶(aspartate-1-decarboxylase, ADC) *KirD* 参与合成 β -丙氨酸^[12-13]。此外, Sfp 型磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(phosphopantetheinyl transferase, PPTase) *KirP* 负责激活 PKS 中的酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)结构域以及 NRPS 中的肽基载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP)结构域^[21]。聚酮-非核糖体肽杂合链的线上装配完成后, 由 Dieckmann 环化酶 *KirHI* 催化形成吡啶酮环并从 PKS/NRPS 装配线上释放^[22]。类糖部分可能在装配线上合成, 也可能是在链释放之后合成, 推测是由 33 位羟基和 29 位酮基发生缩醛反应自发形成^[12]。随后经过一系列后修饰酶的催化, 包括 *KirM* 催化 20 位氧甲基化, *KirHVI* 催化 30 位羟化, *KirOI* 催化吡啶酮环 C5-C6 双键的形成, *KirOII* 催化四氢呋喃环的形成及 15、16 位羟化^[19], 最终合成莫西霉素。

本研究将通过综合利用组合代谢工程技术, 过表达或组合过表达基因簇内多个参与合成前体化合物的酶的编码基因 *kirN*^[14,20]和

kirD^[12-13]、参与活化 ACP/PCP 的磷酸泛酰巯基乙胺转移酶编码基因 *kirP*^[21]、主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)的外排泵编码基因 *kirTI* 与 *kirTII*^[14], 以及天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)编码基因^[23]等构建莫西霉素高产菌株, 以期对山丘链霉菌莫西霉素产量进行有效提升。另外, 在公开的细菌基因组数据库中系统搜索与莫西霉素生物合成基因簇高度相似的 PKS/NRPS 杂合基因簇, 对其分布进行研究。莫西霉素高产菌株的构建及其他潜在产生菌的发掘可为莫西霉素产量的进一步提升与应用开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

山丘链霉菌(*S. collinus*) Tü 365 (CGMCC 4.5577), 中国普通微生物菌种保藏管理中心, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、*E. coli* ET12567/pUZ8002 和质粒 pSET152-kasO* (pBS21003)^[24]均为本实验室保藏, 质粒 pKasO*-KA2BE-acc 由中国科学院微生物研究所王为善研究员惠赠。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶和 DNA Marker, 纽英伦生物技术(北京)有限公司; DNA 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒, 北京博迈德基因技术有限公司; 抗生素, 上海源叶生物科技有限公司。

基因扩增仪, 杭州柏恒科技有限公司; 组合式全温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 高效液相色谱、半制备型高效液相色谱, 岛津企业管理(中国)有限公司; 液相色谱-高分辨电喷雾质谱仪, 沃特世公司。

本研究使用的引物见表 1。

表 1 本研究使用引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	用途 Usage
SQ-kasO-KirP-F	GTGCAGGACTGGGGGAGTTCTTAAGCGCGAGTCGAATCTGGAGGAT	扩增山丘链霉菌 <i>kirP</i> 基因 Amplification of <i>kirP</i> gene from <i>Streptomyces collinus</i>
SQ-kasO-KirP-R	ACAGCTATGACATGATTACGAATTCCCGGCGTCAGTTGTGACTGGGT	
SQ-kasO-KirP-F1	AATGACCGACGAAGACCTCGGAATTCGCGAGTCGAATCTGGAGGAT	扩增山丘链霉菌 <i>kirTI</i> 、 <i>kirTII</i> 基因 Amplification of <i>kirTI</i> and <i>kirTII</i> genes from <i>S. collinus</i>
SQ-kasO-KirP-R1	GTATGGCGCGCCGGCGTCAGTTGTGACTGGGT	
SQ-kasO-KirT-F	GTGCAGGACTGGGGGAGTTCTTAAGCGCGCCATACCGAAGAAGCTG	
SQ-kasO-KirT-R	ACAGCTATGACATGATTACGAATTCCGGGGACGGTCAGGACACTC	
SQ-kasO-KirT-F1	CTGACGCCGGCGCGCCATACCGAAGAAGCTG	扩增山丘链霉菌 <i>kirD</i> 基因 Amplification of <i>kirD</i> gene from <i>S. collinus</i>
SQ-kasO-KirT-R1	AGGAAACAGCTATGACATGATTACGCGGGGACGGTCAGGACACTC	
SQ-kasO-KirD-F	GTGCAGGACTGGGGGAGTTCTTAAGTGAACGGAGACCACCCGGTGTA	
SQ-kasO-KirD-R	TACGCGACTGCGGATCGGTGCGGTACGCGTC	
SQ-kasO-KirN-F	CACCGATCCGCAGTCGCGTACACGGAGGAGCA	扩增山丘链霉菌 <i>kirN</i> 基因 Amplification of <i>kirN</i> gene from <i>S. collinus</i>
SQ-kasO-KirN-R	ACAGCTATGACATGATTACGAATTCCGAGGTCTTCGTCGGTCATTTGTT	
152-A2BE-F	GTGCAGGACTGGGGGAGTTGATGCGCAAGGTGCTCATCGC	扩增天蓝色链霉菌 A3(2) <i>acc</i> 基因 Amplification of <i>acc</i> gene from <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
152-A2BE-R	CCTGGTTCCTTCTTGTTGTTTCAGCGCCAGCTGTGCGGGG	
152-psf-F	CGCCAGGGTTTTCCCAAGTCAC	验证山丘链霉菌重组菌株 Validation the recombinant strains of <i>S. collinus</i>
152-psf-R	TGCTTCCGGCTCGTATGTTGTG	

1.3 培养基

LB 培养基用于培养大肠杆菌, 2×YT 培养基、MS 培养基用于接合转移, TSB 培养基用于种子活化, 均参照文献[25-26]配制。HA 培养基用于山丘链霉菌的孢子培养^[14]。M1、M2、M6、M8、FM2、MSL、SSM 培养基用于菌株的发酵, 其中 M2、M6、M8、FM2、SSM 培养基参照文献[27]配制, MSL 培养基参照文献[14]配制。M1 培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 4.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 2.00, pH 7.2。

1.4 质粒的构建

以山丘链霉菌基因组 DNA 为模板^[26], 使用表 1 中的 4 对引物 SQ-kasO-KirP-F/R、SQ-kasO-KirT-F/R、SQ-kasO-KirD-F/R 和 SQ-kasO-KirN-F/R 分别扩增含 *kirP* (918 bp)、*kirTI*+*kirTII* (1 755 bp)、*kirD* (485 bp)和 *kirN* (1 443 bp)基因的 DNA 片段。PCR 反应体系(50 μL): 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.5 μL, DNA 模板(50 mg/L) 1 μL, DMSO 2.5 μL, 2×*ApexHF* FL PCR Master Mix 25 μL, ddH₂O 18.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 1 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。分别将 *kirP*、*kirTI*+*kirTII*、

kirD 和 *kirN* 基因片段与经 *Afl* II 和 *EcoR* I 酶切的 pSET152-kasO*载体进行 Gibson 组装, 经酶切验证及测序验证后, 获得目标基因过表达质粒 pSET152-kasO*-*kirP*、pSET152-kasO*-*kirT* 以及 pSET152-kasO*-*kirD-kirN*。以 SQ-kasO-KirP-F1/R1、SQ-kasO-KirT-F1/R1 两对引物分别按照上面所述 PCR 条件扩增含 *kirP* (903 bp)、*kirTI+kirTII* (1 740 bp)基因的片段, 将 *kirP*、*kirTI+kirTII* 基因片段与经 *EcoR* I 酶切的 pSET152-kasO*-*kirD-kirN*载体进行 Gibson 组装, 经酶切验证及测序验证后, 获得组合过表达质粒 pSET152-kasO*-*kirD-kirN-kirT-kirP*。以 152-A2BE-F/R 为引物, 按照上面所述 PCR 条件扩增天蓝色链霉菌 A3(2)中的乙酰辅酶 A 羧化酶编码基因 *acc* (3 639 bp)片段, 将 *acc* 基因片段与经 *Bam* H I 和 *Xba* I 酶切的 pSET152-kasO*载体进行 Gibson 组装, 经酶切验证及测序验证后, 获得过表达质粒 pKasO*-KA2BE-*acc*。大肠杆菌培养、转化、质粒提取等参照文献[26]进行。

1.5 大肠杆菌-链霉菌属间接合转移

通过大肠杆菌-链霉菌接合转移将过表达及组合过表达质粒分别转移到山丘链霉菌中, 构建基因过表达的重组菌株。接合转移实验参考文献[28]操作, 使用 25 μ g/mL 羰基试剂和 50 μ g/mL 安普霉素筛选获得接合子, 使用 PCR 扩增插入的 DNA 片段验证接合子的正确性。PCR 反应体系 (50 μ L): 引物 152-psf-F/R (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, 基因组 DNA 模板 (50 mg/L) 1 μ L, DMSO 2.5 μ L, 2 \times Rapid *Taq* Master Mix 25 μ L, ddH₂O 18.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.6 链霉菌的发酵

山丘链霉菌野生型及重组菌株在 HA 培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 用接种铲挖取 1 cm \times 1 cm 的带

菌琼脂块, 转接 TSB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 2 d 后, 取 5 mL 种子液转接至 50 mL 发酵培养基 (M1、M2、M6、M8、FM2、MSL、SSM), 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 7 d, 每 24 h 取样 1 mL; 另设有 MSL 培养基发酵添加树脂的组别, 在接种后第 2 天添加 XAD-16 树脂, 第 7 天结束发酵。所有发酵实验均重复 3 次, 使用 GraphPad Prism 10 软件对数据进行统计分析和作图, 使用 *t* 检验比较组间数据的差异显著性。

1.7 液相色谱-高分辨质谱分析

使用液相色谱-高分辨电喷雾质谱仪及 C18 色谱柱 (2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m) 进行高分辨质谱检测分析。

1.8 化合物的分离纯化

山丘链霉菌在 HA 固体培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 用接种铲挖取 1 cm \times 1 cm 的带菌琼脂块接种 TSB 培养基, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 2 d, 取 50 mL 种子液转接 500 mL MSL 发酵培养基, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 2 d, 加入灭菌的大孔吸附树脂, 再继续以相同条件培养 5 d。发酵结束后收集树脂, 用甲醇浸取, 将收集的甲醇浸取液旋干, 用甲醇重溶。首先使用 C18 硅胶柱进行分离, 将有目标产物的样品合并旋干, 用甲醇重溶后使用 Sephadex LH20 凝胶柱进行分离, 将有目标产物的样品合并, 最后使用半制备型高效液相色谱进行纯化, 色谱柱为 SilGreen C18AQ (10 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相为含 0.1% 甲酸的 40% 乙腈/水溶液, 流速为 3 mL/min, 制得化合物纯品。化合物冻干后, 溶于 acetone-*d*₆ 中, 送中国科学院微生物研究所所级公共技术中心进行核磁分析。

1.9 莫西霉素产量及菌体生物量的测定

取 500 μ L 发酵液加入等体积甲醇溶液, 振荡混匀, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清, 用 0.45 μ m 滤膜过滤后进行高效液相色谱分析。使

用高效液相色谱仪, ZORBAX SB-C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 在 328 nm 的紫外波长下进行检测, 全波长扫描范围为 190–800 nm。流动相: A 相为水+0.1%甲酸, B 相为乙腈+0.1%甲酸; 总流速 1 mL/min。梯度洗脱程序: 0–2 min, 5% B 相; 2–25 min, 5%–95% B 相(线性梯度); 25–30 min, 95% B 相; 30–35 min, 5% B 相。

称取 10 mg 莫西霉素纯品溶于甲醇, 配制成 10 g/L 的莫西霉素母液, 分别稀释为 500、300、100、50、1 mg/L 的标准溶液, 采用上述方法进行高效液相色谱分析, 使用 328 nm 下峰面积绘制莫西霉素标准曲线。

参照文献[29]采用二苯胺法测定菌体生物量。

1.10 生物信息学分析方法

细菌基因组数据下载自 NCBI Genome 数据库(截至 2024 年 2 月)。使用山丘链霉菌中莫西霉素生物合成基因簇中的蛋白序列为查询蛋白, 在已下载的细菌基因组中搜索其同源蛋白编码基因, 找出成簇排列的同源蛋白编码基因, 为可能的莫西霉素类生物合成基因簇。随后将基因簇内基因编码蛋白序列与 MIBiG 数据库中已知天然产物生物合成基因簇中基因编码蛋白序列进行比对^[30], 通过人工复筛挑选出与莫西霉素生物合成基因簇高度相似的基因簇。蛋白序列比对使用 BLASTp 及 Parasail_aligner 完成^[31]。

使用多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)方法比较莫西霉素类天然产物生物合成基因簇所在宿主菌株的基因组相似性。参考文献[28,32–33]中的方法, 选择 ATP 合酶 β 链、DNA 旋转酶 β 亚基、重组酶 A、RNA 聚合酶 β 亚基和色氨酸合酶 β 亚基等 5 个编码基因进行分析。多重序列比对、Kimura 双参数距离计算以及进化树的构建使用 MEGA 11.0 完成^[34], 使用 iTOL 网站进行进化树可视化^[35]。

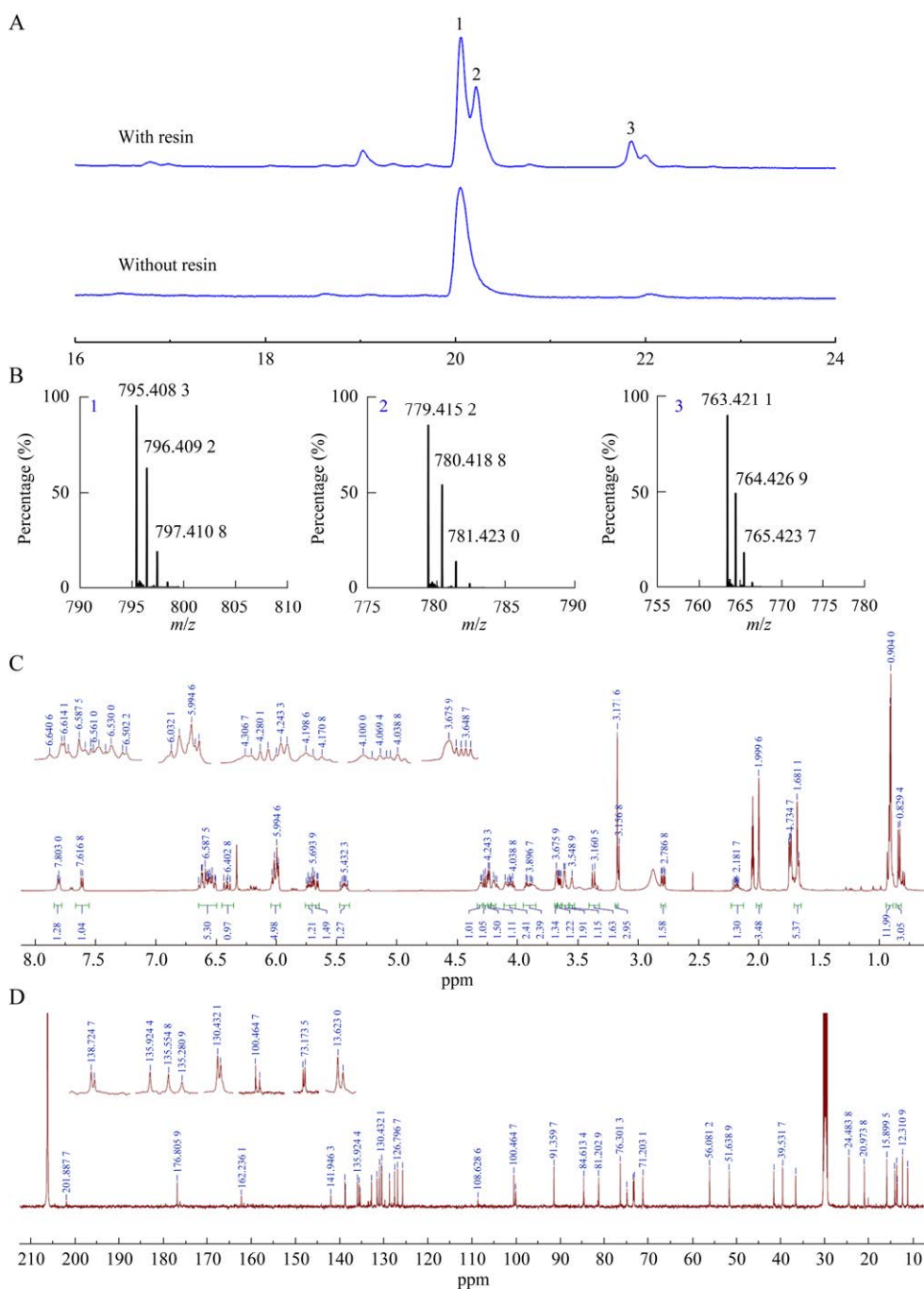
2 结果与分析

2.1 山丘链霉菌中莫西霉素的分离和鉴定

为了获得山丘链霉菌合成的莫西霉素及其结构类似物, 利用 MSL 培养基培养山丘链霉菌, 在发酵过程中分别添加 XAD-16 大孔吸附树脂或不添加树脂, 使用高效液相色谱分析其发酵产物, 结果显示在添加树脂的发酵产物中, 使用 328 nm 检测可以观察到一系列化合物具有与莫西霉素相似的紫外吸收光谱(图 2A)。使用液相色谱-高分辨电喷雾质谱进一步分析发酵产物, 确定其中 3 个峰对应产物的[M–H]⁺质荷比分别为 795.408 3、779.415 2 与 763.421 1, 分别与莫西霉素(计算值 795.406 8, 对应分子式 $C_{43}H_{60}N_2O_{12}$, 化合物 1)、30-deoxy-kirromycin (计算值 779.411 9, 对应分子式 $C_{43}H_{60}N_2O_{11}$, 化合物 2) 和 30-hydroxy-5,6-dehydro-1-N-demethyl-16-deoxy-kirrothricin (计算值 763.417 0, 对应分子式 $C_{43}H_{60}N_2O_{10}$, 化合物 3)的分子量相符(图 2B)。在不添加树脂的发酵液中, 产物主要是化合物 1, 化合物 2 和 3 对应的峰均不明显(图 2A), 推测在此发酵条件下生物合成中间体化合物 2 和 3 能够完全转化为化合物 1。为了进一步确认化合物 1 为莫西霉素, 使用 MSL 培养基对山丘链霉菌进行 10 L 摇瓶发酵, 分离纯化制得化合物 1, 冻干后为淡黄色固体粉末。使用 acetone- d_6 溶解后进行 ¹H 谱和 ¹³C 谱分析(图 2C 和 2D), 可以观察到 5 个单峰甲基(包括 1 个氧甲基 δ_H 3.17/ δ_C 56.1、2 个双键上甲基 δ_H 2.00/ δ_C 13.5 和 δ_H 1.68/ δ_C 11.2)、2 个双峰甲基(其中 1 个双键甲基 δ_H 1.74 (br. d, $J=7.0$ Hz)/ δ_C 13.6)、1 个三峰甲基 0.92 (t, $J=7.2$ Hz)、9 个双键、7 个连氧次甲基、3 个羰基(其中 1 个酮羰基 δ_C 201.9, 1 个半缩醛 δ_C 100.5)等基团。以上结果与文献[36]中报道的莫西霉素数据一致, 因此化合物 1 被鉴定为莫西霉

素。核磁信号的详细归属如下(碳原子编号见图1): ^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ 7.80 (t, $J=5.4$ Hz, H-26), 7.61 (d, $J=7.5$ Hz, H-6), 6.50–6.64 (overlapped, H-9/10/11/23/36), 6.41 (dd, $J=15.0$ 、 9.4 Hz, H-12), 5.98–6.03 (overlapped, H-5/13/22/37), 5.72 (dt, $J=15.1$ 、

5.4、5.4 Hz, H-24), 5.67 (dd, $J=15.1$ 、 5.4 Hz, H-35), 5.44 (m, H-38), 4.31 (dd, $J=6.2$ Hz、 5.5 Hz, H-15), 4.27 (dd, $J=14.8$ 、 6.2 Hz, H-14), 4.24 (br. d, $J=5.5$ Hz, H-33), 4.20 (dd, $J=5.5$ Hz, H-16), 4.05 (dt, $J=15.4$ 、 5.5 、 5.5 Hz, H-25a), 3.91 (dt, $J=15.9$ 、 5.5 、 5.5 Hz,



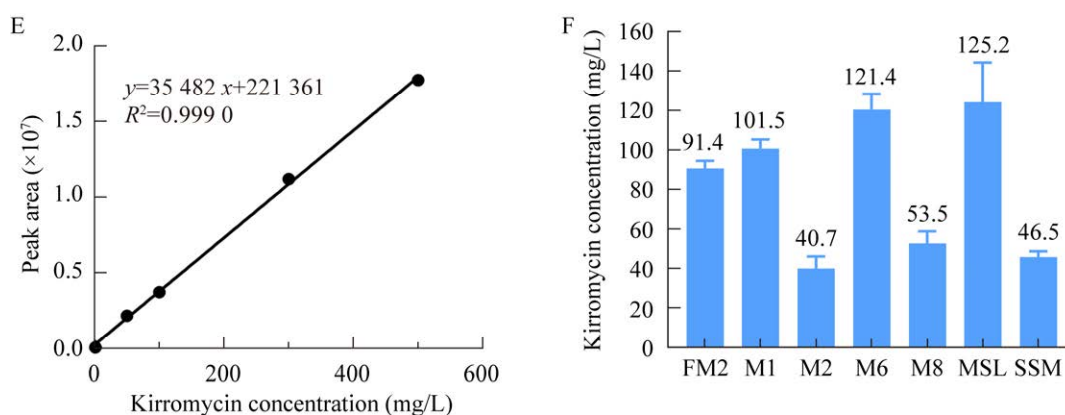


图2 山丘链霉菌中莫西霉素相关代谢产物分析 A: 山丘链霉菌野生型菌株莫西霉素相关代谢产物的高效液相色谱分析(1: 莫西霉素; 2: 30-脱氧莫西霉素; 3: 30-羟基-5,6-脱水-1-N-脱甲基-16-脱氧黄丝菌素). B: 3个化合物的高分辨质谱分析. C: 莫西霉素的核磁共振氢谱. D: 莫西霉素的核磁共振碳谱. E: 莫西霉素标准曲线. F: 山丘链霉菌在不同培养基(未添加树脂)中莫西霉素产量的定量分析

Figure 2 Analysis of kirromycin-related metabolites of *Streptomyces collinus*. A: HPLC analysis of kirromycin-related metabolites in *Streptomyces collinus* (1: Kirromycin; 2: 30-deoxy-kirromycin; 3: 30-hydroxy-5,6-dehydro-1-N-demethyl-16-deoxy-kirrothricin). B: HR-MS results of 3 kirromycin related compounds. C: ^1H -NMR spectrum of kirromycin; D: ^{13}C -NMR spectrum of kirromycin. E: The standard curve of kirromycin. F: Yield analysis of kirromycin in different culture media (without resin).

H-25b), 3.67 (br. s, H-30), 3.65 (dd, $J=8.0$ 、 3.9 Hz, H-17), 3.61 (br. s, H-31), 3.37 (d, $J=9.5$ Hz, H-20), 3.17 (s, H₃-42), 2.79 (dd, $J=11.5$ 、 4.5 Hz, H-28), 2.18 (m, H-19), 2.00 (s, H₃-40), 1.74 (br. d, $J=7.0$ Hz, H₃-39), 1.71 (m, H₂-44), 1.68 (br. s, H₃-43), 0.92 (t, $J=7.2$ Hz, H₃-45), 0.91/0.90(s, H₃-46/47), 0.84 (d, $J=7.0$ Hz, H₃-41)。 ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6) δ 201.9 (C-7), 176.8 (C-2/27), 162.0 (C-4), 142.0 (C-6), 138.7 (C-8), 138.6 (C-11), 135.9 (C-13), 135.6 (C-21), 135.3 (C-9), 132.7 (C-12), 131.5 (C-24), 130.9 (C-35), 130.5 (C-22 或 C-37), 130.4 (C-37 或 C-22), 128.7 (C-10), 127.5 (C-23), 126.8 (C-36), 125.7 (C-38), 100.8 (C-3), 100.5 (C-29), 100.1 (C-5), 91.4

(C-20), 84.6 (C-17), 81.2 (C-14), 76.3 (C-33), 74.8 (C-16), 73.4 (C-15), 73.2 (C-31), 71.2 (C-30), 56.1 (C-42), 51.6 (51.7), 41.5 (C-25), 39.5 (C-32), 36.6 (C-19), 24.5 (C-47), 21.0 (C-44), 15.9 (C-46), 14.1 (C-41), 13.6 (C-40 或 C-39), 13.5 (C-39 或 C-40), 12.3 (C-45), 11.2 (C-43)。

为了定量评估莫西霉素的产量,我们绘制了莫西霉素的标准曲线 $y=35.482x+221.361$, $R^2=0.9990$ (图 2E), 并利用 7 种不同发酵培养基培养山丘链霉菌, 对其中莫西霉素的产量进行了定量测定, 结果显示使用 MSL 培养基的莫西霉素产量最高(图 2F)。由于添加树脂与不添加树脂的发酵产物中莫西霉素产量基本相当, 考虑到不填树脂进行发酵时发酵液中无化合物 2 干扰莫西霉素产量的定量检测, 我们在后续重组菌株的

发酵过程中没有添加树脂。

2.2 山丘链霉菌中莫西霉素生物合成基因簇的修正

对基因簇内途径特异性调控基因进行遗传操作是靶向激活基因簇或提高其产物产量的重要方法。在山丘链霉菌莫西霉素生物合成基因簇中,只有2个基因编码的蛋白与已知调控蛋白有一定的序列相似性,KirRI (104个残基)与弗兰克氏菌(*Frankia* sp.) CcI3 中一个未被鉴定的 TetR 家族调控蛋白 C 末端的序列一致性达到 61%, KirRII (119个残基)与 *Frankia* sp. CcI3 中同一个蛋白的 N 端具有 50% 的序列一致性^[14]。我们注意到 *kirRII* 恰好位于 *kirRI* 的上游,推测这2个基因可能实际上编码一个完整的 TetR 家族调控蛋白。因此我们对这2个基因附近区域进行了测序,发现已公布的 *kirRII* 基因序列的终止密码子 TGA 实际测序结果为 TGG,这就表明 *kirRII* 和

kirRI 及中间序列实际上为一个完整的基因,由 ATG 作为起始密码子,TGA 作为终止密码子,共 708 bp,我们将其命名为 *kirR* (图 3)。序列分析表明 *kirR* 编码一个完整的 TetR 家族调控蛋白,这修正了长期以来对该基因簇的错误注释。由于 TetR 家族调控蛋白通常负调控代谢产物的生物合成,敲除其编码基因往往可以提高代谢产物的产量。因此我们尝试对该基因进行敲除,但遗憾的是,我们未能筛选获得 *kirR* 敲除突变株。

为了进一步研究 *kirR* 基因在莫西霉素类天然产物生物合成基因簇中的存在状态,我们在公开的细菌基因组数据库中搜索莫西霉素类天然产物的生物合成基因簇。从 NCBI Genome 数据库中共下载得到 57 088 个细菌基因组(截至 2024 年 2 月),包括所有细菌完整基因组数据(组装状态标注为 complete genome 或 chromosome),以及已报道的莫西霉素产生菌所在的链霉菌属

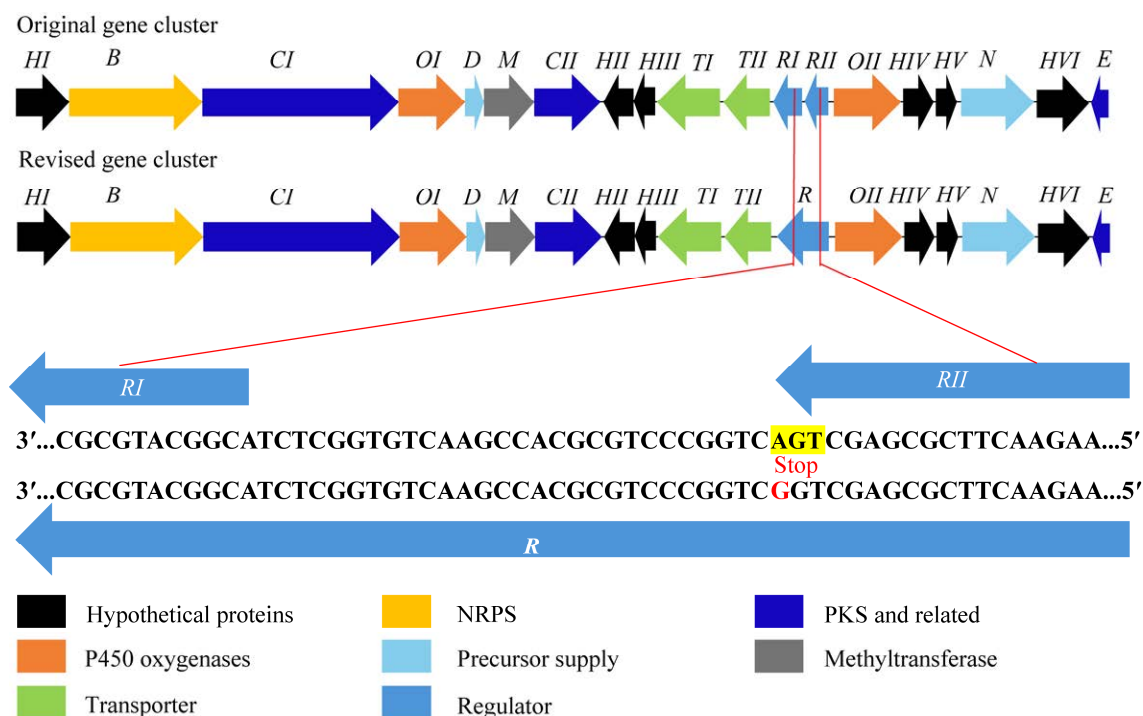


图 3 山丘链霉菌中莫西霉素生物合成基因簇修正

Figure 3 Revision of the kirromycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces collinus*.

(*Streptomyces*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)和拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)的所有细菌基因组数据。以山丘链霉菌中莫西霉素生物合成基因簇为查询序列,在上述细菌基因组中搜索成簇排列的同源蛋白编码基因,并经过人工检验复核,排除与 MIBiG 数据库中其他天然产物生物合成基因簇更相似的基因簇^[30],最终获得了 31 个与莫西霉素生物合成基因簇相似、可能合成类似结构天然产物的生物合成基因簇。这些基因簇中 PKS/NRPS 编码基因的组成与排列顺序与山丘链霉菌中莫西霉素生物合成基因簇基本一致,蛋白序列相似性较高(序列一致性在 70%–100%)。其中一些莫西霉素类天然产物生物合成基因簇,如来自无核链霉菌(*Streptomyces anulatus*) NRRL B-3362 和玫瑰色链霉菌(*Streptomyces roseovercillatus*) NRRL B-3500 的基因簇中,也观察到编码一个完整 TetR 家族调控蛋白的基因。这些结果提示我们,在莫西霉素生物合成基因簇中的 *kirR* 基因,编码一个完整的 TetR 家族调控蛋白。

这 31 个新莫西霉素类天然产物生物合成基因簇的宿主菌大多为链霉菌,个别为拟无枝酸菌和北里孢菌(*Kitasatospora setae*) (图 4),这与已报道的此类化合物的产生菌主要为链霉菌相符。我们进一步使用 MLSA 计算这些细菌以及 21 个模式链霉菌之间的基因组相似度,以澳大利亚糖丝菌(*Saccharothrix australiensis*) DSM 43800 和西班牙糖丝菌(*Saccharothrix espanaensis*) DSM 44229 为外群,分析结果如图 4 所示,31 个含有莫西霉素类天然产物生物合成基因簇的细菌分布在不同的分支。其中一个较大的分支包含了卡特利链霉菌(*Streptomyces cattleya*) NRRL 8057 (=DSM 46488=NBRC 14057),该菌被报道可以合成类似莫西霉素的天然产物^[37];另外 2 个较

大的分支分别以 *S. netropsis* 和 *S. globosus* 为代表。此外,其他含有莫西霉素类天然产物生物合成基因簇的细菌分别聚成小分支。

2.3 过表达生物合成相关基因提高山丘链霉菌中莫西霉素的产量

提高前体生物合成相关基因以及基因簇中与抗性及产物转运相关基因的表达量是提升天然产物产量的有效策略。例如,在 *S. coelicolor* A3(2)中通过过表达乙酰辅酶 A 羧化酶提高聚酮生物合成前体丙二酸单酰辅酶 A 的供应,使得芳香聚酮类天然产物放线紫红素的产量增加了 6 倍^[23]。在龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*) M4018 中组合过表达土霉素抗性基因 *otrA* 以及外排泵编码基因 *otrB*、*otrC*,使土霉素产量提高了 179%^[38]。为了提高莫西霉素的产量,我们对生物合成基因簇内的巴豆酰辅酶 A 还原酶编码基因 *kirN*、天冬氨酸-1-脱羧酶编码基因 *kirD*、磷酸泛酰巯基乙胺转移酶编码基因 *kirP*、MFS 家族的外排泵蛋白编码基因 *kirTI* 和 *kirTII*,以及来自 *S. coelicolor* A3(2)的乙酰辅酶 A 羧化酶编码基因 *acc* 进行过表达或组合过表达(图 5A、5B),分别构建了重组菌株 SQ-KirP、SQ-KirT、SQ-KirND、SQ-ACC 和 SQ-KirDNPT,重组菌株的验证结果见图 5C、5D。从已测试的培养基中选择产量最高的 MSL 培养基,进行重组菌株的发酵实验,结果显示在发酵第 6 天莫西霉素的产量达到最大值(图 5E)。以第 6 天的莫西霉素产量计算(图 5F),单独过表达 *kirP* 基因使得莫西霉素产量提高了 16.5%,组合过表达 *kirTI* 和 *kirTII* 基因使其产量提高了 15.9%、组合过表达 *kirN* 和 *kirD* 基因使其产量提高了 37.8%。值得注意的是,单独过表达 *acc* 基因以及组合过表达 *kirD*、*kirN*、*kirP*、*kirTI* 和 *kirTII* 基因的菌株中莫西霉素产量具有显著提升,其产量分别为 198.3 mg/L 和 208.1 mg/L,较野生型菌株分别提高了 57.8%和 65.6%。

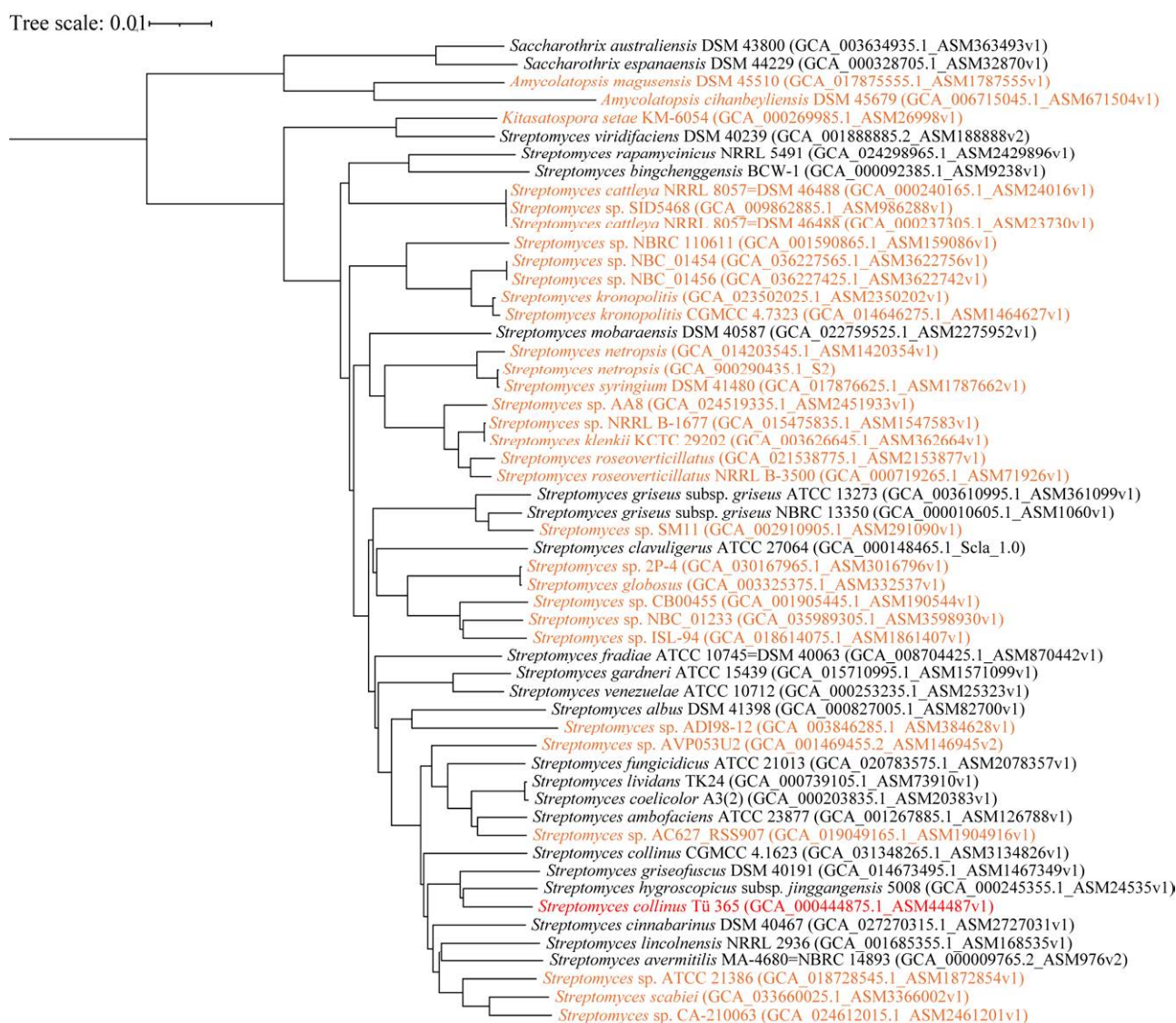


图4 含莫西霉素类天然产物生物合成基因簇菌株的进化树 红色：本研究选择的山丘链霉菌；橙色：预测含有莫西霉素类天然产物生物合成基因簇的菌株；黑色：其他模式菌株；括号内为基因组在 NCBI Genome 数据库中的序列号；图中标尺所示为 Kimura 双参数距离 0.01

Figure 4 Evolutionary tree of strains containing biosynthetic gene clusters of kirromycin-like natural products. Red: *S. collinus* Tü 365 selected in this study; Orange: Strains containing biosynthetic gene clusters of kirromycin-like natural products; Black: Other model strains. The serial number within the parentheses is the genome's accession number in the NCBI genome database. The scale on the chart indicates a Kimura two-parameter distance of 0.01.

为了进一步评估重组菌株的发酵特性,我们对山丘链霉菌野生型菌株及各个重组菌株在 MSL 培养基中的发酵过程进行了全产程分析。结果显示(图 5E),野生型及各个重组菌株发酵第 4 天后,莫西霉素的产量增长速度减缓,第 6 天

产量达到最大值。野生型与各个重组菌株生长趋势一致,在第 3 天后菌体进入衰亡期,生物量均开始下降。这些结果说明过表达 *kirD*、*kirN*、*kirP*、*kirTI*、*kirTII* 和 *acc* 能不同程度地提高莫西霉素的产量,并且对菌体生长无显著影响。

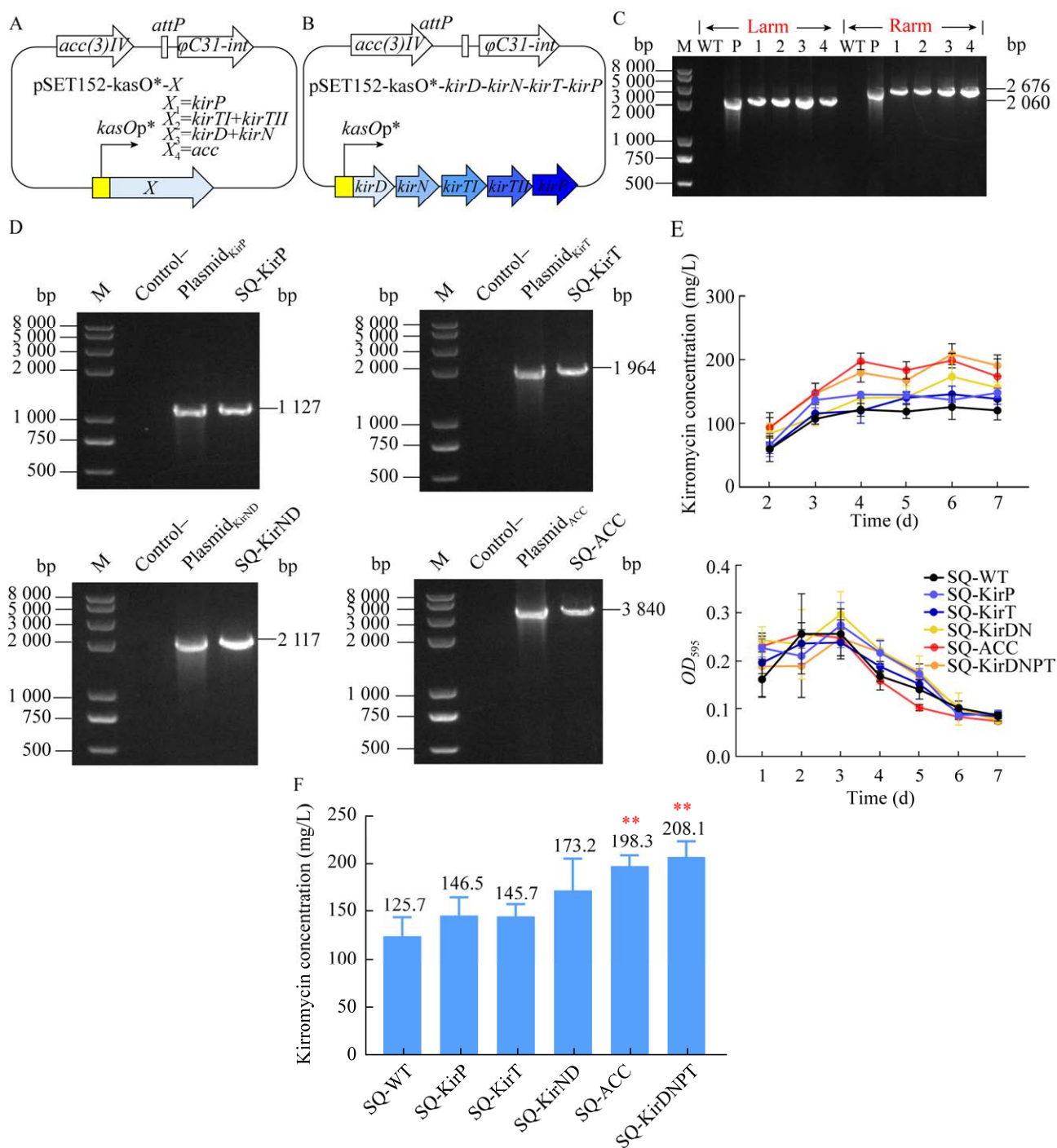


图 5 山丘链霉菌重组菌株的验证及产量分析 A: pSET152-kasO*-*kirP*、pSET152-kasO*-*kirT*、pSET152-kasO*-*kirD-kirN* 及 pKasO*-KA2BE-*acc* 过表达质粒构建示意图. B: pSET152-kasO*-*kirD-kirN-kirT-kirP* 组合过表达质粒构建示意图. C: 菌株 SQ-KirDNPT 的 PCR 验证 (M: DNA marker; WT: 山丘链霉菌野生型菌株; P: pSET152-kasO*-*kirD-kirN-kirT-kirP* 质粒; 1-4: 菌株 SQ-KirDNPT; Larm: pSET152-kasO*-*kirD-kirN-kirT-kirP* 上游基因; Rarm: pSET152-kasO*-*kirD-kirN-kirT-kirP* 下游基因). D:

菌株 SQ-KirP、SQ-KirT、SQ-KirND 及 SQ-ACC 的 PCR 验证 (M: DNA marker; Control-: 山丘链霉菌野生型菌株; Plasmid_{KirP}: pSET152-kasO*-kirP 质粒; Plasmid_{KirT}: pSET152-kasO*-kirT 质粒; Plasmid_{KirDN}: pSET152-kasO*-kirD-kirN 质粒; Plasmid_{ACC}: pKasO*-KA2BE-acc 质粒). E: 过表达菌株与野生型菌株发酵过程中莫西霉素产量与生物量变化曲线. F: MSL 培养基发酵第 6 天的莫西霉素产量(**: $P<0.01$)

Figure 5 Verification and yield analysis of recombination strain of *Streptomyces collinus*. A: Schematic illustration of the plasmids pSET152-kasO*-kirP, pSET152-kasO*-kirT, pSET152-kasO*-kirD-kirN and pKasO*-KA2BE-acc. B: Schematic illustration of the plasmid pSET152-kasO*-kirD-kirN-kirT-kirP. C: Verification of strain SQ-KirDNPT (M: DNA marker; WT: The wild-type of *S. collinus*; P: The plasmid of pSET152-kasO*-kirD-kirN-kirT-kirP; 1-4: The strains of SQ-KirDNPT; Larm: The upstream genes of pSET152-kasO*-kirD-kirN-kirT-kirP; Rarm: The downstream genes of pSET152-kasO*-kirD-kirN-kirT-kirP). D: Verification of strains SQ-KirP, SQ-KirT, SQ-KirND and SQ-ACC (M: DNA marker; Control-: The wild-type of *Streptomyces collinus*; Plasmid_{KirP}: The plasmid of pSET152-kasO*-kirP; Plasmid_{KirT}: The plasmid of pSET152-kasO*-kirT; Plasmid_{KirDN}: The plasmid of pSET152-kasO*-kirD-kirN; Plasmid_{ACC}: The plasmid of pKasO*-KA2BE-acc). E: Time-course curves of kirromycin production and biomass of recombination strains and wild-type strain within 7 days. F: Kirromycin yields of different strains at 6 d (**: $P<0.01$).

3 讨论与结论

莫西霉素对少数革兰氏阳性菌和少数革兰氏阴性菌具有显著的抑制活性,它可以特异地与细菌延伸因子 EF-Tu 相互作用,从而抑制细菌蛋白质的合成^[39]。由于这一独特的作用机制,莫西霉素作为实验试剂被广泛用于核糖体结构和功能的研究^[40-41]。近年来还有研究表明,莫西霉素及其结构类似物显示出优异的抑制线状丝虫内共生菌沃尔巴克氏体的活性,并且优于注册药物多西环素的活性,因而有望成为治疗丝状线虫感染的新先导化合物,为消除热带盘尾丝虫病和淋巴丝虫病带来了希望^[13]。

作为一种聚酮-非核糖体肽类杂合天然产物,莫西霉素生物合成过程中需要磷酸泛酰巯基乙胺转移酶 KirP 激活 ACP/PCP,此外还需要大量的丙二酸单酰辅酶 A、乙基丙二酸单酰辅酶 A 及 β -丙氨酸等作为生物合成单元。已有研究显示, kirP 基因失活导致莫西霉素产量下降 90%,表明 KirP 在莫西霉素的生物合成中发挥重要作用^[21]。基因失活及回补实验证实天冬氨酸-1-脱羧酶 KirD 参与 β -丙氨酸的生物合成^[15]。巴豆酰

辅酶 A 还原酶 KirN 催化巴豆酰辅酶 A 转化为乙基丙二酰辅酶 A,研究表明 kirN 基因失活导致莫西霉素产量显著降低^[20]。此外,该基因簇内还含有 MFS 家族的外排泵蛋白 KirTI、KirTII,可能参与莫西霉素的外排,实现宿主菌的自我保护。有多项研究结果表明,过表达磷酸泛酰巯基乙胺转移酶编码基因、外排泵蛋白编码基因及前体合成酶编码基因能有效提高目标化合物的产量^[42]。然而,到目前为止尚无通过对生物合成酶和外排泵蛋白编码基因等进行基因工程改造提高莫西霉素产量的报道。在此之前,有研究人员通过自然筛选和培养基优化,将游动放线菌 *Actinoplanes* sp. A8924 中莫西霉素产量从 30-50 mg/L 提高到 350 mg/L,随后通过在发酵过程中加入聚苯乙烯树脂,进一步提高了莫西霉素的产量^[43]。由于 *Actinoplanes* sp. A8924 及其自然筛选菌株的基因组信息未知,这些菌株中莫西霉素产量得以提升的分子机制尚不清楚。综合考虑已有的莫西霉素生物合成相关研究结果,本文利用高强度组成型启动子 kasOp*过表达或组合过表达山丘链霉菌 Tü 365 莫西霉素生物合成基因簇内的 kirN、kirD、kirP、kirTI、kirTII、以

及天蓝色链霉菌 A3(2)中的乙酰辅酶 A 羧化酶编码基因 *acc*, 实现莫西霉素产量的显著提升。未来通过整合理性代谢工程策略、自然筛选及人工诱变筛选等策略, 将有助于进一步提高莫西霉素的产量。

此外, 我们通过对山丘链霉菌中莫西霉素生物合成基因簇的序列进行重测序分析, 发现此前被注释为 *kirRI* 和 *kirRII* 的 2 个基因实际上构成一个完整的 TetR 家族调控蛋白编码基因 *kirR*, 因此修正了长期以来对该基因簇的错误注释, 为进一步研究莫西霉素生物合成的调控机制奠定基础。我们还通过对公开的细菌基因组数据进行系统分析, 发掘获得 31 个预测可以合成莫西霉素类天然产物的生物合成基因簇, 这不仅为发掘新结构的莫西霉素类活性天然产物提供指导, 还将为构建产量更优的莫西霉素工程菌株提供新的调控元件、催化元件和潜在底盘菌株。

综上, 本研究工作修正了莫西霉素生物合成基因簇, 构建了莫西霉素产量提升的基因工程菌株, 单独过表达 *acc* 基因及组合过表达 *kirN*、*kirD*、*kirP*、*kirTI*、*kirTII* 基因对于莫西霉素的产量有显著的提升效果, 相较于野生型菌株分别提高了 57.8% 与 65.6%, 其产量分别达到 198.3 mg/L 和 208.1 mg/L, 我们还发掘获得一系列具有合成莫西霉素类天然产物潜能的新微生物菌株。这些研究结果为未来构建更优的莫西霉素高产菌株奠定了基础, 将进一步推动莫西霉素的应用开发研究。

REFERENCES

- [1] ABDEL-RAZEK AS, EL-NAGGAR ME, ALLAM A, MORSY OM, OTHMAN SI. Microbial natural products in drug discovery[J]. Processes, 2020, 8(4): 470.
- [2] HUTCHINGS MI, TRUMAN AW, WILKINSON B. Antibiotics: past, present and future[J]. Current Opinion in Microbiology, 2019, 51: 72-80.
- [3] GENILLOUD O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics[J]. Natural Product Reports, 2017, 34(10): 1203-1232.
- [4] ALAM K, MAZUMDER A, SIKDAR S, ZHAO YM, HAO JF, SONG CY, WANG YY, SARKAR R, ISLAM S, ZHANG YM, LI AY. *Streptomyces*: the biofactory of secondary metabolites[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 968053.
- [5] VOST C, VERWIEL PEJ. The total structure of the novel antibiotic mocimycin (MYC 8003)[J]. Tetrahedron Letters, 1973, 14(52): 5173-5176.
- [6] MAEHR H, LEACH M, YARMCHUK L, STEMPEL A. Antibiotic X-5108. V. Structures of antibiotic X-5108 and mocimycin[J]. Journal of the American Chemical Society, 1973, 95(25): 8449-8450.
- [7] WOLF H, ZÄHNER H. Metabolic products of microorganisms. 99. Kirromycin[J]. Archives of Microbiology, 1972, 83(2): 147-154.
- [8] PARMEGGIANI A, NISSEN P. Elongation factor Tu-targeted antibiotics: four different structures, two mechanisms of action[J]. FEBS Letters, 2006, 580(19): 4576-4581.
- [9] OLSTHOORN-TIELEMAN LN, PALSTRA RJ TS, van WEZEL GP, BIBB MJ, PLEIJ CWA. Elongation factor Tu3 (EF-Tu3) from the kirromycin producer *Streptomyces ramocissimus* is resistant to three classes of EF-Tu-specific inhibitors[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(9): 3581-3590.
- [10] TAVECCHIA P, MARAZZI A, DALLANOCE C, TRANI A, CICILIATO I, FERRARI P, SELVA E, CIABATTI R. Synthesis and biological evaluation of new fragments from kirromycin antibiotic[J]. The Journal of Antibiotics, 1996, 49(12): 1249-1257.
- [11] STARK H, RODNINA MV, WIEDEN HJ, ZEMLIN F, WINTERMEYER W, van HEEL M. Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex[J]. Nature Structural Biology, 2002, 9: 849-854.
- [12] VALLE M, ZAVIALOV A, LI W, STAGG SM, SENGUPTA J, NIELSEN RC, NISSEN P, HARVEY SC, EHRENBERG M, FRANK J. Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy[J]. Nature Structural Biology, 2003, 10: 899-906.
- [13] XU ZR, FANG SM, BAKOWSKI MA, RATEB ME, YANG D, ZHU XC, HUANG Y, ZHAO LX, JIANG Y, DUAN YW, HULL MV, McNAMARA CW, SHEN B. Discovery of kirromycins with anti-*Wolbachia* activity from *Streptomyces* sp. CB00686[J]. ACS Chemical Biology, 2019, 14(6): 1174-1182.

- [14] WEBER T, LAIPLE KJ, PROSS EK, TEXTOR A, GROND S, WELZEL K, PELZER S, VENTE A, WOHLLEBEN W. Molecular analysis of the kirromycin biosynthetic gene cluster revealed beta-alanine as precursor of the pyridone moiety[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(2): 175-188.
- [15] LAIPLE KJ, HÄRTNER T, FIEDLER HP, WOHLLEBEN W, WEBER T. The kirromycin gene cluster of *Streptomyces collinus* Tü 365 codes for an aspartate-alpha-decarboxylase, KirD, which is involved in the biosynthesis of the precursor beta-alanine[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2009, 62(8): 465-468.
- [16] RÜCKERT C, SZCZEPANOWSKI R, ALBERSMEIER A, GOESMANN A, IFTIME D, MUSIOL EM, BLIN K, WOHLLEBEN W, PÜHLER A, KALINOWSKI J, WEBER T. Complete genome sequence of the kirromycin producer *Streptomyces collinus* Tü 365 consisting of a linear chromosome and two linear plasmids[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(4): 739-740.
- [17] MUSIOL EM, GREULE A, HÄRTNER T, KULIK A, WOHLLEBEN W, WEBER T. The AT₂ domain of KirCI loads malonyl extender units to the ACPs of the kirromycin PKS[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2013, 14(11): 1343-1352.
- [18] MUSIOL EM, HÄRTNER T, KULIK A, MOLDENHAUER J, PIEL J, WOHLLEBEN W, WEBER T. Supramolecular templating in kirromycin biosynthesis: the acyltransferase KirCII loads ethylmalonyl-CoA extender onto a specific ACP of the trans-AT PKS[J]. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(4): 438-444.
- [19] MUSIOL-KROLL EM, ZUBEIL F, SCHAFHAUSER T, HÄRTNER T, KULIK A, McARTHUR J, KORYAKINA I, WOHLLEBEN W, GROND S, WILLIAMS GJ, LEE SY, WEBER T. Polyketide bioderivatization using the promiscuous acyltransferase KirCII[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(3): 421-427.
- [20] 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: 3230.
- [21] PAVLIDOU M, PROSS EK, MUSIOL EM, KULIK A, WOHLLEBEN W, WEBER T. The phosphopantetheinyl transferase KirP activates the ACP and PCP domains of the kirromycin NRPS/PKS of *Streptomyces collinus* Tü 365[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 319(1): 26-33.
- [22] GUI C, LI QL, MO XH, QIN XJ, MA JY, JU JH. Discovery of a new family of Dieckmann cyclases essential to tetramic acid and pyridone-based natural products biosynthesis[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(3): 628-631.
- [23] RYU YG, BUTLER MJ, CHATER KF, LEE KJ. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7132-7139.
- [24] PAN GH, XU ZR, GUO ZK, HINDRA, MA M, YANG D, ZHOU H, GANSEMANS Y, ZHU XC, HUANG Y, ZHAO LX, JIANG Y, CHENG JH, van NIEUWERBURGH F, SUH JW, DUAN YW, SHEN B. 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.
- [25] SAMBROOK J, RUSSELL DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [26] KIESER T, BIBB MJ, BUTTNER MJ, CHATER KF, HOPWOOD DA. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [27] 孙佳宁, 王海燕, 范可强, 何信, 廖振翔, 王立艳, 黄英, 任晋玮, 孟大力, 潘国辉. 喷他霉素新生产菌的发现及产量提高[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(8): 2888-2904.
- SUN JN, WANG HAY, FAN KQ, HE X, LIAO ZX, WANG LY, HUANG Y, REN JW, MENG DL, PAN GH. Discovery and production improvement of new pentamycin-producing bacteria[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(8): 2888-2904 (in Chinese).
- [28] 李栋, 范可强, 胡会涛, 潘国辉. 糖丝菌属次级代谢潜能分析及代表菌株基因编辑体系建立[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(7): 2614-2629.
- LI D, FAN KQ, HU HT, PAN GH. Secondary metabolism potential of *Saccharothrix* and establishment of gene editing systems in representative strains[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(7): 2614-2629 (in Chinese).
- [29] ZHAO YB, XIANG SH, DAI XD, YANG KQ. A simplified diphenylamine colorimetric method for growth quantification[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(11): 5069-5077.
- [30] TERLOUW BR, BLIN K, NAVARRO-MUÑOZ JC, AVALON NE, CHEVRETTE MG, EGBERT S, LEE S,

- MEIJER D, RECCHIA MJJ, REITZ ZL, van SANTEN JA, SELEM-MOJICA N, TØRRING T, ZAROUBI L, ALANJARY M, ALETI G, AGUILAR C, AL-SALIHI SAA, AUGUSTIJN HE, AVELAR-RIVAS JA, et al. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D603-D610.
- [31] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL. BLAST+: architecture and applications[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 421.
- [32] LABEDA DP, DUNLAP CA, RONG XY, HUANG Y, DOROGHAZI JR, JU KS, METCALF WW. Phylogenetic relationships in the family *Streptomycetaceae* using multi-locus sequence analysis[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(4): 563-583.
- [33] RONG XY, HUANG Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(1): 7-18.
- [34] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [35] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [36] BARBER J, DEROME AE, HOWARD TD, LIAN LY, TEBB G. Full assignments of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the antibiotic kirromycin (mocimycin)[J]. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1989, 27(8): 748-753.
- [37] SUGAI S, KOMAKI H, HEMMI H, KODANI S. Isolation and structural determination of a new antibacterial compound demethyl-L-681, 217 from *Streptomyces cattleya*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2016, 69(11): 839-842.
- [38] YIN SL, WANG XF, SHI MX, YUAN F, WANG HZ, JIA XL, YUAN F, SUN JL, LIU TJ, YANG KQ, ZHANG YX, FAN KQ, LI ZL. Improvement of oxytetracycline production mediated via cooperation of resistance genes in *Streptomyces rimosus*[J]. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(9): 992-999.
- [39] WOLF H, CHINALI G, PARMEGGIANI A. Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1974, 71(12): 4910-4914.
- [40] FISCHER N, NEUMANN P, KONEVEGA AL, BOCK LV, FICNER R, RODNINA MV, STARK H. Structure of the *E. coli* ribosome-EF-Tu complex at 3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM[J]. *Nature*, 2015, 520(7548): 567-570.
- [41] MILLER MR, BUSKIRK AR. An unusual mechanism for EF-Tu activation during tmRNA-mediated ribosome rescue[J]. *RNA*, 2014, 20(2): 228-235.
- [42] SEDJOAH RC AA, SUN SW, ABDALMEGEED D, SHAO YT, WU GJ, WU ZC, WANG MX, ZHOU JJ, ZHENG J, XIN ZH. Overexpression of PPase in *Streptomyces* sp. NAUS: increasing biocontrol potential against postharvest tomato fruit decay and isolation of a novel antifungal compound[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 204: 112462.
- [43] GASTALDO L, MARINELLI F, ACQUARELLA C, RESTELLI E, QUARTA C. Improvement of the kirromycin fermentation by resin addition[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 16(5): 305-308.