



微生物药物产量理性化提高的策略及其研究进展

吴蕴¹, 宋晨阳², 陈文青^{1*}

¹ 武汉大学药学院, 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072

² 延边春雷生物药业有限公司, 吉林 延吉 133000

摘要: 微生物药物(Microbial drug)是一类结构复杂多样, 生物活性显著的小分子化合物。微生物药物产量决定了其后续的可开发性与使用成本。传统育种方法提高微生物药物产量效果明显, 但随机性强且成本高昂, 然而合成生物学的兴起为微生物药物产量理性化提高注入了全新活力。本文从启动子的工程化应用、前体供应、基因组重排等方面, 综述了近年来合成生物学策略在放线菌来源的微生物药物产量理性化提高方面所取得的相关研究进展。

关键词: 微生物药物, 产量理性化提高, 传统育种策略, 合成生物学

微生物在自然界中广泛存在, 个体微小, 种类多样, 人们认识微生物的历史源远流长, 但是有目的地从微生物次级代谢产物研发新药的历史不到80年。微生物次级代谢产物的结构多样性决定了其抗菌性、抗肿瘤、抗病毒和免疫抑制等多种活性特点, 使其成为人们发现新药物的源泉(图1)。微生物药物泛指来源于微生物的药物, 主要包括放线菌和真菌^[1]。目前, 已经从中发现了约25000种具有生物活性的次级代谢产物, 其中有百余种可以用作微生物药物^[1]。

微生物药物因具有广泛的药理活性, 其化合物或衍生物已经被应用到临床、农业等多方领域。如抗肿瘤的力达霉素, 抗鸡球虫病的南昌霉

素、抗水稻稻瘟病的春雷霉素, 抗水稻纹枯病的井冈霉素等。由于微生物次级代谢产物原始产量相对较低, 直接通过微生物发酵不易获得大量目的药物, 工业化生产受限, 不利于推广应用。因此, 如何提高微生物药物产量成为目前发展微生物药物的当务之急。

合成生物学是涉及遗传学, 分子生物学, 生物信息学等多个学科, 设计和合成各种复杂生物功能模块、系统以应用于生产特定微生物药物等的一门综合学科。生物科学是近年发展起来的一个综合学科, 与传统生物学通过解剖生命体以研究其内在构造的方法不同, 合成生物学是以人工合成DNA为基础, 以此为最基本要素开始逐步合

基金项目: 国家自然科学基金(31270100)

*通信作者: Tel: +86-27-68752453; E-mail: wqchen@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-08; 修回日期: 2015-12-25; 网络出版日期: 2015-12-30

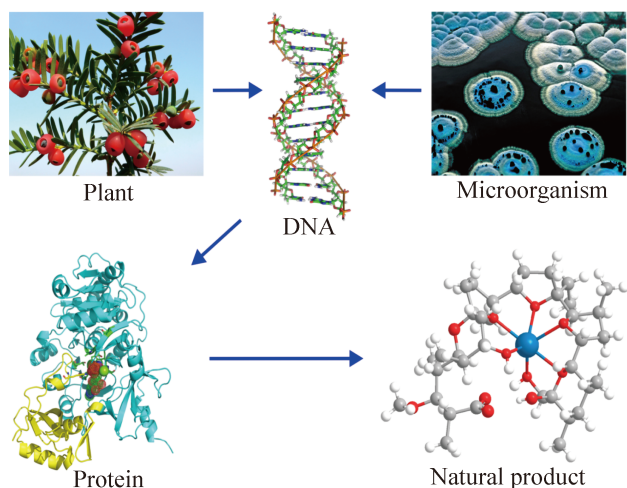


图 1. 天然产物的化学结构与生物活性多样性
Figure 1. Sturuture and bioactivity diversity of natural products.

成零部件, 再将其连成网络, 建立具有预定功能的人工生物体系, 并将之运用于实际应用的学科。科学家们已从不同方面对合成生物学及其应用进行了论述^[2-4], 认为合成生物学将对医药、能源、化学品和环境等应用与生产领域产生深远影响, 加快对人类赖以生存的若干化学品从高度依赖化石资源制造向可再生生物资源制造的变革。

随着合成生物学研究的深入和新型测序技术的发展和普及, 对产生微生物药物的全基因组序列测定也越发普遍。在此基础上研究关键基因对微生物药物合成及功能的影响, 从基因组水平上对微生物药物的产生和作用机制阐述, 从而通过

合成生物学手段, 改造微生物代谢, 提高目的药物产量的策略得到诸多发展。本文主要综述调控基因控制、基因簇加倍、前体供应增加、以及基因组重排等方法, 从而说明运用以合成生物学为主的现代生物技术理性化提高微生物药物产量的过程。

1 合成生物学在微生物药物产量方面的应用

1.1 调控基因的利用

1.1.1 正负调控基因在微生物药物产量提高方面的应用: 调控基因是编码能与操纵序列结合的调控蛋白的基因, 也是基因簇中次级代谢产物生物合成的开关。调控基因从调控方式可分为正调控基因和负调控基因。正调控基因产生的调控蛋白与操纵序列结合后能增强或启动转录水平, 进而使产量提高, 而负调控基因则与之相反。目前, 在合成生物学领域, 通过生物信息学方法分析相关基因簇信息推测可能的调控基因, 并通过对正调控基因的过量表达或负调控基因的敲除(图2), 激活或者沉默基因簇, 使目的产物产量提高的方法广泛应用于抗生素生物合成研究^[5]。

春雷霉素是一种应用广泛、生物活性显著的绿色农用抗生素, 对于水稻稻瘟病有高效防治作用, 但由于国内企业长期以来春雷霉素生产菌株

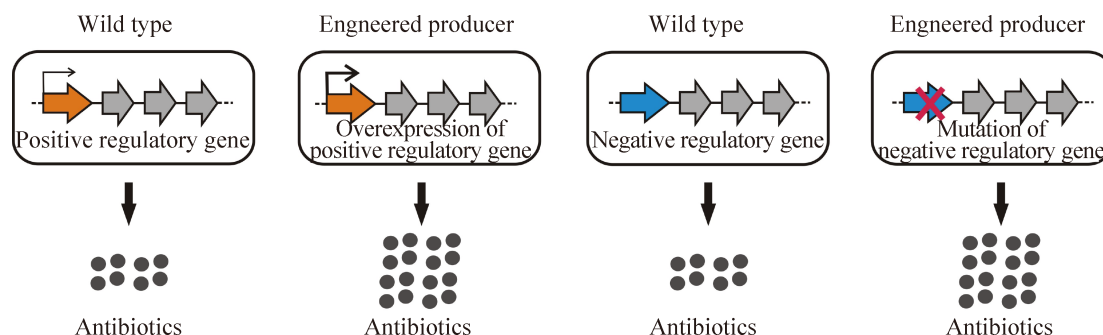


图 2. 途径特异性调控基因的工程化利用

Figure 2. Engineered application of the pathway specific regulatory genes.

发酵效价较低,市场竞争力较弱,如何提高春雷霉素产量成为提升我国春雷霉素产业化技术水平、增强国际竞争力必须要攻克的难题。Zhu等^[6]对宏基因组DNA粘粒文库进行筛选,获得粘端质粒,对其中推测的5个调控基因进行敲除和回补试验确定其调控方式后,在春雷霉素低产菌株中分别对其中的正调控基因*kasT*进行了过量表达,对其余4个负调控基因(*kasW*、*kasX*、*kasV*、*kasS*)进行敲除操作,发现最终春雷霉素的产量都有不同程度的提高,其中过量表达*kasT*,产量提高了186%,敲除*kasV*后,产量提高了194%。但在之后的春雷霉素高产菌株中重复以上实验并没有得到预期的结果。推测因为多发性诱变,高产菌株中的核苷酸发生大量变异而导致这种差异,这也表明在研究过程中应该根据实际情况采取不同的策略来进行调控操作,必要时还需结合其他代谢相关工程技术。

力达霉素是一种新型抗肿瘤抗生素,在临床医学上的抗肿瘤活性高于阿霉素。其合成基因簇中负调控基因的缺失可以使其产量相对野生型有一定的提高,在此基础上过量表达正调控基因,又可使产量相对野生型提高7倍^[11]。综上,正调控基因的过量表达或负调控基因的敲除,均可提高微生物次级代谢产物产量。

1.1.2 全局调控基因的应用: 微生物药物,例如抗生素,其生物合成受到严格复杂的调控,全局调控就是其中一类调控机制(图3)。全局调控基因也可以称为多效性调节基因,一般位于生物合成相关基因簇之外,调控相应途径特异性基因的表达^[7]。相对于微生物代谢中其他的调控方式,全局调控是一种更为普遍,复杂的调控方式。通过控制全局调控基因可以影响次级代谢生产中的许多方面,包括前体的供给,还有生物合成基因的表达^[8]。全局调控基因根据参与调控的基因数量分为孤立响应调控基因和双组分调控系统基因两类^[7]。

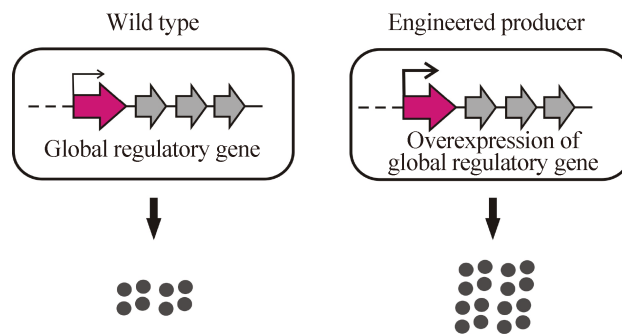


图3. 过量表达全局调控基因

Figure 3. Overexpression of the global regulatory gene.

孤立响应调控基因通常为单个基因,例如链霉菌常有的全局调控基因*adpA*。研究发现在链霉菌中敲除*adpA*,突变株不再产生链霉素,而过量表达*adpA*则会提高链霉素的产量。这是因为*adpA*编码转录激活因子AdpA,AdpA可以直接结合到基因簇的启动子区域,使结构基因表达^[9]。

双组分调控基因在链霉菌的调控系统中参与多种生理代谢过程,与链霉菌复杂的形态学发展和抗生素合成调控密不可分。Tan^[9]等在井冈霉素的生产研究中发现了一组双组分调控基因*afsA-arpA*,属于A因子级联调节系统。*afsA*与A因子生物合成相关,*arpA*则编码A因子受体,两者在基因簇中位置相邻,协同调节*adpA*转录,共同调控目的药物产量。微生物存在大量诸如此类的双组分调控基因,例如*kasW-kasX*,是存在于小金色链霉菌中的双组分调控基因,产生的KasW-KasX构成双组分体系,是微生物感应外界营养和环境信号的传感器和相应调节器^[10-12]。

综上,全局调控基因对微生物药物的生物合成多以层层级联的方式间接调控。加强对微生物药物全局调控的研究,充分利用全局调控基因,可加快微生物药物高产菌株的构建,从而提高微生物药物产量。

1.2 基因簇的加倍

基因簇加倍本质上是将生物合成基因簇再导入到含有这个基因簇的微生物中,最终使目的产

物产量提高的遗传学手段(图4)。研究发现卡那霉素高产菌株的染色体组内存在多拷贝的卡那霉素生物合成基因簇, 由此可见加倍次级代谢产物生物合成基因簇拷贝数亦可以提高产量^[13]。尼克霉素是核苷类抗生素, 具有抗真菌、杀螨虫等生物活性, 对于人类和哺乳动物无毒性, 被认为是较理想的一种抗生素。Liao等^[14]通过大肠杆菌-链霉菌种属接合转移将尼克霉素的完整基因簇再导回原链霉菌, 使之在链霉菌染色体组上加倍, 其发酵分析结果显示尼克霉素X和尼克霉素Z的组分产量分别提高3倍和0.75倍。由此可知, 加倍生物合成基因簇, 是提高微生物药物产量的可行策略。

1.3 前体供应增加

基于对抗生素生物合成途径的了解, 合成生物学通过两种方式来优化抗生素的生产, 其中之一就是通过增加抗生素生物合成途径中前体物质的供应来克服生产过程的瓶颈^[15]。通过前体供应增加提高微生物代谢产物产量, 除了直接添加前体物质以外, 还可通过间接方式提供。例如, 小金色链霉菌、吸水链霉菌5008等是以UDP-Glu (Uridine Diphosphate Glucose)为合成前体的微生物(图5), 过量表达合成Ugp (UDP-glu pyrophosphatase)的基因, 增加Ugp产量, 可加快催化葡萄糖形成从而合成前体UDP-Glu^[16]。

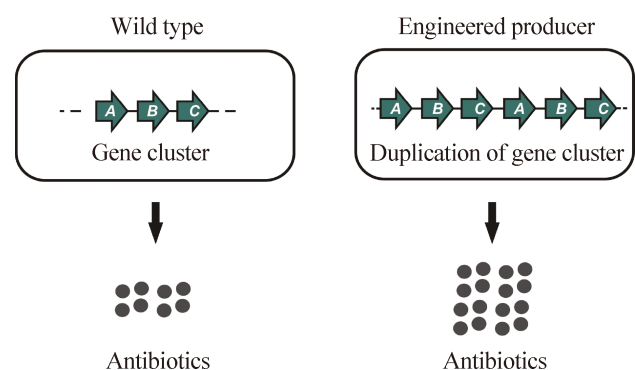


图 4. 微生物药物合成基因簇的加倍
Figure 4. Duplication of the gene cluster for microbial drug biosynthesis.

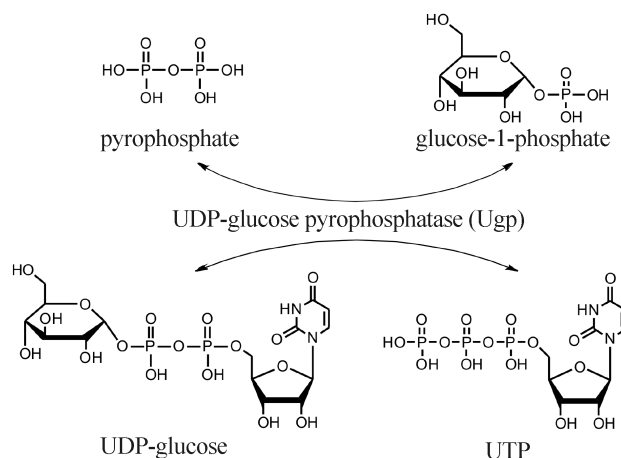


图 5. UDP-Glu生物合成示意图^[16]
Figure 5. The scheme map for the biosynthesis of UDP-Glu^[16].

此外, 通过基因组重排技术也可增加前体物的供应。zhou等^[17]研究发现, 经过基因组重排得到的突变株, 其ε-多聚赖氨酸产量从1.8 g/L左右提高至3.11 g/L。对比原始菌株和突变株在多聚赖氨酸生物合成途径中关键酶的活性变化, 突变株中与前体合成相关的酶活性加强, 前体物质供应增加而提高了微生物代谢产物产量(图6)。综上所述, 增加前体供应也可成为提高微生物次级代谢产物产量策略之一。此外, 不同组合生物学方法在一定范围内可联合操作。

1.4 基因组重排(Genome Shuffling)

微生物的产物浓度超过细胞耐受值后会对自

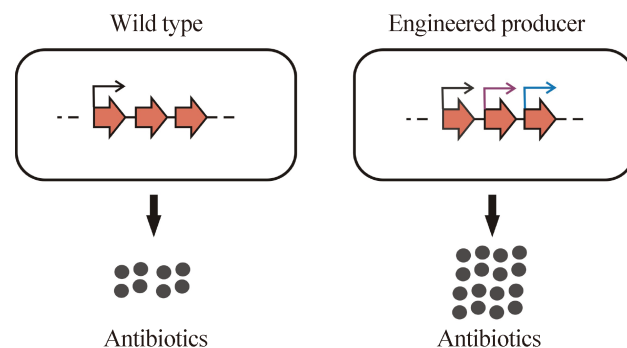


图 6. 微生物药物生物合成途径的优化
Figure 6. Pathway optimization for microbial drug biosynthesis.

身产生毒害作用,通常微生物体内会存在一种自我限制机制,严格监管代谢通量或产生降解酶快速降解多余产物来进行自我保护。这种自我限制机制的存在,使得微生物代谢产物难以积累导致产量偏低。经过多轮次基因组重排,除了可间接增加前体供应而提高微生物次级代谢产物产量,同时也可提高菌体对产物浓度的耐受性,增加微生物代谢产物的积累。Zhou等^[17]通过比较多聚赖氨酸耐受菌株F4-22和原始菌株MZ-18中的酶活性以及发酵过程中菌丝球形态的变化,发现通过基因组重排获得的耐受菌株,能更多地积累多聚赖氨酸,产量提高。

基因组重排技术相对于常规诱变育种,无需系统分析微生物基因组信息,具有执行周期短,易获得突变株等优势,这使其逐渐成为提高微生物产量的新型现代生物技术。

1.5 途径优化

除上述改造微生物提高次级代谢产物产量的方法,还可以利用合成生物学和代谢工程,优化微生物药物生物合成途径,提高微生物次级代谢产物产量。Zhu等^[18]在体外重新构建甲羟戊酸途径,通过定量表达生物合成途径中的各个中间产物,实现合理优化法尼烯生产。DeLoache等^[19]通过将植物,细菌和啮齿动物基因混合导入酵母菌中,同时优化酵母生物合成途径,生产更有效,成瘾性更低的阿片类药物。此外,通过启动子工程,加强目的基因启动子的表达,也能实现提高微生物药物增产的目的。

2 展望

随着基础生物学和基础医学的迅速发展,新时期已经赋予微生物药物新的内涵和用武之地。微生物药物生物活性突出,结构新颖,在各个领域的应用相对传统药物有着更为明显的优势,发展前景广阔。目前,针对提高微生物药物产量发

展了诸多以合成生物学为主的现代生物技术,如调控基因控制、基因簇加倍、前体供应增加、以及基因组重排等。诸如此类的策略可实现对微生物次级代谢产物产量的理性化提高,使重要天然药物能够工业化生产,例如日前因诺贝尔奖而闻名于世的青蒿素,即利用合成生物学手段达到了工程酵母工业化制备的水平,减少了土地能源浪费^[20]。与此同时,另外一些新型现代生物技术,如途径优化、启动子工程等也被广泛应用于提高微生物药物产量研究。目前我国诸多科技计划正大力资助与微生物药物合成生物学相关的各研究所、高校的项目或课题,预计未来我国在微生物药物合成生物学方面将取得更多的成果和技术突破。

参考文献

- [1] Wu LZ, Hong B. Synthetic biology toward microbial secondary metabolites and pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(2): 155-160. (in Chinese)
武临专, 洪斌. 微生物药物合成生物学研究进展. *药学报*, 2013, 48(2): 155-160.
- [2] Huang W, Wang JB, Tang GL. Synthetic biology toward medicinal natural products. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(9): 891-899. (in Chinese)
黄伟, 王健博, 唐功利. 天然产物类药物的合成生物学研究. *生命科学*, 2011, 23(9): 891-899.
- [3] Liang QF, Wang Q, Qi QS. Synthetic biology and rearrangements of microbial genetic material. *Hereditas*, 2011, 33(10): 1102-1112. (in Chinese)
梁泉峰, 王倩, 祁庆生. 合成生物学与微生物遗传物质的重构. *遗传*, 2011, 33(10): 1102-1112.
- [4] Wang YY, Guo WB, Song CJ. New method for industrial microbial strains improvement: construction of dominant genome-simplified strains. *Acta Microbiol Sinica*, 2012, 52(3): 286-294. (in Chinese)
王媛媛, 郭文斌, 宋存江. 工业微生物菌种改造的新方法-优势小基因组生产菌的构建. *微生物学报*, 2012, 52(3): 286-294.

- [5] Olano C, Lombo F, Mendez C, Salas JA. Improving production of bioactive secondary metabolite in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(5): 281-292.
- [6] Zhu CC, Kang QJ, Bai LQ, Cheng L, Deng ZX. Identification and engineering of regulation-related genes toward improved kasugamycin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015: 1-11.
- [7] 陈艳萍, 赵春田, 裘娟萍. 全局调控基因对抗生素生物合成的影响. *浙江农业科学*, 2012 (7): 1067-1073.
- [8] Wang T, Bai LQ, Zhu DQ, Lei X, Liu G, Deng ZX, You DL. Enhancing macrolide production in *streptomyces* by coexpressing three heterologous genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50(1): 5-9.
- [9] Tan GY, Bai LQ, Zhong JJ. Exogenous 1, 4-butyrolactone stimulates a-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110 (11): 2984-2993.
- [10] Santo-Beneit F, Rodriguez-Garcia A, Sola-Landa A, Martin JF. Cross-talk between two global regulators in *streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Molecular Microbiology*, 2011, 92(2): 337-345.
- [11] Wang R, Mast Y, Wang J, Zhang W, Zhao G, Wohlleben W, Lu Y, Jang W. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(1): 30-48.
- [12] Yu Z, Zhu H, Zhang W, Qin Z, Yang S, Tan H, Jiang W. Different regulation of antibiotic biosynthesis by draR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 2012, 85(3): 535-556.
- [13] Yanai K, Murakami T, Bibb M. Amplification of the entire kanamycin biosynthetic gene cluster during empirical strain improvement of *streptomyces kanamyceticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(25): 9661-9666.
- [14] Liao GJ, Li J, Li L, Yang HH, Tian YQ, Tan HR. Cloning, reassembling and integration of the entire nikkomycin biosynthetic gene cluster into *Streptomyces ansochrom ogenes* lead to an improved nikkomycin production. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 1-6.
- [15] Wohlleben W, Mast Y, Muth G, Rottgen M, Stegmann E, Weber T. Synthetic biology of secondary metabolite biosynthesis in actinomycetes: engineering precursor supply as a way to optimize antibiotic production. *FEBS Letters*, 2012, 586(15): 2171-2176.
- [16] Zhou X, Wu H, Li Z, Zhou XF, Bai LQ, Deng ZX. Over-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase increases validamycin a but decreases validoxyamine a production in *Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis* 5008. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(6): 768-776.
- [17] Zhou YP, Ren XD, Wang L, Chen XS, Mao ZG, Tang L. Enhancement of ϵ -poly-lysine production in ϵ -poly-lysine-tolerant *Streptomyces* sp. by genome shuffling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(9): 1705-1713.
- [18] Zhu FY, Zhong XF, Hu MZ, Lu L, Deng ZX, Liu TG. In vitro reconstitution of mevalonate pathway and targeted engineering of farnesene overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 9999(7): 1-10.
- [19] DeLoache WC, Russ ZN, Narcross L, Gonzales AM, Martin VJJ, Dueber JE. An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11: 465-471.
- [20] Kong JQ, Wang W, Cheng KD, Zhu P. Research progresses in synthetic biology of artemisinin. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(2): 193-205. (in Chinese)
孔建强, 王伟, 程克棣, 朱平. 青蒿素的合成生物学研究进展. *药学报*, 2013, 48(2): 193-205.

The strategies and research progresses of rational improvement of the yield of microbial drug- A review

Yun Wu¹, Chenyang Song², Wenqing Chen^{1*}

¹ Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei Province, China

² Yanbian Chunlei Biopharmaceutical Co., Ltd, Yanji 133000, Jilin Province, China

Abstract: Microbial drug is a large family of small molecules with unusual structural features and potent bioactivities. The production of microbial drug is crucial for its subsequent development and cost. Traditional breeding strategies for microbial drug production have been demonstrated to be remarkably effective, but they have also indicated the drawback of exceptional randomness and high cost. Synthetic biology has recently promised a revival for the rational enhancement of microbial drugs. In this review, we mainly discuss the recent progress from the aspects of promoter engineering, precursor supply, genome shuffling and etc., to delineate the application of the synthetic biology strategies to enhance the production of the microbial drugs, particularly, produced by actinomycetes.

Keywords: microbial drug, rational production enhancement, traditional breeding strategies, synthetic biology

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270100)

*Corresponding author. Tel: +86-27-68752453; E-mail: wqchen@whu.edu.cn

Received: 8 November 2015; Revised: 25 December 2015; Published online: 30 December 2015