

两性霉素 B 合成基因簇及其组合生物学进展

张博, 张海东, 周奕腾, 黄恺, 柳志强

浙江工业大学生物工程学院; 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室, 杭州 310014

摘要 两性霉素 B (AmB) 作为第一个用于深部真菌感染的药物, 自上市以来已使用超过半个世纪, 目前仍是临床治疗中不可缺少的药物。随着近年来 AmB 衍生物药物的发展, 以及其生产菌株结节链霉菌 (*Streptomyces nodosus*) 全基因组和 AmB 体内合成代谢途径的解析, 运用基因工程和代谢工程的方法对 AmB 组合生物合成的研究逐渐增多。由于 AmB 在当今临床治疗上的地位仍极其重要, 因此促进 AmB 产业的发展具有显著的经济及社会效益。本文对 AmB 进行了概述, 并对其合成基因簇相关基因及其当前组合生物合成的研究现状进行了总结与探讨。

关键词 两性霉素 B; 结节链霉菌; 合成基因簇; 组合生物学

1955 年, 从委内瑞拉奥里诺科河水样中的结节链霉菌 (*Streptomyces nodosus*) 中人们分离得到了两性霉素 B (Amphotericin B, AmB, 图 1)。自 1966 年, AmB 作为第一个用于深部真菌感染的药物上市, 直至现在, 一直用做天然广谱抗真菌抗生素, 目前仍然是临床上不可替代的抗真菌药物^[1]。AmB 结构特点与大部分多烯大环内酯类抗生素相同, 此类抗生素均为两性物质, 具有亲脂性的位于同一平面的共轭多烯发色团, 以及亲水性的大环内酯环外羟基化部位^[2]。AmB 作为七烯大环内酯类抗生素其主要特点是具有 7 个共轭多烯的大环内酯, C8 位为羟基、C16 位为羧基、C19 为海藻糖胺基团。

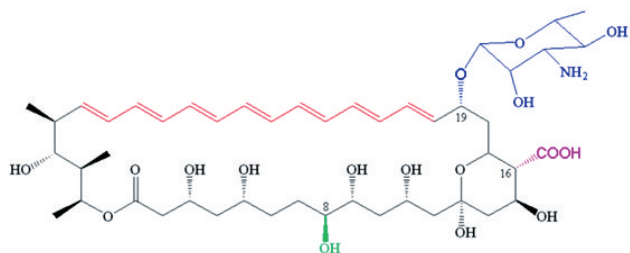


图 1 AmB 分子结构

Fig. 1 Molecular structure of AmB

AmB 除使用在具有生命威胁性的全身性真菌感染外, 同时还具抗病毒 (朊病毒、HIV 等)、抗寄生虫的作用, 其中利什曼原虫作为“最易被忽视的疾病”在非洲和南美洲地区, 每年

会造成近 5000 余人的死亡^[3-5], 抗利什曼原虫药物市场预计每年在 2 亿美元左右^[6-7], AmB 为这些地区人类的生命健康做出了重要贡献。由于毒副作用的存在, 学者们一方面对 AmB 给药形式进行研究^[8], 例如 AmB 脂质体、乳剂、纳米粒子、PEG 偶联等^[9]; 另一方面则是不断对其衍生物进行各方面的研究。随着 AmB 合成代谢途径的解析, 通过基因工程等生物学手段合成 AmB 衍生物的研究逐年增加。本文综述 AmB 体内代谢途径的相关过程及其基因簇, 总结近年来通过生物法合成 AmB 衍生物的组合生物学研究进展。

1 AmB 合成基因簇

Streptomyces nodosus 全基因组共 7714110 bp, 基因组中具有多种天然产物, 包括多烯类、肽类以及萜类等合成基因簇, 其中两性霉素属于 I 型聚酮合酶 (polyketide synthases, PKSs) 合成的多烯大环内酯类聚酮化合物, 其合成基因簇全长约为 135 kb^[10]。

Caffrey 等^[11]使用基因组步移 (genomic walking) 的方法, 克隆并鉴定得到全长约为 113 kb 两性霉素的生物合成基因簇, 该基因簇包含 17 个开放阅读框。Carmody 等^[12]重新鉴定了基因簇左端 16 kb 及右端的 4 kb, 新延长的部分包含 12 个开放阅读框 (*amph RI-RIV*, *amph RVI*, *orf 5-10*, *amph E*)。其完整合成基因簇如图 2。

收稿日期: 2017-03-21; 修回日期: 2017-05-15

基金项目: 浙江省教育厅科学研究项目 (Y201636181); 中国博士后科学基金 (2016M601962)

作者简介: 张博, 讲师, 研究方向为代谢工程及合成生物学, 电子信箱: zhangbo0305@zjut.edu.cn; 柳志强 (通信作者), 教授, 研究方向为工业催化及酶定向改造, 电子信箱: microlu@zjut.edu.cn

引用格式: 张博, 张海东, 周奕腾, 等. 两性霉素 B 合成基因簇及其组合生物学进展[J]. 科技导报, 2017, 35(19): 74-80; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.19.010



图2 两性霉素生物合成基因簇

Fig. 2 Organisation of the amphotericin biosynthetic gene cluster

Carmel等^[13]通过¹³C同位素标记揭示了AmB在细胞体内的生物合成途径,为生物法合成AmB衍生物提供了基础,研究表明在结节链霉菌体内,通过18步延伸反应,将3个丙酸盐和16个乙酸盐前体环化后形成聚酮化合物主体,之后在主体的基础上通过3步后修饰作用,即海藻糖胺糖基化、C8位的羟基化以及C41位的环外甲基分支氧化为羧基而最终形成AmB。因此可将AmB合成基因簇中29个相关基因分为:PKS基因、后修饰基因、转运与调控基因。

1.1 PKS基因

聚酮合成酶(PKSs)是一类多功能酶,涉及到一些重要聚酮化合物的生物合成,根据基因序列和组成蛋白质的空间构象,PKSs可分为3大类。其中PKSs-I型通过乙酸、丙酸和丁酸的缩合构筑大环聚酮。在延长聚酮生长链时,每导入一个羧酸单位就包括脂肪酸生物合成的一个完整循环所需要的所有反应,其功能性亚基包括酰基载体蛋白(ACP)、酰基转移酶(AT)、酮酰基载体蛋白合成酶(KS)、酮基还原酶、脱水酶(DH)和烯酰还原酶等,还包括终止聚酮链延长和环化的大环聚酮所需要的硫酯酶(TE)。

两性霉素属于PKSs-I型的聚酮合成反应,其中PKSs由Amph A、Amph B、Amph C、Amph I、Amph J、Amph K这6个蛋白组成,而AmB的聚酮化合物前体中每个部分均是由这些蛋白所包含的模块——对应负责,每一个PKSs基因簇编码蛋白都是由模块所组成,包括单模块、双模块、三模块和六模块,共包括一个载入模块和18个延伸模块;每个模块又由多个结构域所构成,包括AT(acyl transferase)结构域,KS(ketosynthase)结构域,ACP(acyl carrier protein)结构域,KR(Ketoreductase)结构域,DH(dehydratase)结构域,ER(enoyl reductase)结构域,多数模块均按照KS-AT-DH-ER-KR-ACP这一顺序排列组合,其中Amph A作为一个载入蛋白,与起始单位乙酰基结合,而Amph K中模块18存在一个特殊的硫酯酶(TE)域,起到终止骨架延伸同时环化大环聚酮的作用。

1.2 后修饰基因

在聚酮化合物主体上的后修饰主要分为3步,即由*amph DIII*、*amph DII*、*amph DI*基因控制的C19位的海藻糖胺糖基化;由*amph N*、*amph M*控制的C16位氧化羧基化;在*amph L*的作用下C8位羟基化。Caffrey等进一步通过基因敲除手段,对AmB生物合成中3步后修饰的过程进行敲除实验,使用质谱、NMR等方法对获得的产物研究,发现 Δ *amph DIII*菌株(敲除野生菌株*amph DIII*基因)的产物C8位未能羟基化,而 Δ *amph L*所得产物则为C8位脱羟基AmB,因此发现C19位

与C8位的修饰,并不影响C16位的氧化羧基化,而C8位的羟基化则可能是在C19位糖基化之后进行的。由于C19位的糖基化反应缺失,故而影响到其后的C8羟基化,因此聚酮化合物后修饰的顺序可能为环外甲基分支氧化羧基化,C19位海藻糖胺糖基化,最后为C8位羟基化^[14]。

1.3 转运与调控基因

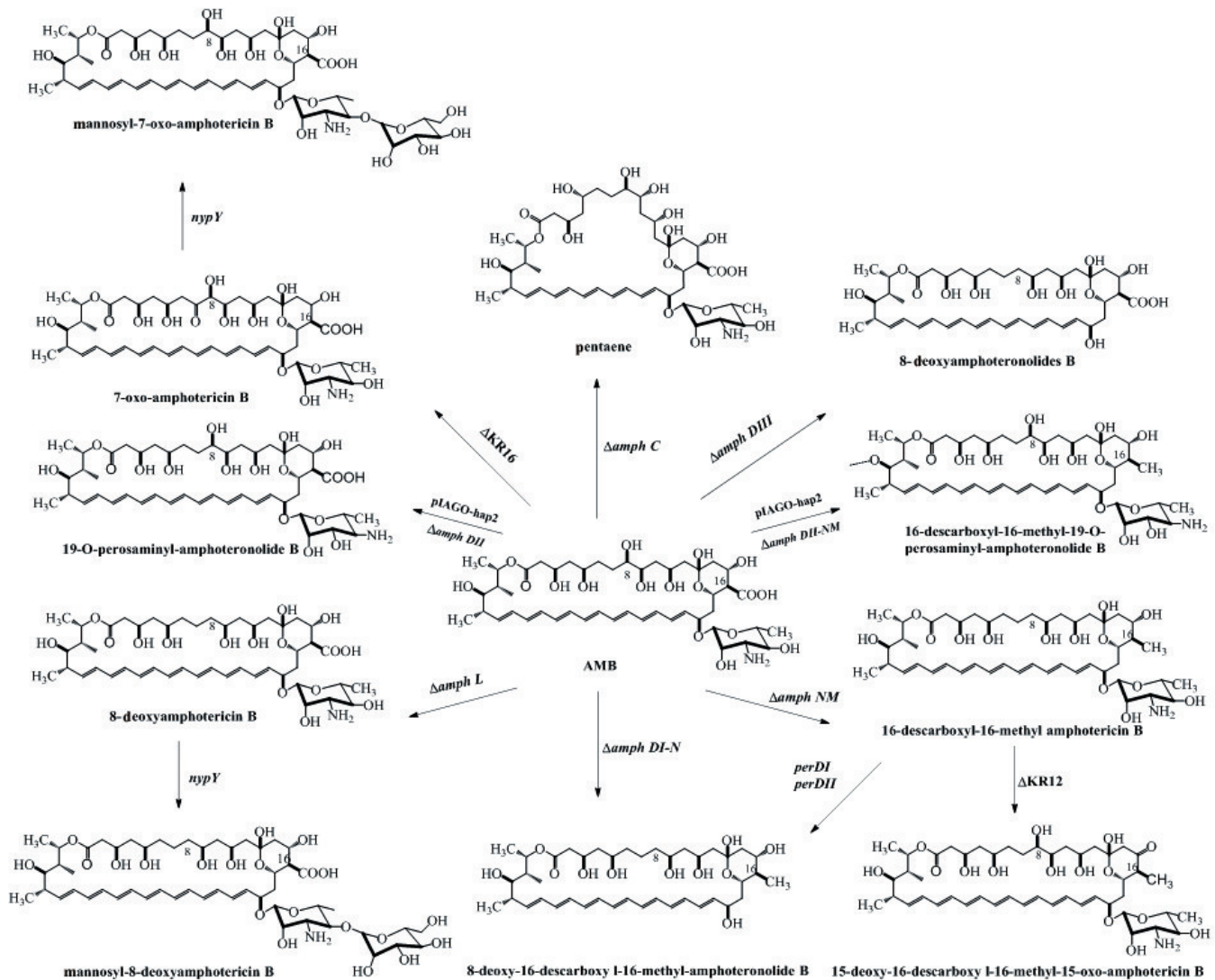
*amph G*和*amph H*表达的ABC转运蛋白,两者同源性仅有25%,目前虽不了解为何具有两种不同的转运蛋白,但这种现象在制霉菌素和匹马霉素中也有存在,例如制霉菌素(*nys G*和*nys H*),匹马霉素(*pim A*和*pim B*)。ABC转运蛋白在细菌中通常以二聚体形式发挥功能,在结节链霉菌中可能也由Amph G和Amph H结合形成异源二聚体,用于转运两性霉素。这两种转运蛋白也被认为是链霉菌自身的保护系统,如果微量的外源固醇进入细胞膜,另外一种ABC转运蛋白就能够发挥作用^[11]。研究已证明转运蛋白可以用来提高次级代谢产物产量,例如Qiu等^[15]过量表达阿维链霉菌中的ABC转运蛋白AvtAB,使得阿维霉素的产量提高约50%。另有学者串联过量表达盐霉素的两个转运蛋白SlnTI和SlnTII,提高盐霉素产量约14.6%^[16]。在两性霉素代谢途径中目前报道的调控基因包括*amph RI-RIII*、*amph RVI*与*amph RIV*,分别属于LAL(Large ATP-binding regulators of the LuxR)和PAS-LuxR(无DBD区域)家族。这些调控因子属于途径特异性调控,对链霉菌次级代谢过程起到较为重要的作用,不仅调控涉及氨基酸、脂类、辅酶、呼吸能量代谢、DNA复制修复、细胞分化等基因的转录,还可能对次级代谢产物的合成产生影响^[17],如在制霉菌素中含有与两性霉素对应的调节基因*nysRI-RIV*^[18],分别将这些基因与强启动*ermE*p*结合并在*S. noursei*中过量表达,除*nysRIII*对制霉菌素产量没有影响,过表达*nysRI*、*nysRIII*、*nysRIV*分别提高4%、21%、36%的产量。又如匹马霉素合成,在*S. chattanoogensis* L103过量表达*scnRII*,匹马霉素产量提高3.3倍达到2.1 g/L^[19];在*S. lydicus* A02过量表达*SlnM2*,匹马霉素产量由原本2.5 g/L提高到5.3 g/L,在30 L发酵罐产量达6.9 g/L^[20]。这一现象在两性霉素中也有报道,如在*S. nodosus* Δ *amph NM*突变株中过量表达*amph RIV*基因,相关衍生物产量可以提高约3倍^[10];在*S. nodosus* ATCC14899中敲除*amph RVI*基因对两性霉素产量没有明显变化^[12]。

2 AmB组合生物学

由于AmB的水溶性低,还具有肾毒性等副作用,一直影响其进一步发展。自20世纪末,人们开始化学合成AmB的

衍生物,如两性霉素B甲酯、Amphoteronolide B甲酯、N-甲基-N-D-果糖基-两性霉素B甲酯(MFAME)等^[21-24],这些尝试为AmB结构与活性间的关系以及如何降低毒性提供了初步的探知。如抑制环外羧基的数量能够提高其对麦角甾醇相对于胆固醇的特异性^[25];衍生化海藻糖胺基团可以提高疾病治疗效果^[26];修饰C13位的半缩酮可以降低溶血活性并且只轻微的减少抗菌性^[27];氟原子在C14位或C28位引入并不会影响抗菌活性等^[28-29]。越来越多的衍生物被发现在保留抗真菌广谱性、活性的同时,提高了水溶性并且降低了毒副作用。这些结果表明AmB衍生物存在广泛的结构特异性,可用于提高疾病的治疗效果。但同时,由于AmB具有复杂的分子结构这一特性,导致很难通过化学合成的方式生产价格适

中、低成本的无毒性AmB衍生物。相对化学合成,生物法合成则具有明显的优势与潜在可能:1)野生菌*Streptomyces nodosus*生产AmB成本低,产量大,具有高效的代谢流和催化过程;2)野生菌*Streptomyces nodosus*全基因组测序分析及相关合成基因簇研究基本完整,目前已具有多种代谢工程改造手段;3)衍生物生物合成基因工程已逐步形成,并已合成了许多重要多烯大环内酯类衍生物,包括制霉菌素、杀念菌素、匹马霉素、龟裂霉素^[30-33]。近年来通过基因工程生物法合成无毒性的AmB衍生物已逐渐形成一定的规模。通过组合生物学对AmB的不同结构位点进行改造,可将获得的AmB衍生物分为2大类,一类为改造后修饰相关基因所得AmB衍生物,另一类为改造PKS基因簇内基因所得AmB衍生物(图3)。



图中箭头表示代谢物经过相关基因敲除或过表达后产生各类衍生物的生物代谢过程

图3 两性霉素B的组合生物学合成

Fig. 3 Combinatorial biosynthesis of Amphotericin B

2.1 改造后修饰相关基因所得 AmB 衍生物

Byrne 等^[14]利用 KC515 噬菌体转染技术,通过构建敲除载体进行同源重组双交换,对目标基因引入移码突变,得到分别敲除 *amph DIII* 和 *amph L* 基因的突变菌株 *Streptomyces nodosus Δamph DIII* 与 *Streptomyces nodosus Δamph L*, 并且从中分别提取得到 8-deoxyamphoteronolides B 及 8-deoxyamphotericin B 两种七烯衍生物。该研究是第一次通过基因工程方法对结节链霉菌 AmB 合成途径中 3 步后修饰过程进行改造而得到的 AmB 衍生物。同团队的 Lochlainn 将 *S. nodosus* 中与其糖基化底物 GDP-甘露糖相关基因 *man A* (磷酸甘露醇异构酶)、*mam B* (磷酸甘露醇酶) 敲除,获得了与突变菌株 *S. nodosus Δamph DIII* 相同的七烯衍生物 8-deoxyamphoteronolides B^[34]。类似的工作也已经在其他链霉菌中开展^[35-36],得到了相关多烯,如制霉菌素、匹马霉素等类似衍生物 10-deoxy-nystatin、4, 5-deepoxypimaricin。当 *amph DIII* 基因被敲除时,所得七烯产物 8-deoxyamphoteronolides B 主要存在于发酵液上清中,表明其水溶性有所提高,但这一化合物不能糖基化,缺少海藻糖胺这一官能团。对其抗菌活性进行检测,当质量浓度达到 6 μg/mL 时,没有表现出抗菌性,这一结果体现了海藻糖胺这一氨基基团对抗菌活性的重要性。当 *amph L* 基因被敲除时,所得七烯产物 8-deoxyamphotericin B 主要存在于菌丝体中,当使用 *S. cerevisiae* 作为指示菌株对其抗菌性进行检测发现,当 8-deoxyamphotericin B 质量浓度达到 1.25 μg/mL 时具有抗菌活性,而 AmB 对该菌的最小抑制浓度达到 0.3125 μg/mL,因此 8-deoxyamphotericin B 抗菌活性表现出轻微的下降。

研究发现,对于环外羧基基团的抑制可以降低 AmB 的毒性^[21]。因此 Carmody 等^[37],将 *S. nodosus* 染色体中负责大环内酯环外羧基氧化相关基因 (*amph N*、*amph M*) 进行敲除,最终在其构建的 *Streptomyces nodosus Δamph NM* 中,提取到 AmB 七烯衍生物 16-descarboxyl-16-methyl amphotericin B,其抗真菌活性与 AmB 相似,且其溶血毒性相对 AmB 降低了 10 倍。Brautaset 等^[38],敲除制霉菌素合成基因簇中的 *nys N*,同样也得到与其类似的制霉菌素类似物,具有抗菌活性和低溶血毒性。Zhen 等^[39]通过相同的思路,也获得 3 种与之相似且效果较好的匹马霉素类似物。近期, Murphy 等^[40]在研究 *S. aminophilus* 中真菌毒素生物合成时采用了新的思路。由于真菌毒素为一种不常见的芳香多烯,其糖基基团为 perosamine (4,6-双脱氧-4-氨基甘露醇),为对 Amphoteronolide B (两性霉素 B 糖基配基) 糖基自由化进行了解,他们来自 *S. aminophilus* 中的 *per DI* (perosamine 糖基转移酶)、*per DII* (perosamine 合酶) 基因导入 *Streptomyces nodosus Δamph NM* 中,以期得到 16-descarboxyl-16-methyl-19-(O)-perosaminyl amphoteronolides,但该菌中能够发现 GDP-D-mycosamine 和 GDP-D-perosamine 的存在,却没有发现任何 perosamine 糖基化的糖基配基。随后的研究发现,在其培养基不添加硫链丝菌素时,能够检测到 8-deoxy-16-descarboxyl-16-methyl-

amphoteronolide B 七烯衍生物。同期 Stephens 等^[41]对 *amph DI*、*amph N* 进行敲除,获得的 *Streptomyces nodosus Δamph DI-N* 突变菌株也能大量积累此种七烯衍生物。在后期研究中,其团队通过将 pLAGO-hap2 质粒 (将 *amph DI* 1-246 残基与 *per DI* 245-458 残基融合,并连接 *per DII* 基因) 导入到 *Streptomyces nodosus Δamph DII* 和 *Streptomyces nodosus Δamph DII-NM* 菌中,从中均提取得到 19-O-perosaminyl amphoteronolide B 相关衍生物,其溶血毒性与 AmB 相当,但最小抑菌浓度低于 AmB。因此使用 perosamine 取代海藻糖胺在抗菌活性上取得了较小的提升,而 19-O-perosaminyl-amphoteronolide B 也显示了相对与 AmB 较好的水溶性,这也为多烯大环内酯类抗生素糖基自由化提供了一种新的方向^[42]。

2.2 改造 PKS 基因簇内基因所得 AmB 衍生物

Carmody 等^[12]通过构建敲除片段 KC-M57,将 *S. nodosus* 中 *amph C* 基因模块 5-7 之间的多个结构域 (AT5-DH5-KR5-ACP5-KS6-AT6-KR6-ACP6-KS7) 敲除,最终获得 *S. nodosus* M57 突变菌,提取其代谢产物进行紫外吸收光谱分析,得到一种在 310、318、333 及 352 nm 处具有吸收峰类似五烯的聚酮化合物,且具有较高产量,该五烯聚酮化合物 (Pentaene) 被发现只存在于培养基上层部分,表明其具有较好的水溶性及较小的聚集倾向,利用 *Saccharomyces cerevisiae* 作为抗菌活性指示剂发现其仍具有较低抗真菌活性。

Reid 用苯丙氨酸取代 6-脱氧红霉素内酯 B 合成酶上的 KR6 结构域内的活性位点酪氨酸^[43],进而使该合成酶失活。Power 等^[25]为增加对 AmB 衍生物的了解,利用类似的方法对 *Amph I* 蛋白上的 KR12 和 *Amph J* 蛋白上的 KR16 结构域进行失活,研究 AmB 结构与活性间的关联。利用同源重组双交换,将 KR12 结构域内活性位点附近的氨基酸从甘氨酸-天冬氨酸-酪氨酸变为甘氨酸-丝氨酸-苯丙氨酸致使其失活;将 KR16 结构域活性位点附近的丙氨酸-天冬氨酸-酪氨酸变为丙氨酸-丝氨酸-苯丙氨酸使其失活。由于在野生菌中 KR12 的敲除失败,Patrick Power 转而而对 *amph N*、*amph M* 敲除的菌株即 *Streptomyces nodosus Δamph NM* 中 KR12 结构域进行失活,提取出七烯衍生物 15-deoxy-16-descarboxyl-16-methyl-15-oxo-amphotericin B,发现在 C15 位引入酮基并不会影响 *amph DI* 催化的糖基化。对此粗七烯衍生物进行抗菌性检测,结果表明当质量浓度达到 10 μg/mL 时具有抑菌性,而 16-descarboxyl-16-methyl-amphotericin B 最小的抑菌浓度为 5 μg/mL,说明了该七烯衍生物具有抗真菌活性,但可能由于 C15 位的酮基导致其活性下降。

而将 KR16 结构域从 *S. nodosus* 中失活后,提取出七烯衍生物 7-oxo-amphotericin B,对其抗真菌活性以及溶血毒性进行检测,AmB 最小抗菌浓度为 1.25 μg/mL,最小溶血浓度为 6 μg/mL,而 7-oxo-amphotericin B 检测到抗菌浓度为 4.5 μg/mL,溶血浓度取达到了 65 μg/mL,其抗菌活力虽降低 1/3,但其溶血毒性也降低到原来的 1/10。

随着对 AmB 各个基团的认知逐渐清晰,在已知环外海藻

糖胺基基团对 AmB 的活性起着重要的作用,以及成功获得 MFAME 衍生物的基础上,如今学者们的研究已逐渐偏向多烯大环内酯双糖修饰。De-Poire 等^[44]将 *Pseudonocardia* 菌株中的 *nyp Y* 基因(糖基转移酶)导入至野生菌和 Δ KR16 突变菌株后获得双糖修饰七烯衍生物 Mannosyl amphotericin B 与 Mannosyl-7-oxo-amphotericin B。Walmsley 等^[45]将 *nyp Y* 基因转致 *S. nodosus* Δ *amph L* 而获得 mannosyl-8-deoxyamphotericin B,其有着与 AmB 相同的抗菌活性,溶血毒性也有着轻微的下降。通过圆二色谱分析 AmB、MFAME、8-deoxyamphotericin B 与 mannosyl-8-deoxyamphotericin B 这 4 种物质,发现 AmB 与 8-deoxyamphotericin B 结果相似,与 mannosyl-8-deoxyamphotericin B 有着轻微的不同,圆二色谱的结果能够评估其在水溶液中的聚集程度^[46],而 AmB 与无毒性的 MFAME 圆二色谱结果存在明显差异,这也证明了双糖修饰结构也影响着其在水中的聚集程度。

3 结论

S. nodosus 全基因组及 AmB 合成代谢途径的解析为后续针对 AmB 及其衍生物的研究提供了理论基础和改造框架。分析 AmB 合成基因簇显示出与多烯大环内酯类抗生素的众多相似之处,通过多种类似抗生素之间的横向比较,结合合成基因簇及其代谢途径的相关信息,进一步促进了 AmB 及其相应衍生物的发展。同时,结合对 AmB 调控基因的深入解析,通过对相关基因的修饰,完善组合生物学内容,并控制其代谢过程中尤其是两性霉素 A 等副产物的生成,以期提高 AmB 在其生产菌株中的产量,降低产品成本,提高工业化水平。然而,传统链霉菌基因工程与代谢工程操作手段较为复杂,这阻碍了相关产物的研究与发展进程,随着新的基因敲除与编辑技术的发展,并成功在链霉菌中得以运用(如 CRISPR/Cas 技术^[47-48]),加之链霉菌表达系统的逐渐更新升级,例如 *Potr*^[49]、*kasOp*^[50] 等此类强启动子,为 AmB 的发展提供巨大的前景。最新通过化学合成方法获得的两性霉素 B 组氨酸甲酯等 AmB 氨基酸衍生物具有优良的水溶性^[51-52],在不降低药效的前提下,提高了药物的安全性,也为日后的生物法合成提供了新方向。从目前的研究成果可以看出,AmB 相关组件对于其活性、毒性等理化性质有着较为规律的一一对应现象,现已挖掘出多种具有活性并且毒性降低的 AmB 衍生物,加强 AmB 组合生物学与代谢工程的衔接,完善提高相关衍生物的生产,进一步加强临床实验研究,会使抗真菌感染类药物得到更大的补充。

参考文献 (References)

[1] Gallis H A, Drew R H, Pickard W W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience[J]. *Reviews of Infectious Diseases*, 1990, 12(2): 308-329.

[2] Aparicio J F, Mendes M V, Anton N, et al. Polyene macrolide antibiotic biosynthesis[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11(14): 1643-1656.

[3] Jones J, Kosloff B R, Benveniste E N, et al. Amphotericin-B-mediated reactivation of latent HIV-1 infection[J]. *Virology*, 2005, 331(1): 106-116.

[4] Chappuis F, Sundar S, Hailu A, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(11): 873-882.

[5] Sundar S, Rai M, Chakravarty J, et al. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: Single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, 47(8): 1000-1006.

[6] Machadosilva A, Tavares C A, Sinisterra R D. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: A patent landscape[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2015, 25(3): 247-260.

[7] Golgher D, Vianna C H, Moura A C. Drugs against leishmaniasis: Overview of market needs and pipeline[J]. *Drug Development Research*, 2011, 72(6): 463-470.

[8] Luke R G, Boyle J A. Renal effects of amphotericin B lipid complex[J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 1998, 31(31): 780-785.

[9] Halperin A, Shadkhan Y, Pisarevsky E, et al. Novel water-soluble amphotericin B-PEG conjugates with low toxicity and potent in vivo efficacy[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(3): 1197-1206.

[10] Sweeney P, Murphy C D, Caffrey P. Exploiting the genome sequence of *Streptomyces nodosus* for enhanced antibiotic production[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(3): 1285-1295.

[11] Caffrey P, Lynch S, Flood E, et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: Deductions from analysis of polyketide synthase and late genes[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(7): 713-723.

[12] Carmody M, Byrne B, Murphy B, et al. Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage KC515 transduction techniques[J]. *Gene*, 2004, 343(1): 107-115.

[13] Mcnamara C M, Crawforth J M, Hickman B S, et al. Biosynthesis of amphotericin B[J]. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 1998, 1(1): 83-88.

[14] Byrne B, Carmody M, Gibson E, et al. Biosynthesis of deoxyamphotericins and deoxyamphoteronolides by engineered strains of *Streptomyces nodosus*[J]. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(12): 1215-1224.

[15] Qiu J F, Zhuo Y, Zhu D Q, et al. Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2011, 92(2): 337-45.

[16] 刘静, 姜春艳, 张部昌, 等. ABC 转运蛋白基因 *slnTI* 和 *slnTII* 与盐霉素生物合成的相关性[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(1): 58-66.

Liu Jing, Jiang Chunyan, Zhang Buchang, et al. Involvement of ABC transporter genes *slnTI* and *slnTII* in salinomycin biosynthesis[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 58-66.

[17] Guerra S M, Rodríguezgarcía A, Santosaberturas J, et al. LAL Regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31475.

[18] Sekurova O N, Brautaset T, Sletta H, et al. In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(5): 1345-1354.

[19] Du Y L, Chen S F, Cheng L Y, et al. Identification of a novel *Streptomyces chattanoogensis* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator SenRII[J]. *Journal of Microbiology*, 2009, 47(4): 506-513.

[20] Wu H L, Liu W C, Dong D, et al. *SlnM* gene overexpression with dif-

- ferent promoters on natamycin production in *Streptomyces lydicus* A02 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(1): 163–172.
- [21] Chéron M, Cybulska B, Mazerski J, et al. Quantitative structure–activity relationships in amphotericin B derivatives[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1988, 37(5): 827–836.
- [22] Nicolaou K C, Chakraborty T K, Daines R A, et al. Amphoteronolide B methyl ester. novel oxidative deglycosidation of amphotericin B[J]. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1987, 76(9): 686–689.
- [23] Szlinder-richert J, Mazerski J, Cybulska B, et al. MFAME, N–methyl–N–D–fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity: relationship between self–association and effects on red blood cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1528(1): 15–24.
- [24] Szlinder-richier J, Cybulska B, Grzybowska J, et al. Interaction of amphotericin B and its low toxic derivative, N–methyl–N–D–fructosyl amphotericin B methyl ester, with fungal, mammalian and bacterial cells measured by the energy transfer method[J]. *Il Farmaco*, 2004, 59(4): 289–296.
- [25] Power P, Dunne T, Murphy B, et al. Engineered synthesis of 7–oxo– and 15–deoxy–15–oxo amphotericins: insights into structure–activity relationships in polyene antibiotics[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(1): 78–86.
- [26] Paquet V, Carreira E M. Significant improvement of antifungal activity of polyene macrolides by bisalkylation of the mycosamine[J]. *Organic Letters*, 2006, 8(9): 1807–1809.
- [27] Taylor A W, Costello B, Hunter P A, et al. Synthesis and antifungal selectivity of new derivatives of amphotericin B modified at the C–13 position[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1992, 46(3): 486–493.
- [28] Tsuchikawa H, Matsushita N, Matsumori N, et al. Synthesis of 28–19F–amphotericin B methyl ester[J]. *Tetrahedron Letters*, 2006, 47(35): 6187–6191.
- [29] Matsumori N, Umegawa Y, Oishi T, et al. Bioactive fluorinated derivative of amphotericin B[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(15): 3565–3567.
- [30] Brautaset T, Sletta H, Nedal A, et al. Improved antifungal polyene macrolides via engineering of the nystatin biosynthetic genes in *Streptomyces noursei*[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(11): 1198–1206.
- [31] Zhou Y J, Li J L, Zhu J, et al. Incomplete –ketone processing as a mechanism for polyene structural variation in the FR–008/candicidin complex[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(6): 629–638.
- [32] Mendes M V, Recio E, Fouces R, et al. Engineered biosynthesis of novel polyenes: A pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(7): 635–644.
- [33] Seco E M, Cuesta T, Fotso S, et al. Two polyene amides produced by genetically modified *Streptomyces diastaticus* var. 108[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(5): 1093–1101.
- [34] Nic–lochlainn L, Caffrey P. Phosphomannose isomerase and phosphomannomutase gene disruptions in *Streptomyces nodosus*: Impact on amphotericin biosynthesis and implications for glycosylation engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(1): 40–7.
- [35] Volokhan O, Sletta H, Ellingsen T E, et al. Characterisation of the P450 monooxygenase *NysL*, responsible for C–10 hydroxylation during biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatinin *Streptomyces noursei*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2514–2519.
- [36] Mendes M V, Recio E, Fouces R, et al. Engineered biosynthesis of novel polyenes: a pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(7): 635–644.
- [37] Carmody M, Murphy B, Byrne B, et al. Biosynthesis of amphotericin derivatives lacking exocyclic carboxyl groups[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(41): 34420–34426.
- [38] Brautaset T, Sletta H, Nedal A, et al. Improved antifungal polyene macrolides via engineering of the nystatin biosynthetic genes in *Streptomyces noursei*[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(11): 1198–1206.
- [39] Zhen Q, Kang Q, Jiang C, et al. Engineered biosynthesis of pimaricin derivatives with improved antifungal activity and reduced cytotoxicity [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(16): 6745–6752.
- [40] Murphy B, Anderson K, Borissow C, et al. Isolation and characterisation of amphotericin B analogues and truncated polyketide intermediates produced by genetic engineering of *Streptomyces nodosus*[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(16): 3758–3770.
- [41] Stephens N, Rawlings B, Caffrey P. *Streptomyces nodosus* host strain optimized for polyene glycosylation engineering[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2012, 76(2): 384–387.
- [42] Hutchinson E, Murphy B, Dunne T, et al. Redesign of polyene macrolide glycosylation: Engineered biosynthesis of 19–(O)–perosaminyl amphoteronolide B[J]. *Chemistry & Biology*, 2010, 17(2): 174–182.
- [43] Reid R, Piagentini M, Rodriguez E, et al. A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(1): 72–79.
- [44] De–poire E, Stephens N, Caffrey P. Engineered biosynthesis of disaccharide– modified polyene macrolides[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 6156–6159.
- [45] Walmsley S, Depoire E, Rawlings B, et al. Engineered biosynthesis and characterization of disaccharide– modified 8– deoxyamphoteronolides[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 101(5): 1899–1905.
- [46] Cybulska B, Gadomska I, Mazerski J, et al. N–methyl–N–D–fructosyl amphotericin B methyl ester (MF–AME), a novel antifungal agent of low toxicity: Monomer/micelle control over selective toxicity[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2000, 47(1): 121–131.
- [47] Cobb R E, Wang Y, Zhao H. High–efficiency multiplex genome editing of streptomyces species using an engineered CRISPR/Cas system [J]. *Acs Synthetic Biology*, 2015, 4(6): 723–728.
- [48] Tong Y, Charusanti P, Zhang L, et al. CRISPR–Cas9 based engineering of actinomycetal genomes[J]. *Acs Synthetic Biology*, 2015, 4(9): 1020–1029.
- [49] Wang W, Yang T, Li Y, et al. Development of a synthetic oxytetracycline– inducible expression system for streptomycetes using de novo characterized genetic parts[J]. *Acs Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 765–773.
- [50] Wang W, Li X, Wang J, et al. An engineered strong promoter for streptomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(14): 4484–4492.
- [51] Antillón A, de Vries A H, Espinosa–Caballero M, et al. An amphotericin B derivative equally potent to amphotericin B and with increased safety[J]. *Plos One*, 2016, 11(9): e0162171.
- [52] Benhar I, Oshero N, Dergachev V, et al. Amphotericin B derivatives: US 20170043029A1[P]. 2017–01–16. <http://www.freepatentsonline.com/20170043029.pdf>.

Researches on the gene clusters of amphotericin B and its combinatorial biology

ZHANG Bo, ZHANG Haidong, ZHOU Yiteng, HUANG Kai, LIU Zhiqiang

Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province; College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract Amphotericin B, as the first drug against deep fungal infection which has been used for more than fifty years, is still an indispensable antibiotic in clinical treatment. In recent years, with the development of AmB derivatives, the analysis of genome of the *Streptomyces nodosus* and the metabolic pathways of AmB, more and more strategies involving genetic engineering and metabolic engineering were used to study the combinatorial biosynthesis of AmB. It's obviously AmB paly an important role in clinical treatment, for this reason developing the production of AmB has significant economic and social benefits. Herein, a brief summary of AmB, the organization of the AmBiosynthetic gene cluster and its current combinatorial biosynthesis is reviewed.

Keywords amphotericin B; *Streptomyces nodosus*; synthetic gene cluster; combinatorial biosynthesis

(责任编辑 田恬)