

新颖的黏细菌模块化天然产物装配线*

朱丽萍 黎志凤** 韩 魁 李曙光 李越中

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 黏细菌的显著特征之一是能够合成结构多样、功能丰富的天然产物。模块化聚酮合酶(PKS)和非核糖体肽合成酶(NRPS)途径是黏细菌合成天然产物的主要方式。与经典模块 PKS/NRPS 相比, 黏细菌来源的模块化 PKS/NRPS 常表现出新颖的装配特征, 显示出多样化的遗传加工潜能和装配产物结构多样性。本文综合归类分析了黏细菌来源的模块化 PKS/NRPS 遗传装配线类型及其对应化合物的生化结构特征, 图文并茂地呈现了黏细菌在遗传、生化、组合生物合成、进化和药物开发领域的生机和潜能, 并展望了基因组学时代带来的契机。

关键词 黏细菌, 天然产物, 聚酮合酶(PKS), 非核糖体肽合成酶(NRPS), 模块化

学科分类号 Q936, Q933

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00325

具有复杂多细胞形态发生特征的黏细菌在系统分类上属于变形细菌门 δ 分支, 包括 3 个亚目 17 个属^[1-2]。黏细菌能够产生丰富多样的次级代谢产物, 是重要药源微生物类群^[2-4], 如, 由纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)产生的埃博霉素(epothilone)氮杂修饰物 Ixabepilone/Ixempra 已被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准作为一线抗癌药物^[5]。近 20 年来, 已从黏细菌次级代谢产物中鉴定出 100 种以上基本化学结构和近 600 种结构衍生物^[2-6], 包括芳香族、杂环、多烯、生物碱、大环、聚醚和肽类等, 其中绝大部分化合物结构新颖。黏细菌的次级代谢产物合成具有菌株特异性, 如 epothilone 产生菌株阳性率仅为 2%^[3]。此外, 黏细菌单一菌株可以产生多种不同结构的次级代谢产物^[2-4]和同一基本结构的大量衍生物。这些重要特征使黏细菌成为生物学活性次级代谢产物研发的重要资源。

据不完全统计, 已知黏细菌次级代谢产物中约 1/3 为聚酮(polyketide, PK)或非核糖体肽(non-ribosomal peptide, NRP)类化合物。PK/NRP 类化合物是复杂天然次级代谢产物中的两个重要家族, 表现出极其丰富的结构与功能, 成为重要药物分子研发对象^[7]。PK 和 NRP 类化合物分别由聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)催化羧酸单体和非

核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)催化氨基酸单体连续缩合而成, 装配过程与脂肪酸合成类似, 底物和中间产物在各功能域中传递与加工, 直至终产物的合成与释放^[6-11]。微生物来源的 PKS/NRPS 至少存在 3 种类型, 其中模块化 PKS/NRPS 构成一类独特装配线模式。近 10 年来, 黏细菌模块 PKS/NRPS 在遗传和生化领域取得了重要研究进展, 相关化合物及其生物合成基因簇被陆续鉴定, 迄今已达 20 例^[12-31], 与经典模块化 PKS/NRPS 不同, 它们表现出独特的组织结构、特殊的遗传和生化特征。2007 年, Wenzel 等^[6]对黏细菌模块化 PKS/NRPS 天然产物装配线中 6 个实例进行了详尽综述。本文在 Wenzel 等的报道基础上, 就黏细菌来源的 20 例模块 PKS/NRPS 新颖装配线特征进行进一步阐述和归类分析。

1 经典模块化 PKS/NRPS 装配线特征

经典模块化 PKS(modular PKS)由基因簇编码,

* 国家自然科学基金资助项目(30900027, 30911120028), 高等学校博士学科点专项科研基金 - 新教师基金资助项目(200804221017)。

** 通讯联系人。

Tel: 0531-88363735, E-mail: lizhifeng@sdu.edu.cn

收稿日期: 2011-07-12, 接受日期: 2011-09-21

编码产物由一至多个肽链组成，每条肽链由一至多个模块(module)组成。每个模块负责一轮聚酮链二碳单元延伸，由3个必需功能域执行3个基本反应：a. 酰基转移酶(acyltransferase, AT)，负责起始单元或延伸单元的识别与转移；b. 酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)，负责起始单元或延伸单元的附着；c. 酮基合酶(ketosynthase, KS)，负责催化延伸单元(通常是丙二酰-CoA 或甲基丙二酰-CoA)与上游模块酰基硫脂缩合，实现聚酮链延伸。此外，每个模块中可能存在1~3个负责酮基还原的修饰域： β -酮基还原酶(β -ketoacyl reductase, KR)，KR+ β -羟基脱水酶(β -hydroxyacyl dehydratase, DH)和KR+DH+烯酰基还原酶(enoyl reductase, ER)，分别将酮基硫酯还原为羟基硫酯、不饱和硫酯和完全饱和硫酯。整条装配线N端存在起始模块(loading module)，负责起始单元的加工与获得。装配线末端通常包含硫酯酶(thioesterase, TE)，具有卸载活性，以线性、环形或支环形式释放产物。Modular PKS的产物加工从起始模块开始，依模块顺序，模块内各结构域依次发挥一次性加工，形成顺次接龙式装配线，直至TE释放产物，整个过程中所有中间产物都以硫酯形式，通过磷酸泛酰巯基乙胺基摆臂(phosphopantetheinyl arm)共价结合在多酶复合体上。产物释放后，通常需经历与基因簇上下游偶联的修饰酶作用(如，甲基化、羟基化和糖基化等)，以赋予各种生物学活性，形成终产物。模块顺序与组成决定了编码产物基本结构，模块数量决定了产物链长度，最终释放形式与

后修饰赋予化合物功能活性^[6-8, 11]。当前，红霉素合成前体 DEBS(deoxyerythronolide B synthase)已成为教科书中模块 PKS 的经典实例^[7-8]。

NRPS 具有类似模块式组织结构^[7]，但所利用的建筑材料为氨基酸单体，每个模块至少含有实现单体装配的3个必需功能域：腺苷酰化结构域(adenylation, A)，负责氨基酸激活；肽酰载体蛋白结构域(peptidyl carrier protein, PCP，也称为硫基化结构域, T)，共价结合激活的氨基酸链；缩合结构域(condensation, C)，催化肽键形成。此外，各模块中还可能含差向异构化结构域(epimerization, E)、N-甲基化结构域(N-methylation, NMT)、杂环化结构域(cyclization, Cy)、还原结构域(reduction, R)和氧化结构域(oxidation, Ox)等修饰功能域，以增加产物结构多样性。与模块 PKS 相似，NRPS 模块顺序、组成和数量也分别决定了肽链的基本结构和长短。

2 黏细菌模块化 PKS/NRPS 新颖装配线特征

自1995年公布第一例黏细菌模块化 PKS/NRPS 装配线以来^[12, 32]，几乎所有黏细菌模块化 PKS/NRPS 装配线都有背于经典模式，展示出新颖的遗传和生化特性。目前已鉴定报道的黏细菌模块化 PKS/NRPS 装配线及其产物达20例(表1)，依特征不同，将其归纳为9大类(20细类)并加以分别阐述。

Table 1 Characters of Myxobacteria modular PKS/NRPS products and their assembly lines

表 1 黏细菌模块化 PKS/NRPS 化合物及其装配线特征

产生菌属	次级代谢产物	生物活性及作用模式	基因簇类型	装配线新颖特征类别 ¹⁾	编码装配线的基因簇登录号
<i>Myxococcus</i>	番红霉素(Saframycin) ^[12]	抗肿瘤	NRPS	8、9.1	U24657
	变绿黏球菌素(Myxovirescin) ^[28] 或 TA ^[13]	抗革兰氏阴性菌，可黏附牙组织	Mixed PKS-NRPS	1、5、6.1、2、4、9.1	NC_008095, MXAN3950-MXAN3928, AJ006977, AY282522
	Myxochromide A ^[29]	细胞毒素	PKS-NRPS	1、3、4.2	NC_008095, MXAN4077-MXAN4079, U24241
<i>Sorangium</i>	Soraphen ^[19]	抗肿瘤，抑制真核细胞乙酰-辅酶A羧化酶	PKS	5、4.2、7	U24241
	埃博霉素(Epothilone) ^[15]	抗肿瘤，诱导微管蛋白聚合并稳定微管结构	Mixed PKS-NRPS	1、5、4.2	AF210843
	Disorazol ^[24]	抑制真核细胞，作用于有丝分裂过程	Hybrid PKS-NRPS	1、5、6.1、2、4.2、4.1、6.2、9.1、6.1	DQ013294
	Chivosazol ^[26]	抗酵母、丝状真菌和哺乳动物细胞，破坏细胞骨架	PKS-NRPS	1、2、3.2、5、6.1、4.2、6.2	DQ065771

续表 1

产生菌属	次级代谢产物	生物活性及作用模式	基因簇类型	装配线新颖特征类别 ¹⁾	编码装配线的基因簇登录号
<i>Sorangium</i>	Ambruticin ^[25]	抗真菌, 干扰真菌渗透调节且对动物细胞无明显副作用	PKS	3、5、6.1、6.2、9.1	DQ897667
	Etnangien ^[31]	抗细菌、放线菌, RNA 聚合酶抑制剂	PKS	3、5、6.1、2、4、9	AM746676, Sce3185-Sce3195
	Jerangolid ^[25]	抗真菌, 干扰真菌渗透调节	PKS	5、9	DQ897668
	Spirangien ^[30]	抗真菌, 细胞毒素	PKS	5、3.2	AJ505006
<i>Stigmatella</i>	Myxothiazol ^[14]	抗菌素, 抑制线粒体呼吸	Mixed and hybrid PKS-NRPS	1、5、7、8、9	AF188287
	Myxochelin ^[16]	抗肿瘤, 铁转运代谢	NRPS	5、6.1、8	AF299336
	Myxalamid ^[17]	抑制电子转移	Mixed PKS-NRPS	1、5、6.1、4.2、7	AF319998
	Stigmatellin ^[18]	抗真菌, 抑制电子转移、抑制线粒体呼吸	PKS	3、5、4.2、8、9	AJ421825
	Myxochromide S ^[22]	细胞毒素	Mixed PKS-NRPS	1、3、5、4.2	AJ698723
<i>Melittangium</i>	Melithiazol ^[20]	抗菌素, 抑制线粒体呼吸	Mixed and hybrid PKS-NRPS	1、5、7、8、9.1	AJ557546
<i>Cystobacter</i>	Tubulysin ^[21]	抗血管生成、抗增殖, 促微管解聚	Mixed and hybrid PKS-NRPS	1、5、7、9、6.1	AJ620477
	Cystothiazol ^[23]	抗真菌, 抑制线粒体呼吸	Mixed and hybrid PKS-NRPS	1、5、7、8、9; 同 Melithiazol	AY834753
<i>Chondromyces</i>	Chondramide ^[27]	抗肿瘤、抗真菌, 结合于肌动蛋白	Mixed PKS-NRPS	1、5、4.2、7、8	AM179409

¹⁾1~9 分别对应于黏细菌模块化 PKS/NRPS 装配线 9 大特征: 1: PKS-NRPS 混杂型(1.1 PKS-NRPS 混合型和 1.2 PKS-NRPS 杂合型), 2: 反式 AT 型, 3: 反复加工型(3.1 模块反复加工型和 3.2 结构域反复加工型或扫描残迹型), 4: 跳跃型(4.1 模块跳跃型或流产式加工型和 4.2 结构域跳跃型或失活结构域型或冗余型), 5: 特殊加载型(5.1 存在 KS/C 结构域型, 5.2 与延伸模块融合型, 5.3 分割型, 5.4 ACP 冗余型, 5.5 非单一途径型), 6: 特殊延伸型(6.1 模块分割型, 6.2 串联结构域型, 6.3 特殊组织型), 7: 特殊建筑材料型, 8: 特殊终止型, 9: 特殊修饰型(9.1 甲基化修饰, 9.2 糖基化修饰 和 9.3 其他反式修饰型)。

2.1 PKS-NRPS 混杂型(hybrid or mixed PKS/NRPS)

经典 PKS/NRPS 中 PKS 模块和 NRPS 模块各自形成独立装配线^[11, 33]。PKS-NRPS 混杂型指的是 PKS 模块和 NRPS 模块混合 (mixed PKS/NRPS, PKS 与 NRPS 模块在装配线的不同肽链中)或杂合 (hybrid PKS/NRPS, PKS 与 NRPS 模块在装配线同一条肽链内)在同一多酶复合体中, 其加工产物由羧酸单体和氨基酸单体共同组装而成。第一例 PKS-NRPS 混杂型装配线于 1999 年报道, 是来自黏细菌 *Stigmatella aurantiaca* 的 myxothiazol^[14]。已报道的 20 例黏细菌 PKSs/NRPSs 中, 12 例属 PKS-NRPS 混杂型(表 1)。依装配产物中氨基酸和羧酸单体利用比例不同分为 3 类, 如图 1 所示。似乎经典的独立 PKS 和 NRPS 装配线, 在黏细菌宿主中发生着频繁重组, 形成了多样化组合装配线。

2.2 反式 AT 型(trans-AT type)

某些天然装配线模块内并没有发现所需的 AT, 它们利用反式 AT 模式(trans-AT)^[6, 11]进行装配。该模式中 AT 域功能由装配线外、具备 AT 功能的独立酶蛋白承担, 能反复发挥作用并对装配线内所有模块的延伸单元进行选择加载。这种酶蛋白含有一个或几个 AT 域。黏细菌的 disorazol、chivosazol、etnangien 和 myxovirescin 装配线均属此模式(图 2)。在 disorazol 中, 延伸单元的装载转移由末端独立 ORF(DisD)编码的酰基转移酶 AT 负责。有趣的是, 分析其装配线各模块 KS 域下游区, 发现它们与 AT 域存在序列相似性, 并且它们彼此间也具有很高相似性, 推测这些区域可能是 AT 域缺失演化后形成, 残存的同源序列可能作为反式 -AT 蛋白的锚定位点, 该假说尚需实验证实^[34]。在 Chivosazol

装配线上游有一保守的反式 AT-OR 双功能域蛋白, 负责丙二酰 -CoA 的加载和转移, 同时该装配线模块 1 中仍保留了一个完整的 AT1 域, 其底物特异性无法根据氨基酸保守性推测, 该域是否有活性尚待证实^[26]. Myxovirescin 装配线上游的 TaV 蛋白负责整个装配线延伸单元选择性转移, TaV 蛋白中含 2 个活性 AT 域, 推测一个负责选择性转移乙

酰 -CoA, 另一个负责丙二酰 -CoA^[28]. Etnangien 装配线上下游共分布了 2 个与 AT 功能相关的 ORF: EtnB 和 EtnK, 其中 EtnK 也包含与 TaV 类似的 2 个 AT 域. 根据氨基酸保守性和化合物结构推测: 3 个 AT 结构域中一个负责丙酸盐, 一个负责丁二酸盐, 另一个功能尚未明晰^[31].

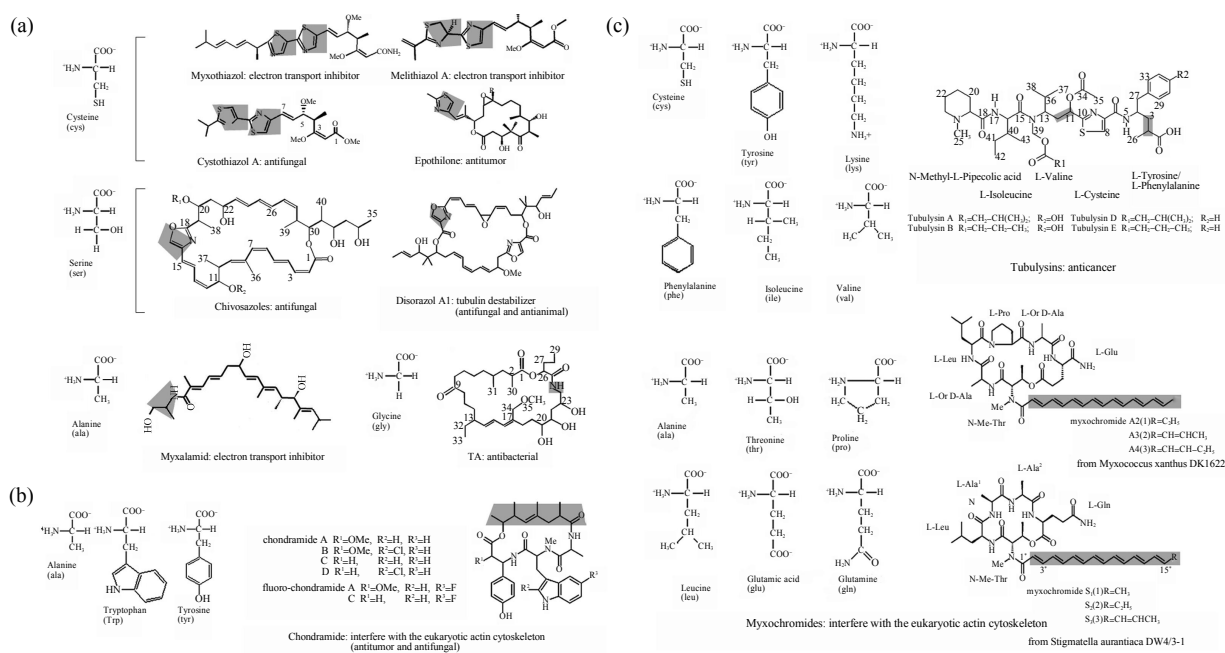


Fig. 1 Modular hybrid/mixed PKS-NRPS assembly lines products from myxobacteria

图 1 黏细菌 PKS-NRPS 混杂型模块化装配线产物

NRPS 利用的氨基酸底物列于左侧, 化合物结构与活性列于右侧. (a) PKS 为主体的装配线产物(NRPS 加工产物基团阴影标识)^[13-15, 17, 20, 23-24, 26, 28]. (b)等比例 PKS-NRPS 装配线产物(PKS 加工产物基团阴影标识)^[27]. (c) NRPS 为主体的装配线产物(PKS 加工基团阴影标识)^[21-22, 29].

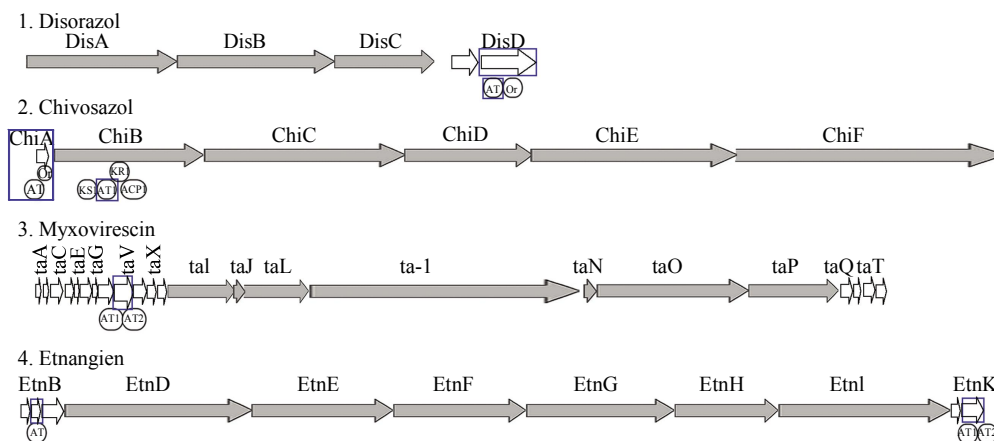


Fig. 2 Examples of trans-AT type PKS/NRPS assembly lines from myxobacteria^[24, 26, 28, 31, 34]

图 2 黏细菌反式-AT 型模块化 PKS/NRPS 实例^[24, 26, 28, 31, 34]

每条装配线上的所有 AT 域均用方框突显标识.

2.3 反复加工型(iterative type)

依反复发挥作用区域范围大小, 反复加工型可分为模块反复加工型和结构域反复加工型(结构域反复加工型又称扫描残迹型)。

2.3.1 模块反复加工型(module iterative type). 经典模块 PKS/NRPS 是线性前进加工模式, 即每个模块依顺次仅利用一次。2000 年报道的 Myxochelin 打破了这种认知: Myxochelin 中 MxcF 模块转运两分子起始单元(二羟基苯甲酸)至 MxcG 模块, 它们分别与 MxcG 延伸单元(活性赖氨酸)的 α - 和 ϵ -侧链缩合, 这是黏细菌中最早发现的非线性加工模式, 该装配线起始模块和延伸模块 C 结构域均被利用 2 次^[16](图 3a)。2001 年 Hardt 等在 Epothilone 产生菌 700L 发酵物中检测到除 Epothilone A 和 Epothilone B 外的 37 个 Epothilones 类似物, 除主要的 16 元环化合物外, 还存在 6 个以 18 元环为骨架的微量产物, 它们较主产物多一个二碳单元^[35], 表明产物链长并非完全决定于模块数量, 暗示着 Epothilones 装配线中部分模块能重复发挥作用。2002 年报道的 Stigmatellin, 经 StiH 和 StiJ 两模块加工后, 共发生 3 轮二碳单元延伸, 产生 3 个相邻的酮基二碳单元, 推测 StiH 或 StiJ 发挥了一次反

复作用^[18](图 3a)。2005 年发现的 Myxochromide S 装配线中仅存在一个 PKS 模块, 但终产物的聚酮链至少经历过 7 次 PKS 加工, 说明装配线中仅有的 PKS 模块 MchAS 被反复利用了多次, 甚至在检测的 Myxochromide S 1~3 类似物中聚酮链长短不一, 说明模块 MchAS 发挥作用的次数有一定弹性(图 3a)^[2]。基于黏球菌来源的化合物 Myxochromide A 与标桩菌的 Myxochromide S 结构极其相似, 2006 年 Wenzel 等^[29]以 Myxochromide S 序列为探针在 DK1622 基因组中探寻到 Myxochromide A 装配线, Myxochromide A 与 Myxochromide S 基因簇水平序列相似性为 70%, 装配线组织模式几乎完全一致, Myxochromide A 中 PKS 模块 MchAA 同 Myxochromide S 中 MchAS 也发挥着反复加工的效用。同年报道的 Ambruticin 装配线中模块 7 也存在重复利用 3 次的可能^[25]。2008 年报道的 Etnangien 模块 2~5 中也存在一次模块反复加工现象^[31](图 3a)。由上述实例可知, 反复加工型模块 PKS 在黏细菌中并不罕见(>20%), 尤其在 Myxochromide 装配线中展现得淋漓尽致。反复加工型 PKSs, 曾被认定为真菌特有类型和真菌来源 PKSs 的分判依据。细菌反复加工型实例的报道,

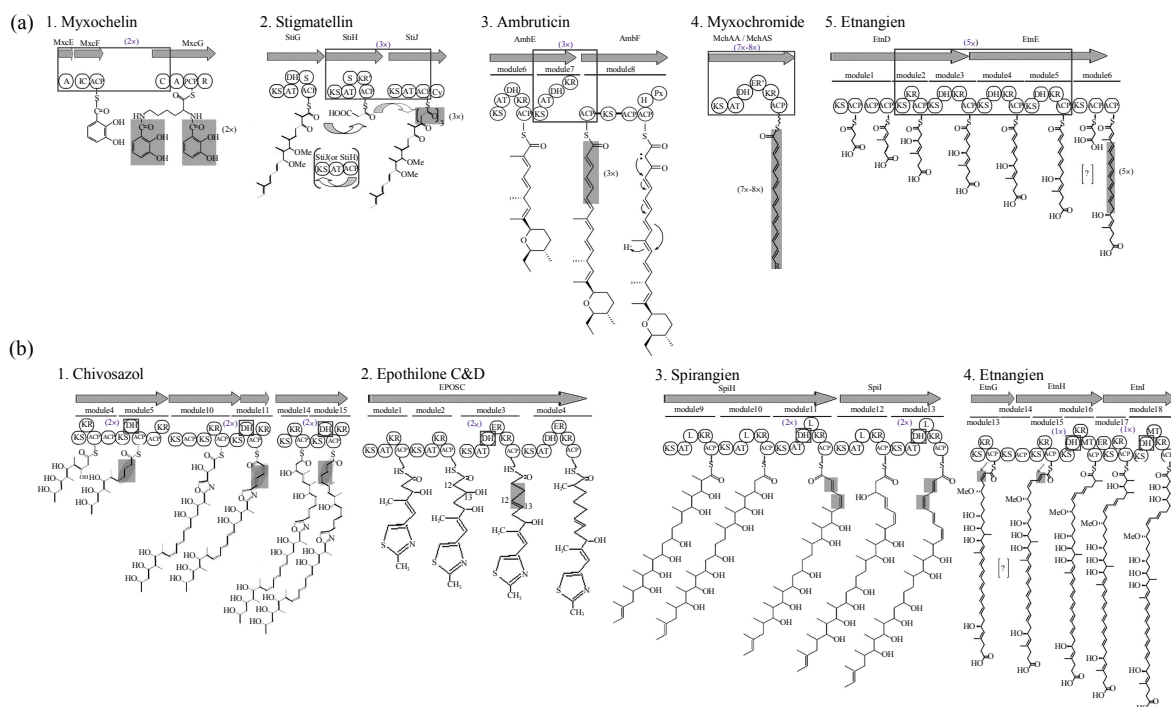


Fig. 3 Iterative PKS/NRPS type assembly lines from myxobacteria

图 3 黏细菌反复加工型模块化 PKS/NRPS 装配线实例

(a) 模块反复利用型^[16, 18, 22, 25, 31]. (b) 结构域反复利用型(化合物名称标于装配线上方, 方框所示为被反复利用的模块或结构域范围, 总利用次数标识于方框边, 阴影突显反复加工对应的结构单元^[15, 26, 30-31, 36]).

模糊了这种分类界限. 似乎, “真菌型”反复加工 PKSs 与经典模块 PKS/NRPS 在黏细菌中发生了整合, 形成了此处所展示的又一类背离经典逻辑的装配线组合模式, 并丰富着装配线产物结构多样性.

2.3.2 结构域反复加工型(domain iterative type).

某些装配模块中缺少与化合物双键结构所对应的催化域, 由其他模块的特定催化域补偿催化. 在 Chivosazol^[26]、Spirangien^[30]和 Epothilone 装配线中都发现了对应模块 DH 域缺失现象(图 3b), 如 Chivosazol 中模块 4、10、14 都不含 DH 结构域, 而相应下游模块 5、11、15 均含有一个 DH, 推测上游模块缺失的 DH 功能由下游模块 DH 通过一种扫描残迹机制 “stutter mechanism” 来补偿实现, 由此称为扫描残迹型(stutter type), 另一方面, 下游模块 DH 域发挥了一次以上脱水作用, 因而又称结构域反复加工型(domain iterative type)^[6]. 这种作用在 Epothilone C&D 装配线中得以证实^[36]: Epothilone C&D 第 12~13 位碳单元的加工由 EPOSC 蛋白的第 2 个模块负责, 然而模块内缺乏生成双键所需的 DH 域, 推测这种缺失由 EPOSC 第 3 模块的 DH(EPOSC-DH3)补偿, Li Tang 等将 EPOSC-DH3 进行了失活与替换改造, 产物第 12~13 位双键消除并出现了预期的羟基, 证明了这种补偿作用和 DH 域被反复利用的事实. 2006 年, Myxovirescin 报道中指出, 仅有的 2 个 ER 结构域负责装配线多处加工产物的还原, 发挥着扫描残迹的作用^[28]. 2008 年, Etnangien^[31]装配线中也发现模块 13 和 15 缺失还原所需的 DH 域, 推测下游模块 16 和 18 的 DH 可能起到补偿作用(图 3b), 奇怪的是模块 16 和 18 自身对应的结构单元未被 DH 域还原, 也就是说, 其 DH 域只发生了一次异位加工作用, 若推测正确的话, 则该 DH 域划分在反式加工型可能更合适.

2.4 跳跃型(skipping type)

2.4.1 模块跳跃型(module skipping type). 与“模块反复加工型”相反, 装配线中有的模块被跳跃, 使加工产物较完整产物链短, 该类型形象地比拟为“流产式加工”. 黏细菌中第一例跳跃式加工产物是环被缩小的埃博霉素衍生物 Epothilone K^[35]. 比较主产物 Epothilone C 与微量衍生物 Epothilone K 化学结构, 并结合装配线特征, 能清晰地推断出 Epothilone K 的形成由装配线模块 7 “流产”所致(图 4a), 此处“流产”只是小概率事件. 2005 年, Wenzel 等^[22,37]在标桩菌 myxochromide S 装配线中清

晰地描述了其 NRPS 蛋白 MchC 模块 4 被完全“流产”的现象(图 4b): 装配线由 6 个 NRPS 模块组成, 但其加工产物仅缩合了 5 个氨基酸, 而 myxochromide S 与黏球菌 myxochromide A^[29]具类似装配线特征, 所不同的是化合物 myxochromide A 的结构与装配线完全拟合, 结构比较分析揭示 myxochromide S 较 myxochromide A 少了第 4 个氨基酸单元, 由此推测模块 4 被跳跃, 进一步序列分析发现模块 4 的 A 和 PCP 结构域保守氨基酸位点存在变异. 2006 年, Wenzel 等^[29]再次用实验首次证实了化合物 myxochromide S 的跳跃是模块 4 中 PCP 结构域高度保守的核心位点突变所致, 此外, 作者还用实验证实 A 结构域特异性口袋处氨基酸的变异可导致不同延伸单元的结合. 2005~2008 年期间, 报道的 disorazol^[24]、myxovirescin (Ta-1 蛋白模块 3 KS 域活性位点突变, 致使缩合功能丧失)^[28]、chivosazol (ChiF 蛋白模块 17, 推测因 KS 保守位点组氨酸被丙氨酸替代而失活)^[26]和 Etnangien (模块 11、14 和 20 均被跳跃但尚未发现关键保守位点变异)^[31]的装配线也都存在模块跳跃(图 4). 就 disorazol^[24]而言, 模块 8、10 和 11 可能未被完全利用, 因在历经这些模块后产物链长并未增长, 有趣的是, 释放的 disorazol 终产物是杂二聚体结构, 具体哪一模块可能在杂二聚体形成中发挥了作用, 尚不能解释(图 4b).

2.4.2 结构域跳跃型(domain skipping type). 模块跳跃型装配线, 多因模块内仅有的 KS、ACP、PCP 等必需结构域失活导致整个模块被跳跃流产. 某些 PKS 或 NRPS 模块中含 2 个拷贝的必需结构域, 其中一个在某种程度上没有活性, 所以称为失活结构域型(inactive domain type), 由于多出一个无用拷贝, 因此又称为冗余型(superfluous domain type)^[6], 这些结构域未发挥作用、被跳跃, 又称结构域跳跃型(domain skipping type). 如, chivosazol^[26]装配线模块 2、12、16 的第一个 ACP, 模块 4 第二个 ACP, 模块 8 第二个 KS, 模块 10 第一个 KS 等似乎都没有活性(图 4d). 除必需结构域外, 修饰结构域同样存在活性中心突变等原因导致不发挥作用而被跳跃, 如, soraphen(DH)、epothilone(ER)、myxalamind (DH & ER)、stigmatellin (KR)、myxochromideS (ER & E)、chivosazol (CMT)、chivosazol(DH)、myxochromideA(ER)、chondramide (DH)、spirangien(DH)等.

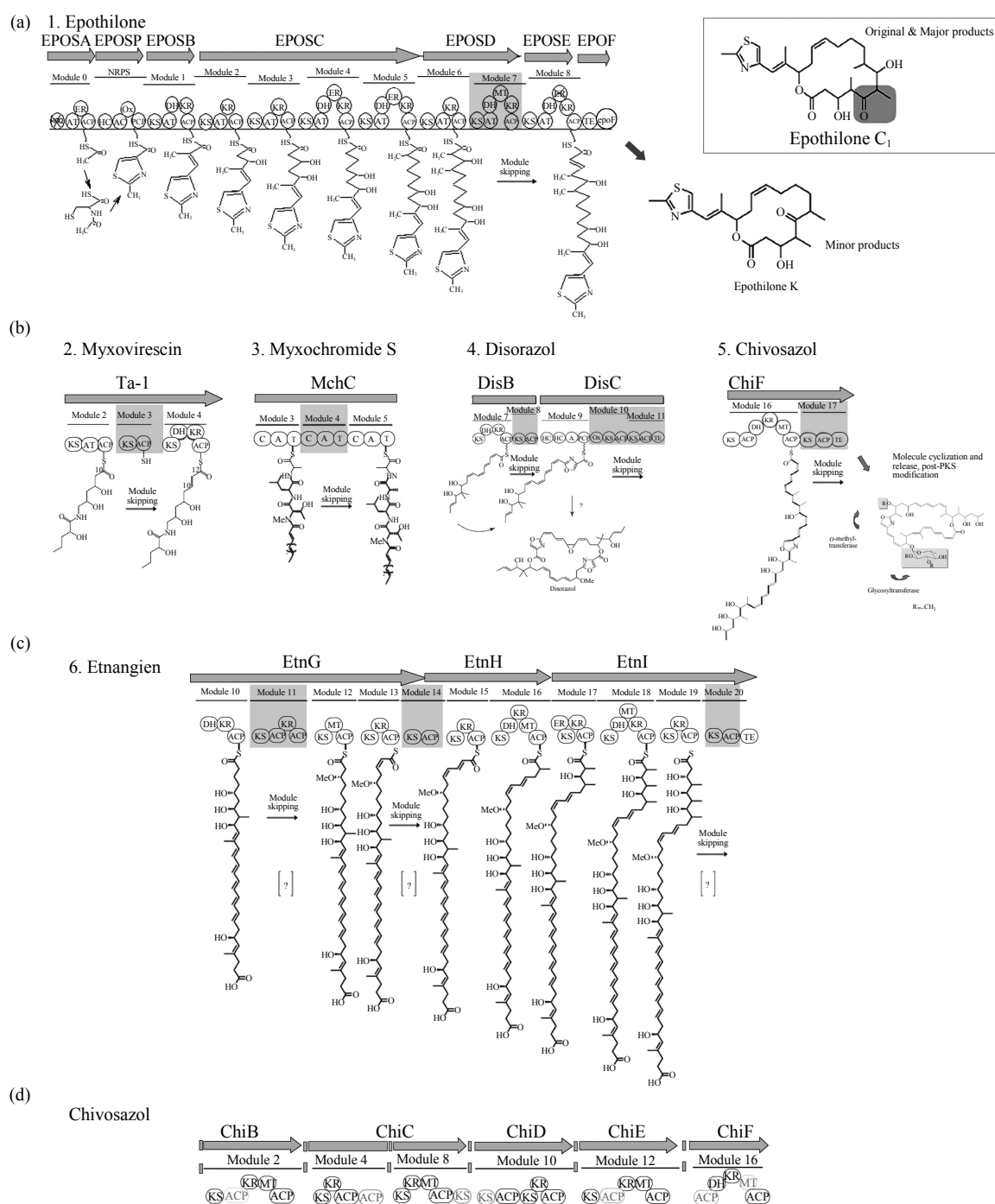


Fig. 4 Examples of skipping type PKS/NRPS assembly lines from myxobacteria

图 4 黏细菌跳跃型模块化 PKS/NRPS 实例

(被跳跃模块阴影突显)

(a)埃博霉素衍生物 Epothilone K 的跳跃式合成模型(完整装配线主产物 Epothilone C₁ 结构标识于方框中, 阴影标识 Epothilone K 缺失的结构单元^[25]); (b) 其他跳跃装配线实例(问号表示 Disorazol 杂二聚体形成机制尚未阐明^[22, 24, 26, 28]); (c) Etnangien 装配线的多处跳跃(问号表示模块被跳跃原因尚未得到解释^[31]); (d) Chivosazol 装配线中结构域失活跳跃实例(失活域由浅色标识^[26]).

2.5 特殊加载型(special loading type)^[11]

经典 PKS/NRPS 装配线起始于加载模块 (loading module), 与延伸模块不同, 加载模块为独立的肽链且不存在缩合结构域, 一般仅包含 AT/A 和 ACP/PCP. 所报道的 20 例黏细菌装配线中, 仅 2 例墨守经典加载模式, 其余均展示新奇组织特征, 分 5 类(图 5a).

2.5.1 存在 KS/C 结构域型. 加载模块中存在非经典模式所需的缩合结构域, 如 PKS 中 epothilone^[15]、melithiazol^[20]、disorazol^[38]、cystothiazol^[23]、ambruticin^[25]、jerangolid^[25]、myxochromide^[22] (除 myxochromide 外, 大部分加载模块 KS 推测无活性)和 NRPS 中 tubulysin^[21]、myxovirescin^[28].

2.5.2 与延伸模块融合型. 加载模块并非独立肽链, 而是与延伸模块融合, 呈现 ACP₁-KS₁-(AT_L)-AT₁-(DH₁-ER₁-KR₁)-ACP₁ 组织模式. 如 soraphen^[19]、myxothiazol^[14]、myxalamide^[17]、Stigmatellin^[18]、chondramide^[27]、spirangien^[30]和 chivosazol^[26].

2.5.3 分割型. 加载模块的必需结构域分割在不同的蛋白肽中, 如 myxochelin^[16]加载模块含 A 和 PCP 结构域, 但其 A 和 PCP 域分别进化成独立蛋白 MxcE 和双功能域蛋白 IC(异分支酸合成酶)-PCP, 加载模块必需功能域被分割在 2 个蛋白质中(该现象同样存在于延伸模块, 见 2.6.1).

2.5.4 ACP 冗余型. Etnangien^[31]加载模块中出现 3 个 ACP 结构域, 类似延伸模块的冗余型(见 2.4.2)或串联结构域型(见 2.6.2).

2.5.5 非单一途径型. 装配线起始并非单一途径, 如, 化合物 myxovirescin^[28]起始方式比较特殊, 有 2 条可行途径: TaI 或 TaL 蛋白负责起始, 各蛋白质又分别含有 2 个 ACP 域, 分别负责乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 加载, 之后模块内 KS 域负责催化 2 个酰基辅酶 A 缩合, 经历甲基化、还原、羟基化后形成下一模块 NRPS 的供体化合物——3 羟基戊酰辅酶 A(C3-hydroxyvaleryl-ACP).

2.6 特殊延伸型(special extension type)

较经典 PKS/NRPS 装配线延伸模块, 源于黏细菌的延伸模块表现出 3 类主要新颖特征:

2.6.1 模块分割型(split-module type)^[6]. 即模块内结构域定位在 2 个 ORFs(open reading frame)中, 更确切地说是 2 个独立的多功能域蛋白上. 模块分割现象最早发现于黏细菌的 myxalamid^[17], 负责 myxalamid 加工的最后一轮模块装配由 2 个独立蛋白 MxaB1 和 MxaB2 联合执行, 每个蛋白质只携带

完整模块的部分结构域——MxaB1 仅含 KS 和 AT, MxaB2 只含 ACP 和修饰域, 联合作用才能实现完整模块功能. 模块分割型在黏细菌中并不罕见, 除上述“2.5 特殊加载型”中所阐述的 myxochelin 外, myxovirescin^[28]、chivosazol^[26]、disorazol^[24]、Etnangien^[31]和 ambruticin^[25]装配线延伸模块中都存在分割现象(图 5b), 其中 chivosazol 模块 11 分布在 2 个基因 *chiD* (只有 KS)与 *chiE* (DH-ACP-KR)中, *chiD* 和 *chiE* 间由翻译终止子和 27 bp 序列所分割. 在 Etnangien 装配线中, 甚至存在多处模块分割现象.

两个独立多功能蛋白协调的模块, 如何像同一多功能蛋白模块那样执行功能? 目前, 有两种推测^[6], 即 a. 通过 2 个蛋白质紧密相互作用使得相关功能域能够依次被利用, 实现产物链的一轮延伸; b. 通过所谓“翻译越过(translational bypassing)”机制使 2 个紧邻开放阅读框得以连成一条肽链, 由此, 即使是断裂基因, 借由“translational bypassing”机制, 能翻译成一体的完整蛋白肽, 从而不受影响地完成化合物装配线产物链的一轮延伸. 模块分割型的鲜活实例, 给我们提出了一个新的课题: 它们是如何进化演变的? 又是如何具体调节操作的?

2.6.2 串联结构域型(tandem domains type). 20 例黏细菌模块 PKS/NRPS 中, 1/4 在模块内出现串联 AT、ACP、HC (heterocyclization, NRPS 中杂环化结构域)或 PCP 活性结构域. 如“2.2 反式 AT 型”中提及 myxovirescin 的 TaV 和 etnangien 的 EtnK 分别串联 2 个活性 AT 域(图 2), 推测负责不同底物的选择加载^[28, 31]. Ambruticin 装配线出现串联 ACP^[25], disorazol 出现串联 ACP 和 HC^[24]. Chivosazol 出现串联 ACP、HC 和 PCP(图 5c), 其中 2 个 PCP 域串联, 尚属首次报道^[26]. 2002 年, Marshall 等^[39]研究了弧菌 vibriobactin NRPS 模块中 VibF 蛋白(Cy1-Cy2-A-C1-PCP-C2)串联 Cy 域(heterocyclization, 亦缩写为 HC), 结果表明: 它们存在功能分工, 其中 Cy2 负责缩合形成酰胺键, Cy1 负责成环 / 脱水、完成杂环化. 2005 年, Rahman 等^[40]研究假单胞菌 Mupirocin 装配线串联 ACP 域表明: 二联体 ACP 域通过形成平行通路, 加快装配线流量, 三联体 ACP 则在执行功能时以串并联交替方式进行, 同样达到加快装配线流量的目的. 由此推测, 黏细菌来源的这些串联结构域同样存在功能分工或加快装配线流量的功效, 但至今

尚无一例黏细菌来源的相关实验证据。

2.6.3 特殊组织型(special organization type). 经典模块的结构域排列通常是 KS-AT-(DH-ER-KR)-ACP 或 C-A-PCP 模式, 但黏细菌中有的模块在排列结构上也很特殊, 如, Chivosazol 模块 5、11 和 15

结构域以 KS-DH-ACP-KR 方式组织排列, 模块 9 以 Cy-Cy-A-PCP-PCP-Ox 方式排列, 这些模块 C 端并非以 ACP 或 PCP, 而是 KR 或 Ox 修饰域结束(图 5c)。

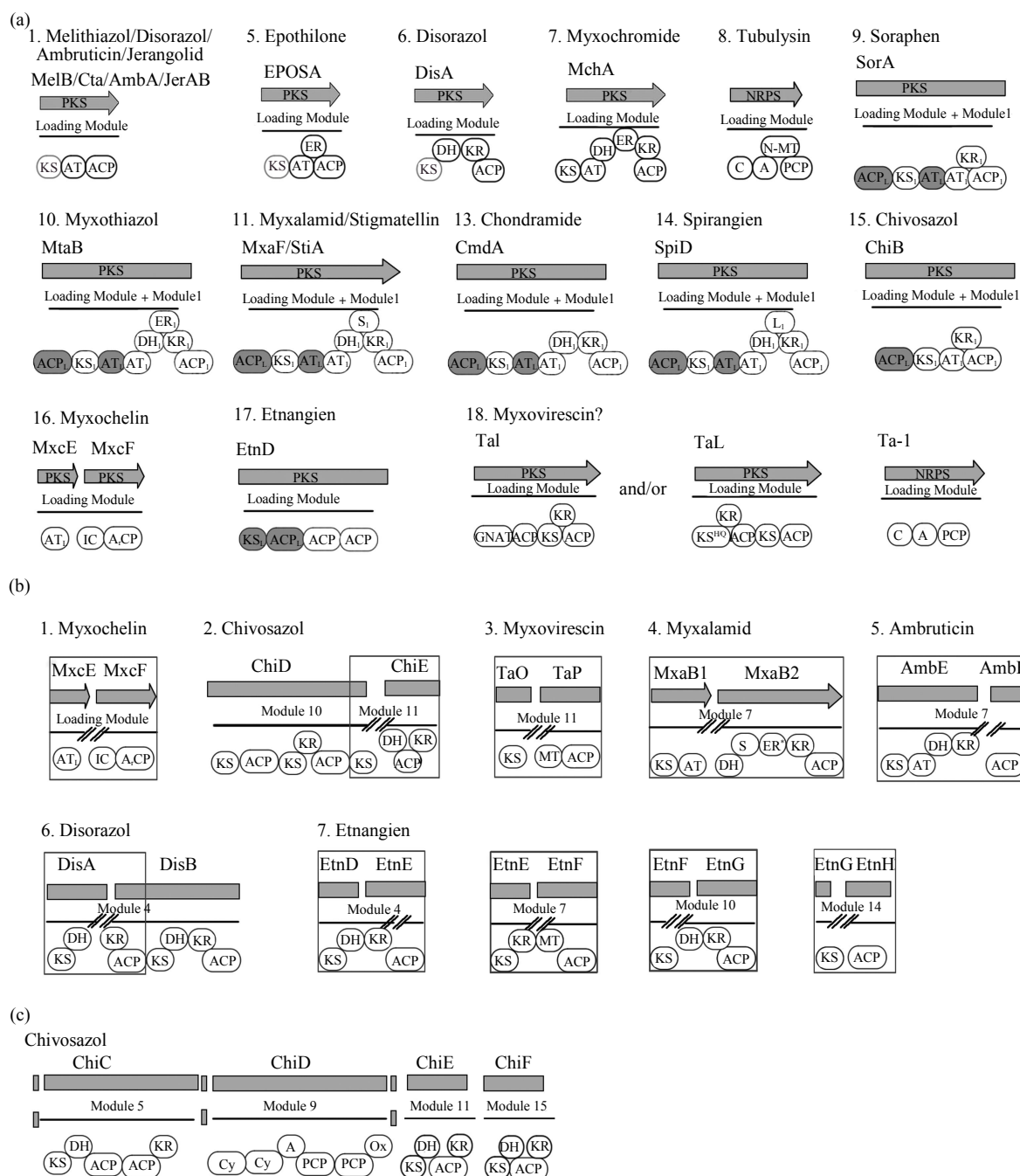


Fig. 5 Examples of special loading and extension type PKS/NRPS assembly lines from myxobacteria

图 5 黏细菌来源的特殊加载型和特殊延伸型装配线模块实例

(a) 特殊加载型^[14-21, 24-28, 30-31, 38]. (b) 模块分割型(被分割模块由方框突出, 分割点由斜杠表示^[16-17, 24-26, 28, 31]). (c) 串联结构域型和特殊组织型(完整 ORF 由箭头表示, 不完整 ORF 用方框表示^[26]).

2.7 特殊建材型(special building block type)

某些黏细菌 PKS/NRPS 装配线可以合成和利用特殊建筑材料, 这些材料的选择取决于模块内 AT 或 A 结构域. Soraph A 装配线^[19]加载模块的 AT_L 域特异选择苯酰-CoA 作为起始单元, 选择特异性已通过组合生物学实验得到证实, 放射性标记实验证实底物苯酰-CoA 由苯丙氨酸衍生而来. Soraph A 装配线模块 3 和 7 中 AT 域能够特异性选择利用甲氧丙二酰-CoA, 甲氧丙二酰-CoA 单元由装配线上游 SorC, D 和 E 3 个蛋白质联合催化加工甘油酸盐(或酯)(glycolate)产生, 有趣的是, 反方向 SorC 以空前的 AT-ACP-MT 组织形式呈现, 负责将加工好的延伸单元搬运给模块 3 和 7 利用. Tubulyisin^[21]起始单元为哌可啉酸, 由环化脱氨酶(由装配线上游 *TubZ* 编码)催化赖氨酸产生. Chondramide^[27]生物合成过程中吸收 β -tyrosine 为底物, 天然氨基酸大部分是 α -氨基酸, 而 β -tyrosine 在自然界中相对稀少, 该底物由装配线下游 CmdF 蛋白编码的氨基变位酶(TAM)催化形成, Chondramide 装配线下游 CmdE 能够编码稀有色氨酸 2- 卤化酶, 由此, 在 Chondramide 发酵产物中能检测到含 2- 氯-色氨酸基团的类似物. Myxothiazol^[14]起始单元异戊酰-CoA, Melithiazol^[20]脱氢异丁酰-CoA 起始单元, Myxalamid^[17]异丁酰-CoA 起始单元和 2- 甲基-丁酰-CoA 延伸单元, Etnangien^[31]丁二酸单酰-CoA (Succinyl-CoA), 这些都是有别于传统建筑材料丙二酰-CoA 或甲基丙二酰-CoA 的特殊装配单元.

2.8 特殊终止型(special terminate type)

经典装配线末端由 TE 域催化产物以线性、环状、支环形式释放并终止装配, 然而, 近年却发现独特的释放域与释放机制, 尤其黏细菌来源的某些装配线表现出非常罕见的释放反应(图 6). 体内外联合研究发现, Myxothiazol^[41]和 Melithiazol^[20]装配线中存在空前的酰胺释放和链终止反应: 装配线末端 NRPS 模块催化甘氨酸单元延伸后, 经进一步氧化修饰产生了不稳定中间体, 中间体随即降解, 降解产物之一为目标化合物, 而 TE 结构域所释放的是中间体降解后残留的乙醛酸. Myxochelin^[16]生物合成装配线也存在特殊终止机制, 体外重组研究表明, 末端还原域(Red)催化硫酯还原并释放产生最终的醇类, 化合物 Myxalamide^[17]和 Saframycin^[12]似乎也经这种释放机制产生. 基于培养标记实验和基因簇分析, 在 Stigmatellin^[18]装配线中发现一种形成色酮环的新 PKS 链释放机制, 其模块 C 端新颖 Cy 域(cyclization, 环化)(该结构域在数据库中找不到

同源性)可将终产物环化释放, 其释放机制尚需进一步实验支持. 2010 年, 本课题组在自主分离的 Epothilones 产生菌 So0157-2 中鉴定到 14 元环、18 元环^[42-43]和 16 元开环 Epothilones 类似物^[44], 它们与主产物 16 元环 Epothilones 碳原子总数相同, 因环化释放位点的差异造成了结构差异, 展示了 Epothilones 装配线环化释放机制的灵活性, 这种灵活性造就了同一基本结构的大量衍生物, 相关机理尚待进一步阐明.

2.9 特殊修饰型(special modification type)

产物从 PKS/NRPS 多酶复合体上释放后, 通常需要经历甲基化、羟基化和糖基化等修饰以获得生物学活性, 然而黏细菌来源的天然产物多发生在装配过程中, 装配后修饰较少.

2.9.1 甲基化修饰(methylation modification). 已报道的黏细菌模块 PKS/NRPS 中 90% 都存在甲基化(仅 myxochelin 和 myxalamid 无甲基化修饰). 依甲基化修饰发生的时空不同, 可分成 3 类: 第一类, 装配后甲基化修饰, 这类甲基化酶通常位于装配线末端, 于放线菌来源的装配线中最常见, 黏细菌中并不多, 目前仅 Soraphen^[19]和 Chivosazol^[26]; 第二类, 甲基化修饰域在装配线内, 依装配线顺次, 在装配过程中发生甲基化, 这类于黏细菌中最常见, 约占 78%; 第三类, 反式-MT 型, 这类甲基化酶并不在装配线内, 但在装配过程中对中间产物执行甲基化修饰(非装配后修饰), 如化合物 Saframycin^[12]、Ambruticins^[25]和 Jerangolids^[25]. 另一角度, 依甲基化修饰位点不同, 黏细菌装配线的甲基化又可分为碳甲基化(C-methyl transferase domain, CMT)、氧甲基化(O-methyl transferase domain, OMT)和氮甲基化(N-methyl transferase domain, NMT). 此外, 在黏细菌 myxovirescin^[28]和 etnangien^[31]装配线中还发现由 HMG-CoA 介导的特殊甲基化修饰.

2.9.2 糖基化修饰(glycosylation modification). 目前黏细菌中仅鉴定出几例糖苷化合物. 唯一实验定性的糖基转移酶是 sorangicin 的 SorF, 它可将多种底物转移到糖苷配基 sorangicin 上^[45]. 黏细菌化合物 Chivosazols A-E^[26]存在糖基修饰, 但在装配线内及上下游找不到对应的糖基转移酶. 2008 年, 我们在国际上首次报道了 So0157-2 来源稳定存在的糖基化埃博霉素^[46-48], 同样在装配线内及上下游没有发现可能的糖基转移酶. 推测化合物 Chivosazols 和 epothilone 的糖基转移酶基因与基因簇并不偶联, 呈反式作用模式.

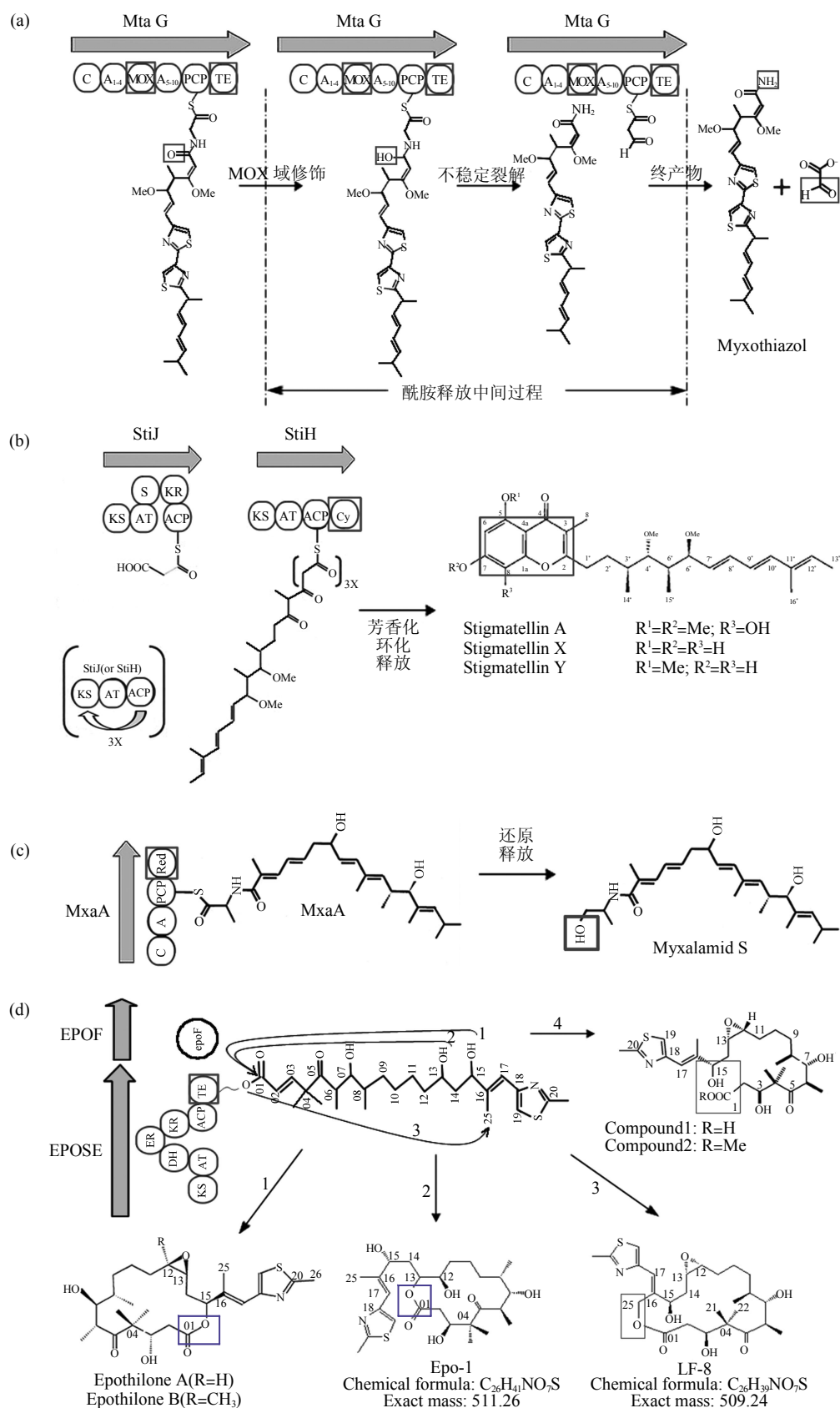


Fig. 6 Special terminator type of PKS/NRPS assembly lines from myxobacteria

图 6 黏细菌来源的特殊终止型 PKS/NRPS 实例

(a) 以 Myxothiazol 为例不稳定中间体介导的产物释放^[41]. (b) Stigmatellin 中 Cy 域介导的终止释放^[18]. (c) 以 Myxalamid 为例还原酶介导的链终止释放^[17]. (d) 以 Epothilones 为例不同位点介导的环化释放(终止释放域和释放产物基团用方框标识^[15, 42-44]).

2.9.3 其他反式修饰型(other trans-gene type). 除糖基转移酶外, 在部分黏细菌装配线中发现某些生物合成所必需的特定基因在核心基因簇中找不到, 推测这些特定基因可能位于产生菌基因组的其他位点呈反式作用型. 如, Tubulysin^[21]装配线中负责将待释放前体进行氧化(oxidized)和酰基化(acylation)的酶在已鉴定装配线区未预测到相关编码基因, Disorazol^[24]衍生物生成所需的环氧化、羟基化、甲基化和酰基化修饰酶也未在装配线核心区找到. 这些推测的反式基因型, 目前仅在黏细菌中报道, 尚待实验验证^[6].

3 总结与展望

综上所述, 黏细菌来源的 PKS/NRPS 装配线特征远较以前所认知的经典模式丰富. 黏细菌的不同新颖装配模式并非孤立出现, 某一装配线往往涉及多种特殊模式组合(表 1), 如 Stigmatellin 既是模块反复加工型、特殊加载型、结构域跳跃型, 同时还是特殊终止型和修饰型, Chivosazol 是混杂型、反式 AT 型、结构域反复加工型、特殊加载型、模块分割型、结构域跳跃型和串联结构域型等等. 这些 PKS/NRPS 装配线的特殊复杂性对基于装配线组织形式推测其装配产物结构带来极大困扰. 但也正因如此, 黏细菌 PKS/NRP 装配线所涉及独特基因素材、酶学素材与装配线模式给传统遗传、生化、组合生物合成和进化学研究注入了新的生机. 另一方面, 这些新颖特性及其不同组合方式, 更进一步增加了天然 PKS/NRPs 化合物结构和功能的多样性, 决定了黏细菌资源在寻求新颖先导结构化合物进行药物开发的重要地位.

然而, 黏细菌的难操作性(如: 黏细菌分离纯化困难、缺乏高效遗传操作系统、液体细胞不生长或聚团生长等)^[2]仍是充分开发利用该资源宝库所面临的现实挑战. 2006 年以来, 黏细菌基因组数据的陆续公布为充分认识开发黏细菌 PKS/NRPS 生物合成潜能提供了契机. 据部分微生物基因组数据统计, 黏细菌拥有最多的 PKS/NRPS 基因簇信息^[49]. 除厌氧黏细菌(*Anaeromyxobacter* spp.)外, 已公布的黏细菌基因组数据均大于 9M, 其中每例基因组所包含的 PKS/NRPS 基因簇装配线均在 10 个以上(*M. xanthus* DK1622, 18 例^[4]; *S. cellulosum* So ce56, 13 例^[50]; *S. aurantiaca* DW4/3-1, 14 例), 然而, 从这些菌株中已鉴的相关化合物却最多不过 5 例^[4], 这揭示了黏细菌基因组次级代谢产物合成潜能及以

往开发手段的局限, 以及黏细菌作为药源菌的持续开发潜力. 以黏球菌模式株 *M. xanthus* DK1622 为例, 2005 年以前, 未曾在该菌中鉴定到任何 PKS/NRPS 产物, 2006 年该菌基因组数据展示了 18 例 PKS/NRPS 装配线, 转录组和蛋白质组实验结果表明, 其中 17 例在实验条件下表达, 然而截至目前, 仅从该菌株中鉴定了 5 例装配线及其对应产物^[4], 即仍有大量 PKS/NRPS 装配线产物有待鉴定与功能开发. 近年来, 发展的基于基因组序列挖掘新颖天然产物策略可为黏细菌基因组资源开发提供借鉴^[51], 包括: a. 预测装配线产物的理化特征, 借助理化特征针对性靶向筛选目标产物; b. 预测装配线底物, 借助标记底物的跟踪发现目标产物; c. 预测装配线酶活及其利用底物, 避开原始菌遗传操作的困难, 在体外无细胞体系中重建整个生化装配过程, 得到目标产物; d. 预测装配线, 在野生菌中进行基因敲除获得突变株, 比较野生菌和突变株的代谢谱图差异, 发现目标产物; e. 预测整个装配线, 在异源宿主中表达, 比较异源宿主中野生菌和突变株的代谢谱图差异, 发现目标产物; f. 预测整个装配线及其调控蛋白, 通过改造调节基因和改造沉默调控蛋白, 比较野生菌和突变株的代谢谱图差异, 找到目标产物. 这些策略都是从获得序列后的生物信息学分析出发, 操作应用中各有优缺点, 需综合考虑^[51]: 装配线产物理化特征能预测的精确程度、装配线底物特异性能预测的精确程度、装配线大小、装配线所在原始宿主或异源宿主的遗传操作体系成熟度、装配线在实验条件下是否表达、装配线附近能否预测到相关调节基因或沉默蛋白等.

参 考 文 献

- [1] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. FEMS Microbiol Rev, 2000, **24**(4): 403-427
- [2] Shimkets L J, Dworkin M, Reichenbach H. The Myxobacteria. The Prokaryotes, New York: Springer, 2005: 1-94
- [3] Gerth K, Pradella S, Perlova O, *et al.* Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. J Biotechnol, 2003, **106**(2-3): 233-253
- [4] Wenzel S C, Muller R. Myxobacteria-'microbial factories' for the production of bioactive secondary metabolites. Mol Biosyst, 2009, **5**(6): 567-574
- [5] Pronzato P. New therapeutic options for chemotherapy-resistant metastatic breast cancer: The epothilones. Drugs, 2008, **68** (2): 139-146

- [6] Wenzel S C, Muller R. Myxobacterial natural product assembly lines: Fascinating examples of curious biochemistry. *Nat Prod Rep*, 2007, **24**(6): 1211–1224
- [7] Cane D E, Walsh C T, Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: Combinations, permutations, and mutations. *Science*, 1998, **282**(5386): 63–68
- [8] Hopwood D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev*, 1997, **97**(7): 2465–2497
- [9] Khosla C, Gokhale R S, Jacobsen J R, *et al.* Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu Rev Biochem*, 1999, **68**: 219–253
- [10] 黎志凤, Nguimbi E, 李越中, 等. 埃博霉素 (Epothilones) 的 PKS/NRPS 杂合基因簇. *生物工程学报*, 2003, **19**(5): 511–515
Li Z F, Nguimbi E, Li Y Z, *et al.* *Chin J Biotechnology*, 2003, **19**(5): 511–515
- [11] Li Z F, Zhao J Y, Xia Z J, *et al.* Evolutionary diversity of ketoacyl synthases in cellulolytic myxobacterium *Sorangium*. *Syst Appl Microbiol*, 2007, **30**(3): 189–196
- [12] Pospiech A, Cluzel B, Bietenhader J, *et al.* A new *Myxococcus xanthus* gene cluster for the biosynthesis of the antibiotic saframycin Mx1 encoding a peptide synthetase. *Microbiology*, 1995, **141**(Pt 8): 1793–1803
- [13] Paitan Y, Alon G, Orr E, *et al.* The first gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase. *J Mol Biol*, 1999, **286**(2): 465–474
- [14] Silakowski B, Schairer H U, Ehret H, *et al.* New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem*, 1999, **274**(52): 37391–37399
- [15] Molnar I, Schupp T, Ono M, *et al.* The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol*, 2000, **7**(2): 97–109
- [16] Gaitatzis N, Kunze B, Muller R. *In vitro* reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(20): 11136–11141
- [17] Silakowski B, Nordsiek G, Kunze B, *et al.* Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: The myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga15. *Chem Biol*, 2001, **8**(1): 59–69
- [18] Gaitatzis N, Silakowski B, Kunze B, *et al.* The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J Biol Chem*, 2002, **277**(15): 13082–13090
- [19] Ligon J, Hill S, Beck J, *et al.* Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26. *Gene*, 2002, **285**(1–2): 257–267
- [20] Weinig S, Hecht H J, Mahmud T, *et al.* Melithiazol biosynthesis: further insights into myxobacterial PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of methyl transferases. *Chem Biol*, 2003, **10**(10): 939–952
- [21] Sandmann A, Sasse F, Muller R. Identification and analysis of the core biosynthetic machinery of tubulysin, a potent cytotoxin with potential anticancer activity. *Chem Biol*, 2004, **11**(8): 1071–1079
- [22] Wenzel S C, Kunze B, Hofle G, *et al.* Structure and biosynthesis of myxochromides S1-3 in *Stigmatella aurantiaca*: Evidence for an iterative bacterial type I polyketide synthase and for module skipping in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chembiochem*, 2005, **6**(2): 375–385
- [23] Feng Z, Qi J, Tsuge T, *et al.* Construction of a bacterial artificial chromosome library for a myxobacterium of the genus *Cystobacter* and characterization of an antibiotic biosynthetic gene cluster. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**(7): 1372–1380
- [24] Kopp M, Irschik H, Pradella S, *et al.* Production of the tubulin destabilizer disorazol in *Sorangium cellulosum*: Biosynthetic machinery and regulatory genes. *Chembiochem*, 2005, **6**(7): 1277–1286
- [25] Julien B, Tian Z Q, Reid R, *et al.* Analysis of the ambruticin and jerangolid gene clusters of *Sorangium cellulosum* reveals unusual mechanisms of polyketide biosynthesis. *Chem Biol*, 2006, **13**(12): 1277–1286
- [26] Perlova O, Gerth K, Kaiser O, *et al.* Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* So ce56. *J Biotechnol*, 2006, **121**(2): 174–191
- [27] Rachid S, Krug D, Kunze B, *et al.* Molecular and biochemical studies of chondramide formation—highly cytotoxic natural products from *Chondromyces crocatus* Cm c5. *Chem Biol*, 2006, **13**(6): 667–681
- [28] Simunovic V, Zapp J, Rachid S, *et al.* Myxovirescin A biosynthesis is directed by hybrid polyketide synthases/nonribosomal peptide synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases, and trans-acting acyltransferases. *Chembiochem*, 2006, **7**(8): 1206–1220
- [29] Wenzel S C, Meiser P, Binz T M, *et al.* Nonribosomal peptide biosynthesis: Point mutations and module skipping lead to chemical diversity. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, **45**(14): 2296–2301
- [30] Frank B, Knauber J, Steinmetz H, *et al.* Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes. *Chem Biol*, 2007, **14**(2): 221–233
- [31] Menche D, Arikan F, Perlova O, *et al.* Stereochemical determination and complex biosynthetic assembly of etnangien, a highly potent RNA polymerase inhibitor from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(43): 14234–14243
- [32] Schupp T, Toupet C, Cluzel B, *et al.* A *Sorangium cellulosum* (myxobacterium) gene cluster for the biosynthesis of the macrolide antibiotic soraphen A: cloning, characterization, and homology to polyketide synthase genes from actinomycetes. *J Bacteriol*, 1995, **177**(13): 3673–3679
- [33] Jenke-kodama H, Sandmann A, Muller R, *et al.* Evolutionary Implications of Bacterial Polyketide Synthases. *Mol Biol Evol*, 2005, **22**(10): 2027–2039

- [34] Hopkins C D, Wipf P. Isolation, biology and chemistry of the disorazoles: New anti-cancer macrodialdes. *Nat Prod Rep*, 2009, **26**(5): 585-601
- [35] Hardt I H, Steinmetz H, Gerth K, *et al.* New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J Nat Prod*, 2001, **64**(7): 847-856
- [36] Tang L, Ward S, Chung L, *et al.* Elucidating the mechanism of cis double bond formation in epothilone biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(1): 46-47
- [37] Wenzel S C, Muller R. Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: Deviations from textbook biosynthetic logic. *Curr Opin Chem Biol*, 2005, **9**(5): 447-458
- [38] Carvalho R, Reid R, Viswanathan N, *et al.* The biosynthetic genes for disorazoles, potent cytotoxic compounds that disrupt microtubule formation. *Gene*, 2005, **359**(0): 91-98
- [39] Marshall C G, Hillson N J, Walsh C T. Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF. *Biochemistry*, 2002, **41**(1): 244-250
- [40] Rahman A S, Hothersall J, Crosby J, *et al.* Tandemly duplicated acyl carrier proteins, which increase polyketide antibiotic production, can apparently function either in parallel or in series. *J Biol Chem*, 2005, **280**(8): 6399-6408
- [41] Gaitatzis N, Hans A, Muller R, *et al.* The mtaA gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem*, 2001, **129**(1): 119-124
- [42] Lu C, Liu X, Li Y, *et al.* Two 18-membered epothilones from *Sorangium cellulosum* So0157-2. *J Antibiot (Tokyo)*, 2010, **63**(9): 571-574
- [43] 鲁春华, 李越中, 刘新利, 等. 18 元或 14 元大环内酯类埃博霉素化合物及其应用: 中国; 美国; 欧盟; 日本, 201010011840. 2010-06-23
Lu C H, Li Y Z, Liu X L, *et al.* 18 or 14 membered ring epothilones macrolides compounds and their application: China; USA; EU; Japan, 201010011840. 2010-06-23
- [44] Zhao L, Zhao B B, Lu C H, *et al.* Two Epothilones from *Sorangium cellulosum* Strain So0157-2. *Chin J Nat Med*, 2010, **8**(4): 298-300
- [45] Kopp M, Rupprath C, Irschik H, *et al.* SorF: a glycosyltransferase with promiscuous donor substrate specificity *in vitro*. *Chembiochem*, 2007, **8**(7): 813-819
- [46] 赵 林, 鲁春华, 李越中, 等. 埃博霉素苷类化合物和以其为活性成分的组合物及其应用: 中国; 美国; 欧盟; 日本, 200810157514. 2009-02-11
Zhao L, Lu C H, Li Y Z, *et al.* Epothiloneosides & compositions comprised of their active ingredients and their application: China; USA; EU; Japan, 200810157514. 2009-02-11
- [47] Wang J, Zhang H, Ying L, *et al.* Five new epothilone metabolites from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2. *J Antibiot (Tokyo)*, 2009, **62**(9): 483-487
- [48] Zhao L, Li P F, Lu C H, *et al.* Glycosylation and production characteristics of epothilones in alkali-tolerant *Sorangium cellulosum* strain So0157-2. *J Microbiol*, 2010, **48**(4): 438-444
- [49] Bode H B, Muller R. The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, **44**(42): 6828-6846
- [50] Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, *et al.* Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(11): 1281-1289
- [51] Zerikly M, Challis G L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem*, 2009, **10**(4): 625-633

Novel Characters of Myxobacterial Modular Natural Product Assembly Lines*

ZHU Li-Ping, Li Zhi-Feng**, HAN Kui, LI Shu-Guang, LI Yue-Zhong

(State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Myxobacteria are noted for their capabilities of synthesizing series of natural products with diverse structures and novel functions. Modular polyketide synthase (PKS) and non ribosomal peptide synthetase (NRPS) are the major natural products of myxobacteria. Compared to classical modular PKS/NRPS, myxobacteria modular PKSs/NRPSs usually show novel assembly features, exhibiting diverse genetic assembly potential and abundant product structure varieties. This review classified novel characters of Myxobacterial PKSs/NRPSs assembly lines and further illustrated their corresponding structure features, revealed their vital and potential in genetics, biochemistry, combination biosynthesis, evolution and drug research areas, and also forecasted their opportunities coming with genome era.

Key words myxobacteria, natural products, polyketide synthase (PKS), non ribosomal peptide synthetase (NRPS), modular

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00325

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30900027, 30911120028) and The Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China-New teacher fund (200804221017).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88363735, E-mail: lizhifeng@sdu.edu.cn

Received: July 12, 2011 Accepted: September 21, 2011