第619次学术讨论会·化学与化工: 物质科学前沿交叉

林可酰胺类抗生素的生物合成研究进展

钟冠男, 陈华, 刘文*

中国科学院上海有机化学研究所, 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032

* 联系人, E-mail: wliu@mail.sioc.ac.cn

2018-10-15 收稿, 2018-11-18 修回, 2018-11-19 接受, 2019-01-17 网络版发表

国家自然科学基金重点项目(21621002)、中国科学院前沿科学重点研究计划(QYZDJ-SSW-SLH037)和上海市科学技术委员会重点项目(17JC1405100)资助

摘要 林可酰胺类抗生素是一类具有独特化学结构以及良好生理学活性的天然产物, 由链霉菌通过一类庞大且复杂的生物合成基因簇产生。尽管林可酰胺类抗生素早在数十年前就已经被发现并应用于临床, 但对它们的生物合成机制的研究直到最近几年才有较大的突破。本文主要总结了近几年林可酰胺类抗生素的生物合成研究进展, 并以此为基础, 阐述了关于林可酰胺类抗生素的结构多样性研究与产生菌的工业改造。

关键词 林可酰胺, 生物合成, 结构多样性, 林可链霉菌的工业改造

林可酰胺类抗生素由一个独特的C1位硫取代的八碳糖单元以及一个(反式正丙基)脯氨酸单元通过中间的酰胺键连接而成。自然界中, 目前已知的天然来源的林可酰胺类化合物种类很少, 仅包含4种化合物: 林可霉素A(lincomycin A, **1**)、林可霉素B(lincomycin B, **2**)、天青菌素(celesticetin, **3**)和Bu-2545(**4**) (图1)。在上述化合物中只有林可霉素A对革兰氏阳性菌具有良好的抗菌活性, 而其他3种化合物的抗菌活性均较低^[1]。目前, 人们通过化学合成、半合成或生物发酵的方法已经获得数百种林可霉素A的衍生物^[2,3]。绝大多数衍生物因其抗菌活性较低或者毒性太大而没有药用价值, 目前仅有克林霉素(clindamycin, **5**)和林可霉素A能成功应用于临床医疗^[4]。克林霉素是将林可霉素A的C7位羟基进行氯取代并发生构型翻转形成的7-表林可霉素, 该化合物显现出比林可霉素A更好的抗菌活性。

林可酰胺类抗生素主要作用于敏感菌的50S核糖体亚基, 通过模拟(de)acetyl-tRNA的3'端, 在肽链延伸循环的初始阶段抑制蛋白质的合成, 从而发挥抗

菌活性^[5,6]。尽管大环内酯类抗生素(macrolides)、林可酰胺类抗生素和链阳霉素(streptogramins)在化学结构上相差很大, 但这三类抗生素的抗菌机制和耐药菌的耐药机制却非常相似, 因此林可酰胺类抗生素的耐药菌同时对大环内酯类抗生素和链阳性菌素具有耐药性, 三类抗生素之间呈现交叉耐药性。其耐药性是由于耐药菌体内的甲基转移酶将23S rRNA第2058位腺嘌呤的第6位氮原子进行单甲基化或双甲基化而造成的, 这类修饰作用使得核糖体与上述3种抗生素的结合能力下降。如果是单甲基化, 仅对林可酰胺类抗生素具有较高的耐药性, 如果是双甲基化, 对上述3种抗生素均呈现较高的耐药性^[7]。

虽然林可酰胺类抗生素在临床应用已有近半个世纪的历史, 但其生物合成机制却迟迟未被阐明。直到近几年以来, 这一类化合物的生物合成机制研究才取得重大的突破, 目前已有许多综述对此进行了详细的总结^[8-10]。本文则主要关注于林可酰胺类抗生素生物合成研究的最新进展, 以及在了解生物合成机制的基础上对其进行的结构多样性研究和林可链

引用格式: 钟冠男, 陈华, 刘文. 林可酰胺类抗生素的生物合成研究进展. 科学通报, 2019, 64: 499-513

Zhong G N, Chen H, Liu W. Recent advances in the biosynthesis of lincosamide antibiotics (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 499-513, doi: 10.1360/N972018-01024

图1 林可酰胺类抗生素及其他含有4-烷基-L-脯氨酸衍生物的天然产物. C1位硫取代的八碳糖和4-烷基-L-脯氨酸分别用蓝色和红色标注
Figure 1 The structure of lincosamides and other natural products containing 4-alkyl-L-proline derivatives. The C1 mercapto-substituted 8-carbon sugars and 4-alkyl-L-prolines are highlighted in blue and red, respectively

霉菌的工业改造.

1 林可酰胺类抗生素及其相关化合物生物合成基因簇的比较

1995年, 由Peschke等人^[11]首次于林可链霉菌

78-11(*Streptomyces lincolnensis* 78-11)中发现了林可霉素完整的生物合成基因簇. 此后, 越来越多的天然产物生物合成基因簇见诸报道, 包括天青菌素(ccb)^[12], 林可霉素(lmb, 来源于*S. lincolnensis* ATCC 25466)^[13], 安曲霉素(anthramycin, ant)^[14], poro-thramycin(por)^[15],

西伯利亚霉素(sibiromycin, *sib*)^[16], 妥梅霉素(tomaymycin, *tom*)^[17], limazepines(*lim*)^[18]和 hormaomycin(*hrm*)^[19](图1, 2)。

作为林可酰胺家族中的一员, 天青菌素在结构上与林可霉素类似, 同样含有C1位硫取代的八碳糖结构, 比较两者的生物合成基因簇, 可以发现在*ccb*和*lmb*中共有18个基因具有高度的同源性, 由此推测上述基因可能负责八碳糖结构的生物合成以及后续与氨基酸单元的缩合过程。在*ccb*中, 除*ccb1*(抗性基因)之外, 推测另外5个基因(*ccb1-5*)可能催化水杨酸的生物合成与上载以及C7位羟基的甲基化。

除林可霉素外, 在hormaomycin和5种吡咯并苯二氮卓类(pyrrolobenzodiazepine, PBD)化合物(安曲霉素、porothramycin、西伯利亚霉素、妥梅霉素、limazepines)中均含有与林可霉素相似的4-羟基-L-脯氨酸单元。比较上述6种化合物的生物合成基因簇, 发现在其基因簇中均存在或部分存在与*lmb*基因簇中*lmbA*, *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbW*, *lmbX*和*lmbY*同源的基因, 且在*ccb*基因簇中均不存在其同源基因(图2), 由此推测上述6个基因参与了4-羟基-L-脯氨酸单元的生物合成过程, 并且所有的4-羟基-L-脯氨酸单元可能采取

了相似的生物合成策略。

2 林可霉素与天青菌素中八碳糖单元生物合成的共性研究

在天然产物的生物合成过程中, 相似的基因和结构往往代表着其在生物体内采取了相似的合成策略。在林可霉素与天青菌素中均含有一个极为相似的C1位硫取代的八碳糖结构, 它们的生物合成过程也极为相似, 仅在最后几步有所不同。早期Brahme等人^[20]使用¹³C标记的D-葡萄糖进行的同位素喂养实验表明林可霉素中的八碳糖来自于己糖寡磷酸支路的五碳单元和一个三碳单元的缩合。2012年, Sasaki等人^[21]通过体外酶学实验证实了林可霉素八碳糖骨架形成的最初两步酶学转化过程, LmbR催化5-磷酸-D-核糖(D-ribose 5-phosphate, R5P, **16**)与6-磷酸-D-果糖(D-fructose 6-phosphate, F6P, **17**)或7-磷酸-D-景天庚酮糖(D-sedoheptulose 7-phosphate, S7P, **18**)的缩合形成8-磷酸D-赤-D-葡萄糖基-八碳糖(D-glycero-D-altro-octulose 8-phosphate(**19**)), 而后该化合物在LmbN的催化下发生异构反应得到8-磷酸D-甘油基-D-阿卓-辛酮糖(D-erythro-D-gluco-octose 8-phosphate

图2 相关生物合成基因簇的比较。ccb, 天青菌素基因簇; lmb, 林可霉素基因簇; ant, 安曲霉素基因簇; por, porothramycin基因簇; sib, 西伯利亚霉素基因簇; tom, 妥梅霉素基因簇; lim, limazepines基因簇; hrm, hormaomycin基因簇

Figure 2 Comparative analysis of available related biosynthetic gene clusters. *ccb*, celesticetin; *lmb*, lincomycin; *ant*, anthramycin; *por*, porothramycin; *sib*, sibiromycin; *tom*, tomaymycin; *lim*, limazepines; *hrm*, hormaomycin

(20)). 此后推测LmbP(激酶)催化化合物**20** C1羟基的磷酸化生成1,8-二磷酸八碳糖(octose 1,8-bisphosphate, **21**). 之后的体外酶学实验证实该中间体可以被LmbK(磷酸化酶)水解产生1-磷酸八碳糖(octose 1-bisphosphate, **22**), 核苷酸转移酶LmbO将中间体**22**转化为二磷酸鸟苷(guanosine diphosphate, GDP)活化的八碳糖(**23**)(图3(a))^[22]. 目前, 中间体**23**, **24**的转化过程依旧不清楚.

最近, 本课题组报道了由2个小分子硫醇参与中间体**24**后续的生物合成过程. 其中一个小分子硫醇

为麦角硫因(ergothioneine, EGT), 该硫醇作为一个组氨酸甜菜碱衍生物在动植物中发挥多种生理学活性^[23]. 另一个小分子硫醇放线硫醇(mycothiols, MSH)作为一种半胱氨酸假多糖(cysteiny pseudo-disaccharide), 是一种在革兰氏阳性菌中居于主导的硫醇, 其生理学活性与我们所熟知的谷胱甘肽(glutathione, GSH)相同^[24]. 糖基转移酶LmbT催化了第一步糖基转移反应, 将GDP活化的八碳糖(**24**)转化为EGT中硫原子结合的八碳糖(**25**). 之后林可霉素或天青菌素中的吡咯环与**25**中八碳糖的氨基缩合形成酰胺键

图3 (网络版彩色)林可霉素与天青菌素八碳糖结构生物合成的共同途径. (a) 八碳糖生物合成的前期途径. (b) 林可酰胺生物合成过程中EGT和MSH的不同功能

Figure 3 (Color online) General octose biosynthesis of lincomycin and celesticetin. (a) The early steps of octose biosynthesis. (b) Different roles of EGT and MSH in lincosamides biosynthesis

(26/27)(第5节). 而后由一种新型的糖基转移酶LmbV催化了一个特殊的硫糖基化或者说是硫醇交换反应, 即将EGT活化的八碳糖(26/27)的糖基转移到MSH的巯基, 得到与MSH中硫原子结合的八碳糖(28/29). 之后该中间体被LmbE水解, 脱除二糖单元形成硫醚氨酸(mercapturic acid, 30/31)(图3(b)). 值得一提的是在八碳糖部分的生物合成过程中, 两个小分子硫醇EGT和MSH发挥了两种不同的功能, EGT作为一个特殊的小分子载体介导了八碳糖单元的活化、转移和修饰; 而MSH则与EGT发生硫醇交换成为硫元素的供体. 作为位居碳、氢、氧、氮和磷之后的第六大元素, 硫元素为生命所必需并广泛存在于各种生物体系中, 但是对于如何将其有效引入活性功能分子的生化机制却知之甚少. 小分子硫醇通过两个罕见的S-糖苷化反应主导了林可霉素的生物合成进程, 不但代表了EGT参与生化反应的首个范例, 而且提供了一种MSH依赖的硫元素引入的新模式^[25,26].

硫醚氨酸中间体(30/31)在一个未知蛋白的催化下脱除氮乙酰基, 之后S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)依赖的甲基转移酶LmbJ催化中间体32/33吡咯环的氮甲基转移反应生成34/35(图4). 此外, 中间体30和N-脱甲基林可霉素(N-demethylincomycin, NDL)也可以在LmbJ的催化下在相同位置引入甲基, 说明LmbJ具有较好的底物容忍性^[27]. 到目前为止, 林可酰胺类抗生素中八碳糖结构单元的生物合成过程几乎完全相同, 区别仅在于吡咯环单元是否含有正丙基侧链.

3 林可霉素与天青菌素中八碳糖生物合成的个性研究

林可霉素和天青菌素生物合成的分支点在于一对同源蛋白LmbF和CcbF, 两者均是磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)依赖的蛋白. 这一对序列上高度同源但活性截然不同的蛋白(CcbF和LmbF)决定了不同的半胱氨酸基团剪切方式, 再在不同的后修饰酶的协同作用下, 最终生成了林可霉素和天青菌素中不同的硫修饰结构.

在林可霉素的生物合成中, LmbF通过PLP依赖的 β -消除催化C-S键的断裂反应(图4(a)). 首先, PLP的醛基与34的氨基缩合形成席夫碱(中间体36), 而后该中间体的 α -H被攫取, 再经历一系列的电子迁移, 导致C-S键断裂形成38, 最终再由SAM依赖的甲基

转移酶LmbG催化巯基的甲基转移反应生成林可霉素A. 而LmbF的副产物, 中间体39发生水解释放PLP, 丙酮酸和NH₃^[27,28].

与LmbF不同的是, CcbF催化的是一个PLP依赖的氧化脱氨反应(图4(b)). 首先, 中间体35上的氨基与PLP的醛基发生缩合得到席夫碱(中间体40), 紧接着末端羧基脱除得到中间体41, 之后该中间体的醛亚胺与O₂之间发生单电子迁移, 形成过氧负离子并与醛亚胺的C α 位相连接(43). 在释放PLP之后, 中间体44消除一分子的H₂O₂, 最后得到的亚胺水解后生成醛基(46). 该化合物在Ccb4(NADPH依赖的还原酶)和Ccb5(SAM依赖的甲基转移酶)的催化下发生醛基的还原和C7位羟基的甲基化生成中间体47^[28,29]. Ccb2(水杨酸-AMP连接酶)负责催化水杨酸的腺苷化, 然后在Ccb1(酰基转移酶)以及辅酶A(CoA)的参与下与中间体47缩合形成天青菌素^[30].

对于天然产物Bu-2545而言, 尽管该化合物的生物合成基因簇目前尚未被报道, 但有实验表明该化合物的生物合成融合了林可霉素和天青菌素的生物合成途径(图4(c)). 中间体35依次在LmbF, LmbG和Ccb4的催化下, 先后发生PLP依赖的C-S键断裂以及两步SAM依赖的甲基转移反应(C1位巯基和C7位羟基)即可生成Bu-2545, 该化合物的存在也表明林可酰胺生物合成相关的蛋白具有较好的底物容忍性^[28].

4 林可霉素A分子中反式4-正丙基-L-脯氨酸单元的生物合成

与天青菌素和Bu-2545相比, 林可霉素A与之化学结构的最大差异在于吡咯环单元的C4位是否连接有一个正丙基基团, 在林可霉素A中这一吡咯环单元又被称为反式4-正丙基-L-脯氨酸(*trans* 4-propyl-L-proline, PPL). 尽管化学结构与L-脯氨酸相似, 但PPL来源于L-酪氨酸. 使用L-[1-¹⁴C]酪氨酸和L-[U-¹⁴C]酪氨酸进行的同位素喂养实验表明PPL的8个碳原子中有7个来源于L-酪氨酸, 而正丙基侧链末端的甲基碳原子来源于SAM^[31].

生物信息学分析表明, *lmbA*, *lmbB1*, *lmbB2*, *lmbW*, *lmbX*和*lmbY*参与了PPL单元的生物合成过程. 首先, 铁卟啉依赖的L-酪氨酸羟化酶(LmbB2)催化L-酪氨酸邻位的氧化反应生成L-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA, 52)^[32,33]. 之后由非卟啉铁依赖的双加氧酶(LmbB1)催化L-DOPA

图4 (网络版彩色)林可酰胺不同的硫磺后修饰途径. (a) 林可霉素生物合成的分支点和后修饰过程. (b) 天青菌素生物合成的分支点和后修饰过程. (c) 天青菌素生物合成中间体通过林可霉素生物合成途径产生天然产物Bu-2545

Figure 4 (Color online) Different pathway toward the distinct S-functionalization of lincosamides. (a) The branch point and post modifications of lincomycin. (b) The branch point and post modifications of celesticetin. (c) Processing celesticetin intermediate through lincomycin biosynthetic route yields the natural product Bu-2545

的苯环发生氧化开环, 生成一个醛基和一个羧基, 该醛基与氨基发生缩合生成吡咯环, 该化合物不稳定, 且为互变异构体, 存在烯胺(**53**)和亚胺(**54**)两种形式

(图5(a))^[34-37].

之后的生物合成途径涉及将化合物**53**或**54**末端的两碳单元(2-C)脱除. 长期以来, 差向异构酶LmbX

图 5 PPL 单元的生物合成. (a) PPL 的生物合成途径. (b) LmbA 及其同源蛋白的后修饰自催化断裂过程. (c) LmbA 及其同源蛋白催化 C-C 键断裂的机制
Figure 5 The biosynthesis of PPL moiety. (a) The biosynthetic pathway of PPL. (b) The post-translational autocatalytic cleavage of LmbA and its counterparts. (c) The mechanism of C-C bond cleavage catalyzed by LmbA and its counterparts

被认为催化了这一C-C键断裂反应^[37]. 最近本课题组发现林可链霉菌中两个与 γ -谷氨酰基转肽酶(γ -glutamyltranspeptidase, γ -GT)同源的蛋白: 特异性的LmbA和非特异性的LmbA2991催化化合物**53**末端的C-C键断裂反应产生乙二酸和一个烯胺形式的中间体(**56**), 该中间体不稳定, 可以自发异构为亚胺形式的中间体(**57**). 在对LmbA进行异源表达时无法获得其可溶性蛋白, 因此, 改用在*ant*基因簇中的同源蛋白Ant6替代LmbA进行体外酶学实验. 研究发现LmbA及其同源蛋白均属于N端亲和水解酶超家族(N-terminal nucleophile (Ntn)-hydrolase superfamily), 直接表达后的前体肽并没有催化活性, 该前体肽自催化其中一个酰胺键的水解生成L(Large)亚基和S(Small)亚基, 而后两个亚基结合形成异源二聚体, 该异源二聚体方具有催化活性(图5(b)), 具体催化过程如下. S亚基新产生的N端苏氨酸残基的羟基亲核进攻化合物**53**侧链的羰基, 催化C-C键的断裂生成中间体**56**和乙二酸单酰基酶, 后者被水解释放副产物乙二酸(图5(c)). 革兰氏阴性菌和真核生物中广泛存在着许多 γ -GT, 主要参与了GSH的代谢过程. 但是在革兰氏阳性菌中不存在GSH, 却存在有大量注释为 γ -GT的同源蛋白. LmbA及其同源蛋白的实验结果表明这些 γ -GT并非全部参与GSH的代谢, 而是具有一些尚不为人所知的新功能. 此外, 在多种革兰氏阳性菌的基因组中均存在*lmbA2991*的同源基因, 对于该基因的真实功能尚有待于进一步的研究^[38].

妥霉素和limazepines的吡咯环侧链部分均缺少一个碳甲基. 与之相对应的是在*tom*和*lim*基因簇中均不含有与*lmbW*, *ant5*, *por10*, *sibZ*和*hrmC*同源的基因. 在林可链霉菌中敲除*lmbW*, 该突变株不再产生林可霉素A, 而林可霉素B的产量却得到了明显的提高. 在该突变株中对*lmbW*的基因进行回补, 则又可以恢复林可霉素A的产生, 由此说明LmbW负责催化了PPL单元侧链末端的碳甲基化^[39]. 体外酶学实验表明, 在PPL的生物合成过程中, LmbA首先催化C-C键断裂反应生成**56**, 之后该中间体在LmbW作用下发生甲基转移反应生成化合物**58**(主要途径). 与**56**相似, **58**同样不稳定, 可以自发异构为亚胺形式(**59**). 此外, LmbW催化的甲基转移反应也可以发生在LmbA催化的C-C键断裂之前, 首先产生甲基转移产物**55**, 之后C-C键断裂生成**58**(次要途径)(图5(a))^[40].

PPL单元后续的生物合成途径目前仍不明确, 从

化学结构来看, 还原中间体**56/58**或者**57/59**中的共轭双键是必须的一步. *lmbY*编码一个F₄₂₀依赖的还原酶, 推测该酶与上述双烯体的还原有关^[37,41]. 根据体内基因敲除的结果, 推测LmbX与PPL中正丙基的构型有关^[41]. 对于上述两种蛋白的真实功能仍有待于进一步的研究(图5(a)).

5 林可酰胺类抗生素中八碳糖与吡咯环单元的缩合

对林可链霉菌中*lmbC*进行基因敲除, 可以在该突变株中积累中间体**25**和PPL单元. 在*lmbN*和*lmbD*缺失的突变株中也检测到相似的结果, 说明上述3个基因涉及到八碳糖与PPL单元的缩合过程^[25].

LmbC及其同源蛋白CcbC均为独立的腺苷化功能域, 且分别倾向于识别自身天然的底物: PPL或L-脯氨酸. 造成这种底物选择性差异的原因在于CcbC中底物识别位点附近的3个较大的氨基酸残基(V306, F205和Y244)在LmbC中被替换为较小的氨基酸残基(G308, A207和L246), 由此释放出的空间可用于容纳PPL末端的正丙基单元. 对CcbC中的3个氨基酸残基进行定点突变可以改变CcbC的底物选择性, 使CcbC倾向于识别PPL甚至带有更长侧链的烷基-L-脯氨酸^[42,43].

通过对LmbN进行blast分析发现该蛋白是一个双功能融合蛋白, 碳端编码一个糖基异构酶, 氮端编码一个酰基载体蛋白(peptidyl carrier protein, PCP). 由此LmbN还参与介导八碳糖与PPL的缩合. 有意思的是在*ccb*基因簇中, 该PCP功能域并非融合在CcbN中, 而是融合在CcbZ的碳端. 换言之, PCP功能域在*lmb*和*ccb*中采用了不同的融合方式^[25].

Lmb(Ccb)C/D/N的功能进一步被体外酶学实验所证实^[25]. LmbC/CcbC通过ATPs活化PPL/L-脯氨酸, 并将它们转移到LmbN/CcbZ的PCP功能域, 而后LmbD/CcbD催化它们与EGT活化的林可酰胺(**25**)发生类似于NRPS的缩合方式形成中间体**26/27**, 并从LmbN/CcbZ的PCP上解离(图6). 如果使用单独的LmbN蛋白氮端PCP功能域代替完整的LmbN蛋白催化酰胺键的缩合, 催化效率几乎没有影响, 说明LmbN蛋白中异构酶功能域与PCP功能域相互独立.

6 林可酰胺类抗生素的结构多样性研究

截至目前, 在林可酰胺类抗生素家族中仅发现

图6 (网络版彩色)EGT介导的八碳糖和吡咯环的缩合过程

Figure 6 (Color online) The condensation of EGT *S*-conjugate octose and pyrrole rings

4例天然来源的化合物, 种类之少令人难以置信. 幸运的是, 人们通过对林可酰胺类抗生素生物合成机制的研究, 进而对它们的生物合成途径进行合理的改造, 可以获得多种多样的具有独特生理学活性且不易被化学合成的林可酰胺结构类似物. Bu-2545的体外生物合成表明林可霉素和天青菌素两种不同的后修饰途径可以相互置换, 加之水杨酸上载蛋白(Ccb1, Ccb2)和吡咯环上载蛋白(LmbC/CcbC, LmbD/CcbD和LmbN/CcbZ中的PCP功能域)具有非常宽泛的底物容忍性, 打开了通过组合生物合成获取“非天然”的天然林可酰胺类抗生素的一扇大门.

天青菌素的生物合成中间体 35 可以被林可霉素生物合成途径所识别, 最终产生天然产物Bu-2545^[28]. 与之相对应, 林可霉素生物合成中间体 34 也可以被天青菌素生物合成中相关的蛋白所识别, 产生同时具有PPL单元和水杨酸的新型林可酰胺类化合物 67 和 68 ^[28,30](图7(a)). 除水杨酸之外, 另外26种苯甲酸衍生物同样可以被Ccb2和Ccb1所识别, 上载到中间体 65 和 66 八碳糖的末端羟基, 从而得到种类众多的林可酰胺类抗生素. 不仅如此, R_1 , R_2 和 R_3 基团的有无进一步扩大了林可酰胺类化合物的数量. 通过对上述因素的排列组合, 使用体外酶学实验的方法人们已经成功获得了超过150种新型的林可酰胺类抗生素(图7(b)). 通过比较林可霉素、天青菌素、化合物 47 , 65 , 67 和 68 对革兰氏阳性敏感菌*Kocuria rhizophila*

的抗菌活性, 发现水杨酸结构和PPL单元中的4-正丙基侧链对于林可酰胺类抗生素的抗菌活性具有重要的影响, 而八碳糖单元中氧甲基的有无对抗菌活性的影响很小, 化合物 67 和 68 的抗菌活性甚至优于林可霉素A^[30].

LmbC具有较大的底物容忍性, 可以将4-正丁基-L-脯氨酸(4-butyl-L-proline, BUPL)和4-正戊基-L-脯氨酸(4-pentyl-L-proline, PEPL)腺苷化. 相比于PPL, BUPL和PEPL具有更长的烷基侧链. 将BUPL和PEPL喂养到*lmbX*缺失的林可链霉菌中, 可以获得4-正丁基-4-脱正丙基林可霉素(4-butyl-4-depropyllincomycin, BULIN)和4-正戊基-4-脱正丙基林可霉素(4-pentyl-4-depropyllincomycin, PELIN)(图7(c)). 后者对金黄色葡萄球菌显现出比林可霉素A更好的抗菌活性^[44]. 上述结果表明, LmbD和LmbN中PCP功能域的底物容忍性同样并不局限于PPL和4-乙基-L-脯氨酸(4-ethyl-L-proline, EPL). 该策略也可以应用于林可酰胺类抗生素的结构多样性研究, 从而获得吡咯环中含有不同烷基侧链的林可酰胺类似物, 进一步拓展林可酰胺类抗生素的结构多样性.

7 林可链霉菌的工业改造

林可霉素A因其具有良好的生理活性而被广泛应用于临床, 相对于林可霉素A而言, 林可霉素B的抗菌活性较低且毒性较大. 为此, 人们在很早之前就

图7 (网络版彩色)林可酰胺类抗生素的结构多样性研究。(a) 林可霉素生物合成中间体通过天青菌素生物合成途径产生非天然的化合物 **67** 和 **68**。(b) 通过组合物合成产生的杂合林可酰胺化合物的结构。(c) 喂养实验获得的BULIN和PELIN的化学结构

Figure 7 (Color online) Structural diversity research of lincosamide antibiotics. (a) Processing lincomycin intermediate through celesticetin biosynthetic route yields the non-natural products **67** and **68**. (b) The structure of hybrid lincosamides generated from combinatorial biosynthesis. (c) The structure of BULIN and PELIN generated from feeding experiments

尝试对林可链霉菌进行工业改造,以期提高林可霉素A的产量,降低林可霉素B的产量,从而简化林可霉素A后续的分离过程,降低工业生产的成本。

在工业改造中常常使用诱变育种的方法。对于林可链霉菌,使用甲基磺酸乙酯(ethylmethansulfonate, EMS)化学诱变和紫外(ultraviolet, UV)照射交替进行的方法,成功筛选到一株新的林可链霉菌突变株。与原始菌株相比,该突变株中林可霉素A的产量提高了22.6%,包括LmbG和LmbI在内的多个蛋白的表达量

均有所提高,说明诱变育种是提高林可霉素A产量的一种行之有效的办法^[45]。

基于林可酰胺类抗生素生物合成机制的研究,对其生物合成途径进行基因工程改造是构建高产菌株的另一种方法。实验表明LmbU(或其同源蛋白HrmB)作为一类新型的转录调控因子,对林可霉素(或hormaomycin)的产量具有正调控作用^[46,47]。将lmbU敲除后不再产生林可霉素,但将lmbU倍增后林可霉素的产量提高了5倍^[48],表明lmbU是一个非常

好的工业改造位点。

研究发现向培养基中加入硝酸盐可以提高包括林可霉素A在内的多种次级代谢产物的产量^[49,50]。对于林可链霉菌,向培养基中加入硝酸盐后,氮调控因子基因*glnR*的表达水平提高了2倍。*GlnR*的高表达进一步提高了林可霉素生物合成基因簇中的抗性基因*lmrA*和一个ABC类型的硝酸盐转运蛋白(ATP-binding cassette (ABC) type nitrate transporters) *ABC1*的转录水平,前者可以促进林可霉素的胞外转运从而提高林可链霉菌对林可霉素的抗性,后者可以促进林可链霉菌对环境中的硝酸盐的胞内转运,为林可霉素的生物合成积累更多的氮元素。不仅如此,*GlnR*还对硝酸盐胞内代谢相关的蛋白具有正调控作用。以上几点因素共同导致了林可霉素A产量的提高^[51]。

TetR家族转录调控因子(TetR family transcriptional regulator, TFRs)可以调控细菌的多种新陈代谢过程,尤其是放线菌中次级代谢产物的生物合成过程。通过对林可链霉菌中TFRs基因的研究,发现其中一个TFR基因(*SLCG_2919*)对林可霉素A的产量具有负调控作用,该基因可以抑制林可霉素生物合成基因簇中的3个抗性基因、多个结构基因以及调控基因*lmbU*的转录,将该基因敲除,林可霉素A的产量可以提高约25%。此外,*SLCG_2919*还可以抑制邻近的*SLCG_2920*基因(编码一个ATP/GTP结合蛋白)的转录,而将*SLCG_2920*倍增后,可以提高林可链霉菌对林可霉素的抗性,从而提高林可霉素A的产量。由此说明*SLCG_2919*是除*lmbU*之外的另一个林可霉素生物合成调控基因,可以通过多种途径调控林可霉素的产量。*SLCG_2919*和相邻的*SLCG_2920*均可以作为林可链霉菌工业改造的靶点^[52]。

BldA是唯一一个亮氨酸稀有密码子UUA的tRNA,同样参与林可霉素的生物合成。BldA影响*lmbB2*, *lmbU*和基因簇外其他含有TTA密码子的基因的转录。将*bldA*基因倍增可以显著提高林可霉素A的产量,而缺失该基因导致林可霉素不再产生。因此,调控因子BldA可以作为林可链霉菌一个潜在的改造位点^[53]。

LmbW催化的SAM依赖的碳甲基化决定了林可霉素A和B的比例。因此,增加*lmbW*和*metK1*, *metK2*(林可链霉菌中的两个SAM合成酶基因)的拷贝数可以提高林可霉素A和B的比例。将*lmbW*和其中一个*metK*同时倍增后,与原始菌株相比,林可霉素A的

产量提高了35.83%,而林可霉素B的产量降低了34.76%^[39]。将*metK1*和*metK2*分别倍增或同时倍增,林可霉素A的产量分别提高了15%, 22%和27%。此外,推测SAM可以作为一种转录调控因子提高*lmbA*, *lmbR*和*lmbU*的转录水平^[54]。预计同时倍增*lmbW*和*metK1*, *metK2*可以进一步提高林可霉素A的产量。

8 展望

从中间的酰胺键断开,林可酰胺类抗生素可分为两个部分:一部分是带有C1位硫取代的八碳糖,另一部分为PPL单元或L-脯氨酸。由于其良好的生理活性以及独特的化学结构,林可酰胺类抗生素多年来持续吸引着许多科研工作者的关注。自从2012年以来,林可酰胺的生物合成途径研究取得了极大的进展,例如两个小分子硫醇EGT和MSH在林可酰胺类天然产物分子骨架的构建中所发挥的不同功能,在PPL单元生物合成过程中中间体53末端两碳单元的脱除,以及林可酰胺类抗生素中两个单元缩合机制的研究均已得到了阐明。尽管如此,对于林可酰胺类抗生素的生物合成途径,目前仍有许多不清楚的地方,例如八碳糖生物合成过程中中间体23至24的转化过程,中间体30/31氮乙酰基的脱除,以及中间体58/59还原生成PPL的过程等等,还有待于进一步的研究,相信在不久的将来还会有很多令人惊奇的发现。

不仅如此,基于林可酰胺的生物合成机制,我们可以获得为数众多的新型林可酰胺结构类似物,从而大大拓展了这一类化合物的结构多样性,并从中得到了两种“非天然”的天然产物,对革兰氏阳性致病菌显现出比林可霉素A更好的抗菌活性。此外,对于林可酰胺类抗生素结构多样性的研究,也使我们更好地了解了这一类化合物的构效关系:八碳糖单元中氧甲基的有无对抗菌活性的影响很小,水杨酸结构和PPL单元中的4-正丙基侧链对于该类抗生素的抗菌活性具有重要的影响,且随着PPL单元烷基侧链的进一步延长,抗菌活性可以获得进一步的提高。这也就为今后的结构改造指明了方向。目前对林可酰胺结构类似物的抗菌活性筛选仅仅局限于少数几种类似物,而水杨酸苯环含有取代基团的结构类似物为数众多却尚未进行抗菌活性测试。通过组合生物合成的方法,我们可以进一步丰富水杨酸苯环的取代基,例如引入具有良好药效基团的氟原子等,并且

同时延长PPL单元的烷基侧链,或许会发现具有更高抗菌活性、更低毒性、更适合应用于临床的新型林可酰胺抗生素。

目前,林可霉素A的生产主要依赖于林可链霉菌的发酵,为此,人们对林可链霉菌的工业改造做出了很多尝试,并取得了一系列令人瞩目的成果。通过对上述的研究成果进行排列组合和筛选,或许可以综合多个方面的优势,获得产量更高的工业菌株。此外,虽然我们可以拓展林可酰胺类抗生素的结构多

样性并发现抗菌活性更好的结构类似物,但尚无法以较低的成本对这些结构类似物进行大规模的生产制备。这也为工业改造提供了新的用武之地,或许我们可以利用合成生物学的方法,在林可链霉菌体内合成我们所需要的某一个或某几个前体类似物,直接获得相应的林可酰胺结构类似物,并进行工业化生产。总之,我们相信,随着研究的不断深入,林可酰胺类抗生素将会在临床中发挥更为重要的作用,更好地服务世人、造福世界。

参考文献

- Lewis C, Clapp H W, Grady J E. *In vitro* and *in vivo* evaluation of lincomycin, a new antibiotic. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1963, 161: 570–582
- Magerlein B J. Modification of lincomycin. *Adv Appl Microbiol*, 1971, 14: 185–229
- Piepersberg W, Distler J. *Aminoglycosides and Sugar Components in Other Secondary Metabolites*. 2nd ed. Wuppertal: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1997. 397–488
- Kucers A, Hoy J F, Lindsay Grayson M, et al. *The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 1997
- Reusser F. Effect of lincomycin and clindamycin on peptide chain initiation. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1975, 7: 32–37
- Wilson D N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 35–48
- Cundliffe E, Demain A. Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37: 643–672
- Spřížek J, Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem Pharmacol*, 2017, 133: 20–28
- Janata J, Kamenik Z, Gazak R, et al. Biosynthesis and incorporation of an alkylproline-derivative (APD) precursor into complex natural products. *Nat Prod Rep*, 2018, 35: 257–289
- Zhang D, Tang Z, Liu W. Biosynthesis of lincosamide antibiotics: Reactions associated with degradation and detoxification pathways play a constructive role. *Acc Chem Res*, 2018, 51: 1496–1506
- Peschke U, Schmidt H, Zhang H Z, et al. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol*, 1995, 16: 1137–1156
- Čermák L, Novotná J, Ságová-Marečková M, et al. Hybridization analysis and mapping of the celesticetin gene cluster revealed genes shared with lincomycin biosynthesis. *Folia Microbiol*, 2007, 52: 457–462
- Koběřská M, Kopecký J, Olšovská J, et al. Sequence analysis and heterologous expression of the lincomycin biosynthetic cluster of the type strain *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. *Folia Microbiol*, 2008, 53: 395–401
- Hu Y, Phelan V, Ntai I, et al. Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem Biol*, 2007, 14: 691–701
- Najmanova L, Ulanova D, Jelinkova M, et al. Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiol*, 2014, 59: 543–552
- Li W, Khullar A, Chou S, et al. Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 2869–2878
- Li W, Chou S, Khullar A, et al. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 2958–2963
- Pavlikova M, Kamenik Z, Janata J, et al. Novel pathway of 3-hydroxyanthranilic acid formation in limazepine biosynthesis reveals evolutionary relation between phenazines and pyrrolobenzodiazepines. *Sci Rep*, 2018, 8: 7810–7819
- Höfer I, Crüsemann M, Radzom M, et al. Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem Biol*, 2011, 18: 381–391
- Brahme N M, Gonzalez J E, Mizsak S, et al. Biosynthesis of the lincomycins. 2. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A. *J Am Chem Soc*, 1984, 106: 7878–7883
- Sasaki E, Lin C I, Lin K Y, et al. Construction of the octose 8-phosphate intermediate in lincomycin A biosynthesis: Characterization of the reactions catalyzed by LmbR and LmbN. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 17432–17435

- 22 Lin C I, Sasaki E, Zhong A, et al. *In vitro* characterization of LmbK and LmbO: Identification of GDP-D-erythro- α -D-gluc-octose as a key intermediate in lincomycin A biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 906–909
- 23 Cheah I K, Halliwell B. Ergothioneine: Antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822: 784–793
- 24 Rawat M, Av-Gay Y. Mycothiol-dependent proteins in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev*, 2007, 31: 278–292
- 25 Zhao Q, Wang M, Xu D, et al. Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. *Nature*, 2015, 518: 115–119
- 26 Wang M, Zhao Q, Liu W. The versatile low-molecular-weight thiols: Beyond cell protection. *BioEssays*, 2015, 37: 1262–1267
- 27 Kamenik Z, Kadlcik S, Radojevic B, et al. Deacetylation of mycothiol-derived ‘waste product’ triggers the last biosynthetic steps of lincosamide antibiotics. *Chem Sci*, 2016, 7: 430–435
- 28 Wang M, Zhao Q, Zhang Q, et al. Differences in PLP-dependent cysteinyl processing lead to diverse S-functionalization of lincosamide antibiotics. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 6348–6351
- 29 Ushimaru R, Lin C I, Sasaki E, et al. Characterization of enzymes catalyzing transformations of cysteine S-conjugated intermediates in the lincosamide biosynthetic pathway. *ChemBioChem*, 2016, 17: 1606–1611
- 30 Kadlcik S, Kamenik Z, Vasek D, et al. Elucidation of salicylate attachment in celesticetin biosynthesis opens the door to create a library of more efficient hybrid lincosamide antibiotics. *Chem Sci*, 2017, 8: 3349–3355
- 31 Spížek J, Řezanka T. Lincomycin, cultivation of producing strains and biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63: 510–519
- 32 Novotna J, Olsovska J, Novak P, et al. Lincomycin biosynthesis involves a tyrosine hydroxylating heme protein of an unusual enzyme family. *PLoS One*, 2013, 8: e79974
- 33 Connor K L, Colabroy K L, Gerratana B. A heme peroxidase with a functional role as an L-tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of anthramycin. *Biochemistry*, 2011, 50: 8926–8936
- 34 Colabroy K L, Hackett W T, Markham A J, et al. Biochemical characterization of L-DOPA 2,3-dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 479: 131–138
- 35 Colabroy K L, Smith I R, Vlahos A H, et al. Defining a kinetic mechanism for L-DOPA 2,3 dioxygenase, a single-domain type I extradiol dioxygenase from *Streptomyces lincolnensis*. *BBA- Proteins Proteom*, 2014, 1844: 607–614
- 36 Saha S, Li W, Gerratana B, et al. Identification of the dioxygenase-generated intermediate formed during biosynthesis of the dihydropyrrole moiety common to anthramycin and sibiromycin. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 449–454
- 37 Colabroy K L. Tearing down to build up: Metalloenzymes in the biosynthesis lincomycin, hormaomycin and the pyrrolo [1,4]benzodiazepines. *BBA-Proteins Proteom*, 2016, 1864: 724–737
- 38 Zhong G, Zhao Q, Zhang Q, et al. 4-alkyl-L-(Dehydro)proline biosynthesis in actinobacteria involves N-terminal nucleophile-hydrolase activity of γ -glutamyltranspeptidase homolog for C–C bond cleavage. *Nat Commun*, 2017, 8: 16109
- 39 Pang A P, Du L, Lin C Y, et al. Co-overexpression of *lmbW* and *metK* led to increased lincomycin A production and decreased byproduct lincomycin B content in an industrial strain of *Streptomyces lincolnensis*. *J Appl Microbiol*, 2015, 119: 1064–1074
- 40 Zhong G, Chen H, Liu W. Reply to ‘C–C bond cleavage in biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin and anthramycin cannot precede C-methylation’. *Nat Commun*, 2018, 9: 3168
- 41 Jiraskova P, Gazak R, Kamenik Z, et al. New concept of the biosynthesis of 4-alkyl-L-proline precursors of lincomycin, hormaomycin and pyrrolobenzodiazepines: Could a γ -glutamyltransferase cleave the C–C bond? *Front Microbiol*, 2016, 7: 276
- 42 Kadlcik S, Kučera T, Chalupská D, et al. Adaptation of an L-proline adenylation domain to use 4-propyl-L-proline in the evolution of lincosamide biosynthesis. *PLoS One*, 2013, 8: e84902
- 43 Vobruba S, Kadlcik S, Gazak R, et al. Evolution-guided adaptation of an adenylation domain substrate specificity to an unusual amino acid. *PLoS One*, 2017, 12: e0189684
- 44 Ulanova D, Novotná J, Smutná Y, et al. Mutasynthesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemoth*, 2010, 54: 927–930
- 45 Pang X, Zheng Y, Qiao X, et al. Improvement of lincomycin production by mutant selection and metabolic regulation. *Prep Biochem Biotech*, 2017, 47: 639–643
- 46 Chen L, Wang Z L, Zhao Q F, et al. Functional determination of the regulatory gene *lmbU* in lincomycin biosynthesis gene cluster (in Chinese). *Chem Bioeng*, 2011, 11: 37–41 [陈琳, 王增亮, 赵群飞, 等. 林可霉素生物合成基因簇中调控基因 *lmbU* 的功能研究. 化学与生物工程, 2011, 11: 37–41]
- 47 Cai X, Teta R, Kohlhaas C, et al. Manipulation of regulatory genes reveals complexity and fidelity in hormaomycin biosynthesis. *Chem Biol*, 2013, 20: 839–846
- 48 Hou B, Lin Y, Wu H, et al. The novel transcriptional regulator LmbU promotes lincomycin biosynthesis through regulating expression of

- its target genes in *Streptomyces lincolnensis*. J Bacteriol, 2018, 200: e00447
- 49 Jin Z, Jiao R. Stimulative effects of nitrate and magnesium salts on biosynthesis of lincomycin by *Streptomyces lincolnensis*. Chin Biochem J, 1997, 13: 709–715
- 50 Shao Z, Gao J, Ding X, et al. Identification and functional analysis of a nitrate assimilation operon *nasACKBDEF* from *Amycolatopsis mediterranei* U32. Arch Microbiol, 2011, 193: 463–477
- 51 Meng S, Wu H, Wang L, et al. Enhancement of antibiotic productions by engineered nitrate utilization in actinomycetes. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101: 5341–5352
- 52 Xu Y, Ke M, Li J, et al. Negative Involvement of the TetR-type regulator SLCG_2919 in the regulation of lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. Appl Environ Microbiol, 2018, doi: 10.1128/AEM.02091-18
- 53 Hou B, Tao L, Zhu X, et al. Global regulator BldA regulates morphological differentiation and lincomycin production in *Streptomyces lincolnensis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102: 4101–4115
- 54 Xu Y, Tan G, Ke M, et al. Enhanced lincomycin production by co-overexpression of *metK1* and *metK2* in *Streptomyces lincolnensis*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2018, 45: 345–355

Summary for “林可酰胺类抗生素的生物合成研究进展”

Recent advances in the biosynthesis of lincosamide antibiotics

Guannan Zhong, Hua Chen & Wen Liu*

State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

* Corresponding author, E-mail: wliu@mail.sioc.ac.cn

Lincosamides characterized by an unusual C1 mercapto substituted 8-carbon sugar joined with a proline moiety by an amide linkage, is a small family of antibiotics. The vital role in clinic and the unique structures have attracted much attention for many years. Natural lincosamides contain only four compounds to date: lincomycin A and B, celesticetin and Bu-2545, among which only lincomycin A possesses good *in vitro* and *in vivo* potency against a variety of Gram-positive microorganisms, such as *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus viridans*. Because of the excellent antibiotic activity of lincomycin A, hundreds of synthetic, semisynthetic and biosynthetic fermentation derivatives have been prepared. However, most of them are not suitable for clinical use due to the low biological activity or high toxicity and so on. Only clindamycin, a semisynthetic analog of lincomycin A, is a clinical acceptance and shows better antibiotic activities than lincomycin A. Natural lincosamides have typically been isolated from actinomycetes and are generated from large and complex gene clusters. Despite found and clinical used for nearly half a century, their biosynthetic pathways have not been elucidated completely. During the past few years, great progress was achieved on lincosamides biosynthetic pathway. It is found that the C1 mercapto substituted 8-carbon sugar derived from the condensation of D-ribose 5-phosphate and D-fructose 6-phosphate or D-sedoheptulose 7-phosphate. During the biosynthesis of the octose, two unique low molecular weight thiols: ergothioneine and mycothiol, function through two unusual glycosylations that program lincosamide transfer, activation and modification, providing the first paradigm for ergothioneine associated biochemical processes and for the poorly understood mycothiol dependent biotransformations. The biosynthesis of lincomycin and celesticetin is branched from a pair of homologous proteins, both of which are pyridoxal-5'-phosphate dependent proteins and are highly related in phylogenesis, but cysteine S-conjugated intermediates are processed in different ways and associated with individual downstream enzyme(s) toward distinct S-functionalization of lincomycin and celesticetin. During the formation of the *trans* 4-propyl-L-proline moiety in lincomycin, two γ -glutamyltranspeptidase homolog proteins (the specific LmbA and a non-specific LmbA2991) catalyze an unusual C–C bond cleavage reaction. Both of them belong to N-terminal nucleophile (Ntn) hydrolase superfamily, and exhibit the activity for post-translational autocatalytic cleavage of a peptide precursor to form a functional heterodimer in which the newly released N-terminal threonine residue acts as a nucleophile to attack a carbonyl group and catalyze the C–C bond cleavage. For the linkage of the octose and the pyrrole rings, the latter are activated by standalone adenylation domains and uploaded to peptidyl carrier proteins, followed by condensation reaction with ergothioneine S-conjugate lincosamine to afford amide bonds. It cannot imagine that such small molecules are biosynthesized via inconceivable process. Although there are still some questions on lincosamides biosynthesis, chances are that more surprise will be unveiled in the near future. Furthermore, on the basis of the biosynthetic mechanism of lincosamides, their biosynthetic pathway could be rationally reconstructed to obtain diverse lincosamide analogues which have distinct physiological activities and are difficult to synthesize, including several unnatural chimeras with antibacterial properties better than lincomycin A, opening the door for combinatorial biosynthesis of hybrid lincosamide antibiotics. But more than that, due to the excellent antibacterial activity of lincomycin A, the lincomycin-producing strain- *Streptomyces lincolnensis* has been engineered for quite a long time to improve the production of lincomycin A, which may help cut production costs and simplify downstream separation processes. This review mainly covers the most recent advances in the biosynthesis of lincomycin and celesticetin, and on this basis, in the structural diversity expansion and lincomycin-producing strain engineering.

lincosamides, biosynthesis, structural diversity, lincomycin-producing strain engineering

doi: 10.1360/N972018-01024