

当前, 传染病的控制主要依赖抗生素, 对抗生素的结构修饰不但可以改善已有药物活性、延长其生命周期, 还可以为新药开发提供更多的来源。糖基化修饰作为一种重要的后修饰在天然产物中广泛存在, 并对其生物活性起到非常重要的作用。研究者通过糖基化改造, 可以获得大量新糖基修饰的天然产物, 为新药开发提供支持。

杨克迁

## 放线菌天然产物糖基化改造研究进展

朱西粉<sup>1△</sup> 潘国辉<sup>3△</sup> 李莉媛<sup>3</sup> 罗琼<sup>2\*</sup> 杨克迁<sup>3\*</sup>

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院 云南 昆明 650201)

(2. 云南农业大学 农业生物多样性与病害控制教育部重点实验室 云南 昆明 650201)

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

**摘要:** 放线菌可以产生结构多样的天然产物, 其中包括很多重要的抗菌和抗肿瘤药物。糖基化修饰在天然产物中广泛存在, 糖基侧链的变化往往会影响天然产物的生物活性。本文综述了放线菌来源天然产物糖基化改造的研究进展。糖基侧链改造的方法主要分为体内基因工程和体外酶学法。运用这两种方法已经成功对多种天然产物进行了糖基侧链改造, 获得了大量带有新糖基修饰的天然产物, 其中有些生物活性得以提高。天然产物糖基侧链改造为新药开发提供了一个重要的途径。

**关键词:** 天然产物糖基化, 组合生物合成, 糖基转移, 糖基改造

## Engineering the glycosylation pattern of natural products in actinobacteria

ZHU Xi-Fen<sup>1△</sup> PAN Guo-Hui<sup>3△</sup> LI Li-Yuan<sup>3</sup> LUO Qiong<sup>2\*</sup> YANG Ke-Qian<sup>3\*</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30670017)

\*通讯作者: 杨克迁: Tel: 86-10-64807459; 信箱: yangkq@im.ac.cn

罗琼: 信箱: qiongbf@yahoo.com.cn

△并列第一作者

收稿日期: 2013-02-19; 接受日期: 2013-04-16

(2. Key Laboratory for Agricultural Biodiversity and Pest Management of China Education Ministry, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

(3. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Actinobacteria are known to produce various natural products, including many important antibacterial and antitumor antibiotics. Glycosylation is a common tailoring reaction in natural product biosynthesis. In most cases, glycosylation significantly affects the bioactivity of natural products. The glycosylation of natural products could be manipulated by *in vivo* genetic engineering or by *in vitro* enzymatic glycodiversification approaches. A large number of new glycosylated products were generated using these two approaches, and some of them showed enhanced bioactivity. These new glycosyl-diversified products offer new opportunities for drug development.

**Keywords:** Natural products glycosylation, Combinatorial biosynthesis, Glycosyltransferase, Glycosylation engineering

微生物产生的天然产物是小分子药物的重要来源, 其中约 70% 由放线菌产生<sup>[1]</sup>。由于放线菌具有强大的天然产物合成能力和复杂的发育分化, 一直受到广泛关注。天然产物合成过程中通常会涉及一些重要的后修饰反应, 主要有羟化、糖基化、甲基化、氨基化以及乙酰化等修饰。其中糖基化修饰在天然产物中广泛存在, 例如临床用抗生素红霉素(Erythromycin)、抗寄生虫农药阿维菌素(Avermectins)以及抗癌药物多柔比星(Doxorubicin), 终产物都带有糖基化修饰(图 1)。糖基可以改善化合物的水溶性, 且通常直接参与天然产物与靶点的相互作用, 去糖基化的天然产物生物活性会受到很大影响, 因而糖基化修饰在天然产物生物活性中起到重要的作用<sup>[2]</sup>。国内外科研工作者对天然产物糖基的生物合成及糖基化修饰展开了深入的研究。近年来, Liu、Thorson 以及 Salas 等研究者对天然产物糖基的合成机理, 糖基转移酶的催化机制及运用不同手段对天然产物进行糖基化修饰改造等方面进行了全面而详尽的综述<sup>[1,3-7]</sup>。本文在以上综述的基础上, 进一步总结了近年来放线菌来源天然产物糖基化修饰及糖基侧链

改造方面最新的研究进展。

## 1 天然产物中糖基的合成

天然产物中糖基的种类丰富多样, Liu 等根据结构对其进行了细致的分类, 其中绝大多数属于 6-脱氧己糖, 也有极少数的是未脱氧己糖, 如万古霉素(Vancomycin)中的 D-葡萄糖<sup>[5]</sup>。天然产物中糖基合成的第一步是单糖的活化, 单糖需经过核苷转移酶作用生成活化的 NDP-糖(少部分为 NMP-糖), 才能被下游的糖基合成酶及糖基转移酶所利用(图2)。合成起始的 NDP-糖大多为 NDP-D-葡萄糖, 由核苷转移酶催化底物葡萄糖-1-磷酸和 NTP 生成。葡萄糖-1-磷酸来源于初级代谢产物葡萄糖-6-磷酸或者果糖-6-磷酸。NDP-D-葡萄糖通常会经过 NDP-己糖-4,6-脱水酶(NDP-hexose-4,6-dehydratase)的作用生成 NDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖(NDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose)。后者是糖基合成的重要中间体, 该糖基碳骨架不同位置可进一步发生特定的修饰反应, 主要包括脱氧反应(通常发生在 C-2、C-3 和 C-4 位置), 异构化反应(通常发生在 C-3 和 C-5 位置), 酮基还原反应(通

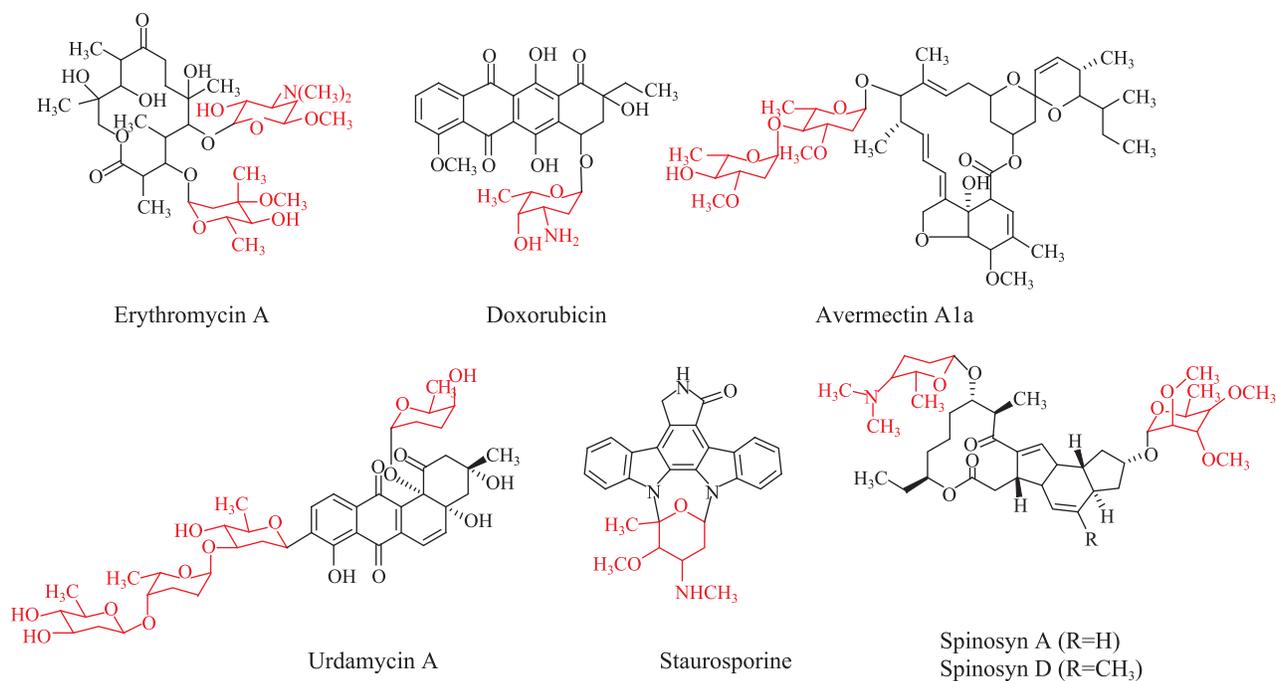


图 1 放线菌产生的糖基化修饰天然产物

Fig. 1 Representative glycosylated natural products produced by actinobacteria

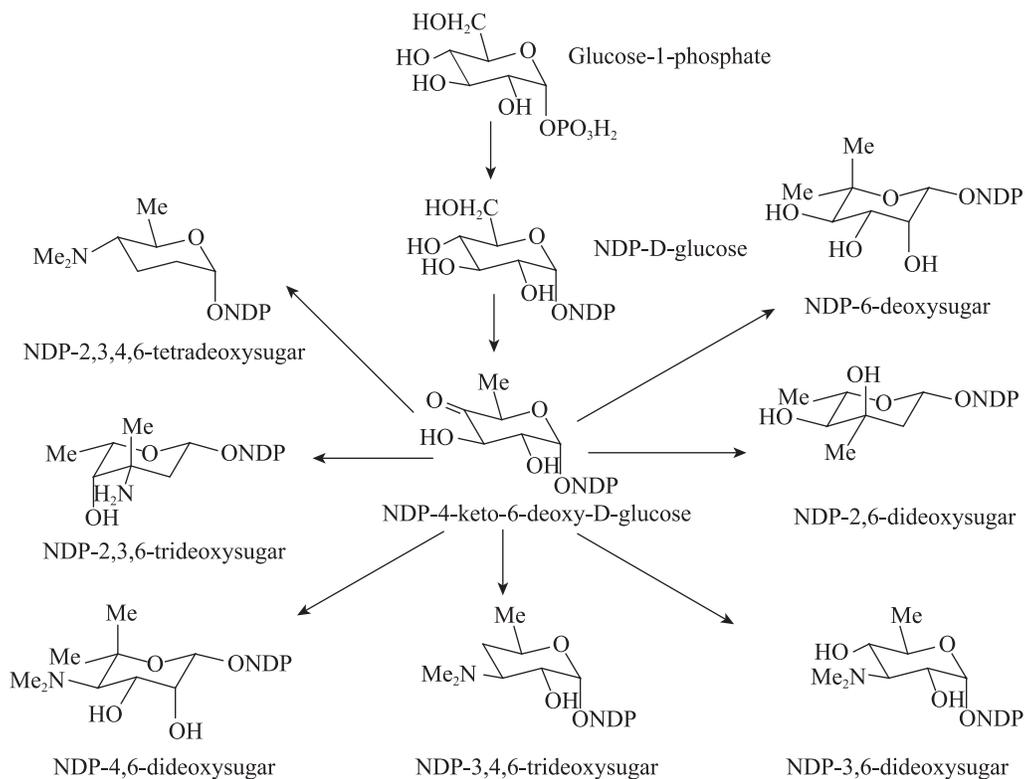


图 2 NDP-糖基的合成及种类

Fig. 2 Biosynthesis and diversity of NDP-sugars

常发生在 C-3 和 C-4 位置), 转氨反应以及甲基化修饰反应(包括 O-、C-和 N-甲基化修饰)等<sup>[1]</sup>。正是由于多种修饰酶的作用, 使得天然产物糖基库拥有着极大的结构多样性。随着微生物基因组信息的不断公布以及基因工程技术的快速发展, 糖基合成基因簇被不断克隆和鉴定。通过体内基因缺失和异源表达等方法, 同时分析代谢产物的变化, 可以初步鉴定相关基因的功能。另外, 体外生化实验的开展使我们对糖基合成途径及糖基合成酶功能有了更深入的认识。Chen 等在大肠杆菌中异源表达了抗生素 Chloroeremomycin 中氨基糖 L-epivancosamine 合成所需的 5 种酶, 成功利用体外酶学合成了氨基糖 L-epivancosamine<sup>[8]</sup>。类似的方法被用于泰乐菌素中 L-mycarose 的体外合成<sup>[9]</sup>。

## 2 天然产物合成中糖基转移酶(Glycosyltransferase, GTs)功能研究

糖基转移酶催化 NDP-糖基与配糖体发生反应, 生成对应的糖基化修饰产物, 因此是连接糖基与配糖体的纽带。按照结构特征的不同, GTs 可分为 GT-A 和 GT-B 两个家族<sup>[10-11]</sup>。GT-A 家族的 GTs 含有两个紧密相连的结构域, 分别负责 NDP-糖和配糖体的结合, 该类 GTs 催化的糖基修饰反应通常需要金属离子( $Mg^{2+}$ 或  $Mn^{2+}$ )的参与, 真核生物中负责合成多糖的 GTs 大多属于 GT-A 家族。GT-B 家族的 GTs 具有两个相似的罗斯曼式卷曲结构域(Rossmann-type domain), 其 N 端结构域负责配糖体的结合, 而 C 端结构域负责结合 NDP-糖, 两个结构域由中间的连接臂隔开, GTs 的活性中心位于两结构域之间, 该类 GTs 催化的糖基修饰反应均不需要金属离子的参与。绝大多数微生物天然产物合成中的 GTs 属于 GT-B 家族。根据催化反应中

立体结构特征的不同, GTs 又可被分成翻转型糖基转移酶(Inverting GTs)和保持型糖基转移酶(Retaining GTs)<sup>[5,12]</sup>。

GTs 催化 NDP-糖和配糖体以不同形式糖苷键进行连接, 包括 O-、C-、N-苷键等, 其中大多数为 O-苷键<sup>[5]</sup>。绝大多数 GTs 催化糖基修饰反应时, 并不需要辅助蛋白的参与, 但值得注意的是, 近年来有研究表明有一小类催化 O-苷键形成的 GTs 需要辅助蛋白的参与, 才能成功催化糖基化修饰反应。如酒霉素/苦霉素 Methymycin/picromycin 合成中糖基转移酶 DesVII 的活性需要辅助蛋白 DesVIII 的协助, 另外类似报道的有 AknS-AknT (辅助蛋白)和 EryCIII-EryCII (辅助蛋白)<sup>[13-16]</sup>。但到目前为止, 这类辅助蛋白所起的作用仍不清楚。催化 C-苷键形成的 GTs 比较少见, 其中研究较多的有 UrdGT2 和 IorB。UrdGT2 催化 NDP-D-olivose 以 C-苷键的形式连接至 Urdamycin 配糖体的 C-9 位上<sup>[17-18]</sup>(图 1)。IorB 被体外证明可以催化 UDP-葡萄糖以 C-苷键的形式连接至配糖体 Enterobactin 上<sup>[19]</sup>。含有 N-苷键的化合物也比较少见, 主要见于吲哚并咪唑(Indolocarbazole)类化合物, 研究较多的有 Staurosporine (图 1)和 Ansamitocins 合成途径中的 GTs StaG<sup>[20-21]</sup>和 Asm25<sup>[22]</sup>, 其中 Asm25 是抗生素合成途径中首例进行体外生化水平表征的催化 N-苷键形成的 GT。

## 3 糖基侧链改造及应用

随着越来越多的糖基合成基因簇及糖基转移酶基因被鉴定, 研究者开始尝试组合使用这些功能元件来获得新糖基修饰的天然产物。以下将从体内基因工程及体外酶学法改造两个方面对天然产物糖基侧链改造的研究工作进行介绍。

### 3.1 体内(*In vivo*)基因工程方法改造糖基侧链修饰

**3.1.1 体内基因缺失技术:** 研究糖基合成基因功能经典的策略就是对糖基合成基因进行缺失, 通过检测突变株中积累的代谢产物结构的变化来鉴定突变基因的功能。在有些情况下, 缺失特定基因后生成的中间体糖基仍然可以被 GTs 所识别, 合成相应中间体糖基修饰的天然产物。在红霉素中 L-mycarose 的合成途径中, EryBIV 催化其中的 4-酮基还原反应。缺失 EryBIV 后积累的中间体 NDP-4-keto-L-mycarose 可被对应的糖基转移酶识别, 得到含有该中间体糖基的红霉素衍生物<sup>[23]</sup>(图 3A)。此外, 在酒霉素/苦霉素 (Methymycin/picromycin) 等天然产物的糖基合成研究工作中也有类似的报道<sup>[24]</sup>。有些中间体糖基还可以被下游的糖基合成酶继续催化, 生成新结构的糖基。杰多霉素(Jadomycin)是委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae* ISP5230)在乙醇刺激等特殊环境压力产生的一种非典型角蕈环类抗生素。当缺失糖基合成基因 *jadO* (NDP-糖 2,3-脱水酶)后, 令人意外地产生了一种新糖基修饰产物 6-脱氧-L-altrose 修饰杰多霉素<sup>[25-26]</sup>(图 3B)。理论上 *jadO* 缺失突变株积累的中间体糖基应该为 NDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖, 推测该中间体糖可被下游 *JadU* (异构酶)和 *JadV* (酮基还原酶)继续催化生成 NDP-6-脱氧-L-altrose, 继而被糖基转移酶 *JadS* 识别生成新糖基修饰的产物, 该结果也表明 *JadS* 对糖基底物具有一定的宽容性。类似的情况在 Urdamycin、Methymycin 等中也有报道<sup>[27-29]</sup>。此外, 通过缺失 GTs 也是获得不同糖基侧链化合物的常用途径, 该方法常用于含有多个 GT 的天然产物合成途径。Landomycin A 是 *Streptomyces cyanogenus* S136 产生的一种含有六糖侧链的角蕈环类抗生素, 该六糖侧链由 4 个 GT 负责合成。通过分别缺失

其合成途径中的 3 个 GT 基因 *lanGT1*、*lanGT4* 和 *lanGT3* 获得了多种含不同糖基侧链的 Landomycin 衍生物<sup>[30-33]</sup>。Zhang 等近来鉴定了 Tiacumicin B (产生菌为 *Dactylosporangium aurantiacum* subsp. *Hamdenensis* NRRL 18085)的生物合成基因簇, 通过对其合成途径中的两个 GT 编码基因 *tiaG1* 和 *tiaG2* 分别进行缺失, 获得了多种不同糖基侧链的 Tiacumicin 衍生物, 同时该工作表明 *TiaG1* 和 *TiaG2* 对非天然的糖基底物具有一定的识别利用能力<sup>[34]</sup>。另外, Zhang 等最近从 *Streptomyces* sp. SCSIO 01127 中鉴定了 Lobophorin 的生物合成基因簇, 通过分别缺失其合成途径中的 3 个 GT 编码基因, 获得了多种不同糖基侧链的 Lobophorin 类衍生物, 并表明 *LobG3* 作为一个迭代的 GT 催化两步糖基转移反应<sup>[35]</sup>。类似的工作在 Urdamycin 等中也有报道<sup>[36]</sup>。这些工作的深入开展, 不仅可以从体内鉴定糖基合成基因以及 GTs 编码基因的功能, 还可以发现具有宽泛糖基底物识别能力的糖基转移酶和糖基合成酶, 为合成新结构糖基以及新糖基修饰天然产物打下坚实的基础。

**3.1.2 体内组合生物合成技术:** 该方法主要是通过通过对糖基合成途径进行代谢工程改造, 来获得新糖基修饰产物。Hutchinson 等早在 1998 年便使用这种方法对 *Streptomyces peucetius* 所产生的抗癌药物多柔比星(Doxorubicin)进行了新糖基修饰改造<sup>[37]</sup>(图 4)。Doxorubicin 中糖基为 L-daunosamine, 缺失其糖基合成基因 4-酮基还原酶(4-Ketoreductase), 再在该突变株中表达具有不同立体结构选择性的 4-酮基还原酶 *AvrE* (来源于阿维菌素合成途径)或者 EryBIV (来源于红霉素合成途径), 成功得到了新糖基 L-epidaunosamine 修饰的产物 Epirubicin。运用相似的方法, 还成功合成了多种新糖基修饰的酒霉素/苦霉素(Methymycin/picromycin)<sup>[38]</sup>。

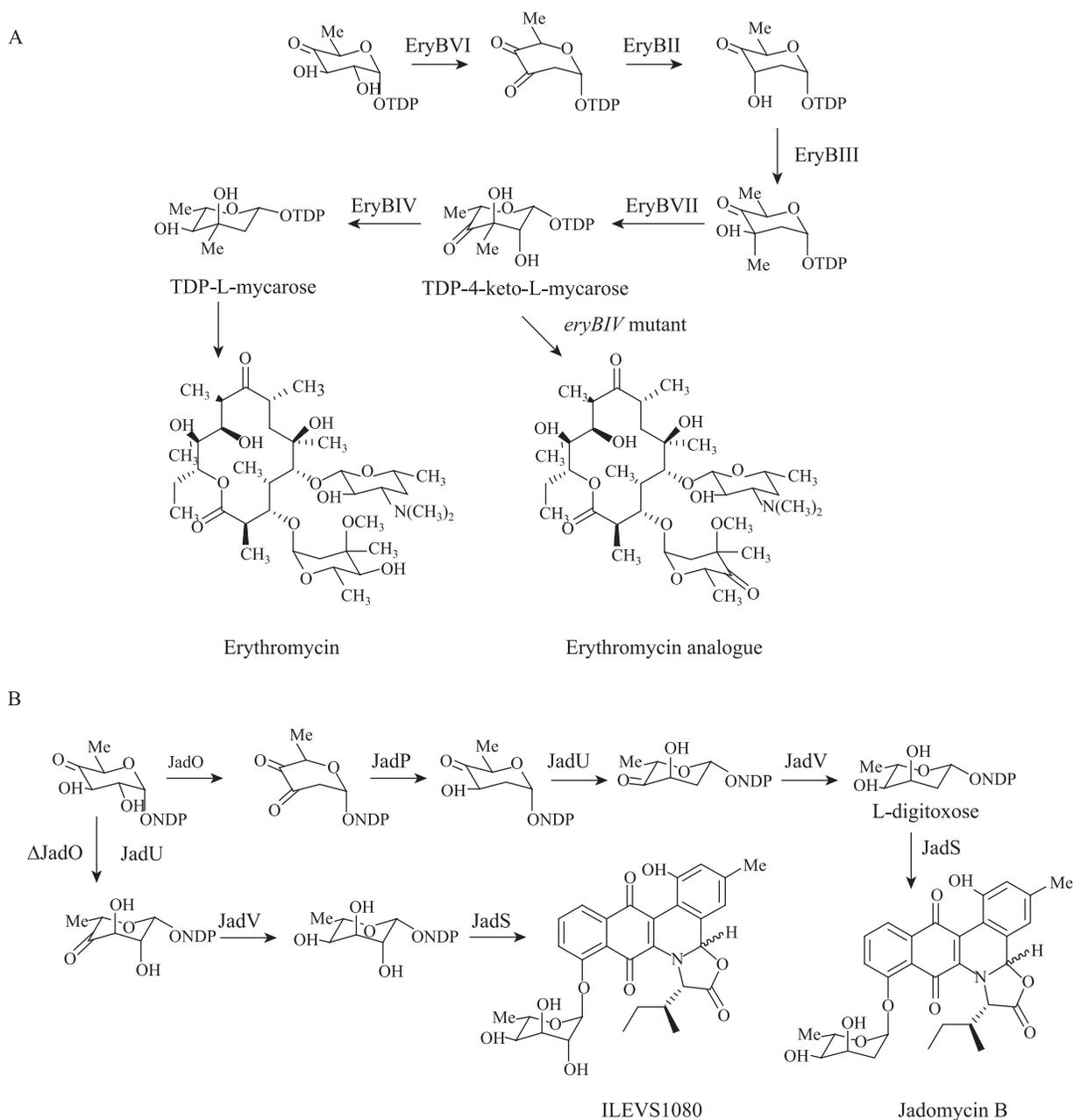


图3 体内基因缺失技术改造红霉素和杰多霉素糖基侧链修饰

Fig. 3 Formation of new glycosylated derivatives of erythromycin and jadomycin by gene inactivation

注: A: 缺失红霉素糖基合成基因 *eryBIV* (NDP-糖 4-酮基还原酶)得到的新糖基修饰的红霉素衍生物; B: 缺失杰多霉素糖基合成基因 *jadO* (NDP-糖 2,3-脱水酶)得到新糖基修饰的杰多霉素衍生物 ILEVS1080.

Note: A: Formation of a new glycosylated erythromycin derivative by inactivation of *eryBIV* (NDP-hexose 4-ketoreductase); B: Formation of a new glycosylated jadomycin derivative ILEVS1080 by inactivation of *jadO* (NDP-hexose 2,3-dehydratase).

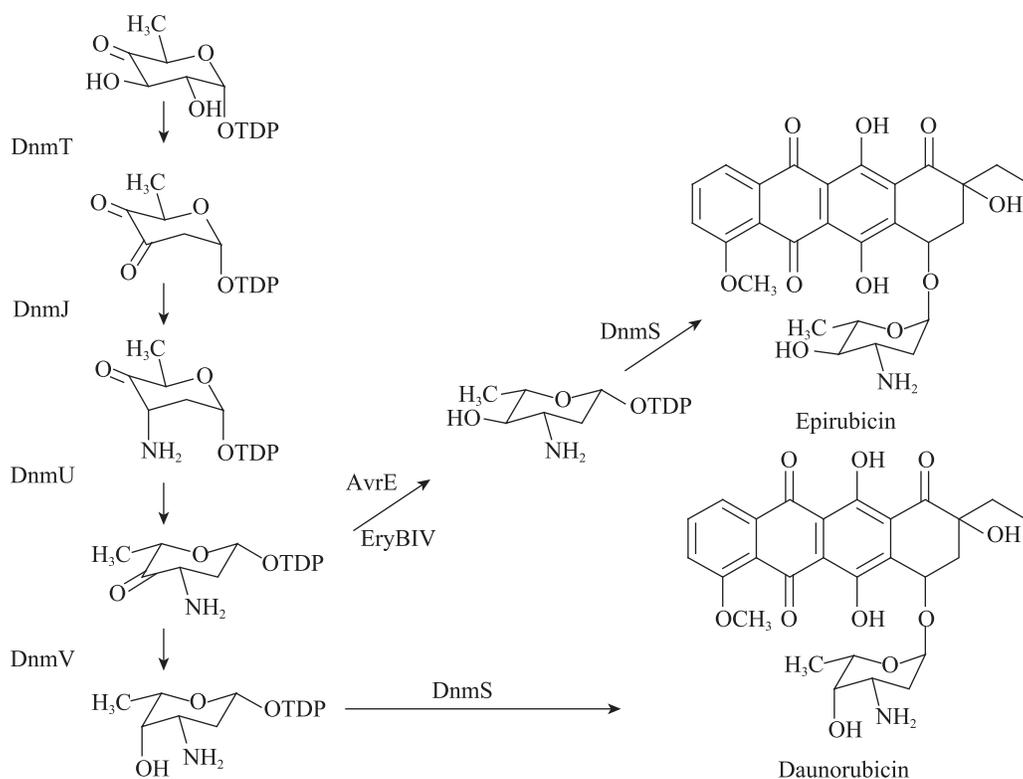


图4 通过代谢工程改变糖基合成途径来对多柔比星糖基侧链进行改造

Fig. 4 Formation of a new glycosylated daurubicin derivative epirubicin by metabolic engineering of sugar biosynthetic pathway

通过引入外源 GTs, 也可实现对天然产物进行新糖基化修饰。红霉素(Erythromycin)是红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)产生的一种大环内酯类抗生素, 缺失其碳霉糖糖基转移酶(Mycarosyltransferase)基因 *eryBV*, 然后在该突变株中表达外源 GT oleandrosyltransferase (OleG2, 来源于 Oleandomycin 合成途径), 成功获得了新糖基修饰产物 3-O-L-rhamnosyl erythronolide<sup>[39]</sup>。 *Sac. erythraea* SGT2 是糖基转移酶基因 *eryCIII*、*eryBV* 和聚酮合酶基因 *eryA* 三基因缺失突变株, 该菌株不能产生红霉素配糖体。TylM2 是泰乐菌素(Tylosin)合成途径中 GT (Mycaminosyltransferase)在 *Sac. erythraea* SGT2 中表达 TylM2, 同时外源添加泰乐菌素的糖苷配体 Tyllactone, 最终合成了一种新糖基修

饰的泰乐菌素 5-O-desosaminyltyllactone, 说明 TylM2 可以识别异源宿主菌所合成的糖基 NDP-desosamine, 并将其修饰到 TylM2 天然的糖苷配体上, 显示出 TylM2 对糖基底物具有较为宽泛的识别能力<sup>[40]</sup>。相似的策略被成功用于多杀菌素(Spinosyn)的糖基化修饰, 在 *Sac. erythraea* SGT2 中表达多杀菌素合成途径中 GT SpnP (Forosaminyltransferase), 同时外源添加多杀菌素假配糖体(Spinosyn pseudoaglycon), 最终获得了新糖基修饰多杀菌素 17-O- $\alpha$ -L-mycarosyl-spinosyn A<sup>[41]</sup>, 说明 SpnP 可以识别异源宿主菌所合成的糖基 NDP-L-mycarose, 并修饰至多杀菌素假配糖体上。这些工作提示我们: 当原始宿主无法合成目标糖基时, 可选择目标糖基产生菌进行遗传

改造,除去其天然配糖体产生能力,再通过外源添加拟修饰的配糖体,可实现天然产物糖基侧链结构改造。

糖基合成途径的不断阐明,使得我们可以通过重组不同来源糖基合成基因,来赋予异源宿主合成新糖基的能力,从而实现对天然产物的新糖基修饰。Tang 和 McDaniel 在 *Streptomyces lividans* 中异源表达了酒霉素/苦霉素(Methymycin/pikromycin)中 D-desosamine 的合成基因簇及其对应的糖基转移酶 DesVII,同时向该重组菌株中引入可以合成不同结构大环内酯的表达载体,最终成功检测到多种 D-desosamine 修饰的大环内酯类化合物<sup>[42]</sup>。这个工作同时也证明 DesVII 具有对糖苷配体很宽泛的识别能力。

为了更方便快捷地在不同宿主中合成新的糖基,Salas 等构建了一系列糖基合成载体(Sugar bisynthesis plasmids)。他们首先使用 PCR 方法扩增糖基合成所需各个基因,再使用特定的限制性酶切位点将各个基因进行连接,构建获得一个游离型载体,并使用红霉素抗性基因启动子 *ermEp\** 来启动这些糖基合成基因的表达<sup>[1,43]</sup>。对这些糖基合成载体的改造也非常容易,为合成特定的目标糖基,可通过引入或剔除不同功能的糖基合成基因,快速构建目标糖基的合成途径。Salas 等对 Oleandomycin (*Streptomyces antibioticus* ATCC11891 产生)中 L-oleandrose 合成基因进行重新整合得到载体 pLN2<sup>[43]</sup>(图 5)。由于 pLN2 含有 NDP-L-olivose 合成所需的所有基因,推测可以合成 NDP-L-olivose。并以此载体为基础根据不同糖基合成途径构建了 NDP-D-olivose, NDP-L-rhamnose, NDP-L-rhodinose 的合成载体。重组菌 *Streptomyces albus* 16F4 含有 Elloramycin 配糖体 8-Demethyltetracenomycin C (8-DMTC)的

合成基因,同时含有 GT ElmGT 的编码基因。将上述 4 个载体导入 *S. albus* 16F4,分析重组菌代谢产物,成功检测到上述 4 种不同糖基修饰的 8-DMTC 衍生物,从而证明了所构建的糖基合成载体在体内可以合成目标糖基,同时也表明 ElmGT 具有较为宽泛的糖基底物识别能力。*Streptomyces argillaceus* 产生的光辉霉素(Mithramycin)是一种抗肿瘤药物,但由于有很强的毒副作用,很大地限制了在临床上的使用。Núñez 等运用组合生物合成方法成功对其进行了新糖基化修饰。突变株 *S. argillaceus* M3W1 可产生 Mithramycin 类似物 Mithramycin SK 和 Mithramycin SDK,载体 pMP3\*BII 可合成糖基 NDP-D-digitoxose,将 pMP3\*BII 导入 *S. argillaceus* M3W1,发现重组菌株除了合成原来的两种产物外,还可以合成另外 3 种新糖基修饰 Mithramycin,分别是 Demycarosyl-3D-β-D-digitoxosylmithramycin SK, Demycarosylmithramycin SDK 和 Demycarosyl-3D-β-D-digitoxosylmithramycin SDK,说明 pMP3\*BII 在 *S. argillaceus* M3W1 中成功合成 NDP-D-digitoxose 并生成对应的糖基化修饰产物<sup>[44]</sup>。活性实验表明,相对于 Mithramycin,这 3 种新化合物具有更好的抗肿瘤活性,其中 Demycarosyl-3D-β-D-digitoxosylmithramycin SK 的细胞毒性低于 Mithramycin,因此具有进一步药物开发的潜力。运用相似的手段,这些糖基合成载体被成功地运用于星形孢菌素(Staurosporine)等另外多种天然产物的糖基修饰改造,显示出较强的适用性<sup>[21,45]</sup>。

这种基于“糖基合成载体”的组合生物合成方法最主要的应用是获得新糖基修饰的天然产物,尤其针对那些具有较好抗肿瘤活性但细胞毒副作用较大的天然产物,通过糖基侧链结构的改造,在某些情况下,可以获得生物活性得

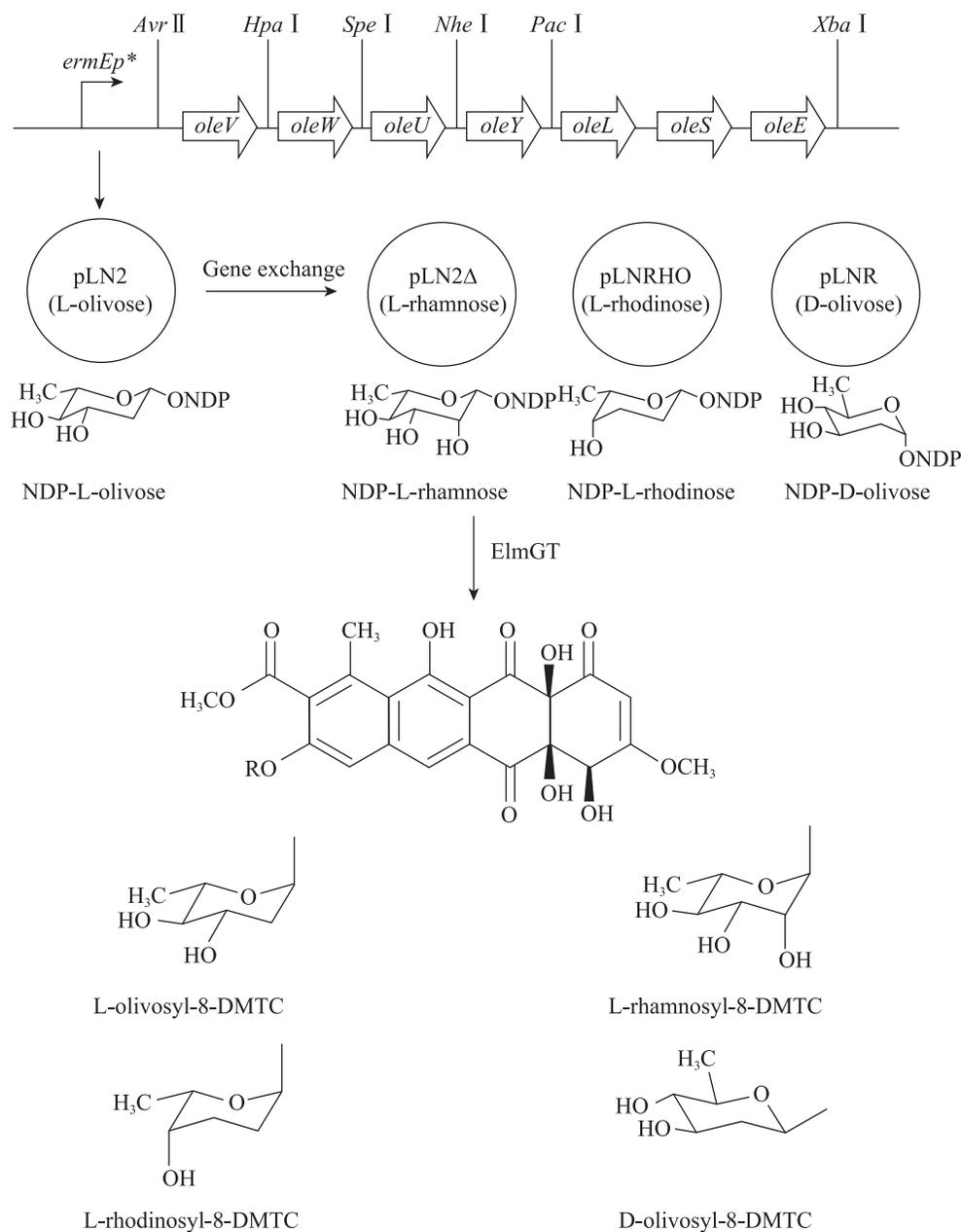


图 5 糖基合成载体的构建以及运用糖基合成载体来对 8-Demethyltetracenomycin C (8-DMTC) 进行新糖基侧链修饰改造

Fig. 5 Construction of sugar cassette plasmids and generation of new glycosylated 8-demethyltetracenomycin C (8-DMTC) derivatives by using these sugar cassette plasmids

以改善的新化合物, 因而可为新药开发提供一种有效的手段; 另外, 通过引入这些不同糖基合成载体, 并分析对应代谢产物糖基结构的变化, 可快速测试 GTs 对糖基底物的识别能力,

深入挖掘 GTs 的底物宽容性; 另一方面, 通过变化糖基合成载体中的基因组合, 结合代谢产物糖基结构的变化, 有助于从体内进行糖基合成基因功能研究。

### 3.2 体外(*In vitro*)酶学法改造糖基侧链及应用

借助于体内基因工程的方法,我们对天然产物糖基合成及其修饰过程有了越来越多的认识。为了深入细致地研究各种糖基合成基因以及 GTs 的功能,人们开始把目光投向体外酶学的研究,并在此基础上发展出了天然产物糖基侧链体外酶学改造法。体外酶学改造法的实现,首先是需要从体外合成活化的底物 NDP-糖,表达具有底物宽容性的 GTs,进而建立酶学水平的糖基转移反应,最终获得新糖基修饰的天然产物。

**3.2.1 体外 NDP-糖的合成:** (1) 糖基合成酶工程改造: 体外酶学法改造糖基侧链的前提是获得 NDP-糖。为了获得结构多样的 NDP-糖,研究者使用蛋白质工程的方法对糖基合成酶进行改造,以获得具有底物宽容性的糖基合成酶。

NDP-糖合成的底物来源是糖-1-磷酸,由对应的糖分子在糖激酶磷酸化的作用下生成。为了获得宽泛底物识别能力的糖激酶,利用随机突变的方法对大肠杆菌来源的半乳糖激酶(Galactokinase)进行改造,获得的突变株 GalK (Y371H)可以识别在 C-2、C-3、C-5 以及 C-6 发生基团变化的 D-半乳糖底物,突变株 GalK (M173L)可以识别在 C-4 位发生异构的 D-半乳糖底物,而双点突变株 GalK (M173L/Y371H)除了具有单点突变株的底物识别能力,还可以识别叠氮基糖(Azido sugars)<sup>[46]</sup>。

(2) 核苷转移酶工程改造: 获得了糖-1-磷酸,接下来需使用核苷转移酶(Nucleotidyltransferase)对其进行 NDP 活化。为拓宽核苷转移酶的底物利用范围,研究者开始尝试使用蛋白质工程的方法对其进行改造。沙门氏菌(*Salmonella enterica* LT2)来源的核苷转移酶 RmlA (D-glucose-thymidyltransferase)与底物 UDP-glucose 或者 TTP 的复合物晶体结构被成

功解析,运用蛋白质工程改造成功拓宽了其对于底物的利用能力,最终 RmlA 及其突变体可以利用多达 30 种结构的糖-1-磷酸<sup>[47-48]</sup>。

(3) NDP-糖的酶学合成: NDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖是大多数天然产物 NDP-糖的前体,研究人员首先发展出该前体的合成方法。一种方法是使用蔗糖、TMP 作为底物,加入蔗糖合成酶(Sucrose synthase,来源于马铃薯)、TDP-葡萄糖-4,6-脱水酶(来源于鼠伤寒沙门氏菌 *Sa. typhimurium*)以及酵母来源的 TMP 激酶,同时在反应体系引入 ATP 再生体系,成功获得 NDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖,其得率约为 70% (相对于反应初加入的 TMP 量)<sup>[49]</sup>。另一种方法是将 NDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖合成相关酶在大肠杆菌(*E. coli* BL21)中共表达,直接使用细胞粗提物进行前体的制备,从而省去了蛋白纯化的工作<sup>[50]</sup>。

NDP-4-酮基-6-脱氧-D-葡萄糖制备方法的建立,极大地促进了天然产物 NDP-糖的体外合成。该前体经过下游异构酶,酮基还原酶以及转氨酶等作用,可最终获得不同结构 NDP-糖。到目前为止,通过体外建立多酶连续反应体系,已成功合成了泰乐菌素(Tylosin)中 D-mycarose<sup>[9]</sup>, Chloroeremomycin 中 L-epivancosamine<sup>[8]</sup>, 多杀菌素(Spinosyn)中 D-forosamine<sup>[51]</sup>和 Kijanimicin 中 L-digitoxose<sup>[52]</sup>。

**3.2.2 糖基转移酶(GTs)底物宽容性挖掘及其改造:** 进行糖基侧链结构改造的工作,决定其成功性的因素是获得具有宽泛底物利用能力的 GTs。底物宽容性包括两个方面,即对 NDP-糖和配糖体两种底物的利用能力。体内的工作表明越来越多具有底物宽容性的 GTs 被发现。Vicenistatin 是 *Streptomyces halstedii* HC-34 产生的一种抗肿瘤聚酮化合物,其中 GT VinC 负责催化氨基糖 dTDP-vicenisamine 连接至配糖体

Vicenilactam 上, 形成 Vicenistatin<sup>[53]</sup>。体外酶学研究表明, VinC 可以催化 dTDP-vicenisamine 修饰至 Neovicenilactam, Brefeldin A 等 8 种配糖体底物上, 生成对应的糖基化修饰产物<sup>[54]</sup>。进一步研究显示, VinC 可以识别利用 dTDP-D-mycarose、dTDP-D-digitoxose 等多种糖基对配糖体 Vicenilactam 进行糖基化修饰<sup>[55]</sup>。以上工作表明 VinC 对配糖体以及糖基底物均显示出十分宽泛的底物利用能力, 可为天然产物新糖基化修饰提供一个重要的工具。星形孢菌素 (Staurosporine) 合成中 GT StaG 除了识别天然糖基底物 NDP-L-ristosamine 外, 还可以利用糖基 NDP-L-rhamnose、NDP-L-olivose、NDP-L-digitoxose 和 NDP-D-olivose, 通过氮苷键连接至星形孢菌素配糖体上<sup>[21]</sup>。Gilvocarcin 合成途径中的 GT GilGT 催化 C-糖基化修饰, 运用 Salas 等构建的糖基合成载体成功合成了多种

糖基修饰的 Gilvocarcin 类衍生物, 从而证明 GilGT 对糖基底物有一定的宽容性<sup>[45]</sup>。除此之外, ElmGT、DesVII 等多种 GTs 均被证明具有底物宽容性<sup>[5]</sup>。

为进一步拓宽 GTs 的底物宽容性, 以获得结构多样的新糖基修饰天然产物, 随机突变、定向进化以及结构域替换等方法被用于 GTs 的结构改造。Urdamycin 中两个 GTs, UrdGT1b 和 UrdGT1c 具有非常高的氨基酸序列相似性 (91% 序列一致性), 但催化的糖基底物却不同 (图 6)。UrdGT1c 催化 NDP-L-夹竹桃糖 (NDP-L-rhodinose) 与 Aquayamycin 的 D-olivose 糖基连接生成二糖侧链, 而 UrdGT1b 催化 NDP-D-olivose 连接至前面二糖侧链中第二个糖基 L-rhodinose 的 C-4 羟基上。序列分析 UrdGT1b 和 UrdGT1c 的不同之处主要集中在 N 端 31 个氨基酸区域, 因此这一区域可能控制了

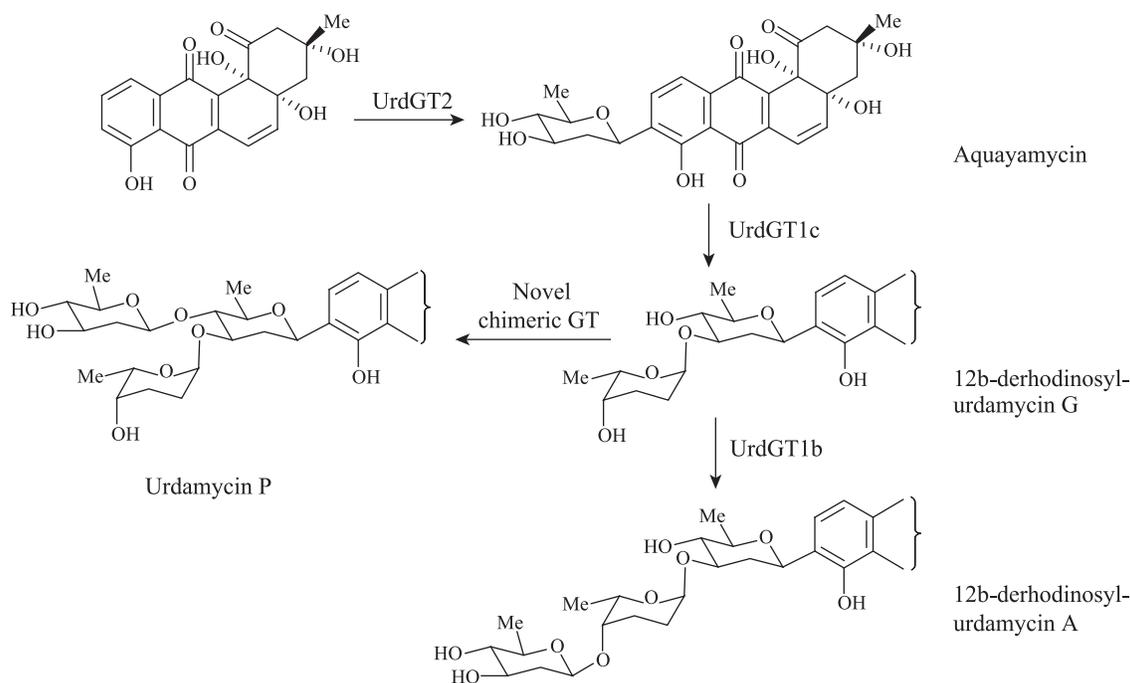


图 6 UrdGT1b 和 UrdGT1c 嵌合突变体 UrdGT1b/1c 催化的一个新的糖基转移反应

Fig. 6 Novel glycosyltransferase reaction catalyzed by chimeric UrdGT1b/1c

底物的特异性<sup>[56]</sup>。Hoffmeister 等对这两个区域片段进行互换,将 UrdGT1b 中这段区域替换为 UrdGT1c 中的对应区域,得到的杂合的 UrdGT1b 表现出类似于 UrdGT1c 的催化活性,同样将 UrdGT1c 中这段区域替换为 UrdGT1b 中的对应区域,得到的杂合 UrdGT1c 也获得了类似 UrdGT1b 的催化活性。进一步研究发现这段 31 个氨基酸长度的区域中只有 10 个氨基酸是决定两者不同底物特异性的关键残基<sup>[57]</sup>。Hoffmeister 等对这 10 个氨基酸进行饱和突变,获得了一类具有新催化活性的突变体,该类突变体可以催化 NDP-D-olivose 连接至二糖侧链中第一个糖基 D-olivose 的 C-4 羟基上,因而生成一个含有分支糖基侧链修饰化合物 Urdamycin P。

Oleandomycin 合成途径中的 GT OleD 被证明对糖基底物及配糖体具有一定的底物宽容性。Williams 等通过定向进化等方法对 OleD 进行改造,获得多个具有宽泛底物识别能力的 OleD 突变体,可识别的底物涵盖 10 多种已知糖基底物和 70 多种配糖体<sup>[58-63]</sup>。其中一个三点突变体 OleD (P67T, S132F, A242V)可以利用 22 种 NDP-糖库中的 15 种糖基底物,而野生型 OleD 仅可以利用 3 种,并且发现该突变体对 6 种非天然配糖体的糖基修饰能力,明显高于野生型 OleD<sup>[58]</sup>。Gantt 等发现利用糖基转移酶所催化的逆向反应在体外制备 U(T)DP-D-葡萄糖时,使用 OleD 的四点突变体 TDP-16 (P67T, S132F, A242L, Q268V)进行酶学反应, U(T)DP-D-葡萄糖的得率最高<sup>[64]</sup>。

天然产物中,通过 O-苷键连接的糖基容易水解,不够稳定,而通过 C-苷键连接的糖基则更为稳定。LanGT2 (来源于 Landomycin A 合成途径)和 UrdGT2 (来源于 Urdamycin A 合成途径)催化的糖基转移反应中,识别的糖基底物均

为 NDP-D-olivose,识别的配糖体骨架也十分相似,不同的是 LanGT2 催化形成 O-苷键,而 UrdGT2 催化形成 C-苷键。Bechthold 等通过对两者的序列和结构特征进行比对分析,寻找出决定两者不同催化机制的可能因素,接着理性构建了多种 LanGT2 突变体,最终成功筛选到具有催化形成 C-苷键能力的多个 LanGT2 突变体<sup>[65]</sup>。其中一个 LanGT2 突变体在一段 10 个氨基酸长度的区域发生变换,获得了催化 C-苷键形成的能力,表明该段区域是决定不同糖苷键形成的重要位置。

因此,通过对 GTs 进行蛋白质工程改造,可以用来拓宽 GTs 的底物宽容性,提高 GTs 的催化活性,同时也有可获得具有新催化活性的 GTs。

**3.2.3 体外天然产物糖基化修饰改造:种类丰富 NDP-糖库的建立以及具有底物宽容性 GTs 的发现及开发,极大地促进了体外天然产物糖基化修饰改造的进程。**

(1) 经典体外酶学法对天然产物进行糖基侧链改造:体外制备不同种类 NDP-糖并纯化 GTs,具有底物宽容性的 GTs 催化配糖体和不同 NDP-糖基发生连接反应,从而对天然产物进行糖基侧链改造(图 7A)。这种策略首先成功应用于酒霉素/苦霉素(Methymycin/picromycin)以及万古霉素(Vancomycin)等糖基修饰改造<sup>[66-67]</sup>。GtfE 和 GtfD 是万古霉素合成途径中的两个 GTs,之前体内工作便表明 GtfE 和 GtfD 对糖基底物具有一定的底物宽泛利用能力。为进一步挖掘 GtfE 的底物利用能力,选用 23 种 TDP-糖作为底物,惊讶地发现在体外酶学反应中 GtfE 可以利用其中的 21 种,生成对应的糖基化修饰产物。其中一种新糖基修饰万古霉素的抗菌生物活性得到提高。

(2) 运用糖基转移酶催化的逆向反应进行

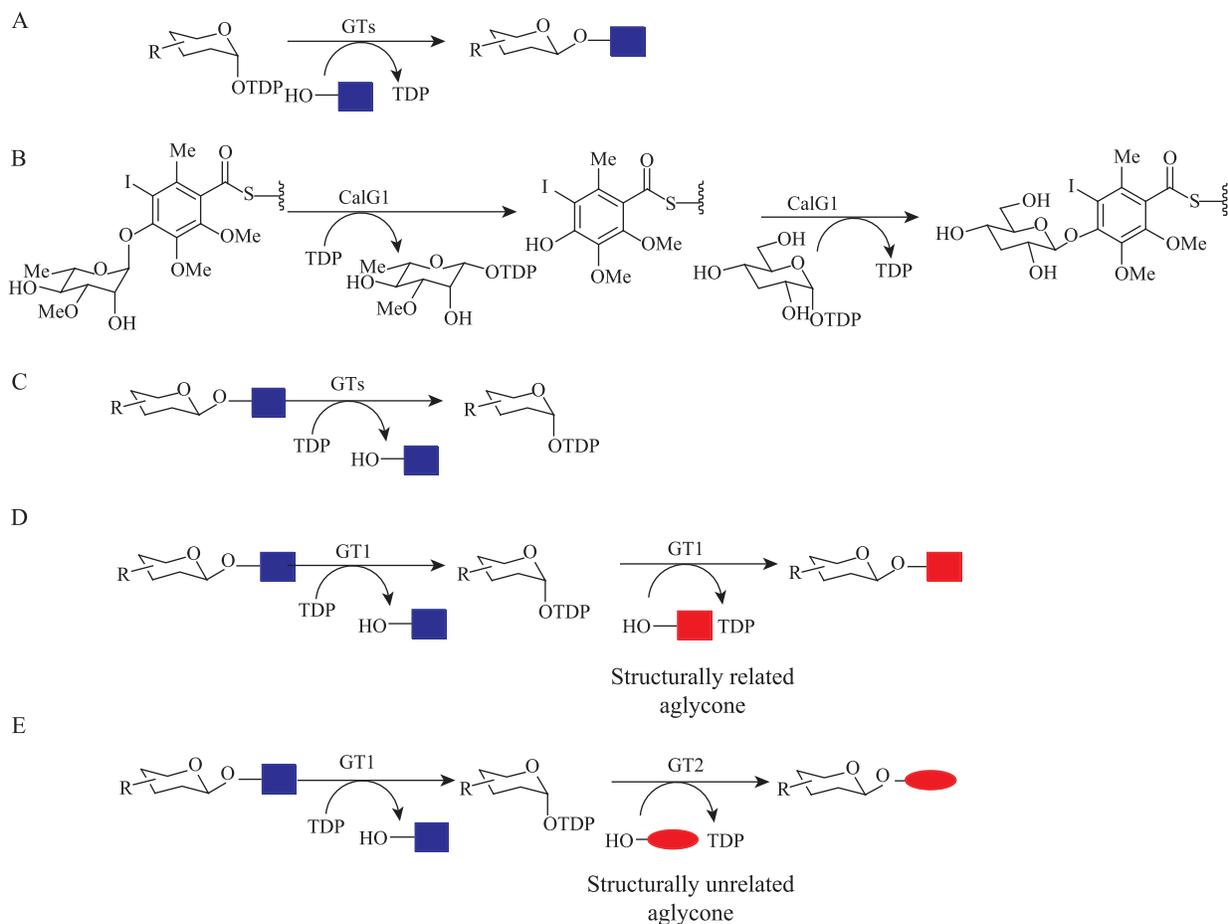


图 7 糖基转移酶催化的反应以及在糖基侧链改造中的应用

Fig. 7 Reactions catalyzed by GTs and its application in generation of new glycosylated derivatives

注: A: 糖基转移酶催化的经典反应; B: CalG1 催化糖基转移逆向反应并可同时催化对新糖基的转移反应; C: 糖基转移酶催化的糖基转移逆向反应; D: 同一糖基转移酶催化的糖苷配体互换反应; E: 运用识别同样糖基底物的两个转移酶来对结构不同糖苷配体进行糖基化修饰。

Note: A: Classical reaction catalyzed by GTs; B: CalG1 catalyzed reverse glycosyl transfer reaction and glycosyl transfer reaction toward new TDP-sugar; C: Reverse glycosyl transfer reaction catalyzed by GTs; D: Aglycone exchange reactions catalyzed by a single GT; E: Formation of glycosylated derivatives of structurally unrelated aglycone by using two GTs that recognize the same TDP-sugar.

天然产物糖基侧链修饰改造: 在刺孢霉素 (Calicheamicin) 中 GT CalG1 的研究工作中, Thorson 等发现 CalG1 可以催化糖基转移的逆向反应, 即在 TDP 存在的条件下, CalG1 催化已发生糖基修饰的天然产物发生去糖基化反应, 生成对应的 TDP-糖和配糖体<sup>[68]</sup>(图 7B)。同时发现, 当上述反应体系中存在新种类的 TDP-糖时, CalG1 可催化生成新糖基修饰的产

物(图 7)。此外, GtfE、GtfD 和 SnogD 等多种 GTs 均被证明具有逆向反应催化能力, 由此推测催化糖基化修饰逆向反应可能是 GTs 的一个共有特征<sup>[68-69]</sup>。在利用 OleD 突变体催化的糖基转移逆向反应进行 NDP-糖制备时, Gantt 等报道在反应中使用 2-氯-4-硝基苯基-糖苷类化合物(2-Chloro-4-nitrophenyl glycosides)作为糖基供体可有效增加 NDP-糖的得率, 并证明生

成的 NDP-糖可有效地和下游的糖基转移反应相偶联,生成对应糖基化修饰的新产物<sup>[64]</sup>。同时,由于逆向反应中所生成的 2-氯-4-硝基苯酚(2-Chloro-4-nitrophenolate)在 410 nm 波长处有特异吸收,因此可通过检测 410 nm 吸收值的变化来方便快速地监测反应的进程。对 GTs 催化可逆反应的不断认识,有效地推动了体外糖基化修饰研究工作的发展。首先,利用 GTs 催化的逆向反应可用来制备天然的 NDP-糖,尤其对于某些复杂结构 NDP-糖基的制备,该方法相对于使用多酶连续反应的 NDP-糖制备方法具有一定的优越性<sup>[70-71]</sup>(图 7C)。其次,使用同一糖基转移酶可以实现结构类似的糖苷配体的互换反应,即通过催化糖基转移逆向反应生成对应的 NDP-糖,再催化该糖基修饰至结构类似的糖苷配体中,从而获得新糖基修饰的产物(图 7D)。除此之外,还可以利用识别同样糖基底物的两个转移酶来对结构不同糖苷配体进行糖基化修饰(图 7E)。因此,利用 GTs 具有催化糖基修饰及其逆向反应的两种特性,在反应体系中引入不同组合的糖基转移酶、糖基修饰天然产物、配糖体和 NDP-糖,这种“一锅煮”(One pot)的方式可以快速实现配糖体的不同糖基化修饰。

#### 4 小结与展望

糖基化修饰与天然产物的生物活性紧密相关,引起了人们的极大关注。糖基合成途径及其修饰相关酶的功能被不断研究,为天然产物糖基侧链改造提供了非常好的基础和机遇。近些年来,运用体内基因工程的方法尤其是组合生物合成技术,成功对多种天然产物进行了糖基侧链改造。在体外,通过蛋白质工程方法对糖激酶、核苷转移酶、糖基转移酶等进行改造,拓宽底物利用能力,并成功运用到天然产物糖基侧链改造的工作中。值得指出的是,糖基转

移酶可以催化糖基修饰逆向反应的发现,为体外进行 NDP-糖制备及糖基侧链改造提供了新的思路。体内外方法的并用成功获得了大量的新糖基修饰天然产物,其中有些在生物活性上有显著提高,显示出这些方法具有很好的应用前景。

但目前天然产物糖基侧链改造的工作依然面临着一些需要解决的问题。首先,很多报道表明新糖基修饰天然产物产量较低,原因可能有两方面:一方面是由于糖基转移酶催化非天然底物的效率较低,另一方面是新糖基底物的前体供应量不足。由于目前直接检测体内 NDP-糖含量的技术还不完善,所以很难确定新糖基是否正常合成。大多数情况下是通过检测最终新糖基修饰产物来判断新糖基是否合成,所以当目标产物产量较低时就很难确定是哪一方面原因。因此,需要尽快建立体内 NDP-糖的定量检测技术。同时,应加大对糖基合成酶催化机理的研究,可为如何提高天然糖基的合成效率提供理论指导,也可以用于开发新的非天然糖基的合成策略。据报道,有相当数量的糖基转移酶底物特异性较强,所以如何有效地拓展糖基转移酶的底物宽容性是一个重要的课题。通过深入开展糖基转移酶晶体结构解析及催化机理的研究工作,才能有效地指导对糖基转移酶的理性改造,增强其催化效率以及底物识别能力,同时还有可能获得具有新催化活性的糖基转移酶。其次,许多天然产物生物活性的分子机制仍不清楚,比如,其糖基分子对活性影响的机制还不清楚,所以如果以改善生物活性为目标,对天然产物进行糖基侧链改造将具有很大的盲目性。需增强对天然产物生物活性分子机制的研究,深入理解天然产物结构与生物活性之间的构效关系,以指导天然产物糖基侧链的理性改造。最后,目前很多体内的糖基化修饰工作是借助于糖基合成载体来实现的,这些载体

大多是游离型载体, 当运用于实际工业生产中时, 需要加入大量对应的抗生素来保证载体稳定存在。所以, 有必要对目前使用的糖基合成载体进行一定的完善, 可通过构建整合型载体来代替对应游离型载体进行体内糖基的合成。

当前, 细菌耐药性问题愈发严重, 因此亟待通过结构修饰的方法来改善已有药物活性, 延长其生命周期。相对于化学法, 生物学法可以更特异地进行糖基结构改造, 并且具有低污染、低能耗等优点。随着研究的不断深入, 天然产物糖基侧链改造工作将得以快速发展, 必将为新药开发做出贡献。

## 参 考 文 献

- [1] Salas JA, Mendez C. Engineering the glycosylation of natural products in actinomycetes[J]. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(5): 219–232.
- [2] Weymouth Wilson AC. The role of carbohydrates in biologically active natural products[J]. *Natural Product Reports*, 1997, 14(2): 99–110.
- [3] He XM, Agnihotri G, Liu HW. Novel enzymatic mechanisms in carbohydrate metabolism[J]. *Chemical Reviews*, 2000, 100(12): 4615–4661.
- [4] Thibodeaux CJ, Melancon CE, Liu HW. Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification[J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1008–1016.
- [5] Thibodeaux CJ, Melancon CE, Liu HW. Natural-product sugar biosynthesis and enzymatic glycodiversification[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2008, 47(51): 9814–9859.
- [6] Gantt RW, Peltier-Pain P, Thorson JS. Enzymatic methods for glyco (diversification/randomization) of drugs and small molecules[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(11): 1811–1853.
- [7] Singh S, Phillips GN, Thorson JS. The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1201–1237.
- [8] Chen HW, Thomas MG, Hubbard BK, et al. Deoxysugars in glycopeptide antibiotics: Enzymatic synthesis of TDP-L-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(22): 11942–11947.
- [9] Takahashi H, Liu YN, Liu HW. A two-stage one-pot enzymatic synthesis of TDP-L-mycarose from thymidine and glucose-1-phosphate[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(5): 1432–1433.
- [10] Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, et al. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 326: 929–939.
- [11] Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, et al. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 328(2): 307–317.
- [12] Sinnott ML. Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer[J]. *Chemical Reviews*, 1990, 90(7): 1171–1202.
- [13] Borisova SA, Zhao LS, Melancon CE, et al. Characterization of the glycosyltransferase activity of DesVII: Analysis of and implications for the biosynthesis of macrolide antibiotics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(21): 6534–6535.
- [14] Lu W, Leimkuhler C, Gatto GJ, et al. AknT is an activating protein for the glycosyltransferase AknS in L-aminodeoxysugar transfer to the aglycone of aclacinomycin a[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(5): 527–534.
- [15] Yuan YQ, Chung HS, Leimkuhler C, et al. *In vitro* reconstitution of EryCIII activity for the preparation of unnatural macrolides[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(41): 14128–14129.
- [16] Moncrieffe MC, Fernandez MJ, Spiteller D, et al. Structure of the glycosyltransferase eryciiii in complex with its activating P450 homologue EryCII[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 415(1): 92–101.

- [17] Kunzel E, Faust B, Oelkers C, et al. Inactivation of the *urdGT2* gene, which encodes a glycosyltransferase responsible for the C-glycosyltransfer of activated D-olivose, leads to formation of the novel urdamycins I, J, and K[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(48): 11058–11062.
- [18] Mittler M, Bechthold A, Schulz GE. Structure and action of the C-C bond-forming glycosyltransferase biosynthesis of the *urdGT2* involved in the antibiotic urdamycin[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 372(1): 67–76.
- [19] Fischbach MA, Lin HN, Liu DR, et al. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(3): 571–576.
- [20] Onaka H, Taniguchi S, Igarashi Y, et al. Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*[J]. *Journal of Antibiotics*, 2002, 55(12): 1063–1071.
- [21] Salas AP, Zhu LL, Sanchez C, et al. Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: Sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(1): 17–27.
- [22] Zhao PJ, Bai LQ, Ma J, et al. Amide N-glycosylation by Asm25, an N-glycosyltransferase of ansamitocins[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(8): 863–874.
- [23] Salah-Bey K, Doumith M, Michel JM, et al. Targeted gene inactivation for the elucidation of deoxysugar biosynthesis in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Molecular and General Genetics*, 1998, 257(5): 542–553.
- [24] Salas JA, Mendez C. Biosynthesis pathways for deoxysugars in antibiotic-producing actinomycetes: Isolation, characterization and generation of novel glycosylated derivatives[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2005, 9(2): 77–85.
- [25] Wang LR, White RL, Vining LC. Biosynthesis of the dideoxysugar component of jadomycin B: Genes in the jad cluster of *Streptomyces venezuelae* ISP5230 for L-digitoxose assembly and transfer to the angucycline aglycone[J]. *Microbiology-SGM*, 2002, 148: 1091–1103.
- [26] Jakeman DL, Borissow CN, Graham CL, et al. Substrate flexibility of a 2,6-dideoxyglycosyltransferase[J]. *Chemical Communications*, 2006, 35: 3738–3740.
- [27] Hoffmeister D, Ichinose K, Domann S, et al. The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: Cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster[J]. *Chemistry & Biology*, 2000, 7(11): 821–831.
- [28] Zhao LS, Sherman DH, Liu HW. Biosynthesis of desosamine: Construction of a new methymycin/neomethymycin analogue by deletion of a desosamine biosynthetic gene[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(39): 10256–10257.
- [29] Borisova SA, Zhao LS, Sherman DH, et al. Biosynthesis of desosamine: Construction of a new macrolide carrying a genetically designed sugar moiety[J]. *Organic Letters*, 1999, 1(1): 133–136.
- [30] Luzhetskyy A, Taguchi T, Fedoryshyn M, et al. LanGT2 catalyzes the first glycosylation step during landomycin A biosynthesis[J]. *ChemBioChem*, 2005, 6(8): 1406–1410.
- [31] Luzhetskyy A, Zhu LL, Gibson M, et al. Generation of novel landomycins M and O through targeted gene disruption[J]. *ChemBioChem*, 2005, 6(4): 675–678.
- [32] Luzhetskyy A, Liu T, Fedoryshyn M, et al. Function of *lanGT3*, a glycosyltransferase gene involved in landomycin A biosynthesis[J]. *ChemBioChem*, 2004, 5(11): 1567–1570.
- [33] Luzhetskyy A, Fedoryshyn M, Durr C, et al. Iteratively acting glycosyltransferases involved in the hexasaccharide biosynthesis of landomycin A[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(7): 725–729.
- [34] Xiao Y, Li SM, Niu SW, et al. Characterization of tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified tiacumicin analogues and revealing a

- tailoring dihalogenase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(4): 1092–1105.
- [35] Li S, Xiao J, Zhu Y, et al. Dissecting glycosylation steps in lobophorin biosynthesis implies an iterative glycosyltransferase[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(6): 1374–1377.
- [36] Luzhetskyy A, Vente A, Bechthold A. Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of biologically active natural products that contain oligosaccharides[J]. *Molecular BioSystems*, 2005, 1(2): 117–126.
- [37] Madduri K, Kennedy J, Rivola G, et al. Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(1): 69–74.
- [38] Zhao LS, Ahlert J, Xue YQ, et al. Engineering a methymycin/pikromycin-calicheamicin hybrid: Construction of two new macrolides carrying a designed sugar moiety[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(42): 9881–9882.
- [39] Doumith M, Legrand R, Lang C, et al. Interspecies complementation in *Saccharopolyspora erythraea*: Elucidation of the function of oleP1, oleG1 and oleG2 from the oleandomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* and generation of new erythromycin derivatives[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(5): 1039–1048.
- [40] Gaisser S, Reather J, Wirtz G, et al. A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(2): 391–401.
- [41] Gaisser S, Martin CJ, Wilkinson B, et al. Engineered biosynthesis of novel spinosyns bearing altered deoxyhexose substituents[J]. *Chemical Communications*, 2002, 6: 618–619.
- [42] Tang L, McDaniel R. Construction of desosamine containing polyketide libraries using a glycosyltransferase with broad substrate specificity[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(6): 547–555.
- [43] Rodriguez L, Aguirrezabalaga I, Allende N, et al. Engineering deoxysugar biosynthetic pathways from antibiotic-producing microorganisms: A tool to produce novel glycosylated bioactive compounds[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9(6): 721–729.
- [44] Nunez LE, Nybo SE, Gonzalez-Sabin J, et al. A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55(12): 5813–5825.
- [45] Shepherd MD, Liu T, Mendez C, et al. Engineered biosynthesis of gilvocarcin analogues with altered deoxyhexopyranose moieties[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(2): 435–441.
- [46] Hoffmeister D, Yang J, Liu L, et al. Creation of the first anomeric D/L-sugar kinase by means of directed evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(23): 13184–13189.
- [47] Barton WA, Lesniak J, Biggins JB, et al. Structure, mechanism and engineering of a nucleotidyltransferase as a first step toward glycorandomization[J]. *Nature Structural Biology*, 2001, 8(6): 545–551.
- [48] Barton WA, Biggins JB, Jiang JQ, et al. Expanding pyrimidine diphosphosugar libraries via structure-based nucleotidyltransferase engineering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(21): 13397–13402.
- [49] Elling L, Rupprath C, Gunther N, et al. An enzyme module system for the synthesis of dTDP-activated deoxysugars from dTMP and sucrose[J]. *ChemBioChem*, 2005, 6(8): 1423–1430.
- [50] Oh J, Lee SQ, Kim BG, et al. One-pot enzymatic production of dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose from dTMP and glucose-1-phosphate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 84(4): 452–458.
- [51] Hong L, Zhao ZB, Melancon CE, et al. *In vitro* characterization of the enzymes involved in TDP-D-foresamine biosynthesis in the spinosyn pathway of *Saccharopolyspora spinosa*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(14): 4954–4967.
- [52] Zhang H, White-Phillip JA, Melancon CE, et al. Elucidation of the kijanimicin gene cluster: Insights into the biosynthesis of spirotronate antibiotics and nitrosugars[J]. *Journal of the American*

- Chemical Society, 2007, 129(47): 14670–14683.
- [53] Ogasawara Y, Katayama K, Minami A, et al. Cloning, sequencing, and functional analysis of the biosynthetic gene cluster of macrolactam antibiotic vicenistatin in *Streptomyces halstedii*[J]. *Chemistry & Biology*, 2004, 11(1): 79–86.
- [54] Minami A, Uchida R, Eguchi T, et al. Enzymatic approach to unnatural glycosides with diverse aglycon scaffolds using glycosyltransferase VinC[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(17): 6148–6149.
- [55] Minami A, Eguchi T. Substrate flexibility of vicenisaminyltransferase VinC involved in the biosynthesis of vicenistatin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(16): 5102–5107.
- [56] Hoffmeister D, Ichinose K, Bechthold A. Two sequence elements of glycosyltransferases involved in urdamycin biosynthesis are responsible for substrate specificity and enzymatic activity[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(6): 557–567.
- [57] Hoffmeister D, Wilkinson B, Foster G, et al. Engineered urdamycin glycosyltransferases are broadened and altered in substrate specificity[J]. *Chemistry & Biology*, 2002, 9(3): 287–295.
- [58] Williams GJ, Zhang C, Thorson JS. Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(10): 657–662.
- [59] Williams GJ, Goff RD, Zhang CS, et al. Optimizing glycosyltransferase specificity via ‘hot spot’ saturation mutagenesis presents a catalyst for novobiocin glycorandomization[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(4): 393–401.
- [60] Williams GJ, Thorson JS. A high-throughput fluorescence-based glycosyltransferase screen and its application in directed evolution[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(3): 357–362.
- [61] Gantt RW, Goff RD, Williams GJ, et al. Probing the aglycon promiscuity of an engineered glycosyltransferase[J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2008, 47(46): 8889–8892.
- [62] Williams GJ, Yang J, Zhang C, et al. Recombinant *E. coli* prototype strains for *in vivo* glycorandomization[J]. *ACS Chemical Biology*, 2011, 6(1): 95–100.
- [63] Yang M, Proctor MR, Bolam DN, et al. Probing the breadth of macrolide glycosyltransferases: *In vitro* remodeling of a polyketide antibiotic creates active bacterial uptake and enhances potency[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(26): 9336–9337.
- [64] Gantt RW, Peltier-Pain P, Cournoyer WJ, et al. Using simple donors to drive the equilibria of glycosyltransferase-catalyzed reactions[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(10): 685–691.
- [65] Harle J, Gunther S, Lauinger B, et al. Rational design of an aryl-C-glycoside catalyst from a natural product O-glycosyltransferase[J]. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(4): 520–530.
- [66] Borisova SA, Zhang CS, Takahashi H, et al. Substrate specificity of the macrolide-glycosylating enzyme pair DesVIII/DesVII: Opportunities, limitations, and mechanistic hypotheses[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(17): 2748–2753.
- [67] Fu X, Albermann C, Jiang JQ, et al. Antibiotic optimization via *in vitro* glycorandomization[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(12): 1467–1469.
- [68] Zhang CS, Griffith BR, Fu Q, et al. Exploiting the reversibility of natural product glycosyltransferase-catalyzed reactions[J]. *Science*, 2006, 313(5791): 1291–1294.
- [69] Siitonen V, Claesson M, Patrikainen P, et al. Identification of late-stage glycosylation steps in the biosynthetic pathway of the anthracycline nogalamycin[J]. *ChemBioChem*, 2012, 13(1): 120–128.
- [70] Zhang CS, Albermann C, Fu X, et al. The *in vitro* characterization of the iterative avermectin glycosyltransferase AvebI reveals reaction reversibility and sugar nucleotide flexibility[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(51): 16420–16421.
- [71] Bode HB, Muller R. Reversible sugar transfer by glycosyltransferases as a tool for natural product (bio)synthesis[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(13): 2147–2150.