

氨基糖苷类抗生素生物合成研究进展

李思聪 孙宇辉*

(武汉大学药学院, 武汉 430072)

摘要: 作为曾经治疗细菌感染的一线临床药物, 氨基糖苷类抗生素在人类与病原微生物的抗争中作出了不可磨灭的巨大贡献, 也成就了这一类抗生素的辉煌。虽然, 伴随着其耳毒性和肾毒性等毒副作用, 以及日益严重的耐药性的严峻挑战, 但借助现代科学技术的发展和认知水平的提高, 氨基糖苷类抗生素许多不曾被了解的新的生物活性也正不断地丰富和拓展着它新的潜能, 使之依然成为人类医药宝库中不可或缺的重要一员。基于此, 本文从分子遗传学、生物化学及结构生物学角度对常见的天然和化学半合成氨基糖苷类抗生素生物合成的研究进展进行简要的概述。

关键词: 氨基糖苷类抗生素; 生物合成

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Research advances in aminoglycoside biosynthesis

Li Si-cong and Sun Yu-hui

(School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract As a kind of first-line antibiotics clinically used for treating bacterial infections, aminoglycosides have greatly contributed to human health against pathogenic microbes and its brilliance has also been realized. Despite its side effects such as ototoxicity and nephrotoxicity and growing challenges of drug resistance, aminoglycosides are still an indispensable and important member of the treasure house of medicine, since many new bioactivities of aminoglycosides that have not been known are constantly enriching and expanding their new potential with the development of science and technology and understanding. In this review, the research progress in genetics, chemical biology, and structural biology of natural and semi-synthesized aminoglycoside are summarized and briefly discussed.

Key words Aminoglycoside antibiotics; Biosynthesis

氨基糖苷 (aminoglycoside) 抗生素是以氨基环醇为母核, 并含有氨基糖环和糖苷键为结构特征的一类化合物。1944 年, 第一例氨基糖苷类抗生素链霉素 (streptomycin) 从灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 中被发现 (图 1)^[1], 由于对结核分枝杆菌表现出的优良活性, 成为当时治疗肺结核的特效药, 其发现者 Waksman 于 1952 年获得诺贝尔生理学或医学奖。此后, 氨基糖苷类抗生素的发现、分离与鉴定进入黄金时代, 更多的氨基糖苷类抗生素被发

现并应用于临床, 如 1949 年, Waksman 等^[2]从弗雷德链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 中发现的新霉素 (neomycin); 1957 年, Umezawa 等^[3]从卡那霉素链霉菌 (*Streptomyces kanamyceticus*) 中发现的卡那霉素 (kanamycin); 1963 年, Weinstein 等^[4]从棘孢小单孢菌 (*Micromonospora echinospora*) 中发现的庆大霉素 (gentamicin); 1967 年, Higgins 等^[5]从黑暗链霉菌 (*Streptomyces tenebrarius*) 中发现的妥布霉素 (tobramycin), 以及 Weinstein 等^[6]于 1970 年从伊尼

收稿日期: 2019-08-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 31470186)

作者简介: 李思聪, 男, 生于 1989 年, 在读博士研究生, 研究方向为微生物与生化药学, E-mail: lastspellcard@whu.edu.cn

* 通讯作者, E-mail: yhsun@whu.edu.cn

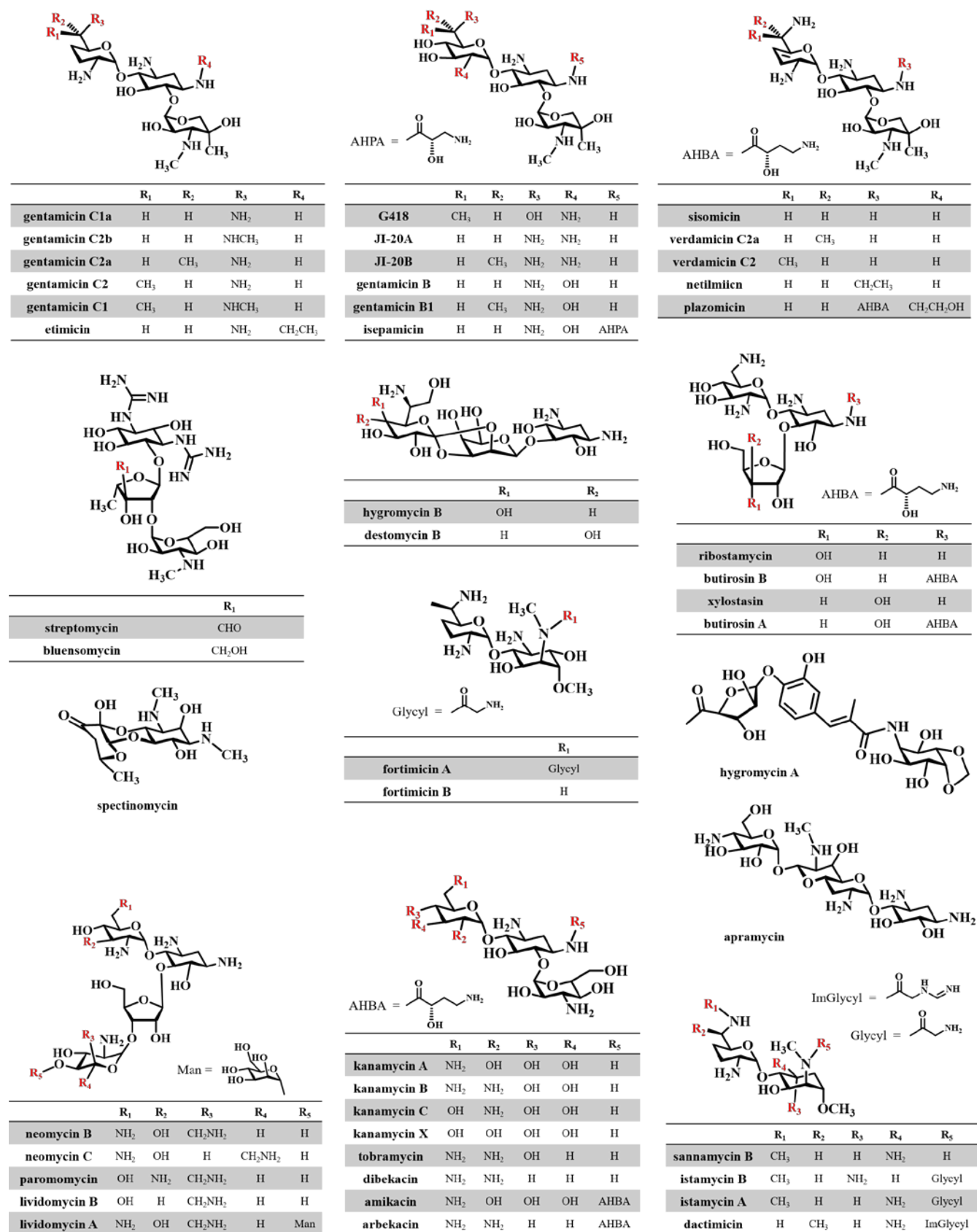


图1 常见的氨基糖苷类化合物
Fig. 1 Amino glycoside compounds

奥小单孢菌 (*Micromonospora inyoensis*) 中发现的西索米星 (sisomicin) 等 (图 1)。尽管结构上各有差异,但它们发挥作用的基本原理都是通过特异性地结合于细菌核糖体 30S 小亚基 16S rRNA 的氨酰-tRNA 位点,干扰细菌蛋白质合成,从而表现出对细菌,尤其是革兰阴性菌优异的杀灭活性^[7-9],因此被广泛应用于临床治疗,对人类的健康做出了极其重要的贡献。近年来,随着耐药性的日益严重,氨基糖苷类抗生素通过与 β -内酰胺类抗生素的协同作用,也成为控制多重耐药菌的重要策略之一^[10]。同时,随着研究不断深入和拓展,氨基糖苷类抗生素更多新的生物活性被揭示出来,如在抗病毒方面,以庆大霉素为代表的氨基糖苷类抗生素可抑制 HIV 相关多肽与反式激活响应 (trans-activation response, TAR) RNA 的结合^[11];庆大霉素及其代谢中间产物 G418 能够恢复由无义突变引起的翻译提前终止 (premature termination codon, PTC),从而激活肿瘤细胞中的抑制因子 p53,使肿瘤细胞凋亡^[12-13],这一新发现赋予了这一传统药物在癌症治疗方面的巨大潜力。此外,庆大霉素还可以作为增感剂,通过与喜树碱、洋地黄毒苷和长春花碱等联用,在体外显著提高对肺癌细胞 NCI-H460 的抑制和杀灭活性^[14]。令人鼓舞的是,2018 年 6 月 26 日,美国 FDA 批准 Achaogen 公司基于西索米星经化学修饰而获得的 plazomicin (商品名 ZEMDRITM) 用于治疗多重耐药性革兰阴性菌导致的严重感染 (图 1)。它能克服多种氨基糖苷钝化酶对抗生素分子的破坏,是针对多重耐药性革兰阴性菌感染的最新一代氨基糖苷类抗生素。这些新活性的揭示,向人们展示出氨基糖苷这一曾经辉煌的经典药物“宝刀未老”,依然绽放出新的锋芒。因此,进一步发掘氨基糖苷类抗生素结构和活性的潜力,成为了人们新的期待。

为了深入挖掘氨基糖苷类抗生素的潜力,特别是运用现代合成生物学和代谢工程等方法对其进行结构优化和定向改造,全面彻底地阐明其生物合成途径是实现这一目的的重要前提。在以庆大霉素为代表的基糖苷类抗生素生物合成早期的研究中,美国先灵公司 Testa 和日本协和发酵工业有限公司 Kase 等利用传统理化诱变方法随机获得一系列庆大霉素生物合成阻断突变株,通过对其发酵产物结构的鉴定和分析,并结合同位素标记前体喂养,推导出庆大霉素可能的生物合成途径^[15-18]。直到进入 21 世纪,

基因组测序技术的快速发展以及基糖苷类抗生素产生菌遗传操作系统的突破,大大加速了其生物合成机制探索的进程。来自遗传学、生物化学及化学生物学,特别是结构生物学的国内外研究进展使其生物合成过程正逐渐清晰,为老药新用的理性定向改造提供了理论支撑。

根据氨基糖苷类抗生素结构差异,可将氨基糖苷化合物分为两大类型,即氨基环醇 (aminocyclitol) 型和 2-脱氧链霉胺 (2-deoxystreptamine, 2-DOS) 型。对于后者,又可根据母核上的糖环取代基,分为 4,5-二取代型、4,6-二取代型和单取代型。本文将对常见的天然和化学半合成氨基糖苷类抗生素生物合成的研究进展进行简要的概述和总结。

1 氨基环醇型氨基糖苷类抗生素的生物合成

该类型抗生素都具有氨基环醇的六元碳环结构,其合成起始化合物均为肌醇 (myo-inositol)。由于共有的母体结构,因此这类抗生素的生物合成共用肌醇的生物合成途径,其生物合成途径为:肌醇-1-磷酸合酶将葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate) 催化生成肌醇-1-磷酸 (myo-inositol-1-phosphate)。然后在磷酸酶的作用下去磷酸化,产生肌醇^[19-21]。肌醇作为合成的起始化合物,参与所有氨基环醇型氨基糖苷类抗生素的生物合成 (图 2)。对于该家族最著名的成员——链霉素,首先在脱氢酶 StrI 的作用下,肌醇 C-2 位羟基被氧化形成鲨肌醇单酮 (scyllo-inosose)^[22],随后氨基转移酶 StsC 将羰基转化为氨基,生成鲨肌醇糖胺 (scyllo-inosamine)^[23]。该中间体被磷酸基和脒基修饰,形成链霉胍-6-磷酸 (streptidine-6-phosphate)。根据推测,它与一个结构独特的五元糖环—链霉糖 (streptose) 相连,形成拟二糖 (pseudodisaccharide) 结构,再与一个葡萄糖环相连,形成拟三糖 (pseudotrisaccharide) 骨架。此外还需要经过脱氢、氨基化和甲基化等多步后修饰才能最终合成链霉素 (图 2)^[24]32.2kDa (StrL)。虽然链霉素以链霉胺为母核,但在生物合成途径中,并不直接产生链霉胺^[25]。此外,如果链霉素 C-3' 位侧链上的羰基被羟甲基取代,则形成双氢链霉素 (dihydrostreptomycin 或 bluensomycin),它可能与链霉素的生物合成相关联^[26]。

在该家族另一重要成员壮观霉素 (spectinomycin) 的生物合成中,根据 Sohng 研究组异源表达的研究结果,肌醇的 C-1 位的羟基被脱氢酶 SpcB 催化氧化,

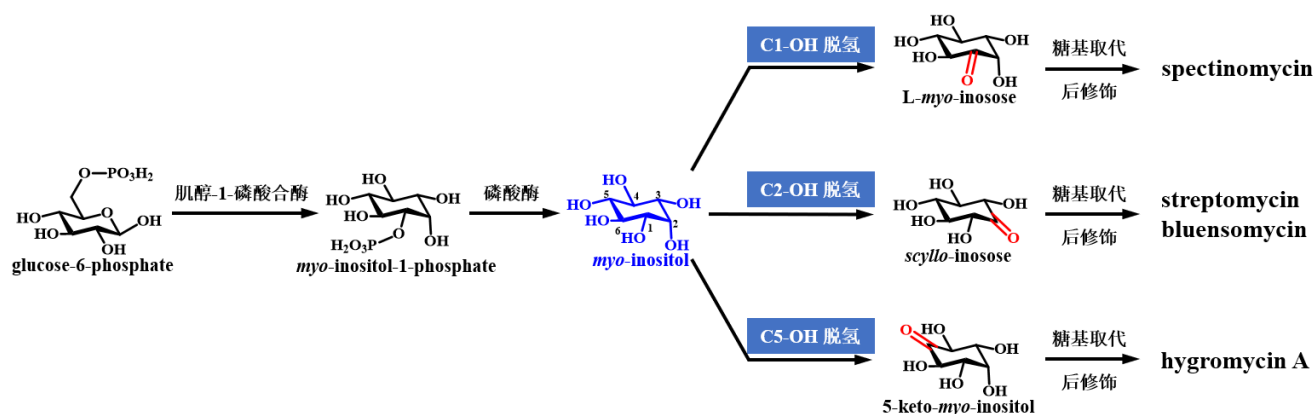


图2 氨基环醇型氨基糖苷抗生素生物合成途径及其氨基糖苷家族成员

Fig. 2 Biosynthesis of aminocyclitol and its members

产生 *L*-肌醇单酮 (*L*-myo-inosose), 然后通过氨基转移酶 SpcS2 催化产生 *L*-肌醇糖胺 (*L*-myo-inosamine), 再经过一轮类似的酮基氨基化反应, 便产生链霉胺的差向异构体 2-*epi*-链霉胺 (2-*epi*-streptamine)^[21]。而它的 N-1 和 N-3 位被甲基转移酶 SpcM 修饰, 生成放线胺 (actinamine)。糖基转移酶 SpcG 将放线胺与壮观糖 (spectinose) 环相连, 形成拟二糖结构, 同时放线胺环的羟基与壮观糖 C-2' 位羰基与形成半缩醛结构, 即为壮观霉素 (图 2)^[27]。关于其结构单元壮观糖的合成, 根据推测, SpcD 能够将葡萄糖-1-磷酸活化成为 dTDP-葡萄糖, 它分别经过脱水酶 SpcE、转氨酶 SpcS1 和脱氢酶 SpcH 等蛋白的催化作用, 形成 dTDP-壮观糖, 随后被加载至母核^[27]。

潮霉素 (hygromycin)A 也是以肌醇为生物合成前体, 但脱氢的位置却不相同, 肌醇 C-5 位的羟基被脱氢酶 Hyg17 催化氧化生成 5-酮基-肌醇 (5-keto-myoinositol) (图 2), 随后在肌糖转氨酶 Hyg8 的催化作用下生成 2L-2-氨基-2-脱氢肌醇 (2L-2-amino-2-deoxy-neo-inositol), 它的两个羟基与一碳单元形成双氧桥五元环之后与核苷类结构单元相连, 即为潮霉素 A^[28]。

福提霉素 (fortimicin) 具有独特的母核结构, 其中福提霉素 B 的母核上有两个氨基以及两个甲基修饰, 而福提霉素 A 在此基础上还有氨乙酰化修饰。从结构上来看, 福提霉素也属于氨基环醇家族, 其生物合成基因簇虽已报道, 但其生物合成途径目前还难以确定, 只有少数基因, 如磷酸转移酶 ForP 编码基因的功能已被阐明, 它催化 3'-OH 的磷酸化, 该修饰可能是脱双羟基的前期步骤^[29]。

2 2-DOS 型氨基糖苷类抗生素的生物合成

此类抗生素以 2-DOS 为母核, 且来源广泛, 在

链霉菌 (*Streptomyces*)、小单胞菌 (*Micromonospora*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 等不同菌株中, 该母核的生物合成过程基本相似。关于 2-DOS 生物合成途径的探究最早源于 1974 年, Reinhart 等^[30]在对新霉素生物合成途径研究时, 通过同位素标记前体喂养, 发现 2-DOS 来源于 D-葡萄糖。随后 Daum 等^[31]发现 2-脱氧鲨肌醇 (2-deoxy-scyllo-inosose, 2-DOI) 也可以作为中间体参与生物合成。从葡萄糖到 2-DOI 的生物转化过程, 则是由 Kakinuma 等^[32-33]通过氘代葡萄糖喂养核糖霉素 (ribostamycin) 产生菌 *Streptomyces ribosidificus* 所揭示。Nakayama 研究组和 Kondo 研究组^[34-36]分别从沙加霉素 (sagamicin) 产生菌和丁酰菌素 (butirosin) 产生菌突变株中发现了 2-脱氧鲨肌糖胺 (2-deoxy-scyllo-inosamine, 2-DOIA) 的积累。另外, Chen 等^[37]从新霉素和庆大霉素的产生菌发酵产物中发现 2-脱氧鲨肌糖胺单酮 (keto-2-deoxy-scyllo-inosamine, keto-2-DOIA) 可作为 2-DOS 生物合成前体 (图 3)。

随着分子生物学技术的发展, 对于 2-DOS 生物合成途径的揭示也逐渐深入到基因水平。1999 年, Kakinuma 研究组^[38-39]首次从丁酰菌素的产生菌 *Bacillus circulans* SANK 72073 中克隆出 2-DOI 合成酶编码基因 *btrC*, 为利用其为探针发掘和克隆 2-DOS 类抗生素生物合成基因簇提供了参考序列。随后, 该研究组通过体外蛋白催化鉴定出转氨酶 BtrS 是催化 2-DOI 到 2-DOIA 氨基转移关键酶^[40-41] (两个基因 *btrN* 和 *btrS*)。值得注意的是, 在 keto-2-DOIA 到 2-DOS 的氨基转移过程中, BtrS 同样可以发挥其氨基转移功能^[40-41] (两个新基因 *btrN* 和 *btrS*)。该现象在新霉素产生菌中也同样存在, Neo5 作为与 BtrE 高度同源的脱氢

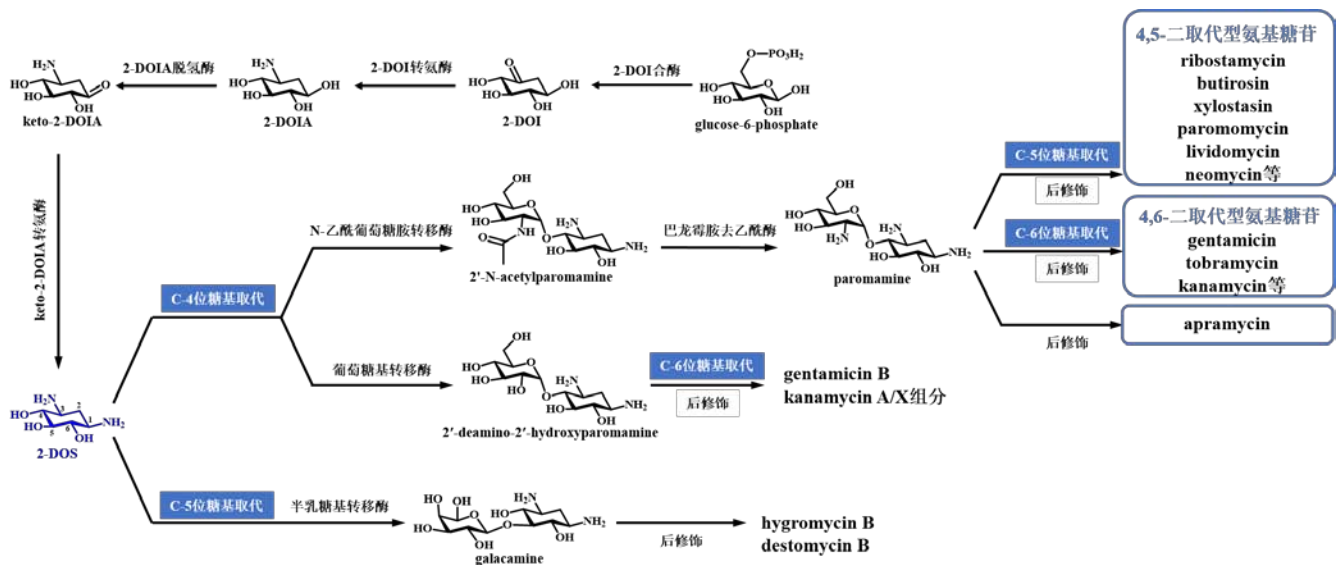


图 3 2-DOS 生物合成途径及其氨基糖苷家族成员
Fig. 3 Biosynthesis of 2-DOS and its members

酶，参与 2-DOIA 到 keto-2-DOIA 的生物催化过程；Neo6 作为与 BtrS 高度同源的氨基转移酶，同样可以参与 2-DOS 生物合成中的两步氨基转移反应^[42-43]。在不同氨基糖苷类抗生素的 2-DOS 生物合成途径中，具有相同功能的酶在结构和催化机理上往往高度相似。但对于 2-DOIA 脱氢酶，却存在两种差异明显的类型，一种以来自新霉素生物合成途径的 NeoA 为代表，它们使用 NAD⁺ 或 NADP⁺ 为辅因子^[43]，另一种以来自丁酰苄菌素生物合成途径的 BtrN 为代表，为 radical SAM(S-adenosylmethionine) 依赖的脱氢酶，它使用铁硫簇 ([4Fe-4S] 型) 为辅因子^[42]。

在合成 2-DOS 母核之后，因 C-4 或 C-5 糖基取代的不同可进入不同的 2-DOS 型氨基糖苷抗生素生物合成途径 (图 3)。其中，巴龙霉素 (paromamine) 是众多 2-DOS 类抗生素生物合成途径中的第一个拟二糖。早期，Testa 等^[15] 通过喂养巴龙霉素，可以恢复西索米星产生菌 *M. inyoensis* 的 2-DOS 营养缺陷型突变株中西索米星的产生；此外，Pearce 等^[44-45] 也发现新霉素和巴龙霉素 (paromomycin) 产生菌的 2-DOS 营养缺陷型突变株中喂养巴龙霉素，可以分别恢复新霉素和巴龙霉素的产生；同样，Takeda 等^[46] 也发现巴龙霉素也可以参与丁酰苄菌素的生物合成；此后，Goda 等^[47] 通过同位素示踪标记证实新霉素中 C-6' 氨基的产生是在巴龙霉素合成之后。这些研究结果说明巴龙霉素作为通用的中间体，广泛地参与 2-DOS 氨基糖苷类抗生素的生物合成过程。而参与巴龙霉素生物合成相关基因的克

隆和功能研究，则远迟于此，直至 2005 年，Kudo 等^[42-43] 通过氨基酸序列分析，才定位了酰苄菌素生物合成基因簇中 N- 乙酰葡萄糖胺转移酶 *BtrM* 编码基因，并推测它可能负责在 2-DOS 上加载葡萄糖胺形成巴龙霉素。2007 年，Spencer 研究组最终通过体外蛋白催化实验，证明 *BtrM* 首先催化 N- 乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) 与 2-DOS 通过糖苷键相连，然后去乙酰酶 *BtrD* 催化 2'-N- 乙酰巴龙霉素 (2'-N-acetylparomamine) 进行脱乙酰反应，形成巴龙霉素^[48] (图 3)。从目前研究结果不难发现，2-DOS 氨基糖苷抗生素从葡萄糖 -6- 磷酸到 2-DOS，再到拟二糖中间体巴龙霉素这一生物合成途径在不同的氨基糖苷类抗生素中具有很强的通用性和保守性，自然界天然氨基糖苷终产物结构的多样性更多来源于后续丰富的基团修饰。

2.1 4,5- 二取代型 2-DOS 氨基糖苷抗生素的生物合成

该类抗生素的结构特征是 2-DOS 环的 C-4 和 C-5 位羟基被取代，以糖苷键与糖环相连。以核糖霉素的生物合成途径为例，由 2-DOS 经 *BtrM* 和 *BtrD* 生成的拟二糖巴龙霉素是该类抗生素生物合成途径中的重要前体，它通过脱氢酶 *BtrQ* 和转氨酶 *BtrB* 的依次作用，C-6' 位的羟基转化为氨基，合成新霉素 (neamine)^[49]，再通过磷酸核糖转移酶 *BtrL* 与磷酸酶 *BtrP* 的依次作用，其 C-5 位与核糖连接，生成核糖霉素^[50]。而核糖霉素的 C-3'' 位羟基通过脱氢酶 *BtrE* 和还原酶 *BtrF* 的连续作用，立体构型翻转，

成为木糖菌素 (xylostasin)^[51]。值得注意的是,核糖的活化方式较为特殊,并非形成 dNDP 形式,而是形成磷酸核糖焦磷酸 (phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)。核糖霉素和木糖菌素的 2-DOS 环 N-1 位点均可被 4-氨基-2-羟基丁酰 (4-amino-2-hydroxybutyric acid, AHBA) 修饰,分别生成丁酰苷菌素的 B 和 A 组分。由于其优异的活性,AHBA 早在 20 世纪 70 年代便成为人们通过化学半合成对天然氨基糖苷类抗生素进行修饰的重要侧链基团,以获得具有更好活性的氨基糖苷类抗生素衍生物。而 AHBA 的生物合成相关基因簇直到本世纪初才被揭示^[50],该基因簇包含 7 个基因: *btrI*-*btrJ*-*btrK*-*btrO*-*btrV*-*btrH*-*btrG*。Spencer 研究组^[52]在体外成功构建了一条包含 5 个关键酶:酰基载体蛋白 BtrI、ATP- 依赖型连接酶 BtrJ、磷酸吡哆醛 (pyridoxal phosphate, PLP) 依赖型脱羧酶 BtrK、双组分黄素依赖型单加氧酶 BtrO 和 BtrV,可合成 AHBA 侧链供体 γ -L-Glu-AHBA-S-BtrI 的生物合成途径。随后,他们又在体外完成了经酰基转移酶 BtrH 催化,将 γ -L-Glu-AHBA-S-BtrI 加载至核糖霉素拟三糖骨架上,并在一特殊的 γ -谷氨酰环化转移酶的作用下脱去 γ -谷氨酰生成丁酰苷菌素 B^[53],最终揭示了丁酰苷菌素中 AHBA 侧链的生物合成与加载途径。在破解了 AHBA 的生物合成途径后,他们将化学合成的 AHBA 侧链供体的模拟底物 γ -L-Glu-AHBA-SNAC,在上述 BtrH 与 γ -谷氨酰环化转移酶的共同催化下,尝试加载至不同的天然氨基糖苷类抗生素上,并最终生成一些列具有“非天然”AHBA 侧链的氨基糖苷类抗生素衍生物^[54]。研究还发现 BtrH 在体外催化 AHBA 加载至其它 2-DOS 氨基糖苷类化合物上的过程中,表现出利用非天然底物 γ -L-Glu-AHBA-SNAC 较其天然底物 γ -L-Glu-AHBA-S-BtrI 更高的催化效率。

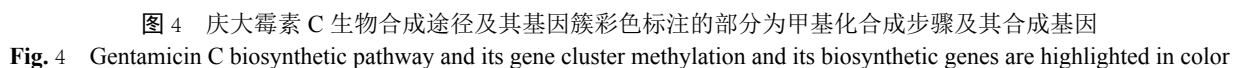
如果核糖霉素没有被 AHBA 修饰,而是经过糖基转移酶 NeoF 和去乙酰酶 NeoD 的催化,核糖环 C-3' 位与葡萄糖胺相连,则可生成拟四糖骨架^[55],它的 C-6' 位羟基经过脱氢酶 NeoQ 和转氨酶 NeoB 作用成为氨基^[49],即为新霉素 C。值得一提的是,在新霉素系列产物合成过程中,NeoQ 和 NeoB 分别是 BtrQ 和 BtrB 的同源蛋白,它们也负责 C-6' 位的氨基化^[49]。而新霉素 C 的 C-5' 位立体构型经过 NeoN 催化后翻转,生成新霉素 B。在此,NeoB 仅识别 C-5' 为 S 构型底物,特异性强,而 NeoN 则是 radical SAM 依赖的差向异构酶^[56],其机理较为特殊,与常见的磷酸吡哆醛

依赖型异构酶有明显差异。新霉素 B 有多种类似物,其中巴龙霉素与其之间差异在于 C-6' 位为羟基而非氨基,在其生物合成过程中,ParQ 和 ParB 分别为 NeoQ 和 NeoB 的同源蛋白,但它们的功能却有差异,ParQ 和 ParB 只能负责 C-6' 位氨基化,无法完成 C-6' 位的修饰^[57]。利维霉素 (lividomycin)B 则在巴龙霉素的结构基础上,C-6' 位构型翻转,此外它还缺失了 C-3' 位羟基,这可能源自脱水酶 LivW 和还原酶 LivY 所负责的脱氧^[57]。另一方面,利维霉素 A 则比新霉素 B 多了一个甘露糖环结构,这一修饰可能源于某个糖基转移酶。

2.2 4,6- 二取代型 2-DOS 氨基糖苷类抗生素的生物合成

此类抗生素的结构特征是 2-DOS 环的 C-4 和 C-6 位羟基被取代,以糖苷键与糖环相连。卡那霉素 (kanamycin) 作为该家族的重要成员,其生物合成途径已被清晰阐明。根据 Sohng 研究组和 Yong 研究组^[58]的报道,2-DOS 母核合成后,首先在糖基转移酶 KanF 和去乙酰酶 KacA 的作用下生成巴龙霉素,随后通过脱氢酶 KanI 和转氨酶 KacL 的催化生成新霉素,这些反应与 4,5- 二取代型的合成相似,但此后反应差异明显。作为合成单元,UDP-葡萄糖在脱氢酶 KanC 和转氨酶 KanD 的作用下,转化为 UDP-卡那糖胺 (UDP-kanosamine),而糖基转移酶 KanE 将它连接至新霉素的 C-6 位,生成卡那霉素 B^[58],而 Eguchi 研究组的研究表明,在 α -酮戊二酸依赖的非血红素铁氧化酶 KanJ 的作用下,卡那霉素 B 的 C-2' 位的氨基氧化为羰基,再由还原酶 KanK 加氢变为羟基,生成卡那霉素 A^[59]。在此过程中,KanI、KacL 和 KanE 具有宽泛的底物识别能力,产生了多种结构差异的中间体,其中包括了 C-6' 位为羟基的卡那霉素 C。

另一方面,负责在 2-DOS 上加载 N-乙酰葡萄糖胺的糖基转移酶 KanF 还能以 UDP-葡萄糖为底物,生成 2'-去氨基-2'-羟基-巴龙霉素 (2'-deamino-2'-hydroxy-paromamine),它可作为后续一系列修饰的底物,最终转化为 C-2' 位为羟基的化合物,即卡那霉素 A 和卡那霉素 X 组分。而该含有 2'-去氨基-2'-羟基-巴龙霉素的分支途径,同样也由于 KanI、KacL 和 KanE 的相对独立及底物宽泛性,形成了复杂的交叉代谢网络^[58]。从结构的角度来说,妥布霉素 (tobramycin) 属于卡那霉素类似物,它与卡那霉素 B 的区别在于 C-3' 上的



缺失了羟基, 可以称为脱氧卡那霉素 B。这种单脱氧结构与另一种氨基糖苷阿泊拉霉素 (也称安普霉素, apramycin) 相似, 在生物合成上可能也有相似之处。

4,6-二取代型 2-DOS 型氨基糖苷抗生素家族中另一重要成员是庆大霉素。它也以巴龙霉素为合成前体, 但加载第三个糖环并非葡萄糖环, 而是吡喃型木糖环 (图 1)。异源表达的结果显示, 它由糖基转移酶 GenM2 连接至 2-DOS 的 C-6 位, 形成拟三糖骨架即庆大霉素中间体 A₂^[60] (图 4)。随后, 拟三糖骨架的 C-3" 位的羟基经过 GenD2 的脱氢和 GenS2 的转氨, 生成 DAA₂, 随后甲基转移酶 GenN 对其 N-3" 位进行甲基化修饰, 生成中间体 A, 再由甲基转移酶 GenD1 对其 C-4" 位进行甲基化修饰, 生成中间体 X₂^[61], 而它也是引发形成庆大霉素 C 多组分的重要分支点。作为一个化学结构并不十分复杂的氨基糖苷分子, 庆大霉素却存在着令人惊奇的、极其多样的甲基化修饰, 这些甲基化修饰既是庆大霉素结构多样性和生物活性展示的重要功能基团, 同时也是耐药性产生的关键结构单元。除前期洪文荣等和 Liu 研究组发现的由甲基转移酶 GenK 在 C-6' 位进行甲基化修饰生成 G₄₁₈^[62-63] 之外, 孙宇辉研究组和 Peter Leadlay 研究组近期的研究结果揭示出甲基转移酶 GenN、GenD1 和 GenK 的作用的先后顺序并不严格, 它们所催化的 C-6'、N-3" 和 C-4" 上的甲基化相对独立, 突破了人们对庆大霉素甲基化“串联式”顺序依次发生的传统认识, 首次建立了“并联式”多步甲基化修饰的立体网络模型^[64] (图 4)。

值得注意的是, GenD1 和 GenK 同属独特的 radical SAM 依赖型甲基转移酶, 该家族蛋白使用 [4Fe-4S] 铁硫簇和维生素 B₁₂ 为辅因子, 可对非活性的原子甲基化, 而 Huang 等^[61-65] 利用底物类似物与 GenK 进行体外酶学实验, 通过观察 SAM 的分解和产物的生成, 对其催化机理进行了更深入的探索。

在庆大霉素所有的甲基化修饰中, N-6' 位甲基化对于通过代谢途径定向阻断来获得依替米星 (etimicin) 化学半合成原料—庆大霉素 C_{1a} 以及低毒性单一组分 C₂ 至关重要, 但其编码基因却一直未曾找到, 尽管庆大霉素生物合成基因簇中所有可能的甲基化基因都通过基因敲除被一一考察。最终, 孙宇辉研究组和 Peter Leadlay 研究组^[64] 通过全基因组测序, 并结合体外酶学和体内遗传等手段, 成功定位了负责庆大霉素生物合成最后一步甲基化基因 *genL*。出人意料的是, 该基因在染色体上与庆大霉素

生物合成基因簇远隔 2.54Mb (图 4), 这一结果也为庆大霉素甲基化修饰网络填补上了最后一个缺口。

庆大霉素中间体 G₄₁₈ 形成后, 经过脱氢酶 GenQ 和转氨酶 GenB₁ 的作用, C-2' 位被氨基化, 生成 JI-20B^[66]。陈代杰研究组和刘文研究组^[67] 的实验结果表明, 它经过 GenP 的催化, C-3' 位被磷酸化形成 Pi-JI-20B。根据推测, Pi-JI-20B 经过 3',4'-脱双羟基, 生成威达米星 (verdamicin), 再经过 4',5' 双键还原, 生成庆大霉素 C_{2a}, 这一系列修饰与 PLP 依赖的转氨酶 GenB₃ 和 GenB₄ 有关^[66]。此后 C_{2a} 在差向异构酶 GenB₂ 的作用下, C-6' 位立体构型改变, 成为庆大霉素 C₂^[66]。2015 年, 夏焕章研究组指出, GenB₂ 也能够催化 JI-20B 的 C-6' 位差向异构, 生成 epi-JI-20B。不仅如此, GenB₂ 还可以完成 JI-20B 和 epi-JI-20B 的相互转化^[68]。如果以上各修饰过程不以 G₄₁₈ 为底物, 而是以与之对应但 C-6' 无甲基化修饰的 X₂ 为底物, 则形成了另一条与之平行的代谢途径, 被相同的酶依次催化, 产生一系列 C-6' 位无甲基的同系物, 即 JI-20A (与 JI-20B 对应), 西索米星 (与威达米星对应), 庆大霉素 C_{1a} (与 C_{2a} 和 C₂ 对应) 以及庆大霉素 C_{2b} (与 C₁ 对应) (图 4)。通过阻断控制 C-6' 甲基化的 GenK, 可导致 C_{1a} 和 C_{2b} 所在代谢支路组分的大量积累^[69-70]。但对于如何通过遗传手段仅获得另一代谢支路中的 C_{2a}、C₂、C₁ 各组分, 仍将是一个巨大的挑战。

庆大霉素 B 组分源于庆大霉素 C 生物合成途径的另一分支, 是庆大霉素产生菌的次要产物。在庆大霉素生物合成中, 负责糖基加载的 GenM₁ 底物特异性较为宽泛, 能以 2-DOS 和 UDP-葡萄糖作为底物, 生成卡那霉素中间体, 即 2'-去氨基-2'-羟基-巴龙霉素, 它可被下游的修饰酶催化, 生成 2'-去氨基-2'-羟基-JI-20A, 即庆大霉素 B^[71]。此外, 夏焕章研究组通过失活其染色体上负责磷酸化修饰的 *genP*, 阻断下游的脱双羟基和双键还原等修饰, 并将负责 C-2' 位脱氨基和羟基化的 *kanJ* 和 *kanK* 导入庆大霉素产生菌, 同样得到庆大霉素 B^[72], 而在喂养葡萄糖的情况下, 过表达糖基转移酶 KanM₁ 和 GenM₂ 则有助于提升庆大霉素 B 和 C_{1a} 的产量^[73]。

2.3 单取代型 2-DOS 氨基糖苷类抗生素的生物合成

单取代型 2-DOS 型氨基糖苷类抗生素的特征为 2-DOS 母核上仅连接了一个糖环取代基。阿泊拉霉素是该家族成员的代表, 其生物合成也以巴龙霉素为前体, 但根据虞沂研究组和张琪研究组的研究,

其 C-6' 位并未被氨基化, 而是通过脱水酶 AprD4 催化 C-3' 位脱水, 并由 NADH/NADPH 依赖的还原酶 AprD3 还原 C-4' 位的羰基, 生成利维胺 (lividamine) [74], 该结构可能也与妥布霉素和利维霉素 B 等含有 C-3' 位单脱氧糖环结构的氨基糖苷的合成相关。在此之后, 利维胺经脱氢酶 AprQ 催化, 在 C-6' 位羟基脱氢 [74], 但如果该步骤发生在 AprD4 和 AprD3 负责的 C-3' 脱氧之前, 则会形成 C-6' 位为羰基的副产物, 导致 C-3' 脱氧无法进行 [74]。Eguchi 研究组则对 AprD4 和 AprD3 的底物选择性进行了探究, 发现它们更倾向于 C-6' 为羟基而非氨基的底物 [75]。一般情况下, 通过 AprQ 作用后, 中间体经一系列催化, 第二个糖环变为含并环的八碳糖环结构, 随后加载第三个糖环, 并进行甲基化等后修饰 [76], 形成阿泊拉霉素。值得注意的是, AprD4 是 radical SAM 依赖的脱水酶, 在反应过程中形成自由基, 机理较为特殊 [77]。

在单取代型 2-DOS 型氨基糖苷类抗生素中, 潮霉素 (hygromycin)B 的生物合成也始于 2-DOS。根据孙宇辉研究组的报道, 与上述使用葡萄糖环或其衍生物为第二个结构单元的化合物不同, 它是在糖基转移酶 HygF 的作用下, 以 UDP- 半乳糖为底物, 将半乳糖环连接至 2-DOS 的 C-5 位 [78]。而甲基转移酶 HygM 可将 2-DOS 的 N-3 位甲基化, 该修饰可以发生在二糖形成前或形成后, 并无严格顺序 [78]。而潮霉素的第三个糖环为七碳糖, 根据陈义华研究组的报道, 它源自景天庚酮糖 -7- 磷酸 (sedoheptulose-7-phosphate)。首先, 异构酶 HygP 将它异构形成环状的 D- 甘油醛 - β - 阿卓 - 庚糖 (D-glycero- β -D-altroheptose), 再通过如磷酸转移酶 HygN、磷酸酶 HygU 和 NDP- 七碳糖合酶 HygO 等酶催化, 活化形成 ADP- 甘油醛 - β - 阿卓 - 庚糖, 该化合物或其修饰后的产物可能是第三个糖环的直接来源 [79]。潮霉素 B 的生物合成过程还包括氧化、转氨和差向异构等修饰, 其中尤为独特的是第二和第三个糖环之间形成的螺环结构, 这一步骤是由 α - 酮戊二酸依赖的非血红素铁氧化酶 HygX 实现的, 它将羟基的氧原子与 C-1" 碳相连, 而该反应同样不依赖 N-1 位甲基化与否 [78-80]。越霉素 (destomycin)B 是潮霉素 B 的类似物, 它们的区别仅在于越霉素 B 的 C-4" 位立体构型与潮霉素 B 不同, 两者的生物合成路径可能也非常相似。

另一个单取代型 2-DOS 型氨基糖苷类抗生素的代表为依他霉素 (istamycin)A, 它也以单脱氧的氨基环醇为母核, 但氨基取代的位置, 以及一些碳原子

的立体构型与 2-DOS 不同。而依他霉素 A 的第二个糖环与庆大霉素 C2b 完全相同, 它们在生物合成上可能存在相似之处 [29]。该类型的氨基糖苷类抗生素还包括 dactimicin, sannamycin B 和依他霉素 B 等, 它们与依他霉素 A 的区别在于对母核的后修饰, dactimicin 在 C-6' 位有甲基化修饰, 与庆大霉素 C1 相似, sannamycin B 母核的 N-1 位缺失了乙酰化修饰, 而依他霉素 B 的 C-3 位立体构型发生了翻转。

3 化学半合成氨基糖苷类抗生素的替代生物合成

除天然来源的第一代氨基糖苷类抗生素外, 人们亦通过化学半合成创造出更多结构多样性的第二代氨基糖苷类抗生素来满足人们对更高活性、更小副作用, 特别是应对逐渐出现的耐药性的需求。多种经化学半合成的氨基糖苷类抗生素已成功应用于临床, 例如通过化学方法将卡那霉素 B 的 C-3', C-4' 羟基脱去, 产生卡那霉素衍生物地贝卡星 (dibekacin) [81]; 通过化学方法将 AHBA 基团引入卡那霉素母核产生阿米卡星 (amikacin) [82]; 在阿米卡星的基础之上将其 C-3' 和 C-4' 羟基脱去, 产生阿贝卡星 (arbekacin) [83]; 将庆大霉素母核上的氨基基团利用化学方法进行烷基化修饰, 产生奈替米星 (netilmicin) [84] 和依替米星 [85]; 利用类似的方法将庆大霉素 B 的母核上 1-N 引入 AHBA 基团产生异帕米星 (isepamicin) [86] (图 1)。

尽管通过化学半合成氨基糖苷类抗生素取得了长足的进展, 但存在合成步骤繁琐、产率低、环保压力大等问题。随着合成生物学等技术的突飞猛进, 人们越来越多开始思考利用生物合成的方法来取代原本通过化学半合成获得的氨基糖苷类抗生素, 这也将成为合成下一代氨基糖苷类抗生素新的突破口。例如 plazomicin 是以西索米星为基本骨架, 经多步化学修饰在 N-1 位加载 AHBA 侧链, 并在 N-6' 位进行羟乙基修饰而获得 [87]。而 AHBA 侧链在丁酰苷菌素中天然存在, 对于含该侧链的半合成抗生素, 可望利用合成生物学的方法, 将 AHBA 侧链生物合成途径引入西索米星产生菌, 运用生物发酵的方法来生产原本需要通过多步化学半合成才能获得的 plazomicin。为了实现这一愿景, 人们已开始了探索和尝试。如 2011 年, Park 等 [58] 首次将丁酰苷菌素产生菌中负责 AHBA 侧链生物合成与加载所需的 7 个基因 *btrI-btrJ-btrK-btrO-btrV-btrH-btrG* 与卡那霉素生物合成最小基因簇进行融合, 并在委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) 中实现了异源表达, 在产物中检测到含有 AHBA 侧链的阿米卡星和 1-N-AHBA-

卡那霉素 X, 尽管最终转化率不足 10%, 而且负责羟乙基修饰的酶在氨基糖苷类的生物合成中也尚未有报道, 这也是实现 plazomicin 全生物合成需要面临和克服的另一个挑战, 但这证实了利用生物合成替代化学半合成这一思路的可行性。

4 氨基糖苷生物合成酶的结构研究

分子遗传学、生物化学及化学生物学方法的应用, 大大推动了氨基糖苷类抗生素的生物合成研究, 而结构生物学的进展, 则从更深层次的角度揭示了相关酶的微观特征及其催化机制。Eguchi 研究组^[88]于 2007 年解析了丁酰苷菌素生物合成中负责 2-DOS 母核结构合成的第一个酶, 即 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 依赖的 2-DOI 合酶 BtrC 的晶体结构, 它为非对称二聚体, 且具有两个不同的活性位点, 并与 Co^{2+} 结合, 该研究阐明了 BtrC 的催化机理。

在氨基糖苷的生物合成中, 涉及到很多 PLP 依赖的酶。Spencer 研究组^[89]揭示了在丁酰苷菌素 2-DOS 生物合成中负责两步转氨反应的 BtrR, 确定其属于天冬氨酸转氨酶类, 获得了它与辅因子 PLP/PMP(pyridoxamine phosphate, PMP) 结合后的晶体结构, 通过分析其结构差异, 推测了对底物识别的影响。他们还研究了同为 PLP 依赖酶的 BtrK, 它在 AHBA 侧链的合成中执行脱羧功能, 在其递交的结构数据中可见酶与 PLP 结合的活性中心。而 Holden 研究组^[90]则通过该蛋白与来自于核糖霉素生物合成途径的同源蛋白 RbmB 的结构对比, 分析了两者在结合 2-DOS 底物后的外亚胺状态下的空间结构的异同。该研究组还通过 X-射线晶体衍射技术, 获得了新霉素合成中 PLP 依赖的转氨酶 NeoB 的结构信息。该酶能催化 C-6' 和 C-6'' 两个位点的转氨, 而该研究揭示了它与不同底物结合的状态和活性位点, 并与庆大霉素生物合成中的 C-6' 转氨酶 GenB1 进行了对比^[91]。2019 年, Ban 等^[71]对 GenB1 的结构进行了更细致的考察, 揭示了其中的甲基口袋对于底物识别和结合效率的影响。

对于庆大霉素生物合成中的关键酶, Dias 研究组^[92]解析了其中甲基转移酶 GenN 的晶体结构, 确证了它对多种底物的甲基化活性, 并通过对其三维结构的分析, 阐释了这种底物宽泛性的来源。该研究组还解析了庆大霉素合成中另一个关键酶 GenD2 的结构信息, GenD2 是 $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ 依赖的氧化还原酶, 负责 C-3'' 羟基的脱氢, 通过结构分析确认了

其中两处特殊的 β -折叠, 并分析了它对二聚体形成及底物识别的影响^[93]。

McCulloch 等^[80]推测 HygX 为氧化酶, 可能负责潮霉素 B 生物合成中最后一步成环反应, 并获取了它与潮霉素 B 的共结晶, 虽然该结果中以镍离子代替了实际发挥作用的铁离子, 并测定了它与潮霉素 B 的底物亲和性。作者据此推测了 HygX 的催化氧化环化反应的机理, 并比较了它与其它 α -酮戊二酸依赖的非血红素铁氧化酶在结构上的异同。

近年来, radical SAM 依赖酶在天然产物中的作用逐步成为研究的难点和热点, 该家族蛋白往往对氧极为敏感, 且在体外往往需要进行铁硫簇重组才具有活性, 对实验条件要求较高, 这可能是其早期研究并不充分的原因之一。2007 年, Eguchi 研究组^[42]解析了丁酰苷菌素生物合成途径中脱氢酶 BtrN 与底物与 SAM 的共结晶, 其折叠方式与已知模型有明显差异。研究结果还显示, 除了催化 SAM 裂解的铁硫簇之外, 该酶还结合了一个辅助铁硫簇, 而根据它与底物的相对位置分析及与同类蛋白的对比, 它可能与氧化还原的催化过程紧密相关。Nicolet 研究组和张琪研究组测定了阿泊拉霉素生物合成途径中脱水酶 AprD4 的结构, 结果显示它仅有一个铁硫簇, 通过对底物共结晶的分析, 指出了底物构象对于催化的影响, 并阐明了与该反应配套的质子传递链^[77]。

5 总结与展望

综上所述, 来自分子遗传学、生物化学和结构生物学的国内外研究进展使氨基糖苷类抗生素生物合成途径和机制正逐渐清晰, 这不仅有助于彻底解答困扰已久的重要基础科学问题, 也为人们利用合成生物学方法进行定向优化和理性创制第三代新型氨基糖苷类抗生素提供了必要前提。但截至目前, 仍有一些关键的生物合成机制问题还有待揭示, 如作为氨基糖苷类抗生素经典代表的庆大霉素, 目前关于其绛红糖胺(purpurosamine)结构上 3',4'-脱双羟基和 4',5'-双键还原机制依然是一个未解之谜, 它不仅直接关乎庆大霉素重要代谢中间产物西索米星的生物合成, 更是庆大霉素完整生物合成线路图中不可或缺的最后一块神秘“拼图”。再如阿泊拉霉素中八碳糖结构单元的合成和并环过程、潮霉素 B 中 C-2' 位的差向异构, 以及福提霉素和依他霉素的母核合成路径等问题。另外, 目前仍有许多功能已知但结构未知的蛋白, 尤其是 radical SAM 依赖的酶, 其生成自

由基的独特机理以及对非活泼碳原子的修饰机制备受关注。目前已获得的蛋白结构数据有限,多是基于 X-射线晶体衍射技术,但该技术对蛋白晶体的质量要求较高,而新兴的冷冻电镜技术或许有助于难以获得结晶的蛋白的结构解析。可以预见,随着结构生物学技术的发展,氨基糖苷类抗生素生物合成途径中更多蛋白的结构和功能将被揭示,从而加深人们对这一重要类别抗生素生物合成机理的认知和利用。

参考文献

- [1] Schatz A, Bugle E, Waksman S A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. *Exp Biol Med*, 1944, 55(1): 66-69.
- [2] Waksman S A, Lechevalier H A. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms[J]. *Science*, 1949, 109(2830): 305-307.
- [3] Umezawa H, Ueda M, Maeda K, *et al.* Production and isolation of a new antibiotic: Kanamycin[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1957, 10: 181-189.
- [4] Weinstein M J, Luedemann G M, Oden E M, *et al.* Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*[J]. *J Med Chem*, 1963, 6(4): 463-464.
- [5] Higgins C E, Kastner R E. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. II. Description of *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1967, 7: 324-331.
- [6] Weinstein M J, Marquez J A, Testa R T, *et al.* Antibiotic 6640, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside antibiotic[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1970, 23(11): 551-554.
- [7] Houghton J L, Green K D, Chen W, *et al.* The future of aminoglycosides: The end or renaissance[J]. *Chem Bio Chem*, 2010, 11(7): 880-902.
- [8] Spahn C M T, Prescott C D. Throwing a spanner in the works: Antibiotics and the translation apparatus[J]. *J Mol Med*, 1996, 74(8): 423-439.
- [9] Kumar C G, Himabindu M, Jetty A. Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: A critical appraisal[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2008, 28(3): 173-212.
- [10] Shaw K J, Rather P N, Hare R S, *et al.* Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes[J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57(1): 138-163.
- [11] Mei H Y, Galan A A, Halim N S, *et al.* Inhibition of an HIV-1 Tat-derived peptide binding to TAR RNA by aminoglycoside antibiotics[J]. *Bioorganic Med Chem Lett*, 1995, 5(22): 2755-2760.
- [12] Floquet C, Deforges J, Rousset J P, *et al.* Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(8): 3350-3362.
- [13] Bidou L, Bugaud O, Belakhov V, *et al.* Characterization of new-generation aminoglycoside promoting premature termination codon readthrough in cancer cells[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(3): 378-388.
- [14] Cuccarese M F, Singh A, Amiji M, *et al.* A novel use of gentamicin in the ROS-mediated sensitization of NCI-H460 lung cancer cells to various anticancer agents[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(12): 2771-2777.
- [15] Testa R T, Tilley B C. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis. II. Gentamicin[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1976, 29(2): 140-146.
- [16] Testa R T, Tilley B C. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis. I. Sisomicin[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975, 28(8): 573-579.
- [17] Kase H, Odakura Y, Nakayama K. Sagamicin and the related aminoglycosides: Fermentation and biosynthesis. I. Biosynthetic studies with the blocked mutants of *Micromonospora sagamiensis*[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1982, 35(1): 1-9.
- [18] Kase H, Shimura G, Iida T, *et al.* Biotransformation of sisomicin and verdamicin by *Micromonospora sagamiensis*[J]. *Agric Biol Chem*, 1982, 46(2): 515-522.
- [19] Loewus M W, Loewus F A, Brillinger G U, *et al.* Stereochemistry of the myo-inositol-1-phosphate synthase reaction[J]. *J Biol Chem*, 1980, 255(24): 11710-11712.
- [20] Majumder A L, Johnson M D, Henry S A. 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase[J]. *Biochim Biophys Acta-Lipids Lipid Metab*, 1997, 1348(1-2): 245-256.
- [21] Thapa L P, Oh T J, Liou K, *et al.* Biosynthesis of spectinomycin: Heterologous production of spectinomycin and spectinamine in an aminoglycoside-deficient host, *Streptomyces venezuelae* YJ003[J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105(1): 300-308.
- [22] Mansouri K, Piepersberg W. Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: Nucleotide sequence of five genes, strFGHIK, including a phosphatase gene[J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 228(3): 459-469.
- [23] Ahlert J, Distler J, Mansouri K, *et al.* Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine: Scyllo-inosose aminotransferase from streptomycin-producing *Streptomyces*[J]. *Arch Microbiol*, 1997, 168(2): 102-113.
- [24] Pissowotzki K, Mansouri K, Piepersberg W. Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: Molecular structure and putative function of genes *strELMB2N*[J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 231(1): 113-123.
- [25] Mahmud T. Progress in aminocyclitol biosynthesis[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(2): 161-170.
- [26] Walker J B. Possible evolutionary relationships between streptomycin and bluensomycin biosynthetic pathways: Detection of novel inositol kinase and

- O-carbamoyltransferase activities[J]. *J Bacteriol*, 1990, 172(10): 5844-5851.
- [27] Lamichhane J, Jha A K, Singh B, *et al.* Heterologous production of spectinomycin in *Streptomyces venezuelae* by exploiting the dTDP-d-desosamine pathway[J]. *J Biotechnol*, 2014, 174: 57-63.
- [28] Palaniappan N, Ayers S, Gupta S, *et al.* Production of hygromycin A analogs in *Streptomyces hygrosopicus* NRRL 2388 through identification and manipulation of the biosynthetic gene cluster[J]. *Chem Biol*, 2006, 13: 753-764.
- [29] Huong N, Lee N J, Hwang H H, *et al.* *In vivo* characterization of phosphotransferase-encoding genes *istP* and *forP* as interchangeable launchers of the C3',4'-dideoxygenation biosynthetic pathway of 1,4-diaminocyclitol antibiotics[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(3): 367-372.
- [30] Rinehart K L, Malik J M, Nystrom R S, *et al.* Carbon-13 as a biosynthetic tool. IV. Biosynthetic incorporation of glucosamine [$1\text{-}^{13}\text{C}$] and glucose [$6\text{-}^{13}\text{C}$] into neomycin[J]. *J Am Chem Soc*, 1974, 96(7): 2263-2265.
- [31] Daum S J, Rosi D, Goss W A. Mutational biosynthesis by idiotrophs of *Micromonospora purpurea*: I. Conversion of non-amino containing cyclitols to aminoglycoside antibiotics[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1977, 30(1): 88-97.
- [32] Kakinuma K, Ogawa Y, Sasaki T, *et al.* Stereochemistry of ribostamycin biosynthesis. Application of hydrogen-2 NMR spectroscopy[J]. *J Am Chem Soc*, 1981, 103(18): 5614-5616.
- [33] Kakinuma K, Ogawa Y, Sasaki T, *et al.* Mechanism and stereochemistry of the biosynthesis of 2-deoxystreptamine and neosamine C[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1989, 42(6): 926-933.
- [34] Fujiwara T, Takahashi Y, Matsumoto K, *et al.* Isolation of an intermediate of 2-deoxystreptamine biosynthesis from a mutant of *Bacillus circulans*[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1980, 33(8): 824-829.
- [35] Igarashi K, Honma T, Fujiwara T, *et al.* Structure elucidation of an intermediate of 2-deoxystreptamine biosynthesis[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1980, 33(8): 830-835.
- [36] Kase H, Iida T, Odakura Y, *et al.* Accumulation of 2-deoxy-scyllo-inosamine by a 2-deoxystreptamine-requiring idiotroph of *Micromonospora sagamiensis*[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1980, 33(10): 1210-1212.
- [37] Chen Y, Walker J B. Transaminations involving keto- and amino-inositols and glutamine in actinomycetes which produce gentamicin and neomycin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, 77(2): 688-692.
- [38] Kudo F, Tamegai H, Fujiwara T, *et al.* Molecular cloning of the gene for the key carbocycle-forming enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminocyclitol antibiotics and its comparison with dehydroquinase synthase.[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1999, 52(6): 559-571.
- [39] Kudo F, Hosomi Y, Tamegai H, *et al.* Purification and characterization of 2-deoxy-scyllo-inosose synthase derived from *Bacillus circulans*. A crucial carbocyclization enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1999, 52(2): 81-88.
- [40] Tamegai H, Nango E, Kuwahara M, *et al.* Identification of L-glutamine: 2-deoxy-scyllo-inosose aminotransferase required for the biosynthesis of butirosin in *Bacillus circulans*[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 2002, 55(8): 707-714.
- [41] Yokoyama K, Kudo F, Kuwahara M, *et al.* Stereochemical recognition of doubly functional aminotransferase in 2-deoxystreptamine biosynthesis[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(16): 5869-5874.
- [42] Yokoyama K, Numakura M, Kudo F, *et al.* Characterization and mechanistic study of a radical SAM dehydrogenase in the biosynthesis of butirosin[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(49): 15147-15155.
- [43] Kudo F, Yamamoto Y, Yokoyama K, *et al.* Biosynthesis of 2-deoxystreptamine by three crucial enzymes in *Streptomyces fradiae* NBRC 12773[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 2005, 58(12): 766-774.
- [44] Pearce C J, Akhtar M, Barnett J E, *et al.* Sub-unit assembly in the biosynthesis of neomycin. The synthesis of 5-O-beta-D-ribofuranosyl and 4-O-beta-D-ribofuranosyl-2,6-dideoxystreptamines[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1978, 31(1): 74-81.
- [45] Pearce C J, Barnett J E G, Anthony C, *et al.* The role of the pseudo-disaccharide neamine as an intermediate in the biosynthesis of neomycin[J]. *Biochem J*, 1976, 159(3): 601-606.
- [46] Takeda K, Aihara K, Furumai T, *et al.* Biosynthesis of butirosins. I. Biosynthetic pathways of butirosins and related antibiotics[J]. *J Antibiot* (Tokyo), 1979, 32(1): 18-28.
- [47] Goda S K, Al-Feel W, Akhtar M. Mechanism of the formation of the two epimeric diamino-hexose rings of neomycin B[J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1986: 1383-1389.
- [48] Truman A W, Huang F, Llewellyn N M, *et al.* Characterization of the enzyme BtrD from *Bacillus circulans* and revision of its functional assignment in the biosynthesis of butirosin[J]. *Angew Chemie Int Ed*, 2007, 46(9): 1462-1464.
- [49] Huang F, Spiteller D, Koorbanally N A, *et al.* Elaboration of neosamine rings in the biosynthesis of neomycin and butirosin[J]. *ChemBioChem*, 2007, 8(3): 283-288.
- [50] Kudo F, Fujii T, Kinoshita S, *et al.* Unique O-ribosylation in the biosynthesis of butirosin[J]. *Bioorganic Med Chem*, 2007, 15(13): 4360-4368.
- [51] Takeishi R, Kudo F, Numakura M, *et al.* Epimerization at C-3" in butirosin biosynthesis by an NAD⁺-dependent

- dehydrogenase BtrE and an NADPH-dependent reductase BtrF[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(3): 487-495.
- [52] Li Y, Llewellyn N M, Giri R, *et al.* Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: Possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway[J]. *Chem Biol*, 2005, 12(6): 665-675.
- [53] Llewellyn N M, Li Y, Spencer J B. Biosynthesis of butirosin: Transfer and deprotection of the unique amino acid side chain[J]. *Chem Biol*, 2007, 14(4): 379-386.
- [54] Llewellyn N M, Spencer J B. Chemoenzymatic acylation of aminoglycoside antibiotics[J]. *Chem Commun*, 2008, (32): 3786-3788.
- [55] Fan Q, Huang F, Leadlay P F, *et al.* The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: Genetic and biochemical evidence for the roles of two glycosyltransferases and a deacetylase[J]. *Org Biomol Chem*, 2008, 6(18): 3306-3314.
- [56] Kudo F, Hoshi S, Kawashima T, *et al.* Characterization of a radical S-adenosyl-L-methionine epimerase, NeoN, in the last step of neomycin B biosynthesis[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(39): 13909-13915.
- [57] Clausnitzer D, Piepersberg W, Wehmeier U F. The oxidoreductases LivQ and NeoQ are responsible for the different 6'-modifications in the aminoglycosides lividomycin and neomycin[J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(3): 642-651.
- [58] Park J W, Park S R, Nepal K K, *et al.* Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(11): 843-852.
- [59] Sucipto H, Kudo F, Eguchi T. The last step of kanamycin biosynthesis: Unique deamination reaction catalyzed by the α -ketoglutarate-dependent nonheme iron dioxygenase KanJ and the NADPH-dependent reductase KanK[J]. *Angew Chemie Int Ed*, 2012, 51(14): 3428-3431.
- [60] Park J W, Hong J S J, Parajuli N, *et al.* Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(24): 8399-404.
- [61] Huang C, Huang F, Moison E, *et al.* Delineating the biosynthesis of gentamicin X2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex[J]. *Chem Bio*, 2015, 22(2): 251-261.
- [62] Hong W, Yan L. Identification of *gntK*, a gene required for the methylation of purpurosamine C-6' in gentamicin biosynthesis[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2012, 58(5): 349-356.
- [63] Kim H J, McCarty R M, Ogasawara Y, *et al.* GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: Isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(22): 8093-8096.
- [64] Li S, Guo J, Reva A, *et al.* Methyltransferases of gentamicin biosynthesis[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2018, 115(6): 1340-1345.
- [65] Kim H J, Liu Y N, McCarty R M, *et al.* Reaction catalyzed by GenK, a cobalamin-dependent radical S-adenosyl-L-methionine methyltransferase in the biosynthetic pathway of gentamicin, proceeds with retention of configuration[J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(45): 16084-16087.
- [66] Guo J, Huang F, Huang C, *et al.* Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis[J]. *Chem Biol*, 2014, 21(5): 608-618.
- [67] Shao L, Chen J, Wang C, *et al.* Characterization of a key aminoglycoside phosphotransferase in gentamicin biosynthesis[J]. *Bioorganic Med Chem Lett*, 2013, 23(5): 1438-1441.
- [68] Gu Y, Ni X, Ren J, *et al.* Biosynthesis of epimers C2 and C2a in the gentamicin C complex[J]. *Chem Bio Chem*, 2015, 16(13): 1933-1942.
- [69] Li D, Li H, Ni X, *et al.* Construction of a gentamicin C1a-overproducing strain of *Micromonospora purpurea* by inactivation of the *gacD* gene[J]. *Microbiol Res*, 2013, 168(5): 263-267.
- [70] Ni X, Zong T, Zhang H, *et al.* Biosynthesis of 3"-demethyl-gentamicin C components by genN disruption strain of *Micromonospora echinospora* and test their antimicrobial activities *in vitro*[J]. *Microbiol Res*, 2016, 185: 36-44.
- [71] Ban Y H, Song M C, Hwang J yeon, *et al.* Complete reconstitution of the diverse pathways of gentamicin B biosynthesis[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(3): 295-303.
- [72] Ni X, Sun Z, Gu Y, *et al.* Assembly of a novel biosynthetic pathway for gentamicin B production in *Micromonospora echinospora*[J]. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 1.
- [73] Wu Z, Gao W, Zhou S, *et al.* Improving gentamicin B and gentamicin C1a production by engineering the glycosyltransferases that transfer primary metabolites into secondary metabolites biosynthesis[J]. *Microbiol Res*, 2017, 203: 40-46.
- [74] Lv M, Ji X, Zhao J, *et al.* Characterization of a C3 deoxygenation pathway reveals a key branch point in aminoglycoside biosynthesis[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(20): 6427-6435.
- [75] Kudo F, Tokumitsu T, Eguchi T. Substrate specificity of radical S-adenosyl-L-methionine dehydratase AprD4 and its partner reductase AprD3 in the C3'-deoxygenation of aminoglycoside antibiotics[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017, 70(4): 423-428.
- [76] Xu M, Zhu Y, Zhu Y, *et al.* Glycine origin of the methyl substituent on C7'-N of octodiose for the biosynthesis of apramycin[J]. *Sci China Ser C Life Sci*, 2006, 49(4): 362-369.

- [77] Liu W Q, Amara P, Mouesca J M, *et al.* 1,2-Diol dehydration by the radical SAM enzyme AprD4: A matter of proton circulation and substrate flexibility[J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(4): 1365-1371.
- [78] Li S, Zhang J, Liu Y, *et al.* Direct genetic and enzymatic evidence for oxidative cyclization in hygromycin B biosynthesis[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(8): 2203-2210.
- [79] Tang W, Guo Z, Cao Z, *et al.* D-Sedoheptulose-7-phosphate is a common precursor for the heptoses of septacidin and hygromycin B[J]. *Proc Natl Acad Sci US*, 2018, 115(11): 2818-2823.
- [80] McCulloch K M, McCranie E K, Smith J A, *et al.* Oxidative cyclizations in orthosomycin biosynthesis expand the known chemistry of an oxygenase superfamily[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(37): 11547-11552.
- [81] Umezawa H, Umezawa S, Tsuchiya T, *et al.* 3", 4"-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1971, 24(7): 485-487.
- [82] Kawaguchi H, Naito T, Nakagawa S, *et al.* BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1972, 25(12): 695-708.
- [83] Kondo S, Iinuma K, Yamamoto H, *et al.* Syntheses of 1-N-{(s)-4-amino-2-hydroxybutyryl}-kanamycin B and -3", 4"-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1973, 26(7): 412-415.
- [84] Wright J J. Synthesis of 1-N-ethylsisomicin: A broad-spectrum semisynthetic aminoglycoside antibiotic[J]. *J Chem Soc Chem Commun*, 1976(6): 206-208.
- [85] Wang H, Zhang Z, Xiong F, *et al.* Isolation and structure characterization of related impurities in etimicin sulfate by LC/ESI-MSⁿ and NMR[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(5): 902-907.
- [86] Nagabhushan T L, Cooper A B, Tsai H, *et al.* The syntheses and biological properties of 1-N-(S-4-amino-2-hydroxybutyryl)-gentamicin B and 1-N-(S-3-amino-2-hydroxypropionyl)-gentamicin B[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1978, 31(7): 681-687.
- [87] Park J W, Ban Y H, Nam S J, *et al.* Biosynthetic pathways of aminoglycosides and their engineering[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 48: 33-41.
- [88] Nango E, Kumasaka T, Hirayama T, *et al.* Structure of 2-deoxy-scylo-inosose synthase, a key enzyme in the biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics, in complex with a mechanism-based inhibitor and NAD⁺[J]. *Proteins*, 2007, 70(2): 517-527.
- [89] Popovic B, Tang X, Chirgadze D Y, *et al.* Crystal structures of the PLP- and PMP-bound forms of BtrR, a dual functional aminotransferase involved in butirosin biosynthesis[J]. *Proteins*, 2006, 65(1): 220-230.
- [90] Zachman-Brockmeyer T R, Thoden J B, Holden H M. The structure of RbmB from *Streptomyces ribosidificus*, an aminotransferase involved in the biosynthesis of ribostamycin[J]. *Protein Sci*, 2017, 26(9): 1886-1892.