

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.05.019

· 综述 ·

微生物核糖体工程在抗生素研发中的应用

Application of microbial ribosome engineering in the research and development of antibiotics

刘 玲(LIU Ling)¹, 朱湘成(ZHU Xiang-cheng)^{1,2}, 黄 勇(HUANG Yong)^{1,3}

(1 中南大学湘雅国际转化医学联合研究院, 湖南 长沙 410013; 2 组合生物合成与天然产物药物湖南省工程研究中心, 湖南长沙 410205; 3 新药组合生物合成国家地方联合工程研究中心, 湖南 长沙 410205)

(1 Xiangya International Academy of Translational Medicine, Central South University, Changsha 410013, China; 2 Hunan Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis and Natural Product Drug Discovery, Changsha 410205, China; 3 National Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis for Drug Discovery, Changsha 410205, China)

[关键词] 多重耐药菌; 次级代谢产物; 微生物; 抗生素; 核糖体工程

[中图分类号] R978.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2016)05-0355-06

为有助于解决全球多重耐药菌感染问题,有必要加速抗生素的研发。针对微生物拥有的巨大生物合成潜力的核糖体工程(ribosome engineering),利用链霉素、庆大霉素和利福霉素等与微生物核糖体或 RNA 聚合酶的相互作用,有助于快速、简便地筛选出对应的突变菌株,进而改进其环境耐受性,提高其次级代谢产物的产量或产生新的天然产物。本文主要综述核糖体工程在抗生素产量提升,以及新抗生素发现等方面的研究进展。

自 1928 年弗莱明发现青霉素以来,抗生素不仅在临床上用于治疗细菌和真菌感染,而且在农林牧渔等行业也得到了广泛应用。2013 年我国消耗各类抗菌药物约 16 万吨,占世界用量的一半,然而其中有 5 万余吨通过多种方式最终进入了我们的水土环境,极大地增加了多重耐药菌产生的概率^[1-3]。现今,抗菌药物滥用和多重耐药菌感染问题已成为全球主要的公共卫生危机之一,我国尤其严重。规范抗生素使用的同时,通过核糖体工程加速抗生素的研发将有助于解决上述问题。见图 1。

1996 年,日本食品研究所 Ochi 研究小组 Shima 等^[4]观察到 1 株耐链霉素变铅青链霉菌(*Strepto-*

myces lividans TK24)能产生大量的 Act。与不耐链霉素且不产生 Act 的 *S. lividans* TK21 菌株相比,TK24 的核糖体蛋白 S12 发生赖氨酸-88 到谷氨酸(K88E)的突变。Ochi 进一步以链霉素为抗性指征,直接从 TK21 筛选获得 200 个以上耐链霉素的突变菌株,其中约 40%能产生 Act。Ochi 和其他研究者进而分别采用利福霉素(rifamycin, Rif)和庆大霉素(gentamycin, Gen)等抗生素进行类似的抗性筛选,提高了目标菌株产生包括抗生素在内的次级代谢产物的产量,或产生了新的天然产物。

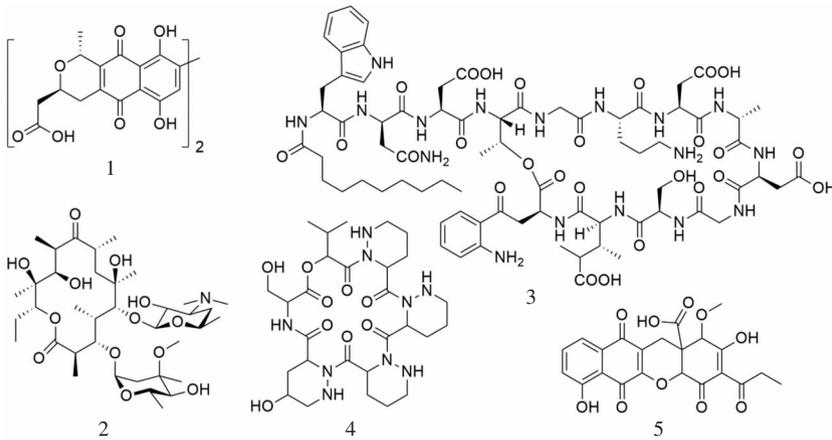
这些研究中使用的抗生素一般作用于微生物的核糖体或 RNA 聚合酶上。Ochi 研究小组因此提出了核糖体工程的概念:与微生物在营养匮乏时的应激反应相似,利用抗生素筛选出相应的耐药菌株,其核糖体或 RNA 聚合酶上发生的改变将导致其基因表达发生变化,表现在改善菌株的环境耐受性,提高次级代谢产物产量或刺激新天然产物的产生^[5]。见图 2。近年来有学者^[6-8]对核糖体工程的原理及其应用进行了综述,认为该技术不需要了解目标菌种的清晰遗传背景,简便易行,能与其他菌种改良方法联合使用。

[收稿日期] 2015-09-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473123)

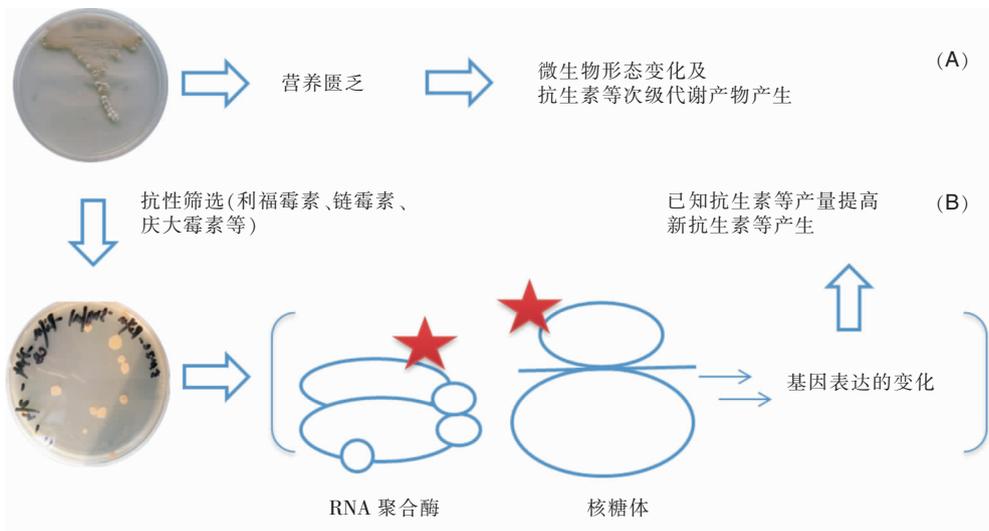
[作者简介] 刘玲(1990-),女(汉族),湖南省岳阳市人,研究生,主要从事天然产物的生物合成研究。

[通信作者] 黄勇 E-mail:jonghuang@csu.edu.cn



核糖体工程用于提高抗生素产量:1 为放线紫红素 (actinorhodin, Act), 2 为红霉素, 3 为达托霉素;核糖体工程用于发现新的抗生素:4 为 piperidamycin A, 5 为 mutaxanthene A

图 1 核糖体工程在抗生素方面的应用



A:微生物在营养匮乏时的应激反应;B:Ochi 提出的核糖体工程原理;★:RNA 聚合酶或核糖体的变化

图 2 微生物在营养匮乏时的应激反应和核糖体工程原理

1 各种抗生素在核糖体工程中可能的作用机理

1.1 链霉素筛选机理 链霉素引起核糖体改变的机制分为两种:高浓度链霉素主要诱导负责编码核糖体 30S 亚基中 S12 蛋白的 *rpsL* 基因突变,而低浓度链霉素则导致编码 16S rRNA 甲基转移酶的 *rsmG* 基因发生突变^[9]。另外, *rpsL* 基因突变可能促进 *frr* 基因表达,其表达产物核糖体循环因子(ribosome recycling factor)在蛋白合成的最后一步能通过促进信使 RNA 和转运 RNA 与核糖体解离,提高基因表达^[10]。

1.2 利福霉素及其他抗生素的筛选机理 产生利

福霉素抗性的突变菌株,其 RNA 聚合酶的 β 亚基 (*rpoB* 基因编码蛋白)发生的变化可能导致 RNA 聚合酶的三维结构发生改变,从而引起次级代谢产物生物合成或其相关基因的变化。如在红霉素产生菌糖多孢红霉菌中加入超过其最低抑菌浓度剂量的利福霉素,筛选获得的突变菌株不仅能耐受高浓度的利福霉素,而且红霉素的产量也提高了近 4 倍,其原因在于红霉素生物合成的底物之一——丙酰辅酶的生物合成基因被过量表达^[11]。庆大霉素可能导致负责编码核糖体 30S 亚基中 L6 蛋白的 *rplF* 基因发生突变^[12],而其他氨基糖苷类抗生素,包括巴龙霉素(paromomycin, Par)和新霉素筛选引起的突变通常位于 16S rRNA 基因的 A 位点^[13]。核糖体

工程最初应用于链霉菌,随后推广到枯草杆菌^[14]、假单胞菌^[15]、变栖克雷伯氏菌^[16]、大肠埃希菌^[17]以及海洋来源的真菌^[18]。

2 应用核糖体工程提高抗生素产量

抗生素在野生菌株中的产量一般较低,只有经

过长期的菌种优化,抗生素生产水平才能得到提高,进而进行工业化生产。以青霉素为例,通过几代人的努力,从上世纪四十年代的 40 U/mL 提升至目前的 10 WU/mL,产量提高近 2 500 倍^[19]。与传统的遗传育种方法相比,核糖体工程在较短的时间内不仅可以增加野生菌株中次级代谢产物的产量,而且可以进一步提升已有工业菌种的产量。见表 1。

表 1 利用核糖体工程提升抗生素产量相关文献

抗生素	产生菌株	方法	变化倍数	生物活性	文献
放线紫红素	天蓝色链霉菌 A3(2)	Str、四环素	-	抗菌	1996 ^[4]
		Str/Gen/Rif	48		2001 ^[20]
沙利霉素	白色链霉菌变种 16d-11	Rif	2.3	抗革兰阳性菌及各种球虫	2003 ^[21]
去甲万古霉素	东方拟无枝酸菌 2-35	Str/Rif 紫外、高能电子诱变	1.45	抗革兰阳性球菌、杆菌	2006 ^[22]
噻唑肽 GE2270	玫瑰浮游双孢菌	Str/Gen/Rif	1.8	抗革兰阳性菌	2006 ^[23]
链霉素	灰色链霉菌 IFO13189	Str	2~3	抗结核杆菌	2009 ^[24]
美贝霉素	冰城链霉菌	Str、紫外化学诱变	1.8	抗寄生虫	2009 ^[25]
红霉素	糖多孢红霉菌	Rif	4	抗菌	2009 ^[11]
西奈芬净	<i>S. incarnatus</i> NRRL 8089	Rif、紫外诱变	7	抗霉菌	2010 ^[26]
阿维菌素	阿维链霉菌 76-02-e	过表达 <i>frr</i> 基因	3~3.7	抗寄生虫	2010 ^[27]
氯霉素	天蓝色链霉菌	Str/Rif、异源表达	20~40	抗菌	2011 ^[28]
纺锤菌素	天蓝色链霉菌	Str/Rif、异源表达	20~40	抗细菌和真菌	2011 ^[28]
紫色杆菌素	大肠埃希菌	Lin/Kan、异源表达	41	抗菌等	2011 ^[29]
放线紫红素	变铅青链霉菌 1326	红霉素	6~8	抗菌等	2012 ^[30]
脂肽类抗生素 A21978C	玫瑰孢链霉菌	Str、报告基因	2.2	抗菌	2012 ^[31]
达托霉素	玫瑰孢链霉菌	<i>pleuromutilin</i>	1.3	抗革兰阳性菌	2013 ^[32]
卑霉素	绿色产色链霉菌	60Co γ 射线、基因组改组 Str	36.8	抗革兰阴性菌	2013 ^[33]
诺西肽	活跃链霉菌	60Co γ 射线、基因组改组 Str	9.2	抗葡萄球菌、杆菌	2014 ^[34]
丰加霉素	淀粉酶产色链霉菌 1628	过度表达 <i>frr</i> 基因	1.46	抗病毒、抗菌	2014 ^[35]

Hu 等^[20]研究表明,在抗生素产量的提升方面,运用单一抗生素进行筛选后发生的单突变不如双突变和多突变,组合突变筛选的效果优于单突变,如在天蓝色链霉菌中,Str/Gen 和 Str/Rif 双抗性突变株合成放线紫红素的能力比 Str、Gen 或 Rif 单抗性突变株高 1.7~2.5 倍,而 Str/Gen/Rif 三抗性突变株产生的放线紫红素产量是野生型天蓝色链霉菌的 48 倍。2011 年 Gomez-Escribano 等^[28]将双抗性突变与异源表达结合使用,在天蓝色链霉菌 *rpsL* (K88E) *rpoB* (S433L) 的工程菌株中,分别将氯霉素、纺锤菌素的产量提升了 20~40 倍。Ahmetagic 等^[29]用林可霉素 (lincomycin, Lin) 和卡那霉素 (kanamycin, Kan) 双抗性筛选联合异源表达,将紫色杆菌素的产量提升了 41 倍。

在工业菌株的应用中, Tamehiro 等^[21]运用 Str/Gen/Rif 3 种抗生素进行组合筛选,最终获得突变菌株的沙利霉素产量较原始工业菌株的产量 (10g/L) 提升了 2.3 倍。华北制药通过紫外、高能电子诱变联合 Str、Rif 筛选,把去甲万古霉素的产

量提高了 145%^[22]。Beltramett 等^[23]获得了 Str, Gen 或 Rif 的 3 种抗生素抗性单突变菌株,噻唑肽 GE2270 产量是初始工业菌株的 1.8 倍。2010 年 Li 等^[27]通过表达阿维链霉菌中的核糖体循环因子,将阿维菌素的产量提高了 3~3.7 倍。2014 年 Ma 等^[35]基于相同的理论基础,过度表达淀粉酶产色链霉菌 1628 中的 *frr* 基因,使丰加霉素增产 1.46 倍。

2013 年 Lv 等^[33]将 60Co γ 射线物理诱变、基因组改组技术 (genome shuffling) 与链霉素抗性筛选结合,获得卑霉素的高产菌株,其产量较初始菌株提高了 36.8 倍。2014 年 Wang 等^[34]用同样的方法获得了活跃链霉菌 AW7 的突变株,诺西肽的产量提高了 9.2 倍,达到 1.54 g/L 的工业发酵水平。Li 等^[32]联合基于报告基因的代谢工程与核糖体工程,获得产量提升 130% 的达托霉素突变菌株。

本课题组目前联合紫外诱变和庆大霉素筛选,提高新型抗肿瘤抗生素 6-脱羟-博莱霉素的产量,突变菌株的产量提高了近 2 倍(待发表)。此外,为提高新颖抗生素平板霉素在普拉特链霉菌中的产

量,我们分别应用 Rif 或 Str 筛选获得了 300 多株抗性菌株,部分菌株的平板霉素产量提高了 1.3 倍左右(待发表)。

3 应用核糖体工程发现新抗生素

微生物全基因组测序研究揭示了微生物产生各

类次级代谢产物的巨大潜力,如一个典型的链霉菌基因组中约含有 20~40 个生物合成基因簇,但是在实验室培养的条件下,这些生物合成基因簇一般不会全部表达。运用核糖体工程快速激活微生物基因组中“沉默”的基因簇,将有助于发现全新的抗生素,以及其他活性天然产物,见表 2。

表 2 利用核糖体工程发现新抗生素等次级代谢产物相关文献

抗生素	产生菌	筛选方法	活性	文献
氨基糖苷类抗生素 3,3'-neotrehalosadiamine	枯草芽孢杆菌	Rif	抗菌	2004 ^[14]
piperidamycin	链霉菌 631689	Rif, Str, Gen	抗菌	2009 ^[36]
放线紫红素衍生物	天蓝色链霉菌等	Rif	抗菌	2013 ^[37]
mutaxanthenes	拟诺卡氏菌 FU40 ΔApoS8	Rif/Str	-	2013 ^[38]
抗肿瘤化合物	杂色曲霉菌 ZBY-3	新霉素	抗肿瘤	2014 ^[39]
弯孢霉菌素 penicitrinone A 等	产紫青霉 G59	新霉素	抗菌 抗肿瘤	2015 ^[18]
fredericamycin A	索马里链霉菌 SCSIO ZH66	Rif	抗菌 抗肿瘤	2015 ^[40]
16 个次级代谢产物	天蓝色链霉菌	Rif, Str	抗菌等	2015 ^[41]

2009 年 Hosaka 等^[36]运用 Rif、Str 和 Gen 3 种抗生素针对土壤中的放线菌进行筛选,成功获得在 *rpoB* 基因和 *rpsL* 基因发生突变的菌株,并发现了一种新抗生素 piperidamycin。2013 年 Ochi 等^[37]在多种放线菌中筛选到多株 *rpoB* 基因突变的菌株,对这些菌株的转录组分析发现,大量沉默的生物合成基因簇的表达增加(最高增高达 70 倍);对天蓝色链霉菌、灰色链霉菌和糖多孢红霉菌的发酵产物进一步分析发现,其均产生了新的次级代谢物,包括多种放线紫红素衍生物。Derewacz 等^[38]在稀有放线菌拟诺卡氏菌中,利用 Str 和 Rif 筛选获得突变菌株,以此为基础获得了一组崭新的芳香聚酮化合物 mutaxanthenes。2015 年 Bachmann 等^[41]又通过质谱分析,发现通过抗性筛选获得的天蓝色链霉菌突变菌株,可以产生大量放线紫红素等 16 个次级代谢产物。Zhang 等^[40]运用核糖体工程激活海洋菌株 *S. somaliensis* SCSIO ZH66 中沉默基因,从该菌种的次级代谢产物中发现了抗肿瘤先导化合物 fredericamycin A (原始菌株不产生该产物),并联合响应曲线法优化该菌种的发酵条件,将产量优化至 (679.5 ± 15.8) mg/L。此外,核糖体工程也能激活真菌中的部分沉默生物合成基因簇,发现新的活性物质。2014 年 Dong 等^[39]在海洋真菌杂色曲霉菌 ZBY-3 获得耐新霉素的突变菌株,与原始菌株相比,发现了 6 种新型的抗肿瘤活性物质。2015 年 Wu 等^[18]用新霉素在海洋真菌产紫青霉 G59 中进行抗性筛选,发现了弯孢霉菌素和 penicitrinone A

等 5 种新型抗生素或抗肿瘤化合物。

4 展望

原创药物研发费用高达 26 亿美元,耗时 10 年以上^[42]。而相对一般药物,抗生素开发周期更长,上市成本更高,导致很多大型制药公司退出了抗生素的研发^[43]。迄今为止,全球已发现了上万种抗生素,而临床使用的 2/3 以上的抗生素均来源于土壤放线菌产生的次级代谢产物^[43]。1970 年后,大量已知抗生素的重复发现使得直接从自然界中发现新抗生素的难度逐渐加大。即使发现新抗生素,其在野生菌株中的产量也很低,需要长期的遗传育种才能大幅度增加产量,1999 年后至今,全球仅有 3 种新型抗生素,利奈唑胺、达托霉素和非达霉素投入临床使用^[44]。面对新抗生素匮乏和多重耐药菌泛滥的矛盾,人们试图解决抗生素研发中的两大问题,即如何快速提高已有抗生素的产量和发现新的抗生素,核糖体工程的应用则成为解决上述问题的一条有效的途径。尽管核糖体工程已经用于沙利霉素、去甲万古霉素、阿维菌素和 GE2270 等,但在工业遗传育种上的应用范围仍不广泛,而且产量提高有限。由于微生物代谢的复杂性,核糖体工程详细作用机制尚未十分清晰,如核糖体、RNA 聚合酶突变后,具体如何精确调控与天然产物生物合成相关基因的表达。如何把模式菌株如天蓝色链霉菌中核糖体工程的作用机理进一步推广,用于指导临床用抗生素等

次级代谢产物产量,将有广泛的应用前景。微生物基因组测序揭示了微生物产生抗生素等次级代谢产物的巨大生物合成潜力。Ochi 和 Bachmann 作为核糖体工程方面的两位权威学者,其研究^[37,41]证明了核糖体工程可以非常有效地激活沉默的生物合成基因簇,而获得在一般实验室培养条件下无法产生的次级代谢产物,为抗生素的发现开辟了一条新的途径。其他用于发现新抗生素的筛选方法也不断出现,如 Ling 等^[45]利用多通道微生物培养原位培养装置,成功地从未被培养细菌发现了对多重耐药菌有优异活性的脂肽类小分子 teixobactin; Hamamoto 等^[46]通过家蚕感染模型,发现了活性优异的脂肽类抗生素 lysocin E。因此,如何把这些抗生素筛选方法与核糖体工程结合,以快速发现更多新颖的抗生素将值得期待。

致谢:感谢段燕文教授对本文写作和修改过程中给予的建设性意见。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang QQ, Ying GG, Pan CG, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. Environ Sci Technol, 2015, 49 (11): 6772 - 6782.
- [2] Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(5): 310 - 317.
- [3] Walsh CT, Wenczewicz TA. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective[J]. J Antibiot (Tokyo), 2014, 67(1): 7 - 22.
- [4] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. J Bacteriol, 1996, 178(24): 7276 - 7284.
- [5] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(6): 1373 - 1386.
- [6] 蔡成平, 王远山, 郑裕国. 核糖体工程与微生物次级代谢产物合成[J]. 生物技术通报, 2012, (9): 51 - 58.
- [7] 谢庶洁, 肖静, 徐俊. 微生物核糖体工程研究进展[J]. 微生物学报, 2009, 49(8): 981 - 986.
- [8] Ochi K, Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters[J]. Appl Microbiol Biot, 2013, 97(1): 87 - 98.
- [9] Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, et al. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria [J]. Mol Microbiol, 2007, 63(4): 1096 - 1106.
- [10] Hosaka T, Xu J, Ochi K. Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant [J]. Mol Microbiol, 2006, 61(4): 883 - 897.
- [11] Carata E, Peano C, Tredici SM, et al. Phenotypes and gene expression profiles of *Saccharopolyspora erythraea* rifampicin-resistant (*rif*) mutants affected in erythromycin production [J]. Microb Cell Fact, 2009, 8: 18.
- [12] Buckel P, Buchberger A, Böck A, et al. Alteration of ribosomal protein L6 in mutants of *Escherichia coli* resistant to gentamicin[J]. Mol Gen Genet, 1977, 158(1): 47 - 54.
- [13] Hobbie SN, Pfister P, Bruell C, et al. Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to mutant ribosomes with alterations in the A site of 16S rRNA[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(4): 1489 - 1496.
- [14] Inaoka T, Takahashi K, Yada H, et al. RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3, 3'-neotrehalosadiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*[J]. J Biol Chem, 2004, 279(5): 3885 - 3892.
- [15] Hosoya Y, Okamoto S, Muramatsu H, et al. Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(8): 2041 - 2047.
- [16] Suzuki T, Seta K, Nishikawa C, et al. Improved ethanol tolerance and ethanol production from glycerol in a streptomycin-resistant *Klebsiella variicola* mutant obtained by ribosome engineering[J]. Bioresour Technol, 2015, 176: 156 - 162.
- [17] Hosaka T, Tamehiro N, Chumpolkulwong N, et al. The novel mutation K87E in ribosomal protein S12 enhances protein synthesis activity during the late growth phase in *Escherichia coli*[J]. Mol Genet Genomics, 2004, 271(3): 317 - 324.
- [18] Wu CJ, Yi L, Cui CB, et al. Activation of the silent secondary metabolite production by introducing neomycin-resistance in a marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59 [J]. Mar Drugs, 2015, 13(4): 2465 - 2487.
- [19] Rokem JS, Lantz AE, Nielsen J. Systems biology of antibiotic production by microorganism[J]. Nat Prod Rep, 2007, 24 (6): 1262 - 1287.
- [20] Hu H, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(4): 1885 - 1892.
- [21] Tamehiro N, Hosaka T, Xu J, et al. Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (11): 6412 - 6417.
- [22] Beltrametti F, Rossi R, Selva E, et al. Antibiotic production improvement in the rare actinomycete *Planobispora rosea* by selection of mutants resistant to the aminoglycosides strepto-

- mycin and gentamycin and to rifamycin[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(4): 283 - 288.
- [24] Tanaka Y, Tokuyama S, Ochi K. Activation of secondary metabolite-biosynthetic gene clusters by generating *rsmG* mutations in *Streptomyces griseus*[J]. J Antibiot (Tokyo), 2009, 62(12): 669 - 673.
- [25] Wang XJ, Wang XC, Xiang WS. Improvement of milbemycin-producing *Streptomyces bingchenggensis* by rational screening of ultraviolet-and chemically induced mutants[J]. World J Microb Biot, 2009, 25(6): 1051 - 1056.
- [26] Fukuda K, Tamura T, Ito H, et al. Production improvement of antifungal, antitrypanosomal nucleoside sinefungin by *rpoB* mutation and optimization of resting cell system of *Streptomyces incarnatus* NRRL 8089[J]. J Biosci Bioeng, 2010, 109(5): 459 - 465.
- [27] Li L, Guo J, Wen Y, et al. Over expression of ribosome recycling factor causes increased production of avermectin in *Streptomyces avermitilis* strains[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010, 37(7): 673 - 679.
- [28] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters[J]. Microb Biotechnol, 2011, 4(2): 207 - 215.
- [29] Ahmetagic A, Pemberton JM. Antibiotic resistant mutants of *Escherichia coli* K12 show increases in heterologous gene expression[J]. Plasmid, 2011, 65(1): 51 - 57.
- [30] Imai Y, Fujiwara T, Ochi K, et al. Development of the ability to produce secondary metabolites in *Streptomyces* through the acquisition of erythromycin resistance[J]. J Antibiot (Tokyo), 2012, 65 (6): 323 - 326.
- [31] Wang L, Zhao Y, Liu Q, et al. Improvement of A21978C production in *Streptomyces roseosporus* by reporter-guided *rpsL* mutation selection[J]. J Appl Microbiol, 2012, 112(6): 1095 - 1101.
- [32] Li L, Ma T, Liu Q, et al. Improvement of daptomycin production in *Streptomyces roseosporus* through the acquisition of pleuromutilin resistance[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 479742.
- [33] Lv XA, Jin YY, Li YD, et al. Genome shuffling of *Streptomyces viridochromo*-genes for improved production of avilamycin[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(2): 641 - 648.
- [34] Wang Q, Zhang D, Li Y, et al. Genome shuffling and ribosome engineering of *Streptomyces actuosus* for high-yield nosiheptide production[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 173(6): 1553 - 1563.
- [35] Ma Z, Tao L, Bechthold A, et al. Overexpression of ribosome recycling factor is responsible for improvement of nucleotide antibiotic-toyocamycin in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(11): 5051 - 5058.
- [36] Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, et al. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(5): 462 - 464.
- [37] Tanaka Y, Kasahara K, Hirose Y, et al. Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes[J]. J Bacteriol, 2013, 195(13): 2959 - 2970.
- [38] Derewacz DK, Goodwin CR, McNees CR, et al. Antimicrobial drug resistance affects broad changes in metabolomic phenotype in addition to secondary metabolism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(6): 2336 - 2341.
- [39] Dong Y, Cui CB, Li CW, et al. Activation of dormant secondary metabolite production by introducing neomycin resistance into the deep-sea fungus, *Aspergillus versicolor* ZBY-3[J]. Mar Drugs, 2014, 12(8): 4326 - 4352.
- [40] Zhang Y, Huang H, Xu S, et al. Activation and enhancement of fredericamycin A production in deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 by using ribosome engineering and response surface methodology[J]. Microb Cell Fact, 2015, 14(1): 64.
- [41] Derewacz DK, Covington BC, McLean JA, et al. Mapping microbial response metabolomes for induced natural product discovery[J]. ACS Chem Biol, 2015, 10(9): 1998 - 2006.
- [42] DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Cost to develop and win marketing approval for a new drug is \$ 2.6 billion[EB/OL](2014)[2015 - 8]. http://csdd.tufts.edu/news/complete_story/pr_tufts_csdd_2014_cost_study, 2014.
- [43] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. John Innes Foundation, 2000.
- [44] Shlaes DM. Research and development of antibiotics: The next battleground[J]. ACS Infect Dis, 2015, 1(6): 232 - 233.
- [45] Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance[J]. Nature, 2015, 517(7535): 455 - 459.
- [46] Hamamoto H, Urai M, Ishii K, et al. Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane[J]. Nat Chem Biol, 2015, 11(2): 127 - 133.

(本文编辑:熊辛睿)