# 천연물 조합생합성을 위한 합성생물학적 도구



이화여자대학교 윤여준 교수

## 1. 개요

인류는 자연계에 존재하는 미생물이나 식물 등을 탐색하는 과정에서 많은 생물학 적 활성을 지니는 천연 화합물들을 발굴해 내었고, 이러한 화합물은 의약품 등 다양 한 유용물질 개발의 중요한 자원으로 사용되어 왔다. 그러나 자연계 탐색을 통해 새 물질을 찾으려는 시도는 많은 시간과 노력, 비용이 요구되어 경제성과 효용성이 떨어 진다. 따라서 기존의 천연 화합물의 구조를 변형해 유용한 비천연 화합물을 발굴하기 위한 다양한 방법이 많이 연구되고 있다.

대표적인 방법인 조합생합성(combinatorial biosynthesis)은 천연 화합물의 생합 성 유전자의 조합을 통해 새로운 생합성 경로를 재구성하는 기술로 화합물 기본골격 이나 작용기 등을 변화시켜 다양한 구조의 화합물을 만들 수 있다. 이때, 생합성 관 련 효소를 외래 유래의 것과 치환하거나 고유성질을 변화, 또는 불활성화 등을 통해 인위적 재조합 생합성 경로를 구축할 수 있다. 이러한 방법은 주로 polyketide (PK) 계열이나 nonribosomal peptide (NRP) 계열의 화합물에 이용되어 그 구조 변형에 도입되고 있으며, 시간과 비용의 절감은 물론, 기존 의약품의 구조와 활성 관계 등을 응용하여 설계하기 때문에 생물학적 활성을 예상할 수 있으므로 새로운 구조의 유용 물질을 개발하는데 보다 효율적인 방법이라고 할 수 있다.

## 2. 합성 생물학 (synthetic biology)의 도입

최근에 들어, 시퀀싱 기술의 발달로 천연 화합물 생합성 유전자의 DNA 서열정보 가 풍부해짐에 따라 이를 이용하여 새로운 종류의 유용 화합물을 만들 수 있는 기회 가 점차 늘어나고 있다[1]. 그러나 기존의 클로닝 방법에 의존하는 유전자 조작법은 거대한 생합성 유전자 집단을 다루거나 다양한 유전자 조합을 위한 시간이 오래 걸리 고 복잡한 경우가 많다. 따라서 합성 생물학적 접근을 통해 좀 더 빠르고 정확하게 조합생합성을 수행할 수 있는 방법이 점차 개발되고 있으며, 특히 다양한 생합성 과 정을 재조합하기 위한 갖가지 DNA assembly 방법이 보고되고 있다.

# 2.1. In vivo homology 기반의 DNA 조립

그 중 homology 기반의 방법은 생합성 유전자 집단의 재조합 및 이종숙주 발현 을 위해 광범위하게 사용되고 있다. 전통적인 *in vivo* Red/ET recombineering 방 법인 LCHR (linear-plus-circular homologous recombination)은 *Escherichia coli* 내에서 coliphage λ Red system 유래의 Redαβγ 또는 Rac prophage 유래의 truncated RecE-T에 의해 linear vector 조각과 circular DNA 사이에 recombination 일어나는 방법으로[2] (그림 1a), 이를 이용해 daptomycin 생합성 domain을 치환하여 다양한 유도체를 만들어냈다[3,4]. LCHR을 통해 다양한 천연 화 합물의 생합성 과정이 조합되었으나, 거대한 유전자 집단의 조합을 위해서는 multiple overlapping clone으로부터 여러 단계의 recombination을 거쳐야 하며 단계마다 고유의 항생제 마커가 필요하다는 번거로움이 있다.

근래에는 full-length RecE-T에 의해 linear vector 조각과 linear DNA 사이에 recombination 일어나는 LLHR (linear-plus-linear homologous recombination) 방법이 개발되었고, 이는 LCHR에 비해 20배 정도 향상된 효율을 보여주고 있다[5] (그림 1b). 이 방법을 이용해 *Photorhabdus luminescens*에서 확 보한 unknown 유전자 집단을 *E. coli*에서 발현하여 천연 화합물의 생산을 확인하였다[5]. LLHR 방법은 genomic DNA로부터 원하는 DNA sequence를 빠르고 효과적으로 가져올 수 있지만, 한 번의 recombination으로 확보할 수 있는 유전자 집단의 크기가 약 60-kb로 한계가 있다.

다른 방법인 TAR (transformation-associated 玊 recombination)은 Saccharomyces cerevisiae의 native in vivo recombination 시스템을 이용하는 방법으로, environmental DNA 샘플이나 genomic DNA로부터 원하는 유전자 부분 을 바로 가져올 수 있다[6] (그림 1c). TAR 방법을 이용해 overlapping cosmid로부 터 생합성 집단을 조합한 BAC (bacterial artificial chromosome) clone을 이종숙 주 Streptomyces albus에서 발현하여 새로운 천연 화합물 fluostatin F, G, H 및 pentacyclic ring을 생산하였다[7,8]. 또한 최근에는 cosmid 기반의 TAR 시스템이 개발되었는데, 이 S. cerevisiae-E. coli shuttle-actinobacterial chromosome integrative capture vector (pCAP01)는 pUC origin을 가지고 있으므로 induction 없이 E. coli 내에서 충분한 양의 DNA를 확보할 수 있다. 이를 이용해 해양 방선균 Saccharomonospora sp. CNQ-490 유래 67-kb 크기의 silent NRP synthetase (NRPS) 유전자 집단을 확보하였으며, 이종숙주 *Streptomyces coelicolor*에서 발현 하여 daptomycin 유도체인 taromycin A를 생산하였다[9]. 이 방법은 거대한 유전자 집단을 한번의 recombination을 통해 발현용 벡터로 바로 확보할 수 있다는 장점이 있다.

또 다른 TAR 기반의 DNA assembler 방법을 이용하여 손쉽게 유전자 삭제나 치 환을 할 수 있다. 생합성에 관련된 여러 DNA 조각들을 *S. cerevisiae* 내에서 한 번 에 조립할 수 있으며, mutation된 각각 DNA 조각들의 조합을 통해 다양한 유도체를 생산할 수 있는 방법이다[10] (그림 1d). 이 방법으로 4~5-kb 크기의 DNA 조각 7개 를 조합하여 총 29-kb의 aureothin 생합성 유전자 집단을 연결하고 이종숙주 *Streptomyces lividans*에서 발현하여 aureothin을 생산하였으며, 또한 PCR을 통해 확보한 AurB PK synthase (PKS)의 DH domain이 inactivation된 조각을 조합하여 aureothin 유도체를 생산할 수 있었다[10]. DNA assembler 방법은 DNA 조각의 PCR 과정 중의 random mutation이나, PKS나 NRPS와 같이 sequence identity가 높은 DNA 조각들을 조합할 경우 삽입, 삭제 등의 mutation이 일어날 수 있는 가능 성이 있다.



그림 2. 천연물 생합성 유전자 집단의 in vivo assembly 방법

## 2.2. In vitro homology 기반의 DNA 조립

대표적인 *in vitro* 방법인 **Gibson assembly**는 overlapping sequence는 가지는 DNA 조각들을 세 단계의 효소반응을 통해 DNA를 조합하는 방법이다. 우선 T5 exonuclease에 의해 이중 가닥 DNA 조각들의 5' 말단이 분해되어 3' 말단이 돌출된 DNA 조각들이 생성되고, 적절한 온도에서 어닐된 construct의 gap이 Phusion polymerase에 의해 채워지고 최종적으로 Taq ligase에 의해 nick이 실링된다[11] (그림 2a).

변형된 *in vitro* 방법 중 하나인 SLIC (sequence- and ligation-independent cloning)은 T4 DNA polymerase가 사용되어 DNA 조각의 3' 말단을 분해되고 또한 단일 deoxynucleotide가 공급되면 T4 DNA polymerase에 의해 부분적으로 gap이 채워지며, *E. coli*에 transformation을 통해 *in vivo* 상에서 최종적으로 gap-filling 과 nick-sealing이 일어나 DNA 조각이 연결되는 방법이다[12] (그림 2b). 이 방법을 통해 mutation된 premonensin 생합성 DNA 조각을 shuttle vector에 클로닝하고 homologous recombination을 통해 chromosomal PKS에 삽입하여 다양한 premonensin 유도체를 만들었으며, 일부 유도체에서는 증가된 항균활성을 보였다 [13].



assembly 방법

합성 생물학을 응용한 homology 기반의 DNA assembly 방법들을 이용하면 좀 더 쉽고 빠른 방법으로 생합성 유전자들을 조합할 수 있다. 비교적으로 *in vivo* 방법 은 *in vitro* 방법보다 큰 사이즈의 유전자들을 조합하기에 좀 더 용이하고, *in vitro* 방법은 보다 짧은 시간에 construction을 완성할 수 있다는 장점이 있다.

## 3. 이종발현을 위한 최적의 이종숙주

다양하고 유용한 DNA assembly 기법이 발전함에 따라, 이를 이종숙주에서 효율 적으로 발현시키기 위해 적절한 이종숙주를 찾고 적용하는 일 또한 중요해지고 있다. 이종숙주의 선택은 많은 경우에 대상 경로나 대사산물의 종류에 따라 결정되는데, 일 반적으로 널리 쓰이는 이종숙주는 *Streptomyces* 종과 *E. coli*이다.

#### 3.1. 이종숙주 Streptomyces

특히 *Streptomyces*는 몇 가지의 장점을 가지고 있는데, 일차 대사로부터 공급되는 이차 대사산물의 생합성 전구체가 풍부하고, 높은 GC content와 Gram positive의 성질을 띠고 있으며, 단백질, promoter, activator, 조절 과정이 *E. coli*와 호환되지 않는다. 또한, 기능적인 생합성 과정에 필요한 post-translational modification을 지원해 주는 환경이 갖추어져 있다. *S. coelicolor*, *S. lividans, S. albus, Streptomyces avermitilis* 등 다양한 *Streptomyces* 이종숙주가 사용되고 있으며, 이종숙주의 이차대사산물 생합성 유전자를 제거함으로써 전구체나 에너지의 공급이 풍부해져 발현시켜준 외래 생합성 유전자로부터 생산되는 화합물의 양이 많아지고 생성 화합물의 검출 및 분석도 용이해진다. 특히 *S. coelicolor*[14]와 *S. avermitilis*[15]의 경우, 효율적인 이종숙주로 사용을 위해 이차대사 생합성 유전자 집단이 제거된 다양한 strain이 만들어졌으며, 이를 이용해 다른 종 유래의 천연 화 합물을 성공적으로 생산할 수 있었다[14-17].

## 3.2. 이종숙주 E. coli

이종숙주로써 *E. coli*는 생장 속도가 훨씬 빠르고 유용한 genetic tool이 다양하다 는 장점이 있다. 하지만 천연물 생합성에 필요한 효소의 부재나 생합성 전구체의 공 급이 어렵다는 단점이 있다. 그럼에도 불구하고, PKS 작동이 용이하도록 *E. coli*를 개량하고 생합성 전구체를 공급함으써 최초로 PK 6-deoxyerythronolide B (erythromycin A의 aglycone)의 생산을 가능하도록 하였다[18]. 이를 시작으로, 거 대 erythromycin 생합성 집단을 6개의 plasmid에 나누어 발현하는 전략으로 erythromycin A 및 그 유도체를 생산하였으며[19], 뿐만 아니라 다양한 NRP 및 PK-NRP hybrid 화합물도 *E. coli*에서 성공적으로 생산하였다[20-23]. 이 결과들로 써 *E. coli* 또한 거대 생합성 유전자 집단의 조합생합성 및 이종 발현을 위한 또 다 른 훌륭한 이종숙주임을 입증하였다.

3.3. 기타 이종숙주

이 뿐만 아니라 Pseudomonas putida, Myxococcus xanthus, S. cerevisiae 등

도 천연 화합물의 이종숙주로 광범위하게 사용되고 있다[1]. *S. cerevisiae*의 경우 특 히 식물이나 균류 유래의 천연 화합물의 이종발현에 유용하며, 이를 이종숙주로 이용 해 말라리아 치료제의 전구체인 artemisinic acid[24]나 indole alkaloid의 생합성 중간체인 strictosidine[25]을 생산 하였다.

이러한 다양한 시도와 발전에도 불구하고, 다양한 천연 화합물을 대량으로 생산할 수 있는 특정 숙주의 개발에는 아직 미치치 못하고 있다. 이보다는 목표 화합물의 생 합성 유전자를 효율적으로 발현하고 대상 전구체 공급을 유용하게 하는 등의 특정 화 합물을 대량 생산하는 최적의 숙주를 개발하는 것이 더 가능성이 있는 방향이라고 생 각된다. 예로, PKS나 NRPS 같은 거대 생합성 과정의 발현을 위해서는 *Streptomyces*를 사용하고, 작은 크기의 단백질들의 발현을 위해서는 *E. coli*를 사용, 식물이나 균류 유래의 화합물 생산을 위해서는 yeast를 사용하는 것이 유용할 것으로 생각할 수 있다.

## 4. 효과적인 생합성을 위한 잠재적인 합성 생물학적 도구

4.1. 생합성 유전자 집단의 효율적 발현을 위한 합성 생물학 도구

점차적으로 발전되고 있는 합성 생물학적 도구들을 적용함으로써 기존의 조합생합 성 방법이 가지는 문제 및 제한점을 해결할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 예를 들 어, (a) 이종숙주의 codon usage에 최적화된 합성 DNA를 이용하여 이종숙주에서의 발현문제를 해결하고, (b) 합성 scaffold를 이용하여 생합성 요소들의 공간상의 배치 를 조절하며, (c) promoter와 ribosome binding site (RBS)의 개량을 통해 전사와 번역 정도를 조절하여, 이종숙주에서 조합된 생합성 유전자 집단을 효율적으로 발현 시킬 수 있을 것이다 (그림 3).



그림 4. 조합된 생합성 유전자 집단의 효율적 발현을 위한 합성 생물학 도구

Sorangium cellulosum에서 생산되는 고가 항암제인 epothilone을 생장속도가 빠르고 유전자 조작이 용이한 이종숙주에서 생산하기 위해, 약 55-kb의 생합성 유전 자 집단을 codon usage에 맞춰 최적화 및 DNA를 합성하였으며 (그림 3a), module 4개 (module 3-6)로 이우러진 가장 큰 크기의 EpoD의 경우 두 부분 (module 3, 4 와 module 5, 6)으로 나누고 둘 사이에 원활한 상호작용을 위해 docking domain으 로 연결을 해주었다. 적절한 promoter의 사용, 낮은 온도에서의 배양, 단백질의 안정 적 형성을 위한 chaperone의 발현을 통해 1 μg/L 이하의 epothilone C와 D가 생 산되는 것을 확인하였다[26]. 유사하게, 이종숙주 *M. xanthus*에서 codon 최적화된 합성 유전자를 발현하여 약 100 μg/L의 epothilone A와 B가 생산되는 것을 확인하 였다[27].

합성 scaffold를 이용하면 생합성 단백질들이 공간상으로 근접한 부분에 위치하게 되고, 생합성 중간체들의 손실이 최소화되어 최종 산물의 수율이 증가할 수 있다 (그 림 3b). 특정 peptide ligand가 퓨전 된 protein scaffold가 타겟하는 효소들을 모집 하여 단백질 복합체를 형성하게 되는데, 이를 이용해 3개의 mevalonate 생합성 효소 들을 연결하여 *E. coli*에서 발현하였으며, scaffold를 사용하지 않을 때와 비교하여 그 생산량이 77배가량 증가하는 것을 확인하였다[28]. 비슷한 원리로, 표지된 효소들 이 scaffold에 위치한 RNA aptamer에 결합하여 공간상 근접한 곳에 위치하게 되는 데, 이 방법으로 2개의 효소를 연결하여 *E. coli*에서 hydrogen의 생산량이 48배 증 가하는 것을 확인하였다[29]. 좀더 최근에는 DNA scaffold를 이용하여 *E. coli*에서 resveratrol, 1.2-propanediol, mevalonate의 생산량이 최대 5배가량 증가하는 것 을 확인하였는데. DNA sequence에 결합한 zinc finger domain에 의해 효소들의 배치가 근접하게 된다[30]. 이런 합성 scaffold는 불안정하다는 단점이 있지만, 앞선 예시들을 통해 non-PKS나 NRPS에서 인공 scaffold 시스템을 효과적으로 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

Promoter와 RBS의 조절을 통해 개개의 단백질의 전사와 번역 정도를 조절할 수 있는데 (그림 3c), 최근에는 널리 사용되는 *S. erythraea* 유래 constitutive promoter ermEp 1의 엔지니어링을 통해 선별된 강력한 promoter를 사용하여 이종 숙주 *S. lividans*에서 flaviolin 생산량이 3배가량의 증가함을 확인하였다[31].

## 4.2. 숙주 개량을 위한 합성 생물학 도구

고효율의 genome editing 도구를 이용해 특정 sequence의 삭제나 추가, 수정 등 을 통해 미생물 숙주를 효과적으로 엔지니어링 할 수 있다. 예로, (a) clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) protein (CRISPR/Cas) 시스템, (b) multiplex automated genome engineering (MAGE), 또는 (c), (d) RNA silencing을 통해, 생산 이종숙주를 최적화 하여 천연물의 생산을 유용하게 할 수 있을 것이다 (그림 4).



그림 5. 숙주 개량을 위한 합성 생물학 도구

CRISPR/Cas 시스템은 세포내로 유입된 외래 유전자를 분해하려고 하는 박테리아 의 면역시스템을 이용한 방법으로, 특정 sequence에 특이적으로 결합하는 guide RNA (gRNA)와 DNA를 절단하는 기능의 Cas9 nuclease로 구성되어 있다[32]. 일반 적으로 *Streptococcus pyogenes* 유래의 type II 시스템이 사용되며, single-guide RNA (sgRNA)는 약 20-bp의 특정 sequence에 결합하고 그 뒤에 존재하는 NGG sequence를 Cas9이 인식하는데 이 부분을 protospacer adjacent motif (PAM)라고 한다. DNA 절단은 PAM site 앞쪽으로 nucleotide 3개가 떨어진 부분에서 일어난다 (그림 4a). 이 방법을 이용하여 다양한 숙주들의 genome을 재구성 되었지만[33-36], off-target effect의 발생 등의 실용성을 평가하는 연구가 더 필요하다.

MAGE는 single-stranded oligonucleotide를 genome에 도입시키면서 유전자의 변이를 유도하는 방법으로 간단하게 다수의 돌연변이를 제작할 수 있다. 짧은 ssDNA 는 타겟 유전자 부분에 결합하여 미스매치나 삽입, 삭제 등을 통해 genome을 수정 하게 된다 (그림 4b). 이를 이용해 엔지니어링 된 *E. coli*에서 lycopene의 생산량이 3일만에 5배가 증가하는 결과를 얻을 수 있었다[37]. 하지만 MAGE는 높은 효율의 transformation이 필요하며, 광범위한 organism에 적용하기 어려운 방법이다.

또한, genome editing이나 없이 antisense RNA나 small regulatory RNA를 매

개로 하는 RNA silencing 방법은 숙주를 엔지니어링 할 수 있는 효과적인 방법이다. 이 작은 RNA들은 mRNA에 결합하여 타겟 단백질의 발현을 억제시키는데 (그림 4c), 이 방법들을 이용해 *S. coelicolor*에서 actinorhodin의 생산량을 저해시켰으며[38], 이종숙주 *E. coli*를 개량하여 이종발현 산물인 tyrosine의 생산량을 증가시킬 수 있 었다[39]. 이 방법은 타겟 유전자의 변형 없이 chromosomal 유전자의 발현을 조절 할 수 있는 유용한 방법이지만, 아직까지는 이 방법이 *E. coli*에서만 적용되고 있다.

위에서 언급한 방법들은 아직 까지는 적용 가능한 부분들이 한정되어 있지만, 점 차적으로 발전하고 있는 합성 생물학적 도구들을 생합성 유전자 집단의 조합 및 이종 숙주에서 발현에 적용함으로써 효과적인 유용 화합물을 생산에 도움이 될 것으로 예 상한다.

# 참고문헌

- Ongley, S.E., Bian, X., Neilan, B.A. & Müller, R. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* 30, 1121-1138 (2013).
- 2. Zhang, Y., Muyrers, J.P., Testa, G. & Stewart, A.F. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli. Nat. Biotechnol.* 18, 1314-1317 (2000).
- Nguyen, K.T. et al. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17462-17467 (2006).
- Baltz, R.H. Combinatorial biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics: a model for synthetic biology to accelerate the evolution of secondary metabolite biosynthetic pathways. ACS Synth. Biol. 3, 748-758 (2014).
- 5. Fu, J. et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nat. Biotechnol.* 30, 440-446 (2012).
- Kouprina, N. & Larionov, V. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution. *Nat. Rev. Genet.* 7, 805-812 (2006).
- Feng, Z., Kim, J.H. & Brady, S.F. Fluostatins produced by the heterologous expression of a TAR reassembled environmental DNA derived type II PKS gene cluster. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 11902–11903 (2010).
- Feng, Z., Kallifidas, D. & Brady, S.F. Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 12629-12634 (2011).
- 9. Yamanaka, K. et al. Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide

biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 111, 1957-1962 (2014).

- Shao, Z., Luo, Y. & Zhao, H. Rapid characterization and engineering of natural product biosynthetic pathways via DNA assembler. *Mol. Biosyst.* 7, 1056-1059 (2011).
- 11. Gibson, D.G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343-345 (2009).
- 12. Li, M.Z. & Elledge, S.J. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. *Methods Mol. Biol.* 852, 51-59 (2012).
- 13. Kushnir, S. et al. Minimally invasive mutagenesis gives rise to a biosynthetic polyketide library. *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* 51, 10664-10669 (2012).
- Gomez-Escribano, J.P. & Bibb, M.J. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb. Biotechnol.* 4, 207-215 (2011).
- Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E. & Ikeda, H. Genome-minimized Streptomyces host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2646–2651 (2010).
- 16. Zhou, M. et al. Sequential deletion of all the polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic gene clusters and a 900-kb subtelomeric sequence of the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol. Lett.* 333, 169-179 (2012).
- Komatsu, M. et al. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth. Biol.* 2, 384–396 (2013).
- Pfeifer, B.A., Admiraal, S.J., Gramajo, H., Cane, D.E. & Khosla, C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli. Science* 291, 1790-1792 (2001).
- Zhang, H., Wang, Y., Wu, J., Skalina, K. & Pfeifer, B.A. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host. *Chem. Biol.* 17, 1232-1240 (2010).
- 20. Watanabe, K. et al. Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli. Nat. Chem. Biol.* 2, 423-428 (2006).
- Bian, X. et al. Direct cloning, genetic engineering, and heterologous expression of the syringolin biosynthetic gene cluster in *E. coli* through Red/ET recombineering. *ChemBioChem* 13, 1946–1952 (2012).
- 22. Ross, A.C., Gulland, L.E., Dorrestein, P.C. & Moore, B.S. Targeted capture and

heterologous expression of the Pseudoalteromonas alterochromide gene cluster in *Escherichia coli* represents a promising natural product exploratory platform. *ACS Synth. Biol.* 4, 414-420 (2015).

- Liu, J., Zhu, X., Seipke, R.F. & Zhang, W. Biosynthesis of antimycins with a reconstituted 3-formamidosalicylate pharmacophore in *Escherichia coli. ACS Synth. Biol.* 4, 559-565 (2015).
- 24. Ro, D.K. et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440, 940-943 (2006).
- 25. Brown, S., Clastre, M., Courdavault, V. & O'Connor, S.E. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 3205-3210 (2015).
- 26. Mutka, S.C., Carney, J.R., Liu, Y. & Kennedy, J. Heterologous production of epothilone C and D in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 45, 1321-1330 (2006).
- 27. OBwald, C. et al. Modular construction of a functional artificial epothilone polyketide pathway. *ACS Synth. Biol.* 3, 759-772 (2014).
- Dueber, J.E. et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat. Biotechnol.* 27, 753-759 (2009).
- Delebecque, C.J., Lindner, A.B., Silver, P.A. & Aldaye, F.A. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science* 333, 470-474 (2011).
- 30. Conrado, R.J. et al. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. *Nucleic Acids Res.* 40, 1879-1889 (2012).
- Siegl, T., Tokovenko, B., Myronovskyi, M. & Luzhetskyy, A. Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes. *Metab. Eng.* 19, 98-106 (2013).
- 32. Ran, F.A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281.2308 (2013).
- Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013).
- Bao, Z. et al. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth. Biol. 4, 585-594 (2014).
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L.A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 31, 233-239 (2013).
- 36. Cobb, R.E., Wang, Y. & Zhao, H. High-efficiency multiplex genome editing of

*Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth. Biol.* 4, 723-728 (2014).

- 37. Wang, H.H. et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* 460, 894-898 (2009).
- 38. Uguru, G.C. et al. Synthetic RNA silencing of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS ONE* 8, e67509 (2013).
- 39. Na, D. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nat. Biotechnol.* 31, 170-174 (2013).