



Marinacarboline 甲基化基因 *mcbD* 的筛选及其功能

陈奇^{1,2,3}, 秦湘静², 李青连², 鞠建华^{2,3*}

¹安徽医科大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230032

²中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省海洋药物重点实验室, 中国科学院海洋微生物研究中心, 广东 广州 510301

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】定位 *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652 基因组中负责 marinacarboline 甲基化修饰的基因 *mcbD* 并鉴定其功能。【方法】游离 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 的基因组序列中功能注释为甲基转移酶的蛋白, 使用 MEGA 6 自带的 ClustalW 与来自于 marformycins 生物合成途径中的 MfnG (D/L-酪氨酸甲基化酶) 进行多序列比对, 用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树, 筛选到与 MfnG 进化关系最近的 Orf03255 (McbD); 扩增 *mcbD* 后克隆至 pET28a(+) 并在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达, 结合 Ni-NTA 亲和层析法纯化获取较高纯度的 McbD 活性蛋白; 以 marinacarboline B 为底物, 利用高效液相色谱检测 McbD 的体外酶活; 利用基于 PCR-targeting 的遗传操作体系构建 *mcbD* 插入失活突变株 ($\Delta mcbD$) 并分析其与野生型菌株的发酵产物差异。【结果】N-末端融合组氨酸标签的 McbD 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中可溶性表达, 亲和层析纯化的 McbD 能够以 marinacarboline B 为底物催化形成 marinacarboline C; *mcbD* 基因阻断突变株 $\Delta mcbD$ 与野生型相比不产生化合物 marinacarboline C, 同时累积 marinacarboline B。【结论】McbD 为 marinacarboline 生物合成中必需的 O-甲基转移酶。

关键词: marinacarboline, 甲基化, 生物合成, 酶反应

β -咔啉生物碱是一类拥有吲哚并吡啶三环体系的重要生物碱类天然产物, 分布于多种生境和生物类群中, 具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒以及抗抑郁等多种生物学活性^[1-2]。近期, 人们通过高通量小分子筛选, 证实该家族的骆驼蓬碱(harmine)

还可驱动产生胰岛素的人类 β 细胞进行增殖, 对糖尿病治疗有重要意义^[3]。Marinacarboline A-D (MCBs, 1-4; 图 1) 作为该类化合物的典型代表, 对疟原虫多重耐药株 Dd2 及敏感株 3D7 具有显著的抑制作用但不显示细胞毒活性, 是优良的抗疟

基金项目: 安徽医科大学博士科研资助基金(XJ201512); 国家自然科学基金(41406195)

*通信作者。Tel/Fax: +86-20-89023028; E-mail: jju@scsio.ac.cn

收稿日期: 2016-11-02; 修回日期: 2016-12-09; 网络出版日期: 2017-01-04

药物先导化合物^[4]。MCBs 最初分离自深海来源的放线菌新属新种 *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652^[5], Tagawa、Battini 和 Li 等分别对其化学合成进行了研究^[6-8]; Chen 等开展了生物合成研究, 筛选并鉴定了其主要的生物合成基因簇, 确定了 *mcbABC* 3 个连续同向排布的功能基因参与 MCBs 的生物合成, 发现新颖的 Pictet-Spengler 酶 McbB 负责合成 β -咔啉骨架^[1]。随后 Wang 和 Mori 等几乎同时开展了 McbB 的结构与功能研究, 前者仅表征了该酶晶体学特征^[9-10], 后者更深入系统进行了酶学及酶结构功能相关性研究, 通过体外实验证实草酰乙醛和丙酮醛均可作为醛基供体, 与 L-色氨酸(Tryptophan, Trp)在 McbB 的催化下形成 MCBs 共有的母核结构; McbB 具有完全不同于其他 Pictet-Spengler 酶的三维折叠特征, 与底物 L-Trp 的共结晶结构结合关键残基定点突变分析证实, 催化活性中心 Glu97 残基是 McbB 酶反应的“酸碱”催化剂^[10]。此外, Ji 等利用体外生化实验确证 McbA 是一个 ATP 依赖、底物识别

宽泛的酰胺键合成酶, 由此通过化学-酶法合成了一系列新的 β -咔啉生物碱类化合物, 对底物的酶促动力学研究证实 β -苯乙胺是天然产物合成中的最适胺基供体^[11]。

然而, 上述对 MCBs 的研究并未涉及化合物 marinacarboline C (3) “右半部分”酪氨酸(Tyrosine, Tyr)结构单元中甲基的形成过程, 直到本实验室 Liu 等从 marformycins 的生物合成基因簇中鉴定了一个同样负责 D/L-Tyr 甲基化的甲基转移酶 MfnG (图 1)^[12], 才为 MCBs 生物合成过程中甲基化酶的筛选提供了有价值的参照。鉴于此, 我们采用基于同源基因的进化关系分析、体外生化实验和体内基因阻断的方法, 从 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 的基因组中鉴定了负责化合物 marinacarboline C 中甲基形成的 *O*-甲基转移酶 McbD, 证实独立于主基因簇 *mcbABC* 外的 McbD 负责 marinacarboline B 的甲基化后修饰, 是其生物合成必需基因, 最终完整阐释了 MCBs 的生物合成机制。

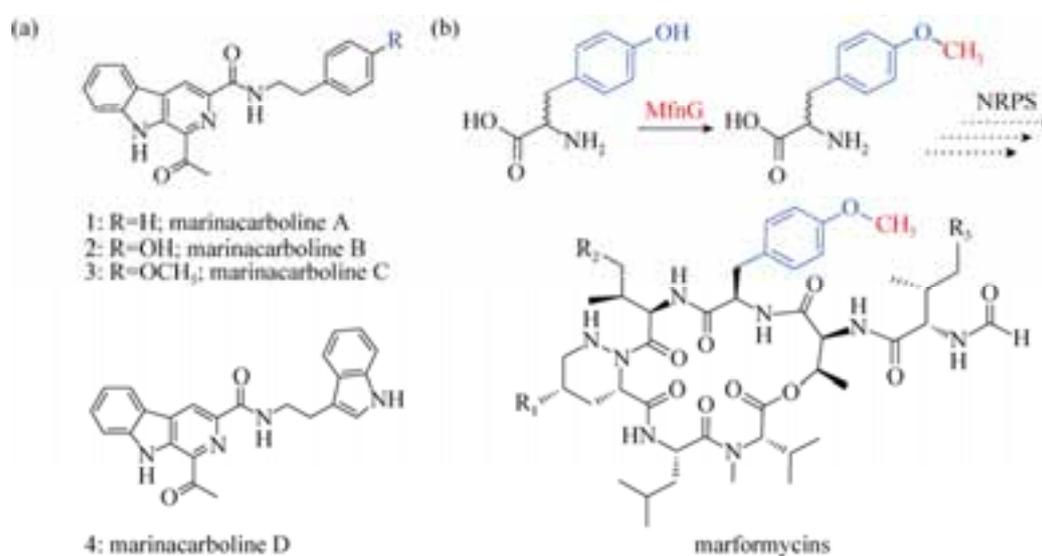


图 1. Marinacarboline A-D(1-4)和 marformycins 的化学结构^[1,12]

Figure 1. Chemical structures of marinacarboline A-D (a) and marformycins (b) ^[1,12]. The MfnG-catalyzed pre-NRPS *O*-methylation step, to afford *O*-methyl-D-Tyr and *O*-methyl-L-Tyr as marformycins building blocks (see reference 12 for details).

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株: *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652 来自中国科学院海洋微生物研究中心(RNAM), 菌株保存和传代使用固体 M-ISP4 培养基, 于 30 °C 下培养; 生产代谢产物使用液体 M-ISP4 培养基。包含有目的基因的 cosmid 7D1、15E12 和 20B12 为本研究中构建, 研究中使用的其他菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基和培养条件: (1) LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 加 ddH₂O 至 1 L, pH 7.0, 固体添加 1.5%–2% 琼脂粉, 121 °C 灭菌 30 min 备用; (2) M-ISP4 培养基: 可溶性淀

粉 10 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, NaCl 1 g, 蛋白胨 1 g, 酵母粉 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, CaCO₃ 2 g, 海盐 30 g, 自来水 1 L, pH 7.2–7.4, 固体添加 1.5%–2% 琼脂粉, 121 °C 灭菌 30 min 备用。

大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21 和 ET12567/pUZ8002 用 LB 37 °C 培养, 而 BW25113/pIJ790 相关菌株使用 30 °C 或 37 °C 培养。*M. thermotolerans* SCSIO 00652 和相关的突变株于 28 °C 培养 7–8 d。

1.1.3 试剂和主要仪器: 限制性核酸内切酶, DNA 连接酶和 DNA marker 等购自 TaKaRa 公司; 高保真 DNA 聚合酶购自 TransGen 公司; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。其他常规试剂均为国产分析纯级产品, 各种抗生素均购自国内的试剂公司, 使用浓度为氨苄青霉素(Ampicillin),

表 1. 文中所用的菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains /plasmids	Description	References/sources
Strains		
<i>E. coli</i> LE392	Host strain of cosmid vector SuperCos 1	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5 α	Host strain for general clone	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Host strain for protein expression	Novagen
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Host strain for conjugation	[13]
<i>E. coli</i> BW25113/pIJ790	Host strain for PCR-targeting	[13]
<i>M. thermotolerans</i>	MCBs biosynthesis stain <i>M. thermotolerans</i> SCSIO 00652	Our Lab.
Ju 3211	The <i>mcbD</i> gene disrupted mutant of <i>M. thermotolerans</i>	This study
Plasmids		
Supercos1	Amp ^r , Kan ^r , cosmid vector	Stratagene
pCR2.1	Amp ^r , Kan ^r , general clone vector	Invitrogen
pET28a(+)	Kan ^r , expression vector	Novagen
pIJ773	Apm ^r , source of <i>acc(3)IV</i> and <i>oriT</i> fragment	[13]
pIJ790	Cml ^r , including λ -RED (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>) for PCR-targeting	[13]
pUZ8002	Kan ^r , including <i>tra</i> for conjugation	[13]
pJu32111	Cosmid7D1 derivative where <i>mcbD</i> was disrupted by <i>aac(3)IV</i>	This study
pJu32112	Cosmid 15E12 derivative where <i>mcbD</i> was disrupted by <i>aac(3)IV</i>	This study
pJu32113	Cosmid 20B12 derivative where <i>mcbD</i> was disrupted by <i>aac(3)IV</i>	This study

Amp) 100 µg/mL、卡那霉素(Kanamycin, Kan) 50 µg/mL、阿泊拉霉素(Apramycin, Apm) 50 µg/mL、氯霉素(Chloramphenicol, Cml) 25 µg/mL 和甲氧苄氨嘧啶(Trimethoprim, Tmp) 50 µg/mL。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成, DNA 测序由上海美吉公司完成。Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪, Eppendorf 5810R 台式大容量多功能冷冻离心机, Eppendorf 5418 小型台式高速离心机, BIO-RAD Molecular Image Gel Doc™ XR⁺ Imaging System 凝胶成像系统, SONICS 超声波破碎仪 VCX-130, Eppendorf Concentrator plus 旋转浓缩仪, Heidolf Laborota4000 eco/WB/G3 旋转蒸发仪, Agilent 1260 infinity 高效液相色谱仪(High performance liquid chromatography, HPLC), 分析型色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 µm), Bruker maXis 超高分辨液质联用仪。

1.2 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 中的甲基转移酶与 MfnG 的进化关系分析

对 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 的基因组序列功能注释表中注释为甲基转移酶的蛋白进行游离, 将得到的序列与 MfnG 进行进化关系分析。使用 MEGA 6 自带的 ClustalW 进行多序列比对, 系统发育树使用邻接法(Neighbor-Joining)构

建。根据比对结果, 分析得到与 MfnG 进化关系较近的蛋白。

1.3 *mcbD* 基因的克隆和表达

以 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 基因组 DNA 为模板, 以 *mcbD*-ex-F 和 *mcbD*-ex-R 为引物(表 2) PCR 扩增大小约为 1.4 kb 的 *mcbD*, PCR 反应条件和循环参数为: 95 °C 5 min; 95 °C 50 s, 60 °C 50 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。得到的 PCR 产物依次经过胶回收、TA 克隆和测序验证, 得到正确的重组载体 pCR2.1/*mcbD*; 经 *Nde* I/*Hind* III 双酶切, 连接到同样酶切的 pET28a(+)载体, 转化 *E. coli* BL21 (DE3)从而得到重组表达菌株 *E. coli* BL21/pET28a(+)/*mcbD*。

将验证正确的重组表达菌株 *E. coli* BL21/pET28a(+)/*mcbD* 进行过夜摇瓶培养, 按照 1% 的接种量转接至 10 瓶 50 mL (250 mL 三角瓶) LB+Kan 培养液中, 于 28 °C、200 r/min 振荡培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.5, 加入 0.05 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG), 置于 16 °C、150 r/min 摇床上继续振荡培养约 15 h, 4000 r/min 离心收集菌体, 转移至 50 mL 离心管中进行蛋白纯化操作或置于-80 °C 备用。

表 2. 本研究中使用的引物
Table 2. Primer pairs used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
<i>mcbD</i> -ex-F	<u><i>CATATGGTCACCAGGGAAGCACTC</i></u>
<i>mcbD</i> -ex-R	<u><i>AAGCTTTCACCTTGATCGCGATCACGAG</i></u>
<i>mcbD</i> -sl-F	<i>GGTCACCAGGGAAGCACTC</i>
<i>mcbD</i> -sl-R	<i>AGGTCCGGGTCACCGTAGAT</i>
<i>mcbD</i> -del-F	<i>GCGCTGTCCGTCTCGACCCCGGGGTGCGGTGGAGCCGCATTCCGGGGATCCGTCGACC</i>
<i>mcbD</i> -del-R	<i>GATCAGCATGTGCAGCTTGAACAGCAGCCCGCGAGGTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</i>

The introduced restriction enzyme sites are highlighted in italics and underlined.

1.4 McbD 蛋白的纯化

将上步得到的菌体用 50 mmol/L PBS (pH 8.0) 缓冲液洗涤 2 次, 结合缓冲液(50 mmol/L PBS, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 8.0)悬浮, 超声破碎后 10000 r/min 离心 40 min 得到上清; 将上清装载到 Ni-亲和层析柱上, 先用 6 mL 结合缓冲液(50 mmol/L PBS, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑)洗脱, 再用 6 mL 洗涤缓冲液(50 mmol/L PBS, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑)洗脱, 接着用 6 mL 洗脱缓冲液 I (50 mol/L PBS, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑)和 6 mL 洗脱缓冲液 II (50 mmol/L PBS, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 1 mol/L 咪唑)洗脱。分别收集各个洗脱组分, 进行 SDS-PAGE 检测, 含有目标蛋白的洗脱组分用 PD-10 脱盐柱(GE healthcare)脱盐, 随后用 10 K Amicon Ultra-15 超滤管(Merck Millipore Ltd.)离心浓缩, 最后用 50 mmol/L PBS (pH 8.0)配制的 50%甘油稀释蛋白至甘油终浓度为 25%, 贮存于-80 °C 超低温冰箱或是暂存于 4 °C 冰箱备用, 贮存蛋白浓度的测定用 Bradford 法进行^[14]。

1.5 McbD 的酶催化反应和 HPLC 检测

McbD 的体外生化反应参考 Liu 等并略有改动^[12], 反应体系为(50 μ L): 3 μ mol/L McbD, 0.2 mmol/L marinacarboline B(2), 0.2 mmol/L SAM (S-腺苷-甲硫氨酸, S-adenosyl-L-methionine), 50 mmol/L PBS (pH 8.0), 30 °C 或 37 °C 反应 1 h。反应结束后, 用 1 mL 乙酸乙酯终止反应, 高速离心、转移上清, 旋转浓缩蒸干后溶于 100 μ L 甲醇, 20 μ L 用于 HPLC 分析。

HPLC 检测条件: 流动相 A 相为 15%乙腈, 流动相 B 相为 85%乙腈, 均含 0.1%冰乙酸(glacial

acetic acid, GAA); 流速为 1 mL/min, 检测波长为 215 nm 和 285 nm。HPLC 走样程序: 0–20 min, 0%–70% B 相; 20–21 min, 70%–100% B 相; 21–26 min, 100% B 相; 26–26.1 min, 100%–0%; 26.1–30 min, 0% B 相。

1.6 *mcbD* 基因阻断突变株(Ju3211)的构建

本部分构建流程参考文献[1,15–17]: 首先用 *mcbD*-sl-F 和 *mcbD*-sl-R 这对引物进行筛选, 目标大小为 798 bp 得到的阳性克隆子分别对应划线至 Kan+Amp 的固体 LB 平板上, 置于 37 °C 培养箱中过夜培养。分别从固体平板上挑取单克隆摇菌, 菌液 PCR 进一步验证。提取 cosmid, 用 *Bam*H I 及 *Eco*R I/*Bgl* II 进行酶切分析, 选择 cosmid 7D1、15E12 和 20B12 分别转化至 *E. coli* BW25113/pIJ790 得到 *E. coli* BW25113/pIJ790/ 7D1、15E12 和 20B12, 成功转入相应 cosmid 的菌株分别制备感受态细胞备用。接下来的步骤参照基于 λ -RED 介导的 PCR-Targeting 技术^[13], *mcbD* 被 Apm 抗性片段置换掉的重组 cosmid 分别标记为 pJu32111、pJu32112 和 pJu32113。将这些重组的 cosmid 分别转化 *E. coli* ET12567/pUZ8002 感受态细胞, 与 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 进行接合转移并挑选双交换突变株。利用微波法^[18]对疑似双交换突变株进行快速抽提基因组 DNA 作为模板, 以 *mcbD* 的表达引物作为其阻断前后的验证引物进行 PCR 验证, 扩增产物野生型大小为 1395 bp, 相应突变型大小为 1648 bp。反应体系及条件为(20 μ L): 10 \times 缓冲液 2 μ L, DNA 聚合酶 *EasyTaq* 1 U, dNTPs 0.5 mmol/L, 引物各 0.5 μ mol/L, DNA 模板约 1 ng, 加水至 20 μ L; PCR 反应条件和循环参数同前文 *mcbD* 基因的扩增。

1.7 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 野生型菌株及突变株的发酵和 HPLC 检测

将 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 野生型菌株及其相应的突变株收取孢子后以约 1% 的接种量分别接入 50 mL 的发酵培养基(M-ISP4)中(装于 250 mL 锥形瓶), 于 28 °C、200 r/min 振荡培养 7–8 d, 用 100 mL 丁酮萃取发酵产物, 有机相于旋转蒸发仪上蒸干, 得到的提取物以 1 mL 甲醇溶解, 离心后取 30 μ L 样品进行 HPLC 检测, 除检测波长为 215 nm 和 375 nm 外, 其余条件与 McbD 酶反应提取物的 HPLC 检测相同。

2 结果和分析

2.1 Orf03255 (McbD)可能与 marinacarboline 的甲基化修饰有关

首先, 从 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 基因组序列功能注释表中得到了 58 个功能为甲基转移酶的蛋白, 考虑 MfnG 的大小、功能以及 marinacarboline C(3)的化学结构特征, 我们只选择了其中功能注释为 *O*-甲基转移酶且大小与 MfnG 相差不大的蛋白用邻接法构建其分子系统发育树。结果发现, 在 Orf00063、Orf00291、Orf00553、Orf00555、Orf00705、Orf01188、Orf01569、Orf02789、Orf03255、Orf03317、Orf04349、Orf04727 和 Orf04971 这 13 个蛋白中, 仅 Orf03255 与 MfnG 的进化关系最近; 生物信息学分析发现 Orf03255 与 MfnG 都属于 SAM 依赖性 *O*-甲基转移酶 II 型家族(SAM-dependent *O*-methyltransferase class II-type)。因此, 我们推测 Orf03255 可能行使与 MfnG 类似的功能, 即负责 marinacarboline C(3)中甲基的形成, 相应的 13 个蛋白与 MfnG 的分子系统进化关系如图 2。McbD (Orf3255)的 GenBank 登录号为 KX840363。

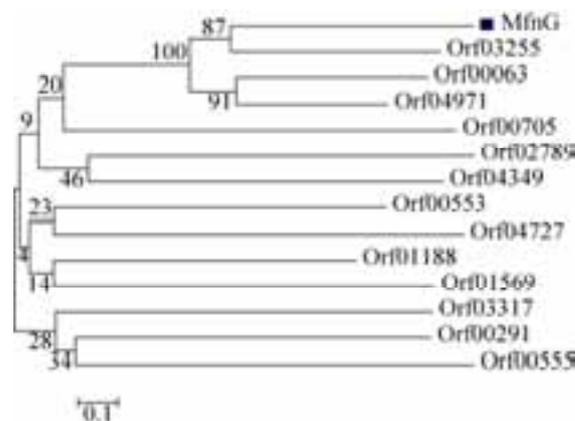


图 2. *M. thermotolerans* SCSIO 00652 基因组序列中部分甲基转移酶与 MfnG 的分子系统进化关系

Figure 2. Phylogenetic tree of the methyltransferases in *M. thermotolerans* SCSIO 00652 with MfnG of marformycins. Numbers at the nodes represent bootstrap percentages obtained from 1000 replicates. The scale bar (0.1) represents the number of amino acid substitutions per residue.

2.2 McbD 的表达和纯化

测序结果表明重组表达菌株 *E. coli* BL21/pET28a(+)/mcbD 构建正确, 小量可溶性分析表明 McbD 可溶性表达。对纯化过程中的各洗脱组分进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明目标蛋白主要存在于洗脱缓冲液 I 中, 而在洗涤缓冲液和洗脱缓冲液 II 中也有分布, 但量较少。因此, 仅对洗脱缓冲液 I 洗脱组分进行脱盐和浓缩, 最终得到的蛋白浓度为 5.62 mg/mL, 由于含组氨酸标签的重组蛋白大小为 52.46 kDa。因此, McbD 的蛋白浓度为 107.13 μ mol/L, 其 SDS-PAGE 分析结果见图 3。

2.3 McbD 的体外功能分析

为证明 McbD 具有将 marinacarboline B(2)甲基化的功能, 对 McbD 的体外生化功能进行了研究。酶反应提取物的 HPLC 分析结果表明(图 4-A):

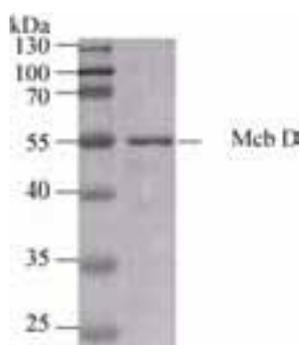


图 3. McbD 的 SDS-PAGE 分析

Figure 3. SDS-PAGE analysis of McbD.

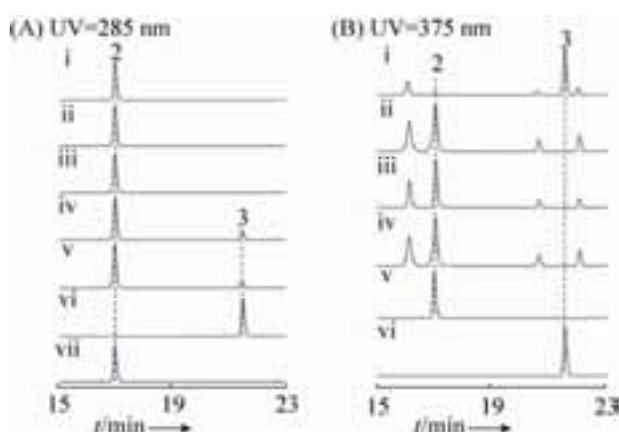


图 4. 不同提取物的 HPLC 检测

Figure 4. HPLC analysis of different extracts. A: *in vitro* characterization of McbD-catalyzed reactions. (i) without McbD, (ii) without SAM, (iii) control assays with boiled McbD, (iv) enzymatic reaction at 30 °C, (v) enzymatic reaction at 37 °C, (vi-vii) authentic standard of 3 and 2; B: metabolite profiles using an Agilent C₁₈ column. (i-iv) *M. thermotolerans* SCSIO 00652 wild-type and its mutant strains Ju 3211, (v-vi) authentic standard of 2 and 3.

仅在同时添加 SAM 和 McbD 的情况下, 在保留时间约为 21.5 min 的位置多出了一个紫外吸收与 β-咪啉生物碱类似的峰(图 4-A, iv-v), 高分辨质谱 HR-ESI-MS(+) *m/z* 测定的 [M+H]⁺ 分子量为 388.1656, 预测的分子式为 C₂₃H₂₁N₃O₃, 比底物 marinacarboline B(2)的分子量多 14, 我们推测产物

可能多了-CH₃基团, 与 marinacarboline C(3)的标准品(图 4-A, vi)校对知其为化合物 marinacarboline C(3), 即 marinacarboline B(2)的苯环羟基被 *O*-甲基化的产物。而在不添加 SAM 和添加煮沸灭活的 McbD 情况下, 均不能发生反应(图 4-A, ii-iii)。在 30 °C 和 37 °C 两种酶反应温度下, 产物 marinacarboline C(3) 的量未见明显区别。因此, McbD 是一个 SAM 依赖的 *O*-甲基转移酶, 体外具有将 marinacarboline B(2) 甲基化形成 marinacarboline C(3)的功能。

2.4 McbD 的体内功能分析

通过生物信息学分析及体外生化实验证实 McbD 具有将 marinacarboline B(2)甲基化形成 marinacarboline C(3)的功能, 而 *mcbD* 是不是负责 marinacarboline B(2)甲基化的唯一基因, 即在 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 基因组内是否还有其他基因具有此功能并不清楚。因此, 需要在体内将 *mcbD* 阻断。我们利用 PCR-targeting 技术, 构建得到了 *mcbD* 被置换突变的 cosmid pJu32111、pJu32112 和 pJu32113, 将它们分别转化 *E. coli* ET12567/pUZ8002 并与 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 进行接合转移, 通过抗性筛选和 PCR 验证得到 *mcbD* 被阻断的突变株 Ju3211(图 5)。

对得到的突变株 Ju3211 进行摇瓶发酵、萃取和 HPLC 分析, 与经相同条件进行发酵和分析的 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 野生型相比, 突变株中 marinacarboline C(3)完全不生产, marinacarboline B(2)的量比野生型高出 10 倍以上(图 4-B, i-iv), 说明 *mcbD* 被阻断后, marinacarboline B(2)不能被后修饰形成对应的产物而得到累积。因此, 进一步的体内基因阻断实验证实 *mcbD* 是基因组中唯一能够编码催化 marinacarboline B(2)甲基化后修饰形成 marinacarboline C(3)的甲基转移酶基因, *mcbD* 是 MCBs 生物合成的必需基因之一。

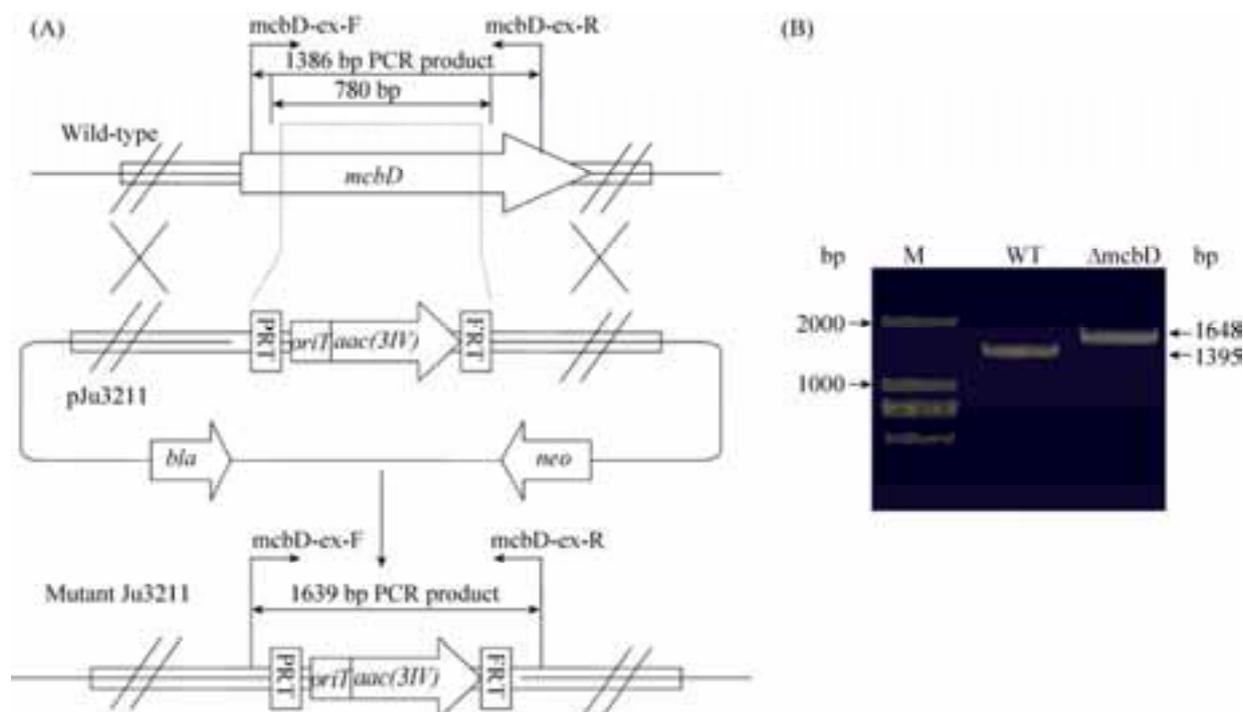


图 5. *mcbD* 基因阻断突变株的构建流程(A)和 $\Delta mcbD$ 突变菌株的 PCR 验证(B)

Figure 5. Inactivation of *mcbD* schematic diagram for *mcbD* gene disruption mutant (A) and gel electrophoresis analyses of PCR products (B). M: DNA molecular ladder; WT: *M. thermotolerans* SCSIO 00652, 1395 bp; $\Delta mcbD$: the *mcbD* disruption mutant, 1648 bp.

3 讨论

本研究首先由生物信息学分析入手，而后由体外生化实验初步证实，最终经体内基因阻断实验确认，发现并鉴定了负责 MCBs 甲基化后修饰的酶 McbD 及其功能，从而最终阐释了 MCBs 的完整生物合成基因簇和生物合成路径。

前期对 MCBs 生物合成基因簇的异源表达实验并未检测到甲基化产物 marinacarboline C(3)的生成,反观 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 野生型的发酵结果, marinacarboline C(3)是确实存在的^[1]。因此我们推测,负责 marinacarboline C(3)中甲基形成的基因一定存在于 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 的基因组之上,但与已鉴定的 MCBs 主基因簇的位置关系并不清楚。实验室 Liu 等对 marformycins

生物合成途径中 D/L-Tyr 甲基转移酶的研究工作为我们对 McbD 的筛选提供了可供进化分析的参照^[12]。鉴于此,通过生物信息学分析,我们从 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 的基因组序列中游离了可能负责 marinacarboline C(3)中甲基形成的系列甲基转移酶,对其进行进化分析,初步筛选得到 Orf03255(McbD),随后经体外和体内实验确证 *mcbD* 是 MCBs 生物合成基因簇的第 4 个基因,独立存在于原有的主基因簇之外。

甲基转移酶催化甲基化反应,常以 SAM 作为甲基的供体^[19-20]。甲基化修饰广泛存在于生物体内,涉及许多重要生理环节。根据作用对象可将甲基转移酶分为遗传物质甲基化酶和非遗传物质甲基化酶,后者包括 O-甲基转移酶、C-甲基转移酶、N-甲基转移酶、S-甲基转移酶和无机 As-甲基

转移酶等。因此, McbD 属于典型的 SAM 依赖性 *O*-甲基转移酶^[19-20], 其行使作用是在 marinacarboline B(2)形成之后, 有着较为严格的时间先后顺序。鉴于此, 我们猜想 McbD 能将 D/L-Tyr 以及酪胺甲基化形成相应的产物。然而, 按照 McbD 酶反应体系及条件进行实验并未检测到各自产物的生成(结果未展示), 这说明 McbD 对底物的识别较为严格, 与甲基转移酶作用底物的单一性特征一致^[19]。此外, 以化合物 marinacarboline B(2)作为底物, 我们还对 MfnG 的底物识别能力进行了进一步研究, 结果发现 MfnG 不能识别 2(结果未展示)。McbD 专一性识别底物 marinacarboline B(2)的具体机制有待于进一步研究。

MCBs 是具有良好开发和应用前景的 β -咪啉生物碱类化合物, 甲基化对其生物活性有着显著影响, 甲基化形成的 marinacarboline C(3)对 *P. falciparum* 多重耐药菌 Dd2 的活性比未被甲基化的 marinacarboline B(2)提高了 7 倍多, 而对敏感菌 3D7 的活性则降低了 1 倍^[4]。因此, McbD 有望作为专一性较强的甲基化酶学工具, 为 β -咪啉生物碱类化合物的结构修饰和改造奠定基础, 从而为其生产开发和用于治疗多重耐药菌提供化学实体。

综上所述, 本研究采用基于同源基因的进化分析、生物转化、体外生化实验以及体内功能基因的阻断从 *M. thermotolerans* SCSIO 00652 的基因组中鉴定了负责化合物 marinacarboline C(3)中甲基形成的 *O*-甲基转移酶 McbD; 同时, 本研究提供了一种鉴定独立存在于主基因簇之外的“不成簇的功能基因”的方法, 为一些特殊活性天然产物的完整生物合成路径解析提供了可供参考的思路。

参考文献

- [1] Chen Q, Ji CT, Song YX, Huang HB, Ma JY, Tian XP, Ju JH. Discovery of McbB, an enzyme catalyzing the β -carboline skeleton construction in the marinacarboline biosynthetic pathway. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(38): 9980–9984.
- [2] Cao RH, Peng WL, Wang ZH, Xu AL. β -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, 14(4): 479–500.
- [3] Wang P, Alvarez-Perez JC, Felsenfeld DP, Liu HT, Sivendran S, Bender A, Kumar A, Sanchez R, Scott DK, Garcia-Ocaña A, Stewart AF. A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication. *Nature Medicine*, 2015, 21(4): 383–388.
- [4] Huang HB, Yao YL, He ZX, Yang TT, Ma JY, Tian XP, Li YY, Huang CG, Chen XP, Li WJ, Zhang S, Zhang CS, Ju JH. Antimalarial β -carboline and indolactam alkaloids from *Marinactinospora thermotolerans*, a deep sea isolate. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(10): 2122–2127.
- [5] Tian XP, Tang SK, Dong JD, Zhang YQ, Xu LH, Zhang S, Li WJ. *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the Northern South China Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(Pt 5): 948–952.
- [6] Tagawa S, Choshi T, Okamoto A, Nishiyama T, Watanabe S, Hatae N, Hibino S. First total syntheses of 1,3-disubstituted β -carboline alkaloids, dichotomide I and marinacarboline A-D. *Heterocycles*, 2013, 87(2): 357–367.
- [7] Battini N, Padala AK, Mupparapu N, Vishwakarma RA, Ahmed QN. Unexplored reactivity of 2-oxoaldehydes towards pictet-spengler conditions: concise approach to β -carboline based marine natural products. *Rsc Advances*, 2014, 4(50): 26258–26263.
- [8] Li J, Tang Y, Jin HJ, Cui YD, Zhang LJ, Jiang T. An efficient synthesis method targeted to marine alkaloids marinacarboline A-D and their antitumor activities. *Journal of Asian Natural*

- Products Research*, 2015, 17(3): 299–305.
- [9] Wang H, Zhang H, Mi Y, Ju J, Chen Q, Zhang H. Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of McbB, a multifunctional enzyme involved in β -carboline skeleton biosynthesis. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 2014, 70(Pt 10): 1402–1405.
- [10] Mori T, Hoshino S, Sahashi S, Wakimoto T, Matsui T, Morita H, and Abe I. Structural basis for β -carboline alkaloid production by the microbial homodimeric enzyme McbB. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(7): 898–906.
- [11] Ji CT, Chen Q, Li QL, Huang HB, Song YX, Ma JY, Ju JH. Chemoenzymatic synthesis of β -carboline derivatives using McbA, a new ATP-dependent amide synthetase. *Tetrahedron Letters*, 2014, 55(35): 4901–4904.
- [12] Liu J, Wang B, Li HZ, Xie YC, Li QL, Qin XJ, Zhang X, Ju JH. Biosynthesis of the anti-infective marformycins featuring pre-NRPS assembly line *N*-formylation and *O*-methylation and post-assembly line C-hydroxylation chemistries. *Organic Letters*, 2015, 17(6): 1509–1512.
- [13] Gust B, Kieser T, Chater KF. REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. Norwich: John Inners Center, 2002.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [15] Li J, Zhu QH, Zhang Y, Ma JY, Tian XP, Li WJ, Zhang CS, Ju JH. Development of a genetic system of deep sea marine actinomycete *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2012, 37(2): 105–111. (in Chinese)
- 李军, 朱清华, 张云, 马俊英, 田新朋, 李文均, 张长生, 鞠建华. 深海放线菌 *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652 遗传操作系统的建立. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(2): 105–111.
- [16] Zhu QH, Li J, Ma JY, Luo MH, Wang B, Huang HB, Tian XP, Li WJ, Zhang S, Zhang CS, Ju JH. Discovery and engineered overproduction of antimicrobial nucleoside antibiotic A201A from the deep-sea marine actinomycete *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(1): 110–114.
- [17] Ma JY, Zuo DG, Song YX, Wang B, Huang HB, Yao YL, Li WJ, Zhang S, Zhang CS, Ju JH. Characterization of a single gene cluster responsible for methylpendolmycin and pendolmycin biosynthesis in the deep sea bacterium *Marinactinospora thermotolerans*. *Chembiochem*, 2012, 13(4): 547–552.
- [18] Xu P, Li WJ, Xu LH, Jiang CL. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. *Microbiology*, 2003, 30(4): 82–84. (in Chinese)
徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 82–84.
- [19] Tian L, Ji BZ, Liu SW, Jin F, Gao J. Research progress of methyltransferase. *Chemistry of Life*, 2007, 27(5): 425–427. (in Chinese)
田铃, 嵇保中, 刘曙雯, 金凤, 高洁. 甲基转移酶的功能与分类. *生命的化学*, 2007, 27(5): 425–427.
- [20] Struck AW, Thompson ML, Wong LS, Micklefield J. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *Chembiochem*, 2012, 13(18): 2642–2655.

Screening and characterization of methylation tailoring gene-*mcbD* in marinacarboline biosynthesis

Qi Chen^{1,2,3}, Xiangjing Qin², Qinglian Li², Jianhua Ju^{2,3*}

¹ School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

² CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, RNAM Center of Marine Microbiology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong Province, China

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen the methylation tailoring gene-*mcbD* in marinacarboline biosynthesis pathway from the genomic sequence of *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652, and to characterize McbD both *in vitro* and *in vivo*. [Methods] Orf03255 (McbD) was selected by phylogenetic analysis of the methyltransferases from *M. thermotolerans* SCSIO 00652 with MfnG (D/L-Tyr methyltransferase) using Mega6. The *mcbD* gene was amplified from the *M. thermotolerans* SCSIO 00652 genomic DNA, cloned into pET28a(+) vector, and expressed in *E. coli* BL21 (DE3); the McbD protein was purified with Ni-NTA affinity chromatography. The McbD-mediated enzymatic reaction was performed with marinacarboline B as substrate and detected with HPLC. The Δ *mcbD* mutant was constructed with PCR-targeting genetic manipulation system. Difference in fermentation extracts between *M. thermotolerans* SCSIO 00652 wild-type and Δ *mcbD* was analyzed with HPLC. [Results] The N-His tagged McbD was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) in soluble form, and purified by Ni-NTA affinity chromatography; further biochemical reaction showed that McbD can catalyze the transformation of marinacarboline B to marinacarboline C with SAM. The Δ *mcbD* inactivated mutant completely abolished the production of marinacarboline C, and accumulated marinacarboline B. [Conclusion] McbD, responsible for the methylation tailoring of marinacarboline, is indispensable in marinacarboline biosynthetic pathway.

Keywords: marinacarboline, methylation, biosynthesis, enzymatic reaction

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Grants for Scientific Research of BSKY (XJ201512) from Anhui Medical University and by the National Natural Science Foundation of China (41406195)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-89023028; E-mail: jju@scsio.ac.cn

Received: 2 November 2016; Revised: 9 December 2016; Published online: 4 January 2017