



天蓝色链霉菌孢子色素 *whiE* 在大肠杆菌中的异源生物合成

赵宇春, 刘向阳, 邓子新, 贺新义, 蒋明*

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

摘要: 【目的】在大肠杆菌中完整重构孢子色素*whiE*的生物合成途径, 分离纯化表达体系中合成的新化合物, 并解析*whiE*的生物合成途径。【方法】构建*whiE*-ORFII、*whiE*-ORFVII和*whiE*-ORFI的单基因重组质粒, SDS-PAGE检测蛋白表达情况; 借助*Xba* I与*Spe* I互为同尾酶的特性, 实现多基因组合串联; 构建好的重组质粒再导入大肠杆菌菌株BAP1中进行异源表达, 并用高效液相色谱(HPLC)检测发酵产物; 依次使用正相硅胶柱和反向半制备柱分离发酵产物, 四级杆飞行时间质谱仪(Q-TOF MS)鉴定发酵产物分子量。【结果】*whiE*-ORFII、*whiE*-ORFVII和*whiE*-ORFI均获得可溶性表达; 这3个基因单个串联到菌株BTw95中均未检测到新的产物生成; 而*whiE*-ORFII和*whiE*-ORFVII、*whiE*-ORFI和*whiE*-ORFVII双基因组合以及三基因组合串联到BTw95中可检测得到两种化合物ZYC-1和ZYC-2。在负离子模式下进行Q-TOF MS检测, ZYC-1的[M-H]⁻为419.0748, 推测分子式为C₂₃H₁₆O₈; ZYC-2的[M-H]⁻为465.0743, 推测分子式为C₂₄H₁₈O₁₀。【结论】本研究推进了孢子色素*whiE*生物合成途径在大肠杆菌中的异源重构, 分离鉴定了2个十二酮II型聚酮化合物, 并推测了孢子色素*whiE*的生物合成途径。

关键词: 孢子色素 *whiE*, 大肠杆菌, 异源生物合成, II型聚酮化合物

抗生素和孢子色素是放线菌的次级代谢产物, 可由聚酮合酶(PKSs)合成。尽管迄今为止已经研究了大量编码抗生素的基因^[1-2], 但由于链霉菌中孢子色素可与链霉菌孢子壁结合, 导致其不易分离纯化, 所以关于孢子色素及其生物合成基因簇的研究报道较少, 相应的结构和功能也未得

到解析^[3-4]。天蓝色链霉菌中的孢子色素 *whiE* 是第一个被发现和克隆的孢子色素, 该基因簇属于II型聚酮合酶基因簇, 为十二酮II型聚酮化合物, 由8个开放阅读框组成, *whiE*-ORFIII (KS_α)、*whiE*-ORFIV (KS_β)和*whiE*-ORFV (ACP)组成最小聚酮合酶^[5]。

基金项目: 国家自然科学基金(31870026, 31300033, 21661140002); 国家重大研发计划(2018YFA0900402); 中科院生命有机化学国家重点实验室开放基金

*通信作者。E-mail: jiangming9722@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-12-13; 修回日期: 2021-01-20; 网络出版日期: 2021-02-23

Bradley S. Moore 等以敲除放线菌紫红素和 *whiE* 生物合成基因簇的天蓝色链霉菌作为表达宿主, 表达了 *whiE* 的生物合成基因簇。当链霉菌中单独表达 *whiE* 的最小聚酮合酶时, 可以合成 30 个以上的聚酮化合物, 其中 8 个的结构得到鉴定, 8 个聚酮化合物的长度不同, 说明此时聚酮链长度控制比较松。当 *whiE* 最小聚酮合酶与环化酶 *whiE*-ORFVI 在链霉菌中共表达, 合成了十二酮化合物 TW95a 和 TW95b, 表明 *whiE*-ORFVI 不仅负责前 2 个环的环化和芳香化, 还与最小聚酮合酶协同控制聚酮链的长度^[6]。为了进一步分析每个基因的功能, Bradley S. Moore 等将环化酶 *whiE*-ORFII 和 *whiE*-ORFVII 分别克隆至表达载体中, 转入天蓝色链霉菌中异源表达, 结果没有检测到新的化合物生成, TW95a 和 TW95b 为主要产物。当将 *whiE*-ORFII 和 *whiE*-ORFVII 与最小聚酮合酶、环化酶 *whiE*-ORFVI 一起克隆至表达载体中, 转入天蓝色链霉菌中异源表达, 不能再检测到化合物 TW95a 和 TW95b 而产生了新的孢子色素, 分离得到红色和蓝色的色素, 但产量很低也不纯, 因此未能进一步鉴定这两种新的色素, 但其在结构上应该更加接近野生型的 *whiE* 孢子色素^[7]。在 24 碳 II 型聚酮化合物 Pradimicin 的生物合成中, 当在天蓝色链霉菌中异源表达最小聚酮合酶 PdmA、PdmB、PdmC 和环化酶 PdmD 时, 也可以合成 TW95a 和 TW95b。当同时串联加入环化酶 PdmL、PdmK 和氧化酶 PdmH 合成 JX111a 和 JX111b, 其中 JX111b 由 JX111a 自发脱羧形成^[8]。

几十年来, 放线菌一直是发现聚酮类化合物的重要来源和主要的异源表达宿主, 大量药物和类似物成功地进入市场, 直到今天仍在临床实践

中使用^[9-10]。但放线菌生长会经历复杂的形态分化, 生长缓慢, 遗传操作相比大肠杆菌较复杂, 在聚酮化合物的生产中, 会受到较多限制。而大肠杆菌生长速度快, 易于培养, 遗传操作简便, 是理想的生产菌株。I 型聚酮化合物如红霉素^[11]、III 型聚酮化合物如 2,4-二羟基-6-戊基苯甲酸已成功在大肠杆菌中实现异源合成^[12], 但 II 型聚酮化合物在肠杆菌中异源合成的报道较少, 主要的原因是 II 型聚酮化合物的最小聚酮合酶在大肠杆菌中不易实现可溶性表达。2019 年, Eriko Takano 首次报道了芳香聚酮化合物在大肠杆菌中的异源生物合成, 并通过组合生物学证明了她们所建立体系的适用性^[13]。本课题组也成功分别实现了醌那霉素和孢子色素 *whiE* 的聚酮合酶 KS_{α} 和 KS_{β} 蛋白复合体在大肠杆菌中的可溶性表达, 成功建立醌那霉素生物合成中间体 Dehydrorabelomycin 的大肠杆菌中异源生物合成平台^[14]。在实现 *whiE*-ORFIII (KS_{α})、*whiE*-ORFIV (KS_{β}) 的可溶性表达之后, 构建串联质粒 pET28a-*whiE*-III-IV (pXY-7) 和 pETM-*whiE*-V-VI-MCAT (pXY-8), 并将其共转入菌株 BAP1/pGro7, 获得合成 TW95c 的大肠杆菌生产菌株 BTw95, 经核磁分析发现 TW95c 的结构与天蓝色链霉菌异源表达合成的 TW95a 有很大相似性, 推测其由 TW95a 经过大肠杆菌中的一个氧化酶催化了一个氧化成环反应而生成。

本研究中, 我们以 BTw95 为出发菌株, 在大肠杆菌中重构了孢子色素 *whiE* 的生物合成途径, 分离纯化表达体系中合成的两个可能的新结构化合物, 并在此基础上推测了 *whiE* 的生物合成途径; 以孢子色素 *whiE* 的表达体系为平台, 建立十二酮 II 型聚酮化合物大肠杆菌异源生产平台, 也为将来十二酮 II 型聚酮化合物的改造提供一个新的平台。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒及引物:大肠杆菌 BAP1、BL21、DH10B 和天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) 均为本实验室保藏。本研究所用质粒见表 1, 多基因串联表达载体 pXY-7、pXY-8 均由本实验室构建保存。引物如表 2 所示, 由上海擎科生物有限公司合成。

1.1.2 培养基:大肠杆菌 BL21、BAP1 和 DH10B 的固体培养基为 LA, 液体培养基为 LB。大肠杆菌 BAP1 的发酵培养基为 PM-LBBS 复合培养基(酵母提取物 5 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, D-山梨醇 185.9 g, 甘油 15 g, HEPES 23.8 g, 甜

菜碱 0.309 g, 蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.6), 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 购买于上海柏益思生物技术有限公司; solution I DNA 连接试剂盒、*Taq* 酶, 购买于 TaKaRa 公司; 高保真酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 购买于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶, Thermo Fisher Scientific 公司; 色谱柱 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)、HPLC、Q-TOF MS 购买于安捷伦科技有限公司。

1.3 生物信息学分析

利用 NCBI 对 *whiE*-ORFI、*whiE*-ORFVII 和 *whiE*-ORFII 进行序列分析。为了预测环化酶参

表 1. 本研究中所用到的质粒
Table 1. Strains used in this study

Plasmids	Relevant Characteristics	Source
pCDFduet-1	CDF ori with P _{T7} ; Sm ^R	Novagen
pET28a	Neo, T7 <i>lac</i> , pBR322 origin, His ₆ -tag plasmid for target gene expression	Novagen
pGro7	GroES-GroEL ori Cm ^r	TAKARA
pET28a- <i>whiE</i> II	Plasmid for <i>whiE</i> -ORFII expression	This study
pET28a- <i>whiE</i> VII	Plasmid for <i>whiE</i> -ORFVII expression	This study
pZYC- I	Plasmid for <i>whiE</i> -ORFI expression	This study
pXY-7	pET28a- <i>whiE</i> -III-IV	This lab
pXY-8	pET32a- <i>whiE</i> -VI-MCAT	This lab
pXY-7-II	pET28a- <i>whiE</i> -III-IV-II	This study
pXY-8-VII	pET32a- <i>whiE</i> -VI-MCAT-VII	This study

表 2. 本研究中所用到的引物
Table 2. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>whiE</i> -ORFI-F	CACATATGACGGTCTCTCCCGT
<i>whiE</i> -ORFI-R	GAGGTACCTCAGGAACCGGCCGAA
<i>whiE</i> -ORFII-F	GACATATGACAGACCAGCAGGTACG
<i>whiE</i> -ORFII-R	CCAAGCTTACTAGTTCATGACACCACCTCGGCC
<i>whiE</i> -ORFVII-F	CCCATATGCACCACACACTGATCGT
<i>whiE</i> -ORFVII-R	ACAAGCTTACTAGTTCAGCCGGCGGGGTCCG

与成环的顺序,本研究选择了已经研究较为清晰的特曲霉素生物途径中的环化酶 TcmN、TcmJ、TcmI 和十二酮 II 型聚酮化合物 Benastatin、Pradimicin, 孢子色素 *sch*、*cur* 的环化酶以及 *whiE*-ORFI (环化酶结构域)、*whiE*-ORFVII、*whiE*-ORFII 和 *whiE*-ORFVI 进行进化树分析,系统进化树采用 MEGA-7 绘制,使用的算法是极大似然法^[15-18]。

1.4 目的基因的克隆

基因扩增以天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 变种 M1154 基因组 DNA 为模板,以表 2 中所示引物进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系: 2 \times Phanta Max Buffer 25 μ L, 50%二甲亚砜 5 μ L, dNTP mix (10 mmol/L) 1 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (100 U) 1 μ L, 上游和下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 模板(30 ng) 1 μ L, ddH₂O 补足至 50 μ L。菌落 PCR 验证体系为 20 μ L: 2 \times mix 10 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 50%二甲亚砜 2 μ L, 挑单菌落作为模板, ddH₂O 补足 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 根据引物 T_m 值设置退火温度, 根据基因长度设置 72 $^{\circ}$ C 延伸时间, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 单基因重组质粒的构建

双酶切处理 PCR 扩增片段,将目的基因分别克隆至表达载体 pET28a 或 pCDFduet-1, 将构建成功的重组质粒分别转化至 DH10B 感受态细胞,菌落 PCR 和酶切验证成功后送公司测序,测序结果正确即单基因重组质粒构建成功。

1.6 多基因重组质粒的构建

多基因串联系统均在 pET 系列载体上,所有基因都由统一的 T7 启动子进行调控。引物设计时在每个基因的 3'端添加 *Spe* I 酶切位点,再借助 *Spe* I 酶切位点与 pET 系列载体核糖体结合位点前的 *Xba* I 酶切位点互为同尾酶的特性,进行多基因串联。多基因组合模式如表 1。

1.7 基因表达鉴定

将构建好的单基因表达质粒转化至 BL21/pGro7 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中过夜培养。挑取单克隆于 3 mL LB 培养基中,加入相应抗生素, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。将过夜培养菌液按照 1:100 (1:50)转接到新鲜的 LB 培养基或发酵培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600}=0.6$ 时,取出置于冰上降温至 10 $^{\circ}$ C 左右后添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 和终浓度为 3 mmol/L 的阿拉伯糖诱导目的基因和分子伴侣的表达,放入 16 $^{\circ}$ C 摇床中继续培养 18-24 h。4000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 收集菌体,取预冷的结合缓冲液重悬,超声破碎菌体,12000 r/min 离心 30 min,分别取全菌和上清进行 SDS-PAGE 检测,确定蛋白是否可溶性表达。

1.8 菌株发酵及萃取

取 10 μ L 菌种管中的菌液接种到 3 mL LB 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日以 1:100 (1:50)转接到 PM-LBBS 复合培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养约 6-7 h 至 OD_{600} 达到 0.6,置于冰上降温,当温度降至 10 $^{\circ}$ C 以下,添加终浓度为 3 mmol/L 的 L-阿拉伯糖和终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 分别诱导分子伴侣蛋白和目的蛋白表达,18 $^{\circ}$ C 培养 4-5 d。萃取方法为发酵液 4000 r/min 离心 20 min 弃菌体,上

清中加 1% 乙酸, 混匀后再添加与发酵液等体积的乙酸乙酯, 剧烈摇晃萃取, 3500 r/min 离心 10 min 取有机相, 旋转蒸发仪旋干后加 600 μ L 甲醇重悬。

1.9 产物 HPLC 及 Q-TOF MS 检测

样品重悬后, 12000 r/min 离心 10 min, 取 10–50 μ L 于样品瓶内衬管中。HPLC 检测时流动相为纯水(A 相)和甲醇(B 相), 均添加千分之一的三氟乙酸, 检测方法: 流速 1 mL/min, 初始为 25% B 相, 20 min 内 B 相由 25% 上升至 100%, 100% B 相保持 5 min, 最后 10 min 为 25% B 相平衡体系。Q-TOF MS 检测时, A 相添加千分之一的甲酸, B 相为纯乙腈, 流速为 0.3 mL/min, 其他条件与 HPLC 检测相同。

2 结果和分析

2.1 生物信息学分析

通过 NCBI 网站的 BLAST 引擎对 4 个蛋白序列进行比对(图 1)。*whiE*-ORFII 中含 cupin 结构域, 类似于 *Streptomyces glaucescens* TcmJ, 是一种参与醌形成的单加氧酶, 参与 II 型和 III 型聚酮合成酶合成的芳香族聚酮的修饰; *whiE*-ORFVII 是 TcmI 家族 II 型聚酮环化酶, 类似于淡青链霉菌特曲霉素基因簇中的 TcmI, 催化特曲霉素 F2 向特曲霉素 F1 的转化; *whiE*-ORFI 中含有 ABM 和 SchA/CurD 结构域, 目前 SchA/CurD 结构域只在链霉菌属的物种中被确认, 参与合成聚酮孢子色素, 与参与合成聚酮类抗生素的蛋白

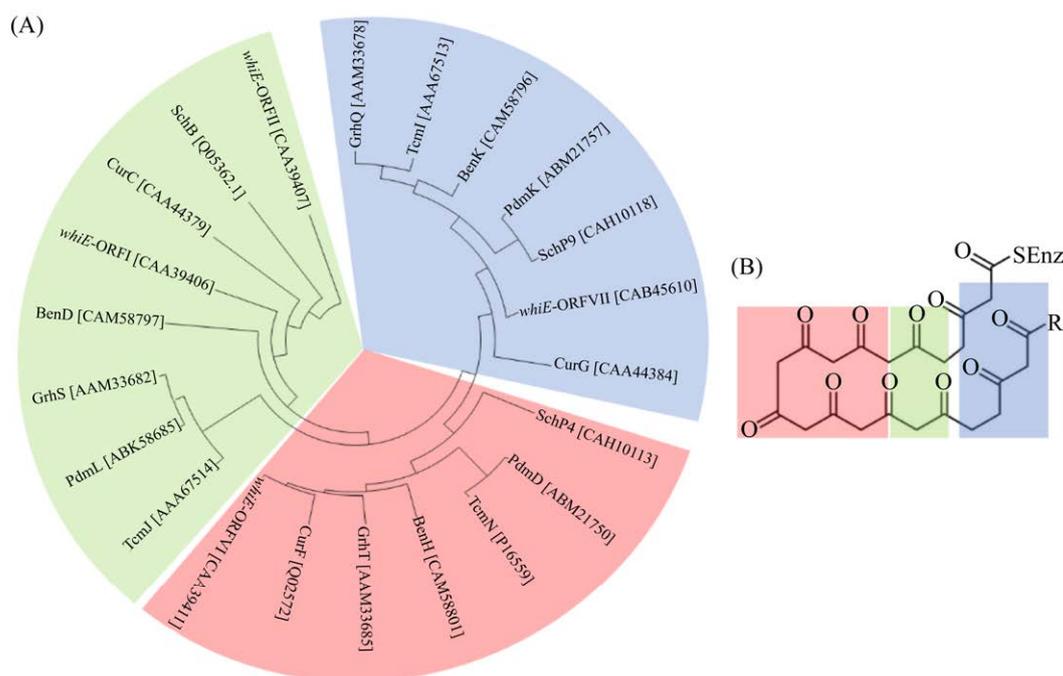


图 1. MEGA-7 软件以极大似然法绘制的 *whiE*-ORFII、*whiE*-ORFVII、*whiE*-ORFI (环化酶结构域) 与其他 II 型聚酮化合物合成基因簇中环化酶的系统进化树分析

Figure 1. Phylogenetic tree generated by MEGA-7 with maximum likelihood method for *whiE*-ORFII, *whiE*-ORFVII, *whiE*-ORFI (cyclase domain) with other type II polyketide synthetic proteins. The color code refers to the function of cyclases, red: 1st/2nd ring cyclase; green: 3rd ring cyclase; blue: 4th/5th ring cyclase. A: phylogenetic tree; B: cyclization pattern in aromatic polyketides produced by type II PKS.

同源, 该蛋白的功能尚不清楚, 但推测其含有 NAD(P)结合位点。

系统进化树分析结果显示, *whiE*-ORFI (环化酶结构域)、*whiE*-ORFVII、*whiE*-ORFII 和 *whiE*-ORFVI 分属 3 个分支。*whiE*-ORFVI 与特曲霉素和 Pradimicin 合成途径中的第一个环化酶 TcmN 和 PdmD 位于同一个分支, 为 *whiE* 生物合成途径中的第一个环化酶, 推测负责 A 环和 B 环的环化;*whiE*-ORFII、*whiE*-ORFI (环化酶结构域)与特曲霉素合成途径中的第二个环化酶 TcmJ 位于同一个分支, 为 *whiE* 生物合成途径中的第二个环化酶, 推测负责 C 环的环化;*whiE*-ORFVII 与特曲霉素合成途径中的第 3 个环化酶 TcmI 位于同一个分支, 为 *whiE* 生物合成途径中的第 3 个环化酶, 推测负责 D 环与 E 环的环化, E 环的环化也可能自发形成。

2.2 质粒构建

2.2.1 构建单基因重组质粒: 将 PCR 扩增片段 *whiE*-ORFII、*whiE*-ORFVII 和 *whiE*-ORFI 酶切处理后克隆至载体 pET28a、pCDFduet-1。菌落 PCR 验证正确后, 分别用引物设计时引入的酶切位点进行双酶切验证。验证正确后, 将构建好的质粒送测序公司进行测序鉴定, 测序结果比对显示全部正确。

2.2.2 构建多基因重组质粒: 多基因串联借助 *Xba* I 与 *Spe* I 互为同尾酶的特性, 分别将基因 *whiE*-ORFII、*whiE*-ORFVII 克隆至表达载体 pXY-7 和 pXY-8, 构建单基因串联菌株和多基因串联菌株(表 3)。

2.3 基因表达结果

将构建好的单基因表达质粒分别转化至 BL21/pGro7 中, 于新鲜 LB 中分别诱导培养, 取全菌和上清样品于 SDS-PAGE 检测可溶性, 结果 3 个蛋白均可在大肠杆菌中可溶性表达。*whiE*-ORFI、*whiE*-ORFII、*whiE*-ORFVII 的大小依次为 45.4、19.0、14.7 kDa, 结果如图 2 所示。

2.4 HPLC 检测发酵萃取液

2.4.1 单个基因串联发酵结果: 将单基因串联菌株 BTw95-1、BTw95-2、BTw95-3 与对照 BTw95 菌株在相同条件下发酵, 与对照相似, 单基因串联菌株的发酵液发酵 2 d 开始慢慢变为浅红色, 随发酵时间延长红色逐渐加深。发酵 4 d 后进行萃取、HPLC 检测, 与对照相比, 单基因串联菌株发酵液中没有检测到新的化合物产生, 在检测波长 276 nm 下, 检测产物以 Tw95c 为主; 在检测波长 500 nm 下, 检测产物以 Tw95d 为主, 检测结果见图 3。

表 3. 本研究中所用到的菌株
Table 3. Strains used in this study

Strains	Characteristics	Source
BAP1	<i>F⁻ompT hsdS_B (r_B⁻mB⁻) gal dcm (DE3) ΔprpRBCD::T7 prom-sfp, T7 prom-prpE</i>	[11]
BTw95	BAP1/pGro7pXY-7 (<i>whiE</i> -III-IV)/pXY-8 (<i>whiE</i> -V-VI-MCAT)	This lab
BTw95-1	BTw95/pXY-7-II	This study
BTw95-2	BTw95/pXY-8-VII	This study
BTw95-3	BTw95/pZYC-I	This study
BTw96-1	BAP1/pGro7/pXY-7-II/pXY-8-VII	This study
BTw96-2	BAP1/pGro7/pXY-7-II/pXY-8-VII/pZYC-I	This study
BTw96-3	BAP1/pGro7/pXY-7-II/pXY-8/pZYC-I	This study
BTw96-4	BAP1/pGro7/pXY-7/pXY-8-VII/pZYC-I	This study

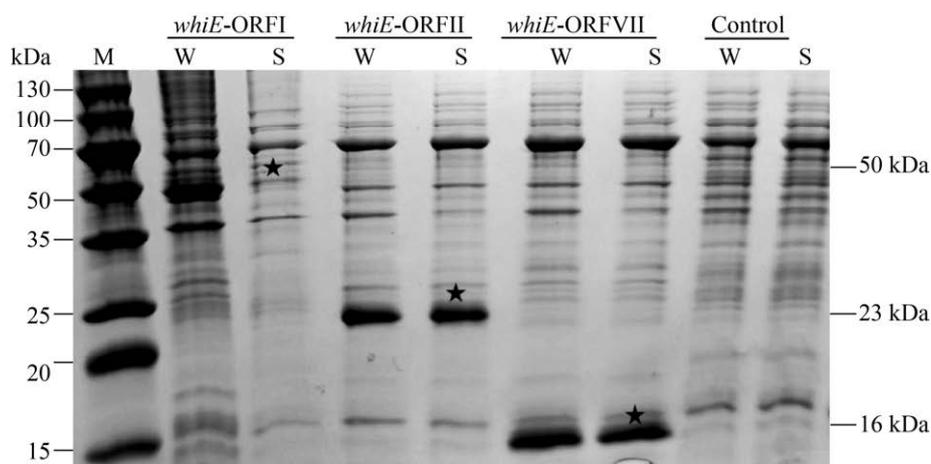


图 2. 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of the fusion protein expression. Lane 1: protein molecular weight marker. W: whole cell lysate of induced cells; S: soluble fraction of induced cells; Control: BL21(DE3) cellular lysate. Over-expressed proteins in the soluble fraction have been denoted with an asterisk.

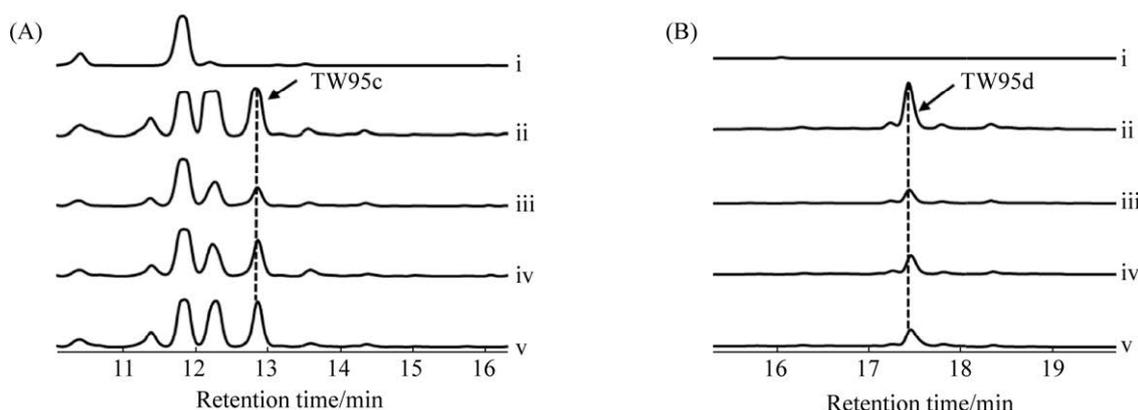


图 3. HPLC 检测单基因组合串联发酵产物

Figure 3. HPLC analysis of the products for single gene combination. i: BAP1/pGro7(control); ii: BTw95 (control); iii: BTw95-3; iv: BTw95-1; v: BTw95-2; HPLC traces of A and B were recorded at 276 nm and 500 nm, respectively.

2.4.2 基因组合串联发酵结果: 将组合串联菌株 BTw96-1、BTw96-2、BTw96-3、BTw96-4 与对照 BTw95 菌株在相同条件下发酵。发酵 4 d, BTw96-3 发酵液颜色与单基因串联菌株发酵液颜色变化相同, BTw96-4 发酵液颜色呈暗红色, BTw96-1、BTw96-2 发酵液颜色呈黑色。与对照

相比, 化合物 Tw95c 在组合串联发酵菌株中产量都下降, 其中 BTw96-1 和 BTw96-2 发酵液中未检测到 Tw95c。BTw96-1、BTw96-2、BTw96-4 的发酵液中均检测到新的化合物, 保留时间为 17.5 min 的 3 个化合物紫外吸收相同, 推测为同一化合物并命名为 ZYC-2; BTw96-1 发酵液中检

测到的保留时间为 18.5 min 的化合物命名为 ZYC-1, 检测结果见图 4。ZYC-1 与 TW95d 相比, 紫外吸收的最大吸收波长蓝移, 如图 5 所示。

2.5 ZYC-1 和 ZYC-2 的分离纯化和结构鉴定

将 7L BTw96-1 菌株发酵 4 d, 依次使用正相硅胶柱和反向半制备柱分离发酵产物, 制备获得 3.5 mg 纯品 ZYC-1 和 3 mg 纯品 ZYC-2。高分辨质谱检测到 ZYC-1 的 $[M-H]^-$ 为 419.0748, 推测分

子式为 $C_{23}H_{16}O_8$, 该化合物为紫色固体, 溶于二甲亚砜, 微溶于甲醇。ZYC-2 的 $[M-H]^-$ 465.0743, 推测分子式为 $C_{24}H_{18}O_{10}$, 该化合物为红色固体, 溶解性能与 ZYC-1 相同, 检测结果如图 6 所示。为了进一步解析化合物 ZYC-1 和 ZYC-2 的结构, 将全部纯品以氘代二甲亚砜作溶剂进行核磁检测时, 在检测过程中化合物不稳定, 自发转变, 最终未能解析其结构, 产物的结构还有待于进一步的解析。

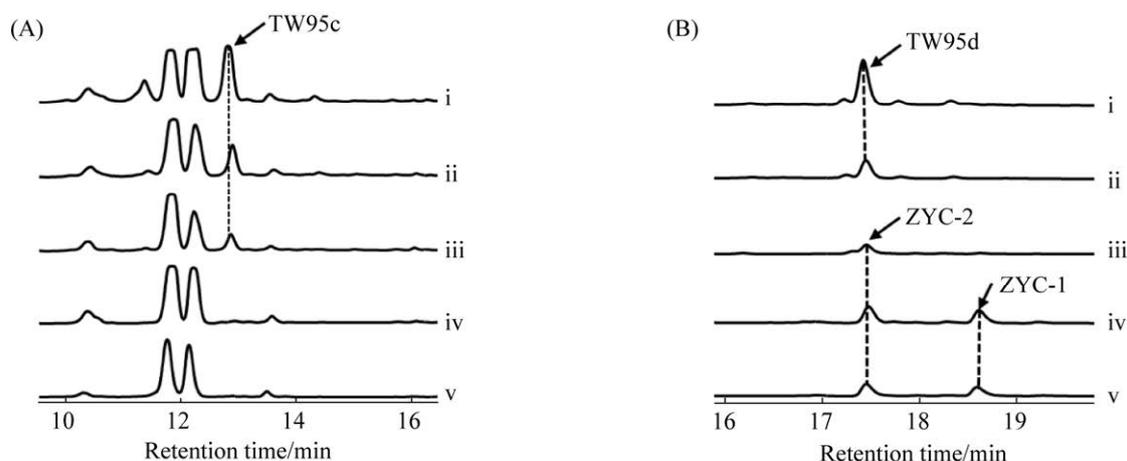


图 4. HPLC 检测多基因组串联发酵产物

Figure 4. HPLC analysis of the products for multi-gene combination. i: BTw95 (control); ii: BTw96-3; iii: BTw96-4; iv: BTw96-1; v: BTw96-2; HPLC traces of A and B were recorded at 276 nm and 500 nm, respectively.

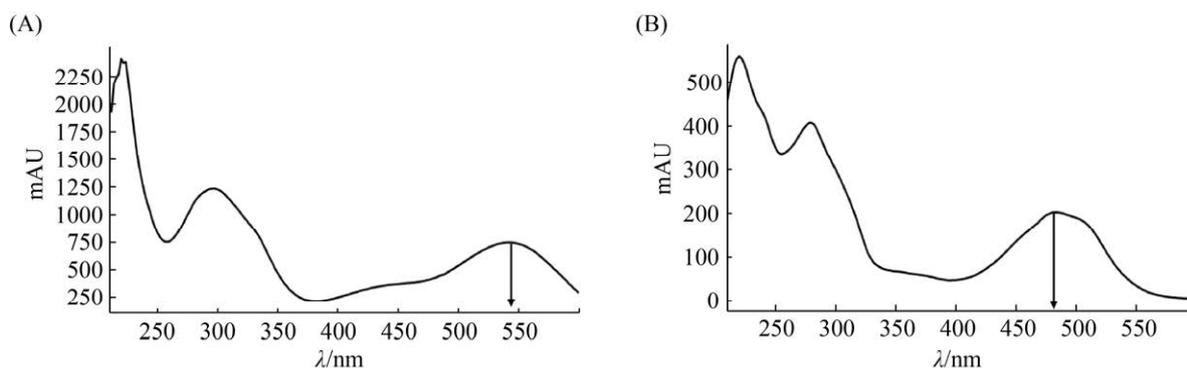


图 5. 化合物 Tw95d 与 ZYC-1 的紫外吸收比较

Figure 5. Comparison of UV absorption of compound Tw95d and ZYC-1. A: Tw95d ; B: ZYC-1.

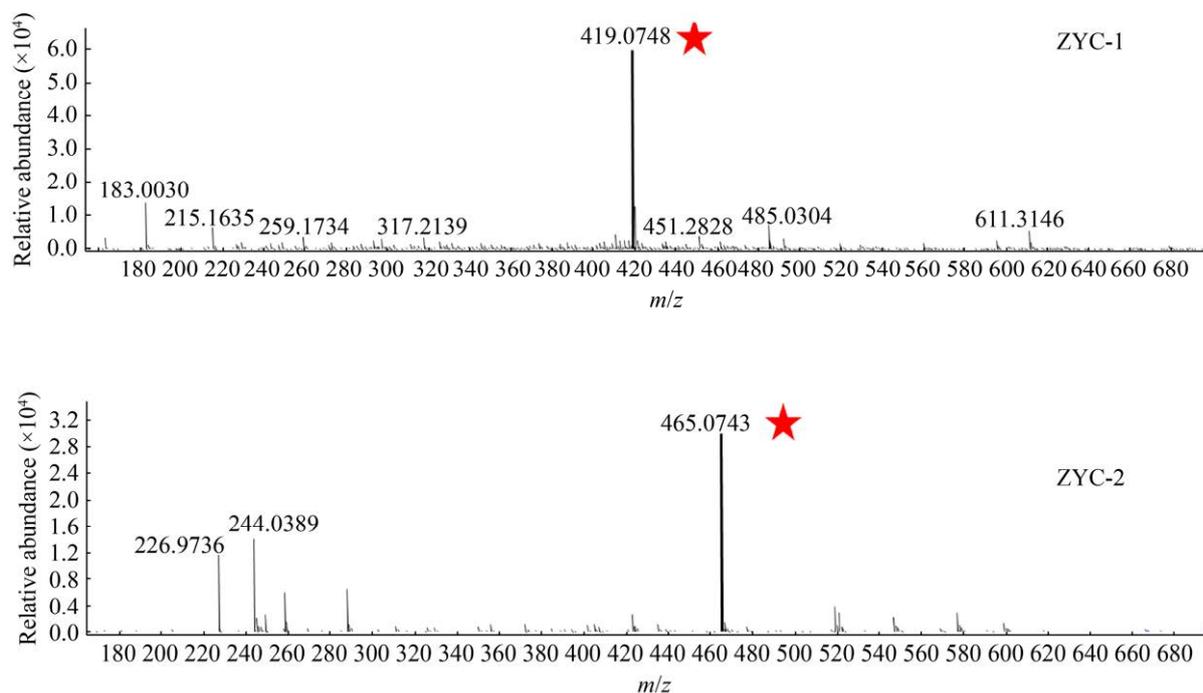


图 6. Q-TOF MS 检测 ZYC-1 和 ZYC-2

Figure 6. Q-TOF MS analysis of ZYC-1 and ZYC-2.

3 讨论

本研究通过多基因串联的方法推进了孢子色素 *whiE* 生物合成途径在大肠杆菌中的重构, 合成了两种十二酮 II 型聚酮化合物 ZYC-1 和 ZYC-2, 建立了新的十二酮 II 型聚酮化合物大肠杆菌异源生产平台。在大肠杆菌中构建孢子色素 *whiE* 的生物合成途径, 涉及到了多个基因的共表达, 是一个具有挑战的问题。在本研究中, 通过利用 *Xba* I 与 *Spe* I 互为同尾酶的特性, 方便快捷地实现了多个基因的组合串联; 并在体系中引入分子伴侣, 辅助蛋白折叠, 提高蛋白的可溶性。孢子色素 *whiE* 的大肠杆菌异源生产平台的建立将有助于十二酮 II 型聚酮化合物的组合性生物合成, 促进更多具有药物活性的天然产物的发现。例如, 后期研究工作中, 可利用 *whiE*-ORFIII、

whiE-ORFIV 与其他十二酮类型的 II 型聚酮化合物生物合成中的后修饰基因偶联, 便捷地合成不同的十二酮的 II 型聚酮化合物。

基于 Q-TOF MS 检测结果、文献调研和生物信息学分析, 我们推测了 ZYC-1 与 ZYC-2 的结构, 并推测了其合成途径, 如图 7 所示。ZYC-2 与 Pradimicin 生物合成中间体 JX111a 结构类似, 在 20 号位多了一个羟基, 推测可能由大肠杆菌基因组中的羟化酶氧化形成, ZYC-1 由 ZYC-2 自发脱羧氧化生成。综合发酵结果, 当单独加入 *whiE*-ORFII、*whiE*-ORFVII 和 *whiE*-ORFI 时, 未能检测到新的产物生成; 当 *whiE*-ORFVII 分别与 *whiE*-ORFII 和 *whiE*-ORFI 两两组合时检测新的产物生成, 说明 *whiE*-ORFVII 可能为孢子色素 *whiE* 生物合成途径中的第 2 个环化酶, 负责了 C 环的环化, 并且只有当其与环化酶 *whiE*-ORFII

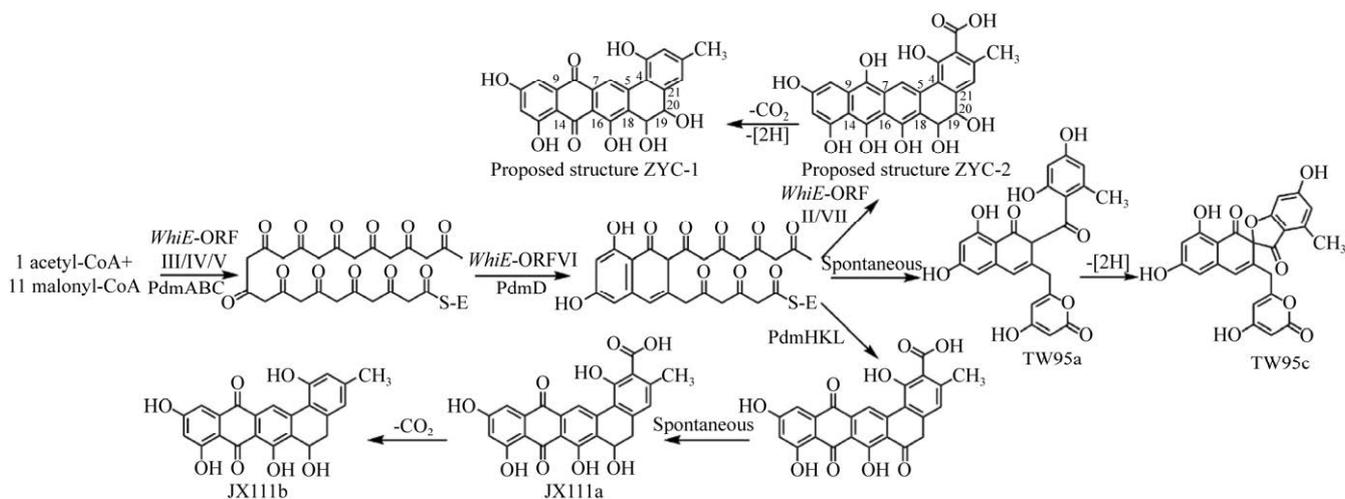


图 7. ZYC-1 和 ZYC-2 的可能的生物合成途径

Figure 7. The proposed biosynthetic pathway for ZYC-1 and ZYC-2.

或双功能酶 *whiE*-ORFI 组合时才能检测到新的产物, 因此推测它们之间具有协同作用, 负责 C 环、D 环、E 环的环化, E 环的环化也可能是自发。唐奕课题组报道了第一例环化酶和单脱氢酶协同作用于聚酮链的环化过程。在 Pradimicin 生物合成中, 第三、四、五个环的环化, 需要环化酶 PdmL、PdmK 和氧化酶 PdmH 协同完成, 并提出了一个模型, 其中 3 种酶形成一个多酶复合体, 包裹已经环化的 B 环和未环化的聚酮链部分。氧化酶 PdmH 靠近 B 环以促进碳 8 位的羟基化, 而环化酶 PdmK 和 PdmL 定位于聚酮链的两端, 以完成碳 5、碳 18 和碳 4、碳 21 位的羟醛缩合, 而当单个酶对聚酮链顺序结合和修饰时, 无法阻止聚酮链的自发环化, 而形成多酶复合体可以有效地跨越未环化聚酮化合物的整个长度, 从而将骨架锁定在适当位置并抑制异常环化^[8]。基于

ZYC-1 和 ZYC-2 的预测结构, 生物合成过程中 B 环也经历了碳 8 位的氧化, 推测由双功能酶 *whiE*-ORFI 或大肠杆菌基因组中的氧化酶完成。当双功能酶 *whiE*-ORFI 与环化酶 *whiE*-ORFVII 组合时, 同时行使环化酶和氧化酶的功能, 这将是一个区别于 Pradimicin 的生物合成模型。

通过孢子色素 *whiE* 生物合成途径在大肠杆菌中的重构, 本研究建立了一个十二酮 II 型聚酮化合物大肠杆菌异源生产体系, 为将来改造和修饰十二酮 II 型聚酮化合物提供了平台, 也为聚酮类抗生素的组合生物合成提供了新的参考。目前, 化合物 ZYC-1 和 ZYC-2 的产量相对较低, 为了未来的工业化应用以及后期化合物的分离纯化和结构鉴定, 可通过在提高前体丙二酰辅酶 A 的供给^[19]、串联加入硫酯酶促进聚酮链释放^[20]以及优化发酵条件等提高目标化合物的产量。

参考文献

- [1] Hertweck C, Luzhetskyy A, Rebets Y, Bechthold A. Type II polyketide synthases: Gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Natural Product Reports*, 2007, 24(1): 162–190.
- [2] Procópio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2012, 16(5): 466–471.
- [3] Blanco G, Pereda A, Méndez Cal. Cloning and disruption of a fragment of *Streptomyces halstedii* DNA involved in the biosynthesis of a spore pigment. *Gene*, 1992, 112(1): 59–65.
- [4] Bergh S, Uhlén M. Analysis of a polyketide synthesis-encoding gene cluster of *Streptomyces curacoi*. *Gene*, 1992, 117(1): 131–136.
- [5] Yu TW, Hopwood DA. Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor* whiE genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction with the act genes for actinorhodin biosynthesis. *Microbiology: Reading, England*, 1995, 141(Pt 11): 2779–2791.
- [6] Shen Y, Yoon P, Yu TW, Floss HG, Hopwood D, Moore BS. Ectopic expression of the minimal whiE polyketide synthase generates a library of aromatic polyketides of diverse sizes and shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(7): 3622–3627.
- [7] Yu TW, Shen YM, McDaniel R, Floss HG, Khosla C, Hopwood DA, Moore BS. Engineered biosynthesis of novel polyketides from streptomyces spore pigment polyketide synthases. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(31): 7749–7759.
- [8] Zhan JX, Watanabe K, Tang Y. Synergistic actions of a monooxygenase and cyclases in aromatic polyketide biosynthesis. *Chembiochem*, 2008, 9(11): 1710–1715.
- [9] Xu M, Wright GD. Heterologous expression-facilitated natural products' discovery in actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(3/4): 415–431.
- [10] Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, 2017, 34(10): 1203–1232.
- [11] Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, Cane DE, Khosla C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, 2001, 291(5509): 1790–1792.
- [12] Tan ZG, Clomburg JM, Gonzalez R. Synthetic pathway for the production of olivetolic acid in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(8): 1886–1896.
- [13] Cummings M, Peters AD, Whitehead GFS, Menon BRK, Micklefield J, Webb SJ, Takano E. Assembling a plug-and-play production line for combinatorial biosynthesis of aromatic polyketides in *Escherichia coli*. *PLoS Biology*, 2019, 17(7): e3000347.
- [14] Liu XY, Hua KM, Liu DX, Wu ZL, Wang Y, Zhang HR, Deng ZX, Pfeifer BA, Jiang M. Heterologous biosynthesis of type II polyketide products using *E. coli*. *ACS Chemical Biology*, 2020, 15(5): 1177–1183.
- [15] Lackner G, Schenk A, Xu ZL, Reinhardt K, Yunt ZS, Piel J, Hertweck C. Biosynthesis of pentangular polyphenols: deductions from the benastatin and griseorhodin pathways. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(30): 9306–9312.
- [16] Shen B, Summers RG, Wendt-Pienkowski E, Hutchinson CR. The *Streptomyces glaucescens* tcmKL polyketide synthase and tcmN polyketide cyclase genes govern the size and shape of aromatic polyketides. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, 117(26): 6811–6821.
- [17] Summers RG, Wendt-Pienkowski E, Motamedi H, Hutchinson CR. The tcmVI region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* encodes the tetracenomycin F1 monooxygenase, tetracenomycin F2 cyclase, and, most likely, a second cyclase. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(23): 7571–7580.
- [18] Li A, Piel J. A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chemistry and Biology*, 2002, 9(9): 1017–1026.
- [19] Wu J, Zhang X, Xia X, Dong M. A systematic optimization of medium chain fatty acid biosynthesis via the reverse beta-oxidation cycle in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 115–124.
- [20] Hua K, Liu X, Zhao Y, Gao Y, Pan L, Zhang H, Deng Z, Jiang M. Offloading Role of a Discrete Thioesterase in Type II Polyketide Biosynthesis. *mBio*, 2020, 11(5).

Heterologous biosynthesis of spore pigment *whiE* from *Streptomyces coelicolor* in *Escherichia coli*

Yuchun Zhao, Xiangyang Liu, Zixin Deng, Xinyi He, Ming Jiang*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Objective] Completely reconstruction of the biosynthetic pathway of *whiE* in *Escherichia coli*, isolation and purification of new compounds synthesized in the recombinant strain for elucidation of the biosynthetic pathway of *whiE*. [Methods] Construction of single-gene recombinant plasmids of *whiE*-ORFII, *whiE*-ORFVII, *whiE*-ORFI, and SDS-PAGE analysis of the fusion protein expression; isoschizomers *Xba* I / *Spe* I were adopted to assemble multiple genes in a single plasmid construct. The recombinant plasmid was then introduced into *Escherichia coli* BAP1 for heterologous expression, and the fermentation products was detected by high performance liquid chromatography (HPLC); the normal phase silica gel column and the reverse semi-preparative column were used sequentially to separate the fermentation products, the quadrupole high resolution mass spectrometry (Q-TOF MS) was used to identify the molecular weight of the fermentation products. [Results] *whiE*-ORFII, *whiE*-ORFVII and *whiE*-ORFI were solubly expressed; no new product was detected when these three genes were added to the strain BTw95 individually; two compounds ZYC-1 and ZYC-2 can be detected in the strains coupled with *whiE*-ORFII & *whiE*-ORFVII, *whiE*-ORFI & *whiE*-ORFVII as well as all the three genes. Q-TOF MS analysis in negative ion mode showed that the $[M-H]^-$ of ZYC-1 is 419.0748 with a proposed molecular formula, $C_{23}H_{16}O_8$ and $[M-H]^-$ of ZYC-2 is 465.0743 with a proposed molecular formula, $C_{24}H_{18}O_{10}$. [Conclusion] This study achieved the heterologous reconstruction of the spore pigment *whiE* biosynthetic pathway in *E. coli*. Two dodecaketide type II polyketides were identified and isolated. The biosynthetic pathway of the spore pigment *whiE* was also proposed.

Keywords: spore pigment *whiE*, *Escherichia coli*, heterologous biosynthesis, type II polyketide

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870026, 31300033, 21661140002), by the National Major R&D Program (2018YFA0900402) and by the Open Fund of the State Key Laboratory of Life Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences

*Corresponding author. E-mail: jiangming9722@sjtu.edu.cn

Received: 13 December 2020; Revised: 20 January 2021; Published online: 23 February 2021