



# 海洋来源节菱孢菌 ZSDS1-F3 中 PKS-NRPS 类天然产物挖掘

龙婷<sup>1,2</sup>, 张庆波<sup>1,2,3</sup>, 牟鹏云<sup>1</sup>, 王俊锋<sup>1,2,3</sup>, 张长生<sup>1,2,3\*</sup>, 朱义广<sup>1,2,3\*</sup>

- 1 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, 广东 广州 510301
- 2 中国科学院大学, 北京 100049
- 3 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458

龙婷, 张庆波, 牟鹏云, 王俊锋, 张长生, 朱义广. 海洋来源节菱孢菌 ZSDS1-F3 中 PKS-NRPS 类天然产物挖掘. 微生物学报, 2022, 62(8): 3224–3235.

Long Ting, Zhang Qingbo, Mou Pengyun, Wang Junfeng, Zhang Changsheng, Zhu Yiguang. Discovery and characterization of a PKS-NRPS hybrid in *Arthrimum arundinis* ZSDS1-F3 by genome mining. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3224–3235.

**摘要:**【目的】以基因组信息为指导, 定向激活海洋来源真菌 *Arthrimum arundinis* ZSDS1-F3 中沉默的聚酮合成酶-非核糖体肽合成酶(PKS-NRPS)类生物合成基因簇, 鉴定次级代谢产物结构。【方法】通过启动子工程和异源表达的策略激活实验室培养条件下沉默或低表达的生物合成基因簇, 实现目标化合物的分离, 通过 HR-ESI-MS 和 NMR 数据分析鉴定产物结构, 结合基因重组和生物信息学分析结果推导化合物的生物合成途径。【结果】依据基因组生物信息学分析, 从海洋来源真菌 *A. arundinis* ZSDS1-F3 中选取一个编码 PKS-NRPS 类次级代谢产物的生物合成基因簇开展研究, 在宿主 *Aspergillus nidulans* A1145 中实现了基因簇的异源表达, 从中分离到 2 个新化合物, 并推导了其生物合成途径。【结论】基因组信息指导下的天然产物挖掘, 可以目标明确地分离产物, 加快真菌中新型天然产物的发现步伐。

**关键词:** 海洋真菌; 基因组挖掘; 结构鉴定; 聚酮聚肽合成酶; 生物合成

**基金项目:** 广东省重点领域研发计划(2020B1111030005); 中国科学院王宽诚率先进入人才计划(GJTD-2020-12); 广东省自然资源厅项目(粤自然资合[2021]48号); 广东省科学技术厅项目(2019TQ05H299)

Supported by the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (2020B1111030005), by the K.C.Wong Education Foundation (GJTD-2020-12), by the Guangdong MEPP Funds (GDNRC[2021]48) and by the Special Support Program for Training High-Level Talents in Guangdong (2019TQ05H299)

\*Corresponding authors. Tel: +86-20-89108532; Fax: +86-20-89023038; E-mail: ZHU Yiguang, ygzhu@scsio.ac.cn, ZHANG Changsheng, czhang@scsio.ac.cn

Received: 21 December 2021; Revised: 24 February 2022; Published online: 21 April 2022

# Discovery and characterization of a PKS-NRPS hybrid in *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3 by genome mining

LONG Ting<sup>1,2</sup>, ZHANG Qingbo<sup>1,2,3</sup>, MOU Pengyun<sup>1</sup>, WANG Junfeng<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Changsheng<sup>1,2,3\*</sup>, ZHU Yiguang<sup>1,2,3\*</sup>

1 Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Material Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China

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

3 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, Guangdong, China

**Abstract: [Objective]** To activate the biosynthesis gene cluster for polyketide synthases-nonribosomal peptide synthetases (PKS-NRPS) from the marine-derived *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3 based on genome analysis, and to isolate and identify the secondary metabolites. **[Methods]** The cryptic biosynthesis gene cluster was activated by promoter engineering and heterologous expression. The products were isolated and elucidated by HR-ESI-MS and 1D and 2D NMR, and the biosynthetic pathways of them were deduced based on gene recombination and bioinformatics analysis. **[Results]** A dormant PKS-NRPS-encoding gene cluster from *A. arundinis* ZSDS1-F3 was activated through heterologous expression in *Aspergillus nidulans* A1145. Two new products were isolated and the biosynthetic pathways were clarified. **[Conclusion]** Via bioinformatics analysis, genome mining plays an important role in the discovery of novel natural products from fungi.

**Keywords:** marine fungi; genome mining; structure identification; PKS-NRPS; biosynthesis

真菌基因组编码的次级代谢产物生物合成基因簇数量远远超过现在已鉴定出的结构类型<sup>[1]</sup>。例如,预测分析发现真菌 *Aspergillus* spp. (基因组大小约为 28–38 Mb) 中含有 36–89 个生物合成基因簇,说明即使在这些模式真菌中,仍有很大的次级代谢产物挖掘空间<sup>[2]</sup>。这些常规条件下不表达或极低表达的基因簇,更有可能在人为操作下激活产生骨架新颖、生物活性好的次级代谢产物。如何激活沉默的生物合成基因簇是目前研究的热点,如 Jiang 等<sup>[3]</sup>通过过量表达全局性调控因子 *laeA* 成功激活了真菌 *Chaetomium globosum* 中沉默基因簇表达,从中分离出一系列细胞松弛素衍生物。Yi 等<sup>[4]</sup>通过核糖体技术从紫草青霉 G59 中分离到一种新的环戊酮硫化物。Liu 等<sup>[5]</sup>以抗性基因为导向,成

功鉴定了具有抗真菌活性 restricticin 的生物合成基因簇并阐明了其生物合成途径。Cai 等<sup>[6]</sup>通过构巢曲霉异源表达体系激活了直立顶孢霉 (*Acremonium strictum*) 中的基因簇 *acre*, 分离到 C4 烷基化异香豆素类化合物。

聚酮合成酶(PKS)以乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 为单位底物催化形成聚酮,非核糖体肽合酶(NRPS)以氨基酸为底物组装成多肽,PKS 和 NRPS 的模块化特性及催化机制使其能够重组和融合,产生 PKS-NRPS 杂合酶<sup>[7]</sup>。真菌中 PKS-NRPS 杂合酶主要由一个 I 型迭代的 PKS 和一个单独的 NRPS 模块组成,产生含有单一氨基酸残基的聚酮链<sup>[8]</sup>。I 型迭代 PKS 部分包含  $\beta$ -酮基合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶 (acyltransferase, AT)、酰基载体蛋白(acyltransferase

cylcarrier protein, ACP) 3 个必需结构域; 此外还有脱水酶(dehydratase, DH)、C-甲基转移酶(C-methyltransferase, cMT)、烯酰还原酶(enoylreductase, ER)、 $\beta$ -酮基还原酶(ketoreductase, KR)等功能结构域<sup>[9]</sup>; NRPS 模块通常包括腺苷酰化结构域(adeylation, A)、缩合结构域(condensation, C)和巯基化结构域(thiolation, T); 在 PKS-NRPS 合成酶末端通常有一个还原或环化结构功能域[reductase (R)/dieckmann cyclization (R\*)]来释放聚酮聚肽链。大多数真菌 PKS-NRPS 合成酶的 PKS 模块中缺少一个有功能的 ER 结构域, 通常是由基因簇中编码反式起作用的 ER 补充<sup>[10]</sup>。

节菱孢属真菌(*Arthrinium* sp.)是一类广泛分布的真菌, 能够产生多种次级代谢产物, 包括生物碱类<sup>[11-12]</sup>、苯并色原酮类<sup>[13-15]</sup>、香豆素类<sup>[16-17]</sup>、萜类<sup>[18]</sup>、甾体类<sup>[19]</sup>、细胞松弛素类<sup>[20]</sup>和氧杂蒽酮类<sup>[21]</sup>等, 这些化合物多具有良好的抗菌、抗病毒和细胞毒等生物活性。菌株 *A. arundinis*

ZSDS1-F3 从中国南海(西沙)的棕色扁海绵(*Phakellia fusca* Thiele)中分离得到, 通过传统的实验室发酵培养方法, 从该菌株中分离得到细胞毒性吡啶生物碱类 arthpyrones A-C<sup>[11]</sup>、细胞松弛素类 arthriniumnins A-D<sup>[20]</sup>、氧杂蒽酮类<sup>[21]</sup>和异香豆素类<sup>[16]</sup>等 7 类共 27 个化合物, 代表性化合物结构式如图 1 所示。为更好地开展菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 次级代谢产物发现的研究, 对其进行了全基因组扫描测序, 基因组信息预测其编码 69 个生物合成基因簇, 表明菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 编码的次级代谢产物丰富, 相比于已经分离到的化合物类型, 还有很大的研究空间, 是进行基因组信息指导次级代谢产物挖掘的很好材料。本研究基于基因组信息, 从菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 中选取一个沉默的 PKS-NRPS 生物合成基因簇为研究对象, 在构巢曲霉(*A. nidulans*) A1145  $\Delta$ ST $\Delta$ EM 中实现该基因簇的异源表达, 分离到 2 个新化合物, 并推导了其生物合成途径。

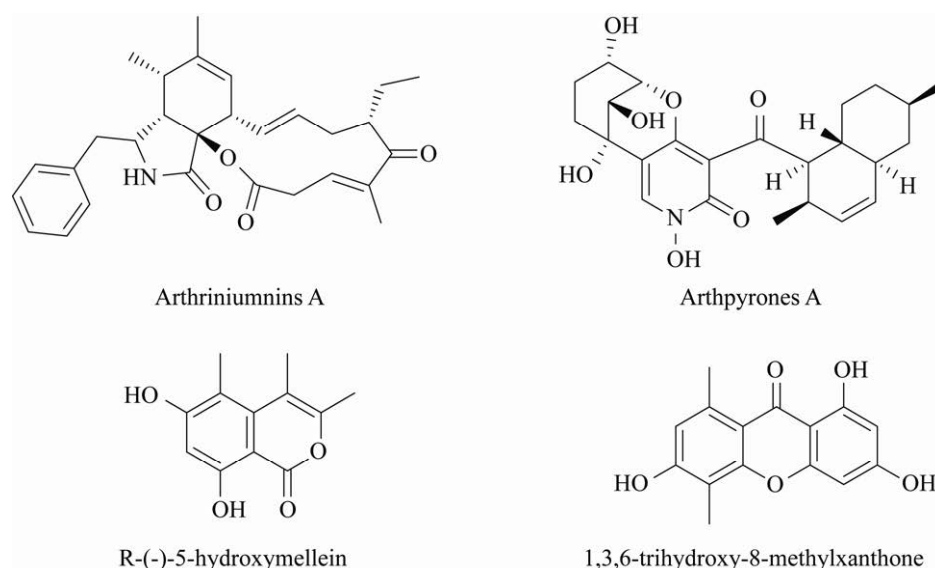


图 1 菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 中分离的代表性化合物

Figure 1 Representative natural products isolated from *A. arundinis* ZSDS1-F3.

# 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

### 1.1.1 菌株和质粒

文中所用菌株见表 1, 所用质粒见表 2。

### 1.1.2 引物

文中所用引物见表 3。

### 1.1.3 培养基和缓冲液

(1) 大肠杆菌培养基。LB 培养基(g/L): 酵母提取粉 5, NaCl 10, 胰蛋白胨 10。MH 培养基(g/L): 水解酪蛋白胨肉汤 21。以上对应的固体培养基加入 2%的琼脂粉。

(2) 真菌培养基。PDB 培养基(g/L): 马铃

薯葡萄糖 24, pH 7.2–7.4。YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20。Uracil 营养缺陷型培养基(g/L): 酸水解酪素 5, 葡萄糖 20, 倒平板时加入终浓度为 6.7 g/L 的无氨基酵母氮源、20 mg/L 的色氨酸、20 mg/L 的腺嘌呤。CD 培养基: 葡萄糖 10 g/L, 20 倍硝酸盐母液 50 mL/L, 微量元素母液 1 mL/L, pH 6.5, 培养 *A. nidulans* A1145  $\Delta$ ST $\Delta$ EM 时需加入终浓度分别为 2.5 mg/L 核黄素、0.5 mg/L 盐酸吡哆醇、2.44 g/L 尿苷和 1 g/L 尿嘧啶的营养素。CD-Sorbitol 培养基: 葡萄糖 10 g/L, 山梨醇 218.6 g/L, 20 倍硝酸盐母液 50 mL/L, 微量元

表 1 菌株汇总表

Table 1 Strains used and generated in this study

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i>		
Trans5a	Host strain for cloning	TransGen Biotech
<i>Arthriniun arundinis</i>		
ZSDS1-F3	Wild strain for genome mining	[11]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
JHY86	Host strain for <i>in vivo</i> homologous recombination to construct <i>A. nidulans</i> plasmids [22]	
<i>Aspergillus nidulans</i>		
A1145 $\Delta$ ST $\Delta$ EM	Host strain for heterologous expression	[22]
LT01	<i>A. nidulans</i> A1154 containing plasmids pYTP, pYTR, pYTU	This study
LT02	<i>A. nidulans</i> A1154 containing plasmid pLT001	This study
LT03	<i>A. nidulans</i> A1154 containing plasmids pLT001, pLT002	This study
LT04	<i>A. nidulans</i> A1154 containing plasmids pLT001, pLT002, pLT003	This study
LT05	<i>A. nidulans</i> A1154 containing plasmid pLT003	This study

表 2 质粒汇总表

Table 2 Plasmids used and generated in this study

Plasmids	Characteristics	Sources
pYTU	Heterologous expression vector in <i>A. nidulans</i> A1145 with auxotrophic markers for uracil	[22]
pYTR	Heterologous expression vector in <i>A. nidulans</i> A1145 with auxotrophic markers for riboflavin	[22]
pYTP	Heterologous expression vector in <i>A. nidulans</i> A1145 with auxotrophic markers for pyridoxine	[22]
pLT001	pYTU containing <i>glaAp-orf1</i>	This study
pLT002	pYTP containing <i>amyBp-orf2</i>	This study
pLT003	pYTR containing <i>gpdAp-orf3</i>	This study

表3 引物汇总表

Table 3 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
pLT001-1	CATCCCCAGCATCATTACACCTCAGCAATGGGTGACAATCGCCTCCCCGAGCCT
pLT001-2	CTTTTCGGCGGTGAGGCCTCTGTAATAAGCGATGCGAATCGCTTCCCTCCAG
pLT001-3	CTGGAGGAAGCGATTTCGCATCGCTTATTACAGAGGCCTCACCGCCGAAAAG
pLT001-4	CGATCATCAGCTTCTCGTGTTCCTCAGGCCATCAGCACCAACCCCATCG
pLT001-5	CGATGGGGTTGGTGCTGATGGCCTGAGAAAACACGAGAAGCTGATGATCG
pLT001-6	CAACAGACCGATACGCCATGTCCCAATGTCGCAAGATAGTGGTCCAGCTCAC
pLT001-7	GTGAGCTGGACCACTATCTTTCGACATTGGGACATGGCGTATCGGTCTGTTG
pLT001-8	GGAGGACATACCCGTAATTTTCTGGGCATTGTTTTGACTGCCATCTACTCGTTTCG
pLT002-1	TGAACAATAAACCCACAGAAGGCATTTATGACCGACGCTGTCGAATCCAGAAT
pLT002-2	GAGACCAACAACCATGATACCAGGGGACCAATCGCATTATGATAGGAAAAG
pLT003-1	ACCCCGCCACATAGACACATCTAAACAATGGATTCTCCCAAGGTATTGATCATT
pLT003-2	AGGGTATCATCGAAAGGGAGTCATCCACTGGCTTCGTACAGCAACGCTGAAAT

素母液 1 mL/L。CD-ST 培养基：可溶性淀粉 20 g/L，胰蛋白胨 20 g/L，20 倍硝酸盐母液 50 mL/L，微量元素母液 1 mL/L，pH 6.5。以上对应的固体培养基均加入 2%的琼脂粉。

(3) 培养基所需营养素。20 倍硝酸盐母液 (g/L)：NaNO<sub>3</sub> 120，KCl 10.4，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10.4，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30.4。微量元素母液 (g/L)：ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22，H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 11，MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 5，FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.6，CoCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.6，CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.6，(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.1。

(4) 菌株 *A. nidulans* A1145 ΔSTΔEM 原生质体制备和转化所需缓冲液。Osmotic Medium：1.2 mol/L MgSO<sub>4</sub>，10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 5.8)。Trapping 缓冲液：0.6 mol/L 山梨醇，0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0)。STC 缓冲液：1.2 mol/L 山梨醇，10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>，10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)。PEG 溶液：60% PEG 4 000，50 mmol/L CaCl<sub>2</sub>，50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)。

#### 1.1.4 主要试剂和仪器

引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。LA *Taq* DNA 聚合酶(北京全式金生物技术公司)，限制性内切酶(Thermo Fisher Scientific

公司)。实验中所使用的甲醇、丙酮、乙酸乙酯等分析纯有机溶剂购自广州化学试剂厂。乙腈(色谱纯)购自安徽时联特种溶剂股份有限公司。氘代试剂购自 Cambridge Isotope Laboratories 公司。

高效液相色谱仪(Agilent 公司)，半制备高效液相色谱仪(Hitachi 公司)，核磁共振仪和高分辨质谱仪(Bruker 公司)，PCR 仪(Eppendorf 公司)，旋转蒸发仪(Heidolph 公司)。

#### 1.2 次级代谢产物生物合成基因簇的分析

基因组序列上传至 antiSMASH 网站 (<https://fungismash.secondarymetabolites.org>) 进行次级代谢产物生物合成基因簇的分析。利用 2ndFind (<http://biosyn.nih.gov/2ndfind>) 软件对目标基因簇所涵盖的序列进行开放阅读框和核糖体结合位点的预测，并结合 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 软件对基因功能进行注释。

#### 1.3 重组质粒的构建

本研究选取了大肠杆菌-酵母-真菌穿梭载体 pYTU、pYTR 和 pYTP 克隆目的基因，每个载体含有强启动子(分别为 *glaA*、*gpdA* 和 *amyB*)、多克隆位点、营养缺陷型筛选标记和抗性筛选

标记。重组质粒构建过程以构建质粒 pLT002 为例说明: 提取菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 基因组为模板, 使用引物 pLT002-1/pLT002-2 扩增目的基因 *orf2*, 将 PCR 扩增获得的目标片段与酶(*Pac* I /*Swa* I)切后的线性载体 pYTP 共同导入酵母 *S. cerevisiae* JHY686 中进行同源重组, 通过营养缺陷型筛选阳性克隆子, 使用 Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep I 试剂盒提取质粒, 转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  中扩增质粒拷贝数, 经测序验证后命名为 pLT002。质粒 pLT001 和 pLT003 以相同的策略构建。

#### 1.4 重组菌株的构建

菌株 *A. nidulans* A1145  $\Delta$ ST $\Delta$ EM 原生质体的制备: 用 CD 固体培养基培养 *A. nidulans* A1145  $\Delta$ ST $\Delta$ EM, 37 °C 培养 3 d 后将新鲜孢子洗脱至 50 mL CD 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 摇床培养 12–16 h 促进孢子萌发; 孢子萌发液 3 900 r/min 离心 15 min, 弃上清; 加入 10 mL Osmotic Medium 洗涤, 3 900 r/min 离心 15 min, 弃上清; 加入 20 mL Osmotic Medium 重悬, 转移到无菌的 250 mL 三角瓶中, 加入 100 mg 溶解酶和 60 mg Yataase 酶, 28 °C、80 r/min 摇床培养过夜裂解; 裂解后产生的原生质体转移到 30 mL 离心管中, 缓慢加入 10 mL Trapping Buffer, 形成上下 2 层, 随后 4 °C、5 300 r/min 离心 15 min, 原生质体悬浮在 2 层液面之间; 将原生质体小心吸取出来, 转移到 15 mL 离心管中, 加入 10 mL STC Buffer, 混匀洗涤, 4 °C、3 900 r/min 离心 10 min, 弃上清; 再加入 200–600  $\mu$ L STC Buffer, 重悬原生质体, 100  $\mu$ L 分装至提前预冷的 1.5 mL 离心管中, –80 °C 保存备用。

将构建好的重组质粒加入到 100  $\mu$ L 的 *A. nidulans* A1145  $\Delta$ ST $\Delta$ EM 原生质体中, 混匀,

冰浴 60 min; 加入 600  $\mu$ L PEG 溶液, 混匀, 室温孵育 20 min; 将混合液涂布于 CD-Sorbitol 固体平板上, 37 °C 正置培养, 待平板干后倒置培养, 3 d 后长出转化子; 挑取单克隆转接到 CD 平板扩大培养并保存菌种。

#### 1.5 次级代谢产物的发酵检测

将重组菌株孢子接种于 CD-ST 液体培养基上, 28 °C 平板静置培养 3 d 取样检测, 样品用乙酸乙酯萃取, 超声 30 min、3 900 r/min 离心 10 min, 取上层有机相减压浓缩蒸干; 加入 100  $\mu$ L 甲醇重悬, 14 000 r/min 离心 10 min, 取 30  $\mu$ L HPLC 检测。检测条件为: 流动相 A 为 10%乙腈(含 0.08%甲酸), 流动相 B 为 90%乙腈, 流速 1 mL/min, 检测波长为 280 nm。高效液相色谱(HPLC)程序: 0–20 min, B 相 5%–80%; 20–21 min, B 相 80%–100%; 21–25 min, B 相 100%; 25–26 min, B 相 100%–5%; 26–30 min, B 相 5%。

#### 1.6 重组菌株发酵产物分离与结构鉴定

将重组菌株孢子接种于 3 L CD-ST 液体培养基中, 28 °C 下平板静置培养 5 d。发酵后菌体用丙酮浸提、乙酸乙酯反萃, 菌液用乙酸乙酯萃取, 萃取后合并, 减压蒸干得到粗提物 2.5 g。将粗提物用 2.5 g 硅胶(100–200 目)拌样, 7.5 g 硅胶装柱, 用环己烷/乙酸乙酯梯度洗脱(5:1、3:1、1:1、0:1、1:2, *V/V*)收集馏分, 根据薄层色谱法(TLC)和 HPLC 分析结果合并得到馏分 Fr.1–Fr.5。馏分 Fr.1 经凝胶色谱(Sephadex LH-20)分离, 用氯仿/甲醇(1:1, *V/V*)等度洗脱, 根据 TLC 和 HPLC 检测结果合并馏分, 得到馏分 Fr.1.1–Fr.1.9, 馏分 Fr.1.6 经半制备高效液相制备, 用乙腈/水(75:25, 流速 2.5 mL/min)等度洗脱, 得到化合物 1 (227.8 mg); 馏分 Fr.1.7 经半制备高效液相制备, 用乙腈/水(65:35, 流速

2.5 mL/min)等度洗脱, 得到化合物 **2** (1.8 mg)。

### 1.7 化合物抑菌活性测试

指示菌包括 4 株革兰氏阴性菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus* ATCC 13214) 和肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883); 3 株革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus* MRSA ATCC 43300) 和藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* SCSIO ML01)。采用微量肉汤稀释法<sup>[23]</sup>测定化合物 **1** 和 **2** 的最小抑菌浓度 (MIC), 具体步骤如下: 将化合物溶解于 DMSO 中配成终浓度为 2.56 mg/mL 的母液, -20 °C 保藏备用。96 孔板每列加入 MH 液体培养基分别为: 第 1 列 200  $\mu$ L, 第 2 列 100  $\mu$ L, 第 3 列 190  $\mu$ L, 剩余每列 100  $\mu$ L。然后在第 3 列分别加入待测样品母液 10  $\mu$ L, 混合均匀后从第 3 列吸取 100  $\mu$ L 液体到第 4 列, 依次往下做等倍稀释, 最后 1 列弃去 100  $\mu$ L。按照同样的方法分别加入

DMSO 和环丙沙星 (0.32 mg/mL) 作为阴性对照和阳性对照。用无菌的 MH 液体培养基将培养好的指示菌稀释 1 000 倍, 除第 1 列外每孔加入 100  $\mu$ L, 使化合物的终浓度分别为 64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125  $\mu$ g/mL, 阳性对照环丙沙星的终浓度分别为 8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.03、0.015  $\mu$ g/mL。以上实验每组做 3 个平行, 37 °C 培养, 16 h 后观察菌株生长情况, 最后按照 CLSI 中甲氧苄胺嘧啶或磺胺药物的肉汤稀释法的终点判断, 与阴性生长对照管比较, 受试菌抑制率达 80% 以上药物浓度为其 MIC。

## 2 结果与分析

### 2.1 真菌 *A. arundinis* ZSDS1-F3 中 PKS-NRPS 基因簇分析

使用在线分析软件 antiSMASH 6.0<sup>[24]</sup> 预测菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 共编码 69 个生物合成基因簇 (cluster) (数据未发表), 其中 4 个为 PKS-NRPS 生物合成基因簇 (图 2), 分析发现 cluster 32 负责吡啶生物碱类化合物 arthpyrones

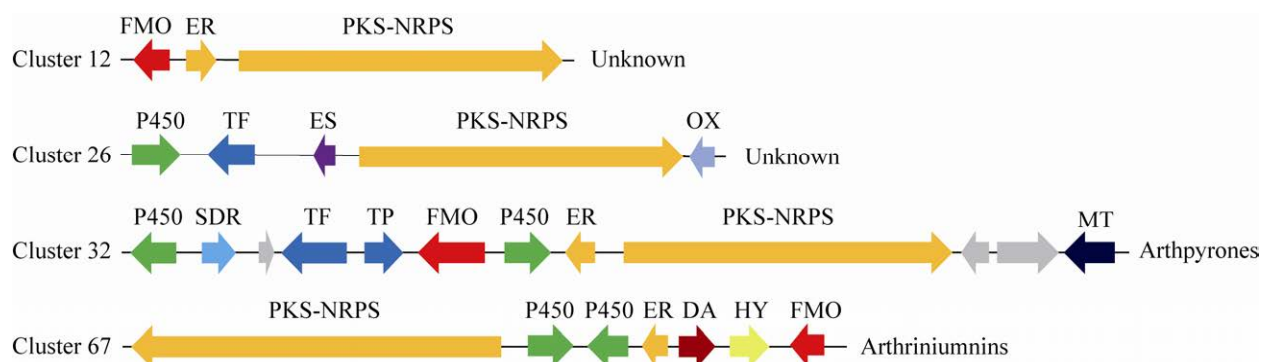


图 2 菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 基因组编码的 PKS-NRPS 基因簇分析

Figure 2 Analysis of PKS-NRPS gene clusters in *A. arundinis* ZSDS1-F3. PKS-NRPS: polyketide synthases-nonribosomal peptide synthetases; ER: trans enoyl reductase; FMO: flavin-dependent monooxygenase; P450: cytochrome P450 monooxygenase; TF: transcriptional factor; ES: esterase; OX: oxygenase; SDR: short chain dehydrogenase; TP: transporter; MT: methyltransferase; DA: Diels-Alderase; HY: hydrolyase.

的生物合成, cluster 67 负责细胞松弛素类化合物 arthriniumnins 的生物合成, 另外 2 个 cluster 编码的化合物未知。为充分挖掘菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 编码 PKS-NRPS 类型次级代谢产物的能力, 选择了 cluster 12 开展研究。

功能预测分析显示 cluster 12 共包含 3 个基因(图 3), 命名为 *orf1-orf3*, *orf1* 编码 PKS-NRPS 合成酶, 从 N 端到 C 端编码的结构域分别为酮基合成酶(KS)、酰基转移酶(MAT)、脱水酶(DH)、C-甲基转移酶(cMT)、功能失活的烯酰还原酶( $ER^0$ )、酮基还原酶(KR)、酰基载体蛋白(ACP)、缩合结构域(C)、腺苷酰化结构域(A)、硫基化结构域(T)、迪克曼环化结构域( $R^*$ ), *orf2*

编码烯酰还原酶(Trans-ER), *orf3* 编码黄素依赖单加氧酶(FMO), 目前还没有这种基因排布的 PKS-NRPS 生物合成基因簇的报道, 提示编码的产物为新化合物。

## 2.2 Cluster 12 的异源表达

为挖掘 cluster12 产生的次级代谢产物, 我们在菌株 *A. nidulans* A1145  $\Delta$ ST $\Delta$ EM 中对该基因簇进行了异源表达研究。HPLC 分析显示, 在强启动子 *glaA* 作用下, 单独表达 PKS-NRPS (*orf1*) 时没有化合物产生, 推测是由于聚酮链的合成需要反式起作用的 ER 结构域存在; 在强启动子 *glaA* 和 *amyB* 作用下, 将基因 *orf1* 和基因 *orf2* 共表达时, 与仅包含空载体的对照相比,

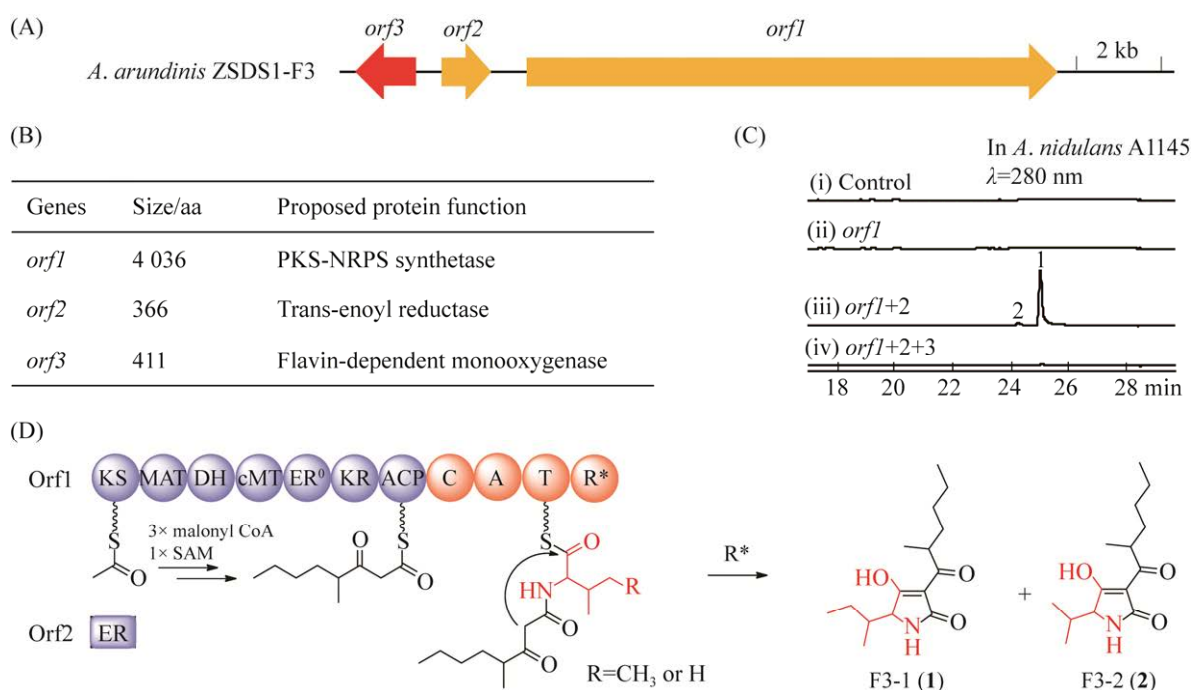


图 3 化合物 1 和 2 的生物合成

Figure 3 Biosynthesis of compounds 1 and 2. A: the cluster of 1 and 2 identified from *A. arundinis* ZSDS1-F3; B: proposed functions of individual *orfs* in the identified gene clusters; C: product profiles from heterologous expression of different combinations in *A. nidulans* A1145. Control in trace i is *A. nidulans* A1145 transformed with vectors not carrying any biosynthetic genes; D: proposed biosynthetic pathway of compounds 1 and 2. KS: ketosynthase; MAT: malonyl-CoA:ACP acyltransferase; DH: dehydratase; cMT: C-methyltransferase;  $ER^0$ : nonfunctional enoylreductase; KR: ketoreductase; ACP: acyl carrier protein; C: condensation; A: adenylation; T: thiolation;  $R^*$ : Dieckmann cyclization.



重组菌株在生长 3 d 后,观察到 2 个新化合物 **1** 和 **2** 的产生(图 3C);然而在添加黄素依赖单加氧酶基因 *orf3* 共表达时,没有新的化合物产生,且已产生的代谢产物 **1** 和 **2** 也基本完全消失。基因 *orf3* 的转录分析证实了该基因的表达,遗憾的是未得到 Orf3 的可溶性蛋白,目前 Orf3 在生物合成途径中的作用尚不清楚。

### 2.3 化合物 **1** 和 **2** 结构鉴定

化合物 **1** 为黄色油状液体,通过高分辨质谱(图 S1)确定其分子式为  $C_{15}H_{25}NO_3$  ( $m/z$  268.190 3  $[M+H]^+$ , 计算值为 268.190 7), 不饱和度为 4。分析化合物 **1** 的  $^1H$ 、 $^{13}C$  和 HSQC 核磁数据(表 4 和图 S1)发现结构中存在 4 个季碳(包括 3 个羰基和 1 个烯碳)、4 个亚甲基、3 个次甲基和 4 个甲基;分析化合物 **1** 的 COSY 图谱发现结构中存在 C4–C8 和 C9–C15 2 个片段,通过 H-4/H-5 与 C-3 的 HMBC 相关证明 C-4 与 C-3 相连,通过 H<sub>3</sub>-15/H<sub>2</sub>-11 与 C-9 的 HMBC 相关证明 C-10 与 C-9 相连(图 4);C-4 的化学位移值

表 4 化合物 **1** 和 **2** 的核磁数据

Table 4  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data of compounds **1** and **2**

No.	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_C$ , type	$\delta_H$ , mult (J in Hz)	$\delta_C$ , type	$\delta_H$ , mult (J in Hz)
1	176.1, C		174.1, C	
2	101.3, C		100.9, C	
3	195.4, C		195.4, C	
4	66.3, CH	3.81, m	66.2, CH	3.71, m
5	36.4, CH	1.79, m	29.6, CH	2.04, m
6	23.2, CH <sub>2</sub>	1.25, m; 1.11, m	19.1, CH <sub>3</sub>	0.95, d (7.0)
7	11.7, CH <sub>3</sub>	0.80, t (7.0)	15.6, CH <sub>3</sub>	0.70, d (6.3)
8	15.5, CH <sub>3</sub>	0.91, d (7.0)	192.0, C	
9	192.0, C		36.1, CH	3.53, m
10	35.7, CH	3.48, m	32.5, CH <sub>2</sub>	1.59, m; 1.37, m
11	32.4, CH <sub>2</sub>	1.59, m; 1.39, m	29.0, CH <sub>2</sub>	1.24, m
12	28.9, CH <sub>2</sub>	1.23, m; 1.18, m	22.1, CH <sub>2</sub>	1.23, m
13	22.0, CH <sub>2</sub>	1.24, m	13.8, CH <sub>2</sub>	0.83, t (7.0)
14	13.8, CH <sub>3</sub>	0.82, t (7.0)	17.1, CH <sub>3</sub>	1.04, ds
15	16.9, CH <sub>3</sub>	1.07, d (7.0)		

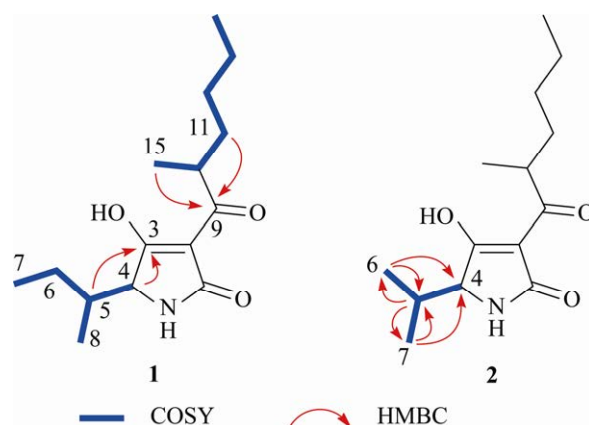


图 4 化合物 **1** 和 **2** 中关键的 COSY 和 HMBC 相关  
Figure 4 Selected 2D NMR correlations for **1** and **2**.

为 66.3, 表明其与 N 相连, 而 N 与化学位移值为 176.1 的羰基形成酰胺键; 化学位移值为 101.3 的烯碳为季碳, 说明它与 C-3/C-1/C-9 相连且与其中一个酮基形成烯醇结构。综上所述, 化合物的 **1** 平面结构确定为如图 3D 所示, 命名为 F3-1。

化合物 **2** 为黄色油状液体, 通过高分辨质谱(图 S2)确定其分子式为  $C_{14}H_{23}NO_3$  ( $m/z$  254.175 2  $[M+H]^+$ , 计算值为 254.175 0), 与化合物 **1** 相比少了一个  $CH_2$ 。进一步比较化合物 **2** 和 **1** 的核磁数据(表 4 和图 S2)发现它们的结构非常相似。主要区别在于, 化合物 **2** 的  $^1H$  谱图中少了一个 t 峰的甲基, 多了一个 d 峰的甲基。通过 H<sub>3</sub>-7 ( $\delta_H$  0.95)/H-5 ( $\delta_H$  2.04)和 H<sub>3</sub>-6 ( $\delta_H$  0.70)/H-5 之间的 COSY 相关, H-5 到 C-6/C-7、H<sub>3</sub>-6 到 C-4/C-5 和 H<sub>3</sub>-7 到 C-4/C-5 的 HMBC 相关, 证明连在化合物 **2** 中 C-4 位的为异丙基(图 4), 而在化合物 **1** 中为异丁基。综上所述, 化合物的 **2** 的平面结构确定为如图 3D 所示, 命名为 F3-2。

### 2.4 化合物 **1** 和 **2** 的生物合成途径推导

基于基因异源重组的结果和已报道的真菌 PKS-NRPS 生物合成机制研究<sup>[8,25]</sup>, 推导了化合

物 **1** 和 **2** 的生物合成途径(图 3D)。化合物 **1** 和 **2** 是 Orf1 和 Orf2 共同作用的产物, Orf1 编码的 PKS 部分与反式起作用的 ER (Orf2) 共同整合 1 个乙酰辅酶 A、3 个丙二酰辅酶 A 和 1 个 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)合成聚酮链, Orf1 编码的 NRPS 部分选择并激活异亮氨酸, 异亮氨酸的氨基进攻 PKS 合成的聚酮链生成酰胺键, 最后在末端 R\*结构域的催化下, 经过分子内的迪克曼环化反应释放产生 **1**, 由于 NRPS 部分 A 结构域的底物宽泛性, 还可以识别缬氨酸为底物, 最终催化生成 **2**。

### 2.5 化合物抑菌活性实验

选取了 4 株革兰氏阴性菌 *E. coli* ATCC 25922、*A. baumannii* ATCC 19606、*V. alginolyticus* ATCC 13214、*K. pneumoniae* ATCC 13883 和 3 株革兰氏阳性菌 *S. aureus* ATCC 29213、methicillin-resistant *S. aureus* MRSA ATCC 43300、*M. luteus* SCSIO ML01 为指示菌, 以环丙沙星为阳性对照, 采用微量肉汤稀释法<sup>[23]</sup>测定化合物 **1** 和 **2** 的最小抑菌浓度(MIC), 测试结果显示化合物 **1** 和 **2** 对这 7 株指示菌无明显的抑制活性, MIC 值均大于 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 3 讨论与结论

生物信息学分析显示, 真菌基因组中存在多个次级代谢产物生物合成基因簇, 在实验室培养条件下, 多数处于不表达或极低地表达, 处于隐性状态<sup>[26]</sup>, 为了充分挖掘真菌次级代谢产物编码能力, 研究人员开发了多种基因簇挖掘策略(表观遗传调控、调控基因过表达、异源表达和启动子工程等)来激活隐性生物合成基因簇, 从而获得新结构天然产物<sup>[27]</sup>。本研究中通过启动子工程和异源表达组合的策略, 成功实现了菌株 *A. arundinis* ZSDS1-F3 中一个编码

PKS-NRPS 生物合成基因簇的表达, 并分离到 2 个新化合物, 表明基因组信息指导下的天然产物挖掘可以加快真菌中新颖天然产物的发现步伐, 同时异源表达体系的建立为后续在该菌株中进一步开展新颖活性化合物挖掘研究奠定了基础。

本研究中激活的 PKS-NRPS 生物合成基因簇包含 3 个基因 *orf1-orf3*, 化合物 **1** 和 **2** 为 Orf1 和 Orf2 共同作用的产物, 遗憾的是, 当加入黄素依赖单加氧酶 Orf3 时, 代谢产物基本完全消失, 没有新化合物产物; 为了能确认 Orf3 的功能, 将化合物 **1** 喂养到菌株 LT05 (菌株 *A. nidulans* A1145 转入基因 *orf3*), 与对照菌株相比, 检测到化合物 **1** 的消耗, 但仍然没有检测到新化合物产生, 我们在菌株 *Trichoderma harzianum* t-22 的基因组挖掘中也遇到过类似的现象<sup>[22]</sup>, 推测是由于化合物 **1** 经黄素氧化酶 Orf3 修饰后的产物不稳定容易被降解所致。进一步克隆表达了 Orf3, 但在酵母和大肠中都未获得可溶性表达的蛋白, 未能开展体外生化功能研究, 因此基因 *orf3* 在该生物合成途径中的作用尚不清楚。

真菌 PKS-NRPS 合成酶由于结合了 PKS 和 NRPS 模块, 能催化不同类型的聚酮骨架和氨基酸聚合, 从而产生结构丰富和生物活性多样的天然产物。基因组数据分析表明, 绝大多数丝状真菌的基因组中编码 2-6 个 PKS-NRPS 生物合成基因簇<sup>[28]</sup>, 在实验培养条件下这些基因簇多处于沉默状态, 随着异源表达平台的多样化和组合生物学研究的深入, 更多新的 PKS-NRPS 生物合成基因簇会得到挖掘和研究, 从而提供更多新结构化合物, 并为通过合成生物学创制结构新颖和活性显著的天然产物提供生物合成元件。

## 参考文献

- [1] Sanchez JF, Somoza AD, Keller NP, Wang CCC. Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports*, 2012, 29(3): 351.
- [2] 李伟, 吴广畏, 杨玉萍, 尹文兵. 后基因组时代的真菌天然产物发现. *菌物学报*, 2015, 34(5): 914–926.  
Li W, Wu GW, Yang YP, Yin WB. Discovery of fungal natural product in the post-genomic era. *Mycosystema*, 2015, 34(5): 914–926. (in Chinese)
- [3] Jiang T, Wang MH, Li L, Si JG, Song B, Zhou C, Yu M, Wang XW, Zhang YG, Ding G, Zou ZM. Overexpression of the global regulator LaeA in *Chaetomium globosum* leads to the biosynthesis of chaetoglobosin Z. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(10): 2487–2494.
- [4] Yi L, Cui CB, Li CW, Peng JX, Gu QQ. Chromosulfine, a novel cyclopentachromone sulfide produced by a marine-derived fungus after introduction of neomycin resistance. *RSC Advances*, 2016, 6(50): 43975–43979.
- [5] Liu N, Abramyan ED, Cheng W, Perlatti B, Harvey CJB, Bills GF, Tang Y. Targeted genome mining reveals the biosynthetic gene clusters of natural product *CYP51* inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(16): 6043–6047.
- [6] Cai Y, Rao L, Zou Y. Genome mining discovery of a C4-alkylated dihydroisocoumarin pathway in fungi. *Organic Letters*, 2021, 23(6): 2337–2341.
- [7] Fischbach MA, Walsh CT, Clardy J. The evolution of gene collectives: how natural selection drives chemical innovation. *PNAS*, 2008, 105(12): 4601–4608.
- [8] Li H, Booth TJ, Chooi YH. Fungal polyketide-nonribosomal peptide synthetases and their associated natural products. *Comprehensive Natural Products III*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 415–444.
- [9] Boettger D, Hertweck C. Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids. *ChemBioChem*, 2013, 14(1): 28–42.
- [10] Du LC, Lou LL. PKS and NRPS release mechanisms. *Natural Product Reports*, 2010, 27(2): 255–278.
- [11] Wang JF, Wei XY, Qin XC, Lin XP, Zhou XF, Liao SR, Yang B, Liu J, Tu ZC, Liu YH. Arthopyrones A–C, pyridone alkaloids from a sponge-derived fungus *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F<sub>3</sub>. *Organic Letters*, 2015, 17(3): 656–659.
- [12] Zhang YY, Zhang QQ, Bao J, Huang JT, Zhang H. Apiosporamide, a 4-hydroxy-2-pyridone alkaloid, induces apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway in osteosarcoma cells. *OncoTargets and Therapy*, 2019, 12: 8611–8620.
- [13] Bao J, Zhai HJ, Zhu KK, Yu JH, Zhang YY, Wang YY, Jiang CS, Zhang XY, Zhang Y, Zhang H. Bioactive pyridone alkaloids from a deep-sea-derived fungus *Arthrinium* sp. UJNMF<sub>0008</sub>. *Marine Drugs*, 2018, 16(5): 174.
- [14] 刘晓涵, 武京帅, 张鹏, 王长云. 1 株南极来源真菌 *Arthrinium arundinis* 的次级代谢产物研究. *中国海洋药物*, 2020, 39(6): 25–30.  
Liu XH, Wu JS, Zhang P, Wang CY. Study on the secondary metabolites of an Antarctic fungus *Arthrinium arundinis*. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2020, 39(6): 25–30. (in Chinese)
- [15] Morishita Y, Okazaki Y, Luo YY, Nunoki J, Taniguchi T, Oshima Y, Asai T. Use of plant hormones to activate silent polyketide biosynthetic pathways in *Arthrinium sacchari*, a fungus isolated from a spider. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(4): 780–784.
- [16] Li YL, Wang JF, He WJ, Lin XP, Zhou XJ, Liu YH. One strain-many compounds method for production of polyketide metabolites using the sponge-derived fungus *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F<sub>3</sub>. *Chemistry of Natural Compounds*, 2017, 53(2): 373–374.
- [17] Tsukada M, Fukai M, Miki K, Shiraishi T, Suzuki T, Nishio K, Sugita T, Ishino M, Kinoshita K, Takahashi K, Shiro M, Koyama K. Chemical constituents of a marine fungus, *Arthrinium sacchari*. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(7): 1645–1649.
- [18] Ye B, Ding WJ, Wang PM, Xu JZ. Two new sesterterpenes from marine-derived fungus *Arthrinium* sp. *Chemistry of Natural Compounds*, 2019, 55(2): 281–284.
- [19] Elissawy AM, Ebada SS, Ashour ML, Özkaya FC, Ebrahim W, Singab AB, Proksch P. Spiroarthrinols A and B, two novel meroterpenoids isolated from the sponge-derived fungus *Arthrinium* sp. *Phytochemistry Letters*, 2017, 20: 246–251.
- [20] Wang JF, Wang Z, Ju ZR, Wan JT, Liao SR, Lin XP, Zhang TY, Zhou XF, Chen H, Tu ZC, Liu YH. Cytotoxic cytochalasins from marine-derived fungus *Arthrinium arundinis*. *Planta Medica*, 2015, 81(2): 160–166.
- [21] Wang JF, Xu FQ, Wang Z, Lu X, Wan JT, Yang B, Zhou XF, Zhang TY, Tu ZC, Liu YH. A new

- naphthalene glycoside from the sponge-derived fungus *Arthrinium* sp. ZSDS1-F<sub>3</sub>. *Natural Product Research*, 2014, 28(14): 1070–1074.
- [22] Zhu YG, Wang JF, Mou PY, Yan Y, Chen MB, Tang Y. Genome mining of cryptic tetrionate natural products from a PKS-NRPS encoding gene cluster in *Trichoderma harzianum* t-22. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2021, 19(9): 1985–1990.
- [23] Ruan XC, Deng XL, Tan ML, Yu CB, Zhang MS, Sun Y, Jiang NH. *In vitro* antibiofilm activity of resveratrol against avian pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 249.
- [24] Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH, Weber T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W29–W35.
- [25] 杨晓钰, 何佳宁, 牛雪梅. 真菌中 PKS-NRPS 杂合天然产物研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(7): 848–864.
- Yang XY, He JN, Niu XM. Research progress on fungal PKS-NRPS hybrid metabolites. *Scientia Sinica: Vitae*, 2019, 49(7): 848–864. (in Chinese)
- [26] 徐杰, 黄建忠, 李力. 基因组挖掘技术及其在真菌中的研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35(11): 201–207.
- Xu J, Huang JZ, Li L. Summary of genomics mining technology and its research progress in fungi. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(11): 201–207. (in Chinese)
- [27] Ziemert N, Alanjary M, Weber T. The evolution of genome mining in microbes—a review. *Natural Product Reports*, 2016, 33(8): 988–1005.
- [28] Minami A, Ugai T, Ozaki T, Oikawa H. Predicting the chemical space of fungal polyketides by phylogeny-based bioinformatics analysis of polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase and its modification enzymes. *Scientific Reports*, 2020, 10: 13556.

(本文责编 李磊)

## 补充材料

附图 1 化合物 1 的质谱和核磁数据

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

附图 2 化合物 2 的质谱和核磁数据

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。