

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(5):541-549; 4 May 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

链霉菌来源的苯并异色烷醌家族抗生素的生物合成

王蔚^{1,2}, 王慧利^{2,3}, 李爱英^{1,2*}

¹华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

²华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079

³温州医学院生命科学学院, 温州 325035

摘要: 苯并异色烷醌 (benzoisochromanequinones, BIQs) 家族抗生素是由链霉菌产生的聚酮类抗生素, 其芳香聚酮母核结构中含有并联的两个芳香环和一个吡喃环, 具有抗菌、抗肿瘤等多种生物学活性。BIQ 抗生素聚酮链的早期生物合成过程代表了芳香聚酮抗生素母核的典型合成机制, 而不同的后期修饰则决定了它们结构和生物学活性的多样性。在过去的二十几年中, 以放线紫红素和美达霉素为研究重点, BIQ 家族抗生素的生物合成机制逐渐得到揭示, 但在后期结构修饰方面仍有许多问题有待解决。本文对 BIQ 家族抗生素的生物合成机制研究进行了综述, 比较了不同 BIQ 家族抗生素结构特点、生物学活性, 并重点阐述了它们生物合成中的后期结构修饰和调控过程的研究进展, 并对 BIQ 抗生素在代谢工程方面的研究进行了展望。

关键词: BIQ 家族抗生素, 芳香聚酮, 生物合成, 结构修饰

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)05-0541-09

BIQ 家族抗生素是一类由链霉菌产生的芳香聚酮抗生素, 分别具有抗癌、抗菌、抗虫等多种生物学活性。这个家族中比较有代表性的化合物包括生物

合成研究最深入的放线紫红素 (actinorhodin, ACT) 以及具有强抗肿瘤活性的美达霉素 (medermycin, MED) 等 (图 1)。

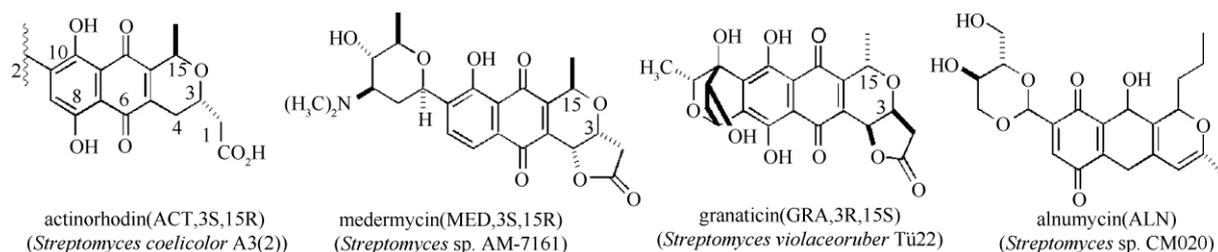


图 1 几个代表性的 BIQ 家族抗生素的结构

Fig. 1 Structures of representative BIQ antibiotics. The numbering given is based on the biosynthetic origin of several BIQ antibiotics; The producing strains are indicated under the names of BIQs respectively.

基金项目: 国家自然科学基金 (30770036, 31170050); 中央高校基本科研业务费 (CCNU10A02011); 浙江省科技厅公益技术应用项目 (2011C23114)

* 通信作者。Tel: +86-27-67862431; E-mail: ayli@mail.ccnu.edu.cn

作者简介: 王蔚 (1986-) 男, 武汉人, 硕士研究生, 研究方向为微生物遗传学。E-mail: wangweibryan@126.com

收稿日期: 2011-11-14; 接受日期: 2012-01-18

BIQ 家族抗生素聚酮母核含有并联的两个芳香环和一个带有手性中心的吡喃环,而生物合成中的后期修饰导致其结构呈现多样性,所以这些抗生素前期芳香聚酮结构的形成以及后期修饰的分子机制一直都是抗生素生物合成研究领域重要的研究对象。在这里,作者结合自己在这个领域的研究结果,对这类抗生素生物合成研究的进展进行了阐述。

1 BIQ 家族抗生素的结构及生物学活性的多样性

BIQ 抗生素虽然成员总数还不是非常多,但也呈现了结构上的多样性(图 1): (a) 吡喃环的两个手性中心 C-3 和 C-15 呈现相反的立体构象——放线紫红素和美达霉素等具有(3*S*, 15*R*)构象,而榴菌素(*granaticin*, *GRA*)等则相反^[1]; (b) 二聚体化——放线紫红素是在 C-10 位通过 C—C 键将两个完全相同的聚酮母核连接起来; (c) 糖基化——榴菌素和美达霉素的母核分别通过稀有的 C—C 糖苷键,与稀有的糖胺(脱氧己糖衍生物)连接,但这两种抗生素在糖苷键数目和连接方式上又有差异^[1-2]; (d) 内酯化——美达霉素、榴菌素等化合物的 C-1 和 C-4 可以形成内酯结构,而放线紫红素、富伦菌素(*frenolicin*)等在 C-1 主要以羧基存在,在某些条件下其 C-1 羧基也可与 C-4 进行内酯化而环化^[3]; (e) 氧化还原和取代——BIQ 的芳香聚酮链呈现不同程度的氧化还原,在糖基上也存在不同的取代基,比如氨基或甲基取代; (f) 二恶烷(*dioxan*)修饰——这是 *alnumycin* (*ALN*) 的母核在 C-10 位置发生的非常稀有的六元杂环修饰^[4]。

这些复杂的结构决定了 BIQ 抗生素生物学活性的多样性:放线紫红素对金黄色葡萄球菌有抑菌作用^[3];榴菌素可抑制革兰氏阳性菌,且具有一定的抑癌活性^[2-3];富伦菌素可以抗鸡球虫病,加快家禽的生长;*alnumycin* 有抗菌活性和抑制细胞生长的作用,并且是 DNA 拓扑异构酶的抑制剂^[4];美达霉素不仅可以抑制一些革兰氏阳性菌的生长,而且对多种癌症有较强的抑制效果^[5]。尤其值得一提的是具有内酯化结构的美达霉素、卡拉芬净(*kalafungin*, *KAL*)等抗生素可以抑制许多癌细胞中

超量表达的 AKT 激酶的活性。AKT 激酶是抗癌药物筛选的重要靶标,所以这些化合物被认为是 AKT 激酶的一类新型抑制剂,通过阻断信号传导来对肿瘤细胞的产生、迁移起到抑制作用;目前已有确切数据揭示这类化合物的吡喃环并内酯结构对阻断肿瘤的信号传导是非常关键的;而其中美达霉素的抑癌效果最好^[5-6],可能与它的糖基化、氧化、内酯化等多种结构修饰都有关系。

2 BIQ 家族抗生素的生物合成

BIQ 抗生素在链霉菌体内的积累涉及到成簇存在的几十个基因的功能,合成过程包括前期聚酮母链合成(形成二环中间体 *bicyclic intermediate*)和后期结构修饰(手性吡喃环、氧化、糖基化等)。

2.1 BIQ 抗生素生物合成基因簇的克隆和序列分析

目前已经有 4 例完整的 BIQ 抗生素生物合成基因簇得到克隆和测序(图 2):放线紫红素的基因簇是第一例得到克隆的完整的抗生素基因簇,由 Hopwood DA 研究团队通过对 7 组抗生素合成阻断突变株进行功能互补而克隆得到,测序揭示由 22 个基因组成^[7];榴菌素生物合成基因簇是通过对产生菌基因组文库杂交筛选得到,测序结果表明含有 33 个基因^[2];美达霉素生物合成基因簇的克隆也是采用基因组文库筛选得到,含有 29 个基因,其最小的聚酮合成酶(*polyketide synthase*, *PKS*)复合体(*minimal PKS*)3 个组分的编码基因没有相邻;而脱氧己糖(*deoxyhexose*, *DOH*)合成酶基因是成簇聚集^[1]; *alnumycin* 生物合成基因簇在 2008 年克隆测序,包含 32 个基因^[4]。另外,富伦菌素、卡拉芬净、*griseusin B*、*nanamycin A methyl ester* 等 BIQ 抗生素生物合成基因簇已经得到部分克隆(主要是含有 *PKS* 基因的区域)。

这些 BIQ 家族抗生素基因簇的基因多数是参与聚酮母链合成、后期修饰以及抗生素生物合成调控、抗性和胞外分泌等过程。另外,在这些基因簇中还存在大量功能未知基因(图 2),而且有些未知基因同时在这几个抗生素基因簇中都存在,彼此有一定同源性,对它们的功能鉴定工作可能会揭示一些较为新颖的生物学机制^[1]。

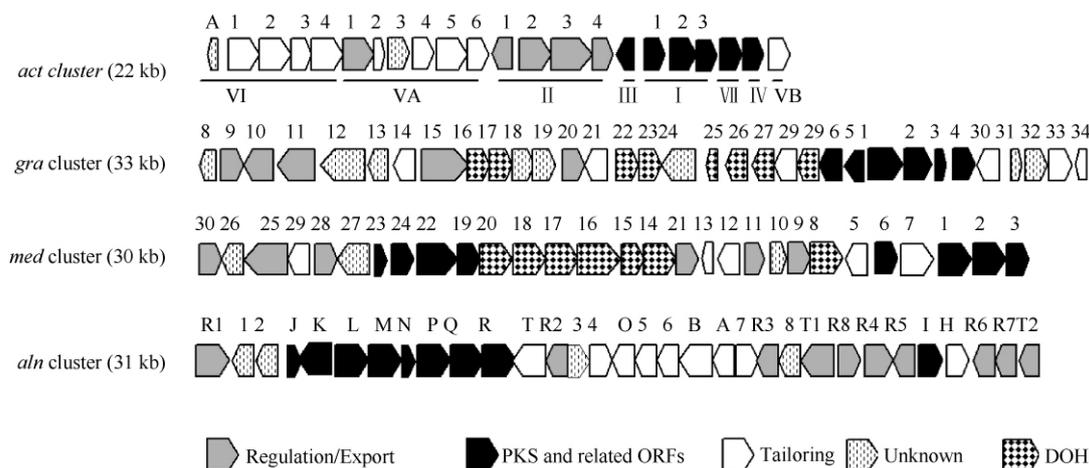


图2 已经克隆的BIQ家族抗生素的生物合成基因簇

Fig. 2 The biosynthetic gene clusters of BIQ antibiotics. DOH: genes for deoxyhexose synthesis; unknown: genes with unassigned function; PKS: genes encoding minimal PKS (ketosynthase, chain length factor and acyl carrier protein), ketoreductase (KR), aromatase (ARO) and cyclase (CYC); Tailoring: genes for the late stage of biosynthetic pathways of BIQs.

2.2 BIQ 抗生素的生物合成

BIQ 家族抗生素的聚酮母链合成反映了芳香聚酮类抗生素母链形成的共有机制,而不同的复杂的后期修饰则赋予这类抗生素的结构多样性,其中放线紫红素的聚酮母链和后期修饰的生物合成研究最为深入,已经成为芳香聚酮抗生素生物合成研究的模式化合物。作者对另一个重要的抗肿瘤抗生素美达霉素生物合成的后期修饰也展开研究。在这里,作者结合这些研究结果,对 BIQ 化合物生物合成进行归纳。

2.2.1 BIQ 抗生素芳香聚酮母链的早期合成-形成二环中间体

BIQ 家族化合物的母核形成分别是由含 16、18、20 个碳原子的聚酮链经二碳单位缩合而来:首先由最小聚酮合成酶复合体 minimal PKS 选择起始单位和延伸单位,并决定链长及缩合反应。这个复合体中三个组分(β -酮酰合酶亚基 KS_{α}/KS_{β} 和酰基载体蛋白)的基因在所有芳香聚酮抗生素基因簇中都存在,往往紧密相邻,偶有例外^[1,8],但都高度保守,表明不同芳香聚酮抗生素基因簇起源的相关性。接下来由酮基还原酶(KR)还原 C-9 酮基,并在 C-7 和 C-12 间成环,由芳香化酶(ARO)催化形成第一个芳香环,再在环化酶(CYC)参与下形成第二个芳香环。这个二环中间体的形成是 BIQ 家族抗生素合成中共有的途径(图 3)^[1-3,9]。

2.2.2 BIQ 家族抗生素生物合成的后期修饰:前期

合成的二环中间体在不同链霉菌中经历了不同的后期修饰,形成不同结构的终产物。

(1) 吡喃环形成——3 种模型

在 BIQ 抗生素合成中,二环中间体形成后首先会经历 C-3 的手性的形成,这一点已分别在放线紫红素、美达霉素和榴菌素生物合成研究中得到遗传学证明:利用一个多基因共表达系统(由二环中间体合成相关的 6 个放线紫红素 PKS 基因及一个酮基还原酶基因 *actVI-ORF1* 组成)进行组合表达,可以导致第一个手性中间体(S)-DNPA 的积累,证明了 *actVI-ORF1* 编码一种立体专一性的酮基还原酶,直接将 C-3 酮基还原成羟基,然后与 C-15 酮基之间发生自发环化脱水,形成(C₃S)型立体构象(图 3)^[10]。作者采用类似方案,仅把来自美达霉素基因簇的基因 *med-ORF12* 取代 *actVI-ORF1*,发现合成的产物 DNPA 也为(C₃S)构型,说明 *med-ORF12* 和 *actVI-ORF1* 属于同一类保守性较高的立体选择性的酮基还原酶(Reductase type-1, RED1)^[11];而来自榴菌素基因簇的基因 *gra-ORF6* 在相同的表达策略下,可以催化二环中间体变成(R)-DNPA,但其序列与 RED1 没有同源性,模拟的立体结构也不同,所以归为另一类酮基还原酶(RED2)^[12-13]。

接下来,中间体 DNPA 的 C-15 要被还原形成第二个手性中心。已经发现放线紫红素基因簇中的还原酶编码基因 *actVI-ORF2* 突变后,菌株会积累前体物质(S)-DNPA,说明 C-15 位的还原作用主要由

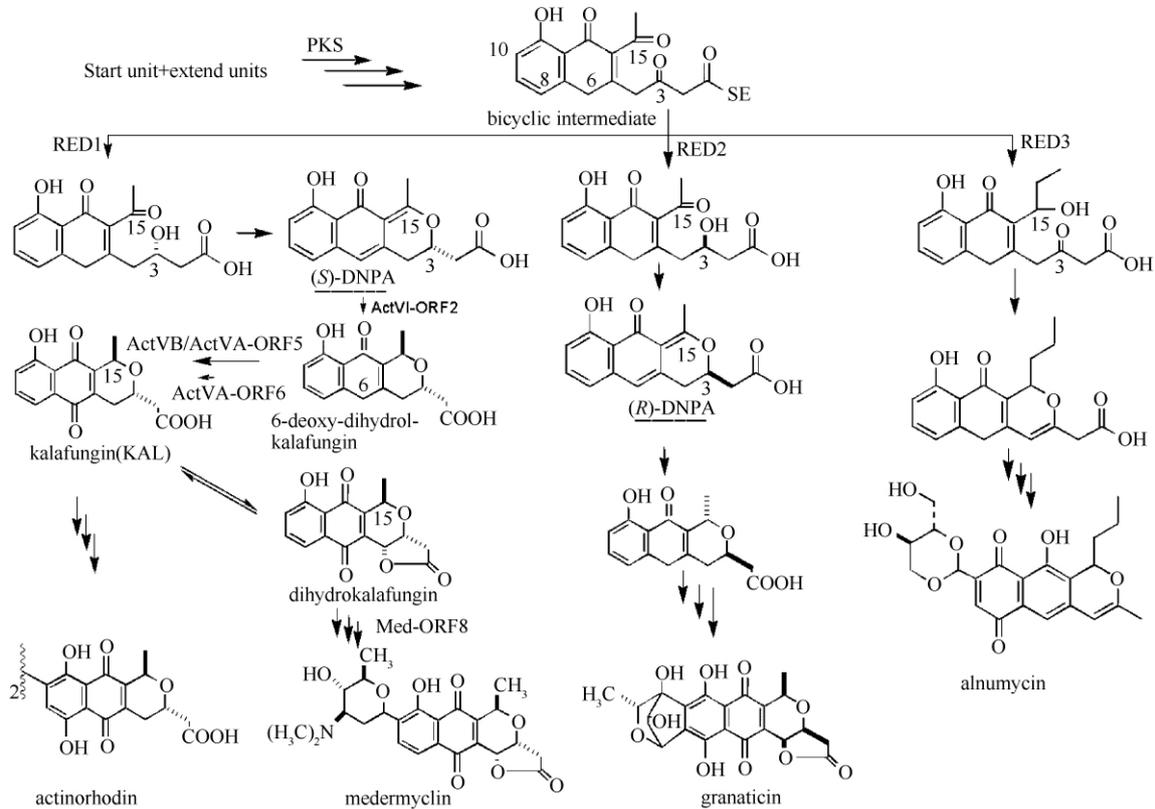


图3 主要的BIQ抗生素可能的生物合成途径

Fig. 3 Proposed biosynthetic pathways of BIQ antibiotics. The numbering given is based on the biosynthetic origin of several representative BIQ antibiotics indicated in bold; PKS: polyketide synthases for biosynthesis of the bicyclic intermediate; Three mechanisms of pyran ring formation were catalyzed respectively by three reductases (REDs). RED1: Med-ORF12 and ActVI-ORF1 to determine C₃S configuration; RED2: Gra-ORF6 to control C₃R formation; RED3: Aln-ORF4 to determine a direct ketoreduction at C₁₅.

ActVI-ORF2 控制,可能是首先还原 C-14 和 C-15 之间的 C—C 双键,再经过异构化,形成 (S)-DNPA 的 α β -不饱和羰基结构^[14]。

美达霉素/放线紫红素和榴菌素的 C-3 手性结构的形成代表了 BIQ 家族两种具有立体专一性的吡喃环的形成模型。而另一个 BIQ 化合物 alnumycin 则代表了第三种可能的吡喃环成环机制:由基因簇中的酮基还原酶基因 *aln*-ORF4 首先将 C-15 位酮基进行还原,这样就直接在 C-3 和 C-4 之间形成了 C—C 双键,接着再进行 C-3 和 C-15 间的环化和脱水作用(而较小的酮基还原酶基因 *Aln*-ORF5 则有可能是 *Aln*-ORF4 的辅助蛋白),这种推论已经通过基因敲除试验得到验证。而 *Aln*-ORF4 与 RED1 和 RED2 两个家族都没有同源性^[4],可以认为是 BIQ 抗生素合成中第三种类型的酮基还原酶 (RED3) (图 3)。

(2) 聚酮母核的氧化和羟化

BIQs 抗生素的吡喃环形成后的中间体上会发生聚酮的 C-6 和/或 C-8 的加氧过程。C-6 位氧化过程在 BIQ 合成过程中普遍存在 (alnumycin 除外),而 C-8 羟化或氧化在 BIQs 合成过程中也普遍存在 (美达霉素和卡拉芬净除外)。最近几年研究发现在放线紫红素基因簇中的 NAD(P)H:flavin 氧化还原酶 ActVB 通过与单加氧酶 ActVA-ORF5 形成一个双组份酶系负责 C-6 的氧化,而单加氧酶 *actVA*-ORF6 则对这个 C-6 氧化过程起补充作用^[15-16]。而在美达霉素和榴菌素基因簇中都存在 *ActVA*-ORF5/ActVB 的同源基因 (*med*-ORF7/*med*-ORF13 和 *gra*-ORF21/*gra*-ORF34),但都没有 *actVA*-ORF6 的同源基因,所以推测榴菌素和美达霉素的 C-6 氧化可能由各自双组分单加氧酶系完成。

有意思的是缺少 C-6 氧化的 alnumycin 基因簇中也有一个类似的双组分氧化酶基因对 (*alnT/alnH*),但没有 *actVA*-ORF6 的同源基因^[4],所以这

个双组分氧化酶是否可以在 alnumycin 的 C-8 进行羟化有待研究。

不过,关于双组分氧化酶在除 C-6 外位置进行氧化的推测已有以下几个实验证据:(1) 研究人员曾将放线紫红素基因簇的 *actVA* 区域导入美达霉素产生菌中,合成 C-8 氧化的美达霉素衍生抗生素^[17],说明这个区域含有可以负责 C-8 氧化的基因,但到现在还不知起主要作用的是其中的 *actVA*-ORF5 还是 *actVA*-ORF6;(2) Valton J 等进行的实验认为 *ActVA*-ORF5/*ActVB* 在放线紫红素的 C-8 的羟化中起作用^[15,18];(3) 日本学者在体外酶学实验中,以 C-6 已经氧化的卡拉芬净 (KAL) (KAL 认为可由 dihydrokalafungin 自发形成的内酯结构,图 3) 为底物时,可以检测到在 *ActVA*-ORF5/*ActVB* 催化下 KAL 的 C14-C5 间双键被氧化成环氧结构,但在体内未检测到这种环氧醌 (epoxyquinone) 物质^[16,19]。这些都说明 *ActVA*-ORF5/*ActVB* 酶系除了在 C-6 位氧化过程中起作用外,还有对于其他位点的氧化活性。这些氧化酶在体内是否会催化 C-8 还有待确定。

(3) BIQ 抗生素的聚酮母核的 C-10 修饰——糖基化、二恶烷化或二聚体化

在 BIQ 抗生素中,美达霉素和榴菌素是通过不同的 C—C 糖苷键在聚酮母核上进行糖基化修饰^[1-2,20]。在榴菌素的合成过程中,*Gra*-ORF14 作为唯一的糖基转移酶,要催化两个 C—C 键形成,将一个脱氧己糖 (4-酮基-2,6-二脱氧葡萄糖) 与聚酮母核相连:a) 脱氧己糖的 1-羟基通过 C—C 糖苷键连接到聚酮母核的 C-9 位 (糖基转移);b) 糖基的 4-酮基通过 C—C 键连接到母核的 C-10 位 (吡啶缩合)。这两步反应哪个在先哪个在后还未有结论^[2];作者课题组在研究美达霉素的 C-糖基化修饰时,通过基因敲除和多基因共表达试验推断脱氧己糖 (angolosamine, 安哥拉糖胺) 与美达霉素的聚酮母核的 C—C 连接是由糖基转移酶 *Med*-ORF8 来催化^[21-22],但具体机制还有待研究。

alnumycin 在 C-10 发生的稀有的二恶烷的修饰是由 *AlnB* 和 *AlnA* 两个酶控制完成,基因敲除以及互补试验已经证明这一点,并且表明 4-羟甲基-5-羟基-1,3-二恶烷基团是在连接到聚酮母核之前单独合成 (应该是通过赤藓醇和甲醛之间的缩醛反应)。然而二恶烷的合成和转移分别由哪个基因来控制还

没有定论。同源性分析认为 *AlnB* 属于卤酸脱卤酶家族,且具有磷酸化酶活性,说明二恶烷合成需要的底物磷酸赤藓醇的形成可能与此酶有关;而 *AlnA* 的功能还难以推定^[4]。

放线紫红素结构中的二聚体化也是发生 C-10 位置,与此位置的氧化还原状态的变化有关。以前曾推论 NAD(P)H:flavin 氧化还原酶 *ActVB* 参与二聚体化过程^[23],但现在已经有遗传数据证明 *ActVB* 主要是参与聚酮母核的氧化^[15-16]。所以哪个基因参与放线紫红素二聚体化目前还没有结论。

(4) 糖基合成

榴菌素和美达霉素基因簇中都存在参与脱氧己糖合成酶的编码基因 (图 2)。抗生素脱氧己糖的合成一般认为底物葡萄糖首先发生磷酸化,然后在不同羟基位置上发生脱氧取代,例如在榴菌素中合成了 4-酮基-2,6-二脱氧葡萄糖,而在美达霉素合成中则合成安哥拉糖胺;相应的糖基合成相关基因在各自基因簇上都能找到 (图 2)。形成的这些脱氧糖基通过 NDP 活化的形式与聚酮母核相连^[1]。作者课题组研究了美达霉素基因簇中一组糖基合成酶基因的功能,发现这组糖基合成酶系与糖基转移酶 *Med*-ORF8 共表达系统可以转化可能的聚酮母核发生安哥拉糖胺的修饰^[21,24]。

(5) 内酯化

除 alnumycin 的 C-1 发生脱羧外,BIQ 化合物按 C-1 位的结构分为两种类型:美达霉素和榴菌素等的 C-1 和 C-4 间为内酯环化,而放线紫红素和富伦菌素等的 C-1 为游离羧基。C-1 的结构与抗生素的生物学活性直接相关^[25];目前已有确切数据揭示美达霉素等 BIQ 抗生素的吡喃环并内酯结构对阻断肿瘤的信号传导是非常关键的^[5-6]。

BIQ 抗生素的内酯化过程发生在 C-4 和 C-1 羧基之间,推测经过异构互变、环化、脱氢等步骤^[26]。内酯化涉及 BIQ 分子氧化还原状态的变化,已经证明这个过程由氧气参与催化,但氧气分子并没有掺入到化合物结构中去;而是否有酶的参与一直未有确切结论。放线紫红素在提取过程中也会发生内酯化 (形成 γ -ACT),怀疑内酯化可能与分泌作用同时发生;而未知功能基因 *actII*-ORF3 很可能参与 γ -ACT 的内酯化,因为突变这个基因会导致 γ -ACT 的减少^[26-27],但具有内酯结构的美达霉素和榴菌素基因簇中并未见到 *actII*-ORF3 的同源基因^[1-2]。

3 BIQ 抗生素生物合成的调控和分泌

跟其它抗生素类似, BIQ 抗生素在链霉菌体内的生物合成受到严格调控, 并且必须及时被分泌出去, 以减少这些次级代谢产物对产生菌的毒性; BIQ 化合物基因簇中也大量存在与抗生素分泌及调控相关的基因, 反映了产生菌自身对抗生素积累的适应性:

3.1 调控因子

在已克隆的四个 BIQ 基因簇中都含有 OmpR 家族调控基因 (*actII-ORF4*、*med-ORF11*、*gra-ORF9* 和 *alnR3*), 其同源基因在其他类型的聚酮抗生素基因簇中也广泛存在, 构成一个大的链霉菌抗生素调控蛋白家族 (*streptomyces antibiotic regulatory proteins*, SARP)。以 *ActII-ORF4* 为例展开的研究表明 SARP 可以识别结合靶启动子, 激活同一基因簇中相关基因的转录。

TetR 家族调控基因也广泛分布在这几个基因簇中 (*actII-ORF1*、*alnR2* 和 *med-ORF28*)。这个家族蛋白含有保守的 DNA 识别结合结构域, 对靶基因表达多起抑制作用。已知 *ActII-ORF1* 可以识别结合靶启动子 DNA 来抑制参与分泌过程的基因 *actII-ORF2* 的表达; 但放线紫红素合成途径的一些三环的中间产物可结合在 *ActII-ORF1* 上, 使之脱离靶启动子, 从而解除对下游靶基因的表达阻遏 (而终产物放线紫红素对 *ActII-ORF1* 的结合作用则要弱一些)^[28-29]。这些中间产物对靶基因转录激活机制可能类似于信号分子的作用, 此类现象在其它抗生素合成调控中也有发现^[30-31]。

双组分调控系统在抗生素合成调控中普遍存在, 通过感应蛋白组分传递外界信号给效应蛋白组分, 从而调控靶基因的表达^[32], 这类系统在 BIQ 基因簇中也广泛存在, 如 *alnR4/alnR5*、*alnR6/alnR7* 和 *gra-ORF10/gra-ORF11*, 但还没有进行功能验证。

还有一些基因 (*actVI-ORFA*、*gra-ORF31*、*med-ORF10* 和 *aln-ORF2*) 属于未知功能蛋白家族, 它们编码的小蛋白没有明显的 DNA 结合位点, 只含有核运输因子 2 (nuclear transport factor 2, NTF2) 功能域。*actVI-ORFA* 的缺失可以明显降低放线紫红素的合成, 且一些后期修饰基因的转录水平也明显下降^[13]; 作者课题组也发现 *med-ORF10* 也能通过控

制后期修饰基因的转录来调控美达霉素合成^[21], 而且二者功能可以互补 (李爱英, 未发表), 所以推测它们可能代表一类新的调控因子, 但机制未知。

另外, 除了基因簇内部的调控因子外, 链霉菌的级联网络调控系统的复杂性决定了 BIQ 抗生素的生物合成可能会受到更多调控因子的作用。

3.2 分泌相关基因

放线紫红素基因簇中的 *actII-ORF2* 是第一个被发现参与抗生素分泌的基因。该基因编码转运膜蛋白, 与放线紫红素的分泌直接相关; 其表达受到 *ActII-ORF1* (TetR 调控蛋白家族) 的阻遏, 但放线紫红素合成途径中的一些中间产物会解除这种阻遏, 促进 *actII-ORF2* 的表达, 导致放线紫红素合成后会及时分泌到胞外, 以免引起细胞毒性^[29]。蛋白组学还鉴定了一个功能未知蛋白 *ActVI-ORF3* 可能与放线紫红素分泌有关 (以前曾认为是后期修饰基因), 因为它位于细胞壁基质中^[33]; 在其它 BIQ 基因簇中也发现有与之同源的基因 (*med-ORF5* 和 *gra-ORF18*)。还有其他基因, 如 *alnT1*、*alnT2*、*gra-ORF15* 和 *med-ORF25* 也都编码膜蛋白, 可能都参与各自抗生素的分泌^[1, 4]。

4 展望

BIQ 家族抗生素在抗菌、抗肿瘤等方面所表现出的潜力使其具有重大研究价值, 尤其是像美达霉素、卡拉芬净等内酯化的 BIQ 抗生素能有效抑制多种肿瘤细胞的发生、发展及迁移。目前临床常用的大多数肿瘤化疗药物的靶标是 DNA, 而美达霉素等则是对肿瘤细胞的信号传导起阻断作用, 而且抗肿瘤效果显著, 所以有望作为一类新颖的抗肿瘤药物得到开发。对它们生物合成过程进行分子水平上的研究, 对于新药研发会有重要的意义。

BIQ 抗生素基因簇的长度在 20 - 40 kb 之间, 相对于大环内酯类抗生素基因簇而言非常小, 遗传操作非常容易, 便于进行代谢工程改造, 所以成为组合生物合成、代谢工程研究重要的研究对象。而其中放线紫红素和美达霉素基因簇的组合表达产生了第一例杂合抗生素, 开启了组合生物合成研究的先河^[17]。以放线紫红素的 PKS 基因进行的组合生物合成研究产生了大量“非天然”的天然产物, 为抗生素代谢工程的研究奠定了理论基础; 随着 BIQ 抗生

素基因簇中的一些后期修饰基因功能的阐明, 这些基因也有可能会在抗生素代谢工程研究中得到利用, 对其它天然产物的生物合成研究也有指导作用。

然而, 在 BIQ 家族中, 尽管放线紫红素是目前生物合成研究最深入的抗生素, 但其后期修饰还没有完全了解清楚; 美达霉素的研究也只是进行了一小部分, 大多数 BIQ 抗生素的后期修饰都还未阐明, 所以后期修饰的机制研究依然是这个研究领域的重点。从不同链霉菌中克隆相关抗生素基因簇, 比较基因簇之间的同源性, 为 BIQ 家族抗生素生物合成基因的功能研究也提供了指导方向。而组学研究手段也越来越多的运用到抗生素生物合成研究中来, 在 BIQ 抗生素后期修饰基因或未知基因的功能阐明中将会发挥越来越重要的作用^[33-34]。

参考文献

- [1] Ichinose K, Ozawa M, Ito K, Kunieda K, Ebizuka Y. Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanquinone gene clusters. *Microbiology*, 2003, 149:1633-1645.
- [2] Ichinose K, Bedford DJ, Tornus D, Bechthold A, Bibb MJ, Revill WP, Floss HG, Hopwood DA. The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(11):647-659.
- [3] Itoh T, Taguchi T, Kimberley MR, Booker-Milburn KI, Stephenson GR, Ebizuka Y, Ichinose K. Actinorhodin biosynthesis: structural requirements for post-PKS tailoring intermediates revealed by functional analysis of ActVI-ORF1 reductase. *Biochemistry*, 2007, 46(27):8181-8188.
- [4] Oja T, Palmu K, Lehmussola H, Leppäranta O, Hännikäinen K, Niemi J, Mäntsälä P, Metsä-Ketelä M. Characterization of the alnumycin gene cluster reveals unusual gene products for pyran ring formation and dioxan biosynthesis. *Chemistry & biology*, 2008, 15(10):1046-1057.
- [5] Salaski EJ, Krishnamurthy G, Ding WD, Yu K, Insaf SS, Eid C, Shim J, Levin JI, Tabei K, Toral-Barza L, Zhang WG, McDonald LA, Honores E, Hanna C, Yamashita A, Johnson B, Li Z, Laakso L, Powell D, Mansour TS. Pyranonaphthoquinone lactones: a new class of AKT selective kinase inhibitors alkylates a regulatory loop cysteine. *Journal of medicinal chemistry*, 2009, 52(8):2181-2184.
- [6] Toral-Barza L, Zhang WG, Huang X, McDonald LA, Salaski EJ, Barbieri LR, Ding WD, Krishnamurthy G, Hu YB, Lucas J, Bernan VS, Cai P, Levin JI, Mansour TS, Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Discovery of lactoquinomycin and related pyranonaphthoquinones as potent and allosteric inhibitors of AKT/PKB: mechanistic involvement of AKT catalytic activation loop cysteines. *Molecular cancer therapeutics*, 2007, 6(11):3028-3038.
- [7] Malpartida F, Hopwood DA. Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular & general genetics*, 1986, 205(1):66-73.
- [8] Li A, Piel J. A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chemistry & biology*, 2002, 9(9):1017-1026.
- [9] 王以光. 抗生素生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2009:168-172.
- [10] Ichinose K, Surti C, Taguchi T, Malpartida F, Booker-Milburn KI, Stephenson GR, Ebizuka Y, Hopwood DA. Proof that the ActVI genetic region of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is involved in stereospecific pyran ring formation in the biosynthesis of actinorhodin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999, 9(3):395-400.
- [11] Li A, Itoh T, Taguchi T, Xiang T, Ebizuka Y, Ichinose K. Functional studies on a ketoreductase gene from *Streptomyces* sp. AM-7161 to control the stereochemistry in medermycin biosynthesis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2005, 13(24):6856-6863.
- [12] Taguchi T, Kunieda K, Takeda-Shitaka M, Takaya D, Kawano N, Kimberley MR, Booker-Milburn KI, Stephenson GR, Umeyama H, Ebizuka Y, Ichinose K. Remarkably different structures and reaction mechanisms of ketoreductases for the opposite stereochemical control in the biosynthesis of BIQ antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2004, 12(22):5917-5927.
- [13] Taguchi T, Okamoto S, Lezhava A, Li A, Ochi K, Ebizuka Y, Ichinose K. Possible involvement of ActVI-ORFA in transcriptional regulation of actVI tailoring-step genes for actinorhodin biosynthesis. *FEMS microbiology letters*, 2007, 269(2):234-239.
- [14] Taguchi T, Ito K, Ebizuka Y, Malpartida F, Hopwood

- DA, Surti CM, Booker-Milburn KI, Stephenson GR, Ichinose K. Chemical characterisation of disruptants of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) actVI genes involved in actinorhodin biosynthesis. *The Journal of antibiotics*, 2000, 53(2):144-152.
- [15] Valton J, Mathevon C, Fontecave M, Nivière V, Ballou DP. Mechanism and regulation of the two-component FMN-dependent monooxygenase ActVA-ActVB from *Streptomyces coelicolor*. *The Journal of biological chemistry*, 2008, 283(16):10287-10296.
- [16] Okamoto S, Taguchi T, Ochi K, Ichinose K. Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster. *Chemistry & biology*, 2009, 16(2):226-236.
- [17] Hopwood DA, Malpartida F, Kieser HM, Ikeda H, Duncan J, Fujii I, Rudd BA, Floss HG, Omura S. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature*, 1985, 314(6012):642-644.
- [18] Valton J, Fontecave M, Douki T, Kendrew SG, Nivière V. An aromatic hydroxylation reaction catalyzed by a two-component FMN-dependent monooxygenase. The ActVA-ActVB system from *Streptomyces coelicolor*. *The Journal of biological chemistry*, 2006, 281(1):27-35.
- [19] Taguchi T, Okamoto S, Hasegawa K, Ichinose K. Epoxyquinone formation catalyzed by a two-component flavin-dependent monooxygenase involved in biosynthesis of the antibiotic actinorhodin. *ChemBioChem*, 2011, 12(18):2767-2773.
- [20] 邓会群, 王惠利, 杨红, 洪华珠, 李爱英. 天然产物的 C-糖基化研究进展. *生物技术通报 (Biotechnology Bulletin)*, 2009, (5): 27-30.
- [21] 蔡晓凤. 芳香聚酮抗生素美达霉素生物合成基因的功能研究. 华中师范大学, 硕士学位论文, 2009.
- [22] 万娟, 邓会群, 张碧乾, 王蔚, 蔡晓凤, 李爱英. 分子伴侣协助下抗肿瘤抗生素美达霉素生物合成中的糖基转移酶 Med-ORF8 的原核表达. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2011, 38(2):221-227.
- [23] Cole SP, Rudd BA, Hopwood DA, Chang CJ, Floss HG. Biosynthesis of the antibiotic actinorhodin-analysis of blocked mutants of *Streptomyces coelicolor*. *The Journal of antibiotics*, 1987, 40(3):340-347.
- [24] 李爱英, 王惠利, 蔡晓凤. 安哥拉糖胺糖基合成酶及糖基转移酶多基因共表达系统的构建及其应用. 中国: ZL200910063347. X. 2009年7月29日.
- [25] Omura S, Tsuzuki K, Iwai Y, Kishi M, Watanabe S, Shimizu H. Anticoccidial activity of frenolicin B and its derivatives. *The Journal of antibiotics*, 1985, 38(10):1447-1448.
- [26] Ichinose K, Taguchi T, Ebizuka Y, Hopwood DA. Biosynthetic gene clusters of benzoisochromanquinone antibiotics in *Streptomyces* sp. -identification of genes involved in post-PKS tailoring steps. *Actinomycetologica*, 1998, 12(2):99-109.
- [27] Tahlan K, Ahn SK, Sing A, Bodnaruk TD, Willems AR, Davidson AR, Nodwell JR. Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 2007, 63(4):951-961.
- [28] Willems AR, Tahlan K, Taguchi T, Zhang K, Lee ZZ, Ichinose K, Junop MS, Nodwell JR. Crystal structures of the *Streptomyces coelicolor* TetR-like protein ActR alone and in complex with actinorhodin or the actinorhodin biosynthetic precursor (S)-DNPA. *Journal of molecular biology*, 2008, 376(5):1377-1387.
- [29] Tahlan K, Yu Z, Xu Y, Davidson AR, Nodwell JR. Ligand recognition by ActR, a TetR-like regulator of actinorhodin export. *Journal of molecular biology*, 2008, 383(4):753-761.
- [30] 刘明, 李爱英. 群感效应与链霉菌次生代谢调控. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51(5):571-578.
- [31] Wang L, Tian X, Wang J, Yang H, Fan K, Luan Z, Qian D, Tan H. Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106:8617-8622.
- [32] 宫彩霞, 李爱英. 链霉菌次生代谢中双因子调控系统的研究进展. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2010, 37(6):904-911.
- [33] Hesketh A, Chandra G, Shaw AD, Rowland JJ, Kell MJ, Bibb MJ, Chater KF (2002). Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2002, 46:917-932.
- [34] Kim SH, Lee HN, Kim HJ, Kim ES. Transcriptome analysis of an antibiotic downregulator mutant and synergistic actinorhodin stimulation via disruption of a precursor flux regulator in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5):1872-1877.

Biosynthesis of benzoisochromanquinones antibiotics from streptomycetes—A review

Wei Wang^{1, 2}, Huili Wang^{2, 3}, Aiyong Li^{1, 2*}

¹ College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

² Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

³ School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

Abstract: Benzoisochromanquinones antibiotics, a group of bioactive polyketide compounds with aromatic polyketide skeletal cores, are accumulated in streptomycetes. The biosynthesis of benzoisochromanquinones antibiotics has triggered great interest because they not only represent model biosynthetic mechanisms of aromatic polyketide skeletal structures, but also possess a variety of tailoring modifications rendering them highly structural and bioactive diversity. Here we reviewed important advances in biosynthesis of benzoisochromanquinones antibiotics in recent 25 years with focusing on the modification mechanisms of these compounds and on the prospects of the metabolic engineering and pharmaceutical discovery of benzoisochromanquinones antibiotics.

Keywords: benzoisochromanquinones, aromatic polyketides, biosynthesis, structural modification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770036, 31170050), by the Fundamental Research Funds For the Central University (CCNU10A02011) and by the Public Benefit Project of Zhejiang Science and Technology Department (2011C23114)

* Corresponding author. Tel: +86-27-67862431; E-mail: ayli@mail.cenu.edu.cn

Received: 14 November 2011/Revised: 18 January 2012

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2012 年 5 月统计

| 时间 | 刊期 | 卷号 | 期号 |
|-------------|---------|---------|--------|
| 1953 - 1956 | 半年刊 | 1 - 4 | 1 - 2 |
| 1957 - 1958 | 季刊 | 5 - 6 | 1 - 4 |
| 1959 | 季刊 | 7 | 1 - 2 |
| 1959 - 1962 | 停刊 3 年 | | |
| 1962 | 季刊 | 8 | 3 - 4 |
| 1963 - 1965 | 季刊 | 9 - 11 | 1 - 4 |
| 1966 | 季刊 | 12 | 1 - 2 |
| 1966 - 1972 | 停刊 6 年半 | | |
| 1973 - 1988 | 季刊 | 13 - 28 | 1 - 4 |
| 1989 - 2007 | 双月刊 | 29 - 47 | 1 - 6 |
| 2008 - 2011 | 月刊 | 48 - 51 | 1 - 12 |
| 2012 | 月刊 | 52 | 5 |