

Streptomyces sahachiroi ATCC 33158 中孢子色素合成基因簇 (*sah*) 的鉴定

李华, 王利娟, 何璟*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要: 【目的】*Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 全基因组测序后, 通过生物信息学分析找到一个 II 型聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 基因簇 *sah*。我们通过基因敲除和异源表达的方法对 *sah* 的生物学功能进行了研究。【方法和结果】对 *sah* 基因簇 ORF (open reading frame) 进行分析后发现, 除了一个额外的氧甲基转移酶基因 *sahI* 以外, 该基因簇与天蓝色链霉菌中负责孢子色素合成的基因簇 *whiE* 具有很高的相似性。将 *sah* 中负责后修饰的 3 个基因 *sahG*、*sahH* 和 *sahI* 分别敲除后, 发现孢子色素的颜色随之发生明显的变化。将 *sah-minimal* PKS 基因和 *whiE-minimal* PKS 基因分别导入变铅青链霉菌 ZX1 中进行异源表达, 高效液相色谱及液质联用分析证实它们产生相同的水溶性红色色素物质。【结论】*sah* 与 *whiE* 基因簇具有相似的生物学功能, 负责链霉菌孢子色素的合成。这两个基因簇所合成的孢子色素具有相同的母核, 差别在于 *sah* 基因簇中多了一个编码氧甲基转移酶的后修饰基因, 这可能是导致两种链霉菌孢子颜色上有细微差别的原因。

关键词: *S. sahachiroi* ATCC 33158, II 型聚酮合酶, 基因中断, 异源表达, 孢子色素合成

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 10-1210-09

微生物可以产生多种色素, 如放线紫红素、灵菌红素和黑色素等^[1]。这些色素大部分具有一定的生物学功能和实用价值, 如维持微生物的疏水活性、维持细胞膜的稳定性、吸附重金属离子、抗菌等^[2]。革兰氏阳性菌放线菌目的链霉菌科普遍能够产生一种功能未知的孢子色素^[3-4]。这种孢子色素长期以来被认为是链霉菌分类的重要依据, 同时也是判断其孢子成熟与否的重要指标^[5]。在链霉菌中这种孢子色素与孢子壁紧密结合, 无法用常见的有机试剂对其进行萃取。所以对孢子色素及其基因簇的相关研究也较少, 其结构和功能至今未知。

第一个被报道的链霉菌孢子色素合成基因簇是天蓝色链霉菌 A3 (2) 的孢子色素合成基因簇^[6]。Hopwood 等通过基因突变, 获得了一个只影响孢子色素产生但不影响产孢的突变株, 命名为 *whiE*。经定位、测序及生物信息学分析, 发现此基因簇属于 II 型聚酮合酶基因簇, 包含有负责聚酮链起始、延伸和终止的最小 PKS (minimal PKS, 包括酮基合成酶 α 亚基 (KS α)、酮基合成酶 β 亚基 (KS β) 和酰基载体蛋白 (ACP))、负责碳链环化的环化酶和芳香化酶以及负责后修饰的羟化酶和单氧化酶^[7]。在天蓝色链霉菌 A3 (2) 孢子色素基因簇中存在两个与孢

基金项目: 国家自然科学基金 (30800020, 30970059); 教育部留学回国人员科研启动基金 ([2009] 1590); 教育部新世纪人才支持计划项目 (NCET-08-0779); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2009PY006)

* 通信作者。Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@ yahoo.com

作者简介: 李华 (1986-), 女, 山西吕梁人, 2009 级硕士研究生, 研究方向为微生物天然产物的生物合成。E-mail: lh861218@163.com

收稿日期: 2012-04-20; **修回日期:** 2012-05-21

子分化调控相关的启动子 *whiEP1* 和 *whiEP2*, 其调控作用使孢子色素只在气生菌丝形成孢子丝的过程中合成^[5,8]。另据相关文献报道, 天蓝色链霉菌 A3 (2) 中负责孢子色素合成和负责放线紫红素合成的 minimal PKS 在一定程度上可以互补^[9-10], 在早期进化中, 抗生素聚酮合酶与孢子色素聚酮合酶有着共同的祖先^[11-12]。有研究人员通过异源表达 *whiE* 的部分基因簇, 得到了许多疑似天蓝色链霉菌孢子色素合成过程中的中间体^[13]。

以 *whiE*-ORFI (单氧化酶)、ORFIII ($KS\alpha$) 和 ORFVII (芳香化酶) 为探针通过 Southern 杂交方法检测链霉菌菌株发现约一半链霉菌具有与 *whiE* 同源的孢子色素合成基因簇^[5]。据此推测这些链霉菌孢子色素是由与 *whiE* 类似的 II 型聚酮合酶基因簇催化合成的, 他们在结构上具有相同的母核。不同的链霉菌具有不同的孢子颜色, 如天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌具有灰色孢子, 而 *S. halstedii* 孢子呈绿色^[14]。这些颜色差异可能由孢子色素合成中后修饰反应的不同所致。Chater 等通过扫描电镜观察发现孢子色素存在与否对天蓝色链霉菌 A3 (2) 的孢子形态并无影响^[5], 说明孢子色素合成基因簇可能只负责孢子色素的合成, 而与孢子的形成和分化无关^[4]。

夏焕章等在对麦迪霉素产生菌 *S. mycarofaciens* 1748 的研究中发现在负责其孢子色素合成的 II 型聚酮合酶基因簇 10 kb 以外存在一个与孢子色素合成密切相关的酮基还原酶^[15]。Nobutaka Funa 指出在灰色链霉菌中, 孢子色素是由 III 型聚酮合酶负责合成的^[16]。这表明其他链霉菌中孢子色素的合成有可能通过不同于 *whiE* 编码的 II 型聚酮合酶合成途径的其它途径合成。

前期我们在 *S. sahachiroi* ATCC33158 中克隆到一个 $KS\alpha$ 基因 *sahA*, 中断该基因后孢子的颜色发生了明显的变化。通过生物信息学分析, 在该链霉菌的基因组序列中找到了一个包含有 *sahA* 基因的 II 型聚酮合酶基因簇, 命名为 *sah*。通过基因中断及异源表达的方法, 对 *sah* 基因簇的功能进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 菌株 *S. sahachiroi* ATCC 33158

购自 American Type Culture Collection (ATCC); 克隆宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、接合转移供体菌大肠杆菌 S17-1 由本室收藏; 变铅青链霉菌 ZX1 由本室收藏; 自杀型载体 pOJ260 由本室收藏^[17]; 异源表达载体 pWS052 和 pWHM4S 由本实验室王珊构建。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌培养基为 LA 固体和 LB 液体培养基, 链霉菌培养基为 TSB、modified ISP-4、MS、PS5、R5 等^[18]。

1.1.3 主要试剂和仪器: 实验中所用抗生素购自 Sigma 公司。限制性内切酶购自 Fermentas 公司, T4DNA 连接酶和 KOD DNA 高保真聚合酶购自 TOYOBO 公司。DNA marker 和 rTaq DNA 聚合酶购自东盛生物科技有限公司。普通 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEM 公司。R5 专用琼脂、TSB 购自 B&D 公司, TES free acid 购自 Promega 公司。所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 测序反应由华大基因公司负责。HPLC 色谱柱: Dikma Technologies 公司的 Diamonsil C18 (2) 5U 250 mm \times 4.6 mm; 高效液相色谱仪: Waters 公司 e2695/2998; LCMS: API2000 LC/MS/MS; 色谱纯试剂购自默克化工。

1.2 分子生物学方法

常见分子生物学方法见参考文献 [19]。PCR 反应为降落 PCR: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s (每个循环退火温度减少 1 $^{\circ}$ C, 直至 18 个循环以后, 保持 52 $^{\circ}$ C 退火 10 个循环), 68 $^{\circ}$ C 延伸。引物序列见表 1。

1.3 链霉菌操作方法

孢子的培养、观察和收取、计数、大肠杆菌与链霉菌属间接合转移 (*S. sahachiroi* ATCC 33158 供体大肠杆菌为 S17-1 菌株)、PEG 介导的质粒向链霉菌的原生质体转化 (*S. lividans* ZX1) 和链霉菌质粒的抽提见参考文献 [18]。

1.4 同框缺失及回补菌株的构建

在目标基因 *sahG*、*sahH* 和 *sahI* 的上下游 2-3 kb 内设计带有酶切位点的引物 (见表 1), 通过 PCR 扩增得到同源交换的左臂和右臂, 酶切后与处理好的自杀型载体 pOJ260 连接, 获得同框缺失质粒 pMSBFAY2 (Δ *sahG*)、pMSBFAY3 (Δ *sahH*) 和 pMSBFAY4 (Δ *sahI*)。分别转化到大肠杆菌 S17-1 中, 得到接合转移的供体菌 S17-1 / pMSBFAY2、S17-1 / pMSBFAY3 和 S17-1 / pMSBFAY4, 然后与受体菌

S. sahachiroi 的孢子进行接合转移, 获得具有安普拉霉素抗性的单交换突变株。松弛培养多代后筛选对安普拉霉素敏感的双交换突变菌株。同框缺失质

粒左右臂以及双交换突变株中缺失区域的大小如表 2 所示。获得双交换突变株后提取其总 DNA, 通过 PCR 验证其基因型。

表 1 克隆所用引物

Table 1 The primers in the study

Primers	Restriction sites	Sequence (5'→3')	Purpose
HydLF	<i>Hind</i> III	AAAAAGCTTGCAGACGGGCGGGCGTAGGACT	
HydLR	<i>Xba</i> I	AAATCTAGACGGACCACCTGACCCAGCCGCTCACGC	
HydRF	<i>Xba</i> I	AAATCTAGACGTGTGATCACCCGCGTGGTTCATAC	
HydRR	<i>Eco</i> RI	AAAGAATTCCTGTAACGCCCGCTCCAGATAC	
MonLF	<i>Hind</i> III	AAAAAGCTTCTGGCGTTCACCTGCTCTGTCA	
MonLR	<i>Xba</i> I	AAATCTAGACTGCTCGGTGGTTCGAAACACGCTC	
MonRF	<i>Xba</i> I	AAATCTAGACTGCTCGACCTCGCCCGGATGGACC	In-frame deletion
MonRR	<i>Eco</i> RI	AAAGAATTCCTGTCAGGATCACCCGGGACTGAAACC	
MetLF	<i>Hind</i> III	AAAAAGCTTATCCCGCCACCCCAATGTCTTC	
MetLR	<i>Xba</i> I	AAATCTAGATTGACTGCACCGTCCCGCCTGAC	
MetRF	<i>Xba</i> I	AAATCTAGACGTGATGTGCGCCTTCTTCCATC	
MetRR	<i>Eco</i> RI	AAAGAATTCGGACGCGTGCTCCAGAAGTGCCTGTG	
HydFE	<i>Eco</i> RI	ATAGAATTCACAGCCAGCAGCAGCCTCCTTAGC	
HydRX	<i>Xba</i> I	AAATCTAGACACCCGACACCCGCCCCAGGA	
MonFB	<i>Bam</i> HI	AAAGGATCCATGCGTGGCAGGCCGTCAGTT	
MonRE	<i>Eco</i> RI	TTTGAATTCGTCGTTCTCCGCTGGTGTGTA	complementation
MetFE	<i>Eco</i> RI	AATGAATTCGGCGGCGTCTTACCTCTGG	
MetRB	<i>Bam</i> HI	AAAGGATCCCACAGCCGCCACCAGCACAC	
MKSFS	<i>Spe</i> I	AAAAGTACTGACGCGGCCGAGGTCCGCTCAT	
MKSRX	<i>Xba</i> I	TTTTCTAGACCCGATTTACAGGCTCCTGCCAGA	
EXF	<i>Xba</i> I	AAATCTAGAGATCTCGTTGTCGCTGTGCCCT	Heterologous expression
ESR	<i>Spe</i> I	AAAAGTACTCCGCGGCCGAGGTGCTGTCAT	

通过 PCR 扩增 *sahG*、*sahH* 和 *sahI* 基因 (包括 RBS 位点), 引物序列见表 1。酶切后分别连接到处理好的质粒 pWS052 (在链霉菌整合型载体 pSET152 多克隆位点处克隆有组成型启动子 P_{emE}) 中, 获得质粒 pMSBFAY7 (*sahG*)、pMSBFAY8 (*sahH*) 和

pMSBFAY9 (*sahI*)^[17]。转化到供体菌 S17-1 后, 分别与对应的缺失中断株 (Δ *sahG*、 Δ *sahH* 和 Δ *sahI*) 进行接合转移, 获得回补菌株 Δ *sahG*::*sahG*、 Δ *sahH*::*sahH* 和 Δ *sahI*::*sahI*。获得的接合子通过 PCR 进行验证。

表 2 同框缺失质粒及菌株信息

Table 2 The information of in-frame deletion plasmids and mutant strains

Gene	Function	Deletion region /bp	Left arm /bp	Right arm /bp	In-frame deletion mutants	PCR products /bp	
						Wild	Mutants
<i>sahG</i>	hydroxylase	1752	2245	2237	Δ <i>sahG</i>	2222	470
<i>sahH</i>	monooxygenase	1041	2222	1811	Δ <i>sahH</i>	2237	1196
<i>sahI</i>	O-methyltransferase	999	1529	1484	Δ <i>sahI</i>	3018	2019

1.5 异源表达载体的构建

通过 PCR 扩增约 3 kb 的 *sah-minimal* PKS (引物 MKSFS 和 MKSRX) 和 *whiE-minimal* PKS (引物 EXF 和 ESR) 基因片段, 酶切后分别连接到处理好的链霉菌表达载体 pWHM4S (在链霉菌自主复制型高拷贝表达载体 pWHM4* 多克隆位点克隆有接合转移元件 *oriT*) 上, 命名为 pMSBFAY5 和

pMSBFAY6。检测正确后与空载 pWHM4S 分别通过原生质体转化导入 *S. lividans* ZX1 进行异源表达。

1.6 异源表达菌株的发酵及检测

分别取一定量的孢子接种于含有 12.5 μ g/mL 硫链丝菌素的 MS 平板上, 30 $^{\circ}$ C, 培养 11 d。将培养基切碎置于三角瓶中, 加入等体积的萃取剂 (乙酸乙酯/乙酸/甲醇 = 80:15:5) 萃取 2-3 h 后, 过滤收

集萃取液,无水硫酸钠除水后过滤,置于真空旋转蒸发仪中除去有机溶剂后,保存于 -20°C 。HPLC检测之前溶解于1-3 mL 甲醇。HPLC检测条件:25% CH_3CN 0.1% HAc 、流速1 mL/min、280 nm 检测。质谱检测条件为:离子化ESI、正离子模式、扫描范围 m/z 50-500。

1.6.1 生物信息学所用分析工具:序列比对和引物设计所用软件为DNASTAR,开放阅读框的预测和分析使用FramePlot 4.0 beta* (<http://nocardia.nih.gov.jp/fp4/>),序列功能预测及分析借助NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)来完成。

2 结果和分析

2.1 *sah* 基因簇功能的预测和分析

在对 *S. sahachiroi* 全基因组序列进行分析的过程中,发现了一个典型的II型聚酮合酶生物合成基因簇,命名为 *sah* (GenBank accession number JQ951949),大小为8.42 kb,包含有九个ORF,如图

1所示。*sah* 基因簇与天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) A3(2)中已报道的孢子色素合成基因簇 *whiE* 具有很高的相似性,其中8个ORF在氨基酸序列上的相似度都达到59%以上。*sahA*、*sahB*和*sahC*与*whiE*-ORFIII、ORFIV和ORFV具有较高的同源性,分别编码II型聚酮合酶的 $\text{KS}\alpha$ 、 $\text{KS}\beta$ 和ACP,组成minimal PKS负责催化聚酮链碳骨架的形成。而*sahD*、*sahE*和*sahF*分别与*whiE*-ORFII、ORFVI和ORFVII具有同源性,所编码的3个环化酶负责碳链的芳香化和环化。羟化酶基因(*sahG*)和单氧化酶基因(*sahH*)与*whiE*-ORFI和ORFVIII同源。此外*sah*基因簇还包含有一个O-甲基转移酶基因*sahI*,而天蓝色链霉菌的孢子色素合成基因簇*whiE*中并没有出现类似的同源基因。*sahI*是否属于*sah*基因簇参与孢子色素的合成还有待于进一步的研究。综上生物信息学分析的结果,推测*sah*可能负责*S. sahachiroi*中II型聚酮化合物类孢子色素的生物合成。在其它链霉菌如*S. avermitilis*、*S. aureofaciens*、*S. halstedii*和*S. curacoii*中均发现有类似的基因簇存在^[3, 15, 20-21]。

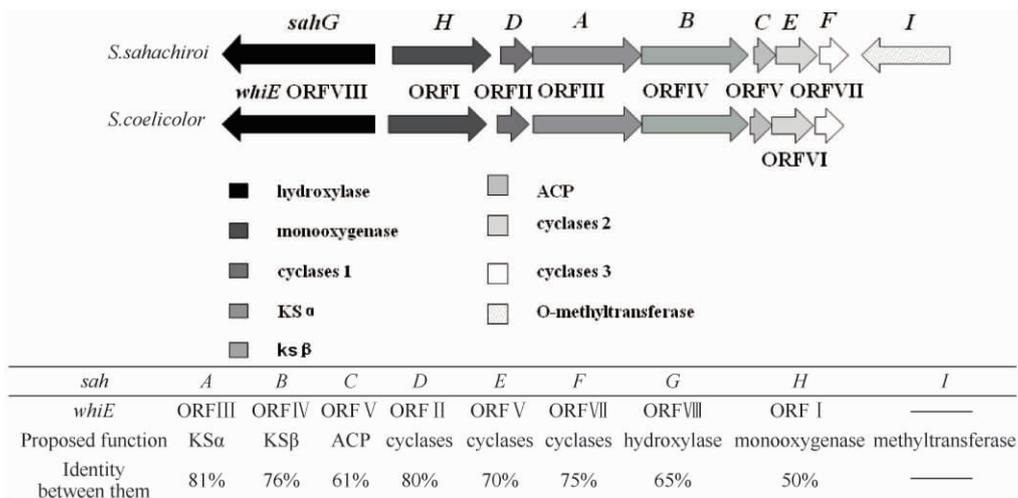


图1 *sah* 与 *whiE* 中基因组成和排布的比较

Fig.1 Genetic organization of the *sah* cluster in *S. sahachiroi* and the *whiE* cluster in *S. coelicolor* A3(2).

据报道,孢子色素合成基因簇中的后修饰基因对孢子颜色有较大的影响^[5]。为了验证3个可能的后修饰基因*sahG*、*sahH*和*sahI*对孢子颜色的影响,我们通过同框缺失的方法对这3个基因的功能进行了研究。

2.2 *sahG* 的缺失和互补

sahG 基因编码的蛋白与 *whiE*-ORFI 的同源性达65%,具有典型的羟化酶功能结构域,包括保守

的脱氢/还原酶家族的特征位点,属于NADB_Rossmann超家族。推测其可能有两种功能:(1)聚酮类抗生素的羟化;(2)芳香族化合物的分解。这类羟化酶的N末端形成 β - α - β 折叠,是FAD中ADP的绑定位点,依赖于FAD和NADPH。氧四环素和特曲霉素生物合成基因簇中的羟化酶都属于这一类型^[21]。为了验证该基因功能,我们构建了同框缺失载体pMSBFAY2。通过接合转移导入*S. sahachiroi*

中,最后筛选得到双交换突变菌株 $\Delta sahG$,如图2。通过PCR的方法对双交换突变株的基因型进行了验证(图3-A)。对比观察野生型 *S. sahachiroi* 和突变菌株 $\Delta sahG$,发现野生型菌株的孢子为深铅棕色,而 *sahG* 缺失后孢子的颜色变为绿色,如图4。为了

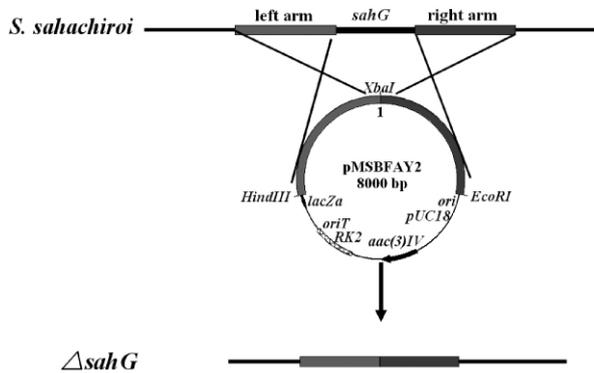


图2 通过同源双交换获得同框缺失突变菌株

Fig. 2 Construction of the in-frame deletion mutant strain $\Delta sahG$.

排除极性效应而进行了回补实验,将克隆有 *sahG* 的表达质粒 pMSBFAY7 导入突变菌株 $\Delta sahG$ 后得到回补菌株 $\Delta sahG::sahG$, $\Delta sahG::sahG$ 孢子颜色恢复到野生型表型,从而证明单个基因 *sahG* 的缺失可以使孢子颜色变为绿色。

2.3 *sahH* 的缺失和互补

sahH 基因编码的蛋白与 *whiE*-ORFVIII 同源性达 59%,具有抗生素生物合成单氧化酶 pfam03992 结构域,属于 cupin 超家族,是一个苯醌形成后修饰过程中的新家族^[22]。其功能与 RppA 类 III 型聚酮合酶合成 THN 后进一步氧化形成淡黄霉素的单加氧酶 MomA 一致,需要有氧化还原活性的二价金属离子作为辅基^[16]。为了研究 *sahH* 基因的功能,构建了同框缺失载体 pMSBFAY3,通过接合转移导入 *S. sahachiroi* 得到双交换突变菌株 $\Delta sahH$,发现 *sahH* 缺失后孢子的颜色变浅,为米黄色,如图4。回补 *sahH* 基因后得到回补菌株 $\Delta sahH::sahH$,其表型恢复到野生型的孢子颜色。

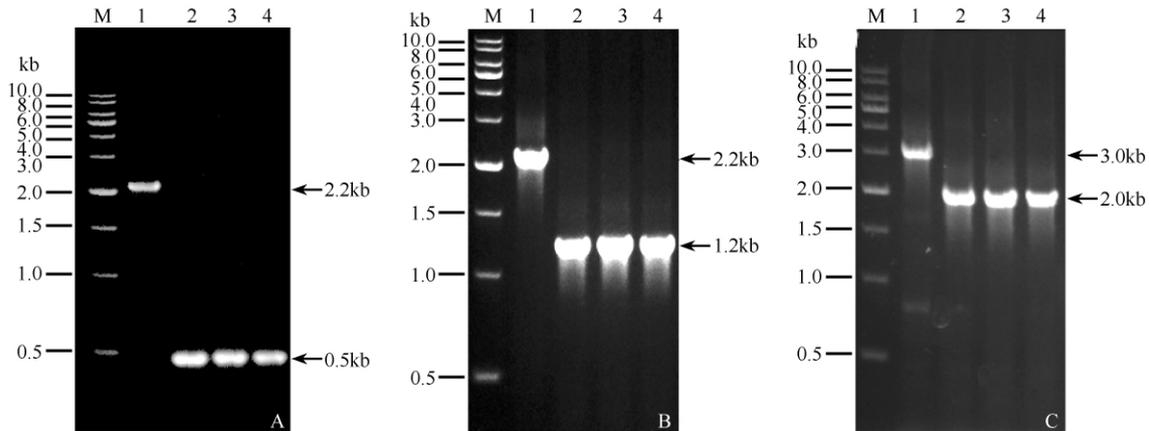


图3 同框缺失突变菌株的PCR验证

Fig. 3 PCR confirmation of *sahG*(A), *sahH*(B) or *sahI*(C) gene deletion in the genome of mutant strains. Lane1: total DNA of *S. sahachiroi* as template; Lane2-4: total DNA of mutant strains as templates; Lane M: 1 kb DNA ladder.

2.4 *sahI* 的缺失和互补

sahI 位于环化酶基因 *sahF* 下游,与其它已经报道的氧甲基转移酶有着很高的同源性,属于依赖于 S 腺苷甲硫氨酸的甲基转移酶 2 家族 (Methyltransf_2)。在天蓝色链霉菌的孢子色素合成基因簇 *whiE* 中没有找到同源基因,目前尚无法确定这个基因是否属于孢子色素合成基因簇。因此,我们通过构建该基因的同框缺失载体 pMSBFAY4,利用接合转移

导入 *S. sahachiroi* 中,得到了双交换突变菌株 $\Delta sahI$ 。*sahI* 缺失后孢子的颜色变浅,为棕色,如图4,回补该基因后得到菌株 $\Delta sahI::sahI$,其孢子颜色恢复到与野生型相同。实验结果表明 *sahI* 基因属于 *sah* 基因簇,这个甲基转移酶的缺失会引起孢子颜色的改变,在孢子色素的后修饰过程中起着重要的作用。

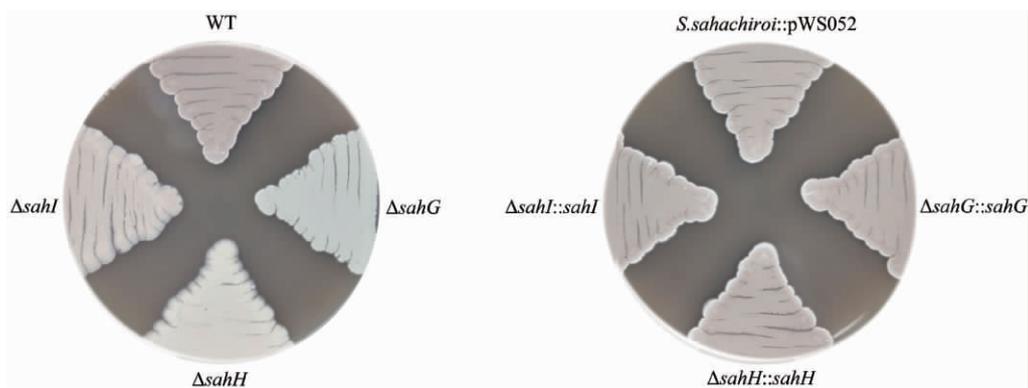


图4 同框缺失突变菌株和回补菌株的表型观察

Fig. 4 Phenotype of in-frame deletion mutants and complementation mutants.

2.5 *sah*-minimal PKS 在 *S. lividans* ZX1 中的异源表达

为了探究 *sah* 合成产物的母核结构, 我们对 *sah*-minimal PKS 基因进行了克隆和异源表达实验。将包含有 *sah*-minimal PKS 的片段克隆到含有组成型启动子 P_{ermE} 的整合型表达载体 pWS052 上, 导入 *S. lividans* ZX1 进行异源表达, 未观察到明显的表型变化。推测可能是由于基因拷贝数低, 表达的蛋白量较少, 导致其合成的化合物达不到检测水平。因此, 又尝试将 *sah*-minimal PKS 克隆到高拷贝游离型表达载体 pWHM4S (同样含有组成型启动子 P_{ermE}) 中, 获得质粒 pMSBFAY5, 导入异源表达宿主 ZX1 进行表达。以空载体和克隆有 *whiE*-minimal PKS 基因的质粒 pMSBFAY6 为对照。发现异源表达菌株 ZX1/pMSBFAY5 和 ZX1/pMSBFAY6 均可产生一种水溶性的红棕色色素, 而含有空载体的对照没有出现颜色变化, 如图 5。该色素性物质由基质菌丝产生, 分泌后可在培养基中扩散。

2.6 异源表达产物的 HPLC 和 LC-MS 分析

为了选择色素产量最高的培养基用于提取分析, 尝试了 2CM、MS、YD、YMS、GYM、YPD、SPA、M10、2XYT、MISP4、SC 这十一种培养基, 发现异源表达菌株在这些培养基上都可产红色色素, 但是在 MS 上的产量明显高于其它培养基。

HPLC 分析显示两个异源表达菌株的峰型完全相同, 与对照菌株相比都含有多个额外的吸收峰 (图 5), 可能为红色色素物质中的不同成分。据文献报道 *whiE*-minimal PKS 在敲除了孢子色素合成基因簇的天蓝色链霉菌 YU105 中表达后可以产生一系列聚酮类化合物^[13, 23-24]。LC-MS 检测发现在正

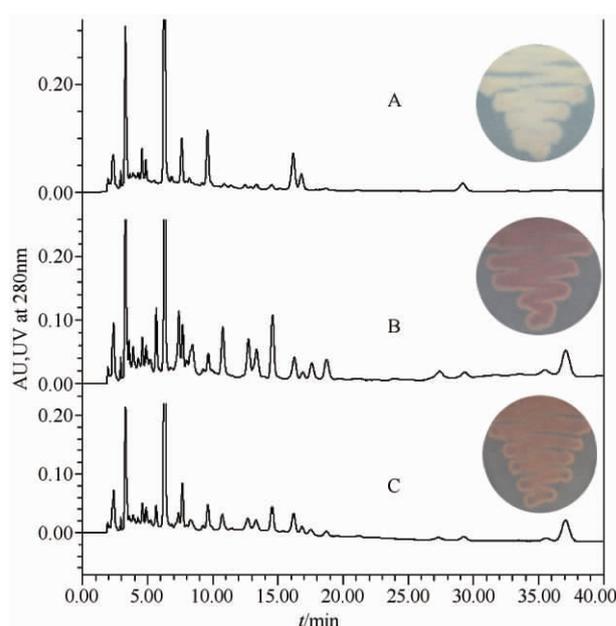


图5 异源表达菌株的表型观察和 HPLC 分析

Fig. 5 Phenotype and HPLC analysis of the *sah* minimal PKS (B) and *whiE* minimal PKS (C) expression in heterologous host *S. lividans* ZX1. *S. lividans* ZX1/pWHM4S (A) was also detected as the negative control strain.

离子加氢模式下, 可以找到文献报道的多个化合物的荷质比 (保留时间 11.9 min 处为 TW93d ($m/z = 468.11$) 和 TW95a ($m/z = 450.1$), 保留时间 13.4 min 处为 TW93d ($m/z = 468.11$) 和 TW95a ($m/z = 450.1$), 保留时间 14.7 min 处为 TW93b ($m/z = 408.09$) 和 TW93h ($m/z = 486.12$), 保留时间 18.5 min 处为 TW93c ($m/z = 464.08$)、TW93h ($m/z = 486.12$) 和 TW95b ($m/z = 464.07$)) (物质结构见参考文献 [13, 23-24])。而在含有空载体的对照菌株中未检测到以上的荷质比。产物准确的化学结

构解析还有待于进一步 NMR 检测。异源表达产物的分析进一步证明了 *sah* 与 *whiE* 的 minimal PKS 具有很高的相似度,它们所编码的孢子色素物质可能具有相同的碳骨架。

3 讨论

本研究通过基因敲除和异源表达等方法证明了从 *S. sahachiroi* 中找到的 II 型聚酮合酶基因簇 (*sah*) 负责合成该链霉菌的孢子色素。基因簇 *sah* 的排布与典型的负责合成抗生素的 II 型聚酮合酶基因簇极其相似^[7]。*sahA*、*sahB* 和 *sahC* 编码 II 型聚酮合酶的 KS α 、KS β 和 ACP,是负责碳骨架延伸的 minimal PKS,而 *sahD*、*sahE* 和 *sahF* 所编码的 3 个环化酶负责聚酮链合成后相应的环化和芳香化。其中 *sahE* 与其它芳香族抗生素合成途径中的早期环化酶具有较高的同源性,可能催化第一个环的形成。*sahD* 和 *sahF* 与特曲霉素生物合成过程中环化酶 *tcmJ* 和 *tcmI* 同源,可能是继 *sahE* 后发挥作用的环化酶。然后由后修饰酶 *sahG*、*sahH* 和 *sahI* 对聚酮化合物进行羟化、氧化和甲基化。

在孢子色素合成基因簇中,后修饰基因的组成和表达量的不同可能是导致孢子色素颜色各异的主要原因^[5]。羟化酶基因 *sahG* 敲除后,*S. sahachiroi* 孢子颜色由野生型的深铅棕色变为绿色,而在 *S. halstedii* 的孢子色素合成基因簇 *sch* 中,该基因的缺失会使孢子颜色从绿色变为紫色。表明羟化酶对孢子的颜色有着很显著的影响。有报道指出,单加氧酶基因的超量表达会造成色素在菌丝体中的沉积,而中断该基因后色素便会扩散到培养基中^[7]。推断单加氧酶基因可能与孢子色素锚定到孢子壁有关。但是在本研究中,敲除单加氧酶基因 *sahH* 只引起孢子颜色的改变,并没有观察到任何孢子色素扩散到培养基中的现象,推测孢子色素的外排可能需要其它的诱导因素。本研究还发现一个独特的后修饰基因 *sahI*,通过同框缺失实验可以观察到 *sahI* 对孢子的颜色影响最小,推测这个基因所编码的氧甲基转移酶可能参与孢子色素合成后修饰过程中的最后一步反应。由于链霉菌孢子色素从未被成功提取,所以对其具体结构及生物合成的研究工作还存在很多未解答的问题。

据文献报道 *whiE*-minimal PKS 与放线紫红素的

act-minimal PKS 能够相互替换,*act* 基因簇中的环化酶可以作用于 *whiE*-minimal PKS 合成的聚酮骨架,使其环化形成较为稳定的结构^[9, 10]。本研究中用于 *sah*-minimal PKS 异源表达的宿主 *S. lividans* ZX1 本身就含有孢子色素合成基因簇和 *act* 基因簇。这些 II 型聚酮合酶基因簇中的环化酶和后修饰酶可能会与 *sah*-minimal PKS 和 *whiE*-minimal PKS 所合成的产物发生作用,使得聚酮化合物通过不同的环化和后修饰过程形成结构各异的复合产物,所以我们在异源表达菌株中发现的红色色素实际上包含十几种不同的化合物,所以相对而言每个化合物的产量较低,导致分离、纯化及结构鉴定工作存在较大的困难,这部分工作仍在进行中。

参考文献

- [1] Venil CK, Lakshmanaperumalsamy P. An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 2009, 5 (3) :49-61.
- [2] Mitchell C, Iyer S, Skomurski JF, Vary JC. Red Pigment in *Bacillus Megaterium* Spores. *Applied Environmental and Microbiology*, 1986, 52 (1) :64-67.
- [3] Bergh S, Uhlen M. Analysis of a Polyketide Synthase-encoding Gene Cluster of *Streptomyces curacoi*. *Gene*, 1992, 117 (1) :131-136.
- [4] Novakova R, Bistakova J, Kormanec J. Characterization of the Polyketide Spore Pigment Cluster *whiESa* in *Streptomyces aureofaciens* CCM3239. *Archives of microbiology*, 2004, 182 (5) :388-395.
- [5] Davis NK, Chater KF. Spore Colour in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) Involves the Developmentally Regulated Synthesis of a Compound Biosynthetically Related to Polyketide Antibiotics. *Molecular Microbiology*, 1990, 4 (10) :1679-1691.
- [6] Chater KF. A Morphological and Genetic Mapping Study of White Colony Mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 1972, 72 (1) :9-28.
- [7] 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*, 1995, 141 (Pt 11) :2779-2791.
- [8] Kelemen GH, Brian P, Flardh K, Chamberlin L, Chater KF, Buttner MJ. Developmental Regulation of Transcription of *whiE*, a Locus Specifying the Polyketide Spore Pigment in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (9) :2515-2521.

- [9] Lee TS, Khosla C, Tang Y. Engineered Biosynthesis of Aklanonic Acid Analogues. *Journal of American Chemistry Society*, 2005, 127(35):12254-12262.
- [10] Lee TS, Khosla C, Tang Y. Orthogonal Protein Interactions in Spore Pigment Producing and Antibiotic Producing Polyketide Synthases. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(10):663-666.
- [11] Blanco G, Brian P, Pereda A, Méndez C, Salas J, Chater K. Hybridization and DNA Sequence Analyses Suggest an Early Evolutionary Divergence of Related Biosynthetic Gene Sets encoding Polyketide Antibiotics and Spore Pigments in *Streptomyces* spp. *Gene*, 1993, 130(1):107-116.
- [12] Komaki H, Harayama S. Sequence Diversity of Type-II Polyketide Synthase Genes in *Streptomyces*. *The Society for Actinomycetes Japan*, 2006, 20(2):42-48.
- [13] 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*, 1999, 96(7):3622-3627.
- [14] Blanco G, Pereda A, Brian P, Méndez C, Chater KF, Salas JA. A Hydroxylase-like Gene Product Contributes to Synthesis of a Polyketide Spore Pigment in *Streptomyces halstedii*. *Journal of bacteriology*, 1993, 175(24):8043-8048.
- [15] Xia H, Wang Y. A ketoreductase Gene from *Streptomyces mycarofaciens* 1748 DNA Involved in Biosynthesis of a Spore Pigment. *Science in China, Ser. C*, 1997, 40(6):636-641.
- [16] Funa N, Ohnishi Y, Fujii I, Shibuya M, Ebizuka Y, Horinouchi S. A New Pathway for Polyketide Synthesis in Microorganisms. *Nature*, 1999, 400(6747):897-899.
- [17] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno E, Nagaraja Rao R, Schoner B. Plasmid Cloning Vectors for the Conjugal Transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116(1):43-49.
- [18] Hopwood D, Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K. Practical *Streptomyces* Genetics. UK: The John Innes Foundation, 2000.
- [19] Sambrook J FE, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [20] 朱娟娟, 陶美凤. 阿维链霉菌孢子色素生物合成对阿维菌素产量的影响. *生物工程学报 (Journal of Biomedical Engineering)*, 2008, 24(10):1702-1713.
- [21] Blanco G, Pereda A, Brian P, Mendez C, Chater KF, Salas JA. A Hydroxylase-like Gene Product Contributes to Synthesis of a Polyketide Spore Pigment in *Streptomyces halstedii*. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(24):8043-8048.
- [22] Funa N. A Novel Quinone-forming Monooxygenase Family Involved in Modification of Aromatic Polyketides. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(15):14514-14523.
- [23] Moore BS, Piel J. Engineering Biodiversity with Type II Polyketide Synthase Genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 78(3-4):391-398.
- [24] Yu TW, Shen Y, 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.

Characterization of the spore-pigment biosynthetic gene cluster (*sah*) in *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158

Hua Li, Lijuan Wang, Jing He*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: [Objective] A putative type II polyketide synthase (PKS) gene cluster (*sah*) was found in the genome sequence of *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 by bioinformatics. In order to discover its biological function, we cloned the *sah* cluster and made functional analyses by gene knockout and heterologous expression. [Methods & Results] Annotation of the predicted open reading frames (ORFs) by protein-protein blast revealed that the *sah* cluster is highly homologous with the spore-pigment biosynthetic cluster (*whiE*) in *S. coelicolor* A3 (2), except an additional O-methyltransferase gene (*sahI*). Three genes of the *sah* cluster, *sahG*, *sahH* and *sahI*, which are putatively involved in post-PKS modifications, were respectively in-frame deleted by double crossover. We observed the color of the mutant strains spores apparently changed. HPLC and LC-MS analyses demonstrated that heterologous expression of the *sah*-minimal PKS gene and the *whiE*-minimal PKS gene in *S. lividans* ZX1 produced the same hydrophilic red pigments. [Conclusion] The *sah* cluster is responsible for the spore-pigment biosynthesis of *S. sahachiroi* ATCC 33158. It catalyzes the formation of polyketides with the same core structures as that of the *whiE* cluster.

Keywords: *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158, type II polyketide synthase (PKS), gene in-frame deletion, heterologous expression, spore-pigment biosynthesis

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800020, 30970059), by the New Century Excellent Talents grant from the Ministry of Education of China (NECT-08-0779), by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, (SRF for ROCS, SEM) ([2009] 1590) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2009PY006)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@ yahoo. com

Received: 20 April 2012 / Revised: 21 May 2012

《微生物学报》综述文章投稿最新要求

2011年12月,第3次修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,自2003年本刊对综述类投稿提出了具体的要求,先后又作了两次修订。

1. 篇幅:主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 新意:选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 述和评:结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
4. 结合作:结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
5. 参考文献:控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
6. 作者:(1)数量不多于3人;(2)提供一份背景材料,内容包括:第一作者科研简介、责任作者(即通讯作者)科研简介、本课题组对相关工作情况介绍(附已发文章)。

欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。