

## 绿灰霉素生物合成途径中 3-羟基吡啶甲酸起始结构单元的活化特异性

谢运昌<sup>1,2</sup>, 鞠建华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 中国科学院海洋微生物研究中心, 广东省海洋药物重点实验室, 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 【目的】鉴定 *sgvS* 是绿灰霉素生物合成起始结构单元 3-羟基吡啶甲酸的必需基因; 测定绿灰霉素起始结构单元 3-羟基吡啶甲酸的活化特异性。 【方法】构建 *sgvS* 的基因失活突变株和反式回补菌株, 对其发酵产物进行 HPLC 分析。并在突变菌株 *sgvS* 的发酵液中分别添加 3-羟基吡啶甲酸, 吡啶-2-甲酸, 3-氯-吡啶-2-甲酸, 4-氯-吡啶-2-甲酸, 3,5-二氯-吡啶-2-甲酸, 烟酸, 2-氟-烟酸, 2-氯-烟酸, 5-氟-烟酸, 6-氟-烟酸和环哌啶-2-甲酸, 用 HPLC 分析其代谢产物的变化。 【结果】突变菌株 *sgvS* 丧失了绿灰霉素的生产能力, *sgvS* 基因反式回补突变株恢复了绿灰霉素的生产能力。向突变菌株 *sgvS* 中添加 3-羟基吡啶甲酸也能恢复绿灰霉素的生产, 但添加其它上述衍生物均无法恢复绿灰霉素的生产或介导产生新的结构类似物。 【结论】*sgvS* 是绿灰霉素及其骨架起始单元 3-羟基吡啶甲酸生物合成的必需基因, *SgvD1* 对 3-羟基吡啶甲酸结构单元的激活存在着严格的底物选择特异性。

**关键词:** 3-羟基吡啶甲酸, 绿灰霉素, 生物合成, 特异性

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1179-10

绿灰霉素 (viridogrisein, 又称 etamycin) 是一种八元环脂肽结构的 B 型链阳菌素, 它与 A 型的灰绿霉素 (griseoviridin) 构成一组结构差异较大, 却具有协同抗菌能力的链阳菌素 (图 1-A) [1]。我们通过全基因组扫描分析发现二者是由同一个基因簇完成生物合成 [2]。绿灰霉素可以作用于细菌核糖体 50 S 大亚基的 P 位点, 促使已合成的肽酰-tRNA 解离, 中断多肽链的延伸; 而灰绿霉素则可作用于相邻的 A 位点, 阻止活化后的氨酰-tRNA 有效结合 [3-5]。特别是在灰绿霉素结合于 50 S 核糖体大亚基的 A 位

点后, 整个核糖体构象改变而利于绿灰霉素高效结合 P 位点, 二者抑菌活力能达到单个分子活性的百倍以上, 可用于治疗许多耐药恶性致病菌引发的感染 [6-8]。

绿灰霉素结构中有 5 个非天然氨基酸, 它们经由一系列非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal peptide synthetases/NRPSs) 中的腺苷酰化结构域 (A domain) 识别并腺苷酰化后再由其他结构域有序拼接组装成最后的绿灰霉素。其中 3-羟基吡啶甲酸 (3-hydroxypicolinic acid/3-HPA) 是绿灰霉素骨架的

基金项目: 国家自然科学基金 (21172231); 国家“973 项目” (2010CB833805)

\* 通信作者。Tel: +86-20-89023028; Fax: +86-20-89023038; E-mail: [jju@scsio.ac.cn](mailto:jju@scsio.ac.cn)

作者简介: 谢运昌 (1984 -), 男, 江西赣州人, 博士, 主要研究方向为微生物天然产物的生物合成。E-mail: [xieyunchang@scsio.ac.cn](mailto:xieyunchang@scsio.ac.cn)

收稿日期: 2013-03-20; 修回日期: 2013-05-09

起始单元<sup>[2]</sup>,它是一个常见的环肽类抗生素起始结构单元,在吡啉霉素(pyridomycin),维吉霉素S

(virginiamycin S)和原霉素I(pristinamycin I)中都存在(图1-A)<sup>[1,9-13]</sup>。

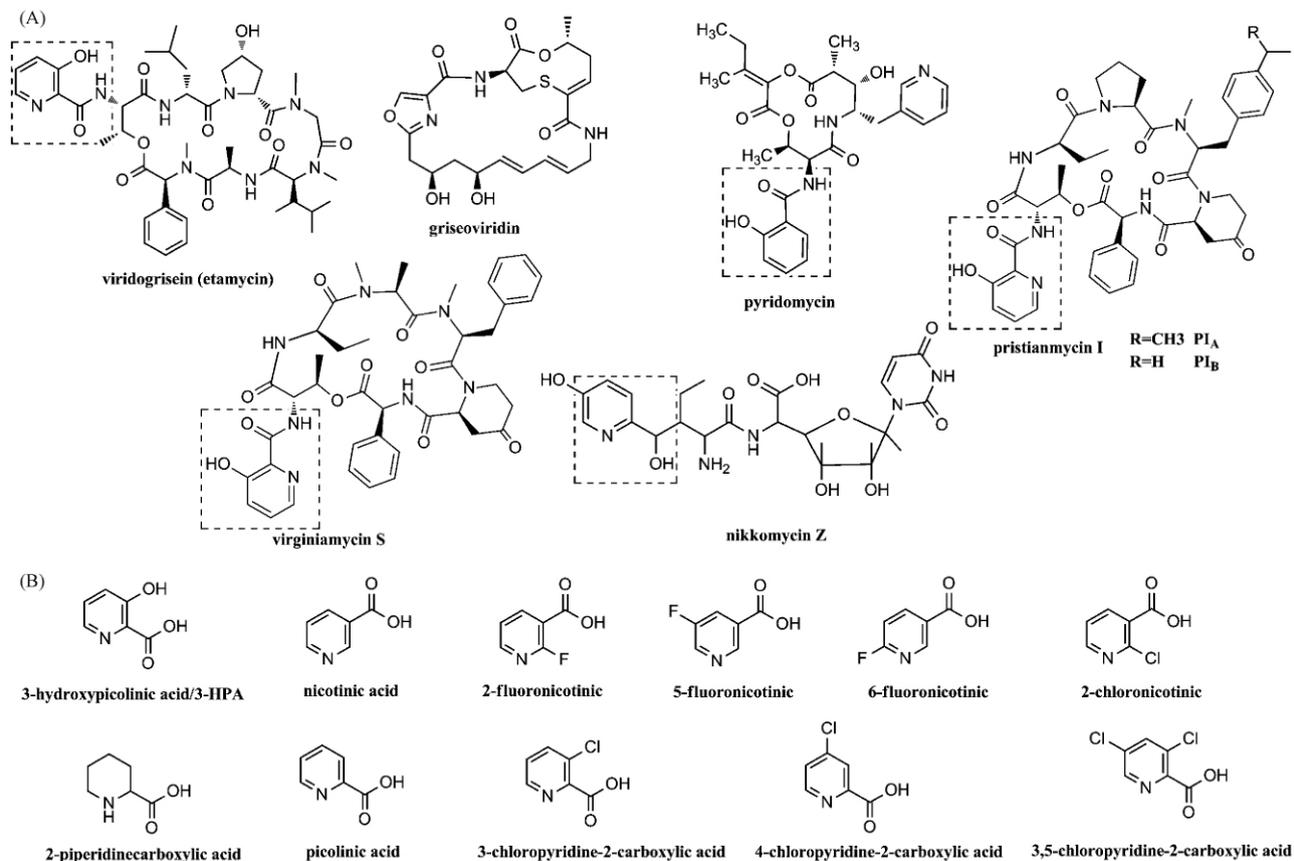


图1. 几种抗生素的化学结构,虚线框内为环肽上的3-羟基吡啉甲酸结构和尼可霉素Z上的吡啉-2-甲酸结构(A)和突变株 $\Delta$ sgvS添加发酵的前体物结构(B)

Figure 1. Chemical structures of the related compounds, A: griseoviridin, viridogrisein, virginiamycin S, pristinamycin I, pyridomycin and the nikkomycin Z, the 3-hydroxypicolinic acid part and the picolinic acid of nikkomycin Z was denoted by dotted box. B: 3-hydroxypicolinic acid and other used compounds in feeding assay of mutant  $\Delta$ sgvS, including nicotinic acid and related halogen derivatives, picolinic acid and related halogen derivatives and 2-piperidinecarboxylic acid.

由于3-羟基吡啉甲酸是绿灰霉素生物合成的起始结构单元,研究相关生物合成机制和起始底物特异性有望通过组合生物合成技术获得新的结构衍生物。已有研究发现3-羟基吡啉甲酸中吡啉环结构的生物合成途径主要有两大类:一类是环肽类B型链阳菌素维吉霉素S中,3-羟基吡啉甲酸生物合成起始于VisA这个L-lysine 2-aminotransferase催化的L-赖氨酸的2位的脱氨基反应,再经过自发的脱水环化形成哌啉-2-羧酸(1-piperidine-2-carboxylic acid),然后再经后续氧化形成吡啉环进而氧化生成最终的3-羟基吡啉甲酸<sup>[11,14]</sup>;另一类是类肽核苷类尼可霉素中,同样起始于与VisA相似性近61%的NikC催化的L-赖氨酸的2位脱氨基反应,随后经黄

素氧化酶NikD氧化形成吡啉-2-甲酸并作为抗生素骨架合成的起点(图2)<sup>[9,15-16]</sup>。催化关键的L-赖氨酸脱氨基反应的L-lysine 2-aminotransferase的基因在含有3-羟基吡啉甲酸起始结构单元的环肽类抗生素的生物合成基因簇中均能发现,而且高度保守,诸如绿灰霉素生物合成基因簇中的sgvL和吡啉霉素生物合成基因簇中的pyrB(表1)<sup>[2,10,17]</sup>。然而研究发现,sgvL并非绿灰霉素3-羟基吡啉甲酸的生物合成的必需基因,相关基因失活突变株中3-羟基吡啉甲酸和绿灰霉素的生物合成均不受影响<sup>[2]</sup>。此外通过同位素标记发现吡啉霉素的3-羟基吡啉甲酸的来源不是L-赖氨酸,而是L-天冬氨酸<sup>[17-18]</sup>。另外在绿灰霉素,原霉素I,吡啉霉素和维吉霉素S这

四类环肽抗生素的生物合成基因簇当中, 均找不到编码尼克霉素中黄素氧化酶 NikD 同源蛋白的基因, 相关吡啶环氧化形成机制仍不清楚。可见即使

存在高度同源的基因簇和化学结构, 3-羟基吡啶甲酸的生物合成途径仍然大相径庭。

表 1. 四种环肽抗生素生物合成基因簇中的同源蛋白

Table 1. The homologous proteins in biosynthetic gene cluster of four cyclopeptide antibiotics

VGiridogrisein	VirginiamycinS	Pristinamycin	Pyridomycin	Function
SgvL	VisA	HpaA	PyrB	L-lysine 2-aminotransferase
SgvS	VirM	SnaO	PyrD	sarcosine oxidase
SgvD1	VisB	SnbA	PyrA	3-hydroxypicolinic acid: AMP ligase

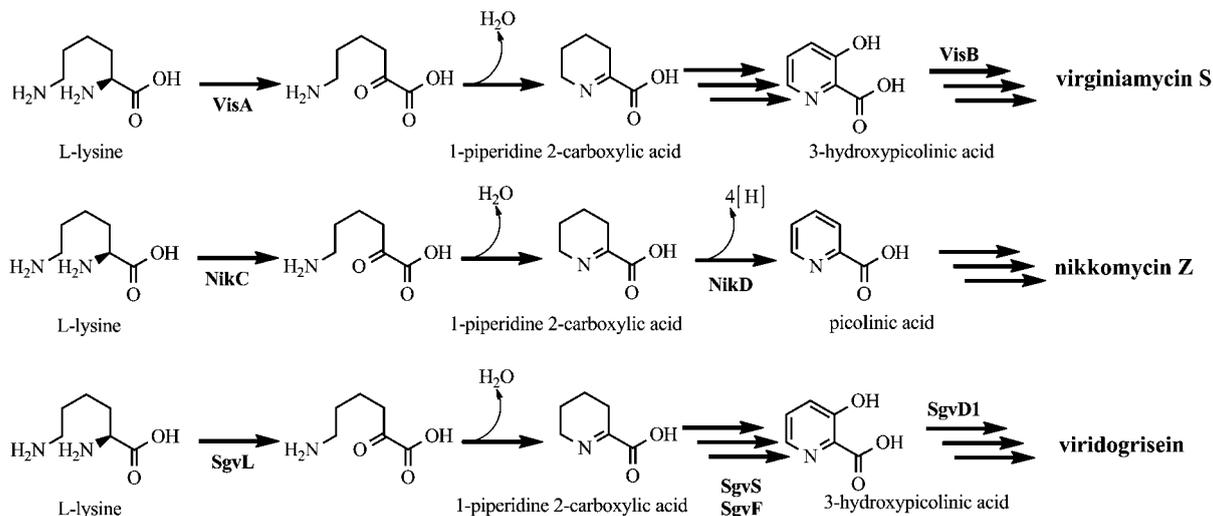


图 2. VisA、NikC 和 NikD 催化的化学反应和最初推导的绿灰霉素中 3-羟基吡啶甲酸的生物合成途径

Figure 2. Mechanism of the reaction catalyzed by VisA, NikC and NikD and the proposed biosynthetic pathway of 3-hydroxypicolinic moiety in viridogrisein.

活化 3-羟基吡啶甲酸是绿灰霉素骨架组装的起点, SgvD1 是催化这步反应的关键蛋白, 研究发现 SgvD1 的高度同源蛋白体外能够激活多种结构类似物, 诸如: 缺失 3 位羟基的吡啶-2-甲酸, 烟酸, 和其他相关衍生物<sup>[17,19]</sup>。但是自然界中已发现的绿灰霉素的同系物和结构类似物中, 3-羟基吡啶甲酸的结构都是高度保守的, 没有分离发现由 3-羟基吡啶甲酸结构类似物作为起点而合成的环肽类化合物, 同样在其他含有 3-羟基吡啶甲酸的化合物当中也没有发现含有相关结构类似物的同系物等等<sup>[20]</sup>。是否 3-羟基吡啶甲酸是绿灰霉素等抗生素生物合成途径唯一可以利用的起始底物, 体内是否有着严格的底物选择机制, 这点尚不明确。

最近, 我们鉴定了 *Streptomyces griseoviridis* NRRL 2427 中的绿灰霉素生物合成的基因簇, 确定了负责绿灰霉素生物合成的基因<sup>[2]</sup>。利用菌株的遗传操作体系, 本研究中我们构建了其中 sarcosine oxidase 编码基因 *sgvS* 的基因失活突变株和反式回

补菌株, 并发现它与绿灰霉素的生物合成相关。通过 3-羟基吡啶甲酸的喂养, 进一步证明它与 3-羟基吡啶甲酸的生物合成相关。随后通过喂养结构类似物吡啶-2-甲酸 (picolinic acid) 及 3 位、4 位和 3,5 位氯代的吡啶-2-甲酸, 烟酸 (nicotinic acid) 及 2 位氟代和氯代、5 位、6 位氟代的烟酸, 甚至饱和环哌啶-2-甲酸 (piperidine-2-carboxylic acid) (图 1-B), 都没有发现绿灰霉素的合成或显著介导新的环肽类化合物生产。我们推断在绿灰霉素的生物合成中存在一条特殊的 3-羟基吡啶甲酸合成途径, 且 3-羟基吡啶甲酸是绿灰霉素骨架生物合成中唯一可以高效利用的起始原料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株: 灰绿链霉菌 *S. griseoviridis* NRRL 2427 来自美国农业部菌种保藏中心

(NRRL), 菌株保存和传代可使用液体 TSB 培养基或固体 M-ISP4 培养基, 于 30℃ 下培养, 生产代谢产物使用特定的菌株发酵培养基。包含有目的基因的

cosmid1H10 为本研究中构建, 其他研究中使用的菌株和质粒参见表 2。

表 2. 所用的菌株和质粒

Table 2. Strains and plasmids used in this study

Strains / plasmids	Description	Reference / source
Strains		
<i>E. coli</i> LE392	Host strain of cosmid vector SuperCos 1	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5a	Host strain for general clone	Stratagene
<i>E. coli</i> ET12567 / pUZ8002	Host strain for conjugation	[21]
<i>E. coli</i> BW25113 / pIJ790	Host strain for PCR-targeting	[21]
<i>S. griseoviridis</i>	GV and VG biosynthesis stain <i>S. griseoviridis</i> NRRL 2427	NRRL
$\Delta$ sgvS	sgvS insert deletion mutant	This study
$\Delta$ sgvS::sgvS	sgvS trans complementation mutant strain	This study
Plasmid		
SuperCos1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , cosmid vector	Stratagene
pCR2.1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , general clone vector	Invitrogen
pIJ773	Apm <sup>r</sup> , source of <i>acc(3) IV</i> and <i>oriT</i> fragment	[21]
pIJ790	Cml <sup>r</sup> , including $\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ) for PCR-Targeting	[21]
pUZ8002	Kan <sup>r</sup> , including <i>tra</i> for conjugation	[21]
pSET152AKE	Apm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>int<sup>o</sup> C31</i> , <i>ermE<sup>+</sup></i>	[21, 22]
pJu5032	sgvS insert mutation cosmid	This study
pSET152AKE- $\Delta$ sgvS	sgvS trans complement plasmid	This study

**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 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L, pH 7.0; (2) TSB 培养基: 大豆蛋白胨 5 g, 胰蛋白胨 15 g, 蔗糖 100 g, 葡萄糖 2.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L, pH 7.0; (3) M-ISP4 培养基: 可溶性淀粉 10 g, 蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, NaCl 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, MnCl<sub>2</sub> 1 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L, pH 7.0 - 7.4; (4) 菌株发酵培养基: 可溶性淀粉 10 g, 蛋白胨 2 g, 酵母提取物 5 g, 玉米粉 3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, NaCl 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, MnCl<sub>2</sub> 1 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L, pH 7.2; 配制对应的固体培养基, 加入 2% 的琼脂粉即可。

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ , ET12567/pUZ8002 用 LB 37℃ 下培养, 而 BW25113/pIJ790 相关菌株使用 30℃ 培养。*S. griseoviridis* NRRL 2427 和相关的突变菌株, 回补菌株用菌株发酵培养基于 28℃ 下培养 5 - 6 天。

**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; 高保真的 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。3-羟基吡啶甲酸购买自上海生工生物工程有限公司, 吡啶-2-甲酸和烟酸及其各种卤代衍生物购自阿达玛斯试剂有限公司。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) 100  $\mu$ g/mL, 卡那霉素 (Kanamycin) 50  $\mu$ g/mL, 阿泊拉霉素 (Apramycin) 50  $\mu$ g/mL, 氯霉素 (Chloramphenicol) 50  $\mu$ g/mL, 甲氧苄氨嘧啶 (Trimethoprim) 50  $\mu$ g/mL。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成, DNA 测序由上海美季公司完成。Eppendorf5331 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, Heidolf Laborota4000 eco/WB/G3 旋转蒸发仪, Varian Prostar 半制备液相色谱, 高效液相色谱柱为 Prodigy ODS-2 分析 C-18 色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)。

## 1.2 sgvS 基因失活突变株 $\Delta$ sgvS 的构建

针对 *sgvS* 基因, 我们选用 cosmid 1H10 参照成熟的 *S. griseoviridis* NRRL 2427 基于  $\lambda$ -RED 介导的 PCR-Targeting 突变方法构建相关的突变菌株  $\Delta$ sgvS<sup>[21]</sup>。相关的突变敲除引物是 sgvS-DelFr (5'-GGCGCCTGGGGCGCGTGC GCGCTGTGGCGCATGCC

CGACATTCCGGGATCCGTCGACC-3') 和 *sgvS*-DelRe (5'-CATCCGGGGGTCCCGCCGCTGACGAGGTCGCCAGCGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3')。对应的突变验证引物为 *sgvS*-HdFr (5'-GGTCGGGTGAGGCGAAGTCC-3') 和 *sgvS*-HdRe (5'-CGGGGCGAACCATCGAGAAG-3')，突变验证引物扩增产物野生型大小为 1160 bp，而相应突变型大小为 1539 bp，扩增的反应条件为：94℃ 4 min；94℃ 40 s，60℃ 45 s，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 10 min。

### 1.3 基因失活突变株 $\Delta$ *sgvS* 的回补菌株的构建

*sgvS* 基因全长 1149 bp，根据相关序列设计了对应的回补扩增引物 *sgvS*-CFr (CATATGAGCAACTGGGACGCCGAAG) 和 *sgvS*-CRe (TCTAGATCAGCGCAGGGCCGCCCGGT)，黑色深体为选用的酶切位点，PCR 扩增条件是 95℃ 4 min；95℃ 40 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 10 min。扩增后的片段先导入载体 pCR2.1 经测序验证后，使用 *NdeI* 和 *XbaI* 双酶切后导入经同样酶切处理的 pSET152AKE 载体，构建 *sgvS* 基因的回补质粒 pSET152AKE-*sgvS*，并导入 ET12567/pUZ8002 后，参照已有的 *S. griseoviridis* NRRL 2427 接合转移方法导入 *sgvS* 菌株，构建对应的回补菌株  $\Delta$ *sgvS*::*sgvS*<sup>[22]</sup>。

### 1.4 *S. griseoviridis* NRRL 2427 野生型菌株，突变菌株和突变回补菌株的发酵和高效液相色谱 (HPLC) 分析

对相关的菌株发酵产物的分析，采用一步培养发酵提取法。将约  $1 \times 10^5$  的菌株孢子接种于 50 mL 的发酵培养基中 (250 mL 三角瓶装)，并于 28℃ 下，200 r/min 培养 5-6 天。发酵后的培养物用 100 mL 的丁酮萃取 2 次，并用旋转蒸发器将丁酮蒸干得到浓缩后的样品，并用 500  $\mu$ L 的甲醇溶解，取 20  $\mu$ L 样品 HPLC 分析。检测使用的流动相为 A 相为 15% 的乙腈水溶液，含有 0.1% 的乙酸；B 相为 85% 的乙腈水溶液，也含有 0.1% 的乙酸。分析条件是：0-20 min，0% - 80% 的 B 相；20-21 min，80% - 100% 的 B 相；21-25 min 100% 的 B 相；25-30 min，0% 的 B 相。流速为 1 mL/min，检测波长为 210 nm。

### 1.5 基因失活突变株 *sgvS* 不同底物添加喂养发酵分析

将基因失活突变株 *sgvS* 和野生型菌株接种于

50 mL 的菌株发酵培养基中 (250 mL 三角瓶装)，并于 28℃ 下，200 r/min 培养 1-1.5 天后，加入 1 mmol/L 当量的 3-羟基吡啶甲酸，吡啶 2-甲酸，吡啶 2-甲酸和烟酸及其各种卤代衍生物，继续培养 4-5 天后，使用丁酮萃取按照野生型菌株发酵分析方法提取样品并 HPLC 分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 *sgvS* 是绿灰霉素生物合成中的必需基因

通过生物信息学比对，我们发现含有 3-羟基吡啶甲酸起始结构单元的 4 种环肽抗生素：绿灰霉素，维吉霉素 S，原霉素 I 和吡啶霉素的生物合成基因簇中可划分出 3 组彼此相似性大于 60% 的蛋白 (表 1)。这其中有一组功能尚不明确，经同源性比较而注释为 sarcosine oxidase 的编码基因。

为了分析这个基因的功能，我们通过 PCR-Targeting 技术，以 cosmid 1H10 为基础，构建了 *sgvS* 基因插入阿泊拉霉素抗性基因而失活的突变质粒 pJu5032，将该质粒导入 ET12567/pUZ8002 后经接合转移后的抗性筛选和 PCR 验证后我们获得了突变菌株  $\Delta$ *sgvS* (图 3)。将突变菌株  $\Delta$ *sgvS* 发酵培养产物萃取 HPLC 分析后与野生型菌株对比，发现由同一个生物合成基因簇合成的灰绿霉素正常生产，而绿灰霉素并没有生产，随后通过导入带有完整 *sgvS* 基因的回补质粒 pSET152AKE-*sgvS*，后获得了  $\Delta$ *sgvS* 的反式回补菌株  $\Delta$ *sgvS*::*sgvS*，并与野生型和突变菌株  $\Delta$ *sgvS* 使用相同的条件进行发酵萃取分析，发现回补菌株能够生产绿灰霉素 (图 4)。由此推断 *sgvS* 是绿灰霉素生物合成的必需基因。

### 2.2 *sgvS* 是 3-羟基吡啶甲酸生物合成的必需基因

通过基因的失活和回补，初步确定了 *sgvS* 是绿灰霉素生物合成所必需的基因。通过生物信息学分析，我们发现 *SgvS* 与 *NikD* 有一定的同源性，后者证明是尼可霉素生物合成起始单元吡啶 2-甲酸中吡啶环上催化双键形成的关键酶<sup>[15]</sup>。此外对比分析表 1 中的 4 种抗生素的结构，发现它们均有含有 3-羟基吡啶甲酸结构，因此我们推测 *sgvS* 可能是 3-羟基吡啶甲酸的生物合成基因。

通过添加 1 mmol/L 当量的 3-羟基吡啶甲酸于突变菌株 *sgvS* 的发酵培养液中并发酵培养 4 天，萃取相应的发酵产物分析发现有明显的绿灰霉素产

出,而且产量与野生型相当(图5)。*sgvD1*和*sgvN*分别编码3-羟基吡啶甲酸腺苷酰活化蛋白和绿灰霉素苯基甘氨酸生物合成的苯乙酰辅酶A双氧化酶,它们都是绿灰霉素合成所必需的功能蛋白,失活后绿灰霉素不再生产<sup>[2]</sup>。利用这两个基因的失活

突变菌株 $\Delta$ *sgvD1*和 $\Delta$ *sgvN*作为对照,发现即使添加相同等的1 mmol/L 3-羟基吡啶甲酸,绿灰霉素也不会生产(图5)。所以通过对比分析,我们发现*sgvS*是一个3-羟基吡啶甲酸的生物合成相关基因。

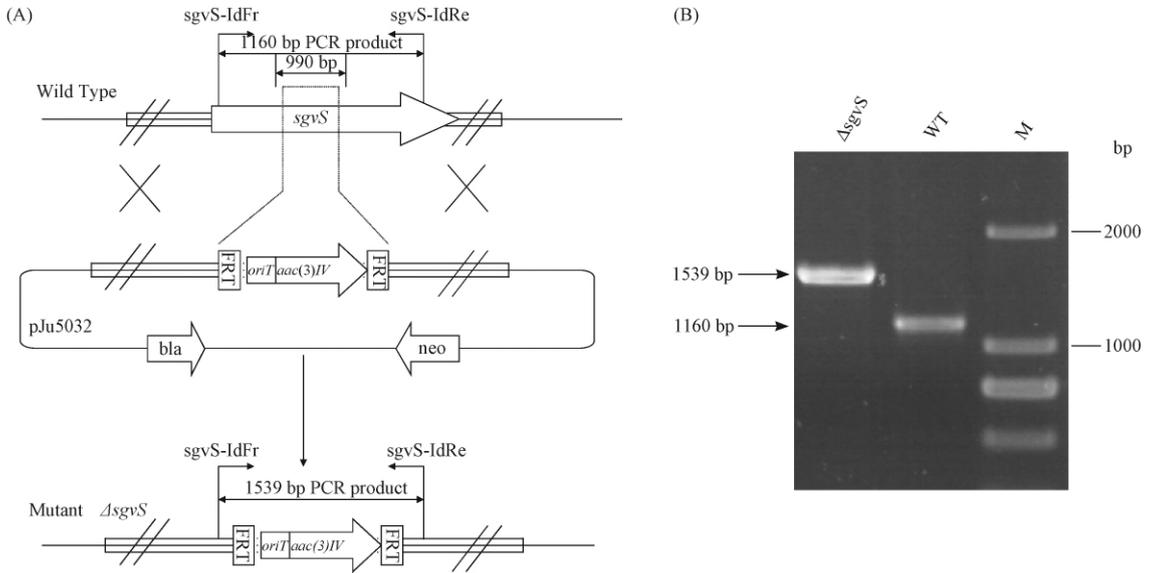


图3. *sgvS* 基因失活突变株的构建流程(A)和 $\Delta$ *sgvS* 突变菌株的PCR验证(B)

Figure 3. Inactivation of *sgvS*. A: Construction of *sgvS* gene replacement mutant. B: Gel electrophoresis of PCR products.  $\Delta$ *sgvS*: mutant strain, 1539 bp; WT: *S. griseoviridis* NRRL 2427, 1160 bp; M: DNA molecular ladder.

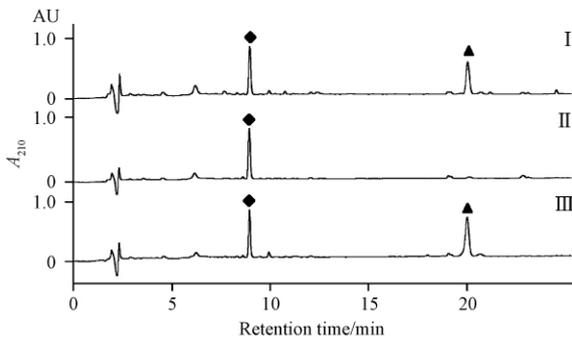


图4. *sgvS* 基因失活突变株和突变回补菌株发酵产物的HPLC分析

Figure 4. HPLC analysis of the fermentation extract of mutant  $\Delta$ *sgvS* and  $\Delta$ *sgvS*::*sgvS*. I: WT, II:  $\Delta$ *sgvS*, III: *sgvS*::*sgvS*. ◆: griseoviridin, ▲: viridogrisein.

### 2.3 3-羟基吡啶甲酸是绿灰霉素生物合成中高效利用的起始底物

通过添加3-羟基吡啶甲酸能够让突变菌株 $\Delta$ *sgvS*恢复生产绿灰霉素,因此利用这个突变菌株,通过添加不同的3-羟基吡啶甲酸的结构类似物或其他一些相关化合物,可以分析这条生物合成途径

的起始底物选择特异性,并希望利用这些特性生产一些由不同前体介导的新化合物。

体外实验证明在 *S. griseoviridis* DSM 40229 中与 *SgvD1* 功能一致的3-羟基吡啶甲酸腺苷酰活化酶能够识别并腺苷化修饰吡啶-2-甲酸和烟酸,因此我们选择添加这两种3-羟基吡啶甲酸的结构类似物,以作验证和对比分析<sup>[19]</sup>。此外选择了3位、4位和3,5位氯代的吡啶-2-甲酸和2位氟代和氯代、5位、6位氟代的烟酸来进一步分析吡啶环结构上各个位点取代的影响(图1-B)。但是通过与3-羟基吡啶甲酸添加发酵结果对比,虽然绿灰霉素的产量正常,但是无论是吡啶-2-甲酸和烟酸,还是添加的卤代衍生物,突变菌株*sgvS*既不能有效利用于恢复绿灰霉素的生产,也不能介导产生明显的环肽类化合物或其他一些新的产物,此外足量的饱和环吡啶-2-甲酸添加,也没有看到明显的环肽或新化合物生产(图6,7)。可见 *S. griseoviridis* NRRL 2427 的绿灰霉素生物合成途径不能高效利用这些3-羟基吡啶甲酸的结构类似物作为起始单元开启化合物的生物合成。

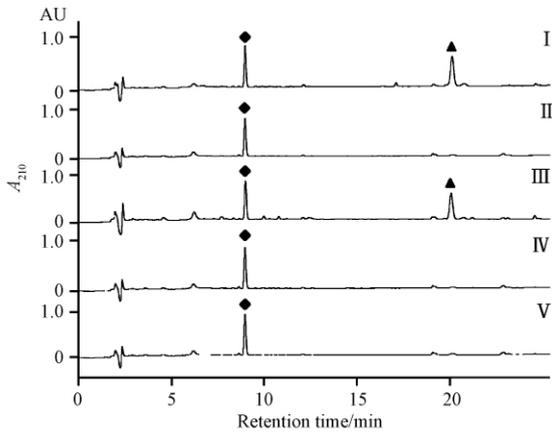


图 5. 基因失活突变株 1 mmol/L 当量 3-羟基吡啶甲酸添加发酵后产物 HPLC 分析

Figure 5. HPLC analysis of the fermentation extract of mutant fed with 1 mmol/L 3-hydroxypicolinic acid. I: WT, II:  $\Delta sgvS$ , III:  $\Delta sgvS$  fed with 3-hydroxypicolinic acid, IV:  $\Delta sgvD1$  fed with 3-hydroxypicolinic acid, V:  $\Delta sgvN$  feeding with 3-hydroxypicolinic acid. ◆: griseoviridin, ▲: viridogrisein.

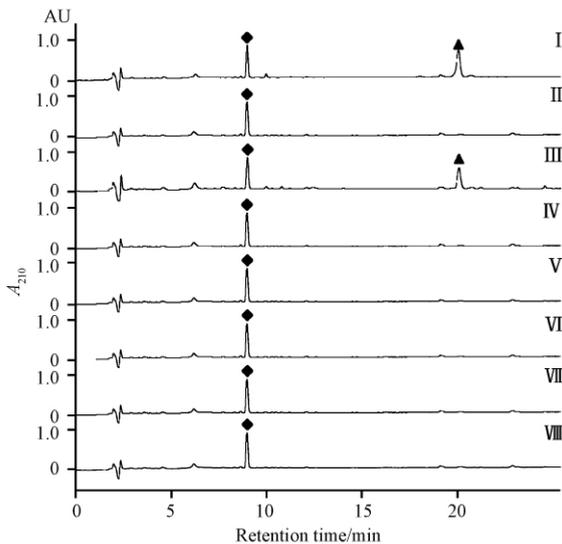


图 6. 基因失活突变株  $\Delta sgvS$  分别添加 1 mmol/L 的 3-羟基吡啶甲酸, 吡啶-2-甲酸及 3 位、4 位和 3,5 位氯代吡啶-2-甲酸后发酵产物的 HPLC 分析

Figure 6. HPLC analysis of the fermentation extract of mutant  $\Delta sgvS$ . I: WT, II:  $\Delta sgvS$ , III:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 3-hydroxypicolinic acid, IV:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L picolinic acid, V:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 2-piperidinecarboxylic acid. VI:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 3-chloropyridinecarboxylic acid. VII:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 4-chloropyridinecarboxylic acid. VIII:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 3,5-chloropyridinecarboxylic acid. ◆: griseoviridin, ▲: viridogrisein.

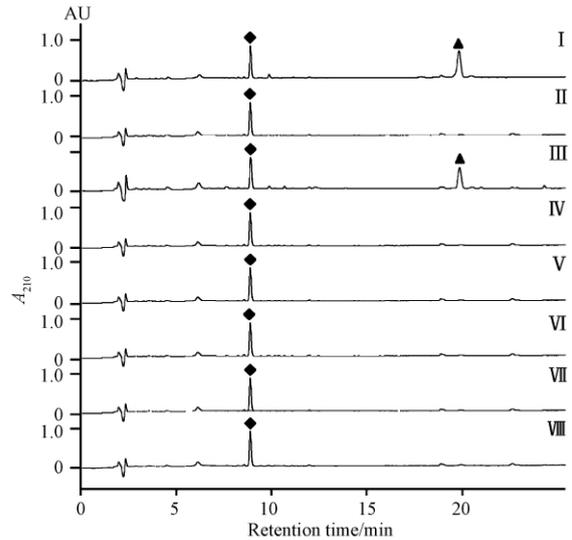


图 7. 基因失活突变株  $\Delta sgvS$  分别添加 1 mmol/L 的 3-羟基吡啶甲酸, 烟酸及 2 位氟代和氯代、5 位和 6 位氟代烟酸后发酵产物的 HPLC 分析

Figure 7. HPLC analysis of the fermentation extract of mutant  $\Delta sgvS$ . I: WT, II:  $\Delta sgvS$ , III:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 3-hydroxypicolinic acid, IV:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L nicotinic acid, V:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 2-chloronicotinic acid. VI:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 2-fluoronicotinic acid. VII:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 5-fluoronicotinic acid. VIII:  $\Delta sgvS$  fed with 1 mmol/L 6-fluoronicotinic acid. ◆: griseoviridin, ▲: viridogrisein.

### 3 讨论

绿灰霉素是具有良好开发和应用前景的环肽类抗生素。在日益严重抗生素滥用和病菌抗药性激增的恶性循环下, 通过研究这种大分子量的环肽化合物的生物合成途径和机制, 发掘和开发相关功能基因以及催化酶, 有利于这类抗生素的生产开发和运用于治疗强力耐药菌, 甚至超级耐药菌引发的严重感染。

我们已经鉴定了 *S. griseoviridis* NRRL 2427 中长达 105 kb 的绿灰霉素和灰绿霉素的生物合成基因簇, 发现一个在含 3-羟基吡啶甲酸结构的化合物的生物合成基因簇中高度保守, 但功能非常不明确的黄素氧化酶的基因 *sgvS*<sup>[2]</sup>, 通过基因失活和反式回补我们发现 *sgvS* 是绿灰霉素生物合成所必需的关键基因, 同时在发酵液添加足量的 3-羟基吡啶甲酸后, 发现突变菌株 *sgvS* 能够恢复生产绿灰霉素, 因此确定 *sgvS* 是 3-羟基吡啶甲酸生物合成的相关

基因。

*sgvS* 基因编码一个黄素氧化酶, 虽然它与已报道的 NikD 有一定的同源性, 后者是尼可霉素生物合成中催化吡啶环上形成双键的关键酶(图 2), 但是编码 L-lysine 2-aminotransferase 的基因 *sgvL* 并非绿灰霉素生物合成所必需<sup>[2,15]</sup>。同时在  $\Delta$ *sgvS* 菌株的发酵液中添加 3-羟基吡啶甲酸的结构类似物吡啶-2-甲酸, 并没有发现菌株恢复生产绿灰霉素。可见在 *sgvS* 菌株体内并没有发现能够利用以吡啶-2-甲酸为底物并 3 位羟化合成 3-羟基吡啶甲酸, 进而参与绿灰霉素的生物合成的催化途径。我们推测绿灰霉素中的 3-羟基吡啶甲酸的生物合成, 与维吉霉素 S 和尼可霉素中的 3-羟基吡啶甲酸生物合成有所不同(图 2), 并不一定是以 L-赖氨酸为起始底物, 成环后再经 SgvS 氧化形成吡啶环, 进而羟化完成 3-羟基吡啶甲酸的生物合成<sup>[2]</sup>。可见 SgvS 的功能与已知的同源蛋白不同, 由它参与的绿灰霉素生物合成, 可能存在独特的 3-羟基吡啶甲酸的生物合成和利用途径。

在绿灰霉素的生物合成基因簇上面, 一共有 4 个负责绿灰霉素骨架组装的 NRPS 基因, 其中 *sgvD1* 编码识别 3-羟基吡啶甲酸的腺苷活化酶, 相关的基因失活突变株不能够有效合成绿灰霉素。我们通过构建  $\Delta$ *sgvS* 菌株, 得到一个可以高效分析体内 SgvD1 底物特异性的活性菌株。研究发现 SgvD1 的同源蛋白诸如 PyrA, 体外都具有广泛的底物选择性<sup>[17]</sup>。但是通过添加吡啶-2-甲酸, 和它的 3 位、4 位和 3,5 位氯代衍生物, 我们并没有明显发现菌株生产一些环肽化合物或者新的化合物(图 6), 可见 3-羟基吡啶甲酸的 3 位的羟基是非常重要的基团, 缺失后的吡啶-2-甲酸及其衍生物不能被生物合成的途径高效识别活化利用。另外添加含 3 位羧基的烟酸和烟酸的 2 位氟代和氯代、5 位和 6 位氟代衍生物后, 发现这些化合物也都不能被 NRPS 组装线高效利用而合成一些前体介导的产物(图 7)。同样当添加饱和环哌啶-2-甲酸后, 发现菌株也没有显著生产相关介导的产物(图 6)。相关结果与 *S. griseoviridis* DSM 40229 中的 3-羟基吡啶甲酸腺苷活化酶体内特异性研究结果一致, 虽然该酶在体外能活化吡啶-2-甲酸和烟酸, 但却无法在体内天然合成或介导产生而经分离纯化获得并结构鉴定的对应产物<sup>[19]</sup>, 这个现象可能是由于经活化后的分子, 结构

发生改变, 形成的中间产物, 无法被后续的催化途径和酶识别利用从而造成生物合成的中止, 没有得到相应的代谢产物。可见在体内, 绿灰霉素生产菌株对底物的选择和利用存在严格的选择特异性, 这可能是自然界中包括绿灰霉素在内的含有 3-羟基吡啶甲酸的环肽类化合物的起始结构单元分子结构和合成基因高度保守, 尚未发现相应位点差异的结构类似物或同系物的分子基础, 而且充足的 3-羟基吡啶甲酸供给, 是绿灰霉素高效生物合成和结构稳定的重要保证。

综上所述, 本研究发现了一个新的 3-羟基吡啶甲酸生物合成的催化酶 SgvS 的编码基因, 同时也发现体内绿灰霉素的骨架组装起始中对 3-羟基吡啶甲酸具有非常严格选择性, 这对深入研究绿灰霉素为代表的环肽类抗生素的前体来源和骨架组装中的底物特异性提供了重要的借鉴和参考。

## 参考文献

- [1] Bartz QR, Ehrlich J, Park GP, Knudsen MP, Smith RM. Viridogrisein and its fermentative production with griseoviridin. USA: U. S. Pat. 3,023,204, 1962.
- [2] Xie Y, Wang B, Liu J, Zhou J, Ma J, Huang H, Ju J. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster and Regulatory Cascade for the Synergistic Antibacterial Antibiotics Griseoviridin and Viridogrisein in *Streptomyces griseoviridis*. *ChemBioChem*, 2012, 13 (18) :2745-2757.
- [3] Cocito C, Di Giambattista M. The in vitro binding of virginiamycin M to bacteria ribosomes and ribosomal subunits. *Molecular & General Genetics*, 1978, 166 (1) : 53-59.
- [4] Di Giambattista M, Chinali G, Cocito C. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1989, 24 (4) : 485-507.
- [5] Di Giambattista M, Nyssen E, Pecher A, Cocito C. Affinity labeling of the virginiamycin S binding site on bacterial ribosome. *Biochemistry*, 1990, 29 (39) : 9203-9211.
- [6] Cocito C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiological Reviews*, 1979, 43 (2) : 145-192.
- [7] Johnston NJ, Mukhtar TA, Wright GD. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Current Drug*

- Targets, 2002, 3 (4) : 335-344.
- [8] Rehm SJ, Graham DR, Srinath L, Prokocimer P, Richard MP, Talbot GH. Successful administration of quinupristin/dalfopristin in the outpatient setting. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 47 (5) : 639-645.
- [9] Bruntner C, Bormann C. The *Streptomyces tendae* Tu901 L-lysine 2-aminotransferase catalyzes the initial reaction in nikkomycin D biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 254 (2) : 347-355.
- [10] Mast Y, Weber T, Golz M, Ort-Winklbauer R, Gondran A, Wohlleben W, Schinko E. Characterization of the 'pristinamycin supercluster' of *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4 (2) : 192-206.
- [11] Namwat W, Kamioka Y, Kinoshita H, Yamada Y, Nihira T. Characterization of virginiamycin S biosynthetic genes from *Streptomyces virginiae*. *Gene*, 2002, 286 (2) : 283-290.
- [12] Ogawara H, Maeda K, Koyama G, Naganawa H, Umezawa H. The chemistry of pyridomycin. *Chemical & pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 1968, 16 (4) : 679-687.
- [13] Pulsawat N, Kitani S, Nihira T. Characterization of biosynthetic gene cluster for the production of virginiamycin M, a streptogramin type A antibiotic, in *Streptomyces virginiae*. *Gene*, 2007, 393 (1-2) : 31-42.
- [14] Namwat W, Kinoshita H, Nihira T. Identification by heterologous expression and gene disruption of VisA as L-lysine 2-aminotransferase essential for virginiamycin S biosynthesis in *Streptomyces virginiae*. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 (17) : 4811-4818.
- [15] Bruckner RC, Zhao G, Venci D, Jorns MS. Nikkomycin biosynthesis: formation of a 4-electron oxidation product during turnover of NikD with its physiological substrate. *Biochemistry*, 2004, 43 (28) : 9160-9167.
- [16] Bruntner C, Lauer B, Schwarz W, Mohrle V, Bormann C. Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tu901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Molecular & General Genetics*, 1999, 262 (1) : 102-114.
- [17] Huang T, Wang Y, Yin J, Du Y, Tao M, Xu J, Chen W, Lin S, Deng Z. Identification and characterization of the pyridomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (23) : 20648-20657.
- [18] Ogawara H, Maeda K, Umezawa H. The biosynthesis of pyridomycin. I. *Biochemistry*, 1968, 7 (9) : 3296-3302.
- [19] Schlumbohm W, Keller U. Chromophore activating enzyme involved in the biosynthesis of the mikamycin B antibiotic etamycin from *Streptomyces griseoviridis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265 (4) : 2156-2161.
- [20] Bonfiglio G, Furneri PM. Novel streptogramin antibiotics. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2001, 10 (2) : 185-198.
- [21] Gust B, Kieser T, Chater KF. *REDIRECT technology: PCR-targeting system in Streptomyces coelicolor*. Norwich: John Inners Center, 2002.
- [22] Ma J, Wang Z, Huang H, Luo M, Zuo D, Wang B, Sun A, Cheng YQ, Zhang C, Ju J. Biosynthesis of himastatin: assembly line and characterization of three cytochrome P450 enzymes involved in the post-tailoring oxidative steps. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50 (34) : 7797-7802.

# Substrate specificity of 3-hydroxypicolinic acid unit in the viridogrsein biosynthetic pathway

Yunchang Xie<sup>1,2</sup>, Jianhua Ju<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Marine Bio-resource Sustainable Utilization, Research Network of Applied Microbiology Center for Marine Microbiology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

<sup>2</sup>Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

**Abstract:** [Objective] To explore the role of *sgvS* in the biosynthesis of 3-hydroxypicolinic acid moiety of viridogrsein, and to analyze the substrate specificity of 3-hydroxypicolinic acid moiety in the viridogrsein biosynthetic pathway. [Methods] Through gene insertion inactivation and *in trans* complementation strategies, we obtained the gene inactivation mutant *sgvS* and its complementation mutant  $\Delta$ *sgvS*::*sgvS*. Meanwhile, we fed 3-hydroxypicolinic acid, picolinic acid, 2-piperidinecarboxylic acid, 3-chloropyridinecarboxylic acid, 4-chloropyridinecarboxylic acid, 3,5-chloropyridinecarboxylic acid, nicotinic acid, 2-chloronicotinic acid, 2-fluoronicotinic acid, 5-fluoronicotinic acid and 6-fluoronicotinic acid to the *sgvS* mutant, respectively. The fermentation extracts were analyzed by HPLC. [Results] *sgvS* mutant abolished the viridogrsein production; viridogrsein production was restored through *in trans* complementation of *sgvS* mutant or by feeding 3-hydroxypicolinic acid to the *sgvS* mutant. No new viridogrsein analogues were observed by feeding other above mentioned 3-hydroxypicolinic acid analogues to the  $\Delta$ *sgvS* mutant. [Conclusion] *sgvS* is necessary for the biosynthesis of 3-hydroxypicolinic acid moiety. The biosynthetic protein, SgvD1, activates 3-hydroxypicolinic acid, showing strict substrate specificity *en route* to the viridogrsein biosynthesis.

**Keywords:** 3-hydroxypicolinic acid, viridogrsein, biosynthesis, specificity

(本文责编:张晓丽)