

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :707 - 718; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140602

尼可霉素生物合成基因簇的改造及其异源表达

王璐^{1#}, 杜德尧^{2#}, 李金娥², 田宇清², 刘浩^{1*}, 牛国清^{2*}, 谭华荣²

¹天津科技大学生物工程学院, 教育部工业发酵微生物重点实验室, 天津 300457

²中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 【目的】异源表达尼可霉素生物合成基因簇, 为尼可霉素核苷和肽基缩合机制研究以及尼可霉素与其它核苷类抗生素的组合生物合成奠定基础。【方法】以含有尼可霉素生物合成基因簇的 pNIK 为出发质粒, 通过 PCR-targeting 的方法, 将基因簇中 *sanG* 和 *sanF* 的启动子替换为组成型 *hrdB* 启动子, 构建重组质粒 pNIKm。通过接合转移的方法分别将 pNIK 和 pNIKm 导入天蓝色链霉菌 M1146 中, 获得异源表达菌株 M1146-NIK 和 M1146-NIKm, 并通过 RT-PCR 检测基因簇的表达情况。最后通过抗菌活性实验和产物的分离鉴定, 比较 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 的抗菌活性和尼可霉素的产生情况。【结果】pNIK 和 pNIKm 在异源宿主天蓝色链霉菌 M1146 成功表达; M1146-NIK 和 M1146-NIKm 均有明显的抗菌活性; M1146-NIK 和 M1146-NIKm 均能产生少量的尼可霉素 X、Z 和假尼可霉素 Z; M1146-NIK 大量积累尿苷, 而 M1146-NIKm 大量积累尿苷、核糖基-4-甲酰-4-咪唑-2-酮和吡啶同型苏氨酸。【结论】尼可霉素生物合成基因簇成功异源表达, 并分离鉴定了尼可霉素产物及其生物合成中间体。本研究将为尼可霉素核苷和肽基缩合的酶学机制研究以及尼可霉素与其它核苷类抗生素组合合成新型杂合抗生素提供理论依据和指导。

关键词: 圈卷产色链霉菌, 尼可霉素, 生物合成基因簇, 异源表达, 抗菌活性, 产物鉴定

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 06-0707-12

尼可霉素 (Nikkomycins) 属于核苷肽类抗生素, 主要产生菌有唐德链霉菌 (*Streptomyces tendae*)^[1] 和圈卷产色链霉菌 (*Streptomyces ansochromogenes*)^[2]。尼可霉素的结构与几丁质合成酶的天然底物 UDP-N-乙酰葡萄糖胺类似, 是几丁质合成酶的强竞争性抑制剂, 可以有效抑制丝状真菌、昆虫、蚜虫和酵母的生长^[3]。尼可霉素由肽基和核苷两部分组成, 肽基部分为羟基吡啶同型苏氨酸 (hydroxypyridylhomothreonine,

HPHT); 核苷部分为尼可霉素 C, 在尼可霉素 X 和 Z 中 (图 1-A), 同 α -氨基己糖醛酸相连的碱基分别为 4-甲酰-4-咪唑-2-酮和尿嘧啶, 相应的核苷称为尼可霉素 Cx 和 Cz。尼可霉素 C 与 HPHT 通过肽键相连形成二肽的尼可霉素 X 和 Z, 尼可霉素 X 和 Z 中的 α -氨基己糖醛酸的 6'-羧基分别与谷氨酸形成肽键, 则形成三肽的尼可霉素 I 和 J^[4]。从唐德链霉菌和圈卷产色链霉菌中, 分别克隆了尼可霉素生物合成基因

基金项目: 国家重点基础研究发展计划——“国家 973 项目” (2013CB734001); 国家自然科学基金 (31470206, 31171202)

* 通信作者。牛国清, Tel: +86-10-64807467, Fax: +86-10-64807461, E-mail: niugq@im.ac.cn; 刘浩, Tel: +86-22-60601599, E-mail: liuhaol227@tust.edu.cn

作者简介: 王璐 (1989-), 女, 河北承德人, 硕士研究生, 主要从事微生物次级代谢的生物合成与调控研究, E-mail: olivia_ll@126.com; 杜德尧 (1984-), 男, 安徽合肥人, 博士研究生, 主要从事微生物次级代谢的生物合成与调控研究, E-mail: dudeyao1020@hotmail.com

收稿日期: 2014-12-19; 修回日期: 2015-01-19

簇,该基因簇包括一个调控基因和分布在三个转录单元中的 21 个结构基因(图 1-B)。通过深入研究这些基因的功能,阐明了调控基因 *sanG* 通过调控 *sanO*-*sanV* 和 *sanN*-*sanI* 的转录,正调控尼可霉素的生物合成,而对 *sanF*-*sanX* 的转录没有影响^[5-6]。此外,阐明了尼可霉素的核苷和肽基的生物合成途径^[7],推测两部分在合成酶 SanS 的作用下缩合形成有活性的尼可霉素^[8],但相关研究至今未见报道。

抗生素生物合成基因簇的异源表达,是研究抗生素生物合成和基因簇遗传改造的重要手段之一,

其优势主要表现在:(1) 将基因簇导入异源宿主中,通过检测终产物验证基因簇是否完整,通过构建系列突变株确定基因簇的边界^[9]; (2) 异源表达是隐性基因簇激活的一个重要手段^[10-11]; (3) 异源表达可以提高目的产物的产量^[12],而且由于异源宿主中特定修饰酶的存在或缺失,可以获得结构多样的目的产物^[4]; (4) 与原始产生菌相比,基因簇在异源宿主中,更易于遗传操作^[13]; (5) 不同的抗生素生物合成基因簇,在异源宿主中通过组合生物合成,形成新的杂合抗生素。

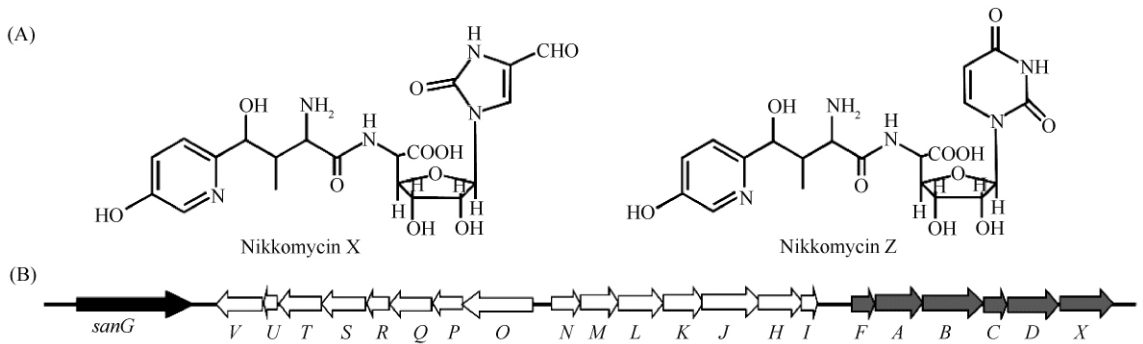


图 1. 尼可霉素的化学结构 (A) 及其生物合成基因簇 (B)

Figure 1. Chemical structures of nikkomycins (A) and organization of the gene cluster for nikkomycin biosynthesis (B).

本研究将含有尼可霉素生物合成基因簇的重组质粒 pNIK 及其衍生质粒 pNIKm (*sanG* 和 *sanF* 的启动子分别替换为 *hrdB* 启动子), 分别导入天蓝色链霉菌 M1146 中, 获得菌株 M1146-NIK 和 M1146-NIKm。通过对 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 抗真菌活性的比较, 评估了启动子替换对尼可霉素异源表达的影响; 通过对有效活性组分的分离、鉴定, 发现 M1146-NIK 与 M1146-NIKm 除了产生尼可霉素 X 和 Z 外, 还可以产生尼可霉素 Z 的结构类似物一假尼

可霉素 Z。此外, 我们比较了两株菌尼可霉素生物合成中间产物的产生情况。本研究将为尼可霉素核苷和肽基缩合机制的研究以及尼可霉素与其它核苷类抗生素的组合生物合成奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 本文所用的菌株见表 1。

表 1. 菌株

Table 1. Strains

Strains	Genotype/description	Reference/source
<i>Escherichia coli</i>		
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) f80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i>	Invitrogen
BW25113	<i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	[14]
ET12567 (pUZ8002)	K-12 derivative, Δ <i>araBAD</i> , Δ <i>rhaBAD</i>	[15]
<i>Streptomyces</i>		
<i>Streptomyces ansochromogenes</i> 7100 (CGMCC 4. 321)	Wild-type, nikkomycin producer	China General Microbiological Culture Collection (CGMCC)
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1146	Δ <i>act</i> Δ <i>red</i> Δ <i>cpk</i> Δ <i>cdca</i>	[13]
M1146-152	<i>S. coelicolor</i> M1146 containing pSET152	This work
M1146-NIK	<i>S. coelicolor</i> M1146 containing pNIK	This work
M1146-NIKm	<i>S. coelicolor</i> M1146 containing pNIKm	This work
<i>Alternaria longipes</i>	Indicator strain	CGMCC

1.1.2 质粒: 本文所涉及的质粒见表 2。

1.1.3 引物: 本文所有引物由 Invitrogen 公司合成, 引物序列见表 3。

表 2. 质粒

Table 2. Plasmids

Plasmids	Relevant characteristics	Reference/source
pBluescript II KS (+)	Routine cloning and subcloning vector	Stratagene
pSET152	Integrative vector	[16]
pIJ790	λ -RED (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101^{ts}</i>	[14]
pIJ778	<i>aadA</i>	[14]
pNIK	A pSET152 based plasmid containing the whole nikkomycin biosynthetic gene cluster	[17]
pBS-NIK	A pBluescript II KS (+) based plasmid containing the nikkomycin biosynthetic gene cluster	This work
pBS-hF	A pBluescript II KS (+) based plasmid containing part of <i>sanF</i> with <i>hrdB</i> promoter	This work
pBS-HI	A pBluescript II KS (+) based plasmid containing part of <i>sanH</i> , <i>sanI</i> and <i>aadA</i>	This work
pBS-HIhF	A pBluescript II KS (+) based plasmid containing part of <i>sanF</i> with <i>hrdB</i> promoter, part of <i>sanH</i> , <i>sanI</i> and <i>aadA</i>	This work
pSET152 :: P _{<i>hrdB</i>} G	pSET152 containing <i>sanG</i> with <i>hrdB</i> promoter	[18]
pBS-hG	pBluescript II KS (+) containing <i>sanG</i> with <i>hrdB</i> promoter	This work
pBS-hGX	pBluescript II KS (+) containing <i>sanG</i> with <i>hrdB</i> promoter, <i>sanG</i> downstream fragment and <i>sanX</i> fragment	This work
pSET152-hGX	pSET152 containing <i>sanG</i> with <i>hrdB</i> promoter, <i>sanG</i> downstream fragment and <i>sanX</i> fragment	This work
pBS-NIKaada	A pBluescript II KS (+) based plasmid containing the whole nikkomycin biosynthetic gene cluster with PhrdB-driven <i>sanF</i>	This work
pBS-NIKm	A pBluescript II KS (+) based plasmid containing the whole nikkomycin biosynthetic gene cluster with PhrdB-driven <i>sanG</i> and <i>sanF</i>	This work
pNIKm	A pSET152 based plasmid containing the whole nikkomycin biosynthetic gene cluster with PhrdB-driven <i>sanG</i> and <i>sanF</i>	This work

表 3. 引物

Table 3. Primers

Primers	Sequences (5'→3')	Purpose
sanH RT-F	GGCCTGGCTGGTCTCTCAA	<i>sanH</i> RT-PCR
sanH RT-R	CTGCCCCGGCTCCTTCTC	<i>sanH</i> RT-PCR
sanHI-F	AATGAGCTCCACCCGGACCGGCTCGACTT	PCR 465 bp of <i>sanH</i> and <i>sanI</i>
sanHI-R	AATCGCGGCCGCTCGTCTCGGACGGCGGCTT	PCR 465 bp of <i>sanH</i> and <i>sanI</i>
sanF-F	GTGGTGTGACGCTCGACTCGG	PCR 355 bp of <i>sanF</i>
sanF-R	CCGCTCGAGCCGTTGCGGTGGGTGTAGAGGC	PCR 355 bp of <i>sanF</i>
aadA-F	AATCGCGGCCGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	PCR of <i>aadA</i> cassette
aadA-R	AATGAATTCATTCCGGGGATCCGTCGACC	PCR of <i>aadA</i> cassette
hrdBp-F	AATGAATTCGCCGCTTCGCCCGGAACG	PCR of <i>hrdB</i> promoter
hrdBp-R	GAACAACCTCTCGGAACGTTGA	PCR of <i>hrdB</i> promoter
sanG dn-F	AATCTCGAGCGGCCGATCGTCCGTTCC	PCR 422 bp of <i>sanG</i> downstream region
sanG dn-R	AATGATATCCGGAAACCGCTGAAGCCCG	PCR 422 bp of <i>sanG</i> downstream region
sanX-F	AATGATATCGACCAAGCTCGCAACCA	PCR 147 bp of <i>sanX</i>
sanX-R	AATGGTACCTCAGGCCGGTCCACACC	PCR 147 bp of <i>sanX</i>
sanG RT-F	GGCTTTCGGTGTGATGAC	<i>sanG</i> RT-PCR
sanG RT-R	CCTGGGAGACGAGGGTCT	<i>sanG</i> RT-PCR
sanF RT-F	GAAGCCCCGGTCTTCCCC	<i>sanF</i> RT-PCR
sanF RT-R	TGATCCGCTCGGTCCCT	<i>sanF</i> RT-PCR
sanX RT-F	GCTCACGCCCTGCACCAT	<i>sanX</i> RT-PCR
sanX RT-R	GTCGACCCGCACCCCAT	<i>sanX</i> RT-PCR
sanO RT-F	CGACGGCTGCCTGGAGTT	<i>sanO</i> RT-PCR
sanO RT-R	CGGATGCCGGCGATGAGA	<i>sanO</i> RT-PCR
sanI RT-F	GCACATCACCCGGACAG	<i>sanI</i> RT-PCR
sanI RT-R	CAATCCTCGTGCATCCGG	<i>sanI</i> RT-PCR
sanN RT-F	CTGTCCGTGTCGGTCCCTG	<i>sanN</i> RT-PCR
sanN RT-R	TCGATCTCGTCCGCTCTC	<i>sanN</i> RT-PCR
sanV RT-F	GGCGGAATGCTCGGAGAT	<i>sanV</i> RT-PCR
sanV RT-R	CGGGTCCGGGATAAACG	<i>sanV</i> RT-PCR

Underlined means restriction enzyme recognition sites.

1.1.4 培养基和培养条件: LB 培养基用于大肠杆菌的培养, MS 培养基和 YEME 培养基用于链霉菌培养, SP^[17] 为尼可霉素发酵培养基。大肠杆菌的培养温度为 37℃, 链霉菌的培养温度为 28℃。

1.1.5 主要试剂: 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, 高保真 KOD-plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司, T4 多聚核苷酸激酶购自 New England Biolabs 公司, T4 DNA 连接酶购自 Thermo 公司, 反转录酶购自 Invitrogen 公司。

1.2 DNA 基本操作与分析

分子生物学常规操作参照分子克隆实验指南^[19], 链霉菌基因组的提取按照链霉菌操作手册进行^[20]。

1.3 重组质粒的构建

重组质粒 pBS-HIhF 和 pSET152-hGX 的构建流程如图 2 所示。具体步骤如下: 以圈卷产色链霉菌基因组 DNA 为模板, 用引物对 sanF-F/sanF-R 扩增

sanF 片段, 用引物对 sanHI-F/sanHI-R 扩增 sanHI 片段; 以天蓝色链霉菌基因组 DNA 为模板, 用引物 hrdBp-F 和磷酸化的 hrdBp-R 扩增 hrdB 启动子片段; 以 pIJ778 为模板, 用引物对 aadA-F/aadA-R 扩增链霉素/壮观霉素抗性基因 aadA 片段。将 sanF 和 hrdB 启动子片段按照图 2-A 所示酶切, 连入 pBluescript II KS (+) 得到重组质粒 pBS-hF; 将 sanHI 和 aadA 片段按照图 2-A 所示酶切, 连入 pBluescript II KS (+) 得到重组质粒 pBS-HI。用 EcoR I/Xho I 酶切 pBS-hF, 回收含有 sanF 和 hrdB 启动子的片段, 连入相同酶切的 pBS-HI, 得到重组质粒 pBS-HIhF。

用 Xba I/Xho I 酶切 pSET152::hG, 回收含有 sanG 及其上游 hrdB 启动子的片段, 连入相同酶切的 pBluescript II KS (+), 得到重组质粒 pBS-hG。以圈卷产色链霉菌基因组 DNA 为模板, 用引物对 sanG dn-F/SanG dn-R 和 sanX-F/sanX-R, 分别扩增 sanG 下游片段 Gdn 和 sanX 片段。将两个扩增片段

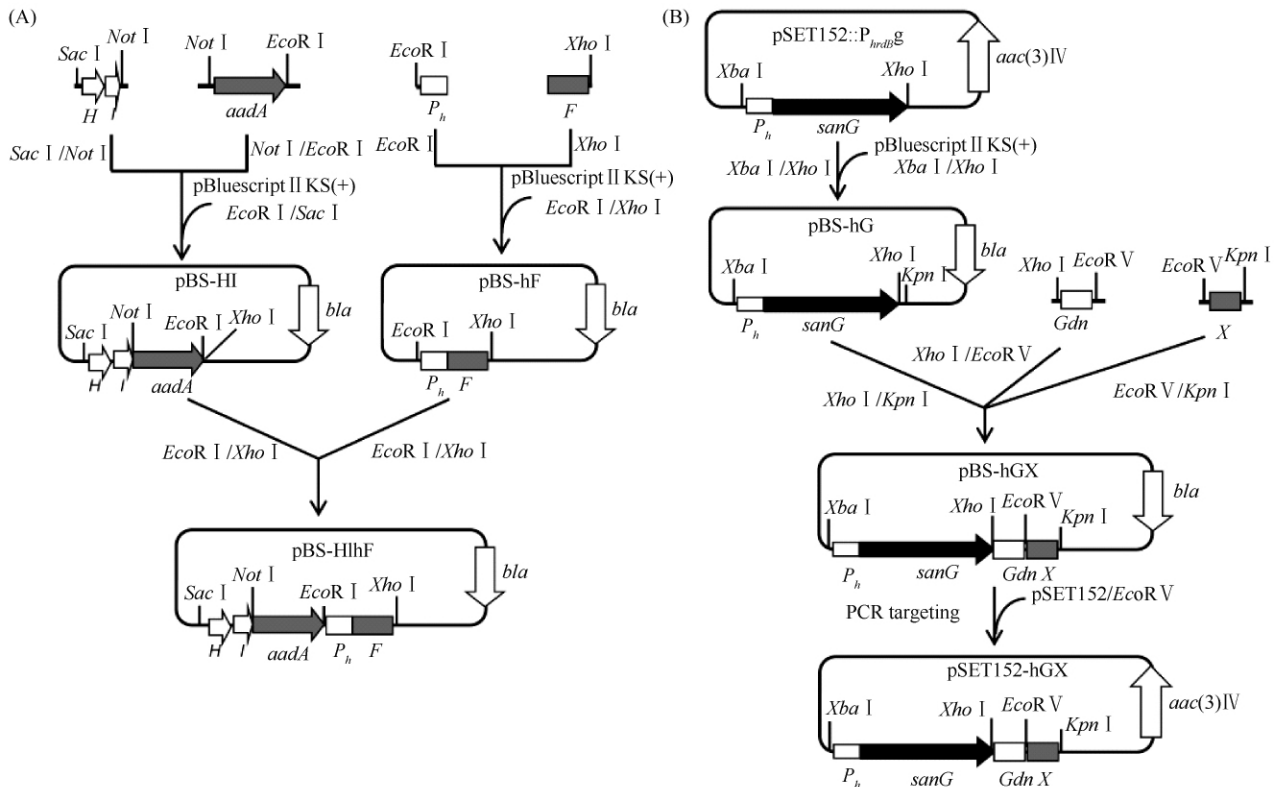


图 2. 重组质粒 pBS-HIhF 和 pSET152-hGX 的构建示意图

Figure 2. Schematic diagram of the construction of pBS-HIhF (A) and pSET152-hGX (B). P_h : *hrdB* promoter; *aadA*: Spectinomycin/streptomycin resistance gene; *bla*: Ampicillin resistance gene; *aac(3)IV*: Apramycin resistance gene; pSET152/*EcoRV*: *EcoR* V linearized pSET152.

按照图 2-B 所示酶切, 连入 *XhoI/KpnI* 双酶切的 pBS-hG, 得到重组质粒 pBS-hGX。用 *EcoRV* 酶切 pSET152, 利用 pSET152 和 pBluescript II KS (+) 含有的 *lacZ* 同源序列, 通过 PCR targeting 获得重组质粒 pSET152-hGX。所有 PCR 扩增片段均由 Invitrogen 公司测序验证。

1.4 天蓝色链霉菌的接合转移

重组质粒转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002, 通过接合转移的方法^[20]转入天蓝色链霉菌 M1146。

1.5 尼可霉素的产生和分析

尼可霉素的发酵和 HPLC 分析按照文献方法^[17]进行, 抗菌活性检测参照文献方法^[21]。

1.6 RNA 制备和 RT-PCR 分析

RNA 制备和 cDNA 合成按照文献 [18] 方法进行。PCR 条件为 95℃ 预变性 5 min, 28 个循环: 95℃ 变性 45 s; 60℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 40 s, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.7 尼可霉素的分离、纯化与鉴定

发酵液通过大孔树脂 (HP20), 收集流出液; 通过阳离子交换树脂, 用 0.2 mol/L 氨水进行洗脱; 将洗脱液通过葡聚糖凝胶柱 Sephadex LH-20, 分段收集并进行活性检测; 将活性区段通过 Agilent 1100 HPLC 系统和 ZORBAX SB-Aq 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 进一步纯化; 纯化样品的结构通过质谱与核磁共振波谱鉴定。

2 结果

2.1 重组质粒 pNIKm 的构建及验证

鉴于 *sanG* 正调控 *sanO-sanV* 和 *sanN-sanI* 的转录, 而对 *sanF-sanX* 的转录没有影响^[5-6]。为了尼可霉素生物合成基因簇的高表达, 我们的策略是将 *sanG* 和 *sanF* 的启动子替换为组成型强启动子, 需要通过 3 次 PCR targeting 和一次 FLP 重组酶介导的抗性基因切除来完成改造 (图 3)。首先, 将 pBluescript II KS (+) 用 *EcoR V* 酶切, 通过 PCR targeting 将尼可霉素生物合成基因簇从 pSET152 转移到 pBluescript II KS (+); 其次, 以 pBS-HIhF 为模板, 用引物 *sanHI-F* 和 *sanF-R*, 扩增 HI-*aadA*-hF 片段, 通过 PCR targeting 将 *sanF* 的启动子替换为 *hrdB* 启动子; 通过 FLP 重组酶的作用, 将抗性基因 *aadA* 片段切除; 最后, 将 pSET152-hGX 用 *EcoR V* 酶切, 通过 PCR targeting 将 *sanG* 的启动子替换为 *hrdB* 启动子, 同时将 pBluescript II KS (+) 替换为 pSET152, 获得 pNIKm (图 3)。重组质粒 pNIKm 分别用 *Bgl II* 和 *Not I* 酶切验证。*Bgl II* 酶切预期片段为 12399、7609、6105、4108、2764、2259 和 534 bp; *Not I* 酶切预期片段为 21409、8062 和 6065 bp。重组质粒 pNIKm 酶切后琼脂糖凝胶电泳结果与预期一致 (图 4-A), 说明构建的重组质粒 pNIKm 是正确的。

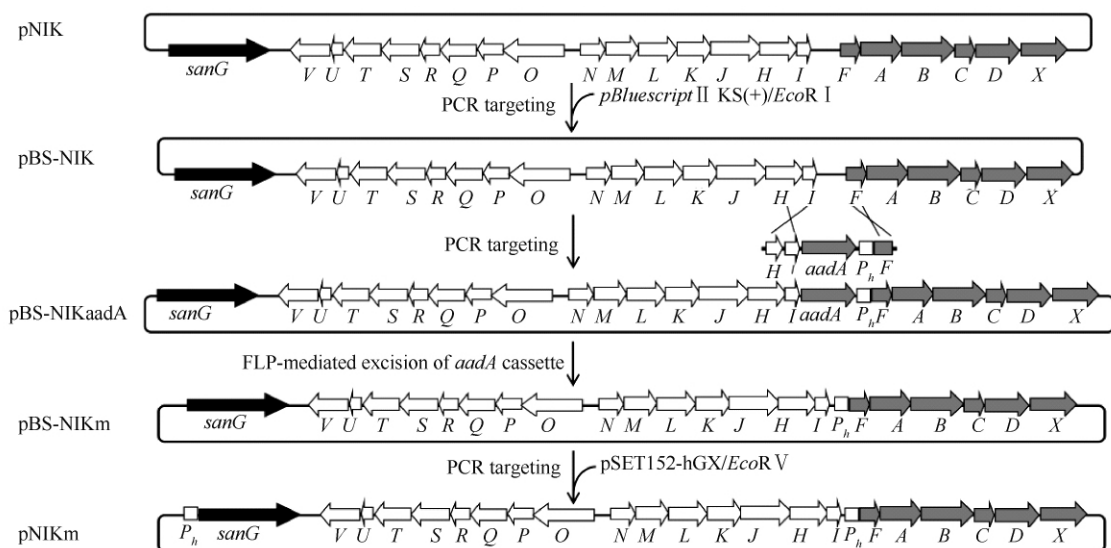


图 3. 重组质粒 pNIKm 的构建示意图

Figure 3. Schematic diagram of the construction of pNIKm. pBluescript II KS (+) / *EcoR V*: *EcoR V* linearized pBluescript II KS (+); *aadA*: Spectinomycin/streptomycin resistance gene; P_h : *hrdB* promoter; pSET152/*EcoR V*: *EcoR V* linearized pSET152.

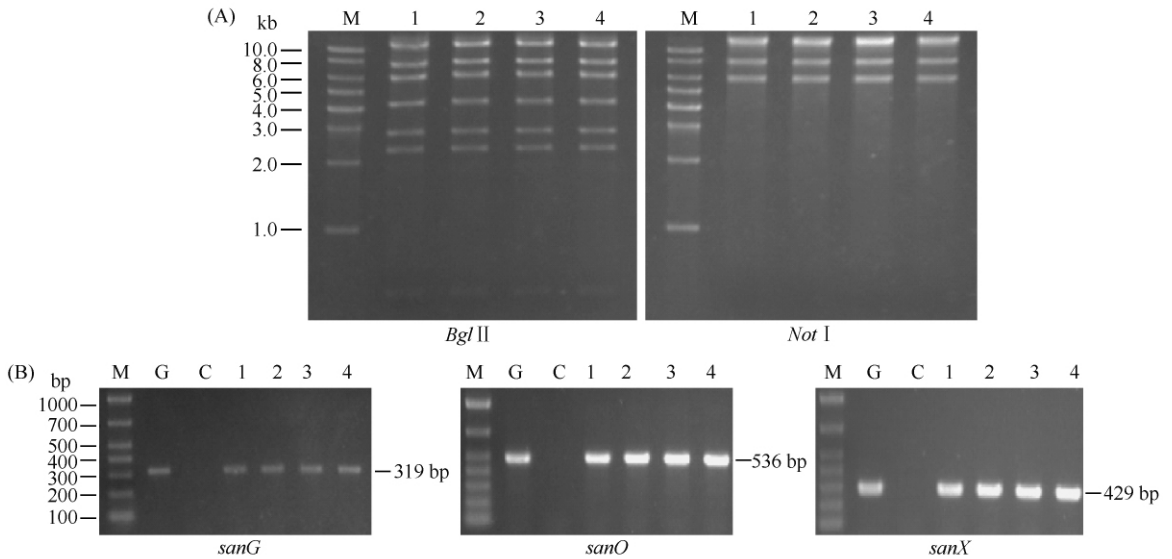


图 4. 重组质粒 pNIKm 的酶切验证以及 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 的 PCR 验证

Figure 4. Confirmation of pNIK and M1146-NIK/M1146-NIKm by restriction digestion analysis (A) and PCR amplifications (B). M: DNA ladder; 1, 2: Different clones of pNIK for restriction digestion or genomic DNAs from different M1146-pNIK as PCR templates; 3, 4: Different clones of pNIKm for restriction digestion or genomic DNAs from different M1146-pNIKm as PCR templates; G: Genomic DNA from *S. ansochromogenes* 7100 as PCR template; C: Genomic DNA from M1146-152 as PCR template.

2.2 重组质粒 pNIK 和 pNIKm 在天蓝色链霉菌 M1146 中的异源表达

天蓝色链霉菌 M1146 是英国 Mevyn Bibb 教授课题组构建的异源表达菌株^[13], 目前该菌株已成功用于多种抗生素生物合成基因簇的表达^[22]。分别将 pNIK 和 pNIKm 通过接合转移导入天蓝色链霉菌 M1146 中, 得到 M1146-NIK 和 M1146-NIKm。随机挑选四个接合子提取基因组 DNA, 选用三对引物 (*sanG* RT-F/*sanG* RT-R、*sanO* RT-F/*sanO* RT-R 和 *sanX* RT-F/*sanX* RT-R) 进行 PCR 验证。所有 PCR 扩增产物片段大小与预期一致 (图 4-B), 说明 pNIK 和 pNIKm 成功转入天蓝色链霉菌 M1146 中。选取 M1146-NIK 和 M1146-NIKm, 培养 24 和 48 h 后分别提取 RNA, 以 *hrdB* 为对照, 通过 RT-PCR 对尼可霉素生物合成基因簇中 *sanG*、*sanV*、*sanO*、*sanN*、*sanH*、*sanI*、*sanF* 和 *sanX* 的转录进行分析。结果表明: 与对照菌株 M1146-152 相比, 以 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 的 cDNA 为模板, 利用八对引物均能扩增出预期条带 (图 5), 说明尼可霉素生物合成基因簇在天蓝色链霉菌 M1146 中成功转录。

2.3 异源表达产物的抗真菌活性检测

以上结果表明尼可霉素生物合成基因簇成功导入天蓝色链霉菌 M1146 中并正常转录, 但这些基因

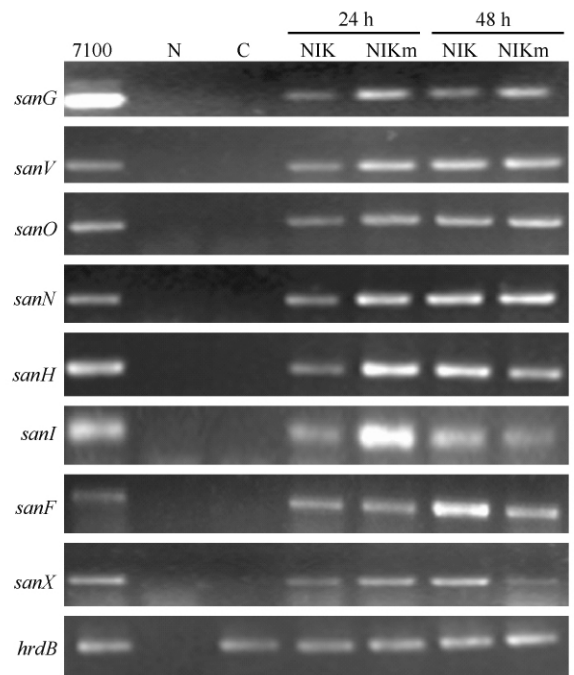


图 5. 尼可霉素生物合成基因簇的转录分析

Figure 5. RT-PCR analysis of genes involved in nikkomycin biosynthesis. PCR templates are genomic DNA from *S. ansochromogenes* 7100 (7100), ddH₂O (N), genomic DNA from M1146-152 (C) and cDNA from M1146-NIK (NIK) or M1146-NIKm (NIKm).

能否合成有生物活性的尼可霉素分子？对尼可霉素生物合成基因簇的改造是否有助于尼可霉素在异源宿主中大量产生？为此，我们分别制备了 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 的发酵液以及对照菌株 M1146、M1146-152 和圈卷产色链霉菌 7100 的发酵液，以长柄链格孢为指示菌，对其抗菌活性进行检测。结果表明：与 M1146 和 M1146-152 不同，M1146-NIK 和 M1146-NIKm 对长柄链格孢有明显的抗菌活性；M1146-NIKm 的抗菌活性低于 M1146-NIK，且两者的抗菌活性均明显低于圈卷产色链霉菌 7100（图 6）。

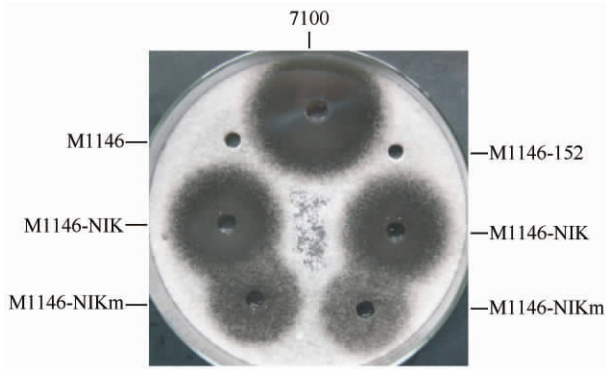


图 6. 抗菌活性检测

Figure 6. Bioassays of nikkomycin production against *A. longipes*.

2.4 异源表达产物的分离与鉴定

前期研究发现：巴比妥酸能够与尼可霉素核苷部分 Cx 的五元环碱基发生特异的颜色反应^[23]。将 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 的发酵液分别与巴比妥酸进行反应，结果发现：与圈卷产色链霉菌 7100 的发酵液一样，M1146-NIKm 的发酵液能够与巴比妥酸反应显示橙色，而 M1146-NIK 的发酵液却不能显示橙色（图 7）。进一步 HPLC 分析发现 M1146-NIKm 可以产生大量的化合物 1、2 和 3，而 M1146-NIK 仅产生化合物 1（图 8-A），但是，直接对 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 的发酵液进行 HPLC 分析，未检测到尼可霉素组分对应的吸收峰。通过化合物分离和核磁共振分析，化合物 1、2 和 3 结构鉴定为尿苷（uridine）、核糖基-4-甲酰-4-咪唑-2-酮（ribofuranosyl-4-formyl-4-imidazolone）和吡啶同型苏氨酸（pyridylhomothreonine, PHT）（图 9、表 4）。

由于这 3 个化合物均不能抑制长柄链格孢的生长，为了纯化 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 发酵液中的有效抗菌组分，分别对 M1146-NIK 和 M1146-

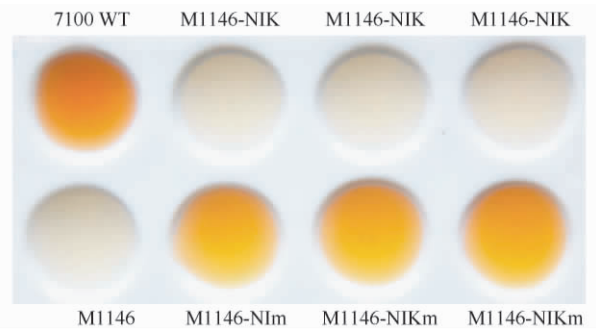


图 7. 巴比妥酸检测

Figure 7. Color reaction of compounds with barbituric acid.

NIKm 进行了发酵罐（5 L）培养，发酵液经过大孔树脂（HP 20）、离子交换树脂、Sephadex LH-20 和 HPLC 等一系列样品浓缩和纯化，确定 M1146-NIK 可以产生尼可霉素 X（约 0.1 mg/L）和尼可霉素 Z（约 0.8 mg/L）；同样 M1146-NIKm 也可以产生尼可霉素 X（约 0.1 mg/L）和尼可霉素 Z（约 0.2 mg/L）。在圈卷产色链霉菌 7100 中，尼可霉素 X 和 Z 的产量，分别为 220 和 120 mg/L^[17]。此外，发现 M1146-NIK 与 M1146-NIKm 在尼可霉素 X 和 Z 之间还产生了一个新的吸收峰（化合物 4），该化合物在 M1146-NIK 中产量约为 0.4 mg/L，而在 M1146-NIKm 中产量约为 0.06 mg/L。抗菌实验表明：与尼可霉素 X 和 Z 一样，化合物 4 对长柄链格孢有明显的抑制作用。化合物 4 与尼可霉素 Z 紫外吸收基本相同；高分辨质谱分析发现其分子量为 496.1671，与尼可霉素 Z 的分子量 496.1675 相近；分子式为： $C_{20}H_{25}N_5O_6$ ，与尼可霉素 Z 的分子式相同，但共进样分析发现化合物 4 与尼可霉素 Z 不同（图 8-B）。这些结果表明，化合物 4 与尼可霉素 Z 分子量相近、结构相似，可能为尼可霉素 Z 的结构类似物。将分离到的化合物 4 进行核磁共振波谱分析，与尼可霉素 Z 的¹H-NMR 和¹³C-NMR 数据比较（图 10、表 5），发现化合物 4 与尼可霉素 Z 的化学位移信号相似，主要差异为：¹H-NMR 中尼可霉素 Z 的一个信号 δ 5.69 (1H, d, $J = 4.5$) 在化合物 4 中向高场位移为 δ 4.71 (1H, d, $J = 4.2$)，同时尼可霉素 Z 中 δ 5.75 (1H, d, $J = 8.0$) 的信号峰在化合物 4 的¹H-NMR 中缺失；在¹³C-NMR 中，尼可霉素 Z 的信号峰 δ 102.4 和 δ 91.2 在化合物 4 中分别变化为 δ 109.8 和 δ 54.5。这些数据表明化合物 4 与尼可霉素 Z 的差别在核苷部分，且糖基部分与尿嘧啶可能连接在

C-5 上。尼可霉素 Z 中 H-6 ($\delta 7.44$, 1H, d) 裂分由双峰变成单峰 ($\delta 7.44$, 1H, s) 以及 H-5 与 H-6 在 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 中无相关信号峰进一步验证了上述推测。结合耦合常数 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY 和 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC 等其他数据以及文献报道^[24], 化合物 4 鉴定为假尼可霉素 Z。

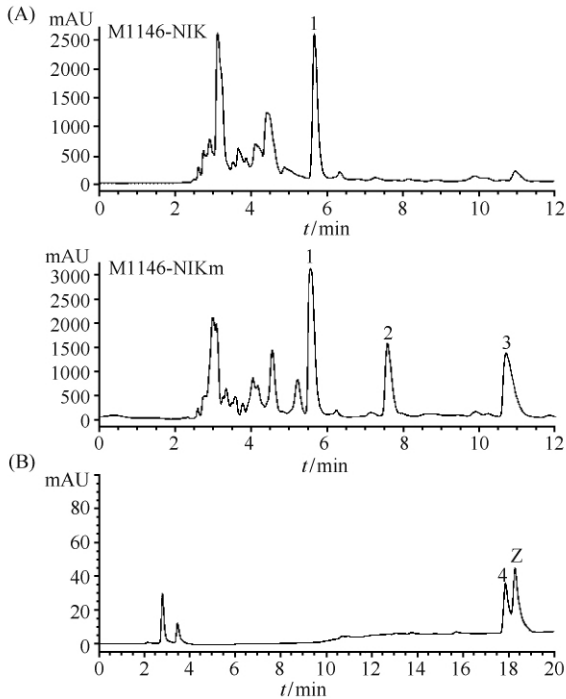


图 8. M1146-NIK 和 M1146-NIKm 发酵液的 HPLC 分析 (A) 及假尼可霉素 Z 和尼可霉素 Z 的共进样 HPLC 分析 (B)

Figure 8. HPLC analysis of uridine (1), ribofuranosyl-4-formyl-4-imidazolone (2), PHT (3), nikkomycin pseudo-Z (4) and nikkomycin Z (Z).

3 讨论

在抗生素生物合成基因簇的异源表达中, 为了基因簇在异源宿主中的成功表达, 一个重要的手段就是将基因簇中关键基因的启动子替换为组成型启动子^[25]。将谷氏菌素生物合成基因簇中关键结构基因的启动子替换为 *hrdB* 启动子, 在异源宿主天蓝色链霉菌 M1146 中, 谷氏菌素的产量提高了 10 倍^[18]。在尼可霉素的生物合成中, *sanG* 正调控 *sanO-sanV* 和 *sanN-sanI* 的转录, 而对 *sanF-sanX* 的转录没有影响^[5-6]。本研究以含有尼可霉素生物合成基因簇的 pNIK 为出发质粒, 将基因簇中 *sanG* 和

sanF 的启动子替换为 *hrdB* 启动子, 构建了重组质粒 pNIKm。将 pNIK 和 pNIKm 分别导入天蓝色链霉菌 M1146 中, 获得菌株 M1146-NIK 和 M1146-NIKm。虽然 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 均有明显的抗真菌活性, 但 M1146-NIKm 的抗菌活性明显低于 M1146-NIK (图 6)。发酵罐培养后, 发现 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 只能产生少量的尼可霉素 X 和 Z。与 M1146-NIK 相比, M1146-NIKm 除了大量积累尿苷外, 还大量积累了核糖基-4-甲酰-4-咪唑-2-酮和 PHT (图 8-A), 说明 *sanG* 和 *sanF* 的启动子替换为 *hrdB* 启动子后, 尼可霉素基因簇中的大部分基因转录增强 (图 5), 导致尼可霉素生物合成中间体大量积累。在尼可霉素的生物合成途径中, 尿苷和核糖基-4-甲酰-4-咪唑-2-酮是尼可霉素核苷 Cz 和 Cx 的重要前体, 而 PHT 是尼可霉素肽基 HPHT 的重要前体^[7]。最近, 有研究发现尿苷和核糖基-4-甲酰-4-咪唑-2-酮转化为 Cz 和 Cx 的过程中, 需要烯醇式丙酮酸转移酶和氨基转移酶的参与^[26-27], 但核苷部分的核糖如何经过酶促反应形成氨基核糖酸还需要深入研究。从现有结果来看, M1146-NIK 和 M1146-NIKm 虽然大量积累了尼可霉素生物合成中间体, 但尼可霉素 X 和 Z 的产量偏低, 说明负责后续反应的基因在异源宿主中低水平表达或者其编码产物的酶活性较低。

将含有唐德链霉菌尼可霉素生物合成基因簇的两个质粒, 同时导入变铅青链霉菌 TK23 中。在具有抗菌活性的 6 个转化子中, 5 个转化子的尼可霉素产量为 10 mg/L, 1 个转化子的尼可霉素产量可以达到 400-500 mg/L^[28]。鉴于此, 通过基因簇比较研究, 筛选唐德链霉菌尼可霉素生物合成基因簇中可能参与核苷部分氨基核糖酸的基因, 导入到 M1146-NIKm 中, 通过检测尼可霉素的产生, 确定这些基因是否参与核苷部分氨基核糖酸的转化。在此基础上, 可以利用天蓝色链霉菌成熟的遗传操作平台, 为解决尼可霉素核苷和肽基的缩合这一重要问题提供便利。

由于异源宿主与原始产生菌遗传背景的差异, 异源宿主中特异性修饰酶的存在或缺失, 产生结构多样化的目的产物^[4]。本研究发现 M1146-NIK 和 M1146-NIKm 不仅产生了少量尼可霉素 X 和 Z, 同时也产生了假尼可霉素 Z (图 8-B 和图 10-B)。在圈卷产色链霉菌中, 并未检测到假尼可霉素 Z 的存

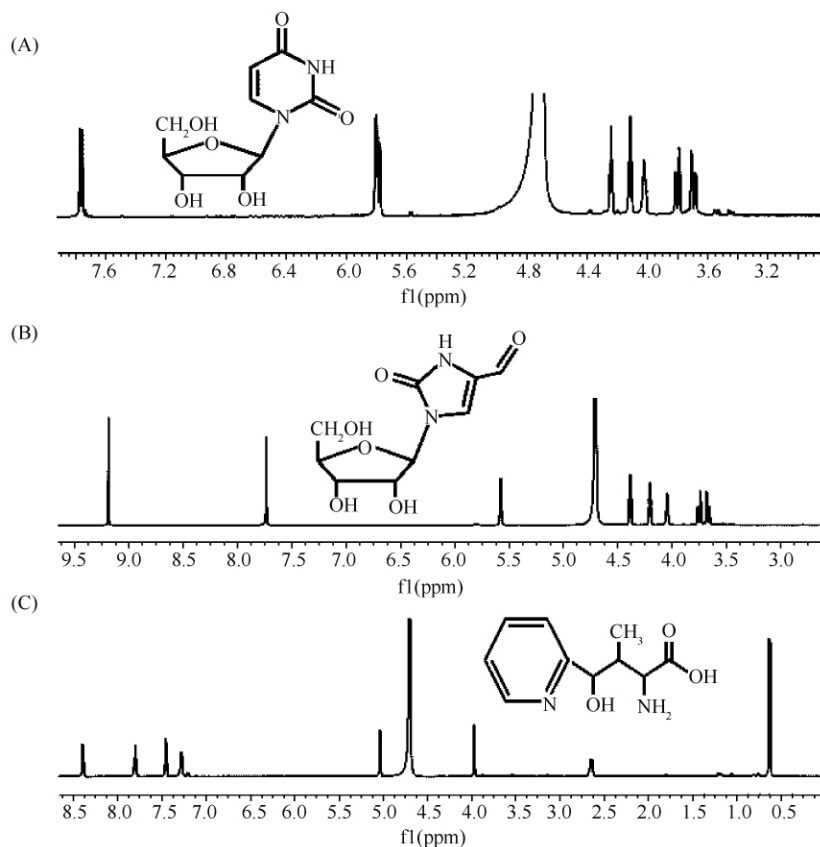


图 9. 化合物 1,2,3 的结构鉴定

Figure 9. Structural determination of uridine, ribofuranosyl-4-formyl-4-imidazolone and PHT. A: Structure and ¹H-NMR spectrum of uridine (1). B: Structure and ¹H-NMR spectrum of ribofuranosyl-4-formyl-4-imidazolone (2). C: Structure and ¹H-NMR spectrum of PHT (3).

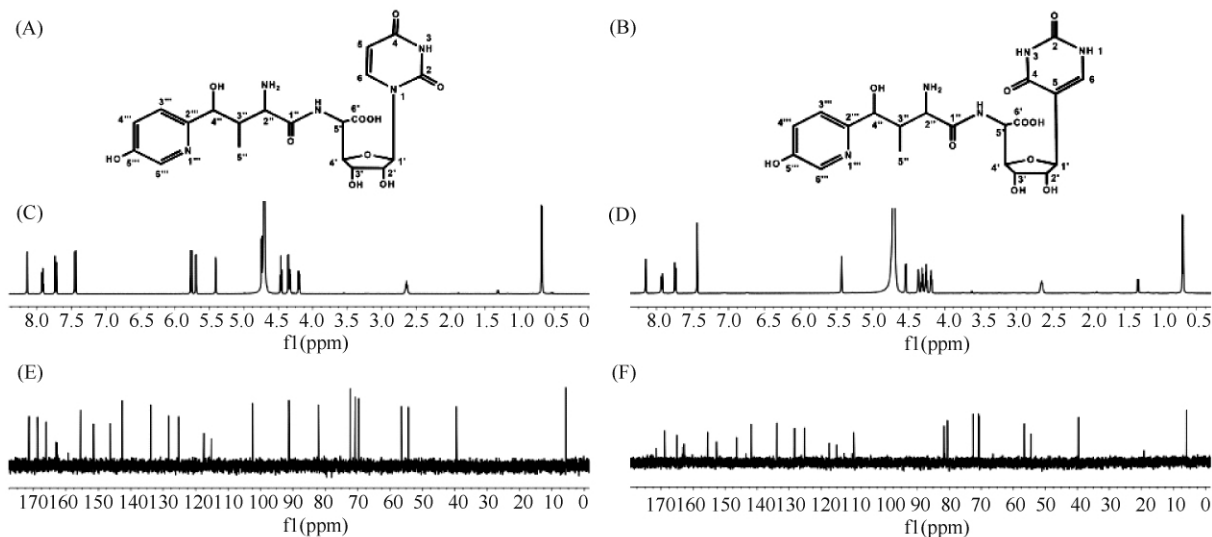


图 10. 尼可霉素 Z 和假尼可霉素 Z 的结构鉴定

Figure 10. Structural determination of nikkomycin Z and pseudo-Z. Structure of nikkomycin Z (A) and pseudo-Z (B); ¹H-NMR spectrum of nikkomycin Z (C) and pseudo-Z (D); ¹³C-NMR spectrum of nikkomycin Z (E) and pseudo-Z (F).

在,但在唐德链霉菌中已有假尼可霉素 Z 的报道^[24]。假尼可霉素 Z 的前体为假尿嘧啶,但假尿嘧啶如何进入尼可霉素的生物合成途径? 相应的酶如何识别假尿嘧啶和尿嘧啶,催化效率如何? 对这些问

题的回答,有待进一步的研究。综上所述,本文将对研究尼可霉素的生物合成,特别是氨基核糖酸的形成和核苷与肽基缩合机制的研究有促进作用,同时可以为尼可霉素与其它抗生素的组合生物合成奠定基础。

表 4. 尿苷、核糖基-4-甲酰-4-咪唑-2-酮和吡啶同型苏氨酸的核磁共振波谱数据分析

Table 4. Summary of ¹H and ¹³C NMR data for uridine, ribofuranosyl-4-formyl-4-imidazolone and PHT in D₂O

Position	Uridine		Ribofuranosyl-4-formyl-4-imidazolone		PHT	
	δ (¹ H, mult., J)	¹³ C (δ)	δ (¹ H, mult., J)	¹³ C (δ)	δ (¹ H, mult., J)	¹³ C (δ)
1						173.7
2		151.9		153.2	3.97 (1H, d, 4)	58.8
3					2.65 (1H, m)	38.3
4		166.4		124.2	5.03 (1H, d, 5)	76.0
5	5.79 (1H, d, 8.0)	103.7	7.74 (1H, s)	125.5	0.63 (3H, d, 6.0)	6.0
6	7.77 (1H, d, 8.0)	143.6	9.19 (1H, s)	180.2		
1'	5.81 (1H, d, 4.0)	91.5	5.57 (1H, d, 4.0)	86.7		
2'	4.24 (1H, t, 6.0)	75.8	4.38 (1H, t, 6.0)	73.4		159.8
3'	4.11 (1H, t, 6.0)	71.6	4.20 (1H, t, 6.0)	70.0	7.45 (1H, d, 8.0)	123.2
4'	4.02 (1H, q, 4.0)	83.6	4.04 (1H, q, 4.0)	84.5	7.80 (1H, t, 8.0)	138.3
5'	3.74 (2H, dd, 8.0, 4.0)	62.7	3.70 (2H, dd, 8.0, 4.0)	60.9	7.28 (1H, t, 8.0)	120.9
6'					8.39 (1H, d, 8.0)	147.8

表 5. 尼可霉素 Z 和假尼可霉素 Z 的核磁共振波谱数据分析

Table 5. Summary of ¹H and ¹³C NMR data for nikkomycin Z and pseudo Z in D₂O

Position	Nikkomycin Z		Nikkomycin pseudo Z	
	δ (¹ H, mult., J)	¹³ C (δ)	δ (¹ H, mult., J)	¹³ C (δ)
2		151.5		152.7
4		166.1		165.1
5	5.75 (1H, d)	102.4		109.8
6	7.44 (1H, d)	142.6	7.44 (1H, s)	141.9
1'	5.69 (1H, d, 4.5)	91.2	4.71 (1H, d, 4.0)	54.5
2'	4.32 (1H, dd, 4.5, 5.5)	72.2	4.18 (1H, dd, 4.0, 6.0)	72.5
3'	4.46 (1H, t, 5.5)	69.7	4.31 (1H, t, 6.0)	70.7
4'	4.19 (1H, dd, 4.0, 5.5)	82.1	4.25 (1H, dd, 4.0, 6.0)	81.6
5'	4.74 (1H, d, 4.0)	54.3	4.53 (1H, d, 4.0)	80.5
6'		171.4		171.5
1''		168.7		168.9
2''	4.35 (1H, d, 4.0)	56.4	4.36 (1H, d, 4.0)	56.4
3''	2.64 (1H, m)	39.6	2.65 (1H, m)	39.7
4''	5.40 (1H, d)	70.7	5.43 (1H, s)	70.9
5''	0.67 (3H, d, 7.0)	5.8	0.69 (3H, d, 7.0)	5.9
2'''	8.70 (1H, s)	146.3	8.68 (1H, s)	146.4
3'''	7.92 (1H, dd, 8.0, 6.0)	125.2	7.92 (1H, dd, 8.0, 6.0)	125.2
4'''	7.72 (1H, dd, 8.0, 6.0)	133.9	7.74 (1H, dd, 8.0, 6.0)	143.9
5'''		155.5		155.4
6'''	8.14 (1H, d, 6.0)	128.3	8.15 (1H, d, 6.0)	128.3

参考文献

[1] Brillinger GU. Metabolic products of microorganisms. 181. Chitin synthase from fungi, a test model for substances with insecticidal properties. *Archives of Microbiology*, 1979, 121 (1): 71-74.

[2] Chen W, Zeng H, Tan H. Cloning, sequencing, and function of *sanF*: A gene involved in nikkomycin biosynthesis of *Streptomyces ansiochromogenes*. *Current Microbiology*, 2000, 41 (5): 312-316.

[3] Dähn U, Hagenmaier H, Höhne H, König WA, Wolf G, Zähler H. Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. 154. Mitteilung. Nikkomycin, ein neuer hemmstoff der

- chitinsynthese bei pilzen. *Archives of Microbiology*, 1976, 107 (2) : 143-160.
- [4] Niu G, Tan H. Nucleoside antibiotics: biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Trends in Microbiology*, 2015, In press.
- [5] He X, Li R, Pan Y, Liu G, Tan H. SanG, a transcriptional activator, controls nikkomycin biosynthesis through binding to the *sanN-sanO* intergenic region in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbiology*, 2010, 156 (Pt 3) : 828-837.
- [6] Liu G, Tian Y, Yang H, Tan H. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Molecular Microbiology*, 2005, 55 (6) : 1855-1866.
- [7] Winn M, Goss RJ, Kimura K, Bugg TD. Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis. *Natural Product Reports*, 2010, 27 (2) : 279-304.
- [8] Li J, Li L, Tian Y, Niu G, Tan H. Hybrid antibiotics with the nikkomycin nucleoside and polyoxin peptidyl moieties. *Metabolic Engineering*, 2011, 13 (3) : 336-344.
- [9] Niu G, Li L, Wei J, Tan H. Cloning, heterologous expression, and characterization of the gene cluster required for gougerotin biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 2013, 20 (1) : 34-44.
- [10] Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77 (1) : 112-143.
- [11] Niu G, Tan H. Biosynthesis and regulation of secondary metabolites in microorganisms. *Science China. Life Sciences*, 2013, 56 (7) : 581-583.
- [12] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (6) : 2646-2651.
- [13] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4 (2) : 207-215.
- [14] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (12) : 6640-6645.
- [15] MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 1992, 111 (1) : 61-68.
- [16] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116 (1) : 43-49.
- [17] Liao G, Li J, Li L, Yang H, Tian Y, Tan H. Cloning, reassembling and integration of the entire nikkomycin biosynthetic gene cluster into *Streptomyces ansochromogenes* lead to an improved nikkomycin production. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9 : 6.
- [18] Du D, Zhu Y, Wei J, Tian Y, Niu G, Tan H. Improvement of gougerotin and nikkomycin production by engineering their biosynthetic gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (14) : 6383-6396.
- [19] Sambrook P, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [20] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation, 2000.
- [21] Feng C, Ling H, Du D, Zhang J, Niu G, Tan H. Novel nikkomycin analogues generated by mutasynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13 (1) : 59.
- [22] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41 (2) : 425-431.
- [23] Delzer J, Fiedler HP, Müller H, Zähner H, Rathmann R, Ernst K, König WA. New nikkomycins by mutasynthesis and directed fermentation. *The Journal of Antibiotics*, 1984, 37 (1) : 80-82.
- [24] Heitsch H, König WA, Decker H, Bormann C, Fiedler HP, Zähner H. Metabolic products of microorganisms. 254. Structure of the new nikkomycins pseudo-Z and pseudo-J. *The Journal of Antibiotics*, 1989, 42 (5) : 711-717.

- [25] Stevens DC, Hari TP, Boddy CN. The role of transcription in heterologous expression of polyketides in bacterial hosts. *Natural Product Reports*, 2013, 30(11) : 1391-1411.
- [26] Binter A, Oberdorfer G, Hofzumahaus S, Nerstheimer S, Altenbacher G, Gruber K, Macheroux P. Characterization of the PLP-dependent aminotransferase NikK from *Streptomyces tendae* and its putative role in nikkomycin biosynthesis. *The FEBS Journal*, 2011, 278(21) : 4122-4135.
- [27] Oberdorfer G, Binter A, Ginj C, Macheroux P, Gruber K. Structural and functional characterization of NikO, an enolpyruvyl transferase essential in nikkomycin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(37) : 31427-31436.
- [28] Bormann C, Möhrle V, Bruntner C. Cloning and heterologous expression of the entire set of structural genes for nikkomycin synthesis from *Streptomyces tendae* Tü901 in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(4) : 1216-1218.

Engineering and heterologous expression of a nikkomycin biosynthetic gene cluster

Lu Wang^{1#}, Deyao Du^{2#}, Jin'e Li², Yuqing Tian², Hao Liu^{1*}, Guoqing Niu^{2*}, Huarong Tan²

¹Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

²State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] We expressed a nikkomycin biosynthetic gene cluster in the well-characterized surrogate *Streptomyces coelicolor* M1146. [Methods] By using PCR-targeting method, we replaced the promoters of *sanG* and *sanF* in pNIK, which contains nikkomycin biosynthetic gene cluster, with the *hrdB* promoter to generate pNIKm. We transferred pNIK and pNIKm into *S. coelicolor* M1146 by intergeneric conjugation and obtained M1146-NIK and M1146-NIKm, respectively. We then evaluated expression of the gene cluster in the heterologous host by RT-PCR. Furthermore, we also compared the antifungal activity and nikkomycin production of M1146-NIK and M1146-NIKm by bioassay against *Alternaria longipes* and HPLC analysis. [Results] M1146-NIK and M1146-NIKm exhibited antifungal activity, and they can produce a trace amount of nikkomycin X, nikkomycin Z and pseudo-Z. There was a substantial accumulation of uridine in M1146-NIK, whereas substantial accumulations of uridine, ribofuranosyl-4-formyl-4-imidazolone and pyridylhomothreonine were observed in M1146-NIKm. [Conclusion] We successfully expressed the nikkomycin biosynthetic gene cluster in the heterologous host and identified nikkomyeins and some of its key biosynthetic intermediates. This study will provide the basis for enzymatic reaction of the condensation between the two nikkomycin moieties and for the generation of hybrid antibiotics by combinatorial biosynthesis.

Keywords: *Streptomyces ansochromogenes*, nikkomycin, biosynthetic gene cluster, heterologous expression, antifungal activity, compound identification

(本文责编:张晓丽)

Supported by Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2013CB734001) and by the National Natural Science Foundation of China (31470206, 31171202)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-64807467; Fax: +86-10-64807461; E-mail: niuqg@im.ac.cn, liuhao1227@tust.edu.cn

#Those authors contributed equally to this work.

Received: 19 December 2014/Revised: 19 January 2015