



杀粉蝶菌素A1生物合成基因簇中甲基转移酶PieB2的功能

赵震宇, 刘倩, 由德林*

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

摘要: 【目的】研究杀粉蝶菌素A1产生菌中甲基转移酶基因*pieB2*的功能。【方法】利用接合转移和同源重组双交换的方法, 构建*pieB2*基因缺失突变株, 以及利用接合转移的方法, 构建回补菌株。通过高保真PCR克隆*pieB2*基因到表达载体pET28a上, 构建质粒pJTU5997, 转化入大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)/pLysE中诱导表达。利用高效液相色谱检测PieB2的体外酶活。【结果】获得了*pieB2*基因缺失的双交换突变株。发酵结果显示, 该突变株不再产生杀粉蝶菌素A1, 而是积累了一种脱甲基产物。N-末端融合组氨酸标签的PieB2在大肠杆菌中获得可溶性表达, 通过体外催化证明了PieB2甲基转移酶的功能。【结论】体内遗传实验和体外生化实验证明了PieB2作为甲基转移酶在杀粉蝶菌素A1合成中的作用。

关键词: 杀粉蝶菌素A1, 甲基转移酶, 基因敲除, 生物合成

杀粉蝶菌素A1 (Piericidin A1, 图 1)是一种具有良好生物活性的 α -吡啶酮类天然产物, 可由多种链霉菌产生^[1]。它通过结合线粒体呼吸作用复合体I, 抑制Fe-S簇氧化和泛醌的还原, 从而作为线粒体呼吸作用抑制剂发挥作用。基于这一作用机理, 杀粉蝶菌素A1对致病真菌显示较强的生物活性, 对蚕、菜青虫有很显著的杀虫效果^[2]。1972年到1982年间, 我国将其作为杀虫抗生素, 进行了大规模的应用性示范推广。近期有研究发现, 杀粉蝶菌素A1对肿瘤也有一定抑制效果^[3-6]。在20世纪初, 通过诱变育种得到的1株杀粉蝶菌素A1高产突变株, 命名为票霉素链霉菌杭州湾变种 (*Streptomyces piomogeues* var. *Hangzhouwanensis*)^[7-8]。

2012年, 上海交通大学联合加州大学洛杉矶分校在此菌株中克隆了杀粉蝶菌素A1生物合成基因簇, 初步解析了其核心结构 α -吡啶酮的生物合成机制^[9]。2014年, 中国科学院南海海洋研究所也从1株海洋链霉菌*Streptomyces* sp. SCSIO 03032中克隆了杀粉蝶菌素A1生物合成基因簇^[10]。在分析杀粉蝶菌素A1生物合成途径基础上, 本研究利用体内基因置换, 失活了杀粉蝶菌素A1生物合成基因簇中的后修饰基因*pieB2*, 并通过体外生化实验证实了PieB2的甲基转移酶功能, 分析了甲基转移酶*pieB2*基因缺失突变株产生的脱甲基杀粉蝶菌素A1的生物活性。为获得活性更好、毒性更小的杀粉蝶菌素衍生物建立了基础。

基金项目: 国家自然科学基金(31170085); 国家“973计划”(2012CB721004)

*通信作者。Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sytu.edu.cn

收稿日期: 2015-10-15; 修回日期: 2015-11-13; 网络出版日期: 2015-12-30

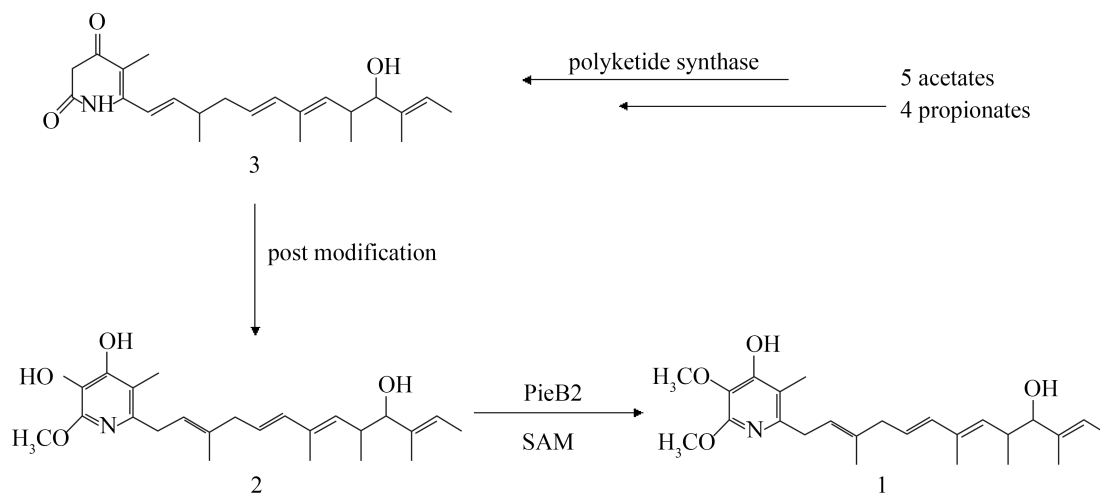


图 1. 杀粉蝶菌素A1的化学结构和PieB2催化的化学反应

Figure 1. Chemical structure of piericidin A1 and PieB2-catalyzed chemical reaction.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌DH10b、BL21 (DE3)/pLysE 和 ET12567/pUZ8002, 票霉素链霉菌杭州湾变种(*Streptomyces piomogeues* var. *Hangzhouwanensis*)^[9], 质粒pJTU1278^[11]、pJTU5990 (pJTU1278衍生)、pIJ773和表达载体pET28a均由上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保藏。甲基转移酶基因*pieB2*缺失的双交换突变株LQ-9, *pieB2*回补菌株ZZY-1以及*pieB2*表达载体pJTU5997为本研究构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶*Nde* I、*Eco*R I、*Hind* III、*Kpn* I和*Mun* I, T4 DNA连接酶均购自Fermentas公司, PCR反应选用TaKaRa *Taq*试剂盒以及高保真DNA扩增酶KOD_PLUS-NEO, 1 kb Plus DNA ladder 购自Invitrogen公司。YMS培养基(Difco酵母膏4 g/L, 可溶性淀粉4 g/L, Difco麦芽提取物 10 g/L, CoCl₂ 5 mg/L, 琼脂粉 16 g/L)用于产生孢子(30 °C, 7 d)以及接合转移。杀粉蝶菌素A1发酵培养基(玉米淀粉15 g/L, 黄豆饼粉15 g/L, 细麦麸15 g/L, KNO₃ 6 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1 g/L,

CaCO₃ 5 g/L, 1.1 kg/cm²灭菌30 min)用于液体发酵。PDA培养基用于生物活性测定(马铃薯200 g/L, 葡萄糖20 g/L, 琼脂粉15 g/L)。LB及LA培养基用于大肠杆菌的培养。根据需要加入的抗生素终浓度为: 氨苄霉素(Ampicillin, Amp) 100 μg/mL, 卡那霉素(Kanamycin, Km) 50 μg/mL, 氯霉素(Chloramphenicol, Cml) 25 μg/mL, 壮观霉素(Spectinomycin, Spec) 50 μg/mL, 阿泊拉霉素(Apramycin, Apr) 30 μg/mL和萘啶酮酸(Nalidixic acid) 25 μg/mL。

1.2 *pieB2*基因敲除突变株的构建

将质粒pIJ773用*Eco*R I和*Hind* III酶切, 回收1398 bp片段, 片段上含有阿泊拉霉素抗性基因以及接合转移使用的*oriT*。以此片段为模板, 设计一对引物*pieB2*-F (5'-ATGGCTGTCGACAA CGACGTCTACAACACACTCCTGGATTCCG GGGATCCGTCGACC-3')和*pieB2*-R (5'-TCAGTTTGCTGCCTTTCGTGCATAGCCGGCGT AGATCACTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'), PCR扩增得到带有阿泊拉霉素抗性基因的DNA片段, 通过与携带杀粉蝶菌素A1生物合成基因的fosmid文库质粒pJTU5990双交换, 得到敲除质粒

pJTU5991, 然后通过结合转移筛选得到*pieB2*双交换突变株LQ-9。在中断基因的外侧设计引物对突变株进行验证, 确定相应基因被阿泊拉霉素抗性基因替换, 由此实现中断*pieB2*的目的。对于突变株LQ-9, 774 bp的*pieB2*双交换后被1382 bp的*oriT-aac(3)IV*替代, 因此以1对验证引物PieB2check-F (5'-TGGGCGATGAAGACGTTTCG-3')和PieB2check-R (5'-CAGGTGCTGCGGGAGGTTG-3')进行PCR时, 野生型条带为1489 bp, 而双交换突变株应为2097 bp, 如图2所示。

1.3 *pieB2* 基因敲除突变株的回补

以票霉素链霉菌杭州湾变种的基因组DNA为模板, 用引物B2-F (5'-ATATGGCTGTCGACAACGACGTCTAC-3')和B2-R (5'-GAATTCTCAGTTTGCTGCCTTTCGTGC-3')进行聚合酶链式反应扩增得到0.7 kb的*pieB2*片段, 经*Nde* I和*Eco*R I双酶切之后, 连接入同样酶切处理的载体pJTU968^[12]。再用*Eco*R I和*Mun* I双酶切, 连接入同样酶切处理的载体pJTU1278, 得到回补质粒pZZY1。在辅助质粒pUZ8002的协助下, 将回补质粒pZZY1通过

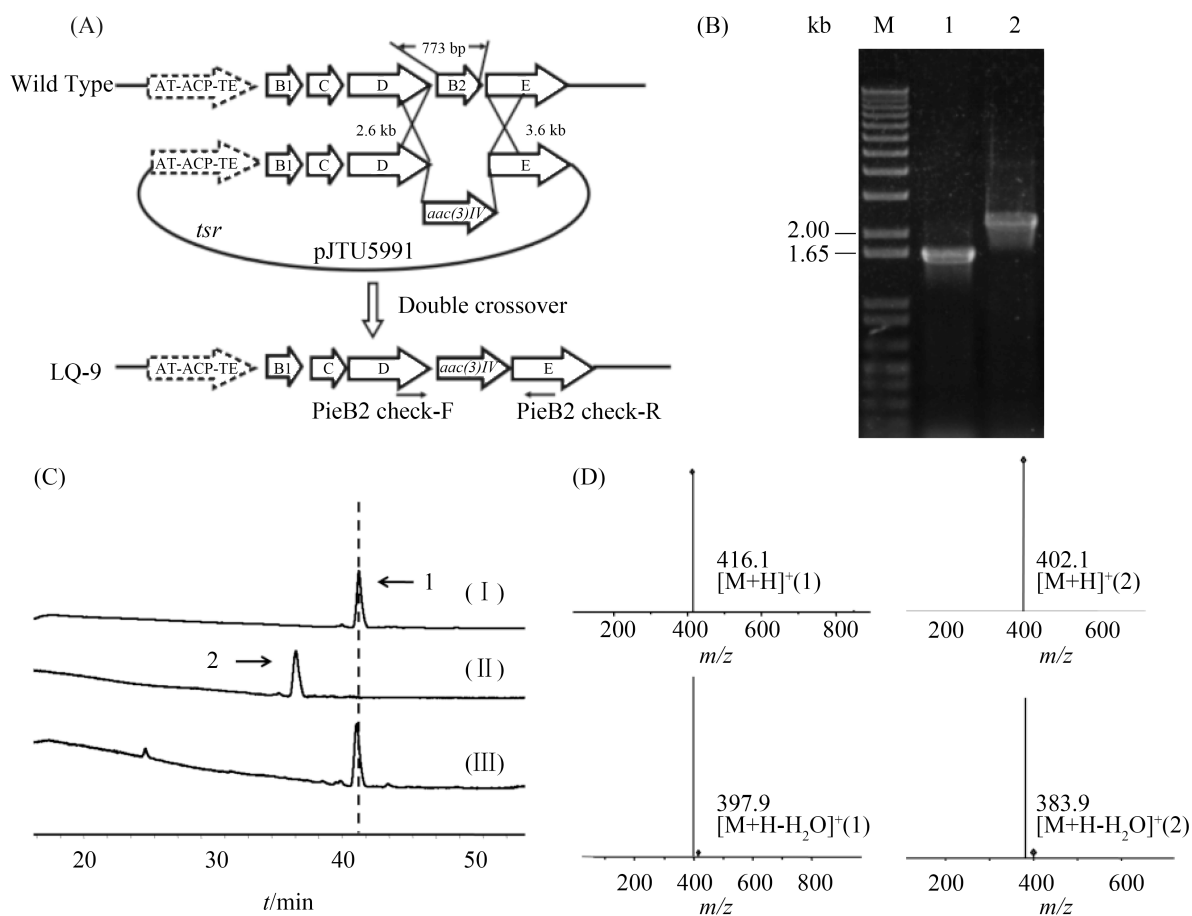


图 2. *pieB2*基因敲除突变株的构建(A, B)和发酵产物的LC-MS检测(C, D)

Figure 2. Construction and LC-MS analysis of the *pieB2* disruption mutant LQ-9. A: construction of the *pieB2* disruption mutant LQ-9. The 0.8 kb region in chromosome was replaced by 1.4 kb *aac(3)IV* gene. B: PCR confirmation of the *pieB2* disruption mutant LQ-9. M, 1 kb DNA ladder; lane 1, wild-type strain; lane 2, double crossover recombinant. C: HPLC analysis of the fermentation extracts of *S. piomogeeus* var. Hangzhouwanensis (i), $\Delta pieB2$ (ii) and $\Delta pieB2$ -pZZY1 (iii) strain. D: validation of picroidin A1 (1) and demethylpicroidin (2) from the fermentation extracts by mass spectrum analysis.

结合转移导入LQ-9中, 通过抗性筛选获得结合转移子ZZY-1。

1.4 链霉菌发酵、发酵产物的HPLC以及LC-MS检测

以TSBY培养基为种子培养基, 将野生型菌株、突变株LQ-9和回补突变株ZZY-1接种, 并于30 °C摇床培养48 h。将其转接至发酵培养基中, 于30 °C摇床培养72 h。离心收集发酵液, 用漏斗过滤除去固体残留物, 用等体积乙酸乙酯萃取3次, 弃去水相, 有机相用旋转蒸发仪蒸干。利用高效液相色谱(HPLC)对粗产物进行检测, 流动相A相为水(经Millipore公司Milli-Q纯水器处理并抽滤), B相为乙腈。检测程序如下: 0–25 min, B相10%–90%梯度洗脱; 25–55 min, 90%等度洗脱; 55–60 min, 90%–100%梯度洗脱。流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 232 nm; 柱温: 25 °C。仪器: Agilent 1100 series LC/MSD Trap System。

液质用[LC-MS(n)]分析是在正离子模式下进行, 喷雾器压力为30 Psi, 干燥气流为10 L/min, 干燥气温为325 °C, 分子量扫描范围为200至700, 多级质谱断裂分析轰击电压在1.0–1.5 V之间。色谱条件同上。

1.5 *pieB2*基因的克隆、表达和纯化

以票霉素链霉菌杭州湾变种的基因组DNA为模板, 用引物B2-F/B2-R进行聚合酶链式反应扩增得到0.7 kb的*pieB2*基因片段, 经*Nde* I和*Eco*R I双酶切之后, 连接入同样酶切处理的载体pET28a, 得到表达质粒pJTU5997。将重组质粒pJTU5997转化入*E. coli* BL21(DE3)/pLysE, 挑取单克隆接入50 mL LB培养基(含50 mg/L卡那霉素, 25 mg/L氯霉素), 于37 °C过夜培养后, 以1%的接种量接入LB培养基(1 L, 含50 mg/L卡那霉素, 25 mg/L氯霉素)中, 于37 °C培养3–4 h, 待 OD_{600} 达到0.4–0.6时, 加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.2 mmol/L, 于16 °C诱导表达8 h。高速离心收集菌体(12000 \times g, 15 min, 4 °C),

用60 mL缓冲液A(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 8.0)洗涤菌体2次后, 重悬于30 mL缓冲液A中, 进行超声波破碎以释放蛋白, 然后高速冷冻低温离心(12000 \times g, 1 h, 4 °C)除去不溶部分。将可溶性上清部分, 上样到HisTrap HT column(1 mL, GE Healthcare)上, 用洗脱缓冲液进行梯度洗脱(50 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液, 300 mmol/L NaCl, 20–200 mmol/L咪唑, pH 8.0), 取15 μ L全菌, 沉淀, 上清和洗脱样品100 °C煮沸, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测融合PieB2蛋白的表达情况与可溶性, 分离胶浓度为12%。根据SDS-PAGE检测情况, 收集PieB2蛋白的洗脱液, 使用Micropure-EZ (Amicon)蛋白超滤管(20 mL, 10 kDa)浓缩至0.5 mL, 溶解于含10%甘油的Tris-HCl缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0), 采用Bradford方法测定蛋白浓度分装保存于–80 °C备用。

1.6 甲基转移酶 PieB2的酶催化反应及检测

采用PBS缓冲液(50 mmol/L, pH 7.5)进行PieB2的100 μ L酶促反应, 包含100 μ mol/L底物, 10 μ mol/L PieB2, 100 μ mol/L S-腺苷甲硫氨酸(SAM)。30 °C反应结束后, 立刻加入等体积乙酸乙酯萃取。上清用旋转蒸发仪蒸干, 进行HPLC分析, 检测酶促反应情况。流动相A相为水(经Millipore公司Milli-Q纯水器处理并抽滤), B相为乙腈。检测程序如下: 0–35 min, B相90%等度洗脱。流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 232 nm; 柱温: 25 °C。仪器: Agilent 1100 series LC/MSD Trap System。

1.7 脱甲基杀粉蝶菌素A1的生物活性测定

将生物学活性测定指示菌-粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)悬浮于0.85%生理盐水制成指示菌悬液, 并用生理盐水调节菌悬液浓度, 使分光光度计测得在650 nm下的 OD 值为0.1左右。PDA培养基加热融化后, 冷却至50–52 °C时, 按4%的比例加入适宜浓度的指示菌悬液, 快速倒入已灭菌的培养皿上, 迅速转动。待培养基冷却凝固后, 在牛

津杯中滴加发酵液或者已分离得到的粗品。培养皿置于4 °C冰箱中放置4–6 h, 然后取出置于30 °C培养12 h后观察结果。

2 结果和分析

2.1 *pieB2*基因敲除突变株的构建和发酵产物分析

对杀粉蝶菌素A1的生物合成基因簇进行生物信息学分析, 发现PieB2与泛醌生物合成中的O-甲基转移酶有很高的序列相似性(50% identity)^[13], 与另一种电子传递链的抑制剂stigmatellin生物合成基因中的StiK有49%同源性^[14]。因此, 推测PieB2可能在杀粉蝶菌素A1的生物合成途径中, 作为甲基转移酶负责杀粉蝶菌素A1在聚酮合酶合成碳骨架后的结构修饰。为了验证这个推论是否正确, 构建了*pieB2*基因敲除突变株LQ-9(图2-A)。将获得的突变株LQ-9, 用杀粉蝶菌素A1发酵培养基进行发酵培养, 30 °C培养3 d后, 用乙酸乙酯萃取发酵产物用于HPLC和LC-MS分析。HPLC结果显示, 与野生型菌株的发酵产物检测结果对比, 突变株LQ-9中杀粉蝶菌素A1不再产生, 但在232 nm波长下, 检测到突变株LQ-9发酵积累的化合物2(图2-C)。通过LC-MS对化合物2进一步检测分析, 发现其 m/z 值为402.1[M+H]⁺, 与杀粉蝶菌素A1(416.1 m/z [M+H]⁺)去掉一个甲基一致。同时, 其二级质谱碎片峰为383.9 m/z [M+H]⁺, 是402.1 m/z [M+H]⁺脱去一分子水后的碎片峰, 也与杀粉蝶菌素A1脱去一分子水后的二级质谱碎片峰(397.9 m/z [M+H]⁺)一致(图2-D)。这些结果证实*pieB2*基因敲除突变株LQ-9产生了脱甲基杀粉蝶菌素A1, 初步表明PieB2在杀粉蝶菌素A1生物合成途径中, 负责催化甲基化后修饰反应。另外, 根据PieB2同源蛋白的体外催化研究^[10], 可以确定其催化后修饰反应的最后一步, 即催化化合物2转化为杀粉蝶菌素A1(图1)。

2.2 *pieB2*基因敲除突变株的回补

为了进一步确认突变株LQ-9产生的脱甲基杀

粉蝶菌素A1, 是*pieB2*的基因敲除产生, 而不是在构建*pieB2*基因敲除突变株过程中其它基因突变导致的, 对突变株LQ-9进行了基因回补验证。本实验中使用质粒pJTU1278进行了*pieB2*基因回补, 它由pHZ1358改造而来, 既可以在大肠杆菌中复制也可以在链霉菌中复制, 有多个限制性酶切位点可以利用。通过PCR扩增*pieB2*基因, 连接入载体pJTU968, 在转入pJTU1278中, 得到带有红霉素抗性基因启动子(Perm E)的回补质粒pZZY1, 将回补质粒pZZY1通过结合转移导入LQ-9中, 获得回补菌株ZZY-1。与野生型的发酵检测结果对比, 发现回补菌株ZZY-1恢复了杀粉蝶菌素A1的产生(图2-C)。证明了PieB2确实是负责脱甲基杀粉蝶菌素A1(化合物2)的甲基化。

2.3 重组甲基转移酶PieB2的体外功能分析

体内基因中断和回补实验显示PieB2是1个甲基转移酶, 为了得到PieB2催化甲基化反应的直接证据, 进行了体外功能验证。首先在大肠杆菌中重组表达了甲基转移酶PieB2, 利用镍柱纯化, 在1 L大肠杆菌培养液中获得10 mg PieB2蛋白。当以化合物2为底物, 在有SAM存在下, PieB2可以催化得到杀粉蝶菌素A1。并且随着时间的延长, 杀粉蝶菌素A1的量逐渐增多(图3-A)。为了进一步证明该体外反应确实是由PieB2催化, 而非其他因素, 用不同酶量的PieB, 检测了其催化化合物2转化为杀粉蝶菌素A1的能力。分别用0、5、10、20 μmol/L的PieB蛋白, 并在反应0.5 h时进行取样检测(避免反应时间过长, 底物全部转化为产物)。当不加入PieB2时, 没有产物杀粉蝶菌素A1的积累, 而其他体系中, 随着酶量的增加, 反应产物杀粉蝶菌素A1的积累增多(图3-B), 再次证明了PieB2催化了甲基化反应。

2.4 脱甲基杀粉蝶菌素A1的生物活性分析

杀粉蝶菌素A1具有良好的生物活性, 包括抗真菌和杀虫^[2]。其中对粘红酵母的最低抑菌浓度可达到1.0 μg/mL。由于其作用机理是抑制线粒体

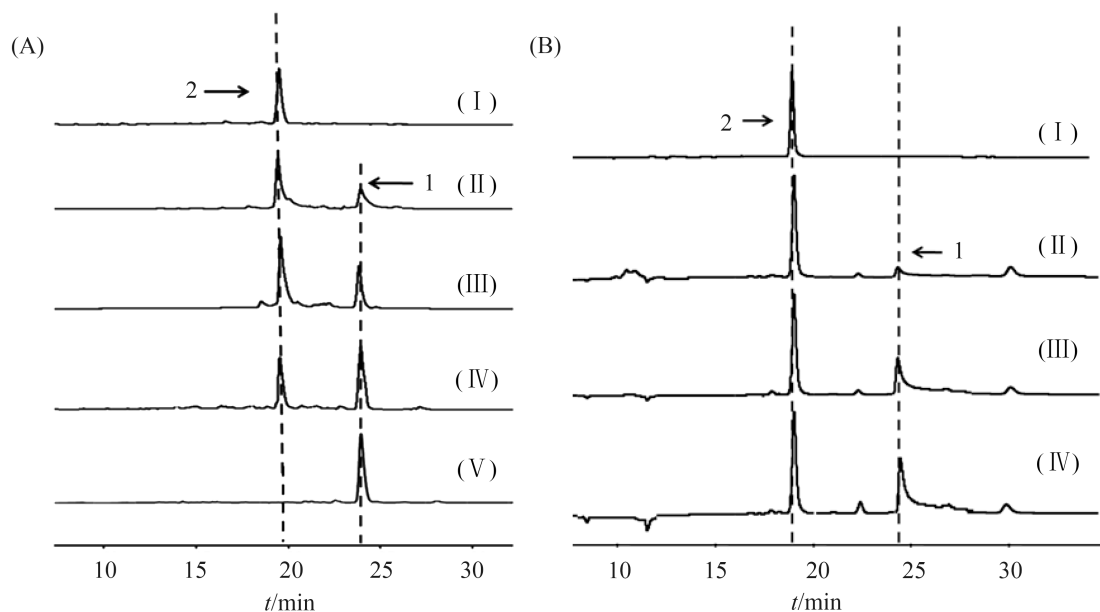


图 3. PieB2体外催化反应的HPLC检测

Figure 3. HPLC analysis of PieB2-catalyzed reactions. A: a time course of PieB2 was assayed for 0 h (I), 0.1 h (II), 0.5 h (III), 1 h (IV), and the standard (V) in PBS buffer (pH 7.5) at 30 °C with 100 μmol/L substrate, 10 μmol/L PieB2 and 2 mmol/L SAM. B: effect of concentration of 0 μmol/L (I), 5 μmol/L (II), 10 μmol/L (III) and 20 μmol/L PieB2 (IV) on transformation of demethylpiericidin (2) into piericidin A1 (1).

呼吸作用，因此杀粉蝶菌素A1对脊椎动物也有很强的毒性。实验证明，它对老鼠的口服急性毒性为3.3 mg/kg，属于高毒药品。因此，获得具有生物活性而毒性降低的杀粉蝶菌素衍生物，是这类抗生素应用的关键^[12]。利用粘红酵母作为指示菌，采用常规杯碟法，对分离获得的脱甲基杀粉蝶菌素A1，进行了生物活性测定。结果显示，杀粉蝶菌素A1的抑菌圈直径为11 mm，脱甲基杀粉蝶菌素A1的抑菌圈直径为9 mm (图4)。两者对粘

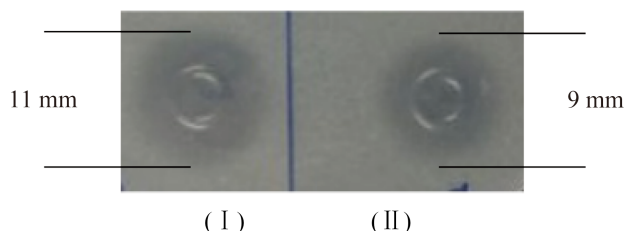


图 4. 脱甲基杀粉蝶菌素A1和杀粉蝶菌素A1的生物活性测定分析

Figure 4. Activity analysis of piericidin A1 (I) and demethyl-piericidin A1 (II).

红酵母都具有抑菌作用，表明脱甲基杀粉蝶菌素A1脱去甲基后仍具有很好的生物活性。

3 讨论

杀粉蝶菌素A1是 α -吡啶酮天然产物，通过抑制电子传递链，对很多生物具有很强的毒性^[1]。其合成基因簇中存在修饰基因*pieB2*，通过生物信息学预测为一个SAM依赖的甲基转移酶基因，参与杀粉蝶菌素A1的后修饰步骤^[9-10]。本文获得的*pieB2*基因缺失突变株LQ-9和回补菌株ZYY-1的HPLC和LC-MS分析结果显示，在*pieB2*基因敲除后，不再有杀粉蝶菌素A1产生，而是积累了脱甲基杀粉蝶菌素A1。将基因回补后，杀粉蝶菌素A1又可以产生。重组PieB2进行体外催化，HPLC检测结果显示，PieB2可以催化脱甲基杀粉蝶菌素A1向杀粉蝶菌素A1的转化，表明PieB2在杀粉蝶菌素A1的合成中起到甲基转移酶的作用。

由于杀粉蝶菌素A1不仅对致病真菌，粉蝶幼

虫具有较高毒性，其对哺乳动物也有很强毒性，而且杀粉蝶菌素A1几乎不溶于水，这使其应用受到局限^[1-2]，本文通过对脱甲基杀粉蝶菌素A1的生物活性测定，结果表明脱甲基杀粉蝶菌素A1作为 α -吡啶酮类天然产物同样具有良好的生物活性。甲基化修饰是广泛存在的一类修饰，对于部分天然产物来说，甲基化对于其生物活性或者水溶性非常重要。例如具有抗肿瘤活性的细胞毒素苯并恶唑在脱去一个甲基后，显示出之前不具有的抗细菌生物活性^[15]。在实验中也观察到相比杀粉蝶菌素A1，脱甲基杀粉蝶菌素A1微溶于水，水溶性有所提高，因此希望通过更多后修饰基因的研究得到水溶性高或生物活性更好的杀粉蝶菌素A1衍生物。本研究得到的脱甲基杀粉蝶菌素A1的毒性尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Hall C, Wu MJ, Crane FL, Takahashi H, Tamura S, Folkers K. Piericidin A: a new inhibitor of mitochondrial electron transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1966, 25(4): 373–377.
- [2] Darrouzet E, Issartel JP, Lunardi J, Dupuis A. The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Letters*, 1998, 431(1): 34–38.
- [3] Chang YJ, Chen WY, Huang CY, Liu HH, Wei PL. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) regulates colon cancer metastasis through EMT biomarkers and the NRF-2/HO-1 pathway. *Tumour Biology*, 2015, 36(3): 1859–1869.
- [4] Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biology & Therapy*, 2006, 5(7): 741–744.
- [5] Hwang JH, Kim JY, Cha MR, Ryoo IJ, Choo SJ, Cho SM, Tsukumo Y, Tomida A, Shin-Ya K, Hwang YI, Yoo ID, Park HR. Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to piericidin A, a GRP78 down-regulator. *Journal of Cellular Physiology*, 2008, 215(1): 243–250.
- [6] Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression*, 1994, 4(1): 1–18.
- [7] Chen CY, Fang QX, Lin KJ, Zhang MB. Studies on aphicidin: I. Identification of the producing streptomycete. *Acta Microbiologica Sinica*, 1980, 20(2): 113–115. (in Chinese).
陈传盈, 方祺霞, 林开江, 张孟白. 杀蚜素的研究I. 杀蚜素产生菌的分离鉴定. *微生物学报*, 1980, 20(2): 113–115.
- [8] Chen CY, Huang WC, Lin KJ, Qian YY, Wang LY, Zhou WQ. Studies on aphicidin: II. Isolation and characterization of aphicidin A. *Acta Microbiologica Sinica*, 1981, 21(2): 192–196. (in Chinese).
陈传盈, 黄文彩, 林开江, 钱玉英, 王龙英, 周伟强. 杀蚜素的研究II. 杀蚜素A的分离和鉴别. *微生物学报*, 1981, 21(2): 192–196.
- [9] Liu Q, Yao F, Chooi YH, Kang QJ, Xu W, Li YR, Shao YC, Shi YF, Deng ZX, Tang Y, You DL. Elucidation of piericidin A1 biosynthetic locus revealed a thioesterase-dependent mechanism of α -pyridone ring formation. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(2): 243–253.
- [10] Chen YL, Zhang WJ, Zhu YG, Zhang QB, Tian XP, Zhang S, Zhang CS. Elucidating hydroxylation and methylation steps tailoring piericidin A1 biosynthesis. *Organic Letters*, 2014, 16(3): 736–739.
- [11] He YL, Wang ZJ, Bai LQ, Liang JD, Zhou XF, Deng ZX. Two pHZ1358-derivative vectors for efficient gene knockout in *Streptomyces*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(4): 678–682.
- [12] Xu H, Zhang YR, Yang J, Mahmud T, Bai LQ, Deng ZX. Alternative epimerization in C₇N-aminocyclitol biosynthesis is catalyzed by ValD, a large protein of the vicinal oxygen chelate superfamily. *Chemistry & Biology*, 2009, 16(5): 567–576.
- [13] McLeod MP, Warren RL, Hsiao WWL, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJM, Holt R, Brinkman FSL, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(42): 15582–15587.
- [14] Kimura K, Nakayama S, Nakajima N, Yoshihama M, Miyata N, Kawanishi G. A new piericidin rhamnocide, 3'-rhamnospiericidin A1. *The Journal of Antibiotics*, 1990, 43(10): 1341–1343.
- [15] Cano-Prieto C, García-Salcedo R, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Fiedler HP, Méndez C, Salas JA, Olano C. Genome mining of *Streptomyces* sp. Tü 6176: characterization of the nataxazole biosynthesis pathway. *ChemBioChem*, 2015, 16(10): 1461–1473.

Function of methyltransferase gene *pieB2* in the biosynthetic cluster of piericidin A1

Zhenyu Zhao, Qian Liu, Delin You*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] In order to obtain piericidin intermediates of low toxicity by metabolic engineering, we studied the function of methyltransferase gene *pieB2* in the biosynthetic cluster of piericidin A1. [Methods] The methyltransferase *pieB2* gene disrupted *Streptomyces piomogeues* var. Hangzhouwanensis was constructed by double crossover recombination. The methyltransferase gene *pieB2* was also PCR amplified and cloned into the plasmid pET28a for overexpressing N-(His)₆-tag PieB2 in *E. coli* BL21(DE3)/pLysE. The recombinant PieB2 was purified by affinity chromatography via AKTA FPLC system. The PieB2 catalyzed reactions were performed using SAM and demethyl-piericidin substrates. [Results] The disruption mutant LQ-9 produced demethyl-piericidin instead of piericidin A1, which was restored by *in trans* complementation of the *pieB2* gene. The N-(His)₆-tag PieB2 was expressed in *E. coli* in soluble form and was successfully purified via Ni²⁺ mediated affinity chromatography. *In vitro* biochemical experiments showed that PieB2 could convert demethyl-piericidin into piericidin A1 in the presence of SAM. The demethyl-piericidin intermediate showed attractive biological activities as well as piericidin A1. [Conclusion] We confirmed that PieB2 is function as a SAM dependent methyltransferase in the biosynthetic gene cluster of piericidin A1.

Keywords: piericidin A1, methyltransferase, gene disruption, biosynthesis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170085) and by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB721004)

*Corresponding author. Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn

Received: 15 October 2015; Revised: 13 November 2015; Published online: 30 December 2015