



白色链霉菌 DSM 41398 中洋橄榄菌素和放线吡喃酮的发现及其生物合成途径分析

谢守锋, 芦晨阳, 胡晓婧, 蒋程恺, 康前进*, 白林泉, 邓子新

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 200030

摘要:【目的】从菌株 *Streptomyces albus* DSM 41398 的发酵产物中发掘结构多样的由 I 型聚酮合酶催化形成的化合物, 以期找到具有新颖结构或强生物活性的化合物。在结构鉴定的基础上, 对其生物合成途径进行分析。【方法】利用 HPLC 分析方法, 通过系统比较野生型菌株 *S. albus* DSM 41398 与 I 型聚酮合酶编码基因簇失活突变株的发酵产物差异, 实现目标化合物的定向分离。然后, 利用 ^1H -和 ^{13}C -NMR 以及 HR-ESI-MS 进行化合物的结构鉴定。最后, 利用生物信息学等方法对化合物的生物合成途径进行推测和分析。【结果】从 5 L 的 *S. albus* DSM 41398 发酵产物中, 分离得到了 2 个具有抗肿瘤活性的聚酮类化合物放线吡喃酮和洋橄榄菌素, 分别定位了它们的生物合成基因簇, 并分别对其生物合成途径进行了推导。其中, 放线吡喃酮的生物合成基因簇为首次报道。【结论】本研究一方面为基因组发掘 *S. albus* DSM 41398 中其他由 I 型聚酮合酶催化形成的化合物提供参考, 另一方面也为相关化合物的结构修饰改造奠定了良好的基础。

关键词: 白色链霉菌 DSM 41398, 聚酮类化合物, 放线吡喃酮, 洋橄榄菌素, 结构鉴定, 生物合成途径分析

链霉菌产生了一系列具有重要生物活性的次级代谢产物, I 型聚酮合酶催化形成的化合物(I 型聚酮类化合物)是一大类结构复杂、生物活性多样的天然产物。从化合物的结构上分析, 该类化合物的结构类型涵盖了大环内酯类(红霉素)、安莎类(利福霉素)、多烯类(两性霉素)、聚醚类(盐霉素)等。在已发现的微生物药物中, 该类化合物是重要的组成部分, 且在市场上所销售的抗生素中占

据重要的位置^[1-2], 引起了全世界研究者的关注。随着 DNA 测序技术的发展, 越来越多的放线菌基因组被测序。在已测序的近千株放线菌基因组中, I 型聚酮类化合物的生物合成基因簇(Biosynthetic gene clusters, BGCs)数量众多, 很可能是新药发现的重要资源^[3-4]。现今人们生活方式的多样化与环境的恶化等因素, 导致了新型疾病不断出现, 一些病原菌的抗生素耐药问题也日益突出, 迫切

基金项目: 国家自然科学基金(31270002, 21476137)

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

收稿日期: 2017-05-09; 修回日期: 2017-05-27; 网络出版日期: 2017-07-11

需要发掘具有新结构或者新生物活性的天然化合物^[5], 为新药研发提供更多的候选物质。

Streptomyces albus DSM 41398 是盐霉素(聚醚类抗生素)的野生型产生菌, 前期研究中, 我们获得了该菌株的精确基因组信息, 通过 antiSMASH 和 RT-PCR 分析显示, 除了盐霉素的 BGC 外, 该菌株染色体上还存在着多个其他 I 型聚酮类化合物的 BGCs, 其中有 7 个 I 型聚酮类化合物的 BGCs 处于活跃表达的状态。为了减少盐霉素生物合成的前体分流, 我们对上述 7 个基因簇进行系统缺失研究, 得到一系列 I 型聚酮类化合物 BGCs 的单独缺失突变菌株, 分别为 Δ PKS-1、 Δ PKS-2、 Δ PKS-3、 Δ PKS-4、 Δ PKS-5、 Δ PKS-6 和 Δ PKS-9^[6]。

在此基础上, 本研究通过系统比较野生型菌株和 PKS 中断突变菌株代谢产物的差异性, 从 *S. albus* DSM 41398 的发酵产物中, 发现了具有抗肿瘤活性的 I 型聚酮类化合物放线吡喃酮(Actinopyranone)和洋橄榄菌素(Elaiohylin)。然后, 根据其生物合成基因簇的信息及组成对其生物合成途径进行了分析与推导。本研究结果显示了 *S. albus* DSM 41398 具有产生多样化 I 型聚酮类次生代谢产物的潜力, 并且首次报道了放线吡喃酮的 BGC, 推导了其可能的生物合成途径, 丰富了该类化合物生物合成途径的研究。此外, 洋橄榄菌素 BGC 的发现与生物合成途径分析, 也为其代谢工程优化及结构改造提供了较好的研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 野生型 *Streptomyces albus* DSM 41398, 该菌株基因组序列的 GenBank 号为 NZ_CP010519。突变株 Δ PKS-1、 Δ PKS-2、 Δ PKS-3、 Δ PKS-4、

Δ PKS-5、 Δ PKS-6 和 Δ PKS-9^[6], 本实验室保存。

1.1.2 主要生化试剂及仪器: 乙酸乙酯、石油醚、丙酮、三氯甲烷、甲醇购自国药集团化学试剂股份有限公司, 乙腈购自安捷伦公司, 氘代甲醇购自 SIGMA 公司; 振荡摇床(ZQZY-70BS)为上海知楚仪器有限公司生产, 高速离心机(SORVALL RC6+)为 Thermo SCIENTIFIC 公司生产, 生物安全柜(HFsafe-1200)为上海力申科学仪器有限公司生产; 采用 Agilent 1262 series HPLC 进行化合物的分析, 化合物的精确分子量在 Agilent G6530 Q-TOF 上进行测定, 核磁数据在 Bruker Avance III 600 MHz 核磁共振仪上进行采集。

1.1.3 培养基: (1) 产孢培养基: ISP4 培养基(购自 BD-Difco 公司)。(2) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 40、黄豆饼粉 30、酵母粉 10, 碳酸钙 2, pH 7.2。(3) 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 30.0、水解酪蛋白 10.0、氯化钠 2.0、氯化钾 2.0、硫酸铵 5.0、磷酸氢二钾 0.2、七水硫酸镁 0.1、氯化钙 0.1, 碳酸钙 5.0, pH 7.2。

1.2 菌株的活化

将保存在 20%甘油里的孢子涂在产孢培养基 ISP4 培养基上活化以便后续发酵。

1.3 菌株的发酵和发酵样品的处理

发酵方法: 分别将活化好的菌株接种到含有 25 mL 种子培养基的 250 mL 三角弹簧种子发酵瓶中, 30 °C、220 r/min 摇床培养 36 h 后, 按照 10% 的接种量转接到发酵培养基中, 于 220 r/min、30 °C 培养 7 d。样品的处理方法: 发酵完成后, 发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次。合并乙酸乙酯萃取液, 进行减压干燥, 再用 1 mL 甲醇将粗提物进行溶解, 经过 0.22 μ m 有机相微孔滤膜过滤后, 供 HPLC 和 LC-MS 分析使用。大量发酵的方法: 发酵种子制备同上, 发酵时使用 500 mL 的三

角弹簧瓶, 每瓶装 100 mL 的发酵培养基, 发酵总体积为 5 L。于 220 r/min、30 °C 培养 7 d。发酵完成后, 使用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 减压干燥, 得到粗提物约 10 g。

1.4 HPLC 检测条件

使用 HPLC 检测各菌株发酵产物次生代谢产物的差异情况, 分析流动相为: 乙腈-水(2%的乙酸), 流速: 0.6 mL/min, 均采用全波长扫描。HPLC 洗脱条件: 0–40 min: 10%–50%乙腈梯度, 40–50 min: 50%–75%乙腈梯度, 50–60 min: 75%–100%乙腈梯度, 60–68 min: 纯乙腈洗脱, 70–90 min: 10%乙腈平衡柱子。色谱柱为: 分析柱为 Agilent 5 TC-C₁₈(2) 250 mm×4.6 mm, SN: 588925-902, PN: 509550。进样体积为 10 μL。

1.5 目标化合物的分离纯化

利用 10 g 的 60–100 目层析硅胶将制备好的粗提物进行拌样。然后, 使用 60 g 的 200–300 目层析硅胶进行干法装柱, 层析柱的规格为: 4 cm×60 cm。待上样完成后, 使用三氯甲烷-甲醇为洗脱剂进行梯度洗脱。首先使用 500 mL 的氯仿进行洗脱, 再逐渐增加洗脱剂中甲醇的比例, 当洗脱剂中氯仿: 甲醇的比例为 20 : 1 时(洗脱体积为 1.5 L), 利用 HPLC 检测该组分, 发现了一个化合物与 ΔPKS-3 发酵样品中所缺少的化合物的保留时间和特征吸收波长均一致, 该份样品命名为 SF1。当洗脱剂氯仿: 甲醇的比例为 10 : 1 时(洗脱体积为 1.2 L), 将洗脱下来的组分利用 HPLC 检测, 发现含有 ΔPKS-9 中缺少的化合物, 该份样品命名为 SF2。

接下来, 将含有目标化合物的两份样品, 分别使用 Sephadex LH-20 进行凝胶过滤色谱纯化(色谱柱规格为 1.8 cm×160 cm), 洗脱剂为甲醇, 流速为 6–8 d/min, 然后, 分别将含有目标化合

物的样品进行减压干燥后, 继续分离纯化。其中, SF1 组分利用正相硅胶柱层析(色谱柱规格为 1.5 cm×50 cm), 装柱硅胶为 18.5 g, 洗脱剂为石油醚: 丙酮=85: 15, 分别收集洗脱组分, 将含有较纯化合物的组分进行减压干燥, 最终得到化合物 SF1 的纯品约 100 mg。SF2 组分再利用正相硅胶柱层析(色谱柱规格为 1.5 cm×50 cm), 装柱硅胶为 15.0 g, 利用氯仿: 甲醇=10: 1 进行洗脱, 将含有较纯的目标化合物组分进行减压干燥, 最终得到化合物 SF2 的纯品为 20 mg。

1.6 生物信息学预测

antiSMASH 在线预测网站预测基因组中次级代谢合成基因簇(<http://antismash.secondarymetabolites.org/>), 通过 Frameplot 4.0 Beta 预测基因簇的开放阅读框(<http://biosyn.nih.gov.jp/2ndfind/>), 美国国立生物技术信息中心 NCBI 网站上提供的 BLAST 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行蛋白预测。通过 NRPS-PKS 在线分析软件(<http://www.nii.res.in/nrps-pks.html>)对 PKS 各个模块及功能结构域进行预测^[7]。

2 结果和分析

2.1 野生型菌株与 PKS 中断突变株的次生代谢产物分析

分别将野生型菌株 *S. albus* DSM 41398 和 7 个突变株(ΔPKS-1、ΔPKS-2、ΔPKS-3、ΔPKS-4、ΔPKS-5、ΔPKS-6 和 ΔPKS-9)在发酵培养基中培养 7 d 后取样, 制备发酵粗提物样品。然后, 利用 HPLC 全波长扫描, 检测野生型和突变株发酵产物的差异性。当扫描波长为 280 nm 时, HPLC 图谱表明野生型菌株和突变株 ΔPKS-3 的发酵产物在 62 min 处有一个明显的差异峰(图 1)。吸收波长特征分析显示, 该化合物的最大吸收波长为 226 nm,

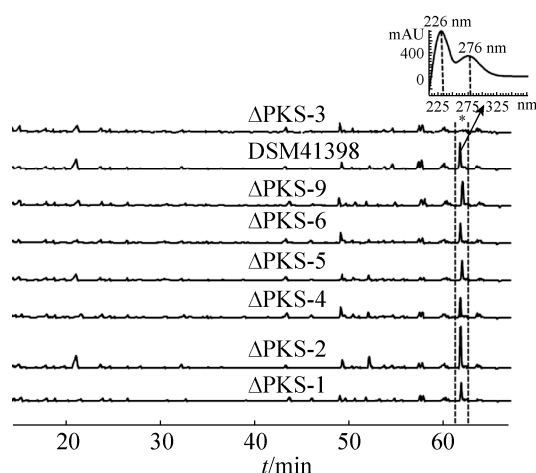


图 1. 野生型菌株和突变株次生代谢产物的 HPLC 分析($\lambda=280$ nm)及目标峰的特征吸收谱

Figure 1. HPLC analysis ($\lambda=280$ nm) of the secondary metabolites of wild type and mutant strains, together with the UV spectrum of the target compound. Wild type strain: *S. albus* DSM 41398; mutant strains: Δ PKS-1, Δ PKS-2, Δ PKS-3, Δ PKS-4, Δ PKS-5, Δ PKS-6 and Δ PKS-9.

特征吸收峰的波长为 276 nm。当检测波长为 254 nm 时, HPLC 图谱表明突变株 Δ PKS-9 与野生型菌株的代谢物在 53 min 分钟左右有一个明显的差异峰, 其最大吸收波长及特征吸收峰的波长均为 254 nm (图 2)。本研究通过比较野生型菌株与突变菌株代谢产物的差异性, 快速定位了 2 个目标差异峰, 为下一步化合物的分离纯化奠定了基础。

2.2 野生型菌株的大量发酵与目标化合物的分离纯化

以上述 2 个 HPLC 图谱中的差异峰为导向, 开展这 2 个化合物的分离纯化和结构鉴定研究。首先, 对野生型菌株进行 5 L 的大量发酵, 发酵完成后, 利用乙酸乙酯萃取, 制备粗提物样品。将粗样品用等量的 60–100 目硅胶进行拌样, 然后再利用正相硅胶(200–300 目)柱层析进行初步纯化, 洗脱剂为氯仿-甲醇梯度洗脱, 并采用 HPLC 分析寻找目标化合物, 合并含有目标样品的洗脱

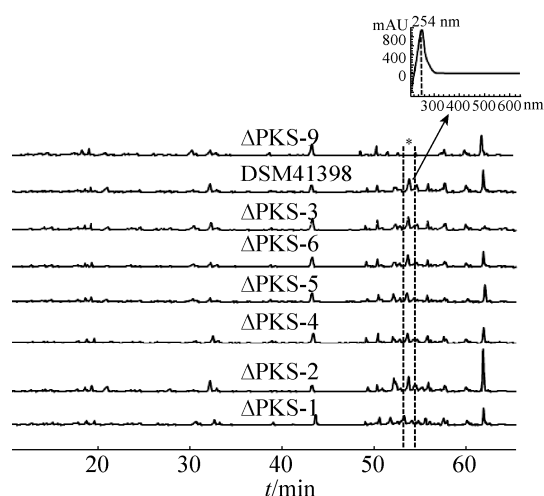


图 2. 野生型菌株和突变株次生代谢产物的 HPLC 分析($\lambda=254$ nm)及目标峰的特征吸收谱

Figure 2. HPLC analysis ($\lambda=254$ nm) of the secondary metabolites of wild type and mutant strains, together with the UV spectrum of the target compound. Wild type strain: *S. albus* DSM 41398; mutant strains: Δ PKS-1, Δ PKS-2, Δ PKS-3, Δ PKS-4, Δ PKS-5, Δ PKS-6 and Δ PKS-9.

液, 进行减压干燥。接着, 使用 Sephadex LH-20 分子筛层析纯化后, 再利用正相硅胶柱层析进行交替纯化, 直至得到目标化合物的纯品。最终得到化合物 SF1 的纯品约 100 mg, 化合物 SF2 的纯品约为 20 mg。

2.3 目标化合物的结构鉴定

放线吡喃酮的结构鉴定: 纯化得到的化合物 SF1 为白色粉末, 易溶于甲醇。称取 5 mg 纯品放入核磁管中, 加入 0.5 mL 氘代甲醇进行溶解, 利用 Bruker Avance III 600 MHz 核磁共振仪收集核磁数据(表 1)。经 ^1H -和 ^{13}C -NMR 的数据分析, 该化合物的结构与放线吡喃酮(Actinopyranone)的相关数据较为一致。同时, 该化合物的高分辨质谱(HR-ESI-MS)所得到的质荷比 m/z 为 401.2732 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (图 3), 计算出的分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}_4$ ^[8]。因此, 将化合物 SF1 的结构鉴定为放线吡喃酮, 结构式如图 4。

表 1. 化合物 SF1 的 ^1H -和 ^{13}C -核磁共振信号归属
Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR of compound SF1 (CD_3OD , 600 and 150 MHz)

No.	δ_{H} , muti. (J in Hz)	δ_{C}	No.	δ_{H} , muti. (J in Hz)	δ_{C}
1	6.40 (d, 6.4)	117.6 (d)	14	1.64 (s)	9.8 (q)
2	6.49 (dd, 15.6/7.2)	143.7 (d)	15	0.71 (d, 7.2)	16.8 (q)
3	2.45 (m)	37.4 (d)	16	1.72 (s)	11.7 (q)
4	2.15 (m)	39.7 (t)	17	1.05 (d, 6.6)	18.5 (q)
5	5.48 (ddd, 15.0, 7.2/7.2)	124.2 (d)	1'	/	153.0 (s)
6	6.03 (d, 15.2)	137.1 (d)	2'	/	116.8 (s)
7	/	133.3 (s)	3'	/	181.8 (s)
8	5.21 (d, 9.0)	134.5 (d)	4'	/	98.6 (s)
9	2.58 (m)	36.2 (d)	5'	/	162.8 (s)
10	3.60 (d, 7.8)	83.2 (d)	6'	1.88 (s)	8.2 (q)
11	/	136.7 (s)	7'	1.72 (s)	5.7 (q)
12	5.34 (m)	121.3 (d)	8'	4.00 (s)	55.2 (q)
13	1.64 (s)	11.7 (q)			

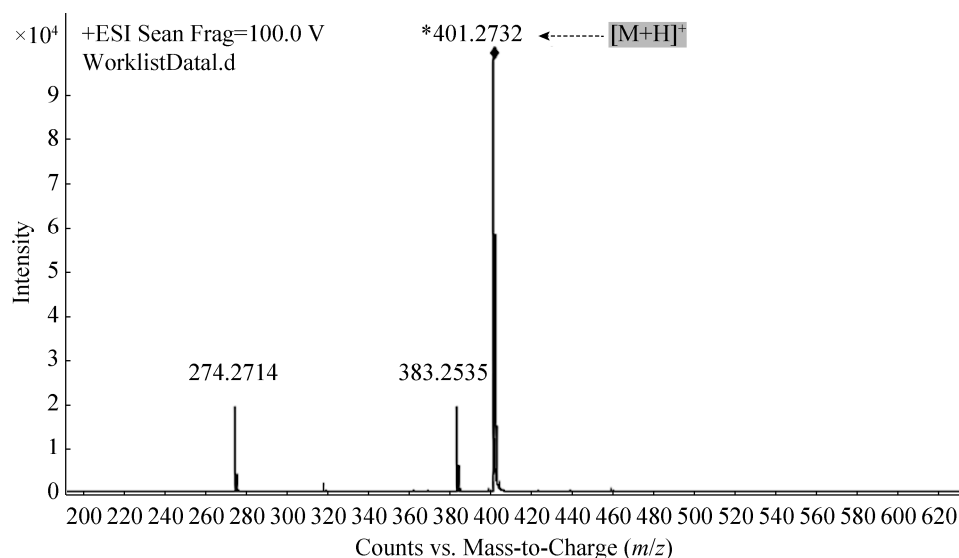


图 3. 放线吡喃酮的高分辨质谱检测结果

Figure 3. The result of HR-ESI-MS analysis of actinopyranone.

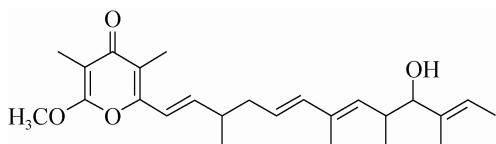


图 4. 放线吡喃酮的化学结构

Figure 4. The chemical structure of actinopyranone.

洋橄榄菌素的结构鉴定：化合物 SF2 为白色粉末，易溶于氯仿。称取 8 mg 样品溶于氘代氯

仿中，在核磁共振仪上进行核磁数据的收集（表 2）。高分辨质谱检测该化合物质荷比 m/z 为 1047.5012 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)（图 5），得到的分子式为 $\text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{18}\text{Na}$ 。质谱数据和核磁共振数据与文献报道的基本相符^[9]。通过 ^1H -和 ^{13}C -NMR 的数据解析，将化合物 SF2 鉴定为洋橄榄菌素(Elaiophylin)，结构如图 6。

表 2. 化合物 SF2 的 ^1H -和 ^{13}C -核磁共振信号归属
Table 2. ^1H - and ^{13}C -NMR of compound SF2 (CDCl_3 , 600 and 150 MHz)

No.	δ_{H} , muti. (J in Hz)	δ_{C}	No.	δ_{H} , muti. (J in Hz)	δ_{C}
1	/	167.1 (s)	1'	/	167.1 (s)
2	5.68 (1H, d, 15.6)	121.3 (d)	2'	5.68 (1H, d, 15.6)	121.3 (d)
3	6.84 (1H, dd, 15.6/11.4)	144.8 (d)	3'	6.84 (1H, dd, 15.6/11.4)	144.8 (d)
4	6.11 (1H, dd, 15.0/11.4)	130.6 (d)	4'	6.11 (1H, dd, 15.0/11.4)	130.6 (d)
5	5.63 (1H, dd, 15.0/10.2)	144.9 (d)	5'	5.63 (1H, dd, 15.0/10.2)	144.9 (d)
6	2.51 (1H, m)	41.2 (d)	6'	2.51 (1H, m)	41.2 (d)
7	5.09 (1H, d, 10.8)	75.8 (d)	7'	5.09 (1H, d, 10.8)	75.8 (d)
8	1.82 (1H, m)	36.2 (d)	8'	1.82 (1H, m)	36.2 (d)
9	3.81 (1H, m)	68.3 (d)	9'	3.81 (1H, m)	68.3 (d)
10	1.62 (1H, m)	42.9 (d)	10'	1.62 (1H, m)	42.9 (d)
11	/	99.2 (d)	11'	/	99.2 (d)
12	1.04 (1H, m)	36.6 (t)	12'	1.04 (1H, m)	36.6 (t)
13	2.28 (1H, m)	69.4 (d)	13'	2.28 (1H, m)	69.4 (d)
14	1.07 (1H, m)	47.9 (d)	14'	1.07 (1H, m)	47.9 (d)
15	3.79 (1H, m)	66.4 (d)	15'	3.79 (1H, m)	66.4 (d)
16	0.98 (3H, d, 6.6)	18.8 (q)	16'	0.98 (3H, d, 6.6)	18.8 (q)
17	1.05 (3H, d, 6.0)	15.5 (q)	17'	1.05 (3H, d, 6.0)	15.5 (q)
18	0.85 (3H, d, 7.2)	9.6 (q)	18'	0.85 (3H, d, 7.2)	9.6 (q)
19	1.06 (3H, d, 6.6)	7.0 (q)	19'	1.06 (3H, d, 6.6)	7.0 (q)
20	1.41 (1H, m)	19.2 (q)	20'	1.41 (1H, m)	19.2 (q)
	1.62 (1H, m)			1.62 (1H, m)	
21	0.80 (3H, d, 6.0)	8.8 (q)	21'	0.80 (3H, d, 6.0)	8.8 (q)
22	4.92 (1H, d, 3.6)	92.5 (d)	22'	4.92 (1H, d, 3.6)	92.5 (d)
23	1.78 (2H, m)	32.7 (t)	23'	1.78 (2H, m)	32.7 (t)
24	3.81 (1H, m)	64.9 (d)	24'	3.81 (1H, m)	64.9 (d)
25	3.73 (1H, m)	70.3 (d)	25'	3.73 (1H, m)	70.3 (d)
26	4.27 (1H, m)	65.8 (d)	26'	4.27 (1H, m)	65.8 (d)
27	1.24 (3H, d, 6.8)	17.1 (q)	27'	1.24 (3H, d, 6.8)	17.1 (q)

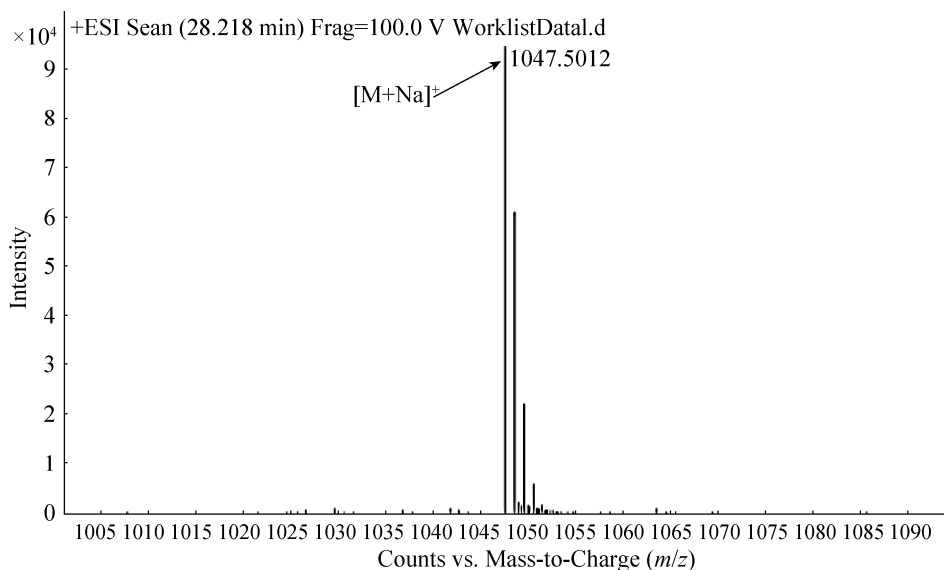


图 5. 洋橄榄菌素的高分辨质谱检测结果

Figure 5. The result of HR-ESI-MS analysis of elaiophylin.

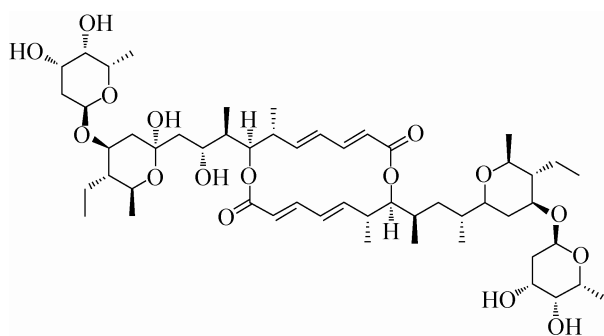


图 6. 洋橄榄菌素的化学结构

Figure 6. The chemical structure of elaiophyllin.

2.4 放线吡喃酮和洋橄榄菌素的生物合成途径分析

放线吡喃酮的生物合成途径分析：首先利用 antiSMASH 预测化合物的 BGC, 再使用 Frameplot 4.0 Beta 预测基因簇每个开放阅读框, NCBI 网站上的 Blast 软件进行蛋白的功能预测(表 3)。放线吡喃酮的 BGC 长度为 104 kb, 其生物合成的组装形式如图 7-A。在放线吡喃酮的 BGC 中含有 5 个聚酮合酶编码基因, 编码了 5 个聚酮合酶蛋白, ATPN1 含有起始模块和第 1、2 个延伸模块, AT 识别的底物分别为丙二酰辅酶 A、甲基丙二酰辅酶 A、甲基丙二酰辅酶 A; 第 1 个延伸模块还含有 KR、DH 催化功能域, 最终催化酮基变为 C=C; 第 2 个延伸模块含有 KR 催化功能域, 最终催化酮基变为羟基。ATPN2 含有第 3、4 个延伸模块, AT 识别的底物分别为甲基丙二酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A; 第 3、4 个延伸模块都含有 KR、DH 催化功能域, 最终催化 2 个酮基变为 2 个 C=C 键。ATPN3 含有第 5 个延伸模块, AT 识别的底物为甲基丙二酰辅酶 A; 第 5 个延伸模块还含有 KR、DH、ER 催化功能域, 最终催化酮基变为 C-C 键。ATPN4 含有第 6、7 个延伸模块, AT 识别的底物分别为丙二酰辅酶 A、甲基丙二酰辅酶 A; 第 6 个延伸

模块还含有 KR、DH 催化功能域, 最终催化酮基变为 C=C 键; 第 7 个延伸模块还含有 KR 催化功能域, 但其不发挥催化酮基变为羟基的功能。ATPN5 含有第 8 个延伸模块, AT 识别的底物为甲基丙二酰辅酶 A; 第 8 个延伸模块还含有 KR 催化功能域, 但其不发挥催化酮基变为羟基的功能。除此之外还含有多个属于 HxlR (*orf1*)、LuxR (*orf2*, *orf36*) 或 IclR (*orf11*) 家族的调控基因以及 ABC 转运蛋白编码基因(*orf6*、*orf7*、*orf8*、*orf9*)。

基于以上功能基因组成的分析, 对放线吡喃酮的生物合成途径进行了推导(图 7-B)。从其生物合成途径可以看出 1 分子放线吡喃酮的合成需要 1 分子的乙酰辅酶 A、2 分子的丙二酰辅酶 A 和 6 分子的甲基丙二酰辅酶 A, 放线吡喃酮聚酮链合成成熟之后被硫酯酶(TE)从 ACP 上水解下来, 经过环化和后修饰途径, 最终形成放线吡喃酮。

洋橄榄菌素的生物合成途径分析：利用与放线吡喃酮 BGC 相同的分析策略, 对洋橄榄菌素 BGC 中的相关功能蛋白进行分析, 分析结果如表 4 所示。其中, 洋橄榄菌素的 BGC 全长为 70 kb, 功能基因的组装如图 8-A。洋橄榄菌素的 BGC 中含有 5 个聚酮合酶基因, 编码 5 个聚酮合酶蛋白, ELPY5 含有 3 个模块, 包括了起始模块和第 1、2 个延伸模块, AT 识别的底物分别为丙二酰辅酶 A、乙基丙二酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A; 此外, 第 1 个延伸模块还含有 KR、DH 催化功能域, 但其 DH 催化结构域不发挥作用, 最终催化酮基变为羟基; 第 2 个延伸模块含有 KR 催化功能域, 最终催化酮基变为羟基。ELPY4 含有第 3 个延伸模块, AT 识别的底物为甲基丙二酰辅酶 A; 第 3 个延伸模块还含有 KR 催化功能域, 但其不发挥催化酮基变为羟基的作用。ELPY3 含有第 4 个延伸模块,

表 3. 放线吡喃酮生物合成基因簇中的功能基因预测分析
Table 3. Deduced functions of *orfs* in actinopyranone biosynthetic gene cluster

Gene	aa	Proposed function	Similar protein (acc. number)	Identity/%
<i>orf1</i>	147	HxIR family transcriptional regulator	WP_040246795	99
<i>orf2</i>	910	LuxR family transcriptional regulator	WP_040406901	35
<i>orf3</i>	273	Trypsin	WP_009943017.1	44
<i>orf4</i>	244	Flavodoxin	WP_062990802.1	84
<i>orf5</i>	276	Amidohydrolase	WP_070198137.1	77
<i>orf6</i>	337	ABC transporter substrate-binding protein	WP_003935721.1	41
<i>orf7</i>	270	ABC transporter permease	WP_078564501.1	79
<i>orf8</i>	403	ABC transporter	WP_051431375.1	71
<i>orf9</i>	215	ABC transporter permease	WP_049570957.1	85
<i>orf10</i>	310	Alpha/beta hydrolase	WP_051307766.1	80
<i>orf11</i>	255	IclR family transcriptional regulator	WP_042189077	45
<i>orf12</i>	275	Hypothetical protein	WP_023530568.1	78
<i>orf13</i>	495	MFS transporter	WP_078617773.1	62
<i>orf14</i>	120	DNA translocase FtsK	WP_066735376.1	52
<i>atpn1</i>	4575	Polyketide synthase	WP_009946797.1	51
<i>atpn2</i>	3746	Type I polyketide synthase	WP_052718869.1	52
<i>atpn3</i>	2225	Polyketide synthase	BAH02268.1	56
<i>atpn4</i>	3438	Type I polyketide synthase	WP_040256246.1	57
<i>atpn5</i>	1894	Type I polyketide synthase	WP_027745028.1	58
<i>orf15</i>	206	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	WP_005321163.1	92
<i>orf16</i>	695	Regulator	044366483	47
<i>orf17</i>	171	Hypothetical protein	WP_028430832.1	75
<i>orf18</i>	144	MFS transporter	WP_054228783.1	78
<i>orf19</i>	300	Transporter	WP_043498359	75
<i>orf20</i>	477	3-carboxy- <i>cis,cis</i> -muconate cycloisomerase	WP_078076776.1	80
<i>orf21</i>	660	FAD-binding protein	WP_078076775.1	77
<i>orf22</i>	421	UDP- <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine dehydrogenase	WP_078076774.1	88
<i>orf23</i>	385	Aminotransferase DegT	WP_078076773.1	80
<i>orf24</i>	408	Aminotransferase DegT	WP_069627421.1	84
<i>orf25</i>	315	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	WP_078079697.1	84
<i>orf26</i>	355	Polyprenyl synthetase	WP_078076771.1	78
<i>orf27</i>	360	Oxidoreductase	WP_033439990	45
<i>orf28</i>	289	Xylose isomerase	WP_031231149.1	81
<i>orf29</i>	442	Peptidase M20	WP_079128120.1	78
<i>orf30</i>	381	Lactate dehydrogenase	WP_078076768.1	86
<i>orf31</i>	305	Oxidoreductase	WP_078076767.1	85
<i>orf32</i>	160	Hypothetical protein	WP_069627431.1	83
<i>orf33</i>	607	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	WP_078076766.1	83
<i>orf34</i>	384	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	WP_067371241.1	95
<i>orf35</i>	279	Streptogrisin A	SCE17834.1	90
<i>orf36</i>	815	LuxR family transcriptional regulator	AGK80163	38

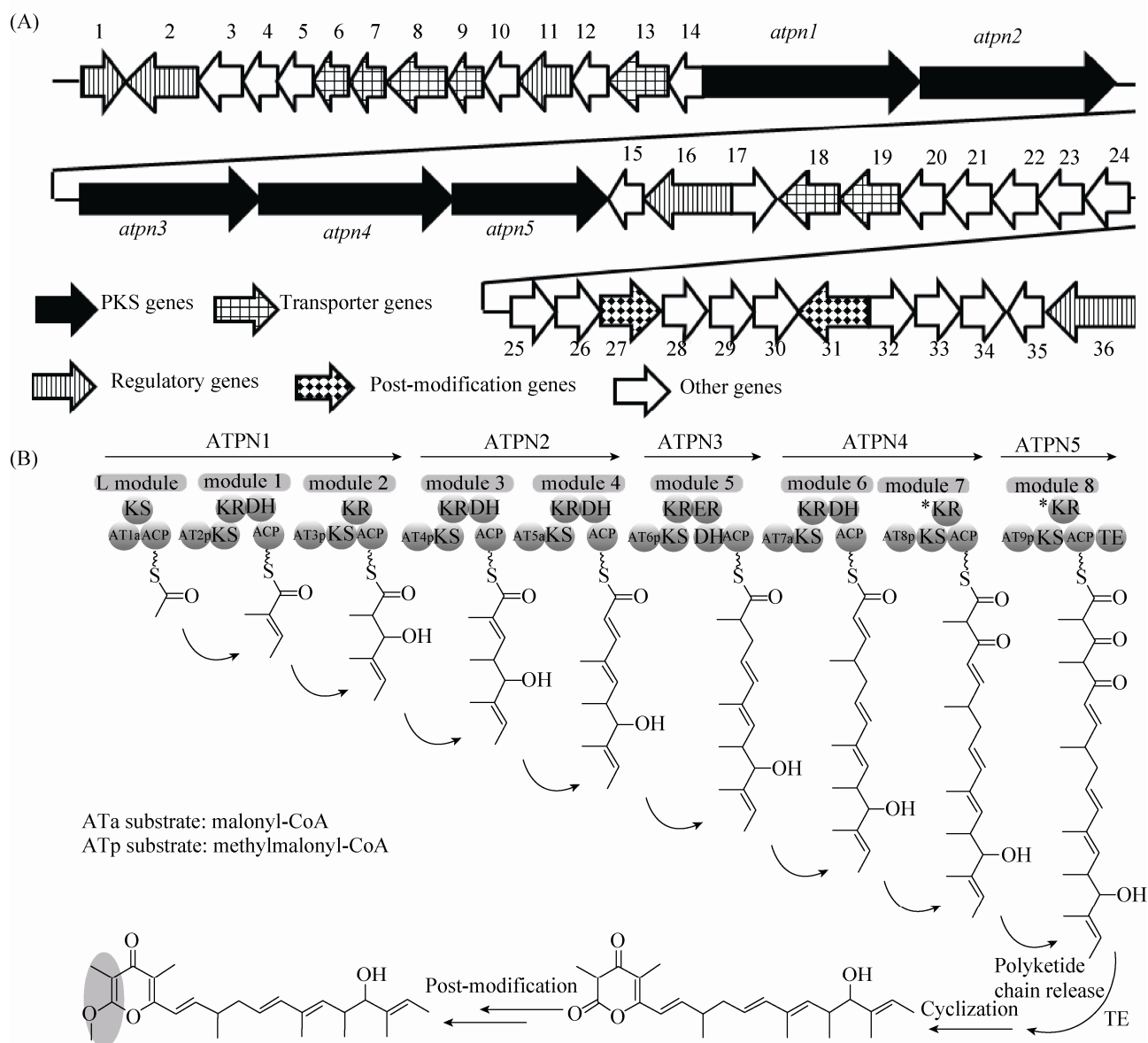


图 7. 放线吡喃酮生物合成基因簇(A)及生物合成途径推导(B)

Figure 7. Biosynthetic gene cluster (A) and deduction of biosynthetic pathway (B) of actinopyranone.

AT 识别的底物为甲基丙二酰辅酶 A；第 4 个延伸模块还含有 KR 催化功能域，最终催化酮基变为羟基。ELPY2 含有第 5、6 个延伸模块，AT 识别的底物分别为甲基丙二酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A；第 5 个延伸模块还含有 KR 催化功能域，

最终催化酮基变为羟基；第 6 个延伸模块还含有 KR、DH 催化功能域，最终催化酮基变为 C=C 键。ELPY1 含有第 7 个延伸模块，AT 识别的底物为丙二酰辅酶 A；第 7 个延伸模块还含有 KR、DH 催化功能域，最终催化酮基变为 C=C 键。除

表 4. 洋橄榄菌素生物合成基因簇中的功能基因预测分析
Table 4. Deduced functions of *orfs* in elaiophylin biosynthetic gene cluster

Gene	aa	Proposed function	Similar protein (acc. number)	Identity/%
<i>orf1</i>	761	Membrane protein	WP_029181812.1	56
<i>orf2</i>	52	Regulatory protein, luxR family	SCL73296.1	71
<i>orf3</i>	486	NDP-hexose 2,3-dehydratase	AGP52909.1	63
<i>orf4</i>	328	Aldo/keto reductase	WP_078647113.1	79
<i>orf5</i>	341	NAD-dependent dehydratase	EXU62919.1	60
<i>orf6</i>	216	LuxR family transcriptional regulator	AGP52912.1	85
<i>orf7</i>	458	Signal transduction histidine kinase	SED09057.1	62
<i>orf8</i>	245	MULTISPECIES: ABC transporter	WP_014056964.1	84
<i>orf9</i>	302	Multidrug ABC transporter ATP-binding protein	WP_059148435.1	88
<i>orf10</i>	209	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	WP_079259966.1	78
<i>orf11</i>	417	Glycosyltransferase	ADP68587.2	81
<i>orf12</i>	261	Oleoyl-ACP hydrolase	AGP52918.1	74
<i>elpy1</i>	2086	Polyketide synthase	WP_059148431.1	75
<i>elpy2</i>	3407	Polyketide synthase	AGP52920.1	76
<i>elpy3</i>	1631	Polyketide synthase	WP_079259961.1	77
<i>elpy4</i>	1622	Polyketide synthase	WP_078639065.1	71
<i>elpy5</i>	4391	Polyketide synthase	WP_009946797.1	53
<i>orf13</i>	324	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	WP_059145979.1	84
<i>orf14</i>	306	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	AEM83455.1	85
<i>orf15</i>	1125	LuxR family transcriptional regulator	AQW47948.1	63

此之外还含有 2 个属于 LuxR 家族的调控基因。由于洋橄榄菌素为二重内酯类结构, 该类产物的释放机制较为特殊, 首先是 1 个聚酮延伸完成的分子结合在 TE 结构域的活性位点上, 然后, 待另一分子的聚酮链组装完成后, TE 结构域催化 2 个聚酮链发生分子间的亲和反应, 形式二重内酯的结构^[10]。

基于上述功能基因组成的分析, 对洋橄榄菌素的生物合成途径进行了推导(图 8-B)。从其生物合成途径可以看出 1 分子洋橄榄菌素的合成需要 2 分子的乙酰辅酶 A、6 分子的丙二酰辅酶 A、6 分子的甲基丙二酰辅酶 A 和 2 分子的乙基丙二酰辅酶 A, 洋橄榄菌素聚酮链组装完成之后被硫酯酶(TE)从 ACP 上水解下来, 经过环化和后修饰途径, 最终形成洋橄榄菌素。

3 讨论和展望

目前, 以基因组序列导向的新结构微生物药物的发现技术已经得到了广泛的应用。此外, 许多研究者还集成了基因组测序、生物信息学、分子生物学、合成生物学等生物学技术, 发展了多样化的活性天然产物发掘策略^[11-13], 使新的微生物活性代谢产物的发现更加聚焦和便捷, 也获得了很多的成功。一般说来, 通过对目标基因簇的定向失活, 使其失去合成目标产物的能力, 将突变株和野生型的发酵代谢产物进行比较, 从而找出目标化合物, 进行结构鉴定和生物活性分析, 依然是快速发现目标化合物的方法之一^[5], 本研究也利用该策略成功获得了具有生物活性的放线吡喃酮和洋橄榄菌素两个重要的聚酮类天然产物。

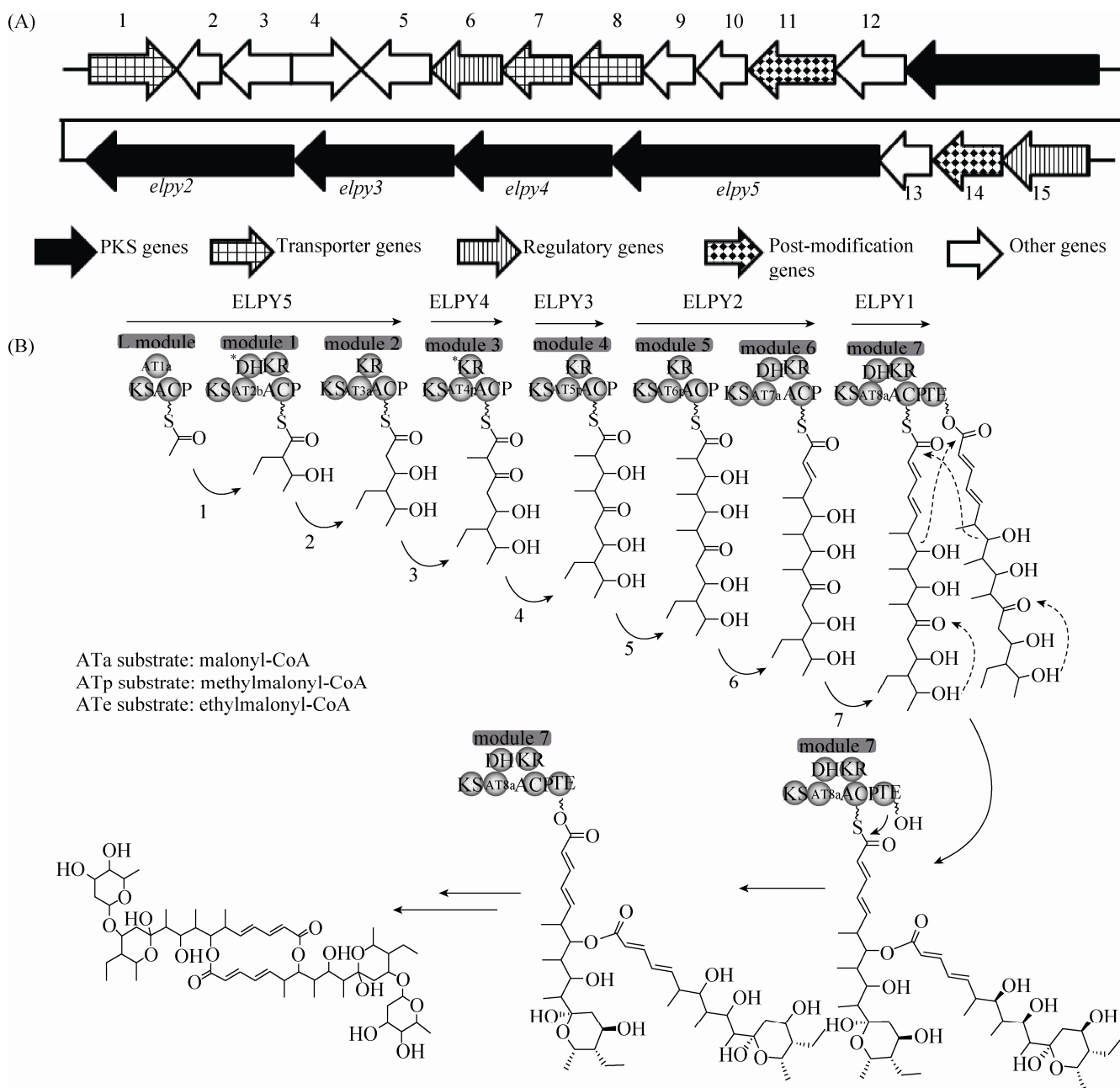


图 8. 洋橄榄菌素生物合成基因簇(A)及生物合成途径推导(B)

Figure 8. Biosynthetic gene cluster (A) and deduction of biosynthetic pathway (B) of elaiophyllin.

放线吡喃酮BGC的发现及生物合成途径的解析, 将为本家族化合物生物合成的研究提供材料。同时, 放线吡喃酮的分子结构与杀粉蝶菌素非常相似。最大的区别在于放线吡喃酮的聚酮链释放

后, 经过一步分子内环化, 最终的分子中含有 1 个吡喃环。杀粉蝶菌素的聚酮链释放后, 先是经过一步氨基的加载, 然后才会发生分子内环化, 形成含有 1 个吡啶环的结构。由于放线吡喃酮和

杀粉蝶菌素均具有良好的生物活性^[14], 后续对于二者的比较研究或者分子结构的定向改造值得进一步探索和深入研究。

洋橄榄菌素具有很好的抗肿瘤活性^[15], 也受到了许多研究者的关注, 具有很好的潜在应用价值, 对于其产量的代谢工程优化和分子结构的遗传学改造均具有重要的现实意义。由于该菌株的相关操作已经非常成熟, 所以利用该菌株来开展洋橄榄菌素的代谢工程优化也具有较强的可行性。同样, *S. albus* DSM 41398 中含有多个 I 型聚酮类化合物的 BGCs, 它们的表达与洋橄榄菌素的生物合成依然具有前体物的竞争情况。后续通过中断竞争性基因簇, 使更多前体物流向洋橄榄菌素的生物合成, 进而有可能进一步提高其产量, 为药物研发提供物质保障。

由于盐霉素产生菌具有较强的天然产生聚酮类化合物的潜力, 而且盐霉素的产量经过优化后已经达到了 6.6 g/L^[6]。本研究为后期对于 PKS-1、PKS-2、PKS-4、PKS-5、PKS-6 生物合成基因簇所对应化合物的发掘提供较好的研究示范。后续针对盐霉素及本研究中发现的放线吡喃酮和洋橄榄菌素的生物合成基因簇进行定向多重失活, 减少底物的分流和菌株的负担, 很可能会成为发现其他化合物更为有效的手段。

参考文献

- [1] Yao YP, Wang WS, Yang KQ. Efficient production of polyketide products in *Streptomyces* hosts—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(3): 418–428. (in Chinese)
姚永鹏, 王为善, 杨克迁. 链霉菌中高效生产聚酮化合物的研究方法及其进展. *微生物学报*, 2016, 56(3): 418–428.
- [2] Chen MJ, Wang GH, Dai SK, Xie LW, Li X. Polyketide antibiotics produced by polyketide synthase in *Streptomyces*—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(12): 1555–1563. (in Chinese)
- 陈敏捷, 王广华, 戴世鲲, 谢练武, 李翔. 链霉菌聚酮类次生代谢产物及其生物合成基因簇. *微生物学报*, 2009, 49(12): 1555–1563.
- [3] Doroghazi JR, Albright JC, Goering AW, Ju KS, Haines RR, Tchalukov KA, Labeda DP, Kelleher NL, Metcalf WW. A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(11): 963–968.
- [4] Jin C. Relationship of polyketide biosynthetic gene clusters. *Microbiology China*, 2014, 41(7): 1470. (in Chinese)
金城. 聚酮类抗生素生物合成基因簇间的关系. *微生物学通报*, 2014, 41(7): 1470.
- [5] Zerikly M, Challis GL. Strategies for the discovery of new natural products by Genome Mining. *ChemBioChem*, 2009, 10(4): 625–633.
- [6] Lu CY, Zhang XJ, Jiang M, Bai LQ. Enhanced salinomycin production by adjusting the supply of polyketide extender units in *Streptomyces albus*. *Metabolic Engineering*, 2016, 35: 129–137.
- [7] Jiang CY, Wang HG, Kang QJ, Liu J, Bai LQ. Cloning and characterization of the polyether salinomycin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces albus* XM211. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(4): 994–1003.
- [8] Schleissner C, Pérez M, Losada A, Rodríguez P, Crespo C, Zúñiga P, Fernández R, Reyes F, de la Calle F. Antitumor actinopyranones produced by *Streptomyces albus* POR-04-15-053 isolated from a marine sediment. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(7): 1590–1596.
- [9] Zhang Y, Zhou X, Song YX, Chen YY, Huang HB, Li J, Hua Y, Ju JH. Elaiophylin from deep South China Sea-derived *Streptomyces albiflaviner* SCSIO ZJ28. *Natural Product Research and Development*, 2013, 25(2): 185–189. (in Chinese)
张云, 周潇, 宋永相, 陈芸芸, 黄洪波, 李洁, 华燕, 鞠建华. 南海深海链霉菌 *Streptomyces albiflaviner* SCSIO ZJ28 中 Elaiophylin 的分离鉴定. *天然产物研究与研发*, 2013, 25(2): 185–189.
- [10] Zhou YJ, Prediger P, Dias LC, Murphy AC, Leadlay PF. Macrodiolide formation by the thioesterase of a modular polyketide synthase. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(17): 5232–5235.
- [11] Ziemert N, Alanjary M, Weber T. The evolution of genome mining in microbes—a review. *Natural Product Reports*, 2016, 33(8): 988–1005.
- [12] Thaker MN, Wang WL, Spanogiannopoulos P, Waglechner N, King AM, Medina R, Wright GD. Identifying producers of

- antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(10): 922–927.
- [13] Jiang WJ, Zhu TF. Targeted isolation and cloning of 100-kb microbial genomic sequences by Cas9-assisted targeting of chromosome segments. *Nature Protocols*, 2016, 11(5): 960–975.
- [14] Liu Q, Yao F, Chooi YH, Kang QJ, Xu W, Li YR, Shao YC, Shi YF, Deng ZX, Tang Y, You DL. Elucidation of ptericidin A1 biosynthetic locus revealed a thioesterase-dependent mechanism of α -pyridone ring formation. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(2): 243–253.
- [15] Han Y, Tian EL, Xu DB, Ma M, Deng ZX, Hong K. Halichobleide D, a new elaiophylin derivative with potent cytotoxic activity from mangrove-derived *Streptomyces* sp. 219807. *Molecules*, 2016, 21(8): 970.

Exploration and biosynthetic mechanism analysis of elaiophylin and actinopyranone from *Streptomyces albus* DSM 41398

Shoufeng Xie, Chenyang Lu, Xiaojing Hu, Chengkai Jiang, Qianjin Kang*, Linquan Bai, Zixin Deng

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Objective] The targeted type I polyketide-derived compounds was explored to discover diverse compounds with good biological activity from *Streptomyces albus* DSM 41398. The biosynthetic pathways of the isolates were further elucidated based on the structure determination and bioinformatics analysis. [Methods] The target compounds were discovered based on comparative HPLC analysis of the fermented broths of wild type and type I PKS gene cluster inactivated mutants. Their chemical structures were elucidated based on ^1H -, ^{13}C -NMR and HR-ESI-MS. Additionally, their biosynthetic pathways were illuminated by bioinformatics analysis. [Results] Two type I polyketide-originated compounds with antitumor activity, elaiophylin and actinopyranone, were isolated from 5 L fermented broth of *S. albus* DSM 41398. Their gene clusters were located, and the biosynthetic pathways were proposed, respectively. Notably, the biosynthesis gene cluster of actinopyranone was reported for the first time in this study. [Conclusion] The investigation of elaiophylin and actinopyranone not only offered a strategy to discover type I polyketide compounds through genome mining, but also paved ways for further compound structural modifications.

Keywords: *Streptomyces albus* DSM 41398, polyketides, actinopyranone, elaiophylin, structure determination, biosynthetic pathway analysis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270002, 21476137)

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

Received: 9 May 2017; Revised: 27 May 2017; Published online: 11 July 2017