



bagZH 编码酪氨酸酶样铜酶并参与 bagremycin 生物合成

祁双双, 吴海珍, 叶江, 张惠展*

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

摘要:【目的】研究 bagremycin 产生菌链霉菌 Tü4128 中编码酪氨酸酶样铜酶的 *bagZH* 基因的功能。【方法】基于同源重组技术敲除 *bagZH* 基因, 利用 HPLC 和 LC-ESI-MS 分析其次级代谢产物谱。在 *E. coli* BL21(DE3) 中异源表达 BagH 并分离纯化, 分别以邻氨基酚和 3,4-AHBA 为底物, 利用 LC-ESI-MS 分析 BagH 催化产物。【结果】HPLC 显示, *bagZH* 基因敲除突变株的 bagremycin 产量显著降低, 回补 *bagZH* 基因表达盒后 bagremycin 产量有所上调。LC-ESI-MS 分析 *bagZH* 基因敲除突变株的次级代谢产物谱, 结果显示, 保留时间为 3.18 min 的新产物分子量为 286.32 g/mol, 与推测的 3,4-AHBA 在体内酯化合成的产物分子量吻合。体外生化分析显示, BagH 能将邻氨基酚的邻位氨基氧化为亚硝基(保护基团)。【结论】本文首次鉴定了 *bagZH* 基因编码的酪氨酸酶样铜酶参与 bagremycin 生物合成。BagH 负责将 3,4-AHBA 的邻位氨基氧化为亚硝基(保护基团)避免自身酯化, 待与反式对香豆酸衍生物缩合后, 再由胞内的还原酶将保护性亚硝基还原为氨基, 最终合成 bagremycin A 和 bagremycin B。我们的研究结果为 bagremycin 作用机制的深入研究以及高产菌株的理性设计与改造提供了基础和参考。

关键词: bagremycin, *bagZH*, 酪氨酸酶样铜酶, 亚硝基化

分离自印度尼西亚爪哇土壤中的链霉菌 Tü4128 株 (*Streptomyces* sp. Tü4128) 能合成 bagremycin A 和 bagremycin B 两种新型次级代谢产物, 两者对芽孢杆菌属、链霉菌属、节杆菌属等一些革兰氏阳性菌具有一定的抗菌活性^[1]。Bagremycin B 是铁载体绿铁(ferroverdin)的化学降

解物, 但作为链霉菌次级代谢的天然产物还是首次被报道^[2]。

在 bagremycin 生物合成途径中^[1], 合成 bagremycin A 的前体化合物是反式对香豆酸 (*p*-coumaric) 和 3-氨基-4-羟基苯甲酸(3,4-AHBA)。作为肉桂酸(cinnamic acid)的衍生物, 反式对香豆

基金项目: 国家自然科学基金(31200026)

*通信作者。E-mail: huizhzh@ecust.edu.cn

收稿日期: 2018-04-04; 修回日期: 2018-05-17; 网络出版日期: 2018-06-07

酸来源于莽草酸途径提供的苯丙氨酸(图 1-A)。3,4-AHBA 由三碳化合物与四碳化合物缩合而成,其路线常见于手霉素和阿克苏霉素等抗生素的合成途径中^[3-4]。

我们在前期工作中采用 Solexa/Illumina 技术对链霉菌 *Tü4128* 株进行了全基因组测序和 *bagremycin* 生物合成基因簇(*bag*)定位,但其上下游边界尚未确定。*bag* 基因簇中的 *bagA*、*bagB*、*bagC*、*bagE*、*bagI* 和 *bagJ* 基因已被克隆和鉴定^[5-8],其中 *BagB* 和 *BagC* 负责反式对香豆酸的合成。

bagZ 与 *bagH* 是 *Tü4128* 株 *bag* 基因簇中紧邻的两个同向基因(图 1-B)。经同源比对分析, *BagH* 属于酪氨酸酶家族的氨基酚氧化酶。酪氨酸酶是存在于所有生物体内的含铜酶^[9],属于双核铜蛋白家族中的一类^[10-11]。

本文证实 *BagH* 为酪氨酸酶家族的新成员, *BagZ* 作为辅因子激活 *BagH* 酶活性。*BagH* 重组蛋白(*rBagH*)在体外能以氨基酚氧化酶的作用催化 *o*-氨基酚底物,暗示 *BagH* 在体内氧化前体化合物 3,4-AHBA 的邻位氨基,由此参与 *bagremycin* 的生物合成。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

用于菌种保藏、接合转移和重组子筛选的链霉菌 *Tü4128* 株孢子生长在 SMA 培养基上, YEME 培养基用于菌丝体培养, 发酵培养基用于次级代谢产物的合成和分析。上述三种培养基按照前文所列的配方^[5]配制。本文所涉菌种和质粒的性质列在表 1 中。

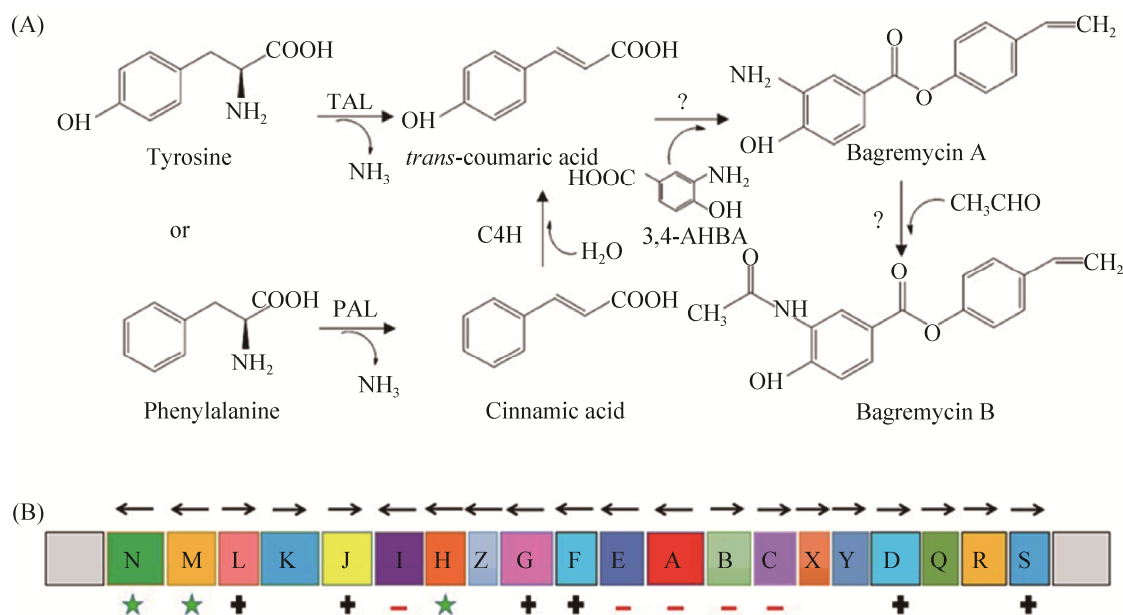


图 1. 链霉菌 *Tü4128* 株 *bagremycin* 生物合成途径及其基因簇

Figure 1. Hypothetical biosynthesis pathway and gene cluster of *bagremycin*. A: Hypothetical biosynthesis pathway of *bagremycin*. B: The gene cluster of *bagremycin*.

表 1. 本文所用的菌种和质粒
Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> JM83	F', <i>ara</i> , <i>lac-proAB</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^r), Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15	Laboratory stock
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>omp</i> , <i>hsdSB</i> (<i>rB</i> ⁻ , <i>mB</i> ⁻), <i>gal dcm</i> (DE3)	Laboratory stock
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>recF-143</i> , <i>zjj-201::Tn10</i> , <i>galK-2</i> , <i>galT-22</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY-1</i> , <i>xy-15</i> , <i>leuB-6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA-31</i> , <i>rpsL-136</i> , <i>hisG-4</i> , <i>tsx-78</i> , <i>mtli</i> , <i>glnV-44</i> , F ⁻ , Cm ^r	Professor Chang-Sheng Zhang
<i>Streptomyces</i> sp. Tü4128	Wild type bagremycins producing stain	Professor Hans-Peter Fiedler
Tü4128-Δ <i>bagZH</i>	In-frame deletion strain of <i>bagZH</i> , Km ^r	This study
Tü4128-Δ <i>bagZH</i> : <i>bagZH</i>	Tü4128-Δ <i>bagZH</i> complemented with <i>bagZH</i> , Km ^r , Am ^r	This study
Tü4128- <i>bagZH</i>	Tü4128 complemented with <i>bagZH</i> , Km ^r , Am ^r	This study
pMJ	oriT, Km ^r , Am ^r	This study
pIB139	<i>aac3(IV)</i> , attφC31, oriT, Am ^r , <i>P_{ermE}*</i>	Laboratory stock
pET-43.1a(+)	Ap ^r , PT7	Laboratory stock
pMJ-Δ <i>bagZH</i>	Deletion plasmid of <i>bagZH</i> , Km ^r , Am ^r	This study
pIB139- <i>bagZH</i>	Complementary plasmid of <i>bagZH</i> , Am ^r	This study
pET-43.1a- <i>bagH</i>	Expression plasmid of <i>bagH</i> , Ap ^r	This study

1.2 基因敲除、回补和过表达

PCR 克隆 *bagZH* 基因上下游同源臂, 分别连接至 pMJ 质粒 *neo* 基因的上游和下游, 构成敲除质粒 pMJ-Δ*bagZH*。将之转化至 *E. coli* ET12567 感受态细胞, DNA 水平验证正确的克隆用于链霉菌 Tü4128 株的接合转移, 借助同源重组敲除 *bagZH* 基因。由阿泊拉霉素抗性筛选出的二次重组子再经 DNA 水平验证, 并进行 RT-PCR 检验以排除 *bagZH* 灭活操作本身影响上下游基因转录的可能性, 最终获得链霉菌 Tü4128 株的 *bagZH* 基因敲除株(*Streptomyces* sp. Tü4128-Δ*bagZH*)。

将 *bagZH* 基因的 ORF PCR 克隆至链霉菌表达型质粒 pIB139 的 *P_{ermE}** 启动子下游, 构成 pIB139-*bagZH* 回补质粒。通过接合转移将回补质粒分别克隆至敲除株 Tü4128-Δ*bagZH* 和野生株 Tü4128 中, 完成回补株和过表达株的构建; 同样, 将 pIB139 空载质粒克隆至敲除株和野生株, 作为对照菌株。

1.3 HPLC 检测次级代谢产物

在 28 °C 和摇床转速为 180 r/min 条件下发酵培养野生株(或对照株)、敲除株、回补株和过表达株。一级摇瓶(种子)培养 3 d, 二级摇瓶培养 14 d (335 h)。发酵液经离心去除菌体, 用 HCl 将发酵上清液调至 pH 5, 过滤杂质, 加入等体积的乙酸乙酯萃取, 旋转蒸发, 用 1.2 mL 甲醇溶解发酵产物, 过滤后进行 HPLC 分析。HPLC 检测采用 XDB-C18 柱, 流动相为 40%乙腈与 60%浓度为 0.1% (V/V) 磷酸的混合溶液, 流速为 1 mL/min, 柱温 30 °C, 280 nm 进行 DAD 检测。所有样品进样 20 μL。

1.4 重组蛋白表达与分离纯化

PCR 扩增 *bagH* 基因的 ORF, 采用 In-fusion 程序将之克隆至大肠杆菌表达型 pET-43.1a(+), 构成 pET-43.1a-*bagH* 重组质粒。该构建物保留了肠激酶酶切位点, 便于将重组蛋白 rBagH 中的 Nus 标签切除。经验证正确的重组质粒转化 *E. coli*

BL21 (DE3)感受态细胞,进行体外诱导表达。表达后的菌体经超声破碎和离心获取上清液(粗酶液),用于重组蛋白 rBagH 的镍螯合亲和层析分离纯化。重组蛋白经考马斯亮蓝染色,测定 595 nm 处吸光值,最终根据蛋白质标准曲线定量重组蛋白的浓度。

将纯化后的重组蛋白溶液转移至透析袋中,用 1×重组牛肠激酶反应缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L CaCl₂, 0.1% Tween-20)在 4 °C 下进行透析。透析缓冲液与蛋白溶液的体积比大于 20:1。透析后的重组蛋白于 16 °C 酶切 12 h,切除 Nus 标签。

1.5 BagH 蛋白体外活性分析

rBagH 催化邻氨基酚氧化的活性分析总体积为 1 mL,其中 1.5 mmol/L 邻氨基酚底物,50 mmol/L 磷酸钾(pH 7.4),重组蛋白 BagH (3.3 μg–330 μg)。所有实验组均设置不添加酶的对照组。具体反应流程为:未加酶的反应液在 30 °C 预孵育

10 min;加酶(rBagH)后反应液在 30 °C 反应 30 min;加入 100 μL 5% (V/V)三氟乙酸终止反应,反应产物过滤后进行 HPLC 分析。检测使用的 XDB-C18 柱经 0.1% (V/V)三氟乙酸平衡 3 min,再用线性梯度为 0–100% (V/V)的含 0.1% (V/V)三氟乙酸的乙腈洗脱 15 min,流速为 1 mL/min,270 nm 进行 DAD 检测^[12]。所有样品进样 20 μL。

2 结果

2.1 bagH 和 bagZ 的生物信息学分析

bagH 基因全长 924 bp,编码 308 个氨基酸,蛋白分子量约为 34 kDa。BagH 的系统发育树见图 2。在 NCBI 数据库中进行同源比对, BagH 与链霉菌 *Streptomyces murayamaensis* 中的 NspF^[13–14] 一致性达 59%,预测为铜蛋白家族 III 型酪氨酸酶超家族成员邻氨基酚氧化酶。该超家族成员均需铜离子激活,每个酶分子结合 2 个铜离子^[15–16]。

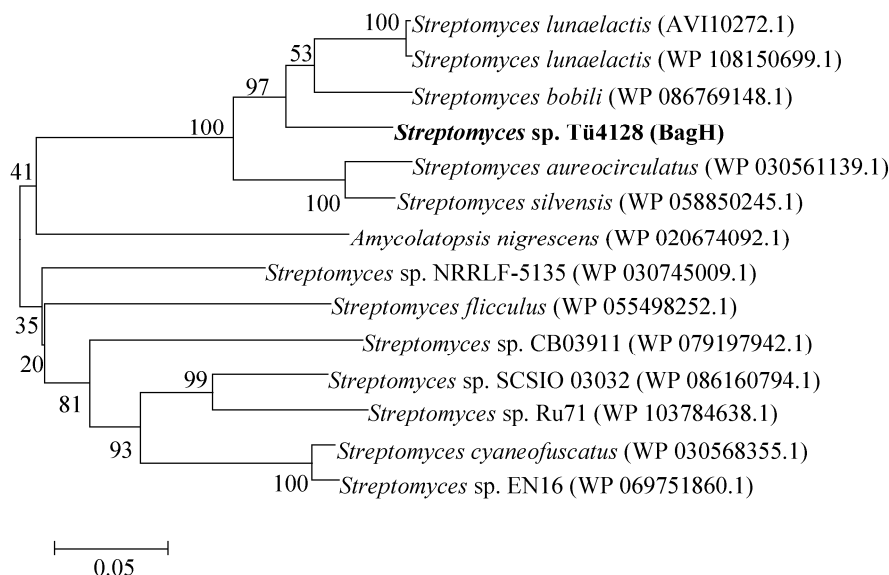


图 2. BagH 系统发育树

Figure 2. Phylogenetic analysis of BagH and their homologs. Sequence alignments were performed with ClustalW, and the neighbor-joining tree was generated with Mega 6. Numbers on the tree branches represent the bootstrap support calculated per 1000 bootstrap replicates. BagH is indicated by bold.

bagZ 基因全长 357 bp, 编码 119 个氨基酸, 蛋白分子量约为 13 kDa。在 NCBI 数据库中进行同源比对, *BagZ* 与 *MelC1* 一致性高达 97%, 与 *Streptomyces griseus* 中 *grixazone* 生物合成途径的 *GriE* 一致性达 55%, 与 *Streptomyces murayamaensis* 中 4,3-HNBAm 生物合成途径的 *NspE* 一致性达 47%。*MelC1* 是 *MelC2* 的分子伴侣, 协助 *MelC2* 多肽链正确折叠, 同时负责将 Cu^{2+} 转运至 *MelC2* 的活性中心^[17-18]。*MelC2* 是典型的酪氨酸酶, 在多种链霉菌中负责次级代谢产物黑色素的合成^[18]。鉴于 *BagH* 与 *MelC2* 同源比对的一致性高达 61%, 预示 *BagZ* 与 *MelC1* 发挥相似的功能, 负责 *BagH* 多肽链折叠与 Cu^{2+} 转运。

2.2 敲除株 *Tü4128-ΔbagZH* 的构建

分别 PCR 克隆 *bagZH* 基因上游同源臂(621 bp) 的下游同源臂(793 bp), 并按图 3-A 所示程序构建敲除质粒 *pMJ-ΔbagZH*。含 *pMJ-ΔbagZH* 的 *E. coli* ET12567 与链霉菌 *Tü4128* 株接合转移, 覆盖抗生素筛选二次重组子(图 3-B)。

为了排除 *bagZH* 基因敲除操作本身影响上下游基因正常表达的可能性, 分别从培养 11 d 的野生株 *Tü4128* 和敲除株 *Tü4128-ΔbagZH* 中提取总 RNA, 经 DNase I 消化后逆转录为 cDNA。PCR 检测 *bagZH* 上游基因 *bagG* 和下游基因 *bagI* 的转录水平, 并比较野生株(图 3-C)与敲除株(图 3-D) 的 RT-PCR 格局。

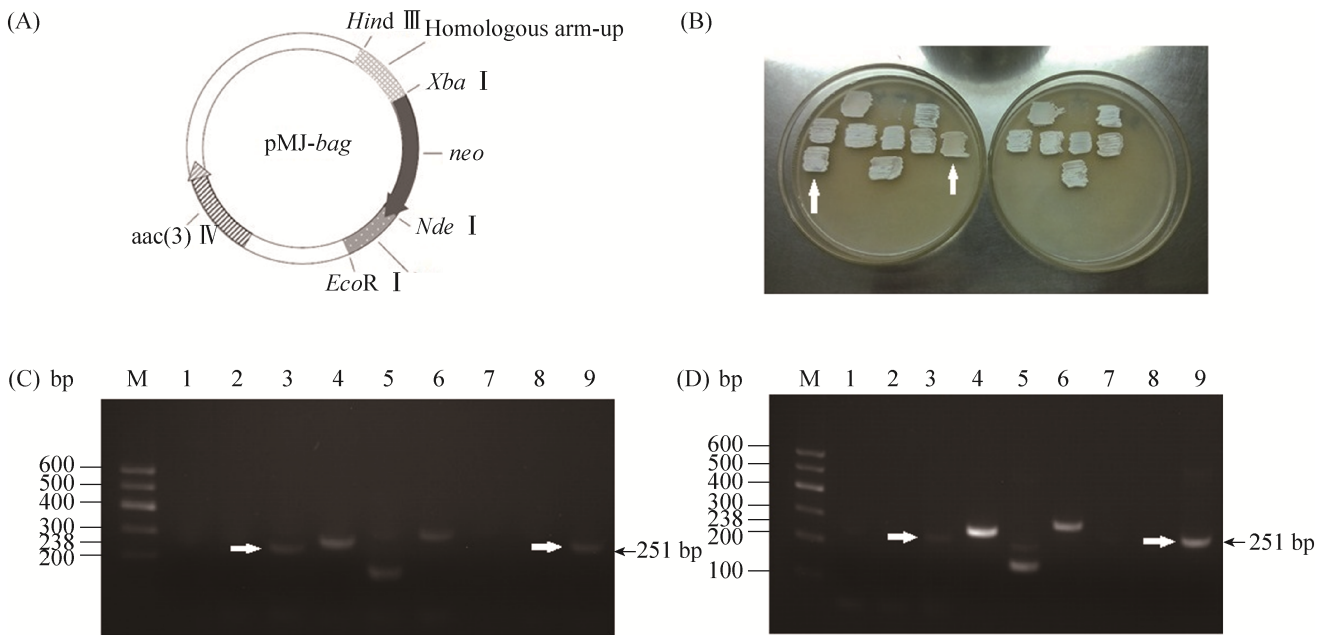


图 3. 链霉菌 *Tü4128-ΔbagZH* 敲除株的构建与筛选

Figure 3. Construction and verification of *bagZH* disruption mutant. A: The schematic diagram of disruption plasmids. B: Resistant screening of target recombinants. Left: kanamycin; right: apramycin. C: Transcripts in *Streptomyces* sp. *Tü4128*. M: DNA marker; Lanes 1, 2: Negative control, primers of *bagG*; 3: *bagG* (238 bp); 4-6: Positive control, primers of *bagA*, *bagC* and *bagE*; 7, 8: Negative control, primers of *bagI*; 9: *bagI* (251 bp). D: Transcripts in *Streptomyces* sp. *Tü4128-ΔbagZH*. M: DNA marker; Lanes 1, 2: Negative control, primers of *bagG*; lane 3: *bagG* (238 bp); lane 4-6: Positive control, primers of *bagA*, *bagC* and *bagE*; lane 7, 8: Negative control, primers of *bagI*; lane 9: *bagI* (251 bp).

结果显示, 无论野生株 Tü4128 还是敲除株 Tü4128- $\Delta bagZH$, 3 个阳性对照基因正常转录, $bagZH$ 上下游基因 $bagG$ 和 $bagI$ 的转录也没有发生显著改变, 而所有阴性对照在对应大小处均无扩增产物。可见, $bagZH$ 基因的敲除操作并不影响其上下游基因的转录, 由 $\Delta bagZH$ 造成的次级代谢产物谱改变可视为 $bagZH$ 基因的贡献。

2.3 $bagZH$ 与 bagremycin 生物合成的相关性

为了探查 $bagZH$ 灭活对 bagremycin 合成的影响, 将野生株 Tü4128、敲除株 Tü4128- $\Delta bagZH$ 、回补株 Tü4128- $\Delta bagZH: bagZH$ 和过表达株 Tü4128: $bagZH$ 分别发酵培养 14 d (335 h), HPLC 检测四株菌的 bagremycin A 和 B 水平(图 4-B 和 4-C)。Bagremycin A 和 bagremycin B 的质谱 HPLC/

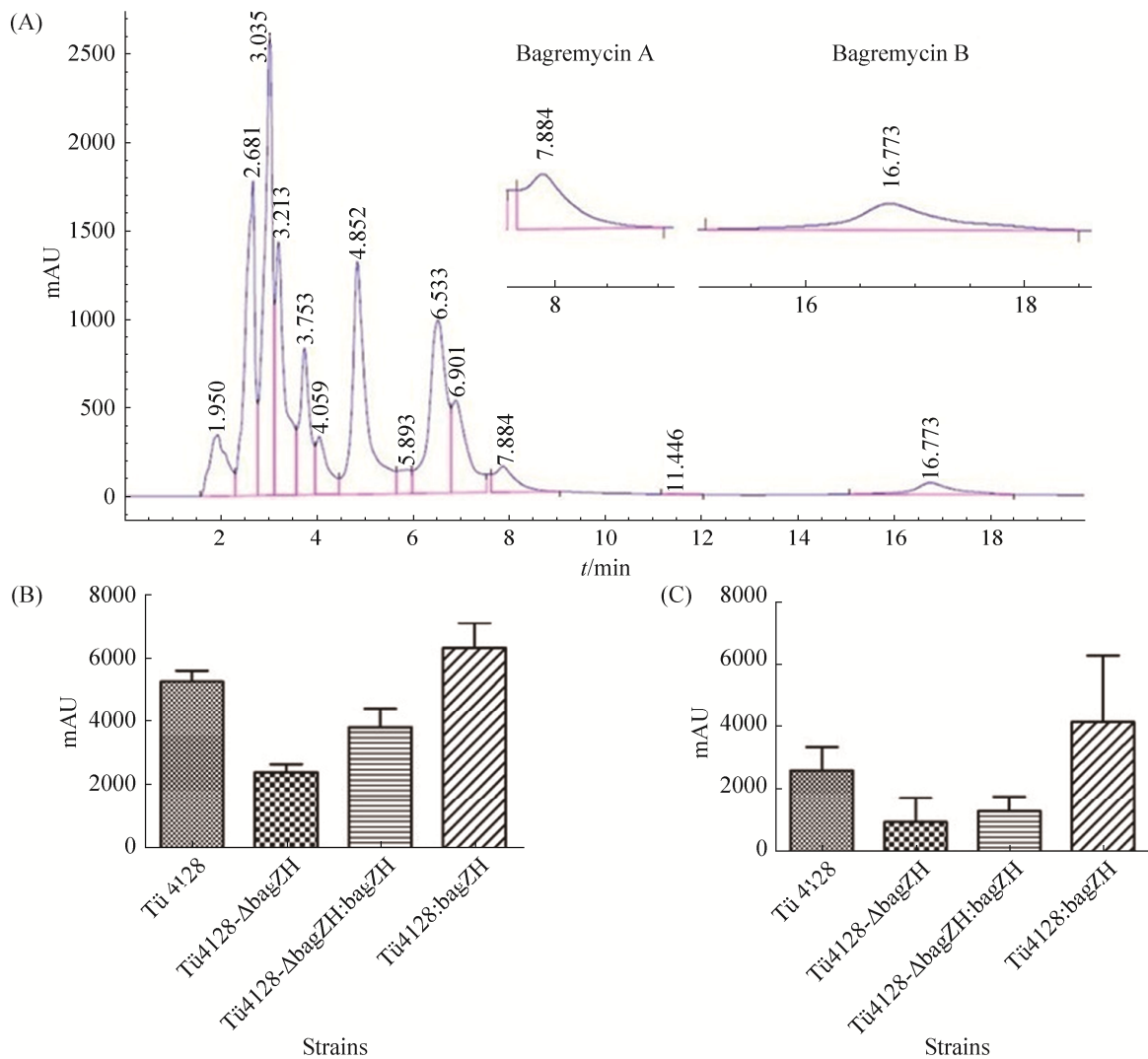


图 4. *Streptomyces* sp. Tü4128 与敲除株、回补株、过表达株的发酵产物 HPLC 结果

Figure 4. HPLC analysis of bagremycins in $bagZH$ mutant strains, complementation strains and overexpression strains. A: HPLC analysis and retention time of bagremycin A and B. B: Production of bagremycin A. C: Production of bagremycin B. ^a Values were expressed as the mean±standard deviation obtained from three independent experiments. ^b mAU*s was defined as the amount of peak area that accumulated the amount of production at a rate of peak height per second.

TOF-MS 分析结果显示, 在本文所述的检测条件下, bagremycin A 和 B 两组分的保留时间分别为 7.8 min 和 16.7 min (图 4-A)。

发酵结果和 bagremycin 的 HPLC 峰面积统计分析显示, *bagZH* 联合敲除后, bagremycin A 和 B 组分的产量均呈显著下降; 在敲除株中回补 *bagZH* 双基因后, bagremycin 的两种组分产量均有所提高, 但没有恢复到野生株水平; 若在野生株中导入 *bagZH* 双基因表达盒(即过表达株), bagremycin A 和 B 组分的产量高于野生株。上述结果证实 *bagZH* 基因影响 bagremycins 的生物合成。

2.4 野生株 Tü4128 和敲除株 Tü4128-Δ*bagZH* 的次级代谢产物谱

多批次发酵产物的 HPLC 结果显示(图 5-A), 相比野生株 Tü4128, 在敲除株 Tü4128-Δ*bagZH* 的次级代谢产物谱中, 保留时间为 3.00 min 和 6.31 min 的产物不再合成, 而在保留时间为 3.18 min 处出现的新产物积累。推测 *bagZH* 基因敲除后, 失去保护基团的邻位氨基与另一 3,4-AHBA 分子的羟基发生酯化反应, 产生分子量为 285.24 g/mol 的化合物 $C_{14}H_{19}O_5N_2$ 。敲除株 Tü4128-Δ*bagZH* 的 LC-ESI-MS 结果显示, 保留时间为 3.18 min 的新产物分子量为 286.32 g/mol (图 5-B 和 5-C)。

2.5 重组 BagH 的体外生化分析

重组质粒 pET-43.1a-*bagH* 在大肠杆菌 BL21 (DE3)中几乎以完全可溶形式表达(图 6-A), 但含重组质粒 pET-43.1a-*bagZ* 的大肠杆菌 BL21 (DE3)经诱导后却以包涵体形式表达重组蛋白 rBagZ (图 6-B)。为了获得具有活性的单体酶, 我们在 rBagH 粗酶液中加入终浓度为 1 mmol/L 的 $CuSO_4$

(代替 BagZ 转运 Cu^{2+} 的作用, BagH 与 Cu^{2+} 的摩尔比为 1:2)。经 Ni^{2+} -NTA 层析纯化后的 rBagH 约为 95.7 kDa (图 6-A), 肠激酶切除 Nus 标签, 获得可用于酶活检测的纯酶液。

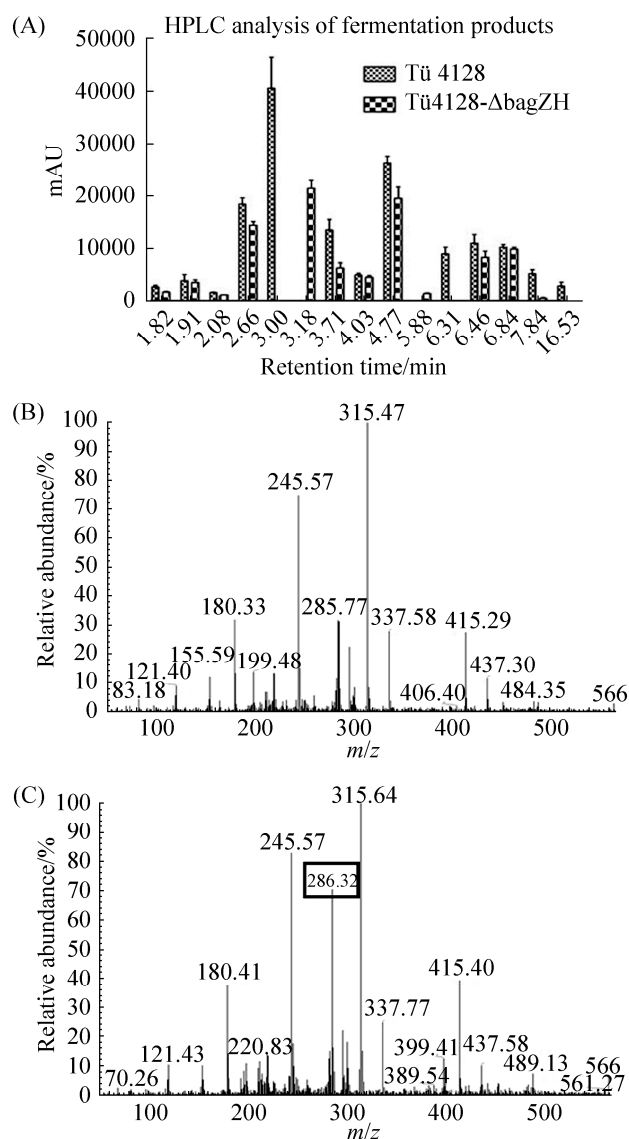


图 5. 野生株 Tü4128 和敲除株 Tü4128-Δ*bagZH* 的次级代谢产物谱

Figure 5. Secondary metabolite spectrum of *Streptomyces* sp. Tü4128 and Tü4128-Δ*bagZH* (A), LC-ESI-MS analysis of Tü4128 (B) and Tü4128-Δ*bagZH* (C).

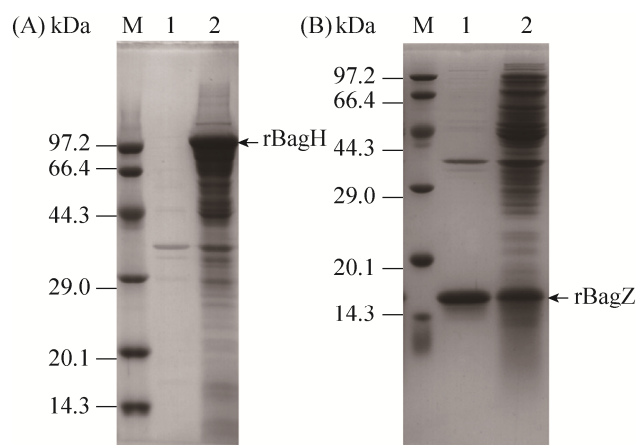


图 6. SDS-PAGE 检测重组蛋白 BagH 与 BagZ 表达
Figure 6. SDS-PAGE of recombinant protein BagH and BagZ. M: Protein marker. (A) lane 1: Inclusion body of pET43.1a-*bagH*; lane 2: Supernatant of pET43.1a-*bagH*. (B) lane 1: Inclusion body of pET43.1a-*bagZ*; lane 2: Supernatant of pET43.1a-*bagZ*.

鉴于生物信息学预测 BagH 是以邻氨基酚为底物的氧化酶(将邻位氨基氧化成亚硝基),我们推测在 bagremycin 生物合成途径中, BagH 可能负责将 3-氨基-4-羟基苯甲酸(3,4-AHBA, 邻氨基酚结构类似物)中的氨基氧化为亚硝基。因此,我们选择 3,4-AHBA 和邻氨基酚作为底物(图 7-A),HPLC 检测分析 BagH 对两种底物的体外活性。

HPLC 结果显示(图 7-C 和 7-D),检测波长为 270 nm 时,实验组中保留时间为 5.2 min 的邻氨基酚底物峰较之对照组减少,同时产生新的产物(保留时间 2.8 min)。表明 BagH 能将邻氨基酚催化产生新的产物(其结构未鉴定)。然而,在同样条件下实验组中保留时间为 4.3 min 的底物 3,4-AHBA 并没有减少,也没有新的产物产生。推测在体外环境下, BagH 对酚式羟基的对位基团具有选择性,基团越简单,其邻位氨基就越容

易被氧化。支持这一推测的事实是: BagH 的同源蛋白 rNspF 在氧化底物亚硝基化时^[19],底物酚式羟基的对位基团会对 rNspF 的活性产生很大影响; rNspF 可以氧化 3,4-AHBA,但对 3,4-AHBAm 的活性更高^[12]。

3 讨论

本文调查结果显示,联合行使邻氨基酚氧化酶活性的链霉菌 Tü4128 株 BagZH 参与 bagremycin 的生物合成,但似乎并非 bagremycin 生物合成所必需。我们在 Tü4128 全基因组测序分析时发现(另文待发表),Tü4128 株基因组中存在包括 *bag* 在内的多种次级代谢产物生物合成基因簇,其中不乏 BagH 的同工酶基因。*bagZH* 基因被敲除后 bagremycin 产量降低,但没有完全消失,意味着 Tü4128 株细胞内存在多重代谢旁路发挥 BagH 样的功能。

HPLC 结果显示, BagH 可在体外以邻氨基酚为底物催化产生新的产物,推测 BagH 将邻氨基酚苯环上的氨基氧化为亚硝基(图 5-B 和 5-C)。然而,在相同反应条件下,3,4-AHBA 未能被 BagH 氧化,这可能是由于体外测活体系与体内环境的不同所致。由于我们未能实现 *bagZ* 与 *bagH* 基因共表达,因而构建了 pET-43.1a-*bagH* 重组质粒将 *bagH* 单独体外表达,并在超声破碎时加入 Cu^{2+} 代替 BagZ 的作用。据文献报道,纯化时为避免 NspE(BagZ 同源伙伴)的干扰单独表达 NspF,加入足够高浓度的 Cu^{2+} 可以代替 NspE 激活 NspF 的酶活性^[12]。我们使用文献推荐的 Cu^{2+} 浓度却未能将 3,4-AHBA 的邻位氨基氧化,有可能该浓度对于 BagH 体外氧化 3,4-AHBA 仍不够高。另外,在体外环境下, BagH 对邻氨基酚类底物酚式羟基对位基团的偏爱性也是一种可能的解释。

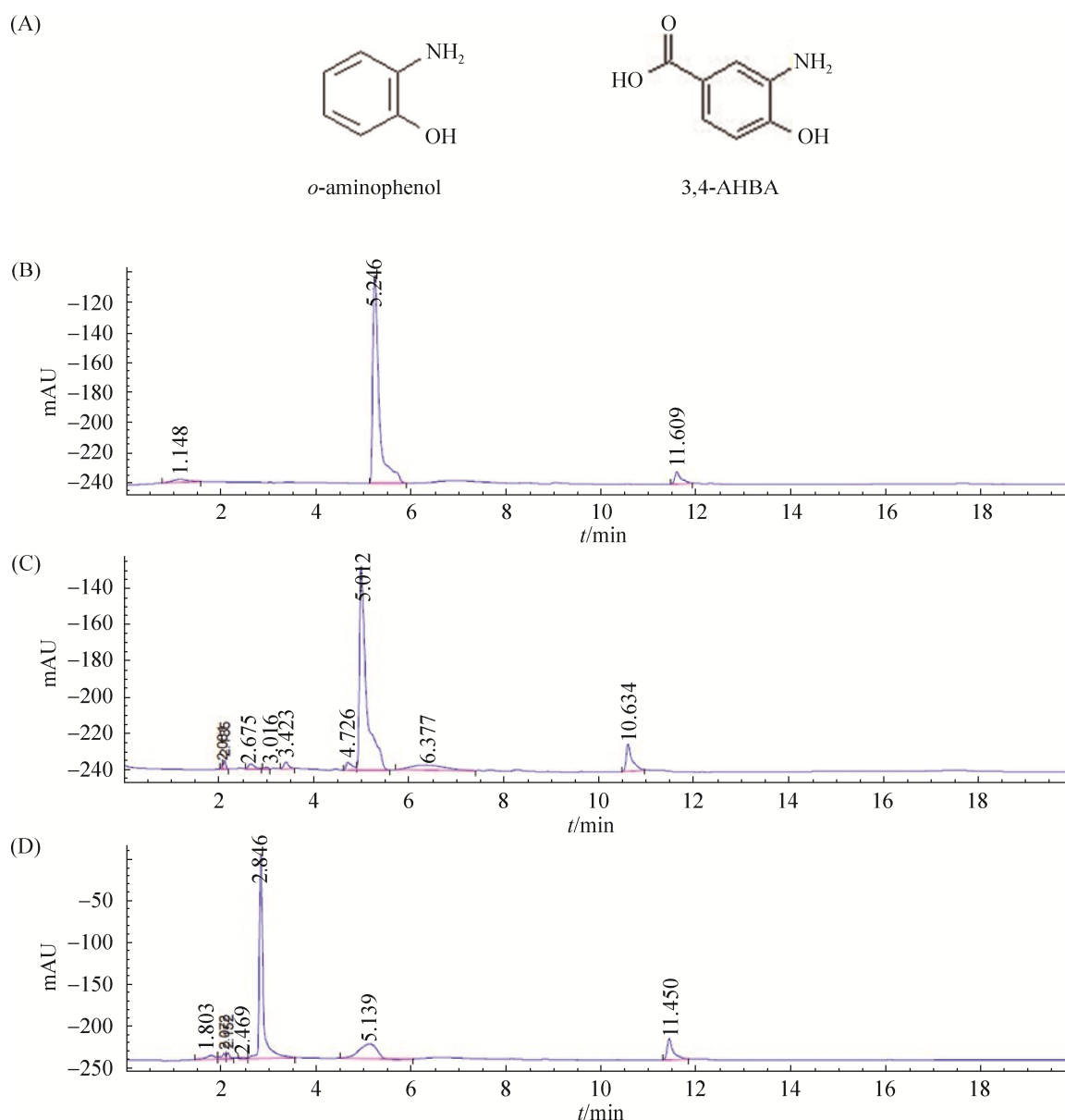


图 7. 邻氨基酚与 3-氨基-4-羟基苯甲酸的化学结构和邻氨基酚体外活性分析

Figure 7. A: Chemical structure of *o*-aminophenol and 3,4-AHBA and *in vitro* activity analysis of *o*-aminophenol. B: *o*-aminophenol. C: Control group, adding proteins of pET-43.1a (+). D: Experimental group, adding rBagH.

综上所述，本文首次鉴定了 *bagZH* 基因与 *bagremycin* 生物合成的相关性，即 *bagZH* 以编码酪氨酸酶样铜酶的方式参与 *bagremycin* 生物合成。作为酪氨酸酶家族的一员，BagH 在链霉菌 Tü4128 株的 *bagremycin* 生物合成途径中，可能贡献于 3,4-AHBA 邻位氨基的氧化保护，避免 3,4-AHBA

在体内发生自身酯化，从而促进 3,4-AHBA 与反式对香豆酸酯化产生 *bagremycin* 前体化合物。据报道，作为抗生素的 *bagremycin* 对特定类型的腺癌也有一定的抑制作用^[1,20]，因而我们的研究结果为 *bagremycin* 作用机制的深入研究以及高产菌株的理性设计与改造提供了基础和参考。

参考文献

- [1] Jonas R, Pandey A, Tharun G. Biotechnological advances and applications in bioconversion of renewable raw materials. Braunschweig, Germany: Doehring Druck, 2004.
- [2] Ballio A, Bertholdt H, Carilli A, Chain EB, di Vittorio V, Tonolo A, Vero-Barcellona L. Studies on feroverdin, a green iron-containing pigment produced by a *Streptomyces* Wak. species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1963, 158(970): 43–70.
- [3] Floss HG. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*, 1997, 14(5): 433–452.
- [4] Li YF, Gould SJ, Proteau PJ. Biosynthesis of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid in *Streptomyces murayamaensis*: incorporation of [4-¹³C] oxalacetate. *Tetrahedron Letters*, 2000, 41(27): 5181–5185.
- [5] Zhu YX, Xu DK, Liao SY, Ye J, Zhang HZ. Cloning and characterization of *bagB* and *bagC*, two co-transcribed genes involved in bagremycin biosynthesis in *Streptomyces* sp. Tü 4128. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(1): 167–172.
- [6] Zhu YX, Liao SY, Ye J, Zhang HZ. Cloning and characterization of a novel tyrosine ammonia lyase-encoding gene involved in bagremycins biosynthesis in *Streptomyces* sp. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(2): 269–274.
- [7] Liu F, Xu DK, Zhang YC, Zhu YX, Ye J, Zhang HZ. Identification of *BagI* as a positive transcriptional regulator of bagremycin biosynthesis in engineered *Streptomyces* sp. Tü4128. *Microbiological Research*, 2015, 173: 18–24.
- [8] Zhang YC, Wu HZ, Ju C, Qi SS, Ye J, Zhang HZ. Identification of *bagJ* as a resistant gene for novel antibiotic bagremycins in *Streptomyces* sp. Tü4128. *Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2017, 43(2): 184–192. (in Chinese)
张玉琛, 吴海珍, 鞠诚, 祁双双, 叶江, 张惠展. *Streptomyces* sp. Tü4128 中新型抗生素 bagremycins 抗性基因 *bagJ* 的研究. 华东理工大学学报(自然科学版), 2017, 43(2): 184–192.
- [9] Claus H, Decker H. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29(1): 3–14.
- [10] Faccio G, Kruus K, Saloheimo M, Thöny-Meyer L. Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 1749–1760.
- [11] Ramsden CA, Riley PA. Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, 22(8): 2388–2395.
- [12] Noguchi A, Kitamura T, Onaka H, Horinouchi H, Ohnishi Y. A copper-containing oxidase catalyzes C-nitrosation in nitrosobenzamide biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(9): 641–643.
- [13] Ginsbach JW, Kieber-Emmons MT, Nomoto R, Noguchi A, Ohnishi Y, Solomon EI. Structure/function correlations among coupled binuclear copper proteins through spectroscopic and reactivity studies of NspF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(27): 10793–10797.
- [14] Cone MC, Melville CR, Carney JR, Gore MP, Gould SJ. 4-hydroxy-3-nitrosobenzamide and its ferrous chelate from *Streptomyces murayamaensis*. *Tetrahedron*, 1995, 51(11): 3095–3102.
- [15] Tepper AWJW, Bubacco L, Canters GW. Interaction between the type-3 copper protein tyrosinase and the substrate analogue *p*-nitrophenol studied by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(2): 567–575.
- [16] Worrall JAR, Vijgenboom E. Copper mining in *Streptomyces*: enzymes, natural products and development. *Natural Product Reports*, 2010, 27(5): 742–756.
- [17] Chen LY, Chen MY, Leu WM, Tsai TY, Lee YH. Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase *trans*-activator MelC1. MelC1 is likely a chaperone for apotyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(25): 18710–18716.
- [18] Leu WM, Chen LY, Liaw LL, Lee YH. Secretion of the *Streptomyces* tyrosinase is mediated through its *trans*-activator protein, MelC1. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(28): 20108–20113.
- [19] Noguchi A, Horinouchi S, Ohnishi Y. Substrate specificity of benzamide synthetase involved in 4-hydroxy-3-nitrosobenzamide biosynthesis. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(1): 93–96.
- [20] Bertasso M, Holzenkämpfer M, Zeeck A, Dall'Antonia F, Fiedler HP. Bagremycin A and B, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. Tü4128. *Journal of Antibiotics*, 2001, 54(9): 730–736.

***BagZH* encodes tyrosinase-like copper enzyme and participates in bagremycin biosynthesis**

Shuangshuang Qi, Haizhen Wu, Jiang Ye, Huizhan Zhang*

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: [Objective] We aimed to reveal a novel function of *bagZH* in *Streptomyces* sp. Tü4128, which encoded a tyrosinase-like copper enzyme. [Methods] The *bagZH* gene was deleted through homologous recombination, and the secondary metabolites were detected and analyzed by HPLC and LC-ESI-MS. The activity of the BagH enzyme expressed by *E. coli* BL21(DE3) was measured by biochemical assays. The catalytic products of the enzyme were analyzed by LC-ESI-MS, in which *o*-aminophenol and 3,4-AHBA were used as substrates. [Results] HPLC analysis showed that the production of bagremycin significantly decreased when *bagZH* was deleted. Complementation of *bagZH* gene expression cassettes in the mutant increased the accumulation of bagremycin. LC-ESI-MS results showed that the molecular weight of the new product with a retention time of 3.18 min was 286.32 g/mol, which was consistent with the predicted molecular weight of the product synthesized by esterification of 3,4-AHBA *in vivo*. *In vitro* biochemical analysis demonstrated that BagH can catalyze the oxidation of *o*-aminophenol (protecting group). [Conclusion] Our findings revealed for the first time that *bagZH* participated in the biosynthesis of bagremycin by encoding a tyrosinase-like copper enzyme. BagH protected the biosynthetic intermediates by catalyzing the oxidation of 3,4-AHBA to a nitroso derivative (protecting group). After condensation with *p*-coumanic acid, the nitroso-group is reduced by a reductase *in vivo* to generate bagremycin A and B. The results obtained in this study provide a basis and reference for in-depth study of the mechanism of bagremycin and rational design and transformation of high-yielding strains.

Keywords: bagremycin, *bagZH*, tyrosinase-like copper enzyme, nitrosation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200026)

*Corresponding author. E-mail: huizhzh@ecust.edu.cn

Received: 4 April 2018; Revised: 17 May 2018; Published online: 7 June 2018