



酮基合酶 AlpRQ 影响醌那霉素的产量

华康敏, 刘向阳, 邓子新, 贺新义, 蒋明*

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:【背景】角萜环类聚酮化合物醌那霉素生物合成基因簇包含了两套酮基合酶(KS_{α} 和 KS_{β})的编码基因, 即 *alpA*, *alpB* 和 *alpR*, *alpQ*, AlpA 和 AlpB 被证明是醌那霉素合成过程中必需的酮基合酶, 而 AlpR 和 AlpQ 则被认为与别的化合物的合成相关。【目的】鉴于 *alpR* 和 *alpQ* 和必需基因 *alpS* 在醌那霉素合成基因簇上紧密相邻, 本研究旨在确定它们与醌那霉素生物合成的相关性。【方法】PCR-targeting 在细菌人工染色体(BAC)文库质粒上进行多基因敲除, 构建好的文库质粒再导入通用宿主 *Streptomyces albus* J1074 中进行异源表达, 并用高效液相色谱(HPLC)检测突变株和野生型菌株的发酵产物。【结果】AlpR 和 AlpQ 对醌那霉素的合成没有直接影响, 但是敲除 AlpRQ 突变株的发酵液中醌那霉素的产量显著提高了。【结论】AlpR 和 AlpQ 很有可能是另一 II 型聚酮化合物的 KS_{α} 和 KS_{β} , 它们与 AlpA 和 AlpB 竞争共同的合成前体。本研究还证明了 AlpR 和 AlpQ 并不能替代 AlpA 和 AlpB 的功能。

关键词: II 型聚酮合酶, 生物合成, 醌那霉素, 芳香环聚酮

聚酮化合物 (polyketide, PK) 是聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 以短链羧酸为延伸单元, 通过一系列重复的脱羧缩合反应生成的天然产物, 其合成过程类似于脂肪酸的合成^[1-2]。许多 PK 类的天然产物可用于临床治疗, 比如抗细菌类、抗真菌类、抗癌类; 降胆固醇; 免疫抑制剂类; 兽用抗生素等等^[3-9]。除了已经投入生产和使用的聚酮类药物, 还有很多具有生物活性的

聚酮化合物尚未成药, 值得科学家们进行更深的研究。

根据合成过程中聚酮合酶的不同, 聚酮化合物通常可分为三类, 即 I 型聚酮化合物 (type I PK), II 型聚酮化合物 (type II PK) 和 III 型聚酮化合物 (type III PK)。II 型聚酮化合物又被称为芳香型或迭代型聚酮化合物, 它们多数是从革兰氏阳性菌放线菌中分离得到的, 如柔红霉素 (daunorubicin),

基金项目: 国家自然科学基金(31870026, 31300033, 21661140002); 国家重大研发计划(2018YFA0900402); 中科院上海生命有机化学国家重点实验室开放基金

*通信作者。Tel: +86-21-62932943; Fax: +86-21-62932418; E-mail: jiangming9722@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-06; 修回日期: 2020-08-31; 网络出版日期: 2021-01-28

土霉素 oxytetracycline 和醌那霉素(kinamycin)^[10-13]。II 型聚酮类化合物的合成酶中包含了一个最小聚酮合酶(minimal PKS), 它由聚酮合酶(KS_α)、链长决定因子(KS_β)和酰基载体蛋白(ACP)组成。II 型聚酮化合物的起始单元首先是在这 3 个酶的作用下通过重复的脱羧缩合反应生成聚酮链的。

醌那霉素(kinamycin)是由 Omura 等于 1970 年在 *Streptomyces murayamaensis* KA-295 的发酵液中首次分离得到。之后, Gould 等完成了几乎所有醌那霉素早期的生物合成研究。1985 年, 他们通过同位素喂养实验, 即将[1,2-¹³C₂]标记的乙酸盐添加到 *S. murayamaensis* 菌株的发酵液中, 继续发酵到结束后再用 ¹³C NMR 进行检测与分析。检测结果表明醌那霉素是由乙酸盐单元组成的, 说明醌那霉素是聚酮类化合物^[14]。他们随后在 *S. murayamaensis* 发酵液中分离到了一个不属于醌那霉素家族的新化合物——dehydrabelomycin (DHR), 同样通过同位素喂养证明了 DHR 是醌那霉素合成过程中的一个中间体。之后 Gould 的团队又陆续从 *S. murayamaensis* 的发酵液中分离并鉴定了一些属于醌那霉素家族的化合物及其生物合成过程中生成的一系列中间体, 其中包括了 pre-kinamycin, keto-anhydrokinamycin, kinobscurinone, stealthin C, kinamycin E 和 kinamycin F^[15-17]。

2011 年, Bunet 等证明了 *Streptomyces ambofaciens* 也能合成醌那霉素^[18]。但在该菌株中, 醌那霉素的生物合成基因簇是双拷贝的, 这会给遗传操作带来不便。2018 年, 本课题组从构建好的 BAC 文库中钓取了包含醌那霉素完整生物合成基因簇的 BAC, 并在 *S. albus* J1074 中对醌那霉素进行了异源表达。与此同时还确定了醌那霉素合成基因簇的边界, 其生物合成基因簇是从 *alpZ* 到 *alp2H*, 总长约 72 kb, 共有 62 个 ORF^[19]。在该菌株中, 醌那霉素异源生物合成体系的建立为我们后续研究其每个基因所编码蛋白的具体功能提供了便利。醌那霉素合成基因簇如图 1 所示。

II 型聚酮类天然产物的生物合成基因簇中包含了“minimal PKS”, 通常这样的“minimal PKS”在芳香型聚酮化合物的生物合成基因簇中有且只有一个, 但醌那霉素的生物合成基因簇比较特殊, 它包含了两套酮基合酶(KS_α 和 KS_β)的编码基因, 即图 1 中的 *alpA*, *alpB* 和 *alpR*, *alpQ*。此前, 已经有文献报导了 *alpA* 和 *alpB* 是醌那霉素合成过程中所必需的酮基合酶基因, *alpR* 和 *alpQ* 则被认为是另一个 II 型聚酮化合物生物合成的 KS_α 和 KS_β 的必需基因, 但没有对这两个蛋白进行研究的报道^[20]。

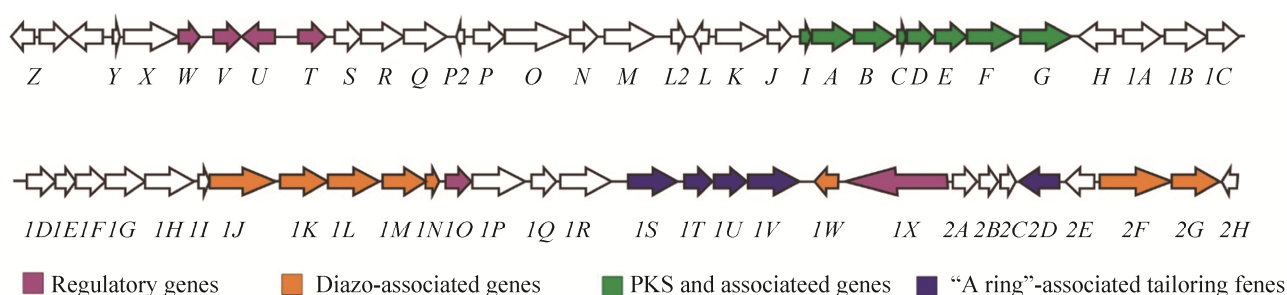


图 1. 醌那霉素生物合成基因簇

Figure 1. Biosynthetic gene cluster of kinamycin (*alp* cluster).

近几年, 在研究醌那霉素的生物合成机制方面有了很大的进展, 科学家们探究了它的苯并茚骨架部分的生物合成过程, 并对其生物合成途径中许多后修饰酶的功能进行了鉴定^[19,21-23]。图 2 是在现有研究基础上对醌那霉素生物合成途径的一个推测。醌那霉素首先在最小聚酮合酶的作用下生产聚酮链骨架, 然后在聚酮还原酶、环化酶、芳香化酶的作用下形成中间体 UWM6, 最后在多种后修饰酶的作用下形成高度氧化的 A 环和重氮官能团。本研究通过体内遗传学实验对醌那霉素生物合成基因簇中两套酮基合酶之间的关系进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种及质粒: 大肠杆菌 DH10B(克隆宿主), ET12567/pUB307^[24-25] (用于三亲本接合转移)和 BW25113^[26] (K12 衍生菌株, 用于基因敲除); 链霉菌 *S. albus* J1074 (异源表达宿主), *S. albus*/ Δ *alpW*-2E9 (转入 Δ *alpW*-2E9 BAC 的出发菌

株, 产 kinamycin D)以及本研究构建的 *S. albus*/ Δ *alpAB* Δ *alpW*-2E9 和 *S. albus*/ Δ *alpRQ* Δ *alpW*-2E9 (2 个突变菌株), 所有菌株均由上海交通大学分子微生物学实验室保存。

Δ *alpW*-2E9: 包含醌那霉素完整合成基因簇的人工细菌染色体(BAC)2E9 上, 敲除负调基因 *alpW*。在此基础上构建了另外 2 个 BAC 质粒(Δ *alpAB* Δ *alpW*-2E9 和 Δ *alpRQ* Δ *alpW*-2E9)。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌的液体培养基为 LB (g/L): 酵母提取物 5, NaCl 5, 胰蛋白胨 10, 加入去离子水使之完全溶解, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; 大肠杆菌的固体培养基为 LA (g/L): 即在 LB 的配方中添加 1.5% (15 g)的琼脂粉, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

链霉菌的孢子活化培养基(g/L): 黄豆饼粉 20–25, 加入 1 L 去离子水, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。灭菌后过滤(六层纱布)到新的烧杯中, 并加入甘露醇 20 g, 完全溶解后调 pH 至 7.2–7.4, 接着加入去离子水定容至 1 L, 最后加入 2% (20 g) 的琼脂粉, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

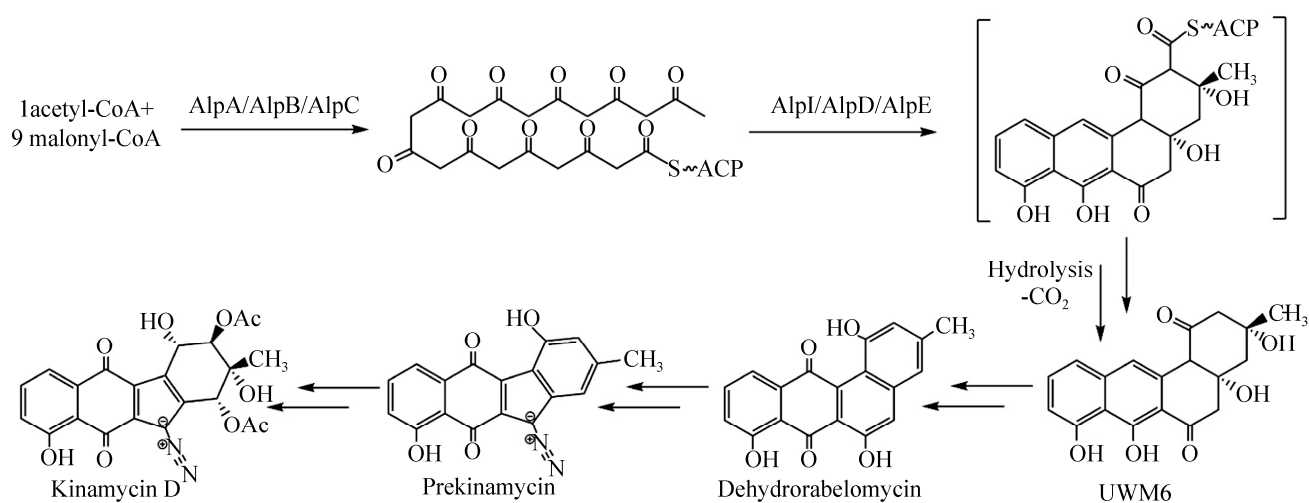


图 2. 推测的醌那霉素合成途径

Figure 2. The proposed biosynthetic pathway of kinamycin.

链霉菌的种子培养基为 TSBY (g/L): 蔗糖 103, 胰蛋白胨 30, 酵母提取物 5, 加入去离子水使之完全溶解, 最后定容至 1 L, 115 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; 链霉菌的发酵培养基为 R2 (g/L): 蔗糖 103, 葡萄糖 10, TES 5.6, 酪蛋白氨基酸(Difco Casaminoacids) 0.1, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.12, K_2SO_4 0.25, 加入去离子水(950 mL 左右)使之完全溶解, 然后调 pH 至 7.2, 最后定容至 970 mL, 115 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。在使用前加入 15 mL 20% 的 L-脯氨酸, 10 mL 0.5% 的 KH_2PO_4 , 5 mL 5 mol/L 的 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 以及 2 mL 微量元素溶液。微量元素溶液(1 L): $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 200 mg, $ZnCl_2$ 40 mg, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 10 mg, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 10 mg, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 10 mg, 加入去离子水使之完全溶解, 最后定容至 1 L, 121 °C、 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 PCR-targeting 引物: 设计了 2 对敲除引物, 即 *S. gt- $\Delta alpAB$* -F: 5'-CGCGATGGCCACGCGCTTCTACAGCTGGGAGGCCTCCCGATTCCGGGGA TCCGTGACGACC-3'; *S. gt- $\Delta alpAB$* -R: 5'-GCGGTTGCGGTGCGTTCGGTTCGGGCGGTGTGCGGGGGTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'; *S. gt- $\Delta alpRQ$* -F: 5'-GTGAACCGCGTCGTGATCACCGGGATCGGCGTCGTCGCCATTCGGGGATCCGTCGACC-3'; *S. gt- $\Delta alpRQ$* -R: 5'-TCACTCCGTCTGAGGGGCCC GGAGCACTGCGGCGGAGTTTGTAGGCTG GAGCTGCTTC-3'。此外, 还设计了 2 对验证引物, 即 *S. gt- $alpAB$* -flank-F: 5'-CCACCTCCAGGAC TTCGACGAGG-3'; *S. gt- $alpAB$* -flank-R: 5'-CCCG CAGGGTGCCTTGAGG-3'; *S. gt- $alpRQ$* -flank-F: 5'-GCCCCGTCCTGGTCTTCGC-3'; *S. gt- $alpRQ$* -flank-R: 5'-AAGGCCAGGAGCCGGAAG-3'。

1.1.4 主要试剂和仪器: PCR 所用试剂、限制性

内切酶购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; HPLC 购自安捷伦科技有限公司。

1.2 基因敲除

本研究中基因敲除采用的是 PCR-targeting 方法。抗性基因模板是带有 *neo* 抗性(编码卡纳霉素或新霉素抗性)的长度为 1.4 kb 的片段, 是用 *Xba* I/*Eco*R I 双酶切从 pJTU4659 质粒上切下来的。敲除引物与目的基因的同源臂长度均为 39 bp。

1.3 三亲本接合转移

本研究中基因敲除实验的接合转移步骤都是采用了三亲本接合转移的方式。敲除了目的基因并完成验证的 BAC 质粒首先是转入了大肠杆菌 ET12567。在接合转移实验的前一天将该菌株与含有辅助质粒的 ET12567/pUB307 分别接种到添加了相应抗生素的 LB 培养基中, 在摇床中培养过夜(37 °C, 220 r/min)。第 2 天分别取 500 μ L 菌液, 转接到添加了相应抗生素的 5 mL LB 培养基中, 摇床(37 °C, 220 r/min)培养至 $OD_{600}=0.6$ (4 h 左右)。培养结束后分别取 1 mL 菌液, 12000 r/min 离心 1 min, 倒掉上清, 菌体用 1 mL 无抗 LB 洗涤 2 次(重悬, 12000 r/min 离心 1 min, 弃上清)。然后分别用 300 μ L 无抗 LB 对菌体进行重悬。

接着取适量(1/3MS 板)活化的链霉菌孢子到装有 1 mL TES 缓冲液的 EP 管中, 12000 r/min 离心 30 s, 弃上清。孢子用 1 mL TES 缓冲液洗涤 2 次(重悬, 12000 r/min 离心 30 s, 弃上清)。然后用 500 μ L TES 缓冲液将孢子重悬起来, 热激 10 min (50 °C), 再加入 500 μ L 的 2 \times YT 培养基, 用枪头吸打混匀后摇床(37 °C, 220 r/min)培养 1 h。1 h 后离心(12000 r/min 离心 30 s), 弃上清, 孢子用

300 μL 的无抗 LB 重悬起来。最后将三管重悬的菌液混匀, 均匀的涂在 MS 板上, 待其吹干后恒温(30 $^{\circ}\text{C}$)培养 13 h 左右。第 2 天将相应抗生素添加到 1 mL ddH₂O 中混匀, 然后均匀覆盖到 MS 板上, 恒温(30 $^{\circ}\text{C}$)培养 3–4 d。

1.4 链霉菌的发酵和萃取

接合转移 3–4 d 后, 挑选单个的接合子进行抗性复证。接着取适量复证后的链霉菌孢子接种到含有相应抗生素的 30 mL TSBY 培养基中, 摇床(30 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min)培养 1–2 d, 即为种子液。然后取 1 mL 种子液加入装有 30 mL 无抗 R2 培养基和 1.5 g HP-20 填料的三棱瓶中(250 mL), 摇床(30 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min)培养 2–3 d。

发酵完成后, 每瓶发酵液中先加入 300 μL 冰醋酸, 接着加入 30 mL 乙酸乙酯进行萃取。萃取过程中需要每隔 10 min 左右晃动混合液, 使发酵液能够萃取充分, 总的萃取时间为 1–2 h。然后将混合液进行分离, 3000 r/min 离心 5 min, 离心之后将上层有机相转移到旋蒸瓶中进行旋转蒸发。有机相完全蒸发后, 用 600 μL 甲醇充分溶解悬蒸瓶中的化合物, 将溶解液转入 1.5 mL EP 管中, -30°C 保存。

2 结果和分析

2.1 醌那霉素生物合成中两套聚酮合酶的序列分析

醌那霉素完整生物合成基因簇中包含有 2 套聚酮合酶基因 *alpA/alpB* 和 *alpR/alpQ*, 这在 II 型聚酮化合物的生物合成途径中是非常罕见的。然而, 在 *alpR/alpQ* 的附近并没有找到编码酰基载体蛋白的基因, 因此无法确定 *alpR/alpQ* 编码的蛋白是否参与生物合成。据报道, 在 *Streptomyces ambofaciens* 中, *alpR/alpQ* 编码的蛋白不是醌那霉

素生物合成的必需基因。为了探究这两组聚酮合酶之间可能存在的关联, 我们首先通过生物信息学的方法对它们进行了研究。前人通过同源对比, 发现 *AlpR/AlpQ* 与已报道的光辉霉素(mithramycin)的聚酮合酶非常相似, 同源性分别为 80%和 72%。从进化树结果来看, 链长决定因子 *AlpB* 和 *AlpQ* 均属于聚酮骨架链长为 20 的分支(图 3)。前人的研究显示, *AlpR/AlpQ* 对于醌那霉素的生物合成并不是必需的, 不过由于 *AlpR/AlpQ* 可能参与合成链长 20 的 II 型聚酮类化合物, 我们也不能排除它们对于醌那霉素的生物合成具有补充作用。

2.2 *S. albus*/ Δ *alpRQ* Δ *alpW*-2E9 和 *S. albus*/ Δ *alpAB* Δ *alpW*-2E9 菌株的构建结果

为了研究 *alpR/alpQ* 与醌那霉素的生物合成的潜在关系, 我们在包含 BAC Δ *alpW*-2E9 的大肠杆菌 BW25113 中, 利用 PCR-targeting 的方法分别同框缺失了 *alpA/alpB* 和 *alpR/alpQ*; 基因缺失过程及验证结果如图 4 和图 5 所示。然后通过三亲本接合转移的方式将 BAC 质粒 Δ *alpAB* Δ *alpW*-2E9 和 Δ *alpRQ* Δ *alpW*-2 E9 分别转入异源表达菌株 *S. albus* J1074 中, 得到了分别敲除两套酮基合酶的突变株, *S. albus*/ Δ *alpAB* Δ *alpW*-2E9 和 *S. albus*/ Δ *alpRQ* Δ *alpW*-2E9。

2.3 *alpAB* 和 *alpRQ* 缺失突变对醌那霉素合成的影响

将构建好的突变 BAC Δ *alpAB* Δ *alpW*-2E9 和 Δ *alpAB* Δ *alpW*-2E9 三亲本接合转移至 *S. albus* J1074 中得到醌那霉素对应的突变菌, 将它们与 *S. albus*/ Δ *alpW*-2E9 (可产生醌那霉素的菌株)在同样条件下进行发酵并检测发酵产物, 检测结果如图 6 所示。

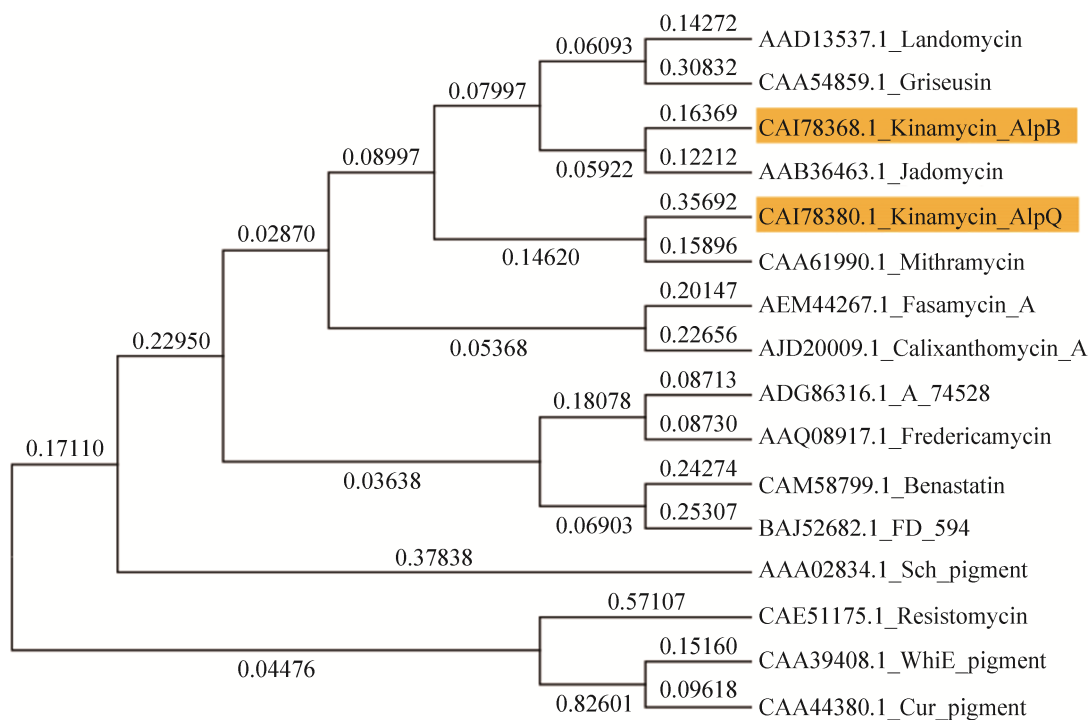


图 3. MEGA-7 软件以极大似然法绘制的 *AlpB*, *AlpQ* 与其他 II 型聚酮化合物合成基因簇中 KS_{β} 的系统进化树分析

Figure 3. Phylogenetic tree generated by MEGA-7 with maximum likelihood method to cluster *AlpB* and *AlpQ* with other ketosynthases involved in other type II polyketide biosynthesis.

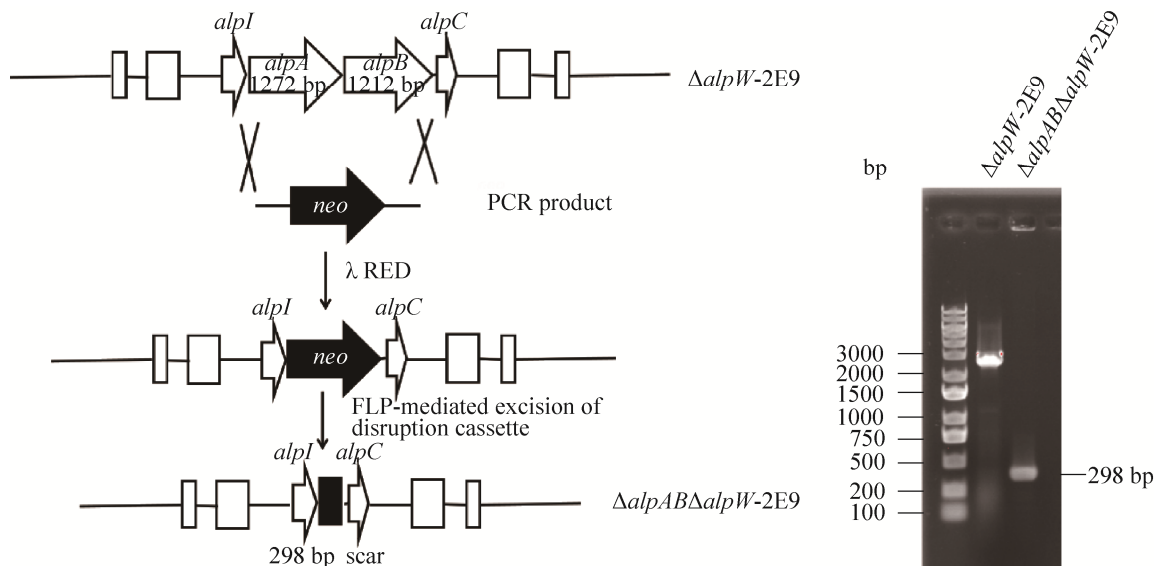


图 4. $\Delta alpAB\Delta alpW-2E9$ BAC 质粒构建示意图及 PCR 验证

Figure 4. Schematic representation of mutant BAC of $\Delta alpAB\Delta alpW-2E9$ and PCR validation (*S. gt-*alpAB*-flank-F* and *S. gt-*alpAB*-flank-R* were used).

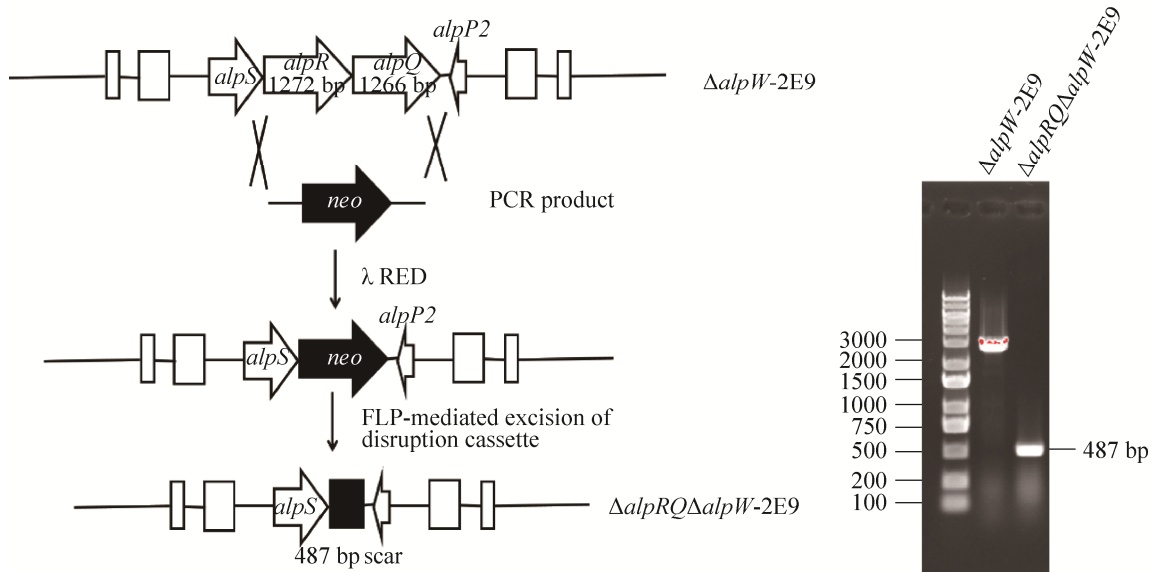


图 5. $\Delta alpRQ\Delta alpW-2E9$ BAC 质粒构建示意图及 PCR 验证

Figure 5. Schematic representation of mutant BAC of $\Delta alpRQ\Delta alpW-2E9$ and PCR validation (*S. gt-alpRQ-flank-F* and *S. gt-alpRQ-flank-R* were used).

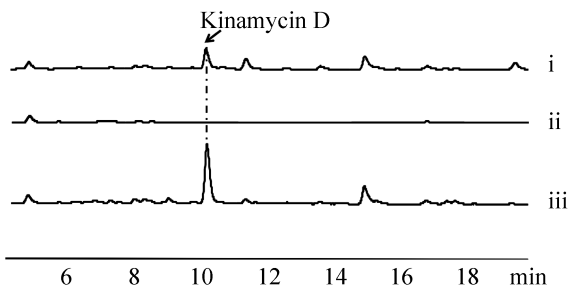


图 6. HPLC 检测 *alpAB* 或 *alpRQ* 敲除菌株的发酵产物

Figure 6. HPLC analysis of the products for kinamycin gene cluster with $\Delta alpAB$ or $\Delta alpRQ$ in *S. albus* J1074. i: *S. albus*/ $\Delta alpW-2E9$ (control); ii: *S. albus*/ $\Delta alpAB\Delta alpW-2E9$; iii: *S. albus*/ $\Delta alpRQ\Delta alpW-2E9$, HPLC traces were recorded at 276 nm.

从发酵结果 HPLC 的分析可以看出, *alpA/alpB* 敲除突变株失去了生物合成醌那霉素的能力(图 6, ii), 说明它们编码的酮基合酶确实如文献报道的那样, 是该基因簇合成醌那霉素聚酮链所必需的聚酮合酶。另一方面, 该突变株完全

丧失醌那霉素产生能力, 也确证了 *AlpR/AlpQ* 并不能互补 *AlpA/AlpB* 的功能。突变菌株 *S. albus*/ $\Delta alpRQ\Delta alpW-2E9$ 不仅能够生产醌那霉素, 其产量是出发菌株(*S. albus*/ $\Delta alpW-2E9$)的 3.2 倍。

alpR/alpQ 的缺失使得醌那霉素的产量大幅提高, 可能的原因是 *AlpR/AlpQ* 参与了另一种 II 型聚酮的生物合成。它们的敲除使得 *AlpR/AlpQ* 参与的生物合成途径中断, 导致与醌那霉素生物合成的共有前体流向了醌那霉素的生物合成中, 从而有效地提高了醌那霉素的产量。为了验证 *AlpR/AlpQ* 是否真的参与合成了一种新的聚酮化合物, 我们对 *S. albus*/ $\Delta alpAB\Delta alpW-2E9$ 和 *S. albus*/ $\Delta alpW-2E9$ 的发酵液进行了仔细分析。除了醌那霉素及其相关产物外, 并没有找到其他可能的 II 型聚酮类产物。与突变菌株 *S. albus*/ $\Delta alpRQ\Delta alpW-2E9$ 相比, *S. albus*/ $\Delta alpW-2E9$ 的发酵液中也没有发现不同的化合物峰。

3 讨论和结论

很多天然产物的生物合成基因簇都很大, 有些甚至超过 100 kb, 包含数十个基因。醌那霉素的生物合成基因簇跨越长度约 72 kb, 包含了 62 个开放阅读框。其中, 很多基因编码蛋白的功能得到了确认, 比如那些参与到醌那霉素聚酮骨架合成的基因。但还是有一些基因的功能目前并不清楚。醌那霉素生物合成基因簇中包含有两组聚酮合酶, 本研究通过体内遗传学实验证实了这两组聚酮合酶功能上并不相同。体内敲除实验证明: 合成基因簇中的 *alpR* 和 *alpQ* 基因不直接影响醌那霉素的合成, 即它们编码的蛋白不是醌那霉素生物合成中所必需的酮基合酶, 可能与另一未知 II 型聚酮化合物的合成相关。但本研究发现 *alpR/alpQ* 缺失突变株的醌那霉素产量显著提高, 约为出发菌株的 3 倍。推测可能是因为 *AlpR*、*AlpQ* 和 *AlpA*, *AlpB* 这两套酮基合酶之间存在合成前体的竞争关系, 所以敲除 *alpRQ* 之后, 用于醌那霉素合成途径的底物增加了, 从而使得终产量提高。

随着遗传操作技术的进步, 提高天然产物产量的方法越来越多。一个常见的策略是通过调控蛋白提高参与天然产物合成的蛋白表达量。另外一个重要手段就是: 阻断与目标产物竞争前体物质的代谢途径, 从而增加目标产物生物合成途径的代谢流。许多天然产物的生物合成都是通过这种方式使得产量显著提高的。不过, 通常都是敲除位于染色体上其他位置的生物合成基因簇。而在本研究中, 通过敲除醌那霉素生物合成基因簇内部的聚酮合酶基因(*alpR/alpQ*), 使得醌那霉素的产量得到了大幅提高, 这是之前没有报道过的。

II 型聚酮化合物的合成酶系是由多个独立的

酶组成的, 其中最核心的成员又被称为最小聚酮合酶, 包括酮基合酶、链长决定因子和酰基载体蛋白。*alpR/alpQ* 附近并没有酰基载体蛋白, 因此该 II 型聚酮体系缺少了关键的酰基载体蛋白。这种情况在少数 II 型聚酮孤儿基因簇中也发现过^[27]。人们推测, 这类型基因簇可能可以利用基因簇外的酰基载体蛋白, 或者采用一个新的生物合成机制, 也有可能基因簇是没有功能的。*alpR/alpQ* 的缺失使得醌那霉素的产量大幅增加这一现象暗示着 *alpR/alpQ* 应该有功能。可是本研究中并不能发现 *alpR/alpQ* 的相关产物, 我们推测其相关产物在发酵液中没有检测到可能是相关产物不稳定, 进一步的研究探索工作正在进行。在 *alpR/alpQ* 附近我们还发现了一个环化酶基因(*alpM*), 乙酰辅酶脱氢酶基因(*alpN*), 肽合成酶基因(*alpP*), 它们形成一个相对独立的簇, 前期研究显示它们可能均不与醌那霉素的生物合成相关。对这些基因编码蛋白功能的研究, 能帮助我们揭示 *AlpR/AlpQ* 的功能以及它们和醌那霉素生物合成的关联。

参考文献

- [1] Hopwood DA. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2465–2498.
- [2] Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 380–416.
- [3] Du LC, Lou LL. PKS and NRPS release mechanisms. *Natural Product Reports*, 2010, 27(2): 255–278.
- [4] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 2004, 56(2): 185–229.
- [5] Crow RT, Rosenbaum B, Smith III R, Guo Y, Ramos KS, Sulikowski GA. Landomycin A inhibits DNA synthesis and G₁S cell cycle progression. *Bioorganic & Medicinal*

- Chemistry Letters*, 1999, 9(12): 1663–1666.
- [6] Hou MH, Wang AHJ. Mithramycin forms a stable dimeric complex by chelating with Fe(II): DNA-interacting characteristics, cellular permeation and cytotoxicity. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(4): 1352–1361.
- [7] Menéndez N, Nur-e-Alam M, Braña AF, Rohr J, Salas JA, Méndez C. Biosynthesis of the antitumor chromomycin A₃ in *Streptomyces griseus*: analysis of the gene cluster and rational design of novel chromomycin analogs. *Chemistry & Biology*, 2004, 11(1): 21–32.
- [8] Keniry MA, Owen EA, Shafer RH. The three-dimensional structure of the 4:1 mithramycin: d(ACCCGGGT)₂ complex: evidence for an interaction between the E saccharides. *Biopolymers*, 2000, 54(2): 104–114.
- [9] Pioletti M, Schlünzen F, Harms J, Zarivach R, Glühmann M, Avila H, Bashan A, Bartels H, Auerbach T, Jacobi C, Hartsch T, Yonath A, Franceschi F. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal*, 2001, 20(8): 1829–1839.
- [10] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 232–260.
- [11] Bartlett JJ, Trivedi PC, Yeung P, Kienesberger PC, Pulinilkunnil T. Doxorubicin impairs cardiomyocyte viability by suppressing transcription factor EB expression and disrupting autophagy. *Biochemical Journal*, 2016, 473(21): 3769–3789.
- [12] Hasinoff BB, Wu X, Yalowich JC, Goodfellow V, Laufer RS, Adedayo O, Dmitrienko GI. Kinamycins A and C, bacterial metabolites that contain an unusual diazo group, as potential new anticancer agents: antiproliferative and cell cycle effects. *Anti-Cancer Drugs*, 2006, 17(7): 825–837.
- [13] Herzon SB, Woo CM. The diazofluorene antitumor antibiotics: structural elucidation, biosynthetic, synthetic, and chemical biological studies. *Natural Product Reports*, 2012, 29(1): 87–118.
- [14] Sato Y, Gould SJ. Biosynthesis of the kinamycin antibiotics by *Streptomyces murayamaensis*. determination of the origin of carbon, hydrogen, and oxygen atoms by carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 1986, 108(15): 4625–4631.
- [15] Seaton PJ, Gould SJ. New products related to kinamycin from *Streptomyces murayamaensis*. II. structures of pre-kinamycin, keto-anhydrokinamycin, and kinamycins E and F. *The Journal of Antibiotics*, 1989, 42(2): 189–197.
- [16] Gould SJ, Melville CR. Kinamycin biosynthesis. Synthesis, detection, and incorporation of kinobscurinone, a benzo[b]fluorenone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1995, 5(1): 51–54.
- [17] Gould SJ, Melville CR, Cone MC, Chen J, Carney JR. Kinamycin biosynthesis. synthesis, isolation, and incorporation of stealthin C, an aminobenzo[b]fluorene. *The Journal of Organic Chemistry*, 1997, 62(2): 320–324.
- [18] Bunet R, Song LJ, Mendes MV, Corre C, Hotel L, Rouhier N, Framboisier X, Leblond P, Challis GL, Aigle B. Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of Kinamycins. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(5): 1142–1153.
- [19] Liu XY, Liu DX, Xu M, Tao MF, Bai LQ, Deng ZX, Pfeifer BA, Jiang M. Reconstitution of kinamycin biosynthesis within the heterologous host *Streptomyces albus* J1074. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(1): 72–77.
- [20] Pang XH, Aigle B, Girardet JM, Mangenot S, Pernodet JL, Decaris B, Leblond P. Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(2): 575–588.
- [21] Wang B, Guo F, Ren JW, Ai GM, Aigle B, Fan KQ, Yang KQ. Identification of Alp1U and Lom6 as epoxy hydrolases and implications for kinamycin and lomaiviticin biosynthesis. *Nature Communications*, 2015, 6: 7674.
- [22] Wang KKA, Ng TL, Wang P, Huang ZD, Balskus EP, van der Donk WA. Glutamic acid is a carrier for hydrazine during the biosyntheses of fosfazinomycin and kinamycin. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3687.
- [23] Wang B, Ren JW, Li LY, Guo F, Pan GH, Ai GM, Aigle B, Fan KQ, Yang KQ. Kinamycin biosynthesis employs a conserved pair of oxidases for B-ring contraction. *Chemical Communications*, 2015, 51(42): 8845–8848.
- [24] 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.
- [25] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric

- conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 155(2): 223–229.
- [26] 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.
- [27] Hillenmeyer ME, Vandova GA, Berlew EE, Charkoudian LK. Evolution of chemical diversity by coordinated gene swaps in type II polyketide gene clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(45): 13952–13957.

Ketosynthetases AlpRQ affects the yield of kinamycin

Kangmin Hua, Xiangyang Liu, Zixin Deng, Xinyi He, Ming Jiang*

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

Abstract: Kinamycin gene cluster contains two ketosynthase (KS_{α} and KS_{β}) coding genes, namely *alpA*, *alpB* and *alpR*, *alpQ*, the first two are necessary for the synthesis of kinamycin, and *alpR* and *alpQ* are thought to be involved in the synthesis of other compounds. **[Objective]** Since *alpR* and *alpQ* are adjacent to the essential gene *alpS* in the kinamycin synthesis gene cluster, this study aims to identify their correlation with kinamycin biosynthesis. **[Methods]** The PCR-targeting multigene knockout was done on the bacterial artificial chromosome library plasmid, and the constructed library plasmid was introduced into *Streptomyces albus* J1074, a general *Streptomyces* host. The fermentation products of the mutant and the wild-type strains were detected by high performance liquid chromatography. **[Results]** AlpR and AlpQ had no direct effect on the synthesis of kinamycin, but the yield of kinamycin increased significantly in $\Delta alpRQ$ mutant. **[Conclusion]** AlpR and AlpQ are likely KS_{α} and KS_{β} for the biosynthesis of another type II polyketide compound, competing for common synthetic precursors with AlpA and AlpB. This study also demonstrates that *alpR* and *alpQ* cannot complement the function of *alpA* and *alpB*.

Keywords: type II polyketide sythesase, biosynthesis, kinamycin, aromatic polyketide

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870026, 31300033, 21661140002), by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900402), and by the Open Project of the State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences

*Corresponding author. Tel: +86-21-62932943; Fax: +86-21-62932418; E-mail: jiangming9722@sjtu.edu.cn

Received: 6 July 2020; Revised: 31 August 2020; Published online: 28 January 2021