



## 珊瑚来源真菌 *Parengyodontium album* SCSIO SX7W11 中聚酮化合物的发现及其生物合成途径分析

周晓雪<sup>1</sup>, 杨佳凡<sup>2,3</sup>, 李明哲<sup>4</sup>, 宋永相<sup>2,3</sup>, 鞠建华<sup>2,3</sup>, 李晓帆<sup>1</sup>, 王立岩<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>深圳大学生命与海洋科学学院 深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 广东 深圳 518055

<sup>2</sup>中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301

<sup>3</sup>中国科学院大学海洋学院, 北京 100049

<sup>4</sup>华南农业大学材料与能源学院, 广东 广州 510642

**摘要:** 海洋来源真菌的天然产物因其独特的结构与生物学活性而备受关注, 而利用基因组信息对其代谢产物进行深入挖掘也成为研究策略之一。【目的】本文以一株南海珊瑚来源的真菌 *Parengyodontium album* SCSIO SX7W11 为目标菌株, 挖掘其生产聚酮类化合物的潜能。【方法】本研究利用 Illumina Miseq 技术对 SX7W11 菌株进行全基因组扫描测序, 运用生物信息学手段对其基因组的生物合成基因簇进行预测和基因功能注释, 挖掘可能产生新颖聚酮化合物的基因簇。对 SX7W11 进行放大发酵后, 利用正相色谱、中压反相色谱、Sephadex LH-20 凝胶色谱、HPLC 半制备等分离手段分离纯化出单体化合物。再利用高分辨质谱(HR-ESI-MS)、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、X-ray 单晶衍射等波谱手段确定化合物的结构, 并根据生物合成基因簇对化合物的生物合成途径进行推导。【结果】全基因组扫描测序结果显示, *P. album* SCSIO SX7W11 基因组大小为 34.0 Mb, 含有 24 个生物合成基因簇, 包括 6 个聚酮合酶基因簇以及 3 个萜烯合酶基因簇。从发酵产物中分离鉴定到 3 个聚酮类化合物: emodin (1)、alternaphenol B (2) 和 sydowinin A (3), 其中化合物 3 获得了单晶结构数据。通过生物信息学方法从菌株基因组中定位到了 sydowinin A 的生物合成基因簇。结合文献对 emodin (1)、alternaphenol B (2) 和 sydowinin A (3) 的生物合成途径进行了分析。【结论】本研究通过基因组挖掘及培养基优化, 发现 1 株珊瑚来源的真菌 *P. album* SCSIO SX7W11 具有生产 sydowinins 类聚酮类化合物的能力, 为该类化合物生物合成机制深入研究奠定了基础。

**关键词:** *Parengyodontium album* SCSIO SX7W11, sydowinin A, 生物合成基因簇, 基因组, 海洋真菌

基金项目: 深圳市科技计划 (JCY20180305123659726)

\*通信作者。Tel: +86-755-26012653; E-mail: lwang@szu.edu.cn

收稿日期: 2021-02-06; 修回日期: 2021-03-30; 网络出版日期: 2021-04-19

天然产物是新药开发的重要来源之一，在过去的一个世纪里，对陆生生物的天然产物研究已相对饱和，人们将目标转移至与陆生生物生态环境迥然不同的海洋生物。目前美国、欧盟、澳大利亚以及日本的药品监督管理机构先后批准了 18 种来自海洋生物的药物上市，临床广泛应用于抗肿瘤、抗病毒和抗菌等方面<sup>[1-2]</sup>。海洋真菌是重要的海洋活性天然产物的来源，1964 年从顶头孢霉菌(*Cephalosporium acremoium*)中分离得到的头孢菌素 C (cephalosporin C)成功上市，成为具有划时代意义的海洋真菌来源药物<sup>[3]</sup>。但是直到 19 世纪 80 年代，人们才真正开始意识到海洋真菌来源天然产物的化学多样性以及由此带来的成药潜力，海洋真菌来源天然产物的研究进入快车道。根据 Carroll 等发表在 *Natural Product Reports* 的统计分析，截止至 2018 年，海洋真菌来源(不包括红树林来源)的新化合物总数已达 4708 个，成为海洋天然产物第二大主体。仅 2018 年就发现新化合物 617 个，比 2017 年增加 38%<sup>[4]</sup>。

聚酮类化合物以其惊人的结构多样性在天然产物创新药物研究中占有重要的地位。众多明星药物如红霉素(大环内酯类)、制霉菌素(多烯类)、四环素(四环类)、莫能霉素(聚醚类)等都是由聚酮合酶经过生物合成产生。聚酮类化合物的研究主要集中于放线菌，近年来海洋真菌被证明是聚酮类化合物的又一重要来源。Jin 等报道了 2014–2017 年海洋真菌来源的天然产物 153 个，其中聚酮类化合物占 25.7%，仅次于生物碱(27.0%)，占主导地位。此外，萜、内酯和甾体的含量分别为 9.9%、3.9%和 3.3%<sup>[5]</sup>。

随着基因组测序和生物信息学的快速发展，研究海洋真菌的代谢产物拥有越来越多的手段<sup>[6]</sup>。

目前挖掘菌株的代谢产物最常用的有 4 种策略：

(1) 传统的生物活性指导分离化合物；(2) 菌株培养条件的变化；(3) 基于代谢组学的分析；(4) 基于基因组中生物合成基因簇的分析<sup>[7]</sup>。其中由于测序技术的发展，基于基因组的代谢产物发现策略越来越受到重视。

近期，我们从南沙群岛海域的珊瑚中分离得到 1 株海洋真菌，命名为 SCSIO SX7W11。经 ITS 序列分析鉴定为 *Parengyodontium album*。本研究利用 Illumina Miseq 技术对 SCSIO SX7W11 菌株进行全基因组扫描测序，并对其进行生物信息学分析，发现该菌株基因组中具有 6 个聚酮合酶基因簇以及 3 个萜烯合酶基因簇，其中 4 个聚酮合酶基因簇未能找到相似序列，有可能编码新颖结构的聚酮类化合物。我们对 *P. album* SCSIO SX7W11 进行初步的培养基优化后，选取次级代谢产物更为丰富的大米培养基和 PDB 液体培养基进行放大发酵，最终分离到 3 个聚酮类化合物(1–3，结构见图 1)。结合质谱、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、X-ray 单晶衍射等相关数据，确定化合物 1、2、3 分别为 alternaphenol B、emodin 和 sydowinin A。化合物 1–3 同属一条生物合成途径，本研究也对其相关的生物合成途径进行了推导和预测分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株信息

菌株 SCSIO SX7W11 分离自南沙群岛海域的鹿角珊瑚(*Acropora* sp.)(图 2)。菌株分离纯化后通过 ITS 基因序列比对鉴定为 *Parengyodontium album*，菌种保存于中国科学院南海海洋研究所菌种保藏库。

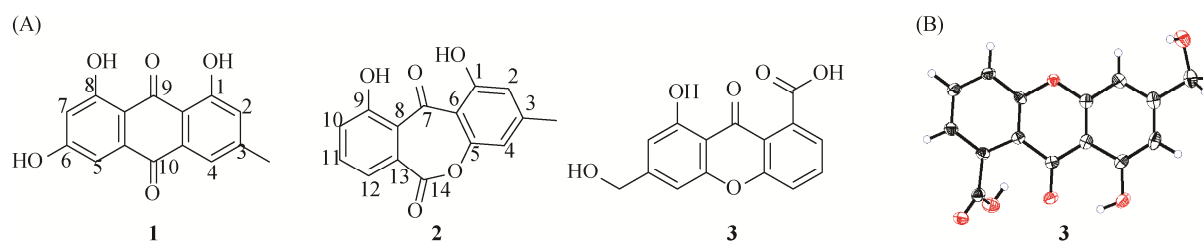


图 1. 化合物 1-3 的化学结构式(A)与化合物 3 的单晶结构(B)

Figure 1. Chemical structures of compound 1-3 (A) and crystal structure of compound 3 (B).

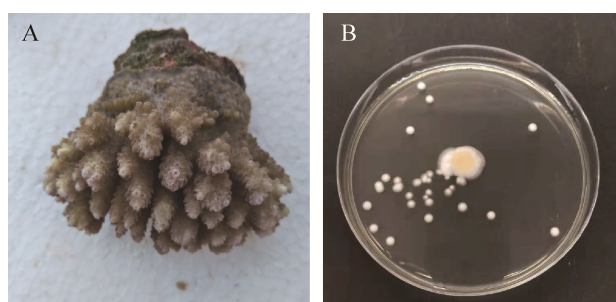


图 2. 鹿角珊瑚(A)和菌株 SCSIO SX7W11 在 PDA 培养基上的形态图(B)

Figure 2. *Acropora* sp. (A) and phenotype of SCSIO SX7W11 on PDA medium plate (B).

## 1.2 仪器和试剂

### 1.2.1 培养基:

(1) 提取真菌 DNA 培养基: YG: 酵母膏 5 g/L, 葡萄糖 20 g/L, trace element 400  $\mu$ L/L (Trace element 100 mL:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.2 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.10 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.50 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.16 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.16 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.16 g,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.11 g), pH 7.0。

(2) 固体发酵种子培养基: YG 固体培养基: 酵母膏 5 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, trace element 400  $\mu$ L/L, pH 7.0。

(3) 液体发酵种子培养基: PDB: 马铃薯浸出粉 300 g/L, 葡萄糖 20 g/L, pH 7.0。

(4) 固体放大发酵培养基: 大米培养基: 直径为 15 cm 玻璃平皿内放入 10 mL 大米, 20 mL 海

水(0.3% 海盐), pH 7.0。

(5) 液体放大发酵培养基: PDB: 同种子培养基。

以上培养基均  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min, 冷却后备用。

### 1.2.2 实验仪器及试剂

PCR 扩增仪(Thermo Fisher Scientific ABI Veriti 96 well 型, 德国 Thermo Fisher Scientific 公司); 多功能组合式摇床(HYG-C, 太仓实验设备厂); 超导核磁共振仪(Bruker AVANCE 700M 型, 德国 Bruker 公司); 高分辨飞行时间质谱(Bruker maXis, 德国 Bruker 公司); 柱色谱硅胶(100-200 目, 烟台江友硅胶开发有限公司), 硅胶薄层板(HS-GF 254, 烟台江友硅胶开发有限公司); 单晶衍射仪(XtaLAB PRO MM007HF 型, 日本理学株式会社); 高效液相色谱仪(Agilent 1260, 美国 Agilent 公司); 半制备高效液相色谱仪(Hitachi Primaide, 日本日立公司); 色谱柱(Thermo  $\text{C}_{18}$ , 250 mm $\times$ 10 mm, 5  $\mu$ m, 美国赛默飞世尔科技公司); 培养箱(MJ01, 湖北黄石恒丰医疗器械有限公司)。试剂: 色谱纯乙腈(安徽时联公司); 其他试剂均为国产分析纯(广州化学试剂厂)。

## 1.3 SCSIO SX7W11 菌种鉴定

1.3.1 gDNA 的制备: 用 YG 固体培养基将 25%

甘油管保存的菌株 *P. album* SCSIO SX7W11 复苏, 将单克隆转接到新的 YG 固体培养基, 28 °C 培养 3–4 d。取少量真菌菌丝于 1.5 mL 离心管。再加 100  $\mu$ L 玻璃珠(直径 0.5–1.0 mm)和 700  $\mu$ L LETS buffer 于离心管中, 振荡 10 min。振荡完毕后 14000 r/min 离心 5 min, 取上清(内含 gDNA) 500  $\mu$ L, 加入等体积的 Tris 酚/氯仿/异丙醇(25 : 24 : 1), 振荡混合 10 min, 14000 r/min 离心 5 min。取上清 400  $\mu$ L, 加 1 mL 异丙醇手动颠倒混合约 2 min。14000 r/min 离心 10 min。弃去上清后再离心 30 s, 将剩余上清吸尽弃去, 剩余沉淀为 gDNA。加 40  $\mu$ L 1 $\times$ TE 或 dd H<sub>2</sub>O 至 EP 管底部溶解。

### 1.3.2 SCSIO SX7W11 ITS 的 PCR 扩增与测序:

对已提取的总 DNA 使用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 FastPfu 高保真聚合酶进行 18S rDNA 扩增, 50  $\mu$ L 反应体系为: ddH<sub>2</sub>O 31  $\mu$ L, dNTPs 5  $\mu$ L, 5 $\times$ FastPfu buffer 10  $\mu$ L, FastPfu Enzyme 1  $\mu$ L, ITS1 1  $\mu$ L, ITS4 1  $\mu$ L, gDNA 1  $\mu$ L。PCR 程序为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 4 °C 保温。PCR 产物由广州擎科生物技术有限公司回收纯化, 完成测序。

**1.3.3 系统发育分析:** 将测序得到的序列结果进行校对拼接后, 登录 GenBank 通过 BLAST 进行同源性序列比对, 选择同源性较高且具有代表性的真菌作为参考序列, 下载相应菌株的序列和信息, 以 *Engyodontium parvisporum* (LC425558.1) 作为外群菌株, 所有包含空白和缺失数据的位置都被消除, 经 bootstrap 试验<sup>[8]</sup>后, 相关类群聚集在一起的百分比(1000 次重复)显示在分支旁边的进化枝上。使用 MEGA 7<sup>[9]</sup>以邻接法(Neighbor-Joining,

NJ)对供试菌株进行多序列比对<sup>[10]</sup>, 构建 ITS 碱基序列系统发育树。

### 1.4 SCSIO SX7W11 的菌体制备与基因组扫描测序

从平板中挑取部分单克隆菌株接种至 YG 液体培养基(50 mL)中, 摇床培养 2 d (28 °C, 200 r/min), 待摇瓶内累积一定菌体量后, 在无菌条件下转移至离心管离心(4000 r/min, 10 min), 倒去上清获得菌体。菌体委托上海凌恩生物科技有限公司进行基因组扫描测序。

### 1.5 基因组的生物信息学分析

将基因组扫描测序结果上传至 antiSMASH V5.2.0 在线分析网站(网址为: <https://fungismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)和 2nd find(<http://biosyn.nih.gov/2ndfind/>), 对基因组编码的次生代谢产物类型进行预测分析, 结合 NCBI 数据库, 利用 BLAST (v2.2.23)软件对菌株基因组中的核苷酸和蛋白质序列进行比对注释, 预测相关基因的功能。

### 1.6 *P. album* SCSIO SX7W11 的发酵与萃取

选取大米培养基和 PDB 培养基进行放大发酵, 大米培养基 150 mm 培养皿培养 100 板, 收菌后加丁酮提取 3 次。粗提物加等量水混悬, 用丁酮萃取获得丁酮层提取物(M)。液体发酵将孢子接入种子培养基(50 mL)发酵 48 h, 种子成熟后转入发酵培养(200 mL $\times$ 100)发酵 7 d, 菌液用丁酮萃取 3 次, 减压浓缩得到粗提物(L)。

### 1.7 化合物分离与鉴定

将大米培养基 M 提取物经正相硅胶柱(4 cm $\times$ 17 cm, 100 目)分离, 氯仿/甲醇体系梯度洗脱(100/0, 98/2, 96/4, 94/6, 92/8, 9/1, 8/2, 1/1), 得到

Fr.MA1–Fr.MA10 共 10 个馏分。将 Fr.MA4–Fr.MA6 合并过 MPLC 柱(ODS 自装色谱柱, 10 cm×3 cm, 40–60 μm)分离, 采用乙腈/水体系(A 相: 1% CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O B 相: 1% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN 0–10 min 0% B–20% B; 10–70 min 20%B–80%B; 70–90 min 80% B–100% B; 90–120 min 100%B); 流速 10 mL/min, 检测波长 254 nm 以及 280 nm, 得到 Fr.E1–Fr.E13 共 13 个馏分。将 Fr.E8 以 Thermo C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm)进一步分离。采用乙腈/水体系(A 相: 1% CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O, B 相: 1% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN, 以 40% B 等梯度洗脱, 流速 2.5 mL/min, 得到化合物 1 (T<sub>R</sub>=18.2 min, 5 mg)。将 Fr.MA1 过硅胶柱(3 cm×20 cm, 100 目), 以石油醚/氯仿(100/0, 50/50)以及氯仿/甲醇(100/0, 95/5, 9/1, 85/15, 8/2, 75/25, 7/3, 65/35, 6/4, 4/6)进行梯度洗脱, 得到 Fr.MB1–Fr.MB10 共 10 个馏分。Fr.MB4 和 Fr.MB5 合并, 经中压反相制备色谱 MPLC 柱(以 ODS 自装色谱柱 10 cm×3 cm, 40–60 μm)分离, 采用乙腈/水 (A 相: 1% CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O, B 相: 1% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN 0–60 min 30% B–100%B; 60–90 min 100%B)梯度洗脱 120 min, 流速 10 mL/min, 检测波长 254 nm, 以及 280 nm, 得到 Fr.MC1–Fr.MC13 共 13 个馏分。将 Fr.MC4 过硅胶柱(4 cm×17 cm, 100 目), 以氯仿/甲醇梯度(100/0, 98/2, 96/4, 94/6, 92/8, 9/1)洗脱, 分离纯化得到化合物 2 (58.1 mg)。将 PDB 培养基粗提物 L 经正相硅胶柱(4 cm×17 cm, 100 目)分离, 氯仿/甲醇体系梯度(100/0, 98/2, 96/4, 94/6, 92/8, 9/1, 7/3, 8/2, 1/1)洗脱, 得到 Fr.LA1–Fr.LA11 共 11 个馏分。将 Fr.LA9 组分通过重结晶法, 纯化得到化合物 3 (6.1 mg)。化合物 1、2 通过高分辨质谱(HR-ESI-MS)、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 等波谱手段确

定结构, 化合物 3 通过 X-ray 单晶衍射确定结构。

## 2 结果和分析

### 2.1 SCSIO SX7W11 的鉴定及系统发育分析

SCSIO SX7W11 菌株在 PDA 培养基平板上菌丝呈现白色至米白色, 菌落表面呈棉絮状, 蔓延性弱(图 2)。将 SCSIO SX7W11 的 ITS 测序结果上传 GenBank 数据库, 获得序列号: MW559477, 再与 GenBank 中的序列进行系统发育分析(图 3), 发现 SCSIO SX7W11 的 ITS 序列与 *Parengyodontium album* (LR778170.1)的相似性最高, 以 100%可信度聚在一个分支。综合以上分析结果, 将 SCSIO SX7W11 鉴定为 *Parengyodontium album*。

### 2.2 *P. album* SCSIO SX7W11 的基因组扫描测序与组装

*P. album* SCSIO SX7W11 委托上海凌恩生物科技有限公司进行基因组扫描测序。测序结果显示, K-mer 预估 *P. album* SCSIO SX7W11 基因组大小为 34.0 Mb, GC 含量为 50.84%。将数据组装成 Scaffold 后, 统计数据结果表明, 该组装基因组一共有 345 个 Scaffold, 大于 1 kb 的有 317 个。预测编码 9135 个基因, 编码基因平均长度为 1521 bp。编码区域长度占基因组 44.49%。基因组包含 125 个非编码 RNA(ncRNA), 其中 104 个为 tRNA, 19 个 5S rRNA, 1 个 18S rRNA, 1 个 28S rRNA。在重复元件中, 散在重复序列共 3342 个, 串联重复序列共 5748 个。

### 2.3 基因组数据分析

利用 antiSMASH (v5.0.0)和 2nd find 在线软件对 *P. album* SCSIO SX7W11 基因组测序结果进行分析, 预测其基因簇编码的次生代谢产物类型。

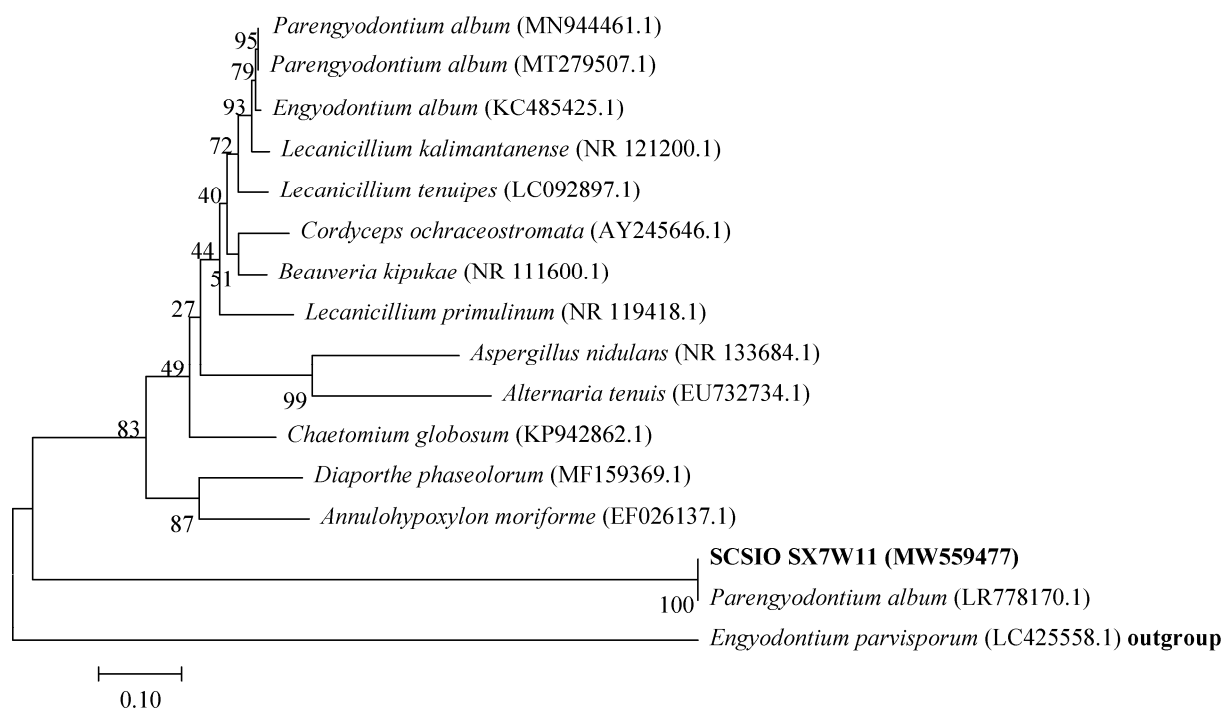


图 3. SCSIO SX7W11 ITS 碱基序列聚类分析

Figure 3. Phylogenetic analysis of ITS sequence of SCSIO SX7W11. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1000 replications; the scale bar indicates 0.10 substitutions per nucleotide position; *Engyodontium parvisporum* LC425558.1 is outgroup.

*P. album* SCSIO SX7W11 的基因组中包含 24 个生物合成基因簇, 其中包括 6 个聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)基因簇, 6 个非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)基因簇, 5 个 NRPS-like 基因簇, 3 个萜烯合酶(terpene synthase, TPS)基因簇, 4 个(PKS-NRPS)杂合型基因簇。进一步比对发现 24 个基因簇中有 10 个基

因簇与已知基因簇序列相似(表 1)。而 6 个聚酮基因簇与已知基因簇的相似度都很低, 仅 cluster 7 和 cluster 18 与已知基因簇分别有 20%与 47%的相似度, 剩下 4 个聚酮基因簇均为未知基因簇。上述结果表明 *P. album* SCSIO SX7W11 菌株具有合成新型聚酮类化合物的潜力, 值得对其产生的聚酮类化合物进行挖掘。

表 1. *P. album* SCSIO SX7W11 菌株 antiSMASH (v5.0.0)分析结果

Table 1. The analysis of *P. album* SCSIO SX7W11 by antiSMASH (v5.0.0)

Number	Cluster type	Query length/bp	Similarity/%	Compounds encoded by similar cluster
Cluster 5	Terpene	21571	40	Squalestatin S1
Cluster 7	T1PKS	47332	20	4-epi-15-epi-brefeldin A
Cluster 8	NRPS	49171	100	Dimethylcoprogen
Cluster 9	PKS-NRPS	51865	100	Pyranonigrin E
Cluster 12	NRPS	38032	71	Cephalosporin C
Cluster 15	NRPS-like	42259	100	eq-4
Cluster 17	NRPS-like,T1PKS	51702	22	Burnettramic acid A
Cluster 18	T1PKS	43723	47	Neosartorin
Cluster 19	Terpene	22876	100	Clavarinic acid
Cluster 20	PKS-NRPS	37941	50	Curvupallide-B

## 2.4 化合物结构鉴定

**2.4.1 发酵结果:** 通过大米固体培养基发酵分离得到 emodin (1) 和 alternaphenol B (2)。通过 PDB 液体发酵分离得到 sydowinin A (3)。

**2.4.2 化合物结构鉴定:** 化合物 1: 橙黄色针状结晶; (-)HR-ESI-MS 呈现[M-H]<sup>-</sup>(*m/z* 269.0455)峰以及[2M-H]<sup>-</sup>(*m/z* 539.0988)峰, 确定其分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>, 其核磁数据为: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 700 MHz) δ<sub>H</sub>: 12.95 (2H, b, 1-OH/8-OH), 7.46 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H-4), 7.13 (1H, d, *J*=2 Hz, H-5), 7.01 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H-5), 6.39 (1H, d, *J*=2 Hz, H-7), 2.40 (3H, s, 3-CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 700 MHz) δ<sub>C</sub>: 161.7 (C-1), 124.4 (C-2), 147.8 (C-3), 120.6 (C-4), 133.4 (C-4a), 108.4 (C-5), 165.4 (C-6), 107.6 (C-7), 163.2 (C-8), 111.8 (C-8a), 188.3 (C-9), 114.2 (C-9a), 182.6 (C10), 135.3 (C-10a), 21.9(3-CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道 emodin 的核磁波谱数据一致<sup>[11]</sup>, 确定化合物 1 为 emodin。

化合物 2: 无色针状结晶; (+)HR-ESI-MS 呈现 [M+H]<sup>+</sup>(*m/z* 271.2421) 峰 以及 [M+Na]<sup>+</sup>(*m/z* 293.0421) 结合 <sup>13</sup>C NMR 确定其分子式为: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>。其核磁数据为: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 700 MHz) δ<sub>H</sub>: 6.68 (1H, brs, H-2), 6.91 (1H, brs, H-4), 7.68 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, H-10), 7.91 (1H, dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, H-11), 7.40 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.0 Hz, H-12), 2.40 (3H, s, H-3-Me), 12.16 (1H, s, H-OH)。 <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 700 MHz) δ<sub>C</sub>: 160.9 (C-1), 108.0 (C-2), 150.0 (C-3), 111.7 (C-4), 133.4 (C-4a), 155.7 (C-5), 106.8 (C-6), 180.6 (C-7), 116.5 (C-8), 155.9 (C-9), 119.2 (C10), 135.6 (C-11), 122.9 (C-12), 134.4 (C-13), 170.1 (C-14), 21.9 (C-3-Me)。以上数据与文献报道 alternaphenol B 的核磁波谱数据一致<sup>[12]</sup>, 确定化合物 2 为 alternaphenol B。

化合物 3: 单斜晶系, *P*2<sub>1</sub>空间群, 晶体大小为 0.4 mm×0.1 mm×0.1 mm; 晶胞参数: *a*=7.554 9

(1) Å, *b*=15.5568 (2) Å, *c*=10.4880 (1) Å, α=90.00°, β=104.645(1)°, γ=90.00°, 晶胞体积 *V*=1192.61(3) Å<sup>3</sup>, *Z*=4, 计算密度 1.5941 g/cm<sup>3</sup>, Cu-Kα 辐射 (λ=1.54184 Å); 收集总衍射点 5498, 独立衍射点 2106; *R*<sub>1</sub>=0.0468, *wR*<sub>2</sub>=0.1282。晶体数据保存在剑桥晶体数据中心, CCDC 编号为 2058820。

## 2.5 Sydowinin A 生物合成基因簇的定位与对比分析

**2.5.1 Sydowinin A 与 monodictyphenone 的生物合成基因簇的对比:** sydowinin A (3) 为 PKS-NPRS 杂合类化合物 balanol<sup>[13]</sup>的前体, 对比分析后推测 *P. album* SCSIO SX7W11 cluster 18 负责 sydowinin A (3) 的生物合成, cluster 18 的基因与文献报导的 monodictyphenone 生物合成基因簇<sup>[14]</sup>相似度较高, sydowinin A (3) 与 monodictyphenone 的化学结构式与生物合成基因簇对比图见图 4。

**2.5.2 基因簇 cluster 18 ORFs 的功能注释:** *P. album* SCSIO SX7W11 cluster 18 定位于染色体 DNA 的 1-43723 bp, 共包含 17 个基因。在 NCBI 数据库内利用 BLAST (v2.2.23) 对 *P. album* SCSIO SX7W11 cluster 18 的各基因进行比对注释, 具体注释结果见表 2。

**2.5.3 Sydowinin A 生物合成途径推导:** 参考目前文献已报道的有关 sydowinin A (3) 的生物合成途径<sup>[13-14]</sup>, 发现 sydowinin A 极有可能与化合物 monodictyphenone 具有相似的生物合成路径。结合菌株 *P. album* SCSIO SX7W11 基因簇中 cluster 18 的基因注释结果以及其前体化合物 emodin (1) 和 alternaphenol B (2), 对 sydowinin A (3) 在菌株 SX7W11 中的生物合成途径进行了推导(图 5)。基因注释结果提示, *P. album* SCSIO SX7W11 的 cluster 18 中包含 8 个可能直接参与 sydowinin A 生

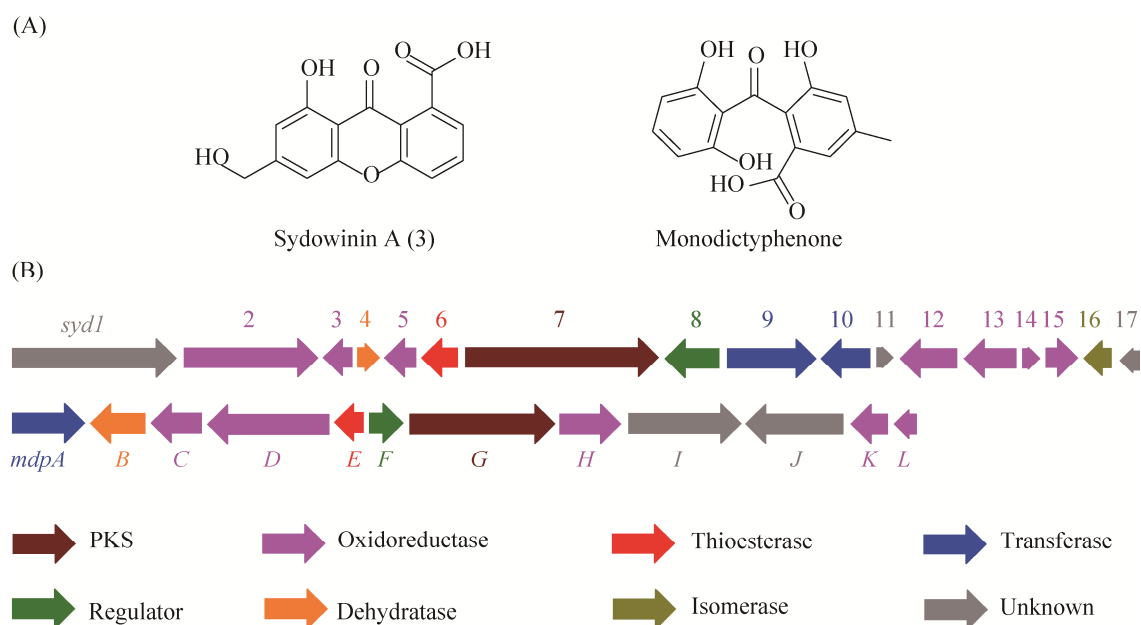


图 4. Sydowinin A (3)与 monodictyphenone 的化学结构式(A)与生物合成基因簇结构对比图(B)

Figure 4. Chemical structure of sydowinin A (3) and monodictyphenone (A) and the comparison of gene structure between the *P. album* SCSIO SX7W11 gene cluster and monodictyphenone gene cluster (B).

表 2. *P. album* SCSIO SX7W11 基因簇 cluster 18 与 monodictyphenone 生物合成基因簇比对结果

Table 2. The gene comparison results of *P. album* SCSIO SX7W11 cluster 18 and monodictyphenone biosynthesis gene cluster

Syd proteins	Size <sup>a</sup>	ID/SI (%)	Mdp Proteins	Size <sup>a</sup>	Proposed function	Homolog
Syd1	1525	25/43			Putative protein	<i>Nicotiana tabacum</i> P10978.1
Syd2	1246	50/64			Putative FAD-dependent monooxygenase	<i>Claviceps purpurea</i> 20.1 M1W850.1
Syd3	264	73/87	MdpC	265	Putative short chain dehydrogenase	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 Q5BH34.1
Syd4	166	51/69	MdpB	214	Putative dehydratase	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 C8VQ71.1
Syd5	287	35/52			Putative oxidoreductase	<i>Methylorubrum extorquens</i> AM1 Q49117.2
Syd6	331	67/79			Putative ACP thioesterase	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 Q4WQZ6.1
Syd7	1798	63/77	MdpG	1746	Carboxylic acid synthase Agn pks1	<i>Paecilomyces divaricatus</i> A0A411PQP9.1
Syd8	499	29/44			Putative transcriptional activator	<i>Aspergillus</i> sp. MF297-2 E1ACQ7.1
Syd9	823	35/53	MdpA	479	Putative transcriptional coactivator	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 C8VQ72.1
Syd10	453	23/40			Putative acetyltransferase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C Q12226.1
Syd11	149	28/42			Putative tRNA ligase	<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5 Q9V176.1
Syd12	524	40/60			Putative P450 monooxygenase	<i>Passalora fulva</i> P0CU70.1
Syd13	481	40/58	MdpL	446	Putative Baeyer-Villiger oxidase	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSCA4 C8VQ61.1
Syd14	273	53/71	MdpK	265	Putative oxidoreductase	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSCA4 C8VQ62.1
Syd15	158	44/61			Putative monooxygenase	<i>Pestalotiopsis fici</i> W106-1 A0A067XNI6.1
Syd16	251	52/65			Putative epimerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C P46969.1
Syd17	133	38/53			Putative protein	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 Q4WNE1.1

<sup>a</sup>: size in units of amino acids (aa); ID/SI: identity/similarity.



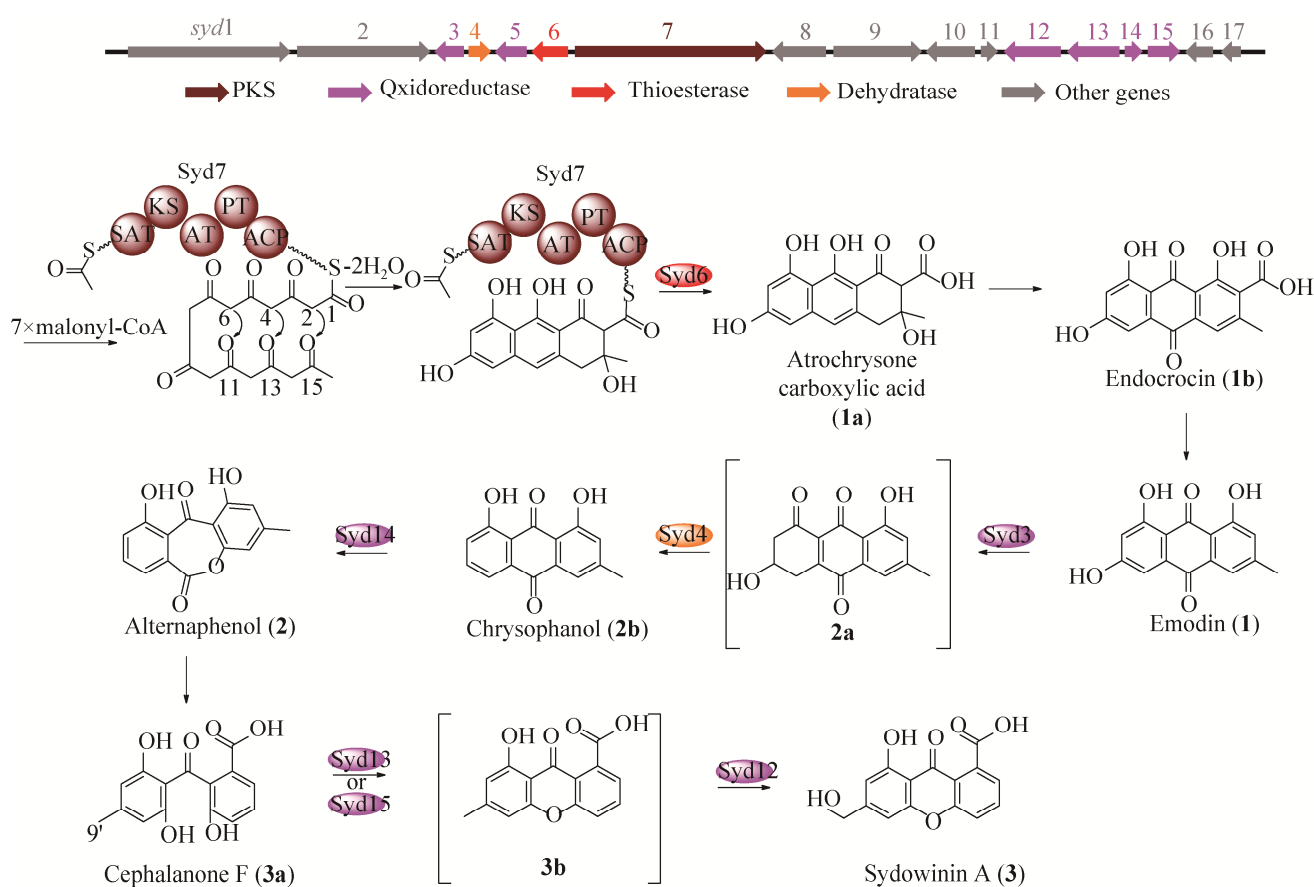


图 5. *P. album* SCSIO SX7W11 菌株中 sydowinin A 的生物合成途径

Figure 5. Putative biosynthetic pathway of sydowinin A in *P. album* SCSIO SX7W11.

物合成的基因, 包括 *syd3*、*syd4*、*syd6*、*syd7*、*syd12*、*syd13*、*syd14* 以及 *syd15*。其中聚酮合酶 Syd7 以及 ACP 硫酯酶 Syd6 共同负责参与大黄素 emodin (2) 中三环蒽醌骨架的合成, 短链脱氢酶 Syd3 负责大黄素 emodin (2) 中羟基的还原; 脱水酶 Syd4 负责蒽醌类中间体 (2b) 的合成; 氧化还原酶 Syd14 可能负责 alternaphenol B (1) 的生物合成; 细胞色素 P450 单加氧酶 Syd12 负责中间体 3b 中 C-9' 位羧基的形成。终产物 sydowinin A (3) 的生物合成则推测可能是通过 Baeyer-Villiger 氧化酶 Syd13 或单加氧酶 Syd15 负责。具体的生物合成途径推测如图 5。

综上所述, sydowinin A (3) 的八酮体聚酮骨架是由一个非还原型聚酮合酶 Syd7 催化形成的。即通过起始单元酰基转移酶 (serine acetyltransferase,

SAT) 结构域、酮基合酶 (ketosynthase, KS) 结构域、酰基转移酶 (acyltransferase, AT) 结构域、酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 结构域的共同参与下, 经过 7 轮链延伸形成八酮基-S-ACP 链。再通过产物模板结构域 (product template, PT) 将 C6-C11, C4-C13 以及 C2-C15 间环化形成大黄素骨架, 最终在硫酯酶 Syd6 的催化下, 经过脱水脱羧形成 emodin (1)。在合成 emodin (1) 后, 再通过短链脱氢酶的催化, 将 emodin 还原为中间体 2a, 2a 再通过脱水酶 Syd4 的催化下还原为蒽醌类中间体 2b, 最后在氧化酶 Syd14 催化下, 通过 Baeyer-Villiger 氧化重排反应将蒽醌类中间体 2b 氧化为缩酚酸类化合物 alternaphenol (2)。Alternaphenol (2) 水解生成中间体 3a, 经过氧化酶 Syd13 或单加氧

酶 Syd15 的作用脱水环化形成中间体 3b, 最后经细胞色素 P450 单加氧酶 Syd12 将 3b 的 9' 位的甲基羟化生成终产物 sydowinin A (3)(图 5)。

### 3 讨论与结论

Sydowinins 是 Hamasaki 等在 1975 年从一株 *Aspergillus Sydowi* 中首次发现的氧杂蒽酮类化合物<sup>[15]</sup>。sydowinin A 对刀豆蛋白 A(Con A)和磷酸酯多糖(LPS)诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖表现出中等的抑制活性(IC<sub>50</sub> 分别为 6.5 和 7.1 μmol/L)<sup>[16]</sup>。sydowinin A 对人结肠癌细胞(HT-29)和人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)具有细胞毒性(IC<sub>50</sub> 分别为 124.3 和 117.8 μmol/L), 当 sydowinin A 与藻毒素 okadaic acid 混合后, 在所有作用浓度水平下均对 SH-SY5Y 细胞表现出协同抑制作用, 毒性显著高于单独化合物<sup>[17]</sup>。除此之外, sydowinin A 对葡萄叶片也具有一定的植物毒性<sup>[18]</sup>。综上所述, sydowinin A 具有丰富的生物活性, 生物合成机制研究未见报道。因此系统阐述其生物合成途径对于深入开发 sydowinin A 具有较高的科学意义。

本研究通过对 *P. album* SCSIO SX7W11 进行聚酮类化合物的基因组挖掘, 从一株珊瑚来源的真菌 *P. album* SCSIO SX7W11 中分离得到了 emodin、alternaphenol B 和 sydowinin A 3 个化合物, 并第一次获得了 sydowinin A 的晶体学数据。通过生物信息学方法从菌株基因组中定位到了 sydowinin A 的生物合成基因簇, 经生物信息学分析并结合文献对其生物合成途径进行了推测, 为 sydowinins 类化合物的生物合成研究奠定了一定的基础。

### 参考文献

- [1] Zhang SW, Huang HB, Gui C, Ju JH. Progress on the research and development of marine drugs. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2018, 37(3): 77–92. (in Chinese)

- 张善文, 黄洪波, 桂春, 鞠建华. 海洋药物及其研发进展. *中国海洋药物*, 2018, 37(3): 77–92.
- [2] Wang C, Zhang GJ, Liu WD, Yang XY, Zhu N, Shen JM, Wang ZC, Liu Y, Cheng S, Yu GL, Guan HS. Recent progress in research and development of marine drugs. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2019, 38(6): 35–69. (in Chinese)
- 王成, 张国建, 刘文典, 杨新雨, 朱妮, 申静敏, 王志成, 刘杨, 程珊, 于广利, 管华诗. 海洋药物研究开发进展. *中国海洋药物*, 2019, 38(6): 35–69.
- [3] Kirby WM, Bulger RJ. The new penicillins and cephalosporins. *Annual Review of Medicine*, 1964, 15: 393–412.
- [4] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2015, 32(2): 116–211.
- [5] Jin LM, Quan CS, Hou XY, Fan SD. Potential pharmacological resources: natural bioactive compounds from marine-derived fungi. *Marine Drugs*, 2016, 14(4): 76.
- [6] Bugni TS, Ireland CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, 2004, 21(1): 143.
- [7] Bader CD, Panter F, Müller R. In depth natural product discovery - Myxobacterial strains that provided multiple secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107480.
- [8] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39(4): 783–791.
- [9] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [10] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [11] Hawas UW, El-Beih AA, El-Halawany AM. Bioactive anthraquinones from endophytic fungus *Aspergillus versicolor* isolated from red sea algae. *Archives of Pharmacal Research*, 2012, 35(10): 1749–1756.
- [12] Shen Y, Xu QL, Cheng P, Liu CL, Lu ZY, Li W, Wang TT, Lu YH, Tan RX, Ge HM, Jiao RH. Aromatic polyketides from a caterpillar associated *Alternaria* sp.. *Tetrahedron Letters*, 2017, 58(31): 3069–3072.
- [13] He X, Zhang M, Guo YY, Mao XM, Chen XA, Li YQ. Revelation of the balanol biosynthetic pathway in *Tolypocladium ophioglossoides*. *Organic Letters*, 2018, 20(20): 6323–6326.
- [14] Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Entwistle R, Keller NP, Wang CCC, Oakley BR. Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(7): 2067–2074.
- [15] Hamasaki T, Sato Y, Hatsuda Y. Structure of sydowinin a, sydowinin b, and sydowinol, metabolites from *Aspergillus sydowi*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1975, 39(12): 2341–2345.
- [16] Liu HJ, Chen SH, Liu WY, Liu YY, Huang XS, She ZG. Polyketides with immunosuppressive activities from mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. ZJ-SY<sub>2</sub>. *Marine Drugs*, 2016, 14(12): 217.
- [17] Hayashi A, José Dorantes-Aranda J, Bowman J, Hallegraef G. Combined cytotoxicity of the phycotoxin okadaic acid and mycotoxins on intestinal and neuroblastoma human cell models. *Toxins*, 2018, 10(12): 526.
- [18] Goddard ML, Mottier N, Jeanneret-Gris J, Christen D, Tabacchi R, Abou-Mansour E. Differential production of phytotoxins from *Phomopsis* sp. from grapevine plants showing esca symptoms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(34): 8602–8607.

# Discovery of polyketide natural products from corals derived fungi *Parengyodontium album* SCSIO SX7W11 and their biosynthetic pathway analysis

Xiaoxue Zhou<sup>1</sup>, Jiafan Yang<sup>2,3</sup>, Mingzhe Li<sup>4</sup>, Yongxiang Song<sup>2,3</sup>, Jianhua Ju<sup>2,3</sup>, Xiaofan Li<sup>1</sup>, Liyan Wang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresource and Eco-environmental Science, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518055, Guangdong Province, China

<sup>2</sup> Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong Province, China

<sup>3</sup> College of Oceanology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>4</sup> College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

**Abstract:** Natural products from marine fungi have been attracting attention for their unique structures and biological activities. Genome mining has become an emerging strategy to explore their metabolites. **[Objective]** In this study, we investigated *Parengyodontium album* SCSIO SX7W11, a marine fungus derived from South China Sea corals for the potential of producing polyketides. **[Methods]** We sequenced the whole genome of strain SX7W11 using Illumina Miseq. The polyketide biosynthetic gene clusters were then predicted and the functions of open reading frames (ORFs) were annotated. Normal phase chromatography, reversed-phase chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were conducted for the isolation and purification of natural products. The purified compounds were characterized by high resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS), <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and X-ray data and the biosynthetic pathways were deduced. **[Results]** The whole genome scanning and sequencing results showed that the genome length of SX7W11 is 34.0 Mb, containing 24 biosynthetic gene clusters. Three polyketides were identified as emodin (**1**), alternanphenol B (**2**), and sydowinin A (**3**). The crystal data of sydowinin A was obtained. The biosynthetic gene cluster of sydowinin A was localized from SX7W11 genome by bioinformatics analysis. The biosynthetic pathway was then proposed. **[Conclusion]** Through genome mining and medium optimization, *P. album* SCSIO SX7W11, a coral derived fungus, has shown the potential to produce sydowinin type polyketides. This work laid a foundation for the biosynthesis study of sydowinin.

**Keywords:** *Parengyodontium album* SCSIO SX7W11, sydowinin A, biosynthetic gene cluster, genome, marine fungi

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Shenzhen Municipal Science and Technology Project (JCY20180305123659726)

\*Corresponding authors. Tel: +86-755-26012653; E-mail: lwang@szu.edu.cn

Received: 6 February 2021; Revised: 30 March 2021; Published online: 19 April 2021