



三烷基取代芳香聚酮 gombapyrones 生物合成基因簇的确认及其生物合成推导

杨名, 李晚露, 张文禹, 林厚文, 周永军*

上海交通大学医学院附属仁济医院海洋药物研究中心, 上海 200127

杨名, 李晚露, 张文禹, 林厚文, 周永军. 三烷基取代芳香聚酮 gombapyrones 生物合成基因簇的确认及其生物合成推导[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4671-4685.

YANG Ming, LI Wanlu, ZHANG Wenyu, LIN Houwen, ZHOU Yongjun. Investigation of the biosynthetic gene cluster of trialkyl-substituted aromatic polyketide gombapyrones from *Streptomyces rubellomurinus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4671-4685.

摘要:【目的】本研究旨在确认链霉菌 *Streptomyces rubellomurinus* ATCC 31215 来源芳香聚酮化合物(gombapyrones, GOMs)的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC), 并对其生物合成途径进行推导。【方法】对链霉菌 *S. rubellomurinus* ATCC 31215 进行大规模发酵及提取分离, 得到 GOM-B 和 GOM-D; 以三烷基取代芳香聚酮生物合成途径保守存在的 P450 单氧化酶的蛋白序列作为探针, 在 GOMs 产生菌 *S. rubellomurinus* 基因组中进行 BLAST 搜索获得潜在的 GOMs 生物合成基因簇(*gom* BGC); 通过对 *gom* BGC 中的聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)结构基因进行同框缺失突变, 对突变株发酵产物进行高效液相色谱-质谱(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)分析以确认 *gom* BGC 与 GOMs 的产生相关; 基于生物信息学分析, 推导 GOM-B 的生物合成途径。【结果】从 *S. rubellomurinus* 发酵产物中分离得到了化合物 GOM-B 和 GOM-D, 并通过一维核磁数据分析确认其结构。从 *S. rubellomurinus* 基因组中获得了潜在的 GOMs 生物合成基因簇 *gom* BGC, 相关基因序列和功能注释已递交 PubMed 数据库(GenBank 编号: OQ831859); 基因缺失突变 PKS 基因 *gomB* 后导致 *S. rubellomurinus* 发酵产物中 GOM-B 和 GOM-D 组分消失; 基于生物信息学分析对 GOM-B 的 I 型 PKS 生物合成途径进行了推导。【结论】首次确认了三烷基取代芳香聚酮 GOM-B 和 GOM-D 的生物合成基因簇 *gom* BGC; 该生物合成途径属于 I 型 PKS, 推测其中 P450 单氧化酶 *GomJ* 具有独特的多烯聚酮链芳构化功能; 与最近报道的 GOM-G 生物合成基因簇 *gbn* BGC 相比较, *gom* BGC 编码的 PKS 装配线缺少一个碳链延伸功能模块, 这与其产物 GOM-B 的碳骨架结构一

资助项目: 国家自然科学基金(32070070)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070070).

*Corresponding author. E-mail: zhouyongjun66@163.com

Received: 2023-04-21; Accepted: 2023-07-27; Published online: 2023-08-08

致; 本工作所报道的 *gom* BGC 展现了细菌 I 型聚酮生物合成基因演变导致其产物结构多样性的范例; *gom* BGC 编码的 P450 氧化酶 GomJ 与已报道同源蛋白(78.3%序列相同) GbnP 相比, 作用底物分子骨架少了 2 个碳, 因此是探究细菌三烷基取代芳香聚酮芳构化酶反应底物耐受性的理想材料。

关键词: 天然产物生物合成; 芳香聚酮; 聚酮合酶; P450 单氧化酶

Investigation of the biosynthetic gene cluster of trialkyl-substituted aromatic polyketide gombapyrones from *Streptomyces rubellomurinus*

YANG Ming, LI Wanlu, ZHANG Wenyu, LIN Houwen, ZHOU Yongjun*

Research Center for Marine Drugs, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Abstract: [Objective] To identify the biosynthetic gene cluster (BGC) of gombapyrones (GOMs), the trialkyl-substituted aromatic polyketides derived from *Streptomyces rubellomurinus* ATCC 31215, and deduce the biosynthetic pathway. [Methods] GOM-B and GOM-D were extracted for the large-scale fermentation broth of *S. rubellomurinus* ATCC 31215. The P450 monooxygenase catalyzing the polyene chain aromatization is conserved in the biosynthetic pathways of trialkyl-substituted aromatic polyketides in bacteria. Thus, BLAST searching was carried out with the P450 monooxygenase as a probe to identify the candidate BGC for GOMs (*gom* BGC) from the genome of *S. rubellomurinus*. Through deletion of the polyketide synthase (PKS) gene in *gom* BGC and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) identification of the fermentation products of the mutant strain, the *gom* BGC can be confirmed to direct the production of GOMs. Furthermore, bioinformatics tools were used to deduce the biosynthetic pathway of GOM-B. [Results] GOM-B and GOM-D were extracted from the fermentation broth of *S. rubellomurinus* and their structures were identified by NMR. The *gom* BGC identified in the work was submitted to the PubMed, with the GenBank accession number: OQ831859. The deletion of a PKS gene *gomB* resulted in the disappearance of GOM-B and GOM-D in the fermentation broth. The biosynthetic pathway of GOM-B was deduced as a type I PKS based on bioinformatics analysis. [Conclusion] This work identified a new BGC which directs the biosynthesis of trialkyl-substituted aromatic polyketides, including GOM-B and GOM-D. The type I PKS involves a P450 monooxygenase GomJ putatively catalyzing the unique polyene chain aromatization. Compared with the *gbn* BGC recently reported to direct the GOM-G biosynthesis, the PKS assembly line encoded by *gom* BGC lacks one elongation module, which is consistent with the carbon skeleton of GOM-B. The *gom* BGC could serve as an example that the gene evolution of bacterial type I PKS leads to the structural diversity of polyketides. Moreover, GomJ shows 78.3% sequence identity to the P450 monooxygenase GbnP functionally identified from *gbn* BGC, whereas the putative substrate of GomJ has two carbons less than the substrate of

GbnP. Thus, the discovery of this work helps to decipher the substrate-specificity mechanism of the unusual P450 monooxygenase which catalyzes polyene chain aromatization in the biosynthetic pathways of trialkyl-substituted aromatic polyketides in bacteria.

Keywords: biosynthesis of nature products; aromatic polyketide; polyketide synthase; P450 monooxygenase

微生物次级代谢产物是发掘药用活性分子的宝贵资源。目前微生物来源药用活性小分子多来自于细菌界放线菌门链霉菌属。微生物天然产物主要有聚酮、多肽、萜、生物碱及核苷类分子几类,其中聚酮是具有代表性的一大类。已发现的聚酮小分子具有广泛的生物活性,如抗菌、抗肿瘤、抗氧化抗炎和杀虫等,例如免疫抑制剂普乐可复(FK506)^[1]、抗菌药物红霉素(erythromycin)^[2]和两性霉素(amphotericin)^[3]以及具有杀虫活性的阿维菌素^[4]。

聚酮生物合成途径中主要的催化元件为聚酮合酶(polyketide synthases, PKS),其作为多功能域大蛋白以装配线模式负责聚酮分子碳骨架的组装。细菌来源聚酮生物合成途径存在3种PKS类型。I型PKS是由多个功能域模块组成的蛋白,每个模块包含1组结构域,在聚酮化合物链组装过程中,每组结构域行使1次功能,所以I型PKS也可以称为模块化I型PKS^[5]。II型PKS的每个催化功能模块由单独的蛋白承担,每个蛋白通过重复工作负责碳链的延伸,大多数细菌来源芳香族聚酮化合物的生物合成由II型聚酮合酶负责。III型PKS也称查尔酮型聚酮合酶,仅含有与I型和II型PKS聚酮合酶(ketosynthase, KS)功能域等效的独立蛋白,以酰基-CoA为底物迭代地合成具有各种链长的产物^[6]。I型PKS多功能大蛋白除含有负责碳链延伸的必须功能域聚酮合酶KS、酰基转运蛋白(acyl transferase, AT)和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP),还存在非必需的还原型功能域,包括酮还原酶(ketoreductase, KR)、脱水酶

(dehydratase, DH)、烯醇还原酶(enoylreductase, ER)^[7]。这些还原型功能域对延伸过程中的聚酮链 β -酮基进行还原(形成 β -羟基)、脱水(形成 α, β -双键)和烯键还原(形成饱和的亚甲基),从而赋予聚酮链丰富结构。

细菌来源芳香聚酮贡献了大量药用活性分子,其生物合成途径得到了广泛深入的研究。细菌芳香聚酮化合物以稠环结构为主,大多由II型PKS或迭代工作模式的I型PKS负责^[8],其芳香环的形成通常由加载在ACP上的 β -羰基聚酮链(poly- β -carbonyl chain)通过醇醛缩合(aldehyde condensation)或克莱森缩合(Claissen condensation)以及脱水反应后形成芳香环。近年发现1类I型PKS来源的三烷基取代芳香聚酮(图1),其独特的芳构化机制引起了关注。同位素标记实验表明三烷基取代芳香聚酮洛奈酸A(lorneic acid A)中苯环形成于聚酮多烯长链部分^[10],而以往报道I型PKS来源的芳香聚酮分子的芳香环一般由PKS装配线的起始单位引入^[15]。这类在聚酮多烯长链部分形成苯环的芳构化机制非常罕见,近期发现该类芳香聚酮的芳香环由独特的P450单氧化酶催化形成^[9]。这类三烷基取代芳香聚酮多数具有良好药用活性,例如链霉菌NPS554来源lorneic acid A具有磷酸二酯酶抑制活性^[16],从链霉菌(*Streptomyces griseoruber*) Acta 3662分离得到的GOM-A对糖原合酶激酶3 β 有抑制活性^[17],链霉菌KIB-H1471来源的benwamycin B和F能抑制T细胞增殖且无明显的细胞毒性^[14],以及从多个链霉菌发酵产物中发现的NFAT-133具有免疫抑制活性^[13]。

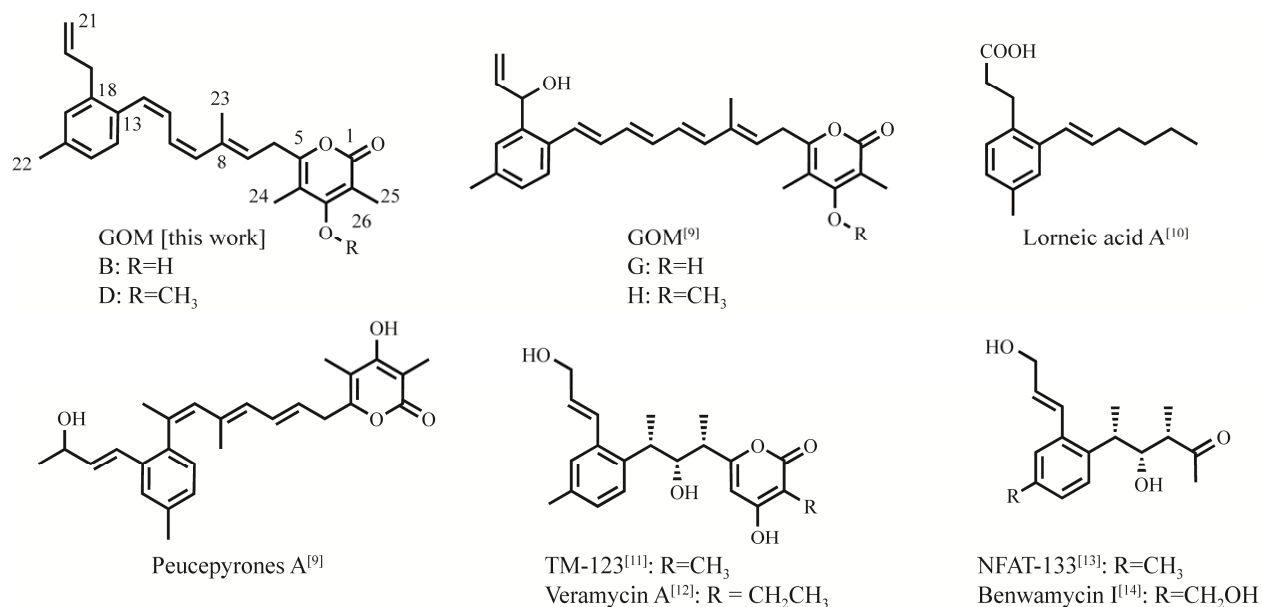


图 1 细菌 I 型 PKS 来源三烷基取代芳香聚酮分子

Figure 1 The trialkyl-substituted aromatic polyketides derived from bacterial type I PKSs.

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

(1) 链霉菌：本研究所用链霉菌为 *Streptomyces rubellomurinus* ATCC 31215。

(2) 大肠杆菌：*Escherichia coli* DH10B 用于质粒构建和扩增。*E. coli* ET12567 用于与链霉菌进行双亲接合转移，其中含有的辅助质粒 pUZ8002 可以将目标质粒转进链霉菌。

(3) 质粒：质粒 pRJgomB 为本工作构建，用于获得基因缺失突变株 Δ gomB。质粒 pYH7 携带阿布拉霉素抗性(apramycin resistance, AprR) 基因，是大肠杆菌-放线菌穿梭质粒，用于构建基因缺失突变株^[18]。

1.1.2 主要试剂和仪器

(1) 本实验中用于基因克隆的高保真酶 KOD OneTM PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司，用于筛选及验证克隆子的酶 2×flash PCR MasterMix (Dye)购自江苏康为世纪生物科技股

份有限公司。本实验中所用限制性内切酶购自 New England Biolabs。用于质粒构建的 Gibson 酶 2×Ezmax-Multi Clonemix Plus 购自吐露港生物科技有限公司。配制 10%的 Chelex 100 resin (Bio-Rad)溶液用于制备基因组 DNA。

(2) 本实验中所用 PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品，核酸电泳仪购自生工生物工程(上海)股份有限公司，低温高速离心机购自赛默飞公司。用于化合物检测的 Acquity UPLC 高效液相色谱仪和 Xevo G2-XS QTOF 质谱仪为 Waters 公司产品。分析色谱柱(C18, 4.6 mm×250 mm, 5 μm) 购自 Phenomenex 公司。

1.1.3 培养基

(1) Luria-Bertani (LB)培养基用于培养大肠杆菌，配方为酵母提取物 5 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，氯化钠 5 g/L，葡萄糖 2 g/L，pH 自然。加入琼脂粉(15 g/L)配成固体培养基用于大肠杆菌的筛选。

(2) SFM (soya flour medium)培养基用于链霉菌的平板静止培养。低温黄豆饼粉 20 g，加

入 400 mL 蒸馏水, 121 °C, 20 min 高压灭菌后纱布过滤, 得到澄清液体, 加入甘露醇 20 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.2–7.4。

(3) TSBY (tryptone soya broth yeast) 培养基用于链霉菌的菌丝体培养。胰蛋白胨大豆汤粉 30 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 蔗糖 100 g/L, 消泡剂 1 mL/L。

(4) SGC (soya glucose calcium) 培养基用于链霉菌发酵培养。低温黄豆粉 30 g 溶于 400 mL 蒸馏水, 灭菌(121 °C, 20 min)后纱布过滤。在所得澄清液体中加入碳酸钙(5 g/L), 蒸馏水定容至 800 mL, 加入消泡剂 1 mL。另外配制 200 mL 25% 葡萄糖溶液, 分别灭菌, 混合后使用。

以上实验所用所有培养基均经过高温高压(121 °C, 20 min)灭菌后使用。

1.2 用于 *gomB* 基因缺失的质粒构建

采用同源重组双交换的策略构建 *gomB* 框内缺失突变株。设计 L-gom-F&R 和 R-gom-F&R 两对引物, 以 *S. rubellomurinus* 基因组 DNA 为模板, 扩增后得到同源重组交换左臂(1.7 kb)和右臂(2 kb)。将左右臂 DNA 经回收纯化后, 与经酶切(*Nde* I)的线性化工具质粒 pYH7 共同装配, 得到重组质粒 pRJgomB。重组质粒经测序无误后, 通过钙转化的方法转入 *E. coli* ET12567/pUZ8002 (该工程大肠杆菌含有辅助质粒 pUZ8002, 帮助重组质粒转进链霉菌), 用于链霉菌接合转移。

用于 PCR 扩增同源重组交换臂的引物为: L-gom-F (5'-CCGGACTGATCAAGGCGAATACCTTCACTTCTTCTTCACGGAGGGGAAC-3'), L-gom-R (5'-TCACGGAAGTTGACTTCCAGGATCACGTGCGCATTG-3'), R-gom-F (5'-GTGATCCTGGAAGTCAACTTCCGTGACGTGCTGATC-3')和 R-gom-R (5'-CCGGACCCGCGCGGTCGATCCCCGGATCCGAGCTCCTTGTCGATCAG-3')。验证突变株的引物为 T-gom-F (5'-CGTCT

TCTGCGGCCTCATGTTC-3')和 T-gom-R (5'-GTCCGTCACCAGGCCGAAGAC-3')。

1.3 链霉菌接合转移及突变株的筛选

通过 *E. coli* ET12567/pUZ8002 和链霉菌 *S. rubellomurinus* 之间跨属接合转移, 将目标质粒 pRJgomB 导入 *S. rubellomurinus* 中, 24 h 用 50 µg/mL 阿布拉霉素及 50 µg/mL 的萘啶酮酸覆盖, 30 °C 静置培养 3–4 d, 可以观察到接合转移子。将接合转移子单克隆转接到含 50 µg/mL 阿泊拉霉素及 50 µg/mL 的萘啶酮酸的平板上进行复证。待重新长出菌体后, 取适量菌体提取基因组, 设计验证引物 PCR 验证质粒导入成功。将成功导入质粒的单克隆在无抗培养基上松弛培养 2–3 代, 对其进行影印平板筛选。对抗生素敏感型单克隆 PCR 筛选, 成功得到完成同源重组双交换的目标突变菌株 Δ *gomB*。

1.4 菌株发酵及发酵产物的检测

链霉菌小规模发酵: 接种链霉菌于 SFM 平板, 30 °C 静置培养。待长出单菌落后, 接种到 25 mL TSBY 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 3–4 d, 以获得种子液。将种子液 1:50 (体积比) 接种至发酵用 SGC 培养基(50 mL), 30 °C、220 r/min 培养 5 d。取 7 mL 发酵液与乙酸乙酯等体积萃取, 充分混合后超声 1 h。离心后取 5 mL 上层有机相, 吹干, 加入 0.8 mL 甲醇以充分溶解, 转移到 1.5 mL EP 管。将样品 13 200 r/min 高速离心 5 min 以去除蛋白杂质, 取上清 500 µL 于小试管中进行高效液相色谱-质谱 (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS) 检测。

链霉菌大规模发酵: 在 SFM 平板接种单菌落, 30 °C 静置培养。待长出单菌落后, 接种到 25 mL TSBY 培养基, 30 °C、220 r/min 培养 3–4 d 以培养一级种子液。将一级种子液 1/50 (体积分数) 转接二级种子液, 培养 1–2 d。二级种子

液 1/50 (体积分数)接种至发酵用 150 mL SGC 培养基, 30 °C、220 r/min 培养 6 d 后收菌液。

1.5 HPLC 及 HPLC-MS 检测条件

本实验中所用 HPLC-MS 检测仪器由 Waters HPLC 搭配 Waters Acquity Qda 质谱检测器, Waters Xbridge C18 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 样品自动进样 20 μL。HPLC 流动相为乙腈和 0.1%甲酸水溶液, 洗脱梯度为 0–30 min (30%–100%乙腈), 30–34 min (100%乙腈), 34–35 min (100%乙腈), 35–40 min (30%乙腈)。流动相为水(0.1%甲酸)和乙腈, 流速 0.7 mL/min。质谱采用正离子模式, 检测范围 m/z 200–1 250。高分辨质谱数据在 Waters Xevo G2-XS Q TOF 质谱检测器上检测得到, 采用正离子模式, 检测范围 m/z 100–1 250。

1.6 化合物的分离及结构鉴定

化合物分离采用真空正相柱层析、反相中压液相色谱分离、制备型 HPLC。收集 12 L 发酵液, 用等体积乙酸乙酯(EtOAc)萃取 3 次。合并有机相萃取液后进行减压蒸馏并得到粗浸膏; 先后通过水相萃取除糖, 通过石油醚除脂, 然后收集样品层旋干得到 11 g 粗浸膏。将浸膏溶于 20 mL 的甲醇加入 15 g 的硅胶粉(200–300 目)拌干, 平铺装填于已经真空减压紧实的正相硅胶柱(柱高约 5 cm, 柱体积约 500 mL)。首先采取石油醚和乙酸乙酯进行梯度洗脱(体积比 1:0 到 0:1), 再采取二氯甲烷和甲醇进行梯度洗脱(体积比 100:1 到 1:1)。依据薄层色谱检测和 HPLC-MS 分析结果合并小馏分, 获得 10 个砍断馏分。再经中压液相制备色谱纯化(ODS 色谱柱 YMC-Park C18, 20×250 mm, 5 μm), 梯度洗脱条件为: 20 mL/min, 30%–80%乙腈, 5 h。依据 HPLC-MS 检测洗脱组分结果, 将含目标分子洗脱液合并旋干, 纯品送去采集核磁数据。纯度低于 90%的样品借助半制备型 HPLC (色谱

柱: Waters Xbridge C18 column 250 mm×4.6 mm, 5 μm)作进一步纯化, 洗脱条件为: 3 mL/min, 57%乙腈(含 0.1%甲酸)。通过上述多种柱色谱分离, 最终拿到目标分子 GOM-B (4 mg)和 GOM-D (2 mg)。目标化合物核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)分析通过 Bruker AVANCE-700 核磁共振仪采集。

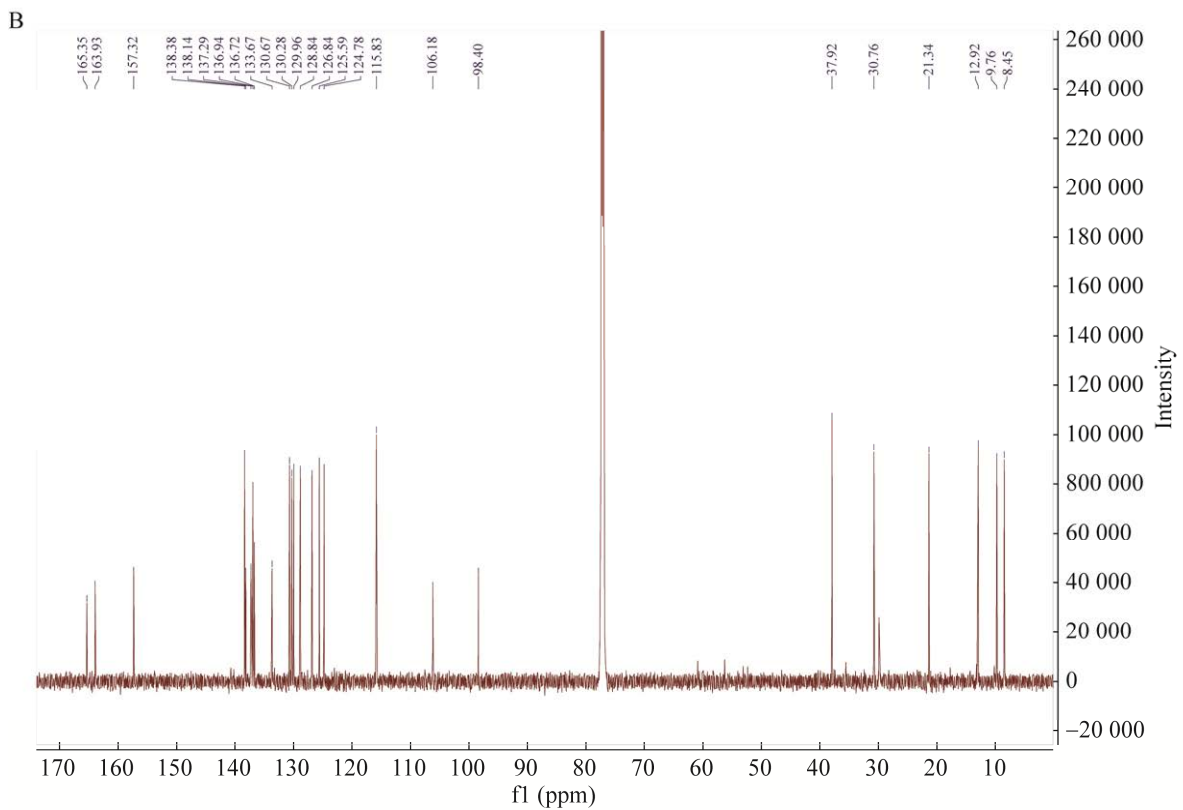
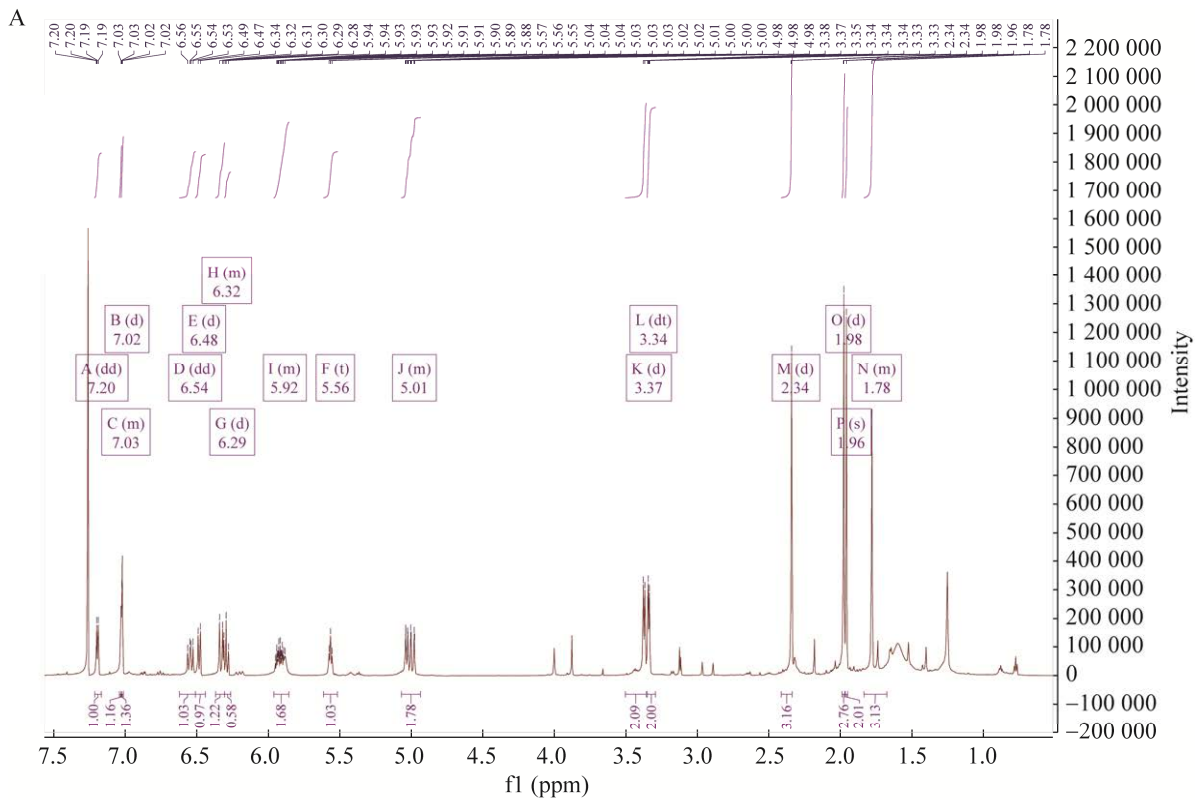
2 结果与分析

2.1 链霉菌 *S. rubellomurinus* 来源三烷基取代芳香聚酮化合物 GOM-B 和 GOM-D 的鉴定

在对 *S. rubellomurinus* ATCC 31215 发酵产物进行 HPLC-MS 分析后, 发现两个紫外吸收光谱与已知化合物 GOM-B 和 GOM-D 高度类似的化合物。高分辨质谱显示 1 号化合物 $m/z=377.212 1$ $[M+H]^+$, GOM-B 理论值 $m/z=377.211 7$ $[M+H]^+$, 误差 1.06×10^{-6} 。2 号化合物检测值 $m/z=391.227 4$ $[M+H]^+$, GOM-D 理论值 $m/z=391.227 5$ $[M+H]^+$, 误差 0.26×10^{-6} 。结合紫外吸收光谱综合分析, 推测其为已知化合物 GOM-B 和 GOM-D, 并对 *S. rubellomurinus* 进行了 12 L 发酵, 分离纯化得到目标化合物, 并获得 2 个单体化合物的 NMR 数据(图 1, 图 2)。通过与文献报道的一维 1H 和 ^{13}C -NMR 谱比较(表 1, 表 2)^[17], 确定 1 号化合物为 GOM-B, 2 号化合物为 GOM-D。化合物 GOM-B 和 GOM-D 为芳香聚酮化合物, 含有 α -吡喃环和独特的 1,2,4-三烷基取代苯环结构的芳香聚酮化合物, 首次在链霉菌 *S. griseoruber* Acta 3662 中分离得到^[17]。

2.2 链霉菌 *S. rubellomurinus* 中 GOM-B 生物合成基因簇的发掘

由于 GOM-B 和 GOM-D 含有独特的 1,2,4-三烷基取代苯环结构, 文献调研发现, 链霉菌来源的 lorneic acid A^[10]、TM-123^[11]、veramycin A^[12]、



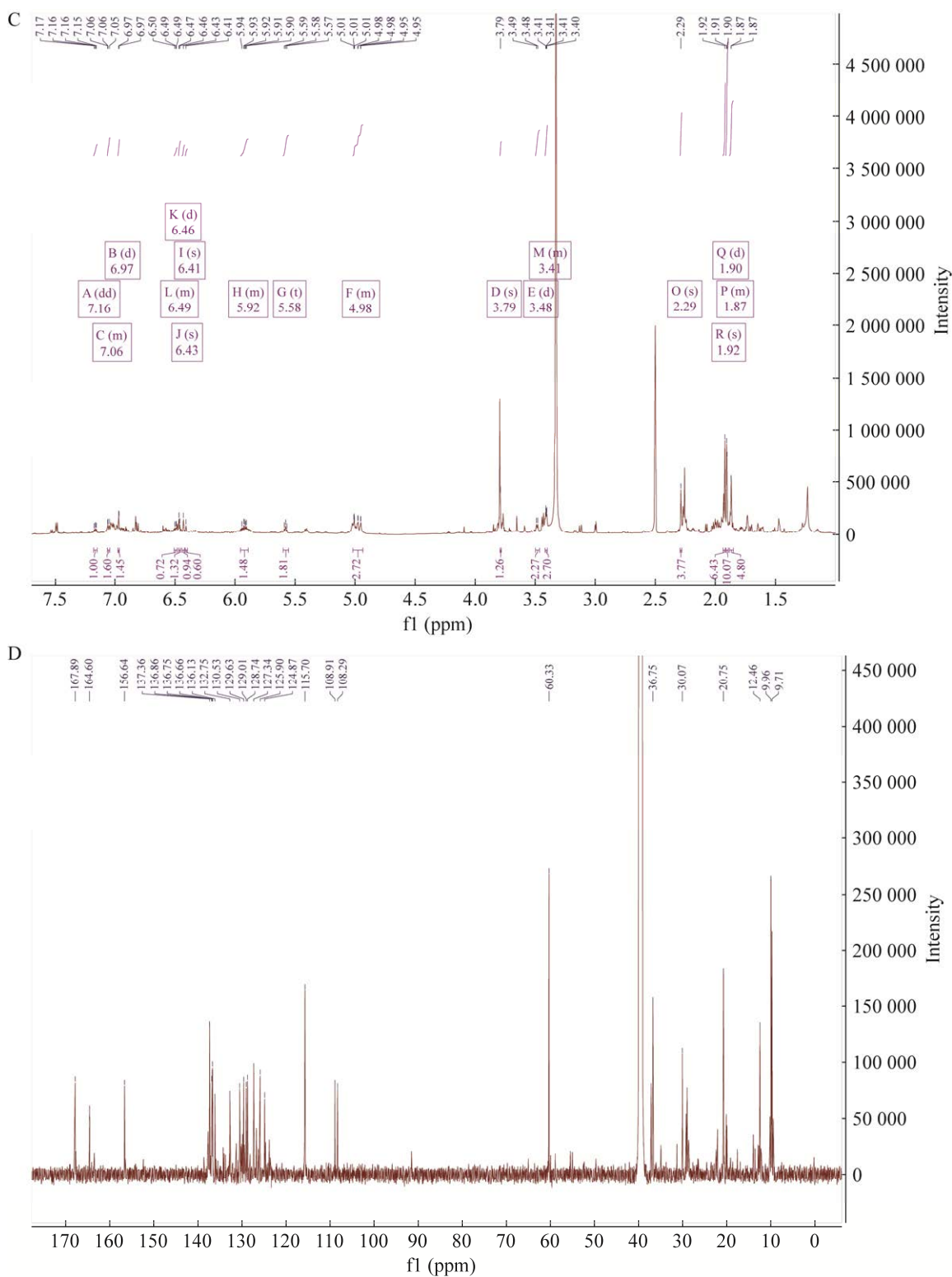


图 2 化合物 GOM-B 和 GOM-D 一维核磁谱

Figure 2 NMR spectra of GOM-B and GOM-D. A: $^1\text{H-NMR}$ of GOM-B. B: $^{13}\text{C-NMR}$ of GOM-B. C: $^1\text{H-NMR}$ of GOM-D. D: $^{13}\text{C-NMR}$ of GOM-D.

表 1 化合物 GOM-B 的一维核磁数据(氘代氯仿溶剂)

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR data of GOM-B (in CDCl_3)

No.	Experimental δ_{C} (175 MHz)	Literature ^[17] δ_{C} (125 MHz)	Experimental δ_{H} , mult. (700 MHz, <i>J</i> in Hz)	Literature ^[17] δ_{H} , mult. (500 MHz, <i>J</i> in Hz)
1	165.4	165.7		
2	98.4	98.6		
3	163.9	164.4		
4	106.2	106.6		
5	157.3	157.3		
6	30.8	30.8	3.37, d (7.4)	3.35, d (7.4)
7	125.6	125.7	5.56, t (7.4)	5.54, t (7.3)
8	136.7	136.8		
9	138.4	138.5	6.48, d (11.1)	6.45, d (5.6)
10	124.8	124.8	6.54, dd (15.3, 11.1)	6.46, d (4.8)
11	130.7	130.7	6.34, m	6.33, m
12	128.8	128.9	6.29, d (11.2)	6.49, d (11.2)
13	133.7	133.7		
14	130.0	130.0	7.20, dd (8.4, 2.3)	7.17, d (7.8)
15	126.8	126.9	7.03, m	7.01, d (7.8)
16	137.3	137.4		
17	130.3	130.3	7.02, d (2.3)	6.99, s
18	138.1	138.2		
19	37.9	37.9	3.34, dt (6.4, 1.7)	3.32, d (6.6)
20	136.9	137.0	5.91, m	5.90, m
21	115.8	115.9	5.01, m	4.96, 5.00, d, d (17.1, 10.2)
22	21.3	21.4	2.34, m	2.31, s
23	12.9	12.9	1.78, m	1.75, s
24	8.5	8.6	1.96, s	1.94, s
25	9.8	9.8	1.98, m	1.96, s

NFAT-133^[13]、benwamycin I^[14]、peucepyrones A^[9]、GOM-G 和 GOM-H^[9]也具有类似的苯环结构(图 1)。将 GOM-B 与已知化合物 GOM-G 进行对比,二者具有类似的由多烯长链连接的 α -吡喃环和独特的 1,2,4-三烷基取代苯环结构,主要差异在于多烯长链的长度。在 GOM-B 中由 7 个碳组成吡喃环与苯环之间的多烯长链,而 GOM-G 为 9 个碳的多烯长链(图 1)。文献调研发现,与以往 I 型 PKS 中直接由含芳香基团的起始单位引入 PKS 装配线形成芳香化合物的机

制不同^[15],推测此类三烷基取代苯环分子中芳构化发生在聚酮链多烯部位。考虑到 GOM-B 与 lorneic acid A 分子中苯环结构相似,推测其生物合成途径中苯环形成机制应该也趋于一致。因此利用推测负责催化 lorneic acid A 分子内苯环形成的 P450 氧化酶 Orf1-257 作为探针^[10],在 *S. rubellomurinus* 基因组中进行挖掘,发现 1 个编码蛋白与 GbnP 相似度为 48.2%的基因 *gomJ*,且该基因两侧含有 6 个 I 型 PKS 基因,我们推测该基因簇可能是 GOM-B 和 GOM-D 的生物合成

基因簇 *gom* BGC。在本工作开展过程中, 2023 年有报道 GOM-G 分子内苯环由独特的 P450 单氧化酶 GbnP 催化形成^[9]。GOM-G 与 GOM-B 结构相似, 均含有三烷基取代苯环结构。根据

antiSMASH^[19]预测结果, 并参照已发表的 GOM-G 生物合成基因簇 *gbn* BGC^[9], 对 *gom* BGC 中的基因进行功能注释(图 3, 表 3), 发现其含有 6 个 I 型 PKS 基因 *gomA-F*, 以及游离的二型硫酯

表 2 化合物 GOM-D 的一维核磁数据(氘代 DMSO 溶剂)

Table 2 ¹H and ¹³C NMR data of GOM-D (in DMSO-*d*₆)

No.	Experimental δ_C (175 MHz)	Literature ^[17] δ_C (125 MHz)	Experimental δ_H , mult. (700 MHz, <i>J</i> in Hz)	Literature ^[17] δ_H , mult. (500 MHz, <i>J</i> in Hz)
1	164.6	164.6		
2	108.3	108.3		
3	167.9	167.9		
4	108.9	108.9		
5	156.6	156.5		
6	30.1	30.3	3.41, m	3.4, d (7.4)
7	125.9	126.7	5.58, t (7.5)	5.6, t (7.3)
8	136.1	135.9		
9	137.4	138.7	6.43, s	6.45, d (5.8)
10	124.9	123.7	6.46, d (5.0)	6.46, d (4.3)
11	130.5	130.4	6.41, s	6.33, m
12	127.3	128.2	6.49, m	6.5, d (11.2)
13	132.8	132.9		
14	129.0	129.4	7.16, d (7.7)	7.15, d (7.8)
15	126.8	126.8	7.06, m	7.06, d (7.8)
16	136.7	136.7		
17	129.6	130.2	6.97, d (1.8)	7.02, s
18	136.9	137.6		
19	36.8	37.2	3.48, d (7.6)	3.30, d (6.5)
20	136.8	136.9	5.92, m	5.88, m
21	115.7	115.8	4.98, m	4.96, 5.00, d, d (17.1, 10.2)
22	20.8	20.8	2.29, s	2.28, s
23	12.5	12.4	1.87, m	1.73, s
24	9.7	9.7	1.90, m	1.90, s
25	10.0	10.0	1.92, s	1.90, s
26	60.3	60.4	3.79, s	3.78, s

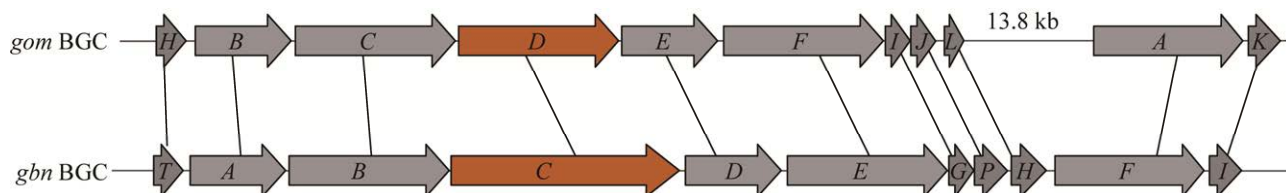


图 3 本研究 *gom* BGC 基因簇与已报道的 *gbn* BGC 基因簇的基因组成分析

Figure 3 Comparative analysis of the genes of *gom* BGC and the reported *gbn* BGC.

表 3 本研究 *gom* BGC 基因簇与已报道的 *gbn* BGC 基因簇的功能比较分析Table 3 Comparative analysis of the gene functions of *gom* BGC and the reported *gbn* BGC

<i>gom</i> BGC		<i>gbn</i> BGC		Proposed function	Identity/Coverage (%)
Protein	Size (aa)	Protein	Size (aa)		
GomH	254	GbnT (WP_205373051.1)	253	Type II thioesterase	70/96
GomB	2 168	GbnA (WP_205373050.1)	2 167	Type I PKS	81/99
GomC	3 544	GbnB (WP_244882706.1)	3 557	Type I PKS	78/99
GomD	3 566	GbnC (WP_244882705.1)	5 284	Type I PKS	72/99
GomE	2 128	GbnD (WP_205373049.1)	2 151	Type I PKS	76/99
GomF	3 695	GbnE (WP_244882703.1)	3 791	Type I PKS	71/99
GomI	473	GbnG (WP_205373048.1)	496	Transport	76/98
GomJ	480	GbnP (WP_205373047.1)	480	Cytochrome P450	78/99
GomL	194	GbnH (WP_205373046.1)	194	Unknown	69/98
GomA	2 772	GbnF (WP_244883147.1)	3 063	Type I PKS	73/99
GomK	385	GbnI (WP_205373045.1)	385	Acyl-CoA dehydrogenase	80/99

酶基因 *gomH*, 可能负责苯环形成的 P450 单氧化酶基因 *gomJ*, 乙酰辅酶 A 脱氢酶基因 *gomK*, 具有转运功能蛋白的编码基因 *gomI* 以及 1 个未知功能基因 *gomL*。

2.3 GOM-B 和 GOM-D 的生物合成途径的推导

遵循 I 型 PKS 的装配原理, 结合对 *gom* BGC 中基因功能的预测, 并参考已报道 GOM-G 的生物合成途径, 对 GOM-B 的生物合成途径进行了推导(图 4A)。该基因簇中含有 6 个 I 型 PKS 基因 *gomA-F*, 依次编码 1 个起始模块和 9 个延伸模块, 共加载 5 个丙二酰辅酶 A 和 5 个甲基丙二酰辅酶 A。通过对 PKS 各模块功能域进行蛋白质序列比对分析, 发现 M8 和 M9 模块中 KR 功能域缺少保守活性位点 Y 和负责 NADPH 结合的 GxGx2Gx3A 保守序列^[20-21] (图 5), 因此推断 KR8 和 KR9 为失活功能域。此外, 与已报道的 *gbn* BGC 编码的 PKS 装配线相似, *gom* BGC 编码的 PKS 装配线的 ER7 应该未行使功能, 这与 GOM-B 的化合物结构相吻合。

GOM-B 前体聚酮链 C₁-C₅ 位 β-酮基经末端硫酯酶 TE 功能域环化形成 α-吡喃环结构并释

放, 同时聚酮多烯部位双键发生系统位移, 随后经 P450 氧化酶 GomJ 催化在 C₁₃-C₁₈ 位成环。另外, 基因 *gomK* 编码蛋白与已报到的乙酰辅酶 A 脱氢酶 TcsD 有 61.2% 的一致, TcsD 被证明可以催化 ACP 上短链末端双键形成^[22], 所以推测 GomK 负责 GOM-B 前体链末端双键的形成。

2.4 通过 PKS 基因同框缺失突变验证 GOM 生物合成基因簇

选取 *gom* BGC 中的 PKS 基因 *gomB*, 在其编码框(编码 2 168 氨基酸)内设计同框缺失删除 983 个氨基酸(图 6A)。将同源重组质粒 pRJgomB 通过接合转移导入 *S. rubellomurinus*, 经同源重组双交换获得突变株 Δ*gomB*。对突变株 Δ*gomB* 发酵产物进行 HPLC-MS 分析发现 GOM-B 和 GOM-D 不再产生(图 6C), 从而确定 *gom* BGC 与 GOM-B 和 GOM-D 的产生相关。

3 讨论与结论

从 *S. rubellomurinus* 中发现了三烷基取代芳香聚酮化合物 GOM-B 和 -D, 通过 PKS 基因缺失突变确认了负责 GOM-B 和 GOM-D 产生的生物合成基因簇 *gom* BGC, 并对其生物合成途

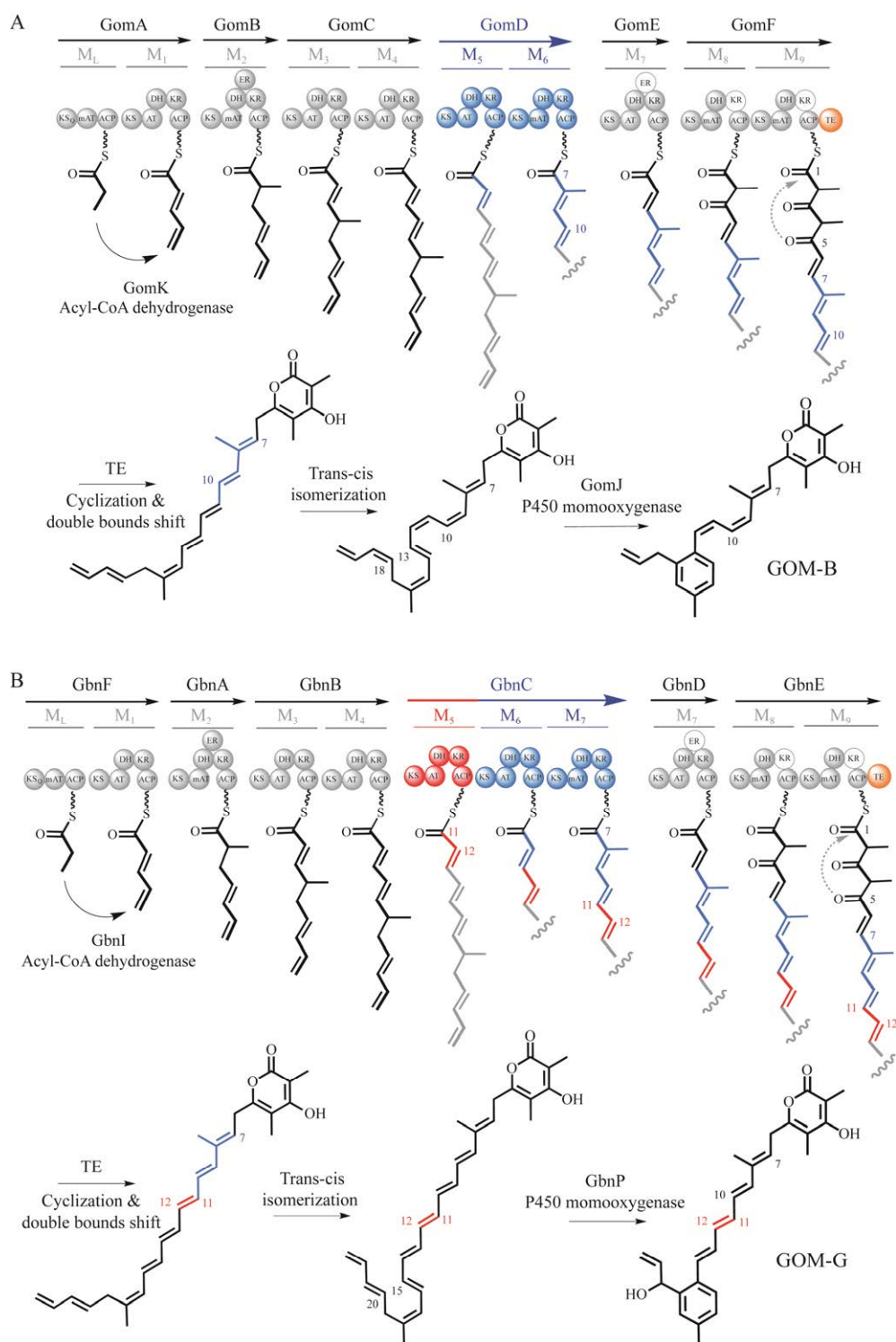


图 4 GOM-B 生物合成途径推导及已报道 GOM-G 的生物合成途径

Figure 4 Proposed biosynthetic logic of GOM-B and the reported biosynthetic logic of GOM-G. A: Proposed biosynthetic logics of GOM-B. B: The reported biosynthetic logics of GOM-G. The module marked in red is supposed to be responsible for the elongation of C₁₁–C₁₂ in GOM-G, which can explain the structural difference of GOM-B and GOM-G.

径进行了推导。目前已报道的 GOM-G 生物合成基因簇 *gbn* BGC^[9]与本工作的 *gom* BGC 应该具有亲缘关系,二者基因组成结构基本一致,关键基因同源度在 69%以上(图 3B)。与 *gbn* BGC 编码的 PKS 相比,*gom* BGC 编码的 PKS 装配线少 1 个碳链延伸模块,从而导致 GOM-B 比 GOM-G 分子骨架少两个碳(图 4)。由于细菌 I 型 PKS 多功能域大蛋白由几类功能域重复排列组成,导致其蛋白序列含有重复的氨基酸序列,进而导致其编码基因普遍含有重复序列。这种重复的 DNA 序列赋予细菌 I 型 PKS 基因在演化过程中发生高频同源重组的可能性^[23-24]。推测 *gbn* BGC 与 *gom* BGC 的差异源于 PKS 基因演化进程中的同源重组片段缺失,因此可作为细菌 I 型 PKS 基因演化导致聚酮产物结构多样化的一个例证。

GOM-B 和 GOM-D 分子中特殊的三烷基取代苯环结构,在链霉菌 I 型 PKS 来源 lorneic acid A、NFAT-133、peucepyrones A 和 GOM-G 化合物中也被发现。此类化合物生物合成基因簇均含有 1 个独特的 P450 单氧化酶基因,其中 lorneic acid A、peucepyrones A 和 GOM-G 生物合成基因簇中的 P450 单氧化酶 LonP (WP_062204318.1)、PcnP (UYQ66237.1)和 GbnP (WP_205373047.1)被南京大学戈惠明团队于 2023 年证明负责三烷基苯环的合成^[9]。本研究 *gom* BGC 基因簇编码的 GomJ 与这 3 个蛋白均具有较高同源性: GbnP (78.3% identity, 99% coverage), LonP (48.2% identity, 92% coverage), PcnP (50.9% identity, 97% coverage)。因此推测 GomJ 行使类似的苯环形成功能(图 4A)。有意思的是 GomJ 与 GbnP 的底物分子相差 2 个碳,暗示该类芳构化酶对多烯聚酮链的长度具有一定的底物耐受性,因此,本研究所发现的 GomJ 是探究 P450 芳构化酶底物链长识别酶学机理的理想材料。

致谢

感谢剑桥大学生物化学系 Peter F. Leadlay 教授提供 *S. rubellomurinus* ATCC 31215 菌株及其基因组信息;感谢剑桥大学生物化学系 Felix Trottmann 同学对构建 Δ *gomB* 菌株所提供的帮助。

参考文献

- [1] SCHREIBER SL, CRABTREE GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506[J]. *Immunology Today*, 1992, 13(4): 136-142.
- [2] WEISBLUM B. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39(4): 797-805.
- [3] LEMKE A, KIDERLEN AF, KAYSER O. Amphotericin B[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(2): 151-162.
- [4] SHOOP WL, MROZIK H, FISHER MH. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health[J]. *Veterinary Parasitology*, 1995, 59(2): 139-156.
- [5] ZHANG LH, HASHIMOTO T, QIN B, HASHIMOTO J, KOZONE I, KAWAHARA T, OKADA M, AWAKAWA T, ITO T, ASAKAWA Y, UEKI M, TAKAHASHI S, OSADA H, WAKIMOTO T, IKEDA H, SHIN-YA K, ABE I. Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2017, 56(7): 1740-1745.
- [6] KULANDAI RAJ AS, TAN KC, CHEN LY, CHENG MJ, LIU RS. Gold-catalyzed bicyclic annulations of 4-methoxy-1,2-dienyl-5-ynes with isoxazoles to form indolizine derivatives via an Au- π -allene intermediate[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(26): 6437-6442.
- [7] FISCHBACH MA, WALSH CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms[J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(8): 3468-3496.
- [8] ZHOU H, LI YR, TANG Y. Cyclization of aromatic polyketides from bacteria and fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(6): 839-868.
- [9] YANG YM, ZHAO EJ, WEI WQ, XU ZF, SHI J, WU

- X, ZHANG B, IGARASHI Y, JIAO RH, LIANG Y, TAN RX, GE HM. Cytochrome P450 catalyzes benzene ring formation in the biosynthesis of trialkyl-substituted aromatic polyketides[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(5): e202214026.
- [10] ZHOU T, KOMAKI H, ICHIKAWA N, HOSOYAMA A, SATO S, IGARASHI Y. Biosynthesis of akaeolide and lorneic acids and annotation of type I polyketide synthase gene clusters in the genome of *Streptomyces* sp. NPS554[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(1): 581-596.
- [11] ZHOU W, POSRI P, ABUGRAIN ME, WEISBERG AJ, CHANG JH, MAHMUD T. Biosynthesis of the nuclear factor of activated T cells inhibitor NFAT-133 in *Streptomyces pactum*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2020, 15(12): 3217-3226.
- [12] DARDIĆ D, BÖHRINGER N, PLAZA A, ZUBEIL F, POHL J, SOMMER S, PADVA L, BECKER J, PATRAS MA, BILL MK, KURZ M, TOTI L, GÖRGENS SW, SCHULER SMM, BILLION A, SCHWENGERS O, WOHLFART P, GOESMANN A, TENNAGELS N, VILCINSKAS A, et al. Antidiabetic profiling of veramycins, polyketides accessible by biosynthesis, chemical synthesis and precursor-directed modification[J]. *Organic Chemistry Frontiers*, 2022, 9(6): 1604-1615.
- [13] BURRENS NS, PREMACHANDRAN U, HOSELTON S, Cwik D, HOCHLOWSKI JE, YE QM, SUNGA GN, KARWOWSKI JP, JACKSON M, WHITTERN DN, MCALPINE JB. Simple aromatics identified with a NFAT-lacZ transcription assay for the detection of immunosuppressants[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1995, 48(5): 380-386.
- [14] YANG FX, HUANG JP, LIU ZX, WANG ZY, YANG J, TANG J, YU ZY, YAN YJ, KAI GY, HUANG SX. Benwamycins A-G, trialkyl-substituted benzene derivatives from a soil-derived *Streptomyces*[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(1): 111-117.
- [15] FLOSS HG, YU TW, ARAKAWA K. The biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA), the precursor of mC7N units in ansamycin and mitomycin antibiotics: a review[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(1): 35-44.
- [16] IWATA F, SATO S, MUKAI T, YAMADA S, TAKEO J, ABE A, OKITA T, KAWAHARA H. Lorneic acids, trialkyl-substituted aromatic acids from a marine-derived actinomycete[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(11): 2046-2048.
- [17] HELALY S, SCHNEIDER K, NACHTIGALL J, VIKINESWARY S, TAN GYA, ZINECKER H, IMHOFF JF, SÜSSMUTH RD, FIEDLER HP. Gombapyrones, new α -pyrone metabolites produced by *Streptomyces griseoruber* Acta 3662[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2009, 62(8): 445-452.
- [18] SUN YH, HE XY, LIANG JD, ZHOU XF, DENG ZX. Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(2): 303-310.
- [19] BLIN K, SHAW S, KLOOSTERMAN AM, CHARLOP-POWERS Z, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [20] ADRIAN T, KEATINGE-CLAY. A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides[J]. *Chemistry & Biology*, 2007, 14(8): 898-908.
- [21] XIE XQ, CANE DE. Stereospecific formation of Z-trisubstituted double bonds by the successive action of ketoreductase and dehydratase domains from *trans*-AT polyketide synthases[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(22): 3126-3129.
- [22] MO S, KIM DH, LEE JH, PARK JW, BASNET DB, BAN YH, YOO YJ, CHEN SW, PARK SR, CHOI EA, KIM E, JIN YY, LEE SK, PARK JY, LIU Y, LEE MO, LEE KS, KIM SJ, KIM D, PARK BC, et al. Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(4): 976-985.
- [23] ZHAI GF, ZHU Y, SUN G, ZHOU F, SUN YN, HONG Z, DONG C, LEADLAY PF, HONG K, DENG ZX, ZHOU FL, SUN YH. Insights into azalomycin F assembly-line contribute to evolution-guided polyketide synthase engineering and identification of intermodular recognition[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 612.
- [24] NIVINA A, YUET KP, HSU J, KHOSLA C. Evolution and diversity of assembly-line polyketide synthases[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(24): 12524-12547.