

## 海洋共附生微生物天然产物生物合成基因研究进展

许静, 徐俊\*

(国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:** 对海洋无脊椎动物天然产物的研究表明, 很多种活性物质的真正生产者是与共共生或附生的未培养微生物。克隆这些未培养微生物中特定活性物质的生物合成基因, 不仅为活性物质的来源提供遗传学证据, 也使通过异源表达相关生物合成基因来大量获取目标化合物成为可能。本文综述了来源于海绵、海鞘、苔藓虫、深海管状蠕虫和深海沉积物中共附生微生物天然产物生物合成基因簇的研究进展。

**关键词:** 海洋共附生微生物; 天然产物; 生物合成基因簇; 宏基因组文库

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0975-05

海洋无脊椎动物能在竞争异常激烈的生境中繁衍生息, 主要依赖于自身拥有的强大化学防御机制。它们产生的大量结构新颖的天然产物因具有独特的生物活性已被大量应用于医药及细胞生物学研究<sup>[1]</sup>, 但直接从海洋无脊椎动物来提取这些化合物存在供应量低、价格昂贵的问题。由于许多海洋天然产物在结构上与微生物天然产物极其相似, 共附生于海洋无脊椎动物的微生物一直被认为是这些化合物真正的生产者。海洋无脊椎动物滋养的共附生微生物平均每种动物达数百种, 其密度高者占宿主动物总重量的 40%, 大都属于难培养的微生物范畴。自 2002 年 Piel 等首次克隆了与甲虫共生的未培养假单胞菌产生的 pederin 生物合成基因簇以来, 在海洋共附生微生物天然产物生物合成基因的研究上已取得了一系列突破<sup>[2, 3]</sup>, 使通过在异源宿主里大量合成这些天然产物加以利用成为可能。本文主要综述海绵、海鞘、苔藓虫这三类常见海洋无脊椎动物及深海极端环境中共附生微生物天然产物生物合成基因方面的研究进展。

### 1 Onnamide 和 pederin 生物合成基因簇

海绵具有丰富的共附生微生物, 涵盖了古细菌、

细菌、蓝细菌、真菌等多个类群<sup>[4]</sup>, 是目前发现活性物质最多的海洋多细胞动物。Onnamide、mycalamide、theopederin 等都是分离自海绵的具有强烈抗肿瘤活性的聚酮类化合物, 推测均由典型的微生物聚酮合酶 (PKS)/非核糖体肽合酶 (NRPS) 杂合基因簇合成。由于海绵基因组包括了其自身组织及其附生的几百种细菌的基因组信息, 直接从海绵宏基因组文库中分离相关产物生物合成基因簇十分困难。该类化合物因与陆生毒隐翅虫 (*Paederus fuscipes*) 毒素 pederin 的结构类似而被称为 pederin 家族。大量实验表明 pederin 是由甲虫共生假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 产生<sup>[5]</sup>, 且该共生菌在甲虫虫卵中以相对纯净的形式存在, 使基于 PKS 基因的相似性来克隆 pederin 生物合成基因簇首先获得成功<sup>[6]</sup>。以此为基础, Piel 等对 *Theonella swinhoei* 海绵宏基因组文库进行 PCR 筛选, 从包含 60000 个克隆的庞大文库中获得了 1 个包含 onnamide 生物合成基因簇的阳性克隆。对上述 PKS/NRPS 基因簇的序列分析结果揭示了一类新颖的 PKS 基因簇排列方式, 同时也是首例报道的海绵共生菌的抗生素生物合成基因簇<sup>[7]</sup>。

两类基因簇所在区域的 GC 含量特征、其内部基

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目(2005J063); 国家自然科学基金(40606031); 国家“973 项目”(2006CB708200)

\*通讯作者: Tel: +86-592-2195833; Fax: +86-592-2085376; E-mail: xu.junn@gmail.com

作者简介: 许静(1982-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物学及分子生物学研究。E-mail: xvjv@163.com

收稿日期: 2008-01-29; 修回日期: 2008-04-18

因都缺乏内含子和多腺苷化位点且前端存在有 Shine-Dalgarno 序列等特征都表明这些基因来源于原核生物。Onnamide 的生物合成基因簇 *onn* 和 Pederin 生物合成基因簇 *ped* 中 7 个 ORF 的蛋白同源性高达 64%~81%。两个基因簇中主要聚酮合酶 PedI 和 PedF 与 OnnB 和 OnnI 不仅在基因排列上惊人的相互对应, 且与可能合成的抗肿瘤活性化合物的分子结构也完全对应<sup>[7]</sup>。值得注意的是, onnamide 的生物合成基因 *onn* 都成簇排列, 而 pederin 生物合成基因则分布在不连续的两个基因岛上。从 *ped* 基因包含有的 IS 原件来推测, 两个 *ped* 基因岛区域本是属于同一个合成的途径的, 它们只是在基因水平转移过程中因重组被分离开了<sup>[8]</sup>。

这两类基因簇中的 PKS 均为 *tran*-AT 类型, 即 PKS 酶系的模块缺乏在每个链延伸步骤中选择聚酮化合物延伸单位的 AT 结构域, 而游离于核心 PKS 基因簇外的 AT 通过反式作用行使其功能<sup>[9]</sup>。此外, 对这两例基因簇的 PKS 序列精细分析还显示, 通过构建系统发育树, 不仅可以把细菌的型 PKS 聚为 *tran*-AT 和 *cis*-AT 两大类, 而且还可以根据各类型 PKS 的亲缘关系, 特异性寻找与活性天然产物相关的 PKS 基因簇<sup>[10]</sup>。

## 2 Bryostatins 生物合成基因簇

Bryostatins 是一类分离自苔藓虫 *Bugula neritina* 的带有 3 个吡喃环的 25 元大环内酯化合物, 具有抑制多种肿瘤细胞的活性, 已进入临床前期研究。最近的研究结果表明, 这类化合物其实是由 *B. neritina* 的共生细菌 *Endobugula sertula* 产生<sup>[11]</sup>。Sudek 等构建了两个不同地域苔藓虫的富含“*E. sertula*”菌基因组的总 DNA 文库, 通过锚定 KS 结构域保守区的引物筛选、序列分析和拼接, 获得了全长约为 80kb 的 bryostatin 生物合成基因簇<sup>[12, 13]</sup>。

*bry* 基因簇由两部分组成: 71 kb 编码 5 个聚酮合酶的 PKS 基因和 6kb 编码 4 个其它附属功能蛋白的基因。根据序列推测, *bryA* 包含的 PKS 模块可能负责 bryostatin 生物合成的起始工作, *bryB* 和 *bryC* 分别包含 4 个 PKS 模块负责链的延伸, *bryD* 和 *bryX* 分别含有 2 个 PKS 模块及硫酯酶, 负责完成链延伸的最后步骤和环化释放过程。*bry* 基因簇中 PKS 基因的显著特点包括所有模块都不含有完整的 AT 结构域、含有 3 个 2.3~3.5 kb 的重复区<sup>[13]</sup>。迄今为止, PKS 基

因中存在大段的重复序列非常罕见。这些重复区段可能可以促进基因间的交换, 为 PKS 模块重排提供了条件。

与整个 *bry* 基因最匹配的是 *Bacillus subtilis* 的 *pksM* 基因, 以及上述甲虫共生菌的 *ped* 基因。*bry* 基因与 pederin/onnamide 合成基因簇的诸多相似之处包括: 都含有甲基转移酶 MT、离散的 AT 结构域和 HMG-CoA 合成酶 (onnamide 合成基因簇中) 它们都拥有一个可以通过 Michael 加成反应合成四氢吡喃环的结构域。

更为有趣的是, 在来源于浅海区的苔藓虫“*E. sertula*”文库中, 上述附属功能基因在 PKS 基因簇上游线性排列, 而在来源于深海区苔藓虫“*E. sertula*”文库中 PKS 基因簇上游和相关附属功能基因下游都发现有转座酶基因, 且二者非紧密连锁 (相隔 5~30 kb)<sup>[13]</sup>。在 pederin/onnamide 合成基因簇的对比研究中也发现了类似的现象, *onn* 基因是成簇存在, 而与之相关的 *ped* 基因却分三段排列在基因组中, 被类似转座子的基因分隔开来。Sudek 等推测位于浅海区“*E. sertula*”文库中排列在一起的 *bry* 基因是进化上更原始的状态。因为共附生的生活方式会导致基因的退化, 故“*E. sertula*”严格的共附生生活方式也许导致了其 bryostatin 生物合成基因的片断化<sup>[14]</sup>。

## 3 Patellamides 生物合成基因簇

Patellamides 是由海鞘 *Lissoclinum patella* 中难培养的共生蓝细菌 *Prochloron didemni* 产生的一种环肽类化合物, 在临床上表现较好的细胞毒性。Patellamides 是典型的假对称环状二聚体, 每个结构单体都包含一个噻唑-非极性氨基酸-咪啉-极性氨基酸序列, 推测这样的特征性结构应该是通过核糖体或非核糖体途径合成再环化或杂环化后得到的。

Schmidt 等通过对 *P. didemni* 全基因组序列的分析发现了负责 patellamides 生物合成的核糖体多肽合成基因簇, 对该基因簇的序列分析表明其包含 7 个可能与环肽 patellamide A 合成相关的基因<sup>[15]</sup>。*patE* 基因编码的 71 个氨基酸序列中含有前导肽段、两条分别与 patellamides A 和 C 序列相同的寡肽序列及其它氨基酸残基, 该肽链在其后的加工过程中被切割和环化形成终产物。在 *patE* 两侧约 11 kb 的区段上分布有与 patellamides 翻译后修饰相关的其它基因 *patA-patG*。*patA* 可能编码一种与前导肽特异性切割有关的

蛋白酶。PatD 包括有腺苷化酶和水解酶活性的保守结构域,可能具有以下两个功能:催化 *patE* 合成的肽链中半胱氨酸和苏氨酸残基环化形成噻唑环和咪啉环;作为腺苷化酶催化前体肽链断裂,为后期环化成 *patellamide* 的最终结构做好准备。*patG* 编码氧化还原酶-蛋白酶混合酶,可能与前体肽链的氧化和成熟有关。PatB、PatC 和 PatF 与其它已知功能的蛋白序列的相似性都很低,在 *patellamide* 合成中的作用还不清楚。

与此同时,Marcel 等从 *P.didemni* 的宏基因组文库中仅找到了一个非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因,但被证明与 *patellamides* 的合成无关。随后其在构建的 *P.didemni* 全基因组 BAC 文库中,通过 LC-MS 联用对克隆培养物的化合物指纹图谱进行分析,才获得了完整的 *patellamides* 生物合成基因簇。由于该基因簇只略大于 30 kb,因此在大肠杆菌宿主中实现了该基因簇的异源表达<sup>[16]</sup>。

## 4 国内相关研究进展

国内对于海洋共附生微生物天然产物合成基因簇的研究多集中在共附生微生物含量丰富的海绵上。李志勇等人采用传统分离培养手段和 DGGE 等分子生态学技术对我国南海的多种海绵共附生微生物进行了研究<sup>[17, 18]</sup>。利用聚酮合酶基因为探针,从两类海绵共附生菌及海绵宏基因组文库中获得了 *tran-AT* 型的 PKS 基因和编码抗菌肽的功能基因<sup>[19, 20]</sup>。

深海极端环境微生物代谢途径的多样性是近年来的研究热点,它们产生的特殊代谢产物与其化学防御、信号传导、共生互养等生命过程密切相关。王鑫等<sup>[21]</sup>构建了深海热液口管状蠕虫 *Ridgeia piscesae* 滋养体中共生的  $\gamma$ -*proteobacteria* 基因组黏粒文库,研究了该共生菌的主要碳固定途径,克隆了该菌中对抗多种重金属毒性的功能基因簇,试图发现管状蠕虫共生菌的解毒基因。笔者所在的研究组从东太平洋深海沉积物样品构建的环境 DNA 宏基因组文库中,用针对聚酮类抗生素生物合成基因序列的特异引物成功分离到 31 kb 连续的 PKS/NRPS 杂合基因簇。序列比对分析结果表明该序列上游有一段可以在大肠杆菌、假单胞菌和链霉菌中均可转录的启动子序列,共包含 4 个开放阅读框,且为同一转录元。值得一提的是,该基因簇中共有 8 kb 的 PKS 序列和 21.5 kb 的 NRPS 序列与上述海绵共生细菌中负责 *onnamides* 生物合成的

聚酮合酶的蛋白序列相似性达 56%,且各模块的排列方式也十分类似,因此推测该基因簇可能来源于深海沉积物环境中的未培养微生物的活性物质生物合成基因簇。

## 5 展望

综上所述,海洋共附生微生物天然产物生物合成基因簇的研究多集中于海绵、海鞘、苔藓虫这三大类生物中,对深海极端生命体系中共附生微生物的相关研究则刚刚起步。这些天然产物合成基因簇的克隆和解析为共附生微生物才是海洋天然产物的真正产生者的论断提供了确凿的证据。

本文列举的这几类生物合成基因簇都是依据于与被研究的最深入的抗生素生物合成基因,如 PKS 或 NRPS 的模块化功能结构域中保守序列的相似性,从包含多种共生微生物的宿主或海洋环境宏基因组文库中筛选获得的。由于宏基因组文库的复杂性,能否从共生菌种类相对单一的组织中,譬如甲虫虫卵及深海管状蠕虫的滋养体等,提取 DNA 构建大库容的宏基因组文库是关键所在。此外,对文库的筛选,除了依赖于生物信息学的分析,还可以直接从活性追踪入手,通过比较克隆子代谢产物的化学指纹图谱来进行。

从宏基因组文库中获得的天然产物生物合成基因簇往往是不完整的。对来源于深海等极端环境宏基因组的克隆,冀望通过染色体步移来找到已知基因簇的侧翼序列几乎是不可想象的。通过组合生物合成,把这些珍稀的生物合成基因片段杂合到其它相似的基因簇中,获取新的化合物可能是唯一的解决方案。由于共生微生物的难培养性,对其天然产物生物合成基因簇加以利用必须借助于异源表达体系。在构建文库时就应该考虑使用可在链霉菌、假单胞菌和大肠杆菌等不同宿主体系中穿梭的大容量 BAC 载体<sup>[22]</sup>。对已经构建在常规载体上的较小基因簇,可以通过更换载体,如 Li 等<sup>[23]</sup>把 34.2 kb 的 *griseorhodin* 基因簇通过包装体系重新克隆,最终整合到链霉菌宿主染色体实现了异源表达。对分散在若干个重叠克隆中的巨大基因簇,必须对动辄近百 kb 的 DNA 片段进行拼接。应用 Red/ET 系统介导的高效同源重组,已经使来源于难操作或难培养的微生物的生物合成基因簇在链霉菌或假单胞菌中实现了异源表达<sup>[24, 25]</sup>。有鉴于此,海洋共附生微生物天然产物生物合成基因簇的充分利用也就可以期待了。

## 参 考 文 献

- [1] Newman D J, Cragg GM. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J Nat Prod*, 2004, 67(8): 1216–1238.
- [2] Schmidt EW. From chemical structure to environmental biosynthetic pathways: navigating marine invertebrate–bacteria associations. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(9): 437–440.
- [3] Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, 2004, 21(4): 519–538.
- [4] Hentschel U, Hopke J, Horn M, et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4431–4440.
- [5] Kellner RL. Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaeus*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(4): 389–395.
- [6] Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(22): 14002–14007.
- [7] Piel J, Hui D, Wen G, et al. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(46): 16222–16227.
- [8] Piel J, Hui D, Fusetani N, et al. Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ Microbiol*, 2004, 6(9): 921–927.
- [9] Piel J, Wen G, Platzter M, et al. Unprecedented diversity of catalytic domains in the first four modules of the putative pederin polyketide synthase. *Chem Biol*, 2004, 5(1): 93–98.
- [10] Fieseler L, Hentschel U, Grozdanov L, et al. Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(7): 2144–2155.
- [11] Grace EL, Margo GH. “*Candidatus Endobugula glebosa*”, a specific bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula simplex*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(8): 4921–4929.
- [12] Hildebrand M, Waggoner L, Liu H, et al. *bryA*: An unusual modular polyketide synthase gene from the uncultivated bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *Chem Biol*, 2004, 11(11): 1543–1552.
- [13] Sudek S, Lopanik NB, Waggoner LE, et al. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from “*Candidatus Endobugula sertula*”, the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod*, 2007, 70: 67–74.
- [14] Moran NA. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell*, 2002, 108(5): 583–586.
- [15] Schmidt EW, Nelson JT, Rasko DA, et al. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(20): 7315–7320.
- [16] Long PF, Dunlap WC, Battershill CN, et al. Shotgun cloning and heterologous expression of the Patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. *Chem Bio Chem*, 2005, 6(10): 1760–1765.
- [17] 孟庆鹏,李志勇,缪晓玲. 可培养海绵共附生微生物的 PKS 基因筛选. *微生物学通报(Microbiology)*, 2007, 34(3): 464–467.
- [18] 何丽明,李志勇,吴杰,等. 基于 PCR-DGGE 指纹的南海海绵共附生细菌优势种群的揭示与系统发育分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(3): 487–491.
- [19] 张成升,李志勇,缪晓玲. 基于皱皮软海绵宏基因组的 PKS 基因筛选的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(3): 526–528.
- [20] 吴杰,李志勇,张成升. 海绵宏基因组文库构建及抗菌肽功能基因的初步筛选. *生物技术通报(Biotechnology Bulletin)* 2006, 3: 95–103.
- [21] 王鑫. 深海热液口管状蠕虫 *Ridgeia piscesae* 共生微生物的鉴定及代谢机制的初步研究. 国家海洋局第三海洋研究所硕士学位论文, 2007.
- [22] Martinez A, Kolvek SJ, Yip CL, et al. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(4): 2452–2463.
- [23] Li A, Piel J. A gene cluster from a marine streptomyces encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chem Biol*, 2002, 9(9): 1017–1026.
- [24] Wenzel SC, Gross F, Zhang Y, et al. Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in *pseudomonads* via Red/ET recombineering. *Chem Biol*, 2005, 12(3): 349–356.
- [25] Wenzel SC, Muller R. Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(6): 594–606.

## Advances on biosynthetic gene clusters of natural product from marine symbiotic microbe——A review

Jing Xu, Jun Xu\*

(Key Laboratory of Marine Genetic Resources, the Third Institute of Oceanography,  
State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Previous research has suggested that the true producers of numerous natural products isolated from marine invertebrates were the microbial epibiont and symbiont which are deemed as not-yet-cultivated microbe. Cloning of the biosynthetic genes responsible for a specific nature product not only provides direct genetic evidence of the origin of the compounds but also establishes the feasibility of mass production of the compounds by heterologous expression. This paper reviews the progresses on the biosynthetic gene clusters of nature products from the symbiotic bacteria including marine sponge, ascidian, bryozoan, deep-sea tube worm and deep-sea sediments.

**Keywords:** marine symbiotic microbe; natural product; biosynthetic gene clusters; metagenomic library

Supported by the Innovation Foundation for Young Scholars of Fujian, China(2005J063), the National Natural Science Foundation of China (40606031) and the National Basic Research Program of China (2006CB708200)

\*Corresponding author. Tel: +86-592-2195833; Fax: +86-592-2085376; E-mail: xu.junn@gmail.com

Received: 29 January 2008/ Revised: 18 April 2008

### 科学出版社科学出版中心生物分社新书推介(2008-05)

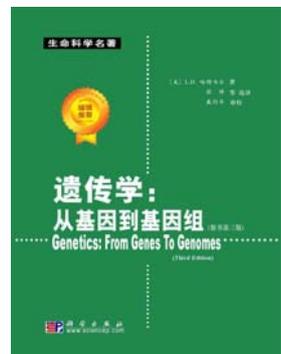
遗传学：从基因到基因组(原书第三版)(配彩图光盘)

【美】L.H. 哈特韦尔 著；张博 等选译；戴灼华 审校

978-7-03-021375-4 ¥138.00 2008年5月30日出版

本书试图集成当代遗传学知识和方法，内容主要包括：形式遗传学——基因传递规律；分子遗传学——DNA 结构及其如何指导蛋白质合成；基因组学——基因分离新技术和有机体完整基因组深入分析；人类遗传学——基因如何调控健康和疾病状态；生命形成的统一——来自不同有机体的信息合成为一个整体内核；分子进化——物种如何进化和趋异。

本书适用于高等院校生命科学、遗传学、分子生物学等专业的教师和学生使用，并可供相关专业研究人员阅读参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编：100717

联系人：周文字 联系电话：010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目