

药用真菌竹黄主要活性成分的异源生物合成

张亚龙^{1#}, 张乐^{1#}, 高洁¹, 柏健¹, 闫道江¹, 张元元², 胡友财^{1*}

- (1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;
2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 竹黄是我国一种重要的药用真菌资源, 其主要活性成分竹红菌素类化合物已作为天然光敏剂广泛应用于食品、医药、农药等领域, 其中竹红菌素软膏已用于临床。然而作为一种珍稀易危的物种, 野生竹黄的资源非常有限。而竹红菌素结构复杂化学合成成本高, 因此亟待一种有效的方法在保护竹黄野生资源的同时合理利用其药用价值。本文即采用合成生物学技术来获取竹黄中的主要活性成分, 以期摆脱对野生资源的依赖。通过对竹黄菌 *Shiraia* sp. cfcc 84681 的全基因组进行细致的生物信息学分析, 从中挖掘到一条竹红菌素生物合成的候选基因簇 *hpc*; 并成功构建了该基因簇的异源表达系统, 获得一株产竹红菌素类化合物的重组菌株。该菌株主要产竹红菌甲素和异竹红菌甲素, 这与野生竹黄提取物的主要成分基本一致。本研究有望为解决野生竹黄的资源短缺问题提供一种新的有效途径。

关键词: 药用真菌; 竹黄; 竹红菌素; 异源生物合成; 合成生物学

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)07-1691-08

Hetero-biosynthesis of the main bioactive components from medicinal fungus *Shiraia bambusicola*

ZHANG Ya-long^{1#}, ZHANG Le^{1#}, GAO Jie¹, BAI Jian¹, YAN Dao-jiang¹,
ZHANG Yuan-yuan², HU You-cai^{1*}

- (1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: *Shiraia bambusicola* is an important medicinal fungus in China. Hypocrellins with perylenequinone skeleton are main bioactive components of *Shiraia bambusicola*, which are widely used in food, medicine, pesticide and other fields as natural photosensitizers. For example, "hypocrellin ointment" has already been used clinically. As a rare and vulnerable species, wild *Shiraia bambusicola* resources are very limited. Due to the complex structure and challenge in chemical total synthesis of hypocrellins, it is urgent to find an effective strategy to rationally utilize its medicinal value while protecting the wild resources. In this study, a candidate gene cluster *hpc* was identified in *Shiraia* sp. cfcc 84681 based on careful bioinformatic analysis. A heterologous expression system for *hpc* gene cluster was successfully constructed and a mutant strain with high yield of hypocrellins was obtained, which mainly produced hypocrellin A and isohypocrellin A. The main ingredients in the mutant strain are consistent with that in the wild *Shiraia bambusicola*. These results provide a new strategy to solve the shortage of wild *Shiraia bambusicola* resources.

收稿日期: 2020-05-08; 修回日期: 2020-06-06.

基金项目: 科技部“重大新药创制”科技重大专项 (2018ZX09711001-008-001); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2017-I2M-4-004).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: huyoucai@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0698

Key words: medicinal fungus; *Shiraia bambusicola*; hypocrellin; hetero-biosynthesis; synthetic biology

药用真菌竹黄是我国一种重要的中药资源,为肉座科真菌 *Shiraia bambusicola* 的子座。竹黄具有化痰止咳、活血祛风、补中益气的功效^[1]。据《本草纲目》记载,竹黄可用于治疗小儿惊风等症。此外竹黄民间常用于治疗气管炎、百日咳、跌打损伤、坐骨神经痛等^[2],亦可浸泡于黄酒或米酒中用于治疗关节炎。鉴于竹黄的广泛功能,每到竹黄采摘季节都有很多客商贩卖竹黄。竹黄菌是一种寄生真菌,需寄生在刚竹属、短穗竹属的竹竿上,其多生长在将衰败或已衰败的竹林中,并受季节、地域环境、寄主等多种因素的严格限制^[3]。竹黄菌在阴凉潮湿的环境中产量较高,干燥向阳环境则产率极低,并且每年三月开始萌发,五六月份才开始成熟,采摘周期短,加之环境的逐年恶化,这些都导致了竹黄的野生资源非常有限,极大地限制了竹黄资源的开发利用^[4]。在生态环境部和中国科学院发布的《中国生物多样性红色名录—大型真菌卷》中,竹黄已被认定为易危物种。易危类物种代表在过去10年或三代内该物种减少比例大于50%。如果野生竹黄资源长期被过度开采并得不到有效的保护,这类资源有可能濒临灭绝。竹黄之所以被广泛应用得益于其显著的药用价值,现代药理学表明竹红菌素是竹黄的主要活性成分,是一类最早发现于竹红菌子座中的多种萘醌类衍生物的混合物,也是我国最早发现的一种新型优良光敏剂,广泛应用于临床治疗胃病、风湿性关节炎和皮肤病^[5-7]。此外,该类化合物在光照时表现出抗肿瘤、抗病毒、抗微生物等活性^[8,9]。目前竹红菌素软膏等已作为药品临床用于治疗外阴白色病变、外阴瘙痒等。竹红菌素主要包括竹红菌甲素(hypocrellin A, HA)、竹红菌乙素(hypocrellin B, HB)、痈囊腔菌素A(elsinochrome A)和尾孢菌素(cercosporin)等(图1)^[10,11]。鉴于该类萘醌类化合物的重要价值,国内外研究者对其产量优化、分离纯化、化学合成等领域进行了多项研究。竹红菌素类化合物的获取单纯依靠传统的提取分离受到野生资源的极大限制,而采用化学合成的方法对竹红菌甲素进行全合成需要19步,产率仅为1.6%^[12-14]。合成生物学的快速发展已在医药、能源等诸多领域取得举世瞩目成果,如抗癌药物青蒿素的生物合成等^[15,16]。合成生物学有望成为有效保护和合理利用珍稀濒危野生药用资源的现代化途径。江南大学的研究学者对竹黄菌中竹红菌素的形成进行了研究,阐明了竹黄抵御外界环境的抗氧化系统,建立了玉米糝固态发酵法产竹红菌素的方法并对发酵条件进行了优化和放大以提高竹

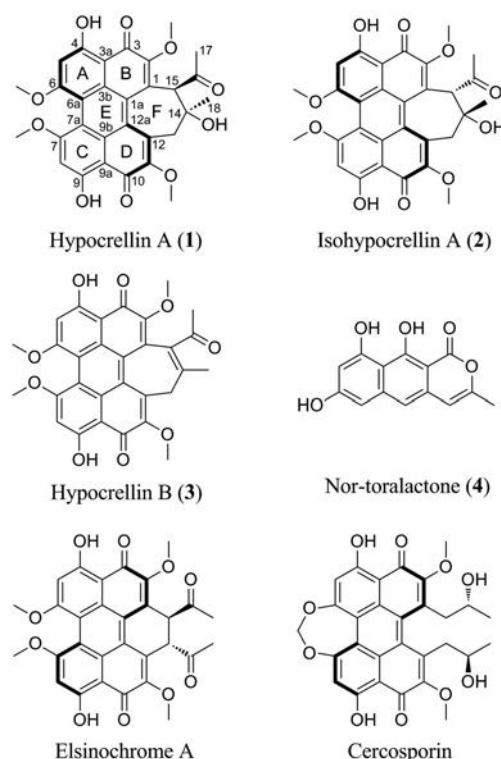


Figure 1 Representative perylenequinone compounds and the compounds identified in this study (1–4)

红菌素的产量,但这离工业化生产仍然存在差距^[17-20]。随着大量真菌基因组测序的完成,来自于烟草尾孢菌(*Cercospora nicotiae*)的 *ctb* 基因簇、竹黄菌(*Shiraia* sp. strain Slf14)的 *hyp* 基因簇、小麦病原菌(wheat pathogen *Parastagonospora nodorum*)的 *elc* 基因簇被推测可能参与不同类型的萘醌类化合物的生物合成^[21-24]。其中,澳大利亚学者Chooi通过丝状真菌异源表达体系证实了来源于小麦病原菌的 *elc* 基因簇中聚酮合酶PKS、具有甲基转移酶和FAD依赖氧化酶活性的双功能蛋白MT-FAD、甲基转移酶MT、漆酶Laccase、FAD依赖的氧化酶、黄素依赖的单加氧酶FMO等共同催化痈囊腔菌素A(elsinochrome A)等的生物合成^[25]。这些研究为采用合成生物学技术解决野生竹黄资源短缺问题奠定了基础。为获得高产竹红菌素类化合物的重组菌株,本研究从竹黄菌 *Shiraia* sp. cfcc 84681 (该菌株在实验室发酵条件下未产竹红菌素类化合物)中挖掘到一个可能产竹红菌素及其类似物的候选基因簇 *hpc*,成功构建了 *hpc* 基因簇异源表达系统,并获得一株该类化合物的高产重组菌株,所得产物的成分与野生竹黄提取物主要成分基本一致。本项研究不但为保护竹

黄野生资源奠定基础,也为通过合成生物学技术有效保护和合理利用珍稀野生药用资源提供借鉴模式。

材料与amp;方法

菌株、培养基等实验材料和培养条件 竹黄菌 *Shiraia* sp. cfcc 84681 来源于中国林业微生物菌种保藏管理中心。全基因组测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。竹黄菌采用土豆培养基 (PDA) 在 28 °C 进行培养用以传代,并用于提取基因组 DNA。构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 菌株用于异源表达操作,使用产孢培养基 (CD 培养基) 在 37 °C 进行培养用以传代;用于异源表达的突变株换用发酵培养基 (CD-ST 培养基, CD 培养基中的葡萄糖被淀粉替代) 进行发酵 (28 °C)。酵母菌株 Y31 用于重组质粒的构建,在 30 °C 条件下接种到相应缺陷的培养基 (SD-Ura minus)。 *Escherichia coli* DH10B 用于常规的基因克隆;大肠杆菌均用常规 LB、SOC 培养基培养,培养温度为 37 °C,根据需要加入 100 μg·mL⁻¹ 氨苄青霉素对菌株进行抗性筛选。用于原生质体制备的缓冲液有 Osmotic 缓冲液、trapping 缓冲液和 STC 培养基。Osmotic 缓冲液配方: 1.2 mol·L⁻¹ MgSO₄, 10 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液, pH 调到 5.8。Trapping 缓冲液配方: 0.6 mol·L⁻¹ Sorbitol, 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.0。STC 缓冲液配方: 1.2 mol·L⁻¹ Sorbitol, 10 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5。以上缓冲液均需过滤除菌并在 4 °C 条件下保存。野生竹黄药材购自安国药材市场。

引物 本文所用的 PCR 扩增引物见表 1。

主要试剂 高保真 DNA 聚合酶 Q5 High-Fidelity DNA Polymerase、限制性内切酶购自美国 New England

Biolabs 公司,酵母质粒提取试剂盒 Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep Kit 来自美国 Zymo Research 生物科技公司, DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒均来自 Axygen 公司;裂解酶 lysig 酶和 yatalase 酶分别购自 Sigma 公司和 Takara 公司;色谱甲醇、色谱乙腈购自美国 Fisher 公司;分析色谱柱 (ACQUITY UPLC® BEH, 1.7 μm, 2.1 mm×50 mm, C18 column) 来自美国 Waters 公司; Silgreen ODS 半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm) 购自北京绿百草科技发展有限公司。实验室所用的各种引物由南京金斯瑞生物科技公司合成, DNA 测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。

DNA 基本操作 分子生物学常规操作参照分子克隆实验指南。

三元穿梭质粒的构建 利用酵母重组的策略构建 *glaA*、*gpdA*、*amyB* 不同强启动子启动的三元穿梭质粒,将母核基因 *hpcA* 构建在含有 *glaA* 启动子的 PANU 载体上,即质粒 PANU-*hpcA*(PKS);构建过程如下:以基因组 DNA 为模板,用设计的带有至少 30 bp 重叠区的 3 对引物 PKS-1-F/PKS-1-R、PKS-2-F/PKS-2-R、PKS-3-F/PKS-3-R 分 3 段扩增 *hpcA* 目的片段,将这 3 段片段和用限制性内切酶 *NotI* 酶切线性化的 PANU 载体在酵母感受态中重组,将筛选到的酵母阳性转化子转到大肠杆菌超级感受态。筛选阳性转化子并提取质粒。按照上述方法将基因 *hpcB* 和 *hpcC* 构建在载体 PANR 上,构建过程如下:分别用 3 对引物 MTFAD-F/MTFAD-R、*glaA*-F/*glaA*-R 和 MT-F/MT-R 扩增 *hpcB* 和 *hpcC* 和启动子 *glaA*,将这 3 段片段和用限制性内切酶 *BamHI* 线性化载体 PANR (带有 *gpdA* 启动子) 在酵母感受态中重组。按照上述方法构建质粒 PANP-*hpcD*(FAD)-*hpcF*(Lac),

Table 1 Primers for PCR

Gene	Primer sequences (5' to 3')
PKS-1-F	CTGAGCTTCATCCCCAGCATCATTACACCTCAGCAATGGCGGAACCCATCAAGGTTTTTC
PKS-1-R	CAATGCGGTGGTATTGTCGAATTC
PKS-2-F	GGTCCTTTTGATGCTGAAGAATTCG
PKS-2-R	CCATTCATGACAAAACCTCCTAG
PKS-3-F	TTGACGCTCTCTCAGCTAGGAG
PKS-3-R	GTGGAGGACATACCCGTAATTTTCTGGGCATTTAAATTTAGGTGACAGCGAGTGGACTG
MTFAD-F	TAACCATTACCCCGCCACATAGACACATCTAAACAATGGCTACGTTAACCTCCTTTAGC
MTFAD-R	ACCAGTTCGGAAGATCAGGGTTTAAACCGCGCCGCTGAGATTTGAGGTCGGCGAATTG
MT-F	CCTGAGCTTCATCCCCAGCATCATTACACCTCAGCAATGTCTCTATTCCAACCTACTGC
MT-R	AAAGGGTATCATCGAAAGGGAGTCATCAATTTAAATAAGCAGCAGGAGAGTGGATAGG
FAD-F	TTCTCTGAACAATAAACCCACAGAAGGCATTTATGTTTGTGCGAGAATTTACCCCAATG
FAD-R	ATCAATTCACCGAGTGGAAGTGCATCATGCGGCTATG
LAC-F	TAACCATTACCCCGCCACATAGACACATCTAAACAATGGCGTGTAATGTTTTCAAGGTC
LAC-R	TGAGACCCAACAACCATGATACCAGGGGATTTAAATCCAAGAACAACCAATAGAAAGTGC
<i>glaA</i> -F	GCGGCCGCGTTTTAAACCCTGATCTTCCGAACCTGGTCTGATC
<i>glaA</i> -R	TGCTGAGGTGTAATGATGCTGG
<i>gpdA</i> -F	AGAAGCATAATAGCCCATGTGATCGACTTTCCACTCCGGTGAATTGATTTGGGTG
<i>gpdA</i> -R	TGTTTAGATGTGTCTATGTGGCGG

将用3对引物FAD-F/FAD-R、LAC-F/LAC-R和gpdA-F/gpdA-R扩增得到的基因片段hpcD、hpcF、启动子gpdA和BamHI酶切线性化的载体PANP(带有AmyB启动子)在酵母细胞中重组。将以上得到的3个质粒PANU-hpcA(PKS)、PANR-hpcB(MTFAD)-hpcC(MT)和PANP-hpcD(FAD)-hpcF(Lac)的阳性转化子送测序验证。3个质粒的质粒图谱如图2所示。

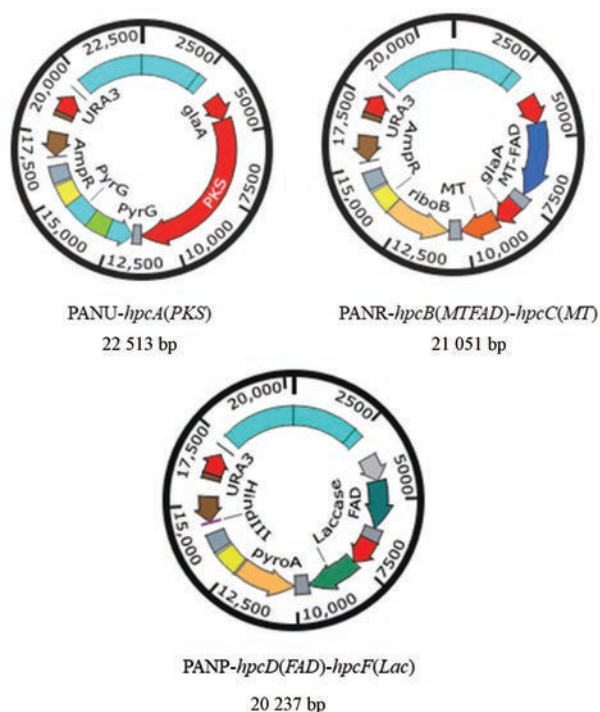


Figure 2 The plasmid maps

相关菌株的发酵与代谢产物的分析 将以下质粒组合导入模式真菌构巢霉中,获得包含不同基因组合的构巢霉异源表达菌株。相应组合如下所示:重组菌株hpcA:包含单独的聚酮合酶基因的质粒PANU-hpcA(PKS);重组菌株hpcABCDEF:包含质粒PANU-hpcA(PKS)、PANR-hpcB(MTFAD)-hpcC(MT)和PANP-hpcD(FAD)-hpcF(Lac)。利用相应的营养缺陷型培养基uracil (pyrG), pyridoxine (pyroA)和riboflavin (riboB)筛选阳性转化子,即得到异源表达菌株。此外,将空质粒PANU、PANR、PANP转入构巢霉宿主细胞中,作为空白对照组。

将不同组合的阳性转化子接种到固体发酵培养基CD-ST中,28℃条件下培养5天然后用乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯层离心浓缩后用100 μL甲醇复溶,13 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液经0.22 μm滤膜过滤,滤液用于超高效液相色谱-串联单四极杆质谱(UPLC-MS)检测。液质联用仪为Waters ACQUITY UPLC H-Class超高效液相色谱-QDa质谱(美国Waters公司)。流动

相A相为乙腈(v/v,0.02%甲酸),B相为0.02%(v/v)甲酸水溶液。采用梯度洗脱的方法,即A相在8 min内由5%(v/v)线性递增至99%(v/v),流速为0.4 mL·min⁻¹,柱温25℃,检测波长为200~800 nm。色谱柱为ACQUITY UPLC® BEH,1.7 μm,2.1 mm×50 mm,C18柱,检测器为光电二极管阵列检测器(PDA)和单四极杆质谱检测器(QDa)。质谱检测条件:采用电喷雾离子源,正负离子交替扫描模式,探针温度:600℃,源温度:120℃,毛细管电压:0.8 kV,锥孔电压:15 V,采样速率:每秒10点。发酵产物的NMR谱由中国医学科学院药物研究所分析测试中心完成(Bruker AVIII-600核磁共振检测仪)。圆二色谱(甲醇溶解)使用JASCO 815圆二色谱仪测定。

中药竹黄及异源表达发酵产物的提取与检测 取干燥竹黄药材50 g,将其碎成粉末,加入甲醇超声提取3次,合并提取液并浓缩;取适量竹黄药材提取物溶于200 μL甲醇中,然后经13 000 r·min⁻¹离心10 min。上清液经0.22 μm滤膜过滤后用于UPLC-MS检测,检测条件同异源表达产物检测条件。

将重组菌株*A. nidulans* (hpcA)的孢子接种到1 L固体CD-ST培养基上,在28℃条件下培养9天。经乙酸乙酯超声提取3次,得粗提物500 mg。粗提物经中压(洗脱条件为20%乙腈-水梯度升至100%乙腈)富集后,再经半制备纯化(流动性条件为含0.06%甲酸的60%甲醇-水)得到化合物4(5 mg)。将重组菌株*A. nidulans* (hpcABCDEF)的孢子接种到4 L固体CD-ST培养基上,在28℃条件下培养8天。经乙酸乙酯超声提取3次,得粗提物4 g。粗提物经中压(洗脱条件为20%乙腈-水梯度升至100%乙腈)富集后,得到含目标产物的粗样品I(45 mg)和粗样品II(40 mg)。粗样品I和II分别再经半制备液相色谱纯化(流动性条件均为56%乙腈-水),分别得到化合物2(7 mg)和化合物1(6.8 mg)。

结果与讨论

1 竹红菌素类生物合成基因簇分析及合成途径推测

为寻找野生竹黄的可替代资源,积累高产竹红菌素类化合物菌株的基因资源,一株竹黄菌*Shiraia* sp. cfcc 84681的全基因组中挖掘到一个可能产竹红菌素类萜醌类化合物的基因簇hpc。如图3所示,该基因簇分布在两个Scaffold中,它们之间用黑色虚线区分。采用生物信息学的方法对该基因簇进行分析,发现该基因簇与elc基因簇高度相似,包括可编码竹红菌素类化合物生物合成所需的5个关键酶,即聚酮合酶HpcA(PKS)、兼具甲基转移酶和FAD依赖性单加氧酶双结

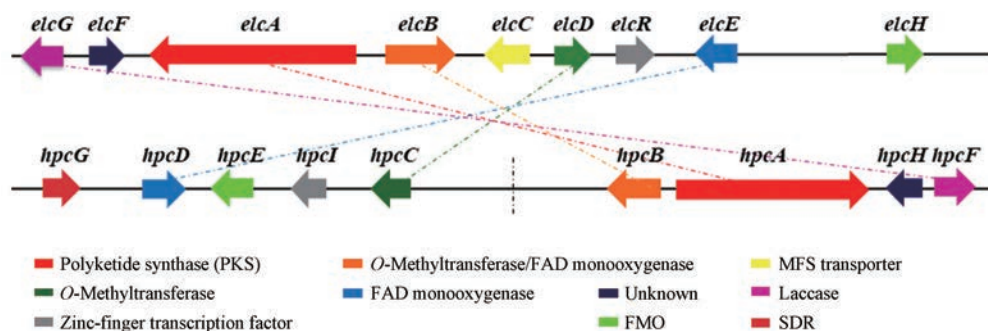


Figure 3 Comparative analysis of gene cluster *hpc* and *etc*

构域的双功能酶 HpcB (MTFAD)、甲基转移酶 HpcC (MT)、FAD 依赖性氧化还原酶 HpcD (FAD) 和漆酶 HpcF (Lac), 说明 *hpc* 基因簇可能负责该类化合物的生物合成。此外, 该基因簇还包含黄素单加氧酶 HpcE (FMO)、短链脱氢/还原酶 HpcG (SDR)、未知功能蛋白 HpcH 和锌指转录因子 HpcI (zinc-finger transcription factor)。

根据竹红菌素类化合物的结构特点以及上述基因簇组成, 推测其生物合成途径如图 4: 在聚酮合酶 HpcA 作用下合成单体化合物 **i**, 之后在双功能酶 HpcB 作用下发生甲基化和开环, 然后在甲基转移酶 HpcC 作用下生成中间体 **ii**; 在 FAD 依赖性氧化酶 HpcD 和漆酶 HpcF 共同作用下, **ii** 发生二聚化, 并经自发的羟醛缩合生成竹红菌素类化合物。根据上述推测, 可以先异源表达聚酮合酶 HpcA 来验证该基因簇。而为了实现最终竹红菌素类化合物的生成, 可以同时异源表达 HpcABCDF。

2 异源表达产物的检测与鉴定

2.1 UPLC-MS 结果分析

对重组菌株 *A. nidulans* (*hpcA*) 和重组菌株 *A. nidulans* (*hpcABCDF*) 的发酵产物、空白对照 (未导入异源基因的构巢曲霉的发酵产物)、野生竹黄提取物分别进行 UPLC-MS 检测 (图 5A)。与空白对照 (图 5A-vii) 相比, 重组菌株 *A. nidulans* (*hpcA*) 的发酵产物 (图 5A-i) 中明显出现一个新的色

谱峰 **4** ($t_R = 4.46$ min), 提示其为聚酮合酶 HpcA 催化形成的聚酮类产物。质谱显示 **4** 的准分子离子峰为 m/z 259 $[M+H]^+$, 其 UV 吸收峰如图 5B 所示, 这与该类聚酮合酶催化合成的产物 nor-toralactone 一致。化合物 **4** 的鉴定也证明候选基因簇 *hpc* 是负责竹红菌素类化合物的生物合成。

而重组菌株 *A. nidulans* (*hpcABCDF*) 的发酵产物 (图 5A-ii) 比空白对照组多出两个明显的色谱峰 (**1**, $t_R = 5.92$ min; **2**, $t_R = 5.75$ min) 以及一个微小的色谱峰 (**3**, $t_R = 6.21$ min), 其中色谱峰 **1** 的保留时间、相对分子质量和紫外吸收与标准品竹红菌甲素 (HA, 图 5A-v) 一致, 推测该化合物为竹红菌甲素; 而色谱峰 **2** 的相对分子质量为 546, 紫外吸收与 **1** 类似, 提示其也是竹红菌素类化合物, 其结构之后得到分离鉴定。此外, 色谱峰 **3** 的保留时间、相对分子质量和紫外吸收与标准品竹红菌乙素 (HB, 图 5A-vi) 完全一致, 可以鉴定为竹红菌乙素 (因含量过低, 后续未分离)。对比分析重组菌株 *A. nidulans* (*hpcABCDF*) 的发酵产物 (图 5A-ii) 和野生竹黄提取物色谱图 (图 5A-iv) 可以发现两者的成分基本一致, 均含主成分 **1**、**2** 以及微量成分 **3**, 仅仅在相对含量上略有差别。其中, 重组菌株中 HB (**3**) 的含量低于野生竹黄提取物中的量, 推测可能是因碱性或

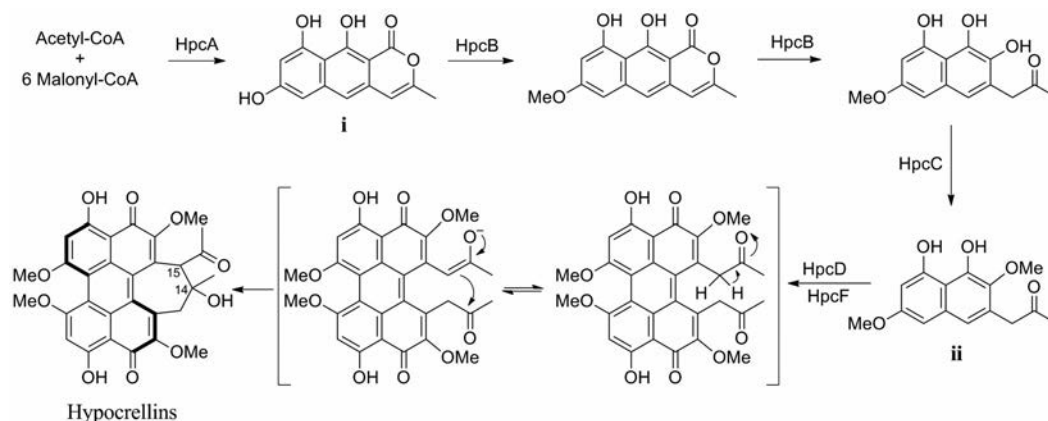


Figure 4 The biosynthetic pathway speculation of hypocrellins with perylenequinone skeleton in *Shiraia bambusiccola*

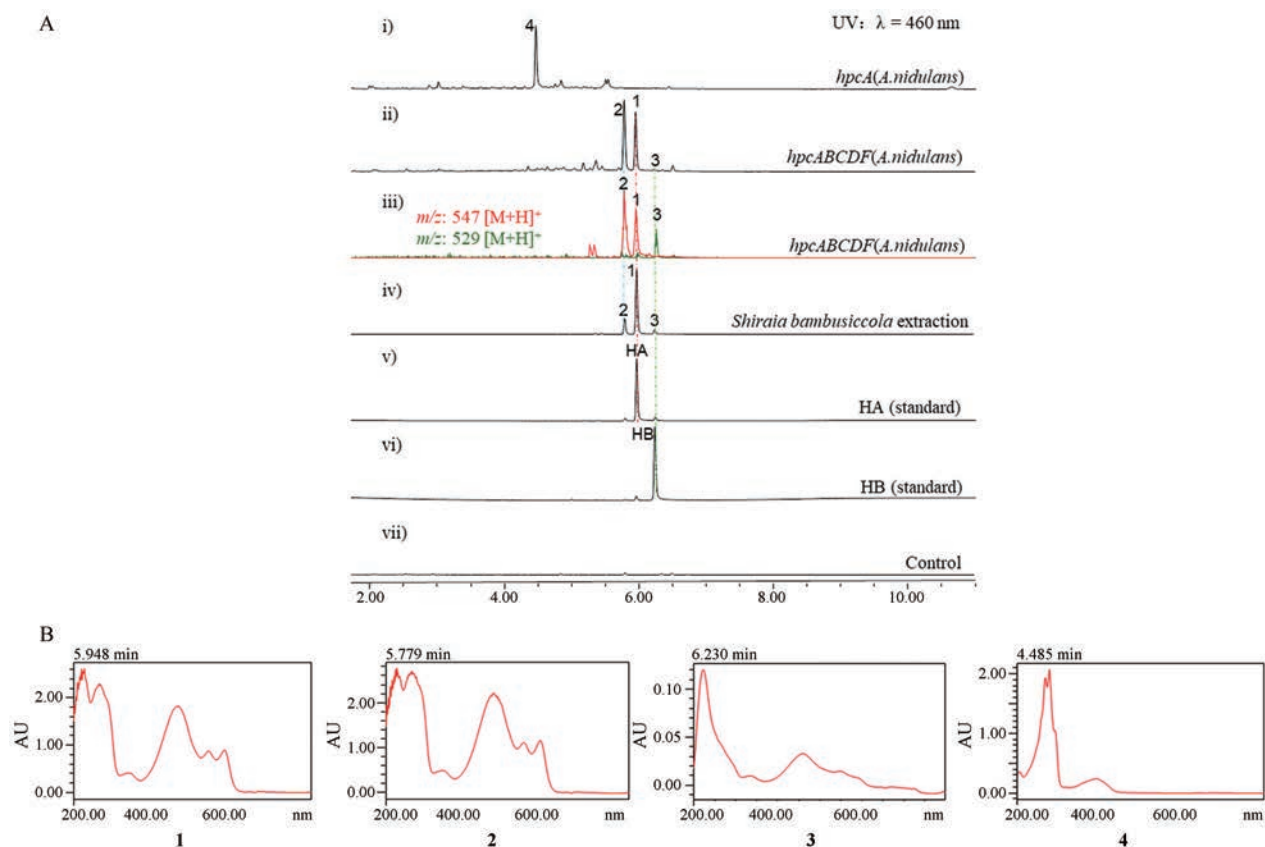


Figure 5 A: The HPLC-MS analysis: heterologous expression combination *hpcA* (i), *hpcABCD* (ii–iii), *Shiraia bambusicola* extracting (iv), Standard of hypocrellin A (HA) (v), Standard of hypocrellin B (HB) (vi) and blank control group (vii); B: UV chromatograms of products 1–4

者加热条件会促进HA自发脱水生成HB, 而野生竹黄生长时间长导致较多HA转化为HB, 因此野生竹黄药材中HB的含量要高于重组菌株。

2.2 异源表达产物的结构鉴定 化合物4为淡黄色粉末, ESIMS显示其准分子离子峰 m/z 259 $[M+H]^+$ 。其 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) 谱呈现1个羟基氢信号 [δ_H 10.25 (s, 1H)], 3个芳香氢信号 [δ_H 6.96 (1H, s), 6.56 (1H, s), 6.42 (1H, s)], 1个烯氢信号 [δ_H 6.29 (1H, s)] 以及1个单峰甲基信号 [δ_H 2.20 (3H, s)]。经与文献中的NMR数据对比, 化合物4鉴定为已知化合物 nor-toralactone^[25]。

化合物1为深红色固体, ESI-MS显示其准分子离子峰 m/z 547 $[M+H]^+$ 。其核磁数据如表2所示, 在 1H NMR谱中显示4个甲氧基氢信号 [δ_H 4.11 (6H, s), 4.07 (6H, s)], 同时在碳谱中显示21个化学位移值大于100.0的低场碳信号, 结合其特征性的紫外吸收, 提示其为竹红菌素类化合物。对比该化合物的NMR数据与已知化合物竹红菌素 (hypocrellin A) 的NMR数据, 两者完全一致, 并且它们的圆二色谱 (CD) 的 Cotton 效应 [533 nm (-7.1), 477 nm (+3.0)] 也一致^[26],

表明化合物1的平面结构和立体构型与竹红菌素均一致。化合物2同样为深红色固体, ESI-MS显示其与1拥有相同的分子量。该化合物的NMR数据和CD数据 [582 nm (-0.9), 542 nm (-0.4), 469 nm (+3.7), 352 nm (-4.2)] 与文献报道的已知化合物一致^[22], 其与竹红菌素的结构差别在于 C_{14} 、 C_{15} 位的构型不同。本文将命名为异竹红菌素 (isohypocrellin A)。

3 小结

本文对一株竹黄菌 *Shiraia* sp 进行了全基因组测序, 并结合生物信息学分析从其全基因组中筛选到一条可能产竹红菌素类化合物的基因簇 *hpc*, 该基因簇包含参与竹红菌素类化合物生物合成的5个基因 *hpcA*、*hpcB*、*hpcC*、*hpcD* 和 *hpcF*。此外, 该基因簇中的 *hpcE* 和 *hpcG* 也尝试异源表达实验证实二者均不直接参与HA类化合物的生物合成, 因此在本文实验部分并未提及。本文采用构巢曲霉表达系统成功构建了 *hpc* 基因簇的高效表达菌株, 获得了竹红菌素 (1) 和异竹红菌素 (2), 产量分别为 1.7 和 1.8 $mg \cdot L^{-1}$ (以实际分离得到的纯化合物量计), 说明该基因簇有进一步优化成工业发酵菌株的潜力。

Table 2 ^1H (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds **1** and **2** (CDCl_3)

No.	1		2		No.	1		2	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}		δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		134.1		131.3	11		151.0		152.0
1a		128.6		128.0	12		133.3		135.2
2		150.8		149.3	12a		127.8		128.4
3		171.0		171.8	13	3.51, d (12.2)	42.0	3.67, d (13.8)	42.6
3a		107.0		106.8		2.63, d (12.2)		2.34, d (13.8)	
3b		125.1		124.6	14		78.9		78.7
4		180.0		179.7	15	3.44, s	60.9	3.72, s	64.4
5	6.56, s	102.1	6.57, s	101.9	16		207.5		206.7
6		167.6		167.3	17	1.89, s	30.2	1.83, s	28.6
6a		117.9		117.6	18	1.70, s	27.1	1.78, s	24.9
7		167.6		167.8	2-OMe	4.11, s	61.8	4.27, s	61.1
7a		118.4		118.0	6-OMe	4.07, s	56.6	4.08, s	56.6
8	6.55, s	102.2	6.56, s	102.3	7-OMe	4.07, s	56.7	4.07, s	56.7
9		180.5		180.1	11-OMe	4.11, s	62.2	4.18, s	62.0
9a		106.9		107.2	4-OH			15.95, s	
9b		125.1		125.5	9-OH			16.06, s	
10		171.9		171.9	14-OH			3.79, s	

讨论

药用资源的保障供应是中药与天然药物可持续发展的基础。据统计,我国有大量具有药用价值的物种分别处于近危、易危、濒危、极危甚至灭绝状态。如何有效保护并合理利用这些珍贵的野生药用资源是中药、天然药物研究领域亟待解决的问题。异源生物合成作为合成生物学的重要技术之一是不依赖于野生药用资源而绿色获取天然药物活性成分的有效途径。与野生资源有限相比,异源生物合成所需的基因资源可通过克隆重复获取,因此有望摆脱对野生资源的依赖。

本研究以易危物种竹黄作为切入点,充分利用该物种的基因组资源,通过在构巢曲霉中表达目标化合物的生物合成基因,实现目标化合物的异源生物合成,从而获取竹黄的主要活性成分。构巢曲霉异源表达系统与大肠杆菌、酵母表达系统等相比在表达真核生物来源的基因方面具有明显优势,该系统在克隆基因簇时不需要去除内含子,操作简便,并且采用在每个表达的目的基因前加入强启动子的方式有利于目标化合物的大量积累^[27],因此构巢曲霉也非常适合于药用真菌中活性成分异源表达的底盘。利用该系统成功构建了竹红菌素类化合物的重组菌株,并且该菌株产生的主要成分竹红菌甲素和异竹红菌甲素以及微量竹红菌乙素,与野生竹黄的主要活性成分刚好一致。同时该重组菌株遗传操作稳定且培养周期短,成本低廉且易于操作。因此,该菌株有开发成商业菌株的潜力,也为寻找药用竹黄资源的替代方法提供了可能性。如果结合启动子优化、培养条件、培养基种类优化等方法,有望进一步提高竹红菌素类化合物的产量。总之,本研究不但为解决药用真菌竹黄野生资源短缺的问题打下坚实基础,也为利用合成生物学技术来绿色获取微量、珍

稀天然药物的活性物质提供可借鉴的途径。

作者贡献: 张亚龙和张乐作为共同第一作者,分别负责实验设计、基因簇异源表达菌株的构建和发酵产物的提取分离,以及质粒的构建和稿件撰写。高洁、柏健、闫道江、张元元分别负责文献的调研及整理,核磁谱图分析、构巢曲霉异源表达系统的优化以及野生竹黄药材的提取;胡友财作为通讯作者全面负责实验设计,稿件撰写与修改等。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Liang XH, Cai YJ, Liao XR, et al. The progress of research on medicinal fungus *Shiraia bambusicola* [J]. J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报), 2008, 27: 21-26.
- [2] Zhong SR, Zhao H, Li AM, et al. Potential TCM-*Shiraia bambusicola* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2002, 33: 372-374.
- [3] Lai GH, Fu LY. Study on the main host plants of *Shiraia bambusicola* [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2000, 19: 8-11.
- [4] Jia XM, Xu XH, Zhuang BC, et al. The progress of biological reasearch of medicinal fungus *Shirar bambusicola* [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2006, 33: 147-150.
- [5] Cui LQ. Investigate the clinical value of bamboo mushroom ointment in the treatment of leukoplakia [J]. China Health Standard Manag (中国卫生标准管理), 2017, 8: 108-109.
- [6] Zhenjun D, Lown JW. Hypocrellins and their use in photosensitization [J]. Photochem Photobiol, 1990, 52: 609-616.
- [7] Weiss U, Merlini L, Nasini G. Naturally occurring perylenequinones [J]. Fortschr Chem Org Naturst, 1987, 52: 1-71.
- [8] Chaloupka R, Sureau F, Kocisova E, et al. Hypocrellin A photosensitization involves an intracellular pH decrease in 3T3 cells [J]. Photochem Photobiol, 1998, 68: 44-50.

- [9] Guo LY, Yan SZ, Tao X, et al. Evaluation of hypocrellin a-loaded lipase sensitive polymer micelles for intervening methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic-resistant bacterial infection [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 106: 110230-110241.
- [10] Kishi T, Tahara S, Taniguchi N, et al. New perylenequinones from *Shiraia bambusicola* [J]. Planta Med, 1991, 57: 376-379.
- [11] Mulrooney CA, O'Brien EM, Morgan BJ, et al. Perylenequinones: isolation, synthesis, and biological activity [J]. Eur J Org Chem, 2012, 21: 3887-3904.
- [12] O'Brien EM, Morgan BJ, Kozlowski MC. Dynamic stereochemistry transfer in a transannular aldol reaction: total synthesis of hypocrellin A [J]. Angew Chem Int Ed, 2008, 47: 6877-6880.
- [13] O'Brien EM, Morgan BJ, Mulrooney CA, et al. Perylenequinone natural products: total synthesis of hypocrellin A [J]. J Org Chem, 2010, 75: 57-68.
- [14] Morgan BJ, Dey S, Johnson SW, et al. Design, synthesis, and investigation of protein kinase C inhibitors: total syntheses of (+)-calphostin D, (+)-phleichrome, cercosporin, and new photoactive perylenequinones [J]. J Am Chem Soc, 2009, 131: 9413-9425.
- [15] Dymond JS, Richardson SM, Coombes CE, et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design [J]. Nature, 2011, 477: 471-476.
- [16] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. Nature, 2013, 496: 528-532.
- [17] Gao RJ, Xu ZC, Deng HX, et al. Enhanced hypocrellin production of *Shiraia* sp. SUPER-H168 by overexpression of alpha-amylase gene [J]. PLoS One, 2018, 13: e0196519.
- [18] Gao RJ, Deng HX, Guan ZB, et al. Enhanced hypocrellin production via coexpression of alpha-amylase and hemoglobin genes in *Shiraia Bambusicola* [J]. AMB Express, 2018, 8: 71-81.
- [19] Cai YJ, Liang XH, Liao XR, et al. High-yield hypocrellin A production in solid-state fermentation by *Shiraia* sp. SUPER-H168 [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 160: 2275-2286.
- [20] Gao RJ, Xu ZC, Deng HX, et al. Influences of light on growth, reproduction and hypocrellin production by *Shiraia* sp. SUPER-H168 [J]. Arch Microbiol, 2018, 200: 1217-1225.
- [21] Chen HQ, Lee MH, Chung KR. Functional characterization of three genes encoding putative oxidoreductases required for cercosporin toxin biosynthesis in the fungus *Cercospora nicotianae* [J]. Microbiology, 2007, 153: 2781-2790.
- [22] Newman AG, Townsend CA. Molecular characterization of the cercosporin biosynthetic pathway in the fungal plant pathogen *Cercospora nicotianae* [J]. J Am Chem Soc, 2016, 138: 4219-4228.
- [23] Yang H, Wang Y, Zhang Z, et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Shiraia* sp. strain Slf14, a novel endophytic fungus producing huperzine A and hypocrellin A [J]. Genome Announc, 2014, 2: e00011-e00014.
- [24] Chooi YH, Zhang G, Hu J, et al. Functional genomics-guided discovery of a light-activated phytotoxin in the wheat pathogen *Parastagonospora nodorum* via pathway activation [J]. Environ Microbiol, 2017, 19: 1975-1986.
- [25] Hu J, Sarrami F, Li H, et al. Heterologous biosynthesis of elsinochrome A sheds light on the formation of the photosensitive perylenequinone system [J]. Chem Sci, 2018, 10: 1457-1465.
- [26] Fang LZ, Qing C, Shao HJ, et al. Hypocrellin D, a cytotoxic fungal pigment from fruiting bodies of the ascomycete *Shiraia bambusicola* [J]. J Antibiot, 2006, 59: 351-354.
- [27] Yaegashi J, Oakley BR, Wang CC. Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans* [J]. J Ind Microbiol Biot, 2014, 41: 433-442.