

Sansanmycin 生物合成基因簇在天蓝色链霉菌中的异源表达

范佳会[#], 侍媛媛[#], 江志波, 李星星, 雷璇, 解云英, 王丽非^{*}, 洪斌^{*}

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所,
国家卫生健康委员会抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050)

摘要: Sansanmycins (SSs) 是一类由 *Streptomyces* sp. SS 产生的尿苷肽类抗生素, 具有抗结核分枝杆菌和铜绿假单胞菌活性。该类化合物主要是由 4',5'-烯胺-3'-脱氧尿苷通过肽键与假四肽链中的 *N*-甲基-2,3-二氨基丁酰基 (DABA) 相连。为了研究相关基因的功能, 进一步利用合成生物学的手段获得 SSs 的新结构衍生物, 本实验克隆了完整的 SS 生物合成基因簇, 并将其在天蓝色链霉菌 M1146、M1152 和 M1154 中异源表达。借助于 HPLC 和 LC-HRMS/MS 等对重组菌株的发酵液进行分析, 结果表明三株异源表达菌株均能产生 SS-A, 而且 M1154 异源表达菌株的 SS-A 产量与未退化的野生型菌株相当。同时从 M1154 异源表达菌株发酵液中发现了一个可能为新结构的 SS 类似物 SS-1154。

关键词: 异源表达; 天蓝色链霉菌; sansanmycin 类似物

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 06-0895-08

Cloning and heterologous expression of sansanmycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces coelicolor*

FAN Jia-hui[#], SHI Yuan-yuan[#], JIANG Zhi-bo, LI Xing-xing, LEI Xuan,
XIE Yun-ying, WANG Li-fei^{*}, HONG Bin^{*}

(Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics of National Health Commission of PRC, Institute of Medicinal Biotechnology, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: Sansanmycins (SSs), produced by *Streptomyces* sp. SS, belong to uridyl peptide antibiotics which exhibit a good inhibitory effect on *Mycobacterium tuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. They share a unique chemical scaffold with a 4',5'-enamido-3'-deoxyuridine attached to DABA (*N*-methyl-2,3-diaminobutryl) which was located in the peptide chain through peptide bond. In order to study the function of related genes and to employ synthetic biology to gain new SS derivatives, we obtained a complete SS biosynthetic gene cluster and heterologously expressed it in *Streptomyces coelicolor* M1146, M1152 and M1154. Fermentation broth of the recombinant strains were detected using HPLC and HPLC-MS/MS, and the result showed that SS-A was successfully produced in the three strains, and its production level in *S. coelicolor* M1154 was similar to the original wild type strain. In addition, a potential SS analogue named as SS-1154 was discovered from the fermentation broth of *S. coelicolor* M1154.

Key words: heterologous expression; *Streptomyces coelicolor*; sansanmycin analogue

收稿日期: 2018-04-03; 修回日期: 2018-05-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81621064, 81603006, 81630089, 81703398); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2016-I2M-3-012);

“重大新药创制”国家科技重大专项 (2018ZX09711001-006-011, 2015ZX09102007-016).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63028003, E-mail: lifeiwang2002@hotmail.com; binhong69@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0295

尿苷肽类抗生素主要包括 pacidamycins、mureidomycins、napsamycins 和 sansanmycins (SSs) (图 1), 主要表现为对结核分枝杆菌和铜绿假单胞菌的抑制活性, 其作用机制为抑制细菌细胞壁生物合成关键酶 *MraY* (UDP-*N*-乙酰胞壁酸-五肽转位酶) 的活性^[1]。由于以 *MraY* 为靶点的药物还未用于临床, 可以有效避免与现用药物交叉耐药的情况。尿苷肽类抗生素化学结构中包含一个独特的母核结构: 4',5'-烯胺-3'-脱氧尿苷通过肽键与假四肽肽链中的 *N*-甲基-2,3-二氨基丁酰基 (*N*-methyl-2,3-diamino butyryl, DABA) 相连。SSs 是 2007 年本所首次分离得到的新型尿苷肽类抗生素, 由 *Streptomyces* sp. SS 产生^[2]。迄今为止, 文献报道的 SS 类化合物结构差异较小^[3], 主要体现在组成假四肽肽链中氨基酸的种类不同: AA₁ 以间位酪氨酸 (*m*-Tyr)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe) 为主, AA₃ 通常为脂肪族氨基酸 [如甲硫氨酸 (Met) 和丙氨酸 (Ala)], 而 AA₄ 在绝大多数情况下为色氨酸 (Trp)。由于靶点的新颖性以及结构的独特性, SS 类化合物成为寻找新型抗耐药结核药物的先导化合物之一。

近年来利用合成生物学手段实现了青蒿素^[4]和紫杉醇^[5]前体在微生物工程菌株中的合成, 展现了合成生物学技术在天然药物生产中的应用前景。合成生物学通过在微生物中人为设计和组装遗传元器件, 形成新的生物学系统, 在发现和创造新结构化合物中也将发挥重要作用^[6]。选择一个合适的宿主是应用该技术的基础之一。目前所发现的具有抗感染、抗肿瘤、免疫抑制等作用的抗生素约有三分之二来源于链霉菌^[7], 因此链霉菌属的工程菌株是利用该技术进行抗生素相关研究的良好宿主。天蓝色链霉菌是第一个完成基因组测定的模式菌株, 2011 年 Gomez-Escribano 等^[8]对 *S. coelicolor* M145 进行基因工程改造, 敲除了 4 个内源性抗生素生物合成基因簇, 并在 *rpoB* 和 *rpsL* 中依次引入点突变, 分别得到了其衍生菌株 M1146、M1152 和 M1154, 由于其遗传背景清楚, 抗生素产量较 M145 有不同程度的提高, 成为异源表达的良好宿主。目前多种抗生素生物合成基因簇已在这几个菌株中成功表达, 例如 Wang 等^[9]将 nikkomycin 生物合成基因簇 *sanG*、*sanF* 的启动子进行替换, 而后在 *S. coelicolor* M1146 中实现异源表达, 为利用合成生物学手段获得新结构核苷肽类化合物的研究奠定了基础。

为克服 *S. sp.* SS 遗传操作困难及菌株退化等问

题, 同时也为后续合成生物学操作奠定基础, 本文利用 PCR-Targeting 构建了完整的 SS 生物合成基因簇, 并在 *S. coelicolor* M1146、M1152 和 M1154 中进行异源表达。借助于 HPLC、HPLC-HRMS/MS 等技术, 对异源表达菌株和对照菌株的次级代谢产物进行了系统对比分析, 结果表明, *S. sp.* SS 中的主产物 sansanmycin A (SS-A) 在三株异源表达菌株中均有产生, 表明 SS 生物合成基因簇在 *S. coelicolor* 中实现了异源表达, 其中在 *S. coelicolor* M1154 中 SS-A 的产量与未退化的 *S. sp.* SS 相当, 同时, 在 *S. coelicolor* M1154 的发酵液中发现了一个可能为新结构的 SS 类似物, 通过与已知 SSs 化合物的 MS/MS 谱进行比较, 初步推测了该化合物的结构。

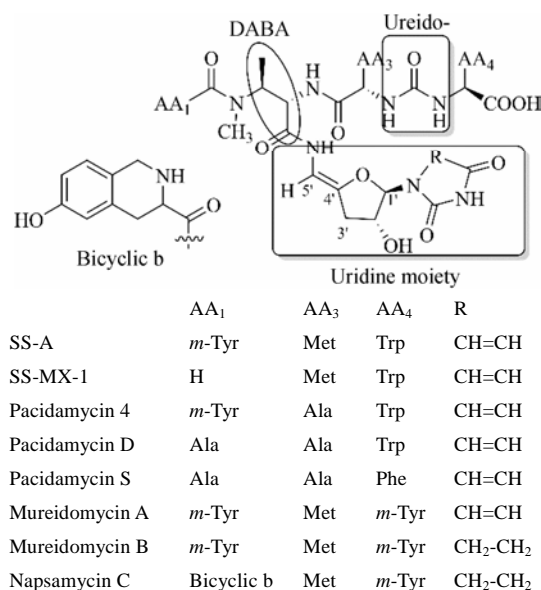


Figure 1 The chemical structures of uridyl peptide antibiotics. AA: Amino acid; *m*-Tyr: Meta-tyrosine; Met: Methionine; Trp: Tryptophan; Ala: Alanine; Phe: Phenylalanine

材料与方法

菌株、培养基和培养条件 *S. sp.* SS^[2]是 SS 产生菌, 采用 S5 培养基^[10]进行固体培养以用于传代, 培养温度为 28 °C。*S. coelicolor* M1146、M1152 和 M1154^[8]及其衍生菌株用 MS 培养基^[11]进行固体培养以用于传代和接合转移, 所有链霉菌菌株均采用 ϕ 培养基^[12]进行液体培养用于提取基因组 DNA。SS 种子和发酵培养基组成成分参见文献 2。*Escherichia coli* DH5 α ^[13]用于常规的基因克隆; *E. coli* ET12567/pUZ8002^[14]用于接合转移, 将 DNA 由大肠杆菌导入链霉菌; *E. coli* BW25113/pIJ790^[15]用于 λ Red/ET 介导的同源重组。大肠杆菌均用 LB 培养基培养, 前两种

培养温度为 37 °C, *E. coli* BW25113/pIJ790 中含有温敏型质粒 pIJ790, 培养温度为 30 °C, 质粒丢失温度为 37 °C。根据需要分别加入 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿普霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素或 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素对菌株进行抗性筛选。

引物 本文所用的 PCR 扩增引物见表 1。

主要试剂 限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司; 2 \times Q5 高保真聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 New England Biolabs 公司; pGEM-T 质粒购自美国 Promega 公司; 色谱甲醇购自上海泰坦公司; 色谱纯水为屈臣氏蒸馏水经 Millipore 纯化仪纯化而得; 固相萃取柱 (Spe-Pack C18) 和色谱柱 (Waters X Bridge C18, 4.6 mm \times 150 mm, 5.0 μm) 购自美国 Waters 公司。

DNA 基本操作 分子生物学常规操作参照分子克隆实验指南^[13], 链霉菌基因组的提取按照链霉菌操作手册进行^[12]。

构建用于完整 SS 基因簇拼接的质粒 pSET-HF 黏粒 10R-1^[16]覆盖了 SS 基因簇上游的部分序列及 *ssaH-F*, 但是不包含 SS 生物合成必需的 *ssaF* 下游序列, 为此本文通过设计与黏粒 10R-1 上下游两端序列的同源双交换来完成基因簇的拼接, 构建了以 pSET152^[17]为载体含有两个同源臂的重组质粒 pSET-HF。构建过程如下: 以 pGEM-T 质粒为模板, 用引物对 Amp-F/Amp-R 扩增氨苄青霉素抗性基因片段, 加入 *Xba* I 和 *Nde* I 酶切位点。以 *S. sp.* SS 的基因组 DNA 为模板, 用引物对 UP-F/UP-R 扩增 *orf-2-ssaH* 片段, 命名为前臂 U, 加入 *Nde* I 和 *Kpn* I 酶切位点, 约 1 kb; 用引物对 F-*orf1-F*/F-*orf1-R* 扩增 *ssaF-orf2* 片段, 命名为后臂 D, 加入 *Kpn* I 和 *EcoR* I 酶切位点, 约 7.2 kb。上述 3 个片段测序正确后连入 *Xba* I 和 *EcoR* I 酶切过的 pSET152 得到重组质粒 pSET-HF, 其包含氨苄青霉素抗性基因以及生物合成基因 *orf-2-ssaH* 和 *ssaF-orf2*。

相关菌株的发酵与代谢产物的分析 将固体培养基上培养 7 天后的相关菌株先接种于 SS 种子培养基进行培养, 28 °C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 48 h 后, 以 5% (V/V) 的接种量转接到发酵培养基, 于 28 °C、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下进行发酵。取第 5 天的发酵液, 经 5000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 除去菌体和不可溶物。取上清液 1 mL 经 Spe-Pack C18 处理, 以 1 mL 60% 甲醇水洗脱, 洗脱液经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液用于 HPLC、HPLC-MS 等检测。

HPLC 在 Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司) 上测试。采用两相梯度洗脱的方法, 其中 A 相为甲醇, B 相为 0.05% (V/V) 醋酸铵水溶液。HPLC 检测时, A 相在 40 min 内由 20% (V/V) 逐渐递增至 80% (V/V), 流速为 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温箱设定为 40 °C, 检测波长为 254 nm。采用外标法对主产物 SS-A 进行定量, 操作如下: 用不同浓度的 SS-A 标准品进行进样, 以浓度为变量与峰面积做线性回归, 当线性 $R^2 > 0.99$ 时, 通过峰面积比值计算重组工程菌株发酵液中 SS-A 浓度。

HPLC-MS 检测, 采用液相色谱仪 Agilent 1100 和离子阱质谱仪 Agilent 5630 (美国安捷伦公司)。柱温箱设定为 25 °C, 其他条件同 HPLC。洗脱液经过色谱柱后, 使用三通等分至二极管阵列检测器 (diode array detector, DAD) 和质谱检测器中。离子阱质谱检测条件: 喷雾电压: 4.5 伏 (V); 载气: 氮气 (N_2), 载气流速: 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 离子源温度: 325 °C; 碰撞裂解气体: 高纯氦气 (He); 一级质谱 (1D MS) 使用全扫描模式, 范围为 m/z 300~2000。数据使用仪器自带的 Data Analysis, version 3.3 进行处理。

高分辨质谱 (HPLC-HRMS/MS) 在 LTQ Orbitrap XL 组合式高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 上测试。流动相同 HPLC, 条件调整为 A 相在 35 min 内由 5% (V/V) 逐渐递增至 80% (V/V), 柱温箱

Table 1 Primers for PCR

Primer	Sequences (5'→3')	Purpose
Amp-F	TATCTAGAACAAATTTTCGCTGATGCG	Used for amplifying <i>bla</i>
Amp-R	TACATATGTGCAAGCAGCAGATTACG	
UP-F	TACATATGGTCCCGTACCCCGCTTGA	Used for amplifying <i>orf-2-ssaH</i>
UP-R	TAGGTACCGAATTCCTGGTGCCCAACT	
F- <i>orf1-F</i>	TAGGTACCCGTTCTCCGACGACGACCTG	Used for amplifying <i>ssaF-orf2</i>
F- <i>orf1-R</i>	TGGAATTCGCGGCAACCTCATCCAA	
<i>orf-1-F</i>	ATGAGCAGTCCCGAGAGC	Used for verifying the <i>orf-1</i> in the plasmid pSSA
<i>orf-1-R</i>	TCATTCGGACAAGTCGCGC	
<i>ssaB-F</i>	CG CATATGGGCATCGACTTCACC	Used for verifying <i>ssaB</i> in the plasmid pSSA
<i>ssaB-R</i>	TAGGATCCTCAGCCCTCCGACCC	
<i>ssaG-F</i>	TACATATGGTGCAGGCCCTGGCA	Used for verifying <i>ssaG</i> in the plasmid pSSA
<i>ssaG-R</i>	GTGGATCCTCAGTCGATCCAGGT	

设定为 40 °C, 数据使用软件 Xcalibur 2.0.7 进行处理。

结果

1 异源表达

1.1 质粒 pSSA 的构建与验证 前期本课题组构建了 *S. sp.* SS 的大片段基因组文库, 并成功解析了 SS 生物合成基因簇 (约 33.1 kb), 但所筛选到的阳性黏粒都没有包含完整的 SS 生物合成基因簇^[16]。本文中利用基于 λ Red/ET 重组产生的 PCR-Targeting 方法^[18]将完整的基因簇拼接接到整合型载体 pSET152^[17]上 (图 2)。重组质粒 pSET-HF 以 pSET152 为载体, 包含了氨苄青霉素抗性基因筛选标记和与黏粒 10R-1 的上游及下游同源的两个同源臂 *orf-2-ssaH* 及 *ssaF-orf2*,

具备了应用 λ Red/ET 重组系统的条件。pSET-HF 经 *Kpn* I 酶切和脱磷酸化处理获得线性片段, 将线性化 pSET-HF 经电转化导入 *E. coli* BW25113/pIJ790/10R-1 中应用 λ Red/ET 重组系统进行同源双交换, 用阿普霉素和氨苄青霉素筛选, 获得完整的 SS 生物合成基因簇, 用多组酶切和 PCR 进行验证, 正确的质粒命名为 pSSA (图 2)。

1.2 重组菌株的获得 将重组质粒 pSSA 和 pSET152 通过接合转移分别导入 *S. coelicolor* M1146、M1152 和 M1154, 获得异源表达菌株 M1146/pSSA、M1152/pSSA 和 M1154/pSSA 以及对照菌株 M1146/pSET152、M1152/pSET152 和 M1154/pSET152。

2 代谢产物分析

2.1 HPLC 结果分析 对野生型菌株 *S. sp.* SS、异源表达菌株和对照菌株的发酵产物分别进行 HPLC 检测 (图 3A), 以 SS-A 标准品 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为对照, 野生型菌株和异源表达菌株在 SS-A 相同的保留时间 ($t_R = 19.5 \text{ min}$) 均出现一个明显的色谱峰, 且它们具有相同的在线紫外图谱 (图 3B), 而对照菌株在该位置没有特征峰出现, 表明 SS 生物合成基因簇可能成功在天蓝色链霉菌中进行了表达, 主产物可能为 SS-A。

2.2 HPLC-MS 结果分析 为了进一步确定三株异源表达菌株产生的新峰是 SSs 类似物, 将其发酵液经 Spe-Pack C18 处理后分别进行 HPLC-MS 检测。结果如图 3C 所示, 分别提取 SS-A 分子离子峰 (m/z 864.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$), 对照菌株无响应 (图 3C-b), 而三株异源表达菌株在保留时间为 $t_R = 24.0 \text{ min}$ 出现响应 (图 3C-c~e), 且与 SS-A 标准品 (图 3C-a) 一致, 进一步说明三株异源表达菌株的代谢产物中可能存在 SS-A。

2.3 HPLC-HRMS/MS 结果分析 为进一步证明三株异源表达菌株表达的化合物是 SS-A, 本实验选择产量较高的 M1154/pSSA 及其对照菌株 M1154/pSET152 的次级代谢产物分别进行 HPLC-HRMS/MS 分析。结果发现在异源表达发酵液样品中, 在保留时间为 $t_R = 31.05 \text{ min}$ (图 4A) 峰中的化合物分子离子峰为 m/z 864.331 5, 与 SS-A 的计算值 (Calcd. 864.334 5 Da) 之间的误差为 3.47 ppm, 且其二级质谱与文献报道的 SS-A 二级质谱^[2]一致 (图 4B), 进一步确定异源表达菌株确实能产生 SS-A, 证明 SS 生物合成基因簇在三株天蓝色链霉菌中成功实现异源表达。

与此同时, 通过 Xcalibur 2.0.7 软件分析两株菌中的差异离子峰 (分子量范围在 600~1000 之间), 发现在异源表达菌株 M1154/pSSA 和对照菌株 M1154/

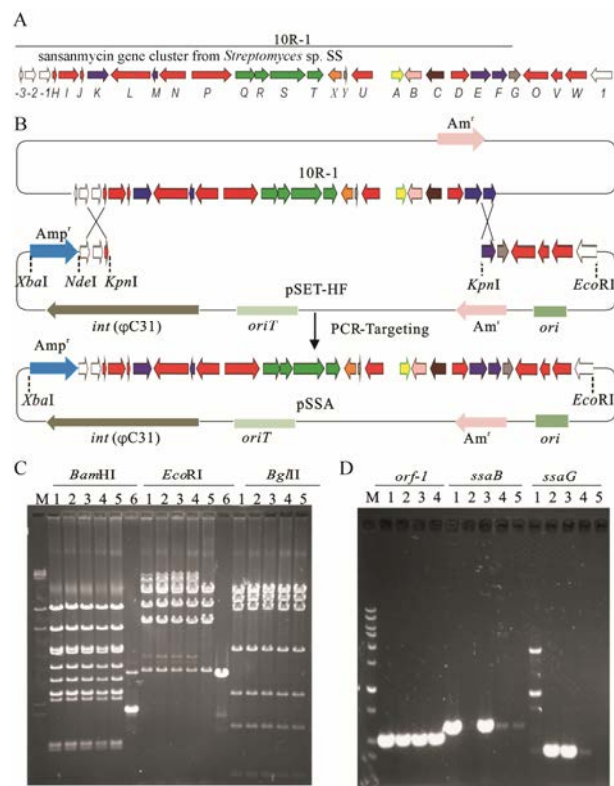


Figure 2 Construction and verification of pSSA. A: Diagram of sansanmycin biosynthesis cluster and cosmid 10R-1; B: Schematic diagram of the construction of pSSA. Am^r stands for apramycin resistance gene; Amp^r stands for ampicillin resistance gene; *int*(ϕ C31) stands for ϕ C31 integrase gene; *oriT* stands for origin of transfer from RT2; *ori* stands for replication origin of colE1. C: Restriction analysis of pSSA. Digestion of 6 colonies of pSSA with *Bam*H I, *Eco*R I, and *Bgl*II. M: λ -*Hind*III digest DNA Marker. D: PCR analysis of pSSA with 10R-1 and pSET-HF as controls. Primers *orf-1-F/R*, *ssaB-F/R*, *ssaG-F/R* were used to amplify a 978 bp, 1 180 bp and 831 bp DNA fragment of *orf-1*, *ssaB* and *ssaG* using 10R-1, pSET152-HF and pSSA as template. M: 1 kb plus DNA marker. Lane 1: 10R-1; Lane 2: pSET152-HF; Lane 3 and 4: pSSA; Lane 5: Negative control

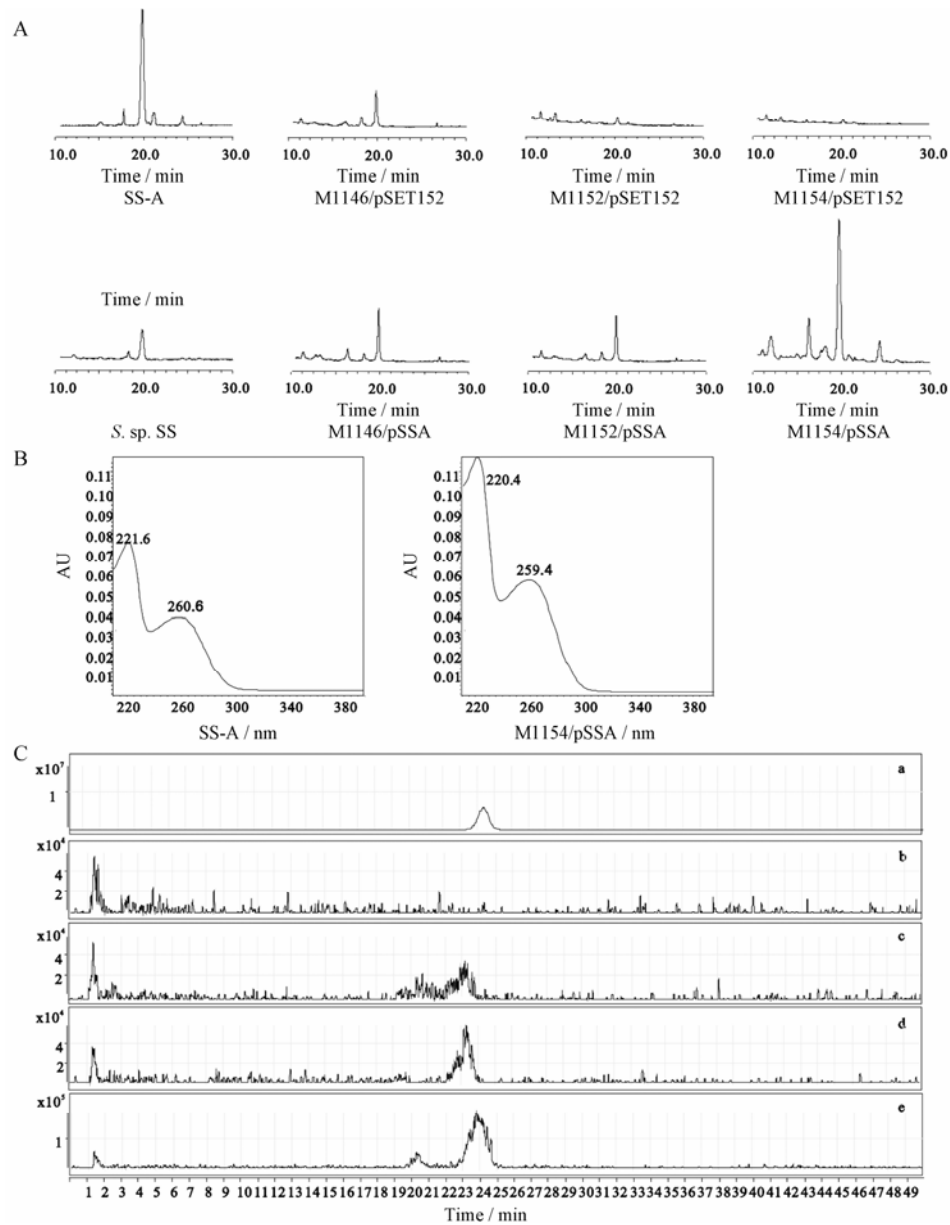


Figure 3 Elucidation of SS-A. A: Comparison of the secondary metabolites in different strains by HPLC. SS-A stands as a control for structure identification of the main product of M1146/pSSA, M1152/pSSA and M1154/pSSA. Sansanmycin producing strain *S. sp. SS* also stands as a control to compare sansanmycin production with other heterologous expression strains. B: Characteristic ultraviolet absorption chromatography of SS-A and the main product of M1154/pSSA. C: Analyzing the compound SS-A in the fermentation broth of M1146/pSET152 (b), M1146/pSSA (c), M1152/pSSA (d) and M1154/pSSA (e) strains using extracted ion chromatography (EIC) of m/z 864.2 with SS-A (a) standing as a control

pSET152 之间有 5 个母离子差异峰,除了 SS-A,分别对其他 4 个母离子的二级质谱进行分析,结果显示其中一个分子离子峰可能为新结构的尿苷肽类化合物。该分子离子峰对应的色谱峰保留时间为 34.42 min,一级高分辨质谱显示其分子离子 m/z 671.2847 [M+H]⁺,计算分子式为 C₃₀H₃₉N₈O₁₀ (Calcd. 671.278 4 Da, 误差 9.5 ppm)。由于产量低,尚无法确定其紫外特征吸收情况。由其碎片离子分析(图 4C),该化合物有可能为 N-末端氨基酸 AA₁ 缺失的 SSs 类化合物。首先

其基峰离子来源于一个 204 Da 的丢失,这与其他 C-末端为色氨酸的 SSs 类化合物二级质谱情况一致;碎片离子 m/z 430.12 (M-225-16) 可能对应化合物丢失尿苷的肽基部分,其与分子离子之间的差值比正常的 SSs 类化合物的尿苷部分大 16 Da,提示该化合物对应的尿苷部分比 SS-A 多一个羟基,且由化合物丢失尿嘧啶的碎片离子 m/z 559.01 (中性丢失为 112 Da,对应为尿嘧啶)以及两个脱水后的碎片离子 m/z 653.44 和 m/z 635.87,推测羟基应位于 4',5'-烯胺-尿苷

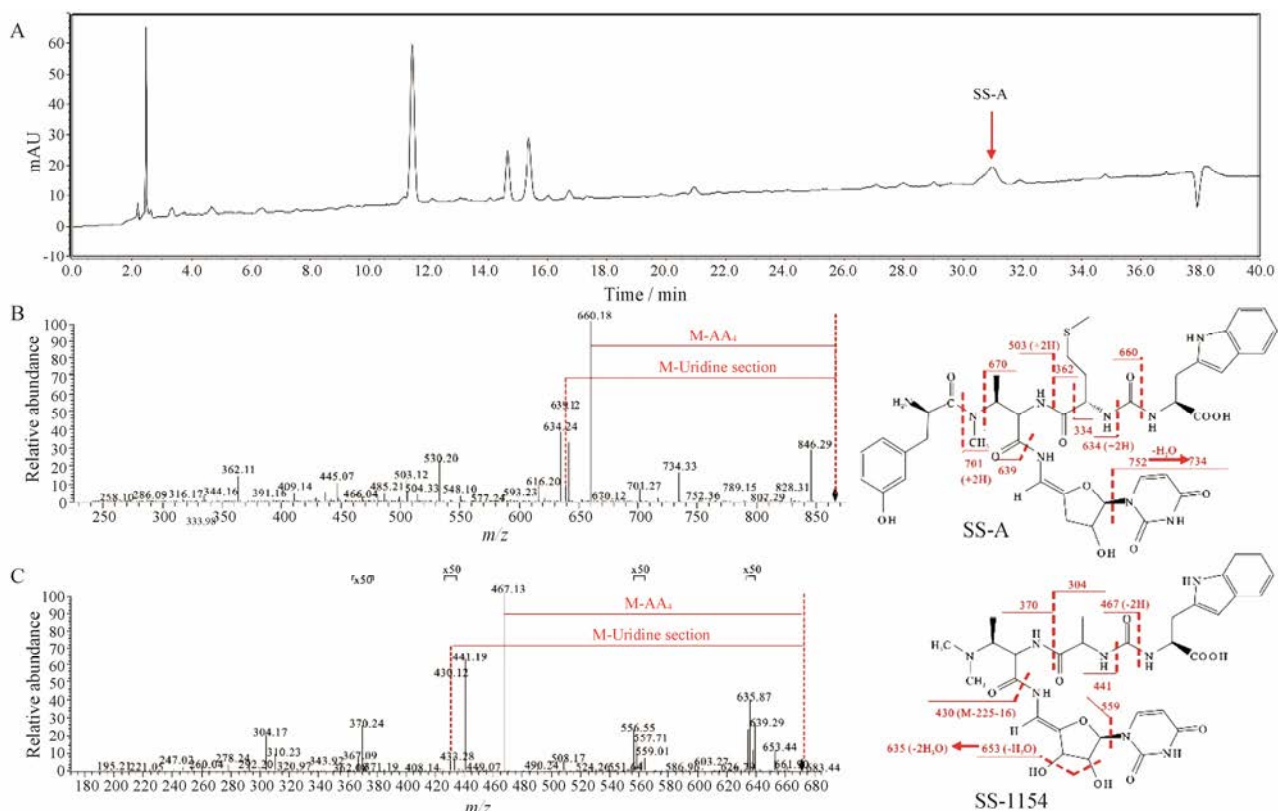


Figure 4 Analysis of the secondary metabolites in M1154/pSSA by HPLC-HRMS/MS. A: The HPLC-DAD spectrum; B: The MS/MS spectrum of SS-A; C: The MS/MS spectrum of SS-1154. The red lines are the auxiliary lines, while the fragment ions and their lost way are in red

的 C-3'; 如图 4 所示, SS-A 的二级质谱中存在 m/z 362 特征离子碎片对应于 AA₃ (Met) 至 C-末端部分的结构, 而该片段在 m/z 671.2847 的二级碎片离子中也存在, 只是其相应由 SS-A 中 m/z 362 变化为 m/z 304, 说明该化合物的 AA₃ 与 SS-A 不同, 可能为丙氨酸 (Ala); 该化合物的 DABA 酰基 (m/z 430~304) 较文献^[19]报道其他类 SSs 的相应结构要大 14 Da, 推测其结构中可能还存在一个 *N*-甲基。综合以上分析及其他相关的碎片离子, 推测该化合物的可能结构为 *N*-甲基-3'-

羟基-去间酪氨酰基 pacidamycin 4, 命名为 SS-1154 (图 4C)。

2.4 SS-A 产量分析 从图 3 中可看出各菌株的化合物产量不同, 因此对野生型菌株及各异源表达菌株的主产物 SS-A 进行 HPLC 定量分析, 以 SS-A 标准品进行外标法定量, 绘制标准曲线, 线性 $R^2=0.9996$, 表明该方法可行。将培养状态一致的菌株以相同体积的接种量进行发酵, 在生长曲线 (图 5A) 一致的情况下, 发酵产物经 Spe-Pack C18 处理后进行 HPLC 检

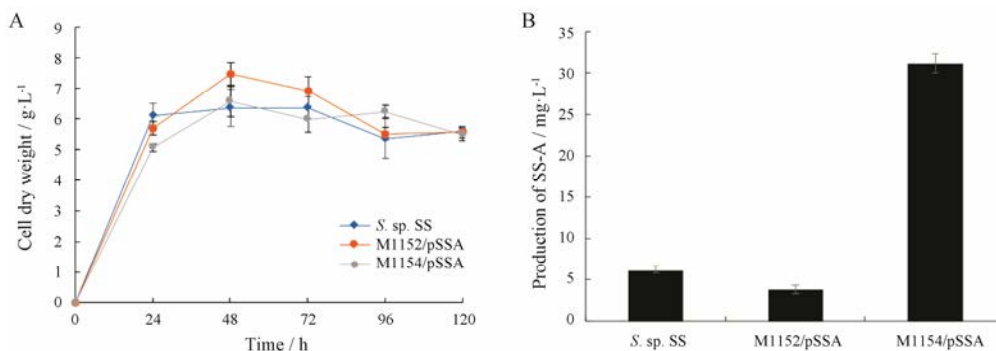


Figure 5 Comparison of the production level of SS-A in different strains. A: Time courses of cell growth; B: Sansanmycin A production level of wild type strain and heterologous expression strains. Bars indicate average values of 3 biological replicates and error bars represent standard deviation

测。M1146/pSSA 中主产物的出峰位置有杂峰, 无法利用峰面积定量, 但从提取离子 m/z 864.3 的 EIC 图 (图 3C) 来看, SS-A 在 M1146/pSSA 的产量明显低于其他菌株。野生型菌株 *S. sp.* SS 出现菌株退化现象, 经自然分离后, 未能获得产量恢复的菌株。由图 5B 结果表明, 异源表达菌株 M1152/pSSA 的 SS-A 产量较野生型略低, 而 M1154/pSSA 的 SS-A 产量与未退化的 *S. sp.* SS 相当^[19], 发酵水平达到了 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。多次传代后发酵结果一致, 说明 SS 生物合成基因簇的异源表达可以避开野生型菌株退化的问题, *S. coelicolor* M1154 是一个良好的异源表达宿主。

讨论

为了实现次级代谢产物的异源表达, 首先需要获得完整的生物合成基因簇。Liao 等^[20]使用 λ Red/ET 重组技术获得了完整的 nikkomycin 生物合成基因簇并将其组装到整合型质粒 pSET152 上。本研究采用相同的技术手段, 以黏粒 10R-1 为基础, 利用 PCR-Targeting 的方法实现了片段拼接, 获得了完整的 SS 生物合成基因簇, 并将其导入到 Gomez-Escribano 等^[8]构建的 *S. coelicolor* M1146、M1152 和 M1154 异源表达宿主中, 对异源表达菌株产物以及对照菌株产物进行检测, 以 SS-A 为标准品, 通过比较紫外特征吸收图谱、二级质谱图谱等, 表明异源表达菌株中有 SS-A 产生, 而对照菌株中没有 SS-A 产生, SS 生物合成基因簇可以在天蓝色链霉菌中异源表达。Gomez-Escribano 等^[8]研究发现, 生物合成基因簇在 *S. coelicolor* M1154 中异源表达通常有更高的产量。本研究以 HPLC 方法对各异源表达菌株的 SS-A 产量进行分析, 结果表明与野生型菌株相比, SS-A 在 M1146/pSSA 菌株中产量很低, 在 M1152/pSSA 菌株中产量次之, 在 M1154/pSSA 菌株产量达到最高。说明 *S. coelicolor* M1154 可能是 SS 生物合成基因簇异源表达的良好宿主。

有文献报道其他尿苷肽类抗生素, 如 pacidamycin^[21]、mureidomycin/napsamycin^[22]的生物合成基因簇分别在 *S. lividans* TK24 和 *S. coelicolor* M1154 中实现了异源表达, 结果表明都可以产生 1 或 2 个已知结构化合物 (图 1), 并且发现了新结构的类似物。此外, *S. coeruleorubidus* 产生的主产物 pacidamycin 4 等的 AA₁ 均为 *m*-Tyr, 而 pacidamycin 异源表达后仅产生 AA₁ 为 Ala 的主产物 pacidamycin D 和新衍生物 pacidamycin S, 推测可能与异源表达的

pacidamycin 基因簇内缺少两个编码基因有关 (在产生菌 *S. coeruleorubidus* 中存在于基因组其他位置^[23]), 这两个基因编码苯丙氨酸羟化酶和相对应的 NRPS 的 A domain。SS 异源表达菌株与野生型菌株的主产物均为 SS-A, 说明本研究克隆的 SS 生物合成基因簇是完整的。本研究利用 HPLC-HRMS/MS 方法对异源表达菌株 M1154/pSSA 的产物进行进一步分析, 发现了一个可能为新结构的 SS 类似物 SS-1154。根据文献报道的尿苷肽类化合物生物合成途径^[24]推测该结构中 AA₃ 替换为丙氨酸可能是由于负责肽链合成的非核糖体肽合成酶具有较大程度的底物宽容性^[25], 加上异源宿主的环境不同于原产生菌从而出现这一改变; DABA 中新增的 *N*-甲基可能是由于异源宿主中存在其他能够使氨基甲基化的酶, 或者参与 DABA 生物合成的 SsaV 可能具有底物宽容性^[23]; 而尿苷部分可能在 3' 位置新增-OH 取代, 推测在合成尿苷结构的基础上被氧化, 可能与异源宿主中的氧化还原酶有关。目前尚未发现其他尿苷部分为该结构的 SSs 类似物, 因此该化合物具有一定的研究价值, 但由于其产量很低, 尚难获得足够量进行结构的进一步解析和生物活性的评价。

目前, 高通量测序技术发展迅猛, 微生物基因组序列越来越容易获得, 通过基因组挖掘技术有可能获得新的尿苷肽类化合物生物合成基因簇和新的生物合成元件。天蓝色链霉菌遗传背景清楚, 为进一步应用合成生物学方法获得新结构尿苷肽类化合物提供了便利, 有利于在异源宿主中进行生物合成元件的替换与组合, 有目的地合成新化合物, 为进一步提高尿苷肽类化合物的结构多样性奠定了基础。

References

- [1] Winn M, Goss RJ, Kimurab K, et al. Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis [J]. Nat Prod Rep, 2010, 27: 279-304.
- [2] Xie Y, Chen R, Si S, et al. A new nucleosidyl-peptide antibiotic, sansanmycin [J]. J Antibiot, 2007, 60: 158-161.
- [3] Jiang ZB, Shi YY, Ren WC, et al. Identification of two novel sansanmycin analogues from *ssaX* knockout strain by HPLC-MS/MS [J]. Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术), 2018, 13: 5-12.
- [4] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. Nature, 2006, 440: 940-943.

- [5] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330: 70–74.
- [6] Wu LZ, Hong B. Synthetic biology toward microbial secondary metabolites and pharmaceuticals [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 155–160.
- [7] Lucas X, Senger C, Erxleben A, et al. StreptomeDB: a resource for natural compounds isolated from *Streptomyces* species [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 1130–1136.
- [8] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters [J]. *Microb Biotechnol*, 2011, 4: 207–215.
- [9] Wang L, Du DY, Li JE, et al. Engineering and heterologous expression of a nikkomycin biosynthetic gene cluster [J]. *Acta Microbiol Sin (微生物学报)*, 2015, 55: 707–718.
- [10] Wang L, Hu Y, Zhang Y, et al. Role of *sgcR3* in positive regulation of enediyne antibiotic C-1027 production of *Streptomyces globisporus* C-1027 [J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 14.
- [11] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics [M]. Norwich, UK: John Innes Foundation, 2000.
- [12] Korn F, Weingartner B, Kutzner HJ. A study of twenty actinophages: morphology, serological relationship and host range [M]//Freerksen E, Tamok I, Thumin H. Genetics of the Actinomycetales. New York: Gustav Fisher Verlag, 1978: 251–270.
- [13] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd Edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [14] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, et al. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^e is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181: 204–211.
- [15] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 1541–1546.
- [16] Li Q, Wang L, Xie Y, et al. SsaA, a member of a novel class of transcriptional regulators, controls sansanmycin production in *Streptomyces* sp. strain SS through a feedback mechanism [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195: 2232–2243.
- [17] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp [J]. *Gene*, 1992, 116: 43–49.
- [18] Zhang Y, Muylers JP, Testa G, et al. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli* [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1314–1317.
- [19] Shi YY, Jiang ZB, Lei X, et al. Improving the N-terminal diversity of sansanmycin through mutasynthesis [J]. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 77.
- [20] Liao GJ, Li JE, Li L, et al. Cloning, reassembling and integration of the entire nikkomycin biosynthetic gene cluster into *Streptomyces ansochromogenes* lead to an improved nikkomycin production [J]. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 6.
- [21] Emma JR, Sabine G, Amany ER, et al. Pacidamycin biosynthesis: identification and heterologous expression of the first uridyl peptide antibiotic gene cluster [J]. *ChemBioChem*, 2010, 11: 1700–1709.
- [22] Tang XY, Marcel G, Xie YY, et al. Identification of mureidomycin analogues and functional analysis of an N-acetyltransferase in napsamycin biosynthesis [J]. *ChemBioChem*, 2013, 14: 2248–2255.
- [23] Li QL, Xie YY, Wang LF, et al. Biosynthesis of uridyl peptide antibiotics: research advances [J]. *J Int Pharm Res (国际药学研究杂志)*, 2012, 39: 17–25.
- [24] Gruschow S, Rackham EJ, Elkins B, et al. New pacidamycin antibiotics through precursor-directed biosynthesis [J]. *ChemBiochem*, 2009, 10: 355–360.
- [25] Zhang W, Ntai I, Bolla ML, et al. Nine enzymes are required for assembly of the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 5240–5243.