

杀念菌素/FR-008 生物合成途径中转运基因 *fscTI* 与 *fscTH* 的功能

雷璇, 孔令新, 张晨, 由德林*, 邓子新*

微生物代谢国家重点实验室, 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200030

摘要: 【目的】分析杀念菌素/FR-008 生物合成途径中转运基因 *fscTI* 和 *fscTH* 的功能。【方法】构建转运基因 *fscTI* 和 *fscTH* 的敲除质粒 pJTU4137, 并通过接合转移和同源重组双交换的方法得到转运基因缺失突变株。转运基因 *fscTI* 和 *fscTH* 也被克隆到高拷贝质粒 pJTU1278 上用于在链霉菌 FR-008 (*Streptomyces* sp. FR-008) 的衍生菌株 ZYJ-6 中进行转运蛋白的过量表达。【结果】获得了转运蛋白缺失的双交换突变株 LX10, 发酵结果显示该突变株不再产生杀念菌素及其衍生物; 过量表达转运蛋白的基因工程菌株 LX11, 其杀念菌素的产量约是对照菌株的 1.5 倍。【结论】体内遗传实验进一步证实 FR-008 生物合成途径中的 *fscTI* 和 *fscTH* 是 ATP 依赖的 ABC 转运基因, *fscTI* 与 *fscTH* 的过量表达增加了杀念菌素的产量, 为利用此方法提高其它多烯类抗生素的产量提供了例证。

关键词: 多烯类抗生素, ABC 转运蛋白, 基因敲除, 基因过量表达

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1458-09

ABC 转运蛋白是一类依赖于 ATP 的跨膜蛋白, 广泛存在于从细菌到人类的多种组织中, 是目前已知的最大的蛋白家族之一^[1]。ABC 转运蛋白一般由两个跨膜结构域 (TMDs) 和两个核苷酸结合结构域 (NBDs) 组成, 跨膜结构域主要负责在细胞膜上形成通道, 而核苷酸结合结构域非常保守, 主要负责结合和水解 ATP 为转运过程提供能量^[2-3]。ABC 转运蛋白能够转运糖、氨基酸、胆固醇、多肽、蛋白、抗生素等多种结构各异的物质^[4]。抗生素属于次级代谢产物, 许多抗生素对自身产生菌都具有一定的毒性, 为了保护自身, 抗生素产生菌往往通过修饰抗生素本身使其在体内不能发挥毒性作用或者将抗生素通过 ABC 转运蛋白排出体外来保护自身^[5-6]。

正定霉素^[7]、光辉霉素^[8]、竹桃霉素^[9] 等抗生素产生菌正是通过 ABC 转运蛋白将抗生素分泌到胞外来保护自身的, 并且这类 ABC 转运蛋白的编码基因往往分布于相应的次级代谢产物合成基因簇中^[10]。在多烯大环内酯类抗生素的生物合成基因簇中也找到了表达 ABC 转运蛋白的同源基因^[11-14]。

多烯大环内酯类抗生素以制霉菌素、两性霉素、杀念菌素 (FR-008) 和匹马霉素为代表, 这类抗生素能够与真菌细胞膜上的甾醇相互作用形成跨膜孔道, 造成胞内分子外泄, 因此具有很强的抗真菌活性^[15-16]。并且由于多烯类抗生素的广谱抗菌活性以及其耐药菌的稀少, 这类抗生素目前在系统性真菌感染的治疗中具有很重要的作用^[17]。在杀念菌

基金项目: 国家自然科学基金 (31170085); 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2012CB721004)

* 通信作者。Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn, zxdeng@sjtu.edu.cn

作者简介: 雷璇 (1985–), 女, 河南洛阳人, 博士, 主要从事分子微生物学研究。E-mail: myown625@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2012-07-10; 修回日期: 2012-10-11

素生物合成基因簇的 *fscA* 和 *fscC* 聚酮合酶区域之间有两个转运基因 *fscTI* 和 *fscTII*^[13] (图 1), 氨基酸序列的同源比对表明 FscTI 具有 ABC 转运蛋白核苷酸结合结构域保守的 P-环 NTP 酶模块, 而 FscTII 具有 ABC 转运蛋白中的保守跨膜区域, 因此在链霉菌 FR-008 (*Streptomyces* sp. FR-008) 中 FscTI 与 FscTII 可能协同发挥了功能。HMMTOP 系统的预测结果也与氨基酸序列的同源比对结果相一致, FscTI 位于细胞质内, 而 FscTII 有 5 个跨膜螺旋^[18]。由于多烯

类抗生素是通过与真菌细胞膜上的甾醇类物质相互作用来发挥抗真菌活性的, 因此一般认为多烯类抗生素不具有抗细菌的活性, 那么多烯类抗生素生物合成基因簇中存在的 ABC 转运蛋白基因的具体功能就有待进一步的阐明。本研究通过遗传学方法对链霉菌 FR-008 中 ABC 转运基因 *fscTI* 和 *fscTII* 的敲除与过量表达, 证实了 *fscTI* 和 *fscTII* 在杀念菌素的生物合成和转运过程中都发挥了重要的作用。

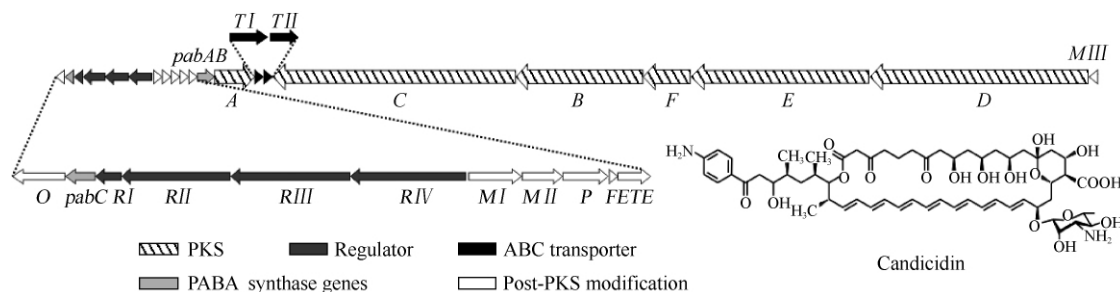


图 1 链霉菌 FR-008 中杀念菌素生物合成基因簇的组成以及杀念菌素的结构^[13]

Fig. 1 The organization of candicidin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. FR-008 and the chemical structure of candicidin^[13].

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件: ZYJ-6 是链霉菌 FR-008 聚酮合酶功能域 KR21 与 DH18 活性位点同时发生点突变的工程菌株, 主要发酵产物为 FR-008-III, 由周永军博士构建^[19]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B 用于 DNA 的遗传操作^[20], *E. coli* ET12567/pUZ8002 用于大肠杆菌与链霉菌之间的接合转移^[21]。pMD18-T (TaKaRa) 和 pBlueScript II SK plus (Stratagene) 用于 DNA 的克隆与测序。pJTU1278 是 pHZ1358 的衍生质粒, 由何云龙博士构建^[22], 用于基因的敲除和过量表达。

SFM^[23] 用于产孢 (30℃, 3 d)、固体发酵 (30℃, 7 d) 以及接合转移。TSBY (10.3% 蔗糖) 用于菌丝体的生长和链霉菌总 DNA 的提取。LB 以及 LA 用于大肠杆菌的培养。根据需要加入的抗生素的终浓度为: 氨苄霉素 (Amp) 100 μg/mL, 卡那霉素 (Km) 50 μg/mL, 氯霉素 (Cml) 25 μg/mL, 阿泊拉霉素 (Apr) 30 μg/mL, 硫链丝菌素 (Thio) 12.5 μg/mL 和 萘啶酮酸 (Ndid) 25 μg/mL。

1.1.2 寡聚核苷酸引物和 DNA 序列分析: 本研究中所用寡聚核苷酸引物列于表 1 中, 由上海生物工程技术有限公司合成。质粒测序由 Invitrogen 生物技术有限公司完成。DNA 序列以及推测的蛋白质序列分析由在线 BLAST 搜索引擎完成 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

1.1.3 主要试剂和仪器: KOD 聚合酶、限制性内切酶和 DNA 连接酶购自 fermentas 公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司。GelDocXR 凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司产品。ABI 9700 型 PCR 仪为 Applied Biosystems 公司产品。Agilent 1100 series LC/MSD Trap 液相色谱质谱联用仪为安捷伦公司产品。色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

1.2 *fscTI* 与 *fscTII* 基因敲除突变株的构建

1.2.1 *fscTI* 与 *fscTII* 基因敲除质粒的构建: 分别用引物 *fscTIF*/*fscTIR* 和 *fscTIIF5*/*fscTIIR5* 通过聚合酶链式反应扩增得到用于同源交换的 2.0 kb 左臂和 1.2 kb 右臂, 将两个片段分别插入到 pBlueScript II SK plus 中得到 pJTU4124 和 pJTU4135。用引物 *aac* (3) IVF/*aac* (3) IVR 扩增得到 1.4 kb 用于替换的阿泊拉抗性基因 *aac* (3) IV, 将扩增得到的片段插入到

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site
fscTIF	ACCTCGCCTACTCCCTGCTCACCACC	2068	
fscTIR	CCGTATGCCTTGCTGACGCCCTCC		
fscTIF5	GCGTCAGCTACCTCGACTACGTCCTGC	1195	
fscTIR5	GACGGGACTGCTTTGCTGTGGG		
aac(3) IVF	GAATTCGGGGATCCGTCGACC	1376	<i>EcoRI</i>
aac(3) IVR	AAGCTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC		<i>HindIII</i>
transporter testF	ACAACCTCGTCTGATCGCCGCTCT	766	
transporter testR	GAGTGGTCAAGGGTCTCCGTGAAA		
transporter testF2	TCGCCACCTTCACAGACCCACG	2121	
transporter testR2	GACGGTCCGAAGTCGCCTGTTTCCT		
fscTF	GGATCCACCCTGATCTCGACCACCC	2560	<i>BamHI</i>
fscTR	GAATTCGGTCCGAAGTCGCCTGTTT		<i>EcoRI</i>
thiof	GAGTTGCTGGATCTGTGCG	332	
thior	ACGACGGGAAGGGAGAAG		

pMD18-T 中得到 pJTU4122。上述克隆通过测序验证后,从 pJTU4122 上酶切得到 1.4 kb *EcoRI* DNA 片段插入 pJTU4124 的相应位点得到 pJTU4134,从而使同源交换左臂和阿泊拉抗性基因在 *EcoRI* 位点拼接,得到的 3.4 kb 的重组片段用 *HindIII* 从 pJTU4134 上切出插入到 pJTU4135 的相应位点得到 pJTU4136,并保证 pJTU4136 中 *fscTI* 与 *fscTII* 方向的一致性,继而 4.6 kb 的 *KpnI-SpeI* 重组片段从

pJTU4136 转移至 pJTU1278 的相应位点得到最终用于基因敲除的质粒 pJTU4137 (图 2-A)。

1.2.2 *fscTI* 与 *fscTII* 基因敲除突变株的构建:在辅助质粒 pUZ8002 的协助下,将基因敲除质粒 pJTU4137 通过接合转移导入 ZYJ-6 中。将所获得的接合转移子在含有 12.5 μg/mL 硫链丝菌素的平板上培养富集同源重组单交换菌株,再经过两轮非抗平板松弛后,在 30 μg/mL 阿泊拉霉素抗性平板与

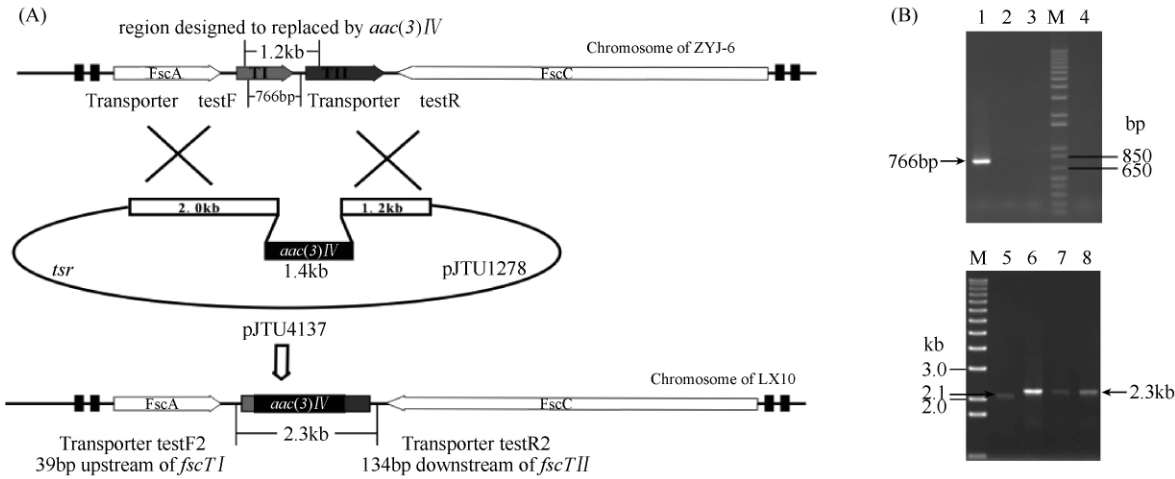


图 2 ABC 转运基因 *fscTI/fscTII* 敲除突变株 LX10 的构建 (A) 和突变株 LX10 的 PCR 验证图谱 (B)

Fig. 2 Construction and confirmation of the *fscTI/fscTII* disruption mutant LX10.

A:Construction of ABC transporter genes *fscTI/fscTII* disruption mutant LX10. The 1.2 kb region in chromosome of ZYJ-6 was replaced by 1.4 kb *aac(3) IV* gene.

B:PCR confirmation of the mutant LX10. M, 1 kb DNA ladder; lane 1, a 766 bp PCR fragment was amplified by using transporter testF/transporter testR as primers and total DNA of ZYJ-6 as template; lane 2, 3, 4, no PCR fragment was obtained by using transporter testF/transporter testR as primers and total DNA of LX10 as template; lane 5, a 2.1 kb PCR fragment was amplified by using transporter testF2/ transporter testR2 as primers and total DNA of ZYJ-6 as template; lane 6, 7, 8, a 2.3 kb PCR fragment was amplified by using transporter testF2/transporter testR2 as primers and total DNA of LX10 as template.

30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿泊拉霉素和 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫链丝菌素双抗平板上作单菌落影印对照, 最终筛选得到了阿泊拉霉素抗性而硫链丝菌素敏感的突变株 LX10。为验证突变株 LX10 中 *fscTI* 与 *fscTH* 确实发生了阻断, 在敲除序列内部设计了一对引物 transporter testF/transporter testR, 野生型和单交换都应能扩出 766 bp 的片段, 但双交换突变株不能扩出来 (图 2-B), PCR 结果与预期相一致。另外分别在 *fscTI* 上游 39 bp 与 *fscTH* 下游 134 bp 各设计一条引物 transporter testF2/transporter testR2, 由于突变株 LX10 中 ABC 转运蛋白编码基因内部 1.2 kb 的 DNA 片段被 1.4 kb 的阿泊拉抗性基因替换, 因此以突变株 LX10 为模板扩增得到的片段 (2.3 kb) 比以 ZYJ-6 为模板扩增得到的片段 (2.1 kb) 大 200 bp (图 2-B)。以突变株 LX10 为模板扩增所得片段克隆到 pMD-18T 后进行测序, 测序结果证实突变株 LX10 中 *fscTI* 与 *fscTH* 基因已经被阿泊拉霉素抗性基因替换。

1.3 *fscTI* 与 *fscTH* 基因过量表达工程菌株的构建

1.3.1 *fscTI* 与 *fscTH* 基因过量表达质粒的构建:

用引物 *fscTF*/*fscTR* 扩增得到从 *fscTI* 上游 468 bp 到

fscTH 下游 132 bp 约 2.5 kb 的片段。为方便后续试验, 在 *fscTF* 的 5' 端引入了 *Bam*HI 酶切位点, 同时在 *fscTR* 的 5' 端引入了 *Eco*RI 酶切位点。将扩增得到的 2.5 kb 片段插入 pBlueScript II SK plus 得到 pJTU4149, 并进行测序验证。用 *Bam*HI-*Eco*RI 酶切 pJTU4149 得到含有天然启动子的 *fscTI*/*fscTH* 片段并插入到 pJTU1278 的相应位点得到最终用于 *fscTI*/*fscTH* 基因过量表达的质粒 pJTU4150 (图 3-A)。

1.3.2 *fscTI* 与 *fscTH* 基因过量表达工程菌株的构建:

在辅助质粒 pUZ8002 的协助下, 将基因过量表达质粒 pJTU4150 通过接合转移导入 ZYJ-6 中。将所获得的接合转移子在含有 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫链丝菌素平板上扩大培养得到 ABC 转运蛋白过量表达的转化子 LX11。为验证转化子 LX11 中已经存在过量表达质粒 pJTU4150, 用扩增硫链丝菌素抗性基因的引物 thiof/thior (pJTU1278 上含有硫链丝菌素抗性基因) 进行验证, 以 LX11 为模板扩增能够得到 300 bp 左右的条带, 而以对照菌株 ZYJ-6 为模板则不能扩增出相应条带 (图 3-B)。

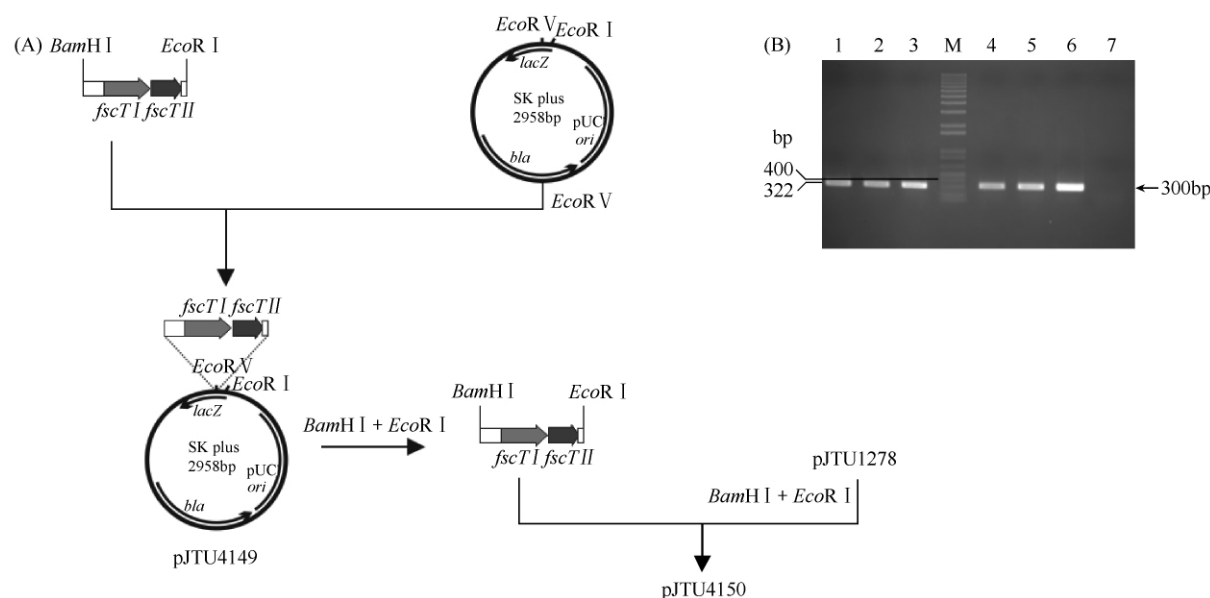


图 3 ABC 转运基因 *fscTI*/*fscTH* 过量表达质粒的构建 (A) 和 ABC 转运蛋白过量表达转化子 LX11 的 PCR 验证图谱 (B)

Fig. 3 Construction and confirmation of the *fscTI*/*fscTH* overexpression strain. A: Construction of the plasmid for overexpression of ABC transporter genes *fscTI*/*fscTH*. B: PCR confirmation of the ABC transporter genes overexpression strain LX11. M, 1 kb DNA ladder; lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, a 322 bp PCR fragment was amplified by using thiof/thior as primers and total DNA of LX11 as template; lane 7, no PCR fragment was obtained by using thiof/thior as primers and total DNA of ZYJ-6 as template.

1.4 链霉菌发酵、发酵产物的 HPLC 以及 LC-MS 检测

将待测菌株在 25 mL SFM 平板上进行稀释滴定, 30℃ 培养 3 d 后孢子计数, 根据孢子计数的结果调节各个菌株之间的接种量。将接种后的 25 mL SFM 平板在 30℃ 培养 7 d 后充分破碎, 加入 2 倍体积甲醇, 40℃ 水浴超声 15 min 萃取培养物。如此反复至萃取液颜色趋近白色, 回收并合并萃取液, 滤去萃取液残渣, 避光 40℃ 减压蒸发浓缩萃取液至粘稠状。加入 20 倍体积的蒸馏水充分震荡后高速离心回收沉淀物, 如此反复至上清颜色趋于白色。然后加入 20 倍体积乙酸乙酯洗涤沉淀物 1 到 2 次, 最终得到嫩黄色沉淀。用甲醇充分溶解并过滤后用于 HPLC 和 LC-MS 分析。

HPLC 的条件为流速 0.6 mL/min, 流动相为 5.5 mmol NH₄AC (pH 4.5): Merck HPLC 级乙腈 = 55:45 (V/V), 检测波长为 380 nm。质谱检测是在正离子模式下进行的, 干燥气流为 8 L/min, 喷雾器压力为 25 psi, 干燥气温为 325℃。

2 结果和分析

2.1 链霉菌 FR-008 中转运基因 *fscTI* 与 *fscTII* 的生物信息分析

我们成功克隆和鉴定了杀念菌素的生物合成基因簇, 对该基因簇生物信息学分析发现在 *fscA* 和 *fscC* 聚酮合酶区域之间有 2 个转运基因 *fscTI* 和 *fscTII*, 它们分别编码 335 和 239 个氨基酸。FscTI 与 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 的 ATP 结合 ABC 转运蛋白 2SCK31.23 显示 56% 的相似性 (similarity) 和 44% 的一致性 (identity)^[24], 与 *Streptomyces argillaceus* 的 ATP 结合 ABC 转运蛋白 MtrA 显示 43% 的相似性和 29% 的一致性, 并且与已经有结构报道的 *Staphylococcus aureus* 中的 ABC 转运蛋白 Sav1866 的 C 端显示 46% 的相似性和 27% 的一致性; FscTII 与 *S. coelicolor* A3 (2) 中的 ABC 转运蛋白穿膜组分 SCGD3.26 显示 41% 的相似性和 23% 的一致性, 与内膜转运蛋白 2SCK31.24 显示 40% 的相似性和 23% 的一致性^[24], 与 *S. argillaceus* 的 ABC 转运跨膜蛋白 MtrB 显示 48% 的相似性和 32% 的一致性。氨基酸序列的同源比对表明 FscTI 具有 ABC 转运蛋白核苷酸结合结构域, 而 FscTII 具有 ABC 转运

蛋白中的跨膜区域。综合以上生物信息分析结果推测在链霉菌 FR-008 中 FscTI 与 FscTII 属于 ABC 转运蛋白超家族, 并且两者可能协同发挥了转运功能。

2.2 *fscTI* 与 *fscTII* 基因敲除对杀念菌素生物合成的影响

根据以上对链霉菌 FR-008 中转运基因 *fscTI* 和 *fscTII* 的生物信息分析, 暗示这 2 个基因很可能参与到了杀念菌素的外排过程, 为了验证这个推论是否正确, 我们构建了 *fscTI* 与 *fscTII* 基因敲除突变株。我们选择 ZYJ-6 作为出发菌株, 因为它主要产生 FR-008-III, 便于以后对突变株发酵产物的检测与分析。在辅助质粒 pUZ8002 的协助下, 将基因敲除质粒 pJTU4137 通过接合转移导入 ZYJ-6 中, 最终筛选得到了 *fscTI* 与 *fscTII* 基因敲除突变株 LX10 (图 2)。

为确认基因工程突变株 LX10 的发酵产物, 在 SFM 上划线培养突变株, 30℃ 培养 7 d 后用甲醇萃取发酵物用于 HPLC 以及 LC-MS 分析。HPLC 检测结果显示突变株 LX10 中杀念菌素组份 FR-008-III 吸收峰消失, LC-MS 也未检测到 FR-008-III 对应的核质比 1110 (正离子模式下, 比分子量多 1), 并且整个 HPLC 洗脱物的全波长扫描图谱中也未发现多烯类特征紫外吸收峰, 说明突变株 LX10 不再产生杀念菌素 (图 4)。

2.3 *fscTI* 与 *fscTII* 基因过量表达对杀念菌素生物合成的影响

fscTI 与 *fscTII* 的基因敲除实验结果表明它们很有可能参与到了杀念菌素的生物合成, 为了进一步研究 FR-008 生物合成基因簇中的 FscTI 与 FscTII 是否具有 ABC 转运蛋白的功能, 能够将多烯类抗生素排出胞外, 我们构建了质粒 pJTU4150, 将 *fscTI* 与 *fscTII* 在链霉菌 FR-008 中进行过量表达。同样选择 ZYJ-6 作为出发菌株, 在辅助质粒 pUZ8002 的协助下, 将基因过量表达质粒 pJTU4150 通过接合转移导入 ZYJ-6 中, 最终筛选得到了 *fscTI* 与 *fscTII* 过量表达转化子 LX11 (图 3)。为确认基因工程菌株 LX11 的发酵产物以及产量变化, 通过定量的方法在 SFM 平板上培养突变株, 30℃ 培养 7 d 后用甲醇萃取发酵物用于 HPLC 以及 LC-MS 分析 (见方法)。在菌株 LX11 的发酵产物中能够找到核质比 1110 的 FR-008-III (正离子模式下, 比分子量多 1), 并且通过定量分析, LX11 中 FR-008-III 的产量约是对照菌株 ZYJ-6: pJTU1278 的 1.5 倍 (图 4)。

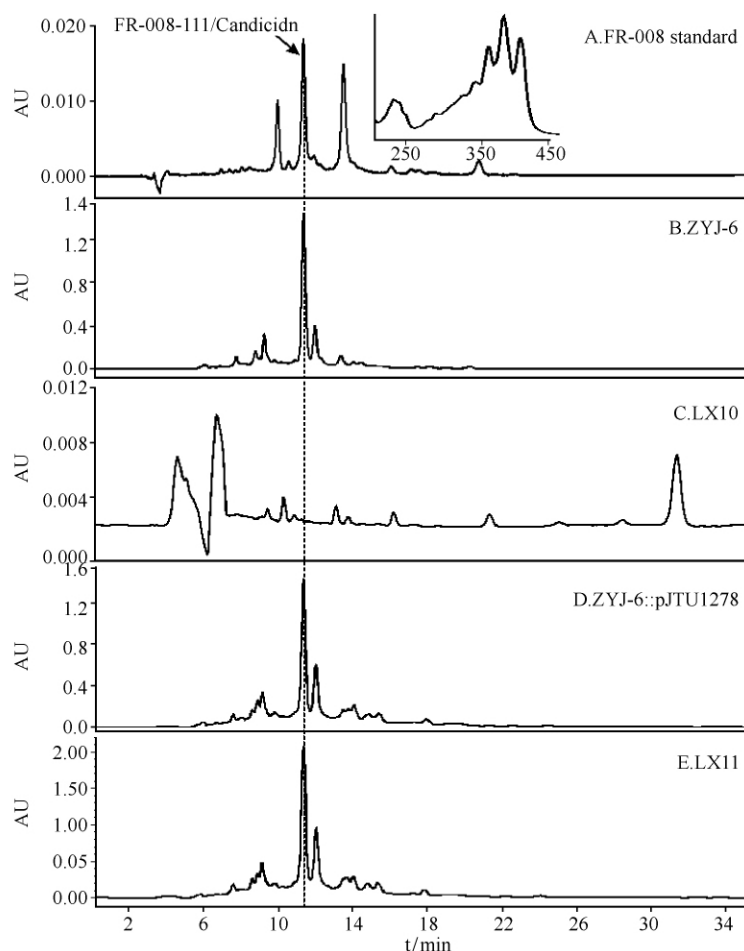


图4 ABC转运基因 *fscTI/fscTH* 基因敲除与过量表达菌株的 HPLC 检测

Fig. 4 HPLC analysis of ABC transporter genes *fscTI/fscTH* disruption and overexpression strains. A, FR-008 standard, and shows the specific UV absorption spectra of polyene antibiotics; B, ZYJ-6; C, LX10, no polyene antibiotics were observed; D, ZYJ-6::pJTU1278, used as a control strain for evaluate the production of candicidin when compared to that of LX11; E, LX11. Overexpression of the ABC transporter genes *fscTI/fscTH* increased candicidin production.

3 讨论

许多抗生素产生菌中都存在 ABC 转运蛋白,能够将胞内合成的次级代谢产物及时排出胞外,从而保护产生菌自身免受抗生素的毒害作用。虽然多烯大环内酯类抗生素是通过与细胞膜上的甾醇相互结合来发挥抗菌活性的,但是由于多烯类抗生素的水溶性很低,胞内的大量积累也会对细胞造成毒害作用,因此同样需要 ABC 转运蛋白将合成的多烯类抗生素及时排出胞外,在多烯类抗生素生物合成基因簇中存在的 ABC 转运蛋白很有可能就负责了抗生素的外排。

对 FR-008 生物合成基因簇中 *fscTI* 与 *fscTH* 的序列分析表明它们编码的蛋白属于 ABC 转运蛋白超家族,推测它们与杀念菌素的生物合成和转运是密切相关的。在已经发表的其他 3 种多烯大环内酯类抗生素制霉菌素、两性霉素和匹马霉素的生物合成基因簇中同样都能够找到 2 个编码 ABC 转运蛋白的同源基因,分别是 *nysG/nysH*、*amphG/amphH* 以及 *pimA/pimB*^[11-12,14]。与杀念菌素生物合成基因簇中 ABC 转运蛋白 FscTI/FscTH 不同的是, NysG/NysH、AmphG/AmphH 和 PimA/PimB 中每一个蛋白都单独具有一个 ATP 结合结构域和一个跨膜结构域。Zotchev 等分别缺失制霉菌素生物合成基因簇中的 *nysG* 和 *nysH*,得到的突变株仍然能够产生少量

的制霉菌素,同时还有一定量的 10-脱氧制霉菌素(10 位少一个羟基的制霉菌素前体)产生,因此推测在制霉菌素产生菌中还有其他转运蛋白能够帮助制霉菌素以及其类似物的转运,并且 NysG-NysH 可能为制霉菌素前体 10-脱氧制霉菌素 10 位上的羟基化提供了有利的环境^[25]。本文获得的 *fscTI/fscTII* 基因敲除突变株 LX10 的 HPLC 以及 LC-MS 分析结果与制霉菌素产生菌中的研究结果不同,*fscTI/fscTII* 敲除后不再有多烯类抗生素产生,说明在 ZYJ-6 中不存在其他具有同样功能的 ABC 转运蛋白,杀念菌素的外排可能特异的由 FscTI 和 FscTII 负责。另外,在链霉菌 FR-008 生物合成基因簇中,*fscTI* 与 *fscTII* 位于聚酮合酶 *fscA* 和 *fscC* 之间,并且分别处在两个聚酮合酶基因的下游,因此对 *fscTI* 与 *fscTII* 的敲除并不会造成极性效应,排除了杀念菌素生物合成基因簇中其他结构基因的敲除导致不再产生杀念菌素的可能。

增加抗生素产生菌中负责外排基因的拷贝数往往可以提高抗生素的产量^[26-27],工程菌株 LX11 的 HPLC 以及 LC-MS 分析结果表明,对 FR-008 生物合成基因簇中的 ABC 转运蛋白的过量表达同样可以提高 FR-008 的产量,这可能是由于 ABC 转运蛋白的过量表达促进了胞内抗生素的外排,从而在一定程度上减弱了合成的次级代谢产物对生物合成的反馈抑制。

本文通过对杀念菌素生物合成基因簇中编码 ABC 转运蛋白基因 *fscTI* 与 *fscTII* 的敲除与过量表达,证实了它们参与到了多烯类抗生素 FR-008 的生物合成和转运过程,并且 FscTI 和 FscTII 是特异性负责 ZYJ-6 中杀念菌素的外排。*fscTI* 与 *fscTII* 的过量表达增加了杀念菌素的产量也为利用此方法提高其它多烯类抗生素如两性霉素的产量提供了例证。

参考文献

- [1] Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Research in Microbiology*, 2001, 152 (3-4): 205-210.
- [2] Holland IB, Blight MA. ABC-ATPases, Adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 293 (2): 381-399.
- [3] Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in Structure Biology*, 2007, 17 (4): 412-418.
- [4] Gottesman MM, Ambudkar SV. Overview: ABC transporters and human disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2001, 33 (6): 453-458.
- [5] Davies JE, Benveniste RE. Enzymes that inactivate antibiotics in transit to their targets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1974, 235 (0): 130-136.
- [6] Mendez C, Salas JA. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Research in Microbiology*, 2001, 152 (3-4): 341-350.
- [7] Guilfoile PG, Hutchinson CR. A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88 (19): 8553-8557.
- [8] Fernandez E, Lombo F, Mendez C, Salas JA. An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*. *Molecular and General Genetics*, 1996, 251 (6): 692-698.
- [9] Olano C, Rodriguez AM, Mendez C, Salas JA. A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Molecular Microbiology*, 1995, 16 (2): 333-343.
- [10] Martin JF, Casqueiro J and Liras P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Current opinion in Microbiology*, 2005, 8 (3): 282-293.
- [11] Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, Strlm AR, Valla S, Zotchev SB. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry&Biology*, 2000, 7 (6): 395-403.
- [12] Caffrey P, Lynch S, Flood E, Finnan S, Oliynyk M. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chemistry&Biology*, 2001, 8 (7): 713-723.

- [13] Chen S, Huang X, Zhou X, Bai L, He J, Jeong KJ, Lee SY, Deng Z. Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candididin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chemistry & Biology*, 2003, 10 (11): 1065-1076.
- [14] Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E, Martin JF. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (15): 10133-10139.
- [15] Bolard J. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, 864 (3-4): 257-304.
- [16] Baginski M, Czub J, Sternal K. Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: Molecular modeling studies. *Chemical Record*, 2006, 6 (6): 320-332.
- [17] Zotchev SB. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Current medicinal Chemistry*, 2003, 10 (3): 211-223.
- [18] Tusnady GE, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 2001, 17 (9): 849-850.
- [19] Zhou Y, Li J, Zhu J, Chen S, Bai L, Zhou X, Wu H, Deng Z. Incomplete β -ketone processing as a mechanism for polyene structural variation in the FR-008/candididin complex. *Chemistry & Biology*, 2008, 15 (6): 629-638.
- [20] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 1983, 166 (4): 557-580.
- [21] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigma E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (1): 204-211.
- [22] He Y, Wang Z, Bai L, Liang J, Zhou X, Deng Z. Two pHZ1358-derivative vectors for efficient gene knockout in *Streptomyces*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20 (4): 678-682.
- [23] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation, 2000.
- [24] 陈实. 多烯类抗生素杀念菌素的生物合成机理与途径工程. 上海交通大学博士学位论文, 2004.
- [25] Sletta H, Borgos SEF, Bruheim P, Sekurova ON, Grasdalen H, Aune R, Ellingsen TE, Zotchev SB. Nystatin biosynthesis and transport: *nysH* and *nysG* genes encoding a putative ABC transporter system in *Streptomyces noursei* ATCC 11455 are required for efficient conversion of 10-deoxynystatin to nystatin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49 (11): 4576-4583.
- [26] Qiu J, Zhuo Y, Zhu D, Zhou X, Zhang L, Bai L, Deng Z. Overexpression of the ABC transporter *avtAB* increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92 (2): 337-345.
- [27] Ullan RV, Liu G, Casqueiro J, Gutierrez S, Banuelos O, Martin JF. The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 267 (5): 673-683.

Function of transporter genes *fscTI* and *fscTII* in the biosynthetic cluster of candicidin/FR-008

Xuan Lei, Lingxin Kong, Chen Zhang, Delin You^{*}, Zixin Deng^{*}

State Key Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Objective] To investigate function of transporter genes *fscTI* and *fscTII* in the biosynthetic gene cluster of candicidin/FR-008. [Methods] We constructed a plasmid pJTU4137 for disruption of transporter genes *fscTI* and *fscTII* by conjugation and homologous recombination. The transporter genes were also PCR amplified and cloned into the high-copy plasmid pJTU1278 for overexpression in strain ZYJ-6 derived from *Streptomyces* sp. FR-008. [Results] The disruption mutant LX10 was unable to produce candicidin and its analogues. Overexpression of *FscTI* and *FscTII* in ZYJ-6 caused a 1.5-fold increase in FR-008-III production compared with the control. [Conclusion] We confirmed that *fscTI* and *fscTII* are function as ATP dependent ATP binding cassette (ABC) transporters in the biosynthetic gene cluster of FR-008. Furthermore, a positive example was provided for improving antibiotic production in other polyene producing strains based on the results that overexpression of *fscTI* and *fscTII* increased candicidin production.

Keywords: polyene antibiotics, ABC transporter proteins, gene disruption, gene overexpression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science Foundation of China (31170085) and by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB721004)

^{*} Corresponding authors. Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn, zxdeng@sjtu.edu.cn

Received: 10 July 2012/Revised: 11 October 2012

《微生物学报》第十届编委会第一次会议纪要

纪念中国微生物学会成立 60 周年大会暨 2012 年学术年会于 2012 年 10 月 27-28 日在江苏省南京市钟山宾馆召开。10 月 27 日晚,召开了《微生物学报》第十届编委会第一次会议,主编谭华荣研究员主持会议。出席编委会会议的成员,有顾问邓子新院士,主编谭华荣,副主编东秀珠、胡福泉、黄力、陆承平、曲音波、沈萍(陈向东代)、徐建国、杨瑞馥,编委陈冠军、黄英、李越中、刘钢、孙明、温廷益、向华、谢建平以及编辑部成员共 20 多人参加了会议。

本次会议的主要议题是目前形势下《微生物学报》的定位,以及第十届编委会如何进一步提升《微生物学报》学术影响力的建议。编委们首先听取了编辑部对期刊现状、2011-2012 年的投稿、审稿统计情况汇报,接着谭华荣主编回顾了学报上届编委会的工作,对各位编委给予《微生物学报》在投稿、审稿方面的无私付出表示衷心感谢,并对编辑部的工作进行了肯定。

讨论阶段,各位编委专家畅所欲言,为《微生物学报》的发展献计献策。集中话题是由于目前评价体系导致的优秀稿件外流现象,以及它对国内期刊,尤其是中文期刊产生的巨大冲击。多数编委认为,在这种形势下,《微生物学报》作为国内目前水平较高的中文学术期刊,需要保持它的高质量。针对高水平稿源不足的情况,编委们提出了许多很好的建议,如:加强与一些专业会议的合作,有针对性的组稿;加强与一些大项目课题组合作,做一些专刊专栏;编辑部多组织一些综述类的文章;编委们继续响应每 2 年给微生物学报贡献 1-2 篇论文的倡导,等等。

编委们同时还建议编辑部加强与编委及审稿专家的及时沟通,以便他们准确把握稿件的质量及期刊的出版计划。

会议对《微生物学报》立足中文学术期刊的地位,加强组稿,热诚为作者服务等内容达成了一致意见。相信在第十届编委会的领导下,通过编辑部人员的共同努力,《微生物学报》会办得更好。