



## 红树林源白骨壤链霉菌中多环稠合大环内酰胺类化合物的结构多样性研究

翁静怡<sup>1</sup>, 步绪亮<sup>2</sup>, 徐俊<sup>2</sup>, 徐岷涓<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学系统生物医学教育部重点实验室, 系统生物医学研究院, 上海 200240

<sup>2</sup>上海交通大学微生物代谢国家重点实验室, 生命科学技术学院, 上海 200240

**摘要:**【目的】通过基因组挖掘的方法, 研究红树林来源白骨壤链霉菌 *Streptomyces avicenniae* 9-9 中多环稠合大环内酰胺(PiMs)类化合物的结构多样性。【方法】通过生物信息学分析白骨壤链霉菌基因组序列, 寻找 PiMs 类化合物的生物合成相关基因; 利用 UPLC-MS/MS 技术对该菌的次级代谢产物进行分析。【结果】在白骨壤链霉菌基因组中发现 PiMs 生物合成基因簇(*aviA-D*); 从菌液提取物中鉴定出 5 个 PiMs 类化合物, 其中包括 ikarugamycin (化合物 1)和 capsimycin B (化合物 2); 基于 PiMs 类化合物 5-6-5 环类型的 MS/MS 碎裂规律, 对化合物 3–5 的结构进行了推测。【结论】红树林来源白骨壤链霉菌 *S. avicenniae* 9-9 具有产生 5-6-5 环类型的 PiMs 类化合物的能力。

**关键词:** 红树林, 白骨壤链霉菌, 次级代谢产物, 多环稠合大环内酰胺, 生物合成

红树林是生长于热带和亚热带海岸潮间带的木本植物群落, 是高生产力、高盐度和高湿度特征的近海生态系统中的生产者。已报道从红树林放线菌中发现的天然产物有 122 个, 其中新天然产物有 73 个<sup>[1-4]</sup>, 这些化合物具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化等多种显著的生物活性<sup>[5-6]</sup>。

多环稠合大环内酰胺化合物(polycyclic tetramate macrolactams, 简称 PiMs)是一类独特的天然产物。这类化合物由大环内酰胺环(macrolactam

ring)和多环稠合的三环结构(carbocyclic ring)两部分组成, 依据碳环的不同环合方式, 可主要分为 5-6-5、5-5-6、5-4-6 和 5-5 环等四种类型<sup>[7-8]</sup>。此类化合物具有多个手性中心, 结构变化多样, 天然来源的新结构层出不穷。Ikarugamycin 是首个被报道的 PiMs 类化合物, 属于 5-6-5 环结构<sup>[9]</sup>。随后不断有 PiMs 类化合物被发现, 如图 1 所示。例如, 从海洋异壁放线菌 WH1-2216-6 发酵产物中分离得到 16-hydroxymaltophilin 等 6 个 5-5-6 环

基金项目: 上海交通大学“转化医学交叉研究基金”(ZH2018ZDB08)

\*通信作者。Tel: +86-21-34207540; Fax: +86-21-34206059; E-mail: minjuanxu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-13; 修回日期: 2019-04-10; 网络出版日期: 2019-04-22

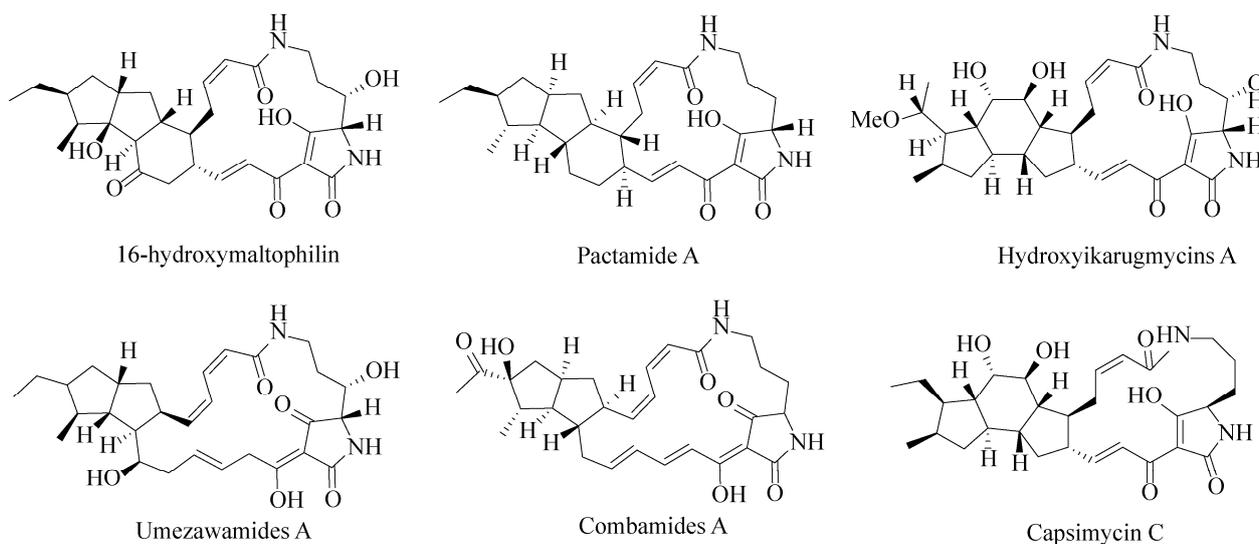


图 1. 近年来发现的 PTMs 类化合物结构

Figure 1. Chemical structures of selected PTMs compounds.

PTMs 类化合物<sup>[10]</sup>; 从海洋来源 *Streptomyces pactum* SCSIO 02999 发现了 6 个新的 PTMs 类化合物 pactamides A–F<sup>[11]</sup>; 从链霉菌 SCSIO 40060 中分离得到 3 个新化合物 hydroxyikarugmycins A–C<sup>[12]</sup>; 通过 *Umezawaea* sp. RD066910 和 *Tsakamurella pulmonis* TP-B0596 的联合培养可以得到 2 个新化合物 umezawamides A–B<sup>[13]</sup>; 陆地来源链霉菌 S10 可以产生 5-5 环结构的化合物 combamides A–D<sup>[14]</sup>; 我们也从红树林源厦门链霉菌 318 分离得到 5-6-5 环系列化合物 capsimycin C–D<sup>[15]</sup>。目前, 共报道了 50 多个 PTMs 类化合物<sup>[8,10–15]</sup>, 发现其具有抗原生动物<sup>[9]</sup>、抗真菌<sup>[9,16]</sup>、抗细菌<sup>[16]</sup>和抗病毒<sup>[17]</sup>多种生物活性, 还可抑制多种肿瘤细胞的生长, 如 MCF-7、HepG2、Huh7、HL-60 及 PANC-1<sup>[8,15,18–20]</sup>, 因此 PTMs 类化合物不仅结构多样, 而且生物活性显著。

PTMs 类化合物虽然具有复杂的骨架结构, 但是其生物合成途径由简洁的聚酮合成酶和非核糖体肽合成酶(PKS/NRPS)的杂合基因簇编码<sup>[8]</sup>。张长生等将链霉菌 ZJ306 菌株中 *ika* 基因簇导入变铅

青链霉菌<sup>[21]</sup>, Antosch 等将链霉菌 Tue6239 菌株中 *ika* 基因簇导入大肠杆菌中<sup>[22]</sup>, 分别实现了 PTMs 类化合物 ikarugamycin 在异源宿主中的生物合成。这些结果显示了 *ikaABC* 这 3 个基因是负责 PTMs 骨架结构形成的充分条件, 其中 *ikaB* 和 *ikaC* 基因决定了 PTMs 类化合物的环合方式。

此外, PTMs 基因簇中还包括羟化酶(sterol desaturase), 可以对大环进行羟基修饰, 将 ikarugamycin 转化为 butremycin<sup>[23]</sup>。在前期研究中, 我们测定了红树林来源的厦门链霉菌(*Streptomyces xiamenensis* 318)的全基因组序列, 通过生物信息学分析预测并确定其具有合成 PTMs 类化合物的能力<sup>[24]</sup>。我们还发现 P450 细胞色素氧化酶 IkaD 在厦门链霉菌 318 中发挥环氧化和羟基化两种后修饰作用, 负责 ikarugamycin 和 capsimycin 在体内的生物转化和降解<sup>[15]</sup>。

白骨壤链霉菌 *S. avicenniae* 9-9 是本课题组从福建漳江口红树林沉积物样本中分离和鉴定的新种<sup>[25]</sup>。本文通过基因组信息挖掘发现白骨壤链霉菌具有 PTMs 生物合成基因簇, 对该菌的发

醇产物进行 UPLC-MS 分析,通过 MS/MS 方法对白骨壤链霉菌中多个 PTMs 类化合物的结构类型进行快速判断。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株:** 本研究使用的白骨壤链霉菌 9-9 菌株保藏于中国海洋微生物菌种保藏管理中心,索取号 MCCC 1A01535 (=NRRL B-24776)。

**1.1.2 培养基:** 固体平板培养基(g/L): 燕麦粉 20, 琼脂 18,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001, pH 7.3。种子培养基 TSB: 胰蛋白胨大豆肉汤 30 g/L。发酵培养基 GYM 培养基(g/L): 葡萄糖 4, 酵母提取物 4, 麦芽提取物 10, pH 7.3; ISP3 培养基(g/L): 燕麦粉 20,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001, pH 7.3; ISP4 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,  $\text{NaCl}$  1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,  $\text{CaCO}_3$  2,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001, pH 7.3。 $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。痕量元素溶液组成为  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌, 获得无菌痕量盐溶液, 接种前再分别加入到培养基中。

**1.1.3 试剂:** 甲醇、乙酸乙酯, 购自上海凌峰化学试剂公司; 色谱级乙腈(Acetonitrile, ACN)、三氟乙酸(TFA), 购自 Sigma-Aldrich 公司; ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 购自 Agilent 公司。化合物标准品 ikarugamycin 和 capsimycin B 是本课题组前期从厦门链霉菌 318 的发酵产物中分离得到<sup>[15]</sup>。

**1.1.4 仪器:** 隔水式恒温培养箱, 购自上海一恒

科学仪器有限公司; 恒温培养摇床, 购自上海智诚仪器设备有限公司; 旋转蒸发仪, 购自日本 EYELA 东京理化器械株式会社; 模块化高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC), 购自日本 Shimadzu 公司; 液质联用 ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC、Q-TOF MS Premier, 购自 Waters 公司。

### 1.2 生物信息学分析

利用 AntiSMASH 数据库<sup>[26]</sup>, 预测白骨壤链霉菌 9-9 全基因组序列中与次级代谢合成相关的基因簇。在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上使用 BLASTP 对 PTMs 生物合成基因簇编码的蛋白进行比对分析。

### 1.3 菌株的培养与发酵

将菌种划线接种于固体平板, 30 °C 恒温培养箱培养 7–8 d, 挑选长势良好的单菌落接入 100 mL 种子培养基中, 30 °C、220 r/min 振荡培养 72 h。活化后的种子液, 按 8%接种量接种于 100 mL 发酵培养基, 30 °C、220 r/min 振荡培养 7 d, 每种发酵培养基设置 3 个平行, 每个平行发酵 100 mL, 期间保持对发酵情况的观察和记录。

### 1.4 代谢产物的提取

将发酵后的菌液分别分装在 50 mL 的离心管中, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清。上清液与等体积的乙酸乙酯充分混匀, 室温静置 24 h 后, 用 500 mL 分液漏斗进行反复萃取 3 次。3 次萃取后的乙酸乙酯合并, 于 37 °C 水浴减压旋转蒸干, 去除有机溶剂, 得到发酵粗提物。GYM 培养基 3 个平行发酵粗提物分别为 13.2、12.7 和 12.9 mg; ISP3 培养基 3 个平行发酵粗提物分别为 20.5、23.1 和 21.8 mg; ISP4 培养基 3 个平行发酵粗提物分别为 26.6、29.8 和 28.1 mg。

## 1.5 代谢产物的 HPLC 分析

使用 HPLC 对发酵粗提物进行检测, 分离柱为 Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温为 40 °C, 流动相 A 为含 0.5% TFA 的超纯水, 流动相 B 为含 0.5% TFA 的乙腈, 洗脱梯度为 25%–90% B, 总时长 43 min, 流速为 1 mL/min。上样量为 10 μL, 检测波长为 190–800 nm。使用 LC Solution 工作站查看和分析数据。

## 1.6 代谢产物的 UPLC-MS 分析

使用上海交通大学分析测试中心 UPLC-QTOF-MS 对发酵粗提物进行检测。色谱分离柱为 ACQUITY BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温为 45 °C, 流动相 A 为 1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为含 1% 甲酸的乙腈, 洗脱梯度为 5%–100% B, 流速为 0.40 mL/min。使用搭载 ESI 源的 Q-TOF 质谱仪进行质量分析, 根据化合物的不同性质采用正离子模式, 离子源温度设定为 120 °C, 毛细管和锥形电压分别设置为 3000 V 和 35 V。MS 扫描的碰撞能量为 6 eV, MS/MS 扫描的碰撞能量为 15–30 eV。扫描持续时间为 0.2 s, 锁定喷射频率为 30 s, 质荷比为 100–1500。质谱数据使用 Metabolynx™ 和 Masslynx 4.1 软件进行分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 白骨壤链霉菌 9-9 中 PTMs 生物合成基因簇 (*avi*) 的生物信息学分析

白骨壤链霉菌 9-9 菌株分离自红树林沉积物样本, 该菌株的全基因组测序已经完成<sup>[27]</sup>, 基因组大小为 6.48 Mb。基于 AntiSMASH 数据库, 从白骨壤链霉菌基因组中预测出与次级代谢相关的基因簇, 包括萜类、硫肽类抗生素、PKS-NRPS、肽类、四氢嘧啶等类型, 其中包括一个被推测为编码 PTMs 类化合物的生物合成基因簇(表 1)。

我们将白骨壤链霉菌中的 PTMs 基因簇与链霉菌 ZJ306 及厦门链霉菌 318 中已经证实的 *ika* 基因簇进行比较发现: 白骨壤链霉菌中存在的 *aviA–D* 与 PTMs 类化合物的生物合成基因簇 *ikaA–D* 是一一对应的。其特点在于, 从基因排列上来看, 白骨壤链霉菌中 *aviD* 基因位于 *aviC* 的直接下游, 而在另两种链霉菌 ZJ306 及厦门链霉菌 318 中, *ikaC* 和 *ikaD* 被多个不相关基因隔开。进一步对 *aviA–D* 分别进行 BLASTP 分析发现, 这 4 个蛋白与 *IkaA–D* 均具有较高的序列相似性, 相似性值从 53% 到 75% 不等, 覆盖率为 99%–100% (表 2)。因此, 白骨壤链霉菌 9-9 具有产生 PTMs 类化合物的潜能。

表 1. 白骨壤链霉菌 9-9 基因组中次级代谢生物合成基因簇的预测

Table 1. Predicted gene clusters involving in the biosynthesis of secondary metabolites in *S. avicenniae* 9-9

Cluster No.	Product type	Length/bp	Putative function	Cluster blast similarity/%*
1	Terpene	21823	Hopene biosynthetic gene cluster	30
2	Siderophore	8980	Desferrioxamine B biosynthetic gene cluster	60
3	Siderophore	13803	Ficellomycin biosynthetic gene cluster	10
4	Type II PKS	58686	Galbonolides biosynthetic gene cluster	33
5	NRPS	85645	Pacidamycin biosynthetic gene cluster	31
6	NRPS/PKS	49276	Ikarugamycin biosynthetic gene cluster	20
7	Lanthipeptide	22580	SAL-2242 biosynthetic gene cluster	100
8	Thiopeptide	40215	Diisonitrile antibiotic biosynthetic gene cluster	11
9	Ectoine	10405	Ectoine biosynthetic gene cluster	100

PKS: polyketide synthase; NRPS: non-ribosomal peptide synthetase. \*: Threshold level >10%

表 2. 白骨壤链霉菌 9-9 中 PTMs 类化合物生物合成基因簇的 BLASTp 分析结果

Table 2. BLASTp analysis of major proteins encoded by the PTMs biosynthetic gene clusters in *S. avicenniae* 9-9

Protein name	Access No.	Amino acid numbers	Identity of homologue in <i>Streptomyces</i> sp. ZJ306/%*	Identity of homologue in <i>S. xiamenensis</i> 318/%*
AviA	WP_052848987.1	3091	70	70
AviB	WP_052848986.1	586	75	75
AviC	WP_052848985.1	352	66	66
AviD	WP_052848984.1	397	53	53

\*: Coverage &gt;98%

## 2.2 多环稠合大环内酰胺类化合物的分析

基于以上生物信息学分析,我们对白骨壤链霉菌 9-9 的代谢产物进行分析。采用 UPLC-QTOF-HRMS 的分析方法,对其中具有 PTMs 类化合物特征紫外吸收的多个成分进行分析,并对目标峰二级质谱(MS/MS)的碎裂规律进行归纳,快速分析并推测 PTMs 类化合物的结构。

首先,我们选择了 3 种不同的发酵培养基,即 GYM 培养基、ISP3 培养基和 ISP4 培养基,对其进行发酵培养。发酵培养 3 d 后,观察到 ISP3 组和 ISP4 组发酵液颜色明显加深,均由灰白色变为深绿色,GYM 组发酵液颜色由金黄色变为棕色。发酵培养 7 d 后,ISP3 组和 ISP4 组发酵液完全变为黑褐色,GYM 组发酵液呈现深棕色。随即对其进行产物提取,通过 HPLC-UV 初步分析发现,在 PTMs 类的特征吸收 325 nm 波长下<sup>[12,15]</sup>,3 组培养基均能产生 5 个明显的 PTMs 类特征峰,即化合物 1-5 (图 2)。与标准品比对后发现,化合物 1 的保留时间与 ikarugamycin 一致,化合物 2 的保留时间与 capsimycin B 一致。进一步通过 UPLC-HRMS 验证,如图 3 所示,在正离子模式下,化合物 1 中准分子离子峰为  $m/z$  479.2910  $[M+H]^+$ ,分子组成为  $C_{29}H_{38}N_2O_4$ ,可确定化合物 1 为 ikarugamycin;化合物 2 中准分子离子峰为  $m/z$  495.2859  $[M+H]^+$ ,分子式为  $C_{29}H_{38}N_2O_5$ ,可确定化合物 2 为 capsimycin B。

此外,不同培养基条件下,白骨壤链霉菌 9-9 中不同 PTMs 类化合物的产量有明显变化。我们建立了 ikarugamycin 和 capsimycin B 的定量标准曲线,5 个样品浓度分别为 0.0125、0.025、0.05、0.1 和 0.2 mg/mL,如图 4-A 所示。对化合物 1 和 2 的产量进行定量分析可得,在 GYM 培养基中,ikarugamycin 和 capsimycin B 的产量分别为 20 和 32 mg/L;ISP3 培养基中,ikarugamycin 产量明显提高,达到 103 mg/L,为 GYM 培养基的 5.15 倍;在 ISP4 培养基中,情况正好相反,capsimycin B 成为主量化合物,产量达到 166 mg/mL,比 GYM 培养基提高 5.19 倍(图 4-B)。

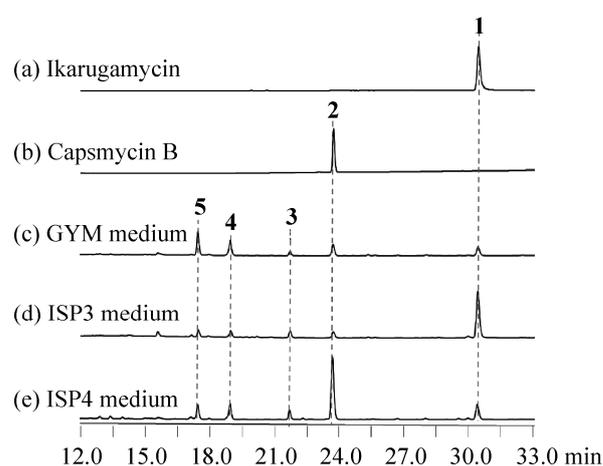


图 2. 不同培养基条件下白骨壤链霉菌发酵粗提物 HPLC 色谱图

Figure 2. HPLC profiles of extracts from *Streptomyces avicenniae* 9-9 cultured in different media.

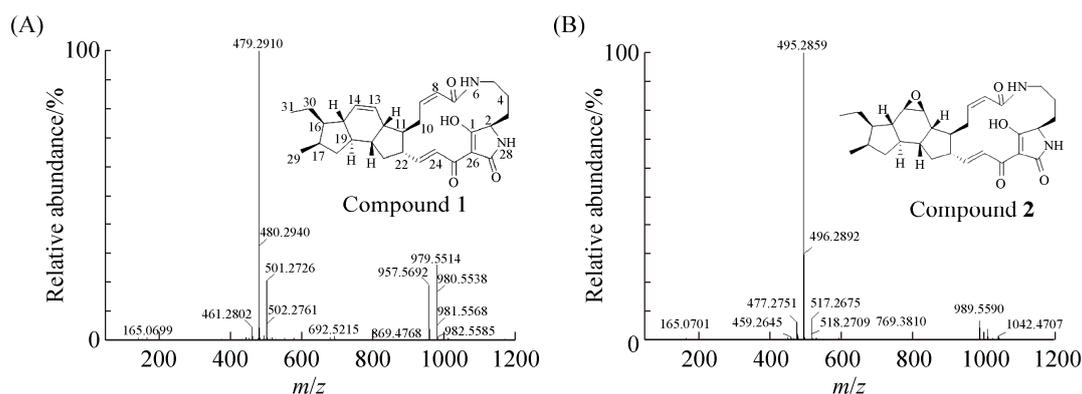


图 3. 化合物 1、2 的质谱图

Figure 3. Mass spectra of compounds 1 and 2.

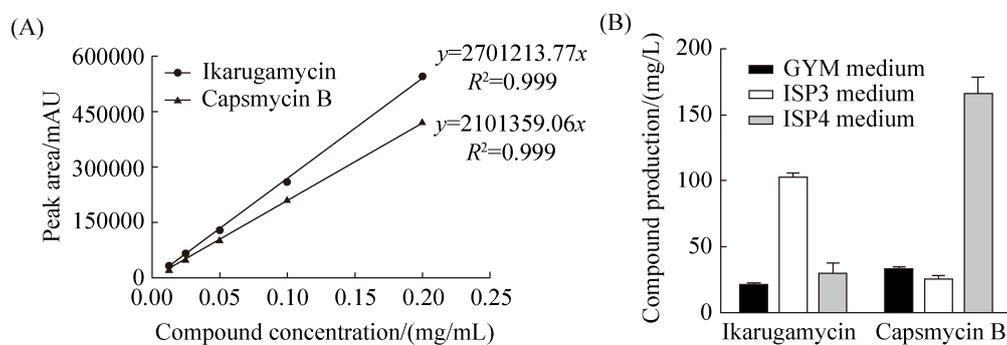


图 4. 不同培养基对化合物 1、2 产量的影响

Figure 4. The production of compounds 1 and 2 in different cultures. A: Standard curves of compounds; B: The production of compounds in different cultures. The error bars in the figure indicate the standard deviations from three independent samples.

### 2.3 多环稠合大环内酰胺类化合物的二级质谱分析

在前期工作中, 我们建立了一种根据 MS/MS 阳离子碎裂规律快速判断 PTMs 类化合物的方法, 可以用于分析 5-6-5 环类型 PTMs 类化合物的结构, 特别是 C-13、C-14 和 C-30 的取代情况<sup>[15]</sup>。由此我们总结了化合物 1-5 的二级质谱碎裂规律, 结果如表 3 所示。

化合物 1 的主要子离子峰有  $m/z$  461.2791、323.1992、281.1893、181.0977 和 139.0868, 如表 3 所示。其中离子强度最高的峰  $m/z$  461.2791 是由结构中大环内酰胺环中的酰胺键断裂、重排形成,

随后进一步断裂成为  $m/z$  281.1893 和五元酰亚胺环  $m/z$  181.0977 两部分碎片。化合物 1 的质谱裂解规律与 ikarugamycin 一致<sup>[15]</sup>, 如图 5 所示。

化合物 2, 主要的碎片离子  $m/z$  477.2757、459.2645、321.1845、279.1742、181.0982 和 139.0873, 质谱裂解规律与 capsimycin B 一致<sup>[15]</sup>, 如图 6 所示。

化合物 3, 在 HR-MS 正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  511.2806  $[M+H]^+$ , 计算分子式为  $C_{29}H_{38}N_2O_6$ 。 $m/z$  511.2806、493.2692 和 475.2586 三个主要的碎片推测是发生了两步脱水。其碎片离子中存在与化合物 2 一致的  $m/z$  321.1839 和

表 3. 化合物 1–5 的碎片离子数据(正离子模式)  
Table 3. Fragment ions of compounds 1–5 in the positive mode

Compound	Observed $m/z$	Relative abundance/%	Formula	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)
Compound 1 (ikarugamycin)	479.2901	100	C <sub>29</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-0.8	-1.7
	461.2791	58	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-1.2	-2.6
	443.2685	31	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-1.5	-3.4
	323.1992	14	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> O <sub>2</sub>	-1.2	-3.7
	281.1893	51	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O	-1.3	-4.6
	181.0977	25	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.0	0.0
	139.0868	40	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O	-0.3	-2.2
Compound 2 (capsimycin B)	495.2871	100	C <sub>29</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.6	1.2
	477.2757	70	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.0	0.0
	459.2645	28	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-0.4	-0.9
	321.1845	9	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>	-1.0	-3.1
	279.1742	26	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O	-0.7	-2.5
	181.0982	51	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.2	1.1
	139.0873	32	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O	0.1	0.7
Compound 3	511.2806	100	C <sub>29</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	-0.4	-0.8
	493.2692	52	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-0.8	-1.6
	475.2586	30	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-1.0	-2.1
	321.1839	24	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>	-1.2	-3.7
	279.1738	27	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O	-0.6	-2.1
	179.0826	11	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0.7	-3.3
	137.0713	10	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0.2	-1.0
Compound 4	493.2693	100	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-0.8	-1.6
	475.2585	62	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-1.2	-2.5
	457.2478	20	C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-1.3	-2.8
	319.1679	19	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	-1.0	-3.1
	277.1579	55	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O	-1.1	-4.0
	181.0986	41	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4	2.2
	139.0867	54	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O	-0.3	-2.2
Compound 5	495.2847	100	C <sub>29</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-1.5	-3.0
	477.2740	81	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-1.5	-3.1
	459.2631	43	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-1.7	-3.7
	321.1835	18	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>	-1.0	-3.1
	279.1736	77	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O	-0.4	-1.4
	181.0981	32	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.4	2.2
	139.0868	46	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O	-0.4	-2.9

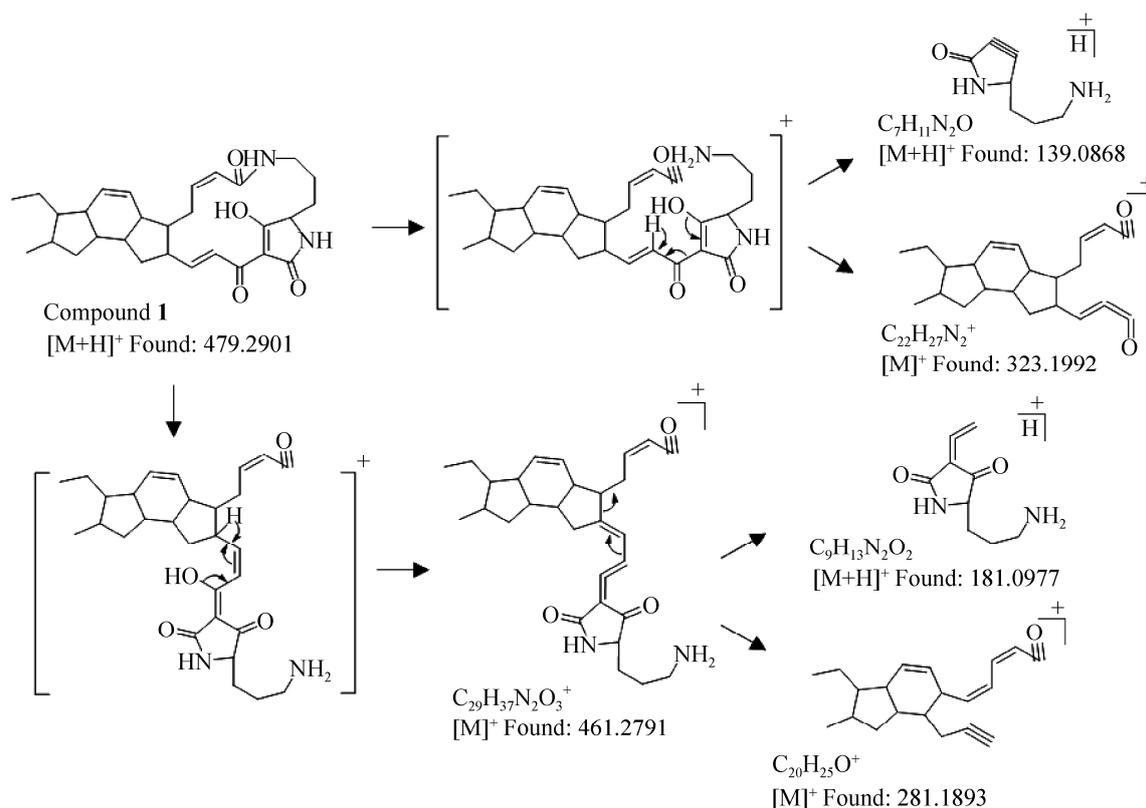


图 5. 化合物 1 的(+) MS/MS 碎裂规律

Figure 5. (+) MS/MS fragmentation pattern of compound 1.

$m/z$  279.1738, 推测化合物 3 的 C-13/14 位上存在三元氧环。而另一部分  $m/z$  137.07139 和  $m/z$  179.0826 均比化合物 2 少 2 个原子质量单位, 推测是由于在大环内酰胺环断裂后的五元环结构部分中多了 1 个不饱和度。PTMs 类化合物可以在固醇去饱和酶(sterol desaturase, 简称 SD)的作用下在大环 C-3 位置上加载羟基, 如 5-6-5 环的 butremycin 或 5-5-6 环的 HSAF<sup>[23,28]</sup>。我们在白骨壤链霉菌下游 16685-17599 区域也发现存在 SD 基因, 由此可推测在化合物 3 为 C-3 羟基取代 epoxyikarugamycin。

化合物 4, 在 HR-MS 正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  493.2693 [M+H]<sup>+</sup>, 计算分子式为 C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>。其碎片离子  $m/z$  181.0986 和  $m/z$  139.0867

与化合物 1 和 2 是一致的, 则大环部分没有改变。而  $m/z$  475.2585、457.2478、319.1679 和 277.1579 均比化合物 2 少 2 个原子质量单位, 推测是在化合物 2 的基础上侧链上形成双键的结构, 双键的位置可能在 C-16、C-30 之间或 C-30、C-31 之间。

化合物 5, 在 HR-MS 正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  495.2847 [M+H]<sup>+</sup>, 计算分子式为 C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 与化合物 2 的分子组成相同, 但是保留时间不同。主要子离子峰  $m/z$  477.2740、459.2631、321.1835、279.1736、181.0981 和 139.0868 均与化合物 2 一致, 可知化合物 5 大环内酰胺环部分与化合物 2 是保守的。推测化合物 5 是保留了 ikarugamycin 的基本结构, 在侧链的 C-30 位羟基取代。

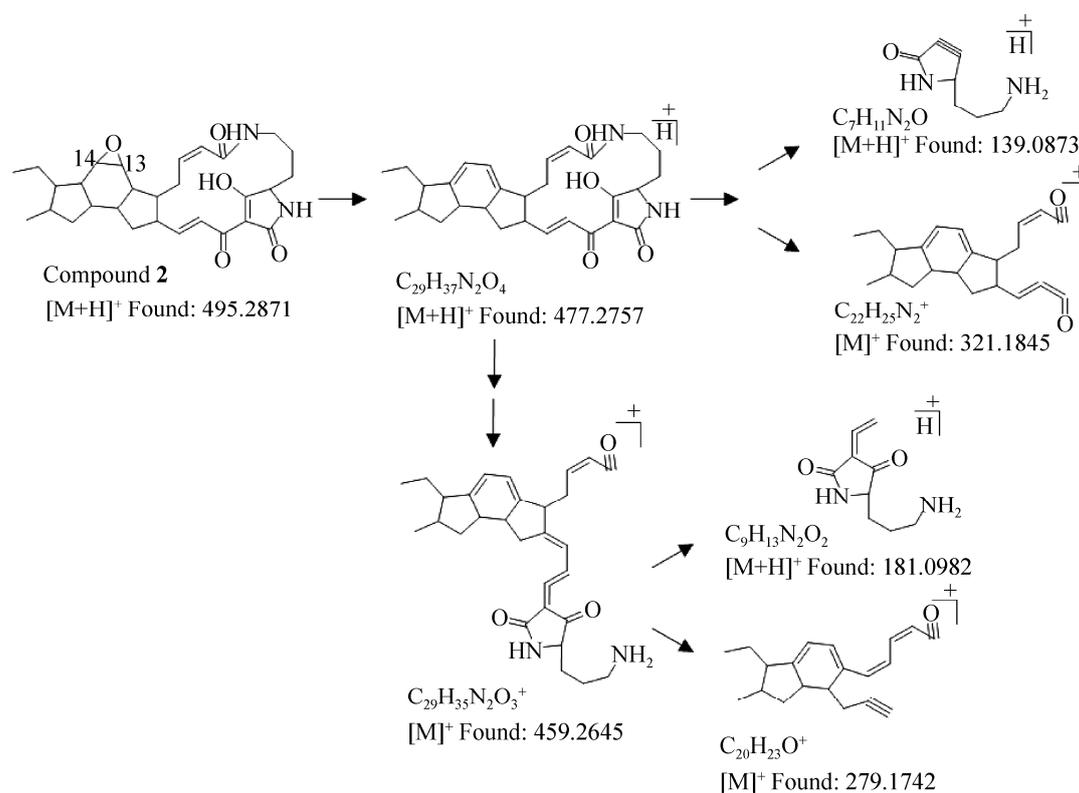


图 6. 化合物 2 的(+) MS/MS 碎裂规律

Figure 6. (+) MS/MS fragmentation pattern of compound 2.

### 3 讨论

白骨壤链霉菌 9-9 中存在的 PTMs 类化合物主要是 5-6-5 环的类型, 以 *ikarugamycin* 和 *capsimycin B* 为代表, 这两个化合物结构上的区别只在于 13 位和 14 位的取代不同。前期从厦门链霉菌 318 中还分离得到其他 5 个 5-6-5 环类型的 PTMs 类化合物。这些化合物都是在 *ikarugamycin* 基础上, 在 C-13/14 位被环氧化, 或者分别被羟基、甲基、甲氧基或氯取代, 以及侧链的 C-30 位被羟基或甲氧基取代。体外抗肿瘤活性筛选发现, *ikarugamycin*、*capsimycin* 和 *capsimycin B* 能够显著抑制胰腺癌细胞 PANC-1 的生长, IC<sub>50</sub> 为 1.30–3.37 μmol/L<sup>[15]</sup>。初步构效关系分析可知, C-13/14 位为双键或者环氧结构时, 抗肿瘤活性相

当; 而 C-13/14 位的三元氧环开环后形成双羟基的结构, 则活性消失。而 *IkaD* 在 PTMs 合成基因簇中决定了 C-13/14 位环氧结构的形成, 因此在白骨壤链霉菌 9-9 中通过对 *aviD* 的改造可以实现靶向生产抗肿瘤活性较高的 PTMs 类化合物。

从西非加纳红树林沉积物分离的小单胞菌产生的 *butremycin* 也是 5-6-5 环 PTMs 类化合物, 其结构中 C-13/14 位为双键, 并在大环 C-3 位有羟基取代。构效关系研究显示在大环结构中 C-3 位的羟基化能显著提高化合物的细胞毒活性, IC<sub>50</sub> 在 0.26–4.10 μmol/L<sup>[8]</sup>。本研究中的化合物 3 经推测 C-13/14 位为环氧结构并在大环 C-3 位也有羟基取代, 因此该类 C-3 位羟基化类型的化合物对于后期构效关系的研究具有重要意义。

PTMs 类化合物的生物合成基因簇广泛存在

于多种链霉菌中<sup>[7]</sup>。虽然 PTMs 类化合物的生物合成基因簇在序列相似性和基因排列方式上都较为保守,但在不同链霉菌菌株中激活沉默的 PTMs 基因簇的表达不乏获得新的 PTMs 结构类似物的例子,如 Olano 等在 *S. albus* J1074 菌株中获得 2 类新的 PTMs 类化合物<sup>[29]</sup>; Saha 等将来源于 *S. pactum* SCSIO 02999 菌株的 PTMs 基因簇在体外重构后导入异源表达宿主,获得了 6 个新的 PTMs 类化合物<sup>[11]</sup>。因此,基于合成生物学理念,将红树林源的链霉菌基因组中的 PTMs 基因簇置于通用强启动子控制下,导入遗传背景清晰的链霉菌宿主中进行表达,有可能获得新的 PTMs 类化合物。

此外,大多数链霉菌细胞膜中主要的甲基萘醌(menaquinone)都是 MK-9,而白骨壤链霉菌 9-9 菌株细胞膜的甲基萘醌组成较为特殊,主要成分为 MK-10。迄今为止,已报道具有此类异常醌型的链霉菌只有 *S. specialis* GW41-1564<sup>[30]</sup> 菌株和 *S. hainanensis* YIM 47672 菌株<sup>[31]</sup>。这两株菌和白骨壤链霉菌在 16S rRNA 基因系统发育亲缘关系最近,可能代表了一类生理特性独特的链霉菌。以此类“稀有”链霉菌基因组序列预测的潜在次生代谢产物生物合成基因簇信息为指导,展开系统的化学分离鉴定,有望发现新的天然产物。

## 参 考 文 献

- [1] Xu DB, Ye WW, Han Y, Deng ZX, Hong K. Natural products from mangrove actinomycetes. *Marine Drugs*, 2014, 12(5): 2590–2613.
- [2] Fu SN, Wang F, Li HY, Bao YX, Yang Y, Shen HF, Lin B, Zhou GX. Secondary metabolites from marine-derived *Streptomyces antibioticus* strain H74-21. *Natural Product Research*, 2016, 30(21): 2460–2467.
- [3] Motohashi K, Izumikawa M, Kagaya N, Takagi M, Shin-Ya K. JBIR-76 and JBIR-77, modified naphthoquinones from *Streptomyces* sp. RI-77. *The Journal of Antibiotics*, 2016, 69(9): 707–708.
- [4] Ye XW, Chai WY, Lian XY, Zhang ZZ. Novel propanamide analogue and antiproliferative diketopiperazines from mangrove *Streptomyces* sp. Q24. *Natural Product Research*, 2017, 31(12): 1390–1396.
- [5] Xu J. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. *RSC Advances*, 2015, 5(2): 841–892.
- [6] Xu MJ, Liu XJ, Zhao YL, Liu D, Xu ZH, Lang XM, Ao P, Lin WH, Yang SL, Zhang ZG, Xu J. Identification and characterization of an anti-fibrotic benzopyran compound isolated from mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis*. *Marine Drugs*, 2012, 10(3): 639–654.
- [7] Blodgett JAV, Oh DC, Cao SG, Currie CR, Kolter R, Clardy J. Common biosynthetic origins for polycyclic tetramate macrolactams from phylogenetically diverse bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 11692–11697.
- [8] Zhang GT, Zhang WJ, Saha S, Zhang CS. Recent advances in discovery, biosynthesis and genome mining of medicinally relevant polycyclic tetramate macrolactams. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2016, 16(15): 1727–1739.
- [9] Jomon K, Kuroda Y, Ajisaka M, Sakai H. A new antibiotic, ikarugamycin. *The Journal of Antibiotics*, 1972, 25(5): 271–280.
- [10] Mei XG, Wang LP, Wang DY, Fan J, Zhu WM. Polycyclic tetramate macrolactams from the marine-derived *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2017, 37(9): 2352–2360. (in Chinese)  
梅显贵, 王立平, 王冬阳, 范杰, 朱伟明. 海洋异壁放线菌 WH1-2216-6 产生的多环含特特拉姆酸大环内酰胺. 有机化学, 2017, 37(9): 2352–2360.
- [11] Saha S, Zhang WJ, Zhang GT, Zhu YG, Chen YC, Liu W, Yuan CS, Zhang QB, Zhang HB, Zhang LP, Zhang WM, Zhang CS. Activation and characterization of a cryptic gene cluster reveals a cyclization cascade for polycyclic tetramate macrolactams. *Chemical Science*, 2017, 8(2): 1607–1612.
- [12] Zhang WJ, Zhang GT, Zhang LP, Liu W, Jiang XD, Jin HB, Liu ZW, Zhang HB, Zhou AH, Zhang CS. New polycyclic tetramate macrolactams from marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 40060. *Tetrahedron*, 2018, 74(47): 6839–6845.
- [13] Hoshino S, Wong CP, Ozeki M, Zhang HP, Hayashi F, Awakawa T, Asamizu S, Onaka H, Abe I. Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated

- from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *The Journal of Antibiotics*, 2018, 71(7): 653–657.
- [14] Liu Y, Wang HX, Song RT, Chen JN, Li TH, Li YY, Du LC, Shen YM. Targeted discovery and combinatorial biosynthesis of polycyclic tetramate macrolactam combamides A–E. *Organic Letters*, 2018, 20(12): 3504–3508.
- [15] Yu HL, Jiang SH, Bu XL, Wang JH, Weng JY, Yang XM, He KY, Zhang ZG, Ao P, Xu J, Xu MJ. Structural diversity of anti-pancreatic cancer capsimycins identified in mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis* 318 and post-modification via a novel cytochrome P450 monooxygenase. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40689.
- [16] Lacret R, Oves-Costales D, Gómez C, Díaz C, de La Cruz M, Pérez-Victoria I, Vicente F, Genilloud O, Reyes F. New ikarugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis*. *Marine Drugs*, 2015, 13(1): 128–140.
- [17] Luo TC, Fredericksen BL, Hasumi K, Endo A, Garcia JV. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced CD4 cell surface downregulation is inhibited by ikarugamycin. *Journal of Virology*, 2001, 75(5): 2488–2492.
- [18] Cao SG, Blodgett JAV, Clardy J. Targeted discovery of polycyclic tetramate macrolactams from an environmental *Streptomyces* Strain. *Organic Letters*, 2010, 12(20): 4652–4654.
- [19] Elkin SR, Oswald NW, Reed DK, Mettlen M, MacMillan JB, Schmid SL. Ikarugamycin: a natural product inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*, 2016, 17(10): 1139–1149.
- [20] Xie YX, Wright S, Shen YM, Du LC. Bioactive natural products from *Lysobacter*. *Natural Product Reports*, 2012, 29(11): 1277–1287.
- [21] Zhang GT, Zhang WJ, Zhang QB, Shi T, Ma L, Zhu YG, Li SM, Zhang HB, Zhao YL, Shi R, Zhang CS. Mechanistic insights into polycycle formation by reductive cyclization in ikarugamycin biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(19): 4840–4844.
- [22] Antosch J, Schaefer F, Gulder TAM. Heterologous reconstitution of ikarugamycin biosynthesis in *E. coli*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(11): 3011–3014.
- [23] Greunke C, Antosch J, Gulder TAM. Promiscuous hydroxylases for the functionalization of polycyclic tetramate macrolactams—conversion of ikarugamycin to butremycin. *Chemical Communication*, 2015, 51(25): 5334–5336.
- [24] Xu MJ, Wang JH, Bu XL, Yu HL, Li P, Ou HY, He Y, Xu FD, Hu XY, Zhu XM, Ao P, Xu J. Deciphering the streamlined genome of *Streptomyces xiamenensis* 318 as the producer of the anti-fibrotic drug candidate xiamenmycin. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18977.
- [25] Xiao J, Wang Y, Luo YX, Xie SJ, Ruan JS, Xu J. *Streptomyces avicenniae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the rhizosphere of the mangrove plant *Avicennia mariana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(10): 2624–2628.
- [26] Blin K, Wolf T, Chevrette MG, Lu XW, Schwalen CJ, Kautsar SA, Duran HGS, De Los Santos ELC, Kim HU, Nave M, Dickschat JS, Mitchell DA, Shelest E, Breitling R, Takano E, Lee SY, Weber T, Medema MH. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W36–W41.
- [27] Doroghazi JR, Albright JC, Goering AW, Ju KS, Haines RR, Tchulukov KA, Labeda DP, Kelleher NL, Metcalf WW. A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(11): 963–968.
- [28] Lou LL, Qian GL, Xie YX, Hang JL, Chen HT, Zaleta-Rivera K, Li YY, Shen YM, Dussault PH, Liu FQ, Du LC. Biosynthesis of HSAF, a tetramic acid-containing macrolactam from *Lysobacter enzymogenes*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(4): 643–645.
- [29] Olano C, García I, González A, Rodríguez M, Rozas D, Rubio J, Sánchez-Hidalgo M, Braña AF, Méndez C, Salas JA. Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(3): 242–256.
- [30] Kämpfer P, Huber B, Buczolits S, Thummes K, Grün-Wollny I, Busse HJ. *Streptomyces specialis* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(11): 2602–2606.
- [31] Jiang Y, Tang SK, Wiese J, Xu LH, Imhoff JF, Jiang CL. *Streptomyces hainanensis* sp. nov., a novel member of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(11): 2694–2698.

# Study on polycyclic tetramate macrolactam metabolites from mangrove-derived *Streptomyces avicenniae*

Jingyi Weng<sup>1</sup>, Xuliang Bu<sup>2</sup>, Jun Xu<sup>2</sup>, Minjuan Xu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Systems Biomedicine, Ministry of Education, Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** **[Objective]** Based on genome mining, we analyzed the secondary metabolites from mangrove-derived *Streptomyces avicenniae* 9-9, targeting on polycyclic tetramate macrolactams (PTMs). **[Methods]** Bioinformatics analysis was carried out to analyze the genome sequence of *Streptomyces avicenniae* 9-9. We searched PTMs by the method of high-performance liquid chromatography and mass spectroscopy. **[Results]** We found four genes, named *aviA-D* involved in PTMs biosynthetic gene clusters in *Streptomyces avicenniae* 9-9. Two PTMs, **1** and **2**, were identified as ikaruganmycin and capsimycin B, respectively. Compound **3** through **5** also belonged to PTMs family, and their structures were proposed based on MS/MS fragmentation pattern. **[Conclusion]** Mangrove-derived *Streptomyces avicenniae* 9-9 can produce PTMs compounds with the 5-6-5 fused tricyclic skeleton.

**Keywords:** mangrove, *Streptomyces avicenniae*, secondary metabolite, polycyclic tetramate macrolactams, biosynthesis

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Medicine and Engineering Interdisciplinary Research Fund of Shanghai Jiao Tong University (ZH2018ZDB08)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-34207540; Fax: +86-21-34206059; E-mail: minjuanxu@sjtu.edu.cn

Received: 13 March 2019; Revised: 10 April 2019; Published online: 22 April 2019