

研究报告



链霉菌 *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167 中 Naphthgeranine A 生物合成基因簇的分析鉴定

刘洋 王晓政 黄婷婷 周子画 林双君*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】微生物来源的天然产物是小分子药物或药物先导物的重要来源。对链霉菌 *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167 的基因组分析显示, 其包含多个次级代谢产物的生物合成基因簇, 具有产生多种新化合物的潜力。【目的】对链霉菌 *S. antibioticus* NRRL 8167 中次级代谢产物进行研究, 以期发现结构新颖或生物活性独特的化合物, 并对相应产物的生物合成基因簇和生物合成途径进行解析。【方法】利用 HPLC 图谱结合特征性紫外吸收和 LC-MS 方法, 排除 *S. antibioticus* NRRL 8167 产生的已知化合物, 确定具有特殊紫外吸收的化合物作为挖掘对象, 然后利用正、反相硅胶柱色谱、高效液相色谱等技术对次级代谢产物进行分离纯化, 分离化合物。利用质谱及核磁共振光谱技术对化合物结构进行解析和鉴定; 提取链霉菌 *S. antibioticus* NRRL 8167 基因组 DNA, 利用 PacBio 测序平台进行基因组测序; 利用生物信息学对基因组进行注释, 并对合成该化合物的基因簇进行定位分析, 推导其生物合成途径。【结果】确定这个化合物是 Naphthgeranine A, 属于聚酮类化合物。全基因组序列分析发现 *S. antibioticus* NRRL 8167 基因组含有 28 个次级代谢产物生物合成基因簇, 其中基因簇 20 可能负责 Naphthgeranine A 的生物合成, 并对其生物合成途径进行了推导。【结论】基于紫外吸收光谱和质谱特征, 从 *S. antibioticus* NRRL 8167 菌株的发酵提取物中分离鉴定了一个聚酮类化合物 Naphthgeranine A。该菌株的全基因组测序为其生物合成基因簇的鉴定提供了前提, 对 Naphthgeranine A 生物合成基因簇和生物合成途径的推测为进一步研究这个化合物的生物合成机制奠定了基础。

关键词: *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167, Naphthgeranine A, 生物合成基因簇, II 型聚酮合酶, 生物合成途径

Analysis and identification of the naphthgeranine A biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167

LIU Yang WANG Xiao-Zheng HUANG Ting-Ting ZHOU Zi-Hua LIN Shuang-Jun*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Microbial natural products have become an important source of small molecule

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31425001); Startup Fund for Youngman Research at SJTU (18X100040053)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34208057; E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

Received: 01-04-2019; Accepted: 05-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31425001); 上海交通大学新进青年教师启动计划(18X100040053)

*通信作者: Tel: 021-34208057; E-mail: linsj@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-04-01; 接受日期: 2019-05-05

drugs and prodrugs in recent years. Genomic analysis shows that *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167 contains a variety of biosynthetic gene clusters of natural products, with the potential to generate multiple new compounds. **[Objective]** Study on the secondary metabolites in *S. antibioticus* NRRL 8167 to discover compounds with novel structures or unique biological activities, and further explore the corresponding biosynthetic gene clusters. **[Methods]** Using HPLC-MS and UV spectrum, we excluded the known compounds produced by *S. antibioticus* NRRL 8167 and identified an unknown compound with special UV-vis absorption as isolation targets. The secondary metabolites were isolated and purified using normal or reverse phase column chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC). The structures of the compounds were elucidated by using mass spectroscopy (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). The genomic DNA of *S. antibioticus* NRRL 8167 was extracted for genome sequencing by the PacBio sequencing platform. Bioinformatics technique was used to annotate the genome, to define the gene clusters that is responsible for the compound biosynthesis, and to propose its biosynthetic pathway. **[Results]** The compound was purified and identified as naphthgeranine A, belonging to polyketides. The whole genome sequence contains 28 secondary metabolites biosynthetic gene clusters. The gene cluster 20 is proposed to be responsible for the biosynthesis of naphthgeranine A. We also speculated the biosynthetic pathway of naphthgeranine A. **[Conclusion]** Naphthgeranine A was purified from *S. antibioticus* NRRL 8167 and structurally elucidated based on the UV-vis spectra, MS data and NMR. Complete genome sequence of this strain provided the opportunity for defining the gene clusters of naphthgeranine A. The proposed biosynthetic gene cluster and biosynthetic pathways laid the foundation for further research on the biosynthetic mechanisms of naphthgeranine A.

Keywords: *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167, Naphthgeranine A, Biosynthetic gene cluster, Type II polyketide synthase, Biosynthetic pathway

长期以来,天然产物因其结构和生物活性的多样性,始终是药物开发的重要来源。统计数据显示,从1981年到2014年批准上市的药物中约有51%来源于天然产物、天然产物的类似物及其衍生物^[1-2]。萘醌类化合物是一类重要的微生物来源天然产物,有着多种多样的生物活性^[3]。比如,分离自青霉菌属(*Penicillium*)的霉酚酸(Mycophenolic acid)是肌苷5'-单磷酸盐脱氢酶(Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH)的抑制剂^[4];分离自*Aspergillus fumigatus*的烟曲霉素(Fumagillin)是治疗微孢子虫病和阿米巴病的重要药物^[5]。近年来,得益于分离技术的提高,越来越多来源于微生物的萘醌类化合物被发现,例如Naphterpins^[6-8]、Marinones^[9-10]、Napyradiomycins^[11-12]、Merochlorin^[13-14]等。

Naphterpins/Marinones类化合物有着复杂的多环结构^[15],通常有4个环,涉及多种取代基,例如羟基、甲基等,有的甚至包含溴原子。其结构中有一个多羟基萘醌环的结构,一个由烷基取代的

环醚结构单元和一个被多种基团(例如羟基、烷基和溴原子)取代的环己烯结构。由此可见,这类化合物在结构上有着一定的复杂性。然而截至目前,这类化合物的生物合成途径尚未得到清晰的阐述。其中,Naphthgeranine A是最简单的Naphterpin/Marinone类化合物^[15],有一个多羟基萘醌环的结构,一个由2个甲基取代的环醚结构和一个甲基取代的环己烯结构。研究表明,Naphthgeranine A具有一定的抗HIV活性^[7]。研究Naphthgeranine A可以提高人们对Naphterpins/Marinones类化合物的认识,为进一步利用这类化合物提供一定的帮助。因此,确定Naphthgeranine A的生物合成基因簇具有重要意义。

本论文研究菌株*Streptomyces antibioticus* NRRL 8167分离自美国弗吉尼亚州马丁斯维尔(Martinsville, VA)的土壤^[16]。通过固体发酵,首次从这个菌株中分离纯化出了Naphthgeranine A(图1)。结合基因组信息,我们对Naphthgeranine A生物合成基因簇进行了定位,并对这个化合物的

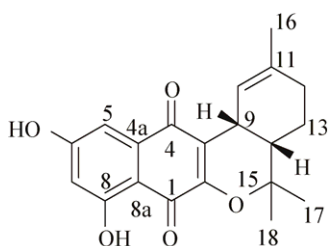


图 1 Naphthgeranine A 的化学结构
Figure 1 The chemical structure of naphthgeranine A

生物合成途径进行了推测。这些工作有利于后续对该化合物的生物合成途径进行更加深入细致的解析, 拓展微生物天然产物生物合成机制的研究, 并为利用组合生物合成及合成生物学创造新的天然产物衍生物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

研究所用的菌株 *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167 购自于美国农业研究菌种保藏中心 (Agricultural research service culture collection)。

1.1.2 培养基

SFM 培养基: 黄豆饼粉 20 g, 蒸馏水 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min, 用 6 层纱布过滤收集黄豆饼粉滤汁, 加入甘露醇 20 g, 琼脂粉 15 g, pH 调至 7.5, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

甲醇、乙酸乙酯、氯仿等有机试剂, 上海国药集团; 色谱纯乙腈 (Acetonitrile, ACN), Sigma-Aldrich 公司; 氘代 DMSO, Cambridge Isotope Laboratory 公司; 正相柱层析硅胶, 青岛海洋化工有限公司; C18 反相柱层析硅胶, YMC 公司。

摇床, New Brunswick Scientific 公司; 旋转蒸发仪, Buchi 公司; 真空泵, Vacuubrand 公司; 冷冻干燥机, Labconco 公司; 高效液相色谱仪 (Agilent 1260 infinity HPLC)、高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪, Agilent 公司; 600 MHz 核磁共振波谱仪, Bruker 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养及发酵

将菌种划线接种于 SFM 平板培养基, 30 °C 恒温培养 5 d 至单菌落表面产生灰色孢子, 用无菌棉棒蘸取适量孢子接种于 SFM 培养基平板上作种子, 置于 30 °C 恒温培养箱培养 7 d, 用无菌棉棒蘸取适量种子转接到 SFM 培养基平板 (9 cm 培养皿中含有 30 mL 固体培养基) 上, 30 °C 恒温培养箱培养 7 d。共发酵 50 L。

1.2.2 次级代谢产物的提取

将链霉菌固体发酵物切碎后, 用 1.5 倍体积的乙酸乙酯进行浸泡, 超声 1 h 或搅拌 1 h, 如此反复浸提 3 遍将化合物完全提取出来。过滤所得浸提液于 40 °C 进行减压蒸馏, 浓缩得黑色粗提物 16.2 g。

1.2.3 次级代谢产物的检测方法

取少量样品使用 HPLC 分析, DAD 检测器全波长扫描, 并选取 210、250 和 290 nm 作为检测波长。HPLC 以 H_2O -ACN 作为流动相。分析柱为 ZORBAX SB-C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, Agilent), 流速为 0.6 mL/min。洗脱条件为梯度洗脱, 乙腈的起始浓度 0–2 min 为 5%; 2–15 min 乙腈浓度由 5% 逐渐增加到 80%; 15–25 min 乙腈浓度由 80% 逐渐增加到 100%; 26–30 min 乙腈浓度持续为 100%; 30–31 min 乙腈浓度由 100% 逐渐降低到 5%; 31–35 min 乙腈浓度持续为 5%, 研究中的 HPLC 检测方法均保持一致。

1.2.4 目标产物的分离纯化及结构鉴定

使用正相硅胶柱进行初步分离。取 200–300 目的硅胶约 200 g 悬浮于石油醚中, 然后装于直径约 8 cm 的柱中, 过夜沉降后待用。粗提物 16.2 g 用甲醇溶解, 然后用 100–200 目硅胶约 30 g 进行拌样, 采用干法上样。用洗脱体系 [石油醚 \rightarrow 石油醚: 乙酸乙酯 (20:1 \rightarrow 15:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 8:1 \rightarrow 5:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:1) \rightarrow 乙酸乙酯] 逐级洗脱。洗脱体积为 2 个柱体积。收集洗脱液, 使用 HPLC 进行样品分析, 最终合并为 FR1–FR8 共 8 个组分。

然后对组分 FR4 进行反相硅胶柱层析分离,

柱子长约 20 cm, 直径 3 cm, 采用湿法上样, 使用甲醇水混合溶剂作为洗脱体系, 甲醇浓度依次为 40%→60%→80%→90%→100%。收集洗脱液, 使用 HPLC 进行样品分析检测, 确保收集的组分纯度, 得到该化合物 11 mg。

将纯品组分减压蒸馏蒸干, 取少许样品溶解于甲醇中, 使用 Q-TOF 检测, 获得高分辨质谱 (HPLC 条件与产物检测方法一致, 电离源为 ESI 源)。剩余样品溶于 0.4 mL 氘代 DMSO 中, 以四甲基硅烷(TMS)作为内标进行核磁共振光谱(NMR)分析。检测结束后, 样品回收, 减压蒸馏去除溶剂, 将干燥的样品于-80 °C 保存。

1.2.5 基因组 DNA 的提取及生物合成基因簇分析

(1) *S. antibioticus* NRRL 8167 基因组的提取与测序。参照链霉菌操作手册^[17]提取菌株 *S. antibioticus* NRRL 8167 基因组 DNA。纯度检测合格后, 由武汉菲沙基因信息有限公司通过 PacBio 测序平台对该物种的基因组进行测序, 测序完成后利用 FALCON 软件对基因组进行拼接, 得到高质量的参考基因组。

(2) Naphthgeranine A 生物合成基因簇的生物信息学分析。将测序结果上传至 AntiSMASH 网站 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) 并进行分析。用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 BLAST 软件对菌株基因组核苷酸序列和蛋白质序列进行比对分析。用 Frame Plot 在线软件 (<http://biosyn.nih.gov.jp/2ndfind/>) 对 DNA 序列开放阅

读框分析。用 BioEdit 7.1.3.0 软件中的 ClustalW 进行多序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 目标化合物的筛选和分离纯化

使用 HPLC-DAD 对发酵产物进行分析(图 2A), 发现有一个峰呈现出特殊的紫外吸收光谱(图 2B)。紫外吸收光谱表明化合物有一定的共轭结构, 推测其可能属于萘醌类化合物, 结构上具有一定的新颖性, 于是将这个化合物作为目标化合物进行后续分离。

利用正相硅胶柱层析和反相硅胶柱层析技术对粗提物进行分离纯化, 最终分离得到 11 mg 化合物。

2.2 结构鉴定

目标化合物是黄色粉末状固体, 可溶于 DMSO, 微溶于氯仿、甲醇。在正离子模式下, 高分辨质谱分析(图 3)得出其准分子离子峰为 341.131 6 $[M+H]^+$, 推测分子式为 $C_{20}H_{20}O_5$, 理论分子量为 340.131 1。

将目标化合物溶解在 0.4 mL 的氘代 DMSO 中进行核磁共振(Nuclear magnetic resonance)分析, 以四甲基硅烷(TMS)作为内标。¹H NMR (图 4A)表明该化合物有 3 个芳香氢信号 δ_H 6.94 (d, $J=2.37$ Hz, H-5)、 δ_H 6.49 (d, $J=2.28$ Hz, H-7)和 δ_H 6.00 (d, $J=4.81$ Hz, H-10), 结合紫外吸收光谱(图 2B)表明该化合物为多取代的萘醌类化合物。¹H NMR (图 4A)

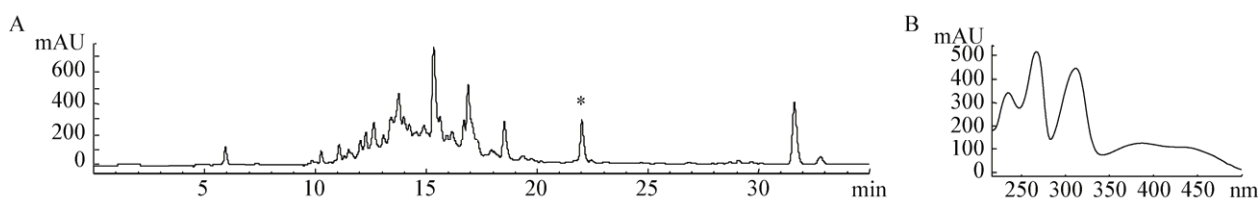


图 2 目标化合物的色谱数据

Figure 2 The chromatographic data of candidate compound

注: A: 目标化合物(*)在 HPLC 上的保留时间(检测波长为 290 nm); B: 目标化合物的紫外吸收图谱。

Note: A: The HPLC profile of the metabolites (*) of *S. antibioticus* NRRL 8167 (detection at 290 nm); B: The UV-vis spectrum of the candidate compound.

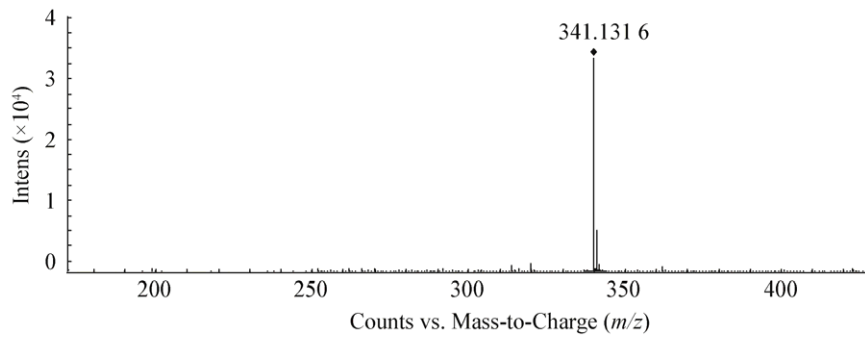


图 3 化合物的高分辨质谱图
Figure 3 The HR-MS spectrum of the compound

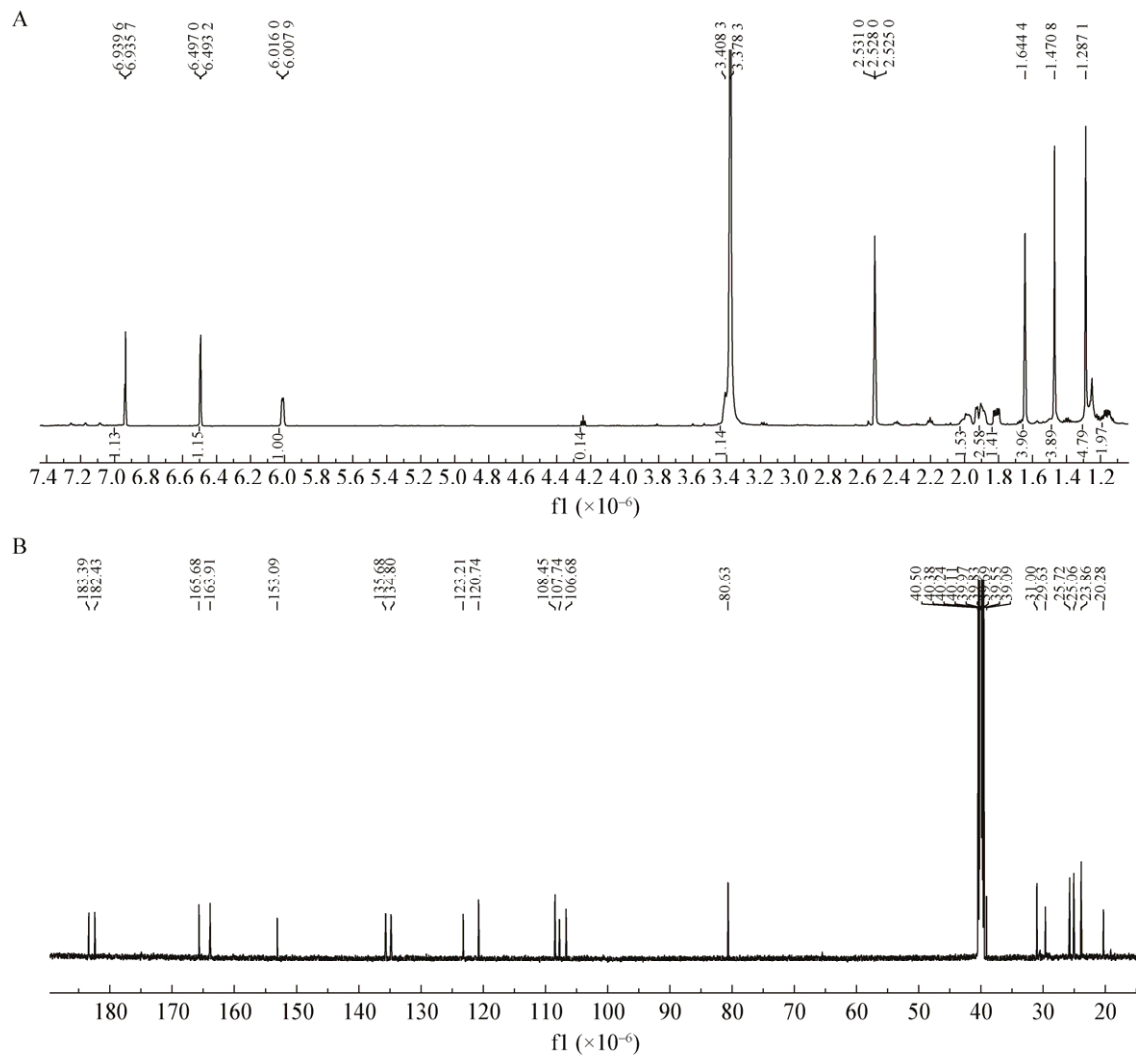


图 4 Naphthgeranine A 的一维核磁共振谱图
Figure 4 The 1D NMR spectra of naphthgeranine A

注: A: 氢谱(600 MHz); B: 碳谱(150 MHz).
Note: A: ^1H NMR (600 MHz); B: ^{13}C NMR (150 MHz).

还显示该化合物有 3 个甲基信号 δ_{H} 1.64 (s, H-16)、 δ_{H} 1.47 (s, H-17)和 δ_{H} 1.28 (s, H-18)。 ^{13}C NMR (图 4B)和 HSQC 显示该化合物有两个羰基信号 δ_{C} 182.4 (C-1)和 δ_{C} 183.4 (C-4); 7 个不饱和季碳信号 δ_{C} 153.1 (C-2)、 δ_{C} 123.2 (C-3)、 δ_{C} 134.8 (C-4a)、 δ_{C} 165.7 (C-6)、 δ_{C} 163.9 (C-8)、 δ_{C} 108.5 (C-8a)和 δ_{C} 135.7 (C-11); 3 个不饱和次甲基碳信号 δ_{C} 107.7 (C-5)、 δ_{C} 106.7 (C-7)和 δ_{C} 135.7 (C-11); 一个连氧季碳信号 δ_{C} 80.7 (C-15); 两个亚甲基信号 δ_{C} 20.3 (C-12)和 δ_{C} 29.6 (C-13); 两个次甲基信号 δ_{C} 31.5 (C-9)和 δ_{C} 1.81 (C-14); 3 甲基信号 δ_{C} 23.8 (C-16)、 δ_{C} 25.7 (C-17)和 δ_{C} 25.0 (C-18)。结合 ^1H - ^1H COSY、HMBC 等 2D NMR 光谱, 确定该化合物为 Naphthgeranine A, 化学结构如图 1 所示, 核磁数据(表 1)与文献[18]一致。

表 1 Naphthgeranine A 的核磁数据(600 MHz, DMSO- d_6)
Table 1 NMR data (600 MHz, DMSO- d_6) of naphthgeranine A

No.	δ_{H} (mult, J/Hz)	δ_{C}	^1H - ^1H COSY	gHMBC
1		182.4		
2		153.1		
3		123.2		
4		183.4		
4a		134.8		
5	6.94 (d, 2.37)	107.7		8a, 4, 7
6		165.7		
7	6.49 (d, 2.28)	106.7		5, 8a
8		163.9		
8a		108.5		
9	3.41 (m)	31.5	10	2, 11
10	6.00 (d, 4.86)	120.7	9	8, 12
11		135.7		
12	1.18 (m)	20.3	13	14, 16
13	1.96 (m)	29.6	12, 14	11, 15
14	1.81 (m)	39.1	13	10, 13
15		80.7		
16	1.64 (s)	23.8		10, 12
17	1.47 (s)	25.7		14, 18
18	1.28 (s)	25.0		14, 17

2.3 *S. antibioticus* NRRL 8167 菌株基因组的生物信息学分析

2.3.1 全基因组序列信息分析

S. antibioticus NRRL 8167 基因组 DNA 纯化合格后, 委托武汉菲沙基因信息有限公司进行全基因组测序。结果显示: *S. antibioticus* NRRL 8167 基因组含有一条线性染色体, 染色体长度为 9 379 887 bp, (G+C)mol% 含量为 71.5%。采用 AntiSMASH (V4.0.2) 对 *S. antibioticus* NRRL 8167 的基因组序列进行分析, 发现共含有 28 个次级代谢物生物合成基因簇, 包括 3 个非核糖体肽合成酶(Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)基因簇、2 个 I 型聚酮合酶(Type I polyketide synthase, PKS)基因簇、1 个 II 型聚酮合酶(Type II polyketide synthase, PKS)基因簇、3 个萜类(Terpene)合成基因簇、2 个 Siderophore 合成基因簇、2 个 Lanthipeptide 合成基因簇、1 个 Butyrolactone 合成基因簇、1 个 Indole 合成基因簇、1 个 Melanin 合成基因簇、1 个 Ectoine 合成基因簇、1 个 Lasso peptide 合成基因簇、1 个 Linardin 合成基因簇、1 个 Bacteriocin 合成基因簇、6 个杂合基因簇、2 个其他类型代谢物合成基因簇。详细信息见表 2。

2.3.2 *S. antibioticus* NRRL 8167 菌株中 Naphthgeranine A 生物合成基因簇的定位与分析

Naphthgeranine A 属于萘醌类天然产物, 从结构上分析该化合物是由 III 型聚酮合酶与萜类合成酶杂合产生的天然产物。然而, 利用 AntiSMASH 数据库对基因组数据比对分析显示基因组中并不含有这样的基因簇。但是, 在该菌株中却包括一个 II 型聚酮合酶基因簇。因此, 推测这个基因簇可能负责合成 Naphthgeranine A。该基因簇定位于编号 20 的基因簇, 这个生物合成基因簇位于染色体 DNA 的 7 883 630-7 956 142 位置, 大小为 72.5 kb, 功能基因的组织排布如图 5 所示。同时, 对该基因簇的基因进行功能注释, 其基因功能见表 3。

2.3.3 Naphthgeranine A 生物合成途径的推导

通过对 Naphthgeranine A 生物合成基因簇各基因的功能注释, 结合生物信息学分析, 可将其合成途径分为骨架的形成和后修饰两大步骤。

表 2 *S. antibioticus* NRRL 8167 基因组 AntiSMASH (V4.0.2) 分析结果Table 2 Biosynthetic gene clusters of secondary metabolite in *S. antibioticus* NRRL 8167 analyzed by AntiSMASH (V4.0.2)

编号 No.	类型 Type	大小 Size (kb)	类似基因簇 Similar known cluster	相似度 Similarity (%)
1	Butyrolactone	9.4	Lactonamycin	10
2	Others	41.1	Akaeolide	8
3	T1pks	93.9	Indanomycin	100
4	Nrps	62.5	Herboxidiene	8
5	Lanthipeptide-Bacteriocin	25.5	Informatipeptin	100
6	Otherks-T1pks	48.7	Laspartomycin	13
7	Terpene	24.5	Hopene	92
8	Indole	21.3	Meridamycin	5
9	Nrps-Siderophore	60.6	Scabichelin	100
10	Terpene	21.7	Geosmin	100
11	Bacteriocin	10.0		
12	Siderophore	11.9		
13	Lanthipeptide	21.3		
14	Terpene	17.7	Albaflavenone	100
15	Siderophore	11.7	Desferrioxamine B	83
16	Melanin	9.3	Lactonamycin	8
17	Nrps	57.2	SCO-2138	71
18	Ectoine	10.4	Ectoine	100
19	Others	42.6		
20	T2pks	72.5	Spore pigment	83
21	Lasso peptide	22.6	SRO15-2005	40
22	T1pks	40.6	Maduropeptin	3
23	Terpene-Melanin	21.2	Melanin	71
24	Lanthipeptide	22.6	Labyrinthopeptin A1,A3	60
25	Butyrolactone-Nrpsfragment-Otherks	66.4	Pyridomycin	26
26	Linaridin	20.6	Legonaridin	33
27	Nrps	48.6	Mitomycin	10
28	Nrps-T1pks	57.1	Antimycin	100

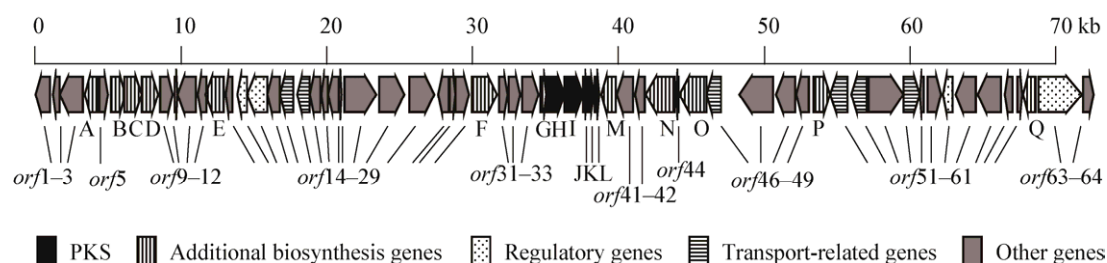
图 5 *S. antibioticus* NRRL 8167 中 Naphthgeranine A 生物合成基因簇Figure 5 The biosynthetic gene cluster of naphthgeranine A from *S. antibioticus* NRRL 8167

表 3 *S. antibioticus* NRRL 8167 菌株 Naphthgeranine A 生物合成基因簇内各基因的功能注释Table 3 Deduced function of open reading frames in the naphthgeranine A biosynthetic gene cluster from *S. antibioticus* NRRL 8167

开放阅读框	大小	同源蛋白及其大小	一致性/相似性	预测的基因功能
Orf	Size (aa)	Protein homologue, size (aa)	Identity/Similarity (%/%)	Proposed function
<i>orf1</i>	343	Sp2771 (3VZ1_A), 457	52/69	Succinate-semialdehyde dehydrogenase
<i>orf2</i>	144	PRK10546 (2RRK_A), 140	38/53	CTP pyrophosphohydrolase
<i>orf3</i>	512	LigTsib (4EQ5_A), 571	34/52	ATP-dependent DNA ligase
<i>NapA</i>	325	Hlmi (4NTD_A), 340	51/64	Thioredoxin reductase
<i>orf5</i>	190	PlcR (2QFC_A), 293	35/59	Virulence regulator
<i>NapB</i>	323	Qor (1YB5_A), 351	31/52	Quinone oxidoreductase
<i>NapC</i>	394	ChsE4-ChsE5 (4X28_A), 400	32/45	Acyl-CoA dehydrogenase
<i>NapD</i>	360	Chse4-chse5(4X28_D), 373	35/46	Acyl-CoA dehydrogenase
<i>orf9</i>	286	TauD (1OIH_A), 301	30/48	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase
<i>orf10</i>	66	ASD48_36420 (KQX78285.1), 64	98/100	Hypothetical protein
<i>orf11</i>	409	NAGPA (CQR65357.1), 413	67/78	Metallophosphoesterase
<i>orf12</i>	182	Pat (4JXQ_A), 186	38/57	Acetyltransferase
<i>NapE</i>	400	Methyltransf_25; Nudix_Hydrolase (AXE84246.1), 390	72/81	Methyltransferase
<i>orf14</i>	149	CMD; YciW (2O4D_A), 165	39/54	Carboxymuconolactone decarboxylase
<i>orf15</i>	222	LiaR (5HEV_A), 210	40/58	Response regulator protein
<i>orf16</i>	455	HisKA_3 (AXE90400.1), 439	69/77	Histidine kinase
<i>orf17</i>	292	RbmA (4BE5_A), 262	39/50	Biofilm scaffolding protein
<i>orf18</i>	309	tm0544 (1VPL_A), 256	32/53	ABC transporter ATP-binding protein
<i>orf19</i>	289	cbiO1 (3GFO_A), 275	41/62	Cobalt import ATP-binding protein
<i>orf20</i>	252	CbiQ (5X3X_Q), 244	43/57	Cobalt energy-coupling factor transporter
<i>orf21</i>	173	PRK02898 (CBG75386.1), 144	71/75	Cobalt transport protein
<i>orf22</i>	257	CbiM (5X3X_M), 222	63/75	Cobalt energy-coupling factor transporter
<i>orf23</i>	69	F750_6382 (AGJ58807.1), 73	90/92	Hypothetical protein
<i>orf24</i>	710	RsbU (GAQ60155.1), 707	74/81	Phosphoserine phosphatase
<i>orf25</i>	564	PucR; HTH_30 (CBG69411.1), 386	84/90	Regulator
<i>orf26</i>	575	VanW (SPF06308.1), 579	77/86	Vancomycin B-type resistance protein
<i>orf27</i>	259	ASD48_36500 (KQX78308.1), 219	99/99	Hypothetical protein
<i>orf28</i>	118	STAS (KPI28265.1), 118	95/97	Sulfate transporter/antisigma-factor antagonist
<i>orf29</i>	313	PrsR (EFD71359.1), 309	73/81	Sensor histidine kinase
<i>NapF</i>	572	Mature chain (Q05355.1), 555	78/84	Polyketide hydroxylase
<i>orf31</i>	187	ASD48_23595 (KQX64296.1), 215	83/83	Hypothetical protein
<i>orf32</i>	248	BU52_31165 (KES03345.1), 211	64/72	Class F sortase
<i>orf33</i>	384	ABM; SchA_CurD; GlnE (AVV43942.1), 385	92/94	TemI family type II polyketide cyclase
<i>NapG</i>	147	Cupin_2 (SHI48933.1), 147	84/93	Monoxygenase
<i>NapH</i>	418	KAS_I_II (1TQY_A), 424	61/73	Beta-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase (KAS)
<i>NapI</i>	415	FabB (1TQY_B), 415	46/60	Polyketide beta-ketoacyl synthase
<i>NapJ</i>	84	PP-binding (2K0X_A), 86	39/55	Polyketide synthase acyl carrier protein
<i>NapK</i>	159	TcmN_ARO-CYC_like (3TL1_A), 159	68/77	Polyketide cyclase

(待续)

(续表 3)

<i>NapL</i>	110	Cyclase_polyket (1TUW_A), 109	43/62	TemI family type II polyketide cyclase
<i>NapM</i>	342	Calo6 (4Z2Y_A), 359	35/51	Methyltransferase
<i>orf41</i>	371	ASD48_23685 (KQX64313.1), 382	99/99	Hypothetical protein
<i>orf42</i>	219	ASD48_23680 (KQX64312.1), 219	100/100	Hypothetical protein
<i>NapN</i>	654	Radical_SAM (AVV47162.1), 651	91/93	RiPP maturation radical SAM protein 1
<i>orf44</i>	40	PRK14985 (2ECP_A), 796	67/91	Maltodextrin phosphorylase
<i>NapO</i>	607	DAP2 (1VE6_A), 582	34/50	Acylamino-acid-releasing enzyme
<i>orf46</i>	344	ASD48_23665 (KQX64310.1), 485	99/99	Hypothetical protein
<i>orf47</i>	756	ASD48_23660 (KQX64309.1), 758	99/99	Hypothetical protein
<i>orf48</i>	427	Eis (5EBV_A), 422	34/46	Acetyltransferase
<i>orf49</i>	263	ASD48_23650 (KQX64307.1), 263	100/100	Hypothetical protein
<i>NapP</i>	377	UbiH (AQA12410.1), 377	76/84	FAD-dependent oxidoreductase
<i>orf51</i>	403	XylH (AWW36118.1), 420	83/89	ABC transporter permease
<i>orf52</i>	363	XylF (3M9W_A), 313	36/53	D-xylose binding protein
<i>orf53</i>	782	RsbU (TCR54763.1), 838	79/84	Serine phosphatase
<i>orf54</i>	354	Chve (3URM_A), 330	99/99	Periplasmic sugar binding protein
<i>orf55</i>	96	Tdk (2B8T_A), 223	44/60	Thymidine kinase
<i>orf56</i>	326	ASD48_23615 (KQX64300.1), 326	100/100	Hypothetical protein
<i>orf57</i>	232	Desr (4LDZ_A), 203	32/47	Transcriptional regulatory protein
<i>orf58</i>	448	Peptidase_S13 (2WKE_A), 466	37/56	D-alanyl-d-alanine carboxypeptidase
<i>orf59</i>	527	ASD48_23600 (KQX64297.1), 527	99/99	Hypothetical protein
<i>orf60</i>	187	ASD48_23595 (KQX64296.1), 215	84/84	Hypothetical protein
<i>orf61</i>	97	ASD48_23590 (KQX64295.1), 97	98/98	Hypothetical protein
<i>NapQ</i>	286	MhpC (3WZL_A), 278	34/55	Zearalenone hydrolase
<i>orf63</i>	997	(KQX64293.1), 995	99/99	AfsR family transcriptional regulator
<i>orf64</i>	239	Embr (2FEZ_A), 388	35/47	Regulatory protein

推测 *NapH*、*NapI*、*NapJ*、*NapK* 和 *NapL* 负责了这个化合物骨架的合成。*NapH* 是 KS_{α} (Ketosynthase- α), 催化 Clasién 缩合反应。*NapI* 属于 KS_{β} (Ketosynthase- β), 决定了碳链的长度。结合生物信息学分析和序列比对(图 6)结果表明, *NapI* 133、137 位为 G、L, 结合分子结构, 推测 *NapI* 形成一个含有 20 个碳的碳链^[19]。*NapK* 是一个环化酶, 与环化酶 *TcmN* 一致性高达 51.7%, *TcmN* 负责将 Decaketidyl-S-ACP 环化形成 *TcmF2*^[20], 因此推测 *NapK* 负责 Naphthgeranine A 中 A、B 和 C 环的形成。*NapL* 是一个与 *TcmI* 有 42.7% 一致性的环化酶, *TcmI* 催化 *TcmF2* 的 D 环环化形成了 *TcmF1*^[20],

因此推测 *NapL* 负责了 Naphthgeranine A 中 D 环的形成, 最终形成了中间体 C, 至此 Naphthgeranine A 的骨架就形成了。

在完成了 Naphthgeranine A 分子主体骨架碳链组装后, 与多肽羟化酶 *CabE* 一致性高达 55.7% 的 *NapF* 催化形成了萘醌结构 D; 之后经过还原形成了 E, E 在 FAD 依赖的单加氧酶 *NapP* 的作用下, 发生 Baeyer-Villiger 反应形成 F; 随后 F 在水解酶 *NapQ* 的催化下形成了中间体 G, 接下来发生亲核取代反应生成 H; H 在甲基转移酶 *NapM* 的催化下形成 I, 最后通过还原反应最终合成了 Naphthgeranine A。详细过程见图 7。

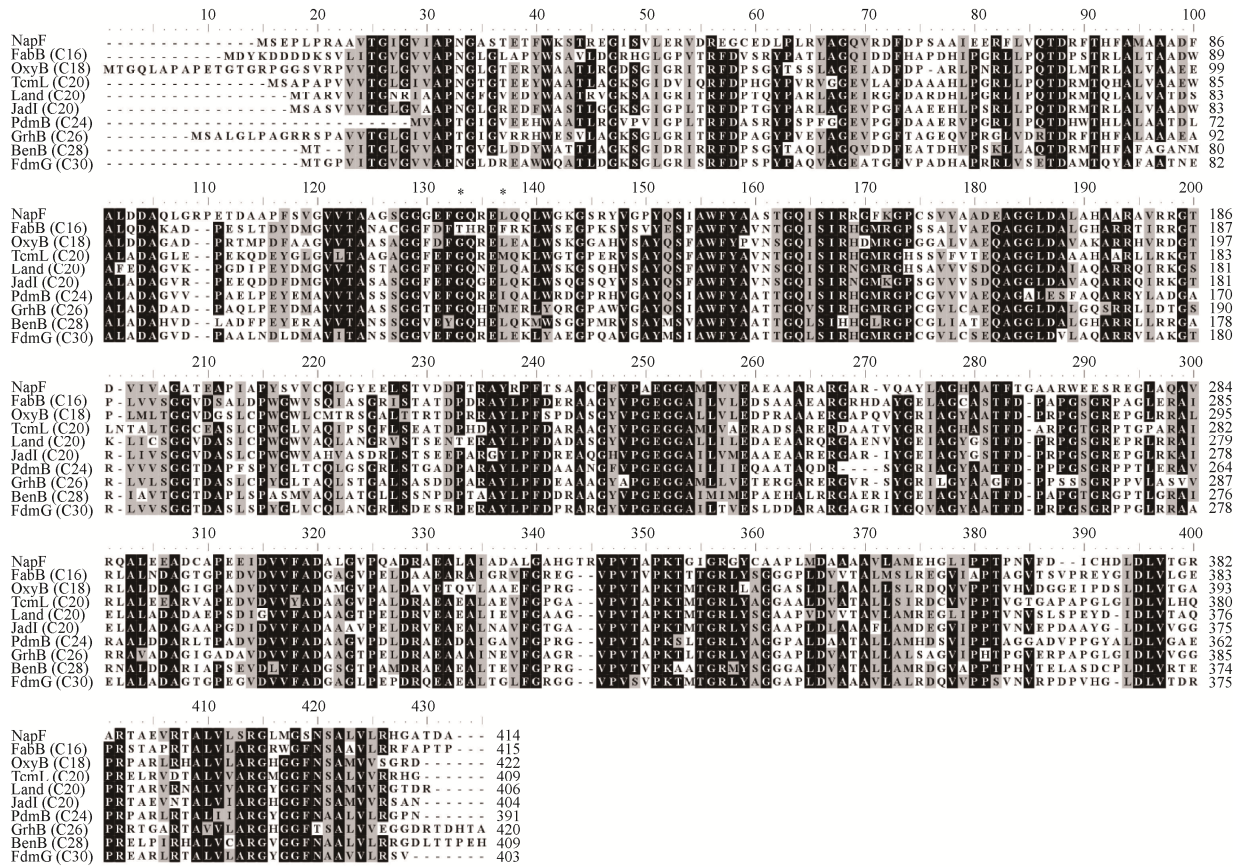
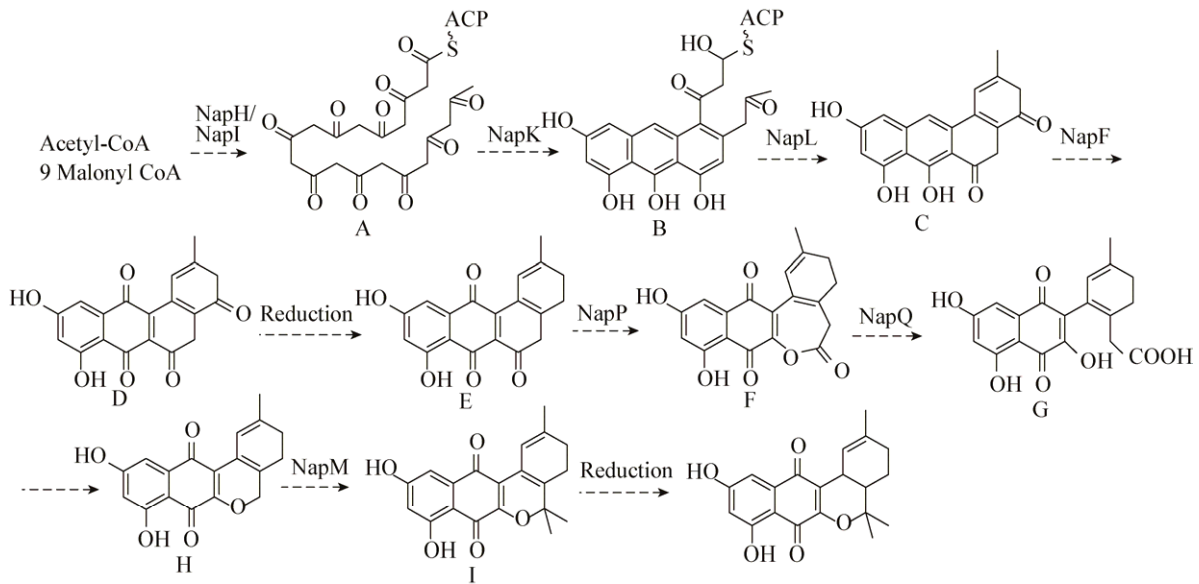
图 6 NapI 和其他 KS β 的氨基酸序列比对Figure 6 Alignment of the amino acids sequences of NapI with other KS β 

图 7 推导的 Naphthgeranine A 的生物合成途径

Figure 7 The proposed biosynthetic pathway of naphthgeranine A

3 讨论与结论

本研究从 *S. antibioticus* NRRL 8167 中分离到萘醌类天然产物 Naphthgeranine A, 通过高分辨质谱和核磁共振光谱分析确认了其结构, 并基于基因组信息推测出其生物合成基因簇和可能的生物合成途径。以往的研究表明在 Naphthgeranine A 的类似物 Merochlorin 和 Napyradiomycin 的生物合成中分别有两个钒依赖的氯过氧化物酶 Mcl24 和 NapH3, 催化了 α -羟基酮的重排反应, 有推测认为在 Naphthgeranine A 的生物合成途径中有关键酶是钒依赖的氯过氧化物酶^[15]。基于 Naphthgeranine A 的化学结构, 推测 III 型聚酮合酶负责形成了萘醌环部分的生物合成^[15], 然而在 *S. antibioticus* NRRL 8167 基因组中却没有发现 III 型聚酮合酶, 也没有关键酶钒依赖的氯过氧化物酶同源蛋白。因此我们推测 *S. antibioticus* NRRL 8167 中通过其他的合成方式来合成 Naphthgeranine A。

微生物来源的芳香族聚酮化合物通常是由 II 型聚酮合酶合成的^[21]。II 型聚酮合酶利用酰基载体蛋白活化底物酰基辅酶 A, 然后在聚酮合酶 KS 的催化下脱羧缩合形成 C-C 键^[22]。II 型聚酮合酶仅利用一套重复使用的模块, 催化多轮 Claisen 缩合反应形成 β -聚酮中间体, 再经过环化形成多环的芳香族化合物^[20,23-24]。伴随多种多样的后修饰过程, 例如氧化、还原、水解、重排和基团迁移等, 最终形成了结构复杂、活性多样的聚酮类化合物^[21]。

S. antibioticus NRRL 8167 的基因组系列分析显示该基因组中只存在一个 II 型聚酮合酶, 基于上述理由推测由该 II 型聚酮合酶合成了 Naphthgeranine A, 同时在该化合物的生物合成途径中有可能涉及到一些比较新颖的酶催化反应, 如氧化重排反应、选择性还原反应等, 以上分析表明 Naphthgeranine A 的生物合成途径与以前推测不同^[15]。结合基因组的相关信息, 我们对 Naphthgeranine A 的生物合成途径进行了推测。本文为研究该化合物

的体内合成路线奠定了基础, 也有利于加深对聚酮类天然产物的认识, 但详细的生物合成机理仍然需要后续的研究验证。

REFERENCES

- [1] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3): 629-661
- [2] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(3): 311-335
- [3] Matsuda Y, Abe I. Biosynthesis of fungal meroterpenoids[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 33(1): 26-53
- [4] Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, et al. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid[J]. *Cell*, 1996, 85(6): 921-930
- [5] McCowen MC, Callender ME, Lawlis LF Jr. Fumagillin (H-3), a new antibiotic with amebicidal properties[J]. *Science*, 1951, 113(2930): 202-203
- [6] Shin-Ya K, Imai S, Furihata K, et al. Isolation and structural elucidation of an antioxidative agent, naphterpin[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1990, 43(4): 444-447
- [7] Wessels P, Göhr A, Zeeck A, et al. Metabolic products of microorganisms. 260: naphthgeranines, new naphthoquinone antibiotics from *Streptomyces* sp.[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(9): 1013-1018
- [8] Volkman C, Jen UH, Zeeck A, et al. Biosynthetic capacities of actinomycetes. 3 naphthgeranine F, a minor congener of the naphthgeranine group produced by *Streptomyces violaceus*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1995, 48(6): 522-524
- [9] Pathirana C, Jensen PR, Fenical W. Marinone and debromomarinone: antibiotic sesquiterpenoid naphthoquinones of a new structure class from a marine bacterium[J]. *Tetrahedron Letters*, 1992, 33(50): 7663-7666
- [10] Hardt IH, Jensen PR, Fenical W. Neomarinone, and new cytotoxic marinone derivatives, produced by a marine filamentous bacterium (actinomycetales)[J]. *Tetrahedron Letters*, 2000, 41(13): 2073-2076
- [11] Takemura S, Hirayama A, Tokunaga J, et al. ChemInform abstract: a concise total synthesis of (\pm)-A80915G, a member of the napyradiomycin family of antibiotics[J]. *ChemInform*, 2000, 31(2): 2000
- [12] Kuniaki T, Yoshiki T, Masazumi K, et al. The first total synthesis of (\pm)-napyradiomycin A1[J]. *Chemistry Letters*, 2002, 31(1): 14-15
- [13] Kaysser L, Bernhardt P, Nam SJ, et al. Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(29): 11988-11991
- [14] Pepper HP, George JH. Biomimetic total synthesis of (\pm)-merochlorin A[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(46): 12170-12173
- [15] Murray LA, McKinnie SM, Pepper HP, et al. Total synthesis establishes the biosynthetic pathway to the naphterpin and marinone natural products[J]. *Angewandte Chemie International*

- Edition, 2018, 57(34): 11009-11014
- [16] Rommel KR, Li CX, Kelly WL. Identification of a tetraene-containing product of the indanomycin biosynthetic pathway[J]. *Organic Letters*, 2011, 13(10): 2536-2539
- [17] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. Colney: John Innes Foundation, 2000: 125-127
- [18] Lu C, Yang C, Xu Z. Three naphthoquinones from *Streptomyces* sp. XZYN-4[J]. *Records of Natural Products*, 2016, 10(4): 430-440
- [19] Tang Y, Tsai SC, Khosla C. Polyketide chain length control by chain length factor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(42): 12708-12709
- [20] Zhou H, Li YR, Tang Y. Cyclization of aromatic polyketides from bacteria and fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(6): 839-868
- [21] Zhang Z, Pan HX, Tang GL. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis[J]. *F1000Research*, 2017(6): 172
- [22] Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2004, 362(1825): 2671-2690
- [23] Das A, Khosla C. Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42(5): 631-639
- [24] Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(26): 4688-4716

(上接 p.2493)

征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>