

文章编号:1004-0374(2005)03-0207-04

南昌链霉菌代谢产物与代谢工程研究现状的 回顾与展望

孙宇辉^{1,2}, 周秀芬¹, 涂国全², 邓子新^{1*}

(1 上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心, 生命科学技术学院, 上海 200030 ;

2 江西农业大学生物工程系, 南昌 330045)

摘要: 南昌链霉菌是从江西农业大学校园油茶根际土壤中分离筛选到的一株链霉菌新种, 它至少可以产生两种具有重要应用和基础研究价值的抗生素——南昌霉素和梅岭霉素。在国家自然科学基金、国家科技攻关计划、上海市科委的资助下, 对这一链霉菌新种进行了多年全面系统的研究, 本文对此进行了全面的回顾, 并对后续研究进行展望。

关键词: 南昌链霉菌; 南昌霉素; 梅岭霉素; 南寡霉素

中图分类号: Q935 文献标识码: A

Overview and prospect on the study of secondary metabolites and metabolic engineering of *Streptomyces nanchangensis*

SUN Yu-Hui^{1,2}, ZHOU Xiu-Fen¹, TU Guo-Quan², DENG Zi-Xin^{1*}

(1 Bio-X Life Science Research Center, School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China; 2 Department of Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: *Streptomyces nanchangensis* is a new species that was isolated from the rhizosphere soil of a tea plant, *Thea oleosa*, in Jiangxi Agricultural University. At least two of the compounds, polyether nanchangmycin and 16-membered macrolide meilingmycin, have been characterized as insecticidal antibiotics. In this review, the present status and prospect on the study of the secondary metabolites and metabolic engineering by the genetic manipulation of the antibiotic biosynthetic genes in *S. nanchangensis* will be presented.

Key words: *Streptomyces nanchangensis*; nanchangmycin; meilingmycin; nanligomycin

1 南昌链霉菌的发现与菌种鉴定

南昌链霉菌是1978年由江西农业大学微生物学教研室欧阳谅等以家蚕为筛选模型从校园油茶根际土壤中分离筛选到的一株链霉菌新种^[1]。在发现初期, 涂国全等对其形态特征、生理生化特征、细胞壁化学成分、DNA 中 G+C 含量以及发酵产物杀虫谱和抑菌谱开展了大量广泛而细致的研究工作^[2~4],

经测试对蚜虫、红蜘蛛、菜青虫、松毛虫、扁刺蛾等多种农林害虫有杀灭作用^[2]。经鉴定该菌株为一链霉菌新种, 因为菌株原发现地江西农业大学地处江西省省会南昌, 由此命名为南昌链霉菌 (*Streptomyces nanchangensis* n. sp. Yan et Ouyang)。

2 南昌霉素和梅岭霉素的结构确定与生物活性

为了了解南昌链霉菌所产生的具有抑菌和杀虫

收稿日期: 2004-11-12

基金项目: 国家“973”项目(2003CB114205)资助

作者简介: 孙宇辉(1967—), 男, 博士, 副教授; 周秀芬(1960—), 女, 博士, 教授; 涂国全(1947—), 男, 硕士, 教授; 邓子新(1957—), 男, 博士, 教授, * 通讯作者。

活性物质的化学本质,高勇生等对发酵产物进行了分离纯化,并对其中最为主要的两个组分进行了结构确定,其中之一为南昌霉素(nanchangmycin),属酸性酯溶性聚醚类抗生素^[2,5]。该抗生素对革兰氏阳性细菌的抑制作用较强,对革兰氏阴性细菌和真菌的作用较弱,还有很强的抗球虫活性。经多年多点药效试验证明,南昌霉素发酵制剂作为饲料添加剂用于防治蛋鸡和肉鸡的球虫病疗效非常显著,抗球虫指数优于进口的盐霉素和莫能霉素,且有提高日增重的效果。毒性和三致试验结果表明该制剂安全、无副作用,是理想的抗球虫药^[2];经化学结构鉴定的另一杀虫活性物质是梅岭霉素(meilingmycin),它属十六元大环内酯类抗生素,与阿维菌素(ivermectin)母核一致,但侧链不同^[2,5]。用梅岭霉素粗提纯物配成溶液对30多种昆虫和螨类进行了试验,试验证明它有广谱杀虫特性,对线虫的作用也很强^[2],其化学结构与阿维菌素8个组分类似。经HPLC结合生物活性分析,梅岭霉素同样含有8个或8个以上组分,对其余各组分的结构鉴定工作仍在进行之中。

3 南昌链霉菌基因克隆系统的建立

南昌链霉菌野生型菌株产抗生素,尤其是梅岭霉素的产量很低,采用常规的理化诱变、原生质体融合和脂酶活性筛选等方法对其进行了一系列的菌种选育,同时结合摇瓶发酵条件的筛选和优化,效价与出发菌株相比虽获得了较大程度的提高,但还未能完全满足产业化的要求^[6-8]。现代分子生物学和生物信息学技术的迅速发展,特别是聚酮生物合成程控的分子机理和特征的阐明^[9-10],为抗生素产量的提高与抗生素品种的创新带来了契机。

对一个完全崭新的微生物菌种,试图从分子水平上揭示和阐明南昌霉素或梅岭霉素的生物合成机理,必须对其遗传背景有一个全面系统的了解。由于南昌链霉菌对外源DNA存在强烈的限制性,虽然尝试使用不同类型和来源的质粒,转化系统都未能建立。链霉菌噬菌体 ϕ C31及其衍生载体能够感染南昌链霉菌并形成溶源。含有 ϕ C31特异性整合位点*attP*的质粒pSET152也可以通过接合转移,以较高的频率整合在南昌链霉菌染色体的*attB*位点上。此外,我们自行构建的大肠杆菌-链霉菌双功能穿梭质粒pHZ1358同样也可以通过接合转移进入南昌链霉菌^[11]。这一基因克隆系统的建立,为在南昌链霉菌中进行基因功能研究奠定了基础。pHZ1358及其衍生的系列载体在其他链霉菌中也得

到了重要的应用,并获得了国际同行的广泛索取和成功应用。

4 南昌链霉菌中聚酮合酶(PKS)生物合成基因簇

研究表明,参与抗生素生物合成的基因往往成簇排列而且紧密连锁,而且,同类抗生素之间生物合成途径存在极大的相似性,这一认识作为抗生素生物合成基因的克隆策略之一已得到广泛的证实和运用。前期研究结果显示,南昌链霉菌至少可产生两种抗生素:梅岭霉素和南昌霉素^[2],其结构表明,这两类抗生素均属聚酮化合物。因此,我们采用异源探针法,用一包含糖多孢红霉菌I型PKS基因簇中4个不同结构域的DNA片段为探针,从南昌链霉菌总DNA基因文库中钓出了90个阳性科斯质粒,经染色体步移,将其中76个分别归属于8个独立的重叠群(contig A~H)^[11]。

在一个菌株中鉴别和分离出多个PKS基因簇将为研究同一生物体内多个PKS基因簇之间的“交叉对话”提供理想的候选材料,这些基因材料及其基因功能多样性的累积,构成了通过组合生物合成高产和创新微生物药物的宝贵基因资源库。

5 南昌霉素生物合成基因簇

通过对contig A的基因置换以及对获得的基因置换突变株所进行的产物检测,证实contig A区域包含了南昌霉素生物合成基因簇^[11]。为了从DNA水平了解参与南昌霉素生物合成的各基因或结构域的组成和特征,以及为在此基础上开展组合生物合成研究,对contig A所包含的整个区域进行了核苷酸序列测定。通过对核苷酸序列所进行的ORF分析和同源性比较,揭示出整个南昌霉素生物合成基因簇共包含30个ORF,其中11个ORF用于编码聚酮合酶,它包含14个模块,共有74个结构域,负责催化南昌霉素糖苷配基的生物合成。另有4个ORF编码可能参与南昌霉素生物合成修饰的蛋白,如负责催化糖苷配基的氧化、异构化和聚醚结构的形成等。还有6个ORF负责编码参与南昌霉素生物合成中糖基的合成及转移的蛋白。此外,在基因簇的两侧还存在着两组共9个潜在的调节基因,它们可能参与南昌霉素生物合成的调控^[12]。通过生物信息学分析结合功能研究,我们提出了国际上首例聚醚类离子载体抗生素——南昌霉素生物合成基因簇的结构组成、聚酮合酶上聚醚链形成和释放的机制以及整个抗生素生物合成的模型,这些发现将大大拓展我们对这类重要抗生素合成机理的认识,加强我们对

众多聚酮化合物生物合成相互转化和结构后修饰的能力。目前一些更为深入研究工作正在进行之中。

6 梅岭霉素生物合成基因簇

梅岭霉素的结构类似物阿维菌素是目前世界上有关生物合成基因簇研究的最为深入的抗生素之一,特别是在利用基因工程进行抗生素的人工改造方面已有了许多成功的范例^[13-15]。1999年,日本北里大学和北里研究所的Ikeda等^[16]将*S. avermitilis*中阿维菌素生物合成基因簇进行了序列测定并提交GenBank,这无疑为梅岭霉素生物合成基因簇的定位和后续研究提供了良好的模板和参照。

通过比较梅岭霉素和阿维菌素化学结构中相同的部分,推测催化它们形成的酶应该也是相同的。由PCR定向扩增出该基因并以之为探针进行Southern杂交以及基因置换实验,成功地定位了梅岭霉素生物合成基因簇所在contig^[17],然后对它也进行了核苷酸序列测定。经过生物信息学分析以及与阿维菌素生物合成基因簇的比较,首先,初步揭示这两个在化学结构和生物学活性等方面极其相似的抗生素在基因簇的组成上却有着出人意料的差异,特别是参与糖苷配基生物合成的ORF在位置和方向上都差距甚远;其次,负责生物合成后修饰的ORF也有着明显的差别。这些差异为我们进行聚酮合酶合成机理的研究以及梅岭霉素/阿维菌素的杂合带来了新的机遇和挑战。

7 南寡霉素生物合成基因簇

在南昌链霉菌前期的研究工作中,南昌霉素和梅岭霉素这两个组分由于其相对较高的含量和重要的应用价值而首先被分离并鉴定了化学结构^[2,5]。在此基础上,孙宇辉等通过遗传学和化学途径确定了这两个重要抗生素的生物合成基因簇并进行了序列测定,初步阐明了它们的生物合成途径^[11-12,17]。经异源探针杂交已了解到在南昌链霉菌中存在8个PKS同源基因簇,除了上述阐明的南昌霉素和梅岭霉素基因簇外,对其余6个基因簇的功能还一无所知,但推测它们可能也编码某抗生素或次生代谢产物。尽管对其化学结构和生物学活性还完全未知,但生物信息学也许可以从另一个角度来揭示这些PKS基因簇的功能。选取contig B中4个前后重叠的科斯质粒进行序列测定,通过生物信息学分析,共揭示19个可能的ORF,其中11个ORF在所有比较的同源基因中与*S. avermitilis*中的寡霉素(oligomycin)生物合成基因簇所对应的ORF有着最高的同源性,

而且在ORF的大小和排列上都极其相似,这暗示contig B所包含的基因簇很可能是寡霉素或相似结构的生物合成基因簇。由此,我们将该基因簇命名为南寡霉素(nanligomycin)生物合成基因簇。在本研究中,我们首次采用反向遗传学手段,即从生物信息学角度初步阐明了南寡霉素的生物合成途径。但是南寡霉素和寡霉素在生物合成基因簇上存在的这些相同和不同点还有待于我们从化学结构上去进一步证实。在化学结构多样性的天然产物中,聚酮化合物是当今在结构和功能对应方面研究得最为透彻和深入的化合物之一,关于I型PKS的基因、模块、结构域的遗传信息如今已变得越来越丰富,这使得人们通过遗传学和生物信息学方法来了解天然产物的化学结构成为可能,这无疑为新活性产物的发现开辟了一条新途径。

8 南昌霉素的组合生物学研究

南昌霉素生物合成基因簇序列的测定为利用基因工程进行南昌霉素的组合生物合成研究开辟了广阔的空间,在这个基础上,我们开展了一系列探索性的工作,如通过对南昌霉素生物合成基因簇模块6中酮基还原酶结构域(KR6)的同框缺失,成功地获得了预期的“非天然的”基因工程新化合物——脱糖南昌霉素^[12],这不仅证明了整个生物合成模型的正确性,还使基因功能定向敲除产生新抗生素药物的合理设想通过组合生物合成的新手段变成了现实;通过对CR结构域与*S. avermitilis* TE结构域的同框置换进行“大环内酯-聚醚”杂合抗生素的创新尝试等。此类研究所形成的工程化菌株和新结构化合物构成了新专利的基础,为利用基因工程技术来提高抗生素产量和创新药物提供了模型系统。

9 展望

自世界上第一例抗生素——青霉素被发现并广泛应用以来,抗生素的筛选工作从未间断,而且富有成效,但是,微生物耐药性的不断出现以及受自然界“递减规律”的影响,随着天然来源的次级代谢产物的不断挖掘,可培养的土著微生物来源的新的有用抗生素越来越难以被发现。现代生物技术的涌现为这一领域焕发了新的活力,特别是近年来以链霉菌聚酮合酶为先导和模式发展起来的组合生物合成,使之能更为有的放矢地利用抗生素基因簇资源,通过人工设计抗生素生物合成途径来主动性地高产或创新微生物药物^[18-20]。

南昌链霉菌中聚醚(南昌霉素)和大环内酯类抗

生素(梅岭霉素和南萁霉素)基因簇中聚酮生物合成编控的分子机理和特征的阐明,利用模块或结构域增加、减少、替换等多种组合生物学手段设计和改造基因簇,形成一系列非天然天然性化合物,在药物创新方面将有可能取得一系列突破,这种突破既可能有基础理论的价值,也具有潜在的应用前景。此外,研究中某一未知产物PKS基因簇(contig C)的阻断却导致南昌霉素抑菌活性的增强被发现,给了我们一个意外的启示:希望在了解同一生物体内多个PKS基因簇之间“交叉对话”的基础上,通过阻断其余PKS基因簇,以减少底物和能量的竞争,而人为实现某一特定抗生素的产量的提高,其新颖之处在于它在抗生素产生菌的遗传育种方面,有可能超越常规,从另一角度去探索抗生素品种与生产能力的改良。

[参 考 文 献]

- [1] 欧阳谅,万淑婉,涂国全,等.一株产生杀虫抗生素的链霉菌新种.微生物学报,1984,24:195~199
- [2] 欧阳谅,涂国全,高勇生.《杀虫抗生素研究》专辑.江西农业大学学报,1993,15.
- [3] 涂国全,欧阳谅.南昌链霉菌生长和产素的生理研究.江西农业大学学报,1993,15:20~26
- [4] 孙宇辉,涂国全,章平肇,等.梅岭霉素生物学活性及其产生菌特性研究——南昌链霉菌生长、发酵过程中形态学的观察.江西科学,1996,14:22~29
- [5] 高勇生,欧阳谅.杀虫抗生素——南昌霉素A的研究.江西农业大学学报,1986,8:126~128
- [6] 吴晓玉,涂国全.南昌霉素A产生菌原生质体诱变选育.江西农业大学学报,1999,21:351~354
- [7] 涂国全,魏赛金,刘 姝,等.南昌霉素高产菌株的链霉素抗性基因突变诱变筛选研究.微生物学通报,2002,29:10~13
- [8] 涂国全,刘 姝,黎循航.梅岭霉素高产菌株的链霉素抗性基因突变诱变筛选研究.微生物学通报,2002,29:33~37
- [9] Cortes J, Haydock S F, Roberts G A, et al. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature*, 1990, 348: 176~178
- [10] Donadio S, Staver M J, McAlpine J B, et al. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*, 1991, 252: 675~679
- [11] Sun Y H, Zhou X F, Liu J, et al. 'Streptomyces nanchangensis', a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. *Microbiology*, 2002, 148: 361~371
- [12] Sun Y H, Zhou X F, Dong H, et al. A complete gene cluster from *Streptomyces nanchangensis* NS3226 encoding biosynthesis of the polyether ionophore nanchangmycin. *Chem Biol*, 2003, 10: 431~441
- [13] Ikeda H, Omura S. Avermectin biosynthesis. *Chem Rev*, 1997, 97: 2591~2610
- [14] Dutton C J, Gibson S P, Goudie A C, et al. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J Antibiot* (Tokyo), 1991, 44: 357~365
- [15] Donadio S, McAlpine J B, Sheldon P J, et al. An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7119~7123
- [16] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9509~9514
- [17] Sun Y H, Zhou X F, Tu G Q, et al. Identification of a gene cluster encoding meilingmycin biosynthesis among multiple polyketide synthase contigs isolated from *Streptomyces nanchangensis* NS3226. *Arch Microbiol*, 2003, 180: 101~107
- [18] Khosla C. Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases. *Chem Rev*, 1997, 97: 2577~2590
- [19] Katz L. Manipulation of modular polyketide synthases. *Chem Rev*, 1997, 97: 2557~2576
- [20] Hopwood D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev*, 1997, 97: 2465~2498

SARS 研究论文产生重要影响

2003年SARS爆发期间,中科院上海生命科学研究院药物研究所药物发现与设计中心和上海生命科学研究院生物信息中心的研究人员及学生,在蒋华良、沈建华、沈旭和李亦学的带领下,开展了SARS重要蛋白结构与功能以及抗SARS药物设计的研究。其中,有关SARS病毒蛋白水解酶三维结构模拟和抗SARS药物虚拟筛选的结果发表在《中国药理学报》(*Acta Pharmacol Sin*)(2003, 24(6): 497~504)上,两年来已经被他人引用了22次,在同行中产生了广泛影响。该论文入选了“中国科学院生物类研究所1999~2004年年均被引用4次以上的论文”,更可喜的是,THOMSON公司根据Essential Science IndicatorSM引用统计,确定该论文为2000年以来在本领域中引用频率为前1%(top-1%)的论文。

摘自 <http://www.sibs.ac.cn>