

文章编号: 1001-8689(2018)01-0028-07

## 基因组信息指导下茂源链霉菌代谢产物研究

王珊珊 郭文强 何宁 齐欣 解云英\*

(中国医学科学院北京协和医学院, 医药生物研究所, 北京 100050)

**摘要:** **目的** 在基因组信息指导下, 研究茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43的代谢产物。**方法** 采用16S rRNA基因序列分析对菌株US-43进行初步分类鉴定, 应用antiSMASH分析菌株US-43的基因组序列并预测其可能含有的代谢产物; 采用正向硅胶柱色谱、凝胶柱色谱以及高效液相色谱等分离技术对该菌株的代谢产物进行分离纯化, 利用核磁共振和质谱鉴定化合物结构; 通过改变培养条件对其发酵稳定性进行考察, 通过HPLC-UV方法建立标准曲线, 研究代谢产物的产量。**结果** 在基因组信息指导下从茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43中分离鉴定了一个 $\alpha$ -吡啶酮类化合物杀粉蝶菌素A1, 且该菌株的发酵稳定性良好, 最高产量为144mg/L。**结论** 茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43能够稳定产生杀粉蝶菌素A1。

**关键词:** 茂源链霉菌; 基因组挖掘; 杀粉蝶菌素A1; 分离鉴定

**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A

## Genome guided investigation of metabolites of the strain *Streptomyces mobaraensis*

Wang Shan-shan, Guo Wen-qiang, He Ning, Qi Xin and Xie Yun-ying

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**Abstract Objective** To research the metabolites of the strain *Streptomyces mobaraensis* US-43 guided by genome informatics. **Methods** Phylogenetic analyses of the strain US-43 were based on 16S rRNA gene sequence. Antismash analysis was carried out to research the genome sequence of the strain US-43 and predict its potential metabolites. Then the target compound was isolated and purified with silica gel column chromatography, LH20 column chromatography, TLC and HPLC. The structure of the obtained compound was elucidated by NMR and mass spectrometry. The fermentation stability was investigated by changing the culture conditions, and the standard curve was established by the HPLC-UV method to study the yield of metabolites. **Results** Finally, an  $\alpha$ -pyridone compound piericidin A1 was isolated and identified from the strain *Streptomyces mobaraensis* US-43 guided by genome informatics. The fermentation stability of the strain US-43 was good and its maximum yield was 144mg/L. **Conclusion** The strain *Streptomyces mobaraensis* US-43 was able to stably produce piericidin A1.

**Key words** *Streptomyces mobaraensis*; Genome mining; Piericidin A1; Isolation and structural elucidation

收稿日期: 2017-01-25

基金项目: 医药生物研究所所长基金(No. 2016ZX350045和No. 2016ZX350053); 北京市自然科学基金(No. 7172137);

中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费(No. 2016-I2M-2-002)

作者简介: 王珊珊, 女, 生于1991年, 在读硕士研究生, 主要从事微生物与生化药学研究, E-mail: wsandyou@163.com

\*通讯作者, E-mail: xieyy@imb.pumc.edu.cn

天然产物基因信息学分析是通过比较基因序列中特定基因及基因簇的保守序列,通过预测酶的活性而对代谢产物进行预测。近年来,得益于专业、开源的天然产物生物合成基因簇预测软件的开发和共享,普通的生物、化学研究者也能够便捷地进行基因信息学分析。目前常用的分析软件主要是antiSMASH、NRPSpredictor2和SBSPKS等,其中antiSMASH是整合度最高,目前应用最广的一款次级代谢产物基因簇预测、分析软件。通过基因分析、产物结构性质预测,可发现潜在未知基因簇,指导已知化合物的排重,辅助产物鉴定,使天然产物发现工作更有针对性、更高效<sup>[1-3]</sup>。

杀粉蝶菌素(piericidin)是一类具有良好生物活性的 $\alpha$ -吡啶酮类抗生素<sup>[5-15]</sup>,它的特征性结构是一个4-羟基吡啶核连着一个甲基化的聚酮侧链<sup>[4]</sup>,其中杀粉蝶菌素A1(piericidin A1)是结构最为简单的杀粉蝶菌素<sup>[5]</sup>。杀粉蝶菌素A1的生物合成途径为:一分子乙酰辅酶A作为起始单元,三分子丙二酰辅酶A和五分子甲基丙二酰辅酶A作为延伸单元被*pieA1-pieA6*(编码聚酮合酶的基因)编码的9个I型PKS模块以典型的流水线装配模式组装成聚酮骨架,并被最后一个模块C端的PieTE结构域水解释放成线性聚酮链,*pieD*编码的氨基转移酶对聚酮链末端的羧基转氨,进而可能由PieC参与环化反应,形成核心结构 $\alpha$ -吡啶环,最后通过2个甲基转移酶、1个FAD依赖的单加氧酶完成3步后修饰步骤,产生终产物杀粉蝶菌素A1。杀粉蝶菌素A1能与线粒体呼吸作用复合体I结合,通过抑制Fe-S簇氧化和泛醌的还原,从而作为线粒体呼吸作用抑制剂发挥作用。基于这一作用机理,杀粉蝶菌素A1对致病真菌显示出较强的生物活性,另外,它还能选择性地杀死一些昆虫<sup>[16]</sup>,对许多肿瘤细胞也有一定抑制作用<sup>[17-18]</sup>。因此,寻找新型杀粉蝶菌素或稳定高产的杀粉蝶菌素A1产生菌株仍具有实际应用意义。

前期本研究对实验室保藏的一株茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43进行全基因组测序,并通过antiSMASH分析发现其含有一个与 $\alpha$ -吡啶酮类化合物杀粉蝶菌素A1具有较高同源性的I型聚酮类(PK)化合物合成基因簇,推测该菌株可能产生化合物杀粉蝶菌素A1或其类似物。根据杀粉蝶菌素类化

合物的结构及理化性质,本研究采用一系列相应的分离手段,从菌株US-43的菌丝体中分离到了一个化合物XNF-WSS1,经结构鉴定确定其为杀粉蝶菌素A1,并对其发酵稳定性和产量进行了研究,发现其在不同pH、不同盐浓度和不同温度的发酵条件下能够稳定产生杀粉蝶菌素A1,且其最高产量为144mg/L。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与培养基

茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43保藏于本实验室。固体斜面培养基:KNO<sub>3</sub> 1.0g/L, NaCl 0.5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.01g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5g/L,可溶性淀粉20g/L,琼脂20g/L,蒸馏水配置,pH7.2。种子/发酵培养基(F1培养基):普通淀粉25g/L,葡萄糖5g/L,蛋白胨3g/L,牛肉膏3g/L, CaCO<sub>3</sub> 2.5g/L,微量元素1.0mL/L,自来水配置,pH7.2;微量元素配方(FeSO<sub>4</sub> 1.0g, MnCl<sub>2</sub> 1.0g, ZnSO<sub>4</sub> 1.0g, CuSO<sub>4</sub> 1.0g, CoCl<sub>2</sub> 1.0g,蒸馏水1L)。

### 1.2 主要试剂与仪器

试剂:丙酮、石油醚、乙酸乙酯、甲醇,购自北京化工厂;色谱级甲醇,购自迪马科技有限公司;氘代DMSO,购自美国Cambridge Isotope Laboratory公司;正相柱层析硅胶,购自青岛海洋化工厂分厂;Sephedex TM LH-20,购自美国GE医疗;薄层色谱硅胶预制板(SGF254),购自烟台化学工业研究所;C<sub>18</sub>反相硅胶柱层析硅胶(50 $\mu$ m),购自美国Waters公司;PCR引物及PCR常规作用试剂分别购自上海生工生物工程有限公司,杀粉蝶菌A1对照品内部制备。

仪器:高压蒸汽灭菌锅(日本Sanyo公司,MLS-3780);恒温生化培养箱(日本Sanyo公司,DH5000);恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司,ZHWY-32);旋蒸式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司 SHB-B95);低温冷冻循环泵(郑州长城科工贸有限公司DLSB-10/30);旋转蒸发仪ZKSY(巩义市予华仪器有限公司ZKSY);高效无菌超净工作台(北京亚泰克隆YT-CJ-1N);高效液相色谱仪(日本岛津公司DGU-20A5);液-质联用仪(Agilent科技有限公司);600M核磁共振仪(德国Bruker公司)。

### 1.3 序列分析

菌株US-43的种属鉴定

### 1.3.1 16S rRNA基因扩增

Chelex-100法提取基因组DNA, 并以此为模板, 进行16S rRNA基因序列的PCR扩增, 采用细菌通用引物: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'); 1540r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。扩增程序: 95℃预变性5min, 95℃变性1min, 54℃退火45s, 72℃延伸1.5min, 35个循环; 72℃延伸10min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪观察电泳结果。PCR产物委托上海生工生物工程有限公司进行测序。

### 1.3.2 进化树构建

将所测序列在EzBioCloud数据库中进行BLAST比对, 从中获得相似度较高的8个典型标准菌株的16S rRNA基因序列作为参比菌株, 用Clustal X软件进行多序列比对, 采用MEGA 5.0软件包中的邻接法(Neighbor-Joining)进行聚类分析, 并构建目标菌株与参比菌株之间的系统进化树。

### 1.4 菌株US-43基因组生物信息学分析

茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43的基因组框架图委托华大基因完成, 其次级代谢产物合成基因簇预测应用antiSMASH3.0分析完成。

### 1.5 菌株US-43的发酵

将固体斜面培养良好的US-43菌株接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中, 29℃, 220r/min, 培养48h, 以10%接种量无菌转接于装有1L发酵培养基的5L大三角瓶中, 29℃, 220r/min, 培养5d。

### 1.6 次级代谢产物的提取

对茂源链霉菌进行大量发酵, 共5L。将发酵所得混合物取出后, 4500r/min离心30min, 弃去上清液, 将菌丝体用2倍体积的丙酮浸泡, 超声破碎, 过夜浸泡后过滤获得丙酮提取液, 再重复一次, 合并萃取后的丙酮, 于30℃减压蒸馏, 去除有机溶剂, 获得发酵粗提物(10g)。

### 1.7 次级代谢产物的分离纯化

使用正向硅胶色谱柱对发酵粗提物进行分离, 石油醚-丙酮梯度洗脱(石油醚, 石油醚:丙酮=10:1、石油醚:丙酮=5:1和丙酮)。收集洗脱液, 减压蒸馏浓缩各组分, 根据杀粉蝶菌素类化合物具有抗真菌活

性及在232nm具有紫外吸收的特点, 分别对各组分作TLC分析以及抗菌活性测试, 结果表明目标产物主要集中于石油醚:丙酮为10:1的洗脱部分(Fr.1, 4g)。

取1g Fr.1, 采用半制备高效液相色谱法对该组分进行分离纯化, 流动相: 甲醇:水= 88:12(V/V), 流速4mL/min, 得到化合物XNF-WSS1(100mg)。

通过HPLC对XNF-WSS1进行纯度分析, 色谱柱为SHIMADZU的ODS C<sub>18</sub>柱(150mm×4.6mm, 5μm); 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 232nm; 柱温箱: 30℃; 流动相: 0~5min 10%甲醇水, 5~45min 10%~100%甲醇水, 45~55min 100%甲醇。

### 1.8 杀粉蝶菌素A1的发酵稳定性

菌株US-43发酵稳定性考察: 选择不同的发酵pH、不同的盐浓度和不同的温度对菌株US-43进行发酵。其中pH选择酸性、中性和碱性(pH为4、7和11), 盐浓度选择低盐、中盐和高盐(正常F1发酵培养基、F1培养基分别加3%和5%的NaCl), 温度选择正常温度和高温(29℃和37℃)。发酵液经同“1.6”项下方法处理得粗提物, 分别将所得的粗提物完全溶于甲醇, 经ODS固相萃取柱预处理后, 采用HPLC分析目标产物的变化, HPLC条件同“1.7”项。

### 1.9 杀粉蝶菌素A1的发酵周期及发酵产量

以本研究纯化得到的杀粉蝶菌素A1为对照品, 精密称取10mg, 置于10mL的容量瓶中, 用甲醇定容, 制成浓度为1mg/mL的储备液, 精密吸取此储备液适量, 用甲醇逐级稀释成浓度如下的系列对照品溶液: 1、0.5、0.25、0.125、0.0625和0.03125mg/mL。精密吸取上述溶液5μL, 注入液相色谱仪, 条件同“1.7”项, 记录峰面积。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

将固体斜面培养良好的US-43菌株接种于装有100mL F1发酵培养基的500mL三角瓶中, 29℃, 220r/min, 分别培养3、5、7、9、11、13、15和17d, 每个发酵天数做3组平行。发酵液经同“1.6”项下方法处理得粗提物, 分别将所得的粗提物完全溶于30mL甲醇, 取其中1mL经ODS固相萃取柱预处理后, 采用HPLC分析目标产物, HPLC条件同“1.7”项。

## 2 结果与分析

## 2.1 菌株系统发育树构建

菌株US-43的16S rRNA基因序列经过扩增并测序后,得到16S rDNA序列。在EzBioCloud数据库进行BLAST,结果表明:其与*Streptomyces abikoensis*(AB184537), *Streptomyces blastmyceticus*(AY999802), *Streptomyces glebosus*(HQ244456), *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *glebosus*(AB184479), *Streptomyces libani* subsp. *rufus*(AJ781351), *Streptomyces lilacinus*(JNXU01001020), *Streptomyces mobaraensis*(AORZ01000256), *Streptomyces varsoviensis*(JOB01000056)的相似性在99.93%~98.71%之间,其中与标准菌株*Streptomyces mobaraensis*(AORZ01000256)的序列相似度高达100%,聚在同一个进化分支上(图1)。

## 2.2 基因组信息学分析

通过antiSMASH3.0对茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43的基因组信息进行分析,发现其

含有一个与 $\alpha$ -吡啶酮类化合物杀粉蝶菌素A1具有较高同源性的I型聚酮类(PK)化合物合成基因簇。该基因簇与*S. piomogeues* var. *Hangzhouwanensis*的基因组中的Contig A<sup>[19]</sup>相似,包含了杀粉蝶菌素A1的生物合成所需要的3个编码聚酮合酶(PieA4, PieA5, PieA6)的基因,1个编码转氨酶PieD的基因、1个编码功能未知蛋白PieC的基因、2个编码甲基转移酶PieB1和PieB2的基因和1个编码单加氧酶PieE的基因,比Contig A多了1个编码聚酮合酶的*PieA4*基因。杀粉蝶菌素A1生物合成所需要的其他3个编码聚酮合酶的基因(*pieA1~pieA3*)可能在拼凑过程中丢失,但通过与

## 2.3 化合物XNF-WSS1的结构鉴定

化合物XNF-WSS1在232nm处的高效液相色谱图及其对应的紫外可见吸收光谱如图2所示,该化合物在232nm处有最大吸收波长,保留时间为43.7min。

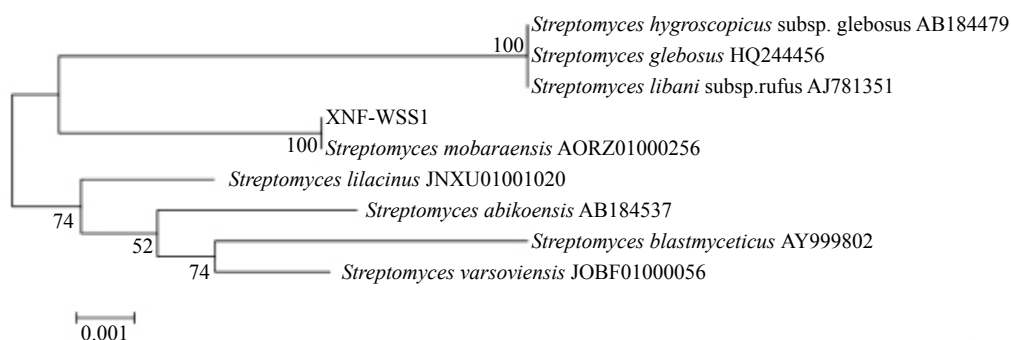


图1 菌株US-43与相关菌株的系统进化树  
Fig. 1 Phylogenetic tree of strain US-43 and related type strains

化合物XNF-WSS1的ESI-MS分子离子峰为 $m/z$  416.2 $[M+H]^+$ ; 分子式为 $C_{25}H_{37}NO_6$ 。

化合物XNF-WSS1  $^1H$  NMR数据:  $^1H$  NMR(600 MHz, DMSO)  $\delta_H$  3.25(d, 2H,  $J=6.88$ ), 5.29(t, 1H,  $J=6.83, 6.83$ ), 2.70(d, 2H,  $J=6.81$ ), 5.43(m, 1H), 5.98(d, 1H,  $J=15.52$ ), 5.24(d, 1H,  $J=9.28$ ), 2.51(m, 1H), 3.56(dd, 1H,  $J=7.5, 2.5$ ), 5.30(q, 1H,  $J=14.6, 6.65$ ), 1.51(d, 2H,  $J=6.67$ ), 1.66(s, 3H), 1.62(s, 3H), 0.73(d, 3H,  $J=6.82$ ), 1.47(s, 3H), 1.95(s, 3H), 3.60(s, 3H), 3.77(s, 3H), 1.20(s, 1H), 9.74(s, 1H)。氢谱中共给出了37个氢信号,结合化合物的碳谱数据(表1)中给出的25个碳信

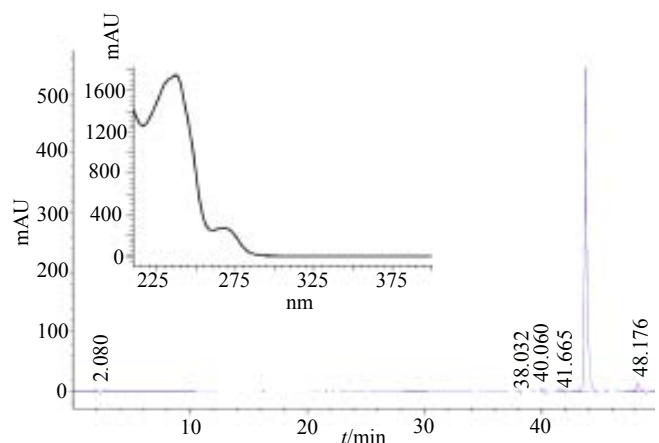


图2 化合物XNF-WSS1的HPLC图谱  
Fig. 2 The HPLC analysis of compound XNF-WSS1

表1 化合物XNF-WSS1在DMSO中的<sup>13</sup>C NMR(600MHz)数据  
Tab. 1 <sup>13</sup>C NMR (600MHz) data for compound XNF-WSS1 in DMSO

Position	Piericidin A1	XNF-WSS1	Position	Piericidin A1	XNF-WSS1
1	34.3	34.45	11	135.6	136.70
2	122.1	119.79	11-CH <sub>3</sub>	10.5	11.73
3	135.4	135.62	12	123.5	122.39
3-CH <sub>3</sub>	13.1	13.22	13	13.1	13.14
4	43.0	42.76	2'	150.8	150.09
5	126.7	124.87	3'	112.1	113.10
6	136.0	138.19	3'-CH <sub>3</sub>	10.4	10.94
7	134.7	134.66	4'	154.0	155.57
7-CH <sub>3</sub>	16.6	16.86	5'	127.8	128.71
8	133.0	132.50	5'-OCH <sub>3</sub>	53.0	52.91
9	36.8	36.51	6'	153.6	154.69
9-CH <sub>3</sub>	17.3	18.33	6'-OCH <sub>3</sub>	60.5	60.42
10	82.8	80.92			

号, 对比文献报道中杀粉蝶菌素A1的<sup>13</sup>C NMR图谱数据, 可以发现化合物XNF-WSS1与文献中的杀粉蝶菌素A1的核磁共振数据基本一致。结合质谱数据推测化合物XNF-WSS1即为杀粉蝶菌素A1, 其化学结构如图3<sup>[20]</sup>。

2.4 杀粉蝶菌素A1发酵稳定性

茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43在不同的温度(29℃和37℃)、不同的发酵pH(4、7和11)和不同的盐浓度下可稳定产生杀粉蝶菌素A1, 且其产量稳定(图4)。

2.5 杀粉蝶菌素A1发酵周期及发酵产量

以对照品质量浓度为横坐标(x), 峰面积为纵坐标(y), 进行线性回归, 各化合物的线性方程和相关系数计算结果见图5。从图中可见该化合物在其浓度范围内线性关系良好。杀粉蝶菌素A1的产量在11d时最高(图6), 约为144mg/L。

3 讨论

化合物杀粉蝶菌素A1最早是于1963年由Takahashi课题组从土壤来源的*Streptomyces mobaraensis*的发酵产物中分离得到的一种新型杀虫代谢物。因为杀粉蝶菌素A1与泛醌在结构上高度相似, 所以它能够通过抑制电子传递链对很多生物产生很强的毒性<sup>[5]</sup>。报道称, 杀粉蝶菌素A1具有良好的抗菌活性和抗真菌活性。另外, 杀粉蝶菌素A1还具有抗肿瘤活性, 在耐依托泊苷HT-29人类结肠癌细胞模型中被确认是一种高度选择性的抗肿瘤剂<sup>[21]</sup>。

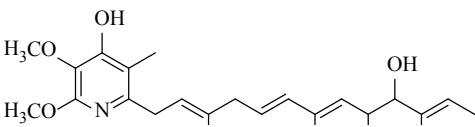
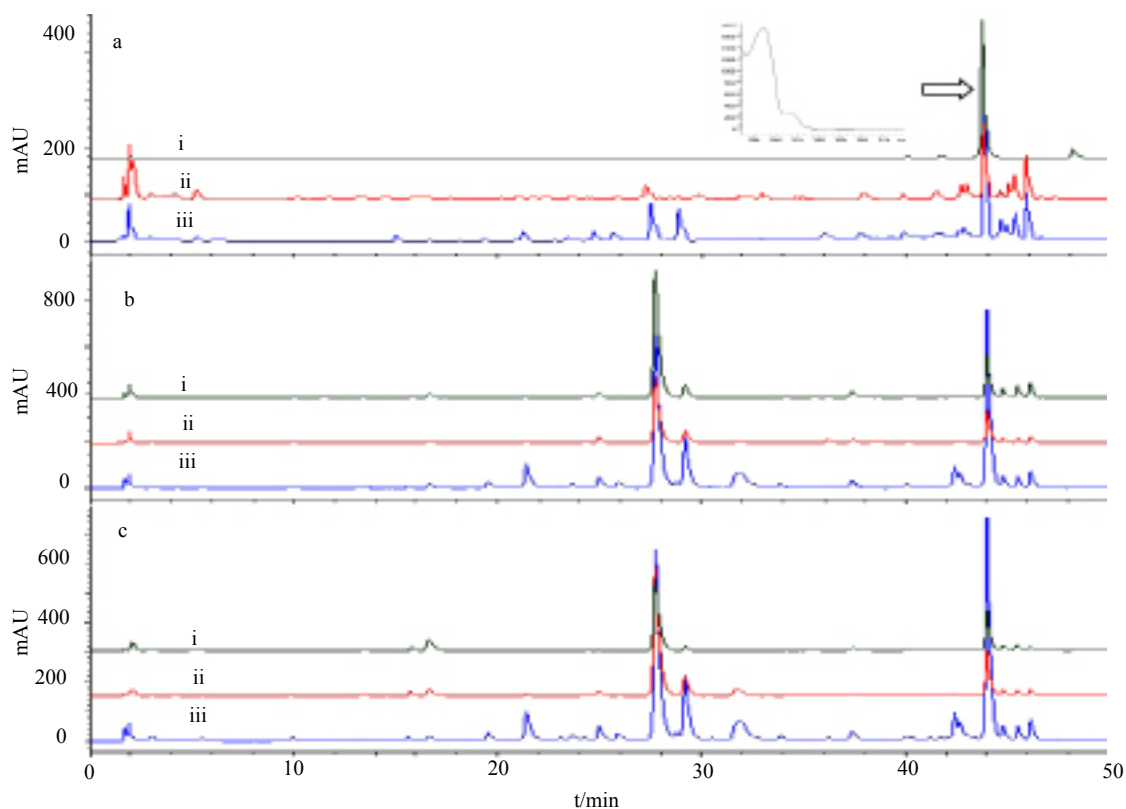


图3 XNF-WSS1 的结构  
Fig. 3 Structure of XNF-WSS1

菌株US-43是本实验室保藏的一株放线菌, 经过初步种属鉴定, 证实其为*Streptomyces mobaraensis*。本研究对菌株US-43进行全基因组测序后, 利用antiSMASH软件对其次级代谢产物基因簇进行分析, 发现其含有一个与α-吡啶酮类化合物杀粉蝶菌素A1具有较高同源性的I型聚酮类(PK)化合物合成基因簇, 通过仔细分析、比对, 本研究推测该基因簇可能负责杀粉蝶菌素A1或其类似物的生物合成。并根据杀粉蝶菌素的, 本研究从该菌的菌丝体中分离鉴定了到了化合物杀粉蝶菌素A1。

这是首次在基因信息指导下, 从茂源链霉菌*Streptomyces mobaraensis* US-43中分离得到了α-吡啶酮类化合物杀粉蝶菌素A1。另外, 本研究对其发酵稳定性和产量进行了研究, 发现其在不同pH、不同盐浓度和不同温度的发酵条件下能够稳定产生杀粉蝶菌素A1, 且其最高产量为144μg/mL。由于杀粉蝶菌素A1具有多种生物活性, 因此, 将菌株US-43开发为稳定高产的杀粉蝶菌素A1生产菌株具有重要的实用意义。



a: 不同培养温度对菌株us-43杀粉蝶菌素A1产量的影响(i: 对照品; ii: 37℃; iii: 28℃); b: 不同发酵pH对菌株us-43杀粉蝶菌素A1产量的影响(i: pH4; ii: pH11; iii: pH7); c: 不同盐浓度对菌株us-43杀粉蝶菌素A1产量的影响(i: 加5%NaCl; ii: 加3%NaCl; iii: 不加NaCl)

图4 杀粉蝶菌素A1在不同发酵条件下的稳定性  
Fig. 4 Fermentation stability of piericidin A1

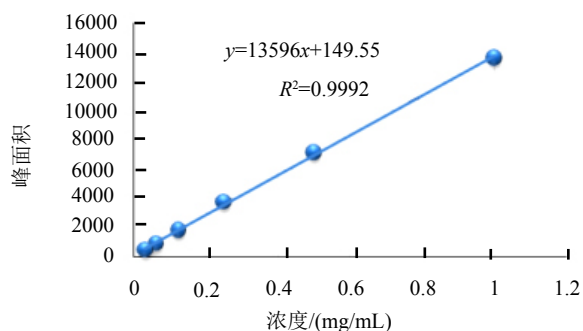


图5 杀粉蝶菌素A1的标准曲线  
Fig. 5 Standard curve of piericidin A1

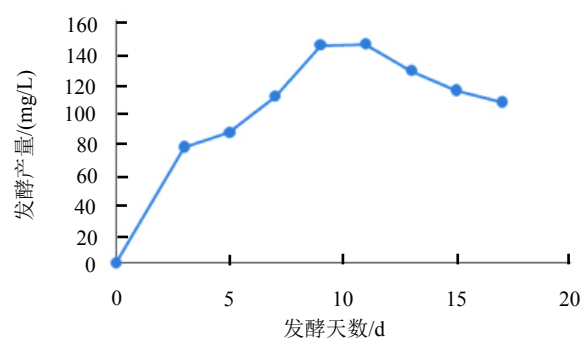


图6 发酵时间对杀粉蝶菌素A1产量的影响  
Fig. 6 Fermentation period and yield of piericidin A1

### 参考文献

- [1] Doroghazi J R, Albright J C, Goering A W, *et al.* A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(11): 963-968.
- [2] Sidebottom A M, Carlson E E. A reinvigorated era of bacterial secondary metabolite discovery[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 24C: 104-111.
- [3] Bentley S D, Chater K F, Cerdeno-Tarraga A M, *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [4] Zhou X F, Fenical W. The unique chemistry and biology of the piericidins[J]. *J Antibiot*, 2016, 69(8): 582-593.
- [5] Hall C, Wu M, Crane F L, *et al.* Piericidin A: A new inhibitor of mitochondrial electron transport[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966, 25(4): 373-377.
- [6] Takahashi N, Suzuki A, Kimura Y, *et al.* Structure of piericidin B and stereochemistry of piericidins[J].

- Tetrahedron Lett*, 1967, 21(21): 1961-1964.
- [7] Kubota N K, Ohta E, Ohta S, *et al.* Piericidins C5 and C6: New 4-pyridinol compounds produced by *Streptomyces* sp. and *Nocardioideis* sp.[J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11(21): 4569-4575.
- [8] Hayakawa Y, Shirasaki S, Shiba S. Piericidins C7 and C8, new cytotoxic antibiotics produced by a marine *Streptomyces* sp.[J]. *J Antibiot*, 2007, 60(3): 196-200.
- [9] Hayakawa Y, Shirasaki S, Kawasaki T, *et al.* Structures of new cytotoxic antibiotics, piericidins C7 and C8[J]. *J Antibiot*, 2007, 60(35): 201-203.
- [10] Urakawa A, *et al.* IT-143-A and B, novel piericidin group antibiotics produced by *Streptomyces* sp.[J]. *J Antibiot*, 1996, 49(10): 1052-1055.
- [11] Ueda J Y, Togashi T, Matukura S, *et al.* A novel nuclear export inhibitor JBIR-02, a new piericidin discovered from *Streptomyces* sp. ML55[J]. *J Antibiot*, 2007, 60(7): 459-462.
- [12] Kimura K, Takahashi H, Miyata N, *et al.* New piericidin antibiotics, 7-demethylpiericidin A1 and 7-demethyl-3'-rhamnopiericidin A1[J]. *J Antibiot*, 1996, 27(49): 697-699 .
- [13] Matsumoto M, Mogi K, Nagaoka K, *et al.* New piericidin glucosides, glucopiericidins A and B[J]. *J Antibiot*, 1987, 40(2): 149-156 .
- [14] Shaaban K A, Helmke E, Kelter G, *et al.* Glucopiericidin C: A cytotoxic piericidin glucoside antibiotic produced by a marine *Streptomyces* isolate[J]. *J Antibiot*, 2011, 64(25): 205-209.
- [15] Iwasaki H, Kamisango K, Kuboniwa H, *et al.* 3'-Deoxytalopiericidin-A1, a novel analog of antitumor antibiotics from oligotroph[J]. *J Antibiot*, 1991, 44(4): 451-452.
- [16] Hall C, Wu M, Crane F L, *et al.* Piericidin A: A new inhibitor of mitochondrial electron transport[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966, 25(4): 373-377.
- [17] Schnermann M J, Romero F A, Hwang I, *et al.* Total synthesis of piericidin A1 and B1 and key analogues[J]. *J Am Chem Soc*, 2006 , 128(36): 11799-11807.
- [18] Jeso V, Yang C, Cameron M D, *et al.* Synthesis and SAR of Lehuamide B: A marine-derived natural product with potent anti-multiple myeloma activity[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(6): 1241-1252 .
- [19] Liu Q, Yao F, Chooi Y H, *et al.* Elucidation of piericidin A1 biosynthetic locus revealed a thioesterase-dependent mechanism of  $\alpha$ -pyridone ring formation[J]. *Chem Biol*, 2012, 19(2): 243-253.
- [20] Singh B, Parshad R, Khajuria R K, *et al.* Saccharonol B, a new cytotoxic methylated isocoumarin from *Saccharomonospora azurea*[J]. *Tetrahed Lett*, 2013, 54(49): 6695-6699.
- [21] Hwang J H, Kim J Y, Cha M R, *et al.* Etoposide-resistant HT-29 human colon carcinoma cells during glucose deprivation are sensitive to piericidin A, a GRP78 down-regulator[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(1): 243-250.