

微生物药物筛选

PPTase 高表达菌株 *Streptomyces ghanaensis* 的发酵及其产物
cytoxazone 的发现黄晓伟¹ 闫晓丽² 田文雅² 瞿旭东²

(1 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 武汉 430030; 2 武汉大学药学院, 武汉 430072)

摘要: 天然产物是新药发现的重要源泉。然而, 由于大多数天然产物的生物合成途径在实验室培养的情况下处于沉默状态, 因此需要对其生物合成调控环节进行干预, 从而使微生物激活其自身的生物合成。在前期工作中, 本研究发展了一种高效激活沉默天然产物的方法。通过在微生物体内过表达磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (phosphopantetheinyl transferase, PPTase), 可以高效激活一系列沉默天然产物的生物合成。基于该工作基础, 本研究从一株 PPTase 过表达的嘎纳链霉菌 *Streptomyces ghanaensis* CGMCC 4.1967 中, 发现了一个新的激活天然产物。经分离后通过结构鉴定该产物为 Th2 细胞 II 型细胞因子细胞特异性抑制剂 cytoxazone。Cytoxazone 此前是在一株分离自广岛的链霉菌 (*Streptomyces* sp.) 的发酵液中发现, 其在嘎纳链霉菌中为首次发现。本研究的结果证实了 *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 可以产生 cytoxazone。这部分工作将对阐明此类重要天然产物的生物合成机制, 并对其进行合成生物学改造以获得更好活性的细胞因子抑制剂建立基础。

关键词: 天然产物; 基因组挖掘; PPTase; Cytoxazone

中图分类号: R979.1⁺1 **文献标志码:** A

Fermentation analysis of the PPTase overexpressed *Streptomyces ghanaensis* strain
and the identification of cytoxazoneHuang Xiao-wei¹, Yan Xiao-li², Tian Wen-ya² and Qu Xu-dong²

(1 Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, HUST, Wuhan 430030; 2 School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract Natural products are critical for drug discovery and development. However, this endeavor is often challenged by the wide inactivation or silence of natural products biosynthetic pathways. We recently developed a highly efficient approach to activate cryptic/silenced biosynthetic pathways through overexpression of the phosphopantetheinyl transferase (PPTase) *in vivo*. Based on these studies, we herein identified a novel activated metabolite-cytoxazone from the *Streptomyces ghanaensis* CGMCC 4.1967 PPTase overexpressing strain. Cytoxazone was previously discovered from *Streptomyces* sp. and has a potent inhibitory activity against Th2 cells to produce type II cytokines. Its production in *Streptomyces ghanaensis* CGMCC 4.1967 was not known before and our results confirmed that the *Streptomyces ghanaensis* CGMCC 4.1967 indeed had the capability to produce this secondary metabolite. Moreover, the successful activation of cytoxazone production demonstrated the effectiveness of PPTase-based approach. This result provided a solid basis for further elucidation of its biosynthesis and generation of structural diversity through pathway engineering.

Key words Natural product; Genome mining; PPTase; Cytoxazone

收稿日期: 2018-05-02

基金项目: 湖北省自然科学基金 (No. ZRMS2017001363)

作者简介: 黄晓伟, 男, 生于 1981 年, 博士, 讲师, 主要研究方向为慢性肝病的早期诊断及药物治疗, E-mail: hwxw9911051@163.com

天然产物对新药的发现和发展至关重要。过去 30 年间,国际上被批准的小分子药物中有 50% 以上来源于天然产物及其衍生物,抗肿瘤和抗感染(抗细菌、真菌、寄生虫和病毒)的比率更是高达 79.8% 和 69.8%^[1]。然而由于长期缺乏新的研究方法和研究思路,新结构的活性天然产物发现率愈来愈低;加之新的代谢性疾病及多重耐药菌的发展快于新活性化合物的临床应用,医药领域对新的活性天然产物愈发迫切的需求,已成为当前药物研发领域最需解决的瓶颈之一^[2]。另外,从天然产物中发现新的活性化合物的方式也是化学合成所不能替代的^[3-4]。因此,从天然产物中寻找具有新颖结构和显著活性的化合物,仍将是更快捷、更有效的方式。

基因组研究表明,目前已鉴定的微生物天然产物大约只占微生物生产能力的 10%,大量的天然产物由于在实验室条件下处于“沉默”状态或微量表达而有待发掘^[5-6]。随着对天然产物生物合成机制了解的日渐深入,发现天然产物的“沉默”状态或微量表达主要是由于在其生物合成基因的表现遗传、转录、翻译以及蛋白后修饰环节的调控问题导致的^[7]。基于这些环节,近年来国际上发展了一系列有效的方法,在激活“沉默”天然产物生物合成基因簇("silent" or "cryptic" gene cluster)中取得了巨大成功^[8]。其中,本研究发现了微生物体内磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(phosphopantetheinyl transferases, PPtase)过强或过弱的修饰次级代谢和初级代谢载体蛋白(carrier protein, CP)是导致天然产物沉默的重要因素^[9]。通过向 33 株放线菌中过量表达来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和黄萎病链霉菌(*Streptomyces verticillus*)的 PPtase 基因 *sfp* 和 *svp*, 共有 23 株菌株(70%)产生了一系列原先“沉默”的天然产物。对其中的一些菌株的激活产物的分离鉴定,我们发掘到了包括 II 型聚酮(type II polyketide) oviedomycin、I 型聚酮(type I polyketide) 化合物 halichomycin 和 defumarylhygrolidin 以及核苷类化合物 puromycin 等一系列沉默的天然产物^[9-10]。为了进一步发掘和鉴定未知激活的天然产物,本研究中,我们对前期获得的一株链霉菌重组菌株 *Streptomyces ghanaensis* CGMCC 4.1967-PPtase 中的一个未知激活组分的分离,通过核磁鉴定发现了其为一种高效的细胞因子抑制剂 cytotoxazone。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

仪器: LC-20AT 型岛津高效液相色谱(HPLC, Shimadzu 公司), C₁₈ 分析柱(Agilent Eclipse XDB-C₁₈, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm, 美国 Agilent 公司); 核磁仪(Bruker BioSpin GmbH, 400MHz 德国 Bruker 公司); ZWY-2102C 型摇床(上海智城分析仪器制造有限公司), SPX-70BIII 生化培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。试剂:均为分析纯试剂,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 培养基和化学试剂

TSB(100mL): 3.0g 胰蛋白胨大豆肉(Tryptone Soya Broth, TSB), 去离子水定容至 100mL。MS(100mL): 2.0g 甘露醇(Mannitol), 2.0g 黄豆粉(Soy Flour), 自来水定容至 100mL。阿泊拉霉素(Apramycin, 购自 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

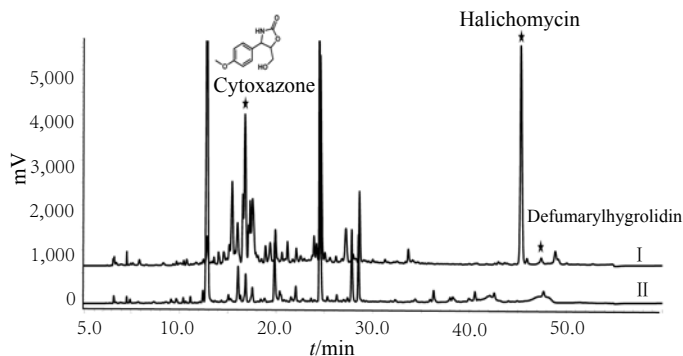
1.3.1 发酵及 HPLC 检测条件

从 -30 $^{\circ}$ C 低温保存冰箱中取出保种用的甘油管, 在无菌操作台中, 取出 20 μ L *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967-PPtase 菌液^[9]接种于含有相应浓度的阿泊拉霉素抗生素的 4mL TSB 培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C、220r/min 摇床培养至一定浓度, 然后吸取 200 μ L 菌液转接入 250mL MS 液体培养基中(共 9L), 置于 28 $^{\circ}$ C, 220r/min 摇床中, 发酵培养 7d 后取出。将等体积的乙酸乙酯加入发酵培养基中, 超声萃取 15min, 充分静置分层后, 取出乙酸乙酯层, 反复萃取 3 次, 旋转浓缩得发酵浸膏 9.5g。称取少量浸膏, 用甲醇溶解, 溶液用 0.22 μ m 的有机相微孔滤膜过滤, 用于 HPLC 检测, 检测条件: 分析条件为 $T=0$ min, 5%B; $T=50$ min, 100%B; $T=50.01$ min, 5%B; $T=60$ min, 5%B。其中 A 相: 超纯水; B 相: 乙腈; 流速为 1mL/min; 检测波长为 254nm; 柱型号: Agilent Eclipse XDB-C₁₈。

2 结果与讨论

2.1 分析 *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967-PPtase 发酵液组分

前期的研究过程中我们获得了一株 *sfp* 和 *svp* 过表达的菌株 *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967-PPtase, 该菌株相对于野生型菌株 *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 能够激活产生聚酮化合物 halichomycin 和 defumarylhygrolidin^[9]。进一步对比其与野生菌株的发酵液组分, 我们发现在检测波长为 254nm 的条件下, 保留时间为 16.8min (HPLC) 处还产生了一个显著增强的峰(图 1)。尽管在野生型菌株发酵液相应的保留时间处也存在着一个峰, 但是两者之间的紫



检测波长为 254nm/L; “*” 为 cytozoxone; halichomycin 和 defumarylhygrolidin 已在前期鉴定: I) *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967-PPTase 菌株; II) *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 野生菌株

图 1 HPLC 分析 *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 野生菌株和 PPTase 重组菌株的发酵液组分

Fig. 1 HPLC analysis of metabolites production in *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 wild-type and PPTase strains

外吸收明显不同, 属于不同化合物。

2.2 分离鉴定激活产物

为了鉴定该激活产物, 我们对发酵并萃取得到的 9.5g 浸膏与甲醇混溶后硅胶拌样, 以石油醚 (PE): 乙酸乙酯 (EA), 乙酸乙酯: 丙酮作为流动相, 以硅胶作为固定相, TLC 为检测手段, 按 0:100~100:0 的梯度进行洗脱, 分离得 9 个组分 (编号为 S1~S9); 其中, 目标化合物主要集中于 S9 (石油醚: 乙酸乙酯=90:10), 分离流程见图 2。目标化合物在 S9 组分静置过程中以白色无定型白色粉末形态析出, 过滤分离以及反复溶解析出后可以得到纯净的化合物 30mg。

2.3 化合物的结构鉴定

高分辨质谱分析确定该化合物正离子分子量为 $[M+H]^+ m/z$ 224.0920, 可以推出分子式为 $C_{11}H_{13}NO_4$ 。由 1H (400MHz, CD_3OD) (图 3A), δ_H 7.22(d, $J=8.4Hz$, 2H), δ_H 6.96 (d, $J=8.4Hz$, 2H)。可知, 该化合物含有一个 1,4- 双取代的苯环结构, 这一点通过 ^{13}C (101MHz, CD_3OD) (图 3B) δ_C 127.8, δ_C 113.6 的高度是其他碳谱的 2 倍得以证实。由 δ_H 3.82 (s, 3H), δ_C 54.4, δ_C 159.9 说明对位取代的基团是 OMe。 δ_C 160.7 说明含有一个羰基。由 δ_C 57.2, 61.5, 81.3 可知这 3 个碳原子与杂原子相连, 由 δ_H 5.00(d, $J=8.4Hz$, 1H) 可知与该氢相连的碳原子与苯环相连 (受苯环电子屏蔽效应, 化学位移向低场位移), 且邻位碳上含有一个氢原子, 根据 1H 谱, 该氢应是 δ_H 4.88(m, 1H), 所连碳原子为手性碳原子, 则另外两个氢原子 δ_H 3.20(m, 2H) 所在的碳原子与其毗邻, 通过与文献对比 [1], 确定该化合

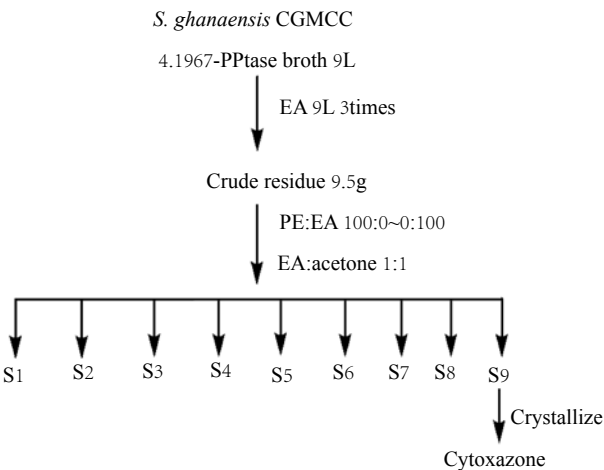


图 2 Cytozoxone 的分离纯化流程

Fig. 2 Purification process of cytozoxone

物为 cytozoxone。

Cytozoxone 能够选择性抑制 Th2 细胞 (对 Th1 细胞无效) 产生 II 型细胞因子, 因此具有很好的应用前景, 可以用于治疗一系列细胞因子失调的疾病, 如风湿免疫系统疾病, 恶性淋巴瘤等 [12]。此前, 该化合物仅报道由一株分离自广岛的链霉菌 (*Streptomyces* sp.) 产生 [11], *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 中为首次分离得到。

3 结论

本研究通过对一株过表达了 PPTase 基因的重组菌株 *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 的发酵产物进行分析, 发现了一个新的激活产物。通过扩大培养, 分离纯化和核磁鉴定, 确定了该化合物为 cytozoxone。该化合物是从嘎纳链霉菌 *S. ghanaensis* CGMCC 4.1967 首次分离得到, 为后续研究其生物合成机制, 合成生物学改造, 以及开发新结构活性细胞因子抑制剂提供了坚实的基础。

参考文献

[1] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(3): 629-661.
[2] O'Connell K M, Hodgkinson J T, Sore H F, et al. Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52 (41): 10706-10733.
[3] Payne D J, Gwynn M N, Holmes D J, et al. Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(1): 29-40.
[4] Morrison K C, Hergenrother P J. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse

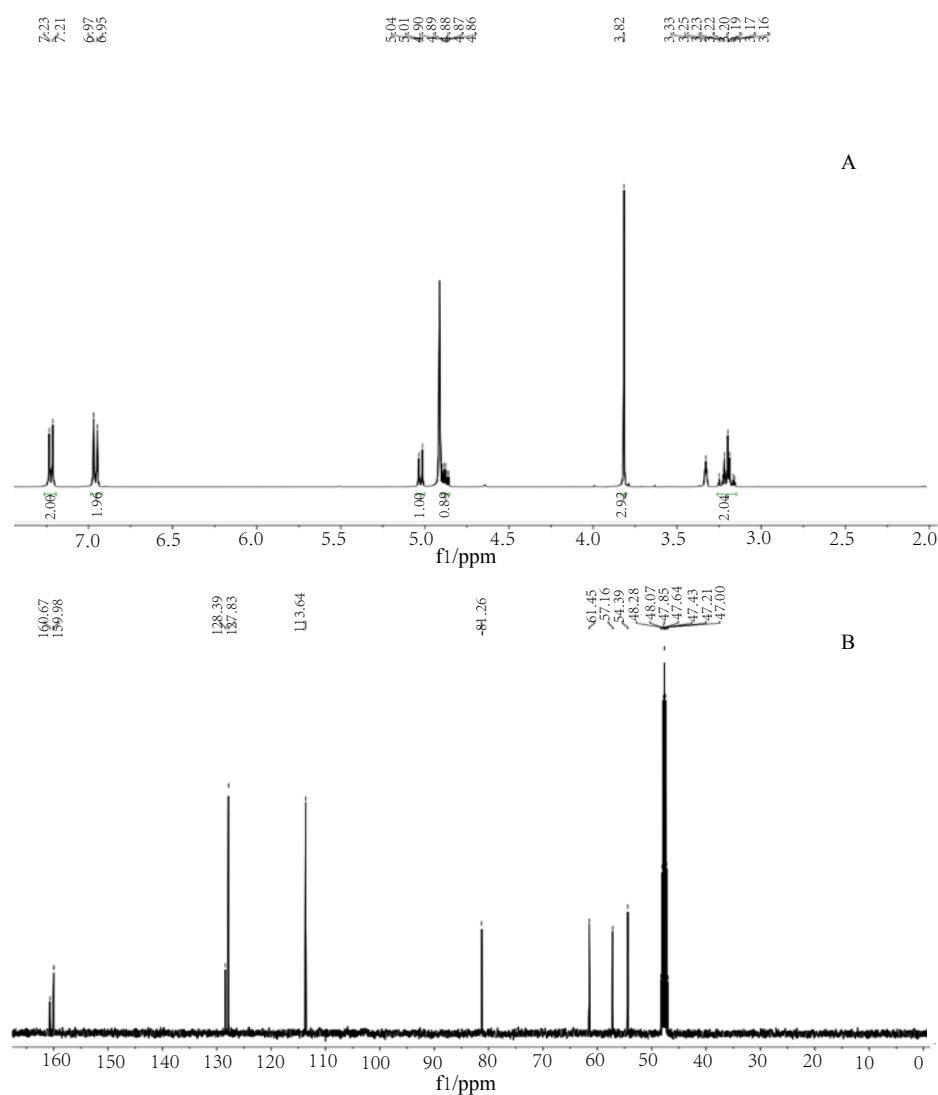
A: ^1H NMR 谱图; B: ^{13}C NMR 谱图

图 3 Cytotoxazone 核磁谱图

Fig. 3 NMR spectra of cytotoxazone

- compounds[J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(1): 6-14.
- [5] Li J W, Vederas J C, Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier[J]. *Science*, 2009, 325 (5937): 161-165.
- [6] Zotchev S B, Sekurova O N, Katz L, Genome-based bioprospecting of microbes for new therapeutics[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(6): 941-947.
- [7] Rutledge P J, Challis G L, Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(8): 509-523.
- [8] Liu G, Chater K F, Chandra G, *et al.* Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77(1): 112-143.
- [9] Zhang B, Tian W, Wang S, *et al.* Activation of natural products biosynthetic pathways via a protein modification level regulation[J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(7): 1732-1736.
- [10] Yan X, Zhang B, Tian W, *et al.* Puromycin A, B and C, cryptic nucleosides identified from *Streptomyces alboniger* NRRL B-1832 by PPtase-based activation[J]. *Syn Syst Biotechnol*, 2018, 3(1): 76-80.
- [11] Kakeya H, Morishita M, Koshino H, *et al.* Cytotoxazone: A novel cytokine modulator containing a 2-oxazolidinone ring produced by *Streptomyces* sp.[J]. *J Org Chem*, 1999, 64(3): 1052-1053.
- [12] Kakeya H, Morishita M, Kobinata K, *et al.* Isolation and biological activity of a novel cytokine modulator, cytotoxazone[J]. *J Antibiot*, 1998, 51(12): 1126-1128.