

教酒链霉菌 NRRL 3882 中钙霉素生物合成后 修饰基因 *calD* 的功能分析

李园莉 苟丽霞 吴秋林 梁晶丹 邓子新 汪志军*

(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 200030)

摘要:【目的】钙霉素是二价阳离子载体,是一类含有吡咯环的聚醚类抗生素,广泛用于细胞二价阳离子的生物学功能研究。本文以钙霉素生物合成基因簇中 *calD* 基因为研究对象,通过蛋白质同源序列比对、基因敲除、回补验证及 HPLC/MS 分析,对 *calD* 基因的功能进行表征。【方法】对 *calD* 基因功能进行生物信息学预测。选用钙霉素产生菌 *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882,通过 PCR-targeting 的方法对 *calD* 基因进行敲除获得突变株,再将 *calD* 基因克隆到链霉菌整合质粒上,通过接合转移技术将 *calD* 回补到缺失株中。使用 HPLC/MS 技术对菌株发酵产物进行分析。【结果】生物信息学预测 CalD 蛋白酶属于氧化还原酶。获得 *calD* 基因敲除突变株 $\Delta calD$ 及基因回补菌株 $\Delta calD:calD$ 。HPLC/MS 检测到 *calD* 基因的缺失菌株大幅降低钙霉素产生能力,与野生型菌株相比,突变株中积累更多的 3-Hydroxylceзомycin 和更少的氮-去甲基钙霉素。【结论】*calD* 参与钙霉素的生物合成。*calD* 的缺失导致 3-Hydroxylceзомycin 的积累,推测 *calD* 负责钙霉素生物合成途径中苯并噁唑环 3 位上羟基转化成酮基的氧化反应。初步阐明了 *calD* 基因在钙霉素生物合成途径中的功能机制。

关键词: 教酒链霉菌 NRRL 3882, 钙霉素, *calD* 基因, 3-Hydroxylceзомycin

Functional analysis of *calD* involved in calcimycin postsynthetic modification by *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882

LI Yuan-Li GOU Li-Xia WU Qiu-Lin LIANG Jing-Dan
DENG Zi-Xin WANG Zhi-Jun*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: [objective] Calcimycin, a divalent cation specific ionophore, is a pyrrole moiety containing polyther antibiotic, widely used to study the biological function of divalent cation in eukaryotic cells. The biosynthetic mechanism of calcimycin remains to be fully elucidated. *calD* is a gene with unknown function in the calcimycin biosynthetic gene cluster. The aim of this study is to identify the function of *calD* in calcimycin biosynthesis pathway. [Methods] Bioinformatic analysis was used to predict the

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 30770016); 国家 973 计划项目(No. 2012CB721000)

*通讯作者: Tel: 86-21-62932943; Fax: 86-21-62932418; ✉: wangzhijun@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-04-11; 接受日期: 2014-05-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-15

function of *calD*. PCR targeting was used to disrupt *calD* in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882. HPLC/MS was used to analyze the fermentation product. [Results] Bioinformatic analysis shows that CalD belongs to the family of alcohol dehydrogenase. The *calD* gene disruption mutant was obtained. The mutant was also complemented with *calD*. HPLC analysis shows that inactivating of *calD* decreases but not abolishes calcimycin production. The yield of N-demethylcalcimycin is also decreased. The *calD* mutant accumulates hydroxyl-cezomycin. [Conclusion] *calD* participates in calcimycin biosynthesis. It might be responsible for the oxidative conversion of the hydroxy-cezomycin to keto-cezomycin. This result paved way for the further analysis of the biochemical function of *calD*.

Keywords: *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882, Calcimycin, *calD* gene, 3-Hydroxycezomycin

钙霉素(Calcimycin)属于聚醚类抗生素^[1-2], 化学结构包括三部分: 吡咯环、螺环及含有取代基团的苯丙噁唑环。钙霉素可以特异地螯合二价金属阳离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+})^[3-5], 广泛应用于二价阳离子穿膜时膜生物属性的研究, 具有重要的应用价值^[6-10]。自钙霉素发现以来, 可以在 PubMed 上检索到 16 000 多篇文献使用钙霉素。

Streptomyces chartreusis NRRL 3882 能合成钙霉素(A23187)^[7]。前期用同位素标记的脯氨酸、乙酸、甲酸、3-羟基邻氨基苯甲酸和甲硫氨酸进行喂养实验, 揭示了钙霉素骨架结构的生物合成前体来源^[11-13]。基于吡咯环的生物合成机理, 以底物识别专一性的腺苷转移酶设计了合理探针, 成功克隆了钙霉素的生物合成基因簇(NCBI 数据库中的序列号: HM452329)。根据生物信息学分析, 认为钙霉素生物合成的模型为: *calN1-N3* 负责吡咯环的合成, *I* 型聚酮合酶 *calA1-A5* 负责

编码螺旋环合成, *calB1-B4* 负责合成 3-羟基邻氨基苯甲酸这个前体。基因簇中含有 3 个合成调控基因 *calR1-R3*, 1 个抗性基因 *calT*, 1 个 N-甲基转移酶基因 *calM*, 1 个 II 型硫酯酶 *calG*, 4 个其他功能基因 *calCDFH* 以及 5 个未知基因 *calU1-U5*^[14-15](图 1)。

基因 *calM* 的敲除实验及体外生化实验表明, CalM 酶参与钙霉素生物合成过程中苯丙噁唑环的后修饰, 催化氮-去甲基钙霉素的甲基化修饰^[15]。目前对钙霉素生物合成后修饰途径的推导为: 色唑霉素中的苯丙噁唑环上 3' 位置经过一系列的氧化转氨反应, 生成氮-去甲基钙霉素, 最后由 CalM 转甲基酶催化生成最终产物钙霉素^[16](图 2)。

综上所述, 目前钙霉素生物合成途径机理的模型中, 尚有多个基因的功能不清楚。本研究选取功能未知基因 *calD*, 进行了基因同框缺失、回补, 揭示了 *calD* 基因在钙霉素合成中的作用。

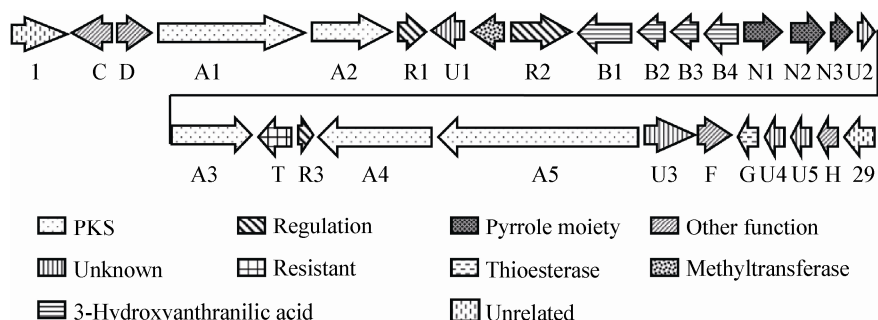


图 1 钙霉素生物合成基因簇

Figure 1 The calcimycin biosynthetic gene cluster

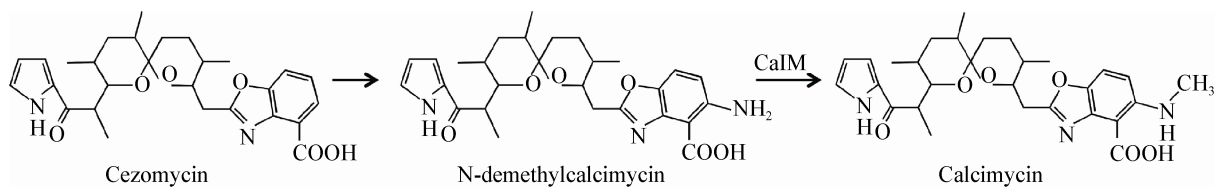


图 2 钙霉素生物合成后修饰途径推导
Figure 2 Proposed post-synthetic modification pathway of calcimycin

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒：钙霉素野生型产生菌 *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882，*Escherichia coli* DH10B，链霉菌接合转移供体菌 *E. coli* ET12567/pUZ8002；链霉菌整合型出发质粒 pJTU2170，携带 *calD* 基因的柯斯质粒 p14F11，见表 1。所有菌种和质粒由本室保存。用于克隆的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司和上海鼎安生物科技有限公司合成。引物 D-F1 (5'-TTCCGCAC GCCATGGACTTCCCGTTCGTCATCAGCCGCAT TCCGGGGATCCGTCGACC-3')和 D-F2 (5'-GTTGA TGACGTCGGCCGCTTCGGCCAGCTCCGTCACC CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3')用于 PCR targeting，D-F3 (5'-ATGCAGGCAGCCTTCATCGA-3')和 D-F4 (5'-CTATCGCAGGGCCCCGGCCC-3')用于突变菌株验证。

1.1.2 主要试剂及培养基：氯霉素(10 mg/L)、卡那霉素(50 mg/L)、氨苄霉素(100 mg/L)，购于福抗公司；Solution I、限制酶，购于 NEB 公司；KOD，购于 Fermentas 公司；OMEGA 胶回收试剂盒，购于 OMEGA 公司；乙酸乙酯、甲醇、乙腈，购于 Sigma-Aldrich 公司。大肠杆菌培养基 LB 和 LA^[21]；链霉菌培养基为 SFM^[18]。

1.1.3 菌株 *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882 的培养：(1) 平板培养：用无菌牙签刮取菌株 NRRL 3882 孢子在 SFM 平板上密集划线直至划满整个平板，30℃ 静置培养 7 d，用无菌棉签将每个平板上的孢子刮取收集到 1 mL 的 20%甘油中-20℃ 保存。(2) 液体发酵：接种 500 μL 孢子甘油保存液至 50 mL TSBY 培养基中，30℃、200 r/min 振荡培养 36 h，得到链霉菌种子液。接种 2 mL 种子液至 200 mL SFM 培养基中，30℃、200 r/min 振荡培养 7 d 进行发酵培养。

表 1 菌种名和质粒 Table 1 Strains and plasmids used in this study		
菌株或质粒 Strains or plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
<i>Streptomyces chartreusis</i>		
NRRL 3882	A23187 production, wild type	NRRL
$\Delta calD$	<i>calD</i> deletion mutant, produces A23187	This work
$\Delta calD:calD$	<i>calD</i> complementation strains, produces A23187	This work
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH10B	F ⁻ <i>recA lacZ</i> Δ M15	[17]
ET12567(pUZ8002)	Cml, Kan, dam dcm hsdS Tra ⁺	[18]
BW25113/pIJ790	RepA101(ts) <i>araBp-gam-be-exo</i> , AraC, RepA101(ts) Cml	[19]
Plasmids		
p14F11	Cml, cosmid carrying <i>calD</i>	[14]
pJTU3764	p14F11-derived plasmid carrying an apramycin resistant gene and a defective <i>calD</i>	This work
pJTU2170	<i>aa(3)I V</i> , <i>lacZ</i> , <i>reppuc</i> , <i>attΦC31</i> , <i>oriT</i>	[20]
pJTU2170- <i>calD</i>	pJTU2170-derived plasmid carrying <i>calD</i> for expression in <i>Streptomyce</i>	This work

1.1.4 *calD* 基因敲除^[19]: PCR targeting 的方法进行基因双交换敲除,按照其手册流程完成 *calD* 基因的敲除。

1.1.5 重组质粒构建: 为了克隆菌株 NRRL 3882 钙霉素生物合成基因簇中的 *calD* 基因,设计了引物 Fla-D1 (5'-GGGAATTCCATATGCAGGCAGCCTTCATCG-3')和 Fla-D2 (5'-CCGGAATTCCTACTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCTCGCAGGGCCCCGGCC-3'),引物两端分别引入 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切位点,同时在引物 Fla-D2 的 3'端引入了 Flag 肽的碱基序列,以柯斯质粒 p14F11 (表 1)为模板,PCR 扩增带有 Flag 标签序列的 *calD* 基因,*Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切处理,连接到同样经过 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切处理的 pJTU2170 载体上,构建得到重组质粒 pJTU2170-*calD*,转化至 ET12567/pUZ8002,命名为 ET12567/pUZ8002/pJTUcalD,4 °C 保存。

1.1.6 *calD* 基因回补: 培养大肠杆菌 ET12567/pUZ8002/pJTUcalD 至菌液 OD_{600} 值到达 0.4–0.6,收集菌体,4 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用不含任何抗生素的新鲜 LB 洗涤菌体 2 次,离心弃上清,残液悬浮菌体,备用。用无菌棉签刮半个平板左右的菌株 NRRL 3882 孢子加入 5 mL TES 缓冲液中,振荡打散孢子,50 °C 热激 10 min,迅速置于冰上冷却,加入 5 mL 孢子预萌发液与 10 μ L $CaCl_2$ (5 mol/L)溶液,37 °C、200 r/min 振荡培养 2 h,离心弃上清,残液悬浮孢子,将之前准备好的大肠杆菌液全部加入到孢子悬浮液中,枪头吹吸混匀,全部涂布至 SFM 平板上,30 °C 培养 14 h,用相应抗生素和萘啶酮酸对 SFM 平板进行覆盖。30 °C 培养 4–5 d。筛选出的接合子扩种培养。

1.1.7 菌株发酵及发酵产物萃取: 对突变株、回补菌株以及野生型菌株同时进行发酵。取 20%甘油保存的孢子按 1:100 比例分别接种至 50 mL TSBY (0.1% Kan, 0.1% Apr)培养基中,30 °C、220 r/min 振荡预培养 36 h,将培养液按 1:50 比例再分别接种于 200 mL 液体 SFM 培养基中,30 °C 发酵 7 d。向经 7 d 发酵后的发酵液中倒入 2 倍体积的乙酸乙酯,充分摇荡 5 min,静置过夜,溶液出现分层现象,

将上层有机溶液加入旋蒸瓶内进行旋蒸,待乙酸乙酯全部蒸干,用 1 mL 甲醇溶液重新溶解旋蒸瓶内残留物质,14 500 r/min 离心 2 min,取上清,留取待用。

1.1.8 HPLC-MS 检测分析发酵产物: 使用 Agilent 1100 series LC/MSD Trap System 层析柱 ZORBAX RX-C₁₈ (5 μ m, 2.1 mm×150 mm)对样品进行检测。HPLC 的 UV 检测波长设置为 280 nm,LC-MS 正离子模式检测,HPLC 流速为 0.3 mL/min,流动相 A 为 0.1%三氟乙酸的水溶液,流动相 B 为甲醇 (70%–95%)。上样进行 HPLC-MS 检测,以钙霉素标准品作阳性对照。对野生型、突变株和回补株 3 种菌株发酵产物进行高分辨率质谱和二级质谱分析^[16]。

2 结果与分析

2.1 *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882 中 *calD* 基因的生物信息学分析

生物信息学分析结果显示(图 3): *calD* 与来源于 *S. viridochromogenes* 的氧化还原酶基因(NCBI 序列号: WP_003988535.1)有 93%的一致性,与来源于 *S. hygroscopicus* subsp. *Jinggangensis* 5008 的氧化还原酶基因(NCBI 序列号: YP_006245105)和来源于 *S. Roseochromogenes* 氧化还原酶基因(NCBI 序列号: WP_023553318.1)都有 69%的一致性,与来源于 *Segniliparus rugosus* 的氧化还原酶基因(NCBI 序列号: YP_006245105)有 55%的一致性,与来源于 *Micromonospora* sp. M42 的氧化还原酶基因(NCBI 序列号: EWM_63021.1)有 62%的一致性。并在醇脱氢酶 GroES-like 结构区域有较高的同源性。

2.2 *calD* 基因敲除与回补

通过 REDIRECT^R Technology^[18,21]的方法对钙霉素产生菌染色体上的 *calD* 基因进行敲除。以 D-F1/D-F2 为引物,扩增阿泊拉霉素抗性基因敲除盒,通过同源重组置换柯斯质粒 p14F11 上的 *calD* 基因,得到置换载体 pJTU3764 (图 4A)。将 pJTU3764 转化到大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 中,与已经预萌发好的 A23187 产生菌野生型菌株孢子混合,使其发生接合转移,用引物 D-F3/D-F4 筛选双交换置换

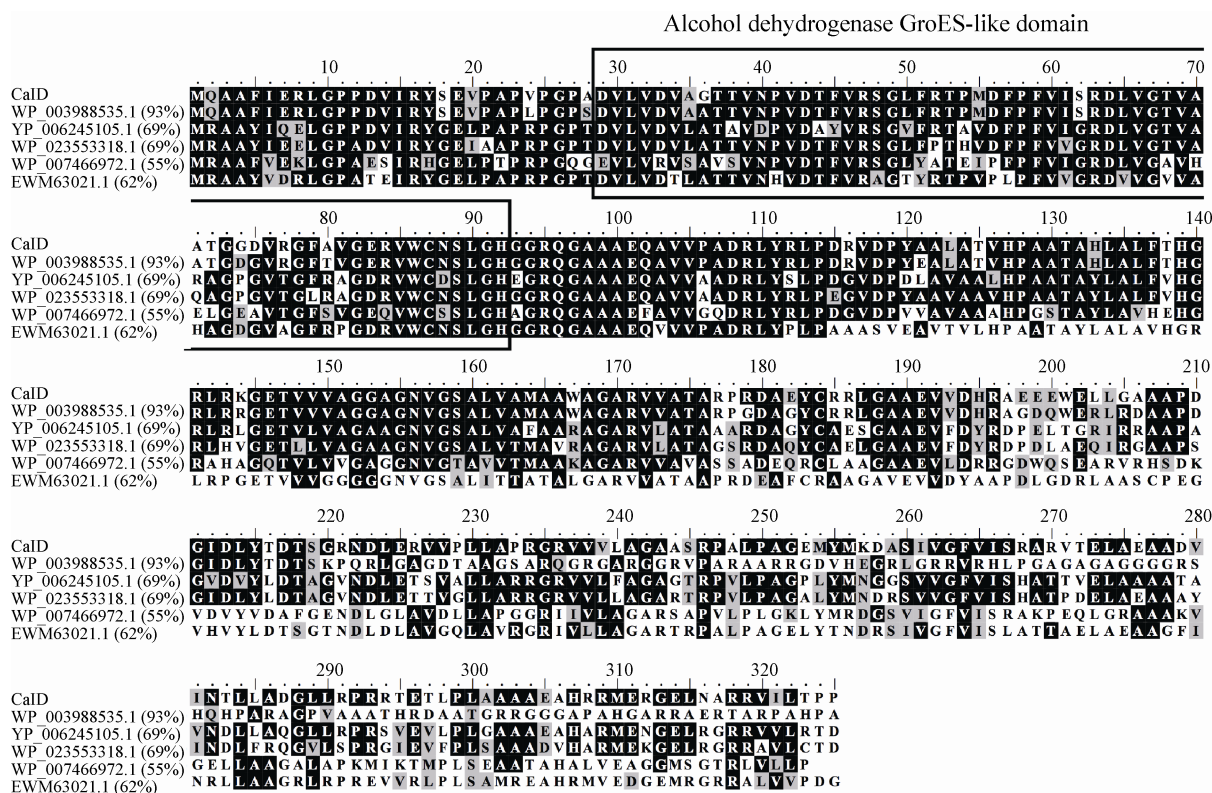


图3 CalD 蛋白和同源蛋白氨基酸序列比对图

Figure 3 Amino acids sequence alignment of CalD with its homologous proteins

注 CalD来源于 *S. chartreusis* NRRL 3882 ;WP_003988535.1来源于 *S. viridochromogenes* ;YP_006245105来源于 *S. hygroscopicus* subsp. *Jinggansensis* 5008 ; WP_023553318.1 来源于 *S. Roseochromogenes* ; WP_007466972.1 来源于 *Segniliparus rugosus* ; EWM_63021.1 来源于 *Micromonospora* sp. M42.

Note: CalD: *S. chartreusis* NRRL 3882; WP_003988535.1: *S. viridochromogene*; YP_006245105: *S. hygroscopicus* subsp. *Jinggansensis* 5008; WP_023553318.1: *S. Roseochromogenes*; WP_007466972.1: *Segniliparus rugosus*; EWM_63021.1: *Micromonospora* sp. M42.

掉 *calD* 基因的突变株,在野生型菌株上扩增到 *calD* 基因,PCR 产物大小是 1.0 kb,在突变菌株上扩增到阿泊拉霉素抗性基因和 *calD* 基因,PCR 产物大小是 1.7 kb (图 4B),将筛选到的双交换突变株命名为 *ΔcalD*。

通过接合转移技术将 *calD* 基因回补到突变株 *ΔcalD* 中,用引物 D-F3/D-F4 筛选回补 *calD* 基因的回补株,在突变菌株上扩增到阿泊拉霉素抗性基因和 *calD* 基因,PCR 产物大小是 1.7 kb,在回补菌株上扩增到 *calD* 基因,PCR 产物大小是 1.0 kb (图 4C),将筛选得到的回补菌株命名为 *ΔcalD:calD*。

按照 1.1.5 中的步骤,通过 HPLC-MS 对突变株 *ΔcalD*、野生型菌株 WT、回补菌株 *ΔcalD:calD* 的

发酵产物分别进行检测分析。以钙霉素标准品为阳性对照,HPLC 结果(图 4D)所示:作为对照组的野生型菌中积累了钙霉素(产物 1)、Cezomycin (产物 2)和氮-去甲基钙霉素(产物 3),基因敲除突变株 *ΔcalD* 中的钙霉素产量大幅下降,却仍然积累 Cezomycin,回补菌株 *ΔcalD:calD* 恢复到野生型菌株的产钙霉素能力,表明 *calD* 基因缺失对钙霉素产量的影响并不是由极性效应产生。突变株 *ΔcalD* 中钙霉素产量的大幅下降以及 Cezomycin 的大量积累表明 *calD* 基因的缺失会部分阻断 Cezomycin 到钙霉素的转化,推测 CalD 蛋白酶可能负责催化钙霉素后合成修饰途径中由 Cezomycin 到钙霉素转化的某一步氧化反应。

2.3 发酵产物高分辨率质谱与二级质谱分析

对野生菌株、突变菌株和回补菌株发酵产物进行高分辨率质谱 Q-TOF 分析, 在保留时间 24 min 处均检测到氮-去甲基钙霉素, 且突变菌株中的产物积累量明显低于野生菌(图 5A)。氮-去甲基钙霉素上的苯丙噁唑环 3'位取代基团为氨基, 分子量为 509.259 9, 分子式为 $C_{28}H_{34}N_2O_6$ 。基于前期对 *CalD* 蛋白为氧化还原酶的生物信息学预测, 推测苯丙噁唑环上有羟基或醛基的生成。对紫外吸收峰进行高

分辨率质谱分析, 结果发现在保留时间 16 min 处检测出分子量为 510.243 9 的化合物, 且突变株中这种物质的积累量大大高于野生型菌株(图 5B), 对此化合物分子式进行预测, 显示结果为 $C_{28}H_{33}N_1O_7$, 与氮-去甲基钙霉素分子式相对比, 此化合物比氮-去甲基钙霉素少一个氢原子和氮原子, 并且多一个氧原子, 初步推测此化合物为苯丙噁唑环上 3'位取代基团是羟基的化合物, 命名为 3-Hydroxylcezymycin。为了进一步确认, 对两种化

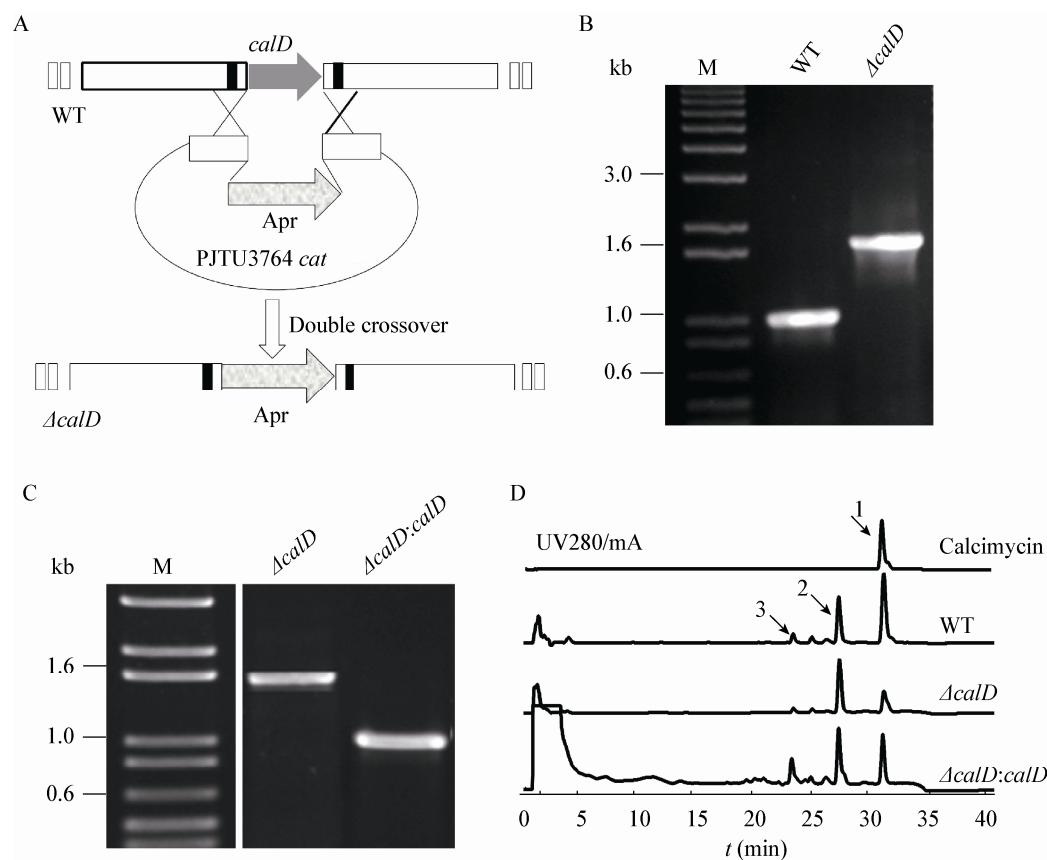


图 4 突变菌株 $\Delta calD$ 的构建和代谢物分析

Figure 4 Construction of mutant strain $\Delta calD$ and its metabolites analysis

注: A: PCR targeting 基因敲除模式图, 通过基因双交换获得突变菌株 $\Delta calD$, 黑色矩形为 B 中 PCR 引物设计位点。B: 溴化乙锭染色凝胶, 从突变菌株中得到更大片段的 PCR 产物, 确认 *calD* 的被置换。C: 溴化乙锭染色凝胶, 从回补菌株中得到更小片段的 PCR 产物, 确认 *calD* 的回补。D: HPLC 分析比较各菌株发酵产物。 *calD* 基因的缺失导致突变菌株的钙霉素合成能力大幅下降, 回补菌株恢复了钙霉素合成能力。产物 1: 钙霉素; 产物 2: Cezomycin; 产物 3: 氮-去甲基钙霉素。

Note: A: Gene disruption by PCR targeting, double crossover replacement to generate strain $\Delta calD$. The dark rectangles indicate the positions of the primers used to generate the PCR products. B: Ethidium bromide-stained agarose gel. The size of 1.0 kb DNA band from $\Delta calD$ indicates the success of gene replacement. C: Ethidium bromide-stained agarose gel. The size of 1.7 kb DNA band from $\Delta calD:calD$ indicates the success of gene complementation. D: HPLC analysis of calcimycin biosynthesis intermediates from WT, $\Delta calD$, $\Delta calD:calD$. The absence of *calD* caused a great decrease in the calcimycin production while the *calD* complemented strain restored the ability of calcimycin synthesis. Compounds 1: Calcimycin; Compounds 2: Cezomycin; Compounds 3: N-demethylcalcimycin.

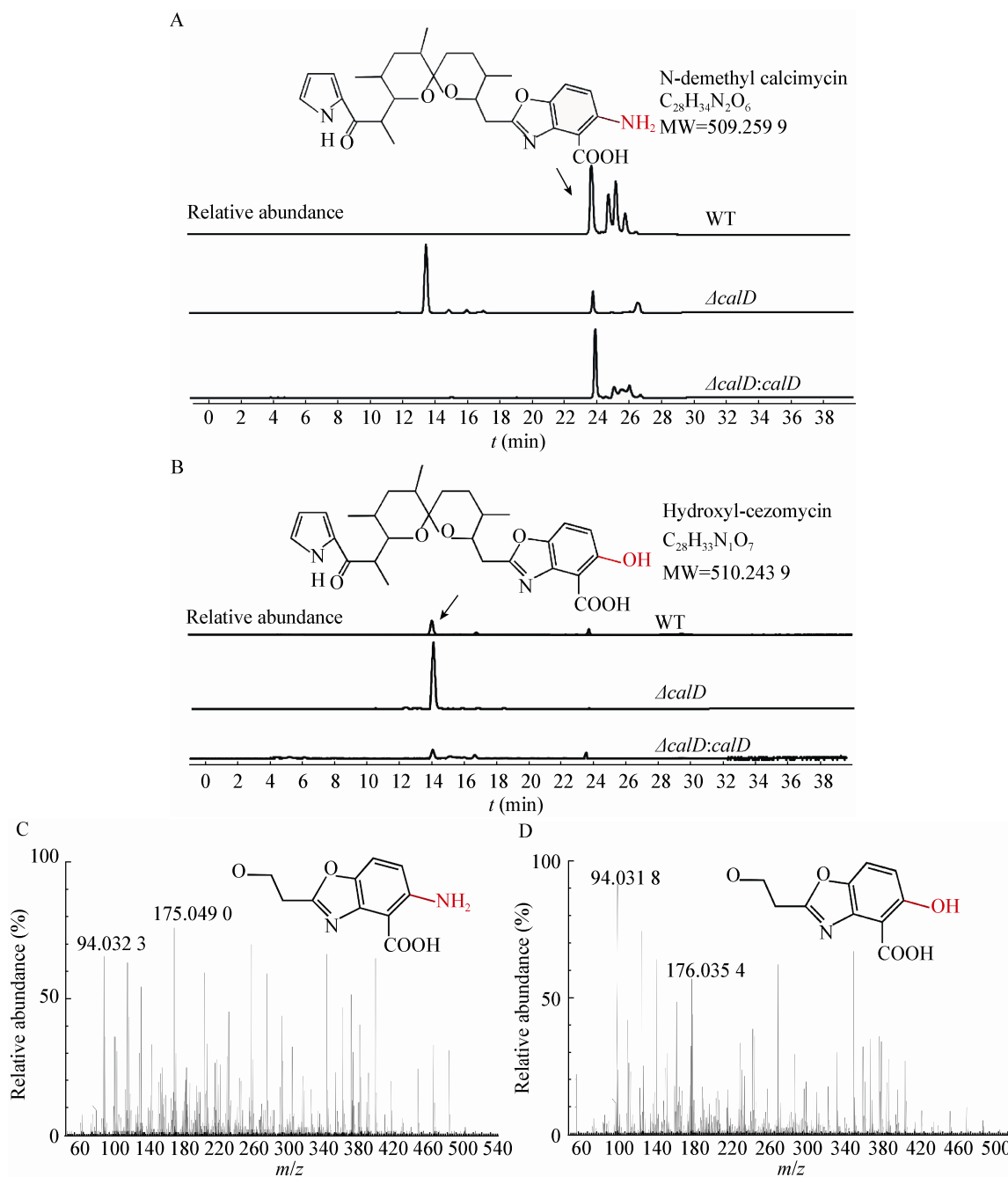


图 5 3-Hydroxylcezomycin 和氮-去甲基钙霉素的色-质谱分析

Figure 5 GC/MS analysis of N-demethylcalcimycin and 3-hydroxycalcimycin

注：A：野生型菌株、突变菌株、回补菌株中氮-去甲基钙霉素的 HPLC 检测，突变菌株 $\Delta calD$ 中氮-去甲基钙霉素的积累量小于野生型菌株。B：野生型菌株、突变菌株、回补菌株中 3-Hydroxylcezomycin 的 HPLC 检测；突变菌株中 3-Hydroxylcalcimycin 的积累量多于野生型菌株。C：氮-去甲基钙霉素的二级质谱分析，检测到核质比为 175.049 0 的氨基苯丙噁唑环特征碎片峰。D：3-Hydroxylcezomycin 的二级质谱分析，检测到核质比为 176.035 4 的羟基苯丙噁唑环特征碎片峰。

Note: A: HPLC analysis of N-demethylcalcimycin in WT, $\Delta calD$ and $\Delta calD:calD$. The accumulation of N-demethylcalcimycin was lower in $\Delta calD$ than in the other two strains. B: HPLC analysis of 3-hydroxylcalcimycin in WT, $\Delta calD$ and $\Delta calD:calD$ strains. The accumulation of 3-hydroxylcalcimycin was lower in $\Delta calD$ than in the other two strains. C: Mass fragmentations of N-demethylcalcimycin. The mass peak of $m/z=175.049\ 0$ ($C_{10}H_9N_2O_4$) is the characteristic fragment of Amino-benzoxazole moiety. D: Mass fragmentations of 3-Hydroxylcalcimycin. The mass peak of $m/z=176.035\ 4$ ($C_{10}H_8N_1O_5$) is the characteristic of hydroxyl-benzoxazole moiety.

合物进行二级质谱分析：两者的特征碎片峰分布基本一致。氮-去甲基钙霉素断裂片段中包含有吡咯环(94.032 3)和苯丙噁唑环(175.049 0)两个特征碎片峰(图 5C)，3-Hydroxylcezomycin 的特征碎片峰中的苯丙噁唑环碎片分子量为 176.035 4(图 5D)，比氮-去甲基钙霉素中的多 1，说明 3-Hydroxylcezomycin 中苯丙噁唑环上的取代基比氮-去甲基钙霉素多 1，而基团 -OH (17)比-NH₂ (16)分子量多 1，因此进一步确认为分子量为 510.243 9 的化合物为苯丙噁唑环上 3'位取代基团为羟基的化合物，即 3-Hydroxylcezomycin。

3 讨论与结论

本研究通过 PCR targeting 方法，将 *calD* 基因在染色体上进行了原位同框基因缺失得到突变株 $\Delta calD$ 。HPLC-MS 结果显示 *calD* 基因的缺失大幅降低了突变株的钙霉素产生能力，并有中间产物 Cezomycin 的大量积累。接合转移回补得到回补菌株 $\Delta calD:calD$ ，HPLC-MS 结果显示回补株的钙霉素产量恢复到了野生型水平，确认突变株中钙霉素产量的变化是由 *calD* 基因的缺失引起，而非抗性基因插入的极性效应，确定了 *calD* 基因和钙霉素生物合成的相关性。

前期的研究^[16]推测在钙霉素的合成后期是由 Cezomycin 经过其苯并噁唑环 3'位氮甲基修饰过程从而得到最终产物钙霉素，包含有 Cezomycin 苯并

噁唑环 3'位上基团一系列的氧化氨化反应。Wu 等^[15]通过对钙霉素基因簇上 *calM* 基因的敲除，发现突变株失去了产生钙霉素的能力，且积累了大量的氮-去甲基钙霉素，CalM 的体外酶活实验证实了 CalM 为甲基转移酶，催化钙霉素生物合成后修饰途径中最后一步的转甲基反应，即氮-去甲基钙霉素转变为钙霉素。生物信息学预测 CalD 蛋白属于氧化还原酶超家族，HPLC 结果显示 *calD* 基因的缺失导致突变株钙霉素产生能力大大低于野生菌株，高分辨质谱和二级质谱结果显示突变株中积累了多于野生型菌株的 3-Hydroxylcezomycin 和低于野生型菌株的氮-去甲基钙霉素，因此 *calD* 基因的敲除阻断了 3-Hydroxylcezomycin 到氮-去甲基钙霉素的大部分转变，导致突变株内 3-Hydroxylcezomycin 的积累。基于对 CalD 蛋白酶为氧化还原酶的预测，推测 CalD 蛋白酶可能负责催化 3-Hydroxylcezomycin 中苯丙噁唑环上 3'羟基转变成酮基的氧化反应，即生成 3-Ketocezomycin。

基于本研究，对钙霉素生物合成后修饰途径推导如下：Cezomycin 经未知功能蛋白催化生成 3-Hydroxylcezomycin，CalD 蛋白酶催化 3-Hydroxylcezomycin 氧化生成 3-Ketocezomycin，再经过转氨作用生成氮-去甲基钙霉素，最后由转甲基酶 CalM 催化合成最终产物钙霉素(图 6)。

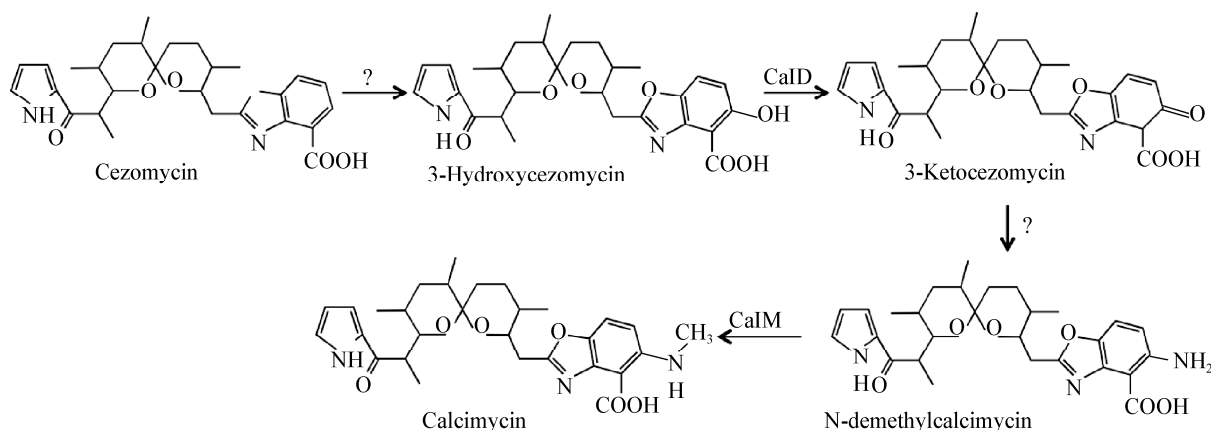


图 6 钙霉素生物合成后修饰途径推导

Figure 6 Proposed postsynthetic modification step of calcimycin biosynthesis

致谢: 感谢上海交通大学生命学院仪器管理平台的张薇老师提供超高效液相色谱-飞行时间质谱仪器的使用。

参考文献

- [1] Chaney MO, Demarco PV, Jones ND, et al. Structure of A23187, a divalent cation ionophore[J]. Journal of the American Chemical Society, 1974, 96(6): 1932-1933
- [2] Chaney MO, Jones ND, Debono M. The structure of the calcium complex of A23187, a divalent cation ionophore antibiotic[J]. Journal of Antibiotics, 1976, 29(4): 424-427
- [3] Abbott BJ, Fukuda DS, Dorman DE, et al. Microbial transformation of A23187, a divalent cation ionophore antibiotic[J]. Antimicrob Agents and Chemother, 1979, 16(6): 808-812
- [4] Deber CM, Pfeiffer DR. Ionophore A23187. Solution conformations of the calcium complex and free acid deduced from proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies[J]. Biochemistry, 1976, 15(1): 132-141
- [5] Smith GD, Duax WL. Crystal and molecular structure of the calcium complex of A23187[J]. Journal of the American Chemical Society, 1976, 98(6): 1578-1580
- [6] Liu CM, Hermann TE, Liu M, et al. X-14547A, a new ionophorous antibiotic produced by *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167. Discovery, fermentation, biological properties and taxonomy of the producing culture[J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32(2): 95-99
- [7] Reed PW, Lardy HA. A23187: a divalent cation ionophore[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247: 6970-6977
- [8] Wong DT, Wilkinson JR, Hamill RL, et al. Effects of antibiotics ionophore, A23187, on oxidative phosphorylation and calcium transport of liver mitochondria[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1973, 156(2): 578-585
- [9] Pressman BC. Biological applications of ionophores[J]. Annual Review Biochem, 1976, 45: 501-530
- [10] Ashby JP, Speake RN. Insulin and glucagon secretion from isolated islets of Langerhans[J]. Biochemical Journal, 1975, 150: 89-96
- [11] Reed PW, Lardy HA. A23187: a divalent cation ionophore[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(21): 6970-6977
- [12] Zmijewski MJ. Biosynthesis of antibiotic A23187 Incorporation of precursors into A23187[J]. The Journal of Antibiotics, 1980, 33(4): 447-450
- [13] David L, Emadzadeh S. Biosynthesis of the ionophorous antibiotic A23187[J]. The Journal of Antibiotics, 1982, 35(11): 1616-1617
- [14] Wu Q, Liang J, Lin S, et al. Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. Antimicrobial Agents and Chemother, 2011, 55(3): 974-982
- [15] Wu Q, Gou L, Lin S, et al. Characterization of the N-methyltransferase CalM involved in calcimycin biosynthesis by *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. Biochimie, 2013, 95(7): 1487-1493
- [16] Wu QL. Study on calcimycin (A23187) biosynthesis[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2011
吴秋林. Calcimycin (A23187)生物合成机理研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2011
- [17] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceeding of the National Academy of sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
- [18] Kieser T, Bibb MJ, Chater KF, et al. Practical *Streptomyces* Genetics: a Laboratory Manual[M]. Norwich, United Kingdom: John Innes Foundation, 2000: 231-232
- [19] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*[M]. Norwich, United Kingdom: John Innes Center, 2003: 2-20
- [20] Huang T, Wang Y, Yin J, et al. Identification and characterization of the pyridomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(23): 20648-20657
- [21] Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 72