

· 医药生物技术 ·

蛇足石杉内生真菌产黄青霉菌 MT-40 中 xanthocillin 类似物生物合成基因簇的挖掘及鉴定

王雯静, 张蓓蓓, 张明亮, 张泽坤, 王阳, 葛祥宇, 杜宇, 张晓雪, 刘晓, 王娟, 王晓晖, 史社坡*

北京中医药大学中药现代研究中心, 北京 100029

王雯静, 张蓓蓓, 张明亮, 张泽坤, 王阳, 葛祥宇, 杜宇, 张晓雪, 刘晓, 王娟, 王晓晖, 史社坡. 蛇足石杉内生真菌产黄青霉菌 MT-40 中 xanthocillin 类似物生物合成基因簇的挖掘及鉴定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3814-3826.

WANG Wenjing, ZHANG Beibei, ZHANG Mingliang, ZHANG Zekun, WANG Yang, GE Xiangyu, DU Yu, ZHANG Xiaoxue, LIU Xiao, WANG Juan, WANG Xiaohui, SHI Shepo. Mining and identification of a biosynthetic gene cluster producing xanthocillin analogues from *Penicillium chrysogenum* MT-40, an endophytic fungus of *Huperzia serrata*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3814-3826.

摘要: Xanthocillin 具有显著的抗菌活性, 结构中含有独特的异腈基。本文通过对蛇足石杉 (*Huperzia serrata*) 内生真菌产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*) MT-40 基因组的测序分析, 利用本地 BLAST 等生物信息学分析工具挖掘具有合成 xanthocillin 类似物潜力的基因簇, 结合米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) NSAR1 异源表达技术实现基因簇中关键基因的功能鉴定。结果成功从内生真菌 *P. chrysogenum* MT-40 中发现一个合成 xanthocillin 类似物的生物合成基因簇(命名为 *for*), *for* 基因簇中的关键生物合成基因 *forB* 编码的异腈基合成酶可以催化合成 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid, 基因 *forG* 编码的 P450 酶可以催化 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid 的二聚化生成 xanthocillin 类似物 *N,N'*-(1,4-bis (4-hydroxyphenyl) buta-1,3-diene-2,3-diyl) diformamide。本文研究结果为进一步从真菌中发现 xanthocillin 类似物提供参考。

关键词: 异腈类化合物; xanthocillin; 米曲霉; 蛇足石杉; 内生真菌

资助项目: 国家自然科学基金(82274042, 81903405)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82274042, 81903405).

*Corresponding author. E-mail: shishepo@bucm.edu.cn

Received: 2022-12-26; Accepted: 2023-03-06; Published online: 2023-03-09

Mining and identification of a biosynthetic gene cluster producing xanthocillin analogues from *Penicillium chrysogenum* MT-40, an endophytic fungus of *Huperzia serrata*

WANG Wenjing, ZHANG Beibei, ZHANG Mingliang, ZHANG Zekun, WANG Yang, GE Xiangyu, DU Yu, ZHANG Xiaoxue, LIU Xiao, WANG Juan, WANG Xiaohui, SHI Shepo*

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Xanthocillin is a unique natural product with an isonitrile group and shows remarkable antibacterial activity. In this study, the genome of an endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* MT-40 isolated from *Huperzia serrata* was sequenced, and the gene clusters with the potential to synthesize xanthocillin analogues were mined by local BLAST and various bioinformatics analysis tools. As a result, a biosynthetic gene cluster (named *for*) responsible for the biosynthesis of xanthocillin analogues was identified by further heterologous expression of the key genes in *Aspergillus oryzae* NSAR1. Specifically, the ForB catalyzes the synthesis of 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid, and the ForG catalyzes the dimerization of 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid to produce the xanthocillin analogue *N,N'*-(1,4-bis(4-hydroxyphenyl) buta-1,3-diene-2,3-diyl) diformamide. The results reported here provide a reference for further discovery of xanthocillin analogues from fungi.

Keywords: isonitrile compound; xanthocillin; *Aspergillus oryzae*; *Huperzia serrata*; endophytic fungi

自然界生物在长期进化过程中,为了维持自身生理代谢,实现自我防御、信号传递等功能,会产生一系列结构丰富多样、具有不同生物活性的次生代谢产物。微生物物种丰富,分布广泛,其代谢产物常常具有新颖的结构及显著的活性,是创新药物的重要来源之一。如免疫抑制剂雷帕霉素(rapamycin)、治疗高胆固醇血症和高脂血症的洛伐他汀(lovastatin)、治疗急性白血病及恶性淋巴瘤的阿霉素(adriamycin)等均来自于微生物^[1]。长久以来,微生物代谢产物研究主要利用各种色谱分离手段,对其发酵产物进行系统的分离纯化和结构鉴定,这种传统研究模式从微生物中发现了大量的活性分子,但也伴随着大量相同或高度相似结构化合

物的重复分离鉴定^[2]。近年来,随着基因组测序技术的快速发展,已有成千上万的微生物基因组序列可以公开获取,基于基因组数据挖掘的天然产物高效发现策略受到关注^[3]。值得注意的是,对微生物基因组序列进行分析发现,已识别的微生物次生代谢产物生物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)中超过 90%的产物仍然未知^[4]。这一现象可能是由于生物体内大部分次生代谢产物的产生是生物体对外界环境、体内生理代谢等复杂组合的反应,然而这些基因簇在常规实验室培养条件下大多是沉默或弱表达^[5-6],故其产物很难用传统的发酵、提取分离而被发现。因此,基于基因组信息挖掘,结合异源表达技术,揭示这 90%以上的神

秘 BGCs 的产物成为天然产物研究的新方向。

Xanthocillin 是一个含有异腈基即碳氮三键 ($-N\equiv C$) 的天然产物, 1950 年首次从陆地真菌特异青霉菌 (*Penicillium notatum*) 中分离得到^[7], 之后在其他真菌如 *Penicillium egyptiacum*^[8]、团青霉菌 (*Penicillium commune*)^[9]、昆虫病原真菌 (*Cordyceps brunnearubra*)^[10] 等中也发现了 xanthocillin 及其 *N*-甲酰基衍生物。研究表明 xanthocillin 具有广谱抗菌活性, 而且对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* Mu50) 及多药耐药的鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) AB5075 也显示出显著抑制活性 (MIC 均为 $1\ \mu\text{mol/L}$)^[11]; xanthocillin 的衍生物 Xanthocillin X dimethylether (XDE) 为血小板生成素受体激动剂^[12]。鉴于这类天然产物独特的结构及活性, 其生物合成机制受到关注。2005 年 Brady 团队从 eDNA (environmental DNA) 中发现了异腈合酶 IsnA^[13], 随后从细菌中发现了一系列异腈合酶如 PvcA^[14]、Amb11/Amb12^[15]、Well1/Well2^[16] 等, 2018 年研究者在丝状真菌烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) AF293 中发现了 XanB 并首次解析了 xanthocillin 的生物合成途径^[17], 上述酶催化异腈基生成时, 均需要核酮糖-5-磷酸 (ribulose-5-phosphate) 的参与, 作为异腈基中碳原子的供体, 这类异腈基合酶称为 type I 型异腈合酶^[18-19]。2017 年, 从链霉菌 (*Streptomyces coeruleorubidus*) 中发现了依赖铁和 2-酮戊二酸 (Fe/2OG) 激活甘氨酸的氮原子来引发脱水、脱羧形成异腈基的氧化酶 ScoE^[20], 类似的异腈合酶还有 Rv0097^[20]、SfaA^[21] 等, 此类酶称为 type II 型异腈合酶。除了 xanthocillin 之外, 目前发现具有异腈基的天然产物越来越多, 因此异腈基形成的机制受到广泛关注^[19]。

课题组前期从蛇足石杉中分离纯化出多株内生真菌, 并从中分离得到一系列结构新颖的

代谢产物^[22-23], 却没有发现异腈类化合物, 进一步对部分菌株进行基因组测序, 分析发现内生真菌 *P. chrysogenum* MT-40 中含有一个与 xanthocillin 生物合成基因簇 *xan* 同源性较高的基因簇 *for*, 提示该基因簇有可能合成 xanthocillin 类似物, 但可能由于在常规发酵中, 不能正常表达而无法发挥作用。鉴于 xanthocillin 及其类似物独特的结构及生物活性, 本文结合米曲霉 (*Aspergillus oryzae* NSAR1) 异源表达对基因簇 *for* 的功能进行研究, 结果发现 *for* 基因簇中的 *forB* 编码蛋白能够催化生成 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid, 而 *forG* 编码蛋白则负责催化 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid 的二聚化, 生成 xanthocillin 衍生物 *N,N'*-(1,4-bis (4-hydroxyphenyl) buta-1,3-diene-2,3-diyl) diformamide。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验用菌株 *P. chrysogenum* MT-40 分离自 2015 年 7 月在福建省南平市采集的蛇足石杉, 经 ITS rDNA 测序并结合真菌的形态学特征鉴定为产黄青霉菌 *P. chrysogenum* (GenBank 登录号: OM570313)^[24]; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 Trans1-T1 购自北京全式金生物技术股份有限公司; *A. oryzae* NSAR1 及相关表达质粒由东京大学 Ikuro Abe 教授赠予。

1.2 仪器和试剂

梯度 PCR 仪 (Eppendorf 公司); UPLC-Q-Exactive-MS 系统: UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪 (Dionex 公司)、四极杆静电场轨道阱高分辨质谱 (Thermo Fisher Scientific 公司); Agilent 1260 分析型高效液相色谱仪 (Agilent 公司); LC-20A T 半制备高效液相色谱仪 (SHIMADAZU 公司); ODS 半制备柱 (SunFire™ C18, 10 mm×150 mm, 5 μm); Varian 600 核磁共振仪 (Varian); 恒温摇

床(北京京创泰宁伟业科技发展有限公司)。

真菌基因组提取试剂盒: HP Fungal DNA Kit (OMEGA, 批号: 00D3195010000B21S029) 购自 OMEGA 公司;高保真聚合酶:Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme, 批号: d17E2241DA)、Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme, 批号: d17E1203KA)、无缝克隆试剂盒: ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme, 批号: 017E2232CA)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;限制性内切酶 QuickCut[™] *Kpn* I (TaKaRa, 批号: AL52544A)及 Yatalase (OZK, 批号: AL6P020)均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L): 土豆 200 (去皮切块, 煮沸 30 min 后纱布过滤, 收集滤液), 葡萄糖 20。糊精多聚蛋白胨酵母提取物(dextrin polypeptone yeast-extract, DPY)培养基(g/L): 多聚蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 糊精 20, KH_2PO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5。M 筛选培养基(g/L): NH_4Cl 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, KCl 0.5, NaCl 0.5, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, D-山梨醇 218.6, 葡萄糖 20, pH 5.5, 上层琼脂 0.6%, 下层琼脂 1.5%, 根据筛选质粒, 分别加入相应营养物质, 即导入质粒 pTAex3 时加入 0.15% L-甲硫氨酸、0.01%尿嘧啶; 导入质粒 pUSA 时加入 0.01%尿嘧啶、0.1%精氨酸。察氏培养基加淀粉(Czapek-Dox+starch, CD+starch)培养基(g/L): 可溶性淀粉 20, 多聚蛋白胨 10, KCl 2, NaNO_3 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, pH 5.5。

米曲霉转染实验相关试剂: 转染缓冲液 0 (200 mL): 马来酸 1.16 g, 用 NaOH 调 pH 5.5; 转染缓冲液 2 (400 mL): D-山梨醇 87.4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.94 g, NaCl 0.82 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 4 mL; 转染缓冲液 3 (200 mL): PEG4000

60 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.74 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 1 mL; 转染缓冲液 1: Yatalase 0.1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.79 g, 用 10 mL 转染缓冲液 0 溶解。

1.3 *P. chrysogenum* MT-40 基因组 DNA 的提取、测序及生物信息学分析

将 *P. chrysogenum* MT-40 接种于 PDA 培养基, 28 °C 恒温, 180 r/min 振荡培养 3 d。用布氏漏斗收集菌丝, 用液氮研磨至粉末后参照试剂盒实验操作步骤快速提取基因组 DNA, 随后将基因组 DNA 交付生工生物工程(上海)股份有限公司, 利用 Illumina Hiseq 2500 系统进行全基因组框架图测序。

将测序基因组数据于本地计算机中建立 BLAST 数据库, 用查询序列(query sequence)进行 BLAST 搜索。将搜索到的候选基因簇的核酸序列上传至 2ndFind 平台(<https://biosyn.nih.gov/2ndfind/>), 参照基因组数据库中的蛋白注释、NCBI 数据库对基因的开放阅读框进行校对。利用 DNAMAN 9.0 进行同源序列比对; 通过 MEGA 7.0 构建邻接法(neighbor-joining, NJ)系统进化树, 进化距离的计算采用泊松校正法, bootstrap 重复次数 1 000 次。

1.4 重组质粒的构建

以 1.3 所述提取的基因组 DNA 为模板, 用表 1 引物序列分别对基因 *forB*、*forG* 进行扩增, 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化目标基因后通过 in fusion 连接方法分别嵌入载体 pTAex3、pUSA 中, 随后转化至 Trans1-T1 *E. coli* 感受态细胞, 培养 12 h 后挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 阳性菌落进行测序验证无误后提取质粒得到重组质粒 *forB*-pTAex3、*forG*-pUSA, 存于 -20 °C 备用。

1.5 米曲霉 *A. oryzae* NSAR1 原生质体的制备及转染实验

从 DPY 平板中挑取新鲜的米曲霉, 接种于

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequence used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
pTAex3- <i>forB</i> -F	<u>TCCGAATTCGAGCTCGGTACC</u> ATGGCCAACCTTGGCACCAG	40
pTAex3- <i>forB</i> -R	<u>TACTACAGATCCCCGGGTACCTCAATC</u> ACAGTGAATTCGCCAC	43
pUSA- <i>forG</i> -F	<u>TCCGAATTCGAGCTCGGTACC</u> ATGGCCTCACCATCCATATTCC	43
pUSA- <i>forG</i> -R	<u>TACTACAGATCCCCGGGTACCTCAGTGT</u> ATACACGAAGACTCCAACCTC	48

The underlined sequences indicate homology extensions.

装有 15 mL 的 DPY 培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 2 d 后转入 100 mL 的 DPY 培养基中培养 1 d, 取 30 mL 左右的菌液, 经无菌脱脂棉过滤, 得到的菌丝于转染缓冲液 1 中混悬, 30 °C、50 r/min 孵育 3 h, 同法过滤消化液, 滤液 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 15 mL 的转染缓冲液 2 重悬原生质体, 再次离心, 重复 2-3 次至显微镜下观察无残留菌丝, 用 4-8 mL 转染缓冲液 2 重悬原生质体, 细胞计数板计数原生质体数量为 $1-5 \times 10^7$ 用于转染实验。

向 200 μ L 原生质体细胞中加入 10 μ g 重组质粒, 冰浴 30 min 后分 3 次加入 250、250、850 μ L 的转染缓冲液 3, 每次均需轻轻混匀, 室温静置 20 min 后加入 5 mL 的转染缓冲液 2, 颠倒混匀。1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清。加入 200 μ L 转染缓冲液 2, 吹打混匀, 涂布于下层 M 筛选培养基中, 然后迅速加入 5 mL 50 °C 保温的上层 M 筛选培养基, 快速晃动铺匀, 待到平板表面充分凝固后, 倒置平板于 30 °C 培养箱中。培养 3-7 d, 挑阳性克隆菌落接种于不含 D-山梨醇的筛选培养基上传代 1-3 次, 得到稳定的重组菌株。将其接种于 PDA 平板培养基, 生长 2-4 周至表面长满大量深色孢子, 用无菌水冲洗平板表面孢子, 吸取孢子液与等体积 50% 甘油混合, 混匀分装后于 -80 °C 冰箱长期贮存。

1.6 米曲霉 *A. oryzae* NSAR1 重组菌株的发酵培养及代谢产物的 LC-MS 分析

将重组菌株接种至含 20 mL 的 DPY 培养基

的 50 mL 离心管中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 2 d 后剧烈振摇离心管至菌丝成松散状态, 全部接种于 100 mL 的 CD+starch 培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 3-5 d。将培养好的重组菌株经布氏漏斗抽滤, 分离菌丝与菌液。菌丝用乙酸乙酯:甲醇(4:1)的有机试剂浸提, 重复 2 次, 合并提取液并减压浓缩后用于液质分析; 菌液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液并减压浓缩后用于液质分析。

UPLC-Q-Exactive-MS 分析条件: 色谱条件: Waters T3 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 40 °C, 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0-10 min, 5% B; 10-20 min, 5%-40% B; 20-35 min, 40%-80% B; 35-40 min, 80%-95% B; 40-50 min, 95% B; 流速为 0.3 mL/min; 进样量为 2 μ L。质谱条件: 电喷雾离子源正离子检测模式(ESI⁺); 离子源电压为 3.5 kV; 鞘气温度 250 °C, 鞘气流速为 35 L/min; 离子源温度为 350 °C; 饱和辅助气流速为 15 L/min; 裂解电压为 300 V; 雾化气为氮气; 数据采集范围 *m/z* 100-1 100, 采用全扫描方式。使用 Xcalibur 4.3 工作站进行数据处理。

2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid (1)的分离制备: 重组阳性菌株发酵液按 1.6 项下方法提取后得到粗提物 600 mg, 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(洗脱剂: 甲醇)分离, 合并馏分得到粗品 60 mg, 再经反向半制备液相[乙腈-水(8:92); 3.0 mL/min]分离纯化得到化合物 1 (1.2 mg)。

2 结果与分析

2.1 *P. chrysogenum* MT-40 基因组中异腈基合成酶候选基因的挖掘

利用 Illumina Hiseq 2500 系统进行全基因组框架图测序, 利用 SPAdes 对二代测序数据进行拼接共得到 123 个 contigs, 总长度约为 48.9 Mb, 以此建立本地 *P. chrysogenum* MT-40 基因组数据库。以 *A. fumigatus* AF293 中 xanthocillin 生物合成的关键酶 XanB (GenBank 登录号: Q4WED9) 以及细菌中经典的异腈合酶 PvcA (GenBank 登

录号: NP_250944)、IsnA (GenBank 登录号: CEK22193)为查询序列(query sequence), 在构建的本地基因组数据库中通过 BLAST 进行同源性搜索, 检索到 contig 16 中含有打分较高的同源序列, 命名为 ForB。同源比对发现 ForB 与 XanB 氨基酸相似度为 78% (图 1); 结构域分析发现同 XanB 一样, ForB 中也包含一个异腈基合成酶超家族结构域和一个 Fe(II)/2-oxoglutarate (2OG)依赖的双加氧酶超家族结构域(图 1, 图 2A), 提示 ForB 可能兼具 IsnA (催化 L-tyrosine 与核酮糖-5-磷酸缩合形成异腈基)和 IsnB (催化脱羧

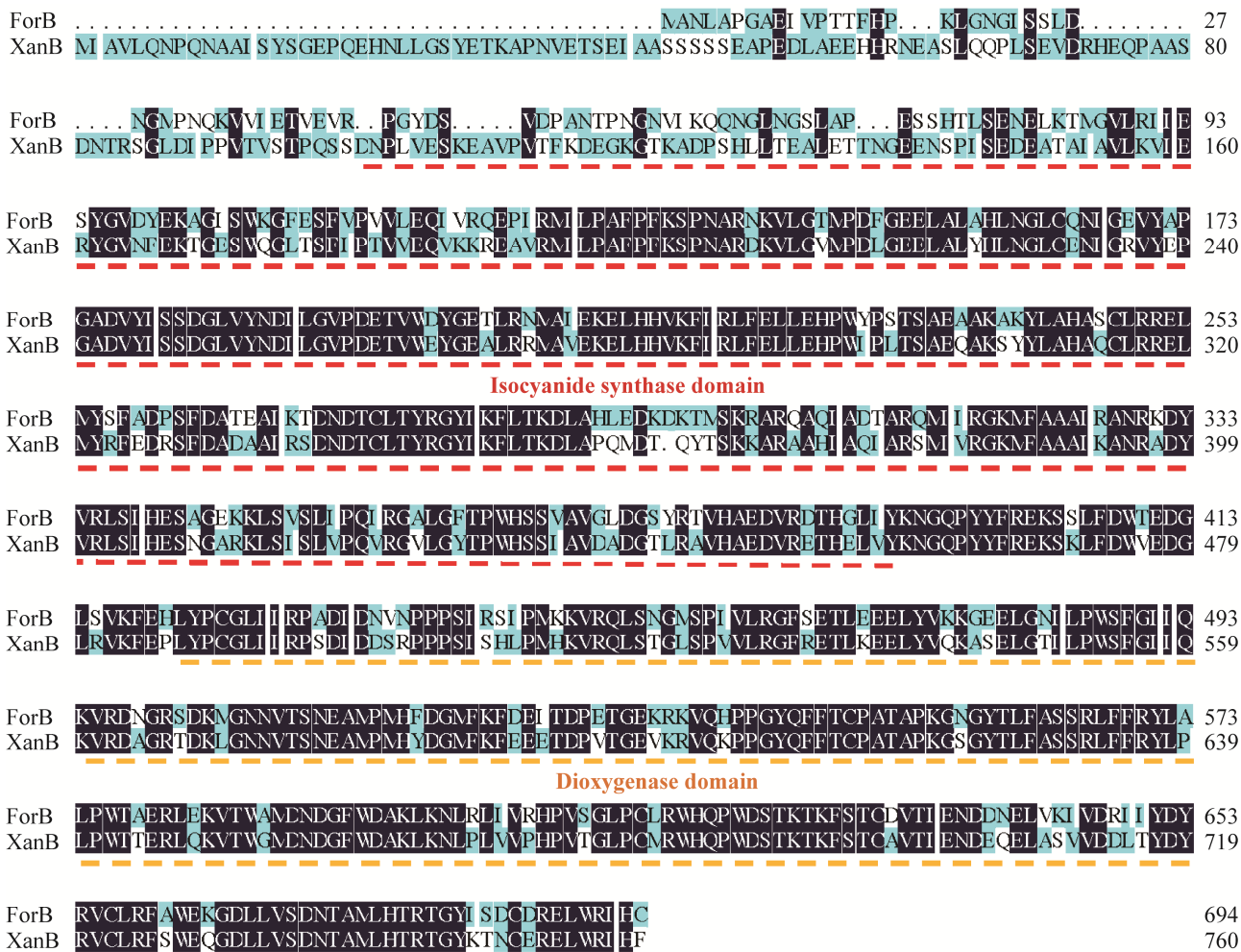


图 1 ForB 与 XanB 氨基酸序列同源比对及结构域分析

Figure 1 Amino acid sequences alignment of ForB and XanB and domain analysis.

及双键形成)的功能,直接催化 L-tyrosine 生成 L-tyrosine isonitrile 的脱羧产物(*E*)-4-(2-isocyanovinyl)phenol。与已知功能的异脲合酶构建进化树(图 2B),发现 ScoE 与 Rv0097、SfaA 三个 type II 型异脲合酶处在单独的一支,而 ForB 及 XanB 与 type I 型异脲合酶处于一支,提示 ForB 同 XanB 一样,均为 type I 型异脲合酶。将 contig 16 的核酸序列上传到 2ndFind 平台,选择烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、米曲

霉(*A. oryzae*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)作为参考物种,对基因簇中各个基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)及功能进行预测分析,结果显示 contig 16 中包含有 5 个完整的 ORF,其基因簇组成与基因簇 *xan* 一致性较高(图 2C),基因簇中包含 *xanA*、*xanB*、*xanC*、*xanD*、*xanG* 的同源序列,同源分析及功能预测(表 2)提示该基因簇很可能具有合成 xanthocillin 类衍生物的功能,命名为 *for*。

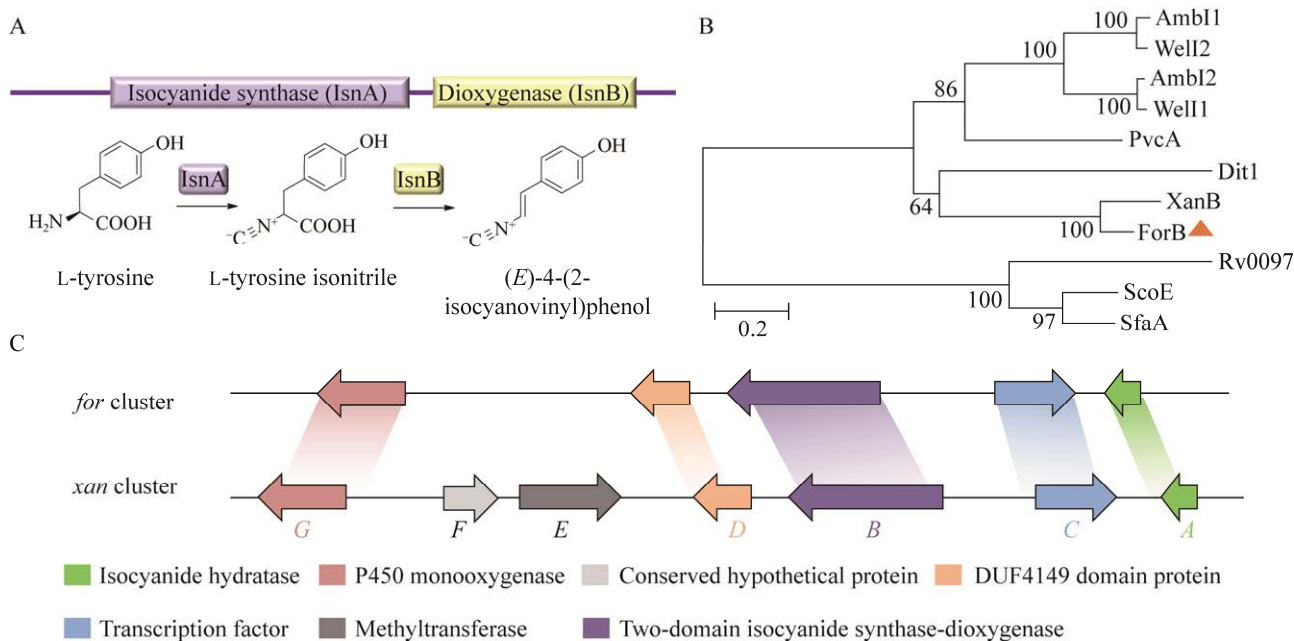


图 2 生物信息学分析

Figure 2 Bioinformatics analysis. A: The isocyanide synthase (IsnA) and dioxygenase (IsnB) domains in ForB. B: Phylogenetic analysis of classic isocyanide synthases. C: Schematic representation of the *for* and *xan* clusters.

表 2 基因簇 *for* 中各基因的功能预测及同源序列比对结果

Table 2 Function annotation of the individual gene in *for* cluster and their homologies in the known *xan* cluster

Gene	Length (aa)	Protein homolog	Identity (%)	Deduced function
<i>forA</i>	234	XanA (<i>A. fumigatus</i>)	56	Isonitrile hydratase-like protein
<i>forB</i>	695	XanB (<i>A. fumigatus</i>)	78	Isocyanide synthase
<i>forC</i>	279	XanC (<i>A. fumigatus</i>)	39	Transcription factor
<i>forD</i>	173	XanD (<i>A. fumigatus</i>)	64	DUF4149 domain protein
<i>forG</i>	510	XanG (<i>A. fumigatus</i>)	63	Cytochrome P450 monooxygenase

2.2 基因簇 *for* 中 *forB*、*forG* 基因的功能鉴定

首先将重组质粒 *forB*-pTAex3 转入 *A. oryzae* NSAR1 中,对得到的阳性重组菌株 *A. oryzae/forB* 进行培养发酵,并对其代谢产物进行液质分析。分析结果显示,与空白相比,重组菌株发酵液提取物在高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)图谱中明显多出 1 个产物峰($t_R=18.7$ min) (图 3A),该产物紫外吸收光谱在 309 nm 有最大吸收(图 3B)。为了进一步确定化合物 **1** 的结构,对重组菌株 *A. oryzae/forB*

进行大量发酵培养,菌液总提取物经分离纯化最终得到化合物 **1** (1.2 mg)。HRESI MS 给出化合物 **1** 的准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 208.060 4 ($C_{10}H_{10}NO_4$, 计算值为 208.061 0); $[M+Na]^+$ m/z 230.042 2 ($C_{10}H_9NO_4Na$, 计算值为 230.042 9) (图 3C),故确定化合物 **1** 的分子式为 $C_{10}H_9NO_4$ 。意外的是,虽然化合物 **1** 的 HRESI MS 仅显示一个分子量,但在其 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) 图谱中,却意外地显示两组非常相似的信号峰,进一步分析化合物 **1** 的 HSQC 和 HMBC 图谱,对其核磁共振

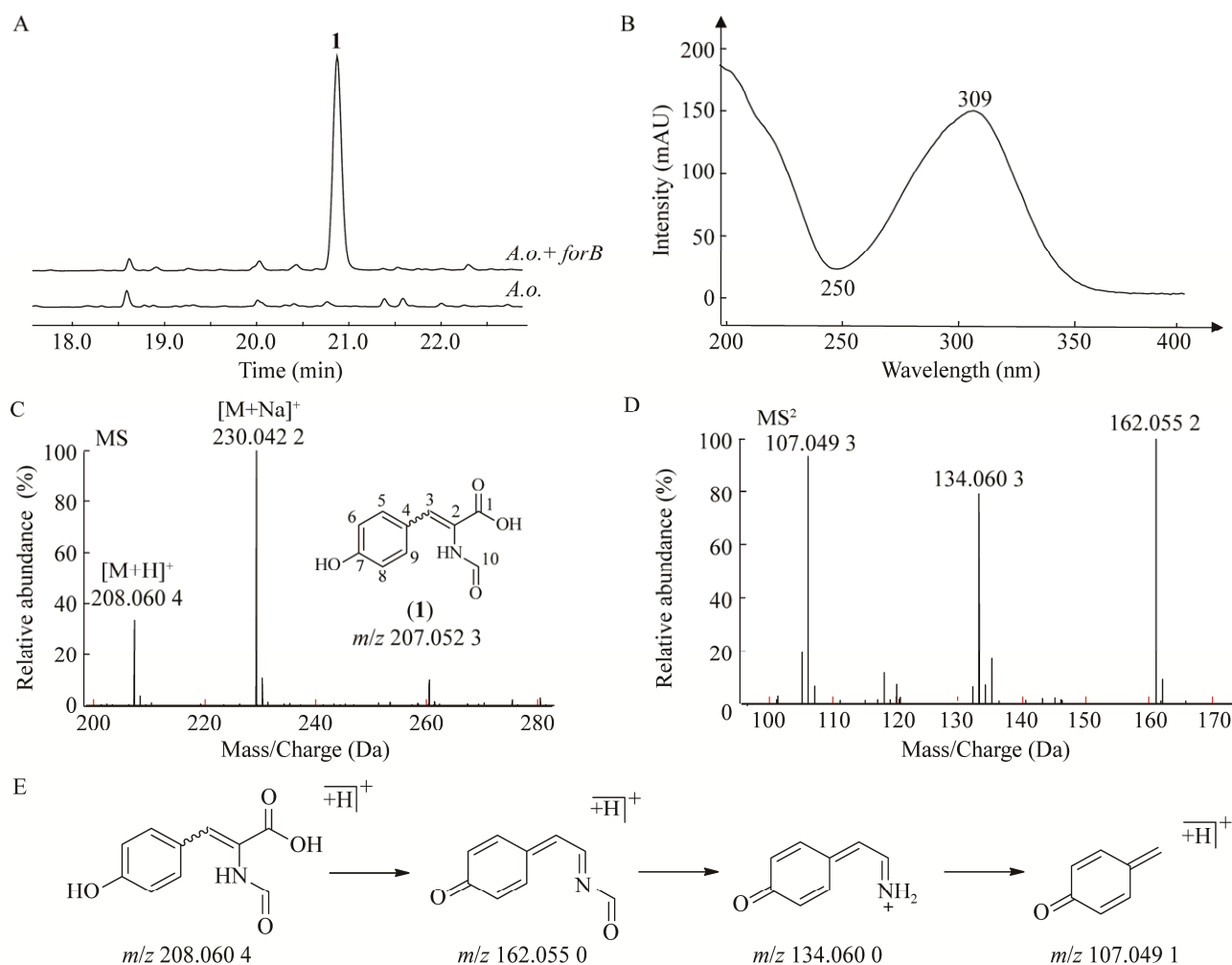


图 3 *ForB* 的产物分析

Figure 3 Compound **1** produced by the transformant *Aspergillus oryzae/forB*. A: HPLC chromatograms at 309 nm. B: UV spectrum of **1**. C: MS spectrum of **1**. D: MS² spectrum of **1**. E: Proposed MS fragmentation pathway of **1**.

(nuclear magnetic resonance, NMR)数据进行归属: δ_{H} 8.16 (1H, s, H-10)/8.14 (1H, s, H-10), 7.40 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-5, H-9)/7.39 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-5, H-9), 7.32 (1H, s, H-3)/7.21 (1H, s, H-3), 6.79 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-6, H-8)/6.78 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-6, H-8); δ_{C} 167.8 (C-10)/163.0 (C-10), 159.4 (C-7)/159.2 (C-7), 132.6 (C-5, C-9)/132.4 (C-5, C-9), 131.7 (C-3)/128.0 (C-3), 127.5 (C-4)/127.2 (C-4), 116.8 (C-6, C-8)/116.4 (C-6, C-8)。根据上述 NMR 数据, 推测化合物 **1** 的结构为 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid, 其中 δ_{H} 8.16 (1H, s)/8.14 (1H, s) 的氢信号对应 δ_{C} 167.8/163.0 的碳信号, 为结构中 *N*-甲酰基对应的氢和碳信号^[10,25]。NMR 图谱中出现两组非常相似的信号峰, 推测可能是由于结构中双键的顺反构型不同导致, 而在化合物 **1** 的碳谱中, 双键直接相连的羧基碳信号(C-1)和双键季碳(C-2)的信号非常难以检测到, 另一个双键碳(C-3)虽为 CH 烯碳, 但其信号也非常弱, 这种现象也提示 C-2 和 C-3 之间的双键可能存在顺反异构现象, 由于双键在不同构型间的动态转化, 导致 C-1, C-2 和 C-3 的信号难以检测。进一步分析化合物 **1** 的二级质谱(图 3D)并对其中碎片进行归属(图 3E), 出现碎片离子 m/z 162.055 2, 为典型的化合物 **1** 脱羧后的信号峰, 出现碎片离子 m/z 134.060 3 和 m/z 107.049 3 也进一步证明化合物 **1** 的结构为 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid。

进一步构建质粒 *forG*-pUSA, 并转入含有 *forB* 的重组菌株, 获得重组菌株 *A. oryzae/forBG*, 发酵培养后在菌液中检测到化合物 **1** 及新产物 **2** 的生成(图 4A), HRESI MS 图谱给出化合物 **2** 的准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 325.118 2 ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$, 计算值为 325.118 8), $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 347.100 3 ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$, 计算值为 347.100 8), 由此确定

化合物 **2** 的分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, 化合物 **2** 的 MS 数据与文献报道一致^[26], 推测化合物 **2** 为化合物 **1** 脱羧后的二聚体(图 4B)。进一步分析化合物 **2** 的二级质谱, 出现碎片离子 m/z 252.101 9, 235.075 6, 146.060 4, 107.049 4 等碎片峰(图 4C), 对二级质谱中典型的碎片离子进行归属(图 4D), 进一步说明化合物 **2** 的结构为化合物 **1** 脱羧后的二聚体 *N,N'*-(1,4-bis (4-hydroxyphenyl) buta-1,3-diene-2,3-diyl) diformamide。

3 讨论

重组菌株 *A. oryzae/forBG* 发酵培养后产生的化合物 **1** 和 **2** 中均含有 *N*-甲酰基, 而不是预测的异腈基, 文献报道在生物体内或者是发酵培养、提取分离过程中含异腈基的产物可自发水解生成 *N*-甲酰基^[27], 推测化合物 **1** 和 **2** 中的 *N*-甲酰基也是由异腈基自发水解生成。在 *for* 基因簇中, 存在一个注释为 isonitrile hydratase 的基因 *forA* (图 2C), 考虑到含有异腈基的 xanthocillin 对微生物自身的毒性, 有可能微生物为了自我防御需要, *forA* 基因编码的蛋白 ForA 会将 ForB 和 ForG 合成产物中的异腈基迅速水解成 *N*-甲酰基, 进而起到类似于自我解毒目的, 在这种情况下, 如果将基因 *forA* 转入 *A. oryzae/forBG* 构建重组菌株 *A. oryzae/forABG*, 消除微生物体内异腈基产物的蓄积, 则有可能提高化合物 **1** 和 **2** 的产率。然而, LC-MS 分析发现, 重组菌株 *A. oryzae/forABG* 中 2 个产物的产率相较不含 *forA* 的菌株 *A. oryzae/forBG* 无明显改变。由于缺乏相应的含有异腈基的底物, 本研究无法直接检测 ForA 的功能。值得注意的是, 在研究基因簇 *xan* 的功能时同时检测到了含有异腈基和 *N*-甲酰基产物^[28], 基因簇 *xan* 中也存在一个被注释为 isonitrile hydratase 的基因 *xanA* (图 2C), 但将 *xanA* 敲除后, 仍然可以检

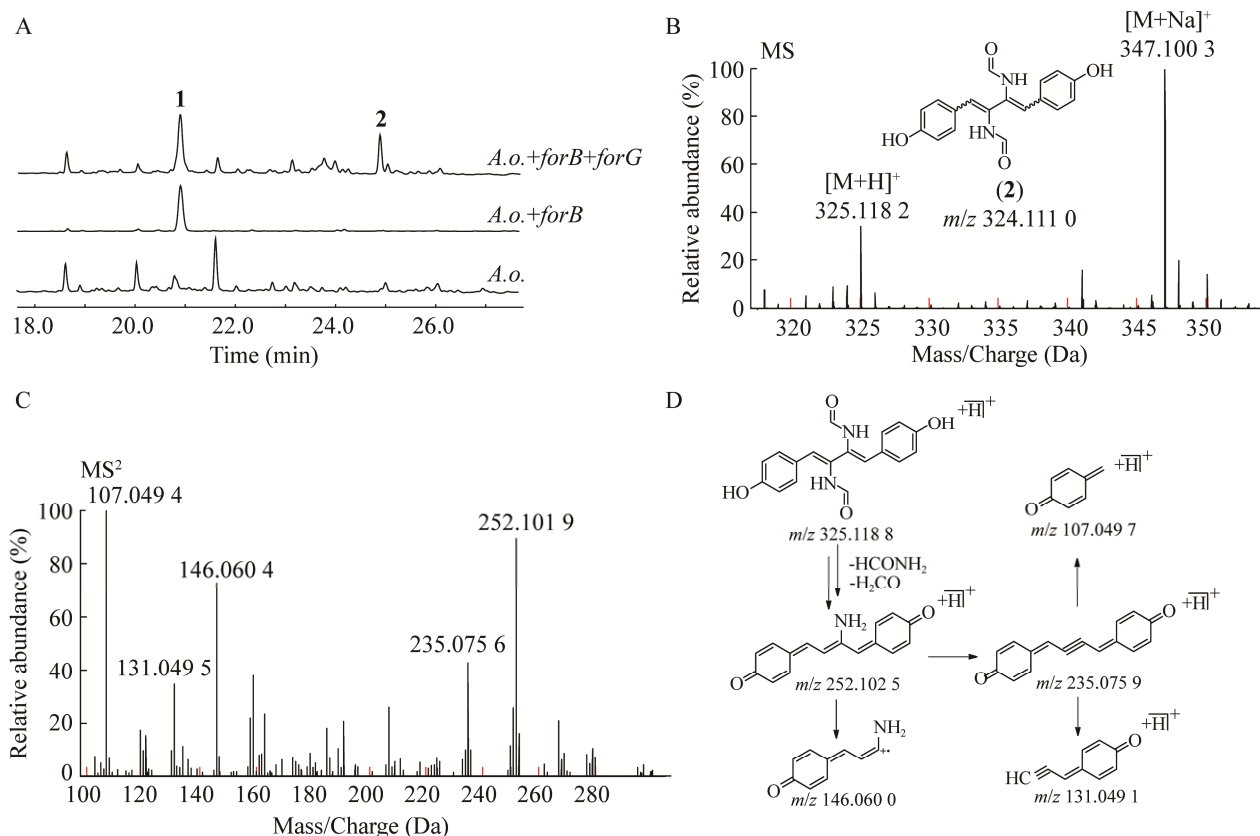


图 4 重组菌株 *Aspergillus oryzae/forBG* 代谢产物分析

Figure 4 Products produced by the transformant *Aspergillus oryzae/forBG*. A: HPLC chromatograms at 324 nm. B: MS spectrum of **2**. C: MS² spectrum of **2**. D: Proposed MS fragmentation pathway of **2**.

测到 *N*-甲酰基产物的产生, 并且 *N*-甲酰基产物的产率无显著变化, 提示 *xanA* 可能和 *forA* 类似, 并非合成 *N*-甲酰基所必须, 至于 *xanA* 和 *forA* 在体内的生理功能, 有待进一步研究。

同文献中报道的 XanB 类似, ForB 的序列同时含有一个异脞基合酶超家族结构域和一个 Fe(II)/2-oxoglutarate (2OG) 依赖的双加氧酶超家族结构域(图 2A)^[17], 二者在催化机制上也可能相似, ForB 中的异脞基合酶结构域负责催化将酪氨酸中的氨基转化为异脞基(可能经自发水解生成 *N*-甲酰基), ForB 中的氧化酶结构(2OG 结构域)催化异脞基 α 和 β 位碳之间不饱和双键的形成(图 5A)。与文献中报道的 IsnA/IsnB、

PvcA/PvcB 双酶体系相比较(图 5B)^[29-31], ForB 中的异脞基合酶结构域和双酶体系中的 IsnA、PvcA 的功能相似, 均可利用核酮糖-5-磷酸作为碳原子的供体, 负责将酪氨酸中的氨基转化为异脞基, 但 ForB 中的氧化酶(2OG)结构域与 IsnB 在催化产物中不饱和双键形成的机制可能不同, 推测虽然 ForB 中的氧化酶(2OG)结构域与氧化酶 IsnB、PvcB 均首先催化异脞基 β 位碳(C-2)发生羟基化, 接下来在催化羟基离去形成双键的过程中, IsnB 催化异脞基的 α 位脱羧和羟基离去形成不饱和双键(double bond), 这种催化机制与嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*)中发现的 XnPvcB 的催化机制相同, 但从铜绿

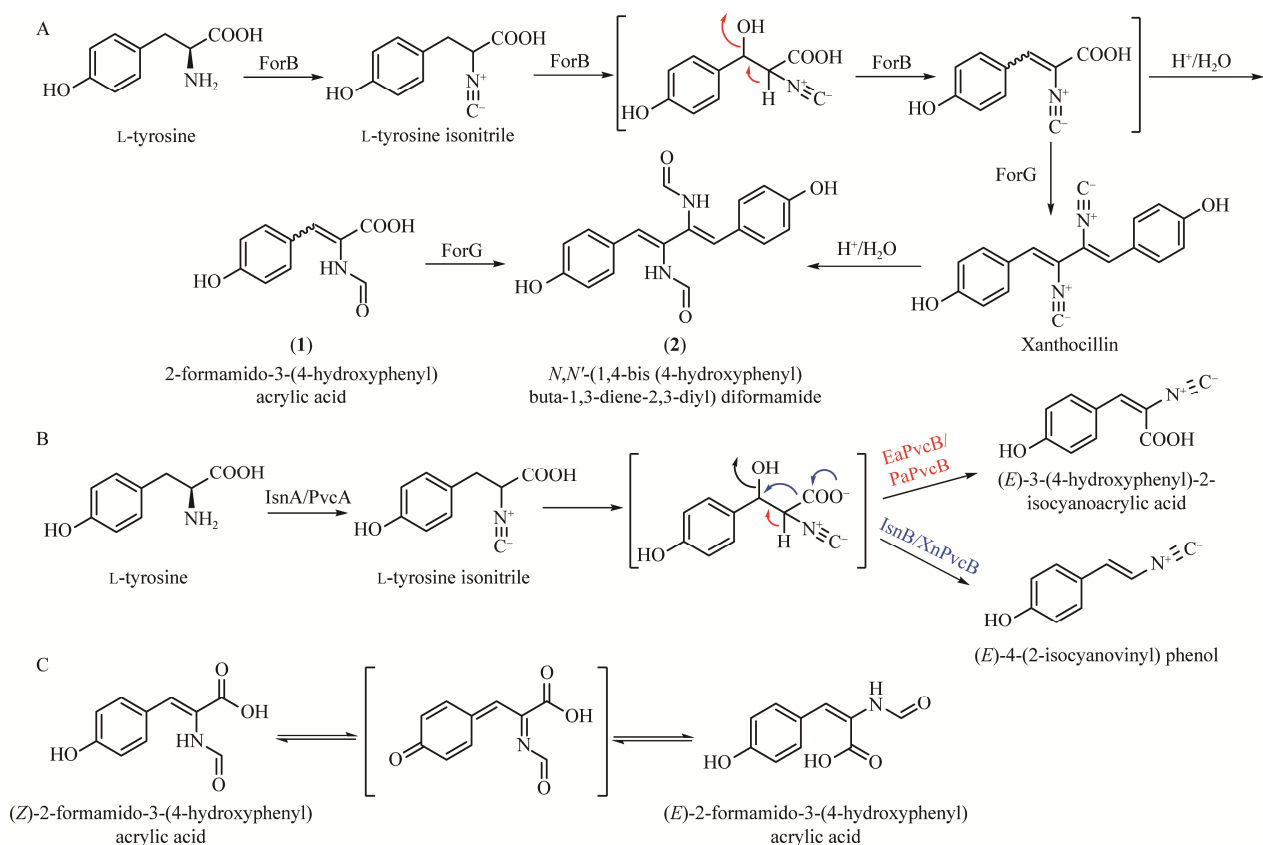


图5 ForB 和 ForG 催化生成化合物 1 和 2 的可能机制

Figure 5 The proposed biosynthetic pathway of compounds 1 and 2 catalyzed by ForB and ForG. A: The proposed biosynthetic pathway of compounds 1 and 2 in this study. B: The biosynthetic mechanisms of (*E*)-4-(2-isocyanovinyl) phenol and (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-isocyanoacrylic acid catalyzed by the dual-enzyme systems of IsnA-IsnB and PvcA-XnPvcB/PaPvcB/EaPvcB. C: The proposed isomerization of compound 1.

假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中发现的 PaPvcB 及梨火疫病菌(*Erwinia amylovora*)中发现的 EaPvcB 则是催化异腈基的 α 位氢与 β 位碳上羟基直接脱水形成不饱和双键(deprotonation-driven), 反应过程中不伴随脱羧反应。另外, 考虑到酶催化反应的立体选择性^[18,32], 由 ForB 中的氧化酶结构域催化异腈基 β 位碳(C-2)发生羟基化时, 大概率也是立体选择性的, 进而在接下来的异腈基的 α 位氢与 β 位碳上羟基脱水形成不饱和双键的反应也可能是具有立体选择性的, 但在对 ForB 催化生成的 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid (1)的结构进行

鉴定的过程中, 通过分析其 NMR 数据, 发现化合物 1 中的双键的构型可能存在 *Z/E* 两种构型, 推测出现这种现象的原因可能是在溶液中存在一个醌式结构介导的自发的异构化过程(图 5C), 但确切的机制有待进一步研究。此外, 在基因簇 *for* 中注释为编码 P450 酶的基因 *forG*, 序列比对分析发现 ForG 与基因簇 *xan* 中的 P450 酶 XanG 氨基酸序列的相似度为 63%, 推测二者功能可能相同, 通过对化合物 2 二级质谱碎片的归属可判断 ForG 与 XanG 的功能的确相同, 均可催化两分子化合物 1 脱羧缩合成其二聚体 2。

4 结论

本研究从蛇足石杉内生真菌 *P. chrysogenum* MT-40 中发现了一个有可能合成 xanthocillin 类似物的基因簇 *for*, 通过在 *A. oryzae* NSAR1 中的异源表达, 成功鉴定了 *for* 基因簇中基因 *forB*、*forG* 的功能。含有基因 *forB* 的重组菌株 *A. oryzae/forB* 可以产生 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid, 含有 *forB* 与 *forG* 的重组菌株 *A. oryzae/forBG* 除了产生 2-formamido-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid, 同时还可以产生 xanthocillin 的类似物 *N,N'*-(1,4-bis (4-hydroxyphenyl) buta-1,3-diene-2, 3-diyl) diformamide, 成功鉴定了基因簇 *for* 的核心功能, 此研究结果为微生物中异腈类天然产物的发现提供了线索。

REFERENCES

- [1] MATTHEW C, RAINER B, ERIKO T. Steps towards the synthetic biology of polyketide biosynthesis[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 351(2): 116-125.
- [2] PYE CR, BERTIN MJ, LOKEY RS, GERWICK WH, LININGTON RG. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(22): 5601-5606.
- [3] MEDEMA MH, de ROND T, MOORE BS. Mining genomes to illuminate the specialized chemistry of life[J]. Nature Reviews Genetics, 2021, 22(9): 553-571.
- [4] WALSH CT, FISCHBACH MA. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(8): 2469-2493.
- [5] JENSEN PAUL R, CHAVARRIA KRYSTLE L, WILLIAM F, MOORE BRADLEY S, NADINE Z. Challenges and triumphs to genomics-based natural product discovery[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(2): 203-209.
- [6] 周锐, 廖国建, 胡昌华. 丝状真菌次级代谢产物生物合成的表观遗传调控[J]. 生物工程学报, 2011, 27(08): 1142-1148.
ZHOU R, LIAO GJ, HU CH. Epigenetic regulation of secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi: a review[J]. Chinese Journal Biotechnology, 2011, 27(08): 1142-1148 (in Chinese).
- [7] ROTHE W. Das neue antibiotikum xanthocillin[J]. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1954, 79(27/28): 1080-1081.
- [8] VESONDER RF. Xanthocillin, a metabolite of *Eupenicillium egyptiacum* NRRL 1022[J]. Journal of the Natural Products, 1979, 42(2): 232-233.
- [9] SHANG Z, LI XM, MENG L, LI CS, GAO SS, HUANG CG, WANG BG. Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(2): 305-314.
- [10] ISAKA M, BOONKHAO B, RACHTAWEE P, AUNCHAROEN P. A xanthocillin-like alkaloid from the insect pathogenic fungus *Cordyceps brunnearubra* BCC 1395[J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(4): 656-658.
- [11] HÜBNER I, SHAPIRO JA, HOBMANN J, DRECHSEL J, HACKER SM, RATHER PN, PIEPER DH, WUEST WM, SIEBER SA. Broad spectrum antibiotic xanthocillin X effectively kills *Acinetobacter baumannii* via dysregulation of heme biosynthesis[J]. ACS Central Science, 2021, 7(3): 488-498.
- [12] YAMAGUCHI T, MIYAKE Y, MIYAMURA A, ISHIWATA N, TATSUTA K. Structure-activity relationships of xanthocillin derivatives as thrombopoietin receptor agonist[J]. The Journal of Antibiotics, 2006, 59(11): 729-734.
- [13] BRADY SF, CLARDY J. Cloning and heterologous expression of isocyanide biosynthetic genes from environmental DNA[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2005, 44(43): 7063-7065.
- [14] CLARKE-PEARSON MF, BRADY SF. Paerucumarin, a new metabolite produced by the *pvc* gene cluster from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(20): 6927-6930.
- [15] HILLWIG ML, ZHU Q, LIU XY. Biosynthesis of ambigua indole alkaloids in cyanobacterium *Fischerella ambigua*[J]. ACS Chemical Biology, 2014, 9(2): 372-377.
- [16] HILLWIG ML, FUHRMAN HA, ITTIAMORNKUL K, SEVCO TJ, KWAK DH, LIU XY. Identification and characterization of a welwitindolinone alkaloid biosynthetic gene cluster in the stigonematalean *Cyanobacterium Hapalosiphon welwitschii*[J]. ChemBioChem, 2014, 15(5): 665-669.
- [17] LIM FY, WON TH, RAFFA N, BACCILE JA, WISECAVER J, ROKAS A, SCHROEDER FC,

- KELLER NP. Fungal isocyanide synthases and xanthocillin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*[J]. *mBio*, 2018, 9(3): e00785-18.
- [18] CHANG WC, SANYAL D, HUANG JL, ITTIAMORNKUL K, ZHU Q, LIU XY. *In vitro* stepwise reconstitution of amino acid derived vinyl isocyanide biosynthesis: detection of an elusive intermediate[J]. *Organic Letters*, 2017, 19(5): 1208-1211.
- [19] CHEN TY, CHEN JF, TANG YJ, ZHOU JH, GUO YS, CHANG WC. Current understanding toward isonitrile group biosynthesis and mechanism[J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2021, 39(2): 463-472.
- [20] HARRIS NC, SATO M, HERMAN NA, TWIGG F, CAI W, LIU J, ZHU X, DOWNEY J, KHALAF R, MARTIN J, KOSHINO H, ZHANG W. Biosynthesis of isonitrile lipopeptides by conserved nonribosomal peptide synthetase gene clusters in actinobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(27): 7025-7030.
- [21] WANG LJ, ZHU MY, ZHANG QB, ZHANG X, YANG PL, LIU ZH, DENG Y, ZHU YG, HUANG XS, HAN L, LI SQ, HE J. Diisonitrile natural product SF₂768 functions as a chalkophore that mediates copper acquisition in *Streptomyces thioluteus*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(12): 3067-3075.
- [22] 贾放放, 齐博文, 张蓓蓓, 王雯静, 王阳, 石璠钰, 刘晓, 朱枝祥, 王娟, 史社坡. 蛇足石杉内生真菌 *Penicillium chrysogenum* MT-40 的代谢产物研究[J]. *中草药*, 2022, 53(13): 3904-3911.
- JIA FF, QI BW, ZHANG BB, WANG WW, WANG Y, SHI FY, LIU X, ZHU ZX, WANG J, SHI SP. Metabolites from *Penicillium chrysogenum* MT-40, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(13): 3904-3911 (in Chinese).
- [23] 石璠钰, 杨洪芸, 莫婷, 齐博文, 王雯静, 张蓓蓓, 刘晓, 史社坡. 蛇足石杉内生真菌 *Cladosporium tenuissimum* MT-35 的代谢产物研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(06): 981-986.
- SHI FY, YANG HY, MO T, QI BW, WANG WJ, ZHANG BB, LIU X, SHI SP. Metabolites of endophytic fungus *Cladosporium tenuissimum* MT-35 from *Huperia serrata*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2022, 34(6): 981-986 (in Chinese).
- [24] QI BW, LI N, ZHANG BB, ZHANG ZK, WANG WJ, LIU X, WANG J, AWAKAWA T, TU PF, ABE I, SHI SP, LI J. A multifunctional cytochrome P450 and a meroterpenoid cyclase in the biosynthesis of fungal meroterpenoid atlantinone B[J]. *Organic Letters*, 2022, 24(13): 2526-2530.
- [25] HELALY SE, ASHRAFI S, TEPONNO RB, BERNECKER S, DABABAT AA, MAIER W, STADLER M. Nematicidal cyclic lipodepsipeptides and a xanthocillin derivative from a phaeosphaeriaceous fungus parasitizing eggs of the plant parasitic nematode *Heterodera filipjevi*[J]. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(10): 2228-2234.
- [26] MARTÍN R, CARMEN MD, GARCÍA C, SONIA, MUÑOZ B, SANTOS J, FONDEVILA A, LUIS J, ALVAREZ V, JAVIER. Synthesis of xanthoxyline analogs for treating neurodegenerative diseases: PCT/ES2013/070065[P]. 2013-08-15.
- [27] WON TH, BOK JW, NADIG N, VENKATESH N, NICKLES G, GRECO C, LIM FY, GONZÁLEZ JB, TURGEON BG, KELLER NP, SCHROEDER FC. Copper starvation induces antimicrobial isocyanide integrated into two distinct biosynthetic pathways in fungi[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 4828.
- [28] RAFFA N, WON TH, SUKOWATY A, CANDOR K, CUI CS, HALDER S, DAI MJ, LANDERO-FIGUEROA JA, SCHROEDER FC, KELLER NP. Dual-purpose isocyanides produced by *Aspergillus fumigatus* contribute to cellular copper sufficiency and exhibit antimicrobial activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(8): e2015224118.
- [29] YU CP, TANG YJ, CHA LD, MILIKISIYANTS S, SMIRNOVA TI, SMIRNOV AI, GUO YS, CHANG WC. Elucidating the reaction pathway of decarboxylation-assisted olefination catalyzed by a mononuclear non-heme iron enzyme[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(45): 15190-15193.
- [30] ZHU J, LIPPA GM, GULICK AM, TIPTON PA. Examining reaction specificity in PvcB, a source of diversity in isonitrile-containing natural products[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(16): 2659-2669.
- [31] SIMMONS JM, MÜLLER TA, HAUSINGER RP. Fe^{II}/α-ketoglutarate hydroxylases involved in nucleobase, nucleoside, nucleotide, and chromatin metabolism[J]. *Dalton Transactions*, 2008, (38): 5132-5142.
- [32] MICALLEF ML, SHARMA D, BUNN BM, GERWICK L, VISWANATHAN R, MOFFITT MC. Comparative analysis of hapalindole, ambiguine and welwitindolinone gene clusters and reconstitution of indole-isonitrile biosynthesis from cyanobacteria[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 213.

(本文责编 陈宏宇)