

## 研究报告

## 链霉菌 HKIB0006 中 collismycin A 葡萄糖酸修饰产物的发现

吉火伍来<sup>1</sup>, 赵子康<sup>2</sup>, 陈媛<sup>3</sup>, 曹明明<sup>3</sup>, 张雅琼\*<sup>1</sup>

1 云南中医药大学 民族医药学院, 云南 昆明 650500

2 云南中医药大学 中药学院, 云南 昆明 650500

3 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650201

吉火伍来, 赵子康, 陈媛, 曹明明, 张雅琼. 链霉菌 HKIB0006 中 collismycin A 葡萄糖酸修饰产物的发现[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 337-349.

JIHUO Wulai, ZHAO Zikang, CHEN Yuan, CAO Mingming, ZHANG Yaqiong. Discovery of products of collismycin A modified with gluconic acid in *Streptomyces* sp. HKIB0006[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 337-349.

**摘要:**【背景】2,2'-联吡啶类天然产物是一类由放线菌产生的抗菌化合物, 抑制真菌活性显著, 结构特征为包含 2,2'-联吡啶片段。该类化合物未发现经后修饰的失活产物, 其自抗性机制尚未明确。

【目的】通过分离纯化并鉴定 2,2'-联吡啶类化合物的后修饰产物, 测试其抗真菌活性, 评价后修饰对抗真菌活性的影响, 初步探求 2,2'-联吡啶类化合物存在的自我保护机制。【方法】利用纸片扩散法筛选对真菌有拮抗能力的放线菌并分离纯化该菌株; 通过基因组测序及分析对其进行鉴定; 利用硅胶柱色谱、高效液相色谱等手段分离纯化目标化合物, 通过核磁共振波谱和质谱鉴定其结构; 测定目标化合物抗真菌活性; 最后通过序列比对来分析推测糖基转移酶。【结果】在链霉菌 (*Streptomyces* sp.) HKIB0006 中鉴定了 2 个 2,2'-联吡啶类化合物。其中一个为新结构 11-O-gluconic acid-collismycin A (1), 为已知抗生素 collismycin A (2) 的 11 位葡萄糖酸修饰产物, 实验表明 1 的抗真菌活性消失。【结论】对化合物 1 和 2 进行抗菌活性测试, 活性测试发现葡萄糖酸修饰导致 1 的抗菌活性丧失, 推测葡萄糖酸修饰可能是 2,2'-联吡啶类化合物的一种自抗性机制, 该修饰可能是菌株 HKIB0006 在与 2 长期共存中进化出的自我保护策略之一。

**关键词:** 链霉菌; 2,2'-联吡啶类化合物; 抗菌活性; 糖基转移酶

资助项目: 国家自然科学基金(22177050); 中国科学院青年促进会项目(2022395); 兴滇英才支持计划(XDYC-QNRC-2022-0774); 云南省基础研究面上项目(202301AT070323); 云南省科技厅科技计划(2019FB060, 202301AZ070001-050)  
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22177050), the Youth Innovation Promotion Association CAS (2022395), the Xingdian Talent Support Program of Yunnan Province (XDYC-QNRC-2022-0774), the Basic Research General Project of Yunnan Province (202301AT070323), and the Science and Technology Program of Yunnan Provincial Department of Science and Technology (2019FB060, 202301AZ070001-050).

\*Corresponding author. E-mail: zzyyqq2003@126.com

Received: 2024-04-26; Accepted: 2024-05-29; Published online: 2024-06-25

## Discovery of products of collismycin A modified with gluconic acid in *Streptomyces* sp. HKIB0006

JIHUO Wulai<sup>1</sup>, ZHAO Zikang<sup>2</sup>, CHEN Yuan<sup>3</sup>, CAO Mingming<sup>3</sup>, ZHANG Yaqiong<sup>\*1</sup>

1 College of Ethnic Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

2 College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

3 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, Yunnan, China

**Abstract:** [Background] 2,2'-bipyridines, a class of antimicrobial compounds produced by actinomycetes, have significant antifungal activities and are featured by the 2,2'-bipyridine moiety. No deactivated compound after post-translational modification of the known 2,2'-bipyridines has been discovered, and the self-resistance mechanisms of microorganisms to these compounds remain to be reported. [Objective] To isolate, identify, and determine the antifungal activities of 2,2'-bipyridines from *Streptomyces* sp. HKIB0006, evaluate the effect of post-translational modification on the antifungal activity, and decipher the self-resistance mechanism of the strain to 2,2'-bipyridines. [Methods] We screened out a *Streptomyces* strain with anti-fungal activity by the disk diffusion method and then identified the strain by genome sequencing. The target compounds were separated by silica gel column chromatography and HPLC, and their structures were elucidated by MS and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The antifungal activities of the isolated compounds were evaluated, and a glycosyltransferase responsible for the self-resistance was revealed by sequence alignment. [Results] Two 2,2'-bipyridines were isolated from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. HKIB0006. One was a new compound named as 11-O-gluconicacid-collismycin A (**1**), and the other was the known antibiotic collismycin A (**2**). The antifungal assay of **1** and **2** showed that **1** was inactive and **2** was active. [Conclusion] The antibacterial activity of compounds **1** and **2** was tested. The compound **1** is a gluconic acid modification product of collismycin A, and it is inactive due to the gluconic acid modification. According to genetic analysis, we propose that the gluconic acid modification may represents one of the self-resistance mechanisms of strain HKIB0006 against collismycin A.

**Keywords:** *Streptomyces* sp.; 2,2'-bipyridine; antimicrobial activity; glycosyltransferase

放线菌是活性天然产物的重要来源,土壤、淡水、海洋生态系统、植物和动物中都包含放线菌<sup>[1]</sup>。放线菌具有强大的生物合成潜力,可以产生结构多样的活性次级代谢产物,比如从中发现了多种抗生素和一系列抗癌、杀虫、抗真菌和免疫抑制药物<sup>[2]</sup>。目前,来自放线菌的抗感染化合物如氯霉素、新霉素、红霉素、卡那霉素和庆大

霉素等,以及抗癌化合物包括蒽环类、博来霉素和烯二炔类已成功应用于临床<sup>[2-3]</sup>。此外,几种新的抗菌化合物(GE2270A, deoxyactagardine, actinonin)和抗癌化合物(salinosporamide A, sungsanpin, diketopi-perazines, marthiapeptide A)正在开展临床试验<sup>[4-8]</sup>。总之,近80年来从放线菌中发现了以抗生素为代表的微生物药物,这

些药物挽救了许多生命。然而,微生物对抗生素的耐药严重威胁人类健康,了解微生物耐药机制有助于耐药菌的防治。与细菌耐药类似,作为抗生素的主要产生菌,放线菌能通过多种特殊机制保护自己免受内源性抗生素的毒性作用<sup>[9]</sup>。

谢丽媛等<sup>[10]</sup>对常见的自抗性机制进行了总结,包括外排泵、化合物封闭、前药、化学修饰、靶点修饰、DNA 修复和管家酶抗性变体等<sup>[11]</sup>。外排泵可将微生物产生的次级代谢产物排出胞外,从而避免毒性化合物与胞内靶点蛋白相互作用<sup>[10]</sup>,例如生产四环素的土霉素链霉菌在四环素生物合成基因簇(biosynthesis gene cluster, BGC)中编码一种跨膜蛋白通道,通过将抗生素排放与质子导入耦合,将抗生素泵出细胞外<sup>[12]</sup>;靶点修饰即活性天然产物靶点的特异性结合位点被修饰后,药物与靶点结合的亲和力会显著降低,从而起到自我保护的效果,例如 16S rRNA 靶点可以通过核糖体甲基转移酶甲基化,从而阻止大环内酯(以及亚胺胺和链球菌素)的结合<sup>[13]</sup>。化学修饰则是微生物通过合成相应的酶对毒性产物进行修饰,如乙酰化、磷酸化、糖基化、氧化还原等,使其转化为低毒产物。磷酸化与酰基化是最为常见的两种修饰方式,比如磷酸转移酶 GtmJ 对庆大霉素 3'-OH 的磷酸化<sup>[14]</sup>,以及 N-乙酰转移酶 BlmB 和 TlmB 对博来霉素类化合物关键氨基的乙酰化<sup>[15]</sup>。涉及自抗性策略的去糖基化与糖基化的例子则比较少,主要包括糖苷酶 KijX 对 kijanimicin 和 lobophorins 的去糖基化<sup>[16]</sup>,以及糖基转移酶 OleI 及 OleD<sup>[17]</sup>、GimA<sup>[18]</sup>和 SunS<sup>[19]</sup>分别对 oleandomycin、spiramycins 和 sublancin 的糖基化。此外,某些微生物体内还存在多种自抗性机制的协同作用,从而实现更加有效的自我保护,例如,在萘啶霉素(naphthyridinomycin)<sup>[20-21]</sup>

和 A26771B<sup>[22]</sup>的生物合成过程中,产生菌均同时采用了前药机制和化合物修饰机制,保护自身不被代谢产物的毒性作用所影响。

2,2'-联吡啶类化合物是由放线菌产生的一类具有独特特征的次级代谢产物<sup>[23]</sup>。自 1959 年从链霉菌菌株中发现第一个化合物 caerulomycin A 以来<sup>[24-25]</sup>,已经从放线菌中分离出大量具有不同结构特征的类似物,如 collismycins (COLs)<sup>[26]</sup>、pyrisulfoxins<sup>[27]</sup>和 cyanogrisides<sup>[28]</sup>等。CAEs、COLs 及相关衍生物的生物活性广泛:如 CAEs 具有抗菌、抗肿瘤和显著的免疫抑制活性,而 COLs 具有抗细菌、抗真菌、抗癌、抗炎和神经保护活性<sup>[29]</sup>。对 2,2'-联吡啶类化合物的生物合成途径也有很多报道,但是该类化合物的失活机制目前尚未见报道。本研究以一株链霉菌 HKIB0006 为对象,分离纯化出该菌株的主要次级代谢产物,对其结构进行鉴定的同时还分析了对真菌的抑菌活性,以期了解其生物活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 23857、大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25722、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) AS2.399,中国科学院昆明植物研究所。

### 1.2 培养基

高氏一号培养基参考文献[30]配制,ISP2 培养基参考文献[31]配制,LB 培养基参考文献[32]配制,YPD 培养基参考文献[33]配制。

M1 培养基(g/L):可溶性淀粉 20.0,无水葡萄糖 10.0,大豆蛋白胨 5.0,酵母提取物 5.0,NaCl 4.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, CaCO<sub>3</sub> 2.0。

M2 培养基(g/L):糊精 40.0,番茄粉 7.5,

酶水解酪素 2.5, 酵母提取物 5.0。

M3 培养基(g/L): 甘油 50.0 mL, 玉米粉 25.0, 酵母提取物 5.0。

M4 培养基(g/L): 蔗糖 100.0, 无水葡萄糖 10.0, casamino acids 0.1, 酵母提取物 5.0, MOPS 21.0, 海盐 1.0,  $K_2SO_4$  0.25.0,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  10.0, 微量元素 1.0 mL。

pH 值均为 7.2–7.4, 121 °C 灭菌 20 min。

### 1.3 主要试剂和仪器

两性霉素 B, 上海吉至生化科技有限公司; 硫链丝菌素和氨苄青霉素, 上海麦克林生化科技有限公司; 大孔吸附树脂, 三菱化学株式会社。立式高压蒸气灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 超高效液相色谱-高分辨质谱仪 (ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, UPLC-HRMS), AB Sciex 公司; SepaBean<sup>®</sup> machine U 快速液相制备色谱系统, 三泰科技(常州)有限公司; 高效液相色谱仪, 岛津公司; 500 MHz 核磁共振波谱仪, 600 MHz 核磁共振波谱仪, 布鲁克公司。

### 1.4 菌株的分离

2022 年 3 月于云南省西双版纳傣族自治州景洪市山林中采集环境样品, 称取 10 g 样品碾碎成粉末状后, 置 60 °C 烘箱中 60 min 至干燥, 将其放入无菌研钵中, 加入少量无菌水进行研磨, 并用无菌水对原液进行梯度稀释, 获得  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  这 5 种浓度的悬浮液。每个梯度溶液吸取 0.1 mL 涂布于含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  重铬酸钾的高氏一号平板, 28 °C 培养 7 d, 挑取单菌落用于后续实验。

### 1.5 菌株的抑菌活性测定

将筛选出的菌株通过平板划线法接种到 ISP2 培养基, 于 28 °C 恒温箱培养 7 d, 收集孢子, 用 M1、M2、M3、M4 和 ISP2 这 5 种培养基对菌株进行液体发酵, 28 °C、220 r/min 振荡

培养 7 d 后, 将发酵液在常温下 7 000 r/min 离心 5 min 获得上清和菌体, 上清中的次级代谢产物用乙酸乙酯萃取; 在菌体沉淀中加入甲醇, 通过甲醇裂解细胞, 释放出代谢产物。最后将乙酸乙酯萃取液和甲醇提取液分别用旋转蒸发器浓缩干燥, 合并获得化合物粗提物。利用纸片扩散法对各粗提物进行活性测定, 并用 UPLC-HRMS 对粗提物中的次级代谢产物进行检测。

### 1.6 化合物的分离、纯化与结构鉴定

基于抑菌活性结果及 UPLC-HRMS 检测结果选择最佳培养基对菌株 HKIB0006 进行扩大发酵, 积累发酵产物。由于目标化合物水溶性强, 不能通过乙酸乙酯萃取得到, 因此在离心分离上清和菌体后, 上清中加入大孔吸附树脂, 置于摇床进行充分振荡, 而后倒去液体, 用甲醇对树脂进行浸泡, 操作进行 2–3 次, 充分提取上清中的次级代谢产物; 菌体直接用甲醇浸泡, 最后合并所有提取液, 旋转蒸发器浓缩后置于 4 °C 暂存。

将菌株 HKIB0006 的发酵液提取物首先通过正相硅胶色谱柱, 使用二氯甲烷: 甲醇(体积比分别为 100:0、95:5、90:10、85:15、80:20、70:30、60:40、50:50、20:80、0:100)进行梯度洗脱。洗脱液收集后用旋转蒸发器减压浓缩, 对浓缩后样品进行 HPLC 分析, 通过 HPLC 中产物峰的紫外吸收特征与 UPLC-HRMS 检测结果中得到的吸收特征做比对, 定位目标化合物所在馏分。

定位到目标化合物所在馏分后, 通过反相液相制备色谱对该部分馏分进行分离纯化, 洗脱剂使用乙腈与水, 设置检测条件: 流速 10 mL/min, 0–20 min, 乙腈浓度用 5%–100% 进行线性梯度洗脱, 检测波长 254 nm 和 340 nm, 梯度洗脱后通过收集单独的峰经蒸发浓缩后得到纯度较高的目标化合物。

最后用 HPLC 进行纯化, 对色谱柱、液相

洗脱体系、洗脱速度、不同洗脱剂的梯度、检测波长等各项条件进行摸索,选择各峰分离程度较好的洗脱条件进行后续实验。单独收集每一个明显的峰,并通过 UPLC-HRMS 确定其纯度后用旋转蒸发仪进行减压干燥。

经 HPLC、UPLC-HRMS 纯度检测后的单体化合物,加入 600  $\mu\text{L}$  DMSO- $d_6$  充分溶解,通过核磁共振波谱仪测定氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )、碳谱( $^{13}\text{C-NMR}$ )、DEPT、HSQC、HMBC、ROESY 和 COSY,确定化合物的二维结构。核磁数据使用 MestReNova 14.0 软件进行处理,结合 Analyst<sup>®</sup> TF 1.6 software 分析所得数据确定单体化合物分子量大小,单体化合物结构用 ChemDraw 19.0 进行绘制。

### 1.7 化合物的抑菌活性测定

用于测定抗真菌活性的阳性对照药物为两性霉素 B,用于抗细菌活性的阳性对照药物为硫链丝菌素和氨苄青霉素。

### 1.8 菌株 HKIB0006 的基因组测序

将菌株 HKIB0006 用 ISP2 固体培养基进行纯化培养,挑取单克隆接种至 5 个 ISP2 平板,于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 7 d,待菌体旺盛生长、孢子完全萌发,将菌株 HKIB0006 的 ISP2 固体培养基培养物送至武汉贝纳科技有限公司进行基因组测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 HKIB0006 的抑菌结果及次级代谢产物分析

从环境样品中分离得到的菌株 HKIB0006 (图 1A)能够明显抑制酵母菌的生长,用 M1、M2、M3、M4 和 ISP2 5 种培养基对菌株进行液体发酵,发酵液提取物经活性测定发现,只有 M3 培养基显示出抑菌作用(图 1B),证明在这 5 种培养基中,菌株 HKIB0006 的活性次级代谢产物只在 M3 培养基中产生。

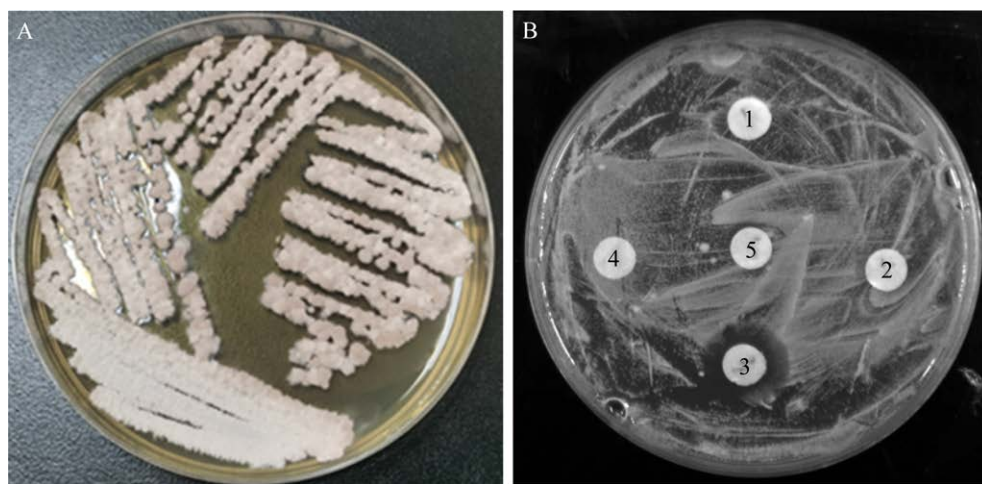


图 1 菌株 HKIB0006 的菌落形态及粗提取物对酵母菌的抑制作用 A: ISP2 培养基上培养 7 d 的菌落形态; B: 五种培养基发酵液提取物对酵母菌的抑制作用。1: M1 培养基; 2: M2 培养基; 3: M3 培养基; 4: M4 培养基; 5: ISP2 培养基。

Figure 1 The colony morphology of strain HKIB0006 and the inhibitory effect of crude extract on yeast. A: Colony morphology on ISP2 medium at day 7; B: The antimicrobial effect of five kinds of culture broth extracts against yeast. 1: M1 medium; 2: M2 medium; 3: M3 medium; 4: M4 medium; 5: ISP2 medium.

将 M3 培养基发酵液提取物进行 UPLC-HRMS 检测, 数据表明: 在 3.643 min 及 4.921 min 有较明显的产物峰(图 2A), 初步猜测活性来源于这 2 个峰。

进一步分析这 2 个峰, 它们的特征紫外吸收相同, 均在 250 nm 和 340 nm 左右(图 2B)。峰 1 的分子量为  $[M+H]^+=452.1129$  (图 2C), 峰 2 的分子量为  $[M+H]^+=276.0811$  (图 2D), 通过比对它们的离子碎片并查阅所推荐的分子式, 初步得出这 2 个化合物均为 2,2'-联吡啶类化合物<sup>[26]</sup>。

## 2.2 化合物的分离、纯化与结构鉴定结果

将菌株 HKIB0006 进行扩大发酵(10 L), 发酵液提取物通过正相硅胶色谱柱、 $C_{18}$  反相液相制备色谱及高效液相色谱等色谱技术, 从中分

离得到单体化合物 1 10 mg, 化合物 2 8 mg, 通过核磁共振波谱仪确定二维结构。

化合物 2 通过 Analyst<sup>®</sup> TF 1.6 software 分析定其分子式为  $C_{13}H_{13}N_3O_2S$  ( $m/z$  276.0811  $[M+H]^+$ , calcd. 276.0728), 经二维核磁数据同文献比对, 确定为化合物 collismycin A<sup>[34]</sup>(图 3), 其易溶于丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙腈, 乙酸乙酯, 不溶于水。化合物 1, 易溶于水、丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙腈, 不溶于乙酸乙酯, 通过 HRESIMS 确定分子式为  $C_{19}H_{21}N_3O_8S$  ( $m/z$  452.1129  $[M+H]^+$ , calcd. 452.1049), 比已知化合物 2 大 176.03。1 的 <sup>1</sup>H 谱和 <sup>13</sup>C 数据与 2 相似(表 1), 表明二者具有相同的结构骨架(原始

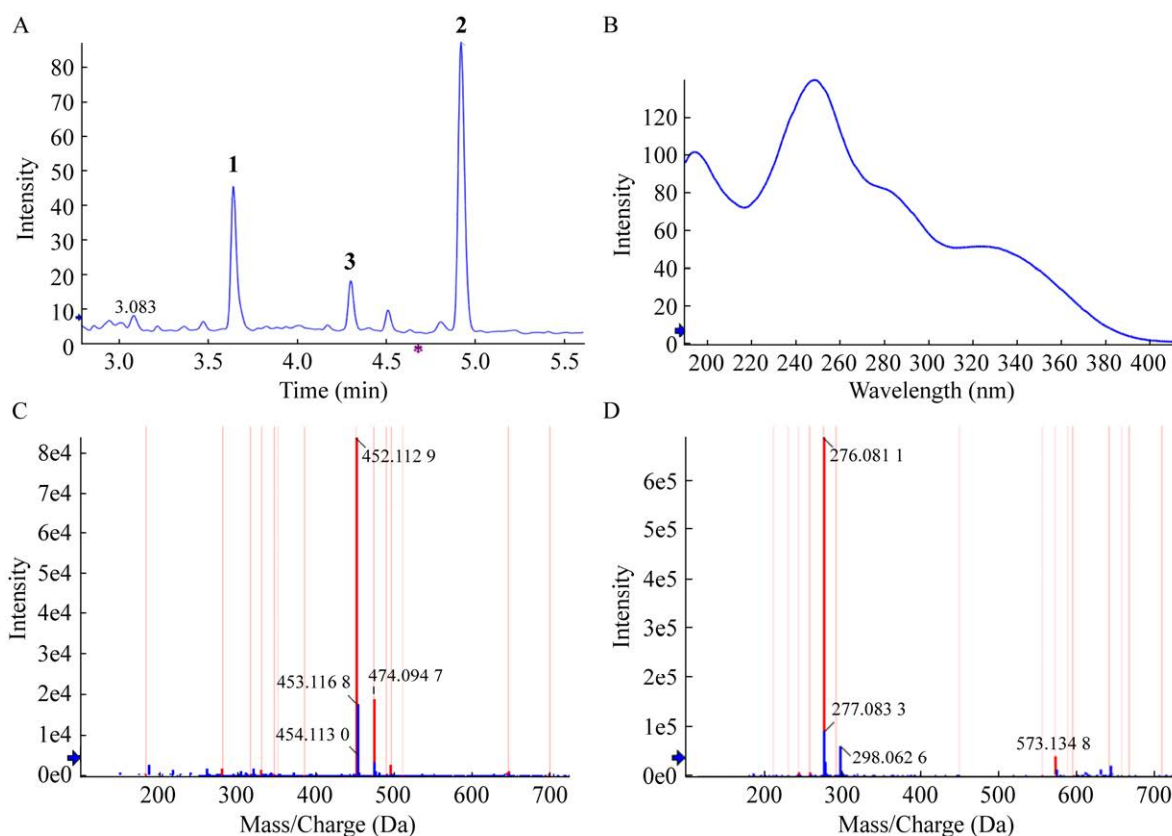


图 2 菌株 HKIB0006 发酵液的 UPLC-HRMS 检测结果 A: 化合物 1 与 2 在 254 nm 处的紫外吸收; B: 化合物 1 与 2 的紫外吸收特征; C: 化合物 1 的分子量; D: 化合物 2 的分子量。

Figure 2 UPLC-HRMS results of strain HKIB0006 broth extract. A: UV absorption of 1 and 2 at 254 nm; B: UV absorption characteristics of 1 and 2; C: Molecular weight of 1; D: Molecular weight of 2.

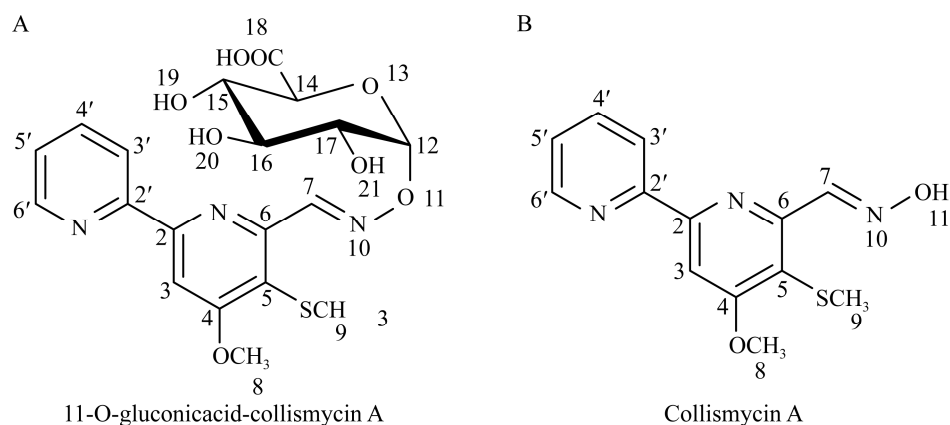


图 3 化合物 1 (A)与 2 (B)的化学结构

Figure 3 The chemical structures of **1** (A) and **2** (B).表 1 化合物 1 与 2 的  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据Table 1  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data of **1** and **2**

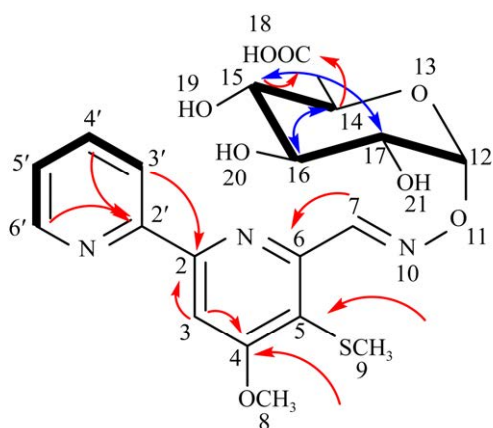
Position	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J=\text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J=\text{Hz}$ )
2	153.8 s		156.0 s	
3	104.0 d	8.08 (s)	103.0 d	8.00 (s)
4	167.0 s		166.9 s	
5	122.5 s		121.1 s	
6	151.3 s		152.7 s	
7	149.5 d	8.95 (s)	146.8 d	8.71 (s)
8	56.6 q	4.09 (s)	56.4 q	4.05 (s)
9	17.7 q	2.37 (s)	17.8 q	2.34 (s)
10				
11				
12	105.1 d	5.10 (d, 8.3)		
13				
14	76.0 s	3.80 (d, 11.4)		
15	71.8 s	3.37 (t, 9.3)		
16	75.7 s	3.33 (t, 8.9)		
17	71.4 s	3.25 (t, 8.6)		
18	170.2 s	10.50 (s)		
19		7.13 (d, 6.1)		
20		7.04 (d, 6.2)		
21		7.21 (s)		
NOH				11.78 (br s)
2'	155.9 s		154.5 s	
3'	121.3 d	8.43 (d, 7.9)	120.8 d	8.37 (d, 8.0)
4'	138.1 d	8.05 (td, 7.7, 1.8)	137.4 d	7.95 (ddd, 8.0, 7.5, 5.2)
5'	125.0 d	7.56 (ddd, 7.5, 4.7, 1.2)	124.7 d	7.48 (dd, 7.5, 5.0)
6'	148.9 d	8.74 (dt, 4.7, 1.4)	149.2 d	8.70 (dd, 5.0, 1.2)

**1**: Recorded at 600 MHz in DMSO- $d_6$ ; **2**: 500 MHz in DMSO- $d_6$ .



核磁谱图请见附图 1, 已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDC0000299)。由  $^1\text{H}$  谱显示 **2** 有脘基信号( $\delta_{\text{H}}$  11.78, 1H, br s), 而 **1** 上无脘基信号, **1** 的 18 号位上有羧基氢信号( $\delta_{\text{H}}$  10.50, 1H, s)。**2** 和 **1** 的  $^{13}\text{C}$  谱分别显示 13 个和 19 个 C 信号, **2** 的 C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  146.8)与 **1** 的 C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  149.5), 相差 2 个化学位移, 证明具有糖苷键。同时 **1** 的  $^{13}\text{C}$  谱还显示具有 5 个连接 O 原子的 C 信号, 而  $^1\text{H}$  谱上也显示多出 3 个羟基 H 信号(H-19、H-20、H-21)且具有一个羧酸, 证明连接了一个葡萄糖酸。综合分析 HSQC 和 HMBC 数据可知, 18-COOH ( $\delta_{\text{C}}$  170.2)与 14-H ( $\delta_{\text{H}}$  3.80)相连, 14-H ( $\delta_{\text{H}}$  3.80)与 15-H ( $\delta_{\text{H}}$  3.37)相连,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 及关键 HMBC 如图 4, 旋光为  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -23.70$ 。

在 **1** 中的葡萄糖酸中, 端基碳上的 H 与邻位 H 上的质子互为耦合, 耦合常数大小为 8.3, 根据糖端基 H 耦合常数( $^1J_{\text{H1-H2}}$ )与苷键构型判断, 表明了这种化合物的葡萄糖酸部分为  $\beta$  构型。综合所述 **1** 的化学结构如图 3A 所示, 将该化合物命名为 11-O-gluconicacid-collismycin A (**1**)。



—  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY     $\curvearrowright$   $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC     $\blacktriangleleft$  NOESY

图 4 化合物 **1** 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、NOESY 及 HMBC 相关

Figure 4 The  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY and HMBC of **1**.

## 2.3 化合物的抑菌活性测定结果

分别将分离出来的单体化合物 11-O-gluconicacid-collismycin A (**1**)、collismycin A (**2**)、用于测定抗真菌活性的阳性对照药物两性霉素 B, 以及用于抗细菌活性的阳性对照药物硫链丝菌素(**3**)和氨苄青霉素(**4**), 配成浓度为 1 mg/mL 的稀释液, 利用纸片扩散法测试化合物的抗菌、抗真菌活性: 纸片上各加入 10  $\mu\text{L}$  化合物 **1**、**2**、**3** 和 **4** 的稀释液(测抗金黄色葡萄球菌时化合物 **3** 和 **4** 均加 3  $\mu\text{L}$ ), 用无菌镊子将纸片按压在涂有指示病原菌的平板上置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中 24 h 后观察抑菌效果。由结果可知: 已知化合物 **2** 对真菌和细菌均有活性, 化合物 **1** 活性消失(图 5)。

为了检测这 2 个化合物对本源宿主细胞是否有抗性, 将菌株 HKIB0006 孢子液涂于 ISP2 平板上, 以硫链丝菌素(**3**)为阳性对照, DMSO 作为阴性对照, 通过纸片扩散法测试活性(化合物 **1** 与 **2** 各加 10  $\mu\text{L}$ , **3** 和 DMSO 各加 3  $\mu\text{L}$ )。结果得知化合物 **1** 对本源宿主无抑制活性, 而已知化合物 **2** 对宿主有活性(图 6)。

综合以上结果得知化合物 **1** 对本源宿主无活性, 而 **2** 对宿主有活性, 显示葡萄糖酸修饰可能是一种自我保护机制, 即微生物为了生存, 会合成有毒的次级代谢产物来杀死其竞争者或抑制其生长, 为了不被自身代谢产物影响, 同时利用它们创造竞争优势, 产生菌必须进化出某种自抗性机制, 以实现“杀敌不伤己”的效果<sup>[10]</sup>。

## 2.4 葡萄糖酸转移酶 Gcol-GT 的序列分析

菌株 HKIB0006 的基因组数据 NMDC60153819 存储在微生物科学数据中心(NMDC), 链接为 <https://nmdec.cn/resource/genomics/genome/detail/NMDC60153819>。通过 antiSMASH 7.0<sup>[35]</sup>对 DNA 序列进行分析, 初步确定了其生物合成基



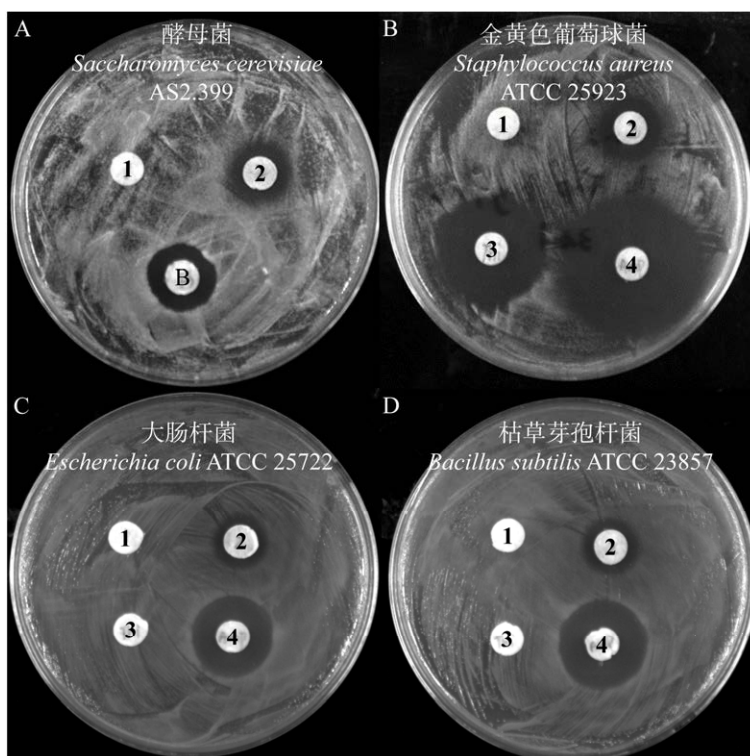


图 5 化合物 1 与 2 和阳性对照药物的抑菌活性测定 A: 化合物 1 与 2 及两性霉素 B 对酵母菌的抑制作用; B: 化合物 1、2、3 及 4 对金黄色葡萄球菌的抑制作用; C: 化合物 1、2、3 及 4 对大肠杆菌的抑制作用; D: 化合物 1、2、3 及 4 对枯草芽孢杆菌的抑制作用。1、2、3 (硫链丝菌素)、B (两性霉素 B) 及 4 (氨苄青霉素): 10  $\mu\text{g}$ ; 测抗金黄色葡萄球菌时化合物 3 和 4: 3  $\mu\text{g}$ 。

Figure 5 Determination of antibacterial activities of 1 and 2 and positive control. A: The inhibitory effects of 1, 2 and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae* AS2.399; B: The inhibitory effects of 1, 2, 3 and 4 on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; C: The inhibitory effects of 1, 2, 3 and 4 on *Escherichia coli* ATCC 25722; D: The inhibitory effects of 1, 2, 3 and 4 on *Bacillus subtilis* ATCC 23857. 1, 2, 3 (thiostrepton), B (amphotericin B) and 4 (ampicillin): 10  $\mu\text{g}$ ; When measuring the activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 3 and 4: 3  $\mu\text{g}$ .

因簇, 完成了各基因的功能注释(表 2), 并与其结构最接近的已知抗生素 caerulomycin A<sup>[36]</sup>的生物合成基因簇进行了比对。序列比对结果表明, 在化合物 1 的生物合成基因簇内部及邻近区域中未发现糖基转移酶基因序列(图 7)。

根据文献[37]已知葡萄糖酸转移酶 GcaC 的氨基酸序列, 在菌株 HKIB0006 蛋白序列中做 BLAST 分析, 搜索到 4 条糖基转移酶(氨基酸序列请见附图 2, 数据存储在国家微生物科学数据

中心, 编号为 NMDCX0000299), 通过 MEGA 6.0 软件对上述 5 条蛋白序列做同源比对, 发现其中 Gcol-GT 与 GcaC 相似度最高(coverage 99%, identity 54.09%), 因此推测其参与了催化化合物 2 到 1 的修饰。

### 3 讨论与结论

本研究分离筛选到一株对真菌具有良好拮抗活性的链霉菌 HKIB0006, 对比不同培养基粗

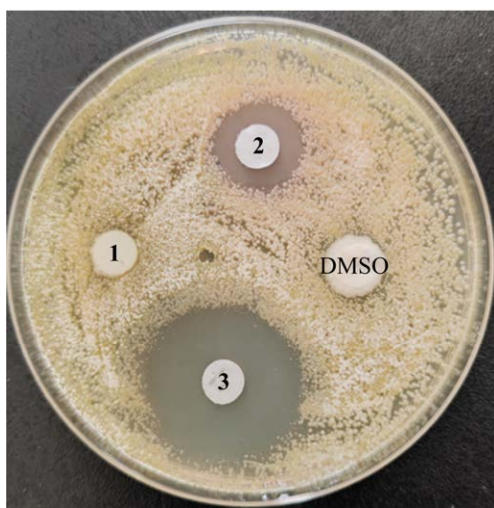


图 6 化合物 1 与 2 对宿主细胞的抑制活性测定  
1、2: 10  $\mu\text{g}$ ; 3 (硫链丝菌素)与 DMSO: 3  $\mu\text{g}$ 。  
Figure 6 The inhibitory activities of 1 and 2 on host cells was determined. 1 and 2: 10  $\mu\text{g}$ ; 3 (thiostrepton) and DMSO: 3  $\mu\text{g}$ .

提取物活性发现, 仅从 M3 培养基发酵液中能检测到活性化合物, 通过 HPLC-HRMS 检测到 M3 培养基发酵液提取物中有 2 个较明显的产物峰, 初步判定抗菌活性来源为这 2 个峰, 通过扩大发酵、产物分离纯化及结构解析, 最终揭示这 2 个峰均为 2,2'-联吡啶类化合物。

2,2'-联吡啶类化合物是一种放线菌来源的化合物, 具有多种生物活性, 包括抗菌、抗肿瘤、免疫抑制活性、抗炎和神经保护活性。有观点认为, 抗生素耐药基因很可能起源于产生抗生素的细菌, 这些细菌必须保护自己免受内源性抗生素的杀伤。本研究中, 从链霉菌 HKIB0006 中鉴定了一种 2,2'-联吡啶类化合物的已知抗生素 collismycin A (2)及其衍生物新结构(1), 命名为 11-O-gluconicacid-collismycin A

表 2 菌株 HKIB0006 中化合物 1 生物合成基因簇注释

Table 2 Biosynthetic gene cluster annotation of 1 in strain HKIB0006

Gene	AA	Protein homologue (accession no.)	Coverage/ Identity (%)	Proposed function
<i>gcolT3</i>	581	<i>caeT3</i> (Query_4188425)	99/65	Iron import ATP-binding/permease protein IrtB
<i>gcolT2</i>	586	<i>caeT2</i> (Query_4441221)	98/64	Iron import ATP-binding/permease protein IrtA
<i>gcolX1</i>	351	(ARF75842.1)	100/79	Vitamin B12-binding protein
<i>gcolX2</i>	364	(WP_161321671.1)	100/86	Vitamin B12 import system permease protein BtuC
<i>gcolX3</i>	273	(WP_311606023.1)	98/90	Fe(3+) dicitrate transport ATP-binding protein FecE
<i>gcolR2</i>	168	<i>caeR2</i> (Query_1351195)	93/60	HTH-type transcriptional regulator MalT
<i>gcolM</i>	352	<i>caeM</i> (Query_1457303)	97/53	Carminomycin 4-O-methyltransferase DnrK
<i>gcolK</i>	504	<i>caeK</i> (Query_1537565)	96/67	Aclacinomycin-N/aclacinomycin-A oxidase
<i>gcolG</i>	531	<i>caeG</i> (Query_4798575)	98/57	Acetylmornithine/succinyl-diaminopimelate aminotransferase
<i>gcolX4</i>	343	(WP_164618159.1)	99/84	Mitomycin biosynthesis 6-O-methyltransferase
<i>gcolO</i>	462	<i>caeO</i> (Query_1689535)	99/65	Hypothetical protein
<i>gcolN</i>	343	<i>caeN</i> (Query_1793967)	99/61	Hypothetical protein
<i>gcolX5</i>	399	(WP_164618153.1)	99/88	Thiamine thiazole synthase
<i>gcolL</i>	425	<i>caeL</i> (Query_5049747)	95/57	Hypothetical protein
<i>gcolE</i>	593	<i>caeE</i> (Query_1968047)	94/52	2-hydroxy-7-methoxy-5-methyl-1-naphthoate-CoA
<i>gcolX6</i>	330	-	-	-
<i>gcolC</i>	424	<i>caeC</i> (Query_6493749)	96/58	GDP-perosamine synthase
<i>gcolD</i>	388	<i>caeD</i> (Query_4150085)	98/59	Monomeric sarcosine oxidase
<i>gcolA</i>	2 515	<i>caeA</i> (Query_2845151)	99/56	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase
<i>gcolB</i>	1 060	<i>caeB</i> (Query_6215307)	96/53	Linear gramicidin synthase subunit D
<i>gcolI</i>	386	<i>caeI</i> (Query_2226549)	95/64	Acyl-CoA dehydrogenase

--: No data found.

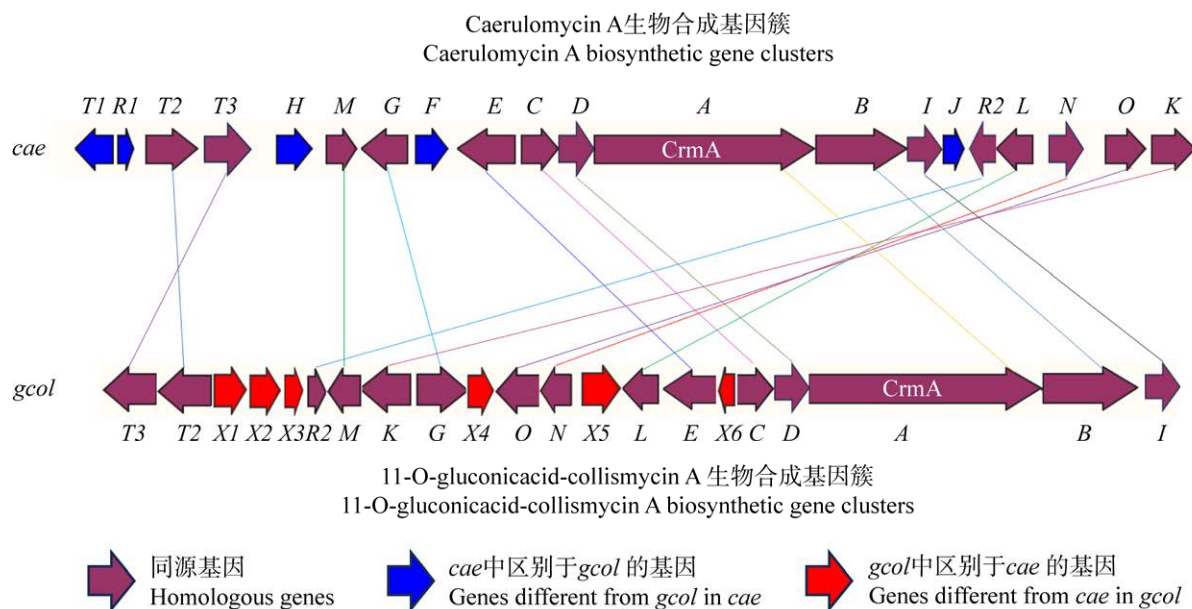


图 7 化合物 1 (Gcol 与 caerulomycin A (Cae)生物合成基因簇比对

Figure 7 Comparison of biosynthetic gene clusters between 1 (Gcol) and caerulomycin A (Cae).

(1), 它不具有抗菌活性, 与前者的区别仅在于结构中 11 位上被葡萄糖酸修饰。通过测试 2 个化合物对本源宿主的抑制活性发现, 1 对宿主无活性, 而 2 有活性, 显示葡萄糖酸修饰可能是一种自我保护机制, 保护自己不被自己产生的毒素杀死。其中, 以这些活性产物为靶标进行的酶催化的化学修饰, 是最为直接的方式去减弱或消灭这种自我伤害, 如磷酸化、酰化、去糖基化与糖基化、氧化与还原、水解(环丙基的水解)及各种双重(或串联)修饰。自抗性机制不仅是微生物宿主用来自我保护的手段, 同时在基因水平上与抗生素的耐药机制也可能有着密切的关系<sup>[38]</sup>。尽管抗性基因在大多数情况下与抗生素生物合成基因共定位, 但在 1 的生物合成基因簇中未发现这种可能编码糖基转移酶的基因。为了鉴定糖基转移酶的功能, 从菌株 HKIB0006 的基因组 DNA 中发现了一个与已知葡萄糖酸转移酶基因相似的基因 *gcol-GT*。Ren 等<sup>[37]</sup>在寻找用于天然产物糖基化修饰的新型酶

的过程中, 发现链霉菌 ATCC 49982 中的糖基转移酶可以将白藜芦醇和其他几种天然产物转化为相应的葡萄糖醛酸苷。本实验中的 *Gcol-GT* 与文献中的 *GcaC* 在氨基酸序列上相似度极高, 推测 *gcol-GT* 催化了 1 的葡萄糖酸修饰, 从而导致 1 失活, 推测葡萄糖酸修饰可能是 2,2'-联吡啶类化合物的一种自抗性机制。

## REFERENCES

- [1] JOSE PA, MAHARSHI A, JHA B. Actinobacteria in natural products research: progress and prospects[J]. Microbiological Research, 2021, 246: 126708.
- [2] DEMAINE AL, SANCHEZ S. Microbial drug discovery: 80 years of progress[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(1): 5-16.
- [3] MAHAJAN GB, BALACHANDRAN L. Antibacterial agents from actinomycetes: a review[J]. Frontiers in Bioscience (Elite Edition), 2012, 4(1): 240-253.
- [4] FENICAL W, JENSEN PR, PALLADINO MA, LAM KS, LLOYD GK, POTTS BC. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052)[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(6): 2175-2180.
- [5] HARVEY AL, EDRADA-EBEL R, QUINN RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2015, 14: 111-129.

- [6] HAYASHI Y, YAMAZAKI-NAKAMURA Y, YAKUSHIJI F. Medicinal chemistry and chemical biology of diketopiperazine-type antimicrotubule and vascular-disrupting agents[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 61(9): 889-901.
- [7] RUSSO P, del BUFALO A, FINI M. Deep sea as a source of novel-anticancer drugs: update on discovery and preclinical/clinical evaluation in a systems medicine perspective[J]. *EXCLI Journal*, 2015, 14: 228-236.
- [8] UM S, KIM YJ, KWON H, WEN H, KIM SH, KWON HC, PARK S, SHIN J, OH DC. Sungsanpin, a lasso peptide from a deep-sea streptomycete[J]. *Journal of Natural Products*, 2013, 76(5): 873-879.
- [9] DARBY EM, TRAMPARI E, SIASAT P, GAYA MS, ALAV I, WEBBER MA, BLAIR JMA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21: 280-295.
- [10] 谢丽媛, 姜逢霖, 胡友财. 微生物中自抗性基因导向的基因组挖掘及其在天然产物发现中的应用[J]. *药学进展*, 2023, 47(4): 244-259.  
XIE LY, JIANG FL, HU YC. Self-resistant gene-directed genome mining in microorganisms and its application in the discovery of natural products[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2023, 47(4): 244-259 (in Chinese).
- [11] ALMABRUK KH, DINH LK, PHILMUS B. Self-resistance of natural product producers: past, present, and future focusing on self-resistant protein variants[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(6): 1426-1437.
- [12] OHNUKI T, KATOH T, IMANAKA T, AIBA S. Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces griseus* and characterization of the cloned genes[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 161(3): 1010-1016.
- [13] BHUJBALRAO R, ANAND R. Deciphering determinants in ribosomal methyltransferases that confer antimicrobial resistance[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(4): 1425-1429.
- [14] KHAREL MK, BASNET DB, LEE HC, LIOU K, MOON YH, KIM JJ, WOO JS, SOHNG JK. Molecular cloning and characterization of a 2-deoxystreptamine biosynthetic gene cluster in gentamicin-producing *Micromonospora echinospora* ATCC15835[J]. *Molecules and Cells*, 2004, 18(1): 71-78.
- [15] COUGHLIN JM, RUDOLF JD, WENDT-PIENKOWSKI E, WANG LY, UNSIN C, GALM U, YANG D, TAO MF, SHEN B. BlmB and TlmB provide resistance to the bleomycin family of antitumor antibiotics by N-acetylating metal-free bleomycin, tallysomyin, phleomycin, and zorbamycin[J]. *Biochemistry*, 2014, 53(44): 6901-6909.
- [16] CUTHBERTSON L, AHN SK, NODWELL JR. Deglycosylation as a mechanism of inducible antibiotic resistance revealed using a global relational tree for one-component regulators[J]. *Chemistry & Biology*, 2013, 20(2): 232-240.
- [17] QUIRÓS LM, AGUIRREZABALAGA I, OLANO C, MÉNDEZ C, SALAS JA. Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(6): 1177-1185.
- [18] GOURMELEN A, BLONDELET-ROUAULT MH, PERNODET JL. Characterization of a glycosyl transferase inactivating macrolides, encoded by gimA from *Streptomyces ambofaciens*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(10): 2612-2619.
- [19] WANG H, van der DONK WA. Substrate selectivity of the sublancin S-glycosyltransferase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(41): 16394-16397.
- [20] ZHANG Y, WEN WH, PU JY, TANG MC, ZHANG LW, PENG C, XU YQ, TANG GL. Extracellularly oxidative activation and inactivation of matured prodrug for cryptic self-resistance in naphthyridinomycin biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(44): 11232-11237.
- [21] WEN WH, ZHANG Y, ZHANG YY, YU Q, JIANG CC, TANG MC, PU JY, WU L, ZHAO YL, SHI T, ZHOU JH, TANG GL. Reductive inactivation of the hemiaminal pharmacophore for resistance against tetrahydroisoquinoline antibiotics[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 7085.
- [22] ZHANG YL, BAI J, ZHANG L, ZHANG C, LIU BY, HU YC. Self-resistance in the biosynthesis of fungal macrolides involving cycles of extracellular oxidative activation and intracellular reductive inactivation[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2021, 60(12): 6639-6645.
- [23] BAUMANN M, BAXENDALE IR, LEY SV, NIKBIN N, SMITH CD, TIERNEY JP. A modular flow reactor for performing Curtius rearrangements as a continuous flow process[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2008, 6(9): 1577-1586.
- [24] HAPKE M, BRANDT L, LÜTZEN A. Versatile tools in the construction of substituted 2,2'-bipyridines: cross-coupling reactions with tin, zinc and boron compounds[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(12): 2782-2797.
- [25] KAES C, KATZ A, HOSSEINI MW. Bipyridine: the most widely used ligand. A review of molecules comprising at least two 2,2'-bipyridine units[J]. *Chemical Reviews*, 2000, 100(10): 3553-3590.
- [26] GOMI S, AMANO S, SATO E, MIYADOH S, KODAMA Y. Novel antibiotics SF2738A, B and C, and their analogs produced by *Streptomyces* sp.[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(12): 1385-1394.
- [27] KEM WR, SOTI F, RITTSCHOFF D. Inhibition of barnacle larval settlement and crustacean toxicity of some hoplonemertine pyridyl alkaloids[J]. *Biomolecular Engineering*, 2003, 20(4/5/6): 355-361.
- [28] FU P, LIU PP, LI X, WANG Y, WANG SX, HONG K, ZHU WM. Cyclic bipyridine glycosides from the marine-derived actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6[J]. *Organic Letters*, 2011, 13(22): 5948-5951.
- [29] DU YQ, WANG C, CUI GD, CHU YW, JIA Q, WANG Y, ZHU WM. Cytotoxic and optically active pyrifulfoxins from the endophytic *Streptomyces*

- albolongus* EA12432[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 248.
- [30] 于冬梅, 朱峰, 邢志富, 范海燕, 朱晓峰, 段玉玺, 王媛媛, 刘晓宇, 陈立杰. 碳代谢基因 *gabT* 调控生防菌 *Snea253* 的  $\gamma$ -氨基丁酸代谢途径影响杀线虫活性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3257-3266.  
YU DM, ZHU F, XING ZF, FAN HY, ZHU XF, DUAN YX, WANG YY, LIU XY, CHEN LJ. Carbon metabolism gene *gabT* regulates  $\gamma$ -aminobutyric acid metabolism of *Streptomyces venezuelae* Snea253 on nematocidal activity[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(12): 3257-3266 (in Chinese).
- [31] 付祖姣, 刘宇波, 郭照辉, 杨华, 罗容珺, 刘欢, 毕世宇, 肖蓉, 胡展, 刘万钧. 链霉菌 Ahn75 菌剂助剂的筛选及对水稻稻瘟病的防效研究[J]. *激光生物学报*, 2022, 31(4): 321-330, 336.  
FU ZJ, LIU YB, GUO ZH, YANG H, LUO RJ, LIU H, BI SY, XIAO R, HU Z, LIU WJ. Screening of adjuvants for *Streptomyces griseobrunneus* Ahn75 agent and its control effects on rice blast[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2022, 31(4): 321-330, 336 (in Chinese).
- [32] 张晓伟, 卢欣雨, 陈琴, 赵胜宗, 刘彦. 高效降解脱铬皮屑的菌株筛选[J]. *皮革科学与工程*, 2022,32(3): 36-41.  
ZHANG XW, LU XY, CHEN Q, ZHAO SZ, LIU Y. Screening of efficiently degradation strains for dechromed wet blue shavings[J]. *Leather Science and Engineering*, 2022,32(3): 36-41 (in Chinese).
- [33] 刘丽娜, 杜仁鹏, 徐家菊, 赵丹. 产胞外多糖酵母菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2023, 40(2): 199-208, 253.  
LIU LN, DU RP, XU JJ, ZHAO D. Screening and identification of exopolysaccharide-producing yeast and optimization of fermentation on conditions[J]. *Journal of Natural Science of Heilongjiang University*, 2023, 40(2): 199-208, 253 (in Chinese).
- [34] SHINDO K, YAMAGISHI Y, OKADA Y, KAWAI H. Collismycins A and B, novel non-steroidal inhibitors of dexamethasone-glucocorticoid receptor binding[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(9): 1072-1074.
- [35] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJM, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [36] CHEN M, PANG B, DING WP, ZHAO QF, TANG ZJ, LIU W. Investigation of 2,2'-bipyridine biosynthesis reveals a common two-component system for aldehydes production by carboxylate reduction[J]. *Organic Letters*, 2022, 24(3): 897-902.
- [37] REN J, BARTON CD, SORENSON KE, ZHAN JX. Identification of a novel glucuronyltransferase from *Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982 for natural product glucuronidation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(3): 1165-1183.
- [38] LI XH, JU JH. Intracellularly driven chemical modifications of antimicrobial secondary metabolites: potent mechanisms of self-resistance[J]. *Pharmaceutical Science Advances*, 2024, 2: 100032.