

杀稻瘟菌素生物合成基因簇的边界确定

杜爱芹 吴俊 邓子新 贺新义*

(上海交通大学 生命科学技术学院 微生物学代谢国家重点实验室 上海 200030)

摘要:【目的】杀稻瘟菌素(BS)是六元糖环肽核苷类抗生素,在农业和基因工程方面有重要应用。由于在其原始产生菌中很难进行基因操作,且许多合成步骤未知,为了增加对此基因簇的认识,为后续生物合成途径的推导和改造提供更多依据,在变铅青链霉菌中确定该基因簇的边界,并对 *blsK* 基因功能进行初步研究。【方法】利用 PCR-targeting 法对已测序基因簇中的基因进行基因置换得到突变株,LC-MS 检测突变株发酵液的产物从而确定基因置换是否影响杀稻瘟菌素的产生。【结果】明确了杀稻瘟菌素基因簇包含 *blsD*–*blsM* 共 10 个基因;在 *blsK* 的基因置换突变株中检测到去甲基杀稻瘟菌素(DBS)和少量杀稻瘟菌素的积累。【结论】*blsD*–*blsM* 这 10 个基因负责杀稻瘟菌素的生成;从 *blsK* 的突变株产物积累结果推测,Blk 蛋白负责加载亮氨酸到 DBS 的精氨酸衍生侧链的 β -氨基上,生成 *N*-亮氨酰化去甲基杀稻瘟菌素(LDBS);BS 生物合成途径有两条,一条是由 DBS 直接甲基化生成 BS;另一条是由 DBS 转化成 LDBS 继而由 LDBS 甲基化和水解生成 BS。

关键词: 杀稻瘟菌素, 基因簇, PCR-targeting, 去甲基杀稻瘟菌素, 生物合成途径

Determination of the boundary of blasticidin S biosynthetic gene cluster

DU Ai-Qin WU Jun DENG Zi-Xin HE Xin-Yi*

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

Abstract: [Objective] Blasticidin S (BS) is a hexose-containing peptidyl-nucleoside antibiotic widely used as fungicidal in agriculture and as an effective selection reagent in eukaryotic cells. Genetic manipulation in the native producer of BS was never successful, which hinder the studies of BS biosynthesis. We recently engrafted the BS biosynthetic gene cluster into the chromosome of *Streptomyces lividans* and achieved heterologous production of BS. In this study, we tried to localize the boundary of BS gene cluster to identify the essential genes, providing functional insights into its remaining unknown biosynthetic steps. [Methods] PCR-targeting was used to carry out gene replacements in *S. lividans*-derived BS producer. The mutants were fermented and assayed by

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2012CB721004)

*通讯作者: Tel: 86-21-62932943-2131; 信箱: xyhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-09-01; 接受日期: 2013-10-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-30

LC-MS for their capability of producing BS. **[Results]** We defined the boundary of the essential BS biosynthetic gene cluster that contains ten genes *blsD* to *blsM*. Disruption of *blsK* leads to the accumulation of demethylblastocidin S (DBS) and BS. **[Conclusion]** Ten genes *blsD* to *blsM* are sufficient for BS biosynthesis. BlsK was responsible for adding leucine to the β -amino group of arginine-derived side chain of DBS to form leucyl-demethylblastocidin S (LDBS). There are two biosynthetic pathways for BS: DBS is directly methylated to BS; the alternative is that DBS is first converted to LDBS that is then methylated and finally hydrolyzed into BS.

Keywords: Blastocidin S, Gene cluster, PCR-targeting, Demethylblastocidin S, Biosynthetic pathway

杀稻瘟菌素(BS)是一种典型的肽核苷类抗生素。1958年,由日本科学家在寻找有机汞农药替代试剂的实验中,从 *Streptomyces griseochromogenes* 中发现并分离得到^[1]。由于它对环境友好,因此在农业上被大规模用于防治稻瘟病等。近年来,它和其抗性基因作为筛选标记被越来越多地用于真核细胞研究^[2]。对杀稻瘟菌素生物合成途径的研究始于1968年^[3],1998年基因簇被克隆^[4],由于杀稻瘟菌素天然产生菌 *S. griseochromogenes* 的遗传操作困难,其生物合成研究进展缓慢。2003年Cone M. C.等^[5]将 *S. griseochromogenes* 染色体DNA上的多个片段导入变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* 中,试图对BS生物合成基因簇进行异源表达,但没有成功,而是得到了产生接近于BS的中间产物,如LBS的菌株。他们对BS基因簇的测序分析认为,发现BS基因簇包含 *orf* 1-9和 *blsS*-*blsN* 之间共28个基因,分析认为其中 *blsS*-*blsN* 与BS生物合成相关。Grochowski L. L.等^[6]对BlsM进行了体外功能研究,发现它负责水解胞嘧啶核苷酸(CMP),为BS合成提供底物胞嘧啶。丰俊等^[7]对BlsE进行了体外表征,证明它是一个SAM依赖型的自由基酶,负责催化CGA(胞嘧啶葡萄糖醛酸)C5位上的脱羧反应;最近,吴俊和李力等通过4次同源交换,将杀稻瘟菌素的合成基因簇嫁接到 *S. lividans* 1326的染色体上,得到了产生杀稻瘟菌素的突变株 *S. lividans* WJ2^[8],成功实现了BS基因簇的异源表达。吴俊等在该异源表达菌株中通过体内基因置换实验证明BlsF可能是BS生物合成过程中的一个调节基因;另外,他还

证明BlsL可能是N甲基转移酶,负责BS生物合成中的甲基转移。尽管多个基因功能已被证实,但BS生物合成途径中仍然有多步反应机制是未知的。

本研究中,我们在杀稻瘟菌素的工程菌株WJ2中,分别突变了 *blsA*、*blsB*、*blsC* 和 *blsN* 基因,确定了它们与杀稻瘟菌素生物合成的关联性,并对 *blsK* 基因的功能进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 本实验所用菌株和质粒见表1和表2。

1.1.2 酶和试剂: 聚合酶链式反应(PCR)所用试剂、限制性内切酶购于TaKaRa公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于Qiagen公司。

1.1.3 培养基: LB (Luria-Bertani)培养基(g/L): 胰蛋白胨10,酵母抽提物5,NaCl 5,葡萄糖1,pH 7.0。LA培养基(g/L): 在LB中加入琼脂粉,使其终浓度为1.5%。TSBY培养基(g/L): 蔗糖103, Oxioid胰豚豆汤粉TSB 30,酵母提取物5,pH 7.0。SFM培养基: 黄豆饼粉20 g,加入900 mL自来水灭菌过滤,甘露醇20 g,补足自来水1 L,pH 4.0-6.0。杀稻瘟菌素基因簇在变铅青链霉菌中的异源表达菌株及基因中断突变株的发酵: 种子培养基(g/L): 黄豆饼粉30,葡萄糖20,酵母提取物5, CaCO₃ 3, MgSO₄·7H₂O 0.5, (NH₄)₂SO₄ 1, pH 7.0; 发酵培养基(g/L): 黄豆饼粉40,葡萄糖80, CaCO₃ 10, MgSO₄·7H₂O 0.6, K₂HPO₄ 0.4, FeSO₄·7H₂O 0.05, (NH₄)₂SO₄ 1, *N,N*-dimethylacetamide 5 mL, pH 7.0。

表 1 研究中所用菌株及主要特征 Table 1 Strains and characteristics used in this study		
菌株 Strains	特征 Characteristics	来源或出处 Source or reference
DH10B	F ⁻ , recA1, lacZ, ΔM15	GIBCO BRL
ET12567/pUZ8002	用于 <i>E. coli</i> 和链霉菌之间接合转移, dam ⁻ , dcm ⁻ , hsd ^S , Cml ^r , Str ^r , Tet ^r , Km ^r	[9]
BW25113	lacIq, rrnBT14, ΔlacZWJ16, hsdR514, ΔaraBADAH33, Δrha-BADLD78	[10]
WJ2	含有 BS 基因簇, 能正常表达 BS	[8]
DAQ1	WJ2 衍生菌株, <i>blsC</i> 基因被中断	本研究
DAQ2	WJ2 衍生菌株, <i>blsN</i> 基因被中断	本研究
DAQ3	WJ2 衍生菌株, <i>blsA</i> 基因被中断	本研究
DAQ4	WJ2 衍生菌株, <i>blsB</i> 基因被中断	本研究
DAQ8	WJ2 衍生菌株, <i>blsK</i> 基因被中断	本研究

表 2 研究中所用质粒及主要特征 Table 2 Plasmids and characteristics used in this study		
质粒 Plasmids	特征 Characteristics	来源或出处 Source or reference
pJTU1780	以 <i>Spe</i> I 和 <i>Xba</i> I 酶切 7D11 得到一段 35 kb 的片段, 将该片段与 pJTU1289 连接而得	[8]
pDAQ1	用 PCR-targeting 法将 <i>blsC</i> 置换为 <i>aadA</i> 和 <i>oriT</i>	本研究
pDAQ2	用 PCR-targeting 法将 <i>blsN</i> 置换为 <i>aadA</i> 和 <i>oriT</i>	本研究
pDAQ3	用 PCR-targeting 法将 <i>blsA</i> 置换为 <i>aadA</i> 和 <i>oriT</i>	本研究
pDAQ4	用 PCR-targeting 法将 <i>blsB</i> 置换为 <i>aadA</i> 和 <i>oriT</i>	本研究
pDAQ8	用 PCR-targeting 法将 <i>blsK</i> 置换为 <i>aadA</i> 和 <i>oriT</i>	本研究

1.1.4 PCR-targeting 引物: 设计 *blsA*、*blsB*、*blsC*、*blsD*、*blsN* 和 *blsK* (表 3) 的 PCR-targeting 引物和验证引物, 引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 基因中断: 本研究中基因中断采用的是 PCR-targeting 方法^[10]。

1.2.2 大肠杆菌与链霉菌的接合转移: 首先在大肠杆菌中构建好基因中断载体质粒, 然后将质粒导入到 ET12567/pUZ8002 中, 与 *Streptomyces lividans* WJ2 孢子进行接合转移。取 100 μL OD₆₀₀ 值约 0.8 的大肠杆菌, 3 500 r/min 离心 5 min, 用 LB 洗 2

遍; 将少量过滤后的 WJ2 孢子用 TES 洗 2 遍, 用 1 000 μL TES 重悬, 50 °C 水浴热激 10 min, 然后将 WJ2 孢子和菌体混匀涂在 TSBY 平板上, 30 °C 静置培养 12–16 h 后, 用壮观霉素和 TMP (三甲氧苄氨嘧啶) 覆盖, 待平板吹干后, 30 °C 继续培养 2–3 d, 即可挑取接合子。

1.2.3 基因置换突变株的筛选及确认: 从接合转移平板上挑出的接合子在无抗 SFM 平板上松弛, 挑取单菌落分别在只含有壮观霉素抗性的 SFM 单抗平板和含有壮观霉素和硫链丝菌素的 SFM 双抗平板上对应划菌块。若双交换发生, 目的基因被成功置换的突变株会在单抗平板上生长, 在双抗平板上

表 3 本实验所用 PCR 引物 Table 3 PCR primers used in this study		
Primers	Forward (F) (5'→3')	Reverse (R) (5'→3')
blsA-tar	CGGTACGGCCCAGGTTTCAGCGCAGGAGGCA GCGACCGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	GGCCAGAGAGCCACTCAATTTGGGGAGCG CTGTCGATCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
blsA-con	TTCTTCCTTGCACCCTCGACCACGT	GGGCTCGGAGCCGGTCTGGCTCGGAT
blsB-tar	GTTGAACGCGTTTCTCCCTGCCCCGGAAGG GATTGTGATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	CCGCACCGGTATCCGAGGATCGCTGGGGT CGGAGGGCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
blsB-con	AAATTGAGTGGCTCTCTGGCCCACT	TCACTGAGGTAGCAGGTGCACCTTGA
blsC-tar	AGCGATCCTCGGATACCGGTGCGGGAGAA TATCCACATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	GCGCGCGGGAGATCGACCACCAGTGGCAG GACAGCGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
blsC-con	AATGGGAGGTTTCTCGGCGCCTGC	CCTCGTAGGTCCAGGCACGACTGGT
blsN-tar	GTTCCGCCCCGGCCGGGTGCTCCTGGATACT GGCTCAATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	TTCGCTCCGTAGGGCACGTTCCGTGCCGGA TGCCCCCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
blsN-con	TTCTCGTCCGCGGTCTCGGTACCGT	ACCGGTCAGGCGGTGTCCGCCTTCA
blsK-tar	GTGAAGGAGTTCCTCGCGGCCCCCGGGACCAC GCCGGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	CTGTCCTCCTCGGGACGGGAAGGAGGCTGA CGGCTGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
blsK-con	TGCAGTCCGCCACACCGATCCG	TCGCCGCCGATGCTCAAGGTCAC

不生长。挑取这样的菌落在 TSBY 中培养 48 h，提取总 DNA，用所敲除基因的验证引物进行 PCR 验证。根据目的基因与置换片段之间大小的差异可以看到基因置换突变株与野生型之间的不同，从而进一步确定基因置换是否发生。对于目的基因大小和置换片段大小相差不大的情况，可以对 PCR 产物进行酶切分析，从而确定基因置换前后片段之间的差别。

1.2.4 杀稻瘟菌素异源表达菌株及基因置换突变株的发酵及发酵液处理：挑取杀稻瘟菌素异源表达菌株或突变株的单菌落，接种于 30 mL 种子培养基中，在 30 °C 摇床(转速 220 r/min)中培养 2 d，取 3 mL 种子液转接到 30 mL 发酵培养基中，继续培养 6 d。将发酵液 6 000 r/min 离心 10 min，用草酸调节上清 pH 至 3.0 左右，有沉淀产生，再次离心，用阳离子交换柱(Supelclean LC-SCX，1 mL，Superco 公司)过滤上清，用 5%氨水洗脱组分至 Eppendorf 管中，45 °C 旋蒸 1 h 进行浓缩，所得样品供测定分析。

1.2.5 杀稻瘟菌素及其衍生化合物的 LC-MS 分析：检测所用高压液相色谱-质谱联用仪为安捷伦

公司的 Agilent 1100 series LC/MS D Trap system。反相柱：Agilent TC-C₁₈ (5 μm，4.6 mm × 250 mm)，流动相：A 相 10 mmol/L 三氯乙酸(Sigma 公司)；B 相：HPLC 级乙腈(Merck 公司)，A:B=(86:14，体积比)；流速为 0.3 mL/min，质谱检测为离子阱的正离子模式，喷雾器压力为 30 psi，干燥气流为 10 mL/min，干燥气温为 350 °C。

2 结果与分析

2003 年 Cone M. C.等对杀稻瘟菌素基因簇进行了测序和分析(图 1 和表 4)。他们认为，该基因簇包含 *blsS*–*blsN* 之间的基因，但缺乏实验证据。根据生物信息学分析结果，我们在此范围内研究该基因簇与 BS 生物合成的相关性，以精确确定 BS 生物合成基因簇的边界。

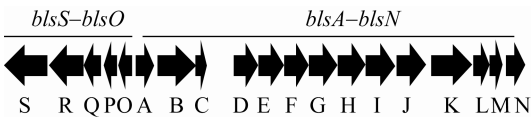


图 1 Cone M. C.等预测的杀稻瘟菌素生物合成基因簇的结构^[5]
Figure 1 Cone M. C.’s proposal of structure of BS biosynthetic gene cluster^[5]

表 4 杀稻瘟菌素生物合成基因簇的相关基因功能
Table 4 The function of genes in the biosynthetic gene cluster of blasticidin S

基因 Gene	编码产物 Encoded product	可能功能 Proposed function
<i>blsS</i>	GMC-type oxidoreductase	GMC 型氧化还原酶
<i>blsR</i>	Unknown	未知功能
<i>blsQ</i>	Transcriptional regulator, GntR family	转录调节因子
<i>blsP</i>	Putative integral membrane plasmid transfer protein	跨膜转运
<i>blsO</i>	Putative membrane protein	膜蛋白
<i>blsA</i>	SAM-dependent methyltransferase	SAM 依赖型甲基转移酶
<i>blsB</i>	Putative carboxylesterase	羧酸酯酶
<i>blsC</i>	Regulatory protein	调控蛋白
<i>blsD</i>	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase	UDP 葡萄糖/GDP 甘露糖脱氢酶
<i>blsE</i>	Unknown	未知功能
<i>blsF</i>	Transcriptional regulator	转录调节因子
<i>blsG</i>	Arginine 2,3-aminomutase	精氨酸变位酶
<i>blsH</i>	Aminotransferase	氨基转移酶
<i>blsI</i>	Ligase	连接酶
<i>blsJ</i>	Self-resistance; transporter	自我保护; 转运子
<i>blsK</i>	Unknown	未知功能
<i>blsL</i>	N-methyltransferase	N-甲基转移酶
<i>blsM</i>	CMP hydrolase	CMP 水解酶
<i>blsN</i>	Unknown	未知功能

2.1 杀稻瘟菌素基因簇边界的确定

我们分别对 *S. lividans* WJ2 中的 *blsN*、*blsC*、*blsB* 和 *blsA* 进行基因置换，得到了相应的突变株 DAQ2、DAQ1、DAQ4 和 DAQ3。利用 PCR 对野生型菌株 WJ2 和各突变株的总 DNA 进行验证，确定基因交换完成(图 2 中 a)；将各突变株和野生型菌株 WJ2 的单菌落接种于种子/发酵培养基中发酵，对发酵液进行处理之后，用 LC-MS 检测发酵产物(图 2 中 b)。

根据 Cone M. C.等对该基因簇结构的预测分析，*blsN* 是基因簇中的最后一个基因，但 DAQ2 的检测结果表明，*blsN* 基因的置换并没有影响杀稻瘟菌素的产生，因此 *blsN* 不是 BS 生物合成基因簇的基因。2006 年，Grochowski L. L.等已证明 *blsM*–*blsN* 的上游基因，所编码的蛋白负责水解 CMP 为胞嘧啶，为 BS 生物合成的起始反应提供底物，是 BS 基因簇的必需基因，由此可以确定 *blsN*

的上游基因——*blsM* 是杀稻瘟菌素的下游边界。

DAQ1 的检测结果表明，*blsC* 基因被置换之后，BS 仍然能够正常产生，说明该基因不是必需的。但由于生物信息学对 *blsC* 的功能预测是调控蛋白，可能本身就不会影响 BS 的产生，因此仅通过 *blsC* 的基因置换不能确定它是否为上游边界，但是从 DAQ4 和 DAQ3 的检测结果来看，*blsB* 和 *blsA* 基因置换突变株仍然能够产生 BS，而 *blsC* 的下游基因 *blsD*，其功能虽然没有经过体外证实，但它编码的蛋白与羟甲基化 CGA 合酶(MiIC)高度相似(46%一致性；56%相似性)，后者的体内、体外工作证实为米多霉素合成必需^[11]，因此通过这一结论以及 *blsC*、*blsB* 和 *blsA* 这 3 个连续基因的置换结果，可以证明杀稻瘟菌素基因簇的上游边界是 *blsD*。

至此我们确定了杀稻瘟菌素基因簇包含 *blsD*–*blsM* 共 10 个基因。

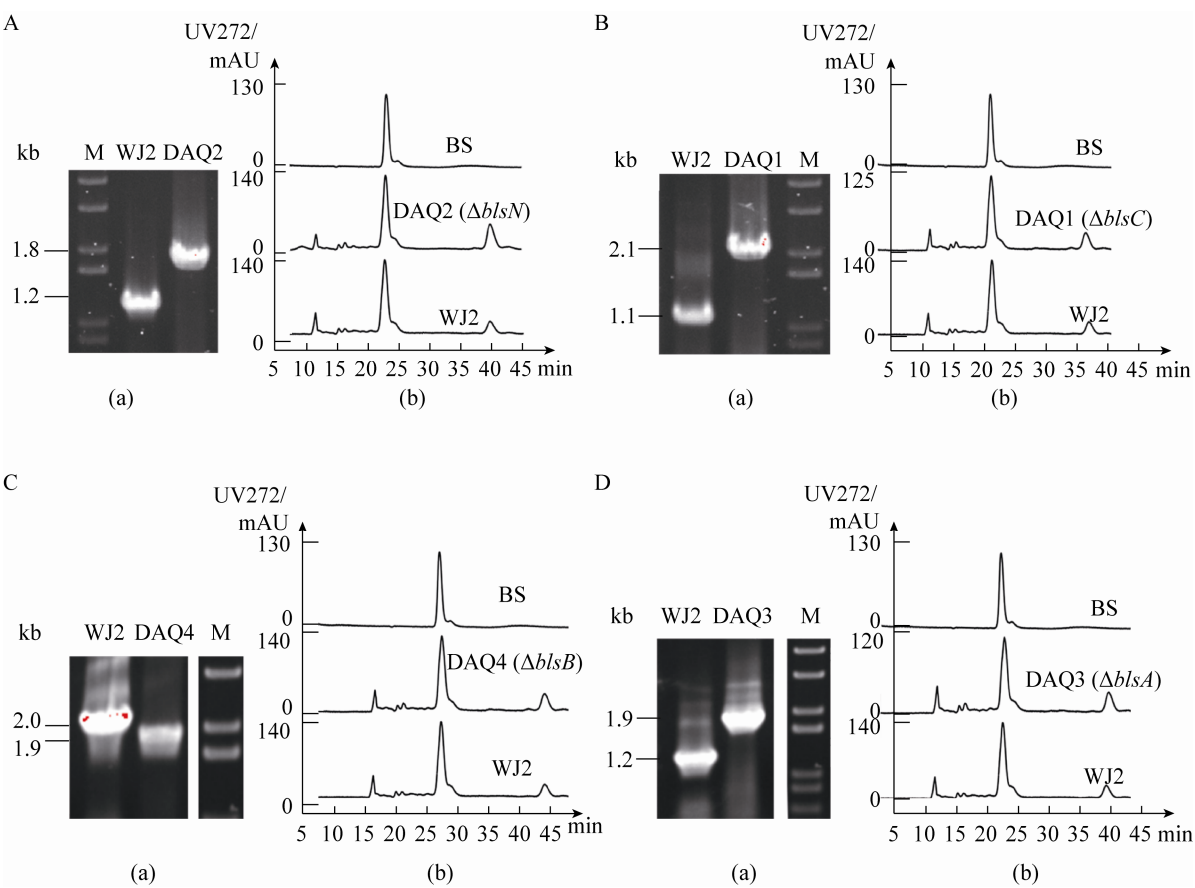


图 2 PCR 验证各突变株和 WJ2 及 LC-MS 对各突变株 DAQ2、DAQ1、DAQ4 和 DAQ3 的检测

Figure 2 Confirmation of mutant strains & WJ2 by PCR and LC-MS analysis of fermentation broth of DAQ2, DAQ1, DAQ4 and DAQ3

注：A：a：PCR 验证 *blsN* 的突变株 DAQ2 和 WJ2；b：LC-MS 对突变株 DAQ2 发酵液的检测。B：a：PCR 验证 *blsC* 的突变株 DAQ1 和 WJ2；b：LC-MS 对突变株 DAQ1 发酵液的检测。C：a：PCR 验证 *blsB* 的突变株 DAQ4 和 WJ2；b：LC-MS 对突变株 DAQ4 发酵液的检测。D：a：PCR 验证 *blsA* 的突变株 DAQ3 和 WJ2；b：LC-MS 对突变株 DAQ3 发酵液的检测。

Note: A: a: Confirmation of WJ2 and mutant strain DAQ2 of *blsN*; b: LC-MS analysis of fermentation broth of DAQ2. B: a: Confirmation of WJ2 and mutant strain DAQ1 of *blsC*; b: LC-MS analysis of fermentation broth of DAQ1. C: a: Confirmation of WJ2 and mutant strain DAQ4 of *blsB*. b: LC-MS analysis of fermentation broth of DAQ4. D: a: Confirmation of WJ2 and mutant strain DAQ3 of *blsA*; b: LC-MS analysis of fermentation broth of DAQ3.

2.2 杀稻瘟菌素基因簇内基因——*blsK* 的基因置换

在确定了杀稻瘟菌素基因簇的边界之后,我们对其中尚未研究过的 *blsK* 基因同样进行了基因置换。BlsK 蛋白功能未知,与 lysyl-tRNA 合成酶有 42% 的相似性。我们通过 PCR-targeting 方法构建

了基因置换质粒 pDAQ8,基因置换过程如图 3 所示。

将 pDAQ8 通过接合转移导入 WJ2 中,得到 *blsK* 的基因置换突变株 DAQ8,对 WJ2 和 DAQ8 的总 DNA 进行 PCR 验证,验证结果如图 4 所示。

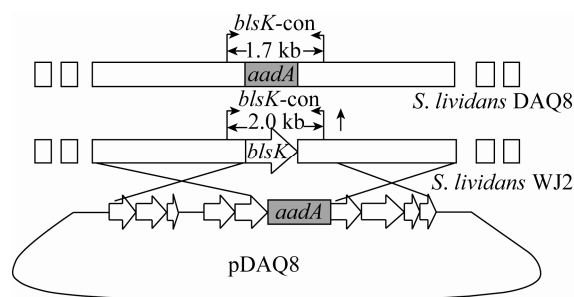


图3 图示通过基因置换用 *aadA* 抗性基因和 *oriT* 基因置换 *blsK* 得到突变株 DAQ8

Figure 3 Schematic representation of gene replacement of *blsK* with *aadA* & *oriT* cassette to produce *S. lividans* DAQ8

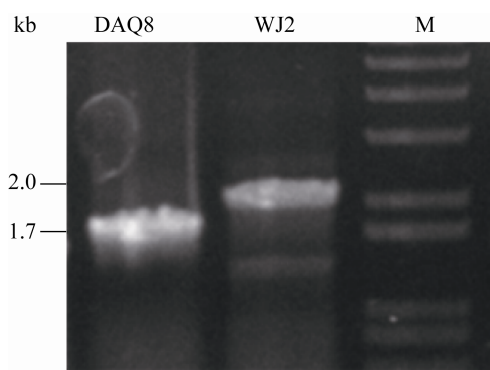


图4 用 PCR 的方法验证突变株 DAQ8

Figure 4 Confirmation of mutant DAQ8 by PCR with primers *blsK-con*

注: M: 1 kb marker; WJ2: 以 WJ2 的总 DNA 为模板, 以 *blsK-con* 为引物进行 PCR 得到的产物; DAQ8: 以 DAQ8 的总 DNA 为模板, 以 *blsK-con* 为引物进行 PCR 得到的产物。

Note: M: 1 kb marker; WJ2: PCR product with primers *blsK-con* using total DNA of WJ2 as template; DAQ8: PCR product with primers *blsK-con* using total DNA of DAQ8 as template.

将 WJ2 和 DAQ8 进行发酵, 检测发酵产物, 检测结果如图 5 所示。

从发酵检测结果来看, *blsK* 被置换后, 有一个新的次级代谢物产生, 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 409 $[M+H]^+$ 。经过二级质谱的碎片分析, 并且与之前文献报道的这一分子量相比较, 可以证明这是脱甲基杀稻瘟菌素; 除此之外, 在提取 m/z 423 $[M+H]^+$ 的离子流图时, 可以得到比较弱的峰, 即杀稻瘟菌素, 也就是说, *blsK* 基因被置换之后, 不仅积累去甲基杀稻瘟菌素, 而且还有少量杀稻瘟菌素继续产生。

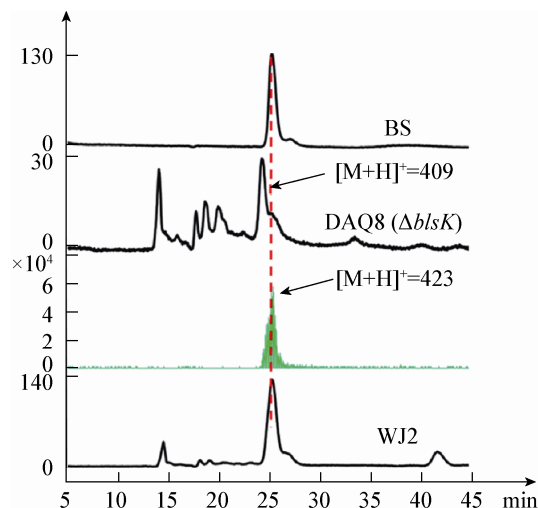


图5 LC-MS 对 DAQ8 的发酵产物的检测

Figure 5 LC-MS analysis of fermentation broth of *S. lividans* DAQ8

注: BS: 杀稻瘟菌素标准品; DAQ8: DAQ8 在种子/发酵培养基中的发酵结果; WJ2: 在种子/发酵培养基中的发酵结果。

Note: BS: Standard sample of blasticidin S; DAQ8: Purified fermentation broth of *S. lividans* DAQ8 with seed/fermentation medium; WJ2: Purified fermentation broth of *S. lividans* WJ2 with seed/fermentation medium.

3 讨论

确定了杀稻瘟菌素基因簇包含 *blsD-blzM* 共 10 个基因, 为杀稻瘟菌素生物合成途径的推导提供可靠的依据。在 *blsK* 的基因置换突变株中, 既有去甲基杀稻瘟菌素的合成, 又有少量杀稻瘟菌素的生成, 这一实验结果给我们以下两方面的启示。一方面根据 Cone M. C. 等推导的生物合成途径^[5] (图 6), 去甲基杀稻瘟菌素 (Demethylblasticidin S, DBS) 与亮氨酸反应生成亮氨酸酰化的脱甲基 (Leucyldemethylblasticidin S, LDBS), 在 *blsK* 基因被置换后, 突变株中大量积累 DBS, 说明 *BlsK* 可能负责该步反应, 即 *BlsK* 的功能是将亮氨酸加载到 DBS 上精氨酸衍生的侧链的 Beta 位氨基上。另一方面少量 BS 的生成使我们推测 BS 的生物合成途径可能有两条。1991 年, Guo J. 等^[12] 利用 *S. griseochromogenes* 的无细胞提取物与 DBS 反应得到了 BS, 说明 DBS 可以在某种酶的作用下直接转

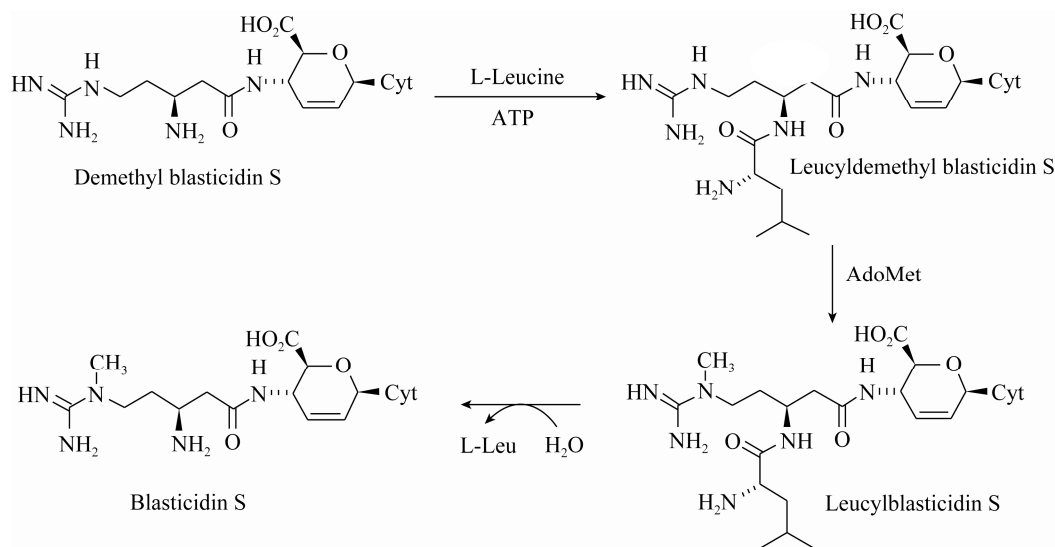


图6 Cone 推导的 BS 生物合成途径
Figure 6 Cone's proposal for the biosynthesis of BS

化为 BS；而 2003 年，在 Cone M. C. 等推导的生物合成途径中，他们认为 BS 是先由 DBS，转化为 LDBS 继而由 LDBS 甲基化而生成的；但是通过我们 *blsK* 突变株的结果可以说明 BS 主要是由 DBS-LDBS-BS 途径合成，同时也可由少量 DBS 直接甲基化而生成，两种途径同时存在，这样也就解释了之前文献中存在的矛盾，更增加了我们对 BS 生物合成途径的认识。

参考文献

- [1] Takeuchi S, Hirayama K, Ueda K, et al. Blasticidin S, a new antibiotic[J]. The Journal of Antibiotics, 1958, 11(1): 1-5.
- [2] Kimura M, Kamakura T, Tao QZ, et al. Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 242(2): 121-129.
- [3] Seto H, Yamaguchi I, Otake N, et al. Studies on the biosynthesis of blasticidin S. Part I. precursors of blasticidin s biosynthesis[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1968(32): 1292-1298.
- [4] Cone MC, Petrich AK, Gould SJ, et al. Cloning and heterologous expression of blasticidin S biosynthetic genes from *Streptomyces griseochromogenes*[J]. The Journal of Antibiotics, 1998, 51(6): 570-578.
- [5] Cone MC, Yin X, Grochowski LL, et al. The blasticidin S biosynthesis gene cluster from *Streptomyces griseochromogenes*: sequence analysis, organization, and initial characterization[J]. ChemBioChem, 2003, 4(9): 821-828.
- [6] Grochowski LL, Zabriskie TM. Characterization of BlsM, a nucleotide hydrolase involved in cytosine production for the biosynthesis of blasticidin S[J]. ChemBioChem, 2006, 7(6): 957-964.
- [7] Feng J, Wu J, Dai N, et al. Discovery and characterization of BlsE, a radical S-adenosyl-L-methionine decarboxylase involved in the blasticidin S biosynthetic pathway[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68545.
- [8] Li L, Wu J, Deng Z, et al. *Streptomyces lividans* blasticidin S deaminase and its application in engineering a blasticidin S-producing strain for ease of genetic manipulation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2349-2357.
- [9] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, et al. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor ζ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(1): 204-211.
- [10] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [11] Li L, Xu Z, Xu X, et al. The mildiomycin biosynthesis: initial steps for sequential generation of 5-hydroxymethylcytidine 5'-monophosphate and 5-hydroxymethylcytosine in *Streptovericillium rimofaciens* ZJU5119[J]. ChemBioChem, 2008, 9(8): 1286-1294.
- [12] Guo J, Gould SJ. Biosynthesis of blasticidin S. Cell-free demonstration of N-methylation as the last step[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1991, 1(10): 497-500.