

## 多氧霉素及其生物合成的研究进展

王季季<sup>1</sup> 邓子新<sup>1,2</sup> 陈文青<sup>1\*</sup>

(1. 武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现(教育部)重点实验室 湖北 武汉 430071)

(2. 上海交通大学生命科学与生物技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200030)

**摘要:** 多氧霉素(Polyoxins)是高效广谱抗真菌核苷类抗生素, 在农业上广泛用于防治植物真菌病害。本文综述了多氧霉素化学结构和理化性质, 尤其是武汉大学组合生物合成与新药发现(教育部)重点实验室近年来在该抗生素生物合成基因簇的克隆、生物合成途径的阐明以及多氧霉素组合生物合成等多个方面的研究进展与成果, 并对今后以多氧霉素为代表的核苷类抗生素的生物合成研究进行了展望。

**关键词:** 多氧霉素, 核苷类抗生素, 生物合成途径, 组合生物合成

## Research progress on polyoxins and its biosynthesis

WANG Ji-Ji<sup>1</sup> DENG Zi-Xin<sup>1,2</sup> CHEN Wen-Qing<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug discovery, Ministry of Education, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

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

**Abstract:** Polyoxin is a high effective and broad-spectrum antifungal peptidyl nucleoside antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis, as a result, it was used extensively to control phytopathogenic fungi in agriculture. This review summarized the research progress on the chemical structure and physical and chemical properties of this antibiotic, and particularly described recent advance of our lab on the cloning and elucidation of the polyoxin biosynthetic pathway, as well as the combinatorial biosynthesis of this antibiotic. Simultaneously, we also take a brief perspective on the studies on nucleoside antibiotics biosynthesis.

**Keywords:** Polyoxins, Nucleoside antibiotic, Biosynthetic pathway, Combinatorial biosynthesis

1965年 Suzuki 等在系统筛选防治作物真菌病害的抗生素时, 在日本熊本县阿苏地区分离发现一株链霉菌, 其发酵液对水稻纹枯病有良好的防治效果<sup>[1]</sup>。进一步研究发现该生物活性物质为多氧霉素(Polyoxins), 由可可链霉菌阿苏变种

(*Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*)产生, 属肽基核苷类抗生素<sup>[1]</sup>。由于多氧霉素对农作物、果蔬及一些经济植物真菌病害有良好的防治作用, 加之其对环境友好, 便在农业生产上大规模推广使用<sup>[2]</sup>。之后 Isono 等发现 *Streptomyces pimogenus* 也

\*Corresponding author: E-mail: wqchen@whu.edu.cn

Received: April 01, 2015; Accepted: May 19, 2015; Published online (www.cnki.net): June 02, 2015

\*通讯作者: E-mail: wqchen@whu.edu.cn

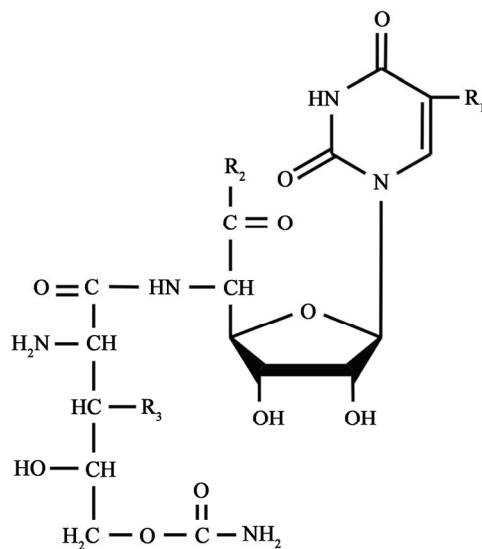
收稿日期: 2015-04-01; 接受日期: 2015-05-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-02

产生多氧霉素<sup>[3]</sup>, 而国内于 1967 年在合肥郊区一菜园土壤中也分离到一株多氧霉素(国内称为多抗霉素)产生菌, 命名为金产色链霉菌(*S. aureochromogenes*), 之后也大规模使用于农业生产<sup>[4]</sup>。多氧霉素对稻瘟病、烟草赤星病、人参黑斑病以及苹果斑点落叶病等具有良好防治效果, 尽管早在 1973 年就在日本发现了多氧霉素耐药性菌株<sup>[5]</sup>, 但迄今为止, 多氧霉素仍是适用范围最广、开发最成功的重要农用抗生素之一。

多氧霉素是广谱抗真菌抗生素, 其作用机制是作为 UDP-N-乙酰葡萄糖胺的竞争性抑制剂, 与几丁质的活性中心相结合, 从而抑制细胞壁的合成, 导致细胞形成原生质体, 并因胞内外渗透压差异而裂解<sup>[6-7]</sup>。多氧霉素属低毒性抗生素, 研究显示其对小鼠、鱼类及水生生物安全<sup>[8-9]</sup>。

## 1 多氧霉素的化学结构与理化性质

早期研究发现多氧霉素由结构相关的 13 个组分(Polyoxin A-M)组成, 在后续研究中又发现了 Polyoxin N<sup>[10]</sup>、Polyoxin O、Polyoxin P 等组分<sup>[11]</sup>,



其化学结构主要由三部分构成, 分别为: 聚脲酸(Polyoximic acid, POIA)、氨甲酰多聚草氨酸(Carbamoylpolyoxamic acid, CPOAA)以及核苷骨架(Nucleoside skeleton), 其中核苷骨架具有 C-5 修饰基团<sup>[2]</sup>(图 1)。

多氧霉素为弱碱性抗生素, 易溶于水不溶于有机溶剂, 在碱性环境下不稳定故不能与弱碱性农药混用; 多氧霉素有  $\alpha$ -氨基, 故其茚三酮反应呈阳性; 多氧霉素都有核苷骨架, 因此最大吸收波长都在 260 nm 左右; 多氧霉素有良好的热稳定性, 温度高于 180 °C 时降解<sup>[8-9]</sup>。

## 2 多氧霉素生物合成基因簇的克隆与生物合成途径的研究

尼可霉素(Nikkomycin)和多氧霉素的核苷骨架相似<sup>[2]</sup>, 推断二者拥有相似的生物合成途径, 而尼可霉素的生物合成基因簇<sup>[12]</sup>已被成功克隆, 于是利用其核苷骨架的相关生物合成基因为探针来克隆得到多氧霉素生物合成基因簇<sup>[13]</sup>(图 2)。陈文青等以尼可霉素生物合成基因 *nikO* 出发, 通过 PCR 扩

Polyoxins	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
A	CH <sub>2</sub> OH		OH
B	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH
D	COOH	OH	OH
E	COOH	OH	H
F	COOH		OH
G	CH <sub>2</sub> OH	OH	H
H	CH <sub>3</sub>		OH
J	CH <sub>3</sub>	OH	OH
K	H		OH
L	H	OH	OH
M	H	OH	H
P	CH <sub>3</sub>	OH	H

图 1 多氧霉素的化学结构

Figure 1 Chemical structures of polyoxins

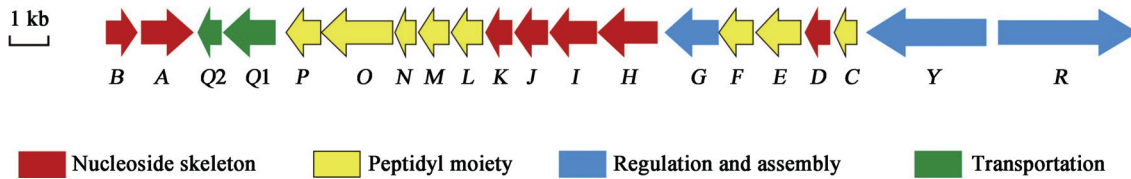


图 2 多氧霉素生物合成基因簇的遗传结构

Figure 2 Genetic organization of the polyoxin biosynthetic cluster

增到探针, 进而从 *S. cacaoi* 基因组文库中克隆到多氧霉素的完整生物合成基因簇, 同时对阳性 Cosmid 5A7 进行改造, 实现多氧霉素在异源宿主 *S. lividans* TK24 中的工程化产生<sup>[13]</sup>。

多氧霉素生物合成基因簇包含 39 个 ORF, 由 13 个结构基因, 2 个调控基因, 2 个膜蛋白相关基因及 3 个功能未确定的基因组成<sup>[13]</sup>(图 2)。主要基因的相关功能如下: *polA* (烯醇式丙酮酰转移酶), *polB* (胸苷酸合酶), *polC* (羟化酶), *polE* (假设蛋白), *polF* (氧化还原酶), *polM* (短链脱氢酶), *polN* (基酸-N-乙酰转移酶), *polP* (N-乙酰谷氨酸激酶), *polO* (氨甲酰转移酶)和 *polL* (未知功能蛋白), *polG* (ATP 依赖的酰胺合成酶), *polQ1*, *polQ2* (膜蛋白), *polR* (具有 ATP 活性的正调控基因)<sup>[14]</sup>, *polY* (调控 *polR* 的转录的正调控基因)<sup>[15]</sup>(图 2)。多氧霉素生物合成基因簇中的两个调控元件, *PolY* 属于 AfsR 家族, *PolR* 属于 SARP 家族, 且只有 *PolY* 中含有 ATPase 结构域。 *polY* 转录直接激活 *polR* 的转录, *PolY* 蛋白 ATPase 结构域不仅具有 ATP 酶活性, 它还可以通过感受细胞内 ADP/ATP 浓度变化调整 *PolY* 的活性, 进而影响靶基因转录<sup>[14-15]</sup>。

多氧霉素的 3 个构造单元(聚肼酸、氨甲酰多聚草氨酸与核苷骨架)独立合成。聚肼酸 (Polyoximic acid, POIA)的生物合成由 *PolF*、*PolC*、*PolE* 三个蛋白负责<sup>[13]</sup>。L-异亮氨酸先脱氢形成  $\beta,\gamma$  双键, 再经过一系列的中间催化并且激活, 最后环化形成聚肼酸(图 3)。其中 L-异亮氨酸的脱氢反应为反式消除。氨甲酰多聚草氨酸 (Carbamoylpolyoxamic acid, CPOAA)的生物合成由 *PolM*、*PolN*、*PolP*、*PolO*、*PolL* 五个蛋白参与<sup>[16]</sup>。

其合成过程推断为: 谷氨酸经过催化生成谷氨酸半醛, 再经过还原、氨甲酰化及氧化, 最终形成氨甲酰多聚草氨酸(图 3)。核苷骨架的生物合成途径推断为: 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)加载到 C-5' 上形成中间产物, 然后氧化消除脱去末端的 2 个碳原子, 最后通过转氨反应形成尿嘧啶氨基己糖醛酸即多氧霉素的核苷骨架<sup>[17]</sup>(图 3)。

研究显示, 参与多氧霉素核苷骨架 C-5 甲基的羟化和羧化基因与多氧霉素基因簇并不连锁, 并且该基因在链霉菌中非广泛存在, 研究证明阿维链霉菌(图 3) (*Streptomyces avermitilis*)中的 ORFsav-4805 是胸腺嘧啶羟化酶, 可以负责或者协助负责多氧霉素核苷骨架 C-5 甲基的羟化和羧化<sup>[18]</sup>, 揭示出多氧霉素生物合成途径与初级代谢途径间存在交叉对话。本课题组在此研究基础上通过同框缺失目标基因和异源表达策略以及蛋白的体外生化反应进一步验证 sav-4805 的这一功能, 目前该研究还在进行中。

### 3 多氧霉素的组合生物合成研究进展

尼可霉素和多氧霉素是核苷类抗生素的典型代表, 都是几丁质合成酶抑制剂<sup>[19]</sup>。二者相同点: 都是由一个核苷骨架与一个或两个肽基组合而成。不同点: 两者的核苷骨架、肽基化学结构有一定差异。尼可霉素的肽基部分是羟基吡啶同型苏氨酸 (Hydroxy pyridyl homo threonine, HPHT)<sup>[20]</sup>, 而多氧霉素的肽基部分是氨甲酰多聚草氨酸 (Carbamoyl polyoxamic acid, CPOAA)。与尼可霉素不同, 多氧霉素有 C-5 修饰基团: 甲基、羟甲基和羧基。除此之外, 尼可霉素的核苷骨架上的碱基除了是尿嘧啶

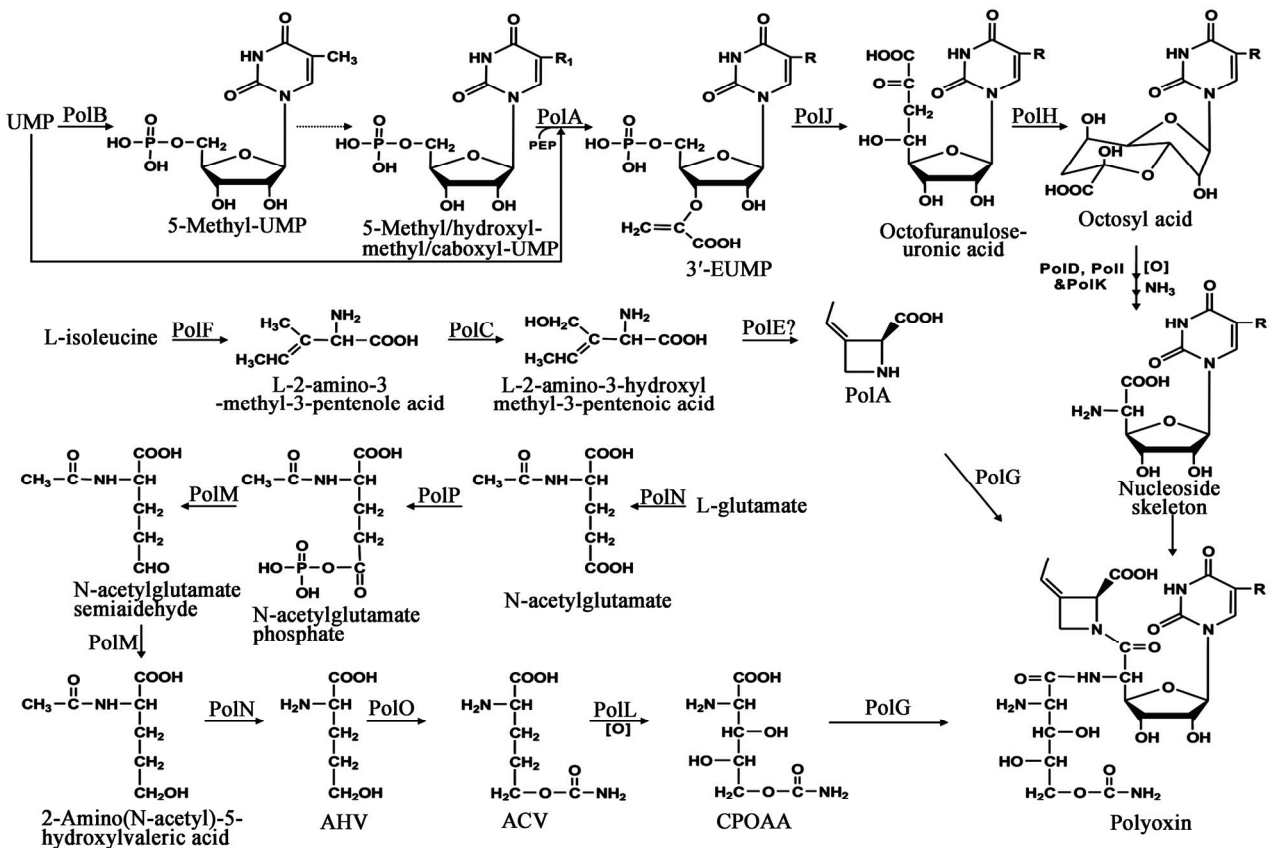


图3 推断的多氧霉素生物合成途径

Figure 3 Proposed pathway for polyoxins biosynthesis

以外，还可以是 4-甲酰-4-咪唑-2-酮。

基于尼可霉素和多氧霉素在结构上的相似性以及基因簇上的同源性，将两个基因簇融合可以得到杂合抗生素，在多氧霉素和尼可霉素组合生物合成的研究中，有以下两种方式：一种是通过特定尼可霉素生物合成基因进行敲除，突变后的 Cosmid 接合转移入改造过的多氧霉素工业菌株中进行异源表达，通过对抗生素产生菌的生物合成通路进行改造，先后得到了以下杂合抗生素：Polyoxin N、Polynik A<sup>[11,21]</sup>与 Nikkomycin A-D<sup>[22]</sup>(图 4)(Nikkoxin A 实为 Polyoxin N)。其中 Polynik A 是最早通过组合生物合成方法合成的多氧霉素与尼可霉素的杂合抗生素之一<sup>[21]</sup>，它具有比 Polyoxin B 更好的抑菌活性，在不同 pH 和温度条件下比 Nikkomycin X 更稳定。Nikkoxin D 的抗菌活性对

比天然抗生素有显著提高，具有潜在临床开发价值。另一种是将多氧霉素生物合成相关基因导入尼可霉素产生菌的突变株中得到杂合抗生素进行异源表达，从而产生杂合抗生素。本课题组在此研究的基础上进一步深入研究，得到了另外 3 个杂合抗生素：Nikkoxin E-G<sup>[23]</sup>(图 4)。

#### 4 总结与展望

多氧霉素是一种抑制真菌细胞壁几丁质生物合成的广谱抗真菌的核苷类抗生素。对稻瘟病、烟草赤星病、人参黑斑病以及苹果斑点落叶病等具有良好防治效果，迄今为止，多氧霉素仍是使用范围最广、开发最成功的重要农用抗生素之一。长期以来，科学家们因为多氧霉素广谱抗真菌且对人畜及环境安全的特点，对多氧霉素的生物合成具有浓厚兴趣。近年来，随着分子生物学技术的快速



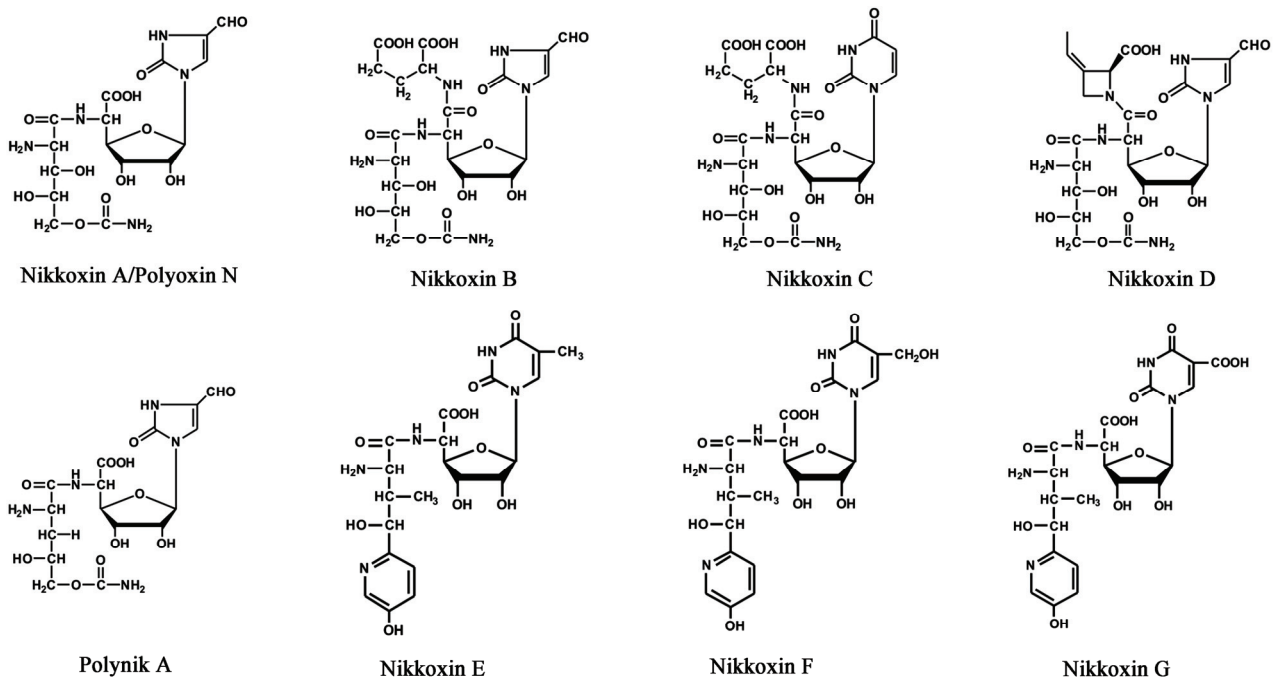


图4 多氧霉素与尼可霉素的杂合抗生素  
Figure 4 Hybrid antibiotics of polyoxin and nikkomyacin

发展以及代谢工程策略的运用, 国内外科工作者们对于多氧霉素及其生物合成有了更加深刻的认识。除了对其化学结构和理化性质、作用机制与生物活性的了解, 更通过克隆多氧霉素生物合成基因簇而对其生物合成途径进行了修正和完善, 在多氧霉素生物合成机理研究领域获得突破。与此同时, 运用合成生物学的策略, 通过两个抗生素的基因簇重组, 人工设计改造抗生素生物合成通路以得到高产量、单一组分, 形成了改造天然产物的一条有效途径。此外, 以多氧霉素的工业菌株作为底盘细胞, 得到尼可霉素有效组分的高产产物, 使得这项研究具有巨大的产业化价值。多氧霉素生物合成途径的研究和定向改造以及组合生物合成的付诸实践不仅可以提升我国多氧霉素的产业化技术水平, 也为其他抗生素的研究提供了范例。

## 参考文献

- [1] Suzuki S, Isono K, Nagatsu J, et al. A new antibiotic, polyoxin A[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1965, 18: 131
- [2] Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(12): 1711-1739
- [3] Isono K, Suzuki S, Sawazaki T, et al. An antibiotic produced by *Streptomyces chromogenus* sp.[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1955, 8(1): 19-21
- [4] Shen YC. Research and development situation of agricultural antibiotics at home and abroad[J]. *Journal of Antibiotics*, 1981, 6(2): 57-64,48 (in Chinese)  
沈寅初. 国内外农用抗生素研究和发展概况[J]. *抗生素*, 1981, 6(2): 57-64,48
- [5] Hori M, Eguchi J, Kakiki K, et al. Studies on the mode of action of polyoxins. VI. Effect of polyoxin B on chitin synthesis in polyoxin-sensitive and resistant strains of *Alternaria kikuchiana*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1974, 27(4): 260-266
- [6] Endo A, Kakiki K, Misato T. Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D[J]. *Journal of Bacteriology*, 1970, 104(1): 189-196
- [7] Endo A, Misato T. Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1969, 37(4): 718-722
- [8] Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y, et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics: Part I. Isolation and characterization of Polyoxins A and B[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1965, 29(9): 848-854
- [9] Isono K, Nagatsu J, Kobinata K, et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics: Part V. Isolation and characterization of Polyoxins C, D, E, F, G, H and I[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1967, 31(2): 190-199
- [10] Uramoto M, Uzawa J, Suzuki S, et al. Isolation and structure of polyoxin N[J]. *Nucleic Acids Research*, 1978, 1(Suppl 2): s327-s332
- [11] Li JN, Li L, Feng C, et al. Novel polyoxins generated by heterologously expressing polyoxin biosynthetic gene cluster in the *sanN* inactivated mutant of *Streptomyces ansochromogenes*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 135

- [12] Bormann C, Möhrle V, Bruntner C. Cloning and heterologous expression of the entire set of structural genes for nikkomycin synthesis from *Streptomyces tendae* Tü901 in *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178: 1216-1218
- [13] Chen WQ, Huang TT, He XY, et al. Characterization of the polyoxin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cacaoi* and engineered production of polyoxin H[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(16): 10627-10638
- [14] Li R, Xie Z, Tian Y, et al. *polR*, a pathway-specific transcriptional regulatory gene, positively controls polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi* subsp. *asoensis*[J]. Microbiology, 2009, 155(6): 1819-1831
- [15] Li R, Liu G, Xie ZJ, et al. *PolY*, a transcriptional regulator with ATPase activity, directly activates transcription of *polR* in polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 75(2): 349-364
- [16] Chen WQ, Dai DF, Wang CC, et al. Genetic dissection of the polyoxin building block-carbamoylpolyoxamic acid biosynthesis revealing the “pathway redundancy” in metabolic networks[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 121
- [17] Isono K, Sato T, Hirasawa K, et al. Biosynthesis of the nucleoside skeleton of polyoxins[J]. Journal of the American Chemical Society, 1978, 100(12): 3937-3939
- [18] Zhao CM, Huang TT, Chen WQ, et al. Enhancement of the diversity of polyoxins by a thymine-7-hydroxylase homolog outside the polyoxin biosynthesis gene cluster[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 7343-7347
- [19] Müller H, Furter R, Zähler H, et al. Effect of nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A on chitosomal chitin synthetase[J]. Archives of Microbiology, 1981, 130(3): 195-197
- [20] Bruntner C, Lauer B, Schwarz W, et al. Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin[J]. Molecular and General Genetics, 1999, 262(1): 102-114
- [21] Li JN, Li L, Tian YQ, et al. Hybrid antibiotics with the nikkomycin nucleoside and polyoxin peptidyl moieties[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(3): 336-344
- [22] Zhai LP, Lin SJ, Qu DJ, et al. Engineering of an industrial polyoxin producer for the rational production of hybrid peptidyl nucleoside antibiotics[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 388-393
- [23] Qi J, Liu J, Wan D, et al. Metabolic engineering of an industrial polyoxin producer for the targeted overproduction of designer nucleoside antibiotics[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015. DOI: 10.1002/bit.25594

## 编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码;

