

研究报告

一个甲基转移酶基因 *lomo3* 在洛蒙真菌素生物合成途径中的功能

盛超兰 王威* 胡洪波 彭华松 张雪洪

(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 200240)

摘要:【目的】洛蒙真菌素是在洛蒙德链霉菌(*Streptomyces lomondensis*)中生物合成的一种具有广谱抑菌活性的吩嗪类抗生素,但其合成机理仍不清晰。在洛蒙德链霉菌 S015 的洛蒙真菌素生物合成核心基因簇下游,有一甲基转移酶基因——*lomo3*,研究该基因对洛蒙真菌素生物合成的影响。【方法】对 *lomo3* 基因进行无痕敲除得到基因缺失突变株 S015Δ*lomo3*,再过表达重组质粒构建回补突变株 S015Δ*lomo3*::*lomo3*,比较两株突变株与野生型 S015 的发酵产物的变化。【结果】发现基因缺失菌株 S015Δ*lomo3* 不能合成洛蒙真菌素,而基因回补菌株 S015Δ*lomo3*::*lomo3* 则可恢复洛蒙真菌素的合成能力。【结论】甲基转移酶基因 *lomo3* 在洛蒙真菌素生物合成过程中起着重要的作用,但该基因的具体功能还有待深入研究。研究对于阐明洛蒙真菌素的生物合成途径具有一定的指导作用。

关键词: 洛蒙德链霉菌 S015, 洛蒙真菌素, 吩嗪类化合物, 甲基转移酶基因

Function of a methyltransferase gene *lomo3* involved in the biosynthesis of lomofungin

SHENG Chao-Lan WANG Wei* HU Hong-Bo PENG Hua-Song ZHANG Xue-Hong

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] Lomofungin is a phenazine antibiotic with broad-spectrum anti-bacterial activity and is biosynthesized by *Streptomyces lomondensis*. In the lomofungin producing strain, *S. lomondensis* S015, a methyltransferase gene *lomo3* at the downstream of the phenazine biosynthesis core gene cluster was studied. [Methods] We inactivated *lomo3* by in-frame partial deletion and obtained strain S015Δ*lomo3*. Complementary strain S015Δ*lomo3*::*lomo3* was then constructed. To investigate the function of *lomo3*, we analyzed the metabolites in the fermentation broth of S015,

Foundation item: National High Technology Research and Development Program of China (No. 2012AA022107); National Natural Science Foundation of China (No. 20706037); National Basic Research Program of China (No. 2012CB721005)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-34207047; E-mail: weiwang100@sjtu.edu.cn

Received: June 09, 2015; **Accepted:** August 26, 2015; **Published online** (www.cnki.net): October 30, 2015

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA022107); 国家自然科学基金项目(No. 20706037); 国家 973 计划项目(No. 2012CB721005)

***通讯作者:** Tel: 86-21-34207047; E-mail: weiwang100@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-06-09; **接受日期:** 2015-08-26; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-10-30

S015 Δ *lomo3* and S015 Δ *lomo3::lomo3*. **[Results]** Inactivation of *lomo3* in *S. lomondensis* S015 resulted in the absence of lomofungin production. The *lomo3* complementary strain S015 Δ *lomo3::lomo3* regained the biosynthesis of lomofungin. **[Conclusion]** This methyltransferase gene *lomo3* plays an important role in the biosynthesis of lomofungin. The information obtained in this study laid a theoretical foundation for the biosynthesis of lomofungin.

Keywords: *Streptomyces lomondensis* S015, Lomofungin, Phenazine compounds, Methyltransferase gene

吩嗪是一类含氮杂环化合物,由两个苯环和一个吡嗪环形成对称的稠环结构。吩嗪类化合物是含有吩嗪结构的一类化合物的总称,以吩嗪环为核心,经过羟基、羧基、甲基等不同的功能基团修饰,形成具有抗菌、抗肿瘤、抗疟疾以及抗寄生虫等不同生物活性的吩嗪衍生物^[1]。

天然吩嗪类化合物主要由假单胞菌、链霉菌以及部分海洋菌属等合成。已报道的由假单胞菌产生的吩嗪类化合物主要有吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、1-羟基吩嗪(1-Hydroxy-phenazine, 1-OH-Phz)、吩嗪-1-甲酰胺(Phenazine-1-carboxamide, PCN)、绿脓菌素(Pyocyanin)等^[2]。与假单胞菌相比,链霉菌不仅能够产生一些结构比较简单的吩嗪类化合物,如PCA、吩嗪-1,6-二羧酸(Phenazine-1,6-dicarboxylic acid, PDC)等^[3],还能合成一些结构更为复杂的,如吩嗪环上含有酯基、醛基、氨基、硫醚基等取代基的吩嗪类化合物^[4]。

研究表明,假单胞菌中的吩嗪类化合物生物合成的前体是PCA,而链霉菌除了PCA,还可以PDC为前体生物合成不同的吩嗪类化合物^[5]。PCA和PDC主要来源于莽草酸途径,其生物合成一般是由7个基因——*phzABCDEFG*组成的核心基因簇完成的^[6],该核心基因簇在假单胞菌和链霉菌中都有发现。前体合成之后,通过不同的侧链修饰途径形成不同的吩嗪类化合物。假单胞菌中的修饰途径研究的比较多,如在铜绿色假单胞菌PAO1(*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)中,甲基转移酶PhzM催化PCA生成5-甲基吩嗪-1-羧酸甜菜碱(5-Methylphenazine-1-carboxylic acid betaine),水杨

酸羟化酶PhzS单独作用时可催化PCA转化为1-OH-Phz,天冬酰胺合成酶PhzH催化PCA转化为PCN^[7]。关于链霉菌中吩嗪类化合物生物合成的修饰基因和修饰途径的研究还很少。

洛蒙真菌素是由洛蒙德链霉菌(*Streptomyces lomondensis*)合成的一种吩嗪类次级代谢产物,由美国Upjohn公司的Bergy博士等分离得到。洛蒙真菌素呈橄榄黄色,其化学结构为6-醛基-4,7,9-三羟基-吩嗪-1-甲酸酯,能够抑制多种革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌生长,还具有抑制真菌的特性,是一种广谱抗生素^[8]。

洛蒙德链霉菌S015(*S. lomondensis* S015)是本实验室从土壤中分离得到的,我们在该菌株的发酵产物中纯化鉴定到了洛蒙真菌素^[9]。通过对S015的全基因组测序分析,在其基因组中找到了由*phzGFEDCB*组成的吩嗪类化合物生物合成核心基因簇,并在此基因簇附近,发现了一个甲基转移酶基因——*lomo3*(NCBI: KP721214.1),如图1所示^[10]。根据洛蒙真菌素的侧链结构,我们推测此基因可能参与了其C-1位的甲酯化反应。本文通过无痕敲除的方法,研究了该基因对洛蒙真菌素生物合成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 工具酶: DNA聚合酶*rTaq*(生化试剂),*Xba*I、*Hind*III、*Bgl*II、*Nde*I限制性内切酶(生化试剂),Solution I DNA连接酶试剂盒,均购自日本TaKaRa公司;KOD-201高保真酶(生化试剂),购自上海硕盟有限公司。

1.1.2 培养基: LB培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵

母提取物 5, NaCl 10, 固体加琼脂 15; MS 培养基(g/L): 黄豆饼粉 30, 加水煮沸后过滤, 加甘露醇 20, 琼脂 20; 2×YT 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 5; 1.0×10^5 Pa, 20 min 高温灭菌。YEME 培养基(g/L): 葡萄糖 4, 麦芽提取物 10, 酵母提取物 4; 0.68×10^5 Pa 高温灭菌 20 min。

1.1.3 菌株和质粒：所用菌株及质粒信息见表 1。

1.1.4 引物：所用引物及具体信息见表 2。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株培养：洛蒙德链霉菌 S015 及其突变株的培养条件为 28 °C、180 r/min。MS 培养基用于产孢培养和固体种子培养；YEME 培养基用于液体种

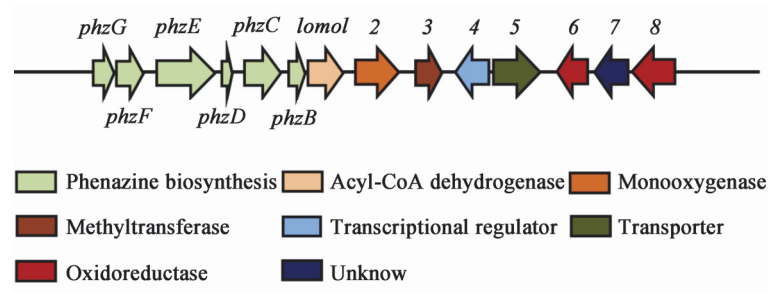


图 1 洛蒙真菌素生物合成基因簇^[10]
Figure 1 Biosynthesis gene cluster of lomofungin^[10]

表 1 菌株和质粒 Table 1 Strains and plasmids used in this study		
菌株或质粒 Strains and plasmids	特点 Characteristics	来源 Reference
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	克隆宿主	TranGen Boitech
ET12567 (pUZ8002)	接合转移供体菌, Km ^R , Cm ^R	MacNeil 等 ^[11]
<i>Streptomyces lomondensis</i>		
S015	野生型	本实验室保存
S015Δ <i>lomo3</i>	<i>lomo3</i> 基因敲除突变株	本实验室保存
S015Δ <i>lomo3</i> :: <i>lomo3</i>	<i>lomo3</i> 基因回补菌株, Apr ^R	本实验室保存
Plasmids		
pKC1139	大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒, 温控型, Apr ^R	Bierman 等 ^[12]
pIB139	链霉菌整合型质粒, 包含强启动子 <i>PerME*</i> , Apr ^R	Wilkinson 等 ^[13]
pMD19-T vector	克隆载体, Am ^R	TaKaRa
pCC701	<i>lomo3</i> 基因同源左臂连接在 pMD19-T 载体上, Am ^R	本实验室保存
pCC702	<i>lomo3</i> 基因同源右臂连接在 pMD19-T 载体上, Am ^R	本实验室保存
pCC703	<i>lomo3</i> 基因左右同源臂拼接在 pMD19-T 载体上, Am ^R	本实验室保存
pKC1139- <i>lomo3</i>	<i>lomo3</i> 基因左右同源臂重组连接在 pKC1139-T 载体上, 用于 <i>lomo3</i> 基因同框缺失, Apr ^R	本实验室保存
pCC704	<i>lomo3</i> 完整基因片段连接在 pMD19-T 载体上, Am ^R	本实验室保存
pIB139- <i>lomo3</i>	<i>lomo3</i> 完整基因片段连接在 pIB139 载体上, 回补载体, Apr ^R	本实验室保存

表 2 PCR 引物及其序列
Table 2 PCR primers and sequences

引物 Primers	碱基序列 Base sequences (5'→3')	作用 Function
<i>lomo3</i> left-F	AAATTTGAATTCTACAGATGTGCTGAAGGCTGGG (下划线为 <i>Hind</i> III 位点)	克隆 <i>lomo3</i> 基因同源重组的左臂
<i>lomo3</i> left-R	AAAAAAAAAAAAAATTTAGATCTCCCGACGTTTCGCTTCCAGTT (下划线为 <i>Bgl</i> II 位点)	
<i>lomo3</i> right-F	AAATTTAGATCTAACGGGTCGAGGAACAGGGC (下划线为 <i>Bgl</i> II 位点)	克隆 <i>lomo3</i> 基因同源重组的右臂
<i>lomo3</i> right-R	AAATTTTCTAGACAGTCGGGGAAGCACTTGAG (下划线为 <i>Xba</i> I 位点)	
<i>lomo3</i> -F	AAATTTCATATGGGCGAGACCGCTCTTCAT (下划线为 <i>Nde</i> I 位点)	克隆携带有完整 <i>lomo3</i> 基因的片段
<i>lomo3</i> -R	AAAATTTTCTAGACCTGAGCGAAATACTCTCGG (下划线为 <i>Xba</i> I 位点)	
pIB-F	TTGCGCCCGATGCTAGTCG	pIB139 载体通用引物, 验证质粒整合入链霉菌中
pIB-R	GCACGACAGGTTTCCCGACTG	

子培养和发酵培养。具体培养方法参考王华盛等^[9]。所有的 *Escherichia coli* 都采用 LB 培养基, 培养温度为 37 °C, 具体培养方法参考 Zhang 等^[10]。

1.2.2 同源重组质粒 pKC1139-*lomo3* 构建: 用引物 *lomo3* left-F、*lomo3* left-R 和 *lomo3* right-F、*lomo3* right-R 分别扩增 *lomo3* 基因左、右同源臂序列。扩增程序: 94 °C 2 min; 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 68 °C 100 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。纯化后加 A 尾: 纯化的 PCR 产物(20 mg/L) 42.5 μL, 10×PCR buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, *rTaq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 72 °C 水浴 30 min 后割胶回收。用连接酶 Solution I 将回收片段连接到 pMD19-T 载体(氨苄霉素抗性, 100 mg/L)上, 转化至 DH5α感受态中, 分别得到 *lomo3* 左、右同源臂连接在 pMD19-T 的重组载体 pCC701 和 pCC702。将 pCC701 和 pCC702 用 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切, 将酶切后的 pCC702 同源臂片段连接到酶切后的 pCC701 载体上, 构建重组载体 pCC703, PCR 验证。将 pCC703 与 pKC1139 载体(阿伯拉霉素抗性, 50 mg/L)用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后连接, 构建重组载体 pKC1139-*lomo3*。

1.2.3 基因缺失突变株的构建和筛选: 将 pKC1139-*lomo3* 载体转化到大肠杆菌 ET12567 (双抗性: 卡那霉素 50 mg/L 和氯霉素 25 mg/L)中, 与

S015 进行接合转移, 接合 18 h 后用 1 mL 含有萘啶酮酸(1 g/L)和阿伯拉霉素(Apr, 2 g/L)的 ddH₂O 覆盖, 28 °C 培养 4 d; 挑取接合子于 Apr 抗性平板上, 28 °C 培养 4 d。从平板中挑菌至 YEME 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养, 传代 5 次, 涂布于无抗 MS 平板上产孢, 收集孢子后稀释至 10⁻⁶, 涂布于无抗 MS 平板上, 28 °C 培养 4 d。利用突变株失去 Apr 抗性的特性, 通过无抗和有抗平板影印, 筛选出基因缺失突变株 S015Δ*lomo3*。

1.2.4 回补质粒 pIB139-*lomo3* 的构建: 回补质粒 pIB139-*lomo3* 的构建方法同 1.2.2。用引物 *lomo3*-F、*lomo3*-R 扩增 *lomo3* 完整的基因片段, 连接到 pMD19-T 载体上, 获得 pCC704 重组载体。将 pCC704 与 pKC1139 载体用 *Nde* I 和 *Xba* I 双酶切后连接, 构建整合载体 pIB139-*lomo3*。

1.2.5 回补菌株的构建及筛选: 将回补质粒 pIB139-*lomo3* 转化到 ET12567 (pUZ8002)中, 接合转移至 S015Δ*lomo3* 中。由于重组质粒 pIB139-*lomo3* 带有阿伯拉霉素抗性, 因此挑取接合子于 28 °C 阿伯拉抗性平板培养, 筛选回补菌株 S015Δ*lomo3*::*lomo3*。

1.2.6 产物分析: 发酵液的预处理^[14]: 取培养 4 d 的发酵液 2 mL, 12 000×g 离心 3 min, 取上清液

1 mL, 用 6 mol/L HCL 调节 pH 到 2.0, 加入等体积丁酮, 振荡萃取 3–5 min 后, 12 000×g 离心 5 min。取上层有机相, 于 33 °C 真空旋转干燥仪旋转蒸干后, 溶于 1:1 (体积比) 的乙腈和 0.1% 甲酸水溶液中, 12 000×g 离心 2 min, 用有机相滤头过滤, 用于产物的 HPLC 分析。

1.2.7 产物的 HPLC 分析^[15]: 流动相为乙腈:0.1% 的甲酸水溶液, 梯度为: 0–4 min, 2:8; 4–20 min, 4:6; 20–30 min, 2:8; 流速为 1 mL/min, 检测波长 270 nm; 采用 Agilent Technologies 1260 Infinity 高效液相色谱仪, 250 mm×4.6 mm 的 Agilent 5 μ m Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱。

2 结果与分析

2.1 *lomo3* 基因敲除和回补

2.1.1 基因缺失菌株 S015 Δ *lomo3* 的构建: 甲基转移酶基因 *lomo3* 全长 819 bp, 设计的左、右同源臂长度分别为 1.9 kb 和 2.0 kb, 包含了 *lomo3* 基因左

端的 58 bp 和右端的 188 bp, 预期敲除长度为 *lomo3* 中间的 573 bp 序列。扩增 *lomo3* 基因左、右同源臂, 结果如图 2A 所示。用 *lomo3* left-F 和 *lomo3* right-R 引物验证重组载体 pKC1139-*lomo3* 的构建结果, 产物大小为左、右同源臂的总长 3.9 kb, 如图 2B 所示, 说明构建成功。用引物 *lomo3* left-F 和 *lomo3* right-R 检验基因缺失菌株 S015 Δ *lomo3* 是否构建成功: 野生株的 PCR 产物长度为 4.5 kb, 由于 *lomo3* 基因的敲除长度为 573 bp, 突变株的 PCR 产物长度应为 3.9 kb, 从图 2C 可以看出, 产物长度与预期相符, 说明基因缺失菌株 S015 Δ *lomo3* 构建成功。

2.1.2 回补株 S015 Δ *lomo3*::*lomo3* 的构建: 用引物 *lomo3*-F、*lomo3*-R 扩增 *lomo3* 完整的基因片段, 构建整合载体 pIB139-*lomo3* 并导入 S015 Δ *lomo3* 中。用引物 pIB-F 和 pIB-R 验证回补菌株 S015 Δ *lomo3*::*lomo3* 的筛选结果。从图 3 可以看出, 菌株 S015 Δ *lomo3*::*lomo3* 的 PCR 产物长度为 1.3 kb, 与预期结果符合, 而基因缺失菌株中则没有该条

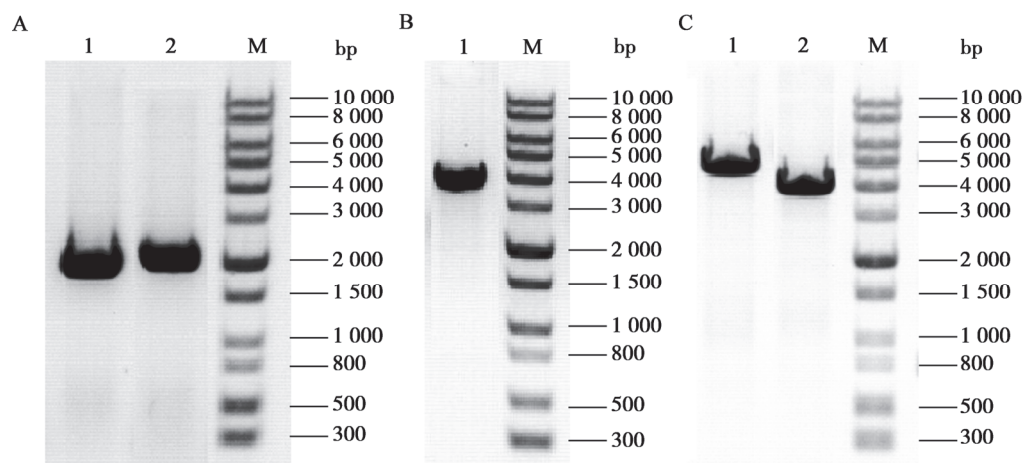


图 2 突变质粒 pKC1139-*lomo3* 构建及 *lomo3* 基因敲除突变株验证电泳图谱

Figure 2 Construction of pKC1139-*lomo3* plasmid *in vitro* and validation of *lomo3* gene knock-out strain

注: M: 1 kb plus DNA ladder marker. A: 1、2: 以全基因组为模板, 扩增 *lomo3* 基因左、右同源臂序列. B: 1: 以 pKC1139-*lomo3* 为模板, 扩增同源臂序列. C: 1: 以 S015 基因组为模板; 2: 以 S015 Δ *lomo3* 基因组为模板。

Note: M: 1 kb plus DNA ladder marker. A: 1, 2: Using the whole genome as a template, amplified homology left and right arm sequences. B: 1: Using pKC1139-*lomo3* as a template, amplified homologous recombination sequence. C: 1: Using S015 genome as a template; 2: Using S015 Δ *lomo3* genome as a template.

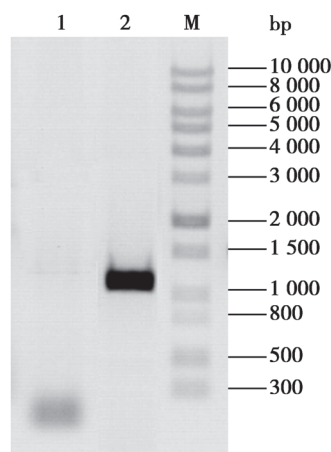


图3 *lomo3* 基因回补菌株的验证图谱

Figure 3 Validation of *lomo3* gene complement strain

注: M: 1 kb plus DNA ladder marker; 1: 以 S015Δ*lomo3* 基因组为模板; 2: 以 S015Δ*lomo3*::*lomo3* 基因组为模板.

Note: M: 1 kb plus DNA ladder marker; 1: Using S015Δ*lomo3* genome as a template; 2: Using S015Δ*lomo3*::*lomo3* genome as a template.

带, 说明基因 *lomo3* 回补菌株构建成功。

2.2 *lomo3* 基因对菌株的影响

2.2.1 平板生长形态: 将野生株 S015、*lomo3* 缺失株 S015Δ*lomo3* 和 *lomo3* 回补株 S015Δ*lomo3*::*lomo3* 划线在 MS 平板上, 于 28 °C 培养 6 d。从图 4A 可以看出, 基因 *lomo3* 对孢子和菌丝的表型没有明显的影响; 但从图 4B 可以看出, 该基因对产物合成有显著影响: S015 有明显的黄色产物, 而基因 *lomo3* 的缺失导致该黄色产物消失, 基因回补后又少量的黄色产物出现。

2.2.2 发酵产物: 将 S015、S015Δ*lomo3* 和 S015Δ*lomo3*::*lomo3* 分别接种至 YEME 发酵培养基中培养 4 d, 对其发酵产物进行 HPLC 检测。图 5A 中野生株 S015 在 17.3 min 出现的发酵产物为洛蒙真菌素; 图 5B 显示 *lomo3* 基因缺失株 S015Δ*lomo3* 的发酵产物中没有洛蒙真菌素, 同时也没有检测到其它的产物; 从图 5C 可以看出, *lomo3* 基因回补后, 菌株 S015Δ*lomo3*::*lomo3* 的发酵产物中又检测到了洛蒙真菌素。这一结果说明, 本文研究的甲基转移酶基因 *lomo3* 对洛蒙德链霉菌 S015 中洛蒙真菌素

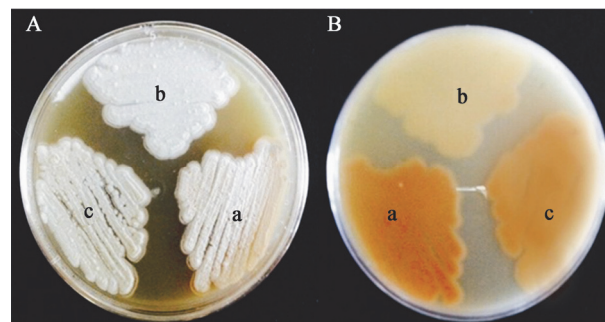


图4 野生株 S015 (a)、*lomo3* 缺失株 S015Δ*lomo3* (b)和 *lomo3* 回补株 S015Δ*lomo3*::*lomo3* (c)在 MS 平板上生长 6 d 的形态

Figure 4 Phenotype of wild type S015 (a), *lomo3* knock-out mutant S015Δ*lomo3* (b) and *lomo3* complementary strain S015Δ*lomo3*::*lomo3* (c) grown on MS medium for 6 days

注: A: 平板的正面; B: 平板的背面.

Note: A: Images from the right side of the culture dish; B: Images from the reverse side of the culture dish.

的生物合成有重要的影响。

3 讨论

本文通过无痕敲除的方法, 研究了洛蒙德链霉菌 S015 中的一个甲基转移酶基因 *lomo3* 对洛蒙真菌素生物合成的影响。

甲基转移酶在很多微生物的次级代谢产物合成中起着重要的作用^[16]。在铜绿色假单胞菌 PAO1 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)中, 甲基转移酶 PhzM 负责 PCA 吩嗪环上 5 位的甲基转移, 生成 5- 甲基吩嗪 -1- 羧酸甜菜碱^[7]。*Streptomyces spheroides* 的新生霉素合成基因簇中, 有一种 S-腺苷甲硫氨酸依赖的氧位甲基转移酶 NovP, 负责诺维糖 C-4 位上羟基的甲基化^[17]。*Streptomyces iakyrus* 在合成放线菌素 G 的过程中, 将编码一种甲基转移酶的基因 *acmG5'* 敲除后, 会导致该菌株不再合成放线菌素 G^[18]。本研究中, 甲基转移酶基因 *lomo3* 的敲除导致 S015 不能合成洛蒙真菌素; 通过 *lomo3* 基因回补, 菌株 S015Δ*lomo3*::*lomo3* 恢复了洛蒙真菌素的合成。说明这个甲基转移酶基因 *lomo3* 在洛蒙真菌素的生物合成过程中起着重要的作用。

Buckland 等^[19]利用 ¹⁴C 标记的方法, 确定了

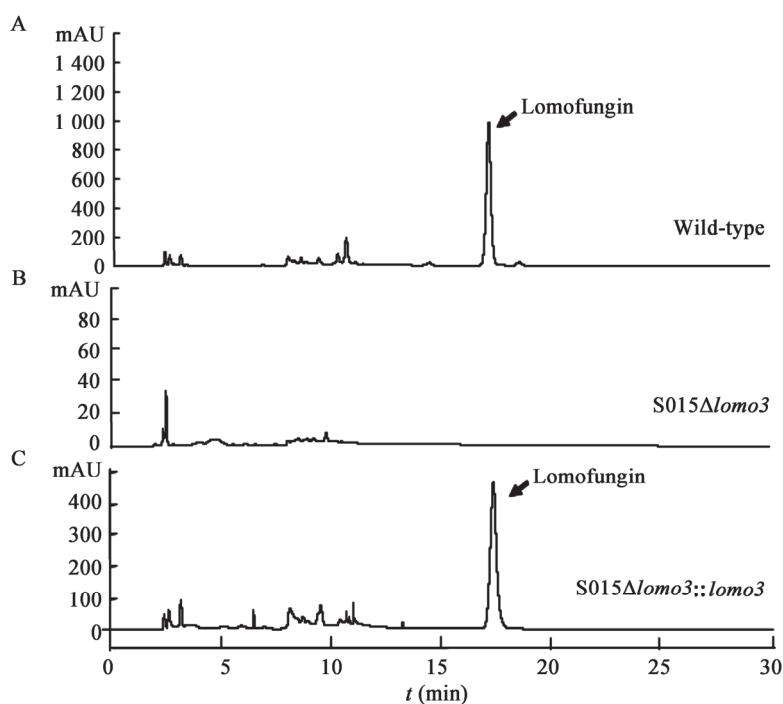


图5 野生株 S015 (A)、*lomo3* 基因缺失株 S015Δ*lomo3* (B)和 *lomo3* 基因回补株 S015Δ*lomo3*::*lomo3* (C) 发酵产物的 HPLC 图谱

Figure 5 HPLC profiles of fermentation products from wild type S015 (A), *lomo3* knock-out mutant S015Δ*lomo3* (B) and complementary strain S015Δ*lomo3*::*lomo3* (C)

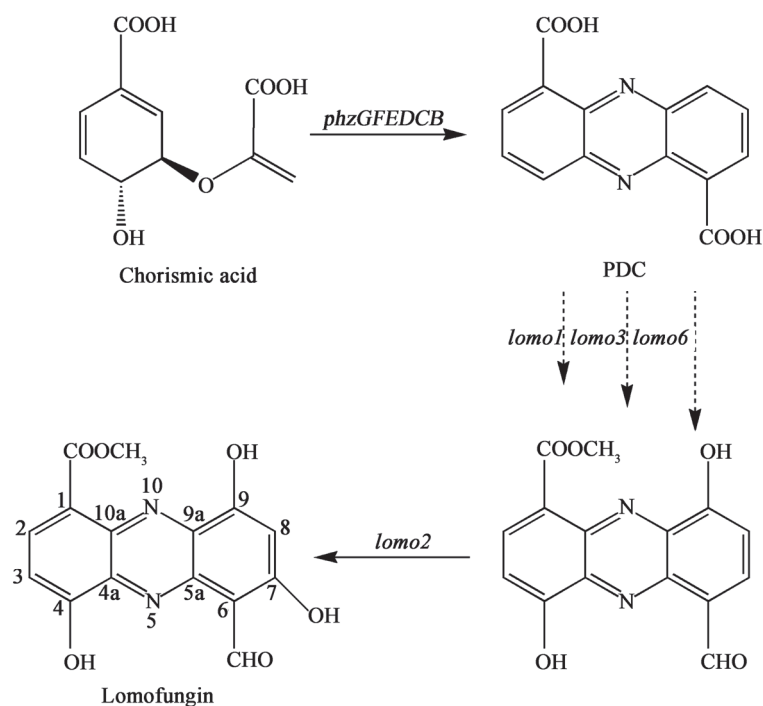


图6 根据 Zhang^[10]和 Buckland 等^[19]相关结果推测的洛蒙真菌素的合成途径

Figure 6 Proposed lomofungin biosynthesis pathway modified according to Zhang^[10] and Buckland et al^[19]

PDC 是洛蒙真菌素合成的前体;而 PDC 来源于莽草酸途径中产生的分支酸(Chorismic acid)^[5]。Zhang 等的研究表明,在洛蒙真菌素的生物合成中,单加氧酶基因 *lomo2* 的功能是在其 C-7 位的羟基转移^[10]。我们根据洛蒙真菌素的侧链结构,推测脱氢酶基因 *lomo1* 参与 C-6 位的羧基还原成醛基,*lomo3* 参与了 C-1 位的甲酯化,*lomo6* 可能作用于 C-4 和 C-9 位的羟基修饰,并据此推测出洛蒙真菌素的生物合成途径(图 6)。我们没有在 *lomo3* 基因缺失株 S015Δ*lomo3* 中检测到其他吩嗪类产物,还不能确定该甲基转移酶作用的底物及相应的反应产物。这可能是因为 *Lomo3* 的底物是由一个或多个可逆反应合成的:当 *lomo3* 基因存在时,反应向着合成洛蒙真菌素的方向进行;而当该基因敲除以后,反应则逆向进行导致在基因缺失菌株中检测不到吩嗪类产物。目前还不能确定 1 位的甲酯反应、6 位的脱氢反应,以及 4、9 位的两个羟基转移反应的先后顺序。我们正在进行 *lomo1*、*lomo6* 的基因敲除和功能的研究,同时还在进行 *Lomo3* 的体外酶学研究,希望通过这些研究,能够确定这些基因尤其是 *lomo3* 的功能,阐明洛蒙真菌素的生物合成途径。

参 考 文 献

- [1] Schneemann I, Wiese J, Kunz AL, et al. Genetic approach for the fast discovery of phenazine producing bacteria[J]. Marine Drugs, 2011, 9(5): 772-789
- [2] Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation[J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44: 417-445
- [3] Hui JY, Wang W, Hu HB, et al. *Streptomyces griseoruber* Y1B, a novel *Streptomyces* for 1-Hydroxyphenazine production[J]. Journal of Applied Biotechnology, 2014, 2(2): 13-31
- [4] Laursen JB, Nielsen J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(3): 1663-1686
- [5] Herbert RB, Holliman FG, Sheridan JB. Biosynthesis of microbial phenazines: incorporation of shikimic acid[J]. Tetrahedron Letters, 1976, 17(8): 639-642
- [6] Mavrodi DV, Ksenzenko VN, Bonsall RF, et al. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(9): 2541-2548
- [7] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(21): 6454-6465
- [8] Johnson LE, Dietz A. Lomofungin, a new antibiotic produced by *Streptomyces lomondensis* sp. n.[J]. Applied Microbiology, 1969, 17(5): 755-759
- [9] Wang HS, Bei XY, Hu HB, et al. Isolation, identification and medium optimization of modified phenazine derivative lomofungin from *Streptomyces lomondensis* S015[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2014, 32(2): 48-54 (in Chinese)
- [10] 王华盛, 贝晓宇, 胡洪波, 等. 洛蒙链霉菌 S015 中吩嗪类活性产物洛蒙真菌素的分离纯化、结构鉴定及发酵优化[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2014, 32(2): 48-54
- [11] Zhang CX, Sheng CL, Wang W, et al. Identification of the lomofungin biosynthesis gene cluster and associated flavin-dependent monooxygenase gene in *Streptomyces lomondensis* S015[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136228
- [12] MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector[J]. Gene, 1992, 111(1): 61-68
- [13] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. Gene, 1992, 116(1): 43-49
- [14] Wilkinson CJ, Hughes-Thomas ZA, Martin CJ, et al. Increasing the efficiency of heterologous promoters in actinomycetes[J]. Journal of Molecular Microbiology Biotechnology, 2002, 4(4): 417-426
- [15] Bergy ME. Lomofungin, a new broad spectrum antibiotic isolation and characterization[J]. The Journal of Antibiotics, 1969, 22(3): 126-128
- [16] Li S, Ye QM, Wang W, et al. High-performance liquid chromatography analysis of lomofungin in *Streptomyces lomondensis*[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36(15): 2059-2068
- [17] Feitelson JS, Hopwood DA. Cloning of a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1983, 190(3): 394-398
- [18] Freil Meyers CL, Oberthür M, Heide L, et al. Assembly of dimeric variants of coumermycins by tandem action of the four biosynthetic enzymes CouL, CouM, CouP, and NovN[J]. Biochemistry, 2004, 43(47): 15022-15036
- [19] Qin ZW, Wang XL, Rateb ME, et al. Disruption of a methyltransferase gene in actinomycin G gene cluster in *Streptomyces iakyrus* increases the production of phenazinomycin[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 352(1): 62-68
- [20] Buckland P, Gulliford SP, Herbert RB, et al. The biosynthesis of phenazines-biosynthesis of lomofungin via phenazine-1,6-dicarboxylic acid[J]. Journal of Chemical Research, 1981, 12: 362