

# 格尔德霉素生物合成的调控基因

赫卫清, 雷健, 刘玉瑛, 王以光

中国医学科学院/中国协和医科大学医药生物技术研究所以, 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

**摘要:** 从吸水链霉菌 17997 中克隆了格尔德霉素(Geldanamycin, Gdm)生物合成酶基因簇, 通过生物信息学分析发现两个 LAL(Large ATP-binding regulators of the LuxR family)家族的调控基因 *gdmRI* 和 *gdmRII*, 基因阻断和基因回复实验证实这两个基因产物都正调控 Gdm 的生物合成。

**关键词:** 格尔德霉素(Geldanamycin, Gdm), 调控基因, 基因阻断

## Regulatory Genes of Geldanamycin Biosynthesis

Weiqing He, Jian Lei, Yuying Liu, and Yiguang Wang

Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics of Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

**Abstract:** Two LAL family regulatory genes, *gdmRI* and *gdmRII*, were identified in the geldanamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* 17997. Disruption of the two regulatory genes resulted in absolute elimination of geldanamycin biosynthesis. The complementation experiments using a single wild-type gene could restore geldanamycin production. These results indicated that both *gdmRI* and *gdmRII* were positive regulatory genes of the geldanamycin biosynthesis.

**Keywords:** geldanamycin (Gdm), regulatory gene, gene disruption

热休克蛋白 90(Heat shock protein 90, Hsp90)参与调控、维持细胞内多种蛋白的构象和功能, 也是多种信号传导蛋白的分子伴侣, 是近年来抗肿瘤研究中发现的极具应用价值的新靶点<sup>[1]</sup>。格尔德霉素(Geldanamycin, Gdm)作为 Hsp90 的特异性抑制剂受到了广泛关注, 其 17 位的衍生物已经进行了临床实验<sup>[2]</sup>, 具有很好的抗肿瘤活性。Gdm 还具有抗原虫和广谱抗病毒作用<sup>[3]</sup>, 最近发现它还能调节上皮氮氧合酶活性以及抗炎症等作用<sup>[4]</sup>。为了实现对 Gdm 的生物学改造, 并深入研究 Gdm 的生物合成及其调控机制, 我们从吸水链霉菌 17997 中克隆了部分

Gdm 生物合成酶基因簇<sup>[5]</sup>, 通过生物信息学分析, 从中发现两个调节基因, *gdmRI* 和 *gdmRII*。分析二者蛋白序列发现在 C 端均含有 LuxR 类型的螺旋-转角-螺旋(Helix-turn-helix, HTH)的 DNA 结合结构域, N 端具有 ATP 结合域, 符合 LuxR 家族大型 ATP 结合调节因子(Large ATP-binding regulators of the LuxR family, LAL)特征。这个家族的代表是大肠埃希氏菌中麦芽糖操纵子的调节蛋白 MalT<sup>[6]</sup>。目前, 已在几个抗生素生物合成基因簇中发现此类调节蛋白, 如 AveR<sup>[7]</sup>, RapH<sup>[8]</sup>, MonH<sup>[9]</sup>, PikD<sup>[10]</sup>, PimR<sup>[11]</sup> 以及 NysRI 和 NusRII<sup>[12]</sup>等, 它们与链霉菌抗生素调控蛋

**Received:** September 21, 2007; **Accepted:** November 9, 2007

**Supported by:** the National Department of Sciences and Technology under Preliminary Basic Research 973 Project (No. 2001CCA00500).

**Corresponding author:** Yiguang Wang. Tel: +86-10-63038137; Fax: +86-10-63176489; E-mail: wangyh456@yahoo.com.cn

基础研究重大项目前期研究专项(973 项目)(No. 2001CCA00500)。

白(Streptomyces antibiotic receptory proteins, SARPs)家族作用类似,多属于途径特异性调控蛋白。NysRI和NysRII正调控nystatin的生物合成基因,并且NysRI调控等级要高于NysRII。PimR正调控匹马菌素生物合成,激活合成匹马菌素的相关基因,但不调节自身转录。PikD也作为正调控因子调节苦霉素的生物合成<sup>[13]</sup>。

本文利用基因阻断和回复实验对 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因在 Gdm 生物合成中的调控作用进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和载体

吸水链霉菌 17997(*Streptomyces hygroscopicus* 17997)为格尔德霉素产生菌,由本所分离并保存。*E.coli* DH5 $\alpha$ 用于质粒转化的受体菌,大肠杆菌 ET12567/pUZ8002,用作接合转移用的供体菌,pGH112(氨苄青霉素抗性和硫链丝菌素抗性),为大肠杆菌-链霉菌穿梭载体,接合转移用载体,中科院微生物所杨克迁教授惠赠。阿普拉霉素抗性基因 *aac*(3) IV(1.5 kb *Xba* I 片段),来源于柯斯质粒 pKC505,由本实验室亚克隆获得。具有卡那霉素抗性的 pKC1139 质粒,用于基因互补实验,由本实验室构建。

#### 1.1.2 培养基

常规培养吸水链霉菌 17997 和其变株的 MY 培养基与接合转移用培养基 MS 按照文献[15]配制。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

硫链丝菌素(Thiostrepton, Tsr)由美国 Squibb & Sons 公司赠送。氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)为华美公司产品,阿普拉霉素(Apramycin, Am)由沈阳药科大学夏焕章教授赠送。卡那霉素(Kanamycin, Km)购自中国药品生物制品检定所。萘啶酮酸(Nalidixic acid),购自 Amresco 公司。氯霉素(chloramphenicol, Cm),购自北京市医药公司制药厂。限制性内切酶、LA-Taq 酶、T4 DNA 连接酶等均购自 TaKaRa 公司。地高辛探针标记试剂盒为 ROCHE(B.M.)公司 DIG High Prime DNA Labeling & Detection Starter Kit II; Southern 杂交尼龙膜购自 Amersham 公司。日本岛津高效液相色谱,型号为 Shimadzu CLASS-VP

V6.10。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基因酶切、连接等操作

按照文献[14]进行。

#### 1.2.2 PCR 反应条件

采用 TaKaRa Pyrobest<sup>TM</sup> DNA polymerase 和 LA-Taq 酶,针对高 GC 序列的 GC-I 缓冲液体系。程序:40°C 预热 1 min,96°C 预解链 2 min,96°C 解链 40 s;55°C~62°C 退火 40 s;72°C 延伸 1.5 min,30 个循环,72°C 延伸 5 min,结束反应。

#### 1.2.3 大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 与吸水链霉菌 17997 接合转移

用同源双交换获得基因阻断株的方法见文献[15]。

#### 1.2.4 基因阻断株的 PCR 验证

在 *gdmRI* 和 *gdmRII* 两个同源片段的外侧设计引物,验证  $\Delta$ RI 变株的引物为 P1: 5'-ATCCTGTCGAT TTCCACG-3' 和 P2: 5'-TCGCTCAGACGCAACC C-3';验证  $\Delta$ RII 变株引物为 P3: 5'-TGTCCTCCTG CTCGGTG-3' 和 P4: 5'-GCGTCTGGACAAGAAGG C-3'。

#### 1.2.5 Southern blotting 的方法

按照 ROCHE 地高辛探针标记试剂盒的说明书进行。

#### 1.2.6 发酵培养和发酵液的提取和分析

按照文献[16]进行。

## 2 结果

### 2.1 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因的序列分析

*gdmRI* 和 *gdmRII* 基因的长度分别是 2907 bp 和 2784 bp,是从吸水链霉菌 17997 柯斯质粒基因文库 *gdmN* CT-4 的序列(基因登录号: DQ914285)中分析得到。两个基因的 GC 含量非常高,分别为 81.7%和 92.1%,符合链霉菌基因的特征。在 *gdmRI* 和 *gdmRII* 的序列中均含有链霉菌基因稀有密码子 TTA,TTA 常出现在参与链霉菌分化和次级代谢调控的基因中<sup>[17]</sup>。两个基因的产物与 LAL 家族的转录调节因子有较高的同源性,在 C 端都有 LuxR 家族的 HTH-DNA 结合结构域,在 N 端都有 NTPase 结合结构域;在 *GdmRII* 中还有一个典型的 Walker A 的 ATP 结合基序<sup>[18]</sup>。在两个基因中间都存在一个 TPR 结构域,TPR 结构域经常参与蛋白质相互作用<sup>[19]</sup>。

2.2 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因阻断和鉴定

按表 1 列举的引物分别扩增 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因的同源片段, 它们的长度分别为 992 bp、994 bp 和 1002 bp、1385 bp, 在相应同源片段中间以

*Pst* I-*Kpn* I 酶切位点插入 1.5 kb 左右的 *Am* 抗性基因, 并与 *Eco*R I-*Xba* I 酶切后的 pGH112 载体片段进行连接, 构建 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因的阻断质粒 pGEXRI 和 pGEXRII(图 1)。

表 1 构建 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因阻断质粒的引物  
Table 1 The primers for the construction of *gdmRI* and *gdmRII* disruption plasmids

Name	Primer sequence (5' -3')
<i>gdmRI</i> homologous fragment 1	CCGGAATTCAGTCCCGGCTGAGTTCG( <i>Eco</i> R I) CGCGGTACCCGGAATGCGTCCAGTATG ( <i>Kpn</i> I)
<i>gdmRI</i> homologous fragment 2	AAAAGTGCAGCACCAGTCCCGACAGC ( <i>Pst</i> I) CTAGTCTAGACCCTCATGTGCCTTCTG ( <i>Xba</i> I)
<i>gdmRII</i> homologous fragment 1	AAAAGTGCAGTCATGGTCGCCGAGCT ( <i>Pst</i> I) CCGGAATTCGCCGCACAGCAGAAAG ( <i>Eco</i> R I)
<i>gdmRII</i> homologous fragment 2	CTAGTCTAGAGATCCCGAGGACACCG ( <i>Xba</i> I) CGGGGTACCTGTCGTTGAGCACGCTC ( <i>Kpn</i> I)

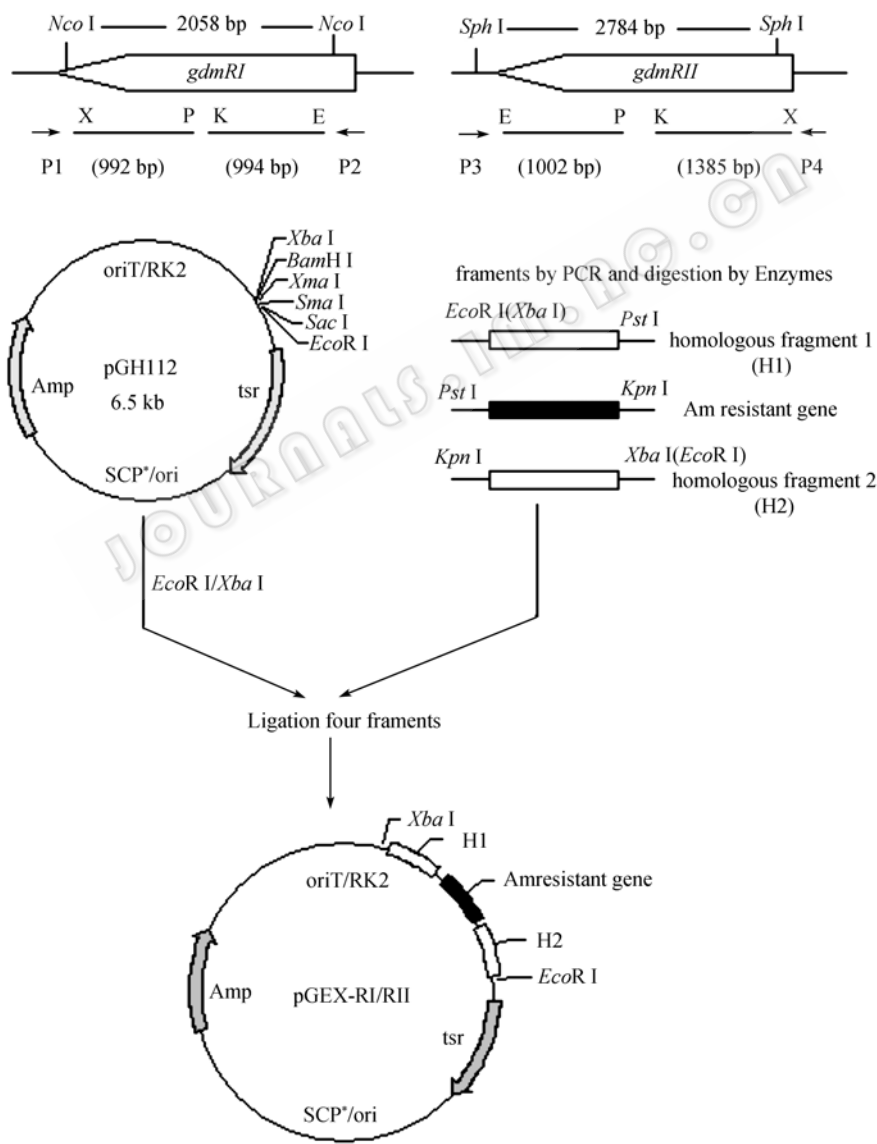


图 1 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因阻断质粒的构建  
Fig. 1 Construction of *gdmRI* and *gdmRII* gene disruption plasmids

通过大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 基因接合转移系统将构建好的阻断质粒导入到吸水链霉菌 17997 中。获得了  $Am^R$   $Tsr^S$  表型的 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因阻断变株  $\Delta RI$  和  $\Delta RII$  各 16 株。以方法 1.2.4 中列出的引物 P1-P2 和 P3-P4 进行 PCR 筛选鉴定, 结果显示, 用 P1-P2 和 P3-P4 引物分别在  $\Delta RI$  和  $\Delta RII$  变株基因组中扩增出的特异性片段比原株的均大 1.5 kb 左右, 与预期结果相符(图 2)。

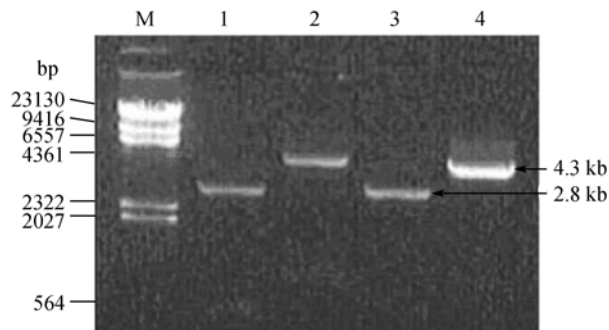


图 2  $\Delta RI$  和  $\Delta RII$  基因阻断变株 PCR 产物电泳

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products of  $\Delta RI$  and  $\Delta RII$  mutants

M:  $\lambda$ -Hind III marker; 1: *S. hygroscopicus* 17997, P1 and P2 primers; 2:  $\Delta RI$  mutant, P1 and P2 primers; 3: *S. hygroscopicus* 17997, P3 and P4 primers; 4:  $\Delta RII$  mutant, P3 and P4 primers

对两种变株又进行了 Southern 杂交鉴定, 以 *Nco* I、*Sph* I 酶切原株和  $\Delta RI$ 、 $\Delta RII$  变株的基因组 DNA, 分别用 *gdmRI* 和 *gdmRII* 同源片段 1 作为探针进行杂交, 原株基因组的杂交片段出现在 2.0 kb (*Nco* I) 和 2.7 kb (*Sph* I) 左右, 而在  $\Delta RI$  变株获得了约 3.5 kb 左右的杂交片段; 在  $\Delta RII$  变株得到 4.2 kb 左右的杂交片段(图 3), 均与预期结果一致。而且两种变株在传代中  $Am^R$  表型均很稳定, 说明变株中确实发生了同源基因双交换, 其中 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因均被插入的  $Am^R$  基因所破坏。

### 2.3 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因阻断株的发酵产物的分析

$\Delta RI$  和  $\Delta RII$  的基因阻断株的发酵产物经提取后进行 HPLC 鉴定, 结果见图 4。

HPLC 检测结果显示  $\Delta RI$  和  $\Delta RII$  的基因阻断株都不产生 Gdm, 变株产生其它次级代谢产物的情况与原株的差异不明显, 而且两种变株的菌落形态、孢子成熟情况等表型与原株基本一致。这些实验结果说明 *gdmRI* 和 *gdmRII* 两者均为 Gdm 生物合成的正调控基因。

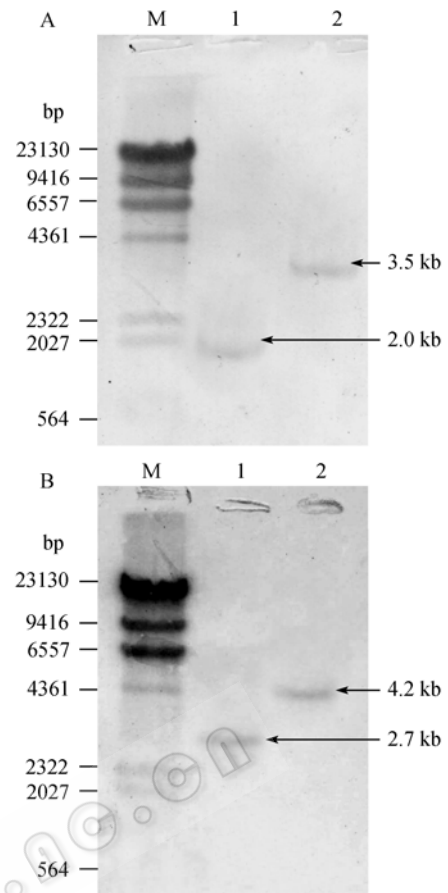


图 3  $\Delta RI$  和  $\Delta RII$  变株的 Southern 杂交验证

Fig. 3 Identification of  $\Delta RI$  and  $\Delta RII$  mutants by Southern blotting

M:  $\lambda$ -Hind III marker; A1: *S. hygroscopicus* 17997; A2:  $\Delta RI$  mutant; B1: *S. hygroscopicus* 17997; B2:  $\Delta RII$  mutant

### 2.4 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因阻断株的回复实验

为了证实阻断变株丧失产生 Gdm 的能力确实是由于 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因的破坏所致, 而不是极性效应导致其它基因的失活, 我们将带有启动子区的 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因重新导入各自变株, 观察对产生 Gdm 的影响。为此在 pKC1139 质粒单克隆位点连入卡那抗性基因片段。再分别将带有启动子的完整的 *gdmRI* 基因(*Xba* I 酶切片段)和 *gdmRII* 基因(*Bcl* I 酶切片段)克隆至具有卡那抗性的 pKC1139 质粒上, 通过接合转移实验, 成功导入到  $\Delta RI$  和  $\Delta RII$  基因阻断变株中, 并利用 PCR 进行了验证。

将回复株在含有 Am 和 Km 各 50  $\mu$ g/mL 条件下进行发酵培养, 并对其发酵产物进行 HPLC 分析, 结果表明  $\Delta RI$  回复株的 Gdm 产量达到了原株的一半左右,  $\Delta RII$  回复株的 Gdm 产量达到了原株的三分之一左右(图 4, 表 2)。回复实验排除了极性效应的影

响, 确定了两个调节基因都正调控 Gdm 的生物合成, 而且二者共同作用才能产生 Gdm, 阻断二者任何一个都会导致菌株无法产生 Gdm。

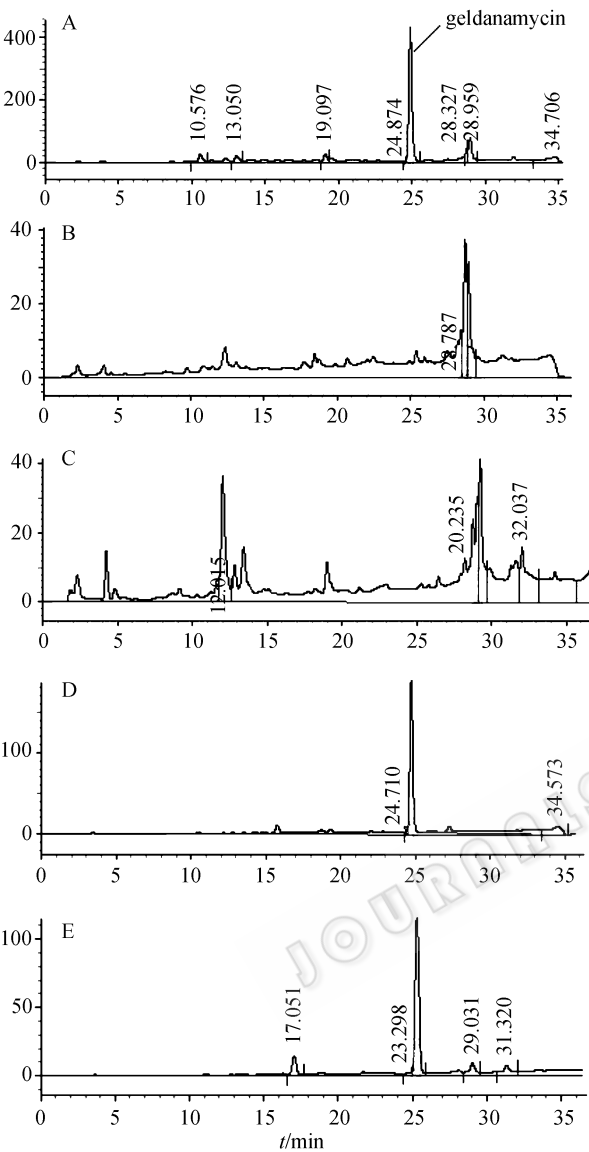


图 4 HPLC 检测ΔRI 和ΔRII 基因阻断株发酵产物  
Fig. 4 HPLC detection of fermentation products of the ΔRI and ΔRII mutants

A: *S. hygroscopicus* 17997; B: ΔRI; C: ΔRII; D: ΔRI complementation strain; E: ΔRII gene complementation strain

表 2 HPLC 检测格尔德霉素含量  
Table 2 The geldanamycin content by HPLC analysis

Name	Retention time	Peak area
<i>S. hygroscopicus</i> 17997	24.874	6944101
ΔRI gene complement	24.710	3257528
ΔRII gene complement	25.298	2113202

3 讨论

在链霉菌中抗生素的生物合成调控多为途径特异性调控, 常常是由 SARP 来完成, 本研究首次对 Gdm 生物合成调控基因进行研究。*gdmRI* 和 *gdmRII* 的分子量比较大, 分别为 2907 bp 和 2784 bp, 分别编码 968 和 927 个氨基酸序列, 通过序列的同源性分析, 推测出 *gdmRI* 和 *gdmRII* 属于 LAL 家族的调控基因, 本研究将两个调节基因分别进行阻断后, 发现变株都无法产生 Gdm, 基因的回复实验又消除基因极性效应的影响, 从而证实了 *gdmRI* 和 *gdmRII* 是 Gdm 的正调控基因。而且变株的表型等特征与原株基本一致, 说明二者很可能是专一性调控 Gdm 生物合成的途径特异性调控基因。

链霉菌大多生活在土壤中, 为了节约能量, 其分化和次级代谢会受到严格的调控。Gdm 属于安莎类化合物, 其生物合成需要许多酶来参与, 其中包括巨型的聚酮合酶, 单是这些酶的合成就要消耗许多能量, 所以对这类次级代谢产物的合成更需要严格的调控。从节约能量的角度来看, GdmRI 和 GdmRII 作为正调控蛋白应该是在转录水平调控 Gdm 相关的生物合成基因, 而且两个调节基因自身的表达也受到了严格的调控: 首先, 在二者的 ORF 中包含有链霉菌基因的稀有密码子 TTA, 在调节蛋白合成时会受到调控。其次, 通过分析 *gdmRI* 和 *gdmRII* 基因的启动子区, 发现含有γ-丁酰内酯类小分子受体蛋白结合的自调节顺式元件(autoregulatory element, ARE)<sup>[20]</sup>的相似序列, 暗示两个调节基因的转录还可能受到其它因子的调控。最后, 两个蛋白都是正调控基因, 缺一不可, 而且还可能有其它蛋白的参与才能起到正调控 Gdm 生物合成基因的作用。所以 Gdm 的生物合成受到了多方面的严格调控。深入研究 GdmRI 和 GdmRII 调节蛋白之间以及与其它因子的相互关系, 将有助于加深对 Gdm 生物合成调节机制的认识, 为提高其产量或改造其结构的研究奠定基础。

REFERENCES

[1] Neckers L, Neckers K. Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2002, 7(2): 277–288.  
[2] Goetz MP, Toft D, Reid J, Ames M, Stensgard B, Safgren

- S, Adjei AA, Sloan J, Atherton P, Vasile V, Salazaar S, Adjei A, Croghan G, Erlichman C. Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*, 2005, **23**(6): 1078–1087.
- [3] Tao PJ, Lou ZX, Yao TJ, Zhang XQ, Xian SW, Yao ET, Liu YZ, Wang SQ. Antiviral study on the broad spectrum antiviral antibiotic 17997 *in vitro* and *in vivo*. *Chinese J Antibiot*, 1997, **22**: 368–372.  
陶佩珍, 娄志贤, 姚天爵, 张兴权, 线素文, 姚恩泰, 刘玉珍, 王淑琴. 广谱抗病毒抗生素 17997 体内外抗病毒活性研究. 中国抗生素杂志, 1997, **22**: 368–372.
- [4] Murphy P, Sharp A, Shin J, Gavrilyuk V, Dello Russo C, Weinberg G, Sharp FR, Lu A, Heneka MT, Feinstein DL. Suppressive effects of ansamycin on inducible nitric oxide synthase expression and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research*, 2002, **67**(4): 461–470.
- [5] He WQ, Wang YG. Cloning and analysis of geldanamycin partial biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**: 902–906.  
赫卫清, 王以光. 吸水链霉菌 17997 格尔德霉素部分生物合成基因簇的克隆和分析. 生物工程学报, 2006, **22**: 902–906.
- [6] Richet E, Raibaud O. MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *EMBO J*, 1989, **8**: 981–987.
- [7] Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, *et al.* Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (21): 12215–12220.
- [8] Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, König A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J, Leadlay PF. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*, 1996, **169**(1): 9–16.
- [9] Oliynyk M. The gene cluster for monensin biosynthesis. University of Cambridge Thesis, 1999.
- [10] Xue YQ, Zhao L, Liu HW, Sherman DH. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. Architecture of metabolic diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(21): 12111–12116.
- [11] Antón N, Mendes MV, Martín JF, Aparicio JF. Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol*, 2004, **186**(9): 2567–2575.
- [12] Sekurova ON, Brautaset T, Sletta H, Borgos SE, Jakobsen M ØM, Ellingsen TE, Strøm AR, Valla S, Zotchev SB. *In vivo* analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. *J Bact*, 2004, **186**: 1345–1354.
- [13] Wilson DJ, Xue Y, Reynolds KA, Sherman DH. Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 3468–3475.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Kieser T, Chater KF, Hopwood DA, *et al.* Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, 2000.
- [16] He WQ, Li JY, Sun GZ, Liu YY, Wang YG. Application of RP-HPLC pattern analysis to detect new products of *Streptomyces hygroscopicus* 17997 mutants. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, **31**(3): 168–171.  
赫卫清, 李京艳, 孙桂芝, 刘玉英, 王以光. 反相高效液相色谱型分析检测吸水链霉菌 17997 变株发酵新产物中国抗生素杂志, 2006, **31**(3): 168–171.
- [17] Leskiw BK, Lawlor EJ, Fernandez-Abalos JM, Chater KF. TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(6): 2461–2465.
- [18] Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1982, **1**: 945–951.
- [19] Marck C, Lefebvre O, Carles C, Riva M, Chaussivert N, Ruet A, Sentenac A. The TFIIB-assembling subunit of yeast transcription factor TFIIC has both tetratricopeptide repeats and basic helix-loop-helix motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(9): 4027–4031.
- [20] Kinoshita H, Tsuji T, Ipposhi H, Nihira T, Yamada Y. Characterization of binding sequences for butyrolactone autoregulator receptors in streptomycetes. *J Bacteriol*, 1999, **181**(16): 5075–5080.