

研究简报

麦迪霉素 3-O-酰基转移酶在螺旋霉素链霉菌 F21 中的酰化特性

马春燕^{1,2}, 武临专¹, 戴剑澍¹, 周红霞¹, 李京艳¹, 孙晓春³, 张侃^{1,2}, 夏焕章², 王以光¹

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

2 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110015

3 中国药科大学, 南京 210038

摘要: 螺旋霉素(SP)与麦迪霉素(MD)均为 16 元大环内酯类抗生素, 并且结构非常相似。螺旋霉素含有 3 个组分, 其结构差异表现在 16 元内酯环 C₃ 上的一个取代基的差异, SP I 组分为羟基、SP II 组分羟基乙酰化、SP III 组分羟基丙酰化; 麦迪霉素是以麦迪霉素 A₁ 为主要组分的多组分抗生素, 麦迪霉素 16 元内酯环 C₃ 上连接的均为丙酰化羟基。已知这类抗生素 16 元内酯环 C₃ 羟基酰化是由一种称为 3-O-酰基转移酶的蛋白催化完成。本研究将螺旋霉素产生菌—*Streptomyces spiramyceticus* F21 中的螺旋霉素 3-O-酰基转移酶基因用 *Streptomyces mycarofaciens* ATCC 21454 中的麦迪霉素 3-O-酰基转移酶基因原位替换后, 发现所产生的螺旋霉素仍然含有 3 个组分, 并且螺旋霉素 III 组分也不是主要组分, 说明麦迪霉素 3-O-酰基转移酶在螺旋霉素产生菌—*S. spiramyceticus* F21 中不具有 16 元内酯环 C₃ 羟基丙酰化特异性以及酰化高效性, 也提示其在麦迪霉素产生菌中的丙酰化特异性和高效性可能与该菌株(种)的特性有关。

关键词: 螺旋霉素链霉菌, 螺旋霉素, 3-O-酰基转移酶, 麦迪霉素, *mdmB*, 酰化

Acylation Specificity of Midecamycin 3-O-acyltransferase within *Streptomyces spiramyceticus* F21

Chunyan Ma^{1,2}, Linzhuan Wu¹, Jianlu Dai¹, Hongxia Zhou, Jingyan Li¹, Xiaochun Sun³, Kan Zhang^{1,2}, Huanzhang Xia², and Yiguang Wang¹

1 Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China

2 School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China

3 China Pharmaceutical University, Nanjing 110015, China

Abstract: Spiramycin and midecamycin are 16-membered macrolide antibiotics with very similar chemical structures. Spiramycin has three components, namely spiramycin I, II and III. Spiramycin II and III are, respectively, the *O*-acetyl and propionyl derivatives at C₃-hydroxyl group of spiramycin I. Midecamycin has four components, and the C₃-hydroxyl group of midecamycin is all *O*-propionylated. The enzyme adding acyl group(s) at the C₃-hydroxyl group during the biosynthesis of spiramycin and midecamycin is 3-O-acyltransferase. The 3-O-acyltransferases for spiramycin and midecamycin are also very similar, and presume to function when exchanged. To explore whether the 3-O-acyltransferase for midecamycin biosynthesis hold still the character of selective and

Received: June 10, 2008; **Accepted:** September 17, 2008

Supported by: National High-tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z230).

Corresponding author: Linzhuan Wu. Tel: +86-10-63165283; E-mail: wulinzhuan@yahoo.com.cn

Yiguang Wang. Tel: +86-10-63038137; E-mail: wangyh456@yahoo.com.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA02Z230)资助。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotides for recombinant plasmid construction				Restriction site
L1'	Upstream	(1)	5'-TATATCTAGAGCGGCACGGGGTTGAACTCC-3'	<i>Xba</i> I
	Downstream	(2)	5'-CGCGCATATGTGGATTCTCGCTCCTCTTTC-3'	<i>Nde</i> I
<i>mdmB</i>	Upstream	(3)	5'-TATACATATGCCGCTCGTGTCGTCGCC-3'	<i>Nde</i> I
	Downstream	(4)	5'-CGCGAAGCTTTCAGGCGCGGGTGAGTTTCG-3'	<i>Hind</i> III
L2'	Upstream	(5)	5'-AGTCAAGCTTTCGCGTGGCAGACCAGACCGCT-3'	<i>Hind</i> III
	Downstream	(6)	5'-GCGCGAATTCTGCACGACGTGCACAGCAAC-3'	<i>EcoR</i> I
Oligonucleotides for PCR screening of SP- <i>mdmB</i> mutants				
L1'	Upstream	(1)	5'-TATATCTAGAGCGGCACGGGGTTGAACTCC-3'	<i>Xba</i> I
L2'	Downstream	(6)	5'-GCGCGAATTCTGCACGACGTGCACAGCAAC-3'	<i>EcoR</i> I
Oligonucleotides for PCR identification of SP- <i>mdmB</i> mutants				
	<i>mdmB</i> -170up	(7)	5'-TCCTGCTCAGCGGTTTTGTTC-3'	
	<i>mdmB</i> -412down	(8)	5'-GAACCCGCGGATAATCGTGGGT-3'	
	SP-AT-up	(9)	5'-CTCGCTATCGTCATCTGGC-3'	
	SP-AT-down	(10)	5'-GAACCCACTTCGCCAACTAC-3'	

1.2 分子克隆载体与 DNA 操作

温敏型大肠杆菌-链霉菌穿梭载体 pKC1139^[4], 携带阿泊拉霉素(Am)抗性, 本实验室保存。PCR 引物(序列见表 1)由北京赛百盛基因技术有限公司和大连宝生物工程有限公司合成。DNA 测序由大连宝生物工程有限公司完成。*S. spiramyceticus* F21 基因组 DNA 提取方法参照文献[5]。PCR 产物的纯化与连接、感受态细胞的制备、DNA 连接产物的转化、重组质粒的筛选参照文献[6]进行。常规 PCR 主要技术参数为反应体积 25 μ L(TaKaRa LA *Taq*, 2 \times GC Buffer I); 基因组 DNA 取 50~100 ng 作模板; 退火温度一般为 58~60 $^{\circ}$ C, 延伸时间为 1~2 min; 25 个循环。

1.3 链霉菌培养与操作

S. spiramyceticus F21 原生质体形成与转化方法参照文献[7, 8]; DNA 同源双交换转化子(SP-*mdmB* 变株)的筛选分离, 首先在 Am 抗性平板上获得单交换转化子, 然后在 37 $^{\circ}$ C、无抗性平板上连续传 3~4 代, 获得分离良好的无抗性单菌落转化子, 预期其中含有发生 DNA 同源双交换的 SP-*mdmB* 变株。SP 产生菌原株与变株的培养与发酵, 见文献[3]。

1.4 SP-*mdmB* 变株的筛选与鉴定

对 1.3 中最后得到的无抗性转化子进行 PCR 筛选与鉴别, 采用 L1'上游引物(1)与 L2'下游引物(6)配对, 以出发菌株 L3-O-AT Δ 作为阴性对照。由于在 L3-O-AT Δ 中插入了约 1.2 kb 的 *mdmB* 基因, 因此预计 *mdmB* 替换变株比出发菌株 L3-O-AT Δ 的 PCR 扩

增产物大 1.2 kb 左右。由于螺旋霉素 *sspA* 基因与麦迪霉素 *mdmB* 基因在核苷酸序列水平非常接近, 通过双序列比对, 专门设计了一对针对 *mdmB* 基因的 PCR 检测引物(引物 7 和 8), 并且在 DNA 同源双交换臂(L1'和 L2')的上、下游分别又合成了一对引物(引物 9 和 10), 并与专门针对 *mdmB* 基因的一对 PCR 检测引物(引物 7 和 8)组合, 通过 PCR 扩增鉴定 *mdmB* 基因确实插入到 L3-O-AT Δ 中 *sspA* 基因缺失的位置。最后, 通过 DNA 测序, 证实所得到的无抗性转化子为 SP-*mdmB* 变株。

1.5 螺旋霉素的 HPLC 检测

链霉菌发酵上清液经乙酸乙酯提取后, 吹干, 甲醇溶解, 进行 HPLC 检测。岛津 LC-10ATvp 液相色谱仪, 二级管阵列检测器, 色谱柱为 Kromasil C18 4.5 mm \times 150 mm, 流动相为甲醇/1%磷酸二氢钠溶液(53/47), 流速为 1 mL/min。

2 结果

2.1 SP-*mdmB* 变株的筛选与鉴定

用于将 *mdmB* 基因插入到缺失 *sspA* 基因的 L3-O-AT Δ 变株中原 *sspA* 基因位置的重组质粒构建过程见图 2; SP-*mdmB* 变株的筛选和 PCR 鉴定所采用引物的相对位置示意图见图 3。通过 PCR 筛选(引物 1/6)获得 SP-*mdmB* 菌株: 出发菌株 L3-O-AT Δ 扩增出 2.3 kb DNA 片段(即 2 个用于双交换的 DNA 同源臂大小之和, 为 1.1 kb+1.2 kb), 而 SP-*mdmB* 菌株

由于插入了 1.2 kb 的 *mdmB* 基因, 扩增出 3.5 kb DNA 片段(图 4 左)。SP-*mdmB* 菌株的鉴定亦采用 PCR 方法: 引物 7/8 组合, 可以特异性地扩增出 *mdmB* 基因 0.24 kb 的 DNA 片段; 引物 7/9 组合, 可以特异性扩增出 2.3 kb 的片段; 引物 8/10 组合, 可以特异性扩增出 1.7 kb 的片段 (图 4 右)。这些引物组合对出发菌株 L3-O-ATΔ 没有特异性 PCR 扩增产物出现(图略)。考虑到 *mdmB* 基因与 *sspA* 基因非常相似, 对 PCR 鉴定出的 SP-*mdmB* 变株中的 *mdmB* 基因部分序列进行测序验证, 证实在 L3-O-ATΔ 中确实插入了 *mdmB* 基因。

2.2 SP-*mdmB* 变株产螺旋霉素组分分析

对 SP 产生菌原株 *S. spiramyceticus* F21、*sspA* 基因删除变株 L3-O-ATΔ 以及 SP-*mdmB* 变株所产生的 SP 组分 HPLC 分析结果显示(图 4): 麦迪霉素 MdmB 在 *S. spiramyceticus* F21 中, 能够将一部分 SPI 乙酰化为 SPII, 但是基本不具有丙酰化 SPI 特异性; 并且, MdmB 在 *S. spiramyceticus* F21 中乙酰化 SPI 的效率也不高, 还有相当比例(50%~60%)的 SPI 没有得到乙酰化(表 2, 根据峰高计算)。

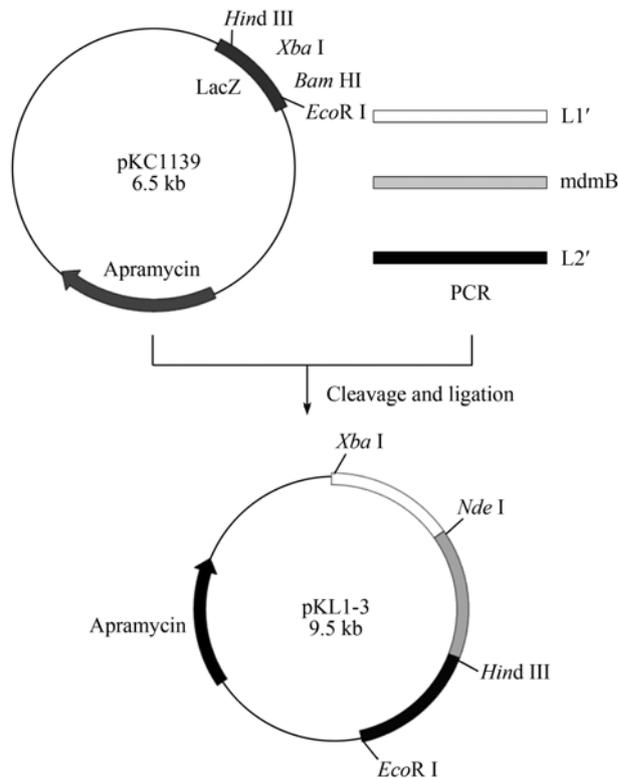


图 2 重组质粒 pKCL1-3 的构建
Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pKCL1-3 for the SP-*mdmB*

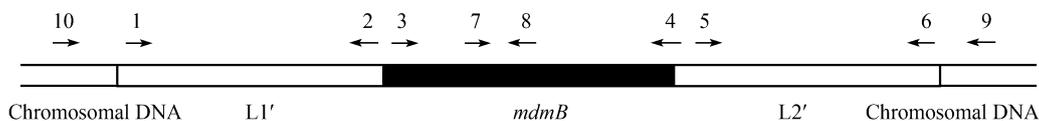


图 3 SP-*mdmB* 变株构建、筛选、鉴别所用 PCR 引物的相对位置示意图

Fig. 3 Schematic representation of oligonucleotides for recombinant plasmid construction, PCR screening and identification of SP-*mdmB* mutants

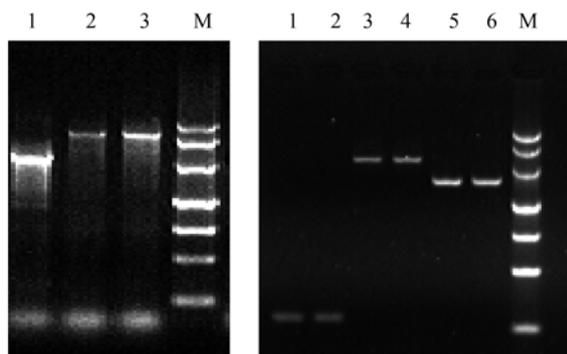


图 4 SP-*mdmB* 变株的 PCR 筛选与鉴定

Fig. 4 PCR screening and identification of SP-*mdmB* mutants

(Left) PCR screening of SP-*mdmB* mutants with primer pair 1/6; 1: L3-O-ATΔ as negative control; 2, 3: SP-*mdmB* mutants; M: DNA marker III

(Right) PCR identification of two SP-*mdmB* mutants with primer pairs 7/8 (lane 1,2), 7/9 (lane 3,4) and 8/10 (lane 5,6); M: DNA marker III

3 讨论

Omura S 曾经对来自 *Streptomyces ambofaciens* ISP-5053 的螺旋霉素 3-O-AT 进行了分离纯化和体外特性研究, 证实螺旋霉素的 3-O-AT 在体外酰化 SPI 的 C₃ 羟基时对酰基供体——乙酰 CoA 或丙酰 CoA 没有选择性^[9]。

麦迪霉素有多种不同产生菌, 所产生的麦迪霉素各个组分比例亦有差异。例如, 目前国内的麦迪霉素生产菌株所产生的麦迪霉素(现称为麦白霉素, 其中含有一定比例的柱晶白霉素 A₆^[10]), A₁ 组分(R=COCH₂CH₃)可达 70%^[11]; 而生米卡链霉菌 *Streptomyces mycarofaciens* ATCC 21454 产生的麦迪霉素, A₁ 组分可高达 90% 以上(本研究中使用的麦迪霉素 *mdmB* 基因来自该菌株)。

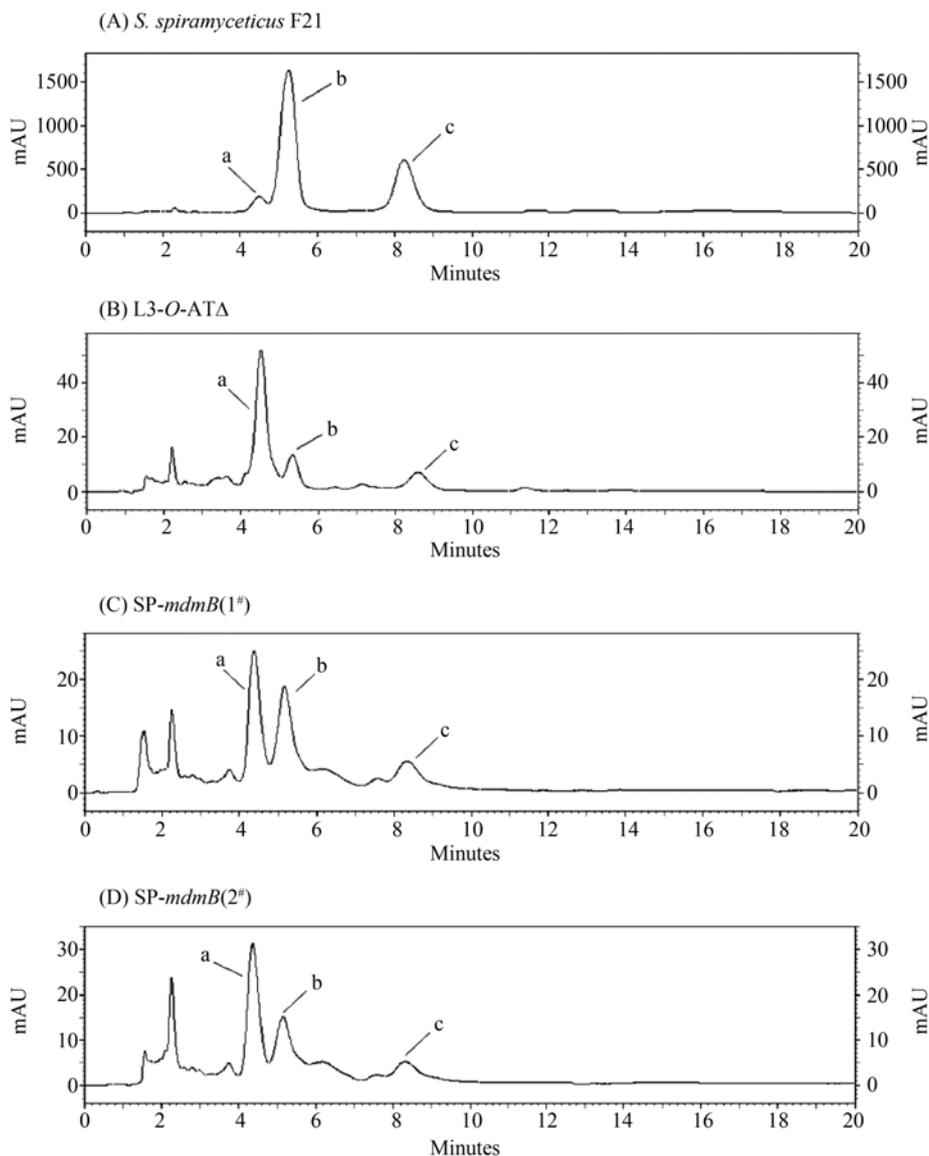


图 5 SP 产生菌原株 *S. spiramyceticus* F21(A)、*sspA* 基因删除变株 L3-O-ATΔ(B)以及 *mdmB* 替换变株(C 和 D) 所产生的 SP 组分 HPLC 分析结果

Fig. 5 HPLC of SP produced by *S. spiramyceticus* F21 (A), L3-O-ATΔ, the *sspA*-deleted mutant of *S. spiramyceticus* F21(B), and SP-*mdmB* mutants (C & D) a=SPI; b=SPII; c=SPIII

表 2 SP 产生菌原株、L3-O-ATΔ 变株和 SP-*mdmB* 变株的 SP 组分比例

Table 2 Relative proportions of SPI, SPII and SPIII produced by *S. spiramyceticus* F21, L3-O-ATΔ and SP-*mdmB*

SP component	Relative percentages (%)			
	<i>S. spiramyceticus</i> F21	L3-O-ATΔ	SP- <i>mdmB</i> (1 [#])	SP- <i>mdmB</i> (2 [#])
SPI	8	72	51	61
SPII	68	18	38	30
SPIII	25	10	11	9

SP 也有多种不同产生菌, 所产生的 SP 各个组分比例也有差异。例如, 国内的 SP 产生菌

Streptomyces spiramyceticus 主要产生 SPII 和 SPIII 组分; 国外的 SP 产生菌 *Streptomyces ambofaciens* 主

要产生 SPI 组分(比例高达 90%)。

麦迪霉素不同组分的结构差异主要是在碳霉糖 4''-羟基酰化基团(丙酰化, 丁酰化)和 16 元内酯环 C₉ 上取代基(羟基, 酮基)的不同上, 而 16 元内酯环 C₃ 上的羟基均被丙酰化(极少量乙酰化)。如果麦迪霉素的 3-O-AT 能够在 SP 产生菌中发挥其丙酰化特异性和高效性, 那么就可以有效地将 SPI 组分转化为 SPIII 组分, 并同时减少 SPI 和 SPII 组分的相对含量; 这对于获得基本只产生 SPIII 组分的螺旋霉素新产生菌具有实际意义。但是, 本研究的结果显示: 麦迪霉素的 3-O-AT 在 SP 产生菌 *Streptomyces spiramyceticus* F21 中并不具有 16 元内酯环 C₃ 羟基丙酰化特异性和高效性, 说明其丙酰化特异性和高效性很可能与麦迪霉素产生菌菌株本身的生理、代谢等特性密切相关。

本实验室曾经尝试在大肠杆菌中表达 *mdmB* 基因和 *sspA* 基因, 通过纯化重组蛋白、建立 2 种酶蛋白的体外生物化学催化反应体系, 比较、研究这 2 种酶蛋白乙酰化、丙酰化 SPI 组分的特异性。但是, 这 2 个酶基因在大肠杆菌中均表达失败(结果未发表)。分析发现, 这 2 个基因编码的酶蛋白均属于多次跨膜蛋白, 可能比较难以异源表达。

同时本实验室注意到曾经克隆、确证 *mdmB* 基因功能的 Osamu Hara 最近在 NCBI 的 GenBank 上对 *mdmB* 基因的功能注释进行了修正, 由原来的催化麦迪霉素内酯环 3 位羟基丙酰化改为“在麦迪霉素生物合成过程中催化碳霉氨基糖的酰化(Catalyzes the acylation of the mycaminose sugar during midecamycin biosynthesis)”。但是, 在麦迪霉素的结构中, 在碳霉氨基糖上没有发生酰化。因此, 这一基因功能注释的修正(未见相应的文章发表), 如果是正确的话, 将对包括螺旋霉素、麦迪霉素等在内的若干 16 元大环内酯类抗生素的生物合成途径(尤其是糖基化过程的细节)的认识产生影响。

另外, 对 *mdmB*、*acyA*、*sspA* 这 3 个酶基因编码的蛋白在 NCBI 中进行了氨基酸序列比对分析, 结果显示: 这 3 个酶蛋白的氨基酸序列一致性(Identities)在 65%~80%、相似性(Positives)在 77%~87%; 其他的酰基转移酶虽然也与这 3 个酶蛋白之间存在序列相似性, 但是序列的一致性和相似性程度与前者相比存在一个显著的落差(例如, 最接近的

4''-碳霉糖异戊酰转移酶, 序列一致性在 40%左右、相似性在 50%~60%); 据此推测 *mdmB* 编码的酶蛋白具有 3-O-AT 活性是合理的。当然, 不能排除 *mdmB* 基因编码的酶蛋白是一个双功能酶的可能性; 但是, 这种猜想还有待实验、尤其是体外生物化学反应数据来证实。本研究的实验结果以及对螺旋霉素 3-O-AT^[8]及其基因阻断变株的分析结果^[2,11], 均间接地支持 *mdmB* 基因具有 3-O-AT 功能; 此外, 对来自 *Streptomyces thermotolerans* TH475 的碳霉素 3-O-AT 基因(*acyA*)功能的研究也证实其具有 3-O-AT 功能^[13, 14]。

无论是本实验室以前获得的 L3-O-ATA 变株, 还是本研究获得的 *mdmB* 替换变株, 与 SP 产生菌原株相比, SP 的生物合成水平均显著下降, 这是否与 Osamu Hara 提出的 *mdmB* 基因的新功能等有关, 还需深入研究。

REFERENCES

- [1] Zhang ZP, Yao TJ. English-Chinese Dictionary of Antibiotics. Beijing: Chemical Industry Press, 2006, 494. 张致平, 姚天爵. 英汉抗生素词典. 北京: 化学工业出版社, 2006, 494.
- [2] Hara O, Hutchinson CR. A macrolide 3-O-acyltransferase gene from the midecamycin-producing species *Streptomyces mycarofaciens*. *J Bacteriol*, 1992, **174**(15): 5141-5144.
- [3] Wu LZ, Ma CY, Wang YG, et al. Deletion of spiramycin 3-O-acyltransferase gene from *S. spiramyceticus* F21 resulting in the production of spiramycin I as major component. *Chin J Biotechnol*, 2007, **23**(4): 612-617. 武临专, 马春燕, 王以光, 等. 螺旋霉素 3-O-酰基转移酶基因的删除和主要产生螺旋霉素组分 I 菌株的获得. *生物工程学报*, 2007, **23**(4): 612-617.
- [4] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, **116**(1): 43-49.
- [5] Xu P, Li WJ, Xu LH, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from Actinomycetes. *Microbiolgy*, 2003, **30**(4): 73-75. 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, **30**(4): 73-75.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- [7] Shang GD, Dai JL, Wang YG. Construction of a stable bioengineered strain of biotechmycin. *Chin J Biotechnol*, 1999, **15**(2): 171-175. 尚广东, 戴剑滢, 王以光. 生技霉素稳定型基因工程菌

- 的构建. 生物工程学报, 1999, **15**(2): 171-175.
- [8] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, *et al.* Practical Streptomyces Genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [9] Omura S, Ikeda H, Kitao C. Isolation and properties of spiramycin I 3-hydroxyl acylase from *Streptomyces ambofaciens*. *J Biochem*, 1979, **86**(6): 1753-1758.
- [10] Zhang ZP. Microbial Pharmacy. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 623.
张致平. 微生物药理学. 北京: 化学工业出版社, 2003, 623.
- [11] Liu SK, Xie LF, Wang XR. Studies on fermentation titer and the productivity of midecamycin A1. *Chin J Antibio*, 2001, **26** (4): 301-303.
刘淑奎, 谢丽芳, 王欣荣. 提高麦白霉素发酵效价及有效 A1 组份产量的研究. 中国抗生素杂志, 2001, **26** (4): 301-303.
- [12] Blondelet-Rouault MH, Dominguez H, Darbon-Rongere E, *et al.* Polypeptides impliqués dans la biosynthèse des spiramycines, séquences nucléotidiques codant ces polypeptides et leurs applications: PCT patent, WO2004033689. 2004-04-22.
- [13] Arisawa A, Kawamura N, Takeda K, *et al.* Cloning of the macrolide antibiotic biosynthesis gene *acyA*, which encodes 3-O-acyltransferase, from *Streptomyces thermotolerans* and its use for direct fermentative production of a hybrid macrolide antibiotic. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(7): 2657-2660.
- [14] Arisawa A, Kawamura N, Narita T, *et al.* Direct fermentative production of acyltylosins by genetically-engineered strains of *Streptomyces fradiae*. *J Antibiot* (Tokyo), 1996, **49**(4): 349-354.



本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
默克化工技术(上海)有限公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	封三, 内页	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页
杭州博日科技有限公司	内页	汕头大学多学科研究中心招聘启事	内页