

# 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 Cloning and Analysis of Geldanamycin Partial Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces hygroscopicus* 17997

赫卫清, 王以光\*

HE Wei-Qing and WANG Yi-Guang\*

中国医学科学院/中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050

Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China

**摘 要** 吸水链霉菌 17997 (*Streptomyces hygroscopicus* 17997) 是我所从中国云南土壤中分离到的格尔德霉素(geldanamycin, GDM)产生菌, GDM 具有良好的抗肿瘤和抗病毒活性, 但其肝毒性和水溶性差的缺点限制了其在临床上的应用。为了实现对 GDM 结构的生物学改造, 首先要获得 GDM 的生物合成基因。根据 GDM 后修饰基因——氨甲酰基转移酶基因(*gdmN*)的保守序列筛选 *S. hygroscopicus* 17997 的柯斯质粒基因组文库, 共获得 6 个阳性克隆, 选择 CT-4 阳性柯斯质粒进行亚克隆和测序, 又通过 PCR 延伸的方法获得了与 CT4 连锁的将近 5kb 的外源序列, 共获得 28.356kb 的外源 DNA 序列, 其中包含了 13 个可能阅读框架, 通过同源比较证实该序列与 *S. hygroscopicus* NRRL 3602 中的 GDM 生物合成基因有很高的同源性。为进一步研究 GDM 生物合成基因的功能, 并通过组合生物学的方法改造 GDM 的结构奠定了基础。

**关键词** 吸水链霉菌 17997 格尔德霉素(geldanamycin, GDM) 氨甲酰基转移酶基因 生物合成基因簇

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0902-05

**Abstract** A geldanamycin(GDM) producing strain, *Streptomyces hygroscopicus* 17997, was isolated from Yunnan China soil by our institute researchers. GDM is an ansamycin antibiotic, which has the ability to bind with Hsp90(Heat Shock Protein 90) and alter its function. Hsp90 is a chaperone protein involved in the regulation of the cell cycle, cell growth, cell survival, apoptosis, and oncogenesis. So it plays a key role in regulating the physiology of cells exposed to environmental stress and in maintaining the malignant phenotype of tumor cells. As an inhibitor of Hsp90, GDM possesses potent antitumor and antiviral bioactivity, but the hepatotoxicity and poor solubility in water limits its clinical use. Two GDM derivatives, 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin(17-AAG) and 17-dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycin(17-DMAG), both showing lesser hepatotoxicity, are now in Phase II and Phase I clinic trials. In order to accomplish the structure modification of GDM by genetic means, an attempt to obtain the biosynthetic gene cluster of GDM from *S. hygroscopicus* 17997 was made. In this study, a pair of primers was designed according to a conserved sequence of one of possible post-PKS(polyketides synthase) modification genes, the carbamoyltransferase(CT) gene(*gdmN*) in GDM biosynthesis. The 732 bp PCR product was obtained from the *S. hygroscopicus* 17997 genomic DNA. Through the colony-PCR Binary Search Method, using the CT gene primers, six positive cosmid clones, CT1-6, were identified from the *S. hygroscopicus* 17997 cosmid genomic library. The CT gene containing

Received: July 14, 2006; Accepted: August 8, 2006.

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

This work was supported by the grant from the National Dept. of Sciences and Technology under Preliminary Basic Research 973 Project(No.2001CCA00500).

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

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

fragments were verified and localized by Southern blot. The CT-4 positive cosmid was then sub-cloned and sequenced. Approximately 28.356kb of foreign gene sequence from CT-4 cosmid and by further PCR extension reaction was obtained. Based on BLAST analysis, this sequence contains 13 possible ORFs and their deduced functions are believed to be involved in GDM production. The ORF1 encoding products show homology (87%) with incomplete sixth module and complete seventh module of PKS, *gdmA3*, in *S. hygroscopicus* NRRL 3602. The ORF2-13 gene products are similar to *gdmF* (95%), *gdmM* (88%), *gdmN* (92%), *gdmH* (92%), *I* (93%), *J* (90%), *K* (93%), *G* (96%), *gdmO* (91%) *gdmP* (93%) and two transcription regulation genes *gdmRI* (83%) and *gdmRII* (90%). The obtained possible GDM biosynthetic gene cluster in *S. hygroscopicus* 17997 will facilitate the further functional analysis of the genes and to modify the structure of GDM through combinatorial biosynthesis.

**Key words** *Streptomyces hygroscopicus* 17997, geldanamycin (GDM), carbamoyltransferase gene, biosynthetic gene cluster

吸水链霉菌 17997 (*Streptomyces hygroscopicus* 17997) 是本所从云南土壤中分离得到的格尔德霉素 (geldanamycin, GDM) 产生菌。GDM 属于苯安莎类抗生素。最先发现 GDM 具有抗原虫和抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>, 本所的研究发现 GDM 还具有良好的抗病毒活性<sup>[2]</sup>。近年的研究表明 GDM 的这些生物学活性是因为它能特异地抑制热休克蛋白 90 (Hsp90) 的 ATP/ADP 结构域<sup>3,4]</sup>, 下调多种 Hsp90 的靶蛋白功能所致。GDM 作为 Hsp90 的特异性抑制剂, 在抗癌和抗病毒治疗中极具潜在的应用前景。但因为 GDM 肝毒性比较大, 水溶性较差, 限制了其实际应用, 所以寻找其低毒、可溶性好的衍生物成为当今研究的主要目标。两种在 GDM C17 位进行取代的衍生物 17-AAG 和 17-DMAG 已在美国进行 II 期和 I 期临床实验<sup>[5,6]</sup>。

为了实现对 GDM 生物学方法的改造, 首先需要从吸水链霉菌 17997 克隆 GDM 生物合成的相关基因。本实验室高群杰博士<sup>[7]</sup>曾根据参与 GDM 生物合成的起始单位 3-氨基-5-羟基苯甲酸 (3-amino-5-hydroxybenzoic acid, AHBA)<sup>8,9]</sup> 合酶基因的保守区域设计兼并引物, 从吸水链霉菌 17997 柯斯质粒基因文库中扩增, 获得了两种 AHBA 生物合成基因簇及与之连锁的部分 PKS 基因片段, 通过基因阻断实验鉴定了参与 GDM 的 AHBA 生物合成基因簇<sup>[10]</sup>, 但所克隆的基因簇中不包括 PKS 后修饰基因。

2003 年 Rascher A<sup>[11]</sup> 报道了 *S. hygroscopicus* NRRL3602 中 GDM 的大部分生物合成基因簇, 但其中缺少 GDM 合成的起始单位 AHBA 生物合成基因簇。为获得完整的 GDM 生物合成基因簇, 本研究以 GDM 的 PKS 后修饰基因-氨甲酰基转移酶 (CT) 基因为起点, 继续克隆与 GDM 生物合成相关的连锁片段, 为今后研究 GDM 生物合成基因的功能和组合生物合成改造 GDM 奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、文库和载体:** 吸水链霉菌 17997 (*S. hygroscopicus* 17997) 格尔德霉素产生菌, 本所保存。吸水链霉菌 17997 基因组文库: 由本实验室高群杰博士构建。 *E. coli* DH-5 $\alpha$ : 大肠杆菌质粒转化用受体菌, 由本实验室保存。pUC18 (Amp<sup>R</sup>): 克隆测序用载体, 由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** LB、SGGP 培养基按<sup>[12,13]</sup>配制, *S. hygroscopicus* 17997 斜面培养基 (MY) (Yeast extract 4 g, Malt extract 10 g, Glucose 4 g 定溶 1000 mL)。氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 为华美公司产品, IPTG 和 X-gal 均购自 Promega 公司。溶菌酶购自 Sigma 公司。限制酶、LA-Taq 酶、连接酶、去磷酸化酶 (CIAP) 均购自 TaKaRa 公司。DNA 回收采用北京鼎国生物技术有限公司的 DNA 快速纯化/回收试剂盒。地高辛探针标记试剂盒为 ROCHE (B. M.) 公司, DIG DNA Labeling & Detection Kit; Southern 杂交尼龙膜购自 Amersham 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 *E. coli* 质粒 DNA 小量提取按分子克隆实验手册的方法<sup>[12]</sup>, DNA 一般操作均按产品说明书进行。链霉菌总 DNA 提取方法及少量快速提取链霉菌总 DNA 按文献<sup>[13]</sup>。**

**1.2.2 PCR 反应:** PCR 反应采用 TaKaRa LA-Taq 酶, GC-I 体系 (20 $\mu$ L) (ddH<sub>2</sub>O 4.6 $\mu$ L, GC-I buffer (2 $\times$ ) 10.0 $\mu$ L, Primer (25 $\mu$ mol/L) 各 0.5 $\mu$ L, Template 1.0 $\mu$ L, dNTP (2.5mmol/L) 3.2 $\mu$ L, Taq 酶 0.2 $\mu$ L)。反应条件: 仪器 40 $^{\circ}$ C 预热 1min, 96 $^{\circ}$ C 预解链 2min, 解链 96 $^{\circ}$ C  $\times$  40s; 退火 55 ~ 62 $^{\circ}$ C  $\times$  40s; 延伸 72 $^{\circ}$ C  $\times$  1.5min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min 后结束反应。

**1.2.3 从基因文库筛选阳性克隆的菌落 PCR 方法:**

本研究采用每次折半查找的方法,从本实验室构建的含 4000 多个柯斯质粒的 *S. hygroscopicus* 17997 基因组文库中获得 6 个阳性克隆,再将每一个单克隆分别作为模板进行 PCR 反应,从而找出包含所需基因片段的阳性柯斯质粒。

2 结果与讨论

2.1 氨甲酰基转移酶 (carbamoyltransferase, CT) 基因的克隆

GDM 生物合成已有的研究表明,在其聚酮体形成后的修饰包括 C4、5 位的氧化, C7 位的氨甲酰基化, C17 位的羟基化以及此后的氧甲基化和 C21 位的氧化等。根据 NCBI 公布的 GDM 生物合成基因序列推测, *gdmN* 基因编码的氨甲酰基转移酶负责 GDM C7 位的氨甲酰基化。

为了进一步获取 *S. hygroscopicus* 17997 中 GDM 生物合成基因簇信息,我们根据 *gdmN* 序列的保守区设计引物,上游引物: 5'-CCGGAATTC TGGGCCACCGCAGCATCGTC-3' (*EcoR* I),下游引物: 5'-AAAAGTGCAGTGAGGAACCGC TGCTCCCAC-3' (*Pst* I)。

以 *S. hygroscopicus* 17997 总 DNA 为模板经 PCR 扩增获得目的片段,其长度为 732bp。电泳结果见图 1。

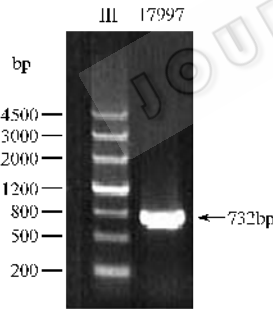


图1 CT 基因 PCR 产物的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR product of CT gene

III : DNA marker III ; 17997 : PCR product from *S. hygroscopicus* 17997 DNA.

回收此条带,用 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切与 pUC18 载体连接转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,鉴定正确的克隆,进行测序。

将测得的序列在 NCBI 上进行同源性比较,分析结果表明 732bp 的 PCR 产物与已公布的 *gdmN* 序列有 94% 的同源性。

2.2 *S. hygroscopicus* 17997 中与 *gdmN* (CT) 基因连锁的 GDM 生物合成基因簇的获得

2.2.1 含 CT 基因的柯斯质粒克隆的获得 利用所设

计的 CT 基因引物,按实验方法中所述折半查找的菌落 PCR 筛选方法,直接筛选 *S. hygroscopicus* 17997 基因文库,从 4000 个柯斯质粒克隆中获得 6 个阳性克隆,CT1-6 其 PCR 产物电泳见图 2。

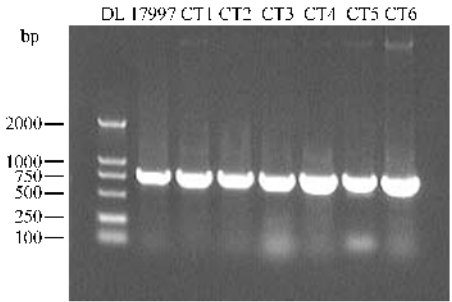


图2 6 个 CT 阳性柯斯质粒的 PCR 电泳

Fig.2 Electrophoresis of PCR products from six CT gene positive cosmids

DL : DL2000 marker ; 17997 : *S. hygroscopicus* 17997 DNA ; CT1-CT6 : CT gene positive cosmids.

2.2.2 CT 基因在柯斯质粒中的定位 :为了验证阳性克隆中所含 CT 基因,并将它们在外源片段中进行定位,将 CT1-6 用 *Bam* H I 及 *Bam* H I / *Sac* I 进行酶切,再以 CT 基因 PCR 产物为探针进行 Southern 杂交 (图略)。结果表明,所研究的柯斯质粒中都包含有 CT 基因。选择 CT-4 进行后续的亚克隆和测序分析。

2.2.3 CT-4 的亚克隆序列测定与生物信息学分析 :首先用 *Bam* H I 酶切 CT-4 柯斯质粒,外源片段中有 5 个 *Bam* H I 片段分别为 14kb、3.9kb、1.7kb、1.4kb、1.2kb 左右,分别回收了 14kb 以外的 4 个 *Bam* H I 酶切片段,连接到 pUC18 载体上进行亚克隆及测序。将 14kb 左右的 *Bam* H I 酶切片段回收后再进行 *Sac* I 酶切,与 CT4 柯斯质粒的 *Bam* H I / *Sac* I 酶切电泳图谱进行比较,有 4 个相对应的酶切片段,大小分别为 4.1kb、2.6kb、2.0kb、1.4kb 左右,将这些片段分别与 *Sac* I 单酶切和 *Sac* I / *Bam* H I 双酶切的 pUC18 载体连接,亚克隆进行酶切鉴定和测序。

将测得的序列与 NCBI 公布的 *S. hygroscopicus* NRRL 3602 中 GDM 的生物合成基因簇相应基因进行比较,发现其同源性很高,且排列一致,但是缺少最外端的 *LuxR* 家族的调节基因。根据已测出的序列和已知的基因序列,设计引物,并插入 *Xba* I 克隆位点。

上游引物 5' CTAGTCTAGA AGTTCGTCCACCGCG TTG3', 下游引物 5' CTAGTCTAGA GGTTCATAGAC GCGCTGCB' 应用上述引物,经 PCR 在 *S.*

*hygroscopicus*17997 基因组中得到一条 5kb 左右的特异性条带,经测序获得 4932bp 的 DNA 序列,该序列中包含有与原测定序列的重叠部分,并覆盖了一个 LuxR 家族调节基因的全序列。

通过酶切鉴定、PCR 验证和测序及序列拼接工作,获得外源片段总长约 28.356kb 的基因序列。该序列已提交 NCBI GenBank,登录号为 DQ914285。

2.2.4 *S. hygroscopicus* 17997 中 GDM 部分生物合成基因簇连锁图:将总长约 28.356kb 的 DNA 进行 ORF 分析,共获得 13 个可能的编码阅读开放框架(ORF)经与 NCBI 公布的 GDM 生物合成基因进行同源性分析,结果表明,本研究获得了 13 个可能与

GDM 生物合成相关的基因,其同源性分别是:ORF1 与 *S. hygroscopicus* NRRL 3602 PKS ORF *gdmA3* 中不完整的第 6 模块(包括 AT、DH、ER、KR、ACP 活性域)和完整的第 7 模块(包括 KS、AT、DH、KR 和 ACP 活性域)的同源性为 87%;ORF2-13 分别与 *gdmF* (95%)、*gdmM* (88%)、*gdmN* (92%)、*gdmH* (92%)、I (93%)、J (90%)、K (93%)、G (96%)、*gdmO* (91%)、*gdmP* (93%) 以及两个调节基因 *gdmRI* (83%) 和 *gdmRII* (90%) 同源。这些基因排列顺序见图 3,表明它们与 *S. hygroscopicus* NRRL 3602 中 GDM 部分生物合成基因簇的排列结构是一致的。

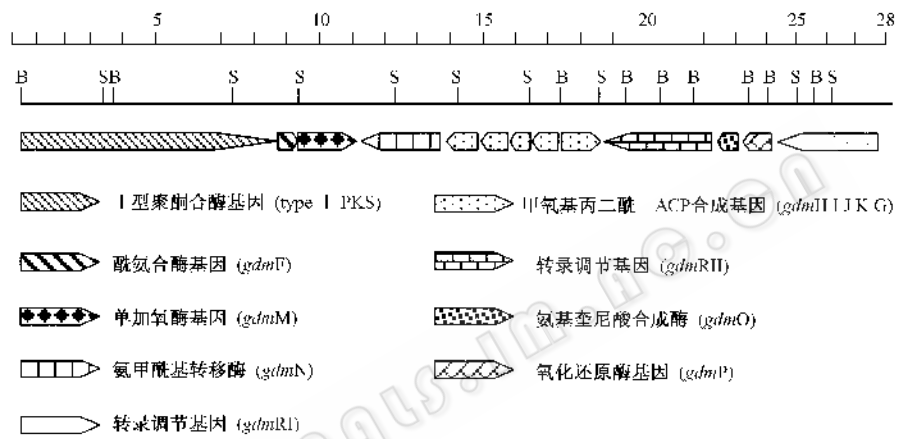


图 3 *S. hygroscopicus* 17997 中 GDM 部分生物合成基因连锁图

Fig.3 The linkage map of geldanamycin partial biosynthetic gene cluster in *S. hygroscopicus* 17997

本实验室原利用 AHBA 合酶基因保守序列在吸水链霉菌 17997 中克隆得到两套 AHBA 生物合成基因簇及与之连锁的部分 PKS 基因片段。本研究继而以参与格尔德霉素生物合成聚酮体后修饰的氨甲酰基转移酶基因为靶点,根据此基因的保守序列设计引物,通过 PCR 从吸水链霉菌 17997 基因文库中获得 28.356kb 的基因序列,其中包含了 13 个可能参与 GDM 生物合成的基因,这样本实验室已经基本获得了格尔德霉素生物合成基因簇,这些工作为研究格尔德霉素生物合成的相关基因的功能以及通过基因阻断或基因重组获得格尔德霉素的新衍生物奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Sasaki K, Yasuda H, Onodera K. Growth inhibition of virus transformed cells *in vitro* and antitumor activity *in vivo* of geldanamycin and its derivatives. *J Antibiot (Tokyo)*, 1979, **32** (8): 849 - 851

[ 2 ] Tang PJ (陶佩珍), Lou ZX (娄志贤), Yao TJ (姚天爵) *et al.* Antiviral study on the broad spectrum antiviral antibiotic 17997 *in vitro* and *in vivo*. *Chinese J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 1997, **22** 368 - 372

[ 3 ] Prodromou C, Roe SM, O'Brien R *et al.* Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997, **90** (1): 65 - 75

[ 4 ] Stebbins CE, Russo AA, Schneider C *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 1997, **89** (2): 239 - 250

[ 5 ] Goetz MP, Toft D, Reid J *et al.* Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*, 2005, **23** (6): 1078 - 1087

[ 6 ] Glaze ER, Lambert AL, Smith AC *et al.* Preclinical toxicity of a geldanamycin analog, 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), in rats and dogs: potential clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, **56** (6): 637 - 647

[ 7 ] Gao QJ (高群杰), Shang GD (尚广东), Wang YQ (王以光) *et al.* Cloning and analysis of geldanamycin biosynthetic genes from *S. hygroscopicus* 17997. *Chinese J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2002, **27**: 13 - 17

- [ 8 ] Ghisalba O , Nüesch J. Genetic approach to the biosynthesis of the rifamycin-chromophore in *Nocardia mediterranei* . IV , identification of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid as a direct precursor of the seven-carbon amino starter-unit. *J Antibiot* ( Tokyo ) , 1981 **34** :64 – 71
- [ 9 ] Becker AM , Herlt AJ , Hilton GL *et al* . 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid in antibiotic biosynthesis. VI. Directed biosynthesis studies with ansamycin antibiotics. *J Antibiot* ( Tokyo ) , 1983 **36** :1323 – 1328
- [ 10 ] He WQ( 赫卫清 ) , Wu LZ( 武临专 ) , Wang YG( 王以光 ) *et al* . Identification of AHBA biosynthetic genes related to geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Curr Microbiol* , 2006 , **52** ( 3 ) : 197 – 203
- [ 11 ] Rascher A , Hu Z , Viswanathan N *et al* . Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS Microbiol Lett* , 2003 **218** :223 – 230
- [ 12 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 , pp. 19 – 23
- [ 13 ] Kieser T , Bibb MJ , Buttner MJ , Chater KF , Hopwood DA. *Practical Streptomyces genetics* , the John Innes Foundation , Norwich , 2000 , pp. 162 – 170