

鉴别杰多霉素生物合成后修饰氧化酶 JadH 中参与底物结合或催化的关键残基

彭晓静^{1*}, 季俊杰^{1*}, 张霞², 范可强², 金玲¹, 张玉秀¹, 杨克迁²

1 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

彭晓静, 季俊杰, 张霞, 等. 鉴别杰多霉素生物合成后修饰氧化酶 JadH 中参与底物结合或催化的关键残基. 生物工程学报, 2012, 28(8): 950-958.

Peng XJ, Ji JJ, Zhang X, et al. Identification of key residues in the catalytic center JadH involved in binding substrates or catalysis of jadomycin biosynthesis. Chin J Biotech, 2012, 28(8): 950-958.

摘要: JadH 是羟化脱水双功能酶, 参与杰多霉素生物合成中的聚酮后修饰反应, 将 2,3-dehydro-UWM6 催化为 dehydrorabelomycin。为了分析杰多霉素生物合成途径中后修饰氧化酶 JadH 结合、催化底物的关键氨基酸, 构建了 JadH 与底物复合物的三维结构模型。利用该模型并结合 JadH 同源蛋白氨基酸序列比对分析, 推测出 JadH 活性中心中可能参与底物结合或催化的关键氨基酸 (R50、G51、L52、G53、F100、R221、I223、P295 和 G298)。通过定点突变及体外酶学实验对这些位点的突变体的催化活性进行评价, 结果显示这些突变株活性均显著低于野生型, 表明这 9 个氨基酸是 JadH 参与底物结合或催化的关键氨基酸。

关键词: 杰多霉素, 后修饰氧化酶, 定点突变, 活性中心

Received: February 25, 2012; **Accepted:** March 26, 2012

Supported by: National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (No. 2009ZX08009-130B), Fundamental Research Funds for the Central University (No. 2010YH05).

Corresponding author: Yuxiu Zhang. Tel/Fax: +86-10-62331792; E-mail: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn

Keqian Yang. Tel/Fax: +86-10-64807459; E-mail: yangkq@im.ac.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-130B), 中央高校基本科研业务费专项 (No. 2010YH05) 资助。

Identification of key residues in the catalytic center JadH involved in binding substrates or catalysis of jadomycin biosynthesis

Xiaojing Peng^{1*}, Junjie Ji^{1*}, Xia Zhang², Keqiang Fan², Ling Jin¹, Yuxiu Zhang¹, and Keqian Yang²

¹ School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

² State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: JadH is a bifunctional hydroxylase/dehydrase involved in jadomycin biosynthesis; it catalyzes a post-PKS modification reaction to convert 2,3-dehydro-UWM6 to dehydrorabelomycin. To identify the key residues involved in substrate-binding and catalysis, structural modeling and multiple sequence alignments of JadH homologs were performed to predict nine residues at the proximity of substrate. Site-directed mutagenesis of the corresponding residues and *in vitro* evaluation of the activities of the mutant enzymes, indicate these mutations severely reduced JadH activity. Our results indicate these residues are specifically involved in substrate-binding or catalysis in JadH.

Keywords: jadomycin, post-tailor oxygenase, site-directed mutagenesis, catalytic domain

角蕈环类聚酮抗生素是土壤中链霉菌产生的一类特殊的芳香聚酮化合物,具有化学结构和生理功能多样性。与其他芳香聚酮化合物一样,角蕈环类聚酮由 II 型聚酮合酶 (Polyketide synthase, PKS) 催化合成。最小 PKS (聚酮合酶 α 、聚酮合酶 β 、酰基载体蛋白) 催化短链羧酸连续脱羧聚合,形成聚酮碳链骨架^[1],然后经过聚酮还原酶、环化/芳化酶等形成一个常见的角蕈环类中间产物 UWM6^[2]。随后的聚酮后修饰作用,如氧化还原、甲基化、糖基化等,对终产物的结构多样性起决定性作用,同时引入的基团也对产物的生物活性产生重要的影响。因此,通过对聚酮后修饰酶的研究,阐明后修饰作用的机理,应用于合成生物学中,将有助于理性合成新的“非天然”的聚酮化合物。杰多霉素 (Jadomycin, JD) 是委内瑞拉链霉菌 *Streptomyces venezuelae*

ISP5230 经热激、乙醇处理或噬菌体感染产生的非典型角蕈环类抗生素^[3-4],具有抗革兰氏阳性菌、酵母、及广谱的抗肿瘤活性^[5-6],有重要的应用价值。研究表明杰多霉素可以通过抑制极光激酶 B 的活性,引发细胞凋亡^[6],同时还有杀伤耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[7]和造成 DNA 损伤的活性^[8]。

和其他角蕈环类聚酮化合物一样,杰多霉素也是经过对 UWM6 的羟化、脱水、氧化、骨架重排和糖基化等后修饰作用得到。已有的研究表明, FAD 依赖的单加氧酶 JadH 催化中间产物 2,3-dehydro-UWM6 (DHU) 的 C12 位羟化和 4a,12b 位脱水反应,得到 CR1,后者在空气中可以自发氧化生成另一个中间产物 dehydrorabelomycin (DHR),因此 JadH 是一个羟化/脱水双功能酶^[9]。氨基酸序列比对显示, JadH

与参与角蕈环聚酮合成的 FAD 和 NADPH 依赖的单加氧酶 PgaE、CabE 和 UrdE 等有高的序列一致性。JadH 与 PgaE 同源率为 59%。PgaE 参与 gaudimycin 生物合成过程中两步连续的氧依赖的后修饰反应:中间产物 DHU 在 C12 和 C12b 位的羟化^[10-11]。JadH、PgaE 和 CabE 等与多种 FAD 依赖的芳香羟化酶 (FAD-dependent aromatic hydroxylases, FAH) 表现出一定的序列相似性,表明它们可能具有相同的反应机理。许多 FAD 依赖的芳香羟化酶的结构和反应机制已经得到深入研究,其中存在着复杂的构象变化^[12]。通过分析对羟基苯甲酸羟化酶 (p-hydroxybenzoate hydroxylase, PHBH) 的晶体结构 (1PBE) 和定点突变数据,推测在反应过程中,PHBH 可能经历 3 种不同构象的转化^[13-14]:与底物结合的 PHBH 处于“in”构象;底物电离触发酶的构象变化,转为“out”构象,从而可以与 NADPH 结合并使 FAD 还原得到 FADH₂;释放 NADP⁺后 PHBH 恢复“in”构象,FADH₂被 O₂氧化得到过氧化中间体,并进一步羟化底物对羟基苯甲酸,此时的“in”构象保证了活性中间体不与溶剂接触而失活;随后产物被释放,酶转为“open”构象,可以再次结合底物,开始新一轮循环。几个关键氨基酸残基的突变可以影响 PHBH 的构象转换,干扰酶催化过程,其中 R220Q 和 A45V 可以稳定“open”构象^[15],减缓底物结合速率;A45G 可以稳定“in”构象^[16],阻断反应过程。芳香羟化酶 PgaE 和 CabE 与 PHBH 的三维结构相似。P282S 突变使 PgaE 活性提高^[17]。JadH 可能在与 PHBH 和 PgaE 相似的反应历程和构象变化。

本研究通过构建 JadH 结合底物 DHU 的三维

结构模型和氨基酸序列比对,用定点突变和体外酶学催化实验分析可能影响 JadH 活性的关键氨基酸,从而为进一步了解 JadH 结合底物的方式以及催化反应的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

含 *jadFGHK* 基因的质粒 pJV69A (+)、质粒 pET30a (+)、*E. coli* BL21 (DE3) 菌株为本实验室构建或保存。

1.1.2 酶和主要试剂

KOD_Plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司。T4 DNA 连接酶和 DNA 限制性内切酶购自 TaKaRa (Shiga, Japan) 公司。Ni-NTA Superflow 购自 GE 公司。化学试剂 FAD 和 NADPH 均购自 Sigma-Aldrich 公司。PCR 扩增引物和 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。DHU、DHR 和 CR1 均由本实验室制备。

1.2 方法

DNA 分子操作、感受态制备和转化均遵循《分子克隆实验指南》^[18]。BLAST 系列软件 (NCBI) 用来从数据库中搜索相关基因或蛋白序列。多重序列比对利用 Clustal X 完成。蛋白的建模工作利用 SWISS-MODEL Web 服务器完成。蛋白三级结构的观察和作图利用 RasMol、Swiss-Pdb Viewer 和 MolMol 完成。

1.2.1 JadH 野生型表达载体的构建

天然序列的 JadH 和带有 His₆ 标签的 JadH 催化活性几乎没有差异,为了方便后续实验蛋白的纯化,构建表达载体 pET30a-*jadH*-nHis, 用来表

达带有 His 标签的 JadH 蛋白。以 pJV69A (+) 为模板, 使用正向引物 (5'-GTGGGTACCGTGAC CACCACCCCG-3') (下划线表示 *Kpn* I 的酶切位点) 和反向引物 (5'-GGAATTCACCGGGCCGC GCCGC-3') (下划线表示 *EcoR* I 的酶切位点), PCR 得到含有完整 *jadH* 基因的片段。用 *Kpn* I 和 *EcoR* I 双酶切 *jadH* 片段和 pET30a (+)。将酶切得到的载体和目的片段连接, 连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3), 对得到的克隆进行 DNA 序列测序, 筛选得到构建正确的 pET30a-*jadH*-nHis。

1.2.2 JadH 突变体表达质粒的构建

以构建好的野生型 JadH 的表达载体 pET30a-*jadH*-nHis 为模板, 设计均含有突变位点的、部分互补的突变引物进行 PCR。在 PCR 产物中加入 1 μ L DpnI 酶, 37 $^{\circ}$ C 酶切 1 h, 酶切产物转化 *E. coli* BL21 (DE3), 对得到的克隆进行 DNA 序列测序, 筛选得到构建正确的 JadH 突变体表达质粒。

1.2.3 JadH 野生型和突变体的表达与纯化

带有野生型和突变型 JadH 表达质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 在含 50 mg/L 硫酸卡那霉素的 Luria-Bertani (LB) 培养基中 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6, 加入 IPTG 至 0.5 mmol/L, 16 $^{\circ}$ C、220 r/min 诱导表达 10 h。离心收集菌体。重悬于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0), 超声破碎后离心取上清。按 Ni-NTA Superflow 说明纯化 JadH 野生型及其突变体。将纯化得到的蛋白于 30 kDa 的超滤管中脱盐浓缩, 重复 3 次。

1.2.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度用 Bradford 法^[19]测定。

1.2.5 体外酶学反应

将纯化得到的酶 (0.2 μ mol; JadH-N-His) 加

到反应混合液中 (总体积为 200 μ L, 含有 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0, 4 μ mol/L FAD, 125 μ mol/L NADPH 和 100 μ mol/L DHU), 32 $^{\circ}$ C 反应 60 s, 加入 1 μ L 1 mol/L 的 HCl 终止反应。HPLC 检测反应产物。

1.2.6 HPLC 检测分析

反应产物 CR1 和 DHR 的定量检测使用 C18 反相 HPLC (Shimadzu Prominence HPLC system)。洗脱速度为 1 mL/min, 洗脱梯度为 25% 乙腈 +0.1% TFA 到 100% 乙腈+0.1% TFA。底物 DHU, 产物 CR1 和 DHR 在 266 nm 和 320 nm 处检测。

1.2.7 相对活性分析

由于 JadH 的真正催化产物 CR1 在酶促反应体系中会自发氧化转化为 DHR, 因此在计算 JadH 的催化活性时, 要将产物 DHR 折合成 CR1 的量。根据对 CR1 自发氧化过程的 HPLC 分析, 确定 DHR 与 CR1 的峰面积比值为 1.4625 : 1。因此可按下面公式计算折合产物量:

折合产物量=产物 CR1 峰面积+产物 DHR 峰面积/1.4625。

突变型 JadH 酶的相对活性根据折合产物量计算:

相对活性=突变体酶的折合产物量 \times 100/野生型酶的折合产物量。

2 结果

2.1 JadH 结构模型的构建和分析

以 CabE 的晶体结构 (2QA1) 为模型构建 JadH 的三维结构模型, 并使用 PSI-Dock 程序^[20]构建 JadH 与 DHU 复合物的结构模型。结构模型分析显示, 底物 DHU 结合于 JadH 的一个疏水性口袋之中, 并与 R50、G51、L52、F100、R221、

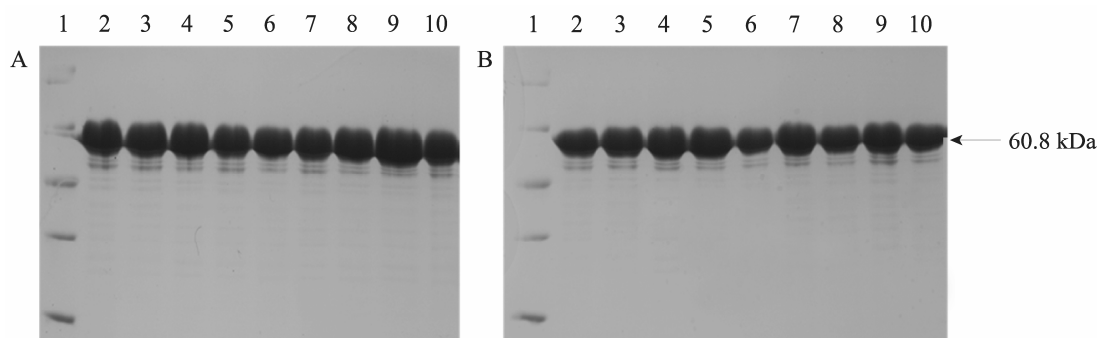


图 2 纯化后 JadH 及其突变体蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified wild type JadH and mutants. (A) 1: low molecular weight protein marker; 2: wild type JadH; 3: L52T; 4: L52K; 5: L52D; 6: G298K; 7: G298L; 8: G51V; 9: F100A; 10: wild type JadH. (B) 1: low molecular weight protein marker; 2: wild type JadH; 3: I223A; 4: R221Q; 5: R221L; 6: P295S; 7: G53D; 8: G53K; 9: R50L; 10: wild type JadH.

表 1 JadH 突变株的相对活性

Table 1 The relative catalytic activities of JadH mutants

Samples	Relative activity (%)	Samples	Relative activity (%)
Wild-type	100.00	Wild-type	100.00
R50L	0.98	G51V	0.47
L52D	2.32	L52K	2.91
L52T	26.08	G53D	1.47
G53K	0.79	F100A	14.65
R221L	0.35	R221Q	0.70
I223A	1.03	P295S	4.65
G298L	2.64	G298K	0.47

3 讨论

迄今为止,还没有关于 JadH 蛋白晶体结构的报道,我们依据 JadH 同源蛋白 CabE 的晶体结构构建了 JadH 及其与 DHU 复合物的结构模型(图 3)。该结构模型与 CabE 的晶体结构非常类似。通过分析结构模型并与其他羟化酶和氧化酶进行序列比较,推测 JadH 中 9 个氨基酸 (R50、

G51、L52、G53、F100、R221、I223、P295 和 G298) 可能参与底物识别、构象转换或参与维持 FAD 所在区域内合适的疏水环境。我们通过定点突变得到 JadH 的突变体后进行体外酶学反应,通过 HPLC 检测产物,以 JadH 野生型为对照,分析 JadH 突变体的相对活性,对这些残基的功能进行了验证。

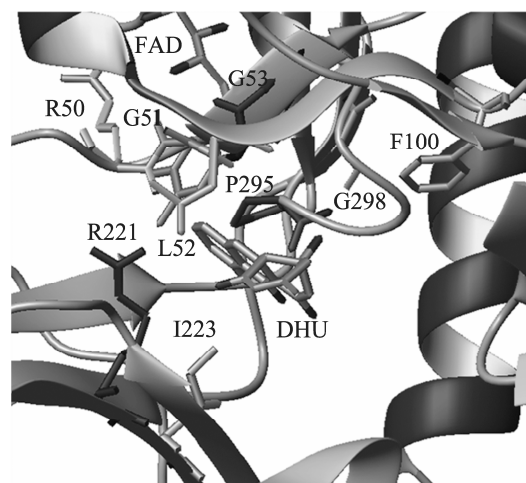


图 3 JadH 底物结合口袋内的关键氨基酸

Fig. 3 The key residues in the substrate-binding pocket of JadH.

所得突变体的活性均远低于野生型, 其中 L52T 与 F100A 的相对活性分别为野生型的 26.08% 和 14.65%; L52D、L52K、I223A、G298L 和 P295S 突变体只有微弱的催化活性 (相对活性 1%~5%); G298K、R221L、R221Q 和 R50L 均丧失了催化活性 (相对活性 < 1%)。R50 是一个带正电荷的极性氨基酸, 而 Leu 为非极性氨基酸, 极性的变化导致突变株 R50L 基本丧失催化活性。结构模型显示, I223 可与底物 DHU 形成疏水相互作用, 当将其突变为 Ala 时, 疏水作用减弱, 而且链长改变导致空间位阻效应, 因此 I223A 只有微弱的催化活性。残基 L52 和 P295 可分别与底物 DHU 的 A 环和 D 环形成疏水相互作用, 当突变为极性氨基酸 Asp、Lys 或 Ser 时, JadH 与底物疏水作用减弱, 识别、结合底物的能力降低, 催化活性也随之降低。另外, F100 侧链的苯环可能与底物 DHU 的 C3 位甲基形成较弱的疏水作用, Phe 突变为 Ala 后, 疏水作用减弱, 影响底物的结合, 导致活性较低。除疏水作用外, 氢键也是酶与底物识别的重要结构基础。结构模型显示, G298 主链上的氨基与底物的 C4a 位羟基可能形成很强的氢键, R221 的侧链末端胍基也可能与底物的 C1 位羰基氧形成氢键。当将 Gly 突变为具有较大侧链的 Leu 或 Lys 时, 产生较大的空间阻碍, 干扰了氢键的形成, 因此 G298K 丧失了催化活性, G298L 也仅有微弱的活性 (2.27%)。而突变 R221L 和 R221Q 均同样也会干扰 R221 侧链胍基参与氢键的形成, 进而影响到 JadH 的活性。同时, JadH 的催化功能依赖 FAD, 推测脱水反应可能是由 FAD 传递质子的酸碱催化反应。疏水口袋的 FAD 所在区域本身不带电荷, 将 L52 突变为带正电的 Lys 或

者带负电荷的 Asp 后, 会改变底物结合区域的静电性质, 可能干扰 FAD 的质子传递过程, 因此也会导致活性降低。同时, 虽然 Thr 的疏水性比 Leu 弱, 但是由于其带有一个烷基侧链, 也可与底物形成疏水相互作用, 因此 L52T 的相对活性高于 L52D, 为 26.08%。

根据序列和结构特征, 推测 JadH 应该具有和 FAD 依赖的芳香羟化酶类似的反应机理和构象转化过程。根据 PHBH 的研究结果以及序列比对信息推测, JadH 的 G51 可能参与酶的构象转化过程, G51 突变成 Val 以后可稳定 Open 构象, 减缓底物结合速率, 从而降低酶的活性。G53 距离底物的脱水位置和 FAD 都比较近, 将其突变成带电的 Lys 和 Asp, 会改变底物区域的静电性质, 干扰 FAD 在底物脱水过程中的质子传递过程, 从而影响其活性, 这与实验结果一致。

但令人意外的是, 突变体 P295S 的活性远低于野生型酶, 这与 PgaE 中对应的氨基酸 P282 的结果截然不同。在 PgaE 中将 P282 突变为 Ser 使 PgaE 活性提高, 作者推测 P282 可能起到触发和传递构象变化的关键作用, P282 突变为 Ser 后构象变化的能垒减弱, 有利于构象转变^[17]。在 JadH 的结构中, P295 可能与 DHU 的 D 环形成疏水作用, 可能涉及构象转换, 并且 P295 可能与附近的 L294、A296、V352、P268 以及 P85 形成一个疏水的区域, 保证活性中心氧化反应的顺利进行。当 P282 突变为 Ser 后可能会与 T269 形成氢键, 而 P295 与底物 DHU 以及附近疏水性氨基酸之间的疏水作用被破坏, 从而不利于反应的进行, 所以造成了 P295S 活性的剧烈下降。

目前只有少数几种 FAD 依赖型单加氧酶的催化机理研究得比较深入。例如, PHBH、PgaE

和 CabE 已经得到晶体结构, 并且分析了 PHBH 和 PgaE 活性中心的关键残基, 推测了可能的反应机理^[13,17,21]。通过异源表达和基因敲除等实验对褐黄癌菌素^[22]、竹桃霉素^[23]、乌达霉素^[24]合成基因簇中的 JadH 同源蛋白进行了功能研究, 推测它们可能催化不同中间体的羟化反应。还有一些聚酮合成途径中的黄素依赖型单加氧酶没有得到详细的功能研究, 只是根据序列特征进行了功能推测, 如 auricin 合成基因簇中的 Aur1A 和 Aur1I^[25], simocyclinone 合成基因簇中的 SimA7、SimA8 和 Sim7^[26], alpomycin 合成基因簇中的 AlpG 和 AlpF^[27]等。除 PgaE 的突变株 H83A 和 P282S 活性提高 150%、K92Q 活性与野生型相当, N289D 和 Δ 377-491 活性显著降低外 ($\leq 1\%$)^[17], 对这些芳香聚酮后修饰氧化酶结合或催化底物的可能关键氨基酸的功能分析鲜有报道。本研究首次构建了 JadH 的三维结构模型, 除与 PgaE 中 P282 同源的 P295 外, 第一次对 JadH 中的 R50、G51、L52、G53、F100、R221、I223 和 G298 进行了定点突变和体外酶学分析。实验结果表明这 9 个氨基酸残基是 JadH 底物结合或催化的关键氨基酸, 推测: R50、L52、I223、P295、F100 参与与底物 DHU 之间的疏水相互作用; G298 的主链氨基及 R221 的侧链胍基与底物 DHU 形成氢键, 参与底物的识别; G53 和 L52 影响 FAD 的质子传递; G51 影响酶的构象转化。这为进一步研究 JadH 的催化机理及 JadH 近缘酶的功能提供了重要依据。

REFERENCES

- [1] Hopwood DA. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev*, 1997, 97(7): 2465–2498.
- [2] Kulowski K, Wendt-Pienkowski E, Han L, et al. Functional characterization of the *jadI* gene as a cyclase forming angucyclinones. *J Am Chem Soc*, 1999, 121(9): 1786–1794.
- [3] Doull JL, Singh AK, Hoare M, et al. Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *J Ind Microbiol*, 1994, 13(2): 120–125.
- [4] Doull JL, Ayer SW, Singh AK, et al. Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J Antibiot*, 1993, 46(5): 869–871.
- [5] Zheng JT, Rix U, Zhao L, et al. Cytotoxic activities of new jadomycin derivatives. *J Antibiot*, 2005, 58(6): 405–408.
- [6] Fu DH, Jiang W, Zheng JT, et al. Jadomycin B, an Aurora-B kinase inhibitor discovered through virtual screening. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(8): 2386–2393.
- [7] Jakeman DL, Bandi S, Graham CL, et al. Antimicrobial activities of jadomycin B and structurally related analogues. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(3): 1245–1247.
- [8] Monro SM, Cottreau KM, Spencer C, et al. Copper-mediated nuclease activity of jadomycin B. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(11): 3357–3360.
- [9] Chen YH, Fan KQ, He YZ, et al. Characterization of JadH as an FAD-and NAD(P)H-Dependent Bifunctional Hydroxylase/Dehydrase in Jadomycin Biosynthesis. *Chembiochem*, 2010, 11(8): 1055–1060.
- [10] Kallio P, Patrikainen P, Suomela JP, et al. Flavoprotein hydroxylase PgaE catalyzes two consecutive oxygen-dependent tailoring reactions in angucycline biosynthesis. *Biochemistry*, 2011, 50(24): 5535–5543.
- [11] Kallio P, Liu ZL, Mäntsälä P, et al. Sequential action of two flavoenzymes, PgaE and PgaM, in angucycline biosynthesis: chemoenzymatic synthesis of gaudimycin C. *Chem Biol*, 2008, 15(2): 157–166.

- [12] Entsch B, Ballou DP, Massey V. Flavin-oxygen derivatives involved in hydroxylation by *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *J Biol Chem*, 1976, 251(9): 2550–2563.
- [13] Entsch B, Cole LJ, Ballou DP. Protein dynamics and electrostatics in the function of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 433(1): 297–311.
- [14] Entsch B, van Berkel WJ. Structure and mechanism of *para*-hydroxybenzoate hydroxylase. *FASEB J*, 1995, 9(7): 476–483.
- [15] Wang J, Ortiz-Maldonado M, Entsch B, et al. Protein and ligand dynamics in 4-hydroxybenzoate hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2): 608–613.
- [16] Cole LJ, Gatti DL, Entsch B, et al. Removal of a methyl group causes global changes in *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Biochemistry*, 2005, 44(22): 8047–8058.
- [17] Koskiniemi H, Metsä-Ketelä M, Dobritzsch D, et al. Crystal structures of two aromatic hydroxylases involved in the early tailoring steps of angucycline biosynthesis. *J Mol Biol*, 2007, 372(3): 633–648.
- [18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [20] Pei J, Wang Q, Liu Z, et al. PSI-DOCK: towards highly efficient and accurate flexible ligand docking. *Proteins*, 2006, 62(4): 934–946.
- [21] Ballou DP, Entsch B, Cole LJ. Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(1): 590–598.
- [22] Kharel MK, Zhu LL, Liu T, et al. Multi-oxygenase complexes of the gilvocarcin and jadomycin biosyntheses. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(13): 3780–3781.
- [23] Zhu LL, Ostash B, Rix U, et al. Identification of the function of gene *IndM2* encoding a bifunctional oxygenase-reductase involved in the biosynthesis of the antitumor antibiotic landomycin E by *Streptomyces globisporus* 1912 supports the originally assigned structure for landomycinone. *J Org Chem*, 2005, 70(2): 631–638.
- [24] Rix U, Remsing LL, Hoffmeister D, et al. Urdamycin L: a novel metabolic shunt product that provides evidence for the role of the *urdM* gene in the urdamycin A biosynthetic pathway of *Streptomyces fradiae* Tü 2717. *Chembiochem*, 2003, 4(1): 109–111.
- [25] Novakova R, Bistakova J, Homerova D, et al. Cloning and characterization of a polyketide synthase gene cluster involved in biosynthesis of a proposed angucycline-like polyketide auricin in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Gene*, 2002, 297(1/2): 197–208.
- [26] Trefzer A, Pelzer S, Schimana J, et al. Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(5): 1174–1182.
- [27] Pang X, Aigle B, Girardet JM, et al. Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 575–588.