

金色链霉菌 SP-371 中新型螺-萘醌结构化合物的发现

聂秋玥 季珍瑜 唐功利*

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

摘要 通过过表达正调控基因的方法成功激活金色链霉菌 SP-371 中的沉默基因簇 *tjh*, 突变株可以产生两种骨架结构的化合物. 据推测两种结构的化合物应该是从同一中间体经过两种不同的后修饰途径得到的. 通过双基因敲除的方法截断了两种化合物的后修饰途径, 成功积累了化合物 Aureuspiro. Aureuspiro 是一个新的天然产物且结构新颖, 含有一个特殊的螺-萘醌结构. 该化合物虽然不是最终化合物生物合成途径中的真实中间体, 但也进一步辅证了共同中间体结构的推测.

关键词 基因组挖掘; 生物合成; II 型聚酮类天然产物; 螺环

Discovery of a Novel Spiro-Naphthoquinone Compound in *Streptomyces aureus* SP-371

Nie, Qiuyue Ji, Zhenyu Tang, Gongli*

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract By overexpressing the positive regulatory gene, the silent gene cluster *tjh* in *Streptomyces aureus* SP-371 was successfully activated. The mutant strain could produce compounds with two distinct core structures which are pentacyclic and tetracyclic structures. It was speculated that these two types of skeletons might be derived from the same intermediate through two different post-modified pathways. These two tailoring pathways were intercepted by the double gene knockout, and aureuspiro was successfully accumulated in the mutant. Aureuspiro is a new natural product with a novel spiro-naphthoquinone structure. Despite aureuspiro is not a true intermediate in the biosynthesis of final products, it could support the hypothesis about structure of the common intermediate.

Keywords genome mining; biosynthesis; type II polyketides natural product; spiro ring

II 型聚酮类化合物是一类重要的天然产物, 该家族化合物结构多种多样^[1a-1b]. II 型聚酮化合物的生物合成已经得到了广泛的研究, 结构多样性主要来源于它们不同的后修饰途径^[2a-2c]. 我们^[3]在金色链霉菌 SP-371 (*S. aureus suzhouensis* SP-371) 的基因组中发现了一个新型 II 型聚酮化合物的生物合成基因簇 *tjh*, 通过过表达正调控基因的方法激活了 *tjh*, 成功得到了 8 个新化合物, 它们包含有两种不同的骨架结构(线性四环结构和五元稠环结构). 根据单基因敲除实验的结果, 推测这两类不同结构的化合物可能是通过同一中间体经过分叉的生物合成途径得到的. 为了得到这一共同中间体, 我们进行了双基因敲除实验, 在 *tjhC5* 和 *tjhD5* 的双敲除突变株

中分离到了一个螺-萘醌结构化合物 aureuspiro, 其结构新颖, 并且对最终产物生物合成途径的阐释有一定借鉴意义.

1 结果与讨论

1.1 $\Delta tjhC5/\Delta tjhD5$ 双敲除突变株的构建

在单基因敲除实验中, 不仅证明了最终的两类化合物是从共同中间体经由两种不同的后修饰途径得到的, 还成功确定了与各自后修饰途径相关的基因. 我们发现 *tjhC5*, *tjhD2*, *tjhD4* 和 *tjhO5* 只参与了线性四环结构化合物的后修饰, *tjhO4*, *tjhD3*, *tjhD5* 和 *tjhD1* 的敲除只对五元稠环结构化合物的产生有影响(Scheme 1). 根据生物

* Corresponding author. E-mail: gltang@sioc.ac.cn

Received May 30, 2020; revised July 3, 2020; published online July 22, 2020.

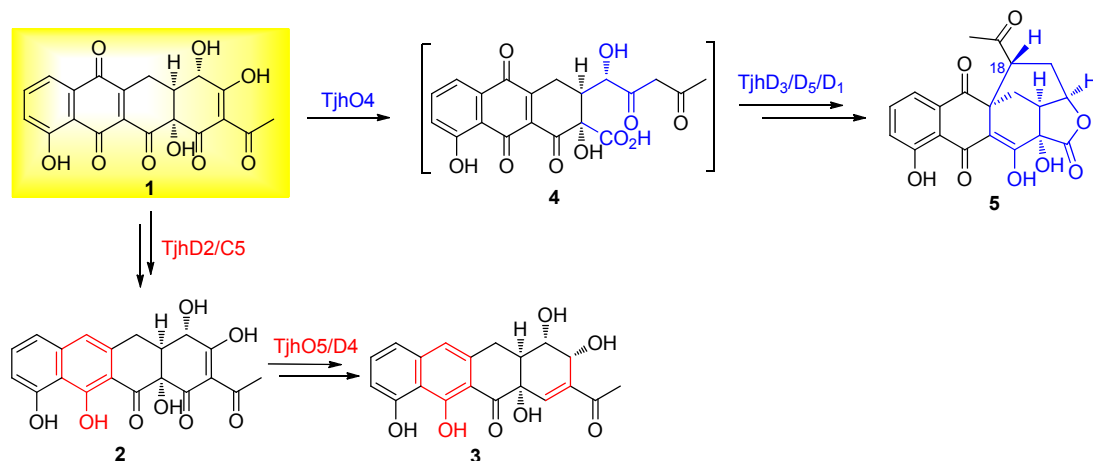
Dedicated to Professor Henry N. C. Wong on the occasion of his 70th birthday.

Project supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901900).

国家重点研发计划(No. 2018YFA0901900)资助项目.

信息学分析,发现四环素生物合成中前体合成相关蛋白与 *tjh* 编码的一系列蛋白同源性较高,所以推测共同中间体 **1** 可能与四环素前体类似^[4]. 在单敲除突变株的发酵提取物中无法检测到共同中间体,所以我们希望通过双基因敲除实验来同时阻断两种后修饰途径从而积累共同中间体.

我们成功在突变株 $\Delta tjhC5$ 的基础上同框敲除了 *tjhD5*. 过表达基因簇中 SARP 家族正调控基因 *tjhR1* 后的突变株 *tjhC5/D5::2R* 成功中断了五元稠环和线性四环骨架化合物的产生(图 1). 然而并未在双敲除突变株的发酵提取物中检测到目标中间体,但其可以产生一个分子量为 302 的化合物.



图式 1 两种骨架结构化合物的后修饰途径
Scheme 1 Post-modified pathways of two skeleton structures

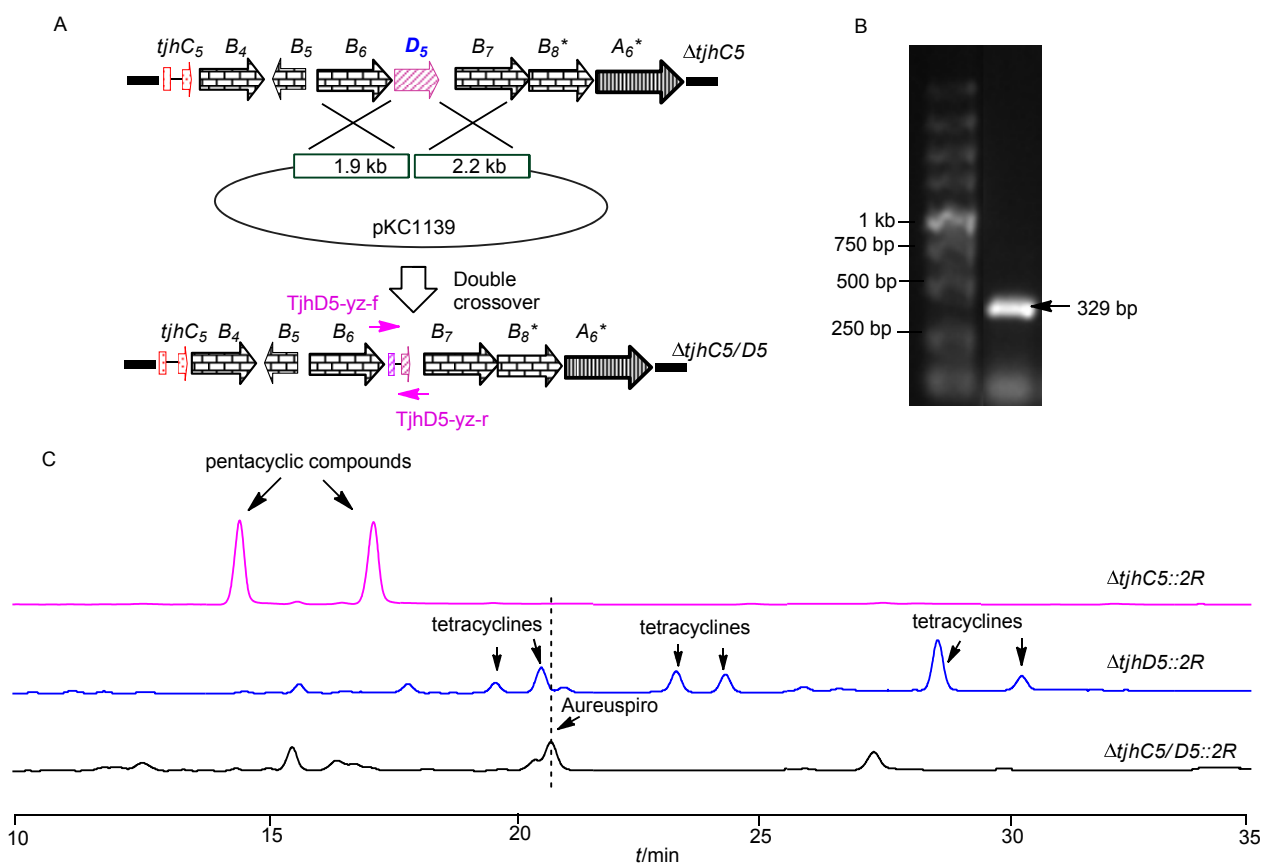


图 1 (A)突变株的构建、(B)突变株的 PCR 验证图和(C) $\Delta tjhC5::2R$, $\Delta tjhD5::2R$ 和 $\Delta tjhC5/D5::2R$ 发酵粗提物 HPLC 图
Figure 1 (A) Construction of the mutant strain, (B) PCR verification of the mutant strain and (C) HPLC analysis of fermentation extractions of $\Delta tjhC5::2R$, $\Delta tjhD5::2R$ and $\Delta tjhC5/D5::2R$

1.2 突变株中化合物 aureuspiro 的分离及鉴定

对突变株 $\Delta tjhC5/D5::2R$ 进行大量发酵, 用乙酸乙酯对其发酵液进行萃取, 得到突变株的发酵提取物. 最终通过 C18 反向柱层析和半制备的方法成功分离得到了化合物 aureuspiro. 该化合物为黄色固体, 紫外光谱于 202, 228 和 348 nm 有较强吸收, 高分辨质谱 (HR-ESIMS) 给出其准分子离子峰 m/z 301.1079 $[M-H]^-$, 其分子式为 $C_{17}H_{18}O_5$ (计算值 301.1081 $[M-H]^-$).

通过核磁共振波谱成功解析了其化学结构. Aureuspiro 的 1H NMR 谱中存在一个甲基氢信号 (δ_H 2.19) 和三个芳基氢信号 (δ_H 7.23, 7.70, 7.53). ^{13}C NMR 谱和 DEPT 谱图显示有 17 个碳信号, 其中包含三个酮羰基碳特征信号 (δ_C 198.1, 203.1, 210.0)、一个连有酚羟基的碳信号 (δ_C 160.5) 和四个仲碳信号 (δ_C 27.2, 28.7, 32.5, 50.3) (表 1). 通过 HSQC 谱将碳信号与相关氢信号联系起来. 1H - 1H COSY 谱显示芳香氢 H-3 和 H-2、H-4 都有相关信号, 说明该苯环结构与野生型中分离得到的化合物结构相同; H-8 与 H-9、H-9 与 H-10、H-10 与 H-11、H-11 与 H-12 分别有氢氢相关信号, 说明对应的四个碳连在一起. HMBC 谱中, H-13 与 C-6、C-15、C-8 都有相关信号, 说明 C-13 可能与 C-14 相邻; H-9、H-11、H-13 都与 C-7 (δ_C 47.9) 有相关信号, 所以结构中可能有以

表 1 Aureuspiro 的核磁共振图谱数据 (500/125 MHz, CH_3OH-d_4)

Table 1 NMR spectroscopic data of aureuspiro (500/125 MHz, CH_3OH-d_4)

Position	δ_C	δ_H	HMBC (H $\rightarrow$ C)	1H - 1H COSY
1	160.5			
2	122.6	7.23 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	4, 15	3
3	136.7	7.70 (t, $J=8.0$ Hz, 1H)	1, 5	2, 4
4	118.5	7.53 (d, $J=8.0$ Hz, 1H)	2, 6, 15	3
5	134.2			
6	198.1			
7	47.9			
8	28.7	1.95~2.02 (m, 1H) 1.72~1.77 (m, 1H)	6, 10, 13	9
9	27.2	1.44~1.50 (m, 1H) 1.56~1.61 (m, 1H)	7, 8, 11	8, 10
10	64.3	4.13~4.18 (m, 1H)	8, 12	9, 11
11	32.5	2.48~2.55 (m, 1H) 2.22~2.47 (m, 1H)	7, 9	10, 12
12		2.95 (dd, $J=4.7, 12.0$ Hz, 1H)	6, 8, 10	11
13	50.3	3.60 (d, $J=16.7$ Hz, 1H) 2.63 (d, $J=16.8$ Hz, 1H)	6, 8, 12, 15	
14	203.1			
15	116.7			
16	210.0			
17	27.1	2.19 (s, 3H)	12, 16	

C-7 为中心的螺环结构. H-10 与 H-9 和 H-11 偶合常数均小于 5 Hz, 且 H-12 与 H-11 偶合常数为 12.0 Hz, 所以 C-12 位取代的甲酰基和 C-10 位的羟基应处于不同的面 (图 2).

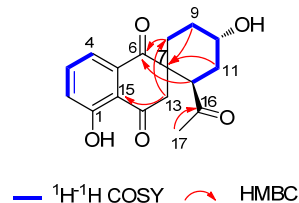
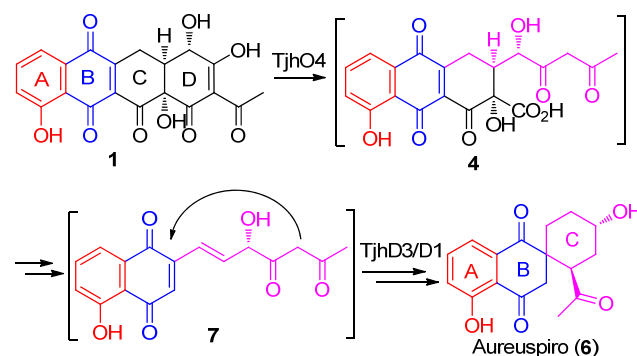


图 2 aureuspiro (6) 化学结构

Figure 2 Chemical structure of aureuspiro (6)

1.3 化合物 aureuspiro 生物合成途径的推测

该化合物可能是共同中间体中 D 环先被 TjhO4 氧化开环, 再经过自发的逆 Diels-Alder 反应和 Michael addition 反应, 之后可能由 TjhD3 或者 TjhD1 对双键和羰基进行了还原, 最终形成了化合物 aureuspiro (Scheme 2). Aureuspiro 中 A, B 环结构与推测的共同中间体相同, 但 C 和 D 环可能由其它后修饰酶的催化 and 自发反应进行了断裂和重排. 该结构进一步证明了分叉型生物合成途径中共同中间体的结构可能与我们推测的一致.



图式 2 推测的 aureuspiro 形成机制

Scheme 2 Proposed mechanism of the formation of aureuspiro

2 结论

通过双基因敲除实验, 成功获得了突变株 $\Delta tjhC5/D5::2R$, 在其发酵提取物中检测到了一个分子量为 302 的新化合物, 将其命名为 aureuspiro. 经过分离纯化和鉴定, 发现该化合物有一个新颖的螺-萘醌结构, 这是一个新的 II 型聚酮类天然产物.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

PCR 扩增仪 Eppendorf Mastercycler, 凝胶成像系统 BioRad Syngene, 质谱仪 Thermo Scientific LCQ Fleet

Ion Trap, 高效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000, 高分辨质谱仪 Agilent Technologies 6230 TOF LC/MS, 核磁共振仪 Bruker AVANCE DRX-500, 分析色谱柱 Grace AlltimaTM, $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, C18 柱, $4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$, 半制备柱 YMC-Pack ODS-AQ, $5\ \mu\text{m}$, C18 柱, $10\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$. 生物试剂购自 New England Biolab、Thermo 和 Takara 公司, 引物合成和 DNA 测序由苏州金唯智公司完成, 国产化学试剂购自上海国药集团有限公司, 百灵威和深圳爱拓化学有限公司, 进口化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司和 TCI 公司, 氘代试剂购自 Cambridge Isotope Laboratories. 链霉菌 *S. aureus suzhouensis* SP-371 由华东理工大学的陶黎明教授提供.

3.2 双敲除突变株的构建

以 pKC1139 为载体构建含左右臂的同框敲除质粒 pNQY-1, 左臂引物为 tjhD5-L-f: TATAAGCTTCACAC-AGGTGACGTACTTC 和 tjhD5-L-r: TATTCTAGATCGT-TGCGGTACGACACC, 右臂引物为 tjhD5-R-f: TATTCT-AGAGATGCTCAAGGGTCTGC 和 tjhD5-R-r: TATGA-ATTCCATGACGTTCTCCATCAGC. 同框敲除质粒经过接合转移导入 ΔtjhC5 突变株中, 经过筛选得到最终双敲除突变株, 具体操作详见文献[3]. 通过 PCR 验证突变株的基因型, 验证引物为 tjhD5-yz-f: CATCGCAAC-GATCAAGGAATTC 和 tjhD5-yz-r: GCCTGCGAGCAC-AGGAACAG, 目标条带大小为 329 bp.

3.3 突变株的发酵

挑取接合子于 2~3 mL 胰酪胨大豆肉汤(Tryptic Soy Broth, TSB)培养基中, 于 $30\ ^\circ\text{C}$, 220 r/min 培养 2~3 d. 小量发酵, 直接将试管中的 2 mL 菌体接到 SP-371 发酵培养基中即可. 大量发酵需将 1 mL 种子液接到装有 100 mL TSB 培养基的 500 mL 摇瓶中, $30\ ^\circ\text{C}$, 220 r/min 培养 1 d, 将 5% 发酵培养基体积的种子液接种到发酵培养基中培养, 培养约 5~7 d. 离心后, 发酵上清液用乙酸乙酯萃取两次, 合并乙酸乙酯, 旋干, 同时收集菌体, 用丙酮浸泡 1 h, 滤去固体, 旋蒸除去丙酮, 剩

余水相用乙酸乙酯萃取多次, 与上清萃取液合并, 旋干备用.

3.4 化合物的检测、分离及鉴定

将发酵提取物用甲醇溶解, 用 LC-MS 进行分析, 程序为(40 min): $T=0\ \text{min}$, 60% A, 40% B; $T=2\ \text{min}$, 60% A, 40% B; $T=35\ \text{min}$, 25% A, 75% B; $T=36\ \text{min}$, 10% A, 90% B; $T=38\ \text{min}$, 60% A, 40% B; $T=40\ \text{min}$, 40% B, HPLC 流速为 $1\ \text{mL}/\text{min}$. 其中 A 相为含体积分数为 1% HCOOH 的 H_2O , B 相为含体积分数为 1% HCOOH 的 CH_3OH , 使用 254 和 272 nm 波长检测. 发酵粗提物用 C18 反向柱层析进行初步的纯化, 再用半制备进行二次纯化. 半制备分离条件: H_2O 和 CH_3OH 分别作为半制备的 A 和 B 相, 用体积分数为 40% CH_3OH 等比例洗脱, 流速为 $3\ \text{mL}/\text{min}$. 最终我们从 8 L 的发酵液中分离得到了约 10 mg aureuspiro. Aureuspiro: 红色固体, m.p. $229\sim 267\ ^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}\ 29.3$ ($c\ 0.1$, MeOH); HR-ESIMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_5$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 301.1081, found 301.1079.

致谢 感谢华东理工大学的陶黎明教授提供 *S. aureus suzhouensis* SP-371 菌株.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 aureuspiro 的紫外吸收光谱、HR-ESIMS 和 NMR 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] (a) David, J. N.; Gordon, M. C. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 770.
(b) Das, A.; Khosla, C. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 631.
- [2] (a) Malpartida, F.; Hopwood, D. A. *Nature* **1984**, 309, 462.
(b) Hertweck, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 4688.
(c) Hertweck, C.; Luzhetskyy, A.; Rebets, Y.; Bechthold, A. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 162.
- [3] Ji, Z.-Y.; Nie, Q.-Y.; Yin, Y.; Zhang, M.; Pan, H.-X.; Hou, X.-F.; Tang, G.-L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58, 18046.
- [4] Xu, W.; Raetz, L. B.; Wang, P.; Tang, Y. *Tetrahedron* **2016**, 72, 3599.

(Zhao, C.)