

文章编号:1673-1689(2008)02-0001-05

真菌聚酮合酶基因的研究进展

许杨^{1,2}, 魏康霞^{1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 由真菌产生的聚酮化合物是一类庞大的次级代谢产物, 具有结构和功能的多样性。聚酮合酶是介导聚酮化合物合成的关键酶。大多数真菌聚酮合酶属于重复 I 型 PKS, 其编码基因通常与聚酮化合物合成的其它相关基因成簇存在。作者论述了真菌聚酮合酶的特性及其基因克隆方法的进展, 并对其在后基因组时代的研究进行了展望。

关键词: 真菌; 聚酮合酶; 重复 I 型 PKS; 基因簇

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

Advance in Fungal Polyketide Synthases Gene

XU Yang^{1,2}, WEI Kang-xia^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Sino-Germany Joint Research Institute of Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Fungal polyketides are a class of secondary metabolites that exhibit a vast diversity of form and function. Their biosynthesis is governed by a key enzyme, so-called polyketide synthases (PKS). Most of fungal polyketide synthase is iterative type I PKS, all genes necessary for fungal polyketide biosynthesis are clustered. This paper introduced the characteristics of fungal PKS and the advance in cloning of their genes, and prospected the research of PKS in the post genome era.

Key words: fungi; polyketide synthetase; iterative type I PKS; gene cluster

真菌聚酮化合物是一类庞大的天然产物。与脂肪酸的合成相似, 真菌聚酮化合物由一个脂酰辅酶 A 为起始单元与若干丙二酰辅酶 A 延伸单元经反复缩合而成(见图 1)。聚酮合酶(polyketide synthesis, PKS)是介导聚酮化合物生物合成的关键酶。由真菌聚酮合酶合成的聚酮化合物在结构和功能上显示出多样性, 有广泛的生物学活性。一方

面, 有些真菌聚酮合酶负责合成一些药物制剂, 如降胆固醇类药物洛伐他汀; 另一方面, 有些可催化合成对食品工业、农业和人体健康能产生巨大伤害的毒素, 如桔霉素、烟曲霉毒素和黄曲霉毒素。因此, 这类化合物越来越为人们所重视, 其编码基因的克隆及功能分析也逐渐成为研究热点。

收稿日期: 2007-06-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30460006); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540).

作者简介: 许杨(1951-), 女, 安徽安庆人, 德国博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物及食品生物技术方面的研究。

Email: xuyang1951@yahoo.com.cn

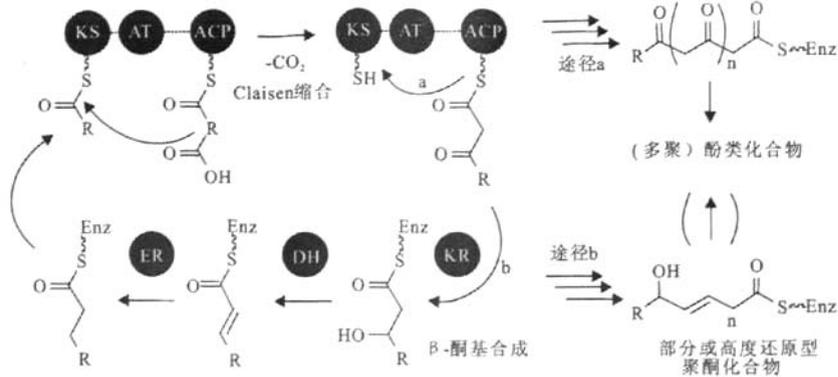


图 1 真菌聚酮合酶的催化机制

Fig. 1 Catalytic mechanisms of fungal polyketide biosynthesis

1 真菌 PKS 的结构

聚酮合酶按结构和催化机制大致可分为 3 类^[1]: I 型 PKS 是一个拥有多个模块 (module) 的巨型多功能多肽, 它以酶结构域 (domain) 的形式参与聚酮碳链延伸的每一步生化反应, 并按顺序催化生物合成。II 型 PKS 是一个多功能酶复合体, 只包含一套可重复使用的结构域, 每一结构域在重复的反应步骤中被多次用来催化相同的反应, 主要负责芳香族聚酮化合物的合成。III 型 PKS 是来自植物和细菌的迭代同型二聚体酶。真菌 PKS 在结构上拥有多功能结构域, 故划为 I 型 PKS。它常包括酮体合成酶 (ketosynthase, KS)、酰基转移酶 (acyl transferase, AT)、脱水酶 (dehydratase, DH)、甲基转移酶 (methyl transferase, MeT)、烯脂酰还原酶 (keto reductase, ER)、酮体还原酶 (enoyl reductase, KR)、酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 和环化酶 (cyclase, CYC) 等结构域。其中 KS、AT 和 ACP 为真菌 PKS 的基本结构域组合。但最近 Seshine 等报道在一些真菌中有潜在的 III 型 PKS^[2-3]。比较基因组分析显示, 粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、鹅掌柄孢壳 (*Podospira anserine*) 和黄孢原毛平革菌 (*Phanerocheate chrysosporium*) 中都存在 1~3 个可能的 III 型 PKS 基因。另外, 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中也拥有 4 个 III 型 PKS 基因 (csyA、csyB、csyC 和 csyD), 其中 csyA、csyB 和 csyD 基因经 RT-PCR 证实是表达基因。Funa 等人对粗糙链孢霉中的 III 型 PKS 进行了进一步的功能鉴定, 证实它负责一个五酮体-烷基二羟基苯甲酸的合成, 并将其命名为 2-氧代烷基-2,6-二羟基苯甲酸合成酶

万方数据

(2-oxoalkylresorcylic acid synthase, ORAS)^[4]。

2 真菌 PKS 的特性

2.1 重复性

真菌聚酮合酶的结构域具有重复性, 即在重复的反应步骤中能被多次用来催化相同的反应。由于真菌 PKS 的重复性, 使其调控机理更为复杂^[5]。在每一轮的延伸反应中, PKS 可选择性地对 β 酮基链进行还原、脱水和甲基化的加工, 形成非还原或部分还原的环状芳香类化合物, 或形成部分还原或高度还原的线型或大环类非芳香族化合物^[6]。目前, 对于真菌聚酮合酶是如何控制链长、还原程度、C-甲基化次数尚不清楚。

2.2 成簇性

对 PKS 基因座分析发现, 真菌中 PKS 基因通常与 PKS 后修饰过程的编码基因、调节基因及抗性基因成簇存在。1999 年 Hutchinson 等报道了来自土曲霉的洛伐他汀合成酶基因簇, 共有 18 个开放阅读框, 经序列比对确定了 13 个 ORF 的功能, 其中包括 PKS 基因、抗性基因、调控基因和转运基因等^[7] (见图 2)。目前, 已鉴定的真菌聚酮化合物次级代谢基因簇有: 黄曲霉毒素、烟曲霉毒素、赤霉素、Compactin、洛伐他汀和黑色素等。真菌基因成簇存在是真菌代谢途径的一个重要特征。

3 聚酮合酶基因克隆技术的发展

目前, 人们已发展出了许多有效的克隆手段, 如免疫筛选法、遗传互补法、异源探针法和同源探针法等。但是, 最常用的克隆 PKS 基因的方法是以同源探针与基因组 DNA 或 cDNA 进行杂交。

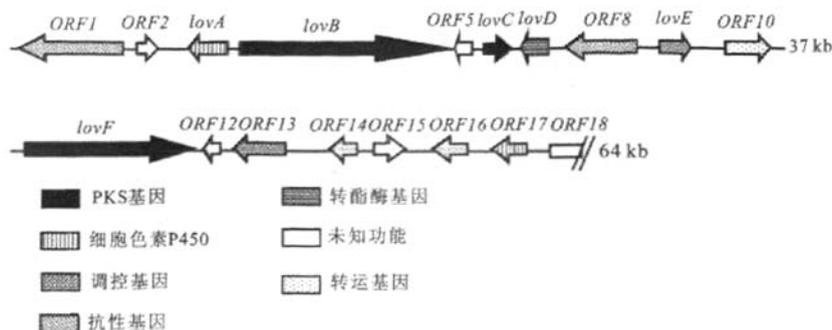


图 2 洛伐他汀生物合成基因簇结构图

Fig. 2 Organization of lovastatin gene cluster

3.1 免疫筛选法和遗传互补法

最初,有人采用细菌 PKS 基因片段作为探针来检测真菌中 PKS 基因。但是,细菌来源的异源探针并不能很好地与真菌 PKS 基因进行杂交。1990 年,Beck 等利用免疫筛选的方法,从展青霉(*Penicillium patulum*)基因组 DNA 表达文库中成功克隆了第一个真菌 PKS 基因-6-甲基水杨酸合成酶(6-MASA)编码基因^[8]。

由于不同真菌 PKS 在结构和功能上存在显著差异,其基因序列间也存在明显的不同,采用已知的 MSAS 基因作为异源探针去筛选其它真菌中 MSAS 或相关的 PKS 基因的方法并不十分有效。在克隆与土曲霉中洛伐他汀合成相关的 PKS 基因时,以展青霉中 6-MSAS 基因的 KS 结构域作探针,仅克隆得到土曲霉中 6-MSAS 基因的同源物,未获得洛伐他汀合成基因。其中,洛伐他汀包括九酮体和二酮体两部分,能抑制 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶。1999 年, Hendrickson 等首先建立了土曲霉的基因组粘粒文库和在产洛伐他汀时期的 cDNA 文库,并遗传诱变得到了 2 个突变株,一株表现为不产洛伐他汀九酮体,另一株则合成无甲基丁酰侧链的洛伐他汀中间体。用遗传互补法在粘粒文库筛选能与九酮体合成酶(LNKS)突变株互补的阳性粘粒,同时用免疫筛选法在 cDNA 文库中获得了 1 个能与阳性粘粒杂交的 cDNA 克隆子。这个 cDNA 用于从基因组文库中分离重叠克隆子,得到编码 LNKS 的 11.6 kb 的区域^[9]。采用遗传互补法, Graziani 等从赤球丛赤壳菌(*Nectria haematococca*)中获得参与子囊壳红色素形成的一个 PKS 基因(PKSN)^[10]。

3.2 同源探针法

同源探针法是根据已知基因的保守序列设计简并引物扩增得到同源探针,再以此探针与大片段

基因组文库进行杂交获得 PKS 基因,是目前最有效和最常用的克隆方法。

最初, Keller 等根据 I 型真菌 PKS 和细菌 PKS 的 β -KS 结构域中两处保守氨基酸区域设计了简并引物^[11],从藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*) cDNA 中扩增烟曲霉毒素相关 PKS 基因(fum5)的 KS 区域。

后来, Bingle 和 Nicholson 等在克隆特定的真菌 PKS 基因上都获得突破性进展^[12]。1999 年, Bingle 等根据 4 种 PKS 的 KS 单元保守序列设计 2 对简并引物(LC1 和 LC2c, LC3 和 LC5c),从不同真菌中扩增得到了 WA 型和 MSAS 型 PKS 片段。2001 年, Nicholson 等发现 β -KS、KR 和 C-MeT 结构域中具有多个长约 7 个氨基酸的高度保守序列,且这些保守序列在非还原(NR)、部分还原(PR)、高度还原(HR) 3 类 PKS 中分别具有不同的序列特点^[13]。根据这些序列设计的引物,从茎点霉(*Phoma* sp.)和 Merck strain MF5453 中扩增到 THNS 和 MSAS 基因片段,从土曲霉中扩增到洛伐他汀九酮体合成酶基因片段,并从桔青霉中得到了可能的康帕汀合成酶基因片段。2005 年, Shimizu 等根据 KS、AT 结构域保守区设计引物,同时采用 Bingle 的 LC 系列引物,成功地从紫色红曲菌(*Monascus purpureus*)中克隆得到催化合成桔霉素的 PKS 基因^[14]。

另外, Sauer 等根据 KS 结构域建立了 2 对 KS 简并引物,从寄生于酸果蔓果实中的真菌中钓取 PKS 基因^[15]。经分析,扩增到的结构域序列分为 3 类:色素类、黄曲霉毒素类及不与任何已知的真菌 PKS 同源的一类。同样的一组引物在真菌 *Glarea loxoyensis* 基因组 DNA 中扩增得到了 3 个 PKS 基因,其中一个基因(PKS1)参与 1, 8-二羟基萘(DHN)的合成^[16]。

C-MeT 引物也是克隆高度还原型 PKS 的一种有效工具。2004 年, Cox 等利用 C-MeT 简并引物, 从茎点霉 C2932 (*Phoma sp.* C2932) 的 cDNA 中扩增出的片段序列, 与各种真菌中 C-MeT 序列具有高度同源性, 再用这一片段在茎点霉 C2932 的 cDNA 文库中筛选获得参与合成角鲨抑素的一个 HR-PKS 基因^[17]。2007 年, Eley 等利用 C-MeT 引物, 从昆虫致病性真菌巴西安白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 中克隆了一个 PKS-NRPS 基因, 经敲除证实该基因参与了 2-吡啶酮软白僵菌素 (2-pyridone Tenellin) 的合成^[18]。

3.3 其它方法

1996 年, Yang 等通过限制性酶介导整合法 (Restriction Enzyme-Mediated Integration, REMI) 介导在 *Tox1* 基因座上插入突变, 并进行生物标签, 克隆了异旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 中一个与 T-2 毒素的合成和毒力有关的 PKS 基因 (PKS1)^[19]。

2002 年, Linnemannstons 等利用藤仓赤霉菌 (*G. fujikuroi*) 中比卡菌素合成受氮抑制的特性, 分别提取抑制 (高氮源) 和去抑制 (无氮源) 生长条件下菌丝体中 mRNA, 经反转录合成的 cDNA 后, 作为模板用于差异显示 PCR, 成功克隆了一个 PKS 基因 (PKS4)^[20]。

值得注意的是, 在寻找真菌中特定 PKS 基因时, 从真菌中分离的代谢物并非都是真菌的代谢物。最近研究显示, 小孢根霉菌 (*Rhizopus microsporus*) 中存在能合成聚酮物根霉素的细菌内共生体, 但其本身未发现有任何 PKS 基因^[21]。

4 后基因组时代给发掘 PKS 基因带来新的契机

在后基因组时代, 经序列比对和软件分析, 人们发现了大量潜在的 PKS 基因。2003 年, 在烟曲霉基因组数据库中查找 KS 结构域序列, 发现了 14 个可能的 PKS 基因^[22]。2005 年, 人们预测在一些真菌中也存在着 III 型 PKS 基因。近几年来, 随着米曲霉、烟曲霉和构巢曲霉等真核生物的基因组序列的公布, 人们发现真菌中的 PKS 基因远比已经克隆得到的要多 (见表 1)。许多 PKS 基因处于沉默状态, 缺少特定的刺激则不表达, 即无法检测到对应的代谢物。而这些隐藏的基因簇很可能是负责重要的致病因子、毒素甚至是候选药物的合成。因此, 激活这些基因对发掘聚酮类化合物宝库就显得尤为迫切。2007 年, Sebastian 等人采用了一种

新的方法, 对诱导沉默基因簇的表达十分有效, 特别是对真核生物^[23]。经基因组分析, 在构巢曲霉中存在一个潜在的杂合聚酮合成酶——非核糖体多肽合成酶 (PKS-NRPS) 编码基因, 命名为 *apdA*。在一般生长条件下, 无法检测到任何 PKS-NRPS 杂合代谢物。Sebastian 等人将可诱导的启动子与该基因簇的特定调节基因克隆于表达载体上, 通过控制启动子来刺激调节基因的异位表达, 从而达到诱导整个沉默基因簇表达之目的。经分离和鉴定, 构巢曲霉中合成了 2 种新的细胞毒素代谢物。可以预测, 随着各种基因组序列的公布, 利用生物信息学方法寻找 PKS 基因, 将对进一步的基因克隆和功能分析有重要的指导作用^[24]。

表 1 在曲霉和其它真菌中已鉴定的可能的聚酮合酶 (PKS) 基因数目

Tab. 1 The numbers of putative polyketide synthase genes identified in aspergilli and some other fungi

| 物种 | 已鉴定的 PKS 同源物数目 |
|--|----------------|
| 赫曲霉 (<i>A. ochraceus</i>) | 5 |
| 土曲霉 (<i>A. terreus</i>) | 7 |
| 寄生曲霉 (<i>A. parasiticus</i>), 黄曲霉 (<i>A. flavus</i>) | 4 |
| 烟曲霉 (<i>A. fumigatus</i>) | 14* |
| 构巢曲霉 (<i>A. nidulans</i>) | 27* |
| 米曲霉 (<i>A. oryzae</i>) | 30* |
| 旋孢腔菌 (<i>Cochliobolus sp.</i>) | 40* |
| 粗糙链孢霉 (<i>Neurospora crassa</i>) | 7* |
| 葡萄孢菌 (<i>Botrytis sp.</i>) | 35* |
| 链孢菌 (<i>Fusarium sp.</i>) | 42* |
| 酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | 0* |

★经生物信息学分析鉴定的 PKS 同源物数量。

5 结 语

聚酮化合物是真菌产生的一类极为重要的次级代谢产物, 具有结构和功能的多样性。真菌中 PKS 基因通常与其他途径相关基因成簇存在, 这使得聚酮化合物的合成途径较为复杂。近几年来, 大量的真菌 PKS 基因被相继克隆和鉴定, 但对其合成途径的调控却了解甚少。笔者认为, PKS 基因的功能分析及其途径调控方面的研究可能是未来的重要课题。另外, 采用组合生物学方法开发具有生物学活性的聚酮类化合物也是努力的方向。

参考文献(References):

- [1] Ben Shen. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7, 285-295.
- [2] Seshime Y, Juvvadi PR, Fujii I, et al. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(1):253-260.
- [3] Juvvadi P R, Seshime Y, Kitamoto K. Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid - flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. *J Microbiol*, 2005, 43(6): 475-486.
- [4] Funo N, Awakawa T, Horinouchi S. Pentaketide resorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from *Neurospora crassa*[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19):14476-14481.
- [5] Julia S, Christian H. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124, 690-703.
- [6] Fujii I, Watanabe A, Sankawa U, et al. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*[J]. *Chem Biol*, 2001, 8(2):189-197.
- [7] Hutchinson CR, Kennedy J, Park C, et al. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 78:287-295.
- [8] Beck J, Ripka S, Siegner A, et al. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases[J]. *Eur J Biochem*, 1990, 192 (2): 487-498.
- [9] Hendrickson L, Davis CR, Roach C, et al. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene[J]. *Chem Biol*, 1999, 6 (7), 429-439.
- [10] Graziani S, Vasnier C, Daboussi MJ. Novel polyketide synthase from *Nectria haemotococca*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70, 2984-2988.
- [11] Keller N P, Brown D, Butchko R A E, et al. A conserved polyketide mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans* [M]. *Molecular Approaches to Food Safety Issues Involving Toxic Microorganisms*, 1995, 263-277.
- [12] Bingle L E, Simpson T J, Lazarus C M. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes[J]. *Fungal Genet Biol*, 1999, 26: 209-223.
- [13] Nicholson T P, Rudd B A, Dawson M, et al. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases[J]. *Chem Biol*, 2001, 8: 157-178.
- [14] Shimizu T, Kinoshita H, Ishihara S, et al. Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(7):3453-3457.
- [15] Sauer M, Lu P, Sangari R, et al. Estimating polyketide metabolic potential among nonsporulating fungal endophytes of *Vaccinium macrocarpon*[J]. *Mycol Res*, 2002, 106: 460-470.
- [16] Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak AM, et al. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (pks1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*[J]. *Mol Genet Genom*, 2003, 268 (5): 645-655.
- [17] Cox R J, Glod F, Hurley D, et al. Rapid cloning and expression of a fungal polyketide synthase gene involved in squalestatin biosynthesis[J]. *Chem Commun*, 2004, 20: 2260-2261.
- [18] Eley K L, Halo L M, Song Z, et al. Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. *Chembiochem*, 2007, 8(3):289-297.
- [19] Yang G, Rose M S, Turgeon B G, et al. A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxins[J]. *Plant Cell*, 1996, 8:2139-2150.
- [20] Linnemannstons P, Schulte J, Mar Prado M, et al. The polyketide synthase gene pks4 from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin[J]. *Fungal Genet Biol*, 2002, 37 (2), 134-148.
- [21] Partida-Martinez L P, Hertweck C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production[J]. *Nature*, 2005, 437:884-888.
- [22] Varga J, Rigo K, Kocsube S, et al. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus species*[J]. *Res Microbiol*, 2003, 154(8):593-600.
- [23] Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, et al. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*[J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(4):213-217.
- [24] Keller N P, Turner G, Bennett J W. Fungal secondary metabolism- from biochemistry to genomics[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(12):937-947.

(责任编辑:李春丽)