

米曲霉 CPA 毒素的 5-氟色氨酸分子探针研究

江 峥^{1,2,3}, 胡江春¹, 王 楠^{*1,2}

(1. 中国科学院 沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2. 浙江大学 海洋学院, 浙江 舟山 316021; 3. 中国科学院大学 研究生院, 北京 100049)

摘要: 米曲霉中往往含有完整的环匹阿尼酸(cyclopiazonic acid, CPA)毒素生物合成基因簇。鉴于 CPAs 对食品安全的潜在威胁和其不同的存在形式, 依据 CPA 的生物合成机制推测可将外源氟代前体探针化合物嵌入 CPA 生物合成途径, 从而形成氟代物用于靶向检测。结果显示, 米曲霉 CPA 合成途径可以接受 5-F-L-Trp 为底物并经 CpaS 酶合成 5-F-cAATrp。由于该化合物并不是其下游催化酶 CpaD 的合适底物, 因而无法启动下游后修饰步骤, 造成了 5-F-cAATrp 在菌株中富集。利用 CPA 生物合成途径对代谢产物的富集效应实现对 CPA 毒素更加方便和特异性的检测, 这对于建立新型 CPA 毒素检测方法, 保障食品安全具有积极意义。

关键词: 米曲霉; 环匹阿尼酸; 5-氟色氨酸; 分子探针

中图分类号: Q 93 文章编号: 1673-1689(2022)02-0046-05 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.02.006

5-F-Trp as A Molecular Probe for CPA Toxins in *Aspergillus oryzae*

JIANG Zheng^{1,2,3}, HU Jiangchun¹, WANG Nan^{*1,2}

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316021, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Aspergillus oryzae* often contains intact biosynthetic gene cluster for producing cyclopiazonic acid (CPA) toxins. As a result, CPAs has been recognized as a potential threat to food safety. Since CPAs may present in different forms of derivatives, we designed a strategy for incorporating exogenous fluorinated precursor into the CPA biosynthesis pathway. The results showed that after 5-F-L-Trp was used as the substrate and a molecular probe, it was accepted as the substrate of the first biosynthetic enzyme CpaS, producing 5-F-cAATrp, the very first biosynthetic intermediate. Meanwhile, 5-F-cAATrp seemed an unsuitable substrate for the next catalytic enzyme CpaD, resulting abolishment of downstream tailoring steps and significant accumulation of this compound. The enrichment effect of CPA metabolites by the molecular probe therefore provides a new opportunity for more convenient and specific detection of CPA toxins targeting only one analyte. These findings are of significance for develop new method for detect and control the CPA toxins in *Aspergillus*-associated food products.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, cyclopiazonic acid, 5-F-Tryptophan, molecular probe

收稿日期: 2020-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471814); 浙江大学学科与人才队伍建设专项项目(129000-541320/001/002)。

* 通信作者: 王 楠(1978—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事海洋微生物天然产物生物合成方面的研究。E-mail: n_wang@zju.edu.cn

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和黄曲霉(*A. flavus*)均属于曲霉属环绕亚属(*Circumdati*)。前者在我国和其他东亚国家均有很长的应用于食品酿造和发酵的历史,后者因产生强致癌物质黄曲霉素而成为食品安全的威胁。比较基因组研究表明,米曲霉和黄曲霉类似于同一个种而非两个独立的种。米曲霉应是在人类长期的驯化过程中通过水平基因转移从黄曲霉的一个类群(Group I)进化而来的,在这个过程中米曲霉逐渐丢失了部分关键基因,造成了不完整的或沉默的黄曲霉素生物合成基因簇^[1]。然而,两个菌株往往均含有 *cpa* 生物合成基因簇^[2],它负责合成一类经常被忽略的真菌毒素 CPAs (cyclopi-zonic acids)^[3-6]。已知的 CPA 类化合物约 30 个^[7],其中 α -CPA 是纳摩级的 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂和神经毒素^[8-10]。除酿造食品外,米曲霉经常生长于谷物^[11-12]及绝大多数加工食物上^[13],造成食品安全隐患。通常对 CPA 的检测是针对个别 CPA 生物合成途径产物,如 α -CPA^[14]。但是,由于 CPA 常常以多种化学形态存在,客观上对针对性的检测造成了挑战^[15]。例如, α -CPA 可以继续经 P450 酶氧化和 N-甲基化生成 speradine 类衍生物^[16-18],speradine 还可继续在酶促

或者自发条件下生成多种氧化及环化产物^[19-20]。假设 CPA 生物合成可以被人为中断在早期步骤,即可实现将所有衍生物进行富集整合的目的。这将使检测目标集中于单个或有限个数的检测对象,从而极大地方便了针对 CPAs 的检测与监控。

从已知的 CPA 的生物合成机制来看(图 1), CpaS(聚酮合酶-非核糖体肽合成酶,PKS-NRPS)首先利用色氨酸、乙酰辅酶 A 及丙二酰辅酶 A 为前体合成第一个中间产物 cAATrp^[21];CpaD(异戊烯基转移酶)继而催化异戊烯基化反应生成 β -CPA^[22]; β -CPA 再通过分子环化反应生成 α -CPA^[23-24];后者依次在 CpaH(P450 单加氧酶)和 CpaM(甲基转移酶)的作用下修饰成 speradine 类衍生物^[25];此外,还存在许多 speradine 继续经氧化的产物,但它们的形成机制尚不清楚。

基于该生物合成途径及上述科学假设,作者尝试将卤代色氨酸嵌入 CPA 生物合成途径,利用其下游酶对底物的特异性造成生物合成的提前中断并引起非天然中间产物的富集,这种表现富集效应将为发展新型特异性 CPA 毒素检测方法提供科学基础。

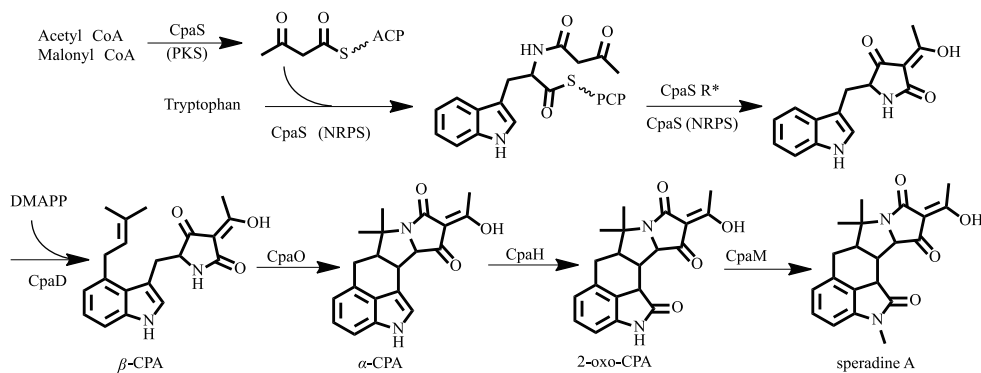


图 1 CPA 生物合成途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of CPA

1 材料与amp;方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌株及培养基 实验菌株 *A. oryzae* HMP-F28:分离自大连凌水桥潮间带采集的繁茂海绵中,保存于中科院沈阳应用生态研究及浙江大学海洋学院海洋生物与药物研究所。

培养基:用人工海水配制改良察氏液体培养基(组分 g/dL):蔗糖 3, NaNO_3 0.2, K_2HPO_4 0.1, KCl 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001;自然 pH,固体培养基为上述改良察氏液体培养基中加入 2 g/dL 琼脂。

人工海水(组分 g/dL): CaCl_2 0.147, 硼砂 0.002 6, KCl 0.068, MgCl_2 1.078, NaCl 2.35, EDTA 0.000 03, NaHCO_3 0.019 6, Na_2SiO_3 0.003, Na_2SO_4 0.4。

1.1.2 主要仪器与试剂 5-Fluoro-L-tryptophan (5-F-Trp);购自 Acros 公司;色谱甲醇及乙腈;购自国药集团化学试剂有限公司;其他培养基成分:市售分析纯级试剂。高效液相色谱-飞行时间质谱仪:安捷伦 6230 液质联用仪 (HPLC-TOF-MS); 色谱柱:Phenomenex C18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);固相萃取小柱:PEP-SPE (官能化聚苯乙烯/二乙烯苯固相萃取柱)。

1.2 实验方法

1.2.1 5-F-Trp 的 Feeding 实验与样品预处理 从甘油管中取 200 μL 菌株保藏液,均匀涂布到改良察氏固体培养基上,用封口膜将培养皿密封,倒置放于恒温培养箱中培养,28 °C 培养 5 d。将活化后的菌株接种到含 100 mL 改良察氏液体培养基的 500 mL 三角瓶中,置于恒温培养箱中于 28 °C、180 r/min 培养 8 d。利用二次添加法,分别在培养 48 h 后添加至终浓度为 0.5 mmol/L 的外源底物 5-F-Trp 固体与 72 h 添加至最终浓度为 1 mmol/L 的外源底物 5-F-Trp 固体,对照组不添加 5-F-Trp。所得发酵液经离心除去菌体,上清液中的代谢产物采用 PEP-SPE 进行富集。将 100 mL 发酵液通过活化的 PEP-SPE 小柱进行吸附,先用 4 mL 超纯水洗去杂质,再用 4 mL 体积分数 80% 甲醇溶液洗脱得待分析样品。

1.2.2 LC-MS 分析

1)LC-MS 分析条件 色谱柱:Phenomenex C18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流量:0.5 mL/min;柱温:35 °C;进样量:10 μL;流动相:体积分数 0.1% 甲酸的超纯水(流动相 A),色谱乙腈(流动相 B)。

2)洗脱条件 0~10 min:体积分数 88% 流动相 A 和 12% 流动相 B 至 65% 流动相 A 和 35% 流动相 B 梯度洗脱;10~30 min:65% 流动相 A 和 35% 流动相 B 至 30% 流动相 A 和 70% 流动相 B 梯度洗脱;30~37 min:30% 流动相 A 和 70% 流动相 B 至 100% 流动相 B 梯度洗脱;37~43 min:100% 流动相 B 等梯度洗脱;43~50 min:88% 流动相 A 和 12% 流动相 B 平衡。

正离子总离子流模式扫描,同时检测波长 220、285 nm 的紫外色谱图,提取色谱法高分辨离子峰对相应代谢物进行定性分析。质谱仪条件:电喷雾离子源(ESI 源);离子模式:正离子模式;喷雾电压:3 kV;汽化温度:300 °C;毛细管温度:270 °C;扫描范围:相对分子质量 150~2 000。

2 结果与讨论

2.1 菌株 *A. oryzae* HMP-F28 的主要代谢产物

在当前实验条件下,未添加底物的 HMP-F28 菌株发酵液中可见 CPA 产物 α-CPA(m/z 337.1547 [M+H]⁺,产物 6)及 β-CPA(m/z 339.1703 [M+H]⁺,产物 5)的典型准分子离子峰,其中 α-CPA(m/z 337.1547[M+H]⁺)为主要代谢产物,见图 2。除此之外,还发现二酮哌嗪 cyclo(N-methyl-Lue-Trp)(m/z 314.1863 [M+H]⁺,产物 1)的产生。这说明米曲霉 HMP-F28 是一个 CPA 产生菌株,其主要 CPA 存在形式为 α-CPA,同时也存在 speradine 型经氧化和甲基化的衍生物 3 和衍生物 4。同时其他类型代谢物相对较少,是一个较理想的检验外源分子探针嵌入目标生物合成途径的细胞体系。

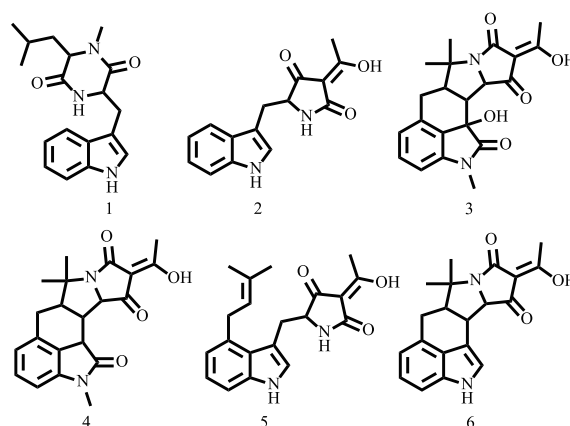


图 2 *A. oryzae* HMP-F28 的主要代谢产物

Fig. 2 Major metabolites produced by *A. oryzae* HMP-F28

2.2 5-F-Trp 分子进入 CPA 代谢途径的产物

当在 HMP-F28 发酵培养基中添加 5-F-Trp 后,可以清楚地观察到原 CPA 类色谱峰的消失(图 3),同时在 23.7 min 处发现一个新的色谱峰的出现。这说明外源添加物对 CPA 生物合成途径发挥了预期阻滞作用,使其主要终产物含量急剧减少乃至消失。进一步提取该新色谱峰的高分辨质谱图可知,该代谢物给出了 m/z 289.0983 [M+H]⁺ 及 C₁₅H₁₄FN₂O₃⁺ 准分子离子峰,对应分子式 C₁₅H₁₃FN₂O₃,这与预期的 CPA 生物合成途径中第一个中间体 cAATrp 的 5-氟代衍生物相符合(图 4),因此将该新产物鉴别为 5-F-cAATrp(衍生物 7)。在添加 5-F-Trp 底物后,菌株中富集 5-F-cAATrp,说明 5-F-Trp 可以进入 CPA 生物合成途径并经 CpaS 酶

的催化生成的 5-F-cAATrp。但是除了 5-F-cAATrp 外,其生物合成下游代谢产物并未见明显富集,意味着 5-F-cAATrp 相对于天然底物 cAATrp 来说不是一个 CpaD 合适的底物。这造成 5-F-cAATrp 从 CpaS 释放后,立即被 CpaD 的底物特异性限制,无法再次进入 CPA 生物合成途径并被继续加工成下游产物。

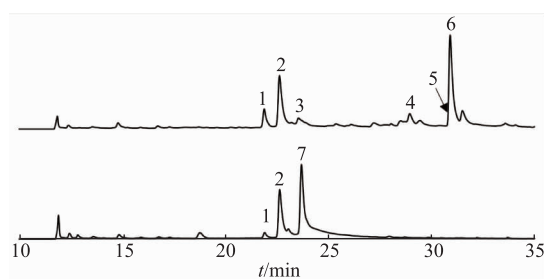


图 3 不添加底物(上)及添加 5-F-Trp(下)的 *A. oryzae* HMP-F28 代谢图谱

Fig. 3 Metabolic profiles of *A. oryzae* HMP-F28 without (upper panel) or with (lower panel) the addition of 5-F-Trp

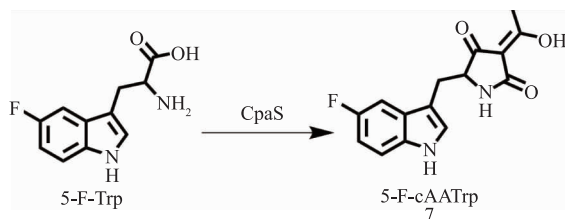


图 4 5-F-Trp 转换为 5-F-cAATrp 的示意图

Fig. 4 Conversion of 5-F-Trp into 5-F-cAATrp

值得注意的是,一般情况下当外源底物进入了某个天然产物的生物合成途径后,通常仍然会观察到目标生物合成途径天然产物的产生。这是因为,无论是原始添加物或者添加物经该途径修饰的衍生物对于相应的催化酶来说都不是天然底物,因此

很难超过天然底物对催化酶活性位点的竞争。本研究结果显示,5-F-Trp 的添加造成了 α -CPA 及下游产物的消失,同时也未见上游 cAATrp 及 β -CPA 的积累,这意味着 5-F-Trp 对原 CPA 途径的抑制最早可能发生在 CpaS 酶 NRPS 模块中的 A domain (腺苷酸化结构域)对色氨酸的激活步骤,尤其当 5-F-Trp 过量存在时,大量的 5-F-色氨酸 AMP 的产生使 T domain (硫酸化结构域)难以捕捉到天然底物色氨酸 AMP 并生成 cAATrp。综上可知,5-F-Trp 应是 CpaS 酶各个结构域的较合适的底物,因而可以抑制 CPA 生物合成途径所有天然产物及中间体的产生;同时,5-F-cAATrp 并非异戊烯基转移酶 CpaD 的合适底物,造成 5-F-Trp 的非天然衍生产物经 CpaS 加工后立即被 CpaD 限制形成早期产物富集,这种富集效应非常有利于对米曲霉、青霉可能含有活跃 CPA 毒素生物合成基因簇的定性检测和定量测定。

3 结 语

作者以 CPA 毒素产生菌米曲霉为研究对象,发现添加外源 5-F-Trp 可以阻断 CPA 毒素(α -CPA 及 β -CPA)的产生;同时因 5-F-Trp 可嵌入 CPA 的生物合成途径并造成非天然上游产物 5-F-cAATrp 的大量富集,这种富集效应可将所有 CPA 代谢途径的下游产物整合为单一化合物 5-F-cAATrp。考虑到 α -CPA 可经过 N-甲基化、多重氧化反应等一系列后修饰步骤生成多达 30 余种毒素衍生物,因而通过探针分子 5-F-Trp 可有效整合这些复杂的后修饰衍生物。利用这种方法可将多个代谢物的定性与定量工作简化为针对单一目标化合物的检测和分析。这对于实现 CPA 毒素的高效检测、保障食品安全等方面具有较好的参考价值。

参考文献:

- [1] GEISER D M, PITT J I, TAYLOR J W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(1): 388-393.
- [2] CHANG P K, EHRLICH K C, FUJII I. Cyclopiazonic acid biosynthesis of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* [J]. *Toxins*, 2009, 1(2): 74-99.
- [3] KIS M, VULIC A, KMETIC I, et al. Cyclopiazonic acid: toxicity and prevalence of insufficiently investigated mycotoxin [J]. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 2019, 14(1-2): 33-38.
- [4] CHANG P K, EHRLICH K C. Cyclopiazonic acid biosynthesis by *Aspergillus flavus* [J]. *Toxin Reviews*, 2011, 30(2-3): 79-89.
- [5] CHANG P K, HORN B W, DORNER J W. Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin

- biosynthesis gene cluster in *Aspergillus flavus*[J]. **Fungal Genetics and Biology**, 2009, 46(2) : 176-182.
- [6] HYMERY N, MASSON F, BARBIER G, et al. Cytotoxicity and immunotoxicity of cyclopiazonic acid on human cells[J]. **Toxicol Vitro**, 2014, 28(5) : 940-947.
- [7] OSTRY V, TOMAN J, GROSSE Y, et al. Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery[J]. **World Mycotoxin Journal**, 2018, 11(1) : 135-148.
- [8] KOVALCHUK Y, EILERS J, LISMAN J, et al. NMDA receptor-mediated subthreshold Ca²⁺ signals in spines of hippocampal neurons[J]. **Journal of Neuroscience**, 2000, 20(5) : 1791-1799.
- [9] SWEENEY M, YU Y, PLATOSHYN O, et al. Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. **American Journal of Physiology–Lung Cellular and Molecular Physiology**, 2002, 283(1) : L144-L155.
- [10] SEIDLER N W, JONA I, VEGH M, et al. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-atpase of sarcoplasmic-reticulum [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1989, 264(30) : 17816-17823.
- [11] GALLAGHER R, RICHARD J, STAHR H M, et al. Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*[J]. **Mycopathologia**, 1978, 66(1-2) : 31-36.
- [12] LANSDEN J A, DAVIDSON J I. Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1983, 45(3) : 766-769.
- [13] PEROMINGO B, RODRIGUEZ M, NUNEZ F, et al. Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and UHPLC-MS/MS[J]. **Food Chemistry**, 2018, 263 : 275-282.
- [14] ANSARI P, HAEUBL G. Determination of cyclopiazonic acid in white mould cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) using a novel internal standard[J]. **Food Chemistry**, 2016, 211 : 978-982.
- [15] UKA V, MOORE G G, ARROYO-MANZANARES N, et al. Unravelling the diversity of the cyclopiazonic acid family of mycotoxins in *Aspergillus flavus* by UHPLC Triple-TOF HRMS[J]. **Toxins**, 2017, 9(1) : 21.
- [16] TOKUOKA M, KIKUCHI T, SHINOHARA Y, et al. Cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster gene cpaM is required for speradine A biosynthesis[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2015, 79(12) : 2081-2085.
- [17] TSUDA M, MUGISHIMA T, KOMATSU K, et al. Speradine A, a new pentacyclic oxindole alkaloid from a marine-derived fungus *Aspergillus tamarii*[J]. **Tetrahedron**, 2003, 59(18) : 3227-3230.
- [18] MA X, PENG J, WU G, et al. Speradines B-D, oxygenated cyclopiazonic acid alkaloids from the sponge-derived fungus *Aspergillus flavus* MXH-X104[J]. **Tetrahedron**, 2015, 71(21) : 3522-3527.
- [19] 庞志伟, 路旭, 胡江春, 等. 诱导烟草悬浮细胞氧爆发的海绵共附生真菌 HMP-F66 的筛选与鉴定[J]. **生物技术通报**, 2015, 31(7) : 174-179.
- [20] HU X, XIA Q W, ZHAO Y Y, et al. Speradines F-H, three new oxindole alkaloids from the marine-derived fungus *Aspergillus oryzae*[J]. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 2014, 62(9) : 942-946.
- [21] LIU X Y, WALSH C T. Cyclopiazonic acid biosynthesis in *Aspergillus* sp.: characterization of a reductase-like R* domain in cyclopiazionate synthetase that forms and releases cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan[J]. **Biochemistry**, 2009, 48(36) : 8746-8757.
- [22] LIU X, WALSH C T. Characterization of cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan dimethylallyltransferase in cyclopiazonic acid biosynthesis: substrate promiscuity and site directed mutagenesis studies[J]. **Biochemistry**, 2009, 48(46) : 11032-11044.
- [23] CAO T, LING J H, LIU Y, et al. Characterization and abolishment of the cyclopiazonic acids produced by *Aspergillus oryzae* HMP-F28[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2018, 82(10) : 1832-1839.
- [24] FISCH K M. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS-NRPS[J]. **RSC Advances**, 2013, 3(40) : 18228-18247.
- [25] KATO N, TOKUOKA M, SHINOHARA Y, et al. Genetic safeguard against mycotoxin cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*[J]. **ChemBioChem**, 2011, 12(9) : 1376-1382.