[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/01
C12P 17/16 C12P 1/00
C12N 1/20

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02811097.8

[43] 公开日 2004 年 12 月 8 日

[11] 公开号 CN 1553954A

[22] 申请日 2002.3.29 [21] 申请号 02811097.8
[30] 优先权
[32] 2001. 3.30 [33] US [31] 60/279,665
[86] 国际申请 PCT/JP2002/003161 2002.3.29
[87] 国际公布 WO2002/079453 英 2002.10.10
[85] 进入国家阶段日期 2003.12.1
[71] 申请人 独立行政法人食品综合研究所
地址 日本茨城县
共同申请人 藤泽药品工业株式会社
[72] 发明人 越智幸三 胡海峰 日野资弘
藤江昭彦 村松秀行

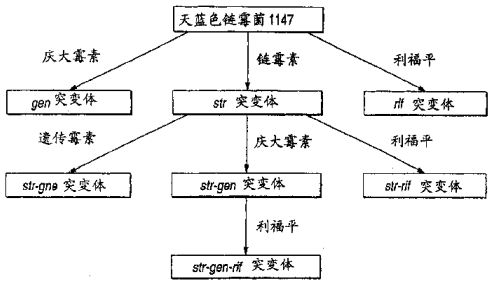
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 温宏艳 张广育

权利要求书 2 页 说明书 18 页 序列表 2 页
附图 10 页

[54] 发明名称 通过赋予药物抗性突变提高次级代谢物产率的方法

[57] 摘要

本发明涉及在微生物中提高次级代谢物产率的方法，例如，通过赋予微生物药物抗性突变对抗生素产生菌进行改良。



ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1.通过赋予微生物对两种或两种以上抗生素的抗性来提高所述微生物中次级代谢物产率的方法。

2.获得具有提高的次级代谢物产率的微生物的方法，该方法包括以下步骤：在含有抗生素的培养基中培养微生物以赋予所述微生物对两种或两种以上抗生素的抗性，其中，所述抗生素浓度高于所述抗生素对起始微生物的MIC，并且分离在培养基中可以生长的菌落。

3.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述的微生物是细菌。

4.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述的微生物属于选自下组的属：链霉菌属（Streptomyces）、芽孢杆菌属（Bacillus）和假单胞菌属（Pseudomonas）。

5.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述的微生物选自天蓝色链霉菌(Streptomyces coelicolor)，浅青紫链霉菌(Streptomyces lividans)，抗生链霉菌（Streptomyces antibioticus），恰塔努加链霉菌（Streptomyces chattanoogensis），枯草芽孢杆菌（Bacillus subtilis），蜡状芽孢杆菌（Bacillus cereus）和吡咯菌素假单胞菌（Pseudomonas pyrrocinia）。

6.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述的抗生素选自核糖体蛋白攻击抗生素，核糖体RNA攻击抗生素，和RNA聚合酶攻击抗生素。

7.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述的抗生素选自：链霉素，遗传霉素，庆大霉素和利福平。

8.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述的次级代谢物选自：抗生素、酶和生理学活性物质。

9.一种生产次级代谢物的方法，该方法包括下述步骤：

在培养基中培养对至少两种抗生素具有抗性的微生物，所述微生物与其起始微生物相比次级代谢物产率得以提高；

形成并积累次级代谢物；和

回收次级代谢物。

10.如权利要求9所述的方法，其中所述的微生物是细菌。

11.如权利要求9中所述的方法，其中所述的微生物属于选自下组的属：链霉菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属。

12. 如权利要求 9 中所述的方法，其中，所述的微生物选自：天蓝色链霉菌，浅青紫链霉菌，抗生链霉菌，恰塔努加链霉菌，枯草芽孢杆菌，蜡状芽孢杆菌和吡咯菌素假单胞菌。

13. 如权利要求 9 中所述的方法，其中所述的抗生素选自核糖体蛋白攻击抗生素，核糖体 RNA 攻击抗生素，和 RNA 聚合酶攻击抗生素。

14. 如权利要求 9 所述的方法，其中，所述的抗生素选自：链霉素，遗传霉素，庆大霉素和利福平。

15. 如权利要求 9 所述的方法，其中，所述的次级代谢物选自：抗生素、酶和生理学活性物质。

16. 如权利要求 1 或 2 所述方法产生的微生物，所述的微生物与其起始菌株相比，次级代谢物的产率得以提高。

17. 如权利要求 16 所述的微生物，其中所述的微生物是细菌。

18. 如权利要求 16 所述的方法，其中所述的微生物属于选自下组的属：链霉菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属。

19. 如权利要求 16 所述的方法，其中，所述的微生物选自：天蓝色链霉菌，浅青紫链霉菌，抗生链霉菌，恰塔努加链霉菌，枯草芽孢杆菌，蜡状芽孢杆菌和吡咯菌素假单胞菌。

20. 通过赋予微生物对除链霉素之外的单一抗生素的抗性而提高微生物中次级代谢物产率的方法。

通过赋予药物抗性突变提高次级代谢物产率的方法

技术领域

本发明涉及通过赋予微生物药物抗性来提高微生物中次级代谢物(如抗生素)产率的方法。具体说来，本发明涉及通过赋予微生物联合药物抗性突变改善其次级代谢物的方法。

背景技术

最初"次级代谢物"是植物生理学家的用语，用来将植物中产生的、没有明显功能的植物（如，染料，香料，药物）归类。现在，其包含一组通常具有低相对分子量的异源化合物，其大多（并非绝对）由没有神经系统的生物(即，细菌、真菌和植物)产生。通过对抗生素和其他具有生物活性的微生物产物进行观察，在六十年代由微生物学家提出了次级代谢的概念(Bently，R.等，Annu. Rev. Microbio. (1999) 53: 411-446)。

已知链霉菌属的微生物可产生多种抗生素和其他类具有生物活性次级代谢物。链霉菌属属于放线菌目。多数情况下放线菌目即指放线菌纲。放线菌纲可以产生60%以上已知由微生物产生的次级代谢物，其中近 80%由放线菌属的微生物产生，其他属的微生物产生的很少(Kieser，T.等，Practical Streptomyces Genetics (2000): 10-11)。

大多数应用于临床的抗生素最初都是由微生物代谢物分离得来的，这些微生物包括细菌、真菌和放线菌，其中链霉菌是已知最有效的抗生素产生菌。D. A. Hopwood 和他的同事建立了链霉菌遗传重组和操作技术(Hopwood 等. Genetic manipulation of Streptomyces, a laboratory manual, 1985)。至今，人们仍重复应用诱变处理并筛选所得克隆的方法改进产生抗生素的链霉菌，并取得了良好的结果。但这种方法也存在缺陷，如耗时、耗资、费力、重复性差、效率低等。目前特意改良菌株的方法是遗传重组和操作，代表菌株改良的重要技术如原生质体融合，结构基因扩增，调节基因和抗性基因克隆等等(Ikeda 等. Actinomycetologica 1991, 5: 8699)。显然，这些技术需要对抗生素生产的生化和遗传知识有进一步的了解。

如上所述，人们已经发明了一些改良菌株的方法并将其应用于发酵工业。已知赋予天蓝色链霉菌（Streptomyces coelicolor）链霉素抗性可使该菌株中放线菌紫素的产率提高(Protein, Nucleic Acid, Enzyme, vol. 44, No. 13, p 1967-1974 (1999); Kagaku to Seibutsu, vol. 37, No. 11, p 731-737 (1999))。但到目前还没有有关提高次级代谢物产率的更有效的方法。

本发明的一个目的就在于提供一种省时、省力、高效、半经验地（semi-rational）提高微生物次级代谢物产率的方法，并可将其应用于对抗生素的生化、遗传没有更多了解的菌株中。

发明内容

为实现上述目的，本发明人通过广泛的研究得到了下述出乎意料的结果。这就是，可以通过赋予天蓝色链霉菌对两种或两种以上抗生素（如链霉素、遗传霉素、庆大霉素、利福平）的抗性提高该菌中放线菌紫素的产率。每种抗生素都能通过诱导相应的突变使得放线菌紫素产率提高。用具有链霉素抗性的突变体作为起始菌株，通过引入另一种抗生素抗性突变，如遗传霉素抗性、庆大霉素抗性或利福平抗性突变即双突变（链霉素和遗传霉素，链霉素和庆大霉素，链霉素和利福平联合抗性突变）可以不断提高放线菌紫素的产率。最后，将利福平-抗性突变引入所述的双突变体(链霉素和庆大霉素)可使放线菌紫素产率进一步提高。已证实：通过引入联合的三种抗生素抗性突变，天蓝色链霉菌中放线菌紫素的产率逐步、连续提高以达到高产水平。

基于上述新的发现完成了本发明。

由此本发明提供:

(1)通过赋予微生物对两种或两种以上抗生素的抗性来提高所述微生物中次级代谢物产率的方法。

(2)获得具有提高的次级代谢物产率的微生物的方法，该方法包括以下步骤：在含有抗生素的培养基中培养微生物以赋予所述微生物对两种或两种以上抗生素的抗性，其中，所述抗生素浓度高于所述抗生素对起始微生物的MIC，并且分离在培养基中可以生长的菌落。

(3)如上述(1)或(2)中所述的方法，其中所述的微生物是细菌。

(4)如上述(1)或(2)中所述的方法，其中所述的微生物属于选自下组的属：链霉菌属（Streptomyces）、芽孢杆菌属（Bacillus）和假

单胞菌属（Pseudomonas）。

(5)如上述(1)或(2)中所述的方法，其中所述的微生物选自天蓝色链霉菌（Streptomyces coelicolor），浅青紫链霉菌（Streptomyces lividans），抗生链霉菌（Streptomyces antibioticus），恰塔努加链霉菌（Streptomyces chattanoogensis），枯草芽孢杆菌（Bacillus subtilis），蜡状芽孢杆菌（Bacillus cereus）和吡咯菌素假单胞菌（Pseudomonas pyrrocinia）。

(6) 如上述(1)或(2)中所述的方法，其中，所述的抗生素选自核糖体蛋白攻击抗生素，核糖体RNA攻击抗生素，和RNA聚合酶攻击抗生素。

(7)如上述(1)或(2)中所述的方法，其中所述的抗生素选自：链霉素，遗传霉素，庆大霉素和利福平。

(8)如上述(1)或(2)中所述的方法，其中所述的次级代谢物选自：抗生素、酶和生理学活性物质。

(9)一种生产次级代谢物的方法，该方法包括下述步骤：

在培养基中培养对至少两种抗生素具有抗性的微生物，所述微生物与其起始微生物相比次级代谢物产率得以提高；

形成并积累次级代谢物；和

回收次级代谢物。

(10)如上述(9)中所述的方法，其中，所述的微生物是细菌。

(11)如上述(9)中所述的方法，其中，所述的微生物属于选自下组的属：链霉菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属。

(12)如上述(9)中所述的方法，其中，所述的微生物选自：天蓝色链霉菌，浅青紫链霉菌，抗生链霉菌，恰塔努加链霉菌，枯草芽孢杆菌，蜡状芽孢杆菌和吡咯菌素假单胞菌。

(13) 如上述(9)中所述的方法，其中，所述的抗生素选自核糖体蛋白攻击抗生素，核糖体RNA攻击抗生素，和RNA聚合酶攻击抗生素。

(14)如上述(9)中所述的方法，其中，所述的抗生素选自：链霉素，遗传霉素，庆大霉素和利福平。

(15)如上述(9)中所述的方法，其中，所述的次级代谢物选自：抗生素、酶和生理学活性物质。

(16)如上述(1)或(2)所述方法产生的微生物，所述的微生物与其

起始菌株相比，次级代谢物的产率得以提高。

(17)如上述(16)中所述的微生物，其中，所述的微生物是细菌。

(18)如上述(16)中所述的方法，其中，所述的微生物属于选自下组的属：链霉菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属。

(19)如上述(16)中所述的方法，其中，所述的微生物选自：天蓝色链霉菌，浅青紫链霉菌，抗生链霉菌，恰塔努加链霉菌，枯草芽孢杆菌，蜡状芽孢杆菌和吡咯菌素假单胞菌。

(20) 通过赋予微生物对除链霉素之外的单一抗生素的抗性而提高微生物中次级代谢物产率的方法。

本发明的另一方面，通过在微生物中诱导单一或多重药物抗性突变以诱导所述微生物中的其他抗生素生物合成，并提供发现新抗生素的新方法。

附图说明

参照附图对本发明进行描述：

图 1 是构建联合药物抗性突变体的策略示意图。如图所示构建了三种单突变体和双突变体和一种三突变体。

图 2 是表明野生型和突变的天蓝色链霉菌产生气生菌丝和放线菌紫素能力的照片。将孢子接种在 R4 和 R3 琼脂平板上，30℃下培养 6 天。

图 3 是利福平抗性突变体中 RNA 聚合酶 β 亚基内的氨基酸改变示意图。簇 I 和 II 代表目前已知的抗性决定区。从所述开放阅读框的起始氨基酸(Met)开始编号。用箭头和数字表示突变的位置，单个的大写字母表示在本研究中发现的改变了的氨基酸。框出的部分表示本研究中新发现的取代。

图 4 是 R3 (□)和 R4 (■)培养基中放线菌紫素产量的比较示意图。放线菌紫素是在培养 6 天后测定的。

图 5 是放线菌紫素在培养基 R4 和 R3 中的产量示意图。符号：■，1147 (野生型)；□，S-1 (str)；●，SG-1(str-gen)；○，SGR-1 (str-gen-rif)。

图 6 是酵母抽提物、水解酪蛋白氨基酸和 KH_2PO_4 对放线菌紫素产量的影响示意图。菌株在添加了不同浓度的酵母抽提物、水解酪蛋白氨基酸或 KH_2PO_4 的 R4 培养基中生长 6 天。符号：■，1147 (野生型)；

□，S-1 (str)； ●，SG-1(str-gen)； ○，SGR-1 (str-gen-rif)。

图 7 是联合抗性突变体中放线菌紫素产率增长示意图。培养物在 GYM，R3 或 R4 液体培养基中生长 7 天。菌株 S-1，SG-1 和 SGR-1 分别用作单、双和三突变体。

图 8 是由天蓝色链霉菌产生的放线菌紫素的化学结构示意图。

图 9 是引入药物抗性突变后，在特定的链霉菌突变体 No. 618824 中产生的新的潜在抗菌试剂照片。

图 10 是赋予抗性的四种抗生素的结构示意图，所述的抗生素包括庆大霉素，遗传霉素，链霉素和利福平。

本发明的最佳实施方式

本发明对所应用的微生物没有其他特殊的限定，只要所述微生物产生的次级代谢产物的产率，可通过赋予该微生物两种或两种以上抗生素抗性得以提高即可。优选使用可产生农用和/或医用抗生素、酶和生物活性物质的土壤微生物。优选细菌。更优选的是放线菌纲。举例来说属于放线菌纲的例子包括：链霉菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属等。最优选的是链霉菌属。特定的非限定性的例子包括天蓝色链霉菌、浅青紫链霉菌、抗生链霉菌、恰塔努加链霉菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和吡咯菌素假单胞菌。

所述的微生物可通过已知的方法从自然界分离也可通过保藏中心如 ATCC，获得。所述的微生物可以是任何野生菌株，突变菌株，细胞融合菌株，转导菌株或是通过 DNA 重组技术所构建的重组菌株，可以是任何应用于发酵工业作为农用和/或医用抗生素、酶和生物活性物质的生产菌株的那些。

本发明对次级代谢物也没有特别的限定，只要通过赋予所述微生物一种或几种抗生素抗性，所述次级代谢产物的产率有所提高即可。优选的次级代谢物包括农用和/或医用抗生素(例如：来自抗生链霉菌 3720 的放线菌素，来自恰塔努加链霉菌 ISP5002 的菲特霉素，来自蜡状芽孢杆菌 2045 的 FR900493 和来自吡咯菌素假单胞菌 2327 的吡咯菌素等)，酶(例如：来自芽孢杆菌种的蛋白酶，来自芽孢杆菌种的淀粉酶，来自浅紫灰链霉菌（Streptomyces lavendulae）的酰基转移酶，来自黄色微球菌（Micrococcus flavus）腺苷脱氨酶，来自 Streptomyces punipalus 的脱甲基酶等)和生物活性物质(例如：来自

Streptomyces tsukubaensis 的 FK506，来自生暗链霉菌（Streptomyces phaeofaciens）No. 7739 的 WS7739 和来自维摩氏链霉菌（Streptomyces willmorei）No. 1279 的 WS1279 等)。

在本发明中对用于向微生物中引入突变的抗生素也没有特殊的限定，只要被赋予所述抗生素抗性的微生物能产生次级代谢物即可。优选的抗生素包括那些所谓的核糖体攻击抗生素，包括核糖体蛋白攻击抗生素(例如，核糖体 S12 蛋白攻击抗生素)和核糖体 RNA 攻击抗生素，以及 RNA 聚合酶攻击抗生素。

为提高微生物中的次级代谢物产率，优选地赋予所述微生物两种或两种以上抗生素抗性。特别优选赋予微生物两种或三种抗生素抗性。最优选赋予所述微生物三种抗生素抗性。

优选赋予抗性的抗生素组合是(1)两种不同的氨基糖苷类抗生素(2)一种氨基糖苷类抗生素和一种安沙霉素抗生素，以及(3)两种不同的氨基糖苷类抗生素和一种安沙霉素抗生素。

特定但非限制性的抗生素的例子包括：氨基糖苷类抗生素，如链霉素，遗传霉素和庆大霉素，安沙霉素类抗生素，如利福平。

对于从起始微生物获得抗生素抗性突变微生物的方法，也没有特别的限定。优选地，将起始微生物在含有抗生素的培养基中培养，分离可在该抗生素中生长的菌落，由此获得抗生素抗性自发突变体。或者对微生物进行常规的诱变处理，如紫外线照射或用甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍(NTG)或亚硝酸进行化学处理，分离可在该抗生素中生长的菌落，由此获得抗生素抗性突变体。在这一步骤中优选地将培养基中抗生素的浓度控制在高于起始微生物的 MIC。

优选地，所述抗生素的浓度为两倍于起始微生物的 MIC(最低抑制浓度)或更高，更优选 5 倍于起始微生物的 MIC 或更高，最优选 10 倍于起始微生物的 MIC 或更高。例如，采用链霉素作为抗生素，优选的浓度比起始微生物的 MIC 高 5 到 100 倍。采用利福平作为抗生素，优选的浓度比起始微生物的 MIC 高 5 到 40 倍。采用庆大霉素作为抗生素，优选的浓度比起始微生物的 MIC 高 2 倍。

可以进一步重复上述步骤以获得抗两种或两种以上抗生素的多（两种或两种以上）抗性微生物。

然后通过合适的方法将其中所需次级代谢产物产量提高了的突变

体筛选出来。例如，通过分析的方法(如 TLC，HPLC (DAD)，LC-MS，光密度等)，生物测定法(酶，例如酰基转移酶、脱甲基酶、脱氨基酶的活性测定；生物活性物质，如抗细菌、抗真菌、抗癌物质的活性测定)等等。例如通过测定 633nm 下上清液的光密度来确定放线菌紫素的量。

利用多抗性微生物时，可在获得了所述多抗性微生物或在引入突变的至少一个步骤完成后再筛选其中次级代谢产物产率提高了的突变体。

利用重组 DNA 技术，可用含有所述次级代谢物生物合成基因的重组质粒转化宿主，由此获得所需次级代谢产物产率提高了的菌株。

在上述的步骤中，可以利用常用的培养方法培养所述的微生物。

上述培养基可以是合成培养基，也可以是天然培养基，只要培养基中含有适量的必需碳源、氮源、无机物、氨基酸、维生素和/或痕量营养物质即可。这些培养基在许多文章中均有公开，例如 Hosoya，Y. 等，Antimicrob. Agents Chemother. (1998) 42: 2041-2047; Kieser，T. 等，Practical Streptomyces Genetics (2000): 406-415; 以及 ATCC 培养基手册中所列的培养基资料。

碳源的例子包括：碳水化合物，如葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖、甘油、淀粉、淀粉水解物、糖蜜、多元醇和多种有机酸，如丙酮酸、延胡索酸、乳酸和乙酸。

氮源的例子包括：氨或多种无机或有机的铵盐如氯化铵、硫酸铵、碳酸铵和乙酸铵、尿素及其他含氮物质，以及含氮有机物质如胨、NZ-胺、肉膏、酵母抽提物、玉米浆、酪蛋白水解物、鱼肉或其消化产物。

无机物的例子包括磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸铵、氯化铵、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰和碳酸钙。

需要时还可向培养基中添加氨基酸和维生素。

所述微生物可以在需氧条件下培养，如振荡培养或通气搅拌培养。一般来说，所述的培养优选在 20-40℃下进行。理想的是将培养基的 pH 值维持在中性水平附近。培养周期通常是 1-7 天。

可通过下述方法回收在微生物和/或培养基中形成和积累的所需次级代谢物。培养结束后去除细胞，或将细胞破碎，离心所得混合物去除破碎的细胞，然后利用已知适于回收所需次级代谢物的方法进行

回收，例如浓缩结晶法，活性碳处理法和/或离子交换树脂法。

以链霉菌菌株为例对本发明进行进一步描述，但这并不作为对本发明的限制。

下面以属于链霉菌属的菌株作为本发明所用微生物的例子进行说明。所述菌株可分成两组：天蓝色链霉菌的野生型菌株和药物抗性突变体，和从土壤中分离的在通常情况下不产生抗生素的未经鉴定的链霉菌种。下面解释的四种抗生素，庆大霉素，遗传霉素，链霉素和利福平作为药物的例子。

天蓝色链霉菌是研究抗生素产生和其他过程的优秀模型菌株；它是已在遗传学上进行了更深入研究的链霉菌的种，可产生四种在化学上存在差异的抗生素：着蓝色聚酮化合物放线菌紫素、十一烷基灵菌红素、次甲霉素和钙依赖性抗生素，上述抗生素的生物合成基因已被分离出来。其中放线菌紫素是代表性的次级代谢物，具有典型的聚酮化合物生物合成途径。

放线菌紫素的特征:从二噁烷中得到细红针状物，分解点 270℃。最大吸收(二噁烷)：560,523 nm。在哌啶、四氢呋喃、二噁烷、苯酚中可溶，微溶于乙醇、乙酸、丙酮。几乎不溶于含水的酸；溶于含水的碱中呈亮蓝色。

药物的特性

庆大霉素:

组成：这一抗生素复合物由三部分组成：庆大霉素 C_1、庆大霉素 C_2 和庆大霉素 C_{1a}。 如图 10 所示它们具有类似的结构。

作用机理：作用于核糖体的16S核糖核酸或其他的核糖体蛋白(L6蛋白质或其他的未知的蛋白质），导致核糖体中蛋白质合成的抑制。

分类：属于氨基糖苷类抗生素。

遗传霉素：

组成：单成分，其结构如图 10 所示。

作用机理：通过作用于 16S 核糖体 RNA 或未知的蛋白质而抑制蛋白质合成。

分类：属于氨基糖苷类抗生素。

链霉素：

组成：单成分，其结构如图 10 所示、其与庆大霉素和遗传霉素存

在很大的差异。

作用机理：通过作用于核糖体 S12 蛋白质和/或 16S RNA 而抑制蛋白质合成。

分类：属于氨基糖苷类抗生素。

利福平：

组成：单成分，其结构如图 10 所示。

作用机理：通过作用于 RNA 聚合酶的 β 亚基而抑制 RNA 合成。

分类：属于安沙霉素类抗生素。

作为本发明的优选实施方式的一个例子，放线菌紫素在天蓝色链霉菌中的产率可通过以 5-10%的高频将下述的每种抗性突变引入菌株中而提高，即链霉素抗性、庆大霉素抗性或利福平抗性。大多数突变体是稳定的并能和野生型菌株一样生长并正常地形成气生菌丝体。此外、将另一种抗生素抗性突变引入单突变体，可将放线菌紫素产率进一步提高 1.8 - 2.2 倍。当然、提高的水平在不同突变体间可能存在差异。最后,可将第三种突变引入双突变体形成三突变体。

然后测定三突变体中放线菌紫素的过量生产。这些抗生素具有不同的作用位点，因此如图 2,4,5 和 7 所示它们的作用是加和的，并可以联合在一起不断对抗生素产生菌进行改良。突变分析表明大多数的利福平抗性突变体在编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 rpoB 基因内产生点突变，产生高水平的利福平抗性；一些具有高水平链霉素抗性的链霉素抗性突变体在编码核糖体 S12 蛋白的 rpsL 基因中有点突变，但这一基因中没有突变能形成低抗性水平突变体；所有的庆大霉素或遗传霉素抗性突变体在 rpsL 基因中均没有突变，它们的突变可能存在于未知基因中。尽管一些突变位点尚未确定，这些突变应当存在于特定的基因中，因为已知本发明中所用的抗生素作用于核糖体中特定的靶位置。

随机诱变和筛选是指一类方法或非重组菌株改良的步骤。由于突变的表型可能并不容易识别，通常要从大量的突变生物体中筛选经改良的突变体，所需突变的出现频率非常低。尽管这种方法具有简单、可靠的优势，但随机筛选法既耗时又昂贵。

而且，利用诱变剂进行随机突变筛选没有特定的目标，表现出相对大的不确定性。相反，本发明所述的方法利用一些抑制蛋白或核酸

合成的抗生素作为筛选试剂，其与传统的诱变剂，如射线、化学物质(碱基类似物、脱去氨基试剂、烷化剂或嵌入剂等等)及生物试剂(噬菌体、质粒或 DNA 转座子等等)完全不同。而且，本发明的方法可产生高频的所需突变，因此筛选阳性突变体并不需要过多的时间和人力。

本发明中所获得的多重药物抗性微生物可用作异源宿主表达编码作为目标的农用和/或医用抗生素、酶和生物活性物质的外源基因。

除通过突变操作所述微生物之外，遗传重组技术还提供了另一种改良菌株的经验方法。其可通过提高，例如基因的剂量或改变调节机制解除生物合成途径中的限速步骤。显然，这需要很多有关天蓝色链霉菌和大肠杆菌产生抗生素的生化和遗传知识。但是，对大多数新的抗生素产生菌缺乏了解，因此这种方法对大多数菌株无法实施。而且这种方法耗资而且复杂。相反，本发明的方法无需对菌株的生化和遗传知识作过多的了解，简单且花费少。这种新方法可以用于大多数微生物，包括链霉菌或其他细菌，特别是从自然界分离的野生型菌株。

除提高菌株产率以外，本发明的方法还可通过引入药物抗性突变活化特定的、沉默的抗生素生物合成基因。本发明人从土壤中分离了大量无抗细菌活性的链霉菌，然后利用其产生抗细菌活性的能力筛选抗生素抗性突变体。本发明人发现如图 9 和表 3 所示，约 50%从土壤中分离的菌株可通过活化产生抗生素。同时如图 9 所示，在突变体中的抗生素合成与培养基有关。因此用多种不同类型的培养基检测抗细菌剂的产率非常重要。

实施例

下面是本发明的优选实施方案。应当理解本发明并非局限于这些实施例。

实施例 1

将天蓝色链霉菌野生型菌株孢子原种涂布于含 0.4%葡萄糖，0.4%酵母抽提物，1%麦芽提取物，0.1%蛋白胨(NZ-Amine，Type A)，0.2% NaCl 和 2%琼脂的 GYM 琼脂上(加琼脂前调 pH 至 7.3)。所述培养基用常规方法灭菌(121℃，15 min.)。然后将琼脂平板在 30℃下温育 10-14 天使孢子形成。向各平板中加入无菌蒸馏水 (5 ml)，轻刮表面使孢子释放。离心收集悬液并用蒸馏水洗两次。接种前在声波水浴中使孢子分散 10 min。将孢子的浓度调节至每 ml 大约 $2x\ 10^9$ 个孢子。

孢子（或细胞）涂布后在分别含有 5μg/ml 链霉素或 1.0μg/ml 庆大霉素或 200μg/ml 利福平的 GYM 琼脂(组分与上述 GYM 琼脂相同)上后，30℃下生长 7 天可获得天蓝色链霉菌自发的链霉素、庆大霉素或利福平-抗性突变体(含有 1μg/ml 链霉素，0.1μg/ml 庆大霉素或 10μg/ml 利福平即可使亲本菌株的生长得以完全抑制)。挑出在筛选平板上生长的单菌落，接种到含有 1%葡萄糖，0.1%酵母抽提物，0.001%水解酪蛋白氨基酸，0.3%脯氨酸，1% $MgCl_2*6H_2O$，0.4% $CaCl_2*2H_2O$，0.002% K_2SO_4，0.56% TES [N-Tris (羟甲基) 甲基-2-氨基乙磺酸]，0.2%痕量元素溶液(如 R2YE 培养基所述)和 2%琼脂的 R4 琼脂(加入琼脂前调 pH 至 7.2)中。将所述的 R4 平板在 30℃下温育 6 天，比较野生型菌株和突变体所产生的兰色放线菌紫素的量，筛选其中的过量产生突变体。将过量产生放线菌紫素的突变体接种到定轨振荡器上含有 5 ml 的 R4 液体培养基(成分与前述的 R4 琼脂培养基相同，但不含琼脂)的 25 ml 试管中，条件为 30℃、350 rpm。温育 6 天后，取 1 ml 培养物样品，调节 pH 至 8.0。1100 g 离心 5 min 后，测定上清液在 633 nm 下的光密度来分析上清液中放线菌紫素的产量。检测到的最高产率：庆大霉素抗性突变体达 1.6 倍，链霉素抗性突变体为 1.8 倍、利福平抗性突变体为 3.0 倍。高产菌株的频率分别为 5%，6%和 10%(参见表 1 和图 7)。

通过下述方法对突变体进行突变分析。以突变体基因组 DNA 为模板，使用根据浅青紫链霉菌(DDBJ 登录号:D83746)的序列设计的合成寡核苷酸引物 P1 (正向：5′-ATTCGGCACACAGAAAC)和 P2 (反向：5′-AGAGGAGAACCGTAGAC)进行 PCR 以获得 Str 抗性突变体的 rpsL 基因片段。利用 Taq 聚合酶(Takara Ex Taq)依照制造商的建议进行 PCR。使用 Perkin-Elmer Cetus 热循环仪，条件是 96℃下温育 5 min 后进行 30 个如下的循环：96℃ 0.3 min.，55℃ 0.2 min 及 72℃ 0.5 min，最后 72℃ 10 min。利用 Bigdye Terminator 热循环测序试剂盒(Perkin-Elmer Applied Biosystems，Foster City，CA，U. S. A)通过双脱氧链终止法对 PCR 产物进行直接测序。用 GENETIX 程序(Software Development Co.，Tokyo，Japan)对序列数据进行分析。

以突变体基因组 DNA 为模板，使用根据天蓝色链霉菌 M145 的序列设计的合成寡核苷酸引物 P3 (正向：5′-GGCCGCTACAAGGTGAACAAGAAG)

和 P4 (反向: 5′-CGATGACGAAGCGGTCCTCC)通过 PCR 获得 Rif 抗性突变体的部分 rpoB 基因片段。PCR 方法和 DNA 测序方法与 rpsL 基因相同。对三种庆大霉素抗性突变体和三种链霉素抗性突变体的 RpsL 基因测序并与天蓝色链霉菌野生型菌株相比较。对三种利福平抗性突变体的部分 rpoB 基因进行测序并与天蓝色链霉菌野生型菌株相比较。三种利福平抗性突变体在 rpoB 基因的这一区域表现出点突变; 只有一种链霉素抗性突变体在 rpsL 基因中存在点突变; 所有的庆大霉素抗性突变体都没有在 rpsL 基因中表现出突变(参见表 2)。

实施例 2

用与实施例 1 相同的方法制备菌株 S-1 (链霉素抗性突变体)的孢子溶液。

S-1 的自发的遗传霉素,庆大霉素或利福平抗性突变体是作为在含 2.5 μg/ml 遗传霉素或 2.5μg/ml 庆大霉素或 200μg/ml 利福平的 GYM 琼脂上生长的菌落而获得的(S-1 菌株的生长被 0.5μg/ml 遗传霉素, 0.5μg/ml 庆大霉素或 10μg/ml 利福平完全抑制)。突变体中的放线菌紫素产率利用 R4 琼脂平板和 R4 液体培养基测定。

检测到的最高产率: 遗传霉素抗性突变体达 1.7 倍, 庆大霉素-抗性突变体达 2.2 倍, 利福平抗性突变体达 2.5 倍。这些高产菌株的频率分别为 13%, 14%和 18%(参见表 1 和图 7)。按实施例 1 中所述的方法对上述突变体进行突变分析。此处所获得的所有三种抗生素抗性突变体都在 S-1 的 rpsZ 基因中保持有突变, 但在 rpsL 基因中没有发现其他突变。7 种利福平-抗性突变体在 rpoB 基因中产生点突变(参见表 2)。

实施例 3

按实施例 1 中所述的方法制备 SG-1 和 SG-2 菌株(庆大霉素和链霉素抗性双突变体)的孢子溶液。

SG-1 和 SG-2 菌株的自发的利福平-抗性突变体是作为在含有 200μg/ml 利福平的 GYM 琼脂上 30℃生长 7 天的菌落而获得的(10μg/ml 利福平使 SG-1 和 SG-2 菌株的生长得以完全抑制)。

突变体中的放线菌紫素产率利用 R4 琼脂平板和 R4 液体培养基测定。

检测到的最高产率:SG-1 菌株的利福平抗性突变体达 3.4 倍,SG-2

菌株的利福平抗性突变体达 3.6 倍。这些高产菌株的频率分别为 10% 和 15%(参见表 1 和图 7)。按实施例 1 中所述的方法进行突变分析。5 种利福平抗性突变体在 rpoB 基因中有突变，但有一种突变体在此区域没有产生突变(参见表 2)。

表 1

药物抗性突变体的筛选和抗生素产率

菌株	放线菌紫素产率 (OD_{633})[a]	MIC (μg/ml)[b]	用于筛选的抗生素浓度 (μg/ml)	产生的放线菌紫素产素提高了的突变株频率[c]	所检测到的最高产率 (OD_{633})[d]
天蓝色链霉菌	0.77	庆大霉素（0.1）	1.0	5 (4/80)	1.25
1147		链霉素（1.0）	5	6 (7/120)	1.39
（野生型）		利福平（10）	200	10 (15/150)	2.32
S-1	1.28	遗传霉素（0.2）	2.5	13 (15/112)	2.22
		庆大霉素（0.1）	2.5	14 (14/104)	2.80
		利福平（10）	200	18 (21/116)	3.14
SG-1	2.02	利福平（10）	200	10 (8/80)	6.88
SG-2	1.88	利福平（10）	200	15 (12/80)	6.68

a，d:用含 5 ml R4 培养基的 25 ml 试管在 30℃下培养 6 天后，在 633 nm 下测得的上清液 OD。所有的测定均一式三份，取平均值。

b: 在 GYM 琼脂上温育两天后测定的结果

c：比起始菌株产生更多抗生素的突变体。括号中的数字是产生更多抗生素的突变体数/测试的突变体数。

表 2

导致氨基酸改变的天蓝色链霉菌 rpsZ 或 rpoB 基因突变的总结

菌株	在rpsL基因中的位置[a]	氨基酸的位置（改变）	在rpoB基因中的位置[b]	氨基酸的位置（改变）	对 STR[d] GEN RIF GNE的抗性水平 (μg/ml)[c]
1147	-[e]				1 0.1 10 0.2
S-1	262A→G	88(Lys→Glu)			100
S-2	ND[f]				5
S-3	ND				10
G-1	ND				0.3
G-2	ND				0.3
G-3	ND				0.3
R-1			1049G→A	350(Arg→His)	400
R-2			1040A→G	347(His→Arg)	400
R-3			1049G→T	350(Arg→Phe)	400
SGe-1	262A→G	88(Lys→Glu)			100 0.5
SGe-2	262A→G				100 1
SGe-3	262A→G				100 1
SG-1	262A→G				100 0.3
SG-2	262A→G				100 0.3
SG-3	262A→G				100 0.3
SR-1	262A→G		995T→C	332(Leu→Arg)	50 50
SR-2	262A→G		1154C→T	385(Pro→Leu)	50 150
SR-3	262A→G		1179C→G	393(Ile→Met)	50 400
SR-4	262A→G		1011C→A	337(Asp→Glu)	100 400
SR-5	262A→G		1010A→G	337(Asp→Gly)	100 400
SR-6	262A→G		1028C→T	343(Ser→Leu)	50 400
SR-7	262A→G		1048C→T	350(Arg→Cys)	50 400
SGR-1	262A→G		1039C→T	347(His→Tyr)	100 0.2 400
SGR-2	262A→G		1041C→A	347(His→Gln)	100 0.2 400
SGR-3	262A→G		ND		50 0.3 300
SGR-4	262A→G		1039C→T	347(His→Tyr)	50 0.2 400
SGR-5	262A→G		1054A→T	352(Asn→Tyr)	50 0.5 400
SGR-6	262A→G		1027C→T	343(Ser→Pro)	100 0.3 300

a，b. 从开放读码框的起始密码子开始编号

c. 在 GYM 琼脂上培养 4 天后确定的

d. STR，GEN，RIF 和 GNE 分别代表链霉素，庆大霉素，利福平和遗传霉素。

e. -，野生型 rpsL 基因。

f. 在 rpsL 或 rpoB 基因内没有检测到突变。

实施例 4

利用天蓝色链霉菌野生型菌株，S-1（链霉素抗性突变体），SG-1（庆大霉素和链霉素抗性双突变体）和 SGR-1（庆大霉素，链霉素和利福平抗性三突变体）进行测定放线菌紫素生物合成的时程。向含有 150

ml R4 或 R3 培养基的 500 ml 锥形瓶接种孢子溶液，30℃下在指定的时间内在定轨振荡器上以 200 rpm 温育。R4 液体培养基的组分与实施例 1 中所用相同。R3 液体培养基除含有增量的酵母抽提物(0.5%)和额外的 KH_2PO_4(0.005%)外与 R4 相同。在 R4 培养基中温育 24h，48h，72h，96h，120h，144h 或 168h(在 R3 培养基中温育 36h，60h，84h，108h，132h，156h，180h)时，取 1 ml 培养物样品，调 pH 至 8.0。1100 g 离心 5 min 后，测定上清液在 633 nm 下的光密度来分析放线菌紫素的产量，结果如图 5 所示，这些分级展示的单、双及三突变体显示出放线菌紫素生物合成的显著增加。

实施例 5

用如实施例 4 中所述的菌株和方法研究了营养来源对放线菌紫素产量的影响。R4 液体培养基用作基础培养基，向其中分别添加不同量的酵母抽提物，水解酪蛋白氨基酸或 KH_2PO_4。对放线菌紫素的分析与实施例 4 中所述相同。如图 6 所示，添加酵母抽提物对放线菌紫素的产率有严重的损害。这一结果在三突变体中表现不甚明显。与酵母抽提物不同，水解酪蛋白氨基酸可有效地增加单、双或三突变体中放线菌紫素的产量，但对野生型菌株没有影响，证明那些药物抗性突变的效力。KH_2PO_4 基本上对放线菌紫素的产率没有影响。

实施例 6

将从土壤中分离的未经鉴定的链霉菌接种到 GYM 琼脂中，如实施例 1 所述制备孢子溶液。对链霉素，庆大霉素或利福平抗性突变体的筛选如实施例 2 所述。将所述抗性突变体接种到 GYM 琼脂，R4 琼脂和 SYM 琼脂，在 30℃下培养 6 天。GYM 琼脂和 R4 琼脂的组分如实施例 1 所述。SYM 琼脂包含 1%可溶性淀粉，0.2%酵母抽提物，0.5%葡萄糖和 2%琼脂(加琼脂前调 pH 至 7.3)。

用琼脂塞（plug）法通过测定对测试微生物(大肠杆菌 K12，金黄色葡萄球菌（S. Aureus）209P,枯草芽孢杆菌 6633 或白色念珠菌（Candida albicans)生长的抑制程度(抑菌区的直径)检测突变体中抗生素的产率。

筛选结果如图 9 和表 3 所示。

表 3

101 到 200 号菌株的筛选结果

起始日期: 02/06/2000	结束日期: 05/09/2000
检测的菌株号	100No. 618749 到 No. 618892
产生药物抗性突变体的菌株数	95
产生能产生抗生素的突变体的菌株数	45
产生作用于大肠杆菌 K12 的突变体的菌株数	6
产生作用于白色念珠菌的突变体的菌株数	17
产生作用于金黄色葡萄球菌 209P 的突变体的菌株数	38
产生作用于枯草芽孢杆菌 6633 的突变体的菌株数	39

实施例 7

依照与实施例 1、2 或 3 中类似的方法制备蜡状芽孢杆菌 No. 2045 的庆大霉素抗性突变体和利福平及庆大霉素抗性突变体。将这些突变体在肉汤培养基中预培养 10h。将细胞(0.1 ml)接种到由(每升) 20 g 聚胨，20 g 玉米浆，和 5 g NaCl 组成的生产培养基(用 NaOH 调 pH 7.5)中在 30℃下培养 2 天。结果如表 4 所示。

表 4

突变体的筛选结果和特性

菌株	基因型	对 GEN*2 的抗性水平 (μg/ml)	对 RIF*2 的抗性水平 (μg/ml)	WB2045*3 的产率 *4 (μg/ml)
蜡状芽孢杆菌 No. 2045	野生型	0.8	1.0	60
BG-1	gen*1	4. 0	1.0	126
BG-2	gen	4. 0	0.8	135
BG-3	gen	4. 5	1.0	130
BGR-1	gen-rif	4. 5	100	380
BGR-2	gen-rif	5. 0	120	340
BGR-3	gen-rif	5. 0	150	285

*1. gen 表示对庆大霉素的抗性， gen-rif 表示对庆大霉素和利福平的抗性。

*2. GEN 表示庆大霉素，RIF 表示利福平。

*3. WB2045 是蜡状芽孢杆菌 No. 2045 产生的具有抗微生物活性的物质，(=FERM BP-1791) (USP4,950,605)。

*4. 通过常规的纸盘扩散实验(Toyo Roshi; thick type 9 mmϕ)在琼脂平板上，利用 1.7 X NG 培养基[一种用于枯草芽孢杆菌产生抗生素的培养基，（每升）含 17 g 营养液(Difco)，17g 葡萄糖，3.4g NaCl，8.5mg $CuSO_4.5H_2O$，12.75mg $FeSO_4.7H_2O$，6.12mg $MnSO_4$-$5H_2O$，25.5mg $CaCl_2$-$2H_2O$,和 15.3mg $ZnSO_4.7H_2O$ (用 NaOH 调 pH 7.2)]30℃下培养 48 小时确定 WB2045 抗枯草芽孢杆菌 6633 的抗菌活性。

实施例 8

依照与实施例 1，2 或 3 类似的方法制备浅青紫链霉菌 66 的利福平-抗性突变体和链霉素及利福平抗性突变体，然后估计放线菌紫素的产量，结果如表 5 所示。

表 5

筛选结果及突变体特性

菌株	基因型	对 RIF 的抗性水平 (μg/ml)*1	对 STR 的抗性水平 (μg/ml)	Act 的产率 (OD_{633nm})*2
浅青紫链霉菌 66	野生型	10	1.0	0.089
SR-1	rif'	200	1.0	0.265
SR-2	rif	400	0.8	0.864
SR-3	rif	400	1.0	0.684
SRS-1	rif-str	400	50	1.200
SRS-2	rif-str	350	120	1.801
SRS-3	rif-str	400	100	1.342

*1. rif 或 rif-str,对利福平有抗性或对利福平和链霉素有抗性; RIF, 利福平; STR, 链霉素。

*2. 用 R4 液体培养基在 30℃下培养 5 天后测定上清液在 633 nm 下的 OD 值来确定放线菌紫素(Act)的产量。

尽管参考特定的实施方式对本发明进行了详细说明，但对本领域的技术人员而言，在不背离本发明的精神和范围的前提下进行多种变换和修饰都是显而易见的。

本申请以 2001 年 3 月 30 日提交的美国临时专利申请 No. 60/279,665 为基础，该申请的全部内容在此引入作为参考。

工业实用性

本发明提供了一种以节省人力、节省时间、高效和半经验的方法提高微生物次级代谢物产率的方法，可应用于对例如,其抗生素的生化和遗传不甚了解的菌株。

<110> 藤泽药品工业株式会社
国家食品研究院
K. 奥基
H. 胡
M. 希诺
A. 福吉
H. 穆拉马特苏

<120> 通过赋予药物抗性突变提高次级代谢物产率的方法

<130> P-40517

<140>
<141>

<150> 美国临时申请 60/279665
<151> 2001-03-30

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明:合成 DNA
正向引物

<400> 1
attcggcaca cagaaac 17

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明:合成 DNA

反向引物

<400> 2
agaggagaac cgtagac 17

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明:合成 DNA
正向引物

<400> 3
ggccgctaca aggtgaacaa gaag 24

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列说明:合成 DNA
反向引物

<400> 4
cgatgacgaa gcggtcctcc 20

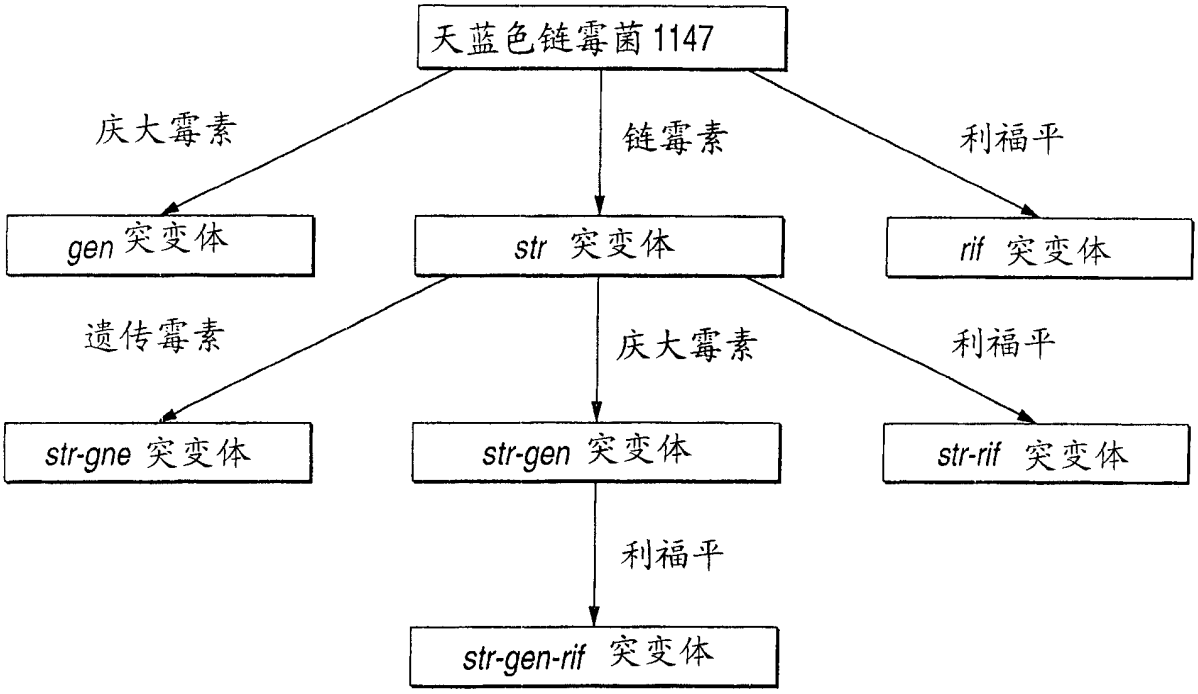

天蓝色链霉菌1147
庆大霉素
链霉素
利福平
gen 突变体
str 突变体
rif 突变体
遗传霉素
庆大霉素
利福平
str-gne 突变体
str-gen 突变体
str-rif 突变体
利福平
str-gen-rif 突变体

图 1

图 2

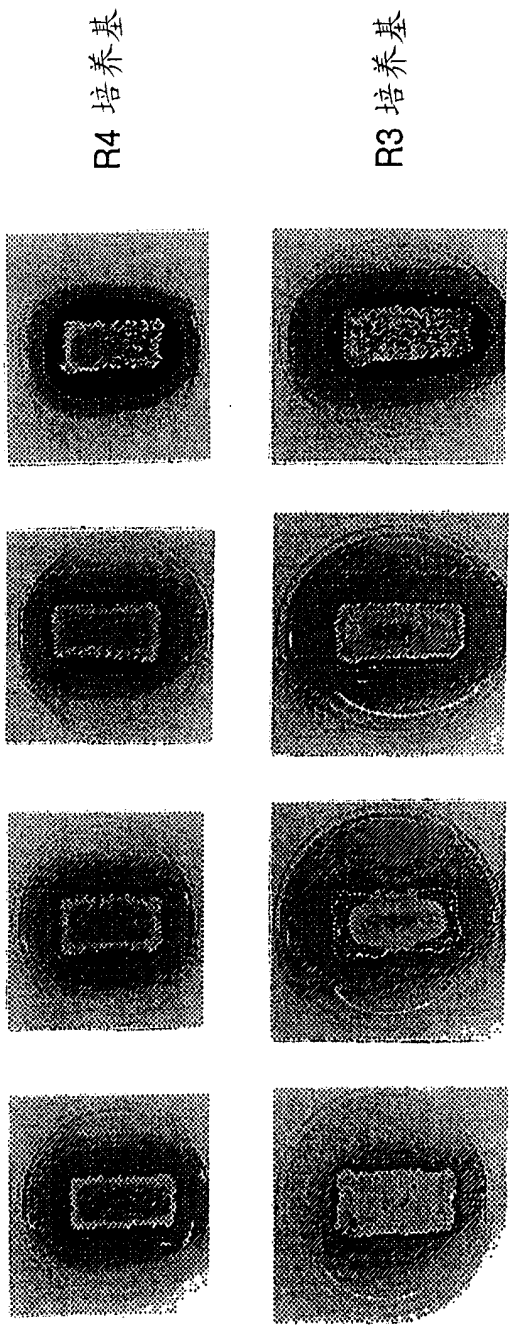
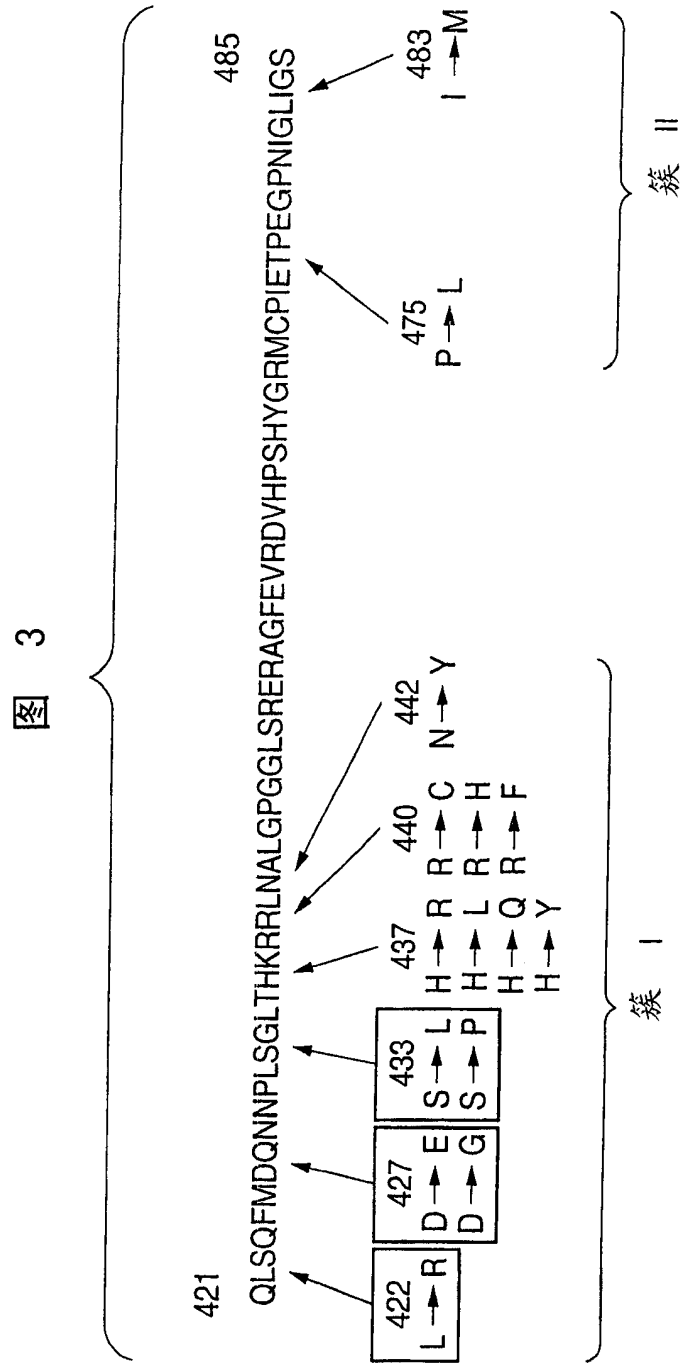


图 3


421
QLSQFMDQNNPLSGLTHKRRLNALGPGGLSRERAGFEVRDVHPSHYGRMCPIETPEGPNIGLIGS
485
422
L→R
427
D→E
D→G
433
S→L
S→P
437
H→R
H→L
H→Q
H→Y
440
R→C
R→H
R→F
442
N→Y
475
P→L
483
I→M
簇 I
簇 II

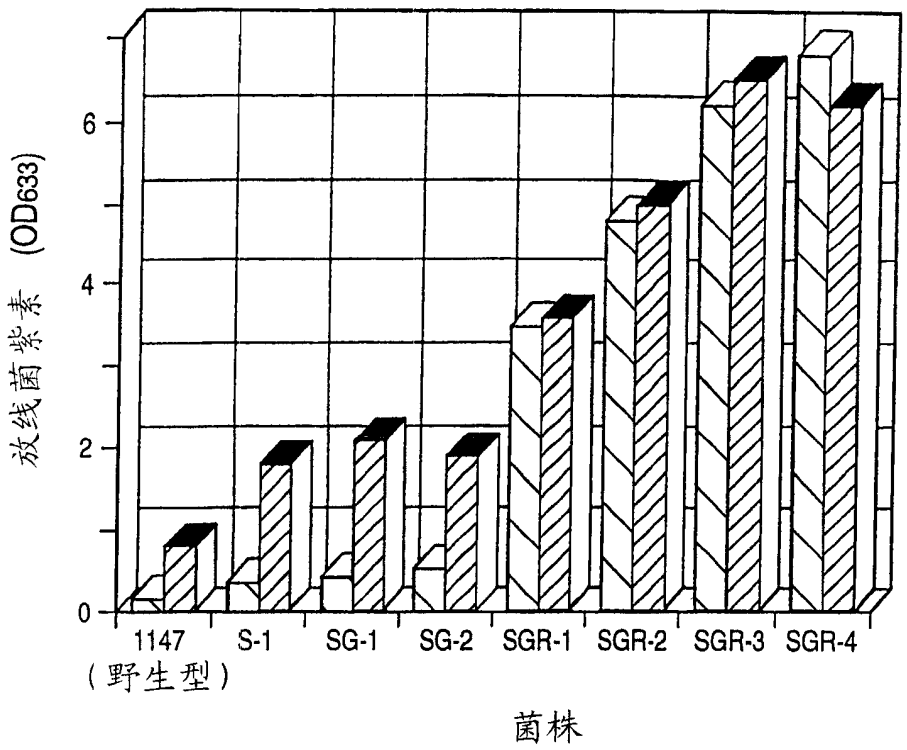
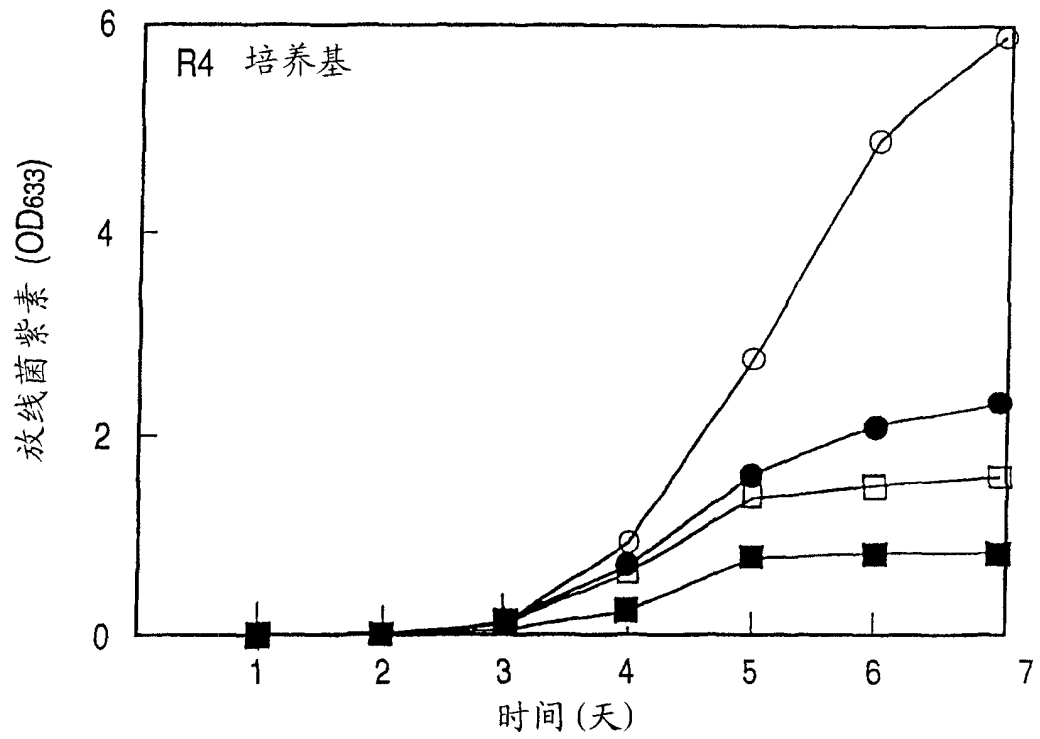


图 4

图 5


R4 培养基
放线菌紫素 (OD633)
时间(天)
0
2
4
6
1
2
3
4
5
6
7

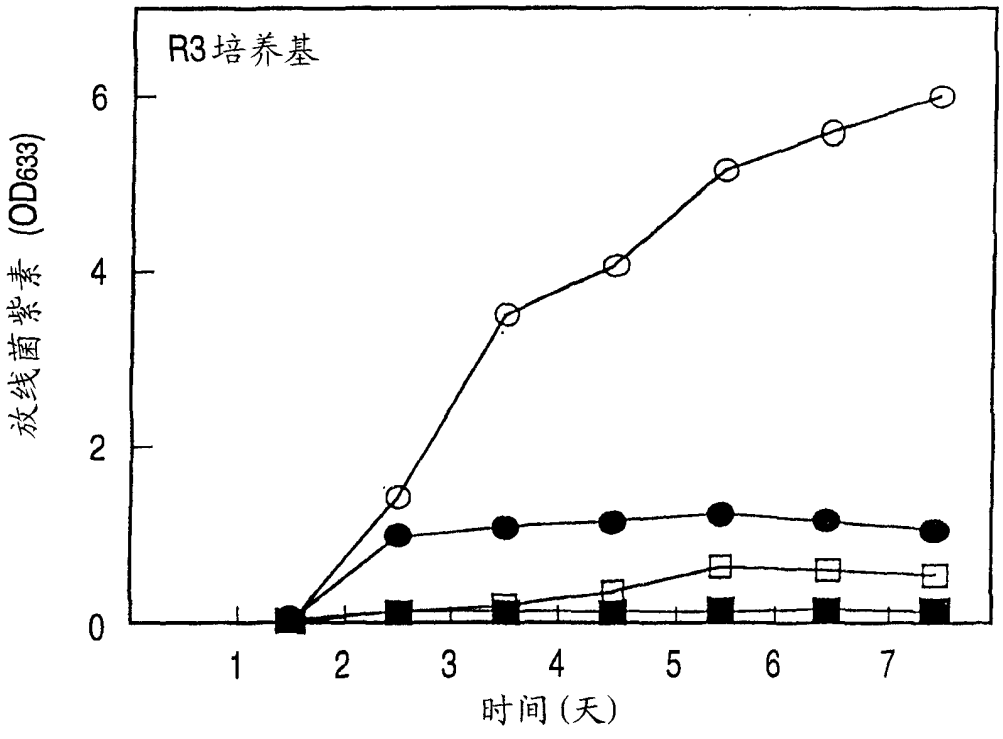
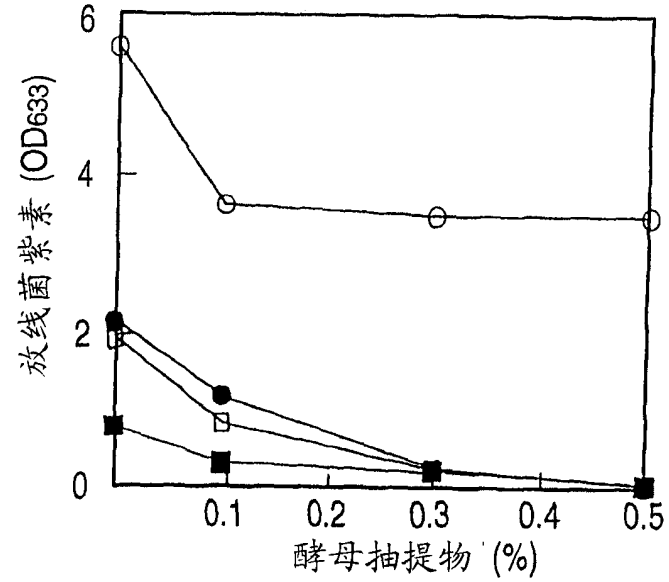
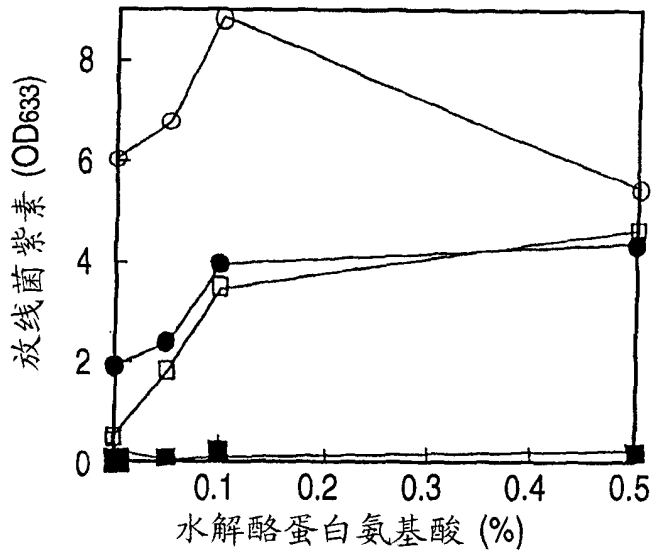

R3培养基
放线菌紫素 (OD633)
时间(天)
0
2
4
6
1
2
3
4
5
6
7

图 6


放线菌紫素 (OD633)
6
4
2
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
酵母抽提物 (%)


放线菌紫素 (OD633)
8
6
4
2
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
水解酪蛋白氨基酸 (%)

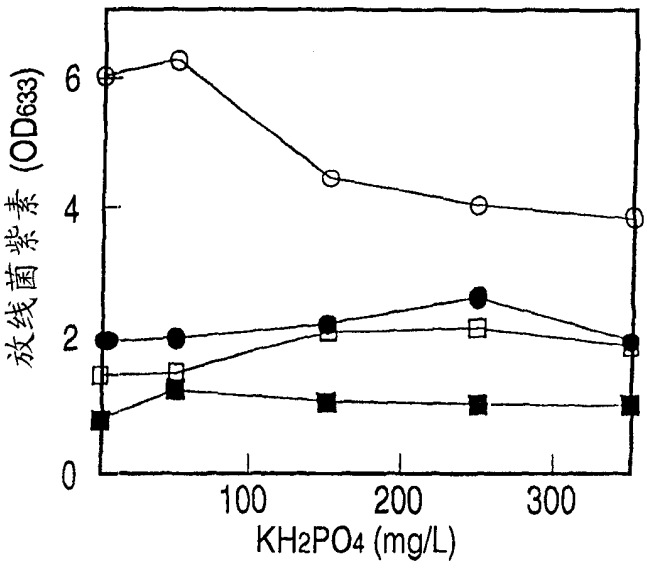
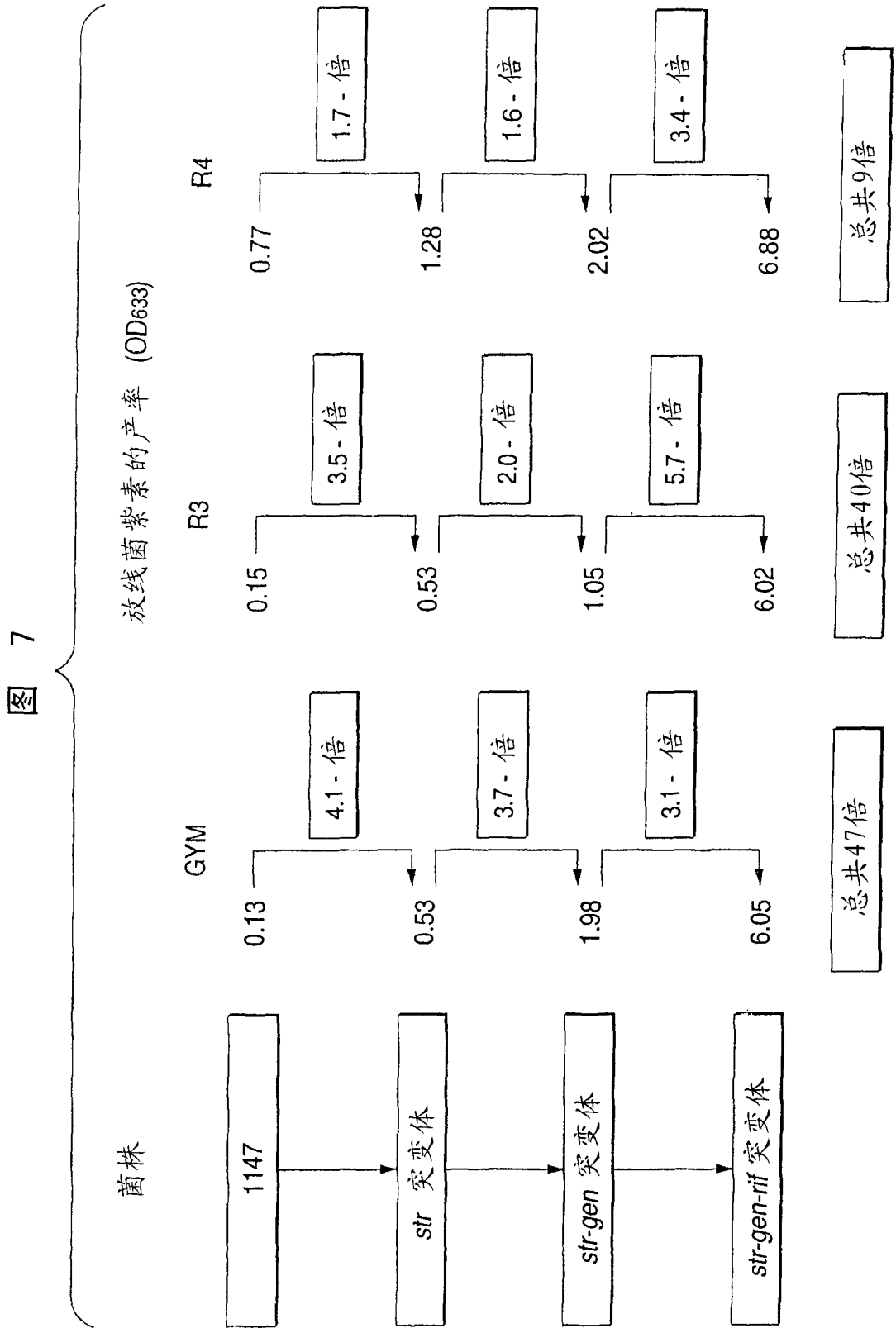

放线菌紫素 (OD633)
6
4
2
0
100
200
300
KH2PO4 (mg/L)

图 7


菌株
放线菌紫素的产率 (OD633)
GYM
R3
R4
1147
str 突变体
str-gen 突变体
str-gen-rif 突变体
0.13
0.53
1.98
6.05
4.1 - 倍
3.7 - 倍
3.1 - 倍
总共47倍
0.15
0.53
1.05
6.02
3.5 - 倍
2.0 - 倍
5.7 - 倍
总共40倍
0.77
1.28
2.02
6.88
1.7 - 倍
1.6 - 倍
3.4 - 倍
总共9倍

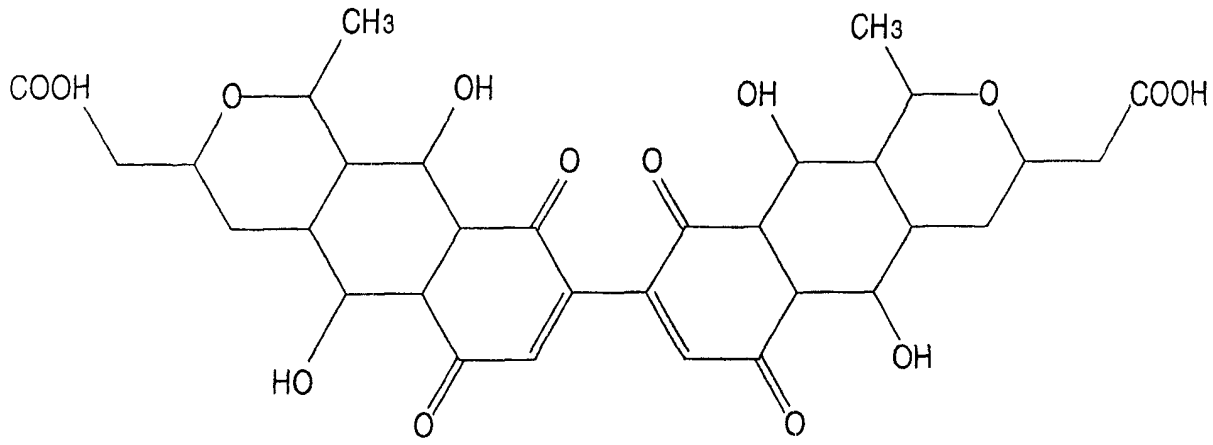


图 8

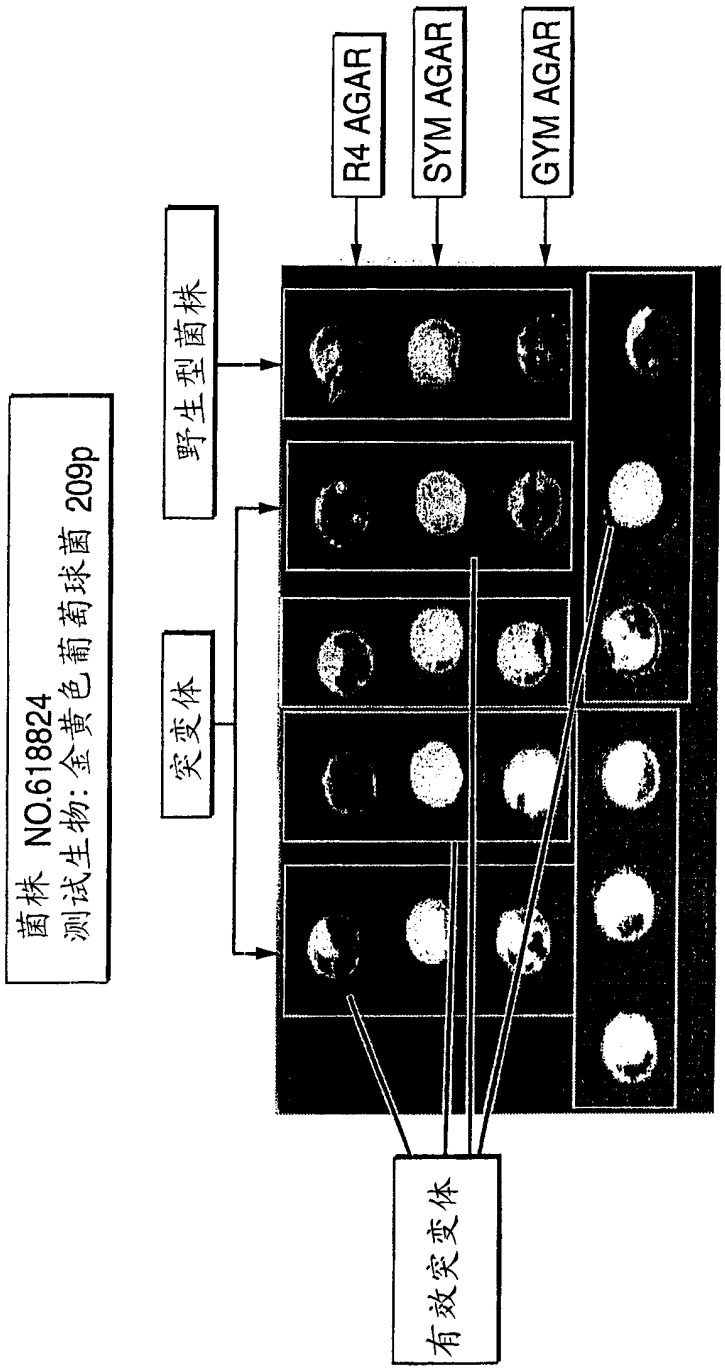
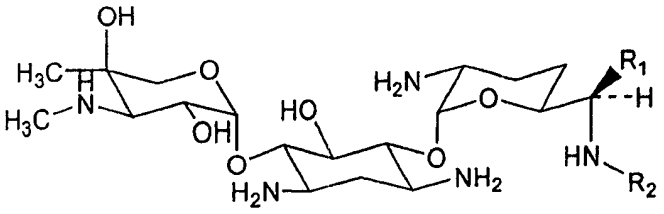

菌株 NO.618824
测试生物:金黄色葡萄球菌 209p
野生型菌株
突变体
R4 AGAR
SYM AGAR
GYM AGAR
有效突变体

图 9

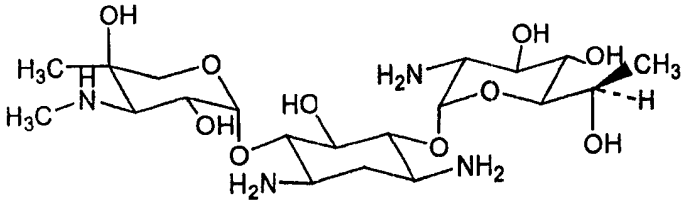
图 10



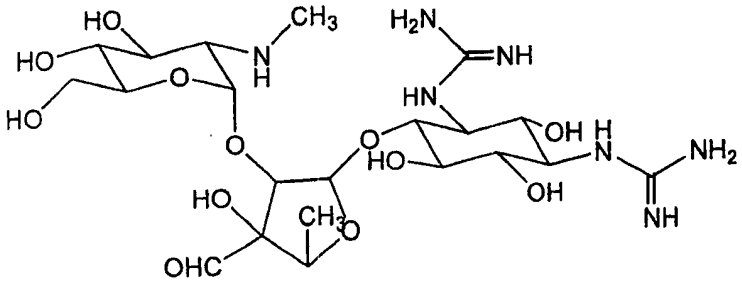
庆大霉素 C1 R1 = R2 = CH_3

庆大霉素 C1a R1 = R2 = H

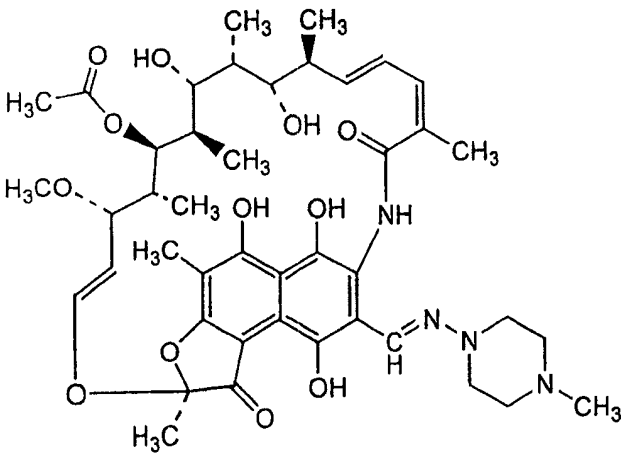
庆大霉素 C2 R1 = CH_3 R2 = H



遗传霉素 (G-418)



链霉素



利福平