

# 拟柱孢藻毒素生物合成的分子基础与进化特征

蒋永光<sup>1</sup>,王志高<sup>1</sup>,王纯波<sup>2</sup>

(1.中国地质大学 环境学院,武汉 430074;2.中国科学院 水生生物研究所,武汉 430072)

**摘要:**拟柱孢藻毒素是由尖头藻等水华蓝藻产生的一种生物碱类蓝藻毒素.毒理学研究表明该毒素进入动物体内后能够对多种器官产生毒性效应,且以肝毒性较为明显.拟柱孢藻毒素的毒性虽不及微囊藻毒素,但由于其结构的稳定性和水溶性,能够在水体中积累到较高浓度,增大了饮用水健康风险,且容易通过食物链富集造成更为严重的中毒事件.随着尖头藻水华在世界范围内的蔓延,拟柱孢藻毒素也引起了研究者和水体管理部门的广泛关注.作为一种次级代谢产物,拟柱孢藻毒素的生物合成是从甘氨酸、精氨酸和丙二酰 CoA 开始,由特定的多种酶依次催化完成的.这些酶的编码基因在基因组上形成簇状结构,不同种的产毒藻具有相似的毒素合成基因簇,主要差别在于基因序列的变异和排列方式的不同.对毒素合成基因及其功能的探究不但有助于建立可靠的分子检测方法,用于预测水华发生过程中的毒素风险,还可以加深对蓝藻次级代谢产物合成与进化的认识,为利用和改造这些天然代谢途径合成新的活性化合物提供参考.通过对拟柱孢藻毒素生物合成的分子基础及其进化特征的系统性总结,以期从分子水平为相关领域的研究者提供有关拟柱孢藻毒素的全面认识.

**关键词:**蓝藻毒素;拟柱孢藻毒素;生物合成;基因簇;系统发育

**中图分类号:**Q931;Q933;Q939

**文献标志码:**A

水体富营养化和蓝藻水华的频繁暴发是工业化社会典型的重大环境问题,加之全球气候变暖对蓝藻生长的促进作用,蓝藻水华已经在世界范围内引起了广泛重视<sup>[1-2]</sup>.水华蓝藻产生的蓝藻毒素给饮用水安全带来了极大风险<sup>[3]</sup>.1979年,澳大利亚昆士兰州棕榈岛上的许多居民(多数是儿童)因为饮用水中毒突发肝毒性肠炎.流行病学调查发现水源地暴发的拉氏尖头藻(原名拉氏拟柱孢藻,*Raphidiopsis raciborskii*)水华产生了致病性物质,导致了饮用水污染,该物质最终被鉴定为拟柱孢藻毒素(cylindrospermopsin,简称CYN)<sup>[4-7]</sup>.小鼠腹腔注射实验表明,CYN的半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)约为200 μg/kg体质量,在注射毒素5~6 d后发生致死效应<sup>[6]</sup>.该毒素对肝脏、胸腺、肾脏和心脏等多个器官均有毒性,肝脏是主要的靶器官<sup>[8]</sup>.在致毒机理方面,研究表明CYN能够抑制蛋白质、还原型谷胱甘肽以及尿嘧啶核苷酸的合成<sup>[9-11]</sup>,还会诱导DNA双链断裂,具有遗传毒性<sup>[12]</sup>.有关CYN毒理的详细资料可以参考已经发表的综述<sup>[13-16]</sup>.

CYN的化学结构主要由三环胍基、羟甲基尿嘧啶和硫酸基团组成(图1),分子式为C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S(m=415 u),是一种两性离子生物碱,具有水溶性<sup>[6]</sup>.由于第7位碳原子(C<sub>7</sub>)是手性结构,CYN还存在一种对映异构体,即7-epi-CYN<sup>[17]</sup>.此外,C-7缺少羟基修饰的CYN结构类似物称为脱氧拟柱孢藻毒素(7-deoxy-CYN)<sup>[18]</sup>,第12位碳原子(C<sub>12</sub>)的硫酸基团修饰也缺失的类似物称为脱氧脱硫拟柱孢藻毒素(7-deoxy-desulfo-CYN).C<sub>12</sub>上的硫酸基团被乙酰基取代的类似物是7-deoxy-desulfo-12-acetyl-CYN<sup>[19]</sup>.毒理学实验表明7-epi-CYN与CYN有相似的毒性,而7-deoxy-CYN未显示出毒性效应,因此,C<sub>7</sub>的羟基是产生毒性的必要结构,并且尿嘧啶基团也是产生毒性所必需的<sup>[17-21]</sup>.

拉氏尖头藻水华原本主要发生在热带、亚热带地区.近年来,该种水华蓝藻在全球范围内快速扩散,其水

收稿日期:2021-03-05;修回日期:2021-04-08.

基金项目:国家自然科学基金(31500071);中国地质大学(武汉)中央高校基本科研业务费专项资金(CUG170680).

作者简介(通信作者):蒋永光(1986-),男,山东泰安人,中国地质大学(武汉)副教授,博士,研究方向为环境微生物,

E-mail:jiangyg@cug.edu.cn.

华发生频次也不断增加<sup>[22-24]</sup>。此外,在其他水华蓝藻,如弯形尖头藻(*R. curvata*)、地中海尖头藻(*R. mediterranea*)、鱼腥藻(*Anabaena*)、束丝藻(*Aphanizomenon*)和颤藻目的 *Kamptonema* (原名 *Oscillatoria*) 中也陆续检测到了产 CYN 的藻株<sup>[25-33]</sup>。迄今为止,除南极外,其他大陆的水体中均有检测到 CYN 的报道<sup>[34]</sup>。该种毒素的污染及其引起的饮用水安全风险和生态风险也日益引起学术界和管理部门的广泛关注。CYN 的合成与产量受到温度、光照以及氮、磷和硫元素的供应等多种环境因子的影响<sup>[35-41]</sup>,但是,由于不同研究者所用的藻株和实验条件的差异,得出的结论往往缺乏一致性。细胞内 CYN 的合成是由特定的毒素基因控制的<sup>[42]</sup>。环境因子对毒素产生的调节作用都要通过影响毒素基因的表达或酶的活性来实现。

蓝藻等微生物含有丰富的次级代谢产物。这些结构多样的化合物的生物合成往往是由一系列的酶催化反应完成的,包括众多具有多个结构域的多功能酶,以及一般的代谢酶和修饰酶<sup>[43-44]</sup>。这些合成酶的编码基因多数在基因组上彼此毗邻,甚至共用一个转录起始位点,这种特殊的基因排列称为基因簇(gene cluster)。非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)和聚酮合酶(polyketide synthase, 简称 PKS)是参与蓝藻毒素分子骨架构建的两类主要的多功能酶。NRPS 的基本结构包括氨酰基腺苷酸化域(A)、肽键缩合域(C)和肽基载体蛋白(PCP)3个部分,分别具有特异性氨基酸激活、肽链延长和肽基运载的功能。另外, NRPS 还含有氨基转移酶(AMT)和差向异构酶(Ep)等修饰酶结构域。PKS 的基本结构包括酰基转移酶(AT)、 $\beta$ -酮合成酶(KS)和酰基载体蛋白(ACP)3个部分,还常含有酮还原酶(KR)、脱氢酶(DH)、烯酰基还原酶(ER)和甲基转移酶(MTF)等修饰酶结构域。处于链延长反应末端的 NRPS 和 PKS 还含有硫酯酶(TE)结构域,具有释放成熟化合物的功能。

为了便于从分子水平上加深对 CYN 产生的了解,建立有效的分子手段用于产毒藻(如无特殊说明,下文所说的产毒藻均指产 CYN 及其结构类似物的藻株)的检测和评估水体藻类产毒潜力及其与环境因子的关联性,本文结合作者前期的研究工作积累,对 CYN 合成基因及其进化特征的研究进展进行系统总结。

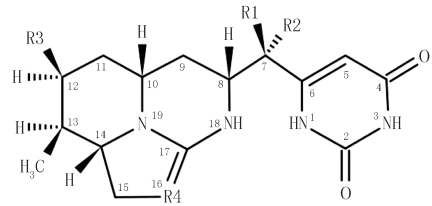
## 1 CYN 合成的分子机理

### 1.1 CYN 的合成基因

MIHALI 等首先从产毒藻株 *R. raciborskii* AWT205 中扩增出了完整的 CYN 合成基因簇(*cyr* cluster)<sup>[42]</sup>,全长 43 kb,含有 15 个开放阅读框(图 2A),包括:脘基转移酶基因 *cyrA*, NRPS/PKS 杂合基因 *cyrB*, 4 个 PKS 基因 *cyrC*~*cyrF*, 胞嘧啶脱氨酶的同源基因 *cyrG* 和 *cyrH*, 磺基转移酶基因 *cyrJ*, 羟基化酶基因 *cyrI*, 钠离子转运蛋白的同源基因 *cyrK*, 腺苷酰硫酸激酶基因 *cyrN*, 推测的调控因子 *cyrO*, 以及不参与毒素合成的转座酶基因 *cyrL* 和 *cyrM*。在产毒藻 *R. raciborskii* CHAB3438<sup>[45]</sup>、*R. curvata* CHAB1150<sup>[46]</sup>、*Aphanizomenon* sp.10E6<sup>[47]</sup> 和 *Kamptonema* sp.PCC 6506<sup>[30]</sup> 的 *cyr* 基因簇中未发现 *cyrN* 和 *cyrO*(图 2)。MAZMOUZ 等认为 *cyrN* 基因是参与硫元素基础代谢的持家基因,并非特异性的毒素基因<sup>[30]</sup>。但是,JIANG 等通过对尖头藻中的产毒藻株和不产毒藻株进行基因检测和比较表明, *cyrN* 仅存在于产毒藻株中,推测其是 *cyr* 基因簇特有的<sup>[45-46]</sup>,在尖头藻中还有另一个预测的腺苷酰硫酸激酶基因可能与基础代谢有关<sup>[48]</sup>。此外, *cyrO* 存在于所有尖头藻中,推测其不是 *cyr* 基因簇特有的<sup>[45-46]</sup>,但是 *cyrO* 是否参与毒素合成的调控仍不清楚。

### 1.2 CYN 合成路径

同位素标记实验表明脘基乙酸分子能够整体嵌合到 CYN 分子骨架中<sup>[49]</sup>,因此, CYN 可以看作是由脘

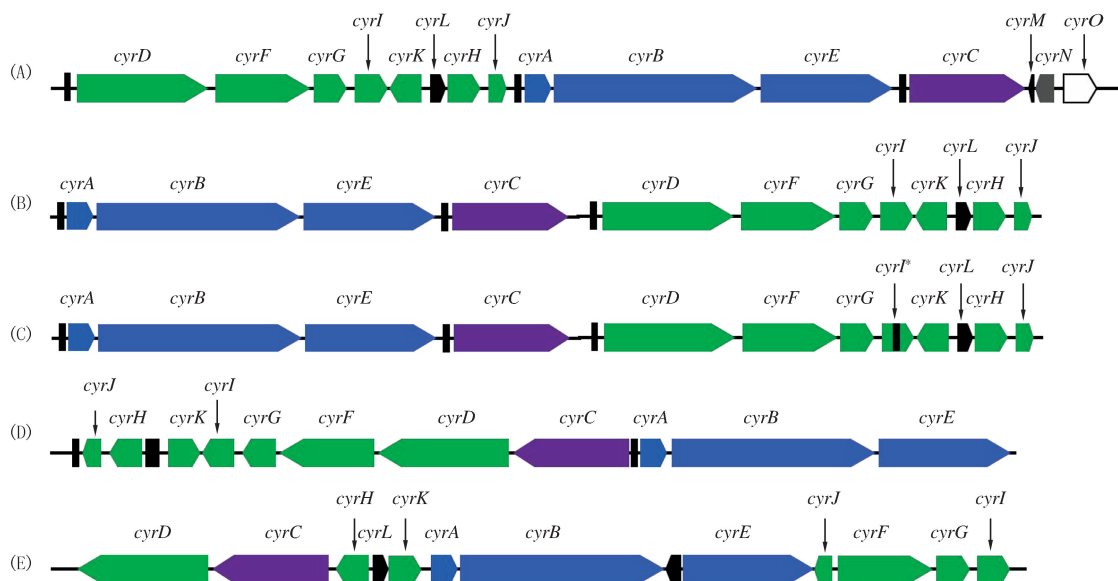


CYN (R1:OH, R2:H, R3:OSO<sub>3</sub>, R4:N<sup>H</sup>)  
 7-epi-CYN (R1:H, R2:OH, R3:OSO<sub>3</sub>, R4:N<sup>H</sup>)  
 7-deoxy-CYN (R1:H, R2:H, R3:OSO<sub>3</sub>, R4:N<sup>H</sup>)  
 7-deoxy-desulfo-CYN (R1:H, R2:H, R3:OH, R4:N)  
 7-deoxy-desulfo-12-acetyl-CYN (R1:H, R2:H, R3:OCOCH<sub>3</sub>, R4:N)

图1 CYN及其结构类似物的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of CYN and its analogues

基乙酸起始合成的聚乙酰链结构.毒素分子中的碳原子分别来源于甘氨酸,5 个乙酸单位和一碳单位,尿嘧啶基团是毒素合成过程中形成的,并非直接来源于含尿嘧啶的底物<sup>[49]</sup>.因此,CYN 的合成过程是由 NRPS 和 PKS 参与完成的.MIHALI 等根据同位素标记实验和生物信息学分析的结果,推测了图 3 所示的 CYN 合成路径<sup>[42]</sup>.



相同颜色的条形图表示位置上倾向于毗邻的基因,黑色代表转座酶或其残余序列,星号表示基因突变。

图2 产毒藻株 *R. raciborskii* AWT205 (A), *R. raciborskii* CHAB3438 (B), *R. curvata* CHAB1150 (C), *Aphanizomenon* sp. 10E6 (D) 和 *Kamptomena* sp. PCC 6506 (E) 的 *cyr* 基因簇结构<sup>[30, 42, 45-47]</sup>

Fig. 2 Composition of *cyr* gene clusters from toxin-producing strains including *R. raciborskii* AWT205 (A), *R. raciborskii* CHAB3438 (B), *R. curvata* CHAB1150 (C), *Aphanizomenon* sp. 10E6 (D) and *Kamptomena* sp. PCC 6506 (E) <sup>[30, 42, 45-47]</sup>

### 1.2.1 CyrA 催化的起始反应

转脒基酶是将供体分子的脒基转移到受体分子的氨基上,形成脒基基团.精氨酸:甘氨酸转脒基酶主要存在于脊椎动物和植物中,是脒基化合物合成的关键酶,在脊椎动物能量代谢(如肌酸合成)和高等植物次级代谢物的合成中有重要作用<sup>[50-52]</sup>.蛋白质模型分析表明 CyrA 与人类精氨酸:甘氨酸转脒基酶(AGAT)具有较高的结构相似性,且参与底物结合的氨基酸位点也高度保守,具有利用精氨酸和甘氨酸作为底物的结构特征<sup>[53]</sup>.MUENCHHOFF 在大肠杆菌中表达和纯化了 CyrA,并加入精氨酸和甘氨酸进行体外酶活性表征,利用核磁共振氢谱鉴定出反应产物中含有脒基乙酸以及精氨酸脱去脒基后的鸟氨酸<sup>[54]</sup>.底物类似物添加实验表明 CyrA 的底物特异性比 AGAT 更高,脒基供体的羧基是与酶蛋白结合时所必需的,进一步的点突变实验表明 CyrA 活性位点的第 245 和 247 位氨基酸对于底物特异性和活性位点稳定性至关重要<sup>[54-55]</sup>.另外,CyrA 催化反应的初始速率、中间产物和产物抑制特征表明该酶的反应动力学具有乒乓反应和随机顺次反应的双重特征,酶分别在 pH 8.5 和 pH 6.5 时具有最大活性和最大稳定性,其最适温度为 32 °C<sup>[54]</sup>.此外,蛋白纯化鉴定的结果表明 CyrA 在细胞内以二聚体和四聚体形式存在<sup>[54]</sup>.尽管体外实验提供了较为确凿的证据,BURGOYNE 等在培养的产毒藻中未能检测到同位素标记的精氨酸脒基转移到脒基乙酸<sup>[49]</sup>,该结果可能是由于藻细胞不能摄取外源添加的精氨酸所致<sup>[53]</sup>.另外,也有研究发现产毒藻和不产毒藻都可以积累脒基乙酸,说明蓝藻中还存在其他脒基乙酸生成途径<sup>[56]</sup>.以上研究结果表明 CyrA 是第一个在原核生物中发现的精氨酸:甘氨酸转脒基酶,催化 CYN 合成的起始反应,将精氨酸的脒基转移到甘氨酸的氨基上形成脒基乙酸<sup>[53-54]</sup>.

### 1.2.2 CyrB 催化第一步碳链延长反应

在预测的参与碳链延长反应的 5 个多功能酶中(CyrB~CyrF),只有 CyrB 含有 NRPS 的 A 结构域

(CyrB-A),具有结合并激活起始底物的功能.但是,已知的 A 结构域都不能利用胍基乙酸作为底物<sup>[42]</sup>.通过比较多种 A 结构域底物结合区的氨基酸残基,KELLMANN 等发现 A 结构域的第一个位点都是天冬氨酸,可以与底物氨基酸的  $\alpha$  氨基形成氢键,第 8 个位点一般是疏水性氨基酸,但 CyrB-A 是天冬氨酸,推测 CyrB-A 的两个天冬氨酸有可能与胍基乙酸的 2 个氨基形成氢键,从而促进该底物的识别和结合<sup>[53]</sup>.利用短杆菌肽合成酶(GrsA)的结构模型对 CyrB-A 进行的建模分析也表明胍基乙酸能够嵌入到其底物结合区<sup>[53]</sup>.CyrB-A 激活胍基乙酸后,可通过 PCP 的摆动臂将其转移到 KS 结构域.与此同时,AT 结构域激活一分子丙二酰 CoA,使其结合到 ACP 上,在 KS 催化下与胍基乙酸发生缩合反应,完成第一个乙酸单位的添加.

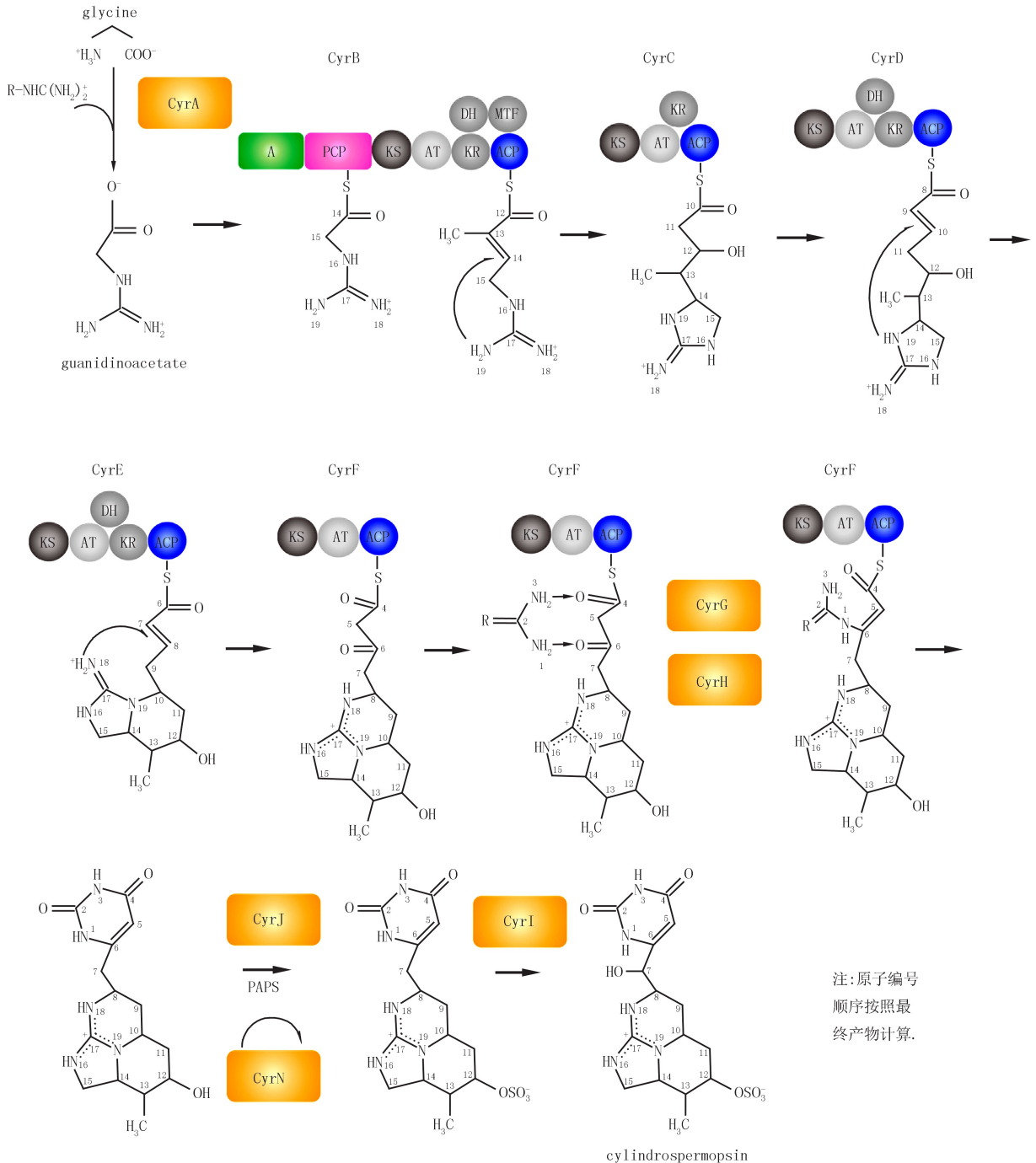


图3 推测的CYN生物合成路径模式图<sup>[42]</sup>

Fig. 3 Hypothetical CYN biosynthesis route<sup>[42]</sup>

CyrB 的 KR 和 DH 结构域可以协同催化将来源于胍基乙酸的酮基还原并脱水,形成第 13 位和 14 位碳

原子之间的烯键( $C_{13}=C_{14}$ ).CyrB 的 MTF 结构域与 S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶同源,预测其催化了  $C_{13}$  的甲基化.同位素标记实验也证实  $C_{13}$  上的甲基来源于 S-腺苷甲硫氨酸<sup>[49]</sup>.此外,用氘代乙酸作为  $C_{13}$  前体的实验也表明 CYN 合成过程中  $C_{13}$  上的全部氘原子均被去除,最后产物分子中  $C_{13}$  上的氢原子是反应过程中添加的,间接证明了上述反应过程推测的合理性.

CYN 分子中三环结构的形成机制尚不清楚,CyrB 催化的反应完成后,线性产物可能直接进入下一步碳链延长反应<sup>[53]</sup>.MIHALI 等提出 CyrB 催化反应的产物可能发生环化,即第 19 位脒基氮可以通过“Michael 加成反应”的方式亲核攻击上述烯键,并与  $C_{14}$  键合,生成 CYN 分子骨架中的第一个环状结构,即五元含 N 杂环<sup>[42]</sup>.根据鲍德温规则,这一分子内关环反应在能量上是有利的,可以在无酶催化的条件下随机发生<sup>[57]</sup>.

### 1.2.3 PKS 催化添加 4 个乙酸单位

毒素合成基因簇编码了 4 个 PKS,其中 CyrC 包含 KS,AT,KR,ACP 4 个结构域,能够在链延长反应后还原酮产生一个羟基.CyrD 和 CyrE 均包含 KS,AT,KR,DH,ACP 5 个结构域,都能够在链延长反应后还原酮并脱水产生一个烯键.CyrF 仅包含 KS,AT,ACP 3 个结构域,链延长反应产物含有 2 个酮基.根据酶反应产物的特征、CYN 的化学结构和同位素标记实验结果可以推测催化反应顺序依次为 CyrC,CyrD 和 CyrE,CyrF<sup>[42]</sup>.

首先,同位素标记实验表明 CYN 的  $C_{12}$  上单键键合的氧原子来自乙酸前体,是由酮基还原产生<sup>[49]</sup>.氘代乙酸培养实验也表明 CYN 合成过程中  $C_{11}$  上的 2 个氘原子都没有丢失,说明  $C_{11}$  没有经历脱氢反应<sup>[49]</sup>.这两个结果表明, $C_{11}$  与  $C_{12}$  键合后的产物只发生了酮基还原,符合 CyrC 的催化反应特征.因此,可以推测 CyrB 催化反应的产物转移到了 CyrC 的 KS 结构域,在其催化下添加第 2 个乙酸单位,随后 CyrC 的 KR 结构域催化  $C_{12}$  位上的酮基还原成羟基.

CyrD 和 CyrE 具有相同的结构域组成,尚不清楚二者的反应顺序.以 CyrD 为例,其 KS 结构域结合 CyrC 催化反应的产物,催化添加第 3 个乙酸单位.CyrD 的 KR 和 DH 结构域依次催化  $C_{10}$  位上的酮基还原和脱水形成烯键( $C_9=C_{10}$ ).氘代乙酸培养实验表明 CYN 合成过程中  $C_9$  上仅保留了 1 个氘原子,证明  $C_9$  确实经历了脱氢反应<sup>[49]</sup>.CyrD 催化反应产物的第 19 位脒基氮可以通过“Michael 加成反应”的方式亲核攻击上述烯键,并与  $C_{10}$  键合,生成 CYN 分子骨架中的第 2 个环状结构,即六元含 N 杂环<sup>[42]</sup>.

CyrE 的 KS 结构域结合上述含有并环的产物,催化添加第 4 个乙酸单位.其 KR 和 DH 结构域依次催化  $C_8$  上的酮基还原和脱水形成烯键( $C_7=C_8$ ).氘代乙酸培养实验表明 CYN 合成过程中  $C_7$  位上的氘原子均被去除,证明  $C_7$  确实经历了脱氢反应<sup>[49]</sup>,并且  $C_7$  位的羟基也不是来源于乙酸,而是在修饰酶催化下添加的.CyrE 催化反应产物的第 18 位氮也可以通过“Michael 加成反应”的方式亲核攻击上述烯键,并与  $C_8$  键合,生成 CYN 分子骨架中的第 2 个六元含 N 杂环<sup>[42]</sup>,CYN 的三环结构得以形成.这一中间产物与 CyrF 的 KS 结构域结合,在其催化下添加第 5 个乙酸单位,产物的  $C_4$  和  $C_6$  上各有 1 个未被还原的酮基.

### 1.2.4 CyrG 和 CyrH 催化尿嘧啶环的形成

同位素分析表明  $C_4$  上的氧原子来自乙酸前体,说明尿嘧啶环是在毒素合成过程中形成的,是一种新的尿嘧啶合成途径.该途径包括  $C_4$  和  $C_6$  共同与 1 个脒基的 2 个氮原子键合<sup>[42,49]</sup>.CyrG 和 CyrH 具有较高相似度,均是胞嘧啶脱氨基酶的同源蛋白,表明二者与氮碳键的形成有关,且催化相似的反应.因此,CyrG 和 CyrH 有可能催化了第 2 个脒基与碳链的键合反应.当脒基的第 1 个氮与  $C_6$  键合时, $C_6$  上的羟基在脱水反应中被去除,并形成 1 个烯键( $C_5=C_6$ ).脒基的第 2 个氮与  $C_4$  键合,同时伴随着中间产物分子与 CyrF-ACP 之间硫酯键的断裂,该产物就是 7-deoxy-desulfo-CYN.由于 CyrF 缺少 TE 结构域,不能催化硫酯键的水解,间接表明了上述反应过程推测的合理性.由于产物分子中脒基碳( $C_2$ )上是羰基,脒基的供体可能是尿素分子或者含氨基的化合物(如精氨酸),脒基供体的碳链以类似脱氢的方式与脒基分离,该反应可能也是由 CyrG 或 CyrH 催化的.

### 1.2.5 CyrJ 和 CyrN 协同催化 7-deoxy-desulfo-CYN 的硫酸化

在 CYN 的结构类似物中,7-deoxy-CYN 应当是由 7-deoxy-desulfo-CYN 经硫酸化反应生成的,推测 CyrJ 催化磺基转移到 7-deoxy-desulfo-CYN 的  $C_{12}$  羟基,生成 7-deoxy-CYN<sup>[42]</sup>.CyrN 催化的产物 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)为 CyrJ 提供活化的硫酸基团.另一结构类似物 7-deoxy-desulfo-12-acetyl-CYN 是在

C<sub>12</sub>羟基上键合了乙酰基,其生成机制尚不清楚,推测是 O-酰基转移酶催化了这一反应<sup>[58]</sup>.已知的 *cyr* 基因簇中都没有编码这种酶的基因,因此,需要对发现这一化合物的藻株进行基因组测序分析,以期确定 O-酰基转移酶的来源.

### 1.2.6 CyrI 催化 7-deoxy-CYN 的羟基化

CyrI 与 2-酮戊二酸依赖的铁氧化酶(2-ODIO)同源,而 2-ODIO 在真核和原核生物中广泛存在,催化各种氧化反应.将 CyrI 的蛋白序列与 2-ODIO 进行比对,可以发现 CyrI 的二级结构中含有在 2-ODIO 中高度保守的二价铁和 2-酮戊二酸结合区域,说明 CyrI 具有氧化酶的特征<sup>[59]</sup>.体外表达和酶催化实验表明 CyrI 能够催化 7-deoxy-CYN 的 C<sub>7</sub> 羟基化生成 CYN 或 7-epi-CYN<sup>[59]</sup>.此外,CyrI 不会将 C<sub>7</sub> 的羟基氧化成酮,也不具有差向异构酶的活性,不能介导 CYN 和 7-epi-CYN 的转变<sup>[59]</sup>.对于 CyrI 催化产生两种手性异构体 CYN 或 7-epi-CYN 的机制,MAZMOUZ 等<sup>[59]</sup>调查了不同产毒藻的 CyrI 蛋白序列相似度,以及手性异构体的含量和比例,发现 CyrI 蛋白可以分成两种基因型,分别对应于高比例的 CYN 和 7-epi-CYN.因此,CyrI 蛋白依其本身的序列和结构特征具有一定的立体选择性,二级结构中的 1 个  $\alpha$ -螺旋可能是立体选择性的调控元件<sup>[60]</sup>.JIANG 等分离鉴定了含有 CyrI 天然碱基突变和插入突变的产毒藻株,这些藻株只能合成 7-deoxy-CYN,为 CyrI 功能的鉴定提供了进一步的证据<sup>[45-46]</sup>.另一种蓝藻毒素石房蛤毒素的合成基因簇也编码了类似 CyrK 的转运蛋白,SxtF 和 SxtM,研究表明藻细胞能够在钠离子和钾离子诱导下排出石房蛤毒素,恰好与这两个蛋白的功能相一致<sup>[61]</sup>.因此,推测 CyrK 也具有辅助藻细胞响应盐离子排出毒素的功能,但是还需要实验验证.另外,JIANG 等分离了具有单碱基缺失的 CyrK 的产毒藻株,这些藻株的 CyrK 的 C 端缺失了部分氨基酸,但是毒素的排出并未被阻断,可能 C 端部分氨基酸缺失不会显著影响 CyrK 的功能<sup>[45]</sup>.

## 2 CYN 合成基因表达的调节

澳大利亚拉氏尖头藻的 *cyr* 基因簇缺少明显的启动子区域,且在基因组上定位于氢化酶基因簇(*hyp*)中<sup>[42,62]</sup>,而 *hyp* 基因的表达受到氮代谢调控因子(NtcA)的调节<sup>[63]</sup>,推测 *cyr* 基因簇可能也受到 NtcA 调控.NtcA 能够激活氮同化基因,这与拉氏尖头藻在缺氮条件下毒素含量最高的结果相一致<sup>[64]</sup>.此外,在从中国水体中分离的产毒尖头藻中,只有 *cyrN* 位于 *hyp* 中,*cyr* 基因簇主体已经转移到了基因组的其他位置<sup>[45]</sup>.尽管如此,这些藻株仍表现出了受 NtcA 调控的特征,在缺氮条件下产毒量明显增加<sup>[65]</sup>.毒素产生还与固氮作用相关,缺氮和富磷的组合条件下拉氏尖头藻的生长率增加,固氮作用增强,毒素合成量也增加<sup>[66]</sup>.

SHALEV-MALUL 等发现在缺氮条件下束丝藻的细胞内毒素含量明显减少<sup>[37]</sup>,但该研究没有测定释放到细胞外的毒素.由于胞外毒素最高可能占到总毒素的 50%以上,尚不能确定束丝藻产毒过程对氮供给的响应特征<sup>[65]</sup>.在束丝藻中,反向转录的 *cyrA* 和 *cyrC* 基因各有 2 个转录起始位点.在缺氮和高光的胁迫下基因转录起点不同,其表达量比氮充足和低光时较低,毒素的产量也较低,但与基因表达量的变化程度不完全一致,说明毒素合成还受到转录后调控<sup>[37]</sup>.与 *cyrA* 和 *cyrC* 的启动子区特异结合的 AbrB 蛋白(细胞转换态调控因子)也已经被分离出来,推测其参与了转录调节过程<sup>[37]</sup>.然而,如图 2 所示,在尖头藻和颤藻中 *cyrA* 和 *cyrC* 的间隔区已经被破坏,AbrB 蛋白是否还能结合到新的启动子区还有待研究.另外,BAR-YOSEF 等还发现椭圆束丝藻(*Aphanizomenon ovalisporum*)毒素基因的表达量在缺磷条件下升高,相应的毒素产量也增加<sup>[41]</sup>.但在拉氏尖头藻中,毒素基因的表达相对稳定,不受磷缺乏的影响,毒素产量与生长率正相关,在低磷条件下产量也低<sup>[67]</sup>.因此 *cyr* 基因的表达调控模式在不同藻株中存在差异,即具有藻株特异性.

## 3 CYN 合成基因的进化特征

微生物次级代谢产物与其生物学和生态学功能密切相关<sup>[43]</sup>,蓝藻毒素合成基因的进化过程可以基于其现生阶段的某些生理作用做简单推测,但是缺少确凿的证据.尽管如此,研究者仍可以根据毒素合成基因簇的排列模式和序列变异来对其进化特征进行分析<sup>[68]</sup>.例如,微囊藻毒素合成基因与 16S rRNA 基因具有共进化特征,结合产微囊藻毒素种类已知的最早化石记录,推测微囊藻毒素的起源早于后生动物,因此,该毒素并不是蓝藻在抵御后生动物捕食过程中进化出来的<sup>[69]</sup>.

### 3.1 *cyr* 基因簇的重排现象

目前已经报道的产 CYN 藻的 *cyr* 基因簇在基因组上的排列方式具有明显的地域性和种间差异(图 2)。从澳大利亚分离的拉氏尖头藻均具有图 2(A)所示的基因簇结构<sup>[42,62]</sup>,而从中国水体分离的尖头藻均具有图 2(B)或图 2(C)所示的 *cyr* 基因排列方式<sup>[45-46]</sup>。尖头藻和束丝藻均属于念珠藻目,在这些产毒藻中,*cyr* 基因簇整体上是 4 个模块片段按不同的排列顺序构成,包括 2 个多顺反子片段: S1(*cyrA-cyrB-cyrE*)和 S2(*cyrD~cyrK*),以及单基因片段 S3(*cyrC*)和 S4(*cyrN*)。因此,藻株的基因簇排列方式可以分为 3 种,以 *R. raciborskii* AWT205 为代表的 S2-S1-S3-S4,以 *R. raciborskii* CHAB3438 为代表的 S1-S3-S2 和 S4,以 *Aphanizomenon* sp.10E6 为代表的(S3-S2)(反向互补)-S1。不同藻株片段衔接位点的序列高度相似,说明以上 *cyr* 基因簇是由共同的原始结构形式重排产生。在 *Kamptonema* sp.PCC 6506 中,S2 被分割成了不同的部分,分布于 S1 和 S3 的上下游。在 *Aphanizomenon* sp.10E6 和 *Kamptonema* sp.PCC 6506 中检测到的腺苷酰硫酸激酶与 *CyrN* 相似度过低,不能确定其是否属于 *cyr* 基因簇的 S4。总体上,念珠藻目种类的 *cyr* 基因排列非常相似,具有一定的同线性(syteny),并与颤藻的 *cyr* 基因排列高度分歧。毒素基因簇结构的差异程度与产毒藻的分类学差异相一致,表明 *cyr* 基因簇可能起源于蓝藻祖先类群,在进化过程中发生了重排现象<sup>[45-47]</sup>。

从图 2 可以看出,在 *cyr* 基因簇中分布有较多的转座酶及其残余序列,这说明转座机制可能介导了 *cyr* 基因簇的重排。JIANG 等发现 *R. curvata* CHAB1150 的 *cyrI* 基因中存在转座酶插入导致的基因失活,进一步证明了转座酶在基因簇进化过程中的关键作用<sup>[46]</sup>。澳大利亚拉氏尖头藻的 *cyr* 基因簇定位于 *hypF* 和 *hupC* 基因之间<sup>[62]</sup>,中国拉氏尖头藻和弯形尖头藻的 *cyr* 基因簇主体部分定位于基因组其他位置,只有 *cyrN* 还留在这位点<sup>[45]</sup>。因此,在中国两种尖头藻中,*cyr* 基因簇主体部分发生了相似的基因组内位置转移。系统发育分析表明中国水体和澳大利亚水体的产 CYN 拉氏尖头藻可以聚成一类,弯形尖头藻则形成独立的分枝<sup>[48]</sup>。这些结果表明 *cyr* 基因簇的位置转移可能在尖头藻祖先类群中就已经发生,而澳大利亚藻株的 *cyr* 基因簇主体部分可能经历了第 2 次位置转移,又回到了 *hypF* 和 *hupC* 基因之间。

### 3.2 *cyr* 基因的保守性

基于产毒藻的 *cyr* 基因和 16S rRNA 基因所做的系统发育树总体上是一致的,其拓扑结构与产毒藻分类地位相一致。这种一致性也对应了产毒藻株间 *cyr* 基因簇结构的共线性现象<sup>[45]</sup>。因此,*cyr* 基因与 16S rRNA 基因在一定程度上具有共进化的关系。但是,与 16S rRNA 基因的系统树相比,在 *cyrA* 基因以及 *cyr* 基因串联簇的系统发育树中<sup>[45,53]</sup>,念珠藻目种类以更低的分歧度聚成一类,其 *cyr* 基因的相似度也要等于或高于 16S rRNA 基因,表明 *cyr* 基因在念珠藻目中具有高度的保守性<sup>[46-47]</sup>。与之相反,念珠藻目产毒藻和颤藻在系统树上具有明显分歧,*cyr* 基因的相似度也低于 16S rRNA 基因。

基因水平转移(HGT)和净化选择是影响基因保守性的 2 个重要因素。STUCKEN 等发现产毒藻在蓝藻系统树上的分布是随机的,由此认为 *cyr* 基因是通过 HGT 在产毒藻中传播的<sup>[70]</sup>。在拉氏尖头藻和束丝藻中,*cyr* 基因簇与基因组上的相邻区域相比具有较高的 GC 含量,进一步证实了 HGT 事件的可能<sup>[47]</sup>。因此,念珠藻目产毒藻之间 *cyr* 基因的高度保守性可能是 HGT 事件的结果<sup>[45]</sup>。另外,尽管念珠藻目种类的 *CyrK* 蛋白序列高度相似并与颤藻差异显著,但是 *Aphanizomenon* sp.10E6 与 *Kamptonema* sp.PCC 6506 在相对更多位点上有相同的氨基酸,这些位点的氨基酸很有可能是从祖先蛋白继承来的。也就是说束丝藻比尖头藻更接近祖先产毒藻,因而推测 *cyr* 基因簇可能是从束丝藻转移到了尖头藻。此外,颤藻中 *cyrI* 基因的 2 种基因型在产毒藻株中的分布与藻株之间的系统发育距离并不一致<sup>[59]</sup>,推测 *cyr* 基因在颤藻中也是通过 HGT 传播的<sup>[59]</sup>。图 4 显示了 *cyr* 基因簇可能发生的 HGT 事件,为了进一步验证 HGT 的可能,还需要对更多地理来源的产毒藻株进行 *cyr* 基因簇的测序分析。

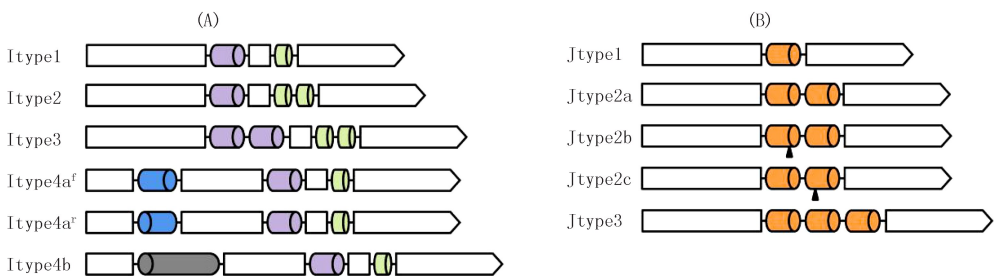
通过分析蛋白质编码基因受到的选择压力也可以解释基因序列的保守性以及基因产物在维持细胞生命活动和环境适应中的重要性。净化选择经常是许多重要基因保守进化的机制<sup>[71]</sup>,这种机制也可能影响了念珠藻目种类而非颤藻的 *cyr* 基因。JIANG 等发现 *cyr* 基因的重组位点稀少且不具有显著性,这与序列本身的保守性相一致<sup>[46]</sup>。另外,*cyr* 基因受到的选择压力并不一致,NRPS/PKS 基因显著偏离中性进化,并存在较多的负选择位点,推测这些基因受到净化选择,但是在局部的进化分枝上也存在少量正选择的位点<sup>[45]</sup>。

YILMAZ 等利用环境 DNA 进行 PCR 扩增,获得了美国佛罗里达州水体中椭圆束似藻的 *cyrB* 基因序列,发现其也受到净化选择<sup>[72]</sup>.NRPS/PKS 基因受到净化选择的内在机制尚不清楚.同种蓝藻中既有产毒种类,也有不产毒种类,毒素的有无对藻细胞生长和生理似乎并没有决定性作用.尽管如此,拉氏尖头藻的产毒株与非产毒株相比,其孔蛋白表达在缺铁条件下显著增强,对胁迫环境的耐受性也更强<sup>[73]</sup>,CYN 可能介导了这种耐受性,但是还需要进一步的研究证据.此外,*cyrA*,*cyrG*,*cyrH*,*cyrI*,*cyrJ* 以及 *cyrK* 整体上处于中性进化,但存在负选择和正选择的部分位点<sup>[45]</sup>.

### 3.3 *cyr* 基因的变异特点

JIANG 等测定了中国淡水水体中的 *cyrI* 和 *cyrJ* 基因序列,并将这些环境序列与产毒藻的相应基因序列汇总起来,根据序列变异特征划分出了不同的基因型<sup>[45]</sup>.对于 *cyrI* 基因,根据其插入序列和片段重复,可以分为 4 种类型(图 5(A)).已知的多数产毒藻 *cyrI* 基因属于 Itype1,其中部分序列含有碱基突变,并导致了基因内部的终止密码子和 *cyrI* 基因失活.与 Itype1 相比,Itype2 和 Itype3 中多出的序列并没有改变基因的阅读框,只是在相应的蛋白质序列内部出现了寡肽的重复拷贝,这些增加的肽段是否影响了基因的功能尚不清楚.Itype4 比 Itype1 多了一段插入序列,引起了基因内部的终止密码子和截断的蛋白序列,导致了 *cyrI* 基因失活.这些插入序列含有反向末端重复,属于典型的转座元件.Itype4af 和 Itype4ar 的插入序列反向互补,推测是转座元件自身倒位形成的.Itype4b 的插入序列内部包含一个完整的转座酶编码基因,证实了转座元件在基因变异中的关键作用.

根据 *cyrJ* 基因序列中重复片段数目和核苷酸缺失情况可以将其分为 3 种类型(图 5(B)).其中 Jtype2 包括 3 种亚类型,Jtype2a 含有两个完整的重复片段,Jtype2b 的第一个片段缺失了 6 聚核苷酸,Jtype2c 在第 2 个片段中缺失了 6 聚核苷酸.已知的产毒藻株的 *cyrJ* 基因分别属于 Jtype2a 和 Jtype2c,毒素检测结果表明这两种亚类型均能催化硫酸化反应.与 Jtype2 比,Jtype1 和 Jtype3 中重复片段的缺失和增加都没有改变基因阅读框,只是在相应蛋白质序列内部存在数目不同的寡肽重复拷贝,其酶活性特征还有待研究.



(A):*cyrI*,紫色、浅绿、蓝色、灰色条块分别表示30、6、92和114个核苷酸的片段。(B):*cyrJ*,橙色条块代表48个核苷酸的片段,黑色三角形代表6个核苷酸的缺失。

图5 2种毒素基因序列的分型示意图

Fig.5 Illustration of sequence types of 2 toxin genes

## 4 总结和展望

由于拉氏尖头藻等产 CYN 蓝藻尚缺乏有效的遗传操作手段,有关毒素合成的生物学机制的研究多是基于生物信息学和化学结构分析所做的推测,少数基因的功能通过体外表达实验得到了验证.天然突变体的鉴定和表征与反向遗传学手段类似,也可以验证目的基因的细胞内功能,*cyr* 基因较高的突变率为研究其功能提供了一种新的途径.但是,天然突变体出现的概率与基因本身的特性有关,且总体较低,分离筛选工作量

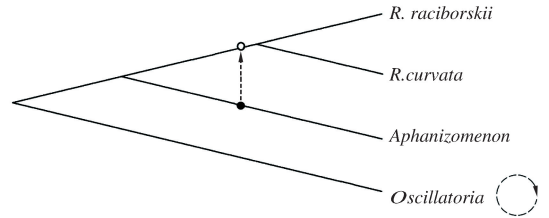


图4 推测的*cyr*基因簇HGT事件

Fig.4 Hypothetical HGT events of *cyr* gene cluster



大.对 CYN 合成基因进化特征的分析表明,*cyr* 并不是单一的进化路线,净化选择在部分基因中起到重要作用,HGT 则影响了整个基因簇的进化过程.

根据国内外的研究进展,今后对 CYN 生物合成路径的研究应当着重在以下几个方向展开:分离纯化无细菌污染的拉氏尖头藻,建立可靠的反向遗传学操作体系,对毒素基因进行定向敲除和回补,并检测突变藻株的代谢产物,从而验证目的基因的确切功能,分析毒素结构形成的中间产物和实际过程;探究毒素合成的调控机制,通过生物信息学分析和基因突变定位调控元件;通过多种产毒藻在同等条件下的检测分析实验,确定影响毒素合成的环境因子;在全球不同地域分离产毒藻株,测定其 *cyr* 基因簇结构,分析产毒藻及其毒素的起源;根据合成生物学的理论和方法,利用毒素合成路径开展长链烷烃或含尿嘧啶化合物的生物合成研究.

## 参 考 文 献

- [1] HO J C, MICHALAK A M, PAHLEVAN N. Widespread global increase in intense lake phytoplankton blooms since the 1980s[J]. *Nature*, 2019, 574(7780): 667-670.
- [2] PAERL H W, PAUL V J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria[J]. *Water Research*, 2012, 46(5): 1349-1363.
- [3] HUANG I S, ZIMBA P V. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology[J]. *Harmful Algae*, 2019, 83: 42-94.
- [4] BYTH S. Palm Island mystery disease[J]. *Medical Journal of Australia*, 1980, 2(1): 40-42.
- [5] HAWKINS P R, RUNNEGAR M T, JACKSON A R, et al. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(5): 1292-1295.
- [6] OHTANI I, MOORE R E, RUNNEGAR M T C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(20): 7941-7942.
- [7] AGUILERA A, GÓMEZ E B, KAŠTOVSKÝ J, et al. The polyphasic analysis of two native Raphidiopsis isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria)[J]. *Phycologia*, 2018, 57(2): 130-146.
- [8] TERAOKA K, OHMORI S, IGARASHI K, et al. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*[J]. *Toxicon*, 1994, 32(7): 833-843.
- [9] FROSCIO S M, HUMPAGE A R, WICKRAMASINGHE W, et al. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system[J]. *Toxicon*, 2008, 51(2): 191-198.
- [10] REISNER M, CARMELI S, WERMAN M, et al. The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice[J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 82(2): 620-627.
- [11] RUNNEGAR M T, KONG S M, ZHONG Y Z, et al. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1995, 49(2): 219-225.
- [12] DÍEZ-QUIJADA L, HERCOG K, ŠTAMPAR M, et al. Genotoxic effects of cylindrospermopsin, microcystin-LR and their binary mixture in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line[J]. *Toxins*, 2020, 12(12): 778.
- [13] MOREIRA C, AZEVEDO J, ANTUNES A, et al. Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(3): 605-620.
- [14] YANG Y M, YU G L, CHEN Y X, et al. Four decades of progress in cylindrospermopsin research: the ins and outs of a potent cyanotoxin[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 406: 124653.
- [15] RZYMSKI P, PONIEDZIALEK B. In search of environmental role of cylindrospermopsin: a review on global distribution and ecology of its producers[J]. *Water Research*, 2014, 66: 320-337.
- [16] ADAMSKI M, CHRAPUSTA E, BOBER B, et al. Cylindrospermopsin: cyanobacterial secondary metabolite. Biological aspects and potential risk for human health and life[J]. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 2014, 43(4): 442-449.
- [17] BANKER R, TELTSC B, SUKENIK A, et al. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon* from lake Kinneret, Israel[J]. *Journal of Natural Products*, 2000, 63(3): 387-389.
- [18] NORRIS R L, EAGLESHAM G K, PIERENS G, et al. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*[J]. *Environmental Toxicology*, 1999, 14(1): 163-165.
- [19] WIMMER K M, STRANGMAN W K, WRIGHT J L C. 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetyl-cylindrospermopsin: two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*[J]. *Harmful Algae*, 2014, 37: 203-206.
- [20] LOOPER R E, RUNNEGAR M T C, WILLIAMS R M. Synthesis of the putative structure of 7-deoxycylindrospermopsin: C7 oxygenation

- is not required for the inhibition of protein synthesis[J]. *Angewandte Chemie(International Ed in English)*, 2005, 44(25): 3879-3881.
- [21] BANKER R, CARMELI S, WERMAN M, et al. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2001, 62(4): 281-288.
- [22] ANTUNES J T, LEÃO P N, VASCONCELOS V M. *Cylindrospermopsis raciborskii*: review of the distribution, phylogeography, and eco-physiology of a global invasive species[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 473.
- [23] BURFORD M A, BEARDALL J, WILLIS A, et al. Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*[J]. *Harmful Algae*, 2016, 54: 44-53.
- [24] SIDELEV S, KOKSHAROVA O, BABANAZAROVA O, et al. Phylogeographic, toxicological and ecological evidence for the global distribution of *Raphidiopsis raciborskii* and its northernmost presence in Lake Nero, Central Western Russia[J]. *Harmful Algae*, 2020, 98: 101889.
- [25] LI R H, CARMICHAEL W W, BRITAIN S, et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata*(cyanobacteria)[J]. *Journal of Phycology*, 2001, 37(6): 1121-1126.
- [26] MCGREGOR G B, SENDALL B C, HUNT L T, et al. Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* skuja(cyanobacteria/nostocales)[J]. *Harmful Algae*, 2011, 10(4): 402-410.
- [27] PREUBEL K, STÜKEN A, WIEDNER C, et al. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae*(Cyanobacteria) isolated from two German lakes[J]. *Toxicon*, 2006, 47(2): 156-162.
- [28] HARADA K I, OHTANI I, IWAMOTO K, et al. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method[J]. *Toxicon*, 1994, 32(1): 73-84.
- [29] KOKOCIŃSKI M, MANKIEWICZ-BOCZEK J, JURCZAK T, et al. *Aphanizomenon gracile*(nostocales), a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium in Polish lakes[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2013, 20(8): 5243-5264.
- [30] MAZMOUZ R, CHAPUIS-HUGON F, MANN S, et al. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15): 4943-4949.
- [31] SPOOF L, BERG K A, RAPALA J, et al. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment(Finland)[J]. *Environmental Toxicology*, 2006, 21(6): 552-560.
- [32] SEIFERT M, MCGREGOR G, EAGLESHAM G, et al. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei*(Farlow ex Gomont)Speziale and Dyck[J]. *Harmful Algae*, 2007, 6(1): 73-80.
- [33] BANKER R, CARMELI S, HADAS O, et al. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum*(Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel[J]. *Journal of Phycology*, 1997, 33(4): 613-616.
- [34] SCARLETT K R, KIM S, LOVIN L M, et al. Global scanning of cylindrospermopsin: critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 738: 139807.
- [35] SAKER M L, GRIFFITHS D J. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii*(Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia[J]. *Phycologia*, 2000, 39(4): 349-354.
- [36] PREUBEL K, WESSEL G, FASTNER J, et al. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae*(Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions[J]. *Harmful Algae*, 2009, 8(5): 645-650.
- [37] SHALEV-MALUL G, LIEMAN-HURWITZ J, VINER-MOZZINI Y, et al. An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(4): 988-999.
- [38] HAWKINS P R, PUTT E, FALCONER I, et al. Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii*(Nostocales, Cyanophyceae) during batch culture[J]. *Environmental Toxicology*, 2001, 16(6): 460-467.
- [39] SAKER M L, NEILAN B A. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii*(Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1839-1845.
- [40] BÁCSI I, VASAS G, SURÁNYI G, et al. Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate-or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 259(2): 303-310.
- [41] BAR-YOSEF Y, SUKENIK A, HADAS O, et al. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons[J]. *Current Biology*, 2010, 20(17): 1557-1561.
- [42] MIHALI T K, KELLMANN R, MUENCHHOFF J, et al. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(3): 716-722.
- [43] FISCHBACH M A, WALSH C T, CLARDY J. The evolution of gene collectives: how natural selection drives chemical innovation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(12): 4601-4608.
- [44] KEHR J C, GATTE PICCHI D, DITTMANN E. Natural product biosyntheses in cyanobacteria: a treasure trove of unique enzymes[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2011, 7: 1622-1635.

- [45] JIANG Y G, XIAO P, YU G L, et al. Sporadic distribution and distinctive variations of cylindrospermopsin genes in cyanobacterial strains and environmental samples from Chinese freshwater bodies[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(17): 5219-5230.
- [46] JIANG Y G, XIAO P, YU G L, et al. Molecular basis and phylogenetic implications of deoxycylindrospermopsin biosynthesis in the cyanobacterium *Raphidiopsis curvata*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(7): 2256-2263.
- [47] STÜKEN A, JAKOBSEN K S. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination [J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2010, 156(8): 2438-2451.
- [48] JIANG Y G, CHEN Y X, YANG S M, et al. Phylogenetic relationships and genetic divergence of paralytic shellfish toxin- and cylindrospermopsin-producing *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* [J]. *Harmful Algae*, 2020, 93: 101792.
- [49] BURGOYNE D L, HEMSCHIEDT T K, MOORE R E, et al. Biosynthesis of cylindrospermopsin [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2000, 65(1): 152-156.
- [50] LEE G T, KIM W J, CHO Y D. Polyamine synthesis in plants. Purification and properties of amidinotransferase from soybean (*Glycine max*) axes [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(7): 781-789.
- [51] HUMM A, FRITSCH E, STEINBACHER S. Structure and reaction mechanism of L-arginine: *Glycine* amidinotransferase [J]. *Biological Chemistry*, 1997, 378(3/4): 193-197.
- [52] HUMM A, FRITSCH E, STEINBACHER S, et al. Crystal structure and mechanism of human L-arginine: *Glycine* amidinotransferase; a mitochondrial enzyme involved in creatine biosynthesis [J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(12): 3373-3385.
- [53] KELLMANN R, MILLS T, NEILAN B A. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, 62(3): 267-280.
- [54] MUENCHHOFF J, SIDDIQUI K S, POLJAK A, et al. A novel prokaryotic L-arginine: *Glycine* amidinotransferase is involved in cylindrospermopsin biosynthesis [J]. *The FEBS Journal*, 2010, 277(18): 3844-3860.
- [55] MUENCHHOFF J, SIDDIQUI K S, NEILAN B A. Identification of two residues essential for the stringent substrate specificity and active site stability of the prokaryotic L-arginine: *Glycine* amidinotransferase CyrA [J]. *The FEBS Journal*, 2012, 279(5): 805-815.
- [56] BARÓN-SOLA Á, SANZ-ALFÉREZ S, DEL CAMPO F F. First evidence of accumulation in cyanobacteria of guanidinoacetate, a precursor of the toxin cylindrospermopsin [J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 1099-1104.
- [57] BALDWIN J E, THOMAS R C, KRUSE L I, et al. Rules for ring closure: ring formation by conjugate addition of oxygen nucleophiles [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1977, 42(24): 3846-3852.
- [58] CULLEN A, PEARSON L A, MAZMOUZ R, et al. Heterologous expression and biochemical characterisation of cyanotoxin biosynthesis pathways [J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(8): 1117-1136.
- [59] MAZMOUZ R, CHAPUIS-HUGON F, PICHON V, et al. The last step of the biosynthesis of the cyanotoxins cylindrospermopsin and 7-epi-cylindrospermopsin is catalysed by CyrI, a 2-oxoglutarate-dependent iron oxygenase [J]. *ChemBioChem*, 2011, 12(6): 858-862.
- [60] MAZMOUZ R, ESSADIK I, HAMDANE D, et al. Characterization of CyrI, the hydroxylase involved in the last step of cylindrospermopsin biosynthesis; binding studies, site-directed mutagenesis and stereoselectivity [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 647: 1-9.
- [61] SOTO-LIEBE K, MÉNDEZ M A, FUENZALIDA L, et al. PSP toxin release from the cyanobacterium *Raphidiopsis brookii* D9 (Nostocales) can be induced by sodium and potassium ions [J]. *Toxicon*, 2012, 60(7): 1324-1334.
- [62] STUCKEN K, JOHN U, CEMBELLA A, et al. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria; comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9235.
- [63] HANSEL A, AXELSSON R, LINDBERG P, et al. Cloning and characterisation of a hyp gene cluster in the filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp. strain PCC 73102 [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 201(1): 59-64.
- [64] SAKER M L, NEILAN B A, GRIFFITHS D J. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, palm island, Queensland [J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35(3): 599-606.
- [65] YANG Y M, CHEN Y X, CAI F F, et al. Toxicity-associated changes in the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to nitrogen fluctuations [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 1041-1049.
- [66] RIGAMONTI N, AUBRIOT L, MARTIGANI F, et al. Effect of nutrient availability on cylindrospermopsin gene expression and toxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2018, 82(1): 105-110.
- [67] YANG Y M, JIANG Y G, LI X C, et al. Variations of growth and toxin yield in *Cylindrospermopsis raciborskii* under different phosphorus concentrations [J]. *Toxins*, 2016, 9(1): 13.
- [68] DITTMANN E, FEWER D P, NEILAN B A. Cyanobacterial toxins; biosynthetic routes and evolutionary roots [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(1): 23-43.
- [69] RANTALA A, FEWER D P, HISBERGUES M, et al. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(2): 568-573.
- [70] STUCKEN K, MURILLO A A, SOTO-LIEBE K, et al. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(1): 37-48.

- [71] JORDAN I K, ROGOZIN I B, WOLF Y I, et al. Essential genes are more evolutionarily conserved than are nonessential genes in bacteria [J]. *Genome Research*, 2002, 12(6): 962-968.
- [72] YILMAZ M, PHILIPS E J. Diversity of and selection acting on cylindrospermopsin *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(7): 2502-2507.
- [73] DAGOSTINO P M, YEUNG A C Y, POLJAK A, et al. Comparative proteomics of the toxigenic diazotroph *Raphidiopsis raciborskii* (cyanobacteria) in response to iron [J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(1): 405-414.

## Molecular basis and evolutionary characteristics of cylindrospermopsin biosynthesis

Jiang Yongguang<sup>1</sup>, Wang Zhigao<sup>1</sup>, Wang Chunbo<sup>2</sup>

(1. School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Cylindrospermopsin is an alkaloid cyanotoxin produced by bloom-forming cyanobacteria such as *Raphidiopsis*. According to toxicological studies, cylindrospermopsin causes toxic effects on several organs, especially on liver. Although the toxicity of cylindrospermopsin is weaker than microcystin, a higher concentration of cylindrospermopsin may accumulate in water bodies due to its structural stability and water solubility, amplifying the health risk in drinking water. In addition, bioaccumulation of cylindrospermopsin may occur through food chain, leading to more severe poisoning. Owing to the worldwide dispersal of *Raphidiopsis* blooms, cylindrospermopsin has attracted widespread concerns from researchers and water administrators. As a secondary metabolite, the biosynthesis of cylindrospermopsin starts from small-molecule substrate and is catalyzed by several special enzymes. The genes encoding these enzymes forms a cluster on the genome. The biosynthesis gene clusters of cylindrospermopsin are similar among different cyanobacterial species and their differences include variations of sequences and gene arrangements. Studies on cylindrospermopsin biosynthesis genes and their function are beneficial to developing reliable molecular detection methods and predicting toxin risk during water blooms as well. Also, in-depth knowledge of the biosynthesis and evolution of cyanobacterial secondary metabolites could provide a reference for synthesizing novel active compounds by utilizing and reconstructing these naturally metabolic pathways. In this review, the molecular basis and evolutionary characteristics of cylindrospermopsin biosynthesis were discussed systematically in order to provide a comprehensive understanding of cylindrospermopsin at molecular level for researchers in related fields.

**Keywords:** cyanotoxin; cylindrospermopsin; biosynthesis; gene cluster; phylogenetics

[责任编辑 刘洋 杨浦]