



肠道菌分泌的抑菌肽——小菌素

梁轩^{1,2}, 张瑜^{1,3}, 汪业军^{4*}, 朱国强^{1,2*}

¹扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

²江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

³扬州大学护理学院, 江苏 扬州 225009

⁴深圳大学医学部医学院, 细胞生物学和医学遗传学系, 广东 深圳 518060

摘要: 小菌素是由肠道菌分泌的一类小分子抑菌肽, 分子量小于 10 kDa, 由细菌质粒或基因组上相关基因簇编码, 小菌素的抑菌谱较窄, 仅对肠道菌中部分亲缘较近的菌种发挥有效的抑菌效应。编码小菌素的基因簇一般包括几个部分: 前体基因, 自身免疫基因, 分泌基因, 转录后修饰基因。与很多微生物通过非核糖体途径分泌抑菌物质不同, 小菌素前体通过核糖体途径分泌。目前已发现的小菌素有 15 种, 它们的结构和抑菌机制具有多样性。

关键词: 小菌素, 结构, 抑菌机制, 肠道菌

小菌素是由肠道菌分泌的一种小分子的毒性肽, 主要由大肠杆菌分泌, 属于细菌素的一种。和其他许多微生物通过与肽酶相关的多酶复合物(即非核糖体途径)分泌抑菌肽不同的是, 小菌素前体通过核糖体途径分泌^[1], 这种方式与革兰氏阳性菌分泌细菌素的方式类似。小菌素具有疏水性, 同时对热和极端 pH 具有较强的稳定性。细菌在养分匮乏的条件下, 小菌素的分泌量会大幅增加。小菌素对肠道菌具有很强的抑菌活性, 最小抑菌浓度在纳摩尔范围。小菌素由其细菌质粒或染色体上^[2-3]所携带的相关基因簇编码, 包括小菌素前

体基因、自身免疫基因、分泌基因和转录后修饰基因。这些基因在不同小菌素之间存在明显差异, 正是这种基因的多样性导致不同小菌素在结构和作用机制方面存在显著差异^[4]。现综述如下。

1 小菌素的分类

近些年, 关于小菌素的报道很多。目前已发现的小菌素有 15 种, 其中有 10 种已经对其结构特点有一定的了解, 它们分别是 MccB17、MccC7/C51、MccE492、MccJ25、MccL、MccM、

基金项目: 国家自然科学基金(31672579); 江苏省重点研发计划(现代农业)(BE2017342); 江苏高校优势学科建设工程

*通信作者。Tel: +86-514-87972590; E-mail: 朱国强, yzgzhu@yzu.edu.cn, 汪业军, wangyj@szu.edu.cn

收稿日期: 2018-08-05; 修回日期: 2018-11-08; 网络出版日期: 2018-11-29

MccV/ColV、MccH47、MccI47 和 Mcc24^[5]。为了更好地对其分类,根据其大小、转录后修饰与否、转录后修饰发生的位置、基因簇的结构将其分为 3 类: I 型小菌素、II 型 a 类小菌素和 II 型 b 类小菌素。

I 型小菌素^[6]包括 MccB17、MccC7/C51 和 MccJ25。它们的分子量最低,小于 5 kDa,整个前体在分泌前发生转录后修饰。II 型小菌素^[7]分子量相对较大,大多为 5–10 kDa, II 型 a 类小菌素包括 MccL、MccV 和 Mcc24,编码它们的基因簇最为简单,只包含前体基因、分泌基因和自身免疫基因,整个前体骨架在分泌前不发生进一步的转录后修饰^[8]; II 型 b 类小菌素包括 MccE492、MccM、MccH47 和 MccI47,编码它们的基因簇结构最为复杂,前体的羧基端在分泌前发生转录后修饰。表 1 为各类小菌素主要结构的基本信息。

2 小菌素基因簇

小菌素基因簇部分保守,至少有 4 个基因簇参与小菌素的编码。其中至少包含 3 类基因:(1) 结构基因:编码的小菌素前体,是小菌素主要的

结构成分。(2) 自身免疫基因:大多毗邻结构基因,保护分泌小菌素的细菌不受自身分泌小菌素的毒害作用。(3) 小菌素分泌基因:编码与小菌素分泌相关的蛋白。此外,大部分小菌素基因簇还含具有转录后修饰基因,能对小菌素前体进行加工,使其更容易被相应受体识别,同时更好地发挥生物学活性^[9–10]。

I 型小菌素由质粒编码。在编码 I 型小菌素的基因簇中,自身免疫基因不与小菌素结构基因相邻,与之相连的是与小菌素前体骨架转录后修饰相关的基因^[11]。

I 型小菌素中,MccB17 由多种含有 70 kb 大质粒 pMccB17 的大肠杆菌编码,整个基因簇由 7 个基因编码,*mcbA* 编码具有 69 个氨基酸的前体,*mcbB*、*mcbC*、*mcbD* 基因编码与 MccA 前体蛋白转录后修饰相关酶,*mcbG* 基因为自身免疫基因,保护细菌不受自身分泌小菌素的毒害^[12]; I 型小菌素 MccC7/C51 是目前发现最小的小菌素^[13],MccC7 最早由含有 43 kb 单拷贝质粒 pMccC7 的大肠杆菌中分离得到,MccC51 从含有 38 kb 低拷贝质粒 pMccC51 的大肠杆菌中分离得到。MccC7 与 MccC51 基因同源性高达 98%–100%,

表 1. 小菌素主要结构大小

Table 1. The size of main structure of microcins

Microsin	Class	Precursor (number of residues)	Leader Peptide (number of residues)	Microsin (number of residues)	Molecular mass/Da
MccB17	I	69	26	43	3093
MccC7/C51	I	7	0	7	1177
MccJ25	I	58	37	21	2107
MccV	IIa	103	15	88	8733
MccL	IIa	105	15	90	8884
Mcc24	IIa	90	17	73	7457
MccE492	IIb	103	19	84	8717
MccM	IIb	92	15	77	7886
MccH47	IIb	75	15	60	7283
MccI47	IIb	77	15	62	4865

都具有 24 bp 结构基因 *mccA*, 编码具有 7 个氨基酸的前体, 而 *mccB*、*mccD* 和 *mccE* 基因参与 MccA 前体的转录后修饰, *mccF* 和 *mccE* 为自身免疫基因; MccJ25^[14] 由 60 kb 的低拷贝质粒 pTUC100 编码, 发现于大肠杆菌 AY25 中。*mcjA* 基因编码具有 58 个氨基酸的前体, *mcjB* 和 *mcjC* 编码的蛋白参与 McjA 的转录后修饰, 而 *mcjD* 基因同时与 MccJ25 的分泌和自身免疫相关。

II 型 a 类小菌素由质粒编码, 只有 4 个基因簇参与编码, 最大的特点是无转录后修饰基因, 前体无需进行转录后修饰, 直接分泌到细胞外^[15]。II 型 b 类小菌素全部由染色体编码, 是基因结构最复杂的一类小菌素, 分子量最大。整个 II 型 b 类小菌素中, 相关基因同源性很高, 调控机制高度相似。

II 型 a 类小菌素中, MccV 是人类最早从大肠杆菌中发现的抑菌物质, 起初被命名为 colicin V^[16]。MccV 由多种含有大于 80 kb 低拷贝质粒 pColV 的大肠杆菌分泌。结构基因 *cvaC* 编码 103 个氨基酸前体, *cvaA* 与 *cvaB* 基因参与小菌素的分泌, *cvi* 基因与其分泌细菌的自身免疫有关; MccL 由猪肠道中的大肠杆菌 LR05 分离得到, 基因簇同样包含 4 个基因, *mclC* 基因编码 105 个氨基酸前体, *mclA* 与 *mclB* 编码小菌素分泌蛋白, *mclI* 与分泌菌自身免疫机制相关; Mcc24^[17] 由具有 43.5 kb p24-2 质粒的尿致病性大肠杆菌 UPEC 2424 分泌, *mtfS* 参与 90 个氨基酸前体的编码, *mtfI* 与分泌菌的自身保护机制相关, 而由 *mtfA* 与 *mtfB* 基因编码的分泌蛋白, 与 MccV 的分泌蛋白 CvaA 和 CvaB 具有高度的同源性。

II 型 b 类小菌素中, MccE492^[18] 由人类粪便中的肺炎克雷伯氏菌 RYC492 中分离, MccE492

基因簇上共有 10 个基因, 结构基因 *mceA* 编码 103 个氨基酸前体, *mceB* 与细菌自身保护有关, *mceC*、*mceD* 和 *mceI* 编码的蛋白与糖基转移酶同源性较高, 参与 MccE492 的转录后修饰, *mceG* 和 *mceH* 编码的蛋白, 参与 MccE492 的分泌; 小菌素 MccH47、MccI47 与 MccM 结构类似, MccH47 最初由大肠杆菌 H47 中分离, MccM 由人粪便中的益生菌 Nissle 1917 中分离, 此外 MccM 和 MccH47 还可以由大肠杆菌 CA46 与 CA58 分泌。在 MccH47^[19] 基因决定簇中, *mchB* 因编码 75 个氨基酸前体, *mchI* 基因与细菌自身保护有关, *mchA*、*mchS1* 和 *mchD* 基因参与 MccH47 的转录后修饰, *mchI* 的上游的基因 *mchX*, 可能与 *mchi* 和 *mchb* 的表达相关, 益生菌大肠杆菌 Nissle 1917 中的小菌素 MccM 和 MccH47 与无致病性的大肠杆菌 CA46 和 CA58 中的 MccM 和 MccH47 相比缺少了 *mcmL* 和 *mcmK* 基因, 而与 UPEC CFTO73 中发现的 MccM 和 MccH47 中的同源性高达 100%; 在小菌素 MccI47 中 *mchS2* 基因编码具有 77 个氨基酸的前体, *mchS3* 基因与细菌自身保护相关, *mchA*、*mchD* 和 *mchS1* 基因与 MccI47^[20] 转录后修饰有关, *mchE* 和 *mchF* 基因与 MccI47 的分泌有关。表 2 为小菌素基因簇信息表, 图 1 为小菌素基因簇结构示意图。

3 小菌素合成机制

3.1 小菌素前体结构及加工

小菌素前体是小菌素的主要结构亚单位, 经过加工后形成成熟的小菌素。小菌素前体包含一段长度不等的前导肽和羧基端的特殊结构区域。

表 2. 小菌素基因簇基本信息
Table 2. Characteristics of microcin gene clusters

Microsins	Structural genes	Self-immunity genes	Export genes	Post-translational modification genes	Genes of unknown function
MccB17	<i>mcbA</i> (210)	<i>mcbE</i> (726) <i>mcbF</i> (744) <i>mcbG</i> (564)	<i>mcbE</i> (726) <i>mcbF</i> (744)	<i>mcbB</i> (888) <i>mcbC</i> (819) <i>mcbD</i> (1191)	–
MccC7/C51	<i>mccA</i> (24)	<i>mccC</i> (1215) <i>mccE</i> (1566) <i>mccF</i> (1035)	<i>mccC</i> (1215)	<i>mccB</i> (1053) <i>mccD</i> (804) <i>mccE</i> (1566)	–
MccJ25	<i>mcjA</i> (177)	<i>mcjD</i> (1743)	<i>mcjD</i> (1743)	<i>mcjB</i> (627) <i>mcjC</i> (1542)	–
MccV	<i>cvaC</i> (312)	<i>cvi</i> (237)	<i>cvaA</i> (1242) <i>cvaB</i> (2097)	–	–
MccL	<i>mclC</i> (318)	<i>mclI</i> (156)	<i>mclA</i> (1242) <i>mclB</i> (2097)	–	–
Mcc24	<i>mtfS</i> (273)	<i>mtfI</i> (282)	<i>mtfA</i> (1245) <i>mtfB</i> (2124)	–	–
MccE492	<i>mceA</i> (312)	<i>mceB</i> (288)	<i>mceH</i> (1242) <i>mceG</i> (2097) <i>mceF</i> (540)	<i>mceC</i> (1113) <i>mceD</i> (1245) <i>mceI</i> (492)	<i>mceE</i> (345) <i>mceJ</i> (1575)
MccH47/MccI47	<i>mchB</i> (228) <i>mchS2</i> (234)	<i>mchI</i> (210) <i>mchS3</i> (435)	<i>mchE</i> (1242) <i>mchF</i> (2097)	<i>mchA</i> (1119) <i>mchS1</i> (1266) <i>mchD</i> (453)	<i>mchX</i> (120) <i>mchC</i> (1551) <i>mchS4</i> (246)
MccM/MccH47	<i>mcmA</i> (279) <i>mchB</i> (228)	<i>mcmI</i> (222) <i>mchI</i> (210)	<i>mchE</i> (1242) <i>mchF</i> (2097)	<i>mcmL</i> (1119) <i>mcK</i> (1275) <i>mchD</i> (453)	<i>mcmM</i> (687) <i>mchX</i> (120) <i>mchC</i> (1551)

The length of each gene (bp) is given in parentheses. Inexistent genes are indicated by transverse line.

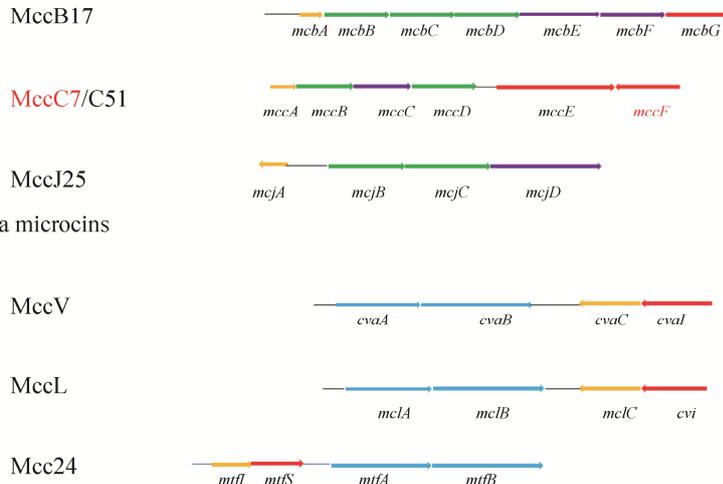
I 型小菌素前导肽较长, 约占整个前体长度的一半。而 II 型小菌素前导肽长度较短, 且高度保守。前导肽功能多样, 首先可以提高小菌素的稳定性, 防止其在细胞内被分解, 其次前导肽作为伴侣蛋白可以将小菌素前体折叠, 使其便于被加工装置识别并修饰, 同时还可以作为小菌素分泌装置识别的序列, 让加工成熟的小菌素被分泌装置识别并分泌到细胞外。不同小菌素中前导肽发挥的功能不同, I 型小菌素前导肽与分泌无关, 与转录后修饰酶对前体的识别有关。II 型小菌素前导肽序列是一种分泌信号, 与分泌装置对小菌素的识别、摄取、分泌都密切相关。

I 型小菌素前体在被进一步加工修饰前不具有抑菌效应。而 II 型小菌素前体在被进一步加工

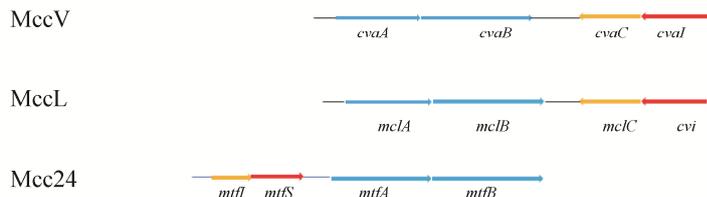
前已经具有部分抑菌活性。例如只携带 II 型小菌素 MccV 结构基因 *cvaC* 和免疫基因 *cvi* 的细菌溶解产物确实有部分抑菌活性。但只携带 II 型小菌素 MccH47 结构基因 *mchB* 和免疫基因 *mchI* 的细菌, 其溶解产物对 MccH47 敏感细菌几乎无抑菌效应, 这是由于在缺乏 *mchACD* 基因参与时, 细菌产生 MccH47 的量大大减少, 导致前体抑菌效应不易显现。

小菌素前体的成熟主要包括 2 个加工过程: 前导肽的切割和转录后修饰, 前导肽的切割需要蛋白水解酶的参与。唯一的不同是, I 型小菌素在分泌前切割前导肽, 而 II 型小菌素前导肽作为分泌信号, 在分泌的过程中才被切除。而转录后修饰过程需要小菌素基因簇上相应转录后修饰基因

Class I microcins



Class II a microcins



Class II b microcins

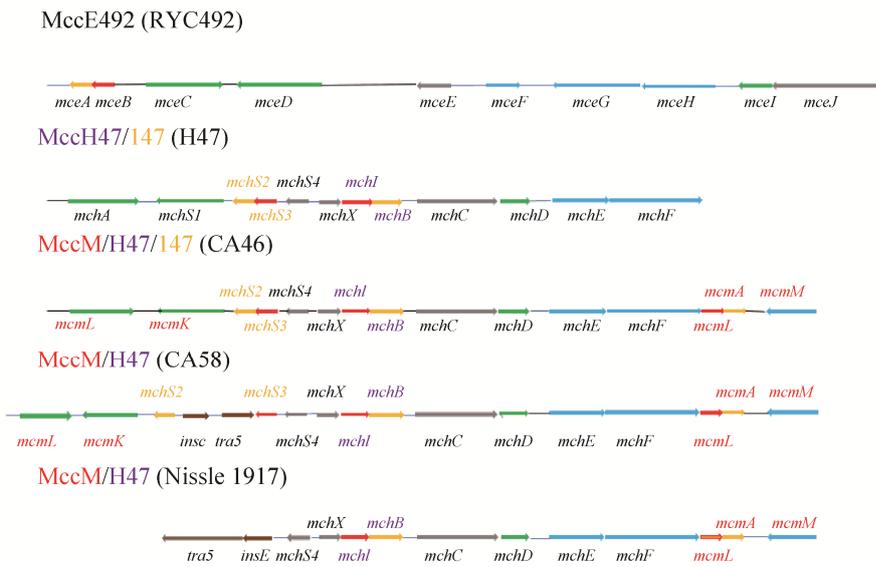


图 1. 小菌素基因簇示意图^[21-22]

Figure 1. Genetic organization of microcin gene clusters. Arrows indicate the direction of genes transcription^[21-22]. The name of genes are indicated above or below the arrow. Colourful genes are specific for the microcins above labelled with the same colour. Black genes are common for the microcins above. Genes of precursors, self immunity, export and post-translational modifications are show in orange, red, blue and green. Genes encoding both immunity and export are shown in purple. Genes of unknown function are shown in grey. The genes encoding transposases for insertion sequences IS2 and IS3 are shown in brown.

所编码的酶参与完成。I型小菌素在分泌前整个骨架都会发生转录后修饰。例如 MccB17 前体 McbA 被 McbB、McbC 和 McbD 三种酶修饰。ATP

依赖性的 McbD 亚单位首先结合到前体前导肽部分，接着在 McbB 与 McbC 亚单位的参与下从前体骨架的氨基端向羧基端环化半胱氨酸和丝氨

酸,形成成熟的小菌素。II型A类小菌素不发生转录后修饰,而II型b类小菌素羧基端序列为修饰酶识别的信号,前体在酶的加工下形成一种小菌素-铁载体的结构。这种小菌素-铁载体是一段小于100个氨基酸的多肽。小菌素前体经转录后修饰酶的作用与沙门菌素形式的邻苯二酚铁载体共价结合^[23],所以这类小菌素又被称为邻苯二酚小菌素,且这一类小菌素与沙门菌素铁载体紧密相关(沙门菌素是一种由沙门菌或其他肠道菌分泌的一种铁载体,由肠菌素经糖基化修饰而来)。产生邻苯二酚小菌素的细菌必须同时产生沙门菌素来完成抑菌产物的前体修饰以更好地发挥小菌素的抑菌效应。这种邻苯二酚小菌素的分子结构决定了它们可以在外界环境铁匮乏时帮助细菌摄取铁。以MccE492为例,MccE492转录后修饰基因*mceC*,*mceD*与沙门菌上的*iroB*和*iroD*基因同源性较高,MceC是一种糖基转移酶,参与肠菌素羧基端的糖基化修饰,MceD是一种糖基化酯酶,可以将糖基化的肠菌素分解成线性结构。而MceI酶可以通过前体羧基端的丝氨酸催化葡萄糖残基的酰基化反应,将小菌素前体的丝氨酸部分与邻苯二酚铁载体通过酯键相连。

3.2 小菌素分泌机制

通过遗传和同源性对小菌素分泌机制进行分析,在很多情况下,分泌装置似乎与自身免疫和小菌素前体切割有关。I型小菌素无典型的分泌装置。MccB17中,小菌素通过McbF和McbE蛋白分泌至细胞外,McbF属于ABC转运蛋白^[24](ATP-binding-cassette transpoter),是一种内膜蛋白,可以利用水解ATP的能量对小菌素进行跨膜运输。而McbE是ABC转运蛋白的辅助蛋白,ABC转运蛋白与其辅助蛋白起到分子泵的作用,将小

菌素通过内膜泵入至周质空间,而涉及MccB17分泌的外膜成分尚未确认。在小菌素MccJ25中,McjD和YojI都是ABC转运蛋白,发挥类似功能。而染色体编码的TolC是一种外膜转运蛋白,能在外膜上形成孔道。这一蛋白能从周质内侧到细胞外形成一条小菌素分泌通道,配合McjD和YojI共同完成小菌素的分泌。

II型小菌素分泌装置结构类似,具有3个部分,其中ABC转运蛋白与附属蛋白由小菌素基因簇上的基因编码。来自MccV的分泌蛋白CvaB与来自MccL、Mcc24、MccE492和MccH47/I47/M所对应的分泌蛋白MclB、MtfB、MceG和MchF都具有很高的同源性,这些ABC转运蛋白与在革兰氏阳性菌中参与分泌II型细菌素的ABC转运蛋白结构类似。这些ABC转运蛋白由3个区域构成,氨基端区域具有蛋白酶,可以水解内膜蛋白,在内膜形成孔道;羧基端区域有ATP结合盒子,可以结合并水解ATP,为小菌素的结合和跨膜运输提供能量;中间部分为跨膜结构域。分泌系统的第2个成分是辅助蛋白。它是一种通过氨基端跨膜螺旋固定于内膜的周质蛋白。在II型小菌素中,这些辅助蛋白也同样高度保守。这种辅助蛋白是与外膜蛋白TolC^[25]连接的媒介。外膜蛋白TolC能在周质空间与细胞外持续形成通道。三种蛋白共同组成II型小菌素分泌装置。

4 小菌素作用机理

成熟的小菌素的抑菌谱狭窄,只限于部分肠道细菌。研究表明在许多肠道菌中存在小菌素受体。当这些受体缺失后,细菌对小菌素出现抗性。这些受体不仅参与小菌素的识别和摄取,还同样参与细菌对营养物质的摄取。有趣的是,这些蛋

白受体还会被噬菌体、抑菌素细胞毒素利用进而入侵细胞,成为细菌致命的弱点。下文将对小菌素识别摄取机制进行阐述。

4.1 小菌素摄取机理

近些年的研究表明细菌的铁摄取系统以及与之相关的 TonB/ExbB/ExbD^[26]内膜能量转导系统同样参与多种小菌素的识别与摄取。铁离子通过 3 条途径被输送到细菌内,与之相对应的是 3 类外膜受体。结合异羟肟酸铁载体(如高铁色素)的 FhuA 受体,结合邻苯二酚铁载体(如肠菌素)的 FepA、Cir 和 Fiu 受体^[27],以及参与羟基羧酸盐(如柠檬酸盐)摄取的 FecA 受体。FepA 和 FhuA 受体三维结构类似,每种受体都具有嵌入外膜的 β 桶形结构,其 N-端为球形区域,这一球形结构通过氢键和盐桥将 β 桶形结构与铁载体结合位点相连,达到摄取铁的目的。在外膜蛋白摄取铁载体之后,需要在固定于内膜的 TonB/ExbB/ExbD 蛋白复合物的帮助下完成跨膜运输,TonB/ExbB/ExbD 可以将质子动力学能量从内膜传递到外膜,为物质的跨膜运输提供能量。

I 型小菌素 MccJ25 被外膜高亲和力的 FhuA 受体识别并结合,识别结构为 β 发卡结构,接着在内膜 TonB/ExbB/ExbD 复合物和 SbmA 蛋白的帮助下跨过外膜和内膜转运至细胞质中。MccB17 通过 OmpF 孔蛋白穿过外膜,接着在 SbmA 蛋白的参与下摄取进入细胞质,MccB17 的结合区域为羧基端的 GyrB 蛋白区域。而 II 型 b 类小菌素-邻苯二酚小菌素它们的识别和摄取机制类似。首先他们羧基端的邻苯二酚铁载体被外膜受体蛋白 FepA、Cir 和 Fiu 识别,在内膜 TonB/ExbB/ExbD 复合物提供能量帮助下跨膜转运,通过外膜和内膜进入细胞质中。实验表明小菌素 MccE492、

MccM 和 MccH47 不会抑制原本对其敏感细菌的 *tonB* 基因缺失株以及 *fepA*、*cir* 和 *fiu* 三基因缺失株的生长,进一步证明了 TonB 蛋白对小菌素的摄取和其抑菌活性的表现起到重要作用。

4.2 小菌素的抑菌机理

大部分基因编码的抑菌肽通过作用于细胞的磷脂双分子层以达到抑制微生物生长的目的。而小菌素抑菌机制具有多样性,有的小菌素作用目标细菌内膜,有的作用于细菌 DNA 或 RNA 结构与功能相关的酶,有的作用于细菌蛋白合成相关的酶。

I 型小菌素作用靶标为细胞质,通过作用于细胞内与 DNA/RNA 结构或合成相关的酶发挥抑菌作用。MccB17 是一种 DNA 促旋酶抑制剂,可以阻止细菌 DNA 的复制,诱发细菌的 SOS 反应^[28]。与此相印证的是,原本对 MccB17 敏感的细菌,当其产生促旋酶的 B 亚基发生点突变时,对 MccB17 的敏感型降低甚至消除。MccC7/C51 是一种翻译抑制剂,通过作用于细菌天冬氨酰 tRNA 合成酶抑制翻译过程^[29],从而抑制细菌蛋白质合成,而细菌转录过程仍能正常进行。MccC7/C51 的多肽骨架能发挥上述抑制作用,而羧基端转录后修饰区域是细菌识别和摄取所需的结构。MccJ25 能够阻塞 RNA 聚合酶次级通道,阻止细菌通过通道转运 RNA 聚合酶,而 RNA 聚合酶是细菌转录过程中最关键酶,所以本质上 MccJ25 的抑菌机制是干扰细菌的转录,其尾部具有的环状结构在这一过程中发挥重要作用。

II 型小菌素的作用目标可能为内膜,其具体抑菌机制仍在进一步研究中,目前 II 型小菌素 MccH47 和 MccE492 抑菌机理研究得较为透彻,MccH47 通过抑制细菌 ATP 合成酶^[30]所必需的内

膜组分 F0 (一种质子通道), 阻碍细菌 ATP 的合成, 通过影响细菌的能量供给达到抑菌作用。MccE492 则通过破坏受体菌甘露糖透性酶的两膜组分 ManY 和 ManZ 发挥抑菌作用, 这种甘露糖透性酶参与细菌对甘露糖和相关戊糖的摄取^[31], 其他 II 型小菌素可能也是通过对内膜成分的作用发挥抑菌作用, 具体机理有待进一步研究。

5 分泌细菌的自身保护机制

细菌在产生抗菌物质的同时必须保护其自身免受毒害作用。小菌素具有抑菌效应, 所以产生小菌素的细菌本身必须具有一套针对自身产生小菌素的防护机制。与产生肠菌素和细菌素的细菌不同, 产生小菌素细菌的自身免疫机制仍在研究中, 推测这些免疫基因编码的免疫蛋白可以破坏进入细胞的小菌素, 使其失去毒性作用^[32]。在 I 型小菌素中分泌基因和自身免疫基因紧密关联, 在基因簇上至少 1 个基因同时参与以上 2 个过程。与 I 型小菌素不同的是, II 型小菌素具有专用的自身免疫蛋白, 成熟的 II 型小菌素氨基端区域具有很大的差异性, 这种结构的特异性可能决定了其与相应的自身免疫蛋白之间存在某种特异性的信息交换。与此相印证的是不同的 II 型小菌素的自身免疫蛋白具有很大差异。

6 小菌素也是一种潜在的毒力因子

研究表明, 部分致病性的肠道细菌也能分泌小菌素。这些小菌素本身不具有毒性, 并且也能对其他肠道菌有不同程度的抑制作用, 但由于细菌具有自我保护机制, 致病菌不会被自身产生的小菌素抑制, 相反这些小菌素还会为产生它们的

致病菌提供了更强的生存能力, 成为了一种潜在的毒力因子。例如在 UPEC CFT073 中, 可以产生两种 II 型 b 类的邻苯二酚小菌素 MccM 和 MccH47, 这两种邻苯二酚小菌素通过与沙门菌素形式的邻苯二酚铁载体共价结合的方式进行转录后修饰。因此这两种小菌素与沙门菌素铁载体关系紧密。沙门菌素是一种羧基端发生糖基化修饰的肠菌素, 是第一种被发现的糖基化铁载体。这种分子结构决定两种小菌素在其感染过程中, 可以作为一种铁载体, 为致病菌更好地摄取铁, 从而为致病菌在肠道的竞争提供优势, 这一特性导致其与致病性相关^[33-34]。

7 小菌素的应用前景

小菌素对各种肠道致病菌具有抑菌作用, 因此产生小菌素的细菌有作为益生菌的潜质, 1917 年从德国抗腹泻士兵粪便中分离出的大肠杆菌益生菌 Nissle 1917^[35], 在人身上得到有效的应用, 对炎症性肠道疾病有很好的疗效。其基因组上具有编码小菌素的基因簇, 可以同时产生 MccM 和 MccH47 两种小菌素, 在其益生功能中发挥重要作用, Nissle 1917 在肠道中定殖, 产生的小菌素可以有效地抑制其他沙门菌他肠道致病菌的生长, 维持肠道菌群平衡。此外, 大肠杆菌 H22 产生小菌素 MccC7/C51, 可以抑制弗氏志贺菌的生长; 而产生 MccJ25 小菌素的大肠杆菌 LR05 广泛分布在猪的肠道环境中, 在抑制猪肠道病原菌生长过程中起到关键作用; 小菌素 Mcc24 可以有效地抑制鸡肠道内致病性沙门菌和 O157:H7 型大肠杆菌的生长。小菌素在益生菌改造方面也有一定的应用前景, 如果能将小菌素基因整合到不含小菌素的传统益生菌中, 可为其提供更好的抑菌能力,

使其发挥更好的益生作用。

小菌素在养殖业有广泛的应用前景, 可以作为动物饲料添加剂, 在预防动物肠道致病菌的感染方面起到一定作用, 与传统抗菌药物相比, 在养殖过程中添加小菌素不用担心畜禽产品化学药物残留, 不会对人的健康造成影响。因此小菌素在预防畜禽肠道感染的领域仍有很大的应用空间。

小菌素在作为食品保存的抗菌剂方面也有广阔的应用前景^[36], 传统抗菌药物的滥用导致病原菌出现耐药性, 抗菌效果减弱。因此对新型抗菌药物需求日益迫切。而小菌素和传统抗生素的作用机制不同, 抑菌谱窄但抑菌活性高效, 同时有效地避免了细菌产生耐药性的问题, 因此小菌素也许能够用于制备新型抗菌药物, 成为传统抗菌药物的替代品。小菌素在作为防腐剂方面也有良好的应用前景, 考虑到此前大部分的防腐剂均为化学合成, 长期使用这类防腐剂会影响身体健康, 而且在食品生产过程中禁止添加抗菌药物, 因此小菌素这种基因编码的多肽可以作为食品保存过程中的一种天然防腐剂。在此之前革兰氏阳性菌产生的细菌素乳酸链球菌素已经在食品保存中作为防腐剂应用, 可以有效地抑制革兰氏阳性菌的生长。如果将小菌素和传统革兰氏阳性细菌素结合也许可以达到更好的效果。因此将小菌素作为针对革兰氏阴性菌的抗菌药物和防腐剂的设想是完全可行的。

总之, 小菌素的强效抑菌活性决定其广阔的应用前景, 在未来的一段时间, 小菌素会继续成为基础和应用研究的活跃领域。

参考文献

[1] Nolan EM, Walsh CT. Investigations of the MceJ-catalyzed posttranslational modification of the microcin E492

C-terminus: linkage of ribosomal and nonribosomal peptides to form “trojan horse” antibiotics. *Biochemistry*, 2008, 47(35): 9289–9299.

- [2] Poey ME, Azpiroz MF, Laviña M. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(4): 1411–1418.
- [3] Laviña M, Gaggero C, Moreno F. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(11): 6585–6588.
- [4] Severinov K, Semenova E, Kazakov T. Class I microcins: their structures, activities, and mechanisms of resistance//Drider D, Rebuffat S. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. New York: Springer, 2011: 289–308.
- [5] Rebuffat S. Microcins from Enterobacteria: on the edge between Gram-positive bacteriocins and colicins//Drider D, Rebuffat S. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. New York: Springer, 2011: 333–349.
- [6] Pons AM, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, 2002, 84(5/6): 531–537.
- [7] Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J. Class II microcins//Drider D, Rebuffat S. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. New York: Springer, 2011: 309–332.
- [8] Boubezari MT, Idoui T, Hammami R, Fernandez B, Gomaa A, Fliss I. Bacteriocinogenic properties of *Escherichia coli* P2C isolated from pig gastrointestinal tract: purification and characterization of microcin V. *Archives of microbiology*, 2018, 200(5): 771–782.
- [9] Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*, 2002, 84(5/6): 511–519.
- [10] Duquesne S, Petit V, Peduzzi J, Rebuffat S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007, 13(4): 200–209.
- [11] Vizán JL, Hernández-Chico C, del Castillo I, Moreno F. The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *The EMBO Journal*, 1991, 10(2): 467–476.
- [12] Thompson RE, Collin F, Maxwell A, Jolliffe KA, Payne RJ. Synthesis of full length and truncated microcin B17 analogues as DNA gyrase poisons. *Organic & Biomolecular*

- Chemistry*, 2014, 12(10): 1570–1578.
- [13] Fomenko DE, Metlitskaya AZ, Péduzzi J, Goulard C, Katrukha GS, Gening LV, Rebuffat S, Khmel IA. Microcin C51 plasmid genes: possible source of horizontal gene transfer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(9): 2868–2874.
- [14] Solbiati JO, Ciaccio M, Fariás RN, González-Pastor JE, Moreno F, Salomón RA. Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(8): 2659–2662.
- [15] Dirix G, Monsieurs P, Dombrecht B, Daniels R, Marchal K, Vanderleyden J, Michiels J. Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides*, 2004, 25(9): 1425–1440.
- [16] Rebuffat S. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 2012, 40(6): 1456–1462.
- [17] Håvarstein LS, Holo H, Nes IF. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology*, 1994, 140(9): 2383–2389.
- [18] Pons AM, Delalande F, Duarte M, Benoit S, Lanneluc I, Sablé S, van Dorsselaer A, Cottenneau G. Genetic analysis and complete primary structure of microcin L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(2): 505–513.
- [19] Strahsburger E, Baeza M, Monasterio O, Lagos R. Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(7): 3083–3086.
- [20] Azpiroz MF, Rodríguez E, Laviña M. The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(3): 969–972.
- [21] Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, 2007, 24(4): 708–734.
- [22] Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(1): 288–297.
- [23] Patzer SI, Baquero MR, Bravo D, Moreno F, Hantke K. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology*, 2003, 149(9): 2557–2570.
- [24] Ma YF, Liang GL, Pei DS, Cui ZB. Advancement of studies on ABC transporter proteins. *Biotechnology Bulletin*, 2008, (5): 35–41. (in Chinese)
马云芳, 梁国鲁, 裴得胜, 崔宗斌. ABC 转运蛋白研究的新进展. *生物技术通报*, 2008, (5): 35–41.
- [25] Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000, 405(6789): 914–919.
- [26] Braun V. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 16(4): 295–307.
- [27] Baquero F, Bouanchaud D, Martinez-Perez MC, Fernandez C. Microcin plasmids: a group of extrachromosomal elements coding for low-molecular-weight antibiotics in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1978, 135(2): 342–347.
- [28] Piskunova J, Maisonneuve E, Germain E, Gerdes K, Severinov K. Peptide - nucleotide antibiotic Microcin C is a potent inducer of stringent response and persistence in both sensitive and producing cells. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(3): 463–471.
- [29] Metlitskaya A, Kazakov T, Kommer A, Pavlova O, Praetorius-Ibba M, Ibba M, Krashennnikov I, Kolb V, Khmel I, Severinov K. Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin C. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(26): 18033–18042.
- [30] Trujillo M, Rodríguez E, Laviña M. ATP synthase is necessary for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(11): 3128–3131.
- [31] Biéler S, Silva F, Belin D. The polypeptide core of Microcin

- E492 stably associates with the mannose permease and interferes with mannose metabolism. *Research in Microbiology*, 2010, 161(8): 706–710.
- [32] Fang CM, Wang JY, Chinchilla M, Levine MM, Blackwelder WC, Galen JE. Use of mchI encoding immunity to the antimicrobial peptide microcin H47 as a plasmid selection marker in attenuated bacterial live vectors. *Infection and Immunity*, 2008, 76(10): 4422–4430.
- [33] Azpiroz MF, Poey ME, Laviña M. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2009, 47(5): 274–280.
- [34] Fardeau S, Mullie C, Dassonville-Klimpt A, Audic N, Sonnet P. Bacterial iron uptake: a promising solution against multidrug resistant bacteria//Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. 2011: 695–705.
- [35] Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 683.
- [36] Gillor O, Kirkup BC, Riley MA. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 2004, 54: 129–146.

Microcins—Antibacterial peptides secreted by Enterobacteria

Xuan liang^{1,2}, Yu Zhang^{1,3}, Yejun Wang^{4*}, Guoqiang Zhu^{1,2*}

¹ College of Veterinary Medicine, Yanzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

² Jiangsu Co-Innovation Center for Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

³ School of Nursing, Yanzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

⁴ College of Cell and Molecular Biology and Medical Genetic, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China

Abstract: Microcins are antibacterial peptides produced by Enterobacteria with low molecular masses below 10 kDa. They are encoded by cluster genes on the plasmid or on the genome. Microcins have narrow antibacterial spectrum. They have potent antibacterial activity against closely related bacteria in Enterobacteria. Typical gene clusters in microcins include microcin precursor gene, the self-immunity gene, the secretion gene and frequently the post-translational modification gene. Microcins are ribosomally synthesized as precursors, in contrast to most microbial antibiotics that are non-ribosomally synthesized. Fifteen microcins have been discovered so far. They show a variety of structures and antibacterial mechanisms.

Keywords: microcin, structure, mechanism of antibacterial property, enterobacteriae

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31672579), by the Jiangsu Key R&D Plan (Modern Agriculture) (BE2017342) and by the Priority Academic Program of Development Jiangsu High Education Institution

*Corresponding author. Tel: +86-514-87972590; E-mail: Guoqiang Zhu, yzqzhu@yzu.edu.cn, Yejun Wang, wangyj@szu.edu.cn

Received: 5 August 2018; Revised: 8 November 2018; Published online: 29 November 2018