

· 综 述 ·

## 白条素研究进展

陈丽兰<sup>1,2</sup>, 黄海滨<sup>1,2</sup>, 卞润恬<sup>1,2</sup>, 邓祖湖<sup>1</sup>, 高三基<sup>1</sup>, 张慧丽<sup>1</sup>

1 福建农林大学 国家甘蔗工程技术研究中心, 福建 福州 350002

2 福建农林大学 农学院, 福建 福州 350002

陈丽兰, 黄海滨, 卞润恬, 邓祖湖, 高三基, 张慧丽. 白条素研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2738-2753.

CHEN LL, HUANG HB, BIAN RT, DENG ZH, GAO SJ, ZHANG HL. Advances in albicidin. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2738-2753.

**摘 要:** 白条黄单胞菌 (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Downson) 是我国进境植物检疫性有害生物, 其引起的甘蔗白条病是甘蔗上最重要的细菌病害。白条黄单胞菌产生一种高效的植物毒素/抗生素, 称为白条素 (Albicidin)。作为引起甘蔗白条病的致病因子, 白条素通过抑制质体 DNA 回旋酶阻碍叶绿体分化, 导致叶面出现典型的白色条纹症状, 同时白条素的抗菌活性也赋予白条黄单胞菌在其定殖甘蔗过程中对抗其他细菌的竞争优势。此外, 在纳摩尔浓度下, 白条素对人类各种革兰氏阳性和革兰氏阴性病原细菌具有快速杀菌作用, 使其成为具有潜在临床应用价值的抗菌药物。文中综述了该毒素的分子结构、传统提取方法、作用机制、生物合成基因及途径和化学合成方法及改良现状, 以期为甘蔗白条病的防治及医用新型抗菌素的开发提供参考。

**关键词:** 甘蔗白条病; 白条黄单胞菌; 白条素; 植物毒素; 抗生素; 生物合成; 化学合成

## Advances in albicidin

CHEN Lilan<sup>1,2</sup>, HUANG Haibin<sup>1,2</sup>, BIAN Runtian<sup>1,2</sup>, DENG Zuhu<sup>1</sup>, GAO Sanji<sup>1</sup>, ZHANG Huili<sup>1</sup>

1 National Engineering Research Center for Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Downson is a quarantine pest for importing plants to China

**Received:** November 9, 2021; **Accepted:** March 23, 2022; **Published online:** March 28, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31801425); Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2019J01417)

**Corresponding author:** ZHANG Huili. E-mail: hlzhang@fafu.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31801425); 福建省自然科学基金 (2019J01417)

that causes leaf scald bacterial disease on sugarcane. *X. albilineans* produces a potent phytotoxin/antibiotic called albicidin. As a pathogenic factor, albicidin causes typical white leaf stripes by inhibiting plastid DNA gyrase and disturbing chloroplast differentiation. Meanwhile, the antibacterial activity of albicidin gives *X. albilineans* a competitive advantage against rival bacteria during their colonization. Furthermore, albicidin has a rapid bactericidal activity against a variety of Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria of human species at nanomolar concentrations, making it a potential antimicrobial drug for clinical application. This article reviews the advances of albicidin from the aspects of its molecular structure, traditional extraction methods, mechanism of action, biosynthetic genes and processes, chemical synthesis method and improvement, in order to provide insights into the prevention and treatment of the sugarcane leaf scald disease, and the development of new antibiotics.

**Keywords:** sugarcane leaf scald; *Xanthomonas albilineans*; albicidin; phytotoxin; antibiotics; biosynthesis; chemical synthesis

甘蔗白条病是由白条黄单胞菌 (*Xanthomonas albilineans*) 引起的一种维管束病害, 是我国甘蔗上的检疫性细菌病害, 在世界上至少 66 个商业化种植甘蔗的国家中发生。病原菌可以定殖在叶、茎、根的维管系统, 引起甘蔗产量和蔗糖质量的高度下降<sup>[1]</sup>。白条病症状有两种类型, 即急性型和慢性型。急性症状主要表现在高感品种中, 表现为外表无症状, 在突遇极端天气时, 整个植株乃至田间大面积植株枯萎死亡; 慢性症状表现发病初期甘蔗叶片出现与叶脉平行的 1–2 mm 白色铅笔线条纹, 后期白化区域逐渐扩展, 导致整个叶片、植株出现大面积白化枯死, 成熟甘蔗植株易生侧芽, 且侧芽新生叶片同样出现白化现象<sup>[2]</sup>。此外, 这种病害具有潜伏性, 受感染的植物可能持续数月甚至数年不表现症状。在易感品种的潜伏期内, 甘蔗产区之间带菌蔗种的调运导致病害的传播。

1983 年, Birch 和 Patil 提出了 *X. albilineans* 侵染甘蔗过程中可能产生一种可扩散的植物毒素<sup>[3]</sup>, 并于 1987 年得到证实该毒素由 *X. albilineans* 产生, 命名为 albicidin<sup>[4]</sup>。在此, 我们赋予 albicidin 中文名称: 白条素。对于

*X. albilineans* 自身而言, 白条素是一种 DNA 回旋酶 (DNA gyrase) 抑制剂, 一方面, 作为植物毒素, 阻断叶绿体在原质体或黄原质体阶段的分化, 从而引起甘蔗叶片失绿症状<sup>[5]</sup>; 另一方面, 作为抗生素, 有助于 *X. albilineans* 在与甘蔗中其他生存细菌的竞争中获得优势<sup>[6]</sup>。Von Eckardstein 等使用液相色谱质谱/质谱联用 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 生物活性引导的光谱网络分析来自 *X. albilineans* 的白条素提取物, 鉴定出 8 种天然白条素类型。除了衍生物 3 基本丧失了对所测试的 5 种人畜致病菌的抑菌活性 (最低抑菌浓度 MIC 值均大于 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 外, 其他 7 种白条素衍生物均表现出抗菌活性。与最早分离的典型白条素 (albicidin 1) 相比, 衍生物 4 显示出对革兰氏阴性菌 (大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BW25113 菌株、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 菌株) 等效的抑菌活性; 衍生物 4/7b/8b 均显示出对革兰氏阳性菌 (枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) DSM10 菌株、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) DSM1790 菌株) 等效或更高的抑菌活性<sup>[7]</sup>。

抗生素耐药性病原菌的增加和传播是对公共卫生的最大威胁之一，目前的临床药品不足以减少耐药性带来的威胁<sup>[8]</sup>。革兰氏阴性病原体具有双层细胞膜，可以形成多重防御机制如存在外膜中特定孔、外膜的靶向性或外排泵的特异性识别。对化合物进入和排出革兰氏阴性病菌的分子基础有限的了解，成为发现新型抗菌化合物的关键瓶颈<sup>[9]</sup>。大多数新药只是对现有药物的改良，因此迫切需要更多的投入来促进创新，特别是针对更具挑战性的人类革兰氏阴性病原体的治疗方法<sup>[10]</sup>。白霉素抑菌效果优于大多数 DNA 回旋酶抑制剂，是一种潜在的具有临床应用价值的抗菌药物<sup>[11]</sup>。由于产量有限和结构不明确，白霉素的临床应用一直受到阻碍，直到 Vivien 等提出异源表达白霉素生物合成基因，毒素产量提高了 6 倍以上<sup>[12]</sup>，之后白霉素的分子结构研究逐渐明朗。本文综述了白霉素的分子特征、提取方法、作用机制、生物合成基因和合成过程，同时也阐述了近年来在异体宿主中产生白霉素和白霉素结构与构效关系方面的研究进展，有助于增加人们对该抗菌素在临床应用价值的理解。

## 1 白霉素的性质与结构

白霉素是一种低分子量非肽抗生素，干粉呈白色结晶态，可溶于极性有机溶剂，如甲醇、乙醇、四氢呋喃、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、95%丙酮和二甲基亚砷。白霉素略溶于水 and 乙腈，基本上不溶于低极性溶剂<sup>[13-14]</sup>。在光谱分析中，白霉素可以吸收紫外线区域的辐射能。在甲醇溶液 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 中， $\lambda_{\text{max}}$  213 nm 和  $\lambda_{\text{max}}$  308 nm 处有最大吸收值， $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 8 \times 10^2$ 。在甲醇溶液中加入 0.06 mol/L 的氢氧化钾，使最大吸收峰转变为 308–320 nm，同时在

350 nm 附近有肩峰。在水溶液 (0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.0) 中， $\lambda_{\text{max}} = 308$  nm，肩峰为 275 nm。白霉素在低 pH 条件下相对稳定，高 pH 条件下相对不稳定，表现为抑菌活性的保留或丧失。例如，白霉素的水溶液在 100  $^{\circ}\text{C}$  时，30 min 内活性没有降低。置于 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 1.0 条件下，3 h 后活性未减弱；然而，置于 25  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 10.0 条件下，3 h 后活性丧失。利用 50  $\mu\text{g/mL}$  链霉菌蛋白酶 (pronase，非特异性蛋白水解酶) 在 37  $^{\circ}\text{C}$  处理白霉素 3 h，白霉素活性未见降低。白霉素最好以干粉的形式储存；该毒素溶解在甲醇中保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$ ，持续 6 个月内活力不丧失。

2015 年，Cociancich 等证明白霉素的结构以多肽和氨基酸为基础，但不含任何蛋白质性氨基酸，由聚酮合成酶 (polyketide synthases, PKSs) 衍生的非蛋白性  $\alpha$ -氨基酸- $\beta$ -氰基-L-丙氨酸 ( $\alpha$ -amino acid  $\beta$ -cyano-L-alanine, Cya-3)、非核糖体肽合成酶 (non ribosomal peptide synthase, NRPS) 衍生的芳香族  $\delta$ -氨基酸对氨基苯甲酸 ( $\delta$ -amino acids *p*-aminobenzoic acid, pABA-2 和 pABA-4) 以及 4-氨基-2-羟基-3-甲氧基苯甲酸 (4-amino-2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, pMBA-5 和 pMBA-6) 组成，这些构造块的五肽在 N 端与 3-(4-羟苯基)-2-甲基丙烯酸 (3-(4-hydroxyphenyl)-2-methyl acrylic acid, MCA-1) 连接 (图 1A)<sup>[15]</sup>。高效液相色谱-质谱分析首次揭示了白霉素纯品的暂定分子式为  $\text{C}_{44}\text{H}_{39}\text{O}_{12}\text{N}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (预计  $m/z$  843.263 6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，计算得到  $m/z$  843.262 1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ， $\Delta m$  1.78 p.p.m)。为了便于杂环磁共振实验，作者还制备了  $^{15}\text{N}$  标记的白霉素，其预期  $m/z$  为 849.247 8  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (计算  $m/z$  849.244 3 ( $\text{C}_{44}\text{H}_{39}\text{O}_{12}^{15}\text{N}_6$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ， $\Delta m$  4.12 p.p.m)。6 Da 的观测差异证实了分子中存在 6 个氮原子。

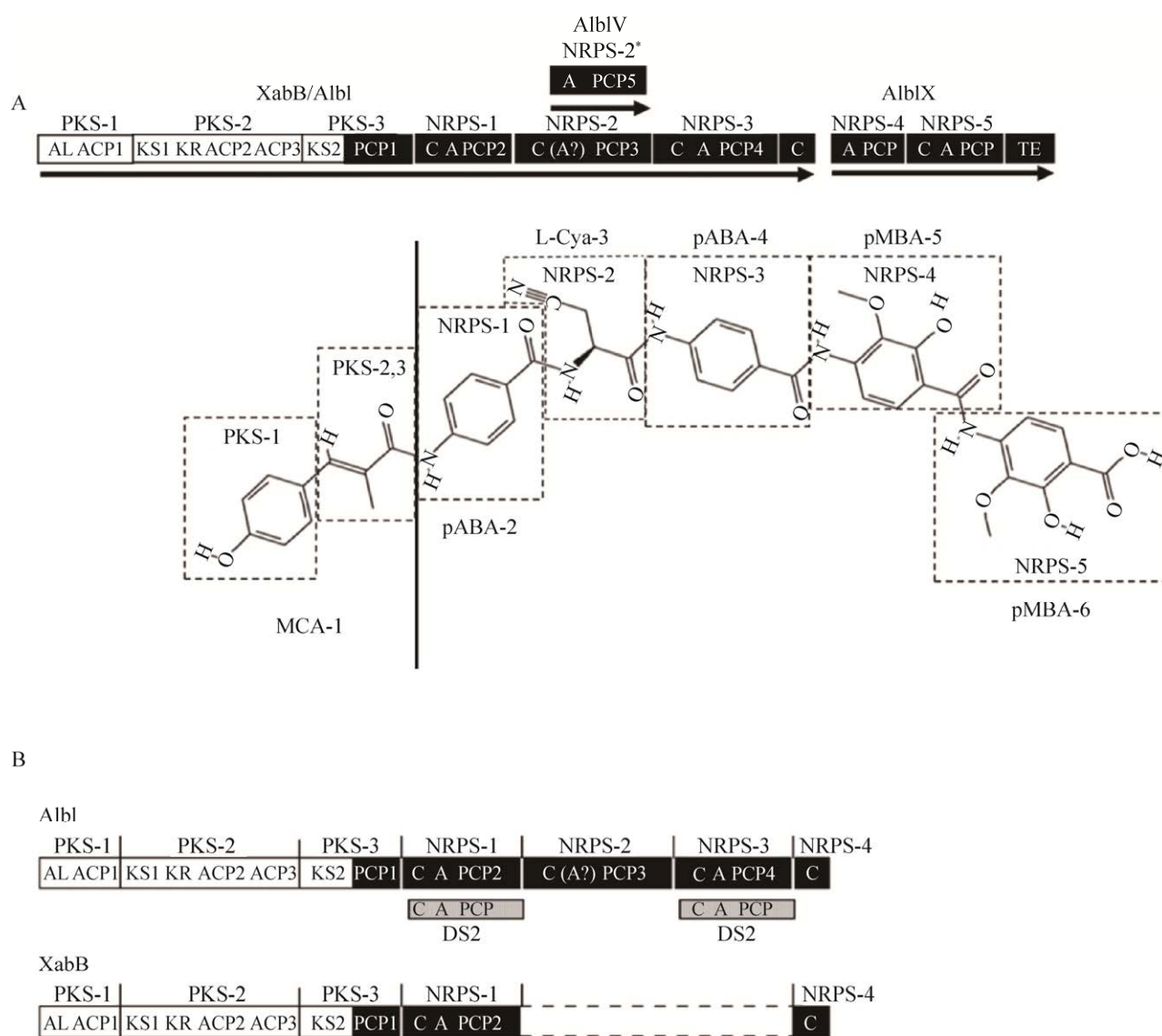


图 1 白条素结构及部分生物合成基因示意图<sup>[11,16-17]</sup>

Figure 1 Schematic diagram of albicidin structure and some biosynthetic genes<sup>[11,16-17]</sup>. A. Model for the synthesis of albicidin by the polyketide synthase (PKS) modules and the nonribosomal peptide synthase (NRPS) modules identified in albicidin biosynthetic cluster XALB1. Boxes with dotted lines around the chemical structure of albicidin indicate the stepwise synthesis by PKSs and NRPSs (Adapted from reference [11] with permission). B. Comparison between the organization of AlbI in strain Xa23R1 from Florida with that of XabB in strain Xa13 from Queensland. Dotted box corresponds to the deletion of NRPS-2 and NRPS-3 modules in XabB compared with AlbI. Shaded boxes correspond to duplicated sequences DS2 located in AlbI (Adapted from reference [16] with permission). PKS: polyketide synthase; NRPS: nonribosomal peptide synthase; AL: acyl-CoA ligase; ACP: acyl carrier protein; KS: ketoacyl synthase; KR: ketoacyl reductase; PCP: peptidyl carrier protein; C: condensation domain; A: adenylation domain; TE: thioesterase; MCA-1: 3-(4-hydroxyphenyl)-2-methyl acrylic acid; pABA:  $\delta$ -amino acids *p*-aminobenzoic acid; L-Cya-3:  $\alpha$ -amino acid  $\beta$ -cyano-L-alanine; pMBA: 4-amino-2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid. The question mark in the NRPS-2 domain indicates that this A domain is incomplete.

## 2 白条素的提取方法

白条素是一种非蛋白质性抗生素,由可诱导甘蔗叶片褪绿的 *X. albilineans* 或其突变体产生。小规模发酵可以在烧瓶或锥形瓶中摇动或振荡条件下进行;大规模生产采用配有搅拌器和通风管的无菌不锈钢发酵罐<sup>[13]</sup>。将 *X. albilineans* 在含水营养培养基(首选 pH 7.0 的蔗糖-蛋白胨培养基)中、28 °C–30 °C 有氧条件下培养,直到稳定期,可产生大量有活性的白条素。发酵需要约 80–150 h,最大抗生素产量发生在约 90–110 h。通过吸取一定量的培养基测定抗生素含量,可以监测抗生素生产的发酵过程。

发酵结束后,通过离心或用合适的滤料进行过滤,将细菌细胞从抗生素培养基中分离出来,并利用色谱树脂如中间极性的聚合丙烯酸酯吸附培养基中的抗生素,然后用甲醇洗脱。洗脱液在真空下蒸发成水浓缩物后加入丙酮,浓缩液:丙酮最终体积比为 5%:95%,冷藏(5 °C 左右)后可以沉淀出非活性物质。去除非活性高分子量杂质沉淀后,通过蒸发液相除去丙酮。浓缩液用甲醇或其他溶剂稀释后,通过 Sephadex LH-20 凝胶过滤,分离出具有活性的单峰,然后利用反相高效液相色谱先后在大孔树脂柱(如 Hamilton PRP-1 柱)和十八烷基硅烷树脂柱(如 Beckman ODS 柱)上进一步纯化。两种反相高效液相色谱以 44% (V/V) 四氢呋喃在含 1% (V/V) 乙酸的水中中等度洗脱效果最好,从活性峰的混合馏分中缓慢蒸发四氢呋喃,过滤收集白色结晶即白条素。

2017 年, Eckardstein 等采用生物活性引导的固相萃取和半制备高效液相色谱对 *X. albilineans* 培养物进行了预纯化。以生物活性为导向,将具有抗菌活性的高效液相色谱组分随后进行 LC-MS/MS 分析。利用全球天然产物社会分子

网络(global natural product social molecular networking, GNPS) 数据分析平台,发现了 8 个新的天然白条素衍生物,其中 4 个以  $\beta$ -甲氧基氰丙氨酸或  $\beta$ -甲氧基天冬酰胺为中心  $\alpha$ -氨基酸<sup>[7]</sup>。这些衍生物的结构是根据精确质量和串联质谱碎片模式推断出来的,并指导了这些白条素衍生物的化学合成,化学合成结果表明这些衍生物全部具有抗菌活性。利用 <sup>1</sup>H-NMR 测定其立体化学性质,准确测定出其中一个白条素天然衍生物( $\beta$ -OMe-Asn-albicidin 8) 的立体构型为 (2*S*, 3*R*), 而不是 (2*S*, 3*S*)。

## 3 白条素的作用机制

DNA 拓扑异构酶(topoisomerase) 在所有细胞中均存在,是控制 DNA 拓扑状态的关键酶,分为 I 型和 II 型,其区别在于它们是否会瞬间破坏 DNA 的一条链或两条链<sup>[18]</sup>。DNA 回旋酶是原核生物中复制和转录所必需的一种 II 型拓扑异构酶,具有负超螺旋 DNA 的独特能力,是由 GyrA 和 GyrB 亚基组成的 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 复合物<sup>[19]</sup>。超螺旋的催化过程包括配对的 GyrA C 端结构域将 DNA 底物包裹在酶周围,固定 DNA 序列使其被 GyrA N 端结构域的催化酪氨酸可逆地裂解。DNA 回旋酶在大多数真核生物中缺失,但有证据表明它存在于顶复虫类(apicomplexans) 和植物中。顶复门原虫如疟原虫、弓形虫等,具有与藻类或植物的叶绿体同源残留质体,称为顶质体(apicoplast)<sup>[20]</sup>。顶质体包含了多条重要的原核合成代谢途径,在原虫中占据不可或缺的地位。鉴于质体特异性 DNA 回旋酶在顶质体基因组复制中起作用, DNA 回旋酶抑制剂可以抑制 DNA 回旋酶、阻断顶质体 DNA 的复制,导致虫体死亡<sup>[21]</sup>。植物叶绿体和线粒体缺乏组蛋白,它们的基因组在许多方面与其细菌祖先相似,可能使这些细

胞器组织 DNA 的方式不同于细胞核 DNA, 并可能均需要 DNA 回旋酶活性。DNA 回旋酶在动物中明显缺失, 使它被选为许多抗菌药物的靶点, 包括喹诺酮类药物 (quinolones), 如萘啶酸 (nalidixic acid) 和环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP), 以及香豆素类药物 (coumarins), 如新生霉素 (novobiocin) 和香豆素 A1 (coumerymycin A1)<sup>[20]</sup>。

白条素是 DNA 回旋酶抑制剂, 最先阻碍植物质体 DNA 复制, 其次, 使蛋白质合成受阻, 导致叶绿体不能分化, 甘蔗叶片发生失绿白化症状<sup>[22]</sup>。一部分缺失白条素的突变体不能使植物产生病斑, 表明该毒素可能对症状的形成有一定的作用<sup>[5]</sup>。但是, 另外一些缺失白条素的突变体仍然能够产生严重的叶部症状, 说明白条素不能单独充分解释 *X. albilineans* 的致病机制<sup>[23]</sup>。*X. albilineans* 在体外产生白条素的量根据菌株不同而变化, 然而没有发现其体外白条素产量与细菌的致病型或遗传多样性有关系<sup>[24]</sup>。

由于原核生物与叶绿体 DNA 的复制机制类似<sup>[4]</sup>, 白条素天然产物通过抑制 DNA 复制显示出杀菌特性<sup>[14]</sup>。白化素的产生者 *X. albilineans* 使用多种自我保护机制对抗这种强效杀菌剂, 包括高度调控的生物合成、外排泵 AlbF 负责从细胞质中主动去除白化素<sup>[25]</sup>、一种与回旋酶相互作用的蛋白 AlbG 保护 DNA 回旋酶不受白化素的抑制<sup>[26]</sup>、特殊的 DNA 回旋酶 A 提高对白化素的耐药性<sup>[27]</sup>。白条素能有效抑制大肠杆菌 DNA 回旋酶催化的 DNA 超螺旋, 抑制浓度 ( $IC_{50}=40-50$  nmol/L) 低于大多数香豆素和喹诺酮类化合物。在 ATP 存在下, 白条素可以稳定回旋酶和 DNA 之间的切割复合物, 在回旋酶的催化过程中阻断被切割 DNA 中间体的再连接, 导致致命的双链 DNA 断裂; 并抑制回旋酶和拓扑异构酶 IV 对超螺旋 DNA 的松弛作用。具有喹诺酮类 (GyrA S83L) 和小菌素 CcdB 药物

(GyrA R462C) 耐药突变的大肠杆菌菌株对白条素表现出交叉耐药, 提示其作用机制类似。与喹诺酮类药物相比, 在缺乏 ATP 的情况下, 稳定回旋酶切割复合物所需的白条素浓度增加了 100 倍。慢性肽类毒物——小菌素 B17 和 CcdB 也可以通过 ATP 依赖的回旋酶构象来阻断再连接, 但与白条素相反, 在常规检测条件下, 它们不能抑制超螺旋<sup>[26]</sup>。在纳摩尔浓度下, 白条素对各种人和动物革兰氏阳性 (如 *B. subtilis* DSM10 菌株、*M. luteus* DSM1790 菌株) 和革兰氏阴性病原细菌 (如 *E. coli* BW25113 菌株、*S. typhimurium* TA100 菌株) 具有快速杀菌作用, 但即使在 8  $\mu\text{g/mL}$  浓度下对培养的哺乳动物细胞无细胞毒性<sup>[11]</sup>。化学合成的新型白条素衍生物 (化合物 7) 经静脉给药小鼠 (剂量为 50 mg/kg), 小鼠没有显示任何不良反应或组织病理学症状。对感染致死剂量耐氟喹诺酮临床分离菌的小鼠静脉注射化合物 7 (剂量 17 mg/kg) 两次, 所有小鼠均存活。与对照相比, 感染脾脏分离的细菌滴度减少 3 个数量级, 肾脏的细菌滴度减少 2 个数量级<sup>[28]</sup>。因此, 白条素作为一种有潜力的临床抗菌药物备受关注。疟疾和弓形虫病的寄生虫含有对其生存至关重要的退化质体<sup>[21]</sup>, 白条素是否具有抗原虫作用, 也是临床研究感兴趣的方向。

## 4 白条素生物合成基因

在 *X. albilineans* 菌株 Xa23R1 基因组中, 白条素的生物合成涉及 3 个基因簇<sup>[29-30]</sup>, 分别为 XALB1 (55 839 bp)、XALB2 (2 986 bp)、XALB3 (9 673 bp)。XALB1 包含 20 个开放阅读框, 命名为 *albI - albXX*, 包括: ① 一个大的具有 PKS 和 NRPS 模块化结构特征的基因 (*albI*) 和两个小的 NRPS 基因 (*albIV* 和 *albIX*); ② 一些假定的修饰、调控和抗性基因<sup>[16]</sup>。XALB2

只包含一个编码磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (phosphopantetheinyl transferase XaPPTase) 基因 *albIXXI*, 该基因是 PKS 和 NRPS 翻译后激活所必需的<sup>[31]</sup>。XALB3 只包含一个 *albXXII* 基因, 编码产物与大肠杆菌热休克蛋白 HtpG 具有很高的同源性<sup>[30]</sup>。由于不同的文献所用菌株不同, 同一蛋白或同源基因被赋予不同的名称, 具体见表 1。

#### 4.1 XALB1

##### 4.1.1 *albI* 表达一个杂合 PKS/NRPS 合成酶

*albI* 编码 6 879 aa 的酶, 多个结构域参与聚酮多肽合成 (图 1)。其中 PKS 区域分为 3 个

模块: PKS-1 模块包含酰基辅酶 A 连接酶 (acyl-CoA ligase, AL) 和酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP1) 结构域; PKS-2 模块包含酮酯酰合成酶 (ketoacyl synthase, KS1)、酮酯酰还原酶 (ketoacyl reductase, KR) 结构域和两个连续的 ACP 结构域 (ACP2 和 ACP3); PKS-3 模块包含一个 KS 结构域 (KS2) 和一个肽基载体蛋白结构域 (peptidyl carrier protein, PCP1)。*albI* 序列中的 PKS 模块通过 PCP1 域与 4 个 NRPS 模块连接。一个典型的 NRPS 模块细分为 3 个功能域: 腺苷酸化结构域 (adenylation domain, A) 用于激活氨基酸单体, 肽基载体蛋

表 1 白霉素生物合成基因名称对照表

Table 1 Comparison of albicidin biosynthesis gene names

	Gene names in Xa23R1	Gene names in other strains	Proposed function	References
XALB1	<i>albXVI</i>	/	No function (transposition)	/
	<i>albXV</i>	<i>xabM</i>	Carbamoyl transferase	[25]
	<i>albXIV</i>	<i>albF</i>	Albicidin transporter, AlbF	[25]
	<i>albXIII</i>	<i>xabL</i>	Putative acyl transferase hydrolase	[25]
	<i>albXII</i>	<i>xabK</i>	Probable benzoyl CoA oxygenase	[25]
	<i>albXI</i>	<i>xabJ</i>	Putative syrc like esterase	[25]
	<i>albX</i>	<i>mbtH</i>	Unknown	[25]
	<i>albXVII</i>	<i>pabAB</i>	Para-amino benzoate synthase	[32]
	<i>albXVIII</i>	<i>pabC</i>	4-amino-4-deoxychorismate lyase	[32]
	<i>albXIX</i>	<i>albG</i>	Immunity against albicidin	[32]
	<i>albXX</i>	<i>ubiC</i>	4-hydroxybenzoate synthetase	[32]
	<i>albIX</i>	<i>xabG</i>	Peptide synthase	[32]
	<i>albVIII</i>	<i>xabF</i>	Regulation	[32]
	<i>albVII</i>	<i>xabE</i>	4-hydroxybenzoate CoA ligase	[32]
	<i>albVI</i>	<i>xabD</i>	O-methyltransferase	[32]
	<i>albV</i>	<i>thp</i>	IS transposase	[33]
	<i>albI</i>	<i>xabB</i>	Polyketide-peptide synthase	[34]
	<i>albII</i>	<i>xabC</i>	O-methyltransferase	[33]
	<i>albIII</i>	/	Activation of <i>alb</i> genes transcription	/
	<i>albIV</i>	/	Peptide synthase	/
XALB2	<i>albXXI</i>	<i>xabA</i>	XaPPTase	[31]
XALB3	<i>albXXII</i>	<i>htpG</i>	Heat shock protein G	[30]

白 (peptidyl carrier protein, PCP) 附着延伸的多肽, 以及缩合结构域 (condensation domain, C) 催化激活的氨基酸和多肽链之间形成肽键<sup>[35]</sup>。*XabB* 基因中前 3 个 NRPS 结构域由 C、A 和 PCP 结构域组成, 且按这个顺序排列; 而 NRPS-4 只包含一个单一的 C 结构域。*albI* 的 NRPS 区域包含一个重复的区域, 即 NRPS-1 和 NRPS-3 (对应图 1B 中的 DS2 区域), 这说明生长链上两个相同的氨基酸 (即 pABA-2 和 pABA-4) 是由 NRPS-1 和 NRPS-3 添加的, 被 NRPS-2 或 NRPS-2\* 添加的一个氨基酸分开<sup>[16]</sup>。C、A 和 PCP 结构域的序列特征在这 4 个 NRPS 模块中是保守的, 除了 NRPS-2 模块的 A 结构域, 表明这个 A 结构域可能没有功能<sup>[16]</sup>。

AlbI 蛋白与来自昆士兰的 *X. albilineans* 菌株 Xa13 的 *xabB* 基因潜在产物非常相似<sup>[34]</sup>。由于缺失 6 234 bp 序列, *XabB* 蛋白只有 4 801 aa; *XabB* 蛋白缺失 NRPS-2 和 NRPS-3 模块, 只包含 NRPS-1 和 NRPS-4 模块 (图 1B)。两个蛋白的 N 端从 Met-1 至 Ile-4 325 只有 5 个氨基酸的差异; *XabB* (从 Arg-4 326 到终止密码子) 与 AlbI (从 Arg-6 404 至终止密码子) C 端部分的相似度为 100%。

由于只有 *X. albilineans* 产生白霉素, 2014 年, Garces 等以 *albI* 基因序列为模板设计 qPCR 引物, 研发出 qPCR 检测白条病菌的方法<sup>[36]</sup>。与常规 PCR 检测相比, qPCR 技术检测灵敏度更高、重复性好、特异性好, 同时反应不受蔗汁提取物抑制。

#### 4.1.2 *albIV* 编码一个 NRPS 模块

*albIV* 基因的潜在产物类似于地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 杆菌肽生物合成中的 BA3 肽合成酶<sup>[37]</sup>。AlbIV 形成一个 NRPS 模块, 只包含一个 A 结构域和一个 PCP 结构域, 其特征序列与 AlbI 蛋白相似<sup>[14]</sup>。然而, 与肽合成酶中

常见的 A 结构域不同, AlbIV 的 A 结构域中 A8 和 A9 核心保守序列被一个 390 aa 的长肽序列分开。这一额外的肽序列与预测的 *N,O*-酰基转移酶 FeeH (397 aa) 具有显著的相似性, 该酶参与一个氧原子取代酰胺基, 在长链 N-乙酰酪氨酸生物合成过程中, 使肽键 (R-CO-NH-R') 转化为酯键 (R-CO-O-R')<sup>[38]</sup>。

#### 4.1.3 *albIX* 包含两个 NRPS 模块

NRPS AlbIX 包含两个 NRPS 模块, 第一模块包含 A 和 PCP 结构域, 第二模块包含 C、A 和 PCP 结构域, 并且两个 NRPS 模块的 A 和 PCP 结构域是相同的, 这意味着它们在生长的白霉素多肽链上装载了相同的氨基酸 (即 pMBA-5 和 pMBA-6)。多肽的末端是 TE 区域, 负责终止生长链<sup>[16]</sup>。

NRPS 蛋白中的腺苷酰 (化) 催化域 (A 结构域) 在识别和激活特定底物方面发挥着重要作用, 因为它们对同源底物具有特异性。*Xa23R1* 菌株中的 3 个白霉素合成相关 PKS 和 NRPS 基因 (*albI*、*albIV* 和 *albIX*) 编码 6 个 NRPS A 结构域<sup>[24]</sup>: ① *albI* 基因中 NRPS-1 和 NRPS-3 模块 A 结构域在 A4-A5 区域中的相似性达 96.4% (这两个结构域带有相同的 NRPS 特征, 这不匹配任何已明确的氨基酸或芳酸代码); ② *albI* 的 NRPS-2 模块 A 结构域, 包含一个不完整和无功能的 A4-A5 区域; *albIV* 的 NRPS-2\* 模块 A 结构域具有一个天冬酰胺特征, 推测替代 NRPS-2 A 结构域功能, 负责 L-Cya-3 的加入; ③ *albIX* 的 NRPS-4 和 NRPS-5 模块 A 结构域在 A4-A5 区域中相似性为 100% (这两个结构域具有相同的 NRPS 特征, 但是这也不匹配任何已明确的氨基酸或芳酸代码)。

#### 4.1.4 生物合成的其他调节、修饰、抗性基因

抗生素的生产受到生物体中严格的表达调控, 这种调控包括在恰当的生长阶段开启生



物合成基因, 并控制抗生素的外排。XALB1 基因簇包含一个调控基因 *albVIII/xabF*。该基因编码产物预测与丁香黄单胞菌的丁香霉素 (syngomycin) 合成酶 SyrP 有 48% 同源。syrP 基因位点定向插入突变, 表现出不寻常的多种表型, 包括在液体培养基中不能产生丁香霉素, 而在琼脂培养基上产生的毒素水平较高; 当培养基中无机磷酸盐浓度大于 1 mmol/L 时, syrP 突变体产生毒素的过程不受抑制<sup>[39]</sup>。

聚酮和多肽抗生素的生物合成开始于启动单元的激活, 然后由大型 PKS 和 NRPS 酶延伸抗生素骨架。白霉素生物合成簇包含几个可能涉及前体分子生产的基因。*albXVII/pabAB* 和 *albXX/ubiC* 基因分别与 pABA 合酶和 pHBA (*p*-hydroxybenzoate, 对羟基苯甲酸) 合酶相似<sup>[15]</sup>。*pabAB* 的失活增加了该病原菌对磺胺 (sulphanilamide) 的敏感性, 但没有阻碍白霉素的产生。*X. albilineans* 含有一个远端 *pabB* 基因, 该基因为白霉素生物合成提供了足够的 pABA。*pabAB* 可能赋予 *X. albilineans* 在更苛刻的环境中生存的优势, 比如受侵染的植物。*pabAB* 的下游是一个已知的抗性基因 (*albXIX/albG*) 和编码 pHBA 合酶的基因 *ubiC*。pHBA 保护 *X. albilineans* 不受 pABA 抑制。因此, 在诱导高水平生物合成抗生素的条件下, 协同表达可能会保护 *X. albilineans* 免受 pABA 中间体和白霉素产物的毒性<sup>[32]</sup>。此外, 这些白霉素前体可能被另一个基因 *albVII/xabE* 激活。XabE 类似苯甲酸 CoA 连接酶, 编码产物 686 aa, 是产生白霉素的关键, *xabE* 突变菌株中检测不到毒素的产生, 在玉米上也没有出现白色铅笔线状条纹, 回补菌株恢复了毒素的产量。

一旦多肽链被释放, 它们通常会被辅助酶 (如甲基转移酶、羟化酶和糖基转移酶) 进一步酶学修饰, 才能成为具有生物活性的最终产

物。大多数修饰酶专门用于生物合成途径本身, 并由聚集在 PKS 和 NRPS 基因簇中的基因编码<sup>[11]</sup>。白霉素的主要生物合成基因簇包含两种甲基转移酶 (AlbII/XabC 和 AlbVI/XabD), 它们利用 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-methionine) 作为共同底物对小分子进行 O-甲基化<sup>[40]</sup>。*albII* 位于 *albI* 下游区域, 与 *albI* 受同一个启动子控制, 且与 Xa13 菌株的 *xabC* 相似度为 100%。该基因编码一个 S-腺苷-L-蛋氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 依赖的 O-甲基转移酶, 含有 3 个保守基序, 可能作用于 *albI* 的产物。Huang 等通过插入突变和互补证实了 *xabC* 参与了 *X. albilineans* 中白霉素的生物合成<sup>[33]</sup>。另外, 白霉素生物合成簇包含一个 O-氨基酰转移酶 (AlbXV/XabM), 该酶在 ATP 存在下, 对白霉素 N 端香豆酸的酚基进行 O-氨基酰化, 形成氨基酰-白霉素 (carbamoyl-albicidin)<sup>[41]</sup>。DNA 回旋酶超螺旋分析表明, 与白霉素相比, 氨基酰-白霉素对细菌回旋酶的抑制效率大约提高了 6 倍 (约 8 vs 49 nmol/L), 表明氨基酰基是白霉素成熟的一个重要结构特征。体内实验表明氨基酰-白霉素对革兰氏阴性菌的作用有差异, 而对革兰氏阳性菌的作用则与白霉素相似。

在细菌中, 抗生素生物合成基因通常与一个或多个对抗生素产生耐药性的基因聚集在一起<sup>[42]</sup>。XALB1 生物合成簇包含两个自我保护基因。AlbXIV/AlbF 是参与白霉素主动外排的 ABC 转运体 (ATP-binding cassette transporter)。在大肠杆菌中表达 *albF* 可使其对白霉素的抗性增加 30–50 倍<sup>[25]</sup>。另一个基因 *albXIX/albG* 与喹诺酮类耐药基因 *qnr* 相似<sup>[43]</sup>。表达 *albG* 的大肠杆菌具有明显的白霉素耐药性。此外, 在体外 DNA 回旋酶超螺旋试验中, 添加纯化的 AlbG 蛋白, 使 DNA 回旋酶具有白霉素抗性, 表明 AlbG 与 DNA 回旋酶亚基相互作用<sup>[20]</sup>。

## 4.2 XALB2

*xabA* 是获得的第一个黄单胞菌属毒素生物合成基因, 基因序列与 *albXXI* 呈现 99.4% 相似性, 两者预测产物 100% 相同。突变体  $\Delta albXXI$  不产生白条素和其他被 *albXXI* 激活的 NRPS 小分子<sup>[18]</sup>, 但不影响 *X. albilineans* 在甘蔗叶片的附着<sup>[44]</sup>。*xabA* 编码产物 278 aa, 其中包含编码磷酸泛酰巯基乙胺转移酶 (XaPPTase) 特征基序 (V/D)G(V/D)D 和 (F/W)(S/C/T)XKE(S/A)XXK<sup>[31]</sup>。XaPPTase 参与 NRPSs 翻译后激活, 是白条素生物合成所必需的<sup>[16]</sup>。所有聚酮肽合成酶、脂肪酸合成酶和非核糖体肽合成酶需要翻译后修饰才能具有催化活性。该酶通过将辅酶 A 的 4'-磷酸泛乙烯基部分转移到保守载体结构域中丝氨酸残基的羟基上, 从而实现非活性蛋白转化为其活性形式<sup>[45]</sup>。

## 4.3 XALB3

XALB3 中唯一的基因 *albXXII* 编码一个 634 aa 的蛋白, 分子量为 71.5 kDa, 与大肠杆菌热休克蛋白 HtpG 具有很高的同源性。Vivien 等通过 *tox*<sup>-</sup> 突变体的回补实验说明了 *htpG* 基因是白条素生物合成必需的, 并揭示了大肠杆菌与白条黄单胞菌 *htpG* 基因之间可以进行功能互换<sup>[30]</sup>。HtpG 与白条素共同定位在细胞膜上, 即毒素最有可能生物合成的细胞部分。

## 4.4 白条素生物合成基因序列的遗传变异

白条素生物合成基因之间的遗传变异最初通过限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析来鉴定。将来自世界各地 137 个 *X. albilineans* 菌株的总基因组 DNA 与两个含有整个白条素生物合成基因簇的 DNA 探针杂交<sup>[46]</sup>, 确定了 14 个单倍型和 2 个主要遗传群 (ALB-RFLP A 组和 ALB-RFLP B 组)。目前, 尚未发现白条素生物合成基因的变异、体外产生白条素含量的变

化以及 *X. albilineans* 致病性的变化三者之间有关系。因此, 需要更多的研究来鉴定涉及 *X. albilineans* 致病性的基因。

不同菌株 XALB1 片段长度差异较大, Huang 等报道来自昆士兰 Xa13 菌株的 *EcoR* I 酶切 DNA 序列片段 (16 511 bp, 包含 *xabB* 基因序列), 与来自佛罗里达 Xa23R1 菌株的 *EcoR* I 酶切 DNA 序列片段 (22 745 bp, 包含 *alBI* 基因序列), 有两处差异<sup>[34]</sup>: ① 两者序列有 5 个核苷酸的差异, 分别位于 XALB1 序列 42 963、42 972、42 980、43 014 和 43 071 这 5 个位置上; ② 虽然与 *alBI* 基因同源, *xabB* 基因序列缺失 6 234 nt, 位置从 43 137 到 49 370。缺失的 DNA 序列对应于一个 2 727 bp 的 DS2 重复序列加上两个 DS2 重复序列之间的区域 (图 1B)<sup>[16]</sup>。本课题组于 2020 年报道了亲缘关系较近的两个菌株 GPE PC73 和 Xa-FJ1 基因组结构上的差异<sup>[47]</sup>。与来自瓜德罗普岛的 GPE PC73 菌株相比, 中国菌株 Xa-FJ1 在 R4 变异区域缺少了 6 234 nt。Xa-FJ1 菌株 (16 508 bp) 与 Xa13 菌株 (16 511 bp) 的 *EcoR* I 酶切 DNA 序列片段核苷酸序列相似度为 98.93%; 而 GPE PC73 菌株 (22 742 bp) 与 Xa23R1 菌株 (22 745 bp) 的 *EcoR* I 酶切 DNA 序列片段核苷酸序列相似度为 98.84%。

## 5 白条素生物合成途径

根据白条素的结构和 *alb* 基因簇中的基因排列, Cociancich 等提出了白条素的生物合成途径如下<sup>[15]</sup>: 白条素的 N 端 MCA-1 模块通过 *AlbI* 的 3 个 PKS 模块协同组装, 与酰基载体蛋白、肽基载体蛋白以硫酯 (S) 方式结合, 而 *AlbI* 的 NRPS-1 模块则将 MCA-1 与随后的 pABA-2 模块耦合。pABA 可以由基因簇内自有基因集 *albXVII* 和 *albXVIII* 或其同源基因催

化初级代谢产物分支酸 (chorismate) 完成。

白条素的生物合成下一步是加入 L-Cya-3 模块。共线性规则指定 NRPS-2 (AlbI) 的 A 结构域负责这一生物合成步骤。然而, 在 ATP-PP<sub>i</sub> 交换实验中, NRPS-2 均未能激活氰丙氨酸 (cyanoalanine) 或天门酰胺单体。生物信息学分析表明, 由于核心基序的低序列保守性, NRPS-2 很可能不具有传统 A 结构域的功能。因此, Cociancich 等<sup>[15]</sup>认为 L-Cya-3 的加入是由 AlbIV 蛋白的 NRPS-2\* 模块负责的 (图 1A), 该模块起反式作用, 类似于博来霉素 (bleomycin) 的生物合成<sup>[48]</sup>。Cociancich 等<sup>[15]</sup>假设了一个通过 NRPS-2\* 激活和原位加工 L-天冬酰胺为氰-L-丙氨酸的两步方案: 将天冬酰胺的  $\alpha$ -羧酸部分进行腺苷化, 并以硫酯结合在 T2 域进行存储和侧链酰胺氧的磷酸化。随后的去磷酸化导致水分子的正式消除, 从而形成氰-L-丙氨酸, 然后连接到生长的肽链。

接下来的步骤包括通过 NRPS-3 (AlbI) 激活和结合 pABA-4, 这与 NRPS-3 模块 A 结构域的体外底物特异性一致。最后, NRPS-4 和 NRPS-5 (AlbIX) 模块将 pMBA-5 和 pMBA-6 结合到生长的肽链上, NRPS-5 的硫酯酶域 (TE 域) 介导了白条素的释放。NRPS-1 和 NRPS-3 (AlbI) 直接使用 pABA 作为底物, 但实验数据表明, NRPS-4 和 NRPS-5 (AlbIX) 优先激活底物 2-和 3-羟基-pABA, 而不是 pMBA, 虽然 pMBA 是最终组成白条素的成分。因此, 作者推测苯甲酰辅酶 A 类加氧酶 AlbXII 对 pABA 进行羟基化预先形成 3-羟基-pABA (pAHBA)。随后激活的 pAHBA 连接到 NRPS-4 或 NRPS-5 的 T 结构域后, 很可能通过  $\beta$ -羟化酶 AlbVIII 和甲基转移酶 AlbII 分别进行羟化和甲基化, 进而加工成 pMBA。

由于 *X. albilineans* 生产白条素的能力有

限, 需要采取其他措施来提高白条素的产量, 以实现其临床潜力。随着 *X. albilineans* 全基因组的测序和白条素生物合成簇的鉴定, 将白条素进行异源表达得到实施。2007 年, Vivien 等将整个白条素生物合成基因簇转移到 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), 白条素在 *Xav* 中的产量比在 *X. albilineans* 增加了 6 倍, 提供了一种有前景的工业化大量生产策略<sup>[12]</sup>。与 *X. albilineans* 相比, 异源寄主的优势在于快速生长, 并且易于进行遗传修饰。

## 6 白条素化学合成途径及改造

2015 年, Kretz 等采用汇聚式全合成法合成白条素<sup>[49]</sup>。在此策略下, 首先合成 3 个不同的白条素片段: ① N 端香豆酸 (MCA-1)、② 对氨基苯甲酸和 Boc-Asn-OH 起始的中心三肽 (pABA-2-Cya-3-pABA-4) 和 ③ 由邻香草醛 (*ortho*-vanillin) 起始的 C 端二肽 (pMBA-5 和 pMBA-6)。中心三肽通过固体光气 (triphosgene, BTC) 介导偶联到 C 端二肽, 形成五肽; 然后, 经过 BTC 介导的定量耦合 N 端香豆酸、整体烯丙基去保护等环节, 最终形成白条素。化学合成的白条素抑菌活性与天然白条素基本一致 ( $IC_{50}$ : 40 nmol/L), 该合成方案为进一步分析其药物性质提供了克数量级规模的白条素<sup>[50]</sup>。

白条素显著的活性, 特别是对革兰氏阴性细菌的活性, 使其成为一种有前途的抗菌药物先导化合物<sup>[51]</sup>。开展白条素的构效关系研究是深入了解其结构特征/基团如何影响回旋酶抑制能力、抗菌活性和病原菌克服耐药性的关键。同时, 天然白条素的结构和化学合成法为研发生物活性更高的白条素衍生物提供了可能<sup>[52]</sup>。

Kerwat 等合成了 14 个白条素衍生物, 主要研究了白条素 N 端结构发生肉桂酰、苯丙酰和苯甲酰残基变化时对体外回旋酶抑制程度、最

低抑制浓度的影响<sup>[53]</sup>。苯甲酰 N 端对位取代衍生物表现出最强的活性，而短 N-乙酰化衍生物的活性显著降低。另外，白霉素的 N 端肉桂酰部分易发生 E/Z 光化学异构化。新形成的 Z 异构体的抑菌活性明显降低，阻碍了白霉素及其有效衍生物的开发和生物学评价。因此，Behroz 等合成了 13 个 N 端二肽发生变化的新白霉素衍生物，用于筛选光化学稳定、高活性的白霉素类似物。生物活性分析显示二芳基炔类似物表现出几乎未减弱的抗菌功效。因此，这个支架为设计一种基于白霉素的有效药物提供思路<sup>[10]</sup>。

为了研究白霉素作为抗生素的药效结构区，Grätz 等合成了中心氨基酸变异的衍生物，用不同的氨基酸修饰白霉素的中心氨基酸，以确定电荷、手性和位阻效应对抗菌活性的影响<sup>[54]</sup>。结果表明，侧链不带电的衍生物保留了抗菌活性，而带电氨基酸残基的加入则显著降低了抗菌活性；在新合成的衍生物中，苏氨酸衍生物最有可能提高白霉素活性。这些信息将有助于开发白霉素的特性，使其更接近药物结构。

另外，白霉素的唯一立构中心是一个不寻常的 L-氰丙氨酸 (Cya-3 模块)，研究发现它易于水解。Behroz 等利用氮杂组氨酸 (azahistidine) 取代先前不稳定的氰丙氨酸作为中心氨基酸，降低了水解敏感性，形成一种新的先导结构——氮杂组氨酸白霉素 (azahistidine albicidin/azaHis-albicidin)。与白霉素天然产物相比，该先导物显示出优越的抗菌活性和化学稳定性，可用于进一步的类似物合成<sup>[8]</sup>。来自分散泛菌 (*Pantoea dispersa*) 的内肽酶 AlbD 可以切割白霉素构造块 pABA-4 和 pMBA-5 之间的中央酰胺键，产生片段 MCA-pABA-L-Cya-pABA 和片段 pMBA-pMBA，从而消除其抗菌活性<sup>[55]</sup>。在新的先导结构——氮杂组氨酸白霉素基础上，Behroz 等合成了 26 个新的白霉素衍生物，对白

霉素 C 端二肽进行了系统的构效关系研究<sup>[8]</sup>，发现在模块 pABA-4 和 pMBA-5 之间的三唑酰胺键电子等排体 (triazole amide bond isostere) 是一个可行的结构基序，可以克服蛋白酶 AlbD 的切割作用，消除其赋予的耐药性，同时保持生物活性<sup>[56]</sup>。Kleebauer 等合成并评价了 6 个关键酰胺连接的等位取代类似物，使其保持抗菌活性的同时，克服了 AlbD 带来的耐药性，其中 3 个类似物的活性最高可达天然白霉素的 8 倍，极大地提高白霉素作为药物应用的可能性<sup>[57]</sup>。

Zborovsky 等系统地将先导结构——氮杂组氨酸白霉素 (称为化合物 2) 分子式中每个构造块的苯基 (phenyl) 替换为吡啶基 (pyridyl)，并进行了构效关系测试<sup>[28]</sup>。其中用吡啶基取代构造块 D (即 pABA-4) 的苯基环，得到一种新型白霉素衍生物 (化合物 7)。由于分子内氢键的作用，吡啶基取代苯基使白霉素的主链变得更平面化，这有利于白霉素的体内活性。该化合物对引起人和动物疾病的所有革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有良好的抗菌活性，包括 *E. coli* DSM 1116 菌株 (MIC≤0.016 μg/mL)、*S. typhimurium* TA100 菌株 (MIC≤0.016 μg/mL)、*B. subtilis* DSM10 菌株 (MIC=0.063 μg/mL)、*M. luteus* DSM1790 菌株 (MIC=0.031 μg/mL)、和 *M. phlei* DSM 7500 菌株 (MIC=0.25 μg/mL)。另外，化合物 7 在 50%人血浆中对大肠杆菌 DSM 1116 菌株的 MIC 值为 0.5 μg/mL，表现出最强的活性，优于其他所有候选分子。利用化合物 7 对临床分离的耐环丙沙星病原体进行抗菌谱分析，结果表明化合物 7 同样具有出色的活性，包括 CIP 耐药菌株 *E. coli* (MIC=0.016 μg/mL，比化合物 2 高出 4 倍)，肯塔基沙门氏菌 *S. kentucky* (MIC=0.016 μg/mL，比化合物 2 高出 8 倍)，金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (MIC=0.063 μg/mL，比化合物 2 高出

8 倍) 和鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* (MIC=0.016  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 比化合物 2 高出 125 倍)。在一些革兰氏阴性细菌如 *A. baumannii*, 有一些菌株对目前所有可用的抗生素都具有耐药性的背景下<sup>[58]</sup>, 化合物 7 有望成为一种对抗超级细菌新型抗生素药物的先导结构。

## 7 总结与展望

本课题组前期研究结果表明, 目前广西、广东、海南、福建等地区均有甘蔗白条病发生, 该病害已对我国甘蔗产业构成严重的潜在威胁, 有效控制白条病的发生和流行是当前亟待解决的重大科学和生产实际问题<sup>[59]</sup>。与其他黄单胞菌相比, *X. albilineans* 基因组显示出与众不同的特征, 缺失两类在其他植物病原黄单胞菌中起决定作用的致病性因子: 黄原胶生物合成基因簇和 III 型分泌系统 *hrp* 基因<sup>[60]</sup>。目前, *X. albilineans* 是唯一产生植物毒素——白条素的黄单胞菌; 同时, 白条素是其唯一已知的致病性因子, 可阻止甘蔗叶绿体分化, 导致出现白条病症状。因此, 病原细菌如何将白条素转运入植物、白条素是否与其他致病因子存在协同作用、白条素在植物中是否有其他靶点是值得关注的科学问题。明确白条素在 *X. albilineans* 中的全部功能, 将会为开发针对甘蔗白条病安全有效的新型药剂提供特异性靶标。

由于白条素是一种有效的 DNA 回旋酶抑制剂, 其对大肠杆菌等人体病原菌的抑制浓度明显低于目前临床使用的 DNA 回旋酶抑制剂, 可以将这些白条素制成用于预防或治疗人和动物细菌感染的化合物或剂型。剂型可以是经肠给药, 如鼻腔、口腔、直肠、皮肤或口服给药, 也可以是吸入剂型或栓剂。另外, 也可以使用非肠道给药, 如皮下、静脉、肝内或肌肉注射形式。必要时, 可以使用药物兼容性的载体和/

或辅药<sup>[50]</sup>。作为 DNA 回旋酶抑制剂, 白条素影响植物质体的分化, 所以白条素相关抗生素不可用于农作物。在抗生素使用过程中, 注意回收废旧包装、过期药品等, 以免对周围环境造成影响。

近年来, 白条素生物合成所有关键酶基因和特征的阐明, 为利用生物技术、分子生物学和合成生物学相结合的方法构建微生物发酵工厂生产白条素奠定了基础。根据 NRPS 模块化的结构特点和催化功能, 研究者能够有目的地改造 NRPS, 合成新型白条素, 并用于药物筛选, 也可以尝试在大肠杆菌、酵母等模式微生物中重构以 NRPS 为核心的非核糖体肽生物合成途径, 从而简化生产白条素所需的菌株发酵和产物纯化过程<sup>[61]</sup>。未来提高白条素产量的进一步修改可考虑以下几个方面: 添加组成型启动子以期上调转录水平; 优化密码子用来提高翻译水平; 添加白条素外排泵以提高白条素分泌水平。

此外, 由于全球耐抗生素细菌日益增加, 在应用新的抗生素之前, 明确细菌对白条素的耐药机制十分必要, 以避免可能导致耐药菌的进化升级。一方面, 利用细菌对抗生素的耐药机制, 挖掘微生物体内抗白条素的相关基因, 通过转基因技术则能使植物对白条素产生抗性, 例如由于内肽酶 AlbD 可以裂解白条素消除其抗菌活性, 将 *albD* 基因转入甘蔗获得的转基因植株能够减轻甘蔗白条病的症状表现及田间危害程度<sup>[62]</sup>。另一方面, 明确病原细菌所采用的耐药策略和分子机制也是研发人和动物新型抗生素的必要条件, 如 Behroz 和 Kleebauer 分别报道了既可以克服 AlbD 耐药性又可以保存生物活性的白条素衍生物<sup>[56-57]</sup>。因此, 挖掘不同机制对白条素的解毒基因, 也是未来研究的一个方向。

## REFERENCES

- [1] Rott P, Davis MJ. Leaf scald. In: a guide to sugarcane diseases. Montpellier, France: CIRAD/ISSCT; 2000: 38-44.
- [2] 孟建玉, 张慧丽, 林岭虹, 等. 甘蔗白条病及其致病菌 *Xanthomonas albilineans* 研究进展. 植物保护学报, 2019, 46(2): 257-265.
- Meng JY, Zhang HL, Lin LH, et al. Research advances in sugarcane leaf scald disease and its causal agent *Xanthomonas albilineans*. J Plant Prot, 2019, 46(2): 257-265 (in Chinese).
- [3] Birch RG, Patil SS. The relation of blocked chloroplast differentiation to sugarcane leaf scald disease. Phytopathology, 1983, 73(10): 1368-1374.
- [4] Birch RG, Patil SS. Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Physiol Mol Plant P, 1987, 30(2): 199-206.
- [5] Birch RG. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. Mol Plant Pathol, 2001, 2(1): 1-11.
- [6] Pieretti I, Cociancich S, Bolot S, et al. Full genome sequence analysis of two isolates reveals a novel *Xanthomonas* species close to the sugarcane pathogen *Xanthomonas albilineans*. Genes, 2015, 6(3): 714-733.
- [7] Von Eckardstein L, Petras D, Dang T, et al. Total synthesis and biological assessment of novel albicidins discovered by mass spectrometric networking. Chem-Eur J, 2017, 23(61): 15316-15321.
- [8] Behroz I, Durkin P, Grätz S, et al. Extensive structure-activity relationship study of albicidin's C-terminal dipeptidic p-aminobenzoic acid moiety. Chem-Eur J, 2019, 25(72): 16538-16543.
- [9] Tommasi R, Iyer R, Miller AA. Antibacterial drug discovery: some assembly required. ACS Infect Dis, 2018, 4(5): 686-695.
- [10] Behroz I, Kleebauer L, Hommernick K, et al. Acetylenic replacement of albicidin's methacrylamide residue circumvents detrimental E/Z photoisomerization and preserves antibacterial activity. Chem-Eur J, 2021, 27(35): 9077-9086.
- [11] Hashimi SM. Albicidin, a potent DNA gyrase inhibitor with clinical potential. J Antibiot, 2019, 72(11): 785-792.
- [12] Vivien E, Pitorre D, Cociancich S, et al. Heterologous production of albicidin: a promising approach to overproducing and characterizing this potent inhibitor of DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1549-1552.
- [13] Birch R G, Patil S S. Antibiotic and process for the production thereof: US, 4525354. 1985-6-25.
- [14] Birch RG, Patil SS. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol, 1985, 131(5): 1069-1075.
- [15] Cociancich S, Pesic A, Petras D, et al. The gyrase inhibitor albicidin consists of p-aminobenzoic acids and cyanoalanine. Nat Chem Biol, 2015, 11(3): 195-197.
- [16] Royer M, Costet L, Vivien E, et al. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. Mol Plant Microbe Interact, 2004, 17(4): 414-427.
- [17] Rostock L, Driller R, Grätz S, et al. Molecular insights into antibiotic resistance-how a binding protein traps albicidin. Nat Commun, 2018, 9(1): 3095.
- [18] Cho HS, Lee SS, Kim KD, et al. DNA gyrase is involved in chloroplast nucleoid partitioning. Plant Cell, 2004, 16(10): 2665-2682.
- [19] Corbett KD, Berger JM. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2004, 33: 95-118.
- [20] Wall MK, Mitchenall LA, Maxwell A. *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. PNAS, 2004, 101(20): 7821-7826.
- [21] McFadden GI, Roos DS. Api complexan plastids as drug targets. Trends Microbiol, 1999, 7(8): 328-333.
- [22] Birch RG, Patil SS. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. Physiol Mol Plant P, 1987, 30(2): 207-214.
- [23] Rott P, Fleites L, Marlow G, et al. Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. Mol Plant Microbe Interact, 2011, 24(5): 594-605.
- [24] Renier A, Vivien E, Cociancich S, et al. Substrate specificity-conferring regions of the nonribosomal peptide synthetase adenylation domains involved in albicidin pathotoxin biosynthesis are highly conserved within the species *Xanthomonas albilineans*. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(17): 5523-5530.
- [25] Bostock JM, Huang G, Hashimi SM, et al. A *DHA14*

- drug efflux gene from *Xanthomonas albilineans* confers high-level albicidin antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*, 2006, 101(1): 151-160.
- [26] Hashimi SM, Wall MK, Smith AB, et al. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(1): 181-187.
- [27] Hashimi SM, Huang G, Maxwell A, et al. DNA gyrase from the albicidin producer *Xanthomonas albilineans* has multiple-antibiotic-resistance and unusual enzymatic properties. *Antimicrob Agents Ch*, 2008, 52(4):1382-1390.
- [28] Zborovsky L, Kleebauer L, Seidel M, et al. Improvement of the antimicrobial potency, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of albicidin by incorporation of nitrogen atoms. *Chem Sci*, 2021, 12(43): 14606-14617.
- [29] Rott PC, Costet L, Davis MJ, et al. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J Bacteriol*, 1996, 178(15): 4590-4596.
- [30] Vivien E, Megessier S, Pieretti I, et al. *Xanthomonas albilineans* HtpG is required for biosynthesis of the antibiotic and phytotoxin albicidin. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 251(1): 81-89.
- [31] Huang G, Zhang L, Birch RG. Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. *Gene*, 2000, 258(1/2): 193-199.
- [32] Hashimi SM, Birch RG. Functional analysis of genes for benzoate metabolism in the albicidin biosynthetic region of *Xanthomonas albilineans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(4): 1475-1485.
- [33] Huang G, Zhang L, Birch RG. Analysis of the genes flanking xabB: a methyltransferase gene is involved in albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. *Gene*, 2000, 255(2): 327-333.
- [34] Huang GZ, Zhang LH, Birch RG. A multifunctional polyketide-peptide synthetase essential for albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology (Reading)*, 2001, 147(Pt 3): 631-642.
- [35] Williams GJ. Engineering polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23(4): 603-612.
- [36] Garces FF, Gutierrez A, Hoy JW. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. *Plant Dis*, 2014, 98(1): 121-126.
- [37] Konz D, Klens A, Schörgendorfer K, et al. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol*, 1997, 4(12): 927-937.
- [38] Brady SF, Chao CJ, Clardy J. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(34): 9968-9969.
- [39] Zhang JH, Quigley NB, Gross DC. Analysis of the *syrP* gene, which regulates syringomycin synthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2771-2778.
- [40] Kagan RM, Clarke S. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 310(2): 417-427.
- [41] Petras D, Kerwat D, Pesic A, et al. The O-carbamoyl-transferase Alb15 is responsible for the modification of albicidin. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(5): 1198-1204.
- [42] Martín MF, Liras P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol*, 1989, 43: 173-206.
- [43] Mazurek L, Ghilarov D, Michalczyk E, et al. Pentapeptide repeat protein QnrB1 requires ATP hydrolysis to rejuvenate poisoned gyrase complexes. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(3): 1581-1596.
- [44] Mensi I, Daugrois JH, Pieretti I, et al. Surface polysaccharides and quorum sensing are involved in the attachment and survival of *Xanthomonas albilineans* on sugarcane leaves. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17(2): 236-246.
- [45] Walsh CT, Gehring AM, Weinreb PH, et al. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthetases. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1(3): 309-315.
- [46] Champoiseau P, Daugrois JH, Girard JC, et al. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*, 2006, 96(1): 33-45.
- [47] Zhang HL, Ntambo MS, Rott PC, et al. Complete genome sequence reveals evolutionary and comparative genomic features of *Xanthomonas albilineans* causing sugarcane leaf scald. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 182.

- [48] Du LC, Sánchez C, Chen M, et al. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Cell Chem Biol*, 2000, 7(8): 623-642.
- [49] Kretz J, Kerwat D, Schubert V, et al. Total synthesis of albicidin: a lead structure from *Xanthomonas albilineans* for potent antibacterial gyrase inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(6): 1969-1973.
- [50] Süssmuth R, Kretz J, Schubert V, et al. Albicidin derivatives, their use and synthesis. US, WO2014125075. 2014-08-21.
- [51] Dang T, Süssmuth RD. Bioactive peptide natural products as lead structures for medicinal use. *Accounts Chem Res*, 2017, 50(7): 1566-1576.
- [52] Süssmuth R, Gratz S, Behroz I, et al. Albicidin derivatives, their use and synthesis. US, 2021017229, 2021-01-21.
- [53] Kerwat D, Grätz S, Kretz J, et al. Synthesis of albicidin derivatives: assessing the role of N-terminal acylation on the antibacterial activity. *ChemMedChem*, 2016, 11(17): 1899-1903.
- [54] Grätz S, Kerwat D, Kretz J, et al. Synthesis and antimicrobial activity of albicidin derivatives with variations of the central cyanoalanine building block. *ChemMedChem*, 2016, 11(14): 1499-1502.
- [55] Vieweg L, Kretz J, Pesic A, et al. The albicidin resistance factor AlbD is a serine endopeptidase that hydrolyzes unusual oligoaromatic-type peptides. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(24): 7608-7611.
- [56] Seedorf T, Kirschning A, Solga D. Natural and synthetic oligoarylamides: privileged structures for medical applications. *Chem-Eur J*, 2021, 27(26): 7321-7339.
- [57] Kleebauer L, Zborovsky L, Hommernick K, et al. Overcoming AlbD protease resistance and improving potency: synthesis and bioactivity of antibacterial albicidin analogues with amide bond isosteres. *Org Lett*, 2021, 23(18): 7023-7027.
- [58] Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 371-387.
- [59] Lin LH, Ntambo MS, Rott PC, et al. Molecular detection and prevalence of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, in China. *Crop Prot*, 2018, 109: 17-23.
- [60] Pieretti I, Royer M, Barbe V, et al. Genomic insights into strategies used by *Xanthomonas albilineans* with its reduced artillery to spread within sugarcane xylem vessels. *BMC Genomics*, 2012, 13: 658.
- [61] 王辰, 徐玉泉. 非核糖体肽合成酶工程改造研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1845-1857.  
Wang C, Xu YQ. Advances in engineering non-ribosomal peptide synthetase. *Chin J Biotech*, 2021, 37(6): 1845-1857 (in Chinese).
- [62] Zhang L, Xu J, Birch RG. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 1021-1024.

(本文责编 郝丽芳)