

纳他霉素的分子生物学研究进展*

邬建国 王敏**

(天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)

摘要: 纳他霉素是一种多烯大环内酯类抗真菌抗生素, 广泛用于食品防腐。通过综述纳他霉素分子生物学的研究进展, 揭示了纳他霉素的生物合成基因簇, 包括纳他霉素 26 元环的形成基因 (*pimS0-pimS4*) 和修饰基因共 16 个可读框架, 并对其编码的蛋白质 PKS、PimD、PimJ、PimK 的功能作了较为详细的论述。

关键词: 纳他霉素, 生物合成, 基因簇, 聚酮合成酶

中图分类号: Q939.1.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0120-04

PROGRESS IN MOLECULAR BIOLOGY OF NATAMYCIN

WU Jian-Guo WANG Min

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)

Abstract: Natamycin is a polyene macrolide antifungal antibiotic, which is widely used in the food industry in order to prevent mould contamination. Biosynthesis gene cluster of natamycin is discovered by the overall of progress in molecular biology of natamycin, including 16 open reading frames which includes the gene for 26-member ring formation of natamycin (*pimS0-pimS4*) and the modifying genes, and the function of the protein including polyketide synthases (PKSs), PimD, PimJ, PimK were studied.

Key words: Natamycin, Biosynthesis, Gene cluster, Polyketide synthase (PKS)

1 前言

纳他霉素 (natamycin), 又称匹马菌素 (pimaricin), 分子式为 $C_{33}H_{47}NO_{13}$, 是一种大环内酯类抗生素, 具有 26 个 C 原子的内酯环, 内含 4 个共轭双键的多烯发色团, 环外有一个海藻氨基糖。纳他霉素具有抗真菌活性, 而无抗细菌活性, 关键在于真菌细胞质膜上含有甾醇。纳他霉素的抑菌作用机制为: 纳他霉素分子的疏水部分即大环内酯的双键部分以范德华力和整个甾醇分子结合, 形成抗生素-甾醇复合物, 破坏细胞质膜的渗透性; 分子的亲水部分即大环内酯的多醇部分则在膜上形成水孔, 损伤膜的通透性, 从而引起菌内氨基酸、电解质等重要物质渗出而死亡^[1]。

纳他霉素作为一种抗真菌剂, 是国际上被美国 FDA 正式批准的仅有的两种生物防腐剂之一 (另一种是 Nisin, 具有抑制细菌活性, 二者抑菌谱互补), 目前在全世界 30 多个国家被广泛用于食品防腐, 以抑制食品 (如: 奶酪、腊肠、饲料等) 霉菌及酵母菌的生长, 因此相关纳他霉素的应用专利不断出现。纳他霉素产生菌作为一种链霉菌, 因其复杂的生活周期 (包括分化及孢子形成^[2]等) 和次级代谢网络, 对其分子生物学的研究不但具有应用价值, 也具有重要的理论意义。本文阐述了纳他霉素产生菌纳塔

* 天津市自然科学基金资助项目 (No. 013609511)

** 联系人 Tel: 022-28193580, E-mail: WangMintj@Yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-09-20, 修回日期: 2002-11-18

尔链霉菌 (*Streptomyces natalensis*) 近年来的分子生物学研究进展。

2 纳他霉素合成基因簇及其功能

Apricio J. F^[3,4] 等人使用 *Streptomyces natalensis* ATCC 27448 粘粒文库 (cosmid library) 和起始于 *pimS0* 的 DNA 片段, 通过基因组步移方法 (genomic walking) 对纳他霉素生物合成簇进行了鉴定, 85kb 的连续 DNA 顺序被测定, 相关基因见图 1, GC 含量分析为 72.8%, 接近链霉菌平均 GC 含量 73%。计算机分析可知, 该基因簇含有 16 个潜在可读框架 (ORFs), 其中包括 5 个聚酮合成酶 (PKS) 基因 (*pimS0-pimS4*)。这些基因的相关功能列于表 1。

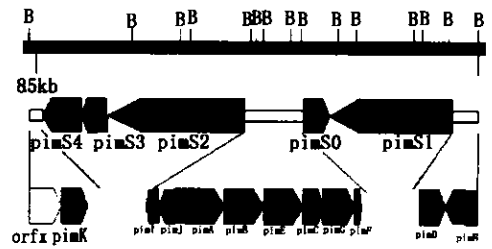


图 1 纳他霉素生物合成基因簇 (Apricio、Fouces 等, 2000^[4])

计算分析可知, 该基因簇含有 16 个潜在可读框架 (ORFs), 其中包括 5 个聚酮合成酶 (PKS) 基因 (*pimS0-pimS4*)。这些基因的相关功能列于表 1。

表 1 纳他霉素生物合成基因簇 ORFs 及结构域

ORFs	多肽	氨基酸	PKS	结构域					
<i>pimS0</i>	PIMS0	1847	PKS						
	loading 组件 0			KS*	Ata				ACP
<i>pimS1</i>	PIMS1 组件 1	6797	PKS	KS	Ata		KR		ACP
	组件 2			KS	Ata	DH	KR		ACP
	组件 3			KS	Ata	DH	KR		ACP
	组件 4			KS	Ata	DH	KR		ACP
<i>pimS2</i>	PIMS2 组件 5	9507	PKS	KS	Ata	DH	KR		ACP
	组件 6			KS	Ata		KR		ACP
	组件 7			KS	Atb		KR		ACP
	组件 8			KS	Ata		KR		ACP
	组件 9			KS	Ata		KR*		ACP
	组件 10			KS	Ata		KR		ACP
<i>pimS3</i>	PIMS3 组件 11	1808	PKS	KS	Ata	DH	KR		ACP
<i>pimS4</i>	PIMS4 组件 12	2024	PKS	KS	Ata	DH	KR		ACP TE
<i>pimA</i>	PimA	602			转运 ABC				
<i>pimB</i>	PimB	626			转运 ABC				
<i>pimC</i>	PimC	352			氨基转移酶				
<i>pimD</i>	PimD	397			细胞色素 P-450 单氧化酶				
<i>pimE</i>	PimE	549			胆固醇氧化酶				
<i>pimF</i>	PimF	63			铁氧还蛋白				
<i>pimG</i>	PimG	398			细胞色素 P-450 单氧化酶				
<i>pimH</i>	PimH	432			流量泵				
<i>pimI</i>	PimI	255			硫酸酶				
<i>pimJ</i>	PimJ	343			糖脱氢酶				
<i>pimK</i>	PimK	458			糖基转移酶				

*: 表示虽有该结构域, 但无催化活性

除以上 16 个 ORFs 之外, 还有一个 ORF (*orfX*), 其功能不详。

通过对 *pimS0-pimS4* 密码子第 3 位 GC 含量分析比较, 发现 *pimS2* 的 GC 含量为 88.6% ~ 93.5%, 远高于其它的 PKS 基因。由此推测 *pimS2* 源于另一个不同的基因。因此, 可推测纳他霉素生物合成基因是通过不同菌株 PKS 基因集合而成的。

3 纳他霉素内酯环的形成

聚酮合成酶 (PKS) 是一类多功能酶, 涉及到一些重要聚酮化合物的生物合成^[7,8]。

根据基因序列和组成蛋白质的空间构象, PKS可分为组件型(PKS-1)和重复型(PKS-2)两大类。其中PKS-1通过乙酸、丙酸和丁酸的缩合构筑大环聚酮。在延长聚酮生长链时, 每导入一个羧酸单位就包括脂肪酸生物合成的一个完整循环所需要的所有反应, 其功能性亚基包括酰基载体蛋白(ACP)、酰基转移酶(AT)、酮酰基载体蛋白合成酶(KS)、酮基还原酶、脱水酶(DH)和烯酰还原酶等, 还包括终止聚酮链延长和环化的大环聚酮所需要的硫酯酶(TE)。而PKS-2主要从乙酸单位合成多环芳香族聚酮, 但形成的羰基一般不还原。

表2 聚酮合酶PKSs的功能

	多肽	前体物	催化功能
PIMS0	组件0	乙酸	起子
PIMS1	组件1	乙酸	形成 C ₂₄ -C ₂₃
	组件2	乙酸	形成 C ₂₂ -C ₂₁ , 在 C ₂₃ -C ₂₂ 形成双键
	组件3	乙酸	形成 C ₂₀ -C ₁₉ , 在 C ₂₀ -C ₂₁ 形成双键
	组件4	乙酸	形成 C ₁₈ -C ₁₇ , 在 C ₁₈ -C ₁₉ 形成双键
PIMS2	组件5	乙酸	形成 C ₁₆ -C ₁₅ , 在 C ₁₆ -C ₁₇ 形成双键
	组件6	乙酸	形成 C ₁₄ -C ₁₃
	组件7	丙酸	形成 C ₁₂ -C ₁₁ , C ₁₂ 上连有一个羧基
	组件8	乙酸	形成 C ₁₀ -C ₉ , C ₉ 和 C ₁₃ 缩水形成半缩酮环
	组件9	乙酸	形成 C ₈ -C ₇
	组件10	乙酸	形成 C ₆ -C ₅
PIMS3	组件11	乙酸	形成 C ₄ -C ₃ , 在 C ₄ -C ₃ 形成双键, 将被氧化形成一个环氧
PIMS4	组件12	乙酸	形成 C ₂ -C ₁ , 在 C ₂ -C ₁ 形成双键, 结束链的延伸

纳他霉素含有大环内酯, 其骨架环的形成由PKS-1催化完成。PKS包括PIMS0、PIMS1、PIMS2、PIMS3、PIMS4, 分别由 *pimS0*、*pimS1*、*pimS2*、*pimS3* 和 *pimS4* 基因编码^[4], 其中PIMS0作为一个转载蛋白, 主要作为第2个PKS亚基的引子。PIMS1包括4个组件(组件1-组件4), 分别

负责纳他霉素生物合成骨架链延长的4个循环, 并形成了部分多烯发色团——共轭双键(由组件2-组件4存在的DH域完成)。在 *pimS0* 上游10567bp, 发现了 *pimS2*, 编码PIMS2, 包括6个组件(组件5-组件10)。组件5含有DH域, 与组件2-组件4共同完成纳他霉素的发色团。距 *pimS2* 终止密码子下游11bp处, 即为 *pimS3*, 编码蛋白PIMS3; 在 *pimS3* 终止密码子下游35bp处为 *pimS4*, 编码蛋白PIMS4。PIMS3、PIMS4均是一个单体, 分别构成PKS多酶系统的组件11和组件12。两者均存在一个DH域, 可催化形成双键, 不同的是组件11形成的双键将会被氧化形成环氧基。因组件12存在一个特殊的硫酯酶(TE)域催化骨架延伸的结束, 在红霉素(erythromycin)^[10]、除草菌素(avermectin)^[6,11]的PKSs中也发现有类似现象。PKS具体功能见表2。

通过PKS催化11个乙酸和一个丙酸的链的缩合, 最终获得了纳他霉素的内酯环骨架, 见图2。

4 纳他霉素的修饰基因

PKS催化作用产生了纳他霉素的骨架, 与纳他霉素成熟分子比较, 还需要PKS的后修饰作用。

4.1 环氧的形成 与其它大环内酯抗生素(如红霉素、纳巴霉素(*rapamycin*)^[12])相似, 纳他霉素的内酯环也需要细胞色素P-450(cytochrome P-450)的修饰。如红霉素的 *eryF*、*eryK* 基因分别编码细胞色素P-450羟基化酶, 催化C₆、C₁₂上的羟基化反应。而在纳他霉素生物合成中, 由 *pimD* 和 *pimG* 分别编码细胞色素P-450单氧化酶, 催化C₄C₅

上的双键, 形成一个环氧^[3]。Marta V Mendes^[5]等人利用噬菌体介导的 *pimD* 基因定位中断方法获得了一突变株 *S. natalensis* 6D4, 主要产物经光谱和 HPLC 分析为脱环氧纳他霉素, 由此可知, PimD 主要催化纳他霉素骨架结构环氧部分的形成。脱环氧纳他霉素生物活性分析, 表明其抗生物活性比纳他霉素低。

4.2 糖基的形成 *pimJ* 编码的 PimJ, 其序

列与糖生物合成的酶有同源性 (>54%), 因此, *pimJ* 可能参与纳他霉素海藻糖胺糖部分的形成。而 *pimK* 与半乳糖酰和葡萄糖醛转移酶有微弱的同源性 (>26%), 也可能参与纳他霉素苷元糖部分的形成^[9]。

5 展望

将 TE 结构域融合到相应组件的羧基端或将所需组件插入到另相邻组件之间, 进而改变内酯环的大小, 以及通过在组件中增加 DH 结构域使羟基进一步还原等在红霉素基因工程中得以实现^[9], 随着纳他霉素生物合成基因簇理解的不断深入, 将积极推动采用基因工程技术提高纳他霉素生物合成能力或改造其化学结构的工作。Dan Ferber 利用基因工程使聚酮化合物在大肠杆菌中得以合成^[13], Marta V Mendes 等通过中断纳他霉素修饰基因 *pimD*, 获得了新型环氧纳他霉素。

链霉菌在生产抗生素方面的特殊作用使它成为放线菌分子生物学研究的核心。近年来的研究热点主要集中在链霉菌形态分化基因的研究^[14]、转移质粒的构建^[2,15]及基因转移方法的改进(如原生质体转化、电穿孔等)等方面, 这些工作的研究必将推动抗生素产量的不断提高和新型抗生素的发现。

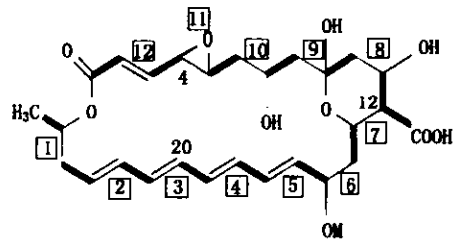


图2 纳他霉素的内酯环骨架 (Aparico、Colina 等, 1999^[3])

参考文献

- [1] 甘 亚. 国外医药抗生素分册, 1998, 19 (6): 460~465.
- [2] Marta V M, Aparicio J F, Martin J F. Plasmid, 2000, (43): 159~165.
- [3] Aparicio J F, Angel J C, Elvira C, et al. J Biol Chem, 1999, (274): 10133~10139.
- [4] Aparicio J F, Roberto F, Marta V M, et al. J Biol Chem, 2000, 895~905.
- [5] Marta V M, Eliseo R, Roberto F, et al. J Biol Chem, 2001, 635~644.
- [6] 孙宇晖, 邓子新. 国外医药抗生素分册, 2001, 22 (3): 108~112.
- [7] Campelo A B, Gil J A. Microbiology, 2002, (148): 51~59.
- [8] Donadio S, Staver M J, McAlpine J B, et al. Science, 1991, 252 (5006): 675~679.
- [9] 张部昌, 赵志虎, 马清钧. 中国生物工程杂志, 2002, 22 (3): 40~44.
- [10] Caffrey p, Green B, Packman L C, et al. Eur J Biochem, 1991, (195): 823~830.
- [11] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1999, 9509~9514.
- [12] Aparicio J F, Mdnar I, Haydock S F, et al. Gene, 1996, 169 (1): 1~7.
- [13] Dan F. Science, 2001, 2 (291): 1683.
- [14] 聂丽平, 谭华荣. 微生物学报, 2000, 8 (40): 444~447.
- [15] 鲍 错, 胡志浩, 周秀芬, 等. 科学通报, 1995, (40): 1440.