

乳链菌肽(NISIN)生物合成的遗传控制

还连栋 陈秀珠

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

乳链菌肽(nisin)是某些乳酸链球菌产生的一个由基因编码的多肽抗生素。它对许多革兰氏阳性菌,包括利斯特氏菌属、梭菌属和芽孢杆菌属这些腐败菌和食物病原菌有强烈的抑制作用,已被 50 多个国家和地区广泛应用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品及乙醇饮料的防腐保鲜。nisin 是越来越受到人们重视的一种无毒的天然食品防腐剂。关于它的理化性质及其应用请参阅有关文章^[1-3]。本文仅就 nisin 生物合成的遗传控制作一综述。

(一) Nisin 基因是位于质粒上,还是位于染色体上*

编码 nisin 的基因是位于质粒上,还是位于染色体上?这是一个至今仍令人关注的问题。1974年,Kozak 等人^[4]报道产 nisin 的乳酸链球菌自发突变为不产 nisin 的频率为 0.03—0.82%,当将产 nisin 的菌株生长于含有原黄素(Pro)或溴乙锭(EB)的培养基中,使不产 nisin 的突变频率增加了 5.4—95 倍;用高温处理(40℃)则增加了 1.4—20 倍,NTG 诱变处理不产 nisin 的突变株,检测了数万个菌落,未得到可产 nisin 的回复突变。他们推测编码 nisin 的基因可能位于质粒上。此后,不断有质粒消除和接合转移实验支持这个论点^[5-10],并认为 nisin 产生、蔗糖发酵和 nisin 抗性是连锁的。如 Tsai 和 Sandine^[11]报道,产 nisin 的乳酸链球菌 7962 含有 6 个质粒。根据质粒消除试验,认为 nisin 的产生与 17.5MDa 质粒有关。当把 7962 与不产 nisin 的葡聚糖明串珠菌 181 作接合转移时,所得转移接合子 HT200 同时具有 nisin 产生和

nisin 抗性表型,另外还含有一个 17.5MDa 质粒。1991年,Kaletta 和 Entian^[12]从乳酸链球菌 6F3 的质粒中克隆到了编码 nisin 的结构基因。

可是,下列一些事实并不支持上述结论。① 1975年,Fuchs 等人^[13]用原黄素及溴乙锭处理产 nisin 的乳酸链球菌 49/V,得到不产 nisin 的突变株 49/V/Pro 和 49/V/EB;CsCl-EB 梯度离心分析显示这两株菌都丧失了 cccDNA。可是就在该文中还报道了这样的事实:有 2 株 nisin 产生菌根本就未检测到 cccDNA;用原黄素及溴乙锭处理含有质粒的 nisin 产生菌 51/V 获得 2 株不产 nisin 的突变株却仍含有 cccDNA。② Davey 和 Pearce^[14]的工作揭示 nisin 产生菌乳酸链球菌 H1 无质粒的衍生株仍保留了产 nisin 的能力。③ Harris 等^[15]报道产 nisin 的乳酸链球菌 NCK400 未检测到质粒 DNA。④ 在一些接合转移实验中,虽然供体菌的 nisin 产生、蔗糖发酵和 nisin 抗性的性状向受体菌转移,但在转移接合子中并未分离到质粒^[7-9]。分离供体菌、受体菌和转移接合子染色体 DNA 和质粒 DNA 分别与 nisin 基因互补的 14 寡核苷酸探针杂交,结果显示该探针与供体菌和转移接合子染色体 DNA 片段有杂交带,而与它们的质粒 DNA 没有杂交带^[16]。这些事实说明 nisin 的产生与质粒的存在与否并无必然的联系。

最近,Donkersloot 和 Thompson^[17]发现产

本文承薛禹谷教授、董可宁教授审阅,并提出宝贵意见,谨致谢意。

nisin 的乳酸链球菌 K1 的染色体缺失可导致 nisin 产生、蔗糖发酵、nisin 抗性和 N⁵-(羧乙基)鸟氨酸酶的丧失,根据杂交结果提出 nisin 结构基因与染色体上的一个可接合转移的转座子有关。Horn 等人^[18]报道,nisin 基因存在于一个称之为 Tn5301 转座子中。Tn5301 大约有 70kb,左端有一个插入序列 IS904,它可能是转座酶基因的编码区,其后是 nisin 结构基因编码区和一个未知功能的可读框(ORF)。Tn5301 的整合具有位点专一性。染色体上靶位点序列为 5'-TTTTTG-3'。Rauch 等^[19,20]在乳酸链球菌 NIZO R5 中发现一个与 nisin 产生、nisin 抗性和蔗糖发酵有关的转座子 Tn5276。它的大小也是 70kb。该转座子可从供体菌接合转移到不同的受体及一个重组突变的受体中,表明 Tn5276 的转移并不依赖于同源重组作用。Tn5276 在乳酸链球菌 MG1614 基因组中至少有 5 个插入位点,但具有方向专一性。Gireesh 等人^[21]报道,一个 68kb 的染色体片段从乳酸链球菌 DL11 接合转移到 HID113 中,转移接合子具有 nisin 产生、蔗糖发酵和对噬菌体敏感性下降表型。杂交结果显示 nisin 基因位于转移

接合子染色体不同的 Sma I 片段的不同位置上,说明 nisin 基因座是不稳定的。该发现可能为 nisin 基因倒底是在质粒上,还是在染色体上的各执己见的报道提供了一个合理的解释。

(二) Nisin 基因的结构及其 mRNA 转录物的鉴定

1988 年,马里兰大学的 Buchman 等^[22]首先克隆了编码 nisin 的基因。Kaletta 和 Entian^[12]、Dodd 等^[23]及本实验室^[24]也先后获得该基因的克隆。比较文献^[12]、^[22]和^[23]编码 nisin 的 ORF,其 DNA 序列完全一致(图 1)。该 ORF 编码一个 57 氨基酸的多肽,C-端的 34 个氨基酸与前体 nisin 的氨基酸序列完全相同,N-端的 23 个氨基酸是前导序列,它可能的功能是将 nisin 输送通过细胞壁,同时将前体分子在精氨酸和异亮氨酸残基之间切开,加工成一个成熟的 nisin。在起始密码子 ATG 之前存在一个典型的核糖体结合位点(RBS)5'-AAGGAGG-3'。在终止密码子 TAA 后不远处有一反向重复序列。但在 RBS 序列前未发现典型的启动子。

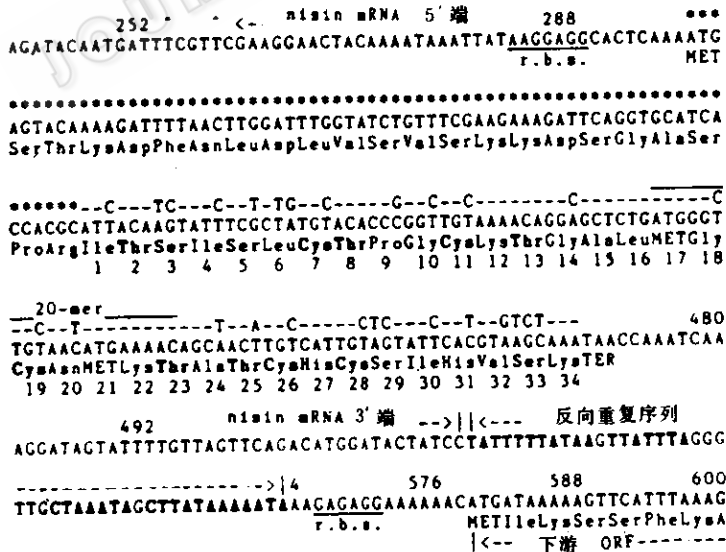


图 1 Nisin 基因的 DNA 序列及其编码的氨基酸

Mulders 等^[25,26]在乳酸链球菌 NIZO 22186 中发现了一个 nisin 天然变体(nisin

Z)。nisin 和 nisin Z 的碱基序列仅有一个核苷酸的差异(C→A),结果导致氨基酸序列上 27

位的组氨酸(His)被天冬酰胺(Asn)取代。比较两者的溶解度^[27,28]和生长抑制谱^[26]仅有微小的差异。表明 nisin 分子中这个氨基酸的改变对其功能不发生大的影响。Dodd 等^[29]采用位点定向诱变造成特定氨基酸改变的策略,进一步探查了 nisin 分子结构与功能的关系。他们发现用谷氨酰胺替代 nisin 分子中 27 位上的组氨酸得到一个工程 nisin 分子(nisA/H27Q),其特性接近 nisin Z,仍具有生物活性。他们又在 nisA/H27Q 分子上造成第二个突变,即用异亮氨酸替代 32 位上的缬氨酸,得到 nisA/H27Q, V32I,用丝氨酸替代 23 位上的苏氨酸,得到 nisA/H27Q, T23S。nisA/H27Q, V32I 仍具有生物学活性,这与 Chan 等人的报道是一致的。Chan 等人^[30]分离和鉴定了 nisin 的两个降解物,发现 nisin 分子 C-端 Dha-33 和 Lys-34 的缺失并不影响其活性。而 nisA/H27Q, T23S, 用平板扩散法未见任何活性,用菌落覆盖法仅检测到很低的活性。表明丝氨酸取代苏氨酸对功能表达造成了有害的影响。他们还将 nisin 分子的 21—34 位氨基酸造成缺失得到 nisA/ Δ 21—34,无论是用平板扩散法还是菌落覆盖法均检测不到活性。此结果与 Wakamiya 等人^[31]的报道并不一致,后者根据合成的 nisin 片段的生物学试验,表明保持 nisin 活性所具备的最基本结构是 1—19 位氨基酸残基。造成这种截然相反结果的原因尚不清楚。

已经发表的工作^[32,33]揭示 nisin 基因是一个多顺反子操纵子的一部分。该操纵子至少有 8.5kb。对编码 nisin 基因的 mRNA 转录物的体内引物延伸实验表明启动子在 nisin 基因上游至少 4kb 处。nisin 基因两端各有一个 ORF。Dodd 等^[23]将上游的 ORF 称之为 IS904,有 1241bp 长,末端有 39bp 不完全反向重复序列。该 ORF 编码一个 253 氨基酸的蛋白质,与大肠杆菌 IS2 插入因子的转座酶基因具有强烈的同源性。Steen 等^[32]详细研究了下游 ORF。它编码一个 851 氨基酸的蛋白质,与牛痘病毒中一个未知功能的“P24 非必需基因”具有最好的同源性,叶绿体中编码与膜相联系的蛋白质的

ORF 和它也有好几处同源。该 ORF 5' 端有一个核糖体结合位点,没有发现典型的启动子,它可能与 nisin 基因共同转录。3' 端有一个串联的终止密码子和一个不依赖 ρ 的转录终止子,这可能是操纵子的末端。Steen 和 Hansen^[33]认为这个多顺反子 mRNA 含有 RNA 加工信号,该加工信号可在距核糖体结合位点上游大约 25bp 处和距终止密码子下游大约 40bp 处进行切割,加工产生一个大约 267bp 长 mRNA 转录物。Nisin 转录物的半衰期大约是 7—10 分钟。

(三) Nisin 基因表达的翻译后调控

一个值得注意的事实是有人^[23]将含有 nisin 基因的质粒 pFI172 引入乳酸链球菌 MG1614 中,可是转化子 FI6016 并不产生有活性的 nisin。他们推测可能是所得克隆是不完整的,缺乏 nisin 成熟加工所需要的基因。该基因所编码的产物(或酶)可修饰 nisin 前体分子使它成为有活性的 nisin。早在 1971 年, Gross 和 Morell^[34]就搞清了 nisin 分子的全结构(图 2)。nisin 由 34 个氨基酸组成,分子量为 3510 道尔顿,含有 5 个硫桥的内环结构,其中一个为 Ala-S-Ala,称为羊毛硫氨酸,其它 4 个是 β -甲基羊毛硫氨酸。Hurst^[35]用放射性示踪物追踪细胞的生化活性,发现 nisin 的合成对一些影响蛋白质合成的抗生素,如氯霉素、嘌呤霉素和土霉素最敏感,表明 nisin 的合成机制与蛋白质合成相类似。Ingram^[36,37]用^[3H]苏氨酸和^[35S]半胱氨酸培养 nisin 产生菌,放射自显影显示放射性参入到羊毛硫氨酸和 β -甲基羊毛硫氨酸中,并证明羊毛硫氨酸和 β -甲基羊毛硫氨酸是由半胱氨酸和丝氨酸或半胱氨酸和苏氨酸形成的。nisin 分子中的另一个稀有氨基酸脱氢丙氨酸则由丝氨酸的脱水作用得到。上述研究表明由核糖体合成的 nisin 的前体蛋白质,经过脱水和形成硫环的翻译后修饰和加工,从而形成了有活性的成熟分子。这已为 nisin 的基因克隆所证实。Buchman 等^[22]及其他实验室^[12,23]对 nisin 基因的 DNA 序列分析表明成熟 nisin 分子中所含有的全部稀有氨基酸与 DNA 序列中编码丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸的位置都一一精确

对应。

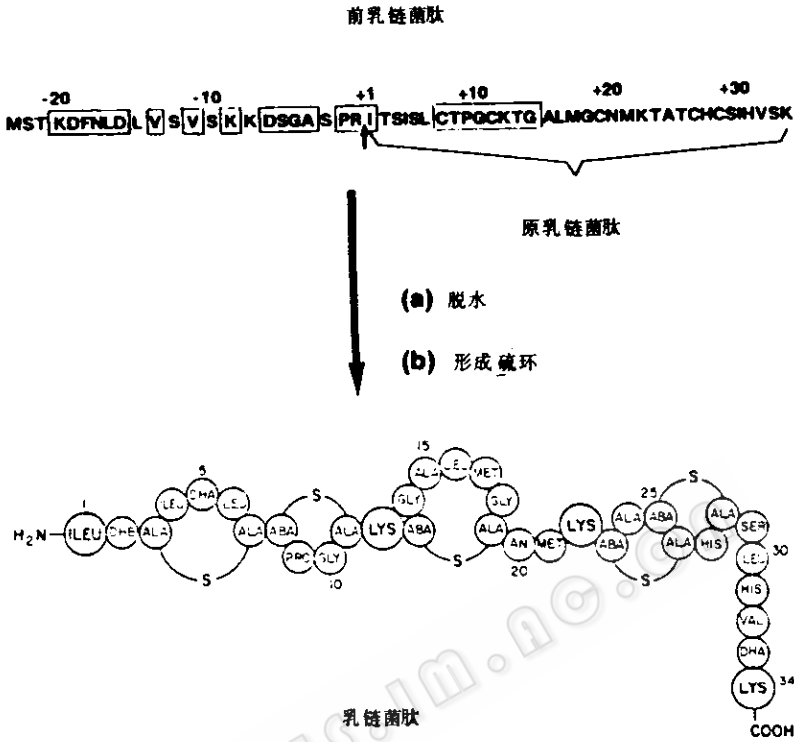


图2 Nisin前体的加工及成熟nisin分子的结构

ABA:氨基丁酸; DHA:脱氢丙氨酸; DHB; β -甲基脱氢丙氨酸;
ALA-S-ALA:羊毛硫氨酸; ALA-S-ABA; β -甲基羊毛硫氨酸

是否确实存在为翻译后修饰所需要的某种产物(很可能是一种或几种蛋白质或酶)呢? 如有这样的产物,编码该产物的基因位于染色体(质粒)的什么地方呢? 这些问题自然成了人们研究的热点。Steen等^[32]分析了nisin基因下游的ORF编码产物(851氨基酸的蛋白质)的二级结构特征。在C-端发现一个14氨基酸(AIFVPSLKLQICL)的越膜螺旋区,18个 α -螺旋分布于ORF的不同部位,螺旋大小为10-45个氨基酸残基不等,其中12个具有明显的疏水矩,以及该蛋白质与某些膜相联系的蛋白质具有同源性,表明它可能是一个附着或锚定在质膜位点上的蛋白质。

最近,Engelke等^[38]分析了nisin基因(nisA)下游的三个ORF(nisB、nisT和nisC)。

距nisA下游110bp处的ORF编码一个993氨基酸的nisB蛋白质。Western blot分析该蛋白质分子量是115kDa(理论值是117.5kDa),与SpaB^[39](26.2%)和EpiB^[40](23.6%)这两个蛋白质同源。而SpaB和EpiB分别为枯草菌素(subtilin)和表皮菌素(epidermin)生物合成所必需。nisB蛋白质含有好几个具有中极两性特征的越膜螺旋区。膜囊泡制备实验显示nisB蛋白质与膜囊泡紧密结合在一起,仅用SDS处理后才被释放出来。nisB与文献^[32]报道的一个含851氨基酸的蛋白质大小略有差异。Engelke等^[38]认为可能是测序移码所致。在nisB终止密码子后14bp处有一编码600氨基酸的nisT蛋白质(69kDa)的ORF,nisT与SpaT有很强的同源性(43.8%)。此外,与大肠杆菌溶血素的输

送蛋白质,百日咳博德特氏菌环细胞溶素的CyaB蛋白质,小鼠的多药物抗性蛋白质和与人纤维囊泡症有关的蛋白质亦有20%同源性,这些蛋白质全与多肽、多糖的分泌有关。nisC的ORF与nisT的5'端重叠,它编码一个418氨基酸的蛋白质(47.3kDa),与SpaC(25.4%)和EpiC(32.1%)蛋白质具有很高的同源性。SpaC和EpiC也分别为subtilin和epidermin的生物合成所必需。

上述研究结果表明,nisin翻译后修饰和加工有关的基因与nisin结构基因紧密连锁。nisin前体分子是由核糖体合成的,翻译后的修饰和加工是在细胞膜上进行的。当然,支持这种推测的直接证据尚有赖于遗传学和生物化学的深入研究。

(四) Nisin 基因与其它含羊毛硫氨酸抗生素基因之间的同源性

乳酸链球菌产生的nisin及枯草芽孢杆菌ATCC6633产生的枯草菌素(subtilin)^[41]和表皮葡萄球菌Tu3298产生的表皮菌素(epidermin)^[42]其结构具有高度的类似性。它们都含有脱氢丙氨酸、β-甲基脱氢丙氨酸、羊毛硫氨酸和β-甲基羊毛硫氨酸这些稀有氨基酸^[43]。比较编码这三种前体肽的DNA序列和氨基酸序列(图3),显示这些抗生素无论在核苷酸序列还是氨基酸序列水平上均有着广泛的结构同源性。表明它们可能来自于一个共同的祖先。但是又有着高度的趋异性,说明这些基因分开进化的时间已经很长了,它们之间的同源性只是为了保持其功能这个选择性压力而不得不保留其原有结构的结果。

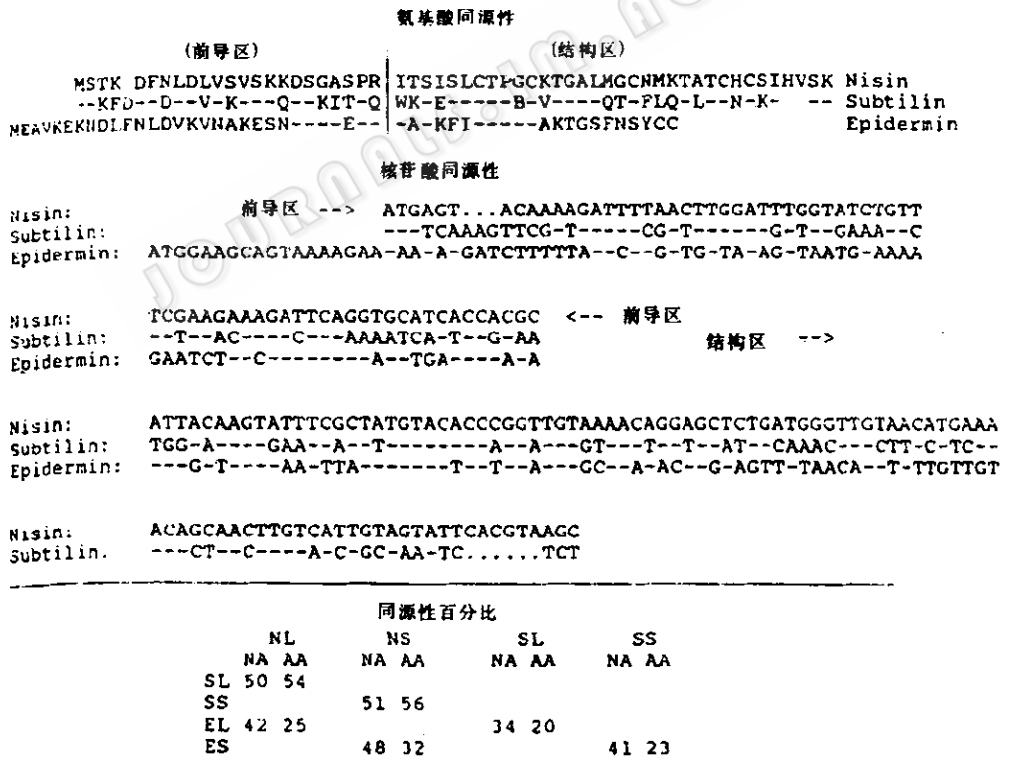


图3 Nisin与Subtilin和Epidermin的氨基酸序列和核苷酸序列同源性比较

Nisin: 乳链菌肽; Subtilin: 枯草菌素; Epidermin: 表皮菌素; AA: 氨基酸序列; NA: 核苷酸序列; NL: Nisin前导区; NS: Nisin结构区; SL: Subtilin前导区; SS: Subtilin结构区; EL: Epidermin前导区; ES: Epidermin结构区

总之, nisin 是一个由核糖体合成, 经过翻译后修饰、加工而含有稀有氨基酸的一种小肽抗生素。它是一种很有前途的天然食品防腐剂。对 nisin 生物合成遗传控制的研究不仅有其应用价值, 而且有深远的理论意义。人们一旦了解 nisin 的结构和功能的关系, 搞清翻译后修饰、加工过程, 就可定向改进 nisin 的溶解度、稳定性、扩大抑菌活性谱, 从而拓宽 nisin 的应用范围。成熟的 nisin 分子是一个含 34 个氨基酸的小肽, 加之它的独特结构, 是用于建立蛋白质工程研究模式系统的一个令人感兴趣的目标基因。彻底搞清了 nisin 翻译后加工的过程及其有关基因和基因产物, 人们就可随心所欲地将一些稀有氨基酸引入正常蛋白质中, 以试验这些正常蛋白质是否获得新的特殊功能。我们满怀信心地相信, 这一天一定会到来, 而且为期不远了。

参 考 文 献

- Broughton J D; *Food Technology*, **44**:100, 1990.
- 陶勇; *食品科学*, **134**:53, 1991.
- 薛禹谷; *干旱区研究*, **9**:49, 1992.
- Kozak W et al.; *J. Gen. Microbiol.*, **83**:295, 1974.
- LeBlanc D J et al.; In "Plasmids and Transposons, Environmental Effects and Maintenance Mechanisms" (Stuttard C & K P Rozee Eds.) Academic Press, Inc., New York, p. 31, 1980.
- McKay L L & K A Baldwin; *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**:68, 1984.
- Gasson M J; *FEMS Microbiol. Lett.*, **21**:7, 1984.
- Gonzalez C F & B S Kunka; *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**:627, 1985.
- Steele J & L L McKay; *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**:57, 1986.
- Lee K W et al.; *Korean J. Animal Science*, **33**:673, 1991.
- Tsai H-J & W E Sandine; *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**:352, 1987.
- Kaletta C & K D Entian; *J. Bacteriol.*, **171**:1597, 1989.
- Fuchs P G et al.; *J. Gen. Microbiol.*, **88**:189, 1975.
- Davey G P & L E Pearce; In "Microbiology-1982" (Schlessinger D Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D. C. p. 221, 1982.
- Harris L J et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:1477, 1992.
- Broadbent J R & J K Kondo; *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:517, 1991.
- Donkersloot J A & J Thompson; *J. Bacteriol.*, **172**:4122, 1990.
- Horn N et al.; *Mol. Gen. Genet.*, **228**:129, 1991.
- Rauch P J G et al.; *Nucl. Acids Res.*, **18**:4253, 1990.
- Rauch P J G & W M De Vos; *J. Bacteriol.*, **174**:1280, 1992.
- Gireesh T et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:1670, 1992.
- Buchman G W et al.; *J. Biol. Chem.*, **263**:16260, 1988.
- Dodd H M et al.; *J. Gen. Microbiol.*, **136**:555, 1990.
- 还连栋等; 全国食品添加剂通讯, **7**:1, 1991.
- Mulders J W M et al.; *Eur. J. Biochem.*, **201**:581, 1991.
- Graeffe T et al.; In "Nisin and Novel Lantibiotics" (Jung G & H-G Sahl Eds.) ESCOM, Leiden, The Netherlands, p. 260, 1991.
- Hugenholtz J & J C M De Veer; In "Nisin and Novel Lantibiotics" (Jung G & H-G Sahl Eds.) ESCOM, Leiden, The Netherlands. p. 440, 1991.
- Kuipers O P et al.; In "Nisin and Novel Lantibiotics" (Jung G & H-G Sahl Eds.) ESCOM, Leiden, The Netherlands. p. 250, 1991.
- Dodd H M et al.; *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3683, 1992.
- Chan W C et al.; *FEBS Lett.*, **252**:29, 1989.
- Wakamiya T et al.; In "Peptides-Chemistry, Structure and Biology" (River J E & G R Marshall Eds.) ESCOM, Leiden, The Netherlands. p. 60, 1990.
- Steen M T et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:1181, 1991.
- Steen M & J N Hansen; In "Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci" (Dunny G M et al., Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D. C. p. 109, 1991.
- Gross E & J L Morell; *J. Am. Chem. Soc.*, **93**:4634, 1971.
- Hurst A; *J. Gen. Microbiol.* **44**:209, 1966.
- Ingram L; *Biochim. Biophys. Acta.*, **184**:216, 1969.
- Ingram L; *Biochim. Biophys. Acta.*, **224**:263, 1970.
- Engelke G et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:3730, 1992.
- Klein C et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**:132, 1992.
- Schnell N et al.; *Eur. J. Biochem.*, **204**:157, 1992.
- Gross E & H Kiltz; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**:559, 1973.
- Allgaier H et al.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**:1051, 1985.

1993年20(5)

微生物学通报

• 307 •

43. Jung G: In "Nisin and Novel Lantibiotics" (Jung G & H-G Sahl Eds.) ESCOM, Leiden, The Netherlands. p. 1, 1991.

(1993-4-6 收稿)