

## 多烯类抗生素合成基因簇中 ABC 转运蛋白研究进展

李涵<sup>1,2</sup> 刘剑波<sup>1,2</sup> 汪谭俊<sup>1,2</sup> 江辉<sup>1,2</sup> 张仁炳<sup>3\*</sup> 管文军<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江大学 生命科学学院 浙江 杭州 310058)

(2. 浙江省微生物代谢与工程重点实验室 浙江 杭州 310058)

(3. 浙江大学 校医院 浙江 杭州 310058)

**摘要:** ABC 转运蛋白家族是一个广泛存在于不同生物细胞中且功能保守的膜蛋白亚家族; 它们是一类单向底物转运泵, 通常以主动转运方式完成多种分子的跨膜转运。随着抗生素合成基因簇相关研究的开展, 越来越多的簇内 ABC 转运蛋白被鉴定出来, 对其生物学功能的研究正逐渐成为热点。多烯类抗生素作为一类重要的抗真菌药物, 能够有效避免真菌产生耐药性, 具有非常重要的临床价值。本文以多烯类抗生素合成基因簇为对象, 综述了在其中所发现的 ABC 转运蛋白的研究进展, 综合分析了其结构特性与功能间的关系, 并对研究应用进行了展望。

**关键词:** ABC 转运蛋白, 基因簇, 多烯类抗生素, 链霉菌

## Research progress of ATP-binding cassette transporters in polyene antibiotic biosynthesis gene cluster

LI Han<sup>1,2</sup> LIU Jian-Bo<sup>1,2</sup> WANG Tan-Jun<sup>1,2</sup> JIANG Hui<sup>1,2</sup> ZHANG Ren-Bing<sup>3\*</sup>  
GUAN Wen-Jun<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(2. Key Laboratory of Microbial Biochemistry and Metabolism Engineering of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(3. Hospital of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

**Abstract:** ATP-binding cassette (ABC) transporters are members of a protein superfamily that is one of the largest and most ancient families with great variety of functions. They are involved in transporting different substrates across the plasma membrane. As more ABC transporters were identified from the gene clusters for antibiotic biosynthesis, recent studies have begun to focus on their biological functions. The polyene antibiotics represent a class of biologically active fungal metabolites synthesized by the genus *Streptomyces*. As drug resistance to polyene remains rare, polyene antibiotics have been the cornerstone of therapy for critically ill patients with invasive fungal infections. We reviewed the latest research progresses on ABC transporters of polyene antibiotic biosynthesis gene clusters, including their structure characteristics and biological functions. The potential relationship between the secondary structure and their function is also discussed.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170032); 国家 863 计划项目(No. 2012AA022107)

\*通讯作者: 张仁炳: Tel: 86-571-87952581; ✉: zrb94276@zju.edu.cn

管文军: Tel: 86-571-88208569; ✉: guanwj@zju.edu.cn

收稿日期: 2013-06-20; 接受日期: 2013-09-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

**Keywords:** ABC transporter, Gene cluster, Polyene antibiotics, *Streptomyces*

在现今已知的抗生素种类中,有大约75%来源于放线菌<sup>[1]</sup>。链霉菌属(*Streptomyces*)是革兰氏阳性丝状放线菌,能产生多种类型的次级代谢产物,其中抗生素和免疫抑制剂等药物是具有重要价值的次级代谢产物,链霉菌因此被称为天然药物的合成工厂<sup>[2]</sup>。临床上广泛使用的万古霉素(Vancomycin)、林可霉素(Lincomycin)、达托霉素(Daptomycin)、氯霉素(Chloramphenicol)及两性霉素B (Amphotericin B)等抗生素分子均由链霉菌合成。

抗生素(Antibiotics)按照作用对象可分为抗菌药(Antibacterial antibiotics)和抗真菌药(Antifungal antibiotics)两大类,作用机制多种多样。多烯类抗生素是一类含有共轭多烯和羟基的大环内酯类化合物,临床上广泛用于治疗真菌感染。该类抗生素通过与细胞膜的主要成分麦角甾醇结合,在细胞膜上形成孔洞,使细胞内容物泄漏,最终导致细胞死亡。这种特殊的作用机制,有效避免了真菌产生耐药性,对致病真菌有良好的杀灭作用,被普遍认为是治疗真菌感染的最后一道防线<sup>[3]</sup>,具有非常重要的临床治疗意义。

随着人们对抗生素合成机制研究的深入,越来越多的抗生素生物合成基因簇(Biosynthetic gene cluster)在链霉菌中被鉴定出来,对这些基因簇中控制合成、调控及转运等重要元件的结构与功能的研究正逐渐成为热点<sup>[4-7]</sup>。除了必需的合成基因和调控基因外,许多抗生素合成基因簇中还存在转运蛋白基因,其中大部分属于ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)家族。虽然目前对基因簇中ABC转运蛋白的研究刚刚起步,但普遍认为这些蛋白参与了抗生素及其合成前体从胞内向胞外转运的过程,能提高细胞自身耐药能力,对抗生素高效合成和分泌具有重要意义。鉴于多烯类抗生素的重要临床价值,本文以多烯类抗生素合成基因簇为例,介绍其中发现的ABC转运蛋白的相关研究进展,深入探讨抗生素合成基因簇中转运蛋白的结构-功能关系。

## 1 ABC 转运蛋白研究概况

### 1.1 ABC 转运蛋白简介

ABC 转运蛋白属于功能保守的膜蛋白亚家族,在生物界中分布广泛,原核与真核生物细胞中都大量存在<sup>[8-10]</sup>;它们是一类单向的底物转运泵,依赖催化 ATP 分子供能完成底物的浓度梯度跨膜转运。ABC 转运蛋白通常具有疏水的跨膜结构域(Transmembrane domains,简称 TMDs)和亲水的保守核酸结合结构域(Nucleotide-binding domains,简称 NBDs)<sup>[11]</sup>,其中 NBDs 通常包含 Walker A、Walker B、Signature motif 等高度保守的序列,用于结合和催化 ATP 分子。在行使跨膜转运功能时,被转运的底物分子首先被 ABC 转运蛋白的 TMDs 识别并结合,然后 NBDs 通过催化 ATP 分子提供能量,帮助 TMDs 将已结合的底物通过跨膜孔道运输到胞外<sup>[12]</sup>。目前已知的 ABC 转运蛋白根据其不同的结构特征被划分为 3 类:I 型、II 型和 III 型<sup>[13]</sup>。

I 型 ABC 转运蛋白是数量最多的一类,该类转运系统一般由两个独立基因编码的蛋白组成:一个包含 NBDs 的亲水蛋白和一个包含 TMDs 的疏水跨膜蛋白,二者形成蛋白复合体以行使转运功能。在达托霉素(Daptomycin)、柔红霉素(Daunomycin)、替曲那新(Tetronacin)、金霉素(Aureomycin)和竹桃霉素(Oleandomycin)等抗生素合成基因簇中发现的 ABC 转运蛋白 DptN/DptM<sup>[14-15]</sup>、DrrA/DrrB<sup>[16]</sup>、TnrB2/TnrB3<sup>[17]</sup>、MtrA/MtrB<sup>[18]</sup>和 OleC/OleC5<sup>[19]</sup>等均属于该类蛋白。II 型转运蛋白是由一个基因编码的包含 NBDs 的亲水性蛋白,不包含疏水跨膜区域,以二聚体结构行使功能。在卡泊霉素(Carbomycin)、林可霉素(Lincomycin)等抗生素合成基因簇中发现的 CarA<sup>[20]</sup>、LmrC<sup>[21]</sup>均属于此类 ABC 转运蛋白。III 型转运蛋白则同时包含疏水的 TMDs 和亲水的 NBDs,由同一个基因编码,链霉素(StrV、StrW)<sup>[22]</sup>、

博来霉素(Ble-orf7)<sup>[23]</sup>以及大部分多烯类抗生素合成基因簇中发现的 ABC 转运蛋白均属于此类。

## 1.2 ABC 转运蛋白在抗生素生产菌株自身耐药中的作用

自然界中许多微生物都能够产生一种或多种具有抗生素活性的分子<sup>[24]</sup>,这些活性分子虽然能够帮助微生物消灭竞争对手,但对生产菌自身同样具有一定的毒性,因此生产菌对其自产抗生素的自身耐受性及其耐药机制受到广泛关注。前期研究发现抗生素生产菌的自身耐药机制主要分为三类<sup>[25]</sup>:(1)使所合成的抗生素分子在胞内失去活性;(2)通过修饰抗生素的作用靶点使抗生素无法正常发挥作用;(3)通过单向转运泵将抗生素分子及时转运到细胞外,显著降低抗生素分子在胞内的累积,减少对自身的毒害作用<sup>[13]</sup>。ABC 转运蛋白在第三类耐药机制中扮演着重要角色<sup>[26]</sup>。

阿霉素(Doxorubicin)和柔红霉素(Daunorubicin)为蒽环类抗生素,工业上常以波赛链霉菌(*S. peucetius*)作为二者的生产菌<sup>[27-29]</sup>。研究人员发现其合成基因簇中存在两个编码 ABC 转运蛋白的基因 *drrA* 和 *drrB*, *DrrA* 具有典型的 NBDs 结构域, *DrrB* 具有包含多个跨膜片段的 TMD 结构域,二者形成异源二聚体发挥功能<sup>[16]</sup>,是典型的 I 型 ABC 转运蛋白。*DrrAB* 能够结合并外排阿霉素和柔红霉素,降低其在胞内的积累以减少对细胞自身产生的伤害<sup>[30]</sup>。其它抗生素生产菌中也发现存在类似功能的基因,如合成色霉素(Chromomycin)的灰色链霉菌灰色变种(*S. griseus* subsp. *griseus*)中的 *cmrA* 和 *cmrB*<sup>[31]</sup>、合成春日霉素的春日链霉菌(*S. kasugaensis*)中的 *kasK* 和 *kasL*、*kasM*<sup>[32]</sup>等,这些基因编码的 I 型 ABC 转运蛋白均能够显著降低所合成的抗生素分子在胞内的累积,提高菌株的自身耐药能力。此外,在来自弗吉尼亚链霉菌(*S. virginiae*)的维吉霉素 M1、来自抗生素链霉菌(*S. antibioticus*)和球孢链霉菌(*S. globisporus*)的竹桃霉素(Oleandomycin/Landomycin)等合成基因簇中,研究人员分别发现了编码 II 型 ABC 转运蛋白的基因

*varM*<sup>[33]</sup>、*oleB*<sup>[34]</sup>、*IndW*<sup>[35]</sup>,均被证实与其自身耐药相关。

因此,抗生素合成基因簇内存在的 ABC 转运蛋白不仅与抗生素转运相关,对于提高抗生素生产菌株的自身耐药能力也至关重要,是微生物为了更好地适应环境而进化产生的一种自我保护机制<sup>[36]</sup>。

## 2 多烯类抗生素及其合成基因簇内的 ABC 转运蛋白

### 2.1 多烯类抗生素及其合成基因簇

如前所述,多烯类抗生素为抗真菌药物,主要由链霉菌合成,属于大环内酯类抗生素家族。其羟基化的大环内脂环上通常带有一个糖(极少数多烯类抗生素的环上不带糖或带有 2 个糖),且在大环内脂环上存在 3-7 个共轭双键,部分多烯类抗生素的分子结构如图 1 所示。

在链霉菌中,抗生素的生物合成基因具有成簇排列的特征,与合成相关的结构合成基因、调控基因、修饰基因和编码转运蛋白的基因等集中位于染色体的一段连续区域。在合成基因簇中,一般会形成几个不同的转录单位;基因簇中绝大多数基因的表达调控发生在转录水平,受途径专一性调节因子和全局调控因子的调控<sup>[37]</sup>;基因簇中通常含有一个以上编码转运蛋白的基因,其表达与结构基因表达之间存在一定的相互调节关系。与其它生物合成基因簇相似,多烯类抗生素的合成基因簇也包含编码结构合成蛋白、调控蛋白、转运蛋白等关键元件的一系列基因,图 2 为多烯抗生素匹马霉素和四霉素合成基因簇的示意图<sup>[38]</sup>。多烯类抗生素多由聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)合成,活性起始元件在一系列模块 PKS 的作用下被组装成线性多聚乙酰长链,经环化后形成具有大环结构的中间体,该中间体再经各种功能酶的加工修饰,被氧化、甲基化或糖基化后形成具有各种结构特征的多烯类抗生素分子,最后被定位在细胞膜上的 ABC 转运蛋白泵出细胞。

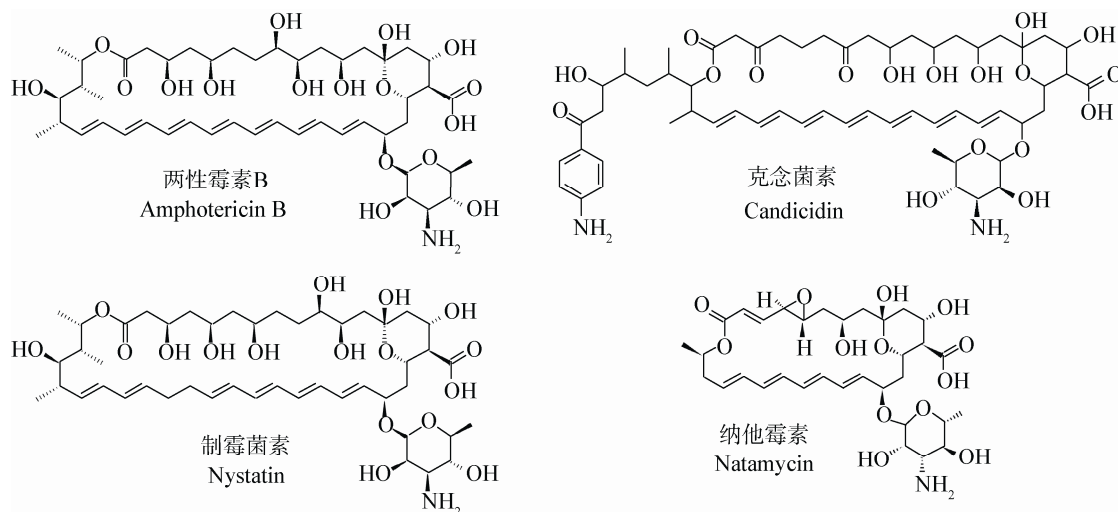
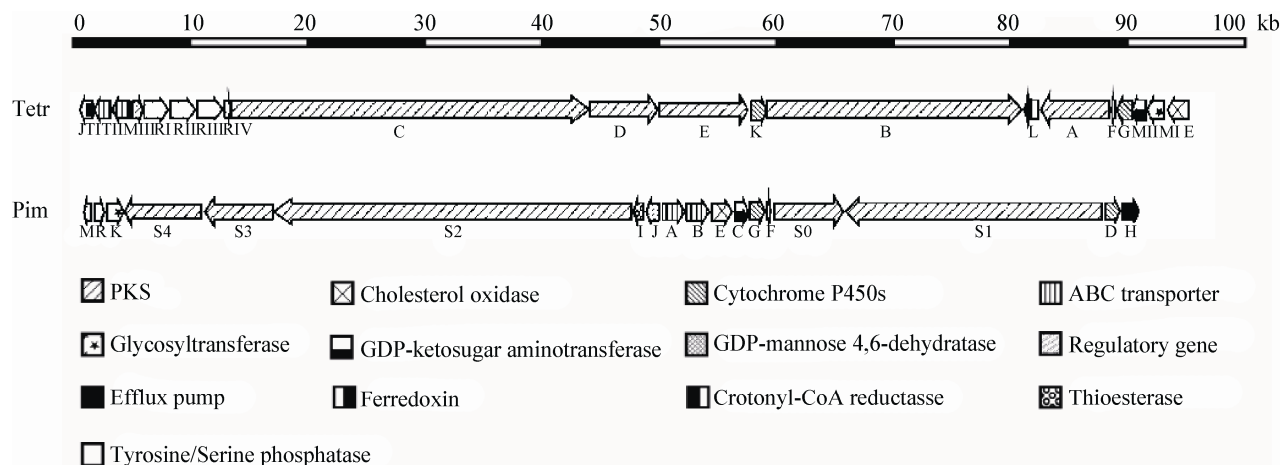


图 1 部分多烯类抗生素分子的化学结构

Figure 1 The chemical structures of some polyene antibiotics

图 2 匹马霉素(Pim)、四霉素(Tetr)合成基因簇示意图<sup>[38]</sup>Figure 2 The biosynthetic gene clusters of pimaricin and tetramycin<sup>[38]</sup>

## 2.2 多烯类抗生素基因簇中的 ABC 转运蛋白结构分析

目前已有 7 个多烯类抗生素合成基因簇被完整或部分地鉴定出来, 它们分别是两性霉素 B (Amphotericin B)<sup>[39-40]</sup>、制霉菌素(Nystatin)<sup>[41]</sup>、匹马霉素/纳他霉素(Pimaricin/Natamycin)<sup>[42-43]</sup>、四霉素 (Tetramycin)<sup>[38]</sup>、克念菌素 /FR008 (Candicidin)<sup>[44]</sup>、龟裂菌素(Rimocidin)<sup>[45]</sup>、菲律宾菌素(Filipin)<sup>[46]</sup>等合成基因簇。在上述基因簇中, 除均包含合成抗生素分子所必需的聚酮合酶模块

(PKS)、细胞色素 P450 单氧合酶(Cytochrome P450 Monooxygenase)、铁氧化还原蛋白(Ferredoxin)等蛋白以外, 在两性霉素 B、制霉菌素、匹马霉素、纳他霉素、四霉素、FR-008 和克念菌素的基因簇内还存在编码 ABC 转运蛋白的基因, 但在菲律宾菌素、龟裂菌素的合成基因簇内则没有发现该类基因。上述多烯类抗生素基因簇中发现的 ABC 转运蛋白在结构上分主要为两类, 一类为 I 型 ABC 转运蛋白, 另一类为 III 型 ABC 转运蛋白。

克念菌素合成基因簇中的 CanRA/CanRB 和

FR-008 中的 FscTI/FscTII 属于 I 型 ABC 转运蛋白家族, *canRA* 编码一个核酸结合蛋白, 该蛋白具有典型的 Walker A、Q-Loop、Signature motif、Walker B 和 D-Loop 等核酸结合蛋白结构域, *canRB* 则编码一个具有 6 个跨膜片段的跨膜蛋白, CanRA 和 CanRB 共同构成了一个 ABC 转运系统, 形成典型的 NBD-TMD 结构。FscTI 和 FscTII 也具有与 CanRA 和 CanRB 相似的结构模式。

制霉菌素 (NysG/NysH)、两性霉素 B (AmphG/AmphH)、匹马霉素 (PimA/PimB) 及四霉素 (TetrTI/TetrTII) 合成基因簇中发现的 ABC 转运蛋白则属于 III 型, 每个蛋白在结构上都包含一个完整的 TMD 和一个用于结合 ATP 的 NBD 结构域。我们从 NCBI 下载了上述蛋白的氨基酸序列, 利用 TMHMM<sup>[47]</sup> 和 Tmpred 软件对上述蛋白的跨膜区结构进行预测后, 发现 NysG、AmphG、TetrTI 和 PimB 具有 4 个跨膜片段, 而 NysH、AmphH、TetrTII 和 PimA 则具有 6 个跨膜片段。以 PimA 和 PimB 为例, 其预测结构如图 3 所示 (该图由我们根据 PimA 和 PimB 的氨基酸序列进行结构预测而得到的结果绘制, 图中黑色区域为 NBD 结构域), 是标

准的 TMD-NBD 结构。由于对基因簇中 ABC 转运蛋白的研究尚处于起步阶段, 目前尚不明确为何上述基因簇中同时存在两个不同的 ABC 转运蛋白, 但鉴于 *pimA* 与 *pimB* 含有 23 bp 的重叠区, 受相同的转录因子调控而实现共转录, 因此研究人员认为这两个基因可能通过形成异构二聚体而行使转运功能<sup>[48]</sup>。虽然初步研究发现 PimA 和 PimB 的转录模式存在差异<sup>[49]</sup>, 敲除基因簇中的调控因子 *pimM* 后, *pimB* 转录水平的下调量远高于 *pimA*, 但研究者认为可能是因为 *pimB* 的转录产物在突变株中更易降解所致。

前期的研究表明, ABC 转运蛋白识别和结合底物的功能位点大多位于跨膜结构域内<sup>[12,50-51]</sup>, 我们通过对同具有 6 个跨膜片段的跨膜区结构的 NysH、AmphH、PimA、TetrTII 的氨基酸序列进行比对, 发现其跨膜区氨基酸序列相似性高达 79.19%, 如图 4 所示。由于这些多烯类抗生素在结构上具有较高的相似性, 转运这些抗生素的 ABC 转运蛋白在其跨膜结构域上应该存在某种相似性, 因此序列比对结果进一步说明合成基因簇内的这些 ABC 转运蛋白确实与抗生素的转运密切相关。

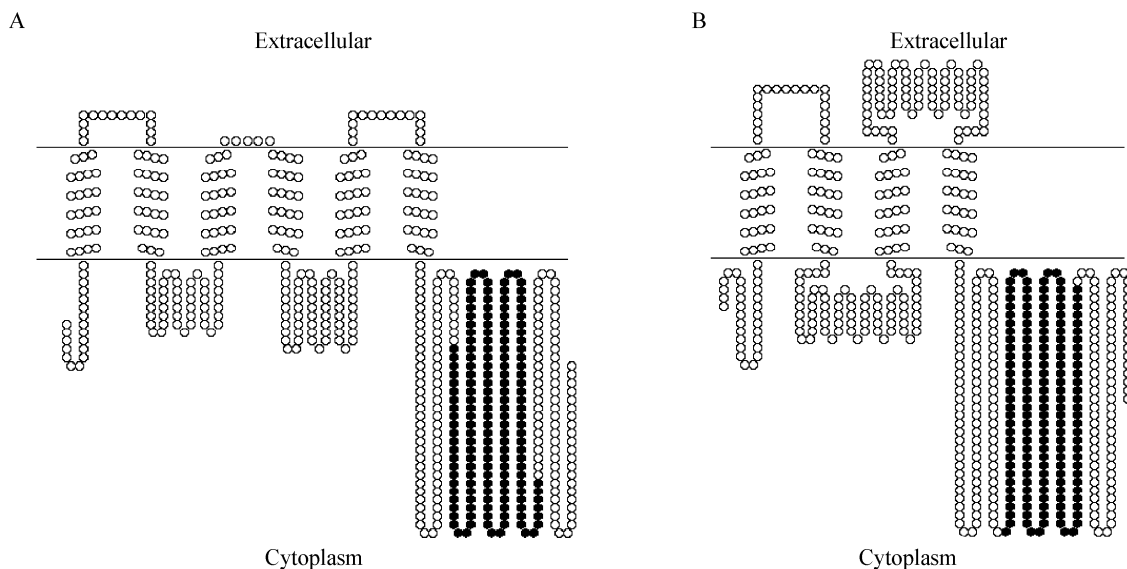


图 3 PimA (A) 和 PimB (B) 结构示意图

Figure 3 Schematic diagram of predicted structure of PimA (A) and PimB (B)

注: 黑色部分为 ATP 结合结构域, 结构模型由 TMHMM 软件预测<sup>[47]</sup>, TOPO2 软件绘制<sup>[52]</sup>。

Note: The black dots represent ATP binding domain which is predicted by TMHMM<sup>[47]</sup> and drawn by TOPO2 software<sup>[52]</sup>.

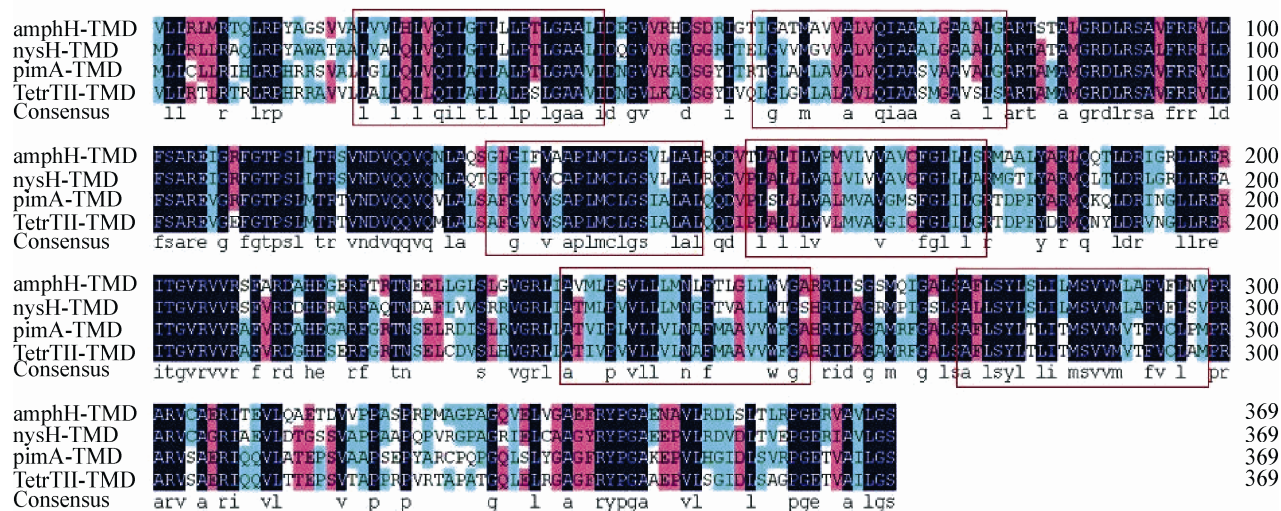


图4 AmphH、NysH、PimA、TetrTI 跨膜结构域氨基酸序列比对结果(方框表示 TMHMM 软件预测的跨膜片段<sup>[47]</sup>)

Figure 4 Sequence alignment of TMDs in AmphH, NysH, PimA, TetrTI (the pane represents the transmembrane helices predicted by TMHMM<sup>[47]</sup>)

值得注意的是,另一个具有6个跨膜片段的ABC转运蛋白CanRB在序列上与NysH、AmphH、PimA和TetrTI的跨膜区序列相似性非常低,只有13%–15%。CanRB位于克念菌素生物合成基因簇中,克念菌素与NysH、AmphH、PimA和TetrTI所对应的制霉菌素、两性霉素B、匹马霉素和四霉素在结构上存在比较显著的差异。如图1所示,在克念菌素的大环骨架上增加了一个长链对苯胺衍生物基团,该基团使克念菌素分子的空间结构变化显著,这种结构变化可能会导致对应的转运蛋白为了更高效地结合转运底物而在跨膜结构上产生适应性变化,使CanRB的序列与其它多烯类抗生素合成基因簇中发现的ABC转运蛋白相比相似性显著降低。

### 2.3 多烯类抗生素基因簇内ABC转运蛋白的功能研究

制霉菌素为四烯类抗生素,其合成基因簇克隆自*S. noursei* ATCC 11455<sup>[41]</sup>,在基因簇侧端发现2个预测的编码ABC转运蛋白的基因*nysG*和*nysH*,二者的氨基酸序列相似度为27%,*nysH*的3'端与*nysG*的5'端存在20 bp的重叠区。Sletta等<sup>[53]</sup>分别

构建了 $\Delta nysH$ 和 $\Delta nysG$ 突变株,研究其对制霉菌素转运的影响,结果表明两个突变株的制霉菌素合成水平较野生菌株下调了35%,但增加了制霉菌素直接前体10-脱氧制霉菌素的累积。研究者认为由于合成的制霉菌素在突变株中无法快速被转运到胞外,在细胞内出现累积,使合成反应的最后一步产生产物抑制效应,最终导致制霉菌素总产量下降和直接前体产生累积。因此,研究人员认为NysG和NysH应参与了制霉菌素向胞外的转运,但敲除这两个蛋白后制霉菌素仍能分泌到胞外,因此推测NysG和NysH并不是唯一行使该功能的转运蛋白。

两性霉素B属于七烯类抗生素,其合成基因簇克隆自*S. nodosus* ATCC 14899<sup>[40]</sup>,与制霉菌素相似,在基因簇的侧端也发现2个预测的编码ABC转运蛋白的基因:*amphG*和*amphH*,二者氨基酸序列相似度为25%,*amphG*的5'端与*amphH*的3'端也存在17 bp的重叠区域。由于*amphH*与*nysH*、*amphG*与*nysG*的序列相似性分别高达76%和80%,因此研究人员推测其功能应与NysH/NysG相似,与两性霉素B分子向胞外转运有关,但并未对其功能进行深入的研究。

匹马霉素又称纳他霉素,为四烯抗生素,其合成基因簇克隆自 *S. natalensis* ATCC 27448<sup>[42]</sup>,在其中发现 3 个编码转运蛋白的基因:*pimA*、*pimB*和 *pimH*,根据序列结构特征 *PimA* 和 *PimB* 被预测为 ABC 转运蛋白,*PimH* 则为外排泵蛋白。*pimA*、*pimB* 位于基因簇中 *pimJ* (糖基脱水酶)与 *pimE* (胆固醇氧化酶)基因之间,二者有 23 bp 重叠区;*pimH* 则位于该基因簇的末端。研究发现 *pimA* 和 *pimB* 的转录受基因簇内专一正调控因子 *PimM*<sup>[49]</sup>、*PimR*<sup>[54]</sup>的调控,敲除 *pimM* 后,*pimA* 与 *pimB* 的表达量均下调,但 *pimB* 的下调量远高于 *pimA*,表现出不同调控模式;敲除 *pimR* 后,*pimA*、*pimB* 和 *pimH* 的表达均显著下调,表明 3 个转运蛋白的功能均与基因簇相关,但作者并未提供突变菌株细胞内、外匹马霉素含量检测数据,其具体的功能和分工尚未深入研究。

四霉素的合成基因簇来自 *S. hygrospinosus* var. *beijingensis*<sup>[38]</sup>,2012 年刚被报道,其中发现了 2 个预测的编码 ABC 转运蛋白的基因 *tetrTI* 和 *tetrTII*。*tetrTI*、*tetrTII* 与 *pimA*、*pimB* 的序列相似性分别达到 91%和 88%,由于四霉素与匹马霉素的结构相似度极高,因此 *TetrTI*、*TetrTII* 的功能应与 *PimA*、*PimB* 相似,和四霉素向胞外分泌相关,目前其具体功能的研究未见报道。

克念菌素与 FR-008 为结构类似的七烯抗生素,克念菌素和 FR-008 的基因簇分别来源于 *S. griseus*<sup>[55-56]</sup>和 *Streptomyces* sp. FR-008<sup>[57]</sup>,在两个基因簇的中间位置分别发现了一对编码 ABC 转运蛋白的基因 *canRA/canRB* 和 *fscTI/fscTII*,*fscTI* 与 *canRA* 的序列相似性为 85%,*fscTII* 与 *canRB* 的相似性为 76%,推测其功能应与克念菌素/FR-008 的分泌转运相关。

### 3 展望

由于抗生素合成基因簇内存在 ABC 转运蛋白很普遍,因此对这些 ABC 转运蛋白的结构、功能及表达调控模式等进行深入研究不仅能够解决基

础理论问题,对提升生产菌株的抗生素生产能力也具有很好的指导价值。目前对于合成基因簇内存在的 ABC 转运蛋白的研究还处于初级阶段,大部分的研究仅限于通过改变这些基因的表达水平来验证其是否参与了抗生素的转运或自身耐药过程,对于其识别底物的关键位点的确认、蛋白质结构改变对转运效率的影响以及调控模式等的研究才刚刚起步<sup>[31]</sup>,尚未见到确认抗生素 ABC 转运蛋白识别底物关键位点的深入报道。随着对抗生素合成基因簇研究的逐渐深入,与之相关的 ABC 转运蛋白的功能研究将会取得越来越多的进展,为从转运角度解决抗生素生产效率低下等问题提供更多的理论依据。

由于 ABC 转运蛋白属于膜蛋白家族,在对其结构功能进行研究时遇到的最大问题是体外表达和纯化比较困难。目前 ABC 转运蛋白的表达主要在大肠杆菌表达体系中进行<sup>[58-59]</sup>,由于这类蛋白的毒性较大,阻碍了其在大肠杆菌体系中获得较高的蛋白表达量,进而制约了高纯度蛋白的制备,使体外生化研究面临一定的困难。同时,也导致蛋白结晶结构无法顺利获得,造成难以通过结构生物学手段确认底物与转运蛋白的直接相互作用位点。但是,随着各种生物学和检测手段日新月异的发展,一定会找到解决这些问题的方法,进而能够更深入和完善地研究 ABC 转运蛋白。

综上所述,深入研究抗生素合成基因簇中 ABC 转运蛋白识别和结合底物的模式,了解其与抗生素分泌相关的转运机理,探索 ABC 转运蛋白与整个抗生素合成通路相辅相成的内在联系,不仅能够从基础机制上解释其生物学过程,还可以在表达、调控等途径上改造生产菌株,通过提高转运效率以增加抗生素的产量,这在工业生产上具有很高的应用价值。

### 参考文献

- [1] Paudel S, Park JW, Lee JH, et al. Functional analysis of ABC transporter genes *pdmR1* and *pdmR2* in *Actinomodura hibisca* P-1752 and enhancement of pradimicin production[J]. Biotechnology and Bioprocess

- Engineering, 2012, 17(1): 8-15.
- [2] Watve MG, Tickoo R, Jog MM, et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?[J]. Archives of Microbiology, 2001, 176(5): 386-390.
- [3] Wingard JR, Kubilis P, Lee L, et al. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis[J]. Clinical Infectious Diseases, 1999, 29(6): 1402-1407.
- [4] Galm U, Wendt-Pienkowski E, Wang LY, et al. The biosynthetic gene cluster of zorbamycin, a member of the bleomycin family of antitumor antibiotics, from *Streptomyces flavoviridis* ATCC 21892[J]. Molecular BioSystems, 2009, 5(1): 77-90.
- [5] Kaysser L, Lutsch L, Siebenberg S, et al. Identification and manipulation of the caprazamycin gene cluster lead to new simplified liponucleoside antibiotics and give insights into the biosynthetic pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(22): 14987-14996.
- [6] Pojer F, Li SM, Heide L. Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics[J]. Microbiology-sgm, 2002, 148: 3901-3911.
- [7] Zhang WJ, Ostash B, Walsh CT. Identification of the biosynthetic gene cluster for the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(39): 16828-16833.
- [8] Crouzet J, Trombik T, Fraysse AS, et al. Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family[J]. FEBS Letters, 2006, 580(4): 1123-1130.
- [9] Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily[J]. Journal of Lipid Research, 2001, 42(7): 1007-1017.
- [10] Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004, 61(6): 682-699.
- [11] Locher KP, Hollenstein K, Dawson RJP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2007, 17(4): 412-418.
- [12] Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview[J]. Research in Microbiology, 2001, 152(3/4): 205-210.
- [13] Mendez C, Salas JA. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms[J]. Research in Microbiology, 2001, 152(3/4): 341-350.
- [14] Baltz RH. Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(8): 506-511.
- [15] Miao V, Coeffet-LeGal MF, Brian P, et al. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry[J]. Microbiology-sgm, 2005, 151: 1507-1523.
- [16] Guilfoile PG, Hutchinson CR. A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(19): 8553-8557.
- [17] Linton KJ, Cooper HN, Hunter IS, et al. An ABC-transporter from *Streptomyces longisporoflavus* confers resistance to the polyether-ionophore antibiotic tetronasin[J]. Molecular Microbiology, 1994, 11(4): 777-785.
- [18] Fernandez E, Lombo F, Mendez C, et al. An ABC transporter is essential for resistance to the antitumor agent mithramycin in the producer *Streptomyces argillaceus*[J]. Molecular and General Genetics, 1996, 251(6): 692-698.
- [19] Rodriguez AM, Olano C, Vilches C, et al. *Streptomyces antibioticus* contains at least three oleandomycin-resistance determinants, one of which shows similarity with proteins of the ABC-transporter superfamily[J]. Molecular Microbiology, 1993, 8(3): 571-582.
- [20] Schoner B, Geistlich M, Rosteck PJ, et al. Sequence similarity between macrolide-resistance determinants and ATP-binding transport proteins[J]. Gene, 1992, 115(1/2): 93-96.
- [21] Peschke U, Schmidt H, Zhang HZ, et al. Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11[J]. Molecular Microbiology, 1995, 16(6): 1137-1156.
- [22] Beyer S, Distler J, Piepersberg W. The *str* gene cluster for the biosynthesis of 5'-hydroxystreptomycin in *Streptomyces glaucescens* GLA.0 (ETH 22794): new operons and evidence for pathway-specific regulation by StrR[J]. Molecular and General Genetics, 1996, 250(6): 775-784.
- [23] Calcutt MJ, Schmidt FJ. Gene organization in the bleomycin-resistance region of the producer organism *Streptomyces verticillus*[J]. Gene, 1994, 151(1/2): 17-21.
- [24] Tahlan K, Ahn SK, Sing A, et al. Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(4): 951-961.
- [25] Cundliffe E. Self-protection mechanisms in antibiotic producers[J]. Ciba Foundation Symposium, 1992, 171: 199-214.
- [26] Sherwood EJ, Hesketh AR, Bibb MJ. Cloning and analysis of the planosporicin lantibiotic biosynthetic gene cluster of *Planomonospora alba*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(10): 2309-2321.
- [27] Grein A. Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces-peucetius*[J]. Advances in Applied Microbiology, 1987, 32: 203-214.
- [28] Lown JW. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents-current status and recent developments[J]. Pharmacology & Therapeutics, 1993, 60(2): 185-214.
- [29] Malta S, Niraula NP, Singh B, et al. Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*[J]. Microbiological Research, 2010, 165(5): 427-435.
- [30] Kaur P. Expression and characterization of DrrA and DrrB proteins of *Streptomyces peucetius* in *Escherichia coli*: DrrA is an ATP binding protein[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(3): 569-575.
- [31] Menendez N, Brana AF, Salas JA, et al. Involvement of a chromomycin ABC transporter system in secretion of a deacetylated precursor during chromomycin biosynthesis[J]. Microbiology-sgm, 2007, 153: 3061-3070.
- [32] Ikeno S, Yamane Y, Ohishi Y, et al. ABC transporter genes,



- kasKLM*, responsible for self-resistance of a kasugamycin producer strain[J]. The Journal of Antibiotics, 2000, 53(4): 373-384.
- [33] Kitani S, Yamauchi T, Fukushima E, et al. Characterization of *varM* encoding typeII ABC transporter in *Streptomyces virginiae*, a virginiamycin M<sub>1</sub> producer[J]. Actinomycetologica, 2010, 24(2): 51-57.
- [34] Olano C, Rodriguez AM, Mendez C, et al. A 2nd Abc transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces-antibioticus*[J]. Molecular Microbiology, 1995, 16(2): 333-343.
- [35] Ostash I, Rebets Y, Ostash B, et al. An ABC transporter encoding gene *IndW* confers resistance to landomycin E[J]. Archives of Microbiology, 2008, 190(1): 105-109.
- [36] Hopwood DA. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them?[J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(4): 937-940.
- [37] Chater KF. The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces*[J]. Nature Biotechnology, 1990, 8(2): 115-121.
- [38] Cao B, Yao F, Zheng X, et al. Genome mining of the biosynthetic gene cluster of the polyene macrolide antibiotic tetramycin and characterization of a P450 monooxygenase involved in the hydroxylation of the tetramycin B polyol segment[J]. ChemBioChem, 2012, 13(15): 2234-2242.
- [39] Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E, et al. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin-A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(15): 10133-10139.
- [40] Caffrey P, Lynch S, Flood E, et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes[J]. Chemistry & Biology, 2001, 8(7): 713-723.
- [41] Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, et al. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7(7): R176.
- [42] Aparicio JF, Fouces R, Mendes MV, et al. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7(11): 895-905.
- [43] Du YL, Li SZ, Zhou Z, et al. The pleiotropic regulator AdpA is required for natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis*[J]. Microbiology, 2011, 157(5): 1300-1311.
- [44] Campelo AB, Gil JA. The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570[J]. Microbiology-sgm, 2002, 148: 51-59.
- [45] Seco EM, Perez-Zuniga FJ, Rolon MS, et al. Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in *Streptomyces diastaticus* var. 108[J]. Chemistry & Biology, 2004, 11(3): 357-366.
- [46] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(5): 526-531.
- [47] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 305(3): 567-580.
- [48] Aparicio JF, Caffrey P, Gil JA, et al. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(3): 179-188.
- [49] Anton N, Santos-Aberturas J, Mendes MV, et al. PimM, a PAS domain positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*[J]. Microbiology-sgm, 2007, 153: 3174-3183.
- [50] Higgins CF, Linton KJ. Structural biology-The xyz of ABC transporters[J]. Science, 2001, 293(5536): 1782-1784.
- [51] Yu L, Yan XY, Wang L, et al. Molecular cloning and functional characterization of an ATP-binding cassette transporter OtrC from *Streptomyces rimosus*[J]. BMC Biotechnology, 2012, 12: 52.
- [52] Ernst R, Kueppers P, Klein CM, et al. A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(13): 5069-5074.
- [53] Sletta H, Borgos SEF, Bruheim P, et al. Nystatin biosynthesis and transport: *nysH* and *nysG* genes encoding a putative ABC transporter system in *Streptomyces noursei* ATCC 11455 are required for efficient conversion of 10-deoxynystatin to nystatin[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(11): 4576-4583.
- [54] Anton N, Mendes MV, Martin JF, et al. Identification of PimR as a positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(9): 2567-2575.
- [55] Gil JA, Campelo-Diez AB. Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(6): 633-642.
- [56] Jorgensen H, Fjaervik E, Hakvag S, et al. Candicidin biosynthesis gene cluster is widely distributed among *Streptomyces* spp. isolated from the sediments and the neuston layer of the Trondheim fjord, Norway[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(10): 3296-3303.
- [57] Chen S, Huang X, Zhou XF, et al. Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex[J]. Chemistry & Biology, 2003, 10(11): 1065-1076.
- [58] Hsu MF, Yu TF, Chou CC, et al. Using Haloarcula marismortui bacteriorhodopsin as a fusion tag for enhancing and visible expression of integral membrane proteins in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56363.
- [59] Zoonens M, Miroux B. Expression of membrane proteins at the *Escherichia coli* membrane for structural studies[J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 601: 49-66.