

## 假单胞菌合成环脂肽转录调控的研究进展

李小璐 向照举 孙燕\* 李治 贺媛媛 张丹 宋卓怡

(陕西师范大学 生命科学学院 陕西 西安 710119)

**摘要:** 假单胞菌所合成的环脂肽是一类由环状的寡肽连接一个脂肪酸链组成的两亲性分子, 利用巯基化模块由非核糖体肽合成酶合成。环脂肽的生物合成受到严格、复杂的调控, GacS/GacA 双组分系统和群体感应系统是其中两类重要的调控系统。本文总结假单胞菌合成环脂肽的调控机制及相关调控因子; 对基于 PCR 的高通量分子筛选方法获取特定环脂肽进行分析, 同时对基于调控机制的遗传改造提高假单胞菌产环脂肽的能力和获取更多新型环脂肽等方面的应用进行展望。

**关键词:** 假单胞菌, 环脂肽, GacS/GacA 双组分调控系统, 群体感应系统

### Biosynthetic regulation of cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas*

LI Xiao-Lu XIANG Zhao-Ju SUN Yan\* LI Zhi HE Yuan-Yuan ZHANG Dan  
SONG Zhuo-Yi

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China)

**Abstract:** The cyclic lipopeptides (CLPs) produced by *Pseudomonas* were made up of a cyclized oligopeptide lactone ring coupled to a fatty acid tail. CLPs were synthesized by nonribosomal peptide synthetases in *Pseudomonas* and the genetic regulation of CLPs syntheses was strict and comprehensive. GacA/GacS two-component signal transduction system and N-AHL-mediated quorum sensing system played an important role in global regulation of CLPs production in *Pseudomonas*. Here, we reviewed some research advances on the systems involved in CLPs syntheses. We discussed the method using PCR to obtain some cyclic lipopeptides and prospected the applications of bioengineering technology in enhancing the production of CLPs in *Pseudomonas*. It was also discussed the genome mining combining with genetic regulation research to obtain new cyclic lipopeptides.

**Keywords:** *Pseudomonas*, Cyclic lipopeptide, GacA/GacS two-component signal transduction system, Quorum sensing

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31400057); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(No. 2014JM3067); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. GK201402023); 大学生国创项目(No. 201310718071, cx13072, 201410718052)

\*通讯作者: Tel: 86-29-85310581; 信箱: sunyan@snnu.edu.cn

收稿日期: 2014-08-14; 接受日期: 2014-10-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-24

环脂肽(Cyclic lipopeptides)是脂肽类化合物,两亲性的物化性质决定了其良好的生物活性。如链霉菌所产的环脂肽 A21978C 的 N-癸酰基衍生物就是新型抗生素达托霉素,具有广谱的抗革兰氏阳性菌活性,对高致病性耐药菌有效率高、杀菌效果好、毒副作用小等优点,有望成为继万古霉素之后的备用抗生素<sup>[1]</sup>。除了链霉菌,假单胞菌也能合成多种环脂肽。目前已从假单胞菌中分离到近 40 种环脂肽,按照脂肪酸链长度和氨基酸数目、种类的不同,这些环脂肽至少可以分为 Viscosin、Amphisin、Tolaasin、Syringomycin、Syringopeptin、Ofamide、Pseudofactin、Putisolvin、Entolysin、Xantholysin 等 10 个家族<sup>[2-4]</sup>。假单胞菌产生的环脂肽通常由 8-25 个氨基酸组成的肽链和其 N 端的脂肪酸链组成,通过形成内酯键使肽链闭合成环状。环脂肽通

过在细胞膜上“打孔”造成跨膜离子流动不平衡,进而使细胞溶解死亡,特别对革兰氏阳性菌具有较好的抑制效果,如 Syringomycin、Entolysin、Putisolvin、Massetolide 等对芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*),结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)等致病菌具有抑制活性<sup>[5]</sup>。环脂肽还可以抑制植物和人类病原菌<sup>[6]</sup>,如立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)和果蝇红酵母(*Rhodotorula pilimanae*)等(表 1)。最近的研究发现环脂肽 Pseudofactin II 对黑色素瘤 A375 细胞具有杀灭作用,而正常的人类真皮成纤维细胞却几乎不受影响,提示 Pseudofactin II 能够作为潜在的抗黑色素瘤细胞药物<sup>[7]</sup>。

表 1 环脂肽生物活性及相关调控因子/系统

Table 1 The biological activity and genetic regulation of cyclic lipopeptides

环脂肽 Cyclic lipopeptides	环脂肽产生菌 Cyclic lipopeptides produced strains	敏感病原菌 Sensative-pathogens	调控因子/系统 Regulatory factors/system	文献 References
Viscosin	<i>P. fluorescens</i> SBW25, <i>P. fluorescens</i> 5064	结核杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , 鸟胞内 分支杆菌 <i>Mycobacterium avumintracellul</i>	ViscBCR/ViscAR; QS 系统	[8-9]
Syringomycin	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B301D	白地霉 <i>Geotrichum candidum</i> 、果蝇红酵母 <i>Rhodotorula pilimanae</i>	SalA/SyrF; GidA	[10-11]
Putisolvin	<i>P. putida</i> PCL1445	抑制铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i> 生物膜形成	DnaK、DnaJ、GrpE; PsoR; QS 系统	[12-15]
Massetolide	<i>P. fluorescens</i> SS101	结核杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , 鸟胞内 分支杆菌 <i>Mycobacterium avumintracellul</i>	MassBCR/MassAR; ClpP/ClpX; DnaK; PrtR	[16-17]
Entolysin	<i>P. entomophila</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> SG511, 节杆菌 <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> , 芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 168	RsmY, RsmZ; EtlR; RsmA	[18]
Amphisin	<i>Pseudomonas</i> sp. DSS73	芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	-	[5]
Tolaasin	<i>P. tolaasii</i>	革兰氏阳性菌	-	[19]
Pseudofactin	<i>P. fluorescens</i> BD5	抑制大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> , 粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> , 表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 等生物膜的形成	-	[20]
Viscosinamide	<i>P. fluorescens</i> DR54	腐霉菌 <i>Pythium ultimum</i> , 立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	-	[21]
Pseudophomins	<i>P. fluorescens</i> BRG100	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i> , 黑胫病菌 <i>Phoma lingam</i> , 黑斑病菌 <i>Alternaria brassicae</i> , 核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	[22]

环脂肽良好的生物活性促使科研工作者对其进行了大量的研究,对环脂肽的生物合成机制有了较好的认知,相比之下,环脂肽的调控机制相关报道还很少。目前研究表明,假单胞菌产生的环脂肽主要受全局性的 GacS/GacA 双组分系统(Two-component signal transduction system)和群体感应系统(Quorum sensing)以及一类重要的 LuxR 类转录调控因子调控,且调控机制多样,如来自恶臭假单胞菌 *P. putida* PCL1445 的 Putisolvin 的合成同时受 Gac 双组分系统和群体感应系统调控;Viscosin 在不同的产生菌中其调控机理也有不同,在其产生菌荧光假单胞菌 *P. fluorescens* SS101 中主要受 Gac 双组分系统调控,而在荧光假单胞菌 *P. fluorescens* 5064 中可能受到多个群体感应系统调控。环脂肽调控系统的复杂性以及相应调控机制的不明确性,限制了有效高产菌株的筛选和改造。因此,环脂肽的调控是这一领域研究的重点问题。本文就近年来假单胞菌合成环脂肽的调控系统及相应的调控因子进行总结。

## 1 环脂肽的合成机制简介

假单胞菌所产生的环脂肽利用巯基化模块由非核糖体肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthetases, NRPSs)合成<sup>[4]</sup>。NRPSs 是目前所发现的最大的酶系,由多个模块按一定的空间顺序排列而成。一个典型的构成 NRPSs 的模块大约由 1 000 个氨基酸组成,主要负责一次底物缩合反应,其结构通常由腺苷酰化(Adenylation, A)、肽酰载体蛋白(Peptidyl carrier protein, PCP)和缩合(Condensation, C) 3 个核心结构域组成,在功能上依次负责氨基酸底物的活化、转移及肽键的形成,但排布顺序为 C、A、PCP。环脂肽 NRPSs 第一个模块除含有 C、A、PCP 结构域外,还含有一个 C1 结构域,负责将 N 端第一个氨基酸酰化,使寡肽链和脂肪酸链相连;某些模块的 C 结构域中含有无差向异构结构域(Epimerization domain, E), C/E 结构域负责将 L-氨基酸转化成 D-氨基酸;最后一个模块的 C 端有

两个硫酯酶结构域(Thioesterase domain, TE),催化成熟肽链环化和释放<sup>[23]</sup>。由于氨基酸残基种类、顺序和氨基酸环化特性的差别以及脂肪酸链的特性、长度和有无支链的差别,导致了环脂肽类化合物种类的多样性和生物活性的特异性。

## 2 参与假单胞菌环脂肽合成的调控系统

### 2.1 GacS/GacA 双组分调控系统

假单胞菌中环脂肽合成受双组分系统 GacS/GacA 调控。GacS/GacA 双组分调控系统是假单胞菌中普遍存在且高度保守的全局调控系统,通过对外界信号的感知来调控环脂肽化合物合成,已成为一个遗传学的标记<sup>[24]</sup>。GacS/GacA 双组分调控系统由感应激酶 GacS 和应答调节蛋白 GacA 组成。GacS 是一种位于细菌细胞膜上的跨膜信号感应蛋白,能够自身磷酸化。当 GacS 与信号识别后, GacS 被激活并发生自身磷酸化,成为有活性的 GacS-P。GacS-P 与位于胞质中的 GacA 相耦联,将磷酸基团转移给 GacA 使之发生磷酸化而活化,活化的 GacA-P 结合到靶基因的启动子区激活靶基因转录,从而对环脂肽的合成进行调节。对于假单胞菌产生的环脂肽,如 Syringomycin、Syringopeptin、Putisolvin、Massetolide、Entolysin 等, GacS/GacA 双组分调控系统是一个总开关,突变这两个调控因子中的任何一个都会导致假单胞菌丧失产生上述环脂肽的能力<sup>[6]</sup>。目前已发现了一些激活 Gac 双组分系统并诱导环脂肽合成的外源信号分子。例如,植物信号分子(熊果苷、D-果糖)通过 Gac, SalA/SyrF 级联调控激活丁香假单胞菌 *P. syringae* pv. *syringae* *syr-syp* 合成 Syringopeptin<sup>[25]</sup>。甜菜种子分泌液包含促使假单胞菌 *Pseudomonas* sp. DSS73 合成 Amphisin 的信号分子,这种信号分子具有热稳定性,能通过渗析被去除,因此,推断可能是一种有机小分子<sup>[26]</sup>。

近年来,一些受 GacS/GacA 双组分系统控制并参与环脂肽合成的调控因子被鉴定,如 SalA/SyrF、ViscBCR/ViscAR、MassBCR/MassAR、EtlR、PsoR

等。通过序列比对和氨基酸序列分析, 这些调控因子 C 末端包含典型的螺旋-转角-螺旋基元 (Helix-turn-helix motif, HTH), 属于 LuxR 蛋白超家族, 然而系统发育分析发现这些调控因子与常见的 LuxR 蛋白超家族成员 FixJ、LuxR、MalT、GerE 等并不聚成一簇, 因此推断这些受 Gac 双组分系统控制并参与环脂肽合成的调控因子属于一个新的 LuxR 蛋白亚家族<sup>[27]</sup>。

**2.1.1 SalA/SyrF 调控因子:** 植物病原细菌丁香假单胞菌 *P. syringae* pv. *syringae* B301D 产生两组诱导植物组织渗漏坏死的环脂肽 Syringomycin 和 Syringopeptin, 对芽孢杆菌、包皮垢分支杆菌以及真菌中的白地霉、果蝇红酵母具有较好的抑制作用。其合成基因簇构成约 132 kb 的 *syr-syp* 基因岛, SalA 和 SyrF 是其中两个重要的调控因子<sup>[10]</sup>。SalA 起着核心调控作用, 突变 *SalA* 导致菌株不能产生这两种环脂肽; 而突变 *SyrF* 会导致这两种环脂肽的产量下降 88%。为了进一步明确受 SalA 调控的基因, Lu 等<sup>[11]</sup> 通过寡核苷酸微阵列 (Oligonucleotide Microarray) 技术证明参与 Syringomycin 和 Syringopeptin 合成、分泌和调控的基因都受 SalA 正调控。其中, SalA 控制 *SyrF* 的转录, *SyrF* 直接结合在 *syr-syp* 的启动子区来激活此生物合成基因表达, 即 Syringomycin 和 Syringopeptin 的合成是通过

Gac-SalA-SyrF-(*syr-syp*) 这一途径进行调控(图 1)。

**2.1.2 ViscBCR/ViscAR、MassBCR/MassAR 调控因子:** Viscosin、Massetolide A 属于 Viscosin 家族, 分别由假单胞菌 *P. fluorescens* SBW25 和假单胞菌 *P. fluorescens* SS101 产生。其肽链由 9 个氨基酸组成, 脂肪酸链为 3-羟基癸酸, 在肽链第 3 位 Thr 和第 9 位 Ile 之间形成酯键成环, 两者主要区别是肽链中第 4 位氨基酸不同。Viscosin、Massetolide A 对结核杆菌和鸟胞内分支杆菌具有较好的抑制作用, 此外 Massetolide A 还能诱导植物产生系统性抗性, 有利于其产生菌 *P. fluorescens* SS101 在植物根部定殖; Viscosin 是假单胞菌所产环脂肽家族中对人感染相关的包膜病毒, 如支气管炎病毒、流感病毒等具有抑制作用的唯一成员<sup>[4,6]</sup>。ViscAR/MassAR、ViscBCR/MassBCR 分别位于 Viscosin、Massetolide A 生物合成基因簇的上游和下游(图 2), 序列比对发现 ViscAR 和 MassAR 序列相似度为 82%, ViscBCR 和 MassBCR 序列相似度为 81%。定点突变这些基因, Q-PCR 检测到相关合成基因的表达受到影响, 其菌体发酵产物经表面活性检测和高压液相色谱分析不含有 Viscosin 和 Massetolide A<sup>[9,16]</sup>。De Bruijn 等<sup>[27]</sup> 证明了 ViscAR 对于 Massetolide A 相应的生物合成基因簇在假单胞菌 *P. fluorescens* SBW25 中进行异源表达是必需的。

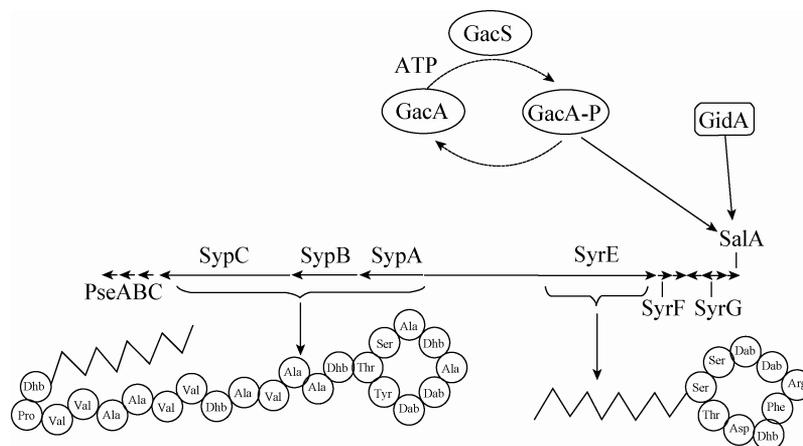


图 1 Syringomycin 和 Syringopeptin 在丁香假单胞菌 *P. syringae* pv. *syringae* B301D 中的调控途径  
Figure 1 The genetic regulation of syringomycin and syringopeptin biosynthesis in *P. syringae* pv. *syringae* B301D

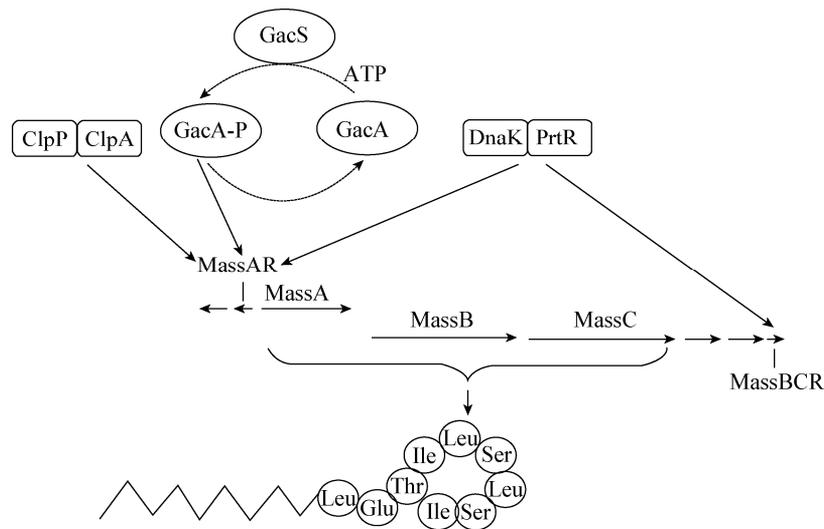


图2 Massetolide A 在荧光假单胞菌 *P. fluorescens* SS101 中的调控途径  
Figure 2 The genetic regulation of Massetolide A biosynthesis in *P. fluorescens* SS101

**2.1.3 EtIR 调控因子:** Entolysin 首次从虫媒假单胞菌 *P. entomophila* 中分离, 其肽链由 14 个氨基酸组成, 在肽链第 10 位丝氨酸和末端异亮氨酸之间通过形成酯键成环。Entolysin 对金黄色葡萄球菌、节杆菌和芽孢杆菌等具有抑制作用, 同时 Entolysin 具有较强的表面活性和溶血活性, 然而却不作为 *P. entomophila* 感染宿主果蝇的毒力因子。通过对 *P. entomophila* 全基因组序列进行分析和注释, 确定了 3 个与 Entolysin 合成相关的生物合成基因 *EtlA*、*EtlB* 和 *EtlC*, 同时在 *EtlA* 上游发现了一个 LuxR 蛋白超家族基因 *EtlR*, 突变 *EtlR* 导致 *P. entomophila* 不能合成 Entolysin。对 *P. entomophila* 的调控序列进一步扫描分析, 发现了 2 个小 RNA 分子 *RsmY* 和 *RsmZ*, 它们上游有典型的 GacA 结合框, 突变 *RsmY* 和 *RsmZ* 会影响 Entolysin 的合成。分析 Entolysin 合成基因 *EtlA*、*EtlB* 5'端序列, 确定了一些小 RNA 结合蛋白 RsmA 的结合部位 (A/UCANGGANGU/A), 突变 *RsmA1*、*RsmA2*、*RsmY*、*RsmZ* 能修复 Entolysin 的合成。因此, Gac 双组分调控系统很可能直接通过小 RNA 结合蛋白 RsmA 或间接通过 LuxR 蛋白超家族基因 *EtlR* 调控

Entolysin 的合成<sup>[18]</sup>(图 3)。

**2.1.4 PsoR 调控因子:** Putisolvin 由恶臭假单胞菌 *P. putida* PCL1445 产生, 能够抑制铜绿假单胞菌等致病菌生物膜的形成并降解已形成的生物膜, 在治疗领域具有潜在的应用价值。该环脂肽由含 12 个氨基酸的肽链和含 6 个碳原子的脂肪酸链组成, 在肽链第 9 位丝氨酸和末端氨基酸之间通过形成酯键成环<sup>[15]</sup>。*PsoR* 基因位于 Putisolvin 合成基因 *PsoA* 上游, 序列分析表明, *PsoR* 由 260 个氨基酸组成, C 末端与 GerE、FixJ 的相似度分别为 35% 和 32%。突变 *PsoR* 能够影响 Putisolvin 合成<sup>[12]</sup>。此外, 在菌株 PCL1445 中还发现了一个编码热激蛋白家族 Hsp70 的基因 *DnaK*, 其表达受 Gac 双组分系统调控, 突变 *DnaK* 能使 Putisolvin 的合成大幅减少, 同时 *DnaK* 和 *DnaJ*、*GrpE* 在低温下能够共同调控 Putisolvin 合成<sup>[13]</sup>。尽管目前这 3 个基因在调控 Putisolvin 合成中的确切作用还不清楚, 但研究者推断这些热激蛋白可能需要适当折叠或者激活其他与 Putisolvin 合成相关的调控因子, 又或者 Putisolvin 的 NRPSs 的适当装配需要 *DnaK* 复合物(图 4)。

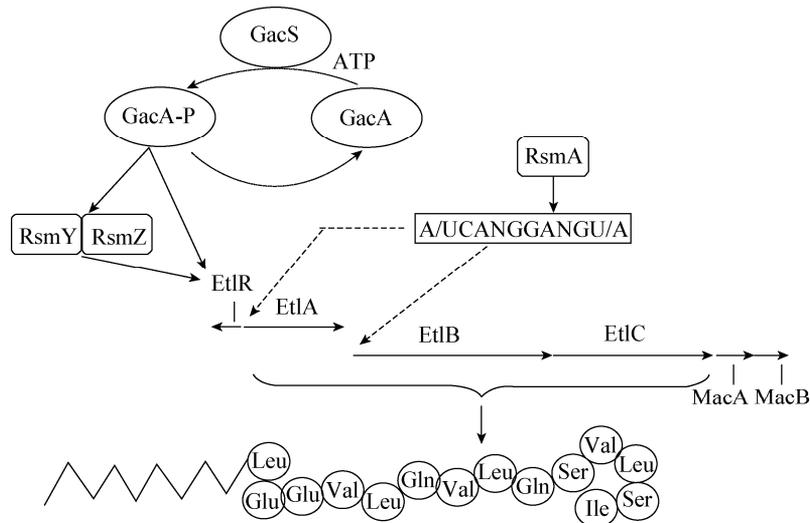


图3 Entolysin 在虫媒假单胞菌 *P. entomophila* 中的调控途径

Figure 3 The genetic regulation of entolysin biosynthesis in *P. entomophila*

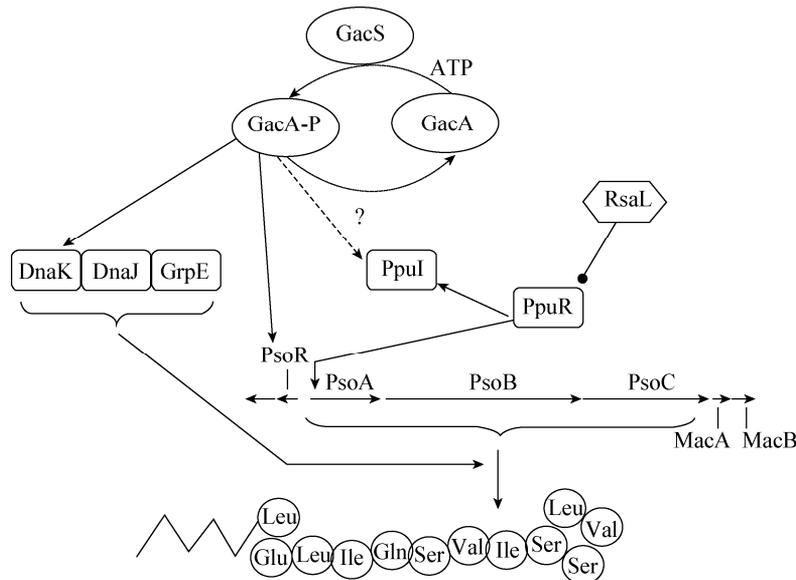


图4 Putisolvin 在恶臭假单胞菌 *P. putida* PCL1445 中的调控途径

Figure 4 The genetic regulation of putisolvin biosynthesis in *P. putida* PCL1445

## 2.2 群体感应系统

细菌的群体感应(Quorum-sensing, QS)广泛存在于自然界的微生物中,是一个依赖细菌密度的基因调控系统。其中,革兰氏阴性细菌通过产生 N-酰基-高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactone, N-AHLs)来调控特定基因的表达<sup>[28]</sup>。在假单胞菌中,目前研究最详细的是铜绿假单胞菌的群体感应系

统。铜绿假单胞菌中有两个基于 AHL 信号分子的群体感应系统: Las 系统和 Rhl 系统。Las 系统由 LasR 和 LasI 组成, LasI 催化合成 N-3-oxo-C12-HSL 信号分子,随着细菌密度增加,胞内外的 N-3-oxo-C12-HSL 浓度均在增加,达到一定阈值后,结合并激活 LasR 启动相关基因的表达。Rhl 系统与 Las 系统相似,由 RhlII 信号分子合成酶和 RhlR 受

体蛋白组成,不同的是 Rhl 系统的信号分子是 N-C4-HSL。QS 系统控制着铜绿假单胞菌中包括外毒素、弹性蛋白酶、溶血素和生物被膜等几乎所有致病因子的表达<sup>[29]</sup>。在假单胞菌所产的环脂肽中,荧光假单胞菌 *P. fluorescens* 5064 所产的 Viscosin 是第一个被发现受 QS 系统调控的环脂肽,其群体感应信号分子通过高压液相色谱分离、质谱分析被鉴定为 N-3-acyl-hydroxyoctanoyl-HSL;在荧光假单胞菌 *P. fluorescens* 5064 突变菌株培养液中添加相应的信号分子,能够修复 Viscosin 合成。然而,突变没有完全阻断 N-AHL 表达,因此研究者推测菌株 5064 中可能不只一个群体感应系统<sup>[8]</sup>。令我们感兴趣的是,在 Viscosin 另一个产生菌 *P. fluorescens* SBW25 中,Viscosin 的合成却受 Gac 双组分系统调控,因此,同一个环脂肽在不同菌株中的转录调控系统很有可能不同<sup>[27]</sup>。

Putisolvin 是另一个受 QS 系统调控的环脂肽。序列分析表明,参与其 QS 调控的基因与已报道的恶臭假单胞菌 *P. putida* IsoF、WCS358 相似性为 99%,属于一类恶臭假单胞菌特有的 PpuI-RsaL-PpuR 群体感应系统<sup>[14]</sup>。其中 *PpuI* 是 *LuxI* 的同源基因,*PpuR* 是 *LuxR* 的同源基因。突变实验进一步证明 *PpuI* 和 *PpuR* 共同调控 Putisolvin 合成,*PpuI* 负责 AHLs 合成;*RsaL* 通过抑制 AHLs 合成来抑制 Putisolvin 合成。目前已知在铜绿假单胞菌中,Gac 双组分调控系统通常通过控制 N-AHLs 合成,间接与 QS 系统耦联。Bertani 等<sup>[30]</sup>为了进一步明确 GacS/GacA 和 QS 系统的关系,通过一系列突变实验表明 GacA 能够正向调控 *PpuI* 的表达,进而影响 N-AHLs 合成。研究表明 Putisolvin 的合成同时受 QS 和 GacS/GacA 双组分系统的调控,那么 GacA 能否通过正向调控 *PpuI* 的表达与 QS 系统耦联,这还需进一步研究(图 4)。

### 3 参与假单胞菌环脂肽合成的其他因子

GacS/GacA 双组分调控系统和 QS 系统在环脂肽的合成方面有着重要的作用。尽管如此,随着研

究的深入、基于现代分子生物学技术同传统的分离检测技术相结合,一些不受 QS 系统和 Gac 双组分系统控制的因子被鉴定,这些因子的缺失会影响环脂肽的合成。

Song 等<sup>[17]</sup>发现在荧光假单胞菌 *P. fluorescens* SS101 中,DnaK 调控 Massetolide 和嗜铁素合成,然而 DnaK 却不受 Gac 双组分系统控制。有意思的是,DnaK 在恶臭假单胞菌 *P. putida* PCL1445 中调控 Putisolvin 的合成却受 Gac 双组分系统控制,说明不同的环脂肽受 DnaK 调控的模式有一定的差别<sup>[13]</sup>;同时 Massetolide 的合成还受 ClpP、PrtR 等调控因子的影响。ClpP 是一个在细菌和真核生物中高度保守的丝氨酸蛋白酶,在胞内折叠和蛋白降解方面发挥着关键作用。ClpP 可能通过降解 MassAR 的转录抑制因子来调节 Massetolide 合成(图 2)。在丁香假单胞菌 *P. syringae* 中 GidA 是另一个和 Gac 双组分系统独立并影响 Syringomycin 和 Syringopeptin 合成的调控因子。突变 *GidA* 不仅使菌株 *P. syringae* 不产环脂肽,还影响许多其他的表型,包括菌体运动、嗜铁素的合成等。在突变 *GidA* 的丁香假单胞菌 *P. syringae* 中过表达 *SalA* 可以修复 Syringomycin 合成,这说明 *GidA* 在 *SalA* 的调控中发挥一定作用(图 1)<sup>[31]</sup>。HtpG 是 2010 年新发现的调控 Arthrfactin 的 Hsp90 类热激蛋白,突变 *HtpG* 基因导致 Arthrfactin 不能合成,但 Arthrfactin 合成酶基因却正常表达,因此,HtpG 可能参与正向转录因子的适当折叠或 Arthrfactin 的 NRPS 复合物的组装<sup>[32]</sup>。

环脂肽的合成除了必需的合成基因和调控基因外,在其合成基因簇的下游还存在转运蛋白基因,属于 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)家族,与环脂肽的分泌有关。如 Syringomycin 和 Syringopeptin 的输出需要 SyrD 和 PseABC 两个 ABC 转运系统<sup>[10]</sup>。SyrD 是一个 ATP-驱动的外排泵,敲除 *SyrD* 后仅有少量的 Syringomycin 和 Syringopeptin 产生;PseABC 与耐受小节分裂区家族(Resistance-nodulation-cell division, RND)外排系统同源,敲除 PseABC 中的

任何一个基因都会导致 Syringomycin 和 Syringopeptin 产量下降 40%–60%。在 Putisolvin<sup>[12]</sup> 和 Entolysin<sup>[18]</sup> 生物合成基因簇下游存在两个基因 *MacA* 和 *MacB*。在大肠杆菌 *E. coli* KAM3 中, *MacA*、*MacB* 蛋白和外膜通道蛋白 TolC 组成一个大环内脂 ABC 转运载体, 负责大环内酯类抗生素从胞内排出到胞外环境<sup>[33]</sup>。研究发现对恶臭假单胞菌 *P. putida* PCL1445 中的 *MacA* 和 *MacB* 进行敲除, Putisolvin 的产量下降了 70%, 而虫媒假单胞菌 *P. entomophila* 中的 Entolysin 几乎不合成。因此我们推测多样的 ABC 转运系统普遍在假单胞菌环脂肽运输中发挥着作用。

#### 4 讨论与展望

假单胞菌所产环脂肽因其抗菌、抗癌、抗病毒等多样的生物活性在作为新型抗生素方面具有潜在的应用价值。此外, 作为生物表面活性剂, 环脂肽具有比市场上所售化学合成的表面活性剂更多的优点, 如廉价底物利用性、稳定性及环境友好性等, 这使得环脂肽在食品加工、药物配方、生物降解等方面具有很好的应用前景。上述这些优点归属于环脂肽多样性的结构, 特定的结构赋予了其特定的活性及不同的应用领域, 如具有明显抗菌活性的环脂肽主要集中在 Viscosin、Amphisin、Putisolvin、Syringomycin 等家族<sup>[34]</sup>; Pseudofactin II 能够降低液滴表面张力, 其乳化性能强于化学合成的表面活性剂吐温-20 (Tween 20) 和聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100), 在生物治疗领域和环境修复方面具有很好的应用价值<sup>[20]</sup>。因此, 快速筛选产特定环脂肽的菌株成为必要。Rokni-Zadeh 等<sup>[23]</sup> 在编码假单胞菌 NRPSs C1、TE 区分别设计引物, 以此通过 PCR 扩增出的核酸序列差异来鉴别不同家族的环脂肽, 同时对扩增出的 15 条 C1、TE 区序列进行系统发育分析, 分别归属于 Viscosin、Amphisin 和 Entolysin 家族, 这一方法为快速筛选产特定环脂肽的假单胞菌提供了一条简单、快捷的思路。鉴于此, 本实验室在 Rokni-Zadeh 等的基础上设计了特异扩增环脂肽

NRPSs C1、TE 区的简并引物, 利用矩阵法开展了基于 PCR 的高通量分子筛选方法, 大大提高了筛选效率。同时对已扩增出的 C1、TE 区片段进行测序, 与已报道的环脂肽序列进行系统发育分析, 从序列上初步预测环脂肽的结构及所属家族。

近年来新一代测序技术的出现, 基因组 DNA 测序成本迅速降低, 测序速度大幅提高, 基于全基因组测序策略对假单胞菌所产环脂肽生物合成机制、代谢通路和调控网络的深入研究以及相关产物的开发成为可能, 为构建产环脂肽假单胞菌的高产工程菌株奠定了良好的理论基础。如在全基因组测序的支持下, Vallet-Gely 等<sup>[18]</sup> 通过生物信息学分析、预测, 并结合随机转座突变、基因回补实验以及传统的分离鉴定等技术手段很好地阐明了 Entolysin 在虫媒假单胞菌 *P. entomophila* 中的生物合成机制和可能的调控网络。同时, 基于全基因组序列分析, 从转录调控方面了解隐蔽性生物合成基因簇沉默机制, 可以获得更多新结构、新活性代谢产物。Laureti 等<sup>[35]</sup> 过表达链霉菌 *Streptomyces ambofaciens* 隐蔽性基因簇内一个可能是转录激活子的调节基因 *sanmR0484*, 结果在发酵液中检测到一类 51 元环的糖基化大环内酯 Stambomycins A-D, 生物活性测定显示 Stambomycins 对革兰氏阳性菌和肿瘤细胞具有较好的抑制效果。另一方面, 基于生物合成机制和代谢调控网络的了解, 利用合成生物学的思想可以引入新的功能基因或元件, 实现不同模块之间任意、高效的组装, 从而更好地筛选优良性状产物。如 De Bruijn 等<sup>[27]</sup> 将荧光假单胞菌 *P. fluorescens* SS101 中调控 Massetolide 合成的相关生物合成基因簇导入到荧光假单胞菌 *P. fluorescens* SBW25 突变株中, 成功实现了菌株 SBW25 同时产 Massetolide 和 Viscosin, 然而 ViscAR 调控因子对两者的合成是必需的。目前, 利用组合生物学对达托霉素的相关研究对深入了解假单胞菌产环脂肽的结构改造具有很好的指导意义<sup>[36]</sup>。

假单胞菌所产环脂肽具有较多优点, 但通过传统方法筛选到的菌株其产量通常较低, 阻碍了对环

脂肽的进一步研究和应用。虽然优化菌体生长培养基、生长条件都可以显著提高产量,但真正突破高产的方法是利用生物工程技术对假单胞菌进行遗传改造<sup>[37]</sup>。从调控的观点来看,可以通过增加正调节基因的拷贝数来增加次级代谢产物的生成量,也可以去除某些负调节子(阻遏子)使产物合成途径实现组成性表达。Dubern 等<sup>[14]</sup>对恶臭假单胞菌 *P. putida* PCL1445 中负责 Putisolvin 合成的负调控基因 *RsaL* 进行突变,显著提高了 Putisolvin 的产量。对于环脂肽 Syringomycin 和 Syringopeptin, SalA 对于这两者的产量起正调控作用,因此通过过表达 SalA 提高这两种环脂肽的产量是一条不错的途径<sup>[25]</sup>。通过人工合成、外源加入相似化学信号分子,改善相应群体感应系统的生物学功能并促进抗生素的合成已是不争的事实,对假单胞菌 QS 系统及其相关信号分子的深入研究可能会对产环脂肽高效菌株的筛选提供一些新的思路<sup>[38]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Shi T, Xie J. Regulation mechanisms underlying the biosynthesis of daptomycin and related lipopeptides[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113(3): 735-741
- [2] Janek T, Łukaszewicz M, Rezanka T, et al. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 6118-6123
- [3] Li W, Rokni-Zadeh H, De Vleeschouwer M, et al. The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62946
- [4] Roongsawang N, Washio K, Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 12(1): 141-172
- [5] Reder-Christ K, Schmidt Y, Dörr M, et al. Model membrane studies for characterization of different antibiotic activities of lipopeptides from *Pseudomonas*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2012, 1818(3): 566-573
- [6] Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O, et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(6): 1037-1062
- [7] Janek T, Krasowska A, Radwańska A, et al. Lipopeptide biosurfactant pseudofactin II induced apoptosis of melanoma A 375 cells by specific interaction with the plasma membrane[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57991
- [8] Cui X, Harling R, Mutch P, et al. Identification of N-3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas fluorescens* 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum sensing[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 111(4): 297-308
- [9] De Bruijn I, De Kock MJ, Yang M, et al. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(2): 417-428
- [10] Kang H, Gross DC. Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the *syr-syp* genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5056-5065
- [11] Lu SE, Wang N, Wang J, et al. Oligonucleotide microarray analysis of the salA regulon controlling phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(4): 324-333
- [12] Dubern JF, Coppoolse ER, Stiekema WJ, et al. Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445[J]. *Microbiology*, 2008, 154(7): 2070-2083
- [13] Dubern JF, Lagendijk EL, Lugtenberg BJ, et al. The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(17): 5967-5976
- [14] Dubern JF, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV. The ppul-rsaL-ppuR quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvin I and II[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(8): 2898-2906
- [15] Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(1): 97-113
- [16] De Bruijn I, De Kock M, De Waard P, et al. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(8): 2777-2789
- [17] Song C, Aundy K, Mortel J, et al. Discovery of new regulatory genes of lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 356(2): 166-175
- [18] Vallet-Gely I, Novikov A, Augusto L, et al. Association of hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, with cyclic lipopeptide production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3): 910-921
- [19] Bassarello C, Lazzaroni S, Bifulco G, et al. Tolaasins AE, five new lipopeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*[J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(5): 811-816
- [20] Janek T, Łukaszewicz M, Krasowska A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12(1): 24-32
- [21] Nielsen T, Christophersen C, Anthoni U, et al. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(1): 80-90
- [22] Quail JW, Ismail N, Pedras MSC, et al. Pseudophomins A and B, a class of cyclic lipopeptides isolated from a *Pseudomonas* species[J]. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 2002, 58(5): 268-271
- [23] Rokni-Zadeh H, Mangas-Losada A, De Mot R. PCR detection of novel non-ribosomal peptide synthetase genes in lipopeptide-producing *Pseudomonas*[J]. *Microbial Ecology*,

- 2011, 62(4): 941-947
- [24] Cheng X, Bruijn I, Voort M, et al. The Gac regulon of *Pseudomonas fluorescens* SBW25[J]. Environmental Microbiology Reports, 2013, 5(4): 608-619
- [25] Wang N, Lu SE, Records AR, et al. Characterization of the transcriptional activators SalA and SyrF, which are required for syringomycin and syringopeptin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(9): 3290-3298
- [26] Koch B, Nielsen TH, Sørensen D, et al. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4509-4516
- [27] De Bruijn I, Raaijmakers J. Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(14): 4753-4761
- [28] Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(2): 224-245
- [29] Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules[J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12(2): 182-191
- [30] Bertani I, Venturi V. Regulation of the N-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5493-5502
- [31] Kinscherf TG, Willis DK. Global regulation by gidA in *Pseudomonas syringae*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(8): 2281-2286
- [32] Washio K, Lim SP, Roongsawang N, et al. Identification and characterization of the genes responsible for the production of the cyclic lipopeptide arthrofactin by *Pseudomonas* sp. MIS38[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(5): 992-999
- [33] Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(19): 5639-5644
- [34] Mandal SM, Barbosa AE, Franco OL. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(2): 338-345
- [35] Laureti L, Song L, Huang S, et al. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(15): 6258-6263
- [36] Xie XM, Wang F, Chen JY, et al. Advances in daptomycin biosynthesis[J]. Microbiology China, 2013, 40(10): 1754-1764 (in Chinese)  
谢祥茂, 王凤, 陈俊勇, 等. 达托霉素生物合成研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1754-1764
- [37] Das P, Mukherjee S, Sen R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2008, 25(1): 165-186
- [38] van Wezel GP, McDowall KJ. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(7): 1311-1333