



氨基酶 PepN1 在细胞外催化杀稻瘟菌素的成熟

贺惠 禹贵阳 王先坤 邓子新 贺新义*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200030

摘要:【背景】肽核苷类抗生素杀稻瘟菌素(Blasticidin S, BS)生物合成途径的最后一步是亮氨酸杀稻瘟菌素(Leucylblasticidin S, LBS)水解成熟为 BS, BS 原始产生菌灰色产色链霉菌和异源表达菌株变铅青链霉菌 WJ2 清洗过的细胞均能催化这一步反应。前期我们确定在这两种菌中都含有编码 3 个氨基酶 PepN 同源蛋白的基因, 其中编码产物 PepN1 主要负责水解 LBS 和亮氨酸脱甲基杀稻瘟菌素(Leucyldemethylblasticidin S, LDBS), 且催化效率相当。但是, 相比于原始产生菌只积累 BS 这一种组分, 异源表达菌株变铅青链霉菌 WJ2 还积累了 LBS 和 LDBS, 这意味着原始产生菌与 WJ2 中 PepN1 的水解活性存在差异。【目的】研究 PepN1 在两个菌株中的表达和分泌对 BS 组分的影响。【方法】利用 PepN1 的多克隆抗体, 通过蛋白免疫印迹法(Western blot)比较不同生长时间的原始产生菌和异源表达菌株在细胞内、细胞培养液中 PepN1 的表达水平。硫酸铵沉淀收集两种菌株培养液中的蛋白, 通过 Western blot 检测 PepN1 的存在并在体外检测水解活性。【结果】原始产生菌第 2–6 天细胞内 PepN1 水平基本没有变化, 而异源表达菌株自第 4 天起细胞内 PepN1 开始减弱, 到第 6 天完全消失; 另一方面, Western blot 在原始产生菌细胞培养液中检测到 PepN1, 而在异源表达菌株中却没有检测到。细胞培养液水解 LDBS 的活性与 Western blot 检测到的 PepN1 表达水平相一致。【结论】BS 原始产生菌能持续表达合成 PepN1 并将一部分 PepN1 分泌到细胞外, 而异源表达菌株 WJ2 从第 4 天起则停止合成 PepN1, 第 2–6 天的细胞均不能将 PepN1 分泌到细胞外, 这导致 WJ2 中积累亮氨酸化的产物。两个菌株清洗过的细胞均可以水解 LDBS 和 LBS, 推测在 WJ2 体内消失的 PepN1 分泌到细胞壁上但没有释放到溶液中, 这部分 PepN1 可以在 WJ2 中将部分 LDBS 和 LBS 水解成对应的 DBS 和 BS。

关键词: 杀稻瘟菌素, 灰色产色链霉菌, 变铅青链霉菌, 氨基酶 N, 蛋白分泌系统

Maturation of Blasticidin S is catalyzed by extracellular aminopeptidase N1

HE Hui YU Gui-Yang WANG Xian-Kun DENG Zi-Xin HE Xin-Yi*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Background] The final step of the peptide nucleoside antibiotic Blasticidin S (BS) biosynthesis pathway is the leucylblasticidin S (LBS) hydrolyzation to BS. The intact cells of BS native producer *Streptomyces griseochromogenes* and the heterologous producer *Streptomyces lividans* WJ2 can catalyze this

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31470195)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62932943-2131; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

Received: 09-10-2018; Accepted: 29-12-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31470195)

*通信作者: Tel: 021-62932943-2131; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-10-09; 接受日期: 2018-12-29

step. Earlier work showed that both strains encode three PepN homologues, of which PepN1 from each strain is mainly responsible for the hydrolysis of LBS and leucyl-demethylblasticidin S (LDBS) at comparable catalytic efficiency. However, comparing with the native producer that only synthesizes BS, WJ2 can also generate LBS and LDBS. This result indicates that the competence of PepN1 is different in these two producers. **[Objective]** Investigation of the effects of the expression level and localization of PepN1 on the productivity and components of BS and derivatives in two producers. **[Methods]** The concentration of PepN1 in the cell lysate and in the cell culture medium of two BS producers at different growth time were tracked and compared by Western blot using PepN1 polyclonal antibody. The protein in the culture medium of the two strains was collected by ammonium sulfate precipitation, and the activity of hydrolyzed LDBS was assayed *in vitro*. **[Results]** On one hand, the content of PepN1 in the native strain didn't change from the 2nd to 6th day, whereas PepN1 started to diminish from the 4th day and totally disappeared on the 6th day in the heterologous strain. On the other hand, PepN1 was detected in the culture medium of native producer rather than the heterologous strain, which was consistent with the different activity of two strain's cell culture medium in hydrolyzing LDBS. **[Conclusion]** The BS native producer can continuously express PepN1 and export part of PepN1 outside of the cell. On the contrary, the heterologous producer WJ2 cease to synthesize PepN1 from the 4th day and it can't be detected in the culture medium, leading to the accumulation of leucylated intermediates. Given that intact cells of two strains are capable of hydrolyzing LDBS and LBS, PepN1 that diminished from the cell lysate might secrete to the cell wall, but not release into the medium, this part of activity accounts for the generation of DBS and BS in WJ2.

Keywords: Blasticidin S, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces lividans*, Aminopeptidase N, Protein secretion system

杀稻瘟菌素(Blasticidin S, BS)是由灰色产色链霉菌(*Streptomyces griseochromogenes*)产生的核苷类抗生素。由于良好的生物活性并且对鱼类无毒害,使它成为第一例大规模用于防治水稻稻瘟病的汞取代抗生素^[1]。近年来,BS和它的抗性基因在转基因研究中被广泛用于筛选转化或转染细胞,是转基因研究中的常规试剂^[2]。目前BS主要依靠化学方法合成。

由于原始产生菌遗传操作困难,我们课题组通过4次同源重组将BS合成基因簇嫁接到变铅青链霉菌染色体上,得到BS的异源表达宿主WJ2(*Streptomyces lividans* WJ2)^[3]。在原始产生菌和异源表达菌株的发酵液中,异源表达菌株产量低且积累了其他几种中间产物,包括脱甲基杀稻瘟菌素(Demethylblasticidin S, DBS)、亮氨酸脱甲基杀稻瘟菌素(Leucyl-demethylblasticidin S, LDBS)和亮氨酸杀稻瘟菌素(Leucylblasticidin S, LBS)(图1)。在前期的研究中,发现大肠杆菌中存在的氨肽酶N(PepN)能够水解LBS生成BS^[4](图2)。已经证明在灰色产色链霉菌和变铅青链霉菌中存在3个位于

BS合成基因簇外的PepN同源蛋白参与LBS的水解。通过体外水解速率和体内敲除实验的比较,证明了PepN1是参与BS成熟的主要水解酶且两菌株来源的PepN1水解速率相差不大^[5]。

在BS生物合成途径的最后几步中,DBS亮氨酸酰化生成LDBS,LDBS甲基化生成LBS,最后LBS被水解脱掉一分子亮氨酸后生成BS,中间产物LDBS和LBS的抑菌活性只有最终产物BS的1/20^[6]。由于清洗过的灰色产色链霉菌具有LBS水解活性^[7],推测在BS的生物合成中,细胞在胞内通过亮氨酸酰化生成LDBS来降低化合物毒性,在通

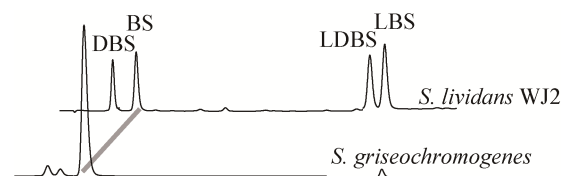


图1 BS原始产生菌灰色产色链霉菌与异源表达菌株变铅青链霉菌WJ2发酵产物比较

Figure 1 Comparative analysis of fermentation products of the native producer *Streptomyces griseochromogenes* and heterologous producer *Streptomyces lividans* WJ2

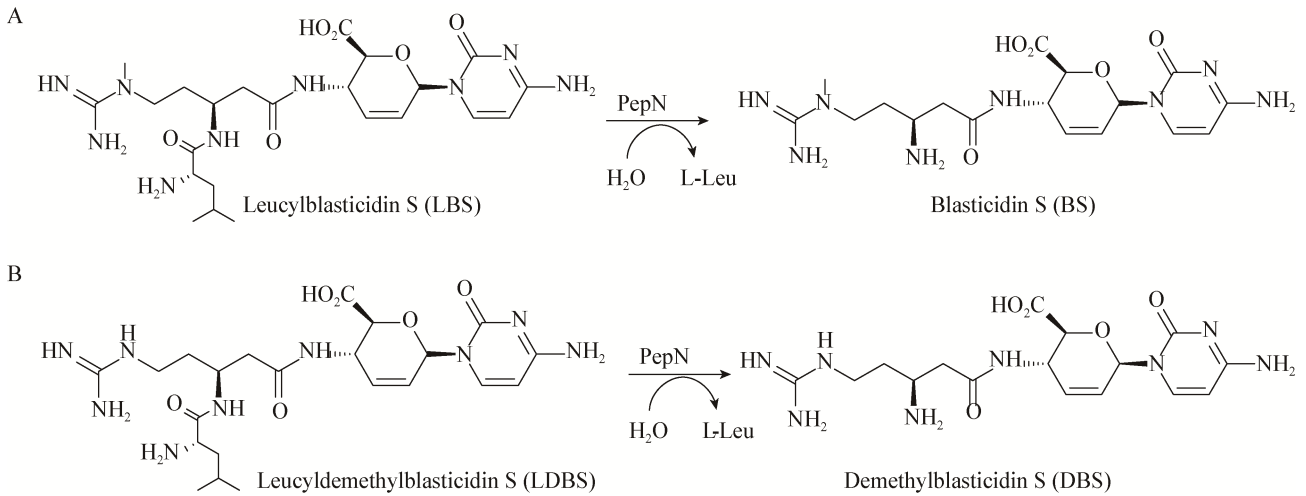


图2 PepN 水解相应底物生成 BS 和 DBS 的示意图

Figure 2 Schematic diagram to show excision of L-leucine from LBS and LDBS by PepN to form BS and DBS

注: A: PepN 水解 LBS 成 BS; B: PepN 水解 LDBS 成 DBS.

Note: A: PepN hydrolyzes LBS into BS; B: PepN hydrolyzes LDBS into DBS.

过细胞膜的过程中或在细胞外水解亮氨酸生成毒性更高的 BS, 从而实现细胞的自我保护^[6]。已有文献报道在链霉菌中, PepN 能够分泌在细胞外^[8-9]。对 PepN1 的蛋白质一级和二级结构预测中, 结果显示 PepN1 没有明显的跨膜区域, 也没有分泌蛋白所具有的信号肽。这一点与自我保护的理论显然是相矛盾的。本研究选取 PepN1 为研究对象, 利用制备的多克隆抗体分析 PepN1 在 BS 原始产生菌和异源表达菌株中表达水平的差异, 以此来揭示异源表达菌株产量低且产物具有多样性的原因, 增加对 BS 生物合成途径的认识, 为提高 BS 产量提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

大肠杆菌 BL21 ($\Delta pepN$)、灰色产色链霉菌 (*Streptomyces griseochromogenes*) 和变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 由上海交通大学分子微生物学实验室保存。

1.1.2 培养基^[10]

大肠杆菌固体培养基为 LA, 液体培养基为 LB。灰色产色链霉菌和变铅青链霉菌固体培养基

为 SFM, 液体培养基为 TSBY。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白预染 Marker (Blue Plus III Protein Marker), 北京全式金生物技术有限公司; HPLC、Innoval C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 安捷伦科技有限公司; 多克隆抗体制备, 武汉爱博泰克生物科技有限公司; DAB 显影试剂盒、二抗, 上海翊圣生物科技有限公司; PVDF 膜、透析膜, 生工生物工程(上海)股份有限公司。台式超声细胞破碎仪, MSE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析

氨肽酶 N (PepN) 同源蛋白或核苷酸序列采用 NCBI BLAST 引擎与各基因序列数据库进行比对。

抗原与 PepN 同源蛋白序列相似性使用 Clustal Omega 在线软件输入氨基酸序列进行比对。

1.2.2 PepN1 多克隆抗体的制备

灰色产色链霉菌的主要水解酶 PepN1sgr 与变铅青链霉菌的主要水解酶 PepN1sli 的氨基酸序列具有 90% 的相似性, 根据两个蛋白一致性序列, 选取处于蛋白 N 端和中间肽段 Disorder score 数值较高的肽段进行合成。Disorder score 数值越高, 说

明选取的肽段越有可能处于蛋白的非结构区,与蛋白的原始结构越相似,免疫后获得的抗体特异性越高。合成的肽段作为抗原免疫兔子,免疫后采血纯化抗体。后续的实验选取特异性更高的多克隆抗体 E4196: 1.85 mg/mL, 该抗体由 PepN1 蛋白 N 端多肽(VPGTNLTREEARQRATLC)免疫兔子后纯化并浓缩得到。

1.2.3 菌体的收集与链霉菌细胞抽提物(Cell free extracts, CFE)的制备

4 °C、4 500 r/min 离心 10 min 收集 TSBY 液体培养基培养后的链霉菌菌体,轻轻倒掉上清后用 CFE 缓冲液洗涤菌体两遍。用 2 mL EP 管称取相等重量菌体(0.2–0.4 g), 1 mL CFE 缓冲液重悬菌体后于–80 °C 保存备用。

制备 CFE 时,将保存的细胞样品置于冰上超声破碎。破碎后于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 上清液即为制备好的 CFE, 可直接用于体外实验或冻存于–80 °C 备用。

CFE 缓冲液: K₃PO₄ 50 mmol/L, DTT 1 mmol/L, 盐酸调 pH 至 8.0。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot)

制备好的蛋白样品上样至 SDS-PAGE 胶进行电泳,使用蛋白预染 Marker 确定目的蛋白大小与位置。转膜:蛋白胶用 ddH₂O 清洗后,将相同大小的 PVDF 膜平铺在凝胶上,在凝胶/PVDF 膜两侧各平铺 5 张润湿的定性滤纸,玻璃棒来回滚动去除各层之间的气泡。倒入转膜液后,根据电极方向装入电泳装置中进行转膜(4 °C 冷室中, 100 V, 70 min)。封闭:转膜结束后,取出 PVDF 膜用 ddH₂O 清洗后,置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中,脱色摇床(40 r/min)上封闭约 2.5 h。一抗孵育: ddH₂O 清洗封闭后的 PVDF 膜 3 遍,置于含有一抗(制备的 PepN1 多克隆抗体)稀释倍数为 3 000 倍的 TBST 溶液中,脱色摇床(40 r/min)上孵育约 2.5 h。二抗孵育: TBST 溶液清洗孵育一抗后的 PVDF 膜 3 遍,置于含有二抗[过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)]稀释倍数为 15 000 倍的 TBST 溶液中,脱色摇床

(40 r/min)上孵育约 1.5 h。显影: TBST 溶液清洗 PVDF 膜 3 遍,使用 DAB 显影试剂盒进行显影,加 ddH₂O 终止显影。

转膜液: Tris 3.03 g, 甘氨酸 14.4 g, 甲醇 200 mL, 蒸馏水定容至 1 L。

TBST 溶液: 1 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 50 mL, 5 mol/L 的 NaCl 30 mL, Tween 20 1 mL, 蒸馏水定容至 1 L。

1.2.5 蛋白表达与大肠杆菌细胞抽提物(CFE)的制备

LB 过夜培养已转入表达质粒的大肠杆菌 BL21($\Delta pepN$), 以 1%接种比例接种至新的 LB 中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值约 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 16 °C 诱导 20 h, 同时培养液中不加入 IPTG 诱导的菌液作为阴性对照。分别收集 4 mL 大肠杆菌菌体, 0.7 mL CFE 缓冲液重悬菌体后超声破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清得到蛋白过表达 CFE。SDS-PAGE 电泳检测蛋白是否表达并进行定量。

1.2.6 硫酸铵沉淀收集细胞培养液蛋白质

4 °C、4 500 r/min 离心 10 min 收集培养液上清, 0.22 μ m 滤膜过滤培养液以去除残留的细胞。4 °C 冷室内使用磁力搅拌器向培养液中缓慢加入硫酸铵粉末至硫酸铵浓度为 80% (25 mL 液体中加入 13.32 g 固体硫酸铵), 放置约 0.5 h 使蛋白充分沉淀。4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集沉淀, 2 mL 缓冲液(含 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)溶解沉淀, 装入透析膜后在缓冲液中透析 24 h。透析后使用 50 kD 超滤管浓缩至约 200 μ L。

1.2.7 HPLC 检测细胞培养液 LDBS 水解活性

利用 LBS 和 LDBS (俄勒冈州立大学 Mark Zabriskie 教授馈赠)可以被 PepN 水解为 BS 和 DBS 的特点检测细胞培养液是否具有水解活性。反应体系中含有 LDBS 和收集的细胞培养液蛋白质样品, 缓冲液(含 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)补齐至 30 μ L, 30 °C 反应 2 h。反应后加入 2 μ L 三氟乙酸(TFA)终止反应, 加入 32 μ L 三氯甲

烷振荡 1 min, 常温下 12 000 r/min 离心 10 min 取上清进行 HPLC 分析。使用 Innoval C18 柱在 Agilent 系列 1260 上进行 HPLC 分析。流动相 A 相选用含有 0.1% TFA 的水溶液, B 相为甲醇, 样品以 0.3 mL/min 的流速洗脱, 缓冲液 B 的浓度在 40 min 内从 5% 升至 40%^[11]。

2 结果与分析

2.1 PepN1 是主要负责 BS 成熟的水解酶

通过检索灰色产色链霉菌(GenBank: CP016279.1)和变铅青链霉菌(GenBank: CP009124.1)全基因组中 *pepN* 基因序列, 在两个菌株中找到 3 个 PepN 同源蛋白编码基因, 并将其编码产物分别命名为 PepN1sgr、PepN2sgr 和 PepN3sgr, 以及 PepN1sli、PepN2sli 和 PepN3sli。为了研究这 3 个 PepN 同源蛋白在 BS 成熟中的作用, 在变铅青链霉菌 WJ2 中构建了 *pepN* 同源基因缺失菌株, 包括分别单独缺失 *pepN1sli*、*pepN2sli* 和 *pepN3sli* 的菌株($\Delta N1$ 、 $\Delta N2$ 和 $\Delta N3$), 以及双缺失菌株($\Delta N1N2$ 、 $\Delta N1N3$ 和 $\Delta N2N3$)和三缺失菌株($\Delta N1N2N3$)。使用这些菌株清洗过的细胞以及细胞抽提物(CFE)水解 LBS 的效率来表征水解活性。结果如图 3 所示, $\Delta N1$ 突变株的细胞和 CFE 失去水解 LBS 活性, 而 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 和 $\Delta N2N3$ 这 3 个突变株水解 LBS 活性几乎没有降低。说明在 3 个 PepN 同源蛋白中, PepN1 是主要

负责水解 LBS 为 BS 的氨肽酶。野生型和各个突变株的细胞以及 CFE 水解 LBS 的活性基本保持一致, 只有 $\Delta N1N2$ 突变株的细胞和 CFE 有差异, 推测 PepN3 可能主要定位于细胞内, 或者细胞破碎后某些金属离子有机会和 PepN3 接触, 激活了 PepN3 水解 LBS 活性。因此选取 PepN1 为研究对象, 分析其在原始产生菌和异源表达菌中表达与分泌的差异, 以期解释 BS 异源表达菌株产量低且组分多的原因。

2.2 PepN1 多克隆抗体的特异性

将上述 6 个 PepN 同源蛋白序列与制备多克隆抗体所使用的抗原序列进行比较, 结果显示抗原序列与 PepN1 有很高的相似性, 其他同源蛋白也有 7-12 个氨基酸与抗原序列相同(图 4)。由于多克隆抗体具有抗原决定簇多样的特点, 除了研究对象 PepN1 外, 其他同源蛋白也有一定几率能够与抗体结合。同时, 这 6 个 PepN 同源蛋白的分子质量较为接近, 有可能会影响对 PepN1 表达量的判断。

为了确定制备所得的多克隆抗体对 PepN1 识别的特异性, 使用禹贵阳博士在变铅青链霉菌 *S. lividans* WJ2 中构建的系列 *pepN* 同源基因缺失菌株的 CFE 进行蛋白质免疫印迹(Western blot)。如图 5A 所示, 在 Western blot 显影图中, 只有 $\Delta N2$ 、 $\Delta N3$ 和出发菌株 *S. lividans* WJ2 这 3 个菌株的 CFE

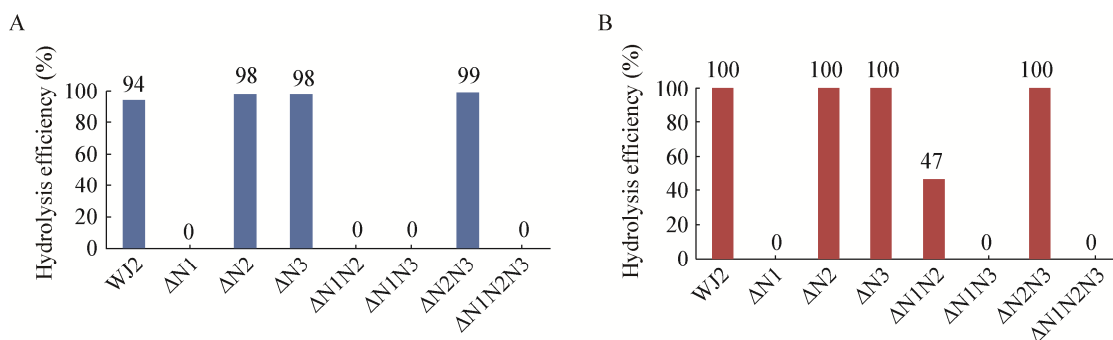


图 3 *pepN* 同源基因缺失突变株和野生型 WJ2 清洗过的细胞以及细胞抽提物(CFE)水解 LBS 活性分析

Figure 3 Activity analysis of hydrolyzing LBS by cells and cell free extracts (CFE) of mutants lacking *pepN* homologues genes and wild-type strain WJ2

注: A: 突变株清洗过的细胞水解 LBS 活性分析; B: 突变株的 CFE 水解 LBS 活性分析。

Note: A: Activity analysis of hydrolyzing LBS by cells of mutant strains; B: Activity analysis of hydrolyzing LBS by CFE of mutant strains.


```

Antigen      VPGTNLTREEARQRAITLC-----
PepN1sli    MPGTNLTREEARQRAITLLTVDSYEIDLDTGA
PepN1sgr    MPGTNLTREEARQRAKLLTVDSYEIDLDTLGA
PepN2sli    MPGENLSRDEARERAAALLSVDGYEVSVDVRSR
PepN2sgr    MPGENLSTRDEARERAAALLSVDGYEVALDLRRA
PepN3sli    --MSVLTRDEAQRTRSRLLDVHYYAIDLDTLGR
PepN3sgr    --MSVITRDEAQLRAQLLDVHRYTIELDLTTG

```

图 4 PepN 同源蛋白与抗原氨基酸序列相似性分析
Figure 4 Similarity analysis of amino acid sequence between PepN homologous protein and antigen

样品显影后出现 PepN1 对应大小条带, 其他突变株没有出现任何条带, 说明制备所得的多克隆抗体识别 PepN1 特异性较高。

由于 PepN2 和 PepN3 两个蛋白可能在细胞内表达量较低而不能在 Western blot 中显影, 为了排除这一可能性, 使用禹贵阳博士构建的在大肠杆菌中分别表达 PepN1sli、PepN2sli、PepN3sli、PepN1sgr、PepN2sgr 和 PepN3sgr 这 6 个蛋白菌株的 CFE, Western blot 检测抗体与这 6 个蛋白结合情况。在大量表达 PepN 同源蛋白的情况下, PepN1 特异性识别抗体能力很高, 因此显影条带颜色较深。PepN2 能够识别抗体, 但特异性很低, 因此条带较弱, 而 PepN3 则完全不能特异性识别抗体(图 5B)。说明制备所得的多克隆抗体识别 PepN1

特异性很高, PepN2 和 PepN3 同源蛋白的存在对使用 Western blot 研究 PepN1 蛋白在体内表达水平变化的影响不大。

2.3 BS 原始产生菌和异源表达菌株细胞内 PepN1 表达水平

BS 的异源表达菌株 *S. lividans* WJ2 发酵产物相比原始产生菌灰色产色链霉菌不仅产量低, 还积累了一部分中间产物。在前期的研究中证明 PepN1sgr 和 PepN1sli 都很稳定, 且水解 LBS 的速率几乎没有差异^[4]。说明产物的组分多样性可能是因为 PepN1 表达水平的差异造成的。选取在 TSBY 培养基上培养 2-6 d 菌丝体的 CFE 分别与 PepN1 抗体进行杂交检测, 结果如图 6A 所示, *S. lividans* WJ1 (无 BS 合成基因簇) 与 *S. lividans* WJ2 杂交条带在 2-6 d 变化趋势相同, 说明外源基因的导入对 PepN1 蛋白表达没有影响。灰色产色链霉菌在 2-6 d 中一直有 PepN1 杂交条带, 且蛋白量几乎没有变化。不同的是, *S. lividans* WJ2 样品在 2 d 和 3 d 有 PepN1 杂交条带, 从第 4 天开始杂交条带减少甚至消失(图 6B)。说明 *S. lividans* WJ2 中 PepN1 可能在培养后期被降解或者分泌到细胞外。

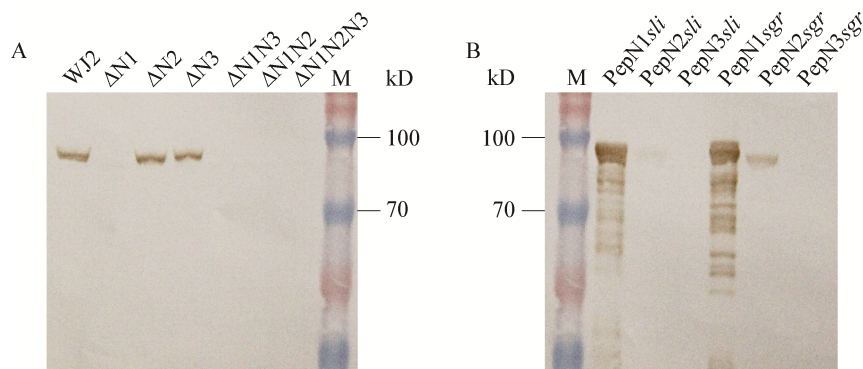


图 5 PepN1 多克隆抗体特异性分析
Figure 5 Assay of the specificity for PepN1 polyclonal antibody

注: A: 使用制备的 PepN1 多克隆抗体对缺失 *pepN* 同源基因的突变株和野生型菌株 WJ2 的 CFE 进行印迹特异性分析; B: 使用制备的 PepN1 多克隆抗体对大肠杆菌中纯化链霉菌来源的 PepN 同源蛋白的菌株 CFE 进行印迹特异性分析。

Note: A: Blot specificity analysis was performed on the CFE of mutants lacking *pepN* homologues genes and wild-type strain WJ2 using the prepared PepN1 polyclonal antibody; B: Blot specificity analysis was performed on the CFE of the strains expressing *Streptomyces*-derived PepN homologous protein in *E. coli* using the prepared PepN1 polyclonal antibody.

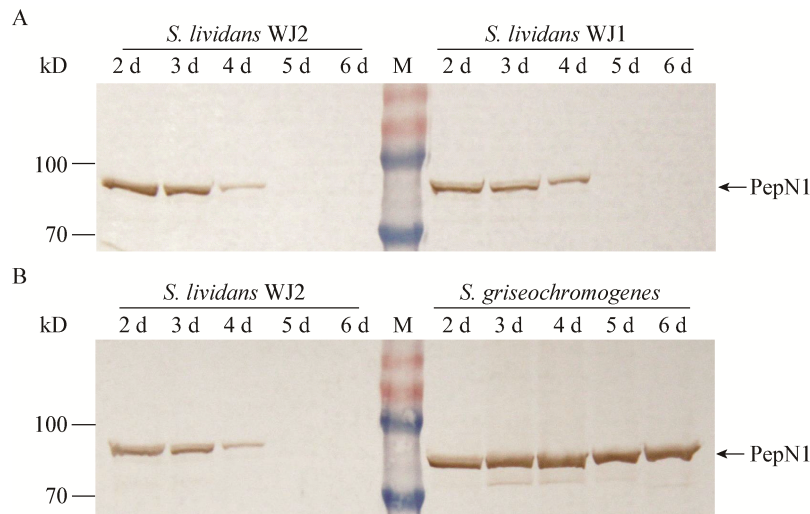


图 6 Western blot 分析 PepN1 体内蛋白表达水平

Figure 6 Analysis of the PepN1 expression level by Western blot

注: A: BS 异源表达菌株 *S. lividans* WJ2 与未导入 BS 合成基因簇的菌株 *S. lividans* WJ1 在第 2-6 天体内 PepN1 蛋白表达水平的变化; B: BS 异源表达菌株 *S. lividans* WJ2 与原始产生菌灰色产色链霉菌在第 2-6 天体内 PepN1 蛋白表达水平的变化。

Note: A: Analysis of PepN1 expression level in the Blasticidin S heterologous producer *S. lividans* WJ2 and *S. lividans* WJ1 (without BS biosynthetic gene cluster) from the 2nd to 6th day; B: Analysis of PepN1 expression level in the Blasticidin S heterologous producer *S. lividans* WJ2 and the native producer *S. griseochromogenes* from the 2nd to 6th day.

2.4 Western blot 分析细胞培养液中是否含有 PepN1

为了追踪 *S. lividans* WJ2 细胞内在培养后期消失的 PepN1, 用硫酸铵沉淀收集原始产生菌和异源表达菌这两种菌株培养液中的蛋白进行分析。选取 TSBY 液体培养基培养第 2-4 天以及第 6 天的培养液为实验材料, 用 80% 的硫酸铵沉淀收集灰色产色链霉菌和 *S. lividans* WJ2 培养液蛋白并透析浓缩后, 通过蛋白胶检测能够发现灰色产色链霉菌培养液中含有大量蛋白, 而 *S. lividans* WJ2 培养液中蛋白量较低, 两个样品蛋白量有很大差异。为了避免 *S. lividans* WJ2 样品因浓度过低而影响判断, 将 *S. lividans* WJ2 的样品冻干浓缩至 1/4 并提高上样量进行杂交, 分析培养液中是否含有 PepN1。结果如图 7 所示, 在灰色产色链霉菌培养液中含有 PepN1, 因而能与抗体杂交出现条带, 而 *S. lividans* WJ2 培养液样品即使在浓缩后仍然没有杂交条带。该结果说明灰色产色链霉菌 PepN1 的表达水平较高, 并将一部分 PepN1 分泌在细胞外, 而 *S. lividans* WJ2 则没有。结合两菌株的发

酵结果(图 1), 表明高活性的 BS 主要是在细胞外形成的, 而 *S. lividans* WJ2 中 BS 的生成可能是细胞内的 PepN1 以及附着在细胞外表面的 PepN1 所致。

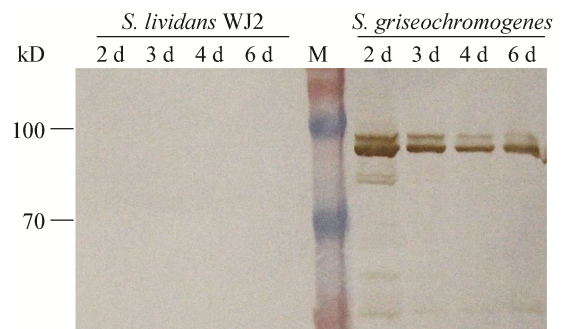


图 7 Western blot 分析细胞培养液中是否含有 PepN1
Figure 7 Western blot analysis of the presence of PepN1 in the cell culture medium

注: 因 *S. lividans* WJ2 样品浓度较低, 将 *S. lividans* WJ2 培养液硫酸铵沉淀物透析并浓缩后, 冻干样品提高样品浓度。进行 Western blot 检测时 *S. lividans* WJ2 上样量为 10 μ L, 而灰色产色链霉菌上样量为 5 μ L。

Note: Due to the low protein concentration of *S. lividans* WJ2 sample, its protein precipitates of culture medium by ammonium sulfate were dialyzed and concentrated. The sample was lyophilized to increase the sample concentration. The sample loaded for *S. lividans* WJ2 was 10 μ L in the Western blot, while that for *S. griseochromogenes* is 5 μ L.

2.5 HPLC 检测细胞培养液水解活性

为了更直观地展现出灰色产色链霉菌能够将 PepN1 分泌到细胞外, 使用硫酸铵沉淀收集了培养液中的蛋白, 并用培养液中的蛋白来水解 LDBS, HPLC 检测产物的生成来测试培养液中 LDBS 的水解活性(以 LDBS 替代 LBS 来检测蛋白的水解活性)。如图 8A 所示, 灰色产色链霉菌样品将 LDBS 全部转化为 DBS, 这与 Western blot 结果是一致的, 表明灰色产色链霉菌分泌了一部分 PepN1 在细胞外。而 *S. lividans* WJ2 样品在 2 h 的反应中只有微弱的水解活性, 培养液中几乎没有 PepN1 存在(图 8B)。

3 讨论与结论

氨肽酶广泛存在于原核和真核生物中, 大部分为氨肽酶属金属酶^[12], 这些氨肽酶因其功能的不同而被定位于细胞不同位置。约 97% 的氨肽酶存在于可溶性组分中, 其中的 65% 存在于细胞质中, 16% 存在于革兰氏阳性菌细胞周质或革兰氏阴性菌细胞壁中, 16% 被分泌到细胞外^[13]。氨肽酶起多种作用, 例如翻译后修饰、蛋白成熟、降解激素、信号肽和营养物质的再循环等^[12-13]。关于

PepN 的亚细胞定位已有一些报道, 例如在变铅青链霉菌(*S. lividans* 66)中过表达时, 在细胞培养液中检测到 PepN 条带且具有活性^[8]。在乳酸乳球菌中, 完整的细胞和细胞抽提物有 PepN 的活性, 细胞培养液中未检测到, 免疫金标记显示 PepN 位于细胞内^[14-15]。在大肠杆菌中, 通过电子显微镜观察不溶产物的生成, 认为 PepN 由镁离子桥介导产生与细胞外表面的静电相互作用^[16-17]。

本研究利用 Western blot 分析了 BS 原始产生菌和异源表达菌株培养液中 PepN1 的存在。结果显示原始产生菌能够分泌一部分 PepN1 在培养液中, 这对于 BS 的生产和细胞的自我保护是有利的。而异源表达菌株细胞内 PepN1 在培养后期逐渐消失, 且没有在培养液中检测到, 说明在异源表达菌株中 PepN1 不能分泌到培养液中, 限制了 BS 的成熟, 这是导致异源表达菌株产量低且积累其他中间产物的原因。

讨论 1: 变铅青链霉菌中 PepN1 的去向。通过 Western blot 测定 2-6 d 中细胞内外 PepN1 的含量, 发现变铅青链霉菌到 3-4 d 就停止合成 PepN1, 4 d 之后则检测不到 PepN1。一方面合成的 PepN1 被

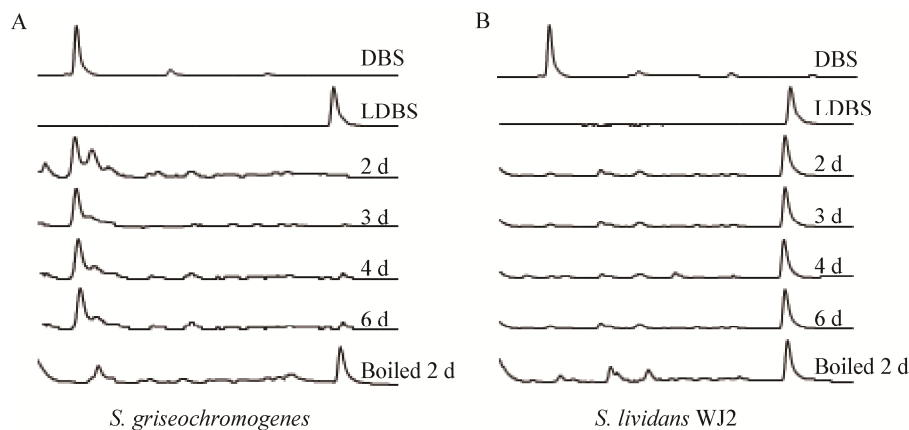


图 8 HPLC 检测细胞培养液样品水解 LDBS 活性

Figure 8 Analysis of LDBS hydrolytic activity of cell culture medium by HPLC

注: A: HPLC 分析 BS 异源表达菌株 *S. lividans* WJ2 第 2-4 天和第 6 天培养液样品水解 LDBS 活性; B: HPLC 分析 BS 原始产生菌灰色产色链霉菌第 2-4 天和第 6 天培养液样品水解 LDBS 活性。反应条件为 30 °C 2 h。Boiled 2 d 表示将第 2 天样品高温失活后加入反应体系, 以此作为水解反应的阴性对照。

Note: A: Analysis of hydrolyzed LDBS activity of BS heterologous producer *S. lividans* WJ2 on day 2-4 and day 6 by HPLC; B: Analysis of hydrolyzed LDBS activity of BS native producer *S. griseochromogenes* on day 2-4 and day 6 by HPLC. The reaction conditions were 30 °C 2 h. The boiled protein from supernatant of day 2 culture was used as the negative control.

外排至细胞外表面, 但是并没有分泌到培养液中, 因为 2–6 d 的 WJ2 细胞有水解 LBS 的活性; 另一方面, PepN1 可能发生自我剪切或者被其他蛋白酶水解。

讨论 2: LBS 或者 LDBS 在细胞外水解生成对应的终产物。BS 生物合成途径中, LDBS 是 BS 合成的一个关键中间产物, 它在细胞内的合成有两个作用: DBS 的细胞毒性和 BS 相似, 胍基侧链 Beta 位氨基需要被亮氨酰化形成 LDBS 来降低其细胞内毒性^[7]; 另一方面是由合成过程的先后顺序决定的, 只有 LDBS 能被甲基化转化为 LBS, 而 DBS 不能直接甲基化形成 BS^[11]。如果 PepN1 在细胞内负责 LDBS 的水解, 那么 DBS 的亮氨酰化则是徒劳的, 合成途径就会在 DBS 亮氨酰化和去亮氨酸水解之间循环, 细胞不会白做无用功, 所以 LDBS 的水解不太可能发生在细胞内。同样, LBS 的水解如果发生在细胞内, 则会产生高毒性的 BS 影响细胞的生长, 所以 LDBS 和 LBS 被水解成对应的 DBS 和 BS 应该是在细胞外生成的。

讨论 3: 清洗过的细胞水解活性导致发酵液中一部分 BS 的积累。在变铅青链霉菌 WJ2 的细胞培养液和培养后期细胞裂解液中几乎检测不到 PepN1, 也没有检测到 LDBS 或 LBS 的水解活性。但仍然能在 WJ2 发酵液中检测到 BS 和 DBS。我们推测它们是由细胞壁外表面的 PepN1 水解 LBS 和 LDBS 而形成的。因为 BS 原始产生菌灰色产色链霉菌和异源表达菌株 WJ2 第 2–6 天清洗过的细胞均具有水解活性, 这部分蛋白的水解效率较低, 可能因菌丝体聚集而减少了与溶液中 LDBS 或 LBS 作用的机会, 所以 WJ2 发酵液中也能检测到部分 BS 的生成。

所有细菌中经典的蛋白分泌途径包括 Sec 和 Tat 途径^[17-18], 需要目的蛋白具有信号肽或者跨膜结构域。对 PepN1 蛋白结构的预测中没有发现信号肽及明显的跨膜结构域, 这意味着 PepN1 可能通过其他途径被分泌到细胞外。比较灰色产色链霉菌和变铅青链霉菌基因组中的分泌系统相关基因, 发现

灰色产色链霉菌中有 10 个基因编码七型分泌系统 (Type VII secretion system) 蛋白, 变铅青链霉菌中有 7 个基因编码七型分泌系统蛋白。经过序列相似性比对, 发现有 4 对相同功能注释基因的相似性很低, 其中 3 个基因在灰色产色链霉菌基因组中相邻。七型分泌系统最早于 2003 年从分枝杆菌中被发现^[19], 是革兰氏阳性菌中一种独特的蛋白分泌系统^[20]。在分枝杆菌中已鉴定出毒力小蛋白质 EsxA 和 EsxB 是由七型分泌系统分泌, 这些分泌蛋白没有可识别的分泌信号肽序列^[21-22]。PepN1 也没有可识别的信号肽序列, 推测 PepN1 的分泌很可能与七型分泌系统相关, 这些猜测还需要后续实验进行验证。PepN1 分泌途径的探索能够完善 BS 生物合成途径, 增强对肽核苷类抗生素生物合成的认识, 对于生物合成基因簇中存在的簇外基因参与生物合成也具有一定借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Takeuchi S, Hirayama K, Ueda K, et al. Blasticidin S, a new antibiotic[J]. The Journal of Antibiotics, 1958, 11(1): 1-5
- [2] IzuMi M, Miyazawa H, Kamakura T, et al. Blasticidin S-resistance gene (*bsr*): a novel selectable marker for mammalian cells[J]. Experimental Cell Research, 1991, 197(2): 229-233
- [3] Li L, Wu J, Deng ZX, et al. *Streptomyces lividans* Blasticidin S deaminase and its application in engineering a Blasticidin S-producing strain for ease of genetic manipulation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2349-2357
- [4] Yu GY, Li L, Liu XY, et al. The standalone aminopeptidase PepN catalyzes the maturation of Blasticidin S from leucylblasticidin S[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17641
- [5] Yu GY. Study on maturation mechanism of Blasticidin S and improvement of its yields[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2017 (in Chinese)
禹贵阳. 杀稻瘟菌素的成熟机制及产量提高研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2017
- [6] Zhang QB, Cone MC, Gould SJ, et al. Reevaluation of the final steps in the biosynthesis of Blasticidin S by *Streptomyces griseochromogenes* and identification of a novel self-resistance mechanism[J]. Tetrahedron, 2000, 56(5): 693-701
- [7] Zhang QB. Advanced studies of Blasticidin S biosynthesis[D]. Oregon: Oregon State University, 1998
- [8] Butler MJ, Aphale JS, Binnie C, et al. The aminopeptidase N-encoding *pepN* gene of *Streptomyces lividans* 66[J]. Gene, 1994, 141(1): 115-119
- [9] Hatanaka T, Arima J, Uraji M, et al. Characterization, cloning, sequencing, and expression of an aminopeptidase N from *Streptomyces* sp. TH-4[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(2): 347-356

- [10] Kieser T, Bibb MJ, Chater KF, et al. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000
- [11] Wang XK, Du AQ, Yu GY, et al. Guanidine *N*-methylation by BlsL is dependent on acylation of beta-amine arginine in the biosynthesis of Blastidicin S[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1565
- [12] Taylor A. Aminopeptidases: structure and function[J]. FASEB Journal, 1993, 7(2): 290-298
- [13] Gonzales T, Robert-Baudouy J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1996, 18(4): 319-344
- [14] van Alen-Boerrigter IJ, Baankreis R, de Vos WM. Characterization and overexpression of the *Lactococcus lactis pepN* gene and localization of its product, aminopeptidase N[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(9): 2555-2561
- [15] Tan PST, Chapot-Chartier MP, Pos KM, et al. Localization of peptidases in Lactococci[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(1): 285-290
- [16] Murgier M, Pelissier C, Lazdunski A, et al. Aminopeptidase N from *Escherichia coli*: unusual interactions with the cell surface[J]. European Journal of Biochemistry, 1977, 74(3): 425-433
- [17] Addlagatta A, Gay L, Matthews BW. Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* suggests a compartmentalized, gated active site[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(36): 13339-13344
- [18] Bagnoli F, Rappuoli R. Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-Positive Bacteria[M]. Cham: Springer, 2017
- [19] Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, et al. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(22): 13001-13006
- [20] Abdallah AM, Gey Van Pittius NC, Champion PAD, et al. Type VII secretion—mycobacteria show the way[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(11): 883-891
- [21] Houben ENG, Korotkov KV, Bitter W. Take five — Type VII secretion systems of *Mycobacteria*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2014, 1843(8): 1707-1716
- [22] Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, et al. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(3): 667-679

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊，中国科技核心期刊，CSCD核心期刊，曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2019年每册定价80元，全年960元，我们免邮费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413