



研究报告

前导肽切割位点对 II 类羊毛硫细菌素切割酶活性的影响

张彤^{1,2} 张杰¹ 钟瑾^{*1,2}

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

2 中国科学院大学 北京 100049

摘要:【背景】II类羊毛硫细菌素大多是由革兰氏阳性菌的核糖体合成并经过翻译后修饰产生的小肽，其生物合成的最后一步是由转运蛋白 LanT N端的肽酶结构域对前导肽进行切割，释放出有活性的羊毛硫细菌素，但目前关于该类羊毛硫细菌素前导肽的切割机制尚不清楚。【目的】考察前导肽切割位点对不同链球菌来源的肽酶结构域 BovT150 和 SboT150 酶切活性的影响。【方法】运用不依赖连接酶的定点突变技术构建前导肽切割位点突变的前体蛋白表达载体，在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中分别表达纯化野生型前体(BovAm 和 SboAm)、突变型前体及对应的切割酶(BovT150 和 SboT150)，构建体外酶切体系，利用 HPLC、抑菌活性分析和 MALDI-TOF MS 检测前导肽的切除情况。【结果】BovT150 不仅能够切割 BovAm 的 GG 和 GA 位点，也能切割 SboAm 的 GG 和 GA 位点，并且对切割位点为 Gly 的前体切割活性较高；SboT150 仅能切割 SboAm 的 GG 和 GA 位点，而对切割位点为 Ala 的活性较高。【结论】II类羊毛硫细菌素前导肽切割位点氨基酸残基的改变不同程度地影响切割酶的切割效率。

关键词：羊毛硫细菌素，前导肽，切割酶，切割位点

Effects of cleavage sites of leader peptides on the activities of class II lantibiotic peptidases

ZHANG Tong^{1,2} ZHANG Jie¹ ZHONG Jin^{*1,2}

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Microbial Resources, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Class II lantibiotics are ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, mainly produced by Gram-positive bacteria. In the last step of its biosynthesis, the N-terminal peptidase domain of transporter protein LanT cleaves the leader peptide to produce active lantibiotics. However, the removal mechanism of leader peptide in this class lantibiotics is still not clear. [Objective] To investigate the effects of cleavage sites on the activity of peptidases domain BovT150 and SboT150 from different streptococci. [Methods] Expression vectors for the precursor peptides with mutated cleavage sites were constructed by site-directed ligase-independent mutagenesis and then the wild-type precursors (BovAm and SboAm), their mutant precursors, as well as the corresponding peptidases (BovT150 and SboT150) were

Foundation items: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201503134); National Natural Science Foundation of China (31570114)

*Corresponding author: Tel: 86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

Received: 21-02-2019; Accepted: 28-03-2019; Published online: 15-05-2019

基金项目：公益性行业(农业)科研专项(201503134)；国家自然科学基金(31570114)

*通信作者：Tel: 010-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

收稿日期：2019-02-21；接受日期：2019-03-28；网络首发日期：2019-05-15

expressed and purified in *E. coli*. The precursors were separately incubated with each peptidase *in vitro* and the removal efficiencies of the leader peptides were assessed by HPLC, antimicrobial activity assay and MALDI-TOF MS. **[Results]** Both cleavage sites GG and GA of BovAm and SboAm allowed BovT150 to retain peptidase activity, and Gly was more suitable to be processed by BovT150. Only cleavage sites GG and GA of SboAm were accessible to SboT150, which cleaved Ala more efficiently. **[Conclusion]** The change of amino acid residues at the cleavage sites of leader peptides affected the efficiencies of class II lantibiotic peptidases in varying degrees.

Keywords: Lantibiotics, Leader peptide, Peptidase, Cleavage site

羊毛硫细菌素(Lantibiotics)是一类主要由革兰氏阳性菌的核糖体合成, 经过翻译后修饰产生的天然产物, 它具有丰富的结构多样性和抑菌活性多样性^[1-2]。羊毛硫细菌素最显著的特点是分子内含有形成硫醚环的特殊氨基酸——羊毛硫氨酸(Lan)和 β -甲基羊毛硫氨酸(MeLan)^[3], 它们赋予了羊毛硫细菌素一系列优良的性质, 例如热稳定性、蛋白酶抗性、耐酸性以及抑制耐药性菌株(如 MRSA 和 VRE 等)的特性^[4]。近年来, 抗生素的滥用导致细菌耐药性增强, 而新型抗感染类药物的缺乏已经对全球公共卫生安全造成了严重的影响。羊毛硫细菌素因其独特的抑菌机制^[5-7]而不易引起细菌产生耐药性, 并且它作为一种小肽, 容易被消化吸收而不产生残留, 不会对人体产生副作用^[8], 因此对羊毛硫细菌素的研究和应用已引起了科研者的广泛关注。

羊毛硫细菌素的生物合成是一个相对复杂的过程, 需要生物合成基因簇上的多个基因共同发挥作用, 以基因座名称 *lan* 统一命名该基因簇。根据修饰酶 LanM 的不同, 羊毛硫细菌素可分为 4 类(I、II、III、IV 类)^[9], 其中 II 类 Lantibiotics 由双功能酶 LanM 完成修饰且其成员众多, 具有较优良的抑菌活性^[10]。II 类 Lantibiotics 基因簇包括前体基因 *lanA* (经过翻译后修饰的前体为 LanAm)、修饰酶基因 *lanM* 和转运基因 *lanT* 等。但是某一个特定 Lantibiotic 有其专属的命名, 例如 Lacticin 481 生物合成相关基因采用 *lac* 命名, 而 Bovicin HJ50 生物合成相关基因采用 *bov* 命名。II 类 Lantibiotics 生物合成过程如下: 首先在核糖体中合成前体蛋白 LanA (包括前导肽和核心肽两部分); LanA 经修饰酶 LanM 的作用, 形成修饰后的前体蛋白(LanAm), 然

后 LanAm 被转运蛋白 LanT 转运到胞外并切除前导肽, 形成具有活性的羊毛硫细菌素^[11]。

转运蛋白 LanT 在 II 类羊毛硫细菌素的生物合成过程中发挥着重要的功能, 它属于 ABC 转运子成熟与分泌蛋白(ABC transporter maturation and secretion, AMS)家族, 由三部分组成: N 端的肽酶结构域 PEP (Peptidase domain)、C 端的核苷酸结合结构域 NBD (Nucleotide-binding domain)和中间的跨膜结构域 TMD (Transmembrane domain)^[12]。其中 N 端肽酶结构域的主要作用是对底物前导肽 C 末端的 GG 或 GA 位点进行切割, 从而切除前导肽。研究表明 LanT N 端 150 个氨基酸(LanT150)可能具备体外切割前导肽的功能, 而目前仅有 LctT150 (Lacticin 481 的切割酶)和 NukT150 (Nukacin ISK-1 的切割酶)被证明具备该功能^[13-14], 其中 Ferguson Ihnken 等发现前导肽中的 GG 位点对 LctT150 肽酶水解活性很重要^[13]。

本工作是对两个 II 类羊毛硫细菌素 Bovicin HJ50 和 Salivaricin B 进行研究, 它们分别对巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megatherium*) 和酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 具有很好的抑制作用^[15-16]。Bovicin HJ50 是由牛链球菌 (*S. bovis*) HJ50 产生的, 其前体的前导肽是由切割酶 BovT150 切掉, 而 Salivaricin B 是由唾液链球菌 (*S. salivarius*) K12 产生的, 由切割酶 SboT150 将其前体的前导肽切掉。从分子结构可以看出(图 1A), Bovicin HJ50 和 Salivaricin B 分别具有典型和非典型(含有一个二硫键形成的环结构) II 类 Lantibiotics 的特征, 然而它们前导肽切割位点对切割效率影响的研究还未见报道。本研究以这两种 Lantibiotics 为研究对象, 考

察不同的前导肽切割位点分别对切割酶 BovT150 和 SboT150 活性的影响, 为开发高效的羊毛硫细菌素切割酶奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要菌株和质粒

E. coli DH5 α 、BL21(DE3)和 Rosetta(DE3)感受态细胞购于北京博迈德基因公司。质粒 pET28a-*bovAM* (Bovicin HJ50 的前体蛋白 BovAm 表达载体)、pET28a-*bovT150*、pETDuet-*sboAM* (Salivaricin B 的前体蛋白 SboAm 表达载体)和 pET28a-*sboT150* 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒和 DNA Marker 均购于博迈德公司; *Dpn* I 限制性内切酶购于 Thermo Scientific 公司; IPTG 购于 VWR Chemicals 公司; Protein marker 购于 Genstar 公司; High-Fidelity Master Mix 和 DNA Loading Buffer 购于北京擎科公司; 一步法快速克隆试剂盒购于翊圣公司; Ni-NTA His 结合树脂购于 GE 公司; 色谱纯乙腈购于 MREDA 公司; 色谱纯三氟乙酸(TFA)购于 DIKMA 公司。

PCR 仪购于 Bio-Gener 公司; DNA 琼脂糖凝胶电泳仪购于君意公司; 蛋白电泳仪购于 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统购于天能公司; 高效液相色谱 (HPLC)购于岛津公司; 5800 蛋白质组分析器质谱仪购于 Applied Biosystems 公司。引物由北京天一辉远公司合成, 测序由北京睿博兴科公司完成。

1.1.3 培养基

培养 *E. coli* 使用 LB 培养基^[17], 需要时向其中加入终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素或 20 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素。

培养指示菌 *Micrococcus luteus* NCIB 8166 使用 S1 培养基^[18]。

1.2 方法

1.2.1 前体序列比对分析

将 II 类羊毛硫细菌素的前体 LctA、NukA、MutA、SboA 和 BovA 氨基酸序列以 FASTA 格式导入 ClustalW 网站(<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)进行序列比对, 随后用 DNAMAN 软件对结果进行标注分析。

1.2.2 前导肽序列突变载体构建

根据 Chiu 等所述的定点突变方法(Site-directed Ligase-Independent Mutagenesis, SLIM)^[19]设计引物(表 1), 将 Bovicin HJ50 的前导肽切割位点氨基

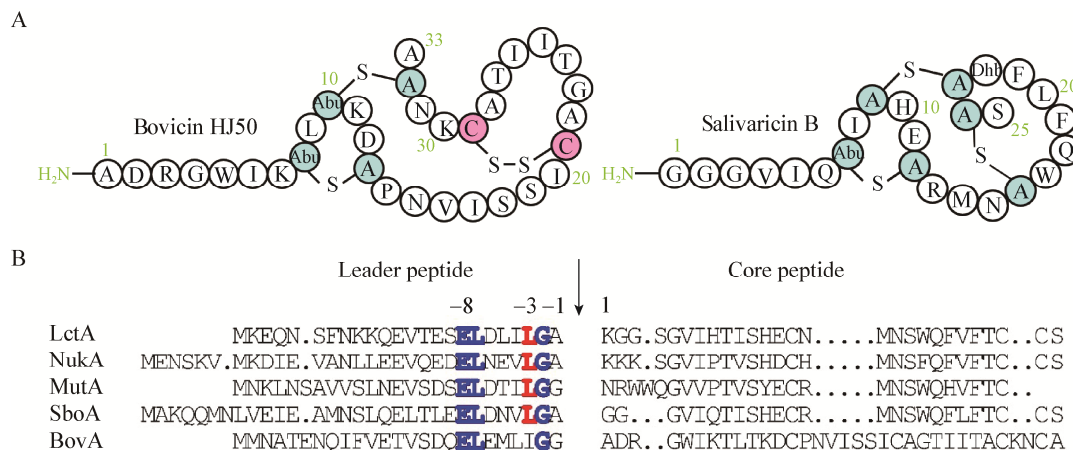


图 1 II 类羊毛硫细菌素前体序列比对(A)及其一级结构(B)

Figure 1 Sequence alignment of class II lantibiotics precursors (A) and primary structure of the lantibiotics (B)

注: 红色: 序列相似性为 75%; 蓝色: 序列相似性为 100%; -1: 前导肽 C 端的最后一位氨基酸; 1: 核心肽 N 端的第一位氨基酸; 箭头: 切割酶切割前导肽的位置。

Note: Red: Sequence similarity level is 75%; Blue: Sequence similarity level is 100%; -1: The last amino acid of C-terminal region of the leader peptide; 1: The first amino acid of N-terminal region of the core peptide; Arrow: The position of leader peptide cleaved by peptidase.

表 1 本研究所用到的 PCR 引物

Table 1 Primers used in this study

| Primers name | Primers sequence (5'→3') | Size (bp) | Purpose |
|--------------|--------------------------------------|-----------|--|
| BovG-1A-L1 | GAAATGTTAATTGGTGCTGCAGATCGTGGATGG | 8 085 | Constructing pET28a- <i>bovAM</i> (G-1A) |
| BovG-1A-S1 | TAATTCTTGGTCACTCACAGTCTC | | |
| BovG-1A-L2 | CCATCCACGATCTGCAGCACCAATTAACATTTC | | |
| BovG-1A-S2 | ATTAAGACTTTAACAAAAGATTGTC | | |
| SboA-1G-L1 | GATTACTCCACCACCACCACCAAGAACGTTATCAAG | 8 324 | Constructing pETDuet- <i>sboAM</i> (A-1G) |
| SboA-1G-S1 | CAAACCATTTACACGAATG | | |
| SboA-1G-L2 | CTTGATAACGTTCTTGGTGGTGGTGGTGGAGTAATC | | |
| SboA-1G-S2 | TTCTTCAAGAGTCAATTCTTG | | |

酸残基由 Gly(ggt)突变成 Ala(gct), 突变体前体基因命名为 *bovA*(G-1A), 而将 Salivaricin B 的 Ala(gct)突变成 Gly(ggt), 突变体前体基因命名为 *sboA*(A-1G)。以 pET28a-*bovAM* 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系(50 μ L): 2 \times High-Fidelity Master Mix 25 μ L, 引物 BovG-1A-L1 和 BovG-1A-S1 (10 μ mol/L)各 2 μ L, 质粒 pET28a-*bovAM* (150 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。PCR 回收产物经 *Dpn* I 酶切后进行退火反应, 然后将产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 待克隆长出后挑取转化子培养, 提取质粒测序鉴定, 得到突变载体 pET28a-*bovAM*(G-1A)。按照同样的方法构建突变载体 pETDuet-*sboAM*(A-1G)。

1.2.3 蛋白表达纯化

将质粒 pET28a-*bovAM*、pET28a-*bovAM*(G-1A) 和 pET28a-*bovT150* 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, pETDuet-*sboAM*、pETDuet-*sboAM*(A-1G) 和 pET28a-*sboT150* 转化至 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞。*E. coli* BL21(DE3)和 Rosetta(DE3)于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养, 待菌液浓度 OD_{600} 为 0.6–0.8 (对数生长期)时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 18 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 20 h。4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 30 min 收集菌体, 重悬菌体以 400 W 功率超声破碎 25 min, 切割酶蛋白 BovT150 和 SboT150 利用钴柱纯化, 其余前体蛋白利用镍柱纯化, 具体

操作见说明书。

1.2.4 体外酶切反应

两种切割酶 BovT150 和 SboT150 经超滤浓缩后, 交换至 Assay buffer (50 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L Na₂SO₄, pH 7.4)。根据 Tricine-SDS-PAGE 胶上对应的蛋白条带宽度估算底物 BovAm、SboAm 及其突变体和切割酶 BovT150、SboT150 的浓度, 并将底物和切割酶分别稀释成相同浓度。按照终浓度为 BovT150 \approx 2 \times BovAm 建立体外酶切反应体系。体系总体积为 400 μ L, 25 $^{\circ}$ C 分别反应 3 h 和 8 h 后取样用于后续分析。

1.2.5 HPLC 分析酶切产物

反应时间为 3 h 的反应液以 13 000 r/min 离心 5 min 后, 0.22 μ m 水系滤膜过滤, 得到的样品利用 HPLC 进行检测。使用岛津公司的 InertSustain 系列 C18 分析柱, 采用梯度洗脱的方法, 流速为 1.0 mL/min。流动相 A 相为含 0.1% TFA 的超纯水, B 相为含 0.1% TFA 的色谱纯乙腈。该 C18 柱的平衡浓度为 5% B, 洗脱浓度范围为 30%–70% B, 25 min。

1.2.6 抑菌活性测定

反应液的抑菌活性采用琼脂打孔扩散法测定。挑取 *M. luteus* NCIB 8166 种子平板的菌, 悬浮混匀于 5 mL 生理盐水, 加入融化的 S1 固体培养基混匀, 倒入无菌培养皿中。待培养基凝固后, 用直径 7 mm 打孔器在指示菌平板上打孔, 每孔加入 50 μ L 样品, 30 $^{\circ}$ C 培养 24–36 h 观察抑菌圈。

1.2.7 质谱鉴定

取 200 μL 反应 8 h 的酶切产物由 Zip-tip (Millipore) 除盐, 最后溶于 60% 的乙腈水溶液中制备成样品。质谱采用 MALDI-TOF MS 5800 蛋白质组分析器进行样品分子量检测。基质 CHCA 水溶液 (5 mg CHCA 溶解于 1 mL 50% 乙腈水溶液, 含 0.1% TFA) 上样量为 1 μL , 样品上样量为 1.2 μL 。

2 结果与分析

2.1 前体序列分析

为了比较前导肽序列的保守性, 利用 ClustalW 对 5 种 II 类的羊毛硫细菌素前体 (LctA、NukA、MutA、SboA 和 BovA, 前 3 种的前体序列在 II 类羊毛硫细菌素中具有代表性) 氨基酸序列进行比对 (图 1B), 从图 1B 可以看出, 这 5 种羊毛硫细菌素的前导肽在 -3 至 -8 区间的序列相似性较高, 由于该区域被认为与 II 类羊毛硫细菌素的成熟加工密切相关, 推测 BovT150 和 SboT150 具有与其他 II 类切割酶相似的切割机制。BovA 和 MutA 的前导肽切割位点是 GG, 而 SboA 等其他 3 种均为 GA, 可以看出切割位点残基的保守性较高, 因此考察 GG 和 GA 位点的变换对切割酶活性的影响。

2.2 异源表达前体蛋白和切割酶蛋白

运用本实验室建立的羊毛硫细菌素半体外生物合成系统 (Semi-*in vitro* biosynthesis, SIVB)^[20], 在 *E. coli* 中共表达前体基因 *lanA* 和修饰酶基因 *lanM*, 获得修饰后的前体蛋白 LanAm, 将 LanAm 与单独表达获得的切割酶 LanT150 在体外进行酶切反应, 从而得到有活性的羊毛硫细菌素, 该系统结合定点突变技术可方便快捷地获得突变体前体蛋白。本研究针对两个羊毛硫细菌素前导肽切割位点的氨基酸残基进行突变, 将 *bovA* 前导肽 -1 位氨基酸 Gly 突变为 Ala, 命名为 *bovA*(G-1A); 将 *sboA* 前导肽 -1 位氨基酸 Ala 突变为 Gly, 命名为 *sboA*(A-1G)。在 *E. coli* BL21(DE3) 中将野生型前体基因 *bovA* 和突变型前体基因 *bovA*(G-1A) 分别与 *bovM* 共表达, 得到经过修饰的野生型前体蛋白 His₆-BovAm 和突变型前体蛋白 His₆-BovAm(G-1A)。计算得到它们的分子量分别为 8 277 Da 和 8 291 Da, 经 Tricine-SDS-PAGE 检测可以看到清晰的条带 (图 2A)。由于 *E. coli* BL21(DE3) 不含稀有密码子的 tRNA, 因此在 *E. coli* Rosetta(DE3) 中运用同样的共表达方法获得含稀有密码子的野生型前体 His₆-SboAm (分子量大小

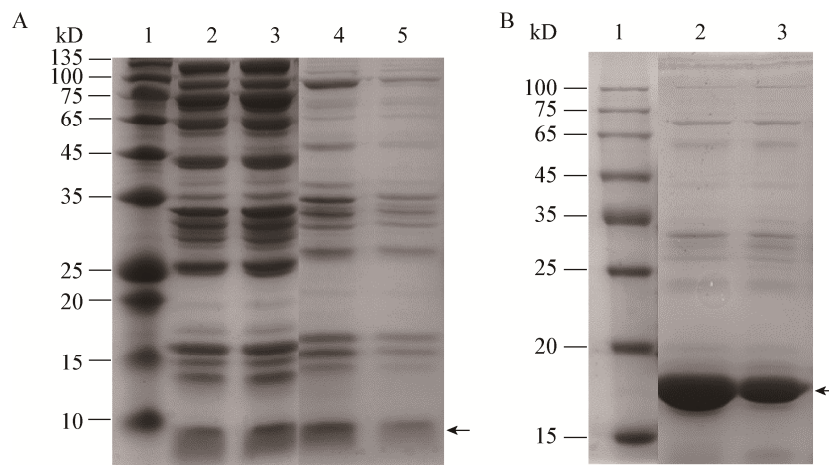


图 2 四种前体蛋白(A)和两种切割酶(B)的 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Figure 2 Tricine-SDS-PAGE of four precursor peptides (A) and two peptidases (B)

注: A: 1: 蛋白 Marker; 2: 纯化的 His₆-BovAm 蛋白; 3: 纯化的 His₆-BovAm(G-1A)蛋白; 4: 纯化的 His₆-SboAm 蛋白; 5: 纯化的 His₆-SboAm(A-1G)蛋白。B: 1: 蛋白 Marker; 2: 纯化的 BovT150-His₆ 蛋白; 3: 纯化的 SboT150-His₆ 蛋白。

Note: A: 1: Protein marker; 2: Purified His₆-BovAm; 3: Purified His₆-BovAm(G-1A); 4: Purified His₆-SboAm; 5: Purified His₆-SboAm(A-1G). B: 1: Protein marker; 2: Purified BovT150-His₆; 3: Purified SboT150-His₆.

为 7 740 Da)和突变型前体 His₆-SboAm(A-1G) (分子量大小为 7 726 Da) (图 2A)。另外两种切割酶 BovT150-His₆和 SboT150-His₆的大小分别为 18.6 kD 和 18.5 kD (图 2B)。

2.3 HPLC 检测体外酶切产物

利用切割酶在体外酶切修饰后的前体可以得到成熟肽。由于成熟肽和前体的疏水性不同, 经过 C18 反相柱分离后会在不同保留时间出现色谱峰。以 His₆-BovAm 为底物, 分别利用 BovT150 和 SboT150 进行酶切。从图 3A 中可以看到, BovT150 酶切对应前体 BovAm (色谱保留时间为 19.5 min), 得到了成熟肽 Bovicin HJ50 的色谱峰(保留时间为 17.5 min)。然而 SboT150 酶切 BovAm 后未出现成熟肽的色谱峰, 表明 SboT150 不能切掉 BovAm 的

GG 位点。当将 Bovicin HJ50 前导肽的切割位点突变为 GA 时, SboT150 仍然不能切掉 Bovicin HJ50 的前导肽。此时虽然 BovT150 也能切割 GA 位点, 但产生的成熟肽浓度明显低于 GG 位点切割产生的, 表明 BovT150 的切割效率降低(图 3B 和表 2)。

当以 His₆-SboAm 为底物时, SboT150 酶切得到了成熟肽 Salivaricin B (其前体和成熟肽的保留时间分别为 24.5 min 和 21 min, 图 3C)。此时 BovT150 竟也能切割 SboAm 的前导肽, 得到成熟肽的色谱峰。将 Salivaricin B 前导肽切割位点由 GA 突变为 GG 后, SboT150 和 BovT150 都能将其切掉, 但从成熟肽浓度可以看出, SboT150 的相对切割效率降低, 而 BovT150 的相对效率升高(图 3D 和表 2)。

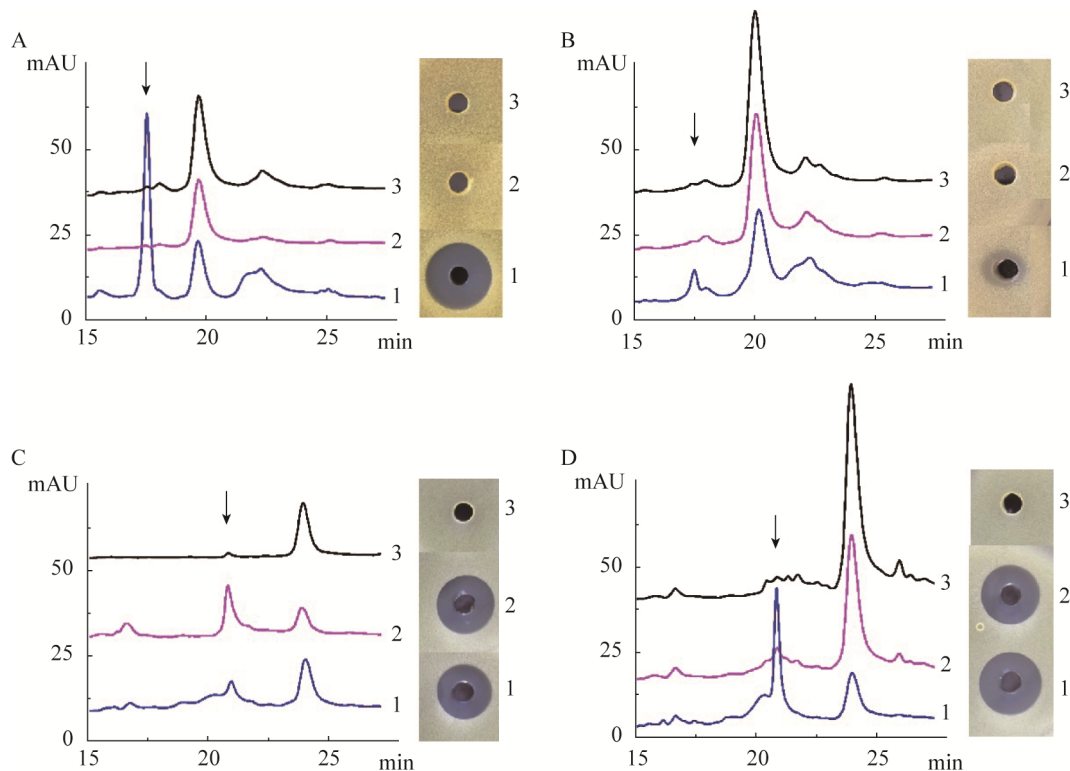


图 3 酶切产物的 HPLC 谱图和抑菌活性

Figure 3 The HPLC spectra and antimicrobial activities of the enzymatic products

注: A: BovAm; B: BovAm(G-1A); C: SboAm; D: SboAm(A-1G). 1: 反应 Buffer; 2: SboT150; 3: BovT150; 箭头: 成熟肽吸收峰。

Note: A: BovAm; B: BovAm(G-1A); C: SboAm; D: SboAm(A-1G). 1: Assay buffer; 2: SboT150; 3: BovT150; Arrow: The peak of mature peptides.

表 2 成熟肽的产量

Table 2 The production of mature peptides

| 前体 Precursor | 切割酶 Peptidase | 峰面积 Peak area |
|-----------------|------------------|------------------|
| BovAm | BovT150 | 1 199 422 |
| BovAm | SboT150 | 0 |
| BovAm(G-1A) | BovT150 | 125 946 |
| BovAm(G-1A) | SboT150 | 0 |
| SboAm | BovT150 | 258 560 |
| SboAm | SboT150 | 384 887 |
| SboAm(A-1G) | BovT150 | 677 391 |
| SboAm(A-1G) | SboT150 | 207 476 |

2.4 酶切产物的抑菌活性检测

由于前体的前导肽被切除后才能显示出抑菌活性, 通过对酶切产物抑菌活性的分析也能考察 BovT150 和 SboT150 对野生型和突变型前体的酶切活性。从图 3 右侧的抑菌活性图可以看出, 出现成

熟肽色谱峰(图 3A 和 3B 的保留时间为 17.5 min, 图 3C 和 3D 的保留时间为 21 min)的酶切产物均显示抑菌活性, 未在对对应时间出现吸收峰的酶切产物均无抑菌活性。以上结果再次表明, BovT150 可以切割 BovAm 和 SboAm 前导肽的 GG 和 GA 位点, 而 SboT150 仅能切割 SboAm 的 GG 和 GA 位点。

2.5 质谱鉴定酶切产物

为了验证切割酶对前体切割后是否产生了成熟肽以及切割位点是否和预期一致, 对上述酶切产物进行了质谱分析。从 Bovicin HJ50 和 Salivaricin B 前导肽的-1 位氨基酸残基进行切割, 产生的成熟肽分子量分别为 3 428 Da 和 2 732 Da^[16,21]。质谱结果显示, 当以 BovAm 作为底物时, BovT150 酶切后的反应产物检测到了分子量为 3 428.0 Da 的质谱峰(图 4A), 而在 SboT150 酶切产物中没有检测到(图 4B),

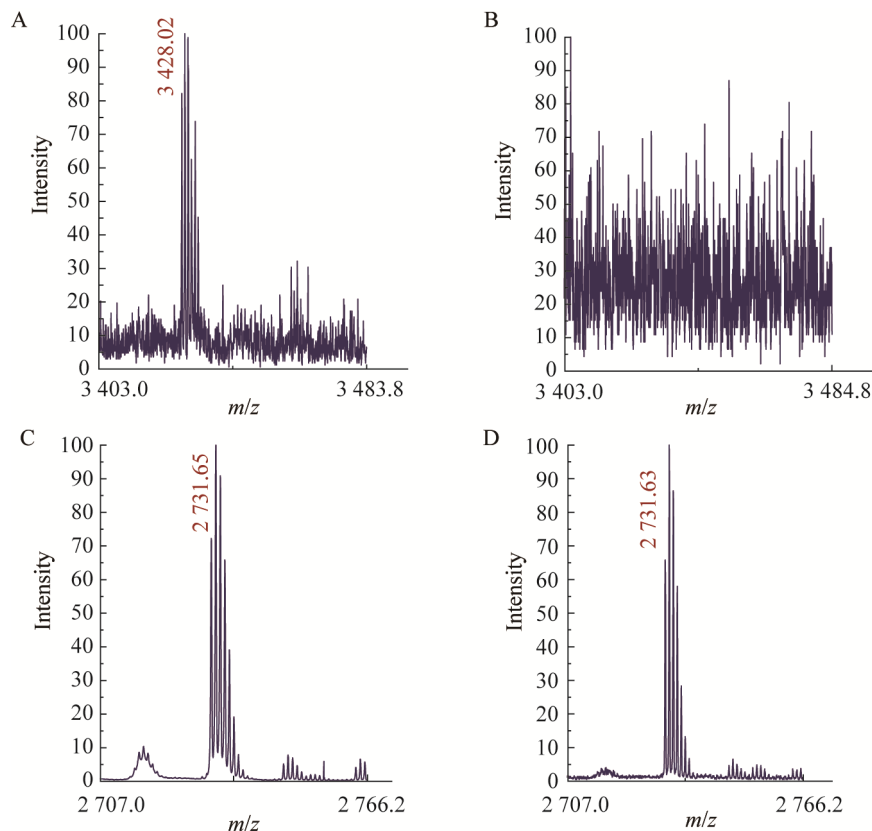


图 4 酶切产物的质谱图

Figure 4 Mass spectra of the enzymatic products

注: A: BovT150 切割 BovAm; B: SboT150 切割 BovAm; C: BovT150 切割 SboAm; D: SboT150 切割 SboAm.

Note: A: BovAm cleaved by BovT150; B: BovAm cleaved by SboT150; C: SboAm cleaved by BovT150; D: SboAm cleaved by SboT150.

表明 BovT150 能切割 BovAm 的 GG 位点, 而 SboT150 不能。当以 BovAm(G-1A) 作为底物时, 经 SboT150 酶切后未检测到成熟肽的分子量, 表明 SboT150 不能切割底物的 GA 位点; 该底物经 BovT150 酶切也未出现相应的分子量, 推测可能是由于成熟肽的产量较低(从 HPLC 成熟肽的色谱峰可以看出)。当分别以 SboAm 和 SboAm(A-1G) 作为底物时, BovT150 和 SboT150 的酶切产物都检测到了分子量为 2 731.6 Da 的质谱峰(图 4C 和 4D), 表明 BovT150 和 SboT150 均能切割 SboAm 的 GG 和 GA 位点。详细的酶切产物质谱检测结果见表 3。

3 讨论与结论

羊毛硫细菌素的生物合成是一个十分复杂却又精准的过程, 而前导肽在这个过程中发挥的作用一直是研究的热点。一般认为, 前导肽可以保护合成的前体不被产生菌的蛋白酶降解, 且保护产生菌不被自身产生的物质杀伤(一般未去除前导肽的前体不具有生物活性)。羊毛硫细菌素的前导肽中还存在修饰酶的识别基序和转运蛋白的识别序列及切割位点, 以指导其进行翻译后修饰和成熟过程^[22]。目前 II 类羊毛硫细菌素中, 有关前导肽切割位点的报道较少, 值得深入研究。例如对 Mutacin II 的研究发现, 前导肽 G-1A 的突变引起 Mutacin II 成熟肽的生物合成受阻, 推测是由于切割位点的突变导致前体不能被切割酶切掉^[23]。将 Lacticin 481 的前导

肽切割位点 Ala-1 突变为残基 Asp、Lys 或 Ile, 完全破坏了 His₁₀-LctT150 的蛋白酶活性, 而 A-1G 突变体前体却能够被 His₁₀-LctT150 切割, 并且与野生型的成熟肽产量相差不大^[13]。在本研究中, Bovicin HJ50 和 Salivaricin B 的分子结构分别是非典型和典型 II 类羊毛硫细菌素的代表, 对其前导肽切割位点的研究有助于全面了解该类前导肽的切割机制。虽然两者前导肽序列相似度很低, 但都具有保守的-3 至-8 区, 以及切割位点 GG 或 GA(图 1A)。结合液相色谱、抑菌活性以及质谱分析结果发现, BovT150 对前导肽切割位点为 Gly 的切割效率较高, 而 SboT150 对前导肽切割位点为 Ala 的切割效率较高。这表明 BovT150 和 SboT150 对酶切位点的选择性都不同于 LctT150(其对 Gly 和 Ala 的作用效率几乎一致)。

BovT150 和 SboT150 对不同切割位点的选择性可能与其空间结构或底物序列相关。由于迄今 II 类羊毛硫细菌素切割酶的空间结构尚未得到解析, 从其属于同一家族(半胱氨酸蛋白酶)的 ComA 的 PEP 空间结构可以得到一些信息^[24]。该 PEP 的晶体结构数据显示, 其结构中存在着一个底物通道, 适合底物前导肽的双甘氨酸位点(GG)进入。当将 GG 位点突变为 GA 后, 该 PEP 的催化效率下降约 800 倍, 推测是由于突变后残基较大, 使 GA 位点较难进入底物通道^[24]。本研究中发现 BovT150 对切割位点 GG 的催化活性明显高于 GA, 推测也可能是与 BovT150 的底物结合区域有关。然而 SboT150 对切割位点 GA 的催化活性高于 GG, 这与底物通道理论的预测不一致, 推测除氨基酸残基的大小外, 该位点氨基酸残基的性质(例如疏水性)或空间构象也影响切割酶的效率。这些推论还有待进一步的研究确认。

目前针对羊毛硫细菌素的 PEP 研究不多, 主要集中在 PEP 对同源前导肽的切割活性研究。本研究中 BovT150 能够切除异源羊毛硫细菌素前体 SboAm 及其突变体 SboAm(A-1G)的前导肽, 而 SboT150 对 BovAm 及其突变体都无酶切活性, 表

表 3 酶切产物的分子量

Table 3 Molecular weights of the enzymatic products

| 前体 Precursor | 切割酶 Peptidase | 切割位点 Cleavage site | 分子量 Molecular weights (Da) |
|-----------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|
| BovAm | BovT150 | GG | 3 428.0 |
| BovAm | SboT150 | GG | — |
| BovAm(G-1A) | BovT150 | GA | — |
| BovAm(G-1A) | SboT150 | GA | — |
| SboAm | BovT150 | GA | 3 731.6 |
| SboAm | SboT150 | GA | 2 731.6 |
| SboAm(A-1G) | BovT150 | GG | 2 731.6 |
| SboAm(A-1G) | SboT150 | GG | 2 731.6 |

Note: —: No product was detected.

明 BovT150 蛋白具有一定的底物宽泛性,有潜力作为工具酶去进行外源蛋白的特异性切割,这将有助于对一些生物合成基因簇中缺乏切割酶的羊毛硫细菌素进行体外生物合成。这些对羊毛硫细菌素切割酶与切割位点相互作用的研究将极大促进羊毛硫细菌素的开发与应用。

REFERENCES

- [1] Jung G. Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α , β -didehydroamino acids[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1991, 30(9): 1051-1068
- [2] Chatterjee C, Paul M, Xie LL, et al. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics[J]. *Chemical Reviews*, 2005, 105(2): 633-684
- [3] Willey JM, van der Donk WA. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 477-501
- [4] Piper C, Cotter PD, Ross RP, et al. Discovery of medically significant lantibiotics[J]. *Current Drug Discovery Technologies*, 2009, 6(1): 1-18
- [5] Hasper HE, de Kruijff B, Breukink E. Assembly and stability of nisin-lipid II pores[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(36): 11567-11575
- [6] Hasper HE, Kramer NE, Smith JL, et al. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1636-1637
- [7] McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25(3): 285-308
- [8] Dischinger J, Chipalu SB, Bierbaum G. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(1): 51-62
- [9] Zhang Q, Yu Y, Velásquez JE, et al. Evolution of lanthipeptide synthetases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(45): 18361-18366
- [10] Knerr PJ, van der Donk WA. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, 81: 479-505
- [11] Xie LL. Lacticin 481: *in vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity[J]. *Science*, 2004, 303(5658): 679-681
- [12] Havarstein LS, Diep DB, Nes IF. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 16(2): 229-240
- [13] Furgerson Ihnken LA, Chatterjee C, van der Donk WA. *In vitro* reconstitution and substrate specificity of a lantibiotic protease[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(28): 7352-7363
- [14] Nishie M, Shioya K, Nagao JI, et al. ATP-dependent leader peptide cleavage by NukT, a bifunctional ABC transporter, during lantibiotic biosynthesis[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 108(6): 460-464
- [15] Xiao HJ, Chen XZ, Chen ML, et al. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50[J]. *Microbiology*, 2004, 150(1): 103-108
- [16] Barbour A, Tagg J, Abou-Zied OK, et al. New insights into the mode of action of the lantibiotic salivaricin B[J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 31749
- [17] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor, 2001: 1595
- [18] Ma HC, Gao Y, Zhao FY, et al. Individual catalytic activity of two functional domains of bovicin HJ50 synthase BovM[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(1): 50-58 (in Chinese)
马宏初, 高涌, 赵方圆, 等. 羊毛硫细菌素 bovicin HJ50 修饰酶 BovM 双功能域单独催化活性鉴定[J]. *微生物学报*, 2015, 55(1): 50-58
- [19] Chiu J, March PE, Lee R, et al. Site-directed, ligase-independent mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(21): e174
- [20] Lin YH, Teng KL, Huan LD, et al. Dissection of the bridging pattern of bovicin HJ50, a lantibiotic containing a characteristic disulfide bridge[J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(3): 146-154
- [21] Zhang J, Feng YG, Teng KL, et al. Type AII lantibiotic bovicin HJ50 with a rare disulfide bond: structure, structure-activity relationships and mode of action[J]. *Biochemical Journal*, 2014, 461(3): 497-508
- [22] Oman TJ, van der Donk WA. Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(1): 9-18
- [23] Chen P, Qi FX, Novak J, et al. Effect of amino acid substitutions in conserved residues in the leader peptide on biosynthesis of the lantibiotic mutacin II[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195(2): 139-144
- [24] Ishii S, Yano T, Ebihara A, et al. Crystal structure of the peptidase domain of *Streptococcus* ComA, a bifunctional ATP-binding cassette transporter involved in the quorum-sensing pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(14): 10777-10785