



研究报告

一株新的产吡咯喹啉醌甲基营养菌全基因组测序和比较基因组学分析

赵长乐¹ 张慧莉^{*1} 张雪¹ 豆宇杰¹ 包鑫²¹ 石河子大学生命科学学院 新疆 石河子 832003² 新疆阜丰生物科技有限公司 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要:【背景】由于甲基营养菌被发现的时间较短,而且可以生产吡咯喹啉醌(pyrrroloquinoline quinone, PQQ)的甲基杆菌属细菌只有少数菌株的全基因组序列被公布,增加了该类细菌基因组学和生物代谢途径研究的难度。【目的】将本实验室筛选的PQQ生产菌经多种诱变方式处理,用于提高PQQ的发酵产量。对高产突变菌株进行全基因组解析,以探究甲基杆菌PQQ合成的分子机制,为后续分子育种提供序列背景信息。【方法】将野生型PQQ生产菌株进行紫外诱变、亚硝基胍诱变、甲基磺酸乙酯诱变、硫酸二乙酯诱变和紫外-氯化锂复合诱变。将突变菌株利用PromethION三代测序平台和MGISEQ-2000二代测序平台测序,然后进行组装和功能注释。组装得到的全基因组序列与模式菌株扭脱甲基杆菌AM1 (*Methylobacterium extorquens* AM1)进行比较基因组学分析。【结果】经11轮诱变获得一株突变菌株NI91,其PQQ产量为19.49 mg/L,相较原始菌株提高44.91%。突变菌株NI91的基因组由一个5 409 262 bp的染色体组成,共编码4 957个蛋白,与模式菌株*M. extorquens* AM1比较发现其PQQ合成过程中剪切加工相关的基因和缺失,但首次在甲基营养菌中发现与基因具有相似功能的基因,且基因的序列存在较大差异。【结论】为甲基营养类细菌甲基杆菌的功能基因组学研究及PQQ合成机理研究提供了基础数据支持,NI91与模式菌株*M. extorquens* AM1的比较基因组学分析为揭示PQQ合成的不同机理提供了分子基础。

关键词: 吡咯喹啉醌, 甲基杆菌, 全基因组测序, 比较基因组学

Whole genome sequencing and comparative genomics analysis of a new pyrroloquinoline quinone-producing methylotroph

ZHAO Chang-Le¹ ZHANG Hui-Li^{*1} ZHANG Xue¹ DOU Yu-Jie¹ BAO Xin²¹ College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China² Xinjiang Fufeng Biotechnology Company Limited, Urumqi, Xinjiang 830001, China

Abstract: [Background] Due to the short time of discovery of methylotrophs, only a few genomes of methylotroph strains that can produce PQQ were sequenced. It increases the difficulty of study the

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21366028); China Postdoctoral Science Foundation (2017M613301XB)

***Corresponding author:** E-mail: zhanghch02@126.com

Received: 15-02-2020; **Accepted:** 01-05-2020; **Published online:** 21-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21366028); 博士后科学基金(2017M613301XB)

*通信作者: E-mail: zhanghch02@126.com

收稿日期: 2020-02-15; 接受日期: 2020-05-01; 网络首发日期: 2020-05-21

genomics and biological metabolic pathways of methylbacterium. **[Objective]** The PQQ-producing bacteria was screened and treated with various mutagenesis methods to improve the yield of PQQ. Whole genome analysis of high-yield mutant strains was performed to provide sequence background information for studying the molecular mechanism of PQQ synthesis and subsequent molecular breeding of methylbacterium. **[Methods]** The wild-type PQQ production strains were subjected to ultraviolet rays mutagenesis, nitroso-guanidin mutagenesis, ethylmethylsulfone mutagenesis, diethyl sulfate mutagenesis, and ultraviolet rays-lithium chloride compound mutagenesis. The whole genome sequence of the mutant strain obtained by mutagenesis was sequenced using the PromethION sequencing platform and the MGISEQ-2000 sequencing platform. The assembled whole genome sequence was compared with the model strain *Methylbacterium extorquens* AM1. **[Results]** A mutant strain NI91 was obtained after 11 rounds of mutagenesis with PQQ yield 19.49 mg/L, which was 44.91% higher than the original strain. The genome of the mutant strain NI91 consists of a chromosome of 5 409 262 bp, encoding 4 957 proteins. Compared with the model strain *M. extorquens* AM1, it was found that the *pqqF* and *pqqG* genes that relate to shear processing during PQQ biosynthesis were deleted. Meanwhile, the *pqqL* was first discovered in methylotrophic bacteria which has a similar function to the *pqqF*, and the sequences of *pqqC/D* between the two strains were quite different. **[Conclusion]** This study provides basic data for functional genomics research of the methylotrophic bacterium and the study of PQQ synthesis mechanism. Comparative genomics between NI91 and the model strain *M. extorquens* AM1 provides a molecular basis for revealing different mechanisms of PQQ synthesis.

Keywords: Pyrroloquinoline quinone, Methylbacterium, Whole genome sequencing, Comparative genomics

甲基营养菌是指以甲醇等一碳化合物为唯一碳源的细菌, 20 世纪 80 年代首次发现了能够利用甲醇的微生物^[1], 截至目前, 国内外对甲基营养菌的代谢途径及代谢产物应用进行了广泛的研究, 其中 *M. extorquens* AM1 是生化途径研究比较透彻的一个菌株, 为甲基营养菌模式菌株, 其基因组序列在 2003 年就已经基本测序完成^[2]。

甲基营养菌可以降解甲醛和甲醇等有害物质来获得能量, 同时将它们转化为蛋白、辅酶、维生素 B₁₂、PHB、多种氨基酸、类胡萝卜素、吡咯喹啉酮等次生代谢产物^[3]。这些代谢产物可作为药物、食品与添加剂^[2], 具有良好的应用前景。

吡咯喹啉酮(pyrroloquinoline quinone, PQQ)在甲基营养菌中作为甲醇脱氢酶的辅酶参与氧化还原过程, 是继吡啶核苷酸[NAD(P)⁺]和核黄素(FMN, FAD)之后发现的第 3 种氧化还原酶辅酶^[4]。具有促进机体生长、抗氧化、刺激神经生长、清除自由基等生理功能, 在食品和医药保健领域具有重要的开发前景^[5-7]。PQQ 的生物合成途

径迄今为止还不是很清楚, 在大多数革兰氏阴性菌中参与其合成的主要基因包括 *pqqA*、*pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE*、*pqqF*、*pqqG*, 大多以基因簇的形式存在^[8]。PqqA 是一段短肽, 为 PQQ 合成的直接前体; PqqB 参与释放 PQQ, 缺失 *pqqB* 基因的菌株其发酵液只能检测到痕量 PQQ, 但细胞裂解物可通过体外实验合成 PQQ^[9]。PqqC 是氧激活酶参与 PQQ 合成的最后一步反应^[10]。PqqD 在 PQQ 合成第一步可能作为肽分子伴侣, 可能定位 PqqE 的活性位点^[11]。虽然目前对 PQQ 的合成途径和合成基因有了一定的了解, 但合成基因的表达调控机制, 以及合成基因间的协调作用等问题仍需要进行深入探讨。

自 1995 年 Fleischmann 等用鸟枪法(whole genome shotgun)对嗜流感菌(*Haemophilus influenza*)进行了全基因组测序以来, 掀起了微生物基因组测序的高潮^[12]。已公布的众多微生物基因组序列, 为从功能基因与蛋白、网络及其调控等不同的角度全面理解与认识微生物的代谢过程和调控机制提

供了丰富的背景信息。比较基因组学是在基因组图谱基础上,通过比较基因组的结构了解基因的功能、表达机制等^[13]。种内比较基因组学研究单核苷酸多态性、拷贝数多态性和染色体结构变异,为人类疾病和微生物育种等提供指导。本文将对筛选并经过多种诱变处理的一株产 PQQ 甲基营养菌进行全基因组测序和分析,并与模式菌株 *M. extorquens* AM1 的基因组进行比较,重点分析两者 PQQ 合成基因的差异,为研究甲基杆菌的 PQQ 合成分子机制及分子育种提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

酵母粉, Oxoid 公司; 甲醇, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 硫酸铵, 国药集团化学试剂有限公司; QIAGEN[®] Genomic DNA 提取试剂盒, Qiagen 公司。PromethION, Oxford Nanopore Technologies 公司; MGISEQ-2000, 深圳华大智造科技股份有限公司; 离位灭菌玻璃发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司。

种子培养基参照文献[14]中的摇瓶培养基配制。

发酵培养基(g/L): 酵母粉 1.0, 甲醇 30.0, MgSO₄·7H₂O 1.5, (NH₄)₂SO₄ 3.0, KH₂PO₄ 1.4, Na₂HPO₄ 3.0; 微量元素(mg/L): 柠檬酸铁 0.3, CaCl₂·2H₂O 0.3, ZnSO₄·7H₂O 0.05, CuSO₄·5H₂O 0.5, CoCl₂·6H₂O 3.2, MnCl₂·4H₂O 0.5, pH 7.0。

1.2 PQQ 含量的测定

发酵液于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 保留上清液。将 PQQ 标准品稀释为 2、4、6、8、10、12、14、16 mg/L, 反应后将吸光度 OD₅₃₀ 对浓度进行拟合做出标准曲线。

在 96 孔板的每孔中加 10 μL 待测液或 PQQ 标准液, 100 μL NBT 溶液, 40 μL PBS 溶液, 90 μL Gly-KOH 溶液, 于 30 °C 环境下避光反应 1 h^[15], 用酶标仪检测其吸光值(λ=530)。

1.3 菌种筛选

采集自 6 个化工厂排污口的土壤样品, 用无菌

水根据 10 倍比稀释 10²-10⁴ 倍, 涂布于不添加酵母粉的种子培养基固体平板上, 于 30 °C 的培养箱培养 3 d。将单菌落挑取于种子培养基中, 于 30 °C、180 r/min 摇床培养至对数期(OD₆₀₀ 为 1.5-3.0), 以 10%接种于发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 发酵 3 d, 并根据 1.1 所示方法测定 PQQ 含量。

1.4 菌种的诱变

以 PQQ 的产量和生物量作为检测指标, 对 *Methylobacterium* sp. CLZ 进行紫外诱变、亚硝基胍(NTG)诱变、甲基磺酸乙酯(EMS)诱变、硫酸二乙酯(DES)诱变、紫外线-LiCl 复合诱变。原始菌株通过上述 5 种诱变手段连续诱变 11 轮后得到一株 PQQ 产量提高且稳定遗传的突变菌株 NI91。

将野生型菌株 CLZ 和突变菌株 NI91 接种至种子培养基中, 于 30 °C、180 r/min 摇床培养至对数期(OD₆₀₀ 为 1.5-3.0), 以 10%的接种量接种于装有 1 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中进行连续发酵, 培养温度为 34 °C, 通气量设置为 120 L/h, 搅拌转速为 500 r/min。

1.5 菌株的全基因组测序、组装、注释

将野生型菌株 CLZ 和突变菌株 NI91 接种至种子培养基中, 于 30 °C、180 r/min 摇床培养至对数期(OD₆₀₀ 为 1.5-3.0), 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。用基因组提取试剂盒提取高质量的 DNA 并构建 DNA 文库, 利用基于第三代测序技术 Oxford Nanopore Technology 的测序仪 PromethION 对 DNA 进行单分子测序, 同时使用 MGISEQ-2000 系统在 PE150 读长模式下对菌株的全基因组进行双末端测序。

以 Mean_qscore_template≥7 以及序列长度≥1 000 bp 对 PromethION 的下机数据进行质控, 用软件 Canu^[16] (参数: default)进行组装, 用软件 Pilon^[17] (参数: default)结合 MGISEQ-2000 的测序数据对基因组进行矫正, 对已成环的基因组序列用软件 Circlator^[18] (参数: fixstart)将序列的原点移动到基因组的复制起始位点。

基因组的编码基因用 Prodigal^[19]程序使用第 11 套密码子进行预测, 保留完整的 CDS (参数: -p None -g 11); tRNA 基因使用 tRNAscan-SE 程序^[20]进行预测(参数: -B -I -m lsu,ssu,tsu); rRNA 基因用 RNAmmer 软件^[21]进行预测(参数: -S bac); 其他 ncRNA 用 infernal 程序^[22]搜索 Rfam 数据库进行预测(参数: --cut_ga --rfam --nohmmonly), 保留预测到的长度 > 数据库中序列长度 80% 的结果; CRISPR 用 minced 程序^[23]进行预测(参数: default); 基因岛用 Islander 程序^[24]进行预测(参数: default)。

提取基因组编码蛋白, 用 InterProScan 程序^[25]进行注释(参数: -appl Pfam,TIGRFAM,SMART -iplookup -goterms -t p -f TSV), 然后提取 GO 数据库的注释信息; 用 rpsblast 程序^[26]比对编码蛋白到 COG 数据库进行 COG 注释(参数: -evalue 0.01 -seg no -outfmt 5)。

1.6 比较基因组学分析

使用 Mauve 软件^[27]对 *Methylobacterium* sp. NI91 与 *M. extorquens* AM1 的基因组序列进行共线性分析; 运用 OrthoVenn2^[28]对 *Methylobacterium* sp. NI91 与 *M. extorquens* AM1 的基因组进行差异分析; 利用 Phyre2^[29]预测氨基酸序列的三级结构模型。

2 结果与分析

2.1 PQQ 含量的标准曲线

如图 1 所示, 以 PQQ 浓度为横坐标, 标准品溶液在 530 nm 下吸光度为纵坐标拟合的标准曲线为: $y=0.0356x+0.1763$, $R^2=0.994$ 。由此判定分光光度法检测 PQQ 的含量可行。待测样品的反应体系在 530 nm 下测定吸光度, 代入上述方程可算出待测样品中 PQQ 的含量。

2.2 菌种的鉴定

土壤样品培养 3 d 后共获得 23 个不同单菌落, 分别发酵 3 d, 最终得到一株 PQQ 产量 5.448 mg/L 的野生型菌株。将野生型菌株 CLZ 的 16S rRNA 基

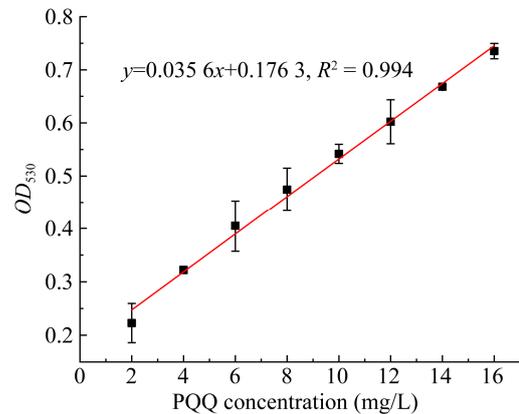


图 1 PQQ 检测的标准曲线

Figure 1 Standard curve for detecting PQQ

因序列(GenBank 登录号 MN795902)在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析, 与 *Methylobacterium* sp. DM1 (GenBank 登录号 CP029173.1)的相似性最高。CLZ 的全基因组序列(GenBank 登录号 CP047608)使用 PGAP^[30] (prokaryotic genome annotation pipeline)与 NCBI 上甲基杆菌属典型菌株的基因组序列进行 ANI (average nucleotide identity)计算, CLZ 与 *Methylobacterium populi* BJ001 的 ANI 值最高, 为 88.608%, 但由于 ANI 值均较低, 不足以将 CLZ 归类于某种, 最终命名 CLZ 菌株为 *Methylobacterium* sp. CLZ。

2.3 突变株与原始菌株的发酵验证

在发酵罐中对原始菌株 CLZ 和突变菌株 NI91 连续发酵 140 h, 野生型菌株 CLZ 的 OD_{600} 值最高为 13.50, PQQ 产量为 13.45 mg/L (图 2A), 突变菌株 NI91 的 OD_{600} 值最高为 15.49, PQQ 产量为 19.49 mg/L (图 2B)。相比原始菌株其 OD_{600} 值和 PQQ 产量分别提高 14.70%、44.91%。

2.4 测序结果的统计及组装

Methylobacterium sp. NI91 样本经 PromethION 测序平台测序, 共产出 3 463 849 211 bp 原始数据, 通过质控的数据量为 3 460 018 793 bp, 对质控后的数据进行基因组组装, 矫正以及优化后, 得到最终的基因组。NI91 样本通过 MGISEQ-2000 平台进行 150PE 测序共产出 1 208 600 700 bp 原

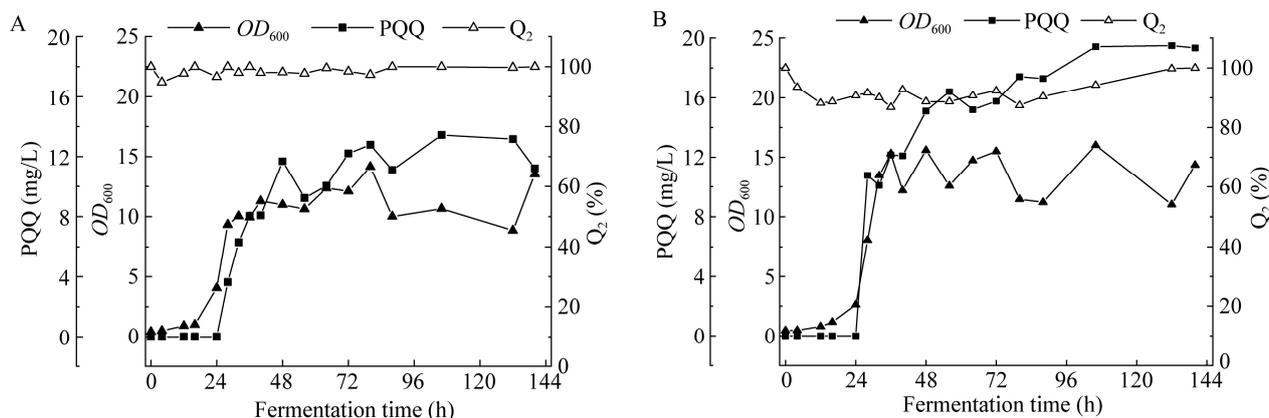


图 2 野生株 CLZ (A)和突变株 NI91 (B)的发酵特性

Figure 2 Fermentation characteristics of wild strain CLZ (A) and mutant strain NI91 (B)

始数据，用于对基因组辅助校正得到最终基因组序列。NI91 基因组由 1 个染色体组成，大小为 5 409 262 bp，(G+C)mol%含量为 68.50%，平均测序深度为 588.56 X。基因组序列已上传 GenBank，登录号 CP047607。

2.5 基因组的基因结构预测

质粒是普遍存在于原核生物细胞内，独立于核 DNA 的可自主复制的 DNA 分子，通过对 NI91 组装结果中的质粒情况进行分析，未发现明显的质粒序列。

CRISPR 序列与 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated genes, Cas gene)构成抵御外来入侵者重要的防御系统(CRISPR-Cas 系统)，经 Minced 程序预测未发现 CRISPR 序列。非编码 RNA (ncRNA) 从基因组上转录而来，直接以 RNA 分子的形式发挥作用，包括 tRNA、rRNA、snRNA、siRNA 等，预测得到的 ncRNA 统计详情见表 1。

基因组岛(genomic island)是一类具有特定结构和功能的大片段 DNA 的总称，常与水平基因转移相关^[31]。预测得到的基因组岛在基因组上的位置见图 3。

2.6 预测蛋白的数据库注释

Methylobacterium sp. NI91 基因组经预测得到

4 957 个编码蛋白。共 2 772 个蛋白质序列在 COG 数据库得到注释，占总蛋白序列 55.92%，如图 4 所示，NI91 预测得到的蛋白序列注释主要集中在 J (翻译，核糖体结构与生物发生)、K (转录)、T (信号转导机制)、M (细胞壁/膜/包膜生物发生)、C (能源生产和转化)、E (氨基酸转运和代谢)、H (辅酶的运输和代谢)、P (无机离子的运输和代谢)、R (仅适用于一般功能预测)等分类单元，分别有 198、225、312、238、221、221、170、198、270 个。值得注意的是，辅酶运输代谢相关基因达 170 个，如此多的基因极有可能是该菌株能够产多种辅酶的原因。

表 1 基因组结构预测统计

Table 1 Genomic structure prediction statistic

类型 Type	数量 Number	长度 Length (bp)	在基因组中的比例 Proportion in genome (%)
tRNA	61	4 745	0.09
rRNA	16S 5	7 357	0.14
rRNA	23S 5	14 059	0.26
rRNA	5S 5	575	0.01
CDS	4 957	4 611 438	85.25
CRISPR	0	0	0.00
Genomic island	8	351 420	6.50

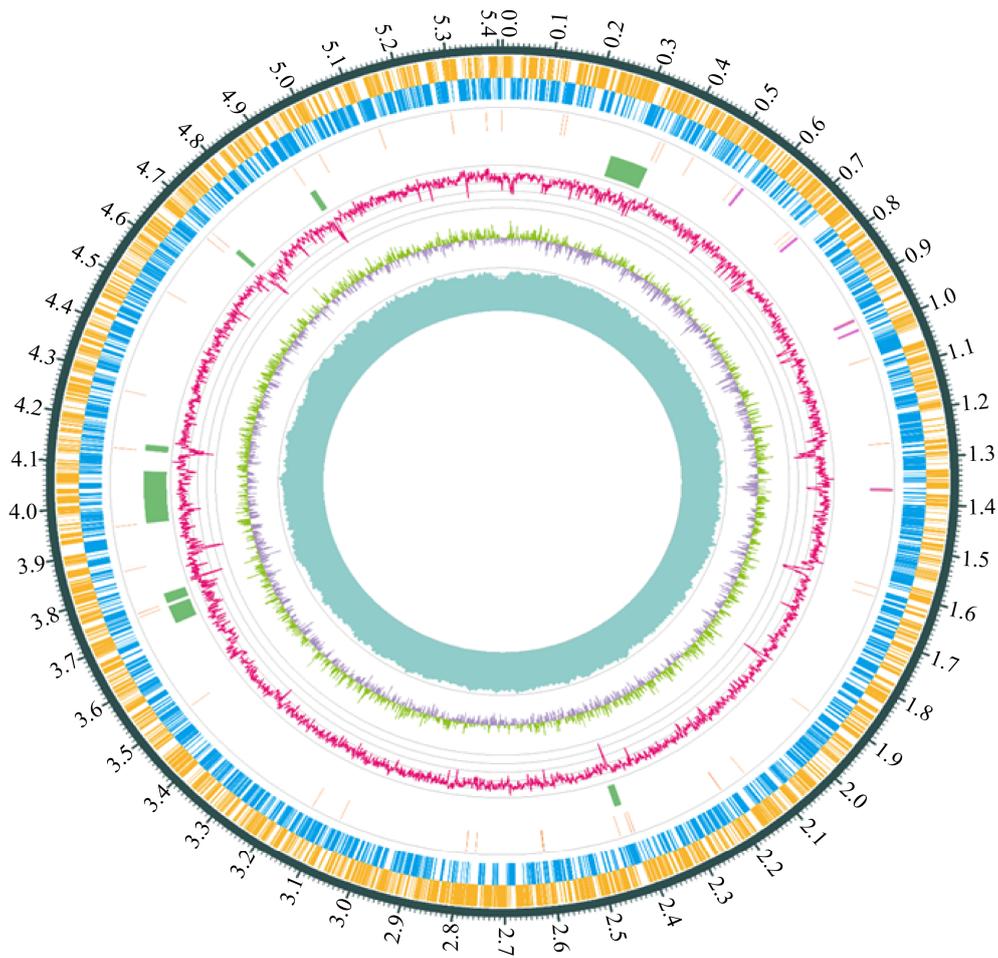


图3 NI91的核基因组圈图

Figure 3 Nuclear genomic circle map of NI91

注: 由外到内依次为编码基因(正义链)、编码基因(负义链)、tRNA(橙色)和rRNA(紫色)、CRISPR(蓝色)和基因岛(绿色)、(G+C)mol%含量、GC-skew、测序深度。

Note: From the outside to the inside, they are the coding gene (sense strand), coding gene (negative sense strand), tRNA (orange) and rRNA (purple), CRISPR (blue) and gene island (green), (G+C)mol% content, GC-skew, sequencing depth.

Methylobacterium sp. NI91 的 4 957 个编码蛋白, 共 2 495 个蛋白质序列在 GO 数据库得到注释, 占总蛋白序列 50.33%, 如图 5 所示, 在分子功能方面, 主要被注释到催化活性 (catalytic activity)、转运活性 (transporter activity)、结合 (binding) 单元; 在生物学过程方面, 主要与代谢过程 (metabolic process)、细胞内过程 (cellular process)、单组织过程 (single-organism process) 单元有关; 在细胞组分方面, 主要注释到细胞部分 (cell part)、细胞 (cell)、膜 (membrane)、膜部分

(membrane part)、高分子配合物 (macromolecular complex) 单元。

2.7 NI91 与 AM1 的基因组比较

如表 2 所示, *Methylobacterium* sp. NI91 相对于 *M. extorquens* AM1 的 4 个质粒全部丢失、基因组“缩水”约 100 kb。对两菌株的染色体进行共线性分析如图 6 所示, 虽然两者互相存在一定程度的基因大片段缺失, 但是总体线性关系一致性较好, 未发现异位、倒位的现象。然后对两菌株的蛋白质序列使用 OrthoVenn2 进行差异比较, 结果如图 7

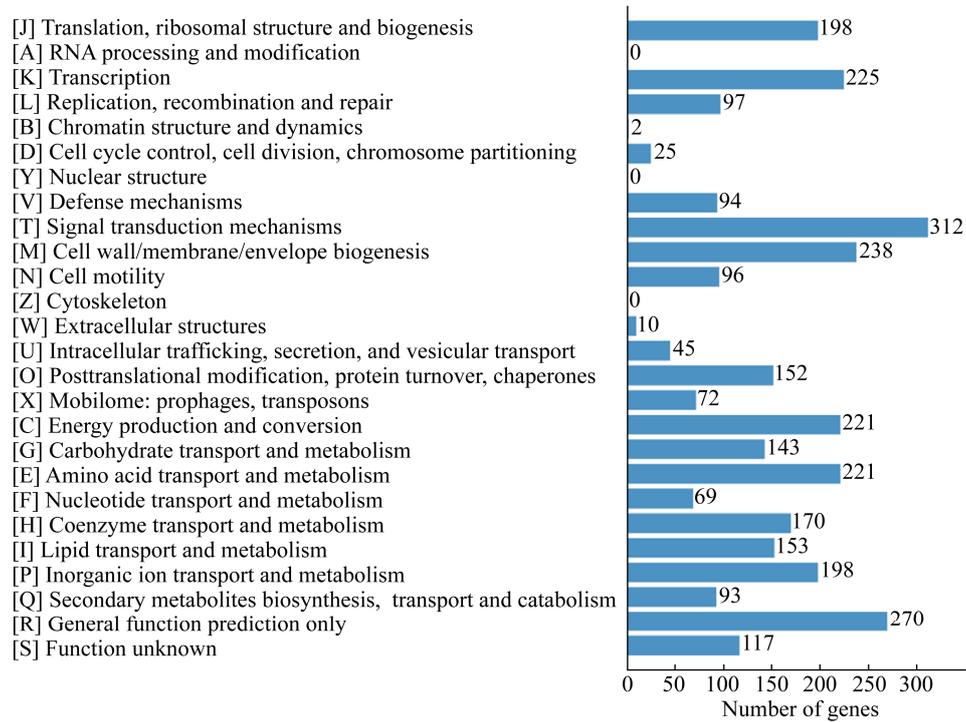


图 4 基因组编码蛋白 COG 功能分类统计

Figure 4 Classification and statistics of COG function of genome-encoded proteins

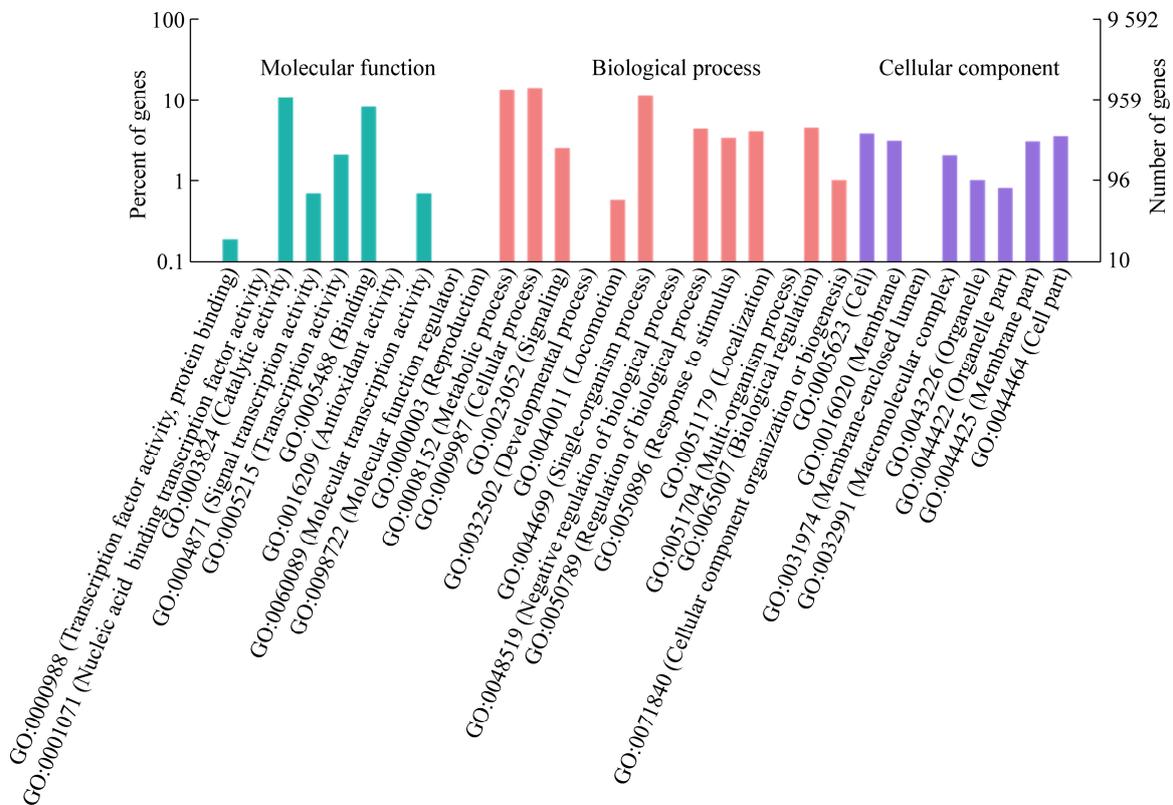


图 5 基因组编码蛋白 GO 功能分类统计

Figure 5 Statistics of GO functional classification of genome-encoded proteins

表 2 基因组结构信息统计

Table 2 Statistics of genome structure information

菌株名称 Strain name	类型 Type	大小 Size (Mb)	(G+C)mol%	蛋白数量 Protein number	rRNA	tRNA	Other RNA
<i>Methylobacterium</i> sp. NI91	Chr	5.41	68.5	4 957	15	61	16
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	Chr	5.51	68.7	4 917	15	57	4
	Plsm	1.26	67.6	1 226	0	6	0
	Plsm	0.04	67.9	42	0	0	0
	Plsm	0.04	65.2	38	0	0	0

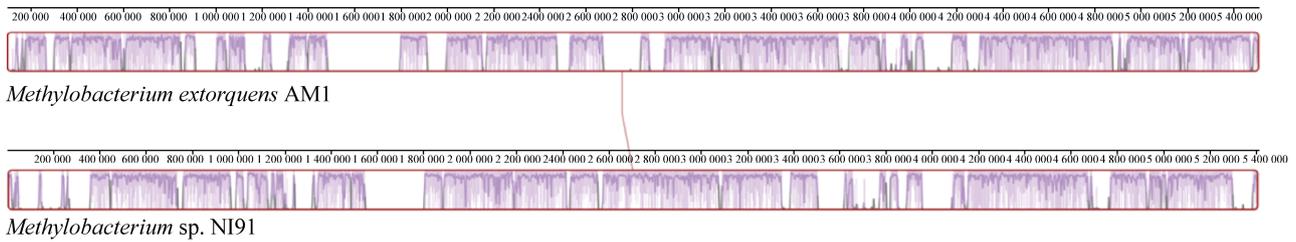


图 6 基因组的整体比对

Figure 6 Global alignment of genome

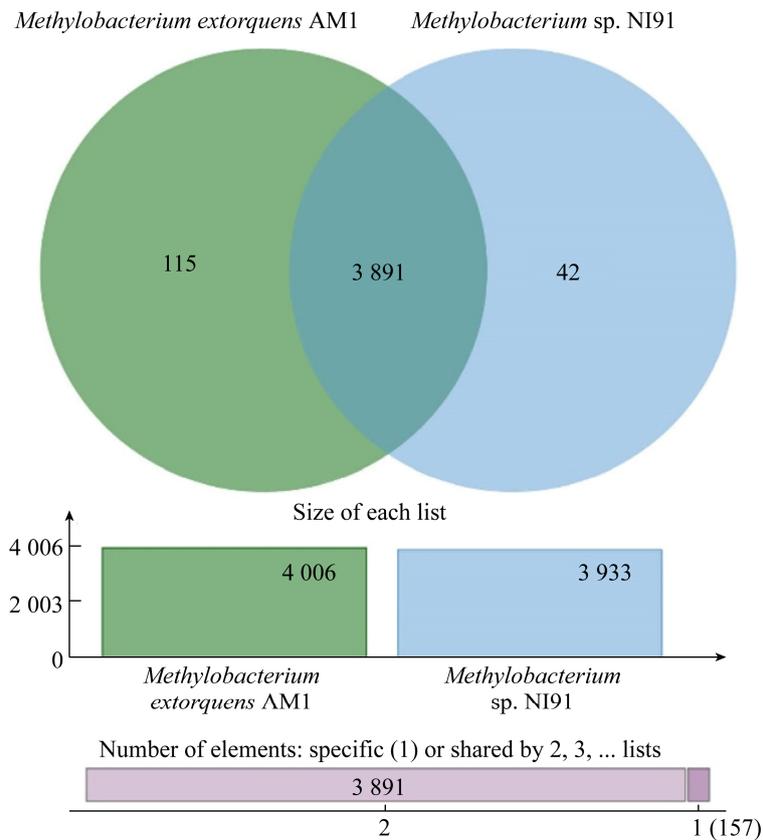


图 7 基因组信息的差异比较

Figure 7 Comparison of differences in genomic information

所示, 两株菌共有的核心基因 3 891 个, AM1 特有基因 115 个, NI91 特有基因 42 个。对 NI91 和 AM1 特有基因进行 GO 分类统计, 如图 8 所示, NI91 相对于 AM1 特有的基因主要是生物学过程 (biological process); 如图 9 所示, AM1 相对于 NI91 所特有的基因仅有生物学过程和分子功能 (molecular function) 且以生物学过程 (cellular metabolic process) 的基因居多, 没有细胞定位 (cellular component) 特有的基因。

2.8 PQQ 合成基因的比较

分别提取了 *Methylobacterium* sp. NI91 和 *M. extorquens* AM1 与 PQQ 合成相关的基因, 如表 3 所示。AM1 含有与 PQQ 合成相关的基因分别是 *pqqA*、*pqqB*、*pqqC/D* 融合基因、*pqqE*、*pqqF*、

pqqG, 而 NI91 仅含有 *pqqA*、*pqqB*、*pqqC/D* 融合基因、*pqqE*, 缺失在 PQQ 合成中可能发挥内切酶的作用的 *pqqF* 和 *pqqG* 基因。虽然 NI91 缺失 *pqqF* 基因, 但是却含有与 *pqqF* 具有相似功能的 *pqqL* 基因^[32-33]对其进行功能替代。

对 *Methylobacterium* sp. NI91 和 *M. extorquens* AM1 共有的 PQQ 合成基因的氨基酸序列进行对比, 3 条 PqqA 序列完全一致。NI91 的 PqqB 相较于 AM1 在上游端多出 69 个氨基酸, NI91 的 PqqC/D 融合蛋白相对于 AM1 在第 259–274 个氨基酸存在明显的差异和缺失, PqqE 蛋白仅在开端存在少数氨基酸序列差异。对两株菌的 PqqB 和 PqqC/D 蛋白进行三级结构预测, 如图 10A、B 所示, 可以明显看出 PqqB 在 NI91 中相对于 AM1 在

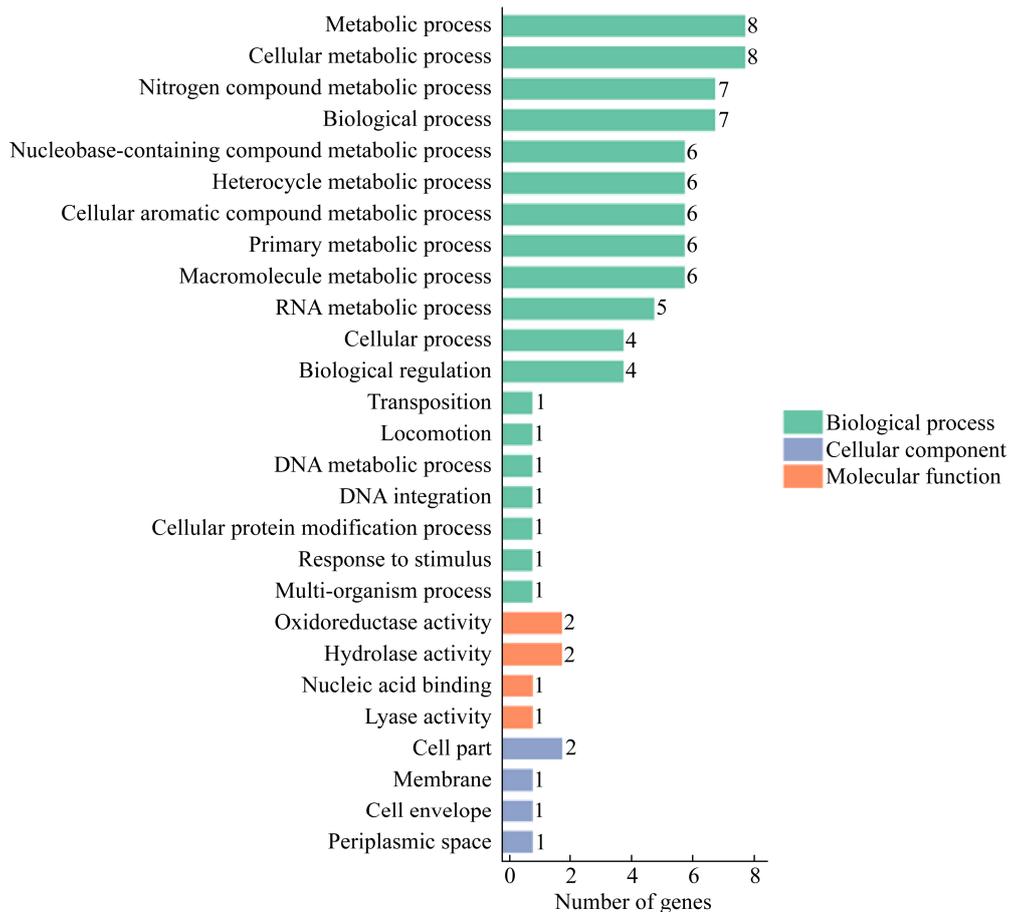


图 8 NI91 特有基因的 GO 功能分类

Figure 8 Classification of GO functions specific to NI91 genes

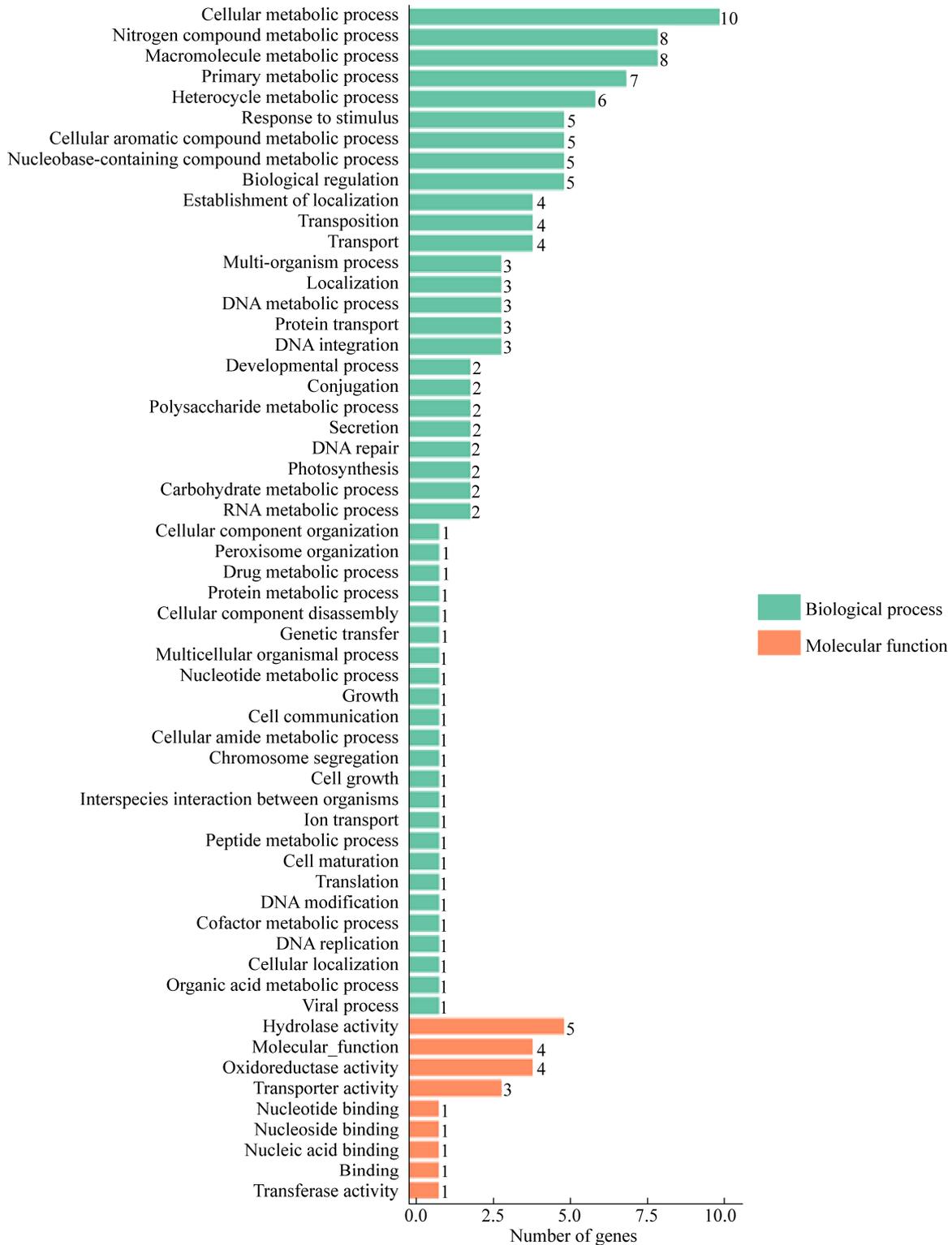


图 9 AM1 特有基因的 GO 功能分类

Figure 9 Classification of GO functions specific to AM1 genes

表 3 PQQ 合成相关基因的统计

Table 3 Statistics of genes related to PQQ synthesis

菌株名称	基因	数量
Strain name	Gene	Number
<i>Methylobacterium</i> sp. NI91	<i>pqqA</i>	3
	<i>pqqB</i>	1
	<i>pqqC/D</i>	1
	<i>pqqE</i>	1
	<i>pqqL</i>	2
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	<i>pqqA</i>	3
	<i>pqqB</i>	1
	<i>pqqC/D</i>	1
	<i>pqqE</i>	1
	<i>pqqF</i>	1
	<i>pqqG</i>	1

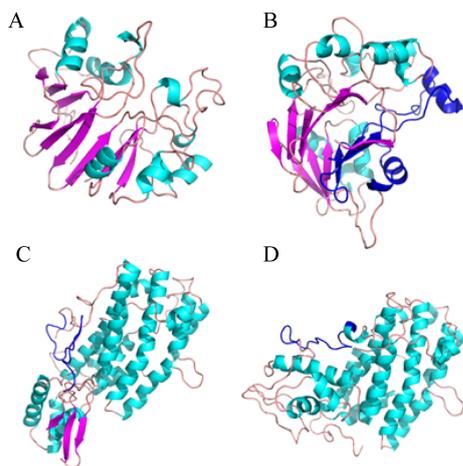


图 10 PqqB 和 PqqC/D 的三级结构

Figure 10 Tertiary structure of PqqB and PqqC/D

注: A: AM1 中 PqqB 的三级结构; B: NI91 中 PqqB 的三级结构; C: AM1 中 PqqC/D 融合蛋白的三级结构; D: NI91 的 PqqC/D 融合蛋白的三级结构. 蓝色区域为同一种蛋白在 AM1 和 NI91 中的差异序列.

Note: A: The tertiary structure of PqqB in AM1; B: The tertiary structure of PqqB in NI91; C: The tertiary structure of PqqC/D fusion protein in AM1; D: The tertiary structure of PqqC/D fusion protein in NI91. The blue region is the difference sequence of the same protein in AM1 and NI91.

上游多出的氨基酸序列对 PqqB 的功能和空间排布产生重大影响, 进而会影响 PQQ 的生成。如图 10C、D 所示, PqqC/D 融合蛋白的氨基酸序列因在 NI91 和 AM1 中的变异和缺失导致其蛋白质的空间结构改变, 致使下游的 3 条 β 片层缺失, 从

而影响了酶的活性, 进而导致其 PQQ 合成代谢的能力产生变化。

3 讨论与结论

吡咯喹啉醌(PQQ)是不同于烟酰胺嘌呤核苷酸和黄素核苷酸的第三类氧化还原酶的辅酶^[34-35]。野生菌的 PQQ 产量多为 2-3 mg/L 左右^[36], 王歆等筛选到一株 PQQ 产量较高的噬甲基菌属菌株 MP606, 野生菌未经诱变选育且未进行发酵条件优化, 其 PQQ 产量 113 mg/L, 是迄今报道 PQQ 产量最高的甲基杆菌^[37]。本研究筛选得到一株 PQQ 生产菌株, 同时生产辅酶 Q10 和类胡萝卜素, 经 16S rRNA 基因序列比对和全基因组序列 ANI 分析最终命名为 *Methylobacterium* sp. CLZ; 然后利用紫外、NTG、EMS、DES、紫外-LiCl 复合诱变交替连续诱变 11 轮得到一株 PQQ 产量提高的突变菌株 NI91, 发酵罐中连续发酵 140 h 其 PQQ 产量为 19.49 mg/L, 相较原始菌株提高 44.91%。

对 NI91 菌株采用二、三代联合测序方案进行全基因组测序, 其基因组由 1 个大小为 5 409 262 bp 的染色体组成, (G+C)mol% 含量为 68.5%, 平均测序深度为 588.56 X, 经预测得到 4 957 个 CDS 序列, CDS 序列翻译后蛋白序列在 COG、GO 蛋白质数据库中分别有 2 772、2 995 个蛋白质注释出了功能, COG、GO 结果的统计可以看出在上述 2 个数据库中注释结果具有很高的一致性, 预测的 CDS 蛋白被注释最多的单元涉及菌体生长的能量代谢和细胞组分的代谢。另外, 生物调控、信号传导、生物膜形成的基因也被大量注释到, 该类基因有利于促发菌体的群体感应, 在培养基中菌体形成了很明显的生物膜, 膜的形成加速了生物体间的物质和信息交流, 有利于细菌适应高甲醇的环境。

将 NI91 和甲基杆菌属模式菌株 *M. extorquens* AM1 的染色体基因组进行比较, 通过共线性分析, 发现两者共线性较好, 未存在异位和倒位的现象。AM1 核基因较 NI91 多出 0.1 Mb 的碱基序

列, 且 AM1 还有 4 个总长为 1.36 Mb、包含 1 309 个基因序列的质粒, NI91 未发现质粒。很明显看出 NI91 相较于 AM1 在基因组水平上大幅“缩水”, 基因组的“缩水”以及质粒的丢失, 在不影响生物体正常机能的情况下, 可使机体的物质和能量得到更加合理的利用^[38]。NI91 菌株和 AM1 菌株之间有 3 891 个核心基因, AM1 特有基因 115 个, NI91 特有基因 42 个。对 NI91 和 AM1 的特有基因分别进行 GO 注释, NI91 的特有基因主要是与生物学过程(biological process)相关, AM1 的特有基因也主要是与生物学过程相关, 但没有与细胞组分(cellular component)相关的基因。目前 PQQ 合成的生化途径尚未完全阐明, 已知的 PQQ 生物合成相关基因的功能尚不足以构成完整的 PQQ 合成途径^[39], 有些大肠杆菌中必需基因为 5 个(*pqqABCDE*)^[40], 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是 6 个(*pqqABCDEF*)^[8], *M. extorquens* AM1 是 7 个(*pqqABC/DEFG*)^[41]。PqqF 和 PqqG 与切割小肽的酶家族具有相似性^[42], 因此推测 PqqF、PqqG 在 PQQ 合成中可能发挥内切酶的作用^[43]。Turlin 等^[33]发现将大肠杆菌一段氨基酸序列与来自肺炎克雷伯氏菌的 PqqF 具有同源性的 7 361 bp 基因序列转入 *pqqE* 和 *pqqF* 缺陷的甲基营养菌后, 可使其恢复 PQQ 的产生。熊向华等^[32]通过构建大肠杆菌 *pqqL* 基因缺陷株研究 *pqqL* 基因的功能证实大肠杆菌的 *pqqL* 基因与 *pqqF* 基因具有同样的功能。本研究比较 AM1 和 NI91 的 PQQ 合成基因簇发现, AM1 的合成基因簇组成是两个经典的 *pqqABCDE/pqqFG* 基因岛, 而 NI91 预测的 PQQ 合成基因簇是 *pqqABCDE/pqqL*, NI91 相对于 AM1 缺少了与 PQQ 合成过程中剪切加工相关的 *pqqFG* 基因岛, 却有一个在肺炎克雷伯氏菌和大肠杆菌中被验证具有和 *pqqF* 具有同工作用的 *pqqL* 基因, *pqqL* 基因也是首次在甲基杆菌属的菌株中被报道。此外, NI91 和 AM1 中的 PqqC/D 和 PqqE 酶的氨基酸序列和三维空间模型具有较大差异, 可为后续 PQQ 的

遗传改造提供新的代谢基因。

对 *Methylobacterium* sp. NI91 的测序研究为甲基营养类细菌甲基杆菌属菌株的功能基因组学及 PQQ 合成机理研究提供了基础数据支持, 其与模式菌株 AM1 的比较基因组学为揭示 PQQ 合成的不同机理提供了分子基础。同时, 本研究在 NI91 的发酵液中分离检测出了辅酶 Q10 和类胡萝卜素, NI91 的基因组序列还可为辅酶 Q10 和类胡萝卜素的代谢研究提供较高的参考价值。由于本研究对菌株全基因组测序数据的解读只能依据数据库中有限的参照信息, 从全基因组数据的角度预测 PQQ 合成相关的功能基因, 对于某些基因还需进行进一步的验证。

REFERENCES

- [1] Anthony C. The Biochemistry of Methylootrophs[M]. New York: Academic Press, 1982: 497-498
- [2] Chistoserdova L, Chen SW, Lapidus A, et al. Methylootrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(10): 2980-2987
- [3] Green PN. Methylobacterium[A]//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The Prokaryotes[M]. 3rd ed. New York: Springer, 2006: 257-265
- [4] Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher B. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach[J]. BMC Biochemistry, 2008, 9: 8
- [5] Felton LM, Anthony C. Role of PQQ as a mammalian enzyme cofactor?[J]. Nature, 2005, 433(7025): E100
- [6] Misra HS, Rajpurohit YS, Khairnar NP. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(2): 313-325
- [7] Misra HS, Khairnar NP, Barik A, et al. Pyrroloquinoline-quinone: a reactive oxygen species scavenger in bacteria[J]. FEBS Letters, 2004, 578(1/2): 26-30
- [8] Meulenbergh JJM, Sellink E, Riegman NH, et al. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* *pqq* operon[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1992, 232(2): 284-294
- [9] Velterop JS, Sellink E, Meulenbergh JJM, et al. Synthesis of pyrroloquinoline quinone *in vivo* and *in vitro* and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(17): 5088-5098

- [10] Shen YQ, Bonnot F, Imsand EM, et al. Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(11): 2265-2275
- [11] Weckler SR, Stoll S, Iavarone AT, et al. Interaction of PqqE and PqqD in the pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthetic pathway links PqqD to the radical SAM superfamily[J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(37): 7031
- [12] Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd[J]. *Science*, 1995, 269(5223): 496-512
- [13] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins[J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104(1/3): 5-25
- [14] Si ZJ. Studies on efficient bioproductions of pyrroloquinoline quinone and poly (β -L-malic acid)[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2017 (in Chinese)
司振军. 微生物高效生产吡咯喹啉醌和聚苹果酸的研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2017
- [15] Flückiger R, Paz MA, Gallop PM. Redox-cycling detection of dialyzable pyrroloquinoline quinone and quinoproteins[J]. *Methods in Enzymology*, 1995, 258: 140-149
- [16] Koren S, Walenz BP, Berlin K, et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k -mer weighting and repeat separation[J]. *Genome Research*, 2017, 27(5): 722-736
- [17] Walker BJ, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963
- [18] Hunt M, de Silva N, Otto TD, et al. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 294
- [19] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119
- [20] Lowe TM, Chan PP. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W54-W57
- [21] Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 3100-3108
- [22] Nawrocki EP, Eddy SR. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(22): 2933-2935
- [23] Bland C, Ramsey TL, Sabree F, et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 209
- [24] Hudson CM, Lau BY, Williams KP. Islander: a database of precisely mapped genomic islands in tRNA and tmRNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D48-D53
- [25] Jones P, Binns D, Chang HY, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1236-1240
- [26] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 421
- [27] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, et al. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394-1403
- [28] Xu L, Dong ZB, Fang L, et al. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W52-W58
- [29] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845-858
- [30] Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(14): 6614-6624
- [31] Boucher Y, Douady CJ, Papke RT, et al. Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups[J]. *Annual Review of Genetics*, 2003, 37: 283-328
- [32] Xiong XH, Yang L, Han XD, et al. Knockout and function analysis of *pqqL* gene in *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(10): 1380-1384 (in Chinese)
熊向华, 杨璐, 韩晓东, 等. 大肠杆菌 *pqqL* 基因敲除与功能分析[J]. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1380-1384
- [33] Turlin E, Gasser F, Biville F. Sequence and functional analysis of an *Escherichia coli* DNA fragment able to complement *pqqE* and *pqqF* mutants from *Methylobacterium organophilum*[J]. *Biochimie*, 1996, 78(10): 822-831
- [34] Duine JA, van der Meer RA, Groen BW. The cofactor pyrroloquinoline quinone[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1990, 10: 297-318
- [35] Duine JA. The PQQ story[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88(3): 231-236
- [36] van Kleef MA, Duine JA. Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(5): 1209-1213
- [37] Wang X, Wang JH, Liu DS, et al. Establishment of the screening method and isolation of PQQ producing strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(6): 982-986 (in

- Chinese)
王歆, 汪建华, 刘党生, 等. 吡咯喹啉酮产生菌筛选方法建立及菌种筛选[J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 982-986
- [38] Li Y, Chen T, Zhao XM. Progress in development of microbial reduced genome[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(9): 838-848 (in Chinese)
李杨, 陈涛, 赵学明. 微生物基因组简化的研究进展[J]. 生命科学, 2011, 23(9): 838-843
- [39] Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher R. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach[J]. BMC Biochemistry, 2008, 9: 8
- [40] Gao SY, Xiong XH, Wang JH, et al. Isolation *pqq* biosynthesis gene cluster from *Gluconobacter oxydans* based on sorbose-dehydrogenase activity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(8): 1104-1108 (in Chinese)
- 高书颖, 熊向华, 汪建华, 等. 利用山梨糖脱氢酶活性筛选氧化葡萄糖杆菌 PQQ 合成基因簇[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 1104-1108
- [41] Morris CJ, Biville F, Turlin E, et al. Isolation, phenotypic characterization, and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequences of *pqqD*, *pqqG*, and *pqqC*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(6): 1746-1755
- [42] Springer AL, Ramamoorthi R, Lidstrom ME. Characterization and nucleotide sequence of *pqqE* and *pqqF* in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(7): 2154-2157
- [43] Davidson VL. Electron transfer in quinoproteins[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 428(1): 32-40

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目, 是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟, 一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台, 同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表, 是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了“名课讲堂”版块, 邀约相关生命科学领域, 如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点, 推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文, 为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台, 促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!