

徐利军, 王业民, 徐敏, 等. 羊毛硫抗生素雷可肽同源基因簇的异源表达[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(5): 93-100.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.05.013

羊毛硫抗生素雷可肽同源基因簇的异源表达

徐利军¹, 王业民¹, 徐敏¹, 赵志龙², 高贵喜¹, 陶美凤¹

1. 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030;

2. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要 高杰氏链霉菌中含有新型羊毛硫抗生素雷可肽(lexapeptide)的同源基因簇 *lxm2*, 为探索该基因簇相应的产物, 将包含 *lxm2* 的细菌人工染色体转到变铅青链霉菌中进行异源表达, 证实其可以产生雷可肽; 同时还获得另一个新次级代谢产物, 基因敲除实验表明此化合物的合成也与 *lxm2* 相关。通过色谱技术对新化合物进行分离纯化, 结合核磁共振谱、高分辨质谱和二级质谱确定其结构为具有多重修饰的线性六肽, 与雷可肽的 N-端六氨基酸序列相同, 命名为 Lxm-N-六肽, 该化合物没有检测到抗菌活性。

关键词 链霉菌; 药物研发; 异源表达; 次级代谢产物; 羊毛硫抗生素; 雷可肽; 超级细菌

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)05-0093-08

微生物来源的天然产物一直以来都是药物研发的主要来源^[1]。近年由于抗生素的滥用, 临床上涌现出多种多重耐药致病菌, 如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐万古霉素粪肠球菌以及耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌等“超级细菌”。多重耐药的“超级细菌”的出现严重威胁人类的健康, 国际上迫切需要结构和作用机制新颖的抗生素来治疗“超级细菌”引起的感染。核糖体肽类抗生素是由核糖体合成的一类翻译后高度修饰的肽类化合物(ribosomally synthesized posttranslationally modified peptides, RiPPs), RiPPs 具有结构多样性和生物活性多样性, 其中羊毛硫肽类抗生素抗菌作用机制独特^[2], 微生物不易产生抗药性, 例如乳链球菌肽 nisin 作为食品防腐剂应用了近 60 年, 至今没发现微生物对其产生抗性^[3-4], 这预示着羊毛硫肽类化合物在药用方面可能有很大的发展潜力, 是发掘抗生素的重要研究对象^[5-6]。

核糖体肽类化合物通常由前体肽经蛋白酶切割、多重修饰后生成成熟的活性肽。前体肽由信号肽、前导肽及核心肽组成, 其中信号肽负责前体肽在细胞内的定位, 前导肽则主要介导核心肽上修饰反应的发生, 修饰后的前体肽经蛋白酶水解切除信号肽和前导肽部分, 形成成熟的活性肽, 释放到胞

外^[7]。羊毛硫抗生素(lantibiotics)是目前研究最深入的一类核糖体肽类抗生素, 其生物合成^[7]、作用机制^[8-9]、生物活性及应用^[10-11]等方面都有较深入的研究。羊毛硫抗生素具有特征性的脱氢丙氨酸(Dha)、脱氢氨基丁酸(Dhb)以及羊毛硫氨酸(Lan)或甲基羊毛硫氨酸(MeLan), 其前体肽通常含有较多的丝氨酸、苏氨酸以及半胱氨酸残基。根据羊毛硫氨酸或甲基羊毛硫氨酸的合成机制可以将羊毛硫抗生素分为 I、II、III 和 IV 四类。I 类的 Lan(或 MeLan)由 Ser(或 Thr)与 Cys 经由脱水酶 LanB 和环化酶 LanC 催化生成; II 类由包含脱水和环化结构域的双功能酶 LanM 催化生成; III 与 IV 类则分别由 LanKC 和 LanL 催化生成, LanKC 和 LanL 均包含中心激酶结构域、N-端磷酸丝氨酸/磷酸苏氨酸裂酶结构域以及 C 端环化酶结构域。其中 LanL 的环化酶结构域中的 3 个结合金属离子的氨基酸残基与 LanC 中的保守一致, LanKC 中的环化酶结构域则不存在这 3 个保守的氨基酸残基^[7]。此外, 羊毛硫肽类化合物的结构多样性还源于大量其他种类的翻译后修饰, 如酰基化、糖基化、卤化、异戊烯化和差向异构化等^[12], 所有已知的羊毛硫肽都需要经过一系列的翻译后修饰才能成为具有生物活性的活性肽^[7]。

收稿日期: 2020-06-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770036)

徐利军, 硕士. 研究方向: 链霉菌次级代谢产物挖掘. E-mail: lijunxuhappy@126.com

通信作者: 陶美凤, 博士, 教授. 研究方向: 抗生素生物合成及代谢调控. E-mail: tao_meifeng@sytu.edu.cn

笔者所在课题组通过异源表达筛选娄氏链霉菌 Sal35 的基因组细菌人工染色体(BAC)文库,发现一个新型羊毛硫抗生素雷可肽(lexapeptide)。雷可肽的化学结构(图 1)^[13]中含有 2 个 Dha、3 个 Dhb、1 个 Lan 和 1 个 C-端氨基乙基甲基 Cys (AviMeCys),然而测序发现其生物合成基因簇中并不含有传统的 Ser/Thr 脱水酶和环化酶同源基因,表明雷可肽是一种新型的羊毛硫抗生素。同时,从

1 株高杰氏链霉菌 Sgt26 (*Streptomyces galteri* 26) 的基因组 BAC 文库中筛选得到 1 个抗菌活性克隆 4D8,测序发现其含有雷可肽生物合成基因簇的同源基因簇^[13],命名为 *lxm2*。本研究通过异源表达 4D8 阐明基因簇 *lxm2* 负责合成的次级代谢产物,并通过基因敲除实验确定相应化合物的合成是否与雷可肽同源基因簇 *lxm2* 有关,旨在为雷可肽的结构改造研究奠定基础。

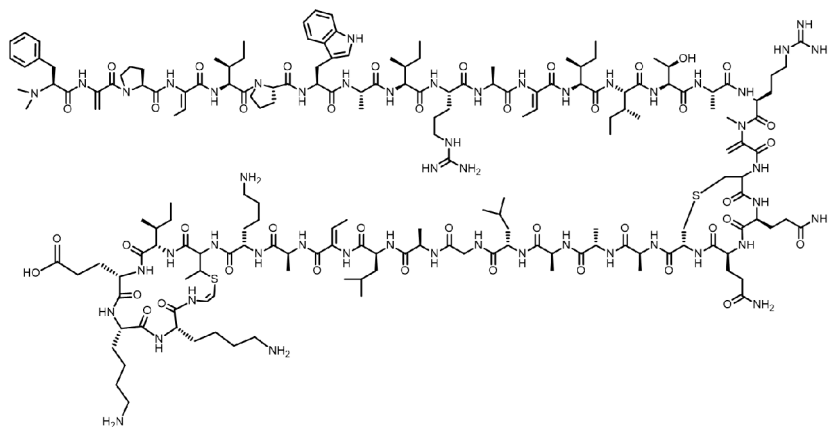


图 1 雷可肽的结构^[13]

Fig.1 The structure of lexapeptide^[13]

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与培养条件

变铅青链霉菌 GX28 为异源表达宿主^[14]。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) mc² 155 以及蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*) 为抗生素活性测定指示菌。高杰氏链霉菌 Sgt26 分离自神农架原始森林。4D8 为来自高杰氏链霉菌 Sgt26 的基因组文库 BAC 克隆,含有雷可肽同源基因簇 *lxm2*^[13]; BAC 文库载体为 pHL931^[13]。大肠杆菌 DH10B 为 BAC 克隆和质粒载体的宿主菌,大肠杆菌 ET12567/pUB307 为大肠杆菌-链霉菌三亲本接合转移的辅助菌株^[15]。pJTU6722 含有红霉素抗性基因,作为模板扩增红霉素抗性基因,用于 4D8 中的雷可肽同源基因簇的基因置换。MS 培养基用于链霉菌菌种的活化和产孢^[16]。YBP 培养基用于链霉菌菌株的固体发酵^[17]。LB 培养基^[18]用于大肠杆菌和生测指示菌的培养。抗生素及使用质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$):阿泊拉霉素(Am)50、卡那霉素(Km)100、氯霉素(Cml)25、萘啶酮酸(Ndx)25、三甲氧苄啶(TMP)50。

1.2 基因敲除

通过 PCR-targeting 技术^[19]敲除 4D8 中的雷可肽同源基因簇。PCR-targeting 引物为 TAR-F: GCCTTCTGCACGCTGTCCCCGATGGCCTTG-GCGTGCACCGCTCCAGGACGATTCCGGG-GATCCGTCGACC; TAR-R: ACGAGAAGGAC-CTGTTCGAGGGTTACACCGCCTACACCTCC-GCCGAGGAGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC, 模板为 pJTU6722, PCR 扩增含红霉素抗性基因的片段,将纯化的 PCR 产物电转化到 BW25113/4D8, 筛选红霉素抗性重组子。验证基因敲除的引物为 4D8-1-F: GCCTTCTGCACGCTGTCC, 4D8-1-R: AGCATCAGCAGCATCTCGT; 4D8-2-F: GCTTC-CTTCGTGTCCTGGTC, 4D8-2-R: GCCGTACTC-CTGCTGATGAC。

1.3 基因簇异源表达和发酵

通过三亲本接合转移将含有接合转移起始区 *oriT* 的 BAC 克隆 4D8、基因簇敲除克隆 4D8 Δ *lxm2* 和 BAC 载体 pHL931 接合转移到高产抗生素的变铅青链霉菌 GX28 中。三亲本接合转移方法参见文献^[15]。含质粒的大肠杆菌 ET12567 为接合转移供体菌,变铅青链霉菌 GX28 为受体菌,

大肠杆菌 ET12567/pUB307 为辅助菌。加抗生素 Am 和 TMP 覆盖后的接合转移平板于 30 °C 培养 5 d 至接合子产孢;挑取 6 个接合子转接到含有 Am 和 Ndx 的 MS 平板上,30 °C 培养 5 d 至产孢;将孢子转接到 YBP 培养基上,30 °C 发酵 7 d。

1.4 Lxm-N-六肽的 HPLC 检测

用 HPLC (色谱柱:Agilent 公司 ZORBAX 300SB-C18, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) 分析检测 Lxm-N-六肽,紫外检测波长为 230 nm,洗脱溶剂为水+0.1% TFA(A相)、乙腈+0.075% TFA(B相),流速 1 mL/min,梯度洗脱条件见表 1。

1.5 Lxm-N-六肽化合物的提取、分离和纯化

将固体发酵物切碎,用等体积甲醇浸提 3 次,浸泡过程中用机械力持续搅拌,浸提液用真空旋转蒸发仪减压蒸馏;得到的甲醇浸提物用少量水溶解,然后加入等体积的正丁醇萃取 3 次,萃取液经减压蒸馏去除有机试剂。再用 CHP20P 大孔吸附树脂分离,将正丁醇萃取物通过干法上样加入到 CHP20P 色谱柱(柱长 60 cm,内径 5 cm)内,甲醇-水梯度洗脱(甲醇梯度由 50% 上升至 100%),每个梯度冲洗 3 倍柱体积,流速为 20 mL/min,收集洗脱液,并用 HPLC 检测。合并含有目标色谱峰样品,减压蒸馏去除溶剂,同样的方法用窄内径的 CHP20P 色谱柱(柱长 40 cm,内径 2 cm)将合并的样品进行再次分离纯化。将得到的样品用尽可能少量的甲醇溶解,样品溶液经过 2 μ m 有机相滤膜过滤后加入到 Sephadex LH20 色谱柱(柱长 180 cm,内径 2 cm)内,甲醇洗脱,流速为 150 μ L/min,收集样品并用 HPLC 检测,合并含有目标化合物的组份。最后用分析型 HPLC(SHIMADZU VP-ODS, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm)分离纯化目标化合物,洗脱溶剂为水+0.1% TFA(A相)、乙腈+0.075% TFA(B相),流速为 0.8 mL/min,梯度洗脱条件见表 1。

1.6 Lxm-N-六肽的结构鉴定

通过 1D 和 2D 核磁共振谱(NMR)和质谱进行鉴定。NMR 谱采用美国 Bruker 核磁共振仪(600 MHz),化学位移以四甲基硅烷为内标(TMS, δ = 0.0 ppm)。LC-MS 采用带有电喷雾离子源(ESI)的安捷伦 1100-LC/MSD 离子阱系统,其中 HPLC 采用表 1 分离纯化条件;高分辨质谱采用与安捷伦 1200 HPLC 联用的 6530 四级杆飞行时间质谱仪 Accurate-Mass QTOF,并采用 ESI 离子源。

表 1 Lxm-N-六肽的 HPLC 检测和 HPLC 分离纯化条件

Table 1 HPLC conditions for Lxm-N-hexapeptide detection and purification

检测条件 Detection condition			纯化条件 Purification condition		
时间/min Time	A/%	B/%	时间/min Time	A/%	B/%
0	90	10	0	75	25
5	90	10	7	75	25
20	50	50	7.1	0	100
30	0	100	14	0	100
35	0	100	15	75	25
36	90	10	20	75	25
45	90	10			

1.7 生物活性测定

将 1% 琼脂固体培养基微波加热融化后,置于 55 °C 水浴中冷却 15 ~ 20 min,以 0.1% ~ 0.2% (V/V) 的量加入生测指示菌的活化培养物,混合均匀后铺制生测指示菌平板(25 mL/板),将无菌滤纸片或牛津杯置于含生测指示菌的培养基上,再将样品液加到滤纸片(20 μ L 上样量)上或牛津杯(200 μ L 上样量)中,置于 37 °C 培养 1 ~ 2 d 观察抑菌圈。

2 结果与分析

2.1 同源基因簇 *lxm2* 的异源表达

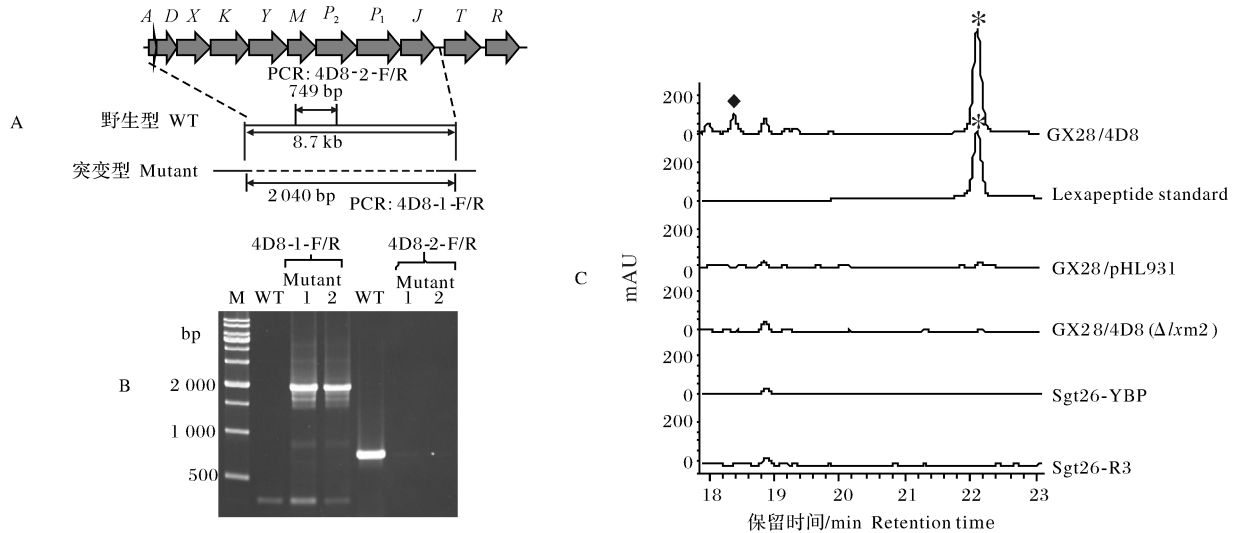
对 BAC 克隆 4D8 中的 *lxm2* 基因簇进行基因敲除,用红霉素抗性基因置换基因簇中除 *lxm2T* 和 *lxm2R* (分别负责编码转运蛋白和调控蛋白)外的所有 *lxm2* 基因,得到 BAC 质粒 4D8 Δ *lxm2*, PCR 验证正确(图 2A、B)。将含 *lxm2* 基因簇的 BAC 克隆 4D8、基因敲除 BAC 质粒 4D8 Δ *lxm2* 和 pHL931 空载体对照接合转移到高产抗生素的变铅青链霉菌宿主菌 GX28 中,得到接合子,分别发酵后进行有机溶剂萃取,通过 HPLC 检测分析发酵抽提物。从 HPLC 图谱观察到 GX28/4D8 在 22.1 min 时产生 1 个吸收峰(图 2C 星号标记),与来自娄彻氏链霉菌 Sal35 的羊毛硫抗生素雷可肽(lexapeptide)标准品的保留时间相同。分析敲除突变株 GX28/4D8 Δ *lxm2* 的代谢产物,发现突变株中不再产生该色谱峰。利用 HPLC 半制备接峰获得少量样品,通过高分辨四级杆串联飞行时间质谱检测得到解卷积相对分子质量为 3 872(图 3A),与雷可肽标准品相对分子质量大小一致。该结果表明 BAC 克隆 4D8 的 *lxm2* 基因簇也负责合成雷可肽。

2.2 Lxm-N-六肽的发现

分析 HPLC 图谱,与空载体菌株 GX28/pHL931

以及原始菌株高杰氏链霉菌 Sgt26 的发酵产物比较, 在菌株 GX28/4D8 的 HPLC 图谱中还出现 1 个新的差异色谱峰(图 2C 菱形标记, 保留时间为 18.4 min)。通过 HPLC 半制备分离该色谱峰对应的化合物, 得到少量样品, 利用液质联用质谱(LC-MS)检测化合物, 相对分子质量为 653.6 ($[M+H]^+$)(图 3B)。分析

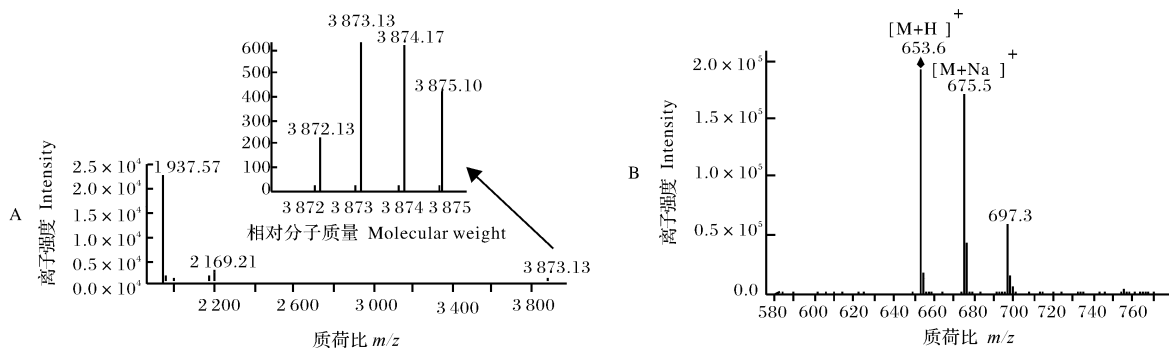
4D8 的 DNA 序列发现, 除同源基因簇 *lxm2* 之外, 没有发现可预测的其他次级代谢相关的基因簇, 因此, 推测该化合物的合成也与雷可肽同源基因簇有关。分析敲除突变株 GX28/4D8 Δ *lxm2* 的 HPLC 代谢图谱, 发现突变株中也不产生该化合物(图 2C), 表明其合成的确与 *lxm2* 基因簇有关。



A: 同源基因簇 *lxm2* 基因敲除及 PCR 验证示意图 Schematic diagram of the knockout of homologous gene cluster *lxm2* and PCR verification; 基因簇 *lxm2* 中, A 编码前肽, D 编码半胱氨酸脱羧酶, X 编码脱水酶, K 编码激酶, Y 编码可能的环化酶, M 编码 N-甲基转移酶, P_2 和 P_1 编码肽酶, J 编码还原酶, T 编码转运蛋白, R 编码 LuxR 家族的转录调控蛋白 A encodes prepeptide, D encodes cysteine decarboxylase, X encodes putative lyase, K encodes kinase, Y encodes putative cyclase, M encodes N-methyltransferase, P_2 and P_1 encode peptidase, J encodes reductase, T encodes transporter, R encodes LuxR family transcriptional regulator; B: PCR 扩增结果 PCR amplification results; C: 雷可肽及 Lxm-N-六肽的 HPLC 检测 HPLC analysis for lexapeptide and Lxm-N-hexapeptide; 星号标记为雷可肽, 菱形标记为 Lxm-N-六肽 The peaks labeled with asterisk are lexapeptide, the peak labeled with diamond is Lxm-N-hexapeptide.

图 2 雷可肽同源基因簇 *lxm2* 的敲除和异源表达

Fig.2 Gene knockout and heterologous expression of the homologous lexapeptide gene cluster *lxm2*



A: Lexapeptide 的解卷积质谱图 Deconvoluted mass spectrum of lexapeptide; B: Lxm-N-六肽的质谱图 Mass spectrum of Lxm-N-hexapeptide.

图 3 Lexapeptide 和 Lxm-N-六肽的相对分子质量检测

Fig.3 Molecular weight determination of lexapeptide and Lxm-N-hexapeptide

2.3 Lxm-N-六肽的分离纯化和结构鉴定

跟踪差异峰分离纯化相应化合物,从20 L发酵培养物得到白色粉末状纯品1.5 mg。将纯化的样品溶于氘代试剂DMSO-*d*6中进行1D-和2D-NMR谱分析,NMR数据总结如表2,推测其结构为含有多重修饰的Me₂-Phe-Dha-Pro-Dhb-Ile-Pro六肽(图4A),其序列与雷可肽的N-端一致,因此将这个分子肽命名为Lxm-N-六肽。如图3所示,Lxm-N-六肽的

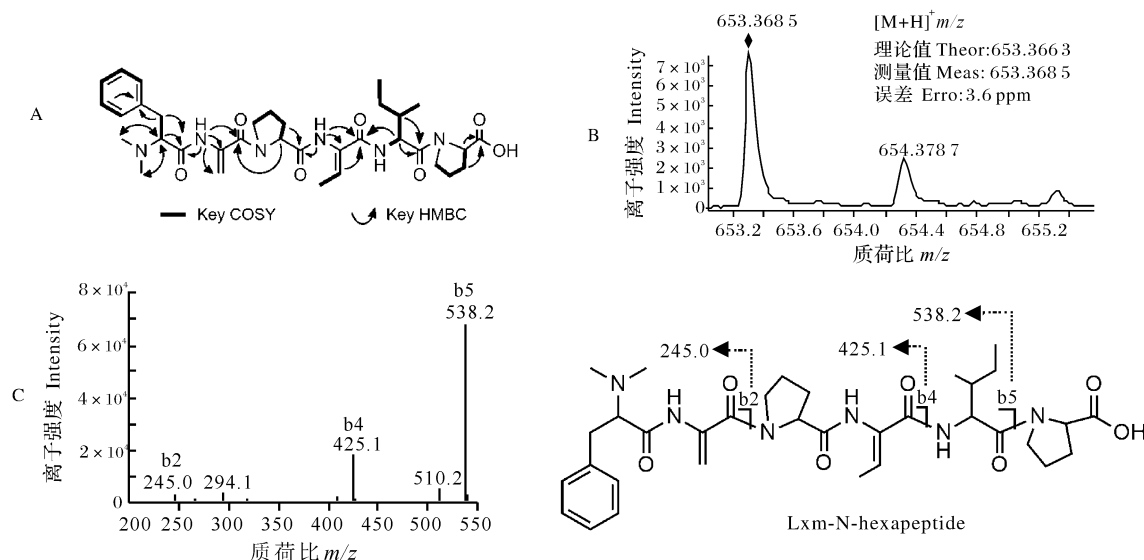
N-端Phe上存在2个N-甲基化修饰,还包括另外2个修饰氨基酸,即衍生自Ser的脱氢丙氨酸(Dha)和由Thr衍生的脱氢- α -氨基丁酸(Dhb)。对Lxm-N-六肽纯品进行高分辨质谱分析,相对分子质量为653.3685([M+H]⁺),理论计算值为653.3663([M+H]⁺),误差为3.6 ppm(图4B);利用串联质谱分析,发现其二级质谱碎片也与NMR推测结构一致,产生了与理论计算值相符的b型碎片离子峰(图4C)。

表2 Lxm-N-六肽的NMR数据汇总(600 MHz,DMSO-*d*6)

Table 2 NMR spectrum data of Lxm-N-hexapeptide (600 MHz,DMSO-*d*6)

碳原子 Carbon	化学位移 δC_{ppm}	质子 Proton	化学位移* δH_{ppm} (Mult, J in Hz)	¹ H- ¹ H-COSY	¹ H- ¹³ C HMBC
N,N-二甲基苯丙氨酸 N,N-dimethyl Phenylalanine (Me₂-Phe)					
1	169.1				C2-H, C3-H ₂ , Dha-NH
2	68.6	C2-H	3.47 (dd, 10, 5)	C3-H ₂	C3-H ₂ , C10/10'-H ₃
3	32.7	C3-H ₂	2.77 (dd, 5, 13), 2.89 (dd, 10, 13)	C2-H	C2-H
4	138.7				C2-H, C3-H ₂ , C6/8-H
5,9	129.2	C5/9-H	7.17 (m)	C6/8-H	C3-H ₂
6,8	128.2	C6/8-H	7.25 (m)	C5/9-H, C7-H	
7	126.1	C7-H	7.17 (m)	C6/8-H	
10,10'	41.3	C10/10'-H ₃	2.25 (s)		C2-H
脱氢丙氨酸 Dehydroalanine (Dha)					
1	165.3				C3-H ₂ , NH, Pro I-C2-H
2	137.8				C3-H ₂ , NH
3	103.4	C3-H ₂ NH	4.83 (s), 5.21 (s) 9.96 (s)		NH
脯氨酸 I Proline I (Pro I)					
1	170.3				C2-H, C3-H ₂ , Dhb-NH
2	60.6	C2-H	4.22 (t, 8)	C3-H ₂	C3-H ₂ , C5-H ₂
3	29.5	C3-H ₂	1.74 (m), 2.18 (m)	C2-H, C4-H ₂	C2-H, C5-H ₂
4	24.7	C4-H ₂	1.68 (m)	C3-H ₂ , C5-H ₂	C2-H, C5-H ₂
5	48.3	C5-H ₂	2.61 (m), 3.13 (m)	C4-H ₂	C3-H ₂ , C5-H ₂
脱氢-α-氨基丁酸 Dehydrobutyryne (Dhb)					
1	163.2				C3-H, C4-H ₃ , NH, Ile-C2-H, Ile-NH
2	129.5				C3-H, C4-H ₃
3	131.1	C3-H	6.59 (q, 7)	C4-H ₃	C4-H ₃ , NH
4	13.0	C4-H ₃ NH	1.65 (d, 7) 8.99 (s)	C3-H	
异亮氨酸 Isoleucine (Ile)					
1	169.7				C2-H, C3-H
2	54.7	C2-H	4.35 (t, 9)	C3-H, NH	NH
3	36.0	C3-H	1.81 (m)	C2-H, C4-H ₂ , C6-H ₃	C2-H, NH
4	24.1	C4-H ₂	0.96 (m), 1.48 (m)	C3-H, C5-H ₃	C2-H
5	10.6	C5-H ₃	0.73 (t, 7)	C4-H ₂	
6	14.6	C6-H ₃ NH	0.86 (d, 7) 7.25 (over-lapped sig)	C3-H, NH C2-H	C2-H
脯氨酸 II Proline II (Pro II)					
1	173.3				C2-H, C3-H ₂
2	58.6	C2-H	4.19 (dd, 5, 8)	C3-H ₂	C3-H, C4-H, C5-H
3	28.8	C3-H ₂	1.81 (m), 2.10 (m)	C2-H, C4-H ₂	C2-H, C4-H, C5-H
4	24.5	C4-H ₂	1.88 (m)	C3-H ₂ , C5-H ₂	C2-H, C5-H
5	46.7	C5-H ₂	3.55 (m), 3.86 (m)	C4-H ₂	C2-H, C3-H, C4-H

* J:偶合常数; s:单峰;d:双重峰;t:三重峰;q:四重峰;dd:双重双重峰;m:多重峰。J: Coupling constants. s: Singlet ;d: Doublet; t: Triplet; q: Quartet; dd: Doublet of doublets; m: Multiplet.



A. Lxm-N-六肽结构及关键 NMR 信号 Structure of Lxm-N-hexapeptide and key NMR signals; B: Lxm-N-六肽的高分辨图谱 High resolution map of Lxm-N-hexapeptide; C: Lxm-N-六肽的二级质谱数据 MS-MS data of Lxm-N-hexapeptide.

图 4 Lxm-N-六肽的结构鉴定

Fig.4 Structure elucidation of Lxm-N-hexapeptide

2.4 Lxm-N-六肽的抗菌活性测定

采用革兰氏阳性菌株金黄色葡萄球菌、蕈状芽孢杆菌、耻垢分支杆菌和革兰氏阴性大肠杆菌做指示菌,将化合物溶于甲醇中,分别用滤纸片和牛津杯进行生测实验,化合物最高使用量达 100 μg ,都没有检测到抑菌活性。暗示雷可肽中起抗菌活性的药效基团可能在该 Lxm-N-六肽之外的部分。

另外,在化合物分离过程中,也曾检测到雷可肽色谱峰之外的活性组分,但是由于其含量极少,没有成功分离到该活性组分。

3 讨论

本研究通过异源表达、基因敲除证实链霉菌 Sgt26 菌株来源的 *lxm2* 同源基因簇负责雷可肽的生物合成。同时还发现和鉴定了 1 个多重修饰的新结构小分子六肽,其序列与雷可肽的 N 端六氨基酸序列一致。

雷可肽具有典型羊毛硫抗生素结构特点^[13],根据羊毛硫抗生素的合成机制^[7,20],雷可肽应该是在翻译后再经过脱水、环化和 Phe 的 N-甲基化等后修饰而形成的。Lxm-N-六肽的结构中也含有甲基化和氨基酸脱水修饰,因此,推测它是成熟的雷可肽在

某种蛋白酶作用下的水解产物。在雷可肽合成相关的同源基因簇 *lxm2* 中有 2 个基因编码蛋白酶,推测 2 个基因产物组成蛋白酶复合物,负责前导肽的切割。根据功能预测,这个蛋白酶复合物没有负责脯氨酸末端水解的功能,所以 Lxm-N-六肽的释放可能跟这个蛋白酶复合物的功能无关,可能是菌体内其他的某种蛋白酶对雷可肽水解而形成的,当然,该推论还需进一步的实验验证。

Lxm-N-六肽的发现具有重要意义。一方面, Lxm-N-六肽结构的鉴定有利于其合成相关基因的研究,负责 Dha、Dhb 和 Lan 合成的基因功能的阐明将有助于雷可肽的生物合成机制的进一步解析。另一方面, Lxm-N-六肽的获得为后续研究提供了一个有价值的线索,雷可肽虽然抑菌效果很好,但分子量过大,这种肽类化合物在进入人体循环系统后很容易被免疫系统当作抗原物质受到排斥而引起抗原反应,可能很难成为系统性抗感染药物; Lxm-N-六肽没有显示出任何生物活性,表明雷可肽发挥其药效活性可能不需要 N 端的六肽部分,基于此,可以对雷可肽的 N 端氨基酸进行删减并检测这些衍生物的抗菌活性,如果可以通过基因改造^[21-22]或寻找一个合适的蛋白水解酶,得到 1 个分子量较小且有抑菌活性的雷可肽结构类似物,那么这种化合

物会有更好的应用前景,将为羊毛硫肽类抗生素的研发提供更广阔的发展空间。

参考文献 References

- [1] NEWMAN D J, CRAAG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(3): 629-661.
- [2] HASPER H E, KRAMER N E, SMITH J L, et al. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1636-1637.
- [3] LUBELSKI J, RINK R, KHUSAINOV R, et al. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(3): 455-476.
- [4] ROGERS L A. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus* [J]. *J Bacteriol*, 1928, 16(5): 321-325.
- [5] DUNBAR K L, MITCHELL D A. Revealing nature's synthetic potential through the study of ribosomal natural product biosynthesis[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(3): 473-487.
- [6] VAN HEEL A J, DE JONG A, MONTALBAN-LOPEZ M, et al. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 448-453.
- [7] KNERR P J, VAN DER DONK W A. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 479-505.
- [8] ASADUZZAMAN S M, SONOMOTO K. Lantibiotics, diverse activities and unique modes of action[J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107(5): 475-487.
- [9] CHATTERJEE C, PAUL M, XIE L, et al. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics[J]. *Chem Rev*, 2005, 105(2): 633-684.
- [10] COTTER P D, HILL C, ROSS R P. Bacteriocins: developing innate immunity for food[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(10): 777-788.
- [11] PIPER C, COTTER P D, ROSS R P, et al. Discovery of medically significant lantibiotics[J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2009, 6(1): 1-18.
- [12] NOLN E M, WALSH C T. How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics[J]. *ChemBiochem*, 2009, 10(1): 34-53.
- [13] XU M, ZHANG F, CHENG Z, et al. Functional genome mining reveals a novel class V lanthipeptide containing a D-amino acid introduced by an F₄₂₀H₂-dependent reductase[J/OL]. *Angew Chem Int Ed*, 2020; 08035 [2020-04-23]. <https://doi.org/10.1002/anie.202008035>.
- [14] PENG Q Y, GAO G X, LYU J, et al. Engineered *Streptomyces lividans* strains for optimal identification and expression of cryptic biosynthetic gene clusters[J/OL]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3042 [2020-04-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30619133/>. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03042.
- [15] FLETT F, MERSINIAS V, SMITH C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 155(2): 223-229.
- [16] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [17] OU X, ZHANG B, ZHANG L, et al. Characterization of *rrdA*, a TetR family protein gene involved in the regulation of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(7): 2158-2165.
- [18] SAMBROOK J F E, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Col Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [19] GUST B, CHALLIS G L, FOWLER K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [20] ARNISON P G, BIBB M J, BIERBAUM G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature[J]. *Nat Prod Rep*, 2013, 30(1): 108-160.
- [21] ZHOU L, VAN HEEL A J, KUIPERS O P, et al. The length of a lantibiotic hinge region has profound influence on antimicrobial activity and host specificity[J/OL]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 11 [2020-04-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310329/>. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00011.
- [22] LUO Y, MCLEAN D, LINDEN G J, et al. The naturally occurring host defense peptide, LL-37, and its truncated mimetics KE-18 and KR-12 have selected biocidal and antibiofilm activities against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* *in vitro*[J/OL]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 544 [2020-04-23]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00544>.

Heterologous expression of lantibiotic lexapeptide biosynthetic gene cluster homologue

XU Lijun¹, WANG Yemin¹, XU Min¹, ZHAO Zhilong², GAO Guixi¹, TAO Meifeng¹

1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China;

2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract Lantibiotics attract extensive attention in the field of discovery and development of antibiotics due to its special action mode and barely observed drug-resistant mutation after being applied for decades. Lexapeptide is a type V lantibiotic recently uncovered via a functional genome mining approach (LEXAS) and has strong antibacterial activity against Gram positive bacteria including MRSA and MRSE. A gene cluster (*lxm2*) similar to the lexapeptide biosynthetic gene cluster was identified through screening the *Streptomyces galtieri* genomic DNA bacterial artificial chromosome (BAC) library via LEXAS. The BAC clone carrying *lxm2* was introduced into *Streptomyces lividians* for heterologous expression, leading to the production of lexapeptide and a novel peak in HPLC. The production of lexapeptide and the new peak was disappeared when the *lxm2* gene cluster was removed from the BAC clone. Based on NMR spectrometry and high resolution mass spectrometry, the structure of the new compound was identified to be a highly modified linear hexapeptide with sequence identical to the N-terminal six amino acids of lexapeptide, thus Lxm-N-hexapeptide was given as its name. The Lxm-N-hexapeptide did not exhibit antibacterial activity.

Keywords *Streptomyces*; drug discovery; heterologous expression; secondary metabolites; lantibiotic; lexapeptide; super bacteria

(责任编辑:张志钰)