

研究报告

推定第四类羊毛硫素合成酶生物信息学分析

胡彦婷^{1,2,3} 安丽康^{2,3} 尹淑丽^{2,3} 程辉彩^{2,3} 张根伟^{2,3} 张丽萍^{2,3} 刘洪伟^{2,3*}

(1. 河北工业大学 天津 300000)

(2. 河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050081)

(3. 河北省主要农作物病害微生物控制工程技术研究中心 河北 石家庄 050081)

摘要:【目的】获得更多关于第四类羊毛硫素合成酶的序列及蛋白结构特征信息,并为研究其作用机制及生物学功能奠定基础。【方法】应用多种软件分析和预测了山丘链霉菌、枯草芽孢杆菌、肺炎双球菌、嗜性乳杆菌、德氏乳杆菌、长双歧杆菌、拟无枝酸菌、大芬戈尔德菌中此类蛋白质的理化性质、结构域、二级结构等,同时采用邻位连接法对这8种蛋白及其结构域进行了进化树的构建。【结果】所研究的这8种蛋白均为亲水性蛋白,均无信号肽;山丘链霉菌、枯草芽孢杆菌、肺炎双球菌、德氏乳杆菌、长双歧杆菌、拟无枝酸菌、大芬戈尔德菌的此类合成酶属于酸性蛋白,嗜性乳杆菌的类第四类羊毛硫素合成酶属于碱性蛋白;除山丘链霉菌、枯草芽孢杆菌、肺炎双球菌的此类合成酶不稳定外,其它菌株的合成酶均稳定;进化结果表明枯草芽孢杆菌和肺炎链球菌同源性最高,LANC-like 结构域与合成酶的进化关系保持了高度的一致,而STYKc/S_TKc 结构域的进化关系表现出了一定的差异;二级结构主要以 α 螺旋和无规卷曲为主;所有的蛋白均有LANC-like 结构域。【结论】类第四类羊毛硫素合成酶在不同的菌种中具有一定的保守性,因此能够发挥相似的生物学功能。研究结果对进一步研究第四类羊毛硫素合成酶具有一定的参考价值,尤其是为通过该途径进一步提高枯草芽孢杆菌生防价值提供基础。

关键词: 类第四类羊毛硫素合成酶, 生物信息学, 枯草芽孢杆菌

Bioinformatics to predict type IV lanthipeptide synthetases

HU Yan-Ting^{1,2,3} AN Li-Kang^{2,3} YIN Shu-Li^{2,3} CHENG Hui-Cai^{2,3} ZHANG Gen-Wei^{2,3}
ZHANG Li-Ping^{2,3} LIU Hong-Wei^{2,3*}

(1. Hebei University of Technology, Tianjin 300000, China)

(2. Institute of Biology, Hebei Academy of Science, Shijiazhuang, Hebei 050081, China)

(3. Main Crops Disease of Microbial Control Engineering Technology Research Center in Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050081, China)

Foundation item: Key Basic Research Project in Hebei Province (No. 13966503D); Key Projects of Hebei Academy of Sciences (No. 15302); Science and Technology Cooperation and Development Funding Projects of Hebei Province (No. Y-15)

***Corresponding author:** Fax: 86-311-83022636; E-mail: lhwei1987@126.com

Received: December 22, 2015; **Accepted:** March 11, 2016; **Published online** (www.cnki.net): April 05, 2016

基金项目: 河北省重点基础研究项目(No. 13966503D); 河北省科学院重点项目(No. 15302); 河北省省级省校科技合作开发资金支持项目(No. Y-15)

***通讯作者:** Fax: 86-311-83022636; E-mail: lhwei1987@126.com

收稿日期: 2015-12-22; **接受日期:** 2016-03-11; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-04-05

Abstract: [Objective] This study aimed to get more information about sequence and protein structure of type IV lanthipeptide synthetases. **[Methods]** Eight potential type IV lanthipeptide synthetases were chosen from *Bacillus subtilis*, *Streptomyces collinus* Tu 365, *Lactobacillus iners* LactinV, *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus delbruecki*, *Bifidobacterium longum*, *Amycolatopsis azurea* and *Finegoldia magna*, and their physicochemical properties, domains, secondary structures were analyzed and predicted using different softwares. By using the Neighbor-joining method of Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, a dendrogram was obtained based on genetic distances. **[Results]** All eight proteins were hydrophilicity and there was no signal peptide in them. The proteins in *S. collinus* Tu 365, *B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *Lactobacillus delbruecki*, *Bifidobacterium longum*, *Amycolatopsis azurea* and *Finegoldia magna* were acidic whereas the others were alkaline. The proteins in *S. collinus* Tu 365, *B. subtilis* and *S. pneumoniae* were unstable whereas the others were stable. The evolutionary analysis showed that *B. subtilis* had the closest genetic relationship with *S. pneumoniae*. The evolutionary relationships of LANC-like domains were similar to total synthase, which was different from STYKc/S_TKc domains. Alpha helix and coil were the basic secondary structure. All those proteins contained LANC-like domain. **[Conclusion]** All that eight synthetases have their conservative structure in different bacteria, therefore, they can play the similar biological functions. All these results will provide information of the type IV lanthipeptide synthetase for further study, especially for improving the bio-control value of *B. subtilis*.

Keywords: The predicted type IV lanthipeptide synthetase, Bioinformatics, *Bacillus subtilis*

枯草芽孢杆菌是一种能够生成内生孢子的根际细菌,同时它也是革兰氏阳性菌的模式菌株,能够产生不同结构的抗菌物质。其产生抗菌活性物质主要包括两类:一类是核糖体途径合成并经翻译后修饰的蛋白类物质,例如羊毛硫素和类羊毛硫素;另一类是非核糖体途径合成的非蛋白类化合物,例如聚酮化合物、氨基糖和磷脂类^[1]。其中经核糖体途径合成的羊毛硫素是一类小分子肽,大概有19–38个氨基酸,大多数羊毛硫素成员都具有抗菌活性^[2]。例如一些商业用途的尼生素,因其具有有效的抗菌活性被称为羊毛硫抗生素^[3]。因其无耐药性、高效安全的特点,极有可能替代传统抗生素被广泛应用,从而引起学者的研究兴趣。

羊毛硫素包括羊毛硫氨酸和甲基羊毛硫氨酸,羊毛硫素合成酶被分为四类:第一类合成酶的作用机理是羊毛硫素在 LanB 家族单官能团脱水酶的作用下使丝氨酸和苏氨酸脱水,并且在 LanC 家族单官能团环化酶的作用下环化。第二类合成酶的作用机理是羊毛硫素的脱水和环化在 LanM 家族的一个双官能团脱水酶和环化酶的作用下完成。第三类和

第四类羊毛硫素合成酶存在3个结构域,他们具有相同的整体结构;具有一个相似的N末端裂解酶结构域、中心激酶结构域和一个有些许差异的C末端环化酶结构域;其主要区别是在第四类羊毛硫素合成酶的环化结构域中存在着锌结合位点,而在第三类中没有^[3-5]。已有研究结果表明第四类羊毛硫素合成酶(LanL enzymes)包含N末端的裂解酶结构域、中心激酶结构域和C末端的LanC-like环化酶结构域^[3-5]。通过基因挖掘发现很多细菌中均存在着第四类羊毛硫素合成酶^[6-8],第四类羊毛硫素合成酶一般存在于芽孢杆菌属、链霉菌属、乳球菌属、乳杆菌属等革兰氏阳性菌中^[9]。目前,虽然对第四类羊毛硫素合成酶的作用机制研究的比较多,但是对于有关第四类羊毛硫素合成酶在不同的生物中的理化性质和结构的研究报道较少,尤其是在枯草芽孢杆菌中,至今仍未有这方面的报道。

本文通过对枯草芽孢杆菌 XF-1 (*Bacillus subtilis* XF-1)的全基因组数据进行挖掘,发现了一个第四类羊毛硫素合成酶候选基因(Type IV lanthipeptide synthetase like gene, *T4LSL*)。通过同

源比对,在其他几种细菌中也发现了第四类羊毛硫素合成酶类似物或是潜在的第四类羊毛硫素合成酶,且据我们所知均未进行基因功能的鉴定。因此本文采用生物信息学方法对这些菌株中推定的第四类羊毛硫素合成酶进行了结构预测及分析,旨在为后续对此类合成酶的鉴定过程提供一定的数据支持,有助于对新型羊毛硫素及抗菌物质的挖掘利用,并为通过基因工程手段或其他手段进行第四类羊毛硫素的高效表达提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 类第四类羊毛硫素合成酶序列的获取与确定

通过 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取枯草芽孢杆菌 XF-1 (*Bacillus subtilis* XF-1)的全基因组 (CP004019.1)^[10]。通过 Bagel^[11] 软件 (<http://bagel.molgenrug.nl/>)挖掘出其基因序列中存在第四类羊毛硫素合成酶候选基因,如图 1 所示。将其氨基酸序列通过 NCBI 数据库进行同源性比对,获得部分细菌菌株中的第四类羊毛硫素合成酶类似物或是潜在的第四类羊毛硫素合成酶,统称为类第四类羊毛硫素合成酶,同时将 Iftime 等^[2]发现的山丘链霉菌(*Streptomyces collinus* Tu 365)中 Type IV lanthipeptide synthetase (AGS73699)作为对照。

1.2 类第四类羊毛硫素合成酶的理化性质分析

应用在线软件 Prot Param^[12](<http://web.expasy.org/protparam/>)对类第四类羊毛硫素合成酶的理化性质进行分析。信号肽通过在线软件 SignalP^[13](<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测,Organism group 参数根据本文所选菌种的属性设置为 Gram-negative bacteria,其它参数使用默认参数。

1.3 激酶磷酸化修饰位点预测

通过在线软件 KinasePhos^[14](<http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw/>)对蛋白质的激酶磷酸化修饰位点进行预测,参数 Serine (S) Kinase、Threonine (T) Kinase、Tyrosine (Y) Kinase 均设定为 Select All ;选

择 Phosphohistidine (H)参数。

1.4 二级结构及结构域预测

应用在线软件 PSIPRED^[15](<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)和 SOPMA^[16](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)对蛋白质的二级结构进行预测,PSIPRED 和 SOPMA 均使用默认参数。结构域应用在线软件 Smart^[17](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1)预测,其参数使用默认值。并应用在线软件 DomainDraw^[18](<http://domaindraw.imb.uq.edu.au/>)绘制结构域模式图,General Settings 使用默认参数。

1.5 进化树的建立

利用 BioEdit 软件进行氨基酸序列比对,其中 ClustalW Options 中的一系列参数设置为默认值,然后利用 MEGA 5.22^[19]软件进行进化树的构建,采用邻位连接法(Neighbor-Joining, NJ)构建进化树,检验方法(Test of Phylogeny)选择 Bootstrap method ;重复抽样次数(Replication)设置为 1 000,以确保进化树的稳定性,其它参数设为默认值。

1.6 蛋白质三级结构预测

用 SWISS-MODEL^[20] 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>)对蛋白质的三级结构进行预测,参数设为默认参数。将预测后的蛋白质三级结构下载为 PDF 格式,之后使用软件 VMD^[21]对下载的三级结构进行处理。

2 结果与分析

2.1 类第四类羊毛硫素合成酶序列的获取与确定

由 NCBI 数据库中得到枯草芽孢杆菌 XF-1 的全基因组,通过 Bagel 软件挖掘出其基因序列中存在第四类羊毛硫素合成酶基因候选基因,如图 1 所示。将其氨基酸序列通过 NCBI 数据库进行同源性比对,获取到数据库中与该蛋白类似蛋白的基本信息。由于本文主要是对潜在的第四类羊毛硫素合成酶进行生物信息学分析,为了研究结果的准确性和可信度,因此选择了数据库中前 500 个序列中羊毛

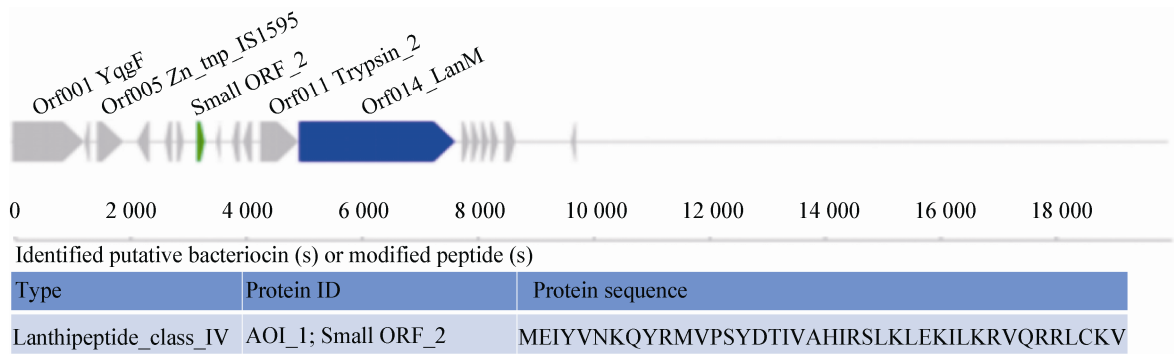


图 1 枯草芽孢杆菌 XF-1 中推定的第四类羊毛硫素
Figure 1 Putative lanthipeptide class IV in *Bacillus subtilis* XF-1

硫素合成酶家族蛋白或是经过基因挖掘显示其可能是第四类羊毛硫素合成酶的蛋白。本文分析的含有类第四类羊毛硫素合成酶的菌株分别为惰性乳杆菌(*Lactobacillus iners* LactinV)、肺炎双球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、拟无枝酸菌

(*Amycolatopsis azurea*)、大芬戈尔德菌(*Finegoldia magna*)，具体信息见表 1。

2.2 部分菌株中类羊毛硫素合成酶的理化性质

通过 ExPASy 中的 ProtParam 在线软件分析获得部分细菌中类第四类羊毛硫素合成酶的理化性质，具体结果如表 2 所示。结果表明这 8 种蛋白的分子量存在着一定的差异，其中山丘链霉菌的

表 1 部分细菌中类第四类羊毛硫素合成酶一致性比较						
Table 1 Homology comparison of the predicted type IV lanthipeptide synthetases from some bacteria						
菌种名称 Species	蛋白名称 Protein	蛋白简称 Protein abbreviations	登录号 GenBank accession No.	一致性 Identity (%)	覆盖率 Query coverage (%)	E 值 E value
山丘链霉菌 <i>Streptomyces collinus</i> Tu 365	Type IV lanthipeptide synthetase	SCLan	AGS73699	33	74	1e-52
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> XF-1	Threonine protein kinase	BSLan	AGE62336	100	100	0
惰性乳杆菌 <i>Lactobacillus iners</i> LactinV	Lanthionine synthetase C-like protein	LILan	EFO67979	33	93	9e-127
肺炎双球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Lantibiotic synthetase	SPLan	COO17013	99	100	0
德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Lanthionine synthetase C-like family protein	LDLan	EPB99379	31	97	6e-114
长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i>	Lanthionine synthetase C family protein	BLLan	ACJ51584	29	97	1e-91
拟无枝酸菌 <i>Amycolatopsis azurea</i>	Lanthionine biosynthesis protein LanL	AALan	WP_005163355	29	99	6e -100
大芬戈尔德菌 <i>Finegoldia magna</i>	Lanthionine synthetase C-like protein	FMLan	WP_002838471	37	98	3e-154

注：蛋白简称命名规则为属名与种名的首字母加 Lan。下同。
Note: Proteins are named by initials of genus name and specific name plus Lan. The same as below.

表 2 部分细菌中类第四类羊毛硫肽合成酶理化性质

Table 2 The physical and chemical properties of the predicted type IV lanthipeptide synthetases from some bacteria

菌种名称 Species	蛋白简称 Protein	信号肽 Signal peptide	氨基酸数量 Number of amino acids	分子量 Molecular weight (Da)	理论等电点 Theoretical pI	亲水性 Hydropathicity	不稳定指数 Instability index
山丘链霉菌 <i>Streptomyces collinus</i> Tu 365	SCLan	NO	1 022	107 631.8	6.02	-0.125	40.04
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> XF-1	BSLan	NO	856	97 961.9	5.85	-0.251	41.75
惰性乳杆菌 <i>Lactobacillus iners</i> LactinV	LILan	NO	837	95 423.1	7.22	-0.290	35.12
肺炎双球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	SPLan	NO	856	97 909.9	5.85	-0.248	42.97
德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	LDLan	NO	829	92 559.6	5.43	-0.264	33.46
长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i>	BLLan	NO	885	99 860.1	6.13	-0.321	35.38
拟无枝酸菌 <i>Amycolatopsis azurea</i>	AALan	NO	847	93 227.8	5.46	-0.209	33.53
大芬戈尔德菌 <i>Finegoldia magna</i>	FMLan	NO	850	98 408.0	5.09	-0.212	34.65

SCLan 分子量最大, 德氏乳杆菌的 LDLan 分子量最小。由理论等电点可以看出, 山丘链霉菌、枯草芽孢杆菌、肺炎双球菌、德氏乳杆菌、长双歧杆菌、拟无枝酸菌、大芬戈尔德菌的类第四类羊毛硫素合成酶的等电点均在 7.0 以下, 属于酸性蛋白, 其中大芬戈尔德菌的等电点最低为 5.09; 惰性乳杆菌的等电点为 7.22, 属于碱性蛋白。除山丘链霉菌、枯草芽孢杆菌、肺炎双球菌的类第四类羊毛硫素合成酶不稳定外, 其它菌株的合成酶均稳定, 所有蛋白均为亲水性蛋白。由理化性质的分析可以得出, 8 种类第四类羊毛硫素合成酶均为亲水蛋白, 不同菌株中合成酶的理化性质存在着一定的差异。信号肽预测结果显示, 这 8 种羊毛硫素合成酶均无信号肽。

2.3 类第四类羊毛硫素合成酶的分子进化分析

为了进一步清楚各个蛋白间的保守性及进化间的关系, 本文利用 BioEdit 软件将这 8 种蛋白中的此类合成酶的氨基酸序列和两个主要结构域的氨基酸序列分别进行了序列比对, 然后利用 MEGA 5.22 软件, 应用邻位连接法进行了进化树的构建, 结果如图 2、3、4 所示。结果显示, LANC-like 结构域和此类合成酶的进化关系基本相同, 其中枯草

芽孢杆菌和肺炎链球菌位于同一结点, 说明二者的遗传距离相同, 同源性最高。二者与大芬戈尔德菌、惰性乳杆菌、德氏乳杆菌、长双歧杆菌、拟无枝酸菌、山丘链霉菌的亲缘关系依次渐远。惰性乳杆菌和德氏乳杆菌同为乳杆菌, 其亲缘关系最近, 大芬戈尔德菌和长双歧杆菌的亲缘关系比较近。此外, 值得注意的是枯草芽孢杆菌与山丘链霉菌的亲缘关系最远。而 STYKc/S_TKc 结构域的进化关系表现出了差异, 以枯草芽孢杆菌和肺炎链球菌为中心, 将 8 种菌株分成了 3 个类群; 山丘链霉菌与其它 7 种菌株的关系依旧是最远的; 此外, 惰性乳杆菌也位于进化树的边缘, 与之亲缘关系较近是大芬戈尔德菌其次才是德氏乳杆菌, 其中长双歧杆菌与之亲缘关系较远。从这 3 种进化关系中可以初步得出 LANC-like 结构域与合成酶的进化关系保持了高度的一致, 由此可以初步判断为合成酶的进化历程主要是由 LANC-like 结构域决定的; 而 STYKc/S_TKc 结构域的进化关系在比较邻近的属间存在着差异, 但在亲缘关系较远的菌种之间基本保持着与 LANC-like 结构域的进化关系一致的趋势。

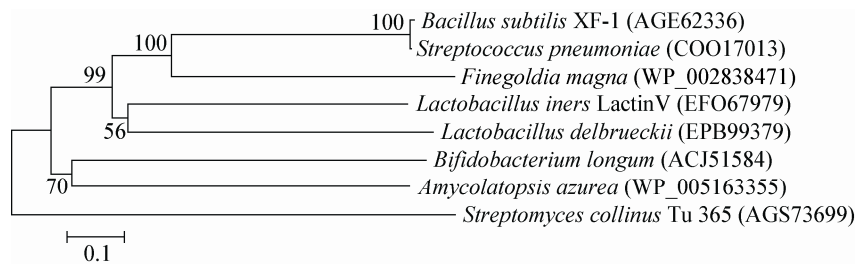


图 2 8 种菌株中(类)羊毛硫素合成酶的进化关系

Figure 2 Phylogenetic analysis of eight predicted lanthipeptide synthetases from some bacteria

注：括号中的序号表示蛋白登录号；分支上的数字表示 Bootstrap 检验值(>70 的 Bootstrap 值较为可信)；标尺表示每单位核苷酸的变化(0.1 代表的是在两个序列中有 10%的变化)。

Note: The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers; The numbers on each branch indicate the bootstrap values (believable if >70); Scale represents the nucleotide changes in per unit (0.1 means 10% changes were observed between two sequences).

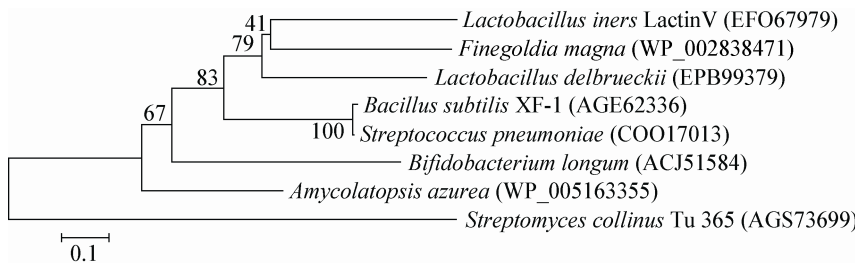


图 3 8 种菌株中 STYKc/S_TKc 结构域的进化关系

Figure 3 Phylogenetic analysis of STYKc/S_TKc domain from some bacteria

注：括号中的序号表示蛋白登录号；分支上的数字表示 Bootstrap 检验值(>70 的 Bootstrap 值较为可信)；标尺表示每单位核苷酸的变化(0.1 代表的是在两个序列中有 10%的变化)。

Note: The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers; The numbers on each branch indicate the bootstrap values (believable if >70); Scale represents the nucleotide changes in per unit (0.1 means 10% changes were observed between two sequences).

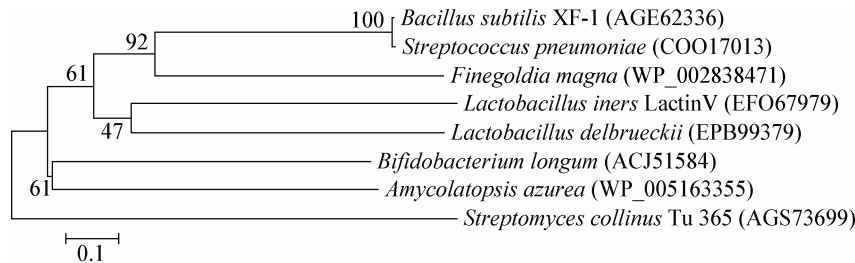


图 4 8 种菌株中 LANC-like 结构域的进化关系

Figure 4 Phylogenetic analysis of LANC-like domain from some bacteria

注：括号中的序号表示蛋白登录号；分支上的数字表示 Bootstrap 检验值(>70 的 Bootstrap 值较为可信)；标尺表示每单位核苷酸的变化(0.1 代表的是在两个序列中有 10%的变化)。

Note: The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers; The numbers on each branch indicate the bootstrap values (believable if >70); Scale represents the nucleotide changes in per unit (0.1 means 10% changes were observed between two sequences).

2.4 激酶磷酸化修饰位点预测

通过在线软件 KinasePhos 对蛋白质的激酶磷酸化修饰位点进行了预测，结果如表 3 所示。结果显示这 8 种蛋白中都含有丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸激酶磷酸化修饰位点，其中 LDLan 还有组氨酸激酶磷酸化修饰位点。这 8 种蛋白中 3 种氨基酸的修饰

位点所占比例各不相同，其中 SCLan、LILan、LDLan、AALan 中丝氨酸和苏氨酸修饰位点所占比例接近 1:1；而其余 4 种氨基酸所占比例接近 2:1。其中丝氨酸所占比例最高的是 BLLan 蛋白、苏氨酸所占比例最高的是 SCLan 蛋白、酪氨酸所占比例最高的是 FMLan 蛋白。有一个 LanM 蛋白质的体外

表 3 激酶磷酸化修饰位点汇总
Table 3 The summary of kinase phosphorylation sites

蛋白名称 Protein	丝氨酸 Serine	苏氨酸 Threonine	酪氨酸 Tyrosine	组氨酸 Histidine
SCLan	51	62	16	0
BSLan	62	36	49	0
LILan	45	48	44	0
SPLan	63	35	49	0
LDLan	38	21	42	1
BLLan	75	41	34	0
AALan	35	32	25	0
FMLan	60	41	58	0

研究表明,丝氨酸和苏氨酸残基分别磷酸化为磷酸丝氨酸(pSer)和磷酸苏氨酸(pThr),接着 β 消除以形成脱氢氨基酸 Dha/Dhb,之后在环化酶的作用下与半胱氨酸残基形成 Lan/MeLan 桥,其中由苏氨酸形成的是 MeLan 桥,由丝氨酸形成的是 Lan 桥^[2-5,22],因此丝氨酸/苏氨酸磷酸激酶修饰位点可能是将底物中的丝氨酸/苏氨酸磷酸化为 pSer/pThr。酪氨酸激酶主要是参与在细胞中将磷酸基团从 ATP 转移到蛋白质的过程,它属于蛋白激酶的一个子类^[23]。由蛋白质的激酶磷酸化修饰位点的预测,可以初步推断出丝氨酸和苏氨酸磷酸化修饰位点所占比例的不同也许会导致中心激酶磷酸化时所消耗底物中丝氨酸/苏氨酸比例的不同,并决定最终合成的蛋白是甲基羊毛硫氨酸还是羊毛硫氨酸;而酪氨酸激酶可能参与其能量消耗的过程,为蛋白的合成提供能量。

2.5 二级结构及结构域预测

常见的蛋白质二级结构有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规卷曲等。本文通过应用在线软件 PSIPRED 和 SOPMA 对蛋白质的二级结构进行了预测,其预测结果中各种二级结构所占比例如表 4 所示。预测结果表明:除德氏乳杆菌的第四类羊毛硫素合成酶的 α 螺旋比例所占比较大,为 50.42%,其他几株菌中 α 螺旋所占比例相差不大;除去山丘链霉菌和德氏乳杆菌中的合成酶中无规卷曲所占比

例相差比较大外,其他菌株中所差不大;各个菌株中 β 转角的比例相差不大; β 折叠所占比例相差比较大,其中德氏乳杆菌的所占比例最小为 13.87%,大芬戈尔德菌的最大为 28%。

为了更准确地确定这 8 种蛋白的功能及其结构,应用在线软件 Smart 对其结构域进行了预测,并使用 DomainDraw 软件按比例绘制了这 8 种蛋白的结构域模式图,其结果如图 5 所示。8 种蛋白中均有 LANC-like 结构域,其中 BLLan 蛋白中 LANC_like 结构域所占氨基酸序列比例较小,其他 7 种蛋白中 LANC_like 结构域所占比例较为相近。此外,LANC-like 结构域位于氨基酸序列的 C-末端,

表 4 部分菌株中类羊毛硫素合成酶二级结构所占百分比
Table 4 The percentage of predicted secondary structure of predicted lanthipeptide synthetases from some bacteria (%)

蛋白名称 Protein	α 螺旋 α -Helix	无规卷曲 Coil	β 转角 β -Turn	β 折叠 β -Strand
SCLan	34.05	40.80	11.06	14.09
BSLan	37.62	31.54	8.88	21.96
LILan	32.02	31.54	10.04	26.40
SPLan	38.20	31.43	8.53	21.85
LDLan	50.42	25.45	10.25	13.87
BLLan	35.59	34.01	10.96	19.44
AALan	39.20	32.11	11.69	17.00
FMLan	32.47	29.18	10.35	28.00



图 5 部分菌株中类羊毛硫素合成酶结构域模式图
Figure 5 The model graph for domains of predicted lanthipeptide synthetases from some bacteria

可能与第四类羊毛硫素的环化阶段密切相关。LILan 拥有 S_TKc 结构域, 代替了其他 7 种蛋白的 STYKc 结构域。S_TKc 和 STYKc 结构域均位于氨基酸序列的中心, 猜测可能与中心激酶的磷酸化作用相关。由结构域可以初步猜测, SCLan、BSLan、SPLan、LDLan、AALan、FMLan 蛋白结构域比较相近, 可能属于同类型蛋白酶; 而 LILan 蛋白可能是与前面 6 种蛋白功能比较相似的蛋白; BLLan 蛋白由于其 C-末端的 LANC_like 结构域所占比例明显较小, 猜测这在很大程度上决定了它与其他蛋白的不同。此外, BSLan、SPLan 的序列长度和结构域位置比较相近, 由此可以初步推断合成酶在这 2 种菌种中是高度保守的, 这与进化关系分析结果相一致。

2.6 蛋白质三级结构预测

为了进一步分析这 8 种蛋白的结构, 本文用 SWISS-MODEL 软件对蛋白质的三级结构进行了预测。目前尚未有对该类合成酶三级结构建立的报道, 因此无法通过生物信息学手段预测该类合成酶完整的三级结构。本文通过将氨基酸序列分成两部分分别预测了其结构, 主要对枯草芽孢杆菌和山丘链霉菌进行了结构预测, 结果如图 6 所示。结果显示, 山丘链霉菌和枯草芽孢杆菌中的羊毛硫素合成酶三级结构保守性比较高, 有相同的 LANC_like 和 STYKc 结构域, 且所处位置相似; 此外其锌离子结合位点均有 3 个; 二级结构组分比较相近。由于 SCLan 蛋白已经确定其属于第四类羊毛硫素合成

酶, 由三级结果预测和基因挖掘工具可以得出 BSLan 蛋白即该株枯草芽孢杆菌中的羊毛硫素合成酶属于第四类羊毛硫素合成酶。

3 讨论

已有研究表明羊毛硫素合成酶因其合成羊毛硫素的机制不同而分为 4 种类型, 目前很多学者研究第四类羊毛硫素合成酶的作用机制, 但对其进行结构分析的报道很少。因此, 本文对这 8 种蛋白的基本信息、理化性质、信号肽、二级结构、结构域等进行了分析。理化性质分析显示山丘链霉菌的 SCLan 分子量最大, 德氏乳杆菌的 LDLan 分子量最小; 其中嗜性乳杆菌类第四类羊毛硫素合成酶属于碱性蛋白, 其它蛋白均为酸性蛋白; 除山丘链霉菌、枯草芽孢杆菌、肺炎双球菌的类第四类羊毛硫素合成酶不稳定外, 其它菌株的合成酶均稳定; 所有蛋白均为亲水性蛋白。信号肽预测结果显示, 这 8 种蛋白均无信号肽。二级结构分析表明, 这 8 种蛋白均含有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规卷曲, 其中 α 螺旋和无规卷曲所占比例较大。进化结果表明枯草芽孢杆菌和肺炎链球菌同源性最高, 其与山丘链霉菌的同源关系比较远。结构域预测结果显示所有的蛋白均有 LANC-like 结构域, 嗜性乳杆菌中具有 S_TKc 结构域, 其它蛋白中均有 STYKc 结构域。

经过分析了解到这 8 种蛋白的分子量、理论等电点、稳定性上有一定的差异, 而其他理化性质相似, 这可能与所处的物种不同和其进化关系有一定的关系。虽然这 8 种蛋白的理化性质有所差异, 但是决定蛋白质功能的主要是功能结构域和三级结构, 因此这种差异并不是影响其蛋白功能的主要因素。已有对第四类羊毛硫素合成酶的研究表明其具有丝氨酸和苏氨酸磷酸激酶结合位点^[22], 这与本文的预测结果相一致。本研究中发现这 8 种蛋白中均有 LANC-like 结构域, 表明其在这 8 种菌株中具有一定的保守性, 其在第四类羊毛硫素合成的过程中发挥着相似的功能。

目前对枯草芽孢杆菌次生代谢产物的研究主要集中在表面活性素、伊枯草菌素、芬枯草菌素等

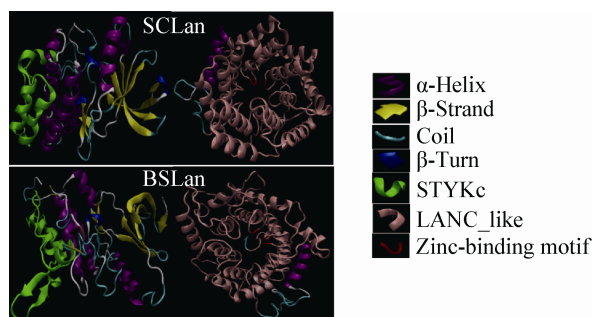


图 6 部分菌株中羊毛硫素合成酶三级结构预测模式图
Figure 6 The model graph on tertiary structure of lanthipeptide synthetases from some bacteria

方面^[24-26],对第四类羊毛硫素的研究较少,尚未有关于第四类羊毛硫素合成酶研究的报道。Iftime等^[2]利用分子生物学手段对山丘链霉菌中 Type IV lanthipeptide synthetase 改造,将第四类羊毛硫素即山丘链霉菌菌素的产量提高了 3.5 至 5.5 倍。本研究为在枯草芽孢杆菌中利用基因工程等改造第四类羊毛硫素合成酶的结构,从而提高第四类羊毛硫素的产量提供了理论基础;对进一步研究第四类羊毛硫素合成酶的作用机制具有重要的指导意义。

抗菌素耐药性问题在很多应用领域凸显,因此,新型抗菌素的挖掘势在必行,通过对已知基因组数据进行挖掘,可以找到一些未引起人们重视的抗菌素合成途径,也有可能通过对这些途径的鉴定发现新型的抗菌素。本文就是基于这一原因,对这 7 种类第四类羊毛硫素合酶和山丘链霉菌中 Type IV lanthipeptide synthetase 进行了结构预测及分析,旨在为研究枯草芽孢杆菌中可能存在的第四类羊毛硫素合成酶奠定基础,为提高枯草芽孢杆菌的生防价值提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845-857
- [2] Iftime D, Jasyk M, Kulik A, et al. Streptocollin, a type IV lanthipeptide produced by *Streptomyces collinus* Tü 365[J]. ChemBioChem, 2015, 16(18): 2615-2623
- [3] 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
- [4] Jungmann NA, van Herwerden EF, Hügelland M, et al. The supersized class III lanthipeptide stackepeptin displays motif multiplication in the core peptide[J]. ACS Chemical Biology, 2016, 11(1): 69-76
- [5] Xie LL, Miller LM, Chatterjee C, et al. Lactacin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity[J]. Science, 2004, 303(5658): 679-681
- [6] Marsh AJ, O'Sullivan O, Ross RP, et al. *In silico* analysis highlights the frequency and diversity of type I lantibiotic gene clusters in genome sequenced bacteria[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 679
- [7] Begley M, Cotter PD, Hill C, et al. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(17): 5451-5460
- [8] Haft DH, Basu MK, Mitchell DA. Expansion of ribosomally produced natural products: a nitrile hydratase- and Nif11-related precursor family[J]. BMC Biology, 2010, 8: 70
- [9] Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2009, 10(1): 2-18
- [10] Guo SY, Li XY, He PF, et al. Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(6): 925-937
- [11] van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, et al. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41: W448-W453
- [12] Roy S, Maheshwari N, Chauhan R, et al. Structure prediction and functional characterization of secondary metabolite proteins of *Ocimum*[J]. Bioinformatics, 2011, 6(8): 315-319
- [13] Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786
- [14] Huang HD, Lee TY, Tzeng SW, et al. KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Suppl 2): W226-W229
- [15] McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server[J]. Bioinformatics, 2000, 16(4): 404-405
- [16] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Computer Applications in the Biosciences: CABIOS, 1995, 11(6): 681-684
- [17] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: D302-D305
- [18] Fink JL, Hamilton N. DomainDraw: a macromolecular feature drawing program[J]. In Silico Biology, 2007, 7(2): 145-150
- [19] Zhao DL, Li JY, Fang SM, et al. The bioinformatics analysis of Prp5 proteins in some model fungi[J]. Microbiology China, 2015, 42(8): 1458-1465 (in Chinese)
赵东磊, 李金玉, 方淑梅, 等. 部分模式真菌中 Prp5 蛋白生物信息学分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(8): 1458-1465
- [20] Bordoli L, Schwede T. Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL Workspace and the Protein Model Portal[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 857: 107-136
- [21] Hsin J, Arkhipov A, Yin Y, et al. Unit 5.7, Chapter 5: Using VMD: An Introductory Tutorial[A]//Baxevanis AD. Current Protocols in Bioinformatics[M]. New York: John Wiley & Sons, 2008
- [22] Goto Y, Ökesli A, van der Donk WA. Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase Family[J]. Biochemistry, 2011, 50(5): 891-898
- [23] Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains[J]. Science, 1988, 241(4861): 42-52
- [24] Zhang YJ, Luo JC, Wu YP, et al. Research advancement of the biological control bacteria *B. subtilis*[J]. Life Science Instruments, 2009, 7(4): 19-23 (in Chinese)
张彦杰, 罗俊彩, 武燕萍, 等. 生防枯草芽孢杆菌研究进展[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4): 19-23
- [25] Li BQ, Lu XY, Guo QG, et al. Isolation and identification of lipopeptides and volatile compounds produced by *Bacillus subtilis* Strain BAB-1[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(17): 3547-3554 (in Chinese)
李宝庆, 鹿秀云, 郭庆港, 等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3547-3554
- [26] Khochamit N, Siripornadulsil S, Sukon P, et al. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain[J]. Microbiological Research, 2015, 170: 36-50