

• 工业生物技术 •

ABC 转运蛋白 SgnA/B 促进纳他霉素胞外转运与高产

宗工理^{1,2}, 陈曦², 张振², 涂煜², 曹广祥², 张佩佩², 付加芳², 张荣珍¹

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 山东第一医科大学 (山东省医学科学院) 生物医学科学学院 (省医药生物技术创新中心), 山东 济南 250062

宗工理, 陈曦, 张振, 涂煜, 曹广祥, 张佩佩, 付加芳, 张荣珍. ABC 转运蛋白 SgnA/B 促进纳他霉素胞外转运与高产. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2534-2548.

ZONG GL, CHEN X, ZHANG Z, TU Y, CAO GX, ZHANG PP, FU JF, ZHANG RZ. ABC transporter SgnA/B promotes extracellular transport and efficient production of natamycin. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2534-2548.

摘 要: 纳他霉素是一种天然、广谱、高效的多烯大环内酯类还原性抗真菌剂, 广泛应用于食品真菌污染的防治和临床真菌感染的治疗。纳他霉素胞外转运效率可能是限制褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*) 发酵高产纳他霉素的重要因素。通过生物信息学及分子对接技术分析纳他霉素胞外转运蛋白 SgnA/B, 发现 SgnA 和 SgnB 两个异源二聚体组成的 ABC 转运蛋白是内向开口构象的转运蛋白, 且 2 个结合位点与纳他霉素结合能力有强弱差异, 更有利于纳他霉素的胞外转运。本研究以纳他霉素生产菌株——褐黄孢链霉菌 F607 为出发菌株, 构建了 *sgnA/B* 基因超表达菌株 F-EX, 以分析 *sgnA/B* 基因超表达对纳他霉素合成及胞外转运的影响。研究发现, 纳他霉素对数合成期的 F-EX 菌株不仅提高了纳他霉素胞外/胞内比, 其 120 h 发酵总产量也提高了 12.5%, 达到 7.38 g/L。最后, 通过转录组测序发现, *sgnA/B* 基因超表达除提高纳他霉素胞外转运效率外, 还影响了与多种氨基酸、丙酸盐、糖、五碳化合物代谢和 TCA 循环相关基因的表达。研究表明, 强化纳他霉素胞外转运有利于纳他霉素的合成, 是提高褐黄孢链霉菌纳他霉素产量的有效策略, 并为纳他霉素工业生产提供了一株具有良好应用前景的菌株。

关键词: 褐黄孢链霉菌; 纳他霉素高产; ABC 转运蛋白; 内向开口构象; 胞外转运

Received: January 21, 2022; Accepted: April 6, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Shandong Province, China (ZR2020MC011, ZR2021QC109); Academic Promotion Program of Shandong First Medical University (LJ001)

Corresponding author: ZHANG Rongzhen. E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2020MC011, ZR2021QC109); 山东第一医科大学学术提升计划 (LJ001)

ABC transporter SgnA/B promotes extracellular transport and efficient production of natamycin

ZONG Gongli^{1,2}, CHEN Xi², ZHANG Zhen², TU Yu², CAO Guangxiang², ZHANG Peipei², FU Jiafang², ZHANG Rongzhen¹

¹ School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² Biomedical Sciences College & Shandong Medicinal Biotechnology Centre, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, Shandong, China

Abstract: Natamycin is a natural, broad spectrum and highly efficient antifungal compound that belongs to polyene macrolide antibiotics. It has been used in prevention of food fungal contamination and treatment of clinical fungal infection. The extracellular transport efficiency of natamycin may be an important factor hampering the yield of natamycin produced by *Streptomyces gilvosporeus*. The extracellular transporter SgnA/B of natamycin was analyzed by bioinformatics tools and molecular docking techniques. This ATP-binding cassette transporter, consisted of SgnA and SgnB, is a heterodimers with inward-facing conformation. The difference between the natamycin combining efficiency of the two drug-binding cavities in SgnA/B is favorable for natamycin extracellular transport. *sgnA/B* gene was overexpressed in *S. gilvosporeus* F607 and the effects of *sgnA/B* gene overexpression on natamycin synthesis and extracellular transport were analyzed. In F-EX strain, the extracellular/intracellular ratio of natamycin in logarithmic synthesis stage was increased, and the total fermentation yield at 120 h was increased by 12.5% and reached to 7.38 g/L. Moreover, transcriptome sequencing analysis showed that *sgnA/B* gene overexpression affected the expression of genes involved in the metabolism of various amino acids, propionate, glucose, C5-branched dibasic acid and TCA cycle. This research demonstrated that the enhanced extracellular transport increased the synthesis of natamycin by *S. gilvosporeus*, and *S. gilvosporeus* F-EX showed good potential for the industrial production of natamycin.

Keywords: *Streptomyces gilvosporeus*; high production of natamycin; ATP-binding cassette transporter; inward-facing conformation; extracellular transport

临床真菌感染和食品真菌污染是威胁人类健康的两大重要因素。对哺乳动物细胞无显著毒副作用的纳他霉素 (natamycin) (又称匹马霉素, pimaricin) 是一种天然、广谱、高效的多烯大环内酯类抗真菌剂, 其分子式为 $C_{33}H_{47}NO_{13}$, 在临床真菌感染及肿瘤治疗和食品真菌污染防治中具有重要价值^[1-3]。纳他霉素可由多种链霉菌合成, 其生物合成基因簇在核酸序列及蛋白水平上具有高度一致性^[1,4], 褐黄孢链霉菌

(*Streptomyces gilvosporeus*)^[5]、纳塔尔链霉菌 (*Streptomyces natalensis*)^[6]、恰塔努加链霉菌 (*Streptomyces chattanoogensis*)^[7]和利迪链霉菌 (*Streptomyces lydicus*)^[8]均可以合成纳他霉素, 合成基因分别标注为 *sgn*、*pim*、*scn* 和 *scl*。褐黄孢链霉菌(*Streptomyces gilvosporeus*) F607 是本实验室通过菌种选育获得的纳他霉素高产菌株^[9]。

S. gilvosporeus 纳他霉素的生物合成由 I 型

聚酮合酶 (SgnS0-S4) 催化乙酸和丙酸形成其骨架结构, SgnD 与 SgnG 负责编码的 P450 单氧化酶完成内酯环修饰。SgnJ 与 SgnC 则与侧链糖基的形成有关^[4]。纳他霉素的生物合成受到多个调控因子的复杂调控。途径特异性调控因子 PimM^[10]、PimR^[11-12]及其同源基因^[7]可专一性调控纳他霉素的生物合成。AdpA^[13]、双组分系统 (two component system, TCS)^[14]和 WhiG^[15]等多个全局调控因子和群体感应诱导物 PI 因子也参与调控纳他霉素的合成。此外, 研究表明, 胞内一定浓度的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 对抗生素生物合成具有重要作用^[16-17]。发酵过程中维持一定浓度的 H₂O₂, 可提高纳他霉素的合成速度, 该调控可能与途径特异性调控蛋白 PimM 的 PAS 结构域响应有关^[18-19]。同时, 由于纳他霉素是一类具有还原性的多烯大环内酯类抗生素, 其胞内积累将影响 ROS 水平, 进而不利于维持其高水平的生物合成。

抗生素胞外转运对抑制抗生素细胞累积、缓解产生产物抑制效应和直接前体产生累积具有重要意义^[20-21]。杰多霉素生物合成簇内易化扩散家族蛋白 JadL 缺失株的胞外杰多霉素 B 产量降低, 过表达株产量则高于野生型 37.87%, 表明通过加强外排可提高胞外杰多霉素 B 的产量^[22]。多烯类抗生素 ATP 结合盒转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter, ABC 转运蛋白) 促进抗生素的胞外转运, 如: 四烯类抗生素制霉菌素基因簇中编码 ABC 转运蛋白的基因 *nysG* 和 *nysH* 突变后, 制霉菌素合成水平较野生菌株下调 35%, 且制霉菌素前体 10-脱氧制霉菌素累积^[20]。

纳他霉素合成基因簇中 *sgnA* 和 *sgnB* 编码的 ABC 转运蛋白 SgnA 和 SgnB 的生物学功能被预测为参与抗生素及其合成前体从胞内向胞

外转运的过程^[1,23], 但目前对于该 ABC 转运蛋白转运纳他霉素的研究较少, 且尚未有基于改变转运效率以提高纳他霉素产量的研究。本研究在实验室前期选育获得的纳他霉素高产菌株 *S. gilvosporeus* F607 基础上, 构建融合 *ermE* 高效启动子的 *sgnA* 和 *sgnB* 双拷贝菌株, 并分析对纳他霉素产量的影响, 通过提高转运效率以增加抗生素的产量, 这在工业生产上具有很高的应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

褐黄孢链霉菌 F607、pMS82 质粒为本实验室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞、pMD-18T 载体, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 链霉菌强启动子 *ermE* 片段由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶 (*Kpn* I、*Hind* III) 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 核酸连接酶 (T4 DNA ligase)、琼脂糖凝胶回收试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒等均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 质粒小提试剂盒购自 TIANGEN 公司。

Pfu DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 购自北京全式金生物科技有限公司; DNA 分子量标准购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物合成及测序, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖购自 Oxoid 公司; 其他国产分析纯普通试剂。

1.3 培养基

LB 液体培养基 (g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。LB 固体培养基: LB 液体培养基中加琼脂粉 15.0 g。MS 产孢固体培养基 (g/L): 黄豆粉 20.0, 甘露醇 20.0, CaCO₃

3.0, 琼脂粉 15.0。NTZ 种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母提取物 3.0, 大豆蛋白胨 5.0, 麦芽浸粉 3.0。NTF 发酵培养基 (g/L): 大豆蛋白胨 20.0, 酵母提取物 4.5, 氯化钠 2.0, 结晶硫酸镁 1.0, 葡萄糖 60.0。

1.4 SgnA/B 转运纳他霉素方式的分析

依据前期 F607 基因组测序 (GenBank 登录号: NZ_CP020569.1) 结果, 从 NCBI 蛋白数据库中查找 SgnA 和 SgnB 的氨基酸序列 (GenBank 登录号: WP_016579058.1 和 WP_014143936.1)。BLAST 分析 SgnA 与 SgnB 蛋白序列同源性。利用 TMHMM-2.0 分析其跨膜结构域。利用 SWISS-MODEL 同源建模构建 SgnA 和 SgnB 三维结构模型。利用 Discovery Studio 分子对接该 ABC 转运蛋白与纳他霉素, 分析其结合转运方式及底物结合氨基酸残基。

1.5 SgnA/B 超表达菌株的构建

1.5.1 SgnA/B 接合转移质粒的构建

以 F607 基因组为模板, 设计带有 *Kpn* I、*Hind* III 酶切位点和 6×His 标签序列的特异性引物 EX-F 和 EX-R (表 1), 高保真 DNA 聚合酶扩增 *sgnA/B* 基因序列, 琼脂糖电泳并回收后, T-A 克隆至 pMD-18T 载体, 测序。测序正确的质粒经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切后, 与预先双酶切的

pMS82 连接, 得到重组基因载体 pMS82-EX, 经酶切、测序验证正确的 pMS82-EX 质粒转化于 *E. coli* ET12567 (pUZ8002)。

1.5.2 重组质粒接合转移 F607 以及重组子的筛选

避光条件下, 用含有潮霉素 (Hyg, 50 μg/mL)、氨苄青霉素 (Amp, 100 μg/mL)、氯霉素 (Cm, 25 μg/mL) 的 LB 培养基培养 *E. coli* ET12567 (pUZ8002, pMS82-EX) 至 OD_{600} 为 0.4–0.6, 等体积 LB 培养基洗涤 2 次, 重悬于 0.1 倍体积的 LB 培养基中。MS 平板培养 *S. gilvosporeus* F607 3–4 d, 刮取孢子接种于种子活化培养基培养约 48 h, 等体积 2×YT 培养基洗涤 2 次, 重悬于 0.1 倍体积的 2×YT 培养基中。200 μL 大肠杆菌与 200 μL 菌丝体混匀, 涂布于添加 10 mmol/L MgCl₂ 的 MS 固体平板上, 30 °C 培养 16–20 h, 1 mL 无菌水 (含 0.5 mg 萘啶酮酸 (NDA) 和 1 mg Hyg) 涂布平板, 继续 30 °C 培养, 接合子在含有 25 mg 的 NDA 和 30 mg 的 Hyg 的培养基中进行筛选。对筛选出的接合子进行至少 3 轮的纯化后, 活化孢子, 提取细菌基因组, PCR 验证引物 V1-F 和 V1-R 扩增 *hgy* 基因, V2-F 和 V2-R 扩增 *ermE* 和 *sgnA* 融合片段进行验证, 验证引物见表 1。阳性接合子命名为 *S. gilvosporeus* F-EX。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
EX-F	AAGCTTGGATCCGATGCTGTTGTGGGCACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCAAGCGGAAGAA GGGAGCGGACATCATCATCACCATCACCATGTGCTGCTCAGCCTTCTGCGAATC
EX-R	ATGGGTACCCATCATCACCATCACCATTTCAGGAAAGACTGGGGGAAATGCC
V1-F	ATCCCTGTTACTTCTCGACCGTATTG
V1-R	GGATCGGTGAAGCCGGAGAG
V2-F	CCGATGCTGTTGTGGGCAC
V2-R	GGACCAGCAGCAGGAGGG
SgnA/B-RT-F	CGACAGCGGCTATATCACCC
SgnA/B-RT-R	CACATCGTTGACGGTCCGC
16S-RT-F	CCGCCTCGTTGCCCTCG
16S-RT-R	CAGGGACGCCCATCGGTG

1.6 SgnA/B 表达情况

S. gilvosporeus F607 和 *S. gilvosporeus* F-EX 菌株摇瓶发酵培养, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 分析 *sgnA/B* 基因在两者中的转录水平^[24], 分别在发酵不同时期 (24、48、72、96、120 h) 10 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 然后进行 RT-qPCR 分析。用不加模板的样品作为阴性对照, 并用看家基因 16S rRNA 作为内标校正因样品初始浓度不同而造成的差异。*sgnA/B* 基因引物 SgnA/B-RT-F、SgnA/B-RT-R 和 16S rRNA 基因引物 16S-RT-F 和 16S-RT-R 见表 1。Western blotting 检测: 发酵 72 h 后, 分别取 10 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 20 min, 上清 TCA 浓缩 100 倍, 蛋白电泳, 转 PVDF, 封闭液中封闭 60 min, 将一抗 (CW0286, CWBIO, China) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (CW0102, CWBIO, China) 37 °C 孵育 60 min, PBS 溶液室温脱色床上洗膜 3 次, 显色液显色分析。

1.7 纳他霉素的发酵与含量测定

1.7.1 纳他霉素的液体摇瓶发酵

取-80 °C 保存的 *S. gilvosporeus* F607 和 *S. gilvosporeus* F-EX 孢子, 4 °C 解冻后, 在超净台中分别取出 1 mL 涂布于 MS 固体平板 (工程菌株需加入终浓度 25 µg/mL 的 Hyg), 29 °C 培养 3-4 d, 待长满白色孢子后, 刮取孢子于种子活化培养基中进行活化。29 °C、220 r/min 培养约 48 h, 以 5% 转接量转接该培养产物于新鲜种子培养基中, 进行种子的二级活化, 29 °C、220 r/min 培养约 24 h, 以 5% 的比例接种于 250 mL 装液量为 30 mL 的三角锥形瓶中, 并加入终浓度为 6% 的葡萄糖, 29 °C、220 r/min 发酵培养 120 h。发酵初始 pH 值为 7.5。每隔 24 h 测定纳他霉素胞外与胞内产量。

1.7.2 纳他霉素含量的 HPLC 测定

取 1 mL 发酵液, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液加入 9 mL 无水甲醇, 得到外排到胞外的纳他霉素含量; 沉淀用 9 mL 无水甲醇重悬后, 超声萃取 20 min, 萃取液 10 000 r/min 离心 10 min, 得到胞内纳他霉素含量。0.22 µm 微孔滤膜过滤上述萃取液, 用于 HPLC 测定纳他霉素含量, 以 1.0 g/L 的纳他霉素标准品作为对照。HPLC 检测条件: 色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C18 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 µm); 流动相: V (0.3% NH₄Cl, 0.02% NH₄Ac): V (乙腈): V (四氢呋喃)=75: 20: 5; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 µL; 检测波长: 303 nm。

1.7.3 胞内 ROS 含量测定

纳他霉素发酵过程中, 每 24 h 收集菌体, 弃上清。采用过氧化氢检测试剂盒 (碧云天, S0038) 检测胞内 ROS 含量: 按照每 100 万细胞加入 100-200 µL 过氧化氢检测裂解液的比例加入裂解液, 随后充分破碎并裂解细胞。4 °C 约 12 000 r/min 离心 3-5 min, 取上清。加入反应试剂, 测定 560 nm 处的吸光度, 等量双蒸水作为空白对照。

1.7.4 转录组测序

纳他霉素发酵 24、60、120 h 时, 取 2 mL 发酵液加入 EP 管, 10 000 r/min 离心, 弃上清液, 沉淀置于液氮进行速冻, 然后置于-80 °C 冰箱保存, 送上海阿趣生物科技有限公司测序, 进行表达差异分析、富集分析和聚类分析, 筛选差异表达基因条件为: 表达差异倍数|log₂ fold change|>1, 显著性 *P*-value<0.05。

2 结果与分析

2.1 SgnA/B 为内向开口的异源双亚基 ABC 转运蛋白

ABC 转运蛋白具有 2 个核苷酸结合区域

(nucleotide binding domain, NBD) 和 2 个跨膜结合区域 (transmembrane binding domain, TMD)^[25-27]。SgnA/B 作为 ABC 转运蛋白, 其生物学功能被预测与纳他霉素的向胞外运输有关^[23]。SgnA/B 的序列分析发现, SgnA 与 SgnB 的一级结构分别有 577 个和 651 个氨基酸, 二者氨基酸序列同源性为 31.57%, 但 SgnA 与 SgnB 的二级结构十分相近, 其中 Walker-A、Q-loop、ABC signature、Walker-B、Switch 和 D-loop 等 ABC 转运蛋白保守的模体 (motif) 高度保守, 其中 SgnA 的 Walker-A 结构域氨基酸序列为“GSTGAGKS”, SgnB 为“GPTGAGKT”, 较好地保留了 Walker-A 结构“GxTGxGKx”的保守序列。SgnB 中模体开关 (switch) 氨基酸残基分别为 Gln528 和 His591, 为高度保守氨基酸残基 (图 1A)。因此, SgnA/B 是由 2 种不同亚基组成的 ABC 转运蛋白。进一步分析跨膜结构域发现, SgnA 和 SgnB 各有 6 个 α 螺旋形成 ABC 转运蛋白 12 个跨膜结构域的典型结构 (图 1B)。

利用 SWISS-MODEL 的 Multiple target project (<https://swissmodel.expasy.org/>), 对 SgnA/B 进行同源建模, 其三维结构模型与已知的海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 中 TM287/288 (PDB: 3QF4) ABC 转运蛋白同源性为 40.33%, 并依据此进行同源建模。SgnA/B 结构模型表明, SgnA/B 为内向开口构象 (inward-facing conformation) 的 ABC 转运蛋白, 该构象的蛋白形成“内宽外窄”的运输通道 (图 2A)。SgnA/B 转运蛋白有 4 个结构域, 2 个跨膜结构域 TMD1、TMD2 和 2 个核苷酸结合结构域 NBD1、NBD2。2 个 TMD 分别由 6 个螺旋组成, NBD 结构则全部位于细胞内 (图 2A)。Switch Gln528 和 His591 则位于该通道的中心位置, 与 Walker-A、Walker-B 形成底物转运的控制系统 (图 2B)。TM287/288

被报道通过与 ATP 和转运底物的结合后, TMD 的螺旋重排形成外向开口构象 (outward-facing conformation), 然后释放转运底物, ATP 水解后, TM287/288 重新恢复其内向开口构象^[26]。

2.2 SgnA/B 的纳他霉素胞外转运方式

为探究 SgnA/B 转运纳他霉素的机制, 采用分子对接的方法, 分析了 SgnA/B 与纳他霉素结合的特性。结果表明, 异源二聚体 SgnA/B 形成的转运通道具有 2 个纳他霉素结合部位 (drug-binding cavity) DBC1 和 DBC2, 分别位于 NBD 和 TMD 结构域 (图 3A)。外向 ABC 转运蛋白结合 ATP 后, NBDs 二聚体形成紧密的三明治结构, NBDs 关闭, 使得 TMDs 重排, 进而蛋白由内向开放转变成外向开放的构象 (ATP 开关模型)^[27]。

进一步分析 SgnA/B 与纳他霉素转运结合部位发现, 纳他霉素与 DBC1 之间形成常规氢键、unfavorable bump 和 alkyl 相互作用, 其结合氨基酸为 SgnB 的 Gln347、Ser206、Asn86、Gln350、Leu93、Leu343、Pro90 和 Glu354。DBC2 与纳他霉素之间, 则还有范德华力、 π -alkyl 等其他相互作用, 如: 与 SgnA 链的 Ser500、Asp503、Thr504 及 SgnB 链的 Thr433 形成 unfavorable bump 相互作用, 与 SgnA 链的 Phe499、Asp507、Leu502 形成常规氢键, 与 SgnB 链的 Leu629 形成 π -alkyl 相互作用, 并与 Thr504 存在 alkyl 相互作用 (图 3B 和 3C)。这些作用力使 DBC2 与纳他霉素结合能降低, 亲和力增加, 因此 SgnA/B 呈现胞内底物亲和能力强, 而跨膜区域亲和能力弱, 因此有利于该外向转运蛋白向胞外转运纳他霉素, 解除胞内因纳他霉素积累抵御 ROS 积累所引发的产物抑制效应, 其转运模式见图 3D。

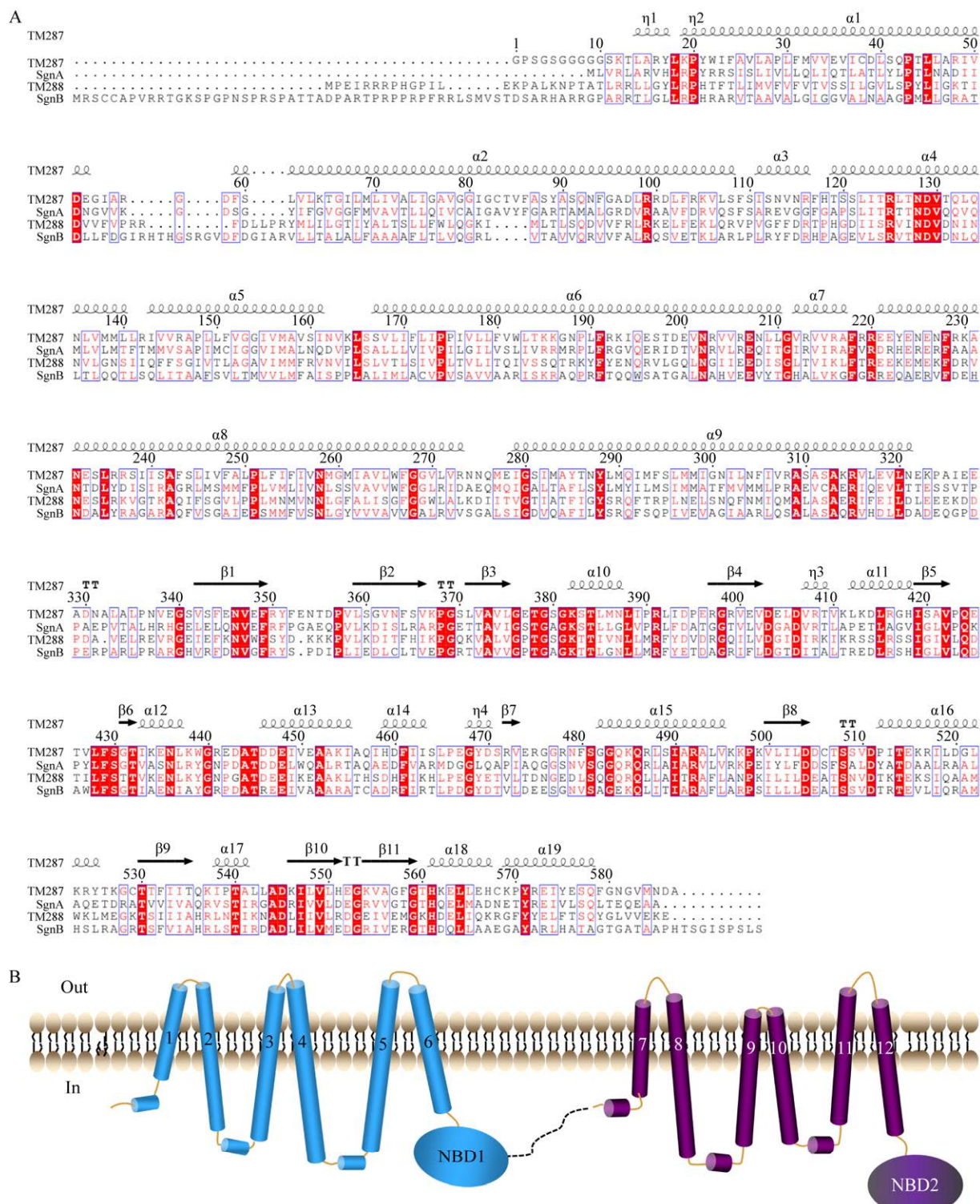


图 1 SgnA/B 氨基酸序列及跨膜结构分析

Figure 1 Sequence alignment and transmembrane structure of SgnA/B. (A) Sequence alignment of SgnA/B with TM287/288. (B) Topology diagram of SgnA/B. Diagram residues not resolved in the structure are shown as dashed lines. Out: outer cell membrane; In: inner cell membrane.

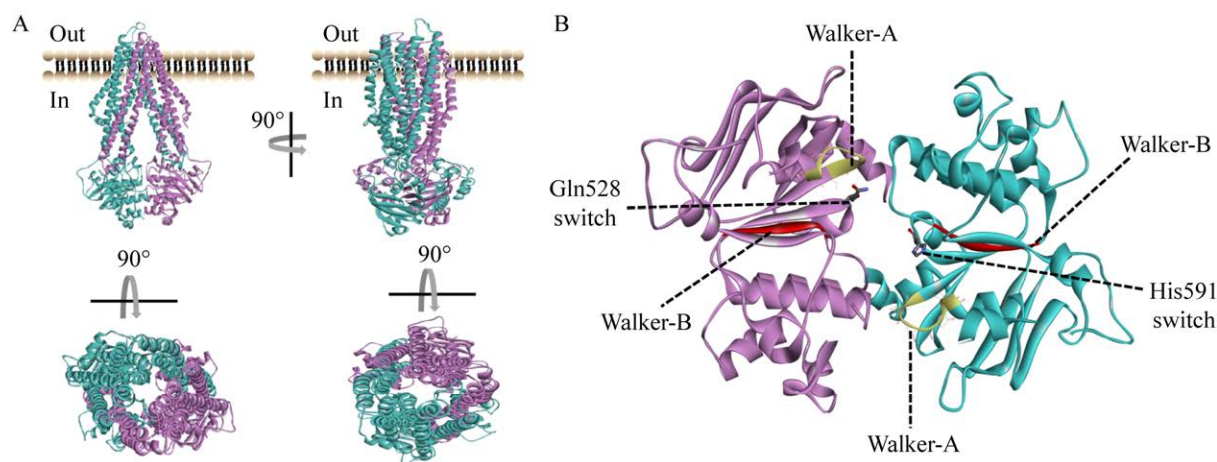


图 2 SgnA/B 三维结构模型

Figure 2 Three dimensional structural model of SgnA/B. (A) The overall structure of the SgnA/B. The N-terminal half (TMD1 and NBD1) is colored in lilac and the C-terminal half (TMD2 and NBD2) in blue. (B) Structure details of NBD1 and NBD2.

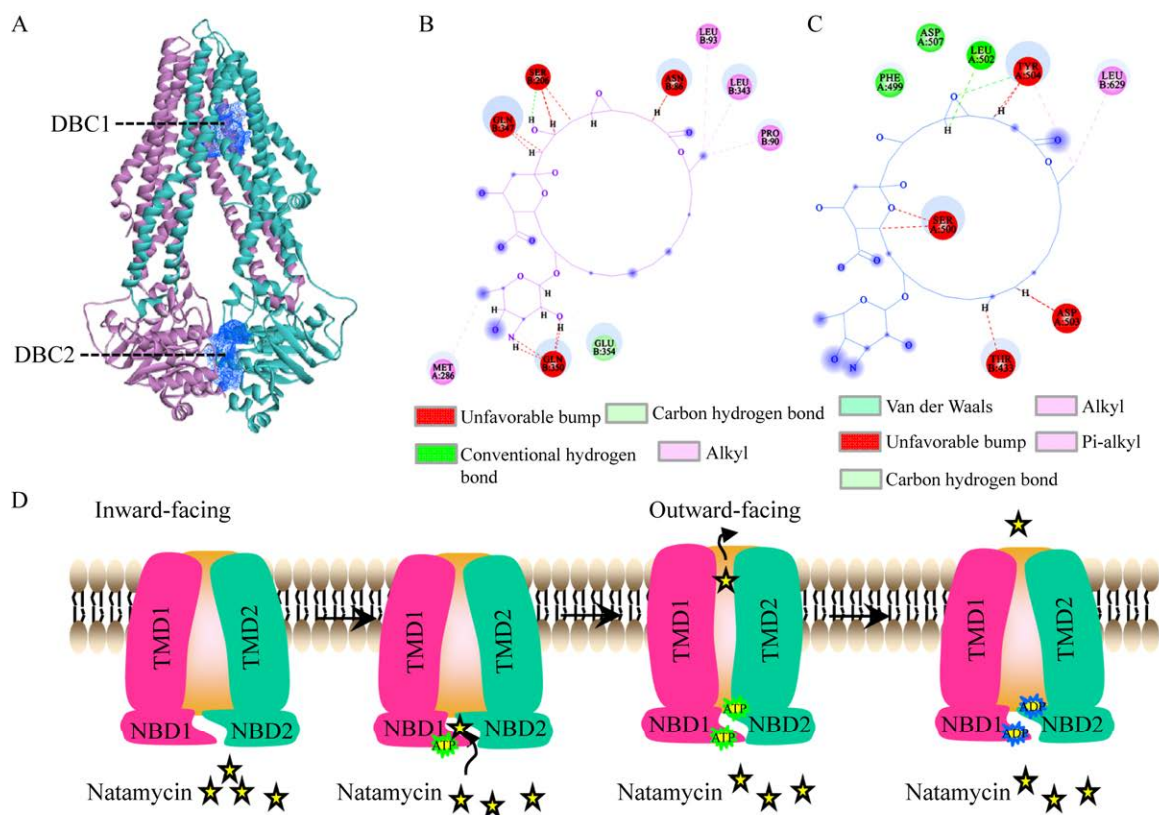


图 3 SgnA/B 转运纳他霉素方式

Figure 3 Natamycin transport mode mediated by SgnA/B. (A) Drug-binding cavity of SgnA/B. The inward-facing cavities are shown as a blue mesh. (B-C) Interacting amino acid residues of DBC1 and DBC2 with natamycin. (D) Proposed mechanism of transport in heterodimeric ABC transporters. SgnA and SgnB are colored in carmine and cyan, respectively. Yellow, green and blue stars are natamycin, ATP and ADP.

2.3 *sgnA/B* 超表达菌株构建

为解除纳他霉素胞内累积产生的产物抑制效应,构建了纳他霉素胞外转运蛋白 *sgnA/B* 超表达菌株。先基于 pMS82 质粒,构建带有 *ermE* 启动子片段的 *sgnA/B* 重组载体 pMS-EX,酶切验证与目的片段理论大小一致,均是 3 699 bp (图 4A)。pMS-EX 经 *E. coli* ET12567 接合转移至 *S. gilvosporeus* F607,潮霉素抗性筛选疑似阳性转化子,PCR 扩增 *sgnA* 部分片段和潮霉素基因片段,扩增片段大小与理论大小一致,分别为 809 bp 和 930 bp,获得阳性转化子,即 *S. gilvosporeus* F-EX (图 4B 和 4C)。

2.4 *sgnA/B* 超表达促进了纳他霉素的外排并提高纳他霉素的产量

为分析 *sgnA/B* 基因超表达对纳他霉素生物合成的影响,RT-qPCR 分析了 *S. gilvosporeus* F-EX 中 *sgnA/B* 基因转录水平的变化,*S. gilvosporeus*-pMS82 为阴性对照。结果显示, *S. gilvosporeus* F-EX 菌株中 *sgnA* 与 *sgnB* 基因水平在 48–120 h 均增加 (图 5A 和 5B),表明在 *S. gilvosporeus* F-EX 菌株中 *sgnA/B* 基因超表达成功。二者增加水平基本一致,与其基因共转录的特点一致。

此外,在 24 h 时 *sgnA/B* 基因转录水平有轻微升高,可能与重组 *sgnA/B* 基因在基因组上,受途径特异性调控基因调控效率下降有关。

超表达重组载体在 *sgnA/B* 基因两端加入了 His 标签序列,以区别于菌株自身 *sgnA/B* 的表达。*sgnA/B* 基因分别编码 577 和 651 个氨基酸。Western blotting 在泳道 2 中检测到 SgnA 和 SgnB 的条带,与理论的分子量一致,而对照泳道中没有检测到蛋白的表达 (图 5C)。证实 F607-EX 中额外拷贝 *sgnA/B* 基因的表达。

为分析 *sgnA/B* 基因的超表达对纳他霉素产量的影响,菌株 *S. gilvosporeus* F607、*S. gilvosporeus*-pMS82 和 *S. gilvosporeus* F-EX 在摇瓶中发酵培养 120 h,分别测定了胞内与胞外纳他霉素的含量。其中, *S. gilvosporeus* F-EX 纳他霉素 120 h 总产量达到 7.38 g/L,较 F607 的 6.56 g/L 提高了 12.5%;负载空质粒菌株 *S. gilvosporeus*-pMS82 的纳他霉素产量与原始菌株 F607 无差异 (图 5D)。分析 *sgnA/B* 超表达菌株纳他霉素的胞外/胞内比发现,在纳他霉素对数合成期, *S. gilvosporeus* F-EX 的胞外/胞内比,明显高于 F607 菌株 (图 5E)。以上结果证实,ABC 转运蛋白 SgnA/B 具有纳

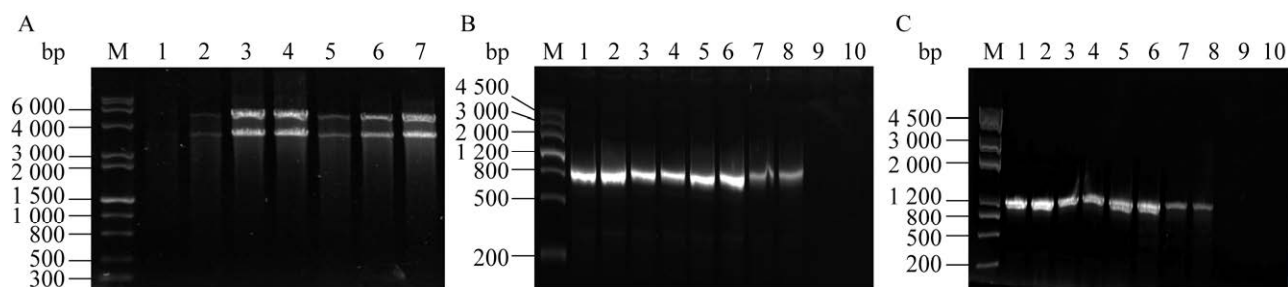


图 4 *sgnA/B* 超表达菌株构建

Figure 4 Construction of *sgnA/B* overexpression strain. (A) pMS-EX verification by digestion. Lane M: DNA marker; lane 1: blank control; lane 2–7: *S. gilvosporeus* F-EX positive transformants 1–6. (B) Verification of *sgnA* fragment in *sgnA/B* overexpression positive conjugations by PCR. Lane M: DNA marker; lane 1–8: positive conjugations 1–8; lane 9: F607; lane 10: blank control. (C) Verification of *hgy* fragment in *sgnA/B* overexpression positive conjugations by PCR. Lane M: DNA marker; lane 1–8: positive conjugations 1–8; lane 9: F607; lane 10: blank control.

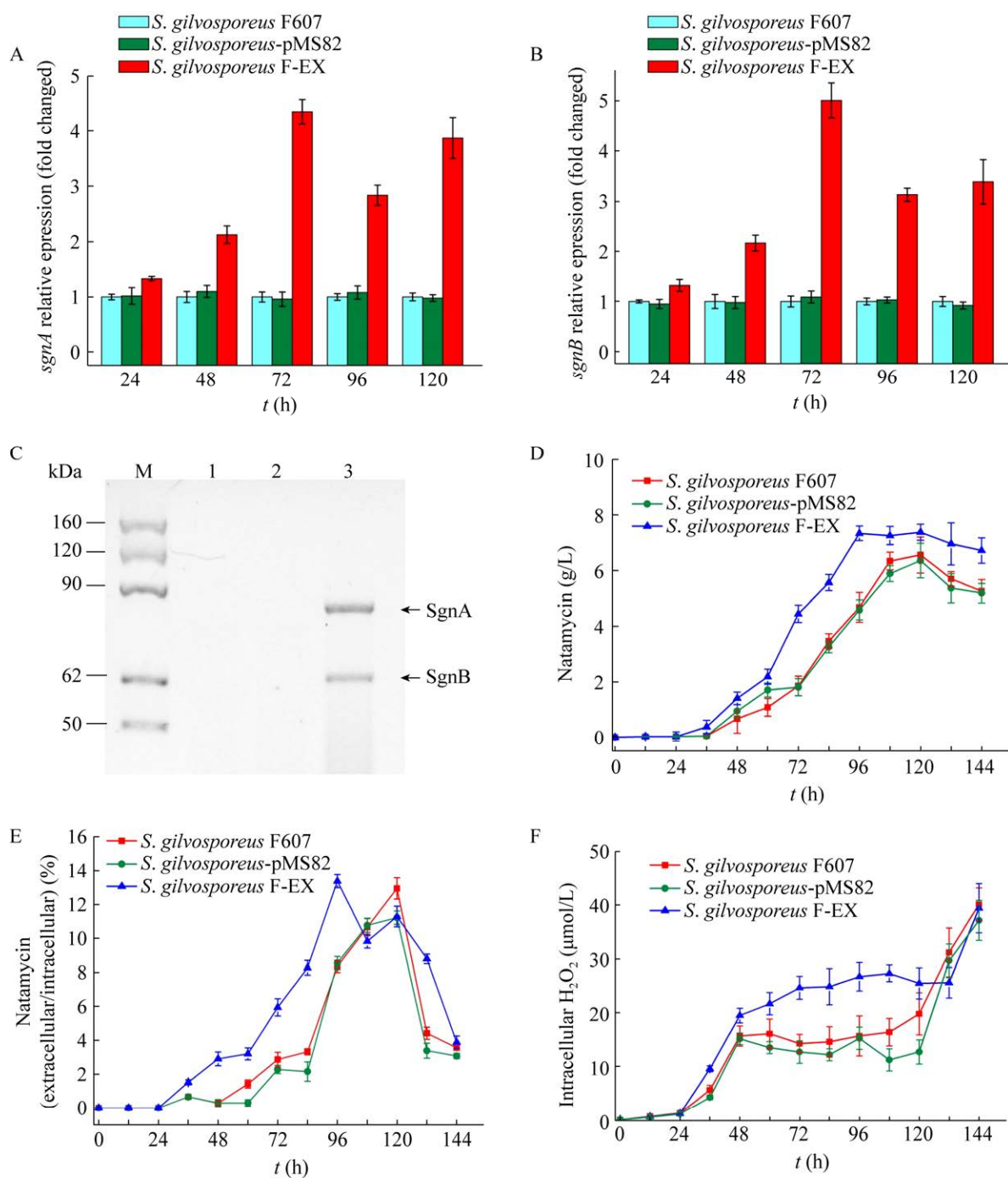


图 5 *sgnA/B* 超表达影响纳他霉素的生物合成和胞外转运

Figure 5 *sgnA/B* overexpression affects natamycin biosynthesis and extracellular transport. (A–B) Expression levels of *sgnA* and *sgnB* gene in different strains. (C) Western blotting of SgnA/B. Lane M: Western marker; 1–3: *S. gilvosporeus* strains F607, pMS82 and F-EX. (D) Total natamycin production of *S. gilvosporeus* strains F607, pMS82 and F-EX. (E) Ratio of extracellular natamycin and intracellular natamycin. (F) Intracellular H_2O_2 of *S. gilvosporeus* strains F607, pMS82 and F-EX.

他霉素向胞外转运功能, *sgnA/B* 的超表达不仅促进了纳他霉素向胞外转运, 而且提高了纳他霉素的总产量。

由于胞内 ROS 浓度对纳他霉素合成的促进作用, 我们分析了在 *sgnA/B* 超表达并促进纳他霉素胞外转运情况下, 胞内 ROS 浓度的变化。结果显示, F-EX 菌株胞内 ROS 浓度在前 48 h 内与 F607 菌株相比, 并无明显差异; 在纳他霉素合成的对数期 (48–72 h) 内, F-EX 菌株则明显高于 F607 对照菌株; 而纳他霉素合成的降速期, 2 个菌株都出现 ROS 的大幅上升, 无明显差异 (图 5F)。该结果表明, 纳他霉素快速合成期的高效外排有利于 *S. gilvosporeus* 维持胞内的 ROS 水平, 促进纳他霉素高效合成的持续进行。

2.5 *sgnA/B* 超表达影响 *S. gilvosporeus* 的初级代谢和次级代谢

进一步分析 *S. gilvosporeus* F607 和 *S. gilvosporeus* F-EX 的纳他霉素生物合成的转录组差异, 对

纳他霉素不同合成时期基因表达进行差异分析。结果发现, 在纳他霉素快速合成期 (60 h), *S. gilvosporeus* F-EX 中有 66.15% 的基因差异表达, 分别有 2 816 个基因表达量上调, 1 941 个基因下调, 2 420 个基因表达量无显著变化。在纳他霉素合成后期和前期, 无显著变化基因则为 5 754 个和 6 832 个, 表明 *sgnA/B* 超表达的影响在纳他霉素对数合成期更为显著 (图 6)。在纳他霉素快速合成期, *S. gilvosporeus* F-EX 与 F607 菌株出现纳他霉素合成速度的显著差异, 因此, 对该时期的基因表达进行了聚类分析, GO 聚类分析发现, 细胞学组件 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 和生物学途径 (biological process) 三大类中, 细胞学组件类别变化较显著的是核糖体功能和细胞器形成相关基因; 分子功能类别变化较显著的是离子跨膜运输和 rRNA 结合相关功能基因; 生物学途径类别则集中于氮代谢和核苷酸代谢 (图 7)。KEGG 聚类分析发现, 核糖体功能相关

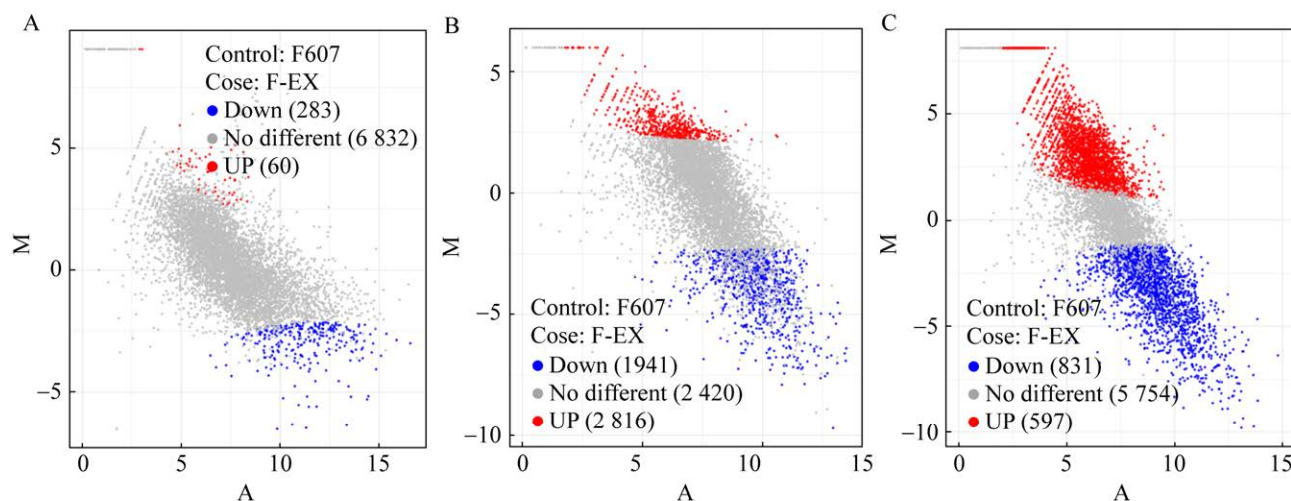


图 6 *S. gilvosporeus* F-EX 的差异表达基因

Figure 6 Differentially expressed genes of *S. gilvosporeus* strain F-EX compared with strain F607. (A–C) Differentially expressed genes at 24 h, 60 h and 120 h. The blue dots represent the down-regulated genes, red dots represent the up-regulated genes, gray dots indicate genes that are not significantly differentially expressed.

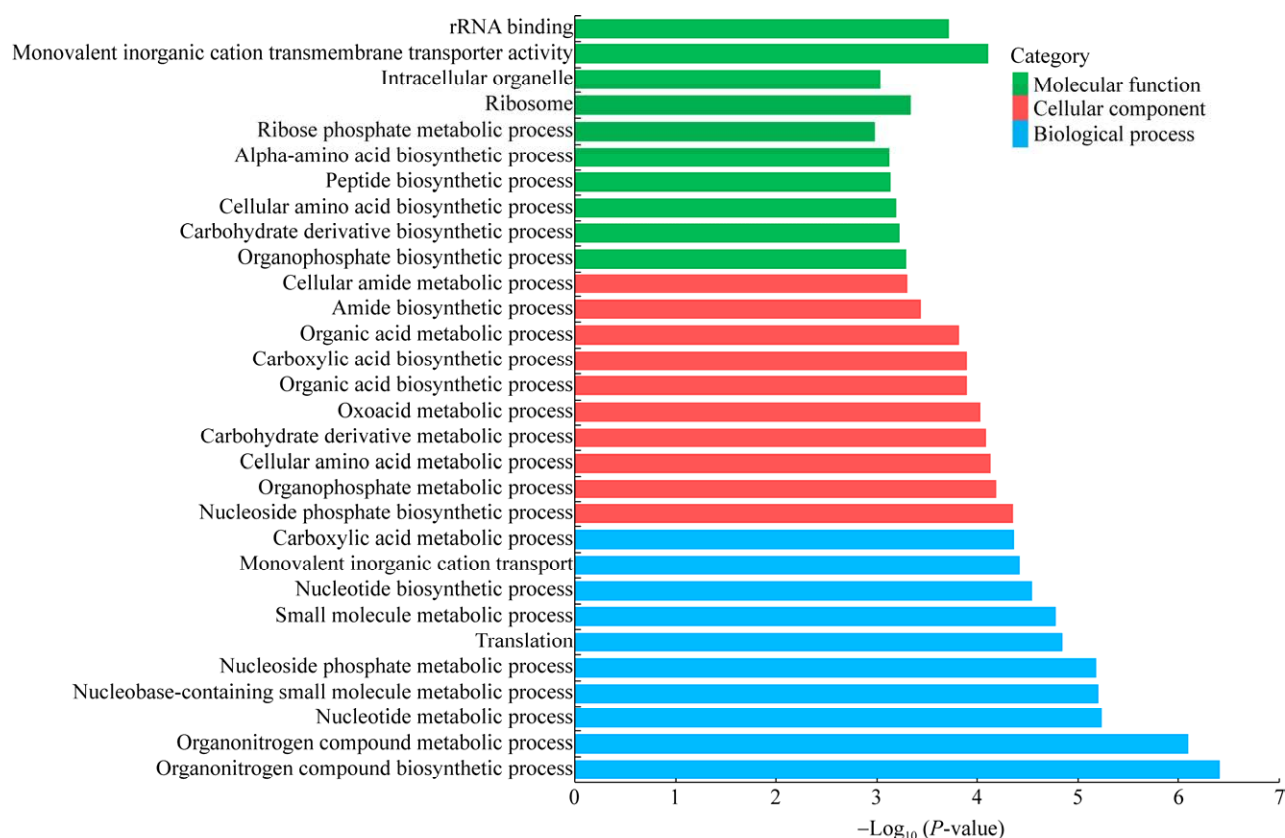


图 7 *S. gilvosporeus* F-EX 在 60 h 时差异表达基因的 GO 富集分析柱状图

Figure 7 GO functional classification map of differentially expressed genes of *S. gilvosporeus* F-EX at 60 h.

基因变化较为显著，而代谢途径类别中基因变化最多，包括了多种氨基酸代谢、丙酸盐代谢、糖代谢、TCA 循环和五碳化合物代谢等初级代谢以及 I 型聚酮化合物的代谢 (图 8)。因此，转录组分析结果表明，*sgnA/B* 的超表达提高了纳他霉素胞外转运效率的同时，还可能通过促进 *S. gilvosporeus* 初级代谢，增加纳他霉素高效合成所需前体的供给来间接促进纳他霉素的合成，但尚需进一步的实验证实。

3 讨论与结论

天然多烯大环内酯类纳他霉素具有广谱、高效的抗真菌特点，被广泛应用在食品防腐和真菌感染性疾病治疗领域^[1]。然而，近期的研

究则发现纳他霉素具有抑制前列腺癌细胞增殖的作用^[2]，为纳他霉素的应用开拓了更广阔的前景。纳他霉素自身具有还原性，易被氧化物氧化，而发酵过程中维持胞内一定浓度的 H_2O_2 ，对纳他霉素的合成具有重要作用^[18-19]。因此，基于这一特性，纳他霉素胞内合成后，高效率地胞外转运，缓解其对胞内 ROS 的清除作用，将是维持纳他霉素高效表达的途径之一。纳他霉素的胞外转运被预测由 ABC 转运蛋白 SgnA 和 SgnB 完成，但其实际作用及其机制尚未有实验证实，基于此，我们进行了 SgnA/B 转运纳他霉素方式的分析，并构建了 *sgnA/B* 超表达菌株，证实了其转运作用的同时，得到了纳他霉素产量提高的菌株 *S. gilvosporeus* F-EX。

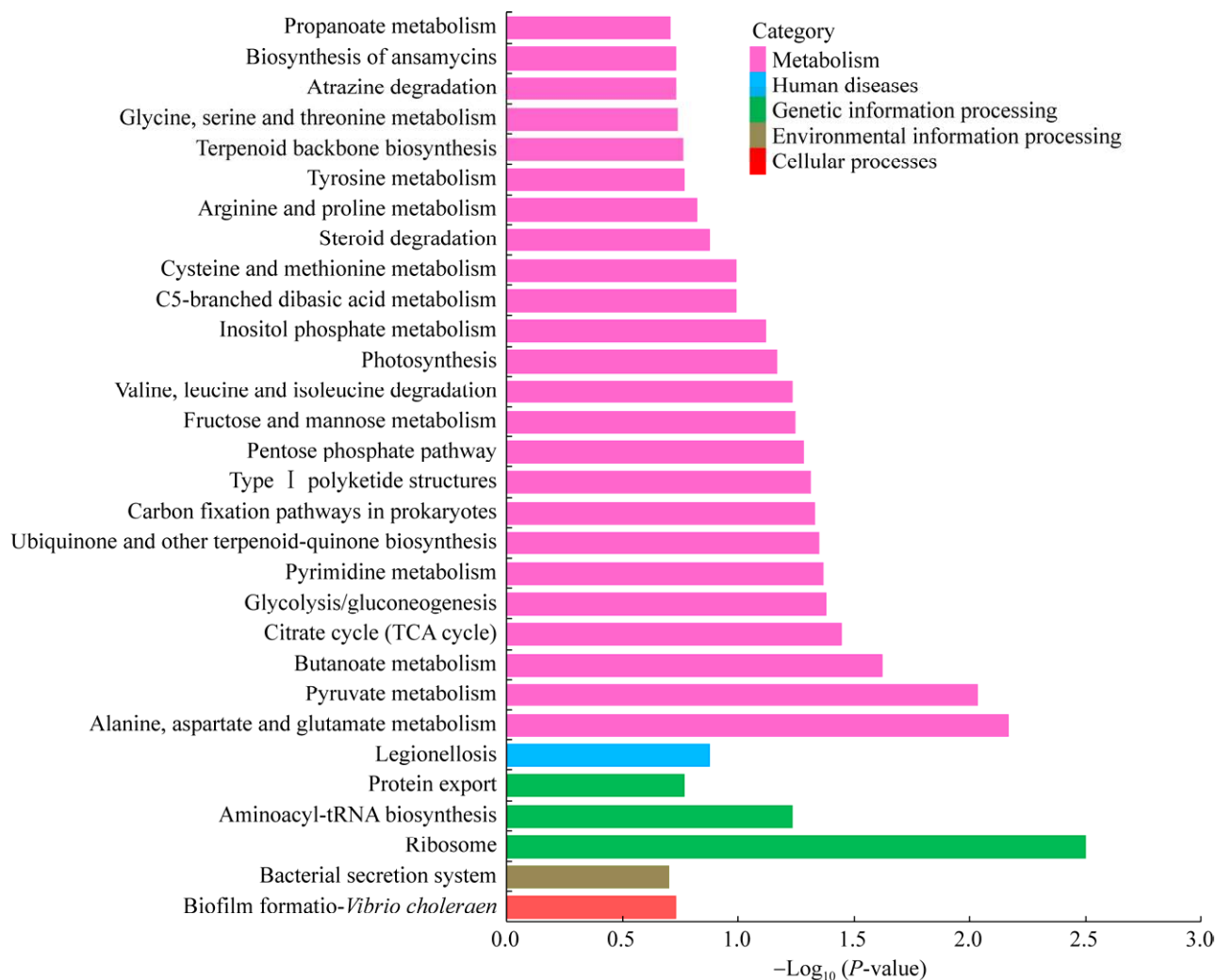


图8 *S. gilvosporeus* F-EX 在 60 h 时差异表达基因的 KEGG 代谢通路分类图

Figure 8 KEGG classification of metabolic pathways map of differentially expressed genes of *S. gilvosporeus* F-EX at 60 h.

在原核生物中, ABC 转运蛋白的 4 个区域可以是相同或不同的 2 种亚基组合。NBDs 结合并水解 ATP, 为转运提供能量, 其结构和序列在 ABC 转运蛋白家族中高度保守, 包括 Walker A 和 Walker B 序列、ATP 结合基序、H loop 及 Q loop。TMDs 主要参与底物的识别并通过转运通过脂双层膜, 结构及序列因转运底物的不同而具有多样性^[25-27]。SgnA/B 由 2 种亚基 (SgnA 和 SgnB) 组成, 虽然 SgnA 和 SgnB

同源性仅为 31.57%, 但所形成亚基的空间结构则高度相似。两种不同亚基组成的 SgnA/B, 呈现典型的内向开口结构, 有研究表明该种结构的“ATP 开关模型”, 当 ABC 转运蛋白与 ATP 和转运底物结合后, TMD 的螺旋重排形成外向开口构象, 然后释放转运底物^[26]。我们进一步分析 SgnA/B 与纳他霉素的结合区域发现, 纳他霉素在 SgnA/B 上具有 2 个结合位点, 即远离细胞膜的 DBC1 和靠近细胞膜的 DBC2。通

过分析 2 个结合位点的作用氨基酸及作用力,发现远离细胞膜的 DBC1 结合纳他霉素较为牢固,而靠近细胞膜的 DBC2 结合纳他霉素能力较弱,这一性质则更有利于纳他霉素的胞外转运。

通过构建 ABC 转运蛋白编码基因 *sgnA/B* 的超表达菌株 F-EX 并分析其对纳他霉素胞外转运效率的影响, F-EX 菌株中纳他霉素的胞外/胞内浓度比的提高,促进了纳他霉素这一还原性次级代谢产物的胞外转运。这一作用将有助于减少胞内纳他霉素的积累,进而可能在一定程度上缓解 ROS 的消除作用,有助于维持对纳他霉素合成具有促进作用的胞内 ROS 浓度,提高纳他霉素的总产量。转录组差异基因聚类分析也证实 I 型聚酮化合物的代谢得到了提升。转录组分析提示我们, *sgnA/B* 的超表达对生长代谢中氨基酸代谢、丙酸盐代谢、糖代谢、TCA 循环和五碳化合物代谢等初级代谢的多个基因表达具有影响,因此,初级代谢过程的变化可能是 *sgnA/B* 另一个影响纳他霉素的生物合成的间接因素。此外,构建的纳他霉素高效转运菌株 *S. gilvosporeus* F-EX, 纳他霉素产量已具备一定的工业化生产潜力。后续可以通过对代谢组、代谢通路的调控、胞内 ROS 的平衡和发酵条件的优化等方式,对该菌株的性能和生产能力进一步提升。

REFERENCES

- [1] Aparicio JF, Barreales EG, Payero TD, et al. Biotechnological production and application of the antibiotic pimarin: biosynthesis and its regulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(1): 61-78.
- [2] Vasquez JL, Lai YH, Annamalai T, et al. Inhibition of base excision repair by natamycin suppresses prostate cancer cell proliferation. *Biochimie*, 2020, 168: 241-250.
- [3] He C, Zhang ZQ, Li BQ, et al. Effect of natamycin on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*—postharvest pathogens of grape berries and jujube fruit. *Postharvest Biol Technol*, 2019, 151: 134-141.
- [4] 付加芳, 张晶, 张严洁, 等. 纳他霉素高产菌株 *Streptomyces gilvosporeus* F607 基因组及其生物合成基因簇分析. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2312-2325.
- [5] Fu JF, Zhang J, Zhang YJ, et al. Analysis of genome sequence and natamycin biosynthetic gene cluster on high producing strain *Streptomyces gilvosporeus* F607. *Microbiol China*, 2019, 46(9): 2312-2325 (in Chinese).
- [6] Wang YM, Tao ZS, Zheng HL, et al. Iteratively improving natamycin production in *Streptomyces gilvosporeus* by a large operon-reporter based strategy. *Metab Eng*, 2016, 38: 418-426.
- [7] Aparicio JF, Fouces R, Mendes MV, et al. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimarin in *Streptomyces natalensis*. *Chem Biol*, 2000, 7(11): 895-905.
- [8] Du YL, Chen SF, Cheng LY, et al. Identification of a novel *Streptomyces chattanoogensis* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator ScnR II. *J Microbiol*, 2009, 47(4): 506-513.
- [9] Wu HL, Liu WC, Shi LL, et al. Comparative genomic and regulatory analyses of natamycin production of *Streptomyces lydicus* A02. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9114.
- [10] Zong GL, Zhong CQ, Fu JF, et al. Complete genome sequence of the high-natamycin-producing strain *Streptomyces gilvosporeus* F607. *Genome Announc*, 2018, 6(1): e01402-e01417.
- [11] Antón N, Santos-Aberturas J, Mendes MV, et al. PimM, a PAS domain positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Microbiology (Reading)*, 2007, 153(Pt 9): 3174-3183.
- [12] Santos-Aberturas J, Vicente CM, Payero TD, et al. Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: PimR modulates pimarin production via the PAS-LuxR transcriptional activator PimM. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38536.
- [13] Santos-Aberturas J, Payero TD, Vicente CM, et al. Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis. *Metab Eng*, 2011, 13(6): 756-767.
- [14] Du YL, Li SZ, Zhou Z, et al. The pleiotropic regulator AdpAch is required for natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis*. *Microbiology (Reading)*, 2011, 157(Pt 5): 1300-1311.

- [14] Mendes MV, Tunca S, Antón N, et al. The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: inactivation or deletion of phoP reduces the negative phosphate regulation of pimarinic biosynthesis. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 217-227.
- [15] Liu SP, Yu P, Yuan PH, et al. Sigma factor WhiG_{ch} positively regulates natamycin production in *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(6): 2715-2726.
- [16] Zhou WW, Ma B, Tang YJ, et al. Enhancement of validamycin A production by addition of ethanol in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Bioresour Technol*, 2012, 114: 616-621.
- [17] Wei ZH, Bai LQ, Deng ZX, et al. Enhanced production of validamycin A by H₂O₂-induced reactive oxygen species in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 1783-1787.
- [18] Beites T, Pires SDS, Santos CL, et al. Crosstalk between ROS homeostasis and secondary metabolism in *S. natalensis* ATCC 27448: modulation of pimarinic production by intracellular ROS. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27472.
- [19] Beites T, Rodríguez-García A, Santos-Beneit F, et al. Genome-wide analysis of the regulation of pimarinic production in *Streptomyces natalensis* by reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(5): 2231-2241.
- [20] Sletta H, Borgos SEF, Bruheim P, et al. Nystatin biosynthesis and transport: *nysH* and *nysG* genes encoding a putative ABC transporter system in *Streptomyces noursei* ATCC 11455 are required for efficient conversion of 10-deoxynystatin to nystatin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4576-4583.
- [21] Caffrey P, Lynch S, Flood E, et al. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*. *Chem Biol*, 2003, 10(1): 93-94.
- [22] 李月. 杰多霉素外排泵基因功能研究应用及一种 biosensor 筛选新调控基因方法的建立[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
Li Y. Characterization and manipulation of the jadomycin efflux gene and construction of a biosensor-based method to screen for novel regulators[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012 (in Chinese).
- [23] Aparicio JF, Caffrey P, Gil JA, et al. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(3): 179-188.
- [24] Cao GX, Howard ST, Zhang PP, et al. Functional analysis of the EspR binding sites upstream of *espR* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol*, 2013, 67(5): 572-579.
- [25] Orelle C, Dalmas O, Gros P, et al. The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J Biol Chem*, 2003, 278(47): 47002-47008.
- [26] Hohl M, Briand C, Grütter MG, et al. Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(4): 395-402.
- [27] 刘艳青, 赵永芳. ABC 转运蛋白结构与转运机制的研究进展. *生命科学*, 2017, 29(3): 223-229.
Liu YQ, Zhao YF. Structure and mechanism of ABC transporter. *Chin Bull Life Sci*, 2017, 29(3): 223-229 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)