

放线菌基因组与生物技术

刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: 天蓝色链霉菌全基因组序列的公布, 对目前工业生产生物活性代谢产物菌株的遗传改造, 构建生产高价值药物的超级菌, 以及由微生物资源去寻找新的生物活性代谢产物将产生巨大影响。文中就基因组时代如何发展由基因组信息和化合物库预测次生代谢路径、研究功能基因组学时代的放线菌次生代谢调控、基因工程技术在放线菌抗生素生产中的应用以及体外分子定向进化与分子育种等生物技术问题进行文献综述。

关键词: 放线菌, 基因组, 基因工程技术

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0140-04

自从 Fleimann 等人 (1995) 发表第一个流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) 全基因组序列以来, 目前仅是真细菌 (Eubacteria) 就有大约 50 个全基因组序列完成测序并公布, 另外还有 300 多个正在测定中 (<http://www.tigr.org/tdb/mdb>; <http://ergo.kntegragenomics.com/GOLD>)。这一种估计还不包括一些公司完成但未公布的基因组序列。大多数已公布的真细菌基因组序列来自致病菌, 其目的是希望提供发现新抗生素和研制疫苗的潜在目标使用。来自细菌基因组的序列正在改变着我们对细菌“种”的理解, 以及对水平基因的传递和细菌进化的认识。

最近另一重要全基因序列的公布是天蓝色链霉菌 [*S. coelicolor*], Bentley *et al.* 2002]。它是一类产生有用的抗生素和许多其他活性代谢物质的工业细菌的代表。*S. coelicolor* 是遗传学上最典型的菌株, 其基因组序列可能会对目前工业生产生物活性代谢产物菌株的遗传改造, 构建生产高价值药物的超级菌, 以及从微生物资源去寻找新的生物活性物质产生巨大影响。我们可以预见未来的几年通过其他放线菌基因组测序和与 *S. coelicolor* 进行比较研究, 以及进一步对功能基因的研究将从根本上理解和改进微生物制药工业化的过程。

1 基因组、系统学和生物技术

作为寻找和发现新的代谢产物的研究, 开始使用有关适宜的生物学材料, 通过巧妙设计的筛选模型, 最终发展成为商业化生产过程。所有发现天然产物的过程有力 and 明显地推动着寻找新的目的产物和革新着微生物学 (Bull *et al.*, 2000)。尽管人们也努力去从其他细菌中寻找和获得有用的次级代谢产物, 但放线菌, 特别是链霉菌仍然是产生商业上有意义的抗生素和其他代谢产物的主要产生菌。最近放线菌分类学的进展正在影响着菌种的选择分离、鉴定和次级代谢产物的筛选。

虽然近30年来,可培养放线菌的系统分类研究有了进展,但我们仍然不仅对放线菌多样性的认识浅薄,而且就已有的分类鉴定也尚有困难。然而,基因组时代提供的信息,基因技术提供的工具,能够让我们在第一时间,使用预测方法(Prediscation)去评价原核生物系统学,去探讨包括放线菌的原核生物世界的多样性。其结果将推动原核生物系统学建立一个坚实的遗传学基础,使微生物学革新和发展。

2 由基因组信息和化合物库预测次生代谢路径

基因组测序项目完成后,我们真正想要知道的是每个基因或蛋白,是如何表达生物功能的。因此我们必须弄清生物学系统是如何由基因和分子构成以及这些分子间的相互作用。路径信息学(Pathway informatics)或者过程信息学(Process informatics)是根据信息学了解生命系统的结构和行为的方法学。路径信息学主要包括象KEGG路径数据库的构成,研发体外重建路径的方法,以及使用上述数据和方法模拟生物学系统。关于使用基因信息学和化合物数据库预测未知代谢路径的方法可以使用3类数据库,即:以不同基因表达(DGE)数据,检出与目的代谢路径相关的基因;使用DGE实验测定基因序列是以分析基因同源性、修饰和框架;一旦列出目的化合物的所有可能的酶和结构,我们就可以追踪底物与产物间的相应原子列举出所有可能的产物。

3 功能基因组学时代的放线菌次生代谢调控研究

目前所应用的功能基因组学研究技术可粗略分为4类:1)系统地改变基因结构,并通过进一步的表型分析研究基因的功能和调控特性;2)对基因转录过程的系统监测,例如芯片(Microarray)技术可以同时分析数千个基因转录子(transcriptomic);3)对基因编译的蛋白系统监测,例如各种蛋白组学(proteomic)技术,以及4)对细胞代谢过程中各种代谢中间或终产物的系统分析,例如代谢组学(Metabolomic)技术。

3.1 系统地改变基因结构的方法

目前主要有两种改变基因结构的方法用于基因组学研究。第一是采用转座子(transposon)进行随机引发突变,并进而对突变株进行表型分析,这一方法已成功地应用于大肠杆菌(*E. coli*)基因功能和调控的系统研究(smith *et al.*, 1995)。第二是全面地宣战,突变基因组的每一个基因,产生一个完整的突变株文库,进而进行表型研究。斯坦福大学的酵母菌(*Saccharomyces*)基因组中心就采用这一策略完成了啤酒酵母的6200个基因突变株的构建(Shoemaker *et al.*, 1996)。最近,哈佛大学的losick 研究组首次构建了一个可用于天蓝链霉菌中大规模产生基因突。使用这一方法可以用于大规模基因诱变,他们已经发现了许多先前功能未知的基因涉及色素形成,气生菌丝和分生孢子的形成等。

3.2 提高抗生素产量及新抗生素的产生

以往的研究已经讨论过几种可用来改良菌种以提高抗生素产量及获得新抗生素的策略,其中包括激活生物合成基因、沉默基因活化、杂种抗生素等。微生物产生抗生素的整个过程需要数十个甚至数百个基因的参与,因此想用简单的常规方法来提高抗生素的产量并不容易。研究生物合成的遗传调控,探讨激活合成基因的设想认为是可行的。已有的克隆 *act* 基因的研究显示了乐观的前景。对野生型放线紫红素产生菌(*act*⁺)引入携带了整套 *act* 基因的PIJ2303质粒,结果放线紫红素的产生量较野生型提

高了30~40倍。这样大的增产幅度完全超出了增加基因量所可能达到的比例(一般只有2~3倍)。

沉默基因的概念指的是有些链霉菌菌株在遗传上具有产生某一抗生素的能力,但因超阻遏以致在正常情况下检测不到它的产物。如果它与另一个缺乏相同调节基因的菌株发生遗传重组,就有可能使这种原先处于阻遏状态的沉默基因活化而使抗生素得以正常的合成。有文献报道,链霉素产生菌灰色链霉菌和伊斯塔霉素(istamycin)产生菌天神岛链霉菌经过原生质体融合得到一个重组子,产生一个称作吲哚霉素(indolizomycin)的新抗生素。庆丰霉素产生菌庆丰链霉菌和井冈霉素产生菌的原生质体融合,得到的重组子有的产生聚醚类抗生素,也有的产生新抗生素多肽类抗生素。推测这些都是由于沉默基因被激活的结果。

3.3 遗传学和生物活性菌株的改进

多年来,使用有效的化学或放射线诱导菌种突变,以提高工业生产菌株的抗生素产量十分重要。用杂交或原生质体融合技术从突变筛选系的分支处组合预期基因,很多情况下也是成功的。用基因工程的方法提高效率也很少有报道,但在一种生物合成途径的限速步骤描述中最终有了可引用的信息。这种途径提高了终产物的产量,对抗生素的生产有很大商业意义。通过调控特异途径或全程调节基因提高工程效价,现在已获得了许多成功的链霉菌工程菌株。

基因工程的更加直观的应用是产生新的“杂种”抗生素。目前这一课题正在吸引越来越多研究者的兴趣,尤其是与聚酮抗生素有关的抗生素研究。虽没有出现有价值的化合物,但终于露出了曙光!如果将生物合成与化学转化结合,在今后几年内将会出现惊人的应用前景。

基因工程技术具有构建高产菌株的潜力,还有菌株表达的新的蛋白质药物。葡萄糖异构酶,已被成功改造,提高了对热和碱的稳定性以用于工业生产。

4 基因工程技术在放线菌抗生素生产中的应用

新抗生素的研究和发现必须要采用新的方法和技术。另一方面,在提高抗生素产量方面,常规的菌种选育方法虽仍不失为一个有效的方法,但主要是针对低产原始菌株产量的提高比较有效,对高产菌株产量的进一步大幅度的提高必须要采用新的技术和手段。近年来,随着基因工程技术的飞速发展,新的抗生素的发现和已知抗生素的改造及菌种选育工作中越来越多的采用了基因工程的方法和技术,这无疑会对抗生素的研究和发展注入新的活力。

4.1 抗生素生物合成基因的克隆

目前常用的抗生素生物合成基因的克隆方法和策略主要有以下几种:1)将目的基因克隆到标准宿主菌中,通过检测基因产物检出阳性克隆;2)利用阻断突变株进行基因克隆;3)通过克隆某种抗生素的抗性基因来分析和检出与其连锁的抗生素生物合成基因;4)利用鸟枪法克隆将抗生素产生菌的DNA大片段克隆到非产生菌中;5)以已克隆的生物合成基因为探针克隆同源的抗生素生物合成基因。

4.2 利用组合生物技术产生新的抗生素

聚酮类化合物(polyketide,简称PK)是由活化的乙酸、丙酸等简单羧酸通过与脂肪酸合成相类似的脱羧缩合反应过程组装得到的,聚酮类化合物是一个包括由植物和

微生物产生的天然化合物的一个大家族。包括大环内酯类、四环类、萜环类和聚醚抗生素在内的许多抗生素菌属于聚酮类化合物,如临床使用的红霉素、四环素、两性霉素、利福霉素、阿霉素、洛伐他丁、西罗莫司、FK506等。

研究表明:除了合成大环内酯类抗生素的PKS外,其它PKS的酶活性的专一性都不很高,而且在生物合成过程中被重复使用。据此,美国斯坦福大学的Khosla教授提出了组合生物合成的理论。利用组合生物技术产生新的抗生素已经成为新药研究的一个重要领域。Khosla通过将不同来源的PKS的重组、添加或删除的方式产生了非天然的天然化合物。随着对放线菌次级代谢产物生物合成研究的逐步深入,组合生物合成的设计和操作会更有逻辑性和针对性,此外与液质联用和核磁共振相结合的高通量筛选也会加速具有新结构和新活性的“非天然”天然产物的分离鉴定工作。

4.3 利用基因重组技术改造抗生素的生产菌

目前利用基因重组技术改造抗生素的生产菌的例子包括有:1)通过解除抗生素生物合成中的限速步骤来提高抗生素的产量;2)通过引入抗性基因和调节基因来提高抗生素的产量;3)通过引入氧结合蛋白来提高抗生素的产量;4)通过增加限制性中间产物转化的酶的基因从而产生出多个组分;5)通过敲除或破坏次要组分的生物合成基因来消除或减少次要组分。

5 体外分子定向进化与分子育种

体外分子定向进化(molecular directed evolution)是近几年发展起来的一种对生物活性分子进行改造的新策略。可以在对目标蛋白的三维结构信息和作用机制尚未了解的情况下,通过对编码基因的随机突变、重组和定向筛选,获得具有改进或全新功能的生物活性分子,从而使在自然条件下需要几百万年的进化过程在短时间内得以实现。在体外分子定向进化与分子育种中应用最多的是DNA改组技术,该方法是发现新的生物活性分子的一种非常有用的方法,近几年在实际研究工作中应用后已经取得了令人瞩目的成就。

DNA改组技术(DNA shuffling)是由美国学者Stemmer(1994)首次提出,也被称作分子育种,它是基于PCR技术,对一组基因群体(进化上相关的DNA序列或筛选出的性能改进序列)进行重组创造新基因的方法。使用单基因DNA改组技术,已经有了若干成功的例子,使有些酶的活性得到了不同程度的提高。当DNA改组用来重组一套进化上相关的基因时,又被称为家族改组(family shuffling),该技术成功的一个典型例子是应用该技术对4种头孢菌素酶的基因进行体外分子定向进化与分子育种,使酶的活力增加了270~540倍,而使用单基因DNA改组技术酶的活力只增加了8倍。

体外分子定向进化大大加快了人类改造和开发包括酶分子在内的生物活性分子新功能的步伐。截止到2000年底,已有几十种药用蛋白质分子经定向进化得到了改进。利用体外分子定向进化与分子育种所取得的成就目前主要有以下几个方面:生物分子活性的提高和稳定性的改善、抗体亲和力的提高、新型疫苗的和其它药物分子的发现、新的代谢途径的开发等,甚至可以用来预测自然进化中新突变的出现。

参考文献(略)