

羊毛硫细菌素及其应用

那淑敏 还连栋

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词: 羊毛硫细菌素, 修饰氨基酸残基

中图分类号: Q939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-06-0430-04

由基因编码、在核糖体上合成的抗菌多肽广泛分布于自然界中。人、动物、昆虫、植物和微生物都可以产生。这些抗菌多肽在食品防腐保鲜以及在药物治疗和医治肿瘤、癌症方面的潜力引起人们极大的关注^[1]。近10年来,原核生物和真核生物产生的抗菌多肽成为人们研究的热点,并取得飞速进展^[1~4]。本文将主要介绍革兰氏阳性细菌产生的羊毛硫细菌素的结构、性质、生物合成、作用机制及应用。

1 什么叫羊毛硫细菌素

由细菌基因编码、在核糖体上合成的抗菌多肽叫作细菌素。它是由某些细菌通过核糖体合成机制产生的一类具有抑菌生物活性的多肽、蛋白质、不同蛋白的复合物或者蛋白与糖和/或脂的复合物^[3]。其合成受蛋白合成抑制剂的干扰。它的抑菌范围不仅仅局限于同源的细菌,有的细菌素抑菌谱较宽,可抑制多种革兰氏阳性菌,包括食物腐败菌和致病菌。在正常情况下,革

兰氏阴性菌对革兰氏阳性菌产生的细菌素不敏感,除非细菌的外壁受到亚致死或螯合剂的处理^[3]。产生菌对其自身产生的细菌素具有免疫性。分子中含有羊毛硫氨酸的细菌素称之为羊毛硫细菌素。

2 羊毛硫细菌素的发现

1908年,自梅契尼科夫提出乳酸菌能抑制非肠道微生物以来,许多学者对革兰氏阳性菌产生的抑菌物质进行了研究。1928年,Roges报道乳酸菌能产生一种抑制其它链球菌生长和阻止保加利亚乳杆菌产酸的物质。以后的研究工作证明这种抑制物为乳链菌肽(nisin)。因分子内含有羊毛硫氨酸而属于羊毛硫细菌素。1951年发现了第2个羊毛硫细菌素,它是枯草芽孢杆菌产生的subtilin,40年后,直到1991年才发现第3个羊毛硫细菌素——葡萄球菌产生的epidermin。此后,

收稿日期:1998-10-05,修回日期:1999-05-10

平均每几个月就发现一个新的羊毛硫细菌素。到目前为止,已在7个不同属的革兰氏阳性菌中发现并鉴定了近20种羊毛硫细菌素^[4]。

3 细菌素的特性

3.1 细菌素前体的前导肽和原肽区 1969年, Ingram^[5]首次报道乳酸链球菌(现称乳酸乳球菌)中 nisin 合成受蛋白质合成抑制剂的干扰。后经实验证明,革兰氏阳性菌产生的低分子量细菌素首先是在核糖体上合成无生物活性的前体肽(包括N末端前导序列和C端原肽区)。第1个分离的羊毛硫细菌素的前体肽是 pre-Pep5。它在膜上经过至少两种酶的修饰,经除去前导肽,产生成熟的细菌素分泌到胞外。羊毛硫细菌素原肽区有19~37个氨基酸残基。原肽区氨基酸残基少的比多的抑菌谱宽。

3.2 羊毛硫细菌素的翻译后修饰 除 salvaricin A 外,所有已鉴定的羊毛硫细菌素都含有羊毛硫氨酸和 α 、 β 双脱氢氨基酸。这些双脱氢氨基酸分别由丝氨酸、苏氨酸脱水形成。但到目前为止,尚不清楚何种酶造成这一脱水反应。已经鉴定的丝氨酸、苏氨酸脱水酶只对游离氨基酸有活性,暗示可能有一类新脱水酶存在。脱水反应后,半胱氨酸残基的-SH加到丝氨酸或苏氨酸脱水残基上缩合形成羊毛硫氨酸(Ala-S-Ala)和 β -甲基羊毛硫氨酸(Aba-S-Ala)。这就是羊毛硫细菌素的翻译后修饰。羊毛硫氨酸与胱氨酸相似,其中硫醚键稳定羊毛硫细菌素的三维结构。其功能与蛋白质中二硫键相似,但比二硫键稳定。修饰氨基酸赋予多肽抗菌活性和由硫醚氨基酸形成的分子内环。不同的羊毛硫细菌素分子内环数目不同。现已证明羊毛硫细菌素 lactocin S 在3个确定编码丝氨酸的位置上含有D-丙氨酸,它是由L-丝氨酸特殊位点脱水形成Dha,然后以立体特异方式加氢形成D-丙氨酸并构筑成 lysinoalanine 桥^[4]。这些修饰氨基酸决定了多肽的结构、功能及不同的抗菌作用。

3.3 羊毛硫细菌素的结构和分型 关于羊毛硫细菌素的分型有两种意见, Jack^[6]和 Nissen-Mayer 等人^[1]认为分A、B二型,而 Hansen^[4]将其分A、B、C三型。两种不同分型区别在于几个细菌素的归属及范围不同。A型羊毛硫细菌素是伸长的螺旋形亲水脂阳离子多肽,分子量2~5kD。其典型代表为 nisin。由链霉菌属产生的B型羊毛硫细菌素由于多肽的广泛折叠而形成紧密的球形结构,分子量约2kD。它们是 duramycin 类细菌素。

marsacidin 和 actagardine 是C型羊毛硫细菌素^[4]。在羊毛硫细菌素中以 nisin 研究最深入。nisin 分子长约5nm,直径2nm,偶极矩大于50Debye(D)^[2]。

4 细菌素产生的遗传学

4.1 基因定位 编码细菌素产生的基因有些位于细菌染色体上,有些位于质粒上。质粒大小从6kb到131kb^[3]。编码 nisin 的基因位于一个可接合转移的70kb的转座子上,称之为 Tn5301 或 Tn5276。

4.2 编码细菌素生物合成的基因簇 现已鉴定了 nisin, snbtilin, Pep5, epidermin, cytolysin, lacticin 481 和 lactocin S 的生物合成基因^[4]。羊毛硫细菌素的生物合成除结构基因外,还包括:①一个或多个参与免疫的蛋白,②ABC转移体,③切割前导肽的丝氨酸蛋白酶,④一个或两个催化氨基酸脱水形成羊毛硫氨酸的蛋白,⑤双组分调节蛋白,它转运一个胞外信号,诱导细菌素的表达。最近 Kuipers 等人^[7]证明, nisin 就是一个胞外信号,它诱导并通过双组分调节蛋白表达自身的结构基因。nisin 的前体肽由57个氨基酸残基组成,成熟的 nisin 含有34个氨基酸残基,其余的23个氨基酸残基是前导肽,与 nisin 合成有关的11个基因位于转座子中一段13~15kb的DNA片段上^[8]。它们是 nisABTCIPRKFEg。Entian^[9]提出了 nisin 生物合成的模型。

4.3 天然发生的变异体 在羊毛硫细菌素中,由于结构基因发生点突变产生变异体是个普遍现象。首例报道的 gallidermin 是 epidermin 的变异体^[1],两者之间的区别仅在第6位氨基酸由异亮氨酸变成赖氨酸。Graffe 和 Kuipers 等^[10]分别报道了 nisin 的变异体 nisin Z。1993年,De Vos 等人^[11]证明 nisin A 和 nisin Z 以相似的频率存在于自然界中(26株 nisin 产生菌中,14株产 nisin A,12株产 nisin Z),产生菌之间有完全交叉的免疫性。nisin A 与 nisin Z 的差异在于结构基因中的碱基由C→A而使多肽中第27位氨基酸由组氨酸变成天门冬氨酸。虽然这只是很小的DNA序列上的变化,但对多肽的性质有很大影响,不仅使 nisin Z 的溶解度高于 nisin A,而且使其在高pH时较 nisin A 更为稳定。由于亲水性能增加, nisin Z 在固体培养基中有较好的扩散性。

4.4 结构与功能的关系——修饰残基的功能 天然产生的羊毛硫细菌素衍生物可呈现不同的生物活性。缺

失 C-末端 Dha₃₃ 和 lys₃₄ 氨基酸残基的 nisin, 其活性与天然 nisin 相当。若将 Dha₃ 残基破坏可导致硫环打开而使 nisin 失去活性, 这些结果已被定点突变所证实。将 nisin Z 中 Dha₃ 变成 Dhb 可使 nisin Z 的抗菌活性降低 2~10 倍。而含有 Ala₃ 的 nisin 则有正常的生物活性。在 nisin 和 subtilin 中将脱氢残基变成 Ala 并不破坏它抑制营养细胞的能力, 但丧失了对枯草杆菌孢子发芽的抑制作用, 说明 Dha₃ 对杀孢活性是必需的, 它可能与孢子外壳的巯基的作用有关。

到目前为止, 已对 nisin, Pep5, subtilin, epidermin, gallidermin 进行点突变研究, 几乎每一种改变都使其抗菌活性降低, 仅有将一个脱氢残基变成另一个脱氢残基或者围绕脱氢残基的环境有变化时才会使活性增加。最引人注目的改变是在 subtilin 中将 Dha₃ 残基替换, 可使其活性增加 4~6 倍^[4]。

突变也可提高羊毛硫细菌素分子对化学试剂和蛋白酶钝化的稳定性。将 subtilin 中 Glu₄ 变成 Ile 可使 Dha₃ 残基的化学稳定性提高近 60 倍。提示 Glu₄ 的羧基可能参与了 Dha₃ 的自发修饰。羊毛硫氨酸环创造了一个局部的连接屏障, 使对蛋白酶的切割产生抗性。这就使得胰蛋白酶对含有 3 个 lysine 残基的 nisin 不起作用, 从而使羊毛硫细菌素及其类似物在药理学的应用中起重要作用^[4]。

5 细菌素的作用机制

用 A 型羊毛硫细菌素处理敏感细胞能在细胞膜上形成短暂的依赖于电压的孔洞, 使低分子量物质流出, 导致细胞死亡。某些 B 型羊毛硫细菌素, 如 duramycin 是在细胞膜上形成离子通道或孔洞引起膜通透性的增加。C 型羊毛硫细菌素与 B 型的作用机制不同, 它们干扰革兰氏阳性细菌细胞壁的合成。nisin 对细胞作用的初级靶是细胞质膜, 它增加了整个细胞和脂质体中膜对离子和小分子化合物的通透性, 严重的使细胞裂解^[3]。此外, nisin 导致敏感细胞或人工脂质体的质子动力 (PMF)、跨膜电位 ($\Delta\psi$) 和 pH 梯度 (ΔpH) 等主要组分的下降, 结果导致细胞死亡。有两种模型解释了 nisin 形成孔洞的机制: ①桶板模型, ②楔形模型。在两个模型都认为孔洞的形成有一个能量需求, 在 50~80mV 的阈值时, 可使通透性增加好几个数量级。孔洞的直径范围为 0.2~1.2nm, 将允许分子量高达 0.5kD 的亲水脂溶质通过, 孔洞的寿命一般是几毫秒 (千分之一秒) 到几秒钟^[12]。

另有证据表明 A 型羊毛硫细菌素如 nisin 和 subtilin 对不同类型的细胞在不同发育阶段有不同的作用机制: 孔洞机制和共价机制。对营养细胞是孔洞机制发挥作用, 与孢子外壳上的巯基作用抑制孢子发芽则是共价修饰的结果^[4]。

6 对细菌素的免疫性

产细菌素菌株必须有保护自身不受细菌素毒害的自身免疫性。A 型羊毛硫细菌素作用在受体细胞膜上形成孔洞不需要特殊的受体, 因而自身保护和免疫就显得特别重要。这类细菌素的免疫至少涉及两种不同的免疫体系。表皮葡萄球菌对 Pep5 的免疫机制是通过 Pep5 免疫基因编码 69 个氨基酸的蛋白与细胞膜外表面的弱结合, 阻止孔洞形成而达到自身免疫。在乳酸乳球菌和枯草芽孢杆菌中, 免疫脂蛋白 NisI(245Aa) 和 SpaI(165Aa) 也分别定位在细胞膜外表面, 表明 nisin 和 subtilin 产生菌也有与 Pep5 相似的免疫机制。由两个膜蛋白 (Nis EG, SpaG 和 SpaF 的疏水区) 和 EpiEG) 和膜质蛋白 (NisF, SpaF 的胞质区和 EpiF) 组成的 ABC (ATP binding cassette) 转运体抑制孔洞形成而在 nisin, subtilin, epidermin 的免疫中起作用。

Siegers 等人^[8]的研究也表明, 除了 nisin 基因外, nisin 基因簇下游的 3 个基因 nisFEG 也参与免疫性。蛋白 NisF 和 NisE 与 ABC 转运体家族的成员有很高的同源性。nisG 编码一个疏水蛋白, 与大肠杆菌素的免疫蛋白有相似的作用。nisF, nisE 和 nisG 的突变体仍能产生 nisin, 但与野生型 nisin 产生菌相比, 这些突变体对 nisin 更敏感, 表明除了 nisin 外, nisin 的免疫性也与这 3 个基因有关。nisF-nisE ABC 转运体与 subtilin 免疫性有关的大肠杆菌转运体 MbcF-MbcE 是同源的。据此提出了 nisin 免疫机制假说^[13]。

90 年代初已经鉴定了 Pep5, nisin, subtilin 的免疫蛋白。nisin 和 subtilin 的免疫蛋白虽含共有序列, 但两个产生菌之间没有交叉免疫性 (即 nisin 产生菌对 subtilin 敏感, 反之亦然), 反映它们免疫机制的特异性。交叉免疫性仅发生在变异体之间, 如 nisin A 和 nisin Z, epidermin 和 gallidermin。有关其它 A 型羊毛硫细菌素的免疫基因因现在尚不清楚^[4]。

7 羊毛硫细菌素的应用

鉴于原核 (包括真核) 生物产生的许多抗菌多肽在

防腐杀菌及医药方面的潜力,大力开发这些新型抗菌制剂不仅有重要应用价值,而且从分子水平上进一步研究和阐明各类抗菌多肽的作用机理、免疫机制、结构与功能,进而通过多肽工程(蛋白质工程)构建新的抗菌多肽或杂种细菌素,改进抗菌多肽的稳定性、溶解度、杀菌谱等具有理论意义。

参 考 文 献

[1] Nissen-Meyer J, Nes I F. Arch Microbiol, 1997, 167: 67~77.

[2] Sahl H G, Jack R W, Bierbaum G. Eur J Biochem, 1995, 230:827~853.

[3] Jack R W, Tagg J R, Ray B. Microbiol Reviews, 1995, 59:171~200.

[4] Hansen J N. Nisin and related antimicrobial peptide in: Strohl W R. ed. Biotechnology of Antibiotics, 1997, 82:437~470.

[5] Ingram L C. Biochem Biophys Acta, 1969, 184:

216~219.

- [6] Jack R, Gotz F, Jung G. Lantibiotics in: Rehm H J, Reed G. eds. Biotechnology, 1997, 7:323~370.
- [7] Kuipers O P, Beerthuyzen M M, Pascalle GGA *et al.* J Biol Chem, 1995, 270:27299~27304.
- [8] Siegers K, Entian K D. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:1082~1089.
- [9] Entian K D De Vos W M. Antonie van Leeuwenhoek, 1996, 69:109~117.
- [10] Graffe T, Rinatata H, Paulin L *et al.* in: Jung G, Sahl H G. eds. Nisin and Novel Antibiotics 1991, 260~268,
- [11] De Vos W M, Mulders J W M, Siezen R J *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, 59:213~218.
- [12] 还连栋, 贾士芳, 庄增辉等. 中国食品添加剂, 1997, 32: 20~23.
- [13] Saris P E J, Immonen T, Reis M *et al.* International J of General and Molecular Microbiol, 1996, 69: 151~159.