

## 细菌基因组序列中 $\epsilon$ -聚赖氨酸合成酶的生物信息学识别与分析

王静<sup>1</sup> 谭之磊<sup>2</sup> 毕德玺<sup>1</sup> 贾士儒<sup>2\*</sup> 欧竑宇<sup>1\*</sup>

(1. 上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 上海 200030)

(2. 天津科技大学 工业微生物教育部重点实验室 天津 300457)

**摘要:**【目的】 $\epsilon$ -聚赖氨酸的合成由  $\epsilon$ -聚赖氨酸合成酶(Pls)所控制, 考察 Pls 在细菌中的分布和保守的序列特征。【方法】基于 Pls 的作用机制, 在蛋白序列中识别与底物结合和缩合相关的结构域, 以及决定底物特异性的氨基酸残基, 进而在已测序基因组中预测 Pls。【结果】发现 110 个已测序的基因组中编码 113 个预测的 Pls, 主要分布在放线菌中, 也在两株革兰氏阴性菌中被发现。一些亲缘性较高菌株的 Pls 一致性较高。【结论】Pls 在放线菌中可能广泛分布。Pls 的腺苷化、巯基化和底物缩合结构域有相对较高的序列保守性, 而跨膜结构域和 Linker 区相对不保守。

**关键词:**  $\epsilon$ -聚赖氨酸,  $\epsilon$ -聚赖氨酸合成酶, 生物信息学识别

## *In silico* identification and analyses of $\epsilon$ -poly-L-lysine synthetases in bacterial genome sequences

WANG Jing<sup>1</sup> TAN Zhi-Lei<sup>2</sup> BI De-Xi<sup>1</sup> JIA Shi-Ru<sup>2\*</sup> OU Hong-Yu<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200030, China)

(2. Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** [Objective] The biosynthesis of  $\epsilon$ -poly-L-lysine is controlled by the  $\epsilon$ -poly-L-lysine synthetase. This paper aims to study the distribution and sequence features of Pls. [Methods] Pls proteins were predicted in the completely sequenced genomes via identification of the substrate-recognition and condensation domains and amino acid residues that determine the substrate specificity. [Results] One hundred and thirteen Pls were identified from 110 genomes, mostly distributed in Actinobacteria, with two identified in Gram-negative bacteria. Most Pls from closely related species display a high degree of identity. [Conclusion] Pls may be widely distributed in Actinobacteria. The adenylation, thiolation, and condensation domains of Pls are conserved while the transmembrane domains and linkers show otherwise.

**Keywords:**  $\epsilon$ -poly-L-lysine,  $\epsilon$ -poly-L-lysine synthetase, *In silico* identification

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31371261); 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD23B05)

\*通讯作者: 贾士儒: Tel: 86-22-60601598; 信箱: jiashiru@tust.edu.cn

欧竑宇: Tel: 86-21-62932943; 信箱: hyou@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-03-06; 接受日期: 2015-04-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-14

天然来源的防腐剂较化学合成防腐剂在安全性方面有较大优势,是食品产业研究的热点之一。其中, $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -Poly-L-lysine,  $\epsilon$ -PL)作为一种天然防腐剂,在抑菌范围、稳定性以及安全性等方面均有良好的表现,在多个国家已被应用到食品工业。 $\epsilon$ -PL 是一种由 L-赖氨酸单体在  $\alpha$ -羧基与  $\epsilon$ -氨基位置脱水缩合形成的同型单体聚合物,聚合度一般为 25–35。 $\epsilon$ -PL 带正电荷,能够与带负电荷的细胞膜发生静电反应,从而破坏细胞膜结构,阻止细胞的物质、信息以及能量的传递,最终导致微生物自溶以及死亡<sup>[1-2]</sup>。

$\epsilon$ -PL 最初是从白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)的培养过滤液中提取出来的<sup>[3]</sup>。Nishikawa 和 Ogawa 利用  $\epsilon$ -PL 带正电荷,能够与碱性或酸性染料发生作用的特性,开发了一种简单敏感的  $\epsilon$ -PL 产生菌筛选方法<sup>[4]</sup>。利用该方法,现已筛选得到更多的  $\epsilon$ -PL 产生菌<sup>[4-9]</sup>。但目前已知的  $\epsilon$ -PL 产生菌基本仅在链霉菌科(*Streptomycetaceae*)和麦角菌真菌(*Ergot fungi*)中发现,其中大部分属于链霉菌科<sup>[4-5]</sup>。目前,对 *S. albulus* NBRC 14147 中  $\epsilon$ -PL 合成的研究最为深入<sup>[10-12]</sup>。

$\epsilon$ -PL 的合成及聚合度控制是由  $\epsilon$ -PL 合成酶( $\epsilon$ -Poly-L-lysine synthetase, Pls)控制的<sup>[12]</sup>。Pls 是一种跨膜蛋白,是一种新的单一模块非核糖体肽合成酶(NRPS),具有类似氨基酸连接酶的活性,可以催化肽键的形成。基于 Pls 蛋白序列对酶的结构及功能进行预测,表明 Pls 的 N-端区域存在有 NRPS 中常见的腺苷化结构域(A 结构域)和巯基化结构域(T 结构域),其中 A 结构域中存在 10 个与底物特异性相关的氨基酸残基<sup>[12]</sup>。但是,与传统的 NRPS 不同,Pls 缺少一个对肽键的形成起重要作用的缩合结构域(C 结构域),也不具有催化产物释放、终止反应的 TE 结构域;取而代之的是,Pls 中存在 3 个串联的可溶性区域,均与传统的 NRPS 的 C 结构域存在相似性,相互之间也具有一定的相似性,它们共同负责底物的缩合<sup>[12]</sup>。这 3 个串联的结构域被依次定

义为 C1、C2 和 C3 结构域。另外,这 3 个结构域被 6 个跨膜结构域(TM 结构域)所包围,而连接相邻 TM 结构域的区域被叫做 Linker 区<sup>[12]</sup>。目前已报道的 Pls 序列并不多,Pls 的序列结构和保守性还有待于研究<sup>[5,7,9,12-13]</sup>。

传统  $\epsilon$ -PL 产生菌筛选方法工作量大、周期长、通量较低,所用染料存在一定毒性,而随着细菌已测序基因组数目的急剧增长,基于基因组序列挖掘  $\epsilon$ -PL 产生菌可作为一种新的选择。因此本文利用 Pls 的蛋白序列特征,开发了一种识别 Pls 的生物信息学方法,在已测序的细菌基因组序列中识别潜在的 Pls 基因;并对识别出的 Pls 进行了比较分析。本研究为  $\epsilon$ -PL 产生菌的筛选和改造提供了新的方法和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 基因组序列来源

细菌完全测序基因组和单独测序质粒的序列信息均从 NCBI 获取(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>)。完整测序基因数据组涵盖 2 769 个基因组,共包含 5 196 个复制子(2014 年 3 月 24 日下载)。单独测序质粒数据涵盖 2 274 个质粒(2014 年 4 月 1 日下载)。

### 1.2 Pls 的识别

从文献中收集已报道的 Pls 蛋白序列(表 1)作为参照(其中来自 *S. albulus* NBRC 14147、PD-1 和 CCRC 11814 的 Pls 蛋白序列完全一致,因此只选取 *S. albulus* NBRC 14147 的 Pls 作为代表)。本文未研究 *Ergot fungi* 中的 Pls。*S. albulus* NBRC 14147 的 Pls 研究比较深入,各结构域和 Linker 区在蛋白序列中的位置已知<sup>[12]</sup>,与其比较确定其他各参照 Pls 中 AT、C1、C2、C3 结构域的位置。Pls 的预测识别方法如图 1 所示。首先通过 BLASTp 查找基因组中的 Pls 同源蛋白,设定参数  $E\text{-value} \leq 0.001$ 。然后将同源蛋白分别与参照序列的 AT、C1、C2、C3 结构域序列进行 BLASTp 比对,设定参数  $E\text{-value} \leq 0.001$ 。最后将每个包含所有结构域的蛋白与参照序列通过 MUSCLE 软件<sup>[14]</sup>进行多序列比对,判断 A

表 1 已报道的 PIs 序列信息  
Table 1 Reported PIs sequences

菌株 Strains	DNA 序列编号 DNA number	PIs 蛋白编号 PIs number	聚合度 Polymerization degree	参考文献 Reference
<i>Streptomyces albulus</i> NBRC 14147	AB385841	BAG68864	25–35	[12]
<i>Streptomyces albulus</i> NK660	CP007574	AIA07462	19–33	[5-6]
<i>Streptomyces albulus</i> PD-1	AXDB00000000	EXU90606	NA	[9]
<i>Streptomyces albulus</i> CCRC 11814	AROY00000000	EPY92338	NA	[13]
<i>Streptomyces roseovorticillatus</i> MN-10	AB477240	BAH85292	20–30	[7]

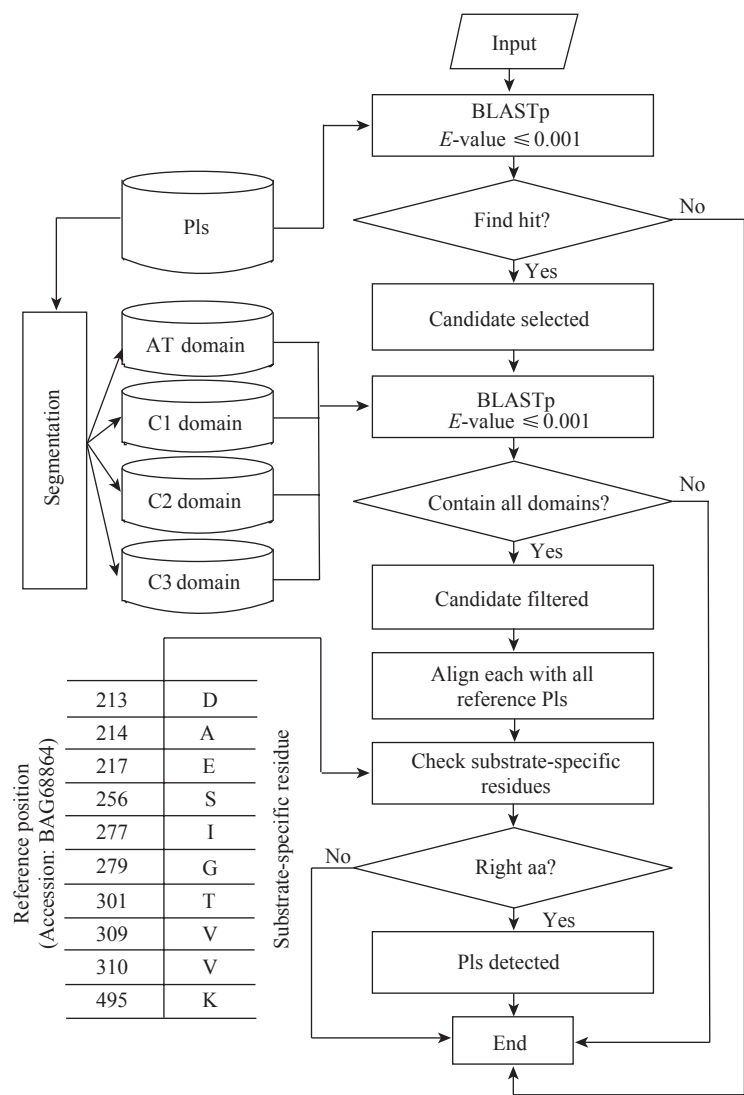


图 1 PIs 的预测识别方法  
Figure 1 PIs prediction approach

Note: aa: Amino acid.

结构域的相应位置是否存在与 L-赖氨酸底物特异性相关的氨基酸残基,进而判定是否为 Pls。决定底物特异性的氨基酸残基已在 NBRC 14147 的 Pls 中报道(图 1)<sup>[12]</sup>。对预测得到的 Pls,参考 *S. albulus* NBRC 14147 的 Pls,依据多序列比对结果提取其中的各结构域和 Linker 区的氨基酸序列。预测过程由 Perl 脚本实现。除以上提到的参数外,其他参数均为默认参数,本方法中的约束条件主要是基于 Pls 序列结构特征设定的,因此在其中的比对过程中选取了比较宽松的参数,以期望有较高敏感度。

### 1.3 蛋白序列分析

氨基酸序列的多序列比对由 MUSCLE 软件<sup>[14]</sup>完成,采用默认参数。系统发生树由 MEGA 5.0 软件<sup>[15]</sup>构建,采用临近相接(Neighbor-Joining)法,自展值设为 1 000。氨基酸序列中 Motif 查找由 MEME 软件<sup>[16]</sup>实现。结合多序列比对和 MEME 结果分析 Pls 蛋白中氨基酸残基的保守程度。

## 2 结果与分析

### 2.1 Pls 预测结果

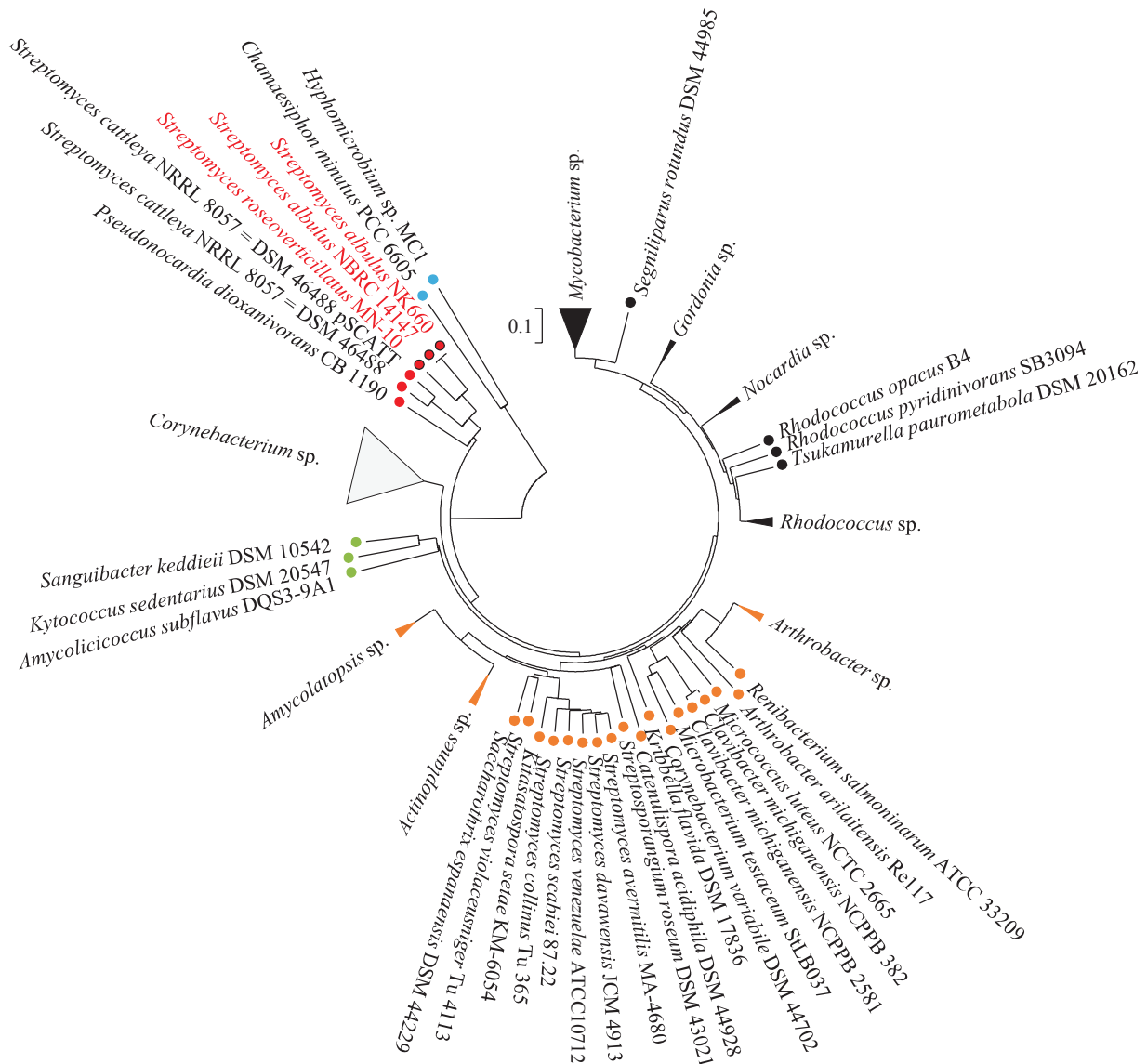
首先对已完整测序的 2 769 个基因组中的 5 169 个复制子进行了 Pls 预测,在 110 个基因组序列中预测出 113 个 Pls 编码基因,分布在 110 个染色体和 2 个质粒上 ([http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/pls\\_supporting\\_data.xlsx](http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/pls_supporting_data.xlsx)); 预测得到 Pls 与已知 Pls 的一致性分布在 30%~65%, AT、C1、C2、C3 结构域与已知相应结构域一致性也在类似范围。除 *Corynebacterium diphtheriae* HC04 的染色体编码 2 个 Pls (CDHC04\_1882 和 CDHC04\_1922)外,其余复制子均编码一个 Pls; 此外, *Rhodococcus opacus* B4 和 *Streptomyces cattleya* DSM 46488 (NRRL 8057) 中均含有 2 个 Pls 编码基因,分别位于染色体和一个质粒上。在单独测序的质粒中没有预测到 Pls 编码基因。预测得到的编码 Pls 的菌株主要属于放线菌,分布在 15 个科中,包括 Catenuisporaceae、Corynebacteriaceae、Gordoniaceae、Mycobacteriaceae、Nocardiaceae、Segniliparaceae、

Tsukamurellaceae、Dermacoccaceae、Microbacteriaceae、Micrococcaceae、Sanguibacteraceae、Micromonosporaceae、Nocardioidaceae、Pseudonocardiaceae 和 Streptomycetaceae,而在革兰氏阴性菌中也发现有 2 株菌编码 Pls,分别为 *Chamaesiphon minutus* PCC 6605 和 *Hyphomicrobium* sp. MC1。目前已报道的  $\epsilon$ -PL 产生菌,包括传统方法筛选到的  $\epsilon$ -PL 产生菌,在原核生物中均为 Streptomycetaceae<sup>[4-5,7,9,12]</sup>,而在其他科中鲜有报道<sup>[17]</sup>。本文在 Streptomycetaceae 也识别出 Pls 编码菌株,分别属于 *Streptomyces*、*Kitasatospora* 和 *Streptosporangium* 属。其中,与 *Streptomyces* 和 *Kitasatospora* 同属的菌株报道较多<sup>[4-8]</sup>。此外,本文发现含有预测的 Pls 的原核微生物还分布于放线菌其他多个科中。

本预测方法在序列相似性比对的基础上,进一步对底物识别结构域和对 Pls 特异的底物缩合结构域进行了识别,排除了一些同源的其他 NRPS; 进而对底物特异性进行了判定。本文方法中第一步 BLASTp 获得约 3.5 万个与 Pls 同源的蛋白,经过第二步对是否含有 AT、C1、C2、和 C3 结构域进行判定,获得约 200 个与 Pls 序列结构相似的蛋白,说明该步骤能够对候选蛋白进行有效过滤。进而对底物特异性进行判定,进行进一步过滤,最终获得 113 个预测的 Pls。说明该方法能够有效缩小候选蛋白范围。该方法基于  $\epsilon$ -PL 的合成机制,综合考虑了底物特异性识别、结合和缩合过程; 预测得到的 Pls 与已知的 Pls 均有较好的一致性,而且各结构域和 Linker 区的排布与已知的 Pls 均一致,因此可保证预测的准确性。但由于已知的  $\epsilon$ -PL 产生菌的基因组数据有限<sup>[6-7,9,12-13]</sup>,本研究预测方法的准确性还有待于验证,因此这些菌株是否为  $\epsilon$ -PL 产生菌还需进一步佐证,但该预测结果可为将来  $\epsilon$ -PL 产生菌的挖掘提供指导。而如果预测出的 Pls 不是专门用于合成  $\epsilon$ -PL 的酶,则有可能是参与其他合成代谢的与 L-赖氨酸缩合相关的酶,而它们的作用机制应该是类似的。

我们对预测得到的 Pls 和已知的 Pls 进行了进化分析,如图 2 所示。根据进化树结构,Pls 可大致分为 6 类。革兰氏阴性菌中发现的 Pls 与其他的均相隔较远。一些亲缘关系较近的菌株编码的 Pls 亲缘关系较高,多位于同一分支,例如

*Corynebacterium* 中的 Pls 位于一个独立分支。*Streptomyces* 中的一些 Pls 位于不同分支,但都由不同菌种编码。当前证据暗示 Pls 编码基因可能很少发生基因水平转移。在包含已知 Pls 的分支中,除 *Streptomyces* 中的 Pls 外,还包括 *Pseudonocardia dioxanivorans* CB 1190 中的 Pls,这也在一定程度暗



**Figure 2** Phylogenetic tree of the identified Pls

Note: The strain names in red and black-bordered red circles are for the reference PIs; The scale of the genetic distance is given; PIs proteins within a same clade are indicated using the same color.

示产生菌并不局限在 Streptomycineae。

此外,对 Pls 的 AT 结构域、C1 结构域、C2 结构域、C3 结构域进行进化分析(图 3),发现不同结构域的进化树与 Pls 的相比存在一定差异,AT 结构域的进化树与 Pls 的较为相似,而 3 个 C 结构域的则差异较大。一个 Pls 的 AT 结构域可能与一类 Pls 的相近,而 C 结构域却与另一类 Pls 的相近,这暗示 Pls 的结构域间可能存在模块进化<sup>[18]</sup>。

### 2.3 不同结构域序列的生物信息学比对

为探究 Pls 的序列特征,对其各结构域和 Linker 区进行了 Motif 识别和氨基酸多序列比对分析。Pls

的不同结构域在  $\epsilon$ -PL 的生物合成过程中分别发挥不同的功能,同时又互相协同作用完成  $\epsilon$ -PL 的合成。NRPS 含有活化氨基酸底物的 A 结构域以及通过磷酸泛酰巯基乙胺(4'-Phosphopantetheine, 4'-PP)臂结合氨酰-O-AMP 的 T 结构域<sup>[19-20]</sup>。在 Pls 中, A 结构域与底物特异性相关, L-赖氨酸在 A 结构域被识别并激活后转移至 T 结构域的 4'-PP 臂<sup>[12]</sup>。对预测得到的 Pls 的 AT 结构域进行了比较(图 4),发现 AT 结构域中存在较多的氨基酸保守序列。其中,除去与底物特异性相关的 10 个保守氨基酸和 4'-PP 结合位点(丝氨酸残基),该结构域中还存在 52 个高

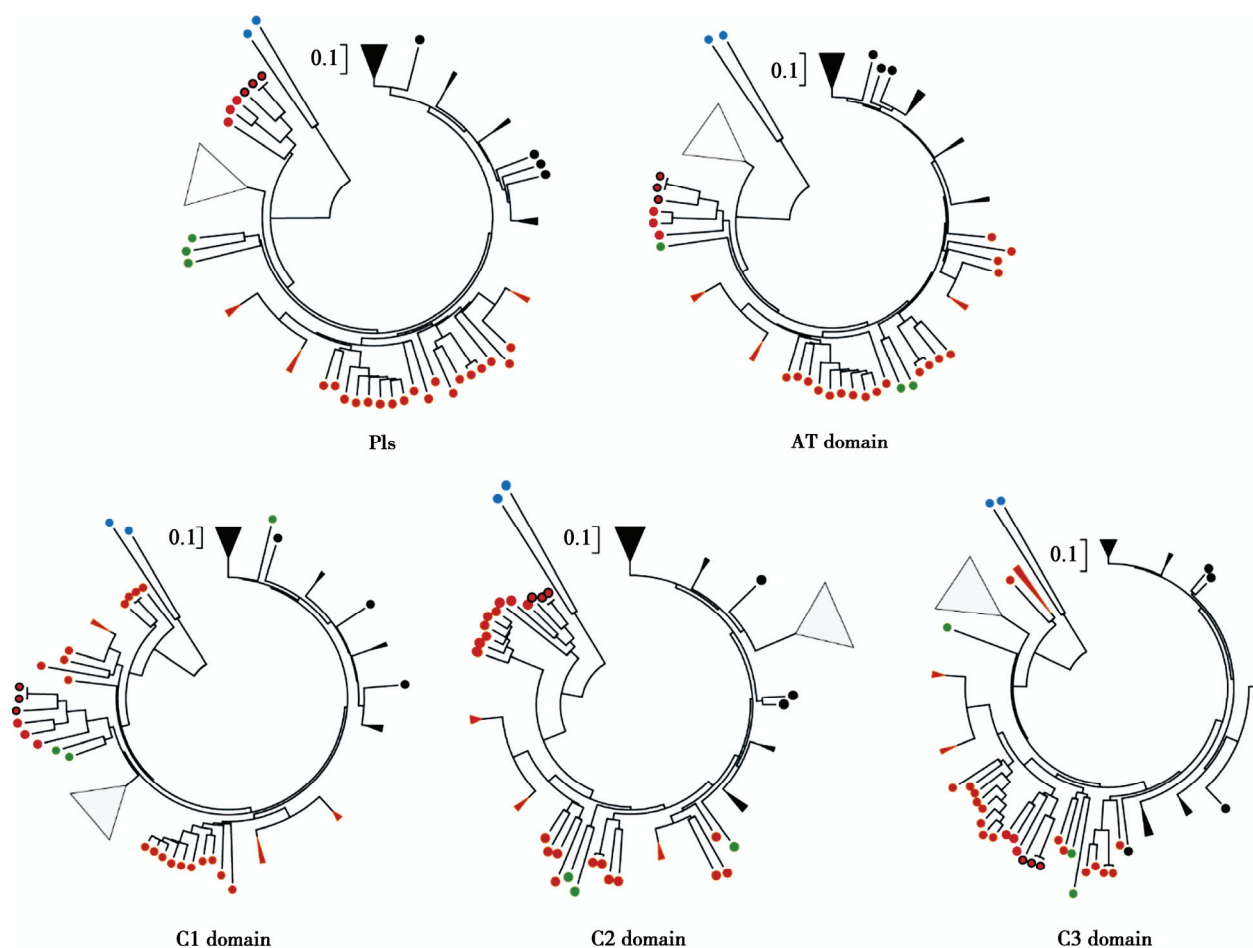


图 3 Pls 中 AT、C1、C2、C3 结构域的进化树

Figure 3 Phylogenetic trees of AT, C1, C2 and C3 domains

注:分支末端颜色表示该蛋白在 Pls 进化树中所处的分支;标尺表示遗传距离。

Note: The colors of circles and triangles in each tree are consistent with those in the tree of Pls; The scale of the genetic distance is given.



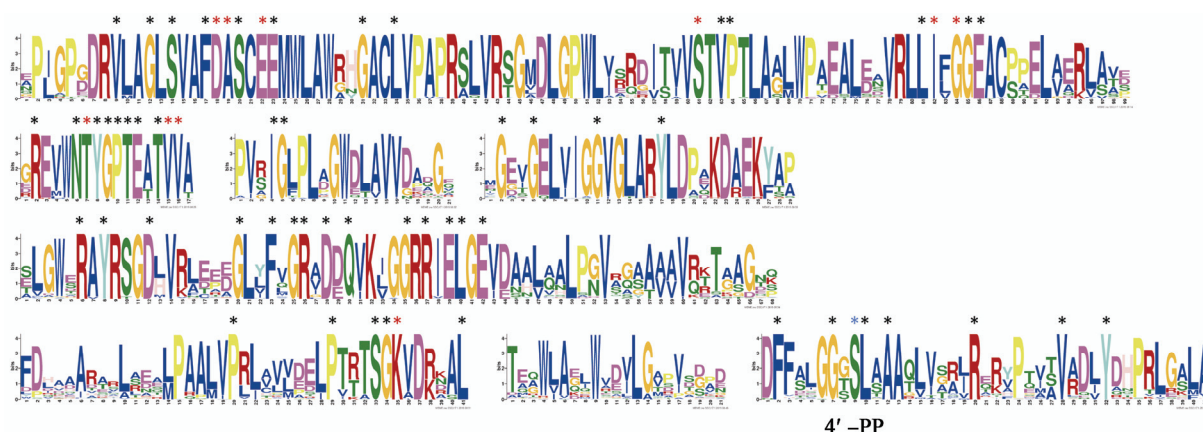


图 4 AT 结构域中保守的 Motif

Figure 4 Conserved motifs in the AT domain

注: 各 Motif 按顺序分开表示; 星号: 所有完全保守的氨基酸残基; 红色星号: 与底物特异性相关的氨基酸残基; 蓝色星号: 4'-PP 结合位点。

Note: Motifs are organized separately in order; A sterisks: Consensus residues; Red asterisks: The substrate-specific residues; Blue asterisks: The 4'-PP binding site.

度保守的氨基酸位点; 而且, 在这 52 个氨基酸残基中, 多数位于与底物特异性相关的氨基酸残基的附近, 猜测这些保守的氨基酸残基与 AT 结构域的功能相关。进而, 在比对结果的基础上, 可以考虑对特定的氨基酸位点进行功能研究, 并通过定点突变或置换进而改变对底物的结合效率。

游离的 L-赖氨酸单体作为延长单位被 Pls 中的 A 结构域腺苷化并转移至 T 结构域后, Pls 催化  $\epsilon$ -PL 合成的反应即开始; 之后游离的底物通过 3 个串联的 C 结构域——添加至延长单位上, 聚合反应不断进行; 因为 Pls 中没有终止结构域, 所以  $\epsilon$ -PL 的肽链不断延伸; 最终, 与 Pls 通过非共价键连接的聚合物通过溶解作用与合成酶脱离, 则获得了不同聚合度的  $\epsilon$ -PL<sup>[12]</sup>。对 C1、C2 和 C3 结构域进行了比较(图 5), 3 个结构域中均存在保守的 Motif, 但完全保守的氨基酸残基数目不同。其中 C1 结构域仅散落 5 个保守位点; 而 C2 和 C3 结构域中则相对较多, 并会有部分聚集在某一区域。这些保守的氨基酸残基可能在底物缩合过程中起到重要作用。另外, 3 个串联的 C 结构域虽然在序列以及结构上具有一定的相似性, 但我们发现它们并不具有类似的

氨基酸保守模式, 说明这 3 个结构域之间存在差异, 可能负责缩合过程中的不同功能。之前有研究通过构建不同 C 结构域的缺失突变株, 发现 3 个串联的 C 结构域必须同时存在才能够保证  $\epsilon$ -PL 的正常合成<sup>[12]</sup>, 这也与我们的推断相符。

同时, 对 Pls 的 TM 结构域(图 6)和 Linker 区(图 7)也进行了比较分析, 发现 TM 结构域和 Linker 区序列虽然并不保守, 但一些特定位置存在相对保守的氨基酸残基或几种出现频率较高的氨基酸残基。Pls 作为一种跨膜蛋白, 其结构较为复杂。纯化的 Pls 在体外仅能合成低聚合度  $\epsilon$ -PL, 而其空间结构是否决定聚合度的分布, 仍有待进一步的研究; 之前对  $\epsilon$ -PL 合成机制的研究推测 Pls 的 C 结构域控制赖氨酸单体的缩合以及聚合度的分布, 但具体的控制区域或氨基酸位点还没有能够确定<sup>[12]</sup>。近期对 *S. albulus* NBRC 14147 中 Pls 的随机突变研究表明, Linker 区对聚合度有贡献, 第 646 位的色氨酸、第 880 位的丝氨酸、第 883 位的亮氨酸以及第 886 位的丙氨酸的突变均会造成  $\epsilon$ -PL 聚合度的改变(聚合度变小)<sup>[10]</sup>。其中第 646 位的色氨酸残基位于连接 TM1 及 TM2 结构域的 Linker 1 区, 本研究表明在

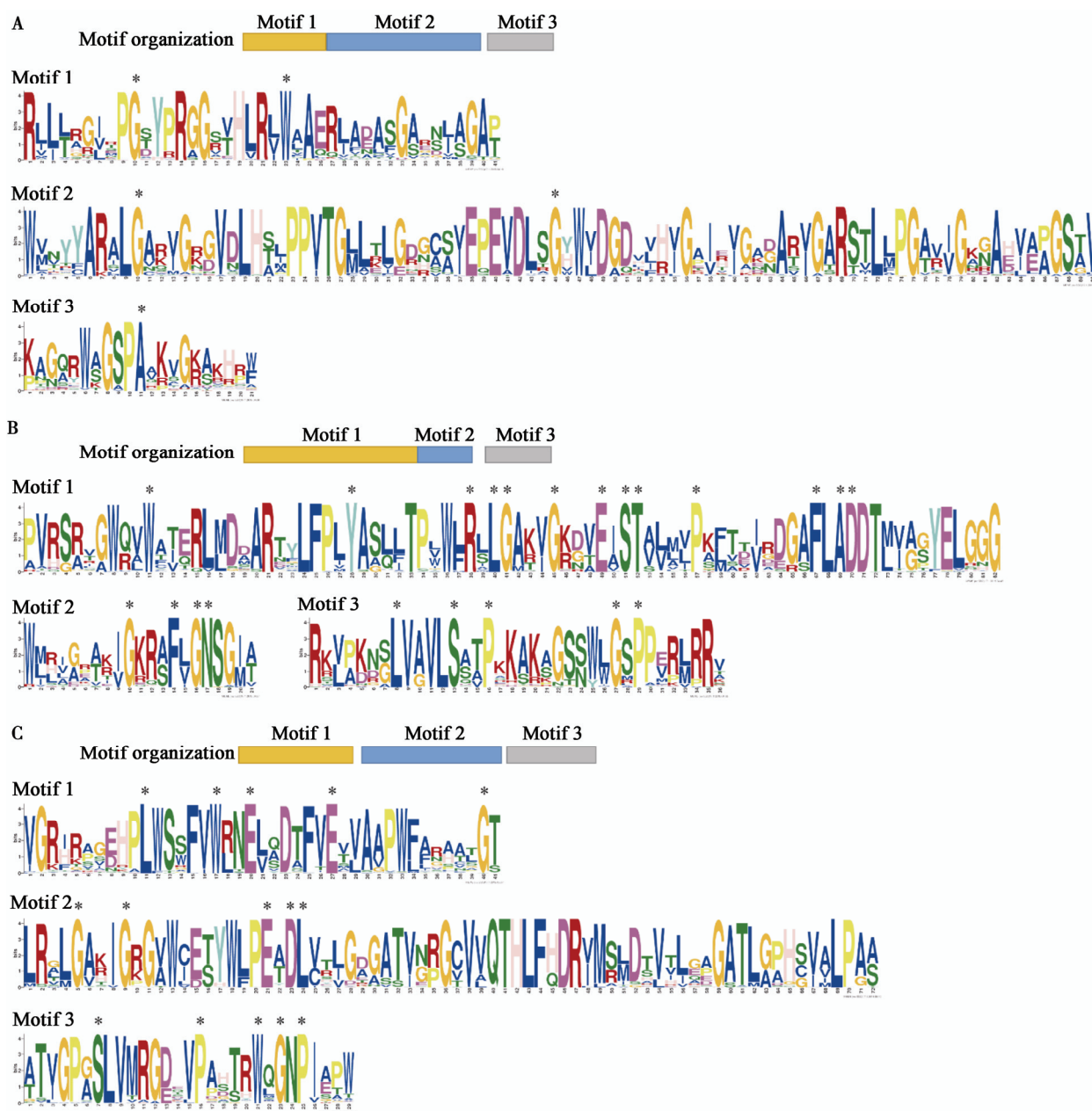


图 5 C1 (A)、C2 (B)、C3 (C)结构域中保守的 Motif

Figure 5 Conserved motifs in the C1 (A), C2 (B) and C3 (C) domains

注：各 Motif 按顺序分开表示；星号：所有完全保守的氨基酸残基。

Note: Motifs are organized separately in order; A sterisks: Consensus residues.

该位置上色氨酸是一种比较保守的残基，说明该位置对 Linker 1 区的功能比较重要，这也与随机突变研究结果相符。第 880 位的丝氨酸、883 位的亮氨酸以及 886 位的丙氨酸均位于连接 TM3 及 TM4 结构域的 Linker 2 区，这 3 个位点均存在几种出现频

率较高的残基，包括上述的氨基酸，这表明这些位点可能对氨基酸的保守性要求不高，而是具有一定选择性。这些位点上氨基酸残基的分布是否会对 Pls 的功能以及产物聚合度产生影响，值得进一步研究。除此之外，突变第 870 位的亮氨酸也会影响  $\epsilon$ -PL



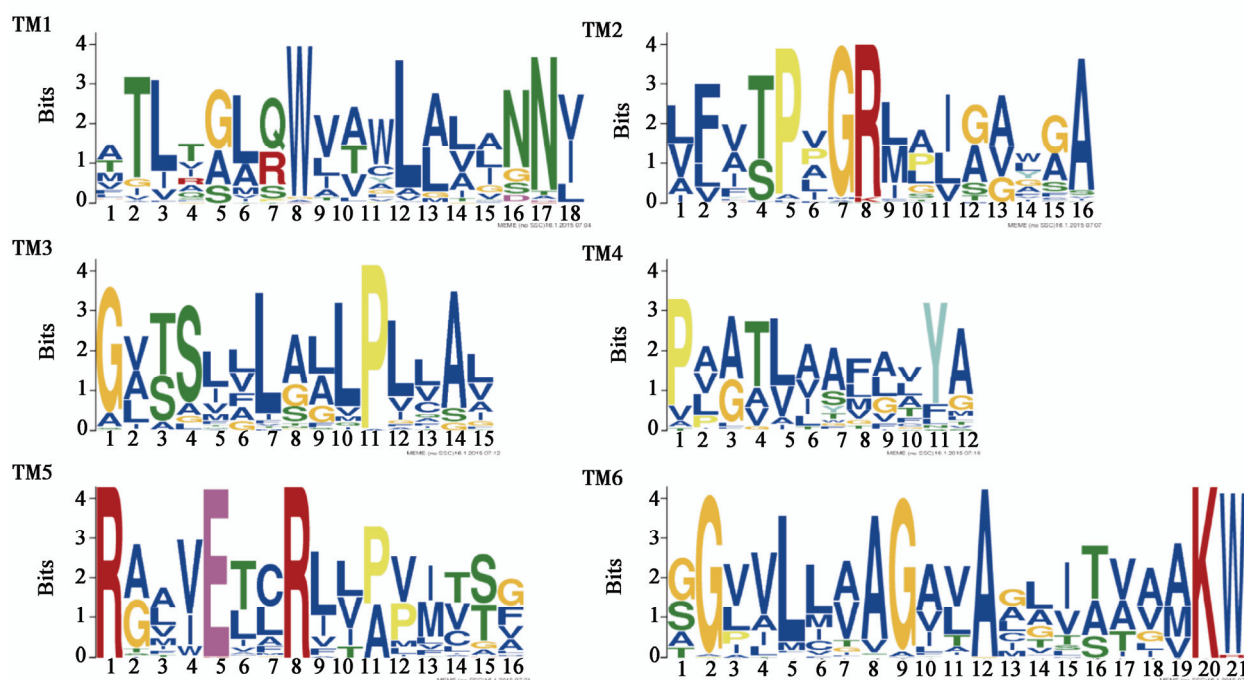


图 6 跨膜区氨基酸序列的保守程度

Figure 6 Amino acid conservation level of the transmembrane domains

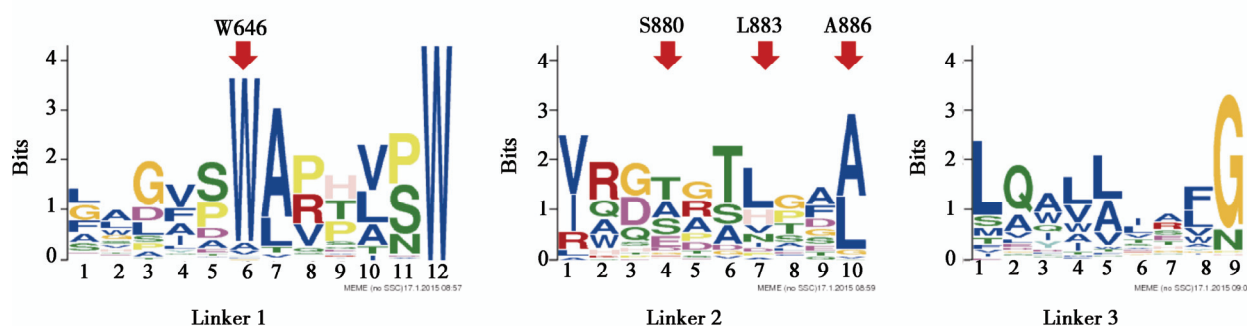


图 7 Linker 区氨基酸序列的保守程度

Figure 7 Amino acid conservation level of the linkers

注: 红色箭头标出 *S. albulus* NBRC 14147 的 Pls 在相应位置的氨基酸残基。

Note: Red arrows indicate the corresponding residues in the Pls of *S. albulus* NBRC 14147.

聚合度的分布, 与前几个位点不同, 该位点不位于 Linker 区, 而是位于非常靠近 Linker 2 区的 TM3 结构域内, 但本文并未发现该位点的氨基酸残基分布特征。另外, 连接 TM5 与 TM6 结构域的 Linker 3 区内的氨基酸位点的突变是否会影响  $\epsilon$ -PL 聚合度的改变, 目前还没有实验证明。同样地, 在另外 2 个

Linker 区内还存在其他相对保守的氨基酸位点, 也有待于研究。本文的不同位点上氨基酸分布结果为进一步探究 Linker 区对  $\epsilon$ -PL 聚合度分布的影响提供了数据基础, 今后研究可以具有针对性的选择氨基酸位点进行突变, 进一步验证与聚合度分布的相关性。

### 3 小结

PIs 控制  $\epsilon$ -PL 的合成及聚合度,但目前仅在 *S. albulus* NBRC 14147 中研究比较深入。而 PIs 在其他菌种中的分布和蛋白的序列特征研究较少。传统筛选  $\epsilon$ -PL 产生菌的方法具有一定局限性,因此本文开发了一种生物信息学方法对 PIs 进行预测。该方法基于 PIs 的作用机制,通过结构域识别和决定底物特异性氨基酸残基的辨别,综合考虑了底物特异性识别、结合和缩合过程。在全测序的细菌基因组序列中,在 110 个染色体和 2 个质粒上识别出 113 个 PIs 基因。预测得到的 PIs 与已知 PIs 具有较高相似性和结构域组成。虽然该方法有待于验证,但能够为产生菌的挖掘提供指导,而且随着基因组测序数据的增多,越来越多 PIs 将会得到识别。对预测得到的 PIs 进行比较分析发现,AT、C1、C2、C3 结构域比较保守;而 TM 结构域和 Linker 区则不保守,一些位点存在保守的氨基酸残基或有特定残基分布特征。在一些特定位点,不同氨基酸残基可能会对  $\epsilon$ -PL 的合成效率和聚合度产生影响,因此本文的结果可为 PIs 的定向改造提供思路。将来对 PIs 进行深入研究,可进一步加快通过基因工程改造  $\epsilon$ -PL 产生菌的研究进程。

### 参考文献

- [1] Hyldgaard M, Mygind T, Vad BS, et al. The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7758-7770
- [2] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, et al. Antimicrobial action of  $\epsilon$ -poly-L-lysine[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1984, 37(11): 1449-1455
- [3] Hamano Y. Occurrence, biosynthesis, biodegradation, and industrial and medical applications of a naturally occurring  $\epsilon$ -poly-L-lysine[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(7): 1226-1233
- [4] Nishikawa M, Ogawa K. Distribution of microbes producing antimicrobial  $\epsilon$ -poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7): 3575-3581
- [5] Geng WT, Yang C, Gu YY, et al. Cloning of epsilon-poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL) synthetase gene from a newly isolated  $\epsilon$ -PL-producing *Streptomyces albulus* NK660 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(2): 155-164
- [6] Gu YY, Yang C, Wang XM, et al. Genome sequence of the  $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing strain *Streptomyces albulus* NK660, isolated from soil in Gutian, Fujian province, China[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(3): e00532-14
- [7] Nishikawa M, Kobayashi K. *Streptomyces roseovorticillatus* produces two different poly(amino acid)s: lariat-shaped gamma-poly(L-glutamic acid) and epsilon-poly(L-lysine)[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 9): 2988-2993
- [8] Ouyang J, Xu H, Li S, et al. Production of  $\epsilon$ -poly-L-lysine by newly isolated *Kitasatospora* sp. PL6-3[J]. *Biotechnology Journal*, 2006, 1(12): 1459-1463
- [9] Xu Z, Xia J, Feng X, et al. Genome sequence of *Streptomyces albulus* PD-1, a productive strain for epsilon-poly-L-lysine and poly-L-diaminopropionic acid[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(2): e00297-14
- [10] Hamano Y, Kito N, Kita A, et al.  $\epsilon$ -poly-L-lysine peptide chain length regulated by the linkers connecting the transmembrane domains of  $\epsilon$ -poly-L-lysine synthetase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(16): 4993-5000
- [11] Yamanaka K, Kito N, Imokawa Y, et al. Mechanism of  $\epsilon$ -poly-L-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(17): 5669-5675
- [12] Yamanaka K, Maruyama C, Takagi H, et al.  $\epsilon$ -poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(12): 766-772
- [13] Dodd A, Swanevelder D, Featherston J, et al. Draft genome sequence of *Streptomyces albulus* strain CCRC 11814, an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-producing actinomycete[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(5): e00696-13
- [14] Edgar RC. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792-1797
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [16] Bailey TL, Boden M, Buske FA, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Suppl 2): W202-W208
- [17] El-Sersy NA, Abdelwahab AE, Abouelkhiir SS, et al. Antibacterial and anticancer activity of  $\epsilon$ -poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL) produced by a marine *Bacillus subtilis* sp.[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(5): 513-522
- [18] Rausch C, Hoof I, Weber T, et al. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7(1615): 1-15
- [19] Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis[J]. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2651-2674
- [20] Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. Nonribosomal peptides: from genes to products[J]. *Natural Product Reports*, 2003, 20(3): 275-287