

真核生物核糖体合成的抗菌多肽

那淑敏 还连栋

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

RIBOSOMALLY SYNTHESIZED ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRODUCED BY EUKARYOTES

Na Shumin Huan Liandong

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

关键词: 真核生物, 抗菌肽

中图分类号: Q516 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 01-0108-10

原核生物、植物、动物(包括脊椎动物和非脊椎动物)都可以产生由基因编码、核糖体合成的抗菌多肽^[1]。已知的核糖体合成的抗菌多肽大部分是最近十几年中鉴定的。80 年代初, Steiner^[2]及 Salsted 等人^[3]首次分离了昆虫的抗菌多肽 cecropin 和 defensins, 从此人们开始关注这类抗菌多肽, 研究了它们的遗传免疫性、寄主防御系统、膜蛋白的相互作用、蛋白的修饰和分泌等, 从而将这些抗菌多肽研制开发成有应用价值的食品添加剂和药物。原核生物产生的抗菌多肽(nisin)早已广泛应用于食品的防腐保鲜并正在开发它在医药上的作用^[4]。国内对 nisin 的研究和开发始于 80 年代末期, 并已用于食品工业。某些真核生物产生的抗菌多肽也已显示它在医药上的功能, 例如青蛙皮肤产生的抗菌多肽已用以治疗皮肤感染^[5], 特别是某些蛙类皮肤产生的抗菌多肽经浓缩后能杀死各种肿瘤细胞(包括对老鼠恶性黑色素瘤和卵巢癌细胞), 有作为抗癌剂的潜力^[5], 而使用浓度只是杀死正常细胞的十分之一。某些真核生物产生的抗菌多肽, 如 magainins 和 defensins 等具有抗革兰氏阳性菌、阴性菌、分枝杆菌、真菌、包被病毒、原生动物的能力, 具有深入研究的价值; 某些抗菌多肽含有 D-氨基酸, 为研究 D-氨基酸如何在核糖体上合成多肽提供了理想的模式体系^[6]。

真核生物产生的抗菌多肽虽然种类繁多, 但结构上有下列三种类型: (1)多肽中富含 1-2 种氨基酸, 通常是脯氨酸; (2)含有二硫键以稳定 β -折叠结构; (3)有亲水脂区域并形成 α -螺旋。下面将部分真核生物产生的几种典型的抗菌多肽的产生、结构、分类、性质、氨基酸序列、生物合成、作用方式等进行讨论。

1 哺乳动物产生的抗菌多肽

不同来源的抗菌多肽表达方式不同。在哺乳动物中, 抗菌多肽以吞噬细胞和粘膜上皮细胞表达。它们主要产生两类抗菌多肽: (1)细胞产生的广谱 defensins(含有 28~45 个氨基酸), 它们是遗传免疫的效应物, 微克分子浓度的 defensins 就能杀死革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、肿瘤细胞和其它包被病毒。有些 defensins 在组织培养基中能中和 I 型 simplex 病毒(HSV), 现已报道了多种真核生物阳离子抗菌肽的结构分类、氨基酸序列及其作用, 而哺乳动物 defensins HNP-3 是迄今唯一探明了三维晶体结构的抗

作者简介: 那淑敏(1939-), 女(满族), 北京市人, 中国科学院微生物研究所高级工程师。主要从事微生物遗传学研究工作

收稿日期: 1998-12-09, **修回日期:** 1999-03-24

菌肽^[7]。核磁共振和结晶学的研究表明, defensins 以非共价结合成二聚体。通过带正电的精氨酸与靶细胞静电吸引开始渗透靶细胞膜, 然后疏水的多肽通过跨膜电位吸附到细胞膜上, 几个二聚体或单体形成跨膜孔洞, 孔洞直径为 25Å。(2) 另一类是序列、结构和氨基酸数目极不相同的一组抗菌多肽, 但有共同的 N 末端序列, 而且保守的原肽区与疏基蛋白酶抑制剂 Cathelin 同源[8]。微克分子浓度的这类多肽即能杀死革兰氏阳性菌和阴性菌。它们虽然一级结构有差异, 但全部富含碱性氨基酸精氨酸和赖氨酸。编码这类抗菌多肽的基因具有相似的结构。

2 植物产生的抗菌多肽 - defensins

植物产生的 defensin 是 Mendez 及其同事^[9]于 1990 年从小麦、大麦粒中首先分离得到。现已从不同单子叶植物和双子叶植物种子中分离或者通过 cDNA 的序列, 分析鉴定了与 r-thionins 同源的蛋白。比较了分离自 7 个不同植物科, 13 个不同种的 14 种有代表性植物的 defensins 的氨基酸序列^[10], 它们具有明显的共同特征: 有 45~54 个氨基酸残基, 并带有正电荷, 具有清楚但相对有限的序列保守性。保守的残基仅在 8 个半胱氨酸、在 13 和 34 位上的二个甘氨酸、第 11 位的芳香族残基和第 29 位的谷氨酸上。近年来, 从果蝇分离到一种病原菌诱导的抗菌多肽 drosomycin, 与植物 defensins RS-AFP1 有 38% 的序列同源性^[9]。与植物 defensin 保守序列相似, 暗示 drosomycin 分享植物 defensin 所有结构性质。用 NMR 光谱测定了分别来自小麦、大麦和小萝卜种子的植物 defensins r1-P 和 r-1H 和 RS-AFP1 的三维结构, 发现与动物 defensins 极其相似^[11]。

微克分子浓度的植物 defensins 就可作为广谱的抗真菌生长的抑制剂。根据它们处理后引起的形态变化可将其分为二类: 一类是减慢真菌菌丝体伸长并增加菌丝体分叉。另一类是虽减缓菌丝体生长, 但不引起大的形态变化。这两类植物 defensins 抗真菌谱也不相同。第三类植物 defensins 是从小麦、大麦和高粱种子中分离的 r1-H、Sial-3, 因能抑制昆虫和人类的 α -淀粉酶, 故称这些植物 defensins 为“ α -淀粉酶”抑制剂型。

在结构和功能上, 植物 defensins 与昆虫和哺乳动物的 defensins 相似。但植物 defensins 对大部分细菌无抑制活性。迄今为止, 大部分植物 defensins 是从植物种子分离获得。它们可保护植物组织和种子不受真菌病原菌侵害, 但对人类和植物细胞的生命力没有影响。为了更直接观察植物 defensins 控制真菌病原菌的能力, 已构建含有植物 defensins 前原蛋白基因的转基因植物, 并证明它的抗病能力比非转基因植物大大提高。

3 蛙类皮肤产生的抗菌多肽

magainins(含 21~27 个氨基酸残基)是爪蟾产生的一类碱性无半胱氨酸的抗菌多肽, 于 1987 年由 Zasloff 发现。最初从蛙皮肤后来从蛙胃中发现。其后, 另一种 magainins 类新肽 PGLa 也从这种蛙的胃中分离到。微克分子浓度的 magainins 能杀死革兰氏阳性、阴性细菌、真菌和原生动物, 甚至真核的肿瘤细胞, 但它们不伤害体细胞或红细胞。最近对 magainins 与磷脂双分子层相互作用的研究表明, 几个 magainins 分子形成一束(可能是 5 个)跨膜螺旋, 并通过桶板机制在细胞膜上瞬时形成孔洞。膜脂是主要的靶。不同种类的蛙可以产生多种抗菌多肽, 它们既无序列相似性又与 magainins 不同。但从不同 Rana 种蛙中分离的抗菌多肽, 都有一个共同的 Rana 区(Rana box): N-末端有涉及膜通透性的亲水脂 α -螺旋, C-末端有二硫键相连的两个半胱氨酸残基。最近从林栖蛙的皮肤中分离到一种新的抗菌多肽, 称为 dermaseptin I^[12], 它是 34 个氨基酸残基组成的阳离子亲水脂多肽, 对不同的致病微生物包括细菌、酵母、原生动物和丝状真菌都有抑制活性。已有的研究表明, 两栖动物的皮肤是抗菌多肽丰富的来源, 它们在医治肿瘤和癌症方面的潜力已引起人们的广泛注意。美国马盖宁制药公司于 1987 年开始致力于 magainins 的商业性研制, 现已开发出 2 种新型 magainins, 并进入 II 期、III 期临床试验。

4 昆虫产生的抗菌多肽

昆虫产生的抗菌多肽是昆虫免疫的效应物。创伤或暴露于细菌组分脂多糖可诱发昆虫的细胞和脂

肪体在瞬时分泌微克分子浓度就能杀死细菌的不同多肽。这些抗菌多肽的合成类似于哺乳动物中的免疫应答和急性免疫应答,与哺乳动物中编码免疫和急性反应蛋白基因的表达调控相似。昆虫的抗菌多肽也是阳离子分子,大致分为四类:第一类是 cecropin(31-39Aa),由鳞翅目和双翅目昆虫产生。第二类是昆虫 defensins(38-43Aa)。其结构与动物和某些植物的 defensin 相似,分布广泛,至今已在双翅目、鞘翅目、膜翅目、半支翅目和蜻翅目中发现,主要杀死革兰氏阳性菌,但它们不伤害红细胞。昆虫 defensins 不在吞噬细胞中作用,而是分泌到受感染昆虫的血液中。最近从果蝇属中分离的抗菌多肽 drosomycin 有 38% 的氨基酸序列与植物 defensins 相似,表明与植物多肽的进化关系,以及 drosomycin 可能是昆虫 defensins 类的多肽^[1]。第三类与某些哺乳动物的抗菌多肽(如 R39, Bac5, Bac7)相似,是 2~4kD 富含脯氨酸或精氨酸的多肽。主要抑制革兰氏阴性菌,作用模式不清。第四类是分子量大于 8~30kD 富含甘氨酸的蛋白。这些大肽与 attacin 总科的成员相互关系较远。

用基因工程方法将真核生物产生的抗菌肽导入作物并得到表达,以达到抗病的目的,是当前国内外研究的热点。Florack 及 During 等分别进行 cecropin B 的转基因烟草及转基因马铃薯的研究工作^[13]。国内也已研究出抗烟草花叶病毒的转基因烟草及抗棉铃虫的转基因棉花。中国农业科学院生物技术中心贾士荣等^[13]自 1986 年开始选定昆虫(蚕)细胞产生的抗菌肽 cecropin 进行马铃薯抗青枯病基因工程的研究,改造并合成了比 cecropin 抗菌能力更强的 cecropin B、m cecropin B、m * cecropin B、Shiva A 及 WHD 等抗菌肽基因并导入我国七个马铃薯栽培品种中,转化出 1050 个转基因株系,通过田间试验,筛选出 3 个株系,其抗病性比起始品种提高 1~3 级。除了马铃薯外,他们还试图将抗菌肽转至水稻、大白菜、蕃茄、柑桔和樱桃等作物。

综上所述,动物中产生的抗菌多肽在遗传免疫中被认为是一种关键的效应物。对早期防御微生物的侵害特别重要。Boman 指出^[14],抗菌多肽(包括细菌产生的细菌素)是一种理想的一线防御物。假定肽键形成速率不变,多肽比蛋白(如免疫蛋白)产生快 100 倍,而且比大的蛋白和免疫细胞扩散更快。

参 考 文 献

- [1] Nissen-Meyer J, Nes I F. *Arch Microbiol*, 1997, **167**:67~77.
- [2] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. *Nature*, 1981, **292**:246~248.
- [3] Selsted M E, Brown D M, Delange R J, et al. *J Biol Chem*, 1983, **258**:14485~14489.
- [4] Hansen J N. Nisin and related antimicrobial peptides. In: Strol W R. ed. *Biotechnology of Antibiotics*, Marcel Dekker Inc. 1997, **82**(15):437~470.
- [5] Jacob L, Zasloff M. Potential therapeutic application of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. In: Baman H G. ed. *Antimicrobial peptides*. New York: Wiley, 1994. 197~223.
- [6] Mignogna G, Simmaco R, Kreil G, et al. *EMBO J*, 1993, **12**:4829~4832.
- [7] Hancock R E W. Cationic peptides. In: Strol W R. ed. *Biotechnology of Antibiotics*. Marcel Dekker Inc. 1997, **82**:471~496.
- [8] Zanetti M, Gennaro R, Romeo D, et al. *FEBS Lett*, 1995, **374**:1~5.
- [9] Mendez E, Moreno A, Collila F, et al. *Eur J Biochem*, 1990, **194**:533~539.
- [10] Broekaert W F, Terras F R G, Cammue B P A, et al. *Plant Physiol*, 1995, **108**:1353~1358.
- [11] Fehlbauer P, Bulet P, Michaut L, et al. *J Biol Chem*, 1994, **269**:33159~33163.
- [12] Mor A, Nicolas P. *Eur J Biochem*, 1994, **219**:145~154.
- [13] 贾士荣,屈贤铭. 马铃薯抗菌肽基因工程. 北京:中国农业科学出版社,1996. 1~30.
- [14] Boman H G. *Annu Rev Immunol*, 1995, **13**:61~92.