

变溶菌素 (Mutanolysin) 研究历史和发展前景

刘同军 徐文琳 张玉臻

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

HISTORY AND PROSPECTS OF THE RESEARCH ON MUTANOLYSIN

Liu Tongjun Xu Wenlin Zhang Yuzhen

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

关键词:变溶菌素,溶菌酶,龋病预防,作用机制

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 0001-6209 (2000) 02-0224-27

变溶菌素 (Mutanolysin) 是由球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*) 的培养液制备的由多种不同溶菌酶组成的粗酶液。这种溶菌酶群在防治龋齿、从细菌细胞壁制取免疫活性物质等方面及一些科研领域有着良好的应用前景,其研究越来越受到广泛重视。

1 变溶菌素的研究历史

变溶菌素的研究历史与龋病的防治有着密切的关系。

龋病是发生在牙齿硬组织的慢性细菌性疾病,是口腔最常见的疾病之一。在世界范围内它的发病率非常高,严重危害着人类健康,因而被世界卫生组织 (WHO) 列为第三位重点防治的疾病。在龋病病因学研究中,致龋菌的研究一直是主要课题之一。早在 1924 年 Clark 就从龋蚀材料中分离出一株变形链球菌 (*Streptococcus mutans*), 但当时并未引起应有的重视。直至六十年代中期变形链球菌才被公认为是重要的致龋菌,并已证明,他有助于形成由胞外葡聚糖组成的牙菌斑。实验表明在动物口腔中接入 *S. mutans* 并保持高蔗糖含量 (约 2/3) 的食物, *S. mutans* 就能引发龋病的形成。这是因为 *S. mutans* 能利用蔗糖产生有粘性的水不溶性的葡聚糖,而使 *S. mutans* 群集在牙齿表面,产生大量的酸性物质而腐蚀牙齿。

1972 年,日本科学家 Yokogawa^[1] 等人从土壤中分离出一株 *S. globisporus*, 其培养过滤液 (变溶菌素) 能迅速溶解从鼠类及人类龋齿中分离出的 *S. mutans* 等致龋链球菌,作用显著。他们随后的工作显示,变溶菌素是一种较抗生素、洗必太等更为切实有效的龋病预防制剂。

变溶菌素在国外特别是日本、美国和德国研究开发较早^[1-3], 而在我国则起步较晚。目前为止,依据文献资料,国内只有山东大学微生物所在做这方面的工作^[4-5]。国内外对变溶菌素的研究主要集中在产生条件优化、分离纯化及其主要生化特性、作用机理等方面。

2 变溶菌素的主要用途

变溶菌素被寄希望能成为一种非常有效的牙菌斑控制制剂,这是因为:(1)、它对变形链球菌 (*S.*

作者简介:刘同军(1971-),男,山东泰安人,山东大学微生物系 98 级在读博士生,主要从事微生物技术方面的工作

收稿日期:1999-05-04,修回日期:1999-09-08

mutans)、血液链球菌(*S. sanguis*)、唾液链球菌(*S. salivarius*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*)等致龋菌的活体细胞有溶解杀死作用;(2)、其最适作用 pH 为酸性,在人类唾液中有活性;(3)、人类唾液中所含的 Ca^{2+} 离子可以激活该酶;(4)、不会引起不可忍受的副作用如腹泻,因为它在酸性 pH 值的胃液中会失活,并在蛋白酶的作用下,进一步分解为肽或氨基酸,不会破坏消化道菌群平衡;(5)、对某些具有抗生素抗性的链球菌有活性。因此,变溶菌素在控制龋病方面还是很有实际作用的。

随着对变溶菌素研究工作的深入,变溶菌素的用途越来越广泛^[6-12],已不仅仅局限于作为一种牙菌斑控制制剂。

由于卵清溶菌酶的溶菌谱有限,许多研究者转而从微生物产生的溶菌酶来替代卵清溶菌酶以获取细菌细胞壁和质膜的结构与免疫化学特性信息^[13]。变溶菌素和溶葡萄球菌素(Lysostaphin)就是两个比较典型的例子。变溶菌素作为一种溶菌酶群,它也有卵清溶菌酶所具有的用途。此外,还具有重要的学术价值。它可以作为工具酶制备原生质体,用来研究细胞的胞内组成,作为辅助工具用来研究其它一些溶菌酶的作用机制^[14]。

M1、M2(EC 3.2.1.17)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(EC 3.5.1.18)和 AM₃-内肽酶是从变溶菌素中分离得到的四种主要溶菌酶,并且都已被纯化至电泳纯。M1 可用来作为细菌细胞壁结构研究和从细菌细胞壁制备特殊种类的抗原、质粒 DNA、天然微生物蛋白和原生质体的有力工具^[15]。细菌细胞壁含有多种生理活性物质,利用 M1 分解植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和 *S. mutans* 细胞壁所得肽聚糖有极强的免疫佐剂活性。所以变溶菌素可以作为从细菌细胞壁选择性地制备生理活性材料的理想制剂。

利用 M1 和 AM₃-内肽酶的联合催化作用可以特异地切断肽聚糖分子中的 A₂pm(D-丙氨酸-(D)-2,6-二氨基庚二酸)连键。1984 年 Kawata 等人^[16]从 *L. plantarum* ATCC 8041 的细胞壁水解液中制备了双糖并偶联合成四种含有内消旋-A₂pm 的三肽、四肽。用酶学和化学分析方法鉴定这几化合物的结构分别是:β-N-乙酰葡萄糖胺-(1→4)-N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-(L)-内消旋-2,6-二氨基庚二酸-(D)-酰胺(GMP₃-A)、β-N-乙酰葡萄糖胺-(1→4)-N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-(L)-内消旋-2,6-二氨基庚二酸-(D)-酰胺-(L)-D-丙氨酸(GMP₄-A)、β-N-乙酰葡萄糖胺-(1→4)-N,6-O-二乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-(L)-内消旋-2,6-二氨基庚二酸-(D)-酰胺(GMP₃-B)、β-N-乙酰葡萄糖胺-(1→4)-N,6-O-二乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰-(L)-内消旋-2,6-二氨基庚二酸-(D)-酰胺-(L)-D-丙氨酸(GMP₄-B)。同时这些双糖对肉瘤-180 有抗癌作用,并且对抗体的形成有极强的辅助活性。MDP(胞壁酰二肽)是微生物细胞壁肽聚糖中具有免疫佐剂活性的最小结构单元,它对生物降解作用有抵抗力,易溶于水,可口服,无副作用,并能增强机体免疫功能、提高疫苗的接种效果。所以,含有内消旋-A₂pm 的二糖肽看来是一种更吸引人的有免疫活性的化合物。但是,由于这些化合物结构复杂,很难用化学合成的方法来制备,所以一直未见相关的报道。

3 变溶菌素的部分性质及作用机理

细菌细胞壁溶解酶可根据它们对细菌细胞壁基本结构的作用机制而分为三类。最常见的是 N-乙酰胞壁酰酰胺酶(N-Acetylmuramidase),它作用于 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β-1,4 糖苷键。另外还有内肽酶(Endopeptidase),能断裂肽键;N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(MurNAC-L-Ala amidase)能水解聚糖和肽之间的酰胺键。变溶菌素的几个主要组分属于以上三类溶菌酶。变溶菌素的活性往往要高于其任何一个单一纯组分,就是因为这些酶相互之间有协同效应,它们可以破坏肽聚糖结构而使细胞对机械作用更敏感。

3.1 M1 和 M2

M1 和 M2 是变溶菌素各组分中研究得最早及了解最为详细的两种溶菌酶。编码 M1 的基因已经

被克隆,而且其核苷酸序列已被测定^[2]。根据对这两种酶消化 *S. mutans* BHT 肽聚糖的 N-末端氨基酸序列及氨基酸组成分析可知它们都是 N-乙酰胞壁酸酰胺酶。它们有很多性质类似于卵清溶菌酶,例如:对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和所有测试的革兰氏阳性菌不起作用;呈现出葡聚糖酶活性;由碱性蛋白质组成;且溴替丁二酰亚胺(N-bromosuccinimide)可使之失活。溴替丁二酰亚胺对 M1 和 M2 的抑制作用显示,同卵清溶菌酶一样,在酶的活性中心含有色氨酸残基。这个结论也被另一个实验结果所证实:当用不同浓度的溴替丁二酰亚胺处理这两种酶液时,其紫外吸收光谱会发生变化,在 280nm 左右的最大光吸收消失了。但是 M1 和 M2 与卵清溶菌酶有很大一点不同,那就是 M1 和 M2 可以溶解 *S. mutans* 的活体细胞或细胞壁,但卵清溶菌酶对这些菌株却不起作用。M1 和 M2 之间有很多共同点,如都不能被 SDS 分离成亚单位,但这两种酶在生理及免疫学特性方面有极大的不同:M1 的分子量为 20000,是由 186 个氨基酸残基组成的,其中有 2 个半胱氨酸残基,M2 的分子量为 11000,是由 99 个氨基酸残基组成的,不含半胱氨酸;M1 的活性较 M2 更容易受离子强度的影响。变溶菌素对 *S. mutans* 的溶菌活性主要是 M1 的贡献。原因之一是 M2 较 M1 对 *S. mutans* 有较小的特异性,而 M2 则对溶壁微球菌(*Microcococcus lysodeikticus*)有很强的溶菌活性。

M. lysodeikticus 的细胞壁之所以对 M2 有较大的敏感性,主要是因为该细胞壁中含有糖醛酸磷壁质这种特殊的结构。如果细胞壁的肽聚糖部分含有鼠李糖聚合物或 O-乙酰基团,则 M2 的酶活性将有很大的降低。如果用热甲酰胺或碱处理去掉鼠李糖聚合物或 O-乙酰基团,或肽聚糖部分胞壁酸残基被含有丙氨酸、异谷氨酰胺和赖氨酸的肽取代后,*S. mutans* BHT 和 *S. aureus* 就会变得对 M2 敏感。因此细胞壁中肽聚糖上的 N-乙酰胞壁酸中的 6-位取代作用对 M2 的水解活性有直接影响。

与 M2 相比,M1 的水解活性较少地受 O-乙酰基团和磷酸二酯(键)的影响,这也是 M1 较 M2 有较广溶菌谱的原因之一。M2 更类似于卵清溶菌酶,因为它们对聚糖的 O-乙酰化或特殊结构的取代溶解困难,然而 M2 将聚糖从肽上的分离机制明显不同于卵清溶菌酶。目前为止,还没有象 M2 作用模式的酶被报道。M1 的活性并不依赖 O-乙酰基团的存在似乎与 *Streptomyces albus* G 的酶 F₁ 和酶 32 等 N-乙酰胞壁酸酶及 *Chalaropsis* B 酶等 N,O-二乙酰胞壁酸酶一致。当胞壁酸残基被含有丙氨酸、异谷氨酰胺和赖氨酸的肽取代后,这两种酶的活性都会有所提高。

3.2 AM₃-内肽酶^[17]

从变溶菌素分解 *L. plantarum* 的细胞壁形成的片段 N-末端及 C-末端氨基酸分析得出,变溶菌素中含有一种能特异性切断 A₂pm 连键的 AM₃-内肽酶。类似的酶早已从 *Streptomyces* L₃ 和 *S. albus* G 培养液中分得(分别为 L₃-内肽酶和 KM-内肽酶)。AM₃-内肽酶的分子量为 13500,等电点为 pH9.0,最适作用 pH 为 8.5,在 pH8.0~pH9.0 之间稳定。Co²⁺ 和 Ca²⁺ 可以激活该酶,而 Zn²⁺、Cu²⁺ 和 EDTA 对其没有抑制作用。这种酶不受 β-内酰胺类抗生素和万古霉素的影响。这些结果显示 AM₃-内肽酶不同于 L₃-内肽酶。AM₃-内肽酶与 DD-羧肽酶的作用机理一样,能催化水解 D-丙氨酸-D-氨基酸键的反应。但是根据对底物亲和力的比较,可以将 AM₃-内肽酶和 *S. albus* G 的 DD-羧肽酶区别开。

3.3 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶^[18]

N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶的分子量为 18500,等电点为 pH6.6,当 pH 值为 6.0、温度低于 50℃ 时,该酶比较稳定。Cu²⁺ 对其酶活性有抑制作用,而 K⁺、Na⁺、Li⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Mn²⁺ 和 EDTA 对其并没有影响。就其本身而论,它并不溶菌,因为它要依赖于己糖酶的前期反应。N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶的活性主要受精链长度影响,而不是肽聚糖中肽的大小。小分子量底物比大分子量底物更适合于这种酶,而且这种酶对底物结构的要求相对较低。

从变溶菌素中分离出的这种酶对各种底物的水解模式不同于从细菌中提出的该类酶。酰胺酶在很多重要的生理现象中扮演一个很关键的角色^[19]。但截止目前,只有很少的几篇有关从链霉菌属制备酰胺酶的报道。

4 变溶菌素研究前景及展望

DD-羧肽酶与细菌细胞壁合成过程的最后一步有密切关系,并对 β -内酰胺类抗生素敏感,但是 AM_3 -内肽酶即使对过量的这类抗生素也不敏感,说明它不能识别该类抗生素的结构模型。然而球孢链霉菌的生长很明显地要受到氨基青霉素、青霉素G和先锋霉素的抑制,这表明球孢链霉菌除了 AM_3 -内肽酶外还含有一种对 β -内酰胺类抗生素敏感的DD-羧肽酶。

变溶菌素的应用日益广泛,其研究也越来越深入。但是, AM_3 -内肽酶是否参与细胞壁的生物合成?变溶菌素中还含有几种及何种类型的溶菌酶?这些还有待于进一步研究。

变溶菌素在临床上的应用也越来越受到关注,给药形式可采用将其放入牙膏、口香糖、含片、漱口液中或做成微胶囊等方式。由于体外实验条件不同于口腔环境,可以考虑通过蛋白质工程改造其中的酶,使其在实际口腔环境中能发挥最大效力。

参 考 文 献

- [1] Yokogawa K, Kawata S, Yoshimura Y. *Agric Biol Chem*, 1972, **36**(12):2055~2065.
- [2] Lichenstein H S, Hastings A E, Langley K E, et al. *Gene*, 1990, **88**(1):81~86.
- [3] Bronneke V, Fiedler F. *Appl Envir Microb*, 1994, **60**(3):785~791.
- [4] 张玉臻,刘同军,宋庆训. *食品与发酵工业*, 1997, **23**(6):16~19.
- [5] 刘同军,张玉臻,徐文琳. *食品与发酵工业*, 1999, **25**(3):5~9.
- [6] Maisnier-Patin S, Richard J. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **140**(1):29~35.
- [7] Sieradzki K, Tomasz A. *J Bacteriol*, 1997, **179**(8):2557~2566.
- [8] Russell J B, Wells J E. *Curr Microbiol*, 1997, **35**(5):299~304.
- [9] Guerlava P, Véronique I, tholozan J L. *Curr Microbiol*, 1998, **36**(3):131~135.
- [10] Ampe F, Omar N B, Guyot J P. *Lett Appl Microbiol*, 1998, **27**(5):270~274.
- [11] Juarez Z E, Murray W S. *Infect Immun*, 1999, **67**(1):271~278.
- [12] Homonylo-McGavin M K, Lee S F, George H B. *Can J Microbiol*, 1999, **45**(6):536~539.
- [13] Barkulis S S, Smith C, Boltralik J J. *J Biol Chem*, 1964, **239**:4027~4043.
- [14] Li S, Norioka S, Sakiyama F. *J Biochem*, 1997, **122**(4):772~778.
- [15] Kampfer P. *J Microb Method*, 1995, **21**(1):55~60.
- [16] Kawata S, Yokogawa K, Takahashi E. *Agric Biol Chem*, 1984, **48**(7):1783~1793.
- [17] Kawata S, Takahashi E, Takase Y et al. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**(12):2801~2808.
- [18] Kawata S, Takemura T, Takase Y, et al. *Agric Biol Chem*, 1984, **48**(2):261~269.
- [19] Hamda S, Torh M, Kotani S. *Archs Oral Biol*, 1978, **23**:543~549.