

极端嗜盐古菌蛋白类抗生素——嗜盐菌素*

厉云 向华** 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Halocin Protein Antibiotics Produced by Extremely Halophilic Archaea*

Li Yun Xiang Hua Tan Huarong

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

关键词: 极端嗜盐古菌, 嗜盐菌素

中图分类号 939.14 文献标识码:A 文章编号 0001-6209(2002)04-0502-04

古菌(Archaea)是一类与细菌及真核生物显著不同的生命的第三种形式^[1],大多生活在极端或特殊环境,主要包括产甲烷古菌(Methanogenic Achaea)、极端嗜盐古菌(Extremely Halophilic Archaea)和极端嗜热古菌(Extremely Thermophilic Archaea)等三大类。极端古菌是极端环境微生物的重要成员,也是极端环境微生物资源开发的重要领域。其中,嗜盐古菌可产生一类蛋白类抗生素,称为嗜盐菌素(halocin)。与细菌素相似^[2],嗜盐菌素是由质粒编码、核糖体合成的。嗜盐菌素由于性质稳定,潜在应用领域广泛,其基因表达调控又独具特色,因而目前已成为极端嗜盐古菌分子生物学研究的重要领域。

1 嗜盐菌素的发现

最早的嗜盐菌素是由 Rodriguez-Valera 及其同事于 1982 年发现的。他们筛选了 40 株极端嗜盐古菌(包括 39 株杆菌和 1 株球菌)并研究了它们相互之间的抑制作用,发现有 7 株可以产生抑菌物质,其中 5 株可以抑制大多数(19~35)菌株,而其它 2 株则只抑制少数(1~3个)菌株^[3]。Torreblanca 等于 1994 年筛查了 68 株极端嗜盐杆菌之间的相互作用,发现有 67 株极端嗜盐杆菌可以产生嗜盐菌素,而且它们的抑菌谱互不相同,不同的抑菌谱可能代表不同的嗜盐菌素。由此,他们得出结论:产生嗜盐菌素是极端嗜盐古菌杆菌的一个普遍特征^[4]。

我们也于最近筛查了 22 株不同来源的极端嗜盐古菌相互之间的抑制作用,发现有 21 株极端嗜盐古菌可以产生嗜盐菌素,其中 6 株(分属于四个属:Halobacterium, Halococcus, Natrinema 和 Natronorubrum)抑菌谱较广,可以抑制大多数菌株(10~17株)。而且,在这 22 株古菌中,有 4 株极端嗜盐嗜碱古菌均可产生嗜盐菌素,有两株(分别是 Natronobacterium gregoryi 和 Natronorubrum tibetense GA33)抑菌谱较广。另外,发现了嗜盐菌素对非嗜盐菌的抑制作用,由 Halobacterium QD5 产生的嗜盐菌素对蜡状芽孢杆菌(Bacillus cereus)也有一定的抑制作用(厉云、向华等未发表资料)。

目前,已发现有上百株极端嗜盐古菌可以产生嗜盐菌素。其中,研究比较深入的嗜盐菌素有四个:

* 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-3-01-02)及教育部留学回国人员科研启动基金资助

** 通讯联系人

作者简介 厉云(1975-),女,山东省日照市人,青岛海洋大学与中国科学院微生物研究所联合培养的在读博士生,主要从事微生物分子遗传学研究。

收稿日期 2001-09-20,修回日期 2001-09-29 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

由 *Haloferax mediterranei* R4 产生的嗜盐菌素 H4,由 *Haloferax gibbonsii* Ma2.39 产生的嗜盐菌素 H6,由 *Halobacterium* sp.GN101 产生的嗜盐菌素 Hal R1,以及最近报道的一个小分子量的嗜盐菌素 S8,它的产生菌是一个尚未精确分类的极端嗜盐杆菌^[5]。其中,H4、H6、Hal R1 和 S8 的蛋白已被纯化^[5-8],H4 的基因 *halH4* 和 S8 的基因 *halS8* 已被克隆和测序,并在 mRNA 转录水平上进行了研究^[7,9]。

2 嗜盐菌素的产生及其分离纯化

2.1 嗜盐菌素的产生

嗜盐菌素 H4、H6、Hal R1 和 S8 的活性都是在培养物从对数末期向稳定期过渡的时候检测到的,并很快上升到最大值。不同的是,H4、H6 和 S8 的活性随即下降,并维持在一个比较低的水平上,而 Hal R1 的活性一旦达到最大值,便可一直保持在这个水平^[5,7,9]。由于嗜盐菌素产生的时期比较特殊,因此可用于作为稳定期基因表达调控的模型进行研究。

2.2 嗜盐菌素的分离纯化及分子量测定

嗜盐菌素为胞外蛋白,它直接分泌到胞外环境中,因此它的纯化相对较为容易。Meseguer 和 Rodriguez-Valera 早在 1985 年就纯化了 H4 的蛋白,SDS-PAGE 显示其分子量大约是 28kD^[6];H6 的分子量相对较大,HPLC 显示其分子量约为 32kD,而 SDS-PAGE 的结果表明其分子量可能小于 31kD^[5,8]。

Hal R1 的情况稍微复杂一些,Rdest 和 Stum(1987)的纯化结果表明,Hal R1 的分子量大约为 6.2kD,但它通常与较大的“携带蛋白(carrier proteins)”一起出现。Shand 等(2000)的纯化结果与此相似,但认为 Hal R1 的分子量应更小一些(约 2.5kD)。首先,通过一系列的递减的分子量截留(nominal molecular weight cutoff,NMWC)过滤浓缩极端嗜盐古菌 *Halobacterium* sp.GN101 稳定期培养物的上清,发现经 100kD NMWC 超滤后剩下的 Hal R1 活性只占全部活性的 7.6%,这一点与 Rdest 和 Stum(1987)的结果是一致的。而大部分的活性成分(约 89.4%)不能通过 30kD NMWC 滤膜。将 30kD 截留下来的活性部分通过一个 BioRad P60M 凝胶过滤柱,发现两个活性峰:一个活性峰在 30kD 左右,另一个较小的活性峰则小于 2.5kD。30kD 左右的活性峰包含了上样液中约 75%的活性,将其收集并用切向流过滤(tangential flow filtration)去盐后通过一反相 HPLC 柱,用含 0.1%三氟乙酸的乙腈洗脱,发现只在 280/214nm 处有一活性峰。收集此活性峰处的样品并进行银染 SDS-PAGE,发现一条小于 2.5kD 的电泳带有活性,而较大的 14kD 的电泳带则没有活性。因此,Shand 等认为 Hal R1 分子量小于 2.5kD,但它在培养液中由于与一个或多个“携带蛋白”相结合,因而表现分子量达到约 30kD^[5]。

嗜盐菌素 S8 的纯化过程与 Hal R1 类似,切向流过滤中,S8 被 30kD 和 10kD NMWC 超滤膜截留效果相同。将 30kD 截留液通过一个 BioRad P30M 凝胶层析柱,发现仅有 2.5kD 附近的一个峰有活性,将活性峰通过反相 HPLC 柱,发现其全部活性位于 280/214nm 的峰上。银染 SDS-PAGE 表明,其分子量大约为 3.58kD^[5,7]。

3 嗜盐菌素的理化性质和可能的抑菌机制

3.1 嗜盐菌素的理化性质

嗜盐菌素大都比较稳定。除 H4 外,H6、Hal R1 和 S8 都对热稳定,而且对去盐作用不敏感。如 H6 可以在 90℃处理 10min 而不失活,Hal R1 煮沸 1h 仍保留 50%活性,而 S8 沸水浴 1h 仍保持全部活性^[5]。

蛋白酶对嗜盐菌素的影响则不尽相同,如 H6 对链霉蛋白酶敏感,对胰蛋白酶不敏感,Hal R1 对非特异性蛋白酶如蛋白酶 K、链霉蛋白酶 P 和弹性蛋白酶敏感,对特异性蛋白酶如木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶不敏感;S8 对蛋白酶 K 敏感,对胰蛋白酶不敏感。另外,Hal R1 对某些有机溶剂如 n-丙醇、乙腈/三氟乙酸和甲醇不敏感,S8 对乙腈等有机溶剂也不敏感^[5-8]。

嗜盐菌素相对稳定,是与它的生态学意义相一致的,由于嗜盐菌素可以减少有相同营养及环境要求的种群间的竞争,因此,它的性质越稳定,对产生菌就越有利。另外,嗜盐菌素在去盐作用下而不失去活

性,说明嗜盐菌素可能具有比较广泛的应用领域。

3.2 嗜盐菌素可能的抑菌机制

尽管嗜盐菌素在极端嗜盐古菌中广泛存在,但嗜盐菌素的抑菌机理至今仍不十分清楚。目前比较清楚的只有 H4 和 H6 两种。将敏感菌株的细胞暴露于 H4 中,发现 5h 后菌体肿胀,成球形,24h 后裂解或接近裂解,它的作用机制被认为是破坏靶细胞上的跨膜离子梯度^[10]。H6 对细胞的形态影响与 H4 相似,只是作用更快,所需活性单位更少。H6 的作用机制被证明是直接抑制 Na^+/H^+ 的反向转运,这也是目前唯一一个被阐明作用机制的嗜盐菌素^[11]。

由于嗜盐菌素广泛存在,而不同的嗜盐菌素通常其抑菌谱也不一样,说明可能存在大量不同的抑菌机制。因此研究不同嗜盐菌素的抑菌机理,将是研究蛋白质与靶分子互作的重要领域。

4 嗜盐菌素基因 *halH4* 和 *halS8* 的基因结构及其克隆表达

4.1 嗜盐菌素 H4 编码基因 *halH4*

同某些细菌素基因一样,已克隆的嗜盐菌素基因如 *halH4* 和 *halS8* 均为质粒编码。*H. mediterranei* R4 有三个大的质粒,其大小分别为 490kb, 320kb 和 130kb,用钳压均匀电场电泳 (CHEF) 分离三个质粒,对已纯化的 H4 蛋白进行末端测序,以此设计简并引物,进行 PCR 扩增,将扩增出的较长的片段作为探针做 Southern 杂交,克隆了 *halH4* 的基因,并发现 *halH4* 基因位于 320kb 的质粒上^[9]。

halH4 的开放阅读框为 1080bp,编码 359 个氨基酸的肽链,具有典型的嗜盐古菌启动子。其转录的起始位点离 5' 起始密码子 (ATG) 只有 4 个碱基,因此 *halH4* 基因同许多古菌基因一样,其转录子没有前导序列。转录的终止子是一对 11 个碱基的回文重复序列,中间间隔着 16 个碱基。H4 蛋白有一个 46 氨基酸的信号肽,它在分泌的时候从前蛋白上切下。这一特征不同于常见的细菌素,大部分大肠菌素和其他绝大多数的细菌素都是利用裂解蛋白进行分泌,某些大肠菌素也存在前导肽,但它们的分泌方式十分独特,因此通常不把他们看作典型的信号肽序列。H4 的另一个特征是在肽链的中部有一段 32 个氨基酸的疏水区域,它可能与 H4 的作用方式有关^[5,9]。

Cheung 等还研究了 *halH4* 基因表达与嗜盐菌素活性之间的关系。首先是在从对数期向稳定期过渡的时候检测到了 H4 的活性,接着, H4 活性快速上升并检测到 *halH4* 基因的转录水平明显升高。但 H4 活性与 *halH4* 转录水平有两点不一致:一是在对数生长期中期, *halH4* 的转录已清晰可见,却检测不到 H4 的活性;二是当 *halH4* 的转录水平达最大时, H4 活性却已明显下降。这说明 H4 的合成受到转录后因子的调节^[5,9]。

4.2 嗜盐菌素 S8 编码基因 *halS8*

halS8 基因也位于一个约 200kb 的质粒上,它的开放阅读框为 933bp,但成熟蛋白仅为 36 个氨基酸,是目前发现的最小的嗜盐菌素,因此被称为“microhalocin”。DNA 测序结果表明, S8 是由一个较大的前蛋白 (311 个氨基酸) 加工而来的,在它的上游和下游分别有 230 个氨基酸和 45 个氨基酸。对一个肽类抗生素来说,具有两个不同的剪切位点是非常独特的。*halS8* 转录的起始位点与起始密码子正好吻合,是极端嗜盐古菌中转录子没有前导序列的又一个例子。它的启动子也是一个典型的古菌启动子,在 -29 到 -24 的位置上有一“TATA box” (5'-ATTTAT-3'),与典型的极端嗜盐古菌启动子的共有序列 (-29TT-TWWW-24, W 为 A 或 T) 高度一致。另外,转录因子 B 的识别位点位于启动子上游 5 个碱基处 (-35AG-34)。*halS8* 基因不具明显的发夹结构的转录终止子,但在 1266 到 1270 处有一嗜盐古菌“T”序列 (5'-TT-TAT-3'),可能起转录终止作用^[5,7]。

halS8 的基因表达模式与 *halH4* 非常相似。培养初期, *halS8* 的转录在一个比较低的水平,而这时检测不到 S8 的活性。当从对数末期向稳定期过渡时,它的转录水平很快上升到原来的 9 倍,这时 S8 的活性也开始上升,与它的转录水平相一致。然而,当 *halS8* 的转录水平达到最大时, S8 的活性却不再上升,说明此时 S8 的翻译过程被抑制。*halS8* 的转录在最高水平保持 13 小时后,迅速下降至对数生长期开始

时的水平^[5,7]。

由于 S8 产生的时期比较特殊,蛋白分子量又很小,因此非常适于研究嗜盐菌稳定期基因的表达、转录的终止、mRNA 的加工、蛋白的分泌和加工以及蛋白质的结构和功能等。

5 总结与展望

嗜盐菌素是在极端嗜盐古菌从对数末期向稳定期过渡时产生的,在已研究的四个嗜盐菌素中有三个性质比较稳定,这说明嗜盐菌素的产生对于极端嗜盐古菌具有重要的生态学意义:进入稳定期时,由于营养等的消耗,环境恶化,生长变缓,在这时产生嗜盐菌素一方面可以裂解敏感细胞,释出内容物,丰富环境中的营养,另一方面,溶菌或抑菌作用可以减少竞争。当环境中的营养重新变得丰富时,产嗜盐菌素的菌株就会在一个竞争相对减少的环境中优先利用这些营养,因此,嗜盐菌素在环境中的存留时间越长,性质越稳定,对菌株越有利。

已报道的 4 个嗜盐菌素都是在从对数末期向稳定期过渡的时候产生的,因此它们可以作为研究极端嗜盐古菌的基因表达调控以及嗜盐蛋白的分泌、结构和功能等的重要模型。而嗜盐菌素的免疫基因,则有望作为极端嗜盐古菌遗传转化系统中抗性的选择性标记。

目前已研究的 4 个嗜盐菌素中,有 3 个对去盐作用不敏感,这说明嗜盐菌素的潜在应用领域广泛。但是已完成基因克隆的两个嗜盐菌素中,H4 虽然抑菌谱比较广,但性质不够稳定,对热和去盐作用都很敏感,S8 虽然性质比较稳定,但它的抑菌谱非常窄,只对少数极端嗜盐古菌有抑制作用^[6,7]。因此,这两个嗜盐菌素在生产上均无应用前景。所以,筛选抑菌谱广、性质稳定的嗜盐菌素,克隆其相关基因,在理论和实践中将具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Woese C R ,Kandler O ,Wheeler M L. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1990 **87** :4576 ~ 4597.
- [2] Jack R W ,Tagg J R ,Ray B. *Microbiol Rev* ,1995 **59** :171 ~ 200.
- [3] Rodriguez-Valera F ,Juez G ,Kushner D J. *Can J Microbiol* ,1982 **28** :151 ~ 154.
- [4] Torreblanca M ,Meseguer I ,Ventosa A. *Appl Microbiol* ,1994 **29** :201 ~ 205.
- [5] Shand R F ,Price L B ,Q 'Connor E M. Halocins :Protein Antibiotics from Hypersaline Environments. In :Aharon Oren. *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. CRC Press ,1999.295 ~ 305.
- [6] Meseguer I ,Rodriguez-Valera F. *FEMS Microbiol Lett* ,1985 **28** :177 ~ 182.
- [7] Price L B ,Shand R F. *J Bacteriol* ,2000 **179** :548 ~ 551.
- [8] Torreblanca M ,Meseguer I ,Rodriguez-Valera F. *J Gen Microbiol* ,1989 **135** :2655 ~ 2661.
- [9] Cheung J ,Danna K J ,Q 'Connor E M ,et al. *J Bacteriol* ,1997 **179** :548 ~ 551.
- [10] Meseguer I ,Rodriguez-Valera F. *J Gen Microbiol* ,1986 **132** :3061 ~ 3068.
- [11] Meseguer I ,Torreblanca M ,Konishi T. *J Biol Chem* ,1995 **270** :6450 ~ 6455.