

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (1) :50 – 58; 4 January 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140154

羊毛硫细菌素 bovicin HJ50 修饰酶 BovM 双功能域单独催化活性鉴定

马宏初^{1,2}, 高涌^{1,2}, 赵方圆^{1,2}, 钟瑾^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 【目的】体外重建羊毛硫细菌素 bovicin HJ50 修饰酶 BovM 双功能域(脱水酶与环化酶功能域)各自的催化活性,为深入了解 BovM 催化机制奠定基础。【方法】在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中分别异源表达纯化 BovM 含脱水功能域的 N 端与含环化功能域的 C 端重组蛋白,构建体外反应体系,分别对其前肽底物 BovA 进行修饰,通过产物抑菌活性及 MALDI-TOF MS 分子量检测来鉴定两者的修饰活性;并通过体内体外两种方法检测双功能域蛋白之间的协同作用。【结果】BovM 的 N 端脱水功能域及 C 端环化功能域分别具有脱水与环化活性,但双功能域重组蛋白之间没有协同作用。【结论】BovM 双功能域均可独立行使各自的催化功能,但 BovM 的完整结构对其正常的催化活性非常重要。

关键词:羊毛硫细菌素,双功能酶,脱水,环化

中图分类号:Q936 **文章编号:**0001-6209(2015)01-0050-09

羊毛硫多肽(lanthipeptide)是一类由细菌核糖体合成并经过翻译后修饰而产生的多肽类物质,具有抗菌活性的羊毛硫多肽被称为羊毛硫细菌素(lantibiotic)^[1]。羊毛硫多肽的主要特征是其分子中含有含硫醚键的特殊氨基酸-羊毛硫氨酸(Lan)与甲基羊毛硫氨酸(MeLan)^[2]。Lan/MeLan 对羊毛硫多肽的活性是不可或缺的,同时也赋予了羊毛硫多肽蛋白酶抗性与热稳定性^[2]。这些特殊氨基酸通常由羊毛硫多肽修饰酶修饰形成。羊毛硫多肽前肽分子 LanA 中的 Ser 或 Thr 由修饰酶脱水形成脱氢丙氨酸(Dha)或甲基脱氢丙氨酸(Dhb),随后 Dha

或 Dhb 与前肽分子中的 Cys 经修饰酶环化,形成 Lan 或 MeLan (图 1-A)。修饰后的前肽分子经加工酶切除前导肽后就形成了成熟的羊毛硫多肽。根据修饰酶及修饰类型的不同,羊毛硫多肽可被分成 4 类(I 类, II 类, III 类, IV 类)。I 类羊毛硫多肽(nisin, subtilin 等)由两种修饰酶,即脱水酶 LanB 与环化酶 LanC 共同完成修饰; II 类羊毛硫多肽(lacticin 481, nukacin ISK-1 等)由双功能酶 LanM 完成修饰; III 类(labyrinthopeptin A2 等)与 IV 类(venezuelin 等)羊毛硫多肽为最近发现的新类型的羊毛硫多肽,其修饰分别由 LanKC 与 LanL 完成^[1]。

基金项目:中国科学院知识创新重要方向项目(KSCX2-EW-Q-14, KSCX2-EW-J-6)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

作者简介:马宏初(1989-),男,山东阳信人,硕士研究生,主要从事乳酸菌分子遗传学研究。E-mail: wahy1989@126.com

收稿日期:2014-03-25; **修回日期:**2014-04-29

II 类羊毛硫多肽是目前发现的种类最多的羊毛硫多肽, 对其资源的开发已引起越来越多人的关注^[3]。负责对其进行翻译后修饰的酶是 LanM, 其同时行使脱水与环化的功能^[4]。LanM 的 N 端为脱水酶功能域, 负责对前肽分子中的 Ser 与 Thr 进行脱水。在修饰过程中, 此功能域将 ATP 的 γ 磷酸基团转移到 LanA 中待修饰的 Ser 与 Thr 的羟基上, 随后再将磷酸基团消除, 最终完成脱水形成 Dha 与 Dhb, 此功能域与包括脱水酶 LanB 在内的其他已知蛋白家族无同源性^[5]。C 端为环化功能域, 负责将 Dha 或 Dhb 与 Cys 进行加成反应形成硫醚键。此功能域与环化酶 LanC 具有同源性, 含有由 2 个 Cys 与一个 His 组成的锌离子结合位点, 并且环化功能需要锌离子的参与^[6]。由于 LanM 具有一定的底物宽泛性, 可被用于在其他活性多肽中引入硫醚键从而使之具有目标活性和更高的稳定性, 因此拥有潜在的应用前景^[7]。然而, 目前对 LanM 催化机制的研究仅局限于 LetM、NukM 等少数几个 LanM 蛋白, 并且主要是通过对蛋白中保守氨基酸残基的定点突变来完成, 尚缺乏对单独的功能域功能的研究, 因此对

LanM 各个功能域能否单独行使功能尚不清楚, 双功能域的功能之间是如何协调的亦不得而知。

Bovicin HJ50 是一种自牛奶中分离的牛链球菌 *Streptococcus bovis* HJ50 产生的 II 类羊毛硫多肽, 对多种革兰氏阳性细菌具有抑菌活性^[8]。Bovicin HJ50 分子中含有两个 MeLan 以及一个特殊的二硫键。BovM 是 bovicin HJ50 的修饰酶, 为 LanM 家族的一员, 负责将 BovA 核心肽分子中的 Thr8 与 Thr10 脱水形成 Dhb, 并与 Cys13 和 Cys32 环化形成 MeLan (图 1-B)^[9-10]。本实验室前期工作通过分别表达 BovA 与 BovM, 在体外环境下利用 BovM 修饰 BovA, 随后利用转运加工蛋白 BovT 胞外蛋白酶结构域 BovT150 切除前导肽, 成功获得有活性的 bovicin HJ50, 从而重建了 BovM 的体外修饰活性, 为深入研究 BovM 修饰机制提供了便利。而本研究则在此基础上着重考察了 BovM 双功能域各自的脱水与环化活性, 并检测了其功能上的协同关系, 证实了其整体结构的重要性。本研究为进一步研究 BovM 的催化机制, 对其进行工程化改造打下基础。

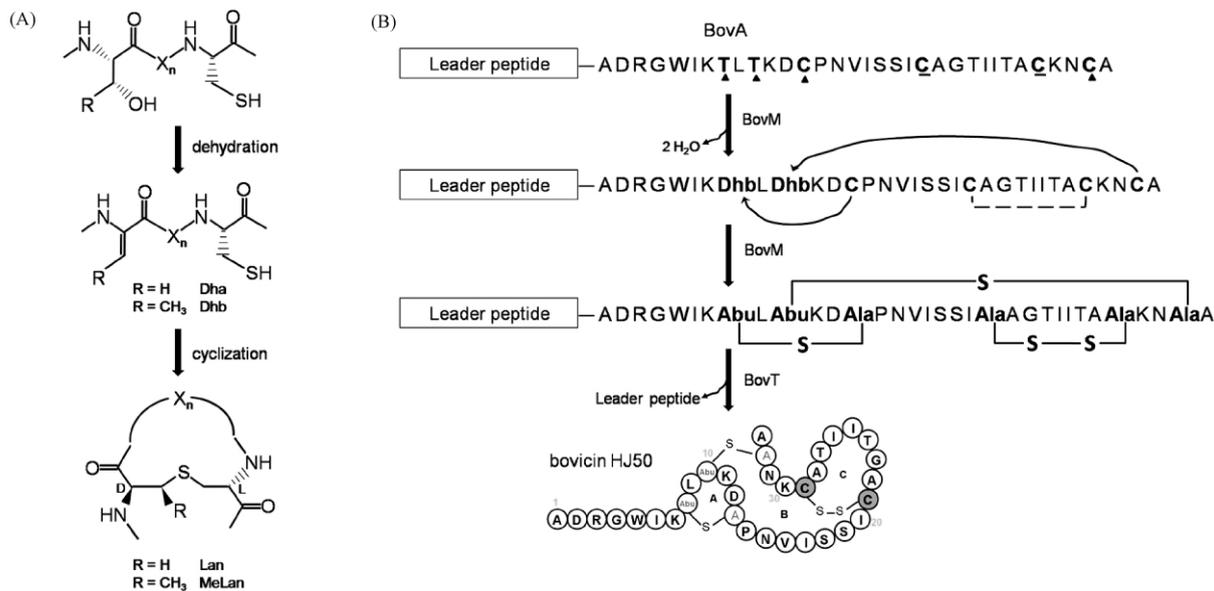


图 1. 羊毛硫多肽特殊氨基酸形成过程 (A) 及 bovicin HJ50 合成过程 (B)

Figure 1. The formation of the unusual amino acid in lanthipeptides (A) and biosynthesis of bovicin HJ50 (B).

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与培养基: 大肠杆菌 (*E. coli*)

DH5 α 与 BL21 (DE3) 分别用于质粒构建与蛋白异源表达, pET-28a, pET-DUET 与 pACYC-DUET 用作蛋白表达, 均为本实验室保存。E. coli 使用 LB 培养基培养, 需要在其中添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素或 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素。指示

菌株黄色微球菌 (*Micrococcus flavus*) NCIB 8166 使用 S1 培养基 (胰蛋白胨 8 g, 酵母提取物 5 g, 葡萄糖 5 g, Na₂HPO₄ 2 g, NaCl 5 g, 吐温 -20 1 mL 溶解于 1 L 蒸馏水中) 30℃ 静置培养。

1.1.2 试剂:快速限制性内切酶与 T4 DNA 连接酶均购于 Fermentas 公司, phusion DNA 聚合酶购自 Thermo 公司, 预染蛋白 Marker 购于鼎国 (北京) 生物科技有限公司, 质粒提取、PCR 清洁以及 DNA 凝胶回收试剂盒均购于 AXYGEM 公司, 引物由上海生物工程合成, 测序由北京博尚生物技术有限公司完成, 专一性巯基修饰剂 N-乙酰马来酰亚胺 (NEM) 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 质粒载体构建

根据 BovM 序列设计引物 (表 1), 以 pET-28a-*bovAM* 为模板扩增目标片段, 目的片段经切胶回收后使用限制性内切酶酶切, pET-28a, pET-DUET 与 pACYC-DUET 亦用相同限制性内切酶酶切, 回收后目标片段与载体片段使用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α , 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 提取阳性克隆培养, 提取质粒测序鉴定。

表 1. 本研究所用 PCR 引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
N-His-BovM-F	CGCGGATCCATGGAAAAATTAGATTTAAC
N-His-BovM-50-F	CGCGGATCCATTAGACAGGTTTTGTTAC
N-His-BovM-450-R	ACGCGTCGACCTATAACTGTTTAATTTCT
N-His-BovM-500-R	ACGCGTCGACCTATCTTAAACAAGATTAG
N-His-BovM-600-R	ACGCGTCGACCTAAAACACATCTAAA
N-His-BovM-501-F	CGCGGATCCACTTCATTGAATATTGATG
N-His-BovM-601-F	CGCGGATCCATAATAAACAATGATTCAA
N-His-BovM-R	ACGCGTCGACCTAAAATCCAAACGTCAGT
C-His-BovM-F	CATGCCATGGAAAAATTAGATTTAAACAAT
C-His-BovM-50-F	CATGCCATGTTAGACAGGTTTTGTTAC
C-His-BovM-450-R	ACGCGTCGACTAACTGTTTAATTTCTTGC
C-His-BovM-500-R	ACGCGTCGACTCTTAAACAAGATTAG
C-His-BovM-600-R	ACGCGTCGACAAAACACATCTAAAAT
C-His-BovM-501-F	CATGCCATGGCTTCATTGAATATTGATG
C-His-BovM-601-F	CATGCCATGGATATAATAAACAATGATTCAA
C-His-BovM-R	ACGCGTCGACAAAATCCAAACGTCAG
Duet-BovA-F	CGCGGATCCGATGATGAATGCTACTGAAAAC
Duet-BovA-R	ACGCGTCGACTTAAGCACAATTTTACAAGCT
Duet-BovM-F	GGAATTCATATGATGGAAAAATTAGATTTAAC
Duet-BovM-500-R	CCGCTCGAGCTATCTTAAACAAGATTAGCTG

1.3 蛋白异源表达纯化

根据以前报道用包涵体复性方法纯化 His₆-BovA, 收集反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 目标峰后

冷冻干燥获得干粉^[9]。BovM 及其截短片表达纯化如下: 将表达载体转化 *E. coli* BL21 (DE3), 在添加相应抗生素的 1 L LB 培养基中 37℃ 摇瓶培养 OD₆₀₀ 至 0.6 - 0.8, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 于 18℃ 下 180 r/min 培养 20 h 后, 离心收集菌体, 重悬于 40 mL start buffer (50 mmol/L Na₂HPO₄, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH7.4) 后超声破碎, 离心取上清, 使用金属离子螯合层析 (IMAC) 与凝胶过滤层析 (SEC) 两步纯化目标蛋白, 蛋白溶于 assay buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂) 中, 经 SDS-PAGE 检测蛋白纯度后, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

1.4 脱水活性测定

将 His₆-BovA 干粉溶解于 assay buffer 中, 测定蛋白浓度。按底物: 酶摩尔比为 10:1 与 BovM 或其截短蛋白混合, 分别为 10 μ mol/L 与 1 μ mol/L。加入终浓度分别为 2.5 mmol/L 与 1 mmol/L 的 ATP 与 DTT, 置于 25℃ 反应, 反应时间为 15 min 至 12 h 不等, 加入终浓度为 0.5% 的三氟乙酸 (TFA) 终止反应, 将全部反应体系经 Zip-tip (Millipore) 除盐。MALDI-TOF MS 检测产物分子量。

1.5 环化活性测定

前期实验表明, 在体外反应体系中不加还原剂二硫苏糖醇 (DTT), 底物 His₆-BovA 分子中自由巯基会自发形成二硫键, 而此二硫键则会阻碍硫醚键的形成, 但不影响 BovM 对 BovA 的脱水。基于这种现象, 制备脱水未环化的 His₆-BovA (Dhy-BovA)。在体外反应体系中不添加 DTT, 将 BovA 与 BovM 按摩尔比 10:1 比例混合后 25℃ 反应 2 h, 将产物使用 RP-HPLC 进行纯化, 收集目标产物冻干后重溶于 assay buffer 中, 测定浓度。将获得的 Dhy-BovA 与 BovM 或其截短蛋白混合, 浓度分别为 10 μ mol/L 与 1 μ mol/L, 反应体系中加入终浓度为 1 mmol/L 的 DTT。25℃ 反应 4 h, 产物经 Zip-tip 除盐后进行 MALDI-TOF MS 鉴定。由于硫醚键形成并无分子量变化, 以质谱方法检测并不能确定硫醚键是否形成, 故以专一性巯基修饰剂 N-乙酰马来酰亚胺 (NEM) 来检测自由巯基数目, 由此判断成环与否。将修饰后产物经 Zip-tip 除盐后真空干燥去除乙腈, 沉淀重溶于 assay buffer 中, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 DTT 和 10 mmol/L 的 NEM, 冰上孵育 30 min, 产物经 Zip-

tip 除盐后质谱检测。

1.6 抑菌活性鉴定

将纯化或修饰后产物用 BovT150 (bovicin HJ50 加工转运蛋白 BovT 的胞外蛋白酶结构域, 在体外条件下可切除 BovA 的前导肽) 酶切, 将 BovT150 按底物: 酶摩尔比 4:1 加入反应体系中, 控制 pH 7.4, 25℃ 下切割过夜。产物利用打孔扩散法测定抑菌活性, 以 *M. flavus* NCIB8166 作为指示菌株。

2 结果

2.1 BovM 及其单独的脱水与环化功能域的表达与纯化

BovM 由 837 个氨基酸组成。序列分析表明, BovM 的 N 端第 1-460 位氨基酸构成了脱水酶结构域, 保守序列位于第 50-450 位之间; C 端第 536-837 位氨基酸构成了环化酶结构域, 含有由保守的 Cys715、Cys761 以及 His762 组成的锌离子结合位点, 保守序列位于 600 位以后 (图 2)。

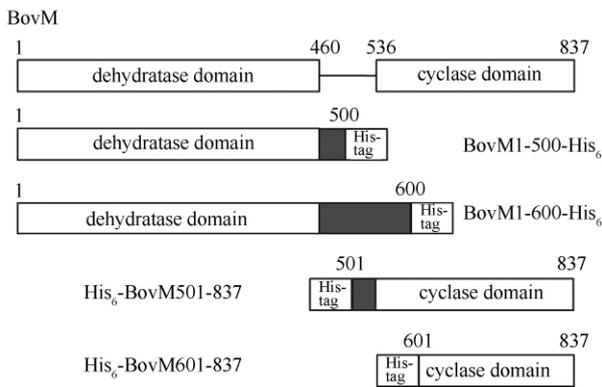


图 2. BovM 及其截短蛋白分子示意图

Figure 2. The molecular pattern of BovM and its truncated derivatives.

为鉴定 BovM 的单功能域是否具有催化活性, 在 *E. coli* 中异源表达纯化 BovM 的 N 端脱水功能域部分: 第 50-450、50-500、1-500 与 1-600 位氨基酸, 以及 C 端环化酶部分: 第 500-837、600-837 位氨基酸的 BovM 截短蛋白, 同时纯化 BovM 作为对照。为保证纯化效率, 分别在目标片段 N 端或 C 端添加 His-tag。结果表明, BovM 的 N 端 50-450 或 50-500 在单独表达时, 在其 N 端或 C 端添加 His-tag 都不能获得目标蛋白, 推测 BovM 缺失 N 端部分氨基酸残基后不能正常折叠。在 BovM 的 1-500 或 1-600 片段的 N 端添加 His-tag 后, 虽然能获得目标蛋白, 但蛋白较易发生沉淀, 在其 C 端添加 His-tag 则可显著提高稳定性, 能够获得较稳定的目标蛋白, 故取 BovM1-500-His₆ 和 BovM1-600-His₆ 重组蛋白研究其催化活性 (图 2, 3-B)。另外, 在对 BovM 的 C 端 501-837 与 601-837 进行表达纯化时发现, 在目标蛋白 C 端添加 His-tag 后所获得的蛋白稳定性不高, 而在 N 端添加 His-tag 后稳定性显著提高, 故选取 His₆-BovM501-837, His₆-BovM601-837 重组蛋白研究其催化活性 (图 2, 3-C)。

2.2 BovM N 端脱水酶功能域具有单独的脱水活性

为测定 BovM 的 N 端脱水酶功能域能否单独行使脱水功能, 在体外反应体系中检测 BovM N 端截短蛋白的脱水活性。在大肠杆菌中表达纯化 BovA 作为底物, 与 BovM、N 端片段 BovM1-500-His₆ 或 BovM1-600-His₆ 混和, 并在体系中添加 ATP、Mg²⁺ 和 DTT 构建体外反应体系。由于底物 BovA 作为未修饰前肽, 其溶解度不高 (20 μmol/L) 且易沉淀, 不利于对 BovM 酶学常数的分析及检测。故本研究通过控制底物与酶用量以及反应时间, 并通过比较底

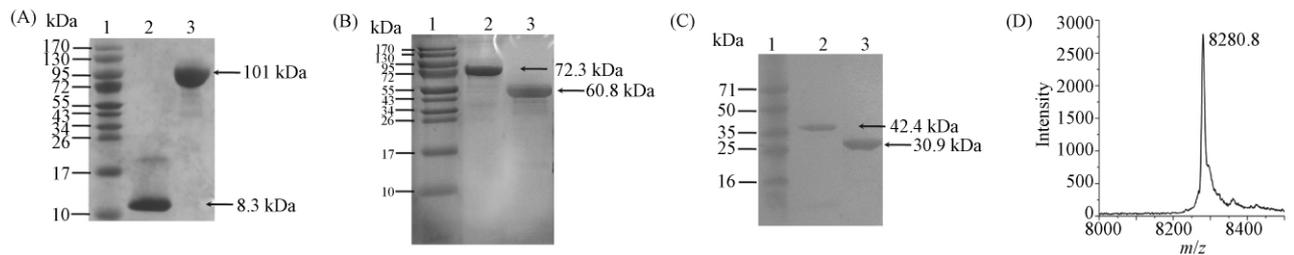


图 3. Tricine SDS-PAGE 电泳图 (A, B, C) 以及 BovA MALDI-TOF 质谱结果 (D)

Figure 3. Tricine SDS-PAGE of BovA, BovM (A), truncated proteins of BovM (B, C) and MALDI-TOF spectra of His₆-BovA (D). A: lane 1. Protein Marker; lane 2. Purified His₆-BovA; lane 3. Purified His₆-BovM. B: lane 1. Protein Marker; lane 2. Purified BovM1-600-His₆; lane 3. Purified BovM1-500-His₆. C: lane 1. Protein Marker; lane 2. Purified His₆-BovM501-837; lane 3. Purified His₆-BovM601-837.

物完全消耗的时间来比较目标蛋白的活性。在底物浓度为 $8 \mu\text{mol/L}$, 酶浓度为 $0.8 \mu\text{mol/L}$ 时, 25°C 下进行反应, 选取不同时间点的反应产物通过质谱检测其分子量。根据氨基酸序列计算, 未修饰底物分子量为 8280 Da (图 4-A), 而两分子脱水的产物分子量则为 8244 Da 。质谱结果表明, BovM 在反应时间 30 min 内即可将底物完全脱水 (图 4-B)。而 BovM1-500-His₆ 在修饰 4 h 后, 仅产生很微量的脱

水产物, 仍有大量底物未被修饰 (图 4-C)。采取提高酶浓度至 $2 \mu\text{mol/L}$, 提高 ATP 浓度至 $5 \mu\text{mol/L}$ 以及增加反应时间等手段后, 底物仍未被完全消耗, 显示其脱水活性极大下降。BovM1-600-His₆ 与 BovM1-500-His₆ 相比活性并无显著差异。以上结果表明, 单独的 BovM 的 N 端脱水结构域具有一定的脱水活性, 但脱水活性较完整的 BovM 下降很大。

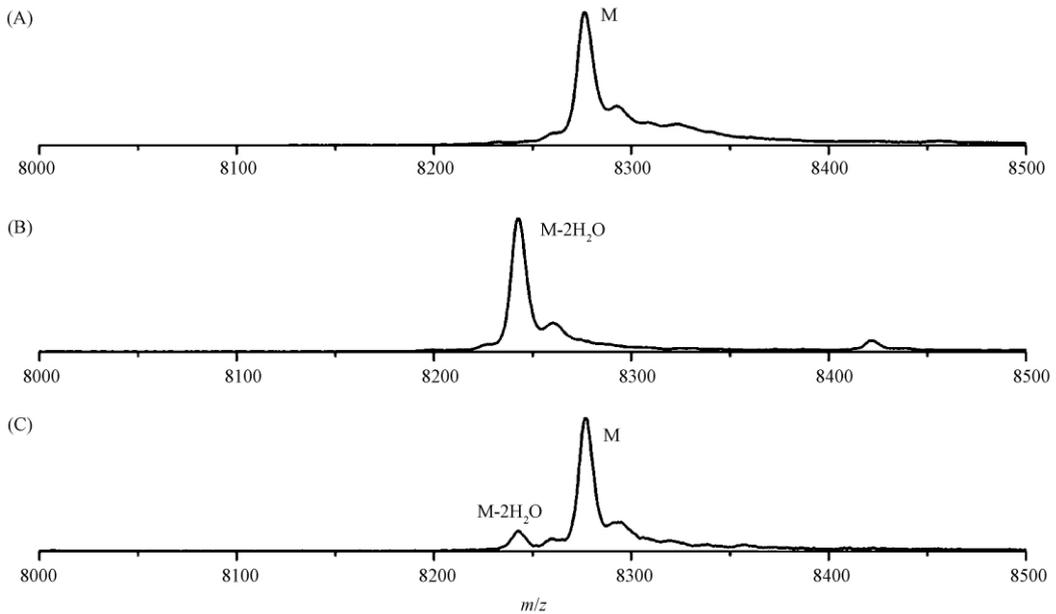


图 4. BovA (A) 与经 BovM 修饰后 (B) 以及经 BovM1-500-His₆ 修饰后 (C) 的 MALDI-TOF 质谱图

Figure 4. MALDI-TOF MS spectra of His₆-BovA (A), BovA modified by BovM *in vitro* for 30 min (B) and BovA modified by BovM1-500-His₆ *in vitro* for 4 h (C).

2.3 BovM C 端环化酶功能域具有单独的环化活性

为检测 BovM 的 C 端单独的环化酶活性, 需要得到脱水未成环的 BovA (Dhy-BovA) 作为底物。前期实验表明, 在水溶液中, BovA 分子中的自由 Cys 会在空气中自发形成二硫键, BovM 在不添加 DTT 的缓冲液中对这种 BovA 修饰时, 会将其脱水但不会打开二硫键。随后去除 BovM, 利用 DTT 将二硫键打开, 即可获得 BovA 脱水未成环的衍生物 Dhy-BovA。将 Dhy-BovA 作为底物, 与 BovM 或 C 端截短蛋白 His₆-BovM500-837、His₆-BovM600-837 相同条件下混合体外反应。由于成环并不需要 ATP 的提供能量, 故反应体系中仅需添加 DTT。由于硫醚键的形成并不能导致产物分子量的变化, 直接质谱检测无法鉴定底物成环与否, 因此需用专一性的

巯基修饰剂 N-乙酰马来酰亚胺 (NEM) 对产物进行修饰, 再通过质谱检测分子中自由巯基的数目。NEM 可与多肽分子中自由巯基发生加成, 每个自由巯基会使产物分子量增加 125 Da 。结果表明, 未修饰的 Dhy-BovA 最多可产生 500 Da 分子量的加成, 说明其含有 4 个自由巯基 (图 5-A-1); 而利用 BovM 修饰后, 产物分子量最多仅增加 250 Da , 表明其中仅含有 2 个自由巯基, 这说明底物发生了环化修饰 (图 5-A-2); 而在 His₆-BovM501-837 修饰后质谱仍可检测到 500 Da 加成的产物, 但其信号强度有所下降 (图 5-A-3), 这表明底物中自由巯基数目有所减少, 可能有硫醚键形成; His₆-BovM601-837 的 500 Da 加成产物则无显著减少。为进一步验证成环状况, 将环化修饰产物经 BovT150 切除前导肽后测定抑菌活性, 结果显示, 在初始底物浓度相同时, Dhy-BovA

和经 His₆-BovM600-837 修饰的产物无抑菌活性, 而经 BovM 或 His₆-BovM500-837 修饰后的产物则具有抑菌活性, 但 His₆-BovM500-837 修饰产物的抑菌活

性较低(图 5-B)。上述结果表明, 单独 BovM C 端环化结构域具有一定的环化活性, 但活性较全长的 BovM 有很大下降。

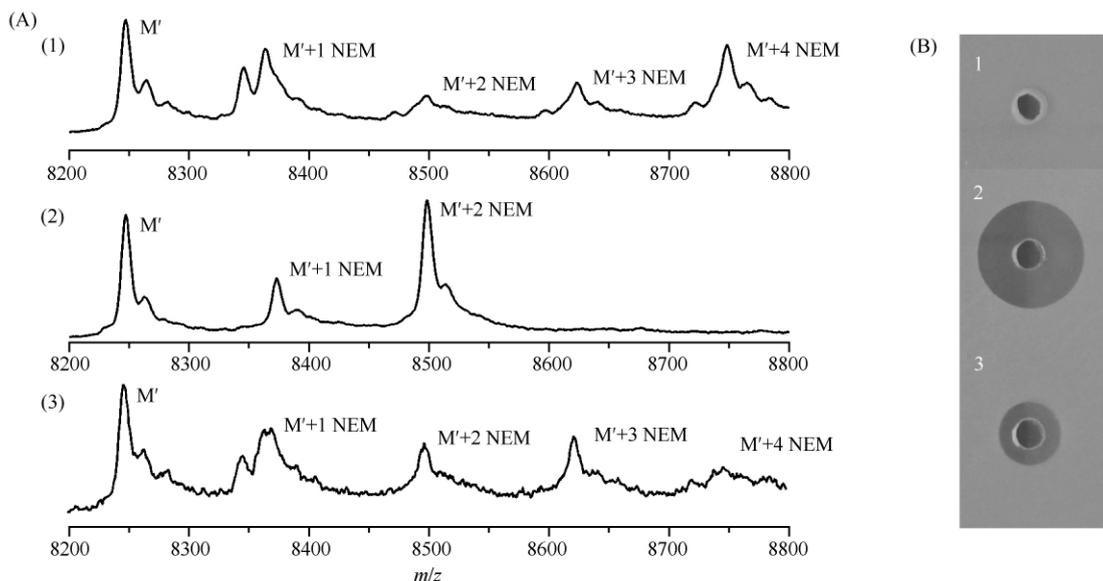


图 5. BovM 及其 C 端截短片环化活性质谱测定结果 (A) 及其对应产物对 *M. flavus* NCIB8166 抑菌活性测定图 (B)

Figure 5. Cyclization activity test of BovM and His₆-BovM500-837 (A) and identification of antimicrobial activity of modified products (B). A: MALDI-TOF MS spectra of Dhy-BovA (1), Dhy-BovA modified by BovM (2) and Dhy-BovA modified by His₆-BovM500-837 (3). B: Inhibition zone against *M. flavus* NCIB8166 of Dhy-BovA (1), Dhy-BovA modified by BovM (2), and Dhy-BovA modified by His₆-BovM500-837 (3) after digested by BovT150.

2.4 BovM 单独的双功能域间的协同作用

上述实验表明, BovM 的 N 端与 C 端功能域截短蛋白均具有相应的催化活性, 但是活性很低。为了验证仅含脱水或环化功能域的 BovM 重组蛋白能否协同作用相互提高各自的修饰活性, 设计实验测定其共存时的催化活性。首先在体外反应体系中, 将底物、BovM1-500 与 BovM500-837 混合反应, 质谱检测产物分子量。结果表明, 共孵育仍仅产生少量脱水产物, 与单独的脱水功能域催化结果相同(图 6-A)。将产物经 BovT150 酶切, 测定产物抑菌活性, 未检测到抑菌活性, 这可能与脱水产物量很少以及环化活性较低有关(图 6-B)。

随后在体内条件下检测双功能域的协同关系。将 BovA, BovM1-500 以及 BovM500-837 共表达于 *E. coli* 中, 其中前两者连接到 pET-DUET 上 2 个读码框中, 后者连接于 pACYC-DUET 中, 随后两种质粒共同转化 *E. coli* BL21 (DE3), 诱导表达纯化蛋白。由于 pET-DUET 酶切位点与 pET-28a 不同, 未修饰底物预期分子量为 7730.3 Da。结果表明, 上清中并

未检测到 BovAm, 而包涵体经纯化后的产物分子量为 7729.3 Da, 为未修饰 BovA (图 6-C, D)。未修饰可能由于 BovM 的 N 端功能域活性很低, 在体内条件下不能在 *E. coli* 中及时修饰 BovA 所导致。以上结果表明, BovM 双功能域截短蛋白在体内或体外条件下共同行使催化功能时没有协同作用。

3 讨论

羊毛硫多肽的合成是一个复杂又精确的过程, 由脱水与环化所形成的成环氨基酸对羊毛硫多肽的活性非常重要^[2]。在 I 类羊毛硫多肽的形成过程中, 脱水酶 LanB 与环化酶 LanC 协同作用, 两者组成复合体共同对 LanA 进行脱水与环化^[11]。单独的 LanB 或 LanC 都能各自发挥相应的脱水或环化功能, 其功能具有独立性^[12-13]。另一方面, 对 IV 类羊毛硫多肽合成酶 LanL 的研究表明, 三功能域酶 LanL 的 C 端与 LanC 具有同源性, 而其 N 端具有 Ser/Thr 激酶与磷酸酶双结构域, 缺失 C 端功能域的

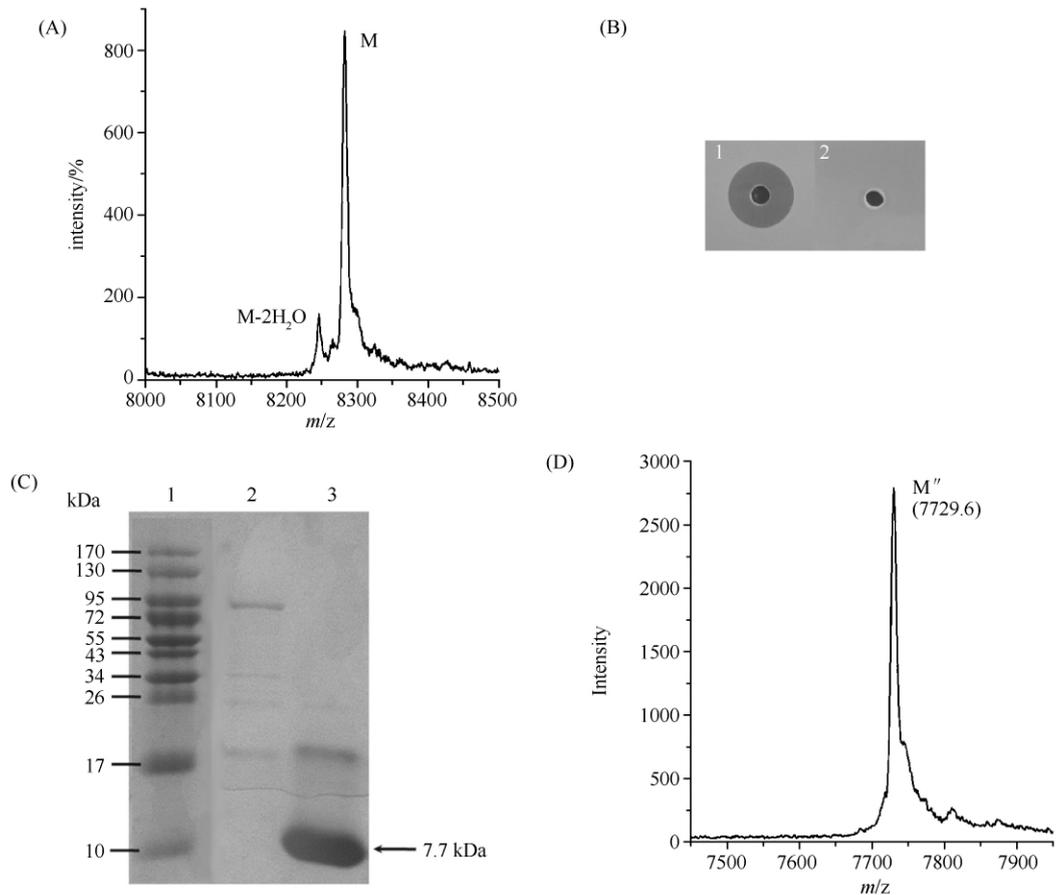


图 6. BovM 双功能域体外 (A, B) 与体内 (C, D) 环境下协同作用分析

Figure 6. Identification of synergistic functions of separate domains of BovM *in vivo* (A, B) and *in vitro* (C, D). A: MALDI-TOF MS spectra of BovA incubated with BovM1-500-His₆ and His₆-BovM500-837 for 4 h. B: Inhibition zone of Bovicin HJ50 (1), and BovA incubated with BovM1-500-His₆ and His₆-BovM500-837 and subsequent incubated with BovT150 (2). C: Tricine SDS-PAGE of purified products. Lane 1: protein marker; lane 2: pupernatants of induced *E. coli* BL21 (DE3) harbouring pETDuet-bovA-bovM1-500 and pACYCDuet-bovM500-837; lane 3: inclusion body of above mentioned induction products. D: MALDI-TOF MS spectra of purified inclusion body.

LanL N 端截短蛋白具有脱水酶活性并缺失了环化酶活性^[14]。LanM 的 N 端结构域与 LanB 和 LanL 并无同源性,暗示其与后者具有不同的修饰机制。此外,先前研究结果表明,将 LanM C 端保守的锌离子结合位点突变后,LanM 环化活性丧失,但仍保有脱水活性,暗示其双功能域功能是独立的^[6]。本研究首次成功在体外重建了 BovM 的 N 端与 C 端的各自脱水与环化活性,实验结果表明 BovM 单独的功能域重组蛋白仍具有相应的活性,但其相应活性均显著下降,证实了其双功能域间功能上的相对独立性。本研究同时还发现,双功能域的截短蛋白在共同作用时,并无明显的协同功能出现。这暗示其双功能域间可能没有直接的相互作用,在 BovM 分子中脱水与环化功能域之间的空间关系并非十分稳

定,还需要通过双功能域间的连接片段实现其功能上的协同作用。

对 lacticin 481 修饰酶 LctM 的体内结合实验表明,LctM 不同长度以及不同区域的截短蛋白对前肽 LctA 的结合活性均明显下降,此研究说明底物结合可能需要全长 LctM 参与^[15];而 nukacin ISK-1 修饰酶 NukM 的体内结合实验表明,NukM 的 N 端或 C 端截短蛋白均仍保有与前肽 NukA 结合活性^[16]。本研究显示,BovM 的双功能域重组蛋白均显示出很低的催化活性。综合以前的报道推测,这可能是由于单功能域重组蛋白的底物结合活力下降造成的。BovM 的 N 端与 C 端功能域均具有底物结合口袋的一部分,单一功能域的重组蛋白底物结合口袋均不完整,底物结合活性由此大幅下降,于是催化活性也

显著降低,但单功能域重组蛋白的催化中心结构仍保持完整,尚能完成相应的催化功能。

截至目前尚未有对 LanM 家族蛋白进行结构解析的报道。对全长 LanM 进行结晶可能会因双功能域在空间上的不稳定性而具有一定的难度,而将 LanM 双功能域分别表达各自结晶获得单个功能域的结构是一种可行的替代方法。本实验表明,虽然 BovM 单功能域活性下降明显,但仍具有相应的功能,说明单个功能域仍然具有相应的活性中心,对其结构解析仍能获得正确的结构信息,由此深入了解 BovM 的催化机制。另外,对 BovM 催化机制的研究可更深入了解 LanM 家族蛋白的催化特性及其对底物的要求,为对酶或底物进行理性设计提供理论依据,从而为酶的工程化改造奠定基础。

参考文献

- [1] Knerr PJ, van der Donk WA. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, 81: 479-505.
- [2] Chatterjee C, Paul M, Xie L, van der Donk WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*, 2005, 105 (2): 633-684.
- [3] Molloy EM, Ross RP, Hill C. 'Bac' to the future: bioengineering lantibiotics for designer purposes. *Biochemical Society Transactions*, 2012, 40 (6): 1492-1497.
- [4] Xie L, Miller LM, Chatterjee C, Averin O, Kelleher NL, van der Donk WA. Lacticin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science*, 2004, 303 (5658): 679-681.
- [5] Chatterjee C, Miller LM, Leung YL, Xie L, Yi M, Kelleher NL, van der Donk WA. Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127 (44): 15332-15333.
- [6] Paul M, Patton GC, van der Donk WA. Mutants of the zinc ligands of lacticin 481 synthetase retain dehydration activity but have impaired cyclization activity. *Biochemistry*, 2007, 46 (21): 6268-6276.
- [7] Levensgood MR, van der Donk WA. Use of lantibiotic synthetases for the preparation of bioactive constrained peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18 (10): 3025-3028.
- [8] Xiao H, Chen X, Chen M, Tang S, Zhao X, Huan L. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*, 2004, 150 (Pt 1): 103-108.
- [9] Lin Y, Teng K, Huan L, Zhong J. Dissection of the bridging pattern of bovicin HJ50, a lantibiotic containing a characteristic disulfide bridge. *Microbiological Research*, 2011, 166 (3): 146-154.
- [10] Liu G, Zhong J, Ni J, Chen M, Xiao H, Huan L. Characteristics of the bovicin HJ50 gene cluster in *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*, 2009, 155 (Pt 2): 584-593.
- [11] Lubelski J, Khusainov R, Kuipers OP. Directionality and coordination of dehydration and ring formation during biosynthesis of the lantibiotic nisin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (38): 25962-25972.
- [12] Garg N, Salazar-Ocampo LM, van der Donk WA. In vitro activity of the nisin dehydratase NisB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (18): 7258-7263.
- [13] Li B, Yu JP, Brunzelle JS, Moll GN, van der Donk WA, Nair SK. Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science*, 2006, 311 (5766): 1464-1467.
- [14] Goto Y, Okesli A, van der Donk WA. Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family. *Biochemistry*, 2011, 50 (5): 891-898.
- [15] Uguen P, Le Pennec JP, Dufour A. Lantibiotic biosynthesis: interactions between pre-lacticin 481 and its putative modification enzyme, LctM. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (18): 5262-5266.
- [16] Nagao J, Aso Y, Sashihara T, Shioya K, Adachi A, Nakayama J, Sonomoto K. Localization and interaction of the biosynthetic proteins for the lantibiotic, Nukacin ISK-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69 (7): 1341-1347.

Individual catalytic activity of two functional domains of bovicin HJ50 synthase BovM

Hongchu Ma^{1, 2}, Yong Gao^{1, 2}, Fangyuan Zhao^{1, 2}, Jin Zhong^{1*}

¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] To reconstitute the *in vitro* catalytic activity of the individual dehydratase or cyclase domain of bifunctional bovicin HJ50 synthase BovM, and lay a foundation for the further investigation of catalytic mechanism of class II lantibiotic synthase LanM. [Method] The truncated proteins of BovM containing the N-terminal dehydratase domain or C-terminal cyclase domain were expressed in *E. coli* and purified. Substrate BovA, the precursor of bovicin HJ50, was incubated with these truncated BovM proteins in *in vitro* reaction system. The antimicrobial activity assay and MALDI-TOF MS analysis were used to monitor the dehydratase or cyclase activity of these truncated proteins. Meanwhile, the synergistic activities of both truncated proteins were tested *in vivo* and *in vitro*. [Results] The N- and C-terminal domains of BovM possessed dehydration and cyclization activity respectively. However, no synergistic activity was detected between these two functional domains. [Conclusion] The individual functional domains of BovM could execute their corresponding functions independently, but the intactness of BovM was important for its full modification activity.

Keywords: lantibiotics, bifunctional enzyme, dehydration, cyclization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-Q-14, KSCX2-EW-J-6)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

Received: 25 March 2014/Revised: 29 April 2014

《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”，即：编辑部内审，专家外审，主编总审。从投稿日期开始，争取在2个月之内给出审稿结果，3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后，首先要由编辑初审，通过后再送外审。将请2位专家进行审阅，再送主编进行最后的总审，这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大，编辑部将再请第3位专家进行初审，之后再送主编总审，那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后（即主编给出总审意见），编辑会给作者发出E-mail告知修改意见（包括学术上的和写作格式上的）。作者在返回修改稿后，经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者，在没有完成全部审稿之前，不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。