

抗生素产率提高和品种改造的遗传工程途径

邓子新 周秀芬

(华中农业大学, 武汉 430070)

[摘要] 过去的十几年是遗传学,尤其是分子遗传学发展的鼎盛时期,这种发展,极大地推动了生物技术产业,尤其是单基因产品产业化发展。然而,对抗生素这种特殊的生物产品而言,因为它是由一套成簇排列的基因协同作用所产生的,只有合成出来的终产物才具有生物活性,所以相对来说,利用分子遗传学的高新技术来进行抗生素效价和品种的遗传工程改良就不如单基因产品那样简单易行。不过,对一系列抗生素生物合成基因簇的克隆及对这类生物合成途径及其遗传调控机理的了解,已为我们提供了许多有益的信息,使我们能把经典的和现代的方法学结合起来,通过对抗生素产生菌的遗传操作来大大提高菌种的产率,或“说服”微生物产生它原本不产生的抗生素。本文根据现有知识来讨论和阐述这个诱人领域的发展前景。

[关键词] 链霉菌, 抗生素, 遗传工程

1 前言

50多年前发现的诸如青霉素、链霉素这类临床上重要的抗生素,极大地刺激了人们从微生物(和植物)资源中寻找大量具有生物活性的物质,也因此获得了许多在农业、医学和营养学上具有价值的产物。然而,由于“递减规律”的制约,70年代以来,发现新抗生素的步履已越来越艰难。现在,尽管人们不断发展了更为敏感和更具有选择性的新筛选办法,揭示天然产物新结构的工作也更加理性化,通常仍要从上万个具有生物活性的分离物中才能发现一种具有潜在用途的新物质。那么,面临着抗生素类物质不断更新换代的需要,如何开拓发现新抗生素的新的有效途径呢?

在重组DNA技术问世之前,曾用两种方法来产生新抗生素,这两种方法都利用了次级代谢过程中的酶可以作用于非天然基质的能力。一种方法是在正常微生物的发酵过程中将异常前体转变成已知抗生素的结构类似物。已利用这种方法产生了新的 β -内酰胺类抗生素。然而,用这种方法所产生的抗生素通常是天然抗生素与其类似物的混合物。后来采用抗生素代谢途径某个步骤的阻断突变株进行“突变合成”,使得发酵过程产生非天然的抗生素,因而方便和改良了结构类似物的回收工作。尽管用突变合成也产生了一些新抗生素,但因制备前体物质较难,又较昂贵,加上转化率又低,所以尚未投入商品生产。

在抗生素领域,除了需要不断发掘新抗生素以外,提高已知抗生素产生菌的生产能力也是抗生素产业的重要环节。几十年来,人们进行了不懈的努力来改良微生物的生产能力,但直到现在,常用的技术仍不外乎诱变剂的复合处理(如紫外、化学或环境压力),利用选择因

本文于1994年5月16日收到。

子（如利用抗生素的毒性剂量，生化抑制剂或金属离子）处理来筛选获得生产力提高的突变株。当然，优化发酵过程，找到最适的培养基组合和生长参数也发挥了不可忽视的作用。

70 年代重组 DNA 技术的兴起，以及 80 年代对链霉素及近缘细菌抗生素生物合成的研究，在很大程度上转移了人们的注意力，把发现新抗生素，获得高产菌株和廉价发酵工艺的期望寄托到遗传工程上。然而，应该充分认识到，即使对链霉菌分子生物学的认识正越来越深入，但若缺乏对抗生素生物合成分子生物学方面足够的知识，要理性地达到这个目标，随心所欲地对某个菌株进行遗传改造，谈何容易！

本文将综述在过去的十几年中，由于链霉菌分子遗传学的飞速发展给这个领域带来的生机，并讨论在抗生素产业上如何利用现有知识的问题。

2 支撑技术的发展

在链霉菌及其近缘放线菌中进行抗生素生物合成基因簇的分离、分析、转移和操作是尝试利用现代分子生物学技术改造抗生素效价和品种的必要前提。这类基因成簇排列的特点使得这种操作趋于容易，当然，支撑技术的发展起了关键的作用。

2.1 抗生素生物合成基因簇分离的方法学

迄今已发展 8 种分离抗生素生物合成基因簇的主要方法^[1]，这 8 种方法是：（1）克隆在标准宿主中然后检测单个基因产物。这种方法仅适用于具有方便而又敏感的检测系统的那些基因产物，可选择变铅青链霉菌 1326 或其衍生菌株制备基因文库，因为它们都是转化实验的有效宿主。（2）产生菌阻断突变的互补。这是最常用的方法，但必须分离抗生素生物合成的阻断突变株，当用鸟枪法制备的基因文库转入阻断突变株以后，突变体的互补可以恢复抗生素的生产力。（3）抗生素产生菌的突变克隆。此法是用天兰色链霉菌的温和性噬菌体为克隆载体的，作为载体的噬菌体没有附着位点（att），所以不能与染色体上的附着位点重组。但当它携带了来自染色体的部分片段以后，就可与染色体上的同源部分发生交换而形成溶源。由于载体上插入了抗性标记，所以溶源菌就很易筛选到。因为外源插入片段既不含启动子，又不含终止子区，所以通过这种片段所介导的重组就会使插入位点所在的基因的失活。（4）先克隆抗性基因，继而分析与之相连锁的生物合成基因。抗生素产生菌都对自身所产生的抗生素有抗性，一般认为，抗性的表达与生物合成同步。因此，抗性基因必然接近或连锁于生物合成基因。抗性基因的克隆是容易的，不过克隆的片段一般都比较大。还应意识到，有的抗生素不止一种抗性基因，这些基因不一定紧密连锁。（5）用与生物合成基因局部同源的寡聚核苷酸探测基因文库。如果分离纯化了至少一种与抗生素生物合成有关的酶的话，就可以根据该酶 N 末端的氨基酸顺序合成一段寡聚核苷酸，然后以此作为探针通过菌落或噬菌斑杂交的方法即可获得所需克隆。链霉菌基因对密码子的利用明显不是随机的，其密码子的第三位 90% 以上是 G 或 C，这一点对合成具有较强同源性的寡聚核苷酸颇有帮助。（6）将大片段 DNA 直接克隆到某个不产这种抗生素的宿主中，以获得抗生素生物合成能力为指标获得克隆体。尽管目前所揭示的抗生素生物合成基因簇无一不是连锁在一起的，这种技术仍有很大的局限性，因为抗生素基因簇可能很大，一举获得完整基因簇的几率不大。在缺乏其它可行技术的情况下，此法仍值得一试。（7）利用已经克隆的某种抗生素生物合成基因片段为探针，探测未知的同类抗生素基因簇。这一方法适用于不同化学结构类型的抗生素，在聚酮类抗生素生物合

成基因克隆的诸多试验中取得了最为广泛的成功。近期的结果暗示, 抗生素生物合成基因簇中的激活子基因之间具有 DNA 序列的同源性, 因此就较易通过已经克隆的激活子基因来克隆未知的激活子基因。(8) 自身克隆或克隆到近缘的同类抗生素产生菌中, 以抗生素超产或降产筛选与抗生素生物合成产量性状有关的因子。已知抗生素合成分别受到正或负的调节, 正控因子的加倍或负控因子的失活可以导致抗生素超产, 而负控因子的加倍或正控因子的失活则可能导致降产。不过应当注意的是, 这种控制数量性状的因子既可能是抗生素生物合成基因簇的一部分, 也可能是与抗生素生物合成基因簇完全无关的一些多效性细胞因子。

2.2 遗传学工具的发展和利用

这些年来, 对抗生素产生菌进行分子遗传操作的工具有了飞速的发展, 新的材料和方法学不断涌现。本文不详述质粒、噬菌体载体以及原生质体转化, 转染。链霉菌中有效转座子和转座诱变系统的发展缓慢, 但近几年取得了很大的成功: Tn4560 和 Tn5096 两个系列的转座子^[2,3]都得到了广泛的应用, 前者不仅成功地用来帮助分离了与抗生素生物合成有关的基因片段, 还用来对已经克隆的片段进行了有效的诱变。

分析和操作抗生素生物合成基因的一个关键步骤就是要能中断基因或基因簇, 在基因(簇)中插入一段外源 DNA (最好携带一个抗性标记) 或利用一个克隆片段与受体基因组序列的同源性, 迫使它们发生单交换或双交换均可达此目的。近来, 这方面的进展尤其引人注目, 不仅以温和性噬菌体 ϕ C31 衍生的载体取得了广泛的成功, 以天然温敏性质粒 pSG5 发展而来的载体提供了进行基因置换试验的最有效方法之一^[4], 用不能在链霉菌中复制的大肠杆菌质粒来转化靶细胞也同样十分奏效^[5], 这些系统已可以施用到许多不同的抗生素产生菌中。

当在大肠杆菌中完成了基因工程的操作以后, 把基因转移到链霉菌宿主中是十分必要的。以前, 这种基因转移都是靠转化来完成的, 而不同宿主对外源 DNA 的限制性往往是一个难以克服的障碍。而现在, 接合转移的办法可在许多情况下取代转化, 这主要是因为发现了携带接合转移起始点 (oriT) 的大肠杆菌质粒可在宿主起反式作用的转移功能的诱动之下, 通过接合而转移到许多链霉菌细胞中^[6]。

在两个主要的方面需要掌握链霉菌基因表达的信息: 第一, 单个的抗生素生物合成基因在天然或其它宿主中表达以提供进行体外研究的蛋白; 第二, 要使一簇与代谢产物生物合成有关的基因适时转录和翻译并达到一定的表达水平^[7]。前者可在大肠杆菌中利用可诱导的 T7 噬菌体启动子而达到目的 (改变链霉菌偏爱利用的那些氨基酸密码子可大大提高其在大肠杆菌中的表达水平)。而要达到后一个目的, 即在链霉菌中控制一套途径酶基因的表达则更困难。尽管我们已积累了大量有关链霉菌天然启动子和翻译信号的知识, 也对抗生素生物合成基因簇与营养和发育基因之间的协同表达有所了解, 但要说抓住了杂合抗生素生物合成途径成功表达的关键还为时过早。

3 抗生素产率提高的遗传工程途径

产率提高的最简明的遗传学途径就是从生产菌中把一些随机 DNA 片段克隆到产生菌或产生同类抗生素的菌种中去, 然后, 再筛选高产转化子。这个方法完全是凭经验, 但如果有一个方便而且可以定量的筛选步骤的话, 此法较为实用。此外, 通过基因剂量或调节抗生素生物合成的过程也有一定的成功机会。

因为抗生素生物合成通常受到基因簇内某个基因的调节, 可以看看这个基因的突变是否可以在某些情况下促进抗生素的产生, 区域缺失效应或位点特异性突变的效应, 以及在调节基因前加入一个强启动子的方法均值得一试。在这方面, 应当使用基因置换方法置换出基因组中的野生型顺序而不用质粒或噬菌体载体。因为这些载体需要在选择压力下才可稳定。通过 ϕ C31 衍生载体上携带的突变 DNA 进行均质化或通过高拷贝载体上突变 DNA 插入片段与染色体上的同源部分进行类似的双交换以置换基因的方法已得到阐明。使用整合性 DNA, 如 SLP1, ϕ C31, Tn4560 或 IS117 来插入突变 DNA 的方法也值得一试。

当然, 提高产率的更直接的途径是增加正控因子或一个在生物合成途径中催化某个限速步骤的酶的基因的拷贝数^[1]。例如, *afsB* 这个调节天蓝色链霉菌中 A 因子和色素代谢物的基因在质粒上以好几个拷贝数存在时, 在 A 因子缺陷的变铅青链霉菌中引起了色素的超量产生。用 Alterbuchner 和 Cullum^[8]描述的载体或修改了的可用大观霉素选择的系统用于待试菌种, 基因剂量的增加通常伴随着 DNA 的扩增。不过这个途径可能导致由高基因剂量产生的有害效应, 即使在选择压力下, 重组菌株可能也不稳定。抗生素生物合成基因存在于高拷贝质粒并导入同源或异源菌株后产量降低的情况也有报道。此外, 确定那个步骤是合成途径中的限速步骤并不是一件简单的事, 因为我们并不了解在抗生素生物合成的多步骤途径中什么东西调控着酶的效价和活力(某中间产物在体内的累积可以暗示它向下一个中间产物的转化是一个限速步骤, 但这一点只能做一个大致的参考)。因此, 增加基因剂量的结果并不易预见, 不过值得一试。

衍生菌株产生抗生素的水平是由抗生素生物合成和对自身抗性酶共同确定的, 这个假设为在菌种改良计划中选择高抗性菌株提供了依据并已取得了成功。Cramer 和 Davies^[9]试验了增加氨基糖苷-6-N-乙酰转移酶基因的拷贝数对氨基糖苷类抗生素产生的影响, 将这个基因克隆在 pIJ702 并分别转入卡那霉素链霉菌和弗氏链霉菌以后使抗性和生物合成均相应增加。应该提到的是, 有些产生菌(如产大环内脂和氨基糖苷类抗生素)不止一个抗性基因。观察抗性基因和生物合成基因启动子相重叠区域的抗性基因上的位点特异性突变对抗生素生物合成的影响将特别有趣。

还有一个提高产率的途径, 就是把整个抗生素生物合成基因簇导入到一个异源寄主中看其是否会解除抗生素生物合成所受到的调节^[1]。如果在天然产生菌中某种主代谢(或次生代谢)的成分在调节抗生素生物合成中起到重要的作用, 这种调节在一个遗传和生理背景完全不同的菌种中可能很不一样, 甚至不存在, 因此也有可能产率增加。这个途径听起来象是在打赌, 也可能不适用, 因为大片段 DNA 可能在重组菌株中不稳定。不过已知整个 *act*, 十一烷基灵菌红素和次甲霉素的整套基因已稳定地插入到 SCP2 衍生的载体中, 柔红霉素和 tetracenomycin C 的整套基因也稳定地插入到 pKC505 中。在次甲霉素的情况下, 基因簇一端的小段缺失还导致了高产。

除了纯遗传学途径以外, 蛋白工程也提供了简化生物合成途径, 加速生物合成的方法。我们对蛋白结构和酶的催化性相互关系方面的了解揭示出通过遗传工程改变一级氨基酸顺序最终优化某个途径酶催化效率的可能性。在这一点上, β -内酰胺类抗生素颇有希望。在这类抗生素中, 异青霉素 N 合成酶(IPNS)经过 3—5 个步骤催化形成一个关键的化合物, 并可把大量三肽基质的类似物- δ -(L- α -氨基己二酸)-L-胱氨酸-缬氨酸转化成异常的 β -内酰胺^[10]。已从青

霉、顶头孢霉和曲霉中克隆了 INPS 基因并在大肠杆菌中得到了表达。一旦抓准了有关其生化反应机制的更多的知识就可用来主动地改良它的活性。把突变的 IPNS 基因或置于一个更强启动子控制之下的正常基因导入到真菌或细菌寄主即可导致青霉素的高产。另一方法是利用改造了的 IPNS 酶的固定化在体外大量产生异青霉素或头孢霉素。蛋白工程途径当然比上述方法需要更大的努力,因为它需要分离和研究途径酶,不过它具有可靠性。

还有另外一些可用遗传工程来改变并期待改良生产过程的一些东西,这包括通常受阻遏的一些基因,它们编码碳、氮源代谢酶以避免一些容易利用的营养对抗生素生产的影响;一些提供生物合成途径中首要中间物前体的基因,可以通过促进合成增加前体的可用性;那些编码热敏性调节蛋白或途径酶的基因以使得发酵在高温中进行,成本降低;以及那些控制抗生素向发酵培养基中分泌或阻碍抗生素再吸收的基因(阻碍再吸收是抗生素产生菌的通用抗性机制)。然而,在所有的情况下,包括利用微生物重组产生新抗生素,没有我们对抗生素合成有关的生化遗传和生理因素的更多更深的了解,经验方法都仍会在基于链霉菌和其它微生物的遗传工程进行菌种改良的所有途径中起主导作用。

4 抗生素品种改造的遗传工程途径

在重组 DNA 技术问世以前,诱导微生物产生新抗物质的主要方法有:(1) 突变合成,即“说服”某个抗生素生物合成的阻断突变株把发酵过程中加入的某种非天然前体转化成为某种抗生素的结构类似物;(2) 杂交合成,即在野生型抗生素产生菌中加入一种酶抑制剂(如对聚酮类抗生素而言,加浅蓝菌素),使天然抗生素的合成“断路”而有利与外加前体物质的结合形成新产物。

异常非天然前体不易吸收或不是正常酶促途径的合适基质的问题可能是上述方法成功与否的限制因素,使用纯化酶则可能通过调节酶和基质的浓度, pH, 温度等因素来使酶促过程达到最大催化,如使用纯化的异青霉素 N 合成酶(IPNS)则可在体外催化许多不同的三肽(ACV)类似物环化成 β -内酰胺抗生素的结构类似物^[11]。诚然,这种方法在新抗的筛选方面也具有十分诱人的前景。

把两种菌株放在一起,经过重组,不用外源添加任何前体即可合成一种新产物。这个方法与前述的几种方法相比,好象更进了一步。说起来通过杂交或原生质体融合产生这种重组菌株十分简单,实际上盲目性很大。用这种方法所产生的抗生素大多不是真正的抗生素生物合成基因之间重组以后的新组合,在多数情况下则可能是接合或原生质体融合过程导致获得或诱导了某种抗性基因的表达,而使某个亲本中本来处于沉默状态的某个抗生素生物合成基因簇得于表达^[10]。

抗生素生物合成的遗传学和分子生物学的进展给抗生素的结构改造和变异带来了新的生机。抗生素生物合成基因可以天然的形式在近缘细菌中成功表达提供了产生杂合抗生素的途径。这种方法通常产生与亲本类似的代谢物,克隆的基因可用来通过遗传操作控制自身的表达水平,来指导它与其它基因的重组,来提供对一种新抗生素的抗性。随着对酶结构和功能知识的深化,最终应有可能改变途径酶的特性,使它们可对异常基质也产生有效作用。因此,抗生素产生菌的基因工程在发掘新的(杂合)抗生素并形成大规模生产方面比上述任何方法都具有较少的限制因素。

对放线紫红素基因 (act) 的研究和利用, 是这个领域的开拓性工作^[12], 将 act 基因簇部分或全部地克隆到产生曼得霉素或榴菌素的链霉菌中, 分别产生了两种异色醌类抗生素, 即曼得红菌素和二氢榴红菌素, 反映出参与放线紫红素生物合成的酶能够作用于曼得霉素和榴菌素途径中的同类中间代谢物, 反之亦然。曼得红菌素是曼得霉素在 6 位发生了羟基化的结果, 相信是 actV 基因产物 (羟化酶) 的作用。二氢榴红菌素是榴菌素的立体化学在位点 1 或 3 发生了颠倒所致, 这可能是在榴菌素的途径中利用了放线紫红素前体的缘故, 因为只有当完整的 act 基因簇存在于榴菌素产生菌时才能产生二氢榴红菌素。与曼得霉素和榴菌素的产量相比, 两种新抗生素的产量都增加了。有趣的是, act 基因在两种不同的寄主菌株中具有不同的行为, 在曼得霉素产生菌中, 它们独立起作用, 只有当引入一组 act 基因时才引起杂合抗生素的产生, 在榴菌素产生菌中, 它们与榴菌素途径的合成酶合作, 几乎全部产生二氢榴菌素。

许多大环内脂类抗生素 (如红霉素, 泰洛星等) 的基因簇已被克隆。将一簇红霉素生物合成基因 (不是所有基因) 转入到变铅青链霉菌中, 低产了一种红霉素的类似物; 当用竹桃霉素产生菌的基因文库去转化红霉素产生菌的一个阻断突变株, 产生了一种新的红霉素衍生物, 经鉴定为 α -去甲基红霉素^[13]。在一个 16 员大环内酯抗生素——螺旋霉素产生菌中引入另一个 16 员大环内酯抗生素——碳霉素基因的 DNA 片段, 产生了异戊酰螺旋霉素^[14]; 同理, 在另一个螺旋霉素产生菌中引入另一个同类抗生素——麦迪霉素的基因片段, 导致产生了丙酰螺旋霉素^[15]。此外, 将红霉素生物合成途径中的羟基化酶在体外中断, 再引入原株, 造成染色体上相应部分的基因阻断, 也产生了脱氧红霉素^[16]。看来, 在大环内脂类抗生素中, 改变聚酮体起始单位, 可得到带不同侧链的聚酮体, 改变聚酮体合成中某个酶基因, 或将聚酮合成酶中不同基因重新组合都有可能新结构化合物的形成。

用其它类别抗生素 (如氨基糖苷类、四环素类、蒽环类、多醚类) 的途径酶的基因也可产生其它类型的杂合抗生素, 它们在异源寄主的出现可因这个寄主的遗传和生理背景不同而表达了某个宿主专一性或克隆专一性的 (通常是缄默的) 基因从而产生一种杂合抗生素, 在链霉菌中处于沉默状态的吩嗪合成酶基因的表达就是一个实例^[17]。然而, 这方面的探索尚不多见。

利用遗传工程来探索新抗并非毫无障碍, 由于某些宿主存在着限制性障碍或缺乏可用载体, 这样, 要导入外源 DNA 并非易事。将外源 DNA 以高拷贝形式引入到同源的遗传背景之下可能阻抑抗生素的产生。提供某个宿主对一种新抗生素的抗性基因以使其对新产物产生抗性, 也不是一件简单的事。此外, 那些受到暂时调节的抗生素生物合成基因, 则可能需要某些寄主特有的调节因子 (蛋白), 而这些因子在异源寄主中则可能不存在。尽管有这样那样的问题, 抗生素产生菌的遗传工程仍不失为一个发掘新抗和提高现有微生物次级代谢产物的产量的强有力的方法。

参 考 文 献

- [1] Chater K F. *Biotechnology*, 1990, 8: 115.
- [2] Chung S-T. *J. Bacteriol.*, 1987, 169: 4436.
- [3] Solenberg P J, Burgetts S G. *J. Bacteriol.*, 1989. 171: 4807.
- [4] Khosla C *et al.*. *M G G*, 1992, 6: 3237.

- [5] MacNeil T *et al.*. J. Bacteriol. , 1993, **175**: 2552.
- [6] Mazodier P *et al.*. J. Bacteriol. , 1989, **171**: 3583.
- [7] Baltz R H. Curr Opin Biotechnol. , 1990, **1**: 12.
- [8] Altenbuchner J, Cullum. J. Biotechnology, 1987, **5**: 1328.
- [9] Crameri R, Davies J. J. Antibiot. , 1986, **39**: 128.
- [10] Hutchinson C R. Med. Res. Rev. , 1988, **8**: 557.
- [11] Wolfe S *et al.*. Science. , 1984, **226**: 1386.
- [12] Hopwood D A, Malpartida F. Nature. 1985, **314**: 642.
- [13] Mcalpine J B *et al.*. J. Antibiotics, 1987, **40**: 1115.
- [14] Epp J L *et al.*. Gene. , 1989, **85**: 293.
- [15] 王以光. 第七次全国抗生素学术会议论文汇编. 1993, 23-31.
- [16] Weber J M *et al.*. Science, 1991, **252**: 114.
- [17] Jones G H, Hopwood D A. J. Biol. Chem, 1984, **259**: 14158.

OVERPRODUCTION AND CREATION OF ANTIBIOTICS BY GENETIC ENGINEERING

Deng Zixin Zhou Xiufen

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract An outburst of studies has been seen in the area of genetics and especially molecular genetics over the past decade. Many developments greatly stimulated a dramatic expansion of the biotechnology industry particularly in the direction of the products of single genes. Antibiotics, a class of complex products usually resulted from the concerted action of a cluster of genes, are more difficult to manipulate in terms of yield increase and creation of new products. However, the successful cloning of a number of antibiotic biosynthetic gene clusters and understanding of the genetic control of antibiotic production in more and more depth are now providing useful information that should allow the imaginative application of a combination of traditional and modern technology for the yield improvement and creation of antibiotics using *Streptomyces* species. Here we will discuss the rapid development in this tempting and prosperous field.

Key words *Streptomyces*, Antibiotic, Genetic engineering