

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

豐原素合成基因，*fenY* 的研究

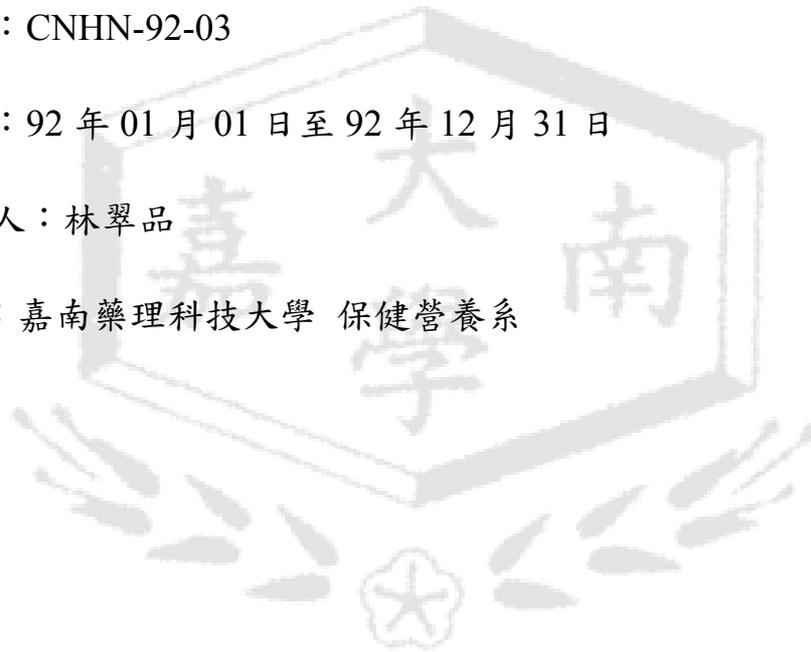
計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNHN-92-03

執行期限：92年01月01日至92年12月31日

計畫主持人：林翠品

執行單位：嘉南藥理科技大學 保健營養系



中華民國 九十三年二月二十六日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNHN-92-03

執行期限：92 年 01 月 01 日至 92 年 12 月 31 日

主持人：林翠品 嘉南藥理科技大學 保健營養系

一、中文摘要

枯草桿菌 F29-3 突變株的篩選是以 Tn917 轉位子進行突變作用所得到的，將這些突變株以南方墨點法分析，發現 FE8 突變株中 Tn917 轉位子所突變的位子不在豐原素 peptide synthetase 操縱組上。進一步以 Tn917 轉位子所突變的附近染色體序列作為探針篩選枯草桿菌 F29-3 基因庫，再分析 DNA 序列發現 FE8 突變株中 Tn917 轉位子所突變的位子是在與氮代謝有關的 *nasA* 操縱組附近的基因 (*fenY*)，FenY 蛋白質序列分析發現含有三個磷酸化的位子，所以推測 FenY 可能參與在豐原素合成的調控上。

關鍵詞：豐原素，枯草桿菌，非核糖體。

Abstract

A *Bacillus subtilis* F29-3 mutant defective in fengycin biosynthesis was isolated by Tn917 mutagenesis. Southern hybridization revealed that Tn917 in this mutant is inserted at a location outside of the

chromosomal region containing the fengycin synthetase operon. Sequencing analysis showed that the transposon is inserted in an unknown gene *fenY* in the *nasA* operon. The protein encoded by this gene potentially contains three phosphorylation sites and may be involved in the regulation fengycin synthesis

Key words: Fengycin, *Bacillus subtilis*, Nonribosomal peptide synthesis.

二、緣由與目的

在轉位子 Tn917 突變實驗中我們分離 20 個豐原素突變株，分析這些突變株我們發現有 2 株豐原素突變株—FE8 及 FX28，它們的 Tn917 所鑲入的位置並不在豐原素合成酶基因上。進一步分析這些序列發現 FX28 突變株中 Tn917 是鑲入與 glutamine synthase 基因具有同源性的區域；FE8 突變株中 Tn917 是鑲入與 nitrate/nitrite 代謝相關基因。也在研究豐原素產量中發現在含有 1% sodium nitrate 的 soybean meal-mannitol 培養基會增加豐原素的產量，但是在含有 ammonium 培養基就會使產量下降。此外，也發現豐原素合成酶啟動子的表現有二個階段。所以我們

認為 FX28 及 FE8 突變株中 Tn917 所鑲入的基因可能是參與豐原素合成基因表現的調控。因此在這個研究計劃中我們將以 FE8 突變株中 Tn917 所鑲入的序列當作探針，從 F29-3 基因庫中篩選出選殖株 (cosmid clones)。再進一步分析序列，再選殖出 Tn917 所鑲入附近的基因—*fenY*。再將 *fenY* 基因破壞以及進行互補作用的實驗以證明 *fenY* 與豐原素合成有直接關係，並且將 FenY 蛋白質大量表現純化分析其功能並且探討與豐原素合成酶啟動子表現的關係，以更了解豐原素這類脂肽類抗生素表現調控的機制。

三、結果及討論

(一) 豐原素突變株的篩選

為了得到豐原素操作組(*fen operon*)之外的豐原素突變株，我們將 pTV1 質體轉形至枯草桿菌以 erythromycin 誘導進行 Tn917 突變，經過 45°C 隔夜培養去除 pTV1 質體，從 4000 個 Tn917 突變株中得到 20 個豐原素突變株。進一步將線形 pTV20 轉形至豐原素突變株進行交叉重組，所得到的突變株是含有大腸桿菌的複製起始點。再抽取突變株的染色體以 *EcoRI* 限制酶切割，然後將所切割的片段自行連接並且轉形至大腸桿菌 HB101。在由這株 HB101 中可以得到 Tn917 轉位子鑲入的染色體 DNA 片段，以此片段為探針進行南方雜交反應發現有除了 FE8 突變株，其他 19 個突變株的 Tn917 轉位子所鑲入的位子都位於選殖株 pFC660，pFC3-1 及 pFC6A5。

(二) F29-3 選殖株基因庫的篩選

為了瞭解 FE8 突變株中 Tn917 轉位子鑲入的染色體性質，所以以 Tn917 轉位子進行 F29-3 選殖株基因庫的篩選，從 5000 個 F29-3 選殖株基因庫中得到 pFC45E12，

全長約 40 kb，再以 *BamHI*，*EcoRI* 及 *Clal* 限制酶定出 pFC45E12 的圖譜 (圖一 B) 發現 pFC45E12 可以切出三個 *BamHI* 的片段，片段大小分別為 B1 片段為 8.2 kb，B2 片段為 3 kb 及 B3 片段為 28.4 kb。也以南方雜交反應證明 Tn917 轉位子鑲入的位子是在 B3 片段上。

(三) 序列分析

由於以南方雜交反應證明 Tn917 轉位子鑲入的位子是在 B3 片段上，所以進一步將 B3 片段以 *Clal* 切割選殖至 pGEM-5Zf(+), 經由 DNA 定序發現 Tn917 轉位子鑲入在一個含有 567 bp 的開放讀碼架構 (ORF), *fenY* 上, 分析 *fenY* 序列發現 G+C 核苷酸成分含有 40% 而且在轉譯起始點前第 7 個核苷酸上有核糖體結合位置 (RBS), GGAAG, 也發現 Tn917 轉位子是鑲插在第 273 個核苷酸上。所以推測 *fenY* 序列可能可以轉譯出 192 個胺基酸, 分子量約為 23 kDa。再分析胺基酸組成發現有 3 個磷酸化的位置, (S/T)X(E/D), 分別位在第 45-47, 97-99 及 146-148 個胺基酸上 (圖二), 所以推測 FenY 可能為一個磷酸蛋白質。在 FenY 的 N 端的第 1-20 及 23-42 個胺基酸上含有 helix-turn-turn 的結構 (圖二), 所以更可以推測 FenY 可能結合在 DNA 上作為一個調控蛋白質。進一步進行 DNA 比對發現 *fenY* 與枯草桿菌的 *yciB* 有相同性, 而 *yciB* 是位於 *nasA* 操作組上; *nasA* 操作組含有四個基因分別為 *nasA*, *yciA*, *yciB* 及 *yciC*, 所轉譯的蛋白質 NasA 是硝酸轉送子 (nitrate transporter), YciA 及 YciB 功能未知, 而 YciC 和 nitrile hydratase 具有相同性, 推測它們可能參與硝酸鹽與亞硝酸鹽代謝。*nasA* 操作組的啟動子位於 *nasA* 基因上游, 含有二個對稱序列, 而且會受到氮源

的調控，假如將細胞培養在硝酸鹽，脯胺酸及麩胺酸培養基 *nasA* 操作組就會啟動，但是培養在氨基條件就會受到抑制，所以推測 *nasA* 操作組會受活化劑及抑制劑的調控。在豐原素合成研究上也發現類似的現象，在 Vanittankom 的報告也指出在 soybean meal-mannitol 培養基中添加 1% 硝酸鈉會使豐原素的合成增加，但是在含有氮的培養基豐原素合成就會受到抑制，在 Lin 的報告也指出豐原素合成酶操作組的啟動子轉錄的有二個階段，在生長對數期開始活化，到生長對數晚期啟動子轉錄會達到最高峰，在生長靜止期急速下降，所以推測豐原素合成酶啟動子在生長對數晚期受到正向因子調控，而在本研究中顯示 FenY 是一個磷酸蛋白質，可以與 DNA 結合而且對豐原素合成是必需的，所以推測豐原素合成酶啟動子受到 FenY 的調控。

五、計畫成果自評

豐原素合成基因，*fenY* 的研究與原計畫相符，達預期目標的百分之八十。證明 FenY 是一個磷酸蛋白質，可以與 DNA 結合而且對豐原素合成是必需的，所以推測豐原素合成酶啟動子受到 FenY 的調控。此研究將有助於了解豐原素如何合成，也可以更深入明瞭非核糖體合成機制，如此將有利於新抗生素的開發。這個研究成果將近期發表於嘉南學報。

六、參考文獻

1. Chen, C. L., L. K. Chang, Y. S. Chang, S. T. Liu, and J. S. Tschen. 1995.

Transposon mutagenesis and cloning of the genes encoding the enzymes of fengycin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen.

Genet. **248**:121-125.

2. Vanittanakom, N. 1985. Antifungal antibiotics of *Bacillus subtilis* F-29-3: Studies on Bacilysin and Fengymycin, A newly Described lipopeptide. Dissertation, zur Erlangung des Grades eines Doktors, der Naturwissenschaften. Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen, Germany.

3. Koch, U. 1988. Fengycin: Strukturaufklärung eines mikroheterogenen Lipopeptolidantibiotikums. Dissertation, zur Erlangung des Grades eines Doktors, der Naturwissenschaften. Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen, Germany.

4. Lin, T. P., C. L. Chen, L. K. Chang, J. S. Tschen, and S. T. Liu. 1999. Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **181**:5060-5067.

5. Shu, H. Y., G. L. Lin, Y. C. Wu, J. S. Tschen, and S. T. Liu. 2002. Amino acids activated by Fengycin synthetase FenE. BioChem. Biophys. Res. Commun. **292**:789-793.

6. Lin, G. H., C. L. Chen, J. S. Tschen, S. S. Tsay, Y. S. Chang, and S. T. Liu. 1998. Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene *fenB* from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **180**:1338-1341.

7. Nakano, M. M., Yang, F., Hardin, P., and Zuber, P. 1995. Nitrogen regulation of *nasA* and *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **177**: 573-579.

8. Ogawa, K. I., Akagawa, E., Yamane K., Sun, Z. W., Lacelle, M., Zuber, P. and Nakano, M. M. 1995. The *nasB* operon and

nasA gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177: 1409-1413.

sites are boxes. ● represents the Tn917 insertion.

七、圖表

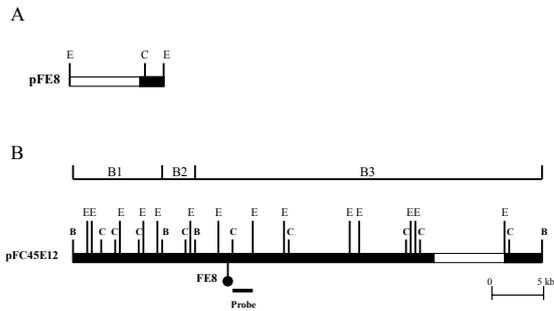


Fig. 1A. The 1.8 kb *ClaI*-*EcoRI* fragment of pFE8 was used for the screening of cosmid library. **1B.** Restriction map of cosmid pFC45E12 (40 kb). Thick lines represent the chromosomal fragment of *B. subtilis* F29-3. White boxes represent vector sequence. FE8 indicates the location of a Tn917 insertion in pFC45E12. pFE8 obtained from the Tn917 insertion mutant FE8. B1, B2, and B3 indicated the three *Bam*HI fragments in pFC45E12. B: *Bam*HI; E: *Eco*RI; C: *Cla*I

```

GGAAGAATGTCATGAAACTGTCATTCTTATTAATTGCTGTTTTGCGCGGCAATCTGCTGTCAGCCTGCTCTTATCATGCGGAGGAG 78
RBS      M K L S F L L I A V F A P A I L L S A C S Y H A D E
AAAGCTGGATCTCAATGAAGAAACAGACAAACACATAAAGGCGGAGAATACAAGCAATGATGGACAAAGCCTCCCGGGGAGAAATAC 168
K A G S Q M K K T D K H I K A E N T S I D W T K P S G G E Y
CCCGATATCAAGCAGCTGAAAAATGCTGGATTGATGTAGACGTGAAACAGCAGAAAGGCTTACATCAAAGCCGGAAGCAAAACCGTCTAT 258
P D I K Q L K N V W I D V D V K Q Q K A Y I K A G S K T V Y
ACCATGGTGTTCATCAGGACTCGATCAAAACCAATGATGATCCACACCCGAAAGGCACATTTCATATCGAGGCTGAACGGGGAGGTGG 348
T M V V S S G L D Q T H D D S T P K G T F H I E P E R G E W
TTTTCTCTGAAGGATATCAGGAAGGGCGGAATCTGGTCTCATGGAAAAACATGGAAAAATTTCTTTTTCACAGCGTACCCATGACA 438
F F S E G Y Q E G A E Y W V S W K N H G K F L F H S V P M T
AAGGACCAAAAAGTCATTGAAAAGGAAGCAAAAAAATAGGGGCAAAAGCATCCATGGCTGTATCAGACTATCCATCCAGATGCGAAT 528
K D Q K V I E K E A K K L G A K A S H G C I R L S I P D A N
TGGATATACGAAAACATACCTGACACACAAAAGTTGTGATCAGCTGA 576
W I Y E N I P E H T K V V I S .

```

Fig. 2. Nucleotide sequence of *fenY*. The three phosphorylation