

透明颤菌血红蛋白基因调控与功能的研究

吴 奕 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 血红蛋白 (VHb) 是一种氧调节、氧结合蛋白。其基因 (vgb) 已被克隆及表达。vgb 基因表达在转录水平上受氧控制, FNR 蛋白作为厌氧激活子介入该调节过程。VHb 可与氧结合参与细胞代谢过程, 使细胞适应贫氧环境。vgb 基因的氧调控启动子和 VHb 蛋白的生理功能在基因工程和发酵工程具有良好的应用前景。

关键词 透明颤菌血红蛋白, FNR, 基因调控, 呼吸

透明颤菌 (*Vitreoscilla*) 是 Beggiatoa 家族的一种丝状, 专性好氧菌, 常可以在沼泽或腐的蔬菜中分离得到。它能合成一种可溶性的血红素蛋白 (Haemprotein) 以适应贫氧环境, 满足其专性好氧性^[1], 这种血红素蛋白由两个相同的亚基组成, 每个亚基分子量为 15, 775, 每分子含有 2 个 b 型血红素 (b Haem)。该蛋白最初被认为是细胞色素 O (Cytochrome O), 有末端氧化酶的功能。但随着真正的细胞色素 O 被分离和确定, 一系列实验结果都向这一结论提出了质疑, 并发现它在许多理化性质上都与高等生物的血红蛋白 (Haemoglobin) 相似^[1]。1986 年前后, 从光谱特性, 氧结合动力学和蛋白质初级结构等角度有力地证明了它是一种原核生物中的血红蛋白类的蛋白质, 并被命名为透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* Haemoglobin, VHb)。根据 Wakabayashi^[1]报道的 VHb 氨基酸序列, 它与其它真核生物的血红蛋白氨基酸序列显示了明显的同源性, 其中与一种豆类血红蛋白 (Lupin Leghemoglobin) 同源性最高, 达 24%, 见表 1。VHb 的生物合成与 *Vitreoscilla* 的生长条件关系密切, 当溶氧 (DO) 成为生长限制性因素时, VHb 大量合成使细胞适应贫氧。VHb 的这一特性在高耗氧的生物过程中具有潜在的应用价值。引起了研究者的重视, 近年来国内外纷纷展开对 *Vitreoscilla* 血红蛋白基因调控、蛋白质功能和应用主面的研究。VHb 是最早发现和确定, 也是迄今为止研究最为深入的一种原核血红蛋白。在 VHb 之后发现的几种原核血红蛋白都与 VHb 存在较高的同源性^[2]。

表 1 血红蛋白的同源性比较: 表内数字为相同氨基酸数在序列中的百分比 (%)

Table 1 Sequence homology (%) in primary structure of several hemoglobin

	HHb α	HHb β	SWMb	GHb	L.L.b
HHb α					
HHb β	60				
SWMb	38	33			
GHb	30	29	32		
L.L.b	23	23	26	23	
VHb	16	16	14	20	24

HHb α : Human α -Chain; HHb β : Human β -Chain; SWMb: Sperm Whale Myoglobin; GHb: Glycera Hemoglobin; L.L.b: Lupin Leghemoglobin; VHb: *Vitreoscilla* Hemoglobin.

1 vgb 基因的克隆与表达调控

Dikshit 和 Webster^[3]根据已报道的 VHb 氨基酸序列合成 DNA 探针杂交筛选了 *Vitreoscilla* 基因库, 得到了含有 vgb 基因的 1.4kbDNA 片断; Khosla 和 Bailey^[4]用类似方法

克隆了 *vgb* 基因。分别克隆得到 *vgb* 基因都在大肠杆菌中获得表达。Khosla 和 Bailey^[4] 还测定了 *vgb* 基因的核苷酸序列, 结果与 Wakabayashi^[36] 报道的 VHb 氨基酸序列十分吻合。*vgb* 结构基因下游与 4 种豆类血红蛋白基因 3' 端序列比较显示了很高同源性, 与大豆血红蛋白 A 基因同源性竟高达 52%, 在 *vgb* 基因转录终止区有茎环结构 ACCA₁taag-gTGGT 和原核转录终止 TTTT₁TA。 *vgb* 在大肠杆菌和 *Vitreoscilla* 中表达条件相似, 都随溶氧水平下跌^[4,6]。光谱分析表明大肠杆菌中表达的 VHb 在富氧呼吸时呈氧合态 (OxyVHb), 而在微氧条件下则呈生理性的还原态^[5], 这与原来在 *Vitreoscilla* 中分析结果完全相同^[1,5]。这些实验结果都说明在大肠杆菌和 *Vitreoscilla* 中 *vgb* 具有相似的调控机理和生理功能。

vgb 基因调控的研究主要围绕着它对氧限状态的应答反应。Khosla 和 Bailey^[7] 在基因工程大肠杆菌以降低溶氧诱导 *vgb* 表达, 并用 Northern(RNA) Blot 测定这一过程 *vgb* mRNA 量, 发现它随溶氧下降而急增, 分析 *vgb* 基因序列上游区, 确定了启动子 P1 的 Pribnow Box 和核糖体结合区域。见图 1。

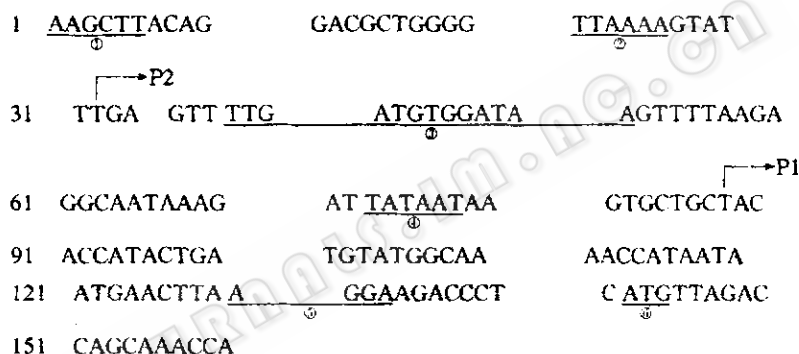


图 1 *vgb* 基因启动子序列分析

Fig. 1 Sequence analysis of *vgb* promoter

用引物延伸分析 5' 端 *vgb* mRNA 确定的转录起始位置与序列分析一致, 证明了上述的启动子(P1)功能, 并发现在该启动子上游还可能存在着另一较弱的启动子(P2)。2 个启动子可能由同一机制受氧调控。Diskshit^[5] 等用 S1 保护法分析 *vgb* 基因的转录也确定了同样的启动子 P1 区域, 而且证明在 *Vitreoscilla* 和大肠杆菌中 *vgb* 的表达是同一启动子的作用结果。当 *vgb* 基因启动子部分缺失时, 它在任何培养条件下都不能得到表达, 融合表达的实验表明, 当 *vgb* 结构基因处于 *tac* 启动子下游时, 其表达受 IPTG 诱导^[7,8]; 而 *vgb* 基因启动子与其它目标基因(Report Gene)如 *cat*, *xylE* 的融合时, 这些目标基因的表达也受氧调控^[8]。所有这些都说明 *vgb* 基因是其自身启动子在转录水平上受氧调控的结果。

但溶氧并非直接作用于 *vgb* 基因启动子上。竺嘉^[9] 等认为细菌应答厌氧环境的调控子 FNR 蛋白介入了 *vgb* 基因调控——当细菌处于微氧环境时, FNR 蛋白自身的氧化还原敏感区感应激活^[10,11], 对 *vgb* 基因启动子具有正调控作用。实验表明在 FNR 缺陷型宿主中 *vgb* 的表达量比普通宿主低几十倍; 而这种 FNR 缺陷型宿主在同时表达外源 FNR 和 VHb 时, *vgb* 的表达量得到回复^[9], 研究 P1 上游序列发现了一段中心对称的反向重复序列 TTGAT—ATTAA, 这段典型的 DNA 结合蛋白的识别序列与 FNR 蛋白的识别

序列(TTGAT - A - ATCAA)仅相差一个碱基^[9], 根据这一 FNR 介入的氧调控模式可由图 2 表示^[7, 9], 由此发展的基因结构数学模型定量模拟了 *vgb* 启动子对溶氧变化的应答过程, 模拟结果在应答速率, 表达强度等方面与实验值良好吻合^[12]。

溶氧并不是影响 *vbg* 基因表达的的唯一原因, 研究表明 cAMP - CAP 复合物也直接或间接地介入了 *vbg* 基因的调控。cAMP - CRP 复合物在大肠杆菌厌氧生长有重要作用, 其作用的方式可能是对碳源加以选择而使代谢适于呼吸途径的改变。cAMP - CRP 复合物对 *vbg* 基因表达的影响可能从属于这一类间接作用。

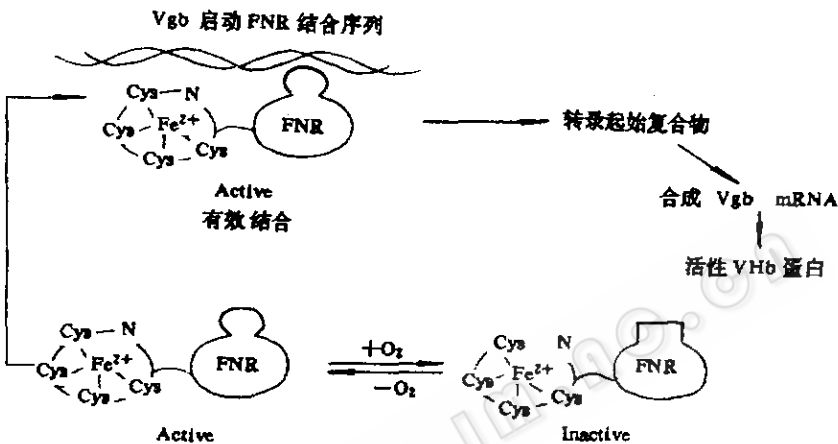


图 2 FNR 介入的 *vgb* 基因氧调控模式

Fig. 2 The mechanism of FNR - dependent regulation of *vgb* in response to oxygen - limited condition

2 VHb 蛋白的生理功能

VHb 的合成使 *Vitreoscilla* 适合在贫氧环境生活, 而它在大肠杆菌中的表达也明显促进了细胞在微氧情况下的生长状况和蛋白质合成能力, Khosla 和 Bailey 用二维电泳分析了 VHb 表达前后菌体蛋白的组成, 未发现有明显差异^[13]说明 VHb 对细胞的促进作用是该蛋白自身的功能, 而不是细胞在基因水平上的二次应答。用光谱分析方法发现 VHb 蛋白可与氧结合生成十分稳定的氧合态, 氧合态的形成是 VHb 蛋白发挥生理功能的必需条件。因此 VHb 蛋白的生理功能可笼统描述为 VHb 蛋白以氧合态形式直接参与细胞的生理过程。在此基础上又有不同假说解释 VHb 的具体行为。

早期研究中最流行的扩散促进假说^[14, 15]认为 VHb 与氧结合增加了氧在细胞周质空间的传递量。Khosla 和 Bailey^[4]发现大肠杆菌中表达的 VHb 有 35% ~ 45% 分泌在周质空间。VHb 蛋白 N 端功能域具有弱输送前导肽的功能, 从而使 VHb 分布在细胞周质空间和细胞质内, 支持了扩散促进假说。

最近的研究就 VHb 对细胞代谢的影响作了更深入的探讨。Kallio 和 Bailey^[16]测定了氧限条件下大肠杆菌中几种能量参数与 VHb 的关系, 发现表达 VHb 的细胞 H⁺ / O₂ 跨膜 ΔpH 和 ATP 浓度分别是原大肠杆菌的 1.5, 1.6 和 2 倍。利用一系列末端氧化酶 Cyo

和 *Cyd* 的缺陷型宿主发现在含有活性 *Cyo* 而缺失 *Cyd* 的菌株中 *VHb* 的促进功能最为显著;Chen 和 Bailey^[17]研究了 *VHb* 对 *Saccharomyces cerevisiae* 代谢的影响,认为 *VHb* 可能直接作用于与氧有关的代谢途径如呼吸链,在氧限条件下碳流分配选择线粒体乙醛歧化途径,促进细胞生长。

在上述研究的基础上吴奕等提出了末端电子受体假说^[12],认为氧合态 *VHb* 作为末端电子受体参与大肠杆菌呼吸链末端氧化过程,并依据这一假说定量研究了 *VHb* 对大肠杆菌能量代谢的影响。研究表明,*VHb* 在微氧代谢状态时的表达大大提高了呼吸链末端电子受体量,促使电子传递过程倾向能量代谢效率较高的 *Cyo* 途径,从而使细胞适应贫氧的生活环境。根据这一假说推算的结果可解释迄今所有关于 *VHb* 生理功能的实验现象。

尽管还没有获得 *VHb* 蛋白作用机制在分子水平上的直接证据,但毫无疑问。*VHb* 与氧形成氧合态,并以这种方式介入了细胞与氧有关的代谢途径中某些关键步骤或途径分支点,改变了氧限时细胞原有代谢方式。

3 *Vitreoscilla* 血红蛋白的应用

虽然在基因调控和蛋白质功能方面 *VHb* 的研究还有许多问题有待于进一步解决,但这并没有影响有关 *VHb* 应用研究的发展。*VHb* 应用研究包括开发 *VHb* 自身功能和 *vgb* 基因启动子功能两个方向。

Vitreoscilla 和大肠杆菌中表达的 *VHb* 都表明它在细胞处于氧限条件下大量合成,促进细胞生长,提高细胞培养密度和蛋白质合成能力。*VHb* 这一特性在耗氧量大,溶氧易成为限制性因素的抗生素工业,基因工程菌高密度发酵和供氧受限制的动、植物细胞培养过程中具有良好的应用前景,借助胞内表达的 *VHb* 蛋白可望降低细胞生长和产物合成对溶氧的敏感程度,使过程适应较低的溶氧水平从而显著降低过程能耗。由于 *vgb* 基因调控机制在专性和兼性好氧菌中十分保守,它在很多微生物中都获得了表达,如假单胞菌(*Pseudomonas*),固氮菌(*Azotobacter*),根瘤菌(*Rhizobium*),酵母(*Saccharomyces*),欧文氏菌(*Erwinia*)和链霉菌(*Streptomyces*)等^[5,8,17,18]。这进一步拓宽了 *VHb* 的应用范围。已有一些文献报道了 *VHb* 的应用实例,如 *VHb* 在 α -淀粉酶基因工程菌中的表达可将细胞密度和 α -淀粉酶产率提高为 1.4 和 3.3 倍^[19]; *VHb* 在链霉菌(*Streptomyces lividans*)中的表达可促进菌体生长^[18]; *VHb* 还能有效提高头孢菌素 C 在顶头孢霉菌中的产量^[20]。另外有一些发酵过程产物合成的氧十分敏感,给发酵过程控制带来困难,而 *VHb* 的表达可降低产物合成对氧的敏感性,提高控制过程操作裕度,降低过程能耗,这已在青霉素酰化酶基因工程菌和链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)生产放线菌紫红素 D 的发酵实验中得到证实^[12,18]。

vgb 基因启动子具有较高表达量,在大肠杆菌中可获得 15% 总蛋白量的表达强度^[9]而其氧调控特性使其诱导方便,诱导条件温和,因此 *vgb* 基因启动子作为一种新型氧调控启动子而有其自身的应用价值。竺嘉等^[9]已利用该启动子构建了新的大肠杆菌氧调控表达载体用以表达外源基因,吴奕等利用这一载体表达外源 TNF,并优化了工艺过程,研究表明 *vgb* 基因启动子在基因工程菌大规模、高密度培养过程中有其独特的优点^[12]。

参 考 文 献

- [1] Wakabayashi S, Webster D A. Nature, 1986 322, 481~483.
- [2] Vasudevan G, Armarego, W. L. F, Shaw D C et al. MGG 1991, 226: 49~58.
- [3] Dikshit K L, Webster D A. Gene, 1988, 70: 377~386.
- [4] Khosla C, Bailey J E, Mol Gen Genet. 1988, 214: 158~161.
- [5] Dikshit K L, Webster D A. J Gen Microbiol. 1989, 135: 2601~2609.
- [6] Khosla C, Bailey J E. Nature, 1988, 331: 633~635.
- [7] Khosla C, Bailey J E. J Bacteriol, 1989, 171: 5995~6004.
- [8] Dikshit K L, Webster D A. Nuc. Ac. Res. 1990, 18: 4149~4155.
- [9] 竺 嘉, 博士论文, 中国科学院上海药物研究所. 1994.
- [10] Sharrocks A D, Green J, Guest J R. Proc R Soc Lond B, 1991, 245: 219~226.
- [11] Spiro S, Guest J R. FEMS Microbiology Reviews, 1990 75: 339~428.
- [12] 吴 奕, 博士论文, 中国科学院上海药物研究所, 1995.
- [13] Khosla C, Bailey J E. Bio/Technology, 1990, 8: 849~853.
- [14] Khosla C, Bailey J E. J Mol Biol, 1989, 210: 79~89.
- [15] Wittenberg J B. J Biol Chem, 1996, 241, 104~114.
- [16] Kallio P T, Bailey J E. Eur J Biochem, 1994, 219: 210~208.
- [17] Chen W, Bailey J E. Biotech Prog. 1994, 10: 308~313.
- [18] Magnolo S K, Leenutaphong D L DeModena J A et al. Bio/Technology, 1991, 9: 473~476.
- [19] Khosravi M, Webster D A, Stark B C. Plasmid, 1990, 24: 190~194.
- [20] DeModena J A, Gutierrez S, Velasco J. Bio/Technology, 1993, 11: 926~929.

Regulation and Function of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene

Wu Yi Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

Abstract *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) was the first bacterial hemoglobin to be cloned, sequenced and expressed. Its expression is regulated by oxygen at the level of transcription, FNR acts as an activator responding the oxygen-limited condition. The cellular VHb raises the ATP productivity enable the organism to survive in poor oxygen environments. The mechanism of gene regulation and physiological function of VHb gene are discussed and the potential application of VHb has also been reviewed.

Key words *Vitreoscilla* hemoglobin, gene regulation, oxygen, FNR, respiratory chain