

# A 因子在原核生物分化和次级代谢中的分子调控

阎章才

(国家自然科学基金委员会生命科学部 北京 100083)

## MOLECULAR REGULATION OF A FACTOR IN THE DIFFERENTIATION AND SECONDARY METABOLISM OF PROKARYOTE

Yan Zhangcai

(Department of Life Sciences, National Natural Science Foundation of China, Beijing 100083)

**关键词:** A 因子, 原核生物, 分子调控

**中图分类号:** Q756 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 01-0111-13

发育分化是现代生物学一个重要的前沿研究领域。近二十年来, 原核生物细胞的发育与分化取得了令人瞩目的成就, 如芽孢杆菌的内源性孢子形成, 放线菌的分生孢子分化, 粘细菌的多细胞形态发生等。形态分化与次级代谢之间的关系是目前的一个研究热点, 本文介绍近年来 A 因子及其类似物在原核生物分化和次级代谢调控中的研究进展。

### 1 A 因子及其类似物

1982 年, Hara 等人分离到一株丧失了生物合成链霉素和孢子形成能力的灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 突变株, 发现当提供一种由野生型菌株产生的可扩散因子时, 突变株的链霉素合成和孢子形成可被同时恢复。这种可扩散因子就是 A 因子<sup>[1]</sup>。实验表明它是次级代谢和形态分化的自调节因子, 担任“开关”的作用。用丫啶橙处理或温度处理, 容易获得这类 A 因子缺陷型突变株。能与这类突变互补的基因 (*afsA*) 已被克隆<sup>[2]</sup>。把这个基因连接到载体质粒上, 转化到突变株后, 能恢复 A 因子的合成。表明该基因编码 A 因子生物合成途径中的一种关键酶。在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中, *afsA* 位于染色体上, 而在灰色链霉菌中是位于质粒上。*afsA* 作为可传递的质粒性因子容易脱落, 其结果是该菌既丧失链霉素产生能力, 又不能形成孢子。总之, 链霉素产生菌的不稳定性, 可理解为控制其开关的调控因子容易脱落所致。

在链霉菌的许多种中又陆续发现了一系列的 A 因子类似物, 它们都有一个  $\gamma$ -丁酸酯环结构<sup>[3]</sup>。在一些与链霉菌关系较远的细菌中也有此类化学信号分子存在<sup>[4]</sup>。例如, 柔鱼 (*Euprymna scolopes*) 的光器官内生长的一种弧菌 (*Vibrio fischeri*) 可产生一种作为衡量细胞密度的自诱导物。当细菌密度较高时, 可诱导形成自诱导物, 从而生物发光。此类诱导物属于高丝氨酸内脂的小分子系列, 也具有  $\gamma$ -丁酸内酯结构。另外, 这类化学信号还在土壤杆菌和根瘤菌诱导的豆科植物根瘤的形成, 以及铜绿假单胞菌素素的产生等过程中发挥作用。简言之, 尽管这些化学信号的生物合成途径和调节机制有所差异, 但大量证据表明由这些可扩散的化学信号因子触发的信号传导在原核生物中是广泛存在的。

### 2 A 因子的受体研究

低浓度的 A 因子可诱导 A 因子缺陷型突变株恢复野生型的表型, 推测在 A 因子信号传导过程中存

**作者简介:** 阎章才 (1965-), 男, 山东省梁山人, 助研, 现从事国家自然科学基金微生物学学科管理工作

**收稿日期:** 1999-03-13, **修回日期:** 1999-05-13

在一个专一性受体。Miyake 等人通过凝胶阻滞法,用放射性标记的 A 因子检测到灰色链霉菌的无细胞提取物中存在能与 A 因子专一性结合的蛋白质<sup>[5]</sup>。但用相同的方法在天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌中却没有检测到。

Onaka 等人从灰色链霉菌 IFO13350 的细胞溶解物中纯化到了 A 因子受体蛋白(ArpA)<sup>[6]</sup>。根据 ArpA 氨基端氨基酸序列特征和经肽链内切酶消化得到的一些片段的氨基酸序列特点,设计了用 PCR 克隆 *arpA* 基因的引物。研究表明获得的 PCR 产物在大肠杆菌 T7 启动子调控下能表达与 A 因子专一性结合的蛋白质。核酸序列分析显示 *arpA* 基因编码一个由 276 个氨基酸残基组成的蛋白质,约为 29kD。而且 ArpA 是以同种二聚体的形式与 A 因子结合。ArpA 的氨基端有一个螺旋/转折/螺旋的结构单元,与大多数 DNA 结合蛋白质有着极大的相似性。这暗示着 ArpA 对多种表型的调控功能是通过直接与某种关键基因的转录调控区结合而发挥作用的。

从灰色链霉菌中分离到一种 A 因子受体蛋白(ArpA)缺陷型突变体。本以为该突变株既不能产生链霉素,又不能形成孢子,因为 A 因子是这两种表型的激活因子。然而,实验结果显示这种突变株能产生几乎十倍于野生型的链霉素的产量,并且该突变株与野生型菌株相比,在生长的较早时期就可形成丰富的孢子。这些结果表明该受体蛋白(ArpA)显然起阻遏作用。当没有 A 因子或 A 因子浓度没达到某个阈值时,ArpA 就专一性结合在特定的 DNA 片段上从而阻遏相应基因的转录,仅当 A 因子结合到 ArpA 与 DNA 形成的复合物上,方可使 ArpA 从 DNA 上解离下来,从而去除阻遏作用。一些研究表明链霉菌的许多种中存在类似于 ArpA 的蛋白质,暗示着类似于这种 A 因子调控系统的调节方式在链霉菌的许多种中普遍存在<sup>[6]</sup>。

Onaka 等人于 1997 年再次证明了 ArpA 的功能主要是起阻遏作用<sup>[7]</sup>。他们发现当 ArpA 第 115 位上的脯氨酸(Pro)被丝氨酸(Ser)替代时,它就失去了结合 DNA 的能力,但仍具有结合配体 A 因子的能力。这反映了 ArpA 有两个独立的功能区域,一个与 A 因子结合,另一个与 DNA 结合。115 位的 Pro 显然是在与 DNA 结合的功能区中扮演着重要角色。

Ando 等人的研究显示一种 A 因子缺陷型突变株灰色链霉菌 HH1 在高渗培养条件下,其基内菌丝和气生菌丝的形成会被大量存在的外源性 A 因子干扰,这暗示着在生长较早期(可能是 A 因子的敏感期)提供大量 A 因子,则会影响基因的有序表达<sup>[8]</sup>。这种干扰作用显然借助了 A 因子信号传导链中的 ArpA。一种能抑制干扰作用的基因被鉴定到,其位于野生型菌株 *afsA* 位点上游 5.5kb 处。此基因被命名为 *sgaA*,它编码一个 269 个氨基酸残基组成的蛋白质,分子量大约为 28kD。

### 3 A 因子调控网络

A 因子触发的信号传导可激活基因 *aphD* 的转录<sup>[9]</sup>。*aphD* 位于链霉素生物合成基因簇中,编码链霉素-6-磷酸转移酶。在链霉素生物合成基因簇中鉴定到一调节基因 *strR*,其产物能增强位于 *strR* 和 *aphD* 下游的 *strB* 的转录。*strR* 的转录是从 *strR* 起始密码子上游区域一个起始位点(PA)开始的,能被 A 因子极大地增强。实验显示 *strR* 起始密码子上游 280bp 处的一个 50bp 的序列与 A 因子的调节作用直接相关。这个序列包含 A、T 富集区,易发生 DNA 弯曲,这种特点有利于蛋白质对其识别。不久,在灰色链霉菌野生型菌株的无细胞提取物中检测到能与该 DNA 区段专一性结合的蛋白质 SmA,其相应的基因为 *smA*。但在 A 因子缺陷型突变株的提取物中没有检测到 SmA。由此可以绘制出 A 因子信号传导链:A 因子信号首先被 A 因子受体蛋白 ArpA“接收”,然后通过一步或多步的传递激活 *smA* 的表达产生 A 因子应答蛋白 SmA,SmA 作为一种反式作用因子再结合到链霉素生物合成基因簇的一个调节基因 *strR* 的上游调控序列即顺式作用元件上,从而激活 *strR* 的转录,其表达产物调节蛋白 StrR 再去激活链霉素生物合成基因簇中其它基因的表达。为解释 A 因子触发的信号链如何影响孢子的形成,研究人员提出 *smA* 上游可能存在一种调节基因,其产物能分别激活 *smA* 和孢子形成相关基因的表达。

以灰色链霉菌 A 因子缺陷型突变株 HH1 为受体,通过互补克隆得到了 A 因子调控孢子形成有关的基因<sup>[9]</sup>。其中有一个基因 *amf* 与气生菌丝的形成有关。它由三个开放阅读框架(ORFs)*amfA*、*B* 和 *R*

组成。其中 *amfA* 和 *B* 的 ORFs 与大肠杆菌 *E. coli* 的膜转运蛋白溶血素 B(hemolysinB)有同源性, 都有一个跨膜 6 次的区域和一个可能的 ATP 的结合区域组成。对 AmfR 蛋白的分析表明, 它与 *E. coli* 中负责编码糖转运系统的基因簇的转录激活因子 UhpA 有同源性。UhpA 蛋白是原核生物两组分调节系统的一个成员。在 AmfR 的氨基酸序列中鉴定到了反应调节器蛋白所共用的保守序列, 其中的 Asp 是一个可能的磷酸化部位, 而螺旋/转折/螺旋的结构单元可以用于结合 DNA。

Kudo 等人在灰色链霉菌突变株 HH1 中发现 *amfC* 仅与气生菌丝形成有关而独立于次级代谢的调控之外<sup>[10]</sup>。用核酸序列分析显示, 检测的 12 种链霉菌都有 *amfC* 基因的同源序列, 其中包括天蓝色链霉菌 A3(2)。灰色链霉菌和天蓝色链霉菌 A3(2)的产物 AmfC 在氨基酸序列上有 60% 的一致性。把天蓝色链霉菌 A3(2)的基因 *amfC* 导入突变株 HH1 中, 可诱导气生菌丝和孢子的形成, 暗示着二者在形态建成上功能相同。

#### 4 展望

次级代谢是在生长的后期逐渐活跃起来的。外界环境、生理状态和多种基因影响着向这个时期的过渡, 其中存在的复杂机理至今仍未被认识清楚。要透彻了解链霉菌中 A 因子及其类似物的调控作用尚需进一步的研究工作。目前在分子水平已部分阐明的 A 因子的类似激素的作用特点, 为提高次级代谢产物的产量提供了一定的理论依据。对链霉菌中次级代谢与发育分化相互关系的研究不仅可揭示原核生物生命现象中一些重要的基础理论问题, 而且可为基因多水平调控分子机制的阐明提供重要的理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] Hara O, Beppu T. *J Antibiot*, 1982, 35:349~358.
- [2] Horinouchi S, Beppu T. *J Bacteriol*, 1984, 158:481~487.
- [3] Horinouchi S, Beppu T. *Mol Microbiol*, 1994, 12:859~864.
- [4] Kaiser D, Losick R. *Cell*, 1993, 73:873~885.
- [5] Miyake K, Horinouchi S, Yoshida M, et al. *J Bacteriol*, 1989, 171:4928~4302.
- [6] Onaka H, Ando N, Nihira T, et al. *J Bacteriol*, 1995, 177:6083~6092.
- [7] Onaka H, Sugiyama M, Horinouchi S. *J Bacteriol*, 1997, 179:2748~2752.
- [8] Ando N, Ueda K, Horinouchi S. *Microbiology*, 1997, 143:2715~2723.
- [9] Beppu T. *Trends Biotechnol*, 1995, 13:264~269.
- [10] Kudo N, Kimura M, Beppu T, et al. *J Bacteriol*, 1995, 177:6401~6410.

《中国药学年摘》是我国唯一的药学科技文献综合性检索类刊物(月刊, 刊号为 CN11-2529)。本刊的特点是刊载我国公开发行的药学期刊, 地方医药杂志, 医药大专院校学报, 植物、微生物、化学化工杂志、专刊等近 500 种刊物中有关中西药理论, 综述, 药物的科研、生产技术、制剂、分析、药理、临床应用, 药品评价, 药品生产管理和质量管理, 制药设备和工厂设计, 新药介绍等文献。并同时建有近 24 万多条的文献数据库, 其中中药文献占一半左右, 所以该库也是世界上拥有中药文献最多的数据库。通过十几年来对外检索服务, 受到了广大医药工作者的普遍欢迎。该库每年可为医药生产、科研、交流、教学、医院、情报研究等部门提供 2 万多条数据, 并可提供网络版和光盘版。

联系地址: 北京西城区北礼士路甲 38 号国家药品监督管理局信息中心

邮编: 100810 电话: (010)68313344 转 1803