

# 链霉菌形态分化基因——白基因的研究

聂丽平<sup>1, 2</sup> 谭华荣\*<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup>辽宁师范大学生物系 大连 116029)

## STUDY ON *whi*-GENES RELATED TO DIFFERENTIATION OF *STREPTOMYCES* SPP.

Nie Liping Tan Huarong

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080*)

(*Department of Biology, Liaoning Normal University, dalian 116029*)

关键词 链霉菌, 形态分化, 白基因

中图分类号 Q939.13 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2000)04-0444-47

白基因(*whi*)是一类在链霉菌形态分化过程中具有重要作用的基因。由于这些基因的突变阻断了气生菌丝到孢子形成这一形态分化过程,相应的突变株在延时培养条件下仍保持白色的表型而得名。1972年 Hopwood 和 Chater 将 50 多个天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)白色突变株分成 9 个形态类型(*whiA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H* 和 *I*)并通过遗传作图将它们定位在了 8 个不同的基因位点上<sup>[1]</sup>。1975年 Chater 等通过分析双突变株的表型确定了五个白基因(*whiA*, *B*, *G*, *H* 和 *I*)的上位关系<sup>[2]</sup>。在上述已确定的 8 个白基因中,有 6 个白基因(*whiA*, *B*, *C*=*J*, *G*, *H* 和 *I*)为孢子形成早期基因<sup>[3]</sup>,与气生菌丝到孢子分隔这一发育转变相关,而 *whiD*, *whiE* 和 *sigF*(编码 sigmaF)为孢子形成晚期基因<sup>[3, 4]</sup>,与孢子成熟和孢子色素形成过程直接相关。最近,这一结果得到了进一步的证实, Schwedock 等利用免疫荧光显微镜技术发现<sup>[5]</sup>,在 *whiA*, *whiB*, *whiG* 和 *whiH* 突变株的气生菌丝中 FtsZ 蛋白不能组装成圆环形梯子结构,而这种结构是孢子分隔特征性的先兆。这些遗传学和细胞学研究结果为研究链霉菌分化提供了可靠的基础。随着分子生物学及其相关领域技术与方法的不断进步,有关链霉菌分化的分子生物学研究在飞速发展,到目前为止,大部分已知的与链霉菌分化有关的白基因和光秃基因已被克隆。基因产物及作用靶位点逐渐被确定和分析,体现分化基因作用和相互关系的表达调控网络已日渐端倪,白基因在链霉菌孢子形成各阶段所发挥的重要作用越来越引人注目。毫无疑问,这些结果将为最终弄清链霉菌分化的分子机制提供重要的依据。

### 1 白基因及其在链霉菌分化中的作用

#### 1.1 *whiG*-编码一个在孢子形成过程中起关键作用的 sigma 因子

1987年 Mendez 和 Chater 利用链霉菌噬菌体载体(KC516),通过遗传互补从天蓝色链霉菌中克隆到了第一个白基因-*whiG*<sup>[6]</sup>。序列分析表明, *whiG* 编码一个次级 sigma 因子(称为  $\sigma^{whiG}$ ),它与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的  $\sigma^D$  和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurum*)及铜绿假单胞菌

\* 通讯联系人

作者简介:聂丽平(1961-),女(汉族),吉林省辽源市人,辽宁师范大学生物系副教授,硕士,主要从事微生物遗传学研究。现在中国科学院微生物研究所攻读博士学位

收稿日期:1999-09-08,修回日期:1999-11-30

(*Pseudomonas aeruginosa*) 的  $\sigma^F$  有 40% 左右的同源性,尤其在保守的识别启动子 -10 区和 -35 区的结构域同源性更高。 $\sigma^D$  和  $\sigma^F$  分别参与运动性和趋化性相关基因的转录,与孢子形成无关;而在枯草芽孢杆菌内孢子形成早期发挥作用的  $\sigma^H$  在结构上与  $\sigma^{whiG}$  并无同源性。基因破坏研究表明,  $\rho whiG$  与营养生长无关,但它是孢子形成所必需的。增加  $\rho whiG$  的剂量可导致基内菌丝中异常的孢子形成及孢子数量的相应增加。因此,可以断定  $\sigma^{whiG}$  在孢子形成早期起决定性的作用。此外,当高拷贝的  $\sigma^{whiG}$  依赖的启动子存在时,可导致野生株表现出类似于  $\rho whiG$  突变株表型,这揭示出一个非常重要事实,  $\sigma^{whiG}$  在细胞中是以有限的数量存在的,控制孢子形成起始的决定因素可能是  $E\sigma^{whiG}$  形式的 RNA 聚合酶全酶的水平<sup>[7]</sup>。已知  $\rho whiG$  突变株的表型为长而直的气生菌丝,推测  $\rho whiG$  所控制的发育决定点可能与孢子形成过程中气生菌丝细胞壁结构的变化有关<sup>[8]</sup>,但是到目前为止尚未鉴定出相应的靶基因。一个已知的  $\rho whiG$  依赖的基因 *orfTH4* 编码甘氨酸甜菜碱结合蛋白,它可能与顶端小室膨压的维持有关<sup>[9]</sup>,另外  $\sigma^{whiG}$  还控制着另外两个孢子形成早期基因 *whiH* 和 *whiI* 的表达<sup>[8,10,11]</sup>。值得注意的是,尽管  $\rho whiG$  在链霉菌孢子形成过程中具有十分重要的作用,但它的转录水平在整个发育周期并无明显的变化,甚至在气生菌丝产生之前也是如此。这一出人预料的结果意味着  $\rho whiG$  的表达是转录后调控的。这使人联想起一些  $\sigma^{whiG}$  同源 sigma 因子的转录后调控方式<sup>[12]</sup>。

### 1.2 *whiB*-编码一个高负电荷的转录调控蛋白

*whiB* 基因在营养生长,气生菌丝形成及抗生素生物合成中均无明显作用,相反,它是孢子形成早期阶段所必需的<sup>[13]</sup>。*whiB* 突变株最突出的形态特征是,菌丝顶端远远超过正常孢子链长度的紧密螺旋,因此,Flardh 等<sup>[8]</sup>推测,  $\rho whiB$  控制的分化决定点可能与菌丝延长的适当控制直接相关,  $\rho whiB$  的序列分析表明<sup>[13]</sup>,它编码一个高负电荷的只有 87 个氨基酸的蛋白质,plotstructure 程序预测这个蛋白(WhiB)的二级结构具有某些真核生物转录激活因子的特征,因此,推测它可能是链霉菌的一个转录因子。在 WhiB 蛋白的分子结构中有许多引人注目的特点,特别值得一提的是它的高电荷性,这暗示它可能无法与细胞膜紧密结合,排除了它在孢子分隔形成过程中结构上的作用,更倾向于它是细胞质内的调控蛋白。此外,在 WhiB 分子中部具有四个以特殊排列方式存在的胱氨酸,它们不能形成已知类型的锌指结构,但可以通过其它方式结合金属离子,也可以形成分子内或分子间的二硫键,所以,  $\rho whiB$  很可能是通过感受细胞内随菌丝生长停止而变化的氧化还原状态来调控某些分化基因的转录与表达<sup>[3]</sup>。转录实验揭示<sup>[14]</sup>,  $\rho whiB$  可以从两个不同的启动子开始转录,即:位于上游弱的组成型启动子(P1)和位于下游强的受发育调控的启动子(P2)。从 P2 开始的转录直至气生菌丝出现时方可检测到并逐渐增强,这与  $\rho whiB$  在发育过程中的作用相一致。与  $\rho whiG$  不同,高拷贝的  $\rho whiB$  不能导致孢子形成提前,也不能使孢子产量增加。

### 1.3 *whiH*-编码一个 GntR 家族的转录调控蛋白

Chater 等人早期的工作表明,  $\rho whiH$  对  $\rho whiA$ ,  $\rho whiB$  和  $\rho whiI$  是上位的<sup>[2]</sup>,最新的形态学和细胞学研究揭示出一些与此不同的结果<sup>[8]</sup>,即:在  $\rho whiH$  突变株的气生菌丝中存在有孢子分隔,它们将气生菌丝分隔成了大小不同的具有松散卷曲的片段。这些片段表现出某些类似于孢子的特征,含有浓缩但异常分配的核物质。由于  $\rho whiG$ ,  $\rho whiA$  和  $\rho whiB$  在  $\rho whiA/\rho whiH$ ,  $\rho whiB/\rho whiH$  和  $\rho whiG/\rho whiH$  双突变株中均能阻断这种片段的形成,这表明  $\rho whiG$ ,  $\rho whiA$  和  $\rho whiB$  对  $\rho whiH$  显然具有上位效应。基因破坏结果表明,  $\rho whiH$  是孢子形成所必需的。 $\rho whiH$  突变株的气生菌丝具有正常的长度,但是,螺旋程度明显下降,所以,  $\rho whiH$  可能与气生菌丝发育过程中菌丝螺旋控制有关。DNA 序列分析揭示,  $\rho whiH$  编码的蛋白质产物与一个大的调控蛋白家族相似,特别是在与 DNA 相互作用的  $\alpha$  螺旋-转角- $\alpha$  螺旋区。在这个蛋白质家族中,那些与  $\rho whiH$  最相似的成员都编码与碳代谢有关的阻遏蛋白。因此,推测  $\rho whiH$  可能是链霉菌中的一个转录调控蛋白,它可能是通过感受菌丝内代谢和生理状态的变化来控制孢子形成过程。

### 1.4 *whiI*-编码一个非典型的应答调控蛋白

在相差显微镜和扫描电镜下,  $\rho whiI$  突变株的形态与野生株非常相似,但是,通过 DAPI 染色所进行

的细胞学分析表明<sup>[11]</sup>, *whi1* 突变株的菌丝中不含有孢子形成时的菌丝分隔,也没有染色体浓缩现象,这与 *whiG*, *whiA* 和 *whiB* 突变株相似,而与 *whiH* 不同。最近, *whi1* 基因已被克隆并进行了序列分析,结果表明, *whi1* 的编码产物与应答调控蛋白家族中的激活因子具有同源性。令人感兴趣的是这个家族中与 *whi1* 最相似的成员是 *whiK*<sup>[11]</sup>。在典型的应答调控蛋白分子中, N-端结构域中的几个保守的氨基酸形成一个特征的磷酸化口袋,直接参与 C 端结构域转录激活因子活性的调控。另外, 应答调控蛋白编码基因通常与另一个编码应答蛋白激酶的基因紧密相连。在对调控信号的应答过程中, 此应答蛋白激酶感受有关的信号并通过磷酸化-去磷酸化方式来调控应答蛋白的活性。在 *whi1* 编码的蛋白分子缺少特征的 N-末端磷酸化口袋, 在 *whi1* 基因位点两侧也无编码应答蛋白激酶的基因存在。从这两方面看, *whi1* 编码一个非典型的应答调控蛋白, 由此推测, *whi1* 的转录活性可能不是通过磷酸化-去磷酸化方式来调控的。相反, 可能通过 *whi1* 本身直接感受某些细胞内信号, 也可能通过其与细胞内某些受发育控制的配体结合, 或者与某些蛋白的相互作用来调控<sup>[15]</sup>。

### 1.5 *whiE*-一个与孢子色素生物合成有关的复杂的基因簇

1990年, Davis 和 Chater 从天蓝色链霉菌中克隆到了孢子色素合成所必需的基因-*whiE*<sup>[15]</sup>。序列分析揭示 *whiE* 是由连续 7 个开放阅读框(ORFs)组成的基因簇, 全部开放阅读框(ORFs I, II, III, IV, V, VI 和 VII)的转录方向一致, 组成一个多顺反子的转录单位; 其中大多数开放阅读框编码的产物与聚酮类抗生素(如放线紫红素, 土霉素, 榴霉素及 tetracenomycin C 等)生物合成基因编码的蛋白具有同源性。Yu 和 Hopwood 的研究工作指出<sup>[16]</sup>, 在 ORF I 上游存在另外一个与孢子色素合成相关的开放阅读框 ORF VIII, 它的转录方向与其它 7 个开放阅读框相反, 但是正常的灰色孢子色素合成所必需的。当 ORF VIII 发生突变时, 天蓝色链霉菌的孢子由灰色转变为绿色。*whiF* 基因簇中八个基因的功能已全部确定, 分别是 *whiE*-ORF III, ORF IV 和 ORF V 编码孢子色素前体碳链组装所必需的聚酮合成酶最小单位的三个亚基; *whiE*-ORF II, ORF IV 和 ORF VII 可能与初生碳链的环化有关; *whiE*-ORF VIII 控制孢子色素合成后期一个 FAD-依赖的羟基化反应; 而 ORF I 则编码一个控制孢子色素在细胞内正确定位的蛋白质。从 *whiE* 基因簇中鉴定出了两个转录方向相反的启动子 *whiEP1* 和 *whiEP2*, 两个启动子均是发育调控的。*whiEP1* 和 *whiEP2* 的转录产物在孢子分隔被观察到时可以检测到<sup>[17]</sup>。*whiF* 突变株不能形成成熟的灰色孢子, 表面为白色的表型。

### 1.6 *whiD*-编码一个应答调控蛋白

*whiD* 基因是一类高度保守的应答调控基因<sup>[18]</sup>。它编码的产物通过信号传递应答外界环境的刺激以及细胞内的信号。该基因位于天蓝色链霉菌基因组 cosmid 库中 D63 和 6G4 之间 1.8Kb 的 DNA 片段上。*whiD* 与链霉菌分化后期孢子成熟过程直接相关。*whiD* 突变株不能形成成熟的灰色孢子, 而是产生薄壁, 形态异常的孢子, 这种孢子对温度很敏感, 在 50°C 即失去活性。

## 2 不同的白基因在链霉菌分化中的相互作用

虽然链霉菌是原核生物, 但是它具有相对复杂的形态分化过程。在这个复杂的过程中, 白基因具有十分重要的作用, 它们控制着气生菌丝到成熟孢子的形态转变<sup>[3]</sup>。目前, 已鉴定的白基因中大多数编码调控蛋白或 sigma 因子, 而不是酶或结构蛋白<sup>[6, 8, 11, 13, 18]</sup>; 而且, 这些蛋白均属于翻译后调控蛋白家庭; 这就意味着链霉菌孢子形成的调控机制可能是十分复杂的。Chater 等的早期工作指出, 在形态分化过程中, *whiG* 对其它测定过的白基因是上位的<sup>[2]</sup>, 这意味着其它白基因的转录可能直接或间接地依赖 *whiG*, 但是, 实验结果指出, 至少 *whiB* 的转录并不依赖于其它任何白基因, 包括在孢子形成过程中起关键作用的 *whiG*<sup>[14]</sup>。这表明, *whiB* 控制着一个不依赖于 *whiG* 的发育决定位点, 同时指出, 链霉菌形态分化过程的调控并不是一个简单的线性级联系统。

最近的一系列研究结果表明, 链霉菌孢子形成早期基因 *whiH* 和 *whiI* 的转录都直接依赖于 *whiG*<sup>[8, 11]</sup>, 所以, *whiG* 对孢子形成晚期过程的控制可能是通过 *whiH* 和 *whiI* 来进行的。因为, 这两个基因是 *whiE* 和 *sigF* 等孢子形成晚期基因转录所必需的。值得注意的是, 编码 *whiI* 和 *whiJ* 均受某种形式

的自我阻遏作用的调控,同时两个基因之间又具有交叉调控关系。如上所述, *whiH* 和 *whiI* 在链霉菌分化调控网络中具有联系孢子形成早期过程和晚期过程的纽带作用,由此, *whiH* 和 *whiI* 的自我阻遏作用和交叉调控关系可能具有重要的意义。也许是为了保证不同的级联系统中的基因表达能够平衡进行,从而确保孢子形成有序的进行。另外,孢子形成晚期基因 *sigF* 的转录依赖于 *whiG* 和其它所有孢子形成早期白基因(*whiA*, *B*, *H*, *I* 和 *J*)。而 *sigF* 又是晚期孢子形成基因 *whiE* 等表达所必需的<sup>[17]</sup>。这就揭示出链霉菌分化调控网络中不同分化基因间共同的汇集点。

此外,由于 *sigF* 的启动子与已知的 *whiG* 依赖的启动子的保守序列无任何相似性<sup>[12]</sup>,可以肯定 *sigF* 对 *whiG* 的依赖是间接的,同时也指出,在链霉菌孢子形成过程中必定存在有另外的 sigma 因子位于 *whiG* 和 *sigF* 之间。不难想象,尽管存在着明显的差异<sup>[3,6]</sup> 枯草芽孢杆菌分化过程中存在的 sigma 因子级联调控系统,同样也存在于链霉菌分化调控过程中。现有的实验结果已充分表明,控制链霉菌分化的是一个复杂的多级调控网络,虽然它的轮廓已越来越清晰,但是仍有许多令人迷惑的问题尚待进一步的研究工作来阐明,即将完成的天蓝色链霉菌基因组全序列分析必将为此提供更多有价值的信息。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Chater K F. *J. GenMicrobiol*, 1972, **72** :9~28.
- [ 2 ] Chater K F. *J. GenMicrobiol*, 1975, **87** :312~325.
- [ 3 ] Chater K F. *Microbiology*, 1998, **144** :1465~1478.
- [ 4 ] Potuckova L, Kelemen G H, Findlay K C, et al. *Mol Microbiol*, 1995, **17** :37~48.
- [ 5 ] Schwedock J, McCormick J R., Angert E A, et al. *Mol Microbiol* 1997, **25** :847~858.
- [ 6 ] Mendez C, Chater K F. *J Bacteriol* 1987, **169** :5715~5720.
- [ 7 ] Chater K, F. *Cell*, 1989, **169** :5715~5720.
- [ 8 ] Flardh K, Findlay K C, Chater K F. *Microbiol*, 1999, **145** :2229~2243.
- [ 9 ] Tan H, Yang H, Tian Y, et al. *Gene*, 1998, **212** :137~146.
- [ 10 ] Ryding N J, Kelemen G H, Whatling C A, et al. *Mol Microbiol*, 1998, **29** :343~357.
- [ 11 ] Ainsa J A, Parry H D, Chater K F. (in preparation).
- [ 12 ] Kelemen G. H, Brown G L, Kormanec J, et al. *Mol Microbiol*, 1996, **21** :593~603.
- [ 13 ] Davis N K., Chater K F. *Mol Microbiol*, 1990, **4** :1679~1691.
- [ 14 ] Soliveri J, Brown K L, Buttner M J, et al. *J Bacteriol*, 1992, **174** :6215~6220.
- [ 15 ] Davis N K, Chater K F. *Mol Gen Genet*, 1992, **232** :351~358.
- [ 16 ] Yu T W, Hopwood D A. *Microbiology*, 1995, **141** :2779~2791.
- [ 17 ] Kelemen G H, Brian P, Flardh K, et al. *J Bacteriol*, 1998, **180** :2515~2521.
- [ 18 ] Palframan W, Buttner M. ISBA, 1997 :5p8.