

腾冲嗜热厌氧菌葡萄糖激酶在不同温度下的表达和催化活性

钱 忠¹, 王敬强¹, 周传奇¹, 马延和², 刘斯奇^{1*}

(¹ 中国科学院北京基因组研究所 北京 101318)

(² 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 尽管在腾冲嗜热厌氧菌的基因组注释中缺乏葡萄糖激酶 (Glucokinase, GLK) (EC 2.7.1.2), 但是该菌的蛋白质表达谱分析表明, TTE0090 可能是一种新型的葡萄糖激酶。利用体外克隆表达的方法, 表达了重组 TTE0090 此蛋白质不仅具备使葡萄糖磷酸化的催化活性, 同时在高温下也能参与反应。采用 Western blot 和阴离子交换层析的方法进一步检验了 TTE0090 在腾冲嗜热厌氧菌体内的蛋白质表达及其催化活性, 发现体内 TTE0090 蛋白表达量随温度的升高而降低, 而酶比活力却与生长温度呈正相关。这可能预示不同温度下腾冲嗜热厌氧菌中的糖酵解途径的催化通量是相对恒定的。实验数据均表明, TTE0090 是存在于腾冲嗜热厌氧菌中的一种新型的葡萄糖激酶。TTE0090 基因和其蛋白产物的研究工作, 将进一步加深人们对嗜热菌的温度适应性以及它们的生存机理的了解。

关键词 腾冲嗜热厌氧菌, 葡萄糖激酶, 温度, 糖酵解

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0243-06

腾冲嗜热厌氧菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 是在我国云南腾冲地区所发现的热泉极端微生物, 为革兰氏阴性厌氧杆菌, 其生长温度范围为 50°C ~ 80°C, 最适温度为 75°C^[1]。该菌在生长过程中能够利用葡萄糖为碳源。一般认为, 细菌中的葡萄糖代谢是通过糖酵解途径实现的, 其中葡萄糖激酶 (Glucokinase, GLK) 是这一途径的限速酶, 葡萄糖-6-羟基的磷酸化是葡萄糖降解的起始而且是必需的步骤^[2]。令人不解的是, 腾冲嗜热厌氧菌的基因组中, 并没有编码葡萄糖激酶的基因^[3]。在细菌中, 6-磷酸葡萄糖还可能通过所谓的磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system, PTS) 来形成^[4]。但是基因组的数据表明, PTS 中的关键酶, 葡萄糖-特异的磷酸转移酶 II (E2A) 在腾冲嗜热厌氧菌中也是缺失的。那么, 腾冲嗜热厌氧菌中葡萄糖是如何代谢的? 如果它的确存在糖酵解通路, 6-磷酸葡萄糖又是如何生成的?

我们测定了在最适生长条件下, 腾冲嗜热厌氧菌的蛋白质表达谱, 鉴定了大约 1200 种蛋白, 其中包括了除葡萄糖激酶以外的所有糖酵解途径所需要的酶^[5]。我们将所有鉴定的蛋白质进行葡萄糖激酶活性区域的序列比对分析, 发现编号为 TTE0090 的基因所编码的蛋白 TTE0090 是 ROK 家族

(Repressors, Open Reading Frames, sugar Kinases) 的一个成员^[6]。ROK 家族含有两类蛋白, 调控转录的阻遏蛋白和糖激酶 (Sugar kinases), 如葡萄糖激酶和果糖激酶 (Fructokinase) 之类。在基因组的注释中, TTE0090 被定义为“转录调控蛋白”, 但是该基因的蛋白质产物的序列分析却表明, 它与葡萄糖激酶有 54% 的同源性, 二级结构相似, 更为重要的是, 它具有与 ATP 结合的功能区域。因此我们假设基因 TTE0090 是存在于腾冲嗜热厌氧菌中的一种新型的葡萄糖激酶的编码基因。如果这个假设成立的话, TTE0090 应该能够催化葡萄糖生成 6-磷酸葡萄糖, 而且它还能够高温条件下保持其催化活性。本文中, 我们报道了一系列的实验设计以及结果, 试图从体外重组表达和体内细胞培养两个方面来证实我们假设的合理性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 腾冲嗜热厌氧菌 MB4^T (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 为中国科学院北京微生物所提供, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 为本实验室保存。

1.1.2 培养基和培养条件 腾冲嗜热厌氧菌的培养基采用改良的 MB 培养基, 用葡萄糖取代淀粉^[1]。

基金项目: 国家“973 项目”——重点基础研究发展规划项目(2004CB719605), 国家自然科学基金资助项目(30570399)

* 通讯作者。Tel: 86-10-80485325; Fax: 86-10-80485324; E-mail: siqiliu@genomics.org.cn

作者简介: 钱 忠(1982-) 男, 浙江温州人, 硕士研究生, 从事极端微生物糖代谢研究。E-mail: qianzhong@genomics.org.cn

收稿日期: 2005-09-22; 接受日期: 2005-11-09; 修回日期: 2005-12-07

将菌种在 75℃ 活化 18h, 当 OD_{600} 达到 0.5 左右, 再接种到 500mL 的培养基中, 并在不同温度下(60℃, 75℃ 以及 80℃) 培养至对数生长期, 然后收集菌体, 用含 5mmol/L DTT 的 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液反复洗涤多次, 菌体置于 -80℃ 保存。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制酶、T4 DNA 连接酶均购于 Promega 公司, *Taq* DNA 聚合酶为本室制备, 测酶活所需试剂(ATP, 葡萄糖, NADH, 磷酸烯醇式丙酮酸盐, 丙酮酸激酶, 磷酸葡萄糖脱氢酶等)均购于 Sigma 公司; Q-Sepharose FF 阴离子柱料购于 Amersham pharmacia, Ni-NTA-Agarose 购于 Qiagen; Western blot 所需一抗(多克隆抗体)为本室制备, 二抗(羊抗兔抗体)购于 Santa Cruz Biotechnology, ECL 试剂盒购于 Amersham, 紫外分光光度计 Ultrospec-3000 购于 Amersham pharmacia。

1.2 生长曲线的绘制

将菌种在 75℃ 活化 18h, 当 OD_{600} 达到 0.5 左右, 再接种到 500mL 的培养基中, 并在不同温度下(60℃, 75℃ 以及 80℃) 培养至对数生长期, 在此期间每隔 1h 取 200 μ L 培养液稀释至 1mL, 测定其 OD_{600} 值, 绘制生长曲线。

1.3 重组表达载体的构建

采用 PCR 的方法, 以腾冲嗜热厌氧菌基因组 DNA 为模板, 在引物中插入 *Xho* I, *Bam*HI 酶切位点, 然后将已经酶切的 PCR 产物和表达载体 pET30a 用 T4 连接酶连接, 构建含有 His-tag 的 pET30a-TTE0090 表达载体。DNA 测序确定插入的片段正确与否。

1.4 重组蛋白的诱导表达和纯化

将 pET30a-TTE0090 转入 *E. coli* BL21(DE3) 大肠杆菌。在 1mmol/L IPTG 诱导的条件下, 诱导大量的重组蛋白质合成。诱导后的菌体悬浮于 Binding Buffer(5mmol/L 咪唑, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L Tris-HCl, pH 7.9), 进行超声破碎。离心分离水溶性部分(上清液)和不溶或非破碎的部分。用 Ni^{2+} 金属螯合层析在上清液中纯化带有 His-tag 的重组蛋白。SDS-PAGE 检测洗脱成分的纯度, 最后将纯度高于 95% 的洗脱组份收集在一起。

1.5 TTE0090 多克隆抗体的制备

约 1mg 纯化的 TTE0090 重组蛋白免疫一只新西兰家兔, 取耳血检测所产生抗体的滴度, 3 次加强后, 取全部血清制备和纯化 IgG。

1.6 Western blot 分析

待测样品中的蛋白质用 12% 的 SDS-PAGE 分

离, 然后电转移到 PVDF 膜上, 用 1:5000 稀释的重组 TTE0090 抗体为一抗, 和 HRP 标记的羊抗兔抗体作为二抗。用 ECL 显影方法鉴定免疫识别的蛋白质。

1.7 离子交换层析纯化腾冲嗜热厌氧菌体内表达的 TTE0090

Q-Sepharose FF 阴离子柱在 10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液里平衡, 然后将提取的腾冲嗜热厌氧菌的可溶蛋白注入该层析柱。采用含 0 ~ 1mol/L NaCl 浓度梯度的溶液洗脱结合的蛋白质, 并收集洗脱组份(1mL/tube)。TTE0090 的纯度和葡萄糖激酶的活性用 12% SDS-PAGE、酶活测定以及 Western blot 加以分析。

1.8 葡萄糖激酶的酶活性的测定

测定葡萄糖激酶活性的方法为 PK/LDH 酶偶联法。在 100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液中, 分别加入 3mmol/L ATP, 6mmol/L $MgCl_2$ 以及底物 D-葡萄糖, 最后加入重组蛋白 TTE0090 启动酶催化反应。该反应在一定的温度下进行 20min, 然后冰浴中止反应。偶联反应系统中含 1.5mmol/L KCl, 5mmol/L PEP, 0.5mmol/L NADH 和 100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 最后加入 PK/LDH 混合酶液启动偶联反应, 在 OD_{340} 下测定 NADH 的变化量。1U 酶活性被定义为每分钟生成 1 μ mol 6-磷酸葡萄糖所需的酶量。

1.9 数据分析

所有数据分析均采用 Sigma Plot 8.0 (SPSS Inc.) 软件, SDS-PAGE 胶图采用 Image Master 5.0 (Amersham Biosciences) 软件进行分析。

2 结果

2.1 pET30a-TTE0090 表达载体的构建以及重组 TTE0090 的表达和纯化

如上所述, 我们采用分子生物学的方法, 用 PCR 方法成功地得到了 TTE0090 的基因片段, 并将其正确地插入到大肠杆菌的表达载体 pET30a。限制性内切酶和 DNA 测序的结果均表明 pET30a-TTE0090 表达载体已成功构建(另文发表)。

pET30a-TTE0090 表达载体转化至 BL21 菌株中, 在 1mmol/L IPTG 的诱导下表达重组蛋白质。该重组蛋白大部分为可溶性, 可有效地结合于 Ni-NTA-Agarose。采用不同浓度的咪唑分步洗脱, 大部分 TTE0090 重组蛋白在 200mmol/L 的咪唑被洗脱, 如图 1 的 1 号泳道所示, 经亲和层析纯化的 TTE0090 重组蛋白纯度大于 95%, 且表观分子量与理论预测相符, 约 40kDa。

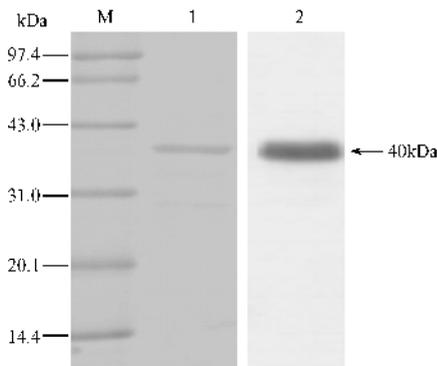


图1 SDS-PAGE 分析纯化的重组 TTE0090 和 Western blot 检测 TTE0090 抗体的活性免疫

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant TTE0090 and Western blot analysis of polyclonal antibody against recombinant TTE0090. M. Low molecular protein marker; 1. The purified recombinant TTE0090; 2. Western blot of polyclonal antibody against recombinant TTE0090.

2.2 TTE0090 抗体的滴度测定

将制备的 TTE0090 抗体和所纯化的 TTE0090 重组蛋白分别进行一系列的稀释,然后采用 Western blot 和 ELISA 测定抗体的滴度(滴定曲线未显示)。结果表明,TTE0090 抗体的滴度为 1:5000。图 1 的 2 泳道为 20ng 的 TTE0090 重组蛋白和 1:5000 稀释的 TTE0090 抗体的免疫反应结果,显示该抗体有较高的特异结合性。

2.3 重组 TTE0090 的活性测定

在 100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液和 Mg^{2+} 的反应体系中,重组 TTE0090 可转化葡萄糖至 6-磷酸葡萄糖,我们测定了不同温度下该反应的 K_m 和 V_{max} 。如图 2 所示,重组 TTE0090 在一个较大的温度范围内都具有酶活性(40℃ ~ 90℃),但这两个动力学常数随温度升高呈钟形曲线,最适反应温度为 60℃。在最适反应温度下 V_{max} 为 340U/mg, K_m 为 0.53mmol/L。重要的是该重组 TTE0090 在 90℃ 下仍

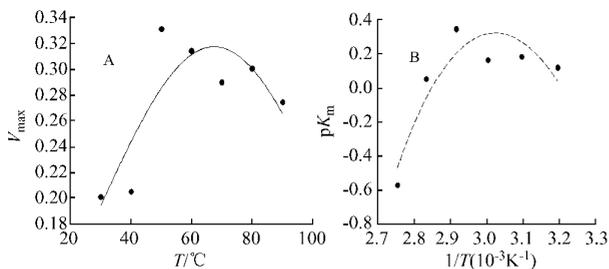


图2 温度变化对重组 TTE0090 V_{max} 和 K_m 的影响

Fig.2 Effect of temperature on V_{max} and K_m of recombinant TTE0090. A: Temperature-dependence of V_{max} ; B: Temperature-dependence of K_m .

具有一定的酶活性(V_{max} 为 296U/mg)。

2.4 温度对腾冲嗜热厌氧菌生长状态的影响

我们选取 60℃, 75℃ 和 80℃ 3 个温度,在 MB 培养基中加入葡萄糖以其为主要碳源。在此生长条件下,腾冲嗜热厌氧菌的生长曲线见图 3。从图中可以看出,该菌在这 3 个温度下的迟缓期(Lag phase)是明显不同的,75℃ 最短,约为 5h,其次为 80℃,为 8h,60℃ 最长,为 16h。进一步的数据分析,腾冲嗜热厌氧菌在对数期(Logarithmic phase)中,75℃ 的生长速率最大,为 0.58,其次 80℃,为 0.50,60℃ 的生长速率最小,为 0.37;值得注意的是,当培养至稳定期(Stationary phase)时,腾冲嗜热厌氧菌在不同温度下所达到的吸光值(OD_{600}),75℃ 最高,为 0.089,其次为 80℃,为 0.065,60℃ 最低,为 0.043。这些细胞生长的动力学数据均揭示,在含有葡萄糖的培养基中温度对该菌的生长状态产生了显著的影响。

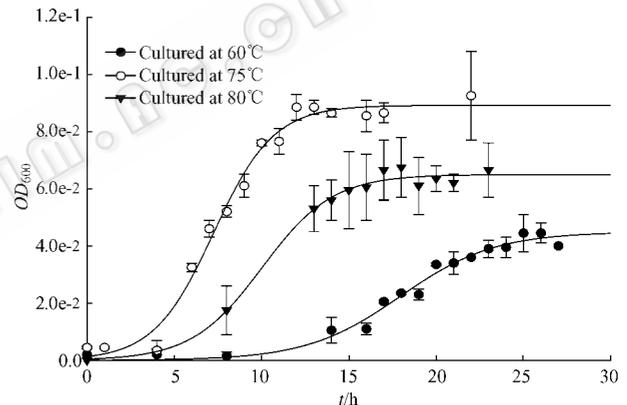


图3 不同温度下腾冲嗜热厌氧菌在含有葡萄糖的培养液中的生长曲线

Fig.3 The growth curves of *T. tengcongensis* at different temperatures in MB containing 1% glucose.

2.5 温度对 TTE0090 在体内蛋白表达量的影响

为了检验温度对 TTE0090 在腾冲嗜热厌氧菌的蛋白表达是否有影响,我们采用 Western blot 的方法检测了 3 个温度下(60℃, 75℃ 和 80℃)腾冲嗜热厌氧菌体内 TTE0090 表达量的变化。将 3 个温度下培养的细菌收集、超声和离心,用 Bradford 方法准确定

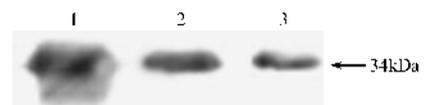


图4 利用 Western blot 分析不同温度下腾冲嗜热厌氧菌 TTE0090 的表达水平

Fig.4 Western blot analysis of TTE0090 expressed at different temperatures in *T. tengcongensis*. 1 ~ 3. *T. tengcongensis* cultured at 60℃, 75℃ and 80℃. In each lane, 15μg extracted protein was loaded.

量上清中蛋白的含量,然后各取 15 μ g 蛋白质进行 Western blot 分析。如图 4 所示,TTE0090 的蛋白表达量随温度升高而下降,在 3 个培养温度中,TTE0090 在 60 $^{\circ}$ C 的表达量最高,其免疫反应强度分别为 75 $^{\circ}$ C 和 80 $^{\circ}$ C 的 2.1 倍和 4.8 倍。

2.6 温度对 TTE0090 在体内酶活性的影响

在腾冲嗜热厌氧菌体内生成的 TTE0090 蛋白质,在低离子强度的缓冲液中能够结合于阴离子交换树脂。如图 5 所示 随洗脱液中的离子强度增加,TTE0090 在 NaCl 浓度约为 0.3~1mol/L 的范围内被洗脱下来,不过,TTE0090 的洗脱活性峰与大部分蛋白质的洗脱峰不相吻合。Western blot 的结果与液相

色谱的谱图则完全相符。以这些洗脱的组分的蛋白质进行 Western blot 分析,结果显示,TTE0090 在 60 $^{\circ}$ C 时的总表达量是最高的,随之的是 75 $^{\circ}$ C 和 80 $^{\circ}$ C 这与我们前面图 4 的结果是一致的。我们采用 Image Master 对洗脱组分的 SDS-PAGE 胶图进行图像分析,可计算出 TTE0090 在每一洗脱组分中相对含量,然后根据酶活性的测定数据,进而计算不同温度下 TTE0090 的酶比活力。如表 1 所示,虽然不同温度下,每一洗脱组分中酶活性并未有显著之差别,但是由于 TTE0090 表达量随温度的增加而下降,这样,在 80 $^{\circ}$ C 下,TTE0090 的比活力比 60 $^{\circ}$ C 提高了将近 5 倍,75 $^{\circ}$ C 也较 60 $^{\circ}$ C 提高了将近 2 倍。

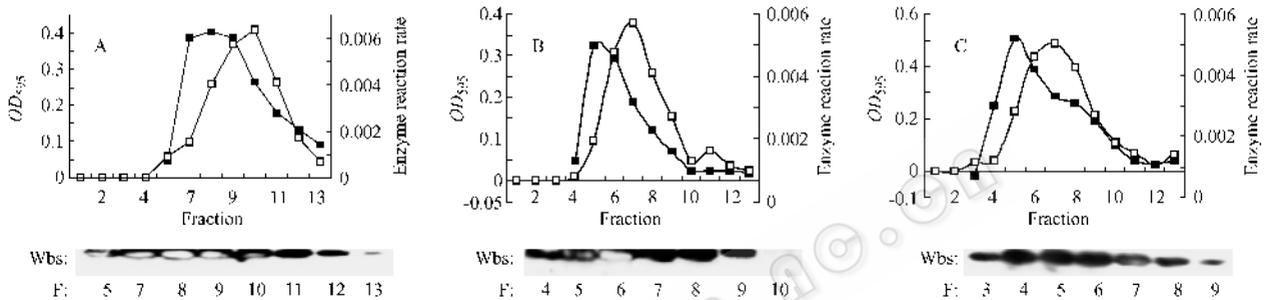


图 5 利用阴离子交换树脂纯化腾冲嗜热厌氧菌所表达的 TTE0090

Fig.5 Partial purification of the expressed TTE0090 *in vivo*. A : native GLK at 60 $^{\circ}$ C (Fraction 6 not tested); B : at 75 $^{\circ}$ C ; C : at 80 $^{\circ}$ C . Up inlet : OD₅₉₅ after adding Bradford reagents (□) and enzyme reaction rate (■) of each fraction ; Low inlet : Western blot analysis of each fraction. Wbs : Western blot results ; F : Fraction.

表 1 腾冲嗜热厌氧菌体内葡萄糖激酶酶活力的比较

Number	GLK/10 ⁻³ mg	Activity/10 ⁻³ U	Specific activity (U/mg)
60 $^{\circ}$ C-8	0.90	6.3	7.0
75 $^{\circ}$ C-5	0.27	5.0	18.5
80 $^{\circ}$ C-5	0.12	5.2	43.3

3 讨论

采用蛋白质功能区域 (Functional Domain) 比对的方法,腾冲嗜热厌氧菌的 TTE0090 基因被重新注释为 ROK 家族的一个新成员。新注释的假设建立在 3 个基本的蛋白质结构信息上。首先,TTE0090 的二级结构 (12 个 β -sheet 和 10 个 α -helix 的排列顺序) 与 ROK 家族的成员十分接近 ;其次,TTE0090 含有一个 ROK 家族的典型的保守区域 (CNCGN YGCFE AYAS 以及 VSTGI GGGVI IEGKL YSGEN SNAAE IGH)^[7,8] ,最后,也是非常关键的一点,TTE0090 的 N-末端具有 ATP 结合位点 (GVDLGCT)^[9,10] 。但是 TTE0090 是否的确是编码葡萄糖激酶的基因,还必须有足够的实验数据来支持。本文中,我们从体外的分子克隆表达达到体内的蛋白纯化,从专一的生物

化学反应到特异的抗体免疫识别等方面,全面地考察了 TTE0090 的生物活性。如前所述,所有的实验都给予一个肯定的答案,蛋白 TTE0090 是一个新型的葡萄糖激酶。TTE0090 的重新注释和实验证实,提供了现代生物学研究中又一个富有启示性的案例。立足于基因组和生物信息数据的基础上,有机结合蛋白质组的分析和传统的生物化学测定,才能够准确地定义基因和发现新基因。

在细菌中 Embden-Meyerhof (EM) 是糖降解的一条主要代谢途径。己糖激酶或是葡萄糖激酶是该途径的第一个不可逆反应的催化剂。嗜热菌里广泛地存在两种葡萄糖激酶,一种是 ATP-依赖性葡萄糖激酶,另一种则是 ADP-依赖性葡萄糖激酶^[11-15]。TTE0090 属于 ATP-依赖性葡萄糖激酶,有相当专一的底物特异性,只能催化葡萄糖的磷酸化 (数据未在本文显示)。本文中的实验数据提示 TTE0090 的催化活性随温度增加呈钟形曲线,最佳反应温度为 60 $^{\circ}$ C ;同时,TTE0090 的热稳定性较强,在 80 $^{\circ}$ C 培养条件下,TTE0090 仍可维持其催化活性。

己糖激酶或葡萄糖激酶在 N-端均含有相对保

守的 ATP 结合位点,但是从氨基酸的一级结构来看,这些糖激酶中并没有发现保守的糖基团的结合顺序^[16]。X-ray 晶体分析和三维图像计算的结果说明,底物的结合位点更多地取决于蛋白质的空间构型^[16,17]。Bae 等^[18]分析了 *Thermus caldophilus* GK24 的己糖激酶的空间构型,发现 His159 与糖分子的 O2 原子形成氢键;Glu156 和 Leu157 与糖分子 O3 原子相互作用;而 Asp107、Glu156、Leu57 和 Gly158 则与糖分子的 C2 和 C3 之间有强相互作用。正是这些氨基酸基团的空间构型,决定了己糖激酶广泛的底物适应性。TTE0090 显然缺乏这样的氨基酸空间分布,因此表现出不同的底物专一性。近来 ROK 家族的 3 个半胱氨酸基团的保守区被认为和底物结合相关,大部分 ROK 成员在其氨基酸顺序的中间位置都含有 CXCGXXGCXE 的结构域,这个顺序恰位于与葡萄糖 O3 和 C3 原子相互作用的区域^[19]。实验表明,如果将这个顺序的半胱氨酸突变,ROK 的催化活性就会丧失。TTE0090 在该结构域的氨基酸顺序为 CNCGNYGCFE,它对于底物的专一性是否具有特别意义,值得进一步探讨。TTE0090 催化活性的温度依赖性呈对称性曲线,最适温度为 60℃,但是它在 40℃和 80℃时仍能有催化活性。这种特征与许多嗜热菌是不同的。*Crenarchaeon Aefopyrum pernix* 的葡萄糖激酶的催化活性有相当大的温度适应范围,其活性与温度的相关性呈对数关系,而不是对称的^[11]。在 40℃时,它仅有可检测性活性,当温度增至 70℃以上,活性陡然上升直至 100℃。在 *Thermotoga maritima* 菌中的葡萄糖激酶也是如此,它在 38℃时的活性甚微,却在 80~98℃范围内活性急剧增加,可是保温于 100℃,它的活性又完全丧失^[20]。活性与温度的非对称变化,很可能反映了在特定温度下,蛋白质分子的刚性结构的结构,这在极端嗜热菌中是相当常见的。嗜热嗜热厌氧菌只是适应于 50~80℃的生长环境,在这一温度范围内,它的葡萄糖激酶蛋白构型可以保持可逆性的弹性改变,虽然催化的活性有所改变,却不会丧失活性。高温条件下,嗜热菌中的蛋白质的热稳定性一直被认为与氨基酸的静电相互作用以及氢键的密度相关。尽管嗜热嗜热厌氧菌的葡萄糖激酶的晶体结构尚未解析,它的一级结构的信息对于了解其热稳定性也是颇有助益。这个葡萄糖激酶的酸性氨基酸的分子比例与碱性氨基酸基本相等,Asp 2.9%、Glu 9.5%、Arg 2.9%、Lys 8.3% 和 His 1.6%。因此,在这个蛋白质分子中几乎可能形成等摩尔的盐键,避免不饱

和极性氨基酸基团对蛋白质结构的微扰。

我们在本研究中观察到的一个重要事实是,随着温度的增加,嗜热嗜热厌氧菌的葡萄糖激酶的蛋白表达量逐渐下降。图 3 说明,60℃和 80℃的细菌生长速度远小于 75℃,可是我们从 Western blot 和部分纯化体内葡萄糖激酶的实验结果中均可以看到,葡萄糖激酶在 60℃的表达量显著地高于其他两个温度。根据这一观察,另一个推论则是令人费解。正是由于葡萄糖激酶在 75℃和 80℃的表达量不高,如果以初步纯化的葡萄糖激酶作为蛋白定量的估算,嗜热嗜热厌氧菌的葡萄糖激酶的酶比活力则是随温度的升高而上升。为了排除测定温度对酶活性的影响,我们将在不同温度下培养并且纯化的葡萄糖激酶,再在不同的温度下进行酶活性的测定和比较。无论在何种条件下,实验结果都是一致的。这意味着,葡萄糖激酶的蛋白质的活性位点可能由于温度的变化而随之改变。酶比活力的变化既可能源自于葡萄糖激酶在高温下的化学修饰,也可能与蛋白质构型变化有关。这是在本研究中引发的一个值得深究的问题之一。嗜热菌在高温条件下,它的应急机制之一便是增强酶的催化效率。例如在 *Pyrococcus furiosus* 中的半乳糖激酶和葡萄糖激酶的催化效率比常温条件下高出 150 倍之多^[21]。葡萄糖激酶是糖酵解通路的限速酶,它的活性大小直接决定了细菌内能量供应的多少。我们假设在不同温度条件下嗜热嗜热厌氧菌里的糖酵解通路的通量是基本恒定的,因此在温度低的状态,葡萄糖激酶的高表达量和低比活可维持细胞的生理活动;而在温度高的状态,葡萄糖激酶的低表达量和高比活仍然能够保持细胞所需要的能量。

参 考 文 献

- [1] Xue Y, Xu Y, Liu Y, et al. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 1335–1341.
- [2] Skarlatos P, Dahl MK. The glucosekinase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1998, **18**: 3222–3226.
- [3] Bao Q, Tian Y, Li W, et al. A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res*, 2002, **12**: 689–700.
- [4] Saier MH Jr. The bacterial phosphotransferase system: structure, function, regulation and evolution. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, **3**: 325–327.
- [5] Wang J, Xue Y, Feng X, et al. An analysis of the proteomic profile for *Thermoanaerobacter tengcongensis* under optimal culture conditions. *Proteomics*, 2004, **4**: 136–150.
- [6] Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, et al. Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiol Rev*, 1994, **140**: 2349–2354.

- [7] Hofmann K , Bucher P , Falquet L , *et al.* The PROSITE database , its status in 1999 . *Nucleic Acids Res* , 1999 , **27** : 215 – 219 .
- [8] Concha MI , Leon G . Cloning , functional expression and partial characterization of the glucose kinase from *Renibacterium salmoninarum* . *FEMS Microbiol Lett* , 2000 , **186** : 97 – 101 .
- [9] Arora KK , Shenbagamurthi P , Fanciulli M , *et al.* Glucose phosphorylation . Interaction of a 50-amino acid peptide of yeast hexokinase with trinitrophenyl ATP . *J Biol Chem* , 1990 , **265** : 5324 – 5328 .
- [10] Flaherty KM , Wilbanks SM , DeLuca-Flaherty C , *et al.* Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity . II . Structure of the active site with ADP or ATP bound to wild type and mutant ATPase fragment . *J Biol Chem* , 1994 , **269** : 12899 – 12907 .
- [11] Hansen T , Reichstein B , Schmid R , *et al.* The first archaeal ATP-dependent glucokinase , from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix* , represents a monomeric , extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity . *J Bacteriol* , 2002 , **184** : 5955 – 5965 .
- [12] Meyer D , Schneider-Fresenius C , Horlacher R , *et al.* Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12 . *J Bacteriol* , 1997 , **179** : 1298 – 1306 .
- [13] Kengen SWM , Tuininga JE , deBok FAM , *et al.* Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* . *J Biol Chem* , 1995 , **270** : 30453 – 30457 .
- [14] Labes A , Schonheit P . Sugar utilization in the hyperthermophilic , sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324 : starch degradation to acetate and CO₂ via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) . *Arch Microbiol* , 2001 , **176** : 329 – 338 .
- [15] Sakuraba HI , Yoshioka S , Koga S , *et al.* ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase , a novel bifunctional enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii* . *J Biol Chem* , 2002 , **277** : 12495 – 12498 .
- [16] Lunin VV , Li Y , Schrag JD , *et al.* Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose . *J Bacteriol* , 2004 , **186** : 6915 – 6927 .
- [17] Tsuge H , Sakuraba H , Kobe T , *et al.* Crystal structure of the ADP-dependent glucokinase from *Pyrococcus horikoshii* at 2.0- resolution : A large conformational change in ADP-dependent glucokinase . *Protein Sci* , 2002 , **11** : 2456 – 2463 .
- [18] Bae J , Kim D , Choi Y , *et al.* A hexokinase with broad sugar specificity from a thermophilic bacterium . *Biochem Biophys Res Commun* , 2005 , **334** : 754 – 763 .
- [19] Mesak LR , Mesak FM , Dahl MK . *Bacillus subtilis* GlcK activity requires cysteines within a motif that discriminates microbial glucokinases into two lineages . *BMC Microbiol* , 2004 , **4** : 6 .
- [20] Hansen T , Schonheit P . ATP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* represents an extremely thermophilic ROK glucokinase with high substrate specificity . *FEMS Microbiol Lett* , 2003 , **226** : 405 – 411 .
- [21] Verhees CH , Koot DG , Ettema TJ , *et al.* Biochemical adaptations of two sugar kinases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* . *Biochem J* , 2002 , **366** : 121 – 127 .

Expression and catalysis of glucokinase of *Thermoanaerobacter tengcongensis* at different temperatures

QIAN Zhong¹ , WANG Jing-qiang¹ , ZHOU Chuan-qi¹ , MA Yan-he² , LIU Si-qi^{1*}

(¹ Beijing Genomics Institute , Chinese Academy of Sciences , Beijing 101318 , China)

(² Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : According to analysis of proteomic profiling for *Thermoanaerobacter tengcongensis* , TTE0090 could be a novel gene of glucokinase (GLK) , though no GLK gene was annotated in the genomic data . With the methods of cloning and expression in vitro , the recombinant TTE0090 was successfully expressed and purified . The recombinant TTE0090 exhibited the catalysis of GLK , even at high temperatures . Detection of expression levels and catalysis of TTE0090 in vivo was furthermore carried out at different temperatures . The expression of TTE0090 was attenuated during the culture temperature elevated ; however , the specific activity was positively correlated to temperature raised . This leads a possibility that the metabolic capacity of glycolysis in *T. tengcongensis* is relatively constant at different temperatures . All the results herein demonstrate that TTE0090 is a novel gene of GLK . The studies on TTE0090 and its protein product , thus , may deepen our understanding of the adaptation mechanism of thermophilic bacteria living in harsh environment .

Keywords : *Thermoanaerobacter tengcongensis* ; Glucokinase ; Temperature ; Glycolysis

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719605) ; Chinese National Natural Science Found (30570399)

* Corresponding author . Tel : 86-10-80485325 ; Fax : 86-10-80485324 ; E-mail : siqiliu@genomics.org.cn

Received : 22 September 2005 / Accepted : 9 November 2005 / Revised : 7 December 2005