

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1193 – 1203; 4 October 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.012

好客嗜酸两面菌 W1 寡营养酸性热泉环境的适应机制

尤晓颜¹, 张巧明¹, 郑华军², 姜成英^{3*}

¹ 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471002

² 上海人类基因组研究中心, 上海 201203

³ 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 【目的】从基因组水平揭示好客嗜酸两面菌 (*Acidianus hospitalis*) W1 对寡营养酸性热泉环境的适应机制。【方法】使用 NCBI 非冗余蛋白数据库、Uniport 蛋白数据库以及 *Sulfolobus* 数据库对好客嗜酸两面菌 W1 基因组序列进行功能注释, 使用 KEGG 数据库对基因组进行 *In silico* 代谢途径重构, 在此基础上, 采用比较基因组学方法对代谢途径进行鉴定和完善。【结果】好客嗜酸两面菌 W1 具备多样化的代谢方式以适应寡营养酸性热泉环境。W1 菌株通过 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸和乙二酸-4-羟基丁酸循环进行 CO₂ 固定、通过氧化还原型无机硫化物 (Reduced inorganic sulfur compounds, RISCs) 获取能量营自养型生长。但 W1 菌株与模式菌株 *Acidianus ambivalens* 的硫代谢方式不同, W1 基因组中缺少编码亚硫酸-受体氧化还原酶 (SAOR)、腺苷硫酸 (APS) 还原酶、硫酸腺苷酰转移酶 (SAT) 和腺苷硫酸:磷酸腺苷转移酶 (APAT) 的基因。此外, W1 菌株可以通过非磷酸化的分支的 ED 途径和 TCA 循环进行葡萄糖代谢, 糖类和氨基酸转运蛋白以及相应水解酶的存在表明 W1 能够利用部分有机物营兼性自养型生长。与 *A. ambivalens* 不同, W1 菌株不能利用 H₂ 作为电子供体。【结论】多样化的代谢方式为好客嗜酸两面菌 W1 更好地适应寡营养酸性热泉环境提供了重要保障, 对于 W1 菌株特有代谢方式的揭示也丰富了对于嗜酸两面菌 (*Acidianus*) 属物种代谢多样性的认知。

关键词: 好客嗜酸两面菌, 基因组, 寡营养, 代谢, 还原型无机硫化物

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1193-11

热泉是研究嗜热古菌与寡营养酸性环境之间的相互作用和适应性机制的理想生境^[1]。研究人员对多个地区热泉环境中古菌群落结构的多样性已经开展了广泛的研究, 如美国黄石国家公园、冰岛、俄罗斯堪察加半岛、罗马尼亚西部平原, 以及我国云南腾冲和西藏地区的热泉等^[2-7]。出于对寡营养酸性环境的适应需求, 在热泉中发现的很多古菌能够

利用单质硫、硫化物、二价铁离子和氢气作为电子供体营化能自养型生长, 其中一些古菌还可以利用有机物作为碳源营兼性自养型生长^[8]。极端嗜热、营化能无机自养型生长、能够进行硫代谢、嗜酸性球菌是硫化叶菌目 (*Sulfolobales*) 的典型特征, 作为其成员之一, 嗜酸两面菌属 (*Acidianus*) 由 7 株 (正式报道) 兼性好氧的嗜酸热古菌构成^[8-13], 最适 pH 值

基金项目: 国家自然科学基金 (31200035, 31171234); 河南科技大学博士启动基金 (090061608)

* 通信作者。Tel: +86-40-64807581; E-mail: jiangcy@mail.im.ac.cn

作者简介: 尤晓颜 (1979 -), 男, 河南洛阳人, 博士, 主要从事极端微生物功能基因组学研究。E-mail: xiaoyanyou@haust.edu.cn

收稿日期: 2014-02-02; **修回日期:** 2014-06-16

范围 0.8 – 3.0, 最适生长温度范围 74 – 90°C。能够进行硫代谢是该属物种的共同特征, 以 O₂ 或者 Fe³⁺ 作为电子受体。其中 *Acidianus manzaensis*、*Acidianus sulfidivorans*、*Acidianus brierleyi* 和 *Acidianus copahuensis* 营兼性自养生长, *Acidianus infernus*、*Acidianus ambivalens* 和 *Acidianus tengchongensis* 营专性自养生长。除 *A. sulfidivorans* 外, 其它物种均可以采用 H₂ 作为电子供体。代谢方式的多样性反映了该属物种对于不同寡营养酸性环境(热泉、硫质喷气孔和海底热泉)多样化的适应性。

相对于硫化叶菌属 (*Sulfolobus*) 和生金球菌属 (*Metallosphaera*), 关于嗜酸两面菌属物种对于寡营养酸性环境的适应机制的研究还相对较少。目前的研究主要集中在物种的分离鉴定^[8-13]、硫代谢机制以及在生物冶金中的应用等方面^[14-19], 缺少基因组序列使得对该属物种独特生理性状的研究只能集中在少数关键基因以及个别代谢途径的功能鉴定上, 还缺乏对其环境适应机制整体性地研究。好客嗜酸两面菌 W1 是分离自美国黄石国家公园热泉的一株新的嗜酸两面菌属古菌^[20-21]。W1 菌株的染色体外的遗传物质(纤毛状病毒 AFV1 和接合质粒 pAH1) 与 W1 菌株之间的相互作用机制之前已经开展了较为细致地研究^[22-23]。为了揭示 W1 菌株对于寡营养酸性热泉环境的适应机制, 我们对 W1 菌株进行全基因组测序并获得了完整的基因组图谱^[21]。在此基础上, 通过对 W1 菌株的基因组序列进行功能注释、代谢途径重构以及比较基因组学分析, 本文对好客嗜酸两面菌 W1 适应寡营养酸性热泉环境可能的分子机制进行了阐释。

1 材料和方法

1.1 基因组 DNA 序列

采用罗氏 454 GS FLX 测序平台对 W1 菌株的基因组进行测序, 应用多引物 PCR 的策略完成基因组空缺区域填充 (Gap closing), 最终获得 W1 菌株的完整基因组序列图谱, 基因组碱基序列准确率高于 99.99%, GenBank 收录号为 NC_015518.1^[21]。用于基因组比较的物种序列下载自 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 包括 *Sulfolobus solfataricus* P2 (NC_002754)、*Metallosphaera sedula* DSM 5348 (NC_009440) 和

Hydrogenobacter thermophilus (NC_013799.1)。

1.2 基因组功能注释和分析

采用 Glimmer3.01 和 FgeneSB (<http://linux1.softberry.com>) 程序对开放阅读框 (ORFs) 预测; 通过与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Uniport (<http://www.uniprot.org>) 以及 *Sulfolobus* (<http://www.Sulfolobus.org/>) 蛋白数据库比对 (BLASTP, E 值 < 1e-03) 注释蛋白质功能; 阅读框移码突变 (Frameshift) 通过人工进行验证; 采用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) 和 ConPred II (<http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/>) 程序预测膜蛋白; 通过与转运蛋白分类数据库 (TCDB) 比对确定转运蛋白; 采用 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 SecretomeP 2.0 (<http://www.cbS.dtu.dk/services/SecretomeP/>) 程序预测分泌蛋白; 采用 tRNAScan-SE 程序鉴定 tRNA 编码基因。

1.3 W1 代谢途径重构

采用基因组百科全书数据库 (KEGG) 的 KAAS 服务器 (KEGG Automatic Annotation Server, <http://www.genome.jp/tools/kaas/>) *In silico* 重构 W1 菌株的代谢途径, 在此基础上通过以下方式对 W1 菌株的重要代谢途径进行完善: (1) 与 *S. solfataricus* P2 和 *M. sedula* DSM 5348 进行比较基因组学分析, 对参与菌株 W1 碳代谢 (ED、EMP、TCA 和 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环) 的基因进行验证; (2) 根据基因注释结果以及与 *M. sedula* DSM 5348 和 *A. ambivalens* 硫代谢途径相关蛋白的比对结果对参与菌株 W1 硫代谢途径的基因进行验证; (3) 与本地化的 CO₂ 固定数据库 (未公开) 比对, 对参与乙二酸-4-羟基丁酸循环、还原性三羧酸循环 (RTCA) 等 CO₂ 固定途径的基因进行比对分析。 (4) 根据以上分析结果, 采用 SmartDraw、PowerPoint 软件绘制 W1 的代谢途径图。

2 结果和分析

2.1 好客嗜酸两面菌 W1 基因组基本特征

好客嗜酸两面菌 W1 基因组由一条环状染色体 (2.14 Mb) 和一个环状质粒 pAH1 (28644 bp) 构成 (图 1), 染色体含有 *cdc6-3* (*ahos0001*)、*whiP/cdt1*

(*ahos1370*) 和 *cdc6-1* (*ahos0780*) 3 个可能的复制起点^[21]。染色体平均 GC 含量 (34.2%) 略低于 *A. tengchongensis* (38%) 和 *A. copahuensis* (34.5%)。46 个 tRNA 编码基因负责 20 种氨基酸的转运, 其中 15 个含有内含子。在编码的 2389 个开放阅读 (ORFs) 中, 1019 个 ORFs 具有明确的注释功能, 绝大多数与硫化叶菌属和生金球菌属物种的编码蛋白同源。在编码保守的假想蛋白的 ORFs 中, 其中 649 个 ORFs 与硫化叶菌属物种同源、176 个 ORFs 与 *M. sedula* DSM 5348 同源。因此, 为进一步鉴定

参与 W1 菌株代谢途径的编码基因功能, 选取 *S. solfataricus* P2 和 *M. sedula* DSM 5348 与 W1 菌株进行基因组比对, 它们的一些重要代谢途径的基因功能已经得到实验证实^[24-26]。质粒 pAH1 与 2009 年完成测序的好客嗜酸两面菌 W1 结合质粒 pAH1 序列相一致^[22], 但少 4 个碱基, 这可能是由于两者采用不同的测序方法造成。pAH1 整合在 tRNA^{Arg} [TCG] 基因中, 整合位点位于基因组 1075876 - 1075946 bp 处。

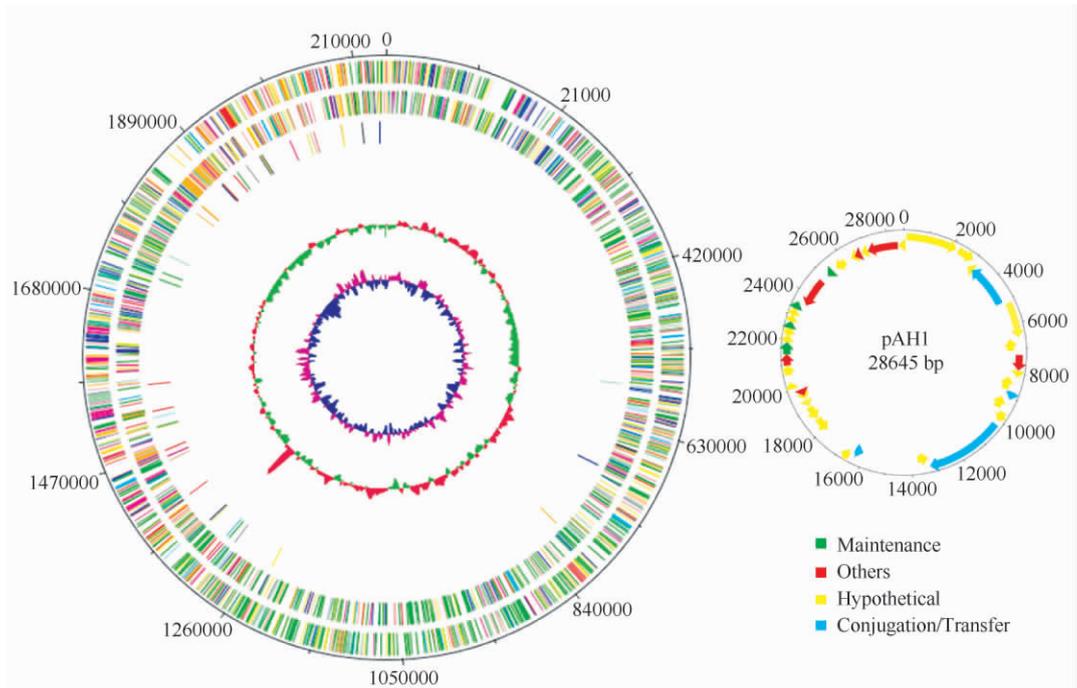


图 1. 好客嗜酸两面菌 W1 染色体与质粒圈图

Figure 1. Graphic representation of the *Acidianus hospitalis* W1 chromosome and plasmid pAH1. For the W1 chromosome, the first two outer circles represent the positions of genes in the chromosome (Circle 1: plus strand, Circle 2: minus strand), colored by functional categories according to COG classification; circle 3 represents tRNA genes; circle 4 represents (G + C) percentage content: above median GC content (red), less than or equal to the median (green); circle 5 represents GC skew (G - C) / (G + C) calculated using a 1 kb window: values >0 (grape), values <0 (blue). Genes of plasmid were colored by functional categories as shown in figure.

2.2 好客嗜酸两面菌 W1 的碳代谢

2.2.1 分支 ED (Entner-Doudoroff) 途径和糖异生途径

基因组学分析表明好客嗜酸两面菌 W1 通过非磷酸化分支的 ED (Entner-Doudoroff) 途径进行葡萄糖分解代谢 (图 2)。ED 途径有 2 条分支, 1 条为非磷酸化的分支, 另外 1 条为半磷酸化的分支, 区别在于 2-酮-3-脱氧-D-葡萄糖酸是否发生磷酸化^[27]。W1 基因组中编码有完整非磷酸化分支的 ED 途径中相关酶类的基因, 如: 2-酮-3-脱氧-D-葡

萄糖酸醛缩酶 (Ahos_0260), 醛脱氢酶 (Ahos_2225) 和甘油酸激酶 (Ahos_0545)。2-酮-3-脱氧-D-葡萄糖酸醛缩酶将催化 2-酮-3-脱氧-D-葡萄糖酸 (KDG) 转变为丙酮酸和甘油醛, 然后在醛脱氢酶和甘油酸激酶的分别作用下将甘油醛转变为 2-磷酸甘油酸。不同于 *S. solfataricus* P2 的葡萄糖的代谢, 好客嗜酸两面菌 W1 缺少半磷酸化的分支, W1 基因组中缺少编码该途径中的关键酶 (2-酮-3-脱氧-D-葡萄糖酸激酶和非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶)

不可逆转的酶类, 如葡萄糖酸脱氢酶 (Ahos_0261), 阻止了 ED 途径向糖异生方向进行。因此, W1 菌株部分完整的 EMP 途径最有可能的运转方向是糖异生。

2.2.2 TCA 循环:好客嗜酸两面菌 W1 编码有完整 TCA 循环相关酶类的基因 (图 2)。与 *S. solfataricus* P2 和 *M. sedula* DSM 5348 类似, W1 的 TCA 循环中从丙酮酸合成乙酰-CoA 以及从 α -酮戊二酸形成琥珀酰-CoA 的过程中分别由“丙酮酸:铁氧还蛋白酶 (PFOR)”和“ α -酮戊二酸:铁氧还蛋白酶 (OGOR)”催化。在催化过程中, 铁氧还蛋白代替 NAD^+ 被用作 PFOR 和 OGOR 的辅因子^[21]。在好客嗜酸两面菌 W1 中, 只含有 1 个拷贝的 PFOR 编码基因, 而在 *S. solfataricus* P2 和 *M. sedula* DSM 5348 中含有多个拷贝 (2-4 个), 基因拷贝数目的差异可能反映了这些物种在不同生境下的生理需求水平不同。如果过多的中间产物从 TCA 循环中抽出, 就必须通过代谢回补反应进行补充, 在这 3 株 *Sulfolobales* 中, 草酰乙酸可以由磷酸烯醇式丙酮酸通过磷酸烯醇式丙酮羧化酶 (Ahos_2286, Sso0756 和 Msed_0756) 的催化作用而得到补充。不同于 *S. solfataricus* P2, W1 不具备乙醛酸循环, 基因组中缺少编码异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶的基因。对于 *M. sedula* DSM 5348, 基因组中只含有苹果酸合酶编码基因 (msed_1412)。

2.2.3 CO_2 固定:古菌在自然界 CO_2 的固定中发挥着重要作用, 已经有多条 CO_2 固定途径在不同的古菌中被鉴定出来^[28]。其中, 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环被认为是硫化叶菌目通用的二氧化碳固定方式, 该途径最早在 *M. sedula* 中被鉴定出来^[29]。3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环可以分为 2 个部分: (1) 乙酰-CoA 和两个碳酸氢根分子经由 3-羟基丙酸转化为琥珀酰-CoA; (2) 琥珀酰-CoA 通过 4-羟基丁酸转化为两分子的乙酰-CoA, 从而完成 1 个循环, 固定 2 分子的 CO_2 (图 2)。与 *M. sedula* DSM 5348 相比较, 好客嗜酸两面菌 W1 基因组中编码有 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸途径中相关酶类的同源基因, 以及该途径中一些功能待定基因的同源基因 (候选基因), 如: 巴豆酰-CoA 水合酶 (Ahos_0035)、3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶 (Ahos_2276 和 1103) 和乙酰乙酰-CoA β -酮硫解酶 (Ahos_2176 和 1303), 这些同源基因的存在表明 W1 可能采用 3-羟基丙酸/4-羟基丁

酸循环进行 CO_2 固定。3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环中的很多基因之前有着不同的注释功能, 但他们的功能目前已经在 *M. sedula* DSM 5348 和 *S. solfataricus* P2 中得到验证^[24-26]。

对于好客嗜酸两面菌 W1, 另外 1 条可能的 CO_2 固定途径是乙二酸-4-羟基丁酸循环^[30]。在该循环中, 1 分子的 CO_2 和 1 分子的碳酸氢根首先经由部分还原性三羧酸循环 (RTCA) 途径被转化为琥珀酰-CoA, 然后琥珀酰-CoA 通过 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环的后半部分被转化为 2 分子的乙酰-CoA 分子 (图 2)。乙二酸-4-羟基丁酸循环中的相关编码基因均在 *A. hospitalis* W1 基因组中发现, 表明该途径可能作为 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环的补充途径发挥 CO_2 固定功能。

2.2.4 乙酰-CoA 的再生:在 W1 菌株的碳代谢循环中, 乙酰-CoA 处于重要的位置, 它被用作 CO_2 固定的受体、也可以用作细胞其它组分合成的前体物质。因此, 保证乙酰-CoA 的足够供给对于细胞正常的生理代谢具有着重要的意义。W1 菌株的 ED 途径和 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环均可以产生乙酰-CoA, 而 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环、TCA 循环以及乙二酸-4-羟基丁酸循环也具有乙酰-CoA 的自我再生功能。此外, 通过对 W1 基因组的分析还发现生成乙酰-CoA 的另外 1 种可能方式, 即通过乙酰-CoA 合成酶 (Ahos_1005/0918) 催化乙酸、ATP 和 CoA 生成乙酰-CoA (图 2)。

2.3 氮的同化

基因组分析结果显示氮的同化作用是好客嗜酸两面菌 W1 获取氮源的主要方式^[21]。与其它嗜酸两面菌属物种类似, W1 菌株不能通过固定空气中的 N_2 或是还原硝酸盐和亚硝酸盐获得氮源, 这些途径相关的基因全部缺失。W1 基因组中编码有 1 个铵转运蛋白 (Ahos_1467), 谷氨酰胺合成酶 (Ahos_0460、Ahos_1272 和 Ahos_2233) 和谷氨酸合成酶 (Ahos_1236 和 1237) 可以催化氨合成谷氨酰胺, 并进一步合成谷氨酸。谷氨酸还可以通过谷氨酸脱氢酶 (NADPH, Ahos_0494) 的催化作用由 α -酮戊二酸和氨合成。此外, W1 菌株基因组还编码有氨甲酰磷酸合成酶 (Ahos_1106 和 1107), 该酶可以催化氨或谷氨酰胺与碳酸氢盐和 ATP 合成氨甲酰磷酸, 氨甲酰磷酸可以进入精氨酸合成途径为精氨酸合成提供氮源或为嘧啶核苷

酸合成提供氮源(表1)。氨甲酰磷酸合成酶在原核和真核生物中普遍存在,是一种重要的氮同化方式^[31]。

表1. 好客嗜酸两面菌 W1 氮同化相关酶类编码基因

Table 1. Genes encoding for ammonium assimilation in the genome of *A. hospitalis* W1

Ammonia assimilation	No. of genes	Gene ID
ammonium transporter	1	Ahos1467
glutamine synthetase	3	Ahos_0460/1272/2233
glutamate synthase	2	Ahos_1236/1237
glutamate dehydrogenase (NADP ⁺)	1	Ahos_0494
aminomethyltransferase	1	Ahos_1326
carbamoyl phosphate synthase small subunit	1	Ahos_1106
carbamoyl phosphate synthase large subunit	1	Ahos_1107

2.4 有机物转运和水解系统

W1 基因组中编码有 1 个糖-质子协同运输蛋白(Ahos_0434)和 1 个 ABC 类型的糖转运蛋白(Ahos_0287-0290)用于糖类物质的运输(表2)。被转运进入细胞的糖类物质可以在细胞内不同类型的糖苷酶水解酶的作用下分解为葡萄糖后进入 ED 途径,如:麦芽糖苷酶(Ahos_0333 和 1625)、半乳糖苷酶(Ahos_0347 和 0285)、甘露糖苷酶(Ahos_0335)以及 family 15 家族的 2 个糖苷水解酶(Ahos_1819 和 273)。此外, W1 还编码有两个参与淀粉水解的酶类: α -淀粉酶(Ahos_1029)和糖元脱枝酶(Ahos_1028)。

28 个负责编码氨基酸、寡肽和氨转运的相关基因在好客嗜酸两面菌 W1 基因组中被鉴定出来^[21]。其中 19 个用于氨基酸转运,如:5 个基因编码氨基酸转运蛋白、3 个基因编码氨基酸渗透酶以及 11 个编码氨基酸渗透酶类似蛋白。此外,基因组中还含有 2 个寡肽 ABC 转运蛋白基因簇(*ahos_0337-0342* 和 *ahos_0170-0175*)。21 个编码蛋白水解酶类的基因散布于基因组中,其中 20 个属于肽酶,包括 4 个内肽酶(Ahos_0428、0516、0695 和 0800), 3 个氨肽酶(Ahos_0013、0588 和 1941), 2 个胃蛋白酶(Ahos_1929 和 2087)和 1 个羧肽酶(Ahos_0991)。在这些蛋白水解酶中,5 个为膜蛋白、4 个为分泌蛋白(表2)。有机物转运蛋白和水解酶编码基因的存在表明好客嗜酸两面菌 W1 可以利用部分糖类、酵母提取物、胰蛋白胨等有机物获取碳源和氮源营兼性自养型生长。

2.5 硫代谢途径

好客嗜酸两面菌 W1 的硫代谢方式与 *S. solfataricus* P2 和 *M. sedula* DSM 5348 不同,单质硫在后者优先被亚硫酸还原酶氧化为亚硫酸,然后进一步被亚硫酸氧化酶氧化为硫酸或是在腺苷硫酸(APS)还原酶和硫酸腺苷转移酶(SAT)的作用下氧化为硫酸^[25]。而对于 W1,单质硫被硫氧化还原酶(SOR, Ahos_0131)氧化,生成亚硫酸、硫代硫酸和硫化氢。SOR 氧化反应的产物亚硫酸,将通过自发的非酶促反应与单质硫生成硫代硫酸,硫代硫酸经由硫代硫酸/连四硫酸循环最终被氧化生成硫酸^[32]。该循环由硫代硫酸:醌氧化还原酶(TQO, Ahos_0238, 0239 和 Ahos_0112, 0113)和连四硫酸水解酶构成(TetH, Ahos_1670)。在周质空间, TQO 以醌作为电子受体将硫代硫酸氧化为连四硫酸,生成的连四硫酸在 TetH 的作用下将连四硫酸水解为硫代硫酸和硫酸,完成 1 个循环。参与 W1 硫氧化代谢过程的相关酶类还有:负责将硫化氢氧化物的硫化物:醌氧化还原酶(SQO, Ahos_0513 和 Ahos_1014)和硫化物脱氢酶黄素蛋白(Fcc, Ahos_0188),以及负责将电子跨膜传递给 O₂ 并偶联 ATP 的产生的醌氧化酶(Ahos_1872, 1873 和 Ahos_0314, 1653)。

根据以上分析结果,推测如下好客嗜酸两面菌 W1 的硫氧化过程^[21]:首先,细胞外的 H₂S 被分泌类型的 SQO 和 Fcc 氧化生单质硫,在细胞外膜上形成硫层。然后,位于外膜的单质硫被假定的巯基转运蛋白转运到细胞质中,单质硫在细胞质中被 SOR 氧化成为亚硫酸、硫代硫酸和硫化氢。产物亚硫酸首先与单质硫通过非酶促反应自发转变为硫代硫酸,最终通过推测的硫代硫酸/连四硫酸循环氧化生成硫酸。H₂S 可以被细胞质中的 SQO 以醌作为电子受体氧化为单质硫,或者与连四硫酸在高温下自发反应生成硫代硫酸和单质硫^[32]。最后,硫氧化过程中产生的硫酸通过硫酸转运蛋白(SulP, Ahos_1256)排出体外完成硫氧化代谢。在硫氧化过程中产生的电子首先传递给醌,然后进入电子传递链传递。末端醌氧化酶(Ahos_0314、1653、1872 和 1873)接收电子后然后传递给 O₂ 并偶联 ATP 的产生。其中一部分电子可以通过反向传递给 NADH 复合体产生 NADH 供给其它代谢途径使用(图3)。

表 2. 好客嗜酸两面菌 W1 基因组中的有机物转运蛋白及水解酶类

Table 2. Transporters and hydrolytic enzymes for organic materials transportation and hydrolysis in the genome of *A. hospitalis* W1

Transporters and hydrolytic enzymes	No. of genes	Gene ID
Sugar transporter		
sugar proton symporter	1	Ahos_0434
sugar ABC transporter ATP-binding protein	1	Ahos_0290
sugar ABC transporter	1	Ahos_0289
sugar transport protein	2	Ahos_0288 Ahos_1628
maltose ABC transporter	1	Ahos_0287
Glycosidases		
alpha-glucosidase	2	Ahos_0333 Ahos_1625
alpha-mannosidase	1	Ahos_0335
alpha-galactosidase	1	Ahos_0347
beta-galactosidase	1	Ahos_0285
glycoside hydrolase 15-related	2	Ahos_2273 Ahos_1819
Others		
alpha-amylase	1	Ahos_1029
glycogen debranching enzyme	1	Ahos_1028
Amino acid transporter and permease		
peptide transporter permease	1	Ahos_0342
peptide transporter ATP-binding protein	1	Ahos_0341
peptide transporter ATP-binding protein	1	Ahos_0340
peptide transporter permease	1	Ahos_0337
oligopeptide transporter ATP-binding protein	1	Ahos_0175
oligopeptide transporter ATP-binding protein	1	Ahos_0174
oligopeptide transporter permease	1	Ahos_0173
transport systems inner membrane component	1	Ahos_0172
ABC-type dipeptide transport system periplasmic component-like protein	1	Ahos_0170
amino acid transporter	5	Ahos_0100 Ahos_0163
amino acid permease	3	Ahos_0328 Ahos_0439
amino acid permease-associated region	11	Ahos_2251 Ahos_2065
Proteolytic enzymes		
trypsin-like serine protease	1	Ahos_0116
X-Pro dipeptidase	1	Ahos_1059
peptidase M19 renal dipeptidase	1	Ahos_0433
peptidase M24	1	Ahos_1275
peptidase M48 Ste24p	2	Ahos_1066 /1031
peptidase M50	1	Ahos_0676
peptidase U32	1	Ahos_1636
peptidase related protein	1	Ahos_2351
prolyl endopeptidase	1	Ahos_0428
proteasome endopeptidase complex	2	Ahos_0516 /0800
metalloendopeptidase, glycoprotease family	1	Ahos_0695
metallopeptidase-like protein	1	Ahos_1003
<i>Pseudomona</i> pepsin	2	Ahos_2087/1929
methionine aminopeptidase	1	Ahos_0588
peptidase M1, membrane alanine aminopeptidase	2	Ahos_0013 /1941
peptidase A5, thermopsin	1	Ahos_0007
carboxypeptidase Taq	1	Ahos_0991

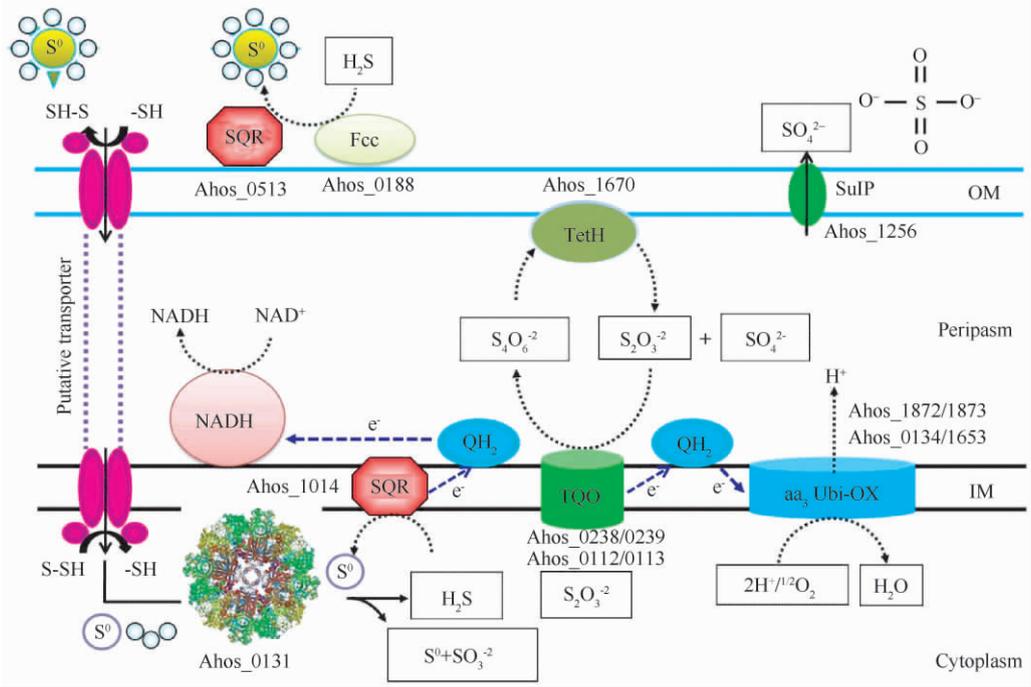


图 3. 好客嗜酸两面菌 W1 的硫代谢途径

Figure 3. Proposed sulfur metabolism pathways in *Acidianus hospitalis* W1. The following abbreviations are used: OM outer membrane, IM inner membrane.

3 讨论

固定 CO₂ 是好客嗜酸两面菌 W1 在寡营养酸性热泉环境下获得碳源的主要方式, 通过比较基因组学分析表明菌株 W1 通过 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸和乙二酸-4-羟基丁酸循环进行 CO₂ 固定途径。而 W1 菌株能否通过还原性三羧酸循环 (RTCA) 固定 CO₂ 作为碳源, 还需要进一步验证, 因为在 W1 菌株基因组中缺少 RTCA 循环中关键酶 ATP 柠檬酸裂解酶 (ACL) 的编码基因, ACL 在 RTCA 循环中负责将柠檬酸催化裂解为草酰乙酸和乙酰-CoA 实现乙酰-CoA 的再生。近来, 一条命名为 ACL-不依赖的柠檬酸裂解途径在产液菌属 (*Aquifex*) 和氢杆菌属 (*Hydrogenobacter*) 的物种中被鉴定出来, 可以替代 ACL 的功能将柠檬酸裂解生成乙酰-CoA^[33-34]。该途径中, 柠檬酸在柠檬酰-CoA 合成酶 (Ccs) 和柠檬酰-CoA (Ccl) 裂合酶的共同作用下裂解, 生成乙酰-CoA。通过比对发现 W1 中基因 *ahos_1485*、*1484* 和 *ahos_2111* 的编码产物与 *H. thermophilus* 的柠檬酰-CoA 合成酶 (Ccs) 和柠檬酰-CoA (Ccl) 的氨基酸序

列的一致性分别为 43% (CcsA)、37% (CcsB) 和 34% (Ccl), 是否这些基因具有类似的功能还有待试验验证。

能够进行硫代谢是嗜酸两面菌属物种的代谢特征, 也是在生物冶金工业中应用的重要性状之一。好客嗜酸两面菌 W1 中单质硫通过硫氧化还原酶 (SOR_{w1}) 进行氧化, SOR_{w1} 编码的 SOR 与嗜酸两面菌属和硫化叶菌属一些物种中已经发现的 SOR 氨基酸序列一致性高达 67-99%, 表明可能具备类似的硫氧化还原功能^[15, 35-36]。亚硫酸是 SOR 催化反应的产物之一, 对细胞具有很强的毒性, 必须及时转化和清除。与 *A. ambivalens* 相比, 亚硫酸在 W1 细胞内通过与单质硫生成硫代硫酸, 然后经由硫代硫酸/连四硫酸循环氧化生成硫酸, 最终被硫酸转运蛋白排出体外。W1 缺少 *A. ambivalens* 中参与亚硫酸氧化的亚硫酸:受体氧化还原酶 (SAOR)、腺苷硫酸 (APS) 还原酶、硫酸腺苷酰转移酶 (SAT) 和腺苷硫酸:磷酸腺苷转移酶 (APAT), 表明嗜酸两面菌属的物种之间具有不同的硫氧化代谢方式。此外, 嗜酸两面菌属的多数物种均可以利用 H₂ 作为电子供体, 而只有 W1 和 *A. sulfidivorans* 不能够利用 H₂ 作为电子供体, 在基因组内缺少氢化酶的编码基

因。代谢方式上的差异反映了嗜酸两面菌属物种对于不同生境的适应机制不同, 多样化的代谢方式为好客嗜酸两面菌 W1 更好地适应寡营养酸性热泉环境提供了重要保障, 对于菌株 W1 适应机制的揭示也丰富了对于嗜酸两面菌属物种代谢多样性的认知。

致谢: 本文成文和试验过程中得到中国科学院微生物研究所刘双江研究员课题组的悉心指导和帮助, 在此表示衷心感谢; 感谢丹麦哥本哈根大学 Roger Antony Garrett 教授提供好客嗜酸两面菌 W1 基因组 DNA。

参考文献

- [1] Satoh T, Watanabe K, Yamamoto H, Yamamoto S, Kurosawa N. Archaeal community structures in the solfataric acidic hot springs with different temperatures and elemental compositions. *Archaea*, 2013, doi: 10.1155/2013/723871.
- [2] Barns SM, Fundyga RE, Jeffries MW, Pace NR. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91 (5) : 1609-1613.
- [3] Coman C, Druga B, Hegedus A, Sicora C, Dragos N. Archaeal and bacterial diversity in two hot spring microbial mats from a geothermal region in Romania. *Extremophiles*, 2013, 17 (3) : 523-534.
- [4] Hou W, Wang S, Dong H, Jiang H, Briggs BR, Peacock JP, Huang Q, Huang L, Wu G, Zhi X, Li W, Dodsworth JA, Hedlund BP, Zhang C, Hartnett HE, Dijkstra P, Hungate BA. A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing. *PLoS One*, 2013, 8 (1) : e53350.
- [5] Huang Q, Dong CZ, Dong RM, Jiang H, Wang S, Wang G, Fang B, Ding X, Niu L, Li X, Zhang C, Dong H. Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China. *Extremophiles*, 2011, 15 (5) : 549-563.
- [6] Kvist T, Ahring BK, Westermann P. Archaeal diversity in Icelandic hot springs. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59 (1) : 71-80.
- [7] Perevalova AA, Kolganova TV, Birkeland NK, Schleper C, Bonch-Osmolovskaya EA, Lebedinsky AV. Distribution of Crenarchaeota representatives in terrestrial hot springs of Russia and Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (24) : 7620-7628.
- [8] Giaveno MA, Urbietta MS, Ulloa JR, Toril EG, Donati ER. Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina. *Microbial Ecology*, 2013, 65 (2) : 336-346.
- [9] Fuchs T, Huber H, Burggraf S, Stetter KO. 16S rDNA-based Phylogeny of the Archaeal Order Sulfolobales and Reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, 1996, 19 (1) : 56-60.
- [10] He ZG, Zhong H, Li Y. *Acidianus tengchongensis* sp. nov., a new species of acidothermophilic archaeon isolated from an acidothermal spring. *Current Microbiology*, 2004, 48 (2) : 159-163.
- [11] Plumb JJ, Haddad CM, Gibson JAE, Franzmann PD. *Acidianus sulfidivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfataria on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57 (7) : 1418-1423.
- [12] Segerer A, Neuner A, Kristjansson JK, Stetter KO. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1986, 36 (4) : 559-564.
- [13] Yoshida N, Nakasato M, Ohmura N, Ando A, Saiki H, Ishii M, Igarashi Y. *Acidianus manzaensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon growing autotrophically by the oxidation of H₂ with the reduction of Fe³⁺. *Current Microbiology*, 2006, 53 (5) : 406-411.
- [14] Bharadwaj A, Ting YP. Bioleaching of spent hydrotreating catalyst by acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi*: Leaching mechanism and effect of decoking. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 673-680.
- [15] Chen ZW, Jiang CY, She Q, Liu SJ, Zhou PJ. Key role of cysteine residues in catalysis and subcellular localization of sulfur oxygenase-reductase of *Acidianus tengchongensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (2) : 621-628.
- [16] Li M, Chen Z, Zhang P, Pan X, Jiang C, An X, Liu S, Chang W. Crystal structure studies on sulfur oxygenase

- reductase from *Acidianus tengchongensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2008, 369 (3) : 919-923.
- [17] Liu H-C, Xia J-L, Nie Z-Y, Peng A-A, Ma C-Y, Zheng L, Zhao Y-D. Comparative study of sulfur utilization and speciation transformation of two elemental sulfur species by thermoacidophilic Archaea *Acidianus manzaensis* YN-25. *Process Biochemistry*, 2013, 48 (12) : 1855-1860.
- [18] Rastegar SO, Mousavi SM, Rezaei M, Shojaosadati SA. Statistical evaluation and optimization of effective parameters in bioleaching of metals from molybdenite concentrate using *Acidianus brierleyi*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2013.
- [19] Urich T, Gomes CM, Kletzin A, Frazao C. X-ray structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. *Science*, 2006, 311 (5763) : 996-1000.
- [20] Bettstetter M, Peng X, Garrett RA, Prangishvili D. AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *acidianus*. *Virology*, 2003, 315 (1) : 68-79.
- [21] You XY, Liu C, Wang SY, Jiang CY, Shah SA, Prangishvili D, She Q, Liu SJ, Garrett RA. Genomic analysis of *Acidianus hospitalis* W1 a host for studying crenarchaeal virus and plasmid life cycles. *Extremophiles*, 2011, 15 (4) : 487-497.
- [22] Basta T, Smyth J, Forterre P, Prangishvili D, Peng X. Novel archaeal plasmid pAH1 and its interactions with the lipothrixvirus AFV1. *Molecular Microbiology*, 2009, 71 (1) : 23-34.
- [23] Greve B, Jensen S, Brugger K, Zillig W, Garrett RA. Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea*, 2004, 1 (4) : 231-239.
- [24] Auernik KS, Kelly RM. Physiological versatility of the extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* supported by transcriptomic analysis of heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (3) : 931-935.
- [25] Auernik KS, Maezato Y, Blum PH, Kelly RM. The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (3) : 682-692.
- [26] She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, Chan-Weiher CC, Clausen IG, Curtis BA, De Moors A, Erauso G, Fletcher C, Gordon PM, Heikamp-de Jong I, Jeffries AC, Kozera CJ, Medina N, Peng X, Thi-Ngoc HP, Redder P, Schenk ME, Theriault C, Tolstrup N, Charlebois RL, Doolittle WF, Duguet M, Gaasterland T, Garrett RA, Ragan MA, Sensen CW, van der Oost J. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98 (14) : 7835-7840.
- [27] Peekhaus N, Conway T. What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (14) : 3495-3502.
- [28] Berg IA, Kockelkorn D, Ramos-Vera WH, Say RF, Zarzycki J, Hugler M, Alber BE, Fuchs G. Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews • Microbiology*, 2010, 8 (6) : 447-460.
- [29] Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, Fuchs G. A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science*, 2007, 318 (5857) : 1782-1786.
- [30] Huber H, Gallenberger M, Jahn U, Eylert E, Berg IA, Kockelkorn D, Eisenreich W, Fuchs G. A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (22) : 7851-7856.
- [31] Holden HM, Thoden JB, Raushel FM. Carbamoyl phosphate synthetase: an amazing biochemical odyssey from substrate to product. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, 56 (5-6) : 507-522.
- [32] Kletzin A, Urich T, Muller F, Bandejas TM, Gomes CM. Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2004, 36 (1) : 77-91.
- [33] Aoshima M, Ishii M, Igarashi Y. A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Molecular Microbiology*, 2004, 52 (3) : 751-761.
- [34] Aoshima M, Ishii M, Igarashi Y. A novel enzyme, citryl-CoA lyase, catalysing the second step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Molecular Microbiology*, 2004, 52 (3) : 763-770.
- [35] Kletzin A. Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate, and hydrogen sulfide from sulfur: purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaeobacterium *Desulfurolobus ambivalens*. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171 (3) :

1638-1643.

reductase from the acidothermophilic archaeon, *Acidianus* strain S5. *Extremophiles*, 2003, 7 (2) : 131-134.

[36] Sun CW, Chen ZW, He ZG, Zhou PJ, Liu SJ.

Purification and properties of the sulfur oxygenase/

Adaptation of *Acidianus hospitalis* W1 to oligotrophic and acidic hot spring environments

Xiaoyan You¹, Qiaoming Zhang¹, Huajun Zheng², Chengying Jiang^{3*}¹ College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471002, Henan Province, China² Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai (CHGC) 201203, China³ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] To study the adaptation of *A. hospitalis* W1 to oligotrophic and acidic hot spring environments at the whole genome level. [Methods] We annotated the gene functions and constructed metabolic pathways of strain W1 by using different databases, such as NCBI non-redundant database (NRDB), UniProt, *Sulfolobus* protein database and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). The metabolic pathways were polished according to the results of comparative genomics. [Results] Strain W1 grew autotrophically by fixing CO₂ as carbon source through 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate or dicarboxylate-4-hydroxybutyrate cycle, and gained energy for growth by oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (RISCs). Strain W1 differed from *A. ambivalens* because its genome did not possess sulfur-metabolizing genes encoding sulfite: acceptor oxidoreductase, adenosine phosphosulfate reductase, sulfate adenylyl transferase and phosphoadenosine phosphosulfate reductase. Glucose was metabolized by strain W1 through non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway and tricarboxylic acid cycle. In addition, the sugar and amino acids transporters, as well as related hydrolysis enzymes were identified in the genome. These results suggest that strain W1 could also grow facultative autotrophically. Strain W1 cannot use H₂ as electron donor due to lack of hydrogenase encoding genes. [Conclusion] The versatile metabolic patterns afforded *A. hospitalis* W1 the ability to adapt to oligotrophic and acidic hot spring environments. Furthermore, the unique metabolic features of strain W1 will help to better understand the metabolic diversities of *Acidianus*.

Keywords: *Acidianus hospitalis*, genome, oligotrophic, metabolism, reduced inorganic sulfur compounds (RISCs)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200035, 31171234) and by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of Henan University of Science and Technology

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807581; Fax: +86-10-64807421; E-mail: jiangcy@mail.im.ac.cn

Received: 2 February 2014/ Revised: 16 June 2014