

氧化亚铁硫杆菌铁氧化系统分子生物学研究进展*

田克立 林建群 张长锐** 颜望明

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

关键词: 氧化亚铁硫杆菌, 铁氧化系统, 分子生物学

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 01-0085-04

氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*, 简称 *T. f*) 是目前研究最多、最具经济价值的浸矿微生物。由于该菌的能量代谢对于生物浸矿起决定作用, 因此其机制的研究必然能促进对该菌生理特性的认识及其遗传改造。氧化亚铁硫杆菌生长方式代表了迄今所知的能够进行生长的热力学极限, 可供该菌生长利用的 ΔE_h 仅有 340mV, 氧化 Fe^{2+} 所能得到的能量很少。在 Fe^{2+} 氧化过程中, 电子通过电子传递链最终传递给氧, 释放能量用于推动 ATP 合成以及从 Fe^{2+} 到 $NAD(P)^+$ 的反向电子传递^[1]。目前已发现多种参与 *T. f* 电子传递链的功能组分, 其中有些已被分离纯化^[2-4], 并提出了多种铁氧化呼吸链模式。但从 Fe^{2+} 到 O_2 的电子传递及反向电子传递机制尚未完全确定, 尤其是 Fe^{2+} 氧化最初阶段的电子载体尚存在争议。目前认为从 Fe^{2+} 到 O_2 的电子传递链主要包括: 亚铁氧化还原酶→铁质兰素→至少一种细胞色素 $c \rightarrow a_1$ 型细胞色素氧化酶等, 而从 Fe^{2+} 到 $NAD(P)^+$ 的反向电子传递链则可能通过一种由细胞色素 bc_1 复合体参与的反向 Q-循环机制来传递电子^[1]。本文综述了近年对其铁氧化系统组成, 基因结构及表达研究所取得的重要进展。

1 亚铁氧化酶

Fukumori 等^[3]从 *T. f* 中分离纯化了一种 63kD 可溶性铁硫蛋白质— Fe^{2+} 细胞色素 c_{552} 氧化还原酶。该蛋白是以 6kD 为最小组成单位的同源八聚体或十聚体。酶分子中含有 18~20 个非血红素铁原子及 6 个无机硫原子, 在 Fe^{2+} 存在时可迅速使细胞色素 c_{552} 还原。Kusano 等^[5]根据该蛋白亚基的部分氨基酸序列合成探针克隆出 *iro* 基因, 并进行了序列测定。发现该基因含有一个 237bp 的开放读码框 (ORF), 编码含 90 个氨基酸的 *iro* 蛋白, 其中包括 37 个氨基酸的跨膜信号序列。信号序列的存在以及酶的酸稳定性均说明 *iro* 酶是一种周质蛋白。在其 ORF 的第 127~129 位尚存在另一个起始密码子, 在两个密码子前分别有一个核糖体结合位点, 究竟哪个是真正的起始密码尚未可知。研究表明 *iro* 基因是独立于其它基因而单独转录的。该基因在 *T. f* 能量传递中的调节机制尚不清楚, 尚未在大肠杆菌中得到表达。

通过序列比较及光谱分析发现, *iro* 蛋白与高氧化电位铁硫蛋白 (HiPIPs) 具有很高

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30170026)

教育部重点基金资助项目 (No. 99181)

** 通讯作者

收稿日期: 2000-10-13, 修回日期: 2001-01-15

的同源性。HiPIPs 是一组常见于紫色光合细菌的、有 (4Fe-4S) 簇的可溶性细菌铁氧化还原蛋白。iro 蛋白亦含有 (4Fe-4S) 簇, 似乎是该蛋白家族的一个新成员。他们^[5]认为由 iro 基因编码的 HiPIP 可从 Fe^{2+} 接受电子, 因而成为呼吸链的第一个电子载体。随后 Cavazza 等^[6]利用一种周质蛋白分离纯化方法, 从 *T. f* 中纯化了一种对酸稳定的可溶性 HiPIP, 证明它是由 4 个亚基组成的四聚体, 每个亚基含有一个 (4Fe-4S) 簇, 分子量为 5582D, 其氨基酸组成及 N 端序列与 Kusano 等报道的 iro 基因编码的序列非常相似^[7]。四聚体亚基的协同作用有利于从高氧化还原电位底物接受电子, 在其实验中未发现 63kD 铁硫蛋白 Blake 和 Shute^[9]则从 *T. f* ATCC23270 中纯化了一种含有细胞色素 c 的亚铁: 铁质兰素氧化还原酶。他们认为该酶是使亚铁氧化的第一个组分, 而不是 HiPIP。因此, 有关亚铁氧化酶在铁氧化呼吸链中的作用还有待于进一步的探讨。

2 铁质兰素 (rusticyanin)

是一种分子量为 16.5kD 的可溶性周质兰铜蛋白, 具有较高的氧化还原电位 (+670mV) 及酸稳定性。其分子为单肽链蛋白, 可通过其辅基 $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ 的氧化还原反应传递电子。在铁生长环境中 *T. f* 体内含高浓度的铁质兰素, 达可溶性蛋白质总量的 5%, 因此它被认为是铁氧化过程中的重要组分之一。由于缺乏相应的突变株, 无法通过与大肠杆菌突变株互补的方法克隆基因并确定其功能。目前有 2 个实验室利用抗铁质兰素抗体进行了基因表达文库的筛选, 克隆了该基因, 但由于未进行核酸序列测定, 尚不能排除假阳性结果。Bengrine 等^[8]通过对不同种类的 *T. f* 进行直接蛋白质分析获得了铁质兰素的氨基酸序列, 根据其氨基酸序列合成探针, 通过 PCR 方法获得 rus 基因片段, 进行了全序列测定, 并成功地在大肠杆菌中得到表达。进一步分析发现, rus 基因是与上游几个基因共转录的, 是该操纵子的最后一个基因。在 rus 基因上游存在一个 σ^{70} 型内部启动子序列 (TTGATC-17bp-TATTAT)。在铁或硫基质中生长时 rus 基因均表达, 说明铁质兰素既参与铁氧化又参与硫氧化。

3 c 型细胞色素

由于无机底物的氧化还原电位较高, 为了获取尽可能多的能量, 典型的化能自养菌内含有高浓度的细胞色素, 可占细胞蛋白总量的 5% ~ 10%。来自不同原核生物类群的细胞色素 c 的分子量、血红素含量、氧化还原电位及等电点等均不同; 而某一特定菌株体内通常存在一种以上的 c 型细胞色素参与电子传递链的组成。在细胞内 c 型细胞色素分为可溶性及膜结合 c 型细胞色素。Tamegai 等^[9]从 *T. f* Fe-1 中纯化了 2 种膜结合 c 型细胞色素: c_{552} (m, 22.3kD) 和 c_{550} (51kD)。两者均可被细菌色素 c 氧化酶氧化, 它们对该酶的 K_m 值远低于可溶性 c_{552} (s) 和铁质兰素, 因此二者可能是生理条件下细胞色素氧化酶的电子供体。尽管 c_{552} (m) 与可溶性细胞色素 c_{552} (s) 的 N 端氨基酸序列相似, 但二者分子量、氨基酸顺序很不相同。

Valkova-Valchanova 和 Chan^[10]则从 ATCC13661 中分离纯化了另外 2 种膜结合细胞色素: 21kD 细胞色素 c 和 68kD 的高分子量 c 型细胞色素。21kD 细胞色素为膜结合周质蛋白, 具有酸稳定性 (pH2), 含量占细胞膜总蛋白的 2%。纯化的 21kD 多肽呈现典型的 c 型细胞色素的光谱特点, 含有 1 个血红素辅基。68kD 细胞色素含量亦较高, 与膜的结合更牢固。在 Fe^{2+} 存在时它们可被铁质兰素快速还原, 还可被细胞膜上 aa_3 型细胞色

素氧化酶氧化。他们认为, 菌体内电子传递的顺序可能是从亚铁→铁质兰素→21kD 或 68kD 细胞色素→细胞色素氧化酶。在其研究中亦发现存在 14kD 和 30kD 的细胞色素 c, 但含量较低。

Elbehti 等^[4]在 BRGM 中发现了可溶性 14kD 细胞色素外的另外 3 种膜结合 c 型细胞色素, 它们的分子量分别为 46, 30, 和 21kD。21kD 细胞色素 c 是一种含 2 个血红素的 c₄ 型细胞色素, 其末端序列与存在于同种 *T. f* 内的可溶性细胞色素 c₄ 相同。46kD 细胞色素在细胞内含量较高, 分离纯化时与一种 36kD 非血红素蛋白结合在一起, 其 N 端氨基酸序列与已经克隆的 *T. f* ATCC33020 *cyc2* 基因编码的 c 型细胞色素序列有 67% 相同, 86% 相似, 说明 46kD 细胞色素可能是 *cyc2* 基因的编码产物。进一步分析发现, 46kD 与 68kD 细胞色素在氨基酸组成和分子极性上很相似, 含正电氨基酸较少, 但它们与 22.3kD、21kD 和 14kD 细胞色素却存在很大差别, 而后 3 者则存在相似之处。作者推测在所有 *T. f* 中均存在一种可溶性 14kD 细胞色素 c、一种 21kD 膜结合细胞色素 c 和一种高分子量膜结合细胞色素 c, 其分子量随不同的类群而不同。

4 细胞色素氧化酶

氧化亚铁硫杆菌能够在极端酸性环境中生长, 一方面要维持着细胞内外如此巨大的跨膜质子梯度; 另一方面必须从氧化 Fe²⁺ 中获得少量能量而生长, 因此对其呼吸链组成及其特性的研究非常有意义。通常情况下, 末端氧化酶是呼吸链中最重要的组分。Ingledew^[11]发现 *T. f* 中存在 a₁ 型细胞色素, 是细胞中唯一能与 CO 结合的组分。Kai 等^[11]从 *T. f* Fe-1 中分离纯化了细胞色素 a₁, 发现它在细菌体内作为细胞色素 c 氧化酶而发挥作用, 可使亚铁细胞色素 c₅₅₂ 及还原性铁质兰素氧化。该酶的最小结构单位由 3 个亚基组成, 再由 2 个这样的结构单位组成二聚体, 每个结构单位含有 1 个血红素 a 辅基, 1 个铜原子, 这个特征是非常独特的。其光谱特性与细胞色素 aa₃ 相似, 然而细胞色素 aa₃ 的每个结构单位含有 2 个不同的血红素 a 和 2 个铜原子, 因此该酶可能并不是一般的细胞色素 aa₃。

5 电子载体的基因表达及调控

Appia-Ayme 等^[12,13]详细研究了 *T. f* ATCC33020 内编码呼吸链各组分基因操纵子的结构及特性, 发现在 DNA 的 2066 到 2620 位点之间存在 1 个 ORF, 称为 *cyc1*, 序列分析表明, 其编码产物 *cyc1* 可能为 21kD 的细胞色素 c₅₅₂。其转录起始点可能位于 1928 或 1979, 随后是编码信号肽的序列, 表明此细胞色素为周质蛋白。其下游序列编码含 184 个氨基酸残基的成熟细胞色素 C₅₅₂, 其中含有 2 个血红素结合位点, 同源序列分析表明, *cyc1* 应属于双血红素 c₄ 型细胞色素, 该家族成员均含有 2 个相同的血红素, 在其肽链中含有与血红素相互作用的保守的氨基酸序列。在 *cyc1* 基因上游 450 和 1916 之间为另 1 个 ORF, 称为 *cyc2*。与数据库比对未发现明显的同源序列。推测其编码的蛋白合成后转位至周质空间, 因为它含有 1 个典型的信号序列。成熟 *cyc2* 的分子量及氨基酸组成与在 BRGM 中发现的 46kD 的膜结合细胞色素 c 相似, 二者的氨基端序列有 66.7% 相同, 85.7% 相似, 说明 *cyc2* 基因编码 46kD 的高分子量细胞色素。在其氨基端含有 1 个典型的血红素结合位点。在 *cyc2* 基因的上游 450bp 内未检测出 ORF 的存在, 因此该基因很可能是操纵子的第 1 个基因。作者根据研究结果提出下述电子传递途径:

$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{X} \rightarrow \text{铁质兰素} \rightarrow \text{细胞色素 } c_4 \rightarrow \text{细胞色素氧化酶} \rightarrow \text{O}_2$, 其中将电子从 Fe^{2+} 传递到铁质兰素的载体尚不知道。他们认为, 高分子量细胞色素可能是呼吸链的第一个电子载体, 因为 *cyc2* 基因所编码的这种细胞色素是操纵子的第一个基因, 且是对酸稳定的外膜蛋白。

cyc1 基因下游为 ORF1, 含有 1 个典型的 *E. coli* 的 RBS, 该基因所编码蛋白的功能尚不知道。同源序列比较未发现相同或相似者。在 ORF1 下游 3296~6805 位点之间存在另外 4 个 ORF, *nus* 基因位于其下游。其中 3 个 ORF 所编码的蛋白分别与 *aa3* 型细胞色素 *c* 氧化酶亚基 II、I 和 III 非常相似, 称之为 *coxB*、*coxA* 和 *coxC*。紧随其后的 ORF 称为 *coxD*, 其编码产物 *CoxD_{TF}* 与细胞色素氧化酶并无相似之处, 但细菌的细胞色素 *c* 氧化酶基因总是以 *coxB-coxA-coxC-coxD* 簇的形式存在于同一位点, 且其亚基 IV 通常都是变异度较高、含有 1 个跨膜螺旋的小蛋白, 因此他们推断 *coxD* 基因编码 *aa3* 型细胞色素氧化酶亚基 IV。

进一步研究发现, 上述 8 个基因存在于同 1 个操纵子内, 其顺序为 *cyc2-cyc1-ORF1-coxB-coxA-coxC-coxD-nus*, 且这 8 个基因是共转录的。已确认, 该操纵子至少存在 3 个转录起始位点, 每个起始位点的上游都有 1 个 *E. coli* σ^{70} 型启动子。其中 2 个位于 *cyc2* 的上游, 1 个位于 *coxD* 和 *nus* 基因之间 (内部启动子)。当 *T. f* 在硫基质中生长时, 转录是分别从 *cyc2* 最上游及 *nus* 上游的 2 个启动子启动转录; 而当 *T. f* 在 Fe^{2+} 基质上生长时, 转录则从下游的启动子开始。内部启动子的作用是使 *nus* 基因在特定生长条件下能够独立于操纵子其它基因而单独表达。多个启动子的存在说明操纵子中不同基因的表达依赖于生长条件而受到严格调控, 从而使细胞能够快速适应环境的变化。基于上述研究结果, 他们推断所有这些基因表达产物属于同一个电子传递链并组成一个呼吸链超复合物。当 ATCC33020 在铁或硫基质中生长时, 操纵子的 8 个基因均可转录, 说明该操纵子所编码的蛋白在亚铁氧化及硫氧化过程中均发挥作用。

总之, 在氧化亚铁硫杆菌铁氧化系统的研究中, 各研究者所得出的结论不同。原因一方面可能是他们对所得资料的解释不同, 另一方面反映出在极端生长环境中强大的选择压力所造成的遗传多样性, 使得不同种群之间能量代谢系统出现差异。因此, 上述研究结果也许真正代表了氧化亚铁硫杆菌不同种群之间电子传递途径及其传递机制的差异。

参考文献

- [1] Ingledew W J. *Biophys Acta*, 1982, **683**: 89~117.
- [2] Sato A, Fukumori Y, Yano T, *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1989, **976**: 129~134.
- [3] Fukumori Y, Yano T, Sato A, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1988, **50**: 169~172.
- [4] Elbehti A, Lemesle-Meunier D. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **136**: 51~56.
- [5] Kusano T, Takeshima T, Sugawara K, *et al.* *J Biol Chem*, 1992, **267** (16): 11242~11247.
- [6] Cavazza C, Guigliarelli B, Bertrand P, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **130**: 193~200.
- [7] Blak R C. II and Shute E. *Biochemistry*, 1994, **33**: 9220~9228.
- [8] Bengrine A, Guiliani N, Appia-Ayme C, *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1443**: 99~112.
- [9] Tamegai H, Kai M, Fukumori Y, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **119**: 147~154.
- [10] Valkova-Valchanova M B, Chan S H P. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **121**: 61~70.
- [11] Kai M, Yano T, Tamegai H, *et al.* *J Biochem*, 1992, **112**: 816~821.
- [12] Appia-Ayme C, Bengrine A, Cavazza C, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **167**: 171~177.
- [13] Appia-Ayme C, Guiliani N, Ratouchniak J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 4781~4787.