



专论与综述



乳酸乳酸球菌基因表达调控研究进展

还连栋

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

乳酸球菌属 (*Lactococcus*) 包括 5 个种, 其中乳酸乳酸球菌 (*Lactococcus lactis*) 是最典型的一个种。乳酸乳酸球菌以前被称之为乳酸菌或 N 群链球菌 (*Streptococcus*)^[1]。近些年来, 乳酸乳酸球菌的基因克隆和表达研究引起了人们广泛注意。这不仅是乳酸乳酸球菌可用作奶类工业发酵的菌母培养物, 具有商业价值; 还由于下述原因而使乳酸乳酸球菌具有重要的理论研究意义和实际应用潜力。首先, 在乳酸乳酸球菌中发现了大量的染色体外因子, 如质粒和噬菌体, 尤其是可在许多乳酸菌和其他宿主中都具有功能的自动传播的接合质粒复制子。这不仅为进一步研究乳酸乳酸球菌的生物学, 而且为发展乳酸乳酸球菌基因克隆的载体系统提供了极好的材料。其次, 乳酸乳酸球菌很容易在实验室中生长和操作, 可作为具有简单代谢作用的、厌氧的革兰氏阳性细菌的生理学或生物化学研究的模式菌种。在乳酸乳酸球菌中建立起来的许多遗传学手段几乎不加改动或稍加修改后即可应用于其他乳酸菌, 因此对乳酸乳酸球菌的分子遗传学研究具有普遍意义。最后, 乳酸乳酸球菌是一类食品级微生物, 可用现代发酵技术在廉价的培养基中进行工业规模的培养。此外, 乳酸乳酸球菌具有分泌蛋白质的能力, 使许多异源的酶和蛋白质可表面表达或分泌出胞外, 能用作蛋白质或初级和次级代谢产物表达的宿主。尤其适用于生产乳链菌肽, 双乙酰和乳酪风味形成有关的酶等一些由乳酸乳酸球菌产生的产物。

由于乳酸乳酸球菌基因克隆技术的迅速进展, 目前已分离和鉴定了许多有关基因表达调控的序列, 为人们从转录和翻译水平上了解乳

酸乳酸球菌的基因表达调控机制提供了可能。

1 选择表达信号的载体

在研究乳酸乳酸球菌基因表达的过程中, 陆续发展了各种类型的选择表达信号的载体。它们包括启动子选择载体、翻译融合载体和转录终止子选择载体。这些载体所用报告基因、选择性标记和复制子列于表 1。

使用的报告基因可分为两类。一类是可以显性选择的报告基因, 它们包括抗生素抗性基因或为营养缺陷突变提供互补的基因; 另一类是编码一个可检测表型的报告基因, 一般可用肉眼鉴别菌落加以识别。这些载体大多都含有通用的多克隆位点。

当用抗生素抗性作为报告基因时, 使用两个不含有启动子的氯霉素乙酰转移酶 (*cat*) 基因。一个是短小芽孢杆菌的 *cat-86* 基因^[13], 另一个是金黄色葡萄球菌的 *cat-194* 基因^[14]。这两个基因虽然同源, 但 *cat-86* 基因的表达受翻译弱化作用的调节^[15]。由于 *cat-86* 基因的诱导性, 用作报告基因具有一定局限。用 *cat-86* 基因突变体构建的一个载体则表现为组成型表达^[6]。当在组成型表达的 *cat-86* 基因上游和诱导型 *cat-86* 基因上游插入同一启动子时, 组成型表达的活性比诱导型表达的活性要高 4 倍。

比较研究了插入 *cat-86* 基因前的同一启动子在乳酸乳酸球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌中的表达, 发现较其他受体系统, 乳酸乳酸球菌中的氯霉素抗性水平和 CAT 活性都较低^[16], 不能将抗性水平和启动子强度联系起

来,这是用 cat-86 或 cat-194 作报告基因构建乳酸乳酸球菌启动子探测载体的主要缺点。de Vos 和 Gasson 采用来自乳酸乳酸球菌的编码磷酸- β -半乳糖苷酶的 lacG 基因。该基因编码的酶易于检测,在基因表达水平和酶活性之间有很好的相关性。lacG 基因已用于乳酸乳

酸球菌启动子选择载体的报告基因并显示基因剂量效应^[17]。Simons 等构建的一个载体 pNZ336,在多克隆位点与 lacG 基因之间的所有 3 个读框中都含有终止密码子,使 lacG 基因翻译的起始均发生在同一位置,而与插入的启动子片段序列无关^[7]。

表 1 用于分离、鉴定转录和翻译表达信号的载体

载 体	报告基因	选择标记	复制子	参考文献
启动子选择载体				
pGKV210	cat-86	ery-194	pWV01	[2]
pNZ220	cat-86	knt-110	pSH71	[3]
pMU1328	cat-194*	ery-194	pVA380-1	[4]
pKTH1750	cat-86	ery-194	pSH71	[5]
pBV5030	cat-86*	ery-194	pWV01	[6]
pNZ336	lacG	cat-194	pSH71	[7]
pKSB8	luxAB	cat-194	pSH71	[8]
pNZ272	gusA	cat-194	pSH71	[9]
翻译融合载体				
pFX3,4,5,6	lacZ	cat-194	pDI125	[10]
pNZ262	prtP-lacZ	cat-194	pSH71	[11]
pMG57	P32-lacZ	ery-194	pWV01	[12]
终止子选择载体				
pGKV11	Psp02-cat-86	ery-194	pWV01	[2]
pGKV259	P59-cat-86	ery-194	pWV01	[2]

* 表示非诱导突变型。

已有实验证实大肠杆菌编码 β -半乳糖苷酶的 lacZ 基因可在乳酸乳酸球菌中表达^[11]。Xu 等人用 lacZ 作报告基因获得一系列基因融合载体,使分离、研究转录和翻译融合成为可能^[10]。用 lacZ 基因构建的另一些载体也被用于分析翻译偶联和 mRNA 二级结构对翻译起始的作用^[18,19]。

另一些报告基因包括来自于费氏弧菌的 luxAB 基因。当它在乳酸乳酸球菌中表达时产生生物发光现象^[8]。van Rooijen 等^[20]和 Eaton 等人^[21]将 lux 基因用于分析乳酸乳酸球菌中诱导型 lac 启动子。最近,Platteeuw 等^[9]用大肠杆菌的不带启动子的 β -葡糖醛酸酶(gusA 基因构建的 pNZ272 启动子选择载体,

可在含有 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-葡糖醛酸(X-gluc)显色底物的培养基上筛选蓝色菌落,分离染色体启动子。他们还利用 pHS71 复制子具有广泛宿主范围的特性,比较了来自于乳酸乳酸球菌中噬菌体、质粒和染色体上的 3 个启动子在干酪乳杆菌、植物乳杆菌和乳明串珠菌中的效率,结果表明在不同的乳酸菌中,启动子的效率有相当大的差异。

2 转录的发动和终止

综观乳酸乳酸球菌基因表达的研究,转录的发动最受注意。主要从两方面研究该过程。一方面鉴定和分析启动子;另一方面鉴定那些决定转录发动专一性的蛋白质。

最近,乳酸乳酸球菌中编码主要 σ 因子的

表 2 乳酸乳酸球菌启动子序列

基因	启动子区	间隔	参考文献
未确定的染色体启动子			
P21	GTTTTTTTCTTGACAGAGAAGGCGAAAAATGGTATTATATTTAGGTACT	18	[16]
P23	CCTAAGACTGATGACAAAAAGAGCAAATTTTGATAAAATAGTATTAGAAT	17	[16]
P32	GAGCTTGGACTAGAAAAAAACTTCACAAAATGCTATACTAGGTAGGTAAT	22	[16]
P44	GCTAAACTCTTGTITTTACTTGATTTTATGTTAAAAATAATTAATGAGTGTA	18	[16]
P59	CATTAAATTCTTGACAGGGAGAGATAGGTTTGATAGAATATAATAGTTGT	17	[16]
P1	AAAGAAAGACTTGCATTTGTTGTTGAAAAATGCTAAAATACATAAGTCCG	17	[5]
P2	AGTTTTTTCTTGACAGAGATGGCGAAAAATGGTATTATATCTAGGTACT	18	[5]
P21	CAAGTTGACCTTGAAAAAAAAC TGAAAATCTGTTATCATAAATAATGGAC	17	[5]
未确定的噬菌体启动子			
Pa1	CGAATTTTTCTTCCATATTTTCAAAGAATCAGTTACTATCTAACGATCAT	18	[23]
PF2	ATATGAAAAATGGACTGATGTAACCCGTTGACTGTAATGGATGCAGAAG	17	[23]
Pa3	TTCATTATTTTATAATCCTCACTAGTGATACATATAGTATTTGGGTTTT	18	[23]
Pg2	ATGGAAAAATACAGACAAGCAAACTAAGGAGGGTATATTGAATGACCTAC	16	[23]
Pf1	AAATGTAAGATTGGAGTTACTAAAACAGTAAC TACTCCAAGTGGAGGTA	17	[23]
PI1G	ATGGCCTATTTT AGACAGAATCAGCTTCTTGTTAAAAATGGGAGAGCAAC	15	[24]
已确定的启动子			
usp45	TCATAAAGAAATA TTAAGGTGGGGTAGGAATAGTATAATATGTTTATTCA	14	[25]
infA	AAAGAAAGACTTGCATTTGTTGTTGAAAAATGCTAAAATACATAAGTCCG	17	[26]
pepN	TTCTTTGTACTCGAAATTTTCTATTCAATTTGATATAATTATATTAATAC	17	[27]
gap	GGTAGTTTATGTTTGCAAATTTTAAAAAAGTGTTAAAAATAAAAGAGTAAG	16	[24]
ais	GTCAAAATAATTGTAAAAGGTTCTATTATCTGATAAAAATGATTGTGAAGT	17	[28]
rrnA	CAGTTAATTCTTGACAAGTTTAGTTAGGTTTGATAGAATATAATAGTTGT	17	[29]
sacB	GTGGCAAACGCTTGACATATATCAAAAAATGATAAAAATAACTTCTGTAA	16	[30]
sacA	CTTATTTATATTGATTTTTTTTATAAAAAACGTTATCATAAATATATATA	17	[30]
lct	TCATTAGTTATTGCATTTTACTAATCGAAGGAGTATAATGATTTT CGAAGG	17	[31]
trpA	TTTTAAATCCTTGACAAGTCTCATAAAAAAGTTTTACAATTATTTTCAACA	17	[32,33]
p3	TCATTAGTTATTGCATTTTACTAATCGAAGGAGTATAATCATTT CGAAGG	17	[34]
mp1	ATGTTGAAAAGCGACAAGTCAGAAAGTGTGCTTTTAAAACAACACTACCC	23	[35]
tmp	GAACCTTGTCAAAGCGAAAATAGCAAAATTTTGCTATAATAGAAAAAGTAA	23	[36]
nisF	GATTCCGAAAATTTGTTTTATATACTTTTTTTTAAACATAAAAATAAAGTGAG	12	[37]
abiD1	TTGCTCCTTCTTGACATATTTAGGATAATATGTTTAAATATATATATCAG	16	[38]
orf1	AGAGGATAAACCAAACTGAAAAGTGCATTTGTTATAATATATATATCAA		[39]
acnA	CAAATTGACATCTTTTTTTAGCTTGAGGCGTGGTAGAATAAAGATAGTAC	23	[40]
upp	AAAAAATTTTGCCATAAAATTAGCAAAATTGCCATATAATGGCAGTTACAA	19	[41]
负控制启动子			
lacA	ACAAAAATAGTTGCGTTTTGTTTGAATGTTTGATATCATATAAACAAAGA	17	[42]
repC	AGCTTTATTGTTGTTTTTATGATTACAAAGTGATACACTAATTTTATAAA	17	[24]
dnaJ	GCTAATTTTTTTTGCCAAAAATGAAAAAACGTGGTAAAAATAGTGCTATTGA	17	[43]
可能是负控制的启动子			
prtp-S	TAAAATTTTCGTTGAATTTGTTCTTCAATAGTATATAATATAATAGTATA	16	[44]
prtp-W	TAAAATTTTCGTTGAATTTGTTCTTCAATAGTATATAATATAATAGTATA	16	[45]
prtM-S	AACCCTACGCTTGATGTAGTTAAGATTATATTATATAATATAATATTATA	17	[24]
prtM-W	AACCCTACGCTTGATGTAGTTAAGATTATATTATATAATATTATATACTA	17	[45]
hisC	AAAATAAATGTTGACTTTTTAAAAACATAACTATTATAATT CAGATAATTA	17	[33,46]
leuL	TATTATTTTATTGACAATTTAAAATATT AAGAGTATTATAATGTAAATTA	17	[33,46]
ilvD	TGACAGATTATTGTATTTTCATTTTTTTAGTGATAAAAATAGCTCTATGTA	17	[33,46]
正控制启动子			
nisA	AACGGCTCTGATTAAATTCTGAAGTTTGTTAGATACAATGATTT C GTTCG	20	[47]
lacR	TTAATTTTTTGTITTTTTTTTTATTTGTTTTTTTAAAAATAGATAACACCG	19	[48]
可能是正控制的启动子			
nisR	ATTGATAGATTATATTTTCTTCAGAAATGAATGGTATAATGAAGTAATGAG	22	[49]
lcnMa	ACATTTGTTAACGAGTTTTATTTTTTATATAATCTATAATAGATTATATAAA	23	[50]
lcnA	ACATTTGTTAACGAGTTTTATTTTTTATATAATCTATAATAGATTATATAAA	23	[50]

基因(*rpoD*)已被克隆和测序。*rpoD* 编码一个 38.8ku 蛋白质,该蛋白质与营养期的枯草芽孢杆菌 σ^{43} 因子以及大肠杆菌 σ^{70} 因子的 C-末端部分高度同源。令人注意的是,乳酸球菌 *rpoD* 基因与大肠杆菌 *rpoD* 温度敏感突变能够部分互补。依据这些结果,Araya 等将 *rpoD* 蛋白质命名为乳酸乳酸球菌 σ^{39} 因子^[22]。

到目前为止,用序列分析结合引物延伸或 S1 核酸酶作图鉴定了数十个乳酸乳酸球菌启动子(表 2)。这些启动子或来源于随机筛选实验,或来源于染色体、噬菌体和质粒 DNA 上已知基因。

比较表 2 列出的启动子序列,乳酸乳酸球菌转录起始位点全都是一个嘌呤碱基,它位于启动子-10 区下游 4~10bp 中。将这些启动子-10 区序列对齐以后,发现绝大多数乳酸球菌启动子含有大肠杆菌 σ^{70} 和枯草芽孢杆菌 σ^{43} 转录因子所识别的启动子中见到的典型的-35 区和-10 区的共有序列^[51, 52]。其序列特征是-35 区 TTGACA 和-10 区 TATAAT 间隔序列为 17 个核苷酸。-10 区的序列保守性要高于-35 区,尤其是那些正控制的启动子。

大约有一半启动子序列在其-10 区上游一个核苷酸的地方有 TG 双核苷酸。1987 年,de Vos 就报道了乳酸球菌启动子中的这个序列特征^[53]。该序列特征在其他革兰氏阳性菌的启动子中也有发现,但在大肠杆菌中不常见^[52]。

正如已经报道,乳酸球菌启动子序列-35 区上游的 DNA 区 A+T 含量高达 78%,远高于乳酸乳酸球菌 DNA 的平均值(62.8%)。van Rooijen 等人报道 *lac* 启动子上游的-322~-76 序列富含 A+T,使其在乳酸乳酸球菌中的转录起始效率提高了 10 倍以上,但在大肠杆菌中却不能这样^[42]。最近, van Asseldonk 发现上游富含 A+T 的 *usp45* 启动子亦有类似效应。他们将 *usp45* 基因与嗜热脂肪芽孢杆菌 *amyS* 的结构基因融合研究了 *usp45* 启动子的功能。当向 *usp45* 启动子上游延长 121bp 时,发现表达水平要高 6 倍^[24]。其他细菌启动子

也有类似的报道,表明启动子上游区对乳酸乳酸球菌转录起始的效率具有作用。证实了 Bracco 等人^[54], Gartenberg 和 Crothers^[55]提出的富含 A+T 序列的弯曲将有助于提高位于下游 DNA 区表达的理论。

含有一个转录激活报告基因的载体也可用于选择和分析终止转录的序列。van der Vossen 等人曾用 pGKV11 和 pGKV259 载体显示地衣芽孢杆菌青霉素酶基因中不依赖 ρ 的终止子在乳酸球菌中具有功能^[2]。并证明推测的 *prtP* 终止子在乳酸球菌中仅有有限的效率^[45]。此外,在许多基因和操纵子的 3' 端含有典型的富含 GC 的回文序列,继之以富含 T 的序列,说明在乳酸乳酸球菌中不依赖 ρ 的终止子是普遍存在的。在乳酸乳酸球菌 *pepN* 基因中,依据转录子的大小及已定位的转录起始位点的事实,支持这样一个终止子在体内的功能^[27, 56]。然而,至今尚未有乳酸球菌的终止子用 S1 作图加以鉴定。

3 转录的正调控

已知仅有少量的启动子处于正调控之下。2 个位于 Tn5276 上的 *nis* 启动子可能是正调控。*nisA* 启动子很可能被一个双组分系统激活物,即 *nisR* 基因的产物激活^[57]。这也将适用于 *nisR* 启动子,因它也被自我调节。分析这些启动子的序列特征,在-35 区前面都有一个反向重复序列,以及在-35 区和-10 区之间有一个长的间隔序列。来自于 *lcn* 操纵子的启动子也具有这些特征,推测 *lcn* 启动子也是正调控类型启动子。然而并不排除次要 σ 因子参与的可能性^[50]。在乳酸球菌中至今未见报道次要 σ 因子,但是在大肠杆菌或枯草芽孢杆菌中,它却是调节环境效应基因表达的一个重要组分^[51, 52]。阐明决定 RNA 多聚酶专一性的这类分子将有助于研究乳酸球菌中分化基因的表达。另外,位于 pMG820 质粒上的 *lacR* 启动子的激活作用也是处于 *LacR* 的自我控制之下,这种正调控作用将在下一节予以详细讨论。

4 转录的负调控

4.1 pSH71 质粒拷贝数控制: 乳酸乳酸球菌中第一个被鉴定的负调控系统是在研究具有广泛宿主范围的质粒 pSH71 拷贝数控制时发现的。repC 基因编码的 6ku 阻遏物含有一个螺旋-转角-螺旋基序, 并与 repCA 启动子转录起始位点附近的一个操纵子序列相互作用。它通过控制自身的转录而保证细胞中 RepC 和 RepA 蛋白质处于稳定状态水平。由于复制蛋白质(RepA)与正复制起始点的相互作用和它对复制的限速, 使质粒拷贝数保持了稳定^[58]。

4.2 乳糖的利用和调控: 乳酸球菌可发酵乳糖转变成乳酸。与此过程有关的代谢转变包括乳糖磷酸转移酶系统(PTS)、塔格糖-6-磷酸途径和糖酵解途径。近年来, 已从分子水平上阐明乳糖利用的控制机制, 提出了乳酸乳酸球菌中第一个基因组成和表达模型。

编码 PTS(LacEF) 的乳糖专一酶, 磷酸- β -半乳糖苷酶(LacG)和塔格糖-6-磷酸途径酶(LacABCD)的 lac 基因都定位于乳酸乳酸球菌 MG1820 菌株的一个 23.7kb 的内源性质粒 pMG820 上^[17, 20]。它们组成一个 7.8kb 的操纵子, 基因顺序为 lacABCDFEGX, 其后是一个 iso-ISS1 因子。末端的 lacX 基因对乳糖生长似乎可有可无^[60]。其产物和 lacN 基因产物组成一个双组分调节系统, 对 SOS 信号作出反应^[61]。lac 基因分别转录成 6kb 的 lacABCDFE 和 8kb 的 lacABCDFEGX 2 个多顺反子转录子。在 lacE 和 lacG 之间有一个反向重复序列起顺反子间终止子的功能。lac 操纵子的转录受一个反向转录的 0.8kb lacR 基因产物的调节。根据核苷酸序列推测的 28ku LacR 蛋白质的氨基酸序列与好几个大肠杆菌的阻遏物, 如 DeoR 族阻遏物有高度同源性^[48]。

Northern 印迹分析显示, 在乳糖中生长时, lac 操纵子转录的诱导较之在葡萄糖中生长时高达 10 倍, 而在葡萄糖中生长时, lacR 基因的转录受到类似诱导。lac 启动子的转录方向正好与编码 LacR 阻遏物的 lacR 基因的转录方向相反。在诱导(乳糖)和非诱导(葡萄糖)条

件下使用同一转录起始点。用过量产生 LacR 的菌株和 LacR 产物缺陷株的遗传学研究, 发现 LacR 是 lac 操纵子的阻遏物, 可能还激活它自身的转录^[42, 48]。用纯化的 LacR 蛋白质所做的物理研究发现, 存在 2 个与该蛋白质具有不同亲和性的操纵子, 一个是高度亲和性的 lacO1, 它具有明显的双向对称性, 位于 lac 启动子中, 另一个 lacO2, 其亲和性要低 3 倍, 它位于 lacR 启动子和 lacR 基因起点之间^[24]。

对 LacR 阻遏物蛋白质工程研究获得的证据表明, 在 DeoR 阻遏物家族中存在 2 个功能域, 一个位于 N-端, 包括与 DNA 结合有关的螺旋-转角-螺旋基序。另一个在 C-末端, 具有若干保守的带电荷的残基, 可对诱导物作出反应, 即与塔格糖-6-磷酸相结合^[62]。

综合物理和遗传学的研究结果, 提出了 lac 基因表达调控的模型。它包括 3 个阶段: (1) 在葡萄糖中生长时, LacR 阻遏物与 lacO1 的结合激活了 lacR 启动子的转录; (2) 葡萄糖中生长使 LacR 浓度不断增加, LacR 与 lacO2 结合就阻抑了 lacR 基因和 lac 操纵子的表达。用 lac 启动子与不含启动子的 cat-86 基因转录融合的体内研究表明, 葡萄糖中生长的阻遏需要 lacO1 和 lacO2 同时存在^[42]。就像在其他调节系统中描述的那样, 它可能有助于在这些操纵子之间形成一个 DNA 环^[63]; (3) 在乳糖中生长时, LacR 阻遏物与塔格糖-6-磷酸结合, 导致 LacR-操纵子复合物的解离, 同时诱导了 lac 操纵子的表达。用定点诱变方法改变 lacR 诱导物结合功能域的带电荷的保守残基, 获得的 LacR 突变体阻止了体内诱导作用和体外与塔格糖-6-磷酸盐的反应。这些结果强烈表明, lac 操纵子表达的诱导物是塔格糖-6-磷酸盐, 而不是原先认为的半乳糖-6-磷酸盐^[64]。

最近发现, 用置换重组而获得的 lacR 基因缺失的乳酸乳酸球菌菌株, 与葡萄糖起反应的第二转录控制系统被打开。在 lac 启动子+12~+25 区域有一个 14 核苷酸序列与其他革兰氏阳性菌中分解代谢物阻抑有关的共有序列相符。很可能这种全局调控将有助于控制乳酸乳

表3 乳酸乳球菌翻译起始位点

基 因	SD 序列及起始密码子	参考文献
<u>nisA</u>	ATAAATTATAAGGAGGCACTCAAAATGAGTACAAAAGATTTT ***** M S T K D F	[73]
<u>lacF</u>	AAACATAAACGGAGGATATTGTTGTGAACAGAGAAGAGATG ***** M N R E E M	[59]
<u>pepXP</u>	CATGTTTATTACGGAGGATTTAAAATGCGCTTTAACCAT TTT ***** M R F N H F	[74]
<u>lacG</u>	CTTTTTTTGAAAGGACTTACACTTATGACTAAAACACTT C C T ***** M T K T L P	[17]
<u>pepO</u>	CTTTTATTAATAAAAGGAGTTTGATATGACAAGGATTCAAGAT ***** M T R I Q D	[75]
<u>pepN</u>	AATACTGAATATTTAGGAGAAGATATGGCTGTAAAACGTTTA ***** M A V K R L	[27]
<u>sacA</u>	AATTTAGTAAATGAGGAAAAAAATGAAATGGTCTACCA A A **** M K W S T K	[30]
<u>lacA</u>	AGTACCACGATTAAGGTATAACCAATGATTCTGACAGTCAC A **** M I L T V T	[20]
<u>als</u>	GAACAAATAGAGGTAAAATAAAAAATGTCTGAGAAACAA T T T ***** M S E K Q F	[28]
<u>lcnDR1</u>	TAAAAAGTAAGGGAGTGAACAATAATGAAAGAACAAAAC T C T ***** M K E Q N S	[34]
<u>lcnDR2</u>	GAATAGCAACATAAGGACAAAATAGTAAAAAAAAGACTTAC ***** M K K K T Y	[34]
<u>lcnDR3</u>	GATTAATATCATTAGGAGTTTAGAATGAAAATAGTTTTAC A A ***** M K I V L Q	[34]
<u>mp1</u>	AAATAATAGAAATAGGAGAATAAAAATGGCTGAATTACTA A A ***** M A E L T K	[35]
<u>scnA</u>	ATAAAATATAAGGAGAAAAATCGTTATGACCAAAGAACAT G A A **** M T K E H E	[76]
<u>tmp</u>	TAAAAATCAATGAGAGGGGTTGCTATGATAATTGGAATATGG ***** M I I G I W	[36]
<u>nisF</u>	CATAAAATAAAGTGAGGAAATATAATGCAGGTAAAAATTCA A **** M Q V K I Q	[37]
<u>nisE</u>	AGATTGTGCATGGAGGAATGTGATATGAAAAGAATAATAGCA **** M K R I I A	[37]
<u>nisG</u>	ATTTACTTAAAGGAGTGATAGAACATGATAAGAAGTGAATGT ***** M I R S E C	[37]
<u>abiD1</u>	TTTTATCATTTTGAAGGAAAAAATATGAAAAATAAAC A A T T A ***** M K N K Q L	[38]
<u>orf1</u>	TATCAAGTTAAGAGAGGAAAGCAAATGACAGAAGAACAGCT A **** M T E E Q L	[39]
<u>acmA</u>	TAATCTTTAGAAAGGTAATTATTTATGCCAGTATCACG T G T T ***** M P V S R V	[40]
<u>upp</u>	GGATCTAGCGAAAGGAAAATCAAAATGTCAAATTTCAAGT C ***** M S K F Q V	[41]
<u>tyrA</u>	TGGATGATCAAGAAAGAGTAAAGAATGAAAAAGATATTAATT ***** M K K I L I	[77]
16S rRNA	3' - CUUUCUCC - 5'	[29]

酸球菌中 lac 操纵子的基因表达^[24]。另外,其他葡萄糖效应基因,包括乳酸乳酸球菌的 sacB 基因和嗜热链球菌的 lacS 基因的转录起始位点附近也发现类似的共有序列^[30, 65]。

4.3 热激反应:已经研究了乳酸乳酸球菌中的热激反应。好几个热激蛋白(HSPs)已被鉴定^[66]。目前,编码 dnaJ^[43], dnaK^[21]和 gro-ESL^[67]的基因已被克隆和测序。它们属于不同的转录单位,在不同水平上受热激诱导。dnaJ 启动子前面有一个反向重复序列

AATTAGCACTCTTATAAAAAGAGTGCTAATT
.....

该重复序列含有许多革兰氏阳性菌中常见的保守基序^[43]。当用一个不含启动子的 usp45-amyS 基因融合作为报告系统时,发现反向重复序列的缺失将导致 dnaJ 基因的组成型表达,表明 dnaJ 基因的热激反应是阻抑型的。dnaK 和 groELS 基因这些操纵子的启动子区域也含有这种保守的基序,虽然它可能位于转录起始点的下游。乳酸球菌热激启动子是否也对其他压力条件作出反应尚需进一步研究。

此外,负调控的启动子还包括位于 Tn5276 上的 sac 操纵子^[30, 68],来自于 SK11 和 Wg2 的 prt 基因的启动子^[69, 70]。这些 prt 启动子含有好几个正向重复序列和一个双向对称性,以 SK11 prt 基因的启动子最为典型^[71]。最近, his 和 leu-ilv 操纵子已被鉴定,它们分别为组氨酸和异亮氨酸诱导。这些操纵子的生物合成除了转录水平上的负调控以外,似乎还受一个弱化作用机制控制^[33, 46, 72]。

5 翻译的起始和密码子使用

目前,仅测定了为数不多的乳酸乳酸球菌基因产物的氨基端多肽序列及其相应基因的核苷酸序列(表3)。在大多数情况下,AUG 三联体用作翻译起始密码子,仅 lacF 和 lcnDR2 用 GUG 三联体起始。在 AUG 或 GUG 密码子的前面有一核糖体结合位点(SD 序列),该序列与乳酸乳酸球菌 16S rRNA 的 3' 端(3'-CUUUCUCC-5')互补^[29]。SD 序列与起始密码子的间隔为 5~9 个核苷酸。SD 序列

自由能(ΔG)范围-35.2~-74.5 kJ·mol⁻¹,处于大肠杆菌(-37.7~-50.2 kJ·mol⁻¹)和枯草芽孢杆菌(-58.6~-79.5 kJ·mol⁻¹) ΔG 值之间^[78]。编码乳酸乳酸球菌主要胞外蛋白 usp45 基因的 SD 序列是个例外,它与 16S rRNA 的 3' 端显示有限的互补, ΔG 值仅为-19.3 kJ·mol⁻¹,与起始密码子 AUG 间隔 7 个核苷酸。usp45 基因的另一个 SD 区与 rRNA 具有较高的互补性, ΔG 值为-60.3 kJ·mol⁻¹,而与 AUG 的间隔为 21 个核苷酸。定点诱变结果表明,这两个 SD 序列在乳酸乳酸球菌中具有完全相同的功能。这就提示了对共有翻译起始的偏离在乳酸球菌中是可以宽容的^[25]。

许多乳酸球菌操纵子都发现有重叠基因,就是说可能存在翻译偶联^[18, 79]。改变 ORF32 的 5' 端编码区与大肠杆菌 lacZ 基因之间的距离,发现翻译偶联将在乳酸球菌中起作用^[18]。含有 ATGA 序列的构型具有最高的偶联效率,在 ATGA 序列中终止密码子(TGA)和起始密码子(ATG)是重叠的,结果使翻译效率增加了大约 3 倍。翻译偶联有助于控制乳酸菌中天然存在基因的表达,分析乳明串珠菌的 β -半乳糖苷酶为此提供证据。该菌的 β -半乳糖苷酶是由 lacL 和 lacM 这两个部分重叠的基因编码的^[80]。

分析来自于乳酸球菌染色体、质粒或噬菌体的几十个基因的密码子^[12, 33],发现乳酸乳酸球菌密码子使用强烈偏爱于 CGU(Arg)和 AUU(Ile)密码子,而不太选择 AGG(Arg)和 CUA(Leu)密码子。并注意到有一些基因,如编码核糖体蛋白和一个翻译起始因子的 rpmG, rpmJ 和 infA 基因、编码柠檬酸透性酶的 citP 和有关乳糖降解的几个 lac 基因都有异常的密码子使用。这些基因通常在乳酸球菌中具有高表达。

本文综述了乳酸乳酸球菌基因表达调控研究的最新进展,列举了乳酸乳酸球菌转录和翻译起始过程中呈现的许多有趣而异常的特征,解释它们在基因表达调控中的作用将是乳酸乳酸球菌中今后研究的一个重要领域。

参 考 文 献

- [1] Teuber M, Geis A, Neve H. The Prokaryotes (Second Edition), A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. Balows A, Truper H G, Dworkin M, *et al* (eds.) Springer Verlag, Berlin, 1992, 1482~1501.
- [2] van der Vossen J M B M, Kok J, Venema G. Appl Environ Microbiol, 1985, **50**: 540~542.
- [3] de Vos W M, Simons A F M. European Patent, 1987, 0 228 726.
- [4] Achen M G, Davidson B E, Hillier A J. Gene, 1986, **45**: 45~49.
- [5] Koivula T, Sibakov M, Palva I. Appl Environ Microbiol, 1991, **57**: 333~340.
- [6] Bojovic B, Djordjevic G, Topisirovic L. Appl Environ Microbiol, 1991, **57**: 385~388.
- [7] Simons G, Buys H, Hogers R, *et al*. Dev Ind Microbiol, 1990, **31**: 31~39.
- [8] Ahmad K A, Stewart G S A B. J Appl Bacteriol, 1991, **70**: 113~120.
- [9] Platteeuw C, Simons G, de Vos W M. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 587~593.
- [10] Xu F, Pearce L E, Yu P L. FEMS Microbiol Lett, 1991, **77**: 55~60.
- [11] de Vos W M, Simons G. Bichimie, 1988, **70**: 461~473.
- [12] van de Guchte M, Kok J, Venema G. FEMS Microbiol Rev, 1992, **88**: 73~92.
- [13] Williams D M, Duvall E J, Lovett P S. J Bacteriol, 1981, **148**: 1162~1165.
- [14] Band L, Yansura D G, Henner D J. Gene, 1983, **26**: 313~315.
- [15] Lovett P S. J Bacteriol, 1990, **172**: 1~6.
- [16] van der Vossen J M B M, van der Lelie D, Venema G. Appl Environ Microbiol, 1987, **53**: 2452~2457.
- [17] de Vos W M, Gasson M J. J Gen Microbiol, 1989, **135**: 1833~1846.
- [18] van de Guchte M, Kok J, Venema G. Mol Gen Genet, 1991, **227**: 65~71.
- [19] van de Guchte M, van der Wal F J, Kok J, *et al*. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, **37**: 216~224.
- [20] van Rooijen R J, van Schalkwijk A, de Vos W M. J Biol Chem, 1991, **266**: 7176~7181.
- [21] Eaton T, Shearman C, Gasson M J. J Gen Microbiol, 1993, **139**: 1495~1501.
- [22] Araya T, Ishinashi N, Shimamura S, *et al*. Biosci Biotech Biochem, 1993, **57**: 88~92.
- [23] Lakshmidhevi G, Davidson B E, Hillier A J. Appl Environ Microbiol, 1990, **56**: 934~942.
- [24] de Vos W M, Simons G F M. Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, Gasson M J, de Vos W M (eds.), Chapman & Hall Inc., New York, 1994, 52~105.
- [25] van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, *et al*. Gene, 1990, **95**: 155~160.
- [26] Koivula T, Palva I, Hemilä H. FEBS Lett, 1991, **288**: 114~118.
- [27] Tan P S T, van Alen-Boerrigter I J, Poolman B, *et al*. FEBS Lett, 1992, **306**: 9~16.
- [28] Marugg J D, Goelling D, Stahl U, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 1390~1394.
- [29] Chiaruttini C, Millet M. J Mol Biol, 1993, **230**: 57~76.
- [30] Rauch P J G, de Vos W M, Gene, 1992, **121**: 55~61.
- [31] Piard J C, Kuipers O P, Rollema H S, *et al*. J Biol Chem, 1993, **268**: 16361~16368.
- [32] Bardowski J, Ehrlich S D, Chopin A. J Bacteriol, 1992, **174**: 6563~6570.
- [33] Chopin A. FEMS Microbiol Rev, 1993, **12**: 21~39.
- [34] Rince A, Dufour A, Pogam S L, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 1652~1657.
- [35] Averd E K, Daly C, Fitzgerald G F, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 1875~1883.
- [36] Leszczynska K, Bolhuis A, Leenhouts K, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1995, **61**: 561~566.
- [37] Siegers K, Entian K D. Appl Environ Microbiol, 1995, **61**: 1082~1089.
- [38] Anba J, Bidnenko E, Hillier A, *et al*. J Bacteriol, 1995, **177**: 3818~3823.
- [39] Bidnenko E, Ehrlich D, Chopin M-C. J Bacteriol, 1995, **177**: 3824~3829.
- [40] Buist G, Kok J, Leenhouts K J, *et al*. J Bacteriol, 1995, **177**: 1554~1563.
- [41] Martinussen J, Hammer K. J Bacteriol, 1994, **176**: 6457~6463.
- [42] van Rooijen R J, Gasson M J, de Vos W M. J Bacteriol, 1992, **174**: 2273~2280.
- [43] van Asseldonk M, de Vos W M, Simons G. J Bacteriol, 1993, **175**: 1637~1644.
- [44] Vos P, Simons G, Sieze R J, *et al*. J Biol Chem, 1989, **264**: 13579~13585.
- [45] van der Vossen J M B M, Kodde J, Haandrikman A J, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1992, **58**: 3142~3149.
- [46] Godon J J, Delorme C, Ehrlich S D, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1992, **58**: 4045~4047.
- [47] Kuipers O P, Rollema H S, de Vos W M, *et al*. Eur J Biochem, 1993, **216**: 281~291.
- [48] van Rooijen R J, de Vos W M. J Biol Chem, 1990, **265**: 18499~18503.
- [49] Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 814~825.
- [50] van Belkum M J, Hayema B J, Jeeringa R E, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1991, **57**: 492~498.
- [51] Harley C B, Reynolds R P. Nucl Acids Res, 1987, **15**: 2343~2361.

- [52] Moran C P. Regulation of Prokaryotic development, Smith I, Slepecky R A, Setlow P (eds.), ASM, Washington D.C. 1989, 167~184.
- [53] de Vos W M. FEMS Microbiol Rev, 1987, **46**: 281~295.
- [54] Bracco L, Kortlarz D, Kolb A, *et al.* EMBO J, 1989, **8**: 4289~4296.
- [55] Gartenberg M R, Crothers D M. J Mol Biol, 1991, **219**: 217~230.
- [56] Stroman P. Gene, 1992, **113**: 107~112.
- [57] van der Meer J R, Polman J, Beerthuyzen M M, *et al.* J Bacteriol, 1993, **175**: 2578~2588.
- [58] de Vos W M, Kuiper H, Lever A, *et al.* ASM, Annual Meeting, New Orleans, 1989, abstract H276.
- [59] de Vos W M, Boerrigter L, van Rooijen R J, *et al.* J Biol Chem, 1990, **265**: 22554~22560.
- [60] Simons G, Nijhuis M, de Vos W M. J Bacteriol, 1993, **175**: 5168~5175.
- [61] Huang X F, Huang D C, Novel G, *et al.* J Bacteriol, 1995, **177**: 283~289.
- [62] van Rooijen R J, Dechering K J, Wilmink C N J, *et al.* Prot Engin, 1993, **6**: 201~206.
- [63] Matthews K S. Microbiol Rev, 1992, **56**: 123~136.
- [64] McKay L L. Antonie van Leeuwenhoek, 1983, **49**: 259~274.
- [65] Poolman B, Rayer T T, Mainzer S E, *et al.* J Bacteriol, 1989, **171**: 244~253.
- [66] Whitaker R D, Batt C A, Appl Environ Microbiol, 1991, **57**: 1408~1412.
- [67] Kim S G, Batt C A. Gene, 1993, **127**: 121~126.
- [68] Rauch P J G, de Vos W M. J Bacteriol, 1992, **174**: 1280~1287.
- [69] Bruinenberg P G, Vos P, de Vos W M. Appl Environ Microbiol, 1992, **58**: 78~84.
- [70] Marugg J D, Meijer W, van Kranenburg R, *et al.* J Bacteriol, 1995, **177**: 2982~2989.
- [71] de Vos W M, Vos P, Simons G. *et al.* J Dairy Sci, 1989, **72**: 3398~3409.
- [72] Delorme C, Etrlich S D, Renault P. J Bacteriol, 1992, **174**: 6571~6579.
- [73] van der Meer J R, Rollema H S, Siezen R J, *et al.* J Biol Chem, 1994, **269**: 3555~3562.
- [74] Mayo B, Kok J, Venema G K, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1991, **57**: 38~44.
- [75] Mierau I, Tan P S T, Haandrikman A J, *et al.* J Bacteriol, 1993, **175**: 2087~2096.
- [76] Hynes W L, Friend V L, Ferretti J J. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**: 4207~4209.
- [77] Griffin H G, Gasson M J. Mol Gen Genet, 1995, **246**: 119~127.
- [78] McLaughlin J R, Murray C L, Rabinowitz J C. J Biol Chem, 1981, **256**: 11283~11291.
- [79] de Felipe F L, Magni C, de Mendoza D, *et al.* Mol Gen Genet, 1995, **246**: 590~599.
- [80] David S, Stevens H, van Riel M, *et al.* J Bacteriol, 1992, **174**: 4475~4481.