

微生物蛋白酶的分子生物学*

徐定邦 李文通

(上海新型发酵厂, 上海)

近十年来, 从分子生物学方面研究微生物蛋白酶的工作进展很大。这些成果为微生物学, 生物化学和遗传学提供了有价值的资料;

也使蛋白酶的生产和应用研究工作者开阔了视

* 本文承复旦大学生物系孙崇荣同志审改, 谨致谢意。

野。本文拟从结构、生物合成和功能三方面加以简述。

结构、功能和进化

根据结构、催化机制和最适 pH 范围,微生物蛋白酶一般可分为四类:第一类为碱性蛋白酶,以丝氨酸为活性中心,酶活性受二异丙基氟磷酸酯等抑制;第二类为中性蛋白酶,需 Zn^{2+} , Ca^{2+} 等离子激活,酶活性受 EDTA 抑制;第三类是以半胱氨酸为活性中心的巯基蛋白酶;第四类为酸性蛋白酶。

不同种属,或同一种的不同菌株产生的蛋白酶常不同。甚至同一菌株可产生几类蛋白酶。因此,微生物蛋白酶的种类很难估计。迄今已分离为电泳纯或色谱纯的已达数十种,已被结晶的多已进行氨基酸组成分析,如仅芽孢杆菌属的碱性蛋白酶,就有 13 种分析过氨基酸组成^[1,2]。自 1967 年首次阐明由 275 个氨基酸残基组成的枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的一级结构后,至今已查明十余种^[3]。对枯草杆菌蛋白酶 BPN'、嗜热芽孢杆菌蛋白酶、灰色链霉菌蛋白酶和分枝杆菌 β -裂解酶已进行过 X 射线衍射分析。这些材料使我们有可能比较各种微生物蛋白酶的结构,深入研究其功能与进化。

一、结构的比较

(一) 与动植物蛋白酶的比较

在结构上有相似之处,如枯草杆菌蛋白酶 BPN' 等与胰蛋白酶、糜蛋白酶等都有三个相同的活性部位(丝₂₀₁·组₆₄·天₃₂);链球菌巯基蛋白酶和木瓜蛋白酶的活性半胱氨酸片段的氨基酸序列相同,为甘·组·半胱,而结合部位色₂₀₁均接近羧基端;青霉和根霉的酸性蛋白酶和胃蛋白酶、凝乳酶相比,不仅活性天门冬氨酸片段的氨基酸序列相似、包括 194 个氨基酸残基的 4 个片段的氨基酸序列相同性达 73%。这说明它们在进化上有联系,催化机制类同,因而在应用上往往可以相互替代。

(二) 不同微生物的蛋白酶之比较

不同微生物的蛋白酶往往很相似。如枯草杆菌蛋白酶 BPN' 和 Carlsberg 三个活性部位的氨基酸序列非常相像;根据氨基酸组成及多肽指纹图谱分析、枯草杆菌蛋白酶 Novo 和 BPN' 完全相同;由 300 多个氨基酸残基组成的嗜热芽孢杆菌蛋白酶的一级结构与非高温菌 NRRL B 3411 产生的中性蛋白酶相比较,有一半氨基酸序列是相同的。后一事实表明、尽管两种酶的耐热性差别很大,但从结构上看是同源的。因此如将高产中心蛋白酶的非高温菌的调节基因转入嗜热芽孢杆菌中,调节基因应容易得到表达,从而有可能提高后者的蛋白酶合成量。

(三) 同一菌株产生的蛋白酶

由于分析技术的发展,陆续发现同一菌株可产生几种蛋白酶。Tsugita 等^[4]曾在一株米曲霉的培养液中分离提纯了 6 种分子量不同的酸性蛋白酶、它们的性质相似,因而估计一级结构也相同。Tsugita 等认为它们由一个结构基因编码,不同之处在于蛋白质结合了不同的多糖。Chaloupka 曾发现细胞内外蛋白酶合成的调节不同,此后又发现同一菌株的胞内和胞外蛋白酶在抗原性,底物和抑制剂的专一性等方面有所不同,因而推测两种酶不相同,但未从结构上证明。1977 年 Stepaner^[2,5]等提纯了枯草杆菌 A50 菌株的胞内碱性蛋白酶,发现它的氨基末端片段的氨基酸序列与同一菌株的胞外酶不同,估计是由二个不同的结构基因编码的,但两个结构基因相似处很多,认为它们是由于基因重复及点突变造成的。

二、结构与功能与进化

(一) 活性部位的功能和耐热性机制

微生物蛋白酶中,活性部位或其它重要部位的氨基酸被取代而功能受严重影响例子不少。如枯草杆菌蛋白酶活性中心丝₂₀₁的羟基被巯基取代后得到的人造枯草杆菌蛋白酶,便不能水解原来可作用的某些底物^[6]。某些部位个别氨基酸对酶的耐热性所起的作用,深受大家注意。例如嗜热芽孢杆菌和枯草杆菌 NRRL B 3411 菌株的蛋白酶,在活性中心的氨基酸、底

物结合部位氨基酸及 Zn^{2+} 的配位氨基酸等方面都基本相似,但 Ca^{2+} 的配位氨基酸有些不同,所以推测 Ca^{2+} 的配位氨基酸不同与酶的耐热性有关^[7]。此外,链霉菌的耐高温蛋白酶还通过特有的巯基与活性组氨酸形成氢键,使丝氨酸、组氨酸和天门冬氨酸组成的电子传递系统更稳定,从而提高了酶的耐热性。

(二) 结构改变和功能的相对稳定性

在蛋白酶分子的某些部位,可以缺失,增加或更换许多氨基酸而酶的功能不受影响。例如枯草杆菌的两种蛋白酶 BPN' 和 Carlsberg,虽然它们的活性部位氨基酸序列相似,但整个分子的一级结构差异很大,BPN' 酶由 275 个氨基酸残基组成,与 Carlsberg 酶有 84 个氨基酸残基不相同。两种酶的特性却非常相似,这说明一个蛋白质分子纵使氨基酸残基被更换了三分之一,其功能仍可保持不变。由于 DNA 经常会发生碱基缺失,插入或更换,蛋白质的一级结构会发生相应改变,但其功能保持相对稳定。已能结晶的各种蛋白酶,虽然结构各有差异,但其活性相差不大,这也说明了功能的相对稳定性。显然,想通过人工诱变改变结构基因使蛋白酶活力提高的可能性是微小的。有趣的是,枯草杆菌蛋白酶与牛糜蛋白酶,不仅一级结构和立体结构迥然不同,活性部位片段氨基酸序列也毫无相似之处,但两种酶的活性部位的空间构型相同,因而催化机制和酶学性质很相似。也说明它们之间有共同的祖先,是“同功异源”进化现象的精彩例子。这就是说,DNA 分子可以通过不同的方式进化,形成一级结构不同因而立体结构也不同的蛋白质,但其活性中心在进化过程中是保守的,从而保持着相似的功能。

(三) 进化

虽然不同微生物及微生物与动植物在蛋白酶的结构上有联系,但结构差异的大小,和亲缘关系的远近并无平行关系。例如,分枝杆菌产生的 α -裂解酶,其一级结构和活性中心片段的氨基酸序列,与同是细菌的枯草杆菌蛋白酶毫不相似,却和链霉菌蛋白酶 A 及牛糜蛋白酶相似。这种情况和细胞色素 C 的进化不同。放线

菌和牛的蛋白酶结构十分相似一事,有人认为是由于进化过程中的偶然机会,通过噬菌体媒介而使链霉菌获得了牛的为蛋白酶编码的基因。

蛋白酶的生物合成及其调节

微生物蛋白酶的生产和应用研究虽然积累了大量资料,蛋白酶合成的分子机制却研究得不多。这里选择生物化学和遗传学材料较多的粉红色链孢霉和芽孢杆菌,对它们的蛋白酶生物合成作一简要介绍,它们可以分别代表真核和原核微生物中的情况。

一、粉红色链孢霉蛋白酶的合成及其调节

Drucker^[8,9] 和 Hanson^[10] 等报道,对数生长期的链孢霉菌丝体悬浮液,只在其中含有牛血清蛋白和几种蛋白酶(如枯草杆菌蛋白酶、糜蛋白酶等)时,菌丝体才立即合成蛋白酶。若同时加入蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺,酶的合成便停止。由此可见,牛血清蛋白不是对已合成的蛋白酶起促进分泌和稳定作用,而加入的几种蛋白酶也不是对已合成的蛋白酶起激活作用,确实是由于上述几种物质对菌丝体合成蛋白酶起诱导作用。用电子显微镜观察,未见外加蛋白酶对细胞膜有任何损伤,而牛血清蛋白分子很大,不可能自由进入细胞内。所以,这些蛋白质以何种方式产生某种信号,促使链孢霉 DNA 转录,尚是一个谜。由于一级结构完全不同的蛋白质均可起诱导作用,排除了由于蛋白酶专一水解蛋白质所形成的多肽起诱导作用的可能性。而氨基酸对酶合成则只起阻遏作用,所以更不可能是蛋白质完全水解产物起诱导作用。

另外,构巢曲霉和假丝酵母的蛋白酶合成不需要蛋白质诱导,但蛋白质有刺激作用。它们和粉红色链孢霉的这种差异的分子机制还不清楚。

牛血清蛋白诱导链孢霉蛋白酶合成,必须在限量供应碳、氮和硫的条件下。Hanson^[11] 比

较了分别限制这三种营养时蛋白酶的结构和性质,认为属同一种酶,由一个结构基因编码。为了解释上述现象,Hanson 提出了蛋白酶合成的复合正调节模型。他认为在蛋白酶结构基因邻近的起动区有三个受体部位,分别接受由三个互相独立的调节基因所产生的特异信号,任何一个受体部位与相应的信号结合,结构基因开始转录,当培养基中碳、氮、硫丰富时,代谢产物(可能是环状 AMP、 NH_4^+ 和半胱氨酸)分别和上述信号结合,转录即停止。反之,当上述营养任何一种被限量时,至少有一种信号与受体部位结合,转录进行。蛋白质中含有碳、氮和硫,按此模型,当缺少这三种营养之任一种时,细胞合成蛋白酶分解蛋白质营养物质,反之则不再浪费氨基酸等原料去合成蛋白酶,所以蛋白质合成是一种适应性机制。另外,在构巢曲霉中也有类似情况,所以这种复合正调节模型在真核微生物中可能带有普遍意义。复合调节可使微生物细胞合成蛋白酶这一重要功能带有相对稳定性、因为任何单个调节基因或受体部位的突变,都不足以影响蛋白酶的合成。如 Drucker 用诱变方法未能得到缺失蛋白酶合成能力的突变株。复合调节模型使我们推测到,要提高蛋白酶的产量,应选择适合的培养条件,限制碳、氮或硫的供给,而同时限制其中两种则不能使蛋白酶合成继续增加。通过使调节基因突变来解除信号与上述三种营养的代谢产物的阻遏作用,而又保持其对受体部位的亲和性是比较困难的。

二、芽孢杆菌蛋白酶合成及其调节

芽孢杆菌蛋白酶的合成有两个特点,第一是氨基酸可以阻遏转录,当阻遏解除后就合成过量的合成蛋白酶的 m-RNA; 第二,合成蛋白酶的 m-RNA 是在细胞膜上的核糖体上进行翻译,新形成的多肽透过细胞壁形成立体结构,或在膜与壁之间的空腔内形成无活性的酶,分泌到细胞外后再被激活^[12-14]。对这些细节的推断已得到不少实验支持。例如在含限量氨基酸的培养基中接种对数期的芽孢杆菌,菌体立

即合成蛋白酶。当加入氯霉素等蛋白质合成抑制剂时,细胞停止合成蛋白质。但加入利福平等核酸合成抑制剂时,由于有过量的合成蛋白酶的 m-RNA 存在,蛋白酶的合成仍能持续一段时间。Shoer^[15]分析过一株芽孢杆菌突变株的培养液,发现其中少了一种分子量约为 3 万的蛋白酶,而多了一种蛋白质,这种蛋白质是由于蛋白酶结构基因发生终止突变而形成的一段蛋白质碎片。这种碎片的立体结构与蛋白酶完全不同,但向细胞外分泌的克分子数与应分泌的蛋白酶的克分子数相同。这一现象用在膜上合成肽,分泌到细胞外来解释,是不难理解的。低浓度的梭链孢酸不抑制细胞原生质中蛋白质合成而抑制蛋白酶合成,也有助于说明蛋白酶是在膜所结合的核糖体上合成的,因为膜上结合的核糖体比游离在原生质上的,对梭链孢酸更敏感。

Uhara 等^[16]曾以芽孢杆菌为材料,进行过蛋白酶调节基因的种间转化。他们以纳豆芽孢杆菌 IAM 1212 的抗链霉素菌株的 DNA 对蛋白酶产量低得多的枯草芽孢杆菌链霉素敏感菌株 6160 进行转化,结果受体菌株的中性蛋白酶产量达到供体水平、而碱性蛋白酶和淀粉酶的产量水平不变。转化株的中性蛋白酶的抗原性、热敏性及电泳位移与受体株的相同,而蛋白酶产生的动力学则与供体株相同。显然,在这种转化作用中,供体菌株的蛋白酶调节基因在转化株中得到了表达。Prestidge^[17]也发现由于定位于 his A1 和 arg C4 之间的某基因的突变,突变株的蛋白酶合成速度是野生菌株的十倍。这些试验对蛋白酶生产菌的选育工作者将会有所启发。

1974 年前后,有几个实验室分别得到一些细胞膜突变株^[18-21],该类突变株的细胞膜电泳谱中缺少一条蛋白质带,缺失鞭毛蛋白聚合能力而不能形成鞭毛。由于细胞膜发生了变化,突变株不再接受转化和转导,对于青霉素等阻碍细胞壁合成的抗生素的抗药性增强。同时这些突变株的胞外蛋白酶、淀粉酶及果聚糖蔗糖酶的产量增加。上述所有性状在转化及转导中

均完全连锁,因而肯定是单基因多效突变。后来有人证明,这些突变株都是同一基因突变。

细胞膜突变和调节基因突变增加蛋白酶产量的效应可以叠加,这对生产实践有很大意义。显然,如果得到了调节基因突变株,将此突变基因转入其它有工业生产价值的菌株,可使后者的酶产量进一步提高。Yoneda^[18,19] 等用亚硝基胍诱变,获得上述突变株的几率大约是十万分之五。但是,利用平板初筛后,利用它们对抗生素抗性增强等多效性状进行定向筛选,获得这类突变株是不很困难的。细胞膜突变株的蛋白酶产量增加的机制尚不清楚。

早就知道蛋白酶形成与芽孢形成有平行关系。已经用遗传学方法证明,芽孢杆菌的碱性蛋白酶产生于芽孢形成的早期,是芽孢形成过程中一个必要环节。Balassa^[22] 认为,碱性蛋白酶的合成还受芽孢形成的“总开关”,蛋白酶合成的“起始开关”和“终止开关”的控制。“总开关”关闭不可能形成蛋白酶;“终止开关”延迟关闭可使蛋白酶产量增加^[23]。因此,在实践上不妨筛选不能正常形成孢子的突变体。这种突变株的损伤部位在蛋白酶合成部位之前,当然不能合成蛋白酶,如发生于“起始开关”开启之后,就可能延迟“终止开关”的关闭,从而使蛋白酶产量增加。

三、质粒与蛋白酶的合成

蛋白酶合成主要受染色体基因控制,近年来发现也受质粒控制。例如,乳链球菌极易发生自发突变失去合成蛋白酶的能力。提高培养温度及用溴化乙锭处理,使突变频率大大提高。因此人们推测乳链球菌蛋白酶的合成与质粒有关。Mckay 等^[24] 用氯化铯溶液超离心去除染色体 DNA。在电子显微镜下观察到野生型乳链球菌有 5 种分子量不同的质粒。而缺失蛋白酶的突变株缺失了分子量为 $8-10 \times 10^6$ 道尔顿的质粒,回复突变株及转导株又有这种质粒。显然,这对工业生产菌株的选育有意义。Hesslewood^[25] 报道,将大肠杆菌抗氨基比林等的抗药因子 RTEM 转入奇异变形杆菌中,可使后者

的蛋白酶产量增加;反之转入抗药因子 R₁₆₁₈,蛋白酶的产量降低;更有趣的是,如同时转入上述两种抗药因子,蛋白酶产量只取决于首先转入的是哪种因子。

微生物蛋白酶的生物功能

Holzer 等^[26]对微生物蛋白酶的生物功能作过详细的评述。这里只举生理意义明确和较近发现的若干实例予以说明。

一、对蛋白质的转化作用

细胞处于饥饿状态时,蛋白酶水解细胞内蛋白质为氨基酸,为菌体提供营养。细胞处于分化阶段(如形成芽孢),蛋白酶大量水解蛋白质,供合成大量必要蛋白质之需。正常生活的细胞内蛋白酶也在活动,但较不活跃。令人感兴趣的是,正常条件下蛋白酶能首先选择性地水解异体蛋白质。如变性的蛋白质,含氨基酸类似物的异常蛋白,以及因基因突变导致转录成翻译错误而合成的异常蛋白。Goldschmidt^[27] 发现,大肠杆菌中因结构基因链终止突变所形成的半乳糖苷酶碎片,在生长对数期即被迅速水解,而正常的酶在同样条件下不被水解。还有人发现,大肠杆菌乳糖操纵子由于调节基因邻近的启动区缺失一小段 DNA,调节基因编码的多肽不能正常组合成具有阻遏活性的四聚体。它即被细胞内蛋白酶迅速水解,所以该突变株中的阻遏蛋白只有正常菌株的十分之一。正常蛋白质如何避免蛋白酶攻击,或蛋白酶如何识别正常蛋白和异常蛋白,这是极为重要而又未被揭开的谜。

由于酶的分离技术不断提高和蛋白酶缺失突变株的不断被发现,现已知道,细胞内往往有多种蛋白酶,它们分别执行不同的功能。例如大肠杆菌在正常条件下有一种水解异常蛋白质的胞内蛋白酶,而在饥饿条件下又合成另一种,以使蛋白质的转化速度加快^[28]。

二、限制性水解作用

(一) 青霉素酶释放因子

Aiyappa 等^[29,30]从地衣芽孢杆菌中提纯了一种称为青霉素酶释放因子的蛋白酶。该酶专一地水解核糖核酸酶和胰岛素 B 链的丝氨酸和苏氨酸的羧基端。因此,它是分析蛋白质一级结构的重要工具酶。该酶对胞膜型青霉素酶转化为胞外型青霉素酶时起修饰作用,前者的酶蛋白中较后者多一个由 20 多个氨基酸残基组成的磷酸酯肽,青霉素酶释放因子使胞膜型酶发生限制性水解,就成为胞外型酶。由于青霉素酶释放因子和青霉素酶二者的合成彼此独立,推测青霉素酶释放因子还可能修饰其它胞膜型酶,胞膜型酶从氨基末端释放出一个疏水性多肽衍生物即成为胞外酶。

(二) 修饰依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶

芽孢杆菌进入芽孢形成期后,依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶受到修饰, DNA 模板的专一性也随之改变。用离体试验证明,这种修饰作用是由碱性蛋白酶来完成的。芽孢形成是一种细胞分化过程。所以,从某种意义上说,蛋白酶是这种分化过程的控制因子。通过对 RNA 多聚酶的修饰来改变它的功能,使细胞只需具备一套为 RNA 多聚酶编码的基因就能完成分化过程,这无疑是经济的。这对高等生物细胞分化过程中基因表达研究,也有意义。

参 考 文 献

- [1] Keay, L.: *Proteases of the Genus Bacillus, Fermentation Technology Today* (ed. by Terui, G.), Society of Fermentation Technology, Osaka, 1972, p. 289.
- [2] Stepanov, V. M., A. Y. Strongin, L. S. Lzotova et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**: 298, 1977.
- [3] Fasman, G. D.: *Handbook of Biochemical and Molecular Biology*, 3rd ed., Vol. III Proteins, CRC Press, Cleveland, 1976, pp. 308—358.
- [4] Tsujita, Y. and A. Endo: *Agr. Biol. Chem.*, **41**: 2125, 1977.
- [5] Strongin, A. Y., L. S. Lzotova, E. T. Abramov et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **159**: 337, 1978.
- [6] Philipp, M., L. Polgar and M. L. Bender: *Thiosubtilisin, Methods in Enzymology*, vol. 19, 1970, p. 215.
- [7] Levy, P. L., M. K. Panyburn, Y. Burstein et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**: 4341, 1975.
- [8] Drucker, H.: *J. Bact.*, **110**: 1041, 1972.
- [9] Drucker, H.: *ibid*, **116**: 593, 1973.
- [10] Hanson, M. A. and G. A. Marzluf: *ibid*, **116**: 785, 1973.
- [11] Hanson, M. A. and G. A. Marzluf: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**: 1240, 1975.
- [12] Both, G. W.: *J. Mol. Biol.*, **67**: 199, 1972.
- [13] Glenn, A. R., G. W. Both, J. L. McInnes et al.: *ibid*, **73**: 221, 1973.
- [14] Semets, E. V., A. R. Glenn, B. K. May et al.: *J. Bact.*, **116**: 531, 1973.
- [15] Shoer, P. and H. P. Pappaport: *ibid*, **109**: 575, 1972.
- [16] Uhara, H., Y. Yoneda, K. Yamane et al.: *ibid*, **119**: 82, 1974.
- [17] Prestidge, L., V. Gage and J. Spizizen: *ibid*, **107**: 815, 1971.
- [18] Yoneda, Y., K. Yamane and B. Moruo: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**: 765, 1973.
- [19] Yoneda, Y. and B. Moruo: *J. Bact.*, **124**: 48, 1975.
- [20] Sekiguchi, J., N. Takada and H. Okada: *ibid*, **121**: 688, 1975.
- [21] Kunst, F.: *Biochimie*, **56**: 1481, 1974.
- [22] Balassa, G., B. J. Dod and J. Zucca: *Overproduction of Sporulation-Associated Extracellular Proteases in Bacillus subtilis Mutant, Spores VI*, (ed. by Gerhardt, P.) American Society for Microbiology, Washington, 1975, p. 279.
- [23] Dod, B. J. and G. Balassa: *Biochimie*, **55**: 1005, 1973.
- [24] McKay, L. L. and J. D. Efstathiou: *Appl. Envir. Microbiol.*, **32**: 38, 1976.
- [25] Hesslewood, S. R.: *J. Gen. Microbiol.*, **85**: 146, 1974.
- [26] Holzer, H., H. Betz and E. Ebner: *Intercellular Proteinases in Microorganisms, Current Topics in Cellular Regulation*, Vol. 9 (ed. by Horecker, B. L.), Academic Press, New York, San Francisco and London, 1975, pp. 103—148.
- [27] Goldschmidt, R.: *Nature*, **228**: 1181, 1970.
- [28] Proutg, W. F. and A. L. Goldberg: *J. Biol. Chem.*, **247**: 3341, 1972.
- [29] Aiyappa, P. S., L. T. Traficante and J. O. Lampen: *J. Bact.*, **129**: 191, 1977.
- [30] Aiyappa, P. S. and J. O. Lampen: *J. Biol. Chem.*, **252**: 1745, 1977.