

木糖代谢酶系基因的克隆与表达

刘 纯 强

(山东大学微生物研究所, 济南)

自然界中,许多细菌和一些酵母、丝状真菌都能利用木糖^[1]。在原核生物中,木糖代谢一般须有三种酶参与,即木糖通透酶、木糖异构酶和木酮糖激酶。在木糖通透酶作用下,木糖进入细胞,然后被木糖异构酶异构化为木酮糖,再由木酮糖激酶磷酸化为5-磷酸木酮糖,最后进入磷酸戊糖途径^[1]。在真核生物中,从木糖到木酮糖通常需要两步反应,即木糖首先被木糖脱氢酶还原为木糖醇,然后再由木糖醇脱氢酶氧化为木酮糖;木糖还原作用需要细胞提供NADPH,木糖醇脱氢酶需 NAD^{+} ^[2]。

木糖是一种五碳糖,可由半纤维素水解得到。半纤维素是自然界中许多植物性材料、农作物秸秆等中的主要成分之一,水解后主要产物为木糖^[3]。因此,木糖的利用,特别是转化为更有价值的产品(如酒精),对国民经济具有重大意义。但是,目前许多具生产应用价值的菌株,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*),都不能够直接利用木糖,这主要是由于在这些菌中木糖代谢酶系不完全。随着重组DNA技术的发展,现在已有可能通过基因操作方法对这些菌的代谢途径进行改造,最终使得它们能够直接利用木糖。此外,木糖异构酶(也叫葡萄糖异构酶)还可催化葡萄糖转化为果糖,在工业上已被广泛用来生产高果糖浆。木糖异构酶基因的克隆为高产木糖异构酶菌株的构建开辟了新途径。近几年来,有关木糖代谢的酶基因,特别是木糖异构酶基因的克隆与表达已越来越引起人们的注意。迄今为止,已从大肠杆菌(*Escherichia coli*)、紫黑链霉菌(*Streptomyces violaceoniger*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和

白纹黄单胞菌(*Xanthomonas albilineans*)克隆到了木糖代谢酶系的基因(表1)。

(一) 木糖代谢酶系基因的克隆与结构

目前,工作主要还集中在细菌木糖代谢途径中前四种酶基因的克隆上。这四种酶是木糖通透酶(XylP)、木糖异构酶(XylA)、木酮糖激酶(XylB)和一个调节酶(XylR)。所有这些基因的克隆都是通过遗传互补的方法实现的(表1)。一般技术线路为:(1)选用合适的克隆载体,建立供体菌的基因文库;(2)将基因文库导入不能利用木糖(Xyl⁻)的突变株中;(3)在含木糖的EMB或MacConkey指示培养基上或在以木糖为唯一碳源的无机盐培养基上筛选能互补Xyl⁻突变株中缺失基因的克隆。

迄今,研究得最深入的是*E. coli*木糖代谢酶系基因的表达特性与结构。在*E. coli*中,XylP、XylA、XylB的合成受木糖诱导和降解物阻遏控制^[3]。XylP、XylA和XylB三个基因连锁,并组成一个操纵子,受正控调节子XylR基因的控制^[4,5,6]。对XylA基因的核苷酸序列分析发现,在此基因的开放读码框(open reading frame)中有两个ATG密码子,相隔9bp;其中第二个ATG位于SD序列下游7bp处,被认为是XylA基因的真正起始密码子^[7,8]。XylA结构基因长1320bp,编码一个440氨基酸的肽链,分子量为49740;XylA肽链的第一个氨基酸为蛋氨酸,表明在成熟的木糖异构酶N末端无信号肽序列^[7]。与XylA基因相邻的开放读码框是编码一个分子量为52000的木酮糖激酶基因^[9]。

与*E. coli* XylA和XylB两个基因的结构

在此稿准备过程中,N. W. Dunn副教授提出了许多有价值的建议,特此致谢。

表 1 克隆的木糖代谢酶系基因

供体菌	克隆的基因	受体菌	文 献
<i>Escherichia coli</i>	XylP XylA* XylB*	<i>E. coli Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5,7,8,19,20,25,27,34,35
<i>Bacillus subtilis</i>	XylA* XylB*	<i>E. coli</i>	10,11
<i>salmonella typhimurium</i>	XylP XylA XylB XylR	<i>S. typhimurium</i>	15
<i>Streptomyces violaceoniger</i>	XylA XylB	<i>S. violaceoniger</i>	12
<i>Xanthomonas albilineans</i>	XylP XylA XylB	<i>E. coli Zymomonas mobilis</i>	16,18,33

注: XylP、XylA、XylB 和 XylR 分别表示木糖通透酶、木糖异构酶、木酮糖激酶和木糖调节酶。
*: 已测序。

构相似,在 *B. subtilis* 中 XylA 基因与 XylB 基因的 3' 末端相连^[10]。此外, *B. subtilis* 和 *E. coli* 两个 XylA 基因的核苷酸序列具很大的同源性^[11]。

S. violaceoniger 的 XylA 基因与 XylB 基因连锁,并能互补 XylA⁻ *E. coli* 突变株,表明 *S. violaceoniger* XylA 基因的启动子可被 *E. coli* 中的 RNA 聚合酶识别^[12]。

在 *S. typhimurium* 中, XylA、XylB、XylP 和 XylR 组成一个正控调节子 (regulon), 受降解物阻遏调控^[13,14]。这四个基因的排列顺序为 XylP-XylR-XylB-XylA^[14,15]。二维凝胶分析表明, XylA 和 XylB 蛋白质亚基具有相同的分子量 (45000) 和等电点 (6.2±0.1)^[15]。

在 *X. albilineans* 中, 木糖异构酶合成受诱导物排阻 (inducer exclusion) 机制控制^[16], 即葡萄糖通过排阻诱导物的输入控制细胞内相应诱导酶的合成^[17]。XylA、XylB 和 XylP 三个酶基因均可在 *E. coli* 中直接表达^[18]。

(二) 木糖异构酶的过量生产

利用重组 DNA 技术将木糖异构酶基因在

体外进行改造,然后导入合适受体菌,在强启动子控制下实现高效表达,在高果糖浆工业中具有重要意义。目前,这方面的工作还仅限于利用 *E. coli* 的木糖异构酶基因。

1985 年, stevis 和 Ho^[19] 将 XylA 基因, 删除自身的启动子后, 分别插到启动子 lac 和 tac 下游, 发现受 tac 控制的木糖异构酶活力比对照菌提高了 20 倍。

1986 年, Batt 等^[20]将含 XylA 结构基因和 SD 序列的 SstII-DglII 片断和质粒 pKK 223 上的启动子 tac 融合, 然后转入 *E. coli* JM105, 在 IPTG 诱导下, 宿主中合成木糖异构酶的水平提高了 50—300 倍, 最高占细胞总蛋白质量的 28%。将此重组细胞用藻酸钙珠包埋后装入 10×50 mm 的柱子反应器中, 循环注入木糖 (10%), 然后检测流出反应液中木酮糖的浓度, 发现木糖到木酮糖的转化率最高可达 12%。

同年, Lastick 等^[21]将含 SD 序列的 XylA 结构基因插入质粒 pKC 30 上强启动子 λ P 2 的下游, 然后转入含温度敏感的 λ 抑制因子的

E. coli 中。当抑制因子被温度失活后,携带重组质粒的菌株便合成大量的木糖异构酶,酶蛋白最高可达细胞蛋白总量的 38%。

(三) 木糖利用菌的构建

目前,在酒精工业上最常用的酵母是 *S. cerevisiae*。此菌不能直接利用木糖,却能高效地利用木酮糖发酵酒精^[22,23]。因此,可通过补加木糖异构酶催化木糖转化为木酮糖后,再由酵母进行发酵^[24]。但这一过程受木糖异构酶生产成本、酶的稳定性等因素限制,难以扩大生产。另一条利用木糖的途径是从自然界中分离能直接利用木糖的酵母。自 1980 年以来,已陆续从自然界中分离到了几株能发酵木糖的酵母,其中比较有希望的是管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus*)、树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 和休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*)^[24]。与其它真菌一样,这些酵母将木糖经木糖醇转化为木酮糖。在反应过程中,由于细胞内积累的 NADH 抑制了木糖醇脱氢酶的活性,使得酵母在利用木糖发酵酒精的同时产生大量的木糖醇副产物,降低了木糖的转化率。因此,解决这一问题的最理想途径是应用重组 DNA 技术把木糖异构酶基因克隆到 *S. cerevisiae* 中去,使酿酒酵母能直接利用木糖发酵生产酒精^[24]。

近几年来,在利用 *E. coli* 木糖异构酶基因构建能发酵木糖的酵母菌方面已取得了一些进展。1983 年,Ho 等^[25,26]将已删除启动子的 XylA 结构基因克隆到酵母启动子 *trp5* 的下游,得到融合基因 *trp5-XylA*。此基因在 *E. coli* 中表达不再受木糖诱导,而受启动子 *trp5* 的控制;导入酵母 *S. cerevisiae* 后,测到了 XylA 基因的表达。但由于表达水平很低,目前尚无实际应用意义。

1984 年,Briggs 等^[8]将仍含自身启动子的 XylA 基因直接克隆到含酵母启动子 *CYC1* 的载体上。由此得到的 XylA 融合基因在 *E. coli* 中的表达仍可被木糖诱导,导入酵母后未能测到 XylA 基因的表达,表明它仍受自身启动子控制。

1985 年,Ueng 等^[27]将一携带 XylA 基因

的 *Pst*I 片断 (2.4 kb) 直接插入质粒 pDB248 中氨苄青霉素抗性 (*Ap^r*) 基因的 *Pst*I 位点上,然后再导入粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)。此菌本身也能产一定基础水平的木糖异构酶,XylA 基因的导入使得这种酶水平提高了五倍。由于 *Ap^r* 基因能在酵母中表达^[28],他们推测,酵母中这种木糖异构酶活力水平的提高可能是由于在 *Ap^r* 启动子控制下 XylA 基因的表达所致^[27]。进一步的酒精发酵实验发现,含 XylA 基因的 *S. pombe* 能利用木糖生产酒精,但产酒精速率很低。发酵 240 小时后最大酒精浓度才达 3%^[29]。由于他们没有报道宿主菌 *S. pombe* 在相同条件下利用木糖产酒精的情况,因此,难以对这项工作的意义进行评估。

1987 年,Sarthy 等^[34]报道和确证了 XylA 基因在 *S. cerevisiae* 中的表达。他们将 XylA 基因的编码序列插到酵母表达质粒 PAAH 5 启动子 ADH 5 和转录终止信号序列之间,然后导入酵母。Northern blot 分析表明,在 *S. cerevisiae* 中 XylA 基因通过转录产生了相应的 mRNA。进一步的 Western blot 法还验证了在离体翻译实验中由此 mRNA 转译成的蛋白质产物,发现此蛋白可与由来自 *E. coli* 的纯木糖异构酶得到的抗血清反应。此外,还发现电泳时两者的迁移率也相同,表明它们具有相同的分子量和电性质,因而确证了 *E. coli* XylA 结构基因在 *S. cerevisiae* 中的表达。然而,酶活测定表明,通过酵母表达的木糖异构酶活力比从 *E. coli* 中分离得到的木糖异构酶活力至少低 10^3 倍。原因尚不清楚。

除酵母外,另一途径是构建细菌“工程菌”发酵木糖。目前,已广泛引起人们注意的细菌是 *Z. mobilis*。此菌为革兰氏阴性菌,能高效利用葡萄糖发酵生产酒精,在葡萄糖转化率、酒精产率等方面均优于 *S. cerevisiae*,是目前最有希望取代酵母发酵酒精的细菌^[30,31]。然而,天然的 *Z. mobilis* 只能利用葡萄糖、果糖和蔗糖,因而限制了它在工业化生产中的应用。*Z. mobilis* 不能直接利用木糖是由于缺乏催化从木糖

到 5-磷酸木酮糖有关的酶(木糖通透酶、木糖异构酶、木酮糖激酶)及磷酸戊糖途径中的关键酶转醛醇酶。重组 DNA 技术的发展为改造 *Z. mobilis* 中的代谢途径提供了可能。目前已在 此菌中表达的外源基因有乳糖发酵基因^[31]和纤维素酶基因^[32]。如能将木糖代谢酶基因克隆到 *Z. mobilis* 中去, 构建成一条完整的木糖代谢途径, 则有可能实现木糖的直接转化。

1988 年, 刘纯强等^[33]首次报道了 *X. albilineans* 的 XylP、XylA 和 XylB 基因在 *Z. mobilis* 的表达。实现此目的的第一步是建立 *Z. mobilis* 的载体转移系统。广宿主质粒 pRK 404 可通过接合转入 *Z. mobilis*, 并能在宿主中稳定地复制增殖, 是一个比较理想的质粒载体。利用 pRK 404 将 *X. albilineans* 的 XylP、XylA 和 XylB 导入 *Z. mobilis* 后, 测到了这三个基因在 *Z. mobilis* 中的表达。质粒图谱分析和 DNA 杂交实验发现, 尽管携带木糖代谢酶基因的重组质粒在 *Z. mobilis* 中进行了分子重排, 但这三个外源基因都仍能稳定地保留在质粒上。这一工作为进一步完善 *Z. mobilis* 中的木糖代谢途径、构建能直接利用木糖的工程菌打下了基础。

(四) 展望

目前, 细菌木糖代谢酶系基因克隆的工作已全面铺开。虽然在利用木糖异构酶基因构建高产木糖异构酶(葡萄糖异构酶)工程菌方面已取得较大进展, 但迄今能高效表达木糖异构酶的受体还限于 *E. coli*。此菌为革兰氏阴性菌, 不能分泌蛋白, 产热源, 不适合应用于酶制剂工业。今后的发展趋势是寻找更合适的受体菌(如枯草杆菌)来高效表达木糖异构酶基因。改造酵母使之能利用木糖的研究仍未取得重大突破。*X. albilineans* 可能是一株较理想的 XylA 基因供体菌, 因为: (1) 在 *X. albilineans* 中, XylA 基因的表达对以 cAMP 为媒介的降解物阻遏不敏感^[16]; (2) *X. albilineans* 的木糖异构酶对木糖的 K_m 值较 *E. coli* 木糖异构酶的低, 表明前者对木糖具有较高的亲合性^[18]。另一途径是将真菌的木糖异构酶基因克隆到酵母

中进行表达^[24]。目前尚无这方面工作的报道。*Z. mobilis* 的应用具有很大的潜力, 因为它生长速度快, 发酵周期短, 酒精产率高。在现有基础上, 进一步通过基因工程方法完成其木糖代谢途径的构建, 可望达到直接利用木糖发酵生产酒精的目的。

参 考 文 献

1. Jeffries T W: *Adv. Biochem. Eng/Biotech.*, 27: 1—32, 1983.
2. Magee R J and K Naim: *Adv. Biochem. Eng/Biotech.*, 32: 61—93, 1985.
3. David J D and H Weismeyer: *Biochim Biophys. Acta*, 201: 497—499, 1971.
4. Maleszka R et al.: *Can. J. Biochem.*, 60: 144—151, 1982.
5. Rosenfeld S A et al.: *Mol. Gen. Genes.*, 184: 410—415, 1984.
6. Batt C A et al.: *Can. J. Microbiol.*, 31: 930—933, 1986.
7. Schellenberg G D et al.: *J. Biol. Chem.*, 259: 6826—6832, 1983.
8. Briggs K A et al.: *MEBOJ.*, 3: 611—616, 1984.
9. Lawlis V B et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 15—24, 1984.
10. Wilhelm M and C P Hollenberg: *MEBOJ.*, 3: 2555—2560, 1984.
11. Wilhelm M and C P Hollenberg: *Nucleic Acid Res.*, 13: 5717—5722, 1985.
12. Marcel T et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 208: 121—126, 1987.
13. Shamanna D K and K E Sanderson: *J. Bacteriol.*, 139: 64—70, 1979a.
14. Shamanna D K and K E Sanderson: *ibid.*, 139: 71—79, 1979b.
15. Ghangas G S and D B Wilson: *J. Bacteriol.*, 157: 158—164, 1984.
16. Rickard P A D et al.: *Aust. J. Biotechnol.*, 3(2): 121—124, 1989.
17. Ullmann A: *Biochimie.* 67: 27—34, 1985.
18. Liu C Q et al.: *J. Biotechnol.*, 6: 159—165, 1987.
19. Stevis P E and N W Y Ho: *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 592—596, 1985.
20. Batt C A: *Biotechnol. Progress*, 2(3): 140—144, 1986.
21. Lastick S M et al.: *Biotechnol. Lett.*, 8: 1—6, 1986.
22. Gong C S et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 430—436, 1981.
23. Wang P Y and H Schneider: *Can. J. Microbiol.*, 26: 1165—1168, 1980.
24. Alexander N J: *Food Technol.*, 99—103, 1986.
25. Ho N W Y et al.: *Enzyme Microb. Technol.*, 5: 417—420, 1983a.
26. Ho N W Y et al.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 13: 245—259, 1983b.

(下转第 153 页)

(上接第 173 页)

27. Ueng P P et al.: *Biotechnol. Lett.*, 7: 153—158, 1985.
28. Roggenkamp R et al.: *Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4466—4470, 1981.
29. Chan E C: *Biotechnol. Lett.*, 8: 231—234, 1986.
30. Skotnicki M L et al.: *Biochem. Soc. Symp.*, 48: 53—86, 1983.
31. Buchholz S E et al.: *TIBTECH*, 5: 199—204, 1987.
32. Liu C Q: *Cloning and expression of genes involved in cellulosic bioconversion*. Ph D thesis. University of New South Wales, Australia. 1988.
33. Liu C Q et al.: *J. Biotechnol.*, 7: 61—70, 1988.
34. Sarthy A V et al.: *App. Environ. Microbiol.*, 53: 1966—2000, 1987.
35. Clark L and J Carbon: *ibid.*, 9: 91—99, 1976.
36. 张其玖等: *生物工程学报*, 4(1): 44—47, 1988.
37. Swings J and J Deley: *Bacteriol. Rev.* 41: 1—46, 1977.