

# 细菌接合转移及其调控机制的研究进展

郑 雷 颜望明 刘振盈

(山东大学生命科学学院微生物学系 济南 250100)

接合转移是 DNA 从一个细菌传递给另一个细菌的高度特异性过程。这一过程通常是由接合性质粒编码。已从不同的革兰氏阴性细菌中分离出接合性质粒,它们分属于 20 多个不亲和群<sup>[1]</sup>。这些质粒都编码细胞接触所必需的伞毛,因此,它们的接合机制可能是相似的。但由于一亲和群质粒不能与其它群的转移缺陷型发生互补,可能存在许多遗传上不同的接合系统。另外,属于不同的不亲和群的质粒之间并不存在 DNA 同源性,也证实了存在不同系统的可能性<sup>[2]</sup>。接合过程涉及到一个质粒 DNA 的广泛区域(F 因子的 33kb 片段)<sup>[1]</sup>。属于同一不亲和群的自然质粒之间存在广泛的同源性,并且编码相关的伞毛和接合系统。革兰氏阳性细菌的接合转移机制似乎在生化、遗传方面与革兰氏阴性细菌不同。最明显的就是这些质粒并不编码用于识别受体细胞的伞毛。

接合转移是较复杂的过程,主要包括:转移起始位点缺失;DNA 转移的起始;双链分离;单链转移;供体,受体互补链的合成及再环化等。质粒接合转移过程也受遗传调控,主要是通过 *finO*, *finP* 两基因参与的调控机制——“*FinO-P*”系统来控制转移的起始和关闭。迄今,只有 *IncF* 质粒研究得较清楚,所以本文主要以 F 因子为对象来论述接合机制。

## 1 DNA 转移方式

DNA 转移有两种模型:一种是伞毛模型,伞毛同潜在的受体细胞形成一种特殊的接触,进而收缩导致细胞之间的接触<sup>[3]</sup>。伞毛残留部分被认为是 DNA 转移的通道,在其轴上有一空洞恰好能容纳单链 DNA 通过。一旦配对形成,即使加入足以使伞毛解聚的 SDS,也无法阻止 DNA 转移的进行<sup>[5]</sup>。另一种模型认为供体和受体细胞在接触处发生包膜融合,形成一种跨膜通道。因为 F 因子 *tra* 基因产物大部分位于膜上,这样的结合可以使受体细胞中进行 DNA 接合转移所需的一些特殊质

粒编码的蛋白质也被转移<sup>[1]</sup>。无论何种模型,有一点是一致的,即只有一条链被转移,并以 5'-端为先导。

## 2 转移起始

**2.1 oriT 位点:** 接合转移是从质粒 DNA 分子上一特殊位点(*oriT*)起始的。现在发现所有参与接合转移的质粒上都带有接合转移所必需的一段相当短的 *oriT* 序列。但 *oriT* 序列具有高度专一性,F 因子的 *oriT* 位点<sup>[6]</sup> 是非对称和定向的,能引导转移区进行有效的转移。非接合型质粒的 *oriT* 序列彼此不同。但用于 DNA 转移的接合质粒系统能识别非接合性质粒的 *oriT* 位点或 *oriT* 外的另一 DNA 序列,带动非接合性质粒转移。

**2.2 oriT 位点缺失:** 已发现 F 因子至少有三个缺失位点,分别具有不同的使用频率,这可能使 F 因子具有某种生物学优势。其中最强的缺失位点的上游有一双重对称序列,这个区可能是一种宿主或质粒编码的蛋白质的识别位点,在 *oriT* 位点和这个对称区之间有一段富 AT 区(约 80% 为 AT)可以促进链的最初分离<sup>[4]</sup>。缺失需要 *traY*, *traZ* 产物参与。*traI* 基因(*traZ* 基因被认为是 *traI* 的一部分)有两个翻译起始位点,从第一翻译位点起始得到的 192kD 的 *TraI* 蛋白为 DNA 解旋酶 I,从第二翻译位点起始得到的 87.8kD 的 *TraI\** 蛋白功能未知<sup>[8]</sup>。*TraI* 蛋白在 *oriT* 位点引入缺失,然后结合在 5'-端由 5'→3'解旋<sup>[13]</sup>。这种作用具有位点和链专一性。研究表明,*TraY* 蛋白位于细胞包被,*TraI* 蛋白位于细胞膜上,因此,两者可能存在一种相互作用:*TraY* 蛋白特异地识别 *oriT* 位点,然后 *TraI* 蛋白进行缺失。值得注意的是,接合过程中的缺失和连接是在 *oriT* 位点连续发生的,在共价闭合形式和 *oriT* 缺失形式之间形成一种动态平衡状态。

*OriT* 缺失以后,在 *TraI* 蛋白作用下进行解旋。约

需要70~80个分子的蛋白结合在约200个核苷酸的DNA单链区,此多聚体作为一稳定复合物,以ATP为能量沿链移动<sup>[1]</sup>。DNA螺旋酶(EcoDNA拓扑异构酶II)也参与解旋,它将松弛的环状DNA转变为负超螺旋形式,促进解旋复合物与DNA的作用,消除开环链的轴旋转影响,提高TraI蛋白解旋效率<sup>[9]</sup>。

### 3 接合转移互补链合成

**3.1 供体细胞中置换链的合成(DCDS):** 供体细胞转移链开始转移,同时进行置换链的合成。DCDS是由DNA多聚酶III全酶完成的,而且需要合成RNA引物<sup>[12]</sup>。DCDS可能存在不只一种引发体形成机制。质粒编码引物酶, RNA聚合酶都能合成RNA引物。另外包括*E. coli*引物酶(dnaG)在内的DnaB依赖的引发机制也可参与作用。在oriT缺刻位点右向区域有一启动子序列,它覆盖了一段对称序列,可以利用此启动子来合成功能性RNA引物。对于小型的ColEI,在保留链的oriV和nic位点之间含有PAS序列riA,这个序列中含有n'蛋白识别位点。在接合过程中,riA位于有利于引发体聚合的单链形式的左侧,这样可以使蛋白复合体在单链上移动,引物合成可能就发生在riA和nic位点之间。

关于DCDS的最后阶段,包括引物切除,新生链末端连接等方面还知之不多,据推测,这些过程都有DNA聚合酶I和DNA连接酶参与。

**3.2 受体细胞互补链的合成(RCDS):** 接合DNA的RCDS与DCDS一样,都是由DNA聚合酶III参与合成互补DNA,但有一个不同:在受体中,转移DNA不表达产物,它所需要的质粒编码产物是由供体提供的。即在转移DNA的同时,接合DNA表达产物也同时被转移,并用于受体细胞的互补链合成。转移DNA首先与受体细胞膜结合,复制得到线性双链分子,继而在细胞膜上转化为共价闭环形式。同DCDS一样,RCDS也有多种RNA引物合成机制,它不同于营养复制,部分方面也不同于DCDS,十分复杂。现在也还没有充分的证据表明受体中互补链合成是连续的,还是非连续过程,但绝大多数模型认为是非连续过程。

### 4 转移DNA的环化

质粒是作为单位长度的非连续链转移的,因此在

oriT位点存在一个精确的5', 3'连接机制。F和ColIb-P9转移DNA的环化是在质粒基因没有在受体中表达时进行的,因此不大可能有质粒编码系统参与。可能在oriT位点产生缺刻后,5'-端与膜蛋白共价结合,DNA转移以后,这个蛋白再识别3'-端,与5'-端连接。F因子的traYZ末端核酸酶就是具有末端核酸酶-连接酶活性的蛋白<sup>[15]</sup>。对于ColEI转移DNA环化也存在类似机制,其中涉及到60kD的松弛复合物。

转移链的环化为互补链的合成提供了一个连续的,共价闭环模板,去除RNA引物,将新合成DNA末端连接。然后在拓扑异构酶,例如DNA螺旋酶作用下,在质粒上引入负超螺旋,这对以后DNA复制和有效转录都是必要的。

### 5 接合转移调控系统

以往普遍认为接合转移为非调控过程,但现在已经证明质粒的接合转移是被严格调控的,这一系统称为“FinO-P”系统。“FinO-P”系统主要是存在一调控机制决定转移区基因的开启和关闭。调控基因为finO, finP。finP基因产物的功能是以反义RNA方式控制traJ转录子的翻译,finO基因产物功能尚未确定。

**5.1 调控系统的组分及相互作用:** 转移调控的中心是finP RNA和traJ mRNA之间的相互作用,因此转移调控是在RNA水平上进行的。finP基因是从traJ开放阅读框架(ORF)反义链附近的一启动子开始转录的。由于终止因子的作用情况不同,可以产生两种不同长度的RNA<sup>[10]</sup>,长的RNA能形成有三个茎环的二级结构<sup>[11]</sup>。finP基因在细胞中连续转录,因此在正常细胞中能保持恒定的finP RNA浓度。traJ基因为一调控基因, TraJ蛋白功能是作为顺式作用因子激活traY启动子,以开启整个转移区的表达。traJ mRNA的前导序列和核糖体结合位点序列能折叠成具有三个茎环的二级结构。finP RNA的一个茎环能与traJ mRNA的核糖体结合位点专一性作用,阻止trJ mRNA翻译表达<sup>[7]</sup>。在这个启动子的上游的traM或finM启动子转录也能跨越traJ基因,因此也称二者为上游traJ启动子。这些上游启动子的转录子包含正常traJ启动子附近对称区域的全部序列,折叠情况不同于正常traJ转录子。上游traJ转录子的三个茎环与finP RNA三个茎环结构互补,能有效地同finP RNA作用,而正常traJ转录子只能与finP RNA的两个

茎环发生互补。正常 *traJ* 转录子的主要作用是表达 *TraJ* 蛋白, 激活 *traY* 基因。调控系统的另一调节基因为 *finO*, *FinO* 蛋白可以作为上游 *traJ* 启动子的抑制物或结合在正常 *traJ* 转录子上促使其保留能与 *finP* RNA 5' 端互补的茎环结构, 更有利于 *finP* RNA 抑制 *traJ* 基因表达<sup>[2]</sup>。

**5.2 调控系统的启动:** 调控系统存在一个开关机制。有人提出, 由于抑制物切除或合成速率不足以满足特定的细胞需求, 就可能产生抑制物瞬间不足而启动转移。实验表明, 一个单一的随机事件即可启动转移发生<sup>[7]</sup>。这些事件包括: *FinO* 蛋白失活; 30S 核糖体结合和少量的 *traJ* 转录子的翻译; *traY* 转录子的合成和翻译。一旦发生这些事件之一, 就会导致其它方面的连锁反应, 进而导致 *TraY* 蛋白合成, 然后结合在 *OriT* 区, 导致转移开启。

**5.3 “FinO-P”转移调控模型假设:** 在正常细胞中 *tra* 基因区处于超螺旋状态, 上游 *traJ* 启动子因 *FinO* 蛋白结合在 *traM* 启动子的上游而关闭。 *finP* 基因在细胞连续转录, 能在胞内维持较恒定的 *finP* RNA 浓度。正常 *traJ* 基因也是连续转录的, 但由于 *finP* RNA 能与 *traJ* mRNA 形成稳定的 *finP*-*traJ* mRNA 复合物, 因而胞内没有 *traJ* mRNA 用于 *TraJ* 蛋白的翻译。 *FinO* 蛋白的结合需要天然超螺旋结构。一旦改变了三维结构, *FinO* 蛋白丢失, 使上游 *traJ* 启动子开启; 另外 *TraY* 蛋白的结合也能改变这个区域的三维结构, 取代 *FinO* 蛋白, 于是 *traM* 启动子开启, 产生 *TraM* 蛋白, 对 *traM* 启动子进行顺式调节。 *FinO* 蛋白去除和 *traM* 启动子开启后 DNA 解旋也会激活 *finM* 启动子, 产生大量 *finM* 转录子。这些转录子有三个基本的茎环结构, 可以促使与 *finP* RNA 快速结合, 同时其自由 3'-端与 *finP* 的自由 5'-端绕茎环快速反绕, 形成双链 *finP*-*finM* RNA 复合体。 *finP* 的结合导致胞内游离 *finP* RNA 浓度降低, 使 *traJ* 转录子翻译成 *TraJ* 蛋白, *TraJ* 蛋白一旦产生, 就激活 *traY* 启动子, 以确保产生足够的 *Tra* 蛋白来满足转移的需要。接合转移使质粒单链化, 可去除大多数的结合蛋白, *TraY* 蛋白可因细微的浓度波动就可能丢失, 而 *FinO* 蛋白则是连续表达的。因此在转移结束时, 质粒恢复超

螺旋, 形成 *FinO* 蛋白结合的最适天然状态<sup>[7]</sup>, *FinO* 蛋白结合上去。此外质粒单链化也有利于 *finP* 的转录, 能在细胞中快速建立 *finP* RNA 的有效浓度, 进而将转移区关闭。

### 结束语

接合转移是一个十分复杂的过程, 涉及区域广泛, 调控复杂, 且各种质粒之间存在着许多不同。对接合机制的研究也只限于几种质粒的有限范围, 而这些质粒中仍有许多悬而未决的问题。另外在接合转移调控方面, 现已发现还有其它五个 F 转移抑制系统 (*FinC*, *Q*, *U*, *V*, *W*)<sup>[14]</sup>。它们都参与 F 因子的转移调控, 它们的作用究竟如何, 是各司其职还是协同作用还不清楚。因此接合转移机制仍有待于进一步研究探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Willetts N, Wilkins B. *Microbiol Rev*, 1987, 48: 24~41.
- [2] Kennedy N, Beutin L, Achtman M, *et al.* *Nature*, 1977, 270: 580~585.
- [3] Cohen A, Fisher W D, Curtiss III R, *et al.* *Proc Natl Acad Sci*, 1968, 61: 61~68.
- [4] Vapnek D, Rupp W D. *J Mol Biol*, 1970, 53: 287~303.
- [5] Willetts N. *Mol Gen Genet*, 1980, 180: 213~217.
- [6] Evert R, Willetts N. *EMBOJ*, 1982, 1: 747~753.
- [7] Clewell D B. *Bacterial Conjugation*, Plenum Press, New York 1993, 1~74.
- [8] Bradshaw H D, Traxler B A. *J Bacteriol*, 1990, 172: 4127~4131.
- [9] Kuhn B, Abdel-Monem M, Krell H, *et al.* *J Biol Chem*, 1979, 254: 11343~11350.
- [10] Dempsey W B. *Mol Gen Genet*, 1987, 209: 533~544.
- [11] Frost L, Lee S, Yanchar N, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1989, 218: 152~160.
- [12] Maturin L J, Curtiss I R. *J Bacteriol*, 1981, 146: 552~563.
- [13] Lovett M A, Helinski D R. *J Biol Chem*, 1975, 250: 8790~8795.
- [14] Willetts N, Skurray R. *Ann Rev Genet*, 1980, 14: 41~76.
- [15] Inamoto S, Yoshioko Y, Ohtsubo E. *J Biol Chem*, 1991, 266: 10086~10092.