

谷氨酸棒杆菌中选择性 σ 因子的研究进展

刘秀霞 高雄 白仲虎*

(江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 工业生物技术教育部重点实验室 生物工程学院
江苏 无锡 214122)

摘要: 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种重要的工业微生物,其基因组中包含编码 RNA 聚合酶的 7 种 sigma (σ) 因子基因,除 σ^A 外,其余 6 种属于选择性 σ 因子。通过 σ 因子进行基因表达调控是细菌调控网络中的重要组成部分,因此研究 σ 因子的功能和调控机制将有助于完善谷氨酸棒杆菌基因调控网络,进而有利于工业生产中菌种优化策略的制定。本文主要对谷氨酸棒杆菌中 6 种选择性 σ 因子的功能和调控机制做一综述,并且讨论了在研究选择性 σ 因子调控功能中需要注意的实验设计问题。最后探讨了选择性 σ 因子在实际应用中的价值及未来需要深入研究的方向,以期能够为谷氨酸棒杆菌调控网络的进一步完善以及选择性 σ 因子研究的规范化提供一些参考。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 选择性 σ 因子, 胁迫

Advances in the alternative σ factors of *Corynebacterium glutamicum*

LIU Xiu-Xia GAO Xiong BAI Zhong-Hu*

(National Engineering Laboratory of Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) is one of important industrial microbe and its genome codes for seven sigma (σ) factors of RNA polymerase. Except σ^A , six other σ are alternative σ factors. The regulation of gene expression mediated by σ factors is the important part of the regulatory network of bacteria. Therefore, the research on the function and regulatory mechanism of σ factors are helpful to improve the gene regulatory network of *C. glutamicum* and further perfect optimizing strategy of stains in the industrial production. This paper reviews the function and regulatory mechanism of six alternative σ factors in *C. glutamicum* and discusses several experimental designing problems noticed in the course of studying on the function of alternative σ factors. Moreover, we also present practical application value of alternative σ factors and its future research

Foundation item: National Basic Research Program of China (No. 2013CB733602); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150148); Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51401A)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-510-85329306; E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

Received: April 25, 2016; Accepted: July 12, 2016; Published online (www.cnki.net): July 15, 2016

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划) (No. 2013CB733602); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20150148); 中央高校基本科研业务费专项项目(No. JUSRP51401A)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85329306; E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-04-25; 接受日期: 2016-07-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-07-15

direction for continuation. This review will provide reference for further improvement of the gene regulatory network and standardization study of alternative σ in *C. glutamicum*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, Alternative σ factors, Stress

细菌的基因表达调控主要发生在转录水平,因此由 RNA 聚合酶指导的转录起始是细菌基因表达调控的关键。RNA 聚合酶与 DNA 结合位点(启动子序列)的特异结合决定了转录的特异性。细菌中一个功能性 RNA 聚合酶全酶由一个五亚基($\alpha 2$, β , β' , ω)核心酶和一个可分离的 σ 亚基组成。其中 σ 亚基负责识别特异的基因启动子序列。几乎所有的细菌中都含有几种不同 σ 因子,它们选择性地与 RNA 核心酶组合构成不同的全酶形式,用于识别不同种类的启动子序列。因此 σ 因子作为转录的全局调控者,调节着大量基因对各种环境胁迫刺激和胞内外条件变化的应答。

细菌中大部分的 σ 因子都属于 σ^{70} 家族。 σ^{70} 家族最多由 4 个结构域组成,其中的亚区域 2.4 和 4.2 分别与所调控基因启动子的-10 区和-35 区结合。 σ^{70} 家族可进一步分为 4 种类型:第一类为初级(Primary) σ 因子,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的 σ^D ,含有完整的 4 个结构域,组成型控制大部分持家基因的转录。第二类为初级类似(Primay-like) σ 因子,在结构上与第一类相似,在功能上与其它几类 σ 因子有交叉。第三类 σ 因子缺少结构域 1,与一些特殊的功能有关,如出芽、鞭毛合成等。第四类 σ 因子只有结构域 2 和 4,数量最多,称作 ECF (Extracytoplasmic function) σ 因子,与细胞响应各种外界胁迫相关^[1]。在通常的生长条件下,细菌一般使用含有第一类 σ 因子的 RNA 聚合酶来维系持家基因的转录。然而,当各种理化因素胁迫或是某种生长需要以各种信号形式出现时,其它几类 σ 因子会以各种方式被诱导或激活。有些 σ 因子会利用抗因子的降解或构象改变来调控 σ 因子的活性,如大肠杆菌中的 σ^E 以及结核分枝杆菌中的 σ^H 。缺乏抗因子的 σ 因子可以切割 C 段或 N 段的具有活性抑制功能的结构域,从而形成一个成熟的 σ 因子。双组分系统在直接感受胁迫信号之后能够对特定 σ 因子

进行转录或蛋白水平的调节。小 mRNA 也会参与部分 σ 因子的诱导表达,例如 3 种小的非编码 RNA 可使大肠杆菌 σ^S 的 RBS (Ribosome binding site)位点从抑制结构中暴露出来。总之,在胁迫信号存在下以各种途径激活的 σ 因子将会与第一类 σ 因子抢夺核心酶,随后引导核心酶开启一系列基因的表达,从而应对细菌的生长要求和环境胁迫。相比第一类,这些 σ 因子对于菌体在宽松环境下的培养并不十分重要,即便被敲除,菌体依然保持生长(生长可能会受到一定影响,但影响有限),因此这类 σ 因子被称为选择性(Alternative) σ 因子^[2]。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种重要的革兰氏阳性非病原土壤微生物,也是氨基酸合成的重要菌株之一。21 世纪初,主要的谷氨酸棒杆菌生产菌种基因组序列得到注释,其中包含编码 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)的 7 种 σ 因子亚基的基因 *sigA*、*sigB*、*sigC*、*sigD*、*sigE*、*sigH* 和 *sigM*。这 7 个 σ 因子全部属于 σ^{70} 家族,并且其命名源于亲缘关系较近的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)^[3],除 σ^A 外,其余 6 种属于选择性 σ 因子,其主要功能和启动子结合区保守序列见表 1。

近年来随着分子生物学技术的发展,通过基因芯片、转录组测序、ChIP-chip 等手段找出了大量由这些 σ 因子直接/间接控制的基因,并且利用引物延伸分析以及 RACE-PCR 等技术对这些受调控基因的转录起始位点和启动子结合区保守序列进行了鉴定。本文在前人研究基础上总结了谷氨酸棒杆菌中选择性 σ 因子的功能和调控机制,以期能够更好地理解谷氨酸棒杆菌在适应外界变化时信息流从外界环境到基因再到蛋白的调控过程。同时讨论了选择性 σ 因子组学研究中培养条件、实验组、取样时间的选择,探讨了选择性 σ 因子在实际应用中的价值及未来需要深入研究的方向,期望为谷氨酸棒

表 1 谷氨酸棒杆菌中的选择性 σ 因子
Table 1 The alternative σ factors of *C. glutamicum*

σ 因子 σ factor	编码基因 Coding gene	类别 Type	主要功能 Primary function	结合基因的-35 区保守序列 Consensus sequence of -35 region in binding genes	结合基因的-10 区保守序列 Consensus sequence of -10 region in binding genes
σ^B	<i>sigB</i>	primay-like	应答冷、热、酸胁迫调控指数期向稳定期转换调控糖代谢	数据不足	TA(A/C)AATTG(A/G)
σ^H	<i>sigH</i>	ECF	应答冷、热、酸、氧化胁迫调控其他 σ 因子	(G/T)GGAA(C/T)(A/T)	(C/T)GTT(G/A)(A/T)(A/T)
σ^M	<i>sigM</i>	ECF	应答热、氧化胁迫	GGAAT	GTTG
σ^E	<i>sigE</i>	ECF	应答热、表面胁迫	尚无报道	尚无报道
σ^C	<i>sigC</i>	ECF	尚无报道	尚无报道	尚无报道
σ^D	<i>sigD</i>	ECF	应答微氧胁迫	尚无报道	尚无报道

杆菌调控网络的进一步完善以及选择性 σ 因子研究的规范化提供一些参考。

1 谷氨酸棒杆菌中主要的选择性 σ 因子

1.1 σ^B

σ^B 不属于 ECF σ 因子,但却会在菌体对外界胁迫做出应答的过程中起调节作用。在早期的一些有关谷氨酸棒杆菌 σ 因子的报道中证实了 *sigB* 会被酸、乙醇、冷、热等胁迫诱导, *sigB* 敲除菌株对这些胁迫的敏感性会增加^[4-6]。此外,作者在分析 0、30%、50% 三种溶氧水平下谷氨酸棒杆菌发酵样品转录组测序数据时,发现 *sigB* 在 0 溶氧水平下表达水平明显高于 30% 和 50% 溶氧水平(该转录组数据已提交到 NCBI GEO 数据库, Accession number GSE77502)。同时,与 Ehira 的报道相对应,一些参与碳代谢途径中的关键基因的表达随之提高,如糖酵解途径中主要的限速酶丙酮酸激酶编码基因 NCgl2008、乳酸脱氢酶编码基因 NCgl2810、乙醛酸途径中的苹果酸合酶编码基因 NCgl2247 等^[7]。说明了 σ^B 有助于提高菌体在低溶氧胁迫时的糖代谢速率及有机酸生成^[8]。

sigB 的 mRNA 表达量受谷氨酸棒杆菌培养阶段的影响。当菌体培养至接近稳定期时,生长条件不再像指数期一般优越,此时 σ^B 的调控有助于菌体从高速生长中脱离。*sigB* 的表达量在转换期(指数末期和稳定前期之间的一段时间)达到最高,进入稳定

期一段时间后逐步降低^[9]。

较之指数期, σ^B 在转换期的作用更大一些。生长处于指数期的 *sigB* 敲除菌株与野生型菌株对比进行表达谱分析未能找出差异表达基因,而在转换期的对比中却找出了一系列由 σ^B 直接或间接调控的基因^[9]。这些基因涵盖范围很广,并且和大肠杆菌 σ^S 的调控基因功能相似,如参与碳代谢、氨基酸代谢、对各类胁迫的防御、膜加工、维生素的合成以及转录和翻译等^[9]。其中一些基因对于维持菌体在稳定期的生长起重要作用,如催化四氢叶酸转甲基到 dUMP 形成 dTMP 的转移酶编码基因 *thyX*, 若将 *thyX* 敲除,则菌体在进入稳定期后很快就会衰亡。 σ^B 控制着 *thyX* 的表达水平,敲除 *sigB* 会导致 *thyX* 基因下调。因此相比野生型,敲除 *sigB* 会导致菌体生长状况变差^[10]。

不可忽略的是,尽管 σ^B 在转换期扮演了重要角色,指数期间的 σ^B 也并非全然无用。例如 σ^B 在指数期可以和 σ^A 相互配合,协同控制一系列与糖代谢、有机酸合成相关的持家基因^[8]。 σ^B 与 σ^A 所识别的启动子-10 保守区域难以被区分开^[3],这使得二者的调控基因有所重叠:原本一些基因的表达在野生型中与 *sigB* 的表达相关,而 *sigB* 被敲除之后却表现出了与 *sigA* 的关联性^[9]。而且 *sigA* 在转换期的表达与 *sigB* 密切相关,转换期 *sigB* 的大量表达导致更多的 σ^B 与 σ^A 竞争核心酶,携带 σ^A 的全酶减少,

而 *sigA* 又需要被 σ^A 自调控, 因此转换期 *sigA* 的表达下降。在 *sigB* 敲除菌株中, 不存在 σ^B 与 σ^A 的竞争, 于是 *sigA* 在转换期的表达模式与野生型中的 *sigB* 相似。

1.2 σ^H

σ^H 是一个总胁迫响应 σ 因子。谷氨酸棒杆菌可以通过 σ^H 调控 Clp 蛋白酶、分子伴侣 GroEL1/GroEL2 等系统以及一系列转录调控因子如 HrcA、HspR、ClgR、SufR 等来应对诸如冷、热、酸及氧化胁迫^[11-15]。同时, σ^A 、 σ^B 、 σ^M 均在不同程度上受 σ^H 控制, 可见 σ^H 处于 σ 因子与胁迫相关调控网络的中心^[16-17]。

值得一提的是, σ^H 与细胞内抗氧化系统之间的关系在谷氨酸棒杆菌中也逐渐明确。它参与了分枝硫醇的再生(*mca*、*mcr*)及其相关的抗氧化过程(*msrA*、*mpx*), 还与硫氧还平衡系统(*trxB*、*trxB1*、*trxC*)有关^[18-20]。同时, σ^H 可以上调磷酸戊糖途径的一些酶编码基因如 *tal-zwf-opcA-devB* 操纵子的表达, 提高还原型辅酶 II (NADPH) 和五磷酸核糖的生成。两者均与氧化还原酶系统密切相关, 其中 NADPH 为硫氧还蛋白系统提供还原力, 而五磷酸核糖为一些氧化还原酶系统提供核黄素辅因子^[17]。此外, σ^H 还能通过控制硫辛酸合成酶 LipA 增加抗氧化辅因子硫辛酸的合成, 并且与铁硫簇的装配、形成以及对其它蛋白质结合有关。铁硫簇是重要的辅因子, 它能赋予各种酶传递电子的能力。但是铁硫簇对氧化胁迫非常敏感, 在通常的好氧培养下, 一些含有铁硫簇的酶耗损较大。当铁硫簇被二硫化物破坏, σ^H 可通过对 *suf* 操纵子等生物合成基因的调控使铁硫簇重新聚集^[13,17,21]。

在翻译水平上, σ^H 及其在放线菌中的直系同源 σ 因子大多遵循典型的抗 σ 因子构象变化调控^[21-22]: 在缺乏刺激的情况下, 抗 σ 因子直接与同源选择性 σ 因子结合从而抑制其活性; 当有刺激信号或效应物出现时, 抗 σ 因子构象发生改变, 于是结合的 σ 因子被释放, 并且恢复活性。谷氨酸棒杆菌中的 σ^H 抗因子 RshA 与结核分枝杆菌中的 RshA

以及天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中控制 σ^R 的 RsrA 都含有几个半胱氨酸残基, 这些保守半胱氨酸残基中的巯基通常在锌离子的帮助下保持还原态, 并且能够感受环境中的氧化还原水平。还原态下, 抗因子 RshA 可与 σ^H 结合使其无法作为转录因子起始其他基因的转录。当环境中氧化胁迫因素增加, RshA 的构象将借由这些巯基的氧化发生变化, 于是 σ^H 被释放。 σ^H 由此开始行使其职能, 介导如前所述的抗氧化系统相关基因上调, 从而维持菌体内部的氧还原水平, 并且能够在外界氧化胁迫水平降低之后还原抗 σ 因子 RshA 中的二硫键, 于是 RshA 重获活性, 再度结合并抑制 σ^H ^[23]。

转录水平上 *sigH* 的表达调控较为复杂。棒杆菌中 *sigH-rshA* 保守地构成一个操纵子, 谷氨酸棒杆菌的 *sigH-rshA* 操纵子上游包含 4 个依赖 σ^A 的启动子以及一个 SOS box^[21]。为使操纵子的转录被更加精确的调控, 4 个启动子相互协同, 同时一些其它的调节方式也参与其中: 首先, 如前所述, σ^B 和 σ^A 对相同启动子的亲和性不同, *sigH* 上游的 σ^A 依赖启动子可能也会被 σ^B 识别, 利用 σ^B 和 σ^A 的竞争效应可使 *sigH* 在特定情况下被诱导, *sigH* 从稳定期开始的大量表达可能与此相关^[24]。其次, 在相关胁迫存在时, DNA 损伤因素的产生可解除结合在 *sigH* 上游第 4 个启动子-10 区的 LexA 抑制物, 从而释放这个启动子的活性, 随后一些 DNA 损伤修复相关的 σ^H 调控基因被表达^[21]。此外, 早年还有报道称 *sigH* 启动子会被 σ^H 自身诱导, 但在近期的报道中却没有发现这一现象^[17,24]。

谷氨酸棒杆菌的 *rshA* 既可随着 *sigH* 一起转录, 也能作为一个顺反子单独被转录。*rshA* 的翻译起始密码子与 *sigH* 的终止密码子之间只有 2 个碱基的间隔, 其启动子存在于 *sigH* 内, 依赖 σ^H 起始^[21]。除此之外, 对于 *rshA* 表达的调控还有其它方式, 因为 *sigH* 敲除后 *rshA* 启动子依然存在活性, 并且能被热激诱导。热激对 *rshA* 的诱导程度远远高于 *sigH*, 推测诱导所造成的过量 RshA 可在胁迫结束之后通过构象变化迅速抑制 σ^H 的活性, 从而达到及时调控

的目的^[17]。

1.3 σ^M

如前文所述, σ^H 是一个总胁迫响应 σ 因子, 而 σ^M 作为 σ^H 所调控的级联网络的一个环节分管一些与氧化胁迫和温度胁迫相关的基因^[16]。*sigM* 会随着 *sigH* 上调而上调, 并且 *sigM* 敲除突变体表现出对冷、热和二硫化物胁迫的敏感性。与其它几种 ECF 类 σ 因子不同, 谷氨酸棒杆菌中的 σ^M 与结核分枝杆菌的 σ^M 同源性较低, 但基因座上 *sigM* 在两种菌内都紧邻 *trxB*、*trxC*。这两个基因分别编码硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶, 直接参与胞内氧化还原平衡的调节。

sigM 的转录由 σ^H 开启, 这使得通过组学手段找出的大部分 σ^M 调控基因都与 σ^H 相关。例如参与氧化胁迫应激的 *trxB*、*trxC* 和 *suf* 操纵子, 参与热胁迫的 *groES*、*groEL*、*clpB*、*hspR* 等^[13,16,21]。然而一个 σ^H/σ^M 调控基因究竟是通过 σ^H 介导被 σ^M 开启还是由 σ^H 和 σ^M 共同调控, 需要进一步验证, 因为基因芯片只能反映调控的最终结果, 无法判断间接调控的情况。此外, σ^M 与 σ^H 所识别的启动子保守序列基本相同, 因此可能会出现两者协同或替代开启同一个基因转录的情况。当然, 也有其它调控方式参与的可能性, 此时情况更加复杂。例如在热激条件下, 一些 σ^M 调控基因如 *clpB*、*sufR* 在 *sigM* 突变株中的表达量会变得与野生型相仿甚至更高^[13]。

1.4 σ^E

谷氨酸棒杆菌的 σ^E 在 ECF finder (<http://ecf.g2l.bio.uni-goettingen.de:8080/ECFinder>) 数据库中的比对结果表明, 其所属的第 14 类 ECF σ 因子普遍调控一种甲基转移酶的生成, 这种酶与细胞壁结构的修饰相关, 可以提高对外界环境因素的抵抗能力。在对谷氨酸棒杆菌 *sigE* 进行的研究中发现编码这种酶的基因的确被 σ^E 所调控。因此, *sigE* 的敲除突变株细胞壁通透性发生改变, 并且展现出了对去垢剂、溶菌酶和多种抗生素的敏感性。另外, σ^E 与模式生物中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 σ^W 和大肠杆菌的 σ^E 有一定相似性, 以二者为代表的 ECF σ 因

子群都与抗菌物质的合成及表面胁迫应激有关^[25-26]。

谷氨酸棒杆菌中的 σ^E 可能代表了 σ^H 以外另一大类的 σ 因子调控。首先, 与 *sigH-rshA* 操纵子类似, *sigE* 与编码抗 σ^E 因子的 *cseE* 也构成一个操纵子, 并且 *cseE* 过表达与 *sigE* 敲除菌株都表现出对热胁迫和 SDS 的敏感性^[26]。尽管 CseE 蛋白中 4 个保守半胱氨酸残基的存在表明了其可能是以构象变化的方式调控 σ^E 活性, 但枯草芽孢杆菌的 σ^W 和大肠杆菌的 σ^E 相应抗因子都是通过蛋白降解的方式进行调控, 因此谷氨酸棒杆菌 σ^E 的激活方式仍然有待确认^[27]。其次, 尽管直接对 *sigE* 的研究较少, *sigE* 却是较为活跃地出现在了各种胁迫造成的差异表达基因谱中, 如: 氮源的饥饿胁迫^[28]、鸟苷四磷酸(ppGpp)合成酶编码基因 *rel* 的敲除^[29]、长时间的酸胁迫^[6]。在过氧化氢耐受突变株中, 其它几种 ECF σ 因子编码基因表达量都提高, 唯独 *sigE* 降低^[30]。在不同溶氧条件下发酵中菌体生长稳定期 *sigE* 表达量也有所不同, 特别是高溶氧条件下 *sigE* 表达水平显著高于低溶氧条件 (NCBI GEO accession number GSE77502)。

1.5 σ^C 和 σ^D

谷氨酸棒杆菌的 σ^C 和 σ^D 目前为止尚未被研究。在结核分枝杆菌中 σ^C 是影响毒力和致病性的重要调节因子, σ^D 调控一些与饥饿反应和脂代谢相关的基因, 同时也和菌体的侵染能力有关。谷氨酸棒杆菌的 σ^D 与前者的 σ^D 在功能上似乎有一定的相关性, 因为二者同为 *rel* 基因的调控基因^[29]。Rel 蛋白可以合成严谨反应的信号分子 ppGpp, 使菌体能够在长期营养限制中生存下来。除此之外, 还发现 σ^D 有助于维持微氧条件下菌体的生长, 并且相对于其它 σ 因子, *sigD* 的过表达更容易造成菌体生长的停滞^[31-32]。

2 对选择性 σ 因子研究中一些问题的探讨

在研究选择性 σ 因子对菌体生长产生的影响时, 通常的做法是将 σ 因子基因敲除菌株与野生型菌株做对比测定菌体的生长曲线, 但有时在不同的

培养条件下得到的结果会截然不同。例如在对比 *sigB* 的敲除菌株与野生型菌株的生长曲线时,发酵罐和摇瓶的结果就相差甚远^[9,33]。发酵罐中很多影响因素如温度、溶氧、pH 都可以得到较为严格的控制,尽可能避免了特定的胁迫环境,因此在发酵罐中, *sigB* 的敲除与否对生长状况影响较小。在摇瓶中的培养缺乏控制,存在各类胁迫,而野生型中的 σ^B 有助于菌体在胁迫环境下生长。一旦将 *sigB* 敲除,突变株无法通过 σ^B 抵御胁迫,因此摇瓶中的胁迫环境使其生长水平下降。类似的问题也在对 σ^E 的研究中出现^[6,26]: 同样是在摇瓶中进行培养,培养条件的变化却能使 *sigE* 的敲除对菌体的生长产生不一致的影响。因此要更多地注意对培养条件的设计和预实验,最好能预先判定某种 σ 因子与何种胁迫相关。若是在摇瓶培养中产生的胁迫对 σ 因子产生的影响较为显著,那么和发酵罐中的结果不符便在预期之内。

在运用组学技术对选择性 σ 因子进行研究时,实验组的选择需要进行一番考量,因为选用不同的实验组最终找出的调控基因数量可能会差别很大。对于含有抗 σ 因子的选择性 σ 因子来说,对照组一般设置为野生型菌株即可,而实验组(以 σ^H 为例)可以是 *sigH* 敲除突变株、*sigH* 过表达和 *rshA* 敲除突变株。不同的实验组有不同的优点和缺点,直接敲除 σ 因子编码基因作为实验组找出的基因数量较少。一方面是因为直接敲除 σ 因子所产生的细胞内转录信号变化较弱。另一方面,由于一些基因的表达调控方式较为复杂,仅敲除一个 σ 因子对基因表达产生的影响可能会被其它方式回补,因此难以检测到差异表达。当 σ 因子过表达时,所传递的信号强度倍增,筛选出来的基因理应会更多。但一些系统性的影响可能会随着表达系统的引入而出现,例如细胞可能应激产生蛋白酶。至于对编码 σ 抗因子的基因进行敲除,不但能保证信号强度基本满足组学技术的分辨率要求,而且可以避免 σ 因子过表达带来的干扰。然而,并不是所有的选择性 σ 因子都有抗 σ 因子。

特定胁迫的引入在某些情况下也有助于 σ 因子调控基因的筛选。一种胁迫可能同时引发多个 σ 因子的调控,甚至菌体内的其它调节系统也会参与进来。因此一些基因仅仅依靠某一种选择性 σ 因子并不能被显著地提高表达,有必要引入特定的胁迫使其它调节方式(其它 σ 因子、转录调节因子等)和 σ 因子(在胁迫中 σ 因子表达量可能也会被诱导增强)共同作用。以 *dnaK* 操纵子的双重调节为例^[12,13], *dnaK* 的 2 个启动子分别被 σ^A 和 σ^H 识别。在没有热胁迫的情况下, HspR 可以结合在 *dnaK* 启动子的 HAIR 结构上使 σ^A 无法起始转录。因此在没有胁迫时取样进行的基因芯片表达谱分析中,由于没有 σ^A 的参与, *dnaK* 的表达在 *sigH* 敲除菌株和野生型菌株之间只有微弱的差异。当热胁迫存在时, HspR 蛋白从 HAIR 上释放, σ^A 与 σ^H 协同开启 *dnaK* 的转录, *dnaK* 的表达差异便较为明显。因此在做表达谱分析时,为了尽可能多地找出选择性 σ 因子调控的基因,可以适当引入一些特定的胁迫背景。

另外,鉴于某些选择性 σ 因子在不同生长阶段对菌体的重要性不同,不能简单地将指数期统一作为组学分析的取样时间点。如前文所述, *sigB* 在转换期发挥的作用较大,相比指数期, *sigB* 敲除菌株在转换期找出了较多的差异表达基因^[9]。之所以出现这种情况,一方面是因为指数期 *sigB* 的表达量并不高,菌体生长到转换期时 *sigB* 才会大量表达。另一方面,与“引入特定胁迫”在本质上是一样的,在转换期一些调控因素会参与进来与 σ^B 协同激活部分基因的表达。因此,为了在选择性 σ 因子发挥最大作用的时期进行取样,可以通过一些预实验,例如将选择性 σ 因子自身的启动子片段连入报告基因,从而检测其在不同培养阶段的活性变化。

3 选择性 σ 因子的应用

谷氨酸棒杆菌是重要的工业微生物,其因无孢子产生、无内毒素、不分泌胞外蛋白酶等优点而被广泛应用于代谢工程、重组蛋白表达等方面^[34]。从选择性 σ 因子的角度入手可对其生产菌株进行多方

位的改造。

许多代谢产物的积累是细胞在复杂环境条件下进行的适应性调整的结果,选择性 σ 因子作为细胞应答外界胁迫的重要手段之一,其调控作用必然涉及到这些代谢产物的合成和分泌途径。因此,对选择性 σ 因子调控网络的研究将有助于理性地对细胞进行改造而获得目的产物。除了如前所述的 σ^B 可以提高有机酸和糖代谢产物的积累以外,过表达 *sigH* 或是敲除 *rshA* 均可提高核黄素的分泌,这意味着 σ^H 可以上调谷氨酸棒杆菌核黄素合成途径相关基因的表达^[17,31]。进一步,为了得到应用广泛的食物添加剂 FMN (Flavin mononucleotide),将催化核黄素成为 FMN 的酶 RibF 与 σ^H 同时过表达后,FMN 积累,这为 FMN 的生物制造提供了线索^[31]。此外,敲除 *sigB* 有助于提高外源蛋白表达量^[35]。利用信号肽 CgR_0949 在 *sigB* 敲除突变株中表达 GFP (Green fluorescent protein)和淀粉酶,产量均提高了 3 倍以上。然而高表达的情况并不适用于所有的信号肽,只有使用少数与 CgR_0949 相似的信号肽才能获得较明显的提高。

每一种选择性 σ 因子响应各种环境胁迫或生长要求不同,利用 σ^B 在转换期大量表达,并能使相关基因被诱导这一特性, Kim 等对 σ^B 识别的启动子进行改造,并且构建了基于这一启动子的表达载体,使谷氨酸棒杆菌在稳定期自诱导一些蛋白的生产成为可能^[36]。不同基因的启动子含有被不同 σ 因子识别的核心元件。对目的基因的启动子区域进行改造,例如添加或替换部分启动子元件,便能达到调控其活性的目的。

4 总结与展望

对于谷氨酸棒杆菌的 6 种选择性 σ 因子,仅有 σ^B 、 σ^H 和 σ^M 的功能、调控机制、调控基因及识别的启动子保守序列被一定程度认识。 σ^E 虽然已经被证实与表面胁迫有关,但似乎也参与了细胞对其它胁迫(营养、热、酸、溶氧等)的应激过程,需要较为系统的研究。由于谷氨酸棒杆菌不是病原菌,因

此很难将 σ^C 、 σ^D 与分枝结核杆菌中的同源物进行功能上的类比,这两种 σ 因子的功能和调控基因都有待研究。

完善各个选择性 σ 因子的功能谱和调控基因谱,鉴定特异的启动子保守区域是当前需要继续完成的工作。这将有助于进一步挖掘关键基因,并将基因的表达与环境刺激、营养条件、胁迫情况及生长阶段等因素对应起来,从而为定向改造谷氨酸棒杆菌的生产性能提供理论支持。值得注意的是,近年来随着结构生物学的发展,越来越多的选择性 σ 因子的结构及调节模型得到解析^[37]。尽管相关研究往往通过大肠杆菌和枯草芽孢杆菌等模式生物进行,但对于谷氨酸棒杆菌来说也具有相应的研究价值。一方面,谷氨酸棒杆菌与某些病原菌较为接近,因此可将其作为这类病原菌的模式生物,从选择性 σ 因子的结构及其与启动子的结合特异性入手寻找靶点,开发新药^[38]。另一方面,可以直接对选择性 σ 因子进行改造,甚至在基因组中引入异源的 σ 因子以及受其控制的代谢通路^[39]。这在其它微生物中已经有了初步的探索,但要将其转化为现实的生产力,还有很长的路要走。

参 考 文 献

- [1] Feklistov A, Sharon BD, Darst SA, et al. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective[J]. Annual Review of Microbiology, 2014, 68: 357-376
- [2] Österberg S, del Peso-Santos T, Shingler V. Regulation of alternative sigma factor use[J]. Annual Review of Microbiology, 2011, 65: 37-55
- [3] Pátek M, Nešvera J. Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 154(2/3): 101-113
- [4] Oguiza JA, Marcos AT, Martín JF. Transcriptional analysis of the *sigA* and *sigB* genes of *Brevibacterium lactofermentum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 153(1): 111-117
- [5] Halgasova N, Bukovska G, Timko J, et al. Cloning and transcriptional characterization of two sigma factor genes, *sigA* and *sigB*, from *Brevibacterium flavum*[J]. Current Microbiology, 2001, 43(4): 249-254
- [6] Jakob K, Satorhelyi P, Lange C, et al. Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(15): 5582-5590
- [7] Yang YK, Wang F, Sun Y, et al. Effect of different dissolved oxygen concentrations on metabolism in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology China, 2016. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.150975 (in Chinese)
杨艳坤, 王芬, 孙杨, 等. 不同溶氧对谷氨酸棒杆菌代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2016. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.150975

- [8] Ehira S, Shirai T, Teramoto H, et al. Group 2 sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16): 5146-5152
- [9] Larisch C, Nakunst D, Hüser AT, et al. The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 4
- [10] Cho S, Yang S, Rhie H. The gene encoding the alternative thymidylate synthase ThyX is regulated by sigma factor SigB in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 328(2): 157-165
- [11] Engels S, Schweitzer JE, Ludwig C, et al. *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor σ^H [J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(1): 285-302
- [12] Barreiro C, González-Lavado E, Pátek M, et al. Transcriptional analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(14): 4813-4817
- [13] Ehira S, Teramoto H, Inui M, et al. Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(9): 2964-2972
- [14] Barriuso-Iglesias M, Barreiro C, Sola-Landa A, et al. Transcriptional control of the F_0F_1 -ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: sigma H factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values[J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(2): 178-188
- [15] Wang TT, Gao F, Kang YW, et al. Mycothiol peroxidase MPx protects *Corynebacterium glutamicum* against acid stress by scavenging ROS[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1221-1228
- [16] Nakunst D, Larisch C, Hüser AT, et al. The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(13): 4696-4707
- [17] Toyoda K, Teramoto H, Yukawa H, et al. Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor σ^H in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(3): 483-496
- [18] Chi BK, Busche T, Van Laer K, et al. Protein S-mycothiolation functions as redox-switch and thiol protection mechanism in *Corynebacterium glutamicum* under hypochlorite stress[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 20(4): 589-605
- [19] Si MR, Xu YX, Wang TT, et al. Functional characterization of a mycothiol peroxidase in *Corynebacterium glutamicum* that uses both mycoredoxin and thioredoxin reducing systems in the response to oxidative stress[J]. Biochemical Journal, 2015, 469(1): 45-57
- [20] Si MR, Zhang L, Chaudhry MT, et al. *Corynebacterium glutamicum* methionine sulfoxide reductase A uses both mycoredoxin and thioredoxin for regeneration and oxidative stress resistance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(8): 2781-2796
- [21] Busche T, Šilar R, Pičmanová M, et al. Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 445
- [22] Mascher T. Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) σ factors[J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(2): 148-155
- [23] Jung YG, Cho YB, Kim MS, et al. Determinants of redox sensitivity in RsrA, a zinc-containing anti- σ factor for regulating thiol oxidative stress response[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(17): 7586-7597
- [24] Kim TH, Kim HJ, Park JS, et al. Functional analysis of *sigH* expression in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 331(4): 1542-1547
- [25] Staroň A, Sofia HJ, Dietrich S, et al. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(3): 557-581
- [26] Park SD, Youn JW, Kim YJ, et al. *Corynebacterium glutamicum* σ^F is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti- σ factor CseE[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 3): 915-923
- [27] Ho TD, Ellermeier CD. Extra cytoplasmic function σ factor activation[J]. Current Opinion in Microbiology, 2012, 15(2): 182-188
- [28] Silberbach M, Hüser A, Kalinowski J, et al. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 119(4): 357-367
- [29] Brockmann-Gretza O, Kalinowski J. Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in presence and absence of the *rel* gene encoding (p)ppGpp synthase[J]. BMC Genomics, 2006, 7: 230
- [30] Lee JY, Seo J, Kim ES, et al. Adaptive evolution of *Corynebacterium glutamicum* resistant to oxidative stress and its global gene expression profiling[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(5): 709-717
- [31] Taniguchi H, Wendisch VF. Exploring the role of sigma factor gene expression on production by *Corynebacterium glutamicum*: sigma factor H and FMN as example[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 740
- [32] Ikeda M, Baba M, Tsukamoto N, et al. Elucidation of genes relevant to the microaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(12): 2806-2808
- [33] Halgasova N, Bukovska G, Ugoreckova J, et al. The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 216(1): 77-84
- [34] Liu XX, Yang YK, Zhang W, et al. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium Glutamicum*: progress, challenges and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(4): 652-664
- [35] Watanabe K, Teramoto H, Suzuki N, et al. Influence of SigB inactivation on *Corynebacterium glutamicum* protein secretion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(11): 4917-4926
- [36] Kim MJ, Yim SS, Choi JW, et al. Development of a potential stationary-phase specific gene expression system by engineering of SigB-dependent *cg3141* promoter in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(10): 4473-4483
- [37] Campagne S, Allain FH, Vorholt JA. Extra cytoplasmic function sigma factors, recent structural insights into promoter recognition and regulation[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2015, 30: 71-78
- [38] Souza BM, de Paula Castro TL, de Oliveira Carvalho RD, et al. σ^{ECF} factors of gram-positive bacteria: a focus on *Bacillus subtilis* and the CMNR group[J]. Virulence, 2014, 5(5): 587-600
- [39] Rhodius VA, Segall-Shapiro TH, Sharon BD, et al. Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of σ s, anti- σ s, and promoters[J]. Molecular Systems Biology, 2013, 9: 702