

调控子和 σ 因子的级联式调控

——原核生物基因调控的一些新概念

王林发

(华东师范大学生物系, 上海)

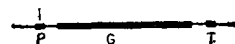
王培之

(中国科技大学生物系, 合肥)

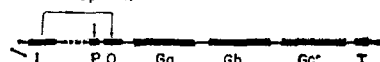
从 Watson 和 Crick 发现 DNA 双螺旋结构至今, 人们对基因本身的结构和组成已有比较深入的了解, 因而, 分子生物学的研究焦点也开始转移到基因调控方面。本文所要介绍和探讨的就是原核生物基因调控方面的一些新进展和新概念, 并将结合自己的研究课题和体会, 把重点放在调控子和 σ 因子的级联式调控方面。图 1 中, 已知的原核生物基因调控单位用模式图^[1]。顺反子(cistron), 现多用作基因的同义词, 是比较早期发现的最简单的调控单位; 操纵子(operon)模型是 Jacob 和 Monod 在研究大肠杆菌中控制乳糖代谢的一组基因时, 首先发现和提出的。之后, 已有大量的操纵子在各种生物中被相继发现和鉴定, 如著名的有色氨酸操纵子, 阿拉伯糖操纵子和组氨酸操纵子等^[2]; 调控子(regulon)则是最近才提出的一个新概念^[3], 它的最大特点是遗传物质结构的不连续性, 即同一调控子中的不同成员可以分布在染色体上的不同部位(见图 1)。

原核生物基因调控主要在转录水平上进行。执行转录功能的主要机构是 RNA 聚合酶(RNA polymerase)。一般来说, 原核生物的 RNA 聚合酶由五个亚基组成^[6], 也就是二个 α 亚基, 一个 β 亚基, 一个 β' 亚基和一个 σ 因子。五个亚基组合在一起的形式, 即 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, 称作“全酶(Holoenzyme)”, 而除去 σ 因子的部分, 即 $\alpha_2\beta\beta'$, 称为“核心酶(Core enzyme)”。 σ 因子的主要功能是帮助核心酶识别特定的启动子(promoter)顺序, 使之准确地结合到转录的起始部位。一旦转录开始, σ 因子就不再起作用了^[6]。

A. 顺反子 (Cistron)



B. 操纵子 (Operon)



C. 调控子 (Regulon)

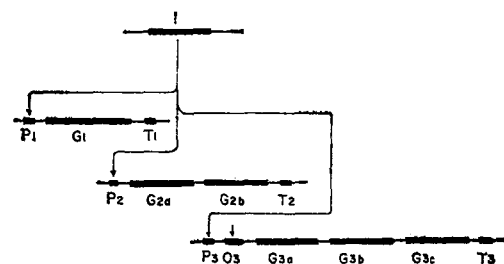


图 1 原核生物基因调控单位模式简图

P: 启动子, G: 结构基因, t: 终止子, I: 调控基因, O: 操纵基因。箭头所指为可能的调控位点。(注: 图中所示的只是各种调控单位的最简单形式。复杂的操纵子中还可能含有衰减子等结构, 在此均未表示。)

调控子和大肠杆菌的热休克反应

目前还很难找到调控子的严格定义。在此, 暂且定义为: 调控子是由调控基因, 及受它(通过其产物)调控而表达的一组相关而不一定相邻的基因所组成的功能单位。

在研究大肠杆菌的热休克反应(Heat Shock Response)现象时, Neidhardt^[4] 和 Yura^[5] 小组分别发现, 把生产在 30℃ 的细菌, 迅速移到 42℃, 培养 5 分钟后, 用 O'Farrell 电泳系统^[7]可以在细菌的提取液中检测到一组新的蛋白质, 当时发现有 13 种, 现已鉴定出 17 种^[8]。他们

称其为“热休克蛋白 (Heat Shock Proteins)”，简称为 hsp。这些蛋白只在热休克的条件下才表达,而不存在于正常生长的细菌中,或存在的量甚微。之后,他们又对其中几个已知功能的蛋白基因,包括编码 RNA 聚合酶 σ 因子的 rpoD 基因^[9],作了染色体上的定位分析。结果发现,这些基因在染色体上的位点是不连续的^[4]。更使他们感到惊奇的是,后来又分离到一个大肠杆菌的突变体,这个突变体即使在热休克条件下,仍不能表达任何一个上述的热休克蛋白^[4]。以后的大量实验揭示,这个突变体中的“突变基因原”编码的是一个正调蛋白 (Positive Regulatory Protein),这个蛋白负责调控一组热休克蛋白基因的表达。所以,他们把这个基因定名为 htpR (R 表示 Regulation)。

最近,Neidhardt 小组已克隆了 htpR 基因,全结构顺序测定结果显示: htpR 的 DNA 顺序^[10]和编码 σ 因子的 rpoD 基因的 DNA 顺序^[11]有很大程度上的同源性(Homology)。美国威斯康星大学的 Gross 研究小组,进一步用离体的实验发现,把提纯的 RNA 聚合酶的核心酶和 htpR 的基因产物重组在一起时,这种离体的全酶能专一性地转录一组编码热休克蛋白的基因^[12],这些基因启动子的 DNA 顺序不同于从大量已知的启动子中归结出来的所谓一致性顺序 (Consensus Sequence),见图 2。他们另命名这些启动子为热休克启动子 (Heat Shock Promoter)。至此,htpR 不论在基因水平,还是在蛋白的功能水平,都类似于 σ 因子。所以, Gross 提议把 htpR 改称为 rpoH (与原已发现的 rpoD 在名称上也保持一致),并命名其产物为 σ^{32} (因其分子量为 32,000 道尔顿左右),原已发现的 σ 因子则称为 σ^{70} (因其分子量为 70,000 道尔顿左右)。

启动子	“-35”	“-10”
σ^{70}	TTGACA	TATAAT
σ^{32}	TTCCCTTGAA	CCCCATTT

图 2 大肠杆菌中已知的两种启动子的“-35”和“-10”区域的 DNA 顺序比较

σ 因子的多样性及其级联式调控作用

RNA 聚合酶“全酶”和“核心酶”的概念,主要起源于对大肠杆菌 RNA 聚合酶的创始性研究^[6]。当时,人们认为原核生物的 RNA 聚合酶仅以一种形式存在。但不久,有几个实验室就在枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 及其噬菌体中发现了多种 σ 因子,并称此现象为 RNA 聚合酶的多样性 (multiplicity)。目前,至少已有五种 σ 因子在枯草杆菌中被发现和纯化,按其分子量的大小,分别称为 σ^{43*} , σ^{37} , σ^{32} , σ^{29} 和 σ^{28} ^[13]。美国戴维斯加州大学的 Doi 教授曾对这些 σ 因子的结构和功能作过全面的论述^[13,14]。另外,还有二个由噬菌体 SPO 1 编码的 σ 因子也已被纯化和鉴定^[15]。(对 SPO1 的转录机制,我们在后面还要详细论述。)值得一提的是,这些 σ 因子所识别的启动子在“-35”和“-10”区域的一致性顺序各不相同,具有很高的专一性,见图 3。这是 σ 因子行使调控作用的一个非常重要方面,也是 RNA 聚合酶多样性的存在前提。

启动子	“-35”	“-10”
σ^{43}	TTGACA	TATAAT
σ^{37}	AGG—TT	GG—ATTG—T
σ^{32}	AAATC	TA—TG—TT—TA
σ^{29}	TT—AAA	CATATT
σ^{28}	CTAAA	CCGATAT
σ^{8p28}	T—AGGAGA—A	TTT—TTT
$\sigma^{8p33-34}$	GGTTAGA	GATATT

图 3 枯草杆菌及其噬菌体中已知的各种启动子的“-35”和“-10”区域的 DNA 顺序比较
图中碱基之间的短划表示在这个位置上的碱基是非一致的。

前面已提到, Gross 等人在大肠杆菌中也发现了第二种 σ 因子,即 σ^{32} ^[9]。最近,美国哈佛大学的一个研究小组,在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中鉴定出两种 σ 因子,按其分子量分别称为 σ^{35} 和 σ^{39} ^[16a]。作者还对不同 σ 因子的生理作用作了推测。和枯草杆菌一样,天蓝色链霉菌也能形成孢子。所以,他们认为,不同 σ 因

* σ^{43} 以前称为 σ^{33} 。最近我们测定了编码这一蛋白的基因的全结构顺序,并根据其氨基酸组成,推算出其实际分子量为 42,828 道尔顿^[21],故改称为 σ^{43} 。

子的交替表达,可能为孢子形成这个分化过程的主要调控环节。另外,天蓝色链霉菌在一定的生长时期内能分泌许多次生代谢物,包括某些抗生素,而这些代谢物在特定时间的表达也许就是由其中某一个 σ 因子负责调控的^[16a]。在研究克氏杆菌(*Klebsiella*)和根瘤菌(*Rhizobium*)的固氮基因时,人们曾发现许多固氮基因的启动子顺序彼此很类似,但均不同于已经发现的原核生物主动启动子的一致性顺序^[16b],所以这些启动子有个专门的名称,叫做 *nif* 启动子(*nif* 为 *nitrogen fixation* 的缩写)。有人推测,负责识别 *nif* 启动子的可能又是一类特殊的 σ 因子。还有,美国加州大学的 Kusto 教授在研究沙门氏菌(*Salmonella*)中一组与含氮化合物代谢有关的基因时,也发现了一个具有 σ 因子活性的蛋白,进一步的纯化和鉴定正在进行之中(个人交流)。因此,我们认为,RNA 聚合酶的多样性在原核生物中具有普遍性。那么,这在基因调控中的实际意义是什么呢?

早在研究枯草杆菌噬菌体 SPO 1 的转录机制时,人们就发现^[15], SPO 1 所编码的基因,根据其表达的顺序,可分为三类:早期基因,中期基因和后期基因。这三类基因的表达,受不同的 σ 因子控制。早期基因由宿主(即枯草杆菌)编码的 σ^{43} 负责转录,而中期和后期基因则分别受噬菌体自己编码的二个 σ 因子所控制(详见图 4)。

与此有关的另一重要的研究课题是枯草杆菌的产孢子过程(Sporulation Process)。枯草杆菌与大肠杆菌不同的一个重要方面是前者能在某些不利的外界条件下,转化为一种休眠状态,即孢子(spore),而一旦条件改善,孢子仍可萌发为正常的营养期细胞(Vegetative Cells)。也许正是这一原始的分化形式,使枯草杆菌成为当今分子生物学中仅次于大肠杆菌的主要研究对象。许多研究小组都已发现,枯草杆菌中已知的五种不同的 σ 因子,在细菌各个不同生长期的表达是不同的^[13]。更为重要的是,有些只出现在某一特定的生长时期。如 σ^{28} 主要存在于营养期,而 σ^{29} 只在孢子期出现,所以又称为

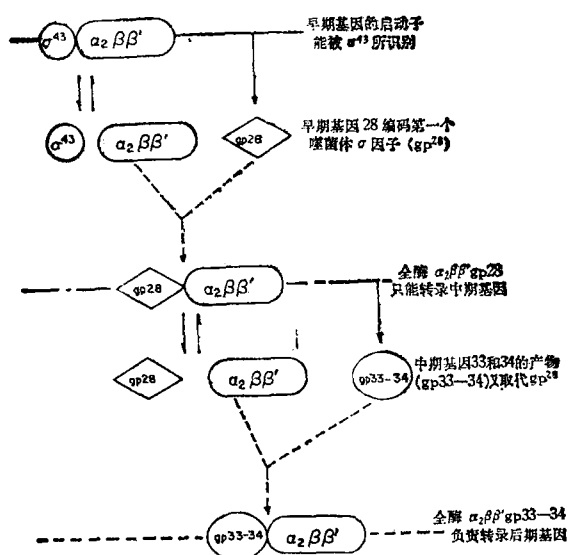


图 4 枯草杆菌噬菌体 SPO1 的转录 σ 因子级联式调控的模型

——早期基因; ----中期基因;后期基因。

孢子专一性 σ 因子^[13]。

基于上述这些重要的发现,美国哈佛大学的 Losick 和 Pero 教授提出了一个称为“ σ 因子级联”(Cascades of Sigma factors)的基因调控模型^[17]。其要点是,细菌或噬菌体在不同的生长时期,或不同的生长环境中,所表达的基因种类和(或)程度各不相同,而 σ 因子的级联式交替,则是实现这种专一性调控的重要分子基础之一。今天,这一模型又得到了大肠杆菌热休克反应系统(Heat Shock Response System)的支持^[8-10]。

当然,真正的调控机制也许远比上述的模型复杂。如我们在研究枯草杆菌不同的启动子时,就发现了重叠启动子(overlapping promoters)的复杂形式,即一个基因同时含有受不同 σ 因子(σ^{37} 和 σ^{43})识别的二个启动子,而且还互相重叠^[18]。这一重要发现,不仅在新的高度上对上述模型作了进一步的证明和修饰,而且也利用这些启动子组合在枯草杆菌中表达异源基因的遗传工程提供了理论依据。

调控子和 σ 因子的内在联系

现在再进一步介绍一个由研究枯草杆菌

的 σ^{28} , 到发现其控制着一个未知功能的调控子的过程。

1981年, 美国伯克莱加州大学的 Chamberlin 研究小组, 首先发现枯草杆菌 RNA 聚合酶的 σ^{28} 因子。但在当时, 对受其调控的基因的结构和功能并不了解, 只知道 σ^{28} 仅存在于营养期细胞中, 而不在孢子期出现^[13]。最近, 我们在研究枯草杆菌中编码 σ^{43} 的基因 rpoD 时, 发现此基因至少部分地受 σ^{28} 调节^[19]。这是至今为止第一个已知的、受 σ^{28} 识别的基因。与此同时, Chamberlin 小组又获二个重大发现。第一, 他们用最新的 DNA 重组技术和启动子探针质粒 (Promoter probe plasmid) 测出: 枯草杆菌染色体上分散分布着约 20 个左右受 σ^{28} 调控的基因^[20]; 第二, 离体实验证明: 纯化的大肠杆菌 RNA 聚合酶的核心酶和枯草杆菌的 σ^{28} 重组而成的“杂交全酶” (Hybrid Holoenzyme) 能识别、并转录大肠杆菌的热休克启动子^[20]。这马上使人联想到: 枯草杆菌的 σ^{28} 和受基调控的 20 个左右基因一起, 可能也是一个类似于大肠杆菌热休克反应系统的调控子。

我们上述的实验结果也支持这一推测^[19]。另外, 我们曾提到, 大肠杆菌热休克调控子中, 已经鉴定的重要成员之一是编码大肠杆菌 σ^{70} 的 rpoD 基因。而以前大量的实验证明: 枯草杆菌的 σ^{43} 无论在结构上还是功能上, 都与大肠杆菌的 σ^{70} 有很大的相似性^[13]。最近, 我们的 DNA 顺序分析结果又在基因水平上证明了这两个基因的同源性^[21]。因此, 我们觉得, 枯草杆菌的 rpoD 基因, 完全有可能就是 Chamberlin 推测的 σ^{28} 调控子中的第一个成员。因为, Chamberlin 小组的实验显示: 这两个调控子的调控因子, 即大肠杆菌的 σ^{32} 和枯草杆菌的 σ^{28} 在功能上有很大的相似性^[20]; 而我们的实验证明: 两个调控子中的重要成员, 即大肠杆菌的 σ^{70} 和枯草杆菌的 σ^{43} 在基因组织和蛋白功能上都有惊人的相似性^[19, 21]。

尽管上述的推测还需要更多的实验证明, 但调控子和 σ 因子之间的内在联系已是显而易见的了。至少在大肠杆菌的热休克调控子中,

rpoH 的基因产物 σ^{32} , 已被清楚地证明为一个必要的调控因子^[8, 9]。

小结与展望

综上所述, 从 σ 因子多样性的发现, σ 因子级联式调控模型的提出, 到调控子概念的建立, 无疑是现代分子生物学有关基因调控研究的又一个飞跃。调控子是高于顺反子和操纵子的又一种新的调控单位, 而 σ 因子的级联式调控则是这种调控形式的分子基础之一。当然, 有关这方面的研究仅仅是开始, 还有许多问题有待于我们去解答。其中, 我们认为两个比较突出的问题是: (1) 是否所有调控子的调控因子都是 RNA 聚合酶的 σ 因子? (2) 原核生物中, 还有比调控子更高层次的转录水平的调控单位吗?

我们暂且把第二个问题留给读者。在此, 仅对第一个问题提出我们的初步解答。首先, 我们的回答是否定的。就象人们起先认为 RNA 聚合酶只有一种 σ 因子一样, 实际上, 随着研究的深入, 发现情况要复杂得多。直到今天, 我们对原核生物 RNA 聚合酶的了解还不能说是完全的。在纯化枯草杆菌的 RNA 聚合酶的过程中, Doi 等研究小组就曾发现过其他几种微量的蛋白因子^[13]。较引人注目的有 δ 因子。虽然这些因子的功能至今未予阐明, 但我们相信, 在复杂的基因表达过程中, 肯定还有类似这些附加因子在起作用。就调控子而言, 至今人们只证明 σ 因子是必需的, 但尚未证明是重要的。由此, 我们不妨作出这样的推测: 一个 σ 因子 (或类 σ 因子) 可以负责一组功能上相近或相关的调控子的表达 (如抗热调控子和抗冷调控子), 但特定调控子的表达, 还需要一个, 甚至多个, 更专一的附加因子的参加, 如 δ 因子。这个因子可以是一个只有在特定环境或生长期才结合到 RNA 聚合酶上的因子, 也可以是 RNA 聚合酶的正常组成部分 (由于极其微量或与核心酶亲和力不很大而难以纯化)。因此, 原核生物 RNA 聚合酶真正的“全酶”结构还有待于进一步阐明, 而这种“全酶”的阐明, 必会促进人们对原核生物转录水平基因调控的进一步了解。

脂质过氧化对细胞与机体的作用

曹 锡 清

(中国协和医科大学, 北京)

脂质过氧化作用是指发生在饱和脂肪酸共价键上的一系列自由基反应^[1-4]。近几年来, 关于脂质过氧化作用的研究涉及面相当广, 包括某些疾病的病理过程如肿瘤、化学中毒、感染、炎症反应、自身免疫病、辐射损伤及心血管系统疾病等以及衰老、吞噬杀菌等生理过程。人们试图从分子水平探讨这些过程的机理。本文将要讨论脂质过氧化物的产生、对机体的作用、生物体抗氧化作用, 及其与衰老、细胞损伤和某些疾病的关系。

一、脂质过氧化的基本概念

机体内存在大量的不饱和脂肪酸, 它们极易受到过氧化作用的损伤, 产生有细胞毒性的

脂质过氧化物^[4,5]。1956 年 Harman^[6] 首先提出自由基学说: 多不饱和脂肪酸 (PUFA) 在自由基和其它一些氧化引发剂 (如羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 、过氧化氢 H_2O_2 或单线态氧 $^1\text{O}_2$) 作用下生成自由基中间物 $\text{L}\cdot$, 然后与 O_2 反应形成 $\text{LOO}\cdot$ 及 LOOH 。它们一方面自发分解形成更多自由基, 攻击其它双键, 产生更多的脂质过氧化自由基, 并依次传递下去成自动分解的链式反应; 另一方面, 铁、铜等过渡族金属离子可能是 PUFA “自动”氧化的起动力, 而且这些金属的复合物还能特异高效地催化脂氢过氧化物的分解, 引起自由基链锁反应 (图 1)。脂质过氧化产生的自由基可通过相互碰撞而猝灭, 也可以与生物体内的一些天然的自由基清除剂或抗氧化剂

参 考 文 献

- [1] Lewin, B., *Gene Expression*, Vol. 1, pp. 229—410, John Wiley and Sons, New York, 1974.
- [2] Miller, J. H., and Renbikoff, W. S.: *The Operons*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1978.
- [3] Lewin, B.: *Genes* pp. 236—257, John Wiley and Sons, New York, 1983.
- [4] Neidhardt, F. C., and Van Bogelen, R. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 894—900, 1981.
- [5] Yamamori, T., and Yura, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 860—864, 1982.
- [6] Chamberlin, M.: In *RNA Polymerase* (Losick, R., and Chamberlin, M. eds.), pp. 17—68, Cold Spring Harbor Laboratory, 1978.
- [7] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007—4021, 1975.
- [8] Neidhardt, F. C., et al.: *Ann. Rev. Genet.*, **18**, 295—329, 1984.
- [9] Taylor, W. E., et al.: *Cell*, **38**, 371—381, 1984.
- [10] Landick, R., et al.: *Cell*, **38**, 175—182, 1984.
- [11] Burton, Z., et al.: *Nucl. Acids. Res.*, **9**, 2889—2903, 1981.
- [12] Grossman, A. D., et al.: *Cell*, **38**, 382—390, 1984.
- [13] Doi, R. H.: In *The Molecular Biology of Bacilli* (Dubnau, D. A., ed.), Vol. 1, pp. 72—110, Academic Press, New York, 1982.
- [14] Doi, R. H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 772—781, 1983.
- [15] Fox, R., et al.: *J. Mol. Biol.*, **101**, 427—433, 1976.
- [16a] Westpheling, J., et al.: *Nature*, **313**, 22—26, 1985.
- [16b] Travers, A.: *Nature*, **313**, 16—17, 1985.
- [17] Losick, R., and Pero, J.: *Cell*, **25**, 582—584, 1981.
- [18] Wang, P. Z., and Doi, R. H.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 8619—8625, 1984.
- [19] Wang, L. F., et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 3368—3372, 1985.
- [20] Brian, J. F., et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 2038—2041, 1985.
- [21] Gitt, M. A., et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 7178—7185, 1985.

[本文于 1985 年 5 月 22 日收到]