



# 大肠杆菌中转录-翻译耦合的机制\*

沈崇杰 莫日根\*\*

(内蒙古大学生命科学学院, 省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 呼和浩特 010020)

**摘要** 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 等原核生物中, 转录和翻译往往是耦合的, 这种耦合通常表现在转录和翻译的互相调控上, 如转录极性、转录衰减和转录-翻译速率的同步。间接耦合和物理耦合是耦合的两种模式。由警报素 (alarmone)(p)ppGpp 维持的间接耦合可能需要 DksA 和 TufA 蛋白的辅助。物理耦合分为 NusG 或 RfaH 因子介导的耦合和非因子条件下产生的“碰撞”耦合。响应于压力的转录或翻译的变化会引发几种耦合模式间的相互转变。耦合对于基因正常表达是必要的, 其解除将引发转录终止、R 环形成、复制-转录冲突、mRNA 切割等不利的事件。结构生物学的相关技术已经清晰地展示了部分耦合的表达体 (expressome) 的结构细节和特征, 这些技术联合多组学分析方法将提供关于耦合的更深层的见解。重要的是, 对耦合的研究或许会为靶向抗菌药物的开发带来新的思路。

**关键词** 大肠杆菌, 转录-翻译耦合, RNA 聚合酶, 核糖体, 表达体

**中图分类号** Q5, Q7

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0118

基因表达通过转录和翻译两个步骤读取存储在 DNA 中的遗传信息。这两个步骤分别由两个大分子装置执行: RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 和核糖体<sup>[1]</sup>。两者都沿着各自的模板 (DNA 或 mRNA) 移动, 以给出反映模板序列信息的聚合产物 (mRNA 或蛋白质)。在原核生物中, 由于缺乏将染色体 DNA 与细胞溶质物理分隔的核膜, 转录和翻译发生在同一个细胞区室 (细胞质) 中<sup>[2]</sup>, 因此, mRNA 可以在转录时进行翻译。转录和翻译在时空上互相协调的现象称作转录-翻译耦合 (transcription-translation coupling)。

大约六十年前, 有关“原核生物中转录和翻译是耦合的”的观点被首次提出<sup>[3]</sup>。*E. coli* 核质的电子显微图片显示, RNAP 和核糖体之间的联系非常密切: 第一个与延伸中的 mRNA 链结合的核糖体通常紧邻 DNA, 有时看起来是与 RNAP 直接接触<sup>[4]</sup>, 这表明细菌中 RNAP 的转录和尾随核糖体 (第一个结合到转录本并执行翻译的核糖体, 又称先导核糖体) 的翻译可能是同时进行的。通过测量转录和翻译的延伸速率, 研究者获得了 RNAP 和尾随核糖体功能上耦合的直接证据<sup>[5-7]</sup>。最近, 以单粒子冷冻电子显微技术 (cryo-electron microscopy,

cryo-EM) 为代表的结构生物学技术被用于阐明耦合的细菌 RNAP 和核糖体复合体 (“表达体”) 的结构细节, 其主要揭示了转录因子 NusG 和/或 NusA 将 RNAP 与核糖体物理连接的作用<sup>[8-9]</sup>。

虽然翻译和转录速率在不同的生长条件下有所不同, 但这两者间始终保持协调<sup>[5-7]</sup>, 说明平衡的转录-翻译耦合机制对于细胞的正常功能不可或缺。耦合的解除所导致的多种冲突, 将对基因表达和细胞活力产生负面影响。结合本实验室的最新研究结果, 本文重点综述了 *E. coli* 中转录-翻译耦合的表现形式、结构细节、机制及意义, 并对耦合的研究内容、方法及其在抗生素治疗领域的应用前景进行展望。

## 1 转录-翻译耦合的表现形式

### 1.1 转录极性

在 *E. coli* 中, 大约 20% 的稳态转录终止事件由转录终止因子 Rho 介导<sup>[10]</sup>。Rho 介导的转录终止需

\* 国家自然科学基金 (32260233) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 0471-4992435, E-mail: morigenm@hotmail.com

收稿日期: 2023-04-03, 接受日期: 2023-04-13

要一段称为Rho利用 (*Rho utilization*, *rut*) 位点的非结构化且富含胞嘧啶的序列<sup>[11]</sup>。通过紧跟在RNAP之后, mRNA上的尾随核糖体掩盖了基因内的*rut*位点, 因此抑制了Rho的结合, 从而阻碍转录终止。当转录极性发生时, 过早的翻译终止导致核糖体从新生的mRNA上解离, 从而允许转录终止因子Rho沿着新生的RNA一直前进到RNAP; 在RNAP处, Rho诱导转录终止, 停止下游基因在操纵子上的转录; 同样地, 翻译速率的降低导致的RNAP和尾随核糖体之间的距离增加有利于Rho与*rut*位点的结合和Rho介导的过早转录终止 (*premature transcription termination*, PTT) 发生<sup>[12]</sup>。特别地, 反义转录本由于缺乏与翻译的耦合而使它们成为Rho的目标, 进而降低了其对正义链转录单位表达水平的干扰<sup>[13]</sup>。因此, 极性不仅是一种响应压力的资源控制方式, 而且是一种有利于基因表达准确性和稳定性的调控机制。

### 1.2 转录衰减

一些*E. coli*操纵子在转录单元的起始位置附近包含一个称为“前导肽”的短开放阅读框, 其翻译被细胞用作传感器来指示下游基因是否应该被转录或过早终止 (“衰减”)<sup>[14]</sup>。转录衰减最典型的例子是细胞利用色氨酸浓度调节*trp*操纵子的表达。用于色氨酸生物合成的*E. coli*操纵子的前导肽包含两个连续的色氨酸密码子; 色氨酸饥饿将导致翻译操纵子前导序列的第一个核糖体停滞在连续的色氨酸密码子处, 从而促进了抗终止子结构的形成, 继而允许RNAP继续转录*trp*操纵子上的下游基因; 当细胞内色氨酸充足时, 核糖体能够穿过连续的色氨酸密码子并导致转录终止发夹结构的形成, 因而关闭了下游结构基因的表达<sup>[15-16]</sup>。因此, 转录衰减可以通过使转录与翻译相互关联来使基因的表达受到精密且机动的调控。

### 1.3 转录与翻译速率的同步

Vogel等<sup>[6]</sup>通过测量转录和翻译延伸速率表明, 转录和翻译速率总是保持一致, 并且随着生长速度的降低而以同等比例降低。Proshkin等<sup>[7]</sup>同样表明, 在不同的生长条件下, 转录速率和翻译速率完美匹配; 翻译速率的增加或降低导致转录速率发生相同的变化。Iyer等<sup>[5]</sup>在引起转录速率降低的碳饥饿条件下也观察到翻译速率相同程度的降低。总之, 转录和翻译速率的耦合总是非常紧密, 可能存在某种机制介导两者之间的动态协调。

一个转录-翻译物理 (接触) 耦合的模型被用

来解释不同生长条件下的转录与翻译的相关性<sup>[7, 17]</sup>。根据该模型, 尾随核糖体的翻译延伸速率决定转录延伸速率。抗生素或突变引起的翻译减慢会使得RNAP与核糖体之间的距离增大, 从而使RNAP停滞或回溯; 回溯时, RNAP在新生RNA和DNA模板链上向后滑动, 压缩上游新生RNA和模板DNA, 同时将新生RNA的3'端挤出核苷三磷酸 (*nucleoside triphosphate*, NTP) 进入位点; 由于具有能量辅助因子EF-G, 尾随核糖体能够活跃地向前易位并通过物理推动的方式将回溯的RNAP重新激活, 从而使RNA链继续延伸<sup>[7, 17]</sup>。另一项最新的研究深化了这个模型: RNAP在其DNA模板上自发回溯的抑制是通过NusG将尾随核糖体束缚在RNAP上来实现的, 并且NusA参与了束缚的协作<sup>[18]</sup>。停滞的RNAP被尾随核糖体重新激活并运行, RNAP的速度与核糖体的速度因而相互匹配, 即转录速率与翻译速率同步。值得一提的是, 这种协调模式并不一定意味着RNAP·核糖体稳定复合物的形成<sup>[17]</sup>。核糖体对RNAP激活的同时可能会降低其转录精确度<sup>[19]</sup>。因此, 核糖体对RNAP的推动可能是一个短暂的非持续性过程, 即RNAP一旦从回溯状态恢复, 尾随核糖体就不再与其紧密接触。

四磷酸鸟苷和五磷酸鸟苷统称为(p)ppGpp, 是细菌中保守的第二信使。作为一种警报素, (p)ppGpp的合成通常由营养缺乏引发, 以允许细菌在各种不利条件下减缓自身生长<sup>[20]</sup>。(p)ppGpp与转录调控有关, 主要是通过直接与RNAP上的两个特定位点 (一个位于 $\omega$ 亚基和 $\beta'$ 亚基之间的界面, 另一个位于转录因子DksA与 $\beta'$ 次级通道边缘螺旋间的界面) 相互作用, 破坏在某些基因 (如rRNA和tRNA基因) 启动子处形成的短暂开放复合体的稳定性, 从而直接抑制转录启动<sup>[21-22]</sup>。最近的研究发现, 用夫西地酸 (*fusidic acid*) 处理的细胞显示出较慢的翻译延伸速率, 而转录延伸速率没有降低, 并且转录延伸随着(p)ppGpp的积累而减慢<sup>[23]</sup>。此外, 当细胞在导致翻译减缓的氮限制条件下生长时, 需要通过(p)ppGpp介导的转录减缓来协调转录与翻译速率<sup>[5]</sup>。因此, (p)ppGpp可以在没有物理耦合的情况下协调核糖体和RNAP之间的速率。这挑战了把RNAP和核糖体之间直接接触作为一般的协调机制的观点。另一项研究表明, (p)ppGpp能够防止嘌呤核苷酸的过度积累及其对5-磷酸核糖-1焦磷酸 (5-phosphoribosyl-1-diphosphate, PRPP) 合成的抑制; PRPP是嘧啶核苷酸、色氨酸和组氨

酸的前体分子, 其缺失将导致细胞在营养限制条件下的生长显著缺陷<sup>[20]</sup>。因此, 警报素可能还通过抑制嘌呤核苷酸的合成来确保色氨酸和组氨酸的可用性以维持基础翻译, 进而间接协调转录-翻译。综上所述, 当生长有利于高效的翻译延伸时, 物理耦合可能很普遍, 而压力或缓慢的翻译延伸会产生对警报素的依赖性以同步转录和翻译的速率。

## 2 转录-翻译耦合的分子机制

### 2.1 因子介导的物理耦合

#### 2.1.1 NusG (RfaH) 介导的耦合

NusG是细菌RNAP的必要调节因子, 大小为20.5 ku; 凭借其能产生瞬时相互作用的双结构域: N端结构域(NusG-NTD)、C端结构域(NusG-CTD)以及结构域之间的灵活接头, NusG能够与不同的伴侣相互作用<sup>[24]</sup>。NusG同时与核糖体和RNAP的相互作用已经在体内和体外证明<sup>[25]</sup>。NusG-NTD与RNAP结合, 而NusG-CTD可以结合Rho或核糖体蛋白uS10<sup>[26-27]</sup>。NusG-NTD与RNAP的结合可防止RNAP长期停顿或回溯, 从而提高整体转录速率<sup>[25, 27]</sup>。Rho因子与NusG-CTD的结合将使Rho发生有利于其装载到RNA的构象变化, 并同时使Rho因子加载到离RNAP仅一小段距离的新生RNA上, 从而促进Rho依赖性转录终止<sup>[12, 25]</sup>。核糖体蛋白uS10和Rho在NusG-CTD上共享相同的结合界面<sup>[25, 27]</sup>。正常翻译时, 转录与翻译耦合, NusG-CTD与uS10结合, 因此无法与Rho结合; 当翻译完成或受抑制时, 核糖体的释放或停滞将导致NusG-CTD与Rho相互作用并促进Rho依赖的终止<sup>[25-27]</sup>, 因此NusG不仅自身结合RNAP和核糖体, 而且在转录-翻译耦合过程中在RNAP和核糖体之间形成物理联系<sup>[27]</sup>。

NusG在耦合中的作用机制最近已通过NusG耦合的RNAP·70S复合物(NusG耦合表达体)的高分辨率结构得到阐明<sup>[28-29]</sup>。NusG的存在将RNAP束缚在30S头部区域, 以避免RNAP的 $\beta'$ 亚基与由uS3、uS10、NusG和16S rRNA的螺旋33形成的腔之间的冲突<sup>[28]</sup>。NusG与RNAP和核糖体上的uS10结合, 证实了其作为分子桥的预期作用。NusG接头长度在14到30 Å的范围变化以及NusG耦合的表达体呈现的高达30°的动态旋转<sup>[28]</sup>表明, NusG充当介导RNAP-核糖体灵活结合的弹性分子拴链。重要的是, 由于核糖体蛋白uS10与Rho因子竞争NusG-CTD上的重叠位点(其中NusG-CTD

的F165在结合uS10方面发挥了关键作用), RNAP和核糖体通过NusG的耦合抑制了Rho因子的募集, 同时抑制了其介导的转录终止<sup>[10]</sup>。因此, 正在被有效翻译的mRNA能够避免PTT, 而那些没有被有效翻译的mRNA是Rho的目标; 通过这种联系, 基因特异性翻译调节因子可以充当基因特异性转录调节因子<sup>[14]</sup>。

NusG介导的耦合可能会间接增强转录和翻译的相互关联。一方面, NusG桥的位置使得核糖体P位点和RNAP活性位点之间出现的不同长度(38、41、42、44和47 nt)的新生间插mRNA与核糖体蛋白uS3的表面对齐<sup>[28-29]</sup>。预计这会最大限度地减少抑制转录和翻译速率的mRNA二级结构的形成, 从而降低了由翻译抑制等因素引起的耦合解除的可能。另一方面, NusG-CTD和核糖体之间的相互作用增加NusG-NTD和RNAP间的亲和力, 减少NusG-NTD从RNAP解离的频率<sup>[28]</sup>。因此, 在存在尾随核糖体的情况下, RNAP与NusG的结合会更稳定。

NusG的旁系同源物RfaH同样是一个能将RNAP和核糖体桥接的转录因子<sup>[30]</sup>。RfaH和NusG的N端结构域(RfaH-NTD)完全相同, 均与延伸中的RNAP相互作用并减少转录暂停<sup>[31]</sup>。RfaH与NusG在RNAP上共享相同的结合位点, 导致它们以相互竞争的方式与RNAP结合<sup>[32]</sup>。通常情况下, RfaH的C端结构域(RfaH-CTD)折叠成 $\alpha$ 发夹并将RfaH-NTD的RNAP结合位点掩盖<sup>[31]</sup>。RfaH在转录前与非模板DNA中的*ops*序列结合, 这将导致RfaH-CTD和RfaH-NTD的分离, 从而使RfaH-NTD可以与RNAP结合; 同时, RfaH-CTD将采用NusG的全 $\beta$ 折叠结构并允许RfaH在和NusG相同的界面处招募uS10并激活翻译<sup>[31-32]</sup>。与NusG不同, RfaH不结合Rho因子, 这可能与它们CTD中L1与L2环的序列差异有关<sup>[10]</sup>。因此, RfaH以3种方式阻碍Rho依赖性转录终止<sup>[31, 33]</sup>。首先, 它通过调节RNAP和第一个尾随核糖体之间的紧密耦合来阻止Rho因子到达RNAP; 其次, 它通过与NusG竞争结合RNAP来减少NusG对Rho依赖性终止的促进作用; 第三, 它通过稳定“闭合钳”形式的RNAP构象来减少RNAP的暂停。

#### 2.1.2 NusA协助NusG介导的耦合

NusA是一种由495个氨基酸(55 ku)组成的多结构域蛋白, 其在细菌和古细菌中高度保守<sup>[34]</sup>。NusA的N端结构域(NusA-NTD)通过一个灵活

的螺旋连接到3个结合RNA的亚结构域：S1、KH1和KH2，形成中央SKK结构域，与新生转录本的单链RNA结合；连接到SKK结构域的C端是酸性重复序列1和2（AR1和AR2），迄今为止，这些重复序列只在*E. coli*中被鉴定出来<sup>[24]</sup>。RNA发夹结构所稳定的RNAP暂停由NusA和RNAP间的相互作用促进，这些相互作用有利于RNAP暂停构象的形成和稳定，并进一步延长了暂停时间<sup>[34]</sup>；NusA-NTD结合 $\beta$ 亚基翼端螺旋（ $\beta$ -FTH）；AR2结合 $\alpha 1$ 亚基C端结构域（ $\alpha 1$ -CTD）；NusA的KH结构域（NusA-KH）与 $\omega$ 亚基的C端螺旋结合以及NusA-NTD与 $\alpha 2$ 亚基C端结构域（ $\alpha 2$ -CTD）的结合<sup>[34]</sup>。相反地，在与其他Nus因子（NusA、B、E和G）的协同作用下，NusA促进了N蛋白依赖的抗终止过程并促使稳定的转录延伸复合物（transcription elongation complex, TEC）形成，从而引导进行性转录和终止位点的通读<sup>[35-36]</sup>。

NusG-NusA耦合表达体的结构是利用纯化的*E. coli*因子重组得到的<sup>[29]</sup>。包含NusA和NusG的*E. coli*表达体的结构（NusG-NusA耦合表达体）与仅包含NusG的结构（NusG耦合表达体）非常相似：NusG分别与核糖体30S头部和核糖体蛋白uS10相互作用；RNAP  $\beta'$ 亚基的锌结合结构域（zinc-binding domain, ZBD）与核糖体蛋白uS3接触；重要的是，NusA可以同时与核糖体和RNAP相互作用，形成灵活的分子桥<sup>[29]</sup>。不同于NusG-NusA耦合表达体中由NusG与核糖体30S头部的相互作用，在NusA耦合表达体中，NusA与核糖体30S体表面进行广泛的相互作用，这种相互作用是由NusA的KH1结构域插入核糖体蛋白uS2和uS5之间的裂缝中驱动的<sup>[29]</sup>。NusA-KH1（E218、E219、D242和D246）的酸性残基与uS2（K105和R108）和uS5（R45、R68和R69）的碱性残基的相互邻近可能支持这种相互作用<sup>[14]</sup>。除此之外，NusA采用的内部弯曲的扩展构型支持其作为RNAP和尾随核糖体的uS2/uS5蛋白之间的“耦合受电弓”来促进表达体的组装，并允许RNAP相对于核糖体30S体旋转<sup>[34]</sup>。

根据结构测定，与NusG耦合表达体相比，NusG-NusA耦合表达体展现出更多的颗粒数量和更高的分辨率<sup>[29]</sup>。这表明NusA可能促进NusG介导的耦合形成或维持其稳定性。目前尚不清楚NusA独自在耦合中的作用，一个主要原因是缺少具有NusA但没有NusG的*E. coli*表达体结构。

## 2.2 非因子依赖的物理耦合

与因子介导的耦合相比，非因子依赖的耦合需要RNAP和核糖体间的直接相互作用。这种互作得到了部分实验数据的支持。Chakrabarti等<sup>[37]</sup>较早的研究表明，仅依赖RNAP和核糖体30S亚基间的结构相容性就能确保转录和翻译间的耦合。通过cryo-EM，Kohler<sup>[9]</sup>和Demo<sup>[38]</sup>两个团队分别解析了70S核糖体/30S核糖体亚基与RNAP相结合的复合物结构（由于前者是通过将翻译核糖体与转录停滞的RNAP碰撞而产生的，故其又被称作“碰撞表达体”）；30S亚基与RNAP的互作细节也在同一年被Fan等<sup>[39]</sup>揭示。

Kloher、Demo和Fan三个团队的研究均表明，30S亚基在RNAP与核糖体的结合中发挥了关键作用；RNAP的mRNA出口位点都会停靠在30S亚基的mRNA入口位点，这确保了自mRNA经RNAP合成后到其抵达核糖体的解码中心的这段期间，Rho无法访问转录本并提前终止转录；并且NusG没有足够的长度桥接RNAP与核糖体，暗示因子介导的耦合无法与非因子依赖的耦合共存<sup>[9, 38-39]</sup>。

不同的是，碰撞表达体中RNAP的mRNA出口位点始终停靠在30S亚基上mRNA的入口位点<sup>[9]</sup>，而在Demo和Fan团队得到的30S亚基·RNAP复合物中，RNAP的mRNA出口位点起初均结合在核糖体的mRNA出口位点附近<sup>[38-39]</sup>。因此，参与和RNAP互作的核糖体蛋白也有明显不同（在碰撞表达体中主要为uS3、uS4和uS5，而在30S亚基·RNAP复合物中主要为uS1和uS2）<sup>[9, 38-39]</sup>。鉴于核糖体上的mRNA出口位点靠近16S rRNA的Shine-Dalgrano结合区，30S亚基·RNAP复合物可能代表了翻译起始阶段两个大分子的结合情况。具体地讲，RNAP和30S亚基结合帮助16S rRNA的折叠和核糖体蛋白的组装，从而将翻译起始和转录延伸相互关联；30S起始复合物的形成将导致30S内部结构的重排和RNAP结合位点的重塑，RNAP从原来的核糖体结合位点（mRNA出口位点）解离并最终停靠在核糖体的mRNA入口位点附近<sup>[38-39]</sup>（与碰撞表达体中的RNAP和核糖体的结合情况相符）。RNAP的重新定位充分体现了生物大分子的构象灵活性以及功能上合作的紧密性。

## 2.3 DksA和TufA辅助的间接耦合

转录因子DksA是一种RNAP结合蛋白，在*E. coli*中以相对恒定的浓度存在<sup>[21]</sup>。作为(p)ppGpp的辅助因子，DksA能够在严紧反应中放

大(p)ppGpp依赖的转录调控的效果; DksA通过将其卷曲螺旋结构域插入到RNAP次级通道来和RNAP相互作用; 这种互作导致次级通道扩展并影响RNAP核心和骨架组件的取向; DksA和RNAP的结合可能使RNAP对(p)ppGpp诱导的骨架-核心棘轮效应更加敏感, 从而在转录调控过程中放大(p)ppGpp的信号<sup>[22]</sup>。

TufA是*E. coli*中的一种翻译延伸因子, 除在蛋白质合成中发挥作用外, 其已经被证明在转录水平上调节与热休克和氧化应激等胁迫反应相关的蛋白质合成<sup>[40]</sup>。最近的文献报道在*tufA* mRNA 5'UTR中存在折叠成两个相似发夹的结构区域SR IIIb。该结构化区域作为一种翻译起始增强子(structured enhancer of translation initiation, SETI)提高了GTP对30S翻译起始复合物的亲和力, 从而增加了ppGpp耐受性并允许有效的蛋白质合成<sup>[41]</sup>。根据本实验室对*E. coli*的翻译组测序(Ribosome profiling sequencing, Ribo-seq)结果, 与野生型菌

株相比, *tufA*基因缺失突变体总体转录表达量和翻译表达量的相关性下降14.75%, 其中DksA蛋白的翻译水平下调55.6% (未发表数据)。所以, TufA可能在耦合形成前或翻译受阻期间通过上调DksA的表达来参与(p)ppGpp依赖的间接耦合。

### 2.4 转录-翻译耦合的阶段性模型

本文提出一个*E. coli*中转录翻译耦合的阶段性模型。与转录延伸相比, 翻译起始是一个相对较长的过程, 因此, RNAP可以在在尾随核糖体开始延伸之前独立地延长几十个核苷酸<sup>[42]</sup> (图1a)。一旦尾随核糖体开始延伸, RNAP和核糖体就会通过新生的mRNA远程连接, 以间接耦合的方式相关联(图1b)。(p)ppGpp在此过程合成维持基本翻译所需的蛋白质并降低转录延伸速率。TufA通过直接或间接的方式增强(p)ppGpp辅助因子DksA的表达, 从而使(p)ppGpp介导的转录延伸降低效应进一步增强。某种调控作用使RNAP倾向于在起始密码子后的100 nt内暂停<sup>[43]</sup>, 这可以让尾随核糖体

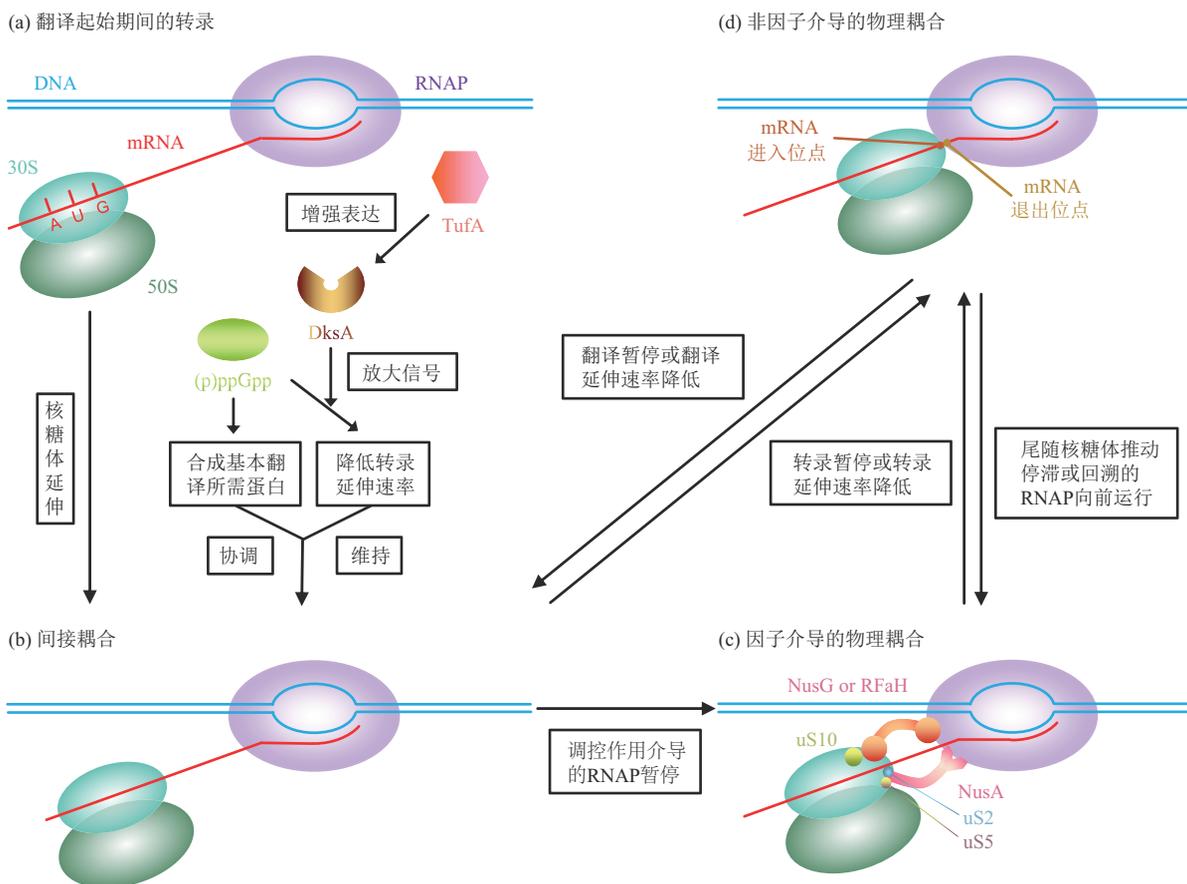


Fig. 1 The molecular mechanisms of the transcription-translation coupling

图1 转录-翻译耦合的分子机制

为便于显示, 核糖体的30S亚基和50S亚基分别用“30S”和“50S”表示。

赶上 RNAP 并形成物理耦合。这种耦合由 NusG 或 RfaH 因子桥接 RNAP 和核糖体的 uS10 蛋白来维持, 并由 NusA 在 RNAP 与核糖体蛋白 uS2、uS5 间形成的桥接稳定 (图 1c)。转录或翻译延伸速率的变化会导致连接 RNAP 和尾随核糖体的新生 mRNA 的长度不同, 进而引起几种耦合机制间的转变 (图 1)。例如, 转录暂停或 RNAP 回溯缩短了尾随核糖体和 RNAP 之间的距离, 这可能导致两者在没有因子存在的条件下以碰撞的方式结合 (图 1d)。随着尾随核糖体推动停滞或回溯的 RNAP 向前运行, 因子介导的耦合可以重新配置<sup>[17]</sup>。另一方面, 翻译障碍会增加尾随核糖体和 RNAP 之间的距离。如果此时处于碰撞耦合模式下, 耦合将转向间接关联转变; 若此时处于因子耦合阶段, 则这种耦合不会被轻易破坏, 因此无法直接导致耦合向间接关联过渡。在这种情况下, 较长的新生 mRNA 可能在 RNAP 和核糖体之间形成突出到外侧的环, 并在转录延伸减慢或翻译延伸加快的条件下得到恢复<sup>[12]</sup>。

### 3 转录-翻译耦合的生物学意义

如前所述, 翻译故障将增加 RNAP 和核糖体之间的距离。当两者距离增加超过间接耦合调节的范围, 转录-翻译耦合将被破坏。所以, 转录-翻译耦合的解除实际上主要是由诸如稀有/过早终止密码子、聚脯氨酸序列、mRNA 二级结构元件 (如假节和茎环) 等引起翻译减慢或停滞的因素造成的<sup>[44]</sup> (图 2a), 如果这些故障没有被及时清除, 将产生一系列严重后果。

早期的观点认为, 转录-翻译耦合是细胞防止非功能性转录物在细胞质中积累的一种方式<sup>[45]</sup>。如前所述, 当翻译受阻从而导致核糖体与 RNAP 解耦时, Rho 容易结合到 *rut* 位点并运行至 RNAP 分解 TEC。特别地, NusG 在此情况下可能进一步促进了 mRNA 对于 Rho 的招募, 且不需要 *rut* 位点<sup>[10]</sup>。关于转录极性的最新发现也表明, 在没有物理耦合核糖体的情况下, 转录终止因子 Rho 在转录启动后早期通过与 NusA 和 NusG 的相互作用与 RNAP 结合, 使 TEC 变成停滞不前的预终止复合体。这种状态有利于 Rho 识别新生 mRNA 中的 *rut* 位点, 随后是 Rho 环的闭合与移位以及 TEC 的分解<sup>[46-47]</sup>。这些分子事件导致 PTT 和操纵子极性 (图 2b)。由于核糖体和 Rho 竞争 NusG 的相同结合界面, 因此, 耦合的核糖体会阻止 Rho 介导的 PTT。这与 Zhu

等<sup>[23]</sup>提出的看法一致: 转录和翻译延伸之间的协调可以防止 PTT, 从而防止细胞在正常生长条件下合成无用的蛋白质。由此看来, 合理配置资源似乎是转录-翻译耦合的部分功能。无论是翻译减缓导致的 PPT, 还是转录减缓导致的核糖体队列拥挤, 都将引起成本的增加和能量的浪费<sup>[48]</sup>。

双超螺旋结构域模型表明 DNA 在移动的 RNAP 后面呈负超螺旋, 这预计将有利于 R 环的形成<sup>[49]</sup> (图 2c)。R 环是一种由双链 DNA 中的一条链与 mRNA 构成的异源双链核酸分子结构。在 *E. coli* 中, 染色体 R 环与转录延伸的缺陷有关, 并且被认为充当后续 RNAP 运动的障碍。停滞的 TEC 可能会干扰复制叉前进, 从而导致叉断裂或崩溃<sup>[50]</sup>。R 环也可能介导细菌中染色体 DNA 复制 (组成型稳定 DNA 复制) 的异常起始<sup>[51]</sup>。Gowrishankar 和 Harinarayanan<sup>[52]</sup>认为, 所有细菌转录都倾向于形成 R 环, 并且 R 环可以通过以下方式之一避免: 类似于在 rRNA 和 tRNA 中的 RNA 二级结构的形成; 翻译与转录的耦合; 在 mRNA 无法翻译的情况下, Rho 和 NusG 介导的 PTT。其中, 转录-翻译耦合有助于防止拓扑异构酶 I 缺陷 (DNA 呈负超螺旋) 的菌株中出现 R 环已经由 Massé 等<sup>[49]</sup>验证。

除翻译障碍外, 当 RNAP 遇到物理障碍或结合了错误的核糖核苷三磷酸 (ribonucleotide triphosphate, rNTP) 时, 其也可能会暂停或回溯<sup>[19]</sup>。耦合允许核糖体解除 TEC 的停滞或回溯, 这对于避免复制体和 RNAP 之间的冲突尤为重要 (图 2d)。这种冲突会进一步引起 DNA 双链断裂以及基因组的不稳定<sup>[53]</sup>。Saxena 等<sup>[25]</sup>的研究也强调了这一点: NusG 与 uS10 结合界面的突变 (NusG F165 或 uS10 M88 和 D97) 将转录与翻译耦合解除并增加了对氯霉素的敏感性。这种表型被一种减少复制体-RNAP 冲突的 RNAP 突变 *rpoB\*35* 抑制。因此, 减弱的 NusG : uS10 相互作用会在翻译受到抑制时导致耦合破坏, 进而引起 RNAP 回溯、复制阻滞和致命的 DNA 双链断裂的形成。

共转录翻译还保护新生转录物免受核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase) 的攻击<sup>[54]</sup> (图 2e)。Iost 和 Dreyfus 表示<sup>[55]</sup>, 当被运行速率较快 (约 230 nt/s) 的 T7 RNAP 转录时, *lacZ* 转录本的稳定性大大降低。T7 RNAP 转录 *lacZ* 基因的速度比核糖体解码 *lacZ* 基因的速度快大约 8 倍, 这种更高的速度会暴

露一个RNase E切割位点; 而当使用较慢(速率与核糖体相似)的*E. coli*酶时, 该位点通常在转录后

不久被核糖体屏蔽, 阻止了RNase E对mRNA的特异性切割<sup>[55]</sup>。

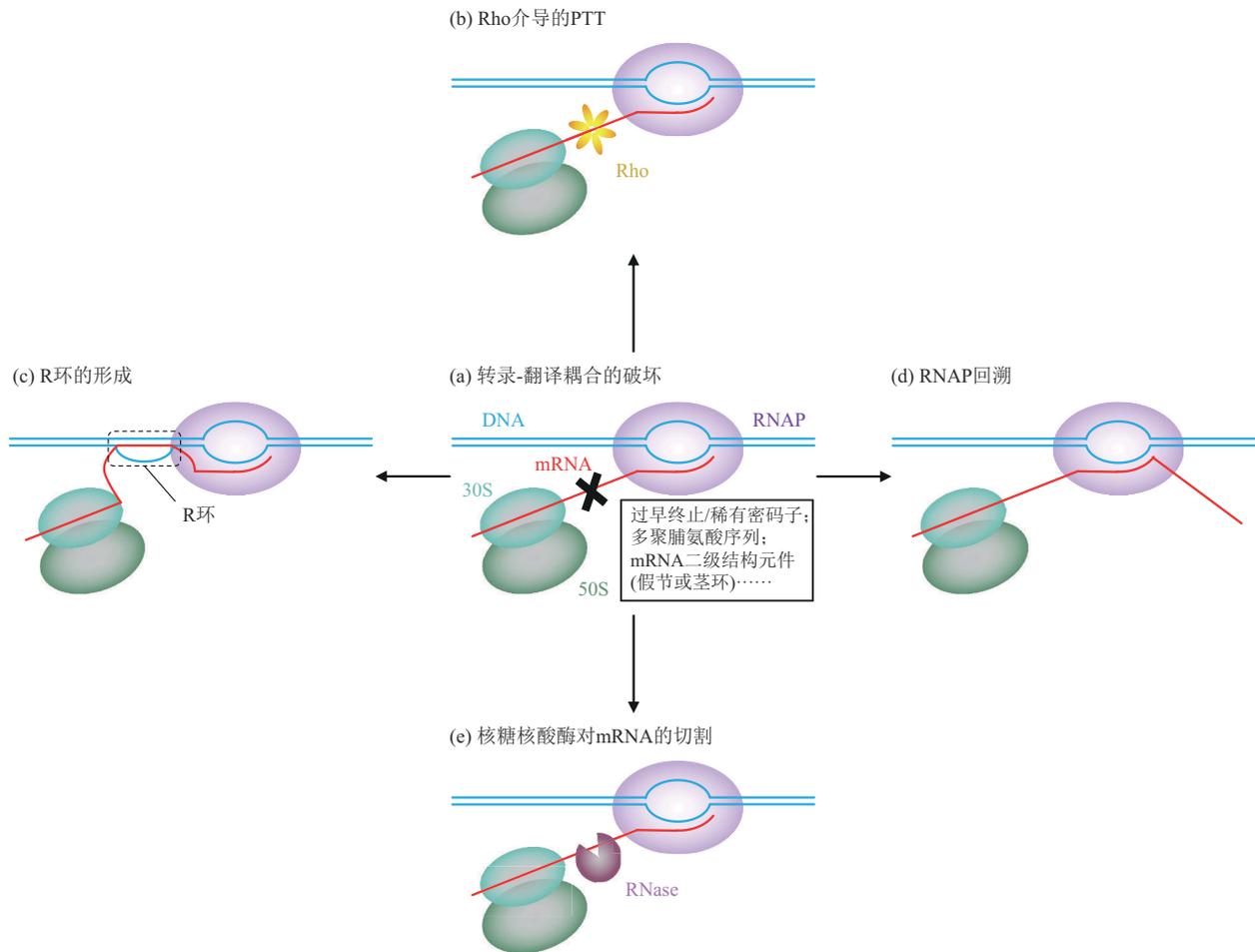


Fig. 2 The consequences of the disrupt of the transcription-translation coupling

图2 转录-翻译耦合破坏的后果

为便于显示, 核糖体的30S亚基和50S亚基分别用“30S”和“50S”表示。

#### 4 总结与展望

转录-翻译耦合是人们对基因表达探索中的一个关键发现, 其框架已经基本确立并走向完善。以*E. coli*为例, 转录翻译-耦合以物理接触或间接(非物理接触)的方式合作进行, 并且受到多种因素的调控。转录和翻译互相调控(转录极性、转录衰减和转录-翻译速率的同步)的事实进一步支持这种耦合。不同阶段的转录-翻译耦合机制对整个细胞功能意义重大, 并在相应的生长条件下保持。当遇到影响转录或翻译的环境挑战时, 细菌会相应地迅速平衡这两个过程的动力学以使转录和翻译相互协调。

尽管*E. coli*能将转录和翻译耦合起来, 但这可

能并不适用于所有原核生物。例如, 在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中发现了RNAP转录远远领先于尾随核糖体的“失控转录”现象<sup>[56]</sup>, 表明耦合的RNAP-核糖体运动不是细菌的一般标志。另外, 在肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)中鉴定出的NusA耦合表达体显示出一个与已经表征的所有*E. coli*表达体存在差异的结构<sup>[57]</sup>, 说明不同生物体可能存在不同的耦合机制, 亦反映了不同物种间基因表达调控机制的潜在多样性。

Bharti等<sup>[58]</sup>最近通过对来自1800个细菌基因组的基因盒进行分析, 鉴定出3个频率较高的基因盒, 且每一个基因盒都编码一种连接转录和翻译的蛋白质(NusG、RpsD和NusA), 暗示基因盒的存在可能在转录-翻译耦合机制中发挥不可忽视的调

节作用。此外，转录组和翻译组学的联合分析能够从全局或者单个基因的角度展现转录与翻译之间的相关性或差异性<sup>[59]</sup>，这或许能为找到和分析更多因素在转录-翻译耦合中的作用带来帮助。因此，通过将高通量组学（转录组和翻译组学）、分子生物学、结构生物学等技术联合运用，或许可以获得对转录-翻译耦合的机制、作用、必要性等方面更深层次的见解。

作为一种原核生物的特异性现象，转录-翻译耦合将为靶向抗菌药物的开发提供一个有吸引力的方向。鉴于多细胞过程的调控子可能作为未来抗菌药物的理想靶点<sup>[60]</sup>，开发靶向耦合因子（如NusG、NusA和(p)ppGpp）的药物或许可以同时影响转录和翻译两个基因表达过程的动力学平衡。特别地，鉴于严紧反应在产生非遗传性抗性和持久细胞形成中起着关键作用，靶向(p)ppGpp介导的转录-翻译耦合的间接调节显示出巨大的潜力，一种(p)ppGpp合成抑制物relacin已经被证明通过阻止细菌细胞进入稳定生长期来降低细菌活力<sup>[61]</sup>。传统的细菌感染治疗主要以必需基因或通路为靶标，可能会施加导致抗生素抗性唤醒的选择压力，进而引起耐药性菌株的泛滥。缺乏警报素的菌株在代谢上受到损害但仍能存活。因此，未来通过设计出靶向(p)ppGpp代谢的药物将在大大降低细胞活力的同时减少耐药性菌株的产生，这对于抗菌治疗具有一定的借鉴意义。

### 参 考 文 献

- [1] Klumpp S. Transcription-translation coupling: traveling a road under construction. *Biophys J*, 2023, **122**(1): 1-3
- [2] Blaha G M, Wade J T. Transcription-translation coupling in bacteria. *Annu Rev Genet*, 2022, **56**: 187-205
- [3] Byrne R, Levin J G, Bladen H A, Nirenberg M W. The *in vitro* formation of a DNA-ribosome complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, **52**(1): 140-148
- [4] Miller O L J, Hamkalo B A, Thomas C A J. Visualization of bacterial genes in action. *Science*, 1970, **169**(3943): 392-395
- [5] Iyer S, Le D, Park B R, *et al.* Distinct mechanisms coordinate transcription and translation under carbon and nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*, 2018, **3**(6): 741-748
- [6] Vogel U, Jensen K F. The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. *J Bacteriol*, 1994, **176**(10): 2807-2813
- [7] Proshkin S, Rahmouni A R, Mironov A, *et al.* Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science*, 2010, **328**(5977): 504-508
- [8] Weixlbaumer A, Grunberger F, Werner F, *et al.* Coupling of transcription and translation in archaea: cues from the bacterial world. *Front Microbiol*, 2021, **12**: 661827
- [9] Kohler R, Mooney R A, Mills D J, *et al.* Architecture of a transcribing-translating expressome. *Science*, 2017, **356**(6334): 194-197
- [10] Lawson M R, Ma W, Bellecourt M J, *et al.* Mechanism for the regulated control of bacterial transcription termination by a universal adaptor protein. *Mol Cell*, 2018, **71**(6): 911-922
- [11] Peters J M, Vangeloff A D, Landick R. Bacterial transcription terminators: the RNA 3'-end chronicles. *J Mol Biol*, 2011, **412**(5): 793-813
- [12] Conn A B, Diggs S, Tam T K, *et al.* Two old dogs, one new trick: a review of RNA polymerase and ribosome interactions during transcription-translation coupling. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(10): 2595
- [13] Magán A, Amman F, El-Isa F, *et al.* iRAPs curb antisense transcription in *E. coli*. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(20): 10894-10905
- [14] Webster M W, Weixlbaumer A. Macromolecular assemblies supporting transcription-translation coupling. *Transcription*, 2021, **12**(4): 103-125
- [15] Turnbough C L J. Regulation of bacterial gene expression by transcription attenuation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2019, **83**(3): e00019-19
- [16] Landick R, Carey J, Yanofsky C. Translation activates the paused transcription complex and restores transcription of the *trp* operon leader region. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(14): 4663-4667
- [17] Stevenson-Jones F, Woodgate J, Castro-Roa D, *et al.* Ribosome reactivates transcription by physically pushing RNA polymerase out of transcription arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(15): 8462-8467
- [18] Bailey E J, Gottesman M E, Gonzalez R L J. NusG-mediated coupling of transcription and translation enhances gene expression by suppressing RNA polymerase backtracking. *J Mol Biol*, 2022, **434**(2): 167330
- [19] Wee L M, Tong A B, Florez Ariza A J, *et al.* A trailing ribosome speeds up RNA polymerase at the expense of transcript fidelity *via* force and allostery. *Cell*, 2023, **186**(6): 1244-1262.e34
- [20] Wang B, Grant R A, Laub M T. ppGpp coordinates nucleotide and amino-acid synthesis in *E. coli* during starvation. *Mol Cell*, 2020, **80**(1): 29-42
- [21] Sanchez-Vazquez P, Dewey C N, Kitten N, *et al.* Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(17): 8310-8319
- [22] Haurlyuk V, Atkinson G C, Murakami K S, *et al.* Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**(5): 298-309
- [23] Zhu M, Mori M, Hwa T, *et al.* Disruption of transcription-translation coordination in *Escherichia coli* leads to premature transcriptional termination. *Nat Microbiol*, 2019, **4**(12): 2347-2356
- [24] Burmann B M, Rösch P. The role of *E. coli* Nus-factors in transcription regulation and transcription: translation coupling: from structure to mechanism. *Transcription*, 2011, **2**(3): 130-134
- [25] Saxena S, Myka K K, Washburn R, *et al.* *Escherichia coli*

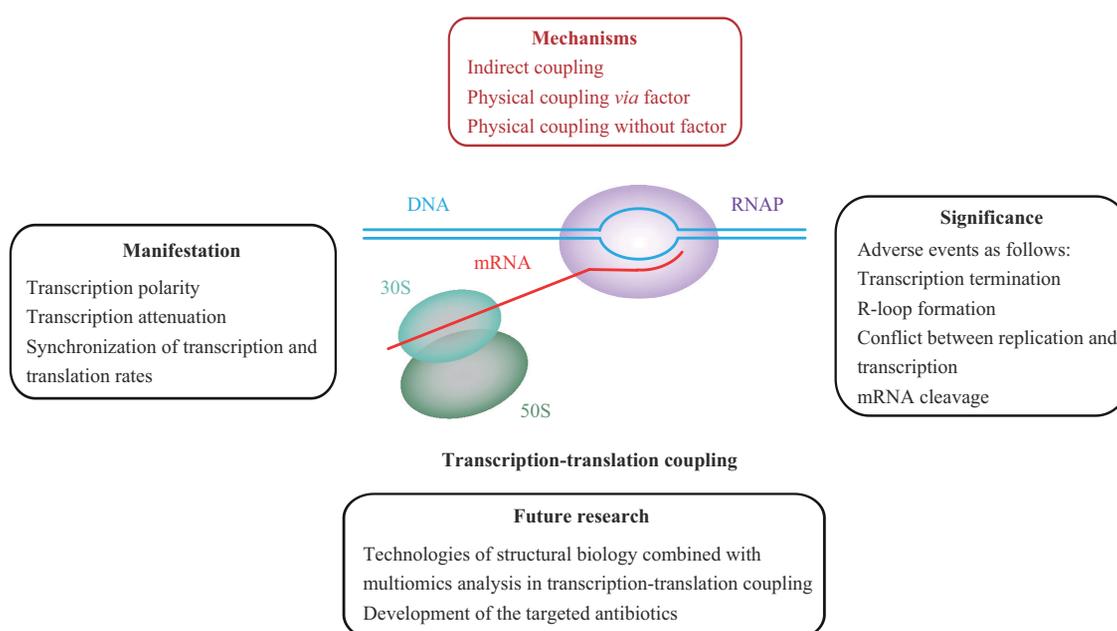
- transcription factor NusG binds to 70S ribosomes. *Mol Microbiol*, 2018, **108**(5): 495-504
- [26] Molodtsov V, Wang C, Firlar E, *et al.* Structural basis of Rho-dependent transcription termination. *Nature*, 2023, **614**(7947): 367-374
- [27] Burmann B M, Schweimer K, Luo X, *et al.* A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science*, 2010, **328**(5977): 501-504
- [28] Webster M W, Takacs M, Zhu C, *et al.* Structural basis of transcription-translation coupling and collision in bacteria. *Science*, 2020, **369**(6509): 1355-1359
- [29] Wang C, Molodtsov V, Firlar E, *et al.* Structural basis of transcription-translation coupling. *Science*, 2020, **369**(6509): 1359-1365
- [30] Artsimovitch I. Rebuilding the bridge between transcription and translation. 2018, **108**(5): 467-472
- [31] Burmann B M, Knauer S H, Sevostyanova A, *et al.* An  $\alpha$  helix to  $\beta$  barrel domain switch transforms the transcription factor RfaH into a translation factor. *Cell*, 2012, **150**(2): 291-303
- [32] Belogurov G A, Mooney R A, Svetlov V, *et al.* Functional specialization of transcription elongation factors. *EMBO J*, 2009, **28**(2): 112-122
- [33] Wang B, Mittermeier M, Artsimovitch I. RfaH may oppose silencing by H-NS and YmoA proteins during transcription elongation. *J Bacteriol*, 2022, **204**(4): e59921
- [34] Guo X, Myasnikov A G, Chen J, *et al.* Structural basis for NusA stabilized transcriptional pausing. *Mol Cell*, 2018, **69**(5): 816-827
- [35] Krupp F, Said N, Huang Y, *et al.* Structural basis for the action of an all-purpose transcription anti-termination factor. *Mol Cell*, 2019, **74**(1): 143-157
- [36] Gusarov I, Nudler E. Control of intrinsic transcription termination by N and NusA: the basic mechanisms. *Cell*, 2001, **107**(4): 437-449
- [37] Chakrabarti S L, Gorini L. Interaction between mutations of ribosomes and RNA polymerase: a pair of *strA* and *rif* mutants individually temperature-insensitive but temperature-sensitive in combination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(3): 1157-1161
- [38] Demo G, Rasouly A, Vasilyev N, *et al.* Structure of RNA polymerase bound to ribosomal 30S subunit. *eLife*, 2017, **6**: e28560
- [39] Fan H, Conn A B, Williams P B, *et al.* Transcription-translation coupling: direct interactions of RNA polymerase with ribosomes and ribosomal subunits. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(19): 11043-11055
- [40] Takeshita D, Tomita K. Assembly of Q $\beta$  viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and -Ts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(36): 15733-15738
- [41] Vinogradova D S, Zegarra V, Maksimova E, *et al.* How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs. *PLoS Biol*, 2020, **18**(1): e3000593
- [42] Shaham G, Tuller T. Genome scale analysis of *Escherichia coli* with a comprehensive prokaryotic sequence-based biophysical model of translation initiation and elongation. *DNA Res*, 2018, **25**(2): 195-205
- [43] Larson M H, Mooney R A, Peters J M, *et al.* A pause sequence enriched at translation start sites drives transcription dynamics *in vivo*. *Science*, 2014, **344**(6187): 1042-1047
- [44] Rodnina M V. The ribosome in action: tuning of translational efficiency and protein folding. *Protein Sci*, 2016, **25**(8): 1390-1406
- [45] Richardson J P. Preventing the synthesis of unused transcripts by Rho factor. *Cell*, 1991, **64**(6): 1047-1049
- [46] Said N, Hilal T, Sunday N D, *et al.* Steps toward translocation-independent RNA polymerase inactivation by terminator ATPase  $\rho$ . *Science*, 2021, **371**(6524): eabd1673
- [47] Hao Z, Epshtein V, Kim K H, *et al.* Pre-termination transcription complex: structure and function. *Mol Cell*, 2021, **81**(2): 281-292
- [48] Chen M, Fredrick K. RNA polymerase's relationship with the ribosome: not so physical, most of the time. *J Mol Biol*, 2020, **432**(14): 3981-3986
- [49] Massé E, Drolet M. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, 1999, **274**(23): 16659-16664
- [50] Schroeder J W, Hurto R L, Randall J R, *et al.* RNase H genes cause distinct impacts on RNA:DNA hybrid formation and mutagenesis genome wide. *Sci Adv*, 2023, **9**(30): eadi5945
- [51] Kogoma T. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**(2): 212-238
- [52] Gowrishankar J, Harinarayanan R. Why is transcription coupled to translation in bacteria?. *Mol Microbiol*, 2004, **54**(3): 598-603
- [53] Dutta D, Shatalin K, Epshtein V, *et al.* Linking RNA polymerase backtracking to genome instability in *E. coli*. *Cell*, 2011, **146**(4): 533-543
- [54] Deana A, Belasco J G. Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev*, 2005, **19**(21): 2526-2533
- [55] Iost I, Dreyfus M. The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*, 1995, **14**(13): 3252-3261
- [56] Johnson G E, Lalanne J, Peters M L, *et al.* Functionally uncoupled transcription-translation in *Bacillus subtilis*. *Nature*, 2020, **585**(7823): 124-128
- [57] O'Reilly F J, Xue L, Graziadei A, *et al.* In-cell architecture of an actively transcribing-translating expressome. *Science*, 2020, **369**(6503): 554-557
- [58] Bharti R, Siebert D, Blombach B, *et al.* Systematic analysis of the underlying genomic architecture for transcriptional-translational coupling in prokaryotes. *NAR Genom Bioinform*, 2022, **4**(3): lqac74
- [59] Zhang D, Li S H, King C G, *et al.* Global and gene-specific translational regulation in *Escherichia coli* across different conditions. *PLoS Comput Biol*, 2022, **18**(10): e1010641
- [60] 沈崇杰, 王晓洁, 范丽菲, 等. 肺炎链球菌 CcrZ 蛋白在细胞周期调控中的作用. *中国细胞生物学学报*, 2022, **44**(12): 2313-2325  
Shen C J, Wang X J, Fan L F, *et al.* *Chin J Cell Biol*, 2022, **44**(12): 2313-2325
- [61] Das B, Bhadra R K. (p)ppGpp metabolism and antimicrobial resistance in bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 2020, **11**: 563944

## Mechanisms of Transcription–translation Coupling in *Escherichia coli*\*

SHEN Chong-Jie, Morigen \*\*

(State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grassland Livestock, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010020, China)

### Graphical abstract



**Abstract** In prokaryotes like *Escherichia coli* (*E. coli*), transcription tends to be coupled with translation, which is usually manifested in the mutual regulation of transcription and translation such as transcription polarity, transcription attenuation and synchronization of transcription and translation rates. Indirect coupling and physical coupling are two different models of the coupling. Indirect coupling maintained by the alarmone (p)ppGpp may require the assistance of DksA and TufA proteins. Physical coupling could be divided into those mediated by NusG or RfaH factors and those induced *via* “collision” under non-factor condition. Changes in transcription or translation in response to pressure will lead to mutual transitions among several coupling modes. Coupling is necessary for normal gene expression, and its release will contribute to adverse events such as transcription termination, R-loop formation, conflict between replication and transcription and mRNA cleavage. The related technologies of structural biology have clearly demonstrated the structural details and characteristics of partial coupled expressomes. These technologies, combined with methods like multiomics analysis, will provide deeper insights into the coupling. Significantly, the study of the coupling may bring new ideas for development of the targeted antibiotics.

**Key words** *Escherichia coli*, transcription-translation coupling, RNA polymerase, ribosome, expressome

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0118

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32260233).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-471-4992435, E-mail: morigenm@hotmail.com

Received: April 3, 2023 Accepted: April 13, 2023