

研究工作

某些肠杆菌脂蛋白信号肽基因的研究

黄耀煌 程志英 邬光惠

(北京军区总医院肝病研究所)

提 要

本文以大肠杆菌脂蛋白信号肽基因为探针探测分析在亲缘关系上离大肠杆菌最远的摩氏摩根菌和奇异变形杆菌的脂蛋白信号肽基因并与其他肠杆菌进行比较。结果表明肠杆菌脂蛋白信号肽在结构上有共同特征,这些结构特征是信号肽功能所必需。摩根菌脂蛋白前体在分泌过程中亦为甘油修饰,信号肽被切掉成为成熟的脂蛋白组装于细菌的外膜。

近十年来关于蛋白质分泌和膜蛋白如何组装到外膜的研究有很大进展,这和信号肽假说的提出有很大关系。Mistein C. (1972) 发现分泌蛋白前体有外加序列, Blobel G. 和 Dobberstein B (1975) 提出信号肽假说, Inouye M. 等(1978) 的“环”模型以及 Wickner W. (1979) 的膜激发学说等也都先后提出来了。现在越来越多的事实证明信号肽普遍存在于分泌蛋白。信号肽假说先是用来解释蛋白分泌机制的,但现在认为膜蛋白也是通过相同机制分泌组装入膜的双脂层的。所以细菌膜蛋白信号肽的研究与胞外酶,细胞分泌食用蛋白和基因工程生产蛋白的分泌问题均有密切联系。

我们在前文中报道了大肠杆菌外膜新脂蛋白基因的发现^[1-3]以及它们的信号肽序列间存在有较高同源性。大肠杆菌外膜脂蛋白(Lpp)是该菌中含量最多的一种蛋白质,是一好的研究模型。Inouye M. 实验室先后对大肠杆菌、欧文氏菌(*E. amylovora*)和沙雷氏菌(*S. marcescens*)的Lpp基因进行了克隆和序列分析,但这3种菌的亲缘关系比较近,从进化上看肠杆菌中以摩氏摩根菌(*M. morganii*)和奇异变

形杆菌(*P. mirabilis*)为离大肠杆菌最远的细菌。我们用大肠杆菌Lpp信号肽基因和其他菌的Lpp基因为探针,探测这两种肠杆菌的Lpp基因并加以分析,比较研究它们的信号肽序列结构的异同和特点。结果表明奇异变形杆菌在亲缘关系上较摩氏摩根菌离大肠杆菌更远,但是它们Lpp信号肽中间部份和上述其他菌的信号肽一样是疏水的,氨基端的氨基酸残基虽有变动,但并不改变细菌信号肽这个区域碱性氨基酸多的特点,羧基端在信号肽切点周围的氨基酸序列非常相似,“亮、亮、丙、甘、半”这5个氨基酸残基高度保守。Lpp前体合成后先甘油修饰,后再加工成为Lpp。信号肽酶辨认这些结构特点对于分泌和组装是有重要意义的。

材 料 与 方 法

1. 菌株、噬菌体和质粒 大肠杆菌菌株 *E. coli* K802F⁻ hsdM⁺ hsdR⁻ galk⁻ salI⁻ lacY⁻ met, *E. coli* JA221 hsdM⁺ hsdR⁻ recA⁻ leuB6⁻ lacY⁻ trpES⁻ lpp⁻/F⁺ lacI^q lac⁺ Pro⁺. 摩氏摩根菌(*A. C. Wilson*), 奇异变形杆菌, 噬菌体 λ 569, 质粒 pKEN 015^[4], pKEN 221^[5] pKEN

125^[6] 和表达克隆载体 pIN-IIA^[7]。

2. DNA 的制备 摩氏摩根菌和奇异变形杆菌的染色体 DNA 和噬菌体 DNA 的制备按文献的方法进行^[4], 质粒 DNA 用氯化铯密度梯度离心法进行。供作分子杂交探针用的 DNA 片段是通过电泳提纯和缺刻转译法制备的^[1]。

3. DNA-DNA 杂交 按 Southern 法^[1]将 DNA 片段从电泳凝胶转到硝酸纤维素膜上进行杂交。

4. 摩氏摩根菌 Lpp 基因的克隆与表达产物的标记 带有摩根菌 Lpp 基因的 DNA 片段克隆到 2569 噬菌体 DNA 载体上, 重组噬菌体在 30℃ 用噬菌斑杂交技术进行筛选获得重组体, 然后根据酶切图谱分离带有 Lpp 编码区的 DNA 片段, 克隆到表达载体 pINIIA 上获得重组质粒, 将此重组质粒转化入受体菌大肠杆菌 JA221、细菌在 M9 葡萄糖培养基(补充有色氨酸、亮氨酸和氨苄青霉素各 50 μg/ml)中 37℃ 培养, 加 IPTG 到 2 mmol/L。有的实验加 Globomycin (M. Itakura 博士赠)至终浓度 100 μg/ml。保温 15 分后加以 20 μCi [³⁵S] 甲硫氨酸到 10 ml 培养物中, 然后继续保温 37℃ 15 分钟。细菌如标记以 [³H] 甘油和 [³H] 棕榈酸, 则分别加 250 μCi [³H] 甘油和 100 μCi [³H] 棕榈酸, 分别继续保温 45 和 30 分钟。用后两种标记物标记后先去磷脂再提溶膜蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

5. DNA 序列分析 按 Maxam and Gilbert 方法进行。

结 果

一、大肠杆菌 Lpp 信号肽基因及其他肠杆菌 Lpp 基因与摩氏摩根菌、奇异变形杆菌染色体 DNA 酶切片段的杂交

重组质粒 pKEN 015 上 XbaI 和 EcoRI 位点之间的 107 bp 含有大肠杆菌 Lpp 信号肽和 Lpp 氨基端 8 个氨基酸残基的编码区, 为了探测摩氏摩根菌和奇异变形杆菌染色体 DNA 中与大肠杆菌 Lpp 信号肽基因同源的序列, 我们以上述 107 bp DNA 片段为特异探针(图 1a,

见图版 I) 与该两肠杆菌染色体 DNA EcoRI 酶切片段进行 DNA-DNA 分子杂交, 发现在严格条件下均不出现杂交带。当温度下降到 20℃, 5 × SSC, 50% 甲酰胺, 在这样不严格的条件下保温两天, 摩根菌在 14 Kb 处呈现一淡的杂交带。我们将 107 bp XbaI EcoRI 片段再用 BstNI 酶切, 分离到 XbaI-BstNI 56 bp 和 BstNI-EcoRI 49 bp 这两个更小的片段, 后者包含有信号肽 C 端高度保守区。在上述杂交条件下, 这两个 DNA 小片段与摩根菌总 DNA EcoRI 酶解物不出现杂交带。但当杂交温度继续降到 12℃ 时, 用后一小片段制成的探针与摩根菌 DNA 14 Kb EcoRI 片段出现杂交带。上述结果见图 2。

为了进一步证实上述 14 Kb EcoRI 片段中含有摩根菌 Lpp 基因, 用离摩根菌较近的沙雷氏菌的 Lpp 基因 453 bp MspI-PvuII 片段(图 1b)为探针与摩根菌染色体 DNA 的 EcoRI 酶解物进行杂交, 30℃ 保温 20 小时后在 14 Kb 处即出现明显的杂交带。同时发现 EcoRI 片段上存在有 XbaI 位点, 1.6 Kb XbaI-EcoRI 片段能与 453 bp 探针杂交, 这一点是很重要的, 因为就现在所知, 肠杆菌 Lpp 基因 SD 序列上游都

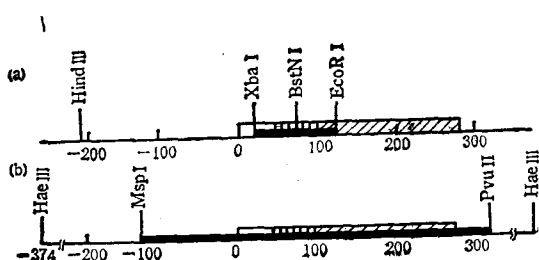


图 2 pKEN015和 pKEN221 重组质粒所含 Lpp 基因的酶切图谱

(a) pKEN015 (b) pKEN221

■: 探针; ▨: Lpp 信号肽基因;
▩: Lpp 结构基因

存在有一独特的 XbaI 酶切位点。以上结果(图 2)进一步证明摩根菌 Lpp 基因存在于上述 14 Kb EcoRI 片段中。

奇异变形杆菌染色体 DNA EcoRI 酶切片段与大肠杆菌 Lpp 信号肽基因即使在不严格

条件下也不能形成杂交带。以从 pKEN221 质粒上获得的带有沙雷氏菌 Lpp 基因的 MspI-PvuII 片段为探针与奇异变形杆菌 DNA EcoRI 片段在 20℃ 下作用两天,在 14Kb 处出现一杂交带,这表明在亲缘关系上奇异变形杆菌可能比摩根菌离大肠杆菌更远些。为了了解这些菌 Lpp 信号肽结构的特点,对摩根菌和奇异变

形杆菌的 Lpp 基因进行了克隆和分析。

二、肠杆菌脂蛋白信号肽结构比较

摩氏摩根菌的 14Kb EcoRI 片段中含 Lpp 编码区的 1.6Kb EcoRI-XbaI 片段经次级克隆到表达载体 pINI1A 上获得重组质粒 pGC-01^[8]。用 Maxam-Gilbert 法测定 XbaI-MspI 片段的核苷酸序列、该片段约有 530 bp,包含该

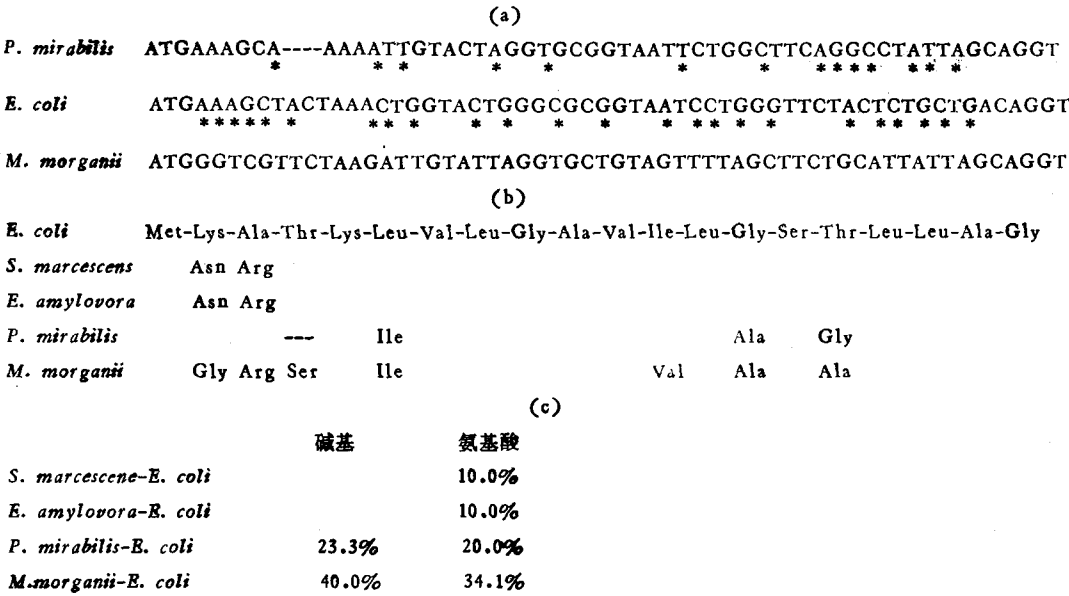


图 3 几种肠杆菌 lpp 信号肽基因核苷酸序列与其编码的氨基酸序列的比较
(a) 核苷酸序列 (b) 氨基酸序列 (c) 各菌与大肠杆菌比较碱基、氨基酸被取代(或缺失)的百分比

菌 Lpp 基因的启动子和编码区。奇异变形杆菌含 Lpp 基因的 1.1Kb 也进行了次级克隆和序列分析,图 3 表示这两种细菌为 Lpp 信号肽编码的 60 个核苷酸序列与大肠杆菌的比较,摩根菌有 24 个 bp 被取代(40%),导致 7 个氨基酸残基改变(34.1%)。虽在氨基端由原来大肠杆菌的 Lys-Ala-Thr 变为 Gly-Arg-Ser。但这并不改变这个区域带正电荷的特征,信号肽的中间区域保持疏水性,羧基端 Leu-Leu-Ala-Gly-Cys 5 个氨基酸顺序不变,这是高度保守的。大肠杆菌第 14 位 Gly 和第 16 位 Thr 在摩根菌都改变为 Ala,但是这些变化并不影响 Lpp 前体越膜组装到外膜。

三、脂蛋白信号肽的断裂

大肠杆菌 Lpp 的氨基端是半胱氨酸,在此

残基上通过硫醚键接上二甘油酯。这个半胱氨酸残基是该蛋白唯一的一个半胱氨酸。信号肽酶作用在信号肽羧基端的 Gly 和 Cys 之间使信号肽从 Lpp 前体上切掉,产生 Lpp。Globomycin 可以阻断信号肽酶的作用,使 Lpp 前体堆积。

摩根菌 Lpp 的编码区在表达质粒载体 pINI1A 的 Lac 启动子和操纵子区的控制下在大肠杆菌中得到表达。同位素标记实验表明摩根菌的 Lpp 和 Lpp 前体均可为 [³H] 甘油和 [³H] 棕榈酸所标记(图 4,见图版 I),这和大肠杆菌的情况相同,也就是说从大肠杆菌到摩根菌,肠杆菌 Lpp 的信号肽断裂之前,Lpp 二甘油酯已经形成,即 Lpp 前体先甘油修饰然后切掉信号肽成为成熟的 Lpp 组装于外膜。

讨 论

根据 DNA 杂交试验结果, 奇异变形杆菌与大肠杆菌的亲缘关系比摩氏摩根菌更 远些, 这和文献上的一些报道是一致的。奇异变形杆菌的 DNA 与大肠杆菌的只有 6% 同源性 (Sanderson, K. E. 1976)^[9], 前者的 DNA G + C 含量只有 39%, 比其它肠杆菌低 50—60% (Buchanan, R. E and Gibbons, N. E. 1974)^[10], 而且该菌 Lpp 与大肠杆菌 Lpp 抗血清之间的交叉反应甚弱。但是最近程志英等已测得奇异变形杆菌 Lpp 信号肽基因的结构, 虽然只有 19 个氨基酸残基, 但它与大肠杆菌 Lpp 信号肽基因的同源性并不差。5 种肠杆菌 Lpp 信号肽氨基酸顺序的比较见图 4 (见图版 I), 可以看出摩氏摩根菌和奇异变形杆菌与大肠杆菌之间的同源性不如其他细菌。

通过比较可以看出这些肠杆菌 Lpp 信号肽基因核苷酸序列之间虽不存在严格的同源性, 但是它们编码的氨基酸顺序却有明显的相似性。特别是当我们从这些氨基酸所带电荷的性质来进行分析的时候, 发现这些结构是和它的功能紧密相联系的。信号肽可分为 3 个部份: 带正电荷的 N 端、中央疏水区和高度保守的切点区。Lpp 前体的 N 端在第 2 和第 5 位上有 Lys 残基, Inouye S. 等将这些残基去掉或代之以带负电荷残基, 结果表明这个区域的正电荷虽然并非 Lpp 转位所必需的条件, 但在那些引入负电荷的突变体中未被修饰的 Lpp 前体明显堆积。用点突变方法获得的实验结果表明氨基末端正电荷在促进转位和加工过程中起有重要的作用。其机制可用 Inouye, M. 提出的环模型加以解释。关于中央疏水部份, 我们的实验表明摩氏摩根菌和奇异变形杆菌 Lpp 信号肽中央部份和大肠杆菌一样保持疏水性质。现有一些报告指出通过体内选择获得一些不能分泌蛋白的突变株, 这些突变株多是由于缺失许多疏

水残基或由于在此疏水区引入带电荷基团所致。这种突变效应和关于此疏水区在信号肽插入脂双层中起重要作用而提出的一些假说是一致的。为要确定疏水区的最小长度, 研究者对大肠杆菌 Lpp 信号肽疏水部份编码区进行一步一步的单个密码缺失试验, 发现缺失 Gly-9 虽未发生有何效应, 但缺失 Gly-14 却导致修饰和没有修饰的 Lpp 前体堆积。此外, 缺失 Leu-13 亦可引起未修饰的 Lpp 前体堆积。为了观察引入酸性和碱性氨基酸残基到疏水区对信号肽功能的影响, Pollitt S. 等在 Gly-9 和 Gly-14 这两个位置上引入带电荷基团, 发现引入 Asp 残基到上述两个位置中的任何一个, 均可引入未修饰的 Lpp 前体堆积。但是 Gly-9 若代之以 Arg, 则未见有明显效应。研究者用点特异突变方法研究结果证明信号肽切点区的特殊结构在修饰和加工过程以及蛋白组装到细菌外膜的机制上均有重要意义。

本研究得到美国纽约州立大学生化系 M. Inouye 教授的帮助特此志谢, 本文作者之一陈志英现在该系。

参 考 文 献

- [1] Yao-xuan, H. et al.: *FEBS LETTERS*, 1982, 137(2), 168.
- [2] Yao-xuan, H. et al.: *Fed. Proc.*, 1982, 41(4), 1280.
- [3] 黄耀煌 邱光惠:《中华微生物学和免疫学杂志》, 1987, 第 6 期. 353.
- [4] Nakamura, K. et al.: *Cell* 1979, 18, 1109.
- [5] Nakamura, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 1369.
- [6] Nakamura, K. et al.: *J. Mol. Genet.*, 1982, 1, 289.
- [7] Nakamura, K. et al.: *EMBO J*, 1982, 1, 771.
- [8] Yao-xuan, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1983, 258(13), 8139.
- [9] Sanderson, K. E.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 1976, 30, 327.
- [10] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edit., Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.

[本文于 1987 年 9 月 5 日收到]

黄耀煌等：“某些肠杆菌脂蛋白信号肽基因的研究”一文的图 1 及图 4

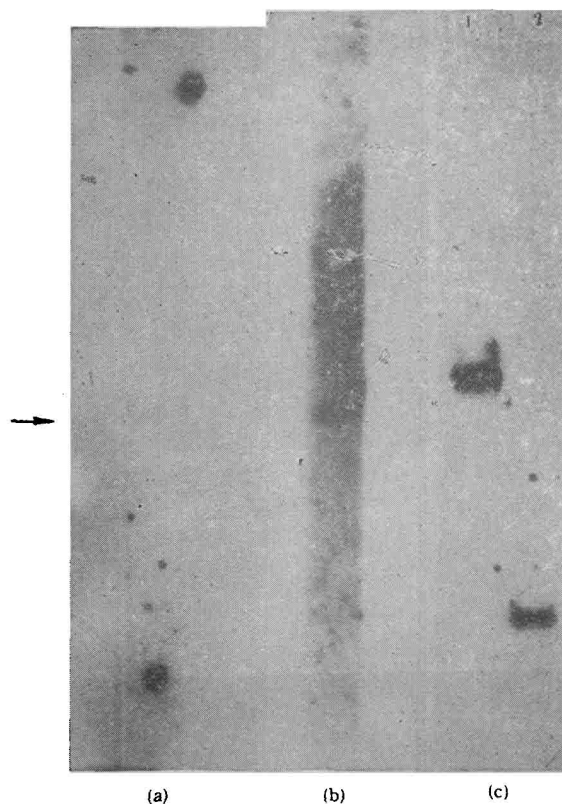


图 1 摩氏摩根菌染色体 DNA EcoRI 酶解片段与不同 Lpp 基因探针的杂交

- 摩根菌 DNA EcoRI 片段与大肠杆菌 Lpp 信号肽基因 107bp 片段探针在 20℃ 下杂交
- 摩根菌 DNA EcoRI 片段与大肠杆菌 Lpp 信号肽基因 49bp 片段探针在 12℃ 下杂交。
- 摩根菌 DNA EcoRI 片段(1)及 EcoRI-XbaI 双酶解片段(2)与沙雷氏菌 Lpp 基因 453 bp MSPI-PVUII 片段探针在 30℃ 杂交。箭号指处为摩根菌 DNA 14kb EcoRI 片段。

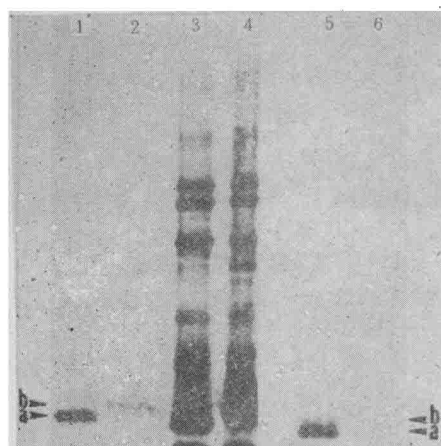


图 4 $[^3\text{H}]$ 甘油和 $[^3\text{H}]$ 棕榈酸标记的摩根菌外膜脂蛋白与脂蛋白前体的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

- $[^3\text{H}]$ 甘油标记, 不加 Globomycin, 膜蛋白与抗 Lpp 的免疫沉淀
- $[^3\text{H}]$ 甘油标记, 加 Globomycin, 膜蛋白与抗 Lpp 的免疫沉淀
- $[^3\text{H}]$ 亮氨酸标记, 不加 Globomycin, 膜蛋白。
- $[^3\text{H}]$ 亮氨酸标记, 不加 Globomycin, 膜蛋白。
- $[^3\text{H}]$ 棕榈酸标记, 加 Globomycin, 膜蛋白与抗-Lpp 的免疫沉淀。
- $[^3\text{H}]$ 棕榈酸标记, 加 Globomycin, 膜蛋白与抗-Lpp 的免疫沉淀。