

放线菌线型复制子新的生物学功能及其应用

覃重军¹ 方 萍²

(¹中国科学院上海植物生理生态研究所 上海 200032)

(²同济大学 污染控制与资源化国家重点实验室 上海 200092)

Novel Functions of the *Actinomycetales* Linear Replicons and its Applications

Qin Zhongjun¹ Fang Ping²

(¹ Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

(² National Key Laboratory of Pollution Control & Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

关键词 放线菌 线型复制子 端粒

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2003)05-0671-05

原核生物的染色体和质粒 DNA 一般为环型结构。在过去的几十年里,人们以不同的材料为研究对象建立了原核生物环型染色体和环型质粒生物学功能的模式体系。近年来,在链霉菌属(*Streptomyces*)中发现 12~1700kb 的线型质粒^[1]和约 8000kb 的线型染色体^[2],有的巨大线型质粒上还带有完整的抗生素生物合成基因簇^[1]。与链霉菌属同属于放线菌目(*Actinomycetales*)的诺卡氏菌属(*Nocardia*)和红球菌属(*Rhodococcus*)中也发现了线型染色体和线型质粒,并揭示了降解多种工业上有毒化合物的基因常由线型质粒所携带^[3,4]。功能研究表明,链霉菌的线型质粒和线型染色体,尤其是端粒在 DNA 复制、重组、修复和接合转移等方面确实具有新的机制。所有这些进展,导致近年来在国际上形成一个对放线菌线型质粒和线型染色体尤其是端粒结构和功能研究的热点。本文综述放线菌尤其是链霉菌线型质粒和线型染色体新的生物学功能及其应用。

1 链霉菌线型质粒和线型染色体的结构和功能

1.1 链霉菌线型复制子的结构

1979 年 Hayakawa 等在娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)中发现一个约 17kb 的线型质粒 pSLA2^[5],其 DNA 5' 末端可能与蛋白共价结合^[6]。pSLA2 的线型 DNA 两端存在约 0.6kb 的倒转重复序列(端粒)端粒上有许多小的倒转重复序列^[7]。由于当时质粒生物学研究热点在环型质粒方面,因而 pSLA2 的工作未引起重视。1987 年 Kinashi 等利用脉冲电泳发现链霉菌巨大线型质粒,在天兰色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中 350kb 的巨大线型质粒 SCP1 上还带有完整的次甲霉素生物合成基因簇^[8]。克隆和 DNA 测序表明 SCP1 的端粒与 pSLA2 的不同。SCP1 的全序列不久前在 Sanger 中心完成(<http://www.sanger.ac.uk/Projects/S-coelicolor>)。线型质粒 SCP1 和线型染色体相互作用位点上还带有几个转座子的序列,暗示

基金项目 国家自然科学基金(30170019,30270030)国家 863 计划(2002AA227021)

作者简介:覃重军(1965-),男,湖南省武冈县人,研究员,博士,从事放线菌分子遗传学研究。Tel:86-21-64042090
Exe 4717; Fax 86-21-64170709; E-mail: qin@iris.sipp.ac.cn

收稿日期 2002-10-21,修回日期:2003-07-03

可能存在新的转座方式^[9]。最小的链霉菌线型质粒 pSCL(约 12kb)的 DNA 的全序列测定也已完成^[10]。利用脉冲电泳技术在链霉菌中发现的线型质粒还有 SLP2^[11]和 pPZG101^[12]等。线型质粒的端粒大小从 40bp 至 380kb。

1993 年 Lin 等发现变青链霉菌(*Streptomyces lividans*)、天兰色链霉菌等几个链霉菌的染色体为线型结构,其中变青链霉菌线型染色体的端粒有约 16kb 与线型质粒 SLP2 的一端完全相同,暗示线型染色体与线型质粒之间发生了遗传交换^[2]。比较染色体遗传图谱和物理图谱,发现约 1500kb 靠近两个端粒的范围无生长所必需的基因,该区段可以发生 DNA 大片的缺失和扩增^[13]。龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)的染色体端粒为 550kb,与线型质粒 pPZG101 的端粒有部分相同^[12]。变青链霉菌和天兰色链霉菌的线型染色体的复制起点被克隆和定位在复制子的中部^[14,15]。发现多数链霉菌线型染色体和线型质粒的端粒结构具有几个保守区^[16],暗示可以利用线型质粒为模型来研究线型染色体的功能。Bao 和 Cohen 分离到线型质粒 pSLA2 的末端蛋白及其基因,并以此为探针在变青链霉菌和天兰色链霉菌线型染色体、以及萎彻氏链霉菌巨大线型质粒中克隆到编码端粒末端蛋白的基因,进一步暗示线型质粒和线型染色体端粒功能的相似性^[17]。

1.2 链霉菌线型复制子的功能

由于链霉菌线型复制子 DNA 的结构与腺病毒和噬菌体 $\Phi 29$ 的相似,因而推测其复制机理亦可能相似,即端粒的末端蛋白为 DNA 复制起点,进行“链置换”复制方式^[18]。然而,Shiffman 和 Cohen 发现线型质粒 pSCL 在中部有一个 DNA 复制起点,可以使 pSCL 以环型质粒形式复制,暗示存在一种新的复制方式^[19]。随后,Chang 和 Cohen 证实了线型质粒 pSLA2 从中部开始向两端进行双向复制,在端粒处留下约 280 核苷酸的单链 DNA 作为复制中间体^[20]。在排除了重组和末端发卡复制模型后,Qin 和 Cohen 鉴定了 pSLA2 端粒中有一些复制所必需的小的倒转重复序列,并证明在环型和线型结构中末端蛋白均可精确识别和结合到端粒最末端的核苷酸上,从而暗示存在“端粒折返”复制方式^[21]。对变青链霉菌线型染色体有复制功能的最小端粒的鉴定,进一步支持了这种复制方式(Qin 等,待发表)。

与新的复制方式相对应,几个与复制相关的新的基因或蛋白已得到鉴定。pSLA2 的基本复制区由 *rep1* 和 *rep2* 两个基因构成,其中 *rep1* 具有几个顺式重复序列,*rep2* 与原核生物 DNA 解螺旋酶高度同源^[22]。只有 pSLA2 的基本复制区的载体可维持 pSLA2 环型复制,但不能维持 pSLA2 线型复制。一个 pSLA2 线型 DNA 复制相关的新基因 *rhrA* 已鉴定,此外,还发现线型质粒存在类似环型质粒的 *kil-kor* 系统(Qin 等,已投稿)。编码变青链霉菌线型染色体末端蛋白的基因来自染色体,该基因的阻断可导致线型染色体在体内缺失和环化^[17]。巨大线型质粒 SCP1 的基本复制区也由两个基因构成,其中一个与原核生物 DNA 解螺旋酶有高的同源性^[23],暗示不同链霉菌线型质粒的复制方式可能具有普遍性。

虽然端粒复制不是以同源重组的方式进行,但是两个 DNA 序列相同的端粒仍可以较高的频率发生同源重组(约 3%,Qin 等,未发表),这进一步支持了两个端粒连在一起形成“火箭框架模型”的假说^[24]。杂交和荧光检测,发现天兰色链霉菌的线型染色体的两端经常连接在一起,这也许能为较高的端粒重组频率和线型染色体表现为环型遗传图谱提供解释^[25]。端粒及其末端蛋白可以保护线型 DNA 免受核酸酶的降解,当端粒损伤时, pSLA2 可以采取 3 种存活方式:利用质粒或染色体上同源端粒对损伤端粒进行重组修复;通过随机缺失和非同源重组环化线型复制子;以及形成不同大小的倒转重复线型复制子^[26]。这为线型染色体经常发生的缺失和环化,以及线型染色体和线型质粒在端粒区同源重组提供了机理上的解释^[13]。对大的倒转重复 DNA 形成机理的深入探讨,暗示线型复制子不同长度端粒形成的根源,同时暗示线型染色体可以形成巨大的倒转重复线型分子^[27]。

由于线型 DNA 复制子特殊的结构,从理论上预测,除了新型的复制机制外,在接合转移和转座等方面亦存在新的机制^[28]。线型质粒 SCP1 可由转座子介导,将质粒的大部分整合到线型染色体上^[29],以及线型质粒 SLP2 与线型染色体在端粒同源区存在一个转座子的事实^[2],支持了这个假设。链霉菌染色体遗传不稳定性是其固有的特点,这种不稳定经常发生在端粒区^[13]。通过去除端粒,发现人工环化的染

色体更不稳定,但分子机理尚不清楚^[13]。通过对许多 pSLA2 衍生载体复制的稳定性测定,我们发现 *rrlA/rrrA* 基因在质粒复制稳定性调控上的关键作用 (Qin 等,已投稿)。

2 链霉菌之外的放线菌线型质粒和线型染色体的结构和功能

利用脉冲电泳技术在链霉菌之外的许多放线菌中发现了线型质粒和线型染色体,如,在红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) 中发现 270kb、400kb 和 420kb 3 个大的线型质粒^[30],在珊瑚红球菌 (*Rhodococcus corallina*) 中发现 70kb、85kb、185kb 和 235kb 4 个大的线型质粒,其中 185kb (pNC30) 的线型质粒上携带有与降解三卤乙烷相关的基因^[31]。红球菌 (*Rhodococcus* sp.) 中 450kb 线型质粒上带有降解聚卤联苯相关的基因^[41]。在玫瑰游动双孢菌 (*Planobispora rosea*) 中发现 16kb 和 27.5kb 两个线型质粒^[31],在隐藏分枝杆菌 (*Mycobacterium celatum*) 中发现一个 23kb 的线型质粒 pCLP,并完成 DNA 全序列测定^[32]。通过凝胶阻滞实验,表明红串红球菌的末端蛋白与端粒 DNA 紧密结合^[30],在隐藏分枝杆菌中也证明末端蛋白与端粒 DNA 末端共价结合^[33]。红串红球菌的衍生线型质粒 pHG207 (225kb) 端粒的两端约 0.6kb 为几乎相同的序列,与链霉菌相似,该段 DNA 含有几个小的倒转重复序列^[34];红串红球菌的另一个线型质粒 pHG201 (270kb) 的端粒在 32/34bp 内只有 65% 同源性,在 100bp 的端粒内有两个小的倒转重复序列^[30]。与链霉菌不同的是, pHG201 和 pHG207 在端粒最末端没有小的 DNA 倒转重复序列和保守序列^[30,34]。隐藏分枝杆菌线型质粒 pCLP 和玫瑰游动双孢菌线型质粒 pPR2 的端粒上有几个倒转重复序列,但与链霉菌的端粒并无同源性,暗示这些链霉菌之外的放线菌线型质粒的 DNA 复制机制与链霉菌的可能有所不同^[31,33]。脉冲电泳和酶切分析表明,红串红球菌、星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)、游动放线菌 (*Actinoplanes*)、小单孢菌 (*Micromonospora*) 等放线菌的染色体为线型,大小超过 7000kb^[35]。对属于放线菌 15 个属的 19 个菌种提取 DNA 进行脉冲电泳,发现染色体均为线型 DNA,其中诺卡氏菌和红球菌中有多个线型质粒,有兴趣的是降解十六烷烃的一株诺卡氏菌有一个大的线型质粒 (马宁等,待发表)。

已鉴定线型质粒 pCLP 的基本复制区大小为 2.8kb,复制起点富含 AT 并有一个 18bp 的重复序列,与原核生物的 *parA* 同源性达 40%,另一个复制蛋白与分枝杆菌环型质粒 pLR7 复制蛋白 *rep* 同源性为 25%^[33]。

3 应用

在链霉菌的不同种中发现了约 5000 种抗生素,其作用包括抗细菌、抗真菌、除草、杀虫、抗肿瘤和免疫抑制剂等。抗生素生物合成基因簇大小在 20~150kb 之间,多数有应用价值的基因簇大于 50kb。在过去 20 多年里,由链霉菌环型质粒衍生的载体可容纳 DNA 片段插入不超过 40kb,而可容纳 >100kb DNA 片段插入的细菌人工染色体 (BAC) 和酵母菌人工染色体 (YAC) 不能在链霉菌中复制。链霉菌天然的线型质粒上携带两个大的抗生素生物合成基因簇^[36],暗示可以利用链霉菌线型质粒稳定复制所需的基本单元,发展链霉菌人工线型染色体 (*Streptomyces* Artificial Linear Chromosomes, SLAC) 来操作、改造和转移巨大的抗生素生物合成基因簇,从而加快抗生素生物合成及其代谢工程的研究步伐。此外,放线菌的红球菌属和诺卡氏菌属中有许多种可以降解许多有害工业化合物,而降解基因常定位在线型质粒上^[3,41]。类似地,可以利用红球菌或诺卡氏菌线型质粒稳定复制所需的基本单元,发展放线菌人工线型染色体,来构建可以降解多种有毒化合物的超级降解菌株。

4 结束语

对放线菌线型染色体和线型质粒的研究,已由结构研究转为揭示新的生物学功能的机理研究。其中以链霉菌小的线型质粒为模型,已初步揭示端粒在 DNA 复制、重组、修复和接合转移等方面确实具有新的机理。进一步的工作需要分离和鉴定更多参与这些过程的蛋白质,深入揭示蛋白与蛋白、蛋白与 DNA 相互作用的分子机制,并最终提出和阐明分子模型。由于多数链霉菌线型染色体和线型质粒的端

粒具有相似的 DNA 序列和结构,因此,可以利用链霉菌线型质粒的研究成果,深入揭示链霉菌线型染色体的新的生物学功能。由于链霉菌之外的放线菌线型质粒的端粒以及基本复制区的 DNA 序列与链霉菌的明显不同,因此,可以借鉴链霉菌线型复制子功能研究的方法和策略,来研究链霉菌之外的放线菌线型复制子可能的新的生物学功能。

参 考 文 献

- [1] Kianshi H, Mori E, Hatani A, *et al.* Isolation and characterization of linear plasmids from lankacidin-producing *Streptomyces* species. *J Antibiot*, 1994, **47**: 1447 ~ 1455.
- [2] Lin Y S, Kieser H M, Hopwood D A, *et al.* The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol*, 1993, **10**: 923 ~ 933.
- [3] Saeki H, Akira M, Furuhashi K, *et al.* Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology*, 1999, **145**: 1721 ~ 1730.
- [4] Shimizu S, Kobayashi H, Masai E, *et al.* Characterization of the 450kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2021 ~ 2028.
- [5] Hayakawa T, Otaka N, Yonehara H, *et al.* Isolation and characterization of plasmids from *Streptomyces*. *J Antibiot*(Tokyo), 1979, **32**: 1348 ~ 1350.
- [6] Hirochika H, Sakaguchi K. Analysis of linear plasmids isolated from *Streptomyces*: Association of protein with the ends of the plasmid DNA. *Plasmid*, 1982, **7**: 59 ~ 65.
- [7] Hirochika H, Nakamura K, Sakaguchi K. A linear DNA plasmid from *Streptomyces rochei* with an inverted terminal repetition of 614 base pairs. *EMBO J*, 1984, **3**: 761 ~ 766.
- [8] Kinashi H, Shimaji M, Sakai A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature*, 1987, **328**: 454 ~ 456.
- [9] Yamasaki M, Miyashita K, Cullum J, *et al.* A complex insertion sequence cluster at a point of interaction between the linear plasmid SCP1 and the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 2000, **182**: 3104 ~ 3110.
- [10] Wu X, Ray K L. Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 37 ~ 52.
- [11] Chen C W, Yu T W, Lin Y S, *et al.* The conjugative plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a 50 kb linear molecule. *Mol Microbiol*, 1993, **7**: 925 ~ 932.
- [12] Gravius B, Glocker D, Pigac J, *et al.* The 387kb linear plasmid pPZG101 of *Streptomyces rimosus* and its interactions with the chromosome. *Microbiology*, 1994, **140**: 2271 ~ 2277.
- [13] Volf J N, Altenbuchner J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol Microbiol*, 1998, **27**: 239 ~ 246.
- [14] Musialowski M S, Flett F, Scott G B, *et al.* Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the DNA-gyrB region. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 5123 ~ 5125.
- [15] Zakrzewska-Czerwinska J, Schempf H. Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *J Bacteriol*, 1992, **147**: 2688 ~ 2693.
- [16] Huang C H, Lin Y S, Yang Y L, *et al.* The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol Microbiol*, **28**: 893 ~ 903.
- [17] Bao K, Cohen S N. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev*, 2001, **15**: 1519 ~ 1527.
- [18] Salas M. Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 1991, **60**: 37 ~ 91.
- [19] Shiffman D, Cohen S N. Reconstruction of a *Streptomyces* linear replicon from separately cloned DNA fragments: Existence of a cryptic origin of circular replication within the linear plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 6129 ~ 6133.
- [20] Chang P C, Cohen S N. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science*, 1994, **265**: 952 ~ 954.
- [21] Qin Z, Cohen S N. Replication at the telomeres of the *Streptomyces* linear plasmid nSLA2. *Mol Microbiol*, 1998, **28**: 893 ~ 903.

- 903.
- [22] Chang P C , Kim E S , Cohen S N . *Streptomyces* linear plasmids that contain a phage-like , centrally located , replication origin . *Mol Microbiol* , 1996 , **22** :789 ~ 800 .
- [23] Redenbach M , Bibb M J , Gust B , *et al* . The linear plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor* A3(2) possesses a centrally located replication origin and shows significant homology to the transposon Tn4811 . *Plasmid* , 1999 , **42** :174 ~ 185 .
- [24] Sakaguchi K . Invertrons , a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids , transposable elements , and genomes of adeno-type viruses . *Microbiol Rev* , 1990 , **54** :66 ~ 74 .
- [25] Yang M C , Losick R . Cytological evidence for association of the ends of the linear chromosome in *Streptomyces coelicolor* . *J Bacteriol* , 2001 , **183** :5180 ~ 5186 .
- [26] Qin Z , Cohen S N . Survival mechanisms for *Streptomyces* linear replicons after telomere damage . *Mol Microbiol* , 2002 , **45** :785 ~ 794 .
- [27] Qin Z , Cohen S N . Long palindromes formed in *Streptomyces* by nonrecombinational intra-strand annealing . *Genes Dev* , 2000 , **14** :1789 ~ 1796 .
- [28] Chen C W . Complications and implications of linear bacterial chromosomes . *Trends Genet* , 1996 , **12** :192 ~ 196 .
- [29] Hanafusa T , Kinashi H . The structure of an integrated copy of the giant linear plasmid SCP1 in the chromosome of *Streptomyces coelicolor* 2612 . *Mol Gen Genet* , 1992 , **231** :363 ~ 368 .
- [30] Kalkus J , Menne R , Reh M , *et al* . The terminal structures of linear plasmids from *Rhodococcus opacus* . *Microbiology* , 1998 , **144** :1271 ~ 1279 .
- [31] Polo S , Guerini O , Sosio M , *et al* . Identification of two linear plasmids in the actinomycete *Planobispora rosea* . *Microbiolgy* , 1998 , **144** (pt 10) :2819 ~ 2825 .
- [32] Le Dantec C , Winter N , Gicquel B , *et al* . Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid : evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems . *J Bacteriol* , 2001 , **183** :2157 ~ 2164 .
- [33] Picardeau M , Vincent V . Mycobacterial linear plasmids have an invertron-like structure related to other linear replicons in *actinomycetes* . *Microbiolgy* , 1998 , **144** (pt 7) :1981 ~ 1988 .
- [34] Kalkus J , Dorrie C , Fischer D , *et al* . The giant linear plasmid pHG207 from *Rhodococcus* sp . encoding hydrogen autotrophy : Characterization of the plasmid and its termini . *J Gen Microbiol* , 1993 , **139** :2055 ~ 2065 .
- [35] Redenbach M , Scheel J , Schmidt U . Chromosome topology and genome size of selected *actinomycetes* species . *Antonie Van Leeuwenhoek* , 2000 , **78** :227 ~ 235 .
- [36] Suwa M , Sugino H , Sasaoka A , *et al* . Identification of two polyketide synthase gene clusters on the linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei* . *Gene* , 2000 , **246** :123 ~ 131 .

《微生物学报》综述文章投稿说明

近一时期 , 我刊一些综述类来稿存在一些问题 , 主要表现为 : 篇幅庞大 , 罗列文献 , 内容空泛 , 缺乏观点 . 为使此栏目更加新颖并更具可读性 , 特提出几点说明 , 欢迎大家根据要求 , 踊跃投稿 , 并提出你们对该栏目的建议和想法 .

1. 本刊主要刊登微型综述 (Mini review) , 来稿字数最好控制在 5000 字以内 (不包括参考文献) .
2. 综述的选题要有新意 , 对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值 .
3. 参考文献应控制在 40 篇以内 , 近 3 年发表的文献不少于 10 篇 .
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展 , 不要泛泛罗列文献 , 只述不评 .
5. 应结合自己的研究工作 , 就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点 .
6. 欢迎报送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章 .