39 卷 5 期
1999 年 10 月
微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica
Vol. 39 No. 5
October 1999

透明颤菌血红蛋白及其基因的研究进展*

于慧敏 沈忠耀
(清华大学化工系 北京 100084)

关键词 透明颤菌血红蛋白,内启动子,贫氧环境,溶氧
分类号 Q78 文献标识码 C 文章编号 0001-6209(1999)05-0478-82

微生物在低溶氧条件下的生理活性通常与通气或无氧条件下的细胞不同。许多事实表明,低溶氧水平将改变细胞生理学。例如,对严格好氧菌,低溶氧值可改变它形成细胞内膜的能力(如灰色固氮杆菌,*Azotobacter vinelandii*)或引起 TCA 中间产物的形成和释放(如真养产碱杆菌,*Alcaligenes eutrophus*);而对兼性好氧菌,低溶氧水平则改变某些酶的活性以及呼吸链的构型[1]。同时,生物反应器的空间多相性有可能导致极低的溶氧水平,因此在大规模细胞培养或高密度发酵如补料分批培养和固定化细胞系统中,供氧问题尤为突出。解决该问题的传统方法一般都局限于提高细胞生长环境中的氧气传递性质,其中包括通入纯氧、通气/搅拌优化配置以及通过加入化学物质如正十二烷或全氟碳(Forane F66)来增加液相中氧气的溶解度[2]。解决氧需求问题的另一途径则是利用基因工程技术来提高细胞自身对氧气的利用率。革兰氏阴性专性好氧菌—透明颤菌(*Vitreoscilla*)于微氧条件下可以合成一种类似于血红蛋白的可溶物质,即为透明颤菌血红蛋白(Vitreoscilla Hemoglobin,VHb)[3]。利用 VHb 在其它菌种中外源表达这一基因策略来解决好氧生物发酵过程中的供氧问题具有很大的科学意义,并可能带来巨大的经济效益。

1 *Vitreoscilla* 菌的研究进展

早在 1870 年,Cohn 就描述了一类与透明颤菌(*Vitreoscilla*)类似的无色、滑动、细菌状微生物,但直到 1949 年,才由 E G Pringsheim 培养、描述并命名。E G Pringsheim 定义了一个新的菌科,即:Vitreoscillaceace,并于 1951 年以菌体藻丝尺寸、形态结构及生长特性等为依据分类描述了六种 *Vitreoscilla* 菌[4]。此后,Pringsheim, Costerton, Hageage, Murray 和 Brzin 等人先后对透明颤菌的菌落形态、结构及特性等各方面都进行了细致的研究,并取得了大量成果。随着研究的深入,*Vitreoscilla* 属划归为 Beggiatoaceae 科,且 W R Strohl 和 T M Schmidt 等人(1986)指出,所有 *Vitreoscilla* 菌的细胞壁均包含相应于细胞质膜、肽聚糖层和脂多糖层的层次结构,因此它属于革兰氏阴性菌[5]。

2 透明颤菌血红蛋白的结构及特性

透明颤菌最重要的应用特性是其可合成一种血红蛋白类似物。1974～1977 年,Dale A Webster 等人从 *Vitreoscilla* 中提取并纯化得到了一种可溶性物质,命名为细胞色素 *o*(Cytochrome *o*, Cyo),实际上即为现在的 VHb。研究发现,该可溶性 Cyo 在不同的环境条件下可呈现三种不同的状态,即氧化态、还原态以及氧合态,并可以相互转化。其中,还原态 Cyo 是生理活性态,而氧合态 Cyo 则是呼吸细胞中最

* 国家自然科学基金重点项目(No. 29834103)
国家'九五'攻关项目(No. 96-C03-03-02)
收稿日期:1998-09-24,修回日期:1998-11-03

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

重要的稳定形式，它在 577*nm*，544*nm* 和 420*nm* 处有最大吸收峰。若向溶液中鼓入 CO 气体，则可形成 C*yo*-CO 复合物，在 566nm，535nm 和 419nm，呈现特征吸收峰[6]。

1986 年，由于真正的 Cy*o* 的发现以及同氧合肌红蛋白等的对比研究，人们发现，从 *Vitreoscilla* 中提取的所谓的可溶性 Cyo 实际上是一种透明颤菌血红蛋白(Vitreoscilla hemoglobin，VHb)[7]。它含有 146 个氨基酸残基，带有两个相对分子量为 15，775 的亚基。研究不同植物和动物的 Hbs 表明，它们具有相同的基因起点。同时，氨基酸序列分析表明，VHb 与其它 Hbs 具有很高的同源性，尤其是与黄羽扇豆血红蛋白(Yellow lupin LegHb)，同源性高达 24%。

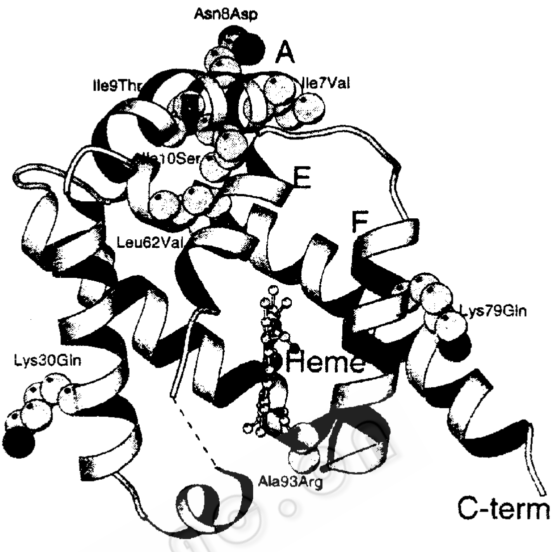

图 1 透明颤菌血红蛋白的三维结构

VHb 同其它血红蛋白的同源性扩展到螺旋构型 B，C，E，F，G 和 H；其立体结构如图 1 所示[8]。计算机分析可知，VHb 与不同的细胞色素之间并不存在显著的同源性。但在基本序列中不同血红蛋白与 b-型细胞色素的类似性使 Runnegar 提出，所有的血红蛋白均是单一种源的，其共同祖先为 b-型细胞色素。而细菌血红蛋白的存在则隐含表明这一共同祖先可能是细菌 b-型细胞色素[7]。

3 透明颤菌血红蛋白基因克隆、表达及调控

直到八十年代中期以前，学者们一直认为，可溶性 Cy*o* 在细胞呼吸中作为一种终端氧化酶而起作用。1986 年，Yutaka Orii 和 Dale A Webster 对 VHb 与 O_2 及 VHb 与 CO 结合的动力学进行了讨论，并指出 VHb 可能是作为 O_2 的载体和贮存物而起作用[9]。Dikshit 和 Webster(1988)在一系列分离、纯化的基础上，测定了透明颤菌血红蛋白基因(Vitreoscilla hemoglobin gene，*vgb*)的氨基酸序列，并通过设计混合寡脱氧核苷探针与透明颤菌基因组 DNA 进行杂交，分析出了 *vgb* 基因的可能位区；随后进行了透明颤菌基因文库的构建，*vgb* 基因克隆以及一系列基因位点剪切分析。结果发现，*vgb* 基因位于 1.4kb 的 *Hind* Ⅲ-*Sal* Ⅰ 片段上，且此 *vgb* 基因片段携带内启动子，而不受载体启动子的控制[10]。同年，Khosla 和 Bailey 进行了一系列 *vgb* 基因的克隆实验，并指出 *vgb* 基因位于约 1.1kb 的 *Hind* Ⅲ-*Sph* Ⅰ 片段上；当 *vgb* 基因在重组大肠杆菌中表达时，通过有无 IPTG 诱导的对比，同样得出了 *vgb* 是以自身启动子启动表达的结论[11]。其后，吴奕，杨胜利等人将 1.4kb 的 *Hind* Ⅲ-*BamH* Ⅰ 基因片段以及 *BamH* Ⅰ-*Pst* Ⅰ 片段分别插入不同质粒的相应位点，构建了有效表达 VHb 的新质粒系列[12]。

Dikshit 和 Webster 通过将克隆的 *vgb* 基因与透明颤菌的全 RNA 进行杂交，确定了 *vgb* 专一性转录产物(VHb)及其长度；*vgb* 基因编码 146 个氨基酸残基，且它是编码该转录产物的唯一基因。在重组大肠杆菌中表达的 VHb 的存在状态与透明颤菌中 VHb 的状态相一致，即：其最重要的功能状态是活性氧合态(Oxyhemoglobin)，而缺氧时则转化为还原态(二价铁)。实验表明，在上述细胞中，VHb 一般以具有生理活性的亚铁形式存在，而 NADH-metHb 还原酶则是该状态得以存在的保证[11]。

1989 年，Dikshit 等人对 VHb 表达过程中最重要的两种酶的活性及功能进行了细致的研究及讨论：其一是血红素合成过程所必需的 δ-氨基-γ-酮戊酸合成酶(ALAS)，其二则是保持 VHb 生理活性亚铁状

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

态所必需的 NADH 高铁血红蛋白还原酶(NADH-metHb)[13]。同年,Khosla 和 Bailey 对 *vgb* 基因的进一步研究表明,在重组大肠杆菌中 *vgb* 启动子的调控处于转录水平且受氧调控,而 *vgb* 基因上游两个启动子的存在则表明它在总体表达水平上涉及很多因素。当 *vgb* 基因启动子部分缺失时,它在任何培养条件下都不能得到表达。同时,他们进一步指出,从 *vgb* 基因中分离的启动子可以用于好氧菌中克隆基因产品的高水平表达,它不需昂贵的诱导剂以及温度突变,因此前景十分诱人[14]。1990 年,Khosla 和 Bailey 等人又指出,相对于将内启动子控制下的 *vgb* 基因插入染色体的单拷贝而言,*vgb* 基因的多拷贝数并不能提供更大的生长增量,且单拷贝菌还具有更实际意义上的基因稳定性[3]。为此,吴奕,杨胜利等(1996)运用同源基因交换法将 *vgb* 基因整合到宿主菌 *E. coli* JM105 的染色体上,得到新的宿主细胞 VG1,且由于 *vgb* 基因的整合,VG1 菌株成为苏氨酸营养缺陷型[15]。研究表明,VHb 的表达使整合型宿主 VG1 比一般的大肠杆菌更适合高密度培养。

4 透明颤菌血红蛋白的生理功能

血红蛋白的氧扩散促进假说最初是由 Jonathan B Wittenberg 于 1966 年首先提出,它表明血红蛋白能够通过与自由氧的不可逆结合以及氧合物的转移扩散来促进氧传递。为了解释透明颤菌血红蛋白的作用机制,Khosla 提出了两个假说:其一即为扩散促进假说,指出 VHb 的存在可以提高缺氧条件下将 O_2 传递到一种或几种终端氧化酶的传氧通量;另一假说可称为胞内氧化还原效应物假说,它指出氧合 VHb(它可以是一个传感器,一个调控子,甚至是一种呼吸酶的变构位点)影响了细胞内一些关键的氧化还原敏感分子的活性,该影响反过来即可引起能量代谢效率的提高。在蛋白质合成的动力学研究中表明,VHb 的促进作用受限氧条件的制约。因此可以假设,VHb 的更大作用可能体现在专性好氧菌,而非兼性好氧菌上[3]。

1989 年,Khosla 和 Bailey 指出,大肠杆菌的好氧呼吸器位于细胞内膜,带有一个朝向细胞质膜的氧结合位点。而生物化学和基因上的证据都表明 *E. coli*-VHb 有一部分输出到了周质空间;对 *Vitreoscilla*-VHb 的定位研究同样定性得到类似结果。实验表明,在重组大肠杆菌或透明颤菌中大约有 1/3~1/2 的活性血红蛋白(Hb)被运输到周质空间,因此,周质空间中含有全细胞 35%~45% 的 Hb 活性。此外,细胞质膜内部和周质空间中的 Hb 还具有相同的分子量。在这两部分的 Hb 中,前 15 个氨基酸相同且与以前的研究相符。*E. coli*-VHb 和 *Vitreoscilla*-VHb 的这种空间分布使学者们对其功能又作出了种种假设[16],并发现氧合态的形成是蛋白发挥生理功能的必要条件,且对细胞的促进作用是该蛋白自身的功能,而不是细胞在基因水平上的二次应答。

1992 年,Dikshit,Lin 以及 Webster 等人指出专性好氧菌 *Vitreoscilla* 具有两种特殊的呼吸特性:首先它含有到目前为止研究得最为透彻的细菌血红蛋白(VHb);其次,在它的呼吸链中以 Na^+ 为动力,而不是大肠杆菌中的 H^+ 泵。此外,他们还提出在大肠杆菌转化株的细胞质中可能存在下列反应循环:

$$VHb(Fe^{II}) + 2H^+ + O_2 \rightarrow VHb(Fe^{III}) + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$$

$$VHb(Fe^{III}) + 2e^- \rightarrow VHb(Fe^{II})$$

$$\text{Net:} \quad 2H^+ + 2e^- + 1/2O_2 \rightarrow H_2O$$

这也即大肠杆菌在正常通气条件下通过电子传递链进行的净反应,而最后与氧气的反应则由细胞色素 *o* 或 *d*(Cy*o* 或 Cy*d*)这两种终端氧化酶催化[17]。

1994 年,Kallio 等人提出,VHb 提高了限氧条件下胞内有效溶氧浓度,因而改变了终端氧化酶的相对活性,提高了质子泵的效率,最终提高了 ATP 产物的效率。此外,他们还提出了 O_2 与 VHb 的可逆结合方程。Philip S Tsai(1995)等人的研究也表明,VHb 在大肠杆菌中的表达提高了终端氧化酶的水平和活性,从而促进了微生物好氧呼吸的效率和生长。实验证明,VHb 的存在提高了终端氧化酶 Cy*o* 的活

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

性，进而提高了大肠杆菌中的氧传递速率 OUR。此外，他们还通过酶动力学分析估计了 VHb 对氧亲和力增大及 *K*m 降低的影响程度[18]。

在上述研究基础上，吴奕等提出了末端电子受体假说，认为氧合态 VHb 是作为末端电子受体参与大肠杆菌呼吸链的末端氧化过程。他们还依据这一假说定量研究了 VHb 对大肠杆菌能量代谢的影响[19]。

5　VHb 在发酵工业上的应用及前景展望[20]

自从 VHb 在大肠杆菌中成功地进行表达以来，它已越来越多地应用到微生物发酵工业的许多领域，并取得了显著效果。

1990 年，Khosravi 和 Webster 等人将 VHb 应用于 α-淀粉酶的生产，发现 VHb 对 α-淀粉酶产量的提高具有很大的作用。此外，在溶氧水平偏低的情况下将 *vgb* 基因转入青霉素酰化酶（pac）基因工程菌中可以明显提高 pac 的表达量。*vgb* 基因不仅能在大肠杆菌中成功表达，在欧文氏菌（*Erwinia*）中也同样起作用。中国科学院上海生物工程研究中心通过实验证实，VHb 在维生素 C 两步法生产中改善了欧文氏菌的生产状况，且在发酵过程中，通气状况越差，VHb 的效果越明显。

此外，VHb 在链霉菌（*Streptomyces*）、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）乃至真核生物霉菌（*Acremonium chrysogenum*）中也都能成功表达，并大大改善发酵过程中的供氧矛盾，大幅度提高产物的产量。

综上所述，透明颤菌血红蛋白能够从分子水平上控制 *vgb* 基因克隆菌对氧气的利用能力，因此能在限氧条件下促进细胞生长和产物合成，从而大幅度提高发酵过程中目的产物的产量和收率。又由于 VHb 的应用不仅可以降低氧气及能量的消耗，还不需要附加的设备投资，因此可大大降低发酵成本。可以说，VHb 的发现及研究进展为利用分子克隆技术解决微生物发酵过程中的氧气供求矛盾及实现高密度发酵培养提供了良好途径，因此 VHb 的研究与应用必将成为发酵工业中的一项关键技术，具有十分光明的前景。

参　考　文　献

[1] Chen J, Tannahill A L, Shuler M L. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, **27**(Feb): 151～155.

[2] Rols J L, Condoret J S, Fonade C *et al*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, **35**: 427～435.

[3] Khosla c, Curtis J E, DeModena J *et al*. *Bio/Technology*, 1990, **8**: 849～853.

[4] Pringsheim E G. *J Gen Microbiol*, 1951, **5**: 124～149.

[5] Strohl W R, Schmidt T M, Lawry N H *et al*. *Intern J of Systematic Bacterology*, 1986, Apr.: 302～313.

[6] Chol M g, Webster D A, Caughey W S. *J Biological Chem*, 1982, **257**(2): 865～869.

[7] Wakabayashi S, Matsubara H, Webster D A. *Nature*, 1986, **322**(31): 481～483.

[8] Joshi M, Mande S, Dikshit K. *Applied and environment microbiology*, 1998, **64**(8): 2220～2228.

[9] Orii Y, Webster D A. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, **261**(8): 3544～3547.

[10] Dikshit K L, Webster D A. *Gene*, 1988, **70**: 377～386.

[11] Khosla C, Bailey J E. *Nature*, 1988, **331**(18): 633～635.

[12] 吴奕，杨胜利. 生物工程学报，1996, **12**(2): 177～182.

[13] Dikshit K L, Spaulding D, Braun A *et al*. *Journal of General Microbiology*, 1989, **135**: 2601～2609.

[14] Khosla C, Bailey J. *Journal of Bacteriology*, 1989, Nov: 5995～6004.

[15] 吴奕，杨胜利. 生物工程学报，1996, **12**(3): 276～283.

[16] Khosla C, Bailey J. *J Mol Biol*, 1989, **210**: 79～89.

[17] Dikshit R P, Dishit D L, Liu Y *et al*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, **293**(2): 241～245.

[18] Tsai P S, Nageli M, Bailey J. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, **49**: 151～160.

[19] 吴奕，杨胜利. 生物工程学报，1997, **13**(1): 1～5.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[20] 郭宏秋,杨胜利.微生物学通报,1996,23(4):227~230.

PROGRESS IN RESEARCH OF *Vitreoscilla* HEMOGLOBIN AND *Vitreoscilla* HEMOGLOBIN GENE

Yu Huimin Shen Zhongyao

(*Department of Chemical Engineering*, *Institute of Biochemical Engineering Tsinghua University*, *Beijing* 100084)

Abstract *Vitreoscilla* is a Gram-negative obligate aerobic bacterium, whose most important property is the ability to produce the *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb). VHb is encoded by a single gene called *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) containing the natural promoter, and the expression of *vgb* gene is regulated by dissolved oxygen at the level of transcription. The oxygen binding VHb participate in the metobolism process of cells and make them grow well in the hypoxic habitats. It also facilitates the bacteria growing and the potein producing obviously. The potential application prospect for the oxygen regulated promoter of *vgb* and the physiological function of VHb in the fermentation industry is reviewed.

Key words VHb, Natural promoter, Hypoxic habitats, Dissolved oxygen

Key Project of Chinese National Natural Science Fund(No. 29834103)

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 96-C03-03-02)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn