

嗜热菌耐热机理的研究进展

马 挺 刘如林

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要: 只在 55℃ 以上的环境中生长的微生物叫嗜热菌。从嗜热菌细胞膜的组成、酶的热稳定性, 以及 DNA、RNA 的耐热机理等方面予以综述, 介绍国内外近年来的研究进展。

关键词: 嗜热菌, 极端嗜热菌, 嗜热酶, 热稳定性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0086-03

生物的一个基本特征是对环境的适应性, 而微生物对高温的适应能力尤为惊人, Stetter 等在海底热口发现能在 110℃ 环境中生活的细菌, Baross 从火山口分离出可生活在高达 250℃ 环境中的细菌。一般认为只在 55℃ 以上的环境中生长的微生物叫嗜热菌, 包括一些细菌及古细菌。极端嗜热菌是泛指最适生长温度在 80℃ 以上的嗜热菌, 其中大部分是嗜热古细菌。嗜热菌在基因工程、蛋白质工程、发酵工程及矿产资源的开发利用上均有很大的应用价值^[1]。

1 嗜热菌细胞膜的组分及其耐热机制

嗜热菌细胞膜的脂双分子层中有很多结构特殊的复合类脂, 主要是甘油脂肪酰二酯。随着温度的升高, 复合类脂中烷基链彼此间隔扩大, 而极性部分作为膜的双层结构则保持整齐状态——液晶态。嗜热菌的细胞膜通常通过调节磷脂组分而维持膜的液晶态, 以获得更高的熔点。嗜热菌的细胞膜中含有异型脂肪酸、稳定型脂肪酸和环烷型脂肪酸, 而无不稳定的不饱和型脂肪酸。增加磷脂酰烷基链的长度, 增加异构化支链的比率, 或是增加脂肪酸饱和度都可维持膜的液晶态, 从而使嗜热菌的细胞膜耐受高温^[2]。

嗜热古细菌的细胞膜主要由类异戊烯二脂组成。磷脂双层的一侧是完全饱和的 C₂₀ 植烷类异戊二烯单醇, 有时两个 C₂₀ 植烷分子会凝聚成 C₄₀ 类异戊二烯双醇, 这些分子以醚键的形式连接甘油分子, 形成植烷甘油二醚和双植烷双甘油四醚。四醚能形成大小和脂双分子层相同的单层膜脂, 避免了双层膜在高温下易变性分开的情况。在嗜热古细菌的膜中还存在环己烷型脂肪酸, 在高温下这种脂肪酸链的环化能促使二醚磷脂

向四醚磷脂转变^[3]。最近发现玉米黄素的嵌入能锚定于脂双分子层的疏水核心, 巩固膜的稳定性, 使其耐受高温^[4]。

2 嗜热菌蛋白和嗜热酶的耐热机制

决定嗜热菌耐热性的主要机制是蛋白质的热稳定性, 在 80℃ 以上环境中能发挥功能的酶称为嗜热酶。嗜热酶对不可逆的变性有抗性, 并且在高温下 (60℃ ~ 120℃) 具有最佳活性, 有的酶甚至在超过 140℃ 时也能稳定一个小时以上, 这样的酶在工业生产中有很大的利用价值。那么, 嗜热酶在高温环境中是如何保持其稳定性的呢?

2.1 动态平衡学说 最初有人认为嗜热菌的许多酶在高温下分解-再合成循环进行得非常迅速, 只要酶在这段很短的循环过程中有活性, 细胞内的这种酶活就能保持一定水平, 这就是动态平衡学说。Rosvita 等人发现喜热嗜油芽孢杆菌 (*Bacillus thermoleovorans*) 中的儿茶酚 2, 3-双加氧酶是热不稳定的, 这种酶必须被不断的合成出来以维持较高的活性^[5]。

2.2 蛋白一级结构的研究 研究表明在蛋白质的一级结构中, 个别氨基酸的改变会引起离子键、氢键和疏水作用的变化, 从而大大增加整体的热稳定性, 这就是氨基酸的突变适应^[6]。有人比较了嗜热菌与常温菌蛋白质氨基酸的组成, 发现嗜热菌蛋白质中 Ile、Pro、Glu 和 Arg 的含量均高于常温菌, 而 Cys、Ser、Thr、Asn 和 Asp 的含量显著低于常温菌。这是因为 Pro 的结构熵较小, 更易折叠, 且一经折叠, 则需很高的能量才能解开, 这样在不影响其高级结构的前提下, Pro 的替代可以提高整个蛋白的热稳定性; Arg 和 Glu 分别比带同样电荷的氨基酸有更大的侧链, 侧链所提供的疏水作用及离子间相互作用能提高蛋白的热稳定性^[7]。

当嗜热酶基因在常温菌细胞中进行表达时, 通常会保留酶的耐热性, 这说明嗜热菌的耐热性是可以遗传的, 编码嗜热酶的基因是对高温适应的结果^[8]。

2.3 蛋白天然构象的热稳定性 嗜热菌的蛋白与常温菌蛋白的大小、亚基结构、螺旋程度、极性大小和活性中心都极为相似, 但构成蛋白质高级结构的非共价力、结构域的包装、亚基与辅基的聚集, 以及糖基化作用、磷酸化作用等等却不尽相同, 通常蛋白对高温的适应决定于这些微妙的空间相互作用^[9]。但有同样活性中心的嗜热蛋白在常温下会由于过于“僵硬”而不能发挥作用。

有人研究了激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 在 118℃ 稳定的红素氧还蛋白和铁氧还蛋白, 发现蛋白中的环状结构很小, α -螺旋更长, 并且在氨基酸的氨基端和羧基端均有特殊的离子相互作用, 这些相互作用在温度上升时能阻止末端区域的解链^[10]。Rainer 等研究了海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 中的 3-磷酸甘油醛脱氢酶, 证实大量极端嗜热菌的蛋白是一个带电残基的盐键网络结构, 该结构中辅基的结合和结构域的偶联都能增加整体的热稳定性^[8]。最近又发现, 温度耐受性与氢键和 (α -螺旋、 β -折叠) 的数目无关, 而与离子键 (盐桥) 有关, 通常嗜热蛋白比嗜常温蛋白约多 14 个盐桥即可获得热稳定性^[11]。

2.4 其它促进酶热稳定性的因素 化学修饰、多聚物吸附及酶分子内的交联也是提高蛋白热稳定性的重要途径。嗜热蛋白酶离子结合位点上所结合的金属离子 (如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等) 可能起到类似于二硫键那样的桥连作用, 促进其热稳定性的提高。

3 嗜热菌遗传物质热稳定性的研究

3.1 DNA 结构的稳定性 目前已知 DNA 双螺旋结构的稳定性是由配对碱基之间的氢键以及同一单链中相邻碱基的堆积力维持的。比较芽孢杆菌属中常温菌和嗜热菌的 DNA

组成,发现生长上限温度和 G + C%之间存在正相关的关系,但是很多嗜热菌的 G + C%与其对应的常温菌相差并不大,有的甚至比常温菌还低。嗜热栖热菌 (*Thermus Thermophilus*) DNA 的 G + C%高达 60 ~ 70%,其 DNA 的构型为 A 型的 DNA—RNA 杂合分子, A 构型的 DNA 相邻碱基重叠偏差大,有利于较多氢键的维持。此外,组蛋白和核小体在高温下均有聚合成四聚体甚至八聚体的趋势,这能保护裸露的 DNA 免受高温降解^[12]。有资料表明嗜热古细菌中存在一种特殊的机制对抗热变性,例如反解旋酶结合在 DNA 双螺旋上,使 DNA 产生更能耐受高温的正超螺旋结构^[13]。

3.2 RNA 世界的对策 tRNA 也是对热比较稳定的核酸分子,嗜热菌属的 tRNA 的 G + C%就明显高于大肠杆菌。最近发现极端嗜热菌 tRNA 的热稳定性与其转录后的修饰有关,修饰后的核苷酸有助于茎环上碱基之间的相互作用、D-环的堆积和新的氢键及离子对的产生。

嗜热菌核糖体的热稳定性是嗜热菌生长上限温度的决定性因子,有人做了嗜热栖热菌 HB8 核糖体基因的插入灭活实验,发现 S17 基因若被 kat 基因取代,会形成温度敏感突变型,若此时加入 S17 蛋白,则会恢复其嗜热性,这说明 rRNA 的热稳定性依赖于 rRNA 与核糖体之间的相互作用^[14]。此外,多胺在嗜热菌核糖体的稳定性上起着独特的作用,在嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus Thermophilus*) 的核糖体或 rRNA 中加入多胺(如腐胺)会提高耐热性。嗜热菌的转录遵循 Szybalski 规则,这导致了 mRNA 链上嘌呤碱基的富集^[15]。非 Watson-Crick 碱基对(如 G-U, G-A, A-C)的增加也能间接导致嗜热菌 RNA 二级结构中氢键数目的增加。此外, RNA 螺旋侧面突起的碱基和近端酯键之间的配对能避免结构上的不稳定性。

4 嗜热菌的研究展望

虽然嗜热菌的耐热机制至今尚不完全清楚,但嗜热菌中的新成分、新结构、新机制的不断发现,将彻底揭开嗜热菌的神秘面纱。今后嗜热菌研究的趋势将是在进一步掌握耐热机理后,人为地赋予一些优秀的工程菌株以耐热性,使其能在高温下发挥效应,从而显现出更为广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Lynn J, Rothschild, Rocco L. Mancinelli Nature, 2001, Vol. 409, No. 22, 1092 ~ 1101.
- [2] elchior D L, Curr Top Membrane Transp, 1982 (7), 263 ~ 316.
- [3] Jack L C M, Van de Vossenberg. Extremophiles, 1998 (2), 163 ~ 170.
- [4] Yokoyama A, Shizuri Y, Hoshino T, et al. Arch Microbiol, 1996, 165, 342 ~ 345.
- [5] Rosvita E Milo, Fiona M Duffner, Rudolf Muller. Extremophiles, 1999 (3), 185 ~ 190.
- [6] Julie Hollien, Susan Marqusee. PNAS, 1999, Vol. 96, No. 24, 13674 ~ 13678.
- [7] 卢柏松, 王国力, 黄培堂. 微生物学报, 1998, 38 (1), 20 ~ 25.
- [8] J Gregory Zeikus, Claire Vieille, Alexei Savchenko. Extremophiles, 1998, 2, 179 ~ 183.
- [9] Rainer Jaenicke. The FASEB Journal, 1996 (10), Jan. 84 ~ 92.
- [10] Michael W. W. Adams, Robert M. Kelly. C&EN, 1995, Dec. 18, 32 ~ 42.
- [11] Gilbert J. Chin. Science, 2000, June2, 288, 1551.
- [12] Kathleen Sandman, John N. Reeve. Arch. Microbiol. 2000, 173, 165 ~ 169.
- [13] Forterre P, Elie C. Biochemistry, 1993, 26, 325 ~ 361.
- [14] Maria S, Horacio A, Francois F. Eurrop Journal Biochemistry, 1999, 266, 524 ~ 532.
- [15] Perry J Lao, Donald R F. Genome Research, 2000, 10, 228 ~ 236.