

苏云金芽胞杆菌 γ -氨基丁酸代谢途径相关 功能基因的克隆、表达及同源性分析*

朱莉^{1,2} 宋福平¹ 张杰¹ 黄大昉^{2**}

(中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害国家重点实验室 北京 100094)

(中国农业科学院生物技术所 北京 100081)

摘要 γ -氨基丁酸代谢旁路作为三羧酸循环的一个分支,在真核、原核生物中广泛存在。在这条代谢途径中,涉及 γ -氨基丁酸分解代谢的主要有两种酶:一种是 γ -氨基丁酸转氨酶,能将 γ -氨基丁酸转变成琥珀酸半醛;另一种是琥珀酸半醛脱氢酶,该酶能将琥珀酸半醛氧化形成琥珀酸,后者进入三羧酸循环。从国内分离得到的苏云金芽胞杆菌G03菌株中克隆了 $gabT$ 和 $gabD$ 基因。其中 $gabT$ 基因含有1440 bp,编码一个大小为52.6 kD的蛋白质,而 $gabD$ 基因大小为1449 bp,编码一个52.2 kD的蛋白质。这两个基因都分别在大肠杆菌中进行了表达和纯化。通过酶活测定结果表明, $GabT$ 和 $GabD$ 蛋白分别呈现出 γ -氨基丁酸转氨酶和琥珀酸半醛脱氢酶的活性。氨基酸序列同源性比对分析发现,这两个蛋白质在蜡芽胞杆菌群(*B. cereus* group)中具有较高的相似性,而与枯草芽胞杆菌的相似性较低则分别为58%、51%。为进一步深入研究 γ -氨基丁酸代谢旁路在苏云金芽胞杆菌中的生物学功能及其转录调控机制奠定了基础。

关键词 γ -氨基丁酸代谢旁路,苏云金芽胞杆菌, γ -氨基丁酸转氨酶,琥珀酸半醛脱氢酶

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1031-06

Cloning, Expression and Phylogenetic Analysis of Two GABA Shunt-related Proteins from *Bacillus thuringiensis**

ZHU Li^{1,2} SONG Fu-Ping¹ ZHANG Jie¹ HUANG Da-Fang^{2**}

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute
of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract The γ -aminobutyric acid (GABA) shunt is a metabolic pathway that bypasses two successive steps of the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) in both prokaryotes and eukaryotes. In this pathway, the enzymes involved in GABA catabolism are GABA transaminase (GABASE), which converts GABA to succinic semialdehyde, and succinic-semialdehyde dehydrogenase (SSADH), which oxidizes succinic semialdehyde to succinate. In this report, we characterized $gabT$ and $gabD$ genes cloned from *B. thuringiensis* strain G03 isolated in China. Both $gabT$ gene, 1440 bp encoding a protein with 52.6 kD, and $gabD$ gene, 1449 bp encoding a protein with 52.2 kD were expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain, and their products were purified by affinity chromatography. By enzyme assay, $GabT$ protein showed the activity of GABASE, while $GabD$ protein exhibited SSADH activity. The amino acid sequences of two proteins, GABASE and SSADH, showed significant identity with those in the *B. cereus* group, but their similarity score between G03 and *B. subtilis* 168 was lower, only 58% and 51%, respectively. In the present study, we provided evidence to identify the genes involved in GABA metabolism, and it will be helpful for further assessment the biological function(s) and regulation mechanism of GABA shunt in *B. thuringiensis*.

Key words GABA shunt, *Bacillus thuringiensis*, GABA transaminase, Succinic-semialdehyde dehydrogenase

* 国家 973 项目(No.2003CB114201)和国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2006AA02Z189)

** 通讯作者 Tel 010-62896113 010-68919842 Fax 010-62812642 E-mail dh Huang@ippcaas.cn, dh Huang@mail.caas.net.cn

收稿日期:2007-03-02,修回日期:2007-05-24

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种以自由态形式广泛存在于原核及真核生物中的四碳非蛋白质氨基酸,在不同生物体中有不同的生理功能。比如,在哺乳动物中 GABA 是作为中枢神经系统中的一种重要的抑制性神经递质存在的,它通过存在于神经突触后膜的 GABA_A、GABA_B 和 GABA_C 三种受体及与其它神经递质的交互作用,参与了动物体内多种重要的行为和生理反应的调节以及癫痫、忧郁症、焦虑症和胰岛素依赖型糖尿病等多种疾病的发病机制^[1]。在植物中 GABA 可在缺氧、冷害、热刺激、机械刺激、干旱和盐胁迫等多种逆境条件下大量积累(GABA 含量可增加几至几十倍)^[2]。人们推测植物在不同逆境条件下大量积累的 GABA 可能在调节植物体内 pH 值、逆境条件下相关代谢中起回补作用、氮储备、渗透调节、调节植物生长发育、诱导逆境乙烯的产生、提高植物防御能力等几方面起作用^[3-4]。在微生物方面, Woese 等^[5]研究发现 γ -氨基丁酸与枯草芽胞杆菌 Marburg 芽胞萌发的有关,而在巨大芽胞杆菌 *B. megaterium* QM B1551 菌株突变芽胞的萌发过程中必需有 γ -氨基丁酸的参加,表明 γ -氨基丁酸可能在芽胞萌发过程中起媒介作用^[6]。最新研究结果表明, GABA 作为真核生物与病原菌细胞间互作中一种重要的信号分子,通过调控细菌群体感应信号分子 OC8-HSL [N-(3-oxooctanoyl)homoserine lactone] 的表达水平,进而影响病原菌对真核生物致病力^[7]。

GABA 由谷氨酸经谷氨酸脱羧酶催化转化而来,其代谢主要是通过 GABA 旁路(GABA shunt)来完成的,主要包括 3 个步骤: L-谷氨酸在 L-谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD)催化下经 α -酮戊二酸脱羧后,产生 GABA; GABA 在 GABA 转氨酶(GABA transaminase, GABASE)催化下,与丙酮酸发生转氨作用生成琥珀酸半醛和丙氨酸;琥珀酸半醛在琥珀酸半醛脱氢酶(Succinic semialdehyde dehydrogenase, SSADH)作用下氧化生成琥珀酸后进入三羧酸循环(Krebs Circle)。这样从 α -酮戊二酸经过谷氨酸、GABA、琥珀酸半醛生成琥珀酸的代谢途径就构成了三羧酸循环的一条侧支,称为 GABA 旁路(GABA shunt)^[8]。研究发现 GABA 旁路在微生物中主要参与氮、碳源的代谢^[9,10]、参与腐胺和精胺等多胺的代谢^[11],并能够对多种逆境胁迫产生应答,

具有重要的生理功能^[12]。

Nickerson 等^[13]在苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)生长及芽胞萌发过程中发现 γ -氨基丁酸代谢旁路的存在。进一步的酶学分析发现,苏云金芽胞杆菌伴胞晶体合成的过程中,不同时期测出的 γ -氨基丁酸代谢旁路中氨基丁酸转氨酶和琥珀酸半醛脱氢酶是有差异的。例如,在对数生长期(4h~6h),对数后期伴胞晶体合成开始(9h~10h),形成芽胞的早期(11h~13h)和后期(15h~16h)即伴胞晶体旺盛合成期,氨基丁酸转氨酶分别为 8.3nmol/(min·mg)、5.7nmol/(min·mg)、1.5nmol/(min·mg)和 1.0nmol/(min·mg)蛋白质;而琥珀酸半醛脱氢酶分别为 24.3nmol/(min·mg)、11.7nmol/(min·mg)、6.2nmol/(min·mg)和 5.0nmol/(min·mg)蛋白质。在这个时期,这两种酶呈下降趋势,而伴胞晶体合成呈上升趋势^[14]。该途径的发现为深入研究苏云金芽胞杆菌的芽胞和伴胞晶体的形成提供了线索,但这仅是在酶学水平的研究,在分子水平上的研究还未见报道。本研究通过对这 2 种酶编码基因的克隆,并在大肠杆菌中过量表达,进一步对其酶活性进行了鉴定,为深入研究 γ -氨基丁酸代谢旁路在苏云金芽胞杆菌中的功能和调控机制提供了线索。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM110 用于基因的克隆, BL21 用于外源基因的表达。大肠杆菌在 LB 培养基中 37℃ 培养,苏云金芽胞杆菌 G03 在 LB 培养基中 30℃ 培养。氨苄青霉素(Amp)使用浓度为 100 μ g/mL。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、KOD DNA 聚合酶购自北京鼎国生物技术有限公司,限制性内切酶购自北京六合通生物技术有限公司。T4DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司,PCR 产物纯化试剂盒购自 TianGen 公司。His-tag 纯化试剂盒(Chelating Sepharose Fast Flow)购自 Pharmacia Biotech 公司,GST 琼脂糖凝胶纯化预装柱(GSTrap 1mL column)购自 Amersham Biosciences 公司。

γ -氨基丁酸、琥珀酸半醛、焦磷酸钾、 β -巯基乙醇、 α -酮戊二酸和氧化型辅酶 NADP⁺ 购自 Sigma 公司。其它化学试剂均来自北京科昊达生物技术有限

1.3 方法

1.3.1 DNA 遗传操作与转化:质粒提取、琼脂糖凝胶电泳鉴定、酶切反应、DNA 片段回收、连接反应和大肠杆菌转化等遗传操作方法参照 Sambrook 等^[15]。苏云金芽胞杆菌感受态的制备和电激转化见参考文献 [16]。所得到的 PCR 产物都经过测序进行验证。

1.3.2 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶基因的克隆、表达与纯化: γ -氨基丁酸转氨酶:利用 KOD 聚合酶通过 PCR 扩增方法从苏云金芽胞杆菌 G03 基因组中获得编码氨基丁酸转氨酶的基因。所用引物根据苏云金芽胞杆菌菌株 YBT1520 全基因组测序结果设计(未发表)。正向引物含 *Bam*HI 限制性酶切位点,反向引物含 *Sal*I 限制性酶切位点(表 1)。PCR 反应条件如下:94℃ 4 min; 94℃ 1min, 54℃ 1 min, 68℃ 3 min, 30 个循环, 68℃ 延伸 10 min。扩增得到的 *gabT* 基因用 *Sal*I 和 *Bam*HI 双酶切后插入同样酶切消化处理的 pET-21b 载体。得到的重组质粒转化大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)。所获得的阳性转化子接种活化,菌液按 1% 转接于含 100 μ g/mL 氨

苄青霉素的 LB 培养基中 37℃ 培养至 OD_{600} 0.5 ~ 0.6, 加 0.5 mmol/L IPTG 18℃、140 r/min 诱导过夜。6000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 4℃ 复溶于 20 mL 20 mmol/L Tris 缓冲液中。混合物 4℃ 条件下搅拌 30 min。之后超声破碎, 12000 r/min 低温离心 30 min 去除细胞沉淀。上清进行 SDS-PAGE(12%) 电泳检测。得到的带有 6 个组氨酸标签的融合蛋白参照 Pharmacia 说明书通过镍柱亲和层析方法进行纯化。

琥珀酸半醛脱氢酶:利用 KOD plus 聚合酶通过 PCR 扩增方法从苏云金芽胞杆菌 G03 基因组中获得编码琥珀酸半醛脱氢酶的基因。引物设计、PCR 反应同前。扩增产物经 *Sal*I 和 *Bam*HI 双酶切后插入同样酶切消化处理的 pGEX-4T-1 载体。得到的重组质粒 pGEX-*gabD* 转化大肠杆菌菌株 BL21。经测序验证正确后,带有 GST 标签的琥珀酸半醛脱氢酶融合蛋白在大肠杆菌中被诱导表达,表达产物参照 Amersham 产品说明书进行谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析纯化。

表 1 引物序列

Name	Sequences	Note
<i>gabDF</i>	CG GGATCCT TGGATAAAAAGGCGAC <i>Bam</i> HI	For pGEX-4T-1 vector
<i>gabDR</i>	AC GCGTCGACT AGTCCCAATGAAATATA <i>Sal</i> I	For pGEX-4T-1 vector
<i>gabTF</i>	CG GGATCCG ATGCTAGAAAAGAAAGTTGGC <i>Bam</i> HI	For pET-21b vector
<i>gabTR</i>	ACGC GTCGACAAC CGGAGCGATGTTTGTTTG <i>Sal</i> I	For pET-21b vector

注:加粗部分为引入的酶切位点。

1.3.3 酶活测定: γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶酶活测定方法参见 Jakob^[17]。

1.3.4 氨基酸序列同源性分析:利用标准化多序列比对软件 Clustal W^[18]将 G03 的 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶氨基酸序列分别与芽胞杆菌属中其它已知的同源序列进行比对分析,并运用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 3.1 软件分别构建两者的遗传进化树^[19]。

2 结果与分析

2.1 γ -氨基丁酸转氨酶 *gabT*、琥珀酸半醛脱氢酶 *gabD* 基因的鉴定

两对引物 *gabTF/gabTR* 和 *gabDF/gabDR* (表 1)用于 G03 基因组 DNA 的扩增,PCR 产物(*gabT*

大小约 1440 bp, *gabD* 约 1449 bp)由上海生工进行测序。核苷酸序列比对分析表明,这两个基因与 YBT1520 菌株的同源基因序列完全一致,与蜡样芽胞杆菌 ATCC 14579 同源基因具有较高的相似性,相似系数分别为 98%(*gabT*)和 97%(*gabD*)^[20]。*gabT* 和 *gabD* 基因序列已提交到 GenBank(登录号分别为: DQ859985 和 DQ859986)。

2.2 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶的表达与纯化

γ -氨基丁酸转氨酶基因 *gabT* 插入到 pET-21b 表达载体并在大肠杆菌 BL21 中成功表达。表达的融合蛋白是可溶性的,大小约为 53 kD,与预计的融合蛋白(包括 52.6 kD 的氨基丁酸转氨酶和 C 末端 6 个组氨酸标记)大小一致(图 2)。粗提物利

用 200 mmol/L 咪唑缓冲液进行镍柱亲和层析得到纯化产物,经 SDS-PAGE 分析蛋白纯度达 90% 以上(图 1 泳道 3)。

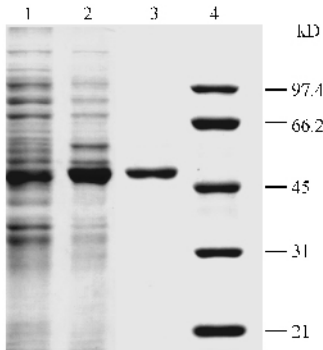


图 1 GabT 融合蛋白镍柱亲和层析纯化 SDS-PAGE 电泳图

1 阴性对照(pET-21b 空载体) 2 GabT 粗蛋白提取物(大约 53 kD);
3 GabT 纯化蛋白(大约 53 kD) 4 低分子量蛋白标记物

琥珀酸半醛脱氢酶基因 *gabD* 通过 pGEX-4T-1 在大肠杆菌 BL21 中正常表达。表达产物大小约为 78 kD,包括 C-末端一个大小约为 53 kD 琥珀酸半醛脱氢酶和 N-末端一个大小为 26 kD GST-标签,并且也是可溶性的(图 2 泳道 1)。用 20 mmol/L PBS 缓冲液(pH 8.0)洗脱经谷胱甘肽凝胶亲和层析方法得到纯度约为 95% 的纯化蛋白(图 2 泳道 2)。

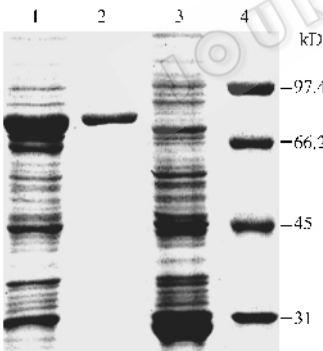


图 2 GabD 融合蛋白谷胱甘肽琼脂糖亲和层析纯化 SDS-PAGE 电泳图

1 GabD 蛋白粗提取物(约 78 kD) 2 GabD 纯化蛋白(约 78 kD) 3 阴性对照(pGEX-4T-1 空载体) 4 低分子量蛋白标记物

2.3 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶的活性检测

得到的纯化产物 GabD 和 GabT 用于酶活测定。其中纯化的 GabT 呈现 γ -氨基丁酸转氨酶活性(2.206 U/mL/mg protein), GabD 纯化蛋白表现出琥珀酸半醛脱氢酶的活性(3.858 U/mL/mg protein)(表 2),与其它纯化的琥珀酸半醛脱氢酶活性相比, G03 的

琥珀酸半醛脱氢酶活性与荧光假单胞菌的相似(3.61 U/mg/protein)^[21],比人的(2.7 U/mg/protein)^[22]略高一些,但比拟南芥的要低得多(23 U/mg/protein)^[23]。酶活测定结果还发现 G03 中琥珀酸半醛脱氢酶活性是依赖于 NADP⁺ 的。

表 2 GabT 和 GabD 蛋白纯化方法和酶活测定结果

	Total protein concentration (mg/mL) ^a	Enzyme activity (Units/mL/mg proteins)	Purification method
GabT			Ni ²⁺ -affinity chromatography
Crude extract	5	3.228	
Purified enzyme	0.2	2.206	
GabD			Glutathione Sepharose affinity chromatography
Crude extract	1.2	4.393	
Purified enzyme	0.4	3.858	

注: ^a 总蛋白质浓度利用牛血清白蛋白作为标准。

2.4 氨基酸序列同源性分析

运用 MEGA 3.1 软件对 G03 的 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶与 NCBI 蛋白质数据库中芽胞杆菌家族 13 个已知的同源蛋白分别进行了氨基酸序列比对分析,结果表明:除了蜡样芽胞杆菌 *weihenstephanensis* KBAB4 (*Bw* KBAB4)外,大多数蜡样芽胞杆菌群成员聚集在一起(图 3A)。来自 G03 的 γ -氨基丁酸转氨酶与蜡样芽胞杆菌 14579 和苏云金芽胞杆菌以色列亚种 ATCC 35646 的具有极高的相似性,相似系数达 99%。三者的大小均为 479 个氨基酸,只有一个氨基酸残基不同,即 G03 中第 304 个残基是天冬酰胺(Asn),而在其它两个菌中则是天冬氨酸(Asp),说明 γ -氨基丁酸转氨酶在蜡样芽胞杆菌群中是相当保守的。而另外 3 个菌即 *B. halodurans* C-125 (*Bh* C-125)、*B. licheniformis* ATCC 14580 (*Bl* 14580) 和枯草芽胞杆菌 168 聚在另一组,与 G03 的相似性较低,其中 G03 和枯草芽胞杆菌 168 相似最低,仅有 58%。

同样地,通过对琥珀酸半醛脱氢酶氨基酸序列同源性分析得到了类似的结果(图 3B)。来自 G03、蜡样芽胞杆菌 14579 和苏云金芽胞杆菌以色列亚种 ATCC 35646 三者的琥珀酸半醛脱氢酶具有较高的相似性,相似系数为 98%。说明琥珀酸半醛脱氢酶在蜡样芽胞杆菌群中同样也是非常保守的。而 G03

和枯草芽胞杆菌 168 之间的相似性也是最低的,仅为 51%。

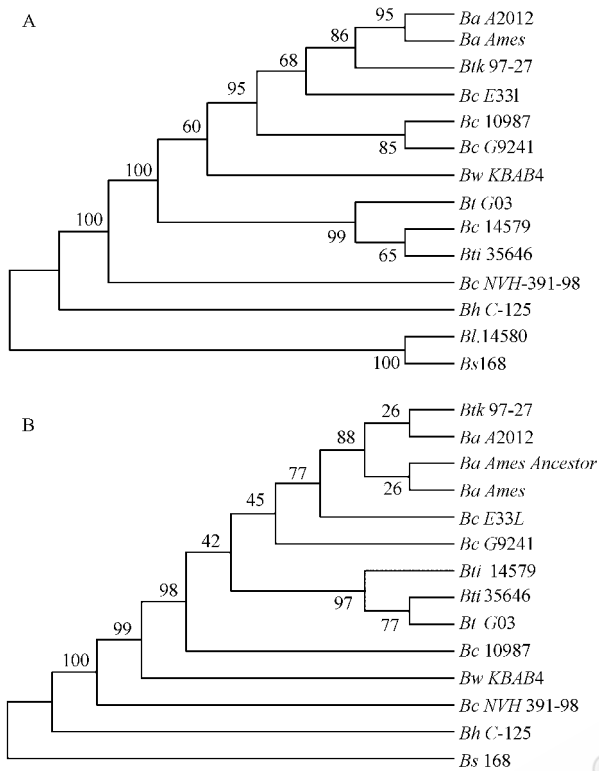


图3 基于氨基酸序列比对结果构建的芽胞杆菌 γ -氨基丁酸转氨酶 (A) 和琥珀酸半醛脱氢酶 (B) 系统进化树

3 讨论

本研究首次从苏云金芽胞杆菌中克隆了 γ -氨基丁酸转氨酶编码基因 *gabT* 和琥珀酸半醛脱氢酶编码基因 *gabD*, 并分别建立了这两种酶的表达和纯化方法。对 γ -氨基丁酸转氨酶而言, 选用 pET-21b 表达载体能够在大肠杆菌中大量表达, 通过镍柱亲和层析方法获得纯化蛋白。与以往报道的纯化方法相比, 在荧光假单胞菌中采用精蛋白处理、硫酸铵分级沉淀、大体积丙酮处理, 然后再通过 N, N-二乙基氨基乙基纤维素层析方法, 经过这些处理虽然可以获得纯化产物, 但酶活性却大部分丧失了^[24]。本实验中采取的表达与纯化方法, 不仅简单易行, 而且能够获得高产量、高纯度的纯化蛋白。另外, 我们发现 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 18°C、140 r/min 的培养条件有利于 γ -氨基丁酸转氨酶基因的表达。而在利用 pET-21b 表达琥珀酸半醛脱氢酶基因时, 却未得到可溶性蛋白。尽管我们采取了多种方法 (如不同温度诱导、不同诱导物浓度、不同转速等组合诱导)

进行表达条件的优化, 但表达产物仍以包涵体的形式存在于沉淀中, 因此换用另一个表达载体 pGEX-4T-1 获得了可溶性目的蛋白。这些结果表明, 不同蛋白质的表达系统可能是不同的。对于同一种蛋白, 其表达纯化的方法不同, 所得到的结果也不尽相同。有关琥珀酸半醛脱氢酶, 最初报道在荧光假单胞菌中是采用三步纯化方法, 包括 Sephacryl S-300、DEAE-Sephacel、Blue Sepharise CL-6B fractions 等^[25]。在大肠杆菌中其纯化方法有所改进, 采用过硫酸铵分级沉淀的方法。与这些方法相比, 采用固定的谷胱甘肽亲和层析方法, 简单快捷, 一步完成纯化, 显著提高了目的蛋白的产量和纯度, 并且较好地保持了蛋白的活性。总之, 本实验所采用的简单、有效的表达纯化方法, 获得了高纯度、高活性的 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶, 为进一步深入研究它们的结构和功能提供了可能。

炭疽芽胞杆菌 (*B. anthracis*)、蜡样芽胞杆菌 (*B. cereus*) 和苏云金芽胞杆菌 (*B. thuringiensis*) 是蜡样芽胞杆菌群中亲缘关系非常接近的 3 个种, 有关它们的分类地位至今尚不清楚。它们是同一个种的不同变种还是属于不同的种始终争论不休^[26, 27]。本实验通过对芽胞杆菌群中 14 个已知的 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶氨基酸序列同源性比对分析发现, 苏云金芽胞杆菌的 γ -氨基丁酸转氨酶、琥珀酸半醛脱氢酶与蜡样芽胞杆菌群中的同源蛋白均具有较高的相似性, 而与蜡样芽胞杆菌群外其它菌的相似性较低。前人通过蜡样芽胞杆菌群与枯草芽胞杆菌比较基因组分析发现, 那些涉及关键代谢、氨基酸、脂类、氮源、磷和硫代谢等途径的基因在不同基因组间无显著差异^[28]。本研究结果发现这 2 种涉及氮源代谢的蛋白在蜡样芽胞杆菌群中是相当保守的, 正好与上述结论相符。另外, 我们发现苏云金芽胞杆菌 97-27 并未与 G03 聚在一起, 而是与炭疽芽胞杆菌 A2012 和 Ames 聚在一起。这些结果再次说明这 3 种菌之间亲缘关系非常接近。

编码 γ -氨基丁酸代谢途径相关酶的基因通常是以 *gab* 基因簇的形式存在的^[12], 但不同生物中 *gab* 基因簇的组织结构却是不同的。大肠杆菌基因组上 *csiD-ygaF-gabDTP* 基因簇组成了一个复杂的、由 σ^s 因子控制的操纵子, 参与 γ -氨基丁酸的代谢^[12, 29]。而枯草芽胞杆菌中涉及 γ -氨基丁酸代谢途径的两个功能基因 *gabK* (编码 γ -氨基丁酸转氨

酶) *gabD* (编码琥珀酸半醛脱氢酶) 组成一个操纵子, 由另外一个与之反向的调节基因 *gabR* 进行转录调控^[9]。根据已发表的苏云金芽胞杆菌 Bt 97-27 全基因组序列, 我们通过基因组比较分析发现, 苏云金芽胞杆菌 Bt 97-27 中与 γ -氨基丁酸代谢相关的基因也是成簇出现的, 但该基因簇的结构与枯草芽胞杆菌和大肠杆菌的明显不同, 其中 *gabD* 和 *gabT* 基因被一个依赖于 σ^{54} 因子的转录调控因子分开, 这两个基因是否组成一个操纵子, 它们与 σ^{54} 因子之间在什么样的关系尚不清楚。进一步分析发现 *gab* 基因簇这种结构在蜡样芽胞杆菌群中基本上是一致的, 说明 γ -氨基丁酸代谢相关的基因在蜡样芽胞杆菌群中是比较保守的, 但在该群的不同菌种中(如蜡样芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌以及苏云金芽胞杆菌), 其功能是否有所不同还有待深入研究。

琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH)属于醛脱氢酶家族, 在原核生物中比较保守^[30]。在细菌中已发现存在两种形式的琥珀酸半醛脱氢酶, 其活性一种依赖于 NAD^+ , 与 4-羟苯基乙酸苯酯(4-hydroxyphenylacetate)的代谢有关; 另一种则依赖于 NADP^+ , 主要参与 γ -氨基丁酸的代谢^[25, 30]。在枯草芽胞杆菌中只发现一种依赖于 NAD^+ 的琥珀酸半醛脱氢酶, 据推测其在涉及琥珀酸半醛利用的功能上可能还存在另外一条与 GABA shunt 无关的代谢途径^[9]。而在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中发现琥珀酸半醛脱氢酶是由两个基因(*gabD1* 和 *gabD2*)编码的, 其活性则是依赖于 NADP^+ 的^[31]。本研究从苏云金芽胞杆菌 G03 中克隆了一个琥珀酸半醛脱氢酶编码基因, 并鉴定其表达产物的活性是依赖于 NADP^+ 的, 但其功能如何, 是否还存在另外一个琥珀酸半醛脱氢酶基因等都需要进一步的验证。

总之, 本研究通过对 γ -氨基丁酸代谢旁路中两个关键基因 *gabT*、*gabD* 的克隆、表达与纯化方法的建立、相关酶的活性分析鉴定以及序列同源性的比对分析, 这些研究工作为进一步深入了解 γ -氨基丁酸代谢旁路在苏云金芽胞杆菌中的生物学功能及其转录调控机制奠定了基础。下一步工作将围绕苏云金芽胞杆菌中 *gabT*、*gabD* 的功能鉴定、*gab* 基因簇的操纵子结构与转录调控机制等方面展开。

致谢 感谢中国科学院微生物所谭华荣教授给予的指导和帮助。本研究由国家 973 项目(No. 2003CB114201)和国家高技术研究发展计划(863 计划)专题(2006AA02Z189)资助完成。

参考文献

- [1] Kriegstein A R. *Nat Neurosci*, 2005, **8**: 1132 ~ 1133.
- [2] Palanivelu R, Brass L, Edlund A F, *et al.* *Cell*, 2003, **114**: 47 ~ 59.
- [3] Bouche' N, Lacombe B, Fromm H. *Trends Cell Biol*, 2003, **13**: 607 ~ 610.
- [4] Bouche' N, Fromm H. *Trends in Plant Sci*, 2004, **9**: 110 ~ 115.
- [5] Woese C R, Morowitz H J, Hutchinson C A. *J Bacteriol*, 1958, **76**: 578 ~ 588.
- [6] Foerster H F. *J Bacteriol*, 1971, **108**: 817 ~ 823.
- [7] Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, *et al.* *Proc Natl Acad Sci*, 2006, **103**: 7460 ~ 7464.
- [8] Bown A W, Shelp B J. *Plant Physiol*, 1997, **115**: 1 ~ 5.
- [9] Belitsky B R, Sonenshein A L. *Mol Microbiol*, 2002, **45**: 569 ~ 583.
- [10] Zaboura M, Halpern Y S. *J Bacteriol*, 1978, **133**: 447 ~ 451.
- [11] Shaibe E, Metzger E, Halpern Y S. *J Bacteriol*, 1985, **163**: 933 ~ 937.
- [12] Metzner M, Germer J, Hengge R. *Molecular Microbiology*, 2004, **51**(3), 799 ~ 811.
- [13] Nickerson K W, DePinto J, Bulla L A. *J Bacteriol*, 1974, **117**: 321 ~ 323.
- [14] Aronson J N, Borris D P, Doerner J F, *et al.* *Appl Microbiol*, 1975, **30**: 489 ~ 492.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] Lereclus D, Arantes O, Chauvaux J, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **60**: 211 ~ 217.
- [17] Jakoby W B. *Methods in Enzymology*, in: Colowick S P, Kaplan N O (Eds.), Academic Press, New York, 1962, pp. 771 ~ 774.
- [18] Higgins D, Thompson J, Gibson T, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 4673 ~ 4680.
- [19] Kumar S, Tamura K, Nei M. *Brief in Bioinform*, 2004, **5**: 150 ~ 163.
- [20] Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, *et al.* *Nature*, 2003, **423**: 87 ~ 91.
- [21] Jakoby W B, Scott E M. *J Biol Chem*, 1959, **234**: 937 ~ 940.
- [22] Chambliss K L, Gibson K M. *Int J Biochem*, 1992, **24**: 1493 ~ 1499.
- [23] Busch K B, Fromm H. *Plant Physiol*, 1999, **121**: 589 ~ 598.
- [24] Scott E M, Jakoby W B. *J Biol Chem*, 1959, **234**: 932 ~ 936.
- [25] Sanchez M, Alvarez M A, Balana R, *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1988, **953**: 249 ~ 257.
- [26] Helgason E, Okstad O A, Caugant D A, *et al.* *Appl Environ Microb*, 2000, **66**: 2627 ~ 2630.
- [27] Radnedge L, Agron P G, Hill K K, *et al.* *Appl Environ Microb*, 2003, **69**: 2744 ~ 2764.
- [28] Anderson I, Sorokin A, Kapatrala V, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **250**: 175 ~ 184.
- [29] Schneider B L, Ruback S, Kiupakis A K, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, **184**: 6976 ~ 6986.
- [30] Donnelly M I, Cooper R A. *Eur J Biochem*, 1981, **113**: 555 ~ 561.
- [31] Tian J, Bryk R, Itoh M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**: 10670 ~ 10675.