

从微生物角度看生物进化

钱存柔

(北京大学生物系)

物种起源的中心内容是物种进化和自然选择。前者说明现存的生物物种具有共同祖先,生物的类型不是一成不变的,而是新种不断产生,旧种不断绝灭。后者说明生物具高度生殖率,必须在有限的生存条件中为生存而斗争,斗争结果能留存者为少数,那些具有利于选择的变异个体会有较多生存的机会,而具不利于选择的变异个体则受淘汰,亦即自然选择。

通过放射性元素计时技术,已经相当肯定地球上原核生物的出现大约是在 $3.5-4.0 \times 10^9$ 年以前,在这漫长生物进化途径中,它们无疑是处在进化阶梯的最底层,研究微生物的进化以及利用微生物作模型来阐明生物进化可能的原因是很有意义的问题。

原核微生物进化的可能过程

最初原始有机体可能是厌氧和异养营养型的,估计在细胞外已有半透性质膜包围,尚无细胞壁结构;细胞没有分化出芽孢或鞭毛等结构;由于此时大气尚属无氧情况,应以发酵作用获得能量;代谢的酶系统非常简单,主要依赖从外界摄取多种的生长因素;这样的原始生物和目前地球上存在着的支原体的性状非常接近。随之发展在细胞外出现了细胞壁,使其能够在渗透压改变的环境条件下生活,但仍然以发酵作用获得能量,乳酸细菌的性状是与此接近的。随之,细胞内分化出芽孢、鞭毛等结构,细胞内出现了氢化酶,使有机体能从 $NADH_2$ 中氧化还原放出氢气,能在还原的底物中生长。固氮酶的出现将大气中的 N_2 固定为有机物;因尚无组成细胞色素的卟啉出现,故只能从底物水平磷酸化得到能量,有的可借 *Stickland* 反应由氨基酸间的氧化还原得到能量,如梭菌即为此种情况。

出现在原始大气中的 CO_2 可能被还原成 CH_4 , 并容许甲烷细菌的进化,这一群细菌可能是地球上最早出现的自养营养型细菌,至今仍广泛分布在厌氧环境中。另一种可能的厌氧电子受体是硫酸盐,是 H_2S 和臭氧发生化学反应的产物,去磺菌可以在厌氧条件下还原硫酸盐作最终电子受体生成 H_2S 。

卟啉和叶绿素的出现是个关键性的转折,导致产生可利用日光和 CO_2 进行光合作用的生物。最初的光合有机体应是厌氧的,利用 H_2S 作为电子给体,如绿

硫细菌、色硫细菌等通过光合作用系统 I (环式磷酸化) 将 CO_2 固定成为有机物;蓝细菌(蓝绿藻)虽然已具有放氧型的光合作用,但其含细菌叶绿素的类囊体呈单条状分散在细胞内,只是发展到高等植物后才有了叶绿体。但是蓝细菌进行光合作用时释放出氧这一进化对地球环境产生很大影响,但还原型大气转变成氧化型。用氧作电子受体就发生了好氧性有机体,它们能从氧化有机物获得比厌氧菌更多的能量。这些有机体生长繁殖过程中向环境排出较复杂的有机物,为以后出现新类型有机体提供了机会。根据化石提供的证据,随地球大气变成氧化型的时候,进化速度有很大突进,导致真核微生物的出现,并从它们进化到更高级的动物和植物(图 1)。

氧在原始大气中出现的另一重要结果是臭氧的形成。臭氧能防止太阳的强紫外辐射到达地球,臭氧防护层出现前,进化只能出现在岩石下或海洋深层;在此以后,有机体才能广泛分布在地球表层,使更多类型的有机体生存进化。

应当强调指出,目前生活的有机体没有一种是原始的。这些有机体中某些种确实很类似原始有机体,可能代表进化树的茎干几百万年来没有变动,它们与原始有机体有关系,但本身并不就是原始有机体。

以微生物为模型在试管内研究进化的可能

一般认为最初的微生物仅具有有限的代谢能力,以后在发展过程中逐渐扩大了它们所具酶的种 类 范 围,并增强了生物合成和分解的能力,这种能力的获得是由于原始微生物通过已存在的基因复制手段增加了基因物质的数量,并可能从其他有机体获得遗传物质所致。近年来欧美几个实验室的科学家们,如英国伦敦大学院 *Clarke*, 英国皇家科学及技术学院 *Hartley*, 美国康耐尔大学 *Mortlock* 和美国西北大学 *Wu* 等人正在开展一项所谓“试管内的进化论”研究。这些研究工作是另一类型的“基因工程”,微生物在特定条件下被迫改善或突然丧失某些代谢能力,这种能力不是由于从外界获得某些物质,而是通过改变它们原先存在的遗传信息,例如由于调控突变而建立起一条新的代谢途径。现将实验内容简单介绍如下:

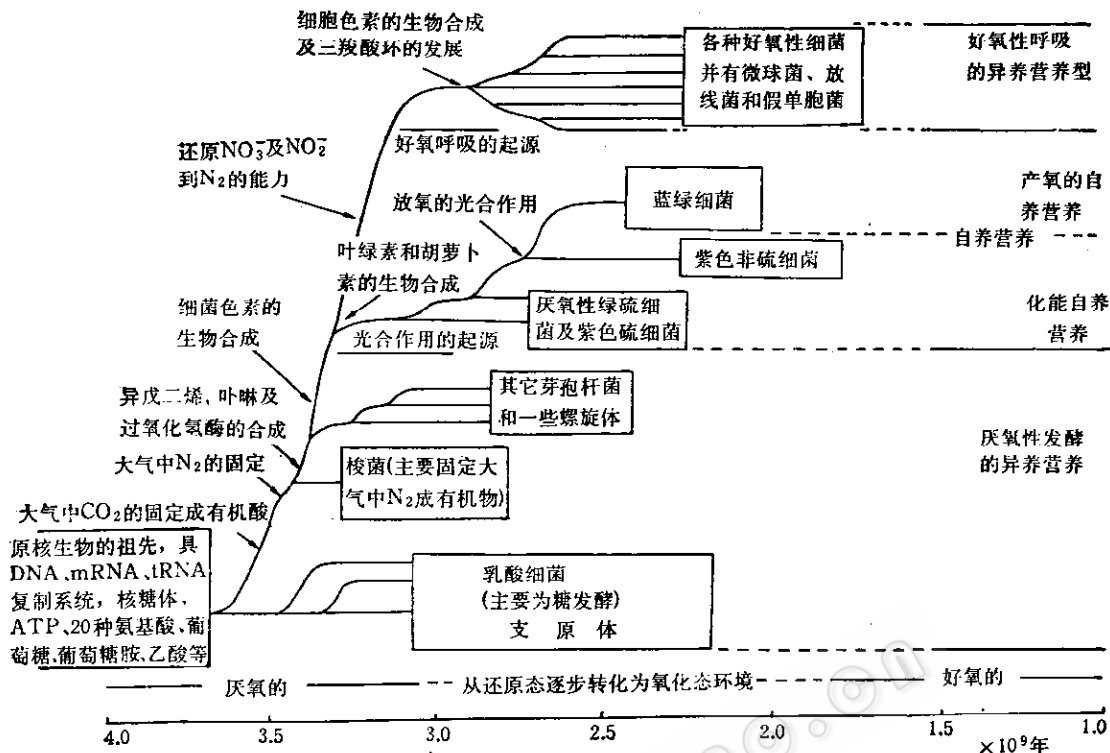


图1 原核生物进化的可能途径

(一) 产气克雷伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*) 的戊糖代谢途径及新代谢途径的建立

野生型克雷伯氏菌能利用自然界较丰富的核糖醇和 D-阿糖醇,但不能利用木糖醇和 L-阿糖醇,首先戊糖醇渗透酶使底物进入细胞,后由以 NAD 为辅酶的戊糖醇脱氢酶将第二位碳原子上的氢脱下,氧化为相应的戊酮糖,再由戊酮糖激酶从 ATP 脱下一个磷到五位碳原子上生成戊酮糖-5-P,以后即进入中心途径进行分解(图 2):

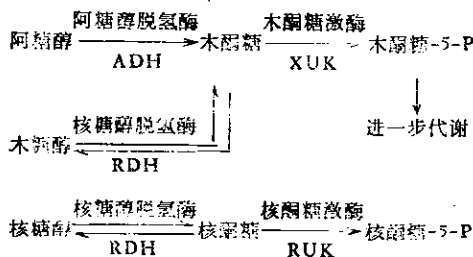


图2 克雷伯氏菌的戊糖代谢途径

控制核糖醇和 D-阿糖醇二条代谢途径的酶都是诱导酶。从表 1 可以看出,将细菌培养在含蛋白胨的基质上时,细胞内的酶活性均极低,一旦加入核糖醇,核糖醇脱氢酶和核酮糖激酶的活性立刻大大提高;加入 D-阿糖醇则 D-阿糖醇脱氢酶和 D-木酮糖激酶也同样大

大提高了酶活性。可见细菌需要核糖醇诱导的遗传信息以合成降解途径中所需的酶。从另一方面也可证实,一旦细胞内诱导酶合成,细菌即立刻迅速增殖,而对细菌不太适宜的基质如木糖醇和 L-阿糖醇加入后,需经长时间的培养才能看出生长(表 2)。克雷伯氏菌野生型亲株不能利用木糖醇或 L-阿糖醇,当接种足数量的细胞培养在含木糖醇或 L-阿糖醇内作生长基质时,由于自发突变的结果,那些获得能分解这两种戊糖醇的变种细胞经选择作用而存留下来,在观察到生长以前的这段时间内,亦即对变种进行选择 and 生长所需的时间。一旦突变种细胞的纯培养建立后,就可看到在木糖醇为基质进行生长的时间只需数小时,而不像亲株那样需要好多天,并且以后证明这些变种细胞内已出现木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶,一条代谢木糖醇的新途径已经建成(表 3)。

在木糖醇(+)变种细胞内除发现有低水平的木酮糖脱氢酶和 D-阿糖醇脱氢酶的活性外,还发现具特别高的核糖醇脱氢酶活性。最初以为是木糖醇代谢可能偶然有诱导核糖醇途径酶的作用,但用纯化技术处理,仍不能将核糖醇脱氢酶与木糖醇脱氢酶分开,最后经过生物化学、免疫学和遗传学实验,证实了这二种酶的活性是由一个共同酶作用的结果。既然如此,那么又为何需要突变才能使细菌在木糖醇上生长呢?那是因

表1 克雷伯氏菌在降解核糖醇和D-阿糖醇的酶活性

生长基质	酶的比活(单位/毫克蛋白质)			
	核糖醇脱氢酶	核酮糖激酶	D-阿糖醇脱氢酶	D-木酮糖激酶
酪蛋白水解物	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
D-葡萄糖	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
核糖醇	1.08—3.71	0.08—0.51	<0.02—0.05	<0.02
D-阿糖醇	<0.05—0.07	<0.02	1.13—4.27	0.23—0.27

表2 克雷伯氏菌在不同戊糖醇内生长的情况

生长基质	达到完全生长的时间 (天)	开始生长前的停滞期 (h)
D-葡萄糖	0.5	1—4
核糖醇	1.0	1—4
D-阿糖醇	0.5	1—4
木糖醇	4.0	72
L-阿糖醇	2.0	15

表3 在木糖醇和L-阿糖醇上生长的克雷伯氏菌突变种在不同基质上生长时细胞内核糖醇脱氢酶的活性

菌株	生长基质	核糖醇脱氢酶 活性单位/毫 克蛋白质
原始亲株	D-葡萄糖	<0.02
	核糖醇	1.10—3.71
	D-阿糖醇	0.05—0.06
	蛋白胨	<0.02
木糖醇上生长的培养物	木糖醇	3.01—19.3
L-阿糖醇上生长的培养物	L-阿糖醇	0.08—0.38
木糖醇(+)变种的纯培养	蛋白胨	18.07—24.1
L-阿糖醇(+)变种的纯培养	蛋白胨	15.66—20.48

为核糖醇操纵子必需发生突变,此突变能容许没有任何诱导物存在时仍能合成高温性的核糖醇操纵子的各种酶。核糖醇操纵子处于负调控状态,调控基因 *rbcB* 能产生阻遏蛋白,在无核糖醇诱导时结合在 *rbcC* 部位(操纵位/启动位),此时结构基因 *rbcD* 和 *rbcK* (核糖醇脱氢酶基因和核酮糖激酶基因)不能表达,因而不能合成核糖醇脱氢酶和核酮糖激酶;一旦核糖醇作为诱导物出现在基质中,就给出信号使阻遏蛋白从 *rbcC* 上脱下,克服了阻遏作用并容许合成核糖醇脱氢酶及核酮糖激酶。当核糖醇被消耗完毕时,阻遏作用又重新出现。然而如果因调节基因发生突变遭到破坏(也可能突变发生在启动基因部位),丧失与阻遏蛋白结合的能力,此时诱导酶的形成不再依赖诱导物的作用,即使没有核糖醇存在,核糖醇脱氢酶和激酶仍可继续合成。同时由于木糖醇结构与核糖醇相似,所以进行木糖醇代谢的新途径就可利用原有的酶生成木酮糖和5-P木

酮糖。

培养环境中由克雷伯氏菌的亲株所习惯利用的核糖醇改变为不能利用的木糖醇后,就出现突变,其中包括那些由于基因复制而具有多个拷贝的基因编码的变种,这样就增多了合成酶的数量,并且如果复制基因之一发生突变,则有可能形成一个改变的酶来利用新的底物,如此多次重复基因的复制和修饰,结果逐渐就可能发展成一条完全新的代谢途径,可用图3表示这一过程:

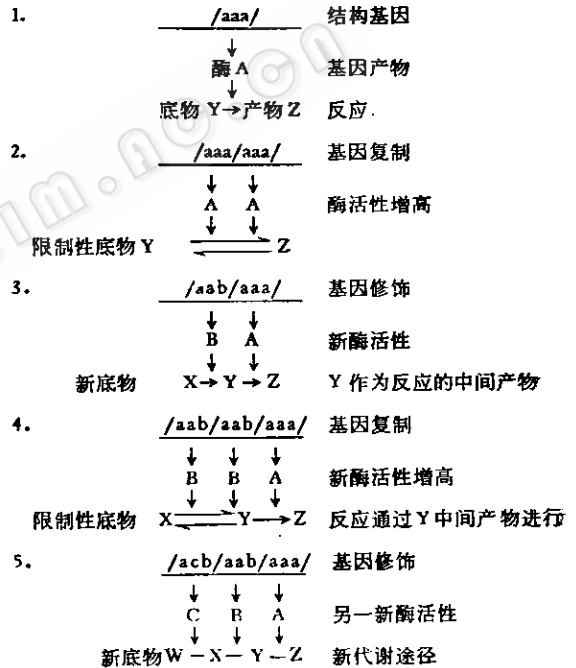


图3 一个操纵子进化的可能性

(二) 核糖醇脱氢酶在恒化器中的进化

将产气克雷伯氏菌A株接种到恒化器内,用M9加0.2%木糖醇作培养基,pH6.7,30℃进行培养。培养过程中每天取12ml测pH、OD值、细胞干重、残留底物及活细胞计数等项,隔一定时间含木糖醇的平板分离。有时用低剂量的UV照射1—2小时以增加突变速度。分离得到的单菌落进行培养后,测无细胞提取物的木糖醇脱氢酶活性。图4表示克雷伯氏菌的自然突变和UV诱变得到的菌株谱系,表4表示各菌

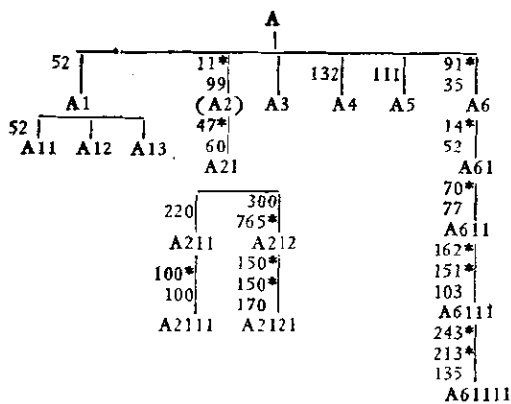


图4 克雷伯氏菌自然突变及UV诱变得到的菌系图谱
(数字表示培养代数,*表示用低剂量UV照射)

表4 克雷伯氏-A及其衍生菌株中核糖醇脱氢酶-A超产的情况

菌株号	最大比生长速度 (μm) (h^{-1})	无细胞提取物中的酶活性	
		核糖醇脱氢酶活性 (单位/mg蛋白质)	对木糖醇的米氏常数 $K_m(\text{M})$
A	0.53	2.0	1.2
A1	0.64	9.0	1.4
A11	0.82	32.0	1.3
A12	—	27.8	1.3
A112	1.20	48.5	—
A2	—	2.4	1.4
A21	0.64	11.0	1.6
A211	0.84	27.0	1.2
A212	0.81	—	1.3
A2121	—	—	1.3
A3	—	13.0	1.3
A4	0.60	15.8	1.4
A5	0.70	—	1.2
A6	—	12.8	1.5
A61	—	18.2	1.5
A611	—	18.7	1.0
A6111	—	35.0	1.5
A61111	1.61	32.0	1.5

株测得的核糖醇脱氢酶活性。

以上结果说明,无论是自然突变或由UV诱变,所得菌株内含核糖醇脱氢酶的活性随着在恒化器内生长世代的增多,酶活性也逐步增加。例如对照A株的核糖醇脱氢酶约为其全部可溶性蛋白的2%,而A1、A3和A4株则逐步增高至10—15%,A6111达35%,A112达48%,比原初提高20多倍。伴随酶活性超产的同时,菌的比生长速度也随之加快,可见通过恒化器内木糖醇的选择作用,原不能以木糖醇为唯一碳源的

克雷伯氏菌变为可利用木糖醇作生长基质。

若用0.2%木糖醇/M9的恒化器,在自发突变的基础上再加亚硝基胍(NG)诱变处理,选择能利用木糖醇的突变株时,发现用高剂量NG处理后,突变株细胞内出现了木糖醇脱氢酶,表现在木糖醇脱氢酶/核糖醇脱氢酶比值A.R.由0.03增加到0.15。在另一批实验比较野生型A株与突变型D株细胞内核糖醇脱氢酶特性时,也发现D株的酶活性比野生型高3—4倍,并对木糖醇的亲合力加大(K_m 值减小,RDH-A为1.20, RDH-D为0.91),反应速度增快(RDH-A为20单位/毫克, RDH-D为43单位/毫克)。但在比较野生型和突变型核糖醇脱氢酶的氨基酸组成序列时,只发现在196位的氨基酸有变化,野生型196位氨基酸原为丙氨酸,在突变型中变为脯氨酸了。

前面已经提到,经过各方面实验证明,核糖醇脱氢酶与木糖醇脱氢酶的性质是相同的,也可说突变株中的木糖醇代谢途径是借用了原先存在于野生型中的核糖醇代谢途径。新酶的形成可能首先由于核糖醇操纵子发生突变,酶活性的增高则可能由于突变中改变了转录过程,或是改善了转译过程,或是由于基因扩增所致。

(三) 产气克雷伯氏菌的核糖醇脱氢酶在大肠杆菌K12中的进化

大肠杆菌K12不能在戊糖醇的基质上生长,因为它不具备所必须的核糖醇和D-阿糖醇脱氢酶,但如果设法把克雷伯氏菌的核糖醇操纵子 rbt 基因通过溶源噬菌体的作用转导至大肠杆菌K12细胞内以后,得到杂交菌株EA。将EA菌株同以前用来选择克雷伯氏利用木糖醇突变种的方法一样,在含0.2%木糖醇/M9培养基的恒化器内进行培养。经过若干代后,不论是核糖醇脱氢酶或是木糖醇脱氢酶活性都明显得到表达。

这一实验结果说明,新的代谢功能的形成除突变外,还可能通过在生物进化过程中遗传物质在种间的相互转移而产生。这一事实同样在细菌质粒的转移以及溶源噬菌体的限制性转导作用中得到证明。

从上述恒化器中以微生物为模型研究在进化途径中获得新功能的过程有以下几个事实可以总结如下:

1. 克雷伯氏菌从最初不能在木糖醇上生长到能利用,首先是核糖醇操纵子的调控基因发生突变,使核糖醇不存在时,核糖醇脱氢酶仍能继续合成,并以其催化新底物木糖醇降解,使微生物能在其上生长;进一步通过基因复制增强了新酶的活性,选择了那些能利用木糖醇快速生长的类型。这样就逐渐导致生成一个能调节新底物(木糖醇)代谢的特异操纵子。看来有机体为扩大利用生长基质的种类形成新途径时,酶的诱导和抑制以及基因复制是很必要的。

2. 新酶的产生是逐步形成的。通过分析野生型和
(下转第243页)

(上接第 267 页)

突变型的核糖醇脱氢酶的结果,虽然二者在氨基酸序列上,仅有一个氨基酸发生改变,但是这一改变就使酶对木糖醇的催化活性大大提高,有的可使木糖醇脱氢酶/核糖醇脱氢酶的比值增加 20 倍,并且在木糖醇上的生长速度与在核糖醇上生长的速度相等甚至超过。值得注意的是,微生物虽然获得了新酶活性,但原来酶的活性依然保留,并未消失。

3. 通过将核糖醇操纵子转移到大肠杆菌细胞内,使其表达并同样能在木糖醇上生长的实验结果,表明种间基因的转移在微生物进化中的重要性,这一过程

可以在克雷伯氏菌与大肠杆菌间发生,也有可能在其他一些微生物种间进行。

参 考 文 献

- [1] 美国 T. D. 布洛克著,四川大学等译:微生物生物学,人民教育出版社,北京,1980。
- [2] Michael A. Tribe et al.: The Evolution of Eukaryotic Cells, Edward Arnold, 1981.
- [3] Microorganisms As Model Systems For Studying Evolution, Robert P. Mortlock Ed., Plenum Press, 1984.