

氧化亚铁硫杆菌亚铁氧化系统的研究进展

欧阳建平^{1,2} 陈新华²(¹厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; ²国家海洋局第三海洋研究所海洋遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)为无机化能自养菌,革兰氏阴性,能在极端酸性环境中生长。由于在生物冶金中的应用及特殊的生理学效应,该菌受到研究者的广泛关注。*A.ferrooxidans* 能氧化亚铁、元素硫及还原态硫化物获得电子,并通过一系列电子载体将电子传递给氧生成水,同时释放能量供生命活动需要。目前对 *A.ferrooxidans* 电子传递系统的研究主要集中于亚铁氧化电子传递系统,已发现多种与亚铁氧化电子传递相关电子载体和操纵子,如电子载体铜蓝蛋白(Rustocyanin R_{us})、细胞色素 C(Cytochrome C, C_{yc})、细胞色素 C 氧化酶(Cytochrome C oxidase, C_{ox})、亚铁氧化酶(Iro)、细胞色素 bc1 复合物(cytochrome bc1 complex bc1)等,以及 rus 操纵子和 pet 操纵子。综述了近年来有关 *A.ferrooxidans* 亚铁氧化电子传递链相关蛋白载体, rus 和 pet 操纵子结构与功能及表达调控等方面的研究进展。

关键词: 氧化亚铁硫杆菌 亚铁氧化 电子传递链

Reserch Progresses in Ferrous Oxidation System of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Ouyang Jianping^{1,2} Chen Xinhua²(¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005; ²The Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005)

Abstract: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A.ferrooxidans*) is a sort of gram-negative obligate autotrophic bacterium which can be capable of growing in extreme acidic environments. *A.ferrooxidans* has attracted great interest because it has been used in industrial mineral processing and features unusual physiology characteristics. *A.ferrooxidans* derives energy by oxidizing ferrous iron, elemental sulfur and its reduced compounds during which the electrons are transferred to oxygen through a series of carriers. At present the researches about oxidative system of *A.ferrooxidans* have mainly focused on the ferrous oxidation system and several electron carriers and operons involved in ferrous oxidation have been identified, such as electron carrier Rustocyanin(R_{us}), Cytochrome C(C_{yc}), Cytochrome C oxidase(C_{ox}), ferrous oxidase(Iro), cytochrome bc1 complex (bc1) and rus and pet operons. In this paper the recent research progresses on structure and function and expression regulation of several electron carriers and operons (rus and pet operons) in *A.ferrooxidans* were discussed.

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans* Ferrous oxidation Electron transfer chain

氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A.ferrooxidans*)为无机化能自养菌,杆状,革兰氏阴性,能在极端酸性环境中生长,最适 pH 在 2.0 左右,最适生长温度为 30℃。*A.ferrooxidans* 在有氧条件下依靠氧化亚铁、各种还原性硫化物以及氢来获

得能量供生命活动需要。在无氧条件下,能以三价铁或硫为电子受体、氢为电子供体,或以三价铁为电子受体、还原性硫化物为电子供体获得能量生长。这些现象说明 *A.ferrooxidans* 能量代谢途径的多样性和复杂性。目前认为亚铁氧化的大部分电子

收稿日期:2008-10-10

基金项目:海洋公益性科研专项(200805032),国际海底区域研发项目(DYXM-115-02-2-07),国家重点基础研究前期项目(2006CB708200)

作者简介:欧阳建平(1983-),男,硕士,研究方向:微生物蛋白组学

通讯作者:陈新华,E-mail:chenxinh@tom.com,Tel:0592-2195297

都顺电势梯度传递给氧;同时少量电子逆电势传递,产生还原力 NAD(P)H 参与细胞内的物质能量代谢。其中对顺电势梯度传递途径操纵子 *rus*, 逆电势电子传递途径操纵子 *pet* 研究较多。综述了近年来有关 *A. ferrooxidans* 亚铁氧化电子传递链相关蛋白载体, 及 *rus* 和 *pet* 操纵子的结构与功能和表达调控等方面的研究进展。

1 电子传递载体蛋白

1.1 亚铁氧化酶(Iro)

Iro 为高电位铁蛋白 HiPIP 家族的一种, 具有较高的氧化还原电势。HiPIP 是生物界广泛分布的电子传递载体, 通过 $(\text{Fe}_4\text{S}_4)^{2+}$ 与 $(\text{Fe}_4\text{S}_4)^{3+}$ 之间相互转化传递电子, 其 N 端有一段 37 个氨基酸组成的信号肽, 具有典型的 Tat 分泌系统识别序列^[1]。 *A. ferrooxidans* Iro 为多亚基 HiPIP, 从 Fe-1 菌株纯化的 Iro 分子量大小为 63 kD, 可分解成 6.0 kD 的小亚基, 从分子量推测, Iro 可能由 8 个或 10 个亚基组成。

Iro 可能是 *A. ferrooxidans* 亚铁氧化电子传递的电子初受体, 参与电子传递途径, 即 Iro 将来自亚铁氧化获得的电子经过水溶性 C_{yc} 和 R_{us} 传递给电子传递体 C_{yc}1, C_{yc}1 将电子传递给 C_{ox}。但由于细菌周质中 pH 较高, 三价铁易沉淀, 亚铁不可能在高 pH 值的周质中被氧化。因此, Iro 与亚铁之间在外膜上可能存在中间电子载体。研究表明, 不同 *A. ferrooxidans* 的 Iro 基因位点可能不同。Fe-1 和 BRGM 菌株的 Iro 基因处于编码腺苷酸基琥珀酸合成酶的 *purA* 基因下游; 在 ATCC19859 和 ATCC33020 菌株中, Iro 基因则位于编码 bc1 亚基细胞色素 C1 的 *petC2* 基因下游。*petC2* 基因下游的 Iro 基因在亚铁氧化早期和硫氧化全过程都有转录, 且在硫氧化过程中表达量比亚铁氧化早期表达量要大^[2], 提示它可能是硫氧化电子传递系统中 bc1 与末端氧化酶之间的电子传递载体^[3,4]。以上分析表明, 可能存在两种功能不同的 Iro 基因, *purA* 基因下游的 Iro 基因可能与亚铁氧化电子传递有关, 位于 *petC2* 基因下游的 Iro 则可能是硫氧化过程中 bc1 与末端氧化酶之间的电子传递载体。但在部分 *A. ferrooxidans* 中没有检测到 Iro 的存在^[5]。根据 *rus* 操纵子所编码蛋白质的组成及定位, 提出一条不需要 Iro 参与电子传递链^[5,6]。因此, 在没有 Iro 的菌株

中电子传递系统可能不需要 Iro 参与。

1.2 细胞色素 C(Cyc)

C_{yc} 是电子传递链重要电子载体, 通常定位于细菌内膜或外膜, 部分分布在细胞周质间隙中, 在周质间隙中的 C_{yc} 大多为可转移的电子载体。对 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 基因组分析发现有 11 个编码 C_{yc} 的基因, 且大多数 C_{yc} 基因有 2 个拷贝^[7]。在亚铁氧化过程中 C_{yc} 的表达量达到总蛋白量 10%, 说明了在亚铁氧化电子传递过程中发挥重要的作用。此外, C_{yc} 也参与硫氧化过程的电子传递, 但是在硫代谢过程中的表达量相对于亚铁中少。对 *A. ferrooxidans* ATCC33020 C_{yc} 表达分析发现, 至少有 1 种 C_{yc} 只在硫氧化过程中得到表达, 3 种 C_{yc} 只在亚铁氧化过程中表达^[7]。另外, 在以三价铁为电子受体, 氢为电子供体的无氧培养条件下, 发现有一种 28 kD 的 C_{yc} 大量表达。这些研究表明, 在不同的电子供体条件下, *A. ferrooxidans* 通过表达不同的 C_{yc} 参与电子传递过程来获取能量, 以适应不同的生活环境。

1.3 铜蓝蛋白(Rus)

R_{us} 是铜蛋白超家族的成员, 是分布于 *A. ferrooxidans* 周质中的可溶性蛋白, 在酸性条件下较为稳定, 其氧化还原电势高达 680 mV。现已在 *A. ferrooxidans* 菌中发现了 2 种 R_{us} 基因, 即 *type-A* 和 *type-B*。*Type-A* R_{us} 基因的分布较 *type-B* 较广泛, 存在 *rus* 操纵子中, 而 *Type-B* R_{us} 基因不存在于 *rus* 操纵子中, 在 *Type-B* 基因下游发现了一个未知开放阅读框^[8]。然而, 目前对于这 2 种 R_{us} 基因的表达行为特征, 即两种基因是否都表达或只有一种基因表达, 以及其表达的两种蛋白是否都具有生物学活性等仍不清楚。

在亚铁氧化过程中, R_{us} 表达量很高, 可达到细菌蛋白总量的 5% 左右, 且表达量变化与亚铁氧化速度变化一致, 说明了 R_{us} 可能是亚铁氧化电子传递系统中的重要蛋白。在硫氧化过程中, R_{us} 在对数期早期有瞬时表达, 但表达量远低于在亚铁中生长的表达量, 随着时间的延续 R_{us} 的表达量逐渐降低, 到了对数期的中后期几乎不表达^[10]。在硫氧化过程中 R_{us} 的本底表达并不能引起亚铁的氧化, 亚铁氧化需要在 R_{us} 积累到一定的量才能发生^[11],

有关 Rus 在硫氧化早期表达的作用目前尚不清楚。

早期研究认为 Rus 是亚铁氧化电子传递的初受体,但由于它存在于细胞周间质中,不可能是亚铁氧化的电子初受体。推测 Rus 蛋白参与亚铁氧化电子传递的可能途径为, Iro 通过中间载体接受 Fe^{2+} 的电子, Iro 再将电子传递给 C_{yc} C552(s), 还原态的 C_{yc} C552(s) 将部分电子传递给 Cox^[11], 部分电子传递给 Rus, 还原的 Rus 再将电子传递给 Cox。从以上电子传递途径分析表明, Rus 可以拓宽电子从 C_{yc} C552(s) 传递到 Cox 的路径。另一条可能的电子传递途径则认为, Rus 作为电子传递链载体一方面将电子从 C_{yc}2 顺电势梯度传递给与 Cox 偶联 c4 型 C_{yc} (C_{yc}1); 另一方面将电子从 C_{yc}2 逆电势传递给与 bc1 偶联的 c4 型 C_{yc} (C_{yc}A)。

1.4 细胞色素 C 氧化酶 (Cox)

Cox 是 *A. ferrooxidans* 亚铁氧化电子传递系统中最重要末端氧化酶, 它能将还原态 C_{yc} 的电子传递给氧生成水, 同时释放出能量供生命活动需要。此外, 它还具有质子泵的功能, 将质子转运出细胞。亚铁氧化过程中绝大多数电子都是通过 Cox 传递给氧, 目前已经提出了多条可能的电子传递链, 但 Cox 是一致接受的末端氧化酶。*A. ferrooxidans* 的 Cox 由 4 个亚基组成, 包括 CoxA、CoxB、CoxC 和 CoxD。它们一同存在于 rus 操纵子中, 其排列顺序为 cox B, cox A, cox C, cox D^[5]。

Cox 是多种有毒重金属作用的靶位点。例如, NaWO₃ 是一种强毒性的重金属盐, 0.2 mM 就能完全抑制 *A. ferrooxidans* 的生长。研究发现, NaWO₃ 与 *A. ferrooxidans* 质膜、细胞质, 及纯化的 Cox 结合量分别为 8、0.5 和 191 μg/mg^[12]。因此, NaWO₃ 对 *A. ferrooxidans* 的抑制作用可能是 NaWO₃ 与膜上的 Cox 结合, 抑制了 Cox 的活性, 其生命活动所需的能量生产被阻止, 从而抑制 *A. ferrooxidans* 的生长。

1.5 细胞色素 bc1 复合物 (bc1)

bc1 是生物圈能量传递重要的蛋白复合物, 几乎所有呼吸作用和光合作用电子传递都与 bc1 有关。它主要在膜结合醌和可溶性小分子 redox 蛋白之间传递电子, 如 C_{yc}, 高电势的铁硫蛋白 HiPIP, 质体蓝素等^[13]。bc1 由 3 种蛋白质亚基组成, 包括细胞色素 b、细胞色素 c1 和 Rieske 蛋白, 这 3 种蛋白

的编码基因均存在于 pet 操纵子中。在 *A. ferrooxidans* 中有 2 种 bc1, 分别由 pet I 操纵子和 pet II 操纵子编码。在亚铁氧化条件下表达的 bc1 由 pet I 编码, 不能顺电势传递电子^[14]; pet II 编码的 bc1 在硫氧化过程中表达。推测 pet I 编码的 bc1 可能负责亚铁氧化过程中电子逆电势传递, pet II 编码的 bc1 可能负责硫氧化过程中顺电势电子传递。

2 操纵子表达调控

2.1 Rus 操纵子表达调控

同一呼吸电子传递系统的电子载体通常存在于同一个操纵子中, 它们的表达调控依赖其生长的条件。*A. ferrooxidans* 的 rus 操纵子与亚铁氧化电子传递相关。它由 c_{yc}1、c_{yc}2、Cox B、Cox A、Cox C、Cox D、Rus 组成及一段未知功能的 ORF^[5] (图 1)。根据 rus 操纵子的基因组成、排列顺序、编码蛋白的细胞定位及其相互作用研究提出了一条电子传递链途径: C_{yc}2-Rus-c_{yc}1-Cox-O₂^[6,5,15]。

在 rus 操纵子中有 3 个启动子, 其中 2 个在 C_{yc}2 上游, 分别为 P_I、P_{II}, 一个在 Cox D 与 Rus 之间为 Prus^[5,10]。rus 操纵子表达调控主要与培养基中电子供体有关。当以亚铁为电子供体时 rus 操纵子大量表达; 当以硫为电子供体时, rus 操纵子在生长对数期早期瞬时表达; 当亚铁和硫同时存在时, 亚铁先被氧化, rus 操纵子大量表达, 随着亚铁的完全氧化 Rus 的表达量也随之减少, 最后停止表达。在硫氧化早期 rus 操纵子的表达主要是由 P_I 启动, 在亚铁氧化过程中 3 个启动子都有启动转录, 且比硫氧化过程中表达量要高。Sugio 等^[16]发现 rus 操纵子的表达可能也与 pH 有关。在硫为唯一能源物质的生长条件下, 生长对数期早期亚铁氧化活性较高, 随着硫的氧化 pH 降低, 亚铁氧化活性也随之降低, 同时, Rus、CoxB 的表达也随着 pH 的变化先增加, 随后逐渐终止^[10], 这与以前的报道相一致, 即 *A. ferrooxidans* 中部分蛋白质的表达与 pH 有关^[7]。因此认为, *A. ferrooxidans* rus 操纵子的表达与培养基中电子供体、硫氧化过程中的细菌生长期, 以及 pH 有关。

另一假想认为硫氧化早期 rus 操纵子的瞬时表达与培养基营养条件有关。大肠杆菌中存在一种营养调控因子——histone like Fis 蛋白, 能调控大肠

杆菌多种生命活动,包括电子传递链的调控^[18]。在 *A. ferrooxidans* 中已经找到 Fis 蛋白类似基因,因此推测硫氧化早期 Rus 的表达可能与营养条件有关,但在 *rus* 操纵子上游并未找到相关调控位点。



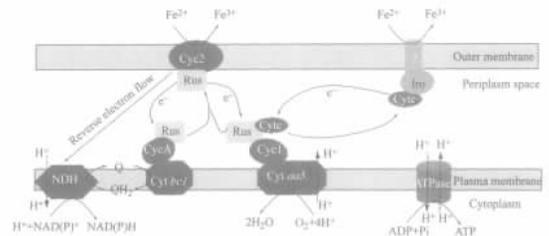
2.2 Pet 操纵子表达调控

目前已证实, *A. ferrooxidans* ATCC 23270 具有 2 个 *pet* 操纵子,即 *pet I* 和 *pet II*,也是迄今惟一一个具有 2 个 *pet* 操纵子的物种。*pet I* 和 *pet II* 操纵子基因组成如下:*pet I*: *cycA1-sdrA1-petA1-petB1-petC1*, *pet II*: *cycA2-sdrA2-petA2-petB2-petC2-hip*。*Pet I* 和 *pet II* 之间相差一个 *hip* 基因,其中 *CycA* 基因编码一种 C4 型 *Cyc*; *SdrA* 基因编码一种脱氢酶的短链,功能尚不清楚; *Hip* 编码一种 HiPIP; *PetA* 基因编码 C4 型 *Cyc*; *PetB* 基因编码细胞色素 b; *PetC* 基因编码 Rieske 蛋白。根据 *CycA1* 基因所处位置分析,它可能是亚铁与 NAD(P) 之间逆电势电子传递载体,可能负责 Rus 与 *bc1* 之间电子传递。*CycA2* 或 *hip* 可能是 *bc1* 与末端氧化酶之间电子传递载体, *bc1* 将电子传递给 *hip* 或 *cycA2*, *hip* 或 *cycA2* 再将电子传递给末端氧化酶。*pet I* 在亚铁为惟一能源物质的生长条件下大量表达,当培养基中的亚铁被氧化完全后表达量明显降低。*pet II* 在亚铁或硫为惟一能源物质的生长条件下都有表达,但 *pet II* 在亚铁生长条件下只在在对数生长期的早期瞬时表达,到了中后期不表达。这种瞬时表达可能受 Fis 蛋白调控^[2],但对 *pet II* 上游序列分析却没有发现 Fis 蛋白结合序列,也没有发现其他调控因子结合序列。由此可见, *pet I* 和 *pet II* 操纵子的表达主要受以下两个因素控制。(1) 受能源物质的调控,即 *pet I* 只在亚铁作为能源的条件下表达, *pet II* 则主要在硫氧化过程中表达;(2) 在亚铁氧化过程中 *pet II* 只在早期瞬时表达, *pet II* 的表达与亚铁氧化所处的时期有关。

3 总结

综上所述 *A. ferrooxidans* 电子传递可能途径

(图 2)。



顺电势传递途径: Fe^{2+} -未知电子初受体-Iro-CytC-Rus-Cyc1-Cox- O_2 或 Fe^{2+} -Cyc2-Rus-Cyc1-Cox- O_2 ;
逆电势电子传递: Fe^{2+} -Cyc2-Rus-CycA-*bc1*-Q-NDH-NAD(P)

A. ferrooxidans 模式菌株 ATCC 33270 基因组测序已经完成 (<http://www.tigr.org>),为通过生物信息学的手段研究 *A. ferrooxidans* 各种生理机制提供了可能,特别为蛋白质组学的研究提供重要的信息平台。虽然 *A. ferrooxidans* 亚铁氧化电子传递链的研究已取得了一些进展,但电子传递的具体路径并不明确,尤其是亚铁氧化电子初受体仍存在较多争议,有待进一步阐明。

参考文献

- 1 T Kusano ,et al. J Biol Chem ,1992 ,267 :11242~11247.
- 2 Bruscella P ,et al. Microbiology ,2007 ,153 :102~110.
- 3 Bruscella P ,Cassagnaud L ,et al. Microbiology ,2005 ,151 :1421~31.
- 4 Brasseur G ,et al. Biochim Biophys Acta ,2002 ,1555 :37~43.
- 5 Appia-Ayme C ,Guiliani N ,et al. Appl Environ Microbiol ,1999 ,65 :4781~4787.
- 6 Yarzabal A ,Brasseur G ,et al. J Bacteriol ,2002 ,184 :313~317.
- 7 Yarzabal A ,et al. FEMS Microbiology Letters ,2002 ,209 :189~195 .
- 8 Kazuhiro SASAKI ,et al. BBB ,2003 ,67 :1039~1047.
- 9 Yarzabal A ,et al. Microbiology ,2004 ,150 :2113~2123.
- 10 Yarzabal A ,Duquesne K ,Bonney V. Hydrometallurgy ,2003 ,71 :107~114.
- 11 Kai M ,et al. J Biochem ,1992 ,112 :816~821.
- 12 Sugio T ,et al. Biotechnology and Biochemistry ,2001 ,65 :555~562.
- 13 Hunte C ,et al. FEBS Lett ,2003 ,545 :39~46.
- 14 Brasseur G ,et al. Biochimica et Biophysica Acta(BBA) ,2004 ,1656 :114~126.
- 15 Giudici-Ortoni MT ,et al. J Biol Chem ,1999 ,274 :30365~30369.

(下转第 69 页)

- 12 Espinasse-Gellner A. A Simple Direct Technique of Transformation in Sunflower. In Proc 14th Sunflower Res Workshop ,1992 ,50~51.
- 13 杨立国,石太渊.作物品种资源,1998,1:14~16.
- 14 张美善,卢敏,陈展宇,等.吉林农业大学学报,2001,23(1):18~20.
- 15 王德兴,杨立国,崔良基,等.辽宁农业科学,2005,(01):19~20.
- 16 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998,224:620~621.
- 17 王紫萱,易自力.中国生物工程杂志,2003,(06):9~13.
- 18 段晓昱,栾春光,郝彦玲,等.甘肃农业大学学报,2004,39(3):239~244.
- 19 胡文冉.油葵再生体系的建立及转天麻抗真菌蛋白(GAFP)基因的研究[硕士学位论文].乌鲁木齐:新疆农业大学,2006.
- 20 徐培洲.油葵再生体系的建立及葡聚糖酶和几丁质酶双价基因转化的研究[硕士学位论文].乌鲁木齐:新疆农业大学,2006.
- 21 刘海臣.向日葵下胚轴组培培养及其遗传转化的研究[硕士学位论文].长春:长春理工大学,2005.
- 22 Power CJ. Am J Bot,1987,74:497~503.
- 23 Burrus M,Chanabe C,Alibert G,et al. Plant Cell Rep,1991,10:161~166.
- 24 Freyssinet M,Freyssinet G. Plant Sci,1988,56:177~181.
- 25 Paterson KE,Everett NP. Plant Sci,1985,42:125~132.
- 26 Anne LM,Denis T,Veromque T,et al. Plant Cell Reports,1989,8:97~100.
- 27 Freyssinet M,Freyssinet G. Plant Sci,1988,56:177~181.
- 28 Schrammeijer B,Sijmons PC,Peter JM,et al. Plant Cell Reports,1990,9:55~60.

.....

(上接第49页)

- 16 Sugio T,et al. Appl Environ Microbiol,1988,54:150~152.
- 17 Amaro AM,et al.J Bacteriol,1991,173:910~915.
- 18 Wackwitz B,et al.Mol Gen Genet,1999,262:876~883.
- 19 Elbehti A,et al. J Bacteriol,2000,182:3602~3606.
- 20 Rawlings DE. Microbial Cell Factories,2005,4:1~13.