

• 综述 •

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.11.1241

色氨酸操纵子调控机制详析

冯 慧¹⁾, 李红民^{1),2)} *

(¹⁾ 西北大学生命科学学院生物科学系, 西安 710069;
(²⁾ 西北大学生命科学学院生物技术系分子生物学课程组, 西安 710069)

摘要 色氨酸操纵子是最早被研究的细菌合成代谢调控、基因表达调控的模型之一。其中阻遏蛋白对转录起始的抑制作用、色氨酸作为辅阻遏物的作用以及通过定点突变揭示的弱化作用的分子机制已基本被阐明。此外,色氨酸操纵子 RNA 结合弱化蛋白、NusA、NusG、TrpY 等调节蛋白对细菌色氨酸操纵子弱化作用的调节机制也在近年来得到进一步揭示。特别是在枯草芽孢杆菌中,色氨酸操纵子主要依赖于转录衰减机制调控,包括由色氨酸激活的色氨酸操纵子 RNA 结合弱化蛋白与新生转录产物结合形成内部终止子,导致 5'非翻译区(5'UTR)转录终止。NusA、NusG 通过刺激 RNA 聚合酶在 5'UTR 的 U107 和 U144 位点暂停,释放出 RNA 聚合酶,最终造成转录终止。不同的是,在 U144 位点 NusA 参与的转录弱化机制依赖其发夹结构,且 NusA 与 RNA 聚合酶作用促进了 RNA 结合弱化蛋白与新生转录产物的结合,使转录终止。而 NusG 是通过与非模板 DNA 链中的一段富含 T 碱基序列和 RNA 聚合酶同时互作,阻止了 RNA 聚合酶向下游移动,从而引起 RNA 聚合酶高效停滞。但在细菌操纵子中,绝大多数调节因子参与的弱化机制最终依赖于 ρ 因子,从而导致多达一半的转录终止事件发生。近年来,随着学科的发展,越来越多关于色氨酸操纵子调节机制新概念被挖掘报道,这也使人类对色氨酸操纵子的表达调控机制的认知愈加详尽。

关键词 色氨酸操纵子; 弱化作用; 色氨酸操纵子 RNA 结合弱化蛋白; NusA; NusG

中图分类号 Q936

A Detailed Analysis of the Regulatory Mechanism of the Tryptophan Operon

FENG Hui¹⁾, LI Hong-Min^{1),2)} *

(¹⁾ Department of Biological Sciences, School of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;
(²⁾ Molecular Biology Course Group, Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract The tryptophan (*trp*) operon is one of the earliest study models applied to the regulation of bacterial bio-synthetic and gene expression. And the molecular mechanisms, including the inhibitory action of repressor on transcription initiation, the role of *trp* as a corepressor and the attenuation revealed by site-directed mutation, have been largely elucidated. Moreover, it has been demonstrated that the regulatory proteins, including the *trp* RNA-binding attenuation protein (TRAP), NusA, NusG, TrpY, have attenuating effects on the *trp* operon, and the attenuation mechanisms have been uncovered recently. Notably, the *trp* operon in *Bacillus subtilis* is mainly regulated by the transcription attenuation mechanism. TRAP firstly binds to the nascent transcripts to form the intrinsic terminator and causes termination in the 5' untranslated region (5' UTR). Afterwards, NusA and NusG stimulate the RNA polymerase to pause

收稿日期: 2019-06-11; 修回日期: 2019-07-14; 接受日期: 2019-07-16
西北大学 2018 年度教学研究与成果重点培育项目 (No.JX18053) 和陕西省高等教育学会 2017 年度高等教育科学研究项目 (No.XGH17058) 资助
* 通讯作者 Tel: 029-88302411; E-mail: lihm2006@nwu.edu.cn
Received: June 11, 2019; Revised: July 14, 2019; Accepted: July 16, 2019
Supported by Key Education Research and Achievement Cultivation Project of Northwestern University in 2018 (No.JX18053) and Higher Education Science Research Project of Shaanxi Higher Education Institute in 2017 (No.XGH17058)
* Corresponding author Tel: 029-88302411; E-mail: lihm2006@nwu.edu.cn

and release at U107 and U144 sites in 5' UTR, which eventually results in transcription termination. However, there are some differences in NusA- and NusG-stimulated RNA polymerase pausing mechanisms. The transcription attenuation mechanism regulated by NusA at U144 depends on the hairpin structure, and the interaction between NusA and the RNA polymerase promotes the binding of TRAP to the nascent transcripts and the transcription termination. NusG, on the other hand, touches a T-rich sequence in the non-template DNA (ntDNA) strand and RNA polymerase at the same time, which prevents forward movement of the RNA polymerase and causes dramatic RNA polymerase pausing. However, in the bacterial *trp* operon, up to half of the transcription termination events rely on the ρ factor. Here we summarize new concepts about the regulation mechanism of the *trp* operon with the development of related disciplines, and provide more in-depth details about the regulation mechanism of the tryptophan operon transcription.

Key words tryptophan operon; attenuation; *trp* RNA-binding attenuation protein (TRAP); NusA; NusG

色氨酸(tryptophan, *trp*)是生物机体的重要营养成分,不仅参与蛋白质的生物合成,例如神经递质血清素,而且可被转化成多种有生物活性的氨基酸衍生物。色氨酸生物合成途径与芳香族氨基酸苯丙氨酸、酪氨酸存在共同的合成步骤和分支途径,该过程涉及到中枢代谢,调控机制极为复杂^[1]。其共同途径由糖酵解的中间代谢物磷酸烯醇式丙酮酸与磷酸戊糖途径的中间代谢物 4-磷酸-赤藓糖合成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP)。DAHP 经几步酶促反应,转化为芳香族氨基酸的共同前体分支酸。在色氨酸生物合成中,分支酸被氨基苯甲酸合酶催化转化为邻氨基苯甲酸。邻氨基苯甲酸在氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶作用下,转化为 N-5'-磷酸核糖邻氨基苯甲酸,并随后被异构酶作用转化为烯醇式 1-(*O*-羧基苯氨基)-1-脱氧核酮糖-5-磷酸。该化合物被吡啶甘油磷酸合酶催化生成吡啶-3-甘油磷酸,吡啶-3-甘油磷酸被色氨酸合成酶催化,先转化为吡啶再生成色氨酸^[2,3]。

细菌基因组中,编码色氨酸合成反应所需催化酶的基因串联排列在一起,共同构成一个转录单位,即色氨酸操纵子。其中,大肠杆菌的色氨酸操纵子研究的最为透彻,其基因表达及与之对应的色氨酸代谢调控机制研究最为深入,弱化作用的分子机制研究在近年来取得了一些新的进展。

1 色氨酸操纵子的基本结构

色氨酸操纵子普遍存在于细菌中,是用于编码生成色氨酸的元件之一。

大肠杆菌(*E.coli*)色氨酸操纵子结构较简单,是由调节基因、调控序列(启动子、操纵基因以及前导序列)和结构基因组成(见 Fig.1)。调节基因 *trpR* 是 1 个独立的操纵子,不与结构基因连锁,距离色氨

酸操纵子基因簇很远,编码色氨酸阻遏物,该阻遏物是 1 个同二聚体,可与操纵子的操纵基因特异性结合,阻止 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)转录起始。启动子和结构基因之间被操纵序列和前导序列隔开。操纵序列与启动子在-21 和+3 碱基之间重叠,阻遏蛋白或 RNAP 结合位点在操纵序列的中心结合区,控制转录进行,中心结合区为包含 18 个碱基对的反向重复序列。当阻遏物结合到操纵基因上时,便成为转录的强抑制物。前导序列是位于结构基因 *trpE* 起始密码子前一段长 162 bp 的 DNA 序列,含有 1、2、3 和 4 四段能够两两互补的反向重复序列。当前导序列被转录进入 RNA 单链内时,可能发生 1:2、2:3、3:4 区段互补配对而形成发夹或者茎环等局部二级结构。当序列 3 和 4 配对时,就形成了弱化子发夹结构,位于转录产物前导序列的末端。因为序列 4 中富含 GC 的回文结构,之后是 8 个串联排列的 U 残基,致使 3:4 茎环结构一旦形成,就成为不依赖 ρ 因子的强终止子结构。结构基因是由 5 个基因构成,其依次排列为:*trpE*、*trpD*、*trpC*、*trpB* 与 *trpA*。结构基因全长为 6 800 bp,它们是色氨酸合成途径中关键酶的合成基因^[4]。

在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *B.subtilis*)色氨酸操纵子中,启动子、结构基因均与大肠杆菌中的色氨酸操纵子略有不同。在 *B.subtilis* 色氨酸操纵子中,包含 7 个结构基因(见 Fig.2)。*trpEDCFBA* 共 6 个结构基因依次排列,位于含有 12 个结构基因的芳香族氨基酸超操纵子中,剩下的第 7 个结构基因 *trpG* 位于叶酸合成操纵子中,该基因所编码的酶参与并调控叶酸和色氨酸的合成。*B.subtilis* 色氨酸操纵子与 *E.coli* 操纵子最大的区别是,它的结构中共有 2 个启动子参与调控,1 个位于芳香族氨基酸超操纵子的起始位置,另 1 个启动子位于 *trpE* 上游约

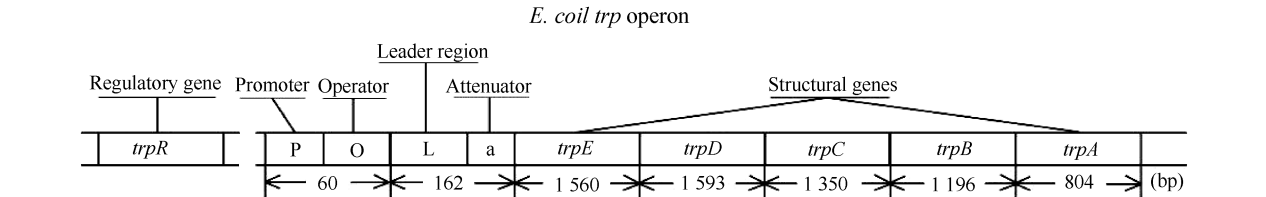


Fig.1 The organization of the *trp* operon in *E. coli* The *trp* operon of *E.coli* is a single transcriptional unit. It consists of a regulatory gene, a regulatory region, and structural genes. The regulatory gene *trpR* is an independent operon and is not linked to structural genes. The *trp* operon regulatory region in *E. coli* contains a promoter-operator and an attenuator. The structural genes are made up of five genes, and they encode anthranilate synthase, anthranilate-phosphoribosyl transferase, indole-3-glycerol phosphate synthase, tryptophan synthase (β subunit), and tryptophan synthase (α subunit), respectively, which catalyze the synthesis of L-tryptophan

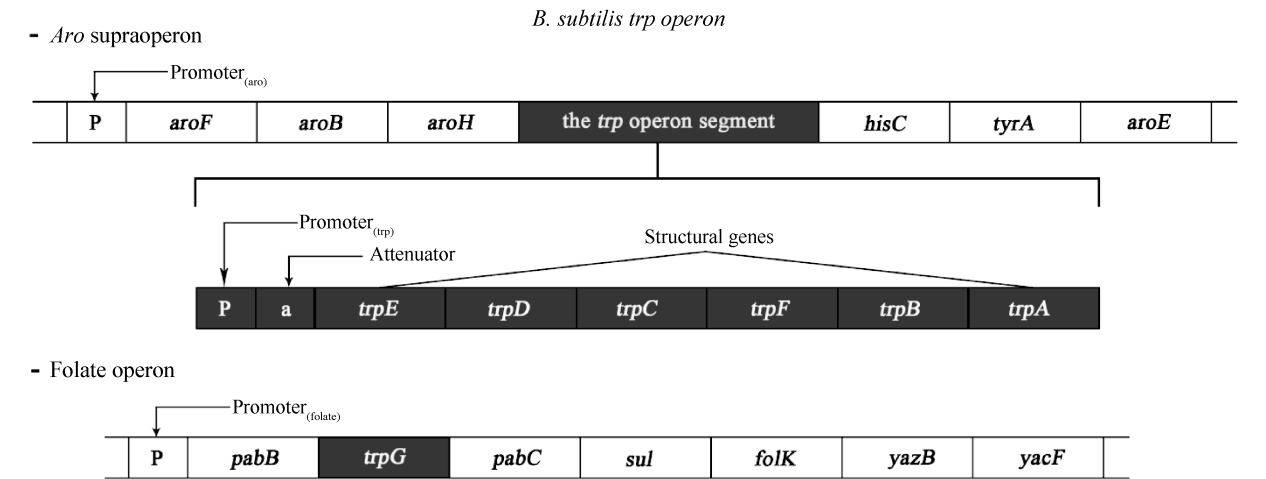


Fig.2 The organization of the *trp* operon in *Bacillus subtilis* The *trp* operon of *B. subtilis* is a segment of a supraoperon, and one of the structural genes, *trpG*, is in a separate transcriptional unit, the folate operon. In *B. subtilis*, the *trp* operon contains two promoters and seven structural genes. Two promoters drive transcription of the *trp* operon segment of the *aro* supraoperon of *B. subtilis*

200 bp 处^[5,6]。

2 色氨酸操纵子调控方式

细菌中 L-色氨酸的生物合成是受到严格调控的。阻遏作用、弱化作用以及终产物 *trp* 对合成酶的反馈抑制,是色氨酸操纵子基因表达调控的主要机制^[7]。其中前两者为较为关键。

2.1 阻遏作用

在细菌色氨酸操纵子中,调节基因 *trpR* 并未与色氨酸操纵子串联在一起,但是其编码的阻遏蛋白可作为反式作用因子从合成部位扩散至基因组色氨酸操纵子位点,与色氨酸操纵子的操纵序列特异性结合,抑制色氨酸操纵子的转录起始(见 Fig.3)。该阻遏蛋白二聚体具有两个螺旋-转角-螺旋 DNA 结合结构域,包含有 1 个中心区域和 2 个灵活的 DNA 解读头部(即 DNA 结合区),2 个解读头部分别由 2 个亚基的羧基端形成。DNA 中心结合区位于操纵

基因中的 18 个回文碱基结构处。阻遏蛋白的活性受 *trp* 调控,当细胞内 *trp* 浓度高时,*trp* 与阻遏蛋白结合形成具有活性的同源二聚体复合物。*trp* 与阻遏蛋白结合的动力学常数为 $1 \sim 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,*trp* 结合状态的阻遏蛋白的解读头部处于正确的空间位置,以一种特定的构象与色氨酸操纵子中的操纵基因区 DNA 大沟特异性结合,结合的动力学常数为 $2 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,阻止 RNAP 与操纵基因结合,抑制模板开链,从而阻止转录起始。研究显示,活化的 *trp* 阻遏物在 *trp* 操纵子启动子/操纵子区域对转录起始的抑制可扩大大约 80 倍^[8]。当细胞内 *trp* 浓度水平低时,阻遏蛋白以一种处于失活状态的二聚体形式存在,不能与操纵基因结合,RNAP 可以结合启动子并占据操纵序列,色氨酸操纵子被 RNAP 转录。细菌细胞内,阻遏蛋白的数量仅需要达到 20 ~ 30 个/细胞即可充分发挥作用,而 *trp* 则发挥辅助阻遏物的作用^[9]。

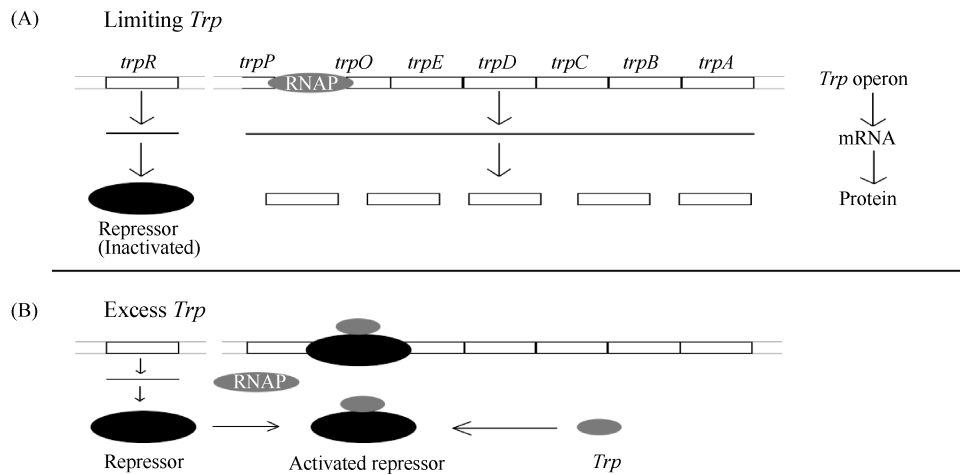


Fig.3 Regulation of the *trp* operon transcription by repressors in *E. coli* In the *E. coli* *trp* operon, tryptophan can activate the *trp* aporepressor. Under limited tryptophan conditions, the repressor is inactivated. RNAP binds to the promoter and occupy the operator region, and the *trp* operon is transcribed. Under excessive tryptophan conditions. The *trp* repressor is activated by *trp*. The repressor binds the *trp* operon operator region and inhibits transcription initiation at the *trp* operon promoter

2.2 弱化作用

2.2.1 *E.coil* 和 *B.subtilis* 色氨酸操纵子弱化作用调节机制 大肠杆菌色氨酸操纵子的前导区段 1 中第 21~68 碱基的序列编码一个包含 14 个氨基酸残基的前导肽,且第 10、第 11 个密码子是连续的 2 个色氨酸密码子,对细胞内的色氨酸浓度可敏感捕获。

细菌中一个有趣的现象就是翻译与转录是偶联的:正在被转录的新生 mRNA 可以不经历任何转录后加工即可作为翻译的模板,也为弱化作用调节基因表达提供了可能。色氨酸操纵子开始转录时,当 RNAP 转录到区段 2 时会发生暂停,一直到有核糖体结合到新生 mRNA 5'一端的核糖体结合位点, RNAP 才重新开始转录。当细胞内色氨酸浓度水平高时,细胞内色氨酰 tRNA 含量随之增多,核糖体能够迅速通过色氨酸操纵子前导序列的 1 区段而到达 2 区段(即占据 2 区段),此时区段 3 亦被转录完成。但是,区段 2 因为核糖体的结合而不能与区段 3 互补配对, RNAP 和核糖体均向下游移动,当区段 4 被转录完成后,即可与区段 3 互补配对形成不依赖 ρ 因子的强终止子结构,即弱化子(或称衰减子),使已经起始的转录过程提前停止(见 Fig.4);当细胞内色氨酸含量较低时,核糖体因色氨酰 tRNA 分子的缺乏而在第 10、11 位密码子上滞留,占据封闭区段 1,而此时因核糖体的结合 RNAP 会继续转录,当区段 2、3 被转录完成时,因 1 区段被核糖体占据,因而 2、3 之间可以互补配对,导致 RNAP 稍作暂停,之后

会继续向下游转录^[10]。有学者将 2:3 配对的二级结构称为抗终止子结构。当区段 4 被转录完成时,因 2:3 双链的存在而不能与区段 3 互补配对形成强终止子结构, RNAP 继续转录下游的转录结构基因,并随后被翻译为色氨酸合成所需的酶,细胞自己合成色氨酸以弥补色氨酸的不足^[11,12]。

B.subtilis 色氨酸操纵子的衰减机制还接受色氨酸操纵子 RNA 结合弱化作用蛋白(*trp* RNA-binding attenuation protein, TRAP)的调节(见 Fig.5)。在这种机制中,TRAP 在抗终止子结构(2:3 双链结构)形成之前与新生转录本结合并导致衰减子形成,引起前导区转录终止^[13]。像色氨酸操纵子阻遏蛋白一样,TRAP 对细胞内 *trp* 浓度很敏感。当细胞内 Trp 浓度水平低时,TRAP 处于非 *trp* 结合状态,无活性,无法与新生的 RNA 结合,2:3 配对而成的抗终止子结构形成,操纵子被转录;当细胞内 *trp* 水平较高时,TRAP 蛋白被 *trp* 结合而被激活。在结构基因被转录之前,TRAP 与色氨酸操纵子前导区转录产物中靠近区段 3 的 11 个(G/U)AG 重复序列结合,形成内部终止子(弱化子),使前导区转录终止^[14,15]。这两种情况下生成的两种 RNA 结构竞争性存在,调控转录的进程。与大肠杆菌相比,*B.subtilis* 色氨酸操纵子的弱化子是一个弱终止子,其茎环结构中茎区的 GC 含量很低,且紧随发夹结构的富含 U 碱基区域中断^[16]。

在早期的弱化机制模型中,TRAP 的作用被认为是与新生转录产物结合,改变新生 RNA 二级结构

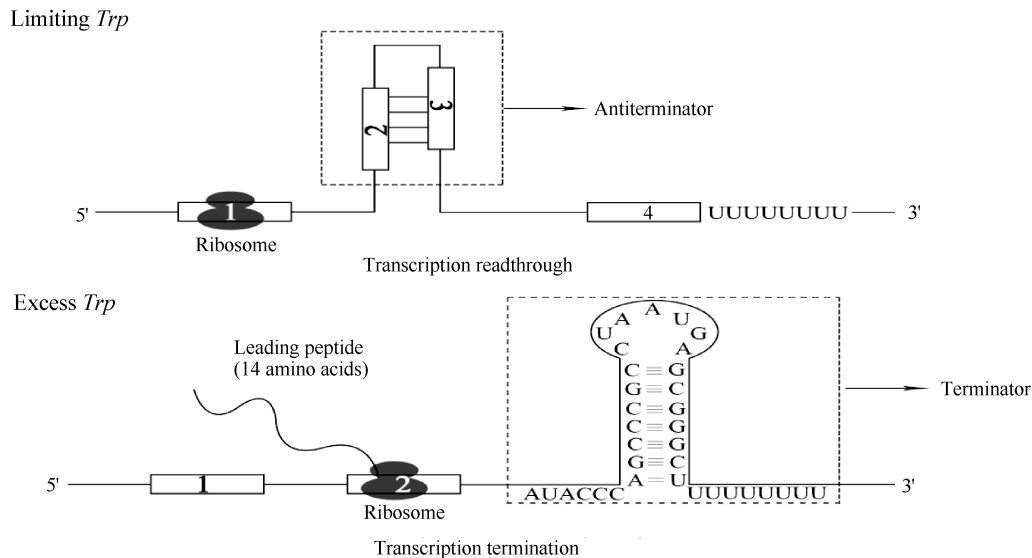


Fig.4 Transcription attenuation regulation of the *trp* operon of *E. coli* The leader transcript segment extending from the start site to *trpE*, is 162 nucleotide long. This transcript forms three alternative RNA secondary structures: 1:2, the pause or anti-antiterminator structure; 2:3, the antiterminator structure; and 3:4, the terminator structure. The resultant RNA structure type depends on the ribosome position on the message and ribosome release from the leader peptide-coding region. The termination decision is based on *trp*. When the cell is limited in *trp*, the ribosome synthesizing the leader peptide stalls at a *trp* codon. This enables the antiterminator, which prevents the formation of terminators, so that transcription continues into the structural genes of the operon. When the cell has excessive levels of *trp*, the translating ribosome reaches the leader peptide stop codon and is released. The terminator then forms, and transcription is terminated

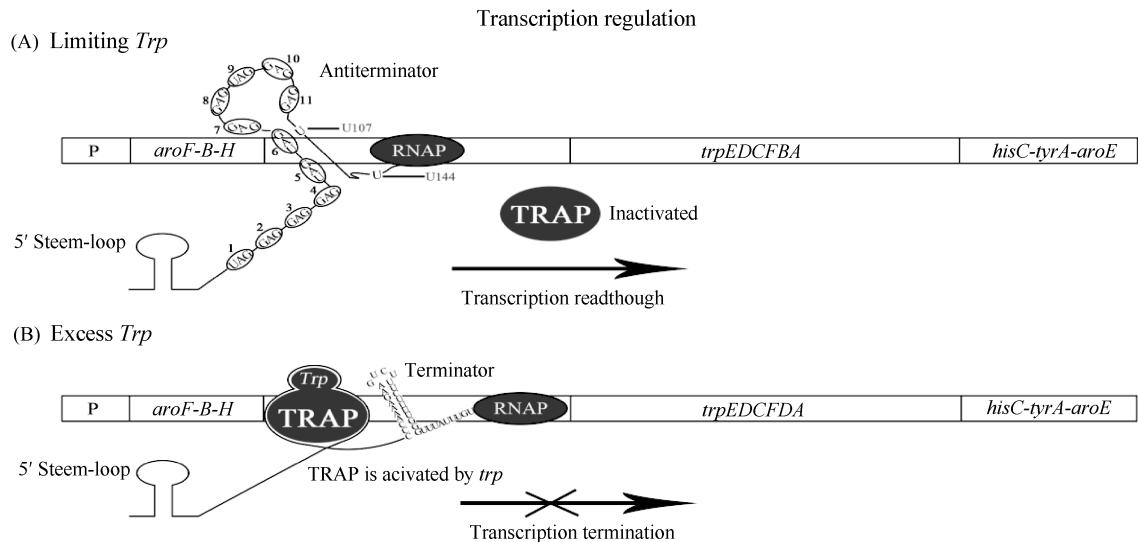


Fig.5 Model of the *B. subtilis* *trp* operon transcription attenuation mechanism In the *trp* operon of *B. subtilis*, the transcription termination events occurring in the leader region depend on whether TRAP is activated by tryptophan. Each RNA polymerase molecule entering the leader region of the *trp* operon segment of the supraoperon pauses following formation of a pause structure. If there is sufficient tryptophan to activate TRAP, TRAP binds to leader RNA and prevents or disrupts formation of the antiterminator. This enables the formation of the terminator, and terminate transcription. During transcription, NusA and NusG stimulate RNAP pausing at U107 and U144. When a cell is starved of tryptophan, TRAP is inactivated and does not bind to the nascent transcript. RNAP eventually overcomes the pause and resumes transcription, resulting in the formation of the antiterminator and transcription readthrough into the *trp* operon structural genes

以形成弱化子。但近年的研究发现,当弱化子突变或缺失时,TRAP 仍可造成 *trp* 操纵子转录终止。这说明 TRAP 除了影响弱化子形成外,也可通过其他途径终止转录,机制有待阐明^[17]。此外,枯草杆菌

的色氨酸操纵子对细胞内空载的 tRNA^{Trp} 浓度较为敏感, tRNA^{Trp} 可调节抗 TRAP 蛋白 (anti-*trp* RNA-binding attenuation protein, AT) 的合成。当细胞内 tRNA^{Trp} 浓度较高时, 诱导细胞合成抗 TRAP 蛋白, AT 与细胞内被活化的即 *trp* 结合状态的 TRAP 结合, 引起 TRAP 构象改变, 丧失促进弱化子形成的活性而无法使转录终止^[18]。

2.2.2 衰减机制的复杂性 在几种常见的细菌色氨酸操纵子中, RNAP 停滞引发的转录暂停调控色氨酸操纵子转录弱化机制, 也是转录终止的先决条件。转录暂停是指 RNAP 通过重排进入一种不活跃状态, 从而暂时停止核苷酸加入。该过程参与新生 RNA 链起始、延伸、折叠、剪接、加工和终止调控机制。在细菌中, RNAP 引发的转录暂停所形成的内部终止子结构可以使转录暂停效率增加 10 倍或更多。此外, 不同的特异性调节因子参与不同的转录弱化机制。在 RNAP 通过操纵子前导区的特定位置时, 一些调节因子与前导区中转录暂停复合物结合, 并引发新生 RNA 折叠, RNAP 停滞于该位点, 使转录暂停或终止^[19,20]。已经发现的参与转录暂停或终止的调节因子有 NusA、NusG 和 TrpY 等。

NusA 和 NusG 是 2 个转录延伸因子, 在 RNAP 的 σ 亚基释放后与 RNAP 直接结合, 不需要与新生 RNA 相互作用。RNAP 在操纵子前导区有 U107 和 U144 两个暂停位点 (见 Fig.5)。两位点的暂停信号由不同的 RNA 发夹结构、U 碱基序列和 T 碱基序列组成。NusA 和 NusG 均在这 2 个位点刺激 RNAP 停滞, 为 TRAP 与新生转录产物结合提供时间。而 TRAP 的结合一方面促进弱化子形成以转录, 同时特异的 RNA 结构抑制核糖体对结构基因 *trpE* 的翻译^[15]。NusA 对转录终止的调节受到发夹结构强度和 U 碱基序列的影响, 而 NusG 对转录终止的影响受到发夹结构强度和富含 T 碱基序列的影响^[13,21]。

在 NusA 激发的转录终止中, 2 个暂停位点上引发的转录终止过程均依赖发夹结构。第 1 个暂停位点 U107 发生在抗终止子和弱化子结构之间临界重叠之前的核苷酸 (前导区序列 3)。第 2 个暂停位点 U144 位于色氨酸操纵子前导序列终止位点下游, 这同时增加了该暂停位点参与 *trpE* 基因翻译调控的可能性。该位点转录终止所依赖的发夹结构与弱化子区域重叠^[15]。研究显示, 敲除该发夹结构, 虽然减弱转录暂停的效率, 但并不影响 RNAP 对该暂停位点的选择。发夹结构与上游新生 RNA 3'-末端之间的距离决定了转录终止位点。而发夹结构下游序

列主要负责转录暂停位点的选择, 紧随发夹结构之后的富含 U/T 区域中的序列对转录暂停与终止也具有一定的影响^[18,22]。当 NusA 在暂停位点与 RNAP 结合时, TRAP 有较短的时间与已存在转录暂停复合物的转录本结合, 释放出 RNAP, 使转录终止。NusA 刺激性转录终止具有协同性。多个 NusA 分子的结合才能引起转录终止, 且 NusA 刺激 5' UTR 转录终止决定了色氨酸操纵子转录范围, 由此可确保对细胞内 NusA 水平的严格控制。在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中, NusA_(Ec) 和 NusA_(Bs) 均促进色氨酸操纵子中 U107 和 U144 位点上 RNAP 暂停和转录终止^[23,24]。

NusG 在原核生物和古细菌中又被叫作 Spt5, 是参与转录终止过程中唯一的 1 个保守的转录因子。NusG 通过与 *trp* 操纵子前导区的 2 个暂停位点与 RNAP 结合, 引发 RNAP 停滞, 促进转录终止。在 U107 位点, NusG 引起适度的 RNAP 暂停激发, 与 NusA 参与的转录弱化机制相同。在 U144 位点, NusG_(Ec) 不会刺激 RNAP 在该位点暂停。但 NusG_(Bs) 可使新生 RNA 特定序列在暂停的转录空泡内与非模板 DNA (non-template DNA, ntDNA) 链中的一段富含 T 碱基序列接触互作。T 碱基增强 NusG_(Bs) 对转录延伸复合物的亲和力, NusG_(Bs) 通过与 RNAP 和 ntDNA 链的同时互作以阻止 RNAP 向下游移动, 引起强有效的 RNAP 停滞。停滞区转录泡内的转录终止机制同时抑制结构基因 *trpE* 的翻译。结构模拟及突变研究结果表明, NusG_(Bs) 的 N 端结构域内有 2 个相邻较短区域的氨基酸残基, 参与识别 *trp* 操纵子停顿信号。转录因子 NusG_(Bs) 的功能主要是识别 ntDNA 链中特定序列, 并刺激 RNAP 暂停^[25]。NusG 的失活可以导致体内 RNAP 在 U144 位点上的暂停信号消失以及色氨酸操纵子表达升高。与 NusA 相比, NusG 过表达在更大程度上降低了色氨酸操纵子的表达^[26]。

在极少数细菌中, 色氨酸传感调节因子 TrpY 对其色氨酸操纵子转录具有一定的调控作用。对于一些极端嗜热古菌来说, L-色氨酸生物合成最后 2 个步骤依赖于 *trp* 合酶催化, *trp* 合酶是由 *trpA* 和 *trpB1* 产物组成的异四聚体, 这 2 个基因位于 *trpCDEGFB1A* 操纵子中。有趣的是在一些生物中, 例如热自养甲烷杆菌, 它具有编码第 2 个 *TrpB* 基因 (*TrpB2*) 的功能。该基因位于 *trp* 操纵子之外, 在 *trp* 操纵子转录过程中, TrpY 与 *TrpB2* 基因上游的 TRP 框序列 (TGACA) 特异性结合, 可以抑制色氨酸操

纵子 (*trpEGCFBAD*) 的转录。但 *TrpB2* 基因转录的抑制需要额外的 TrpY, 其过程由色氨酸刺激但不依赖于色氨酸的存在^[27,28]。

2.2.3 ρ 因子对弱化作用的影响 细菌操纵子中, 各种调节因子所参与的弱化机制半数依赖于 ρ 因子。 ρ 因子是由 6 个亚基形成的环形六聚体蛋白, 具有 ATP 水解酶和解旋酶活性, 分子量 300 kD。依赖于 ρ 因子的转录终止信号极为复杂, 序列分析预测 ρ 因子结合位点 (*rut*) 是富含嘧啶的 RNA 元件, 其长度超过 30 个核苷酸。 ρ 因子可以与非结构性的不含核糖体的 RNA 结合。在色氨酸操纵子中, ρ 因子先与未结合核糖体的新生 RNA 中富含 C 碱基序列结合, ρ -RNA 复合物激活 ρ 因子 ATP 水解酶活性, 借助自身水解酶活性获得能量推动其沿着新生 RNA 链移动。但移动速度比 RNAP 慢, ρ 因子向下游移动并将序列信息传递至六聚体中心孔部位。当 RNAP 在前导区特定位点暂停时, ρ 因子与 RNAP 相互作用, 转录停止, ρ 因子利用解旋酶活性解开 RNA-DNA 杂交链, 随后将转录产物释放, 并使 RNAP 与该因子一起从操纵子上释放出来。研究发现, 依赖于 ρ 因子的转录终止通常需要富含 C 碱基的顺式作用元件和反式作用因子的存在, 这些辅助元件对转录终止可能具有促进作用^[29]。通常, ρ 因子依赖性转录终止发生于多个 RNAP 暂停位点。但在肠道沙门氏菌中, Mg^{2+} 转运蛋白基因 *mgtA* 5'-端前导区只存在 1 个 ρ 因子依赖性转录终止的长期暂停位点。近些年的研究数据表明, 受调节的 ρ 因子依赖性的转录终止可能需要一些与组成型因子依赖性终止子不同的调节元件^[30]。之前有多项研究表明, 依赖于 ρ 因子的转录终止与 RNAP 存在很大的联系, 但它只是在特定的位置驱动新生转录本释放。 ρ 因子诱导 RNA 释放的位置通常与 RNAP 在无 ρ 因子情况下的暂停位点相对应。总而言之, 无论 ρ 因子在其他位点或者终止子处与 RNAP 接触, 它最终都会与 RNA 结合, 并沿着转录本移动, 以诱导其从延伸复合物中释放^[31]。

3 问题与展望

色氨酸操纵子作为细菌合成代谢调控涉及的基因表达调控模型的典型代表, 其调控机制中阻遏蛋白的作用、弱化作用以及弱化作用的精细调节机制已基本明了, 使人类对细菌营养物质的代谢有了详细认知, 并对氨基酸生产、细菌生产控制起到了重要的指导作用。但是, 色氨酸操纵子的调节机制依然

存在盲区: 弱化作用的产生依赖于细菌中翻译与转录过程的偶联。RNAP 起始转录后为什么在前导区特定位点暂停, 并一直到有一个核糖体结合到新生 mRNA 5'-端后 RNAP 才继续转录? 该暂停位点有何特异性? 与引起弱化作用的结构有何不同? 核糖体的结合造成了 mRNA 或 RNAP 结构的何种改变, 才允许 RNAP 重新转录等等? 这是仍待阐明的细菌基因表达调控的重要机制。

参考文献 (References)

- [1] Liu L, Duan X, Wu J. L-Tryptophan Production in *Escherichia coli* Improved by Weakening the Pta-AckA Pathway [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(6): e0158200
- [2] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**(6): 615-626
- [3] 王镜岩. 生物化学, 第 3 版 [M]. 北京: 高等教育出版社 (Wang JY. *Biochemistry*, 3rd ed [M]. Beijing: Higher Education Press), 2002: 356-359
- [4] Yanofsky C. The different roles of tryptophan transfer RNA in regulating trp operon expression in *E. coli* versus *B. subtilis* [J]. *Trends Genet*, 2004, **20**(8): 367-374
- [5] Gollnick P, Babitzke P, Antson A, et al. Complexity in regulation of tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *Annu Rev Genet*, 2005, **39**: 47-68
- [6] Gutierrez-Preciado A, Yanofsky C, Merino E. Comparison of tryptophan biosynthetic operon regulation in different Gram-positive bacterial species [J]. *Trends Genet*, 2007, **23**(9): 422-426
- [7] Yanofsky C. RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria [J]. *RNA*, 2007, **13**(8): 1141-1154
- [8] Yanofsky C. Using studies on tryptophan metabolism to answer basic biological questions [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(13): 10859-10878
- [9] 吴健全, 徐琪寿, 郭长江. 色氨酸操纵子研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源 (Wu JQ, Xu QS, Guo CJ. *Progress in Tryptophan Operon* [J]. *Amino Acids Biotic Resour*), 2008, **30**(3): 55-58
- [10] Niu H, Li R, Liang Q, et al. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, **46**(1): 55-65
- [11] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学, 第 4 版 [M]. 北京: 高等教育出版社 (Zhu YX, Li Y, Zheng XF, et al. *Modern Molecular Biology*, 4th ed [M]. Beijing: Higher Education Press), 2013: 261-169
- [12] Yanofsky C. Tryptophan Operon of *Escherichia coli* [J]. *Brenner's Encyclopedia Genet* Second Ed, 2013, 221-223
- [13] Mondal S, Yakhnin AV, Babitzke P. Modular organization of the NusA- and NusG-stimulated RNA polymerase pause signal that participates in the *Bacillus subtilis* trp operon attenuation mechanism [J]. *J Bacteriol*, 2017, **199**(14). pii: e00223-17
- [14] Sharma S, Gollnick P. Modulating TRAP-mediated transcription termination by AT during transcription of the leader region of the *Bacillus subtilis* trp operon [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(9): 5543-5555
- [15] Yakhnin AV, Babitzke P. NusA-stimulated RNA polymerase pausing and termination participates in the *Bacillus subtilis* trp operon attenuation mechanism *in vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(17): 11067-11072
- [16] Potter KD, Merlino NM, Jacobs T, et al. TRAP binding to the *Bacillus subtilis* trp leader region RNA causes efficient transcription termination at a weak intrinsic terminator [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**(6): 2092-2102
- [17] McAdams NM, Gollnick P. The *Bacillus subtilis* TRAP protein

- can induce transcription termination in the leader region of the tryptophan biosynthetic (trp) operon independent of the trp attenuator RNA[J]. PLoS One, 2014, **9**(2): e88097
- [18] Cruz-Vera LR, Gong M, Yanofsky C. Physiological effects of anti-TRAP protein activity and tRNA (Trp) charging on trp operon expression in *Bacillus subtilis*[J]. J Bacteriol, 2008, **190**(6): 1937-1945
- [19] Guo X, Myasnikov AG, Chen J, *et al.* Structural basis for NusA stabilized transcriptional pausing[J]. Mol Cell, 2018, **69**(5): 816-827
- [20] Kang JY, Mishanina TV, Bellecourt MJ, *et al.* RNA polymerase accommodates a pause RNA hairpin by global conformational rearrangements that prolong pausing[J]. Mol Cell, 2018, **69**(5): 802-815
- [21] Czyz A, Mooney RA, Iaconi A, *et al.* Mycobacterial RNA polymerase requires a U-tract at intrinsic terminators and is aided by NusG at suboptimal terminators [J]. MBio, 2014, **5**(2): e00931
- [22] Yakhnin AV, Babitzke P. Mechanism of NusG-stimulated pausing, hairpin-dependent pause site selection and intrinsic termination at overlapping pause and termination sites in the *Bacillus subtilis* trp leader[J]. Mol Microbiol, 2010, **76**(3): 690-705
- [23] McAdams NM, Gollnick P. Characterization of TRAP-mediated regulation of the *B. subtilis* trp operon using in vitro transcription and transcriptional reporter fusions in vivo[J]. Methods Mol Biol, 2015, **1259**: 333-347
- [24] Mondal S, Yakhnin AV, Sebastian A, *et al.* NusA-dependent transcription termination prevents misregulation of global gene expression[J]. Nat Microbiol, 2016, **1**: 15007
- [25] Yakhnin AV, Murakami, KS, Babitzke P. NusG is a sequence-specific RNA polymerase pause factor that binds to the non-template DNA within the paused transcription bubble[J]. J Biol Chem, 2016, **291**(10): 5299-5308
- [26] Yakhnin AV, Yakhnin H, Babitzke P. Function of the *Bacillus subtilis* transcription elongation factor NusG in hairpin-dependent RNA polymerase pausing in the trp leader[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, **105**(42): 16131-16136
- [27] Karr EA, Sandman K, Lurz R, *et al.* TrpY regulation of *trpB2* transcription in *Methanothermobacter thermautotrophicus* [J]. J Bacteriol, 2008, **190**(7): 2637-2641
- [28] Hiyama T, Sato T, Imanaka T, *et al.* The tryptophan synthase beta-subunit paralogs TrpB1 and TrpB2 in *Thermococcus kodakarensis* are both involved in tryptophan biosynthesis and indole salvage[J]. FEBS J, 2014, **281**(14): 3113-3125
- [29] Ciampi MS. Rho-dependent terminators and transcription termination[J]. Microbiology, 2006, **152**(Pt9): 2515-2528
- [30] Hollands K, Sevostianova A, Groisman EA. Unusually long-lived pause required for regulation of a Rho-dependent transcription terminator[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, **111**(19): E 1999-2007
- [31] Santangelo TJ, Artsimovitch I. Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, **9**(5): 319-329