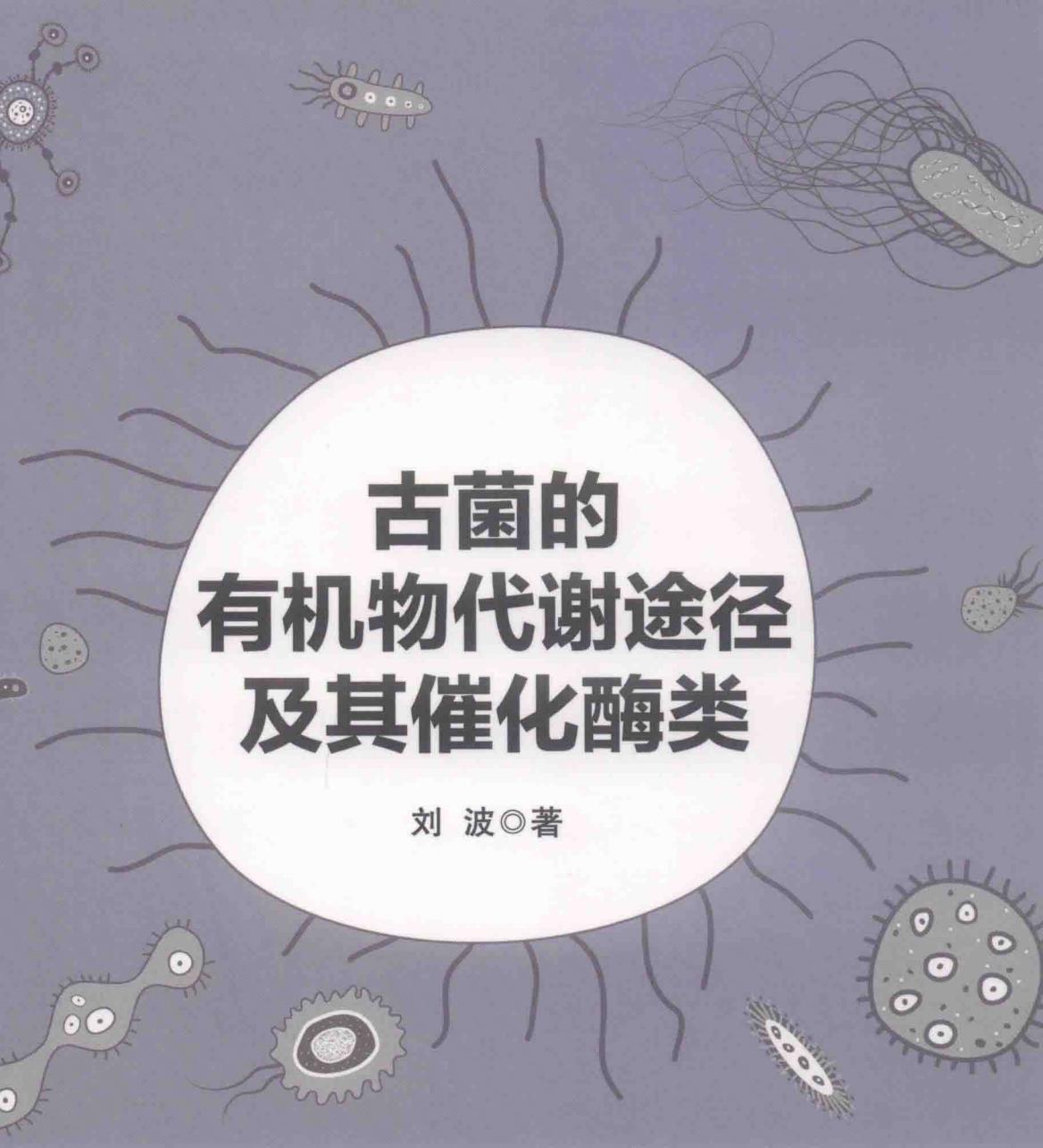


The background of the top half of the cover is a dark purple-grey color. It is decorated with various stylized, hand-drawn illustrations of microorganisms. These include several spherical cells with internal organelles, some with long, thin flagella or cilia extending from them. There are also elongated, rod-shaped bacteria and some more complex, multi-segmented structures. The central focus is a large, white circle containing the title text.

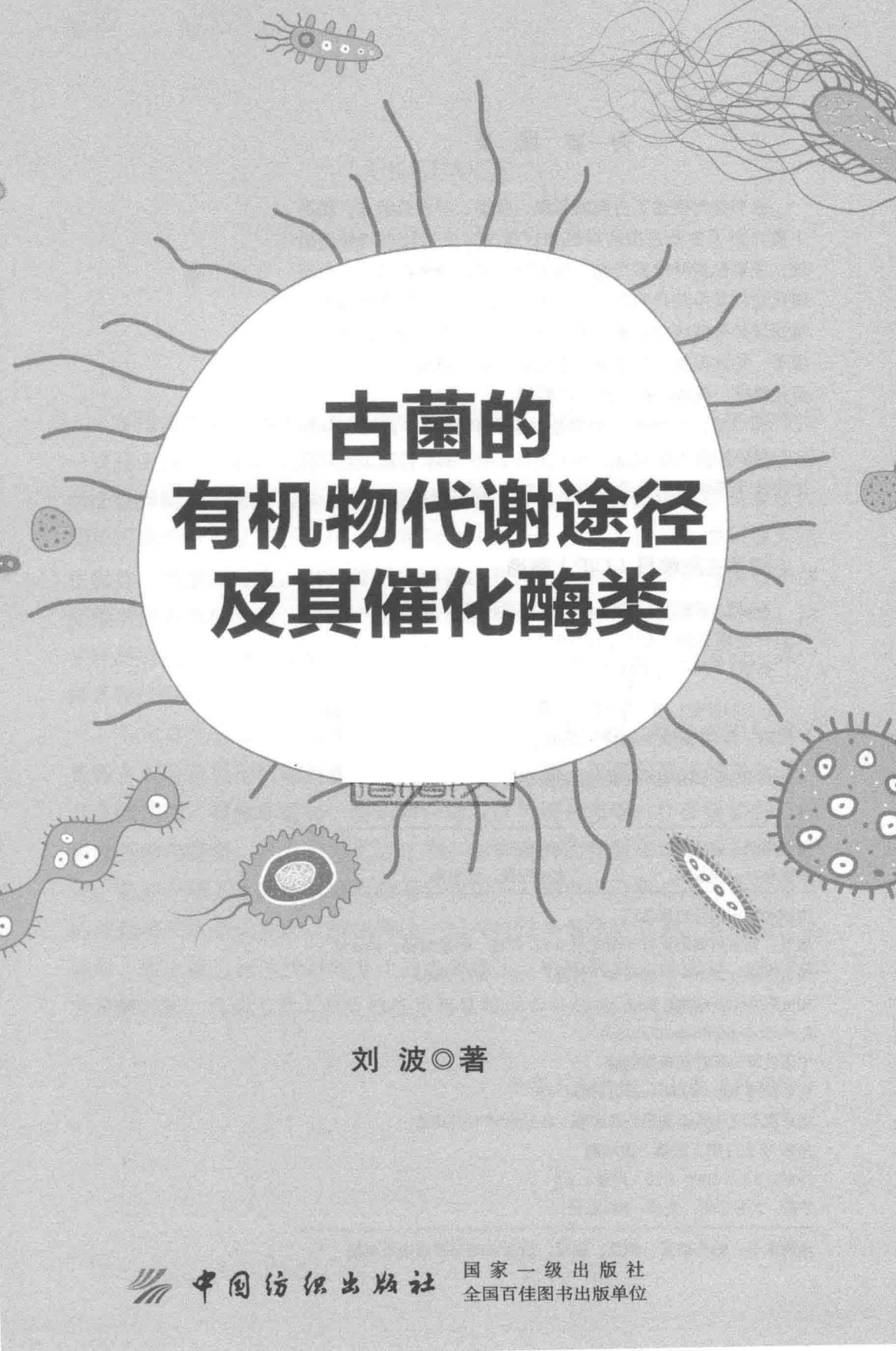
古菌的 有机物代谢途径 及其催化酶类

刘 波◎著

古菌是生命三域的重要分支之一，
其习性、生理、代谢以及遗传特征一直是生命科学领域
尤其是微生物学领域的热点和前沿科学内容。

 中国纺织出版社

国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

The background of the cover is a light gray with various stylized, hand-drawn illustrations of microorganisms. These include several oval-shaped cells with internal structures, some with flagella, and a large, complex structure in the top right corner that resembles a network of fibers or a large cell. A large white circle is centered on the page, containing the title text.

古菌的 有机物代谢途径 及其催化酶类

刘 波◎著



中国纺织出版社

国家一级出版社
全国百佳图书出版单位

内 容 提 要

本书首先概述了古菌的起源、分类、习性及特点,随后主要介绍了各种古菌的有机物代谢与合成的特点与作用机理,主要包括纤维素代谢、几丁质代谢、糖酵解途径、海藻糖代谢以及甲烷代谢等。本书参考了近年来古细菌有机物代谢领域的最新研究成果,重点介绍了古菌有机物代谢途径的细节、特点以及参与这些代谢途径的催化酶类的生化性质、催化特性、调控特征与催化机制等。

本书适合生物学、微生物生理与代谢等专业的高校师生、科研院所人员阅读,也可作为发酵控制、代谢工程以及生物技术等领域的企业技术人员的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

古菌的有机物代谢途径及其催化酶类 / 刘波著. —

北京:中国纺织出版社,2019.2

ISBN 978-7-5180-5687-3

I. ①古… II. ①刘… III. ①微生物学-有机化合物-代谢-研究②微生物学-酶催化剂-研究 IV. ①Q93

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第264252号

策划编辑:向连英

特约编辑:张 源

责任校对:寇晨晨

责任印制:储志伟

中国纺织出版社出版发行

地址:北京市朝阳区百子湾东里A407号楼 邮政编码:100124

销售电话:010-67004422 传真:010-87155801

<http://www.c-textilep.com>

E-mail: faxing@c-textilep.com

中国纺织出版社天猫旗舰店

官方微博 <http://weibo.com/2119887771>

北京虎彩文化传播有限公司印刷 各地新华书店经销

2019年2月第1版第1次印刷

开本:710×1000 1/16 印张:9.5

字数:210千字 定价:68.00元

凡购本书,如有缺页、倒页、脱页,由本社图书营销中心调换



PREFACE

前 言

古菌是生命三域的重要分支之一，其习性、生理、代谢以及遗传特征一直是生命科学领域尤其是微生物学领域的热点和前沿科学内容。鉴于目前全世界能源的逐渐短缺，有效的转化木质纤维素等有机化合物是全世界利用可再生资源从而替代化石能源的重要途径。在此方面，古细菌作为微生物的一类重要分支，发挥着不可替代的作用。人们现已发现许多可降解纤维素的古细菌种类，它们广泛分布于自然界的各种不同条件的环境。对于各种有机化合物的降解，主要依赖于存在于这些微生物（古细菌）体内的各种代谢酶类。

本书首先概述了古菌的起源、分类、习性及特点，随后主要介绍了各种古菌的有机物代谢与合成的特点与作用机理，主要包括纤维素代谢、几丁质代谢、糖酵解途径、海藻糖代谢以及甲烷代谢等。作者根据自己的研究基础与经历，并且参考了近年来古细菌有机物代谢领域的最新研究进展，重点介绍了古菌有机物代谢途径的细节、特点以及参与这些代谢途径的催化酶类的生化性质、催化特性、调控特征与催化机制等。本书适合生物学、微生物生理与代谢等专业的高校师生、科研院所人员阅读，也可作为发酵控制、代谢工程以及生物技术等领域的企业技术人员的参考用书。

齐鲁工业大学（山东省科学院）

刘 波



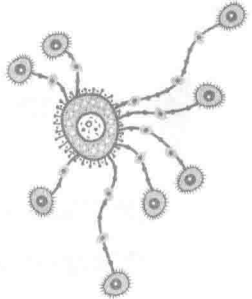
目 录

CONTENTS

第一章 古菌的起源、分类、习性及特点	1
第一节 古菌习性概述	1
第二节 古菌的鞭毛结构与功能及特点	4
第三节 古菌的遗传信息及其特点	13
第二章 古菌纤维素代谢	17
第一节 古菌的有机物代谢与合成概述	17
第二节 古菌纤维素代谢概述	18
第三节 内切葡聚糖酶	20
第四节 葡萄糖苷水解酶	33
第五节 纤维素水解酶类的协同作用	41
第三章 几丁质代谢	48
第一节 几丁质降解途径概述	48
第二节 古菌中与几丁质降解有关的嗜热酶	51
第三节 超嗜热古菌 <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 外切氨基葡萄糖苷酶	52
第四节 超嗜热古菌 <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 几丁二糖脱乙酰酶	67
第五节 超嗜热古菌 <i>Pyrococcus furiosus</i> 几丁质内切、外切酶与 嗜热球古菌 <i>Pyrococcus</i> 属的特有几丁质降解途径	73
第四章 糖酵解途径	81
第一节 古菌糖酵解途径概述	82
第二节 古菌 ED 葡萄糖酵解途径概述	83
第三节 古菌 ED 糖酵解途径中的关键酶类	91



第四节	古菌 EM 糖酵解途径	102
第五节	古菌戊糖磷酸途径	103
第六节	古菌糖酵解酶类的应用及代谢调控	107
第五章	海藻糖代谢	108
第一节	海藻糖的研究现状概述	108
第二节	6- 磷酸海藻糖合成酶研究概述	114
第三节	古菌 <i>Thermoplasma acidophilum</i> 6- 磷酸海藻糖合成酶 ...	117
第四节	古菌 <i>Thermoplasma acidophilum</i> 6- 磷酸海藻糖合成酶的 分子模建与突变分析	126
第五节	海藻糖 - 6 - 磷酸合成酶 N-loop 区域的功能、可塑性以及 进化意义	128
第六节	海藻糖 - 6 - 磷酸合成酶研究展望	130
第七节	古菌 <i>Thermoplasma acidophilum</i> 中海藻糖 - 6 - 磷酸磷酸 化酶	131
第八节	嗜热古菌 <i>Sulfolobus tokodaii</i> strain 7 中麦芽寡糖基海藻糖 合酶	137
参考文献		144



第一章

古菌的起源、分类、习性及特点

第一节 古菌习性概述

1. 生物的分类、起源与进化

生命从起源形成到今天经历了漫长的进化过程，人类对生命起源进化的认识也几经周折。1866 年，黑克尔（Haeckel E.）提出生命进化树的三个分支：动物、植物、原生生物。后几经变换，直至 1977 年，惠特克（Whittaker）提出动物、植物、真核原生生物、真菌和原生生物五界生物进化分类系统，被当时绝大多数学者所接受。

随着近代分子生物学技术的迅速发展，1990 年，以沃斯（Woese）、斯泰特尔（Stetter）等为代表的科学家，以他们称之为细菌“化石”的 16S rRNA 的核苷酸序列分析为主的一系列研究结果提出生物分类分为古细菌界（Archaeobacteria）、真细菌界（Eubacteria）和真核生物界（Eucarya）的三界学说，并构建了有根系统进化树（图 1.1）。

古细菌细胞为原核细胞，膜脂主要是类异戊基甘油二醚或二甘油四醚，核糖体含古生菌型 rRNA。古菌又可以分为宽广古生菌界（Euryarchaeota）和矿泉古生菌界（Crenarchaeota）。宽广古生菌界的生态栖居域比较广泛，代谢类型比较多样，而矿泉古生菌界与古生菌祖先的表型十分相似。

地质学家认为，地球早期大气层的温度很热，而根据古菌的栖息地硫黄区热土的还原性化学条件与早期地球情况大致相符，而且其代谢性也和



地球早期环境很吻合，因此有人认为，高温菌的起源就是生命的起源，最原始的生命形式是生长温度最高的严格厌氧的高温菌，如凯氏炽热甲烷菌 (*Methanopyrus kandleri*)。

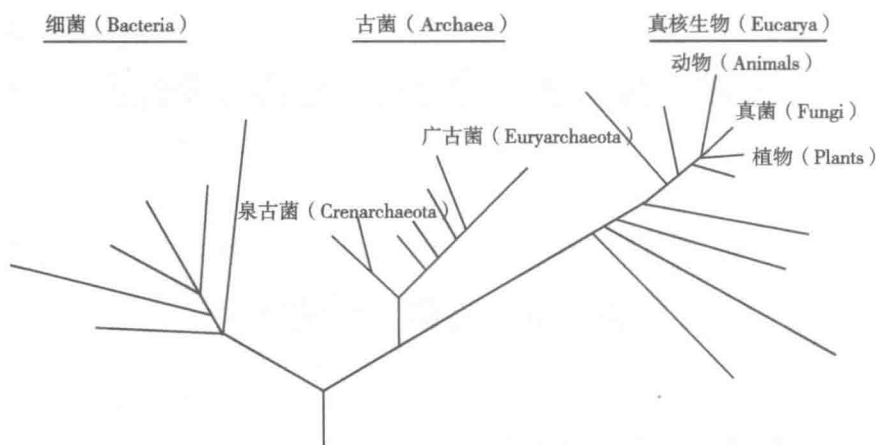


图 1.1 表明生命三域的根型系统进化树

随着氧气的丰富，微生物的多样性也大大增加。现在较为流行的内共生假说认为，真核细胞的祖先可能是由一个丢失了细胞壁的革兰氏阴性真细菌宿主细胞吞没古生菌形成共生关系融合而成。最终宿主基因组转移至古生菌中，形成核和内生网状组织，在形成真核基因组时真细菌和古生菌基因都可能有所丢失。

2. 极端环境微生物的研究现状

由于大多数古菌生活在厌氧、高盐或高温等极端环境中，包括嗜热、嗜冷、嗜酸、嗜碱、嗜压、抗辐射和极端厌氧等多种类型，因此一般将古细菌也称为“极端环境微生物” (Extremophiles)。极端环境微生物不仅能够耐受这些极端的自然条件，而且其生长依赖于这些极端因子，因此它们多样化适应机制的揭示将为生命科学发展提供全新的突破口。

目前，国际上对于极端环境微生物领域研究较为活跃，其中，美国、日本、英国、法国、意大利等国处于领先水平。我国也处于该领域研究的快速发展时期。2004 年，国家重点基础研究发展规划资助项目 (973 计

划)——极端环境微生物及其功能利用的基础研究正式启动。该研究可以分为以下 6 个领域:一、极端环境微生物的生物多样性及潜在应用价值评估;二、极端厌氧环境中产氢微生物的元基因组学;三、极端嗜热与嗜盐古菌的遗传机制;四、耐辐射菌等极端环境微生物的 DNA 修复机制;五、极端环境微生物的嗜极生理和代谢调控的研究;六、嗜热功能蛋白质及分子机器。

目前,极端环境微生物的研究大致分为以下几个领域:

(1) 遗传机制的研究。这方面主要包括古菌 DNA 复制、修复以及嗜极的遗传机制的研究。微生物常被用做模式生物来研究生命的基本规律。古菌自身作为一种独特的生命形式在遗传信息传递方面更类似于真核生物,因此在研究真核生物遗传机制方面,古菌可能是优于细菌的模式生物。

(2) 代谢方面的研究。古菌的新陈代谢总体上类似于细菌,但有报道古菌中经常存在不同于真核生物和细菌的有机物降解途径。如有机物几丁质的降解、氨基酸的降解、葡萄糖的转化等。

(3) 嗜热酶的催化机制、嗜热和热稳定性机制以及应用。

(4) 古菌资源的收集与分类方面的研究。

古菌的形态各异,广泛分布于地球上的各个角落。例如,显微镜观察发现,某些古菌可呈线状、杆状、三角形状、圆球状等。还有些古菌呈不规则的多节状(knobby),上面附着有许多裂片(lobe)。虽然从外形上看,古菌的形态和细菌没有明显大的区别,但是内部的细胞结构,如其细胞壁的化学组成则与真核生物和细菌存在很大的差异。此外,它们的细胞质内具有形状和组成与真核生物和细菌明显不同的核糖体(ribosome)结构。此外,它们的细胞膜与已报道的生物的结构也有明显差别。

从细胞的结构和组成上讲,古菌相对于细菌和真核生物要简单得多,其细胞机器也缺少真核生物的复杂性。例如,遗传载体 DNA 的存在形式,真核生物中普遍存在复杂的染色体(chromosomes)结构。显然,相对于真核生物,古菌不需要较大的基因组序列组成,这与它们相对简单的代谢组成是相吻合的。例如,与人类具有超过 30 亿个碱基对(base pair, bp)的宏大基因组相比,古菌掘越氏热球菌(*Pyrococcus horikoshii*)的基因组仅包含



有约 1700000 个碱基对 (bp)。

第二节 古菌的鞭毛结构与功能及特点

1. 古菌鞭毛概述

古菌鞭毛在已发现的古细菌所有种类中十分普遍，其为一种特殊的原核生物所特有运动构造，负责古细菌在各种环境中的运动功能。相比于细菌鞭毛，古菌鞭毛虽同样呈现为螺旋结构，但其与 IV 型细菌来源的菌毛更为相似。就结构而言，古菌鞭毛比细菌鞭毛更薄，但缺少可供亚基自由通过的管腔。古菌鞭毛的鞭毛蛋白经过处理，形成与 IV 型菌毛蛋白信号肽类似的前体蛋白，然后通过前鞭毛蛋白酶去除。细菌鞭毛蛋白并不是由类似于信号肽的结构组成，而古菌鞭毛和 IV 菌体系统之间还存在其他同源物。此外，N-聚糖的附着会形成古菌鞭毛蛋白的进一步翻译后修饰。人们对甲烷球菌属也进行了研究，确定了形成聚糖以及将其依附于鞭毛蛋白靶蛋白所需的糖基转移酶和寡糖转移酶。

2. 古菌鞭毛结构

卡尔·沃斯 (Carl Woese) 通过 16S/18S rRNA (核糖体 RNA) 序列构建进化树表明古菌形成了不同于细菌和真核生物的第三个生物域。科研工作者随后发现了古菌不同于细菌和真核生物的许多特性，而古菌特殊的鞭毛结构即是其中之一。鞭毛在已发现的所有古菌中普遍存在，在不同物种中，其数目从 1~100 不等。

随后的研究表明，鞭毛由“鞭毛基因” (fla gene) 编码而成，但在不同的古菌物种中，其鞭毛基因的组织 and 结构各不相同。这些鞭毛基因的产物赋予古菌在不同的生态环境中的适应以及运动能力，化学倾向性 (chemotaxis, 又称为趋药性)、光倾向性 (phototaxis)、氧气倾向性 (aerotaxis) 等。研究发现，古菌细胞壁不含二氨基庚二酸和胞壁酸、醚键膜脂质、DNA 催化的 RNA 聚合酶以及对众多抗生素产生的抗性。值得注意

的是,虽然古菌的趋药性系统非常像细菌,但在古菌中没有发现类似于在细菌中存在的能够与磷酸化的 CheY 相互作用的转换蛋白 FliM。代表性古菌如甲烷菌 (Methanococcus) 与硫化叶菌 (Sulfolobus) 等的鞭毛系统通常作为模式物种来研究鞭毛介导的蛋白质运输与磷酸化修饰等生命活动,如信号肽的剪切以及鞭毛结构的 N 末端糖基化等。通过 ATP 提供能量,古菌中的这些鞭毛结构使其在不同的环境中进行各种运动。

古菌的鞭毛结构主要有一类具有表明黏合能力的蛋白构成。有趣的是,古菌的鞭毛结构与 IV 类型的菌毛 (Type IV pili) 具有较高的序列同源性,而与细菌的鞭毛结构没有相似性。此外,古菌的鞭毛与 IV 类型菌毛都具有家族三类型的信号肽 (class 3 type signal peptides) 以及信号肽酶 (peptidase)。其中,在古菌鞭毛结构中的信号肽酶为 FlaK/PilD,在 IV 类型菌毛中为 PilD。然而,在细菌的鞭毛结构中,均缺少信号肽和信号肽酶。

3. 古菌鞭毛的分布

在所有主要培养的古菌亚群中,鞭毛非常常见,甚至在火山热原体等缺乏细胞壁的菌种中,其依然存在。虽然大多数观察结果表明,鞭毛运动与鞭毛基因 (fla) 位点有相关性,但是仍存在某些特殊情况。例如甲烷八叠球菌类和耐超高温热棒菌等,其鞭毛可能从一组与 fla 基因有微小联系或完全没有任何联系的基因中产生,或者其所观察到的“鞭毛”是一些类似鞭毛但实际上却是一种新型蛋白组成的其他表面附属物。以上问题仍需进行深入研究。

古菌的趋性系统 (趋化性、趋光性和趋氧性) 与细菌类似,使其可以进入更适宜的环境中。事实上,趋化性与古菌鞭毛的相互作用是目前研究的热点问题,而鞭毛系统也参与并用于研究与蛋白质输出和翻译后修饰相关的各种基本生物学现象,尤其是信号肽切割和鞭毛蛋白的 N-糖基化。

4. 古菌鞭毛的特点

4.1 古菌鞭毛的一般特征及其与细菌鞭毛和 IV 型菌毛的关系

古菌鞭毛和细菌鞭毛在外观、作用上相似,且都为螺旋结构,但二者



仍存在很多不同。首先，与大多数细菌鞭毛相比，古菌鞭毛的直径较小；其次，细菌鞭毛的锚定结构由鞭毛环和鞭毛杆构成，而古细菌的锚定结构是一种尚不明确的螺旋状结构；再次，钩形鞘区域的长度在细菌表毛中是固定的，而在古菌鞭毛中则极具变化性。在这两种结构中，鞭毛之间看似相似的趋化作用却掩盖了其结构的根本性差异，例如细菌鞭毛由质子动势或钠动势（极少情况下）驱动旋转，而最近的研究表明，古细菌鞭毛的旋转有赖于 ATP。最后，古菌鞭毛的结构和鞭毛丝的基本构造单元与细菌鞭毛完全不同，但其却与细菌来源的 IV 型菌毛类似。

值得注意的是，IV 型菌毛和古菌鞭毛都没有可供亚基通过的内部管腔；而对于细菌鞭毛而言，亚基可借助 III 型分泌系统从管腔中被送入远端细胞中。古菌鞭毛蛋白与 IV 型菌毛蛋白的相似性以及古菌鞭毛中缺乏足够大的管腔，使得古菌的鞭毛在其结构基部而非远端细胞部位生长。

4.2 鞭毛蛋白、菌毛蛋白和纤维蛋白的区别

研究者最先在古菌鞭毛中发现 IV 型菌毛蛋白样蛋白构成的表面附属物，随后在 IV 鞭毛和 Iho670 纤维中也发现了类似物质。那么如何区分这些不同类型的 IV 型菌毛蛋白样蛋白呢？首先三者的信号肽非常相似，而且均位于切割点附近，但它们的长度不同，古菌鞭毛的蛋白长度通常为 200~250 个残基，菌毛蛋白为 130~150，而 Iho670 纤维蛋白长约 300 个残基。此外，鞭毛蛋白通常位于串联操纵子的源头，而这些操纵子中包含某些与 gQnQsJ1aC-J 相关的 fla 单位蛋白。在分离试验中，染色体其他位置上的鞭毛蛋白与 fla 相关基因附近的鞭毛蛋白产生分离。研究发现，相对于菌毛和纤维蛋白，古菌鞭毛蛋白中 +3 位置的甘氨酸残基与 flaK 切割位有关。

5. 古菌鞭毛的结构与功能

与细菌鞭毛类似，古菌鞭毛具有运动功能，可参与表面的群集运动、检测湿度，并促进生物膜形成。此外，古菌鞭毛可以促进某些细胞间相互作用，形成双生物膜，或参与表面黏附（这种黏附是由其他类似于菌毛蛋白的蛋白质介导的）。目前，有关古菌的研究报告中均指出古菌的游动由鞭毛驱动。虽然某些研究表明特定古菌具有 IV 型菌毛，可通过伸展和收缩形

成表面抽搐式运动,但目前已知的所有IV型菌毛的实例中没有观察到回缩。

古菌的鞭毛具有多种功能。其中,鞭毛参与的最重要的生命活动是游动 (swimming)。最近的研究表明,在某些古细菌物种中,鞭毛还参与其他一些重要的生命活动。例如,在嗜热的广古菌强烈炽热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 中,鞭毛参与形成细胞表面的粘连以及细胞之间如电缆般 (cable-like) 的连接。*Pyrococcus furiosus* 和甲烷古菌甲烷嗜热菌 (*Methanopyrus kandleri*) 之间可以通过鞭毛而相互作用,从而形成两种成分构成的生物膜。在硫化叶菌 (*Sulfolobus*) 中,鞭毛可介导细胞之间的群集,且鞭毛和菌毛能够协调作用参与细胞之间的粘连。然而,在某些嗜盐古菌中,发现鞭毛并不参与细胞表面之间的连接。猜测这些嗜盐古菌所处的高盐环境能够抵消细胞表面电荷之间的排斥力,从而使得这些古菌不需要鞭毛介导的细胞表面粘连。

古菌具有与细菌明显不同的细胞表面结构。例如,某些古菌的细胞壁仅由细胞质膜和S层构成。因此,古菌的鞭毛如何锚定并连接到细胞上,是一个十分有趣且尚不清楚的科学问题。在嗜盐古菌中,人们通过电镜观察发现,一个极性的细胞质亚膜结构可能有助于鞭毛的锚定。例如,在嗜盐古菌嗜盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*) 中,在其细胞膜的下层发现了这种结构,并且位于细胞内鞭毛插入的区域。这种亚膜结构的直径可达300nm,并且位于细胞质膜20nm以下。

大部分古菌具有多种鞭毛蛋白 (flagellin) 基因,但是在硫化叶菌中,仅发现一个编码蛋白基因。甲烷古菌中发现的3~4个鞭毛蛋白中的两个是重要的细胞结构蛋白。而在某些古菌如 *A. pernix*、*A. fulgidus* 等中,存在两个鞭毛蛋白,其中一个为纤丝蛋白,而另一个可能为鞭毛钩相关蛋白。

不论细菌鞭毛还是古菌鞭毛,鞭毛的旋转均呈现不规律状态。由于古菌缺乏细胞质和外膜,古菌鞭毛的锚定结构中无鞭毛环。而对于多鞭毛的古菌,其细胞壁仅由S层细胞质膜组成,或根本没有细胞壁。

经观察,极端嗜盐菌等古菌的亚细胞质膜极性膜样结构可固定一些古细菌鞭毛,据早期研究推测,其主要通过鞭毛嵌入细胞质膜下的盘状结构形成固定作用。通过对嗜盐杆菌研究认为,古菌含有鞭毛丝蛋白和钩形蛋



白，而 JlaB3 的缺失形成了无钩鞭毛丝。通过缺失分析可以确定甲烷球菌 (*M. maripaludis*) 的 FlaB3 为鞭毛钩。古菌的鞭毛丝结构说明了古菌鞭毛和细菌鞭毛的根本差异，为古菌鞭毛和细菌 IV 型菌毛的结合提供了支持。

关于鞭毛的调节功能，对于产甲烷菌的研究成果使人们认识到 *fla* 基因的调节作用。*fla* 基因的 mRNA 与多种因子发生反应，在细胞受亮氨酸限制时降低，但在受氢限制时增加。此外，对于携带缺失 *M.maripaludis* 的突变体而言，*fla* 操纵子连续传代后不会出现转录，且通过蛋白质印记无法检测来自 *fla* 操纵子的各种蛋白质。但在非鞭毛化的细胞中，鞭毛细胞中发现的蛋白质印迹中可以检测到相似量的鞭毛蛋白，这说明鞭毛调节是转录后的。一组鞭毛蛋白基因携带众多与鞭毛蛋白共同转录而来的 *fla* 基因，这些基因均有可能参与鞭毛的形成。随着各种古菌遗传工具的改善，这些基因逐渐被删除或灭活，在没有 *flaC* 的古菌中，细胞不需要这种基因产物来形成鞭毛。

6. 鞭毛蛋白的翻译后修饰

古菌鞭毛蛋白先合成具有 III 类信号肽的前蛋白，然后切割该信号肽，促进鞭毛蛋白形成鞭毛丝。*N*-聚糖附着造成从 SDS-PAGE 迁移的边带相对分子质量与从基因序列推导的相对分子质量无密切联系，而实验证明，一些聚糖附着行为对鞭毛蛋白渗入甲烷球菌的鞭毛丝具有重要意义。

6.1 去除信号肽

鞭毛蛋白在古细菌中经历的第一个翻译后修饰为去除信号肽。前蛋白形成的鞭毛丝是古细菌鞭毛和细菌鞭毛最显著的区别。这些古菌鞭毛蛋白由 IV 型非典型短信号肽形成，即 IE 类信号肽。此类信号肽通过 IV 型前菌毛素肽酶 (TFPP) 输出的蛋白质去除信号肽，而不是通过看家信号肽酶 I 去除。在对 IV 类菌毛蛋白的研究中发现，甘氨酸在正确处理前菌毛蛋白的过程中发挥了重要作用。最近的研究显示，除菌毛蛋白样内鞭毛蛋白基因外，*M.maripaludis* 还具有其他 IV 型菌毛蛋白样基因，其中一种被称为 EppA。值得注意的是，EppA 仅处理菌毛蛋白而 FlaK 仅处理鞭毛蛋白。对于 EppA 切割而言，所有的菌毛蛋白中都含有 +1 谷氨酰胺，但是鞭毛蛋白

中没有。最近的研究成果表明, FlaK 的信号肽长度符合参与处理活动的条件, 但鞭毛蛋白中的 -2~+2 个氨基酸转换成菌毛蛋白不会影响 FlaK 处理菌毛蛋白。

6.2 鞭毛蛋白的 N-糖基化

鞭毛蛋白在古细菌中经历的第二个主要的翻译后修饰是糖基化。通过基因序列推断出的质量来判断古菌鞭毛蛋白的 SDS-PAGE 迁移, 我们发现, 大多数古菌鞭毛蛋白最终将发展为糖蛋白。古菌鞭毛蛋白氨基酸序列的检查显示, 几乎所有古菌鞭毛蛋白都有多个 N 链序列。根据真核生物的 Stt3 亚基相似性确定了将已聚合的聚糖转移至靶蛋白的寡糖基转移酶, 即参与聚糖聚合和转移的基因——aglB。然而, aglB 突变细胞呈非鞭毛化形式, 由此显示了聚糖附着对于鞭毛丝形成的重要作用。

此外, 有证据表明, 促进三糖形成的糖基转移酶 (aglH) 可以补充 alg7 中的酵母条件致死突变体。而且, 促进二糖聚糖形成的 aglA 敲除仍然是鞭毛化的, 而促进单糖聚糖形成的 algK 或 aglC 敲除呈现非鞭毛化, 因此, 二糖及以上多糖的聚糖对于鞭毛蛋白形成鞭毛丝而言非常重要。除 aglB、agl10、MMP0350 外, 其他基因的缺失不会形成非鞭毛细胞, 因为缺失这些基因的突变体或其鞭毛蛋白上完全没有聚糖, 或只是单糖聚糖。

7. 几种代表性古菌的鞭毛结构

7.1 嗜热球菌

长期以来, 研究者一直对热源体菌属的鞭毛存在争议。主要是由于嗜热球菌缺乏外部细胞壁。之后, 研究者在火山热原体菌 (*T. volcanium*) 中分离出了鞭毛, 发现了糖蛋白, 且分离出的鞭毛条带上的 N 末端测序表明了其与沃氏甲烷球菌 (*M. voltae*) 的鞭毛蛋白的序列非常相似。在嗜热球菌 *Pyrococcus furiosus* 中, 每个细胞大约含有 50 个鞭毛。将其鞭毛纯化后, 测得其直径为 9~10nm, 并且, 由于该古菌能够耐极端高温环境, 其分离的鞭毛也表现出很强的耐热性。该古菌的鞭毛主要由 1 个相对分子质量约 30 kDa 糖蛋白构成。

对 *Thermococcus kodakaraensis* 的五条串联鞭毛蛋白基因进行转录分析后



发现, 多个转录物全部在 *flaB1* 上游进行。而在对 *Pyrococcus furiosus* 的研究中发现, 大多数古菌鞭毛在高温中极其稳定。除了运动外, 这些鞭毛还行成了类似于绳索的结构, 使细胞与细胞相连, 并可黏附于各种物体表面。

7.2 硫化叶菌

在代表性嗜盐古菌硫磺矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 中, 发现了典型的鞭毛蛋白结构, 缺失突变分析表明这些鞭毛蛋白对于细胞之间的粘连是具有重要作用的。但是, 不同于其他古菌, 硫化叶菌中仅发现了 1 个鞭毛蛋白编码基因。此外, 从该古菌中纯化的鞭毛的直径达 14.5nm, 并且具有一个右手螺旋结构。但是, 在该古菌中没有发现钩状结构区域。

利用 SDS-PAGE 分析从芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) 中分离出的纯化丝, 显示出两条主要的鞭毛蛋白条带。这两种鞭毛蛋白至少在前 23 个 N 末端位置呈现相同的氨基酸序列, 因此, 这两个条带代表了相同的鞭毛蛋白, 但是糖基化程度不同。此外, 还在 *S. solfataricus* 中研究了鞭毛。通过分析缺失突变体, 我们发现, 鞭毛和菌毛是附着于各种表面所必需的。

7.3 嗜盐古菌

嗜盐杆菌中的鞭毛蛋白是第一个被测序的鞭毛蛋白, 并且, 据此科学家发现它们与细菌来源的鞭毛蛋白没有明显的序列相似性。因此, 古菌的鞭毛的结构与性质可能具有不同于细菌的特点。在纯化的鞭毛中, 发现了该古菌的 5 种鞭毛蛋白, 分别为 *flgA1*、*flgA2*、*flgB1*、*flgB2* 以及 *flgB3*。在每个鞭毛蛋白中, 均发现了 3 个 N-糖基化位点。基因突变分析表明, 每个鞭毛蛋白均具有特定的功能。

首先对盐藻中的古菌鞭毛进行了深度研究, 结果显示鞭毛丝呈右手螺旋, 其通过鞭毛的旋转移动, 且可在不同温度下发生从直线到螺旋状的多态转变。古菌鞭毛的鞭毛蛋白早期显示为糖蛋白, 并携带 N-聚糖。通过对单独的鞭毛蛋白基因突变体进行研究, 人们发现, 各个鞭毛具有特定的作用, 鞭毛蛋白却是所有正常的功能性鞭毛所必需的。通过将 *flgA* 和 *flgB* 鞭毛蛋白先渗入鞭毛丝中, 证明 *flgB3* 形成钩形鞘区。此外, 人们还发现, 与细菌鞭毛通过质子动势或钠动势驱动鞭毛旋转的情况不同, 该古菌鞭毛的旋转主要依赖 ATP。

7.4 甲烷古菌

在纯化的甲烷古菌产甲烷球菌 (*Methanococcus deltae*) 中, 包含两种主要的鞭毛蛋白, 其相对分子质量分别为 32kDa 和 34kDa。该古菌鞭毛蛋白的糖基化能够被糖基化抑制剂杆菌肽 (bacitracin) 所抑制, 并且非糖基化的鞭毛蛋白不能形成该甲烷古菌的正常鞭毛结构, 说明糖基化对于鞭毛蛋白组装是必不可少的。此外, 在甲烷古菌万氏甲烷球菌 (*Methanococcus vannielii*) 基因组中, 发现了三个鞭毛蛋白编码基因。但在纯化的鞭毛中, 仅得到了鞭毛蛋白 flaB1 和 flaB2, 其相对分子质量分别为 30.8kDa 和 28.6 kDa, 但没有得到鞭毛蛋白 flaB3。进一步, 通过三种方式我们获得了三个鞭毛蛋白的基因, 在纯化鞭毛的过程中我们发现, flaB1 和 flaB2 为 30.8kDa 和 28.6kDa 时, 主要结构蛋白在典型的甲烷球菌 fla 操纵子中呈现三种鞭毛蛋白基因串联。通过纯化, 我们还发现, 已知的糖基化抑制剂杆菌肽抑制了隐含的糖基化, 当浓度不断上升时, 蛋白质印记中检测到的鞭毛蛋白相对分子质量逐渐降低, 这可能导致低糖或非糖基化。

7.5 钠白菌

Natrialba magadii 的串联鞭毛蛋白基因, 通过转录分析, 我们了解到其所有四种鞭毛蛋白以及第一个相邻的潜在 fla 基因为共同转录而来。由于发生糖基化现象, SDS-PAGE 鉴定得出的鞭毛蛋白远大于基因预测的大小。当盐水浓度下降至 8% 时, *N. magadii* 鞭毛将分离成原丝, 比鞭毛丝薄, 当浓度进一步下降时, 则仅剩蛋白质聚集体。

8. 古细菌鞭毛系统的基因组学

通过查验, 遗传数据库未能检测到参与古细菌基因组中鞭毛结构或形成的鞭毛基因的任何同源物。科研工作者已经研究了古菌鞭毛系统的系统发育学, 并且已经鉴定了 IV 型菌毛和 II 型分泌系统中的同源物。而且, 古菌毛 ATP 酶只是一小部分, 似乎与古菌鞭毛形成无关, 可独立于 flaJ 的多跨膜蛋白同源物发挥作用。

通过系统发育学研究发现, 古菌鞭毛系统的成分并不会经常在不同的古菌种中转移, 同时, 也未发现任何 fla 基因横向转移的证据。