

极端嗜热微生物及其高温适应机制的研究进展

曾静 郭建军 邱小忠 王贤卓 袁林

(江西省科学院微生物研究所, 南昌 330096)

摘要: 极端嗜热微生物在高温条件下生长繁殖, 其必然具有适应高温环境的特殊细胞结构、基因类型以及生理生化机制。极端嗜热微生物的研究对探索生命的起源以及极端嗜热微生物的开发和应用具有重要意义。对极端嗜热微生物中细胞膜、核酸分子、蛋白质分子、代谢产物和辅酶的高温适应机制的研究进展进行了概述, 旨为极端嗜热微生物以及来源于极端嗜热微生物的各种生物分子的开发和应用提供理论依据。

关键词: 极端嗜热微生物; 热稳定性; 高温适应机制

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.09.005

Advances on Hyperthermophiles and Mechanism of Their Thermal Adaptation

Zeng Jing Guo Jianjun Qiu Xiaozhong Wang Xianzhuo Yuan Lin

(Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096)

Abstract: Hyperthermophiles are able to grow and reproduce at high temperatures, and inevitably they should have special cellular features, genome sequences and physiological properties to adapt to high temperatures. The researches on hyperthermophiles possess significances for exploring the origin of life on Earth, and the developments and applications of hyperthermophiles. The recent advances on the thermal adaptation of cellular components of hyperthermophiles (cell membranes, nucleic acids, proteins, metabolites and cofactors) are summarized, which may provide the theoretical basis for the developments and applications of hyperthermophiles and their cellular components.

Key words: hyperthermophiles; thermo-stability; thermal adaptation

极端嗜热微生物 (Hyperthermophiles) 是指最适生长温度在 80℃ 以上的微生物^[1]。与一般嗜热微生物不同, 极端嗜热微生物在 60℃ 以下会停止生长, 有的极端嗜热微生物在 90℃ 以下就会停止生长^[1], 如最高生长温度为 113℃ 的极端嗜热古生菌 *Pyrolobus fumarii*^[2]。Stetter 于 1981 年分离得到第一株极端嗜热微生物, 即炽热甲烷嗜热菌 (*Methanothermus fervidus*), 其最适生长温度为 82℃, 最高生长温度为 97℃^[3]。目前, 人们已经从高温环境中分离得到 90 余种极端嗜热微生物^[1]。

极端嗜热微生物具有独特的基因类型、生理生化机制、代谢产物以及特殊的高温适应机制。目前关于极端嗜热微生物的研究主要集中于极端嗜热微生物的发现、适应极端高温环境的分子机制和调控机制。同时, 人们对来源于极端嗜热微生物的各种生物分子, 如极端嗜热蛋白质、相容性溶质及代谢产物等也高度关注。这些研究有助于人们理解地球上生命的起源, 为寻找其他可能存在生命的环境提供线索, 同时也可以为生物技术以及相关的工业领域提供丰富的生物资源。

收稿日期: 2015-01-15

基金项目: 江西省科研院所基础设施配套项目 (20142BBA13030), 江西省重点科技成果转移转化计划 (20142BBI90041), 江西省科技厅青年科学基金资助项目 (20151BAB214001), 江西省科学院科研开发专项博士项目 (2014-YYB-08)

作者简介: 曾静, 女, 博士, 研究方向: 极端嗜热蛋白酶的高温适应性机制; E-mail: zengjingwhu@126.com

通讯作者: 袁林, 男, 博士, 研究方向: 工业微生物的应用; E-mail: yuanlin2003cn@aliyun.com

1 极端嗜热微生物

1.1 极端嗜热微生物的分布

极端嗜热微生物分布于环境温度高达 80–115℃ 的高温环境中, 包括陆地高温环境、海洋高温环境及人造高温环境^[4]。陆地高温环境包括火山喷气孔、热泉及含有石油的地热层等。这类高温环境中盐浓度较低(0.1%–0.5%), 环境 pH 变化范围广(pH 0–10)。海洋高温环境包括浅海热液系统、深海热气排气口(又称黑烟囱, Black Smokers)及活跃的海底山等。这类高温环境中盐浓度较高(3%), 环境 pH 呈弱酸性至弱碱性(pH 5–8.5)。人造高温环境包括发烟的煤矸石堆以及地热发电厂和核电站的流出物等。高温条件下氧气的溶解度较低, 并且高温环境通常充满还原性气体, 因此, 除了暴露在空气中的火山喷气孔的表层外, 极端嗜热微生物所分布的高温环境主要是缺氧的环境。值得注意的是, 一些极端嗜热微生物是从高于它们最高生长温度的高温环境中分离得到的, 如 *Hyperthermus butilicus* 和 *Pyrococcus abyssi*; 另外一些极端嗜热微生物, 如 *Archaeoglobus profundus* 则是从低于其最适生长温度的环境中分离得到的。这说明, 在原始生存环境中, 极端嗜热微生物可能并不处于最佳的生长状态^[5]。

1.2 极端嗜热微生物的系统学分类

根据基于原核生物 16S rRNA 和真核生物 18S rRNA 序列分析所构建的系统进化树, 地球上所有生物分为细菌、古生菌和真核生物^[6]。极端嗜热微生物位于细菌和古生菌中。细菌中热袍菌属(*Thermotoga*)和产液菌属(*Aquifex*)属于极端嗜热微生物, 生长温度最高的极端嗜热细菌是 *Thermotoga maritima* 和 *Aquifex pyrophilus*^[5]。其中 *T. maritima* 的最高生长温度为 90℃, 最适生长温度为 80℃; *A. pyrophilus* 的最高生长温度为 95℃, 最适生长温度为 85℃^[1]。古生菌的泉古菌门(Crenarchaeota)、广古菌门(Euryarchaeota)、纳古菌门(Nanoarchaeota)和初古菌门(Korarchaeota)中均分布有极端嗜热微生物^[1]。纳古菌门中 *Nanoarchaeum equitans* 是目前已知的最小生物, 它寄生在极端嗜热古生菌 *Ignicoccus hospitalis* 的表面^[7]。目前已知的生长温度最高的极端嗜热古生菌分别来

源于火裂片菌属(*Pyrolobus*)、热网菌科(Pyrodictiaceae)的 *Geogemma* 属和甲烷火菌属(*Methanopyrus*), 如最高生长温度为 113℃ 的 *P. fumarii*^[2]、最高生长温度为 121℃ 的 *Geogemma barossii* (Strain 121)^[8], 以及生长压力为 20 MPa 时最高生长温度为 122℃ 的 *Methanopyrus kandleri* strain 116^[9]。

极端嗜热微生物位于系统进化树的根部, 分支较短, 且其生存的极端环境(如高温、高压、缺氧和充满还原性气体等)与生命起源时地球上的环境相似^[10], 因此极端嗜热微生物可能是与地球上所有生物的祖先最接近的生命形式。但是, 这一推测与一些实验结果相悖^[11]。例如, RNA 分子在高温条件下的稳定性差; 通过对来源于常温微生物 *Escherichia coli* 的 DNA polymerase I 和来源于嗜热微生物 *Thermus aquaticus* 的 *Taq* polymerase 的结构和功能进行分析发现, *Taq* polymerase 可能起源于常温微生物, 在适应高温环境的过程中, 3′–5′ 核酸外切酶功能模块中氨基酸残基发生变化(如带电荷氨基酸残基和疏水性氨基酸残基的数目增加), 使其缺失 3′–5′ 核酸外切酶活性。因此, 有的学者认为地球上最早的生命形式可能是常温微生物。目前, 关于地球上最早的生命形式的研究尚未有定论。有关极端嗜热微生物的基因组学、蛋白质组学及生理生化性质等的研究有利于人们对地球生命起源进行深入探索。

1.3 极端嗜热微生物的代谢类型

极端嗜热微生物获取能量的方式简单, 其代谢类型分为化能无机自养型(Chemolithoautotrophic)和异养型(Heterotrophic)两类。大多数极端嗜热微生物属于化能无机自养型微生物。化能无机自养型极端嗜热微生物以 CO₂ 作为唯一碳源, 通过有氧呼吸和厌氧呼吸来获取能量^[12]。化能无机自养型微生物通过还原性三羧酸循环(如 *A. pyrophilus* 和 *Thermoproteus neutrophilus*)、还原性乙酰辅酶 A 途径(如 *Archaeoglobus lithotrophicus*)以及 3- 羟基丙酸循环(如 *Metallosphaera sedula*、*Sulfolobus metallicus* 及 *Acidianus infernus*)这 3 种途径来固定 CO₂。在呼吸作用中, H₂ 是重要的电子供体, 其他电子供体还包括硫化物、硫和亚铁离子。有氧呼吸中, O₂ 作为电子受体。进行有氧呼吸的极端嗜热微生物通常是微

需氧微生物,能够在氧气浓度较低($< 10 \text{ ppm}$)的条件下生长,如 *A. pyrophilus*。根据厌氧呼吸中电子受体的不同,厌氧呼吸可以分为硝酸盐呼吸、硫酸盐呼吸、硫呼吸和二氧化碳呼吸等^[12]。系统进化树中位于最根部,且分支最短的极端嗜热微生物均为化能无机自养型(如 *Pyrolobus*、*Pyrodictium*、*Methanopyrus*、*Aquifex*)。这些微生物是有机物的初级生产者,可以为异养型微生物提供营养物质^[12]。

一些化能无机自养型极端嗜热微生物同时是兼性异养型,能够利用环境中有机物(如死细胞)生长,这些微生物主要属于硫化叶菌属(*Sulfolobus*)、生金球菌属(*Metallosphaera*)、酸双面菌属(*Acidianus*)及热棒菌属(*Pyrobaculum*)^[12]。异养型极端嗜热微生物以有机物为碳源,通过呼吸作用(包括有氧呼吸和厌氧呼吸)或者发酵作用获取能量^[12]。异养型极端嗜热微生物可以利用多肽混合物如蛋白胨或胰蛋白胨、酵母粉、碳水化合物以及有机化合物生长。例如,热火球古菌属(*Pyrococcus*)的极端嗜热古生菌可以利用多肽、纤维二糖、麦芽糖及丙酮酸等生长^[13];热袍菌属(*Thermotoga*)的极端嗜热细菌可以利用葡萄糖、淀粉及木聚糖等生长^[1];从热泉中分离得到的 *Acidilobus saccharovorans* 可以利用乙酸盐、乳酸盐及乙醇生长^[14]。

2 极端嗜热微生物的高温适应机制

生物生长的上限温度很大程度取决于生物分子的热稳定性^[5]。细胞在代谢途径中所产生的一些小分子化合物和不耐热的氨基酸在高温条件下不稳定,易发生水解或分解。如当温度达到 100°C 时,小分子化合物 NAD^+ 、ATP 和 ADP 会发生水解,其中 NAD^+ 的半衰期少于 10 min , ATP 和 ADP 的半衰期约为 $1\text{--}6 \text{ h}$ ^[15]。蛋白质在高温条件下易发生共价修饰作用(如天冬酰胺残基和谷氨酰胺残基的脱酰胺作用、组氨酸残基和半胱氨酸残基的氧化作用等)而导致其失活和降解^[15]。虽然这些生物分子在体外高温条件下不稳定,但其依然能在生长温度高达 $100\text{--}113^\circ\text{C}$ 的极端嗜热微生物中发挥生理功能,说明极端嗜热微生物具有独特的高温适应机制。

2.1 细胞膜的高温适应机制

极端嗜热微生物包括极端嗜热细菌和极端嗜热

古生菌。虽然细菌和古生菌的细胞膜的基本组分都是磷脂分子,但两者的构成相差较大^[15]。如细菌中磷脂分子由含有 $16\text{--}18$ 个碳原子的脂肪酸(疏水尾)通过酯键与甘油骨架(亲水头)的 $1,2$ 碳位相连构成,而古生菌中磷脂分子由类异戊二烯(疏水尾)通过醚键与甘油骨架(亲水头)的 $2,3$ 碳位相连构成;细菌的细胞膜是磷脂双分子层膜,而古生菌的细胞膜是单分子层膜或单、双分子层混合膜。因此,它们的细胞膜的高温适应机制有很大的区别。极端嗜热细菌主要通过提高磷脂分子中饱和脂肪酸的比例、增加磷脂分子中磷脂酰烷基链的长度以及提高异构化支链的比例来增强细胞膜的热稳定性^[16]。饱和脂肪酸之间存在着较强的疏水相互作用,可以增强细胞膜在高温条件下的刚性,从而使其在高温条件下更加稳定。此外,一些极端嗜热细菌的磷脂分子兼具细菌和古生菌中磷脂分子的特征。例如,极端嗜热细菌 *T. maritima* 的磷脂分子由含 17 个碳原子的脂肪酸通过醚键与甘油骨架相连构成^[15]。

古生菌的细胞膜结构包括双植烷甘油二醚分子(Diphytanylglycerol, 称为 Archaeols)构成的双分子层膜结构;双植烷双甘油四醚分子(Dibiphytanyldiglycerol, 称为 caldarchaeols)(即双植烷甘油二醚的二聚体形式)或双植烷甘油诺尼醇四醚分子(Dibiphytanyl glycerol nonitol tetraethers, 称为 Nonitolcaldarchaeols)构成的单分子层膜结构^[17]。目前人们仅在嗜热古生菌(包括极端嗜热古生菌)中发现单分子层膜结构,可能是由于单分子层膜结构具有更高的机械强度。一些嗜热古生菌[如热原体目(Thermoplasmatales)]的细胞膜中双植烷双甘油四醚分子或双植烷甘油诺尼醇四醚分子的每条 C_{40} 双植烷链含有 $0\text{--}4$ 个环戊烷结构^[18]。增加环戊烷结构的数量可进一步提高细胞膜的机械强度,降低细胞膜的流动性。此外,在嗜热古生菌中,甘油骨架的 C_3 位和诺尼醇分子的 C_6 位存在糖基化修饰。亲水头所连接的糖基之间会形成氢键,降低细胞膜的流动性,从而提高细胞膜的热稳定性^[18]。

2.2 核酸分子的高温适应机制

极端嗜热微生物胞内的 DNA 反解旋酶、与 DNA 分子相结合的带正电荷的蛋白质、聚胺类物质

以及高浓度的钾盐是其胞内 DNA 分子维持热稳定性的重要因素^[16]。极端嗜热微生物均含有一种特殊形式的 DNA 拓扑异构酶, 即 DNA 反解旋酶 (DNA reverse gyrase), 它能够促进 DNA 分子形成正向超螺旋结构, 从而增强 DNA 分子的热稳定性^[16]。例如, 极端嗜热古生菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 的野生型菌株能够在 100℃ 生长, 而缺失 DNA 反解旋酶基因的突变株 (Δrgy) 在 80℃ 以上生长缓慢, 且最高生长温度仅为 93℃, 这说明 DNA 反解旋酶在维持高温条件下 DNA 分子的稳定性方面发挥重要作用^[19]。广古菌门 (Euryarchaeota) 的部分极端嗜热微生物含有类组蛋白 (Histone-like proteins), 它们能够与双链 DNA 分子结合, 具有稳定其双螺旋结构的作用。*T. kodakarensis* KOD1 含有两种组蛋白 (HpkA 和 HpkB), 它们对于 DNA 分子的包装和核小体的形成非常重要^[16]。泉古菌门 (Crenarchaeota) 的部分极端嗜热微生物含有小分子 DNA 结合蛋白, 如 *Sulfolobus acidocaldarius* 中小分子 DNA 结合蛋白 Sac7d 能够与 DNA 分子结合, 并有效地提高 DNA 分子的溶解温度^[20]。部分极端嗜热微生物胞内含有较高浓度的钾盐, 有的极端嗜热微生物胞内的钾离子浓度高达 1 mol/L。部分极端嗜热产甲烷菌 (Hyperthermophilic methanogens) 胞内含有较高浓度的三钾环 -2,3- 二磷酸甘油酯 (Tripotassium cyclic-2,3-diphosphoglycerate); 极端嗜热古生菌 *Pyrococcus woesei* 胞内含有较高浓度的二肌醇 -1,1'- 磷酸钾 (Potassium di-inositol-1,1'-phosphate)^[17]。钾离子与 DNA 分子结合可以防止 DNA 分子在高温条件下发生脱嘌呤作用。

古生菌的 tRNA 分子存在转录后修饰作用^[15]。其所包含的经过化学修饰的核糖核苷酸包括: 古嘌呤 archaesine (7-formamidino-7-deazaguanosine)、 m^2Gm ($N^2,2'$ -O-dimethylguanosine)、 m_2^2Gm (N^2, N^2 -O-trimethylguanosine)、 m^5s^2U (5-methyl-2-thiouridine) 等^[16]。其中 m^2Gm 和 m_2^2Gm 这两种核糖核苷酸是极端嗜热古生菌 tRNA 分子所特有的。古生球菌属 (*Archaeoglobus*)、甲烷嗜热菌属 (*Methanothermu*)、热变形菌属 (*Thermoproteus*)、热球菌属 (*Thermococcus*)、热棒菌属 (*Pyrobaculum*)、热网菌属 (*Pyrodictium*) 及热火球古菌属 (*Pyrococcus*) 等极端嗜热

古生菌均含有这两种核糖核苷酸分子^[15]。

极端嗜热微生物的 rRNA 分子主要通过与核糖体中蛋白质组分的结合来提高热稳定性。极端嗜热古生菌中 rRNA 分子的转录后修饰水平较低, 但是 rRNA 分子中核糖核苷酸分子的甲基化修饰水平随着极端嗜热微生物的培养温度的提高而有所升高, 这说明极端嗜热古生菌中 rRNA 分子的甲基化修饰作用有利于其热稳定性的提高^[15]。例如, *S. solfataricus* 中 16S rRNA 和 23S rRNA 的甲基化修饰对于维持其二级结构及三级结构的热稳定性非常重要^[21]。

2.3 蛋白质分子的高温适应机制

来源于极端嗜热微生物的蛋白质具有优良的热稳定性。如来源于极端嗜热古生菌 *Pyrococcus horikoshii* 的蛋白质 CutA1 在环境 pH 为 7.0 的变性温度 T_d (Denaturation temperature) 高达 148.5℃^[22]; 来源于极端嗜热古生菌 *P. woesei* 的淀粉酶能够在 130℃ 发挥活性^[23]。通过对同源的极端嗜热蛋白质 (来源于极端嗜热微生物) 和常温蛋白质 (来源于常温微生物) 的分子结构进行比较分析发现, 同源的极端嗜热蛋白质与常温蛋白质具有很高相似性^[24]。以同源的极端嗜热酶和常温酶为例, 两者除了进化上的差异以及维持稳定性和发挥活性的温度范围不一致外, 在一级结构和三级结构上具有高度的相似性。例如, 极端嗜热酶和常温酶的氨基酸序列具有 40%~85% 的相似性; 其三级结构具有重叠性; 它们具有相同的催化机理。因此极端嗜热蛋白质主要通过稳定非保守结构来提高整个分子的稳定性。

极端嗜热蛋白质的高温适应机制涵盖了蛋白质的一级结构到四级结构的变化, 而且极端嗜热蛋白质的热稳定性是由多种稳定机制共同决定的, 包括内在因素和外在因素。极端嗜热蛋白质维持热稳定性的内在因素包括如下:

2.3.1 氨基酸残基的组成与分布。与常温蛋白质相比, 极端嗜热蛋白质中带电荷氨基酸残基 (Asp、Glu、Lys、Arg 和 His) 的含量提高 (增加 3.24%), 不带电荷的极性氨基酸残基 (Ser、Thr、Asn 和 Gln) 的含量降低 (减少 4.98%, 其中 Gln 的含量减少了 2.21%)^[24]。另外, 极端嗜热蛋白质中疏水

性氨基酸残基和芳香族氨基酸残基的含量也略有提高^[24]。由于极端嗜热微生物的基因组具有多样性,极端嗜热微生物中蛋白质的氨基酸组成不一定完全符合上述规律。因此,蛋白质的热稳定性与其氨基酸组成并不具有完全的相关性。更多的数据表明蛋白质中氨基酸残基的分布以及氨基酸残基之间的相互作用与蛋白质的热稳定性具有更强的相关性。例如,同源的常温蛋白酶 subtilisin BPN' 与嗜热蛋白酶 thermitase 含有相同数量的带电荷氨基酸残基,但是 thermitase 含有更多的离子键^[25]。

2.3.2 增强非共价作用力 如离子键、氢键、疏水相互作用和芳香环相互作用等。以离子键为例,对比极端嗜热蛋白质和与其同源的常温蛋白质的分子结构发现,极端嗜热蛋白质含有更多离子键(以及离子键网络),这表明离子键(以及离子键网络)对于极端嗜热蛋白质维持其热稳定性非常重要^[26]。通过对分别来源于嗜冷微生物、常温微生物和极端嗜热微生物的乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)的结构进行分析发现,蛋白质的热稳定性与离子键的数量及离子键网络的大小呈正相关性^[27]。

2.3.3 提高 α -螺旋结构(α -helix)的稳定性 蛋白质主要通过如下方式来提高 α -螺旋结构的稳定性:肽链骨架结构中氨基酸残基主链之间形成氢键;倾向于形成 α -螺旋结构的氨基酸残基的含量提高,不利于 α -螺旋结构稳定性的氨基酸残基(如 Val、Ile 和 Thr)的含量降低;氨基酸残基侧链之间的相互作用($i, i+3; i, i+4$); α -螺旋结构的 N 末端和 C 末端的极性氨基酸残基与主链之间形成氢键; α -螺旋结构的 N 末端和 C 末端附近的带电荷氨基酸残基(N 末端附近含有带负电荷的氨基酸残基、C 末端附近含有带正电荷的氨基酸残基)与螺旋偶极子(helix macrodipole)之间的静电作用^[28]。

2.3.4 减少溶剂可及的疏水表面 蛋白质分子表面的疏水性氨基酸残基倾向于远离蛋白质周围的水分子,不与溶剂产生相互作用,蛋白质分子表面疏水性氨基酸残基的分布不利于其稳定性和溶解性^[26]。许多极端嗜热蛋白质通过减少溶剂可及的疏水表面来提高热稳定性,如来源于 *T. kodakarensis* 的核糖核酸酶 HIII (Tk-Rnase HIII)^[29] 等。

2.3.5 多肽链 N 末端和 C 末端的对接及松散末端的

固定 蛋白质中 loop 结构、N 末端及 C 末端是其分子结构中具有较强多变性的区域。在蛋白质发生热变性的过程中,这些区域会首先出现解折叠现象^[24]。一些极端嗜热蛋白质通过修饰这些热不稳定的区域获得较强的热稳定性。其中 loop 结构的修饰包括以下两个方面:缩短 loop 结构的长度;将 loop 结构固定在蛋白质分子结构的其他区域上^[15]。极端嗜热蛋白质主要通过延长相邻的二级结构或引入新的二级结构来缩短 loop 结构,如来源于极端嗜热古生菌 *Vulcanisaeta moutnovskia* 的内酯酶(VmoLac)即通过引入额外的 α -helix 来缩短 loop 结构^[30]。Loop 结构的固定主要是通过离子键、氢键和疏水相互作用完成。蛋白质的 N 末端和 C 末端也通过与 loop 结构类似的方式固定在蛋白质分子结构的其他区域^[24],如来源于 *T. maritima* 的铁氧化还原蛋白(Ferredoxin)的 N 末端通过氢键固定在蛋白质的核心区域^[31]。

2.3.6 结合金属离子。金属离子的结合与酶分子的活性和稳定性相关,例如来源于 *Pyrococcus furiosus* 的胞外 α -淀粉酶的活性和稳定性与其结合的 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 相关^[32]。Zeng 等^[33]对来源于 *P. furiosus* 的极端嗜热蛋白酶 pyrolysin 的高温适应性机制进行了研究,研究结果表明 pyrolysin 含有两个与其热稳定性密切相关的 Ca^{2+} 结合位点。

2.3.7 蛋白质亚基之间的相互作用和多聚化。已有实验证据表明亚基之间的相互作用可以影响极端嗜热蛋白质的热稳定性。例如,来源于极端嗜热古生菌 *P. abyssi* 的 tRNA^{m1}A57/58 甲基转移酶(tRNA^{m1}A57/58 methyltransferase, pabTrml)以四聚体的形式存在。在四聚体结构中,不同亚基的半胱氨酸残基 Cys196 和 Cys233 之间相互形成了 4 对二硫键。野生型与突变体 C196S/C233S 的 T_m 值分别为 105.3℃ 和 88.8℃,即亚基间二硫键的去除导致该酶分子的热稳定性下降,这说明亚基间的二硫键对于 pabTrml 的热稳定性非常重要^[34]。与同源的常温蛋白质相比,许多极端嗜热蛋白质的寡聚化程度更高。极端嗜热蛋白质的寡聚化结构也与其稳定性相关。如来源于常温微生物的甲川四氢甲烷喋呤环水解酶(methenyl-tetrahydromethanopterin cyclohydrolase)以二聚体的形式存在,而来源于极端嗜热古生菌 *Methanopyrus kandleri* 的甲川四氢甲烷喋呤环水解酶

(Mch) 以三聚体的形式存在^[35]。

2.3.8 翻译后修饰 翻译后修饰现象广泛地存在于极端嗜热微生物中。极端嗜热蛋白质的翻译后修饰包括糖基化 (Glycosylation)、磷酸化 (Phosphorylation)、甲基化 (Methylation) 等^[36]。与从原始菌中分离得到的天然蛋白质相比, 一些异源表达 (如在 *E. coli* 中进行表达) 得到的重组极端嗜热蛋白质的稳定性较差, 这可能与天然蛋白质的翻译后修饰相关。例如, 来源于 *P. furiosus* 的极端嗜热蛋白酶 pyrolysin 是一种与细胞膜组分结合的糖基化蛋白酶^[37]。Pyrolysin 具有较好的热稳定性, 在 95℃ 的半衰期为 9 h, 而大肠杆菌中表达的重组 pyrolysin 在 95℃ 的半衰期仅为 2.5 h^[37]。这两种酶分子的热稳定性差异可能与 pyrolysin 的糖基化修饰相关。

极端嗜热微生物胞内的环境因子 (如相容性溶质、分子伴侣蛋白等) 及细胞组成成分 (如 S 层) 可以作为外在因素来维持极端嗜热蛋白质的热稳定性。极端嗜热微生物胞内的相容性溶质 (如环 2,3-二磷酸甘油酸、磷酸二肌醇、甘露糖基甘油酸等)、分子伴侣蛋白等, 可以辅助蛋白质维持其热稳定性^[38]。例如, 炽热甲烷嗜热菌 (*M. fervidus*) 胞内环 2,3-二磷酸甘油酸 (Cyclic 2,3-diphosphoglycerate, cDPG) 的浓度随其培养温度的提高而升高, 并且 cDPG 可以明显提高 *M. fervidus* 中甘油醛-3-磷酸脱氢酶的热稳定性^[39]。分子伴侣蛋白能够与热变性的蛋白质结合, 防止热变性的蛋白质发生聚集, 并能辅助它们折叠形成正确的构象。极端嗜热古生菌 *T. kodakarensis* KOD1 含有两类分子伴侣蛋白 CpkA 和 CpkB, 它们分别在其生长温度过低和生长温度过高的情况下表达并发挥功能^[16]。一些极端嗜热微生物细胞表面的 S 层可以作为胞外酶的附着位点, 如极端嗜热古生菌 *Staphylothermus marinus* 中存在附着于 S 层的胞外丝氨酸蛋白酶 STABLE, 与 S 层的结合可以提高 STABLE 的热稳定性^[40]。

2.4 代谢产物和辅酶的高温适应机制

代谢途径中许多重要的中间代谢产物和辅酶在高温条件下的稳定性较差。极端嗜热微生物通过快速合成或替换热稳定性较差的代谢产物 (或辅酶)、提高酶分子的催化效率以及一些特殊的保护机制来

维持其在高温条件下的正常代谢活动^[15]。极端嗜热微生物中代谢产物和辅酶的高温适应机制主要包括以下 4 种^[15]。

2.4.1 微环境保护作用 (Microenvironment protection)

许多辅酶的热稳定性依赖于其所处的环境。如 ATP 的热稳定性与环境 pH 及金属离子相关; 在高 pH 条件下, NADH 具有较高的热稳定性。ATP 和 NAD⁺ 能在生长温度高达 100℃ 以上的极端嗜热微生物中发挥生理功能, 说明这些极端嗜热微生物中可能存在有利于其维持较高热稳定性的微环境。

2.4.2 代谢通路 (Metabolic channeling)

同一代谢途径中参与反应的酶分子按照特定的顺序发挥作用。在一些极端嗜热微生物中, 对热不稳定的中间代谢产物由上游酶分子迅速转移至与上游酶分子并列排布的下游酶分子, 这样有利于极端嗜热微生物克服因中间代谢产物的不稳定性对代谢过程产生的不利影响。氨甲酰磷酸 (Carbamoyl phosphate, CP) 是精氨酸合成途径和嘧啶合成途径中重要的中间代谢产物, 但氨甲酰磷酸 100℃ 时稳定性较差 (100℃ 的半衰期 < 2 s)。极端嗜热古生菌 *P. abyssi* 中氨甲酰磷酸合成酶与其下游的天冬氨酸氨基甲酰转移酶 (Aspartate carbamoyltransferase, ATCase) 在空间上并列排布, 构成氨甲酰磷酸的转运通道, 从而保护氨甲酰磷酸, 也使代谢反应正常进行^[41]。

2.4.3 提高酶分子的催化效率 (Catalytic efficiency)

Sterner 等^[42] 关于极端嗜热细菌 *T. maritima* 中色氨酸合成途径的研究表明, 来源于 *T. maritima* 的磷酸核糖邻氨基苯甲酸盐异构酶 (Phosphoribosyl anthranilate isomerase, Tprai) 具有较高的催化活性 (K_m 值降低, k_{cat} 值升高), 能够克服对热不稳定的磷酸核糖邻氨基苯甲酸盐 (80℃ 时半衰期为 39 s) 对色氨酸合成所造成的不利影响。

2.4.4 对热不稳定的代谢产物或辅酶的替换或缺失 (Substitution or deletion)

一些极端嗜热微生物通过替换代谢途径或采用热稳定性较好的中间代谢产物或辅酶来适应高温环境。例如, 极端嗜热古生菌 *P. furiosus* 通过一种非磷酸化的 ED 途径 (Entner-Doudoroff pathway) 来完成糖酵解过程。在这种代谢途径中, 非血红素铁蛋白 (Non-haem iron proteins) 替代辅酶 NAD (P) 发挥功能^[43]。

3 展望

极端嗜热微生物对高温环境的良好的适应性来源于极端嗜热微生物的生物大分子,如蛋白质、磷脂分子等对高温环境具有良好的耐受能力,因此其在科研及多种生产领域有重要的应用价值^[44]。例如,极端嗜热微生物直接应用于生物能源、生物冶金及环境的生物修复等领域;极端嗜热酶除具有优良的热稳定性和高温催化活性外,还对有机溶剂、去污剂及变性剂等有较强的耐受性,因此其能够克服工业生产中苛刻的反应条件对酶分子应用的限制。此外,极端嗜热微生物中遗传操作系统的建立以及极端嗜热酶在常温宿主中的异源表达拓展了其开发和应用前景。但是极端嗜热微生物的采集和培养需要特殊的设备和条件,这一特点导致其研究和工业化生产的进度缓慢,因此极端嗜热微生物及其特殊的高温适应机制有待进一步的深入研究开发。

参考文献

- [1] Stetter KO. A brief history of the discovery of hyperthermophilic life [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41 (1): 416-420.
- [2] Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, et al. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C [J]. *Extremophiles*, 1997, 1: 14-21.
- [3] Stetter KO. History of discovery of the first hyperthermophiles [J]. *Extremophiles*, 2006, 10 (5): 357-362.
- [4] Mehta D, Satyanarayana T. Diversity of hot environments and thermophilic microbes [M] // Satyanarayana T, Littlechild JA. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. Netherlands: Springer Netherlands, 2013: 3-60.
- [5] Auerhoff B, Müller V. Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles [J]. *Research in Microbiology*, 2010, 161 (6): 506-514.
- [6] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (12): 4576-4579.
- [7] Huber H, Hohn MJ, Rachel R, et al. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont [J]. *Nature*, 2002, 417 (6884): 63-67.
- [8] Kashefi K, Lovley DR. Extending the upper temperature limit for life [J]. *Science*, 2003, 301 (5635): 934-934.
- [9] Takai K, Nakamura K, Toki T, et al. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high pressure cultivation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (31): 10949-10954.
- [10] Lal AK. Origin of life [J]. *Astrophys Space Sci*, 2008, 317: 267-278.
- [11] Forterre P. A hot topic: the origin of hyperthermophiles [J]. *Cell*, 1996, 85 (6): 789-792.
- [12] Stetter KO. History of discovery of hyperthermophiles [M]. *Extremophiles Handbook*. Springer Japan, 2011: 403-425.
- [13] Kelly RM, Adams MW. Metabolism in hyperthermophilic microorganisms [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1994, 66: 247-270.
- [14] Mardanov AV, Svetlitchnyi VA, Beletsky AV, et al. The genome sequence of the crenarchaeon *Acidilobus saccharovorans* supports a new order, *Acidilobales*, and suggests an important ecological role in terrestrial acidic hot springs [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (16): 5652-5657.
- [15] Jaenicke R, Sterner R. Life at High Temperatures [M]. *The Prokaryotes*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 337-374.
- [16] Imanaka T. Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles [J]. *Proc Jap Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2010, 87: 587-602.
- [17] Daniel RM, Cowan DA. Biomolecular stability and life at high temperatures [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57 (2): 250-264.
- [18] Ulrik NP, Gmajner D, Raspor P. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84 (2): 249-260.
- [19] Atomi H, Matsumi R, Imanaka T. Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (14): 4829-4833.
- [20] Robinson H, Gao YG, Merary BS, et al. The hyperthermophile chromosomal protein Sac7d sharply kinks DNA [J]. *Nature*, 1998, 392 (6672): 202-205.
- [21] Noon KR, Bruenger E, McCloskey JA. Posttranscriptional modifications in 16S and 23S rRNAs of the archaeal hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180 (11): 2883-2888.
- [22] Tanaka T, Sawano M, Ogasahara K, et al. Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150°C [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580 (17): 4224-4230.
- [23] Koch R, Spreinat A, Lemke K, et al. Purification and properties of a

- hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei* [J]. Arch Microbiol, 1991, 155 (6): 572-578.
- [24] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65 (1): 1-43.
- [25] Teplyakov AV, Kuranova IP, Harutyumyan EH, et al. Crystal structure of thermitase at 1.4 Å resolution [J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 214 (1): 261-279.
- [26] Littlechild J, Novak H, James P, et al. Mechanisms of thermal stability adopted by thermophilic proteins and their use in white biotechnology [M] // Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. Springer Netherlands, 2013: 481-507.
- [27] Coquelle N, Fioravanti E, Weik M, et al. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments [J]. J Mol Biol, 2007, 374 (2): 547-562.
- [28] Sterner RH, Liebl W. Thermophilic adaptation of proteins [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2001, 36 (1): 39-106.
- [29] Dong H, Mukaiyama A, Tadokoro T, et al. Hydrophobic effect on the stability and folding of a hyperthermophilic protein [J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 378 (1): 264-272.
- [30] Hiblot J, Bzdrenga J, Champion C, et al. Crystal structure of VmoLac, a tentative quorum quenching lactonase from the extremophilic crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia* [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8372.
- [31] Macedo-Ribeiro S, Darimont B, Sterner R, et al. Small structural changes account for the high thermostability of 1 [4Fe-4S] ferredoxin from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* [J]. Structure, 1996, 4 (11): 1291-1301.
- [32] Savchenko A, Vieille C, Kang S, et al. *Pyrococcus furiosus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc [J]. Biochemistry, 2002, 41 (19): 6193-6201.
- [33] Zeng J, Gao XW, Dai Z, et al. Effects of metal ions on stability and activity of hyperthermophilic pyrolysin and further stabilization of this enzyme by modification of a Ca^{2+} -binding site [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80 (9): 2763-2772.
- [34] Guelorget A, Roovers M, Guerineau V, et al. Insights into the hyperthermostability and unusual region-specificity of archaeal *Pyrococcus abyssi* tRNA m1A57/58 methyltransferase [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38 (18): 6206-6218.
- [35] Grabarse W, Vaupel M, Vorholt JA, et al. The crystal structure of methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri* [J]. Structure, 1999, 7 (10): 1257-1268.
- [36] Eichler J, Adams MW. Posttranslational protein modification in Archaea [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69 (3): 393-425.
- [37] Dai Z, Fu HT, Zhang YF, et al. Insights into the maturation of hyperthermophilic pyrolysin and the roles of its N-terminal propeptide and long C-terminal extension [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (12): 4233-4241.
- [38] Neves C, Da Costa MS, Santos H. Compatible solutes of the hyperthermophile *Palaeococcus ferrophilus*: osmoadaptation and thermoadaptation in the order *Thermococcales* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71 (12): 8091-8098.
- [39] Shima S, Herault DA, Berkessel A, et al. Activation and thermostabilization effects of cyclic 2, 3-diphosphoglycerate on enzymes from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* [J]. Archives of Microbiology, 1998, 170 (6): 469-472.
- [40] Mayr J, Lupas A, Kellermann J, et al. A hyperthermostable protease of the subtilisin family bound to the surface layer of the Archaeon *Staphylothermus marinus* [J]. Curr Biol, 1996, 6: 739-749.
- [41] Van Boxstael S, Maes D, Cunin R, Aspartate transcarbamylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi* [J]. FEBS Journal, 2005, 272 (11): 2670-2683.
- [42] Sterner R, Kleemann GR, Szadkowski H, et al. Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer [J]. Protein Sci, 1996, 5: 2000-2008.
- [43] Mukund S, Adams M. The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway [J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266 (22): 14208-14216.
- [44] Atomi H, Sato T, Kanai T. Application of hyperthermophiles and their enzymes [J]. Curr Opin Biotechnol, 2011, 22 (5): 618-626.

(责任编辑 狄艳红)