

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

生長速率及碳源對大腸桿菌延胡索酸基因 FUMA 與  
FUMC 表現、mRNA 穩定性及蛋白質轉譯調控之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2311 - B - 009 - 009

執行期間：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：曾慶平

執行單位：國立交通大學生物科技研究所

中華民國 90 年 10 月 31 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 生長速率及碳源對大腸桿菌延胡索酸基因 *FUMA* 與 *FUMC* 表現、mRNA 穩定性及蛋白質轉譯調控之研究

計畫編號：NSC 89-2311-B-009-009

執行期限：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

主持人：曾慶平

執行機構及單位名稱：國立交通大學生物科技研究所

### 一、中文摘要

在大腸桿菌內，*fumarase* 是檸檬酸循環 (TCA cycle) 中將延胡索酸 (fumarate) 與蘋果酸 (L-malate) 相互轉換的重要酵素。已知大腸桿菌含有 *fumA*, *fumB* 及 *fumC* 三種不同延胡索酸酵素基因。為探討細胞生長速率對各延胡索酸酵素基因表現之影響，本實驗利用化學恆定連續式培養法，控制細胞生長速率來觀察大腸桿菌延胡索酸酵素突變株 (*fumA*, *fumB* 及 *fumC*) 中酵素之相互調控關係，結果發現各突變株之延胡索酸酵素活性皆隨生長速率之上升而減少，此現象與野生株活性表現之趨勢相同。另一方面，分別以不同碳源(葡萄糖及醋酸)培養大腸桿菌野生株，發現 *fumC* mRNA 穩定性在葡萄糖為碳源時，隨生長速率之增加而上升，若以醋酸為碳源時卻出現相反之結果，顯示碳源在 *fumC* mRNA 轉錄(後)層面，亦扮演重要之調控角色。

Abstract

*Escherichia coli* contains three biochemically

distinct fumarases to catalyze the interconversion of fumarate to L-malate in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. In this study how the *fumA* and *fumC* genes are regulated by cell growth rates, we examined the fumarase activity of *fumA*, *fumB* and *fumC* mutants in continuous cultures. The results showed that the fumarase activity of three mutants are regulated by the rate of cell growth as they shown in wild type strain. In addition, the regulation of the stability of *fumC* mRNA are carbon source dependent. The results suggest that the growth rate-dependent regulation of *fumA* and *fumC* genes was affected by carbon source utilization at both transcriptional and translational levels.

### 二、緣由與目的

生長速率與環境因子

微生物會因應外界環境因子的改變，進而調節細胞內的基因表現、細胞的生長速率至最佳生長狀態。而影響微生物生長的因子，可以大略分為物理性及化學性兩

類：物理因子包括溫度、酸鹼度、滲透壓等，化學因子則包括水、氧氣、碳源、氮源等。

#### 碳源的影響

大腸桿菌利用不同碳源當養分，進行各種合成、代謝的途徑，建構了細胞的骨架，也產生能量來維持細胞生長。不同的碳源因為會經過不同的代謝途徑，得到不同的能量導致不同的生長速率，當以葡萄糖為碳源時，葡萄糖先藉由 PTS (phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase systems) 磷酸化後進入細胞內，進行糖解反應 EMP pathway (Embden-Meyerhof-Pathway)，以 acetyl-CoA 進入檸檬酸環，完成呼吸作用產生能量。若是以醋酸為碳源，醋酸藉由主動運輸進入細胞，經由 acetate kinase 及 phosphotransacetylase 或 acetyl-CoA synthetase 作用形成 acetyl-CoA 進入檸檬酸環，同時大腸桿菌還會進行乙醛酸鹽支路 (glyoxylate bypass)，用以補充胺基酸合成所需要的二元酸 (dicarboxylic acid)。

#### 生長速率與大腸桿菌細胞組成的關係

1958 年，Schaechter 等人研究 *Salmonella typhimurium* 時首先發現細胞內巨分子的組成，例如：DNA RNA Protein，會隨生長速率的增加而增加 (4)，當大腸桿菌 B/r 的生長速率由  $\mu = 0.6$  (doublings/h) 升高至  $\mu = 2.5$  時，DNA 的量由  $7.6 \mu\text{g}/10^9$  cell 增加到  $18.3 \mu\text{g}/10^9$  cell；RNA 的量由  $20 \mu\text{g}/10^9$  cell 增加到  $211 \mu\text{g}/10^9$  cell；protein 的量由  $100 \mu\text{g}/10^9$  cell 增加到  $450 \mu\text{g}/10^9$  cell。此外，除了巨分子組成的改變，其他關於基因調節的因子，例如：RNA

polymerase 數量、活性及 DNA、RNA、蛋白質合成速率等都會受生長速率影響，由此可知細胞的生長速率與核細胞生理、基因調控有密切的關係。

#### 四、結果與討論

生長速率及碳源對 *fumA* 與 *fumC* 基因的 mRNA 表現量之影響

本實驗以化學恆定連續培養方式偵測不同生長速率對大腸桿菌 K-12 細胞內 *fumA* 與 *fumC* 基因的 mRNA 表現量的影響。在以酸為碳源培養的情況下，測定比生長速率為 0.48/h 0.72/h 及 0.96/h 時細胞內 *fumA* 的 mRNA 表現量會隨著比生長速率的增加而減少，其中 *fumA* 的 mRNA 表現量在三種比生長速率下分別為 1.5 : 1.2 : 1。而 *fumC* 基因 mRNA 的表現量也隨著比生長速率的增加而減少，其中 *fumC* 的 mRNA 表現量則分別為 2.2 : 1.6 : 1。若以葡萄糖為碳源時，測定比生長速率為 0.72/h、0.96/h 及 1.2/h 時細胞內 *fumA* 與 *fumC* 基因 mRNA 的表現量，發現 mRNA 也會隨著比生長速率的增加而減少，其中 *fumA* 基因 mRNA 的表現量分別是 2 : 1.7 : 1；而 *fumC* 基因 mRNA 的表現量分別是 1.7 : 1.3 : 1。因此我們發現大腸桿菌細胞內的 *fumA* 與 *fumC* 基因 mRNA 的表現量均會隨比生長速率的增加而減少，而且 mRNA 穩定性也受生長速率所調控，除了以醋酸培養且比生長速率為 0.96/h 時，其餘生長條件下的 mRNA 均隨比生長速率的增加而更穩定，顯示各生長條件下經由啟動子轉錄出的 mRNA 在各比生長速率間的差距原本應更大 (6)。*fumA* 與 *fumC* 基因的 mRNA 在各比生長速率的表現量可間接

影響轉譯作用的蛋白表現(1)。目前在檸檬酸環中也發現其他代謝<sup>o</sup>的基因會受生長速率所調控(2, 3, 5), 而這些代謝<sup>o</sup>的表現可能也透過此轉錄(後)機制調節。

## 五、參考文獻

1. Jacques, N., J. Guillerez, and M. Dreyfus. 1992. Culture conditions differentially affect the translation of individual *Escherichia coli* mRNAs. *J. Mol. Biol.* 226:597-608.
2. Park, S. J., C. P. Tseng., and R. P. Gunsalus. 1995. Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. *Mol. Microbiol.* 15(3):473-482.
3. Park, S. J., C. P. Tseng., and R. P. Gunsalus. 1995. Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. *J. Bacteriol.* 177(22):6652-6656.
4. Schaechter, E., O. Maaloe, and N. O. Kjeldgaard. 1958. Dependence on medium and emperature of cell size and chemical composition during balance growth of *Samonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 19:592-606.
5. Tseng, C. P., A. K. Hansen., P. Cotter., and R. P. Gunsalus. 1994. Effect of cell growth rate on expression of the anaerobic respiratory pathway operons *frdABCD*, *dmsABC*, and *narGHJI* of

*Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176(21):6599-6605.

6. Tseng, C. P., G. Chao., and R. P. Gunsalus. 1996. Effect of cell growth rate and different oxygen levels on expression of fumarase genes (*fumA*, *fumB*, *fumC*) of *Escherichia coli*: role of *arcA* and *fnr* gene products. Unpublished.

