

植物伴生细菌数量应答系统的研究进展*

宋水山 贾振华 高振贤 马 宏 段普凡

(河北省科学院生物研究所 石家庄 050051)

摘要: N-酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 作为信号分子介导的细菌数量应答系统参与许多生物学功能的调节, 当侵染动植物寄主组织的病原菌繁殖到一定量时, 细菌本身产生的 AHLs 积累到临界浓度, AHLs 与胞内特异受体结合, 启动致病因子的表达。利用 AHLs 降解酶和 AHLs 类似物的特性, 干扰和破坏病原菌的 AHLs-数量应答系统, 将为利用现代生物技术防治细菌病害开辟了一条全新的途径。

关键词: 细菌数量应答系统, N-酰基高丝氨酸内酯, 细菌信息素, 生物防治

中图分类号: Q93; Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0117-04

QUORUM SENSING IN PLANT-ASSOCIATED BACTERIA

SONG Shui-Shan JIA Zhen-Hua CAO Zhen-Xian MA Hong DUAN Pu-Fan

(*Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050051*)

Abstract: Bacterial N-Acyl-L-homoserine lactones (AHLs) -mediated quorum sensing is involved in the regulation of diverse biological functions. As the bacterial pathogen population density increases, AHLs concentration secreted by pathogen reaches a threshold and then interacts with their intercellular receptor and triggers expression of virulence genes. It is a promising approach to biologically control bacterial disease in plants and animals by manipulating bacterial AHL-quorum sensing with AHLs-degrading enzyme and AHL analogue.

Key words: Bacterial quorum sensing, N-acyl-L-homoserine lactones, Bacterial pheromone, Bio-control

胞间通讯不仅对真核生物如动物和植物至关重要, 而且在原核生物如细菌的生物学功能协调方面也发挥着重要的作用。细菌通过可自由扩散的小分子化合物作为信号分子进行个体细胞间信息交流, 感应其自身群体密度的变化, 当细菌达到一定浓度时, 调整整个群体的行为, 做出相应的应答。这一过程被称为“数量应答系统”(Quorum sensing)^[1]。已在革兰氏阳性和革兰氏阴性菌中鉴定出几种信号分子。其中研究最广泛和深入的是 N-酰基高丝氨酸内酯 (N-Acyl-L-homoserine lactone, 即 AHLs)。AHLs 首先是在海洋发光细菌中发现的, 目前在许多革兰氏阴性菌中均有报道。AHLs 介导的细菌数量应答系统参与许多生物学功能的调节, 如生物发光, 孢子形成, 菌体游动, 抗生素合成, 质粒接合转移, 动植物病原菌致病因子的产生等^[2]。利用现代生物技术手段人为地操纵细菌数量应答系统, 有望成为提高植物抗病性的新方法、新途径。本文将综述这方面的研究进展, 并展望 AHL 调控系统在植物细菌病害生物防治中的应用前景。

1 AHLs 调控系统

____几种细菌可以合成相同的 AHL, 但同一 AHL 在不同的细菌中可能调控不同的生物

* 河北省自然科学基金资助项目 (No.303610)

Project Granted by Hebei Provincial Science Fund (No.303610)

收稿日期: 2003-04-04, 修回日期: 2003-06-12

过程。海洋细菌费氏发光弧菌 (*Vibrio fischeri*) 的 LuxI 合成 N-羧基己酸高丝氨酸内酯 (N-3-oxohexanoyl-L-homoserine lactone, 3OHHL), 3OHHL 依赖细胞密度调节生物发光, 而胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) 的 CarI 同样合成 3OHHL, 但这种信号分子诱导 *Erwinia carotovora* 分泌降解植物细胞壁的胞外酶类和抗生素 Carbapenem 的合成^[3]。紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) 的 *culI* 编码合成与 3OHHL 结构相似的 N-己酸高丝氨酸内酯 (N-hexanoyl-L-homoserine Lactone, HHL) 的酶, HHL 诱导该菌产生紫色杆菌素和几丁质酶^[4]。使 LuxI, CarI 或 CuiI 失活, 或删除该基因, 可分别导致细菌失去生物发光, 致病和产紫色杆菌素的能力。

不同细菌可以合成不同的 AHLs。虽然不同的 AHLs 可能含有不同结构的脂酰链, 但均具有相同的高丝氨酸内酯环, 其调控生物过程的机制是相似的。AHLs 由 LuxI 族蛋白诱导产生, 然后透膜扩散至胞外, 并在培养基中积累。如果 AHLs 随细菌群体密度的增加在细胞外积累到一定的浓度, 这些信号分子就与胞内特异受体 LuxR 族蛋白发生作用, AHLs-LuxR 复合物与特定的启动子序列结合, 启动含 LuxI 族基因在内的操纵子的转录表达, 产生 LuxI 蛋白并进一步促进 AHLs 的合成, 形成一个正反馈调节机制。同时该操纵子内其它基因被同步诱导表达, 并产生一些蛋白质^[5]。

AHLs 合成酶可分为 3 种类型: (1) 最早发现, 也是最普通的 LuxI 型。LuxI 以 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 和脂酰-脂酰载体蛋白 (Acyl-ACP) 或脂酰辅酶 A (Acyl-CoA) 为底物合成 AHLs。(2) LuxM 型, 虽然 LuxM 与 LuxI 的同源性不是很高, 但它可以利用同样的底物合成 AHLs。(3) 从荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) F113 中鉴定出的 HdtS, 它与 LuxI 和 LuxM 均无同源性。许多细菌以利用不同种类的 AHLs 合成酶系合成 AHLs。至于为何细菌在进化过程中产生不同的 AHLs 合成酶而同时又发挥相同的作用尚不清楚。或许是因为拥有 AHLs 合成酶可以保护自身免受能够产生 AHLs 合成酶抑制物质的竞争者或寄主的进攻。

R 蛋白及其同源物是 AHLs 的胞内特异受体。R 蛋白含有两个结构域, C 端是保守的螺旋-转角-螺旋结构, 负责与转录起始位点上游的 DNA 回文结构序列结合。N 端为 AHL 结合位点。近来的研究表明, R 蛋白的 C 端还存在另一结构域, 参与 R 蛋白多聚体形成。多数 R 蛋白以二聚体形式与 DNA 结合, 只有 *Erwinia carotovora* 的 CarR 与 AHL 结合后形成高度有序的多聚体。与 Lux 框结合后, R 蛋白可能通过与 RNA 聚合酶 α 亚基的 C 端互相作用, 启动基因转录。

2 不同植物伴随细菌的数量应答系统

2.1 欧文氏菌及其相关菌种 许多研究表明, *Erwinia carotovora* 亚种的致病和胞外酶、harpins 以及抗生素的合成需要 3OHHL 的诱导。CarI 失活的突变株失去致病力, 感染合成 AHL 的转基因烟草可以恢复 CarI 突变株的致病力^[6]。最近发现一新的调节机制, 增加 *E. carotovora* spp. *carotovora* SCC3193 中的 *expR* 的拷贝数可以抑制胞外酶的产生和分离。同样在菌株 *E. carotovora* spp. *carotovora* 71 中过量表达 *expR*, 不仅完全抑制胞外酶的合成, 而且可以提高 *rsmA* 的转录水平。RsmA 编码促进 RNA 降解的 RNA 结合蛋白。结果提示 3OHHL 可能是通过转录后调节发挥作用的。另外 Koiv & Mae (2001 年) 发现 OHL 失活突变体产生过量的 RsmA 蛋白, 这也许就是 OHL 缺陷型细菌不能产生胞外蛋白的原因^[7]。

2.2 根瘤菌 根瘤菌—豆科植物共生关系的建立依赖于根瘤菌与寄生植物间复杂的信息交流。虽然目前不能确定 AHLs 信号转录在结瘤形成中不可或缺的作用,但其与成瘤数量确实有一定的关系。根瘤菌种产生许多 AHLs。豆科根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 中有 4 种 LuxI 同源物 (如 CinI, RhiI, TraI 和 RaiI), 可以合成 7 种 AHLs。*R. leguminosarum* 的数量应答系统以 RhiR 调节参与根际生长的 *rhiABC* 基因操纵元的表达影响结瘤。*rhiR* 和 *rhiA* 基因突变不影响 Nod 信号分子的合成,只减少结瘤。相反, RhiI 突变却增加结瘤^[8]。这说明这种调节是微妙的,可能是通过影响菌体生长和代谢而影响结瘤,而不是直接作用于结瘤形成。数量应答系统还参与根瘤的发育。*cinI* 在侵染线和处于分化状态的类菌体中表达。苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium etli*) 根瘤的正常发育需要 *cin* 系统参与。*cinI* 突变导致固氮能力降低,同时类菌体生长和形态出现异常。

2.3 假单胞菌 植物伴生假单胞菌可以利用一种或多种数量应答系统调节多个性状,包括在寄生植物表面的粘着性和活力。*Pseudomonas aureofaciens* 30-84 中存在两种数量应答系统^[9]。PhzR 和 CsaR 分别识别由 PhzI 和 CsaI 合成的 AHL,从而调节特异基因的表达。铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中也存在两种数量应答系统,即 LasR-I 和 RhiR-I^[10]。LasI 合成了 3-羧基十二酸-L-高丝氨酸内酯 (N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone, 3OC12HL) 与 LasR 结合, RhiR 主要与由 RhiI 介导产生的丁酸-L-高丝氨酸内酯 (N-butyl-L-homoserine lactone, 4BHL) 结合,从而启动包括胞外蛋白酶、胞外毒素和脂肪酶等在内的致病因子的表达。RhiR 和 LasR 分别调控不同系列基因的表达,但是许多基因也同时受两种转录激活物的调控。使 *P. aeruginosa* 中群体感应系统中某一组分突变失活并不严重影响细菌的生长,如 LasI 和 RhiI 双突变的突变株 PAO-MWI 仍能在 LB 培养基中保持与野生菌株相同的生长,但是突变株的致病力却受到严重的影响。植物病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* 在寄主植物上的定殖以及致病作用均需要 AHL 信号的参与^[11]。

3 其它信号分子介导的数量应答系统

除 AHLs 外,植物伴生和根际微生物还可以合成另外一些小分子影响 AHL 数量应答系统或作为数量应答系统的信号分子。某些假单胞菌、植物病原真菌 *Alternaria alternate* 产生环二肽如环苯丙氨酸-脯氨酸、环脯氨酸-丙氨酸。虽然这些化合物在结构上与 AHLs 不相似,但是它们能够激活或拮抗 AHLs 识别的受体^[12]。其生态和生理学意义尚未清楚。引起十字花科黑根病的病原菌野生黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*) 通过可扩散的胞间信号分子调节胞外多糖的产生。链霉菌 (*Streptomyces*) 中,可扩散的小分子-含丁酸内酯的自身诱导物调节抗生素和色素的合成,同时诱导分化和孢子形成。

4 AHLs 调控系统与生物防治

适宜的 AHL 浓度是引发病原菌致病因子表达的关键因子。因此, AHLs 信号分子可能成为生物防治动、植物细菌病害的新靶点,开辟一条生物防治细菌病害的新途径。

AHL 降解酶分解 AHLs,使其难以达到引发致病因子表达的临界浓度,从而使病原菌失去致病力。从土壤中分离出两种能够降解 AHL 信号分子的细菌。*Varionax paradoxus* VAI-C 合成氨脂酰水解酶,水解 AHLs,释放脂肪酸和高丝氨酸内酯^[13]。*Bacillus* sp.

(芽孢杆菌) 240B1 含有 *aiiA* 基因, 编码 AHL 水解酶, 水解 AHL 的内酯键, 产生脂酰高丝氨酸。近来发现 *aiiA* 基因同源物广泛存在于苏云金芽孢杆菌中。表达芽孢杆菌 *aiiA* 基因的重组 *E. carotovora* SCGI 分泌胞外酶的量显著降低, 用其感染茄子和马铃薯时, 植物不发病。表达芽孢杆菌 *aiiA* 基因的转基因烟草和马铃薯时对 *E. carotovora* 侵染的抗性显著提高, 当接种病原菌时, 烟草叶子和马铃薯块茎上不出现病斑或显著推迟病斑的出现^[14]。这种表型的出现可能是因为降解或消灭 AHL 信号分子可以延缓病原菌致病基因的表达, 使寄生植物获得足够的时间启动其自身防御系统来抵抗病原菌的进一步侵染。

AHLs 信号分子的类似物或拮抗剂可以与 AHLs 竞争其胞内特异受体-R 蛋白, 破坏 AHLs 的调控机制, 使病原菌失去致病力。海洋真核生物 *Delisea pulchra* 分泌呋喃信号, 可与细菌的 AHL 信号转导途径相互作用。有研究指出, 卤化呋喃可抑制 *Pseudomonas aeruginosa* 的数量应答系统介导的表型出现, 可抑制 *E. carotovora* 抗生素合成和致病因子的表达。Teplitski 等 (2000 年) 发现高等植物如豌豆、大豆和水稻也可以分泌影响细菌 AHLs 信号转导的特异化合物^[15]。另外还发现表达 *E. carotovora* *expI* 基因的转基因烟草对 *E. carotovora* 侵染的抗性提高。这可能是因为转基因植物本身可以产生 AHL, 在病原菌侵染的早期就可诱导其致病因子提前表达, 植物在病原菌未达到危害数量时就启动防御系统, 从而遏制了病害的发生。

综上所述, 细菌 AHL—数量应答系统参与病原菌的发病, 并发挥着关键作用, 因此可以成为利用生物技术防治细菌病害的新靶点。利用转基因技术使植物自身产生 AHLs 或者产生降解 AHLs 的酶, 将能够达到这一目的。但是仍有许多问题有待进一步研究。如 AHLs 的降解对细胞及其周围环境的影响, AHLs 在胞内的代谢途径, AHLs 水解酶的底物特异性以及其是如何在细胞内被调节的, AHLs 水解酶的作用对细胞的生理和生态学的影响等。因此, 克隆新的 AHLs 降解酶的基因, 深入研究细菌 AHL—数量应答系统的调控机理, 不仅具有重要的理论意义, 而且具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] Withers H, Swift S, Williams P. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4: 186 ~ 193.
- [2] Swift S, Throup J P, Williams P, *et al.* *Trend Biochem Sci*, 1996, 21: 214 ~ 219.
- [3] Jones S, Yu B, Bainton N J, *et al.* *EMBO J*, 1993, 12: 2477 ~ 2482.
- [4] McClean K H, Winson M K, Fish L, *et al.* *Microbiology-UK*, 1997, 143: 3703 ~ 3711.
- [5] Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P. *Annu Rev Genet*, 2001, 35: 439 ~ 468.
- [6] Fray R C. *Annals of Botany*, 2002, 89: 245 ~ 253.
- [7] Koiv V, Mae A. *Mol Gen Genomics*, 2001, 265: 287 ~ 292.
- [8] Lithgow J K, Wilkison A, Hardman A, *et al.* *Mol Microbiol*, 2000, 37: 81 ~ 97.
- [9] Zhang Z, Pierson L S III. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 4305 ~ 4315.
- [10] Whitely M, Greenberg E P. *J Bacteriol*, 2001, 183: 5529 ~ 5534.
- [11] Dumenyo C K, Mukerjee A, Chum W, *et al.* *Eur J Plant Pathol*, 1998, 104: 569 ~ 582.
- [12] Holden M T G, Chhabra S R, de Nys R, *et al.* *Mol Microbiol*, 1999, 33: 1254 ~ 1266.
- [13] Leadbetter J R, Greenberg E P. *J Bacteriol*, 2000, 182: 6921 ~ 6926.
- [14] Dong Y H, Wang L H, Xu J L, *et al.* *Nature*, 2001, 411: 813 ~ 817.
- [15] Teplitski M, Robinson J B, Bauer W D. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13: 637 ~ 648.