



专论与综述

DSF-家族群体感应信号生物合成途径与调控机制研究进展

宋凯 周莲 何亚文*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 教育部代谢与发育科学国际合作联合实验室
上海 200240

摘要: 群体感应是微生物间相互交流的一种重要机制。Diffusible Signaling Factor (DSF)-家族群体感应信号分子存在于多种革兰氏阴性菌中, 调控细菌的致病性和适应性。本文首先介绍 DSF-家族群体感应信号的结构多样性与保守性、生物合成途径和两类调控机制。DSF 家族群体感应信号属于一类长链不饱和脂肪酸, 碳水化合物和支链氨基酸是主要合成前体; 合成途径主要包括脂肪酸合成循环和兼具脱水酶和硫酯酶活性的 RpfF; 在黄单胞菌和伯克氏菌中分别存在 2 种蛋白-蛋白互作机制调控 DSF 生物合成。随后, 综述最新相关研究结果, 提出顺式-2-十二碳烯酸(BDSF)可能是野油菜黄单胞菌感染大白菜过程中所依赖的“活体”群体感应信号。最后, 讨论和展望本领域下一步值得研究的关键科学问题。

关键词: 黄单胞菌, 群体感应, DSF-家族信号, RpfF, RpfC

Research progress in the biosynthetic pathway and regulatory mechanisms of diffusible signaling factor-family quorum sensing signals

SONG Kai ZHOU Lian Ya-Wen HE*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic and Developmental Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Quorum sensing (QS) is one of the most important cell-cell communication mechanisms used by bacteria. DSF-family QS signals are present in a range of Gram-negative bacterial species, regulating bacterial virulence and adaptation. In this review, the structural diversity and conservation of DSF-family QS signals, their biosynthetic pathways and two regulatory mechanisms controlling DSF biosynthesis were firstly introduced. DSF-family signals are all long-chain unsaturated fatty acids, their biosynthetic precursors include carbohydrates and branched-chain amino acids; the major biosynthetic pathway include fatty acid elongation cycle and the key enzyme RpfF with both dehydratase and thioesterase activities; two regulatory mechanisms involving protein-protein interactions were identified to control DSF biosynthesis in *Xanthomonas* and *Burkholderia*, respectively. Then, the key *in planta* QS signal used by *Xanthomonas*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31972231)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-34207941; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

Received: 13-07-2020; **Accepted:** 03-08-2020; **Published online:** 19-10-2020
基金项目: 国家自然科学基金(31972231)

***通信作者:** Tel: 021-34207941; E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-13; **接受日期:** 2020-08-03; **网络首发日期:** 2020-10-19

campestris pv. *campestris* during its infection of Chinese cabbage was introduced. Finally, some key scientific questions in this research area were discussed and prospected.

Keywords: *Xanthomonas*, quorum sensing, DSF-family signals, RpfF, RpfC

黄单胞菌是黄单胞菌属(*Xanthomonas*)细菌的统称,属于革兰氏阴性菌。多数黄单胞菌为植物病原菌,能侵染至少 124 种单子叶植物和 268 种双子叶植物,包括重要的粮食和经济作物水稻、棉花、大豆、十字花科蔬菜、柑橘和香蕉等,造成严重的经济损失^[1-3]。此外,黄单胞菌中的水稻白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)、野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)和木薯细菌性枯萎病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*)还是植物分子病理学研究的模式细菌^[4]。因此,黄单胞菌研究兼具理论意义和应用价值。

群体感应(Quorum Sensing)指微生物通过分泌和感应信号小分子来感知自身所处的群体密度而调控基因表达的一种通讯机制,是微生物提高群体竞争能力的一种保守机制^[5-8]。目前已知的群体感应信号分子包括高丝氨酸内酯类、喹诺酮(PQS)、环肽类、 γ -丁酸内酯(γ -Butyrolactone)、AI-2 (Autoinducer-2)和 Diffusible Signaling Factor (DSF)-家族群体感应信号等^[7,9-10]。DSF-家族群体感应信号是首先在植物病原黄单胞菌中鉴定的一类顺式不饱和中链脂肪酸,包括 DSF、BDSF、CDSF 和 IDSF 等^[7]。动植物病原菌利用 DSF-家族群体感应信号分子感应群体密度,调控多种与致病性和环境适应性相关的生物学功能^[6-7,11]。自 2010 年以来,全球多个实验室开展了 DSF 信号分子生物合成途径研究,DSF 生物合成前体、合成途径、几个关键合成酶的生物化学功能和 DSF 生物合成调控机制都基本上得以阐明。本文将系统综述这几个方面的研究进展,讨论和展望尚需解决的科学问题,为更深入的基础研究和应用研究提供理论指导。

1 DSF-家族群体感应信号化学结构的多样性与保守性

Wang 等^[12]首次从 *Xcc* Δ rpfC 突变体培养液中

纯化了 DSF, 鉴定其化学结构为顺-11-甲基-2-十二碳烯酸(*cis*-11-Methyl-2-Dodecenoic Acid) (图 1)。比较 DSF 及其结构类似物的生物学活性可以发现: α,β 位的不饱和双键对 DSF 的活性贡献最大; α,β 双键的顺式构型、碳链长度和 11 号位的甲基取代也与 DSF 生物学活性有关。通过酸化提取和检测方法, He 等从 *Xoo* 培养液中分离并鉴定出顺式-2-十二碳烯酸(*cis*-2-Dodecenoic Acid, BDSF)和顺式,顺式-11-甲基十二烷基-2,5-二烯酸(*cis,cis*-11-Methyldodeca-2,5-Dienoic Acid, CDSF)^[13]。随后, Zhou 等^[14]及 Deng 等^[15]在 *Xcc* 的培养液中鉴定出顺式-10-甲基-2-十二碳烯酸 [*cis*-10-Methyl-2-Dodecenoic Acid, IDSF (DSF-II)]。此外, *Xcc* 还产生 2 种含量非常低的 DSF-家族 QS 信号: 顺式-9-甲基-2-癸烯酸(*cis*-9-Methyl-2-Decenoic Acid)和顺式-2-十一碳烯酸(*cis*-2-Undecenoic Acid), 其生物学功能与 DSF 类似^[15](图 1)。

铜绿假单胞菌合成顺式-2-癸烯酸(*cis*-2-Decenoic Acid), 诱导生物膜分散^[16]; 苛养木杆菌产生顺式-2-十四碳烯酸(*cis*-2-Tetradecenoic Acid, *Xf*DSF1)和顺式-2-十六碳烯酸(*cis*-2-Hexadecenoic Acid, *Xf*DSF2), 其生物学功能与 DSF 相似^[17-18]; 革兰氏阳性菌变形链球菌(*Streptococcus mutans*)产生反式-2-癸烯酸(*trans*-2-Decanoic Acid, SDSF), 抑制白色念珠菌从酵母菌形态向菌丝形态的转变^[19]。Han 等^[20]从产酶溶杆菌培养液中分离鉴定出 13-甲基十四烷酸(13-Methyltetradecanoic Acid, LeDSF3), LeDSF3 正调控抗真菌因子 HSAF 的生物合成。奇怪的是 LeDSF3 为饱和脂肪酸, 缺少 DSF 家族信号分子中关键的不饱和双键, 这一结构特征尚需进一步验证。

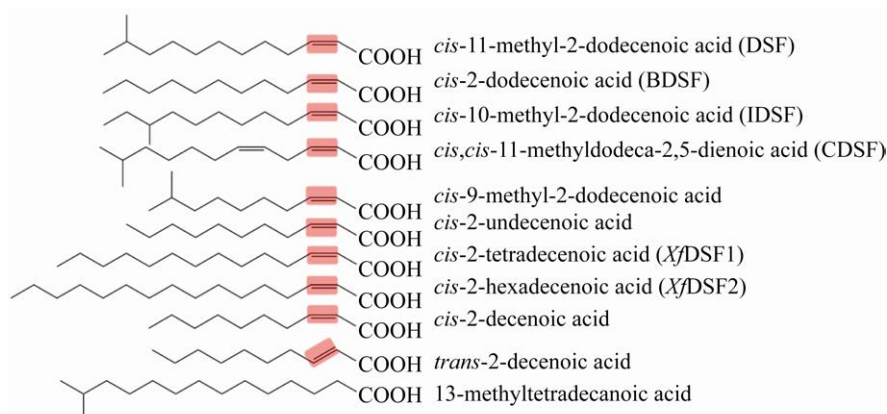


图1 DSF-家族群体感应信号分子的化学结构

Figure 1 Chemical structures of DSF-family quorum sensing signals

2 DSF-家族 QS 信号生物合成途径和机制

2.1 RpfF 具有硫酯酶和脱水酶活性, 以 3-羟基酯酰 ACP 为底物合成 DSF-家族信号分子

Xcc 中 *rpf* 基因簇与 DSF 生物合成和信号传导密切相关, 其中 *rpfF* 编码烯酰辅酶 A 水合酶参与 DSF 的生物合成^[21]。Cheng 等^[22]解析 RpfF 的晶体结构, 发现 RpfF 属于巴豆酶家族成员, 其 C 端为一个 α 螺旋区域, N 端由一个 α 螺旋和一个 β 折叠组成的螺旋式核心区域, 2 个保守的谷氨酸位点 (Glu¹⁴¹ 和 Glu¹⁶¹) 与 RpfF 酶活性密切相关。RpfF 中有一个由 20 个疏水氨基酸构成的通道, 可能为 DSF 合成区域, 点突变其中的任何一个氨基酸都影响 DSF 合成。

洋葱伯克氏菌中 Bcam0851 负责 BDSF 生物合成, Bcam0851 与 *Xcc* RpfF 氨基酸一致性比例达 37%^[23]。Bi 等^[24]首先发现在酰基-ACP 合成酶的协助下, Bcam0851 催化 3-羟基十二烷酰基-ACP 产生顺-2-十二碳烯酰基-ACP, 还能体外裂解 3-羟基十二烷酰基 ACP 中的硫酯键, 释放 *holo*-ACP, 因此具有硫酯酶和脱水酶双重活性。Zhou 等^[14]在体外实验中也证实 *Xcc* RpfF 具有硫酯酶和脱水酶活性, 能够将 3-羟基十二烷酰基-ACP 转化为 BDSF。

2.2 *Xcc* 利用脂肪酸循环途径合成 DSF 直接前体 3-羟基酯酰 ACP

Bi 等^[24]首先证实 RpfF 的底物 3-羟基十二烷酰

基-ACP 来自脂肪酸合成 (Fatty Acid Synthesis, FAS) 途径而不是脂肪酸降解途径。细菌中 FAS 是由一系列独立的可溶性脂肪酸合酶 (FAS II) 完成, 主要包括起始反应和循环反应。起始反应由丙二酰单酰 CoA:ACP 转酰基酶 (FabD) 和 β -酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH) 催化完成。随后进入延伸循环反应, 经由丙二酰-ACP 与 3-酮基-ACP 合酶 (FabB 或 FabF)、3-酮酰基-ACP 还原酶 (FabG)、3-羟基酰基-ACP 脱水酶 (FabZ) 和烯酰 ACP 还原酶 (FabI) 的催化最终产生酯酰-ACP 用于下一步的合成^[25]。当延伸至 10 个碳时, 产物 β -羟基癸酰 ACP 经 FabA 或 FabZ 脱水转化为反-2-癸烯酰 ACP; FabA 通过异构酶活性将反-2-癸烯酰 ACP 异构化产生顺-3-癸烯酰 ACP; 顺-3-癸烯酰 ACP 不能被 FabI 还原, 但能与丙二酰单酰 ACP 在 FabB 的催化下缩合生成顺-5- β -酮基十二碳烯酰 ACP, 该产物再次进入脂肪酸合成的循环反应, 最终合成不饱和脂肪酸^[25-28]。*Xcc* 中参与 FAS 的基因主要包括 Xcc0115 (编码 FabV)、Xcc0581-Xcc0582 (编码 FabB 和 FabA)、Xcc1016-Xcc1020 (编码 FabH、FabD、FabG、AcpP 和 FabF) 以及 Xcc1362 (FabZ)^[29]。由于脂肪酸合成途径对于细菌的存活至关重要, 因此无法通过基因敲除验证其功能。浅蓝菌素能够抑制 FAS 途径中 3-酮脂酰 ACP 聚合酶 I 或 II (FabF 和 FabB) 的活性, 向培养基中添加 30 mg/L 的浅蓝菌素不影

响 *Xcc* 菌体生长,但是显著抑制 DSF-家族群体感应信号的合成^[14],说明 FAS 参与 DSF 信号生物合成。

在细菌脂肪酸合成起始反应中, FabH 催化乙酰辅酶 A 与丙二酸-ACP 缩合产生乙酰乙酰-ACP。Yu 等^[30]证明 3-酮脂酰 ACP 聚合酶(FabH)编码基因 *Xcc1016* 是 *Xcc* 生长所必需的,参与脂肪酸生物合成;在体外反应中, *Xcc* FabH 比大肠杆菌 FabH 具有更宽泛的底物选择性。*Xcc* FabH 不仅以乙酰辅酶 A 作为底物产生脂肪酸合成前体,还能以短链酰基 ACP 与丙二酰 ACP 作为底物合成更长的酰基 ACP;用大肠杆菌 *fabH* 替换 *Xcc fabH* 后所得 *Xcc* 菌株生长减缓, DSF 合成显著下降。

3-酮脂酰 ACP 还原酶 FabG 在细菌脂肪酸延伸循环反应中负责合成中间体 3-羟基酯酰 ACP^[31]。在 *Xcc* 中过表达 FabG 编码基因 *Xcc1018* 显著提高 DSF、BDSF、CDSF 和 IDSF 的生物合成^[14]。Hu 等^[31]和 Yu 等^[32]分别发现 *Xcc0416* 编码的 FabG2 和 *Xcc4003* 编码的 FabG3 同样具有 3-酮脂酰 ACP 还原酶活性, *fabG2* 或 *fabG3* 敲除株 DSF 产量均显著降低;体外酶活分析结果显示: FabG2 会优先利用长链 3-氧代酰基-ACP,但对短链的 3-氧代丁酰基-ACP 和 3-氧代己酰基-ACP 活性较低。

2.3 在以碳水化合物为唯一碳源的培养体系中 *Xcc* 主要合成 BDSF

为了探究 DSF 家族信号分子生物合成前体, Zhou 等^[14]以 XOLN 培养基[g/L: K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.001, 酵母提取物 0.625, 胰蛋白胨 0.625, pH 7.0]为基本培养基,外源添加不同碳水化合物,培养 24 h 后检测 DSF 信号分子的生物合成,结果表明添加碳水化合物淀粉、蔗糖、葡萄糖、果糖等主要促进 BDSF 的生物合成, DSF 和 IDSF 生物合成受到部分抑制。Deng 等^[33]将宿主植物汁液或其乙醇提取物外源添加到 *Xcc* 培养基中, DSF 家族信号分子产量显著提高,进一步的 ^{13}C 标记实验表明葡萄糖是 DSF 信号分子中碳骨架的来源。

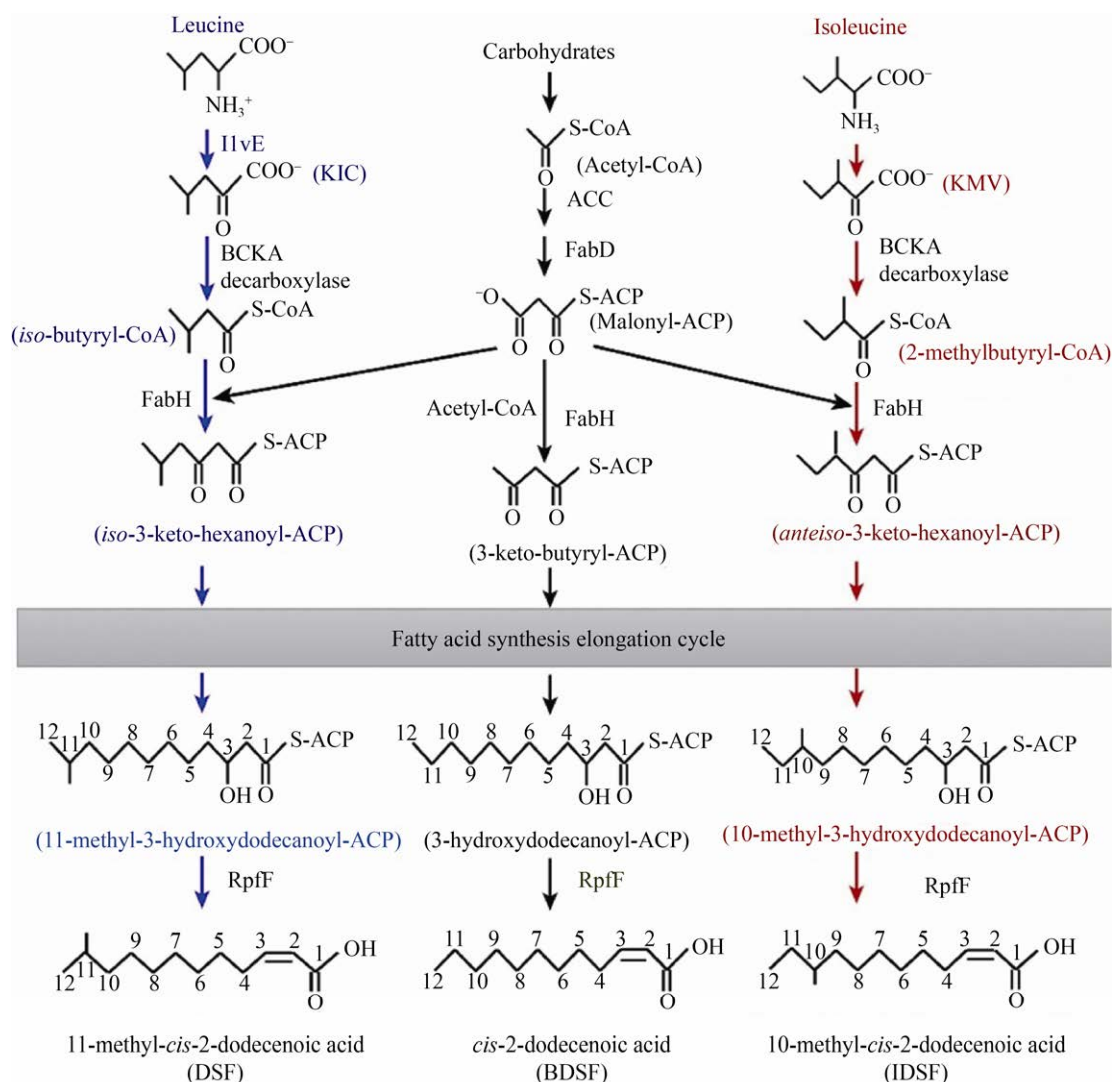
2.4 DSF 和 IDSF 的甲基侧链来自支链氨基酸

IDSF、DSF 和 BDSF 的化学结构差异主要表现在甲基侧链(图 1)。为了探究这些侧链甲基的来源, Zhou 等^[14]以含有 2 g/L 蔗糖的 XOLN 培养基(简称 YYS)为基础培养基,发现添加亮氨酸和缬氨酸后 DSF 生物合成显著提升,添加异亮氨酸后 IDSF 生物合成显著提升,因此, DSF 的甲基侧链主要来源于亮氨酸和缬氨酸, IDSF 的甲基侧链来源于异亮氨酸^[14]。

细菌中支链脂肪酸的合成前体来自支链的酰基辅酶 A,后者分别来自 3 种支链 α -酮酸: α -酮异己酸(KIC)、 α -酮异戊酸(KIV)和 α -酮- β -甲基戊酸(KMV),它们分别来自亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸代谢;外源添加 KIC 或 KIV 显著提高了 DSF 水平,添加 KMV 提高 IDSF 水平^[34]。酮醇酸还原异构酶的缺失突变体 $\Delta ilvC$ 不能通过碳水化合物代谢产生 KIV 和 KMV,也不能合成缬氨酸和异亮氨酸; $\Delta ilvC$ 产生的 DSF 和 IDSF 显著减少^[35]。综上所述, Zhou 等^[7]提出了 DSF 家族信号分子生物合成途径,如图 2 所示。

3 RpfC/RpfR 与 RpfF 相互作用调控 DSF 信号分子的生物合成

已发现的 DSF-家族信号生物合成调控机制主要分为两类。第一类广泛存在于植物病原黄单胞菌、嗜麦芽寡单胞菌、苛养木杆菌和产酶溶杆菌中,这些菌株都包含一个 *rpf* 基因簇,编码 DSF 合成酶 RpfF、DSF 信号受体与信号传导双组分系统 RpfC/RpfG 并负责 DSF 信号降解的 RpfB^[7,36-37]。赵延存等^[38]在水稻细菌性条斑病原菌 *Xoc* 中敲除 RpfC 或者同时敲除 RpfC 和 RpfG 显著提高了 DSF 的水平,敲除 RpfG 显著降低了 DSF 水平,说明 RpfC 和 RpfG 参与 DSF 的生物合成调控。RpfC 包含 5 个跨膜结构域(Transmembrane Domain, TM)、1 个组氨酸激酶结构域(Histidine Kinase Domain, HK)、1 个信号接收结构域(Receiver Domain, REC)和 1 个组氨酸磷酸转移结构域(Histidine Phosphate

图2 DSF、BDSF 和 IDSF 的生物合成途径模式图^[7]Figure 2 Proposed biosynthesis pathway of DSF, BDSF and IDSF^[7]

Transfer Domain, HPT)^[39]。He 等^[40]发现 RpfC 利用其 REC 结构域通过蛋白-蛋白相互作用结合 RpfF; 敲除 REC 结构域显著提高 DSF 生物合成, 过表达 REC 结构域完全抑制野生型和 *rpfC* 突变体合成 DSF; 敲除 RpfC 中的 HPT 结构域后, *Xcc* 胞外多糖和胞外酶生物合成显著降低, DSF 的生物合成不受影响。Cheng 等^[22]解析了 RpfC(REC)-RpfF 复合体的晶体结构, 发现 REC 结构域结合在 RpfF 中一个疏水通道入口处, 阻碍了 DSF 合成前体进入, 抑制了 DSF 的生物合成(图 3A)。Cai 等^[42]利

用大肠杆菌表达和纯化了完整的 RpfC, 证实 RpfC 为 DSF 的受体蛋白: 当 DSF 结合到 RpfC N-端由 22 个氨基酸组成的感应区域时, HK 结构域激酶活性被激活, RpfC 自我磷酸化。基于上述结果, He 等^[40]提出 DSF 生物合成自我调控模式: 当胞外 DSF 浓度低于某一浓度阈值时, RpfC 处于非激活构象, 其 REC 结构域结合 RpfF, 抑制 DSF 生物合成; 随着细菌繁殖, DSF 不断在胞外累积至特定阈值时, 激活 RpfC 自我磷酸化, 导致构象变化, 释放 RpfF, DSF 大量合成。这一自我调控机制在

苛养木杆菌和嗜麦芽寡养单胞菌中也得到证实:当 RpfC 和 RpfF 同时存在时, DSF 信号传导才能进行^[18,43]。此外,不同环境来源的嗜麦芽寡养单胞菌分离株包含 2 套氨基酸序列不完全一样的 RpfF/RpfC 系统:一套编码 RpfF1 和相应的 RpfC1,另一套编码 RpfF2 和相应的 RpfC2,二者一一对应,不能相互替代,仅携带 *rpf-1* 基因簇的嗜麦芽寡养单胞菌可以产生能够检测到的 DSF^[18]。通过对 2 种分离株的耐药性分析发现:携带 *rpf-1* 的嗜麦芽寡养单胞菌对 β -内酰胺类的抗生素耐药性更强,而携带 *rpf-2* 的嗜麦芽寡养单胞菌对大肠菌素的耐药性更强^[43-44]。

第二类 DSF-家族信号生物合成调控机制主要存在于条件致病菌洋葱伯克氏菌和阪崎肠杆菌中, RpfF 的同源蛋白 RpfF_{BC} 负责合成 BDSF,但基因簇中缺少 RpfC/RpfG 双组分系统的同源蛋白,

RpfR 负责 BDSF 的信号感应和信号传导^[45-46]。RpfR 包含 PAS、GGDEF 和 EAL 这 3 个功能域,是 BDSF 的受体蛋白,其中 S¹⁶⁹、N¹⁷²、N²⁰²、R¹⁸⁷ 是 BDSF 结合的关键位点^[41,45],敲除 RpfR 后,洋葱伯克氏菌的 BDSF 生物合成水平显著提高^[45]。Waldron 等^[41]发现在所有 RpfR 同源蛋白的 N 端存在一段高度保守的氨基酸序列,命名为 FI (RpfF Interaction)结构域,敲除 FI 结构域后, RpfR 磷酸二酯酶活性提高,胞内 C-di-GMP 水平降低, BDSF 水平显著提高;通过解析 RpfF-RpfR (FI)的晶体结构发现:RpfF-RpfR (FI)复合体是由 3 个 RpfF-RpfR (FI)不对称单元对称性组装产生的异六聚体,每个 RpfR (FI)蛋白同时与 2 个 RpfF 蛋白相互作用,该相互作用将 RpfR (FI)置于 RpfF 底物入口附近,从而阻止酰基-ACP 底物进入 RpfF 活性位点,抑制 RpfF 的硫酯酶活性(图 3B)。

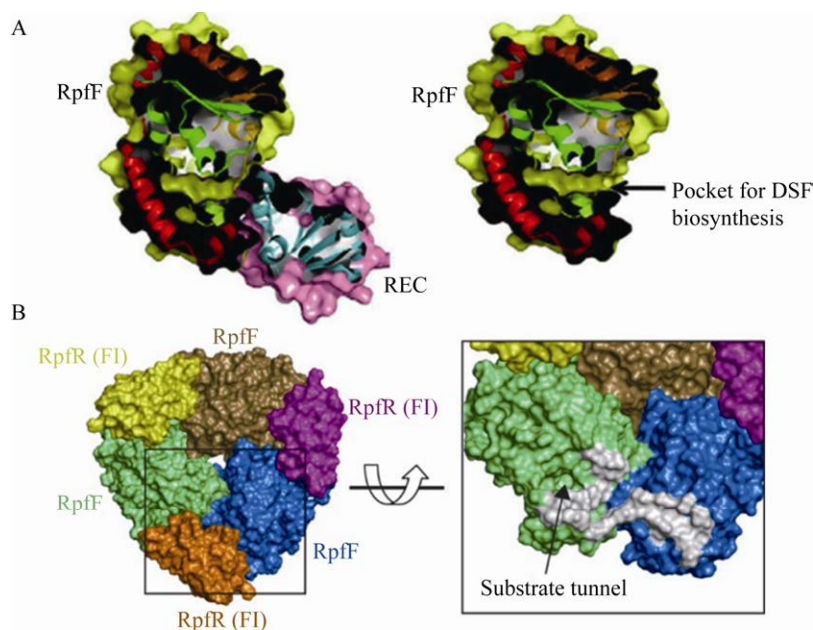


图 3 RpfC/RpfR 与 RpfF 交互调控 DSF 生物合成 3-维结构示意图^[22,41]

Figure 3 Schematic diagram of RpfC/RpfR interacting with RpfF to regulate DSF synthesis^[22,41]

注: A: 野油菜黄单胞菌中 RpfC 结构域 REC 与 RpfF 结合,阻止 DSF 合成前体进入疏水合成通道; B: 洋葱伯克氏菌中 RpfR-FI 结构域与 RpfF 结合抑制 BDSF 合成前体进入合成通道

Note: A: The RpfC-REC domain of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* binds to RpfF and inhibits DSF biosynthesis; B: The RpfR-FI domain of *Burkholderia cepacia* binds to RpfF and inhibits BDSF biosynthesis

4 BDSF 是 *Xcc* 侵染大白菜过程中依赖的主要群体感应信号分子

黄单胞菌 *Xcc* 和 *Xoo* 在培养过程中产生多种 DSF-家族群体感应信号分子, 它们的比例和浓度与培养条件密切相关。Zhou 等^[14]对比 *Xcc* $\Delta rpfC$ 在 YEB、NYG 和 XOLN 这 3 种培养基中 DSF、BDSF、CDSF 和 IDSF 的产量, 发现其相对比例在营养丰富的 YEB 培养基中分别为 81.1%、11.3%、4.0%和 3.6%, 在 NYG 培养基中分别为 52.5%、45.5%、0%和 2.0%, 在营养贫瘠的 XOLN 培养基中分别为 20.0%、79.0%、0%和 1.0%, *Xcc* $\Delta rpfC$ 在营养丰富的培养基中主要产生 DSF, 但在营养相对贫乏的培养基中合成的信号分子大多为 BDSF。

Xcc 属于维管束病原菌, 从叶表水孔或伤口侵入, 最后在植物维管束中繁殖侵染^[2]。在侵染植物过程中 *Xcc* 只能通过降解植物细胞获得营养物质合成 DSF, 因此, 所合成和利用的 DSF 信号分子取决于植物细胞成分^[34]。Xu 等^[47]发现水杨酸诱导 *Xoo* 产生 DSF。Diab 等^[34]发现添加大白菜提取物到 XYS 培养基中主要促进 *Xcc* 合成 BDSF。在此基础上, Diab 等^[34]利用 *Xcc* 双突变体 $\Delta rpfB\Delta rpfC$ 进一步研究了植物源小分子化合物(氨基酸、植物激素、植物有机酸、酚类化合物)对群体感应信号生物合成的影响, 结果发现添加直链氨基酸半胱氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸和组氨酸显著促进 BDSF 生物合成, 添加谷氨酸显著促进 DSF 生物合成; 添加植物激素脱落酸或赤霉素显著提高 DSF 水平, 降低 BDSF 水平; 添加酚类化合物 4-羟基苯甲酸和 2-羟基肉桂酸会诱导产生 BDSF, 而添加 0.5 mmol/L 3-羟基苯甲酸则抑制 DSF 的产生。陈慧等^[48]发现甲硫氨酸、色氨酸和胱氨酸能有效降低 $\Delta rpfC$ 的 DSF 和 BDSF 的生物合成水平。

为了进一步研究 *Xcc* 侵染过程中所依赖的 DSF 信号分子, Diab 等^[34]建立了利用 *rpfB* 突变体侵染大白菜肥厚肉质叶片的侵染方法, 接种 1–3 周后, 分别采集叶片(500 g 以上)提取 DSF 信号分子,

利用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-TOFMS)检测感染叶片中的 DSF 信号分子种类和含量, 结果表明: 侵染 2–3 周后只能检测出 BDSF 和 DSF, BDSF 占 DSF-家族群体感应信号分子总量的 70%以上。Diab 等^[34]发现相同浓度的 DSF 或 BDSF 诱导 $\Delta rpfF$ 菌株合成蛋白酶和胞外多糖能力相似, 因此推断 BDSF 可能是 *Xcc* 侵染大白菜过程中依赖的主要群体感应信号分子。

5 总结与展望

目前, DSF-家族群体感应信号分子的结构多样性、信号感应传导通路、生物合成途径及其调控机制基本明确, 是目前研究最为深入的群体感应系统之一。DSF-家族群体感应系统不仅调控病原菌的致病性, 同时影响病原菌的耐药性和对环境的适应性, 这些研究结果不仅有助于了解细菌适应环境变化的分子机制, 还有助于设计新颖的病原菌防治方法。

尽管如此, 作者认为本领域至少在以下几方面仍有深入探究的必要: (1) DSF 生物合成途径来源于脂肪酸合成, DSF 与脂肪酸生物合成是否存在前体竞争关系? DSF 进入脂肪酸 β -氧化降解途径后产生的底物是否会影响 DSF 的合成? (2) 目前已在黄单胞菌和洋葱伯克氏菌中分别发现了 2 种不同的 DSF 信号传导机制, 是否在其他 DSF 产生菌中存在第三类信号传导机制? (3) 在特定微生物群落中, DSF 信号分子如何与其他群体感应信号分子互作? (4) 在病原菌与寄主互作过程中, DSF 群体感应信号分子如何影响寄主的生长发育? 寄主代谢产物又是否对病原菌群体感应有影响? (5) 随着微生物组学和合成生物学的发展, 通过共生微生物干扰病原微生物的群体感应信号识别也是未来群体感应研究领域的一个重要研究方向。在共生微生物中异源表达 DSF 生物合成酶 RpfF, 获得高产 DSF 或 BDSF 的工程菌株, 利用工程菌株来干扰其他病原菌的致病性, 达到生物防治效果。

REFERENCES

- [1] Leyns F, De Cleene M, Swings JG, De Ley J. The host range of the genus *Xanthomonas*[J]. The Botanical Review, 1984, 50(3): 308-356
- [2] He YQ, Tang JL. Genomic analysis and pathological genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[A]/Yu ZN, Shao ZZ, Sun M. Microbial Genome Research in China[M]. Beijing: Science Press, 2012: 446-485 (in Chinese)
何勇强, 唐纪良. 十字花科黑腐病菌基因组分析与病理基因组学[A]/喻子牛, 邵宗泽, 孙明. 中国微生物基因组研究[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 446-485
- [3] Vicente JG, Holub EB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops[J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(1): 2-18
- [4] Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629
- [5] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(2): 269-275
- [6] Deng YY, Wu JE, Tao F, Zhang LH. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria[J]. Chemical Reviews, 2011, 111(1): 160-173
- [7] Zhou L, Zhang LH, Cámara M, He YW. The DSF family of quorum sensing signals: diversity, biosynthesis, and turnover[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(4): 293-303
- [8] Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(6): 371-382
- [9] Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. Nature, 2017, 551(7680): 313-320
- [10] Lee J, Wu JE, Deng YY, Wang J, Wang C, Wang JH, Chang CQ, Dong YH, Williams P, Zhang LH. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response[J]. Nature Chemical Biology, 2013, 9(5): 339-343
- [11] Zhang LH. Research progress of microbial quorum sensing systems[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(5): 50-58 (in Chinese)
张炼辉. 微生物群体感应系统的研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 50-58
- [12] Wang LH, He YW, Gao YF, Wu JE, Dong YH, He CZ, Wang SX, Weng LX, Xu JL, Tay L, et al. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(3): 903-912
- [13] He YW, Wu JE, Cha JS, Zhang LH. Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production[J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 187
- [14] Zhou L, Yu YH, Chen XP, Diab AA, Ruan LF, He J, Wang HH, He YW. The multiple DSF-family QS signals are synthesized from carbohydrate and branched-chain amino acids via the FAS elongation cycle[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13294
- [15] Deng YY, Wu JE, Yin WF, Li P, Zhou JN, Chen SH, He F, Cai J, Zhang LH. Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(5): 1534-1545
- [16] Davies DG, Marques CNH. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(5): 1393-1403
- [17] Beaulieu ED, Ionescu M, Chatterjee S, Yokota K, Trauner D, Lindow S. Characterization of a diffusible signaling factor from *Xylella fastidiosa*[J]. mBio, 2013, 4(1): e00539-12
- [18] Ionescu M, Yokota K, Antonova E, Garcia A, Beaulieu E, Hayes T, Iavarone AT, Lindow SE. Promiscuous diffusible signal factor production and responsiveness of the *Xylella fastidiosa* Rpf system[J]. mBio, 2016, 7(4): e01054-16
- [19] Vilchez R, Lemme A, Ballhausen B, Thiel V, Schulz S, Jansen R, Sztajer H, Wagner-Döbler I. *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule *trans*-2-decenoic acid (SDSF)[J]. Chembiochem, 2010, 11(11): 1552-1562
- [20] Han Y, Wang Y, Tombosa S, Wright S, Huffman J, Yuen G, Qian GL, Liu FQ, Shen YM, Du LC. Identification of a small molecule signaling factor that regulates the biosynthesis of the antifungal polycyclic tetramate macrolactam HSAF in *Lysobacter enzymogenes*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2): 801-811
- [21] Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJG, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(3): 555-566
- [22] Cheng ZH, He YW, Lim SC, Qamra R, Walsh MA, Zhang LH, Song HW. Structural basis of the sensor-synthase interaction in autoinduction of the quorum sensing signal DSF biosynthesis[J]. Structure, 2010, 18(9): 1199-1209
- [23] Boon C, Deng YY, Wang LH, He YW, Xu JL, Fan Y, Pan SQ, Zhang LH. A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition[J]. The ISME Journal, 2008, 2(1): 27-36
- [24] Bi HK, Christensen QH, Feng YJ, Wang HH, Cronan JE. The *Burkholderia cenocepacia* BDSF quorum sensing fatty acid is synthesized by a bifunctional crotonase homologue having both dehydratase and thioesterase activities[J].

- Molecular Microbiology, 2012, 83(4): 840-855
- [25] Cronan JE, Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways[J]. Methods in Enzymology, 2009, 459: 395-433
- [26] Campbell JW, Cronan Jr JE. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery[J]. Annual Review of Microbiology, 2001, 55: 305-332
- [27] Lin S, Hanson RE, Cronan JE. Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway[J]. Nature Chemical Biology, 2010, 6(9): 682-688
- [28] Cronan JE. Biotin and lipoic acid: synthesis, attachment, and regulation[J]. EcoSal Plus, 2008, 3(1), DOI: 10.1128/ecosalplus.3.6.3.5
- [29] Li H, Zhang XL, Bi LJ, He J, Jiang T. Determination of the crystal structure and active residues of FabV, the enoyl-ACP reductase from *Xanthomonas oryzae*[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26743
- [30] Yu YH, Hu Z, Dong HJ, Ma JC, Wang HH. *Xanthomonas campestris* FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32811
- [31] Hu Z, Dong HJ, Ma JC, Yu YH, Li KH, Guo QQ, Zhang C, Zhang WB, Cao XY, Cronan JE, et al. Novel *Xanthomonas campestris* long-chain-specific 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase involved in diffusible signal factor synthesis[J]. mBio, 2018, 9(3): e00596-18
- [32] Yu YH, Ma JR, Guo QQ, Ma JC, Wang HH. A novel 3-oxoacyl-ACP reductase (FabG3) is involved in the xanthomonadin biosynthesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(12): 1696-1709
- [33] Deng YY, Liu XL, Wu JE, Lee J, Chen SH, Cheng YY, Zhang CY, Zhang LH. The host plant metabolite glucose is the precursor of diffusible signal factor (DSF) family signals in *Xanthomonas campestris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(8): 2861-2868
- [34] Diab AA, Cao XQ, Chen H, Song K, Zhou L, Chen B, He YW. BDSF is the predominant in-plant quorum-sensing signal used during *Xanthomonas campestris* infection and pathogenesis in Chinese cabbage[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2019, 32(2): 240-254
- [35] Li KH, Yu YH, Dong HJ, Zhang WB, Ma JC, Wang HH. Biological functions of *ilvC* in branched-chain fatty acid synthesis and diffusible signal factor family production in *Xanthomonas campestris*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2486
- [36] Alcaraz E, García C, Friedman L, de Rossi BP. The *rpf*/DSF signalling system of *Stenotrophomonas maltophilia* positively regulates biofilm formation, production of virulence-associated factors and β -lactamase induction[J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(6): fnz069
- [37] Wang XY, Zhou L, Yang J, Ji GH, He YW. The RpfB-dependent quorum sensing signal turnover system is required for adaptation and virulence in rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(3): 220-230
- [38] Zhao YC, Liu CH, Qian GL, Yin FQ, Zhou YJ, Song ZW, Liu FQ. Function of a two-component system RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(4): 449-456 (in Chinese)
- 赵延存, 刘春晖, 钱国良, 殷芳群, 周奕景, 宋志伟, 刘凤权. 水稻细菌性条斑病菌 RpfC_{xoc}/RpfG_{xoc} 双组分系统的功能[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 449-456
- [39] Zhou L, Wang XY, He YW. DSF signal-dependent quorum sensing in plant pathogenic bacteria *Xanthomonas*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(14): 2910-2922 (in Chinese)
- 周莲, 王杏雨, 何亚文. 植物病原黄单胞菌 DSF 信号依赖的群体感应机制及调控网络[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2910-2922
- [40] He YW, Wang C, Zhou L, Song HW, Dow JM, Zhang LH. Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(44): 33414-33421
- [41] Waldron EJ, Snyder D, Fernandez NL, Sileo E, Inoyama D, Freundlich JS, Waters CM, Cooper VS, Neiditch MB. Structural basis of DSF recognition by its receptor RpfR and its regulatory interaction with the DSF synthase RpfF[J]. PLoS Biology, 2019, 17(2): e3000123
- [42] Cai Z, Yuan ZH, Zhang H, Pan Y, Wu Y, Tian XQ, Wang FF, Wang L, Qian W. Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(4): e1006304
- [43] Huedo P, Yero D, Martínez-Servat S, Estibariz I, Planell R, Martínez P, Ruyra A, Roher N, Roca I, Vila J, et al. Two different *rpf* clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(13): 2431-2442
- [44] Yero D, Huedo P, Conchillo-Solé O, Martínez-Servat S, Mamat U, Coves X, Llanas F, Roca I, Vila J, Schaible UE, et al. Genetic variants of the DSF quorum sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia* influence virulence and resistance phenotypes among genotypically diverse clinical isolates[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1160
- [45] Deng YY, Schmid N, Wang C, Wang JH, Pessi G, Wu DH, Lee J, Aguilar C, Ahrens CH, Chang CQ, et al. *Cis*-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

- America, 2012, 109(38): 15479-15484
- [46] Suppiger A, Eshwar AK, Stephan R, Kaefer V, Eberl L, Lehner A. The DSF type quorum sensing signalling system RpfF/R regulates diverse phenotypes in the opportunistic pathogen *Cronobacter*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 18753
- [47] Xu J, Zhou L, Venturi V, He YW, Kojima M, Sakakibari H, Höfte M, De Vleeschauwer D. Phytohormone-mediated interkingdom signaling shapes the outcome of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 1-16
- [48] Chen H, Zhou L, Chen B, Song K, Guo XC, He YW. The activities of natural amino acids to induce *Xanthomonas campestris* to degrade DSF-family quorum sensing signals[J]. Microbiology China, 2019, 46(11): 2952-2962 (in Chinese)
- 陈慧, 周莲, 陈博, 宋凯, 郭晓春, 何亚文. 天然氨基酸诱导野油菜黄单胞菌降解 DSF-家族群体感应信号活性分析[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11): 2952-2962

(上接 p.1170)

征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。本刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 10 人时全部列出, 多于 10 人时列出前 10 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model[J]. Cell, 1999, 96(1): 47-56
- [2] Cheng XY, Liu WW, Xu Y, Zhou NY. Screening and characterization of culturable hydrocarbon-degrading strains from the South and East China Seas[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 975-985 (in Chinese)
- 程晓宇, 刘伟伟, 许楹, 周宁一. 中国东海和南海海域可培养烃类降解细菌的筛选及功能[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 975-985
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过计算机网络进入国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmhc.cn/>)或国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到接受号(Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>