

根瘤菌群体感应系统研究进展*

谷峻 陈文峰 陈强 陈文新**

(中国农业大学生物学院农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室 北京 100094)

摘要: 群体感应是指细菌中依赖于细胞密度的基因表达调控过程, 参与这种调节的系统被称为群体感应系统。N-酰基高丝氨酸内酯是大多数革兰氏阴性细菌群体感应系统的信号分子。这种系统调节细菌各种生理学反应和某些特定功能。在根瘤菌与宿主豆科植物成功建立共生关系的过程中, 起着重要作用。详细的综述了根瘤菌中已发现的群体感应系统, 并阐述了这种系统的调节功能和对实际应用的指导意义。

关键词: 群体感应系统, 根瘤菌, N-酰基高丝氨酸内酯

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0110-05

Advancement of Quorum Sensing in Rhizobia*

GU Jun CHEN Wen-Feng CHEN Qiang CHEN Wen-Xin**

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing, 100094)

Abstract: Quorum sensing is defined as the cell density-dependent regulation of gene expression, and the involved system is the quorum sensing system, in which N-acyl homoserine lactone is known as the signal molecules of most gram-negative organisms. It can regulate diverse physiological functions. This paper reviewed the quorum sensing systems and the recent advances which play a major role in the formation of the symbiosis between the rhizobia and their host plants.

Key words: Quorum sensing, Rhizobia, N-acyl homoserine lactone

群体感应 (quorum sensing, QS) 是指当细菌的数量达到一定的密度 (quorum) 时, 才能发生的感应 (sensing) 现象, 即细菌能够通过某些特定信号分子的浓度变化来感知周围环境中自身或其它细菌的数量变化, 当信号分子达到一定浓度阈值时, 启动相关基因的表达来适应环境的变化^[1]。参与调节群体感应信号分子合成及其相关操纵元组成的系统被称为群体感应系统。

目前, 在许多原核生物中都发现了群体感应系统, 调节其各种生理学反应和某种特定功能, 如 生物发光、质粒转移、生物膜形成和抗生素生物合成等。最近的研究发现根瘤菌的群体感应系统在其与宿主豆科植物成功建立共生关系的过程中, 起着重要作用。本文简要综述了根瘤菌群体感应系统的研究进展。

1 根瘤菌群体感应系统产生的信号分子

与大多数革兰氏阴性细菌一样, 目前已发现的根瘤菌 QS 系统产生的信号分子主要

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30270001, No.30400001)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30270001, No.30400001)

“973”计划与课题基金资助 (No.2001CB108905)

农业部农业环境微生物工程重点开放实验室开放基金资助

** 联系人 Tel: 010-62893749, E-mail: wenxin_chen@263.net

收稿日期: 2004-02-26, 修回日期: 2004-04-08

是具有两亲性的 N-酰基高丝氨酸内酯类化合物 (N-acyl homoserine lactones, AHLs)。这类化合物的特点是含有一个疏水性的高丝氨酸内酯环和一个亲水性的酰胺侧链。通常,不同 AHLs 的酰胺链碳原子数目不同(碳原子数从 4 个到 18 个,多为偶数个,奇数仅为 7 个碳),并且在酰胺链上的第 3 位碳原子上具有不同的取代基团(氢、羟基、羰基)。在 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 中还发现了具有不饱和双键的 AHL²¹。据统计,在根瘤菌中已发现并测定结构的 AHLs 大约有 14 种(表 1)。此外,还分离到了一些结构待确定的长链和短链 AHLs。Fuqua 等¹¹推测 AHLs 的两亲性使它们能够穿过磷脂双层膜,定向到达细胞内或细胞外。

表 1 根瘤菌的群体感应系统

根瘤菌种名	AHL 种类	产生 AHL 的系统	QS 调节的表型
<i>R. leguminosarum</i>	C ₆ -HSL, C ₇ -HSL, C ₈ -HSL	rhlR/rhlI	结瘤有效性
bv. <i>viciae</i>	3-OH-C ₈ -HSL, C ₆ -HSL, C ₇ -HSL, C ₈ -HSL	rhlR/rhlI	未知
	3-oxo-C ₆ -HSL, C ₈ -HSL	traR/traI	质粒转移
	3-OH-C _{14:1} -HSL	cinR/cinI	生长抑制
<i>R. etli</i> CNPAF512	羟基化长链 AHL 短链 AHL 化合物	cinR/cinI raiR/raiI	固氮; 共生体形成; 生长抑制 固氮; 生长抑制
<i>R. etli</i> CFN42	3-oxo-C ₆ -HSL 3-OH-C ₈ -HSL	traR/traI 未知	质粒转移 未知
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	3-oxo-C ₈ -HSL 其他短链和长链 AHL	traR/traI 未知	质粒转移; 生长抑制 未知
<i>S. meliloti</i> Rm1021	C ₁₂ -HSL, 3-oxo-C ₁₄ -HSL C _{16:1} -HSL, 3-oxo-C _{16:1} -HSL, C ₁₈ -HSL	sinR/sinI	II 型胞外多糖的产生
<i>S. meliloti</i> Rm41	3-oxo-C ₁₄ -HSL, C ₁₆ -HSL C _{16:1} -HSL, 3-oxo-C _{16:1} -HSL, 3-oxo-C ₈ -HSL	sinR/sinI traR/traI	II 型胞外多糖的产生 质粒转移
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Bradyoxetin	未知	结瘤基因的激活

大多数细菌不止产生一种类型的 AHL,不同的细菌也可产生相同的 AHL。前者使细菌存在多种群体感应系统并且构成了复杂的调节网络,调节细菌多种生理反应,以适应环境变化;而后者则使不同细菌之间能够相互交流信息,以保证其自身在某一生态区系中占据特定的生态位。例如, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 至少能产生 6 种不同的 AHLs。当 AHLs 达到一定浓度,根瘤菌开始调节某些生理反应和表型,如质粒转移¹³、结瘤效率⁴等。

慢生大豆根瘤菌中,存在着一类称为细胞密度因子 (cell density factor, CDF)¹⁵ 的特殊群体感应信号分子 (Bradyoxetin),其化学结构见图 1,目前还未找到合成 Bradyoxetin 的相关基因,但已发现它可调节大豆慢生根瘤菌的结瘤¹⁶。这种化合物具有氧烷环,与链霉菌 OM2317 产生的氧烷菌素很相似,氧烷菌素能抑制枯草芽孢杆菌和 *Piricularia oryza* 的生长,Bradyoxetin 也具有类似的生物活性。研究已

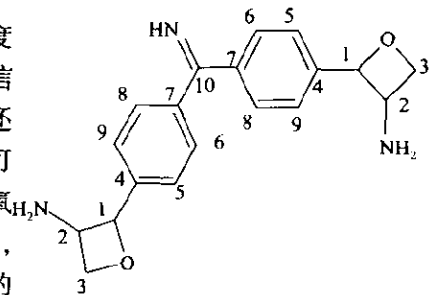


图 1 Bradyoxetin 的化学结构

证实,这种化合物也与已知的铁载体化合物 mugenic acid 结构类似,其合成受铁元素调节,缺铁时,其产生量最大。

2 根瘤菌中的群体感应系统

在根瘤菌与宿主豆科植物形成有固氮活性的共生体的过程中,许多信号分子(黄酮类物质、结瘤因子、胞外多糖等)参与了信息交流。根瘤菌的群体感应系统参与调节了共生过程中的多个重要阶段,进而影响结瘤效率、共生体的形成和胞外多糖的产生。目前已证实根瘤菌中至少存在5种不同的群体感应系统,合成多种 AHLs,研究者把 AHLs 作为共生信号,深入研究其对根瘤菌共生结瘤的影响。

2.1 traR/traI 系统 迄今为止,在 *R. leguminosarum*、*R. sp.* NGR234、*R. etli* CFN42、*Sinorhizobium meliloti* Rm41 中都发现了这种群体感应系统^[2,7-9]。根瘤土壤杆菌中的 traR/traI 系统已经被研究清楚^[10]。在根瘤菌中,该系统位于根瘤菌的相应质粒上,参与调节根瘤菌质粒的转移。

根瘤土壤杆菌的 traR/traI 系统由 traR、traM、traAFB、traCDG 和 traI-trb 操纵元组成。其中 TraR 是一种调节蛋白,当环境中的 AHLs 的浓度达到一定阈值时, TraR 与 AHL 结合,构象发生改变,形成有活性的二聚体复合物,作为转录激活子,诱导 trb 操纵元和 traAFB、traCDG 的表达。在 trb 操纵元中, traI 基因(AHL 合成酶基因)表达后, AHL 迅速增加,形成了一个正向反馈调节环路。而 TraM 是 TraR 的反向激活因子,当存在少量 TraR 时, TraM 与 TraR 结合形成没有活性的复合物,使 traAFB、traCDG 等基因无法表达,致使 Ti 质粒不能接合转移。此外,研究发现根瘤土壤杆菌的 traR/traI 系统中, TraR 与 3-羰基辛酸-高丝氨酸内酯(3-oxo-C₈-HSL)结合形成的二聚体还能调节 Ti 质粒上的 repABC 操纵元,进而影响 Ti 质粒的拷贝数。在 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 的质粒 pRL1JI 上存在着与根瘤土壤杆菌 trb 操纵元同源的基因簇^[2]。其 traI 基因位于 trb 基因上游。除了 TraR 调节子外,它还携带着另一个位于 trb 操纵元下游的调节基因-bisR。TraR 通过诱导 trb 操纵元调节质粒 pRL1JI 的接合转化。

序列比对分析发现,在 *R. sp.* NGR234 的质粒 pNGR234a 上存在与根瘤土壤杆菌相似的 traR/traI 系统。也具有功能相似的 TraI、TraR、TraM 3 种调节蛋白^[6]。但是两者质粒转移频率不同。正常情况下,根瘤土壤杆菌的 Ti 质粒的转移频率为 10²,而质粒 pN-GR234a 的转移频率仅为 10⁹,造成 pNGR234a 低频转移的机制还不清楚。

R. etli CFN42 的 traR/traI 系统位于质粒 p42a 上^[8]。质粒 p42a 的转移受 TraI、TraR、和 CinR 的调节。*R. etli* CFN42 的 traR/traI 系统主要有 4 个调节基因: traI, traR, traM 和 cinR。其中 traI-trb 操纵元与根瘤土壤杆菌的 Ti 质粒上的 traI-trb 操纵元同源性很高。traI 编码的 TraI 负责 3-oxo-C₈-HSL 的合成。此外,在 *R. etli* CFN42 中还检测到了 3-OH-C₈-HSL 的存在,其合成和功能还需进一步研究。

在 *S. meliloti* Rm41 中, traR/traI 系统位于其特有的质粒 pRme41a 上,负责合成至少 3 种不同的 AHLs (表 1),而 *S. meliloti* Rm1021 中未发现 traR/traI 系统。与根瘤土壤杆菌相似, TraM 对 *S. meliloti* Rm41 的 traR/traI 系统进行负调节,以保证只有在高细胞浓度时此系统才有活性,从而调控该质粒的接合转移^[9]。

2.2 sinR/sinI 系统 sinR/sinI 系统目前仅在 *S. meliloti* 中发现。*S. meliloti* Rm1021 的基因组序列完成后,发现了与 luxR/luxI 同源的另一组基因,命名为 sinR/sinI 系统^[9]。进一

步研究发现,该系统负责一些新的 AHLs 的合成,如 C_{12} -HSL, 3-oxo- $C_{16:1}$ -HSL, C_{18} -HSL 等。如果这个系统被破坏,根瘤的固氮表型将延迟,粉红色根瘤的数量减少,表明 *sinR/sinI* 系统在 *S. meliloti* 与紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 建立有效共生体的过程中发挥作用。最近,研究证实这个系统也是 *S. meliloti* 顺利合成 II 型胞外多糖必需的, *expR* 的产物 ExpR 是合成 II 型胞外多糖基因 *exp* 的正向调节子。而在菌株 Rm1021 中,由于一个插入序列将 *expR* 阻断,使其无法合成 II 型胞外多糖。菌株 Rm41 和 Rm8510 有完整的 *expR* 基因,能合成大量的 II 型多糖。研究发现, *sinI* 突变子中由于一些 *exp* 基因的表达被破坏,因而无法合成 II 型胞外多糖,但这种缺失,可通过添加野生型 Rm1021 的 AHL 粗提物或添加合成的 $C_{16:1}$ -HSL 来弥补。因此, *sinRI* 基因可能通过 ExpR 来调节 II 型胞外多糖的产生。具有 *sinI* 突变却能产生其它的 II 型胞外多糖的菌株,不能形成有固氮能力的根瘤,表明 *sinRI* 基因调控产生的 II 型胞外多糖对根瘤菌的侵染是十分重要的,这些实验结果为 QS 系统调节共生体形成的机制提供了有力证据。

2.3 *raiR/raiI* 系统和 *cinR/cinI* 系统 目前研究发现这两个群体感应系统都仅存在于 *R. leguminosarum* 和 *R. etli* CNPAF512 中。*raiR/raiI* 系统分别位于 *R. leguminosarum* 的质粒 pIJ9001 上和 *R. etli* CNPAF512 的染色体上^[11,12]。在 *R. leguminosarum* 中, *raiRI* 基因主要负责合成 3-OH- C_8 -HSL, 同时合成微量的 C_6 -HSL, C_7 -HSL 和 C_8 -HSL; 在 *R. etli* CNPAF512 中,它主要合成短链 AHLs。在 *R. leguminosarum* 和 *R. etli* CNPAF512 中, *raiI* 基因都受 *RaiR* 和 3-OH- C_8 -HSL 的正向调节,两者的 *RaiI* 和 *RaiR* 序列同源性分别为 93% 和 88%。

在 *R. etli* CNPAF512 中,已鉴定的仅有两个群体感应系统,即 *raiR/raiI* 系统和 *cinR/cinI* 系统,共合成 7 种 AHLs。由于在 *cinI/raiI* 的双突变子中,未检测到 AHLs 的合成,推测这两个系统负责所有 AHLs 的合成^[15]。*R. etli* CNPAF512 的 *cinR* 和 *cinI* 基因负责长链 AHLs 的合成,它与 *R. leguminosarum* 的 *cinR* 和 *cinI* 基因分别具有 96% 和 95% 的同源性。该系统合成的羟基化长链 AHL, 虽然不像 *R. leguminosarum* 的 3-OH- $C_{14:1}$ -HSL 那样具有双键,仍然可抑制 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 的生长。最令人兴奋的是 Daniels 等首次在 *R. etli* 类菌体中发现了 3 种不同的 AHLs^[13], 其中一种化合物能与 *cinI* 产生的 AHL 共迁移; 此外,从类菌体中也提取到了由 *raiI* 合成的 AHLs。同时, *cinI* 和 *cinR* 基因突变株形成的根瘤未观察到任何表型缺失,但由于形成了异常的共生体而使固氮量减少。研究还发现 *cinI/raiI* 双突变子在结瘤过程中,固氮量也严重减少。

2.4 *rhiR/rhiI* 系统 这个系统仅存在于 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 的共生质粒 pRLJI 上,由 *rhiI*、*rhiABC* 和 *rhiR* 3 部分组成。*rhiI* 负责短链 AHLs 合成(表 1)。已证实 *rhiABC* 的表达受 *RhiR* 的正向调节,黄酮类物质会抑制 *rhiR* 和 *rhiABC* 基因的表达。虽然 *rhiABC* 的功能未知,但研究发现当根瘤菌位于宿主植物根际时, *rhiA* 基因高效表达,在类菌体中却不表达。在 *nodFE* 突变株中, *rhiA* 或 *rhiR* 的突变会使根瘤数量减少,据此推测 *rhi* 操纵元很可能像 *nod* 基因一样,仅在共生过程的早期阶段起作用。

由此可见,一株根瘤菌不止存在一种群体感应系统,这些系统不是孤立的,而是相互协调,构成复杂的群体感应调节网络。例如,在 *R. leguminosarum* bv. *viciae* 存在 4 种群体感应系统,其中 *traR/traI* 系统的 *BisR* 能抑制 *cinI* 基因的表达,使这两个群体感应系统之间存在着一个负向的反馈环路。虽然对该菌的群体感应调节网络进行了较多研究,但是这些系统在其生命循环中的作用仍是未知的。

3 慢生大豆根瘤菌中独特的群体感应调节

早期的研究发现,当细胞密度较高时,慢生大豆根瘤菌的 *nod* 基因表达受到抑制,暗示着存在群体感应现象,但未检测到 AHLs。后来科学家们在慢生大豆根瘤菌中发现了自身诱导物 Bradyoxetin。研究证实,缺铁时,Bradyoxetin 的量最大^[6]。同时发现,铁饥饿时,慢生大豆根瘤菌 *nolA* 基因表达增加,而 *nod* 基因表达下降。Loh 等证实,Bradyoxetin 的一个效应调节子是 NswB^[14]。NswB 是慢生大豆根瘤菌双组分系统的组分,是感知 Bradyoxetin 所必需的。当慢生大豆根瘤菌的数量增加时,Bradyoxetin 也增加,NswB 感知这一信号后,诱导 *nolA* 基因表达,随即激活 *nodD*₂,抑制 *nod* 基因的表达。已知在高细胞密度条件下,当黄酮类物质存在时,慢生大豆根瘤菌的 NodD2 是抑制 *nod* 基因表达所必需的。在植物中,*nolA* 和 *nswB* 是对 *nod* 基因进行负调节所必需的,说明慢生大豆根瘤菌的这种群体感应系统在共生过程的早期至中期阶段调节着根瘤菌和宿主植物间的信号交流。

4 展望

根瘤菌与其宿主豆科植物建立共生关系的过程是一个复杂的信号交流过程。目前仍有许多现象未研究清楚,如胞外多糖虽然是根瘤菌成功感染宿主植物根系形成根瘤所必需的,但其确切功能还未知;根瘤菌进入根瘤中,通过何种调节机制分化形成类菌体并进行信号交流也是未知领域。群体感应系统虽参与了这些未知领域的调节,但其调节机制还需要不断研究。对群体感应系统及其调节功能的研究,也使人们在研究开发根瘤菌新型接种剂和改进接种技术中取得突破。Loh 等发现慢生大豆根瘤菌 NswB 突变株对群体感应调节不敏感。在菌体浓度高时,它能更好地结瘤,占瘤率大于野生型菌株,从而具有更强的竞争力和应用价值。

由此可见,根瘤菌中复杂的群体感应系统是其更好的适应环境以及与宿主植物成功建立共生关系必不可少的保证。因而对根瘤菌的群体感应系统及其调节机制的深入研究,有利于人们更好地了解根瘤菌与豆科植物之间的信息交流、提高根瘤菌的结瘤效率,有效应用根瘤菌接种剂,推动农业可持续发展具有积极的指导意义。

参考文献

- [1] Fuqua W C, Winans S C. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 269 ~ 275.
- [2] Lithgow J K, Wilkinson A, Hardman A, *et al.* *Mol Microbiol*, 2000, **37**: 81 ~ 97.
- [3] Wilkinson A, Danino V, Wisniewski-Dye F, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, **184**: 4510 ~ 4519.
- [4] Rodelas B, Lithgow J K, Wisniewski-Dye F, *et al.* *J Bacteriol*, 1999, **181**: 297 ~ 319.
- [5] Loh J, Carlson R W, York W S, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**: 14446 ~ 14451.
- [6] Loh J, Stacey C. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 10 ~ 17.
- [7] Tun-Garrido C, Bustos P, Gonzalez V, *et al.* *J Bacteriol*, 2003, **185**: 1681 ~ 1692.
- [8] He X, Chang W, Pierce D L, *et al.* *J Bacteriol*, 2003, **185**: 809 ~ 822.
- [9] Marketon M M, Conza'lez J E. *J Bacteriol* 2002, **184**: 3466 ~ 3475.
- [10] Zhu J, Winans S C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 1507 ~ 1512.
- [11] Wisniewski-Dye F, Jones J, Chhabra S R, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, **184**: 1597 ~ 1606.
- [12] Rosemeyer V, Michiels J, Verreth C, *et al.* *J Bacteriol*, 1998, **180**: 815 ~ 821.
- [13] Daniels R, De Vos D E, Desair J G, *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 462 ~ 468.
- [14] Loh J, Lohar D P, Andersen B, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, **184**: 1759 ~ 1766.