

## 专论与综述

## 细菌群体感应淬灭酶的研究进展\*

邱 健<sup>1</sup> 贾振华<sup>2</sup> 李承光<sup>1</sup> 马 宏<sup>2</sup> 宋水山<sup>2\*\*</sup>(河北工业大学化工学院生物工程系 天津 300130)<sup>1</sup> (河北省生物研究所 石家庄 050051)<sup>2</sup>

**摘要:** 细菌的群体感应系统 (Quorum sensing, QS) 参与许多生物学功能的调控, 其中包括动植物病原细菌致病因子的生成以及人类某些病原细菌生物膜的形成。酰基高丝氨酸内酯 (N-acylhomoserine lactone, AHL) 是调控群体感应系统的关键信号分子。近年的研究表明, 不同生物体包括细菌和真核生物中都存在类别不同的能够降解 AHL 的群体感应淬灭酶 (Quorum-quenching enzyme)。在 AHL 依赖型致病菌和转基因植物中表达 AHL 降解酶能有效地抑制 QS 信号分子的积累, 从而阻断了病原细菌的发病机制, 提高了植物的抗病性。这些新颖的群体感应淬灭酶的发现, 不仅为防治细菌侵染提供了可行的途径, 也对研究它们在宿主中的功能和对生态系统的潜在影响提出挑战。

**关键词:** 群体感应, 群体感应淬灭酶, AHL 内酯酶, AHL 酰基转移酶, 对氧磷酶, 信号干扰

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0139-05

## Advance on Bacterial Quorum-quenching Enzymes\*

QIU Jian<sup>1</sup> JIA Zhen-Hua<sup>2</sup> LI Cheng-Guang<sup>1</sup> MA Hong<sup>2</sup> SONG Shui-Shan<sup>2\*\*</sup>(Department of Biotechnology Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130)<sup>1</sup>(Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050051)<sup>2</sup>

**Abstract:** A range of bacterial species use N-acyl homoserine lactone (AHL) molecules as quorum sensing signal to regulate different biological functions, including production of virulence factors and biofilm formation of human pathogens. Several groups of AHL-degradation enzymes have recently been identified in a range of living organisms, including bacteria and eukaryotes. Expression of these enzymes in AHL-dependent pathogens and transgenic plants efficiently quenching the acceleration of QS signal and blocks pathogenic infection. Discovery of these novel quorum quenching enzymes has not only provided a promising means to control bacterial infections, but also presents new challenges to investigate their roles in host organisms and their potential impact on ecosystems.

**Key words:** Quorum sensing, Quorum quenching enzymes, AHL-lactonase, AHL-acylase, Paraoxonase, Signal interference

近些年的研究发现, 单个细菌之间存在着信息交流, 并且通过这种信息交流对外界环境变化进行群体性应答。这种细菌与细菌之间的信息交流称为群体感应 (Quorum Sensing, 简称 QS)。群体感应在协调细菌群体基因同步表达和细菌生物学功能上起着

\* 河北省自然科学基金资助项目 (No. 303610)

\*\* 通讯作者 Tel: 0311-83014618, E-mail: shuishans@hotmail.com

其他作者: 张 霞<sup>2</sup> 冀营光<sup>1</sup>

收稿日期: 2005-09-12, 修回日期: 2005-10-28

非常重要的作用<sup>[1]</sup>。在众多的群体感应信号分子中,酰基高丝氨酸内酯(AHLs)是研究最深入全面的,它参与许多细菌生物学功能的调控如生物发光、抗生素的合成、质粒结合转移、生物群游现象、细菌致病和生物膜的形成等等。目前还有许多细菌也可以产生 AHL,但对其生物学功能仍不甚了解。

原核生物之间和原核生物与真核生物之间的相互作用在自然生态系统中是普遍存在的。如果许多细菌通过 QS 介导的群体活动提高其在自然环境中的竞争力,如产生抗生素和致病因子,那么其竞争对手很有可能利用某个特殊的机制来破坏这些细菌的群体感应,从而在竞争中占得先机。近几年来,人们已经从一些原核生物和真核生物中鉴定出一些群体感应淬灭酶和抑制剂,这些群体感应淬灭酶可以降解细菌 QS 系统的信号分子 AHL,干扰细菌 QS 系统,破坏其参与调控的生物学功能。尤其重要的是,群体感应淬灭酶可以降解决定动植物病原细菌致病因子产生的 AHL,减轻和消除病原菌的致病性,是实现利用“群体感应淬灭”、“致病拮抗”和“信号干扰”等防治动植物病害策略的关键因子。本文综述了不同来源的细菌群体感应淬灭酶的研究进展,并展望其应用前景。

## 1 群体感应淬灭酶的存在

### 1.1 原核生物中的群体感应淬灭酶

研究发现,许多植物和动物(包括人类)中的病原细菌如欧文氏胡萝卜软腐病菌(*Erwinia carotovora*)、菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)、玉米细菌性枯萎病菌(*Erwinia stewartii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*)等都是依赖 AHL 信号分子来调控致病因子的生成。而 AHL 信号分子的浓度又是调控致病基因表达的关键因素,因此通过采用降解致病菌产生的信号分子 AHL 来控制细菌侵染的策略应该是可行的。

首先报道的编码群体感应淬灭酶的基因是从革兰氏阳性菌芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) 240B<sub>1</sub>中克隆得到的 *aiiA*,其后研究证明 *aiiA* 编码一个 AHL 内酯水解酶<sup>[2]</sup>。此后不久,Leadbetter 和 Greenberg (2000) 报道 *Variovorax paradoxus* (VAI-C) 可以利用 AHL 作为唯一的能源和氮源,其细胞培养液检测到高丝氨酸内酯,表明此种菌可能产生一种酰基转移酶,但是这种酶的基因目前尚未克隆出来<sup>[3]</sup>。我室利用 PCR 方法从 2 株芽孢杆菌的基因组 DNA 中克隆出两个内酯酶基因,序列分析表明,这两个基因的编码产物与其它芽孢杆菌克隆出的内酯酶基因具有很高的同源性<sup>[4]</sup>。

迄今为止,已经报道并研究的含群体感应淬灭酶活性的菌种不下 10 种,其中包括 4 个 *Bacillus* species、1 个 *Agrobacterium tumefaciens*、*Arthrobacter* sp.、*Klebsiella pneumoniae*、*P. aeruginosa*、*Ralstonia* sp. 和 *V. paradoxus*,它们分别来自于植物、土壤、生物膜和实验室的保藏菌种<sup>[5-9]</sup>,这些菌分别属于 3 个门即 Actinobacteria (*Arthrobacter* sp.)、Firmicutes (*Bacillus* species)、Proteobacteria (*A. tumefaciens*、*K. pneumoniae*、*P. aeruginosa*、*Ralstonia* sp. 和 *V. paradoxus*)。其中大多数编码 AHL 降解酶的基因已经被克隆并加以研究。这些结果表明,编码 AHL 内酯酶的基因可能广泛地存在于许多原核生物中。

不同来源的类 AHL 降解酶在氨基酸序列上也有所不同。*Ralstonia* sp. XJ12B 的 AHL

酰基转移酶和 *P. aeruginosa* PAO1 的 AHL 酰基转移酶 (氨酰酶) 的同源性只有 39%。系统发育分析显示, 原核生物中的 AHL 内酯酶可以划归为两个簇, 即 AiiA 簇和 AttM 簇。芽孢杆菌中得到的 AHL 内酯酶都属于 AiiA 簇, 它们之间的序列同源性达 90% 以上<sup>[2,4-6,9]</sup>。来自于 *A. tumefaciens*、*K. pneumoniae*、*P. aeruginosa* 和 *Arthrobacter* sp. 的内酯酶属于 AttM 簇, 它们之间的同源性为 30% ~ 58%。虽然 AiiA 簇和 AttM 簇之间的同源性低于 25%, 但它们都含有一个高度保守的结构域 HXDH ~ H ~ D, 此结构域已被证明对 AHL 内酯酶的活性具有决定性作用<sup>[2,5,10]</sup>。

**1.2 真核生物中的群体感应淬灭酶** 当真核宿主不断遭遇病原微生物的侵染时, 真核生物会逐渐形成或利用已有的机制破坏细菌群体感应信号系统, 抵御病原菌入侵。至今已报道的真核生物中的 AHL 降解酶只有 3 种。一种是猪肾脏中的酰基转移酶。研究发现, 这种酶能够使 C<sub>4</sub>-HSL (N-Butyryl-homoserine lactone) 和 C<sub>8</sub>-HSL (N-Octanoyl-homoserine lactone) 脱酰基化, 产生 L-高丝氨酸<sup>[11]</sup>。另一种是 Greenberg 等在动物细胞中检测到某种能降解 AHL 而使之失活的酶。研究表明, 这种酶能使 C<sub>6</sub>-HSL (N-Hexanoyl-homoserine lactone) 失活, 这种酶很可能是由 *PON* 基因编码的对氧磷酶<sup>[11]</sup>。第 3 种是在植物中发现指状岩褐藻能产生卤素过氧化物酶催化产生卤素氧化物破坏 AHL 信号分子<sup>[12]</sup>, 目前还没有其它植物能产生降解细菌 AHL 信号分子的酶的报道。

## 2 群体感应淬灭酶的作用机制和特性

不同微生物产生的 AHL 信号分子有着高度的保守性，它们都含有相同的高丝氨酸内酯环状结构，不同之处是碳链长短不一，酰基侧链上的取代基不一样。在这些群体感应淬灭酶中，内酯酶和脱羧酶可以在标有 1 和 2 的位置上水解内酯环使之成为酰化高丝氨酸，而酰基转移酶和脱氨酶可以在 3 和 4 位置作用，使高丝氨酸内酯环与酰基侧链分离生成脂肪酸和高丝氨酸内酯（见图 1）。然而目前只鉴定出酰基高丝氨酸内酯酶和酰基高丝氨酸氨基转移酶。它们分别水解内酯环和酰基键。

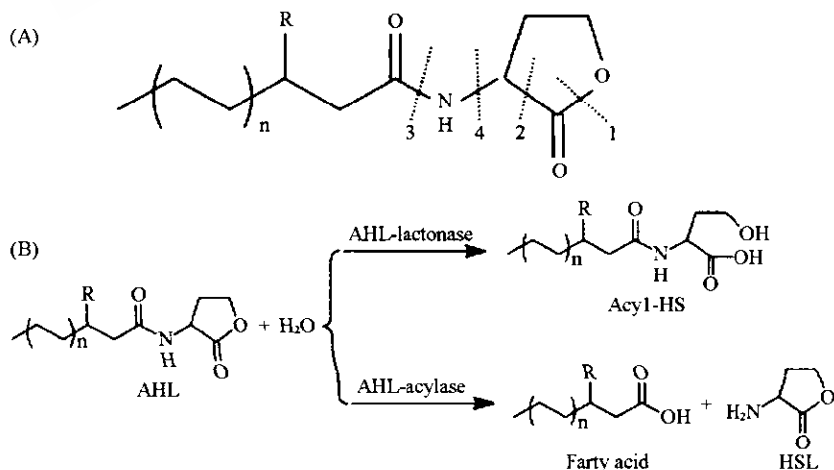


图 1 AHL 结构及其降解途径

尽管对 PON 酶降解 AHL 的作用机制尚不甚了解,但是 PON 酶(如 PON1 和 PON3)对多种内酯的水解能力已经得到证实<sup>[13]</sup>。通过序列比对和基因突变分析发现,

对酶催化作用非常重要的 HXDH ~ H ~ D 结构域在所有的 AHL 内酯酶中高度保守<sup>[2,5]</sup>。这个结构域与许多金属水解酶中  $Zn^{2+}$  结合结构域 (HXHXDH) 有相似之处。最近 Thomas 的报道指出, 从苏云金芽孢杆菌中得到的 AHL 内酯酶确实是一个金属蛋白酶, 结合  $Zn^{2+}$  离子对酶活性至关重要<sup>[13]</sup>。另外, 不含有 HXDH ~ H ~ D 结构域的 PON 酶的活性受  $Ca^{2+}$  浓度的影响, 表明它可能采用特有的催化机制。

AHL 内酯酶和 PON 类内酯酶的底物谱也有不同。PON 酶更像是广谱性的水解酶, 能水解各种酯和内酯。人 PON1 酶能够水解有机磷杀虫剂、神经制剂、芳香族羧酸酯、环酯、烷基内酯。而免 PON3 酶也能催化水解芳香族羧酸酯、环酯、烷基内酯, 但对芳香族羧酸酯的活性比较低<sup>[14]</sup>。但芽孢杆菌 240B<sub>1</sub> 的 AHL 内酯酶只对各种 AHL 表现出很强的酶活性。

对于 AHL 酰氨酶的酶催化机制和底物特异性相关报道还不是很多。从 *Ralstonia* sp. XJ12B 中得到的由 *aiiD* 编码的 AHL 酰基转移酶与头孢菌素酰氨酶和其他 N-末端 (N-terminal, Ntn) 水解酶具有很高的序列同源性。在 AHL 酰氨酶的底物特异性的实验中发现, AiiD 蛋白降解碳链大于 8 的长链信号分子的能力明显优于碳链小于 6 的短链信号分子。

### 3 AHL 降解酶的生物学功能

自然界中有许多微生物可以产生 AHL 降解酶<sup>[6,8,11]</sup>。现在, 越来越多的证据显示 AHL 降解酶参与微生物之间相互作用和调控微生物生理习性等。

研究表明, 苏云金芽孢杆菌可以通过产生 AHL 内酯酶来抑制植物病原菌欧文氏胡萝卜软腐病菌致病因子表达。产生 AHL 内酯酶的苏云金芽孢杆菌能有效地抑制欧文氏胡萝卜软腐病菌细胞在植物组织中扩展, 但并不影响菌体本身的生长。而 *aiiA* 基因突变株则不能阻止病原菌的 QS 信号转导, 导致病原菌的迅速扩展。这些结果说明 AHL 内酯酶可以影响微生物不同种群之间的相互作用, 提高其产生菌的环境竞争能力。

另外, 由 *atm* 编码的 AHL 内酯酶也参与根癌农杆菌信号分子的代谢更新。群体感应信号分子 3OC<sub>8</sub>-HSL 参与调控根癌农杆菌 Ti 质粒的结合转移。它的浓度随着细胞的生长而变化, 当细胞生长进入对数生长期时, 3OC<sub>8</sub>-HSL 的浓度迅速增加; 当细胞进入稳定期时, 它的浓度迅速减小。研究表明, AHL 信号分子的迅速消减与 AHL 内酯酶的产生有关联。在细胞生长初期和对数生长期, AHL 内酯酶基因 *atm* 的表达受到 IclR 负调控转录因子 *AttJ* 的抑制, 因此 3OC<sub>8</sub>-HSL 能随着细胞的生长而积累。但是, 一旦进入稳定期, *AttM* 的表达被饥饿的信号分子和逆境警报素 (p) ppGpp 激活, 产生的 AHL 内酯酶迅速降解 3OC<sub>8</sub>-HSL, 依赖群体感应的 Ti 质粒的结合转移也随之终止。由于 Ti 质粒结合转移对细菌来说是一个耗能过程, 当遇到不良环境如饥饿时, 细菌可以利用 AHL 内酯酶及时终止它能量消耗过程, 适应饥饿的逆境<sup>[7]</sup>。

哺乳动物细胞中能够降解 AHL 的酶可能是对氧磷酶家族, 它至少由三个成员组成, 即 PON1、PON2 和 PON3。它们似乎都具有多种保护性功能。PON1 能水解毒性有机磷, 并且可以通过水解氧化胆固醇的衍生物和磷脂衍生物防治动脉硬化<sup>[15]</sup>。人体中的 PON2 和 PON3 酶不能或者能有限地水解有机磷, 但可以水解芳香族化合物和脂肪族内

酯,并且具有抗氧化性<sup>[15,16]</sup>。

#### 4 AHL 降解酶在生防及药理学上的应用

群体感应淬灭酶可以用来生物防治由细菌 QS 系统介导的农作物细菌病害。研究表明,在动植物病原菌中表达异源的 AHL 内酯酶和 AHL 酰胺酶均能显著减轻致病菌的致病力<sup>[2,8,16]</sup>。在植物中表达 AHL 内酯酶基因能有效地消减细菌群体感应信号分子,瓦解了细胞密度依赖型细菌的侵染。许多能够合成 AHL 内酯酶的细菌如苏云金芽孢杆菌、荧光假单胞菌等或携带外源 AHL 内酯酶的基因的工程菌,与致病菌欧文氏胡萝卜软腐病菌混合接种马铃薯,发病程度远比单独接种病原菌的减弱。我研究室也将 *aiiA* 基因分别转入 *E. coli* 和 *P. fluorescens* 中,这两种工程菌与致病菌混合接种,也表现出良好的抗病性(资料待发表)。所有这些结果表明群体淬灭机制很可能会成为一种新的生防方法。在植物抗病基因工程育种中,通常的作法是将抗病基因置于组成型启动子控制下,但是组成性表达抗病基因常导致不良的农艺性状,如植株矮化、叶片黄化、育性降低,进而导致产量和生物量的降低,如果将群体淬灭机制和诱导性植物防卫系统结合起来可能会建立既不影响植物其他性状又可以有效抵御病原物侵染的防卫机制。

现在讨论群体感应淬灭酶在药理学上的潜在应用似乎有些为时尚早,因为很多特性还有待研究如酶的输送、稳定性、功效、毒性和副作用等等。进一步的研究要证明是否这些群感淬灭酶能作为广谱的保护性药物蛋白,以及 *AiiA* 和 *AiiM* 两簇的 AHL 内酯酶是否也具有与 PON 酶相似地抗氧化作用。

总之,细菌群体感应淬灭酶的发现和研究为生物防治依赖 QS 的细菌侵染提供了可能的途径,也对研究它们在宿主中的作用和对生态系统的潜在影响提出挑战。

#### 参 考 文 献

- [1] 宋水山,贾振华,高振贤,等. 微生物学通报, 2004, **31** (2): 117 ~ 120.
- [2] Dong Y H, Xu J L, Li X Z, et al. Proc Natl Acad Sci, USA, 2000, **97**: 3526 ~ 3531.
- [3] Leadbetter J R, Greenberg E P. J Bacteriol, 2000, **182**: 6921 ~ 6926.
- [4] 宋水山,马 宏,贾振华,等. 生物技术, 2005, **15** (1): 7 ~ 10.
- [5] Dong Y H, Gusti A R, Zhang Q, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 1754 ~ 1759.
- [6] Lee S J, Park S Y, Lee J J, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 3919 ~ 3924.
- [7] Zhang H B, Wang L H, Zhang L H. Proc Natl Acad Sci, USA, 2002, **99**: 4638 ~ 4643.
- [8] Lin Y H, Xu J L, Hu J, et al. Mol Microbiol, 2003, **47**: 849 ~ 860.
- [9] Uroz S, Carlier A, Elasri M, et al. Microbiol, 2003, **149**: 1981 ~ 1989.
- [10] Wang L H, Weng L X, Dong Y H, et al. J Biol Chem, 2004, **279**: 13645 ~ 13651.
- [11] Xu F, Byun T, Deussen H J, et al. J Biotechnol, 2003, **101**: 89 ~ 96.
- [12] Taga M E. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**: 14549 ~ 14554.
- [13] Thomas P W, Everett M. Stone Biochemistry, 2005, **44** (20): 7559 ~ 7569.
- [14] Draganov D I, Stetson P L, et al. J Biol Chem, 2000, **275**: 33435 ~ 33442.
- [15] Molina L, Constantinescu F, Michel L, et al. FEMS Microbiol Ecol, 2003, **45**: 7181.
- [16] Billecke S, Draganov D, Counsell R, et al. Drug Metab Dispos, 2000, **28**: 1335 ~ 1341.