

细菌化学趋向性机理的研究进展

张蔚文 张 灼

(云南大学生物系, 昆明 650092)

(一) 前言

许多具有运动能力的细菌会对多种化学物质的浓度梯度产生趋向或离避反应, 这种行为即是化学趋性运动。究其机制, 是由于运动性细菌膜表面存在各种专一性的化学受体, 它使得细菌能检测到胞外环境中化学物质的浓度变化, 并通过胞内的传递系统将感受到的化学信息转变成细胞内的信号, 进而由这种信号改变细菌鞭毛运动的方向, 由此决定了细菌的趋性运动行为^[1,2]。近10年来国内外学者对化学趋向性的分子机制进行了不少研究, 但有关的细节却直到近几年才得到阐明。Hess等^[3]和Oosawa等^[4]用实验证明了细菌细胞内化学趋向性信号处理和传递涉及到蛋白质的磷酸化级联机制, 进而证实细菌化学趋向性信息处理方式和高等真核生物的信息处理过程很相似^[5]。现在已鉴定, 分离出化学趋向性信息处理网络中的几个主要功能蛋白, 对它们的作用及信息处理网络的组成和调控也进行了描述, 本文总结了该领域近年来的研究结果。

(二) 化学趋向性信息处理网络的组成

细菌通过其鞭毛的旋转推动菌体的运动。鞭毛反时针旋转(CCW)时推动菌体呈直线前移, 而顺时针旋转(CW)时则导致菌体的随意转向或作翻滚运动。细菌膜表面的化学受体能不停顿地监视着环境中吸引物或排斥物的浓度变化, 并根据所感受到的变化以改变鞭毛运动的方向, 产生相对应的化学趋性运动。一般认为, 化学吸引物能刺激鞭毛的CCW运动, 而化学排斥物则刺激CW运动的发生^[1]。

1. 膜传感蛋白: 负责感受化学效应物刺激的传感蛋白分布于细菌细胞膜上。对*Escherichia coli*的研究发现该细菌细胞膜上有四种膜传感蛋白, 每一种传感蛋白各负责检测一系列化学

效应物, 膜传感蛋白可直接作为化学效应物的受体或和胞外化学效应物结合蛋白反应而作为间接受体。这四种传感蛋白分别是: ① Tsr蛋白: 它可作为丝氨酸及相关氨基酸诱发趋向运动的信号受体, 并负责亮氨酸、吡啶和弱酸等化学排斥物趋避信号的检测和传递。此外, 它和热趋向运动有关; ② Tar蛋白: 是L-天门冬氨酸及相关氨基酸和二羧酸的趋向运动的信号受体, 并且可以通过和胞外麦芽糖结合蛋白的相互作用而介导麦芽糖趋向运动信号的感受, 它还负责细菌对 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 的趋避运动; ③ Trg蛋白: 可以和胞外核糖、半乳糖结合蛋白作用而介导细菌对这两种糖的趋向性运动; ④ Tap蛋白: 可以通过和胞外二肽的结合蛋白的相互作用促进对二肽的趋向性运动^[6]。对这四种传感蛋白的编码基因的序列测定已完成^[7]。

研究发现, *E. coli*的四种膜传感蛋白都属于甲基受体蛋白(MCP), 并且跨膜分布。结构上包括一个细胞膜外的化学受体区域和胞膜内负责将感受到的胞外刺激转变为胞内信号的信号区域, 前者主要是传感蛋白的氨基末端, 而后者主要是羧基末端^[8]。MCP传感蛋白的甲基化或去甲基化反应决定的MCP蛋白甲基化水平, 在调节传感蛋白感受化学效应物刺激的相对灵敏性中有重要作用, 它决定了细菌对化学效应物发生反应的浓度范围。MCP传感蛋白胞膜内的信号区域上有可被甲基化的谷氨酸残基, 这是调节细胞化学趋性反应的关键部位之^[3]。

Oosawa等^[8]将Tar传感蛋白的羧基端编码基因进行了克隆, 并翻译产生了Tar传感蛋白的羧基端蛋白片段, 该蛋白片段能保留传感蛋白的完整的信号转移功能, 这表明传感蛋白在功能和结构上可明显分为相互区分的两个区

域。他们还利用基因转移技术将其它传感蛋白的氨基端基因连到 Tar 羧基端编码基因上,并翻译产生一个嵌合蛋白,该蛋白保留了 Tar 的信号传递和适应功能,但和化学效应物的反应却根据新氨基端的不同有所改变。这一结果说明各种膜传感蛋白的羧基端结构、功能有显著的相似性。Dahi 等^[6]为了研究肠细菌中传感蛋白的进化,比较了 *Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*E. coli* 和 *Salmonella typhimurium* 的传感蛋白基因,发现在 *K. pneumoniae* 的不运动种类中也有至少两个趋向性功能传感蛋白基因存在,其中一个可以和 *E. coli* 的 *tsr* 基因突变株互补产生丝氨酸趋向运动;*E. aerogenes* 的 *tes* 基因(编码丝氨酸趋向性)也可以和 *E. coli* 的 *tsr* 基因突变株互补;*E. aerogenes* 的 *tas* 基因(编码天门冬氨酸趋向性)可以和天门冬氨酸趋向性缺陷的 *E. coli* 的 *tar* 基因突变株互补,但不能和麦芽糖趋向性缺陷的 *tar* 基因突变株互补,其原因可能是此突变株中缺乏胞外麦芽糖结合蛋白;*E. aerogenes* 的 *Tse* 和 *Tas* 传感蛋白的胞膜内信号区域和 *E. coli* 及 *S. typhimurium* 的传感蛋白十分相似。这进一步证实了 Oosawa 等的研究结论^[8]。此外,还发现 *Tse* 传感蛋白的胞膜外受体区域和 *Tar* 的对应区域结构也很相似,但 *Tas* 和 *Tar* 的受体区域相似性则稍差。在 *Tsr*、*Tar*、*Tse* 和 *Tas* 四种传感蛋白的受体区域还发现几小段相同的保守区序列,而在不能感受氨基酸刺激的 *Tap* 和 *Trg* 传感蛋白中却未发现,推测这些保守区可能和氨基酸的结合有关系。

目前已纯化出多种 MCP 传感蛋白,发现不同种属来源及不同种类的化学趋向性传感蛋白在结构、功能性质和大小上均有明显的相似性^[9],暗示着不同种属的细菌化学趋向性反应可能有相同或相似的机制。Harwood 等^[10]曾详细研究了 *Pseudomonas putida* 苯甲酸酯化学趋向刺激的受体蛋白,它也是一个 MCP 传感蛋白,分子量 60000 道尔顿,和 *E. coli* 的 MCP 传感蛋白分子量相近。

2. 胞质内调节蛋白:将膜传感蛋白所接受

的化学刺激转变成有效的鞭毛运动信号,还涉及到几个胞质内调节蛋白。其中激发途径中由 CheA, CheW, CheY 和 CheZ 等调节蛋白负责将感受到的刺激从膜传感蛋白转移给鞭毛的“发动机”^[11],并启动相应的鞭毛运动^[2]。据研究认为^[1]:CheY 调节蛋白在胞内趋性信号传递中起着中心作用。Hess 等^[3]用高拷贝质粒引入 CheY 基因,发现其过量表达时会使细菌不停地作翻滚运动,而这种翻滚运动能被高拷贝质粒引入 CheZ 基因所抑制,从这一结果可以看出,鞭毛进行 CW 运动时必须要有 CheY 调节蛋白的参与,而 CheZ 调节蛋白的作用是拮抗或抑制 CheY 蛋白,使细菌鞭毛进行 CCW 运动。通过对缺乏 CheZ 功能的突变体的研究,发现 CheZ 调节蛋白对 CheY 蛋白的抑制是通过它催化磷酸化的 CheY 蛋白脱磷酸基,使胞内信号蛋白失活来实现的。Stock 等^[12]研究了 *S. typhimurium* 的 CheY 调节蛋白的三维结构,从其 X-射线晶体结构图上看, CheY 蛋白是由 5 条平行的 β -片层组成的单一功能域蛋白,分子量约为 14000 道尔顿,其磷酸化位点位于靠近 β -片层羧基端的一个天门冬氨酸侧链簇上。他们还发现 *S. typhimurium* 的 CheY 蛋白序列和其它种属来源的 CheY 蛋白氨基酸序列相似,并有相似的分子构型和活性位点。

关于 CheA 调节蛋白的作用, Hess 等^[3]发现 CheA 调节蛋白在体外实验中,在 Mg^{2+} 存在条件下可以自我磷酸化,其中的磷酸基还可以迅速传递给 CheY 蛋白,和涉及细胞的适应机制的 CheB 蛋白,由此调节了这两种蛋白的活性。Oosawa 等^[4]研究了 CheA 调节蛋白的作用后,推测 CheA 蛋白在结构上应具有三个功能域。第一个区域负责和 CheB、CheY 蛋白作用并传递磷酸基,第二个区域调节 CheA 蛋白的磷酸化并控制该蛋白的稳定性,第三个区域负责从传感蛋白接受信息并调节 CheA 蛋白的活性。Hess 等^[13]也详细研究了 CheA 蛋白的结构特性,发现经蛋白酶水解后的一个 CheA 蛋白片段不能自我磷酸化,但仍保持将磷酸基传递给其它调节蛋白的能力。这证实 Oosawa 的

研究,说明 CheA 蛋白的几个功能域是相互区分的,并发现 CheA 蛋白磷酸化发生的位置是第 48 号组氨酸,凡此氨基酸位置发生改变的细菌均不能再产生化学趋向性反应,该组氨酸位于 CheA 蛋白的氨基端,在此末端还包括控制磷酸基传递的功能区域;信号接受位点则位于 CheA 蛋白的羧基端。CheA 蛋白结构的任何一个功能区发生改变都会导致细胞的化学趋向反应缺陷。此外,一个很令人感兴趣的发现是紧接着第 48 号组氨酸的羧基端一侧有一段 Gly-X-Gly-X-X-Gly 的保守序列,由于此序列在其它许多核苷酸结合蛋白中均有发现,CheA 蛋白是否还和核酸存在某种关系尚待研究。CheW 蛋白的作用主要是调节 CheA 蛋白的自我磷酸化速率^[2]。总之,研究表明 CheA 和 CheW 蛋白和膜传感蛋白的作用在衔接传感蛋白和 CheY 蛋白功能中有重要作用。研究结果同时显示细菌化学趋向性信号传递,是通过一个磷酸化蛋白中间体进行的。

细菌只对化学效应物浓度梯度发生反应的能力取决于其适应机制。细菌通过此机制不断地调节传感系统的敏感性,使处于均匀浓度环境中的细菌不产生趋向性运动。在适应过程中有 CheR 和 CheB 两个胞内调节蛋白参与,它们通过共价修饰传感蛋白(MCP)调节对化学效应物的敏感性,其中 CheR 作为转甲基酶发生作用,将一个甲基团转到 MCP 的谷氨酸残基上,而 CheB 则具有甲基酯酶活性,能够催化从 MCP 上去除甲基, MCP 的甲基化水平是适应反应的关键^[14,15]。CheB 蛋白的甲基酯酶活性受胞外化学效应物刺激的调节, Russell 等^[16]研究认为,化学效应物浓度变化影响 MCP 的甲基化水平有两种可能的机制。其一是化学效应物和传感蛋白结合后引起后者构象变化,因而改变了其甲基化位点和甲基酯酶 CheB 的结合,这种机制称为局部调节,因为传感蛋白只能影响和它发生直接联系的酶;其二是化学效应物和传感蛋白结合后引起某种调节因子的产生或破坏,再由此影响胞质内其它酶的活性,这种机制称为整体调节。作者认为 CheB 蛋白的调节

很可能是后一种机制。Springer 等^[17]的研究也支持这一看法。他们还发现调节因子的有效作用需要 cheA 和 / 或 cheW 基因产物的参与,还发现磷酸基团由 CheA 蛋白传到 CheB 蛋白和 CheB 酶活性的激活有关。Nettleton 等^[18]比较研究了来自 *E. coli* 和 *Bacillus subtilis* 的甲基酯酶 CheB,发现两种 CheB 酶都可以催化其它种属来源的 MCP 脱甲基,当把化学吸引物加入 *E. coli* 的 CheB 酶和 *B. subtilis* 的 MCP 混合液中时,可观察到明显的脱甲基反应,颠倒混合液成分时亦然,这表明不同分类归属的细菌中得到的 CheB 有相当的功能一致性。Burgess-Cassler 等^[19]也证明不同种属细菌的 CheR 酶有功能相似性。

(三) 磷酸化与化学趋向性信号的传递

调节鞭毛运动的信号在本质上可以是电信号(如细胞膜电势的改变),机械信号(如传感蛋白和鞭毛“发动机”的直接接触作用)或是化学信号, Segall 等^[20]在详细研究了 *E. coli* 中信号传递的本质后,排除了前两种可能性,他们证明胞内信号传递速度很慢,近似于一个蛋白质性质的大分子扩散穿过细胞质的速度,并且这个信号作用持续时间短(0.1 秒),作用范围也不大。他们认为信号的本质是一种蛋白质分子。此推论后来得到证实^[5]。尽管鞭毛运动本身并不需要 ATP^[21],但在化学趋性运动中却必须不停地供给 ATP。缺乏 ATP 供应的细胞鞭毛只能进行 CCW 运动,这表明在鞭毛产生 CW 运动时需要 ATP。ATP 可能用于某种蛋白质的磷酸化。为了证实这种可能性, Hess 等^[3]纯化出各种可溶性 Che 蛋白,并在体外测定它们作为磷酸基团供体或受体的活性,发现 CheA 能发生依赖 ATP 的自我磷酸化,并能将磷酸基很容易地传给 CheY 和 CheB 调节蛋白,证明了磷酸化是信号产生和传递的核心。

(四) 化学趋向性机理的生化模型

化学趋向性机理的生化模型见图 1。Hess 等^[3]研究发现磷酸化可以调节 CheY 和 CheB 蛋白的酶活性,磷酸化的 CheY 和 CheB 是功能活性态的蛋白。磷酸化的 CheY 蛋白可以作

用于鞭毛“发动机”，使其作 CW 运动，而磷酸化的 CheB 蛋白则可以通过去除 MCP 上的甲基团来调节细菌对化学效应物刺激的适应。激活反应或适应反应通过 CheB 和 CheY 磷酸化水平的改变来实现。图 1 的模型很好地解释了有关化学趋向性的大部分问题。磷酸化的 CheY 和 CheB 的水解使磷酸基通过信号系统传递，这解释了发生化学趋性反应为什么要持续供给 ATP。磷酸化的活性调节蛋白的迅速衰退对于建立有效的适应机制也是必需的，并且符合前人研究发现胞内信号作用时间短，范围有限的结论^[20]。此外，磷酸化级联系统也为信号的放大提供了条件。最后，信号系统中的多控制点将有利于细菌对化学效应物迅速作出反应，例如 CheY 调节蛋白的活性可由 CheA 和 CheZ 蛋白同时调控。

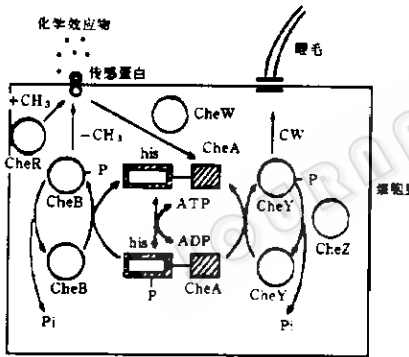


图 1 细菌化学趋向性信号传递的模式图

(五) 磷酸化级联系统的普遍性

目前在原核生物中已发现不少被称为双组件的调节系统，它们负责调节细胞对各种环境条件变化的反应^[22]。比较这类系统中感受组件、调节组件和化学趋向性反应中组成蛋白的氨基酸序列，发现它们之间有明显的相似性，例如 CheA 氨基酸序列和这类系统的感受体相似，而 CheY 和 CheB 则和这类系统的调节体相似。控制谷氨酰氨合成酶基因表达，即是由一个涉及 NtrC 蛋白磷酸化的级联放大系统所激活^[3]。尽管化学趋向性系统不涉及基因表达，

而是调节细菌的运动，但其调节系统的本质和 NtrC-NtrB 系统仍有相似性，这证明在原核生物中磷酸化级联系统可能是一种较为普遍的信号传递方式。

(六) 其它调控途径

Wolfe 等^[23]研究了缺乏全部已知的胞质 Che 蛋白编码基因(除 cheY 基因外)的 *E. coli* 所发生的化学趋性运动，发现添加乙酸后可促使该缺陷菌鞭毛发生 CW 运动。通过改变生长条件并使用代谢抑制剂和乙酸代谢的缺陷株，他们发现鞭毛发生 CW 运动时需要乙酰 CoA 合成酶，该酶负责催化从乙酸通过乙酰腺苷酸中间体形成乙酰 CoA。缺乏此酶的细菌即便保留有化学趋向性所需的基因，也不会发生化学趋性运动。作者认为乙酰腺苷酸在促进鞭毛 CW 运动中有重要作用，并推测它可能通过对 CheY 的化学修饰(这种修饰作用不需要 CheA 蛋白的参加)，或是修饰和 CheY 蛋白发生作用的鞭毛“发动机”来起作用。目前对这种调控途径的生化基础不详，因而尚不知乙酰腺苷酸如何在此途径中起作用，以及此途径和磷酸化级联途径的异同和关系。我们已知在 NtrC-NtrB 系统中已发现有腺苷酰基化，尿苷酰基化和磷酸化等几种修饰方法都可以有效地激活谷氨酰氨合成酶的基因，推想在细菌化学趋向性反应中也完全有可能存在其它类似的信息传递方式。Harwood 等^[10]发现 *Pseudomonas putida* 对苯甲酰甲酸发生趋向性反应时，并不会发生受体蛋白的甲基化反应。推测存在其它的化学信号处理和传递方式。总之，虽有广泛的证据证明在许多种细菌中磷酸化级联系统是化学趋向性信号处理的主要方式，但不能以此排除其它途径存在的可能性。也许这些途径是以某种目前尚不知的方式和磷酸化系统相互联系、相互协调而发生作用。由于我们对磷酸化级联系统的认识还不够全面，有待进一步探讨。

(七) 结束语

近年来对化学趋向性分子机理的研究，证明了磷酸化级联系统在多种微生物趋性运动中的作用，并阐明了该系统作用的许多细节。但还

有许多问题有待深入研究,例如跨膜的传感蛋白如何将信号传给 CheA 蛋白,传感蛋白如何调节 CheA 的磷酸化, CheY 蛋白如何作用于鞭毛“发动器”,以及 CheZ 蛋白脱 CheY 磷酸基的调控等,这些问题的阐明,将对提高化学趋向性的认识和科学利用提供有益的理论基础。

参 考 文 献

1. Parkinson J S et al.: *Cell*, **53**(1): 1-2, 1988.
2. Bourret R B et al.: *J. Biol. Chem.*, **264**(13): 7085-7088, 1989.
3. Hess J F et al.: *Cell*, **53**(1): 79-87, 1988.
4. Oosawa K et al.: *Cell*, **53**(1): 89-96, 1988.
5. Stewart R C et al.: *Chem Rev*, **87**(5): 997-1025, 1987.
6. Dahi M K et al.: *J. Bacteriol.*, **171**(5): 2361-2371, 1989.
7. Manson M D et al.: *Nature (London)*, **321**: 253-256, 1986.
8. Oosawa K et al.: *J. Bacteriol.*, **170**(6): 2521-2526, 1988.
9. Nowlin D M et al.: *J. Bacteriol.*, **163**(1): 262-266, 1985.
10. Harwood C S et al.: *J. Bacteriol.*, **171**(10): 4603-4608, 1989.
11. Wolfe A J et al.: *J. Bacteriol.*, **169**(4): 1878-1885, 1987.
12. Stock A M et al.: *Nature (London)*, **337**(6209): 745-749, 1989.
13. Hess J F et al.: *Nature (London)*, **336**(6195): 139-143, 1988.
14. Thoenke M S et al.: *Biochemistry*, **27**(22): 8453-8457, 1988.
15. Thoenke M S et al.: *Biochemistry*, **28**(13): 5585-5589, 1989.
16. Russell C B et al.: *J. Bacteriol.*, **171**(7): 3609-3618, 1989.
17. Springer R et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **81**(12): 5061-5065, 1984.
18. Nettleton D O et al.: *J. Bacteriol.*, **171**(1): 120-123, 1989.
19. Burgess-Cassler A et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**(10): 12835-12836, 1982.
20. Segall J E et al.: *J. Bacteriol.*, **152**(1): 51-59, 1985.
21. 程皆能等: 微生物生理学, 第3-4页, 复旦大学出版社, 上海, 1987.
22. Ronson C W et al.: *Cell*, **49**(3): 579-581, 1984.
23. Wolfe A J et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **85**(18): 6711-6715, 1988.