

细菌磷代谢的分子调控

夏琪 姜卫红

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

关键词 细菌, 磷代谢, 调节

分类号 Q939.11

细菌的磷代谢通常是由一种两组分调节系统即磷酸盐调节子(Pho regulon)所控制。所谓两组分调节系统,是指控制一大类细菌适应性反应、由结构和功能类似的两种同源蛋白族的成员组成的一类信号传导系统。其中磷酸盐调节子是研究较为深入的一种重要的两组分调节系统,它为细菌的正常磷代谢提供了保证。

1 细菌两组分调节系统

两组分调节系统在细菌中是很常见的,目前已在十多种细菌中发现,仅在大肠杆菌中就可能五十多种^[1]。近年来,类似的传导系统在真核生物中也有发现,如酵母^[2,3]和植物^[4]。

一般说来,组成细菌两组分调节系统的两种蛋白分别起着传感器和调节器的作用。编码传感器(sensors)蛋白的基因和编码与之相应的反应调节器(response regulators)蛋白的基因是连锁的,有时还是同一操纵子的组成部分。前者通常位于细胞质膜上,监测环境因子的变化。后者位于细胞质内,介导传感器信号引起的基因表达或运动性的变化。传感器蛋白的羧基端有一传递器(transmitter),后者的氨基端有一接收器(receiver)元件。二者之间的通讯联系涉及磷酸化和去磷酸化反应。传感器蛋白的输入功能区调节传递器的功能,而反应调节器蛋白的输出功能区用接收器收到的传感器信号来激活或抑制其活性,从而引发反应。典型的传递器元件位于传感器羧基端,由几个保守的序列模块组成。传感器蛋白通常是组氨酸蛋白激酶,可以自身磷酸化也可以使相应的反应调节器磷酸化。细胞内外的变化由传感器接收后通过磷酸化作用传导信号,依次调控细菌趋化性和基因表达。典型的接收器有高度保守的一级结构和类似的高级结构^[5]。各种调节系

统各司其职,保证了细菌细胞的正常生理活动,本文将主要介绍负责细菌磷代谢的Pho调节子。

2. 细菌的磷代谢

作为细胞生长的必需元素,磷源的吸收和利用对细菌的生长有着重要的作用,因而细菌具有几种不同的代谢途径来降解利用不同的磷源。总的来说,细菌可以利用三种形式的磷源,即:无机磷酸盐(inorganic phosphates, Pi),有机磷酸酯(organophosphates),磷酸酯(phosphonates, Pn)。Pi为通常情况下最适磷源。

Pi充足时,可被高Km值Pi转运系统(Pit)和低Km值Pi转运系统(Pst)所吸收。Pit是一个单组份转运蛋白,由质子驱动力所驱动,类似于LacY。而Pst是结合蛋白依赖性转运系统,其中PstS为周质空间Pi结合蛋白,PstA和PstC为膜内嵌蛋白,PstB为渗透酶。Pi受限时,负责转运有机磷酸酯的主要是sn-3-磷酸甘油即G-3-P的结合蛋白依赖性UgpBAEC转运系统。UgpB是周质空间G-3-P结合蛋白,UgpA和UgpE是膜内嵌蛋白,而UgpC为渗透酶。另一大类磷源即磷酸酯的吸收要通过有十四个基因组成的phn操纵子来完成,它包括了一个Pn转运系统和一个Pn降解系统。

Pi进入细胞后,其代谢途径的选择取决于碳源,生长条件及生长状况。可能通过底物水平磷酸化生成1,3-二磷酸甘油,或通过混合酸发酵生成乙酰磷酸,或通过氧化磷酸化生成ATP等。有机磷酸酯被UgpBAEC系统作用后很可能将其Pi成分转运给另一有机磷酸酯如磷脂,再由后者作为Pi的提供者。Pn则被降解产生Pi后参与ATP的合成。细胞中磷代谢是复杂的,但从

根本上说,任何磷化合物的利用需要两步进行,即磷的吸收和 P_i 合成 ATP,之后可用于多种化合物的生成如膜脂、核酸及为蛋白质翻译后加工提供高能键等。无论磷最终去向如何,磷化合物的吸收同化总是与 Pho 调节子息息相关的。

3 Pho 调节子

3.1 Pho 调节子的成分 目前为止,大肠杆菌中由 P_i 调节的基因共发现了 31 个,组成了磷酸盐调节子。按其功能可分为 8 个基因或操纵子^[6]。

除 *psiE* 外,所有的磷酸调节子基因或操纵子的启动子上游都有一个 18 碱基的同源序列“Pho 盒”(Pho Box)。其中, *phnC*, *phoA*, *phoB*, *phoH*, *pstS*, *ugpB* 的启动子有由磷酸化的 PhoB 蛋白激活体外转录的证据,胞内 *phoA*, *phoB*, *pstS*, *phoH*, *phnC*, *ugpB* 启动子的 mRNA 起始位点已被确定。通过启动子 5' 缺失对表达的影响确证了 Pho 盒确实是胞内转录激活所必需的,证据来自 *phnC* 启动子, *phoE* 启动子, *pstS* 启动子。

3.2 Pho 调节子的调节机制 P_i 对 Pho 调节子的控制有两个方面:由 PstSCAB, PhoU 和 PhoR 共同在 P_i 过剩情况下对该调节子的抑制及 P_i 受限时 PhoR 对之的激活。这两种情况下都由胞外 $[P_i]$ 控制,而与胞内 $[P_i]$ 无关。 P_i 的 K_d 值为 $10\mu M$,组成型表达,所以不是 Pho 调节子的成员。而 Pst 多组分体系的 K_d 值为 $0.8\mu M$,当 P_i 受限时表达, PstSCAB 转运系统和 PhoU 蛋白是 P_i 调节系统的必需成分。因为当环境中 $[P_i]$ 降到 $4\mu M$ 以下时 ($PstS$ 饱和的 $[P_i]$), Pho 调节子被激活,胞内 $[P_i]$ 则无此作用。所以跨膜信号传导是从 PstSCAB 系统开始的。另一方面, P_i 的转运和抑制作用并不一定是相偶联的。

PhoB 和 PhoR 蛋白的序列与两组分调节系统的 regulator 和 sensor 同源的发现使 Pho 调节子的调节机制得以明晰。两组分调节系统的转录激活包括 sensor 蛋白的磷酸化及其对相应 regulator 的磷酸化和去磷酸化。与之相应, PhoR 起着自身磷酸化酶和 PhoB 的蛋白激酶这两重作用,所以 PhoR 很可能以磷酸化和去磷酸化来调节 PhoB 处于活性或非活性状态。因此, P_i 对 Pho Regulon 的控制可能通过三步进行: 1. $[P_i]$ 的降低使 PstS 在周质空间与 PhoR 的一个区域结合,该结合可能使 PhoR 与 PhoU 在胞质中分离,从而促进 PhoR 二聚体的形成, PhoR 因此由抑制态转变为活性态。2. PhoR 二聚体再与 PstS 相结合,而激活态 PhoR* 作为自身磷酸

化酶而磷酸化。3. PhoR* 使 PhoB 磷酸化,将 PhoB 变为活性态 PhoB*。当 $[P_i]$ 不足以饱和 PstSCAB 转运系统时, PhoU 可能保持与 PstB 的结合,当 P_i 饱和了 PstB 后, PhoU 被释放而同 PhoR 结合。 P_i 对 Pho regulon 的调节和 PhoR 与蛋白质相互作用的证据来自 PhoR 的区域结构 (domain structure) 研究。PhoR 由 431 个氨基酸组成,含 3 个区域,近 N-端是一个大约 50 个氨基酸组成的高度疏水区,可能形成两个跨膜的 α -helix 和一段短的六七个氨基酸区暴露在周质空间中,也可能都在膜内。PhoR 的大部分序列在胞质中,可能由两个 domain 组成,许多传感器在 N 端激酶区域前有一段 50 氨基酸区,而 PhoR 则有大约 150 个氨基酸紧跟在膜区域之后,突变分析证明这个连接区域 (linker domain) 在抑制过程和蛋白相互作用中都是必需的,可能还涉及 PhoU 和 PhoR 的相互作用。PhoR 的 C 端是激酶区域, H213 保守的组氨酸可能是自身磷酸化位点^[6]。

3.3 Pho 调节子的交叉调节 所谓交叉调节,即两组分调节系统中一种系统的反应调节器受控于不与其相应的传感器所提供的信号,这一现象的结构基础在于不同的调节系统传感器蛋白和调节器蛋白的序列同源性。Pho 调节子中存在着三种调控机制,两种有交叉调节。 P_i 的控制是一种形式的跨膜信号传导,与磷代谢的第一步即 P_i 的吸收相联系,而另两种控制即交叉调节都与磷代谢的中间步骤相联系,在 P_i 合成 ATP 过程中都与中心代谢途径相关。PhoR 突变体中, P_i 控制消失而代之以不依赖于 P_i 的两种控制方式,这种形式形成了交叉调节的基础,从生理和突变状况在野生型细胞中的表现看,这种调节可能也是重要的。这两种方式通过不同途径由碳源和能源来调节,其中之一由葡萄糖诱导,需要 CreC 作为传感器,另一则由丙酮酸诱导,需要乙酰磷酸的合成。二者都与中心代谢及 P_i 代谢主要步骤紧密相关。

较新的证据^[7]表明,在 PhoR, CreC, 乙酰磷酸合成消失的情况下, PhoB 可以接受 VanS 的激活,其合成增加了五百倍以上。VanS 是另一种两组分调节系统的反应调节器,存在于 *Enterococcus faecium* 中负责万古霉素 (vancomycin) 抗性,其相应的传感器是 VanR。这些结果更加说明了各个两组分系统有一个共同的调节机制,而且各传感器和反应调节器都是以相似的区域在跨膜信号感受、自身磷酸化、蛋白间磷酸传递等跨膜信

号传导过程中起作用的。

4 Phn 操纵子

Pho 调节子中负责一大类磷化合物降解利用的 *phn* 操纵子,近年来研究较多。Pn 即磷酸酯,是自然界存在的有机磷酸酯的类似物,不同之处在于以 Pn 的 C-P 键代替了通常的 C-O-P 键,这一取代使得 Pn 性质非常稳定,有时键能近似 C-C 键^[8]。自 1959 年发现 AEPn(α -aminoethylphosphonate)以来,几十种 C-P 化合物已被发现。尽管有许多磷酸酯的存在,C-P 键的解离和合成过程还鲜为人知。有证据表明 C-P 键的降解通常有两条途径,即 C-P 裂解酶途径和磷酸酯酶途径^[9],这两条途径的底物专一性是不同的。C-P 裂解酶途径有较为广泛的底物范围,可以通过氧化还原反应降解 C 位上有取代基的 Pn(如 AEPn)和没有取代基的 Pn(如 MPn, methylphosphonate)。尽管分子生物学和遗传学方面已做了相当多的工作,但理想的体外 C-P 裂解酶活性检测手段尚未建立。磷酸酯酶途径较为专一,主要以 α -C 上有取代基的 Pn 为底物,通过两步反应来完成。磷酸酯酶(phosphonatease)是磷酸乙酸酐水解酶(phosphonacetaldehyde hydrolase)的简称。大肠杆菌降解 Pn 是通过 C-P 裂解酶途径来完成的。

Phn 操纵子由 *phnCDEFGHIJKLMAOP* 十四个基因组成^[8-9]。在 *E. coli* K-12 中 Pn 的利用是隐性的(cryptic),而在 *E. coli* 的大多数菌株和其它菌种如 *E. aerogenes* 中是显性的(functional)。这一现象是由于 *phnE* 在 *E. coli* K-12 中的一个移码突变造成的。*phn* 操纵子中 *phnCDE* 编码了 Pn 转运系统,*phnGHIJKLMNP* 编码了 C-P 裂解酶复合体,*phnF* 和 *phnO* 的功能尚不清楚,但有证据表明它们可能起着调节作用。

Enterobacter aerogenes 也利用 Pn,但其底物范围比 *E. coli* 广泛,并且可利用 C-P 裂解酶和磷酸酯酶两条途径来降解 Pn。C-P 裂解酶途径中的基因与 *E. coli* 中相似,但负责 Pn 转运和裂解酶的基因没有连锁,而且两条途径的基因也互不连锁,也没有序列的同源性。与 *E. coli* 的 C-P 裂解酶途径相似,*E. aerogenes* 两条途径都

受到 Pho 调节子的控制。在 *S. typhimurium* 中,只存在磷酸酯酶途径,主要降解 AEPn。该 AEPn 转运系统是多组分的,类似于 *E. coli* 中 C-P 裂解酶途径的结合蛋白依赖性 Pn 转运系统,而这一途径同样是受到 Pho 调节子的控制。*S. typhimurium* 的 Pho 调节子受到调节的方式也同 *E. coli* 中相似。相对于 *E. coli* 的 Pho 调节子中的 31 个基因而言,*S. typhimurium* 的 Pho 调节子的基因要少得多^[10]。

磷酸化作用是信号传导的核心。迄今为止,关于 Pho 调节子已做了大量的工作,但一些基因如 *phoH*, *psiE*, *psiF*, *phnF* 等,功能尚不清楚。在 Pi 受限时,传感器 PhoR 如何感受胞外 [Pi] 而使自身磷酸化再磷酸化 PhoB 的机理并不十分明了,尽管 PstSCAB 转运系统和 PhoU 是必需的,PstSCAB 系统和 PhoU 很可能传递了一种 Pi 受限的信号给 PhoR,这一过程便包括了蛋白质之间的相互作用。PstS, PstC, PstA, PstB 和 PhoU 如何相互作用,如何与 PhoR 相作用以及交叉调节都值得人们进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Pakinson J S. Cell, 1993, 73:857~871.
- [2] Metcalf W W, Wanner B L. Gene, 1993, 129:27~32.
- [3] Cheng C, Kwok S F, Bleecker A B *et al.* Science, 1993, 262:539~544.
- [4] Hazelbauer G L, Bery H C, Matsumura P. Cell, 1993, 73:15~22.
- [5] Wanner B L. J Cell Biochem., 1993, 51:47~54.
- [6] Jiang W, Metcalf W W, Lee K-S *et al.* J Bacteriol, 1995, 177:6411~6421.
- [7] Fisher S L, Jiang W, Wanner B L *et al.* J Biol Chem, 1995, 270:23143~23149.
- [8] Ota I M and Varshavsky A. Science, 1993, 262:566~569.
- [9] Wanner B L. Biodegradations, 1994, 5:175~184.
- [10] Maeda T, Wurgler-Murphy S M, Saijo H. Nature, 1994, 369:242~245.