

细菌应激反应中(p)ppGpp 代谢的调控

刘彪 宁德刚*

(江苏大学 环境学院 江苏 镇江 212013)

摘要: (p)ppGpp 是介导细菌细胞对环境胁迫产生应激反应的重要胞内信号, 通过控制一系列重要的细胞活动使细菌得以生存。通过对蓝细菌中(p)ppGpp 代谢的研究, 对(p)ppGpp 作用机制、控制(p)ppGpp 代谢的酶系统、环境胁迫信号传递、细胞中(p)ppGpp 水平的调控及其多样性进行了总结。

关键词: 环境胁迫, 应激反应, (p)ppGpp, 代谢调控

Modulation of (p)ppGpp metabolism during bacterial stringent response

LIU Biao NING De-Gang*

(School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: (p)ppGpp is a well known intracellular signal that mediates bacterial stringent response to environment stresses through the change of its concentration level thus controls many important cellular processes for bacterial survival. In this review, we outline the mechanism of (p)ppGpp action, the enzyme system involved in (p)ppGpp metabolism, and summarize the signal transmission, the regulation and the diversity of (p)ppGpp metabolism. Moreover, we give a brief introduction on our achieved results recently about (p)ppGpp metabolism in cyanobacteria, and predict that a (p)ppGpp new metabolic mechanism different from those known exists in cyanobacteria.

Keywords: Environment stress, Stringent response, (p)ppGpp metabolism, Modulation

细菌为了生存必须快速感知和适应不断变化的生存环境。细胞内 GDP 或 GTP 的衍生物四磷酸或五磷酸鸟嘌呤核苷[(p)ppGpp]的积累所诱导的应激反应是细菌应对环境或营养胁迫的多种策略之一^[1]。细菌细胞内(p)ppGpp 水平的变化可导致一系

列重要生命过程的改变, 如 DNA 复制受阻、rRNA 合成抑制及降解、基因的差别表达以及代谢酶的激活或抑制^[2-3]。(p)ppGpp 对细胞生命活动的调控能产生多种作用效应, 如感知细菌密度、抗生素合成、细胞分化、细菌毒素的产生以及病原菌的致病

性等^[1,4]。因此,环境胁迫导致细菌细胞中(p)ppGpp水平的变化是细菌产生应激反应的重要胞内信号。(p)ppGpp代谢主要由(p)ppGpp合成酶和水解酶控制。(p)ppGpp对细菌细胞生命过程的调控以及生物学功能研究结果已有介绍^[1,5],本文重点介绍(p)ppGpp在细菌细胞内代谢调控的研究进展。

1 (p)ppGpp的作用机制

(p)ppGpp作用靶点是RNA聚合酶。大多数的转录调控因子是通过与启动子或启动子附近区域的结合调控RNA聚合酶(RNAP)的转录功能。但是,(p)ppGpp不需要与调控序列或其他转录调控因子相互作用,而是直接与RNAP结合调控转录。曾经认为(p)ppGpp作用于RNAP的 β , β' , σ^{70} 亚基或 β , β' 亚基。然而,晶体结构分析揭示了(p)ppGpp定位于RNAP催化中心的附近的次级通道中^[6],该通道是聚合反应底物NTP进入的催化中心,以及转录阻滞新合成的RNA与RNAP分离的入口。

结构和功能与转录延伸因子相似,但是,序列明显不同的蛋白DksA,通过稳定(p)ppGpp与RNAP的相互作用提高(p)ppGpp的转录调控功能^[7]。因此,(p)ppGpp单独或与DksA一起通过抑制或激活不同基因的转录,实施基因表达的调控。(p)ppGpp转录抑制作用的一种可能的机制是(p)ppGpp与DksA一起降低RNAP与DNA形成开放复合体的稳定性,从而抑制如rRNA启动子的转录^[8-9];另一种可能的机制是RNAP被(p)ppGpp诱捕在封闭的复合体中,不能启动转录^[10-11]。因此,(p)ppGpp的转录抑制可能通过多种因素的协同作用,在多个水平上发挥调控功能。(p)ppGpp的转录激活作用主要包括直接和间接两种激活机制模型。直接激活模型认为,(p)ppGpp和DksA刺激RNAP与DNA形成稳定开放复合体的速率,但确切的机制还不清楚^[9]。直接机制也可能通过(p)ppGpp促进持家Sigma因子 σ^{70} 与RNAP核心的亲和力而激活转录^[11]。间接激活机制是通过(p)ppGpp激活胞内由其他Sigma因子 σ^S 、 σ^H 、 $\sigma^{N[5]}$ 和 $\sigma^{E[12]}$ 指导的基因转录。(p)ppGpp改变持家Sigma因子 σ^{70} 与RNAP核心的亲和力,并提高其他Sigma

因子与RNAP结合的能力,并由此提出Sigma竞争模式^[13]。由于(p)ppGpp调控不同基因的表达,实现其抑制DNA复制、rRNA合成、不同功能基因差别表达以及代谢酶的激活或抑制,并导致细菌细胞生命活动的改变。

2 细菌中控制(p)ppGpp代谢的酶系统

对细菌中控制(p)ppGpp代谢的酶系统研究主要集中于几种模式菌。在大肠杆菌中,分子量为84 kD的核糖体结合蛋白RelA催化ATP的焦磷酸根基团转移到GTP或GDP核糖的3'羟基合成pppGpp或ppGpp。分子量为79 kD的胞质蛋白SpoT在有 Mn^{2+} 存在时,水解(p)ppGpp 3'位置的二磷酸基团,具有(p)ppGpp水解酶活性和微弱的合成酶活性,在磷源、碳源或脂肪酸和铁等多种营养胁迫时合成(p)ppGpp^[14]。尽管SpoT和RelA具有高度的序列同源性,但RelA仅具有(p)ppGpp合成酶活性。虽然大肠杆菌中应激反应由RelA和SpoT严谨调控,但在其他一些革兰氏阳性菌以及蓝细菌中,染色体上含有单一relA/spoT同源基因,编码具有(p)ppGpp合成酶和水解酶双重功能的RelA/SpoT同源蛋白(RelA/SpoT homologue, RSH)控制(p)ppGpp代谢。在Firmicutes家族成员中,除具有RelA/SpoT同源基因外^[15],最近还发现了具有(p)ppGpp合成酶活性的蛋白^[16-18]。

具有双重功能的SpoT和RSH的活性调控由蛋白中不同的保守结构域控制^[11]。氨基末端具有合成结构域(Catalytic domain, CAD)和水解结构域(Hydrolysis domain, HD),羧基末端有TGS(Threonyl-tRNA Synthetase-GTPase-SpoT proteins, TGS)结构域和ACT(Aspartate kinase-chorismate mutase-TyrA, ACT)结构域。TGS结构域的确切功能尚不清楚,推测可能具有调控与核苷类配体结合的功能;ACT结构域与特异性的配体如核苷酸等结合、调控酶的活性。RelA中有CAD、TGS和CAT,没有HD,因此仅具有合成酶活性。SpoT的氨基酸序列与RelA高度相似,其序列限制合成酶活性但不影响水解酶活性。由于RelA无HD序列可视为特

殊的合成酶, SpoT 为有微弱合成酶活性的水解酶^[1]。

3 具有(p)ppGpp 合成酶活性蛋白对环境胁迫信号的感知

对大肠杆菌中 RelA 感知氨基酸饥饿的机制了解得比较清楚。当氨基酸缺乏时, 非氨酰基化的 tRNA 结合于核糖体的 A 位点阻滞蛋白质的合成, 多肽延伸时核糖体空置反应诱导 RelA 合成 (p)ppGpp^[19]。因此, 通过氨基酸饥饿或加入氨酰 tRNA 合成酶抑制剂可诱导 tRNA 非氨酰化。对 SpoT 感知除氨基酸饥饿外的多种营养胁迫的应激反应所知甚少。最近发现了 SpoT 感知脂肪酸饥饿的机制^[20]: 酰基载体蛋白(ACP)结合于 SpoT 的 TGS 结构域, 细胞中非酰基化 ACP 和酰基化 ACP 的比率可能影响这种结合。因此, 脂肪酸饥饿改变 SpoT 两种催化活性的平衡并导致合成酶活性升高, 积累 (p)ppGpp。SpoT 感知其他营养胁迫的机制可能更为复杂。如磷饥饿时, SpoT 的合成酶活性升高, 细胞积累 (p)ppGpp^[21]; 在磷源充足条件下, 适配蛋白 RssB 将生长稳定期转录因子 σ^S (RpoS) 运送至蛋白酶 ClpXP 并使其降解。但在抗 RssB 的抗适配蛋白 IraP 存在时 RssB 活性被抑制, 阻止 σ^S 被蛋白酶 ClpXP 降解, 因此 IraP 可中和 RssB 并激活 RpoS 循环。磷饥饿时, SpoT 合成 (p)ppGpp, 由此增加 IraP 的转录并提高 σ^S 的稳定性, 并通过激活 σ^S 控制的基因的转录使细胞适应磷饥饿胁迫。

双重功能的 RSH 活性调控可能具有与 RelA 相同的信号感知能力。这种推测被来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的 Rel_{Mtb} 和以嘌呤霉素(Puromycin)处理的核糖体、polU、未负载的 Phe-tRNA 核糖体激活组分的体外研究结果所证实^[22]。尽管核糖体的结构已非常清楚, 但 RelA 或 RSH 与核糖体之间的相互作用所知甚少。RelA 和 Rel_{Mtb} 羧基末端的点突变或缺失突变降低对核糖体空置反应的激活作用, 提示其合成酶活性的激活信号由其亚基的羧基末端传递到氨基末端, 并推测二聚体的形成参与这种激活作用^[23]。

4 细胞内(p)ppGpp 合成酶和水解酶活性的调控

细胞中 (p)ppGpp 水平决定细菌对环境胁迫产生应激反应, 其合成酶和水解酶两种相反催化活性的平衡调节是细菌应激反应的关键。合成酶或水解酶活性的同等水平上调将导致 (p)ppGpp 合成和水解的无效循环^[14]。合成酶活性过高增加 (p)ppGpp 并刺激应激反应, 抑制细胞生长和非必须活性的基因性表达。过量的水解酶使 (p)ppGpp 水平过低, 细胞不能对营养胁迫产生适当的反应。大肠杆菌中由 SpoT 和 RelA 同源蛋白参与的 (p)ppGpp 代谢调控机制已比较清楚。最近对具有双重功能的 RSH 的催化活性的调控也取得进展。

来源于 *Streptococcus equisimilis* 的 (p)ppGpp 合成酶/水解酶 Rel_{Seq} 体外活性分析结果显示, 羧基末端结构域的缺失抑制水解酶活性而激活合成酶活性, 表明 Rel_{Seq} 的水解酶活性位于羧基末端片段 (1-385 aa)^[14]。然而, 相似的缺失并不抑制来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的 Rel_{Mtb} 水解酶活性, 但失去依赖核糖体激活组分的激活作用^[23]。尽管 Rel_{Seq} (1-385 aa) 缺少羧基末端, 但其晶体结构研究发现具有两种互相排斥活性位点: 水解酶活性位点和合成酶活性位点。Rel_{Seq} 由两个非对称单体构成, 并形成水解酶关闭/合成酶打开 (Hydrolase-OFF/synthase-ON) 或水解酶打开/合成酶关闭 (Hydrolase-ON/synthase-OFF) 的二聚体构象, 两种构象的改变代表水解酶和合成酶活性的交互转换。晶体中水解酶和合成酶的活性位点相距 30 埃, 并且具有相同的独立结构域。当处于水解酶打开/合成酶关闭的构象时, 其中一个单体分子的水解酶位点结合特殊的环鸟嘌呤核苷酸 ppG2:3'p, 另一个单体分子的合成酶位点结合 GDP, ppG2:3'p 的存在可能与锁定酶的这种构象有关。因此, 这种二聚体局部和整体构象差异的产生与两种相反催化活性的交互调控状态一致^[23]。

根据诱导适应和双功能 RSH 中相反活性位点之间的分子内别构信号的组合原理, 提出了

(p)ppGpp 合成和降解的调控模式^[23]: 由核苷结合水解结构域引发的构象改变导致合成酶活性关闭, 由合成酶位点到水解酶位点的反向信号途径可能导致水解酶活性关闭。利用可提供焦磷酸的 ATP 类似物作为抑制剂, 抑制其水解酶活性的初步研究结果支持这一推测。与此类似的构象改变可能在信号从空载核糖体/tRNA 到结合 Rel_{seq} 羧基末端结构域的传递过程中具有重要的作用。由于 RSH 与一些病原菌的毒素产生有关, 并且不存在于哺乳动物中, 这种自我调控机制提示, Rel_{seq} 的相反催化活性可用于设计特异的抑制因子干扰不同的活性位点, 因此具有开发成新的抗细菌药物的潜力。

5 细菌中(p)ppGpp 代谢调控的多样性

在已完成基因组测序的细菌中, 都含有 (p)ppGpp 合成酶和水解酶同源基因, 但其组成各不相同。大肠杆菌和所有的 β - 和 γ - 变形菌以 RelA 和 SpoT 合成 (p)ppGpp, SpoT 水解 (p)ppGpp^[24]。Firmicutes 或放线菌家族成员具有 *rsh* 同源基因和 2 个以上具有合成酶活性的基因^[16], 其他细菌如蓝细菌则含有单一的 *relA/spoT* 同源基因^[24]。Firmicutes 家族中各成员的 (p)ppGpp 代谢也存在差异。如 *Bacillus subtilis* 中具有一个编码双功能的 RSH 蛋白的同源基因, 和两个编码产物具有合成酶活性的 *yjbM* 和 *ywaC* 基因。*rsh* 基因缺失突变株可以在正常培养条件下生长, 因此是非必需的; *yjbM* 和 *ywaC* 基因在碱性条件下诱导表达并合成 (p)ppGpp^[16]。但在 Firmicutes 的另一成员 *Staphylococcus aureus* 中, 也含有 1 个 *rsh* 基因和 2 个编码 (p)ppGpp 合成酶的 *relP* 和 *relQ* 基因。在营养丰富培养条件下, *relP* 和 *relQ* 基因中 1 种或 2 种表达产物合成 (p)ppGpp, 并通过 RSH 水解酶活性维持一定水平的 (p)ppGpp。因此, *rsh* 基因是必需基因不能缺失或失活^[17]。

最近, 我们对蓝细菌的模式菌株集胞蓝细菌 PCC6803 中唯一的 *rsh* 基因(*syn-rsh*)的表达产物在 (p)ppGpp 代谢调控中的作用进行了初步研究。互补试验证明 *syn-rsh* 编码产物可使大肠杆菌 *relA-/spoT*

双缺失突变株回复野生型表型, 并在细胞中积累一定水平的 (p)ppGpp; 在实验室培养条件下 *syn-rsh* 不能缺失, 在细胞中可检测到低水平的 (p)ppGpp; 氨基酸饥饿可诱导细胞中 (p)ppGpp 水平升高并维持在相应水平。表明 *syn-rsh* 表达产物具有合成和水解 (p)ppGpp 的双重功能, 一定水平的 (p)ppGpp 是集胞蓝细菌 PCC6803 在实验室生长条件下细胞生长所必需的^[25]。丝状固氮蓝细菌 *Anabaena* PCC7120 中 *rsh* 同源基因具有类似的功能, 并且 (p)ppGpp 与缺氮诱导后的固氮作用和异形胞的分化无关^[26]。因此, 不同类型的细菌具有不同 (p)ppGpp 合成酶和水解酶基因组成以及不同的 (p)ppGpp 代谢调控途径, 甚至相同基因构成的细菌中 (p)ppGpp 代谢也存在差异, 表明其代谢的复杂性与多样性。

6 细菌中(p)ppGpp 代谢的研究展望

尽管对 (p)ppGpp 的研究已有近 40 年的历史, RelA/SpoT 的蛋白结构和 (p)ppGpp 的作用机制等被逐步阐明, 但 (p)ppGpp 的代谢过程及胁迫信号的传递过程仍值得进一步研究。蓝细菌中可能存在不同于已知 (p)ppGpp 代谢调控机制。近来在叶绿体中发现存在 RSH 同源蛋白和合成产物。根据内共生理论, 植物叶绿体中的 *rsh* 基因很可能来源于具有放氧光合作用的蓝细菌。因此, 对蓝细菌中 *rsh* 基因功能的研究对揭示高等植物叶绿体中的 *rsh* 介导的应激反应机制, 以及叶绿体的起源和进化具有重要理论意义; 另外, (p)ppGpp 积累的直接作用结果是抑制细胞生长或导致细胞死亡, 蓝细菌中唯一的 *rsh* 基因的编码产物对 (p)ppGpp 代谢可能具有其他细菌中 RSH 相似的活性调控机制, 以蓝细菌 RSH 为靶点设计并筛选特异的 (p)ppGpp 水解酶活性位点的抑制因子, 对控制日益严重的蓝藻水华具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] Potrykus K, Cashel M. (p)ppGpp: still magical[J]? Annu Rev Microbiol, 2008, 62: 35–51.
- [2] Touloukhonov II, Shulgina I, Hernandez VJ. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA

- polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the β' -subunit[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 1220–1225.
- [3] Srivatsan A, Wang JD. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(2): 100–105.
 - [4] Braeken K, Moris M, Daniels R, et al. New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology[J]. *Trends Microbiol*, 2006, 14(1): 45–54.
 - [5] Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*[J]. *Trends Microbiol*, 2005, 13(5): 236–242.
 - [6] Artsimovitch I, Patlan V, Sekine SI, et al. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp[J]. *Cell*, 2004, 117(3): 299–310.
 - [7] Perederina A, Svetlov V, Vassilyeva MN, et al. Regulation through the secondary channel–structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription[J]. *Cell*, 2004, 118(3): 297–309.
 - [8] Paul BJ, Barker MM, Ross W, et al. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP[J]. *Cell*, 2004, 118(3): 311–322.
 - [9] Paul BJ, Berkmen MB, Gourse RL. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(22): 7823–7828.
 - [10] Potrykus K, Vinella D, Murphy H, et al. Antagonistic regulation of *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter activity by GreA and DksA[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(22): 15238–15248.
 - [11] Maitra A, Shulgina I, Hernandez VJ. Conversion of active promoter–RNA polymerase complexes into inactive promoter bound complexes in *E. coli* by the transcription effector, ppGpp[J]. *Mol Cell*, 2005, 17(6): 817–829.
 - [12] Costanzo A, Ades SE. Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, σ^E , by guanosine 3', 5'-bispyrophosphate (ppGpp)[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(13): 4627–4634.
 - [13] Jishage M, Kvint K, Shingler V, et al. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(10): 1260–1270.
 - [14] Mechold U, Murphy H, Brown L, et al. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel_{Seq}, the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(11): 2878–2888.
 - [15] Wolz C, Geiger T, Goerke C. The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes[J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(2/3): 142–147.
 - [16] Nanamiya H, Kasai K, Nozawa A, et al. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*[J]. *Mol Microbiol*, 2008, 67(2): 291–304.
 - [17] Geiger T, Goerke C, Fritz M, et al. Role of the (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of *Staphylococcus aureus*[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(5): 1873–1883.
 - [18] Lemos JA, Lin VK, Nascimento MM, et al. Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*[J]. *Mol Microbiol*, 2007, 65(6): 1568–1581.
 - [19] Haseltine WA, Block R. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70(5): 1564–1568.
 - [20] Battesti A, Bouveret E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism[J]. *Mol Microbiol*, 2006, 62(4): 1048–1063.
 - [21] Bougdour A, Gottesman S. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31): 12896–12901.
 - [22] Avarbock D, Avarbock A, Rubin H. Differential regulation of opposing RelMtb activities by the aminoacylation state of a tRNA-ribosome-mRNA-RelMtb complex[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(38): 11640–11648.
 - [23] Avarbock A, Avarbock D, Teh JS, et al. Functional regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase/hydrolase activities of Rel_{Mtb} from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(29): 9913–9923.
 - [24] Mittenhuber G. Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins)[J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, 3(4): 585–600.
 - [25] 缪小刚, 徐卫东, 宁德刚. 集胞藻 PCC6803 中 *relA/spoT* 同源基因 *syn-rsh* (*slr1325*) 的鉴定[J]. *微生物学报*, 2011, 51(7): 898–905.
 - [26] Ning D, Qian Y, Miao X, et al. Role of the *all1549* (*ana-rsh*) gene, a *relA/spoT* homolog, of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120[J]. *Curr Microbiol*, 2011, 62(6): 1767–1773.