

细菌自然转化的分子机制研究进展

孙东昌¹, 张衍梅^{1, 2*}, 施跃峰¹

¹浙江省植物有害生物防控重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021

²Department of Pathology, University of Virginia, Charlottesville 22908, USA

摘要: 自然环境中, 具备自然转化能力的细菌可以自发地从外界获取 DNA, 从而获得新的遗传性状。为能够自然地转化, 细菌需首先建立一个被称作感受态的生理状态并在此状态下表达 DNA 摄取和加工相关的基因。DNA 摄取基因的表达产物可组装一个能将外源 DNA 摄入细胞质的蛋白复合物。在细胞质中, 进入的 DNA 可同基因组 DNA 发生同源重组或建立一个独立的质粒。一般 DNA 摄入细胞的过程可分为两个阶段, 即从外部基质到细胞周质和跨细胞内膜的转运。近年来, 包括作者在内的研究人员发现大肠杆菌中存在新的自然质粒转化模式。本文将首先综述近年来细菌自然转化的分子机制, 随后简要介绍大肠杆菌中独特的自然质粒转化模式。

关键词: DNA 摄取, 感受态, 自然转化, 质粒转化, 大肠杆菌

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001 - 6209 (2012) 01 - 0006 - 06

在自然条件下, 细菌能够主动摄取外源 DNA 并将其稳定遗传, 该过程被称作自然转化 (natural transformation)。自 1928 年 Griffith 首次发现肺炎链球菌转化以来, 细菌自然遗传转化现象已在多种细菌中发现。获取外源 DNA 的细菌通常形成了新的遗传性状, 例如抗药性和致病性^[1-4]。

细菌自然转化是一个受基因控制的生理状态, 具备摄取外源 DNA 能力的细胞被称作感受态细胞^[5]。自然转化广泛地存在于细菌和古菌中。目前, 人们已经鉴定出 70 多种不同种类的细菌具备自然转化能力^[6], 其中包括革兰氏阳性菌枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus*

pneumoniae) 以及革兰氏阴性菌奈瑟氏淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)。

在多数具备自然转化能力的细菌中 (如肺炎链球菌), 感受态是一个短暂的状态^[7]; 而在另外一些情况中, 感受态存在于细菌 (如奈瑟氏淋球菌) 的整个生命周期^[8]。自然转化不同于人工转化, 因为后者需要热激和钙离子诱导或电击。在基因工程应用上, 为将外源基因整合到基因组 DNA (包括基因敲除), 一般需采取自然转化的方式导入基因; 而在构建含目标基因的重组质粒时, 则需采取人工转化的方式将质粒 DNA 转入细胞。在以下的介绍中, 我们

基金项目: 国家自然科学基金 (31100071); 浙江省自然科学基金 (Y3110237); 浙江省农业科学院博士启动基金; 浙江省农业科学院前瞻性项目基金; 浙江省“重中之重学科建设”开放基金

* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-86404070; E-mail: yanmeizhang81@yahoo.com

作者简介: 孙东昌 (1982 -), 男, 湖北广水人, 博士, 微生物遗传学和药学研究。Tel/Fax: +86-571-86404070; E-mail: sundongchang@yahoo.com

收稿日期: 2011-06-05; **修回日期:** 2011-07-10

将主要讨论细菌自然转化。

为应对外界压力, 不同种类的细菌进化出它们各自独立的方式控制感受态的建立, 从而调控获取外源 DNA 的过程^[1, 9-11]。例如, 在受到抗生素(如氟喹诺酮)的刺激下, 革兰氏阳性菌肺炎链球菌形成细菌自然感受态^[12]; 而在革兰氏阴性菌霍乱弧菌中, 壳聚糖可诱导感受态建立^[10]。由于细菌在各自差异巨大的生境中应对的压力条件大不相同, 感受态调控机制通常呈现多样性。而在细菌自然转化过程中, 这些不同的感受态调控通路却控制着高度同源的 DNA 摄取和加工相关的基因表达^[1, 10-11]。

1 细菌转化中的感受态调控

当枯草芽胞杆菌开始进入平台生长期或者从营养丰富培养基转移至营养贫瘠培养基中, 它便开始形成自然转化感受态, 并且该状态将维持一段时间^[9]。在枯草芽胞杆菌感受态建立时, 由 *comX* 基因编码的信息素 ComX 通过双组分系统将感受态信号传递至细胞内^[9]。当 ComX 积累到一定程度时, ComX 与细胞膜蛋白 ComP 结合并导致 ComP 磷酸化, 接着磷酸化的 ComP 将磷酸基团转移至其效应蛋白 ComA; 然后磷酸化的 ComA 可启动阻遏蛋白 ComS 表达, 从而阻止转录因子 ComK 降解使得 ComK 得以积累^[13]; 最后 ComK 识别相应功能基因的启动子区(被称作 ComK box) 从而起始 DNA 摄取和加工相关基因的转录^[9]。与枯草芽胞杆菌感受态建立的时间不同, 肺炎链球菌在对数生长期建立短暂的感受态^[7]。肺炎链球菌的感受态信息素 CSP (Competence-Stimulating Peptides) 由 *comC* 基因编码, 在对数生长期分泌; CSP 积累到一定程度后可结合膜蛋白 ComD 并使之磷酸化, 磷酸化的 ComD 将磷酸基团传递给 ComE 使之能够激活 sigma 因子 ComX 的编码基因转录^[14-15], 最终 ComX 识别功能基因的启动子区特异序列(被称作 ComX box) 并起始这些基因的转录^[16]。

在肺炎链球菌和枯草芽胞杆菌中, 两种感受态调控通路存在进化上的差异。首先, 在肺炎链球菌中, 感受态基因转录依赖于选择性 sigma 因子 ComX; 而在枯草芽胞杆菌中, 转录调节因子 ComK

参与枯草芽胞杆菌感受态调控^[1]。其次, 虽然在肺炎链球菌和枯草芽胞杆菌中感受态信号都是通过双组分系统传递, 但是这两种细菌的双组分系统的构成却毫无关联^[1]。另外, 在分泌到肺炎链球菌细胞外之前, 通过剪切前导肽未成熟的 CSP 加工成熟; 而在枯草芽胞杆菌中, 无活性的感受态信息素 ComX 不仅需要被剪切成为成熟的形式, 还需要经过翻译后的修饰才具备活性^[1]。

革兰氏阴性菌流感嗜血杆菌的感受态建立受转录调节因子 Sxy 和 cAMP 受体蛋白 CRP (cAMP Receptor Protein) 共同调控^[11]。流感嗜血杆菌从营养丰富的培养基转移至营养贫瘠的培养基时, 细胞饥饿信号分子 cAMP 浓度将增高, 从而激活其受体蛋白 CRP。在流感嗜血杆菌感受态操纵子的启动子区上存在一段特殊的 CRP 结合位点, 其核心序列为 TGCGAA^[11]。在 Sxy 的作用下, 激活的 CRP 结合其在靶标基因的启动子上的作用位点(该位点因此被称作 CRP-S), 从而起始相关感受态基因的转录。这些感受态基因的编码产物承担着 DNA 摄取和加工的任务, 并可将摄入的外源 DNA 整合到细菌基因组上^[11]。

2 细菌自然转化过程中的 DNA 摄取

无论在革兰氏阳性菌还是在革兰氏阴性菌中, 感受态调控因子都通过起始保守的晚期感受态基因转录的方式影响自然转化过程。这些晚期感受态基因的编码产物执行 DNA 结合、摄取和加工的任务, 从而协助 DNA 跨越细胞外膜 (Outer Membrane, OM, 仅存在于革兰氏阴性菌) 和细胞内膜 (Inner Membrane, IM)。部分 DNA 进入细胞后被整合为细菌自身的遗传物质^[5]。DNA 摄入细胞的过程可分为两步, 即跨越外膜的 DNA 摄取 (DNA uptake) 和跨越内膜的 DNA 转运 (DNA translocation)^[17]。

2.1 跨越外膜的 DNA 摄取

DNA 摄取的第一步是识别和结合外源 DNA。在流感嗜血杆菌中, 携带 9 碱基对核酸序列 (5'-AAGTGGGT-3') 的 DNA 能够被选择性地摄入到细胞周质中, 该特异序列被称作摄取信号序列 (Uptake Signal Sequence, USS)^[18]。据推测, DNA 摄取的偏

好性可能由细胞外膜上能够识别 USS 的受体所决定。然而,至今尚未有任何有关 USS 受体的报道。现有观点认为外源 DNA 可能经由外膜蛋白 ComE (或 PilQ) 或其同源蛋白进入细菌细胞周质^[19-20]。其中,外膜蛋白 PilQ 中腔的直径约为 6 nm^[21-22],理论上能够容纳直径为 2.4 nm 的双链 DNA 进入。此外,一组被称作伞毛或假伞毛的蛋白同时参与四型伞毛 (Type IV Pili, T4P) 的组装/解组和 DNA 摄取^[23]。在 T4P 的介导下, DNA 同膜受体蛋白 ComEA 相互作用以便进行下一步的转运。

2.2 跨越内膜的 DNA 转位

接着, DNA 从膜周质往细胞质中转移。进入细胞周质的 DNA 同内膜受体蛋白 ComEA 相互接触后, ComEA 将双链 DNA 呈递给核酸降解酶 EndA, 从而降解双链 DNA 中的一条单链; 另外一条互补的单链则经由多次跨膜的内膜蛋白 ComEC/Rec-2 (ComEC 和 Rec-2 高度同源) 组成的通道进入细胞质^[24-27]。在肺炎链球菌的 DNA 跨内膜转位过程中, 来自双链 DNA 的一条单链以 3'-5' 的方向进入细胞质, 而其互补的单链 DNA 则是以相反的方向被降解^[25, 28-29]。因为单链 DNA 进入和其互补链的降解速率相同且二者几乎同时进行, 所以人们认为这两个事件应相互关联^[25, 28-30]。实验证据表明在流感嗜血杆菌和肺炎链球菌的自然转化过程中, DNA 无法进入内膜通道蛋白 ComEC/Rec-2 缺失的突变株中^[25, 27]。生物信息学分析表明供 DNA 跨越内膜转运的通道可能由两个 ComEC 单体所组成^[26]。这些实验证据和生物信息学分析暗示 ComEC/Rec-2 很可能是外源 DNA 穿越内膜进入细胞质的通道。但是, 直接支持上述推测的证据仍然缺失。因为在大肠杆菌中过量表达 ComEC/Rec-2 及其同源蛋白造成细胞毒性^[31], 所以至今我们仍然无法通过生物化学和生物物理学手段进一步分析野生型 ComEC/Rec-2 蛋白的特性。在 ATP 结合蛋白 ComFA 的协助下, 单链 DNA 被转运至细胞质中^[32]。随后, 进入细胞质的单链 DNA 被单链 DNA 保护蛋白 DprA 保护, 以防止核酸酶的降解。

3 大肠杆菌中独特的自然质粒转化模式

长期以来, 人们一直认为广泛应用于基因工程

和分子生物学研究的大肠杆菌仅在非生理条件下可被动地接受外源 DNA, 从而实现人工转化。近年来, 包括笔者在内的研究人员的结果表明处于自然状态的大肠杆菌也能够获取外源质粒 DNA^[33-35]。笔者及其同事发现平台生长期大肠杆菌经静置培养后, 能够在固体琼脂培养基表面完成质粒转化过程^[33]; 加入 DNA 酶可完全抑制质粒转化; 转化感受态的建立不受热激和冰浴等条件诱导, 而受琼脂浓度和固体基质表面细菌密度等因素影响^[33-34]。此外, 提高二价阳离子 (如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等) 浓度对质粒转化没有显著影响^[34]。

笔者及其同事调查大肠杆菌 DNA 摄取机制的研究结果证明大肠杆菌自然质粒转化不依赖保守的供单链 DNA 摄取的分子装置, 表明质粒 DNA 进入大肠杆菌的途径不同于传统 DNA 摄取途径^[34]。在肺炎链球菌自然质粒转化过程中, 因为来自两个不同供体质粒的互补单链 DNA 经保守的 DNA 摄取装置介导进入细胞后重新建立新的质粒, 所以供体质粒浓度和转化速率之间呈现二级动力学的特性。笔者及其同事的研究表明在大肠杆菌自然质粒转化过程中, 质粒浓度和转化速率之间呈现一级动力学特性; 因此在大肠杆菌获取外源质粒 DNA 的过程中, 来自单个质粒的双链 DNA 应跨越细菌内膜和外膜进入细胞^[34]。相应地, 细菌中应存在一条供双链 DNA 进入的通道。

Maeda 等人的研究结果表明, 通过某种信息素的诱导和细胞间的接触, 质粒 DNA 可以在大肠杆菌之间转移^[35]。因为加入 DNA 酶可抑制质粒转化, 所以该过程中质粒应以转化的方式进入细胞^[35]。然而, 仍不清楚诱导质粒转化的信息素的分子本质及相应质粒转移的分子途径。在大肠杆菌中, 质粒也可通过细胞间形成的纳米管道跨膜转移^[36]。上述过程中质粒对 DNA 酶的加入并不敏感^[36], 因此笔者认为质粒通过纳米管运输的方式不属于转化。

4 展望

为适应生存环境, 细菌采取不同的感受态调控策略激活保守的 DNA 摄取装置。尽管分子生物学、遗传学和生物信息学等手段让我们了解到组装这套

保守 DNA 摄取装置的蛋白复合物的基本特性,但是我们对于这套装置如何摄取 DNA 的详细过程仍然知之甚少。对于 DNA 跨越细胞外膜的过程,我们无法判定是否存在 DNA 摄取信号的受体蛋白,因此仍不清楚 DNA 摄取信号究竟如何介导 DNA 进入细胞。在 DNA 跨越细胞内膜的过程中,至今仍无法解释为何一条单链 DNA 的进入必须伴随着其互补链的降解,也无法明确单链 DNA 经由高度保守的内膜通道蛋白实现跨膜转运的详细过程。笔者认为,深入阐明 DNA 跨越外膜和内膜的分子机制将仍然是今后研究细菌自然转化的主要方向。此外,在某些较特殊的自然质粒转化过程中,存在不经保守的 DNA 摄取装置进入细胞的机制^[33-35]。这些非经典的 DNA 进入通路还有待进一步的探索。

参考文献

- [1] Claverys JP, Prudhomme M, Martin B. Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, 2006, 60:451-475.
- [2] Elwell LP, Shipley PL. Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Annual Reviews of Microbiology*, 1980, 34:465-496.
- [3] Foster TJ. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiological Reviews*, 1983, 47:361-409.
- [4] Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Reviews of Biochemistry*, 2009, 78:119-146.
- [5] Dubnau D. DNA uptake in bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, 1999, 53:217-244.
- [6] Johnsborg O, Eldholm V, Havarstein LS. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 2007, 158: 767-778.
- [7] Claverys JP, Martin B, Polard P. The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33: 643-656.
- [8] Biswas GD, Thompson SA, Sparling PF. Gene transfer in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1989, 2 Suppl:S24-28.
- [9] Dubnau D. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 1991, 55:395-424.
- [10] Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu CY, Schoolnik GK. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science*, 2005, 310:1824-1827.
- [11] Redfield RJ, A Cameron D, Qian Q, Hinds J, Ali TR, JS Kroll, PR Langford. A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 347: 735-747.
- [12] Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 2006, 313:89-92.
- [13] Turgay K, Hahn J, Burghoorn J, Dubnau D. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *The EMBO Journal*, 1998, 17:6730-6738.
- [14] Havarstein LS, Gaustad P, Nes IF, Morrison DA. Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Molecular Microbiology*, 1996, 21:863-869.
- [15] Pestova EV, Havarstein LS, Morrison DA. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Molecular Microbiology*, 1996, 21:853-862.
- [16] Luo P, H Li, Morrison DA. ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 2003, 50:623-633.
- [17] Kruger NJ, Stingl K. Two steps away from novelty - principles of bacterial DNA uptake. *Molecular Microbiology*, 2011, 80:860-867.
- [18] Danner DB, Deich RA, Sisco KL, Smith HO. An eleven-base-pair sequence determines the specificity of DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Gene*, 1980, 11:311-318.
- [19] Drake SL, Koomey M. The product of the *pilQ* gene is essential for the biogenesis of type IV pili in *Neisseria gonorrhoeae*. *Molecular Microbiology*, 1995, 18: 975-986.
- [20] Dougherty BA, Smith HO. Identification of *Haemophilus influenzae* Rd transformation genes using cassette mutagenesis. *Microbiology*, 1999, 145:401-409.

- [21] Parge HE, Forest KT, Hickey MJ, Christensen DA, Getzoff ED, Tainer JA. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature*, 1995, 378:32–38.
- [22] Collins RF, Davidsen L, Derrick JP, Ford RC, Tonjum T. Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183:3825–3832.
- [23] Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews in Microbiology*, 2004, 2:241–249.
- [24] Inamine GS, Dubnau D. ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177:3045–3051.
- [25] Bergé M, Moscoso M, Prudhomme M, Martin B, Claverys JP. Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 2002, 45:411–421.
- [26] Draskovic I, Dubnau D. Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Molecular Microbiology*, 2005, 55:881–896.
- [27] Barouki R, Smith HO. Reexamination of phenotypic defects in *rec-1* and *rec-2* mutants of *Haemophilus influenzae* Rd. *Journal of Bacteriology*, 1985, 163:629–634.
- [28] Méjean V, Claverys JP. Polarity of DNA entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 1988, 213:444–448.
- [29] Méjean V, Claverys JP. DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268:5594–5599.
- [30] Puyet A, Greenberg B, Lacks SA. Genetic and structural characterization of *endA*, a membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 213:727–738.
- [31] Daley DO, Rapp M, Granseth E, Melen K, Drew D, Heijne GV. Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science*, 2005, 308:1321–1323.
- [32] Takeno M, Taguchi H, Akamatsu T (2011) Role of ComFA in controlling the DNA uptake rate during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111:618–623.
- [33] Sun D, Zhang Y, Mei Y, Jiang H, Xie Z, Liu H, Chen X, Shen P. *Escherichia coli* is naturally transformable in a novel transformation system. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 265:249–255.
- [34] Sun D, Zhang X, Wang L, Prudhomme M, Xie Z, Martin B, Claverys JP. Transforming DNA uptake gene orthologs do not mediate spontaneous plasmid transformation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191:713–719.
- [35] Etchuuya R, Ito M, Kitano S, Shigi F, Sobue R, Maeda S. Cell-to-cell transformation in *Escherichia coli*: a novel type of natural transformation involving cell-derived DNA and a putative promoting pheromone. *PLoS One*, 2011, 6:e16355.
- [36] Dubey GP, Ben-Yehuda S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 2011, 144:590–600.

Advances in the molecular mechanism of natural bacterial transformation—A review

Dongchang Sun¹, Yanmei Zhang^{1, 2*}, Yuefeng Shi¹

¹ State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

² Department of Pathology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908, USA

Abstract: Naturally transformable bacteria are able to take up DNA to acquire new genetic traits in the environment. To be naturally transformed, bacteria need to establish a physiological state, called natural competence, in which DNA uptake and processing genes are expressed. DNA uptake proteins assemble a complex to pull exogenous DNA into the cytoplasm where it can recombine with the genome DNA or establish as a plasmid. In general, DNA uptake of bacteria could be divided into two stages: DNA is transported from the milieu to the periplasm at the first stage (for Gram-negative bacteria) and is translocated across the inner membrane at the second stage. Our work and other studies revealed new plasmid DNA transformation modes in *Escherichia coli*. Here, we first reviewed recent advances in the molecular mechanism of natural transformation and then described the distinctive plasmid transformation mode in *E. coli*.

Keywords: DNA uptake, competence, natural transformation, plasmid transformation, *Escherichia coli*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (31100071), by the Natural Science Foundation of Zhejiang province (Y3110237), by the Doctor's Start-up Grant from Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, by the Foresight Program from Zhejiang Academy of Agricultural Sciences and by the Zhejiang Open Foundation of the Most Important Subjects

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-86404070; E-mail: yanmeizhang81@yahoo.com

Received: 5 June 2011/Revised: 10 July 2011

勘 误

发表在《微生物学报》2011年第51卷第7期第876—890页中的文章“南海北部陆坡神狐海域HS-PC500岩心微生物多样性”出现了两处错误。(1)第886页中有2大段内容重复;(2)第886页中右栏第5行,“β-变形菌”应为“δ-变形菌”。特此更正,请读者谅解!

目前,已经更正了《微生物学报》网刊上的内容,国内外各大数据库也会陆续进行更正。

第一作者:焦露; 责任作者:苏新
中国科学院微生物研究所联合编辑部
2011年12月