

综述

磷酸酶在病原菌感染寄主中的作用

朱培, 李鑫强, 李振轮

西南大学资源环境学院 土壤无机-有机-生物界面相互作用实验室, 重庆 400716

朱培, 李鑫强, 李振轮. 磷酸酶在病原菌感染寄主中的作用. 生物工程学报, 2012, 28(2): 154-163.

Zhu P, Li XQ, Li ZL. Roles of phosphatases in pathogen infection: a review. Chin J Biotech, 2012, 28(2): 154-163.

摘要: 磷酸酶不仅在生物体正常细胞进程中具有重要作用, 而且在病原菌与寄主相互作用中也起着至关重要的作用。目前, 国内外在革兰氏阴性病原菌通过其Ⅲ型分泌系统 (Type III secretion system, TTSS) 分泌磷酸酶到寄主细胞以调控寄主免疫和扩大病原性方面研究较多, 而在病原真菌逃避寄主免疫方面则报道很少。本课题组研究发现昆虫病原真菌绿僵菌分泌的一种胞外酪氨酸蛋白磷酸酶在体外能特异地使蝗虫体液免疫信号转导物质去磷酸化, 暗示可能影响蝗虫的免疫防御。以下着重从磷酸酶的分类及其在病原菌感染寄主中的作用研究等方面进行综述, 以期为进一步研究磷酸酶的作用提供参考。

关键词: 磷酸酶, Ⅲ型分泌系统, YopH, SptP, SopB, OspF

Roles of phosphatases in pathogen infection: a review

Pei Zhu, Xinqiang Li, and Zhenlun Li

Laboratory of Soil Mineral-Organic-Biological Interfacial Interaction, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Phosphatases play a key role not only in cell physiological functions of an organism, but also in host-pathogen interactions. Many studies demonstrated that some Gram-negative pathogenic bacteria could evade host immunity and promote pathogenicity by injecting phosphatases into host cells through type III secretion system. However, there were few reports about pathogenic fungi evading the immunity of hosts. Our researches indicated that the entomogenic fungus *Metarhizium anisopliae* could dephosphorylate the signal transduction substance of locust humoral immunity specifically *in vitro* by secreting extracellular protein tyrosine phosphatase, which implied that the fungus might interfere with the immune

Received: June 7, 2011; **Accepted:** August 26, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871630), Natural Science Foundation of Chongqing, China (No. CSTC 2009BB1292), the “211” Ecology National Key Discipline of Southwest University.

Corresponding author: Zhenlun Li. Tel: +86-23-68251249; Fax: +86-23-68250444; E-mail: lizhlun4740@sina.com.cn

国家自然科学基金 (No. 30871630), 重庆市自然科学基金 (No. CSTC 2009BB1292), 西南大学生态学重点学科“211工程”建设平台资助。

defense of locust. To provide reference for further studies of the functions of phosphatases, we reviewed the types of phosphatases and their roles in pathogen infection.

Keywords: phosphatase, type III secretion system, YopH, SptP, SopB, OspF

自然界中,植物和动物持续暴露在大量的微生物中,其中不乏病原菌。病原菌侵染寄主并通过消耗寄主营养、破坏寄主组织结构、分泌毒素、干扰代谢等损伤甚至致死寄主^[1-2]。但病原菌侵染寄主的过程并非一帆风顺,它们要克服寄主产生的一系列防御反应。而寄主体内某些信号蛋白的可逆磷酸化是寄主调节信号转导产生防御反应的重要途径之一^[3]。并且信号蛋白磷酸化与去磷酸化之间的平衡决定了它的活性强度与持久度,而可逆磷酸化的水平是由相对特异的蛋白激酶与磷酸酶的相互作用决定的^[3-6]。如果病原菌侵入寄主后,能分泌出一些特定的酶,如磷酸酶等,改变寄主体内的信号转导物质的磷酸化状态,就能调节寄主的代谢、繁殖、免疫等重要的生命过程,打乱寄主的防御体系,从而有利于病原菌的侵入、定殖、快速繁殖和扩散,并大规模开发寄主细胞功能为进行侵染服务,以扩大病原性,甚至导致寄主很快死亡。目前,国际上在革兰氏阴性病原菌通过其Ⅲ型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)分泌细菌蛋白到寄主细胞以调控寄主免疫和扩大病原性方面研究较多,而在病原真菌逃避寄主免疫方面则报道很少。我国对磷酸酶的研究则主要集中在磷酸酶在生物体正常细胞进程中的作用,关于磷酸酶在病原菌侵染寄主中的作用研究较少。基于以上原因,本文着重对磷酸酶的分类及其在病原菌侵染寄主中的作用研究进行综述,以期为进一步系统研究

磷酸酶的作用提供参考。

1 磷酸酶的分类

基于底物不同可将磷酸酶分为:非特异性磷酸酶,可以催化水解几乎所有的磷酸酯键;蛋白磷酸酶(Protein phosphatases, PPase),以磷酸蛋白和磷肽为底物。非特异性磷酸酶基于它们作用的最适 pH 可被分为碱性和酸性磷酸酶。PPase 种类较多,其功能主要是作用于蛋白质上的磷酸丝氨酸(Phosphate serine, pSer)、磷酸苏氨酸(Phosphate threonine, pThr)及磷酸酪氨酸(Phosphate tyrosine, pTyr),使其去磷酸化。根据功能不同,通常将 PPase 分为丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶、酪氨酸蛋白磷酸酶。

1.1 非特异性磷酸酶

1.1.1 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP, EC3.1.3.1)

AP 是一种能水解磷酸单酯化合物、ATP、焦磷酸化合物,底物专一性较低的磷酸单酯水解酶(Orthophoric monoester phosphohydrolase)。AP 为含锌的糖蛋白,最适 pH 为 7.6~9.9,几乎存在于除高等植物以外的所有生物体,且异源 AP 在分子量、编码序列、等电点、存在方式、免疫反应性、底物及抑制剂、参与细胞代谢过程、酶比活力等方面表现出异质性。研究表明, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 几乎可以作为 AP 的普遍激活剂^[7-8],而 Hg^{2+} 、 KH_2PO_4 、EDTA、DFP 等均为 AP 的抑制剂。而且,所有金属螯合剂如 EDTA

都是酶活性的可逆抑制剂。通常情况下,二硫苏糖醇和 β -巯基乙醇也抑制酶的活性。

1.1.2 酸性磷酸酶 (Acid phosphatase, AcP, EC3.1.3.2)

AcP 是一种在酸性条件下水解各种磷酸酯键的酶,分为低分子量 AcP 和高分子量 AcP,根据它们对抑制剂酒石酸的耐受性可分为酒石酸敏感性 AcP 和酒石酸抗性 AcP。

酒石酸抗性磷酸酶 (Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP, TRAcP) 是一类相互关联的金属酶,目前分离到的所有 TRAcP 具有相似的物理和酶学性质。TRAcP 的特异底物为芳香族有机物如 pNPP、pTyr 及含有磷酸基团的核苷二磷酸和核苷三磷酸。磷脂脂肪族有机物如磷酸腺苷酸、pSer 和 pThr 不被水解^[9]。TRAcP 的酸性磷酸酶活性被磷酸盐、钼、锌、铜、氟化物、钒、砷、钨和维生素 C 抑制。反应产物磷酸盐和它的类似物钒酸盐、砷酸盐、钼酸盐引起竞争抑制。氟化物、钨酸盐、铜、锌引起非竞争抑制。酶可被弱还原剂激活,如 β -巯基乙醇。维生素 C 协同铁离子、锰和镁对 TRAcP 有激活作用。

1.2 蛋白磷酸酶

1.2.1 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (Serine/threonine protein phosphatase, EC3.1.3.16)

丝氨酸/苏氨酸 PPase 为含金属酶,通过一个金属活性的亲核水分子,使底物在单反应步骤中脱磷酸。丝氨酸/苏氨酸 PPase 由 PPP 和 PPM 两类结构截然不同的基因家族编码,目前发现的主要有 PPP 家族的 PP1、PP2A、PP2B; PPM 家族的 PP2C 以及 PPX 等。两家族磷酸酶序列不同,但蛋白构象相似,全酶由 N-末端的催化结构域与 C-末端调节与结合域组成。研究发现,金属螯

合剂、软海绵酸、冈田酸 (Okadaic acid, OA)、互变霉素、蓝绿藻类代谢物、FK506、环孢菌素、ARCK-1、磷酶等可抑制丝氨酸/苏氨酸 PPase 活性^[10]。

1.2.2 酪氨酸蛋白磷酸酶 (Protein tyrosine phosphatase, PTPs, EC3.1.3.48)

PTPs 基于功能、结构和序列的不同,可分为 3 个主要的亚家族:酪氨酸特异性、双特异性 (DSPs) 及低分子量磷酸酶 (LMPTPs)。酪氨酸特异性磷酸酶严格识别含 pTyr 蛋白质,可分为受体型 PTPs 和胞浆型 PTPs; DSPs 识别含 pTyr、pSer、pThr 蛋白底物,包括 MAP 激酶 MAPs、细胞周期调控磷酸酶 Cdc25、肿瘤抑制子 PTEN。PTPs 超家族为不含金属酶类,通过半胱氨酸磷酸酶中间体来催化脱磷反应。其标志是催化区的活性位点序列 (H/I) C (X) 5R (S/T) (X 代表任意氨基酸),又被称为 PTPs 标志基序^[11]。对耶尔森氏菌属 *Yersinia* 病原菌 PTP、PTP1B、VH 和低分子量磷酸酶的催化机制的研究显示,所有的 PTPs 具有相同的催化机制^[11],即在 PTPs 催化区的标志基序中,Cys 残基作为亲核中心,与底物形成一个硫磷酸共价酶中间物,恒定的 Arg 残基则参与结合底物和稳定转换状态,保守的 Asp 残基作为弱酸,为底物解离的基团提供质子,有助于磷酸的形成,接下来,Asp 残基作为弱碱,催化酶中间物 Cys-P 水解^[12]。

2 磷酸酶的作用

2.1 磷酸酶在生物体正常细胞进程中的作用

AP 和 AcP 在生物体新陈代谢过程中对磷酸根进行循环利用,二者可在脊椎动物的骨化过程中发挥重要作用^[13]。另外,AP 还可作为生化试

剂、基因工程工具酶、疾病监测指标等。在微生物中, AP 不仅参与磷的代谢, 其诱导型 AP 基因还是相关基因的转录调控因子, 因此对细胞的生长和代谢起着非常重要的作用。AcP 在生物体内分布很广, 动物、植物、微生物中广泛存在, 与细胞间物质转运、磷酸基团转移反应、物质代谢、能量转化以及信号转导等有关。此外, 在磷饥饿胁迫条件下, 植物分泌 AcP 至根系外, 分解土壤中有有机磷化合物, 释放无机磷, 供植物吸收、利用, 对于提高土壤有机磷的有效性具有重要的现实意义^[14]。

丝氨酸/苏氨酸 PPase 是最初被认为具有重要生理功能的一类 PPase, 因为当细胞受到刺激后, 丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化占蛋白质结合磷酸总量的 97%

以上^[15]。而后的研究发现, PTPs 在植物细胞中参与黑暗胁迫、脱落酸 (Abscisic acid, ABA)^[16]、水杨酸 (Salicylic acid, SA)^[17]、脱氢抗坏血酸 (Dehydroascorbate, DHA)^[18]等诱导气孔关闭的信号途径及水分胁迫信号传递调节^[16]; 同时 PTPs 在动物细胞信息传递中也起着重要的作用^[19-20]。

2.2 磷酸酶在病原菌感染寄主中的作用

病原菌侵入寄主后, 主要通过消耗寄主营养、干扰代谢、破坏寄主组织结构和分泌毒素等来杀死寄主。病原菌侵入寄主后, 寄主体内的营养物质就成为其唯一营养来源。这不仅是病原菌在寄主体内增殖生长的基础, 也是寄主死亡的重要原因。然而, 某些病原菌并不能直接吸收利用寄主体内许多营养物质 (如病原真菌不能利用昆虫血腔中大量的有机磷等), 必须分泌相应的

水解酶类将其酶解成小分子后, 方可吸收利用。Vincent 等^[21]发现蚱蜢感染球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 后血淋巴中的 AcP 活性大大增加。Xia 等^[22-24]的研究表明, 绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 侵入昆虫血液后, 会分泌酸性磷酸酶到寄主体内, 降解昆虫血液中的有机磷, 产生无机磷, 从而为绿僵菌在昆虫体内繁殖与生长提供磷营养。

许多侵染动物和植物的革兰氏阴性细菌具有一种向寄主细胞定向分泌细菌蛋白的 TTSS。研究发现, 这个系统向寄主细胞定向分泌激酶或磷酸酶等具有调节代谢能力的蛋白。这些蛋白通过改变寄主体内那些在信号传导过程中有重要作用的蛋白的磷酸化状态, 从而更改寄主的免疫功能并有利于病原菌在寄主体内的定殖、繁殖和传播以提高致病性。病原菌的激酶或磷酸酶进入寄主体内, 使病原菌能直接干扰寄主体内的信号传导途径。当进入寄主体内的激酶或磷酸酶作用靶标后, 由于级联放大作用, 其影响会迅速扩大。目前, 在沙门氏菌属 *Salmonella*、志贺氏菌属 *Shigella* 和耶尔森氏菌属 *Yersinia* 病原菌中已经发现了这种 TTSS。而且, 在寄主细胞内也找到了由细菌分泌进去的 PTPases、肌醇磷酸酶和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。

2.2.1 酪氨酸蛋白磷酸酶: YopH

由 *Yersinia* 毒性质粒编码的一种酪氨酸蛋白磷酸酶 YopH, 它最先被确定为毒力决定因子^[25-26]。YopH 包含一个与分泌、转移和陪伴绑定有关的结构域, 一个与典型真核细胞信号传导蛋白一致的富脯氨酸 SH3-结构中心, 一个与真核细胞的 PTPs 催化结构域同源的碳末端结构域^[26-28]。同真核细胞的 PTPs 一样, 当 YopH

中保守的 Cys-残基 (C403S/S) 突变后, 其 PTPs 活性丧失。

Yersinia 逃避寄主细胞防御的一种机制是阻止寄主巨噬细胞的噬菌作用。*Yersinia* 通过 *Yersinia* outer proteins (Yops) 破坏上皮细胞和巨噬细胞肌动蛋白细胞骨架, 使寄主细胞消化细菌的能力降低^[29]。YopH 通过 TTSS 分泌到寄主巨噬细胞内, 通过 Fc 受体和补体受体 (CR) 脱磷酸化而抑制其信号传导活性, 从而抑制巨噬细胞的噬菌作用^[29], 而且还控制上皮细胞中的侵袭素含量。另外, Sauvonnet 等^[30]发现了 YopH 在 *Yersinia* 致病机理中的另一新作用。YopH 通过使寄主 3-磷酸肌醇激酶通路失活阻止 T 细胞增殖, 并且下调 MCP-1mRNA 编码从而抑制巨噬细胞的补给, 提高致病性。

用培养上皮细胞作为模型研究发现, YopH 能使 p130Cas 和 paxillin 蛋白脱磷酸化^[31-33], 这两种蛋白与肌动蛋白细胞骨架衔接相关, 而且 p130Cas 在细胞骨架与信号物质连接中有着重要作用^[34]; 还能使酪氨酸激酶激活黏附激酶 (FAK) 脱磷酸化^[31]。

目前, 对于 YopH 是怎么防止 *Yersinia* 被巨噬细胞吸收的机理还不太清楚。一种观点是 YopH 通过细菌外层的膜蛋白侵袭素与细胞 β 1 结合域共同作用, 从而抑制吸收媒介的活性^[31,35]。在这个模型中, 侵袭素的结合刺激了细胞靶标的酪氨酸残基磷酸化, 导致细胞骨架重新分布。但这个模型也有一些争议。当侵袭素或者与侵袭素相应的物质增加时, 作为 YopH 作用底物的 paxillin 和 p130Cas 并没有产生酪氨酸残基脱磷酸化。而且鼠疫耶尔森氏菌 *Y. pestis* 并不表达侵

袭素。因此, 在 *Y. pestis* 中 YopH 抑制巨噬细胞的噬菌作用机制还不清楚。

2.2.2 另一种酪氨酸蛋白磷酸酶蛋白: SptP

由 *Salmonella* 菌致病性岛 1 和 2 (*Salmonella* pathogenicity island 1 and 2, SPI-1 and SPI-2) 编码的 TTSS 对于 *Salmonella* 菌致病寄主及在巨噬细胞中增殖起重要作用, SPI-1 编码的 TTSS 蛋白对于鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium* 感染肠上皮细胞十分重要^[36-37], 例如, 具有 PTPs 活性的 TTSS 蛋白 SptP。另外, Humphreys 等^[38]研究发现, SptP 通过使寄主细胞 AAA+ATPaseVCP 脱磷酸化促进其在细胞内的复制。在伤寒沙门氏菌 *S. typhi* 和副伤寒沙门氏菌 *S. paratyphi* 的基因组上都能找到与 SptP 同源的序列。SptP 的碳末端 PTPs 结构域与 YopH 和真核生物 PTPs 的催化结构域同源, 但不具有寄主特异性。与 YopH 一样, 当 SptP 的 PTPs 活性催化域的保守 Cys-残基 (C481S) 被突变后, 其磷酸酶活性完全丧失。

很有趣的是 SptP N-末端与 *Yersinia* spp. 的 YopE^[39-40]和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的外毒素 S (ExoS)^[41]同源。*P. aeruginosa* 的外毒素 S (ExoS) 与破坏寄主细胞骨架相关。就 SptP 而言, 这个保守域对破坏寄主肌动蛋白细胞骨架是重要的。研究发现, SptP 在体外具有激活 GTPase 的功能。GTPase 在细胞骨架形成动力、Rac 和 Cdc42 中起着重要作用。这个活性是独立于 PTPase 活性之外的^[42]。这暗示着 SptP 激活 GTPase 的功能可以通过 Rac 和 Cdc42 向下游传递信号, 使 *Salmonella* 侵入寄主后, 寄主的肌动蛋白细胞骨架重新构建, 帮助维持寄主细胞的生存发育能力。基于 ExoS 和 YopE 与 SptP 结

构相似,也许 ExoS 和 YopE 也有激活 GTPase 的功能。

2.2.3 肌醇磷酸酶

研究发现,都柏林沙门氏菌 *S. dublin* 能够转移肌醇磷酸酶 SopB 进入寄主。SopB 是肠病发生的根本原因。*S. typhimurium* 分泌的 SigD 蛋白与 *Shigella* spp. 分泌的 IpgD 蛋白和 *S. dublin* 分泌的 SopB 高度同源^[43]。在 *S. typhi* 和 *S. paratyphi* 基因组中可以扩增到与 SigD 高度同源的保守序列。这表明 SopB/SigD 蛋白在发病机理中起重要作用。尽管 SopB/SigD 蛋白是由中心异构体 25 致病性岛编码的,但它还是通过中心异构体 63 TTSS^[43]分泌。当 *S. dublin* 侵入人肠道上皮细胞并分泌 SopB 蛋白后,其脱磷酸化产生的 1,4,5,6-四磷酸肌醇将激发 3-磷酸肌醇激酶依赖性的信号传导,从而使肠上皮细胞 Ca^{2+} 水平提高^[44]。当定点突变真核生物 4-磷酸酶 2 个保守结构域的 1 个 Cys-残基 (C481S) 后,磷酸酶活性和 1,4,5,6-四磷酸肌醇的含量水平都会降低^[45]。

用小牛肠道环状感染模型研究证明,侵袭诱导的流体分泌量和白细胞量的提高都是依赖分泌具有活性的 SopB 蛋白。在体外, SopB 显示出非常广泛的底物特异性。它能水解 3,4,5,6-四磷酸肌醇和肌醇磷脂酰磷酸盐上任一位置的磷酸根。如果 SopB 在体内也像这样水解这些底物,那么寄主中的许多信号传导途径将被打乱,包括那些影响细胞生存和细胞内膜运输的调节途径。

2.2.4 磷酸化苏氨酸裂解酶: OspF 效应分子家族

丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinases, MAPKs) 是细胞内的一种丝氨酸

/苏氨酸蛋白激酶,在细胞内具有生物进化的高度保守性。所有的 MAPKs 激酶活性环内都包含一个保守的 Thr-X-Tyr 保守序列,并且激酶的活性需要 Thr 和 Tyr 共同磷酸化。MAPKs 在哺乳动物中至少存在 3 条信号通路:细胞外信号调节蛋白激酶 (Extracellular signal-regulated kinases, ERKs) 通路、p38 激酶通路、c-Jun N-末端激酶 (JNK) 通路,它们通过转录因子磷酸化而改变基因的表达水平,参与调控植物和动物的先天性免疫、生长、增殖、分化凋亡及细胞间功能同步等多种生命过程^[46-47],并且经常成为病原菌效应分子的作用靶标。

Li 等^[48]报道了来源于多种 TTSS 致病病原菌的一个效应分子家族——OspF、SpvC、HopAI1,这类效应分子能够特异地、不可逆地去磷酸化寄主 MAPK 激酶并使其失活进而阻断或调节寄主免疫相关信号通路^[46],增强病原性。弗氏志贺氏菌 *S. flexneri* 感染 HeLa 细胞和 Caco-2 细胞的分析结果显示, OspF 使 MAPKs、ERK1/2 和 p38 失活,阻断 H3pS10 中 Ser 残基的磷酸化,从而选择性抑制 NF- κ B 依赖基因的表达,如趋化因子 IL8 的表达。通过分析一系列 *Shigella* 缺失突变体,发现 OspF 在 ERKs 和 p38 失活中必不可少。通过对 MAPKs 的脱磷酸化, OspF 抑制 MAPK 依赖基因的表达^[46]。对重组蛋白进行串联质谱分析发现,在抑制 MAPK 激酶通路激活的过程中 OspF 具有磷酸化苏氨酸裂解酶活性,该酶活性在此之前从未报道。OspF 家族成员包括来自于动物病原菌 *Salmonella* 的 SpvC 和来自植物病原菌丁香假单胞菌 *P. syringae* 的 HopAI1 都具有这种酶活性。与其他蛋白磷酸酶不同的是,磷酸苏氨酸裂解酶产生一个修饰苏氨酸残基而不是自

由羟基。这种化学修饰阻止了 Thr 残基的再次磷酸化^[48]。

3 磷酸酶在病原菌侵染寄主中的地位与作用展望

病原细菌通过 TTSS 向寄主细胞分泌特定酶,如磷酸酶等,打乱寄主免疫防御,促进其病原性。对这些充满魅力的毒力因子的进一步研究是要阐明它们是如何影响寄主细胞的。通过鉴定这些毒力蛋白在寄主体内的相应靶标,将有助于研究揭示出寄主信号传导途径是怎么被打乱的,以及这些毒力因子在致病机理中所起的作用。在越来越多的病原微生物中发现 TTSS,暗示会发现越来越多的转移磷酸酶。由于已经从耶尔森氏菌属 *Yersinia*、沙门氏菌属 *Salmonella* 和志贺氏菌属 *Shigella* 病原菌中发现的蛋白毒力因子与真核生物激酶和磷酸酶显著同源,一个令人关注的问题是这些蛋白起源在哪里,又是怎么进化的。肌醇磷酸酶 SigD/SopB 的发现也是非常引人入胜的,特别是它进入磷脂的信号传导途径,及 OspF 效应分子家族特异性不可逆地脱磷酸化 MAPKs,将对寄主细胞的诸多生理功能产生关键的调控作用。病原细菌通过界面直接干扰寄主的信号传导途径,修改寄主体内蛋白的磷酸化水平,从而强有力地迅速瓦解寄主的防御,并大规模地开发寄主细胞功能来为病原细胞进行侵染服务。

目前,人们对于病原菌与寄主相互作用研究多局限在病原细菌,对于病原真菌尤其磷酸酶在病原真菌与寄主互作中作用的研究则很少报道。有研究报道,侵染人的巴西副球霉菌

Paracoccidioides brasiliensis 通过改变 β -葡聚糖为 α -葡聚糖能逃避人体细胞免疫^[49]。Wang 和 Leger^[50]发现绿僵菌在烟草天蛾幼虫 *Manduca sexta* 血淋巴中的虫菌体表面表达了一种胶原蛋白 (MCL1),将虫菌体表面具有免疫原性的细胞壁组成成分,如 β -1,3 葡聚糖,保护起来,避免由寄主产生的吞噬和包埋等细胞免疫作用。Li 等^[51-53]以金龟子绿僵菌蝗变种 *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* CQMa102 菌株为研究材料,用酪蛋白从液体培养基中诱导、分离、纯化出一个新的胞外酪氨酸蛋白磷酸酶。其 pI 为 9.45,热稳定性及 pH 稳定性都很好,酶活性高,并证明该 PTPase 在体外能改变其寄主(蝗虫)血淋巴中与信号传导相关蛋白 (Toll-Like receptor) 和与功能蛋白转运相关蛋白 Trans-Golgi p230 磷酸化状态,进而可能影响寄主体液免疫。然而目前尚无明确结论,还需深入研究。

目前国际上关于磷酸酶在病原菌侵染寄主中的作用研究还处于积累阶段,国内的研究更少。因此,该方面的许多未知领域将会吸引着无数学者进行更多的相关研究,随着研究的深入,人们将会揭示病原菌打乱寄主细胞信号传导途径、逃避寄主防御的分子机制,有助于防御病原菌的侵染。

REFERENCES

- [1] Liang ZQ. Biodiversity of entomogenous fungi. *Chin Biodivers*, 1996, 4(4): 235-241.
梁宗琦. 虫生真菌的多样性. *生物多样性*, 1996, 4(4): 235-241.
- [2] Qiu WF. *Extensive Mycology*. Beijing: Science Press, 1998: 837-939.

- 裘维藩. 菌物学大全. 北京: 科学出版社, 1998: 837-939.
- [3] Bartels S, González Besteiro MA, Lang D, et al. Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(6): 322-329.
- [4] Östman A, Böhmer FD. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(6): 258-266.
- [5] Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 2000, 103(2): 221-225.
- [6] Liu SR, Liu HQ, Qi ZT, et al. Protein kinase and protein phosphatase in cell proliferation and differentiation. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2004, 25(5): 550-552.
刘善荣, 刘厚奇, 戚中田, 等. 蛋白激酶与蛋白磷酸酶在细胞增殖分化中的机制研究. *第二军医大学学报*, 2004, 25(5): 550-552.
- [7] Stec B, Holtz KM, Kantrowitz ER. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *J Mol Biol*, 2000, 299(5): 1303-1311.
- [8] Zappa S, Rolland JL, Flament D, et al. Characterization of a highly thermostable alkaline phosphatase from the Euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4504-4511.
- [9] Cheung CK, Panesar NS, Haines C, et al. Immunoassay of a tartrate-resistant acid phosphatase in serum. *Clin Chem*, 1995, 41(5): 679-686.
- [10] Shi JX, Shi Q. Recent development of studies on protein phosphatases and inhibitors. *Sect Clin Biochem Lab Med Foreign Med Sci*, 2005, 26(5): 281-284.
石继祥, 施杞. 蛋白磷酸酶及其抑制剂研究近况. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26(5): 281-284.
- [11] Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, 42: 209-234.
- [12] Pannifer ADB, Flint AJ, Tonks NK, et al. Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by X-ray crystallography. *J Biol Chem*, 1998, 273(17): 10454-10462.
- [13] Rao NM, Nagaraj R. Anomalous stimulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase activity in guanidinium chloride. *J Biol Chem*, 1991, 266(8): 5018-5024.
- [14] Huang Y, Zhang HW, Xu FS. Research progress on plant acid phosphatases. *J Huazhong Agric Univ*, 2008, 27(1): 148-154.
黄宇, 张海伟, 徐芳森. 植物酸性磷酸酶的研究进展. *华中农业大学学报*, 2008, 27(1): 148-154.
- [15] Shenolikar S. Protein serine/threonine phosphatases—new avenues for cell regulation. *Ann Rev Cell Biol*, 1994, 10: 55-86.
- [16] Xing Y, Wang YQ, Zhang SQ, et al. Protein tyrosine phosphatase maybe effect on the accumulation of ABA and involve in signal transference of water stress of plant cell. *Chin Sci Bull*, 2003, 48(4): 369-374.
邢宇, 王幼群, 张蜀秋, 等. 酪氨酸蛋白磷酸酶可能影响 ABA 的积累和参与植物细胞水分胁迫信号传递. *科学通报*, 2003, 48(4): 369-374.
- [17] Yang GH, Che YM, Shi WL, et al. Involvement of protein tyrosine phosphatase in signal transduction of salicylic acid regulated stomatal movement of *Vicia faba* L. *Plant Physiol Commun*, 2007, 43(1): 81-84.
杨国辉, 车永梅, 石武良, 等. 酪氨酸蛋白磷酸酶 (PTPase) 参与水杨酸调控蚕豆气孔运动的信号转导. *植物生理学通讯*, 2007, 43(1): 81-84.
- [18] Fan DP, Shi YC, Liu WQ. Involvement of protein tyrosine phosphatase in signal pathway of dehydroascorbate. *Plant Physiol Commun*, 2009, 45(9): 843-846.
范邓鹏, 石永春, 刘卫群. 酪氨酸蛋白磷酸酶参与脱氢抗坏血酸的信号途径. *植物生理学通讯*, 2009, 45(9): 843-846.
- [19] Zhu XZ, Yu YZ, Fang YM, et al. Overexpression of Shp-2 is associated with the unlimited growth and

- apoptosis resistance of p210 bcrabl-mediated chronic myeloid leukemia. *Natl Med J China*, 2005, 85(27): 1903–1906.
- 朱旭贞, 虞瑛姿, 方永明, 等. 酪氨酸蛋白磷酸 2 高表达对 p210bcr/abl 诱导的慢性粒细胞白血病细胞增殖与凋亡抵抗的影响. *中国医学杂志*, 2005, 85(27): 1903–1906.
- [20] Zhao XT, Zhang Z. The role of protein tyrosine phosphatases involved in Shp-2 in the formation of the neuromuscular junction. *Natl Med J China*, 2006, 86(15): 1052–1056.
- 赵晓涛, 张正. 含 Shp-2 的酪氨酸蛋白磷酸酶在神经肌肉接头形成中的作用. *中华医学杂志*, 2006, 86(15): 1052–1056.
- [21] Vincent MJ, Miranpuri GS, Khachatourians GG. Acid phosphatases activity in haemolymph of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, during *Beauveria bassiana* infection. *Ent Exp Appl*, 1993, 67(2): 161–166.
- [22] Xia YX, Dean P, Judge AJ, et al. Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Insect Physiol*, 2000, 46(9): 1249–1257.
- [23] Xia YX, Clarkson JM, Charnley AK. Acid phosphatases of *Metarhizium anisopliae* during infection of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Arch Microbiol*, 2001, 176(6): 427–434.
- [24] Xia YX, Clarkson JM, Charnley AK. Trehalose-hydrolysing enzymes of *Metarhizium anisopliae* and their role in pathogenesis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Invertebr Pathol*, 2002, 80(3): 139–147.
- [25] Bölin I, Wolf-Watz H. The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription. *Mol Microbiol*, 1988, 2(2): 237–245.
- [26] Guan KL, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science*, 1990, 249(4968): 553–556.
- [27] Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(4): 1315–1352.
- [28] Sory MP, Boland A, Lambermont I, et al. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(26): 11998–12002.
- [29] Adkins I, Köberle M, Gröbner S, et al. *Yersinia* outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int J Med Microbiol*, 2007, 297(4): 235–244.
- [30] Sauvonnet N, Lambermont I, van der Bruggen P, et al. YopH prevents monocyte chemoattractant protein 1 expression in macrophages and T-cell proliferation through inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Microbiol*, 2002, 45(3): 805–815.
- [31] Persson C, Carballeira N, Wolf-Watz H, et al. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130^{Cas} and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. *EMBO J*, 1997, 16(9): 2307–2318.
- [32] Black DS, Bliska JB. Identification of p130^{Cas} as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J*, 1997, 16(10): 2730–2744.
- [33] Black DS, Montagna LG, Zitsmann S, et al. Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol Microbiol*, 1998, 29(5): 1263–1274.
- [34] Panetti TS. Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130^{CAS}: effects on cell spreading and migration. *Front Biosci*, 2002, 7: d143–d150.
- [35] Mogemark L, McGee K, Yuan M, et al. Disruption of target cell adhesion structures by the *Yersinia* effector YopH requires interaction with the

- substrate domain of p130^{Cas}. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84(4): 477–489.
- [36] Papezova K, Gregorova D, Jonuschies J, et al. Ordered expression of virulence genes in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Folia Microbiol*, 2007, 52(2): 107–114.
- [37] Gong H, Su J, Bai Y, et al. Characterization of the expression of *Salmonella* type III secretion system factor PrgI, SipA, SipB, SopE2, SpaO, and SptP in cultures and in mice. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 73.
- [38] Humphreys D, Hume PJ, Koronakis V. The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(3): 225–233.
- [39] Forsberg A, Wolf-Watz H. The virulence protein Yop5 of *Yersinia pseudotuberculosis* is regulated at transcriptional level by plasmid-pIB1-encoded *trans*-acting elements controlled by temperature and calcium. *Mol Microbiol*, 1988, 2(1): 121–133.
- [40] Forsberg A, Wolf-Watz H. Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol*, 1990, 172(3): 1547–1555.
- [41] Kulich SM, Yahr TL, Mende-Mueller LM, et al. Cloning the structural gene for the 49-kDa form of exoenzyme S (ExoS) from *Pseudomonas aeruginosa* strain 388. *J Biol Chem*, 1994, 269(14): 10431–10437.
- [42] Fu YX, Galán JE. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, 1999, 401(6750): 293–297.
- [43] Hong KH, Miller VL. Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J Bacteriol*, 1998, 180(7): 1793–1802.
- [44] Eckmann L, Rudolf MT, Ptasznik A, et al. D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(26): 14456–14460.
- [45] Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, et al. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol*, 1997, 25(5): 903–912.
- [46] Shan LB, He P, Sheen J. Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell Host Microbe*, 2007, 1(3): 167–174.
- [47] Colcombet J, Hirt H. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochem J*, 2008, 413(2): 217–226.
- [48] Li HT, Xu H, Zhou Y, et al. The Phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science*, 2007, 315(5814): 1000–1003.
- [49] Borges-Walmsley MI, Chen DL, Shu XH, et al. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*, 2002, 10(2): 80–87.
- [50] Wang CS, Leger RJ St. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6647–6652.
- [51] Li ZL, Wang ZK, Peng GX, et al. Purification and characterization of a novel thermostable extracellular protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(8): 1961–1968.
- [52] Li ZL, Wang ZK, Peng GX, et al. Regulation of extracellular acid phosphatase biosynthesis by culture conditions in entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *Ann Microbiol*, 2007, 57(4): 565–570.
- [53] Li ZL, Wang CT, Xia YX. Isolation of two locust protein targets of a protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *J Invertebr Pathol*, 2008, 99(2): 151–155.