

植物病原细菌的双组分传导系统

何晨阳 饶军华 王金生

(南京农业大学植保系, 南京 210014)

病原细菌与寄主植物之间建立成功的寄生关系是一个动态的信息交流过程。病菌的双组分传导系统是对环境信号, 尤其是植物特定成分以及有关条件的识别, 并且能有效传递, 改变基因表达, 进而对环境信号作出反应的因子。双组分传导系统只是复杂调节网络中一部分, 广泛存在于细菌中^[1]。典型双组分传导系统由一个感受蛋白和一个调节蛋白组成。感受蛋白的 C 末端约 250 个氨基酸有明显同源性, 而调节蛋白的 N 末端约 120 个氨基酸高度保守。

感受蛋白直接或间接地感受环境信号刺激而自发磷酸化, 并将磷酸转移到特定调节蛋白的天冬氨酸残基上。磷酸化调节蛋白能改变其调节功能^[2]。本文对根癌土壤杆菌双组分传导系统和其它病菌中决定对寄主植物的致病性和对非寄主植物致敏性的 hrp 基因调控系统研究结果加以综述。

1 根癌土壤杆菌 VirA/VirG 系统

1993-04-06 收稿

根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 一些菌株毒性基因 (Vir) 调节子至少有 8 个操纵子组成 (VirA, B, C, D, E, F, G, H), 通过植物伤口分泌物成分专化性诱导能激活双组分调控蛋白 (VirA, VirG), 这些分泌物一般为酚类和单糖类化合物^[3,4] (图 1)。

VirA 和 VirG 是所有其它 Vir 诱导必需的正向调节蛋白^[5], 在氨基酸水平上与其它双组分调控蛋白同源。VirA 在 III 区与感受蛋白 (CheA, NtrB, EnvZ) 同源, VirG 在 N 端与调节蛋白 (CheY, NtrC, OmpR) 同源。

染色体基因也与植物信号对 Vir 基因诱导有关。ros 专化性地反向调节 VirC 和 VirD 基因, chvD 位点与环境胁迫作出反应的 VirG 基因表达有关, chvE 位点编码一种糖结合蛋白, 将单糖信号给 VirA, misA 位点编码了 tRNA-异戊烯转移酶, 减弱 Vir 基因活化, chvA,

chvB, exoC (pscA) 与涉及对植物吸附的环 β -1, 2 葡聚糖合成和运输有关。

1.1 VirA 蛋白

VirA 可能是一种膜转移蛋白, 因为在 N 末端有 2 个约 91kd 疏水序列, C 末端为细胞质内序列残基。在大肠杆菌中已将缺失了不同长度 N 末端 VirA 氨基酸基因序列融合到 lacZ 启动子上, 发现只有当 VirA 第一个疏水区缺失后, 才能检测到过量产生的蛋白。平截的 VirA 细胞质 C 端在体外具有一种 ATP 专化性的自发磷酸化活性, 可以使所有其它感受蛋白保守的组氨酸 474 磷酸化。组氨酸 474 变成谷氨酸 474 时产生一种非磷酸化的 VirA 蛋白^[6]。VirA 可分为 I、II、III、IV 4 个区段 (图 2)。

I 区 VirA 蛋白周质部分的外部信号感受区, 利用周质糖结合蛋白 chvE 来感受糖分子, 但不能感受酚类化合物^[7]。该区 15 个氨基

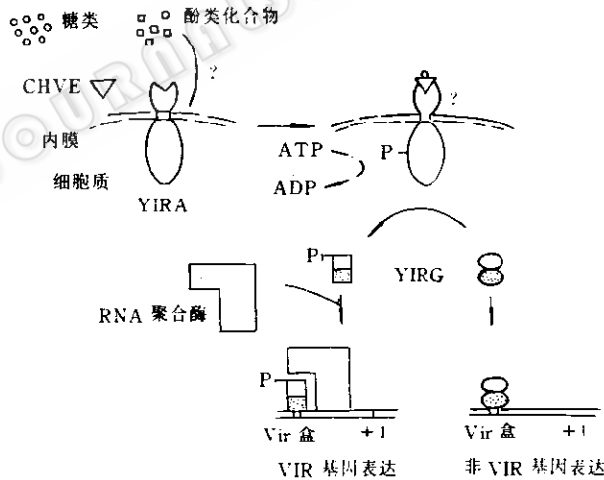


图 1 根癌土壤杆菌 VirA/VirG 信号传递途径活化的模式

酸延伸区与大肠杆菌中起糖结合蛋白作用的 Trg 蛋白一个区同源, 后者是一种细菌趋化性信号传导分子。糖和乙酰丁香酮对 Vir 诱导有协同作用, 因为这两种物质单独存在时, 即使在低浓度下, 也只能低水平地诱导 Vir 表达^[8]。

这表明, 糖结合蛋白 chvE 与 VirA I 区作用后, 对酚类化合物更敏感。但有趣的是, 当 VirA 周质区缺失后, 即使在低浓度的乙酰丁香酮作用下, 也能更加活跃地诱导 Vir 基因表达。

II 区 细胞质区段 N 末端部分, 影响

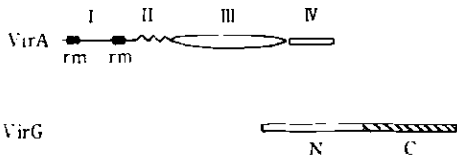


图2 根癌土壤杆菌 VirA/VirG 蛋白区域结构

VirA 蛋白 C 末端激酶活性^[6]。作为中间桥梁，该区与将信号从周质传到激酶区有关。它也可以用于直接或间接地检测乙酰丁香酮，但至今尚不清楚乙酰丁香酮是直接与 VirA 作用，还是通过一个未知受体与 VirA 作用。

IV 区 是 VirA 中与 VirG 互作位点，与 VirG 蛋白 N 末端具有同源性。但缺失该序列后，对 Vir 基因诱导影响并不明显。认为 IV 区对 Vir 基因诱导并不重要。

1.2 VirG

VirG 蛋白既无疏水区，又无信号肽序列，一般认为是一种胞质蛋白。然而，只有少数 VirG 蛋白是可溶的，而大多数蛋白在内膜上，可能是这部分 VirG 蛋白与内膜上 VirA 蛋白有关。在 ATP 存在时，VirA 能使 VirG 磷酸化，VirA 上组氨酸 474 的磷直接转移到 VirG 上天冬氨酸 52 位点上。如果天冬氨酸 52 磷酸化位点发生突变，VirA 对 VirG 的磷酸化作用丧失，VirG 对 Vir 基因调节子的功能也同样丧失^[9]。

VirG 是激活 Vir 基因的一个关键分子。它在低 pH 和低磷条件下表达增强，VirG 基因有两个启动子能独立地对低 pH 和低磷信号起反应。作为一个转录活化子，VirG 蛋白有一个序列专化性的 DNA 结合区 [10]，能保护中间含有 12bp 的一致序列的区域（亦称 Vir 盒）。所有 Vir 基因的启动子都有这种一致序列。每个启动子需要一个 Vir 盒用于 VirA/VirG 介导的诱导^[11]。对 VirG 所结合的最小 DNA 分析表明，在 Vir 盒 3' 端至少需要增加 9 个非一致残基序列。VirG C 端与 Vir 盒 DNA 片段结合，可以增加其亲和力，但并不改变它对 DNA 结合

的专化性。因为非磷酸化的 VirG 虽然也能结合 Vir 盒序列，但却不能在体内激活 Vir 基因表达^[12]。

磷酸化促进了 VirG 和 RNA 聚合酶的互作。一旦磷酸化的 VirG 通过其 C 端结合到 Vir 基因启动子上，N 端就与 RNA 聚合酶互作，将 RNA 聚合酶转移到 Vir 启动子上^[13]。试验已证明，① Vir 基因启动子缺少一个通常情况下能为 δ^{70} 识别的 -35 区，VirG 识别位点于 -60 区，接近 -35 区。② Vir 基因体外表达需要 δ^{70} RNA 聚合酶，ATP 和磷酸化的 VirA 和 VirG，③ 与 VirA/VirG 与大肠杆菌感受渗透压有关的 EnvA/OmpR 类似。④ VirG 与 δ' 因子和 FixJ 的 -35 结合区同源。

2 病原细菌 hrp 基因调控系统

已从其它植物病原细菌中鉴定出 hrp 基因簇，它决定了对寄主植物的致病性和对非寄主植物致敏性^[14]，同时也分离出诸如胞外降解酶、胞外多糖、毒素和激素基因^[15]。对这些致病相关基因表达调控研究表明，一些基因表达受到寄主植物合成化合物的诱导，一些调节基因则与双组分调控系统基因同源^[15]。

2.1 丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)

丁香假单胞菌大多数 hrp 基因是成簇排列的，一般为 20kb 大小，至少有 7 个互补群，在不同致病变种中保守。将 hrp 基因簇转入非致病的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)，后者获得了致敏性^[16]。

对大豆致病变种 (*P. syringae* pv. *glycinea*) 无毒基因表达的研究发现，hrp 基因参与了品种专化性过敏性反应。无毒基因可在病叶和简单培养基中表达，而不能在复合培养基中表达；在复合培养基中加入大豆叶片提取物也不能诱导表达；在简单培养基中加入三羧酸循环中间产物，诱导受到抑制。hrp 基因发生突变，在病叶和简单培养基中诱导 avrB 能力减弱。显然，hrp 基因簇中的一些基因与对环境信号作出反应的基因调控有关^[17]。

菜豆致病变种 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) hrp 基因簇右端 hrp S. R 编码了

二种蛋白,与NtrC蛋白具有序列相似性,调节着其它的hrp基因^[18]。基因簇左端的hrpL也具有对其它hrp基因调控的功能。与在植株内相比,在低渗透压培养基中hrp操纵子的表达方式有些差别,认为植物专化性信号分子与之有关。因为在低渗透培养基中或在一定碳源存在时,大多数hrp基因的诱导表达水平相当高,而调节基因hrpSR和hrpL被诱导水平很低,但后者在植株内诱导水平很高。表明该系统中发生了两种水平的信号,即高渗透势对于由植物专化性信号所引起的诱导进一步加强是必需的。但目前尚不清楚这类植物信号性质特征。

有趣的是,丁香致病变种(*P. syringae* pv. *syringae*)丁香毒素的产生需要syrB基因诱导表达,而syrB是由植物提取物所诱导的。这些提取物包括了酚类 β 糖苷化合物,如对苯二酚糖苷,七叶苷,水杨苷等^[19]。虽然尚不清楚hrp基因是否调控着丁香素的产生,但有人推测该系统中可能与双组分传导系统有关。

2.2 梨火疫病欧文氏菌 (*Erwinia amylovora*)

该病菌hrp基因簇约40kb,至少有6个互补群,引入到大肠杆菌或非植物病原菌中,能使受体在不同植物上引起过敏反应。该hrp基因簇与丁香假单胞(*P. syringae*)中hrp基因同源,其中与hrpS同源的片段所编码的蛋白序列与hrpS基因蛋白序列相似度达40%^[20]。梨火疫病欧文氏菌hrp基因在25℃下,pH5.5的简单培养基中表达最高。另外用启动子探针(MudII PR3)分离到了受植物提取物诱导的基因,其中大多数与致病性有关。

2.3 青枯假单胞菌 (*P. solanacearum*)

用转座子Tn5已从病菌中产生了hrp和dsp基因突变体,其中23kb的hrp定位于大质粒上,其它的hrp和dsp基因簇分布在基因组上^[21]。其中一个hrp基因簇的表达受到马铃薯薯愈伤组织中低分子量化合物的诱导。

2.4 黄单胞杆菌 (*Xanthomonas*)

在野油菜黄单胞杆菌辣椒致病变种(*X. campestris* pv. *vesicatoria*)中发现了一个至少

有6个互补群、长约25kb的hrp基因簇,与其它致病变种的DNA有很高同源性,表明该hrp基因在野油菜黄单胞杆菌中是保守的。

在甘兰致病变种(*X. campestris* pv. *campestris*)和莴苣致病变种(*X. campestris* pv. *vitians*)中克隆的DNA与青枯假单胞菌大质粒编码的hrp基因簇同源^[21]。它们在复合培养基中不能表达,但可以在植株中,或被植物悬浮培养液中热稳定的。分子量小的亲水因子所诱导^[22]。也有研究表明,甘兰致病变种一个hrp基因表达受到小萝卜叶片诱导,但尚不清楚是否与双组分调控系统有关。

用寡核酸探针已鉴别出甘兰致病变种的二对基因,编码了与双组分调控系统同源的蛋白^[23]。诱变其中一对调控基因引起了多效性表型,改变了胞外多糖的产生,但对致病性无影响。另外研究表明,一个由7个基因组成的基因簇(rpf基因簇)调控了与病程相关的胞外酶和多糖的合成,对其中rpfC测序,发现了一个与感受蛋白和调节蛋白区段同源蛋白质产物^[24]。

3 结语

植物信号对病原细菌致病基因的诱导现象是普遍存在的。在一些系统中双组分信号系统起了很重要的作用。

植物病原细菌基因表达系统必须适应有效的环境信号感受机制。根癌土壤杆菌只有感受到植物受伤位点后,Vir基因才能表达,这种表达需要低pH、低磷、单糖或酚等特殊条件,但这些因子都不能单独有效地诱导Vir基因。

hrp基因簇在对植物信号作出反应时才能表达的特征,类似于根癌土壤杆菌中控制Vir调节子表达的VirA/VirG。因此,植物病原细菌利用双组分调控系统,是为了介导和调节几个不同的过程对环境信号作出反应。这反映出感受蛋白/调节蛋白对不同区段结合所表现出来的多效性功能。

参 考 文 献

- [1] Ronson C W, Xicon B T, Ausubel F M. Cell. 1987. 49.

- 579-581.
- [2] Albright L M, Huala, E, Ausubel, F. M. *Annu. Rev. Genet.* 1989, **23**: 311-316.
- [3] Hess K M., Dudley M W, Lynn D G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **88**: 7854-7858.
- [4] Ankenbauer R G, Nester E W. *J. Bacteriol.* 1990, **172**: 6443-6446.
- [5] Rogowsky P M, Close, t L Chimera J A. *J Bacterio.* 1987, **169**: 5101-5112.
- [6] Jin S, Riotsch T Ankenbauer R G. *J Bacteriol.* 1990, **172**: 525-530.
- [7] Melchers L S, Regensburg-Tuink, T J G, Bourret, R. *EMBO. J.* 1989, **8**: 1919-1925.
- [8] Cangelosi, G AA, Ankenbauer R G, Nester E W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**: 6708-6712.
- [9] Stock J B., Ninfa A J, Stock A M, *Microbiol Rev.* 1989, **53**: 450-490.
- [10] Powell B S, Rogowsky R M, Kado C I. *Mol. Microbiol.* 1989, **3**: 411-419.
- [11] Arlat M, Boucher C. *MPMI.* 1991, **4**: 211-213.
- [12] Jin S, Roitsch T, Ankenbauer R G, *J. Bacteriol.* 1990, **172**: 531-537.
- [13] Ankenbauer R G, Nester E M. *MPMI.* 1991, **4**: 400-406.
- [14] Willis D K. *MPMI.* 1991, **4**: 132-138.
- [15] Daniels M J, Dow J W, Osbourn *Annu. Rev Phytopathol.* 1988, **26**: 285-312.
- [16] Huang H C, Schuurink R, Denny T P. *J Bacteriol.* 1988, **170**: 4748-4756.
- [17] Huynh T V, Dahlbeck D, Staskawicz B J. *Science.* 1989, **245**: 1374-1377.
- [18] Fellay R, Rahme L G Mindrinos M N. *Adv. Mol. Genet. Plant. Microbe. Interact.* eds. H Hennecke D. P. S Verina Dordrecht, The Netherlands: Kluwer 1991. **1**: 45-52.
- [19] Mo Y Y, Griss D C, *MPMI.* 1991, **4**: 28-36.
- [20] Roitsch T, Wang H, Jin S. *J. Bacteriol.* 1990, **172**: 6054-6060.
- [21] Huang Y, Xu P, Sequeira L. *MPMI.* 1990, **3**: 48-53.
- [22] Schulte R, Bonas U. *J. Bacteriol.* 1991, **174**: 815-823.
- [23] Osbourn A E, Clarker B R, Stevens B J H, *et al.* *MGG.* 1990, **222**: 145-151.
- [24] Tang J L, Liu Y N, Barber C E, *et al.* *MGG.* 1987, **210**: 443-448.