

刘晓东,吴 港,杨智敏,等. RpoN 和 RpoS 参与细菌鞭毛合成与趋化调控的研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):11-16.

RpoN 和 RpoS 参与细菌鞭毛合成与趋化调控的研究进展

刘晓东^{1,2}, 吴 港^{1,2}, 杨智敏^{1,2}, 燕永亮², 林 敏², 张云华^{1,2}

(1. 安徽农业大学生命科学学院,安徽合肥 230036; 2. 中国农业科学院生物技术研究所,北京 100081)

摘要:在自然界中,细菌需要靠趋化运动来趋利避害以获得有利的生存环境。鞭毛作为细菌的运动器官,是趋化的前提与基础,鞭毛的合成组装是一个高度有序、耗能的等级调控过程,每一等级的基因表达都需要多个调控因子参与。RpoN 对鞭毛合成基因的表达为正调控,鞭毛调节子 FleQ 作为 RpoN 的激活增强子,与 RpoN 协同调控了鞭毛基因的转录与表达,相反,RpoS 负调控包括鞭毛调控 σ 因子 FliA 在内的鞭毛合成基因的转录与表达,且 *rpoS* 基因的缺失导致鞭毛合成相关基因的转录水平显著上调。RpoS 能够负调控诸多鞭毛基因的表达可能是通过调控鞭毛主调节子 FleQ 或鞭毛调控 σ 因子 FliA 来实现的;亦可能是由于 RpoS 和其他的 σ 因子竞争有限的核心聚合酶造成的。本文综述了细菌的鞭毛合成与趋化中不同 σ 因子之间存在复杂的交叉调控。

关键词:RpoN; RpoS; 鞭毛; 趋化; 调控

中图分类号: Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0011-06

为了适应复杂多变的外界环境,细菌需要通过诱导不同 σ 因子来调控特定基因的转录与表达。在长期的进化过程中, σ 因子产生了种类和功能上的差异,依据结构和功能可将 σ 因子分为 σ^{54} 和 σ^{70} 2 类家族因子。

在大肠杆菌中已经报道了 7 个 σ 因子,包括负责持家基因表达的主调控因子(σ^{70} 或 RpoD)和氮代谢调控因子(σ^{54} 或 RpoN),以及一般胁迫应答调控因子(σ^{38} 或 RpoS)、热休克调控因子(σ^{32} 或 RpoH)、鞭毛合成调控因子(σ^{28} 或 FliA)、细胞周质压力调控因子(σ^{24} 或 RpoE)和铁转运调控因子(FecI 或 σ^{19})等其他应激调控因子^[1]。除了 σ^{54} ,其他 σ 因子都属于 σ^{70} 家族,这些 σ 因子有选择性负责一组特异性基因的转录与表达,在序列和功能不同于 σ^{54} 。很多研究人员发现,在 σ^{70} 家族中 σ 因子之间存在竞争关系如 σ^{70} 和 σ^{28} 之间的竞争,不同 σ 因子有竞争性地与核心酶结合。Dong 等发现大肠杆菌中 σ^{54} 和 σ^{38} 之间存在拮抗调控关系,对大肠杆菌的转录组分析显示,在 RpoN 调控的基因中有 60% 的基因是和 RpoS 交叉调控的,例如编码鞭毛合成调控因子 σ^{28} 的 *fliA* 基因被 RpoN 正调控,而被 RpoS 负调控^[2]。

1 RpoN 的发现及其功能

RpoN 又称 σ^{54} ,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中最先报道,是 RNA 聚合酶的一个亚基,可通过识别特定的启动子元件来严格控制不同基因的表达。RpoN 依赖型启动子没有 σ^{70} 家族转录因子识别所需要的典型 -35 和 -10 保守元件。RpoN 所识别的保守启动子序列为 CTGG-N8-TTGCA,其在转录起始位点约 -24GG/-12GC 最为保守^[3]。

收稿日期:2013-04-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31170081、31101746);国家“973”计划(编号:2010CB126504)。

作者简介:刘晓东(1984—),男,山东临沂人,硕士研究生,主要从事细菌基因工程研究。E-mail: lxd_0001@126.com。

通信作者:张云华,博士,副教授,从事微生物生物技术研究。E-mail: yunhua9681@163.com。

RpoN 的全酶能和启动子形成稳定的闭合转录复合体,该全酶需要 1 个增强结合蛋白(enhancer-binding protein,EBP)作为激活子启动基因转录,EBP 能够水解 ATP,使得闭合的转录复合体空间构象变化,形成开放的复合体而起始基因的转录。RpoN 具有调控氮同化、氨基酸摄取、有机分子的降解、固氮相关基因以及鞭毛合成基因转录起始等功能,对基因的表达调控发挥至关重要的作用。

RpoN 能够调控细菌氮代谢相关基因的表达。在大肠杆菌中,RpoN 能够调控大约 30 个操纵子的转录表达,其中有一半基因参与了氮同化过程。铜绿假单胞菌的 *rpoN* 突变株不能够合成氮同化过程中的谷氨酸胺合成酶。在固氮施氏假单胞菌中,*rpoN* 缺失突变株丧失了固氮能力。

除了对氮代谢的影响,在单核增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)等细菌中发现 RpoN 还调节了碳代谢。Arous 等通过对 *Listeria monocytogenes* 的 *rpoN* 突变株研究发现,其可能参与调控了 16 个碳代谢相关基因如 *lmo0519* 基因的转录,其主要功能是参与糖的转运^[4]。在地杆菌中,RpoN 能够调控 *ducB* 基因的表达,该基因编码延胡索酸和琥珀酸的转换器,延胡索酸作为终端电子受体对细胞的生长起很重要的作用^[5]。在植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)中,RpoN 调控甘露糖磷酸转移酶系统(PTS),而 PTS 仅负责运输甘露糖,若 PTS 缺失,将导致静止期细胞内磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)浓度升高,这个葡萄糖转运系统在碳代谢调控方面发挥很重要的作用^[6]。

RpoN 控制了一套多元化基因的转录,能够调控很多不同功能基因的转录与表达,除了在碳、氮代谢中发挥重要的调控功能之外,其还参与调控鞭毛合成、细菌的运动及定殖等。

2 RpoS 的发现及其功能

RpoS 又称为 σ^S 或 σ^{38} ,是一个选择性 σ 因子,在不同胁迫压力条件下发挥着重要的核心作用。Hengge-Aronis 等推测 *rpoS* 基因编码一个假定的 σ 因子,其能够在细胞进入稳定期时诱导 *otsA*、*otsB* 等诱导型基因的表达,使得细菌能在稳定

期压力或者饥饿条件下生存^[7]。

RpoS 在转录和翻译水平受到严格的控制。通过定量免疫印迹分析发现,在指数期几乎检测不到 RpoS 蛋白^[8]。虽然 RpoS 的表达量非常低,但其依然调控许多基因的表达,例如,负责摄取铁的一些基因 *fhuA*、*fhuF*、*cirA*、*entCB*、*exbD*、*fecI*、*fepB* 和 *fepD* 等,均被 RpoS 正调控。在代谢过程中,铁是很多酶的电子受体,能够有效的利用铁是非常重要的^[9]。当细菌由指数期进入稳定期,RpoS 蛋白随着细菌生长速率的降低而逐渐积累。在稳定期或者饥饿条件下如碳源、氮源、氨基酸缺乏,细胞的生长几乎停止,RpoS 被高度的诱导表达,其稳定性也有所提高^[10],随着 RpoS 的大量表达,其所调控的一些特定基因表达水平亦有所变化。

RpoS 能够有效的调节胁迫应答基因的表达,并且参与调控碳、氮代谢过程一些基因的转录与表达。在大肠杆菌中,RpoS 调控了全基因组 10% 的基因^[11-13],其中大约 400 个基因被 RpoS 正调控^[11,13]。 σ^S 正调控 *lysA*、*lysC*、*dapB* 及 *lysP* 等基因的表达,这些基因主要负责 L-赖氨酸的合成和赖氨酸的转运。*rpoS* 基因突变后,糖原代谢(*glgCAP*、*glgX*)、醋酸盐合成(*pta*、*ackA*)、糖酵解(*fbaB*、*pfkB*)、精氨酸合成(*argB*)、TCA 循环中所有基因及乙醛酸支路的基因表达水平均提高^[14]。

在许多细菌中,RpoS 参与调控了饥饿、高温与低温冲击、酸冲击、渗透压冲击及紫外辐射等应答反应。随着研究的深入,还发现 RpoS 负调控了鞭毛合成及调控有关的 39 个基因如 *fliA*、*fliHDC* 等和 10 个趋化相关基因(*tap*、*tar*、*trg*、*tsr*、*cheAW*、*cheRBYZ*)的表达^[14]。因此,RpoS 可能在鞭毛与菌毛的合成与趋化运动调控中发挥重要作用。

3 RpoN 和 RpoS 对鞭毛合成的调控机制

3.1 鞭毛

鞭毛(flagellum)是从细菌菌体伸出的细长而弯曲的丝状物,长度常为菌体若干倍,少则 1~2 根,多则可达数百根,是细菌的运动器官。鞭毛既是一个马达,又是一个蛋白质转运、组装装置^[15],主要由 3 部分组成:①基体:嵌入在细胞壁内的部分,即分子马达;②鞭毛钩:连接马达的主轴和鞭毛丝,起传递扭矩的作用;③鞭毛丝:作为执行部件由马达驱动旋转,产生推动力,驱动细菌运动,功能上类似于螺旋桨。 G^- 细菌与 G^+ 细菌的鞭毛结构存在着差异: G^- 细菌鞭毛的基体上有 2 对环,1 对为 L 环和 P 环,扣着细胞壁的外壁层,1 对为 S 环和 M 环,扣着细胞膜; G^+ 鞭毛的基体上只有 S 环和 M 环^[16]。

根据鞭毛的旋转方向可以将鞭毛的运动方式分为 2 类:(1)顺时针旋转(CW):当鞭毛顺时针旋转时,可以使细菌进行翻滚来调整运动方向(图 1-a);(2)逆时针旋转(CCW):当鞭毛逆时针旋转时,可以产生向前的推动力,在没有外界刺激的情况下,细菌以先平地直线运动一段距离,然后再翻滚 1 次改变方向再向前运动,以一种游动间翻滚的方式随机选择性运动(图 1-b)。当细胞感受到趋向物浓度升高或趋避物浓度降低时,它们就会向前游动;如果细胞感受到相反的浓度梯度,则会发生较剧烈的翻滚而改变运动方向^[17]。在复杂的环境条件下,细菌就是通过不断调整自己的运动方式来完成趋利避害的^[18]。

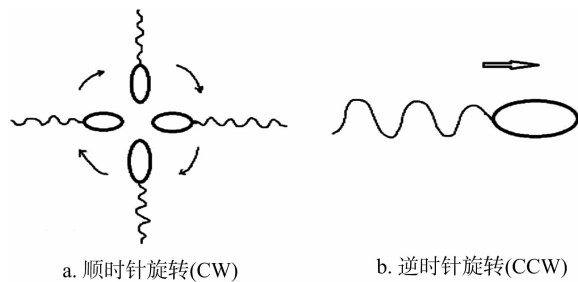


图1 细菌泳动和翻滚示意图

3.2 鞭毛的级联调控

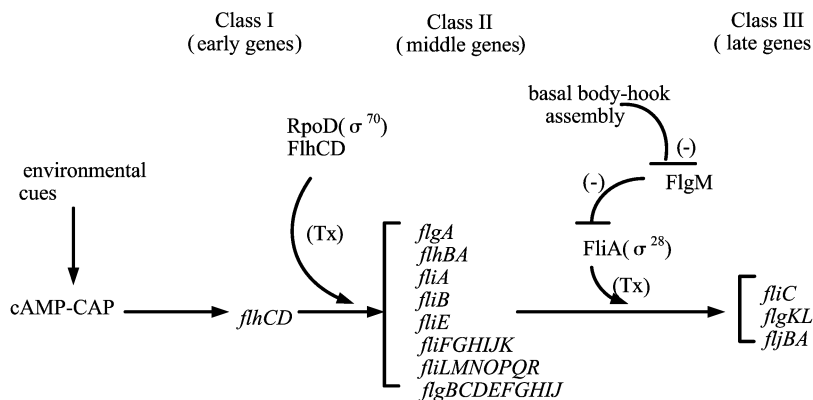
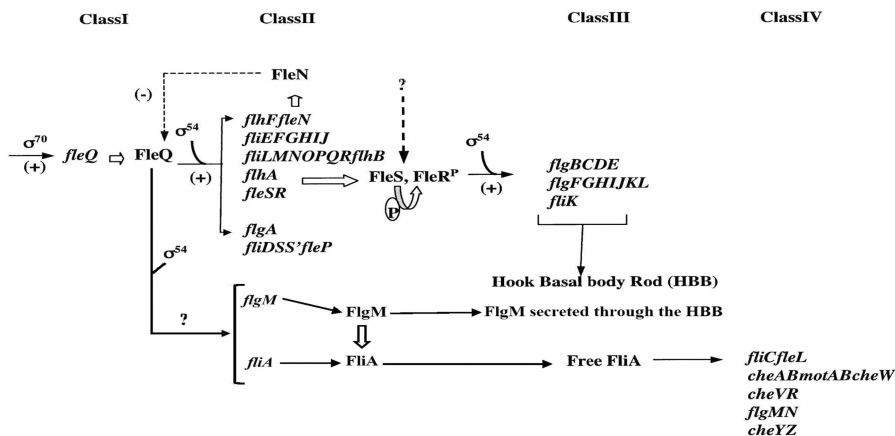
鞭毛介导的运动广泛存在,超过 80% 的已知细菌都具有鞭毛^[19-21]。鞭毛结构复杂,有很多基因参与了鞭毛的合成调控,其中包括调节蛋白、鞭毛结构蛋白、组装功能装置、产生动力的马达装置及控制鞭毛根部的趋化装置。鞭毛合成组装是一个高度有序的级联调控过程,每一等级基因的表达都需要多个调控因子的参与。鞭毛的合成组装及功能的发挥是非常消耗物质和能量的过程,这就需要细菌严格地调控。

目前,模式菌中的鞭毛调控模式主要分为Ⅲ型和Ⅳ型 2 种调控模式。Ⅲ型调控模式主要存在于大肠杆菌和沙门氏菌等,也是目前鞭毛等级调控研究最清楚的一种调控模式。在大肠杆菌中,参与鞭毛合成调控的基因有 50 多个,分为 3 个调控等级:Ⅰ级基因由 *fliHDC* 操纵元组成,其编码产物是整个鞭毛合成级联调控体系的主调控因子,负责总调控。*fliHDC* 转录激活因子可以激活Ⅱ级基因的表达;Ⅱ级基因主要包括鞭毛分泌体系和基体的组分,其中 *fliA* 编码的 1 个鞭毛特异性 σ 因子,即 *FliA* (σ^{28});Ⅲ级鞭毛基因负责编码鞭毛丝蛋白、鞭毛钩蛋白、马达蛋白及趋化性蛋白等(图 2)。各个操纵元受 *FliA* 的正调控,同时又受一个抗 σ 因子 *FlgM* 的负调控,*FlgM* 结合到 *FliA* 因子上阻止其与 RNA 核心酶结合。抗 σ 因子 *FlgM* 一直存在于细胞内,直到鞭毛的基体和鞭毛钩都组装好,它才从鞭毛蛋白的分泌装置被分泌至细胞外,从而降低对 *FliA* 的抑制作用。*FliA* 可以激活Ⅲ级鞭毛基因的表达,完成鞭毛的合成与组装。

在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中,鞭毛合成的等级调控要比大肠杆菌中更复杂,分为 4 个等级^[22]:处于最高层的调控因子是 *FleQ*,为依赖 RpoN 的转录激活因子,其作为 RpoN 的增强子激活第二等级基因的转录,主要包括 M 环、S 环、鞭毛马达转子及鞭毛分泌装置相关的基因;第二等级中 *fliA*、*fles*、*fleR* 等重要基因,分别编码鞭毛合成特异性因子 σ^{28} 、双组份调控系统 *FleSR*,*FleQ* 能够调控双组份调控系统 *FleSR* 的表达;第三等级基因负责合成鞭毛基体、鞭毛钩及鞭毛丝蛋白等;第四等级鞭毛基因主要是鞭毛丝蛋白和趋化蛋白基因。鞭毛的成功合成与组装还需要其他调控因子的参与(图 3)。

3.3 RpoN 对鞭毛合成的调控

起初认为 RpoN 功能可能只是调控氮代谢,进一步研究发现,RpoN 除了调控氮代谢之外,在细菌的运动、鞭毛的形成、细胞间的信号传递及细菌的定殖中发挥重要的作用。在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和新月柄杆菌(*C. crescentus*)中发现,RpoN 能够调节鞭毛和菌毛的形成及群体间的感应,其

图2 大肠杆菌和沙门氏菌中鞭毛等级调控^[21]图3 铜绿假单胞菌鞭毛等级调控系统^[23] (有改动)

控制了鞭毛基体的附着和运动^[24]。*P. aeruginosa* 的 *rpoN* 突变株表现出对上皮细胞粘附能力下降^[25]。斯氏假单胞菌 A1501 (*Pseudomonas stutzeri* A1501) 的 *rpoN* 突变株几乎丧失了定植在水稻根系的能力,透射电镜观察发现,*rpoN* 突变株没有形成鞭毛,趋化试验表明该突变株完全失去了运动能力。

在 *P. aeruginosa* 等 IV 型鞭毛调控模式菌中, RpoN 参与调控了鞭毛基因的级联调控^[26]。鞭毛 I、II 等级基因的调控受 RpoN 依赖型调节子 FleQ 调节。FleQ 是鞭毛级联调控中最高等级的调控因子,被鉴定为类似于 NtrC 家族 RpoN 依赖的转录激活子。FleQ 蛋白具有 DNA 结合结构域,但氨基酸末端没有调节结构域,它和 RpoN 共同调控鞭毛基因的转录起始。通过对 *flhA*、*fliE*、*fliL* 及 *fleSR* 等基因启动子分析发现,这些基因的上游存在 FleQ 结合位点,并在 FleQ 结合位点上游发现了 RpoN 的保守结合位点^[27]。启动子融合和微阵列分析表明 *fleSR*、*fliEFGHIJ*、*flhA*、*flhF*、*fleN*、*flgA*、*fliLMNOPQR* 及 *flhB* 直接被 FleQ 和 RpoN 调控^[25]。

目前,对鞭毛调节因子 *fliA* 的转录表达调控机制还不是很清楚,研究人员对于其转录是否受 RpoN 调控存在异议。在铁还原菌 (*G. sulfurreducens*) 中,微阵列芯片分析表明 *fliA* 基因及其他的鞭毛合成基因如 *flg-1*、*flg-2* 及 *flh-A* 的启动子区域具有高度保守的 RpoN 识别位点,推测这些基因很可能受 RpoN 调控,这与 *Campylobacter spp* 和 *Vibrio spp* 中 RpoN 能够调控 *fliA* 基因的表达相一致^[28-30]。

有研究者认为铜绿假单胞菌中, *fliA* 基因的转录并不依赖于 RpoN。大肠杆菌转录组数据显示, RpoN 调控包括 *fliA* 在内的一些 II 级鞭毛基因的转录,但没有证据证明 *fliA* 基因受 σ^{54} 因子的直接调控。Dong 等人通过 5' - RACE 发现,大肠杆菌 *fliA* 基因有 2 个转录起始位点,一个启动子位于鸟嘌呤核苷酸位点上游 30 bp 处 (σ^{70} 识别位点),另外的一个位于腺苷酸的起始密码子上游 18 bp (σ^F 位点),并没有发现 RpoN 识别的保守结合位点^[2]。*fliA* 基因的转录起始可能依赖于其他未知的调控机制,或者 RpoN 通过 FlhDC 间接调控 *fliA* 的转录,与其他转录调控因子协同调控了 *fliA* 基因的表达,亦有可能 RpoN 与 FliA 共同调控了 III、IV 等级鞭毛基因的转录与表达。

通过对斯氏假单胞菌 A1501 基因启动子预测分析发现,可能被 RpoN 调控的基因有 107 个。与编码鞭毛合成及运动相关的基因有 48 个,其中有 34 个基因可能受 RpoN 调控。在 *fliA*、*fleS*、*flgBCDE*、*flgFGHIJKL*、*flgM*、*fliLMNO*、*flgF*、*fliE*、*fliOPQ* 及 *cheABZY* 等基因的上游 200 bp 内发现有 RpoN 可能的保守结合位点,其中在 *fliA*、*fleQ* 及 *flgM* 的上游还发现了 RpoS 可能的保守结合位点。RpoN 与 RpoS 是否直接调控这些基因的转录表达还有待进一步的研究。

3.4 RpoS 对鞭毛合成的调控

关于 RpoS,多数研究者致力于其在一般胁迫条件下调控机制的研究。随着研究的深入,发现鞭毛合成和趋化系统是受调节蛋白调控和复杂环境双重因素的影响^[31]。在一定的

胁迫条件下如高温、高渗透压及高浓度的糖类等,鞭毛的合成被胁迫环境所抑制,例如大肠杆菌在胁迫条件下,鞭毛合成受抑制,菌体失去运动能力^[32]。斯氏假单胞菌 A1501 在 pH 值 6.0 和 0.8 mol/L NaCl 条件下趋化试验表明,该菌在这 2 种胁迫条件下没有运动能力。胁迫环境因素可能抑制了鞭毛的合成或者趋化性,从而表现出胁迫条件下无运动现象。Shi 等在大肠杆菌中发现,高温和高渗透压等环境因素能够抑制主调节子 *flhDC* 的转录表达^[32]。胁迫条件下,RpoS 很可能通过鞭毛合成主调控因子 FlhDC 来决定是否合成鞭毛,也可能抑制趋化受体的表达。降低趋化感受蛋白的表达可能导致细胞对胞外的趋化信号敏感度减弱,从而使细菌表现出不运动。在正常条件下,*rpoS* 基因缺失后反而提高了细菌的运动能力如大肠杆菌^[2]。

根据上述细菌的不同表型分析推断,在复杂的调控网络中,RpoS 可能负调控了鞭毛合成与运动相关基因的表达。大肠杆菌基本培养基条件的转录组数据分析显示,与野生型相比,*rpoS* 突变株中鞭毛 I 级基因 *flhDC* 的表达量上调了 1.5 倍,II 级基因 *flgA*、*flgBCDEFGHIJ*、*flhBAE*、*fliA*、*fliFGHIJK* 及 *fljLMNOPQR* 约上调了 1.6 ~ 2.6 倍,III 级基因 *flgKL*、*fliC*、*motAB* - *cheAW* 及 *tar* - *tap* - *cheRBYZ* 上调了约 1.5 ~ 2.8 倍^[2]。在丰富培养基的稳定期阶段,大肠杆菌 RpoS 负调控了 47 个基因,其中有 15 个基因是鞭毛合成基因。与野生型相比,*rpoS* 突变株的 *flgM*、*flgA*、*flgF*、*flgH*、*flgI*、*fliD*、*fliN* 及 *fliM* 基因上调约 5 倍,*flgB*、*flgC*、*flgD*、*flgE*、*flgG*、*fliA* 及 *fliZ* 基因上调了约 6 ~ 14 倍。*rpoS* 基因的过表达使得鞭毛合成、趋化和运动相关的 39 个基因下调 2 倍以上^[12]。通过免疫印迹法分析发现,*rpoS* 突变株中特异性鞭毛调控因子 FliA(σ^{28})的表达水平高于野生型^[16]。

在斯氏假单胞菌 A1501 中,*rpoS* 突变后菌体的运动能力增强了,通过 RT-PCR 分析相关基因的表达,发现在 *rpoS* 突变株中 *fliA*、*flgM* 的表达量提高了 1.5 ~ 2.5 倍,推测斯氏假单胞菌 A1501 中 RpoS 蛋白对鞭毛合成相关基因的调控是负调控。

编码鞭毛蛋白、马达组分及趋化蛋白的基因分布于多个不同的转录操纵子。RpoS 能够负调控诸多鞭毛合成相关基因的表达,可能是通过负调控鞭毛主调节子 FlhDC 或鞭毛 σ 因子 FliA 而实现的,亦可能是由于 RpoS 和其他的 σ 因子竞争有限的核心聚合酶造成的^[14]。

在大肠杆菌中,H-NS 是 1 个类组氨酸蛋白,也被称之为拟核相关蛋白,其缺失会导致细胞不能合成鞭毛,从而使菌体丧失运动能力。进一步研究表明,hns 突变株在细胞的指数期积累了异常水平的 RpoS 蛋白,RpoS 的蛋白量与野生型菌株在稳定期或者处于其他胁迫条件下时 RpoS 的水平相当^[33-34],后来,发现 H-NS 对 RpoS 的作用是转录后调控的,其激活 *rpoS* 的翻译并提高了 σ^s 蛋白的稳定性^[35]。hns 突变株中高表达的 RpoS 可能抑制了鞭毛基因的转录与表达。

RpoS 对基因的调控非常依赖于环境条件,很多基因只有在特殊的条件下才被 RpoS 调控^[14]。鞭毛合成相关的转录调节因子受不同环境条件的诱导,特别是不利于细菌存活的环境变化,可能使得细胞内 RpoS 蛋白大量积累,抑制了鞭毛基因的转录与表达,从而使细胞降低能量消耗来应对不良的生

存环境。当不良环境消除后,RpoS 在细胞内被快速的降解掉,鞭毛基因在 RpoN 等调控因子的调控下正常表达,从而形成完整的鞭毛,细菌恢复运动能力,正是这种依据生存环境条件诱导的调控,使得细菌能够在有利的生存环境下运动寻找更适宜的栖息之地。在一定逆境条件下,抑制或关闭鞭毛等相关基因的表达,为细菌节省生存所必须的能量与物质,这是一种微生物对环境适应性的体现。

4 细菌的趋化及其调控

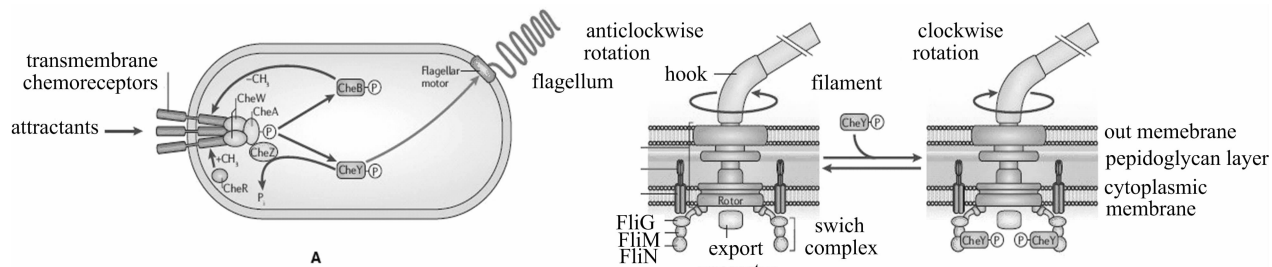
趋化是由于介质中物质浓度差异形成的刺激引发的趋向性。细菌的趋化性可以使细菌向营养物质前进、趋避有害物质,是具有运动能力细菌的本能。生活在多变的环境中,细菌需要与外界环境时刻保持信息联络并做出一定的应答反应。细菌化学趋向性信息处理网络由跨膜蛋白分布组成,具有专一性的膜传感蛋白(也称为趋化性受体,即 MCPs)和胞质内调节蛋白。趋化反应一般分为 3 个阶段:(1)外界化学物质刺激感受器:细菌的细胞膜表面存在着各种专一性的化学信号受体——膜传感蛋白,其可感受不同物质的刺激;(2)膜传感蛋白将胞外的化学信号转换为胞内的各种信号传递给胞内调节蛋白;(3)根据不同的刺激,胞内调节蛋白将信号转换为胞内有效的鞭毛信号,进而调控细菌的鞭毛运动方向,使得鞭毛对于不同的化学信号做出相应的趋化运动应答。

目前,关于细菌趋化主要以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌及肠杆菌为研究对象,其中,大肠杆菌的趋化研究较为透彻。在大肠杆菌中,跨膜信号受体能够感受到化学效应物浓度的变化,然后将信号通过 CheW 传递给趋化组氨酸蛋白激酶 CheA,跨膜受体激活 CheA 自我磷酸化,磷酸化的 CheA-P 将相关的应答调节子 CheB 和 CheY 磷酸化,CheY-P 结合到鞭毛的马达上,使得细菌将鞭毛的运动方向由逆时针改变为顺时针。CheB-P 是一个甲基酯酶,调节趋化甲基转移酶 CheR,CheZ 是一个特殊的磷酸酶,它能够脱去 CheY-P 的磷酸基团,使得信号快速的终止(图 4-A)。

大肠杆菌的鞭毛马达开关是双向的。鞭毛马达的逆时针和顺时针构象是以平衡状态存在的,当有 CheY-P 存在时,鞭毛会启用逆时针旋转模式,当 Che-Y 结合到 FliM 和 FliN 的时候,会将平衡转换为顺时针旋转模式。FliM 和 FliN 上具有 34 个 CheY-P 结合位点,结合位点被占据得越多,顺时针方向的鞭毛旋转模式就越持久,即细菌不停地调整运动方向以趋利避害(图 4-B)。

通过分析不同细菌的趋化基因启动子发现,大多数细菌的趋化基因 *cheA*、*cheB*、*cheY*、*cheZ*、*cheR* 及 *cheW* 等与鞭毛合成基因同处于 1 个或者几个操纵子中,趋化基因和部分鞭毛合成基因共用相同的启动子,大肠杆菌的转录组数据也证实了这一观点,*rpoN* 基因缺失后,趋化相关基因与鞭毛等级 III 基因的下调倍数相近,推测部分鞭毛合成的晚期基因和趋化基因为共转录。从逻辑上讲,完整鞭毛的组装是发挥趋化系统功能的前提与基础。

斯氏假单胞菌 A1501 的水稻根部定殖试验表明,*rpoN* 突变株几乎完全丧失了定殖能力,不能与水稻根系形成稳定的联合固氮体系。RpoN 缺失后导致该菌鞭毛合成缺陷,丧失了趋化运动能力,影响了细菌向植物根系发生特异的定向移动,

图4 大肠杆菌趋化调控系统^[36]

从而不能定殖在根表或者侵入到植物的根表内部,破坏了联合固氮菌与植物根系建立稳定的联合固氮体系。细菌具有鞭毛,可以游动,这是趋化性的基础,而对于固氮菌和致病菌,趋化性是侵入植株并在植株体内定殖的前提。RpoN 对细菌定殖的调控作用目前还不清楚。

在很多细菌中,*rpoS* 的缺失使得菌体趋化能力增强。通过对大肠杆菌 *rpoS* 突变株的单细胞运动踪迹的测定及统计学分析,*rpoS* 突变株比野生型运动速率更快、运动范围更

大^[37]。大肠杆菌转录组数据显示,RpoS 能够负调控 *tap*、*tar*、*trg*、*tsr*、*cheAW* 及 *cheRBYZ* 等 10 个趋化基因的转录。RpoS 是否直接的调控细菌的趋化运动系统,现在还不清楚。

在自然环境中,细菌通过吸收利用环境中的碳源、氮源等营养成分来生存繁殖。细菌周围生活场所中的离子浓度和营养成分是不断变化的。不同细菌具有不同的最适生态位,细菌需要靠趋化运动来趋利避害以获得有利的生存环境。细菌的趋化是环境因素和菌体内部调控共同作用的结果(图 5)。

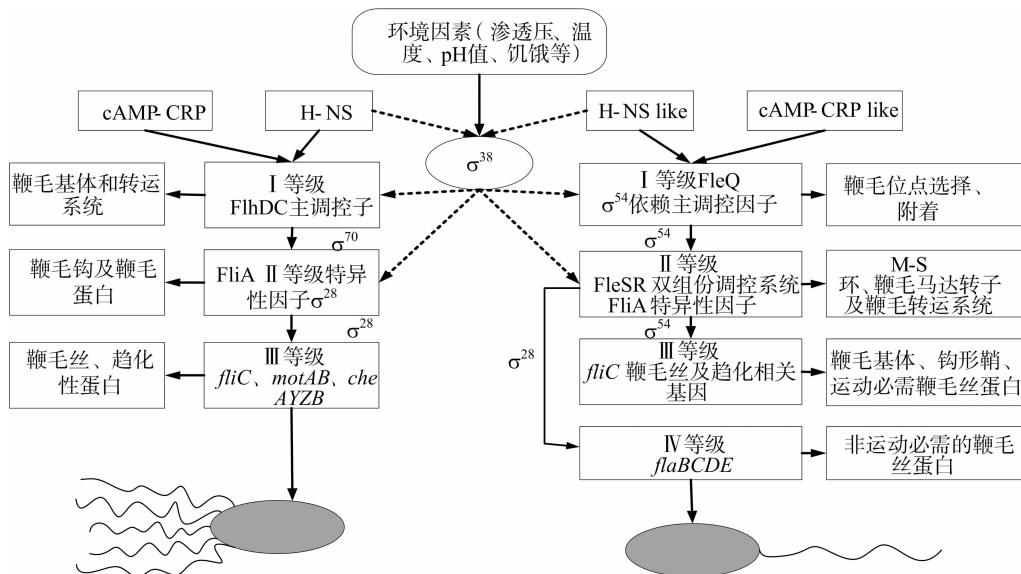


图5 鞭毛的等级调控体系(实线表示正调控;虚线表示负调控)

5 讨论与展望

细菌对于基因的转录调控不是简单的开或者关,为了应对多变的环境条件,细菌必须通过各种理化和代谢信号来确保相应基因的启动或关闭,而调控因子的调节是一个十分复杂的过程,是诸多因素作用的结果。转录的激活取决于大量转录因子的相互作用,如 σ 因子之间协同或拮抗调控某些特殊基因的表达。细菌通常以多重调控网络的方式来调节某一外界的刺激应答,不同基因的表达被综合复杂的等级调控网络所调控。细菌对某些特定基因的调控存在信号整合的现象,一个环境信号能够使得很多的基因上调或者下调,调节因子通常会涉及到许多不同功能基因的表达。基因的表达调控是在多变环境中细菌对生存的挑战。

鞭毛的合成与组装既受环境因素的作用,又是一个高耗能的过程,这就需要微生物严格地调控。每一等级鞭毛基因的表达都需要多个调控因子的参与,它是一个高度有序的级

联调控过程。

鞭毛的运动与趋化可以使得细菌到达最适宜的生长环境,在竞争条件下,有趋化能力的细菌更具优势。例如,植物根系向周围分泌一些特殊的分泌物,固氮菌通过感应环境中的分泌物浓度变化,向植物根系发生特异的趋化运动,定殖在根表或者侵入到植物的根表内,从而建立稳定的联合固氮体系,在细菌向根表的定向运动过程中,鞭毛运动和趋化发挥了至关重要的作用。依据生存环境条件诱导的网络调控,使得细菌能够在有利的生存环境下运动寻找更适宜的栖息之地,在一定逆境条件下,抑制或关闭鞭毛等相关基因的表达,为细菌节省生存必须的能量与物质,这是微生物对环境适应性的一种体现。

参考文献:

- [1] Gross C A, Chan C L, Lonetto M A. A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase [J]. Philosophical Transactions of

- the Royal Society of London. Series B; Biological Sciences, 1996, 351 (1339) : 475 – 482.
- [2] Dong T, Yu R, Schellhorn H. Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli* [J]. Molecular Microbiology, 2011, 79 (2) : 375 – 386.
 - [3] Barrios H, Valderrama B, Morett E. Compilation and analysis of sigma54 – dependent promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27 (22) : 4305 – 4313.
 - [4] Arous S, Buchrieser C, Folio P, et al. Global analysis of gene expression in an rpoN mutant of *Listeria monocytogenes* [J]. Microbiology, 2004, 150 (5) : 1581 – 1590.
 - [5] Leang C, Krushkal J, Ueki T, et al. Genome-wide analysis of the RpoN regulon in *Geobacter sulfurreducens* [J]. BMC Genomics, 2009 (10) : 331.
 - [6] Marc J A, Stevens. Transcriptome response of *Lactobacillus plantarum* to global regulator deficiency, stress and other environmental conditions [D]. Dutch: Wageningen University and Research Centre, 2008.
 - [7] Hengge – Aronis R, Klein W, Lange R, et al. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173 (24) : 7918 – 7924.
 - [8] Jishage M, Iwata A, Ueda S, et al. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178 (18) : 5447 – 5451.
 - [9] Dong T, Kirchhof M G, Schellhorn H E. RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12 [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 279 (3) : 267 – 277.
 - [10] Hengge – Aronis R. Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli* [J]. Cell, 1993, 72 (2) : 165 – 168.
 - [11] Lacour S, Landini P. Sigma S – dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigma S – dependent genes and identification of their promoter sequences [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186 (21) : 7186 – 7195.
 - [12] Patten C L, Kirchhof M G, Schertzberg M R, et al. Microarray analysis of RpoS – mediated gene expression in *Escherichia coli* K – 12 [J]. Mol Genet Genomics, 2007, 272 (5) : 580 – 591.
 - [13] Weber H, Polen T, Heuveling J, et al. Genome – wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigma S – dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187 (5) : 1591 – 1603.
 - [14] Dong T, Schellhorn H E. Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2009, 281 (1) : 19 – 33.
 - [15] Macnab R M. How bacteria assemble flagellar [J]. Annual Review of Microbiology, 2003 (57) : 77 – 100.
 - [16] Yonekura K, Maki – Yonekura S, Namba K. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament [J]. Research in Microbiology, 2002, 153 (4) : 191 – 197.
 - [17] Webre D J, Wolanin P M, Stock J B. Bacterial chemotaxis [J]. Current Biology, 2003, 13 (2) : R47 – R49.
 - [18] Wadhams G H, Armitage J P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, 5 (12) : 1024 – 1037.
 - [19] Moens S, Vanderleyden J. Functions of bacterial flagellar [J]. Critical Reviews in Microbiology, 1996, 22 (2) : 67 – 100.
 - [20] Thomas N A, Bardy S L, Jarrell K F. The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure [J]. FEMS Microbiology Review, 2001, 25 (2) : 147 – 174.
 - [21] Wu J, Newton A. Regulation of the caulobacter flagellar gene hierarchy; not just for motility [J]. Molecular Microbiology, 1997, 24 (2) : 233 – 239.
 - [22] Schuster M, Hawkins A C, Harwood C S, et al. The pseudomonas aeruginosa RpoS regulon and its relationship to quorum sensing [J]. Molecular Microbiology, 2004, 51 (4) : 973 – 985.
 - [23] Dasgupta N, Wolfgang M C, Goodman A L, et al. A four – tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Mol Microbiol, 2003, 50 (3) : 809 – 824.
 - [24] Duque E, de la Torre J, Bernal P, et al. Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* [J]. Environmental Microbiology, 2013, 15 (1) : 36 – 48.
 - [25] Ramphal R, Koo L, Ishimoto K S, et al. Adhesion of pseudomonas aeruginosa pilin – deficient mutants to mucin [J]. Infection and Immunity, 1991, 59 (4) : 1307 – 1311.
 - [26] Totten P A, Lara J C, Lory S. The rpoN gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172 (1) : 389 – 396.
 - [27] Jyot J, Dasgupta N, Ramphal R. FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site [J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184 (19) : 5251 – 5260.
 - [28] McCarter L L. Regulation of flagellar [J]. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9 (2) : 180 – 186.
 - [29] Soutourina O A, Bertin P N. Regulation cascade of flagellar expression in Gram – negative bacteria [J]. FEMS Microbiology Review, 2003, 27 (4) : 505 – 523.
 - [30] Kazmierczak M J, Wiedmann M, Boor K J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005, 69 (4) : 527 – 543.
 - [31] Dobrin R, Beg Q K, Barabási A L, et al. Aggregation of topological motifs in the *Escherichia coli* transcriptional regulatory network [J]. BMC Bioinformatics, 2004 (5) : 10.
 - [32] Shi W, Li C, Louise C J, et al. Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175 (8) : 2236 – 2240.
 - [33] Teplitski M, Goodier R I, Ahmer B M. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella* [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185 (24) : 7257 – 7265.
 - [34] Yamashino T, Ueguchi C, Mizuno T. Quantitative control of the stationary phase – specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H – NS [J]. Embo Journal, 1995, 14 (3) : 594 – 602.
 - [35] Barth M, Marshall C, Muffler A, et al. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177 (12) : 3455 – 3464.
 - [36] Porter S L, Wadhams G H, Armitage J P. Signal processing in complex chemotaxis pathways [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9 (3) : 153 – 165.
 - [37] Ojima Y, Hakamada K, Nishinoue Y, et al. Motility behavior of rpoS-deficient *Escherichia coli* analyzed by individual cell tracking [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 114 (6) : 652 – 656.