



## 甲基化受体蛋白 MCP2923 在睾丸酮丛毛单胞菌 CNB-1 趋化过程中的作用

何蕴喆<sup>1,2</sup>, 黄舟<sup>1,2</sup>, 姜成英<sup>1,2,3</sup>, 刘双江<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

<sup>2</sup> 中国科学院大学, 北京 100049

<sup>3</sup> IMCAS-RCEECAS 环境微生物技术联合实验室, 北京 100101

**摘要:**【目的】MCP2923 是睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*) CNB-1 的一种甲基化趋化受体蛋白, 本研究旨在阐明其在 CNB-1 菌株趋化过程中的作用。【方法】利用游动平板法(swimming plate)检测了 CNB-1 及其 MCP 突变菌株 CNB-1 $\Delta$ 20、CNB-1 $\Delta$ MCP2923、CNB-1 $\Delta$ 20/pDSK519-MCP2923、CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MCS-2-MCP2923 和 CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MCS-2-MCP2923 $\Delta$ LBD 对 35 种芳香族化合物以及 9 种小分子有机酸的趋化性; 进一步利用 Agarose-in-plug 法表征了 MCP2923 介导的对芳香族化合物的趋化表型; 结合生物信息学分析, 对 MCP2923 配体结合结构域(MCP2923LBD)进行了克隆、表达和纯化, 利用等温滴定量热法(ITC)检测了 MCP2923LBD 与原儿茶酸等 11 种化合物的相互作用。【结果】CNB-1 对原儿茶酸、4-羟基苯甲酸等 12 种芳香族化合物以及顺乌头酸等 9 种 TCA 循环中间代谢产物具有强、中强和弱 3 个层次的趋化表型; 敲除 MCP2923 基因减弱了菌株对上述趋化诱导物的表型; 将 MCP2923 基因回补到 CNB-1 $\Delta$ 20 菌株中可回补菌株对 15 种趋化效应物的表型, 敲除 MCP2923 基因的配体结合区丧失了对 15 种趋化物的表型回补能力。虽然 Agarose-in-plug 法检测到了菌株对原儿茶酸和 4-羟基苯甲酸的趋化表型, 但 ITC 未能检测到原儿茶酸和 4-羟基苯甲酸等 11 种化合物与 MCP2923LBD 直接的相互作用。【结论】MCP2923 可引发 CNB-1 菌株对多种芳香族化合物以及小分子有机酸的趋化表型, 且 MCP2923LBD 在这个过程中起关键作用; 由于 ITC 的结果不能证明 MCP2923LBD 与芳香化合物和小分子有机酸等效应物的直接结合, 推测 MCP2923 引发 CNB-1 趋化作用的机制不同于已报道的 MCP2201 和 MCP2901 的作用方式, 其确切机制还有待于进一步深入研究。

**关键词:** 睾丸酮丛毛单胞菌 CNB-1, 甲基化受体蛋白(MCP), 细菌趋化性, 芳香化合物, 三羧酸循环(TCA)

基金项目: 国家自然科学基金(31230003)

\*通信作者。Tel: +86-10-64807423; Fax: +86-10-64807421; E-mail: liusj@im.ac.cn

收稿日期: 2017-02-07; 修回日期: 2017-04-04; 网络出版日期: 2017-05-16

细菌的趋化性是细菌趋向对自身有利或者躲避对自身有害的环境因子或者化学物质,从而使细菌处于最适生长环境中的一种行为。因为具有最简单的趋化信号通路, *E. coli* 作为细菌趋化性研究的模式生物<sup>[1]</sup>,其包括 5 个甲基化受体趋化蛋白(MCP), Tar、Tsr、Tap、Trg 和 Aer, 1 个组氨酸激酶 CheA, 1 个响应调控蛋白 CheY 和 1 个磷酸脂酶 CheZ。细菌的趋化过程可以分为 3 个部分: (1) 位于细胞膜上的 MCP 感应趋化效应物,通过自身的构象变化产生信号; (2) 信号通过 MCP 传递,影响 CheA 的自磷酸化活性,并进一步影响 CheY 的磷酸化水平; (3) 磷酸化的 CheY 与鞭毛蛋白 FliM 结合,进而影响细菌鞭毛的旋转方向,最终决定了细菌的运动方向。

趋化作用起始于 MCP 对趋化效应物的感应, MCP 可以感应的趋化效应物的种类很多,包括糖类、氨基酸和芳香化合物等营养物质。芳香化合物是自然界中仅次于碳水化合物的第二大碳库<sup>[2]</sup>,可以作为很多微生物生长的碳源和能源,支持细胞生长。目前已经分离鉴定了很多具有芳香化合物降解能力的菌株,例如 *Pseudomonas putida* KT2440<sup>[3]</sup>、*Comamonas testosteroni* CNB-1<sup>[4]</sup>、*Sphingobium* sp. SYK-6<sup>[5]</sup>、*Cupriavidus necator* LMP134 等。在许多菌株中,芳香化合物的降解与细菌的趋化性之间存在联系,如 Sanmata 等人的研究表明 *Burkholderia* sp. SJ98 菌株只能对可降解的硝基芳香化合物产生趋化表型<sup>[6]</sup>;另有学者证明,芳香化合物本身亦可以激活趋化通路,如 Parales 等研究表明 *Pseudomonas putida* F1 菌株对甲苯等芳香化合物具有明显的趋化表型,当 *todX* 等芳香化合物降解基因被敲除后,菌株依然可以对甲苯表现出趋化性<sup>[7]</sup>。目前对于细菌感应芳香化合物的机制分为代谢依赖型和非代谢依赖型两

种,代谢依赖型的趋化包括: (1) 通过 Aer 类受体感应 FAD 的氧化还原状态来介导微生物对芳香化合物的趋化性; (2) 通过感应代谢中间产物来介导微生物的趋化性。代谢依赖型趋化过程中 MCP 不直接与效应物结合,而是与微生物代谢的中间产物相互作用。而非代谢依赖的趋化是指 MCP 可以直接感应趋化效应物本身,例如,存在于 *E. coli* 细胞中的 Tar、Tsr、Tap 和 Trg 等 MCP 蛋白。许多 MCP 蛋白分子,如 McpT<sup>[8]</sup>、NahY<sup>[9]</sup>、NbaY 和 CtpL<sup>[10]</sup>等分别介导甲苯、萘、2-硝基苯甲酸和对氯苯胺的趋化,但并没有报道与之直接结合的配体,其引发趋化的确切机制还不清楚。

*Comamonas testosteroni* CNB-1 中存在 19 个 MCP, Ni 等人构建了敲除全部 MCP 编码基因的突变菌株 CNB-1 $\Delta$ 20、所有 MCP 的单敲除突变菌株(如: CNB-1 $\Delta$ MCP2923)和所有 MCP 的单回补突变菌株(如: CNB-1 $\Delta$ 20/pDSK519-MCP2923),并进一步证明其中的 MCP2201 和 MCP2983 可以感应芳香化合物代谢的中间产物从而实现对芳香化合物的趋化<sup>[11-12]</sup>。在最近的研究中, Huang 等人对 CNB-1 中的 MCP2901 进行了研究,证明 MCP2901 可以直接与 2,6-二羟基苯甲酸、2-羟基苯甲酸和柠檬酸结合,这是首次报道 MCP 与芳香族化合物存在直接相互作用<sup>[13]</sup>。

本研究对 CNB-1 菌株中 MCP2923 所介导的趋化性进行研究。利用游动平板法,首先检测了 CNB-1 菌株对 44 种化合物的趋化表型。结果表明, CNB-1 菌株对原儿茶酸、4-羟基苯甲酸等 12 种芳香化合物以及顺乌头酸等 9 种 TCA 循环中间代谢产物具有趋化性。对 CNB-1 $\Delta$ MCP2923 菌株趋化表型的测定表明, MCP2923 基因的缺失使得 CNB-1 $\Delta$ MCP2923 的趋化表型相对于原始菌株略

有减弱。而进一步将 MCP2923 基因回补至 CNB-1 $\Delta$ 20, 结果表明 MCP2923 基因可以部分回补 CNB-1 $\Delta$ 20 对效应物的趋化表型。MCP 的配体结合结构域(LBD)往往在介导趋化过程中起着关键性的作用, 尽管利用 ITC 技术没有检测到 MCP2923LBD 与效应物的相互作用, 但将 MCP2923LBD 敲除后, 丧失了其对趋化效应物的趋化表型, 表明 MCP2923LBD 在趋化过程中发挥重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、基因组 DNA 和相关菌株

本研究使用的菌株和质粒均列于表 1 内, CNB-1 基因组 DNA 由本实验室自行提取保存。CNB-1 及其突变株的活化或培养使用 1.5%琼脂的 LB 平板或 LB 液体培养基, 需要时加入终浓度为 200  $\mu$ g/mL 的卡那霉素, 培养温度 30  $^{\circ}$ C。 *E. coli* BL21(DE3)菌株的活化或培养也使用 LB 培养基,

并加入 50  $\mu$ g/mL 的卡那霉素。MCP2923 利用 pDSK519 和 pBBR1MCS-2 进行回补, MCP2923LBD 利用 pET28a 进行表达。

### 1.2 主要试剂

PCR 反应使用 TOYOBO 生产的 KOD-Plus-Neo 高保真酶或康维世纪公司生产的 2 $\times$ Taq MasterMix 进行; 质粒提取均使用 GenStar 公司生产的 StarPrep Plasmid Miniprep Kit 提取试剂盒; PCR 产物和酶切产物均使用 OMEGA 公司生产的 E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit 或 E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Cycle-Pure Kit 进行纯化; 酶切反应和连接反应所使用的酶均为 NEB 公司生产, pDSK519 和 pBBR1MCS-2 使用 *Kpn* I-HF 和 *Xba* I 进行双酶切, pET28a 使用 *Nde* I 和 *EcoR* I-HF 进行双酶切, 连接反应使用 T4 DNA Ligase 进行连接。

游动平板法使用的琼脂为 BD 公司生产的 Bacto Agar; Agarose-in-plug 法使用 Amresco 公司生产的低熔点琼脂糖; 无机盐培养基(MSB)成

表 1. 本研究使用的菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Relevant genotype or description	Source or references
<b>Strains</b>		
CNB-1		[14]
CNB-1 $\Delta$ 20	All the possible chemoreceptors were disrupted in CNB-1	[12]
CNB-1 $\Delta$ MCP2923	MCP2923 was disrupted in CNB-1	[12]
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<b>Plasmids</b>		
pDSK519	Broad-host-range cloning vector; Km <sup>r</sup>	[15]
pDSK519-MCP2923	Carries MCP2923 to generate complementation for MCP2923	
pBBR1MCS-2	Km <sup>r</sup> , lacPOZ <sup>+</sup> broad host vector with R	[16]
pBBR1MCS-2-MCP2923	Carries MCP2923 to generate complementation for MCP2923	This work
pBBR1MCS-2-MCP2923 $\Delta$ LBD	Ligand binding domain deletion plasmid of MCP2923	This work
pET-28a(+)	Protein expression vector	
pET-28a(+)-MCP2923LBD	pET28a derivative for expression of MCP2923LBD (Asn <sup>30</sup> -Ala <sup>188</sup> )	This work

分为(g/L):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.00、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.00、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.50、 $\text{MgSO}_4$  0.03, pH 8.0; chemotaxis buffer (CB) 成分为(mmol/L):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40.00、EDTA 10.00、甘油 0.05%, pH 8.0。

蛋白纯化缓冲液(mmol/L):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50、NaCl 300, pH 7.4; 透析缓冲液(mmol/L): NaCl 50、MES 5、PIPES 5、咪唑 5、Tris 5, pH 8.0。

### 1.3 趋化性检测

游动平板法: 将过夜培养的 CNB-1 或突变菌株以 1% 转接于 LB 培养基, 30 °C 过夜培养, 室温下离心收集菌体, 用 CB 或 MSB 培养基洗涤菌体, 相同条件下再次离心, 弃去上清, 重悬后, 吸取 0.5  $\mu\text{L}$  菌体接种到趋化物浓度为 0.15 g/L 的 MSB 半固体平板上(琼脂浓度 0.28%), 于 30 °C 培养箱中培养 12–15 h 后, 观察并记录实验结果。根据趋化圈的直径将菌株的趋化表型定义为强、中强和弱 3 个层次, 强趋化表型: CNB-1 菌株的趋化圈直径大于 2 cm, 以“+++”表示, 相应的化合物定义为强趋化效应物; 中强趋化表型: CNB-1 菌株的趋化圈直径在 1–2 cm 之间, 以“++”表示, 相应的化合物定义为中强趋化效应物; 弱趋化表型: CNB-1 菌株的趋化圈直径小于 1 cm, 以“+”表示, 相应的化合物定义为弱趋化效应物。

Agarose-in-plug 法: 如上述方法收集细胞, 重悬后, 接种于溶有 0.15 g/L 4-羟基苯甲酸(4HB)的 MSB 培养基中, 培养 5 h 后, 相同条件下收集、洗涤细胞, 重悬细胞, 调  $OD_{600}$  至 0.7 后进行趋化性检测。

### 1.4 MCP2923LBD 的表达纯化及配体的鉴定

将过夜培养的 *E. coli* BL21-pET28a-MCP2923LBD 以 1%–2% 的接种量转接于 1.5 L LB 培养基中, 培养至  $OD_{600}$  为 0.6–0.8, 0.3 mmol/L

IPTG 诱导 11 h, 4 °C 离心收集菌体, 用蛋白纯化缓冲液洗涤 1 次, 4 °C 再次收菌, 并称量, 以 1 : 5 的质量体积比重悬菌体, 超声破碎, 4 °C 离心, 取上清, 过滤后, 利用 GE 公司生产的 HiTrap TALON crude 进行蛋白纯化, 先分别用 15 mmol/L 和 30 mmol/L 咪唑进行洗杂, 再用 150 mmol/L 咪唑进行洗脱, 纯化样品经 SDS-PAGE 检测后, 利用 Millipore 生产的 Amicon Ultra-15 10K 进行超滤浓缩, 浓缩后的样品利用 GE 公司生产的 HiLoad 16/60 Superdex 200 pg 进一步纯化, 再次超滤, 浓缩后, 过夜透析。

ITC 实验利用 TA 公司生产的 Affinity ITC 进行。用透析液将上述浓缩样品稀释至 100  $\mu\text{mol/L}$ , 化合物浓度为 5 mmol/L, 在 25 °C、75 r/min 条件下进行 ITC 实验。蛋白浓度的测定利用 Bio-Rad 公司生产的 Quick Start Bradford 1 $\times$  Dye Reagent 进行。

## 2 结果和分析

### 2.1 CNB-1 及其 MCP 受体突变株对芳香化合物和 TCA 循环中间代谢产物的趋化表型检测

游动平板法是一种检测细菌趋化性的常用方法, 利用该方法对 35 种芳香族化合物和 9 种 TCA 循环中间代谢产物进行了筛选(表 2, 图 1), 结果表明, CNB-1 菌株对 12 种芳香族化合物和 9 种 TCA 循环中间代谢产物具有趋化表型, 其中对 PCA 和 4HB 具有强趋化表型, PCA 和 4HB 为强趋化效应物, 对 3HPA、Gen、3HB、Van、Ben、cis-Aco、Mal、Fum 和 Oxa 具有中强趋化表型, 这 9 种化合物为中强趋化效应物, 对 Vin、Cat、Phe、4FP、GA、 $\alpha$ -Ket 和 iCit 具有弱趋化表型, 这 7 种化合物为弱趋化效应物。

表 2. CNB-1 对 44 种化合物的趋化表型检测结果

Table 2. The phenotype of CNB-1 to 44 compounds

Compounds	Abbreviation	Phenotype	Compounds	Abbreviation	Phenotype
Protocatechuic acid	PCA	+++	Resorcinol	Res	-
4-Hydroxybenzoic acid	4HB	+++	4-Hydroxysalicylic acid	4HS	-
3-Hydroxybenzoic acid	3HPA	++	4-Chlorocatechol	4CP	-
Gentisuric Acid	Gen	++	Phenylacetic acid	PAC	-
3-Hydroxyphenylacetic acid	3HB	++	m-Toluic acid	3TC	-
cis-Aconitic acid	cis-Aco	++	4-Nitrobenzoic acid	4NB	-
Malic acid	Mal	++	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	34DPA	-
Fumaric acid	Fum	++	4-Methylcatechol	4MP	-
Oxaloacetic acid	Oxa	++	3-Methylcatechol	3MP	-
Vanillic acid	Van	++	p-Dimethylbenzaldehyde	4DB	-
Benzoic acid	Ben	++	Biphenyl	Bip	-
Vanillin	Vin	+	Diphenylamine	Dip	-
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	$\alpha$ -Ket	+	m-Phenylenediamine hydrochloride	3PH	-
Catechol	Cat	+	5-Sulfosalicylic acid	Kal	-
Phenol	Phe	+	p-Nitroaniline	4NA	-
p-Hydroxybenzaldehyde	4FP	+	4-Hydroxybenzyl alcohol	4HBA	-
Gallic acid	GA	+	m-Nitrochlorobenzene	3NCB	-
Citric acid	Cit	+	Ethylene-diamine dihydrochloride	EDD	-
Pyruvic acid	Pyr	+	Metanilic acid	3ABS	-
Succinic acid	Suc	+	Chromotropic acid	Chr	-
Isocitric acid	iCit	+	3-Hydroxybenzyl alcohol	3HBA	-
4-Chlorobenzoic acid	4CB	-	2-Hydroxybenzyl alcohol	2DT	-

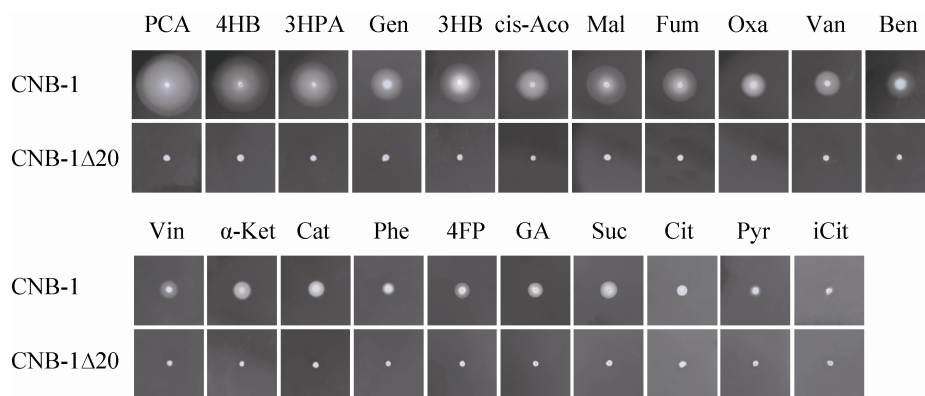


图 1. 游动平板法检测 CNB-1 对 21 种化合物的趋化表型

Figure 1. Chemotactic responses to 21 compounds (at final concentrations of 0.15 g/L) by strain CNB-1 and CNB-1 $\Delta$ 20, as determined with swimming plate assays. All tests were performed in triplicate, and one set of bacterial colony photos is displayed. The abbreviations of each compound were listed in Table 2.

## 2.2 突变菌株 CNB-1 $\Delta$ MCP2923 的趋化表型减弱

为了验证 MCP2923 在 CNB-1 中介导趋化作用, 对 CNB-1 $\Delta$ MCP2923 菌株的趋化表型进行了检测。结果显示, 相对于 CNB-1 野生株, MCP2923 基因的敲除突变株 CNB-1 $\Delta$ MCP2923 对 20 种趋化物的趋化表型减弱, 而对异柠檬酸等其他化合物的趋化则没有明显影响(图 2-C)。其中, 对 Gen、3HB、3HPA 和 Oxa 趋化减弱在 25% 以上; 对 4HB 和 Mal 趋化减弱的比例在 20% 左右; 对 Ben、PCA、Van、Vin、cis-Aco、Fum 和  $\alpha$ -Ket 趋化减弱的比

例在 16% 左右; 对于 Cat 和 Phe 趋化减弱的比例分别为 26% 和 39.8%。这表明 MCP2923 参与了 CNB-1 对这些化合物的趋化, 且多种 MCP 在这一过程中发挥着作用。

## 2.3 MCP2923 基因可以部分回补 CNB-1 $\Delta$ 20 的趋化表型

在确定敲除 MCP2923 基因可以减弱趋化表型后, 进一步将 MCP2923 回补到 CNB-1 $\Delta$ 20 菌株中, 以确定 MCP2923 在 CNB-1 菌株趋化中的作用(图 3-A, B)。pBBR1MCS-2 和 pDSK519 两种质

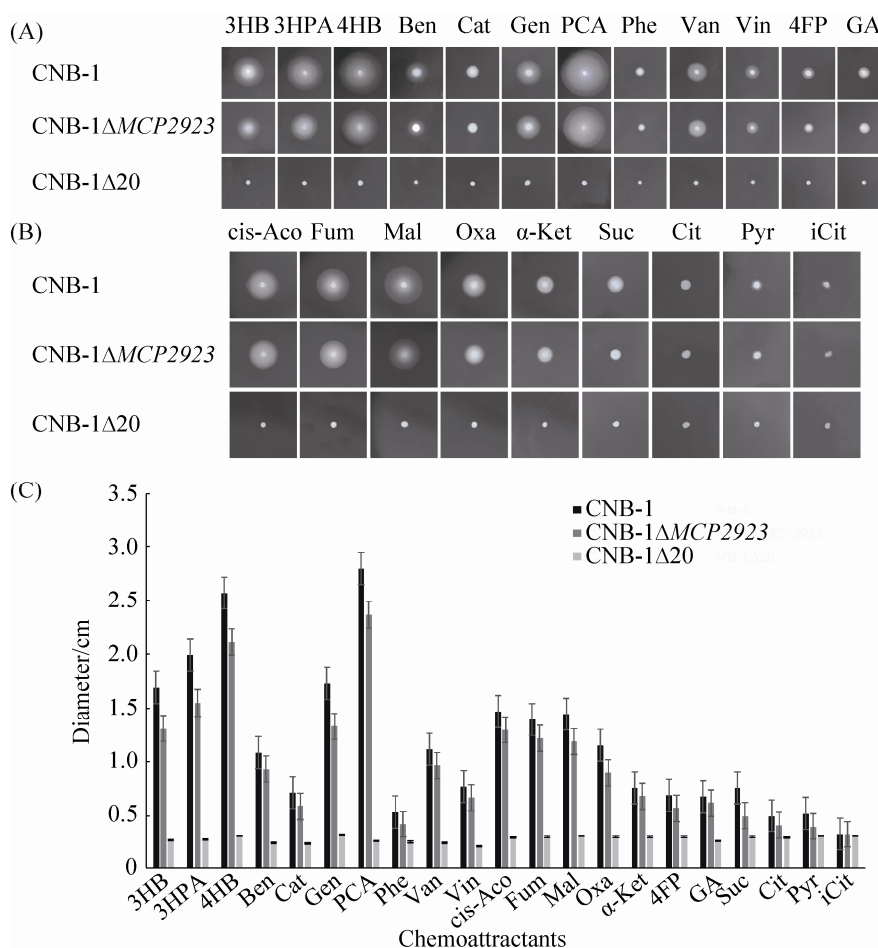


图 2. 游动平板法检测 CNB-1 $\Delta$ 2923 对 21 种趋化物的趋化表型

Figure 2. Chemotactic responses to 21 chemoattractants with strain CNB-1 and mutants (CNB-1 $\Delta$ 20 and CNB-1 $\Delta$ MCP2923). Swimming plate assays were used. All tests were performed in triplicates, and one set of bacterial colony photos is displayed (A) & (B). Averages of colony diameters were plotted, and standard deviations are shown (C). The abbreviations of each compound was listed in Table 2.

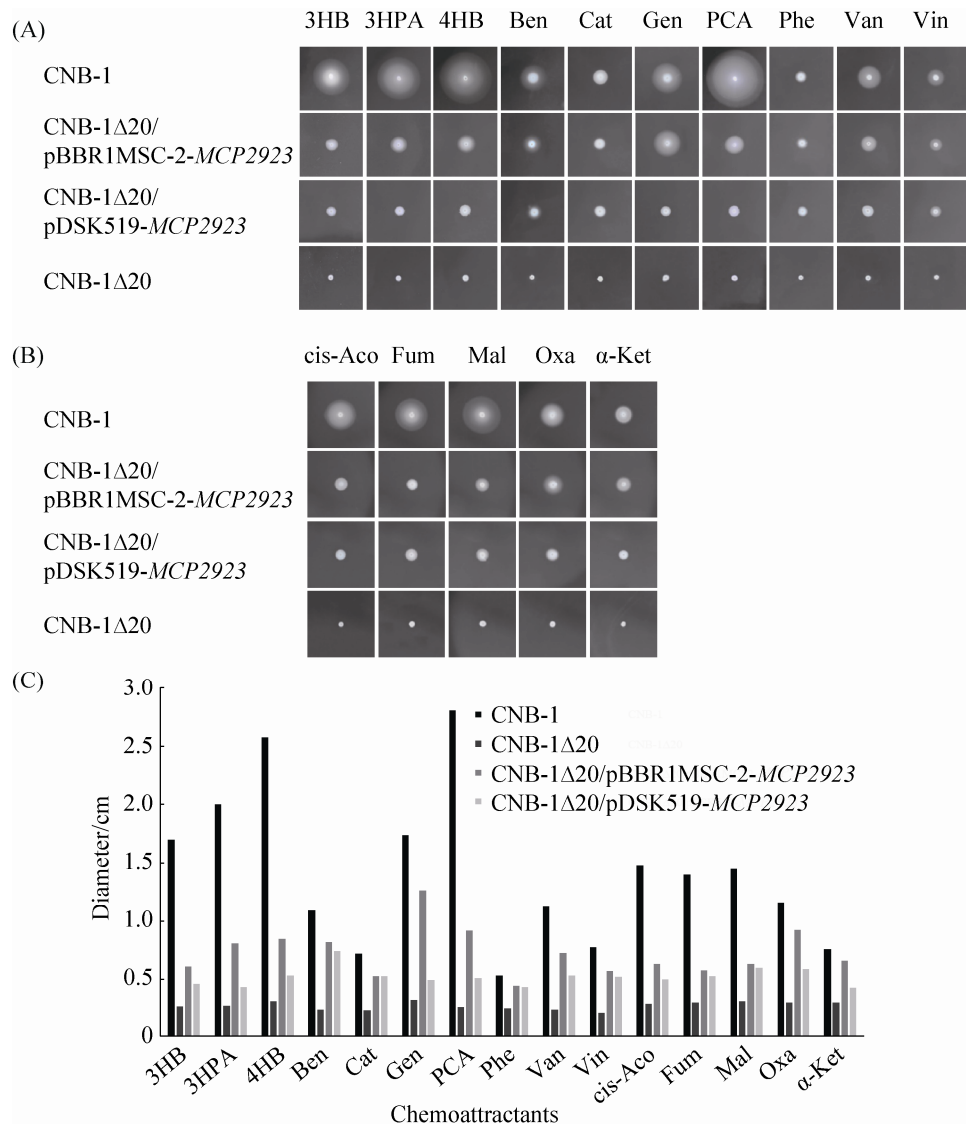


图 3. 游动平板法检测 *MCP2923* 基因回补 CNB-1 $\Delta$ 20 的趋化表型

Figure 3. Chemotactic responses to 15 chemoattractants with strain CNB-1 and mutants (CNB-1 $\Delta$ 20, CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MSC-2-*MCP2923* and CNB-1 $\Delta$ 20/pDSK519-*MCP2923*). Swimming plate assays were used. All tests were performed in triplicate, and one set of bacterial colony photos is displayed (A) & (B). Averages of colony diameters were plotted, and standard deviations are shown (C). The abbreviations of each compound was listed in Table 2.

粒对 *MCP2923* 回补结果表明, *MCP2923* 可以回补 CNB-1 $\Delta$ 20 对上述趋化物中 15 种的趋化表型, 但无法回补 CNB-1 $\Delta$ 20 对 4FP 和 GA 的趋化表型。CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MSC-2-*MCP2923* 的表型强于

CNB-1 $\Delta$ 20/pDSK519-*MCP2923*, 这可能与这 2 个质粒在宿主菌株的拷贝数差异有关。CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MSC-2-*MCP2923* 对 3HB、3HPA、4HB 和 Mal 的趋化表型的回补比例分别为 23.5%、31.0%、



23.4%和 27.8% (图 3-C), 这与敲除 MCP2923 基因造成的表型减弱比例大致相同。而对于其他化合物, MCP2923 回补产生的表型变化比例均明显大于 MCP2923 敲除产生的表型变化比例。

#### 2.4 利用 Agarose-in-plug 法检测 MCP2923 对芳香族化合物的趋化性

游动平板法相对于其他方法具有简单易行的优点, 但趋化效应物的浓度梯度形成是依赖代谢的, 这意味着如果某一类化合物不能被菌株代谢, 则不能使用该方法检测趋化性。对比游动平板法, Agarose-in-plug 法依赖趋化物在溶液中扩散形成浓度梯度, 随后实验使用 plug-in 法筛选可能与 MCP2923 存在直接相互作用的趋化效应物(图 4)。利用 Agarose-in-plug 法对 10 种芳香族化合物进行检测, 但只检测到了单回补菌株对 PCA 和 4HB 的趋化表型, 说明 MCP2923 介导的对芳香化合物

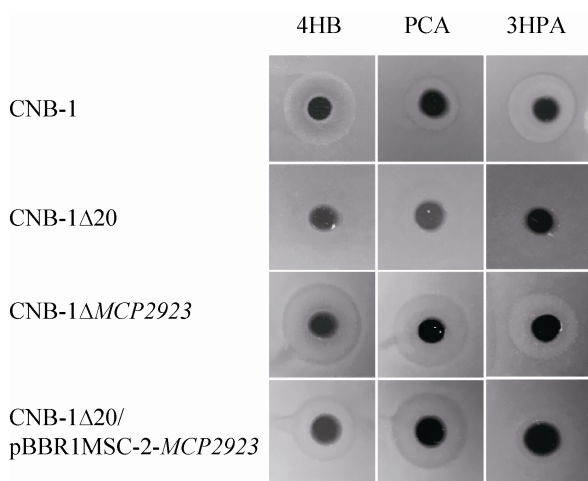


图 4. Agarose-in-plug 法检测 MCP2923 对芳香族化合物的趋化性

Figure 4. Chemotactic responses of strain CNB-1 and mutants (CNB-1 $\Delta$ 20, CNB-1 $\Delta$ MCP2923 and CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MCS-2-MCP2923) to 4HB, PCA and 3HPA using agarose-in-plug assays. The concentration of each compound used in the assays was 10 mmol/L. The abbreviations of each compound were listed in Table 2.

的趋化作用, 包括了代谢依赖型和非依赖型两种趋化现象。

#### 2.5 MCP2923 蛋白分子的跨膜结构和配体结合区的生物信息学分析

根据 MCP 跨膜区的数目和 LBD 结构域的位置可以将其分为 5 种不同的拓扑结构, 分别为 Ia、Ib、II、III、Iva 和 IVb<sup>[17]</sup>。为了获得 MCP2923 的拓扑结构, 对 MCP2923 进行了相关分析。DAS 是根据疏水性氨基酸序列来预测蛋白跨膜区的生物信息学工具, 经 DAS 预测, MCP2923 在第 12–29 位氨基酸和第 192–208 位氨基酸具有两段跨膜区(图 5-A)。Pfam 数据库和 SMART 数据库进一步分析也印证了这一预测, 结果表明 MCP2923 具有典型 MCP 所具有的 HAMP 结构域和 MA 结构域(图 5-B)。因此可以认为, MCP2923 为 2 次跨膜, 并且配体结合结构域在膜外侧, 属于 Ia 型拓扑结构, LBD 结构域的长度为 162 个氨基酸残基。

#### 2.6 MCP2923LBD 在 MCP2923 介导的趋化表型中起关键作用

配体结合结构域(ligand binding domain, LBD)是 MCP 与配体相结合的区域, 是趋化信号的起始位置, 在细菌的趋化中起着关键作用。为了验证 MCP2923LBD 对 MCP2923 功能的必需性, 将 MCP2923LBD 结构域敲除, 构建了 CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MCS-2-MCP2923 $\Delta$ LBD 菌株, 利用游动平板法对其趋化性进行了检测(图 6)。结果表明, 缺失配体结合结构域的 MCP2923 无法回补 CNB-1 $\Delta$ 20 对 PCA 和 Oxa 等 15 种趋化效应物的趋化性。表明 MCP2923LBD 在 MCP2923 介导的趋化表型中是必需的。

#### 2.7 MCP2923LBD 的纯化及其配体的筛选

为了进一步确定 MCP2923 是否与上述趋化物存在直接的相互作用, 在表型实验证明 MCP2923LBD



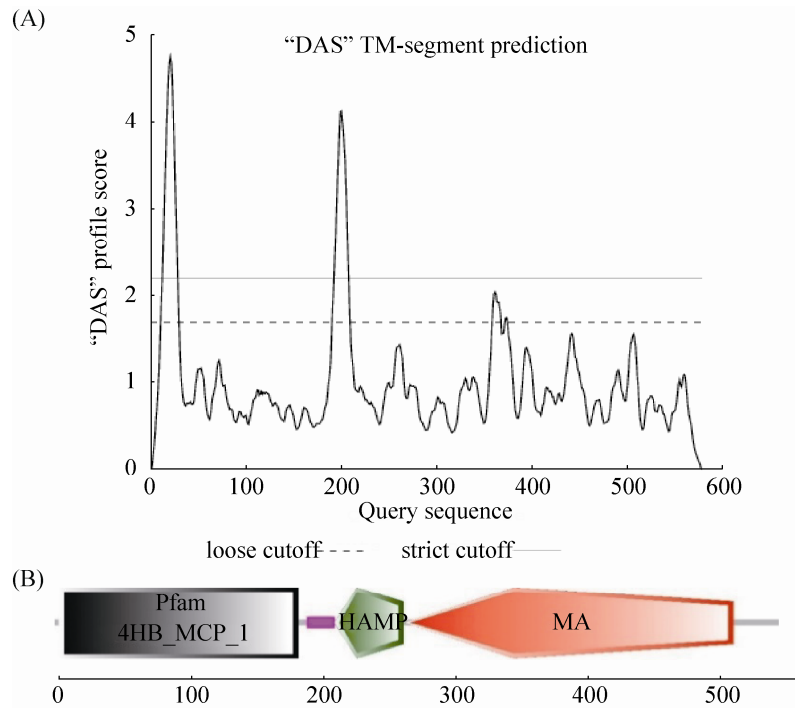


图 5. MCP2923 的结构域和跨膜区分析

Figure 5. The bioinformatic analysis for MCP2923 is performed by DAS server, Pfam database and SMART database. A: the DAS server predict MCP2923 has two transmembrane regions, F<sup>12</sup> to L<sup>29</sup> and A<sup>192</sup> to I<sup>208</sup>; B: protein domain of MCP2923 is analyzed by Pfam database and SMART database. MCP2923 has HAMP domain and MA domain, representing a typical MCP.

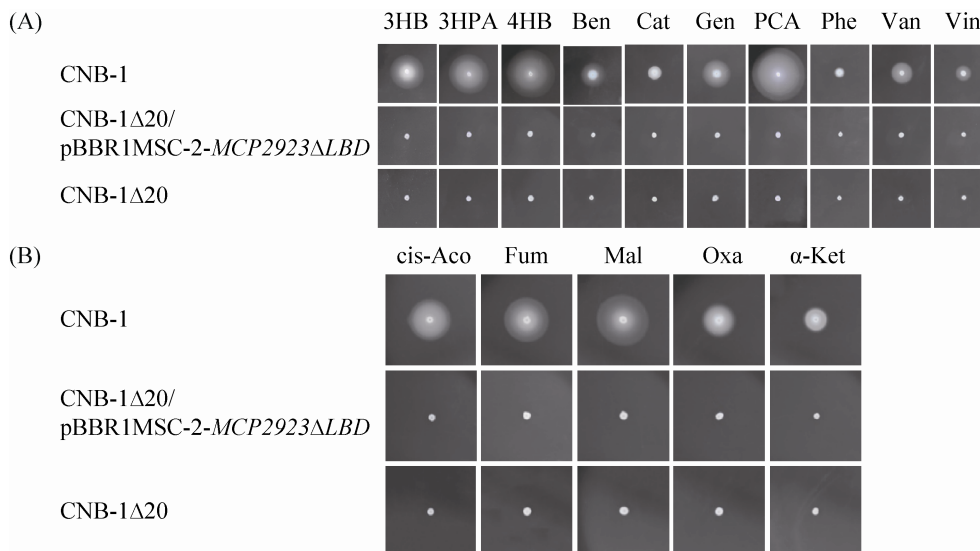


图 6. 敲除 MCP2923LBD 使 MCP2923 无法回补 CNB-1Δ20 趋化表型

Figure 6. Chemotactic responses to 15 chemoattractants with strain CNB-1 and mutants (CNB-1Δ20, CNB-1Δ20/pBBR1MSC-2-MCP2923ΔLBD). Swimming plate assays were used. All tests were performed in triplicate, and one set of bacterial colony photos is displayed (A) & (B). Averages of colony diameters were plotted. The abbreviations of each compound were listed in Table 2.

在 MCP2923 介导的趋化表型中起关键作用后, 进一步利用生化实验对上述结论进行了验证。

对 6 种芳香族化合物(PCA、4HB、3HPA、Gen、Cat 和 Phe)的滴定结果表明, MCP2923LBD 与这 6 种趋化物均不存在明显的相互作用。虽然在 PCA 进行实验时出现了热量变化趋势, 但 5 mmol/L PCA 滴定透析液的对照实验中也出现了热量变化的趋势, 因此不能确定 PCA 与 MCP2923LBD 具有相互作用。对 4 种 TCA 循环中间代谢产物的筛选也没有检测到其与 MCP2923LBD 之间存在相互作用。

### 3 讨论

通过游动平板法对 44 种化合物的筛选, 我们发现了 CNB-1 具有趋化表型的 21 种趋化效应物, 其中包括 12 种芳香化合物和 9 种 TCA 循环中间代谢产物, MCP2923 基因可回补 CNB-1 $\Delta$ 20 对这 21 种趋化效应物中 15 种趋化效应物的表型, 不能恢复对 4FP、GA、Cit、Pyr 和 Suc 等趋化效应物的表型, 其中原因尚不清楚。敲除 MCP2923 基因使突变菌株 CNB-1 $\Delta$ MCP2923 相对于野生型菌株表型均略有减弱; 缺失 LBD 的 MCP2923 不能恢复突变菌株 CNB-1 $\Delta$ 20 对本实验测定的效应物的趋化性。以上实验结果都表明, MCP2923 可以介导 CNB-1 对多种芳香化合物和小分子有机酸等趋化效应物的趋化表型, 并且其 LBD 结构域在其介导趋化表型的过程中起关键作用。对大多数化合物而言, MCP2923 基因敲除造成的趋化圈减弱比例小于 MCP2923 所回补的趋化圈比例, 这在一定程度上说明, CNB-1 中 MCP 的功能存在冗余。有意思的是, 虽然从表型实验的结果看, 单回补 MCP2923 无法介导 CNB-1 对 4FP、GA、Cit、Pyr 和 Suc 的趋化, 但敲除 MCP2923 却对趋化表型产生了影响, 这表明 MCP2923 对这 5 种化合物

的趋化可能需要多种 MCP 共同参与。另外, 是否利用 4HB 对菌株进行诱导培养, 直接影响着 Agarose-in-plug 法的实验结果, 这一现象与 PcaY 介导的对芳香族化合物的趋化相似<sup>[18]</sup>。在最近的研究中, Lopez-Farfan 等人利用 RT-PCR 的方法对 *P. putida* KT2440 中的 MCP 基因的转录水平进行了检测, 发现在趋化效应物的存在下, 相应 MCP 基因的转录水平多数上调<sup>[19]</sup>。结合两种单回补菌株 CNB-1 $\Delta$ 20/pDSK519-MCP2923 和 CNB-1 $\Delta$ 20/pBBR1MCS-2-MCP2923 的表型检测结果以及敲除、回补表型比例存在差异的结果, 表明 MCP2923 的表达水平可能影响菌株的趋化表型。

ITC 实验表明 MCP2923LBD 与所检测的 10 种化合物均没有相互作用。Iwaki 等人实验证明了 NbaY 可以引发对 2-硝基苯甲酸的趋化表型<sup>[20]</sup>, 但 García 等人研究表明, 与 NbaY 具有高相似性的 McpP 可以结合丙酮酸, 但不能与 2-硝基苯甲酸相互作用<sup>[21]</sup>。另外有研究表明, MCP 对苯酚的趋化性也不是通过与其 LBD 结构域结合实现的, 而是与 MCP 跨膜区或 HAMP 结构域相互作用来介导菌株对苯酚的趋化表型<sup>[22]</sup>。综上所述, MCP2923 可能存在 LBD 结构域与化合物直接作用以外的其他趋化作用机制, 确切的分子机制还有待研究。

微生物的趋化性不仅可以使自身处于有利的环境中, 还可以通过自身的趋化运动提高其降解环境中污染物的能力和效率。例如, Paul 等人通过模拟环境研究了 *Ralstonia* sp. 在土壤中对 4-硝基苯酚的降解。结果表明, 具有趋化性的 SJ98 菌株其降解能力强于不具有趋化性的 RKJ200 菌株<sup>[23]</sup>。将微生物的趋化性与芳香族化合物的降解能力相结合, 可以加强微生物对环境中芳香族化合物的降解能力, 治理芳香族化合物造成的环境污染。MCP 作为趋化通路中的第一个分子, 在微生物的

趋化中起着重要的作用。研究 MCP 不仅有利于我们更好地理解微生物趋化性本身，也有助于构建更加高效的芳香族化合物降解菌株。

## 参考文献

- [1] Parkinson JS, Hazelbauer GL, Falke JJ. Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(5): 257–266.
- [2] Díaz E, Jiménez JI, Nogales J. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(3): 431–442.
- [3] Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen J, Timmis KN, Dusterhoft A, Tümmler B, Fraser CM. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(12): 799–808.
- [4] Ma YF, Zhang Y, Zhang JY, Chen DW, Zhu YQ, Zheng HJ, Wang SY, Jiang CY, Zhao GP, Liu SJ. The complete genome of *Comamonas testosteroni* reveals its genetic adaptations to changing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(21): 6812–6819.
- [5] Masai E, Kamimura N, Kasai D, Oguchi A, Ankai A, Fukui S, Takahashi M, Yashiro I, Sasaki H, Harada T, Nakamura S, Katano Y, Narita-Yamada S, Nakazawa H, Hara H, Katayama Y, Fukuda M, Yamazaki S, Fujita N. Complete genome sequence of *Sphingobium* sp. strain SYK-6, a degrader of lignin-derived biaryls and monoaryls. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(2): 534–535.
- [6] Samanta SK, Bhushan B, Chauhan A, Jain RK. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward different nitroaromatic compounds and their degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269(1): 117–123.
- [7] Parales RE, Ditty JL, Harwood CS. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 4098–4104.
- [8] Lacal J, Muñoz-Martínez F, Reyes-Darías JA, Duque E, Matilla M, Segura A, Ortega-Calvo JJ, Jimenez-Sánchez C, Krell T, Ramos JL. Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(7): 1733–1744.
- [9] Grimm AC, Harwood CS. NahY, A catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(10): 3310–3316.
- [10] Vangnai AS, Takeuchi K, Oku S, Kataoka N, Nitisakulkan T, Tajima T, Kato J. Identification of CtpL as a chromosomally encoded chemoreceptor for 4-chloroaniline and catechol in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(23): 7241–7248.
- [11] Ni B, Huang Z, Wu YF, Fan Z, Jiang CY, Liu SJ. A novel chemoreceptor MCP2983 from *Comamonas testosteroni* specifically binds to *cis*-aconitate and triggers chemotaxis towards diverse organic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(6): 2773–2781.
- [12] Ni B, Huang Z, Fan Z, Jiang CY, Liu SJ. *Comamonas testosteroni* uses a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates to trigger chemotactic responses towards aromatic compounds. *Molecular Microbiology*, 2013, 90(4): 813–823.
- [13] Huang Z, Ni B, Jiang CY, Wu YF, He YZ, Parales RE, Liu SJ. Direct sensing and signal transduction during bacterial chemotaxis toward aromatic compounds in *Comamonas testosteroni*. *Molecular Microbiology*, 2016, 101(2): 224–237.
- [14] Wu JF, Sun CW, Jiang CY, Liu ZP, Liu SJ. A novel 2-aminophenol 1,6-dioxygenase involved in the degradation of *p*-chloronitrobenzene by *Comamonas* strain CNB-1: purification, properties, genetic cloning and expression in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 2005, 183(1): 1–8.
- [15] Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 1988, 70(1): 191–197.
- [16] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 1995, 166(1): 175–176.
- [17] Lacal J, García-Fontana C, Muñoz-Martínez F, Ramos JL, Krell T. Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(11): 2873–2884.
- [18] Luu RA, Kootstra JD, Nesteryuk V, Brunton CN, Parales JV, Ditty JL, Parales RE. Integration of chemotaxis, transport and catabolism in *Pseudomonas putida* and identification of the aromatic acid chemoreceptor PcaY. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(1): 134–147.
- [19] López-Farfán D, Reyes-Darías JA, Krell T. The expression of many chemoreceptor genes depends on the cognate chemoeffector as well as on the growth medium and phase. *Current Genetics*, doi: 10.1007/s00294-016-0646-7.
- [20] Iwaki H, Muraki T, Ishihara S, Hasegawa Y, Rankin KN, Sulea T, Boyd J, Lau PCK. Characterization of a pseudomonad 2-nitrobenzoate nitroreductase and its catabolic pathway-associated 2-hydroxylaminobenzoate mutase and a chemoreceptor involved in 2-nitrobenzoate chemotaxis. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(9): 3502–3514.
- [21] García V, Reyes-Darías JA, Martín-Mora D, Morel B, Matilla MA, Krell T. Identification of a chemoreceptor for C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> carboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(16): 5449–5457.

[22] Pham HT, Parkinson JS. Phenol sensing by *Escherichia coli* chemoreceptors: a nonclassical mechanism. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(23): 6597–6604.

[23] Paul D, Singh R, Jain RK. Chemotaxis of *Ralstonia* sp. SJ98 towards *p*-nitrophenol in soil. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(10): 1797–1804.

## Chemotactic responses towards various organic compounds mediated by MCP2923 in *Comamonas testosteroni* CNB-1

Yunzhe He<sup>1,2</sup>, Zhou Huang<sup>1,2</sup>, Chengying Jiang<sup>1,2,3</sup>, Shuangjiang Liu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>3</sup> IMCAS-RCEECAS Joint Laboratory for Environmental Microbial Technology, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Objective] MCP2923 is a putative of *Comamonas testosteroni* CNB-1. The objective of this study was to experimentally characterize MCP2923 for chemotactic response. [Methods] Using swimming plate assay, we determined chemotaxis towards 35 aromatic compounds and 9 Tricarboxylic Acid Cycle intermediates. Agrose-in-plug was used to screen aromatic chemoattractants that might bind to MCP2923 directly. To study the ligand of MCP2923, Isothermal Titration Calorimetry experiment was done to 11 chemoattractants. [Results] Swimming plate assay showed that CNB-1 responded to 12 aromatic compounds and 9 Tricarboxylic Acid Cycle intermediates that were defined as strong, medium and weak chemoattractants. Knockout MCP2923 gene reduced chemotactic responses to these chemoattractants. Complemented with MCP2923 gene to CNB-1Δ20, chemotaxis toward 15 chemoattractants was restored. Deletion of the ligand binding domain of MCP2923, chemotaxis failed to complement. Isothermal Titration Calorimetry experiment showed no response to the tested 11 compounds, including protocatechuic acid and 4-hydroxybenzoic acid. [Conclusion] MCP2923 mediates chemotaxis towards both aromatic compounds and Tricarboxylic Acid Cycle cycle intermediates by CNB-1. The ligand binding domain of MCP2923 is necessary for triggering chemotaxis toward these chemoattractants.

**Keywords:** *Comamonas testosteroni* CNB-1, methyl-accepting chemotaxis protein (MCP), bacterial chemotaxis, aromatic compounds, tricarboxylic acid cycle

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31230003)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-64807423; Fax: +86-10-64807421; E-mail: liusj@im.ac.cn

Received: 7 February 2017; Revised: 4 April 2017; Published online: 16 May 2017

刘双江, 博士, 现任中国科学院微生物研究所所长、研究员。现任亚洲研究资源中心网络主席。2000年入选中国科学院“百人计划”。2007年国家杰出青年科学基金获得者, 目前担任 *Applied and Environmental Microbiology*、*Archives of Microbiology* 编辑, 《微生物学报》、《环境科学学报》、《生物工程学报》等杂志编委。在芳烃类化合物的微生物代谢与趋化、微生物分离培养技术及微生物资源收集、极端环境微生物应用等方面, 取得了突出成绩, 包括: (1) 发现了多个芳烃类化合物转运蛋白和多条代谢途径; (2) 鉴定了催化苯环裂解的 2-氨基酚-1,6-双加氧酶基因, 发现了两类新型脱氨酶; (3) 通过改进培养方法和技术, 从各种环境中分离获得各种生理类群的微生物菌种, 已经鉴定并命名了多个微生物新物种, 并建立了 2 个新属—杨氏菌属(*Yangia*)和周氏菌属(*Zhouia*); (4) 揭示了丛毛单胞菌 CNB-1 对多种芳烃化合物的趋化的新机制。

