

## 铜绿假单胞菌 III 型分泌系统的分子调控机制

罗勤<sup>1</sup>, 金守光<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

(<sup>2</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology, PO Box 100266, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA)

**摘要:** 铜绿假单胞菌是临床上重要的革兰氏阴性条件致病菌。通过 III 型分泌系统, 铜绿假单胞菌将其毒力因子注入到真核宿主细胞内部, 逃避宿主巨噬细胞的吞噬降解, 引起宿主相应的病理变化, 是铜绿假单胞菌感染致病的重要原因。本文在简单介绍铜绿假单胞菌 III 型分泌系统组成和功能的基础上, 主要对调控 T3SS 基因转录表达的分子机制的研究进展进行综述和讨论。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; III 型分泌系统; 转录调控

**中图分类号:** Q935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1413-05

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 又称绿脓杆菌, 是临床上重要的革兰氏阴性条件致病菌。该菌广泛分布于自然界及正常人皮肤、肠道和呼吸道, 可引起烧伤或免疫力低下患者呼吸道感染、败血症、骨髓炎、心内膜炎和尿路感染等并发症, 在囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 患者中更能造成严重伤害甚至死亡<sup>[1]</sup>。另外, 该菌极易聚集在各种侵入性检查和体内人工置留物的表面, 形成生物膜, 成为耐药菌株, 治疗十分棘手<sup>[2, 3]</sup>。因此, 深入理解铜绿假单胞菌致病机理, 研发新药靶标, 有效预防和治疗铜绿假单胞菌感染是包括临床医生在内的科学工作者的共同目标。

目前已知铜绿假单胞菌成功感染宿主细胞导致疾病的主要原因是其能够通过 III 型分泌系统 (type III secretion system, TTSS 或者 T3SS<sup>[4]</sup>) 的作用, 逃避宿主巨噬细胞的吞噬降解。T3SS 在革兰氏阴性致病菌中普遍存在, 其功能是将病原菌的效应分子 (effector, 以毒力蛋白为主) 注入 (如通过转位作用) 到真核宿主细胞内部, 从而导致许多疾病<sup>[5-7]</sup>。尽管不同病原菌的 T3SS 在分子结构和转运机制上有很多相似之处, 但是被转运的效应分子、T3SS 基因的表

达调控方式以及致病机理却因病原菌的不同而千差万别<sup>[8]</sup>。本文结合作者在国外的相关工作, 在简单介绍铜绿假单胞菌 III 型分泌系统组成和功能的基础上, 主要对调控 T3SS 基因表达分子机制进行综述和讨论。

### 1 铜绿假单胞菌 T3SS 的分子组成和功能

铜绿假单胞菌 T3SS 的分子结构和其它革兰氏阴性致病菌 (如耶尔森氏菌属 *Yersinia* spp., 沙门氏菌属 *Salmonella* spp., 福氏志贺氏菌 *Shigella flexneri*) 一样, 由细菌膜上的装置蛋白 (Bacterial membrane apparatus proteins)、转位子蛋白 (translocators)、被转移的效应分子 (Translocated effectors) 和 T3SS 分子伴侣 (chaperones) 四类蛋白组成<sup>[5, 6]</sup>。装置蛋白横跨细菌细胞内外膜, 形似指向胞外的注射针头, 被称为 T3SS 的结构蛋白<sup>[9]</sup>; 通过装置蛋白的跨膜通道和转位子蛋白的转运作用, 将毒力蛋白组成的效应分子分泌到胞外或直接注射到真核细胞内部。许多效应分子常常特异性地结合一些小分子的酸性蛋白, 即分子伴侣, 以提高分泌前和分泌时的稳定性。铜绿假单胞菌 T3SS 涉及相互关联的 43 个基因<sup>[8]</sup>。其中, 与分泌、转

位和调节相关的基因位于染色体的相邻部位, 形成毒力岛, 由 5 个操纵子组成 *pscUTSRQPON*, *popN-PCR1234DR*, *PCRGVH-popBD*, *exsCEBA* 和 *exsD- pscBCDEFGHIJKL* (图 1); 而编码效应分子及其伴侣分子的基因则分散位于染色体的不同部位。如图 1 所示, 铜绿假单胞菌的效应分子有 4 种: ExoS, ExoT, ExoU 和 ExoY<sup>[10]</sup>。ExoS 和 ExoT 具有 ADP 核糖基转移酶活性, 能抑制宿主细胞吞

噬作用、破坏肌动蛋白细胞骨架重排、导致细胞凋亡和抑制细胞分裂等; ExoU 和 ExoY 分别是具有磷脂酶和腺苷酸环化酶活性的细胞毒素<sup>[11]</sup>。除了抗吞噬作用外, 效应分子对宿主细胞组织的破坏增强了细菌的侵染传播能力, 从而导致机体引发系统感染和败血症<sup>[5]</sup>。因此, 效应分子在铜绿假单胞菌的致病过程中起着关键作用, 是主要的致病因子。

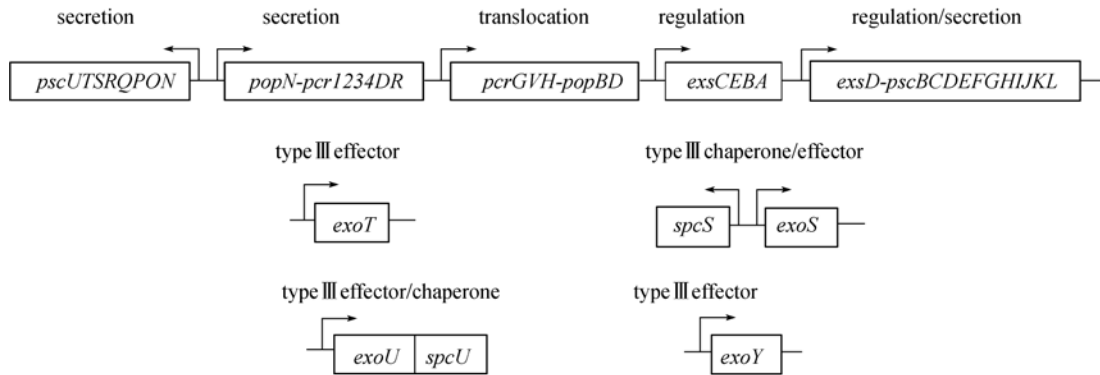


图 1 T3SS 基因的组成和功能

Fig.1 Genetic organization of the T3SS. The arrows indicate direction of the ExsA-dependent transcripts (modified from Yahr<sup>[8]</sup>).

## 2 铜绿假单胞菌 T3SS 的主要调控因子及其调控机制

研究表明, 铜绿假单胞菌 III 型分泌系统基因的表达与环境条件紧密相关: 细菌与宿主细胞的相互接触 (Host cell contact) 以及细胞外的低  $\text{Ca}^{2+}$  (微摩尔) 环境 (low  $\text{Ca}^{2+}$ ) 能诱导 T3SS 的表达; 而代谢压力、DNA 损伤、胞外高  $\text{Cu}^{2+}$  和低渗透压等不利环境所引起的应激反应抑制其活性<sup>[8]</sup>。针对不同环境信号做出不同响应不仅有利于细菌节省能源, 而且适时表达 III 型分泌系统基因, 还能减少抗体产生, 逃避宿主免疫监控。环境信号是如何传递到细胞内? T3SS 哪些基因被诱导或抑制? 其机制是什么? 一直是研究铜绿假单胞菌的方向和热点。在过去的 5 年里, 大约有 25 个基因被鉴定出与 T3SS 的调控有关<sup>[12-16]</sup>, 主要调控因子 ExsA 和 Vfr 在调节 T3SS 基因的表达上扮演了其重要的作用。

### 2.1 T3SS 的表达需要 ExsA

III 型分泌系统所有基因都受到 ExsA 的直接调控<sup>[10]</sup>。ExsA 是 AraC 转录激活子家族成员之一。在依赖于 ExsA 调控的基因启动子上距离转录起始点上游约 51-52 个碱基处有一个 TNAAAANA 的保守序列, 该序列是 ExsA 的结合位点<sup>[17]</sup>。ExsA 可能以单

体的形式结合到靶 DNA 启动子上, 调节靶 DNA 的转录表达。ExsA 活性受到三个蛋白: ExsC, ExsE 和 ExsD 的反馈调控: ExsD 结合到 ExsA 上, 抑制 ExsA 的活性; ExsC 的作用为抗-抗失活因子, 能直接结合到 ExsD 上并抑制 ExsD 的负调节活性; 而 ExsE 通过结合到 ExsC 上, 起到拮抗 ExsC 功能的作用。编码 ExsD 的 *exsD* 基因位于操纵子 *exsD- pscBCDEFGHIJKL* 的首位; 而编码 ExsA、ExsC 和 ExsE 的基因位于同一个 *exsCEBA* 操纵子上。由 *exsE* 编码的 ExsE 蛋白不仅具有调控作用, 还具有分泌蛋白的特性, 所以通过其分泌来调节 ExsA 的活性, 将 T3SS 基因的转录与蛋白质的分泌联系起来<sup>[18]</sup>: 在高  $\text{Ca}^{2+}$  环境条件下, 蛋白质的分泌受到抑制, ExsE 在细胞内积累, 并且结合到抗-抗失活因子 ExsC 上, 释放出抗活性因子 ExsD, ExsD 随即结合到 ExsA 上, 抑制 ExsA 活性而保持 T3SS 基因的低转录水平; 反之, 低  $\text{Ca}^{2+}$  环境条件或直接与宿主细胞接触, 激活蛋白质的分泌, ExsE 被 T3SS 分泌系统转运到细胞外, 胞内 ExsE 浓度降低, 导致更多的 ExsC 结合到 ExsD 上, 从而释放出 ExsA, 诱导 T3SS 的表达。但迄今为止, 还没有弄清 ExsE-ExsC, ExsC-ExsD, ExsD-ExsA 的相互作用的细节, 也没有找到这些蛋白质之间的结合与钙离子浓度变化的任何关联。但这种反馈抑制现象在其他阴性细菌的

T3SS 中是普遍存在的<sup>[8]</sup>。

关于铜绿假单胞菌接受环境信号后, T3SS 如何开始启动表达, 目前还没有明确定论。我们在实验<sup>[17]</sup>中观察到除了低钙刺激外, 效应分子向胞外分泌还需要环境提供一种具有“低亲和、高容量钙结合能力”(low-affinity, high-capacity calcium-binding ability)的蛋白分子 TSFs (Type III Secretion Factors), 如血清白蛋白和酪蛋白。同时还发现加入 TSF 和 EGTA (乙二醇二乙醚二胺四乙酸, 钙离子螯合剂)后, 胞内积累的效应分子立即向外分泌, 远远快于 T3SS 基因的表达, 这个实验现象表明, T3SS 的分泌也受到诱导信号的严格控制。结合其它革兰氏阴性病原菌 T3SS 的研究成果, 我们认为<sup>[19]</sup>: 铜绿假单胞菌在 T3SS 分泌器顶部可能存在一个“帽子”结构阻挡着 T3SS 的分泌。当细菌接受环境刺激, 如低钙和 TSF 或与宿主细胞接触后, “帽子”被揭开, 导致包括 ExsE 在内的效应分子的分泌, 从而激活 ExsA, 诱导 T3SS 基因的表达。“帽子”结构的组成及其调节机制将有待于进一步实验证实。

## 2.2 cAMP 级联系统调控 T3SS 基因的转录

环境信号通过影响 cAMP 在细菌胞内水平是调节 T3SS 基因表达的另外一种重要的方式<sup>[20, 21]</sup>。一些目前已明确的对于 T3SS 基因表达重要的环境条件, 如低钙环境可能是通过影响胞内 cAMP 的水平来调控 T3SS 的表达。实验证明: 低钙和氯化钠浓度升高条件下, 胞内 cAMP 的水平升高, T3SS 活性相应增强<sup>[20]</sup>。盐效应可以归结到渗透压的变化, 因为用其他溶剂如蔗糖代替也可以得到同样结论<sup>[20]</sup>, 暗示渗透压、cAMP 信号级联系统和 T3SS 的调节可能存在某种关联。

目前已知 cAMP 是以转录调控因子 Vfr 蛋白的变构调节子的形式作用于铜绿假单胞菌基因<sup>[20, 21]</sup>。Vfr 在结构和功能上与大肠杆菌 cAMP 受体蛋白 CRP 同源, 能调控群体感应 (QS), 外毒素 A 的分泌和四型纤毛介导的菌体运动等, 是铜绿假单胞菌重要的转录调节因子之一<sup>[22]</sup>。运用全基因组芯片技术揭示<sup>[20]</sup>: 相比野生铜绿假单胞菌, 在缺失 cAMP 或者 Vfr 的突变株中, 大约有 200 个基因的表达水平下调, 其中包括 T3SS、四型纤毛的合成和 II 型分泌系统的一些基因。该实验同时暗示了 T3SS 极可能在全局调控网络中, 尤其是调控致病进程中起到一定作用。

cAMP-Vfr 复合物调节 T3SS 基因表达的途径可

能和 ExsA 一样。遗传互补实验<sup>[19, 20]</sup>表明 ExsA 的过量表达可以补偿编码 Vfr 或者 cAMP 生物合成基因的缺失突变; 但是 cAMP 或 Vfr 的过量表达却不能补偿缺失 ExsA 的突变, 说明 cAMP 和 Vfr 作用于 ExsA 的上游或者与 ExsA 同步而调节 T3SS 基因的表达。然而 cAMP 和 Vfr 在调节 T3SS 表达中是如何发挥作用的迄今还不清楚。Vfr 和 ExsA 分别属于 CRP 和 AraC 家族成员, 尽管 CRP 能够协同 AraC 的转录作用, 甚至 cAMP-Vfr 还可以识别并结合到大肠杆菌 CRP 的靶 DNA 上, 但在 EMSA 实验中<sup>[23]</sup>, cAMP-Vfr 复合物不能识别并结合到 *exsCEBA* 操纵子上, 暗示 cAMP-Vfr 复合物不是直接作用于 *exsA* 的表达; 同时, 在已经测序完毕的铜绿假单胞菌 (PAO1) 基因组中只发现有两个与 CRP 结合的类似位点, 分别位于 *lasR* 和 *fleQ* 启动子上<sup>[24]</sup>。前者是 *las* 群体感应系统的调控因子编码基因, 后者是调控鞭毛合成的关键基因, 但它们并不影响 T3SS 的表达; 而且在 Vfr 缺失菌中引入 CRP 也不能补偿突变效应<sup>[25]</sup>。因此, cAMP-Vfr 复合物是如何调节 T3SS 基因的表达还有待进一步研究。

## 2.3 其它影响 T3SS 表达的因子

DNA 损伤在许多生物中是调节基因表达的信号。在铜绿假单胞菌中, DNA 损伤首先激活细菌 SOS 应急信号级联系统, 从而诱导 DNA 修复系统开始工作并产生绿脓细菌素<sup>[26]</sup>。我们的实验表明<sup>[27]</sup>, SOS 诱导产生一种抑制 T3SS 表达的蛋白 PtrB。抑制 T3SS 的转录可能使细菌在 DNA 损伤时集中能量进行 DNA 修复。

藻酸盐在囊性纤维化 (CF) 发病机制中起着重要作用。藻酸盐的合成受到 Sigma 因子 AlgU 的正调控和抗 Sigma 因子 MucA 蛋白的负调控<sup>[14]</sup>。有趣的是, 来自年长 CF 患者呼吸道的临床分离株, 却有许多带有 *mucA* 缺失突变, 导致过量表达藻酸盐, 产生粘液表型。这些粘液型的菌株在体外培养时, 即使是在低钙条件下也不表达 T3SS, 这与我们的实验一致<sup>[14]</sup>: 即人工诱导的 *mucA* 基因缺失突变, 导致 T3SS 的表达受到抑制。藻酸盐的合成抑制 T3SS 表达的机制还不清楚, 有可能是大量的藻酸盐给细菌造成了代谢压力, 进而影响 T3SS 的表达。

Rhl 是铜绿假单胞菌的群体感应系统 (QS) 之一, 研究发现 T3SS 的表达在 Rhl 群体感应系统的缺失突变株中升高, 类似结果在 Sigma 因子 *rpoS* 突变株中

也有发现<sup>[28,29]</sup>。由于 RpoS 具有调节 Rhl 表达的功能, 因此, RpoS 有可能通过群体感应来调节 T3SS 的表达。

### 3 展望

综上所述, 尽管过去几年里对于铜绿假单胞菌 T3SS 表达调控的认识有了很大提高, 但依然存在许多问题亟待解决。今后最困难也是最值得研究的是鉴定出那些诱导和抑制 T3SS 表达的环境和宿主信号因子以及构建调控网络体系, 对于深入研究 T3SS 复杂的调节机制、阐明其致病机理和设计针对 T3SS 表达的治疗药物和方法, 具有极其重要的意义。

### 参 考 文 献

- [1] Pier GB. CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5(1): 81–86.
- [2] 杨洋, 王燕. 铜绿假单胞菌生物被膜感染的研究进展. 国际呼吸杂志(*International Journal of Respiration*), 2007, 27(18): 1399–1401.
- [3] Mikuniya T, Kato Y, Ida T, *et al.* Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother*, 2007, 13(5): 285–290.
- [4] Desvaux M, Hébraud M, Henderson IR, *et al.* Type III secretion: what's in a name? *Trends Microbiol*, 2006, 14(4): 157–160.
- [5] Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(4): 535–549.
- [6] 汪莉, 王玉民, 岳俊杰, 等. III型分泌系统分子伴侣研究进展. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(6): 840–844.
- [7] 王蔚森, 潘玲. 细菌III型分泌系统的研究进展. 畜牧与兽医(*Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2006, 38(6): 58–60.
- [8] Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol*, 2006, 62(3): 631–640.
- [9] Yip CK, Strynadka NC. New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(4): 223–230.
- [10] Frank DW. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 1997, 26(4): 621–629.
- [11] 杨洪江, 魏东盛, 李明春, 等. 铜绿假单胞菌 *popN*-突变子III型分泌水平及与蛋白酶关系的研究. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2007, 23(5): 846–851.
- [12] Linares JF, López JA, Camafeita E, *et al.* Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2005, 187(4): 1384–1391.
- [13] Zheng Z, Chen G, Joshi S, *et al.* Biochemical characterization of a regulatory cascade controlling transcription of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6136–6142.
- [14] Wu W, Badrane H, Arora S, *et al.* MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2004, 186(22): 7575–7585.
- [15] Urbanowski ML, Lykken GL, Yahr TL. A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(28): 9930–9935.
- [16] Dasgupta N, Ashare A, Hunninghake GW, *et al.* Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca<sup>2+</sup> and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun*, 2006, 74(6): 3334–3341.
- [17] Kim J, Ahn K, Min S, *et al.* Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2005, 151(11): 3575–3587.
- [18] Dasgupta N, Lykken GL, Wolfgang MC, *et al.* A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol*, 2004, 53(1): 297–308.
- [19] Yang H, Shan Z, Kim J, *et al.* Regulatory role of PopN and its interacting partners in type III secretion of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2007, 189(7): 2599–2609.
- [20] Wolfgang MC, Lee VT, Gilmore ME, *et al.* Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell*, 2003, 4(2): 253–263.
- [21] Rietsch A, Mekalanos JJ. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 2006, 59(3): 807–820.
- [22] Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, *et al.* Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2002, 184(13): 3605–3613.
- [23] Shen DK, Filopon D, Kuhn L, *et al.* PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 2006, 74(2): 1121–1129.
- [24] Dasgupta N, Ferrell EP, Kanack KJ, *et al.* *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is Sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol*, 2002, 184(19): 5240–5250.
- [25] West SE, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease

- production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol*, 1994, 176(24): 7532–7542.
- [26] Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 2002, 84(5-6): 499–510.
- [27] Wu W, Jin S. PtrB of *Pseudomonas aeruginosa* suppresses the type III secretion system under the stress of DNA damage. *J Bacteriol*, 2005, 187(17): 6058–6068.
- [28] 胡晓梅, 胡福泉. 铜绿假单胞菌的细胞间信号联系及其在感染中的作用. 中华医院感染学杂志(*Chinese Journal of Nosocomiology*) 2006, 16(4): 478–480.
- [29] Bleves S, Soscia C, Nogueira-Orlandi P, et al. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 2005, 187(11): 3898–3902.

## Molecular determinants in regulating *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system—A review

Qin Luo<sup>1\*</sup>, Shouguang Jin<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

(<sup>2</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology, PO Box 100266, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA)

**Abstract:** *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative opportunistic bacterial pathogen. Successful injection of virulence factors into host cells, evasion of phagocytosis and promotion of pathogenesis depend primarily on the function of type III secretion system (T3SS). A complex set of signaling pathways have been shown to modulate T3SS expression. In this review, a brief introduction is given on the composition, function, and molecular determinants that regulate *P. aeruginosa* T3SS gene expression.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; type III secretion system (T3SS); transcriptional regulation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500025), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of State Education Ministry and the Construction Fund for “211” Project of the Ministry of Education of China

\*Corresponding author. Tel: +86-27-67863314; Email: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

Received: 17 March 2008/ Revised: 19 April 2008

### 科学出版社生物分社新书推介 (2008-08)

真核生物转录因子 (第五版)

原著: David S. Latchman

导读: 刘进元 教授 (清华大学生物系)

978-7-03-022222-0 ¥98.00 2008年8月 出版

内容简介

所有细胞中的 DNA 都是一样的,但基因调控保证了每种细胞的特异性蛋白质会在正确的时间出现在正确的地点,控制这个过程的蛋白质就是转录因子。转录因子的作用机制对于临床和基础科学领域的工作者来讲,早已耳熟能详。但是,不管对于学生还是研究人员,要详细了解转录因子庞大的队伍以及它们丰富的作用机制,可能都不是件容易的事。

本书第一版出版于 1991 年,此后每 3~6 年再版一次,不断补充最新科研进展,达到基础知识讲解和前沿发现介绍的完美融合。第五版新增的内容有: 抑制性小 RNA 及其调控转录的作用

·转录因子的治疗性应用

·转录因子在调节染色质结构及转录延伸方面的作用

