

粘细菌的多细胞形态发生及其分子调控

周璐 李越中¹⁾ 李健

(山东大学生命科学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 粘细菌的多细胞形态发生是粘细菌细胞社会性行为的主要表现, 包括细胞有序聚集、细胞自溶、子实体发育和粘孢子的分化形成等。粘细菌的形态发生过程涉及复杂的信号系统和调控, 与真核生物具有较大的相似性, 是研究原核生物细胞分化发育以及生物进化的重要模式材料。

关键词 粘细菌, 黄色粘球菌, 形态发生, 分子调控

学科分类号 Q93

原核生物的细胞行为主要是单细胞的活动。在较为复杂的类群中, 也涉及细胞的群体行为。其中, 粘细菌 (myxobacteria) 表现得尤为突出, 包括细胞的摄食、运动、多细胞形态的发生 (子实体的发育和粘孢子的形成) 等, 具有很强的社会性 (sociality)。粘细菌细胞的群体行为中, 子实体的发育和粘孢子的形成最为引人注目。过程中涉及的细胞之间的信号传导模式更接近真核生物。在过去的 30 年里, 粘细菌细胞行为的研究主要是以黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*) 作为模式材料开展的^[1]。

黄色粘球菌的多细胞形态发育是对环境的抗逆性结构发育, 需要三个基本的条件: 营养物饥饿、高细胞浓度和固体介质表面。营养物的匮乏导致发育信号因子的合成; 粘细菌群落 (swarm) 中的营养细胞在子实体发育早期信号因子的作用下向各焦点有序聚集; 在聚集和早期的堆积过程中, 大部分细胞发生程序化自溶; 聚集后的存活细胞进行有序排列, 其中一部分细胞分化形成不具繁殖活性的结构细胞, 如子实体的柄、孢子囊壁等, 一部分在子实体形成的末期分化为抗逆的休眠性粘孢子。粘孢子的形成标志着子实体的真正成熟和发育过程的结束。

1 细胞的有序聚集及信号因子

粘细菌群落 (swarm) 中的营养细胞向各焦点有序聚集是子实体形成的前奏。目前较为被人们接受的观点认为细胞聚集依赖于细胞间的接触和信号物质的感知与交流。早在 1962 年, McVittie 等发现黄色粘球菌的两组发育缺陷突变株在混合培养时发生代谢物的“互补”, 并发育成正常的子实体。

这一发现表明粘细菌的分化发育依赖于胞外信号物质的交流。目前已发现的黄色粘球菌信号因子至少有 5 类, 即 A_{sg}、B_{sg}、C_{sg}、D_{sg} 和 E_{sg}。除了 B_{sg}, 其他 4 种均参与细胞的聚集过程。

1.1 A 信号 (A_{sg})

A_{sg} 在营养物缺乏后 1~2 h 时表达, 是已知最早起作用的信号因子。如果细胞密度足够高, 将进行一系列的发育活动; 如果密度不够, 则维持低水平生长直到细胞密度足够高。A_{sg} 本身是由混合蛋白酶产生的一些氨基酸和肽的混合物。a_{sg} 突变株缺乏对饥饿条件的反应, 不能启动子实体发育的任何步骤, 但可以被添加的适宜氨基酸和肽的混合物所恢复。突变的位点包括 a_{sgA}, a_{sgB} 和 a_{sgC} 三个遗传座位。a_{sgA} 基因有两个分别与组氨酸蛋白酶酶的传送域和反应调控子的接受域同源的功能域^[2], 因此认为 a_{sgA} 的功能与信号的传导有关。a_{sgB} 基因可能编码一个 C 端具有螺旋-转折-螺旋结构的 DNA 结合蛋白, 推测是识别编码 A 信号的胞外蛋白酶基因序列的一个转录因子^[3]。a_{sgC} 基因则可能编码黄色粘球菌主要的 σ 因子。

1.2 B 信号 (B_{sg})

B_{sg} 是一个依赖于 ATP 的蛋白酶, 也在发育的早期发挥功能, 可能是破坏阻遏发育的蛋白因子。b_{sg} 突变只发生在同一个遗传座位即 b_{sgA} 上。b_{sgA} 基因序列与 *E. coli* 和 *Bacillus brevis* 的 lon 基因基本同源^[4]。

1.3 C 信号 (C_{sg})

C_{sg} 作用较 A_{sg} 和 B_{sg} 晚, 约在发育开始后的 6~7 h 时, 是 5 个胞外信号中最后起作用的因子。

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1998-10-07, 修回日期: 1999-02-03

通过金免疫定位和不运动突变株 (*mgl* 突变株) 的研究证实 Csg 结合在胞外纤维 (fibrils) 上. Csg 通过细胞与细胞间的相互接触控制细胞的聚集和子实体形成时细胞的方向. Csg 的突变发生在单基因位点 *csgA* 上. 基因的表达产物是一个 17 ku 的短链醇脱氢酶, 酶的作用产物是 C 信号. NAD(P)^+ 可加强 Csg 对 *csgA* 突变株的恢复作用^[5]. 目前对 Csg 功能的明确认识仅在于它是一个与细胞连接的信号, 在调控参与韵律振动、运动、聚集和孢子形成的 50 多个基因中起主要作用. 此外, C 信号还可能是存在于胞外的发育时钟, 不但对发育基因表达的时序起作用, 也控制细胞在空间上近距离的相互作用.

1.4 D 信号 (Dsg)

dsg 基因的产物可能不是 D 信号本身, 但可恢复 *dsg* 突变. *dsg* 突变株的发育进程只是部分受干扰, 即生孢减少, 聚集不正常并且被延迟, 具体机理尚不清楚. 克隆的 *dsg* 基因与 *E. coli* 的翻译起始因子 IF3 有 50% 的序列同源性^[6].

1.5 E 信号 (Esg)

Esg 在发育开始后的 3~5 h 时表达, 信号的交换也需要细胞之间的接触, 这是细胞聚集和子实体形成过程中准确定位的先决条件. *esg* 基因与支链酮酸脱氢酶复合体中的 E1 脱羧酶基因序列基本相似, 并且 *esg* 突变体的发育可被复合体的产物短支链脂肪酸异戊酸、丁酸甲酯和异丁酸恢复^[7].

细胞有序聚集的机制至今尚未完全阐明. 1998 年, Harris 等^[8] 进一步研究 (p) ppGpp 发现, 营养物质 (氨基酸) 的匮乏导致 (p) ppGpp 的合成, 它不但控制子实体形态发生的启动, 同时也诱导子实体发育早期基因如 *Asg* 的表达. (p) ppGpp 合成酶 *relA* 基因缺陷株的 *Asg* 的合成也受阻. 但对 (p) ppGpp 如何影响发育的机制仍有待进一步研究.

2 细胞自溶

在细胞聚集和早期的堆积过程中, 根据发育环境的不同, 有 65%~90% 的细胞发生自溶. 粘细菌的细胞自溶属于原核生物的细胞程序化死亡^[9]. 目前尚未有令人信服的证据证明细胞自溶与发育存在必然的联系. 但有越来越多的证据表明自溶与粘孢子的形成紧密相关. 例如粘孢子表面的 S 蛋白. 19 ku 的 S 蛋白有两个对 Ca^{2+} 高亲和的结合域, 与钙调素 (calmodulin) 和牛晶状体蛋白有序列相似性^[10]. S 蛋白本身不具有信号肽序列, 不能通过

分泌释放到胞外. 正是细胞的自溶释放了大量的 S 蛋白, 并在粘孢子表面自组装. 氨基葡萄糖也可以诱导生长细胞群体的大规模自溶, 诱导型的发育性自溶伴随着磷酸酯酶和自杀物质 AMI 浓度的提高.

3 子实体形成和分子调控

聚集后的细胞进行有序排列, 并发育形成一定形态的多细胞结构 (子实体). 粘细菌的发育过程是细胞形态和功能在时间和空间上的有序表达. 通过 Tn5-lac 转座子随机插入产生转录融合 *lacZ* 基因的表达, 推断黄色粘球菌大约有几百个发育基因, 并测定了发育基因的表达时间表及它们与 A、B、C 或 D 信号的依赖性, 由此构建了发育基因表达的时间依赖性图谱^[2]. 基因表达的调控主要是转录水平的. 此外, 内源性 ADP-核糖基化作用也参与发育的调控. 值得注意的是, 聚集过程中启动表达的信号因子通常持续表达到子实体的形成期, 这对维持子实体发育过程中细胞的排列、定位和信号传导等是必需的.

3.1 σ 因子和蛋白激酶调控

利用 *E. coli* 的 *rpoD* 基因制备的探针在黄色粘球菌染色体上鉴定获得 *sigA* 基因, 并证明克隆的该基因与 *E. coli* 的 σ^{70} 基因和枯草芽孢杆菌的 σ^{43} 高度同源. 继而以 *sigA* 的高度保守区制备探针又鉴定了两个在表达时间和表型上均不同的 σ 因子基因 *sigB* 和 *sigC*. 新近又鉴定到一个在生长平衡期表达的、含 297 个氨基酸的 σ 因子, SigD^[11]. 这些结果表明黄色粘球菌不同发育时期基因的表达是由 σ 因子的级联系统调节的.

利用真核生物丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的 VI 和 VII 亚结构域的高度保守序列制备 PCR 引物, 以黄色粘球菌的染色体为模板, 得到了许多 PCR 产物. Munoz Dorado 等从中鉴定到一个基因 *pkn1*, 与真核生物丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的催化区域有序列相似性. *pkn1* 在 *E. coli* 中的表达产物能在其丝氨酸和苏氨酸残基上发生自催化磷酸化. *pkn1* 缺陷突变株表现为聚集不能完成, 孢子产量下降. 用 *pkn1* 的亚结构域序列做基因鉴定探针, 与经过 *Xho*I 消化的黄色粘球菌的染色体片段进行 DNA 印迹法检测, 发现了 23 条杂交带. 其中, *pkn5* 和 *pkn6* 的研究较为深入^[12]. 这两种基因的表达是组成型的, 但在发育早期表达有微小的增强. Pkn5 和 Pkn6 在生长和发育中有互补作用. 推测 Pkn6 是接收胞外信号的穿膜传感器, 而 Pkn5 对发育起

着负调控作用。

3.2 顺式/反式作用元件调控

在 *tps* 和 *ops* 发育操纵子复合体中, 下游的 S 蛋白基因 *tps* 在发育的早期表达; 而上游的 S1 蛋白基因 *ops* 在孢子成熟时才表达。两种蛋白质十分相似, S1 蛋白的含量仅是 S 蛋白的 1/10。该操纵子有远端顺式元件 (上游激活位点, UAS) 和近端顺式元件两个调控区。凝胶滞留法分析表明 *ops* 的 UAS 上结合有某种 DNA 结合蛋白质。用 DNase I 保护印迹法分析显示, 发生结合的活性位点是一个 18 bp 序列 (-273~-290)。进一步研究发现 *tps* 和 *ops* 均有多个 UAS。其中, *ops* 的 UAS 中有一个 180 bp 的片段能够激活 *tps* 的转录。说明 *tps* 和 *ops* 可能存在一个共同的调控转录顺式作用元件^[13]。

目前对发育基因转录调控涉及的反式作用因子了解较少。 *sigB* 是利用已知其他细菌的转录调节基因从黄色粘球菌染色体中发现的, 但直接由此 σ 因子控制的转录基因尚未找到。另外, *frzABCDE* 发育操纵子的分析表明, 内部的 *frzCD* 和 *frzE* 基因产物正是控制该操纵子转录的激活因子^[14], 具体机制也未阐明。

3.3 调控区域

具有一个大的转录调控区域是黄色粘球菌发育基因的普遍特征。最显著的例子是编码 Csg 的基因 *csgA*。 *csgA* 基因不但在发育的不同时间表达, 还对营养水平、Bsg 和胞壁质组分及其自身的基因产物起反应。对 *csgA* 转录起始点上游序列进行缺失突变的研究表明, -729~-930 bp 的 DNA 片段对发育的正常进行是必需的。此外, 在 *csgA* 上游 DNA 片段中还发现了其他的调控位点: 如-676~-729, -400~-676, -336~-400, 和-266~-336。 *csgA* 大范围的转录调控区恰恰是 *csgA* 对营养物水平、信号分子及 *csgA* 的自身产物作出有效应答, 从而谨慎控制细胞在发育过程中聚集, 分化形成孢子的时序一致性所必需的。但普遍存在于发育基因转录起始点上游的大范围转录调控区是否是发育基因表达调控复杂性的真实反映仍是一个值得探讨的问题。

4 细胞分化和粘孢子的形成

粘细菌细胞的分化是在子实体的形成过程中进行的。与其他原核生物的分化相比, 粘细菌的细胞分化更为复杂, 不但包括休眠性粘孢子的形成, 还

包括细胞转化为子实体柄、孢子囊壁等不具繁殖活性的结构细胞。粘细菌发育性自溶后剩余细胞的一部分 (60%~70%) 在子实体形成的末期分化为休眠性粘孢子。粘孢子的形成标志着子实体的真正成熟和发育过程的结束。粘孢子的形成也可以通过人工诱导的方法独立于子实体的形成。如甘油可诱导粘孢子形成, 但诱导形成的粘孢子缺乏成熟子实体内粘孢子的一些重要的结构特征。

5 更复杂的粘细菌的多细胞形态发生

黄色粘球菌的子实体形态结构是粘细菌中较为简单的。目前有关粘细菌子实体发生的研究除粘球菌之外, 仅仅在橙色标桩菌 (*Stigmatella aurantiaca*) 开展了工作。橙色标桩菌的子实体结构比黄色粘球菌要复杂得多。细胞堆除发育出柄外, 还进一步在柄上分化为多个孢子囊束, 在每一个孢子囊束中的细胞分化为大量休眠性粘孢子。与黄色粘球菌不同, 在橙色标桩菌的细胞浓度低于子实体发育所需时, 可见光可促使形成正常的子实体^[15]。光线可明显促进细胞对聚集过程中产生的信息素的敏感性。信息素是挥发性的分支烷烃衍生物, 相对分子质量约为 200, 它在结构上与细胞数量敏感性的自诱导因子 (quorum-sensing autoinducers) 家族成员不同, 但却能完成对密度控制的相似功能。此外, 在橙色标桩菌中发现了更多的原认为只属于真核生物的性质。目前, 通过 *E. coli* 和橙色标桩菌的膜结合转移方法得到了一系列的 Tn5-lacZ 转座子插入突变株, 其中有些是在发育的不同阶段受阻的发育突变株。进一步的研究将使我们有可能了解形成复杂多细胞结构的分子机制。

6 小结与展望

粘细菌的基因组在原核生物中是最大的。已测定的黄色粘球菌的基因组大小为 9 454 kb, 橙色标桩菌为 9 200~9 870 kb, 直立标桩菌为 9 710~10 010 kb。而其他细菌的基因组大小从 *Mycoplasma genitalium* 的 585 kb 到 *Bradyrhizobium japonicum* 的 8 700 kb; 即使发育过程较复杂的原核生物如 *Bacillus cereus* 也仅 5 700 kb。真核生物酿酒酵母的基因组大小为 13 389 kb。粘细菌的基因组大小介于原核和真核生物之间。以 Tn5-lac 为染色体基因启动子的报告基因显示黄色粘球菌基因组仅有 8% 在发育过程中表达。粘细菌大量的“多余”DNA 的功能尚未得

到解释。

粘细菌尽管在系统分类上属于细菌, 并不更接近真核生物, 但却表现与真核生物更多的相似性。如在粘细菌中发现类似真核生物的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 暗示这类细菌可能有类似于真核生物信号传导的级联反应。由于遗传操作的优越性, 粘细菌可作为研究信号调控的理想体系。对粘细菌多细胞形态发生分子调控的研究, 不但对认识原核生物的细胞分化发育, 而且对理解生命的进化过程、真核生物的细胞行为和分化发育的分子调控等具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Dworkin M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev*, 1996, **60** (1): 70~102
- 2 Kaiser D, Kroos L. Intercellular signaling. In: Dworkin M, Kaiser D eds. *Myxobacteria II*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 257~ 283
- 3 Plamann L, Davis J M, Cantwell B, *et al.* Evidence that asgB encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*, 1994, **176** (7): 2013 ~ 2020
- 4 Gill R E, Karlok M, Benton D. *Myxococcus xanthus* encodes an ATP-dependent protease which is required for developmental gene transcription and intercellular signaling. *J Bacteriol*, 1993, **175** (14): 4538~ 4544
- 5 Lee B-U, Lee K, Robles J, *et al.* A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD (P) + -containing protein. *Genes Dev*, 1995, **9** (23): 2964~ 2973
- 6 Cheng Y, Kalman L V, Kaiser D. The dsr gene of *Myxococcus xanthus* encodes a protein similar to translation initiation factor IF3. *J Bacteriol*, 1994, **176** (5): 1427~ 1433
- 7 Toal D R, Clifton S W, Roe B A, *et al.* The esg locus of *Myxococcus xanthus* encodes the E1 α and E1 β subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase. *Mol Microbiol*, 1995, **16** (2): 177~ 189
- 8 Harris B Z, Kaiser D, Singer M. The guanosine nucleotide (p) ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev*, 1998, **12** (7): 1022~ 1035
- 9 Hochman A. Programmed death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol*, 1997, **23** (3): 207~ 214
- 10 Dworkin M. Cell surfaces and appendages. In: Dworkin M, Kaiser D eds. *Myxobacteria II*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 63~ 83
- 11 Ueki T, Inouye S. A new sigma factor, SigD, essential for stationary phase is also required for multicellular differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Genes cells*, 1998, **3** (6): 371~ 385
- 12 Inouye S, Inouye M. Development-specific gene expression: protein serine/threonine kinases and sigma factors. In: Dworkin M, Kaiser D eds. *Myxobacteria II*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 201~ 212
- 13 Kil K-S, Brown G L, Downard J S. A segment of the *Myxococcus xanthus* ops DNA functions as an upstream activation site for tps gene transcription. *J Bacteriol*, 1990, **172** (6): 3081~ 3088
- 14 Weinberg R A, Zusman D R. Evidence that the *Myxococcus xanthus* frz genes are developmentally regulated. *J Bacteriol*, 1989, **171** (11): 6174~ 6186
- 15 White D. Cell interactions and the control of development in *Myxobacteria* populations. *Int Rev Cytol*, 1981, **72**: 203~ 227

Multicellular Morphogenesis in Myxobacteria and Its Molecular Regulation. ZHOU Lu, LI Yue-Zhong, LI Jian (State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China).

Abstract Multicellular morphogenesis is the main content of myxobacterial social behavior. The morphogenesis contains aggregation of cells under nutrient deprivation, autolysis, development of fruiting bodies and formation of myxospores. There is a complicated system of signals and regulation during morphogenesis, which is much more similar to eukaryotes. *Myxobacterium* is an important model for studying cellular differentiation and development in prokaryotes and biological evolution.

Key words myxobacteria, *Myxococcus xanthus*, morphogenesis, molecular regulation

阿尔茨海默氏病与氧应激

陈 瑗 周 玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病, 是老年人群痴呆最普遍的原因, 也是老年人病态和死亡的主要原因。以阿尔茨海默氏病与氧应激为题, 从 AD 发生的分子基础和氧应激基础, 以及 β 淀粉样蛋白 (β amyloid, β A) 的聚合作用和毒性与自由基的关系, 对近年来在 AD 发生机制研究中引人注目的