

水稻内生成团泛菌 YS19 共质体形成差异 表达蛋白 MaIE 及其兼职功能*

李倩倩** 熊小路** 牟昱飞** 易婷 李二丽 卢镇岳 缪煜轩 冯永君***

(北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要 成团泛菌 YS19 是从水稻“越富”品种中分离的一种优势内生细菌, 与宿主水稻互作时具有多种促生作用, 其形成的共质体(sympasmata)结构与菌体抗逆及与宿主互作有重要意义. 研究发现了一种在 YS19 共质体形成阶段高表达的差异蛋白, 对其用肽指纹图谱进行鉴定, 发现其属于周质空间麦芽糖结合蛋白家族. 克隆了该蛋白质的基因, 重组表达并分离纯化了该蛋白质, 发现它是一种兼职功能蛋白, 其不仅参与麦芽糖的 ABC 运输系统, 而且在强酸环境下不易发生变性沉淀, 并可通过疏水面的显著暴露结合底物蛋白来发挥分子伴侣活性, 这些兼职功能构成了菌体抗逆生存适应性的重要分子基础.

关键词 水稻内生菌, 成团泛菌, 麦芽糖结合蛋白, 兼职功能蛋白

学科分类号 Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00259

成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)是一种很重要的环境微生物, 它广泛分布于植物体、空气、土壤与水体等. 成团泛菌 YS19 是从水稻“越富”品种中分离的一种内生细菌的优势种^[1-2]. 研究表明, YS19 在与宿主水稻相互作用时, 有很强的固氮活性和促生作用, 且能通过分泌生长素影响自然培养的水稻植株中光合产物由茎、叶向穗的转移^[3]. YS19 在宿主水稻定殖时大量分布于水稻各生育期的各器官, 其典型特点是形成成团的共质体(sympasmata)结构, 它属于一种类似生物薄膜(biofilm)的由菌体细胞簇连而成的凝块状特殊结构^[4], 且对宿主水稻的定殖具有专一性. YS19 在指数生长期之前为单细胞生长阶段, 而进入稳定期初期后大部分菌体表现为多细胞聚集的成团生长阶段^[5], 且其在宿主上也主要以共质体的形式定殖^[6]. 通过对 YS19 进行 GFP 标记^[6], 并应用激光扫描共聚焦显微镜分别对 YS19::gfp 与 YS19 混合培养物进行活体观察, 发现共质体结构是由许多单菌聚集而成, 而不是起源于一个细胞分裂而来的单克隆体系^[7].

细菌学家倾向于认为, 细菌由单细胞聚集成团之后, 可能会产生一些原来单细胞状态所无法具有

的优势, 如代谢复杂底物、抵御生物/非生物的伤害以及适应特定环境、分化成特异的细胞类型等. 研究发现, 由于几乎所有的内生细菌与植物互作时都形成聚集体结构, 探究这类聚集体的结构与功能对于揭示内生细菌的生存适应性乃至菌体-宿主互作机制方面将有重要意义. 前期研究表明, YS19 形成共质体结构对所选择的各种逆境(高渗透压、干燥、重金属)表现出了极高的抗逆能力, 分别比未成团的单菌细胞高约 100~500 倍^[8], 另外, 对尚未形成共质体结构的成团泛菌 YS19 进行低 pH 处理时, 发现大多数游离细菌都提前形成了紧密的共质体结构, 并且通过镜检清楚地观察到细菌从各个方向往一个中心聚集的场面. 可见共质体聚集结构在菌体抗胁迫生存方面发挥了重要作用. 无论是菌体抗逆性的实现还是聚集结构的形成很大程度上

* 国家自然科学基金资助项目(30870055).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-68914495, E-mail: fengyj@bit.edu.cn

收稿日期: 2011-06-09, 接受日期: 2011-12-19

都决定于特定基因的表达和调控作用. 本研究发现了与共质体形成相关的一种差异表达蛋白, 并对差异蛋白的重要兼职功能与菌体抗逆生存之间关系进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

成团泛菌 YS19 菌株是从水稻“越富”品种体内分离, 并由本实验室在 LB 琼脂斜面培养基上保存. 每次试验, 活化后的菌株在 LB 液体培养基中培养 12 h, 然后按 1% 接种量(v/v)接种至 LB 液体培养基中 30℃ 培养, 摇床转速 3 r/s.

1.2 差异表达蛋白的发现与肽指纹图谱鉴定

成团泛菌 YS19 存在散生(单细胞)和形成共质体两种生长状态, 将 YS19 在 LB 培养基上培养, 取经过不同时间段培养的菌液(根据文献[1], YS19 在培养 6 h 后逐渐形成共质体), 收集细胞. 超声破碎后, 通过我们前期成熟应用的含 SDS- 孔径梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)^[9]检测全细胞蛋白质表达.

从电泳凝胶上获取差异蛋白, 用胰蛋白酶进行消化, 再通过 MALDI-TOF 4800 Plus 型质谱仪 (Applied Biosystem, America) 分析酶切片段大小, 获得该蛋白质的肽指纹图谱. 然后使用 MASCOT 方法, 在 SWISS-Prot 目标数据库中检索该蛋白质的同源蛋白.

1.3 差异表达蛋白基因的克隆及重组表达与分离纯化

根据得到的同源蛋白, 产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)的麦芽糖结合蛋白 MalE(肽段匹配度 49%, 见结果 2.1)的基因设计引物, 利用 PCR 扩增技术得到目标基因. 但由于根据同源蛋白的基因设计的引物可能存在与模板 DNA 不一定完全配对问题, 这样扩增得到的序列可能在末端序列(引物区)上不能准确反应模板的实际序列. 所以, 为了能够得到编码该差异蛋白的准确基因序列, 设计引物时基于已知的 *E. aerogenes* 的 *mal* 操纵子序列, 在 *malE* 基因的起始密码子和终止密码子两端外的区域寻找保守区, 设计上游引物 5' GCGCCATGGGCATGAAAATCAAACTGGCGCTCGCAT 3' 和下游引物 5' GGGCTCGAGCTTGGTGATACGGCCCTGTGCATCCT 3'.

然后以成团泛菌 YS19 基因组为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94℃ 60 s, 55℃ 50 s, 72℃ 90 s,

重复 36 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min. 将扩增得到的产物进行测序, 然后定位实际基因的起始与终止位点. 构建重组表达质粒时, 再从目标基因已测序的两端设计引物, 并在上下游引物分别添加限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 切点, 其中上游引物为 5' GCGCCATGGGCGGAGGATGGAAAGAGGTTG 3', 下游引物为: 5' GGGCTCGAGGCGTACATTAAAACAACAAGGTAACC 3'.

以 YS19 基因组为模板, 进行 PCR 扩增, 对产物进行测序, 得到 YS19 的 MalE 蛋白的基因序列. PCR 扩增产物经 *Nco* I 和 *Xho* I (Promega 公司) 酶切后, 连接到质粒 pET28a (卡那霉素抗性, 重组基因下游端加上了一个 His6-Tag 标签) 的 *Nco* I - *Xho* I 切点内. 用连接好的质粒转化 *Escherichia coli* BL21 (DE3), 克隆基因的保真程度通过测定重组质粒的序列实现. 转化子目的蛋白的产生, 通过 SDS-PAGE 检测.

目的重组菌株在含 0.1 g/L 卡那霉素的 LB 培养基中培养, 培养至菌体浊度达到 0.3 时, 加入 1 mmol/L IPTG 在 37℃ 诱导培养 10 h. 培养液经 12 000 g 离心 7 min, 收集菌体重悬于 0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.3), 0.1 mol/L NaCl 中, 加入 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF, 在 400 W 的功率下超声处理 90 次, 每次处理 3 s, 间隔 5 s. 在 4℃ 下 12 000 g 离心 45 min, 收集上清液. 上清液选择用 Ni 亲和层析柱来分离, 用 0.1 mol/L 的咪唑洗脱, 纯化蛋白经 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳和考马斯亮蓝 (Sigma 公司) 染色后进行颜色密度分析, 纯度应在 95% 以上. 蛋白质浓度通过 Bradford 试剂 (Bio-Rad 公司) 法测定, 以牛血清白蛋白 (Sigma 公司) 为标准.

1.4 重组蛋白的分子伴侣活性分析

将纯化的重组蛋白溶液 (0.5 g/L) 用盐酸调 pH 值至 1 和 2, 处理 1 h 后, 离心 (10 000 g, 20 min) 去除沉淀蛋白质, 对上清(未沉淀的蛋白质)进行 SDS-PAGE 检测.

分子伴侣活性主要通过检测目标蛋白对底物蛋白在不同逆境处理条件下的保护作用来实现. 根据文献[10]报道, 这里选择较常用的乙醇脱氢酶 (ADH) 作为底物, 将底物蛋白 ADH (Sigma 公司) 与重组蛋白按浓度比 1:10 混合, 然后将体系用 1 mol/L 的 HCl 调至 pH2, 在 25℃ 下处理 30 min, 10 000 g 离心 10 min. 以相同终浓度而不含重组蛋白的 ADH 作相同处理为对照, 然后用 0.02 mol/L

Tris (pH 10)将上清液调回 pH 7.0, 通过 SDS-PAGE 检测未沉淀的底物量.

1.5 圆二色性测定

蛋白质的圆二色性(CD)光谱用 J-715-150L 型分光偏振器(JASCO 公司, Japan)分析记录, 通过仪器外联的水浴来控制温度(25℃), 将纯化的蛋白质分别调到 pH 7.0、5.1、2.2 和 1.0, 并在 25℃ 下保持 1 h 后, 用光径为 0.1 cm 石英比色皿分析在 200~250 nm 波长范围的 CD 光谱, 每个样品的光谱值为 5 次重复扫描后得到的数值平均.

1.6 酸处理对重组蛋白疏水面暴露的影响

重组蛋白在不同理化条件下的疏水面暴露情况采用 8- 萘氨基 -1- 萘磺酸(Bis-ANS)荧光探针技术进行研究. 将蛋白质溶液样品用 1 mol/L 的 HCl 分别调至 pH 1.5、2.2、3.0、3.8、4.6、5.0、5.5、6.0、6.5, 在 20℃ 下保持处理 20 min, 然后离心 (10 000 g, 4℃) 10 min 去除沉淀, 将上清转移至新试管, 每管中加入等量的 Bis-ANS, 最后使每管蛋白质终浓度为 0.5 g/L, Bis-ANS 浓度为 25 μmol/L. 用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计分别对各管样品进行荧光强度分析.

2 结 果

2.1 共质体形成阶段差异表达蛋白及其肽指纹图谱的鉴定

对不同时间培养的成团泛菌 YS19 全细胞蛋白经 SDS- 孔径梯度 PAGE 比对分析(图 1), 发现绝

大部分蛋白质表达表现出一致性, 但有一种蛋白质(如图 1 中箭头所指)在共质体形成时表达量显著增加, 经过 MALDI-TOF-MS 分析鉴定, 共得到 53 个指纹图谱峰(图 2a). 根据所得到的肽指纹图谱, 用 MASCOT 检测方法, 以 SWISS-Prot 为目标数据库进行比对发现: 与其匹配度最高的同源蛋白为来

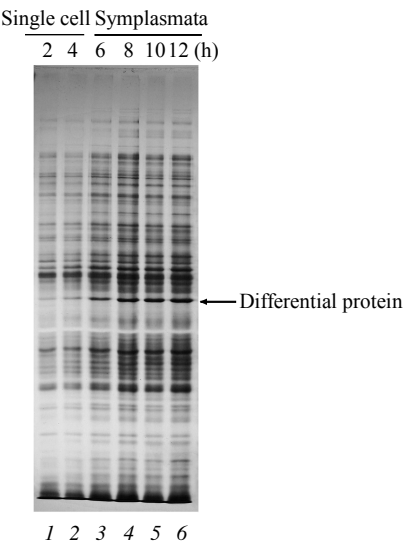


Fig. 1 SDS-containing pore gradient PAGE showing the protein expression profile of YS19

YS19 was cultivated in LB medium and sampled at indicated time (2 ~ 12 h, corresponding to lanes 1 ~ 6). The bacterial cells were treated with SDS-PAGE loading buffer (100℃, 10 min), loaded onto polyacrylamide gel at equal protein concentrations, and electrophoresed at 20 mA for 2 h.

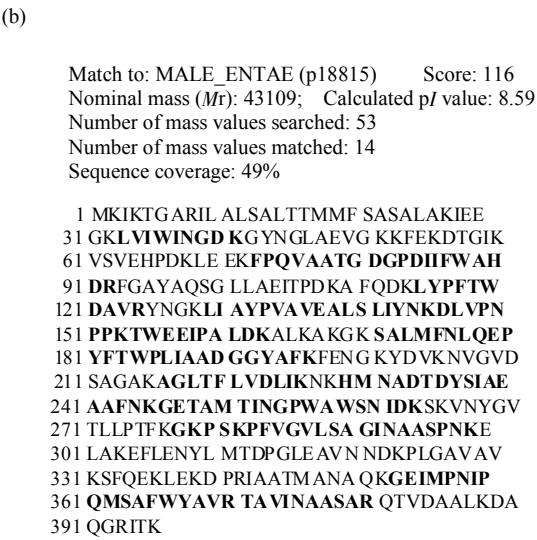
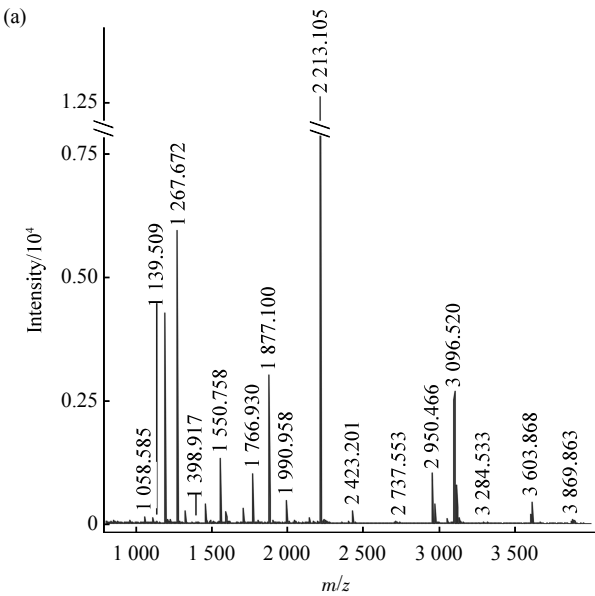


Fig. 2 Protein mass fingerprinting of the differential protein (a) and sequence coverage with maltodextrin-binding protein of *Enterobacter aerogenes* (b)

源于产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)的周质空间麦芽糖结合蛋白 MalE (maltose-binding periplasmic protein), 有 14 个质谱峰与之匹配(表 1), 序列同源率为 49%, 得分值为 116 (图 2b), 远大于显著性差异($P < 0.05$)对应得分值 62, 说明该同源性具有

显著性; 其次为 *E. coli* 的 MalE 蛋白, 有 10 个质谱峰与之匹配, 得分值为 69; 第三为鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的 MalE 蛋白, 有 10 个质谱峰与之匹配, 得分值为 60. 由此判断, 该差异表达蛋白属于周质空间麦芽糖结合蛋白家族.

Table 1 Matched peptides with maltodextrin-binding protein of *Enterobacter aerogenes*

Start - End	$M_r(\text{expt})$	$M_r(\text{calc})$	Delta	Miss	Peptide
33~41	1056.58	1056.60	-0.01	0	K.LVIWINGDK.G
73~92	2212.10	2212.07	0.03	0	K.FPQVAATGDGPDIIIFWAHDR.F
115~124	1266.66	1266.64	0.02	0	K.LYPFTWDAVR.Y
129~145	1876.09	1876.07	0.02	0	K.LIAYPVAVEALSLIYNK.D
129~153	2736.55	2736.55	-0.00	1	K.LIAYPVAVEALSLIYNKDLVNPPEK.T
154~163	1200.60	1200.60	-0.00	0	K.TWEEIPALDK.A
171~196	2949.46	2949.44	0.02	0	K.SALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFK.F
171~196	2965.46	2965.44	0.02	0	K.SALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFK.F Oxidation (M)
216~226	1188.73	1188.71	0.01	0	K.AGLTFLVDLIK.N
229~263	3868.86	3868.75	0.11	1	K.HMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDK.S
246~263	1989.95	1989.93	0.03	0	K.GETAMTINGPWAWSNIDK.S
246~263	2005.94	2005.92	0.02	0	K.GETAMTINGPWAWSNIDK.S Oxidation (M)
278~299	2138.20	2138.18	0.01	0	K.GKPSKPFVGVLSAGINAASPNK.E
353~380	3095.51	3095.53	-0.02	1	K.GEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASAR.Q 2 Oxidation (M)

No match to: 959.53, 1058.58, 1139.51, 1211.70, 1222.65, 1224.67, 1227.69, 1289.64, 1321.78, 1322.76, 1398.92, 1456.75, 1463.70, 1506.74, 1550.76, 1593.76, 1612.83, 1706.85, 1713.82, 1766.93, 1788.90, 1897.95, 1899.10, 2047.10, 2122.04, 2235.07, 2251.06, 2402.19, 2423.20, 2711.37, 3049.52, 3092.57, 3108.58, 3111.53, 3127.50, 3284.53, 3603.87, 3884.89, 3886.87

2.2 共质体形成阶段差异表达蛋白基因的克隆及重组表达、分离纯化

根据同源蛋白(产气肠杆菌 MalE 蛋白)所在的 *mal* 操纵子, 在操纵子的 *malE* 基因的起始和终止密码子两端以外的区域, 寻找保守区设计引物, 扩增得到了包括 *malE* 基因在内的更长一段基因(图 3a-2), 全长约 1 500 bp, 并进行测序. 然后, 对比产气肠杆菌的 *malE*, 找到 YS19 中的 *malE* 基因的起始和终止密码子区的碱基序列, 确定 YS19 中的 *malE* 基因的完整序列为 1 191 bp (图 3a-3), 并提交 GenBank 数据库(HQ398254). 其编码 396 个氨基酸, 根据同源序列分析, 其中 1~26 位氨基酸为信号肽. 根据 YS19 的 *malE* 基因推导出蛋白质初生肽链的计算分子质量为 43 093, 而同源蛋白产气肠

杆菌 MalE 蛋白的分子质量为 43 109, 两者十分接近. 经过比对, 发现 YS19 的 MalE 与 *E. coli* 的 MalE 蛋白同源率为 94.1%, 与 *Enterobacter* 的 MalE 同源率高达 93.69%.

构建重组表达质粒时, 根据目标基因的两端设计带有 *Nco* I 和 *Xho* I 切点的引物, PCR 扩增得到目标基因(图 3a), 成功构建表达载体 pET28a-*malE*, 并在 *E. coli* BL21(DE3)实现了重组表达, 由于 MalE 是一种周质空间蛋白, 在重组表达时形成了未成熟蛋白和信号肽被切掉的成熟蛋白(分子量稍小)两个组分(图 3b). 通过亲和层析的方法, 利用 0.1 mol/L 咪唑洗脱, 对重组蛋白进行分离纯化, 得到电泳纯的 MalE 成熟蛋白(图 3c).

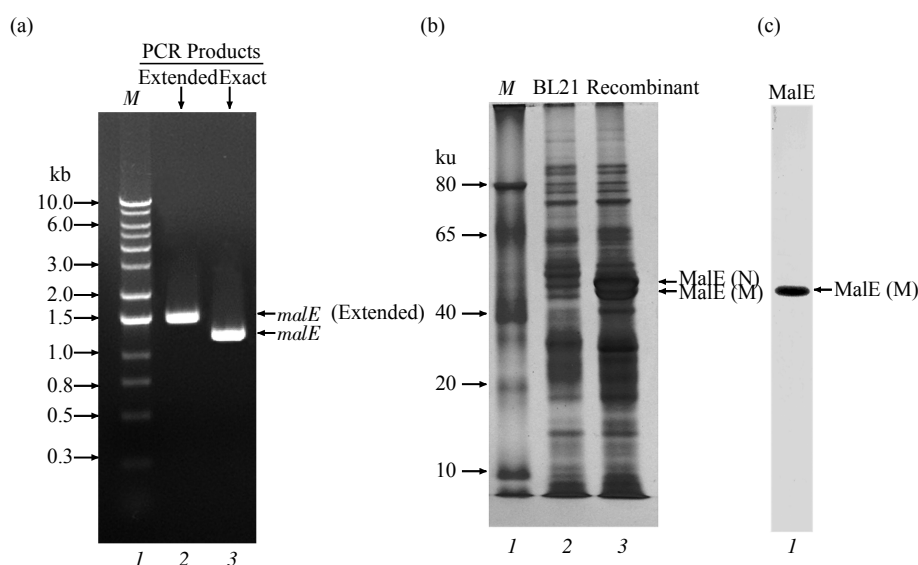


Fig. 3 Gene clone (a), recombinant expression (b) of YS19 *malE* gene and purification of the overexpressed protein (c)

(a) The extended gene (the gene cloned with the sequence being flank expended, lane 2) and the exact gene (lane 3) represent two PCR products of the *malE* gene as described under "Materials and methods". *M*: Molecular mass marker. (b) The recombinant strain BL21 is induced by 1 mmol/L IPTG at an optical density of 0.3 at 37°C for 10 h (lane 3), using an empty vector plasmid containing strain as a control (lane 2). *M*: Molecular mass marker. For SDS-PAGE in (b) and (c), samples were treated with loading buffer at 100°C for 10 min and loaded onto the gel and electrophoresed at 20 mA for 2 h. Symbols: MalE(N), Nascent; MalE(M), Matured protein.

2.3 重组蛋白分子伴侣活性测定

MalE 蛋白的本职工作是周质空间的麦芽糖结合蛋白, 参与麦芽糖的 ABC 运输系统. 但在本研究中发现, 它的差异表达时间正与 YS19 抗逆结构共质体的形成完全耦合, 且表达量很高, 远远超过其作为 ABC 运输系统参与菌体二次生长碳源麦芽糖运输的需求量. 那么, 在共质体形成阶段大量表达的 MalE 蛋白是否具有某种兼职功能(moonlighting function), 即除了参与麦芽糖的 ABC 运输系统, 还参与菌体的抗逆生存呢? 由于成团泛菌 YS19 在葡萄糖培养基培养时强烈产酸^[1], 说明菌体具有抗酸胁迫的机制, 因此, 选择低 pH 作为研究重组蛋白生理功能的实验条件有比较好的研究价值. 将纯化的重组蛋白在不同 pH 条件下 (pH 7, pH 2, pH 1) 处理 1 h, 之后对其上清液进行 SDS-PAGE 检验 (图 4a), 结果表明, 重组蛋白仍存留于上清液中, 说明该蛋白质在强酸条件下不易变性沉淀, 即对强酸处理有很强的耐受作用. 重组蛋白质自身在强酸条件下不易变性沉淀, 那么, 它是否可以像 HdeA 等分子伴侣蛋白一样, 保护菌体细胞的其他蛋白质

免受酸处理造成的变性沉淀, 从而对成团泛菌 YS19 的抗酸等恶劣环境生存起到某种作用呢?

为了探索重组 MalE 蛋白是否能够作为一种兼职功能蛋白质具有分子伴侣活性, 本研究检测了有 MalE 蛋白存在时底物蛋白对强酸处理的敏感性. 通过对含有重组蛋白和不含重组蛋白的 ADH 体系对比电泳分析可以看出: 当体系中含有重组蛋白时, 低 pH 对底物 ADH 变性所引起的沉淀作用被明显地抑制, 而使更多的蛋白质仍然存留于上清液中; 相对应的, 当体系中不存在重组蛋白时, 大部分底物 ADH 蛋白则发生了变性沉淀, 而只有很少一部分存留于上清液中(图 4b). 上述结果表明, 重组蛋白在酸性条件下的确抑制了因变性作用而引发的底物蛋白的沉淀, 发挥了分子伴侣活性, 表现出兼职功能. 从图 4b中可以看出, 这种分子伴侣活性仅对约 20%的底物蛋白起了有效的保护作用, 但仍比未保护的底物蛋白抗沉淀能力提高了约 10 倍. 尽管作为兼职功能的分子伴侣活性并不是非常高, 但考虑到 MalE 蛋白在 YS19 中的表达量极高 (图 1), 其保护作用应当还是很显著的.

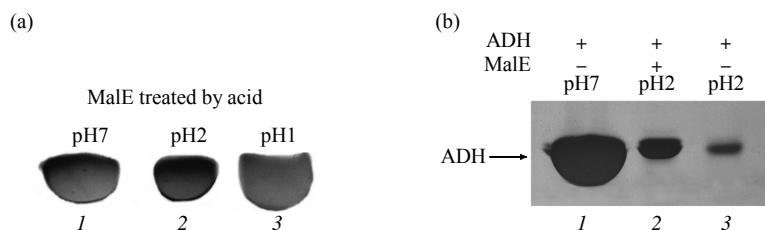


Fig. 4 SDS-PAGE examination of the YS19 MalE protein in resistance to aggregation reaction caused by low pH treatments (a) and its chaperone-like activity (b)

(a) The MalE protein itself was measured. (b) Under native (lane 1) or denaturing acidic conditions (lanes 2, 3), in the presence (lane 2) or absence (lane 3) of the MalE, the quantity of the substrate protein alcohol dehydrogenase (ADH) in the supernatant was examined. For, both (a) and (b), each treatment was performed with a final MalE protein concentration of 0.5 g/L, and the proteins remained in the supernatants were examined.

2.4 重组蛋白圆二色性测定

重组 MalE 蛋白在低 pH 值条件下不易变性沉淀, 这种特性可能与其结构的稳定性有关. 蛋白质圆二色性(CD)分析证明了这一推测(图 5), 研究发现, 在中性环境下, 重组蛋白主要在 222 nm 处呈现一较大的负峰, 而在 208 nm 处有一肩峰, 这些是 α 螺旋结构的特征性谱线, 说明在天然状态下, 重组蛋白的二级结构主要由 α 螺旋结构组成. 当 pH 值很低时, 重组蛋白整体结构的有序度降低了, 但依然保持较好的二级结构; 当 pH 继续降至 1.0 左右时, 重组蛋白的 CD 谱线的整体特征仍与 pH 2.2 时的特征类似. 说明在极端的酸性环境中, 即便其结构发生了一些变化, 重组蛋白仍较好地保

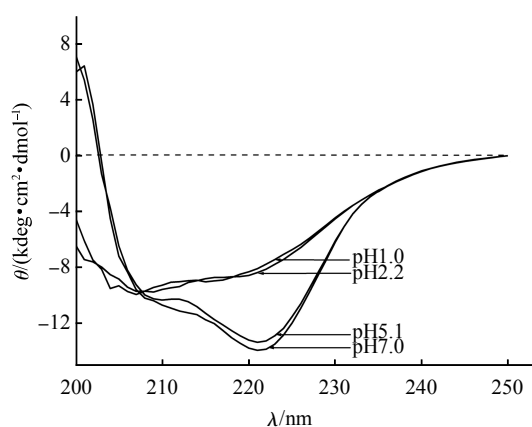


Fig. 5 Far-UV CD spectra of the native (pH7.0) or acid-treated (pH5.1, pH2.2, pH1.0) MalE protein at the final protein concentration of 200 mg/L

持了大部分结构, 暗示了重组蛋白很可能在极端环境中会通过这种结构的变化行使了包括分子伴侣活性在内的某些特殊的功能, 因为正是蛋白质的有序度降低, 才可以暴露其部分疏水面, 并通过暴露的疏水面与底物相互作用, 发挥分子伴侣功能. 这种现象与机制在其他分子伴侣蛋白研究中已经被大量发现并得到共识^[10-11].

2.5 重组蛋白在低 pH 值环境下疏水面暴露明显

为了考察 MalE 蛋白在酸变性条件下是否确实存在疏水面暴露状态, 本研究用 Bis-ANS 荧光探针技术对这一问题进行了分析(图 6). 研究发现, Bis-ANS 荧光探针单独存在时, 其荧光强度很弱, MalE 蛋白加入后, 荧光强度明显增强. 随着溶液 pH 值的降低, 荧光强度不断上升, 并在 pH 3.8 时荧光强度达到了最高. 由于蛋白质肽链氨基酸侧链—COO⁻在更低的 pH(小于 3)发生质子化, 生成—COOH, 后者是很强的荧光猝灭因子, pH 值的进一步降低又导致了蛋白质中—COOH 的增多, 故荧光强度在 pH 为 3.8 时达到峰值后又有下降趋势, 且最大发射波长红移. 根据 CD 测定结果, 蛋白质二级结构在极酸的条件下会有所减少, 会导致疏水面暴露的减少, 也可能造成荧光强度下降. 虽然如此, 当 pH 值降至很低时, 荧光强度虽有所降低, 但仍然比中性条件下(pH 6.5)的强度高出 1 倍以上. 这充分说明, 重组蛋白在酸变性条件下明显地暴露了其疏水面, 并与 Bis-ANS 相互作用增强.

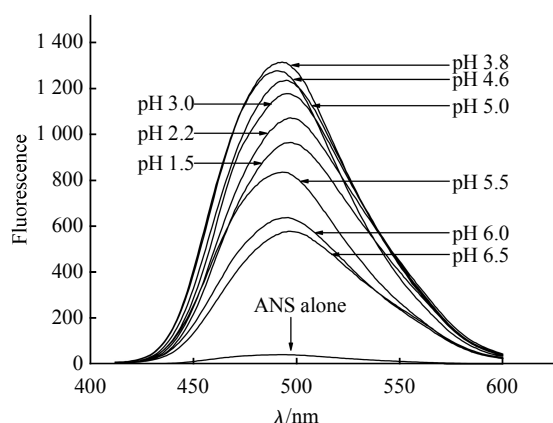


Fig. 6 Fluorescence of Bis-ANS probe (0.025 mmol/L) and MalE protein (0.5 g/L) binding complex at different pH conditions

在从中性条件到 pH 5.5, 最大发射波长呈现红移的趋势, 而在 pH 5.0 以下的位置, 发生明显蓝移, 这与在此 pH 值范围内荧光强度的显著增加相吻合。

3 讨 论

成团泛菌在应用与环境微生物学研究中具有重要价值和极为独特的细菌学分类地位, 就连其模式种 *P. agglomerans* JCM1236T 都曾先后被误划为克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)^[12], 使之成为一种重要的模式微生物。YS19 菌株是从重要作物水稻中分离的具有多种生物学作用的内生菌, 是成团泛菌的重要代表菌株, 探究其共质体聚集结构对于揭示内生细菌的生存适应性乃至菌体-宿主互作机制方面有重要意义。本研究表明, YS19 在多细胞共质体生长阶段, 周质空间蛋白 MalE 的表达量显著增加, 并证明 MalE 蛋白自身具有很强的抗酸能力, 且能发挥分子伴侣活性来减少酸处理对其他蛋白质造成的变性沉淀作用。本研究发现, 在强酸条件下, YS19 菌体的 MalE 蛋白整体结构的有序度降低了, 但依然保持较好的二级结构, 不易发生变性沉淀; 而很多其他研究证实, 这种特性能有效地保护细胞免受因蛋白质沉淀所导致的病变乃至死亡^[10, 13]。因此可以推断, 周质空间 MalE 蛋白不易变性沉淀的特性, 可能是菌体 YS19 长期进化过程中形成的一种对外界环境的适应策

略。同样, 其他微生物中的 MalE 同源蛋白也显示出这种特性, 例如在嗜热菌(*Thermotoga maritima*)中, 其 MalE 同源蛋白在温度和 pH 值发生剧烈变化的情况下, 均显示出很高的稳定性^[14]。更为重要的是, 本研究还发现原本作为麦芽糖的 ABC 运输系统表达的 MalE 蛋白, 不但不易受酸致沉淀, 而且还能发挥分子伴侣活性, 就更进一步说明 MalE 蛋白对于菌体抗酸生存的生物意义。这样看来, 它应当属于一种兼职功能蛋白。兼职功能蛋白的概念是近年来新提出的, 是指一类具有两种或两种以上功能的蛋白质, 且这些功能间没有直接相关性, 此类蛋白质能够通过多种形式转换其功能^[15], 而这种新型的调节方式被认为是生物体在进化过程中实现增加蛋白质功能的一种重要策略^[16]。

结构研究发现, MalE 蛋白在酸变性条件下, 通过暴露了其疏水面与底物蛋白相互作用, 而这正是发挥分子伴侣功能的结构基础, 与很多其他伴侣样蛋白的作用机制相同^[11]。比如, 大肠杆菌周质空间 HdeA 蛋白, 在酸性环境下能够帮助其他蛋白质减少变性沉淀, 就是基于 HdeA 能调整为一种有序性降低的球状结构(这种结构未在中性条件下发现)从而暴露其部分疏水作用面, 结合变性蛋白发挥伴侣活性^[10], 赋予细菌较好的耐酸能力。而本研究中发现的在共质体形成阶段以极高量表达的 MalE 蛋白, 其所表现出的分子伴侣活性的兼职功能构成了 YS19 共质体形成和抗胁迫生存的重要蛋白质基础。除此之外, 有研究表明, MalE 蛋白还具有其他兼职功能, 例如它还与细菌的趋化运动(趋营养物质麦芽糖)有关, 其机制是通过打开或闭合 MalE 空间结构的两翼, 作为两种不同的信号影响鞭毛的转动方向, 从而实现趋化性^[17-18]。值得注意的是, 蛋白质这种多功能性, 也出现在其他一些周质空间蛋白, 如 SurA (它是一种脯氨酰异构酶, 又是一种分子伴侣蛋白)等^[19-20]。

因此, 在共质体形成阶段大量表达的 MalE 蛋白以其在强酸等不良环境下不易变性沉淀的特性、分子伴侣活性乃至趋化性等所谓兼职功能构成了 YS19 共质体形成和抗胁迫生存的重要蛋白质基础。周质空间作为菌体细胞与外界环境进行相互作用的第一道媒介(趋利)或屏障(弊害), 包括 MalE 在内的这类周质空间蛋白的功能可能远不止是 ABC 物质运输这么简单, 其具有的分子伴侣活性等多种兼职功能, 使得我们需要重新评价其生物学功能以及它们在细菌生存适应性中的特殊意义。

参 考 文 献

- [1] Feng Y J, Shen D L, Dong X Z, *et al.* *In vitro* symplasmata formation in the rice diazotrophic endophyte *Pantoea agglomerans* YS19. *Plant and Soil*, 2003, **255**(2): 435–444
- [2] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未, 等. 水稻内生联合固氮菌的筛选、鉴定及分布特性. *植物学报*, 1999, **41**(9): 927–931
Yang H L, Sun X L, Song W, *et al.* *Acta Bot Sin*, 1999, **41**(9): 927–931
- [3] Feng Y J, Shen D L, Song W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *J Appl Microbiol*, 2006, **100**(5): 938–945
- [4] Achouak W, Heulin T, Villemin G, *et al.* Root colonization by symplasmata forming *Enterobacter agglomerans*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **13**(4): 287–294
- [5] Zhang X, Li E L, Feng Y J, *et al.* Colonization of endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 on host rice, with formation of multicellular symplasmata. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, **26**(6): 1667–1673
- [6] 冯永君, 宋 未. 水稻内生优势成团泛菌 GFP 标记菌株的性质与标记丢失动力学. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, **18**(1): 85–91
Feng Y J, Song W. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2002, **18**(1): 85–91
- [7] Duan J Y, Yi T, Feng Y J, *et al.* Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 forms multicellular symplasmata *via* cell aggregation. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **270**(2): 220–226
- [8] 张巍波, 缪煜轩, 冯永君. 成团泛菌 YS19 symplasmata 结构对菌体抵抗逆境的作用. *微生物学杂志*, 2009, **29**(1): 12–17
Zhang W B, Miao Y X, Feng Y J. *J Microbiology*, 2009, **29**(1): 12–17
- [9] Feng Y J, Jiao W W, Fu X M, *et al.* Stepwise disassembly and apparent nonstepwise reassembly for the oligomeric RbsD protein. *Protein Science*, 2006, **15**(6): 1441–1448
- [10] Hong W Z, Jiao W W, Hu J C, *et al.* Periplasmic protein HdeA exhibits chaperone like activity exclusively within stomach pH range by transforming into disordered conformation. *J Biol Chem*, 2005, **280**(29): 27029–27034
- [11] Hartl F U, Manajit H H. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 2002, **295** (5561): 1852–1858
- [12] Gavini F, Mergaert J, Beji A, *et al.* Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing & Fife 1972 to *Pantoea* gen-nov as *Pantoea agglomerans* comb nov and description of *Pantoea dispersa* sp-nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, **39**(3): 337–345
- [13] Pogliano J, Lynch A S, Belin D, *et al.* Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev*, 1997, **11**(9): 1169–1182
- [14] Wassenberg D, Liebl W, Jaenicke R. Maltose-binding protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Stability and binding properties. *J Mol Biol*, 2000, **295**(2): 279–288
- [15] 郑 婕, 董 韬, 冯永君. 兼职功能蛋白. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, **26**(7): 587–595
Zheng J, Dong T, Feng Y J. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, **26**(7): 587–595
- [16] Brandon D M. Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends Plant Sci*, 2004, **9**(5): 221–228
- [17] Zhang Y H, Gardina P J, Kuebler A S, *et al.* Model of maltose-binding protein chemoreceptor complex supports intrasubunit signaling mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(3): 939–944
- [18] Armitage J R, Dorman C J, Hellingwerf K, *et al.* Thinking and decision making, bacterial style: Bacterial Neural Networks, Obernai, France, 7th–12th June 2002. *Mol Microbiol*, 2003, **47**(2): 583–593
- [19] Vertommen D, Ruiz N, Leverrier P, *et al.* Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics*, 2009, **9**(9): 2432–2443
- [20] Watts K M, Hunstad D A. Components of SurA required for outer membrane biogenesis in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2008, **3**(10): e335

Symplasmata Formation Related MalE Protein and Its Moonlighting Functions in Rice Endophyte *Pantoea agglomerans* YS19*

LI Qian-Qian**, XIONG Xiao-Lu**, MU Yu-Fei**, YI Ting, LI Er-Li, LU Zhen-Yue,
MIAO Yu-Xuan, FENG Yong-Jun***

(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract *Pantoea agglomerans* YS19 is an endophytic diazotrophic bacterium isolated from rice (*Oryza sativa* cv. Yuefu) grown in temperate climatic regions in west Beijing (China). The bacterium forms aggregate structures called "symplasmata", in which several (at least two) to hundreds of individual cells tightly bind together. Our previous study revealed that there were two growth stages for YS19, including the single cell stage existing before exponential growth phase and the symplasmata forming stage starting at the end of the exponential growth phase in liquid LB medium. More strikingly, the symplasmata structures contribute to bacterial stress (e.g., dehydration, heavy metal toxicity, and osmotic shock) resistance and are especially significant for bacterial surviving strategy in suiting an adaptive life to hostile environments. In this research, YS19 was cultivated in LB medium, and the whole cellular protein expression of the cultures sampled at different times (0~12 h) was analyzed by SDS-PAGE. Here, a novel protein differentially expressed at the symplasmata forming stage was captured. The protein was purified and digested by trypsin. The digests were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and the peptide mass fingerprint of this protein was successfully obtained. Then, database searching with Mascot in the SWISS-Prot database was performed using the recorded peptide mass fingerprint data. It is found that among 53 peptides, there are 14 peptide masses matching to MalE from *Enterobacter aerogenes*, which is a protein belonging to the periplasmic maltose-binding protein family of the ATP-binding cassette transporters. Then the gene of the MalE protein was cloned from YS19, expressed in the *E. coli* BL21 (DE3), and the recombinant protein was purified to homogeneity. Under stress (acid) treatments, the recombinant protein showed strong anti-aggregation ability, and even exhibited chaperone-like activity. This assay was achieved by comparing the quantity of the substrate proteins remaining in the supernatant under various denaturing acid conditions, where the aggregation of the substrate protein was effectively suppressed in the presence of the recombinant MalE protein. Far-UV circular dichroism spectroscopy examination on the purified MalE proteins under different pHs indicated that the global structures exhibited a sudden transition from a highly ordered conformation to a less ordered one. However, MalE was still capable of maintaining most of its secondary structures under these extreme acidic conditions (pH1~2). Finally, the Bis-ANS fluorescent probe technique was used to explore the effect of acid condition on the hydrophobic surfaces exposing of the protein. It is found that with the decrease of the pH value, the fluorescence intensity of the samples increased gradually, suggesting the MalE protein exposed the hydrophobic surfaces of the molecule to bind the substrates, implying the protein performed its chaperone activity *via* exposing its hydrophobic surfaces under acidic condition. MalE protein, originally found as a periplasmic maltose-binding protein of the ATP-binding cassette transporters, whose expression in YS19, however, far exceeds the amount being needed for transmembrane transports, is most likely a moonlighting protein for its alternative biological functions as a chaperone protein as revealed by this study. This research provided valuable information on the life styles and survival strategies of microorganisms that forms multicellular aggregates at specific growth stages and also explained the protein basis adopted by YS19 symplasmata-forming cells in surviving the stress conditions.

Key words rice endophyte, *Pantoea agglomerans*, maltose-binding protein, moonlighting protein

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00259

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30870055).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-10-68914495, E-mail: fengyj@bit.edu.cn

Received: June 9, 2011 Accepted: December 19, 2011