

农杆菌 T-复合物的形成与转运研究进展*

郭敏亮** 高佃坤 金英善

(扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要 在简要介绍农杆菌 T-DNA 转运全过程的基础上, 结合作者近年的工作, 重点对 T-复合物的形成和 T-复合物在农杆菌细胞内的转运机理的最新进展进行归纳和评述. 农杆菌能够将其 Ti 质粒上的一段 DNA 以单链 DNA-蛋白质复合物(简称 T-复合物)的形式, 通过其细胞两端的四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)转运到宿主植物中, 并使宿主发生遗传转化, 因而农杆菌介导的 T-DNA 转运技术已成为应用最广泛的植物转基因技术, 同时, 由于转运 T-复合物的 T4SS 也是某些质粒接合转移和许多病原微生物分泌致病效应蛋白的通道, 因此, 农杆菌 T-DNA 转运机理的研究受到了广泛的重视和关注, 使得这方面的研究进展非常迅速.

关键词 农杆菌, T-复合物, 四型分泌系统, T-DNA 转运
学科分类号 Q936, Q75

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00195

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种栖生于土壤的植物病原菌. 在自然界中, 该病原菌可以把它的 Ti 质粒上的一段 DNA(人们称之为 T-DNA)转运到双子叶植物中, 并整合到植物的基因组中进行表达, 从而导致宿主植物发生冠瘿瘤疾病(crown gall disease)^[1,2]. 由于 Ti 质粒上的 T-DNA 片段被其他外源基因片段所替代之后, 农杆菌仍然能把外源的基因片段转运到宿主植物中去, 因此农杆菌已经成为对植物进行转基因的重要工具^[1~3]. 随着农杆菌人工宿主的不断增加^[4], 农杆菌介导的 T-DNA 转运技术已经成为目前使用最广泛的一种植物转基因技术, 利用该技术已经获得了不少性状得到改良的农作物新品种^[1,3]. 农杆菌的人工宿主不仅在高等植物中不断增加, 还扩展到酵母、真菌和哺乳动物细胞^[4]. 有人预测农杆菌可能成为动物和人类疾病基因疗法的基因载体^[4]. 所以, 农杆菌 T-DNA 转运机理的研究受到了广泛的关注和重视. 农杆菌介导的 T-DNA 转运除了做为一种重要的转基因技术之外, 还是许多重要的生物学过程的研究模型, 例如作为生物不同界之间生物大分子转运机理的研究模型^[2], 由于农杆菌是利用四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)把 T-DNA 转运出去的, 因此也是四型分泌系统分泌机理的研究模型^[5]. 这就

使农杆菌 T-DNA 转运机理的研究显得更加重要和有意义.

近年来, 有关农杆菌 T-DNA 转运机理的研究有很大的进展, 从单链 T-DNA 的产生、转运到与宿主基因组整合的全过程有了一个全貌的了解^[1,2,6]. 整个过程可简要地概括成下面 5 个步骤(图 1): ①农杆菌感受受伤植物细胞分泌的信号物质, 然后表达有关的致毒蛋白(virulence protein); ②其中一种致毒蛋白 VirD2 从 Ti 质粒上切下单链 T-DNA, 并且通过共价键连在单链 T-DNA 的 5' 端形成 VirD2-单链 T-DNA 复合物(简称为 T-复合物, T-complex), 在 T-DNA 转运过程中的某些阶段, 另一致毒蛋白 VirE2 可能覆盖整个单链 T-DNA 以保护其不被降解, 在这些转运阶段, T-复合物就变成一个由 VirD2、单链 T-DNA 和许多 VirE2 分子构成的更大的复合物; ③T-复合物通过农杆菌细胞

* 国家自然科学基金(30870054)和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0514-87979054, E-mail: guoml@yzu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-01, 接受日期: 2009-05-26

膜上的四型分泌系统转运到宿主细胞^[5,7]; ④ T-复合物进入宿主细胞之后, 在宿主相关蛋白的帮助下进入细胞核^[8,9], 并将 T-DNA 整合到宿主的基因组中^[10~12]; ⑤ 整合的基因在宿主中表达. 整个农杆菌 T-DNA 的转运过程是一个非常复杂的生物学过程, 参与该过程的蛋白质非常多, 为了界定一下我们的讨论范围, 我们将整个过程分成两个阶段: 把在农杆菌细胞内发生的事件视为第一个阶段, 即包括参与 T-DNA 转运的相关基因的诱导表达, T-复合物

的形成和在农杆菌细胞内的转运; 把在宿主细胞内发生的事件视为第二个阶段, 主要包括 T-复合物在宿主细胞内的转运和单链 T-DNA 与宿主基因组的整合. 本文将主要介绍农杆菌 T-DNA 转运过程中第一阶段发生的事件, 并结合作者近年的研究成果重点讨论在农杆菌 T-复合物的形成和农杆菌细胞内转运这两方面所取得的一些最新进展, 对今后的研究提出一些看法.

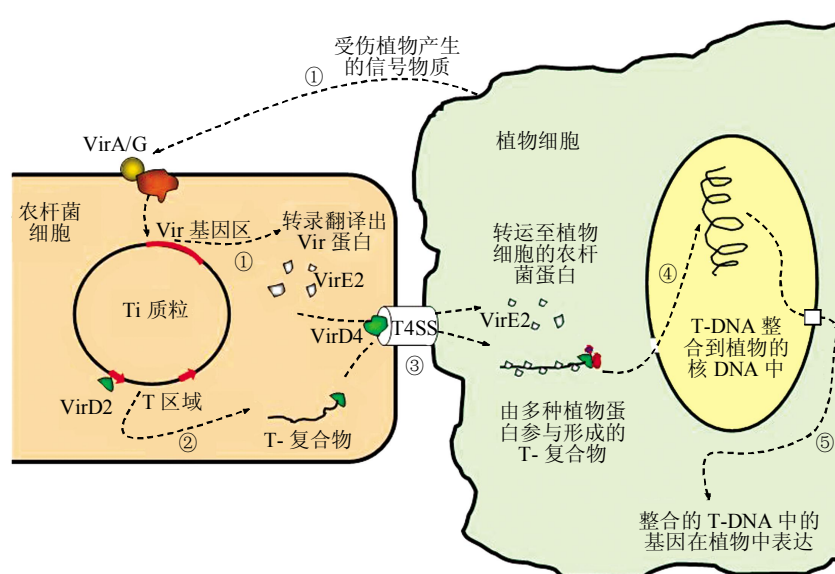


Fig. 1 Diagram of *Agrobacterium* T-DNA transfer process

图 1 农杆菌 T-DNA 转运过程示意图

1 T-DNA 转运相关基因的诱导表达

农杆菌在受到受伤植物细胞分泌的酚类和糖类信号物质的诱导后, 就开始启动与 T-DNA 转运有关的基因表达. 在自然状态下农杆菌的 T-DNA 转运结果是引起宿主植物发生冠瘿瘤疾病, 因此这些与 T-DNA 转运和致病有关的基因通称为致毒基因(virulence gene, *vir* gene), 根据这些基因被发现和鉴定的时间先后以及在基因组中的排列顺序分别以 A、B、C、D、E、F、G 等来编号. 多数 *vir* 基因都存在于 Ti 质粒上, 只有少数 *vir* 基因存在于拟核染色体 DNA 上. 这些基因所编码的蛋白质通称为致毒蛋白(Virulence protein, Vir protein). *vir* 基因的诱导表达主要受 3 个蛋白质的调节控制: 第一

个是位于细胞周质的糖类结合蛋白 ChvE, 该蛋白质由农杆菌拟核染色体 DNA 上的 *chwE* 基因编码, 被认为具有识别受伤植物细胞分泌信号物质的功能; 第二个是跨膜组氨酸蛋白激酶 VirA, 能够催化相关的蛋白质磷酸化; 第三个蛋白质是胞质响应调节因子 VirG, 在 VirA 的催化下, VirG 被磷酸化后就可以激活至少 14 个 *vir* 基因操纵子的表达^[13]. 有关这方面的研究, 在近二三年没有重大的进展.

2 T-复合物的形成

农杆菌是以单链 DNA-蛋白质复合体(简称 T-复合物)的形式把自身 Ti 质粒上的一段 DNA 转运到宿主中, 这段被转运的 Ti 质粒上的 DNA 就称为

T-DNA. 在 Ti 质粒上的这段 T-DNA, 因其只是 Ti 质粒上的一个片段(或区域), 不是一个 DNA 分子, 因此又称为 T-区域(T-region), 在 T-区域的两边分别含有一段 25 bp 的正向重复边界序列 (border sequence). 农杆菌在转运这段 T-DNA 之前, 首先必须从 Ti 质粒上把 T-DNA 的一条链切下, 然后形成 T-复合物才能进行转运, 这段从 Ti 质粒上切下而被转运的单链 T-DNA, 现在被普遍称为 T-链(T-strand).

2.1 单链 T-DNA 的产生

从 Ti 质粒上的 T-区域内把单链 T-DNA 切割下来的任务是由 VirD2 蛋白来完成的. VirD2 蛋白具有核酸内切酶的活性, 能把双链 DNA 的一条链切开而使环状质粒 DNA 发生松弛, 因此又叫松弛酶(relaxase), 它与 VirD1、VirC1 和 VirC2 一起形成一个复杂的松弛体(relaxosome), 免疫共沉淀的结果证明, VirC1 和 VirC2 可直接与 Ti 质粒结合^[14], 可能起着识别 Ti 质粒上 T-DNA 的边界序列和促进松弛体形成的作用, 具有松弛酶活性的 VirD2 能在特定的位点上把 T-DNA 中的一条链从 Ti 质粒上切割下来, 并且以共价键的形式结合在单链 T-DNA 的 5'端, 形成 VirD2-单链 T-DNA 复合物. 早期的研究结果认为, 每个农杆菌细胞一般只能产生 1~2 个这种 VirD2-单链 T-DNA 复合物, 但是最新的研究结果显示, 在人工设计的优良诱导条件下, 农杆菌细胞内的 VirD2-单链 T-DNA 复合物数量随着诱导时间的延长持续增加, 诱导 24 h 后每个细胞内的单链 T-DNA 分子数可达到 50 多个^[14]. 与此同时, Ti 质粒的拷贝数也随着诱导时间的延长而增加, 从未诱导时的 1 个拷贝每个细胞增加到诱导 24 h 后的 4~5 个拷贝每个细胞^[13, 14]. 这说明诱导条件严重地影响细胞中单链 T-DNA 的产生. 研究结果还证明, 除了诱导时间严重影响农杆菌细胞内的单链 T-DNA 分子数外, VirC1 和 VirC2 也明显地刺激细胞内单链 T-DNA 的产生^[14].

2.2 T-复合物的组成

农杆菌转运 T-DNA 是以相关的蛋白质与单链 T-DNA 构成核蛋白复合体的形式来实现的, 在这个被转运的 T-复合物(T-complex)中, VirD2 蛋白与单链 T-DNA 是以共价键结合在一起, 不是可以随便分开的. 现有的研究结果证明, 在从单链 T-DNA 的产生到单链 T-DNA 进入宿主细胞核和整合到宿主基因组的整个 T-DNA 转运过程中, VirD2 始终与单链 T-DNA 共价结合在一起^[1, 2], 因

此 VirD2 和单链 T-DNA 是这个 T-复合物的两个核心组分. 过去习惯上认为, 为了保护单链 T-DNA 不被核酸酶降解, 单链 T-DNA 上应该覆盖着大量的具有单链 DNA 结合功能的 VirE2 蛋白, 因此一个完整的清晰的 T-复合物构成是 VirD2-单链 T-DNA-nVirE2^[6]. 但是近几年的研究结果证明, T-复合物的构成并不是过去所认为的那么简单, T-复合物的构成在转运过程的不同阶段显然是不一样的. 由于 T-复合物在通过农杆菌细胞膜上 T4SS 外运的过程中没有检测到 VirE2 与单链 T-DNA 的结合^[15], 因此认为, 在农杆菌细胞内的 T-复合物没有 VirE2 的结合, VirE2 蛋白可能只在 T-复合物到达宿主细胞后才与单链 T-DNA 结合^[15], 但是 VirE2 与单链 DNA 的结合能力很强, 而且这种结合是协同性的, 诱导后的农杆菌细胞内又含有大量的 VirE2 蛋白, 同时还有实验证据显示, VirE2 与单链 DNA 结合后可以促进整个复合物在细胞中的转运^[16]. 在分离的农杆菌细胞提取液中也确实检测到了 VirD2-单链 T-DNA-nVirE2 复合物的存在^[17], 那么如何解释 T-复合物在通过细胞膜转运时却检测不到 VirE2 与单链 T-DNA 的结合? 目前的解释有两种: 一种解释是 VirE1 阻止了 VirE2 在农杆菌细胞内与单链 T-DNA 的结合^[18], 因此认为在农杆菌细胞内, 单链 T-DNA 上是没有结合 VirE2, 处于一种裸露状态; 而我们认为, VirD2-单链 T-DNA-nVirE2 复合物应该存在于正常诱导的农杆菌细胞内, 可能因为体积太大, 在通过膜上的 T4SS 转运通道时, VirE2 被逼从 T-复合物上解离下来, 所以在通过 T4SS 的转运过程中就检测不到 VirE2 与单链 T-DNA 结合^[17]. 此外, 在农杆菌细胞内, VirC1 和我们最新鉴定的 T-复合物招募蛋白 VBP(VirD2-binding protein, VBP)也应该是 T-复合物组成的一部分^[14, 19]. 在到达宿主细胞后, 许多宿主细胞的蛋白质进一步加入到 T-复合物组分的行列^[9, 11], 以帮助 T-复合物寻找宿主的细胞核和 T-DNA 的整合位点, 所以在宿主细胞中的 T-复合物构成更复杂.

3 T-复合物的转运通道——四型分泌系统

农杆菌是利用四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)把 T-复合物转运到宿主细胞中^[7]. 农杆菌的 T4SS 分布在细胞的两端, 而且每个细胞中的数量可能很少^[20]. 农杆菌的 T4SS 是一个至少有 12 种蛋白质组成的跨膜蛋白复合体, 这 12 种蛋白

质是 VirD4 和 11 种 VirB 蛋白, 11 种 VirB 蛋白分别编号为 VirB1 至 VirB11, 其中 VirD4 被称为偶联蛋白(coupling protein), 在质膜的内侧, 起着识别 T4SS 分泌底物的作用, 由 11 种 VirB 蛋白构成的分泌通道不仅横跨农杆菌细胞的内外膜和周质空间, 而且还延伸到细胞壁外的纤毛中^[21]. VirD4 和一些高度保守的 VirB 蛋白的同源性检索结果显示, T4SS 广泛存在于多种细菌中^[7], 从同源分析结果看, 农杆菌的 T4SS 与细菌的质粒接合系统具有共同的进化起源, 事实上, 现在仍然有相当一部分质粒还是通过 T4SS 进行接合转移^[17].

根据与农杆菌 T4SS 中的 3 个重要蛋白质 VirD4、VirB4 和 VirB10 同源性的差别, T4SS 可以分为 4 组, 分别称为 F、P、I 和 GI 型^[7]. 由于 T4SS 在细菌中分布广泛, 因此可以想象通过 T4SS 分泌的底物种类也不会少. 目前已经肯定 T4SS 除了能够作为农杆菌 T-复合物和部分质粒接合转移的通道外, 还是多种高发病率和致病性病原微生物, 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、嗜肺性军团菌(*Legionella pneumophila*)、杆菌状巴尔通氏体(*Bartonella bacilliformis*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、羊种布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、汉赛巴尔通体(*Bartonella henselae*)和贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)等, 分泌致病效应蛋白(effector protein)的通道^[7, 22].

由于农杆菌中的 T4SS 研究得最清楚, 因而被视为是 T4SS 的标准模型. 有关农杆菌 T4SS 的组装、结构模型和系统中各组分蛋白质与被转运的 T-复合物之间关系方面的研究, 是这几年农杆菌 T-DNA 转运机理研究的热点领域, 因此进展非常快, 利用蛋白质相互作用关系和免疫共沉淀的方法, 已经构建出了一个比较清晰的 T4SS 结构模型^[15]. pKM101 质粒是通过 T4SS 来进行接合转移, pKM101 质粒具有编码 T4SS 的全部基因, 其中 3 个基因所编码的 TraN、TraO 和 TraF 蛋白分别与农杆菌 T4SS 中的 VirB7、VirB9 和 VirB10 蛋白高度同源, 这 3 种蛋白质构成了 T4SS 分泌通道的核心结构. 由 TraN、TraO 和 TraF 3 种蛋白质构成的 T4SS 核心复合物 15Å 分辨率的三维结构已于 2009 年利用低温电镜(cryo-electron microscopy)采集的数据构建出来了(图 2)^[23], 从低温电镜的结构图中可以看出, 构成该核心复合物的 3 种蛋白质均含有 14 个分子.

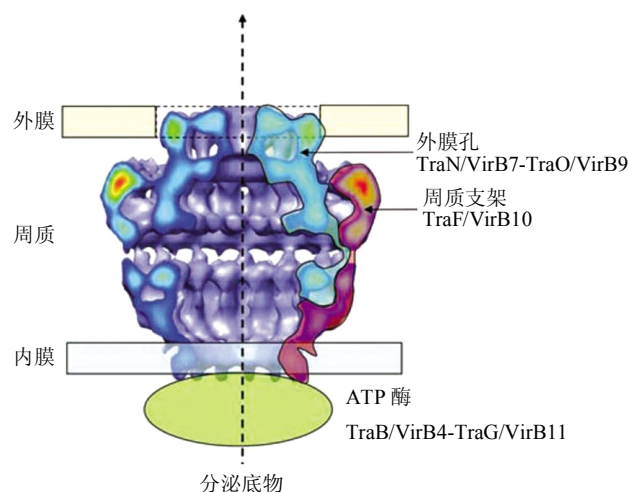


Fig. 2 The cryo-EM structure of the wild-type core complex of T4SS from plasmid pKM101^[23]

图 2 质粒 pKM101 的 T4SS 野生型核心复合物的低温电镜结构^[23]

4 T-复合物与四型分泌系统的识别

随着越来越多的细菌被发现含有 T4SS 和 T4SS 分泌机理的深入研究, 被鉴定能被 T4SS 分泌的底物也越来越多. 就农杆菌中而言, 就已经证明 T4SS 不仅能转运 T-复合物, 还至少能转运 VirE2、VirE3 和 VirF 等 3 种蛋白质和部分能够进行接合转运的质粒^[19]. 在同一个细胞内, T4SS 要转运这么多种不同的底物, T4SS 是如何识别这些待转运的底物的呢? 根据一些免疫共沉淀的研究结果显示, T4SS 不能识别 T-复合物中的单链 T-DNA 组分, T4SS 是通过结合在 T-复合物中的蛋白质来识别 T-复合物, T-复合物中的单链 T-DNA 是搭了 T-复合物中蛋白质的“便车”而被 T4SS 转运出去的^[15]. 因此, 现在认为 T4SS 实际上是一种蛋白质的分泌通道, 而不是核酸的分泌通道. 于是, 人们试图从这些能被 T4SS 转运的底物中找到一些共同的特征来推测可能被 T4SS 识别的信号. 通过对一些可被 T4SS 转运的蛋白质的氨基酸序列比较发现, 在这些蛋白质的羧基端含有很多成串出现的碱性氨基酸(图 3)^[19], 但是目前还没有发现更多的共同特征. 另一个问题是这些待转运的底物又是如何找到数量不多而且只分布在细胞两端的 T4SS. 把一些能被 T4SS 识别的蛋白质与荧光蛋白

融合后,可在荧光显微镜下观察到荧光主要出现在农杆菌细胞的两端^[14, 17],说明这些能被 T4SS 识别

的蛋白质在农杆菌细胞中不是均匀分布,也就是说这些待转运的底物是能够自行聚集到 T4SS 附近。

能被 T4SS 转运的蛋白质

VirE2 ----KLPSDAAQLLAEPSDRYSRAAFVRPEPALPPISDSRRTYESRPRSQSVNSF

VirE3 ----NSEQQALLNELLSVPLPGPLPKADHERPRVLESSRSRERSMSGGLSL

VirF ----GGPNAVGLLTTNESFEKNINEVYNRTRAELDASSRDRSRGSLR

能被 T4SS 转运的松弛酶

VirD2 ----ATDSLATAHLQQRRGVLSKRPREDDDGEPSERKRERDERSKDGRGGRR

MobA-RSF1010----ALARPDATDNRGRLDLAALGGPMKNDRTLQAIGRQLKAMGCR

TraI-F ----LREPQRVREAVREIARENLLQERLQQMERDMVRDLQKEKTLGGD

TraI-RP4 ----LLRKENDEILVLPVDKATVQRMKRLAIGDPVTVTPRGSLKTTRGRSR

招募蛋白 VBP

VBP1 ----AYVKARYSSQYKISQEALDWIGERATLLSLVGEVCRDHISALERDAGREIAEQGAAEE

VBP2 ----AYVKARYSKHFEISEEALGWLGERTAHLELVKVVCDEHIEKVDCGVRMGGSESSQ

VBP3 ----AYVKARYSKFEVSEALTWLQERTAELHKLVETLCREHIEKLEHAAGQAANSSD

Fig. 3 Amino acid residues in the C-termini of proteins that can be transferred or recognized by T4SS

图 3 能被 T4SS 转运或识别的蛋白质 C 端的氨基酸序列

带下划线的氨基酸为碱性氨基酸

对于相对较小的单个蛋白质分子(如 VirE2、VirF 等)来说,只要农杆菌细胞能产生数量足够多的分子,这些分子可能比较容易通过自由扩散找到细胞两端的 T4SS 分泌系统,因此,当在农杆菌细胞内表达大量的能被 T4SS 识别的蛋白质底物时,就可以明显地看到这些蛋白质分子大多数都分布在细胞两端的 T4SS 附近^[14, 17]。而对于 T-复合物来说,情况可能就完全不同了,T-复合物不仅分子大而且我们认为在自然的诱导条件下农杆菌细胞内的 T-复合物分子数量应该是非常少,对于这种分子大而数量少的核蛋白复合体来说,如果完全依靠自由扩散来寻找 T4SS, T-复合物的转运效率将会是很低^[17]。最新的研究证明,有 2 个蛋白质起着招募 T-复合物到 T4SS 附近的作用,一个是 VirC1 蛋白, VirC1 不仅能显著地促进单链 T-DNA 的产生,也参与 T-复合物在农杆菌细胞内的早期转运过程^[14]。另一个就是 VBP(VirD2-binding protein, VBP)蛋白,我们通过基因突变^[24]、免疫共沉淀和蛋白质融合重组等方法证明 VBP 具有明显的招募 T-复合物到 T4SS 的功能^[17], 同源性分析显示, VBP 是一类高度保守的蛋白质,农杆菌中就含有 3 个 *vbp* 的同源基因,而且其中有一个 *vbp* 同源基因与质粒接合系统的相关基因排列在一起^[19],同时,我们也证明 VBP 能够促进某些以 T4SS 为转运通道的质粒的接合转移^[17]。因此我们认为, VBP 是参与农杆菌

T-DNA 转运和某些质粒接合转移的一类新蛋白质,并把这类蛋白质定义为“T-复合物招募蛋白(T-complex recruiting protein)”^[17]。

5 展 望

综上所述,农杆菌 T-DNA 的转运是一个非常复杂的过程,参与的蛋白质(或基因)非常多,然而到底有多少农杆菌的蛋白质(或基因)直接参与或影响这个过程还是个未知数,因此未来的研究还有可能会发现更多的蛋白质(或基因)参与这个过程。除此之外,就农杆菌 T-DNA 转运过程中在农杆菌细胞内发生的事件而言,要完全揭开发生这些事件的分子机理,我们认为至少还有下列几方面的问题需要进一步地深入研究。第一个需要深入研究的的问题是现在已经确定参与这一过程的蛋白质生物化学特性的鉴定。目前这些蛋白质在 T-复合物的产生和转运过程中所起的作用和功能的确定都是依赖于蛋白质相互作用、基因突变、免疫共沉淀等方法获得的实验数据来证明的,对这些蛋白质的真正生物化学功能的确定仍然没有可靠的实验数据。比如根据蛋白质氨基酸序列的同源性分析和结构域预测, VirC1、VirB4、VirB11 和 VirD4 均含有相关 ATPase 的结构域, VBP 也含有核苷转移酶结构域,同时对这些结构域中的保守氨基酸进行突变也证明这些保守氨基酸影响这些蛋白质的生物学功能,但

是表达出来的相关重组蛋白就是检测不到所预测的酶活性, 因此, 这些参与 T-复合物形成和转运蛋白质的生化功能研究将是 T-DNA 转运机理研究的一个重要方向. 第二个问题是 T4SS 的结构仍然没有完全阐明, 低温电镜观察到的 T4SS 结构只是人工重建的核心复合物结构, 而且这种结构与早些时候通过免疫共沉淀所获得的 T4SS 各种组成蛋白相互作用关系的结果还没有完全统一起来, 因此一个天然的完整的 T4SS 超分子复合物的真实结构模型还没有真正形成. 第三个需要继续引起人们重视的问题就是 T4SS 与待分泌底物之间的识别机理. 在蛋白质结构层面上来认识 T4SS 与分泌底物识别的分子机理, 将是未来设计控制 T4SS 分泌致病效应蛋白药物的基础. 第四, 到底有多少农杆菌的蛋白质被转运到宿主细胞中, 参与 T-复合物在宿主细胞中的转运和 T-DNA 与宿主基因组的整合, 也是还没有完全确定.

参 考 文 献

- 1 Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium-mediated* genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, **17**(2): 147~154
- 2 McCullen C A, Binns A N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, **22**(1): 101~127
- 3 叶兴国, 王艳丽, 丁文静. 主要农作物转基因研究现状和展望. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**(5): 93~100
Ye X G, Wang Y L, Ding W J, *China Biotechnology*, 2006, **26**(5): 93~100
- 4 Lacroix B, Tzfira T, Vainstein A, *et al.* A case of promiscuity: *Agrobacterium's* endless hunt for new partners. *TRENDS in Genetics*, 2006, **22**(1): 29~37
- 5 Christie P J, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, *et al.* Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, 2005, **59**: 451~485
- 6 Zhan Y, Zeng F, Xin Y. Progress on molecular mechanism of T-DNA transport and integration. *Acta Genetica Sinica*, 2005, **32**(6): 655~665
- 7 Juhas M, Crook D W, Hood D W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular Microbiology*, 2008, **10**(12): 2377~2386
- 8 Dafny-Yelin M, Levy A, Tzfira T. The ongoing saga of *Agrobacterium*-host interactions. *Trends Plant Sci*, 2008, **13**(3): 102~105
- 9 Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, *et al.* Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science*, 2007, **318**(5849): 453~456
- 10 Lacroix B, Loyter A, Citovsky V. Association of the *Agrobacterium* T-DNA-protein complex with plant nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(40): 15429~15434
- 11 Anand A, Krichevsky A, Schornack S, *et al.* *Arabidopsis* VIRE2 interacting protein2 is required for *Agrobacterium* T-DNA integration in plants. *Plant Cell*, 2007, **19**(5): 1695~1708
- 12 Citovsky V, Kozlovsky S V, Lacroix B, *et al.* Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular Microbiology*, 2007, **9**(1): 9~20
- 13 Cho H, Winans S C. VirA and VirG activate the Ti plasmid *repABC* operon, elevating plasmid copy number in response to wound-released chemical signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(41): 14843~14848
- 14 Atmakuri K, Cascales E, Burton O T, *et al.* *Agrobacterium* ParA/MinD-like VirC1 spatially coordinates early conjugative DNA transfer reactions. *EMBO J*, 2007, **26**(10): 2540~2551
- 15 Cascales E, Christie P J. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science*, 2004, **304**(5674): 1170~1173
- 16 Grange W, Duckely M, Husale S, *et al.* VirE2: a unique ssDNA-compacting molecular machine. *PLoS Biol*, 2008, **6**(2): e44
- 17 Guo M (郭敏亮), Jin S, Sun D, *et al.* Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(50): 20019~20024
- 18 Dym O, Albeck S, Unger T, *et al.* Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(32): 11170~11175
- 19 Guo M (郭敏亮), Hou Q, Hew CL, *et al.* *Agrobacterium* VirD2-binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, **20**(10): 1201~1212
- 20 Judd P K, Kumar R B, Das A. Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(32): 11498~11503
- 21 Backert S, Fronzes R, Waksman G. VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesins in bacterial type-IV secretion systems?. *Trends Microbiol*, 2008, **16**(9): 409~413
- 22 Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol*, 2008, **10**(8): 1573~1581
- 23 Fronzes R, Schäfer E, Wang L, *et al.* Structure of a type IV secretion system core complex. *Science*, 2009, **323**(5911): 266~268
- 24 郭敏亮, 诸庆, 高佃坤. 产生无标记农杆菌突变体方法的建立及优化. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(5): 556~565
Guo M, Zhu Q, Gao D. *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(5): 556~565

Progress in The Formation and Transfer of *Agrobacterium* T-complex*

GUO Min-Liang**, GAO Dian-Kun, JIN Ying-Shan

(College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Jiangsu 225009, China)

Abstract *Agrobacterium tumefaciens* can transfer a DNA fragment (T-DNA) from its Ti plasmid to host plant and integrate the T-DNA fragment into host cell nuclear genome. *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer is the most widely used genetic transformation method for plant. The T-DNA is delivered in the form of single-stranded T-DNA-protein complex (T-complex) by the polar-located *Agrobacterium* type IV secretion system (T4SS) to the host cell. T4SS is ancestrally related to bacterial conjugation machines and still used by many plasmids as conjugation channel. Moreover, T4SS is also the secretion channel that used by many human bacterial pathogens to inject the effector proteins to host cells, thus contributing directly to the bacterial pathogenicity. Therefore, in addition to the technical application as a gene vector to create transgenic plants, *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer also provides a fascinating model system to study the intercellular transfer of macromolecules. The study on the molecular mechanism of T-DNA transfer arouses extensive interest and progresses rapidly in recent years. Here the recent advances in research on T-complex formation and T-complex transfer in *Agrobacterium* cell are reviewed.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, T-complex, type IV secretion system, T-DNA transfer

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00195

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30870054) and The Startup Fund of Scientific Research for The Returned Overseas Chinese Scholars from National Ministry of Education.

**Corresponding author.

Tel: 86-514-87979054, E-mail: guoml@yzu.edu.cn

Received: April 1, 2009 Accepted: May 26, 2009