双组分系统分析预测共生机制

崔艳华1,曲晓军2,马 莺1

(1.哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院,哈尔滨 150090, yhcui@ hit.edu.cn;2.黑龙江省科学院微生物研究所,哈尔滨 150010)

摘 要:为明确双组分系统在德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌共生中起的作用,采用生物信息学手段,对二者的5个菌株的基因组进行扫描,对其中双组分系统进行预测,并进行结构分析及功能预测,旨在从信号调控的角度揭示二者的共生关系.结果表明,德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌均含有5~9个双组分系统.其中部分双组分系统涉及调控细菌素合成、蛋白水解能力及建立感受态,推测德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌通过以上双组分系统相互协作,进行共生.

关键词:德氏乳杆菌保加利亚亚种;嗜热链球菌;双组分系统;共生关系;生物信息学分析
 中图分类号:Q936
 文献标志码:A
 文章编号:0367-6234(2010)11-1798-07

Forecasting protocooperation by two component system analysis

CUI Yan-hua¹, QU Xiao-jun², MA Ying¹

School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, yhcui@hit.edu.cn;
 Institute of Microbiology, Heilongjiang Science Academy, Harbin 150010, China)

Abstract: With use of bioinformatics analysis, five completely sequenced *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* genomes were scanned in order to predict two component systems (TCSs) and reveal protocooperation between *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*. 5-9 pairs of the putative TCSs were detected and analyzed in the five genomes. Biological functions of the putative TCSs were predicted by comparing them with those of other microorganisms. Some of TCSs were putatively involved in production of antimicrobial peptides, proteolytic ability, and developing competence etc. The results clue to that the cooperation between *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* of these TCSs.

Key words: Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus; Streptococcus thermophilus; two component system; protocooperation; bioinformatics analysis

德氏乳杆菌保加利亚亚种(Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, 文中简称 L. delbrueckii) 和 嗜 热 链 球 菌 (Streptococcus thermophilus) 是最具经济价值的同型发酵乳酸菌, 在世界上广泛应用于酸奶和瑞士型干酪等发酵乳品的生产^[1-2]. 二者在牛奶发酵过程中彼此促进生

长和酸化,但互作机制尚不十分明确^[1].在牛奶发 酵过程中,*L. delbrueckii*和*S. thermophilus* 需对变 化的环境进行感知和反应.在细菌中通常由双组 分信号转导系统(Two-component system,TCS)来完 成这一功能.典型的 TCS 包括组氨酸蛋白激酶 (Histidine protein kinase, HK)和应答调节蛋白 (Response regulator protein, RR).

当前 L. delbrueckii 和 S. thermophilus TCS 系统研究鲜有报道,且二者共生机制尚不十分明确^[3-5].为此,利用生物信息学手段对二者的 TCS 系统进行预测,并进行结构和功能分析,旨在从 TCS 系统的角度揭示二者的协同关系.

收稿日期: 2009-02-15.

基金项目:哈尔滨工业大学优秀青年教师培养计划(HITQNJS. 2007. 36);哈尔滨工业大学科研创新基金资助项目(HIT. NSRIF. 2008. 19).

作者简介: 崔艳华(1978—),女,博士,讲师;

马 莺(1961一),女,教授,博士生导师.

1 实 验

1.1 L. delbrueckii 和 S. thermophilus 基因组序列 L. delbrueckii ATCC 11842、ATCC BAA –

365; S. thermophilus LMG18311、LMD – 9 和 CNRZ1066 基因组序列信息来自 NCBI(www.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/).

1.2 双组分信号系统的预测

上述基因组序列用于 TCS 的预测.保守蛋白序 列数据库(Pfam: www.sanger.ac.uk/software/ Pfam/)中的 HisKA(PFAM00512)、HATPase_c (Pfam02518)、Response_reg(PFAM00072)序列用于 HMMER 搜索.HisKA HMM 和 HATPase_c HMM 用 于扫描组氨酸蛋白激酶中高度保守的磷酸基团接受 区域和 HATPase 区域,Response_reg HMM 用于扫描 应答调节蛋白中保守的磷酸基团接受区域. 功能域采用 SMART(simple modular architecture research tool)分析(http://smart.embl-heidelberg.de).应用 TMHMM Server(http://www.cbs. dtu.dk/services/TMHMM-2.0)分析蛋白跨膜结构 区域.序列比对采用 BLASTP 程序(www.ncbi. nlm.nih.gov/blast/).采用 ClustalW 进行多重序列 比对,利用 TREECON 软件建立系统发育树.

2 结果与分析

2.1 双组分信号转导系统的分布

使用 Pfam HMMs HisKA、HATPase_c 和 Response_reg 信息对 *L. delbrueckii* ATCC 11842、 ATCC BAA – 365 及 *S. thermophilus* CNRZ1066、 LMG18311 和 LMD – 9 等 5 株菌全基因组的 TCS 系统进行预测分析. *L. delbrueckii* 中,HK 为 6 ~ 7 个,RR 为 6 ~ 7 个;而 *S. thermophilus* 中发现了 6 ~ 10 个 HK 和 8 ~ 10 个 RR(见表 1).

1.3 序列分析

细菌名	菌株	<u>基因组</u> Mb	$\frac{CG}{\%}$	НК	RR	HK – RR	Orphans HKs	Orphans RRs	GenBank
L. delbrueckii	ATCC 11842	1.86	49.7	6	6	5	1	1	CR954253
L. delbrueckii	ATCC BAA – 365	1.86	49.7	7	7	7	0	0	CP000412
S. thermophilus	CNRZ1066	1.80	39.1	10	10	9	1	1	CP000024
S. thermophilus	LMG18311	1.80	39.1	10	10	9	1	1	CP000023
S. thermophilus	LMD – 9	1.86	39.1	6	8	6	0	2	CP000419

表1 L. delbrueckii 和 S. thermophilus 中 TCS 的分布情况

L. delbrueckii ATCC11842 与 BAA - 365 菌 株,具有5个高度同源的 TCS. ATCC11842 中含有 单独的 HK (YP_618959)和单独的 RR (YP_ 618256),但却未发现二者相应的 RR 和 HK. ATCC11842 和 BAA - 365 菌株来源上存在差异, 推测调控基因在进化上存在一定差异^[3-4].

S. thermophilus CNRZ1066 与 LMG18311 菌 株的 TCS 相似, 而 LMD -9 菌株的 TCS 数目明显 少于上述两个菌株. CNRZ1066 分离自法国酸奶, LMG18311 于 1974 年分离自英国的商业酸奶, LMD -9 也分离自酸奶^[4-5]. 通过比较基因组杂 交分析发现, S. thermophilus 不同菌株的核心基 因具有较大差异, 推测部分基因在稳定的环境中 退化和消失^[6-7].

将预测的 HK 进行聚类分析,建立系统发育 树,以大肠杆菌的 HK PhoR 作参比,以更好显示 L. delbrueckii 与 S. thermophilus 各菌株 HK 之间 的亲缘关系.研究表明 HK 分为 11 组(I – XI).使 用 TMHMM、Pfam、SMART 工具对各组 HK 蛋白结 构区域进行了分析. I – XI 组呈现了不同的结构 区域特征(见图 1,2).

所预测的 HK 大多数是跨膜蛋白,可直接感

受外界环境的变化,而部分 HK,如 IV、X、XI 组的 HK 缺乏跨膜区域.缺少跨膜区域的 HK,可能感 受细胞内信号(如氧化还原电位的变化)或者通 过特有的信号传导蛋白获得外界环境信号. HAMP 结构域主要发现于 HK、热激蛋白 HSP90 等 ATP 结合蛋白中,但具体功能未知,推测与细 菌渗透敏感性有关^[8]. III、IV、VI、XI 组的蛋白均 具有 HAMP 结构区域. PAS 结构域(PER-ARNT-SIM domain)能够感受光、氧、氧化还原电位、小分 子配体和细胞总能量的变化,是重要的信号感受 结构域^[9]. PAC 结构区域通常出现在 PAS 结构域 的 C 端,推测与 PAS 结构域的折叠有关. VI、VII 组中的蛋白均具有 PAS 结构区域. VI 组中蛋白 PAS 结构域的 C 端还伴有 PAC 结构域.

将预测的 RR 进行聚类分析,建立系统发育 树,以大肠杆菌的应答调节蛋白 KdpE 作为参比. 研究表明,RR 分为 11 组(I – XI),与 HK 聚类结 果相类似.使用 TMHMM、Pfam、SMART 工具对各 组的 RR 蛋白结构区域进行分析(见图 3,4).与 HK 多样的结构区域相比,RR 的结构区域较单 一,大多数 RR 的输出区域为典型的 Trans reg_C 结构域(III 组,V 组至 XI 组).



组氨酸蛋白激酶序列全长使用 ClustalW 进行多重比对,利用 TREECON 软件建立系统发育树.蛋白名称的前两个字母分别表 示菌株来源,后为蛋白在 NCBI上的编号,如 Ld 表示 L. delbrueckii ATCC 11842;LB 表示 L. delbrueckii ATCC BAA365;S1 表示 S. thermophilus CNRZ1066;S2 表示 S. thermophilus LMG18311;S3 表示 S. thermophilus LMD – 9. PhoR Ecoli 为大肠杆 菌组氨酸蛋白激酶 PhoR,蛋白编号为 ECAP001050.

图 1 L. delbrueckii 与 S. thermophilus 组氨酸蛋白激酶的 系统发育图谱

来自 L. delbrueckii 的 YP_812153 和 YP_ 618256 及 S. thermophilus 的 YP_142021、YP_ 140102、YP_820990、YP_820049、YP_140954、 YP_139065 聚为一类,上述蛋白含有 LytTR 型输 出区域. LytTR 结构域中的 DNA 结合区域是一种 新型的 DNA 结合区域,不同于常见的 HTH(helix - turn - helix)或 WH(winged - helix)型的 DNA 结合区域^[10]. LytTR 型输出区域广泛地分布于低 G+C含量的革兰氏阳性菌中,参与毒力、细菌素 和胞外多糖合成等多种代谢调控^[10].

来自 S. thermophilus 的 YP_820749、YP_

141772、YP_139848、YP_820666、YP_141681、 YP_139770 的输出区域为 HTH_LuxR 结构区域. HTH_LuxR 结构域由 65 个氨基酸组成,具有螺旋 -转角 -螺旋(helix-turn-helix, HTH)结构,为 DNA 结合区域,常见于 LuxR/FixJ 族应答调节蛋 白的输出区域.大多数 HTH_LuxR 结构区域充当 转录的激活因子,但有时抑制转录或呈现双重作 用^[11]. L. delbrueckii 中 RR 未发现此类结构域.

所预测的 RR 大多数具有信号输出区域,而 S. thermophilus 的 YP_141734 和 YP_139811 较 为特殊,仅具有接受区域,缺乏 DNA 结合区域即 信号输出区域.通常输出区域是 DNA 结合模件, 充当转录因子,激活目标基因的表达^[12].无输出 区域的 RR,可通过其他方式作用于目标蛋白,如 E. coli调控趋化作用的 CheB 磷酸化后改变对靶 蛋白的亲和力,促使化学感应器蛋白 MCPs 去甲 基化^[13].有一部分此类 RR,仅作为信号级联放大 系统中的一个上游组分,在复杂的磷酸转移系统 中传递磷酸基团,如 B. subtilis 孢子形成系统中 的 SpoOF 即充当一个磷酸基团传递的元件^[14].

2.2 组氨酸蛋白激酶和应答调节蛋白的分类

典型的 HK 具有传感器区域和组氨酸激酶核 心区域.激酶核心区域序列高度保守,存在着5个 由5~10个氨基酸组成的保守区域,分别为 H、 N、G1、F、G2-box.这些高度保守的氨基酸残基在 底物结合、催化上具有重要作用^[12,15],根据保守 区域特点,Grebe 将 HK 划分为 11 亚族^[15].

以已知类型的 HK 为参照,将预测 HK 的保 守 HisKA 和 HATPase_c 区域序列进行聚类分析. 结果发现 53.8% 的 HK 属于 HK1a 亚族(见表 2). HK1a 亚族是 HK 较大的一个亚族,参与多种 代谢调控,如磷酸盐代谢、藻酸盐的生物合成等. YP_141691 和 YP_139780 属于 HK3i 亚族,其保 守的组氨酸残基(His, H)上游第二位为色氨酸 (Trp, W) 残基. YP_812154 等 10 个蛋白属于 HK10 亚族,此类 HK 多参与细菌的群体感应^[16].

RR 位于细胞质中,由 N 端的接受区域和 C 端的输出区域组成.通常输出区域是 DNA 结合模件,充当转录因子,具有典型的 HTH 结构.根据输出区域的差异,可将 RR 分为 CheB、CitB、LytR 和 OmpR 等 11 个亚族^[15].聚类分析表明,大多数 RR 属于 OmpR 亚族(见表 2).YP_618256、YP_812153 等蛋白具有 LytR 结构区域,属于 LytR 亚族.YP_141681、YP_141772 等蛋白具有 HTH_LuxR 结构区域,属于 CitB 亚族.





显示每组中代表性蛋白的结构区域. I(YP_142022)、II(YP_139849)、II(YP_139384)、IV(YP_812689)、V(YP_820684)、VI(YP_812231)、VII(YP_812893)、VIII(YP_619676)、IX(YP_812847)、X(YP_139289)、XI(YP_140736). 图 2 L. delbrueckii 与 S. thermophilus 组氨酸蛋白激酶的结构域简图



应答调节蛋白序列全长使用 ClustalW 进行多重比对,利用 TREECON 软件建立系统发育树. KdpE Ecoli 为大肠杆菌应答调 节蛋白 KdpE,蛋白编号为 ECYP851812.蛋白编号同图 1. 图 3 L. delbrueckii 与 S. thermophilus 应答调节 蛋白的系统发育图谱



显示每组中代表性蛋白的结构区域. I(YP_142021)、II(YP_ 139848)、III(YP_812846)、IV(YP_141734)、V(YP_813730)、 IV(YP_139383)、III(YP_820685)、VIII(YP_812688)、IX(YP_ 820505)、X(YP_139286)、XI(YP_140735).

图 4 L. delbrueckii 与 S. thermophilus 应答 调节蛋白的结构域简图

2.3 功能的预测

使用 NCBI BLASTP 对预测的 TCS 系统进行 了功能预测,其中有部分 TCS 与已知生物功能的 TCS 系统相似(见表 2),功能涉及全局调控、细菌 素合成等. 尽管 S. thermophilus 在生境上与乳杆 菌、乳球菌相近,但在遗传进化上却与病原链球菌 如 Streptococcus pyogenes、S. pneumoniae、 Streptococcus mutans 关系密切. BLAST 研究发现, S. thermophilus 中多个 TCS 系统与病原菌中毒力 因子调控系统高度同源(见表 2). S. thermophilus 与进化关系密切的病原菌的全基因组比较研究发现,病原菌中的致病力相关基因在该菌中已缺失或为假基因^[5],因此上述毒力调控相关的 TCS 无实际功能.

表 2 L. delbrueckii 和 S. thermophilus TCS 系统的功能预测

菌种	HK 蛋白	HK 类型	RR 蛋白	RR 类型	HK/RR 顺序	序列同源性	功能预测	
	编号		编号			(HK/RR, Identities/Identities)		
Ld	YP_618326	1a	YP_618325	OmpR	RH	NP_814923/NP_814922 49%/75% Efae	万古霉素抗性	
	YP_618757	1a	YP_618756	OmpR	RH	YP_395826/YP_395827 42%/66% Lsak	厌氧调控	
	YP_618912	1a	YP_618911	OmpR	RH	YP_194286/YP_194287 44%/67% Laci	耐胆汁能力	
	YP_619318	1a	YP_619319	OmpR	HR	YP_194374/YP_194375_62%/91%_Laci	蛋白水解能力、耐酸能力	
	YP_619676	1a	YP_619677	OmpR	HR	NP_816886/NP_816885 52%/80% Efae	万古霉素抗性	
	YP_618959	1a		1		ZP_02920187 41% Sinf	未知	
			YP_618256	LytR		ZP_03073433 33% Lreu	未知	
LB	YP_812154	10	YP_812153	LytR	RH	NP_784990/ZP_03073433_33%/33%_Lplan/Lreu	未知	
	YP_812231	1a	YP_812230	OmpR	RH	NP_814923/NP_814922 49%/75% Efae	万古霉素抗性	
	YP_812689	1a	YP_812688	OmpR	RH	YP_395826/YP_395827 42%/66% Lsak	厌氧调控	
	YP_812847	1a	YP_812846	OmpR	RH	YP_194286/YP_194287 44%/67% Laci	耐胆汁能力	
	YP_812893	1a	YP_812892	OmpR	RH	ZP_02920187/ZP_02433651 41%/60% Sinf/Csci	未知	
	YP_813339	1a	YP_813340	OmpR	HR	YP_194374/YP_194375_62%/91%_Laci	蛋白水解能力、耐酸能力	
	YP_813729	1a	YP_813730	OmpR	HR	YP_394892/YP_394891 55%/82% Lsak	万古霉素抗性厌氧调控	
S1	YP_140736	1a	YP_140735	OmpR	RH	AAX71389/AAX71388 45%/81% Spyo	全局调控、毒力	
	YP_140953	10	YP_140954	LytR	HR	NP_815056/NP_815057 41%/65% Efae	万古霉素抗性	
	YP_141203	1a	YP_141200	OmpR	RH	NP_345296/NP_345295 70%/84% Spne	感受态建立	
	YP_141303	3c	YP_141302	OmpR	RH	AAB91593/AAB91594 31%/52% Bsub	细菌素合成	
	YP_141522	1a	YP_141523	OmpR	HR	AAX71389/AAX71388 72%/86% Spyo	生存能力	
	YP_141682	7	YP_141681	CitB	RH	NP _ 721890/NP _ 721889 64% /77% Smut	未知	
	YP_141691	3i	YP_141692	OmpR	HR	NP_346072/NP_346073 62%/84% Spne	毒力	
	YP_141773	7	YP_141772	CitB	RH	NP_720926/NP_720927 56%/83% Smut	耐氧、热、细菌素合成	
	YP_142022	10	YP_142021	LytR	RH	NP_358058/NP_358057 37%/33% Spne	细菌素合成	
	YP_140853	1a		2	Н	NP_688325 68% Saga	未知	
			YP_141734	无	R	YP_001450468 82% Sgor	感受态建立	
S2	YP_138855	1a	YP_138854	OmpR	RH	AAX71389/AAX71388 46%/81% Spyo	全局调控、毒力	
	YP_139064	10	YP_139065	LytR	HR	NP_815056/NP_815057_50%/65%_Efae	万古霉素抗性	
	YP_139289	1a	YP_139286	OmpR	RH	NP_345296/NP_345295 70%/84% Spne	感受态建立	
	YP_139384	3c	YP_139383	OmpR	RH	AAB91593/AAB91594 31%/52% Bsub	细菌素合成	
	YP_139610	1a	YP_139611	OmpR	HR	AAX71389/AAX71388 72%/87% Spyo	生存能力	
	YP_139771	7	YP_139770	CitB	RH	NP_721890/NP_721889 63%/77% Smut	未知	
	YP_139780	3i	YP_139781	OmpR	HR	NP_346072/NP_346073 62%/84% Spne	毒力	
	YP_139849	7	YP_139848	CitB	RH	NP_720926/NP_720927 56%/82% Smut	耐氧、热、细菌素合成	
	YP_140103	10	YP_140102	LytR	RH	NP_358058/NP_358057_37%/33%_Spne	细菌素合成	
	YP_138965	1a			Н	NP_688325 68% Saga	未知	
			YP_139811	无	R	YP_001450468 82% Sgor	感受态建立	
S3			YP_819853	LytR	R	AAX71388 80% Spyo	全局调控、毒力	
	YP_820048	10	YP_820049	LytR	HR	NP_815056/NP_815057 27%/50% Efae	万古霉素抗性	
	YP_820347	3c	YP_820346	OmpR	RH	AAB91593/AAB91594 31%/52% Bsub	细菌素合成	
	YP_820504	1a	YP_820505	OmpR	HR	AAX71389/AAX71388 72%/86% Spyo	生存能力	
	YP_820667	7	YP_820666	CitB	RH	NP _ 721890/NP _ 721889 63% /77% Smut	未知	
	YP_820684	3i	YP_820685	OmpR	HR	NP_346072/NP_346073 61%/84% Spne	毒力	
			YP_820749	CitB	R	NP_720927 83% Smut	耐氧、热、细菌素合成	
	YP_820991	10	YP_820990	LytR	RH	NP_358058/NP_358057 37%/32% Spne	细菌素合成	

注: Efae, Enterococcus faecalis V583; Lsak, Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K; Laci, Lactobacillus acidophilus NCFM; Sinf, Streptococcus infantarius subsp. infantarius ATCC BAA – 102; Lreu, Lactobacillus reuteri 100 – 23; Lpla, Lactobacillus plantarum WCFS1; Csci, Clostridium scindens ATCC 35704; Spyo, Streptococcus pyogenes MGAS6180; Spne, Streptococcus pneumoniae TIGR4; Cnov, Clostridium novyi NT; Smut, Streptococcus mutans UA159; Saga, Streptococcus agalactiae 2603V/R; Sgor, Streptococcus gordonii str. Challis substr. CH1. 菌种编 号同图 1.

L. delbrueckii 中发现了与 Lactobacillus acidophilus 中调控蛋白水解能力的 LBA1524HK/ LBA1525HK 系统同源的 YP_619318/YP_619319 和 YP_813339/YP_813340, 推测这两个系统与细 菌的蛋白水解能力相关^[17]. 而在 S. thermophilus 中没有发现此类 TCS. 该结果从 TCS 调控的角度, 支持了 Gilbert 等人观点,即 L. delbrueckii 具有较 高蛋白水解能力,为S. thermophilus 提供肽和氨 基酸营养^[18].同时 LBA1524HK/LBA1525HK 也 与细菌的耐酸能力密切相关,因此推测 YP_ 619318/YP_619319 和 YP_813339/YP_813340 调控着细菌的耐酸能力.在牛奶发酵过程中,细菌 需耐受不断酸化的低 pH 环境. 耐酸能力是评价 酸奶发酵剂的一个重要指标.同时研究发现 L. delbrueckii 的 YP_ 618912/YP_ 618911、YP_ 812847/YP_812846 系统与L. acidophilus 中调控 细菌耐胆汁能力的 YP_194286/YP_194287 同源 性很高^[19],推测与耐胆汁能力相关. 益生菌在胃 肠道中生存和定殖的最大挑战是酸性环境(pH 2.5~3.5)和胆汁对其生长的抑制作用.因此调 控耐酸和耐胆汁能力的 TCS 系统将有助于益生 菌在人胃肠道中生存和其益生功能的发挥.

有些细菌在生长过程通过分泌细菌素抑制其 他微生物的生长.目前,已在S. thermophilus 菌株 中发现了包括 thermophilin ST - 1、T、110 等在内 的8种细菌素^[20]. 而L. delbrueckii 细菌素报道较 少^[21]. BLAST 发现, S. thermophilus CNRZ1066、 LMG18311 和 LMD - 9 3 个菌株均含有两个 TCS 参与细菌素合成(见表2). YP_141303/YP_ 141302 YP_ 139384/YP_ 139383 YP_ 820347/ YP_820346 分别来自3个菌株且同源,与 Bacillus subtilis、L. lactis 和 Carnobacterium divergens 中 SpaK/SpaR、NisK/NisR 和 DvnK/ DvnR 系统高度同源,这些系统分别调控着 I 型细 菌素 subtilin、nisin、divercin V41 的合成^[21-24]. YP_142022/YP_142021_YP_140103/YP_140102 和 YP_820991/YP_820990 系统与 Streptococcus pneumoniae 中调节细菌素合成的 BlpH/BlpR 系 统相似^[24]. 近来研究证实 S. thermophilus LMD -9中YP_820991/YP_820990系统调控细菌素的 合成, 而 CNRZ1066、LMG18311 中的同源系统, 由 于细菌素 ABC 转运基因 blpA 和转运加工基因 blpB 基因发生无义突变而没有相应的功 能^[25-26]. 在 L. delbrueckii ATCC 11842、BAA -365 基因组中没有发现调控细菌素合成的基因. 因此,推测 S. thermophilus 通过分泌细菌素抑制

其他细菌的生长,为自身和 L. delbrueckii 的生长 创造有利条件.同时, S. thermophilus 产生的细菌 素也可能对 L. delbrueckii 产生拮抗作用.

S. thermophilus 中发现了与 S. pneumoniae 调控细胞感受态建立的 CiaH - CiaR 同源的 TCS 系统 YP_141203/YP_141200 和 YP_139289/ YP_139286^[27].建立细胞感受状态是自然遗传转 化的必要条件.而自然遗传转化是实现细菌种间 基因交流即基因水平转移的重要机制.全基因组 分析表明 S. thermophilus 存在着 10 余处基因水 平转移区域,涉及细菌素、胞外多糖合成等等^[5]. 因此,推测 YP_141203/YP_141200 和 YP_ 139289/YP_139286 与细胞感受态建立调控相关, 进而促进种间基因交流.而 L. delbrueckii 中未发 现此类系统.

Bolotin 等人研究发现, S. thermophilus 和 L. delbrueckii 之间存在基因水平转移现象. S. thermophilus pepD 基因中含有一个发生基因水平 转移的 G+C 含量异常区域. 该区域内的 3.6 kb 大小片段,与L. delbrueckii 的 DNA 区域同源性高 达95%,编码了独特的 metC 基因,该基因为甲硫 氨酸合成所必须,而牛奶中缺乏此种氨基酸^[5]. 因此推测 S. thermophilus 通过 YP_141203/YP_ 141200 和 YP_139289/YP_139286 调控建立细胞 感受态,进而获得 L. delbrueckii 提供的相关基 因,实现种间基因的转移,从而实现与L. delbrueckii subsp. bulgaricus 共生,适应生境的目 的.同时,本研究通过 YP_141203/YP_141200 和 YP_139289/YP_139286 系统的上下游基因扫描 发现,这两个 TCS 邻近区域存在着 IS3 型转座酶 基因子. 推测通过转座酶基因实现外源基因在基 因组的定位.

3 结 语

通过生物信息学分析方法对 L. delbrueckii 和 S. thermophilus 的 TCS 系统进行预测和结构分 析,并对其功能进行了预测. L. delbrueckii 和 S. thermophilus 因长期适应营养丰富的牛奶环境而 缺少一些代谢系统,因此 TCS 数目较少,在5~ 9个之间.这些 TCS 系统与全局调控、抗生素抗性 及外界压力相关,为进一步通过实验确定其功能 奠定了基础.其中部分 TCS 与细菌素合成、蛋白 水解能力和细菌感受态的建立相关,推测德氏乳 杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌通过以上双组分 系统相互协作,进行共生.本研究从 TCS 调控信 号转导的角度,分析了 L. delbrueckii 和 S. thermophilus 的共生关系,为明确二者共生机制提供了旁证.

参考文献:

- [1] ADOLFSSON O, MEYDANI S N, RUSSELL R M. Yogurt and gut function [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 80: 245 – 256.
- [2] GARCÍA-ALBIACH R, JOSÉ M, DE FELIPE P, et al. Molecular analysis of yogurt containing Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in human intestinal microbiota [J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(1):91-96.
- [3] VAN DE GUCHTE M, PENAUD S, GRIMALDI C, et al. The complete genome sequence of Lactobacillus bulgaricus reveals extensive and ongoing reductive evolution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (24): 9274 - 9279.
- [4] MAKAROVAA K, SLESAREVB A, WOLFA Y, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (42):15611 – 15616.
- [5] BOLOTIN A, QUINQUIS B, RENAULT P, et al. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22 (12):1554-1558.
- [6] GALIA W, PERRIN C, GENAY M. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties [J]. Int Dairy J, 2009, 19:89-95.
- [7] RASMUSSEN T B, DANIELSEN M, VALINA O, et al. Streptococcus thermophilus core genome: Comparative genome hybridization study of 47 strains [J]. Appl Environ Microbiol, 2008,74(15): 4703 – 4710.
- [8] ARAVIND L, PONTING C P. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 176: 111-116.
- [9] TAYLOR B L, ZHULIN I B. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, 63:479 - 506.
- [10] NIKOLSKAYA A N, GALPERIN M Y. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30:2453 – 2459.
- [11] FUQUA W C, WINANS S C, GREENBERG E P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [J]. J Bacteriol, 1994, 176:269 – 275.
- [12] PARKINSON J S, KOFOID E C. Communication modules in bacterial signaling proteins [J]. Annu Rev Genet, 1992, 26:71 – 112.
- [13] MOWBRAY S L, SANDGREN M O J. Chemotaxis receptors: A progress report on structure and function
 [J]. J Struct Biol, 1998, 124:257 275.
- [14] TZENG Y L, HOCH J A. Molecular recognition in signal transduction: The interaction surfaces of the Spo0F response regulator with its cognate phosphorelay proteins

revealed by alanine scanning mutagenesis [J]. J Mol Biol, 1997, 272:200-212.

- [15] GREBE T W, STOCK J B. The histidine protein kinase superfamily [J]. Adv Microb Physiol, 1999, 41:139 – 227.
- [16] STURME M H J, FRANCKE C, SIEZEN R J, et al. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: A special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [J]. Microbiology, 2007, 153:3939 – 3947.
- [17] AZCARATE PERIL M A, MCAULIFFE O, ALTER-MANN E, et al. Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10):5794 – 5804.
- [18] GILBERT C, ATLAN D, BLANC B, et al. A new cell surface proteinase: Sequencing and analysis of the prtB gene from Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus
 [J]. J Bacteriol, 1996, 178:3059 3065.
- [19] PFEILER E A, AZCARATE PERIL M A, KLAEN-HAMMER T R. Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus* [J]. J Bacteriol, 2007, 189(13):4624-4634.
- [20] GILBRETH S E, SOMKUTI G A. Thermophilin 110: A bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110 [J]. Curr Microbiol, 2005, 51:175 – 182.
- [21] MEER van der J R, POLMAN J, BEERTHUYZEN M M, et al. Charaterization of the Lactococcus lactis nisin A operon genes nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis [J]. J Bacteriol, 1993, 175:2578 – 2588.
- [22] CHUNG Y J, HANSEN N J. Determination of the sequence of *spaE* and identification of a promoter in the subtilin (spa) operon of *Bacillus subtilis* [J]. J Bacteriol, 1992, 174:6699 - 6702.
- [23] METIVIER A, PILET MF, DOUSSET X, et al. Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by Carnobacterium divergens V41: Primary structure and genomic organization [J]. Microbiology, 1998,144:2837 - 2844.
- [24] SAIZIEU de A, GARDES C, FLINT N, et al. Microarray-based identification of a novel Streptococcus pneumoniae regulon controlled by an autoinduced peptide [J]. J Bacteriol, 2000, 182:4696-4703.
- [25] FONTAINE L, BOUTRY C, GUÉDON E, et al. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in Streptococcus thermophilus [J]. J Bacteriol, 2007, 189(20):7195-7205.
- [26] FONTAINE L, HOLS P. The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpGSt, a thiol-disulfide oxidase [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(4):1102-1110.
- [27] GIAMMARINARO P, SICARD A M, GASC A M. Genetic and physiological studies of the CiaH-CiaR two-component signal transducing system involved in cefotaxime resistance and competence of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Microbiology, 1999, 145:1859 1869.
 (编辑 刘 形)