

苜蓿根瘤菌 1021 外源 cAMP 上调 *gln* 及 *glnK-amtB* 的表达

田哲贤 毛贤军 苏玮 李健 Anke Becker 王忆平*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程暨植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871. Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Postfach 100131, 33501 Bielefeld, Germany. * 联系人, E-mail: wangyp@pku.edu.cn)

摘要 苜蓿根瘤菌 1021 中多个腺苷酸环化酶基因的存在, 暗示着 cAMP 的重要性. 本研究用全基因组 DNA 微阵列分析了外源 cAMP 对苜蓿根瘤菌的功能. 分析结果表明, *gln* 和 *glnK* 的转录水平在外源 cAMP 存在时有明显上调. 通过测定 *gln* 和 *glnK* 启动子与 *lacZYA* 报告基因融合系统在苜蓿根瘤菌体内的活性, 再次证实外源 cAMP 对 *gln* 和 *glnK* 启动子表达有激活作用.

关键词 cAMP 苜蓿根瘤菌 *gln* *glnK*

根瘤菌既可以在土壤中自由生活, 又可以与豆科植物共生. 根瘤菌与豆科植物之间特异性的相互识别是建立有效共生体系的前提. 经历一系列的分化过程, 两者最终在豆科植物根部组织里形成根瘤, 里面含有特异分化的根瘤菌细胞——类菌体. 植物细胞给类菌体提供碳水化合物, 类菌体把分子 N₂ 还原成氨, 给植物细胞提供氮源. 与共生过程有关的信号传递系统及受其调控的基因网络(genetic network)是微生物与植物相互作用研究领域中的重要研究对象 [1,2].

环腺苷酸(cAMP)是广谱的第二信使, 参与很多信号传导途径, 由腺苷酸环化酶合成 [3]. 在大肠杆菌及相关细菌中, 腺苷酸环化酶由 *cya* 基因编码. 最初, cAMP 与其受体蛋白 CRP 形成的复合体被认为是碳代谢基因的转录激活因子 [4]. 后来发现, 在大肠杆菌中 CRP-cAMP 复合体参与更广的基因调控网络, 既有激活作用也有抑制作用, 如谷氨酰胺合成酶基因的两个串联启动子中, CRP-cAMP 激活 σ^{70} -依赖型 *glnAp1*, 抑制 σ^{54} -依赖型 *glnAp2* [5]. 在根瘤菌中, cAMP 也参与多种代谢过程的调节. 在大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 中, cAMP 降低谷氨酸合酶和谷氨酰胺合成酶的活性 [6]; cAMP 解除苹果酸或其他三羧酸循环中间产物对谷氨酸代谢的抑制作用 [7]. 根瘤菌中有多个腺苷酸环化酶基因, 如苜蓿根瘤菌 1021 的基因组中有 31 个基因编码推测的核苷酸环化酶(腺苷酸或鸟苷酸环化酶) [8]. 苜蓿根瘤菌 1021 中多个腺苷酸环化酶基因的存在, 暗示着 cAMP 的重要性.

在苜蓿根瘤菌中, *gln* 和 *glnK* 分别编码谷氨酰

胺合成酶和 P 类似蛋白 GlnK [9]. 在根瘤中, 根瘤菌 *gln* 和 *glnK* 等氮同化过程相关基因在侵染早期表达, 形成类菌体后即关闭表达 [10]. 这种氮同化过程和固氮过程的时序和空间上的分离, 可能与有效共生固氮体系建立和维持有关. 但是, 其中的信号传递途径还不清楚.

苜蓿根瘤菌 1021 的全基因组序列已经解析完毕 [11]. 在此基础上, 建立并利用全基因组 DNA 微阵列平台, 分析了不同遗传或生理条件下的基因表达谱变化 [12-15]. 本研究利用全基因组 DNA 微阵列以及启动子-*lacZ* 融合报告系统, 发现在苜蓿根瘤菌中 *gln* 和 *glnK* 的转录水平在外源 cAMP 存在时有明显上调.

1 材料与方 法

() 菌株与质粒. 见表 1.

() 遗传操作. 质粒 DNA 的提取和纯化、转化、限制性酶切及连接按 Sambrook 等人 [18] 的方法进

表 1 本工作中所用的细菌菌株和质粒

菌株/质粒	相关特点	来源/参考文献
苜蓿根瘤菌菌株		
1021	野生型, 链霉素抗性	[16]
质粒		
pGD926	<i>lacZYA</i> 融合载体, 四环素抗性	[17]
pKU1012	pGD926 衍生质粒, 带有苜蓿根瘤菌 <i>Pgln::lacZYA</i>	本工作
pKU1014	pGD926 衍生质粒, 带有苜蓿根瘤菌 <i>PglnK::lacZYA</i>	本工作
pKU101	pGD926 衍生质粒, 带有大肠杆菌 <i>glnAp2::lacZYA</i>	[5]

行. 根据苜蓿根瘤菌的基因组数据(GeneBank 登录号: AL591688, AE006469 和 AL591985)设计引物 PCR 扩增 *gln* 启动子(5'-cccaagctttccggaagecaggag-3', 5'-cgggatcctcgagcttatacttggtcatt-3')和 *glnK* 启动子(5'-cccaagctttgatgcctctgtc-3', 5'-cgggatccatggccatcacattttcatc-3').

() 培养条件. 在分析外源cAMP (或cGMP)引起苜蓿根瘤菌 1021 基因表达谱变化的实验中, 细菌过夜预培养MOPS缓冲的GMS培养基^[19]. 然后稀释到有或无 2 mmol/L cAMP (或cGMP)的 50 mL同样的培养基中, 起始 A_{600} 为 0.05, 待生长到 A_{600} 为 0.8 时, 迅速收获细菌, 用液氮快速冷冻, -80 保存. 在检测外源cAMP对*Pgln::lacZYA*和*PglnK::lacZYA*表达影响的实验中, 细菌培养条件与转录组学分析实验一致, 在 A_{600} 为 0.5~1.5 的对数生长期, 按照Miller^[20]方法测定 β -半乳糖苷酶活性.

() DNA 微阵列操作及数据分析. 总 RNA 提取、杂交探针的标记、杂交、数据获得及分析按照文献^[12]报道的方法进行. 使用 2 张 DNA 微阵列分别与 2 个独立实验样品的探针进行杂交.

2 结果

多个 *cya* 基因的存在预示着 cAMP 在苜蓿根瘤菌生理中的重要作用, 同时也预示着苜蓿根瘤菌中 *cya* 缺失分析的难度. 本研究利用全基因组 DNA 微阵列, 分析了外源 cAMP 对苜蓿根瘤菌的基因表达谱的影响. 考虑到高浓度 cAMP 在溶液中的带电特性可能影响细胞膜的带电特性, 会进一步影响基因表达谱的变化, 故用 cGMP 作为对照. 比较了含有 2 mmol/L 的 cAMP 或 cGMP 的 GMS 培养基中培养的苜蓿根瘤菌 1021 以及不含任何环核苷酸的 GMS 培养基中培养的苜蓿根瘤菌 1021. 每个基因的表达差异倍数的对数值(M 值)对该基因的杂交信号强度的对数值(A 值)进行作图(图 1). 从这个分布图可知, 表达有显著差异($M > 1$ 或 < -1)的基因数目并不多. 与未处理的细菌相比, 受 cAMP 处理的细菌中共有 48 个基因表达有差异; 而受 cGMP 处理的细菌中共有 41 个基因表达有差异. 在表 2 中列出了外源 cAMP 引起表达差异最为显著的基因. 其中, 只有 4 个基因在外源 cGMP 引起的表达谱中也被检测到有显著变化, 剩下的被认为是受 cAMP 特异调控的. 有意思的是, *gln* 和 *glnK-amtB* 的表达水平在外源 cAMP 的存在下有显著提高, 但不受外源 cGMP 的影响.

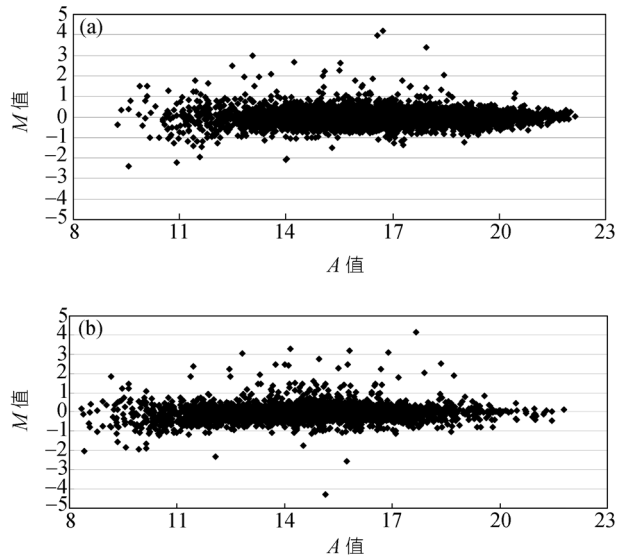


图 1 全基因组表达谱变化分布图

每个基因的表达差异倍数的对数值($\log_2(I_{+cAMP}/I_{-cAMP})$, M 值)对该基因的杂交信号强度的对数值($\log_2(I_{+cAMP}I_{-cAMP})^{0.5}$, A 值)进行作图. (a) 外源 cAMP 引起的表达谱变化; (b) cGMP 引起的表达谱变化

表 2 外源 cAMP 引起表达变化最显著的基因

基因	功能	\log_2 比率
<i>sma0958</i>	可能的 AtrC 乙酰乳酸合成酶	2.62
<i>sma1505</i>	推测的 GntR 家族转录调控子	-2.07
<i>sma2047</i>	TRm24 推测的转座酶	2.98
<i>sma2109</i>	保守的假定蛋白	2.68
<i>sma2127</i>	ATP 结合蛋白	2.47
<i>smb20745</i>	Gln, 谷氨酰胺合成酶 蛋白	3.40
<i>smb21329</i>	假定蛋白	2.00 (2.65) ^{a)}
<i>smc01878</i>	LigA 可能的 DNA 连接酶蛋白	2.24
<i>smc02167</i>	保守的假定蛋白	-2.02
<i>smc02278</i>	假定/未知蛋白	2.26 (3.49)
<i>smc02774</i>	胞外周质结合蛋白	2.03 (1.16)
<i>smc03806</i>	GlnK 可能的氮调控蛋白 P 2	3.95
<i>smc04164</i>	假定蛋白	4.18 (4.16)

a) 括号里的数值是外源 cGMP 引起的基因表达的倍数的对数值

为了验证外源 cAMP 对 *gln* 和 *glnK-amtB* 表达的激活作用, 我们检测了在有或无外源 cAMP 的条件下苜蓿根瘤菌 1021 中启动子-报告基因融合子的表达量. 通过 PCR 方法扩增得到 *gln* 和 *glnK* 的启动子 DNA 片段, 分别与低拷贝的广宿主质粒 pGD926 上无启动子的 *lacZYA* 进行融合, 得到 pKU1012 和 pKU1014. 通过三亲杂交, 把 pKU1012 和 pKU1014 以及空载体 pGD926 分别导入到苜蓿根瘤菌 1021 中. 在有或无外源 cAMP (2 mmol/L) 的 GMS 培养基中培养这些带有报告系统的细胞, 并在不同的生长时间测定 β -半乳糖苷酶活性. 含有空载体 pGD926 的苜蓿

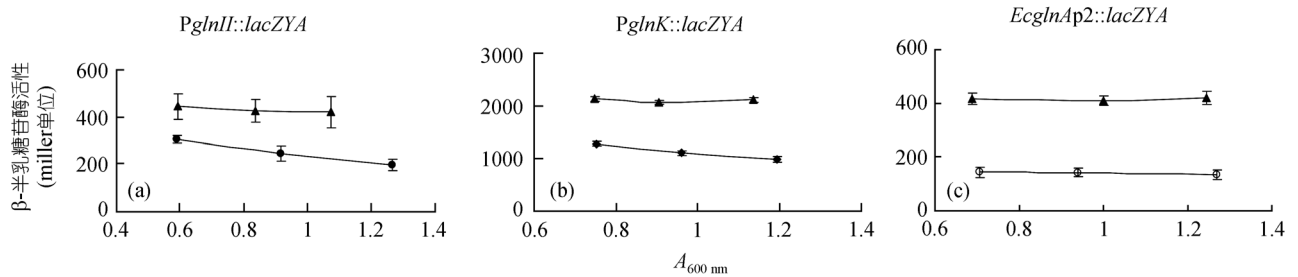


图 2 苜蓿根瘤菌中 *PglN1::lacZ* (a), *PglNK::lacZ* (b) 以及 *glnAp2::lacZ* (c) 在有或无 2 mmol/L 外源 cAMP 条件下表达活性

根瘤菌 1021 在有或无外源 cAMP (2 mmol/L) 的条件下, 在生长 A_{600} 为 0.4~1.5 时没有检测到 β -半乳糖苷酶活性(数据未显示). 含有 pKU1012 (*PglN1::lacZYA*) 或 pKU1014 (*PglNK::lacZYA*) 的苜蓿根瘤菌 1021 的 β -半乳糖苷酶活性在有外源 cAMP 的条件下比在无外源 cAMP 的条件高 2 倍(图 2(a)和(b)). 这些结果表明, 外源 cAMP 对 *gln* 和 *glnK-amtB* 的表达确实有明显的激活作用.

由于 *gln* 和 *glnK-amtB* 的表达可能都是由 σ^{54} -依赖型启动子启动的^[9], cAMP 是否对苜蓿根瘤菌体内的其他 σ^{54} -依赖型启动子的表达有激活作用? 为此, 把带有大肠杆菌谷氨酰胺合成酶基因 σ^{54} -依赖型启动子 *glnAp2* 和 *lacZYA* 融合子的 pGD926 衍生质粒 pKU101^[5] 导入到苜蓿根瘤菌 1021 中. 结果表明, β -半乳糖苷酶活性在有外源 cAMP 的条件下比无外源 cAMP 的条件要高 3 倍(图 2(c)). 这个结果支持外源 cAMP 对苜蓿根瘤菌体内的 σ^{54} -依赖型启动子的表达具有激活作用的推测.

3 讨论

本工作发现, 外源 cAMP 对苜蓿根瘤菌中 *gln* 和 *glnK-amtB* 的启动子的表达有明显的激活作用(图 2(a)和(b)). 以前的研究表明, 在侵染过程中 *gln* 和 *glnK* 有显著的表达, 而在成熟的类菌体中表达量很低, 其机制还不清楚^[10]. 另一方面, 在侵染过程中, 3 个腺苷酸环化酶基因 *cyaD1*, *cyaF4* 和 *smal591* 有特异表达^[21]. 据此, 推测在侵染过程中这些腺苷酸环化酶基因的表达量升高, 带动了 *gln* 和 *glnK* 的表达量的提高. 在未来的研究中可以通过比较野生菌和这些腺苷酸环化酶基因缺失菌产生的根瘤中 *gln* 和 *glnK* 的原位表达来加以证实.

外源的 cAMP 可能对苜蓿根瘤菌体内的 σ^{54} -依赖

型启动子的表达具有普遍激活作用. 作为一个证据, 异源的大肠杆菌 σ^{54} -依赖型启动子 *glnAp2* 在苜蓿根瘤菌中的表达也受 cAMP 的激活(图 2(c)). 从本工作的转录组学分析中发现受 cAMP 上调 (2.5 倍) 的 *smb20436* 很可能也是由 σ^{54} -依赖型启动子来带动的, 此基因可能是编码硝酸盐转运蛋白(www.promscan.uklinux.net). 在大肠杆菌中, cAMP 及其受体蛋白 CRP 形成复合体对 σ^{54} -依赖型的大肠杆菌 *glnAp2*, 肺炎克氏杆菌 *nif* 启动子和苜蓿根瘤菌 *dctA* 启动子的表达有显著的抑制作用^[5,22,23]. 本工作所涉及到的苜蓿根瘤菌 *gln*

和 *glnK* 启动子在大肠杆菌中也被 cAMP 显著抑制(数据未显示). 大肠杆菌中这种 cAMP 对 σ^{54} -依赖型启动子的体内表达的普遍抑制作用是依赖其受体蛋白 CRP, 并且其分子机理可能是多途径的^[5,24,25]. 目前, 还没有找到苜蓿根瘤菌中 cAMP 的特异受体蛋白. 至于 cAMP 通过何种信号传递系统最终激活 *gln* 和 *glnK* 的表达还不是很清楚, 有待进一步研究.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展计划(批准号: 2001CB108902 和 2001CB108903)、国家自然科学基金(批准号: 30470940)及德国 Bundesministerium für Bildung und Forschung (批准号: 031U213D) 和 Deutsche Forschungsgemeinschaft (批准号: BIZ7) 的资助项目.

参 考 文 献

- Oke V, Long S R. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 641—646[DOI]
- Spaank H P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 257—288[DOI]
- McCue L A, McDonough K A, Lawrence C E. Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*, 2000, 10: 204—219[DOI]
- Kolb A, Busby S, Buc H, et al. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 749—795[DOI]

- 5 Tian Z X, Li Q S, Buck M, et al. The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2001, 41: 911—924[DOI]
- 6 Upchurch R, Elkan G. The role of ammonia, L-glutamate, and cAMP in the regulation of ammonia assimilation in *Rhizobium japonicum*. *Biochem Biophys Acta*, 1978, 538: 244—249
- 7 Lim S, Shanmugam K. Regulation of hydrogen utilization in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 584: 479—492
- 8 Shenoy A R, Visweswariah S S. Class nucleotide cyclases in bacteria and archaeobacteria: Lineage-specific expansion of adenyl cyclases and a dearth of guanylyl cyclases. *FEBS Lett*, 2004, 561: 11—21[DOI]
- 9 Dombrecht B, Marchal K, Vanderleyden J, et al. Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely related species of the Rhizobiales. *Genome Biol*, 2002, 3(12): research0076.1—0076.11
- 10 Patriarca E J, Tate R, Iaccarino M. Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66: 203—222[DOI]
- 11 Galibert F, Finan T M, Long S R, et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 2001, 293: 668—672[DOI]
- 12 Ruberg S, Tian Z X, Krol E, et al. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: Genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol*, 2003, 106: 255—268[DOI]
- 13 Becker A, Berg aes H, Krol E, et al. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, 17: 292—303
- 14 Krol E, Becker A. Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272: 1—17
- 15 Barnett M J, Toman C J, Fisher R F, et al. A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16636—16641[DOI]
- 16 Meade H M, Signer E R. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 2076—2078
- 17 Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, et al. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid*, 1985, 13: 149—153[DOI]
- 18 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 19 Zevenhuizen L P T M. Selective synthesis of polysaccharides by *Rhizobium trifolii* strain TA-1. *FEMS Microbiol Lett*, 1986, 35: 43—47[DOI]
- 20 Miller J H. *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972
- 21 Ampe F, Kiss E, Sabourdy E, et al. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol*, 2003, 4: R15[DOI]
- 22 李稚婷, 孙义成, 毛贤军, 等. 碳代谢总体调控蛋白 CRP 对肺炎克氏杆菌 *nif* 启动子的抑制作用. *科学通报*, 2002, 47(15): 1133—1139
- 23 Wang Y P, Giblin L, Boesten B, et al. The *Escherichia coli* cAMP receptor protein (CRP) represses the *Rhizobium meliloti* *dctA* promoter in a cAMP-dependent fashion. *Mol Microbiol* 1993, 8: 253—259
- 24 Maheswaran M, Forchhammer K. Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling. *Microbiology*, 2003, 149: 2163—2172[DOI]
- 25 Huo Y X, Tian Z X, Mathieu R, et al. Protein-Induced DNA bending clarified the architectural organization of the σ^{54} -dependent *glnAp2* promoter. *Mol Microbiol*, 2006, 59: 168—180[DOI]

(2006-04-18 收稿, 2006-06-20 接受)