

细菌群体感应与 II 类乳酸菌细菌素的合成调控

唐晓婷,易华西*,章检明

哈尔滨工业大学化工学院食品科学与工程系,哈尔滨 150090

摘要: II 类乳酸菌细菌素具有抑菌谱广,尤其对单核细胞增生李斯特菌表现出强抑制作用,被视为一类新型、安全的天然食品防腐剂,具有广泛应用前景,但合成量低是目前限制其应用的瓶颈之一。群体感应是细菌细胞间的相互交流,从而感知自身信号分子浓度进行基因表达调控的一种生理行为,已经证明乳酸菌群体感应系统能调控细菌素的合成。本文综述了细菌群体感应调控机制及其对乳酸菌细菌素生物合成调控的作用,为通过群体感应系统调控提高乳酸菌细菌素的产量提供思路。

关键词: 群体感应;乳酸菌;细菌素;合成调控

中图分类号:Q935

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.8.030

Quorum-sensing and Biosynthesis Regulation of Class II Bacteriocin in Lactic Acid Bacteria

TANG Xiao-ting, YI Hua-xi*, ZHANG Jian-ming

Department of Food Science and Engineering, School of Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Abstract: Class II bacteriocins produced by lactic acid bacteria have been regarded as novel and safe food bio-preservatives due to their broad antimicrobial spectrum and the special anti-microbial activity against *Listeria monocytogenes*. Though Class II bacteriocins have great potential on food industry, low production is one of the bottlenecks for their application. Quorum-sensing is a physiological behavior that bacterial cells communicate with each other, so as to perceive the concentration of signal molecules to regulate the expression of genes. It has been reported that Class II bacteriocins production was regulated by the Quorum-sensing system in lactic acid bacteria. In this study, the regulatory mechanism of Quorum-sensing and its influence on the biosynthesis of bacteriocins was reviewed, which would make a solid foundation for the study on the improvement of bacteriocins production regulated by Quorum-sensing system.

Key words: Quorum-sensing; lactic acid bacteria; bacteriocins; biosynthesis regulation

乳酸菌代谢过程中会产生多种具有抗菌活性的物质,其中细菌素是乳酸菌在代谢过程中由核糖体合成的具有抗菌活性的蛋白质或多肽,且能被人体降解,成为天然食品防腐剂的重要研究领域之一,对保障食品质量和人体健康具有重要意义^[1]。最具有应用前景的乳酸菌细菌素主要分为两类: I 类细菌素,乳酸链球菌素 nisin 是该类细菌素的代表,分子量一般小于 5 kDa,由 19~38 个氨基酸组成,需翻译后修饰才能产生活性; II 类细菌素,分子量一般小于 10 kDa,具有热稳定性,不需翻译后加工修饰^[2], II 类细菌素又分为 a、b 两个亚组: (1) IIa 类: 对李斯特菌具有特异的抑菌活性,从发酵啤酒中

分离的 *Lactobacillus plantarum* 423 产生的 plantaricin423 就是已知的 IIa 类植物乳杆菌素^[3]; (2) IIb 类细菌素: 由两条多肽链组成,其中两条多肽链的氨基酸序列不同,每条多肽链由 15~30 个氨基酸组成^[3], 植物乳杆菌素 plantaricinA、plantaricinEF、plantaricinNC8 等都属于此类。

1 细菌的 QS 系统

细菌群体感应(quorum sensing, QS)是细菌在细胞内产生和释放自诱导物化学信号分子,当细胞外的信号分子达到最小临界阈值浓度时,细菌可以感知自身细胞群体密度,引发群体行为,并改变特定基因的表达的一种基因调控现象^[5]。这种群体感应行为存在于不同物种之中,控制多种表型性状,通常包括毒力因子、胞外酶、抗生素和生物表面活性剂等代谢产物^[6,7]。QS 现象只有细胞密度达到一定阈

收稿日期:2015-12-18 接受日期:2016-03-15

基金项目:国家自然科学基金(31571850);哈尔滨市青年后备人才项目(2014RFQXJ069)

* 通讯作者 Tel:86-451-86282908; E-mail: yihuaxi@hit.edu.cn

值才能发生,所以也将这一现象称为细胞密度依赖的基因表达;QS系统是细胞间通过化学信号分子的产生、识别、传递和响应进行交流和相互协调的作用机制,通常分为种内信号分子和种间信号分子^[8]。革兰氏阴性(G⁻)细菌和革兰氏阳性(G⁺)细菌的QS系统具有较大差别。

1.1 G⁻细菌的QS系统

G⁻细菌中的QS与海洋费氏弧菌调节生物发光的QS系统一致^[8],为LuxI-LuxR调节系统;这种信号转导机制适用于大部分依赖细胞密度调节各种功能的G⁻细菌,LuxI是自诱导物合成酶,催化QS系统中信号分子酰基高丝氨酸内酯衍生物(N-acylhomoserine lactones, N-AHLs)的合成^[9,10]。LuxR是细胞质的自诱导物受体和转录激活剂。当LuxR和自诱导物结合时具有活性,并且可以促进编码荧光素酶和其他发光酶基因的操纵子luxCDABE转录^[11]。自诱导物AHLs是水溶性、膜通透性的两亲化合物,可以在细胞内自由扩散或通过特定的转运系统转运出细胞膜,在环境中随着细胞密度的增加信号分子浓度不断积累增大;当信号分子达到临界阈值浓度时,进入细胞并与细胞内的LuxR蛋白结合进而激活转录调节子和控制群体感应目标基因表达^[12,13]。LuxR-AHLs复合物也具有诱导自身luxR基因和自诱导物合成酶基因luxI表达的作用。LuxR结构分析表明,LuxR受体具有特定的酰基结合位点,每一个LuxR只与其同源的自诱导物AHLs结合才能被激活^[14,15]。由于LuxR受体和同源自诱导物AHLs之间的特异性,LuxI-LuxR调节系统主要用于细菌种内之间进行交流。

1.2 G⁺细菌的QS系统

G⁺细菌QS系统是由一个自诱导肽(AIP)和双组份信号转导系统(RR)共同组成的,也称为三组份系统,许多II类乳酸菌细菌素的产生由该系统调节。细胞间交流是通过分泌修饰加工后的小分子寡肽(AIPs)作为信号分子来感应环境因子和菌群密度的变化,自诱导肽通过专用的ATP-结合盒(ABC)转运分泌到细胞外部;浓度随细胞浓度的增加而增加,当细胞外的AIPs浓度达到临界阈值时,可以被膜结合的双组份传感激酶探测到,激活特定的受体酶蛋白,并与细胞膜上的组氨酸蛋白激酶(Histidine Protein Kinase, HPK)感受器结合^[16]。HPK由感受环境变化的N端的传感器区域(Sensor region)和具有保守的ATP结合域和His磷酸化位点的C端的

激酶核心结构域(Kinase core domain)组成,是QS系统的重要组成部分,结合后的肽配体通过磷酸化激酶受体启动信号转导级联,传感器激酶检测到信号,进行自身磷酸化,然后将磷酸基团转移到响应调节器上,磷酸化的响应调节蛋白被激活结合到DNA特异的启动子上,控制群体感应目标基因的转录^[17]。AIP在G⁺的核糖体中合成,经过转录、修饰、加工合成,成为稳定的、具有活性的寡肽信号分子,分子量在5~17个氨基酸残基之间,结构多变,不同的信号分子前体肽的长度及组成差别较大,转录后增加了AIP分子的特异性,因此G⁺也用于细菌种内交流。细菌种间的交流则是利用叫做吡喃酮二酯类化合物(AI-2)的信号分子进行,此类信号分子在G⁺和G⁻中均存在。

研究表明,G⁺细菌的QS系统可以用来调控细菌的多种表型,例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和变异链球菌(*Streptococcus mutans*)的生物膜形成和毒力因子致病力,肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的感受性和遗传竞争能力,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的细菌素合成^[18-20]。

2 QS系统对植物乳杆菌合成II类细菌素的调控

目前已经证实多种乳酸菌产生细菌素的生物合成由QS系统调控。由于细菌之间有共同的交流基础,所以存在相似性;但是因为每个系统为促进自身特定物质生存,都对自身条件进行了优化,也存在差异性。细菌合成细菌素也被认为是细菌感应到外界不良生长环境或因子的一种自我保护行为^[21]。

随着人们对细菌素合成的研究不断深入,已经证实不同菌株的细菌素生物合成由QS调控,目前研究比较深入的产细菌素植物乳杆菌有C11、WC5F1、J51、NC8、J23等^[22-26],被视为最有发展和应用前景的产细菌素乳酸菌^[27]。图1显示了这5株植物乳杆菌基因座的结构,分析发现这5株菌株基因座呈现以下相同点:(1)都含有一个双组份调节系统,这个双组份信号转导系统由跨膜的组氨酸蛋白激酶(HPK)和位于细胞质的反应调节子(RR)组成;(2)一个诱导肽(IP);(3)一个专用的ABC转运系统;(4)其他与细菌素合成有关的基因。

以*L. plantarum* C11菌株为例,调控细菌素合成

的基因由五个可诱导的操纵子组成,分别是:*plnEFI*、*plnJKLR*、*plnMNOP*、*plnABCD*、*plnGHSTU-VW*^[20];其中,*plnABCD*是与群体感应相关的基因,*plnA*编码诱导肽(IP),*plnB*组氨酸蛋白激酶(HPK),*plnCD*编码两个具有高度同源性的反应调节器(*PlnC*和*PlnD*),但*PlnC*和*PlnD*对调节基因启动子的亲和力和协同作用并不相同^[28]。操纵子*plnEFI*和*plnJKLR*编码两个肽的细菌素*PlnEF*和*PlnJK*,以及共同的免疫蛋白。*plnMNOP*操纵子包含的4个基因,如*plnN*基因,但是目前还不清楚这些基因在细菌素合成中的功能。操纵子*plnGHSTU-VWXY*编码分泌并加工用于ABC转运系统的ABC转运蛋白和辅助蛋白,其中,*plnTUVW*编码未知功能

的II型CAAX蛋白酶。位于细胞外的信号分子*PlnA*可以诱导细菌素产生,并起着诱导与细菌素产生相关的这五个操纵子转录的作用^[29];实验证明,*L. plantarum* DC400与乳酸菌共培养时,由*L. plantarum* DC400产生的信号分子*PlnA*可以诱导乳酸菌某些蛋白过表达或抑制蛋白表达,从而增强细胞的生存能力^[30]。*L. plantarum* WCFS1的基因组序列显示,它的*pln*基因座的结构和序列与C11菌株一致,所以与C11具有相同的群体感应调节机制^[22]; *L. plantarum* J51的全基因组序列虽然与C11不相同,但是调控细菌素产生群体感应基因相同,具有相同的调节机制^[31]。

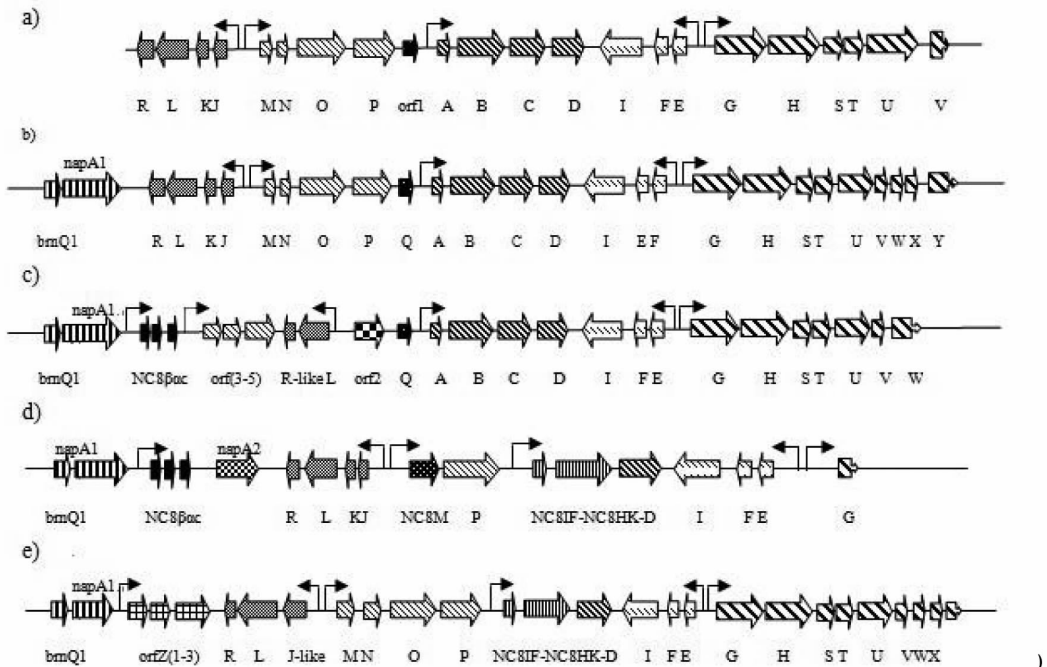


图1 植物乳杆菌 C11 (a)、WCSF1 (b)、J51 (c)、NC8 (d)、J23 (e) 的细菌素合成基因簇

Fig. 1 Biosynthetic gene clusters of bacteriocin in *L. plantarum* C11 (a), WCSF1 (b), J51 (c), NC8 (d) and J23 (e)

由于不同菌株在特定环境下的优化,调节乳酸菌产细菌素的QS基因也各不相同,如*L. plantarum* NC8,它的三组分调节系统是由*plnNC8IF-plnNC8HK-plnD*这三个操纵子编码的,其中产生诱导肽的基因是*plnc8IF*,产生诱导肽信息素PLNC8IF;编码产生组氨酸蛋白激酶的是*plnc8HK*基因,产生NC8-HK;调节响应调节蛋白的基因是与C11的*plnD*具有高度相似性的*NC8-plnD*^[32]。当*L. plantarum* NC8菌株与特定的G⁺菌共培养,或者是在培养物中加入自诱导肽PLNC8IF时,细菌素的产

量增加。Antonio等人通过反转录PCR证明,向NC8中加入共培养物,可以促进NC8的转录产生细菌素,加入外源的PLNC8IF也具有相同的效果,在培养物中添加PLNC8IF不仅是诱导编码两个肽的细菌素的三个基因的表达(*NC8, EF, JK*),同时也诱导NC8菌株中三组分调节系统*plnNC8IF-plnNC8HK-plnD*的表达,证明PLNC8IF可作为环境信号分子通过群体感应调节*L. plantarum* NC8的细菌素产量,具有自诱导的作用^[33]。而孟祥晨等人证明,当*L. plantarum* KLDS1. 0391与*L. helveticus*

KLDS1.9207 菌株共培养时,细菌素产量增加,*plnNC8HK-plnD* 基因显著上调,而敲除 *plnNC8HK-plnD* 基因,信号转导系统的识别路径中断,影响细菌素产量,说明除了信号分子 PLNC8IF 外,*plnNC8HK-plnD* 基因也与细菌素产量密切相关^[34]。*L. plantarum* J23 的全基因组序列具有包含新开放阅读框的新结构^[35],基因座与 *L. plantarum* C11 和 *L. plantarum* NC8 不相同,但都有相似的特征,调控细菌素产生的群体感应基因与 NC8 相同,具有相同的调控机制。

由嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 产生的细菌素被命名为 lactacinB,也属于 II 类细菌素的一种,*L. acidophilus* NCFM 的全基因组序列中有 9.5kb 大小的区域含有 12 个假想基因,编码细菌素 lactacinB 的产生和分泌^[36]。*L. acidophilus* La-5 和 NCFM 菌株中编码 lactacinB 的基因区域是相同的。lactacinB

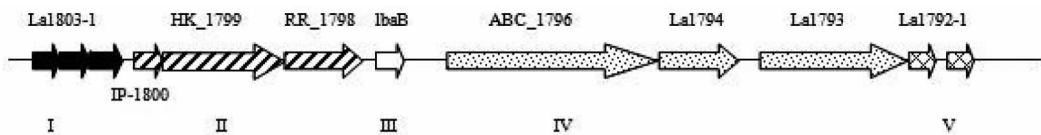


图2 *L. acidophilus* La-5 细菌素合成基因簇

Fig. 2 Biosynthetic gene clusters of bacteriocin in *L. acidophilus* La-5

葛青萍等人证明,将含有不同浓度信号分子溶液和经过胰酶处理后的含有不同浓度的信号分子溶液分别加入含有副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) HD1.7 的培养基中,细菌素 Paracin1.7 的产量比不加信号分子的培养基中细菌素 Paracin1.7 的产量明显增加^[39],证明了发酵液中含有信号分子,从而证明 *L. paracasei* HD1.7 可以通过群体感应调控细菌素 Paracin1.7 的生物合成,且细菌素 Paracin1.7 是群体感应的信号分子,但对这种信号分子的结构和调控机制目前还未见报道。

3 展望

近年来对乳酸菌基因组研究比较广泛,通过生物信息学手段,对已知乳酸菌的基因组进行预测和分析,已经发现许多乳酸菌具有群体感应,且不同乳酸菌细菌素的群体感应基因不同。目前已经证实乳酸菌群体感应系统对细菌素的产生具有调控作用。但是,产细菌素乳酸菌的群体感应基因存在多样性,目前还没有一套通用的调控系统应用到细菌素的生产中。加强对乳酸菌群体感应系统功能多样性的研

的合成基因簇主要分布在五个区域^[37]:*L. acidophilus* 中编码细菌素基因区域 I *La1801*、*La1802*、*La1803*;编码三组分调节系统基因的区域 II *IP1800*、*HK1799*、*RR1798*;编码 lactacinB 结构基因的区域 III *IbaB*;编码 ABC 转运系统和辅助蛋白基因的区域 IV *ABC1796*、*La1794*、*La1793*;假定的细菌素基因区域 V *La1791*、*La1792*。当向 *L. acidophilus* La-5 培养物中加入化学合成的成熟肽 IP-1800 时,编码 lactacinB 的结构基因 *IbaB* 转录表达上调,同时 *L. acidophilus* La-5 培养液中细菌素活性增加^[38]。由 *L. acidophilus* La-5 与酸奶发酵菌株嗜热链球菌共培养 5~6 h 后产生的细菌素活性增加,同时检测到 *IbaB* 基因表达上调最大,而编码 IP-1800 前体的 IP-1800 基因和编码 ABC-转运蛋白的 *ABC-1796* 基因的表达基本没有变化,从而证明 *L. acidophilus* La-5 产细菌素主要由 *IbaB* 基因控制。

究,不仅对提高乳酸菌细菌素的产量具有重要作用,而且对研究乳酸菌在不良生长环境中的适应竞争机制及其代谢调控也具有重要意义^[40]。

参考文献

- 1 Swetwathana A, et al. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Sci*, 2015, 109: 101-105.
- 2 Fimland G, et al. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins; biosynthesis, structure, and mode of action. *J Peptide Sci*, 2005, 11: 688-696.
- 3 Van Reenen CA, et al. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, 2003, 1: 29-40.
- 4 Nissen MJ, et al. Structure function relationships of non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 1: 19-37.
- 5 Waters CM, et al. Quorum sensing: cell-to-cell communica-

- tion in bacteria. *Ann Rev Cell Dev Biol*,2005,21:319-346.
- 6 Van Kessel JC, *et al.* Quorum sensing regulates the osmotic stress response in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol*,2015,1:73-80.
- 7 Bassler BL, *et al.* Quorum Sensing, The prokaryotes. Berlin Heidelberg:Springer-Venlay,2013:495-509.
- 8 Castillo A, *et al.* How bacteria use quorum sensing to communicate. *Nature Education*,2015,2:4.
- 9 Hidalgo RB, *et al.* Indole inhibition of N-acylated homoserine lactone-mediated quorum signaling is widespread in Gram-negative bacteria. *Microbiology*,2014,160:2464-2473.
- 10 Fuqua C, *et al.* Regulation of gene expression by cell-to-cell communication; acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Ann Rev Gene*,2001,1:439-468.
- 11 Studer SV, *et al.* Non-native acylated homoserine lactones reveal that LuxIR quorum sensing promotes symbiont stability. *Environ Microbiol*,2014,8:2623-2634.
- 12 Dunlap P, *et al.* Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence//Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 1. Berlin Heidelberg:Springer-verlay,2014. 37-64.
- 13 Guo M, *et al.* 3-Aminooxazolidinone AHL analogs as hydrolytically-stable quorum sensing agonists in Gram-negative bacteria. *Med Chem Comm*,2015,6:1086-1092.
- 14 Galloway WRJD, *et al.* Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*,2012,9:449-458.
- 15 Zhang R, *et al.* Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature*,2002,6892:971-974.
- 16 Waters CM, *et al.* Quorum sensing: Cell-to-Cell communication in bacteria. *Ann Rev Cell Dev Biol*,2005,21:319-346.
- 17 Jiang LM (姜黎明), *et al.* The research advances of AI-2/LuxS quorum sensing system mediating *Lactobacillus* probiotic properties. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*,2014,26:414-418.
- 18 Maldonado BA, *et al.* Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *Int J Food Microbiol*,2009,130:35-42.
- 19 Gobetti M, *et al.* Cell-cell communication in food related bacteria. *Int J Food Microbiol*,2007,128:34-45.
- 20 Rutherford ST, *et al.* Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspect Med*,2012,11:705-709.
- 21 LeRoux M, *et al.* Bacterial danger sensing. *J Mol Biol*,2015,427:3744-3753.
- 22 Diep DB, *et al.* Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol*,1996,15:4472-4483.
- 23 Kleerebezem M, *et al.* Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceed Nat Acade Sci*,2003,4:1990-1995.
- 24 Navarro L, *et al.* Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *L. plantarum* J51 strain. *Int J Food Microbiol*,2008,2:390-394.
- 25 Maldonado A, *et al.* Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl Environ Microbiol*,2003,1:383-389.
- 26 Rojo BB, *et al.* Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Arch Microbiol*,2008,5:491-499.
- 27 Sabo SS, *et al.* Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res Int*,2014,64:527-536.
- 28 Straume D, *et al.* DNA binding kinetics of two response regulators, PlnC and PlnD, from the bacteriocin regulon of *Lactobacillus plantarum* C11. *BMC Biochem*,2009,10:17.
- 29 Anderssen EL, *et al.* Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl Environ Microbiol*,1998,6:2269-2272.
- 30 Cagno R, *et al.* Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400; Induction of plantaricin A (*PlnA*) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*,2010,11:2175-2190.
- 31 Navarro L, *et al.* Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *L. plantarum* J51 strain. *Int J Food Microbiol*,2008,2:390-394.
- 32 Maldonado A, *et al.* Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch Microbiol*,2004,1:8-16.
- 33 Maldonado A, *et al.* Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J Bacteriol*,2004,5:1556-1564.
- 34 Man LL, *et al.* The role of *plnC8HK-plnD* genes in bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* KLD51. 0391. *Int Dairy J*,2014,2:267-274.