

# 细菌群体感应信号分子淬灭酶的研究进展

邢启凡<sup>1</sup> 柳鹏福<sup>2</sup> 史吉平<sup>2</sup> 孙玉梅<sup>1</sup>

(1. 大连工业大学生物工程学院, 大连 116034; 2. 中国科学院上海高等研究院可持续技术研究中心, 上海 201210)

**摘要:** 群体感应 (Quorum sensing, QS) 是细菌细胞间通过信号分子互相交流的一种现象, 细菌细胞通过分泌并感应特定的信号分子浓度, 当信号分子浓度达到一定阈值时, 细菌细胞会启动特定基因尤其是很多致病基因的表达, 这就给防治某些植物、动物性疾病提供了一种新思维。群体淬灭 (Quorum quenching, QQ) 就是基于群体感应而提出的, 它主要是通过分解细菌细胞所产生的信号分子, 使信号分子浓度在阈值之内, 从而使细菌无法表达特定致病因子, 进而防治病害的一种方法, 群体淬灭酶是研究的最多也是最有效的淬灭途径。到目前为止, 很多群体淬灭酶已经被分离出来。系统总结了群体淬灭酶的种类、特性、催化机制和生理功能方面的进展。

**关键词:** 群体感应; 群体淬灭; 分子淬灭酶; 酰基高丝氨酸内酯酰基转移酶; 酰基高丝氨酸内酯酶

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.10.011

## Research Progress on Bacterial Quorum Quenching Enzymes

Xing Qifan<sup>1</sup> Liu Pengfu<sup>2</sup> Shi Jiping<sup>2</sup> Sun Yumei<sup>1</sup>

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034; 2. Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences Sustainable Technology Research Center, Shanghai 201210)

**Abstract:** Quorum sensing (QS) is a phenomenon of intercellular communication of bacteria via signal molecules. Bacteria secrete the specific signal molecules and respond to them, and bacterial cells enable the expression of specific genes, especially disease-causing genes while the signal molecules accumulate to a threshold concentration. This provides a new thought to prevent plants and animals from bacterial pathogenicity. Quorum quenching (QQ) based on QS system is a schema to decompose the signal molecules beyond the threshold concentration, and therefore represses the expression of specific virulence gene, so finally the prevention and control of diseases are achieved. The enzymes of QQ have been explored the most and also proved to be the most effective ways of quenching. To date, many QQ enzymes have been isolated successfully. Here we review progress on QQ enzymes with aspects of their type, property, catalytic mechanism, and physiologic function.

**Key words:** quorum sensing; quorum quenching; molecule quenching enzyme; acyl homoserine acylase; acyl homoserine lactonase

### 1 细菌群体感应系统

微生物自从被发现直到 20 世纪 60 年代, 人们一直认为细菌是单细胞生物, 不会表现出多细胞生物的性状。20 世纪 60 年代, 研究人员发现作为单细胞生物的细菌个体间有交流能力, 并能表现出一些多细胞生物才有的性状, 研究人员把这种信号交流方式称作群体感应 (Quorum sensing, QS)<sup>[1]</sup>。首

次发现群体感应现象的细菌是一种海洋细菌费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*), 它能够通过群体感应来控制自身发光现象<sup>[2]</sup>, 群体感应能让细菌细胞感知周围细胞密度变化, 从而引发其在高细胞密度下特有的、多样的细胞行为模式<sup>[3]</sup>。

群体感应细菌产生、释放、检测并能应答一种称为“自诱导物 (AI)”的小分子物质, 也称为信号

收稿日期: 2015-01-26

基金项目: 国家基金委青年科学基金项目 (41306142)

作者简介: 邢启凡, 男, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程; E-mail: xingqifan2008@sina.com

通讯作者: 孙玉梅, 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 微生物代谢控制发酵; E-mail: sunyumei62@163.com

分子。细菌在生长过程中不断产生并释放信号分子，随着细菌密度增加，信号分子浓度也在增加，当浓度达到阈值时，信号分子会与细菌中表达某些特定功能蛋白的基因结合，启动相应功能基因的表达，从而使细菌表现出另一些表型特征。

群体感应现象在许多已知的细菌中都存在，从自然界中游离生活的细菌到寄生于高级生物体内的细菌（共生体和病原菌），不同的细菌细胞产生的信号分子不同，革兰氏阴性细菌产生酰基高丝氨酸内酯（Acyl-homoserine lactones, AHL）类分子（图 1-A）；革兰氏阳性细菌则是利用一种小分子多肽（Autoinducing peptides, AIP）作为信号分子；还有一种自诱导物质称为 AI-2，结构为呋喃酮酰磷酸二酯，在革兰氏阴性菌和阳性菌中均存在，用于两种细菌的种间信息交流<sup>[4]</sup>。

## 2 群体淬灭

群体感应控制着细菌的很多活动，如抗生素的产生及对抗生素的抗性、接合作用、毒力因子的产生、胞外酶合成、群集、生物膜形成及生物发光等<sup>[5, 6-9]</sup>，具有群体感应系统的细菌很多都是植物病原菌，植物的细菌性病害是威胁农业生产的主要自然灾害之一。病害的发生往往造成作物大面积减产，并在农产品贮藏、加工、运输过程中进一步造成更大的损失。通常对这类致病菌繁殖是采用化学药物来防治，虽然化学药物的使用能显著减轻病害的危害程度。但大量化学药物的使用，会导致环境污染，而且细菌耐药性增加，就需要增加用药量，从而导致更严重的环境污染，再者残留的化学药物也会危害人体健康等。所以，寻找更干净、更健康的方法来抑制植物的细菌性病害成为一种迫切需求。干扰 QS 系统则成为一种新型的病害防治策略，群体淬灭应运而生，群体淬灭是利用某种方法干扰或者降解群体感应产生的信号分子，使信号分子浓度低于启动致病因子表达所需要的阈值，从而使致病菌的致病因子无法启动表达，致病菌不表现出致病力，病害不再发生。群体淬灭主要有如下 3 个方式：（1）干扰信号分子的合成；（2）降解信号分子，使信号分子浓度低于阈值；（3）阻止信号分子与受体蛋白结合，使之不能行使转录调节功能<sup>[10]</sup>。其中降解信

号分子是研究较多的一种淬灭方式，这种方式主要是由细菌产生一种酶称为群体淬灭酶，这种酶能降解信号分子，保持信号分子浓度低于阈值，使病原菌无法表达致病因子，不对宿主产生病害作用。这种方式对外界没有副作用，而且它并不作用于致病菌本身，而是作用于致病菌产生的信号分子，因而不会使致病菌产生抗药性，能作为一种高效、长久的药物选择。

## 3 群体淬灭酶

群体淬灭酶能利用群体感应中的信号分子 AHL 作为底物，通过酶促反应使 AHL 分解。第一个鉴定出来的群体淬灭酶是由一株革兰氏阳性菌芽孢杆菌中的基因 *aiiA* 编码的酰基高丝氨酸内酯酶（Acyl-homoserine lactonase）<sup>[7]</sup>，随后，Leadbetter and Greenberg<sup>[11]</sup>报道争论贪噬菌（*Variovorax para-doxus* VAI-C）能利用信号分子 AHL 作为唯一能源和氮源物质，其降解 AHL 分子的酶属于酰胺酶。在这两株菌中发现的群体淬灭酶几乎代表了群体淬灭酶中两个重要的分支。

根据 AHL 的分子结构（图 1-A），可能至少有 4 种酶能够降解 AHL 分子，内酯酶和脱羧酶能从 1 号位和 2 号位水解 AHL，而酰基转移酶和脱氨基酶能从 3 号位和 4 号位裂解 AHL，但到目前为止，只发现了两种 AHL 降解酶：酰基高丝氨酸内酯酶和酰基高丝氨酸内酯酰基转移酶（Acyl-homoserine lactone acylase）<sup>[12]</sup>。酰基高丝氨酸内酯酶主要作用于高丝氨酸内酯环，从五环中酯键碳与氧之间打开内酯环

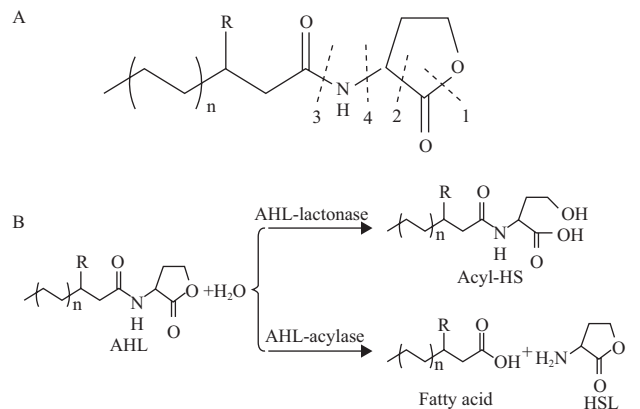


图 1 酰基高丝氨酸内酯（AHL）分子结构及两种酶的作用位点

(图 1-B), 使得信号分子失去活性; 高丝氨酸酰基转移酶则作用于与内酯五环相连的酰基侧链, 切断酰胺键, 生成脂肪酸和高丝氨酸内酯环(图 1-B), 信号分子即失去活性。

3.1 AHL 酰基转移酶

第一种酰基转移酶的发现来自于争论贪噬菌 VAI-C, 当生长环境中有 AHL 存在时, 这种菌会向培养基中分泌水解产物高丝氨酸内酯, 而 AHL 的侧链脂肪酸则用来分解产生能量<sup>[13]</sup>。其他有代表性的酰基转移酶有来自青枯菌 XJ12B (*Ralstonia* sp. XJ12B) 中由 *aiid* 编码的酰基转移酶 AiiD<sup>[14]</sup>; 铜绿假单胞菌 PAO1 中存在两种酰基转移酶 PvdQ 和

QuiP<sup>[12, 15, 17]</sup>, 二者间在氨基酸序列上只有 21% 的同源性; 放线菌链霉菌 M664 菌株 (*Streptomyces* sp.) 中的酰基转移酶 AhlM<sup>[19]</sup>。淡水藻类中也发现了具有 AHL 降解活性的菌, 鱼腥藻属 PCC7120 (*Anabaena* sp. PCC7120) 中由基因 *all3924* 编码的酰基转移酶 AiiC, 这种藻类的细胞原液能够降解相当一部分的 AHLs, 尤其是长链 AHLs, 侧链 3 号碳上的取代基对它的活性没有影响<sup>[20]</sup>。最近, 有人在极端微生物耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 中发现了能降解 AHL 信号分子的酶, 进一步分析确定这是一种酰基转移酶<sup>[21]</sup>。其他 AHL 酰基转移酶, 见表 1。

在已经发现的酰基转移酶中, 序列分析显示几

表 1 AHL 酰基转移酶

菌种	所属蛋白家族	酶	作用底物	文献
<i>Variovorax paradoxus</i> VAI-C	ND	ND	C4-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL	[13]
<i>R. alstonia</i> sp. XJ12B	Ntn- 水解酶	AiiD	Long chain AHLs	[14]
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Ntn- 水解酶	PvdQ	Long chain AHLs	[15]
<i>Shewanella</i>	Ntn- 水解酶	Aac	C8-HSL, C10-HSL and C12-HSL	[22]
<i>R. solanacearum</i> GMI1000	ND	Aac	C7-HSL and C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL and C10-HSL	[16]
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Ntn- 水解酶	QuiP	AHLs with or without substitution on carbon 3 C7 to C14-HSL	[17]
<i>P. syringae</i> B728a	Ntn- 水解酶	HacA	C8-HSL, C10-HSL and C12-HSL	[18]
<i>P. syringae</i> B728a	Ntn- 水解酶	HacC	C6 to C12-HSL	[18]
<i>Streptomyces</i> sp. Strain M664	Ntn- 水解酶	AhlM	C8-HSL, C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL	[19]
<i>Anabaena</i> sp. PCC7120	Ntn- 水解酶	AiiC	long-chain AHLs regardless of the substitution group at the C3 position	[20]
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Ntn- 水解酶	QqaR	C8 to C14-HSL regardless of the substitution group at the C3 position	[21]
<i>Ochrobactrum</i> .A44	$\alpha/\beta$ 水解酶系	AiiO	C4 to C14-HSL with or without 3-oxo or 3-hydroxy substituents	[23]
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	ND	AHL-Acylase	C10-HSL	[24]

注: ND: 未鉴定, 下同

乎所有 AHL 酰基转移酶都属于 N 末端亲核 (Ntn) 水解酶, 如 AiiD、PvdQ、QuiP、AhlM、AiiC 等, 这类酶经相应基因编码后翻译形成一个保守区域, 该区域分成两个亚单位: 一个信号肽, 后面接一个  $\alpha$  亚单位, 然后是间隔序列, 跟着一个  $\beta$  亚单位。 $\beta$  亚单位中熟化和催化作用所需要得 N 末端亲核在 AHL 酰基转移酶中是高度保守的。定点突变显示区域中保守的甘氨酸-丝氨酸对与 AHL 酰基转移酶活性至关重要<sup>[22]</sup>。但是 Robert Czajkowsk 等<sup>[23]</sup>在对一株苍白杆菌 *Ochrobactrum*.A44 研究发现, 它所产生的酶 AiiO 虽然属于酰基转移酶, 结构分析却表明这种酶没有其他酰基转移酶所具有的 Ntn 水解酶结构, 而是属于  $\alpha/\beta$  水解酶折叠酶系。

由于不同菌产生的酰基转移酶不同, 所以这些酶能作用的底物信号分子也有所不同, 青枯菌 XJ12B 合成的酰基转移酶 AiiD 能降解长链 AHL, 铜绿假单胞菌 PAO1 中的酰基转移酶 QuiP, 能够降解侧链长度在 11-14 个碳的 AHL 信号分子, 而侧链 3 号碳上的取代基并不影响其活性, 说明这种酶具有范围较广的 AHL 淬灭活性<sup>[17]</sup>, 链霉菌中 AhlM 能够降解范围较广的 AHLs, 还能降解盘尼西林 G, 说明 AhlM 的底物选择性较广<sup>[19]</sup>, Czajkowsk 等<sup>[23]</sup>从苍白杆菌 (*Ochrobactrum*.A44) 中发现的 AiiO 能降解酰基侧链长度在 C4-C14 的 AHL, 侧链 3 位碳上无论是氢取代还是氧取代对它的活性都没有影响, 而且该酶更易降解长链的 AHL。还有人发现, 一



种来自海洋鱼类致病菌的黄杆菌 (*Tenacibaculum maritimum*)，它能够利用短链 AHL (C4-HSL) 形成细胞膜，同时也表现酰基转移酶活性能够降解长链 AHLs (C10-HSL) [24]。

### 3.2 AHL 内酯酶

第一种 AHL 内酯酶 AiiA 是从芽孢杆菌 240B1 中发现的，由 *aiaA* 基因编码，芽孢杆菌中很多菌能产生 AiiA 同系物，其中研究较多的属苏云金芽孢杆菌中的 AiiA。在一些芽孢杆菌中还发现了能产生耐热内酯酶，如嗜热地芽孢杆菌 HTA426 (*Geobacillus kaustophilus* HTA426) [25] 和土芽孢杆菌 YS-8 (*G. caldxylosilyticus* YS-8) [26]。除了芽孢杆菌外，在其他一些细菌中也发现了 AHL 内酯酶，如根癌农杆菌中 *attM* 编码的 AHL 内酯酶 AttM、*aiaB* 编码的 AiiB [27]、节杆菌 (*Arthrobacter*) 中的 AhlD [28]、克雷伯肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumonia*) 中的 AhlK [28]、细杆菌 (*Microbacterium testaceum*) 中的 AiiM [29]、土壤芽孢杆菌 (*Solibacillus silvestris*) 中的 AhlS [30] 及红球菌 (*Rhodococcus*) 中的 QsdA [27] 等。近几年，通过元基因组方法鉴定出了一组编码内酯酶的基因 *-bpiB* [31]，已经从硝化细菌 (*Nitrobacter*) Nb-311A、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescen*) 和黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 中检测出了 BpiB01、BpiB04 和 BpiB07 三种同源基因编码的酶，这 3 种酶能够降解 3-O-C8-HSL，序列分析显示它们与已知的 AHL 降解基因没有相似性 [31, 32]。其他内酯酶，见表 2。

对已知内酯酶的序列分析，几乎所有的内酯酶都属于金属  $\beta$  内酰胺酶，根据核苷酸序列水平上的同源性差异，系统分析进一步分为两类，首先是 AiiA 类，由所有芽孢杆菌中的 AHL 内酯酶组成，由于它们在氨基酸水平上与芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 240B1 同源性达 90% 以上；第二类是 AttM 类，包括 AttM、AiiB 和 AhlD，由于产生这一类酶的菌在系统分类上处于同一个分支系统下，故将这些酶统一分类为 AttM 类，这类酶在多肽序列上只有 30%–58% 的相似性。在 AttM 和 AiiA 两类内酯酶中都发现了一个高度保守的  $Zn^{2+}$  结合域 HXHXDH，但 AttM 和 AiiA 两类酶的同源性却还不到 25%，该区域已经证明了

对于 AHL 内酯酶活性是必需的，该结构域类似一些金属水解酶的  $Zn^{2+}$  结合区域，然而它又与已知的金属水解酶  $Zn^{2+}$  结合区域有所不同，属于一种新型的结构 [7]。在已经发现的内酯酶中，几乎所有内酯酶在酶活性中心都含有一个  $Zn^{2+}$  结合位点，而且实验也证明， $Zn^{2+}$  能增加内酯酶的活性，甚至有的酶中若没有  $Zn^{2+}$  则没有内酯酶活性，说明  $Zn^{2+}$  对于内酯酶活性比较重要，不同内酯酶  $Zn^{2+}$  结合的区域有所不同。

尽管几乎所有内酯酶都属于金属  $\beta$  内酰胺酶，但仍有一些与内酰胺酶完全没有关系的内酯酶。第一种 QsdA，从一株红串红球菌 *R. erythropolis* W2 中鉴定出来的 AHL 内酯酶 [33]，这是一种磷酸三酯酶 (PTE)，能够降解 C6 到 C14 的 AHLs，PTE 酶也是一种金属依赖性蛋白， $Zn^{2+}$  结合在 PTE 区域，能裂解磷酸三酯键 [34]，同时具有内酯酶活性和酰胺水解酶活性。土芽孢杆菌属中的嗜热菌也能产生 PTE 型 AHL 内酯酶，这种嗜热菌产生的酶由于耐热性在生物技术上具有非常大的应用潜力，如 *G. kaustophilus* 产生的 GKL [35]。

除了  $\beta$  内酰胺酶和 PTE 之外，第三类发现 AHL 内酯酶的是  $\alpha/\beta$  水解酶折叠酶系，比如细杆菌 StLB037 中的 AiiM [29] 和苍白杆菌 *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188 中的 AidH [36]， $\alpha/\beta$  水解酶是一类结构上相关，具有多种不同催化功能的酶，这类酶有两个共同特征：一个亲核酸性组氨酸催化三分子和一个序列为 Gly-X-Nuc-X-Gly 的亲核基团，这两个区域对 AHL 降解活性至关重要 [36]。

此外，还有一些其他的内酯酶，如通过土壤元基因组文库分析得到的锌依赖型金属水解酶 QlcA [37]，与发现的其他内酯酶无太大联系；还有 BpiB01、BpiB04 和 BpiB07 [31, 32] 等，氨基酸序列上也与其他内酯酶没有明显的相似性。

通常，根据细菌代谢方式不同，一种菌只产生一种酶，但是红串红球菌中却报道了能产生不同的 AHL 降解酶 [40]。比对基因组显示，在同一菌中能同时存在编码 AHL 酰基转移酶和内酯酶的基因，这类菌还有耐辐射奇球菌 R1 (*D. radiodurans*)，生丝单胞菌 ATCC15444 (*Hyphomonas neptunium*) 和发光杆菌 TTO1 (*Photobacterium luminescens*) [41]，其中耐辐

表 2 AHL 内酯酶

菌种	所属蛋白家族	酶	作用底物	文献
<i>Bacillus cereus</i> 240B1	金属 β 内酰胺酶	AiiA	3-O-C6-HSL, 3-O-C8-HSL, 3-O-C10-HSL	[ 22 ]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> c58	金属 β 内酰胺酶	AttM	3-O-C8-HSL, C6-HSL	[ 27 ]
<i>Arthrobacter</i> sp.IBN110	金属 β 内酰胺酶	AhlD	3-O-C6-HSL, C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL	[ 28 ]
<i>Geobacillus kaustophilus</i> strain HTA426	酰胺水解酶	GKL	C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL, 3-O-C8-HSL and 3-O-C12-HSL	[ 25 ]
<i>Microbacterium testaceum</i> StLB037	α/β 水解酶折叠酶系	AiiM	3-O-C6-HSL, C6-HSL, 3-O-C8-HSL, C8-HSL, 3-O-C10-HSL, C10-HSL	[ 29 ]
<i>M.avium</i> subsp.	酰胺水解酶	MCP	C7-HSL, C8-HSL, 3-O-C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL	[ 38 ]
<i>M.tuberculosis</i>	酰胺水解酶	PPH	C4-HSL, C10-HSL, 3-O-C8-HSL	[ 39 ]
<i>Ochrobactrum</i> sp. T63	α/β 水解酶折叠酶系	AidH	C4-HSL, C6-HSL, 3-O-C6-HSL, 3-O-C8-HSL, C10-HSL	[ 36 ]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> W2	PTE 族	QsdA	C6 to C14-HSL, AHLs with or without substitution on carbon 3	[ 27 ]
<i>Solibacillus silvestris</i> StLB046	金属 β 内酰胺酶	AhlS	C6-HSL, 3-O-C6-HSL, C10-HSL, 3-O-C10-HSL	[ 30 ]
<i>Sulfolobus solfataricus</i> strain P2	酰胺水解酶	SsoPox	3-O-C8-HSL, C8-HSL, 3-O-C10-HSL, 3-O-C12-HSL	[ 33 ]
<i>Deinococcus radiodurans</i>	金属 β 内酰胺酶	QqlR	C8 to C14, with a preference for unsubstituted AHLs	[ 21 ]
Soil metagenomic clone	金属 β 内酰胺酶	QlcA	C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL, C10-HSL, 3-OH-C6-HSL, 3-O-C8-HSL, 3-OH-C8-HSL	[ 37 ]
<i>Nitrobacter</i> .Nb-311A	ND	BpiB01	3-O-C8-HSL	[ 31 ]
<i>Pseudomonas fluorescen</i>	糖基水解酶	BpiB04	3-O-C8-HSL	[ 32 ]
<i>Xanthomonas campestris</i>	ND	BpiB07	3-O-C8-HSL	[ 32 ]

射奇球菌 R1 已经被证明其基因组中含有编码 AHL 内酯酶和酰基转移酶的基因 *qqlR* 和 *qqaR*, 并且实验中检测到耐辐射奇球菌能同时产生这两种酶, 它们都能降解侧链为长链的 AHL 信号分子<sup>[21]</sup>。能编码两种酶的细菌很有可能是为了能在环境中取得生存优势, 一种酶不足以分解环境中其他菌产生的信号分子, 因而进化出了能产生两种酶的基因; 还有一种可能是一些寄生菌为了防止自身数量过大而进化出的一种机制, 其中一种酶用以分解其他菌产生的信号分子, 取得生存优势, 而另一种酶则在种群数量达到某个值时表达产生, 分解自身所产信号分子, 使自身数量控制在一定范围内不足以威胁寄主安全, 从而使细菌与寄主达到共生的目的。

3.3 群体淬灭酶的应用

由于 AHL 内酯酶和 AHL 酰基转移酶能够分解 AHL 信号分子, 并且所有这些酶都来自微生物细胞, 有越来越多的证据表明这些酶在细菌与细菌间相互作用中起重要作用。

在含有 *aiaA* 基因的苏云金芽孢杆菌中, 表达产生的 AHL 内酯酶 AiiA 能抑制具有群体感应的植物病原菌软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*), 软腐欧文氏菌能通过信号分子控制毒性基因的表达, 苏云

金芽孢杆菌能显著抑制毒力因子的产生, 降低软腐欧文氏菌带来的致病性<sup>[7]</sup>; 从一株布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*) 中发现的酰基转移酶 AibP 在体外条件下能够降解自身产生的内生 AHL 分子并在巨噬细胞的侵染期间减少 AHL 的积累<sup>[42]</sup>; 含有 *attM* 基因的根癌农杆菌能抑制 Ti 质粒的接合转移<sup>[27]</sup> 等, 这些数据表明, 菌株在自然界中取得竞争优势, 群体淬灭酶具有重要作用。

另一方面, 淬灭酶在植物病害防治方面也已 有进展, *aiaA* 基因表达编码的 AHL 内酯酶能减少病原菌感染烟草和线虫, 而且, 转基因植物所表达的 AHL 内酯酶能有效淬灭细菌群体感应信号分子并减少细菌依赖于群体数量的侵染<sup>[43]</sup>, 一些能产生 AHL 内酯酶的野生菌或者工程菌如芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)、节杆菌、假单胞菌 (*P. fluorescens*) 等都能显著降低致病菌软腐欧文氏菌引起的马铃薯软腐病<sup>[22, 28, 32]</sup>, 因此, 这些基因编码的群体淬灭酶在植物抗病性和生物制药方面有非常广阔的前景。

群体淬灭酶在环境方面同样有所应用, 废水处理中, 处理系统会由于微生物产生的生物膜出现膜生物淤积, 从而导致处理效率的显著降低, 膜生物淤积的传统处理方法是利用物理方法和化学抗菌剂

或者抗生素来减少膜生物淤积,这些方法旨在消除生物膜或者杀死产生膜的微生物来达到减少淤积,因而会产生抗药性和二次污染问题,而群体淬灭并不对微生物生长产生影响,成为了一种非常有应用前景的防止膜生物淤积技术<sup>[44]</sup>。

随着分子生物学技术的发展,有人对群体淬灭酶进行改造并取得了一定的进展。在酰基转移酶 PvdQ 中,将其中的两个氨基酸 Leu $\alpha$ 146Trp 和 Phe $\beta$ 24Tyr 替换后得到的突变酶活性比原野生型酶显著提高;再将两种突变酶重组得到另一突变酶 PvdQ<sup>L $\alpha$ 146W, F $\beta$ 24Y</sup>,它能显著减少伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)中信号分子的量并抑制群体感应调控的表型产生<sup>[45]</sup>;其他突变型酶还有从嗜热地芽孢杆菌中得到的一种耐热内酯酶,属于重组磷酸三酯酶类,这种酶是通过分子技术改进的耐热性工程酶,它的催化效率更高并且能催化的底物信号分子范围更广,能显著减少鲍氏不动杆菌(*A.baumannii*)生物膜的量,鲍氏不动杆菌是人体病原菌,说明这种重组酶在药物应用上比较有潜力<sup>[46]</sup>。重组 AiiA 酶则能减少栖息于铜绿假单胞菌调节的生物膜结构中浮游细胞的数量<sup>[47]</sup>,而固定化的 SsoPox 酶(GKL)能够抑制铜绿假单胞菌中许多毒力因子的产生<sup>[48]</sup>,关于淬灭酶的固定化应用,Byoungsoo 等<sup>[49]</sup>将群体淬灭酰基转移酶用磁分离介孔二氧化硅固定化以后发现,在 200 r/min 剧烈摇晃下,固定化酶与游离酶失去 90% 活性所需时间分别为 10 d 和 1 d,将固定化酶应用到水处理上后,能有效减少生物膜的形成,说明淬灭酶固定化在水处理的膜过滤方面有很大的应用前景。

#### 4 小结

前面已经讨论过根据信号分子的结构特征,至少有 4 种酶能降解 AHL 分子,但只发现两种,另外两种酶也可能存在,已经有文献报道了一种氧化还原酶,这种氧化还原酶本身并不降解信号分子,而只是氧化或还原信号分子的酰基侧链来对信号分子进行修饰,使信号分子不能与受体蛋白结合<sup>[50]</sup>,还需要对这些酶进行更多的研究。群体淬灭酶的广泛存在意味着这类酶在微生物之间以及微生物和宿主之间相互作用中的重要作用,它不直接作用于微生物

物本身,因而不会使目标微生物产生抗性,对于病害防治是一种高效措施,而且群体淬灭酶不会污染环境,不会带来环境问题,将成为非常有潜力的农药替代品,但是目前要使群体淬灭酶能商业化运用还存在很多困难,如酶在自然环境中的稳定性,以及这类新型“农药”的运输、贮存和使用等问题,因此还需要大量的研究来解决这些问题。

#### 参考文献

- [1] Suga H, Kristina M, Smith KM. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7 (5): 586-591.
- [2] Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system [J]. *J Bacteriol*, 1970, 104 (1): 313-322.
- [3] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum-sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176 (2): 269-275.
- [4] Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2 (6): 582-587.
- [5] Bruhn JB, Dalsgaard I, Nielsen KF, et al. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria [J]. *Dis Aquat Org*, 2005, 65 (1): 43-52.
- [6] Kalia VC, Purohit HJ. Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37 (2): 121-140.
- [7] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (7): 3526-3531.
- [8] Swift S, Downie JA, Whitehead NA, et al. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology [J]. *Adv Microb Physiol*, 2001, 45 (11): 199-270.
- [9] Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world [J]. *Microbiology*, 2007, 153 (12): 3923-3938.
- [10] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. *Nature*, 2002, 417 (9): 141-147.

- [ 11 ] Leadbetter JR, Greenberg EP. Metabolism of acylhomoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus* [ J ] . J Bacteriol, 2000, 182 : 6921-6926.
- [ 12 ] Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes [ J ] . The Journal of Microbiology, 2005, 43 ( S ) : 101-109.
- [ 13 ] Czajkowski R, Jafra S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules [ J ] . Acta Biochim Pol, 2009, 56 ( 1 ) : 1-16.
- [ 14 ] Lin YH, Xu JL, Hu J, et al. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes [ J ] . Mol Microbiol, 2003, 47 ( 3 ) : 849-860.
- [ 15 ] Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [ J ] . Appl Environ Microbiol, 2003, 69 ( 10 ) : 5941-5949.
- [ 16 ] Chen CN, Chen CJ, Liao CT, Lee CY. A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GM1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity [ J ] . BMC Microbiol, 2009, 9 ( 89 ) : 1-11.
- [ 17 ] Huang JJ, Petersen A, Whiteley M, Leadbetter JR. Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [ J ] . Appl Environ Microbiol, 2006, 72 ( 2 ) : 1190-1197.
- [ 18 ] Shepherd RW, Lindow SE. Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology [ J ] . Appl Environ Microbiol, 2009, 75 : 45-53.
- [ 19 ] Park SY, Kang HO, Jang HS, et al. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching [ J ] . Appl Environ Microbiol, 2005, 71 ( 5 ) : 2632-2641.
- [ 20 ] Romero M, Diggle SP, Heeb S, et al. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120 : identification of *aiiC*, a novel AHL-acylase [ J ] . FEMS Microbiol Lett, 2008, 280 ( 1 ) : 73-80.
- [ 21 ] Koch G, Nadal-Jimenez P, Cool RH, Quax WJ. *Deinococcus radiodurans* can interfere with quorum sensing by producing an AHL-acylase and an AHL-lactonase [ J ] . FEMS Microbiology Letters, 2014, 356 ( 1 ) : 62-70.
- [ 22 ] Morohoshi T, Nakazawa S, Ebata A, et al. Identification and characterization of N-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015 [ J ] . Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72 ( 7 ) : 1887-1893.
- [ 23 ] Czajkowski R, Krzyżanowska D, Karczevska J, et al. Inactivation of AHLs by *Ochrobactrum* sp. A44 depends on the activity of a novel class of AHL acylase [ J ] . Environmental Microbiology Reports, 2011, 3 ( 1 ) : 59-68.
- [ 24 ] Romero M, Avendaño-Herrera R, Magariños B, et al. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group [ J ] . FEMS Microbiol Lett, 2010, 304 ( 2 ) : 131-139.
- [ 25 ] Chow JY, Xue B, Lee KH, et al. Directed evolution of a thermostable quorum-quenching lactonase from the amidohydrolase superfamily [ J ] . Biol Chem, 2010, 285 : 40911-40920.
- [ 26 ] Seo MJ, Lee BS, Pyun YR, Park H. Isolation and characterization of N-acylhomoserine lactonase from the thermophilic bacterium, *Geobacillus caldoxylosilyticus* YS-8 [ J ] . Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75 ( 9 ) : 1789-1795.
- [ 27 ] Hong KW, Koh CL, Sam CK, et al. Quorum quenching revisited—from signal decays to signalling confusion [ J ] . Sensors, 2012, 12 ( 4 ) : 4661-4696.
- [ 28 ] Park SY, Lee SJ, Oh TK, et al. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria [ J ] . Microbiology, 2003, 149 ( 6 ) : 1541-1550.
- [ 29 ] Wang WZ, Morohoshi T, Ikenoya M, et al. AiiM, a novel class of N-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum* [ J ] . Appl Environ Microbiol, 2010, 76 ( 8 ) : 2524-2530.
- [ 30 ] Morohoshi T, Tominaga Y, Someya N, Ikeda T. Complete genome sequence and characterization of the N-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris* [ J ] . J Biosci Bioeng, 2012, 113 ( 1 ) : 20-25.
- [ 31 ] Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, et al. Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* [ J ] . Appl Environ Microbiol, 2009, 75 ( 1 ) : 224-233.
- [ 32 ] Amara N, Krom BP, Kaufmann GF, Meijler MM. Macromolecular inhibition of quorum sensing : enzymes, antibodies, and beyond



- [ J ] . Chem Rev, 2011, 111 ( 1 ) : 195-208.
- [ 33 ] Elias M, Dupuy J, Merone L, et al. Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities [ J ] . J Mol Biol, 2008, 379 ( 5 ) : 1017-1028.
- [ 34 ] Uroz S, Oger PM, Chapelle E, et al. A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases [ J ] . Applied and environmental Microbiology, 2008, 74 ( 5 ) : 1357-1366.
- [ 35 ] Elias M, Tawfik DS. Divergence and convergence in enzyme evolution : parallel evolution of paraoxonases from quorum-quenching lactonases [ J ] . The Journal of Biological Chemistry, 2011, 287 ( 1 ) : 11-20.
- [ 36 ] Mei GY, Yan XX, Turak A, et al. AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase [ J ] . Appl Environ Microbiol, 2010, 76 ( 15 ) : 4933-4942.
- [ 37 ] Riaz K, Elmerich C, Raffoux A, et al. Metagenomics revealed a quorum quenching lactonase QlcA from yet unculturable soil bacteria [ J ] . Commun Agric Appl Biol Sci, 2008, 73 ( 2 ) : 3-6.
- [ 38 ] Chow JY, Wu L, Yew WS. Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis K-10 in the amidohydrolase superfamily [ J ] . Biochemistry, 2009, 48 ( 20 ) : 4344-4353.
- [ 39 ] Afriat L, Roodveldt C, Manco G, Tawfik DS. The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase [ J ] . Biochemistry, 2006, 45 ( 46 ) : 13677-13686.
- [ 40 ] Park SY, Hwang BJ, Shin MH, et al. N-acyl homoserine lactone producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities [ J ] . FEMS Microbiol Lett, 2006, 261 ( 1 ) : 102-108.
- [ 41 ] Kalia VC, Purohit HJ. Quenching the quorum sensing system : potential antibacterial drug targets [ J ] . Crit Rev Microbiol, 2011, 37 ( 2 ) : 121-140.
- [ 42 ] Terwagne M, Mirabella A, Lemaire J, et al. Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* [ J ] . PLoS One, 2013, 8 ( 12 ) : e82514.
- [ 43 ] Dong YH, Wang LH, Xu JL, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase [ J ] . Nature, 2001, 411 : 813-817.
- [ 44 ] Lade H, Paul D, Kweon JH. Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling [ J ] . International Journal of Biological Sciences, 2014, 10 ( 5 ) : 550-565.
- [ 45 ] Koch G, Nadal-Jimenez P, Reis CR, et al. Reducing virulence of the human pathogen *Burkholderia* by altering the substrate specificity of the quorum-quenching acylase PvdQ [ J ] . National Academy of Sciences, 2014, 111 ( 4 ) : 1568-1573.
- [ 46 ] Chow YJ, Yang YY, Tay SB, et al. Disruption of Biofilm Formation by the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii* using engineered quorum-quenching lactonases [ J ] . Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58 ( 3 ) : 1802-1805.
- [ 47 ] Igarashi J, Suga H. Custom synthesis of autoinducers and their analogues [ M ] . Methods Mol Biol, 2011, 692 : 265-274.
- [ 48 ] Hawwa R, Aikens J, Turner RJ, et al. Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus* [ J ] . Arch Biochem Biophys, 2009, 488 ( 2 ) : 109-120.
- [ 49 ] Lee B, Yeon KM, Shim J, et al. Effective antifouling using quorum-quenching acylase stabilized in magnetically-separable mesoporous silica [ J ] . American Chemical Society, 2014, 15 ( 4 ) : 1153-1159.
- [ 50 ] Romero M, Mayer C, Muras A, et al. Silencing bacterial communication through enzymatic quorum-sensing inhibition [ M ] //Quorum Sensing vs Quorum Quenching : A Battle with No End in Sight. Springer India, 2015 : 219-236.

( 责任编辑 狄艳红 )