

# 西瓜果斑病菌 T2SS 分泌蛋白的筛选和功能预测

潘 宏<sup>1,2</sup> 高天一<sup>1</sup> 吴明德<sup>1</sup> 杨 龙<sup>1</sup> 张 静<sup>1</sup> 李国庆<sup>1</sup>

1. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 2. 天津农学院图书馆, 天津 300384

**摘要** 利用 KEGG 和 STRING 数据库分析比较瓜类果斑病菌(西瓜嗜酸菌)(*Acidovorax citrulli*, Ac)和主要植物病原细菌 II 型分泌系统(T2SS)的基因组成, 收集有试验证据的植物病原细菌 T2SS 分泌蛋白序列信息, 与已测序并经注释的果斑病菌 AAC00-1 菌株基因组进行序列比对, 筛选出候选的果斑病菌同源 T2SS 分泌蛋白。通过对筛选出的分泌蛋白的信号肽、代谢通路、蛋白互作网络及其在植物细胞中的定位进行分析, 预测部分分泌蛋白的生物学功能。

**关键词** 细菌性果斑病; 瓜类果斑病菌(西瓜嗜酸菌); 分泌蛋白; 筛选; 功能

**中图分类号** S 432.4<sup>+</sup>2; S 436.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0027-09

细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是严重威胁瓜类生产的一种毁灭性病害, 在世界多个国家已将其列为重要检疫性病害, 其病原菌为瓜类果斑病菌(西瓜嗜酸菌)(*Acidovorax citrulli*, Ac)<sup>[1]</sup>。BFB 主要通过种子传播, 病菌通过带菌种子传播到幼苗, 引起幼苗发病, 但在西甜瓜成株期病害症状不明显, 到瓜类接近成熟时在果实上爆发果斑病<sup>[2]</sup>。在病害防治方面, 种子处理、种子检疫、药物防治等措施对 BFB 的防效均有限, 迄今尚无对 Ac 有抗性的种质资源。

*A. citrulli* 是革兰氏阴性细菌, 其主要致病因子有 II 型分泌系统(T2SS)、III 型分泌系统(T3SS)、IV 型菌毛(type IV pili)、鞭毛和群体感应等<sup>[3]</sup>。T2SS 是革兰氏阴性细菌中结构保守的分泌系统。典型的 T2SS 由一套 12~16 个 *gsp* 基因组成大型操纵子, 其产物是一个超大分子的复合体(也称分泌子, secreton), 横跨在细菌的双层膜上<sup>[3-4]</sup>。在人类、动物和植物病原细菌中, 细菌通过 T2SS 分泌系统将致病相关的蛋白从周质分泌到胞外, 这些蛋白包括毒力因子、毒素或侵染寄主需要的溶解酶<sup>[5]</sup>。在非病原细菌中, 细菌通过 T2SS 分泌的锚定蛋白吸收环境中的矿物质<sup>[6]</sup>。T2SS 既可通过一般分泌途径(Sec), 也可通过双精氨酸途径(Tat)分泌蛋白<sup>[7]</sup>。

Johnson 等<sup>[8-9]</sup>利用 *A. citrulli* AAC00-1 菌株

研究了 T2SS 和 T3SS 对细菌在西瓜种子和幼苗定殖的影响, 结果表明缺失 T3SS 结构基因 *hrcC*, 导致细菌没有致病性, 接种 AAC00-1  $\Delta hrcC$  的幼苗不表现症状, 且不能产生过敏性坏死反应, 但 AAC00-1  $\Delta hrcC$  在西瓜种子萌发时仍与野生型有相同的定殖水平。与之相比, T2SS 结构基因 *pulO* 的突变体在种子中的定殖能力明显降低, AAC00-1 *pulO::TnGFP* 在萌发的种子上的群体密度较野生型 AAC00-1 明显降低, 幼苗的发病率从野生型的 91.5% 降至 11%。由此可推测, T3SS 对 AAC00-1 引起病害有重要作用, 但对细菌在植物组织中的定殖没有太大作用, 而 T2SS 则可能影响细菌的定殖和种子到幼苗的传播。BFB 是典型的种传病害, 细菌从种子到幼苗的转移和定殖在果斑病的发生中有重要作用, 但 Ac 的 T2SS 可以分泌哪些蛋白以及这些蛋白在细菌的定殖和传播中起何作用尚没有研究报道。因此, 深入研究果斑病菌 T2SS 的功能及其分泌蛋白将有助于了解 Ac 的发病机制。

*A. citrulli* AAC00-1 菌株的基因组序列由 Joint Genome Institute (JGI) 测序并于 2007 年发布(GenBank 登录号 NC\_0008752), 为瓜类细菌性果斑病的研究提供了基础信息。笔者利用 KEGG 中注释的 AAC00-1 基因组信息和其他植物病原细菌基因组信息, 分析比对其 T2SS 的基因组成, 根据

收稿日期: 2014-08-12

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201003066)

潘 宏, 硕士, 副研究馆员. 研究方向: 生物信息软件应用. E-mail: panhong@mail.hzau.edu.cn

通信作者: 李国庆, 博士, 教授. 研究方向: 植物病害生物防治. E-mail: guoqingli@mail.hzau.edu.cn

已报道的植物病原细菌 T2SS 分泌蛋白谱,与 Ac 基因组进行序列比对和信号肽分析,筛选出与 Ac 同源的 T2SS 分泌蛋白,并对筛选出的分泌蛋白的功能、分泌蛋白的互作、分泌蛋白在已知细菌代谢通路中的位置进行分析,旨在为深入研究果斑病菌从种子到幼苗定殖和传播的分子机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

1)文献资料。检索 PubMed、CAB 等学术文献数据库和谷歌学术搜索引擎获得公开发表的、有试验证据支持的植物病原细菌 T2SS 分泌蛋白信息。主要检索词:T2SS、分泌蛋白(secretory protein, secreted protein, secretome)、胞外毒素(extracellular toxin, exotoxin)、胞外蛋白(extracellular protein, exoprotein, extracellular protease)等。文献检索结果用 Zotero 文献管理软件保存。

2)基因序列。从 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 获取人工注释的 *A. citrulli* AAC00-1 菌株和其他植物病原细菌菌株全基因组序列。KEGG 中无菌株全基因组序列信息的分泌蛋白序列从 NCBI 的核酸数据库下载。

### 1.2 分析方法

1) *A. citrulli* AAC00-1 菌株的 T2SS 基因结构分析。利用 KEGG 对 T2SS 的注释,查找 Ac 和主要植物病原细菌的 T2SS 基因组成,用 STRING 9.1 (<http://string-db.org/>) 比对分析主要植物病原细菌的 T2SS 基因结构。

2) *A. citrulli* 同源 T2SS 分泌蛋白序列比对。将文献中报道的、通过试验验证为 T2SS 分泌系统分泌的蛋白序列分别用 NCBI BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 STRING 9.1 与 *A. citrulli* AAC00-1 基因组序列比对,采用缺省阈值输出比对结果。如果一个分泌蛋白序列通过 STRING 比对,在 Ac 基因组中有 1 条同源序列,则采用 STRING 的比对结果,并参考 NCBI BlastP 的比对分数;如果一个分泌蛋白序列在 STRING 中没有得到同源序列,则舍弃。

3)分泌蛋白信号肽分析。分别用 Sec 信号肽分析工具 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 Tat 信号肽分析工具 TatP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) 分析 Ac 的同源 T2SS 分泌蛋白序列是否含有 Sec 和

Tat 信号肽区域。

4)分泌蛋白的功能预测。用 STRING9.1 预测分泌蛋白的功能和蛋白间的互作关系,利用 KEGG 检索分泌蛋白在 Ac 代谢通路中的位置。用 TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 预测分泌蛋白进入植物细胞后在植物细胞内的定位。

## 2 结果与分析

### 2.1 *A. citrulli* AAC00-1 菌株的 T2SS 基因结构

T2SS 可分为 3 个主要功能组分:内膜平台(IM platform),由 Gsp C、F、L、M、E 组成;起活塞作用的假菌毛,由 Gsp G、H、I、J、K 组成;负责向外膜分泌物质的外膜复合体(OM secretin),主要由 Gsp D 组成<sup>[3]</sup>。Korotkov 等<sup>[10]</sup> 根据最新的 T2SS 结构和生物化学研究成果将 T2SS 的结构分成 4 个部分:假菌毛、外膜复合体、内膜平台和 ATP 酶,将 Gsp E (ATP 酶)单独作为一个组分。果斑病菌有 2 套 T2SS 基因(表 1),除 Aave\_0926 外,其余基因位于同一条染色体链上(图 1)。

表 1 *A. citrulli* AAC00-1 II 型分泌系统基因组成

Table 1 Type II secretion system of *A. citrulli* AAC00-1

基因 <sup>1)</sup> Gene	<i>gsp1</i> <i>gsp1</i>	基因 Gene	<i>gsp2</i> <i>gsp2</i>	蛋白 Protein	蛋白功能 <sup>2)</sup> Protein function
Aave_1068				Gsp E	ATPase
Aave_4160		Aave_0916		Gsp E	ATPase
Aave_4150		Aave_0917		Gsp D	OM secretin
		Aave_0918		Gsp N	Unknown function
Aave_4152		Aave_0919		Gsp M	IM platform
Aave_4153		Aave_0920		Gsp L	IM platform
Aave_4154		Aave_0921		Gsp K	Pseudopilin
Aave_4155		Aave_0922		Gsp J	Pseudopilin
Aave_4156		Aave_0923		Gsp I	Pseudopilin
Aave_4157		Aave_0924		Gsp H	Pseudopilin
Aave_4158		Aave_0925		Gsp G	Pseudopilin
Aave_4151		Aave_0926		Gsp C	IM platform
Aave_4159		Aave_3974		Gsp F	IM platform

1) T2SS 基因的组成和编号来自 KEGG Module aav\_M00331 (Type II general secretion system), Aave\_4151 (Gsp F) 由 Johnson 等<sup>[9]</sup> 的分析结果补充。Gene name and ID are from KEGG Module aav\_M00331 (Type II general secretion system), with Aave\_4151 from Johnson et al<sup>[9]</sup>;

2) T2SS 结构蛋白功能名称来自 Korotkov 等<sup>[10]</sup>。Protein function refers to Korotkov et al<sup>[10]</sup>。

在 KEGG 的 T2SS 直系同源基因表中<sup>[11]</sup>, 根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* C58 和番茄细菌性溃疡病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 没有 T2SS 基因; 水稻细菌性谷枯病菌 *Burkholderia glumae* BGR1、菊狄克氏菌

*Dickeya dadantii* Ech703、软腐病菌 *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 和 *P. wasabiae* WPP163、丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a、番茄细菌性斑点病菌 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000、水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331 各有 1 套 T2SS 基因；茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* GMI1000 除了有 1 套完整的 T2SS 基因外，还有多个 *gsp D*、*F*、*G*、*E* 基因；菜豆晕疫病菌 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A、柑橘溃疡病菌 *X. axonopodis* pv. *citri* 306、白菜黑腐病菌 *X. campestris* pv. *campestris* 8004 和 *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913、番茄疮痂病菌 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 均有 2 套 T2SS 基因；与瓜类果斑病菌 *A. citrulli* AAC00-1 同属的水稻病原细菌 *A. avenae* ATCC 19860 同样也有 2 套 T2SS 基因。

以 Ac 的 T2SS 基因为结点，用 STRING 比对植物病原细菌的 T2SS 同源序列(图 1)。由图 1 可

知，与 Ac 同属的 *Acidovorax* sp. JS42 菌株(图 1-F)的 T2SS 基因的序列长度和排列顺序与 AAC00-1(图 1-E)的第 1 套 T2SS 一致，但 *Acidovorax* sp. JS42 菌株只有 1 套 T2SS。 *X. campestris*(图 1-C)的第 2 套 T2SS 基因除 N 基因外，其余基因都与 Ac 的第 2 套 T2SS 排列相同。 *R. solanacearum*(图 1-D)的 T2SS 除两端的 *gsp C* 和 *gsp F* 外，其余基因排列顺序均和 Ac 的第 1 套 T2SS 的基因相同。此外， *R. solanacearum* 还有 2 套缺少假菌毛的 T2SS 基因(只有 *gsp D*、*F*、*G*、*E*)与 Ac 的第 2 套 T2SS 高度同源。由图 1 还可知，5 个假菌毛基因 *gsp G*、*H*、*I*、*J* 和 *K* 排列顺序最保守。外膜分泌子 *gsp D*、内膜平台 *gsp F* 和 Atp 酶 *gsp E* 的排列顺序有变化。Ac 的 Aave\_3974(*gsp F*)基因没有位于 T2SS 基因簇内，在图上未能标示出，但 *D. dadantii*(图 1-A)、*P. atrosepticum*(图 1-B)、*X. campestris*(图 1-C)、*R. solanacearum*(图 1-D)的 *gsp F* 均位于 T2SS 基因簇内。



图 1 植物病原细菌 T2SS 基因结构比对(可信分数为 0.700)

Fig. 1 Alignment of genes encoding type II secretion pathways (confidence score 0.700)

### 2.2 预测的 *A. citrulli* T2SS 分泌蛋白

文献检索共获得 17 篇通过试验鉴定的植物病原细菌 T2SS 分泌蛋白的文献。其中，研究中采用的野生型菌株有 10 个，分别为 *B. glumae* BGR1<sup>[12]</sup>(GenBank 登录号 NC\_012724 和 NC\_012722)，*D. dadantii*(=*Erwinia chrysanthemi*)3937<sup>[13-14]</sup>(NC\_014500)；*P. atrosepticum*(=*E. carotovora* subsp. *atroseptica*) SCRI1043<sup>[15]</sup>(NC\_004547)；*P. wasabiae* SCC3193<sup>[16]</sup>；*R. solanacearum* GMI1000<sup>[17]</sup>(NC\_003295)；*X. axonopodis* pv. *citri* 306<sup>[18-19]</sup>(NC\_003919)；*X. campestris* pv. *campestris* 8004<sup>[20]</sup>(NC\_007086)；*X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10<sup>[21]</sup>(NC\_007508)；*X. oryzae* pv.

*oryzae* BXO1<sup>[22]</sup> 和 *X. oryzae* pv. *oryzae* T7174R<sup>[23]</sup>。菌株 *P. wasabiae* SCC3193、*X. oryzae* pv. *oryzae* BXO1 和 *X. oryzae* pv. *oryzae* T7174R 在 KEGG 和 NCBI 中没有全基因组序列信息，在 GenBank 中也没有分泌蛋白序列信息，因此，在本试验中分别采用 KEGG 注释的 *P. wasabiae* WPP163(NC\_013421) 和 *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC 10331(NC\_006834) 菌株的序列与 Ac 进行比对。

文献中已鉴定的分泌蛋白共有 110 个，通过与 Ac 基因组序列对比，得到 23 条 Ac 同源序列。这些序列按蛋白功能可分为细胞壁降解酶、菌毛和鞭毛蛋白和其他毒力因子(表 2)。

表 2 预测的瓜类果斑病菌 AAC001 的 T2SS 分泌蛋白  
Table 2 Candidate type II secretory proteins in *A. citrulli* AAC00-1

基因 ID/蛋白 ID Gene ID/Protein ID	蛋白 Protein	信号肽 <sup>1)</sup> Signal peptide	比对基因 ID/蛋白 ID Alignment gene ID/ Protein ID	BlastP 分数 BlastP score	BlastP E 值 BlastP E-value	比对序列来源菌株 Alignment reference strain
植物细胞壁降解酶 Plant cell wall-degrading enzymes						
Aave_2102/YP_970457	Cellulase	Sec Tat <sup>a</sup>	cbhA: RSp0583/NP_522144	93.2	7e-21	<i>R. solanacearum</i> GMI1000
Aave_2924/YP_971266	Endoglucanase	Tat	Egl: RSp0162/NP_521723	76.3	7e-16	<i>R. solanacearum</i> GMI1000
Aave_3396/YP_971728	Putative cellulose	Tat	ECA2220/YP_050313 pelA;Dda3937_03370/ YP_003883967	74.3	2e-16	<i>P. atrosepticum</i> SCRI1043
Aave_3434/YP_971765	Pectate lyase	Sec	pelD;Dda3937_03372/ YP_003884109 pelE;Dda3937_03371/ YP_003884108	158	9e-44	<i>D. dadantii</i> 3937
Aave_3590/YP_971915	Xylanase	Sec Tat <sup>a</sup>	XOO4428/YP_203067	438	1e-154	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC 10331
菌毛和鞭毛蛋白 Pili and flagellum proteins						
Aave_3551/YP_971876	Tfp pilus assembly protein tip-associated adhesin PilY1-like protein	Tat <sup>a</sup>	pilY1: XAC2665/NP_642976	152	5e-38	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306
Aave_4422/YP_972736	Flagellar hook capping protein FlgD	—	ECA1704/YP_049805	114	1e-31	<i>P. atrosepticum</i> SCRI1043
Aave_4423/YP_972737	Flagellar hook protein FlgE	—	bglu_1g33140/ YP_002913080	265	3e-84	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_4425/YP_972739	Flagellar basal-body rod protein FlgG	—	ECA1707/YP_049808	335	2e-116	<i>P. atrosepticum</i> SCRI1043
Aave_4429/YP_972743	Flagellar rod assembly protein FlgJ	—	ECA1710/YP_049811	175	1e-52	<i>P. atrosepticum</i> SCRI1043
Aave_4430/YP_972744	Flagellar hook-associated protein FlgK	—	Pecwa_1877/ YP_003259265	156	1e-41	<i>P. wasabiae</i> WPP163
其他毒力因子 Other virulence factors						
Aave_0745/YP_969119	Fis family transcriptional regulator, ThiJ/PfpI	—	bglu_2g05090/ YP_002908191	326	1e-113	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_1226/YP_969591	Molecular chaperone DnaK	—	bglu_1g06340/ YP_002910531	1050	0.0	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_1365/YP_969730	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	—	bglu_1g25250/ YP_002912305	737	0.0	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_1391/YP_969756	VirK protein	Sec	XAC0435/NP_640790	147	3e-46	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306
Aave_1471/YP_969836	Hypothetical protein	—	bglu_2g01460/ YP_002907869	308	3e-100	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_2867/YP_971209	NAD-dependent epimerase/dehydratase	Tat <sup>a</sup>	bglu_1g29130/ YP_002912680	348	2e-121	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_3071/YP_971411	Thiamine-phosphate pyrophosphorylase	Tat <sup>a</sup>	bglu_1g03190/ YP_002910224	189	3e-57	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_3408/YP_971739	Ankyrin	Sec Tat	bglu_1g13820/ YP_002911235	138	5e-40	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_3643/YP_971966	Import inner membrane translocase subunit Tim 44	Sec	bglu_1g30820/ YP_002912849	145	1e-40	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_4189/YP_972503	Triacylglycerol Lipase	Sec Tat <sup>a</sup>	bglu_2g07730/ YP_002908426	206	9e-64	<i>B. glumae</i> BGR1
Aave_4296/YP_972610	Carbohydrate-binding family 6 protein	Sec Tat <sup>a</sup>	XAC0817/NP_641169	1008	0.0	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306
Aave_4538/YP_968717	Tuf I(elongation factor Tu)	—	bglu_1g02430/ YP_002910148	730	0.0	<i>B. glumae</i> BGR1

1) Sec:表示有 Sec 信号肽; Tat:表示有 Tat 信号肽和功能域; Tat<sup>a</sup>:表示有 Tat 信号肽,但没有 Tat 功能域; —:表示既无 Set 信号肽也无 Tat 信号肽。 Sec:Protein with Sec signal peptide; Tat:Protein with Tat signal peptide and Tat motif; Tat<sup>a</sup>:Potential Tat signal peptide but no Tat motif was found; —:No Sec or Tat peptide signal.

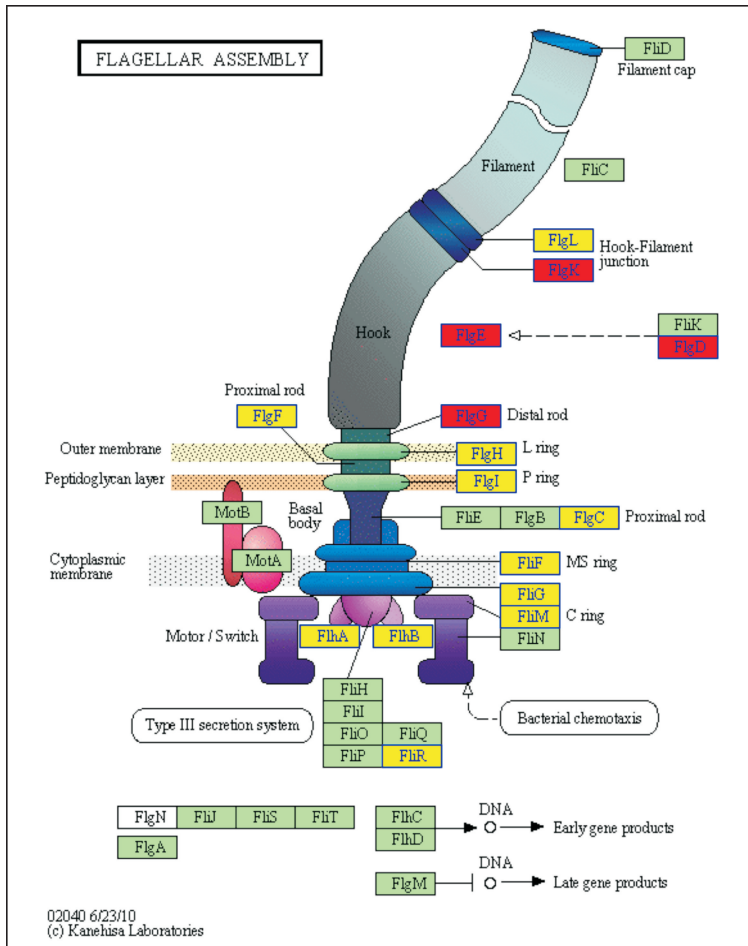


与 Aave\_3070 (thiG, thiazole synthase) 和 Aave\_3067 (phosphomethylpyrimidine kinase) 有密切的互作关系。鞭毛基因的互作关系保守,在图 2 中聚为一簇,并通过 Aave\_0945 (GroL, chaperonin Gro-EL) 与另外 2 个分泌蛋白 Aave\_4538 (tuf1, elongation factor Tu)、Aave\_1226 (molecular chaperone DnaK) 产生互作关系。

2) T2SS 分泌蛋白涉及的代谢通路。利用 KEGG 中的代谢数据库分析分泌蛋白的功能。结果表明, Aave\_2102 和 Aave\_2924 的功能相同,在淀粉和蔗糖代谢途径上将纤维素分解成纤维二糖。Aave\_1365 是琥珀酸半醛脱氢酶,参与谷氨酸盐、酪氨酸、赖氨酸等多个氨基酸的代谢,反应物是琥珀酸半醛 (succinate semialdehyde), 产物是琥珀酸。

Aave\_3071 与它的 2 个互作蛋白 Aave\_3070、Aave\_3067 均是硫胺素 (维生素 B1) 合成途径中的酶。Aave\_4189 位于甘油酯类代谢通路,产物是三酰甘油或脂肪酸。其余分泌蛋白在 KEGG 中尚未注释代谢通路信息。

3) T2SS 分泌的鞭毛蛋白。在 KEGG 鞭毛蛋白的结构模型 (KEGG Pathway aav02040 Flagellar assembly) 中,比对得到的 Ac 鞭毛蛋白均位于细菌胞外(图 3,红色标示 T2SS 分泌的鞭毛蛋白,黄色标示 STRING 预测的其他鞭毛互作蛋白,FlgJ 位于鞭毛内部未标示)。其中 FlgE 是鞭毛钩蛋白(钩子蛋白, hook), FlgK 是链接钩子和鞭毛丝的链接蛋白, FlgD 是钩子帽子蛋白, FlgG 是传动杆蛋白, FlgJ 在 MS 环 (FliF) 内腔上方组装传动杆帽子蛋白。



红色方框表示候选的 T2SS 分泌鞭毛蛋白,黄色方框表示 STRING 预测的鞭毛互作蛋白,绿色方框表示 Ac 其他的鞭毛蛋白,白色为非 Ac 基因组蛋白,圆角方框示另一个代谢通路。Red box, candidate type II secretory protein. Yellow box, interactor with candidate proteins from STRING. Green box, other flagellar protein of Ac. White box, gene not in Ac genome. Rounded rectangle, another pathway.

图 3 瓜类果斑病菌中 T2SS 分泌的鞭毛蛋白在 KEGG 鞭毛蛋白结构模型 (aav02040, Flagellar assembly) 中的位置  
Fig. 3 Location of T2SS secreted flagellin by Ac on the KEGG pathway (aav02040, Flagellar assembly)

4)分泌蛋白在植物细胞中的定位预测。按 SignalP 4.1 和 TatP 1.0 结果剪切细菌分泌蛋白的 Sec 信号肽和 Tat 信号肽序列后,用 TargetP 1.1 分析分泌蛋白进入植物细胞后可能的亚细胞位置,试

验结果显示有 3 种分泌蛋白定位于植物细胞的叶绿体中,5 种分泌蛋白定位于植物细胞的线粒体中,其他分泌蛋白可定位于植物细胞的任何亚细胞结构中(表 3)。

表 3 分泌蛋白在植物细胞中的定位<sup>1)</sup>

Table 3 Subcellular location of secretory proteins in plant

基因 ID Gene ID	信号肽 SP	序列长度/aa Sequence length	分数 Score				定位 Location	可信度 <sup>2)</sup> Reliability
			叶绿体转 运肽 CTP	线粒体靶 向肽 MTP	信号肽 SP	其他 Others		
植物细胞壁降解酶 Plant cell wall-degrading enzymes								
Aave_2102	Sec	368	0.131	0.076	0.076	0.853	—	2
Aave_2102	Tat	378	0.089	0.109	0.234	0.595	—	4
Aave_2924	Tat	411	0.276	0.109	0.420	0.262	S	5
Aave_3396	Tat	314	0.047	0.252	0.055	0.866	—	2
Aave_3434	Sec	480	0.329	0.103	0.086	0.670	—	4
Aave_3590	Sec	304	0.034	0.365	0.114	0.666	—	4
Aave_3590	Tat	288	0.146	0.094	0.063	0.930	—	2
Aave_3551	Tat	1 457	0.357	0.100	0.132	0.737	—	4
菌毛和鞭毛蛋白 Pili and flagellum proteins								
Aave_4422	—	216	0.620	0.044	0.034	0.518	C	5
Aave_4423	—	425	0.246	0.148	0.135	0.471	—	4
Aave_4425	—	260	0.126	0.118	0.059	0.636	—	3
Aave_4429	—	300	0.529	0.045	0.275	0.250	C	4
Aave_4430	—	642	0.054	0.613	0.152	0.041	M	3
其他毒力因子 Other virulence factors								
Aave_0745	—	226	0.034	0.408	0.089	0.848	—	3
Aave_1226	—	654	0.202	0.089	0.214	0.746	—	3
Aave_1365	—	479	0.090	0.196	0.038	0.811	—	2
Aave_1391	Sec	121	0.170	0.112	0.076	0.777	—	2
Aave_1471	—	444	0.005	0.746	0.040	0.386	M	4
Aave_2867	Tat	226	0.035	0.166	0.076	0.907	—	2
Aave_3071	Tat	268	0.007	0.439	0.316	0.508	—	5
Aave_3408	Sec	201	0.100	0.122	0.050	0.890	—	2
Aave_3408	Tat	199	0.141	0.133	0.056	0.866	—	2
Aave_3643	Sec	321	0.327	0.409	0.004	0.240	M	5
Aave_4189	Sec	283	0.002	0.237	0.331	0.507	—	5
Aave_4189	Tat	286	0.002	0.558	0.174	0.420	M	5
Aave_4296	Sec	744	0.741	0.168	0.029	0.249	C	3
Aave_4296	Tat	729	0.198	0.504	0.060	0.184	M	4
Aave_4538	—	396	0.045	0.317	0.140	0.813	—	3

1)CTP:Chloroplast transition peptide; MTP:Mitochondria targeting peptide; S:代谢途径 Secretory pathway; C: 叶绿体 Chloroplast; M:线粒体 Mitochondrion; —:胞内其他位置 Any other location;

2)可信度等级(RC)从 1~5,1 表示预测强度最大。Reliability class from 1 to 5, where 1 indicates the strongest prediction;

1:RC>0.800, 2:0.800≥RC≥0.600, 3:0.600≥RC≥0.400, 4:0.400≥RC≥0.200, 5:RC<0.200.

### 3 讨 论

多数植物病原细菌有 1~2 套 T2SS 基因,但这 2 套基因在功能上如何分工还没有详细报道。仅 Ferrandez 等<sup>[24]</sup>发现 *D. dadantii* 3937 的第 2 套 T2SS(Stt,second type two)可分泌一个锚定在细菌外表面(不分泌到植物环境中)的果胶裂解酶同源蛋白 PnlH,PnlH 通过 Tat 途径穿过内膜。PnlH 在 Ac 中没有同源序列。本试验比对得到的 5 个细胞壁降解酶中,Aave\_2924 和 Aave\_3396 均有 Tat 信号肽和功能域,Ac 中 2 套 T2SS 基因的功能有待进一步研究。

鞭毛对细菌粘附及定殖在生物或非生物表面都起着重要作用,但一般认为,鞭毛胞外的结构蛋白是由鞭毛自身分泌的<sup>[25]</sup>。KEGG 的代谢通路(aav02040)也是这样注释的,但 3 个独立的试验研究表明<sup>[12,16,26]</sup>,植物病原细菌的 T2SS 可分泌鞭毛蛋白,且这些鞭毛蛋白基因在 Ac 和其他植物细菌基因组中是相邻的(图 2)。由此可推测,T2SS 可能参与了鞭毛组装过程。

在植物细胞间定殖是细菌入侵植物体的第一步。此阶段植物通过识别细菌的保守分子特征识别入侵者并诱导防卫反应。这种诱导称为微生物或病原菌诱导的分子模式 MAMP 或 PAMP(microbe-

or pathogen-associated molecular pattern),植物的这种防卫反应叫做 MAMP 或 PAMP 诱导的免疫(MAMP triggered immunity, MTI 或 PAMP triggered immunity, PTI)<sup>[27]</sup>。本研究比对得到的毒力因子中, Aave\_4538(elongation factor Tu)是细菌中最丰富的蛋白,也是植物免疫反应的开关<sup>[28]</sup>。在 Ac 中 Aave\_4538 是否由 T2SS 分泌到胞外,并与瓜类作物的 MTI(或 PTI)相互作用,进而对 Ac 的定殖过程起重要作用,值得进一步研究。

锚定蛋白重复序列(ankyrin repeat, ANK)是真核生物中广泛存在的蛋白-蛋白互作功能域(protein-protein interaction motif)。人类病原细菌可通过多个分泌系统将锚定蛋白分泌到寄主细胞中,因细菌锚定蛋白与寄主锚定蛋白有相同的结构,细菌可利用锚定蛋白模拟或调控寄主细胞的某些功能<sup>[29]</sup>。Ac 中比对得到的锚定蛋白 Aave\_3408 的功能有待进一步研究。

大多数植物病害是在 19 世纪末或 20 世纪初鉴定的,而瓜类细菌性果斑病菌则是在 1960 年以后才有报道,直到 1980 年以后才造成经济损失<sup>[3]</sup>。相比于其他植物病原细菌,果斑病菌的研究报道文献较少。本研究详细分析了已报道的植物病原细菌 T2SS 分泌蛋白谱,结合 KEGG 和 STRING 等生物信息学工具对果斑病菌中同源的 T2SS 分泌蛋白及其功能进行了解析。除文中已讨论和分析的毒力因子外,还有协助蛋白折叠和再折叠的 dnaK 分子伴侣蛋白(Aave\_1226)、在寄主细胞内起复制和扩散作用的 VirK 蛋白(Aave\_1391)等。本试验得到的毒力因子均为细菌生理生化过程中重要的酶,并可定位在植物细胞的叶绿体、线粒体和其他细胞组分中。这些信息可为深入研究果斑病菌在种子传播和幼苗定殖过程中的分子机制提供理论依据。

**致谢** 试验设计和分析过程中得到中国农业科学院植物保护研究所赵廷昌研究员、王铁霖博士和华中农业大学植物科学技术学院吕学良博士、曾丽梅博士、于琳博士等提供的宝贵意见和热情帮助,谨致谢意!

## 参 考 文 献

- [1] 高天一,潘宏,别之龙,等. 葫芦种子带菌对幼苗细菌性果斑病发生和侵染途径的影响[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(5): 36-39.
- [2] 赵廷昌,孙福在,王兵万,等. 哈密瓜细菌性果斑病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 357-364.
- [3] BURDMAN S, WALCOTT R. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(8): 805-815.
- [4] DOUZI B, FILLOUX A, VOULHOUX R. On the path to uncover the bacterial type II secretion system [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367(1592): 1059-1072.
- [5] RONDELET A, CONDEMIN G. Type II secretion: the substrates that won't go away [J]. Research in Microbiology, 2013, 164(6): 556-561.
- [6] LE BLASTIER S, HAMELS A, CABEEN M, et al. Phosphate starvation triggers production and secretion of an extracellular lipoprotein in *Caulobacter crescentus* [J]. PLoS ONE, 2010, 5(12): e14198.
- [7] JHA G, RAJESHWARI R, SONTI R V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(9): 891-898.
- [8] JOHNSON K L, MINSAVAGE G V, WALCOTT R R. Effect of type III and type II secretion on *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* colonization of watermelon seed and seedling tissue [J]. Phytopathology, 2009, 99(6s): S59.
- [9] JOHNSON K L. Elucidation of the molecular host-pathogen interactions that influence seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* [D]. Athens: Library, University of Georgia, 2010.
- [10] KOROTKOV K V, SANDKVIST M, HOL W G J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism [J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(5): 336-351.
- [11] Ortholog table M00331 [EB/OL]. /2014-04-25. [http://www.kegg.jp/kegg-bin/view\\_ortholog\\_table?md=M00331](http://www.kegg.jp/kegg-bin/view_ortholog_table?md=M00331).
- [12] GOO E, KANG Y, KIM H, et al. Proteomic analysis of quorum sensing-dependent proteins in *Burkholderia glumae* [J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(6): 3184-3199.
- [13] HASSAN S, HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N. Identification of two feruloyl esterases in *Dickeya dadantii* 3937 and induction of the major feruloyl esterase and of pectate lyases by ferulic acid [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(4): 963-970.
- [14] HASSAN S, SHEVCHIK V E, ROBERT X, et al. PelN is a new pectate lyase of *Dickeya dadantii* with unusual characteristics [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(10): 2097-2206.
- [15] COULTHURST S J, LILLEY K S, HEDLEY P E, et al. Dsba plays a critical and multifaceted role in the production of secreted virulence factors by the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(35): 23739-23753.
- [16] LAASIK E, POLLUMAA L, PASANEN M, et al. Expression of *nip<sub>p</sub>.w* of *Pectobacterium wasabiae* is dependent on functional fl-



- gKL flagellar genes* [J]. *Microbiology*, 2014, 160:179-186.
- [17] LIU H, ZHANG S, SCHELL M A, et al. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(12):1296-1305.
- [18] GUO Y, FIGUEIREDO F, JONES J, et al. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(6):649-661.
- [19] YAMAZAKI A, HIRATA H, TSUYUMU S. HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2008, 74(2):138-150.
- [20] MENG Q L, TANG D J, FAN Y Y, et al. Effect of interactions between Mip and PrtA on the full extracellular protease activity of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 323(2):180-187.
- [21] SZCZESNY R, JORDAN M, SCHRAMM C, et al. Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. *The New Phytologist*, 2010, 187(4):983-1002.
- [22] RAJESHWARI R, JHA G, SONTI R V. Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(8):830-837.
- [23] FURUTANI A, TSUGE S, OHNISHI K, et al. Evidence for HrpX-dependent expression of type II secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(5):1374-1380.
- [24] FERRANDEZ Y, CONDEMIN G. Novel mechanism of outer membrane targeting of proteins in Gram-negative bacteria [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(6):1349-1357.
- [25] 孙琳琳. *Shewanella oneidensis* 鞭毛丝亚基蛋白的翻译后修饰及 FlaA 和 FlaB 功能差异研究 [D]. 杭州:浙江大学图书馆, 2013.
- [26] CORBETT M, VIRTUE S, BELL K, et al. Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting pathway [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(4):334-342.
- [27] NEWMAN M A, SUNDELIN T, NIELSEN J T, et al. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants [J]. *Plant-Microbe Interaction*, 2013, 4:139.
- [28] ALBERT M, JEHLE A K, FUERST U, et al. A two-hybrid-receptor assay demonstrates heteromer formation as switch-on for plant immune receptors [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(4):1504-1509.
- [29] AL-KHODOR S, PRICE C T, KALIA A, et al. Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins [J]. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(3):132-139.

## Screening and functional prediction of type II secretory proteins in *Acidovorax citrulli* AAC00-1

PAN Hong<sup>1,2</sup> GAO Tian-yi<sup>1</sup> WU Ming-de<sup>1</sup> YANG Long<sup>1</sup> ZHANG Jing<sup>1</sup> LI Guo-qing<sup>1</sup>

1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Tianjin Agricultural University Library, Tianjin 300384, China

**Abstract** Bacterial fruit blotch (BFB) is a severe seed-borne disease on melons. The type II secretion system (T2SS), one of bacterial virulence factors, may contribute to bacterial colonization and transmission. In this study, genes encoding T2SS and the genetic organization of T2SS clusters in *Acidovorax citrulli* (Ac) strain AAC00-1 were compared with those in other plant pathogen species via KEGG and STRING databases. In addition, T2SS secretory proteins in Ac strain AAC00-1 with homology to experimentally proofed T2SS secretory proteins in other phytopathogenic bacteria were identified based on BLASTP search. The secretion signals, possibly involved metabolism pathways, presumed protein interaction, subcellular location in plant cells of T2SS secretory proteins in Ac strain AAC00-1 were analyzed. These results provide valuable information for further investigation of the underlying molecular mechanisms of the secretory proteins of Ac during the seed colonization and seedling transmission.

**Key words** bacterial fruit blotch; *Acidovorax citrulli*; secretory proteins; screening; function

(责任编辑:陈红叶)