

齐梦祎, 夏丞垚, 纪燕玲, 等. 黏细菌来源硫胺素酶 I 的生理功能探究[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 204-211.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.022

## 黏细菌来源硫胺素酶 I 的生理功能探究

齐梦祎<sup>1</sup>, 夏丞垚<sup>1,2</sup>, 纪燕玲<sup>1</sup>, 黄彦<sup>1</sup>, 李周坤<sup>1</sup>, 叶现丰<sup>1</sup>, 崔中利<sup>1</sup>

1. 南京农业大学生命科学学院/农业农村部农业环境微生物重点实验室, 南京 210095;  
2. 厦门大学药学院, 厦门 361102

**摘要** 为探究硫胺素酶 I 在黏细菌中的生理功能, 选取 *Corallococcus* sp. EGB、*Mycrococcus xanthus* DK1622 和 *Cystobacter* sp. 1404 三种不同种属的黏细菌, 研究 3 种黏细菌基因组中硫胺素合成与菌株生长发育的关系。结果显示, 3 种黏细菌基因组中均具有完整的硫胺素合成途径, 且具有硫胺素合成前体噻啉(4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine, HMP)回收相关基因, 但未发现硫胺素或其前体噻啉回收相关基因; HMP 合成酶基因 *thiC* 上游存在的焦磷酸硫胺素核糖开关 (TPP-riboswitch) 可根据环境中硫胺素浓度调控 *thiC* 基因的转录水平。菌株 DK1622 及其硫胺素酶 I 敲除突变株 CL1003 中分别插入 *thiC* 基因, 构建突变菌株 CL1006 和 CL1007, 发现 CL1006 在无硫胺素培养基中需要额外添加硫胺素或 HMP 才能恢复生长, 但相比于硫胺素处理组, HMP 处理组菌落直径显著增加了 9.0%; CL1007 只能在添加 HMP 平板中生长, 单独添加完整的硫胺素并不能使其恢复生长, 但当硫胺素酶 CcThi1 和硫胺素共同添加时, CL1007 的生长得到恢复。结果表明, 黏细菌不直接利用外源硫胺素, 但可通过硫胺素酶 I 将其分解成噻啉前体被利用。

**关键词** 黏细菌; 硫胺素; 硫胺素酶 I; *thiC* 基因

**中图分类号** Q935 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0204-08

硫胺素又称维生素 B<sub>1</sub>, 是最早被人们发现的水溶性维生素, 由噻啉环和噻唑环通过亚甲基桥连接组成, 在生物体中起着维持正常糖代谢的作用, 是一类十分重要的辅助因子<sup>[1]</sup>。在细胞中, 硫胺素的生物活性形式为焦磷酸硫胺素 (thiamine pyrophosphate, TPP), 它以辅酶的形式参与了体内许多生物过程, 如糖酵解、磷酸戊糖途径、三羧酸循环和一些氨基酸合成等过程<sup>[2]</sup>。自然界中大多数真菌、细菌和植物都可以自主合成硫胺素<sup>[3]</sup>。硫胺素的合成步骤已经被报道, 首先是前体噻啉和噻唑的独立合成, 然后偶联形成单磷酸硫胺素 (thiamine monophosphate, TMP) 后进一步形成 TPP 参与生物体的各个反应过程。TPP 是一些细菌和植物代谢过程中不可缺少的关键辅因子, 这使得它们进化出多种途径获取 TPP, 包括利用环境中存在的前体物质<sup>[4]</sup>。

硫胺素可被硫胺素酶催化分解, 根据其催化过程中是否需要额外添加亲核试剂, 硫胺素酶分为硫胺素酶 I 和硫胺素酶 II 2 种类型。硫胺素酶 II, 又称

作 TenA, 需要水作为亲核试剂, 存在于细菌、古菌、真菌和植物中, 细菌和古菌中分布较多<sup>[5-6]</sup>。TenA 作为胞内酶能够回收利用环境中硫胺素的降解产物, 如硫胺素在 *Bacillus halodurans* 中被分解和去乙酰化生成氨基噻啉, 然后在 TenA 催化下氨基被水中的羟基取代, 生成前体 HMP, 用于新的硫胺素合成<sup>[7]</sup>。硫胺素酶 I 的分布相对较窄, 主要存在于某些特定种类的微生物和一些多细胞生物中, 如黏细菌、芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)、梭菌 (*Clostridium* sp.)、某些蕨类、昆虫、贝类、淡水和海洋鱼类等<sup>[8-9]</sup>。硫胺素酶 I 催化硫胺素分解是通过多种有机亲核试剂实现<sup>[10]</sup>。研究表明动物硫胺素缺乏症与硫胺素酶 I 关系密切, 如脚气病的发生与人食用富含硫胺素酶 I 食物有关, 但该过程中硫胺素酶 I 的生理功能却一直未被确定<sup>[11-12]</sup>。硫胺素及其前体在生态环境中也被认为是驱动微生物之间相互作用的重要因素, 但硫胺素酶 I 在这个复杂的互作系统中所发挥的作用仍需进一步研究<sup>[12-13]</sup>。

收稿日期: 2024-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32170123; 32371730; 32370119)

齐梦祎, E-mail: 1401254100@qq.com

通信作者: 崔中利, E-mail: czl@njau.edu.cn

黏细菌是一类具有独特生命周期和多细胞群体行为的化能有机营养型革兰氏阴性菌<sup>[14]</sup>,根据基因组信息,黏细菌被重新分类为黏细菌门(Myxococcota),包含黏球菌纲(Myxococcia)和多囊菌纲(Polyangia)2个纲、4个目、7个科和24个属<sup>[15]</sup>。黏细菌在自然界中分布广泛,北极苔原、酸性土壤、沙漠、温带、热带雨林、海洋和其他含盐环境等都可以成为它的栖息地<sup>[16-17]</sup>。此外,黏细菌在土壤微生物中丰度较高。Zhou等<sup>[18]</sup>对多种陆地土壤微生物群落进行分析,发现黏细菌在土壤总细菌群落中的相对丰度为0.4%~4.5%。在山东大学校园土壤中,在3%的相似水平下,检出黏细菌占细菌群落的4.10%,占总OTU的7.5%,几乎包含了所有已培养的黏细菌科或属<sup>[18]</sup>。

作为微生物食物网结构中的关键类群,黏细菌可以与包括细菌和真菌在内的多种微生物相互作用<sup>[19-22]</sup>,如产生分泌水解酶瓦解病原真菌细胞壁<sup>[23]</sup>,产生大量的次生代谢产物拮抗病原菌的生长<sup>[24]</sup>。南京农业大学农业农村部农业环境微生物重点实验室最新研究发现,黏细菌能分泌硫酸素酶I拮抗大豆疫霉菌的生长并控制病害的发生。对于自然界的大多数生物来说,硫酸素是一种十分重要的营养物质,黏细菌也不例外,其分泌的硫酸素水解酶似乎是对自身生长发育不利的,且微生物来源硫酸素酶I的生理功能至今尚不明确。本研究通过解析黏细菌细胞内硫酸素合成途径及其关键基因的功能,阐明硫酸素酶I在黏细菌生长发育过程中的生理作用,旨在为进一步探索硫酸素酶I在其他生物体中的生理功能以及黏细菌在微生物关系网中所发挥的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究所使用 *Coralloccoccus* sp. EGB 和 *Cystobacter* sp. 1404 由南京农业大学农业农村部农业环境微生物重点实验室分离保藏。*Myxococcus xanthus* DK1622 为黏细菌模式菌株。

### 1.2 培养基类型

VY/4 固体培养基:0.25% 安琪酵母、0.1%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.5% 琼脂粉,pH 7.2。

LBS 液体培养基:0.7% 淀粉 0.1% 胰蛋白胍、0.5% 酵母提取物、0.1% 硫酸镁,pH 7.2。

不含维生素的 CTT-1 液体培养基:1% 无维生

素酪蛋白酸水解物(Sigma)、1 mmol/L PBS (pH 7.6)、10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)、8 mmol/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.2。

YT 液体培养基:1% 胰蛋白胍、0.5% 酵母提取物。

合成培养基 A1:0.01% L-天冬氨酸、0.01% L-苯丙氨酸、0.01% L-异亮氨酸、0.01% L-缬氨酸、0.005% L-亮氨酸、0.001% L-甲硫氨酸、0.000 1%  $\text{VB}_{12}$ 、0.5% 丙酮酸钠、0.012 5% 亚精胺、0.5% 天冬氨酸(KOH 调节 pH 至 7.6)、10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.6)、10  $\mu\text{mol/L}$  氯化铁、8 mmol/L 硫酸镁、10  $\mu\text{mol/L}$  氯化钙、0.05% 硫酸铵。

### 1.3 黏细菌中硫酸素合成途径相关基因分析

利用 *Coralloccoccus* sp. EGB、*Myxococcus xanthus* DK1622 和 *Cystobacter* sp. 1404 基因组,结合 NCBI 和 KEGG 数据库并参考原核生物硫酸素合成途径,分析 3 种黏细菌中硫酸素合成途径相关基因的存在情况。

### 1.4 硫酸素合成途径关键基因表达情况

在不含维生素的 CTT-1 液体培养基中分别添加 5  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$  硫酸素培养菌株 EGB,以不加硫酸素的培养基作为对照。在 30 °C 摇床 180 r/min 条件下培养 24 h,每 2 h 取 1 mL 菌液离心收集菌体后进行液氮速冻处理,保存于 -80 °C。将收集的菌体利用生工柱式 RNA 提取试剂盒(B518659, Sangon, China)进行 RNA 提取,具体步骤参照试剂盒说明书。随后使用诺唯赞反转录试剂盒(R333-01, Vazyme, China)将 RNA 反转录成 cDNA,具体步骤参照试剂盒说明书。通过 PCR 扩增测定硫酸素合成关键基因的转录情况,模板为反转录后的 cDNA,内参基因为 EGB 中的 *rpoB* 基因,相关引物见表 1。

表 1 引物序列名称及功能

Table 1 Primers sequence names and functions

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列<br>Primer sequence(5'→3') |
|---------------------|--------------------------------|
| EGB- <i>RpoB</i> -F | ACGGCAAGGGCACGAT               |
| EGB- <i>RpoB</i> -R | TGGTCCATGAACTGCGACA            |
| EGB- <i>thiC</i> -F | TGCTCTGCTACGTGACACCCAA         |
| EGB- <i>thiC</i> -R | ATCCTCCCAGCGGAACCTCG           |
| EGB-F               | TCATCATCGGCACTGTTCATC          |
| EGB-R               | GGATGGTGC GGTTGAGGAGC          |

### 1.5 硫酸素合成关键基因的插入失活

在黏细菌 DK1622 的 *thiC*(*MXAN\_4235*)基因内

部选取1 009 bp进行PCR扩增(表1),利用诺唯赞同源重组试剂盒(C112-01, Vazyme, China)将扩增后获得的目的片段与pBJ113载体相连,具体步骤参照试剂盒说明书。将连接产物转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,将测序正确的转化子使用诺唯赞公司试剂盒(DC201-01, Vazyme, China)进行质粒大提,具体方法参照使用说明书。随后将提取质粒电转至DK1622菌体中,电转步骤如下:将5  $\mu$ L质粒加入到菌体后轻轻混匀转移至预冷的2 mm电转杯中进行电转。在1 250 V、400  $\Omega$ 、25  $\mu$ F的条件下电击,结束后迅速加入1 mL YT液体培养基,在摇床180 r/min 30  $^{\circ}$ C条件下孵育6 h,随后涂布于0.35%的半固体YT培养基(卡那霉素抗性),30  $^{\circ}$ C培养4~5 d后挑取明黄色菌落进行PCR验证确认菌株正确性。

### 1.6 黏细菌对硫胺素的利用试验

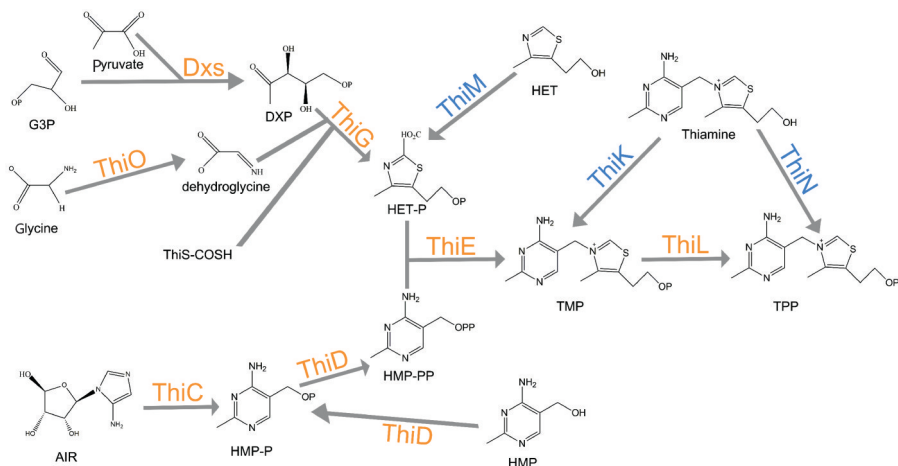
在固体培养基CTT-1条件下研究黏细菌对硫胺素的利用情况。采用YT培养基培养菌株DK1622、CL1003、CL1006、CL1007,5 d后在固体平板上刮取菌落,经无菌水洗涤3次,用无菌水重悬菌体,统一浓度为OD<sub>600 nm</sub>=5。将0.1  $\mu$ mol/L 硫胺素、0.1  $\mu$ mol/L HMP和0.1  $\mu$ mol/L 硫胺素与CcThi1的反应产物(1  $\mu$ mol/L CcThi1与0.1  $\mu$ mol/L 硫胺素处理24 h)、等体积无菌水(CK)分别添加到CTT-1培养基后制备平板,将3  $\mu$ L制备好的黏细菌菌液点在平板培养基上,待菌液吹干后置于30  $^{\circ}$ C培养1 d,统计菌落直径。在液体培养实验中,鉴于菌株DK1622在CTT-1液体培养基中生长状态不佳的情况,选用合成培养

基A1进行液体实验。将1  $\mu$ mol/L 硫胺素、1  $\mu$ mol/L HMP和1  $\mu$ mol/L 硫胺素与CcThi1的反应产物(1  $\mu$ mol/L CcThi1与0.1  $\mu$ mol/L 硫胺素处理24 h)分别添加到4 mL A1培养基试管中进行试验,摇床180 r/min 30  $^{\circ}$ C条件下培养5 d,收集菌体并使用FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit(MP Biomedicals, Santa Ana, CA)提取菌体DNA,使用诺唯赞公司qPCR试剂盒(Q511-02, Vazyme, China)对菌体生物量进行定量分析,具体步骤参照试剂盒说明书,相关引物见表1。

## 2 结果与分析

### 2.1 黏细菌硫胺素合成与回收途径的分析

本研究以 *Coralloccoccus* sp. EGB、*Myxococcus xanthus* DK1622 和 *Cystobacter* sp. 1404 三种不同种属来源的黏细菌基因组为代表,分析硫胺素合成途径在黏细菌基因组中的存在情况(图1)。结果显示,3种不同种属来源的黏细菌基因组中都具有从头合成硫胺素相关激酶的基因,表明黏细菌具有自主从头合成硫胺素的能力。但需要注意的是,在外界硫胺素供应充足的条件下,许多生物会直接利用外源硫胺素或前体并转换为TMP或TPP,而非自身合成,最大程度地减少生化过程的能量消耗。在3株黏细菌的基因组中进一步分析均没有发现与硫胺素和噻唑回收利用相关的3种激酶(硫胺素激酶ThiK、硫胺素焦磷酸激酶ThiN和噻唑激酶ThiM)的存在,推测黏细菌在回收利用硫胺素和噻唑前体方面可能存在一定限制。



黄色标注代表黏细菌基因组存在相关蛋白的合成基因,蓝色标注代表未发现同源蛋白的合成基因。Yellow indicate the presence of related genes in the myxobacteria genome, blue indicate that no homologous genes were found.

图1 黏细菌从头合成硫胺素

Fig. 1 Myxobacteria can synthesize thiamine *de novo*

## 2.2 硫胺素合成途径中 *thiC* 基因的分析

分析不同种属黏细菌硫胺素合成途径发现,上述3个种属的黏细菌基因组均具有磷酸甲基嘧啶合酶(phosphomethylpyrimidine synthase, *thiC*)基因,该基因参与硫胺素生物合成途径中嘧啶环的合成,将5-氨基咪唑核糖核苷酸(AIR)转化为4-氨基-2-甲基-5-羟甲基嘧啶磷酸(HMP-P)或相关醇,是硫胺素合成途径中的关键酶之一;并且在该基因上游存在 TPP 核糖开关(TPP-riboswitch),而 TPP 核糖开关通常被认为是可以根据硫胺素浓度控制基因转录的元件,当硫胺素浓度过高时,TPP 核糖开关就开始工作,从而控制相关基因转录停止(图2)。以上结果表明,细胞内外硫胺素的浓度可能会影响基因 *thiC* 的表达。

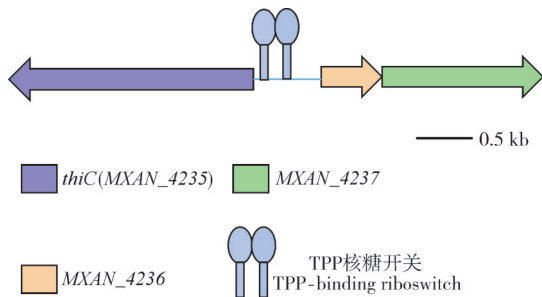


图2 TPP结合核糖开关存在于黏细菌 *thiC* 基因上游(以DK1622为例)

Fig. 2 TPP-binding riboswitch located upstream of myxobacterial *thiC* gene (DK1622 as an example)

## 2.3 外源硫胺素浓度对黏细菌中 *thiC* 基因转录水平的影响

为进一步验证上述结果,本研究以菌株EGB为研究对象,在其培养基中添加不同浓度硫胺素,测定 *thiC* 基因的转录水平。由图3可知,添加不同浓度的硫胺素会导致EGB中 *thiC* 基因的转录水平发生明显改变。在无维生素的CTT-1培养基中分别添加无菌水、5  $\mu\text{mol/L}$  硫胺素和50  $\mu\text{mol/L}$  硫胺素,发现 *thiC* 基因的转录水平会随着硫胺素浓度的增加而下调,在5  $\mu\text{mol/L}$  硫胺素和50  $\mu\text{mol/L}$  硫胺素添加2 h后 *thiC* 分别下调了约10%和50%。以上结果表明硫胺素浓度对调控黏细菌基因组中编码嘧啶合成酶基因 *thiC* 的转录水平具有重要影响。环境中高浓度的硫胺素可能通过抑制细胞内硫胺素合成途径相关基因的转录抑制细胞内硫胺素的合成,而此时黏细菌更倾向于利用外源硫胺素而不是通过自身合成。但在黏细菌EGB基因组中并未发现硫胺素回收相关基

因。因此,本研究推测黏细菌中硫胺素酶I的存在可能与环境中硫胺素的回收利用有关。

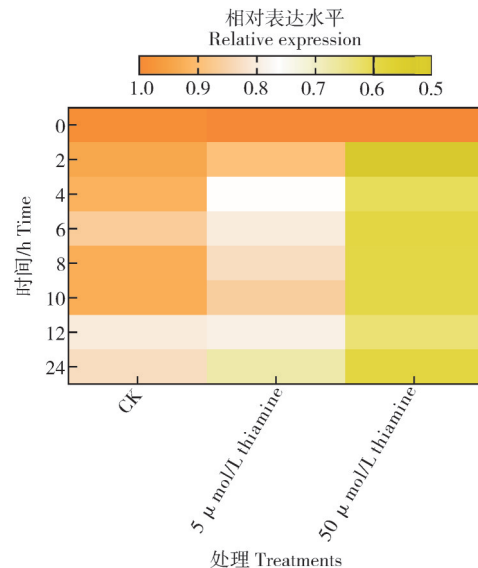


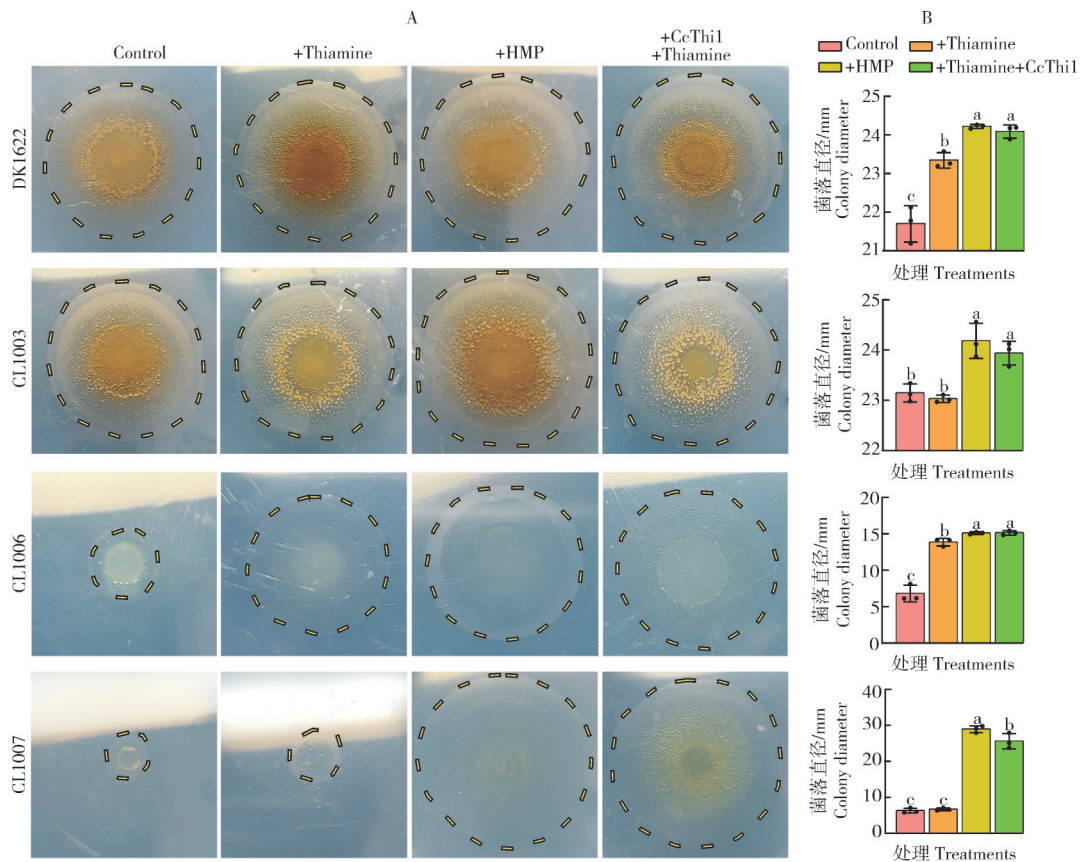
图3 硫胺素抑制 *thiC* 基因的转录

Fig. 3 Thiamine suppresses *thiC* gene transcription

## 2.4 *thiC* 基因对黏细菌生长的影响

为了更深入探究黏细菌和硫胺素的关系,本研究分别在菌株DK1622和硫胺素酶I基因敲除菌株CL1003中插入 *thiC* 基因,获得突变菌株CL1006和CL1007。由图4可知,具有自主合成硫胺素能力的菌株DK1622和突变菌株CL1003( $\Delta\text{MAXN}_4523$ ),在无硫胺素的CTT-1固体培养基上能正常生长,但插入失活了 *thiC* 基因的突变菌株CL1006和CL1007则在CTT-1培养基上失去了生长能力。在培养基中额外添加硫胺素后,突变菌株CL1006恢复生长,但突变菌株CL1007仍不能生长;在培养基中添加硫胺素前体HMP时,突变菌株CL1007恢复生长。随后本研究将异源表达的硫胺素酶CcThi1与硫胺素反应后的产物加到CTT-1培养基中,发现突变菌株CL1006和CL1007的生长状态良好。但突变菌株CL1006在添加HMP和CcThi1+硫胺素的培养基中生长的菌落直径比在只添加硫胺素的培养基中增加了9.0%,并且菌株DK1622和突变菌株CL1003在试验中也出现了相似的现象。

随后,本研究在液体培养条件下做了同样的试验来验证结果。在液体培养基A1中分别添加硫胺素、硫胺素前体HMP、CcThi1水解硫胺素的产物,收集培养5 d后的DK1622、CL1003、CL1007全部菌体,提取总DNA并利用荧光定量PCR测定其生物量。由图5可知菌株DK1622和突变菌株CL1003在4种



A: 黏细菌在含有硫胺素和前体的固体培养基中的生长情况 Growth of myxobacteria in solid media containing thiamine and precursors; B: 菌落直径测定 Measurement of colony diameter.

图4 硫胺素酶 I 促进黏细菌利用外源硫胺素

Fig. 4 Thiaminase I facilitates the utilization of exogenous thiamine by myxobacteria

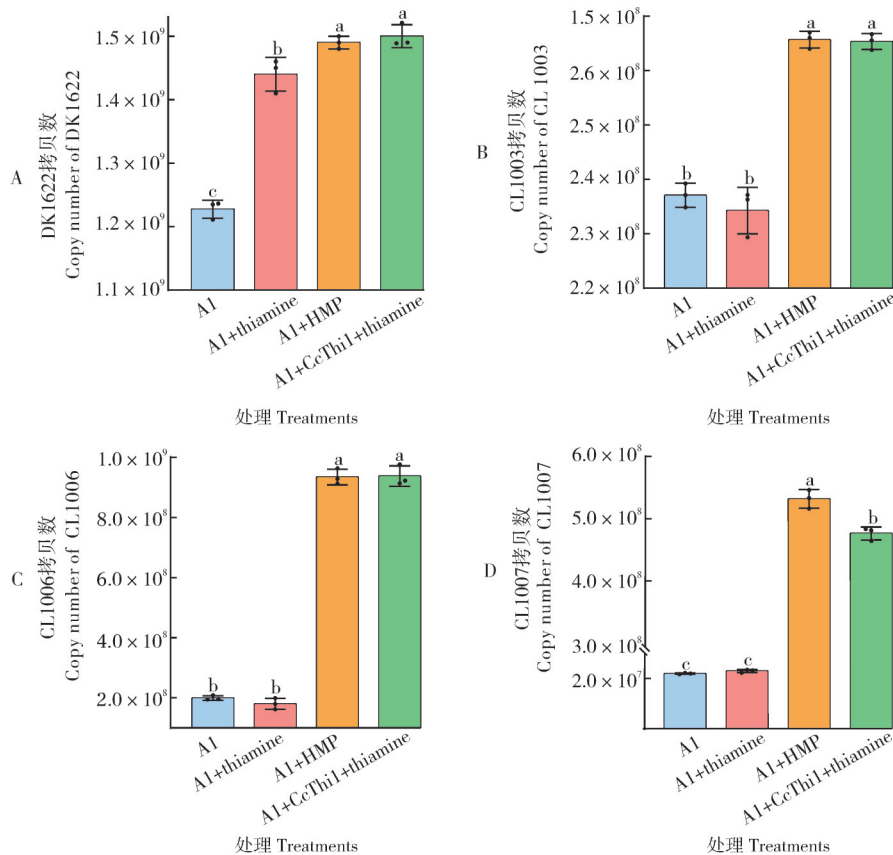
培养条件下均可生长,突变菌株 CL1007 只有在添加 HMP 和 CcThi1 与硫胺素反应后的产物时才会生长,该结果与固体平板上的结果一致。但突变菌株 CL1006 在单独添加外源硫胺素的液体培养基中并没有表现生长迹象,与其在固体平板上的生长现象相反,推测可能是黏细菌在液体培养条件下所产生的硫胺素酶 I 不足以分解硫胺素生成前体供自身使用。以上结果表明,硫胺素酶 I 可以优先将外源硫胺素分解供黏细菌利用。

### 3 讨论

本研究对 3 种不同种属的黏细菌基因组进行比对分析发现,它们均具有从头合成硫胺素的能力并且在编码嘧啶合成酶相关基因(*thiC*)的上游都发现 TPP 核糖开关,推测其可能与黏细菌合成硫胺素相关。黏细菌培养过程中 *thiC* 基因的转录水平随外源添加硫胺素浓度的增加显著下调,表明黏细菌中 *thiC* 基因的转录受环境中硫胺素浓度的调控。硫胺素作为包括黏细菌在内的许多生物重要的营养物质,在

生物生长代谢过程中起着关键作用<sup>[12]</sup>,黏细菌可以不依赖外部环境中的硫胺素进行细胞内从头合成,但其进化出外泌型硫胺素酶 I 的生理生态功能需要进一步研究。Xia 等<sup>[9]</sup>研究发现,珊瑚球菌属黏细菌 EGB 能通过分泌硫胺素酶 CcThi1 分解环境中硫胺素,抑制大豆疫霉菌的生长,表明硫胺素酶具有在生态环境中为黏细菌创造竞争优势的潜在作用。尽管硫胺素酶 I 的发现证明了黏细菌在植物病原菌防治中的潜力,但该酶在黏细菌自身生长发育过程中的功能尚不清楚。

硫胺素酶自从 20 世纪中期被发现以来,一直备受科学家们的关注。然而,科学家们至今仍未完全明确硫胺素酶 I 的生理功能。前人研究认为 *Burkholderia thailandensis* 产生的硫胺素酶 I 和硫胺素酶 II 在生理功能上存在相似之处,参与硫胺素的收集利用并且供自身生长<sup>[12, 25]</sup>。虽然 *Burkholderia thailandensis* 能够直接利用硫胺素,但在环境中存在硫胺素前体物质时,该菌还是会优先利用前体而不是外



A: 菌株 DK1622 Strain DK1622; B: 菌株 CL1003 Strain CL1003; C: 菌株 CL1006 Strain CL1006; D: 菌株 CL1007 Strain CL1007.

图5 不同液体培养条件下黏细菌的生物量

Fig. 5 Myxobacteria biomass under different liquid culture

源硫胺素。在海洋细菌 *Candidatus pelagibacter* strain HTCC1062 中也有类似情况,硫胺素缺乏限制菌株的生长,但其并不能通过外源添加硫胺素来缓解<sup>[25]</sup>。相反,HTCC1062 只在 HMP 存在时恢复生长<sup>[25]</sup>。同样,真核浮游植物在生长过程中更倾向于利用嘧啶前体而非硫胺素<sup>[26]</sup>。本研究通过对黏细菌基因组进行分析,发现黏细菌拥有完整的硫胺素从头合成能力,但环境中存在硫胺素时,黏细菌并不能直接吸收利用外源硫胺素,它们会利用自身分泌的硫胺素酶 I 将硫胺素分解,释放出可供使用的嘧啶前体。该过程使黏细菌相对于从更基础成分合成硫胺素的生物而言具有一定的生态优势。此外,本研究推测黏细菌通过对外源硫胺素的分解以达到抑制直接利用外源硫胺素微生物生长的目的是一种适应性竞争策略。该策略能够保证黏细菌自身在微生物群落中的生长优势,但包括黏细菌在内的很多微生物只能利用 HMP 的原因仍然未知,该过程是否与硫胺素或 HMP 的胞内转运过程相关需要进一步验证。

综上,本研究发现了黏细菌具有从头合成硫胺素的能力,但通过黏细菌基因组比对并未发现与硫

胺素和噻唑回收相关酶的合成基因。TPP-binding 核糖开关存在于 *thiC* 基因的上游,并且 *thiC* 基因的转录水平在环境中存在硫胺素时显著下调。黏细菌无法直接利用外源硫胺素,而是通过其分泌的硫胺素酶 CcThiI 将外源硫胺素水解成嘧啶供自身利用或直接利用外源 HMP。

## 参考文献 References

- [1] 孙亚丽,唐家琪,毛馨晨,等.植物维生素 B<sub>1</sub> 生物合成及生物强化的研究进展[J].安徽农业科学,2024,52(2):5-9.SUN Y L, TANG J Q, MAO X C, et al. Research progress on biosynthesis and biofortification of vitamin B<sub>1</sub> in plants[J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2024, 52(2): 5-9 (in Chinese with English abstract).
- [2] BROWN G. Defects of thiamine transport and metabolism[J]. Journal of inherited metabolic disease, 2014, 37(4): 577-585.
- [3] FITZPATRICK T B, THORE S. Complex behavior: from cannibalism to suicide in the vitamin B<sub>1</sub> biosynthesis world[J]. Current opinion in structural biology, 2014, 29: 34-43.
- [4] SAÑUDO-WILHELMY S A, GÓMEZ-CONSARNAU L, SUFFRIDGE C, et al. The role of B vitamins in marine bio-

- geochemistry [J]. Annual review of marine science, 2014, 6: 339-367.
- [5] ZALLOT R, YAZDANI M, GOYER A, et al. Salvage of the thiamin pyrimidine moiety by plant TenA proteins lacking an active-site cysteine [J]. The biochemical journal, 2014, 463 (1): 145-155.
- [6] ONOZUKA M, KONNO H, KAWASAKI Y, et al. Involvement of thiaminase II encoded by the *THI20* gene in thiamin salvage of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS yeast research, 2008, 8(2): 266-275.
- [7] JENKINS A H, SCHYNS G, POTOT S, et al. A new thiamin salvage pathway [J]. Nature chemical biology, 2007, 3(8): 492-497.
- [8] MURATA K. Actions of two types of thiaminase on thiamin and its analogues [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1982, 378(1): 146-156.
- [9] XIA C Y, ZHAO Y Q, ZHANG L, et al. Myxobacteria restrain *Phytophthora* invasion by scavenging thiamine in soybean rhizosphere via outer membrane vesicle-secreted thiaminase I [J/OL]. Nature communications, 2023, 14 (1) : 5646 [2024-05-31]. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41247-0>.
- [10] KREINBRING C A, REMILLARD S P, HUBBARD P, et al. Structure of a eukaryotic thiaminase I [J]. PNAS, 2014, 111 (1): 137-142.
- [11] KRAFT C E, ANGERT E R. Competition for vitamin B<sub>1</sub> (thiamin) structures numerous ecological interactions [J]. The quarterly review of biology, 2017, 92(2): 151-168.
- [12] SANNINO D R, KRAFT C E, EDWARDS K A, et al. Thiaminase I provides a growth advantage by salvaging precursors from environmental thiamine and its analogs in *Burkholderia thailandensis* [J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2018, 84 (18) : e01268-18 [2024-05-31]. <https://doi.org/10.1128/AEM.01268-18>.
- [13] PAERL R W, BOUGET F Y, LOZANO J C, et al. Use of plankton-derived vitamin B<sub>1</sub> precursors, especially thiazole-related precursor, by key marine picoeukaryotic phytoplankton [J]. The ISME journal, 2017, 11(3): 753-765.
- [14] 窦新玉, 潘雯, 董志铭, 等. 天山大峡谷原始森林黏细菌的分离鉴定及其抗菌活性 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3952-3969. DOU X Y, PAN W, DONG Z M, et al. Isolation, identification, and antimicrobial activities of myxobacteria in primitive forest of Tianshan Grand Canyon [J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3952-3969 (in Chinese with English abstract).
- [15] WAITE D W, CHUVOCHINA M, PELIKAN C, et al. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2020, 70(11): 5972-6016.
- [16] 杜欣然, 王晶晶, 冉柒, 等. 黏细菌资源及其系统分类 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3104-3121. DU X R, WANG J J, RAN Q, et al. Resources and taxonomy of myxobacteria: a review [J]. Microbiology China, 2023, 50 (7) : 3104-3121 (in Chinese with English abstract).
- [17] 卢天梅, 官佳松, 覃诗敬, 等. 广西北部湾可培养黏细菌资源初探及其抗菌活性研究 [J]. 热带海洋学报, 2023, 42(3): 158-168. LU T M, GUAN J S, QIN S J, et al. Study on culturable mucobacteria resources and their antibacterial activity in Beibu Gulf of Guangxi [J]. Journal of tropical oceanography, 2023, 42 (3) : 158-168 (in Chinese with English abstract).
- [18] ZHOU X W, LI S G, LI W, et al. Myxobacterial community is a predominant and highly diverse bacterial group in soil niches [J]. Environmental microbiology reports, 2014, 6 (1) : 45-56.
- [19] LI Z K, YE X F, CHEN P L, et al. Antifungal potential of *Corallococcus* sp. strain EGB against plant pathogenic fungi [J]. Biological control, 2017, 110: 10-17.
- [20] YE X F, XU C S, XIE T T, et al. Myxobacterial outer membrane  $\beta$ -1, 6-glucanase induced the cell death of *Fusarium oxysporum* by destroying the cell wall integrity [J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2023, 89(1) : e0123622 [2024-05-31]. <https://doi.org/10.1128/aem.01236-22>.
- [21] WANG W H, LUO X, YE X F, et al. Predatory Myxococcales are widely distributed in and closely correlated with the bacterial community structure of agricultural land [J/OL]. Applied soil ecology, 2020, 146: 103365 [2024-05-31]. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103365>.
- [22] YE X F, LI Z K, LUO X, et al. A predatory myxobacterium controls cucumber *Fusarium* wilt by regulating the soil microbial community [J/OL]. Microbiome, 2020, 8 (1) : 49 [2024-05-31]. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00824-x>.
- [23] LI Z K, YE X F, LIU M X, et al. A novel outer membrane  $\beta$ -1, 6-glucanase is deployed in the predation of fungi by myxobacteria [J]. The ISME journal, 2019, 13(9): 2223-2235.
- [24] 翟辰欣, 吕莹, 汪绍杰, 等. 黏细菌生物活性产物及其应用研究进展 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4237-4259. ZHAI C X, LÜ Y, WANG S J, et al. Research progress in bioactive products of myxobacteria and their applications [J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4237-4259 (in Chinese with English abstract).
- [25] CARINI P, CAMPBELL E O, MORRÉ J, et al. Discovery of a SAR11 growth requirement for thiamin's pyrimidine precursor and its distribution in the Sargasso Sea [J]. The ISME journal, 2014, 8(8): 1727-1738.
- [26] GUTOWSKA M A, SHOME B, SUDEK S, et al. Globally important haptophyte algae use exogenous pyrimidine compounds more efficiently than thiamin [J/OL]. mBio, 2017, 8 (5) : e01459-17 [2024-05-31]. <https://doi.org/10.1128/mbio.01459-17>.

## Physiological function of thiaminase I derived from myxobacteria

QI Mengyi<sup>1</sup>, XIA Chengyao<sup>1,2</sup>, JI Yanling<sup>1</sup>, HUANG Yan<sup>1</sup>, LI Zhoukun<sup>1</sup>, YE Xianfeng<sup>1</sup>, CUI Zhongli<sup>1</sup>

1.College of Life Science/Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2.School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China

**Abstract** Three genera of myxobacteria including *Coralloccoccus* sp. EGB, *Myxococcus xanthus* DK1622 and *Cystobacter* sp. 1404 were used to study the physiological function of thiamine I from myxobacteria. The relationship between the pathway of synthesizing thiamine and the growth and development of strain in the genomes of three myxobacteria was identified. The results showed that three myxobacteria had complete pathway of synthesizing thiamine in their genomes, and contained genes related to the recovery of thiamine precursor pyrimidine (4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine, HMP), but no genes related to the recovery of thiamine or its precursor thiazole was found. The presence of TPP-riboswitch at the upstream of the HMP synthase gene *thiC* regulated the transcription level of the *thiC* gene based on the concentration of thiamine in the environment. Mutant CL1006 and Mutant CL1007 were constructed by inserting the *thiC* gene into strain DK1622 and thiaminase I knockout mutant CL1003, respectively. It was found that CL1006 required additional addition of thiamine or HMP to recover growth in thiamine-free medium. The HMP treatment group significantly increased the colony diameter by 9.0% compared to the thiamine-treated group. CL1007 only grew on HMP plates, and the addition of intact thiamine alone did not restore its growth. However, when CcThi1 and thiamine were added together, the growth of CL1007 was restored. It is indicated that myxobacteria do not directly utilize exogenous thiamine, but can utilize pyrimidine precursors produced by decomposing thiamine through thiaminase I.

**Keywords** myxobacteria; thiamine; thiaminase I; *thiC* gene

(责任编辑:葛晓霞)