

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240079



主持人: 缪卫国, 吴少英

脯氨酸亚氨基酸肽酶调控野油菜黄单胞菌的致病力

邢 芸[#], 占昭宏, 吴可建, 魏炳峥, 陶 均^{*}

(海南大学 热带农林学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海南 海口 570228 中国)

摘 要: 为探究脯氨酸亚氨基酸肽酶是否调控野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)的致病力, 首先通过生物信息学分析 *Xcc* 中潜在的脯氨酸亚氨基酸肽酶, 然后在大肠杆菌中表达、纯化这些蛋白, 体外检测其脯氨酸亚氨基酸肽酶活性, 最后在 *Xcc* 中突变及回补这些基因, 通过分析突变及回补菌株的致病力、生长特性、运动力和胞外酶活性, 初步确定脯氨酸亚氨基酸肽酶在调控 *Xcc* 致病力中的作用。结果表明, *Xcc* 编码两个脯氨酸亚氨基酸肽酶(PipA 和 PipB), 突变其中任何一个都导致 *Xcc* 致病力下降。进一步分析发现 *pipA* 和 *pipB* 过表达均导致病原菌运动力增强。此外, *pipA* 过表达提高了 *Xcc* 胞外蛋白酶活性, 但 *pipB* 不具备这种活性。因此, 脯氨酸亚氨基酸肽酶 PipA 和 PipB 可能通过调控 *Xcc* 的运动性, 进而影响病原菌的致病能力, PipA 还可能通过调控胞外蛋白酶活性, 进而影响 *Xcc* 致病力。

关键词: 野油菜黄单胞菌; 脯氨酸亚氨基酸肽酶; 致病力; 运动性

中图分类号: S432.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2025)03-0406-09

邢芸, 占昭宏, 吴可建, 等. 脯氨酸亚氨基酸肽酶调控野油菜黄单胞菌的致病力 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(3): 406-414. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240079

野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)是十字花科黑腐病的病原菌, 通过水孔或气孔进入十字花科植物维管束, 并在此定殖、扩散^[1]。病原菌生长及侵染受各类蛋白质合成和降解的调控, 蛋白酶是调控蛋白降解和激活蛋白活性的重要因素^[2]。肽酶在水解肽键降解蛋白质中起到非常重要的作用, 根据其催化的反应, 肽酶可以分为内肽酶、氨基肽酶和羧基肽酶^[3]。脯氨酸亚氨基酸肽酶(Proline Imino-Peptidase, PIPase)负责从多肽或蛋白质中去除 N 端脯氨酸残基^[3-4], 也可以去除 N 端 L-丙氨酸或 D-丙氨酸, 但效率较低^[5]。在食品工业中, PIPase 用于去除奶酪加工中的肽和含脯氨酸的二肽^[6-8]。在 *Xcc* 中, PipA 具有 PIPase 活性, 是其致病力和运动能力的重要调节因子^[9]。PipA 在许多植物病原菌中高度保守, 暗示其可能是这些病原菌致病力的重要调控因子, 但 *Xcc* 中是否还有其他蛋白也具有 PIPase 活性并不清楚。

本研究通过体外酶活分析鉴定了 *Xcc* 中另一个 PIPase 蛋白 XC3394(PipB), 比较了 PipA 和 PipB 对 *Xcc* 致病力的调控能力, 发现 PipA 和 PipB 均正调控 *Xcc* 的致病力, 负调控 *Xcc* 的运动性; PipA 调控病原菌胞外蛋白酶活性, 但 PipB 没有此调控功能。此外, PipB 不能互补 PipA 的功能, 2 个 PIPase 在 *Xcc* 中的调控通路有差异, 并不是功能冗余的。该研究为解析 PIPase 在 *Xcc* 中的作用机制奠定了基础, 为更加全面认识病原菌与宿主互作提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 菌株、植物及质粒 本实验所使用的菌株和质粒如表 1 所示。

1.2 引物 实验所用引物详见表 2。

1.3 PipA 和 PipB 的表达与纯化 以 *Xcc* 8004 基因组为模板, 以 *pipA*qef/*pipA*qer、*pipB*qef/*pipB*qer 为引物, 扩增 *pipA* 和 *pipB* 基因片段,

收稿日期: 2024-05-08

修回日期: 2024-05-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260647)

[#]第一作者: 邢芸(1999—), 女, 海南大学热带作物学院 2021 级硕士研究生。E-mail: xy13115609818@126.com

^{*}通信作者: 陶均(1976—), 男, 博士, 教授。研究方向: 植物与病原微生物互作。E-mail: taoj@hainanu.edu.cn

表 1 菌株和质粒来源
Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

名称Name	相关特性Correlation characteristic	来源Source
Strains		
<i>Xcc</i> 8004	A wild-type <i>Xcc</i> strain, a laboratory strain with spontaneous rifampicin-resistance	Lab collections
DH5 α	Genetically engineered recipient bacteria.	Biomed
BL21(DE3)	Bacteria for protein expression	Biomed
$\Delta pipA$	The <i>pipA</i> deletion mutant of <i>WT</i>	This study
$\Delta pipB$	The <i>pipB</i> deletion mutant of <i>WT</i>	This study
$\Delta pipA/\Delta pipB$	The <i>pipA</i> and <i>pipB</i> deletion mutant of <i>WT</i>	This study
<i>pipA</i> / $\Delta pipA$	The <i>pipA</i> complementation strain of $\Delta pipA$	This study
<i>pipB</i> / $\Delta pipB$	The <i>pipB</i> complementation strain of $\Delta pipB$	This study
<i>pipA</i> / $\Delta pipB$	The <i>pipA</i> complementation strain of $\Delta pipB$	This study
<i>pipB</i> / $\Delta pipA$	The <i>pipB</i> complementation strain of $\Delta pipA$	This study
<i>pipA</i> / $\Delta pipA$ / $\Delta pipB$	The <i>pipA</i> complementation strain of $\Delta pipA/\Delta pipB$	This study
<i>pipB</i> / $\Delta pipA$ / $\Delta pipB$	The <i>pipB</i> complementation strain of $\Delta pipA/\Delta pipB$	This study
Plasmids		
pK18mobSacB	<i>Xanthomonas</i> suicide vector, Kan ^R	[10]
pHMI	Broad host vector, Sp ^R	[11]
pQE80L	Protein expression vector, Amp ^R	Qiagen
pK18- <i>pipA</i>	pK18mobSacB based plasmid for <i>pipA</i> deletion	This study
pK18- <i>pipB</i>	pK18mobSacB based plasmid for <i>pipB</i> deletion	This study
pHMI- <i>pipA</i>	pHMI based plasmid for <i>pipA</i> expression	This study
pHMI- <i>pipB</i>	pHMI based plasmid for <i>pipB</i> expression	This study
pQE80L- <i>pipA</i>	pQE80L based plasmid for <i>pipA</i> expression in <i>E. coli</i>	This study
pQE80L- <i>pipB</i>	pQE80L based plasmid for <i>pipB</i> expression in <i>E. coli</i>	This study

*Bam*HI/*Hind*III 酶切后连接到相同酶切的 pQE80L 载体上, 测序验证正确后获得 His-PipA、His-PipB 融合表达载体 pQE80L-*pipA*、pQE80L-*pipB*, 然后将融合表达载体转化 BL21(DE3)细胞^[12]。菌株 37 ℃ 过夜培养后, 以 1 : 100 体积比转接到 500 mL 新鲜溶菌肉汤 (Luria Bertani, LB) 液体培养基继续培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6 ~ 0.8 后, 加入 250 μ L 1 mol·L⁻¹ 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 并于 25 ℃、90 r·min⁻¹ 条件下诱导培养 5 ~ 6 h。离心收集菌体后进行超声破碎(超声功率比 40%、超声 5 s、间隙 5 s、总时间 10 min), 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳观察蛋白诱导表达情况。利用 His 标签蛋白纯化蛋白原理, 采用 His-tag 纯化磁珠 (BeaverBeads®IDA-Nikel Kit) 与上清进行共孵育, 经过低浓度咪唑 (50 mmol·L⁻¹) 洗杂再用高

浓度咪唑 (500 mmol·L⁻¹) 洗脱蛋白, 最后用蛋白浓缩柱 (Millipore) 将洗脱蛋白进行浓缩并置换至 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液中, 按照 SDS-PAGE 电泳结果标定一致蛋白量, 取相同蛋白量的 2 μ L 进行酶活力验证实验。

1.4 PipA 和 PipB 的肽酶活性检测 以对硝基苯胺 (p-nitroanilide, pNA) 作为底物测定 PipA 和 PipB 的肽酶活性。以 MBP 蛋白作为空白对照, 以无蛋白体系为阴性对照。使用分光光度计在 405 nm 处测量吸光值。反应体系如下: 1 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0)、1 mmol·L⁻¹ pNA。混合体系加入 96 孔板中, 在酶标仪上 37 ℃ 反应 45 min, 每 5 min 测量 1 次吸光值^[12]。

1.5 缺失突变体和互补菌株的构建 构建缺失突变体: 使用 *pipA* 和 *pipB* deletion 引物以 *Xcc* 8004 基因组为模板扩增 *pipA* 和 *pipB* 基因上下游片段

表 2 本研究所用引物
Tab. 2 Primers used in this study

引物Primer	序列Sequence(5'-3')	用途Usages
<i>pipAddFF</i>	TCTGA <u>AAGCTT</u> GCTGCTGGAGTTGTAGGAAG	<i>pipA</i> deletion
<i>pipAddFR</i>	TCTGGGATCCGATGCGGTACCAGGTGCGAT	
<i>pipAddRF</i>	ACGTGGATCCAACTTCCTCGACGACCACAG	
<i>pipAddRR</i>	ACTCGAATTCAACGTAGTGCGCAGCACTAC	
<i>pipBddFF</i>	TCTGA <u>AAGCTT</u> GAGCGGTTTCGATCTGATCGC	<i>pipB</i> deletion
<i>pipBddFR</i>	TCTGGGATCCCATGCGTCGGTCTGCGGGA	
<i>pipBddRF</i>	ACGTGGATCCGACAGCTTCGCGCTGAGAAGG	
<i>pipBddRR</i>	ACTCGAATTCAATCGGCTGCTGCAGGCTTTG	
<i>pipAhmF</i>	ACCATGATTACGCCA <u>AGCTT</u> GATGCGCACGCTCTATCCCGA	Δ <i>pipA</i> complementation
<i>pipAhmR</i>	GTAGAATTCTAGAGGGTACCAGACGGCACGATTGGCCAGCG	
<i>pipBhmF</i>	ACCATGATTACGCCA <u>AGCTT</u> GATGCGCACGCTCTATCCCGA	Δ <i>pipB</i> complementation
<i>pipBhmR</i>	GTAGAATTCTAGAGGGTACCAGGCGAAGCTGTCGGTCGCAC	
<i>pipAqeF</i>	ACGTGGATCCATGCAGTGCACCGAGGGTTTC	PipA expression
<i>pipAqeR</i>	ACGCAAGCTTAGACGGCACGATTGGCCAGCG	
<i>pipBqeF</i>	ACGTGGATCCAATGCGCACGCTCTATCCCGAG	PipB expression
<i>pipBqeR</i>	ACGCAAGCTTAGGCGAAGCTGTCGGTCGCAC	

注: 下划线表示酶切位点。
Note: The enzyme cutting sites are underlined.

Hind III/*Bam*H I, *Bam*H I/*Eco*R I 酶切上下游片段, 使用 T4 连接酶连接到 *Hind* III/*Eco*R I 酶切的 pK18*mobSacB* 载体中, 获得敲除载体 pK18-*pipA* 和 pK18-*pipB*。通过三亲接合法将重组载体转化至 *Xcc* 8004 中, 经过两步同源重组方法获得突变体菌株 Δ *pipA*、 Δ *pipB*^[13]。

基因互补: 以 *Xcc* 8004 基因组为模板, 扩增 *pipA*、*pipB* 基因片段, *Hind* III/*Eco*R I 酶切后克隆到相同酶切的广宿主载体 pHM I, 获得互补载体 pHM I -*pipA*、pHM I -*pipB*。三亲接合杂交法进行回补和交叉回补, 获得相关菌株(*WT*、 Δ *pipA*、 Δ *pipB*、 Δ *pipA*/ Δ *pipB*、*pipA*/ Δ *pipA*、*pipB*/ Δ *pipB*、*pipA*/ Δ *pipB*、*pipB*/ Δ *pipA*、*pipA*/ Δ *pipA*/ Δ *pipB*、*pipB*/ Δ *pipA*/ Δ *pipB*)^[13]。

1.6 *Xcc* 致病力分析 待测菌株活化于 NRSP (NYG: 1% Tryptone; 1% Glycerol; 0.5% Yeast-extract+Rif+Sp) 平板培养基中 28 ℃, 使用灭菌 ddH₂O 将菌体清洗下来, 将 OD₆₀₀ 值调至 1.0, 剪叶法接种 45 d 左右生长一致、长势良好的‘京丰一号’甘蓝, 每种菌株至少接种 10 片叶片, 从 0 d 开始, 每 5 d 进行一次观测, 待病斑长度有显著差异

时对其进行拍照并测量病斑长度^[14]。

1.7 *Xcc* 生长表型测定 将相关待测菌株在 NRSP 固体培养基上活化, 并接种于 NYG 液体培养基中, 28 ℃, 160 r·min⁻¹ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值约为 1.0, 将菌液进行 10⁻¹~10⁻⁴ 梯度稀释, 点接在 NRSP 培养基上, 48 h 后观察其生长状况; 将菌液以 1:100(体积比)转接至新鲜的 NRSP 液体培养基中, 间隔一定时间测量菌液浓度, 绘制细菌生长曲线。

1.8 胞外纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶活性检测 在 NYG 培养基中, 以 28 ℃ 和 180 r·min⁻¹ 的条件培养待测菌株, 直至 OD₆₀₀ 约为 1.0, 用无菌 ddH₂O 清洗 2 次, 重悬于 ddH₂O 中, 使 OD₆₀₀ 值为 1.0。取 2 μL 不同待测菌液分别接种到含有 0.5% 羧甲基纤维素、0.1% 可溶性淀粉或 2% 脱脂奶粉的 NRSP 固体培养基上。28 ℃ 倒置培养至菌圈直径为 1 cm 左右。分别染色: 纤维素平板: 0.1% 刚果红染色 30 min, 加入 1 mol·L⁻¹ NaCl 于水平摇床 60 r·min⁻¹ 清洗 1~2 min, 测量菌圈直径及水解圈直径(cm)。淀粉平板: 1:100 的 I₂/KI (0.08 mol·L⁻¹ I₂, 3.2 mol·L⁻¹ KI) 染色 1~10 min, 测量菌圈直径

和水解圈直径(cm)。脱脂奶粉平板: 直接观察, 测量菌圈直径和水解圈直径(cm)。水解能力以水解圈直径与菌圈直径之差表示(cm)^[15]。

1.9 运动性检测 在 NYG 培养基中, 以 28 ℃ 和 180r·min⁻¹ 的条件培养待测菌株, 直至 OD₆₀₀ 值约为 1.0, 用无菌 ddH₂O 清洗 2 次, 重悬于 ddH₂O 中, 使 OD₆₀₀ 值为 1.0。无菌牙签蘸取菌液 5 s 后, 垂直接种于游动培养基 (0.03% Tryptone, 0.03% Yeast-extract, 0.25% Agar) 中。28 ℃ 正置培养至可观察到显著游动圈时, 测量菌体游动圈的直径 (cm)。蠕动性: 取上述稀释菌液 2 μL 等间距点接到蠕动性培养基 (1% Tryptone, 0.5% Yeast-extract,

2% Glucose, 0.6% Agar) 上, 28 ℃ 正置培养至可观察到显著蠕动圈时, 测量菌圈的直径 (cm)^[16]。

2 结果与分析

2.1 PipA 和 PipB 均具有脯氨酸亚氨基酸酶 (PIPase) 活性 虽然 PipA 已被证实为 PIPase, 但在 *Xcc* 中是否还有相同活性的蛋白并不清楚。为此, 通过同源搜索发现, *Xcc* 中还有 1 个与 PipA 同源的蛋白 (XC3394), 但其具体功能还未被鉴定。对二者进行了序列比对, 其核酸序列相似性为 44.72%、氨基酸序列相似性为 16.46% (图 1-A)。为分析 XC3394 是否具有 PIPase 活

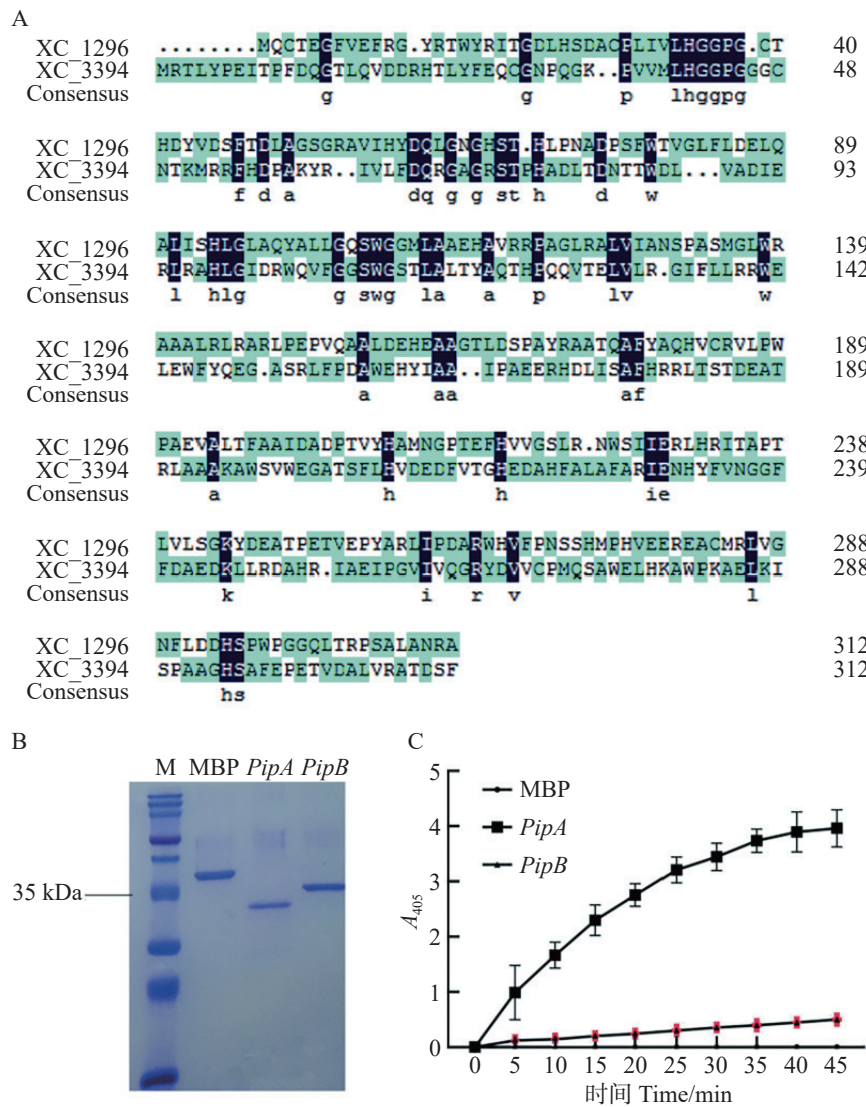


图 1 PipA 和 PipB 的 PIPase 活性分析

Fig. 1 The PIPase activities of PipA and PipB

A: PipA 与 PipB 的序列比对。B: SDS-PAGE 检测 PipA 和 XC3394 (PipB) 蛋白的浓度和纯度。M: 蛋白分子量 Marker; C: PipA 和 PipB 分解 pNA 的能力。

A: The sequence alignment between PipA and PipB. B: Analysis of PipA and PipB proteins by SDS-PAGE. M: Protein Marker. C: The hydrolysis abilities of pNA by PipA and PipB.

性,本研究在大肠杆菌中表达和纯化了 PipA 和 XC3394(图 1-B),利用 pNA 为底物测定 PIPase 活性。如图 1-C 所示, PipA 和 XC3394 均能分解 p-NA。虽然 XC3394 分解 p-NA 的能力低于 PipA,但其仍具有 PIPase 活性。因此,将 XC3394 命名为 PipB。

2.2 *pipA* 和 *pipB* 突变导致 *Xcc* 致病力降低 虽然已有研究表明 PipA 调控 *Xcc* 致病性^[7],但 PipB 的功能并不清楚。为分析 PipB 是否调控 *Xcc* 致病力,构建了 *pipA* 和 *pipB* 的突变体及互补菌株 (WT、 $\Delta pipA$ 、 $\Delta pipB$ 、 $\Delta pipA/\Delta pipB$ 、*pipA*/

$\Delta pipA$ 、*pipB* $\Delta pipB$ 、*pipA*/ $\Delta pipB$ 、*pipB*/ $\Delta pipA$ 、*pipA*/ $\Delta pipA/\Delta pipB$ 、*pipB*/ $\Delta pipA/\Delta pipB$),通过剪叶法接种检测了这些菌株的致病力。结果显示(图 2),与野生型相比,*pipA* 突变菌株致病力极显著降低,互补 *pipA* 后,部分恢复了致病力;*pipB* 突变后致病性也显著降低;互补 *pipB* 恢复了突变体的致病力。互补 *pipA* 能够恢复 *pipB* 及 *pipA/pipB* 突变体的致病力,但互补 *pipB* 不能恢复 *pipA* 及 *pipA/pipB* 突变体的致病力。以上结果说明, PipA 和 PipB 正调控 *Xcc* 致病力,但 PipA 和 PipB 功能不冗余,都调控 *Xcc* 的致病性。

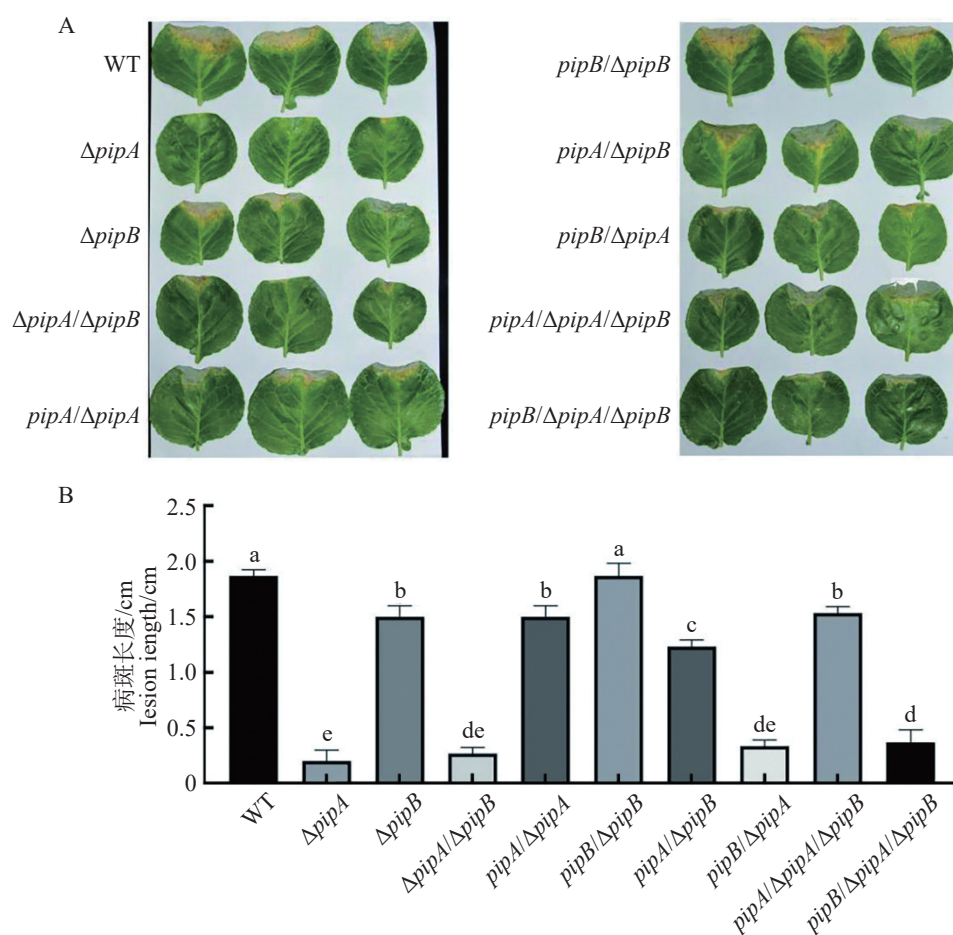


图 2 PipA 和 PipB 调控 *Xcc* 致病性

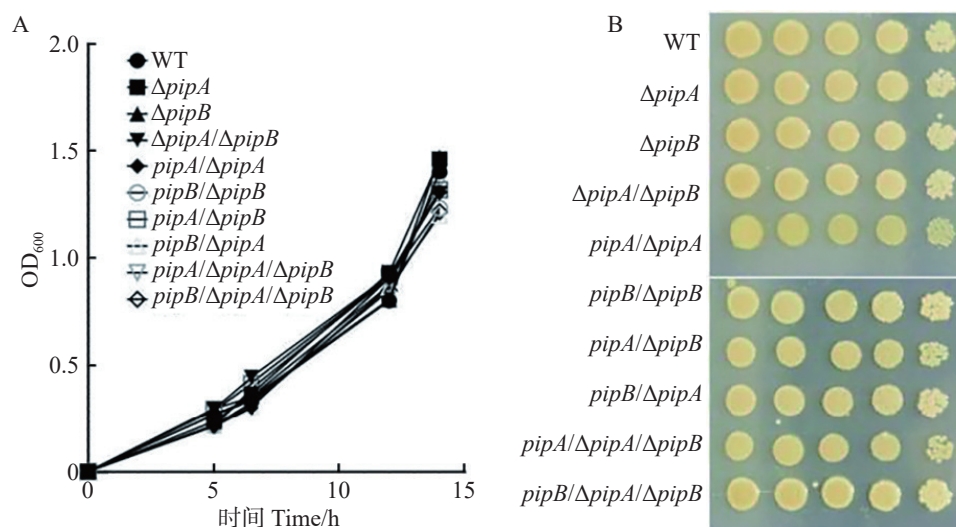
Fig. 2 *Xcc* virulence are regulated by PipA and PipB

A: 接种 14 d 后甘蓝叶片的病斑表型; B: 感染叶的病斑长度。数据用平均数±标准差表示。

A: The infected leaves after 14-day inoculation by *Xcc* strains; B: Lesion length of the infected leaves. Data shown as means ± standard derivation (SD).

2.3 *pipA* 和 *pipB* 不调控 *Xcc* 的生长 为分析 PipA 和 PipB 调控 *Xcc* 致病性是否与细菌生长相关,比较了 *pipA* 和 *pipB* 的突变体及互补菌株 (WT、 $\Delta pipA$ 、 $\Delta pipB$ 、 $\Delta pipA/\Delta pipB$ 、*pipA*/ $\Delta pipA$ 、*pipB*/ $\Delta pipB$ 、*pipA*/ $\Delta pipB$ 、*pipB*/ $\Delta pipA$ 、*pipA*/ $\Delta pipA/\Delta pipB$ 、*pipB*/ $\Delta pipA/\Delta pipB$) 的生长速度。如图 3 所示,无论是在液体还是固体培养基中,所有菌株生长速度都没有差异。因此, PipA 和 PipB 可能不通过调控病原菌的生长来影响其致病力。

2.4 *pipA* 和 *pipB* 过表达抑制 *Xcc* 的运动能力 病

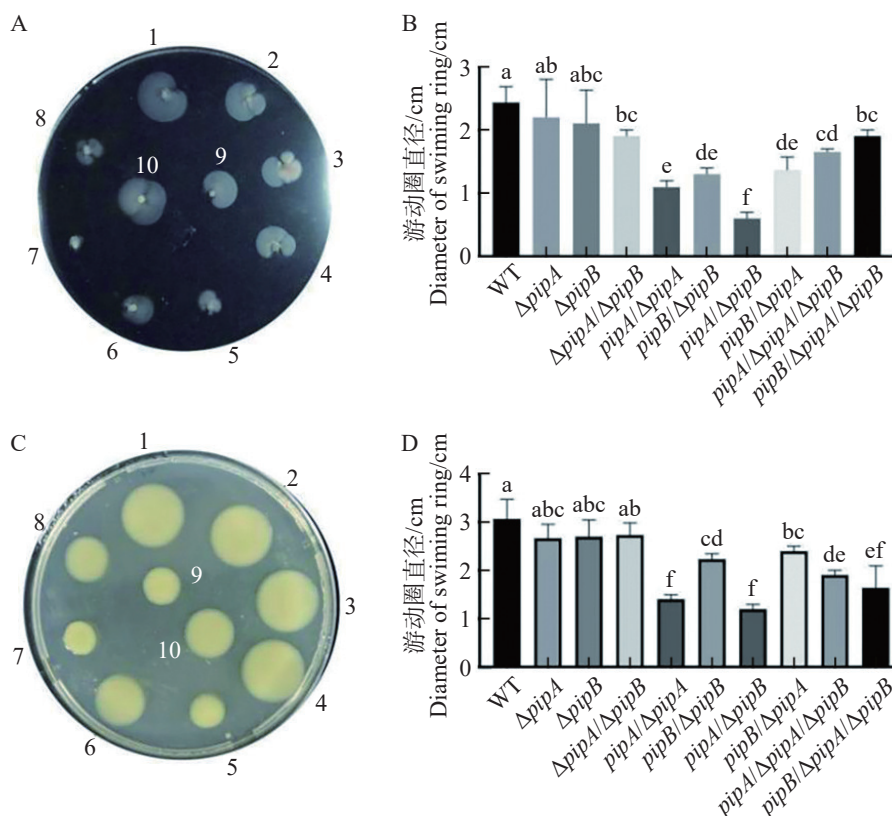
图3 PipA 和 PipB 对 *Xcc* 生长的影响Fig. 3 The effects of PipA and PipB on *Xcc* growth

A: 待测菌株在液体培养基中的生长曲线; B: 待测菌株在固体培养基上的生长表型。

A: Growth curves of the indicated bacteria in NRSP liquid media; B: The growth phenotype of the indicated bacteria on NRSP solid media.

原菌的运动性与其致病性相关, 运动性在致病初期具有重要作用。细菌普遍的运动方式是游动和蠕动, 均调控病原菌的致病力^[18-19]。为此, 本研究检测了 *pipA* 和 *pipB* 突变对 *Xcc* 运动能力的影

响。细菌游动性和蠕动性实验发现 *pipA* 和 *pipB* 突变并不显著影响病原菌的运动性, 但 *pipA* 和 *pipB* 回补菌株的运动性显著低于野生型及突变体菌株(图4)。该结果说明 *pipA* 和 *pipB* 表达量升

图4 PipA 和 PipB 的过表达对 *Xcc* 运动能力的影响Fig. 4 The effects of *pipA* and *pipB* overexpression on *Xcc* motility

A: 游动性表型; B: 游动直径; C: 蠕动性表型; D: 蠕动直径。

A: Swimming phenotype; B: Swimming diameters; C: Swarming phenotype; D: Swarming diameters.

高会显著抑制病原菌的运动能力。因此,在病原菌侵染植物过程中,*pipA* 和 *pipB* 表达量升高可能导致病原菌运动能力降低,进而促进病原菌在维管束中的定殖。

2.5 *pipA* 过表达影响胞外蛋白酶的活性 植物细胞壁是其抵抗病原菌侵染的一道屏障,病原菌

分泌的多种细胞壁降解酶促进其入侵^[20]。通过比较 PIPase 相关菌株各种胞外酶活性发现,*pipA* 过表达使胞外蛋白酶活性增强,但不影响胞外纤维素酶和淀粉酶的变化,*pipB* 突变及过表达均不影响 *Xcc* 胞外酶活性(图 5)。因此, PipA 可能通过调控胞外蛋白酶活性或分泌影响 *Xcc* 的致病力。

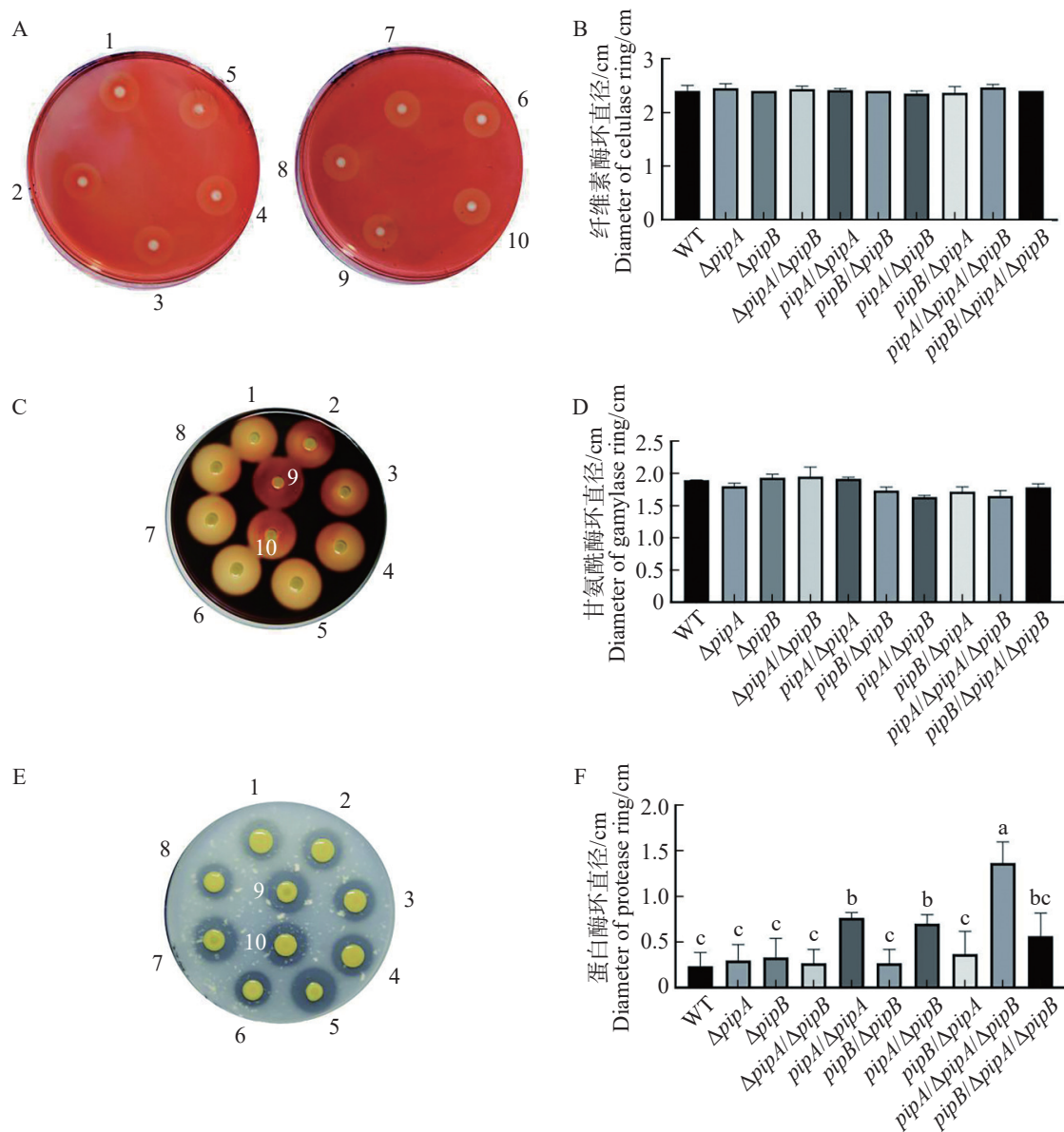


图 5 PipA 和 PipB 对 *Xcc* 胞外酶活性的调控作用

Fig. 5 The activities of extracellular enzymes are regulated by PipA and PipB

平板法检测胞外纤维素酶(A)、淀粉酶(C)和蛋白酶(E)活性;B、D和F为A、C和E图的消化圈直径的统计结果;水解能力以水解圈直径与菌圈直径之差表示(cm)。

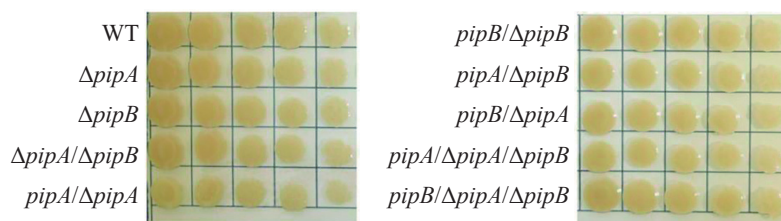
The activities of cellulase (A), amylase (C) and protease (E) analyzed by plate assays; The digestive diameters were also shown in B, D and F for cellulase, amylase and protease activities, respectively. The hydrolysis activity was shown as the difference between the diameter of the hydrolysis circle and the diameter of the colony (cm).

2.6 *pipA* 和 *pipB* 不影响胞外多糖的产生 胞外多糖 (Extracellular polysaccharide, EPS)可抑制防御反应来增强寄主植物的敏感性^[21]。此外, EPS 还

可以包裹细菌以阻止宿主识别并使其在宿主组织中高效定殖^[22]。为探究 PipA 和 PipB 是否参与胞外多糖的形成,通过将待测菌株接种在含有 2% 葡

葡萄糖的 NYG 固体培养基上观察其菌落形态, 以分析其 FPS 合成能力。结果显示(图 6), 所有菌株的

菌落形态与野生型相比几乎没有差别。因此, PipA 和 PipB 不调控胞外多糖的形成。



待测菌株接种于含 2% 葡萄糖培养基上的生长表型。

Growth phenotype of the tested strains inoculated on NRSP media supplemented with 2% glucose.

图 6 PipA 和 PipB 对 *Xcc* 胞外多糖形成的影响

Fig. 6 The effects of PipA and PipB on *Xcc* exopolysaccharide synthesis

3 讨论

本研究旨在探究 PipA 和 PipB 是否具有 PIPase 活性, 是否调控 *Xcc* 致病力以及是否存在功能冗余。体外酶活实验证实, PipB 同 PipA 一样具有 PIPase 活性, 暗示这 2 个 PIPase 可能存在功能冗余或特异性。已知 PIPase 在调控细菌的运动性、胞外酶合成等方面发挥了重要作用^[9]。例如, 在 *Xcc* 中, *pipA* 基因表达受到上游群体感应调节因子 *XccR* 诱导, 是 *Xcc* 致病力的重要调节因子, 可抑制植物水杨酸信号通路, 进而抑制植物免疫反应, 促进病原菌侵染^[9, 23], 但具体调控机制还不清楚。本研究发现, 除 PipA 外, PipB 同样是 *Xcc* 致病力的重要调控因子, 表明 2 个 PIPase 均在 *Xcc* 与植物互动中起着非常重要的作用。

为探究 PipA 和 PipB 通过何种机制调控 *Xcc* 的致病力, 本研究从细菌的生长、胞外酶活性和运动性等方面进行了研究。*pipA* 和 *pipB* 突变和过表达对细菌生长、胞外纤维素酶、胞外淀粉酶活性和胞外多糖的产生均无显著影响, 但对运动性有一定的影响, 暗示 PIPase 可能通过调节 *Xcc* 运动性, 进而影响其致病力。除运动性外, *pipA* 的过表达还影响胞外蛋白酶活性。此外, PipA 对运动性、蛋白酶活的影响远强于 *pipB*。因此, PipA 可能是 *Xcc* 主要的 PIPase, 在其致病力调控中起到主要作用, 而 PipB 可能作为辅助性 PIPase。但是交叉互补实验发现 *pipB* 并不能互补 *pipA* 突变导致的功能变化, 其单独突变也能显著降低病原菌的致病力。以上结果表明 PipA 和 PipB 功能并不冗余, 可通过调控不同致病相关途径来调控病原菌的致病力, 但 PipA 和 PipB 调控 *Xcc* 致病力的具体机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] VICENTE J G, CONWAY J, ROBERTS S J, et al. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars[J]. *Phytopathology*, 2001, 91(5): 492 – 499.
- [2] 朱镜璇. 分子动力学模拟结合深度学习探究氨基酸突变或配体结合对酶活性的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [3] KAMARUDDIN S, AHMAD REDZUAN R, MINOR N, et al. Biochemical characterisation and structure determination of a novel cold-active proline iminopeptidase from the psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12[J]. *Catalysts*, 2022, 12(7): 722.
- [4] KUERMAN M, WANG R, ZHOU Y, et al. Metagenomic insights into bacterial communities and functional genes associated with texture characteristics of Kazakh artisanal fermented milk *Ayran* in Xinjiang, China[J]. *Food Research International*, 2023, 164: 112414.
- [5] INTAD S. Biochemical activities of actinopain peptidases from actinomyces bacteria[D]. Hong Kong, China: The University of Hong Kong, 2023.
- [6] KAMARINOU C S, KIOUSI D E, REPANAS P, et al. Dissecting the genetic basis of the technological, functional, and safety characteristics of *Lactocaseibacillus paracasei* SRX10[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(1): 93.
- [7] YAMAMOTO Y, USUKI H, IWABUCHI M, et al. Prolyl aminopeptidase from *Streptomyces thermoluteus* subsp. *fuscus* strain NBRC14270 and synthesis of proline-containing peptides by its S144C variant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(18): 6180 – 6185.
- [8] YAMAMOTO Y, USUKI H, KUMAGAI Y, et al. Synthesis of prolyl-hydroxyproline using prolyl aminopeptidase from *Streptomyces aureofaciens* TH-3[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(8): 1560 – 1564.
- [9] ZHANG L L, JIA Y T, WANG L, et al. A proline iminopeptidase gene upregulated in *planta* by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(1): 121 – 136.
- [10] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the

- Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69 – 73.
- [11] HUYNH T V, DAHLBECK D, STASKAWICZ B J. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity[J]. *Science*, 1989, 245(4924): 1374 – 1377.
- [12] SUDO T, SHINOHARA K, DOHMAE N, et al. Isolation and characterization of the gene encoding an aminopeptidase involved in the selective toxicity of ascamycin toward *Xanthomonas campestris* pv. *citri*[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 319(1): 99 – 102.
- [13] BORN A, SOETBEER J, HENEN M A, et al. Ligand-specific conformational change drives interdomain allostery in Pin1[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 4546.
- [14] 郭艺. *Xcc* *suxB* 应答蔗糖信号调控机制的初步研究[D]. 海口: 海南大学, 2020. doi:10.27073/d.cnki.ghadu.2020.001152
- [15] 于燕燕, 夏影影, 吴可建, 等. XppI 调控水稻白叶枯病菌致病力的潜在机制[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(6): 642 – 650.
- [16] KOYANAGI T, HARA A, KOBAYASHI K, et al. *Thermococcus* sp. KS-1 PPIase as a fusion partner improving soluble production of aromatic amino acid decarboxylase[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 178.
- [17] KAN J H, AN L, WU Y, et al. A dual role for proline iminopeptidase in the regulation of bacterial motility and host immunity[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(8): 2011 – 2024.
- [18] WADHWA N, BERG H C. Bacterial motility: machinery and mechanisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(3): 161 – 173.
- [19] MOREIRA C G, WEINSHENKER D, SPERANDIO V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence *in vitro* and *in vivo*[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(3): 914 – 926.
- [20] 陈小云. 柑橘溃疡病菌致病相关基因生物学功能分析及 XAC1992 互作蛋白的初步筛选[D]. 广州: 华南农业大学, 2019. doi:10.27152/d.cnki.ghanu.2019.001210
- [21] YUN M H, TORRES P S, EL OIRDI M, et al. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(1): 178 – 187.
- [22] ALVAREZ A M. Black rot of crucifers[M]//SLUSARENKO A J, FRASER R S S, LOON L C. Mechanisms of resistance to plant diseases. Dordrecht: Springer, 2000: 21–52.
- [23] GHIFARI A S, TEIXEIRA P F, KMIEC B, et al. A mitochondrial prolyl aminopeptidase PAP2 releases N-terminal proline and regulates proline homeostasis during stress response[J]. *The Plant Journal*, 2020, 104(5): 1182 – 1194.

Proline imino-peptidases regulate the virulence of *Xanthomonas campestris*

XING Yun[#], ZHAN Zhaohong, WU Kejian, WEI Bingzheng, TAO Jun^{*}

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources; School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: To investigate if the proline aminopeptidases (PIPases) regulate the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), we first analyzed the putative PIPases in *Xcc* by bioinformatics; then expressed and purified these proteins, and detected their PIPase activities *in vitro*; finally studied the roles of these genes in *Xcc* virulence by analyzing the infective ability, growth rates, motility, and extracellular enzyme activities of the mutants and the corresponding complementary strains of these mutants. The results indicate that *Xcc* encodes two PIPases, PipA and PipB. Mutation of either gene led to a decrease in *Xcc* virulence. Overexpression of *pipA* or *pipB* resulted in enhanced motility. In addition, *pipA* overexpression increased the activities of the extracellular proteases in *Xcc*, but *pipB* did not have this activity. Therefore, PipA and PipB may affect *Xcc* virulence by regulating its motility, and PipA may also regulate extracellular protease activity to affect *Xcc* infection.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; PIPase; Virulence; Motility

(责任编辑:潘学峰)