

# 沼泽红假单胞菌砷代谢基因多样性及进化分析

郭少伟<sup>1</sup>, 吕常江<sup>1,2</sup>, 张意<sup>1</sup>, 赵春贵<sup>1</sup>

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 浙江大学 化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027)

**摘要:** 对已公布全基因组的沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)砷代谢基因进行解析,探求其砷代谢机制及进化关系.已公布全基因组的 7 个菌株中均含有砷抗性(ars)基因簇,主要包括 arsR,arsC,arsM,arsB,acr3p,arsH,但不同菌株间的 arsR 同源性可以有较大差异,有 6 个菌株同时含有 I 和 II 两类 arsC,5 个菌株含有 arsM,arsM 同源性也有较大差异.结果表明:*R. palustris* 砷代谢机制的主体为细胞质 As(V)还原和 As(III)甲基化,菌株不同,砷代谢基因呈现明显差异和多样性.

**关键词:** 沼泽红假单胞菌; 砷抗性; 基因簇; 生物信息学

**中图分类号:** Q 811.4

**文献标志码:** A

微生物在与砷的长期相互作用过程中进化出各种各样的砷代谢机制,在自身解毒过程中伴随着砷价态及形态的转化,对砷的地球化学循环起到了重要的影响<sup>[1]</sup>.近年来,微生物砷代谢研究发展迅速,先后报道了 7 种砷代谢机制<sup>[2]</sup>,包括细胞质 As(V)还原、呼吸性 As(V)还原、化能自养 As(III)氧化、化能异养型的 As(III)氧化、As(III)甲基化、不产氧光合作用偶联的 As(III)氧化,以及 As(V)代替磷供细菌生长代谢,但研究证据并不支持最后一种砷代谢机制<sup>[3]</sup>.2004 年,F. W. Larimer 等<sup>[4]</sup>首次测定了沼泽红假单胞菌(*R. palustris*)<sup>[5]</sup>的 CGA009 菌株基因组序列;2006 年,Qin 等<sup>[6]</sup>从该菌株中克隆了转甲基酶基因(arsM),首次提供了细菌砷甲基化机制的实验证据.前期研究结果表明:*R. palustris* 对砷具有较强的抗性,能够在厌氧条件下将胞内的 As(V)还原为 As(III)<sup>[7]</sup>.对已公布全基因组 APB 的砷代谢基因簇结构进行分析,*R. palustris* 砷代谢基因簇具有更为复杂的“多操纵子”结构<sup>[8]</sup>.但关于不同砷抗性(ars)操纵子中砷代谢基因之间如何表达和调控,尚缺乏系统而深入的研究.本文以基因组砷代谢基因簇相关基因序列为基础,利用生物信息学手段,系统分析 *R. palustris* 砷代谢基因簇及砷代谢相关基因 arsR,arsM 和 ArsC 蛋白的系统进化关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 基因组序列的获取和一般特征

分别从 LPSN(<http://www.bacterio.cict.fr/>),IJSEM(<http://ijs.sgmjournals.org/>),ATCC(<http://www.atcc.org/>)和 DSMZ(<http://old.dsmz.de/index.htm>)等网站获取目前已报道的 *R. palustris* 菌株.然后在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)及 MicrobesOnline(<http://microbesonline.org/>)数据库以种名为关键词获取全基因组序列,描述 *R. palustris* 基因组的一般特征.

### 1.2 砷代谢相关基因及定位

在获取的全基因组序列中搜索目标基因,以报道的砷代谢相关基因为参照<sup>[1-2, 9-11]</sup>,通过 GenBank 注释获取相关基因的定位及功能,利用 BLAST 工具获取同源序列及基因注释;然后,结合获取基因序

**收稿日期:** 2013-04-28

**通信作者:** 赵春贵(1964-),男,教授,主要从事微生物学、生物化学与分子生物学、化学生物学等的研究. E-mail: chungui@hqu.edu.cn.

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(31070054, 31270106);福建省自然科学基金资助项目(2010J01209, 2012J01136)

列的特征分析,确认基因功能注释的准确性.同时,利用 EMBL(http://www.embl.org/)与 DDBJ(http://www.ddbj.nig.ac.jp/)数据库,对获取的基因信息进一步确定.

### 1.3 系统发育树的构建

用 Clustal X 2.0 软件对目的基因的核酸序列或蛋白的氨基酸序列比对分析,在 Mega 5.0 软件上用邻接法(neighbor joining, NJ)进行聚类分析.基于细菌全基因组序列的聚类分析参照文献[12]的方法进行,利用 Mauve 2.3.1 软件获取基因组进化距离矩阵(genome content distance matrix),并在 Mega 5.0 软件上采用邻接法进行分析.

## 2 结果和分析

### 2.1 R. palustris 基因组的多样性

从数据库中共收集到 7 株 R. palustris 的全基因组序列,其基因组一般特征如表 1 所示.从表 1 可知:7 个菌株均含有 1 条染色体,GC 摩尔分数为 64%~66%,仅 CGA009 含有 1 个质粒;BisB5 染色体相对较小,约为 4.89 Mb,TIE-1 染色体相对较大,约为 5.74 Mb,其他 5 菌株染色体大小相近,约为 5.5 Mb;DX-1 含有 105 个假基因,远远高于其他菌株.此外,7 个菌株含有的 rRNA 操纵元,rRNA 及 tRNA 等数量上也存在一定的差异,CGA009 砷代谢基因簇大小约为 8.1 kb,明显高于其他菌株.结果表明:R. palustris 基因组特征上呈现出多样性,R. palustris 不同菌株具有高度异质化和多样化.

表 1 R. palustris 基因组一般特征

Tab.1 General features of the genome of R. palustris

特征	菌株						
	CGA009	HaA2	BisB18	BisA53	BisB5	DX-1	TIE-1
染色体数目	1	1	1	1	1	1	1
质粒数目	1	0	0	0	0	0	0
基因组大小/kb	5 459.2	5 331.7	5 513.8	5 505.5	4 892.7	5 404.1	5 744.0
GC 摩尔分数/%	65.1	66.0	65.0	64.4	64.8	65.4	64.9
基因数目	4 898	4 772	5 016	4 972	4 492	5 082	5 382
蛋白数目	4 820	4 683	4 886	4 878	4 397	4 917	5 246
假基因数目	18	30	58	36	21	105	74
rRNA 操纵元	2	1	2	2	2	2	2
tRNA	49	50	50	48	51	50	52
rRNA	8	5	6	6	6	6	6
砷代谢基因簇 /kb	8.1	3.1	2.4	4.1	5.3	5.3	5.3

### 2.2 物种的进化关系和砷代谢基因簇结构分析

R. palustris 菌株砷代谢相关基因的分布与结构,如图 1 所示.从图 1 可知:7 个菌株的染色体中均含有以 ars 操纵子为主体的砷代谢基因簇,主要包括砷代谢调节基因(arsR)、细胞质 As(V)还原酶基因(arsC)、As(III)外排蛋白基因(arsB 或 acr3p)、转甲基酶基因(arsM)、砷抗性相关功能基因(arsH)和未知功能基因(arsU)等.7 个菌株中,ars 操纵子主要包括 arsRCC(acr3p) 和 arsRM 两种类型.研究表明:R. palustris 具有细胞质 As(V)还原代谢机制及 As(III)甲基化代谢机制.不同菌株的砷代谢基因簇由 1 至 4 个砷代谢操纵子组成,不同菌株基因簇中的基因组成、排列顺序和方向有所不同.

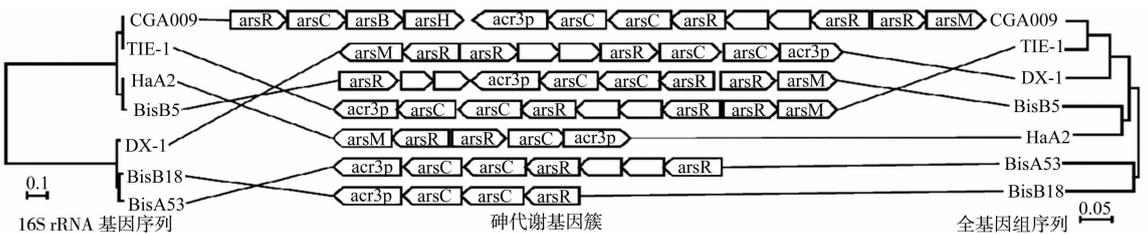


图 1 R. palustris 菌株砷代谢相关基因的分布与结构

Fig.1 Distribution and structure of the arsenic metabolic genes in R. palustris

16S rRNA 基因序列和基因组进化距离矩阵聚类分析及砷代谢基因簇结构的进化关系, 如图 1 所示。基于 16S rRNA 基因序列的分析表明: BisA53, BisB18 和 DX-1 聚为一类; TIE-1, CGA009, BisB5 和 HaA2 聚为一类。基因组进化距离矩阵聚类分析显示: BisB18 和 BisA53 聚为一类; BisA53 砷代谢基因簇在 *arsRCC(acr3p)* 基础上进化出了 *arsRUU*, 构成 2 个砷代谢操纵子; CGA009, TIE-1, DX-1, BisB5 和 HaA2 聚为一类。这 5 个菌株的特点是砷代谢基因簇更加复杂, 而且均含 *arsRM*。 *R. palustris* 不同菌株间存在着砷代谢基因的易位与倒位, 不同菌株 *ars* 操纵子进化程度不同, 进化趋向于结构更为复杂的“多操纵子”。两种聚类方式的结果虽然有差异, 但基因组进化距离矩阵聚类分析分辨率更高, 更容易分辨不同的菌株, 同时与 *R. palustris* 菌株之间的砷代谢基因簇的进化关系<sup>[8]</sup>更相符。

### 2.3 砷代谢调节基因的分析

调节基因对基因的表达具有重要的调控作用。 *R. palustris* 菌株砷代谢基因簇中拥有多个操纵子, 为了解不同操纵子中基因的表达关系, 选择 *R. palustris*, 以及另外 2 种 APB 不同菌株的不同类型操纵子和 4 株非光合细菌 *arsRBC* 操纵子上游的 *arsR* 序列进行了系统发育分析, 结果如图 2 所示。

从图 2 可知: 不同操纵子中 *arsC*, *acr3p* 及 *arsM* 上游的 *arsR* 系统发育关系因种而异。以 *arsR(acr3p)C* 为例, 在 *R. sphaeroides* 不同菌株中 *arsR* 同源性较高, 而与 *R. vannielii* 的 *arsR* 的同源性较低。对 *arsRCC(acr3p)* 而言, 在 6 株 *R. palustris* 中, BisA53, CGA009, TIE-1, BisB5 与 BisB18 的 *arsR* 同源性较高, 而与 DX-1 相比, *arsR* 同源性则较低。

*arsRM* 操纵子上游的 *arsR* 也呈现出多样性。研究结果表明: 同种不同菌株间相同(或相似)类型操纵子上游的 *arsR* 可以有较大差异, 不同类型操纵子上游 *arsR* 的同源性也可很高。 *arsR* 的同源性差异可能与环境中砷调控基因的表达有关, 但含有多个 *ars* 操纵子的细菌在砷代谢过程中, 不同操纵子中砷代谢基因如何表达调控, 其与菌种(株)抗砷能力之间的关系等问题目前尚不明确, 还需要更多的证据。

### 2.4 细胞质砷还原蛋白分析

细胞质 As(V) 还原酶基因(*arsC*)是 *ars* 操纵子的关键基因。文献报道的典型菌种(株)和 *R. palustris* *ArsC* 序列的系统发育分析, 如图 3 所示。由图 3 可知: 5 类不同的 *arsC* 表达产物中, 现有的综述文献仅报道 4 类<sup>[13-14]</sup>。第 I 类为 *ArsC* 以谷胱甘肽作为电子供体, 第 II 类为 *ArsC* 电子供体为硫氧还蛋白, 第 III 类命名为 Arr2p, 其电子供体与第一类相同, 第 IV 类 *ArsC* 电子供体为 mycothiol(MSH)。尤其是第 V 类 *ArsC*(*synArsC*), 最先发现于集胞藻属(*Synechocystis* sp. PCC6803)中, 随后在其他淡水藻类中也

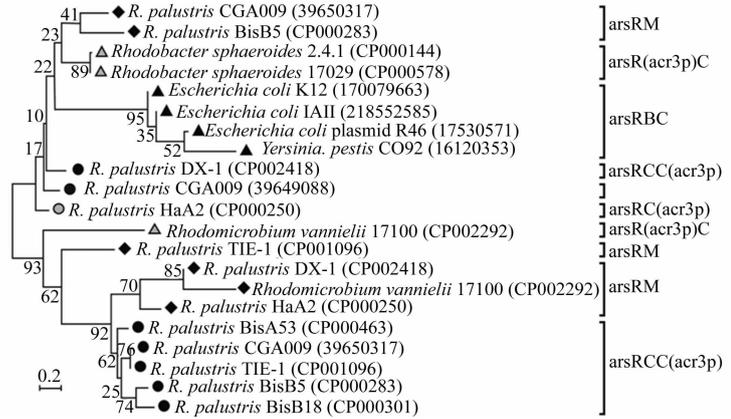


图 2 基于 *arsR* 基因序列的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships based on *arsR* gene

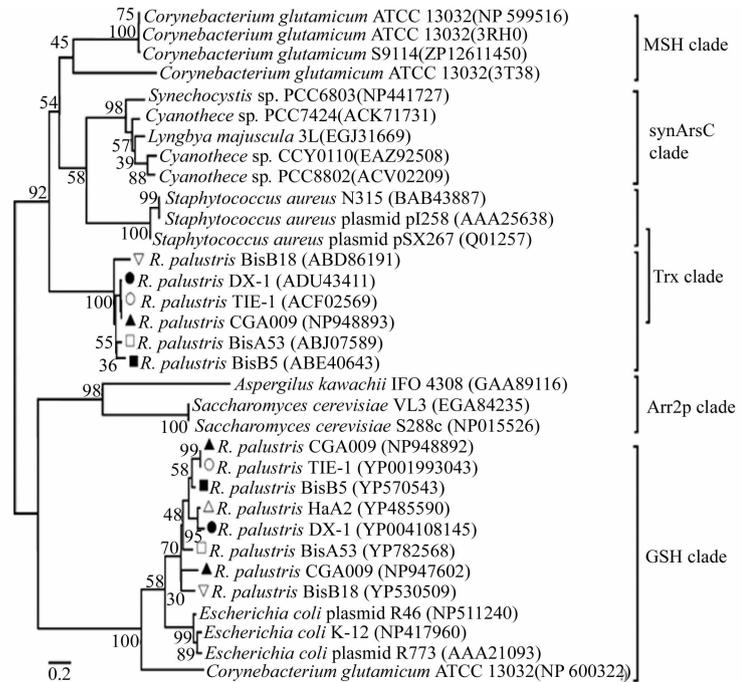


图 3 基于细胞质砷还原蛋白氨基酸序列的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic relationships derived from *ArsC* amino acid sequences

发现了它的同源基因,其氨基酸序列与第Ⅱ类同源性较高,但电子供体却与第一类相同<sup>[15-16]</sup>.分析发现,该类 ArsC 首先与第Ⅳ类聚为一类,再和第Ⅱ类聚在一起.

已有文献认为, *synArsC* 的变化机制是由 ArsC 催化位点上的半胱氨酸残基位置所决定的<sup>[17]</sup>,但其进化来源尚不清楚.通过数据库中 *nArsC* 基因序列的同源性系统分析,尚未在其他细菌中发现该基因是否应单独列为一类,还值得探讨.同时发现:7株 *R. palustris* 均含有第Ⅰ类 ArsC,而 BisB5, CGA009, BisB18, BisA53, TIE-1 和 DX-1 还含有第Ⅱ类 ArsC,这种同一基因组中含有两类 *arsC* 基因的现象明显区别于其他光合生物,在非光合生物中也不常见,显示出 *R. palustris* 砷代谢基因的多样性.

## 2.5 转甲基酶基因分析

已有研究表明:转甲基酶(ArsM)可将细胞内的 As(Ⅲ)转化为甲基砷化物,最终生成挥发性三甲基砷(TMA)排出胞外,降低了环境中砷的浓度,能够达到环境砷治理的目的<sup>[6]</sup>.因此,分析了 *R. palustris* 中 *arsM* 基因的多样性.与 *R. palustris* BisB5 的 *arsM* 序列相比,5株 *R. palustris* 及 8株典型非光合生物的 *arsM* 序列的同源性达 80%以上,其系统发育分析如图 4 所示.从图 4 可知:CGA009, TIE-1, BisB5 和 DX-1 的 *arsM* 聚为一类,而 HaA2 的 *arsM* 聚为另一类,表明 *arsM* 具有多样性.

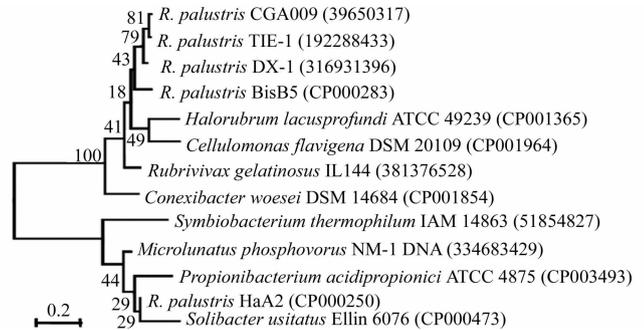


图 4 基于 *arsM* 基因序列的系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic relationships based on *arsM* gene

## 3 讨论

基于已公布的全基因组序列砷代谢基因簇的分析,解析了 *R. palustris* 砷代谢机制和砷代谢基因簇. *R. palustris* 砷代谢机制的主体为 *ars* 操纵子介导的细胞质 As(V)还原和 As(Ⅲ)甲基化,菌株不同,砷代谢基因和砷代谢途径有明显差异.砷代谢基因簇的结构与分布呈现多样性,且不同菌株砷代谢基因簇进化程度不同,进化趋向于更为复杂的“多操纵子”结构.

调节基因在基因表达过程中发挥重要的作用, *R. palustris* 砷代谢调节基因(*arsR*)具有多样性,同种不同菌株间相同(或相似)类型 *ars* 操纵子上游的 *arsR* 有较大差异,不同类型操纵子上游的 *arsR* 的同源性也可以很高. *arsR* 的多样性可能与菌种(株)的环境适应性有重要的关系,尤其是含有多操纵子砷代谢基因簇中砷代谢基因的表达和调控,尚缺乏系统而深入的实验研究.

在同一基因组中含有两类 *arsC* 基因的现象并不常见.已有研究表明:一株放线菌谷氨酸棒状杆菌(ATCC 13032)中含有Ⅰ类、Ⅱ类和Ⅳ类 ArsC<sup>[14]</sup>.本文的分析表明:7株 *R. palustris* 中均含有Ⅰ类 ArsC,其中 6个菌株同时含有Ⅰ类和Ⅱ类 ArsC.由此认为,这两类 *arsC* 能够同时表达,第Ⅱ类 ArsC 是第Ⅰ类 ArsC 功能上的补充,两类 *arsC* 同时表达更有利于细胞内物质的有效利用,并增强了细菌对砷的抗性.但究竟是否如此,两类 ArsC 在胞内如何协调发挥作用,尚缺乏实验证据.

As(Ⅲ)甲基化现象普遍存在于细菌、真菌、原生动物及高等动物中<sup>[18]</sup>.通过基因组砷代谢基因分析表明:*R. palustris* 也普遍存在 *arsM*,7株 *R. palustris* 中就有 5株含有 *arsM*,但不同菌株间,*arsM* 同源性也具有较大差异.值得关注的是,有研究发现一些起始无甲基化现象的细菌,如 *Corynebacterium* sp, *E. coli*, *Flavobacterium* sp, *Proteus* sp 和 *Pseudomonas* sp,在高浓度砷长期(6个月)诱导下,可将无机砷转化为甲基砷化物<sup>[18]</sup>.因此,细菌中 *arsM* 是来源于自身基因的演化,还是存在其他未发现的甲基化途径,也是值得探索的问题.

## 参考文献:

- [1] MUKHOPADHYAY R, ROSEN B P, PHUNG L T, et al. Microbial arsenic: From geocycles to genes and enzymes [J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(3): 311-325.
- [2] 王革娇, 黄银燕, 李洁. “吃”砷霜的细菌: 解析微生物的砷代谢[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 154-160.
- [3] ERB T J, KIEFER P, HATTENDORF B, et al. GFAJ-1 is an arsenate-resistant, phosphate-dependent organism[J].

- Science,2012,337(6093):467-470.
- [4] LARIMER F W,CHAIN P,HAUSER L,et al. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*[J]. Nat Biotechnol,2004,22(1):55-61.
- [5] HUNTER C N,DALDAL F,THURNAUER M C,et al. The purple phototrophic bacteria[M]. Netherlands:Springer,2009:577-689.
- [6] QIN J,ROSEN B P,ZHANG Y,et al. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase[J]. Proc Natl Acad Sci,2006,103(7):2075-2080.
- [7] 吕常江,张永雨,赵春贵,等. 光照厌氧条件下沼泽红假单胞菌对砷的抗性及其机制[J]. 环境科学学报,2012,32(10):2375-2383.
- [8] 吕常江,赵春贵,杨素萍,等. 紫色非硫细菌的砷代谢机制[J]. 微生物学报,2012,52(12):1497-1507.
- [9] ROSEN B P. Biochemistry of arsenic detoxification[J]. FEBS Lett,2002,592(1):86-92.
- [10] SILVER S,PHUNG L T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic[J]. Appl Environ Microb,2005,71(2):599-608.
- [11] PAEZ-ESPINO D,TAMAMES J,DE LORENZO V,et al. Microbial responses to environmental arsenic[J]. Bio-metals,2009,22(1):117-130.
- [12] DARLING AE,MAU B,PERNA N T. ProgressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement[J]. PLoS One,2010,5(6):e11147.
- [13] 蔡林,王革娇. 抗砷性微生物及其抗砷分子机制研究进展[J]. 微生物学通报,2009,36(8):1253-1259.
- [14] VILLADANGOS A F,BELLE K V,WAHNI K,et al. *Corynebacterium glutamicum* survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms[J]. Mol Microbiol,2011,82(4):998-1014.
- [15] LI R,HAILE J D,KENNELLY P J. An arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics[J]. J Bacteriol,2003,185(23):6780-6789.
- [16] LOPEZ-MAURY L,SANCHEZ-RIEGO A M,REYES J C,et al. The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC6803[J]. J Bacteriol,2009,191(11):3534-3543.
- [17] KIM S G,CHUNG J S,SUTTON R B,et al. Redox, mutagenic and structural studies of the glutaredoxin/arsenate reductase couple from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. Biochim Biophys Acta,2012,1824(2):392-403.
- [18] BENTLEY R,CHASTEEN T G. Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth[J]. Microbio Mol Biol R,2002,66(2):250-271.

## Diversity and Evolutionary Analysis of Arsenic Metabolism Gene in *R. palustris*

GUO Shao-wei<sup>1</sup>, LYU Chang-jiang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, ZHAO Chun-gui<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract:** The arsenic metabolic mechanisms and evolution relations of the arsenic metabolic genes in *Rhodospseudomonas palustris* were explored based on the data of the whole genome sequence. The results showed that arsenic metabolic gene clusters existed in seven *R. palustris* strains mainly contained *arsC*, *arsR*, *arsM*, *arsB*, *acr3p* and *arsH* genes. There was considerable regulation gene (*arsR*) diversity among *R. palustris* strains in same species. Both type I and type II of *Ar*sC were found in six strains of *R. palustris*, and the *arsM* gene with low homology in different *R. palustris* strains was widely found in five strains. It is also manifested that arsenic metabolic mechanisms were mainly arsenate reduction and arsenite methylation in cytoplasm, whereas the distinction and diversity of arsenic metabolic genes were relied on different strains.

**Keywords:** *Rhodospseudomonas palustris*; arsenic resistance; gene clusters; bioinformatics