

微生物中邻氨基苯甲酸代谢与功能研究进展

陈 博, 宋 凯, 何亚文

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 教育部代谢与发育科学国际合作联合实验室, 上海

收稿日期: 2024年7月11日; 录用日期: 2024年9月3日; 发布日期: 2024年9月12日

摘 要

邻氨基苯甲酸(Anthranilic acid, ATA)是微生物产生的一种小分子化合物, 是色氨酸合成途径的中间产物。近年来一些研究发现ATA是一类信号分子, 影响微生物生理功能。本文首先概述了大肠杆菌和酿酒酵母中ATA与色氨酸合成的关系, 随后详细介绍了ATA在铜绿假单胞菌中的代谢与功能, 以及ATA调控青枯雷尔氏菌的生理活动。最后结合其他微生物中ATA的最新研究结果, 我们提出ATA可能参与微生物跨界交流。

关键词

邻氨基苯甲酸, 色氨酸合成, 信号分子, 跨界交流

The Metabolism and Functions of Anthranilic Acid in Microorganisms

Bo Chen, Kai Song, Ya-Wen He

Joint International Research Laboratory of Metabolic and Developmental Sciences, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University (SJTU), Shanghai

Received: Jul. 11th, 2024; accepted: Sep. 3rd, 2024; published: Sep. 12th, 2024

Abstract

Anthranilic acid (ATA) is a small molecule produced by microorganisms and is an intermediate product of the tryptophan synthesis pathway. In recent years, it has been revealed that ATA is a new signaling molecule and has effects on microbial physiology. In this review, we first briefly outlined the relationship between ATA and tryptophan synthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. We then summarized the metabolic network and biological functions of ATA in *Pseudomonas aeruginosa*, as well as the progress of ATA in regulating the physiology of *Ralstonia solanacearum*.

Finally, we summarized the latest results describing the roles of ATA in other microorganisms and proposed that ATA may play a role in interkingdom communication.

Keywords

Anthranilic Acid, Tryptophan Biosynthesis, Signaling Molecule, Interkingdom Communication

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

邻氨基苯甲酸(anthranilic acid, 2-aminobenzoic acid, 以下简称 ATA)是微生物和植物色氨酸生物合成的中间体。大肠杆菌和酿酒酵母等微生物通过色氨酸合成保证生命活动正常进行。近年来, 邻氨基苯甲酸被认为可以独立成为一种信号分子, 它在调控铜绿假单胞菌和青枯雷尔氏菌生理功能和种间交流方面已经得到证实[1] [2]。本文着重介绍了邻氨基苯甲酸在四种模式微生物中的研究进展, 系统阐述了邻氨基苯甲酸的生物合成、降解和调控通路以及生物学功能, 为进一步研究邻氨基苯甲酸的生理学功能奠定基础。

2. 大肠杆菌的色氨酸合成途径

微生物具有从头合成色氨酸的能力, 以大肠杆菌为例, 色氨酸的合成涉及多个酶催化的反应步骤, 包括中心代谢途径、莽草酸途径和色氨酸分支途径(图 1)。中心代谢途径包括以葡萄糖为初始底物, 经过糖酵解途径(EMP)形成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)以及经过戊糖磷酸途径(HMP)形成赤藓糖-4-磷酸(E4P)。莽草酸途径以 PEP 与 E4P 为起始化合物, 二者缩合形成 3-脱氧-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP)。DAHP 经过几步反应形成莽草酸(shikimic acid), 莽草酸再与 PEP 作用, 形成 3-烯醇丙酮酸莽草酸-5-磷酸, 之后形成分支酸(chorismic acid)。分支酸是莽草酸途径的重要枢纽物质, 其中一个重要的分支就是合成色氨酸。色氨酸分支途径所需要的酶包括: 邻氨基苯甲酸合酶(TrpE, TrpG)、邻氨基苯甲酸焦磷酸转移酶(TrpD)、磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶(TrpF)、吲哚甘油 3-磷酸合酶(TrpC)和色氨酸合酶(TrpA, TrpB) [3]。

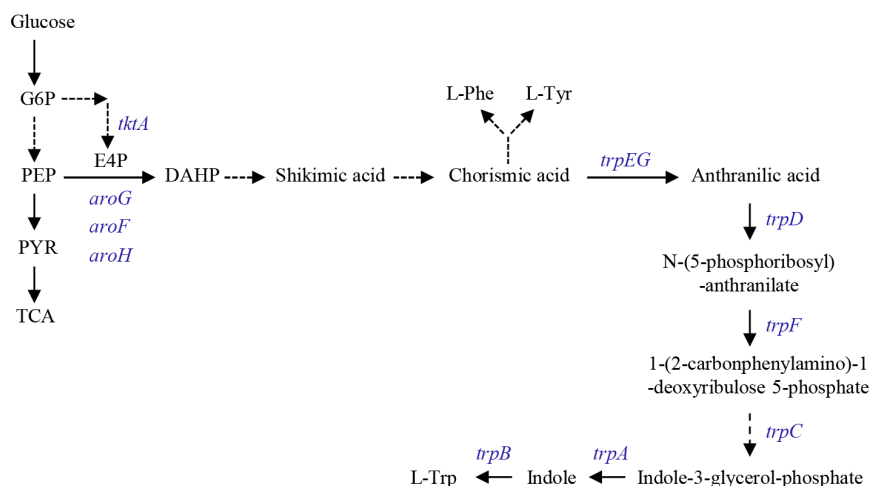


Figure 1. The synthesis pathway of tryptophan in *Escherichia coli*

图 1. 大肠杆菌的色氨酸合成途径

3. 酿酒酵母的色氨酸代谢途径

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)合成色氨酸的途径与大肠杆菌相似, 邻氨基苯甲酸是色氨酸合成的中间产物[3] (图 2(A))。有所不同的是, 以酿酒酵母为代表的真菌与哺乳细胞类似, 具有进一步将色氨酸分解成喹啉酸(quinolinic acid)的能力, 完成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的从头合成(图 2(B)) [4] [5]。

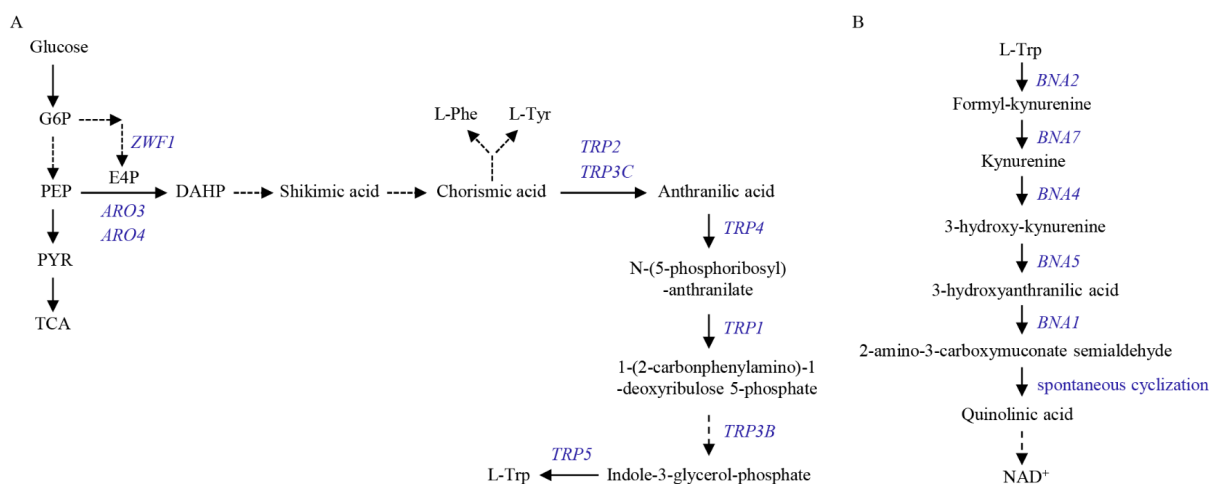


Figure 2. The metabolic pathway of tryptophan in *Saccharomyces cerevisiae*

图 2. 酿酒酵母的色氨酸合成和利用途径

4. 铜绿假单胞菌中邻氨基苯甲酸研究进展

邻氨基苯甲酸代谢途径在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中研究地最为充分, 包括三种合成路径和三种转化去向。铜绿假单胞菌是常见的环境微生物, 但当宿主组织或免疫系统被破坏时, 它就表现为一种机会性病原体, 可以感染昆虫、植物、动物和人类[6]。临床上该病原体是导致既往有免疫功能低下和囊性纤维化(cystic fibrosis, 简称 CF)等疾病的患者发病和死亡的主要原因[7]。铜绿假单胞菌内复杂的群体感应结构, 四个相互连接的系统(*las*、*rhl*、*pqs* 和 *iqs*)以精细的调控网络和分级管理的方式进行协作, 赋予该菌保持稳态并且根据种群需求和环境压力高效调节一系列毒力基因表达的能力[8]。*pqs* 系统主要信号分子是 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS), 通过依赖或不依赖 LysR 型转录调控因子 PqsR 的方式调控一些毒力因子表达。除此之外, PQS 也能介导铁的获取、细胞毒性、外膜囊泡生物发生以及发挥宿主免疫调节活性[9]。

2005 年, Bredenbruch 等人证实 ATA 和一种脂肪酸结合产生 2-庚基-4-喹诺酮, 继而通过一种单加氧酶转化为 PQS [10]。此后的研究表明 ATA 不仅是合成 PQS 的重要中间体, 还能被邻氨基苯甲酸双加氧酶复合物降解, 产物最终进入 TCA 循环[1]。因此, 邻氨基苯甲酸是铜绿假单胞菌的关键代谢产物, 其主要代谢途径及调控的生物学功能介绍如下。

4.1. 邻氨基苯甲酸的合成

4.1.1. 邻氨基苯甲酸合酶 TrpEG 和 PhnAB

铜绿假单胞菌合成 ATA 的途径之一是利用分支酸为前体, 该反应由邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase)催化完成。铜绿假单胞菌内有两套功能性邻氨基苯甲酸合酶, 即 TrpEG 和 PhnAB。TrpEG 编码基因位于色氨酸合成操纵子上, 而 TnpAB 编码基因恰好与 PQS 合成基因簇 *pqsABCDE* 相邻, 受到 PqsR 正调控[11]。基因敲除实验表明, TrpEG 和 PhnAB 的编码基因在功能上并不冗余, 因为 *trpE* 突变体为色

氨酸营养缺陷型, 但能产生 PQS, 表明内源性 *phnAB* 不能代替 *trpE* 生成色氨酸; 另外, *phnA* 突变不会导致细菌色氨酸营养缺陷, 但严重影响 PQS 和绿脓菌素合成[12][13]。换言之, TrpEG 产生的 ATA 专门用于色氨酸生物合成, 而 PhnAB 则专门产生 ATA 促进喹诺酮生物合成。此后虽然有实验证明人为地在 *trpE* 敲除突变体中过表达 PhnAB 或者在 *phnAB* 敲除突变体中过表达 TrpEG 能够分别恢复铜绿假单胞菌色氨酸营养缺陷表型或 PQS 生产能力, 但在整个细菌生长繁殖过程中, 由于 *trpE* 和 *phnAB* 表达水平不一致(前者的表达量在生长早期较高, 在高细胞密度时显著降低, 而后者的表达量在指数中后期逐渐增加), 因此导致内源 TrpEG 和 PhnAB 功能不能互补, 色氨酸和喹诺酮类生物合成途径之间没有串扰[14]。

Palmer 等人还对 *P. aeruginosa* 中 TrpE 和 PhnA 蛋白序列进行了 BLAST 分析, 目的是用来确定与之相关的邻氨基苯甲酸合酶同源物的分布。该研究得到的系统发育树结果显示: TrpE 与包括许多假单胞菌在内的近缘物种的同源蛋白具有显著相似性; 相比之下, PhnA 的蛋白序列则与多个不同物种来源的蛋白关系最为密切。因而作者推测 *P. aeruginosa* 通过水平基因转移从另一种细菌的色氨酸生物合成机制中获得了 *phnAB* 操纵子, 这一事件可能发生在荧光假单胞菌多样化之后, 因为 *P. aeruginosa* 的近亲不含有 *phnAB* 样操纵子[14]。由此看来, PhnAB 的存在主要是为了产生更多的 ATA 用于喹诺酮类化合物的生物合成。

4.1.2. 犬尿氨酸途径

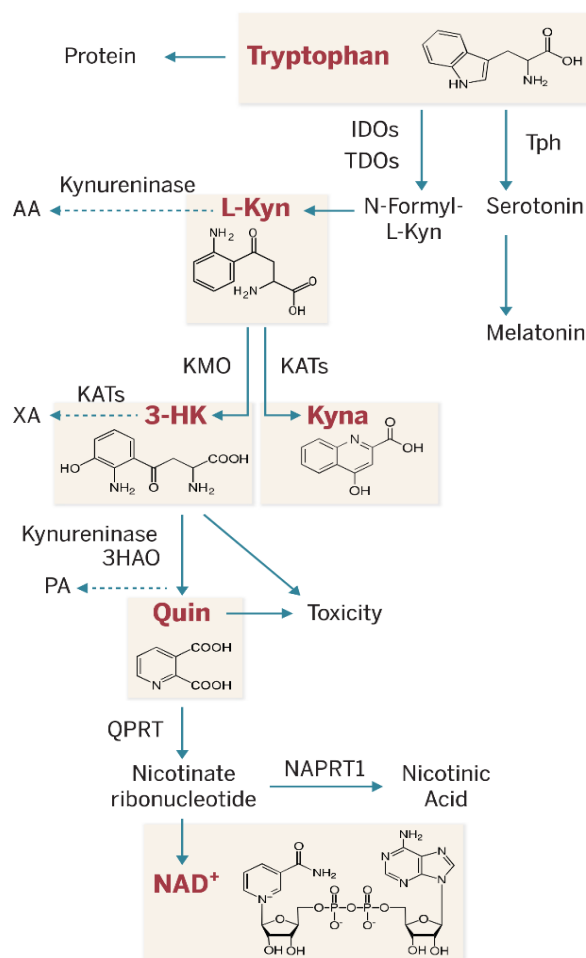


Figure 3. Overview of the kynurenine pathway of tryptophan degradation in mammals [15]

图 3. 哺乳动物色氨酸降解的犬尿氨酸途径[15]

犬尿氨酸途径(kynurenine pathway, 简称 KP)原本被认为是哺乳动物色氨酸代谢的主要途径,超过 95% 的游离色氨酸是 KP 途径的底物,由此产生一系列代谢物,包括但不限于神经递质、激素和维生素[15](图 3)。由于色氨酸及其代谢物广泛参与机体炎症、免疫反应和兴奋性神经传递,且代谢物水平的失衡与多种人类疾病有关,关于色氨酸代谢物在神经生理学和免疫学中的功能被广泛研究,旨在开发新的药物及针对 KP 途径的治疗靶点[16]。

在过去的几十年中,人类和酵母中的犬尿氨酸途径得到了大量的阐明,大多数酶的编码基因已经被确定。随后也发现在为数不多的细菌中存在与犬尿氨酸途径类似的色氨酸氧化降解现象,例如蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*),铜绿假单胞菌和金属拉尔斯顿氏菌(*Ralstonia metallidurans*)均包含 KP 途径的 3 个关键基因(图 4(A)),即编码色氨酸 2, 3-双加氧酶的 *kynA*, 编码酰胺水解酶的 *kynB*, 和编码犬尿氨酸酶的 *kynU*, 它们分别对应于真核 KP 途径中的 TDO (tryptophan-2, 3-dioxygenase)、AFMID (kynurenine formamidase)和 KYNU (kynureninase),能够将色氨酸转化为邻氨基苯甲酸[17];而黄单胞菌目(Xanthomonadales)和黄杆菌目(Flavobacteriales)具有负责犬尿氨酸途径的全部基因(*kynA*、*kynB*、*kmo*、*kynU* 和 *haaO*),意味着它们很可能以一种真核生物的方式降解色氨酸生成 NAD^+ [18]。

铜绿假单胞菌中的 *kynABU* 基因成簇排列,在犬尿氨酸存在的情况下, *kynAB* 基因被诱导合成更多的邻氨基苯甲酸[19]。 *kynB* 上游转录因子 *kynR* 介导了这条通路中相关基因的表达调控, *kynA* 和 *kynB* 对犬尿氨酸转录活性的增加完全依赖 KynR 与犬尿氨酸复合物的形成[20] (图 4(B))。

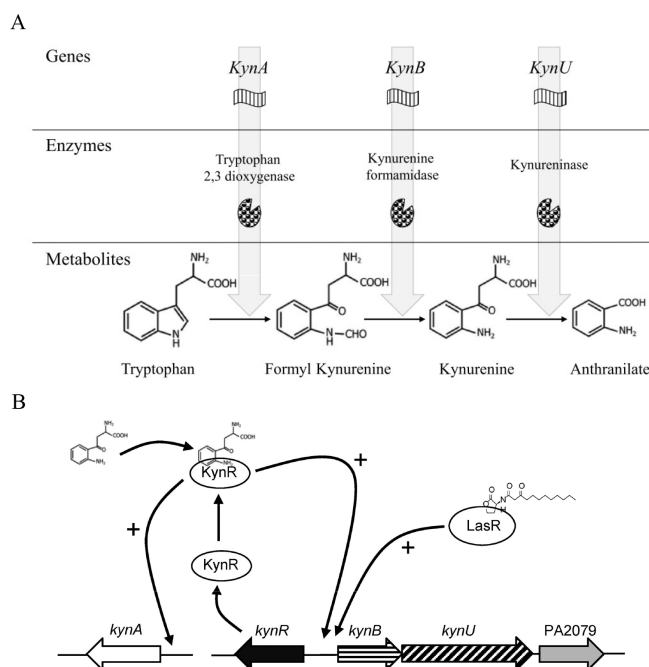


Figure 4. The kynurenine pathway was positively regulated by KynR in *P. aeruginosa*

图 4. *P. aeruginosa* 的犬尿氨酸途径受 KynR 正调控

4.1.3. 三条合成途径的关系

在实验室环境下,分支酸途径和犬尿氨酸途径似乎都参与 *P. aeruginosa* 中 ATA 的生物合成。Palmer 等通过一系列实验证实了这一结论:在高水平色氨酸存在的情况下,敲除 *phnAB* 后细菌产生 PQS 水平明显降低,表明当氨基酸过量时,PhnAB 也会产生 ATA 用于 PQS 的生物合成,通过 *kynABU* 途径降解色

氨酸不是生成 ATA 的唯一途径。这与当 *trpE* 和 *kynA* 同时敲除时, 外源添加 5 mM 色氨酸仍然可以产生约 1 μ M PQS 的结果相吻合。除了色氨酸外, 苯丙氨酸和酪氨酸也能提高 PQS 的产量。 Δ *kynA* 与 Δ *trpE* Δ *kynA* 突变体在外源添加苯丙氨酸或者酪氨酸条件下分别能够合成 3~7 μ M 和 2~6 μ M 的 PQS, 但 Δ *phnAB* 突变体没有检测到任何 PQS 产生, 表明 PhnAB 是在苯丙氨酸和酪氨酸存在下负责 PQS 产生的邻氨基苯甲酸合酶; 并且, 与色氨酸不同的是, 苯丙氨酸和酪氨酸对 PQS 合成的诱导不是通过分解代谢成 ATA, 而是增加了 ATA 生物合成的共享前体分支酸对 PQS 生物合成的通量[14]。

一项对囊性纤维化肺病人痰液成分的测量结果表明, CF 肺中色氨酸水平极低(<10 μ M), 因此分支酸介导的 ATA 合成可能是 CF 肺中的主要途径[21]。

4.2. 邻氨基苯甲酸的转化

4.2.1. *pqsABCDEH* 基因簇负责转化 ATA 成 PQS

邻氨基苯甲酸一经合成, 通过 *pqsABCDEH* 基因编码产物共同作用逐步转化生成 PQS (图 5), 其中 *pqsABCDE* 位于 *phnA* 上游, *pqsH* 位于基因组较远位置, 每一步酶催化的反应如下: 1) *pqsA* 编码邻氨基苯甲酸 CoA 连接酶活化 ATA 生成邻氨基苯甲酰-CoA (anthraniloyl CoA) [22]; 2) 随后在 3-氧酰基酰基载体蛋白 PqsD 的帮助下与丙二酰 CoA 缩合生成邻氨基苯甲酰乙酰-CoA (2-aminobenzoylacetyl-coenzyme A, 2-ABA-CoA) [23]; 3) 借助 PqsE 硫酯酶活性, 2-ABA-CoA 被水解为邻氨基苯甲酰乙酸 (2-aminobenzoylacetate, 2-ABA) [24]; 4) 2-ABA 之后与辛烷酰 CoA 缩合生成另一重要的活性化合物 2-庚基-4-喹诺酮(2-heptyl-4-quinolone, HHQ), 该反应由 PqsBC 组成的异质 FabH 二聚体样蛋白催化[25]; 5) *pqsH* 编码黄素依赖型单加氧酶在 C-3 位置羟基化 HHQ 并最终生成 PQS [26]。整个合成途径受到群体感应信号 PQS/HHQ 和转录因子 PqsR 复合物的调控, *pqsR* 的突变会导致 *phnAB* 和 *pqsABCDE* 表达终止[27]。

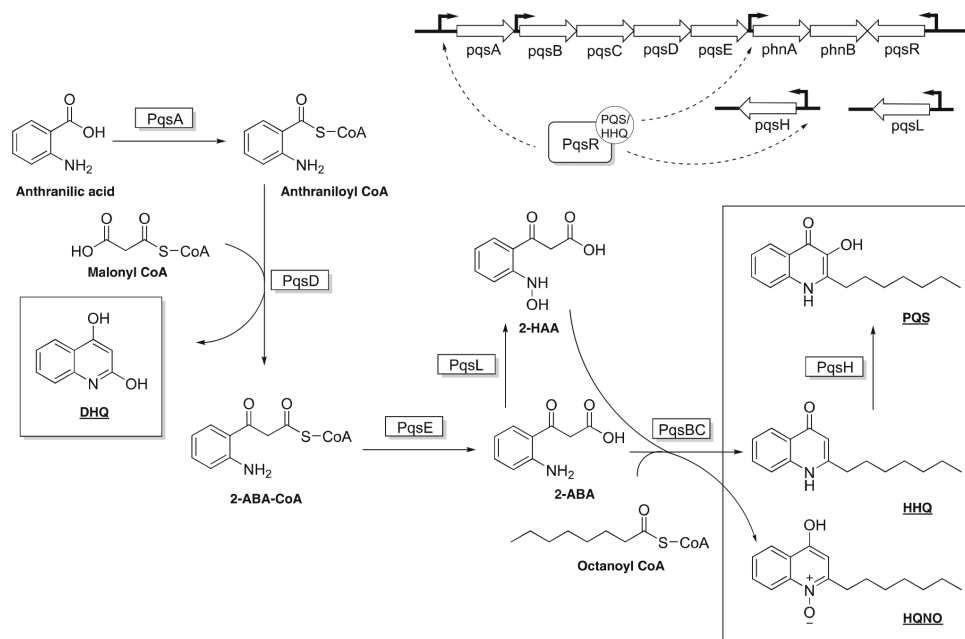


Figure 5. Proposed pathway for PQS biosynthesis in *P. aeruginosa* [28]

图 5. *P. aeruginosa* 中 PQS 生物合成途径[28]

4.2.2 邻氨基苯甲酸降解途径

ATA 在铜绿假单胞菌生长至稳定期后期迅速积累, 达到 0.05 mM [29]。细胞内合成积累的邻氨基苯

甲酸池可以同时用于 PQS 分子合成和能量代谢,后者就是将 ATA 降解为乙酰 CoA 和琥珀酰 CoA,铜绿假单胞菌包含这一代谢过程所需的全部基因[30] (图 6)。

ATA 降解途径的第一步是将其转化为儿茶酚。这个反应涉及到一种氧化还原酶(EC 1.14.12.1),该氧化还原酶由三个亚基组成,它们是属于同一操纵子的 *antA*、*antB* 和 *antC* (PA2512、PA2513、PA2514)基因的产物。第二步,由 *catA* (PA2507)编码的氧化还原酶将儿茶酚转化为顺式,顺式-粘康酸(*cis, cis-muconate*)。随后的两个反应将顺式、顺式-粘康酸环化为粘康酸内酯(*muconolactone*),然后转化为 3-氧己二酸烯内酯(3-oxoadipate-enol-lactone)。这些反应由 PA2509 编码的锰依赖的环异构酶 I (EC 5.5.1.1)和由 PA2508 编码的粘康酸内酯-异构酶(EC 5.3.3.4)催化。PA2507、PA2508 和 PA2509 属于同一操纵子。第五步酶促反应对应于将 3-氧己二酸烯内酯水解成 3-氧己二酸(3-oxoadipate),负责该反应的酶(EC 3.1.1.24)在铜绿假单胞菌中由 *pcaD* (PA0231)编码。与 *pcaD* 同属于一个操纵子的还包含 *pcaT* (PA0229)、*pcaB* (PA0230)和 *pcaC* (PA0232)基因。*PcaT* 蛋白是一个二羧酸转运体,预计包含 12 个跨膜螺旋;*PcaB* 和 *PcaC* 降解 β -羧基-粘康酸(β -carboxy-muconate),从而促进 3-氧己二酸的合成。ATA 降解的第六步是将 3-氧己二酸转化为 3-氧己二酰 CoA (3-oxoadipyl-CoA)。CoA 供体是琥珀酰 CoA,负责催化的酶是 3-氧己二酰 CoA 转移酶, *pcaI* (PA0226)和 *pcaJ* (PA0227)分别编码 3-氧己二酰 CoA 转移酶的两个亚基。此外,PA0226 和 PA0227 基因与 *pcaF* (PA0228)属于同一操纵子,后者编码该通路的最后一个酶(EC 2.3.1.174),即 3-氧二吡基 CoA 硫化酶,将 3-oxoadipyl-CoA 转化为一个琥珀酰 CoA 和一个乙酰 CoA (图 6)。

ATA 降解过程受到 LysR 型转录因子 AntR 正调控,它由 *antA* 上游基因 PA2511 编码而来。ATA 作为配体激活了 AntR,使 AntR 结合到 *antA* 和 *antR* 之间的间隔区域,从而诱导 *antABC* 操纵子转录以降解 ATA [31] [32]。

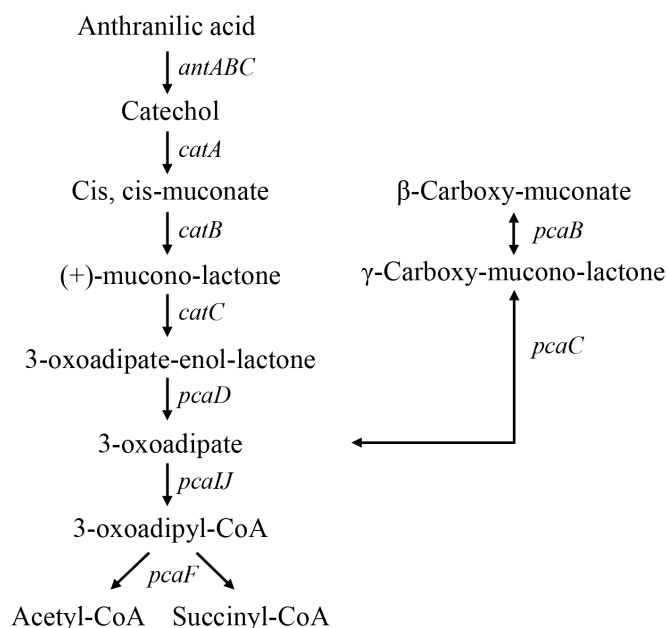


Figure 6. Anthranilic acid degradation pathway in *P. aeruginosa*

图 6. *P. aeruginosa* 中的邻氨基苯甲酸降解途径

4.3. 邻氨基苯甲酸生物学功能

一直以来,关于 ATA 代谢产物(如 PQS 和色氨酸)对铜绿假单胞菌生物膜形成和毒力影响的研究较

多。抛开前体效应, ATA 本身也被发现参与调节该病原菌生物膜形成、致病性和抗生素敏感性等功能。

研究发现, CF 肺中的铜绿假单胞菌主要存在于生物膜中, 而非浮游状态[33][34]。与浮游细菌相比, 存在于生物膜中的铜绿假单胞菌的 *antABC* 被显著增强, 导致生物膜形成增加。由于在此过程中并未观察到任何参与 ATA 生物合成基因的上调, 预计这些细胞内的 ATA 池会被迅速耗尽[30]。进一步研究表明, *antABC* 突变体形成的生物膜少于野生型; 流式细胞系统中, 正常铜绿假单胞菌生物膜形成时间大约在 48 小时, 而 *antABC* 突变体在 84 h 后也难以形成生物膜结构, 说明内源性 ATA 的产生对生物膜形成有重要影响[1]。外源添加 ATA 证实了它对生物膜形成的抑制作用。ATA 恶化了 *P. aeruginosa* 生物膜的蘑菇结构, 通过剪切力使生物膜的蘑菇结构恶化, 形成扁平的生物膜。研究还发现, ATA 通过降低细胞内 c-di-GMP 水平, 调节 EPS 主要成分 Psl、Pel 和海藻酸盐的合成基因的表达, 破坏生物膜结构, 诱导预先形成的铜绿假单胞菌生物膜的分离[35]。

铜绿假单胞菌培养物中的 ATA 水平不是一成不变的, 它在稳定期迅速上升, 然后再次下降形成一个 ATA 峰。研究者密切关注这一现象, 发现 ATA 峰出现后, 铜绿假单胞菌的生物膜的形成, 抗生素耐受性和毒力均有所增加[1]。为了验证这些生理活动改变与 ATA 的关系, 研究人员测试了 *antABC* 突变体的毒力水平和抗生素敏感性。*antABC* 突变体培养 24 h 后的上清液毒性显著降低; 当使用四种不同的抗生素(羧苄青霉素, 庆大霉素, 妥布霉素和多粘菌素 B)处理时, *antABC* 突变体对它们的敏感性均显著增加。这些结果表明, 在 ATA 没有被适当降解并保持在高浓度水平条件下, 细菌毒力因子的生成量会降低, 对抗生素的敏感性会增加。为了证实这一点, 作者在初始培养基中加入 ATA, 这种处理显著降低了野生型菌株毒力因子的产生。与此同时, 野生型菌株在有 ATA 共培养情况下会展现出更强的抗生素敏感性[1]。

除了铜绿假单胞菌, ATA 也对肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的生物膜形成和抗生素耐受性表现出明显抑制作用[1][36], 这意味着铜绿假单胞菌分泌的 ATA 会影响其周围其他细菌的生理机能。综上所述, ATA 更像是一个信号分子, 调节铜绿假单胞菌和周围细菌的生物膜形成、毒性和抗生素耐受性[1]。

5. 邻氨基苯甲酸在青枯雷尔氏菌中的研究进展

2020 年, 宋等在研究青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)拮抗镰刀链球菌(*Sporisorium scitamineum*)过程中分离并鉴定出关键成分邻氨基苯甲酸。青枯雷尔氏菌是一种土传细菌, 可在全球范围内共计 200 多种植物中引起细菌性枯萎病。外源添加 ATA 能够强烈抑制镰刀链球菌中 PKAcAMP 通路成分的表达水平, 进而干扰其有性交配和菌丝形成, 这表明青枯雷尔氏菌产生的邻氨基苯甲酸具有跨界通信的作用[2]。

与铜绿假单胞菌不同, 青枯雷尔氏菌的两套 QS 系统, 分别是以 PhcSRB 为核心的 *phc* 系统, 产生信号分子 3-羟基棕榈酸甲酯(3-hydroxypalmitate, 3-OH PAME)或 3-羟基肉豆蔻酸甲酯(methyl 3-hydroxymyristate, 3-OH MAME); 以及以 SolIR 为核心的 *sol* 系统, 产生 AHL 类信号分子。另外一个与铜绿假单胞菌不同的点在于, 青枯雷尔氏菌主要通过 TrpEG 催化分支酸产生邻氨基苯甲酸, *kynABU* 同源基因只发挥次要合成作用。*trpE*、*trpG* 和 *trpEG* 的缺失突变体与野生型相比没有明显的生长滞后, 但表现出一系列表型差异: 1) *trpEG* 缺失菌株失去了对镰刀链球菌有性交配和菌丝形成的抑制能力; 2) *trpEG* 缺失菌株在生物膜形成、纤维素酶产生、运动性、EPS 产生和致病性等方面严重受损; 3) *trpEG* 缺失菌株中 QS 系统相关基因 *phcA*、*phcB* 和 *solI* 转录水平下降, 说明邻氨基苯甲酸及其合成酶 TrpEG 对青枯雷尔氏菌的生理活动起着至关重要的作用。

青枯雷尔氏菌产生的 ATA 具备信号分子的典型特征, 其功能发挥离不开 RaaR 特异性受体蛋白。RaaR 属于 LysR 家族转录因子, 其底物结合结构域对 ATA 的感知增强了 RaaR 与靶基因(如 *phcB* 和 *solI*)

启动子的结合,这代表了一种新的单组分信号系统[37]。RaaR 对邻氨基苯甲酸功能的发挥必不可少, *raaR* 突变体的生物膜、胞外多糖和纤维素酶等产量明显减少,外源添加 ATA 并不能将这些表型恢复到野生型菌株水平,相反, *raaR* 的反式表达几乎完全恢复了相关致病因子的产生。综上所述,青枯雷尔氏菌中存在一个 ATA 介导的信号系统,在细胞密度逐渐变高,胞内邻氨基苯甲酸浓度达到一定阈值时,邻氨基苯甲酸与 RaaR 结合,引起受体蛋白构象变化,进而增强 RaaR 与靶基因启动子相结合的能力。

6. 其他微生物中邻氨基苯甲酸功能的报道

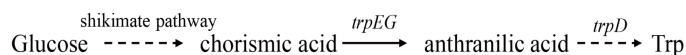
植物促生菌贵州木霉 *Trichoderma guizhouense* NJAU 4742 产生的邻氨基苯甲酸能够在典型的生长素通路中调节生长素的信号传导和转运,并且通过 RBOHF 诱导的活性氧爆发增强内胚层细胞壁重构,显著促进拟南芥侧根发育[38]。

内生菌鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* 在抗病水稻种子中积累和传播,通过产生 ATA 向感病水稻种子提供抗病特性。进一步研究表明,在不影响细胞生长的情况下,ATA 可以拮抗种子传播植物病原体伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia plantarii*)的 sigma 因子 RpoS,进而破坏毒性因子生物合成的调节系统,最终使水稻种子抗病性增强[39]。

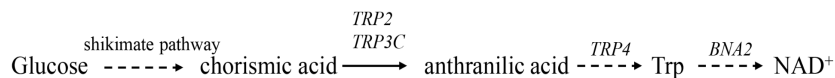
7. 总结与讨论

本文综述了近年来微生物中邻氨基苯甲酸的合成和功能研究,如图 7 所示,邻氨基苯甲酸扮演的角色不再局限于色氨酸从头合成途径的中间体,可能作为一种信号分子来影响微生物生理活动。

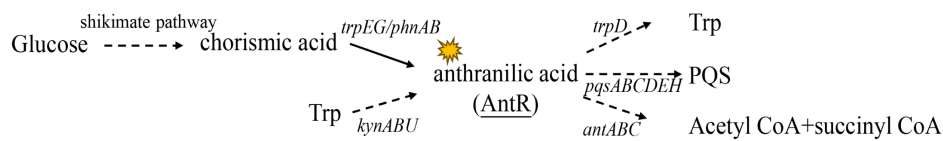
E. coli



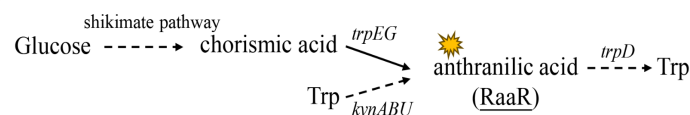
S. cerevisiae



P. aeruginosa



R. solanacearum



下划线部分代表 ATA 受体蛋白,黄色标记代表 ATA 作为信号分子。

Figure 7. The main pathway to synthesize and metabolize anthranilic acid in microorganisms

图 7. 微生物合成和代谢邻氨基苯甲酸的主要途径

铜绿假单胞菌中,邻氨基苯甲酸不利于细菌毒力因子的生成及抗生素抵御,因此在细菌生长至一定阶段后,降解酶基因 *antABC* 被启动,促使细菌向着更有利于生物膜形成和抗生素耐受的方向转变;青枯雷尔氏菌中邻氨基苯甲酸则直接通过受体 RaaR 促进细菌生物膜形成、纤维素酶产生、运动性、EPS 产生和致病性等方面的表型,这种信号后期会否被猝灭,细菌高耗能致病状态如何冷却有待后续的研究。在邻氨基苯甲酸合成方式上,铜绿假单胞菌选择在 PQS 合成基因簇上游复制一份 *trpEG* 拷贝,形成分支酸依赖的 *phnAB* 合成途径,这条通路与色氨酸依赖的 *kyn* 代谢途径并行,保证该菌邻氨基苯甲酸的正常合

成；青枯雷尔氏菌虽然选择保守的色氨酸合成基因 *trpEG* 作为邻氨基苯甲酸合成主效基因，但 $\Delta trpEG$ 不影响细菌在贫瘠培养基中的生长，这一反常现象提示该菌可能进化出独立于色氨酸合成的 *trpEG*，目的是专供邻氨基苯甲酸的合成。两种细菌在邻氨基苯甲酸合成途径上的巧妙设计都与这一小分子化合物对代谢活动的贡献相吻合。在受体研究方面，铜绿假单胞菌通过 Lrp/AsnC 样蛋白 KynR 与中间产物犬尿氨酸的结合诱导了合成基因 *kynABU* 的表达，后期又通过 LysR 家族蛋白 AntR 与邻氨基苯甲酸直接结合激活降解基因 *antABC* 的表达；青枯雷尔氏菌中，邻氨基苯甲酸能够直接结合 LysR 家族蛋白 RaaR 诱导合成基因 *trpEG* 的表达，激活自身合成。

当邻氨基苯甲酸的功能扩展为一种信号传导物质时，有关于它的生物学功能、合成途径、受体类型、猝灭方式、外排通道以及自我调节方式都需要被一一确认。上述研究可以为其他细菌中邻氨基苯甲酸的研究提供一些可行性的线索，包括邻氨基苯甲酸很大可能是通过邻氨基苯甲酸合酶催化分支酸或者邻氨基苯甲酸-2, 3-双加氧酶催化色氨酸而来；邻氨基苯甲酸的受体则最有可能是 LysR 家族蛋白。对细菌邻氨基苯甲酸受体的发掘和研究将有助于我们系统地探究它调控生理代谢的程度以及如何实现这一功能。

Anthranilic acid produced by microorganisms

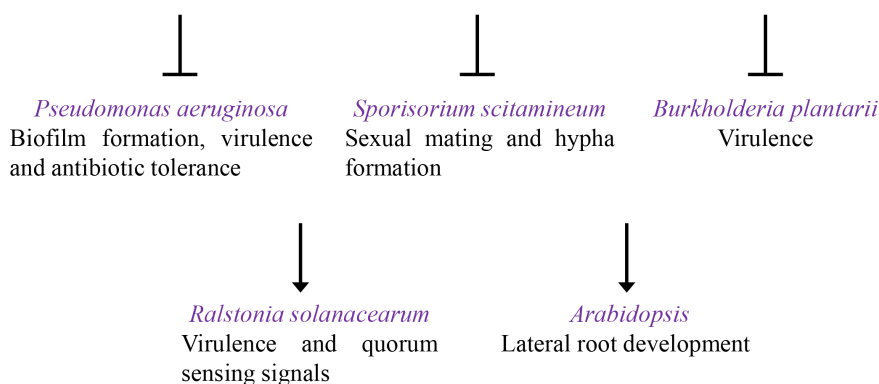


Figure 8. Anthranilic acid plays crucial roles in bacterial physiology and interkingdom communication

图 8. 邻氨基苯甲酸具有跨界交流的能力

此外，微生物产生的邻氨基苯甲酸具有跨界交流的特点，例如能够影响拟南芥根的发育，影响镰刀链球菌的有性交配和菌丝形成，以及影响包括铜绿假单胞菌在内的多种细菌的致病能力(图 8)。由此看出，邻氨基苯甲酸或许能够帮助产生菌获得复杂生态环境下的高竞争力。

基金项目

国家自然科学基金(31972231, 32172355)。

参考文献

- [1] Hwang, H., Li, X., Kim, S. and Lee, J. (2022) Anthranilate Acts as a Signal to Modulate Biofilm Formation, Virulence, and Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* and Surrounding Bacteria. *Microbiology Spectrum*, **10**, e01463-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01463-21>
- [2] Song, S., Yin, W., Sun, X., Cui, B., Huang, L., Li, P., et al. (2020) Anthranilic Acid from *Ralstonia solanacearum* Plays Dual Roles in Intraspecies Signalling and Inter-Kingdom Communication. *The ISME Journal*, **14**, 2248-2260. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0682-7>
- [3] Ren, X., Wei, Y., Zhao, H., Shao, J., Zeng, F., Wang, Z., et al. (2023) A Comprehensive Review and Comparison of L-

- Tryptophan Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **11**, Article 1261832. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1261832>
- [4] Panozzo, C., Nawara, M., Suski, C., Kucharczyk, R., Skoneczny, M., Bécarn, A., *et al.* (2002) Aerobic and Anaerobic NAD⁺ Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **517**, 97-102. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02585-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02585-1)
 - [5] Kato, M. and Lin, S. (2014) Regulation of NAD⁺ Metabolism, Signaling and Compartmentalization in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, **23**, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.07.009>
 - [6] Cigana, C., Lorè, N.I., Bernardini, M.L. and Bragonzi, A. (2011) Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *BioMed Research International*, **2011**, Article ID: 852513. <https://doi.org/10.1155/2011/852513>
 - [7] Parkins, M.D., Somayaji, R. and Waters, V.J. (2018) Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **31**, e00019. <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-18>
 - [8] Lee, J. and Zhang, L. (2014) The Hierarchy Quorum Sensing Network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, **6**, 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
 - [9] Lin, J., Cheng, J., Wang, Y. and Shen, X. (2018) The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**, Article 230. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00230>
 - [10] Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Müller, R. and Häussler, S. (2005) Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines. *Journal of Bacteriology*, **187**, 3630-3635. <https://doi.org/10.1128/jb.187.11.3630-3635.2005>
 - [11] Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. and Rahme, L.G. (2001) A Quorum Sensing-Associated Virulence Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a LysR-Like Transcription Regulator with a Unique Self-Regulatory Mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 14613-14618. <https://doi.org/10.1073/pnas.251465298>
 - [12] Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A. and Crawford, I.P. (1990) Identification and Characterization of Genes for a Second Anthranilate Synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the Two Anthranilate Synthases and Evolutionary Implications. *Journal of Bacteriology*, **172**, 884-900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>
 - [13] Essar, D.W., Eberly, L., Han, C.Y. and Crawford, I.P. (1990) DNA Sequences and Characterization of Four Early Genes of the Tryptophan Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **172**, 853-866. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.853-866.1990>
 - [14] Palmer, G.C., Jorth, P.A. and Whiteley, M. (2013) The Role of Two *Pseudomonas aeruginosa* Anthranilate Synthases in Tryptophan and Quorum Signal Production. *Microbiology*, **159**, 959-969. <https://doi.org/10.1099/mic.0.063065-0>
 - [15] Cervenka, I., Agudelo, L.Z. and Ruas, J.L. (2017) Kynurenines: Tryptophan's Metabolites in Exercise, Inflammation, and Mental Health. *Science*, **357**, eaaf9794. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9794>
 - [16] Platten, M., Nollen, E.A.A., Röhrig, U.F., Fallarino, F. and Opitz, C.A. (2019) Tryptophan Metabolism as a Common Therapeutic Target in Cancer, Neurodegeneration and Beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, **18**, 379-401. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>
 - [17] Kurnasov, O., Jablonski, L., Polanuyer, B., Dorrestein, P., Begley, T. and Osterman, A. (2003) Aerobic Tryptophan Degradation Pathway in Bacteria: Novel Kynurenine Formamidase. *FEMS Microbiology Letters*, **227**, 219-227. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00684-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00684-0)
 - [18] Lima, W.C., Varani, A.M. and Menck, C.F.M. (2008) NAD Biosynthesis Evolution in Bacteria: Lateral Gene Transfer of Kynurenine Pathway in Xanthomonadales and Flavobacteriales. *Molecular Biology and Evolution*, **26**, 399-406. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn261>
 - [19] Farrow, J.M. and Pesci, E.C. (2007) Two Distinct Pathways Supply Anthranilate as a Precursor of the *Pseudomonas* Quinolone Signal. *Journal of Bacteriology*, **189**, 3425-3433. <https://doi.org/10.1128/jb.00209-07>
 - [20] Knoten, C.A., Hudson, L.L., Coleman, J.P., Farrow, J.M. and Pesci, E.C. (2011) KynR, a Lrp/AsnC-Type Transcriptional Regulator, Directly Controls the Kynurenine Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **193**, 6567-6575. <https://doi.org/10.1128/jb.05803-11>
 - [21] Palmer, K.L., Aye, L.M. and Whiteley, M. (2007) Nutritional Cues Control *Pseudomonas aeruginosa* Multicellular Behavior in Cystic Fibrosis Sputum. *Journal of Bacteriology*, **189**, 8079-8087. <https://doi.org/10.1128/jb.01138-07>
 - [22] Coleman, J.P., Hudson, L.L., McKnight, S.L., Farrow, J.M., Calfee, M.W., Lindsey, C.A., *et al.* (2008) *Pseudomonas aeruginosa* PqsA Is an Anthranilate-Coenzyme A Ligase. *Journal of Bacteriology*, **190**, 1247-1255. <https://doi.org/10.1128/jb.01140-07>
 - [23] Dulcey, C.E., Dekimpe, V., Fauvelle, D., Milot, S., Groleau, M., Doucet, N., *et al.* (2013) The End of an Old Hypothesis:

- The *Pseudomonas* Signaling Molecules 4-Hydroxy-2-Alkylquinolines Derive from Fatty Acids, Not 3-Ketofatty Acids. *Chemistry & Biology*, **20**, 1481-1491. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.09.021>
- [24] Drees, S.L. and Fetzner, S. (2015) PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules. *Chemistry & Biology*, **22**, 611-618. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.04.012>
- [25] Drees, S.L., Li, C., Prasetya, F., Saleem, M., Dreveny, I., Williams, P., *et al.* (2016) PqsBC, a Condensing Enzyme in the Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Quinolone Signal: Crystal Structure, Inhibition, and Reaction Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, **291**, 6610-6624. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.708453>
- [26] Schertzer, J.W., Brown, S.A. and Whiteley, M. (2010) Oxygen Levels Rapidly Modulate *Pseudomonas aeruginosa* Social Behaviours via Substrate Limitation of PqsH. *Molecular Microbiology*, **77**, 1527-1538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07303.x>
- [27] Ilangovan, A., Fletcher, M., Rampioni, G., Pustelny, C., Rumbaugh, K., Heeb, S., *et al.* (2013) Structural Basis for Native Agonist and Synthetic Inhibitor Recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator PqsR (MvfR). *PLOS Pathogens*, **9**, e1003508. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003508>
- [28] Montagut, E.J. and Marco, M.P. (2021) Biological and Clinical Significance of Quorum Sensing Alkylquinolones: Current Analytical and Bioanalytical Methods for Their Quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **413**, 4599-4618. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03356-x>
- [29] Choi, Y., Park, H., Park, S.J., Park, S., Kim, S., Ha, C., *et al.* (2011) Growth Phase-Differential Quorum Sensing Regulation of Anthranilate Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules and Cells*, **32**, 57-66. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-2322-6>
- [30] Costaglioli, P., Barthe, C., Claverol, S., Brözel, V.S., Perrot, M., Crouzet, M., *et al.* (2012) Evidence for the Involvement of the Anthranilate Degradation Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *MicrobiologyOpen*, **1**, 326-339. <https://doi.org/10.1002/mbo3.33>
- [31] Oglesby, A.G., Farrow, J.M., Lee, J., Tomaras, A.P., Greenberg, E.P., Pesci, E.C., *et al.* (2008) The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology: A Regulatory Link between Iron and Quorum Sensing. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 15558-15567. <https://doi.org/10.1074/jbc.m707840200>
- [32] Kim, S., Im, S., Yeom, D. and Lee, J. (2012) AntR-mediated Bidirectional Activation of *antA* and *antR*, Anthranilate Degradative Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, **505**, 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.004>
- [33] Moreau-Marquis, S., Stanton, B.A. and O'Toole, G.A. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation in the Cystic Fibrosis Airway. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **21**, 595-599. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.12.001>
- [34] Yang, L., Haagenen, J.A.J., Jelsbak, L., Johansen, H.K., Sternberg, C., Høiby, N., *et al.* (2008) *In Situ* Growth Rates and Biofilm Development of *Pseudomonas aeruginosa* Populations in Chronic Lung Infections. *Journal of Bacteriology*, **190**, 2767-2776. <https://doi.org/10.1128/jb.01581-07>
- [35] Kim, S., Park, H. and Lee, J. (2015) Anthranilate Deteriorates the Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Antagonizes the Biofilm-Enhancing Indole Effect. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 2328-2338. <https://doi.org/10.1128/aem.03551-14>
- [36] Li, X., Kim, S. and Lee, J. (2017) Anti-Biofilm Effects of Anthranilate on a Broad Range of Bacteria. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 8604. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06540-1>
- [37] Song, S., Sun, X., Guo, Q., Cui, B., Zhu, Y., Li, X., *et al.* (2022) An Anthranilic Acid-Responsive Transcriptional Regulator Controls the Physiology and Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathogens*, **18**, e1010562. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010562>
- [38] Chen, Y., Fu, Y., Xia, Y., Miao, Y., Shao, J., Xuan, W., *et al.* (2024) Trichoderma-Secreted Anthranilic Acid Promotes Lateral Root Development via Auxin Signaling and RBOHF-Induced Endodermal Cell Wall Remodeling. *Cell Reports*, **43**, Article ID: 114030. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114030>
- [39] Matsumoto, H., Fan, X., Wang, Y., Kusstatscher, P., Duan, J., Wu, S., *et al.* (2021) Bacterial Seed Endophyte Shapes Disease Resistance in Rice. *Nature Plants*, **7**, 60-72. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00826-5>