

文章编号:1000-5862(2020)02-0182-08

环二鸟苷酸对细菌运动调控的研究进展

袁媛,彭仁*
(江西师范大学生命科学院,江西 南昌 330022)

摘要:细菌中的第二信使环二鸟苷酸(c-di-GMP)对细菌的运动性有调节作用. c-di-GMP 调控鞭毛的生物合成、菌毛形成和菌毛蛋白的组成,以及其他一些与运动相关的蛋白的合成. 细菌的运动性与其毒力、致病性、粘附性、趋化性、生物膜组成等密切相关. 在革兰氏阴性细菌中,关于 c-di-GMP 的信号通路的研究较为清晰,而在革兰氏阳性细菌中,关于该信号转导通路的研究较少. 此外,有关 c-di-GMP 的信号通路的研究主要集中在病原菌. 该文主要综述了一些常见病原菌中 c-di-GMP 对其运动性的调控机制,为研究其他细菌 c-di-GMP 信号通路提供思路.

关键词:环二鸟苷酸;运动性;病原菌;信号通路

中图分类号:Q 935;Q 936 **文献标志码:**A **DOI:**10. 16357/j. cnki. issn1000-5862. 2020. 02. 13

0 引言

细菌的运动器官一般为鞭毛,在显微镜下可观察到细菌的运动. 鞭毛运动有液体泳动、固体表面滑行及液体旋转梭动 3 种方式. 在液体培养基中细菌通常由鞭毛调节它的运动,然而当细菌与固体表面接触时,表现为滑行和抽搐运动. 如在铜绿假单胞菌中表现为抽搐运动,而在黄色粘球菌和一些蓝细菌中表现为滑行运动^[1-4]. 鞭毛在细菌定植、运动,以及与植物组织、动物组织黏附作用中起重要作用. 鞭毛能促进个体细胞接近、结合甚至侵入到新的动植物组织中^[5].

纤毛是一种来源于细胞基体并突出细胞表面的细胞器,分为运动纤毛和初级纤毛^[6]. 相较于鞭毛,纤毛较短,2 者直径相近. 不论是鞭毛还是纤毛,在细菌的运动中都起着十分重要的作用.

环二鸟苷酸(c-di-GMP)是细菌中广泛存在的第二信使,它与其效应子结合后可调控细菌的许多生理活动,如细菌生物被膜发育、致病力、运动性、胞外多糖产生及细胞分化、细胞聚集等^[7-8]. 细菌胞内 c-di-GMP 是由 2 分子的 GTP 分子通过含 GGDEF 结构域的二鸟苷酸环化酶催化合成的,c-di-GMP 的降解是由含 EAL 或 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶来

完成的,产物为 pGpG 或 2 分子的 GMP^[9-10]. c-di-GMP 效应子包括结合效应蛋白和 RNA 类的核糖开关,c-di-GMP就是通过这 2 类物质对微生物的生理功能来进行精细调控的^[11].

1 在革兰氏阴性细菌中 c-di-GMP 对运动性的调控

1.1 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)

沙门氏菌(*Salmonella*)主要存在于人和动物的肠道内,属于致病能力极强的革兰氏阴性短杆菌^[12]. 鼠伤寒沙门氏菌属于食源性革兰氏阴性致病菌,其宿主范围极其广泛、环境适应能力强且具有较强的致病性^[13]. 在小肠结扎模型中,相比无鞭毛的鼠伤寒沙门氏菌,有鞭毛的能引起更强的中性粒细胞浸润和炎症反应^[14]. 这可能是因为鞭毛帮助细菌游到宿主小肠腔内的微褶细胞附近,从而引起多种宿主感染甚至会导致疾病^[15].

在鼠伤寒沙门氏菌中,CsrA 通过对 c-di-GMP 结合蛋白 mRNA 水平的控制来调节该蛋白的转录. c-di-GMP 特异性磷酸二酯酶 STM3611 通过 CsrA 来控制鞭毛功能,也可以通过 FlhDC/FlhA 来进行间接调节. CsrA 下调 STM1344 的表达,而 STM1344 又通

收稿日期:2019-11-19
基金项目:国家自然科学基金(31960011,31560018)资助项目.
通信作者:彭仁(1972-),男,江西丰城人,教授,博士,主要从事酶学和微生物生物化学研究. E-mail:renpeng@jxnu.edu.cn

过*flhA*来调节磷酸二酯酶STM3611,从而控制运动性^[16]。

J. E. Karlinsey等^[17]提到,伤寒沙门氏菌*flhDC*操纵子是表达整个鞭毛调控子所必需的主控制操纵子。在*flhDC*启动子和*flhDC*结构基因之间插入T-POP转座子会阻断*flhDC*的转录。伤寒沙门氏菌在诱导剂四环素存在时会运动,这是因为鞭毛蛋白生成和运动都需要诱导剂的作用。

D. Chandrani等^[15]的研究结果表明鞭毛基因表达的2个辅助调控因子FliZ和FliT在维持鞭毛种群水平分布方面具有重要作用。FlgM、FliZ和FliT蛋白在鞭毛调控中起着辅助作用,它们可能在细胞分裂和鞭毛频率分布中起着控制基因表达的关键作用。

K. Paul等^[18]发现在大肠杆菌和沙门氏菌中缺乏特定的磷酸二酯酶YhjH会影响细菌的运动性。在大肠杆菌和沙门氏菌中,PilZ结构域蛋白YcgR在c-di-GMP调控下对鞭毛运动进行调节,c-di-GMP与YcgR蛋白相互作用可以抑制这些微生物的运动性。YcgR依赖c-di-GMP与鞭毛转子蛋白FliM和FliG相互作用。然而在大肠杆菌和沙门氏菌中的YcgR不会影响鞭毛基因的表达但直接干扰鞭毛组装。

在大肠杆菌中,调节鞭毛运动的机制是一种翻译后、依赖c-di-GMP的机制。高浓度的c-di-GMP诱导鞭毛旋转产生逆时针偏转(CCW),从而导致游泳平稳。大肠杆菌c-di-GMP受体YcgR与鞭毛开关复合物的FliG亚基结合,通过c-di-GMP来增强YcgR-FliG相互作用。从而改变FliG-FliM相互作用以抑制鞭毛的旋转^[19]。

Hou Yanjie等^[20]提到,在大肠杆菌和沙门氏菌中c-di-GMP通过靶蛋白YcgR来调节细菌的运动。一方面,YcgR直接与MotA相互作用,与c-di-GMP的细胞浓度相关;另一方面,YcgR与FliG、FliM相互作用,在c-di-GMP存在下相互作用变得更强。活化的YcgR干扰了MotA和FliG之间的静电相互作用。

肠出血性大肠杆菌(EHEC)O157:H7是一种食源性致病菌,在肠道上皮定植会引起出血性结肠炎和溶血性尿毒综合征。VmpA是影响大肠杆菌O157:H7运动和控制生物膜形成的c-di-GMP信号通路的组成部分,它具有c-di-GMP磷酸二酯酶活性,影响菌株运动性,它的失活会导致游泳运动能力下降^[21]。

1.2 新洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)

洋葱伯克霍尔德菌复合体(*Burkholderia cepacia* complex, Bcc)至少含有18种不同的物种,它会在遗传性疾病囊性纤维化(CF)患者的肺部中导致慢性感染^[22]。新洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cenocepacia*)可从各种生态位中分离出来,为机会性致病菌,它可以在不同的环境中繁殖,包括囊性纤维化的肺部。在CF患者的痰液中富含氨基酸,在模拟CF患者痰液的营养条件下,新洋葱伯克霍尔德菌会增加鞭毛蛋白表达和游动能力。

含PAS结构域的c-di-GMP磷酸二酯酶BCAL1069(CdpA)能负调控c-di-GMP水平,进而调节新洋葱伯克霍尔德菌K56-2在模拟CF患者痰液的营养条件下的游泳运动。BCAL1069蛋白在精氨酸和谷氨酸的作用下调节游泳运动,该菌株通过诱导细胞内c-di-GMP水平来调节游泳运动,但它的运动不受鞭毛蛋白表达的影响。在模拟CF患者痰液营养条件下采取上调鞭毛蛋白的表达和改变鞭毛的模式后,K56-2菌株的游泳运动能力会有所增加。新洋葱伯克霍尔德菌K56-2中WspR(二鸟苷酸环化酶)的异源表达会引起c-di-GMP水平的增加和游动运动能力的降低,但不影响鞭毛蛋白的表达或鞭毛的合成^[23]。

当新洋葱伯克霍尔德菌在CF肺部中时,运动性增强、鞭毛蛋白表达增加。肺部囊性纤维化的营养条件还可以介导鞭毛数量和定位的变化。新洋葱伯克霍尔德菌K56-2在肺部囊性纤维化条件下能够诱导多鞭毛生成。单个氨基酸可增强其运动性,但不能促进鞭毛蛋白的表达。*flhF*基因参与鞭毛合成和鞭毛定位,在新洋葱伯克霍尔德菌中FliH过表达会导致鞭毛蛋白和鞭毛生物合成的减少,以及运动能力的降低,在产生一定量的FliH蛋白后,它负调节其自身的基因表达和鞭毛生物合成^[22]。

1.3 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)

铜绿假单胞菌具有极性鞭毛,可在液体环境中游动,并可在半固态表面上显示出运动性。FliA不仅通过控制鞭毛生物合成来调控运动性,而且还通过调节c-di-GMP浓度来影响群体运动。在铜绿假单胞菌PAO1中,FliA对运动的调控依赖于c-di-GMP。FliA可调控在铜绿假单胞菌中鞭毛蛋白的生成、鞭毛丝组装的起始和长度控制、趋化性调控因子、运动旋转和FliA特异性抗 σ 因子等基因的表达^[24]。

在铜绿假单胞菌中c-di-GMP水平的升高抑制了鞭毛驱动的群集运动,该菌株极性鞭毛的旋转受

复合物 MotAB 和 MotCD 控制, MotAB 不能支持群集运动, 而 MotCD 能促进群集运动. PilZ 结构域蛋白 FlgZ 以 c-di-GMP 依赖性方式直接与蛋白 MotC 相互作用, 进而影响群集运动. 当 c-di-GMP 水平升高时, FlgZ 和 Pel 影响多糖的产生从而抑制了群集运动. FlgZ 是影响铜绿假单胞菌的群集运动的 c-di-GMP 受体, c-di-GMP 结合的 FlgZ 通过其与 MotCD 的相互作用来阻碍运动^[25].

FimX 在铜绿假单胞菌中 IV 型菌毛生物合成和抽搐运动中起着重要作用. c-di-GMP 控制 FimX 与其伴侣结合, 调节 IV 型菌毛的组装和蠕动. FimX 定位于细菌细胞的一极, EAL 结构域的缺失或特征 EVL 基序的突变会影响 FimX 的单极定位^[26].

铜绿假单胞菌会引起囊性纤维化患者的慢性感染. IV 型菌毛和鞭毛在运动性、粘附性和生物膜形成中发挥重要作用. IV 型菌毛较少, 分布在铜绿假单胞菌的两极, 它在抽搐运动的过程中介导固体表面上的细菌运动. IV 型菌毛是由菌毛蛋白组成的, 其中菌毛蛋白是 *pilA* 基因的产物. 组装 IV 型菌毛需要蛋白 FimX, 然而 FimX 具有磷酸二酯酶活性, 但它不显示二鸟苷酸环化酶活性^[27].

1.4 新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)

新月柄杆菌是单鞭毛细菌, 它有 2 种不同的运动模式. 该菌的鞭毛是一个刚性螺旋, 因此无论它的游泳方向如何它都能保持其几何形状^[28]. 鞭毛和菌毛在新月柄杆菌预分裂细胞的一极上进行不对称地组装, 其中 PleA 是细胞极上插入外膜菌毛分泌通道和 PilA 菌毛蛋白亚基累积所必需的^[29].

TipF 是依赖 c-di-GMP 的细胞周期调节受体, 它通过退化的 c-di-GMP 磷酸二酯酶 EAL 结构域来感知并转导该信号, 以使核形成极性鞭毛. TipN 在极性鞭毛组装早期时起作用, 是鞭毛的正确定位所必需的. 细胞周期的 2 个主要的转录调节因子 CtrA 和 GcrA 在细胞周期的转录过程中起着重要作用. CtrA 诱导早期鞭毛结构成分的合成, 然而 GcrA 需要在 G1/S 过渡时聚集包括 TipF 在内的大量细胞周期调控转录产物^[30].

在新月柄杆菌中, TipF 和 TipN 确定新鞭毛发育的细胞极. TipF 对于运动性是必需的, 且包含 c-di-GMP 磷酸二酯酶(EAL)结构域. TipN 在 TipF 之前定位于鞭毛一极, 对于鞭毛正确定位必不可少, 并且 TipF 有助于在新月柄杆菌中正确表达鞭毛基因^[31].

DgrA 是 PilZ 的同源物, 同时也是 c-di-GMP 结

合蛋白, 它控制新月柄杆菌的鞭毛运动功能. c-di-GMP 浓度增加或 DgrA 对运动功能的干扰会阻断菌株的运动性. 鞭毛运动蛋白 FliL 与 DgrA 依赖性的细胞运动控制有关^[32].

新月柄杆菌在分裂时产生一个运动性 SW 细胞和一个 ST 细胞. SW 后代是运动的, 使用其菌毛最终重新附着到表面. 新月柄杆菌通过 c-di-GMP 与 CheY 样(Cle)蛋白家族的 C 末端的结合来调节鞭毛活性. 在它们的 c-di-GMP 结合构象中, Cle 蛋白与鞭毛开关相互作用从而控制运动活性. Cle 蛋白与鞭毛运动开关上的 CheY 结合调节运动行为. Cle 蛋白还可以通过 c-di-GMP 结合来与鞭毛基体相互作用^[33].

1.5 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)

恶臭假单胞菌信号蛋白 PP2258 通过 c-di-GMP 控制其运动能力. 蛋白 PP4397/FlgZ 能够结合 c-di-GMP 是其对恶臭假单胞菌运动性的影响的前提条件. 恶臭假单胞菌中 PP4397/FlgZ 在游泳和群集运动中有重要作用, PP4397/FlgZ 在 PP2258 下游响应 c-di-GMP 水平的调节, 它对由于缺乏信号蛋白 PP2258 而导致的 c-di-GMP 水平升高产生响应^[34].

缺乏 PP2258 蛋白或其过表达均会导致恶臭假单胞菌在固体培养基上的运动缺陷. PP2258 蛋白具有 PAS-GGDEF-EAL 结构域结构. 恶臭假单胞菌编码的 PP4397 蛋白与大肠杆菌和肠球菌 YcgR 分别具有 22% 和 24% 的序列一致性^[35], 所以推测恶臭假单胞菌编码 PP4397 蛋白与 YcgR 蛋白功能相似, 可以影响鞭毛的组装, 进而影响菌株的运动性.

在恶臭假单胞菌 KT2440 中编码的 GcbA 同源基因 PP_0563 是一个类似于 pld 的响应调节器, 恶臭假单胞菌 GcbA 参与初始表面附着和游泳, 在初始生物膜形成和游泳运动中起着重要作用. 在恶臭假单胞菌 KT2440 中, FleQ 与 *gcbA* 启动子结合能促进 *gcbA* 转录和 GcbA 表达, 而提高 c-di-GMP 水平则抑制了这种促进作用^[36].

在恶臭假单胞菌 KT2440 中, 鞭毛 σ 因子 FliA (σ^{28}) 部分控制磷酸二酯酶 BifA 的表达, FliA 作为负调节剂通过控制 *bifA* 的转录来调节 c-di-GMP 水平以促进游泳运动. BifA 蛋白的表达部分受鞭毛 σ 因子 FliA 控制, 而 FliA 过表达会降低恶臭假单胞菌 KT2440 中细胞内 c-di-GMP 的水平. 通过增强 BifA 蛋白的表达, FliA 作为负调节剂可调节 c-di-GMP 水平, 从而促进游泳运动, 因此 FliA 在恶臭假单胞菌 KT2440 的游泳能力调节中具有正反馈功能^[37].

flgZ 为编码 PilZ 结构域蛋白的鞭毛基因,它可以通过与鞭毛转子的相互作用来调节假单胞菌的游动能力.在荧光假单胞菌 F113 中,二鸟苷酸环化酶(WspR、SadC)和一种磷酸二酯酶(BifA)与游泳运动性和生物膜形成的调节有关.由 c-di-GMP 介导而导致游泳运动下调的信号转导途径至少部分独立于 *flgZ*.菌株游泳运动能被 BifA 激活或许是因为消耗了细胞内的 c-di-GMP^[38].

FlgZ 与大肠杆菌 YcgR 蛋白具有同源性,YcgR 蛋白在 c-di-GMP 作用下作为鞭毛制动器调节运动.*flgZ* 位于鞭毛操纵子中并与鞭毛基因 *flgMN* 共转录.*flgZ* 基因的转录取决于鞭毛调节剂 FleQ 和 FliA.在高 c-di-GMP 条件下,FlgZ 在细胞鞭毛极中的位置可能表明其与鞭毛基底体发生相互作用^[38].

FleQ 是铜绿假单胞菌中一种新型的 c-di-GMP 结合蛋白,可控制铜绿假单胞菌中 EPS 生物合成基因的转录调控.FleQ 激活鞭毛生物合成基因的表达,它还抑制基因的转录,包括参与 EPS 生物合成的 *pel* 基因,且这种抑制通过 c-di-GMP 得以缓解^[39].

在植物有益细菌恶臭假单胞菌 KT2440 中,FleQ 中的突变减少了生物膜形成和植物表面的定殖.这是由于 FleQ 与 c-di-GMP 相互作用,并且直接结合鞭毛和 EPS 基因的启动子区域^[40].

FleN 是 FleQ 在调节恶臭假单胞菌 KT2440 中 2 个生物膜基质编码操纵子的协同因子.FleN 缺失增加了恶臭假单胞菌 KT2440 中的鞭毛数,使游动能力和生物膜形成受损.FleN 及其同源的 FlhG 控制着鞭毛生物合成,缺乏 FleN 使鞭毛数量增多,并且改变鞭毛和生物膜相关基因的表达.FleN 的 ATP 酶活性是游泳运动和控制鞭毛数量所必需的^[41].

在恶臭假单胞菌中,FleQ 正调节鞭毛的生物合成,但负调节恶臭假单胞菌的 VI 型分泌系统.FleQ 在 c-di-GMP 作用下调控鞭毛和胞外多糖生物合成基因的表达.在菌株 KT2442 中胞内 c-di-GMP 水平在调节 FleQ 对 K1-T6SS 合成中起着重要作用,且可通过 c-di-GMP 来调节 FleQ 活性从而影响鞭毛运动.FleQ 和 RpoN 共同改变胞内 c-di-GMP 水平,通过 c-di-GMP 调节菌株 KT2442 中 T6SS 生物合成以及鞭毛的生物合成.菌株 KT2442 中 FleQ 在早期和晚期指数期时激活鞭毛的生物合成,但在早期指数生长期时抑制 T6SS 基因簇中 K1-T6SS 的生物合成.RpoN 和 FleQ 对恶臭假单胞菌 KT2442 中鞭毛和 K1-T6SS 的生物合成具有相似的调控作用.菌株 KT2442 细胞分泌大量鞭毛蛋白 FliC 和 Hcp1 蛋白

(VI 型分泌系统的一个关键成员 Hcp1),FleQ 和 RpoN 均可对 FliC 表达产生正向调控作用,而对 *hcp1* 的表达在生长的各个阶段中均产生负向调控作用^[42].

1.6 羊布鲁氏杆菌(*Brucella melitensis*)

c-di-GMP 对细胞壁结构、生物膜、运动性和复制具有广泛的影响.布鲁氏菌属(*Brucella*)是胞内兼性细菌,可导致布鲁氏菌病.c-di-GMP 升高会导致整体代谢变化,从而影响细胞壁、IV 型分泌系统和营养获取,其中 BpdA 磷酸二酯酶突变体可以调节 c-di-GMP 水平,降低鞭毛转录^[43].

羊布鲁氏病是一种人畜共患病.羊布鲁氏杆菌不能运动,但可以产生鞭毛,鞭毛使得羊布鲁氏杆菌毒力加强,毒力是由 c-di-GMP 通过介导鞭毛表达来调控的.在羊布鲁氏杆菌中,一定浓度的 c-di-GMP 对鞭毛的产生有抑制作用^[44].c-di-GMP 降解酶 BpdA 控制鞭毛基因的表达.BpdA 磷酸二酯酶的缺失会导致鞭毛启动子活性显著降低,鞭毛转录强烈下调.

2 在革兰氏阳性细菌中 c-di-GMP 对运动性的调控

2.1 艰难梭菌(*Clostridium difficile*)

艰难梭菌(*Clostridium difficile*)为革兰氏阳性、高致病性菌株,可导致腹泻、结肠炎等.在艰难梭菌中,c-di-GMP 抑制鞭毛运动和毒素产生,并促进菌毛依赖性生物膜的形成^[45].

c-di-GMP 促进艰难梭菌中菌毛蛋白 PilA1 基因表达和 IV 型菌毛(TFP)生物合成,胞内 c-di-GMP 浓度的增加会使鞭毛运动降低.c-di-GMP 增加表面运动性,促进艰难梭菌中依赖性 TFP 的表面活性,且 TFP 是艰难梭菌 R20291 表面运动所必需的.c-di-GMP 核糖开关 Cdi2_4 通过调控 IV 型菌毛(T4P)来促进细胞的聚集.在艰难梭菌中 c-di-GMP 浓度的增加会降低鞭毛的运动性并增加细胞聚集^[46].

艰难梭菌是一种厌氧病原体,可形成孢子,RstA 蛋白的破坏减少了孢子的形成并增加了毒素产生和运动性.RstA 通过影响 *sigD* 基因的转录来抑制运动和毒素的产生.SigD 蛋白是已知的毒素特异性 σ 因子 TcdR 的正调节因子^[47],它能够正向调控艰难梭菌的毒素基因,c-di-GMP 可以通过 SigD 蛋白来抑制细菌的运动性和毒素的产生.c-di-GMP 水平的增加会降低 *tcdA* 基因和 *tcdB* 基因的表达水平,也降低了 *tcdR* 基因的表达水平.c-di-GMP 直接影响鞭毛操纵

子 $flgB$ 的表达而对运动进行调控^[48].

艰难梭菌的滑行和抽搐运动都需要 IV 型菌毛 TFP,TFP 主要由菌毛蛋白 PilA 组成. 菌毛组装需要核苷酸结合蛋白 PilB、PilT、内膜蛋白 PilC、前菌毛素肽酶 PilD 和外膜蛋白 PilQ. 许多次要的菌毛蛋白也参与细菌的大分子转运,如 PilB、PilC、PilD 和 PilN 等^[1]. 艰难梭菌鞭毛在粘液附着中发挥作用. 艰难梭菌的 $fliC$ 基因和 $fliD$ 基因,分别编码 39-kDa 鞭毛蛋白和 56-kDa 鞭毛帽蛋白,这 2 种蛋白均与艰难梭菌附着在肠粘膜层有关^[49].

在艰难梭菌中胞内 c-di-GMP 浓度的增加降低了鞭毛的运动性并增加了细胞聚集,在艰难梭菌中 c-di-GMP 抑制鞭毛的表达. c-di-GMP 诱导原代初级 IV 型菌毛 T4P 基因簇的表达,诱导 T4P 合成. 初级 IV 型菌毛 T4P 基因 $pilA1$ 和 $pilB1$ 的失活使菌毛无法形成. c-di-GMP 上调 $pilA1$ 基因和 $pilB1$ 基因转录. c-di-GMP 与核糖开关 c-di-GMP-I (Cdi1) 结合促进转录的提前终止. 核糖开关 c-di-GMP-II (Cdi2_4) 是位于初级 IV 型菌毛 T4P 基因位点上游的另一个转录核糖体开关,c-di-GMP 也能够与 Cdi2_4 结合,因此 c-di-GMP 在艰难梭菌细胞聚集和 T4P 表达调控中有重要作用^[50].

在艰难梭菌中鞭毛能促进肠上皮细胞的粘附,鞭毛基因的表达还间接影响葡萄糖基化毒素的产生,调节 $flgB$ 操纵子表达的因子除影响鞭毛运动外还影响毒素的产生. 鞭毛开关位于 $flgB$ 操纵子的上游,鞭毛开关的方向控制着下游鞭毛基因的表达,鞭毛开关控制鞭毛和葡萄糖基化毒素的相变. 当鞭毛开关处于关闭方向时,需要通过艰难梭菌特异性调控因子来破坏或降解早期鞭毛基因 mRNA^[51].

在艰难梭菌中 c-di-GMP 核糖开关是位于 $flgB$ 操纵子上游的 Cdi1 核糖开关,该操纵子编码几个早期鞭毛基因. c-di-GMP 与 Cdi1 核糖开关的结合促进转录终止提前. 细胞内 c-di-GMP 的增加会降低 Cdi1 核糖开关下游鞭毛基因的转录并抑制游泳运动. c-di-GMP 通过抑制 $flgB$ 来操纵子基因 $sigD$ 的转录,间接抑制 TcdA 和 TcdB 毒素的合成^[52].

c-di-GMP 调节艰难梭菌的游动能力,Cdi1 (c-di-GMP 核糖开关)控制着 $flgB$ 和下游鞭毛基因的表达. 鞭毛基因表达的调控发生在转录水平. 艰难梭菌在软琼脂中可看到明显的运动,在软琼脂培养基中的运动性随细胞内 c-di-GMP 的增加而降低,艰难梭菌 630 菌株乳链菌肽诱导 DccA 蛋白表达后,在软琼脂中的运动能力显著下降. 然而,在 R20291 中表

达 pPdcA-EAL 可以显著提高运动能力,但这种影响很小^[53].

艰难梭菌 630 Δ erm 在体内成功定植不需要鞭毛和运动性. 在菌株 R20291 中,鞭毛在定植和粘附中起作用,且艰难梭菌菌株之间存在统计学意义上的显著性差异^[54]. 在艰难梭菌 630 株中,糖基转移酶基因 (CD0240) 的插入失活导致鞭毛丝无法在细胞表面上产生,只有少量未经修饰的鞭毛蛋白. 艰难梭菌产生的鞭毛蛋白是具有独特修饰的糖蛋白,鞭毛蛋白的糖基化是正确组装和随后的运动所必需的^[55].

2.2 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)

苏云金芽孢杆菌是昆虫致病菌,为革兰氏阳性. 研究表明:删除苏云金芽孢杆菌 BMB171 中的一个或多个 pde 基因能够提高其细胞内的 c-di-GMP 水平. 细胞内 c-di-GMP 水平的提高能够产生细胞活力、生物膜形成和细胞聚集等方面的改变. 其中细胞内 c-di-GMP 水平升高可通过阻碍部分鞭毛组装基因的转录来抑制细胞活力,因此随着 c-di-GMP 水平的升高,该菌对棉铃虫的杀虫活性增强^[56].

在苏云金芽孢杆菌 407 中,c-di-GMP 水平的升高对细胞的生物膜形成起到正调控作用,然而对其运动性和细胞毒性起到负调控作用. 在过表达菌株和缺失突变体中对生物膜、运动性和细胞毒性都有显著影响. CdgF 是一种主要的二鸟苷酸环化酶,控制着生物膜和运动型生活方式之间的转换^[57].

3 展望

细菌的运动能力在幼龄的菌株中比较活跃,而在老龄的菌株中运动性较差甚至无法运动. 细菌的运动不仅在细菌的迁移中有作用,而且对于细菌的其他生理功能(如毒力、侵入其他细胞或组织、生物膜的组成等)都有十分重要的作用. c-di-GMP 为细菌中普遍存在的第二信使,它不仅能够调控鞭毛和纤毛形成,而且还能通过调控因子或者与蛋白质结合对细菌的运动性来进行直接或是间接地调控. 因此,c-di-GMP 信号通路的研究是微生物生理生化领域的一个研究热点.

近年来,c-di-GMP 信号通路的研究主要集中在病原菌方面,如肠致病性大肠杆菌 (EPEC)、鼠伤寒沙门氏菌、羊布鲁氏杆菌、铜绿假单胞菌、鼻疽伯克氏菌、云南烟草野火病病原细菌等^[58-61],这些研究揭示了 c-di-GMP 信号通路与细菌的毒性之间的关

系。笔者在研究1株赤红球菌时发现c-di-GMP信号通路与该菌株的有机溶剂耐受性存在关联,这暗示该通路对于微生物的抗逆性也可能发挥一定的作用^[62]。因此,通过对不同微生物中c-di-GMP信号通路的研究,有助于进一步认识该信号通路在各种微生物的独特生理特性中所扮演的角色,从而为调控这些微生物的运动提供新的思路。

4 参考文献

- [1] Belas R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria [J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(9): 517-527.
- [2] 赵晓阳,孙伟,杨炳君,等. 鞭毛和纤毛拍击研究 [J]. 中国科技信息, 2018(3/4): 52-53.
- [3] 徐娜娜,何静妹,汤仁仙. 细菌鞭毛染色方法的改良 [J]. 实用医技杂志, 2017, 24(2): 218-219, 241.
- [4] 李交昆,南美花,吴学玲,等. 细菌鞭毛在生理活动中的作用 [J]. 生命科学, 2018, 30(6): 673-679.
- [5] 许绵,周明旭,朱国强. 细菌鞭毛运动、黏附和免疫逃逸机制的研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2017, 37(2): 369-375, 380.
- [6] 肖良,赵海丹. 纤毛的研究进展 [J]. 海军总医院学报, 2006, 19(1): 32-35.
- [7] 程寿廷,王芳芳,钱韦. 鉴定 cyclic di-GMP 效应蛋白:高通量筛选策略与实验验证方法 [J]. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1376-1389.
- [8] Roelofs K G, Jones C J, Helman S R, et al. Systematic identification of cyclic-di-GMP binding proteins in *Vibrio cholerae* reveals a novel class of cyclic-di-GMP-binding ATPases associated with type II secretion systems [J]. Plos Pathogens, 2015, 11(10): 1-29.
- [9] Düvel J, Bertinetti D, Möller S, et al. A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 88(2): 229-236.
- [10] Li Kewei, Yang Guangjian, Debru A B, et al. SuhB regulates the motile-sessile switch in *Pseudomonas aeruginosa* through the Gac/Rsm pathway and c-di-GMP signaling [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1045.
- [11] 钱韦,马旅雁,谷立川,等. Biofilm 与 c-di-GMP 专刊序言:微生物的社会性、c-di-GMP 调控及研究新技术 [J]. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1351-1356.
- [12] 曲道峰,沈杨,张聪聪,等. 沙门氏菌 CRISPR 位点的结构特征比较 [J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 209-218.
- [13] 闫春娟,欧阳震霖,冉浚侨. 鼠伤寒沙门氏菌 c-di-GMP 结合蛋白 YcgR 的表达、纯化及活性鉴定 [J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 771-779.
- [14] 耿士忠,潘志明,方强,等. 鼠伤寒沙门氏菌 X4550 *flhD* 基因缺失株的构建 [J]. 中国兽医科学, 2010, 40(1): 1-6.
- [15] Chandrani D, Chaitanya M, Mande S S, et al. Dynamics and control of flagella assembly in *Salmonella typhimurium* [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 36.
- [16] Jonas K, Edwards A N, Ahmad I, et al. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium* [J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(2): 524-540.
- [17] Karlinsey J E, Tanaka S, Bettenworth V, et al. Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription [J]. Molecular Microbiology, 2000, 37(5): 1220-1231.
- [18] Paul K, Nieto V, Carlquist W C, et al. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "Backstop Brake" Mechanism [J]. Molecular Cell, 2010, 38(1): 128-139.
- [19] Fang Xin, Gomelsky M. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility [J]. Molecular Microbiology, 2010, 76(5): 1295-1305.
- [20] Hou Yanjie, Li Defeng, Wang Dacheng. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the flagellar motor 'brake' molecule YcgR with c-di-GMP from *Escherichia coli* [J]. Acta Crystallographica Section F, 2013, 69(6): 663-665.
- [21] Branchu P, Hindré T, Fang Xin, et al. The c-di-GMP phosphodiesterase VmpA absent in *Escherichia coli* K12 strains affects motility and biofilm formation in the enterohemorrhagic O157: H7 serotype [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2013, 152(1/2): 132-140.
- [22] Kumar B, Cardona S T. Synthetic cystic fibrosis sputum medium regulates flagellar biosynthesis through the *flhF* gene in *Burkholderia cenocepacia* [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 65.
- [23] Brijesh K, Sorensen J L, Cardona S T. A c-di-GMP-modulating protein regulates swimming Motility of *Burkholderia cenocepacia* in response to arginine and glutamate [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 56.
- [24] Lo Yiling, Shen Lunda, Chang C H, et al. Regulation of motility and phenazine pigment production by FliA is cyclic-di-GMP dependent in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. Plos One, 2016, 11(5): e0155397.
- [25] Baker A E, Diepold A, Kuchma S L, et al. A PilZ domain protein FlgZ mediates c-di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(13): 1837-1846.

- [26] Qi Yaning, Chuah M L C, Dong Xueming, et al. Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (4): 2910-2917.
- [27] Kazmierczak B I, Lebron M B, Murray T S. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(4): 1026-1043.
- [28] Liu Bin, Gulino M, Morse M, et al. Helical motion of the cell body enhances *Caulobacter crescentus* motility [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(31): 11252-11256.
- [29] Viollier P H, Shapiro L. A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(2): 331-345.
- [30] Davis N J, Cohen Y, Sanselicio S, et al. De- and repolarization mechanism of flagellar morphogenesis during a bacterial cell cycle [J]. *Genes and Development*, 2013, 27(18): 2049-2062.
- [31] Davis N J, Viollier P H. Probing flagellar promoter occupancy in wild-type and mutant *Caulobacter crescentus* by chromatin immunoprecipitation [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 319(2): 146-152.
- [32] Christen M, Christen B, Allan M G, et al. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(10): 4112-4117.
- [33] Nesper J, Hug I, Kato S, et al. Cyclic di-GMP differentially tunes a bacterial flagellar motor through a novel class of CheY-like regulators [J]. *eLife*, 2017, 6: e28842.
- [34] Wirebrand L, Österberg S, López-Sánchez A, et al. PP4397/FlgZ provides the link between PP258 c-di-GMP signalling and altered motility in *Pseudomonas putida* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12205.
- [35] Österberg S, Åberg A, Herrera S M K, et al. Genetic dissection of a motility-associated c-di-GMP signalling protein of *Pseudomonas putida* [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(4): 556-565.
- [36] Xiao Yujie, Nie Hailing, Liu Huizhong, et al. Expression of the diguanylate cyclase GcbA is regulated by FleQ in response to cyclic di-GMP in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 8(6): 993-1002.
- [37] Xiao Yujie, Liu Huizhong, Nie Hailing, et al. Expression of the phosphodiesterase BifA facilitating swimming motility is partly controlled by FliA in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. *Microbiology Open*, 2017, 6(1): e00402.
- [38] Martínez-Granero F, Navazo A, Barahona E, et al. Identification of *flgZ* as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas* [J]. *Plos One*, 2014, 9(2): e87608.
- [39] Hickman J W, Harwood C S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(2): 376-389.
- [40] Molina-Henares M A, Ramos-González M I, Daddaoua A, et al. FleQ of *Pseudomonas putida* KT2440 is a multimeric cyclic diguanylate binding protein that differentially regulates expression of biofilm matrix components [J]. *Research in Microbiology*, 2017, 168(1): 36-45.
- [41] Nie Hailing, Xiao Yujie, Liu Huizhong, et al. FleN and FleQ play a synergistic role in regulating *lapA* and *bcs* operons in *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2017, 9(5): 571-580.
- [42] Wang Yuzhou, Li Ye, Wang Jianli, et al. FleQ regulates both the type VI secretion system and flagella in *Pseudomonas putida*: FleQ Regulates T6SS and Flagella [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2018, 65(3): 419-427.
- [43] Khan M, Harms J S, Marim F M, et al. The bacterial second messenger cyclic di-GMP regulates *Brucella* pathogenesis and leads to altered host immune response [J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(12): 3458-3470.
- [44] Petersen E, Chaudhuri P, Gourley C, et al. *Brucella melitensis* cyclic di-GMP phosphodiesterase BpdA controls expression of flagellar genes [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(20): 5683-5691.
- [45] Purcell E B, McKee R W, Courson D S, et al. A nutrient-regulated cyclic diguanylate phosphodiesterase controls *Clostridium difficile* biofilm and toxin production during stationary phase [J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(9): e00347-17.
- [46] Purcell E B, McKee R W, Bordeleau E, et al. Regulation of Type IV pili contributes to surface behaviors of historical and epidemic strains of *Clostridium difficile* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(3): 565-577.
- [47] Edwards A N, Tamayo R, McBride S M. A novel regulator controls *Clostridium difficile* sporulation, motility and toxin production [J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(6): 954-971.
- [48] McKee R W, Mangalea M R, Purcell E B, et al. The second messenger cyclic di-GMP regulates *Clostridium difficile* toxin production by controlling expression of *sigD* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(22): 5174-5185.
- [49] Tasteyre A, Barc M C, Collignon A, et al. Role of FliC and

- FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization [J]. Infection and Immunity, 2001, 69(12):7937-7940.
- [50] Bordeleau E, Purcell E B, Lafontaine D A, et al. Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile* [J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(5):819-832.
- [51] Anjuwon-Foster B R, Tamayo R. A genetic switch controls the production of flagella and toxins in *Clostridium difficile* [J]. Plos Genetics, 2017, 13(3):e1006701.
- [52] Hendrick W A, Orr M W, Murray S R, et al. Cyclic di-GMP binding by an assembly ATPase (PilB2) and control of type IV pilin polymerization in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* [J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199(10):e00034-17.
- [53] Purcell E B, McKee R W, McBride S M, et al. Cyclic diguanylate inversely regulates motility and aggregation in *Clostridium difficile* [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(13):3307-3316.
- [54] Baban S T, Kuehne S A, Barketi-Klai A, et al. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis; comparison between a non-epidemic and an epidemic strain [J]. Plos One, 2013, 8(9):e73026.
- [55] Twine S M, Reid C W, Aubry A, et al. Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile* [J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(22):7050-7062.
- [56] Fu Yang, Yu Zhaoqing, Liu Shu, et al. c-di-GMP regulates various phenotypes and insecticidal activity of Gram-positive *Bacillus thuringiensis* [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:45.
- [57] Shelud'ko A V, Filipécheva Y A, Telesheva E M, et al. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dynamic conditions [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(2):19.
- [58] Girón J A, Torres A G, Freer E, et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells [J]. Molecular Microbiology, 2002, 44(2):361-379.
- [59] 丁莉莎,王瑶. 鞭毛介导的运动性与细菌生物膜的相互关系 [J]. 微生物学报, 2009, 49(4):417-422.
- [60] Chua K L, Chan Y Y, Gan Y H. Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei* [J]. Infection and Immunity, 2003, 71(4):1622-1629.
- [61] Ichinose Y, Shimizu R, Ikeda Y, et al. Need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: genetic analysis with flagella-defective mutants $\Delta fliC$ and $\Delta fliD$ in host tobacco plants [J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69(4):244-249.
- [62] 匡素芳. 赤红球菌定量蛋白质组学及其二鸟苷酸环化酶的融合表达和催化特性研究 [D]. 南昌:江西师范大学, 2019.

The Research Progress on Regulation of Bacterial Motility by Cyclic Diguanosine Monophosphate

YUAN Yuan, PENG Ren*

(College of Life of Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: Cyclic diguanosine monophosphate (c-di-GMP) that is the second messenger in the bacteria regulates bacterial motility. c-di-GMP regulates flagellum biosynthesis, pili formation, pilin composition and synthesis of other motor-related proteins. The motility of bacteria is related to its physiological activities such as virulence, pathogenicity, adhesion, chemotaxis and biofilm composition. In Gram-negative bacteria, the signaling pathways of c-di-GMP are well documented. Nevertheless, few reports about the pathway in Gram-positive bacteria are available. Furthermore, the studies on the signaling pathway focus on pathogen. The mechanisms of bacterial motility regulated by c-di-GMP are summarized in the present paper, which provides examples for the study of c-di-GMP signaling pathway in other bacteria.

Key words: cyclic diguanosine monophosphate; motility; pathogen; signaling pathway

(责任编辑:刘显亮)