

c-di-GMP 信号途径对细菌致病性的调控作用

管文静 吴茂森 何晨阳*

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘要: 环鸟苷二磷酸(c-di-GMP)是一种广泛存在于细菌中的新型第二信使。鸟苷酸环化酶(DGC)和磷酸二酯酶(PDE)分别控制了 c-di-GMP 的合成和降解, 其中 DGC 活性由 GGDEF 结构域决定, PDE 活性由 EAL 和 HD-GYP 结构域决定。c-di-GMP 调控着细菌多种生物学功能, 抑制毒性因子产生和运动性, 促进生物膜形成。c-di-GMP 下游是一个包括转录、翻译以及翻译后等多层次的复杂调控网络。本文结合本室有关水稻白叶枯病菌的研究结果, 综述近年来国内外在 c-di-GMP 研究领域的最新进展。

关键词: 环鸟苷二磷酸, 毒性, 运动性, 生物膜形成, 调控作用

Cyclic Diguanylate Signalling in Regulation of Bacterial Pathogenesis

GUAN Wen-Jing WU Mao-Sen HE Chen-Yang*

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Cyclic diguanylate (c-di-GMP) is a bacterial second messenger of growing recognition involved in the regulation of a number of complex physiological processes. In combinations to the related progress of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causing agent of bacterial blight of rice in our lab, this review describes (1) the biosynthesis and hydrolysis of c-di-GMP and several mechanisms of regulation of c-di-GMP metabolism, (2) the contribution of c-di-GMP to regulating virulence, motility and biofilm formation, processes that affect pathogenesis of many bacteria, and (3) ways in which c-di-GMP may mediate these regulatory effects.

Keywords: Cyclic diguanylate, Virulence, Motility, Biofilm formation, Regulation

上世纪 80 年代, 首先在葡糖酸醋酸杆菌中发现了作为纤维素合成酶异构激活因子的环鸟苷二磷酸(c-di-GMP)^[1]。近几年来, c-di-GMP 被认为是一种新发现的、广泛存在于细菌中的全新的第二信使^[2]; 国内外在有关 c-di-GMP 代谢调控、细胞功能和信号传导的作用等方面取得了重要的进展。本文将结合本室近年来水稻白叶枯病菌的相关研究结果, 对此作

一综述。

1 c-di-GMP 的代谢

1.1 GGDEF 和 EAL 结构域蛋白分别控制 c-di-GMP 的代谢

在对葡糖酸醋酸杆菌纤维素合成的研究中, 发现了作为纤维素合成酶异构激活因子的 c-di-GMP,

并发现了控制其合成的鸟苷酸环化酶(DGC)和水解的磷酸二酯酶(PDE)及其编码基因^[3]。DGC和PDE分别含有高度保守的GGDEF和EAL结构域。两个GTPs分子在DGC作用下形成c-di-GMP, c-di-GMP在PDE作用下被水解为pGpG。PDE活性需要Mg²⁺和Mn²⁺, 受Ca²⁺和Zn²⁺强烈抑制。GGDEF活性位点氨基酸残基的改变可能导致DGC活性丧失, 但也不尽然。铜绿假单胞杆菌GGEEF具有DGC活性; 虽然有的GGDEF结构域蛋白丧失了DGC活性, 可往往仍起着重要的调控作用。因为EAL基序的变化似乎对PDE活性没有影响, 至今仍未完全确定EAL结构域蛋白的活性位点^[2]。

1.2 HD-GYP 结构域蛋白具有 PDE 活性

HD-GYP结构域蛋白属于磷酸水解酶HD家族。许多细菌HD-GYP与Che-Y类双组分信号接收结构域(REC)相连, 表明它可能参与信号传递。HD-GYP结构域蛋白与c-di-GMP水解有关^[4]。某些细菌具有GGDEF和HD-GYP结构域蛋白, 却没有EAL结构域, 表明HD-GYP很可能代替EAL行使PDE的作用。HD-GYP结构域蛋白能将c-di-GMP水解为中间产物pGpG, 最终水解为GMP^[2]。此外, HD-GYP结构域蛋白RpfG与GGDEF结构域蛋白发生直接互作, 推测可能具有调节GGDEF结构域蛋白的功能^[5]。水稻白叶枯病菌中 3 个蛋白具有HD-GYP结构域, 其中RpfG_{xoo}突变后直接影响到细菌胞外多糖产生能力(待发表资料)。

1.3 细菌具有大量 GGDEF、EAL 和 HD-GYP 结构域蛋白

在细菌基因组中广泛地分布着GGDEF、EAL和HD-GYP结构域。铜绿假单胞杆菌有 38 个、沙雷杆菌有 98 个、霍乱弧菌中有 53 个、大肠杆菌有 29 个, 水稻白叶枯病菌中具有 25-26 个这样的蛋白(待发表资料)。表明c-di-GMP是一个广泛存在于细菌中的第二信使^[6]。

2 c-di-GMP 代谢的调控

在磷酸化、细胞内定位、转录和蛋白稳定性水平上的 DGC 和 PDE 活性调控机制, 在时空上严格控制着细胞内 c-di-GMP 浓度。

2.1 输入结构域

GGDEF、EAL和HD-GYP结构域蛋白含有多种输入结构域, 包括PAS、GAF、HAMP、REC和HTH

等传感蛋白结构域和调控元件, 表明c-di-GMP代谢调控模式多样^[7]。PAS在血红素或核黄素等协同因子存在下能感应光、氧化还原物质和氧分子。GAF结构域能结合寡核苷酸, 酿酒酵母菌GAF结构域能结合cGMP。REC或HTH结构域是信号传导系统应答调节子的结构特征。具有REC和EAL结构域的水稻白叶枯病菌VieA_{xoo}位于化感系统基因簇中, 推测REC可能接收来自化感系统基因的信号, 调控c-di-GMP代谢(待发表资料)。但是, 并非所有与GGDEF和EAL结构域共同存在的其它结构域都能调控酶活性。霍乱弧菌VieA的EAL结构域两旁具有REC和HTH结构域, 体外试验发现REC磷酸化对PDE活性却没有影响^[8]。

2.2 GGDEF 和 EAL 结构域共存

一个蛋白同时存在 GGDEF 和 EAL 两个结构域。水稻白叶枯病菌有 10 个这种蛋白(待发表资料)、野油菜黄单胞杆菌有 8 个、铜绿假单胞杆菌有 16 个。

GGDEF-EAL结构域蛋白中通常有一个结构域是非保守的, 丧失酶活性, 但它却对另一个结构域具有调控作用。新月柄杆菌GGDEF-EAL结构域蛋白CC3396 含有非保守的GEDEF, 丧失DGC活性, 但仍能结合GTP, 并且激活相邻的EAL结构域控制的PDE活性^[9]。铜绿假单胞杆菌FimX的GGDEF结构域活性位点被GDSIF取代, 但具有调控PDE活性的功能^[7]。

GGDEF-EAL结构域蛋白可能同时具有DGC和PDE活性。副溶血性弧菌GGDEF-EAL结构域蛋白ScrC具有两种酶活性。ScrC具有DGC活性, 产生c-di-GMP; 当ScrC与ScrA和ScrB同时存在时, 具有PDE活性, 降解c-di-GMP^[10]。水稻白叶枯病菌PdeA_{xoo}同时具有EAL和GGDEF结构域, 但其具体功能还未明确。

2.3 DGC 和 PDE 稳定性、细胞定位和转录

控制DGC和PDE稳定性是c-di-GMP代谢调控途径之一。鼠疫杆菌有 6 个蛋白控制着血晶素储藏(Hms)蛋白, 3 个Hms蛋白受温度调控, 其中HmsT推测具有DGC活性, 在 37°C时不稳定, 易被Lon和ClpPX蛋白酶降解^[7]。

通过调节DGC和PDE在细胞内的位置可以调控c-di-GMP代谢。葡糖醋酸杆菌PleD含有REC和GGDEF结构域, 当它从细胞质弥散状态定位于鞭毛

着生的细胞极性部位时,细胞从游动状态转变为附着状态,这种生长状态的转变可能与细胞内c-di-GMP浓度有关^[11]。

对DGC和PDE编码基因转录的调控是调控c-di-GMP代谢的另一种主要模式。霍乱弧菌其他DGC和PDE基因表达也在转录水平上受到调控。其中转录激活子VieA具有PDE活性,它与组氨酸激酶VieS共转录。VieA磷酸化激活其转录调控活性,自诱导*vieSA*的表达^[12]。

3 受 c-di-GMP 调控的效应子

一般认为,细菌可能存在类似分子开关的蛋白,结合c-di-GMP后,再作用于下游蛋白,引起一系列级联反应^[2]。

c-di-GMP受体分子PilZ结构域蛋白的发现,为调控机制的解析提供了直接证据。PilZ结构域蛋白是c-di-GMP结合位点,与受c-di-GMP调控的细胞功能有密切关系^[13]。PilZ结构域在细菌中广泛分布,并且能与许多其它结构域共存。表明PilZ除了起到分子开关的作用,还可能调控其它输出结构域活性。

PelD是在铜绿假单胞杆菌中发现的一个新的c-di-GMP受体,介导了c-di-GMP调控的多糖合成和生物膜形成^[14]。

Clp是野油菜黄单胞杆菌中一个推导的具有环化核苷酸cNMP结合结构域和保守的DNA结合结构域(HTH)信号受体蛋白^[15]。Clp_{xoo}在水稻白叶枯病菌中调控了鞭毛运动性、胞外多糖产生、H₂O₂抗性和致病性。这些因为*clp_{xoo}*突变所引起的表型变化与c-di-GMP调控的细胞功能很类似,表明Clp_{xoo}可能位于c-di-GMP信号途径的下游,调控病菌的生物学功能(待发表资料)。

4 受 c-di-GMP 调控的细胞功能

c-di-GMP在转录、翻译和翻译后水平上调控细菌毒性、运动性和生物膜形成等方面的功能^[7]。一般而言,细胞内c-di-GMP浓度较高时,细菌趋于静止,有利于生物膜形成,发生聚集;而浓度较低时,有助于运动性和毒性因子产生^[16]。

4.1 毒性因子产生

c-di-GMP直接调控着细菌毒性因子的产生^[7]。霍乱弧菌应答调节子VieA具有PDE活性,是ToxT表达必需的,ToxT控制了纤毛和霍乱毒素CT表

达^[8]。沙门氏杆菌通过EAL结构域编码基因*cdgR*调控c-di-GMP,负调控活性氧抗性机制,抑制毒性。铜绿假单胞杆菌两个PDE编码基因*pvrR*和PA3947突变降低细菌致病力^[17]。此外,c-di-GMP在肺炎军团菌、布鲁氏菌、百日咳杆菌和创伤弧菌中都能调控细菌毒性因子的产生^[7]。因此,c-di-GMP通过不同方式抑制了细菌毒性的表达。

4.2 运动性

在早期侵染过程中运动性是细菌定殖所必需的,细菌运动性与致病性密切关联。细菌有鞭毛泳动、爬动和纤毛抽动3种主要运动方式。一般认为,c-di-GMP对于运动性有抑制作用^[18]。

在转录、翻译和翻译后水平上调控鞭毛基因,从而影响鞭毛运动性。(1)影响鞭毛基因的转录。过量表达DGC(CdgF),霍乱弧菌运动性降低;过量表达PDE,细菌运动性增加。CdgF过量表达菌株的许多重要鞭毛基因显著下调表达,表明CdgF通过改变细胞c-di-GMP的浓度、调控了鞭毛基因的转录^[19]。(2)参与蛋白翻译、稳定性、分泌的调控。新月柄杆菌TipF具有PDE活性,*tipF*突变后运动性降低。在*tipF*突变体中鞭毛基因*fljK*的转录几乎不受影响,但蛋白的翻译水平却显著降低^[20]。(3)参与鞭毛功能的调控。新月柄杆菌DGC(DgcA)过量表达菌株鞭毛完整,鞭毛蛋白未受影响,但运动性明显受到抑制。过量表达PilZ结构域蛋白DgrA和DgrB,结果相同^[21]。

参与了纤毛抽动的调控。铜绿假单胞杆菌FimX含有REC、PAS、GGDEF和EAL结构域,具有PDE活性。*fimX*突变后,胞内c-di-GMP浓度降低,运动性受到抑制,纤毛在细胞表面的聚集力显著降低^[22]。

4.3 生物膜形成

c-di-GMP调控细菌浮游生长方式和生物膜之间的相互转换。低浓度c-di-GMP抑制生物膜形成和表面附着物质产生,使细菌处于游动状态;高浓度c-di-GMP提高黏附基质成分表达,产生多细胞行为,促进生物膜形成,将细菌锁定在静止状态^[16]。

调控生物膜重要组分EPS的产生^[7]。霍乱弧菌胞外多糖(VPS)合成酶由两个操纵子编码,受两个转录激活子VpsR和VpsT调控。PDE编码基因*vieA*突变后,*vps*转录显著提高,生物膜形成能力增强,过表达*vieA*抑制生物膜形成。因此,c-di-GMP参与对VPS的调控是通过转录激活*vpsR*和*vpsT*实现

的^[19]。水稻白叶枯病菌DSF信号系统Rpf蛋白无论是在单基因突变体中、还是在双基因突变体中, EPS产生显著减少。

通过纤毛影响生物膜形成。纤毛能提高细菌吸附于其它细菌或介质表面的能力, 在生物膜形成初期具有十分重要的作用。霍乱弧菌红血球凝聚素型纤毛(MSHA)合成的操纵子包含了一个GGDEF-EAL结构域基因^[23]。

调控细菌从生物膜中散开。铜绿假单胞杆菌趋化性调控因子BdlA突变后, c-di-GMP浓度增加, 细菌聚集后分散能力降低。BdlA本身并不具有PDE和DGC活性。推测BdlA可能通过控制这两个酶的活性、调节胞内c-di-GMP浓度^[24]。

5 c-di-GMP 在细菌信号传导中的作用

c-di-GMP 信号途径可能与双组分调控系统(TCS)共同发挥作用^[25]。TCS普遍存在于细菌信号传递过程中, 依赖具有胞外输入功能域的组氨酸感应蛋白激酶和具有输出功能域的胞内应答调节子之间的磷酸转移来实现信号传导。大多数 GGDEF 和 EAL 结构域并非独自存在, 其中部分被归入了TCS^[26]。

c-di-GMP可能是许多胞外信号在胞内共同的第二信使。许多GGDEF和EAL结构域蛋白镶嵌在细胞膜上或与细胞膜相连, 具有信号感应结构域, 能够感应胞外信号, 并传至胞内^[27]。

c-di-GMP可能与细菌群体感应(QS)联系密切。QS与c-di-GMP调控着许多相同的细胞功能(生物膜形成、多细胞性和毒性), 所以这两个信号传导机制很可能是相互联系的。野油菜黄单胞杆菌DSF是QS信号分子, RpfC/RpfG组成的TCS负责感应和传导DSF信号^[27]。RpfG含有HD-GYP结构域, 具有PDE酶活性, 或直接作用于GGDEF结构域蛋白^[28]。海栖热袍菌QS调控DGC和PDE基因表达, 控制胞内c-di-GMP浓度^[29]。QS信号分子合成可能也与c-di-GMP有关^[30]。

6 结语

近年来, 对于第二信使c-di-GMP代谢机制以及细胞功能调控的研究取得了很大进展。受体分子PilZ的发现对于阐明和认识c-di-GMP的信号传导通

路具有里程碑式的意义。然而, c-di-GMP 的研究还有许多关键科学问题有待于进一步探索: (1)数量众多的 GGDEF、EAL 和 HD-GYP 结构域蛋白如何协作调控胞内 c-di-GMP 浓度? 是否存在主效基因? 每个蛋白是否在这个复杂的调控网络中都承担特定作用? 对于蛋白稳定性和细胞定位调控 DGC 和 EAL 代谢酶的观点需更多的证据。(2) c-di-GMP 下游产物 pGpG 和 GMP 是否在信号传导中具有信号分子作用? (3) c-di-GMP 是通过何种途径调控细胞如此众多的功能? 是否存在其它 c-di-GMP 受体分子? 受体分子结合 c-di-GMP 后是如何介导下游调控反应? c-di-GMP 是否可能通过碱基互补配对的方式结合其它 RNA 分子而实施调控作用? (4) c-di-GMP 信号途径与其它信号途径的关系将是需要深入研究的热点之一。

参考文献

- [1] Ross P, Aloni Y, Weinhouse H, *et al.* Control of cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: a unique quanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. *Carbohydrate Res*, 1986, **149**: 101-117.
- [2] Urs J, Jacob M. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev of Genet*, 2006, **40**: 385-407.
- [3] Tal R, Wong HC, Calhoon R, *et al.* Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4416-4425.
- [4] Galperin MY, Natale DA, Aravind L, *et al.* A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1999, **1**: 303-305.
- [5] Andrade MO, Alegria MC, Guzzo CR, *et al.* The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Microbiol*, 2006, **62**: 537-551.
- [6] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF. Cyclic Di-GMP signaling in bacteria: Recent advances and new puzzles. *J Bacteriol*, 2006, **11**: 8327-8334.
- [7] Tamayo R, Pratt JT, Camilli A. Role of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2007, **61**: 131-148.
- [8] Tischler AD, Camilli A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun*, 2005, **73**: 5873-5882.
- [9] Christen M, Christen B, Folcher M, *et al.* Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phos-

- phodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 30829–30837.
- [10] Ferreira RB, Antunes LC, Greenberg EP, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J Bacteriol*, 2008, **190**: 851–860.
- [11] Paul R, Weiser S, Amiot NC, *et al.* Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev*, 2004, **18**: 715–727.
- [12] Lim B, Beyhan S, Meir J, *et al.* Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: Modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol Microbiol*, 2006, **60**: 331–348.
- [13] Ryjenkov DA, Simm R, Romling U, *et al.* The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 30310–30314.
- [14] Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, *et al.* A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol*, 2007, **65**: 1474–1484.
- [15] He YW, Ng AY, Xu M, *et al.* *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol Microbiol*, 2007, **64**(2): 281–292.
- [16] Yildiz FH. Cyclic dimeric GMP signaling and regulation of surface-associated developmental programs. *J Bacteriol*, 2008, **2**: 781–783.
- [17] Kulasakara H, Lee V, Brencic A, *et al.* Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2839–2844.
- [18] Wolfe AJ, Visick KL. Get the message out: cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol*, 2008, **1**: 463–475.
- [19] Beyhan, S, Tischler AD, Camilli A, *et al.* Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J Bacteriol*, 2006, **188**: 3600–3631.
- [20] Huitema, Pritchard ES, Matteson D, *et al.* Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell*, 2006, **124**: 1025–1037.
- [21] Christen M, Christen B, Allan MG, *et al.* DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**: 4112–4117.
- [22] Kazmierczak BI, Leboron MB, Murray TS. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 2006, **60**: 1026–1043.
- [23] Galperin MY. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*, 2005, **5**: 35.
- [24] Morgan R, Kohn S, Hwang SH, *et al.* BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2006, **188**: 7335–7343.
- [25] Romling U, Amikam D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, **9**: 218–228.
- [26] Camilli A, Bassler BL. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science*, 2006, **311**: 1113–1116.
- [27] He YW, Wang C, Zhou L, *et al.* Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 33414–33421.
- [28] Andrade MO, Alegria MC, Guzzo CR. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Microbiol*, 2006, **62**: 537–551.
- [29] Johnson MR, Montero CI, Connors SB, *et al.* Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbiol*, 2005, **55**: 664–674.
- [30] Kovacicova G, Lin W, Skorupski K. Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/biofilm formation by the virulence activator AphA and the acetate-responsive LysR-type regulator AlsR in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 2005, **57**: 420–433.