

c-di-GMP 对细菌胞外多糖合成与运输的调控

赵腊梅¹ 孙惠芳¹ 刘正杰^{1,2} 林春^{1,2} 毛自朝^{1,2*}

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院 云南 昆明 650201)

(2. 云南农业大学特色资源植物改良与利用研究所 云南 昆明 650201)

摘 要: 环二鸟苷酸(Cyclic diguanylate, c-di-GMP)的发现已有 29 年。作为重要的细菌第二信使, c-di-GMP 可参与调节细菌生物膜的合成与降解、运动、毒性、细胞周期、细胞分化等多种活动过程。胞外多糖(EPS)是细菌生物膜的主要组成成分,其合成和运输主要受 c-di-GMP 调控。目前细菌胞外多糖在医药、食品、农业、工业和环保等多个领域均有广泛的应用,其相关研究备受关注。本文旨在论述细菌中 c-di-GMP 合成与降解的调控,部分合成酶(Diguanylate cyclase, DGC)与降解酶(Phosphodiesterase, PDE)及其受体分子(Receptor)晶体结构等研究成果,并结合我们研究农杆菌 ATCC31749 中 c-di-GMP 对可德胶合成调控的基础上,重点阐述 c-di-GMP 对纤维素、藻酸盐、多聚氮乙酰葡萄糖胺(PNAG)和可德胶等 EPS 合成与运输的调控机制。

关键词: 细菌, 环二鸟苷酸, 胞外多糖, 调控, 生物合成

Regulation in EPS biosynthesis and transportation by cyclic diguanylate

ZHAO La-Mei¹ SUN Hui-Fang¹ LIU Zheng-Jie^{1,2} LIN Chun^{1,2} MAO Zi-Chao^{1,2*}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

(2. Institute of the Improvement and Utilization of Characteristic Resource Plants, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: 29 years have passed since the discovery of bis-(3',5') cyclic di-guanylate (c-di-GMP) which is a key bacterial second messenger involved in the regulation of many crucial bacterial processes including biofilm formation and disappearing, cell motility, virulence, cell cycle controlling, cell differentiation and aggregation as well. c-di-GMP plays an irreplaceable role in biosynthesis and transportation of bacterial extracellular polysaccharides (EPS), which are major component of bacterial biofilm. Currently, due to its wide range of application in medicine, food processing, agriculture industries and environmental protection, it has gained more attention from medical and nutritional biochemistry researchers. In this paper we first reviewed recent achievements on crystal structure of c-di-GMP metabolic enzymes and its multiple receptor protein of c-di-GMP with emphasis on its *in*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31170057)

***Corresponding author:** E-mail: mao2010zichao@126.com

Received: March 29, 2016; **Accepted:** May 16, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 24, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170057)

***通讯作者:** E-mail: mao2010zichao@126.com

收稿日期: 2016-03-29; **接受日期:** 2016-05-16; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-02-24

vivo concentration regulation; then combined with our researches on the regulation of curdlan, biosynthesis by c-di-GMP in *Agrobacterium* sp. ATCC31749, we further focus on the advancement of c-di-GMP regulation on the biosynthesis and transportation of bacterial extracellular polysaccharides (EPS), such as cellulose, alginate, poly-N-acetylglucosamine (PNAG) and curdlan as well, which were widely used in industrial, pharmaceutical and food applications.

Keywords: Bacteria, c-di-GMP, Extracellular polysaccharides, Regulation, Biosynthesis

环二鸟苷酸(Cyclic diguanylate, c-di-GMP)的发现已有 29 年,最初是因变构激活细菌纤维素合成而被发现,目前已确定 c-di-GMP 参与调控包括细菌生物膜的合成与降解、运动、毒性、细胞周期、分化、变异、细胞通讯等多种生命活动和代谢,是重要的细菌第二信使。c-di-GMP 由二鸟苷酸环化酶(Diguanylate cyclase, DGC)合成,并被特异性磷酸二酯酶(Phosphodiesterase, PDE)降解。c-di-GMP 的信号传导主要由其效应分子核糖开关(Riboswitch)或/和受体分子(Receptor)所介导。c-di-GMP 调节生物膜的合成、细胞运动、致病菌的毒性等主要是通过调控胞外多糖的合成与运输来实现的。细菌胞外多糖种类繁多,已广泛应用于医药、食品、工业等多个领域,目前其合成机制的研究备受关注。研究确定胞外多糖的合成与运输途径分为:(1) Wzx/Wzy 依赖途径;(2) ATP 结合盒(ABC)转运体依赖途径;(3) 合成酶依赖途径;(4) 胞外单蔗糖酶合成依赖途径^[1-2],其中合成酶依赖途径的多种多糖的合成受 c-di-GMP 的调控。本文综述了 c-di-GMP 最新的研究进展,并结合我们对农杆菌(*Agrobacterium* sp.) ATCC31749 中 c-di-GMP 调控 EPS 可德胶合成研究的基础上,重点论述 c-di-GMP 对纤维素、藻酸盐、PNAG 和可德胶等胞外多糖合成与运输的调控。

1 c-di-GMP 概述

c-di-GMP 是普遍存在且十分重要的细菌第二信使,它是细菌纤维素研究的副产物。Aschner 等在 1946 年开始研究细菌和动物纤维素的合成过程中发现,木醋杆菌(目前被定名为木葡糖酸醋杆菌, *Gluconacetobacter xylinus*)的静息细胞能够合成纤维素^[3-4]。1985 年 Ross 等发现一个含鸟苷酸的寡核苷酸分子调控木葡糖酸醋杆菌中纤维素的合成^[5],

进一步研究确定该化合物由鸟嘌呤、核糖和磷酸以 1:1:1 的比例形成^[6],随后(1987 年)通过质谱、核磁共振及体外化学合成等手段确认了该纤维素合酶活化剂为双(3',5')-环状鸟苷酸^[7]。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中也发现了对纤维素的合成有明显激活作用的 c-di-GMP 的存在^[8],说明 c-di-GMP 并非木葡糖酸醋杆菌特有,应具有广泛的种间分布^[9]。c-di-GMP 以四方形的形式形成二聚体,类似于双螺旋 DNA 的方式嵌入到受体分子进行信号传导^[10]。细胞内 c-di-GMP 浓度主要由含 GGDEF(或 GGEEF)(Gly-Gly-Asp/Glu-Glu-Phe)结构域的二鸟苷酸环化酶(DGC)合成,并由含 EAL(Glu-Ala-Leu)或 HD-GYP(His-Asp-Gly-Tyr-Pro)结构域的特异性磷酸二酯酶(PDE)降解。c-di-GMP 的信号传导由核糖开关(Riboswitch)和受体分子(Receptor)介导,最终通过激活或抑制基因表达,或(和)是激活或抑制酶活性来完成信号传导。

2 c-di-GMP 合成酶、降解酶的晶体结构

2.1 DGC 结构

目前已有 11 个细菌物种中的 27 个 DGC 或类似蛋白的三级结构被测定^[11-12],在 DGC 的羧基末端一般含有 GGDEF/GGEEF 的 c-di-GMP 合成结构域,氨基末端(N 端)含有跨膜及信号传导的结构域。DGC 的羧基末端(C 端)由 5 个 α 螺旋和 7 个 β 折叠组成,底物 GTP 和 Mg^{2+} 分别被活性中心的残基所结合,其中鸟苷酸的碱基多被活性中心 Asp 和 Asn 残基通过氢键结合,而 Mg^{2+} 分别与 GTP 的磷酸基团和活性中心 GGDEF 中的 Glu 及临近的 Asp 通过离子键相连。PleD 是第一个被确定的 DGC,参与新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)细胞周期调控,调节细胞游离运动与附着聚集两状态间相互转化^[13]。

PleD 晶体结构研究发现,其 C 末端由 5 个 α 螺旋和 7 个 β 短链组成: $\alpha 1-\beta 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 2-\beta 3-\alpha 4-\beta 4-\beta 5-\beta 6-\alpha 5-\beta 7$, GGDEF 以 β 折叠的形式存在于 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 之间,两个 DGC C 末端的 GGDEF 反向平行排列,各结合一个 GTP 分子,存在镁离子的条件下进行缩合催化形成 c-di-GMP^[14]。在 DGC 的 N 端多含有 PAS [因在昼夜周期蛋白(Per), 芳基羟受体核转运蛋白(Arnt)和 E 类螺旋-环-螺旋蛋白(Sim1)中均含保守结构域而命名], GAF [因在 cGMP 特异性磷酸二酯酶(cGMP-specific phosphodiesterase)/腺苷酸环化酶(Adenylate cyclases)/甲酸氢裂合酶转录激活因子(Formate hydrogen lyase transcriptional activator)中含保守结构域得名], REC [信号接收结构域(Receiver domain)]等结构域,可通过感应胞外或胞间信号,进行二聚化以调节 DGC 的活性。例如,测定新月柄杆菌 CheY^[15-16]晶体结构后发现, CheY 合成 c-di-GMP 受到严格的调控,首先其 N 末端的结构域通过感应胞外信号,变构激活其组氨酸激酶活性,致使 CheY 的 N 末端 REC 结构域中 Asp₅₃ (第 53 位 Asp 残基)磷酸化,改变多肽的构象,进而使分别与 1 分子 GTP 和 Mg^{2+} 结合的 C 端催化结构域二聚化,催化 2 分子的 GTP 缩合而形成 c-di-GMP。在 c-di-GMP 的合成过程中,产物 c-di-GMP 还可通过结合到 DGC 的 RXXD (其中 X 为任意氨基酸)结构域而变构抑制 DGC 的活性。

2.2 PDE 的结构

含 EAL 结构域的 PDE 催化水解 c-di-GMP 为线性的二聚鸟苷酸(pGpG),而含 HD-GYP 结构域的 PDE 则是将 c-di-GMP 直接降解为 2 分子 GMP。EAL 型 PDE 的高级结构,先后在脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)等菌株中被测定^[14,17-19]。脱氮硫杆菌 TBD1265 和肺炎克雷伯菌 BlrP 被结晶后, X 衍射发现,这些蛋白均以反平行的方式形成二聚体, EAL 结构域由 3 个螺旋所连接,连接界面均由保守的氨基酸组成。最近 Bellini 等^[20]通过嗜热菌(*Persephonella marina*)中 PmGH (HY-GYP 型 PDE)

的晶体结构研究发现,HD-GYP 型 PDE 以头对头的二聚体形式排列,每个单体通过 N 端 GAF 结构域相互作用,而使含 HD-GYP 的 C 端二聚化, c-di-GMP 以 'U' 形(顺式)的形式接近并结合到 PmGH 的活性中心而被水解,不同于 TBD1265 和 BlrP 等 EAL 型酶, c-di-GMP 是以伸展的分子构象进入活性中心被水解的^[21]。

3 c-di-GMP 的效应分子

c-di-GMP 在细菌生物体内主要通过两类效应分子发挥作用,一类是效应蛋白,一类是核糖开关。前者作为蛋白质,与 c-di-GMP 专一性结合后可调控基因表达或激活酶活性;后者是 mRNA 5'非编码区(5'Untranslational region, 5'UTR)的特定保守序列折叠成一定的 RNA 二级结构,能专一性与 c-di-GMP 结合并影响蛋白质翻译。

3.1 受体的种类

3.1.1 PilZ 结构域效应蛋白: 目前有越来越多的 c-di-GMP 的效应蛋白被发现,最主要的还是 PilZ 结构域蛋白^[22]。2006 年, Amikam 和 Galperin^[23]预测并确定细菌纤维素合成酶催化亚基(BcsA)下游 100 个氨基酸形成独立的蛋白结构域,专一性地与 c-di-GMP 结合,该结构为已知的 PilZ 结构域,这是第一个预测并随后被实验证实了的 c-di-GMP 受体蛋白。含 PilZ 结构域蛋白的分布非常广泛,大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的 YcgR^[24],纯化后具有与木葡糖酸醋杆菌的 BcsA 一样高效结合 c-di-GMP 的 PilZ 结构域。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) UMR1 菌株中, YcgR 通过 PilZ 与 c-di-GMP 结合调控细菌的运动能力。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中含 PilZ 结构域蛋白 AlgA,与 c-di-GMP 结合后调节胞外藻酸盐的合成^[25]。多种细菌基因组分析表明,不同物种均含有较多的 c-di-GMP 合成与降解酶类,但含 PilZ 的受体分子数量变化较大且具有物种特异性。如在大肠杆菌中有 29 个 GGDEF/EAL 结构域蛋白,却只有 2 个 PilZ 结构域蛋白^[23],而蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)中只有 12 个 GGDEF/EAL/HD-GYP

结构域,却有着 15 个 PilZ 结构域蛋白^[26]。

3.1.2 与 c-di-GMP 合成与降解酶类结构相似的受体分子:这类受体含有与 GGDEF、EAL 或 HD-GYP 类似的结构域,不具有 c-di-GMP 合成或者降解的活性,但能够与 c-di-GMP 专一结合,进行信号传导。例如铜绿假单胞菌中发现的内膜蛋白 PelD,具有保守基序 RXXD^[27],通过与 c-di-GMP 结合后调控 Pel 多糖的合成^[28]。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)中含 GGDEF 和 EAL 结构域的 c-di-GMP 受体分子(LapD),c-di-GMP 能够高效地结合到其退化的 EAL 结构域,激活 LapG 的蛋白酶活性,促进细菌生物膜中胞外蛋白的合成与分泌^[29]。目前认为这类受体蛋白可能来源于 c-di-GMP 代谢酶类,但在进化过程中因编码活性中心碱基的突变,导致催化功能丢失的同时,产生作为受体分子的新功能^[17]。

3.1.3 c-di-GMP 结合型 DNA 结合蛋白或转录因子:铜绿假单胞菌中鞭毛合成基因受 c-di-GMP 的调控。激活鞭毛合成基因表达的 FleQ 蛋白能与 c-di-GMP 专一性结合,但不具有之前所述 c-di-GMP 结合结构域的氨基酸保守基序^[30],FleQ 的 C 末端为 DNA 结合结构域,激活鞭毛蛋白的表达,并以 c-di-GMP 依赖的方式调控 Pel 多糖的合成。c-di-GMP 结合 FleQ 则抑制它与 *pel* 启动子的结合,导致 *pel* 操纵子受 FleQ 转录抑制的效应被解除,从而负调控胞外多糖 Pel 的产生^[31]。FleQ 的 N 端为典型 REC 结构域[FleQ(REC)],是 FleQ 功能所必需的。FleQ 的晶体结构发现 FleQ(REC)与氮信号传导蛋白 NtrC 的 REC 结构不同,以一种不寻常的方式介导 FleQ 蛋白形成二聚体来调控基因的表达。霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中 c-di-GMP 的水平升高抑制应激反应调节子 RopS 的表达,能与 c-di-GMP 结合的霍乱弧菌的胞外多糖调节子 VpsR 和 VpsT 的敲除突变能够消除这种抑制,VpsT 能与 *rpoS* 启动子结合是通过 c-di-GMP 依赖的方式来介导的。研究发现,VpsT 与 c-di-GMP 结合,促使 VpsT 结合 *rpoS* 的转录起始位点,使 *rpoS* 转录沉默,促使细菌进入生物膜形成的状态^[32]。研究表明 c-di-GMP 可以形成二

聚体、四聚体、八聚体等形式发挥功能^[33],最近研究显示 c-di-GMP 组装成四聚体的形式介导转录因子 BldD^[34]的二聚体化,激活其 DNA 结合活性,抑制孢子发育相关基因的表达,控制链霉菌(*Streptomyces*)中细胞的分化。

3.2 核糖开关

核糖开关(Riboswitches)是 mRNA 5'非翻译区(5'UTR)序列折叠成一定的构象,这些构象的改变应答于体内的信号分子,从而通过这些构象的改变达到调节 mRNA 的稳定性并调控翻译的目的。Tamayo 等^[35]首先提出核糖开关参与 c-di-GMP 的信号传导。Sudarsan 研究小组^[36]发现 c-di-GMP 能专一性结合一类特殊的核糖开关 GEMM (Genes related to the environment, membranes and motility),调控蛋白质的翻译。c-di-GMP 与核糖开关 GEMM 的结合是不对称的,c-di-GMP 中的一个鸟苷酸 G_α 以 Hoogsteen 碱基配对方式与 GEMM 配对,另一个 G_β 则是以 Watson-Crick 碱基对的方式与 GEMM 的 92 位高度保守的碱基 Cys 结合的^[37]。研究发现,除 c-di-GMP 结合位置的突变外,GEMM 中多个保守碱基突变后,均保留 c-di-GMP 的亲合力及翻译调控活性,这表明核糖开关在碱基突变上有很大的弹性和耐受性,这也是 c-di-GMP 核糖开关多样性产生的基础^[38]。目前多种核糖开关在霍乱弧菌和铜绿假单胞菌等多种细菌中被发现,因这些核糖开关能感应 c-di-GMP 的浓度而促进蛋白的合成,目前已构建含这些核糖开关调控报告基因(如 GFP)表达的载体,用于活体测定 c-di-GMP 浓度变化。

4 细菌中 c-di-GMP 的浓度调控

细胞体内的 c-di-GMP 浓度变化是细胞生理代谢改变的基础,而胞内 c-di-GMP 浓度是怎样调控的呢?铜绿假单胞菌中转录调控因子 AlgR 通过直接结合 DGCmucR 的基因启动子促进 *mucR* 的表达,增加细胞内 c-di-GMP 的水平^[39]。铜绿假单胞菌 PAO1 中的 YfiBNR^[40]三元信号系统,能响应细胞外信号刺激来调节胞内 c-di-GMP 水平,具体是膜间隙蛋白 YfiR 与 YfiN(DGC)结合抑制了 c-di-GMP

的合成能力,晶体结构研究表明,PAO1 菌株中含信号感应结构域的外膜脂蛋白 YfiB,通过感应环境信号,使 YfiB 构象改变,能优先与 YfiR 结合,并将其束缚于外膜内侧,解除了 YfiR 与 YfiN 的结合,以分子开关的机制解除 YfiN (DGC)的抑制,启动 c-di-GMP 合成活性来增加胞内 c-di-GMP 的水平。YfiBNR 系统的同源序列分布广泛,在大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和荧光假单胞菌 SBW25 中分别通过类似的机制调控 c-di-GMP 的合成来调节细菌细胞运动,纤维素合成及 3 型菌毛的合成与分泌。多数 c-di-GMP 的合成酶与降解酶均具有 PAS、GAF、REC 等结构域,在 c-di-GMP 的合成和降解过程中均可通过这些结构域感应并传导胞间环境信号,并最终通过激活或抑制 DGC 和 PDE 的活性从而来控制胞内 c-di-GMP 的含量;另外 DGC 中往往具有能与 c-di-GMP 结合,引发构象变化的 RXXD 结构域,c-di-GMP 与该结构域结合后,能反馈抑制 DGC 的活性。细菌通过上述不同层次的调控来实现菌株感应胞内和(或)胞间环境的变化而精细调控 c-di-GMP 的水平。

5 c-di-GMP 对 EPS 合成调控

c-di-GMP 参与调节细菌生命中生物膜的合成、运动、毒性、细胞周期、分化、变异、细胞通讯等多个活动,最为清楚的是 c-di-GMP 促进细菌生物膜的合成^[41-42]。细菌生物膜的形成是细菌细胞响应逆境并产生适应和抗性的结果,其本质是在逆境下使游动、微弱而单一的细菌,形成固定、强大而联合的细胞聚集体来共同抵御逆境的胁迫。根癌农杆菌附着并侵染植物细胞的过程中,细胞产生纤维素等生物膜成分,能较好地附着于宿主并抵抗宿主细胞的防御性攻击。同样动物病原菌生物膜形成后,使菌株致病能力提高,增强了菌株抵御宿主的免疫进攻的同时,也降低了抗生素和生物试剂毒害的作用而产生耐药性。苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)通过生物膜的形成来实现与宿主细胞之间的一个动态平衡并开启固氮功能。大多数固氮菌通过刺激其自身和周围宿主细胞进行大量的呼吸代谢来消

耗氧,并通过胞外多糖的粘性使细胞聚集而形成生物膜,以形成封闭的环境,从而达到固氮所需的低氧的条件。综上所述,c-di-GMP 在调节固氮、侵染能力、抗生素抗性、细菌与宿主相互作用等方面发挥重要作用。这些作用的发挥与 c-di-GMP 参与调节细菌多糖的合成与转运是密不可分的。细菌多糖按细胞存储部位,大致可分为胞外多糖(EPS)和荚膜多糖(CPS),其途径有 4 种(见前述),其中研究较多且较为清楚的是 Wzx/Wzy 依赖和合成酶依赖的合成途径。目前认为 c-di-GMP 主要调控合成酶依赖途径,该途径中多糖链的合成与运输在多数情况下不是由单亚基合成酶来执行的,而是由具有跨膜结构域的蛋白亚基聚合成多亚基合成复合物来完成,这种由多亚基酶催化合成与运输且研究较多清楚的胞外多糖主要包括藻酸盐、纤维素和可德胶等^[43-44]。

5.1 纤维素合成的调控

纤维素是世界上最丰富的有机物,不仅是细菌生物膜的重要组成部分,也是植物、真菌、部分动物细胞壁的重要组成部分。合成纤维素的细菌分布相当广泛^[45-46]。细菌纤维素合成酶,在二价阳离子(如 Mg^{2+})存在的条件下,通过反复催化并延伸以 β -1,4-糖苷键连接的葡聚糖分子而形成。首先合成复合物中糖基转移酶(GT)的胞内 PilZ 结构域与 c-di-GMP 结合而被变构激活,促进该亚基内膜内侧催化结构域与供体[尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)], Mg^{2+} 和受体(含非还原端 4'羟基的 β -1,4-葡聚糖)结合;进而 UDPG 被转移到活性中心结合受体非还原端 4'羟基的附近;最后葡萄糖基从 UDPG 中转移出来,与受体非还原端 4'羟基相连接而延长了聚合物;细长的聚合物被转移到跨膜(TM)通道中,使得新添加的葡萄糖残基单元重新占据受体位点;之后 UDP 被 UDPG 替换,为新一轮聚合物的延伸做准备。通过上述反复催化的方式,最终合成纤维素单链分子。细菌纤维素合酶复合物至少包含内膜蛋白 BcsA 和 BcsB,以及外膜蛋白 BcsC。BcsA 与 C 端定位于膜间隙,N 端锚定于内膜上的 BcsB 亚基形成复合物,完成纤维素合成和内膜转运。BcsA 包含 8 个 TM 螺旋,胞质 GT 的催化结构域在第 4 和

第 5 跨膜(TM)螺旋之间。供体(UDPG)和受体(含 4'-OH 非还原受体纤维素)的结合,聚合物合成和细长纤维素聚合物的易位,跨膜运输通道的形成均由 BcsA-B 复合体来完成。BcsA 胞内延伸的 C 末端具有含“RXXRDXSXXG”基序的 PilZ 结构域(其中 X 为任意氨基酸),与 c-di-GMP 结合而激活催化活性。光合细菌球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)中 BcsA-BcsB 复合体晶体结构研究揭示,不存在 c-di-GMP 时, BcsA 无催化活性,阻碍底物结合到活性部位;当与 c-di-GMP 结合后,酶被变构激活,可使底物结合到活性位点,成为激活状态的纤维素合酶复合体^[47-48]。目前纤维素在革兰氏阴性菌中合成的外膜运输机制仍不清楚,推测 BcsC 等蛋白参与这个过程。

5.2 藻酸盐合成的调控

藻酸盐是 β -D-甘露糖醛酸(M)和 α -L-古洛糖醛酸(G)通过 β -(1 \rightarrow 4)糖苷键连接组成的 EPS。这些 M、G 单体可以以连续的甘露糖醛酸(MM)、古洛糖醛酸(GG),或是二者交替(MG)形成共聚物。藻酸盐主要由褐藻,假单胞菌(*Pseudomonas*)和固氮菌(*Azotobacter*)等生物合成。藻酸盐的生物合成调控网络是高度复杂的,包括转录、转录后和翻译后的调控^[48]。其中藻酸盐的翻译后调控主要是由 c-di-GMP 结合到 Alg44 的 PilZ 结构域而激活酶的活性。Alg44 是藻酸盐合成与运输复合物必不可少的核心组分。Alg44 蛋白是一个多结构域蛋白,包括 C 端定位于细胞质内与 c-di-GMP 结合的 PilZ 结构域、跨膜结构域(TM)和 N 端定位于膜间隙,与多药运输蛋白(Multidrug transporter)结构相似的结构域所组成^[49]。Alg44 调控藻酸盐合成的翻译后调节机制与纤维素合成复合酶中 BcsA 蛋白类似, c-di-GMP 结合 Alg44 的 PilZ 结构域,使得构象发生改变,使糖核苷酸(合成供体)更靠近相应的糖基转移酶(Alg8)的活性部位^[47]。Alg44 的 C-末端 PilZ 序列的缺失会使突变株丧失藻酸盐的合成能力^[49],这表明 c-di-GMP 结合 Alg44 的胞质 PilZ 结构域,可通过由内向外的信号传导机制,通过 Alg44 的膜间隙结构域来激活藻酸盐的聚合反应是重要的调

控途径^[50-51]。

5.3 多聚氮乙酰葡萄糖胺(PNAG)合成的调控

PNAG 是细菌细胞壁基质和生物膜广泛存在的一种胞外多糖。在鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)、大肠杆菌和黑胫病菌(*Pectobacterium atrosepticum*)中, PNAG 的生物合成是由 c-di-GMP 激活的^[51-53]。大肠杆菌中 PNAG 的合成和分泌是由 *pgaABCD* 操纵子编码的蛋白来合成的。PgaA 和 PgaB 负责 PNAG 胞外运输, PgaC 和 PgaD 是多糖聚合与延伸所必需的。在乙酰化的藻酸盐和纤维素等聚合物的合成中,它们首先各自合成酶将非乙酰化的前体进行聚合,随后在周质中进行 O-乙酰化修饰,而 PNAG 则是以 UDP-N-乙酰葡萄糖胺为直接供体来合成的。PgaB 是预测的外膜脂蛋白,在 PNAG 的导出过程中对 3% PNAG 残基进行去乙酰化^[54],形成成熟的 PNAG。外膜孔蛋白 PgaA 能够转运局部去乙酰基(成熟的)的 PNAG 到细胞表面。PgaC 属于 GT-2 家族,位于内细胞膜,能够将活化的 UDP-GlcNAc 合成聚 GlcNAc。PgaC 的催化结构域存在于细胞质,它与 PgaD,一种 N 末端有两跨膜螺旋的小蛋白,聚合形成具有多糖合成(GT 活性)与内膜转运活性(运输功能)的二聚体。在大肠杆菌中两个 DGCs, YcdT 和 YdeH 均是 PNAG 合成所必需的, CsrA 抑制二者的表达,删除 *csrA*, PNAG 依赖的生物膜形成增加^[55]。最近有新的报道指出 c-di-GMP 变构激活 PgaCD 复合体(GT)的活性^[56],具体是 c-di-GMP 具有分子胶功能,介导其相互作用,使 PgaC 和 PgaD 粘合,形成有 GT 和多糖内膜转运活性的二聚体,从而在翻译后水平调控 PNAG 的合成。

5.4 (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4) β -D-葡聚糖合成的调控

在苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)中发现的一种新型线性混合连接的(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4) β -D-葡聚糖^[57](Mixed-linkage β -D-glucan, ML β -D-葡聚糖),该聚合物可以被特异性的地衣多糖酶水解,产生一个二糖(\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow)重复单元。研究发现,在苜蓿中华根瘤菌细胞内没有纤维素合成酶操纵子的前提下,过表达 PleD (DGC),增加了混合连接的 β -D-葡聚糖的合成,说

明 c-di-GMP 促进 ML β -D-葡聚糖的合成。该混合多糖由含 2 基因的操纵子(*bgsBA*)控制合成。c-di-GMP 主要是结合到 BgsA(GT) C 端与 PilZ 没有同源性的结构域,变构激活 BgsA-B 复合物合成 ML β -D-葡聚糖,目前推测 BgsB 可能参与该多糖的运输。

5.5 可德胶合成的调控

β -(1 \rightarrow 3)-葡聚糖主要存在植物^[58]和真菌^[59]的细胞壁中,是部分细菌生物膜的主要多糖成分并被广泛应用于医药与食品等领域^[60]。生产可德胶的模式菌株 *Agrobacterium* sp. ATCC31749 基因组已经被测序,且拥有较多的转录组和蛋白组的信息^[61-63]。*Agrobacterium* sp. ATCC31749 基因组中 4 个基因(*crdA*、*crdS*、*crdC* 和 *crdR*)是可德胶合成与调控的重要基因。生化分析表明 CrdS 是合成酶催化亚基,其催化结构域位于细胞质,N 端位于内、外膜间隙,具 7 个跨膜结构(TM),C 端位于细胞质的内膜蛋白,大肠杆菌中表达 CrdS 的胞质催化结构域(CmcrdS)形成包涵体,经重新折叠后的 CmcrdS 未检测到可德胶合成活性^[64],将 CrdS 在小麦胚无细胞体系统中表达并纯化后,体外与大肠杆菌中分离的膜成分或脂质体(Liposome)组装形成含 CrdS 的纳米盘(Nano disc)后,检测到可德胶合成的催化活性^[65],说明跨膜结构是其催化活性所必需的,且 CrdS 能够独立完成可德胶的合成。我们确证 CrdR^[44]是可德胶合成操纵子的正调控转录因子,其潜在的 DNA 结合区域位于 CrdA 起始密码子上游-98 bp 片段内。Ruffing 等^[61]对 ATCC31749 中可德胶合成基因的研究发现 GGDEF 蛋白 AGRO_3967 的基因在可德胶合成期上调表达(5.7 倍),该基因敲除导致可德胶产量下降 57%。我们在 ATCC31749 中表达来源于大肠杆菌的 *yddV* (DGC)后,c-di-GMP 含量增加,可德胶产量提高,表达大肠杆菌 *yhjH* (PDE)后 c-di-GMP 含量下降,但可德胶的产量没有明显差异^[66]。进一步进行 RNA 测序分析菌株生长(无可德胶合成)与可德胶发酵阶段的差异表达基因,发现与 CrdA、CrdS、CrdC 一起上调表达基因中,有多种为 c-di-GMP 合成酶基因,预示可德胶合成与运输受 c-di-GMP 的调控。

目前 ATCC31749 可德胶的合成操纵子编码的 CrdA 与 CrdC 功能均未知,结构预测,发现在 CrdA 的 N 端部位具有 1 个跨膜结构(TM),且与多药运输蛋白具有较高的相似性,推测定位于内膜并与可德胶的内膜转运相关;CrdC 结构预测发现有 2 个 TMs,推测其定位于外膜上,完成多糖的外膜转运。CrdA 和 CrdC 在可德胶中合成和运输中的功能可能类似于纤维素合成与运输复合体中的 BcsB 与 BcsC 的功能。

ATCC31749 中存在纤维素合成操纵子(*cel*),且 CrdS 和根癌农杆菌 CelA 有相似的跨膜结构及胞质催化结构域,共属 GT-2 糖基转移酶。进行 ATCC31749 和产纤维素根癌农杆菌(ATCC33970)间基因组比较分析,相对于 ATCC33970,ATCC31749 *cel* 中 *celA* C₁₅₃ (ATG 下游 153 处的碱基 C,下同)缺失,*celB* G₂₄₇ 缺失,致移码突变;*celG* 多处终止突变;仅 *celC*、*celD* 和 *celE* 具有完整读码框,其中 *celC* 编码葡聚糖水解酶,应与转运无关,推测具有膜结构特征的 CelD 和 CelE 可能参与可德胶的运输。相对于 ATCC31749,产纤维素根癌农杆菌(ATCC33970)中也含有 *crd* 操纵子,但 CrdA 基因突变而使该蛋白的 N 端缺失 27 氨基酸残基,C 端移码突变而丧失功能,这些研究揭示了 ATCC31749 和 ATCC33970 分别只产可德胶和纤维素的基因基础,同时预示 ATCC31749 菌株中 c-di-GMP 可能与 CrdS 或 CrdA 和 CrdS 复合物结合,从而变构激活并促进可德胶的合成和内膜转运。

6 展望

调控因子 AlgR 转录激活 *mucR* 活性调节 c-di-GMP 的合成,YfiNBR 以分子开关的机理调控胞内 c-di-GMP 含量。这些研究增强了对 c-di-GMP 胞内浓度调控的理解,但在许多细菌基因组中我们发现有很多的 c-di-GMP 代谢酶,如何基于基因组序列全面阐述 c-di-GMP 代谢酶转录水平和翻译后修饰水平的调控将是 c-di-GMP 下一轮研究的热点。在 c-di-GMP 代谢酶活性调控方面,一般在 c-di-GMP 代谢酶(无论是 DGC 还是 PDE)的 N 端或 C 端均有重要的信号接收与感应位点,细胞中应该有更为通用或专一的信号传递途径,调控 DGC

和 PDE 活性,通过 c-di-GMP 的合成或降解活性来调控 c-di-GMP 含量,阐明各类 DGC 和 PDE 激活机制也是一步研究的重点。c-di-GMP 信号传导途径不仅能够促进细菌生物膜的形成,也能够调控生物膜的降解,如链霉菌中,在营养丰富的环境下,通过谷氨酸诱导 c-di-GMP 合成与降解调控来降解生物膜,恢复细菌细胞繁殖分化的单细胞、游离的状态。但是 c-di-GMP 如何调控生物膜的降解,实现细胞浮游状态的转换机制仍有待深入探讨。另在多糖合成与运输方面,研究较为清楚的是 c-di-GMP 调控纤维素和藻酸盐合成运输,其它重要细菌多糖是否由 c-di-GMP 调控以及如何调控等还不清楚;而目前因胞外多糖的运输机制不明,c-di-GMP 是否参与调控多糖的运输过程及调控机制等也是急需阐明的内容。

另外,c-di-GMP 在应用上有广阔的前景。在医药卫生和植物细菌性病害防治方面,我们可以通过代谢工程的手段,超表达 PDE 基因、抑制 DGC 基因的表达或者利用 c-di-GMP 合成酶抑制剂等来降低 c-di-GMP 水平,减少生物膜合成或促进生物膜的降解,以降低病原菌的毒性,克服其对抗生素的抗性;同时在植物保护方面,可用相似的策略防治作物病害以提高产量。同时在环境治理,如农残、工业污水处理等,微生物生物膜能吸附截留污染物^[67],合成生物膜的细菌具有较强的农残耐受性且可氧化分解残留,形成反硝化环境,实现脱氮除磷等功能。因此应用上可超表达 DGC 或抑制 PDE 的表达来提高 c-di-GMP 含量以诱导生物膜合成,增强工程菌株对农残和有毒污水的抗性,实现较好的农残生物降解并应用于污染的治理与环境保护。

参 考 文 献

- [1] Whitney JC, Howell PL. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria[J]. Trends in Microbiology, 2013, 21(2): 63-72
- [2] Schmid J, Sieber V, Rehm B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 496
- [3] Aschner M, Hestrin S. Fibrillar structure of cellulose of bacterial and animal origin[J]. Nature, 1946, 157(3994): 659
- [4] Hestrin S, Aschner M, Mager J. Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum*[J]. Nature, 1947, 159(4028): 955-958
- [5] Ross P, Aloni Y, Weinhouse C, et al. An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*[J]. FEBS Letters, 1985, 186: 191-196
- [6] Ross P, Aloni Y, Weinhouse H, et al. Control of cellulose synthesis *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase[J]. Carbohydrate Research, 1986, 149(1): 101-117
- [7] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid[J]. Nature, 1987, 325(6101): 279-281
- [8] Amikam D, Benziman M. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(12): 6649-6655
- [9] Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(1): 1-52
- [10] Liaw YC, Gao YG, Robinson H, et al. Cyclic diguanylic acid behaves as a host molecule for planar intercalators[J]. FEBS Letters, 1990, 264(2): 223-227
- [11] Yousef KP, Streck A, Schutte C, et al. Logical-continuous modelling of post-translationally regulated bistability of curli fiber expression in *Escherichia coli*[J]. BMC Systems Biology, 2015, 9: 39
- [12] Zhu B, Liu CL, Liu SH, et al. Membrane association of SadC enhances its diguanylate cyclase activity to control exopolysaccharides synthesis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(10): 3440-3452
- [13] Hecht GB, Newton A. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(21): 6223-6229
- [14] Whiteley CG, Lee DJ. Bacterial diguanylate cyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(1): 124-141
- [15] Chan C, Paul R, Samoray D, et al. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(49): 17084-17089
- [16] Paul R, Abel S, Wassmann P, et al. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(40): 29170-29177
- [17] Minasov G, Padavattan S, Shuvalova L, et al. Crystal structures of YkuL and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(19): 13174-13184
- [18] Barends TRM, Hartmann E, Griesse JJ, et al. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase[J]. Nature, 2009, 459(7249): 1015-1018
- [19] Kariisa AT, Weeks K, Tamayo R. The RNA domain Vc1 regulates downstream gene expression in response to cyclic diguanylate in *Vibrio cholerae*[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148478
- [20] Bellini D, Caly DL, McCarthy Y, et al. Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre[J]. Molecular Microbiology, 2014, 91(1): 26-38
- [21] Wigren E, Liang ZX, Römling U. Finally! The structural secrets of a HD-GYP phosphodiesterase revealed[J]. Molecular Microbiology, 2014, 91(1): 1-5
- [22] Chou SH, Galperin MY. Diversity of c-di-GMP-binding proteins and mechanisms[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(1): 32-46
- [23] Amikam D, Galperin MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein[J]. Bioinformatics, 2006, 22(1): 3-6
- [24] Ryjenkov DA, Simm R, Römling 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]. The Journal

- of Biological Chemistry, 2006, 281(41): 30310-30314
- [25] Merighi M, Lee VT, Hyodo M, et al. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(4): 876-895
 - [26] Hobley L, Fung RK, Lambert C, et al. Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(2): e1002493
 - [27] Whitney JC, Colvin KM, Marmont LS, et al. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(28): 23582-23593
 - [28] Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(6): 1474-1484
 - [29] Newell PD, Monds RD, O'Toole GA. LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(9): 3461-3466
 - [30] Hickman JW, Harwood CS. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor[J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(2): 376-389
 - [31] Su TT, Liu SH, Wang K, et al. The REC domain mediated dimerization is critical for FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* to function as a c-di-GMP receptor and flagella gene regulator[J]. Journal of Structural Biology, 2015, 192(1): 1-13
 - [32] Wang HX, Ayala JC, Benítez JA, et al. The LuxR-type regulator VpsT negatively controls the transcription of *rpoS*, encoding the general stress response regulator, in *Vibrio cholerae* biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(5): 1020-1030
 - [33] Gentner M, Allan MG, Zaehring F, et al. Oligomer formation of the bacterial second messenger c-di-GMP: reaction rates and equilibrium constants indicate a monomeric state at physiological concentrations[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(2): 1019-1029
 - [34] Tschowri N, Schumacher MA, Schlimpert S, et al. Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development[J]. Cell, 2014, 158(5): 1136-1147
 - [35] Tamayo R, Pratt JT, Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis[J]. Annual Review of Microbiology, 2007, 61: 131-148
 - [36] Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, et al. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP[J]. Science, 2008, 321(5887): 411-413
 - [37] Kulshina N, Baird NJ, Ferré-D'Amaré AR. Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2009, 16(12): 1212-1217
 - [38] Smith KD, Lipchock SV, Livingston AL, et al. Structural and biochemical determinants of ligand binding by the c-di-GMP riboswitch[J]. Biochemistry, 2010, 49(34): 7351-7359
 - [39] Kong WN, Zhao JR, Kang HP, et al. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(17): 8268-8582
 - [40] Li SS, Li TT, Xu YY, et al. Structural insights into YfiR sequestering by YfiB in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 16915
 - [41] Sommerfeldt N, Possling A, Becker G, et al. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 2009, 155(4): 1318-1331
 - [42] Simm R, Lusch A, Kader A, et al. Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(9): 3613-3623
 - [43] Rehm BHA. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(8): 578-592
 - [44] Yu XQ, Zhang C, Yang LP, et al. CrdR function in a curdian-producing *Agrobacterium* sp. ATCC31749 strain[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 25
 - [45] Mao ZC, Chen RR. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp.[J]. Biotechnology Progress, 2007, 23(5): 1038-1042
 - [46] McManus JB, Deng Y, Nagachar N, et al. AcsA-AcsB: The core of the cellulose synthase complex from *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2016, 82: 58-65
 - [47] Morgan JL, McNamara JT, Zimmer J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2014, 21(5): 489-496
 - [48] Hay ID, Wang YJ, Moradali MF, et al. Genetics and regulation of bacterial alginate production[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(10): 2997-3011
 - [49] Oglesby LL, Jain S, Ohman DE. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt6): 1605-1615
 - [50] Navarro MVAS, Newell PD, Krasteva PV, et al. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis[J]. PLoS Biology, 2011, 9(2): e1000588
 - [51] Newell PD, Boyd CD, Sondermann H, et al. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage[J]. PLoS Biology, 2011, 9(2): e1000587
 - [52] Boehm A, Steiner S, Zaehring F, et al. Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress[J]. Molecular Microbiology, 2009, 72(6): 1500-1516
 - [53] Pérez-Mendoza D, Coulthurst SJ, Sanjuán J, et al. N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 12): 3340-3348
 - [54] Itoh Y, Rice JD, Goller C, et al. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(10): 3670-3680
 - [55] Jonas K, Edwards AN, Simm R, et al. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins[J]. Molecular Microbiology, 2008, 70(1): 236-257
 - [56] Steiner S, Lori C, Boehm A, et al. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction[J]. The EMBO Journal, 2012, 32(3): 354-368
 - [57] Pérez-Mendoza D, Rodríguez-Carvajal MÁ, Romero-Jiménez L, et al. Novel mixed-linkage β-glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(7): E757-E765
 - [58] Zavaliev R, Epel BL. Imaging callose at plasmodesmata using aniline blue: quantitative confocal microscopy[A]//Heinlein M. Plasmodesmata: Methods in Molecular Biology[M]. New York: Springer, 2015, 1217: 105-119
 - [59] Wiater A, Paduch R, Pleszczyńska M, et al. α-(1→3)-D-glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(4): 787-795
 - [60] Zhang RR, Edgar KJ. Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdian[J]. Biomacromolecules, 2014, 15(4): 1079-1096
 - [61] Ruffing AM, Chen RR. Transcriptome profiling of a curdian-producing *Agrobacterium* reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 17
 - [62] Jin LH, Um HJ, Yin CJ, et al. Proteomic analysis of

curdian-producing *Agrobacterium* sp. in response to pH downshift[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 138(3/4): 80-87

[63] Dai XM, Yang LB, Zheng ZY, et al. Proteomic analysis of curdian-producing *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 in response to dissolved oxygen[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(8): 1018-1025 (in Chinese)

戴小萌, 杨利博, 郑志永, 等. 溶氧影响土壤杆菌 ATCC 31749 发酵生产热凝胶的蛋白质组学[J]. 微生物学报, 2015, 55(8): 1018-1025

[64] Periasamy A, Shadiac N, Amalraj A, et al. Cell-free protein synthesis of membrane (1,3)- β -D-glucan (curdian) synthase: co-translational insertion in liposomes and reconstitution in nanodiscs[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1828(2): 743-757

[65] Marczak M, Matysiak P, Kutkowska J, et al. PssP2 is a polysaccharide co-polymerase involved in exopolysaccharide chain-length determination in *Rhizobium leguminosarum*[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e109106

[66] Yu XQ. Primary studies on regulation curdian biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan Agricultural University, 2013 (in Chinese)

余小琴. 农杆菌 ATCC 31749 可德胶合成调控的初步研究[D]. 昆明: 云南农业大学硕士学位论文, 2013

[67] Saleem M, Moe LA. Multitrophic microbial interactions for eco-and agro-biotechnological processes: theory and practice[J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(10): 529-537

2017 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
20	第三届中国临床微生物学医院感染学术会议	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9 月	50	待定	马晓莹
21	2017 年中国微生物学会酿造分会学术年会	中国微生物学会酿造分会	10 月	200	青岛	鲁菲 高洁
22	第 13 届全国海洋药物年会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	10 月	300	青岛	于广利
23	2017 国际化学学生物学会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	10 月	500	上海	谭高翼
24	2017 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10 月中下旬	800	待定	杨海花 王旭 010-64807200
25	第三届放线菌生物学与产业化暨首届微生物药物学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	10 月下旬	100	湖南长沙	夏立秋
26	第十届全国青年微生物学工作者学术讨论会	中国微生物学会普通微生物学专业委员会	10 月	200	湖南长沙	王琳淇 胡胜标 胡玮
27	首届微生物前沿交叉创新论坛	中国微生物学会普通微生物学专业委员会、环境微生物学专业委员会和分子微生物学及生物工程专业委员会联合主办	10 月	50	湖南长沙	李越中 覃重军 周宁一
28	第二届全国昆虫肠道微生物与环境治理学术研讨会暨第五届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及产业化研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	200	湖北武汉	郑龙玉 罗勤 ly.zheng@mail. hzau.edu.cn
29	类鼻疽病的实验室诊断与临床诊治	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11 月	50	海南三亚	陈海
30	幽门螺杆菌快速分离培养、鉴定、药敏试验新技术培训班	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	11 月	50	浙江宁波	吕宝霞
31	第九届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行与服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11 月	400	江苏南京	阮志勇 010-8210863 李 盼 010-82105075
32	人体微生物组学与健康	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	待定	50	上海	郭晓奎、秦金红
33	全国医学微生物学高峰论坛	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	待定	200	上海	郭晓奎、秦金红
34	第二十次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	600	浙江杭州	钟卫鸿
36	2017 中国生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	11 月	800	四川成都	毛群颖
37	第十二届全国芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	200	江苏南京	高学文 025-84395268