



SadC 合成的 c-di-GMP 信号通过 PilZ 和 FlgZ 调节铜绿假单胞菌的泳动能力

董友明[#], 林心铭[#], 付春情, 王倩琪, 吴玲娟, 卢冰倩, 林羲, 包其郁, 李科伟^{*}

温州医科大学检验医学院(生命科学学院) 检验医学教育部重点实验室, 浙江 温州 325035

董友明, 林心铭, 付春情, 王倩琪, 吴玲娟, 卢冰倩, 林羲, 包其郁, 李科伟. SadC 合成的 c-di-GMP 信号通过 PilZ 和 FlgZ 调节铜绿假单胞菌的泳动能力[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1115-1127.

DONG Youming, LIN Xinming, FU Chunqing, WANG Qianqi, WU Lingjuan, LU Bingqian, LIN Xi, BAO Qiyu, LI Kewei. Cyclic di-GMP produced by SadC regulates swimming motility of *Pseudomonas aeruginosa* via PilZ and FlgZ[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1115-1127.

摘要:【目的】探究铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC) SadC 合成的环二鸟苷酸(cyclic di-GMP, c-di-GMP)信号与 PilZ 结构域受体间的信号传递关系, 分析鉴定出特定 PilZ 结构域受体的调控功能和机制。【方法】SadC 突变株和过表达菌株的构建及泳动能力分析; SadC 过表达背景下, PilZ 结构域受体突变各菌株的泳动表型分析和筛选; 基因敲除和过表达解析筛选出的 PilZ 结构域受体功能; 定点突变和遗传互补检测筛选出的 PilZ 结构域受体是否参与 SadC 合成 c-di-GMP 对泳动能力的调控。【结果】SadC 通过影响鞭毛功能而非鞭毛形成抑制铜绿假单胞菌的泳动能力; PilZ 结构域受体突变菌株筛选发现 PilZ、FlgZ 这 2 个受体参与了 SadC 介导的泳动能力抑制; 功能分析发现 $\Delta pilZ$ 或 $\Delta flgZ$ 的泳动能力相比野生型 PA14 显著增强, 而过表达 PilZ 或 FlgZ 则抑制了泳动能力; 定点突变和回补实验发现 PilZ 第 10 位和 FlgZ 第 140 位氨基酸 R 对其介导 SadC 负调控泳动能力至关重要, 多序列比对分析表明这些位点是其保守的 c-di-GMP 结合位点。【结论】SadC 合成的 c-di-GMP 信号通过 PilZ 和 FlgZ 调控铜绿假单胞菌的泳动能力。

关键词: 铜绿假单胞菌; SadC; 环二鸟苷酸; PilZ 结构域蛋白; PilZ; FlgZ; 泳动能力

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY21C010004); 浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划) (2020R413040); 温州市基础性科研项目(Y20210082)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY21C010004), the Science and Technology Innovation Activity Plan of College Students in Zhejiang Province (Planted Talent Plan) (2020R413040), and the Basic Science Research Project of Wenzhou City (Y20210082).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-577-86699185, E-mail: curwaylee@wmu.edu.cn

Received: 2022-07-17; Accepted: 2022-09-22; Published online: 2022-09-28

Cyclic di-GMP produced by SadC regulates swimming motility of *Pseudomonas aeruginosa* via PilZ and FlgZ

DONG Youming[#], LIN Xinming[#], FU Chunqing, WANG Qianqi, WU Lingjuan, LU Bingqian, LIN Xi, BAO Qiyu, LI Kewei^{*}

Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ministry of Education, School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To identify the PilZ domain-containing receptor(s) that sense the second messenger cyclic di-GMP (c-di-GMP) produced by the diguanylate cyclase SadC in *Pseudomonas aeruginosa* and investigate the functions and regulatory mechanisms of the identified receptor(s). [Methods] We constructed the strains in which *sadC* gene was deleted or overexpressed and tested their ability to swim by using a plate-based approach. We then added *sadC* in multicopy in each deletion mutant of the eight PilZ domain-containing receptors and screened for the mutants with alleviated swimming repression compared to the wild-type PA14 overexpressing SadC. For the mutations screened out, single gene knockout and overexpression strategies were used to explore the function of the identified receptor(s). Furthermore, site-directed mutagenesis and genetic complementation were employed to test whether the identified receptor's role in SadC-mediated swimming repression requires its c-di-GMP-binding motif. [Results] The SadC-mediated repression of swimming motility was associated with flagellar malfunction rather than flagellum formation. Two PilZ domain-containing receptors, PilZ and FlgZ, were identified to be involved in SadC-mediated swimming repression. The deletion of gene *pilZ* or *flgZ* increased the swimming motility, while overexpression of them significantly impaired swimming. A R10A substitution in the conserved c-di-GMP-binding motif of PilZ, or a R140A substitution in FlgZ, resulted in a variant that was no longer able to repress swimming in $\Delta pilZ$ or $\Delta flgZ$ overexpressing SadC, indicating that the conserved residue required for c-di-GMP binding is critical for PilZ or FlgZ to repress swimming in response to SadC-derived c-di-GMP. [Conclusion] PilZ and FlgZ are the effector relay proteins that respond to SadC c-di-GMP signaling to mediate swimming repression in *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; SadC; cyclic di-GMP (c-di-GMP); PilZ domain-containing proteins; PilZ; FlgZ; swimming motility

环二鸟苷酸(cyclic di-GMP, c-di-GMP)是细菌中普遍存在且特有的第二信使,调控着多种生理活动和行为,包括运动性、生物膜形成、毒力因子表达、病原-宿主互作、抗生素耐药性等^[1-2]。也因此,c-di-GMP及其信号传导通路被认为是良好的抗菌靶标。c-di-GMP的合成和降

解分别受鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC)和磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)控制,而DGC和PDE的活性则分别由分子内高度保守的GGDEF和EAL(或HD-GYP)结构域决定,通过与其相连的多种输入结构域和多种调控机制,在时空上精细控制着c-di-GMP的胞内

稳态^[3-4]。在信号传导上, c-di-GMP 受体(如 PilZ 结构域蛋白)可以感知细胞内 c-di-GMP 浓度并与其直接结合, 通过改变自身空间构象或功能, 在转录、翻译及翻译后水平上将信号向下游传递, 特异性调控多种生理和致病进程^[5-7]。

通常情况下, 细菌基因组编码有大量含有 GGDEF 或 EAL 结构域的蛋白, 同时又具有众多 c-di-GMP 受体。如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PA14 菌株有 16 个 GGDEF 结构域蛋白, 5 个 EAL 结构域蛋白和 16 个同时具有 GGDEF-EAL 双结构域的蛋白^[8], 同时铜绿假单胞菌还有 8 个 PilZ 结构域受体蛋白^[9]。然而, 由于 c-di-GMP 分子可在细胞内自由扩散^[6], 关于其信号传导的一个颇为有趣的问题是, 每个 DGC 或 PDE 所控制的特定 c-di-GMP 信号和不同 PilZ 结构域受体间是否存在选择性的信号传递关系, 如果是, 其具体的信号对接关系是怎样的。

本文以铜绿假单胞菌鸟苷酸环化酶 SadC 为研究对象, 以菌体泳动表型作为判定依据, 通过基因敲除、过表达和 PilZ 结构域受体突变株筛选等方法, 针对性探究了 SadC 合成的 c-di-GMP 信号与 PilZ 结构域受体间的信号传递关系, 发现 8 个不同的 PilZ 结构域受体中只有 PilZ 和 FlgZ 这 2 个受体参与了 SadC 产生的 c-di-GMP 信号介导的泳动能力抑制, 初步建立了 SadC 合成 c-di-GMP 的下游信号传导模型。这些结果丰富了我们对于 c-di-GMP 信号传导途径和调控机制的认识, 也为 c-di-GMP 信号的特异性调控假说提供了新的例证和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和培养条件

铜绿假单胞菌野生型 PA14 菌株、8 个不同 PilZ 结构域蛋白编码基因敲除菌株^[10]、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 S17-1、及质粒

pEX18Gm、pUCP20、pUC18T-mini-Tn7T-Gm 均由本实验室保藏。其他由上述菌株、质粒衍生的重组菌株及质粒为本研究构建。除特殊说明外, 所有菌株都培养于 LB 培养基(1 L): 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 氯化钠 5 g, pH 7.0, 固体培养基添加 1.5% (质量体积分数)的琼脂, 培养温度 37 °C。用于筛选和质粒维持的抗生素浓度: 铜绿假单胞菌采用羧苄青霉素 150 μ g/mL, 庆大霉素 30 μ g/mL, 萘啶酮酸 20 μ g/mL; 大肠杆菌采用氨苄青霉素 100 μ g/mL, 庆大霉素 10 μ g/mL。

1.2 主要试剂和仪器

基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于北京全式金生物技术股份有限公司; Taq DNA 聚合酶、PrimeSTAR 高保真 DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶和 DNA 连接试剂盒购于 TaKaRa 公司; 泳动检测采用 BD Difco 颗粒状琼脂(214530); 酪蛋氨酸购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物由北京擎科生物科技有限公司杭州分公司合成; 电镜观察用铜网普通碳膜(200 目)购于中镜科仪; 采用 JEM-F200 场发射透射电子显微镜观察鞭毛形态。

1.3 重组质粒和菌株的构建

基因扩增以菌株 PA14 基因组 DNA 为模板, 采用 PrimeSTAR 高保真 PCR 体系进行扩增。通过将 *sadC*、*pilZ* 及 *flgZ* 基因克隆到 pUCP20 载体实现相应蛋白的过表达; 将野生型及点突变后的 *pilZ* 或 *flgZ* 分别克隆到 pUC18T-mini-Tn7T-Gm, 并采用基因自身的启动子控制表达, 实现基因的染色体单拷贝回补; 用于载体连接的酶切位点添加于目的基因上下游引物的 5'末端, 连接产物化学转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 菌落 PCR 和酶切验证成功者进一步通过测序确认。重组质粒通过电转化(pUCP20 衍生)或接合转移

(pUC18T-mini-Tn7T-Gm 衍生)的方式导入铜绿假单胞菌^[11]。

1.4 基因敲除

基因敲除采用自杀质粒 pEX18Gm, 借助于同源重组和蔗糖反选系统进行^[12]。首先, 采用重叠 PCR 的方法连接待敲除基因两端各约 1 kb 的同源臂, 并克隆至 pEX18Gm, 获得敲除质粒并转化入大肠杆菌 S17-1 感受态细胞后, 通过接合转移的方式将其导入铜绿假单胞菌。单交换菌株在含有 30 µg/mL 庆大霉素和 20 µg/mL 萘啶酮酸的 LB 平板上筛选; 双交换菌株采用含 10% (质量体积分数)蔗糖、但不含氯化钠的 LB 平板进行筛选。所获得的基因无痕敲除菌株通过 PCR 及其产物测序进行确认。

1.5 泳动能力检测

泳动能力检测在含有 0.3%琼脂的半固体平板上进行^[13], 所用培养基为 M8 基本培养基, 并添加一些补充成分。配制方法为(1 L): 称取 3 g 琼脂加入 760 mL 去离子水中, 高压蒸汽灭菌后水浴至 55 °C, 加入预先配制并水浴至 55 °C的无菌 5×M8 溶液(64 g Na₂HPO₄·7H₂O, 15 g KH₂PO₄, 2.5 g NaCl, 去离子水定容至 1 L) 200 mL, 20% (质量体积分数)葡萄糖溶液 10 mL, 20% (质量体积分数)酪蛋白氨基酸溶液 25 mL, 1 mol/L 的 MgSO₄溶液 1 mL, 去离子水 4 mL, 充分混匀后按每块 25 mL 倾注平皿, 室温冷却凝固 3–4 h。接种时采用无菌的牙签或 10 µL 移液枪头蘸取培养过夜的菌液, 穿刺接种到上述泳动检测平板的琼脂层中, 注意不触碰到平皿底部。30 °C培养 17–22 h 后, 数码相机拍照记录泳动表型, 并以平皿直径为参照标准采用 PowerPoint 中的直线工具(形状大小)测量泳动圈的直径大小, 定量分析每个菌株的泳动能力。

1.6 透射电镜观察鞭毛

将培养过夜的菌液转接至斜面培养基培养

10–12 h 后, 沿管壁缓慢加入 1 mL 2.5%戊二醛磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2–7.4)轻轻悬浮菌体并转移至离心管中, 同时也进行了固定。

15 min 后, 将铜网浸入悬浮液静置 30 s, 并于双蒸水中轻轻晃动 2 s 进行漂洗, 滤纸吸去残留液体后, 于钛蓝(Ti Blue)染色液中负染 6 s, 双蒸水中漂洗 2 次, 干燥后用 JEM-F200 场发射透射电镜观察。

1.7 生物信息学分析和数据处理

菌株 PA14 基因和蛋白序列、编号及名称参考假单胞菌数据库 (<https://www.pseudomonas.com/>)、UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)和 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/genes.html>); 利用 Clone Manager 软件进行引物设计; 采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)和 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)数据库进行蛋白质结构域分析; 采用 Clustal X 进行蛋白质多重序列比对和保守位点分析; 绘图和统计分析采用 GraphPad Prism 进行; 显著性差异分析采用 *t* 检验或单因素方差分析结合 Tukey 多重比较法进行。

2 结果与分析

2.1 SadC 通过调控鞭毛功能抑制泳动能力

SadC 是一个具有跨膜和胞质结构域并在 C 端具有典型 GGDEF 结构域的膜蛋白(图 1A), 已被证明具有鸟苷酸环化酶活性^[14]。当 SadC 过表达时铜绿假单胞菌 PA14 胞内 c-di-GMP 浓度显著升高, *sadC* 突变后菌株 PA14 的生物膜和胞外多糖形成能力减弱, 群集运动能力增强^[14]。在此基础上, 本文进一步研究了 SadC 对鞭毛介导的泳动能力的影响。通过构建 *sadC* 敲除菌株, 发现Δ*sadC* 的泳动能力相比野生型 PA14 显著增强(图 1B、1C); 当采用一个多拷贝质粒 pUCP20

过表达 *SadC* 时(pUCP-*sadC*), 野生型 PA14 和 $\Delta sadC$ 菌株的泳动能力都显著下调, 且野生型 PA14 相比 $\Delta sadC$ 下调更加显著(图 1B、1C), 表明 *SadC* 对 PA14 的泳动能力具有抑制作用。

由于铜绿假单胞菌的泳动完全由鞭毛

介导^[15], 我们通过透射电镜观察了 *SadC* 过表达时菌体的鞭毛形成、位置和长度, 发现 *SadC* 过表达并不影响鞭毛的形成和形态(图 1D、1E), 提示 *SadC* 可能是通过调控鞭毛运动活力抑制泳动能力。

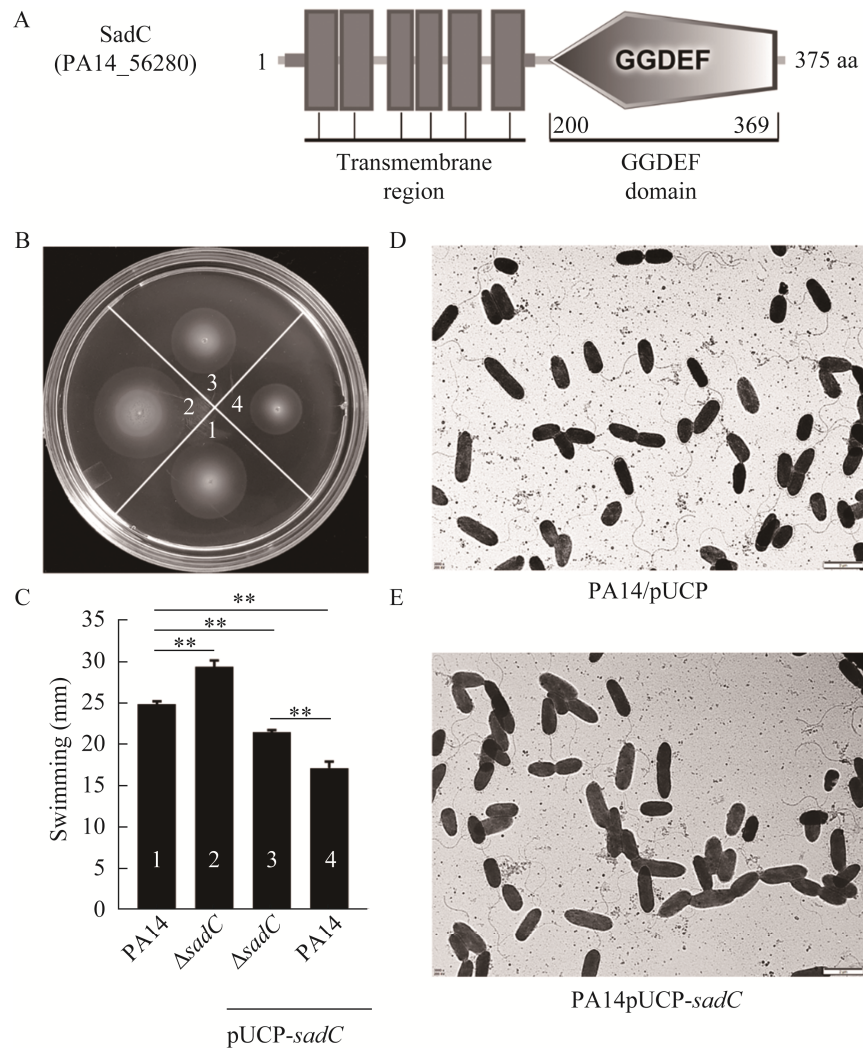


图 1 *SadC* 蛋白的结构域分析(A)及 *SadC* 对菌体泳动(B、C)和鞭毛形成(D、E)的影响

Figure 1 The domain analysis of *SadC* and role of *SadC* in the regulation of swimming motility and flagella formation. A: Schematic representation of the domain organization of full-length *SadC* (PA14_56280, UniProtKB A0A0H2ZGI1) as predicted by SMART. Numbers indicate residues flanking the GGDEF domain of *SadC*. B and C: Swimming motility assay and quantification of the swimming zones of wild-type strain PA14, $\Delta sadC$ carrying a vector control or a *sadC*-containing multicopy plasmid. Error bars represent the standard deviations. Significance was determined by Students' *t*-test (**: $P < 0.01$). D and E: TEM analysis of strain PA14 carrying the empty vector or overexpressing *sadC* as indicated. Bar: 2 μ m.

2.2 PilZ 和 FlgZ 介导了 SadC 对泳动能力的抑制

由于 SadC 是一种鸟苷酸环化酶, 过表达时胞内 c-di-GMP 浓度上调, 我们推测 SadC 对菌体泳动的抑制可能是通过 c-di-GMP 信号途径进行的。在 c-di-GMP 信号传导中, c-di-GMP 受体通过识别、接受和传递 c-di-GMP 信号而实现 c-di-GMP 信号的输出, 继而调控下游靶标并影响细菌的生理活动。目前已知 PilZ 结构域蛋白是 c-di-GMP 受体家族中最大的一类^[16], 在铜绿假单胞菌的基因组中编码有 8 个含 PilZ 结构域的蛋白, 其中 7 个被证明具有 c-di-GMP 结合能力^[9], 包括 HapZ (PA14_27930)、PA14_25420、PA14_56180、MapZ (PA14_60970)、Alg44

(PA14_18550)、FlgZ (PA14_20700) 以及 PA14_00130。另外, PilZ (PA14_25770) 虽然在体外未检测到 c-di-GMP 结合能力, 但并未排除体内与 c-di-GMP 结合的可能性^[9]。

为研究这 8 个不同的 PilZ 结构域蛋白是否参与了 SadC 产生的 c-di-GMP 信号介导的泳动抑制, 我们在野生型 PA14 中对每个 PilZ 结构域蛋白编码基因进行敲除, 并将 SadC 过表达质粒 (pUCP-sadC) 分别导入这些突变株中。结果发现, 在野生型 PA14 中过表达 SadC 显著抑制了菌体泳动(图 2A, 2 号), 而在这些 PilZ 结构域蛋白突变株中过表达 SadC 后绝大多数菌株的泳动能力仍然被抑制, 只有 $\Delta pilZ$ (图 2A, 6 号) 和 $\Delta flgZ$ (图 2A, 9 号) 这 2 个菌株的泳动能力得以

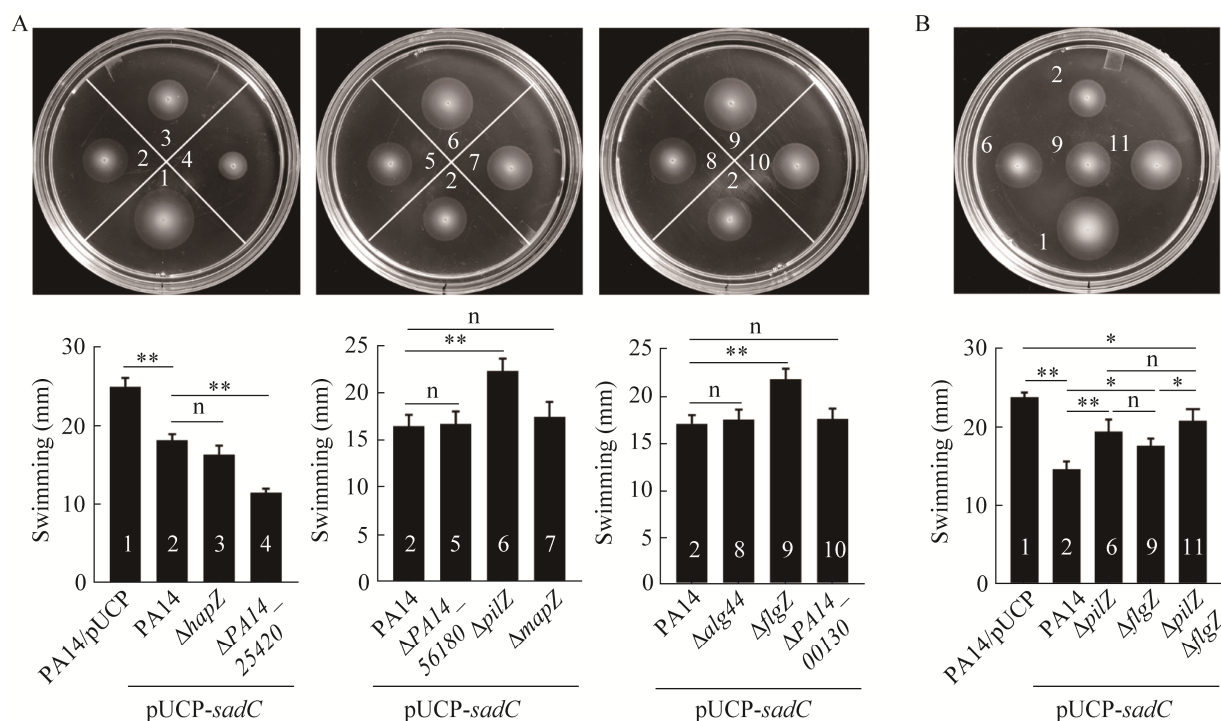


图 2 PilZ 和 FlgZ 参与了 SadC 介导的泳动能力抑制

Figure 2 PilZ and FlgZ are involved in the SadC-mediated repression of swimming. A: Swimming phenotype and quantification of the swimming zones of the indicated strains. B: Swimming motility of the indicated strains (top) and quantification of the swimming zones (bottom). Error bars indicate standard deviations, and data were analyzed by one-way analysis of variance followed by a Tukey's multiple comparison. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; n: No significant difference.

部分回复, 表明 PilZ 和 FlgZ 在遗传调控途径上位于 SadC 的下游, 并参与了 SadC 对泳动能力的抑制。而且, 当 *pilZ* 和 *flgZ* 同时被敲除后, 在 SadC 过表达的背景下, $\Delta pilZ \Delta flgZ$ 双敲除菌株的泳动能力相比 $\Delta pilZ$ 略有增强, 尽管这种差异无统计学意义(图 2B); 而 $\Delta pilZ \Delta flgZ$ 双敲除菌株相比 $\Delta flgZ$ 的泳动能力显著上调(图 2B), 这在一定程度上提示 PilZ 和 FlgZ 在介导 SadC 对泳动能力的抑制效应时具有累加效应。

2.3 PilZ 和 FlgZ 负调控泳动能力

从功能上讲, PilZ 曾被报道参与了铜绿假单胞菌 PAK 菌株 IV 型菌毛生物合成及其介导的

蹭行运动的调节^[17], 但其对泳动能力的影响仍未知; 而 FlgZ 对铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的泳动能力具有抑制作用^[18]。为更详细了解 PilZ 和 FlgZ 对菌体泳动的影响, 本研究分别检测了野生型 PA14、 $\Delta pilZ$ 、 $\Delta flgZ$ 及 PilZ 和 FlgZ 过表达菌株的泳动能力。结果发现, 与野生型 PA14 相比, $\Delta pilZ$ 的泳动能力显著上调, 而过表达 PilZ 菌株的泳动能力则发生了显著下调(图 3A)。另外, $\Delta flgZ$ 的泳动能力相比野生型显著上调, 而过表达 FlgZ 显著抑制了菌体的泳动能力(图 3B)。这些结果表明 PilZ 和 FlgZ 对泳动能力都具有抑制作用。

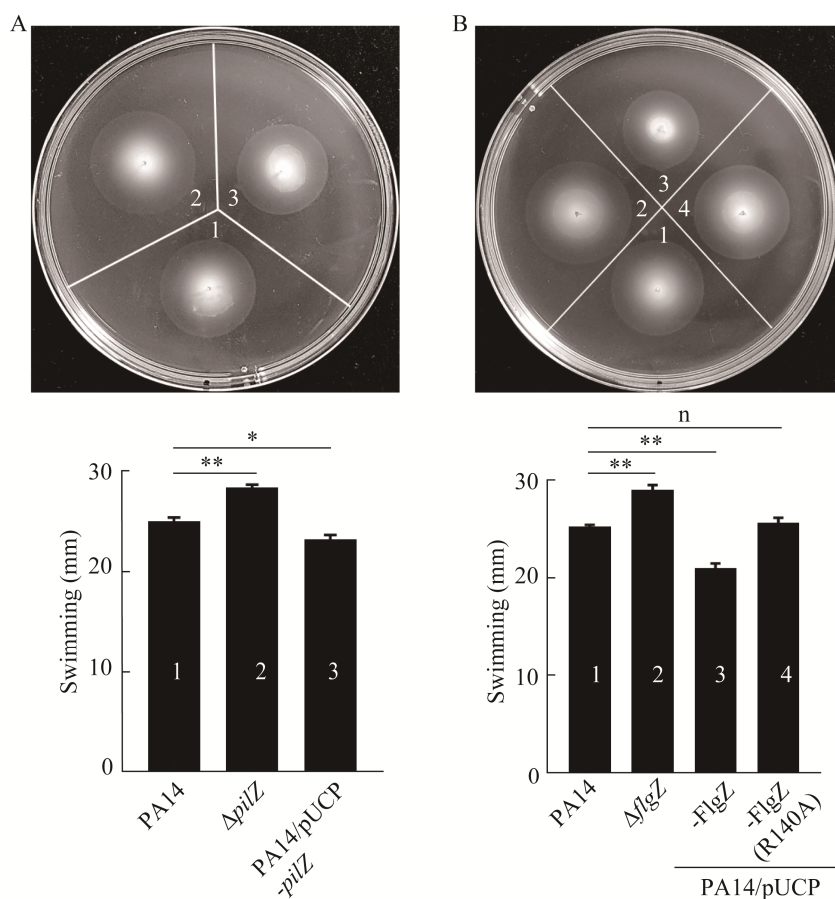


图 3 PilZ (A)和 FlgZ (B)基因敲除和过表达菌株的泳动能力

Figure 3 Swimming behavior of wild-type PA14, $\Delta pilZ$, $\Delta flgZ$ and PA14 overproducing PilZ or FlgZ as indicated. A: Phenotype and quantification of swimming motility of PA14, $\Delta pilZ$, and PA14 containing the PilZ overexpressing vector. B: Swimming analysis of PA14, $\Delta flgZ$ and PA14 overexpressing either the native FlgZ or the FlgZ (R140A) variant with the mutated c-di-GMP binding motif. Significance was determined by Students' *t*-test. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; n: Non-significant.

2.4 PilZ 和 FlgZ 对泳动的抑制依赖于其保守的 c-di-GMP 结合位点

在 PilZ 结构域中保守的 RXXXR 和 D/NXSXXG (X 代表任意氨基酸)基序是其与 c-di-GMP 结合的关键位点^[19]。此前的研究表明 FlgZ 的 RXXXR 基序中第一个精氨酸(R)残基突变为丙氨酸(A)后丧失了与 c-di-GMP 的结合能力和对群集运动的抑制作用^[18,20]。不过,该精氨酸残基(R140)在 FlgZ 抑制菌株 PA14 泳动能力中的作用还不清楚。通过比较 FlgZ 野生型和 FlgZ (R140A)变异体过表达时的泳动能力,发现过表达 FlgZ 野生型显著抑制了菌体的泳动能力,而过表达 FlgZ (R140A)菌株的泳动能力则和野生型 PA14 相当(图 3B),表明 R140 位点在 FlgZ 抑制菌株 PA14 的泳动中发挥关键作用。

由于 PilZ 中保守的 c-di-GMP 结合位点还不明确,通过对铜绿假单胞菌 8 个不同 PilZ 结构域蛋白及其他菌中典型的 PilZ 结构域蛋白进行序列比对,包括大肠杆菌 YcgR 和霍乱弧菌 VCA0042,发现 PilZ 第 10 位残基精氨酸(R)和第 36 位残基甘氨酸(G)与其他 PilZ 结构域蛋白的 c-di-GMP 结合保守位点高度重叠,提示这些氨基酸可能是 PilZ 与 c-di-GMP 结合的关键位

点,而 FlgZ 典型的 c-di-GMP 结合保守区域则与之前报道的相一致^[20](图 4)。

为检测 PilZ 对泳动能力的抑制是否需要保守的 c-di-GMP 结合位点的参与,我们分别把 PilZ 第 10 位氨基酸 R 和第 36 位氨基酸 G 突变为丙氨酸(A),并检测了 PilZ 野生型、PilZ (R10A)和 PilZ (G36A)突变体过表达对菌体泳动的影响。结果发现,与野生型 PA14 (图 5, 1 号)相比, PilZ 野生型过表达(图 5, 2 号)显著抑制了泳动能力,而 PilZ (R10A)过表达株(图 5, 3 号)的泳动表型则和野生型 PA14 相当,表明 R10 位点对 PilZ 抑制泳动能力至关重要。相反, PilZ (G36A)过表达菌株(图 5, 4 号)的泳动能力相比野生型 PA14 发生了轻微但显著的下调,提示 G36 位点在 PilZ 对菌体泳动的抑制中不重要或作用十分微弱。不过需要注意的是,上述各菌株的泳动圈大小在总量上的变化并不大,尽管统计学分析表明差异显著,这可能与 PilZ 对泳动相对较弱的抑制能力有关。

2.5 PilZ 和 FlgZ 保守的 c-di-GMP 结合位点对其介导 SadC 对泳动的抑制至关重要

为进一步探究 PilZ 和 FlgZ 介导 SadC 调节的泳动能力是否是通过其保守的 c-di-GMP 结合

```

Alg44 (16-66)      - Q R Q F A R V K L P A R I R Y I G - - - - A N R E G V D A R L L D L S A G - - - G F A F T A S G A P I Q P G D L Y K - - - - -
MapZ (7-52)       E R R R F H R I A F D A D S E I L Q - - - - G E R R W E V L L H D V S L H G - - - - I L V G P Q D W N G D - - - - -
HapZ (10-55)      E K R D F I R M K L D T P V T I R C - - - - E G R E S V A L - C R D L S A S G - - - - L L L E A Q S E L A P G - - - - -
PA14_00130 (3-51) N Q R Q Y P R T P L K C R I R I S H - - - - P L F G E L M A Q T R D L S D T G - - - V Y V K H P D L T Q L P T G - - - - -
PA14_56180 (3-49) L Q R H I Q R H Q L P S Y L K V F N - - - - R I T D K P M G Y I G N V S E D G - - - - L L L I S Q L P M L V G - - - - -
PA14_25420 (129-174) - K V M N K R I D L L G Q V M V Q S - - - - L L K E I G E P R K V S L S E G G - - - - V S F H H D R A L P V G - - - - -
FlgZ (138-193)    Q R R N A Y R A S I K Q S Q P I A A E I A G E K L R A P L S G Q L L D I S A T G A K L R F A G N V A E R L H P G - - - - -
PilZ (7-48)       - - - L G P R N G I L S - L T I K D - - - - K S V L Y A A Y M P F I R N G G - - - - L F I P T N K N Y K L G - - - - -
VCA0042 (134-182) Q L R K E P R F E L N L A G K V L F - - - - D E H R G D C E L R D L S R S G - C R F I T P P L G K T Y Q V G - - - - -
YcgR (112-177)    Q R R R Y F R I S A P L H P P Y F C Q T K - L A D N S T L R F R L Y D L S L G G M G A L L E T A K P A E L Q E G M R F A Q I E V N M G

```

```

Alg44 (67-115)    - - G K L L - F Q V D S - - - - I S F S L E V E F Q V R S V D P A S R R - - - - V G C E F Q N L K P - - - - - R E V A A L R Y L I - -
MapZ (53-103)     - - P Q R P - F E A R L Y - - - - L G L D V L I R M E I S L A W A R D G L - - - - L G F E C Q H I D L - - - - - D S I S H L R R L V E -
HapZ (56-95)      - - D H L R - V S I P S - - - - T H E T L T - G L E L E A R V V R C E R - - - - L G P G R H S L G L - - - - - S I - - - - -
PA14_00130 (52-88) - - S V V T - G Q V Q D - - - - L P I D A P - I L Q M E V V R V D A E G - - - - V G L R F L S E A - - - - -
PA14_56180 (50-110) - - A R F E - L R L K V P L G G R P Q C I D F S A D C R W T C E D V T P G H F D S G F H L L A P P A E F L E L V E A L R R Y F -
PA14_25420 (175-229) - - Q L L V - L R M V L - - - - L P Q G F G L E L R A R V I H A O P H D D E F E I G T E F E A L S D - - - - - A Q R O L L A R H I L O
FlgZ (194-249)    - - E I Y E D F S A Q L - - - - P Q G A I S S A I E L R H V R F D E K L D A T F A G V R F S E M S G - - - - - L A Q R Q V - - - - -
PilZ (49-107)     - - D E V F M L L N L M E E P - E K I P V A G K V V W I T P K G A Q G N R A A G I G V Q F N D G D N - - - - - T A R N K I E T Y L A G
VCA0042 (183-240) - - - D L V A L E I F S - D L R G T K T F P P L T G K I C N L Q R S L H H A R Y G L E F N E E G R N - - - - - N A K N L L A Q L K F N
YcgR (178-230)    Q W G V F H - F D A Q L - - - - I S I S E R K V I D G K N E T I T T P R - - - - L S F R F L N V S P - - - - - T V E R Q L Q R I I F S

```

图 4 多序列比对分析不同 PilZ 结构域蛋白中保守的 c-di-GMP 结合位点

Figure 4 Multiple-sequence alignment of different PilZ domain-containing proteins for identifying conserved residues in the c-di-GMP binding region. Eight *P. aeruginosa* PilZ domain-containing proteins, YcgR from *E. coli* and VCA0042 from *Vibrio cholerae* were analyzed. The sequence alignment was generated by Clustal X using the complete PilZ domain of each protein as defined by the Pfam database. The consensus sequence (marked with gray background) was obtained at a threshold frequency of 60%, and the conserved residues of FlgZ and PilZ mutagenized in this study are highlighted in bold.

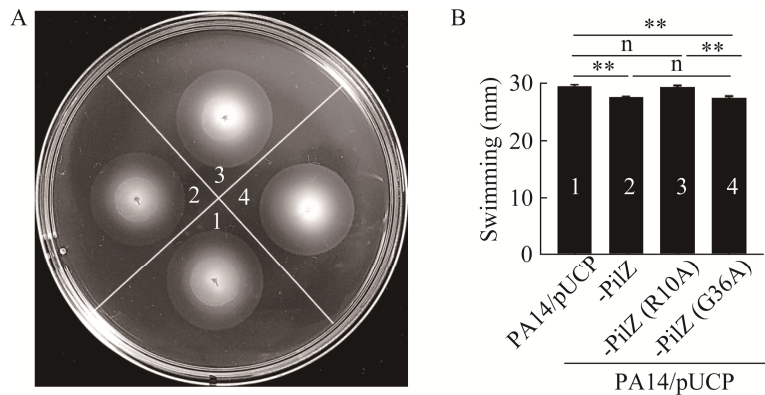


图5 野生型 *PilZ*、*PilZ* (R10A)和 *PilZ* (G36A)突变体过表达菌株的泳动能力

Figure 5 Swimming motility of the indicated strains overexpressing WT *PilZ*, *PilZ* (R10A) or *PilZ* (G36A) mutant variant. Swimming motility (A) and quantification of swimming zones (B) of wild-type PA14 carrying either the pUCP20 vector alone or pUCP20 with WT *PilZ*, *PilZ* (R10A) or *PilZ* (G36A). Significance was determined by one-way analysis of variance and a Tukey's posttest. **: $P < 0.01$; n: No significant difference.

位点进行的, 本研究采用染色体单拷贝回补的方法, 分别将 *PilZ* 野生型及 *PilZ* (R10A)、*PilZ* (G36A)突变体编码基因连同 *pilZ* 自身启动子^[9](起始密码子上游 460 bp 区域内)克隆到染色体整合载体 pUC18T-mini-Tn7T-Gm 上^[11], 之后

将其分别整合回补到 $\Delta pilZ$ 染色体上的 *attTn7* 位点^[11], 并在 *SadC* 过表达背景下检测 *PilZ* 及其突变体回复泳动抑制的能力。结果发现, 回补 *PilZ* 野生型或 *PilZ* (G36A)突变体显著抑制了 $\Delta pilZ$ 的泳动能力(图 6A、6B), 而回补 *PilZ* (R10A)

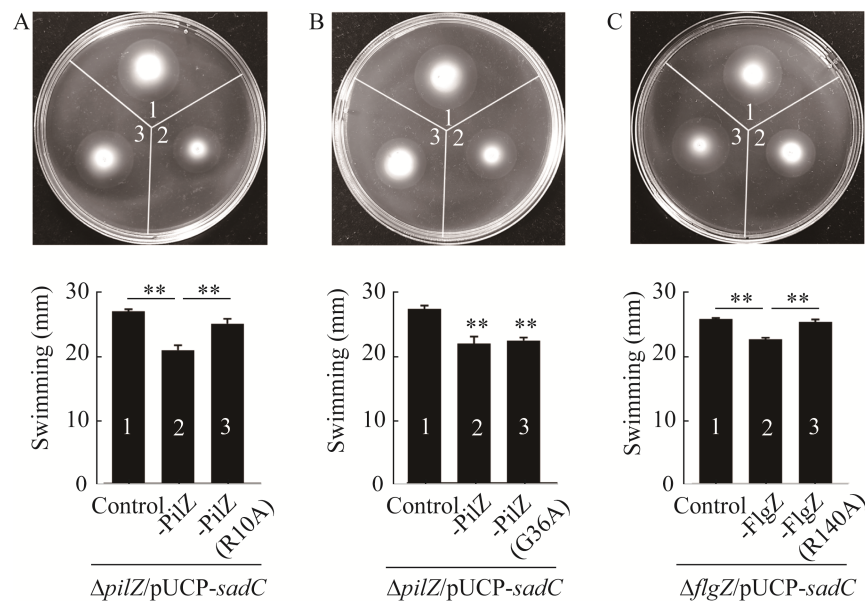


图6 *SadC* 过表达背景下染色体单拷贝回补 *PilZ*、*FlgZ* 野生型及其突变体时菌体的泳动能力

Figure 6 Swimming motility of the indicated strains complemented with WT *PilZ*, *FlgZ* or their mutant variants in a *SadC* overexpression background. A and B: Swimming behavior and quantification of swimming zones of $\Delta pilZ$ /pUCP-*sadC* carrying the chromosomally encoded wild-type *PilZ*, *PilZ* (R10A) or *PilZ* (G36A) at the *attTn7* site under the control of its own promoter. C: Swim analysis and quantification of swimming zones of $\Delta flgZ$ /pUCP-*sadC* harboring the chromosomally encoded wild-type *FlgZ* or *FlgZ* (R140A) as under panel (A). Significance was determined by Student's *t*-test, **: $P < 0.01$.

突变体对泳动的抑制作用显著降低(图 6A), 表明 R10 位点在 PilZ 介导 SadC 对泳动的抑制作用中发挥关键作用。类似地, SadC 过表达时在 $\Delta flgZ$ 中回补 FlgZ 野生型显著恢复了泳动能力抑制, 而回补 FlgZ (R140A) 突变体则无法介导泳动抑制(图 6C)。这些结果表明 PilZ 和 FlgZ 保守的 c-di-GMP 结合位点对其介导 SadC 对泳动的抑制至关重要。

3 讨论与结论

在过去的几十年中, c-di-GMP 信号传导研究取得了显著进展, 如 c-di-GMP 代谢机制的阐明, 不同类型 c-di-GMP 受体的发现, c-di-GMP 信号的全局和区域特异性传导模型的提出和不断被证实^[21], 使得 c-di-GMP 研究成为破解细菌应答外界信号并转化为特定适应行为这一过程的良好案例。但是, 由于大量 c-di-GMP 代谢酶的存在、c-di-GMP 上游调控信号以及 c-di-GMP 下游受体的多样性, 使得 c-di-GMP 信号系统及其调控机制的完全解析仍然是一个巨大的挑战, 特别值得一提的是特定代谢酶控制的 c-di-GMP 信号和不同 c-di-GMP 受体间的具体信号传递关系目前仍知之甚少。本研究发现 SadC 合成的 c-di-GMP 分子在 8 个不同的 PilZ 结构域受体中选择性通过 PilZ 和 FlgZ 调控铜绿假单胞菌的泳动能力, 增进了我们对 c-di-GMP 信号系统在铜绿假单胞菌中调控作用和分子机理的认识, 也为 c-di-GMP 信号传导的特异性假说提供了新的支持。

SadC 最初是 O'Toole 等对生物膜形成调控研究时通过转座子插入突变文库筛选发现的^[22], 因其突变后能导致表面黏附缺陷(surface attachment defective)而被命名^[14], 并通过体内 c-di-GMP 浓度测定和体外活力检测被证明是一种有活性的鸟苷酸环化酶^[14]。不过, 目前关于 SadC 对泳动

能力的影响仍存在一定的争议。Merritt 等最初报道 *sadC* 缺失对菌株 PA14 泳动无影响^[14], 而该实验室随后的一篇论文则报道 *sadC* 缺失后泳动能力相比野生型 PA14 显著增强^[23]。此外, Bhasme 等还发现在 PAO1 菌株中敲除 *sadC* 后泳动能力显著上调^[24]。与后两者报道相一致, 我们的结果也表明 *sadC* 突变会显著提高菌株的泳动能力。另外, 当前关于 SadC 的研究多集中在 SadC 蛋白本身所参与的环境信号应答^[25]、遗传调控途径^[26-27]和 SadC 互作蛋白上^[28-29], 对于 SadC 作为一个鸟苷酸环化酶所参与的 c-di-GMP 信号传导及其机制方面少有关注。在 Lewis 等^[30]研究乙醇对铜绿假单胞菌运动和胞内 c-di-GMP 浓度的影响时, 发现 SadC 和另一个鸟苷酸环化酶 GcbA 参与了乙醇诱导的 c-di-GMP 浓度上调, 同时还发现 PilZ 和 FlgZ 参与了乙醇介导的运动能力抑制, 不过该研究对于 SadC 和 GcbA 合成的 c-di-GMP 信号与 PilZ、FlgZ 间的信号传递关系仍不清楚。与 Lewis 等的发现不谋而合却又更进一步, 本研究理清并明确了 SadC 产生的 c-di-GMP 分子和 PilZ、FlgZ 间的信号传递关系, 为更深入研究 SadC 合成 c-di-GMP 信号的下游传导机制奠定了基础。类似地, 课题组正着力探究其他 DGC 或 PDE 控制的 c-di-GMP 信号与各 PilZ 结构域受体间的信号传递关系, 相关结果将为全面解析 c-di-GMP 信号传导途径及其调控机制提供更多的依据。

PilZ 结构域是最早发现的 c-di-GMP 受体, 其命名也归因于众多 c-di-GMP 结合蛋白中负责 c-di-GMP 结合的区域和铜绿假单胞菌 PilZ 蛋白的高度相似^[17,31]。有趣的是, 体外重组蛋白(N 端融合 MBP)活性分析并未检测到 PilZ 蛋白和 c-di-GMP 的结合^[9], 究其原因很可能是 PilZ 蛋白和 c-di-GMP 的亲和力过低难以捕捉, 或其与 c-di-GMP 的结合需要寡聚化或其他因子的辅

助^[9]。另外,氨基酸序列比对并未在 PilZ 蛋白中发现典型的 RXXXR 或 D/NXSXXG 结构域(图 4),这一点与 PA14_25420 (在 PAO1 中的编号为 PA2989)类似,而 PA2989 在体外实验中却具有最强的 c-di-GMP 结合的能力^[9]。Merighi 等推测这些缺失的关键结构域残基的功能可能被其附近具有相似电荷性质的残基替代,并在 c-di-GMP 结合中执行相同的功能^[9]。类似地,我们分析了 PilZ 蛋白序列中对应典型结构域周围的氨基酸序列,发现其第 6 位氨基酸残基天冬酰胺(N)也是极性氨基酸(前 10 位氨基酸 MSLPPNLGPR),推测其在 c-di-GMP 结合上可能扮演着类似的功能。未来我们将通过体内实验或其他手段进一步验证这些假设并深入研究 PilZ 和 c-di-GMP 的结合及其机制。

不同于 PilZ 蛋白,FlgZ 的相关研究已经较为深入^[18,20],其和 c-di-GMP 结合后能定位到细胞极,并和鞭毛定子蛋白 MotC 结合,阻止 MotC 和转子衔接,进而抑制鞭毛旋转。而且,FlgZ 还被认为是介导 c-di-GMP 调节菌体运动的“通用”受体蛋白^[20],本研究发现 FlgZ 参与了 SadC 合成 c-di-GMP 介导的泳动抑制,为 FlgZ 的“通用”c-di-GMP 受体角色提供了新的例证。有趣的是,在荧光假单胞菌 F113 菌株中的研究发现 $\Delta sadC \Delta flgZ$ 双敲除菌株的泳动能力和 $\Delta sadC$ 单敲除株无显著区别^[32],推测除了不同菌株生理特性和调节机制上的差异,还可能是由于野生型菌株中 c-di-GMP 浓度很低,敲除 *sadC* 后其相应的 c-di-GMP 信号丧失,而 FlgZ 参与运动调节的机制之一就是和 c-di-GMP 结合,没有了相应 c-di-GMP 结合的 FlgZ 功能减弱,再进一步敲除 *flgZ* 后的表型也就变化不大了。

根据以上研究,我们提出了 SadC 调控铜绿假单胞菌泳动能力的分子机制模型:在遇到某

种不利于运动的环境条件(如乙醇或表面接触)时,由 SadC 合成的 c-di-GMP 第二信使分子可将信息传递到细胞质中。该 c-di-GMP 信号分子会被 FlgZ 识别和接受,并将信息进一步传递给鞭毛定子 MotC,导致鞭毛功能受损,菌体运动性减弱。此外,该 c-di-GMP 信号还可由 PilZ 向下游传递,并通过一种未知的机制抑制铜绿假单胞菌的泳动能力。由于细菌运动在环境应答和宿主感染中的重要作用,以 c-di-GMP 为媒介,通过 SadC-FlgZ (MotC)/PilZ 信号轴在翻译后水平调控鞭毛运动,可使菌体对环境变化做出快速反应,更好地适应环境。

参考文献

- [1] JENAL U, REINDERS A, LORI C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 271-284.
- [2] HALL CL, LEE VT. Cyclic-di-GMP regulation of virulence in bacterial pathogens[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2018, 9(1): 10.1002/wrna.1454.
- [3] PETCHIAPPAN A, NAIK SY, CHATTERJI D. Tracking the homeostasis of second messenger cyclic-di-GMP in bacteria[J]. *Biophysical Reviews*, 2020, 12(3): 719-730.
- [4] 管文静, 吴茂森, 何晨阳. c-di-GMP 信号途径对细菌致病性的调控作用[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(3): 427-431.
GUAN WJ, WU MS, HE CY. Cyclic diguanylate signalling in regulation of bacterial pathogenesis[J]. *Microbiology*, 2009, 36(3): 427-431 (in Chinese).
- [5] CHOU SH, GALPERIN MY. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(1): 32-46.
- [6] HENGGE R. High-specificity local and global c-di-GMP signaling[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(11): 993-1003.
- [7] 杨凤环, 田芳, 陈华民, 何晨阳. 病原细菌受体介导的 c-di-GMP 信号传导及其调控机制[J]. *植物保护*, 2017, 43(1): 9-14.
YANG FH, TIAN F, CHEN HM, HE CY. Cyclic di-GMP signal receptor-mediated regulation of

- bacterial behaviors[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(1): 9-14 (in Chinese).
- [8] KULASAKARA H, LEE V, BRENCIC A, LIBERATI N, URBACH J, MIYATA S, LEE DG, NEELY AN, HYODO M, HAYAKAWA Y, AUSUBEL FM, LORY S. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(8): 2839-2844.
- [9] MERIGHI M, LEE VT, HYODO M, HAYAKAWA Y, LORY S. 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.
- [10] HOU LL, DEBRU A, CHEN QQ, BAO QY, LI KW. AmrZ regulates swarming motility through cyclic di-GMP-dependent motility inhibition and controlling pel polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* PA14[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1847.
- [11] CHOI KH, SCHWEIZER HP. Mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 153-161.
- [12] HMELO LR, BORLEE BR, ALMBLAD H, LOVE ME, RANDALL TE, TSENG BS, LIN CY, IRIE Y, STOREK KM, YANG JJ, SIEHNEL RJ, HOWELL PL, SINGH PK, TOLKER-NIELSEN T, PARSEK MR, SCHWEIZER HP, HARRISON JJ. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(11): 1820-1841.
- [13] HA DG, KUCHMA SL, O'TOOLE GA. Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2014, 1149: 59-65.
- [14] MERRITT JH, BROTHERS KM, KUCHMA SL, O'TOOLE GA. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(22): 8154-8164.
- [15] YEUNG ATY, TORFS ECW, JAMSHIDI F, BAINS M, WIEGAND I, HANCOCK REW, OVERHAGE J. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(18): 5592-5602.
- [16] ORR MW, LEE VT. A PilZ domain protein for chemotaxis adds another layer to c-di-GMP-mediated regulation of flagellar motility[J]. *Science Signaling*, 2016, 9(450): fs16.
- [17] ALM RA, BODERO AJ, FREE PD, MATTICK JS. Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(1): 46-53.
- [18] BENSE S, BRUCHMANN S, STEFFEN A, STRADAL TEB, HÄUSSLER S, DÜVEL J. Spatiotemporal control of FlgZ activity impacts *Pseudomonas aeruginosa* flagellar motility[J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 111(6): 1544-1557.
- [19] CHEANG QW, XIN LY, CHEA RYF, LIANG ZX. Emerging paradigms for PilZ domain-mediated C-di-GMP signaling[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(1): 381-388.
- [20] BAKER AE, DIEPOLD A, KUCHMA SL, SCOTT JE, HA DG, ORAZI G, ARMITAGE JP, O'TOOLE GA. PilZ domain protein FlgZ mediates cyclic di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(13): 1837-1846.
- [21] DAHLSTROM KM, O'TOOLE GA. A symphony of cyclases: specificity in diguanylate cyclase signaling[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71: 179-195.
- [22] O'TOOLE GA, KOLTER R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 295-304.
- [23] HA DG, RICHMAN ME, O'TOOLE GA. Deletion mutant library for investigation of functional outputs of cyclic diguanylate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PA14[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(11): 3384-3393.
- [24] BHASME P, WEI Q, XU AM, NAQVI STA, WANG D, MA LZ. Evaluation and characterization of the predicted diguanylate cyclase-encoding genes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *MicrobiologyOpen*, 2020, 9(3): e975.
- [25] SCHMIDT A, HAMMERBACHER AS, BASTIAN M, NIEKEN KJ, KLOCKGETHER J, MERIGHI M, LAPOUGE K, POSCHGAN C, KÖLLE J, ACHARYA KR, ULRICH M, TÜMMLER B, UNDEN G, KAEVER V, LORY S, HAAS D, SCHWARZ S, DÖRING G. Oxygen-dependent regulation of c-di-GMP synthesis

- by SadC controls alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(10): 3390-3402.
- [26] MOSCOSO JA, JAEGER T, VALENTINI M, HUI K, JENAL U, FILLOUX A. The diguanylate cyclase SadC is a central player in Gac/Rsm-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(23): 4081-4088.
- [27] ZHU B, LIU CL, LIU SH, CONG HJ, CHEN YH, GU LC, MA LZ. 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.
- [28] MCCARTHY RR, MAZON-MOYA MJ, MOSCOSO JA, HAO YA, LAM JS, BORDI C, MOSTOWY S, FILLOUX A. Cyclic-di-GMP regulates lipopolysaccharide modification and contributes to *Pseudomonas aeruginosa* immune evasion[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 17027.
- [29] BAKER AE, WEBSTER SS, DIEPOLD A, KUCHMA SL, BORDELEAU E, ARMITAGE JP, O'TOOLE GA. Flagellar stators stimulate c-di-GMP production by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(18): e00741-e00718.
- [30] LEWIS KA, BAKER AE, CHEN AI, HARTY CE, KUCHMA SL, O'TOOLE GA, HOGAN DA. Ethanol decreases *Pseudomonas aeruginosa* flagellar motility through the regulation of flagellar stators[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(18): e00285-e00219.
- [31] AMIKAM D, GALPERIN MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein[J]. Bioinformatics: Oxford, England, 2006, 22(1): 3-6.
- [32] MARTÍNEZ-GRANERO F, NAVAZO A, BARAHONA E, REDONDO-NIETO M, GONZÁLEZ de HEREDIA E, BAENA I, MARTÍN-MARTÍN I, RIVILLA R, MARTÍN M. 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.