

参与表观遗传调控的细菌 DNA 甲基转移酶 CcrM 的研究进展

王浩, 王尔雅, 郭敏亮*

扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州

王浩, 王尔雅, 郭敏亮. 参与表观遗传调控的细菌 DNA 甲基转移酶 CcrM 的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 3848-3858.
WANG Hao, WANG Erya, GUO Minliang. Research progress of bacterial DNA methyltransferase CcrM involved in epigenetic regulation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 3848-3858.

摘要: DNA 甲基化是细菌进行表观遗传调控的重要方式, α 变形菌利用受细胞周期调控的 DNA 甲基转移酶(cell cycle-regulated DNA methyltransferase, CcrM)对 DNA 进行甲基化。CcrM 不含限制性内切酶功能单元, 属于孤儿甲基转移酶。CcrM 通过对序列中腺嘌呤进行甲基化影响 DNA 与蛋白质的相互作用, 从而调节大量基因的表达, 对 α 变形菌细胞周期等过程的调控至关重要。本文综述了 CcrM 的功能、结构及其表观调控机制, 阐明了 CcrM 对 DNA 的识别、催化及活性调控的机理, 总结了细胞周期全局性调控因子(global cell-cycle regulator, GcrA)利用 CcrM 的甲基化信号调节基因表达的机制, 并展望了 CcrM 未来的潜在研究方向, 为进一步深入研究细菌表观遗传调控机制提供了参考。

关键词: 受细胞周期调控的 DNA 甲基转移酶(CcrM); 细菌 DNA 甲基化; 表观遗传调控; 细胞周期全局性调控因子(GcrA)

Research progress of bacterial DNA methyltransferase CcrM involved in epigenetic regulation

WANG Hao, WANG Erya, GUO Minliang*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

Abstract: DNA methylation is an important way of epigenetic regulation in bacteria.

资助项目: 国家自然科学基金(32300151)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32300151).

*Corresponding author. E-mail: guoml@yzu.edu.cn

Received: 2025-02-22; Accepted: 2025-04-23; Published online: 2025-05-21

Alphaproteobacteria methylate DNA by using the cell cycle-regulated DNA methyltransferase (CcrM). CcrM does not contain a functional unit of restriction endonuclease, thus belonging to an orphan methyltransferase. By methylating adenine in DNA sequences, CcrM influences the interaction between DNA and proteins, regulates the expression of numerous genes, and is crucial for the regulation of processes such as the cell cycle of *Alphaproteobacteria*. We reviewed the function, structure, and epigenetic regulation of CcrM, clarified the mechanisms of CcrM in DNA recognition, catalysis, and activity regulation, summarized the mechanism by which the global cell-cycle regulator (GcrA) utilizes the methylation signals produced by CcrM to regulate gene expression, and provided an outlook on the potential future research directions of CcrM, providing a reference for further in-depth study of the epigenetic regulation mechanisms in bacteria.

Keywords: CcrM; bacterial DNA methylation; epigenetic regulation; GcrA

在细菌中 DNA 甲基化广泛存在, 调控着复杂的生命进程。细菌 DNA 甲基化系统分为 2 类, 一类是含有限制性内切酶的限制与修饰系统 (restriction and modification systems, R-M 系统), R-M 系统包含 2 种能够识别同一特定序列的酶, 即限制性内切酶和甲基转移酶 (methyltransferase, MTase); 另一类是不含限制性内切酶的孤儿甲基转移酶^[1]。这 2 类甲基化系统的功能完全不同。R-M 系统的主要功能是防御外源 DNA 入侵, 该系统通过甲基转移酶对内源 DNA 的特定定位点进行甲基化修饰, 从而使相应的限制性内切酶无法识别和切割内源 DNA; 而外源 DNA 由于缺乏对应位点的甲基化修饰, 会被限制性内切酶水解^[2]。孤儿甲基转移酶不含限制性内切酶, 不能像 R-M 系统那样发挥防御外源 DNA 的作用, 通常通过甲基化修饰改变蛋白质与特定序列的结合, 从而调控细菌的生理过程^[3]。

在 α 变形菌中研究最为深入的孤儿甲基转移酶是受细胞周期调控的 DNA 甲基转移酶 (cell cycle-regulated DNA methyltransferase, CcrM)。 α 变形菌中主要的 DNA 甲基化位点为腺嘌呤 6 号位、胞嘧啶 4 号位以及胞嘧啶 5 号位^[3]。CcrM 催化的甲基化位点与 I 型 R-M 系统相同, 暗示 CcrM 可能源于 I 型 R-M 系统丢失限制性内切酶后进化而来。功能上, CcrM 完全

独立于 R-M 系统, 其催化的腺嘌呤 6 号位甲基化是 α 变形菌中最主要的表观遗传调控信号^[3], 细胞周期全局性调控因子 (global cell-cycle regulator, GcrA) 正是通过识别该信号来控制基因表达^[4]。此外, α 变形菌中还存在另一种孤儿甲基转移酶, 即胞嘧啶甲基转移酶。目前此类酶的功能尚不清楚, 与 CcrM 不同, 该酶对于细菌生存多为非必需^[5-6]。

CcrM 在弧形柄杆菌 (*Caulobacter vibrioides*) 中首次被发现^[7], 在 α 变形菌中高度保守^[5]。目前仅在立克次氏体目 (*Rickettsiales*) 和磁球菌目 (*Magnetococcales*) 中未发现其同源基因^[8-10]。CcrM 对于 α 变形菌大多是必需的, 缺失 CcrM 会导致细菌死亡^[9,11-12]。CcrM 对 α 变形菌的细胞周期调控至关重要。CcrM 通过甲基化调控多个关键的细胞周期因子的表达, 进而调控细胞周期的有序进行^[5]。在马耳他布鲁氏菌 (*Brucella melitensis*) 和放射形农杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) 中, CcrM 还影响细菌的毒力^[12-13]。

细菌的表观遗传调控是细菌基因表达调控的重要方式, CcrM 所催化的腺嘌呤甲基化是 α 变形菌的主要表观遗传调控形式, 其对细菌细胞周期等过程的调控十分关键。因此本文对 CcrM 在细菌表观遗传调控中的作用机制进行综述, 阐述 CcrM 的功能、结构及调控机制, 以期为进一步深入研究细菌表观遗传调控机制提供参考。

1 CcrM 催化特定定位点的甲基化

CcrM 属于 DNA 甲基转移酶 β 家族, 与流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的 Hinf I 甲基转移酶具有同源性。其催化单元负责识别并结合底物 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-methionine, SAM), 将甲基从 SAM 转移到 GATNC (其中 N 代表任意核苷酸残基)基序的腺嘌呤核苷酸残基的 6 号位上, 形成 N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenine, 6mA) (图 1A)^[7]。CcrM 对 GATNC 基序的识别具有特异性, 单个碱基替换(如 5'-AA NTC-3'), 会导致 CcrM 对其催化活性降低至原有的 1/10^[14]。CcrM 对单链 DNA 和 RNA 表现出相似的特异性识别^[14]。GATNC 基序的侧翼序列也会影响 CcrM 的酶活性, 侧翼序列的差异导致 CcrM 催化速度在 0.6–8.0 min⁻¹ 之间波动^[15]。相较于未甲基化的 DNA 双链底物, CcrM 对半甲基化的 DNA 双链具有更高的催化活性^[16]。这与 CcrM 在细胞中的功能场景有关, 在 *C. vibrioides* 中 CcrM 在复制后期的前分裂细胞中表达活跃; GATNC 基序由于 DNA 复制的半保留特性处于半甲基化状态(只有亲本链处于甲基化状态), 此时 CcrM 开始表达并对新生链进行甲基化, 最终形成全甲基化的 DNA 双链^[7]。

2 CcrM 的结构及催化机制

CcrM 主要由 N 端的甲基转移酶结构域和 C 端的非特异性 DNA 结合结构域组成。N 端的 MTase 结构域主要由一个开放的“ $\alpha\beta\alpha$ 三明治”结构构成, C 端的结构域则由多种二级结构元件堆积形成, 两者由一段灵活的短肽链连接在一起(图 1B); CcrM 以二聚体形式发挥功能, 二聚体界面主要由 2 个单体 MTase 结构域的部分氨基酸残基构成(图 1C)^[17]。

靶链和互补链之间的分离是实现甲基化反应的前提之一^[18-19]。CcrM 二聚体与 DNA 结合时形成 2 条碱性通道, 分别将靶链和互补链扭曲, 使靶链识别区和互补链维持在分离状态

(图 1C)^[17]。R₃₅₀ 残基对于链分离过程是必需的, SAM 能够稳定双链的分离状态^[20]。链分离过程与 CcrM 催化甲基转移时的构象变化是相互独立的^[19]。

CcrM 二聚体中 2 个单体对 DNA 结合和催化的贡献并不均匀^[17]。其中一个单体的 MTase 结构域负责特异性识别靶序列并催化甲基化反应, 而另一个单体的 C 端结构域则与靶链的互补链的磷酸和糖骨架相互作用, 实现对 DNA 的非特异性结合(图 1C)^[17-18]。MTase 结构域中 β -折叠片的连接环提供了绝大部分用于识别 GATNC 的氨基酸残基。其中, R₄₄ 识别 G; D₃₁/P₃₂/P₃₃/Y₃₄ 识别 A; 第 3 位的 N 是可变的, 结合在 L₃₈–L₄₂ 之间的疏水残基处; H₉₄/R₁₂₉ 等残基识别 T, L₄₂/P₁₂₃/F₁₂₅/K₁₂₆ 识别 C (图 1C)^[17]。第 2 位的 A 是甲基受体, 被 DPPY 4 个氨基酸残基包围, DPPY 是 MTase 中保守的催化活性模体^[21]。DPPY 分别与腺嘌呤环的极性基团形成氢键, 将腺嘌呤 6 号位的 N 原子与 SAM 的甲基、硫原子紧密排列, 从而构成 MTase 催化甲基转移反应的必要环境^[21]。

3 CcrM 的活性调控

CcrM 活性受细胞周期的动态调控。在 *C. vibrioides* 中, CcrM 蛋白仅在前分裂细胞中可检测到, 并在 DNA 复制完成后才发挥作用^[22]。如果在整个细胞周期中持续合成 CcrM, 细胞会出现分裂异常并过度启动 DNA 复制的现象^[9,22], 表明 CcrM 活性的时间控制对细胞周期至关重要。CcrM 的活性调控基于严格的转录和转录后调控机制。 α 变形菌中保守的细胞周期调节因子 CtrA 能够结合 *ccrM* 启动子, 激活 *ccrM* 的转录(图 2)^[23-25]。CtrA 在 *C. vibrioides* 前分裂细胞和游动细胞中含量丰富且处于激活状态, 其转录激活活性受自身磷酸化状态的影响^[23,26]。CtrA 对 *ccrM* 的激活还受到 small CtrA inhibitory protein (SciP) 因子的调控(图 2), SciP 通过与 CtrA 互作阻止其招募 RNA 聚合酶, 从而抑制

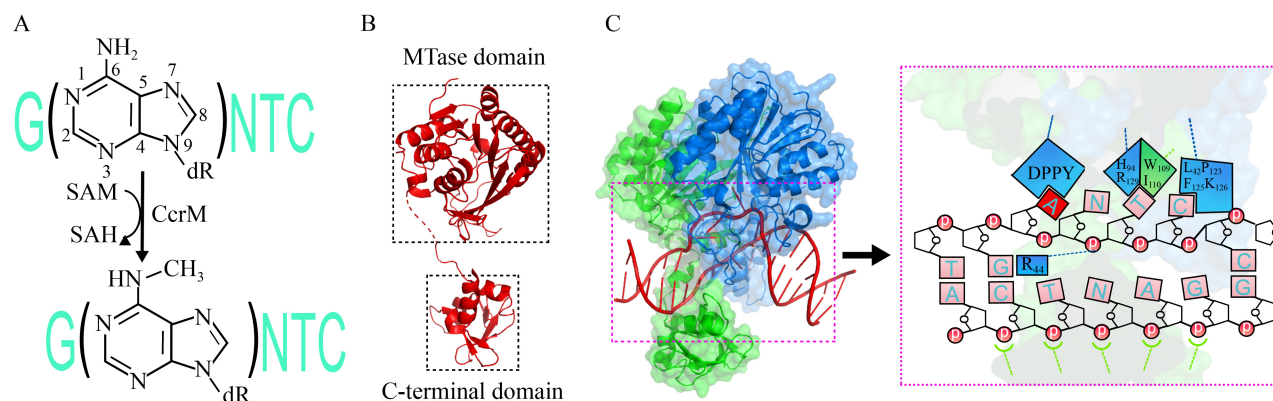


图1 CcrM的序列识别与催化机制。 A: CcrM催化GANTC生成G(6mA)NTC的示意图(腺嘌呤核苷酸以结构式呈现, dR表示磷酸脱氧核糖); B: CcrM单体结构(PDB: 6PBD); C: CcrM结合和催化DNA的机制(PDB: 6PBD)^[17]。红色表示双链DNA (double-stranded DNA, dsDNA), 蓝色和绿色分别指示CcrM二聚体的2个单体, 其中蓝色单体主要负责靶位点的识别和催化甲基转移, 绿色单体主要负责靶位点互补链的非特异性结合, 右侧虚线框内容展示了CcrM识别和催化GANTC的机制, 用于识别GANTC基序的几个模体均以模块形式标注, 其中蓝色底色的模块来自图C左侧二聚体中的蓝色单体, 绿色底色的模块来自图C左侧二聚体中的绿色单体, 绿色弧线表示用于非特异性识别靶位点互补链的模体。

Figure 1 Sequence recognition and catalytic mechanism of CcrM. A: Schematic diagram of CcrM catalyzing the formation of G(6mA)NTC from GANTC (The adenine residue is presented in structural formula, and “dR” represents phosphodeoxyribose); B: Structure of the CcrM monomer (PDB: 6PBD); C: Mechanism of CcrM binding to and catalyzing DNA (PDB: 6PBD)^[17]. The dsDNA is shown in red. The blue and green colors indicate the two monomers of the CcrM dimer, respectively. The blue monomer mainly functions in recognition and methyl-transfer of target site, while the green monomer is mainly involved in non-specific binding to the complementary strand of the target site. The content within the dashed box on the right side shows a schematic diagram of the mechanism by which CcrM recognizes and catalyzes GANTC. Several motifs used for recognizing the GANTC motif are all marked in a modular form. The modules with a blue background are from the blue monomer in figure C, and the module with a green background is from the green monomer of the dimer in figure C. The green arcs represent the motifs used for non-specific recognition of the complementary strand of the target site.

CtrA 对 *ccrM* 的转录激活(图 2)^[27]。值得注意的是, CcrM 也能够甲基化自身启动子的 GANTC 基序, 这一修饰最终导致 *ccrM* 转录的抑制(图 2)^[28], 但具体的抑制机制目前尚不清楚。除了转录调控, CcrM 还受到转录后调控。CcrM 是一种不稳定的蛋白质, 能够被 Lon 蛋白酶降解^[22,29-30], 因此 Lon 蛋白酶可以通过控制 CcrM 在细胞中的含量实现对 CcrM 活性的调控(图 2)。Lon 蛋白酶使得 CcrM 的蛋白质水平能够随着细

胞周期中 *ccrM* 转录的波动而变化^[31]。此外, MucR 作为一种保守的转录调节因子也能够调控 CcrM 的活性(图 2), MucR 通过覆盖在 GANTC 基序上阻止 CcrM 与 GANTC 的结合, 从而使 CcrM 处于无效活性状态^[32]。

4 CcrM 的调控功能

CcrM 在 α 变形菌中高度保守, 对于 *A. radiobacter*、*B. melitensis* 和草木栖剑菌

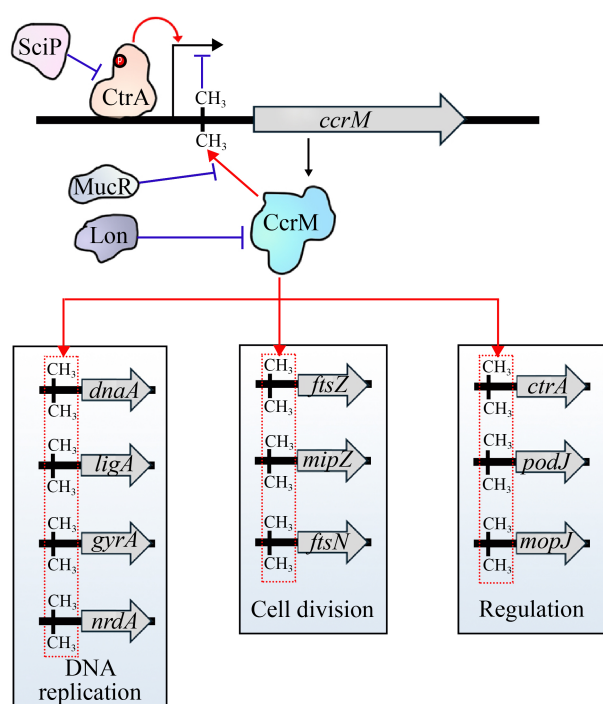


图2 CcrM的调控机制。灰色箭头表示待转录的基因，黑色箭头表示转录，红色箭头表示激活，蓝色“T”形线表示抑制，“CH₃”表示由CcrM催化转移到GANTC基序上的甲基，各矩形包含受CcrM调控的生理过程，仅选取了代表性基因和生理过程。

Figure 2 Regulatory mechanism of CcrM. The grey arrows represent the genes to be transcribed, the black arrow indicates transcription, the red arrows indicate activation, the blue “T”-shaped lines indicate inhibition, and “CH₃” represents the methyl group transferred to the GANTC motif catalyzed by CcrM. Each rectangle contains the biochemical processes regulated by CcrM, and only representative genes and biochemical processes are included.

(*Ensifer meliloti*)等细菌的生存是必需的^[9,11-12]，表明 CcrM 的生理功能对 α 变形菌来说十分重要。过表达或持续表达 *ccrM* 基因会导致 GANTC 位点在整个细胞周期中始终保持完全甲基化状态，此时细胞通常会积累 2 条以上的染色体，呈现出异常形态，并丧失适应能力^[7,22,33]。CcrM 还显著影响细菌的运动性、生物膜形

成和毒力^[12,34]，在根瘤菌中 CcrM 与共生固氮有关^[35]。

在 *C. vibrioides* 中大约 10% 的基因表达会因 *ccrM* 的缺失而发生变化，其中包含大量参与细胞周期调控的基因，这些基因在其启动子区域通常含有一个或多个 GANTC 基序^[8]。*C. vibrioides* 的细胞周期涉及柄细胞和游动细胞的分化，CtrA 调控因子在其中发挥重要作用。*ctrA* 启动子的上游调控区域包含 2 个 GANTC 基序，该启动子仅在半甲基化时才能激活 *ctrA* 转录^[33]。由于 CcrM 在 DNA 复制阶段不表达，而亲代 DNA 处于全甲基化状态，因此复制会产生 2 个半甲基化的子代 DNA，CcrM 正是在此时被激活表达，控制半甲基化 DNA 向全甲基化 DNA 的过渡，进而控制 CtrA 等调控因子的表达^[7,33]。CtrA 能够与复制原点结合以保护其半甲基化状态；细胞分裂完成后，在游动细胞中 CtrA 仍然与复制原点结合，确保复制原点处于半甲基化状态，不会进一步启动复制；然而在柄细胞中，CtrA 被蛋白酶水解或失活，复制原点完全甲基化后可在 DnaA 的作用下再次启动复制^[36]。除了在 *C. vibrioides* 中，CcrM 在 *A. radiobacter*^[11]、*B. melitensis*^[24]、*R. meliloti*^[9,37] 等 α 变形菌中通过 CtrA 调控 DNA 复制的机制具有保守性。目前来看，CcrM 对细胞分化的控制是 *Caulobacter* 特异性的。

除了通过 CtrA 调控 DNA 的复制和细胞分化，CcrM 还影响一系列细胞周期相关基因的表达(图 2)^[31]。在 *C. vibrioides* 中参与 DNA 复制的 *ligA*、*gyrA*、*nrdA* 等基因的表达受 CcrM 水平的影响^[8]；FtsZ 是细胞分裂调节蛋白，在 *C. vibrioides*、*B. melitensis* 和 *A. radiobacter* 中 CcrM 协同 GcrA 调控 FtsZ 的表达^[29,38-41]；在 *C. vibrioides* 中 PopZ 和 PopJ 等细胞极性调节因子受 CcrM/GcrA 的调控^[8,42]，但在 *B. melitensis* 中两者的表达并不受 CcrM/GcrA 调控^[40]。在 *A. radiobacter* 中 CcrM 通过 GcrA 促进 *repABC*^{Ch2} 操纵子中基因的表达，调控复制起始和染色体

分离^[34]；在 *C. vibrioides* 中细菌运动性相关因子 FlaY、细胞形态相关因子 CreS 等均受到 CcrM 的表达调控^[8,43]。研究表明 CcrM 介导的甲基化控制着 *dnaA* 的转录^[33]。然而之后的研究显示 *dnaA* 的表达与 *ccrM* 无关^[44]。除了调节细胞周期，*A. radiobacter* 的 CcrM 还通过 GcrA 调控 Ti 质粒拷贝和毒力基因表达^[13]。受 CcrM 调控的细胞周期相关基因的具体信息详见表 1。

在不同 α 变形菌中 CcrM 调控的基因大多集中在 DNA 复制、细胞形态等方面，可见 CcrM

在调控细胞周期过程中的保守作用。然而有些受调控的基因也体现了菌种特异性，如 *popZ* 和 *popJ* 在 *C. vibrioides* 中受 CcrM 调控，而在 *B. melitensis* 中则不受其影响。CcrM 调控部分菌株特有的致病或共生固氮等过程也体现了 CcrM 功能的菌种特异性。尽管在调控功能上有差异，但 CcrM 调控基因表达的机制看起来高度保守。在已验证的受调控基因中大部分都是通过 GcrA 实现了表达调控(表 1)。

表1 CcrM调控的细胞周期相关基因

Table 1 Cell cycle-related genes regulated by CcrM

Gene	Function	Activated (A)/ repressed (R) by CcrM	Activated by GcrA	Validated strain	References
<i>dnaA</i>	DNA replication	Controversial	Repressed by GcrA	Cv	[8,33,45-47]
<i>ligA</i>	DNA replication	A	–	Cv	[8]
<i>gyrA</i>	DNA replication	A	–	Cv, Bm	[8,40,46]
<i>nrdA</i>	DNA replication	A	–	Cv	[8]
<i>recJ</i>	DNA replication	A	–	Cv	[8]
<i>ssb</i>	DNA replication	A	–	Cv	[8]
<i>thyA</i>	DNA replication	A	–	Cv	[8]
<i>repABC</i>	DNA replication	A	Yes	Ar	[8]
<i>nstA</i>	Chromosome segregation	A	Yes	Cv	[41]
<i>parE</i>	Chromosome segregation	A	–	Cv, Bm	[8]
<i>ftsZ</i>	Cell division	A	Yes	Cv, Bm, Ar	[8,38-40]
<i>ftsN</i>	Cell division	A	Yes	Cv, Bm	[4,8,38,40]
<i>ftsW</i>	Cell division	R	–	Cv	[8]
<i>ftsE</i>	Cell division	A	–	Cv	[8]
<i>mipZ</i>	Cell division	A	Yes	Cv, Bm	[4,38,40,45]
<i>pleC</i>	Polarity	A	Yes	Cv	[4,43]
<i>popZ</i>	Polarity	R	–	Cv	[8]
<i>podJ</i>	Polarity regulator	A	Yes	Cv	[4,38,45]
<i>tipF</i>	Polarity regulator	A	Yes	Cv	[4]
<i>flaY</i>	Motility	A	Yes	Cv	[4]
<i>staR</i>	Stalk biogenesis	A	–	Cv	[8,46]
<i>creS</i>	Cell shape	A	Yes	Cv	[8,43]
<i>ctrA</i>	Cell cycle regulator	R	Yes	Cv, Ar, Bm, Em	[4,8,38,45,48]
<i>mopJ</i>	pleiotropic regulator	A	Yes	Cv	[42]

– indicates that no information is available. Cv: *C. vibrioides*; Bm: *B. melitensis*; Ar: *A. radiobacter*; Em: *E. meliloti*.

5 CcrM/GcrA 表观调控系统

GcrA 是一种受细胞周期调控的转录调节蛋白, 控制数百个基因的表达^[41,46,49]。转录组分析表明, CcrM 调控的基因与 GcrA 调控的基因存在显著重叠^[8,40]。在 α 变形菌中, GcrA 通常与 CcrM 共同保守存在^[10,38]。 $\Delta gcrA$ 和 $\Delta ccrM$ 突变体的表型具有高度相似性, 在快速生长条件下均无法进行细胞分裂^[38-39,50]。在缺乏 CcrM 的细胞中, GcrA 对染色体区域的亲和力较低^[4,49]。染色质免疫共沉淀测序 (chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-Seq) 实验证实, GcrA 在体内优先与含有 GANTC 基序的 σ^{70} 因子依赖型启动子结合^[49]。GANTC 的甲基化对 GcrA 与启动子的结合至关重要, GcrA 对 G(6mA)NTC 的亲和力显著高于 GANTC^[4,13]。在一些测试的启动子(包括 *mipZ* 启动子)上, GcrA 对半甲基化 GANTC 基序的亲和力取决于甲基化的 DNA 链, 因此 GcrA 可能通过结合甲基化的 GANTC 链不对称地调控某些基因表达^[4]。这些研究表明 GcrA 是一种 CcrM 相关的表观遗传调节因子, 其转录调节活性受其靶启动子中 GANTC 甲基化状态的影响。

最近的几项研究揭示了 GcrA 的结构及其调节基因转录的机制。GcrA 包含 2 个主要的结构域: 位于 N 端的 DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, DBD) 和位于 C 端的 σ 因子互作结构域 (σ factor-interacting domain, SID) (图 3), DBD 负责识别并结合甲基化的 GANTC 基序, SID 则负责与 σ^{70} 因子结合, 调节转录水平^[51]。

与 DNA 结合时, DBD 的螺旋-转角-螺旋结构镶嵌到双链 DNA 的大沟中, 并通过氢键、堆积力等相互作用来识别序列中的 GANTC 基序^[51-52]。DBD 表面有 2 个“口袋”, 它们参与结合 DNA 2 条链上的甲基基团。第一个深口袋容纳正链上的甲基基团, 第二个浅口袋容纳负链上的甲基基团; DBD 也可以结合非甲基化的 DNA, 其与非甲基化 DNA 的结合方式与结合甲

基化 DNA 基本相同, 只是用于结合甲基基团的 2 个口袋是空的, 这解释了为什么 GcrA 与甲基化 DNA 的亲和力高于非甲基化 DNA^[51]。

GcrA 能够通过 SID 与 σ^{70} 互作, 从而组成一个 GcrA- σ^{70} -RNAP 全酶(图 3), 共同在基因组 DNA 上滑动扫描^[50-52]。DBD 识别并结合 G(6mA)NTC 后, 便阻止 GcrA- σ^{70} -RNAP 在 DNA 上继续滑动, 保证 RNAP 处于启动转录的合适位置, 从而开启下游基因的转录(图 3)^[50]。此外, DBD 与启动子的结合还能够一定程度上提高启动子的解链速率, 加速转录^[52]。

6 总结与展望

CcrM 作为 α 变形菌中保守的孤儿甲基转移酶, 对细胞周期等过程起到至关重要的调控作用。CcrM 能够识别 DNA 中的 GANTC 基序, 并对其中腺嘌呤的 6 号位进行甲基化。通过这种甲基化实现对众多基因的表观遗传调控。CcrM 的活性呈周期性变化, 转录和转录后调控的多种组合实现了细菌对 CcrM 活性的时间控制。GcrA 是 CcrM 实现基因表达调控的重要因子, 其 DNA 结合结构域能够特异性识别甲基化的 GANTC 基序, σ 因子互作结构域则通过与 σ^{70} 因子互作, 激活下游基因的表达。

在 γ 变形菌中存在一种与 CcrM 相对应的孤儿甲基转移酶, 即 DNA 腺嘌呤甲基化酶 (DNA adenine methylase, Dam)。Dam 与 CcrM 一样催化腺嘌呤 6 号位的甲基化, 调控细胞周期等过程。然而 Dam 在识别位点、时空表达方面与 CcrM 存在显著不同。Dam 的识别序列为 GATC, 且其在整个细胞周期均有表达^[3]。CcrM 敲除在 α 变形菌中通常是致死的, 而 Dam 敲除大多并不致死^[53]。CcrM 和 Dam 在表观遗传调控机制上也完全不同。CcrM 协同转录激活因子 GcrA 促进基因表达, 而 Dam 则利用甲基化抑制 leucine-responsive regulatory protein (Lrp)、redox-sensitive regulator (OxyR) 等转录阻遏蛋白与启动子的结合, 从而起到基因表达开关的作用^[3]。此

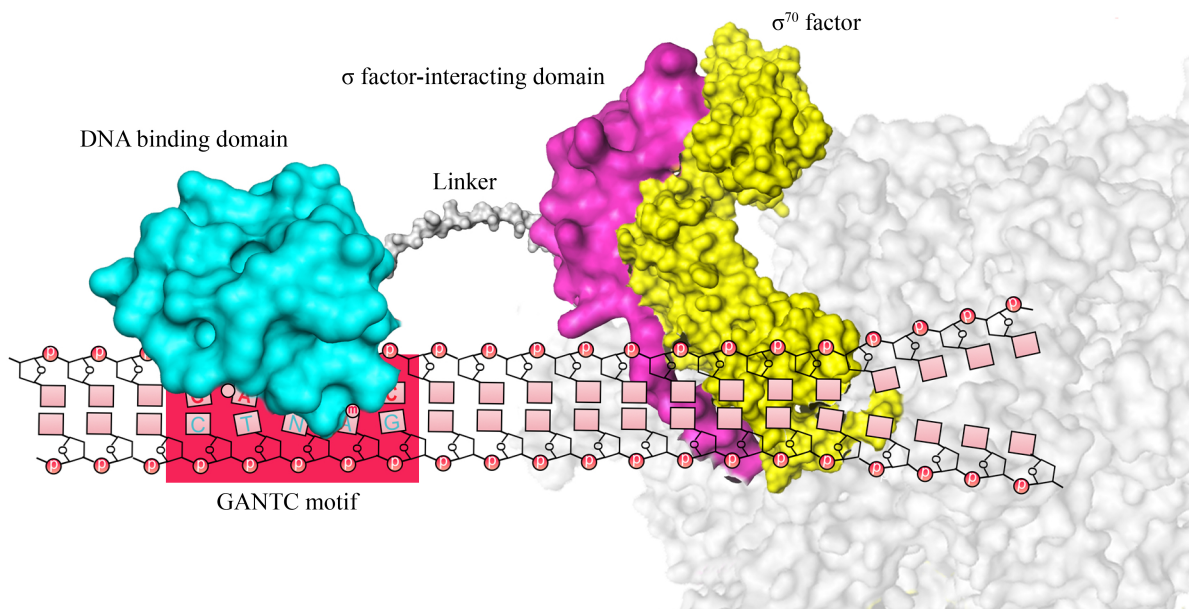


图3 GcrA激活基因表达的机制。蓝色结构表示GcrA的DNA结合结构域(DBD)示意模型, 紫色结构表示GcrA的 σ 因子互作结构域(SID)示意模型, 两者由灰色的linker (示意模型)连接, 黄色结构为 σ^{70} 因子示意模型, 浅灰色结构表示RNA聚合酶示意模型。GcrA通过DBD识别G(6mA)NTC (红底色矩形), 再通过SID与 σ^{70} 因子互作, 激活转录。模型基于Gonzalez等和Wu等^[50-52]的研究结果总结绘制。

Figure 3 Mechanism of GcrA activating gene expression. The blue structure represents the schematic model of the DNA-binding domain (DBD) of GcrA. The purple structure represents the schematic model of the σ -factor interaction domain (SID) of GcrA. The two are connected by a grey linker (schematic model). The yellow structure is the schematic model of the σ^{70} factor, and the light-grey structure represents the schematic model of RNA polymerase. GcrA recognizes the G(6mA)NTC motif (rectangle with red background) through the DBD, and then interacts with the σ^{70} factor through the SID to activate transcription. The model was summarized and drawn based on the research findings of Gonzalez et al. and Wu et al.^[50-52].

外, CcrM 和 Dam 在细胞周期调控上也有不同的功能倾向。Dam 在复制起始、错配修复、鞭毛相变等方面起到直接的调控作用, 而 CcrM 则在调控复制、细胞形态、染色体分离等方面发挥重要作用。CcrM 和 Dam 的差异反映了 α 变形菌和 γ 变形菌在表观遗传调控上的长期分化。

表观遗传调控对细菌毒力影响深远, CcrM 在人类、动物和植物病原细菌中广泛存在, 它是否参与调控毒力基因表达呢? 在 *B. melitensis* 等细菌的研究中尚未发现 CcrM 直接调控毒力基因的证据。然而王尔雅在研究 *A. radiobacter* 毒力基因表达时发现, CcrM 介导的甲基化能够通过

GcrA 调控毒力基因所在质粒的复制, 进而调控一系列毒力基因的表达^[13]。这一发现证明了 CcrM 在 *A. radiobacter* 毒力基因表达调控中的重要作用, 相信在其他重要的病原细菌中也存在 CcrM 调控毒力基因表达的机制。

尽管 CcrM 通过 GcrA 调控相关基因表达的途径已经较为清楚, 但仍然存在相当数量的基因受到 CcrM 调控, 而与 GcrA 似乎无关, 不同物种受 CcrM/GcrA 调控的基因差异也很大^[40], 有些 α 变形菌中甚至缺乏 GcrA 同源蛋白^[6]。因此, GcrA 可能并非 CcrM 实现其表观遗传调控的唯一途径, 寻找和研究其他相关调节因子将

成为 CcrM 表观遗传调控研究的重要方向之一。值得注意的是,有些基因是受到 CcrM 抑制的(表 1),而 GcrA 主要通过 σ 因子互作激活下游基因表达,那么这些基因受到 CcrM 抑制的机制是什么?是否存在与 GcrA 对应的抑制因子?为了寻找新的 CcrM 依赖性表观遗传调控因子,利用染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)技术富集与 GANTC 基序结合的蛋白质,再通过质谱技术在富集得到的蛋白质中寻找相关调控因子是一种可行的方法。

在真核生物 DNA 甲基化表观调控系统中还存在一个重要的调控因子,即 DNA 去甲基化酶。DNA 甲基化酶和去甲基化酶共同调控着基因组的甲基化状态。原核生物的去甲基化酶还有待进一步发掘。研究表明大肠杆菌 AlkB 在体外能够介导 6mA 去甲基化^[54], *C. vibrioides* alkB 基因的表达和 *ccrM* 一样受到细胞周期的影响^[55]。有推测认为 α 变形菌的 AlkB 能够像真核生物去甲基化酶一样参与表观遗传的调控。然而,数据显示在正常生长的 *C. vibrioides* 中 AlkB 对基因组 DNA 的甲基化并无全局性的改变,尽管有部分 CcrM 调控的基因也受到了 *alkB* 突变的影响^[29]。因此, α 变形菌中是否存在 CcrM 对应的去甲基化酶还有待进一步探究。挖掘 α 变形菌中的去甲基化酶需要更多蛋白结构的支持。随着 AI 对蛋白质结构预测越来越准确,相信在 α 变形菌的基因组中能够找到更多潜在的去甲基化酶。此外,细菌突变体库的构建和新一代测序技术的应用也将有助于在 α 变形菌中寻找 CcrM 对应的去甲基化酶。

作者贡献声明

王浩:论文的撰写和修改;王尔雅:资料的收集与整理、协助论文撰写;郭敏亮:论文整体构思与设计。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] OLIVEIRA PH, FANG G. Conserved DNA methyltransferases: a window into fundamental mechanisms of epigenetic regulation in bacteria[J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(1): 28-40.
- [2] GORRELL R, KWOK T. The *Helicobacter pylori* methylome: roles in gene regulation and virulence[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2017, 400: 105-127.
- [3] WION D, CASADESÚS J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(3): 183-192.
- [4] FIORAVANTI A, FUMEAUUX C, MOHAPATRA SS, BOMPARD C, BRILLI M, FRANDI A, CASTRIC V, VILLERET V, VIOLLIER PH, BIONDI EG. DNA binding of the cell cycle transcriptional regulator GcrA depends on N6-adenosine methylation in *Caulobacter crescentus* and other *Alphaproteobacteria*[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(5): e1003541.
- [5] CHRISTEN B, ABELIUK E, COLLIER JM, KALOGERAKI VS, PASSARELLI B, COLLIER JA, FERRO MJ, McADAMS HH, SHAPIRO L. The essential genome of a bacterium[J]. Molecular Systems Biology, 2011, 7: 528.
- [6] CURTIS PD, BRUN YV. Identification of essential alphaproteobacterial genes reveals operational variability in conserved developmental and cell cycle systems[J]. Molecular Microbiology, 2014, 93(4): 713-735.
- [7] ZWEIGER G, MARCZYNSKI G, SHAPIRO L. A *Caulobacter* DNA methyltransferase that functions only in the predivisional cell[J]. Journal of Molecular Biology, 1994, 235(2): 472-485.
- [8] GONZALEZ D, KOZDON JB, McADAMS HH, SHAPIRO L, COLLIER J. The functions of DNA methylation by CcrM in *Caulobacter crescentus*: a global approach[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(6): 3720-3735.
- [9] WRIGHT R, STEPHENS C, SHAPIRO L. The CcrM DNA methyltransferase is widespread in the alpha subdivision of proteobacteria, and its essential functions are conserved in *Rhizobium meliloti* and *Caulobacter crescentus*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(18): 5869-5877.
- [10] BRILLI M, FONDI M, FANI R, MENGONI A, FERRI L, BAZZICALUPO M, BIONDI EG. The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: a comparative genomic analysis[J]. BMC Systems Biology, 2010, 4: 52.
- [11] KAHNG LS, SHAPIRO L. The CcrM DNA methyltransferase of *Agrobacterium tumefaciens* is essential, and its activity is cell cycle regulated[J].

- Journal of Bacteriology, 2001, 183(10): 3065-3075.
- [12] ROBERTSON GT, REISENAUER A, WRIGHT R, JENSEN RB, JENSEN A, SHAPIRO L, ROOP RM 2nd. The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(12): 3482-3489.
 - [13] 王尔雅. 根癌农杆菌细胞周期调节因子 GcrA 调节 *vir* 基因表达的机制研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2024.
WANG EY. Mechanism of *vir* gene expression regulated by *Agrobacterium tumefaciens* cell cycle regulator GcrA[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2024 (in Chinese).
 - [14] REICH NO, DANG E, KURNIK M, PATHURI S, WOODCOCK CB. The highly specific, cell cycle-regulated methyltransferase from *Caulobacter crescentus* relies on a novel DNA recognition mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(49): 19038-19046.
 - [15] WOODCOCK CB, YAKUBOV AB, REICH NO. *Caulobacter crescentus* cell cycle-regulated DNA methyltransferase uses a novel mechanism for substrate recognition[J]. Biochemistry, 2017, 56(30): 3913-3922.
 - [16] BERDIS AJ, LEE I, COWARD JK, STEPHENS C, WRIGHT R, SHAPIRO L, BENKOVIC SJ. A cell cycle-regulated adenine DNA methyltransferase from *Caulobacter crescentus* processively methylates GANTC sites on hemimethylated DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(6): 2874-2879.
 - [17] HORTON JR, WOODCOCK CB, OPOT SB, REICH NO, ZHANG X, CHENG XD. The cell cycle-regulated DNA adenine methyltransferase CcrM opens a bubble at its DNA recognition site[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4600.
 - [18] KONTTINEN O, CARMODY J, PATHURI S, ANDERSON K, ZHOU XF, REICH N. Cell cycle regulated DNA methyltransferase: fluorescent tracking of a DNA strand-separation mechanism and identification of the responsible protein motif[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(20): 11589-11601.
 - [19] KONTTINEN O, CARMODY J, KURNIK M, JOHNSON KA, REICH N. High fidelity DNA strand-separation is the major specificity determinant in DNA methyltransferase CcrM's catalytic mechanism[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(13): 6883-6898.
 - [20] MALONE T, BLUMENTHAL RM, CHENG X. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes[J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 253(4): 618-632.
 - [21] SCHUBERT HL, BLUMENTHAL RM, CHENG XD. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(6): 329-335.
 - [22] WRIGHT R, STEPHENS C, ZWEIGER G, SHAPIRO L, ALLEY MR. *Caulobacter* Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation[J]. Genes & Development, 1996, 10(12): 1532-1542.
 - [23] REISENAUER A, QUON K, SHAPIRO L. The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(8): 2430-2439.
 - [24] BELLEFONTAINE AF, PIERREUX CE, MERTENS P, VANDENHAUTE J, LETESSON JJ, de BOLLE X. Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(4): 945-960.
 - [25] FRANCIS N, PONCIN K, FIORAVANTI A, VASSEN V, WILLEMART K, ONG TAP, RAPPEZ L, LETESSON JJ, BIONDI EG, de BOLLE X. CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*[J]. Molecular Microbiology, 2017, 103(5): 780-797.
 - [26] COLLIER J. Cell cycle control in *Alphaproteobacteria*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 30: 107-113.
 - [27] GORA KG, TSOKOS CG, CHEN YE, SRINIVASAN BS, PERCHUK BS, LAUB MT. A cell-type-specific protein-protein interaction modulates transcriptional activity of a master regulator in *Caulobacter crescentus*[J]. Molecular Cell, 2010, 39(3): 455-467.
 - [28] STEPHENS CM, ZWEIGER G, SHAPIRO L. Coordinate cell cycle control of a *Caulobacter* DNA methyltransferase and the flagellar genetic hierarchy[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(7): 1662-1669.
 - [29] CAMPBELL M, BARTON IS, ROOP RM 2nd, CHIEN P. Comparison of CcrM-dependent methylation in *Caulobacter crescentus* and *Brucella abortus* by nanopore sequencing[J]. Journal of Bacteriology, 2024, 206: e00083-24.
 - [30] ZHOU XF, WANG JR, HERRMANN J, MOERNER WE, SHAPIRO L. Asymmetric division yields progeny cells with distinct modes of regulating cell cycle-dependent chromosome methylation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(31): 15661-15670.
 - [31] MOUAMMINE A, COLLIER J. The impact of DNA methylation in *Alphaproteobacteria*[J]. Molecular Microbiology, 2018, 110(1): 1-10.
 - [32] ARDISSONE S, REDDER P, RUSSO G, FRANDI A, FUMEAUX C, PATRIGNANI A, SCHLAPBACH R, FALQUET L, VIOLLIER PH. Cell cycle constraints and environmental control of local DNA hypomethylation in *alpha-proteobacteria*[J]. PLoS Genetics, 2016, 12(12): e1006499.
 - [33] COLLIER J, McADAMS HH, SHAPIRO L. A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(43): 17111-17116.
 - [34] MARTIN S, FOURNES F, AMBROSINI G, ISELI C, BOJKOWSKA K, MARQUIS J, GUEN N, COLLIER J. DNA methylation by CcrM contributes to genome maintenance in the *Agrobacterium tumefaciens* plant pathogen[J]. Nucleic Acids Research, 2024, 52(19): 11519-11535.
 - [35] DICENZO GC, CANGIOLI L, NICOUD Q, CHENG

- JHT, BLOW MJ, SHAPIRO N, WOYKE T, BIONDI EG, ALUNNI B, MENGONI A, MERGAERT P. DNA methylation in *Ensifer* species during free-living growth and during nitrogen-fixing symbiosis with *Medicago* spp.[J]. *mSystems*, 2022, 7(1): e0109221.
- [36] MARCZYNSKI GT, SHAPIRO L. Control of chromosome replication in *Caulobacter crescentus*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2002, 56: 625-656.
- [37] PINI F, de NISCO NJ, FERRI L, PENTERMAN J, FIORAVANTI A, BRILLI M, MENGONI A, BAZZICALUPO M, VIOLLIER PH, WALKER GC, BIONDI EG. Cell cycle control by the master regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti*[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(5): e1005232.
- [38] MURRAY SM, PANIS G, FUMEAUX C, VIOLLIER PH, HOWARD M. Computational and genetic reduction of a cell cycle to its simplest, primordial components[J]. *PLoS Biology*, 2013, 11(12): e1001749.
- [39] GONZALEZ D, COLLIER J. DNA methylation by CcrM activates the transcription of two genes required for the division of *Caulobacter crescentus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 88(1): 203-218.
- [40] ADHIKARI S, ERILL I, CURTIS PD. Transcriptional rewiring of the GcrA/CcrM bacterial epigenetic regulatory system in closely related bacteria[J]. *PLoS Genetics*, 2021, 17(3): e1009433.
- [41] NARAYANAN S, JANAKIRAMAN B, KUMAR L, RADHAKRISHNAN SK. A cell cycle-controlled redox switch regulates the topoisomerase IV activity[J]. *Genes & Development*, 2015, 29(11): 1175-1187.
- [42] SANSELICIO S, BERGÉ M, THÉRAULAZ L, RADHAKRISHNAN SK, VIOLLIER PH. Topological control of the *Caulobacter* cell cycle circuitry by a polarized single-domain PAS protein[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7005.
- [43] MOHAPATRA SS, FIORAVANTI A, VANDAME P, SPRIET C, PINI F, BOMPARD C, BLOSSEY R, VALETTE O, BIONDI EG. Methylation-dependent transcriptional regulation of crescentin gene (*creS*) by GcrA in *Caulobacter crescentus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2020, 114(1): 127-139.
- [44] JONAS K, CHEN YE, LAUB MT. Modularity of the bacterial cell cycle enables independent spatial and temporal control of DNA replication[J]. *Current Biology*, 2011, 21(13): 1092-1101.
- [45] HOLTZENDORFF J, HUNG D, BRENDÉ P, REISENAUER A, VIOLLIER PH, McADAMS HH, SHAPIRO L. Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle[J]. *Science*, 2004, 304(5673): 983-987.
- [46] KOZDON JB, MELFI MD, LUONG K, CLARK TA, BOITANO M, WANG S, ZHOU B, GONZALEZ D, COLLIER J, TURNER SW, KORLACH J, SHAPIRO L, McADAMS HH. Global methylation state at base-pair resolution of the *Caulobacter* genome throughout the cell cycle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(48): E4658-E4667.
- [47] XU CR, HOLLIS H, DAI M, YAO XY, WATSON LT, CAO Y, CHEN MH. Modeling the temporal dynamics of master regulators and CtrA proteolysis in *Caulobacter crescentus* cell cycle[J]. *PLoS Computational Biology*, 2022, 18(1): e1009847.
- [48] REISENAUER A, SHAPIRO L. DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*[J]. *EMBO Journal*, 2002, 21(18): 4969-4977.
- [49] HAAKONSEN DL, YUAN AH, LAUB MT. The bacterial cell cycle regulator GcrA is a $\sigma 70$ cofactor that drives gene expression from a subset of methylated promoters[J]. *Genes & Development*, 2015, 29(21): 2272-2286.
- [50] GONZALEZ D, COLLIER J. Genomic adaptations to the loss of a conserved bacterial DNA methyltransferase[J]. *mBio*, 2015, 6(4): e00952.
- [51] WU XX, HAAKONSEN DL, SANDERLIN AG, LIU YJ, SHEN LQ, ZHUANG NN, LAUB MT, ZHANG Y. Structural insights into the unique mechanism of transcription activation by *Caulobacter crescentus* GcrA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(6): 3245-3256.
- [52] WU XX, YU CZ, MU WH, GU ZX, FENG Y, ZHANG Y. The structural mechanism for transcription activation by *Caulobacter crescentus* GcrA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(4): 1960-1970.
- [53] 张文婷, 姚玉峰. 细菌DNA甲基化研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(10): 1026-1038.
ZHANG WT, YAO YF. Research progress on bacterial DNA methylation[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2018, 45(10): 1026-1038 (in Chinese).
- [54] LI DY, DELANEY JC, PAGE CM, YANG XD, CHEN AS, WONG C, DRENNAN CL, ESSIGMANN JM. Exocyclic carbons adjacent to the N6 of adenine are targets for oxidation by the *Escherichia coli* adaptive response protein AlkB[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(21): 8896-8901.
- [55] COLOMBI D, GOMES SL. An *alkB* gene homolog is differentially transcribed during the *Caulobacter crescentus* cell cycle[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(10): 3139-3145.