

细菌多糖的生物合成机制

陈蕾蕾, 王未名, 祝清俊, 杜方岭*

(山东省农业科学院农产品研究所, 济南 250100)

摘要:近些年来,细菌多糖因其重要的医学价值和工业用途引起了人们的广泛关注。随着细菌基因组的不断测序,众多与细菌多糖合成相关的基因簇被发现。不同多糖合成基因簇的比对分析结果表明,尽管自然界中多糖的结构复杂多变,但是它们的合成机制却是相对单一的。本文就当前国际国内不同细菌多糖的合成机制,以及多糖合成途径中相关糖基转移酶和聚合酶的研究进展进行了论述。

关键词:细菌多糖;糖基转移酶;聚合酶;Wzy 依赖途径

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1583-07

多糖 (polysaccharide, PS), 又称多聚糖, 是由至少十个以上的单糖单位缩合、失水而连接起来的均聚物或共聚物, 是一类广泛存在于自然界中的生物体产生的独特的生物大分子, 在细胞间相互作用、信号转导、免疫反应等许多生理生化过程中都发挥着重要作用。根据组成, 多糖可以分为均多糖和杂多糖, 前者指只有一种单糖组成的多糖, 一般是构成植物和动物骨架的材料, 和各种生物能源的主要来源。后者指由两种或两种以上的单糖组成的多糖。杂多糖因其结构的复杂性具有更广泛的功能, 它们是细胞壁和胞外基质的主要组分, 是病原细菌的主要致病因子, 并且在细胞发育和细胞的相互识别中担任着重要的角色^[1]。

近些年来,细菌多糖因其重要的医学价值和工业用途引起了人们的广泛关注^[2]。病原细菌的表面多糖一直被认为是主要的致病因素,它介导病原菌对宿主的识别和黏着,促进生物膜的形成从而抵抗宿主免疫系统的攻击。据此针对由病原细菌引起的许多传染性疾病,比如肺炎、脑膜炎和脓血症等,多糖疫苗被开发研究,有些已投入临床使用。细菌多糖还具有重要的工业用途,可以用作稳定剂、乳化剂和胶凝剂等。此外,细菌多糖还是碳水化合物和

糖生物学研究领域一个很好的研究对象。随着细菌基因组的不断测序,众多多糖合成基因簇被发现^[3-4]。不同多糖合成基因簇的比对结果证明尽管自然界中多糖的结构复杂多变,但是它们的合成机制却是相对单一的。了解多糖合成途径的分子机制可以帮助我们改变多糖的结构,改善多糖的理化性质,研究多糖结构和功能的相互关系,从而最终利用细胞机器合成出具有不同功能的多糖。

1 细菌多糖的种类和结构

按形态学上的分类,可以把细菌多糖分为3种类型:细胞壁多糖,位于细胞壁层;细胞外多糖,位于细胞壁外,即介于细胞与细胞之间;细胞内多糖,位于原生质膜内侧或作为原生质膜的组分。

1.1 O-抗原 (O-antigen)

O-抗原是一类典型的细胞壁多糖,它是细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的重要组成部分,还是许多病原细菌的致病因子^[5]。O-抗原由许多含3-6个单糖的重复单元 (O-unit) 组成,单糖的组成、排列以及单糖之间和单元之间连键的多样性导致了O-抗原结构的复杂变化,而许多单糖上的乙酰化、糖基化、硫酸化等修饰残基又增加了O-抗原结构的复

基金项目:农业部 948 项目 (2009-Z39)

* 通信作者。Tel: +86-531-83179137; Fax: +86-531-88960332; E-mail: dufl@saas.ac.cn

作者简介:陈蕾蕾(1982-),女,山东济南人,助研,博士,微生物学专业,从事微生物多糖的研究。E-mail: chenleilei@yahoo.cn

收稿日期:2010-03-23;修回日期:2010-08-13

杂性。这种结构上的复杂性后来成了细菌分型 (serotyping) 的重要依据, 到目前为止大肠杆菌中已报道的就有 186 种 O-serotype^[6]。

1.2 细胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS)

广义的细胞外多糖包括两个部分, 荚膜多糖 (capsular polysaccharides 简称 CPSs) 和胞外多糖 (EPSs)。它们的区别在于, CPSs 是以分散的荚膜形式与微生物细胞紧紧相连, 而 EPSs 则作为黏液分泌出去不与细胞表面相连。CPSs 和 EPSs 是很难区分的, 因为 CPSs 通常会失去与细胞膜的结合而溶到介质当中。荚膜多糖是通过共价键连接到磷脂或 lipid-A 从而附着到细胞表面的, 一般是线性多糖, 包括许多重复单元。荚膜多糖高度水合, 含有许多取代基比如乙酰基、酰基、磷酸基和硫酸基。在由细菌引起的感染性疾病中, CPS 是主要的毒力因子。比如, 可以引起肺炎、脑膜炎等人类致死性疾病的重要病原菌肺炎链球菌, 该菌可以表达合成 90 多种结构不同的荚膜多糖^[7]。

大多数细菌胞外多糖是由一个单糖单位组成的同多糖, 或者是由两到八个单糖构成的有规则重复单位的杂多糖。EPS 由范围极广的单糖组成, 而目前只发现了其中一小部分。这些单糖包括 D-葡萄糖、D-半乳糖和 D-甘露糖等。主要发现的细菌高聚物由己糖或者甲基戊糖 (通常为 L-海藻糖或 L-鼠李糖) 与糖醛酸构成, 最常见的糖醛酸是 D-葡萄糖醛酸和 D-半乳糖醛酸。除了鞘中或与蓝细菌相关的其他胞外多糖外, 戊糖在细菌中较为少见。某些种属产生的 EPS 所含的氨基糖通常是乙酰氨基己糖胺的衍生物, 其它则含有 O-甲基戊糖。细菌多糖中存在酰基、磷酸基和硫酸基等无机取代基, 并且在海洋胞外多糖中较为常见。热液口微生物分泌的胞外多糖与其他生态环境中微生物分泌的胞外多糖的结构不同, 表现在糖醛酸含量高 (达 10% - 40%) 和高度乙酰化上, 使得这些多糖粘度较高, 对金属离子、微生物菌体自身以及蛋白颗粒具有较强的结合能力。因此, 热液口微生物分泌的胞外多糖对于微生物适应深海热液口的极端环境具有重要的意义。

1.3 细胞内多糖 (intracellular polysaccharide)

细菌细胞含有许多不同的多糖结构, 构成了细胞的不同形状和刚性。这些多糖结构包括肽聚糖 (由重复的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖单元和单一的 N-乙酰-D-胞壁酸组成, 发现几乎所有的真细菌都含有此结构)、脂多糖 (革兰氏阴性菌含有)、胞壁酸以及

糖醛酸磷壁酸质 (革兰氏阳性菌含有)。

2 细菌多糖的生物合成途径

尽管多糖的结构千变万化, 但是它的合成途径却是相对一致的, 即通过不同的糖基转移酶 (Glycosyltransferases, GTs) 将单糖从糖核苷酸供体上顺序性转移而装配到脂类载体上形成一个重复单元, 随后这些重复单元被聚合和输出, 形成细胞外多糖。典型的多糖合成基因簇一般包括糖核苷酸合成相关基因、糖基转移酶基因和多糖合成调节基因。总的合成过程可以分为 3 个步骤: (1) 糖合成的起始 (initiation reaction); (2) 糖重复单元的延伸、翻转和聚合 (the elongation/translocation/polymerization of repeating units); (3) 多糖的输出 (export of polysaccharide)。下面就主要的细菌多糖即: O-抗原 (O-antigen)、荚膜多糖 (CPS) 以及胞外多糖 (EPS) 的生物合成过程分别做一概述。

2.1 O-抗原的生物合成

O-抗原是在连接到脂类 A-核组装成细菌脂多糖之前单独合成的。参与 O-抗原组装的基因呈簇状排列, 在大肠杆菌 (*Escherich coli*) 和肠炎沙门菌 (*Salmonella enterica*) 中位于基因 *galF* 与 *gnd* 之间^[8], O-抗原的生物合成过程可以分为 3 步。

(1) 起始 (initiation): 细胞质中存在大量的糖核苷酸, 起始反应是发生在细胞膜的胞质面, 这一步在整个多糖的合成过程中是比较保守的。以糖核苷酸为糖供体, 位于细胞膜上的脂载体十一异戊烯磷酸 (Und-P) 为糖受体, 由起始糖基转移酶 (initial glycosyltransferase, IT) 催化, 形成 Und-PP-连接的糖复合物。IT 是膜蛋白, 根据拓扑学结构的不同分为两类^[9]。一类属于 PNTTP 蛋白家族, 含有 10-12 个穿膜结构域, 主要参与糖基化过程、O-抗原合成以及 ECA (Enterobacterial common antigen) 的合成, 典型代表是葡萄糖酰胺-1-P 转移酶 (GlcNAc-1-P transferase) WecA。WecA 是一个膜蛋白, 含有 12 个穿膜结构域, 其催化反应见图 1-A。WecA 是首先在 ECA 的合成途径中被发现的, 随后的研究证明它也可以催化 O-抗原合成的起始反应^[10]。另一类 IT 属于 PHTP 蛋白家族, 含有 5-6 个穿膜结构域, 主要参与 EPS、CPS 以及部分 ECA 的合成, 典型代表是半乳糖-1-P 转移酶 (Gal-1-P transferase) WbaP。WbaP 也是膜蛋白, 含有 6 个穿膜结构域, 催化反应见图 1-B。WbaP 是从沙门氏菌中分离得到的, 随后在许多 EPS 和 CPS 的合成系统中, 与 WbaP 具有相似功能相似结构的同源酶陆续被发现, 它

们都具有转移葡萄糖-1-P 或半乳糖-1-P 的能力 (图 1)^[11-12]。

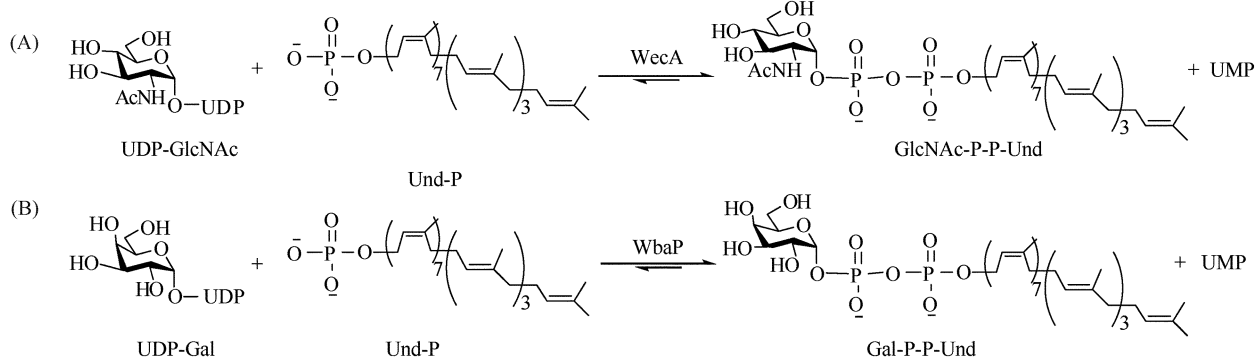


图 1 起始糖基转移酶 WecA 和 WbaP 催化的化学反应方程式

Fig. 1 Reaction catalyzed by initial transferase WecA and WbaP.

(2) 糖重复单元的延伸、翻转和聚合 (elongation/translocation/polymerization) 这是糖单元合成的主要过程, 根据这一过程中糖单元装配方式以及翻转机制的不同, 这一途径可以分为三类: Wzy-dependent, ABC-transporter dependent 和 synthase-dependent pathway。

Wzy-dependent pathway: 这一途径主要发生在 O-抗原的合成过程中。起始反应之后, 不同的单糖残基陆续被加到 Und-PP-sugar 中间产物上形成 O-units。单糖残基之间的连接是通过特定的糖基转移酶催化的, 这些糖基转移酶是可溶性的或是位于胞质空间的膜蛋白, 每个单糖单元通过翻转酶 (flippase) Wzx 从细胞膜的胞质面翻转到外周质 (periplasm) 空间, 然后通过聚合酶 (polymerase) Wzy 聚合形成一个长链 O-抗原, 最后连接到脂类 A 的核心区域^[8]。聚合反应包括将初生糖单元从 Und-PP 脂载体上转移到 Und-PP-O-units, 然后由 Wzz 控制增加的糖单元的数量^[13-14]。多糖的运输和组装过程中至少需要三种酶 (Wzx, Wzy 和 Wzz) 的参与。根据预测的疏水性和拓扑结构, 可将 Wzx 蛋白质归为含有 11 或 12 个跨膜片段的一类膜整合蛋白家族。Wzx 蛋白质具有很低的核酸序列同源性, 其可作为区分不同 O-serotypes 类型的一个特殊基因标志。Wzx 缺失菌株能促成 O-unit 中间产物在内膜的胞质侧积累, 表明 Wzx 蛋白质具有翻转酶 flippase 的功能^[15]。据推测, Wzx 蛋白质可以利用质子或电子梯度作为能源, 将 Und-PP-linked O-units 转运至细胞膜内膜的周质空间侧。进一步的实验研究证明了 Wzx 的功能不依赖于整个 O-unit 的化学结构, 但是其需要对第一个 Und-PP-linked 的糖进行识别^[16]。在 Und-PP-linked O-units 转位至周质空间的过程中, Wzy 负责将 O-units 聚合到成糖多聚体。Wzy 蛋白质是一种膜整合蛋白, 具有 11-13 个的跨

膜区域, 不同物种来源的 Wzy 具有很低的氨基酸序列同源性。Wzy 是阐明 O-多糖生物合成机制的关键酶, 采用酶化学法合成的 O-unit 底物, 结合对 Wzy 的异源表达, Wzy 的聚合功能及其与 Wzz 的相互作用在体外试验中得到了证实^[17]。O-抗原的链长是由 Wzz 来调节的。相较于 Wzx 和 Wzy, Wzz 的一级序列具有相对较高的同源性。Wzz 在 C-端和 N-端各有一个跨膜片段, 并在周质空间内有一个大的亲水环, 经晶体结构解析此亲水环主要是 α -螺旋结构^[18]。Wzz 蛋白体内聚合成六聚体, 然后通过微弱地改变自身的结构, 在聚合酶 Wzy 和剪切酶 WaaL 等组装成复合体的过程中行使分子伴侣的功能^[19]。Wzz 蛋白质属于 ‘Polysaccharide Co-Polymerases’ (PCP) 超家族, 这个家族的成员参与包括 O-抗原、荚膜多糖以及胞外多糖在内的多糖的链长调控。由于 O-抗原的形态可以通过 SDS-PAGE 以及随后的银染很容易被观察, Wzz 成为研究多糖链长调控机制的最好模型。

ABC-transporter dependent pathway: 到目前为止, 这种途径仅在 *E. coli* O8, O9, O52 和 *Klebsiella pneumoniae* O1 and O12 中观察到^[20-22]。在这种途径中, 初生的 O-多糖链的合成是在细胞内膜的胞质空间面完成的。以 WecA 介导的多糖合成起始之后, 特定的糖基转移酶加入一个糖残基作为 Und-PP-GlcNAc 和重复单元结构域间的接头。后续的链延伸是通过向 Und-PP-linked 受体的非还原端渐进性转移单糖残基完成的。聚合作用之后, 初生的 O-糖基链依赖 ABC 运输蛋白的 ABC-2 亚家族实现穿越内膜的转位。ABC-2 运输蛋白是由膜整合蛋白 Wzm 和含有 ATP-结合基序的可溶性蛋白 Wzt 组成。据报道, 在 ATP 水解的过程中, Wzt 经诱导其构型发生变化, 从而导致了其与 Wzm 间的相互作用, 随后引导糖多聚体跨越细胞膜^[20, 23]。

Synthase-dependent pathway: 这种途径仅在 *Salmonella enterica* 质粒编码的 O54 抗原 (ManNAc 的均聚体) 的合成中报道过^[24]。这种途径的作用原理类似于 ABC 运输蛋白-依赖型途径,除了前者具有一个合成酶之外,该合成酶似乎能通过渐进机制催化聚合反应,进而导致多糖链的延伸并伴随初生的多聚体同时地跨越细胞膜。这个合成酶具有两个独立的但是保守的结构域。一个结构域负责糖残基的渐进性转移,其结果导致链的延伸,另一个结构域与介导初生多糖穿越内膜的转位有关。

(3) 终止和连接 (Termination and Ligation): 对 3 种延伸/聚合途径来说,连接步骤是共有的,并且其需要 O-抗原转移到初生的 Lipid A/core。连接的机制仍然是 LPS 组装中未解决的重要问题之一。WaaL 蛋白质(或“连接酶”)是现在已知的参与连接的唯一蛋白质,但是有关过程或对其它细胞因子的需求方面的信息仍然很少^[25]。WaaL 为膜整合蛋白,具有较低的氨基酸序列相似性。已有文献报道 WaaL 蛋白质缺乏分辨供体结构的能力,这表明其识别 Und-P 载体而不是 Und-P 载体上结合的糖^[26]。但是,连接活性的发挥仍需要特异性的脂类 A-核心寡糖受体结构,并且 WaaL 蛋白被认为依赖于这种受体的特异性。

2.2 荚膜多糖的生物合成

荚膜多糖的生物合成由一大簇基因编码,基因簇通常是单向排列,转录成单个多顺反子 mRNA,并协调表达。细菌中大量的荚膜基因簇已经被克隆出来,其中 *E. coli* 来源的荚膜基因簇已经被广泛地研究。*E. coli* 能够产生 80 种不同的荚膜分型,这些荚膜分型可归于 4 个群组。群组 1 和 4 有共同的装配系统,群组 2 和 3 组成一个不同的体系。群组 1 和 4 的 CPS 以两种不同的形式在细胞表面进行表达。一种形式与 lipid A/core 连接,称为 KLPS,另一种是高分子量的荚膜 K 抗原。

群组 1 和 4 抗原的荚膜和 KLPS 形式具有共同的 Wzy-依赖型的过程来合成 O-抗原。Und-PP-linked 的重复单元是在内膜与细胞质的界面上合成的。随后脂类-连接的单元通过 Wzx 转移出内膜,并且通过 Wzy 以将生长链从 und-PP 载体转移至新的脂类-连接的单元的方式实现聚合^[27]。Wzy-依赖型 KLPS 的聚合作用在多聚体转移至 lipid A/core 受体时被终止,这一过程也是由 WaaL 催化实现的。KLPS 的链长是由 Wzz 调控的。群组 1 的 KLPS 包含许多短链的单元,这是由于缺少 *wzz* 基因造成的。但是,荚膜 K-抗原的链长控制机制比 KLPS 要复杂

的多。Wzc 蛋白质是群组 1 荚膜多糖的调控蛋白。其与 Wzz 具有相似的拓扑结构,但是 Wzc 具有携带 ATP-结合基序和酪氨酸-富集区的 C-端细胞质结构域,从而使其区别于 Wzz。Wzc 功能要求其在磷酸化和去磷酸化形式间的循环,这一循环是由 Wzb 完成的^[28-29]。Wzc 蛋白已知为寡聚体。运用低温电镜技术和单颗粒分析,Wzc 的结构在 14 Å 分辨率上解析出来^[30],结果表明 Wzc 形成具有 C4 旋转对称性的四聚体复合物。上面的“crown”区形成一个连续的密度环,并且 4 个不连接的“roots”从“crown”的下侧显露出来。但是,由于低的分辨率,Wzc 的精确功能和催化结构域仍然未知。*E. coli* 群组 1 荚膜是由分子量超过 100 KDa 的多糖重复单元形成的。Wza 在群组 1 荚膜的分泌过程中是必需的。Wza 是一个高度保守的多聚体外膜蛋白^[31]。通过交联实验,Wzc 与 Wza 间的相互作用被鉴定出来^[32],并且最近分离的包含 Wzc 和 Wza 的高度有序结构,用于 Cryo-EM 结构研究,将为群组 1 荚膜组装系统的结构和功能提供重要信息。

群组 2 和 3 荚膜的合成基因在 *serA* 附近成簇排列^[33]。基因 *wzx* 和 *wzy* 的缺失反映出群组 2 和 3 荚膜与群组 1 和 4 荚膜的合成机制存在根本的差别。起始阶段需要一种未知的内源性受体的参与,并且链的延伸需要渐进性糖基转移酶。多聚体在非还原端的延伸构成了群组 2 荚膜的保守特征。多聚体通过 ABC 转运蛋白转运出去。功能性的荚膜转运蛋白被认为含有两个亚基,KpsM 和 KpsT^[34-35]。其它的蛋白质也涉及参与输出过程,但是细节仍然不清楚。

2.3 胞外多糖的生物合成

EPS 的生物合成类似于 O-抗原和群组 1 和 4 CPS 的 Wzy-依赖型途径。在 EPS 的生物合成系统中,也发现了 Wzx, Wzy, 和 Wzz 的同源物。近年来,越来越多的细菌中参与 EPSs 生物合成的基因簇被克隆和鉴定,其中包括参与革兰氏阴性菌的 EPSs (诸如 xanthan, acetan, sphingan S-88 等) 合成的基因簇,以及参与革兰氏阳性菌诸如乳酸菌 (LAB) 的 EPSs 合成的基因簇^[36-38]。参与 xanthan 生物合成的 Gum 蛋白由 *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* 染色体上 16 kb *gumBCDEFGHIJKLM* 基因簇编码。*Sphingomonas* strain S88 中与 sphingan S-88 合成相关的基因簇为 29 kb,包含 sphingan S-88 生物合成、装配以及分泌所必需的所有基因。LAB 产生的 EPSs 在食品工业的广泛应用及其在其它领域潜在的应用前景,使得有关乳酸菌的 EPSs 遗传学

研究发展极为迅速。常温 LAB(如 *L. lactis* subsp. *Cremoris* 和 *L. lactis* subsp. *Lactis*) 中, EPS 的产生通常与质粒相关, 而嗜热 LAB(如 *S. thermophilus*) 产生 EPS 与质粒的存在无关, 所有合成 EPS 所需的基因位于染色体上。海洋多糖在微生物对海洋生态环境的适应过程中发挥着重要作用, 近些年来海洋多糖的结构陆续被解析, 然而有关海洋多糖的生物合成途径研究却很少。本课题组从一株分离自深海的适冷菌假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*) 中纯化得到了一个单糖组成以葡萄糖为主的同多糖, 随后并克隆得到了一个长约 7500 bp 的多糖合成基因簇。该基因簇中含有 6 个开放阅读框, 其中包括属于 PHTP 蛋白家族的起始糖基转移酶, 葡萄糖基转移酶, 以及参与多糖聚合和输出的酶复合体。通过与已经报道的其它来源的细菌多糖合成基因簇相比较, 推测在该适冷菌中多糖合成途径为 ABC-transporter 依赖途径(待发表)。假交替单胞菌是深海中的主要细菌菌群, 阐明其多糖合成机制将有助于揭示深海生态系统中的碳循环过程。

3 结语

细菌多糖的应用潜能主要由其物理学和流变学特性决定, 影响这些特性的因素很多, 诸如分子量的大小, 聚合物的硬度, 侧链以及非糖组分的存在, 包括有机和无机取代。遗传工程可以用来指导多糖合成并通过改变组成和链长来获得或提高符合人们需要的特性。因此, 了解细菌多糖的合成机制是至关重要的。虽然, 近些年来有关细菌多糖合成机制的研究取得了很大的进展, 但是仍存在许多关键性的问题未能解决。首先, 大部分与细菌多糖合成调节相关的酶类都是膜蛋白, 而相较于水溶性蛋白, 膜蛋白的表达纯化以及结构解析都相当困难, 因此很难据此了解这些酶类的催化活性及催化机理, 成为多糖合成研究中的主要瓶颈问题。其次, 作为多糖合成途径中主要的酶类, 不同来源的糖基转移酶以及相同来源的不同糖基转移酶之间的同源性很低, 家族种类繁多, 使得有关糖基转移酶的进展缓慢^[39-40]。另外, 到目前为止除了乳酸菌中由质粒编码表达的酶类催化合成的胞外多糖实现了异源表达, 其它来源的细菌多糖尤其是病原菌产生的多糖至今还无法异源表达, 这就限制了细菌多糖在医药以及工业领域的大规模应用。随着基因组学以及蛋白质组学的不断发展, 分子生物学技术手段的不断提升, 有关细菌多糖合成机制的研究将会引起人们更多的关注, 诸如上述的瓶颈性问题也有望解决, 从

而能够为细菌多糖的更广泛的应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] Ratner DM, Seeberger PH. Carbohydrate microarrays as tools in HIV glycobiology. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13(2): 173-183.
- [2] Barbara V, Chen M, Russell JC, Elena PI. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 2009, 14(7): 2535-2554.
- [3] Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71: 635-700.
- [4] Samuel G, Reeves P. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(23): 2503-2519.
- [5] Nagy G, Tibor P. Lipopolysaccharide: a tool and target in enterobacterial vaccine development. *Biological Chemistry*, 2008, 389(5): 513-520.
- [6] Guo H, Kong Q, Cheng J, Wang L, Feng L. Characterization of the *Escherichia coli* O59 and O155 O-antigen gene clusters: the atypical *wzx* genes are evolutionary related. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 248(2): 153-161.
- [7] Aanensen DM, Mavroidi A, Bentley SD, Reeves PR, Spratt BG. Predicted functions and linkage specificities of the products of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(21): 7856-7876.
- [8] Reeves PR, Wang L. Genomic organization of LPS-specific loci. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2002, 264(1): 109-135.
- [9] Amer AO, Valvano MA. The N-terminal region of the *Escherichia coli* WecA (Rfe) protein, containing three predicted transmembrane helices, is required for function but not for membrane insertion. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(2): 498-503.
- [10] Amer AO, Valvano MA. Conserved aspartic acids are essential for the enzymic activity of the WecA protein initiating the biosynthesis of O-specific lipopolysaccharide and enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 2): 571-582.
- [11] Pelosi L, Boumedienne M, Saksouk N, Geiselman J, Geremia RA. The glucosyl-1-phosphate transferase WchA (Cap8E) primes the capsular polysaccharide repeat unit biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 327: 857-865.
- [12] Saldias MS, Patel K, Marolda CL, Bittner MB, Contreras I, Valvano MA. Distinct functional domains of the *Salmonella enterica* WbaP transferase that is involved in the initiation reaction for synthesis of the O antigen

- subunit. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 2): 440-453.
- [13] Daniels C, Vindurampull C, Morona R. Overexpression and topology of the *Shigella flexneri* O-antigen polymerase (Rfc/Wzy). *Molecular Microbiology*, 1998, 28: 1211-1222.
- [14] Franco VA, Liu D, Reeves PR. The Wzz (Cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O antigen chain length specificity. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 2670-2675.
- [15] Liu D, Cole R, Reeves PR. An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(7): 2102-2107.
- [16] Feldman MF, Marolda CL, Monteiro MA, Perry MB, Parodi AJ, Valvano MA. The activity of a putative polyisoprenol-linked sugar translocase (Wzx) involved in *Escherichia coli* O antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 35129-35138.
- [17] Woodward R, Yi W, Li L, Zhao GH, Eguchi H, Sridhar PR, Guo HJ, Song JK, Motari E, Cai L, Kelleher P, Liu XW, Han WQ, Zhang WP, Ding Y, Li M, Wang PG. In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(6): 418-423.
- [18] Tocilj A, Munger C, Proteau A, Morona R, Purins L, Ajamian E, Wagner J, Papadopoulos M, Van Den Bosch L, Rubinstein JL, Fethiere J, Matte A, Cygler M. Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15(2): 130-138.
- [19] Larue K, Kimber MS, Ford R, Whitfield C. Biochemical and structural analysis of bacterial O-antigen chain length regulator proteins reveals a conserved quaternary structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(11): 7395-7403.
- [20] Feng L, Senchenkova SN, Yang J, Shashkov AS, Tao J, Guo H, Cheng J, Ren Y, Knirel YA, Reeves PR, Wang L. Synthesis of the heteropolysaccharide O antigen of *Escherichia coli* O52 requires an ABC transporter: structural and genetic evidence. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4510-4519.
- [21] Kido N, Torgov VI, Sugiyama T, Uchiya K, Sugihara H, Komatsu T, Kato N, Jann K. Expression of the O9 polysaccharide of *Escherichia coli*: sequencing of the *E. coli* O9 *rfb* gene cluster, characterization of mannosyl transferases, and evidence for an ATP-binding cassette transport system. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(8): 2178-2187.
- [22] Izquierdo L, Merino S, Regue M, Rodriguez F, Tomas JM. Synthesis of a *Klebsiella pneumoniae* O-antigen heteropolysaccharide (O12) requires an ABC 2 transporter. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(5): 1634-1641.
- [23] Cuthbertson L, Kimber MS, Whitfield C. Substrate binding by a bacterial ABC transporter involved in polysaccharide export. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(49): 19529-19534.
- [24] Keenleyside WJ, Whitfield C. A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(45): 28581-28592.
- [25] Abeyrathne PD, Daniels C, Poon KK, Matewish MJ, Lam JS. Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(9): 3002-3012.
- [26] Heinrichs DE, Yethon JA, Whitfield C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 221-232.
- [27] Drummelsmith J, Whitfield C. Gene products required for surface expression of the capsular form of the group 1 K antigen in *Escherichia coli* (O9a; K30). *Molecular Microbiology*, 1999, 31(5): 1321-1332.
- [28] Vincent C, Doublet P, Grangeasse C, Vaganay E, Cozzone AJ, Duclos B. Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(11): 3472-3477.
- [29] Wugeditsch T, Paiment A, Hocking J, Drummelsmith J. Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assemble of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(4): 2361-2371.
- [30] Collins RF, Beis K, Clarke BR, Ford RC. Periplasmic protein-protein contacts in the inner membrane protein Wzc form a tetrameric complex required for the assembly of *Escherichia coli* group 1 capsules. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(4): 2144-2150.
- [31] Beis K, Nesper J, Whitfield C, Naismith JH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Wza outer-membrane lipoprotein from *Escherichia coli* serotype O9a;K30. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(Pt 3): 558-560.
- [32] Reid AN, Whitfield C. Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides: evidence for molecular

- recognition between Wza and Wzc for colanic acid biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(15): 5470-5481.
- [33] Pearce R, Roberts IS. Cloning and analysis of gene clusters for production of the *Escherichia coli* K10 and K54 antigens; identification of a new group of serA-linked capsule gene clusters. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(14): 3992-3997.
- [34] Johnson JR, O'Bryan TT. Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis Gene *kpsM* by a rapid and specific PCR-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(4): 1773-1776.
- [35] Clarke BR, Pearce R, Roberts IS. Genetic organization of the *Escherichia coli* K10 capsule gene cluster; identification and characterization of two conserved regions in group III capsule gene clusters encoding polysaccharide transport functions. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(7): 2279-2285.
- [36] Serrania J, Vorholter FJ, Niehaus K, Puhler A, Becker A. Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* galactose utilization genes from transcriptome data. *Journal of Biotechnology*, 2008, 135(3): 309-317.
- [37] Dabour N, LaPointe G. Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7414-7425.
- [38] Black WP, Xu Q, Cadieux CL, Suh SJ, Shi W, Yang Z. Isolation and characterization of a suppressor mutation that restores *Myxococcus xanthus* exopolysaccharide production. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 11): 3599-3610.
- [39] Weijers CA, Franssen MC, Visser GM. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(5): 436-456.
- [40] Chang M, Bai LP, Shan JJ, Jiang R, Zhang Y, Guo LH, Zhang R, Li Y. Biochemical characteristics and function of a fucosyltransferase encoded by *ste7* in *Ebosin* biosynthesis of *Streptomyces* sp. 139. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(10): 1092-1097.

Biosynthesis mechanisms of bacterial polysaccharide —A review

Leilei Chen, Weiming Wang, Qingjun Zhu, Fangling Du*

(Institute of Agro-Food Science & Technology, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: Bacterial polysaccharides play important roles both in medicine and industry. Due to the development of bacterial genome sequencing, many gene clusters related to the biosynthesis of bacterial polysaccharide have been found, aligned and analyzed. Despite of their complex composition and structures, different bacterial polysaccharides are biosynthesized via similar pathways. This review discussed the research development of the biosynthetic mechanism of different bacterial polysaccharides, with emphasis on the glycosyltransferases and polymerases involved in the biosynthetic pathway.

Keywords: bacterial polysaccharide; glycosyltransferase; polymerase; Wzy-dependent pathway

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 948 Program of the Agriculture Department of China (2009-Z39)

* Corresponding author. Tel: +86-531-83179137; Fax: +86-531-88960332; E-mail: duffl@saas.ac.cn

Received: 23 March 2010/Revised: 13 August 2010