



探索大肠杆菌细胞膜合成过程中脂肪酸的掺入模式

谢玲玲¹, 宁婷婷¹, 卞光凯¹, 高丁^{2*}, 刘天罡^{1*}

¹ 武汉大学药学院, 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071

² 中国科学院武汉病毒所, 湖北 武汉 430071

摘要:【目的】探索大肠杆菌生长分裂过程中, 脂肪酸作为底物在细胞膜合成过程中的掺入模式。【方法】本研究解析了以乙酰 CoA 为底物, 合成中间产物长链脂酰-ACP, 随后合成磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)的途径, 并将合成途径中的 10 个关键酶与绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)或红色荧光蛋白(monmer Cherry, mCherry)进行融合, 在大肠杆菌内表达这些融合蛋白, 用激光共聚焦荧光显微镜成像的方式来获得这些融合蛋白的定位信息。【结果】宽场荧光显微镜成像结果显示, 磷脂酰乙醇胺合成途径中的 10 个酶在不同表达水平下出现不同的定位模式。在大肠杆菌中高水平表达融合蛋白 EGFP-FabA、EGFP-FabB、EGFP-FabI、EGFP-FabG、EGFP-PlsB 和 EGFP-PssA 时, 细胞两极和中部有大量蛋白聚集的现象。EGFP-FabD、EGFP-FabF、EGFP-CdsA、EGFP-PSD 在不同表达水平下, 均匀分散在细胞质或细胞膜上。缩时影像(Time-lapse)结果显示, 合成途径中的一个关键蛋白 EGFP-PlsB 在细胞分裂前随着细胞膜的内陷聚集到细胞隔膜, 随着细胞分裂, 母细胞的隔膜成为新细胞的两极。【结论】本研究通过获取磷脂酰乙醇胺合成相关蛋白酶在大肠杆菌中的定位结果, 推测脂肪酸分子是在细胞分裂隔膜和两极掺入, 被催化合成 PE 后被运送到细胞膜其他位置。

关键词: 磷脂酰乙醇胺(PE), 细胞膜合成, 融合荧光蛋白, PlsB, 脂肪酸, MreB

细胞膜是细胞与外部环境分隔开的生理边界, 它包裹着活细胞的细胞质, 保证生命体必须的生化反应。细胞膜由内外两层膜组成, 即内膜和外膜, 内外膜之间由周质隔开, 其中内膜是由脂质双分子层和镶嵌在其中的蛋白构成^[1-2]。尽管不同类型的细胞中, 细胞膜磷脂的组成有所差异, 但大部分由

磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、磷脂酰甘油(phosphatidylglyrecol, PG)和卵磷脂(cardiolipin, CL)组成。大肠杆菌细胞膜磷脂是由 80%的 PE、5%–25%的 PG 和 5%–10%的 CL 组成^[1]。

大肠杆菌磷脂酰乙醇胺合成途径可以分为长链脂酰-ACP 合成和磷脂合成 2 个部分。与长链脂

基金项目: “万人计划”青年拔尖人才项目

*通信作者。刘天罡, Tel: +86-27-68755086, E-mail: liutg@whu.edu.cn; 高丁, E-mail: gaoding@wh.iov.cn

收稿日期: 2017-01-09; 修回日期: 2017-02-21; 网络出版日期: 2017-03-01

酰-ACP 合成相关的蛋白包括 FabH、FabB、FabG、FabA、FabI、FabD、FabF 和 FabZ，乙酰 CoA 经过这些 Fab 酶的催化后得到特定长度的长链脂酰-ACP，随后进入磷脂合成阶段，由 PlsB/PlsC 系统催化，经过 PssA、PSD 和 CdsA 的后续催化合成磷脂酰乙醇胺^[3](图 1)。

对于细胞膜合成机制的研究大都集中在阐明合成相关蛋白的生化性质^[2]，对于磷脂合成的位置，底物分子的掺入方式以及合成酶的亚细胞定位涉及很少。利用 PE 和 CL 的特异性荧光染料将枯草芽孢杆菌染色发现，枯草芽孢杆菌细胞膜中磷脂酰乙醇胺(PE)和卵磷脂(CL)聚集在细菌的两

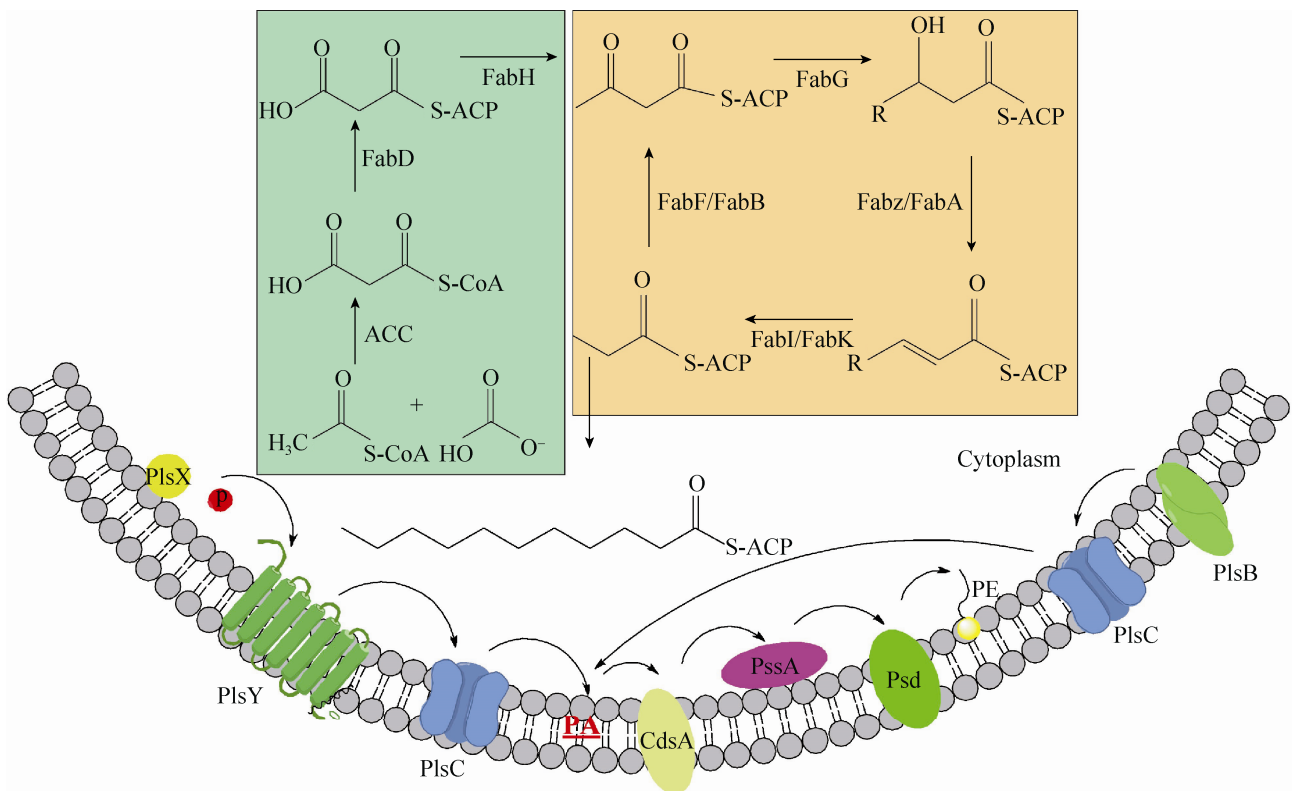


图 1. 大肠杆菌磷脂合成途径

Figure 1. PE synthesis pathway in *E. coli*. Acetyl-CoA is catalyzed by three condensing enzymes, including FabH (β -ketoacyl-ACP synthase III), FabB (β -ketoacyl-ACP synthase I), and FabF (β -ketoacyl-ACP synthase II). FabG (β -ketoacyl-ACP reductase), FabA/Z (β -ketoacyl-ACP dehydratase) and FabI (trans-2-enoyl-ACP reductase) add two carbons with the completion of each turn of the cycle until a long chain acyl-ACP is generated. After the desired chain length of acyl-ACP has been synthesized, it is transferred to either sn-1 or sn-2 position of glycerol-3-phosphate(G3P) by the PlsB/PlsC system. These reactions produce phosphatidic acid (PA), which is the universal phospholipid precursor in bacteria. CdsA (phosphatidate cytidylyl-transferase) catalyzes the conversion of PA to the activated intermediate, CDP-diglyceride, which can then be utilized in the synthesis of either PE, PG or CL. PssA (CDP-diacylglycerol-L-serine phosphatidyl-transferase) condenses serine to the phosphatidyl moiety of CDP-DAG coupled with the release of cytidine monophosphate (CMP). The final reaction in PE biosynthesis is performed by PSD (phosphatidyl-L-serine carboxylase), which decarboxylates the serine head group, resulting in the release of CO_2 .

极和分裂隔膜位置。同时通过融合荧光蛋白表达的方式发现,合成这两种磷脂的关键蛋白也聚集在两极和中间,说明枯草芽孢杆菌中的 PE 和 CL 极有可能是在两极和细胞分裂位置合成的。而在大肠杆菌中,利用荧光染料染色的方式难以观察到磷脂清晰的定位模式^[4]。蛋白的定位机制可以在一定程度上指示其在细胞中的特殊功能^[5],追踪磷脂合成相关酶的亚细胞定位是探索底物和中间产物如何掺入细胞膜的一种方法。磷脂合成酶的磷脂分子合成发生在大肠杆菌什么位置,脂肪酸分子又是如何随着细胞生长掺入到大肠杆菌细胞膜中,这些关于细胞膜合成的动态分布问题,仍然不得而知。

蛋白以动态形式存在于细胞中^[6],获得细胞生长过程中蛋白的动态变化非常重要。研究者们可利用超高分辨荧光显微镜成像,得到大肠杆菌内清晰的蛋白定位,利用缩时影像(Time-lapse)显微拍摄技术能观察到细胞生长分裂过程中蛋白的移动^[7]。本研究从研究蛋白定位展开,对大肠杆菌细胞膜磷脂酰乙醇胺的生物合成机制进行探索,在大肠杆菌中表达从乙酰 CoA 合成长链脂酰-ACP,继而合成磷脂酰乙醇胺途径中的 10 个关键蛋白,获得不同表达水平下蛋白的定位模式。在大肠杆菌磷脂合成途径中,第一个阶段长链脂酰-ACP 合成后,合成细胞膜磷脂的第一步反应是甘油-3-磷酸的乙酰化,PlsB 是这一反应的关键蛋白。

研究发现,磷脂酰乙醇胺合成途径中关键酶与荧光蛋白的融合蛋白 EGFP-FabA、EGFP-FabB、EGFP-FabI 和 EGFP-PlsB 等在高水平表达下聚集在细胞两极,同时利用 Time-lapse 显微拍摄技术对 EGFP-PlsB 蛋白在细胞生长过程中的定位进行追踪,发现 EGFP-PlsB 在细胞膜上不是静止不动的,而是伴随着细菌的生长在细胞膜上以一定的规律动态移动。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

1.1.1 菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL1-blue 用来保存和扩增质粒,大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655(DE3)用来表达蛋白。

1.1.2 质粒:本研究使用的原始载体 pET28 含有 T7 启动子和乳糖操纵子。所有表达载体均在酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I 之间插入融合蛋白基因,所用引物如表 1 所示。绿色荧光蛋白基因 *gfp* 和樱桃红荧光蛋白基因 *mcherry* 根据已知序列合成。用 overlap PCR 的方法将 *fabB* 基因和 *gfp* 基因融合在一起^[8],用 1 个 24 bp 的 linker 将目标蛋白基因和荧光蛋白基因连接在一起,荧光蛋白连在目标蛋白的 N 端(图 2),linker 的序列是 CCTAGTTGTAGTAGTCCTAGTCCT。其他蛋白表达载体的构建均采用 simple cloning 的方法^[9],将包含荧光蛋白基因的载体和目的基因连接起来。

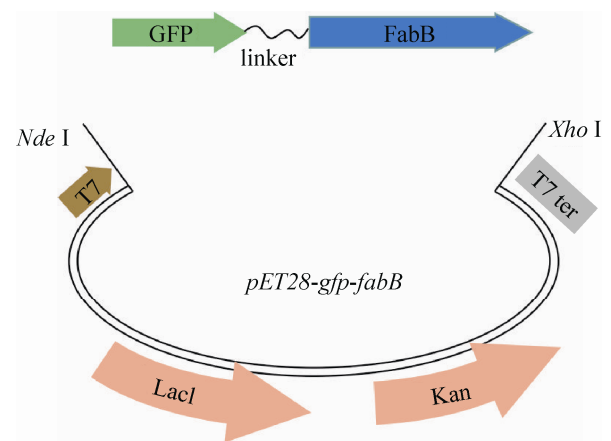


图 2. 表达融合蛋白所用重组质粒的构建示意图(以 EGFP-FabB 为例)

Figure 2. Construction schematic of recombinant plasmid for fusion protein expression (taking EGFP-FabB for example).

均在 30 °C 下诱导表达 30 min, 菌液经过离心浓缩并保存在 4 °C 待用。

1.3 脂肪酸合成的体外重建

体外重建脂肪酸合成的实验方法参考文献[10], 将参与脂肪酸合成的所有蛋白纯化出来, 按照文献中的优化比例加入蛋白, 用放射性薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC) 进行脂肪酸的检测。在这个反应中加入每个参与反应的 Fab 蛋白各 1 $\mu\text{mol/L}$, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ holo-ACP 和 TesA, 1 mmol/L 的 NADPH、NADH 和 TECP, 0.2 mmol/L 的 acetyl-CoA, 0.5 mol/L 的 5% C^{14} 标记的 malonyl-CoA (American Radiolabeled Chemicals)。为了验证融合的 EGFP-FabB 蛋白与 FabB 功能上的差异, 将体外反应中的 FabB 蛋白用 EGFP-FabB 替换。

1.4 宽场荧光成像和 3D-SIM 成像

宽场荧光成像和 3D-SIM 成像都在 DeltaVision OMX V4 成像系统 (GE Healthcare Company, Issaquah, USA) 进行, 物镜为 60X/1.42 N.A. (Olympus)。用 FITC, A568 过滤器设置通过单色激光来激发。用 softWoRx version 6.5.2 (GE Healthcare Company) 软件进行图像的去卷积和重构。将 2 μL 浓缩后的样品加到载玻片上, 盖上盖玻片。激发波长为 488 nm 或者 561 nm, 图像的对比度和亮度调节使用软件 Adobe Photoshop CS5 处理。

1.5 Time-lapse 拍摄 EGFP-PlsB 动态成像

EGFP-PlsB 的动态成像在 PerkinElmer VOX 转盘共聚焦显微镜进行, 采用物镜 100 \times /1.49 N.A. (Olympus), ImagEM-1KEMCCD 相机 (HAMAMAT SU), 以及 Volocity 6.3 软件 (PerkinElmer)。琼脂胶块含有 1.8% 的琼脂糖, 用稀释了 5 倍的 LB 溶解。琼脂胶块的制备参考文献[11], 制备过程如图 3。将融化的琼脂溶液滴加到载玻片上, 待冷却 2 min

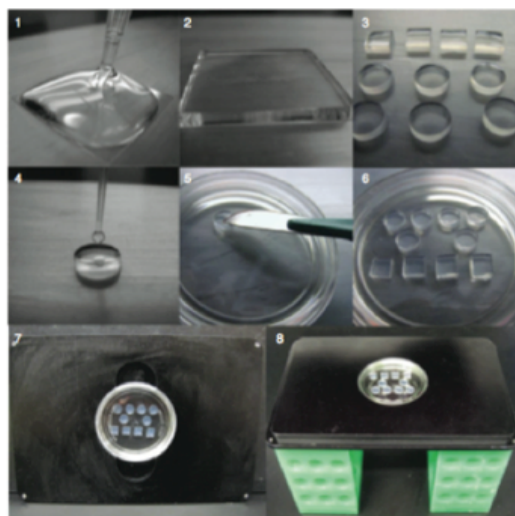


图 3. 琼脂胶块的制作

Figure 3. The process of making agarose pad. Molten agar solution (1.8%; LB diluted 1:5 in water) was added to the well of a culture slide and covered with a glass slide. After cooling, the slide was removed and two air pockets were cut out of the agar, leaving a 3–5 mm agarose bridge in the center of the well.

左右, 用盖玻片盖住使胶块表面平整, 待胶块凝固完全, 移去盖玻片, 将胶块切成 1 cm^2 的正方形小块。质粒 pXL03 转入大肠杆菌, 加入 0.01 mmol/L 的 IPTG 诱导, 30 °C 诱导 30 min, 菌液滴加到琼脂胶块成像。恒温控制室提前预热到 37 °C 至少 30 min, 菌液加到琼脂胶块上之后, 置入恒温空间用于观察。通过减少曝光时间来减小光毒性, 动态拍摄的时间间隔为 2 min, 拍摄总时长 120 min。

2 结果和分析

2.1 体外重建脂肪酸合成的实验证明融合蛋白 EGFP-FabB 的活性

通过将体外脂肪酸合成反应体系中的 FabB 蛋白换成融合了绿色荧光蛋白的 EGFP-FabB, 放射性 TLC 检测脂肪酸含量的结果显示, EGFP-FabB 的活性与 FabB 活性相当, 如图 4 所示。

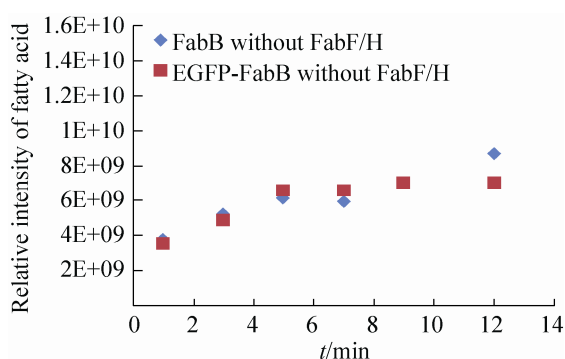


图 4. 体外重建脂肪酸合成体系验证融合蛋白 EGFP-FabB 的活性

Figure 4. *In vitro* reconstitution of fatty acid biosynthesis to verify the activity of the fused protein EGFP-FabB. Whether EGFP-FabB has a function analogous to that of FabB was tested in the *in vitro* reconstitution fatty acid biosynthesis system. FabB was replaced by EGFP-FabB in the reconstitution system, and the production of fatty acid was recorded at different time points. The y-axis represents the relative intensity of fatty acid on the TLC plate. And the x-axis represents the reaction time of the *in vitro* reconstitution of fatty acid biosynthesis.

2.2 长链脂酰-ACP 合成的相关酶在不同表达水平下的定位模式

长链脂酰-ACP 合成的相关酶 FabA、FabB、FabG 和 FabI 分别融合了绿色荧光蛋白 EGFP, T7 启动子启动表达, 浓度梯度的 IPTG 诱导表达这些融合蛋白。对于每一个诱导条件下的样品, 我们随机选取了 5 个以上的成像视野进行拍摄, 总共获得了超过 50 个细胞的定位成像图。重复试验的结果一致显示, 在 IPTG 浓度高达 10 mmol/L 和 0.1 mmol/L 时, 这些蛋白呈现明显的两极和中间位置聚集的现象, 而当 IPTG 浓度降低到一定程度时, 它们在整个细胞均匀分布。蛋白 mCherry-FabH 在高浓度 IPTG 诱导下, 呈现一种中空分布模式, 表达水平降低时在整个细胞均匀分布(图 5)。

2.3 与 PE 合成相关的膜蛋白在不同表达水平下的定位模式

长链脂酰-ACP 合成之后, 进一步合成磷脂酰乙醇胺的几个膜蛋白包括 PlsC、PlsB、PssA、PSD 和 CdsA。在不同诱导条件下表达这些膜蛋白得到的每个样品, 也有超过 50 个单细胞被测定。重复试验一致显示, EGFP-PlsB 和 PssA 在 10 mmol/L 和 1 mmol/L 的 IPTG 诱导下呈现两极和隔膜定位, 然而随着 IPTG 加入量的减小, 这种两极定位逐渐消失, EGFP-PssA 均匀分布在整个细胞质, EGFP-PlsB 则成簇状分散在细胞膜。EGFP-PSD、EGFP-PlsC 和 EGFP-CdsA 在 10 mmol/L 到 0.001 mmol/L 的 IPTG 诱导下均在细胞膜上呈现离散分布(图 6)。

2.4 超高分辨荧光显微镜成像下 EGFP-PlsB 的定位模式以及 EGFP-PlsB 在细胞内移动的动态成像

荧光显微镜的应用使观测大肠杆菌内复杂的结构成为可能, 蛋白在细胞内处于不断运动的状态, 并会根据细胞状态定位在特定位置^[12]。PlsB 是利用细胞质中的底物脂酰-ACP 合成磷脂酰乙醇胺反应的第一个酶, PlsB 的空间定位对于解释脂肪酸掺入细胞膜模式以及 PE 合成发生的位置非常重要。通过超高分辨荧光显微镜观察, 发现 EGFP-PlsB 在 0.16 $\mu\text{mol/L}$ 的 IPTG 诱导下, 成簇分散在整个细胞膜上(图 7-A)。

通过优化动态拍摄的条件, 经过 2 h 的观察, 结果表明, 随着细菌的生长和分裂, EGFP-PlsB 沿着细胞膜移动, 在分裂前集中到细胞隔膜, 分裂结束后定位在新细胞的两极(图 7-B)。这一结果说明, 脂肪酸很有可能是在细胞分裂隔膜位置掺入细胞膜中的, 细胞膜磷脂合成大部分发生在细胞隔膜。作为母细胞隔膜的产物, 子细胞的两极也可能掺入脂肪酸, 合成新的磷脂来提供细胞膜的合成。

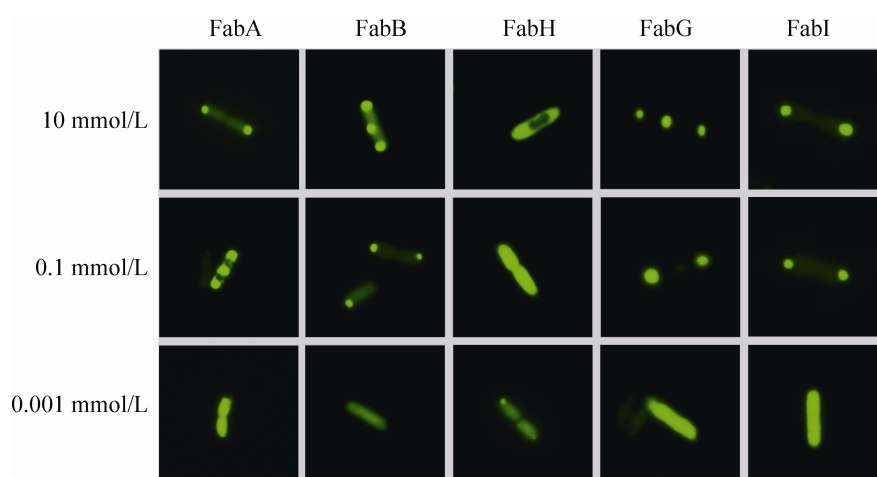


图 5. 脂肪酸合成相关蛋白的定位

Figure 5. Localization of enzymes involved in long chain acetyl-ACP synthesis. More than five fields were captured for microscope imaging, and there were in total more than 50 cells' images were collected of every microscopy sample. After repeated trials, we concluded that the long chain acetyl-ACP synthesis enzymes, including EGFP-FabA, EGFP-FabB, EGFP-FabG, and EGFP-FabI were localized at the poles in *E. coli* cells when induced with 10 mmol/L or 0.1 mmol/L IPTG. When induced with 1 μ mol/L IPTG, these enzymes were distributed throughout the cytoplasm. The fused protein mCherry-FabH distributed throughout the cell except for a circular region in the middle of the cell when induced with 10 mmol/L IPTG, whereas it was dispersed throughout all the cell when induced with 0.1 mmol/L IPTG or less.

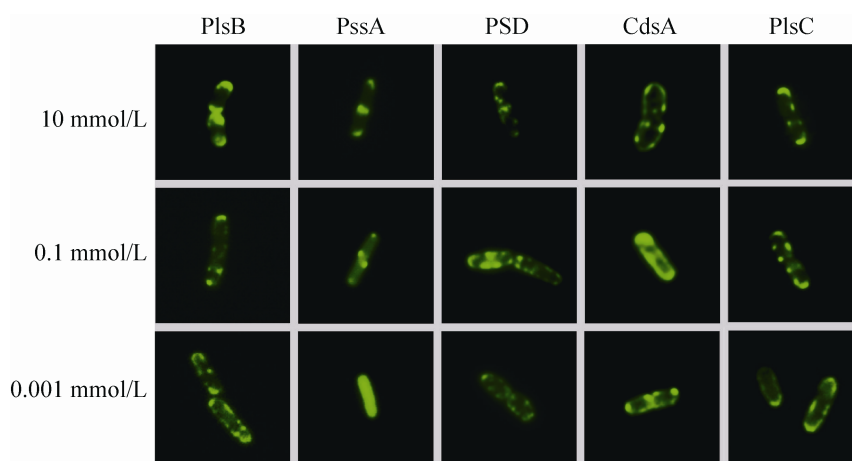


图 6. 脂酰-ACP 到磷脂酰乙醇胺合成酶的定位

Figure 6. Localization patterns of enzymes involved in PE synthesis. More than 50 cells' images were obtained of each sample. It can be concluded that EGFP-PssA accumulated in the polar and septal regions when induced with 10 mmol/L or 0.1 mmol/L IPTG, but it was distributed in the cytoplasm when induced with 1 μ mol/L IPTG. EGFP-PlsB accumulated at the poles in the presence of 10 mmol/L IPTG, and when the IPTG amount was decreased, EGFP-PlsB gradually scattered on the entire membrane. All the other membrane enzymes were scattered on the membrane at different expression levels.

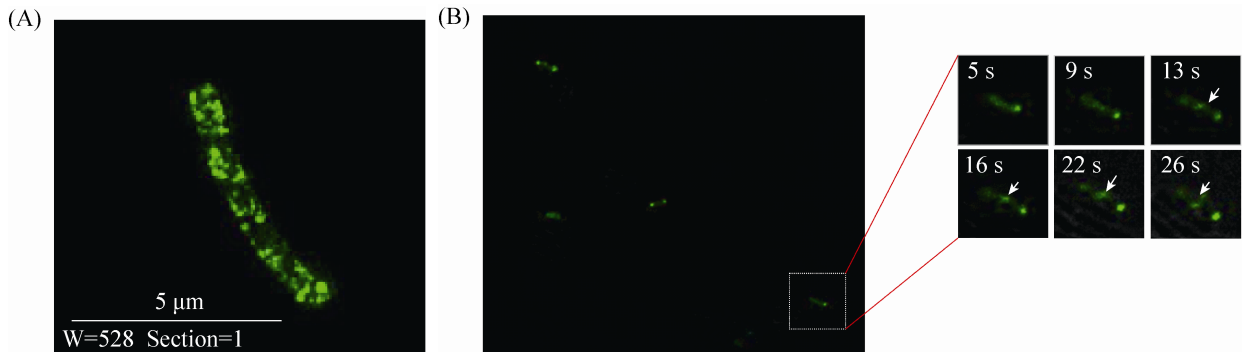


图 7. 超高分辨荧光显微镜下 EGFP-PlsB 定位成像图以及 Time-lapse 模式下 EGFP-PlsB 在不同时间点的定位成像图

Figure 7. Super-resolution microscopic images of EGFP-PlsB localization and Time-lapse images of EGFP-PlsB localization at different time points. A: Super-resolution image showed that EGFP-PlsB clustered on the entire membrane. B: Collection of six images at different time points from time-lapse images showed that the fluorescence signal spread around the cell at first, and then it became comparatively stronger at the septum of the cell when it divided. And at last the septum became the poles of the new cells along with the completion of division.

3 讨论

大肠杆菌细胞膜磷脂中 80%的成分是磷脂酰乙醇胺,脂质双分子层构成了细胞膜的基本骨架,脂质的流动性保证细胞膜的生理功能,因而磷脂酰乙醇胺的合成是细胞膜合成的基础。本研究通过观察大肠杆菌中参与细胞膜磷脂酰乙醇胺合成相关蛋白在胞内的定位信息,揭示出脂肪酸在磷

脂合成过程中掺入细胞膜的时空模式,回答细胞膜扩增发生的地点这一基本问题。

本研究提出脂肪酸作为底物参与磷脂合成过程中掺入细胞膜的 2 种模型(图 8),一种模型假设脂肪酸是在细胞两极和细胞隔膜掺入,继而合成磷脂,运送到细胞膜上补充细胞膜的合成;另一种模型则假设脂肪酸随机掺入,磷脂在整个细胞膜上随机合成。

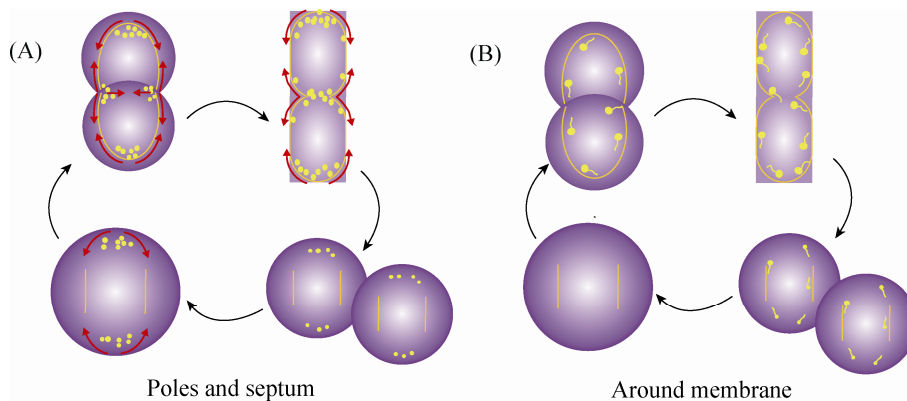


图 8. 脂肪酸在磷脂合成过程中掺入细胞膜的 2 种模式

Figure 8. Proposed modes of fatty acid insertion mechanism during membrane synthesis. A: Insertion of fatty acid occurs at the septum and new synthesized molecules are transferred along the membrane to the other region of the cell. B: Fatty acid insertion occurs randomly around the entire membrane during cell growth and division.

由于分子染料成像的有限性,本研究从磷脂合成相关的蛋白酶定位着手探索磷脂合成的位置以及脂肪酸掺入细胞膜的方式。在大肠杆菌中表达磷脂酰乙醇胺合成相关的 10 个关键蛋白发现,同一个蛋白在不同的表达水平下,呈现不同的定位模式,高水平表达下,蛋白出现两极和中部聚集的现象,包括 EGFP-FabA、EGFP-FabB、EGFP-FabG、EGFP-FabI、EGFP-PlsB 和 EGFP-PssA,而 EGFP-FabD、EGFP-FabF 分布在整个细胞质,EGFP-PSD、EGFP-PlsC 和 EGFP-CdsA 则成簇分布在细胞膜上,mCherry-FabH 则呈现一种中空的定位模式。蛋白定位模式总结见表 2。所有磷脂酰乙醇胺合成相关蛋白,在较低水平下都呈现出均匀分散的定位模式,这种均匀分布可能是蛋白处于不断运动状态下的平衡。而过表达下的蛋白聚集可能是调节酶活性的一种方式,因为高水平表达下细胞产生了多余的酶^[13]。

在本研究中,不同的表达水平会导致大肠杆菌蛋白亚细胞定位的不同,为了探索大肠杆菌真

实的蛋白亚细胞定位模式,本研究另外构建了 2 株突变株,将基因组上的 *fabB* 和 *fabH* 基因分别被融合基因 *egfp-fabB* 和 *egfp-fabH* 替换,利用基因组上 *fabB* 和 *fabH* 的原始启动子分别表达 EGFP-FabB 和 mCherry-FabH。荧光显微镜成像结果显示,EGFP-FabB 和 mCherry-FabH 都均匀分散在整个细胞内(图 9)。由此推测,低水平表达下 EGFP-FabB 和 mCherry-FabH 更接近于细胞内真实的 FabB 和 FabH 的定位情况。本研究所用的 T7 启动子是较强的启动子,使用较低浓度 IPTG 诱导时的表达水平可能更接近于细胞内真实的基因表达水平。

在研究膜蛋白的定位时,荧光蛋白融合在目标蛋白的 N 端还是 C 端是个问题,因为 EGFP 只有在大肠杆菌细胞质中才会发光^[12]。我们将这几个膜蛋白 C 端和 N 端都融合上荧光蛋白,当 N 端融合 EGFP 时,这 5 个蛋白都发光,而 CdsA 和 PssA 的 C 端融合荧光蛋白时没有荧光,为了保持一致性,都采用 N 端融合荧光蛋白。

表 2. 大肠杆菌内磷脂酰乙醇胺相关酶高水平表达下在大肠杆菌中的定位

Table 2. Sub-cellular localization of the enzymes involved in lipid synthesis in *E. coli* at high expression level

Protein	Function	Localization
FabA	Beta-hydroxydecanoyl-ACP-dehydratase	Polar
FabB	Beta-ketoacyl-ACP-synthase	Polar
FabG	Beta-Keto-ACP-reductase	Polar
FabH	Ketoacyl-ACP- synthase III	Hollow
FabI	Enoyl-ACP-reductase	Polar
PssA	Phosphatidylserine synthase	Polar and septal
PSD	Phosphatidylserine decarboxylase	Clustered
CdsA	CDP-diacylglycerol synthetase	Clustered
PlsB	sn-Glycerol 3-phosphate acyltransferase	Polar and septal
PlsC	1-Acylglycerol 3-phosphate acyltransferase	Clustered
ACC	Acetyl-CoA carboxylase	Cytoplasm
FabD	Malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase	Cytoplasm
FabF	Beta-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase	Cytoplasm

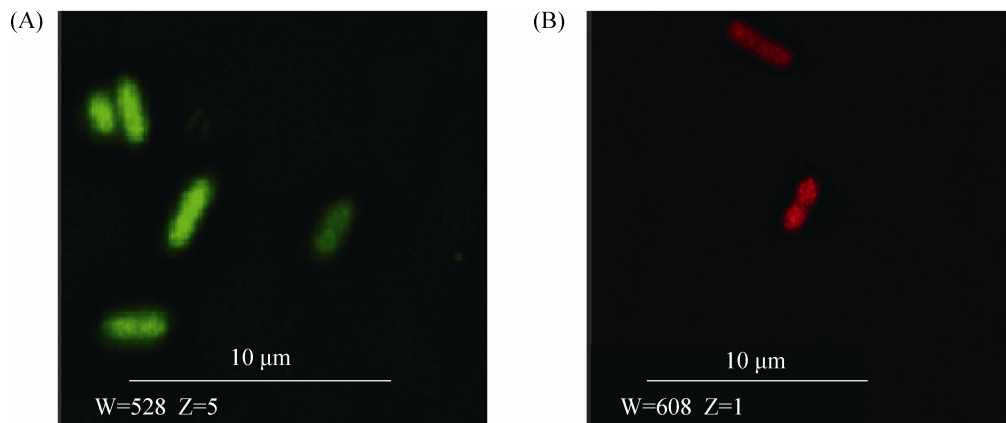


图 9. 基因组原始启动子启动表达 EGFP-FabB (A)和 mCherry-FabH (B)时蛋白在大肠杆菌内的定位

Figure 9. Localizations of EGFP-FabB (A) and mCherry-FabH (B) when they were promoted by local promoters in *E. coli*. Both EGFP-FabB and mCherry-FabH distributed around the whole cell when their expressions were promoted by the local promoters in the genome of *E. coli*.

相对于静态成像, 动态成像能更好地反映蛋白在细胞体内的真实变化。PlsB 是以细胞质中的脂酰-ACP 为底物, 合成磷脂的第一个膜蛋白, 是本研究中的一个关键蛋白。EGFP-PlsB 在分裂前聚集到分裂位置的现象表明, 脂酰-ACP 极有可能是在细胞分裂隔膜掺入到细胞膜中, 继而合成磷脂, 细胞分裂形成的隔膜成为新细胞的两极, 脂肪酸可能在新细胞两极掺入脂肪酸, 继续合成磷脂, 保证细胞的生长。图 8 中的磷脂合成模型 B 更符合细胞内的真实状况。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌细胞两极的物质合成要远远少于侧壁和分裂位置的合成, 在球形金黄色葡萄球菌和链球菌物种, 新的合成也主要发生在分裂隔膜^[14]。

蛋白的极性定位是保证细胞正常功能的基础, 通过分子标记等方法, 在很多细菌中已经可以观察到蛋白在细胞中的极性定位, 然而, 引导和调节这种极性的一个通用的调节因子还没有找到^[15]。MreB 是细菌中肌动蛋白的一个同源蛋白, 与 Mre 系列蛋白共同维持细胞的棒状形态^[14]。在新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)中分别敲除和

高水平表达 MreB, 发现 MreB 对于染色体某些序列的极性定位, 以及调控蛋白的动态定位, 从而引导蛋白定位到特定细胞极至关重要^[15-16]。

在枯草芽孢杆菌内, MreB 细胞骨架与细胞流动性的脂质域有关, 可通过干扰脂质稳态来影响膜蛋白定位^[17]。在海栖热袍菌(*Thermotoga maritime*)中, MreB 呈细丝状与细胞膜相连, 协调细菌细胞壁的合成, RodZ 直接或间接地将 MreB 与细胞壁合成相关的酶耦合^[18]。

EGFP-PlsB 在 0.16 μmol/L 的 IPTG 诱导下成簇分布在细胞膜上, 与已经报道的大肠杆菌骨架蛋白 MreB 的螺旋分布模式相似。我们将 PlsB 和 MreB 融合不同颜色荧光构建在同一个 pET28 载体上表达, 用 T7 启动表达 mCherry-MreB, 启动子 plq22 启动 EGFP-PlsB 表达, 启动子 plq22 是本实验室已验证的较弱启动子, 用一个较弱的启动子启动表达 PlsB 是为了避免强启动子启动时高水平表达下 PlsB 的两极聚集。在一些细胞中, MreB 的聚集伴随着 PlsB 的聚集, 但 MreB 和 PlsB 的共定位程度很低(图 10)。

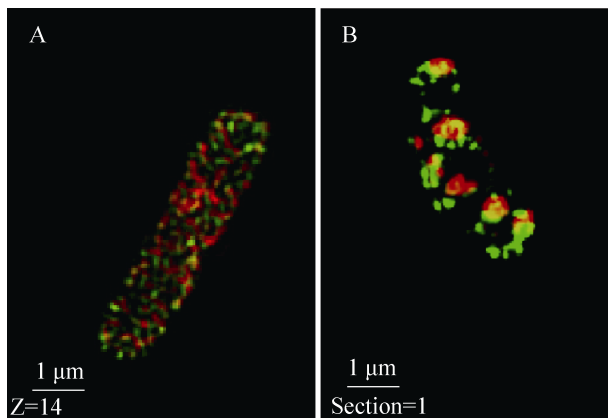


图 10. EGFP-PlsB (A)和 mCherry-MreB (B)在大肠杆菌共表达高分辨成像图

Figure 10. Super-resolution images of *E. coli* in which EGFP-PlsB (A) and mCherry-MreB (B) were co-expressed. Two fluorescent colors indicated that EGFP-PlsB and mCherry-MreB were distributed around the membrane without obvious co-localization. In some cells, PlsB patches followed the orbit of the MreB focus.

MreB 作为细胞骨架处在细胞膜内膜之下，PlsB 在细胞膜上，两者在空间上不在一个层面，因此共定位程度低也是正常的。而在大肠杆菌中，PlsB 和 MreB 之间有可能存在一个因子，通过蛋白耦合或者其他未知的方式将两者间接联系起来。MreB 可能通过一种间接的方式引导 PlsB 的移动，甚至调节整个磷脂合成相关酶的定位，从而调节大肠杆菌内磷脂的合成。

参 考 文 献

- [1] Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 222-233.
- [2] Cronan JE. Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 203-224.
- [3] Parsons JB, Rock CO. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(3): 249-276.
- [4] Nishibori A, Kusaka J, Hara H, Umeda M, Matsumoto K. Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(6): 2163-2174.
- [5] Hughes HV, Huitema E, Pritchard S, Keiler KC, Brun YV, Viollier PH. Protein localization and dynamics within a bacterial organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(12): 5599-5604.
- [6] Johnson AS, van Horck S, Lewis PJ. Dynamic localization of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2004, 150(9): 2815-2824.
- [7] Huang B, Bates M, Zhuang XW. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78: 993-1016.
- [8] Bryksin AV, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 2010, 48(6): 463-465.
- [9] You C, Zhang XZ, Zhang YHP. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1593-1595.
- [10] Yu XY, Liu TG, Zhu FY, Khosla C. *In vitro* reconstitution and steady-state analysis of the fatty acid synthase from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(46): 18643-18648.
- [11] Gregory JA, Becker EC, Pogliano K. *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes & Development*, 2008, 22(24): 3475-3488.
- [12] Rapp M, Drew D, Daley DO, Nilsson J, Carvalho T, Melén K, De Gier JW, Von Heijne G. Experimentally based topology models for *E. coli* inner membrane proteins. *Protein Science*, 2004, 13(4): 937-945.
- [13] Beaty NB, Lane MD. The polymerization of acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(21): 13051-13055.
- [14] Cabeen MT, Jacobs-Wagner C. Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(8): 601-610.
- [15] Gitai Z, Dye N, Shapiro L. An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(23): 8643-8648.
- [16] Bean GJ, Amann KJ. Polymerization properties of the *Thermotoga maritima* actin MreB: roles of temperature, nucleotides, and ions. *Biochemistry*, 2008, 47(2): 826-835.
- [17] Gowrishankar K, Ghosh S, Saha S, Rumamol C, Mayor S,

Rao M. Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell*, 2012, 149(6): 1353-1367.

[18] Morgenstein RM, Bratton BP, Nguyen JP, Ouzounov N,

Shaevitz JW, Gitai Z. RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(40): 12510-12515.

Fatty acid insertion mechanism during membrane synthesis in *Escherichia coli*

Lingling Xie¹, Tingting Ning¹, Guangkai Bian¹, Ding Gao^{2*}, Tiangang Liu^{1*}

¹Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

²Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to explore the mechanism of fatty acid insertion during membrane synthesis when cells grow and divide in *Escherichia coli*. [Methods] In the phosphatidylethanolamine (PE) synthesis pathway, acetyl-CoA was used as the substrate to synthesize long-chain acyl-ACP, followed by the synthesis of PE. The ten enzymes involved were each fused with a fluorescent protein such as enhanced green fluorescent protein (EGFP) or monomer Cherry (mCherry), and the fusion proteins were expressed in *E. coli*. The localizations of the fusion proteins were detected by laser scanning confocal fluorescence microscopy. [Results] Fluorescent microscope images showed that the proteins EGFP-FabA, EGFP-FabB, EGFP-FabI, EGFP-FabG, EGFP-PlsB, and EGFP-PssA accumulated in the polar and septal regions when expressed at high levels. Therefore, the ten enzymes displayed different localization patterns at different expression levels. Time-lapse imaging showed that EGFP-PlsB accumulated in the septum before cell division, then these regions of division became poles of the new cells. [Conclusion] This indicates that fatty acid inserted at the septum for PE synthesis and then PE was transported to all the other membrane regions.

Keywords: phosphatidylethanolamine (PE), membrane synthesis, fusing with fluorescent protein, PlsB, fatty acid, MreB

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Young Talents Program of National High level Personnel of Special Support Program (The “Ten Thousand Talent Program”)

*Corresponding author. Tiangang Liu, Tel: +86-27-68755086, E-mail: liutg@whu.edu.cn; Ding Gao, E-mail: gaoding@wh.iov.cn

Received: 9 January 2017; Revised: 21 February 2017; Published online: 1 March 2017