

SEDS蛋白的结构与功能研究进展

李晨辰^{1,2,3} 吴昊^{1,2,3} 田开仁^{1,2,3} 乔建军^{1,2,3} 李艳妮^{1,2*}

(¹天津大学, 化工学院制药工程系, 天津 300072; ²天津大学, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072;

³天津大学, 教育部前沿科学中心, 天津 300072)

摘要 肽聚糖是细菌细胞壁的主要成分, 在维持细胞活性、形状和保护渗透压等方面起着重要作用。SEDS(shape, elongation, division, and sporulation)蛋白是参与肽聚糖合成的一类膜蛋白家族, 其成员与细胞形状、伸长、分裂和孢子形成有关。一系列遗传和生化证据表明, SEDS蛋白具有糖基转移酶功能, 是细胞延长和分裂机制的核心聚合酶。SEDS蛋白分布的广泛性、结构的保守性和功能的重要性, 使其有望成为新一代抗生素研究的重要靶标。该文对SEDS蛋白的结构和功能进行了综述, 重点介绍了SEDS蛋白的结构及其参与肽聚糖合成的调控机制, 并对SEDS蛋白的应用和前景进行了展望。

关键词 肽聚糖; SEDS; RodA; FtsW; SpoVE

Research Progress in the Structure and Function of SEDS Protein

LI Chenchen^{1,2,3} WU Hao^{1,2,3} TIAN Kairen^{1,2,3} QIAO Jianjun^{1,2,3} LI Yanni^{1,2*}

(¹Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ²Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin 300072, China;

³Frontiers Science Center for Synthetic Biology (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Peptidoglycan is the main component of bacterial cell wall and plays an important role in maintaining cell viability, shape and protecting osmotic pressure. SEDS protein is a family of membrane proteins involved in peptidoglycan synthesis. Its members are related to cell shape, elongation, division and spore formation. A series of genetic and biochemical evidences show that SEDS protein has glycosyltransferase function and is the core polymerase of cell elongation and division mechanism. Considering its extensive distribution, conservative structure and critical function, SEDS protein is expected to be an essential target for the development of new antibiotics. The structure and function of SEDS protein are summarized. Its structure characteristics and regulation mechanism in peptidoglycan synthesis are highlighted. In the end, the application and development of SEDS protein are prospected.

Keywords peptidoglycan; SEDS; RodA; FtsW; SpoVE

SEDS(shape, elongation, division, and sporulation)蛋白家族是一类在细菌中广泛存在的细胞壁聚合酶家族, 与细胞形状、伸长、分裂和孢子形成有关, 在肽聚糖(peptidoglycan, PG)的合成过程中发挥

着关键作用。目前鉴定得到的SEDS蛋白家族成员主要包括RodA、FtsW和SpoVE。RodA为杆状决定蛋白, 与细胞伸长有关, 在维持细胞杆状、保持细胞活力方面发挥重要作用。在大肠杆菌(*Escherichia*

收稿日期: 2019-12-24 接受日期: 2020-03-02

国家自然科学基金(批准号: 31570089)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-27892069, E-mail: liyanni@tju.edu.cn

Received: December 24, 2019

Accepted: March 2, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31570089)

*Corresponding author. Tel: +86-22-27892069, E-mail: liyanni@tju.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5273>

coli)^[1]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[2]、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)^[3]、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)^[4]等细菌中, *rodA*的缺失会导致细胞变为球形。FtsW为细胞分裂蛋白, 在*B. subtilis*^[5]、*M. tuberculosis*^[6]、新月形杆菌(*Caulobacter crescentus*)^[7]等细菌中, *ftsW*的缺失或抑制会阻碍细胞分裂。SpoVE是与细胞形态和分裂相关的芽孢期蛋白, 在*B. subtilis*^[8]、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)^[9]等具有芽孢的细菌中参与孢子皮层PG的合成。

近年来, 国内外研究人员对SEDS蛋白展开了广泛的研究。哈佛大学BERNHARDT课题组的MEESKE等^[10]通过放射性标记、免疫印迹分析等方法证实了RodA具有糖基转移酶活性, 同课题组的CHO等^[11]通过荧光显微镜成像证实了RodA具有PG聚合酶活性, 可与具有交联活性的B类青霉素结合蛋白(class B penicillin binding protein, bPBPs)协同作用催化PG合成。2018年, 陈尔曼等^[12]通过对猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) FtsW的生物信息学分析发现, 该蛋白具有高同源性和高保守性, 能够对免疫动物产生交叉免疫保护作用。2019年郑辉等^[13]对*M. tuberculosis* RodA的结构和功能进行了预测, 认为高保守、高稳定的RodA可以作为潜在的结核药物靶点。2019年TAGUCHI等^[14]通过蛋白印记检测和液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)检测证实了FtsW为PG聚合酶, 可与bPBPs协同作用在细胞分裂过程中产生隔膜肽聚糖。

PG是组成细胞壁的重要大分子, 而细胞壁的合成及其完整性是几乎所有细菌维持生命活动所必需的, 因此, 对参与PG生物合成的蛋白进行靶向破坏是治疗细菌感染的有效途径^[15]。自发现抗生素以来, 抑制病原微生物PG的聚合途径一直是研究的焦点。EVANS等^[16]报道了糖肽类抗生素万古霉素通过与PG前体Lipid II的D-Ala-D-Ala二肽末端结合阻止PG合成; WIEDEMANN等^[17]报道了羊毛硫抗生素可通过与Lipid II结合影响PG聚合; JACOBY等^[18]报道了β-内酰胺类抗生素可通过与bPBPs结合抑制PG的交联; 2019年, HELAL等^[19]报道了磷酸糖脂类抗生素莫诺霉素可通过抑制A类青霉素结合蛋白(class A penicillin binding protein, aPBPs)的糖基转移酶活性从而阻止聚糖链的聚合等。然而, 细菌不断进化

产生耐药性, 为解决该问题, 新的治疗方法不断被提出, 如组合疗法。在组合疗法中两种或多种抗生素存在协同作用, 可以杀死或抑制原本对其中任何一种抗生素均有抗药性的细菌。用磷霉素与氨曲南处理伯克霍尔德菌(*Burkholderia cenocepacia*)可导致细胞裂解^[20], 用磷霉素和D-环丝氨酸处理球形红球菌(*Rhodococcus globerulus*)可抑制Lipid II的生物合成^[21]。2019年, FLORES-MIRELES等^[22]提出了SEDS蛋白和PBP聚合酶共同介导的PG生物合成机制, 为开发有效组合疗法和控制细菌耐药性的产生开辟了新思路。SEDS蛋白中的RodA和FtsW在大多数细菌中都是必不可少的, 因而有望成为新一代抗生素的作用靶标。本文基于SEDS蛋白的结构和功能对其研究现状进行了综述, 并对其在新型抗生素开发中的应用前景进行了展望。

1 SEDS蛋白的结构

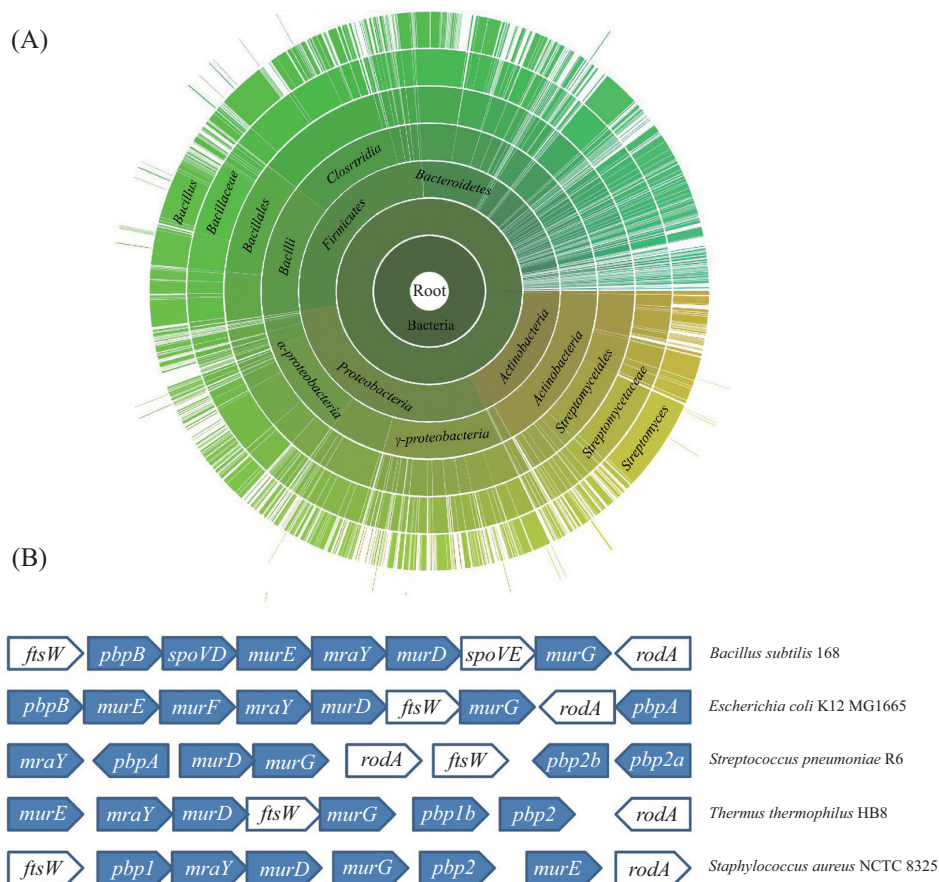
1.1 SEDS蛋白的一级结构

SEDS家族蛋白在厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)等下属的7 932种细菌中广泛存在。如图1A所示, 旭日图从中心向外的层级依次为超界、界、门、纲、目、科、属、种, 每个圆环代表了SEDS蛋白在该层级的物种分布数据比例。至今已知的具有FTSW_RODA_SPOVE结构域的序列多达18 774个, 其中有100个序列具有Transpeptidase结构域, 有19个序列同时具有PBP_dimer和Transpeptidase结构域。以研究较为深入且常见的菌株为例, 在其基因组背景中对编码SEDS蛋白的基因进行了分析(图1B), 可以看出该蛋白在细菌中是广泛存在的。SEDS蛋白在细菌中分布的广泛性表明它在细菌中发挥着重要作用。

我们在NCBI上随机选取了12种致病菌的SEDS蛋白, 与已知晶体结构的嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*) RodA进行序列比对, 结果显示出结合位点残基的高度保守性(图2)。SEDS蛋白在细菌中存在的广泛性及结合腔残基的保守性, 为开发具有广谱作用的靶向抗生素提供了可能。

1.2 SEDS蛋白的三级结构

1.2.1 RodA的三级结构 SEDS蛋白在细胞生命活动中发挥着重要作用。研究蛋白的三维结构, 有助于我们更深入地理解其作用机制, 并在此基础上



A: SEDS蛋白在细菌中广泛分布。数据来源于<http://pfam.xfam.org/family/PF01098#tabview=tab7>。B: 编码SEDs蛋白RodA、FtsW和SpoVE的基因在选定菌株中的存在情况。数据来源NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库, 深色模块代表参与PG生物合成的邻近基因。

A: SEDS proteins are widely distributed in bacteria. Data is from <http://pfam.xfam.org/family/PF01098#tabview=tab7>. B: the presence of genes encoding SEDS proteins RodA, FtsW and SpoVE in selected species. Data is from NCBI database, and the dark-bottomed modules represent neighboring genes involved in PG biosynthesis.

图1 SEDS蛋白的广泛分布
Fig.1 The wide distribution of SEDS proteins

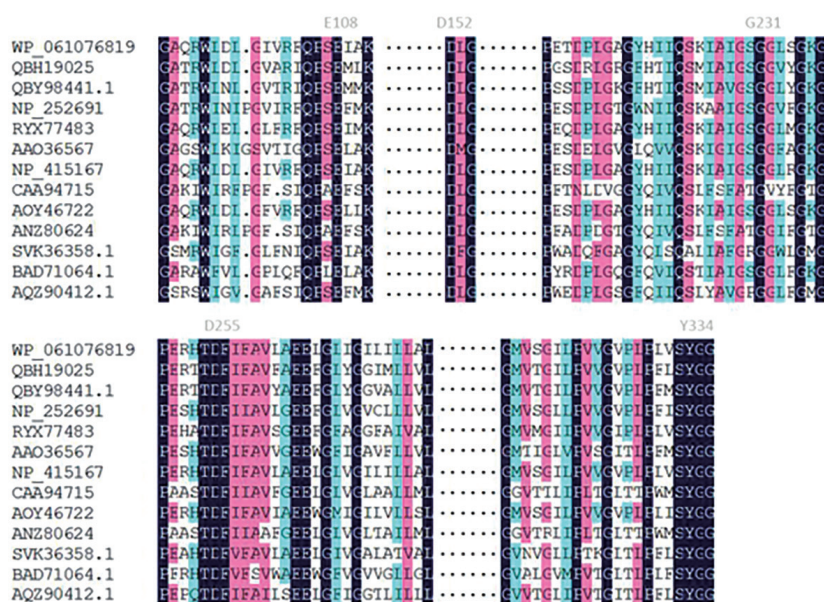


图2 12种SEDS蛋白与嗜热栖热菌RodA(BAD71064.1)的结合位点区域序列比对
Fig.2 Sequence alignment of binding site regions between 12 SEDS proteins and *T. thermophilus* RodA (BAD71064.1)

进行基于靶点的新型抗生素的设计与开发。然而, SEDS蛋白作为一种膜蛋白, 它的跨膜区数量、去污剂的选择、重组蛋白在异源细胞中过表达导致的错误折叠等诸多因素^[23], 限制了对其晶体结构的解析。截止到目前, 在PDB(protein data bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/>)数据库已发布的156 954个晶体结构中, 膜蛋白有954个(<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>), 其中SEDS的晶体结构报道只有*T. thermophilus* RodA(PDB ID: 6BAR)及其D255A突变体(PDB ID: 6BAS)。

2016年, MEESKE等^[10]通过高通量测序(Mut-Seq)筛选了RodA中的必需残基。RodA的胞内环非常短, 极少暴露在细胞内表面, 相比之下胞外环(extracellular loops, ECL) 2、4和5很大, 包含许多功能的必需残基, 如Pro97、Gly101、Glu102、Trp105、Gln226、Trp233、Asp280、Gly362、Gly363、Ger364、Ger365等。2018年, SJODT等^[24]首次利用进化偶联-分子置换(EC-MR)的方法确定了*T. thermophilus* RodA(图3)及其突变体的晶体结构, 为SEDS蛋白晶体结构的解析提供了新的研究思路。RodA蛋白晶体(PDB ID: 6BAR)的分辨率为2.9 Å, 具有10个跨膜螺旋(transmembrane helices, TM), 其中一部分是无序的(残基204~256, 266~276)。这些跨膜螺旋大多笔直垂直于膜平面, 仅TM3除外, 它在Pro71处以45°弯曲穿过膜。ECL2包含一个高度保守的 β -hairpin结构, 转角残基为Gly100和Pro101,

与 β -hairpin相邻处存在一个疏水空腔, 两侧残基为Glu108、Met306、Leu307、Gln310和Thr342。该中心腔面向细胞外表面, Glu108和Lys111在腔的边缘形成了一个绝对保守的盐桥。中心腔形成的凹槽可以与脂质结合, 为潜在的药物作用靶点。

SJODT等^[24]将*T. thermophilus* RodA和*E. coli* RodA进行序列比对, 用QuikChange定点突变法构建*E. coli*对应中心腔残基的突变菌株, 将Glu114突变为Glu114(E114A)、Lys117突变为Glu117(K117A)、Asp159突变为Glu159(D159A), 结果细胞失去杆状形态变成球形, 表明突变蛋白正确折叠并且能够与Rod复合体的其他成员相互作用, 但是不能促进细胞伸长。为了确定中心腔的盐桥与催化功能相关还是仅对蛋白折叠有作用, 他们构建了盐桥交换突变体, 通过圆二色光谱法测量到蛋白的正确折叠, 但在体外没有检测到肽聚糖聚合活性, 表明中心腔的盐桥与聚合酶活性有关。SJODT等^[24]利用MODELLER构建了基于*T. thermophilus* RodA结构的*B. subtilis* RodA同源模型, 用变异性指数表征碱基的耐突变程度。他们对*B. subtilis*中心腔附近残基进行了一系列定点突变(I113A、I113S、Q114A、E117A、E117K、F118A、K120A、D167A、D167N、A171L、D280A、D280N、S364A), 结果细胞变为球形, 表明中心腔附近的其他残基对RodA功能也十分重要。此外, 他们采用同样的方法证明了RodA与bPBPs的结合位点位于跨膜区TM8和TM9。总之, SJODT等^[24]

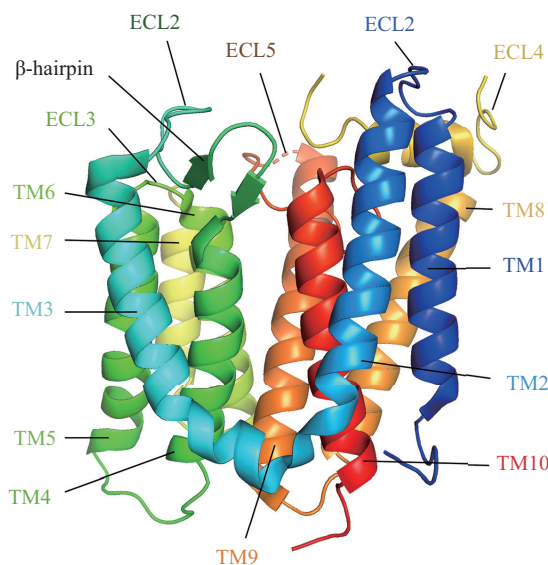


图3 SEDS蛋白RodA的晶体结构(根据参考文献[24]修改)

Fig.3 Crystal structure of SEDS protein RodA (modified from reference [24])

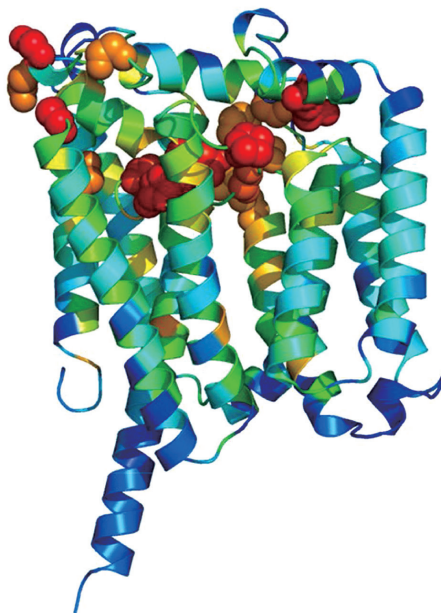


图4 SEDS蛋白FtsW的三维结构模型(根据参考文献[25]修改)

Fig.4 Three-dimensional structural model of SEDS protein FtsW (modified from reference [25])

通过对RodA及其突变体的晶体结构及活性研究,揭示了RodA在PG合成中发挥作用的关键位点,为今后基于RodA的结构进行新型抗生素的开发提供了理论基础。另外, RodA与bPBPs结合位点的发现,也为进一步深入探讨SEDS/bPBPs的协同作用提供了研究基础。

1.2.2 FtsW的三级结构 目前, PDB数据库中未见有FtsW晶体结构的报道。OVCHINNIKOV等^[25]在没有结构模板的情况下依赖于物理模型(Rosetta构象搜索)和蛋白序列残基-残基协同进化信息对FtsW蛋白的结构进行了预测, 构建了其三维结构模型(图4)。FtsW模型包含10个TM螺旋, 后七个(TM4~TM10)采用与STT3(二烷基二磷酸低聚糖蛋白糖基转移酶, PDB: 3WAK)中TM4~TM7、TM10~TM12相似的拓扑结构。高保守性的残基(红色或橙色)显示为球形, 用以指示相互作用表面和潜在的功能位点。FtsW发挥翻转功能时底物Lipid II的锚定位点与STT3的底物锚定位点相似, STT3蛋白TM4的N-端保守DxH基序在底物结合位点配位二价金属离子, 据此他们推测, FtsW蛋白TM4上的保守残基R145和K153对于FtsW的翻转酶活性至关重要。

2 SEDS蛋白的功能

2.1 RodA的功能

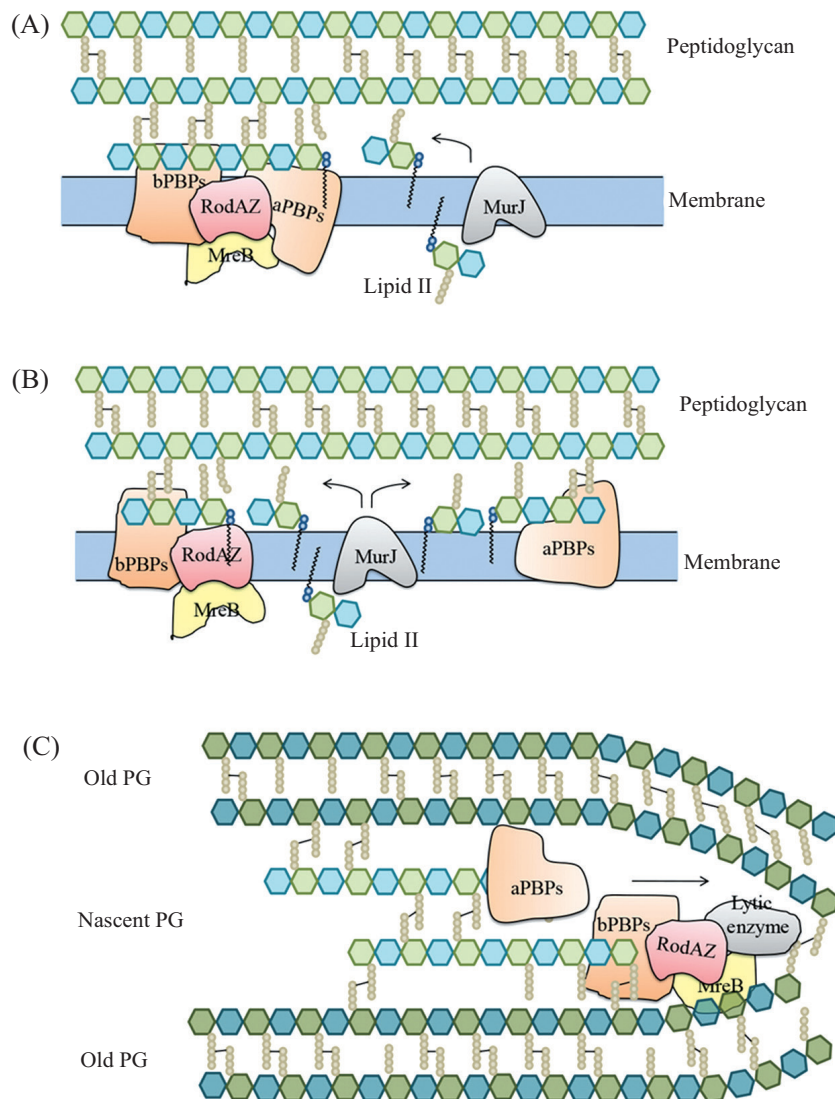
细胞完整性和形状的维持需要PG生物合成的

调节, 包括侧向合成和细胞分裂两种模式, 分别发生在两极和隔膜, 由两种大分子蛋白复合物(延伸体和分裂体)分别控制^[26]。RodA在延伸体中通过参与PG的生物合成控制细胞杆状形态, 但它的具体功能之前一直没有定论。最近MEESKE等^[10]的研究证明, RodA在PG合成中具有糖基转移酶(glycosyltransferase, GTase)功能。转糖基化是PG合成过程的关键步骤之一。几十年来, aPBPs是公认的参与细胞壁生物合成的唯一糖基转移酶^[27]。但是, 近些年研究发现, 有非aPBPs类型的糖基转移酶存在。MCPHERSON等^[28]构建了*B. subtilis* aPBPs全敲除菌株($\Delta 4$), 细胞虽然出现生长缺陷但仍能够存活。RICE等^[29]对粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的研究也得到了类似的结果。MEESKE等^[10]在 $\Delta 4$ 突变体中过表达RodA, 发现菌株的生长缺陷得到显著缓解, 使用放射性标记的Lipid II测定糖基转移活性, 发现RodA过表达突变体的活性高于野生型并远高于 $\Delta 4$ 突变体, 纯化的RodA在体外能够催化Lipid II向聚糖链的转化, 而必需位点突变的RodA(W105A和D280A)没有糖基转移活性。这些体内和体外的证据首次证明了SEDS家族的RodA为糖基转移酶。随后, EMAMI等^[30]用候选基因消除法再次证实了RodA是细胞壁合成的关键糖基转移酶, 对于细胞延伸必不可少, 敲除*rodA*后aPBPs合成聚糖链的过程将会失控。

在延伸体中, 转糖酶RodA与转肽酶PBP2形成复合物, 成对作用参与PG的生物合成^[31]。之前人们普遍接受的PG合成“Unified Model”(图5A)认为, RodAZ(RodA和RodZ)、MreB、aPBPs与bPBPs形成复合物, 在MreB的引导下, aPBPs通过其转糖结构域合成PG链, 随后具有转肽活性的aPBPs和bPBPs将这些链交联成紧密的网状结构^[32]。然而, 2016年CHO等^[1]通过单分子跟踪实验发现, MreB和aPBPs在不同的复合物中发挥作用, 参与PG合成。在延伸体中, MreB与RodAZ之间存在强相互作用, RodA与bPBPs之间存在强相互作用^[1], RodAZ又介导MreB与bPBPs

的间接作用, 三者形成的Rod复合体与aPBPs在空间上是独立的。这些证据支持了PG合成的“Interdependent Model”(图5B), 该模型认为细胞伸长过程中的PG合成主要由Rod复合体介导。细胞通过RodA的转糖作用产生聚糖链并通过bPBPs的转肽作用与原有PG交联。aPBPs与Rod复合体在空间上是独立的, 但在PG合成过程中协同发挥作用。

2017年, ZHAO等^[33]对PG合成的新数据进行整理, 提出了杆状细菌PG合成的“Break before Make Model”(图5C)。首先, 与复合体相连的内肽酶局部切割原有PG链的交联, 随后RodA产生聚糖链并通



A: 统一模型。B: 相互依赖模型。C: 先断后合模型。Lipid II: 脂质连接的二糖五肽前体; aPBPs: A类青霉素结合蛋白; bPBPs: B类青霉素结合蛋白; RodAZ: 糖基转移酶RodA和细胞骨架蛋白RodZ; MreB: 细胞形状决定蛋白; MurJ: Lipid II翻转酶; Lytic enzyme: 自溶素。

A: unified model. B: interdependent model. C: break before make model. Lipid II: lipid-linked disaccharide-pentapeptide precursor; aPBPs: class A penicillin binding protein; bPBPs: class B penicillin binding protein; RodAZ: glycosyltransferase RodA and cytoskeletal protein RodZ; MreB: cell shape-determining protein; MurJ: Lipid II flippase; Lytic enzyme: autolysin.

图5 PG合成模型(根据参考文献[11,32-33]修改)

Fig.5 PG synthesis model (modified from references [11,32-33])

过bPBPs附着到原有链上,新生的聚糖链为aPBPs的转糖作用提供模板,MreB稳定的圆周运动有助于提供规则的模板结构。aPBPs进行局限性的自由扩散运动,直到它们识别到模板然后将新材料添加到模板中。aPBPs产生的额外PG链,一侧与新生肽聚糖交联,另一侧与原有PG交联,确保结构的完整性。

在*E. coli*中抑制PBP2会阻止MreB运动,但RodA仍然可以合成PG,新生成的PG片段无法掺入原有的网状结构,而是被迅速降解并进入再循环^[34-35],表明在Rod复合体介导的PG合成过程中,PBP2提供了转糖基化后的第一个连接点,为RodA驱动MreB运动提供支点。ROHS等^[36]构建了*E. coli*的PBP2突变体,发现该突变体能在体内过度激活细胞壁合成并在体外刺激RodA-PBP2复合物的活性,表明PBP2在RodA刺激PG聚合从而在定向细胞壁组装中起重要作用。

2.2 FtsW的功能

FtsW是细菌细胞分裂过程中必需的SEDS蛋白,在大多数具有细胞壁细菌中是保守的^[37]。在*B. subtilis*中FtsW是孢子形成不对称隔膜的必需蛋白^[38],在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中FtsW对分裂体的定位十分重要^[39]。1994年,MATSUHASHI等^[40]根据蛋白的跨膜区特点和对PG合成的影响,推测FtsW可能为Lipid II翻转酶,但该假设一直没有得到证实。直到2011年,MOHAMMADI等^[41]开发了一种基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法,通过研究膜锚定前体Lipid II在囊泡中的易位,首次通过体外实验证明了纯化的FtsW可以参与Lipid II的翻转,并由此推测SEDS家族蛋白(包括RodA、FtsW和SpoVE)为翻转酶。然而,SHAM等^[42]的体内研究表明,当RodA和FtsW均无活性时,Lipid II仍然可以从细胞质膜的内侧向外侧转移,由此判断SEDS蛋白不是PG合成的唯一Lipid II翻转酶。

为了进一步研究FtsW的翻转活性,OVCHINNIKOV等^[25]利用分子模拟的手段对FtsW的结构进行了预测,认为残基R145和K153与翻转活性有关。基于FtsW在体外与Lipid II和PBP3的相互作用,2017年,LECLERCQ等^[31]提出了关于Lipid II的翻转调控假设,当PBP3不存在时,Lipid II结合到FtsW的孔中并易位,但无法释放;PBP3存在时,它可与FtsW相互作用诱导FtsW的构象变化,从而释放Lipid II。2018

年,BOLLA等^[43]通过质谱表征翻转酶与Lipid II的结合水平,结果发现,FtsW与Lipid II的结合比另一个翻转酶MurJ与Lipid II的结合要弱。LIU等^[44]通过MurJ荧光蛋白融合体的可视化实验揭示了,MurJ在翻转过程中的定位需要依赖FtsW的活性。这些证据直接或间接地表明FtsW参与Lipid II的翻转。

此外,由于FtsW与RodA的序列同源性和拓扑等价性,人们推测它们在细菌细胞中可能具有相似的功能^[45]。OVCHINNIKOV等^[25]预测FtsW的跨膜结构与STT3相似,而STT3可将寡糖从脂质连接的前体转移到新生的糖蛋白上,因此推测FtsW也具有糖基转移酶功能。在体外实验中,FtsW对aPBP1b的糖基转移作用进行负调控^[31],同时*B. subtilis* $\Delta 4$ 突变体存在胞质分裂现象^[10],这些均从侧面证实了FtsW在细胞分裂过程中具有催化活性。2019年,TAGUCHI等^[14]将纯化的FtsW与Lipid II、bPBP和二价阳离子共同孵育,结果检测到PG聚合物的存在,因此证明了FtsW为糖基转移酶。

在分裂体的PG生物合成过程中,FtsW与bPBPs形成复合物,分别发挥聚合酶和交联酶活性^[11]。已有免疫共沉淀^[46]和双杂交实验^[47-48]证实了FtsW与PBP3的结合。2019年,TAGUCHI等^[14]报道了FtsW为PG聚合酶,与bPBPs协同作用在分裂过程中产生隔膜PG,FtsW的聚合酶活性取决于其募集到隔膜的bPBPs的存在。BOES等^[49]通过共表达证实了PBP1b、PBP3和FtsW形成PG合酶亚复合体,FtsBLQ和FtsN分别通过拮抗和激活作用调节该复合体的活性^[50],实现精确而平衡的细胞分裂过程。REICHMANN等^[51]通过活性位点突变和荧光寿命显微成像(fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)-FRET技术证明了,FtsW-PBP1对于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细胞活力至关重要,是分裂位点向内PG合成所必需的。

为了确定聚糖链的延伸方向,WELSH等^[52]将*S. aureus* FtsW-PBP1复合物、Gal*-Lipid II(用¹⁴C放射性标记的半乳糖将脂质非还原端封住,得到仅能作为糖基供体的Lipid II变体)和Lipid II共同孵育,用PAGE放射自显影法区分脂质单体在还原端还是非还原端添加。随后为了进一步确定聚合所需的最小脂质长度,他们将不同长度的Gal*-Lipid II变体与FtsW-PBP1、Lipid II孵育,经酶促反应去除脂质链后利用LC-MS分析反应产物^[52]。结果表明,SEDS蛋

白通过在聚糖链的还原端添加新的Lipid II单体来合成PG, 并且FtsW在供体和受体中具有不同的底物结合要求, 受体位点可以耐受较短的脂质, 而供体部位需要更长的脂质(至少含有30个碳原子)。

2.3 SpoVE的功能

B. subtilis *spoVE*基因是细胞生长的非必需基因, 但对孢子皮质PG的合成至关重要。孢子形成始于不对称分裂, 产生较小的前孢子和较大的母细胞。发育后期, 在母细胞指导下两个前孢子膜之间合成皮质PG层。SpoVE是*B. subtilis* SEDS家族成员, 是形成孢子皮层所必需的, 对孢子脱水、休眠和耐热性至关重要^[45,53]。孢子形成过程中SpoVE的表达由 σ E相关的RNA聚合酶控制^[54], *spoVE*突变会阻止皮质PG的合成, 并引起脂质前体的积累^[55]。内生孢子可以在极端高温和干燥条件下生存, 主要是由于存在孢子皮质PG, 敲除*spoVE*的*B. subtilis*突变体会出现孢子耐热性的损失^[56]。

孢子发育后期, 在前孢子外膜表面会组装形成保护性的蛋白外壳。SafA蛋白是内层组装的关键因素, 控制着母细胞表达的其他膜蛋白在外壳的定位。作为皮质PG合成所需的糖基转移酶, SpoVE的活性会影响SafA的定位^[8]。REAL等^[56]通过延时显微镜观察功能性SpoVE-GFP融合体在单个*B. subtilis*孢子形成过程中的分布, 发现SpoVE的定位模式与吞噬前孢子的膜动态密切匹配。SpoVE、SpoVD(一种bPBPs)和SpoVB(MurJ同系物)分别具有合成细胞壁所需的糖基转移酶、转肽酶、翻转酶活性, 可构成最简单的PG组装机[10,55]。FAY等^[57]利用免疫共沉淀和FRET证明了SpoVE与SpoVD的相互作用是直接的, SpoVD在前孢子膜的定位取决于SpoVE, 并且SpoVD可保护SpoVE不被胞内蛋白水解。他们构建的SpoVE-SpoVD融合蛋白中任一部分点突变都会阻止孢子皮层的生成, 表明SpoVE与SpoVD的相互作用与PG合成功能相关^[57]。

3 SEDS蛋白的应用

SEDS蛋白具有广泛性和保守性, 可以作为抗生素开发的普适性靶标, SEDS蛋白与其他蛋白的协调作用也为如何应对细菌耐药性提供了新的解决思路。人类病原体单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)通常用高剂量的 β -内酰胺抗生素与庆大霉素联用治疗。但是, 这种方法对于免疫系统

受损的个体并不适用, 会造成严重的细菌感染甚至危及生命, 因此开发治疗*L. monocytogenes*感染的新药物十分必要。2019年, RISMUNDO等^[48]发现*L. monocytogenes* SEDS缺失突变体对 β -内酰胺抗生素和莫诺霉素的敏感性增加。以莫诺霉素为例, 突变体的抗药性降低了4倍。因此, 研究抑制FtsW和RodA活性的抗菌剂有助于治疗*L. monocytogenes*感染, 降低死亡率。

此外, 以SEDS为作用靶标的抗菌活性物质的筛选仍在进行中。2017年, EMAMI等^[30]对2 387种放线菌(*Actinomyces bovis*)的提取物进行化学遗传筛选, 得到命名为654/A的活性分子, 它对*B. subtilis*和*B. subtilis* aPBPs全敲除菌株具有抗生素活性, 且对后者的抑制作用明显大于前者。在*S. aureus*中654/A具有同样的效果。莫诺霉素和654/A分别对aPBPs和SEDS有抑制作用, 两者共同使用能够对菌株造成严重的杀伤作用, 有望在临床的抗菌组合疗法中产生不错的效果。

4 问题与展望

根据近些年对SEDS蛋白结构和功能的研究报道, 我们对细菌细胞壁的合成有了更深刻的理解, 荧光D-氨基酸(fluorescent D-amino acid, FDAA)探针等化学工具的开发也有助于了解细胞壁装配和修饰酶在体内的作用^[58]。但SEDS蛋白的晶体结构目前尚未得到解析, 关于其与底物的结合模式仍知之甚少, 限制了我们对其作用机理的深入探讨。另外, Rod复合物如何定义PG合成的起始位点, aPBPs如何识别推定的Rod模板, aPBPs和SEDS/bPBPs如何协同发挥作用, SEDS蛋白在体内的翻转酶活性如何等问题, 仍需进一步深入研究。RodA和FtsW高度保守, 且与PBP相比在细菌中更为常见, 因此很有可能成为未来最重要的广谱靶标。SEDS蛋白结构中多个跨膜区的存在和向外开口的构象特点, 使得药物可以直接在细胞质膜外部与蛋白结合, 为我们设计开发靶向药物提供了有利条件。此外, 具有抑制RodA活性的新型抗菌物质的发现也为抗生素的设计提供了良好的开端^[30]。由于针对单个致死蛋白的抑制剂很容易出现细菌抗药性的问题, SEDS蛋白与其他蛋白的协同作用和生物学联系为联合抗菌疗法提供了新思路, 对设计治疗细菌感染的多药组合具有深远意义。

参考文献 (References)

- [1] STRAUME D, STAMSÅS G A, BERG K H, et al. Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b) [J]. *Mol Microbiol*, 2017, 103(1): 99-116.
- [2] HENRIQUES A O, GLASER P, PIGGOT P J, et al. Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis* [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 28(2): 235-47.
- [3] ARORA D, CHAWLA Y, MALAKAR B, et al. The transpeptidase PbpA and noncanonical transglycosylase RodA of *Mycobacterium tuberculosis* play important roles in regulating bacterial cell lengths [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(17): 6497-516.
- [4] THIBESSARD A, FERNANDEZ A, GINTZ B, et al. The proteins RodA and PBP2b are implicated in the control of the ovoid-shape of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 and play a role in cells defence against superoxide radicals [J]. *Sci Aliment*, 2017, 22(1/2): 75-85.
- [5] GAMBA P, HAMOEN L W, DANIEL R A. Cooperative recruitment of FtsW to the division site of *Bacillus subtilis* [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1808.
- [6] DATTA P, DASGUPTA A, SINGH A K, et al. Interaction between FtsW and penicillin-binding protein 3 (PBP3) directs PBP3 to mid-cell, controls cell septation and mediates the formation of a trimeric complex involving FtsZ, FtsW and PBP3 in mycobacteria [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 62(6): 1655-73.
- [7] MODELL J W, HOPKINS A C, LAUB M T. A DNA damage checkpoint in *Caulobacter crescentus* inhibits cell division through a direct interaction with FtsW [J]. *Gene Dev*, 2011, 25(12): 1328-43.
- [8] PEREIRA F C, NUNES F, CRUZ F, et al. A LysM domain intervenes in sequential protein-protein and protein-peptidoglycan interactions important for spore coat assembly in *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 2018, 201(4): e00642.
- [9] 曲宁. 转录因子SigmaK和GerE对芽胞外壁组成基因的表达调控[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [10] MEESKE A J, RILEY E P, ROBINS W P, et al. SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases [J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 634-8.
- [11] CHO H, WIVAGG C N, KAPOOR M, et al. Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(10): 16172.
- [12] 陈尔曼, 邓宗云, 郭慧芝, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌ftsW基因的克隆和分析[J]. 畜牧兽医科技信息(CHEN E M, DENG Z Y, GUO H Z, et al. The cloning and analysis of *ftsW* gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*), 2018, (9): 32-34.
- [13] 郑辉, 王华林, 李娜, 等. 结核分枝杆菌RodA蛋白结构特征的生物信息学分析[J]. 武汉轻工大学学报(ZHENG H, WANG H L, LI N, et al. Bioinformatics analysis of physicochemical properties and structural characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* RodA [J]. *Journal of Wuhan Polytechnic University*), 2019, 38(4): 17-21.
- [14] TAGUCHI A, WELSH M A, MARMONT L S, et al. FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4: 587-94.
- [15] HENRICHFREISE B, BRUNKE M, VIOLLIER P H. Bacterial surfaces: the wall that SEDS built [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(21): 1158-60.
- [16] EVANS D A, BARROW J C, WATSON P S, et al. Approaches to the synthesis of the vancomycin antibiotics. synthesis of orienticin C (bis-dechlorovancomycin) aglycon [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119(14): 3419-20.
- [17] WIEDEMANN I, BOTTIGER T, BONELLI R R, et al. Lipid II-based antimicrobial activity of the lantibiotic plantaricin C [J]. *Appl Environ Micro*, 2006, 72(4): 2809-14.
- [18] JACOBY G A. AmpC beta-lactamases [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(1): 161-82.
- [19] HELAL A M, SAYED A M, OMARA M, et al. Peptidoglycan pathways: there are still more [J]. *Rsc Adv*, 2019, 9(48): 28171-85.
- [20] JORGENSEN M A, MACCAIN W J, MEBERG B M, et al. Simultaneously inhibiting undecaprenyl phosphate production and peptidoglycan synthases promotes rapid lysis in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2019, 112(1): 233-48.
- [21] LIN T, GROSS W S, AUER G K, et al. Cardiolipin alters *Rhodospirillum rubrum* cell shape by affecting peptidoglycan precursor biosynthesis [J]. *Mbio*, 2019, 10(1): e2401-18.
- [22] FLORES-MIRELES A L. Msphere of influence: uncovering new ways to control multidrug resistance by dissecting essential cell processes [J]. *Msphere*, 2019, 4(5): e00648-19.
- [23] BIRD L E, RADA H, VERMA A, et al. Green fluorescent protein-based expression screening of membrane proteins in *Escherichia coli* [J]. *J Vis Exp*, 2015, (95): e52357.
- [24] SJODT M, BROCK K, DOBIHAL G, et al. Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis [J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 118-21.
- [25] OVCHINNIKOV S, KINCH L, PARK H, et al. Large-scale determination of previously unsolved protein structures using evolutionary information [J]. *Elife*, 2015, 3(4): e09248.
- [26] KIESER K J, RUBIN E J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(8): 550-62.
- [27] SAUVAGE E, KERFF F, TERRAK M, et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis [J]. *Fems Microbiol Rev*, 2008, 32(3): 234-58.
- [28] MCPHERSON D C, POPHAM D L. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(4): 1423-31.
- [29] RICE L B, CARIAS L L, SUSAN R, et al. Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium* [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(11): 3649.
- [30] EMAMI K, GUYET A, KAWAI Y, et al. RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2(3): 16253.
- [31] LECLERCQ S, DEROUAUX A, OLATUNJI S, et al. Interplay between penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis [J]. *Sci Rep-uk*, 2017, 7(1): 43306.
- [32] BANZHAF M, SAPAROE A B V D B V, TERRAK M, et al. Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation [J]. *Mol Microbiol*, 2012, 85(1): 179-94.
- [33] ZHAO H, PATEL V, HELMANN J D, et al. Don't let sleeping dogmas lie: new views of peptidoglycan synthesis and its regula-

- tion [J]. *Mol Microbiol*, 2017, 106(6): 847-60.
- [34] CHO H, UEHARA T, BERNHARDT T G. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery [J]. *Cell*, 2014, 159(6): 1300-11.
- [35] UEHARA T, PARK J T. Growth of *Escherichia coli*: significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(11): 3914-22.
- [36] ROHS P D A, BUSS J, SIM S I, et al. A central role for PBP2 in the activation of peptidoglycan polymerization by the bacterial cell elongation machinery [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(10): e1007726.
- [37] KHATTAR M M, BEGG K J, DONACHIE W D. Identification of FtsW and characterization of a new *ftsW* division mutant of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(23): 7140-47.
- [38] GAMBA P, VEENING J W, SAUNDERS N J, et al. Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(13): 4186-94.
- [39] NOIRCLERC-SAVOYE M, LANTEZ V, SIGNOR L, et al. Reconstitution of membrane protein complexes involved in pneumococcal septal cell wall assembly [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75522.
- [40] MATSUHASHI M. Chapter 4 utilization of lipid-linked precursors and the formation of peptidoglycan in the process of cell growth and division: membrane enzymes involved in the final steps of peptidoglycan synthesis and the mechanism of their regulation [M]. *New Compr Biochem*, 1994, 27: 55-71.
- [41] MOHAMMADI T, VAN DAM V, SIJBRANDI R, et al. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane [J]. *Embo J*, 2011, 30(8): 1425-32.
- [42] SHAM L T, BUTLER E K, LEBAR M D, et al. Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis [J]. *Science*, 2014, 345(6193): 220-2.
- [43] BOLLA J R, SAUER J B, WU D, et al. Direct observation of the influence of cardiolipin and antibiotics on lipid II binding to MurJ [J]. *Nat Chem*, 2018, 10(3): 363-71.
- [44] LIU X, MEIRESONNE N Y, BOUHSS A, et al. FtsW activity and lipid II synthesis are required for recruitment of MurJ to mid-cell during cell division in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2018, 109(6): 855-84.
- [45] IKEDA M, SATO T, WACHI M, et al. Structural similarity among *Escherichia coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively [J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(11): 6375-8.
- [46] GOUZEL K, NATHALIE D, DANIEL L. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(7): 2233-43.
- [47] FRAIPONT C, ALEXEEVA S, WOLF B, et al. The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli* [J]. *Microbiology*, 2010, 157(1): 251-9.
- [48] RISMONDO J, HALBEDEL S, GRÜNDLING A. Cell shape and antibiotic resistance are maintained by the activity of multiple FtsW and RodA enzymes in *Listeria monocytogenes* [J]. *Mbio*, 2019, 10(4): e01448-19.
- [49] BOES A, OLATUNJI S, BREUKINK E, et al. Regulation of the peptidoglycan polymerase activity of PBP1b by antagonist actions of the core divisome proteins FtsBLQ and FtsN [J]. *Mbio*, 2019, 10(1): e1912-8.
- [50] DEN BLAAUWEN T, LUIRINK J. Checks and balances in bacterial cell division [J]. *Mbio*, 2019, 10(1): e119-49.
- [51] REICHMANN N T, TAVARES A C, SARAIVA B M, et al. SEDS-bPBP pairs direct lateral and septal peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus* [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(8): 1368-77.
- [52] WELSH M A, SCHAEFER K, TAGUCHI A, et al. Direction of chain growth and substrate preferences of shape, elongation, division, and sporulation-family peptidoglycan glycosyltransferases [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 12994-7.
- [53] JORIS B, DIVE G, HENRIQUES A, et al. The life-cycle proteins RodA of *Escherichia coli* and SpoVE of *Bacillus subtilis* have very similar primary structures [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 4(3): 513-7.
- [54] MIYAO A, THEERAGOOL G, TAKEUCHI M, et al. *Bacillus subtilis* *spoVE* gene is transcribed by sigma E-associated RNA polymerase [J]. *J Bacteriol*, 1993, 175(13): 4081-6.
- [55] PRADEEP V, AMY W, REICHERT E D, et al. Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 65(6): 1582-94.
- [56] REAL G, FAY A, ELDAR A, et al. Determinants for the subcellular localization and function of a nonessential SEDS protein [J]. *J Bacteriol*, 2007, 190(1): 363-76.
- [57] FAY A, MEYER P, DWORKIN J. Interactions between late-acting proteins required for peptidoglycan synthesis during sporulation [J]. *J Mol Biol*, 2010, 399(4): 547-61.
- [58] TAGUCHI A, KAHNE D, WALKER S. Chemical tools to characterize peptidoglycan synthases [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 53: 44-50.