

肺炎链球菌CcrZ蛋白在细胞周期调控中的作用

沈崇杰[#] 王晓洁[#] 范丽菲 莫日根^{*}

(内蒙古大学生命科学学院, 省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 呼和浩特 010020)

摘要 为了维持基因组稳定性, 细胞在增殖过程中不仅需要对细胞周期各事件(DNA复制、DNA分离和细胞分裂)进行单独调控, 还要将这些事件彼此协调起来。在细菌中, DNA复制起始和细胞分裂分别由复制起始蛋白DnaA和细胞分裂体(divisome)蛋白FtsZ负责, 然而这两个过程的协调机制少有报道。最近在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中发现一种细胞周期时空调节子CcrZ, 其具有三个功能: (1) 激活DnaA依赖的复制起始; (2) 参与后期细胞分裂体的组装; (3) 通过将Z环(Z-ring)适时定位在细胞中央以使DNA复制和细胞分裂相协调。基于CcrZ的结构和保守性, 该文综述了以CcrZ为代表的多种蛋白调控DNA复制起始、Z环组装和定位的机制, 并展望了多细胞周期事件协调子在相关领域的应用前景。

关键词 CcrZ; CcrZ-FtsZ互作; DnaA激活; DNA复制; 细胞分裂; 细胞周期调控

The Role of CcrZ Protein of *Streptococcus pneumoniae* in Cell Cycle Regulation

SHEN Chongjie[#], WANG Xiaojie[#], FAN Lifei, Morigen^{*}

(State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grassland Livestock, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010020, China)

Abstract To maintain genomic stability, cells not only need to regulate cell cycle events (DNA replication, DNA segregation, and cell division) during proliferation respectively, they also need to coordinate these events with each other. In bacteria, DNA replication initiation and cell division are responsible for the replication initiation protein DnaA and the cell division divisome protein FtsZ, respectively. However, the mechanism of coordination of these two processes is rarely reported. A cell cycle spatiotemporal regulator CcrZ was recently discovered in *Streptococcus pneumoniae*, which has three functions: (1) CcrZ activates DnaA-dependent replication initiation; (2) CcrZ participates in the late-stage assembly of cell divisome; (3) CcrZ coordinates DNA replication and cell division by positioning the Z-ring at the midcell. Based on the structure and conservation of CcrZ, this paper reviews the mechanisms of various proteins represented by CcrZ in regulating DNA replication initiation, Z-ring assembly and Z-ring localization. It also prospects the application of coordinators of multiple cell cycle events in related fields.

Keywords CcrZ; CcrZ-FtsZ interaction; DnaA activation; DNA replication; cell division; cell cycle regulation

细胞周期(cell cycle)是细胞复制其内容物和分离的一连串的复杂的事件^[1], 拥有G₁、S、G₂、M等明显不同的几个阶段。在真核细胞中, 细胞周期的

有序进程依赖于由细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)组成的生化引擎^[2]。Cyclin-CDK复合物的周期性活

收稿日期: 2022-06-03 接受日期: 2022-07-25

国家自然科学基金(批准号: 32060016)资助的课题

[#]共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0471-4992435, E-mail: morigenm@hotmail.com

Received: June 3, 2022 Accepted: July 25, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32060016)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-471-4992435, E-mail: morigenm@hotmail.com

性调节细胞周期转换,例如DNA复制的启动或有丝分裂的进入^[2]。此外,特定的检查点(checkpoint)机制在不同阶段动态检测着细胞周期,以确保在早期事件完成之前不会发生晚期事件^[3]。

与真核生物不同,细菌细胞周期有明显两个阶段:染色体复制期C,从起始复制到终止所需的时间;细胞分裂期D,从复制结束到随后细胞分裂完成所需要的时间^[4]。细胞周期是个严格调控的过程,例如控制DNA复制起始和细胞分裂的机制或在DNA损伤或复制停滞的情况下抑制分裂的SOS反应。然而,这些不同的机制是如何组织和协调以确保细胞周期有序进行的仍有待在分子水平上揭示^[5]。

染色体复制起始在同一个细胞周期中仅发生一次^[6]。复制起始蛋白DnaA在复制起始过程中起关键作用,是个正向调控因子^[6]。DnaA蛋白有ATP-DnaA和ADP-DnaA两种存在方式,ATP-DnaA具有复制活性而ADP-DnaA不具备这样的活性^[7]。ATP-DnaA蛋白通过结合复制起始点来引发复制的启动,其以高度调控的方式在复制原点(*oriC*)聚集并通过形成DnaA-*oriC*复合体进而将*oriC*处的双链部分解旋^[8]而启动染色体复制。作为复制起始负调控反馈,有分子机制确保在同一个细胞周期中复制起始只发生一次:(1)在染色体复制过程中,由Hda蛋白介导的ATP-DnaA的水解失活,被称为RIDA;(2)由SeqA蛋白介导的*oriC*暂时隔绝(sequestration);(3)DnaA对*datA*序列的高亲和性结合^[5,7,9]。

细菌细胞分裂的机制是基于丝状温度敏感蛋白Z(filamentous temperature-sensitive protein Z, FtsZ)聚合成保守的Z环结构^[10]。FtsZ是细菌细胞分裂的关键调节因子,其主要作用是:作为支架来促进分裂机器的组装,产生可引导细胞包膜内陷的收缩力,并调节肽聚糖(peptidoglycan, PG)的代谢^[11]。细胞分裂蛋白需要与染色体进行时间和空间上的协调,以确保每个子细胞接收一份完整的染色体^[12]。这种协调主要是通过调节FtsZ在细胞中的定位来实现的。研究较多的Z环(Z-ring)定位系统是在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的类核封闭(nucleoid occlusion, NO)系统和Min系统。这两个系统分别负调控类核和细胞极的Z环形成,以确保细胞分裂发生在细胞赤道位置^[13]。

肺炎链球菌(肺炎球菌)是一种人类呼吸道疾病的病原体,是引起细菌性肺炎的主要原因^[14]。而

细菌的存活与增殖与其细胞周期紧密相关。因此,对于其细胞周期调控的研究就显得尤为重要。与大肠杆菌相比,肺炎链球菌缺乏NO和Min等调控系统,其通过利用一种细胞周期时空调节因子CcrZ激活DNA复制及组装Z环,并将DNA复制和细胞分裂协调起来^[15]。本文从CcrZ的一级结构出发,对CcrZ高级结构、CcrZ-FtsZ相互作用进行预测,综述了以CcrZ为代表的多种蛋白调控DnaA依赖的DNA复制起始、Z环组装和定位的机制并给出MapZ-CcrZ联合调控DNA复制和细胞分裂的模型,并且展望了CcrZ等多细胞周期事件协调子在靶向治疗与合成生物学的应用前景。

1 CcrZ蛋白的结构和保守性

1.1 CcrZ蛋白的结构

CcrZ蛋白首先在肺炎链球菌中被发现,由264个20种不同的氨基酸组成,其中Leu(11.4%)占比最高,Cys(0.8%)占比最低。其分子量为31.1 kDa,等电点(pI)为8.9,不稳定性指数为48.77,脂肪指数为82.73,总平均亲水性为-0.57^[16]。我们对CcrZ的高级结构进行预测^[17-19](图1和图2),推定其含有一个单一氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferase, APH)家族结构域,由氨基酸残基Pro39~Tyr225构成。CcrZ还被推测具有保守的P环、Brenner's基序[HXDhX3N](CcrZ H157~N164)和APH基序。其中,P环由1个无规则卷曲(Gly15~Lys19)组成;Brenner's基序由1个 β 折叠(Val156~His157)和1个无规则卷曲(Gly158~Asn164)组成;APH基序由1个 β 折叠(Ile173~Asp177)、1个无规则卷曲(Trp178~Asp185)和1个 α 螺旋(Arg186~His196)组成。Meta-Disorder预测出了CcrZ两侧的无序区域(Met1~Leu3和Arg257~Arg263)^[20]。我们在UCLA-DOE的SAVES服务器检验预测结果如下。用于检测蛋白质结构立体化学质量的PROCHECK显示87.1%的氨基酸落在拉氏图(Ramachandran plot)的“最适区”,0.9%的氨基酸落在“不被允许区”^[21],说明蛋白质构象合理。用于检查氨基酸残基立体化学参数的WHATCHECK也通过了87.5%的指标^[22],说明所预测蛋白结构正常。得注意的是,CcrZ整体的三维结构与肺炎链球菌中的LicA胆碱激酶相似。该结构形状上为银杏叶状,在N-端“叶片”和C-端“叶片”中间有一个裂缝,这个裂缝比LicA激酶N-端叶和C-端叶之间的裂口更宽,

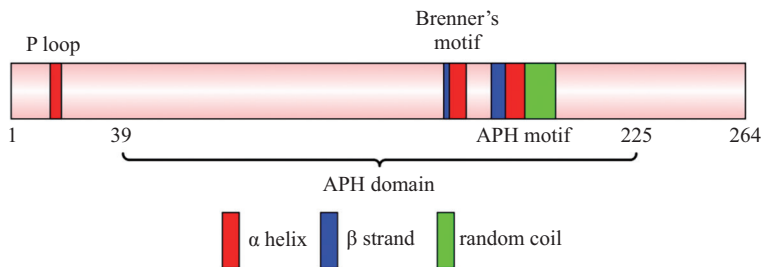
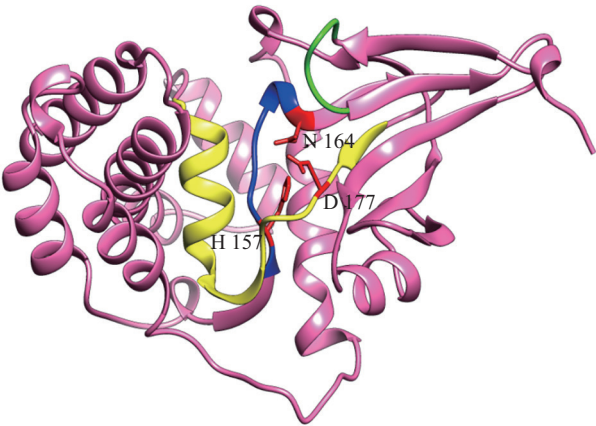


图1 CcrZ结构示意图(根据参考文献[17-18]修改)

Fig.1 Schematic representation of CcrZ structure (modified from references [17-18])



绿色部分: P环; 蓝色部分: Brenner's基序; 黄色部分: APH基序; 红色部分: CcrZ三个功能依赖性的保守氨基酸, 在这里特别表示成棍棒结构。
Green section: P-loop; blue section: Brenner's motif; yellow section: APH motif; red section: three function-dependent conserved amino acids of CcrZ, specifically expressed as a stick structure here.

图2 CcrZ三级结构预测(根据参考文献[19]修改)

Fig.2 The prediction of CcrZ's tertiary structure (modified from reference [19])

推测其在结合底物和ATP中发挥功能, 并且可以结合更多略大的分子。

1.2 CcrZ在进化上保守

除肺炎链球菌外, 在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) SH1000和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168中也发现 *ccrZ*同源物(SAOUHSC_01866和 *ytmP*), 且它们编码的蛋白功能与CcrZ相似^[23]。为了探讨 *ccrZ*在各细菌中的同源性, GALLAY等^[24]利用PSI-BLAST对大多数厚壁菌门中的 *ccrZ*(或其同源物)基因的序列进行比对。分析结果表明, 在肠球菌科(*Enterococcaceae*)(39%)、梭菌纲(*Clostridia*)(38%)、乳杆菌科(*Lactobacillaceae*)(36%)、肉杆菌科(*Carnobacteriaceae*)(36%)、气球菌科(*Aerococcaceae*)(34%)、组织菌科(*Tissierellia*)(33%)、芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)(33%)、葡萄球菌科(*Staphylococcaceae*)(31%)中同一性(identity)大于30%, 在革兰阴性菌纲(*Negativicutes*)、丹毒丝菌纲(*Erysipelotrichia*)、

明串珠菌科(*Leuconostocaceae*)中也各有30%、29%、24%的同一性。Gene Neighborhoods分析也揭示在葡萄球菌科、乳杆菌科、肠球菌科、肉杆菌科、气球菌科、链球菌科(*Streptococcaceae*)、李斯特氏菌科(*Listeriaceae*)、芽孢乳杆菌科(*Sporolactobacillaceae*)、地微杆菌属(*Geomicrobium*)中 *ccrZ*与一个编码tRNA甲基转移酶的 *trmB*基因相邻近^[25]。特别地, 在芽孢杆菌科、链球菌科、乳杆菌科、肠球菌科、肉杆菌科中都发现一个含有EcsB结构域的基因与 *ccrZ*邻近^[25]。这些结果说明, CcrZ在大多数厚壁菌门中是结构保守的。

CcrZ含有五种同时在胆碱激酶LicA和厚壁菌门(*Firmicutes*)中保守的残基, 其中 Asp159、Asn164和 Asp177在超过95%蛋白中保守, His157和 Asp189在超过80%的蛋白中保守, 且这五种保守的残基都在空间上邻近于胆碱激酶-磷酸腺苷复合物中的磷酸腺苷(AMP)^[24]。Asn164、Asp177与AMP的部分

α -磷酸相互作用, Asp159对胆碱的部分羟基的氢键的形成至关重要^[26]。CcrZ不具有胆碱结合所必需的胆碱和乙醇胺激酶特异性的保守疏水残基,但在相应位置有一些极性氨基酸^[24]。针对于CcrZ中这5个保守的残基进行突变分析^[24],结果说明至少His157、Asn164和Asp177对于肺炎链球菌中CcrZ的功能是极其重要的(图2);而Asp159和Asp189的突变不会导致生长缺陷,说明其对CcrZ的功能是非必要的。

2 CcrZ与DnaA域I、III互作激活DNA复制起始

DnaA是大多数细菌中染色体复制的起始者。遗传和生化数据已经按照功能将DnaA的结构域分成四部分。域I: 一个招募DnaB的N-端分子,含有3个 α 螺旋和3个 β 折叠,其与多种蛋白质相互作用^[27];域II: 一个灵活的连接器,使域I和域III相互间的旋转变得自由,并在两域之间创造可变的距离^[28];域III: 具有AAA+蛋白超家族的典型基序,包括Walker型ATP结合基序,该基序的功能是识别和水解ATP,并且作为与其他蛋白质相互作用的位点^[29];域IV: 一个C-端DNA结合结构域,包含一个螺旋-转角-螺旋基序以用于特异性识别oriC处的DNA盒^[30]。

DnaA与其调控子的研究主要集中在枯草芽孢杆菌中。WOZNIAK等^[31]最近在枯草芽孢杆菌中发现,CcrZ通过与DnaA的域I和域III以及DnaB的相互作用来激活DNA复制起始,这种相互作用有助于CcrZ定位到oriC处。CcrZ通过磷酸化一个小分子,该小分子作为代谢物或第二信使向DnaA、DnaB发出信号,从而确保复制在恰当的时间被起始^[24,31]。DNA复制起始在枯草芽孢杆菌中由四聚体蛋白YabA负向调节,该蛋白质通过与DnaA的域III结合来抑制DnaA与oriC的协同结合,同时这种结合使得YabA竞争性抑制DnaD与DnaA的相互作用,从而抑制复制过度启动^[32]。同样枯草芽孢杆菌中报道的一种DnaA负调控子,也叫孢子形成诱导蛋白SirA,其维持着孢子发育过程中两条染色体上基因组拷贝数^[33]。SirA通过与DnaA域I上的一个位点结合来与DnaA相互作用,从而破坏DnaA在oriC处的定位,最终阻止复制过度起始^[32]。此外,在枯草芽孢杆菌中还报道了一种DNA复制调节剂Soj/ParA,其定位和DNA复制起始的调节依赖于DNA复制起始蛋白DnaA^[7,34]。Soj通过直接与DnaA的域IIIB(或连接域IIIB和IV的区

域)相互作用来调控DnaA螺旋的装配^[35]。作为控制DnaA活性的分子开关,Soj对立的调节活性由其存在形式决定: 当其为单体时,特异性抑制DnaA寡聚体的形成来阻止DNA复制起始;当其二聚化后,便成为DnaA的激活剂并刺激DnaA螺旋的形成,这与其增加DNA复制起始频率的能力一致^[7]。

在大肠杆菌中,同型四聚体DiaA是染色体复制起始的正调控子,其每一个亚基都有一个和DnaA域I作用的结合位点^[36]。DiaA同时结合多个DnaA分子,从而刺激oriC内ADLAS上DnaA分子的协同结合^[37]。这种协同结合所基于的原理是一种连接效应,即当两个DnaA分子中的一个通过DiaA与DNA结合时,另一个分子的自由扩散受到物理连接的抑制,从而导致对DNA的整体亲和力增加^[38]。因此,DnaA的域I与域III在不同细菌的DnaA与其调控蛋白结合中发挥了重要的作用。在枯草芽孢杆菌中,同时发现多种蛋白与DnaA的域I或域III相互作用,说明其存在于一个调控途径或网络。这些调控子彼此之间的关联值得进一步探索。

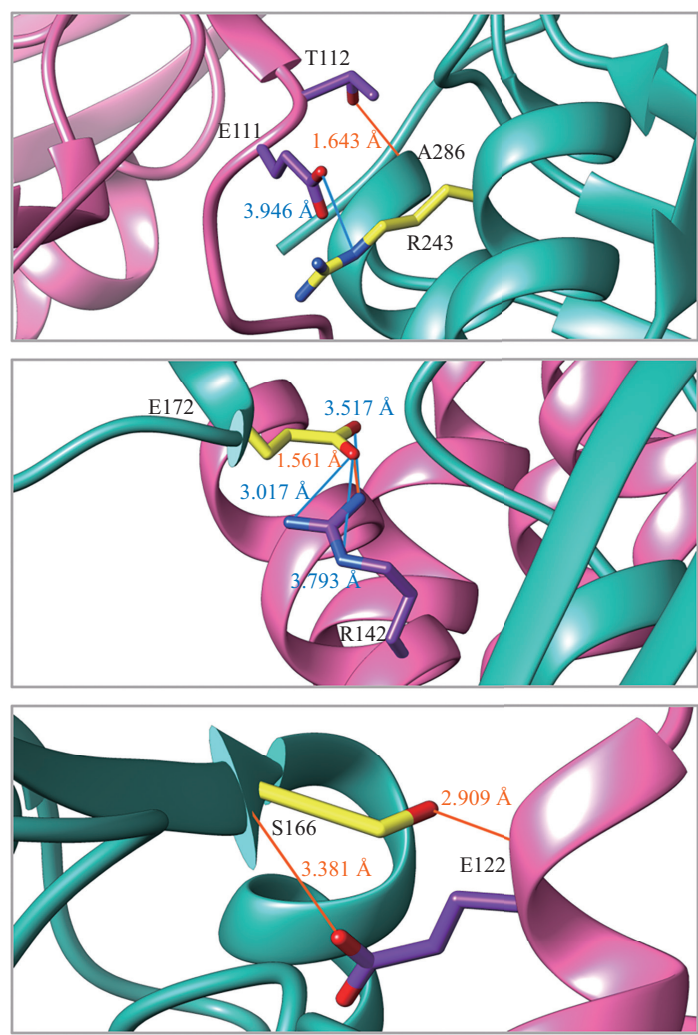
3 CcrZ是肺炎链球菌细胞分裂体组成部分

细菌胞质分裂由分裂体介导,分裂体是一种多蛋白复合物,在细胞中央附近组装并驱动内膜(inner membrane, IM)的内陷、肽聚糖细胞壁的合成与重塑、革兰氏阴性菌外膜(outer membrane, OM)的内陷^[39]。在不同细菌中,参与细胞分裂体组装的蛋白有很大不同。已经有十多种蛋白质被确定为肺炎链球菌分裂体的组成部分,它们通过特定的顺序进行组装,并通过彼此协调高效地完成细胞分裂^[40](图4)。CcrZ通过与FtsZ等分裂蛋白相互作用参与后期分裂体的装配,并且将复制起始与分裂环的形成偶联起来^[38]。

3.1 CcrZ与FtsZ的相互作用

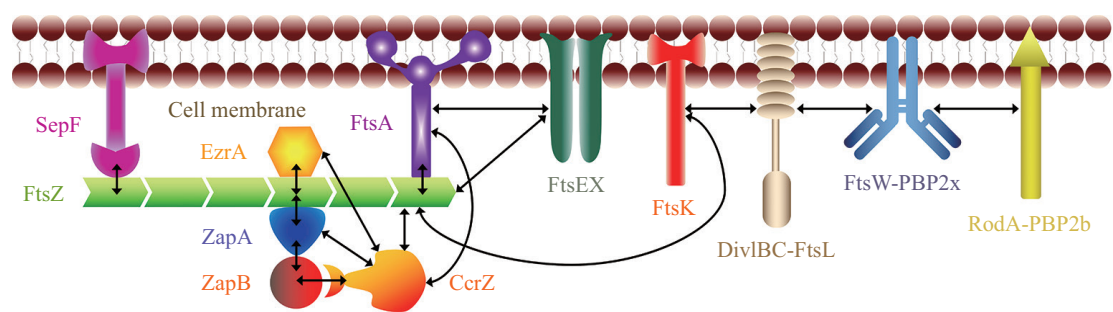
FtsZ是真核生物微管蛋白的同源物,也是第一个被招募到细胞中央分裂位点的分裂体蛋白^[41]。FtsZ单体在细胞中央以头对尾的方式形成短的原丝,并通过GTP依赖的快速聚合和解聚绕细胞的短轴做圆周运动,进而聚合成动态变化的Z环,作为整个分裂体组装的支架^[42]。在肽聚糖的帮助下,Z环向内收缩,将细胞分成两个子细胞^[43-44]。

CcrZ在隔膜处的定位依赖于和FtsZ的相互作用,一个主要原因是CcrZ不含有跨膜结构域^[45]。CcrZ



红色结构: CcrZ; 绿色结构: FtsZ; 黄线: 氢键; 蓝线: 离子键。
Red structure: CcrZ; green structure: FtsZ; yellow lines: hydrogen bonds; blue lines: ionic bonds.

图3 CcrZ和FtsZ的相互作用预测(方法引自参考文献[49])
Fig.3 The predictive interaction between CcrZ and FtsZ (methods cited from references [49])



在细胞分裂体后期组装的某一阶段, CcrZ通过与FtsZ、FtsA、EzrA、ZapA相互作用移动到细胞分裂位点, 并在那里激活DnaA依赖的复制起始。
各分裂体蛋白间的相互作用在图中用黑色双箭头表示。
At a certain stage of late cell divisome assembly, CcrZ moves to the cell division site through interaction with FtsZ, FtsA, EzrA and ZapA, where it activates DnaA-dependent replication initiation. The interactions between cell divisome proteins are shown in the figure with black double arrows.

图4 CcrZ是肺炎链球菌细胞分裂体的组成部分(根据参考文献[10,40-41,55]修改)
Fig.4 CcrZ is part of the cell divisome in *Streptococcus pneumoniae* (modified from references [10,40-41,55])

和FtsZ间相互作用首先由纳米互补报告检测(NanoBit complementation reporter assay)^[46]和细菌双杂交(bacterial two-hybrid assay)^[47]等实验证明。基于氨基酸序列,我们用PPA-Pred2初步预测了两之间相互作用的结合亲和力,显示结合自由能(ΔG)为 -10.34 kcal/mol,解离常数(K_d)为 2.63×10^{-8} mol/L^[48]。随后,我们通过对接分析对两者的相互作用进行分子水平的预测^[49],一共得到10个对接复合物,并利用PDBePISA对分子对接的结果进行检验(所依据的原理是 ΔG 越低体系越稳定)^[50],筛选出 ΔG 最低(-11.3 kcal/mol)的模型(该数值同时最接近之前的初步预测)。我们对得到的最稳定的CcrZ-FtsZ对接复合物进行分析^[49],结果显示:CcrZ和FtsZ分别在Thr112-OG1与Ala286-O、Arg142-NH2与Glu172-OB1、Glu122-OE1与Ser166-N、Glu122-O与Ser166-OG之间形成氢键,距离分别为1.643、1.561、3.381、2.909 Å;并在Arg142-NE与Glu172-OE1、Arg142-NH1与Glu172-OE1、Arg142-NH2与Glu172-OE2、Glu111-OE2与Arg243-NE之间形成离子键,距离分别为3.793、3.017、3.517、3.946 Å(图3)。CcrZ和FtsZ各有37个氨基酸残基参与了相互作用表面的形成,占各自氨基酸总数的比例分别为8.3%和8.7%,相互作用表面的溶剂可及表面积为1 334.1 Å²和1 253.2 Å²,分别占各自结构总表面积的8.3%和8.7%。有趣的是,CcrZ中央的“裂缝”并没有参与两者的互作,这样的利好在于CcrZ始终与FtsZ以最稳定的方式结合,同时不影响其利用“裂缝”将底物分子磷酸化进而传递信号的功能。

FtsZ含有两个保守结构域:N-端GTP酶区域(FtsZ_{NTD})与C-端GTP酶激活区域(FtsZ_{CTD}),两结构域之间由一个长中心螺旋H7连接^[51-52]。FtsZ_{NTD}含有核苷酸结合位点,可以与另一个FtsZ亚基的FtsZ_{CTD}的GTP水解环T7结合以激活GTP酶活性^[53];FtsZ_{CTD}包含与H7螺旋连接的四链 β 折叠,其一侧被两个螺旋所支撑,另一侧暴露于溶剂中^[54]。FtsZ_{CTD}是介导FtsZ与其他调节分裂、组装和拆卸的辅助蛋白相互作用的关键结构^[54]。根据我们的分析结果,FtsZ_{CTD}的20个氨基酸残基参与形成与CcrZ相互作用的表面,占到FtsZ所有参与相互作用残基数量的54%,表明FtsZ_{CTD}在一定程度上参与了互作。细胞分裂涉及大量的蛋白质结合、互作^[55],分裂体蛋白FtsA、ZipA、SepF、EzrA、ZapA、FtsEX、FtsK和与分裂相关蛋白MapZ、MinC、MciZ、ClpX、YacF、SulA等均与

柔性的FtsZ_{CTD}结合^[54]。因此,FtsZ_{CTD}在FtsZ参与和其他蛋白质相互作用方面发挥着较为重要的作用。然而到目前为止,尚不清楚这些蛋白质是否存在竞争结合,或者在这个有限长度的结构域中是否存在足够的空间来同时结合所有相互作用的蛋白质^[56]。

3.2 CcrZ参与后期分裂体的组装

与已经被报道的多数细菌一样,肺炎链球菌分裂体的组分也是按照一定顺序进行装配的。在组装的早期阶段,FtsA、SepF、EzrA和ZapA被报道参与将FtsZ细丝和束锚定到细胞膜上^[40]。FtsA是肌动蛋白家族的成员,通过直接与内膜的细胞质小叶相互作用,将C-端插入到磷脂双层中^[57]。FtsA和ZipA一起将FtsZ聚合物连接到膜内侧,并且参与细胞膜和Z环的重塑^[58]。FtsA还在协调细胞中央隔膜和外周PG的生长、调节分裂体活性方面发挥关键作用^[57];SepF在几乎所有革兰氏阳性菌中保守,其与FtsA在功能上存在一定重叠^[59]。SepF可以组装成直径约为50 nm的规则蛋白环,在新生的隔膜前缘顶部形成弧形,将FtsZ原丝捆绑成长管结构,从而将FtsZ聚合物平行排列于分裂平面并附着在细胞膜上^[60];EzrA是一种双顶蛋白,其细胞质结构域形成类似收缩蛋白的卷曲螺旋结构^[61]。EzrA血影蛋白样分子的二聚体在细胞质中形成拱形结构,与FtsZ结合并调节束的横向相互作用^[61];Z环相关蛋白ZapA是Zap族蛋白(ZapA~D)的成员,以四聚体的形式与FtsZ原丝交联^[62]。ZapA虽然在肺炎链球菌中不是必需的^[63],但其可以促进FtsZ原丝的形成并平行排列原丝,使其拉直和稳定,从而增加大规模纤维网络的空间有序性和时空持久性^[62,64]。

FtsEX、FtsK、DivIBC-FtsL等蛋白参与了晚期组装^[40]。FtsEX是ABC超家族的成员,其通过FtsE与FtsZ的保守C-端结构域相互作用而被招募^[65]。FtsEX在细胞分裂中有3个重要的作用:一是作用于FtsA以促进下游蛋白质的招募;二是参与隔膜肽聚糖(sPG)合成的激活和调控;三是水解ATP并同时激活酰胺酶来裂解新合成的sPG,促进细胞收缩^[66]。FtsK是一种DNA转位酶,其N-端结构域是细胞分裂所必需的,它将FtsK定位于细胞隔膜并参与分裂机器的组装^[67]。而其C-端结构域是FtsK和其他分裂体蛋白建立重要相互作用所必需的^[67]。FtsK的主要作用是激活用于分解染色体二聚体的XerCD系统并在胞质分裂完成之前将DNA移出分裂位点以及参与细胞质膜和肽聚糖

层的同时收缩的耦合^[67]; DivIBC-FtsL亚复合体在FtsK之后被招募到分裂体,参与PG合酶的调节^[68]。FtsL可能在锌敏感性和膜通透性中发挥功能^[69]。DivIC借助其细胞外卷曲螺旋结构域与FtsL结合,并通过将FtsL由寡聚状态转变为二聚体形式来保护其免受RasP切割^[70]。DivIB通过其中心的 β 结构域与DivIC-FtsL相互作用,并从物理角度或通过其他方式稳定FtsL^[71]。

在分裂体组装的最后阶段,子细胞整体的形状和刚度的维持需要细胞在膜延伸时产生更多PG^[40]。在肺炎链球菌中,PG合酶复合物FtsW-PBP2x参与隔膜与外周PG的合成以及隔膜环的扩大^[72];另一种PG合酶RodA-PBP2b参与细胞延长,以及合成一种侧壁以将新的PG从细胞中央的外环推出^[73]。

CcrZ在后期阶段参与分裂体的组装,其通过与FtsZ、FtsA、EzrA、ZapA相互作用定位到隔膜中央,并通过激活DnaA起始复制^[74](图4)。有趣的是,在大肠杆菌中与ZapA-ZapB相连的MatP在肺炎链球菌中的相应位置被CcrZ取代^[74]。MatP是大肠杆菌染色体复制末端区域的组织者,在分裂体组装过程中,其通过FtsZ-ZapA-ZapB-MatP的连接方式将染色体分离与细胞分裂偶联起来。而在肺炎链球菌中,具有复制起始功能的CcrZ成为了新的偶联者,即复制起始和细胞分裂同时发生。肺炎链球菌如何做到在这一较短时间内(从细胞分裂开始到细胞分裂结束)完成DNA复制和分离值得探索。

4 CcrZ协调DNA复制与细胞分裂

在细菌中,由于Z环是驱动细胞分裂的分裂体组装的核心,其定位必须被限制在细胞中央以及染色体以外的区域,以使得分裂获得的两个子代细胞大小相等、基因组稳定。在已经被报道的FtsZ空间定位调节子中,只有SlmA、MinCDE、MipZ采用负调控的方式定位Z环^[75]。更重要的是,MipZ和CcrZ分别协调着两个细胞周期事件的进行,其中MipZ协调DNA分离与细胞分裂,而CcrZ则协调DNA复制与细胞分裂^[74]。

4.1 细菌中的Z环定位调节子

4.1.1 SlmA和MinCDE SlmA介导的NO是大肠杆菌中一种负向调节FtsZ的系统。SlmA对Z环的空间定位被认为是由于SlmA在大肠杆菌染色体DNA上的一种特殊结合模式所致的^[76]。SlmA特异性结合

位点分布在除复制终止区之外的染色体上^[76]。这种分布模式将导致Z环只能在靠近复制终止区的染色体DNA上组装。已经提出SlmA抑制Z环形成的两种可能的分子机制如下。一种模型假设SlmA导致FtsZ原丝解聚^[77]:体外分析表明,只有当SlmA与其在DNA上的特定结合位点结合时,FtsZ的解聚才会以显著加快的速度发生^[77]。因此,除复制终止区外,原丝的解聚在类核中的任何地方都会发生。在另一种模型中,有人提出,DNA结合的SlmA不解聚原丝,而是捕获它们,使它们不能形成Z环^[78]。然而,到目前为止,还没有证实FtsZ原丝和细胞内延伸的SlmA结构之间有任何共定位^[79]。虽然SlmA在分子水平上的特征已经很广泛,但在细胞水平上对其作用和功能的了解仍然有限。

另一种在大肠杆菌中发现的FtsZ负调控系统为Min系统。三种Min蛋白,即MinC、MinD和MinE,在大肠杆菌细胞中形成一个Z环几何定位系统,该系统阻止在细胞两极处的Z环形成^[80]。三种蛋白质中,只有MinC直接与FtsZ相互作用以抑制其组装成Z环,其与FtsZ保守的C-末端结构域结合,通过FtsZ的GTPase活性介导FtsZ聚合物的断裂^[81]。MinC抑制功能的激活基于其与MinD的结合^[82]。MinD是一种ParA家族ATP酶,当其结合ATP时以二聚体的形式时结合在细胞膜上,并从细胞极向细胞中央延伸^[80]。含有膜结合两亲螺旋的MinE被定位到细胞极后与MinD结合,MinD的ATP酶活性被激发,MinD单体化并离开细胞膜,在细胞另一极聚集^[80]。MinE也通过细胞质或沿膜扩散,重新与另一极的MinD结合^[80]。该过程循环往复,以此形成一种振荡分子机制。由于MinC与MinD结合,其在细胞两极的时间要远远长于其被运输的时间,因此随着时间的推移,MinC最低浓度位于细胞中央,这为FtsZ在那里的组装提供了最佳条件。

4.1.2 MipZ 在新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)中,新生的游动细胞被阻滞在类G₁状态,它包含一个单独的静止染色体,oriC位于有鞭毛的极点,其末端位于与鞭毛相对的极点^[83]。它一旦转变成有柄细胞,复制体在oriC上组装,复制得以起始^[84]。其中一个新合成的oriC保持在原始位置,而另一个拷贝以MreB/actin依赖的方式迅速向细胞的另一端迁移^[83]。随着染色体的其余部分复制,姐妹基因座被连续地分离到早期的子代细胞室^[84]。同时,复制体慢慢地向分

裂平面移位,使得最后复制的末端区域定位在靠近收缩的部位^[84]。

尽管不依赖Min系统和类核封闭系统,新月柄杆菌仍然可以利用一种必要蛋白质MipZ负向调控分裂环的组装和放置,同时对新复制的染色体 $oriC$ 进行两极的定位^[85]:(1)在S期之前,起始区和相关的MipZ-ParB复合体位于细胞的初生柄极,而FtsZ位于细胞的另一极;(2)在染色体和 $oriC$ 复制后,DNA双链立即被ParB和MipZ占据,其中一个MipZ·ParB· $oriC$ 复合物迅速向相反的细胞极移动;(3)一旦迁移的MipZ·ParB· $oriC$ 复合物到达目的地,MipZ丰度最高的点与极点重合。因此,极点的FtsZ复合物不稳定,FtsZ的聚合被引导到细胞中央;(4)随着FtsZ在细胞中央聚合形成Z环,细胞开始分裂。因此,MipZ一方面能定位Z环,另一方面能使细胞分裂延迟直到染色体分离结束,以维持细胞正常的周期。

4.1.3 SsgA和SsgB 天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)是唯一已知的对生长不是必需的细胞分裂生物,其营养菌丝体由间隔5~10 μm 的隔膜(横壁)分隔开的合胞体细胞组成^[86]。在生殖阶段,链霉菌在气生菌丝产生孢子长链,随后发生复杂的分裂事件,在短时间内产生多达100个Z环梯状物^[87]。SsgA是天蓝色链霉菌中一种细胞分裂激活剂,通过促进其旁系同源SsgB的正确定位以及将FtsZ招募到未来细胞分裂位点来协调细胞周期^[88]。

在年轻的气生菌丝中,SsgA形成若干个焦点,此时,SsgB和FtsZ仍然是弥散的;随后,SsgA和SsgB短暂定位在气生菌丝互相交替的两侧;在细胞分裂形成特定的孢子之前,FtsZ通常穿过菌丝体形成长螺旋状的细丝,并在互相交替的两侧附着在已经组装完成的SsgB焦点上;此后,FtsZ与SsgB继续共定位,SsgB通过与FtsZ和膜强烈的相互作用来束缚FtsZ;在孢子形成阶段,染色体浓缩并分离,孢子隔膜(Z环)产生^[88]。在孢子成熟过程中,SsgA定位于隔膜的任意一侧,并最终标记出孢子发芽的两个位置^[89]。目前还不清楚控制SsgA定位的机理以及这些机理是否也受到某种程度的正调控。

4.1.4 PomZ PomZ蛋白是P环ATP酶ParA/MinD/Soj超家族的成员,其功能和定位需要ATPase活性来维持^[90]。作为黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)中正向调控系统的一部分,其对于Z环的形成以及FtsZ在

细胞分初期的正确定位至关重要。PomZ具有两个功能:首先,PomZ参与识别初始分裂位点,其定位不依赖于FtsZ,并在FtsZ之前定位到该分裂位点;其次,PomZ参与将FtsZ招募到初始分裂位点以及稳定Z环^[91]。PomZ定位是动态的,受细胞周期调控。细胞周期事件和将这些事件传递给PomZ的机制尚不清楚。根据已有研究表明,染色体复制/分离的开始导致PomZ从弥散的分布到偏离中心区域的定位;染色体复制/分离的完成导致PomZ从偏离中心的位置定位到细胞中央;胞质分裂的完成导致PomZ从细胞中央分散到各处^[91]。PomZ的零散分布可能是基于其与DNA的非特异性结合^[90]。在PomZ偏离中心区域定位时,其始终结合在类核上,表明其可能连接到特定的染色体区域。

4.2 CcrZ时空协调DNA复制起始和Z环定位

在肺炎链球菌中, $oriC$ 的分离依赖于分离蛋白ParB和染色体结构维持蛋白SMC(structural maintenance of chromosome protein),并且新复制的 $oriC$ 立刻标记了未来的细胞分裂位点^[92-93]。ParB是一种DNA结合蛋白,可特异性识别并积累于 $oriC$ 附近的 $parS$ 位点,对于染色体分离和分裂的偶联相当关键^[92]。SMC与ScpA和ScpB蛋白形成复合物并被与 $ParS$ 结合的ParB招募到 $oriC$ 附近^[93]。SMC被认为通过压缩和组织染色体以促进分离,并防止在未分离的染色体上形成分裂膜^[92-93]。早期分裂蛋白MapZ被鉴定参与帮助肺炎链球菌建立正确的分裂平面^[94]。与PG结合的MapZ蛋白在FtsZ之前定位到未来的分裂位点,并通过蛋白质-蛋白质相互作用正确定位Z环^[94]。CcrZ的功能在之前已经被论述:其作为细胞分裂体的成分通过与FtsZ相互作用定位到细胞中央以激活DnaA从而起始DNA复制。由于FtsZ是通过MapZ移动到 $oriC$ 所确定的分裂平面,CcrZ也间接参与了Z环的放置。因此,一个通过MapZ、CcrZ的时空定位所确定的细胞周期调控模型得以建立^[24,31,74,92-94]。(1)复制开始后,染色体结构维持蛋白SMC被位于 $oriC$ 附近的ParB蛋白招募,介导结合DnaA的 $oriC$ 向两侧分离。(2) $oriC$ 在未来子细胞中央建立起分裂平面,MapZ跟随 $oriC$ 移动并定位到该平面,FtsZ和CcrZ保留在细胞中央。(3)FtsZ开始携带CcrZ向未来细胞分裂位点移动,部分参与Z环组装的FtsZ仍留在细胞中央,当复制和分离终止后,分裂环的组装也几乎同时完成。(4)细胞分裂形成的子细胞每一个都含有完整的基因组。

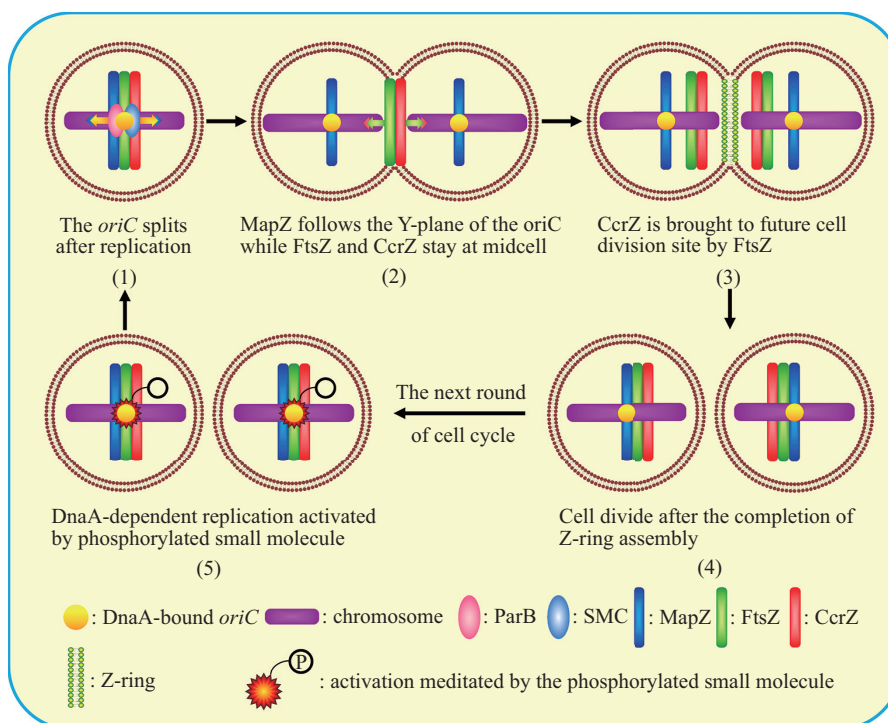


图5 CcrZ和MapZ时空调控复制和分裂的模型(根据参考文献[24,31,94]修改)

Fig.5 Model for spatiotemporal regulation of replication and division by CcrZ and MapZ (modified from references [24,31,94])

(5) 在新生的细胞中,当FtsZ与CcrZ到达细胞中央后,CcrZ通过磷酸化一个中间分子激活DnaA来启动新一轮复制,下一轮细胞周期开始(图5)。在缺乏CcrZ的情况下,由于DnaA不能被激活或激活不足,复制起始受阻或者延迟,这经常会导致Z环错误定位(分裂膜异常)、无核细胞产生以及染色体断裂等一系列无益的事件产生^[24,31,74]。总之,这个模型确保DNA复制在oriC已经分离并定位在子细胞中央之后才开始,以及DNA复制在每个细胞周期只发生一次,将DNA复制与细胞分裂有效连贯地串联起来。

5 展望

细菌感染长期以来一直威胁着人们的健康,特别是随着后抗生素时代的到来,临床上常用的药物难以抗击耐药菌产生的致病性。虽然人们已经将分裂体蛋白FtsZ、FtsA、FtsE、FtsI、ZapA、ZipA、SepF等作为抗菌药物的候选靶点进行研究,并开发出一些天然及合成类抑制剂,但是由于某些原因,这些药物在控制细菌感染上成效甚微,仅仅通过抑制细胞分裂来破坏细菌生长的可能性需要进一步探索^[95]。细菌的快速繁殖与其细胞周期各事件的有序协调紧密相关。最近,关于将多个细胞周期事件相关联的调控

因子的信息开始增长^[55],已经发现一些调节子偶联染色体分离和细胞分裂或者DNA复制和细胞分裂,如FtsK、ParB、MatP、MipZ、CcrZ。这些因子通过在不同细胞周期事件间建立桥梁,确保子代细胞正常产生。因此,如果这些蛋白在多数病原菌中存在或保守,它们将成为同时针对多个细胞过程的理想靶点。特别地,当一种蛋白在不同细菌内含有同源物时,在结构上的差异将有助于开发选择性抑制剂,使治疗更有针对性。现阶段通过研究共调控子开发抗菌药物的主要瓶颈之一可能是缺乏这些调节子结构的可用性^[55]。一个解决的办法是大量筛选可能的抗菌分子。当筛选的分子能有效地削弱调节子的功能时,那么这些分子就被证明具有抗菌作用,因而也就能成为抗菌药物研发所需的材料。

随着人们对生物学理解的深入和分子工具的发展,“合成生物学”(synthetic biology)这一概念被引入。创造“合成生命”的尝试有利于解决关于生命如何出现和进化的基本问题,同时,其设计原则的阐明也有助于合成细胞由点到面的获得触手可及^[96]。在大肠杆菌中,Min系统由于已经在脂质体中建立起用于定义细胞中央分裂位点的两极振荡,其被建议用于合成细胞分裂所需的“对称性破

坏”(symmetry breaking)过程^[97-98]。用于控制细菌细胞收缩的Z环凭借其简单的构造也在合成细胞分裂的“变形”(deformation)阶段显示出诱人的潜力^[96]。值得一提的是,基因组复制的适当时机,对于合成生物细胞的适应性至关重要^[99]。噬菌体 $\phi 29$ 是一种比较完善的用于合成细胞的复制系统,由1个DNAP和3个相关蛋白组成^[100]。 $\phi 29$ -DNAP表现出链置换活性,可以避免需要额外的解旋酶来解开上游双链DNA^[101]。其已被证明可以在体外实现高达70 Kb的线性DNA片段的高复制率^[102]。 $\phi 29$ 系统的复制从复制起点开始,可以通过以解旋酶为基础解旋线性的噬菌体DNA双链,但这是一个不受控制的过程,通常会导致复制爆发^[96]。CcrZ蛋白的发现产生出一种潜在的应用可能性。因此蛋白可以调控复制起始,通过将其运用到合成细胞中以对起始步骤进行严格准确的控制,在此基础上利用 $\phi 29$ 复制系统介导新DNA链的延伸,或许可以解决复制起始阶段缺乏监管的问题。更重要的是,活的合成细胞的一个关键特征是具有功能性的细胞周期,细胞生长、DNA复制、DNA分离、细胞分裂能很好地协调并整合在一起^[96]。以CcrZ为代表的同时协调多个细胞周期事件的调节子如果能作为自然机制在相关分子系统中被实施,那么将大大提高合成细胞的存活率,从而降低创造合成细胞的难度。

参考文献 (References)

- WENZEL E S, SINGH A. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer [J]. *In Vivo*, 2018, 32(1): 1-5.
- ROBERT L. Size sensors in bacteria, cell cycle control, and size control [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 515.
- ANAND S K, SHARMA A, SINGH N, et al. Entrenching role of cell cycle checkpoints and autophagy for maintenance of genomic integrity [J]. *DNA Repair*, 2020, 86: 102748.
- REYES-LAMOTHE R, SHERRATT D J. The bacterial cell cycle, chromosome inheritance and cell growth [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(8): 467-78.
- KATAYAMA T, OZAKI S, KEYAMURA K, et al. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(3): 163-70.
- KATO J, KATAYAMA T. Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli* [J]. *EMBO J*, 2001, 20(15): 4253-62.
- SCHOLEFIELD G, ERRINGTON J, MURRAY H. Soj/ParA stalls DNA replication by inhibiting helix formation of the initiator protein DnaA [J]. *EMBO J*, 2012, 31(6): 1542-55.
- FELICORI L, JAMESON K H, ROBLIN P, et al. Tetramerization and interdomain flexibility of the replication initiation controller YabA enables simultaneous binding to multiple partners [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(1): 449-63.
- CAMARA J E, SKARSTAD K, CROOKE E. Controlled initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli* requires functional Hda protein [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(10): 3244-8.
- 涂远强, 韩雪, 陈世伟, 等. 乳酸菌应激下分裂体组装及其调控作用研究进展[J]. *食品科技*(TU Y Q, HAN X, CHEN S W, et al. Progress in the study of divisome assembly and regulation of lactic acid bacteria under stress [J]. *Food Sci Technol*), 2020, 45(11): 8-14.
- WOLDEMESKEL S A, MCQUILLEN R, HESSEL A M, et al. A conserved coiled-coil protein pair focuses the cytokinetic Z-ring in *Caulobacter crescentus* [J]. *Mol Microbiol*, 2017, 105(5): 721-40.
- WANG X, RUDNER D Z. Spatial organization of bacterial chromosomes [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 22: 66-72.
- MANNIK J, BAILEY M W. Spatial coordination between chromosomes and cell division proteins in *Escherichia coli* [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 306.
- SINHA D, ZIMMER K, CAMERON T A, et al. Redefining the small regulatory RNA transcriptome in *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39 [J]. *J Bacteriol*, 2019, 201(14): e00764-18.
- PINHO M G, KJOS M, VEENING J W. How to get (a) round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(9): 601-14.
- DUVAUD S, GABELLA C, LISACEK F, et al. Expasy, the swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W216-W27.
- BERNHOFER M, DALLAGO C, KARL T, et al. Predict protein: predicting protein structure and function for 29 years [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W535-W40.
- SODING J, BIEGERT A, LUPAS A N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(web server issue): W244-W8.
- KELLEY L A, MEZULIS S, YATES C M, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10(6): 845-58.
- SCHLESSINGER A, PUNTA M, YACHDAV G, et al. Improved disorder prediction by combination of orthogonal approaches [J]. *PLoS One*, 2009, 4(2): e4433.
- LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures [J]. *J Appl Crystallogr*, 1993, 26(2): 283-91.
- HOOFT R W, VRIEND G, SANDER C, et al. Errors in protein structures [J]. *Nature*, 1996, 381(6580): 272.
- ANDERSON M E, SMITH J L, GROSSMAN A D. Multiple mechanisms for overcoming lethal over-initiation of DNA replication [J]. *bioRxiv*, 2021: 2021-5.
- GALLAY C, SANSELICIO S, ANDERSON M E, et al. CcrZ is a pneumococcal spatiotemporal cell cycle regulator that interacts with FtsZ and controls DNA replication by modulating the activity of DnaA [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(9): 1175-87.
- SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-

- D12.
- [26] WANG L, JIANG Y L, ZHANG J R, et al. Structural and enzymatic characterization of the choline kinase LicA from *Streptococcus pneumoniae* [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e120467.
- [27] ABE Y, JO T, MATSUDA Y, et al. Structure and function of DnaA N-terminal domains: specific sites and mechanisms in inter-DnaA interaction and in DnaB helicase loading on *oriC* [J]. J Biol Chem, 2007, 282(24): 17816-27.
- [28] NOZAKI S, OGAWA T. Determination of the minimum domain II size of *Escherichia coli* DnaA protein essential for cell viability [J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 11): 3379-84.
- [29] KATAYAMA T. Roles for the AAA+ motifs of DnaA in the initiation of DNA replication [J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36(Pt 1): 78-82.
- [30] ASKLUND M, ATLUNG T. New non-detrimental DNA-binding mutants of the *Escherichia coli* initiator protein DnaA [J]. J Mol Biol, 2005, 345(4): 717-30.
- [31] WOZNIK K J, BURBY P E, NANDAKUMAR J, et al. Structure and kinase activity of bacterial cell cycle regulator CcrZ [J]. PLoS Genet, 2022, 18(5): e1010196.
- [32] MATTHEWS L A, SIMMONS L A. Cryptic protein interactions regulate DNA replication initiation [J]. Mol Microbiol, 2019, 111(1): 118-30.
- [33] WAGNER J K, MARQUIS K A, RUDNER D Z. SirA enforces diploidy by inhibiting the replication initiator DnaA during spore formation in *Bacillus subtilis* [J]. Mol Microbiol, 2009, 73(5): 963-74.
- [34] MURRAY H, ERRINGTON J. Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA [J]. Cell, 2008, 135(1): 74-84.
- [35] SCHOLEFIELD G, WHITING R, ERRINGTON J, et al. Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation [J]. Mol Microbiol, 2011, 79(4): 1089-100.
- [36] KEYAMURA K, FUJIKAWA N, ISHIDA T, et al. The interaction of DiaA and DnaA regulates the replication cycle in *E. coli* by directly promoting ATP DnaA-specific initiation complexes [J]. Genes Dev, 2007, 21(16): 2083-99.
- [37] OZAKI S, KATAYAMA T. DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin [J]. Plasmid, 2009, 62(2): 71-82.
- [38] STAUFFER M E, CHAZIN W J. Structural mechanisms of DNA replication, repair, and recombination [J]. J Biol Chem, 2004, 279(30): 30915-8.
- [39] 黄玄贺, 孙宁, 钟冬晓, 等. 细菌分裂蛋白及FtsZ抑制剂的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展(HUANG X H, SUN N, ZHONG D X, et al. A Review on bacterial cell-division protein and recent progress of FtsZ inhibitors development [J]. Prog Biochem Biophys), 2020, 47(9): 935-55.
- [40] BRIGGS N S, BRUCE K E, NASKAR S, et al. The pneumococcal divisome: dynamic control of *Streptococcus pneumoniae* cell division [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 737396.
- [41] DU S, LUTKENHAUS J. Assembly and activation of the *Escherichia coli* divisome [J]. Mol Microbiol, 2017, 105(2): 177-87.
- [42] PEREZ A J, CESBRON Y, SHAW S L, et al. Movement dynamics of divisome proteins and PBP2x:FtsW in cells of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(8): 3211-20.
- [43] LARIVIERE P J, MAHONE C R, SANTIAGO-COLLAZO G, et al. An essential regulator of bacterial division links FtsZ to cell wall synthase activation [J]. Curr Biol, 2019, 29(9): 1460-70.
- [44] MONTEIRO J M, PEREIRA A R, REICHMANN N T, et al. Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmilling-independent step of cytokinesis [J]. Nature, 2018, 554(7693): 528-32.
- [45] BERNHOFFER M, KLOPPMANN E, REEB J, et al. TMSEG: novel prediction of transmembrane helices [J]. Proteins: Struct, Funct, Bioinf, 2016, 84(11): 1706-16.
- [46] OLIVEIRA P A, FRIGGEN A H, QIN L, et al. The bacterial chromatin protein HupA can remodel DNA and associates with the nucleoid in *Clostridium difficile* [J]. J Mol Biol, 2019, 431(4): 653-72.
- [47] KARIMOVA G, PIDOUX J, ULLMANN A, et al. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(10): 5752-6.
- [48] NIKAM R, YUGANDHAR K, GROMIHA M M. Intelligent computing theories and application [M]. Berlin: Springer, 2018: 809-15.
- [49] PETTERSEN E F, GODDARD T D, HUANG C C, et al. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis [J]. J Comput Chem, 2004, 25(13): 1605-12.
- [50] KRISSINEL E, HENRICK K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state [J]. J Mol Biol, 2007, 372(3): 774-97.
- [51] YOSHIKAWA T, FUJITA J, TERAKADO H, et al. Crystal structures of the cell-division protein FtsZ from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* [J]. Acta Crystallogr, Sect F: Struct Biol Commun, 2020, 76(Pt 2): 86-93.
- [52] SCHUMACHER M A, OHASHI T, CORBIN L, et al. High-resolution crystal structures of *Escherichia coli* FtsZ bound to GDP and GTP [J]. Acta Crystallogr, Sect F: Struct Biol Commun, 2020, 76(Pt 2): 94-102.
- [53] SASS P, BROTZ-OESTERHELT H. Bacterial cell division as a target for new antibiotics [J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(5): 522-30.
- [54] HURLEY K A, SANTOS T M, NEPOMUCENO G M, et al. Targeting the bacterial division protein FtsZ [J]. J Med Chem, 2016, 59(15): 6975-98.
- [55] MISRA H S, MAURYA G K, CHAUDHARY R, et al. Interdependence of bacterial cell division and genome segregation and its potential in drug development [J]. Microbiol Res, 2018, 208: 12-24.
- [56] GAO Y, WENZEL M, JONKER M J, et al. Free SepF interferes with recruitment of late cell division proteins [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16928.
- [57] MURA A, FADDA D, PEREZ A J, et al. Roles of the essential protein ftsa in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae* [J]. J Bacteriol, 2017, 199(3).
- [58] CONTI J, VIOLA M G, CAMBERG J L. FtsA reshapes membrane architecture and remodels the Z-ring in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2018, 107(4): 558-76.
- [59] PENDE N, SOGUES A, MEGRIAN D, et al. SepF is the FtsZ anchor in archaea, with features of an ancestral cell division system [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3214.
- [60] SOGUES A, MARTINEZ M, GADAY Q, et al. Essential dy-

- dynamic interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1641.
- [61] CLEVERLEY R M, BARRETT J R, BASLE A, et al. Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis [J]. Nat Commun, 2014, 5: 5421.
- [62] DU S, LUTKENHAUS J. At the Heart of Bacterial Cytokinesis: The Z Ring [J]. Trends Microbiol, 2019, 27(9): 781-91.
- [63] THANASSI J A, HARTMAN-NEUMANN S L, DOUGHERTY T J, et al. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(14): 3152-62.
- [64] HUANG K H, DURAND-HEREDIA J, JANAKIRAMAN A. FtsZ ring stability: of bundles, tubules, crosslinks, and curves [J]. J Bacteriol, 2013, 195(9): 1859-68.
- [65] DU S, HENKE W, PICHOF S, et al. How FtsEX localizes to the Z ring and interacts with FtsA to regulate cell division [J]. Mol Microbiol, 2019, 112(3): 881-95.
- [66] PICHOF S, DU S, LUTKENHAUS J. Roles of FtsEX in cell division [J]. Res Microbiol, 2019, 170(8): 374-80.
- [67] STEINER W, LIU G, DONACHIE W D, et al. The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers [J]. Mol Microbiol, 1999, 31(2): 579-83.
- [68] MARMONT L S, BERNHARDT T G. A conserved subcomplex within the bacterial cytokinetic ring activates cell wall synthesis by the FtsW-FtsI synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(38): 23879-85.
- [69] BLENCOWE D K, AL J S, MORBY A P. Identification of a novel function for the FtsL cell division protein from *Escherichia coli* K12 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(1): 44-9.
- [70] WADENPOHL I, BRAMKAMP M. DivIC stabilizes FtsL against RasP cleavage [J]. J Bacteriol, 2010, 192(19): 5260-3.
- [71] LE GOUELLEC A, ROUX L, FADDA D, et al. Roles of pneumococcal DivIB in cell division [J]. J Bacteriol, 2008, 190(13): 4501-11.
- [72] PEREZ A J, BOERSMA M J, BRUCE K E, et al. Organization of peptidoglycan synthesis in nodes and separate rings at different stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Mol Microbiol, 2021, 115(6): 1152-69.
- [73] TROUVE J, ZAPUN A, ARTHAUD C, et al. Nanoscale dynamics of peptidoglycan assembly during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Curr Biol, 2021, 31(13): 2844-56.
- [74] PEREZ A J, VILLICANA J B, TSUI H T, et al. FtsZ-ring regulation and cell division are mediated by essential EzrA and accessory proteins ZapA and ZapJ in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 780864.
- [75] HAJDUK I V, RODRIGUES C D, HARRY E J. Connecting the dots of the bacterial cell cycle: coordinating chromosome replication and segregation with cell division [J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 53: 2-9.
- [76] CHO H, MCMANUS H R, DOVE S L, et al. Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(9): 3773-8.
- [77] DU S, LUTKENHAUS J. SlmA antagonism of FtsZ assembly employs a two-pronged mechanism like MinCD [J]. PLoS Genet, 2014, 10(7): e1004460.
- [78] TONTHAT N K, MILAM S L, CHINNAM N, et al. SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(26): 10586-91.
- [79] MANNIK J, BAILEY M W. Spatial coordination between chromosomes and cell division proteins in *Escherichia coli* [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 306.
- [80] ROWLETT V W, MARGOLIN W. The bacterial Min system [J]. Curr Biol, 2013, 23(13): R553-R6.
- [81] SHEN B, LUTKENHAUS J. Examination of the interaction between FtsZ and MinCN in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings [J]. Mol Microbiol, 2010, 75(5): 1285-98.
- [82] LUTKENHAUS J. The ParA/MinD family puts things in their place [J]. Trends Microbiol, 2012, 20(9): 411-8.
- [83] VIOLLIER P H, THANBICHLER M, MCGRATH P T, et al. Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(25): 9257-62.
- [84] JENSEN R B, WANG S C, SHAPIRO L. A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus* [J]. EMBO J, 2001, 20(17): 4952-63.
- [85] THANBICHLER M, SHAPIRO L. MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter* [J]. Cell, 2006, 126(1): 147-62.
- [86] MCCORMICK J R, LOSICK R. Cell division gene ftsQ is required for efficient sporulation but not growth and viability in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. J Bacteriol, 1996, 178(17): 5295-301.
- [87] FLÄRDH K, BUTTNER M J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(1): 36-49.
- [88] WILLEMSE J, BORST J W, DE WAAL E, et al. Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces* [J]. Genes Dev, 2011, 25(1): 89-99.
- [89] NOENS E E, MERSINIAS V, WILLEMSE J, et al. Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of *Streptomyces coelicolor* [J]. Mol Microbiol, 2007, 64(5): 1244-59.
- [90] GERDES K, HOWARD M, SZARDENINGS F. Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation [J]. Cell, 2010, 141(6): 927-42.
- [91] TREUNER-LANGE A, AGUILUZ K, VAN DER DOES C, et al. PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus* [J]. Mol Microbiol, 2013, 87(2): 235-53.
- [92] KJOS M, VEENING J W. Tracking of chromosome dynamics in live *Streptococcus pneumoniae* reveals that transcription promotes chromosome segregation [J]. Mol Microbiol, 2014, 91(6): 1088-105.
- [93] MINNEN A, ATTAIECH L, THON M, et al. SMC is recruited to *oriC* by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Mol Microbiol, 2011, 81(3): 676-88.
- [94] VAN RAAPHORST R, KJOS M, VEENING J W. Chromosome segregation drives division site selection in *Streptococcus pneumoniae* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(29): E5959-E68.
- [95] AWASTHI D, KUMAR K, KNUDSON S E, et al. SAR studies

- on trisubstituted benzimidazoles as inhibitors of Mtb FtsZ for the development of novel antitubercular agents [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(23): 9756-70.
- [96] OLIVI L, BERGER M, CREYGHTON R, et al. Towards a synthetic cell cycle [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4531.
- [97] RAMM B, HEERMANN T, SCHWILLE P. The *E. coli* MinCDE system in the regulation of protein patterns and gradients [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(21): 4245-73.
- [98] LITSCHER T, RAMM B, MAAS R, et al. Beating vesicles: encapsulated protein oscillations cause dynamic membrane deformations [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(50): 16286-90.
- [99] SIMMONS L A, BREIER A M, COZZARELLI N R, et al. Hyperinitiation of DNA replication in *Escherichia coli* leads to replication fork collapse and inviability [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 51(2): 349-58.
- [100] SALAS M, HOLGUERA I, REDREJO-RODRÍGUEZ M, et al. DNA-binding proteins essential for protein-primed bacteriophage ϕ 29 DNA replication [J]. *Front Mol Biosci*, 2016, 3: 37.
- [101] PAEZ J G, LIN M, BEROUKHIM R, et al. Genome coverage and sequence fidelity of ϕ 29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(9): e71.
- [102] BLANCO L, BERNAD A, LÁZARO J M, et al. Highly efficient dna synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase: symmetrical mode of DNA replication [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(15): 8935-40.