

# 新时期微生物学研究的“知”与“行”

**编者按** 中国科协第381期青年科学家论坛——新时期微生物学研究的“知”与“行”于2019年9月21日在西南大学举行。此次论坛由中国微生物学会承办。本刊摘录部分学者的主要观点,以飨读者。

## 细胞色素P450酶及其还原伴侣研究

李盛英(山东大学微生物技术研究院,教授)

细胞色素P450单加氧酶是广泛参与微生物天然产物生物合成的关键催化元件,其引入的氧化性基团对于生物活性与生物利用度的改善以及生物合成途径的多样化延伸具有重要作用。通过若干微生物来源P450酶的酶学与酶工程研究,能将该类催化元件运用于药物、能源、工业化学品等产品的生物智造。与此同时,通过系统研究微生物P450酶的还原伴侣的功能机制,不仅颠覆了“还原伴侣选择不影响P450酶催化类型与选择性”的传统认识,而且率先提出了细菌I型P450酶最适还原伴侣的预测原则。

## 调控细菌耐药和复苏的关键分子机制研究

白凡(北京大学生命科学院,研究员)

细菌耐药性是一种现象,具有同样基因组的细菌群体通过异质性的基因表达产生了一个细胞亚群,称为持留菌,它们能耐受抗生素治疗。之前,持留菌的形成归因于细胞的休眠状态和生长停滞;尽管抗生素结合到了其作用靶点,但由于细胞的代谢缓慢,抗生素无法对细菌造成伤害。持留菌形成的机制是细菌学研究的热点。

在显微镜下,对耐药细菌在撤除抗生素后复苏生长过程的单细胞进行观测,发现每个持留菌表现

出不同的休眠深度,从而调控持留菌复苏生长所需时间的快慢。进一步地对单细胞实时动态观察,意外发现伴随着细菌休眠深度的加深,细菌细胞内会出现明显的“小黑点”。通过蛋白荧光标记和高通量质谱鉴定,这些小黑点被证明是大量蛋白质沉淀产生的聚合体。沉淀聚合体的形成,导致细菌进入深度休眠状态;而当细菌需要复苏生长时,沉淀聚合体需要解聚,恢复细菌细胞内的蛋白质平衡分布。之后,通过大量的单细胞实时荧光成像和分子生物学实验,深入揭示细菌细胞内三磷酸腺苷(ATP)的耗竭是导致蛋白质沉淀聚合体产生的分子机制。当ATP得到补充,细菌准备复苏生长时,还需要两个重要的蛋白DnaK和ClpB协助沉淀聚合体的解聚。

## 海洋酸化抑制束毛藻的固氮作用

史大林(厦门大学环境与生态学院,教授)

浮游植物在海洋和全球碳循环中扮演着举足轻重的角色。氮是浮游植物生长所必需的元素,其缺乏限制了全球面积一半以上海区的初级生产力。束毛藻是海洋生态系统中“新氮”的重要来源之一,可贡献高达50%的全球海洋总固氮量,对海洋初级生产力以及碳、氮生物地球化学循环起着至关重要的作用。工业革命以来,近1/3人类活动排放的二氧化碳(CO<sub>2</sub>)进入海洋,导致海洋以迄今3亿年以来最快的速度酸化。海洋酸化将怎样影响束毛藻的固氮作用以及碳、氮生物地球化学效应和气候效应如何,是国际海洋全球变化研究的热点和

焦点。

研究发现,在束毛藻生活的寡营养海区,痕量金属铁是其生长和固氮作用最重要的限制因子之一。CO<sub>2</sub>升高对束毛藻固氮的促进作用弱于海水pH下降对其的抑制作用,导致海洋酸化的净效应为抑制束毛藻固氮,且该负效应随着海水中铁浓度的下降而增强。实验表明,藻细胞内的pH随着海水pH的下降而下降,束毛藻上调固氮酶的表达以应对由此引起的固氮速率降低,同时加大能量生产用以维持细胞内的pH稳态。鉴于固氮酶合成和能量生产过程对铁的高度需求,铁限制条件加剧了酸化的负效应。我们预测,如果人为CO<sub>2</sub>排放量继续上升,酸化将使本世纪全球束毛藻氮固定潜力降低27%,其中限制铁的区域降幅最大。

## 细菌受体感知细胞内外信息的生化机制

钱韦(中国科学院微生物研究所,研究员)

大部分微生物是不致病的,只有400多种是病原微生物,其中还有一些是条件致病菌,但是在微生物受到外界一定的刺激时,其很有可能转变为病原微生物。组氨酸激酶是细菌感受刺激的主要受体,由组氨酸激酶和反应调节因子组成的双组分信号系统是主要的细菌感知和反应机制。组氨酸激酶作为受体,通过自磷酸化检测环境和细胞间刺激,磷酸化同源反应调节因子,引起适应性反应。双组分信号系统几乎调节细菌细胞的所有生理过程,包括群体感应、渗透压、应激反应和毒力。

主要以动物病原和植物病原为对象,对细菌感知刺激进行了研究。研究发现,细菌感知刺激和信号具有多样性,包括感知自身、感知寄主、感知细胞生存状态与感知环境。感知自身是对群体感应信号的接收,感知寄主方面,细菌可以跨界感知植物激素——细胞分裂素,感知细胞生存状态主要是组氨酸激酶感知环二鸟苷单磷酸(c-di-GMP)并控制细菌游动性——毒力生存方式的转变。在这其中一个名为RavS的受体在控制细菌生存方式转变中发挥着重要作用:RavS是一种组氨酸激酶,当其处于高磷酸化水平时,控制细菌游动,但抑制细菌的

毒力;当RavS处于低磷酸化水平时,虽然对毒力没有控制作用,却能抑制细菌的游动性。因此,当细菌需要从自由生存状态向毒性状态转变时,RavS的磷酸化水平必须下降到较低水平。这一下降过程是由细菌细胞内第二信使分子c-di-GMP严格控制的,c-di-GMP直接接合到RavS的ATP酶区,显著增强了它的磷酸转移酶活性。在将磷酸基团“甩”给RavR(下游反应调节蛋白)以后,RavS的磷酸化水平自然回归到较低水平,从而解除对细菌毒力因子表达的抑制作用。因此,c-di-GMP信号分子与受体RavS的相互作用是调控细菌自由生活向毒性转变的关键环节。

## 基于“装配线”化学的模板化生物合成研究

刘文(中国科学院上海有机化学研究所,研究员)

由动植物或微生物产生的天然产物往往具有良好的抗菌、抗肿瘤、抗病毒或者免疫抑制等活性,在医药产业中占有重要地位。有趣的是,在生物合成过程中,一些蛋白在组织和利用小分子原料形成结构复杂的天然产物时,犹如装配线般高效有序,经由这种“模板化”的装配方式合成的天然产物主要为聚酮和非核糖体聚肽类。其生物合成过程是“模板化装配线酶学机制”的典型代表。以聚酮为例,在一个最小的聚酮合酶(PKSs)模块中,酰基转移酶识别并上载小分子羧酸底物到硫酯化功能域上,再由酮基合成酶催化两个底物之间发生克莱森缩合形成C—C键。非核糖体聚肽合成酶(NRPSs)催化过程与之相似,区别在于利用氨基酸作为底物,催化形成C—N键。PKSs和NRPSs的模块之间可以进行置换和融合,进而产生更为复杂的杂化合物。PKSs/NRPSs形成了一条集前体聚合与修饰以及链延伸与终止为一体的装配线,并且遵循非迭代的“单结构域单功能”规则。虽然以PKSs和NRPSs为代表的装配线已经得到较为充分的研究,然而,近年来,越来越多的特殊装配线被发现,包括特殊的前体单元、装配线上的化学修饰以及线下后修饰反应几个方面。

## 三维基因组DNA大片段编辑机制研究

吴强(癌基因及相关基因国家重点实验室,研究员)

基因组编辑几乎在生物学和医学的每一个领域都有应用,并且已经渗透到社会的许多方面。其中,聚类规则间隔短回文重复序列(CRISPR/Cas9)系统以其方便、简单、高效、低成本等优点在基因组编辑中得到了广泛的应用。动态三维基因组折叠与DNA复制和修复、染色体易位、重组和分离、RNA转录、剪接和转运等许多过程密切相关。为了探索三维基因组动力学,我们正开发利用双重sgRNAs编程的CRISPR/Cas9进行DNA片段编辑的技术,该技术可致使各种染色体重排,包括DNA片段缺失、倒置、复制或循环、插入和易位。

自CRISPR/Cas9新一代基因编辑系统建立以来,人们普遍认为Cas9核酸酶切割DNA双链是产生平头末端的。在最新研究中,通过体内(in vivo)的DNA片段编辑技术,并结合高通量测序及体外断裂实验,发现Cas9核酸酶切割DNA双链能够产生突出末端,而不仅仅是之前研究报道的平头末端断裂方式。同时,通过基因工程改造Cas9核酸酶,使其具有不同的突出末端切割模式。这进一步证明了Cas9切割末端的多样性。通过系统的CRISPR DNA片段编辑实验,利用双重sgRNAs编程的Cas9分析染色体重排的深序列连接,发现核苷酸插入是可预测的。

## 细菌进化:基于序列的挖掘到功能的验证

杨瑞馥(军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所,研究员)

获取核酸序列并深入挖掘是研究细菌进化的主要手段,随着序列大数据的积累,可以通过细菌全基因组关联分析(BGWAS)将序列变异信息与表型进行关联,进而可以设计实验进行验证。从功能进化的角度理解细菌进化中表型的改变,了解序列分析在细菌进化研究中的意义以及从功能进化角度来理解和验证,使我们能够更好地理解细菌进化

过程中变异的意义,为更好地利用变异规律来防治传染病以及预测传染病奠定基础。

## 睾丸酮丛毛单胞菌的趋化性

刘双江(中国科学院微生物研究所,研究员)

从处理化工废水的污水处理厂污泥中分离获得睾丸酮丛毛单胞菌。研究发现,该细菌对4-氯硝基苯、3-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、原儿茶酸、香草酸、香草醛、龙胆酸、苯酚等化合物具有趋化性,对睾丸酮丛毛单胞菌20个MCP进行系统敲除,构建不具有趋化能力的CNB-1D20突变株;同时,通过逐个回补MCP的手段,系统鉴定了每一个MCP蛋白在感应不同芳环类化合物过程中的作用;进一步对甲基趋化受体蛋白MCP2201与不同化合物结合能力研究发现,MCP2201不能与芳环类化合物结合,而是与三羧酸循环(TCA)中间产物结合。这是一类全新的细菌趋化途径,即细菌可以通过感知TCA循环中间化合物实现对芳香类化合物的趋化。

## TDF耐药的发现与鉴定

黄爱龙(重庆医科大学,教授)

替诺福韦(TDF)被称为“高效、低耐药”的抗病毒药物,目前已成为乙型肝炎治疗的首选药物,但是临床上仍有少部分患者对TDF仅部分应答,关于“这种现象是否与TDF耐药有关”的报道还十分罕见。目前,我们观察到一名白血病伴乙型肝炎患者,该患者的治疗过程包括化疗、恩替卡韦(ETV)和TDF抗病毒治疗等,然而在TDF治疗3个月后发生了病毒学突破。为分析该患者是否发生了TDF耐药,我们提取了病毒学突破之后的患者乙型肝炎病毒(HBV)DNA,通过T-A克隆测序和深度测序分析了反转录酶区(RT)序列的变异情况,结果显示RT区134、145、238、248位点发生了高频突变。进一步,在HBV 1.1倍体质粒的基础上构建了HBV RT区替换HBV表达质粒和多位点突变HBV表达质粒。细胞药物敏感实验结果显示,对于野生型

HBV 和 134/145/238/248 位点突变 HBV, TDF 的 IC50 分别为  $0.32 \pm 0.04 \mu\text{M}$  和  $1.99 \pm 0.35 \mu\text{M}$ , 而 RT 替换突变 HBV 的 TDF IC50 则大于  $25.6 \mu\text{M}$ , 表明这些位点的突变导致了比较明显的耐药现象。同源建模分析发现, 多位点突变导致蛋白活性位点产生一定的小幅度构象变化, 引起 RT 对药物的结合亲和力减弱, 而对脱氧核苷酸的结合亲和力不变或增强, RT 结合药物的选择性变差, 进而可能产生耐药性。

## 结核分枝杆菌-宿主相互作用及新诊断标志物筛选与临床验证

谢建平(西南大学生命科学学院现代生物医药研究所, 研究员)

结核分枝杆菌感染导致的结核病仍然是全球单一致病菌感染死亡率最高的重大公共卫生威胁。全球每年 1000 多万新发结核病患者, 有 150 万人死于结核病, 远高于艾滋病。结核病现有诊断措施, 无论是病原学还是免疫学诊断, 在报告时间、成本、灵敏度和特异性等方面都亟需改进。

我们采用多种组学技术, 包括基因组、转录组、蛋白质组、甲基化组、修饰组、单细胞转录组、抗体组等, 从致病菌和宿主两个方面, 综合利用全球结核病相关大数据, 筛选获得了结核病患者特异性的诊断标志物分子及组合, 并在结核病患者临床样本

中进行了双盲考察, 获得了特异性、灵敏度都接近 90% 的检测效果, 能够鉴别肺部其他感染与肿瘤。同时, 这些标志物分子还能够监测结核病药物治疗效果, 为结核病防控提供更好的基础技术支持。

## 抗非酒精性脂肪肝新型益生菌的发现与机制研究

刘宏伟(中国科学院微生物研究所, 研究员)

全球非酒精性脂肪肝(NASH)发病率达 3%~5%。预测 2030 年内, NASH 将超过乙型肝炎, 成为威胁人类健康的又一杀手。肠道菌群已成为研发抗代谢性疾病新药的新靶点。我们构建了结构多样性丰富的食药真菌化合物库, 从中筛选获得一个抗非酒精性脂肪肝的灵芝先导分子。进一步, 通过结构改造优选获得一个稳定性好、药理作用显著、安全低毒的药物候选分子 SA7。SA7 抗脂肪肝作用与新药奥贝胆酸相当, 并具有控制体重增长、改善胰岛素抵抗作用。SA7 作用机制新颖: 靶向调节肠道菌群, 促进丁酸产生菌、抑制条件致病菌, 减少内毒素血症、降低系统性炎症, 从而治疗包括 NASH 的代谢综合征疾病。

(西南大学药学院周涛、廖国建整理)

(责任编辑 王丽娜)