

文章编号: 1004-0374(2011)09-0882-09

微生物分解代谢物控制蛋白CcpA的研究进展

吴艳, 顾阳, 任聪, 杨晟, 姜卫红*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 合成生物学重点实验室, 上海 200032)

摘要: 碳分解代谢物阻遏 (carbon catabolite repression, CCR) 是指微生物在混合碳源发酵时优先利用速效碳源 (通常为葡萄糖), 且该碳源的代谢产物会抑制其他非速效碳源代谢相关的基因表达和蛋白活性, 从而影响非速效碳源利用的现象。在低 GC 含量革兰氏阳性菌中, CCR 效应的关键调控因子为分解代谢物控制蛋白 CcpA (catabolite control protein A)。该调控蛋白具有多效性功能, 除参与 CCR 外, 还与中心碳、氮代谢的调控、生物被膜的形成和毒性基因的表达等多种生理过程相关。综述了近年来有关 CcpA 蛋白的功能、作用机制及分子结构的研究进展。

关键词: CcpA; 碳分解代谢物阻遏效应; 多效性; 晶体结构

中图分类号: Q93-31; Q78 **文献标志码:** A

Recent research on catabolite control protein A in microorganisms

WU Yan, GU Yang, REN Cong, YANG Sheng, JIANG Wei-Hong*

(Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Carbon catabolite repression (CCR) is defined as the phenomenon that microorganisms preferentially utilize a rapidly metabolizable carbon source (normally glucose), along with inhibition of some gene expression and enzyme activities related to catabolism of non-preferred carbon resources. In low-GC Gram-positive bacteria, the key regulator for exerting CCR is CcpA (catabolite control protein A), which is a pleiotropic regulator involved in various physiological process in addition to CCR, including central carbon and nitrogen metabolism, biofilm formation and toxin gene expression. This paper reviewed the recent research advances of function mechanisms and molecular structure of CcpA.

Key words: catabolite control protein A; carbon catabolite repression; pleiotropism; crystal structure

1 微生物中的CCR效应及CcpA的发现

1942年, Jacques Monod 等观察到, 大肠杆菌 *Escherichia coli* 在葡萄糖和半乳糖混合碳源环境中优先利用葡萄糖, 当葡萄糖消耗后才开始利用半乳糖, 即出现了二阶段生长的现象。随后的研究表明, 葡萄糖存在时, 其分解代谢物会抑制与其他糖代谢相关的基因表达, 这种现象被称之为碳分解代谢物阻遏 (carbon catabolite repression, CCR) 效应^[1]。

E. coli 等肠道细菌中介导 CCR 效应的关键调控蛋白为转录激活因子 CRP (cyclic AMP receptor protein), 又称分解代谢基因激活蛋白 (catabolite gene-activator protein, CAP)^[2]。当培养基中不含葡

萄糖时, 葡萄糖转运蛋白的 EIIA 结构域 (EIIA^{Glc}) 处于磷酸化状态, 能够激活腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC), 催化胞内 cAMP 的合成, 而 cAMP 在浓度足够高时可与 CRP 结合形成复合体, 然后激活非速效碳源分解代谢相关基因的转录; 相反, 葡萄糖存在时则会导致 EIIA^{Glc} 去磷酸化, 从而无法启动非速效碳源的利用^[3-5]。

收稿日期: 2011-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070075); 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2011CBA00806)

*通信作者: E-mail: whjiang@sibs.ac.cn

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等低 GC 含量革兰氏阳性菌的 CCR 效应机制与大肠杆菌不相同。在有氧条件下, *B. subtilis* 中检测不到 cAMP^[6], 亦未找到 CRP 类似的蛋白。1991 年, Henkin 等^[7] 发现了 *B. subtilis* 中编码分解代谢物控制蛋白的基因 *ccpA*, 将该基因中断失活后, 能够解除葡萄糖对 α -淀粉酶合成基因 *amyE* 的抑制作用, 从而表明 CcpA 是 *B. subtilis* 中控制 CCR 效应的关键因子。之后的研究者相继在其他低 GC 含量革兰氏阳性菌中发现了 CcpA 的存在, 如 *Clostridium acetobutylicum*^[8]、*Staphylococcus xylosus*^[9]、*Lactobacillus pentosus*^[10]、*Lactococcus lactis*^[11]、*Listeria monocytogenes*^[12]、*Streptococcus thermophilus*^[13]、*Enterococcus faecalis*^[14]、*Thermoactinomyces* sp. E79^[15] 等。这些研究结果表明, 含 PTS 系统的低 GC 含量革兰氏阳性菌大部分可能以 CcpA 依赖的 CCR 效应进行碳源次序代谢的调控, 且这些 CcpA 蛋白具有较高的保守性。

2 CcpA的多效性调控作用

2.1 依赖于CcpA的CCR效应机制

在 CcpA 调控蛋白被发现之前, Nicholson 等^[16] 就观察到, 枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 的淀粉酶编码基因 *amyE* 启动子区存在 *cre*(catabolite repression element) 位点, 该位点突变后可以解除葡萄糖对 *amyE* 的 CCR 效应, 葡萄糖与淀粉即可被同步利用, 从而证明 *cre* 位点是参与 CcpA 依赖的 CCR 效应的重要顺式调控元件。随后的研究表明, 除 *amyE* 外, 许多参与碳源代谢的操纵子内均有 *cre* 位点的存在, 如 *gntR*(参与葡萄糖酸代谢)^[17-18]、*xyIA*(参与木糖代谢)^[19]、*abnA*(参与阿拉伯糖代谢)^[20] 等。1995 年, Kim 等^[21] 通过 EMSA、footprinting 实验证明了 CcpA 可以与 *amyE* 转录起始位点处的 *cre* 位点 *amyO* 结合, 而且这种结合不需要共阻遏物 Hpr 的协助; 但后续的相关研究表明, 在大多数情况下 CcpA 与 *cre* 位点的结合需要共阻遏蛋白 P-(Ser)-HPr 的参与^[22-26]。HPr(histidine-phosphoryl protein) 有组氨酸残基和丝氨酸残基两个磷酸化位点, 该蛋白的组氨酸残基在磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system, PTS) EI(enzyme I) 催化下以磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 为底物进行磷酸化, 并将磷传递给负责葡萄糖转运和磷酸化的 PTS 系统; HPr 蛋白的丝氨酸残基随后在 Hpr 激酶/磷酸酯酶 HPrK/P(Hpr kinase/ phosphoesterase)^[27] 的催化下被磷酸化, 形成 P-(Ser)-HPr 并与转录调控因子 CcpA

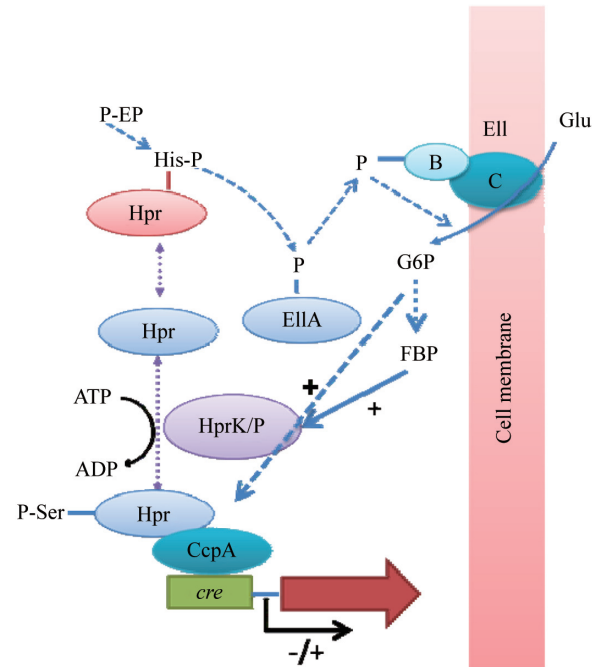
形成复合体, 参与 CCR 效应^[23,25]。

HPrK/P 的活性受胞内 ATP 与无机磷酸比例 (ATP/Pi) 以及葡萄糖代谢产物 1, 6-二磷酸果糖 (FBP)、6-磷酸葡萄糖 (G6P) 水平的影响^[27-29]。当葡萄糖等速效碳源存在时, 胞内高水平的 ATP/Pi 与葡萄糖代谢产物激活 HPrK/P 的激酶活性, 将 HPr 的丝氨酸残基磷酸化, 然后 P-(Ser)-HPr 与 CcpA 结合形成复合物, 与非速效碳源代谢基因的 *cre* 位点结合, 抑制其转录 (图 1)^[5,30]。

值得注意的是, *B. subtilis* 中除 HPr 外, 还存在一个 HPr 的同种异型蛋白 Crh (catabolite repression HPr-like protein)^[31], 两者均参与 CcpA 依赖的 CCR 效应过程, 但前者在这一过程中起主要作用。Hpr 缺失后, Crh 只能部分地完成 Hpr 的功能, 而 Crh 缺失后, CCR 效应的调控不受影响^[31-32]。而以琥珀酸盐或柠檬酸盐为碳源时, 编码 Mg²⁺-柠檬酸盐转运蛋白的 *citM* 基因特异性地受 Crh 抑制^[33]。Crh 目前仅在芽孢杆菌属中被发现^[30,34]。

2.2 依赖于CcpA的CCA效应机制

当速效碳源存在时, 除引起 CCR 效应外, 也



在葡萄糖等速效碳源存在时, 胞内 ATP 及 FBP 水平的升高激活 HPrK/P 的激酶活性, 将 HPr 丝氨酸残基磷酸化。P-(Ser)-HPr 与 CcpA 形成复合物, 与目的基因的 *cre* 位点结合, 从而阻遏/激活该基因的转录。FBP 与 G6P 可增强 CcpA-P-(Ser)-HPr 与 *cre* 位点的结合。

图1 低GC含量革兰氏阳性菌中CcpA依赖的CCR/CCA效应机制

有一些基因可以被激活,这种现象称为碳分解代谢物激活(carbon catabolite activation, CCA)。CcpA 依赖的 CCA 效应机制与 CCR 效应类似,即 CcpA 在共阻遏物 P-(Ser)-HPr 或 P-(Ser)-Crh 的协助下与目的基因的特定序列(如 *cre* 序列)结合,激活基因转录(图 1)。尽管 CcpA 对有些基因实施 CCA 效应时也不需要共阻遏物,但不同点在于,CcpA 实施阻遏效应时的 *cre* 序列一般在启动子区内或在读码框内,如 *amyE*^[16]、*bglP*^[35]、*cccA*^[36]、*dctP*^[37]、*glpF*^[38]、*phoP*^[39]、*acuA*^[40] 等;而 CcpA 实施激活效应时,其 *cre* 序列一般位于启动子上游,如 *ackA*^[41-42]、*pta*^[43]、*ilvB*^[44] 等,也有些受 CcpA 激活的基因在其启动子区未发现 *cre* 序列,如 *alsSD*^[45]。

2.3 CcpA 参与的其他调控过程

许多微生物的 *ccpA* 基因缺失突变株除解除了 CCR 效应外,亦表现出其他的表型,如生长受到抑制^[9,11,46-48]、产孢减少^[49]、产溶剂受影响^[8] 等,这表明 CcpA 除参与碳源代谢的 CCR/CCA 效应外,还可能具有其他的调控功能。

2.3.1 对糖酵解途径的促进作用

糖酵解是真核细胞及细菌摄入体内的葡萄糖最初经历的酶促分解过程。已有研究表明,糖酵解途径的许多关键酶基因均受到 CcpA 的调控。

在 *B. subtilis* 中,编码糖酵解过程关键酶甘油醛-3-磷酸脱氢酶的是 *gap* 操纵子,而研究表明,*gap* 操纵子的激活依赖于 CcpA 的存在^[50],但 CcpA 并不直接与 *gap* 操纵子结合^[51-52],而是通过影响 PTS 系统及其代谢中间物的方式间接调控 *gap* 操纵子^[53]。此外,*B. subtilis* 中编码磷酸甘油酸激酶的 *pgk* 操纵子的激活也依赖于 CcpA^[50]。

在 *L. lactis* 中,*las* 操纵子编码参与糖酵解过程的磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶及 L-乳酸脱氢酶,该操纵子的转录在 *ccpA* 缺失突变株中降低了 75%^[11]。*CcpA* 缺失后,丙酮酸激酶及 L-乳酸脱氢酶活性的降低导致代谢产物中乙醇、乙酸的增加,而野生型的发酵产物主要为乳酸^[11]。

2.3.2 对碳溢流代谢的调控

在碳源丰富的培养基中,细菌通过糖酵解产生的丙酮酸并不能全部进入三羧酸循环,而是会生成乙酸、乳酸、乙偶姻等代谢产物分泌到胞外,这称为碳溢流代谢(carbon overflow metabolism)。在 *B. subtilis* 中的研究发现,即使在高浓度的葡萄糖培养条件下,*ccpA* 突变株也不会发生碳溢流现象^[50]。究其原因:催化丙酮酸生成乙酸的两个关键

酶——磷酸转移酶和乙酸激酶的编码基因 *pta* 与 *ackA* 受到 CcpA 的正调控^[43,54];而丙酮酸经乙酰辅酶 A 生成乙偶姻途径的关键酶乙酰乳酸合酶的编码基因 *alsSD* 到亦受 CcpA 的正调控^[45,54];此外,与乙酸、乙偶姻分解代谢相关的 *acsA*、*acuABC* 也受到 CcpA 的抑制^[54]。研究还发现,*L. lactis* 中的 CcpA 也具有促进丙酮酸生成 L-乳酸的功能^[11]。这些研究结果表明,在某些细菌中,CcpA 参与调控了丙酮酸转变为乙酸、乙偶姻、L-乳酸等可分泌碳源的过程,从而降低了进入 TCA 循环的碳流量。

2.3.3 对有氧呼吸作用的抑制

呼吸作用是生物体细胞把有机物氧化分解并产生能量的化学过程。其中三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)是有氧呼吸过程中的关键反应过程,是需氧生物体内普遍存在的糖、脂肪和蛋白质在体内彻底氧化的共同代谢途径^[55]。*B. subtilis* 中,CcpA 可以直接或间接地抑制参与 TCA 循环的柠檬酸合酶编码基因 *citZ* 的表达^[56]。与柠檬酸转运相关的 *citM-yflN* 操纵子也是 CcpA 依赖的 CCR 效应的直接靶点之一^[57],而对该操纵子起正调控作用的双组份系统 *CitS/CitT* 亦受到 CcpA 的直接抑制^[58-59]。此外,TCA 循环中间产物的转运同样受到 CcpA 的调控,例如四碳二元酸,如苹果酸、延胡索酸、琥珀酸的转运系统是由 *dctP* 基因编码,该基因以及正调控该基因的双组份系统 *dctS/dctR* 均受到 CcpA 的抑制^[37]。

此外,*B. subtilis* 中的 *resABCDE* 操纵子^[60]、编码细胞色素 *c₅₅₀* 的 *cccA* 基因^[36]、编码细胞色素 bd 氧化酶的 *cydABCD* 操纵子^[61] 等均参与有氧呼吸过程的电子传递,而这些基因的表达均受到 CcpA 的抑制。

2.3.4 参与氮代谢的调控

微生物能够以柠檬酸循环、糖酵解及戊糖磷酸途径等代谢中间产物为碳骨架合成部分或全部氨基酸^[62]。CcpA 对谷氨酸的生物合成有促进作用。*B. subtilis* 氮同化过程中,谷氨酸的生物合成是连接碳代谢及氮代谢的纽带。参与谷氨酸生物合成的谷氨酸合成酶由 *gltAB* 操纵子编码,该操纵子的激活需要糖酵解中间产物的积累,而在 *ccpA* 突变株中因无足够的糖酵解中间产物积累导致 *gltAB* 操纵子无法被激活^[63],因而 CcpA 能够间接地对 *gltAB* 操纵子起到激活作用。*CcpA* 缺失突变株中,*gltAB* 无法激活被认为是葡萄糖-铵盐培养时菌体生长受抑制的关键因素。另外,参与氨基酸降解的谷氨酸脱氢

酶的编码基因 *rocG* 亦受到 CcpA 的 CCR 效应作用。在 *ccpA* 突变株中 *rocG* 的 CCR 效应被解除, 导致谷氨酸的合成量减少, 从而表现为突变株在葡萄糖-铵盐培养基上的生长受到抑制^[64]。

分支氨基酸 (branched-chain amino acids, BCAAs), 如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸等的合成则受到 CcpA 依赖的 CCA 效应的调控。BCAAs 是蛋白质中含量最高的氨基酸, 可以形成蛋白质的疏水核心, 而且这些氨基酸是异构支链脂肪酸和反异构支链脂肪酸 (芽孢杆菌膜脂脂肪酸的主要种类) 生物合成的前体。*B. subtilis* 中负责 BCAAs 生物合成的关键操纵子为 *ilv-leu* 操纵子, 该操纵子直接受 CcpA 的激活^[44,65], 其编码产物参与催化由丙酮酸到氨基酸的生物合成, 并且将碳代谢与氨基酸合成偶联起来。

2.3.5 对其他生理过程的影响

CcpA 除了广泛地参与碳、氮代谢的调控外, 在某些微生物中还参与一些特殊的生理过程, 如产孢、产溶剂、毒性基因的表达等。

在重要的产溶剂梭菌 *C. acetobutylicum* ATCC 824 中, *ccpA* 中断后, 在不调控 pH 的情况下, 突变株在发酵培养基中出现酸累积, 从而无法正常产生溶剂^[8]。这表明 CcpA 直接或间接地参与了该菌株产酸产溶剂过程的调控。

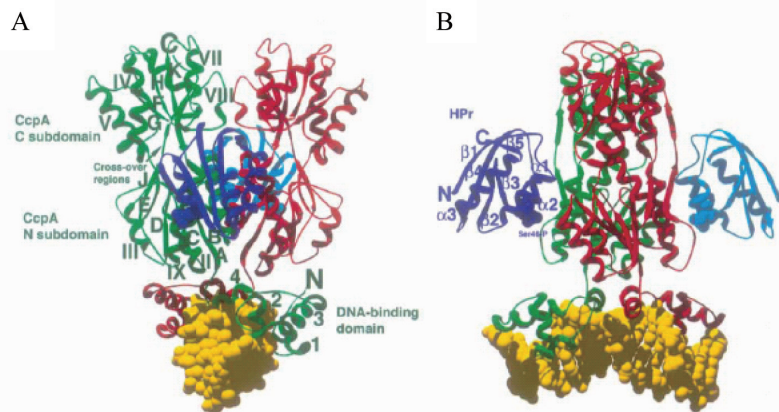
在一些致病菌如酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 中, CcpA 直接激活毒性基因的表达^[49,66-68]。此外, 在胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 中, CcpA 参与调控 *dnaK* (编码热休克蛋白)、*groESL* 操纵子 (编码分子

伴侣) 的激活, *ccpA* 突变菌株在热激后的存活率比野生型菌株明显降低^[69]; 在 *B. subtilis* 及 *S. aureus* SA113 中, CcpA 通过调控 *cidA*、*icaA*、*citB*、*citZ* 等基因的表达促进生物被膜 (biofilm) 的形成^[70-71]; 在 *C. perfringens* 中, CcpA 通过抑制 *pilT*、*pilD* 基因的转录进而负调控 TFP 依赖的滑移运动^[72], 且该菌的充分产孢和生物被膜的充分形成亦依赖于 CcpA, 但具体机制尚不清楚^[49,73]。

3 CcpA结构与功能的研究进展

3.1 CcpA的结构解析

CcpA 属于 LacI-GalR 转录因子家族^[7], 其 N 末端为 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD), C 末端结构域又称核心结构域 (core domain), 参与同源二聚化及共阻遏物的结合^[74]。在巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* 中, CcpA 的 N 末端 DNA 结合结构域由 60 个氨基酸残基组成, 包含两个 DNA 结合元件: 由 3 个 α 螺旋 (helix1~3) 形成的螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix, HTH) 结构, 结合 DNA 双螺旋的大沟; 由 helix4 形成铰链螺旋 (hinge helix), 结合 DNA 双螺旋小沟。C 末端的核心结构域由第 61~332 个氨基酸残基组成, 可分为 N 亚结构域 (N subdomain) 及 C 亚结构域 (C subdomain)。N 亚结构域含 4 个 α 螺旋 (I~III, IX), 包围着 6 股平行 β 折叠片 (A~E, J), 参与同共阻遏物的结合。C 亚结构域含 5 个 α 螺旋 (IV~VIII), 包围着 5 个 β 折叠股 (F~I, K)。两个亚结构域间由 β E- α IV、 β I- α IX、 β J- β K 形成 3 个连接, 使得两个亚基间可以旋转^[74] (图 2)。*B. megaterium* 的 CcpA 与 P-(Ser)-HPr、



CcpA-P-(Ser)-HPr-cre 复合体结构。两个分子的 CcpA 形成同源二聚体, 与两个分子 P-(Ser)-HPr 结合形成复合体, 进而与 *cre* 位点结合; B, A 图所示结构旋转 90°。

图2 *B. megaterium* CcpA-P-(Ser)-HPr-cre 复合物的结构^[74]

P-(Ser)-Crh 等共阻遏物及 *cre* 序列结合的复合体结构已经得到解析^[28, 34, 74]。但由于 CcpA 的 N 末端 DBD 与 C 末端核心结构域之间的连接很不稳定, 因而完整的 CcpA 单晶很难获得^[75]。*B. megaterium*、*B. subtilis*、*L. lactis* 中断开的 CcpA C 末端结构域及 N 末端 DNA 结合结构域的结构也已分别得到解析^[75-77]。

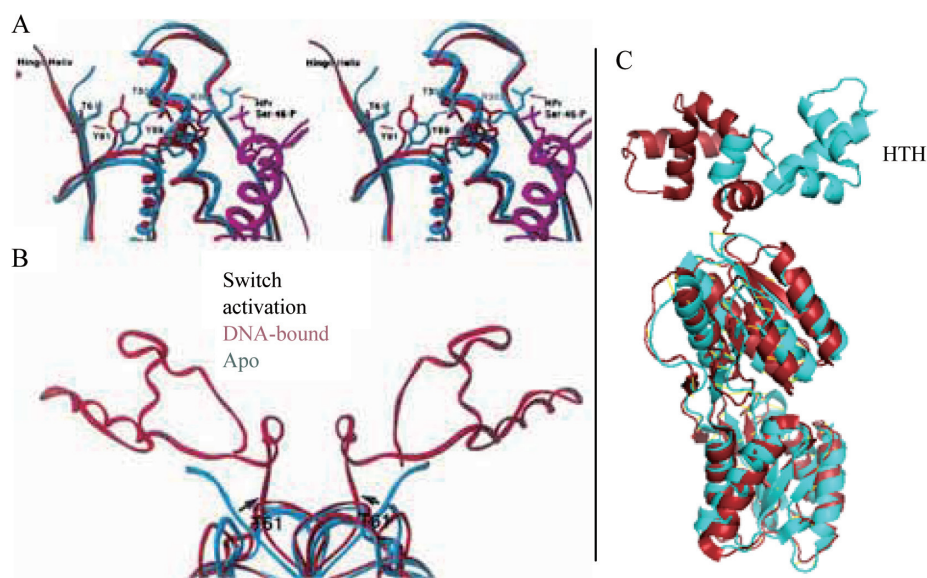
3.2 CcpA 与共调节物结合的变构“开关”机制

一般情况下, CcpA 需要结合共调节物 P-(Ser)-HPr 发生变构才能与 *cre* 序列结合。通过比较 CcpA-P-(Ser)-HPr-*cre* 复合体中 CcpA 的结构和脱辅基的 CcpA(apoCcpA) 结构, 可以发现, 结合了 P-(Ser)-HPr 后, CcpA 的 C 亚结构域几乎不受影响, 但 N 亚结构域发生了 3~8° 的旋转, 从而由“关”的状态变为“开”的状态^[74](图 3C)。CcpA 与 P-(Ser)-HPr 的相互作用主要是通过 CcpA 二聚体中单体 1 N 亚结构域的 α 螺旋 I、IX 及单体 2 N 亚结构域 α 螺旋 I、II 来实现的, 其中 CcpA 的 Tyr295、Ala299、Val300、Leu304 等氨基酸残基可以与 P-(Ser)-HPr 的 Ile47、Met48、Met51 等氨基酸残基形成紧密的界面(图 3)。CcpA 与 P-(Ser)-HPr 结合后, 后者的 Ser46-P 可与 CcpA 中 Arg303 作用,

使 Arg303 旋转并随之造成 Tyr89 位置的改变, 进一步导致 Tyr91 和 Thr306 间氢键的断裂, Tyr91 将 Thr61 排出, 使 N 末端 DBD 的 HTH 结构发生约 180° 旋转, 改变两个 CcpA 单体铰链螺旋的排列, 从而使 CcpA 与 *cre* 位点结合^[74-75] CcpA 位于 N 亚结构域和 N 末端 DBD 之间的 Thr61 的位置变化是这种“开关”调控的关键。

芽孢杆菌中 HPr 的同种异型蛋白 Crh 参与 CcpA 变构调节作用的机制与 HPr 类似, 但 HPr 与 CcpA 的结合能力比 Crh 高 10 倍左右^[34]。6-磷酸-葡萄糖、1, 6-二磷酸-果糖同 CcpA 的结合可以对其结构进行微调, 增强 CcpA-P-(Ser)-HPr 与 *cre* 的结合^[28]。

作为多效调控因子, CcpA 可以同很多基因的 *cre* 位点结合, 这些 *cre* 位点具有一定的保守性, 同时也有一定的差异。CcpA 如何同这些差异的 *cre* 位点结合, 在抑制一些基因表达的同时又能激活一些基因的表达呢? Schumacher 等^[78] 分别以受 CcpA 激活、抑制及随机的 *cre* 位点与 CcpA 共结晶, 通过对晶体结构的分析, 发现 CcpA-P-(Ser)-HPr 复合体与上述三个 *cre* 位点结合的亲和性是相近的。在与不同的 *cre* 位点结合时, CcpA 的结构, 尤其是



A: 脱辅基 apoCcpA(蓝色)与 CcpA-P-(Ser)-HPr-*cre* 复合体中 CcpA(红色)的结构的重叠图。参与变构“开关”的氨基酸残基(棍棒模型显示): CcpA 的 Thr61、Tyr89、Tyr91、Thr306、Arg303; HPr 的 Ser46-P^[74]。B: 与 P-(Ser)-HPr 的结合导致 CcpA N 亚结构域及 Thr61 的变化使得两 CcpA 单体的铰链区并排排列, 从而形成可以结合 DNA 的铰链螺旋(红色), 而 apoCcpA 两单体的铰链区远离^[74]。C: apoCcpA(蓝色)单体与 CcpA-P-(Ser)-HPr-*cre* 复合体中 CcpA(红色)单体的重叠图。结合 P-(Ser)-HPr 后, CcpA 的 HTH 结构旋转了约 180°。

图3 P-(Ser)-HPr 的结合导致 CcpA 结构改变^[74-75]

DNA 结合结构域会发生不同角度的弯曲。在这个过程中, CcpA DNA 结合结构域的 Arg22、Leu55 这两个保守的氨基酸残基识别 *cre* 序列的保守区, 而一些非极性氨基酸, 如 I5、A18 等, 可以加强与 *cre* 序列的结合过程^[78], 从而使 CcpA-P-(Ser)-HPr 复合体与不同 *cre* 位点结合的亲和性相近。由此, 再根据之前研究人员的工作, 我们可以得出结论, CcpA 行使阻遏或激活效应主要是由 *cre* 位点的位置决定的^[78], 行使阻遏效应时的 *cre* 位点一般在启动子区内或在读码框内, 如 *amyE*^[16]、*bglP*^[35]、*ccaA*^[36]、*dctP*^[37]、*glpF*^[38]、*phoP*^[39]、*acuA*^[40] 等; 而 CcpA 行使激活效应时, 其 *cre* 位点一般位于启动子上游。

3.3 CcpA功能域的研究

由于 CcpA 具有多效性调控功能, 将其敲除后会影响许多生理代谢过程, 因此有必要研究其结构与功能的关系, 而对 CcpA 进行点突变及随机突变是了解其功能域和活性位点的重要手段之一。

在 *B. megaterium* 中, CcpA 发生 T4S、7H、N49S 单点突变后, 可解除对 *xylA* 基因的抑制, 且保持菌体的正常生长^[79]。这三个氨基酸残基均位于 CcpA N 末端 DBD 结构域, Thr4 是 HTH 结构的第一个氨基酸, Arg47 位于 N 末端 DBD 与 C 末端核心结构域的连接处, Asn49 参与形成铰链 α 螺旋与 DNA 小沟结合。这三个位点突变成相似氨基酸后, 可能仅影响 CcpA 与部分 *cre* 位点的结合 (如 *xylA* 上游的 *cre* 位点), 但不影响与生长相关的基因的激活 (如分支氨基酸的合成), 从而将 CcpA 的 CCR 效应与影响生长的功能分开。此外, 现已确认 *B. megaterium* CcpA 与 P-(Ser)-HPr 或 P-(Ser)-Crh 结合的关键氨基酸残基有 Tyr295、Ala299、Val300、Leu304 等, 其中 Y295R 突变后, CcpA 以不依赖于 P-(Ser)-HP 的方式与 *cre* 位点结合, 而 A299E 突变后 CcpA 无法与 *cre* 位点结合^[80]。*B. subtilis* CcpA 的相应氨基酸残基发生 A300W、A302W、L306W、K308W 突变后, 不能对 *xynP*、*gntR*、*ackA* 及 *alsS* 产生完全的 CCR/CCA 效应^[81]。

此外, 对 CcpA 中参与 P-(Ser)-HPr 变构调节的氨基酸残基进行突变也会对 CcpA 的调控功能造成较大影响。例如, *B. megaterium* CcpA 发生 Y89E 的突变及 *B. subtilis* CcpA 中相应位点 Y90W 的突变可导致 CcpA 与 *cre* 位点的结合不依赖于 P-(Ser)-HPr, 形成组成型的 CCR/CCA 效应; 而 *B. megaterium* CcpA 参与变构调节的关键氨基酸残基 R303D 突变

后会导致 CcpA 不能结合至 *cre* 位点^[80]。

上述研究既对 CcpA 的关键氨基酸残基的功能进行了探讨, 同时也给我们以启示: 是否可以通过对 CcpA 进行分子结构的改造实现其多效调控功能的分离。

4 研究与应用展望

CcpA 介导的 CCR 效应存在于多种低 GC 含量革兰氏阳性菌中, 其多效性调控功能也得到一定程度的揭示和研究。鉴于 CcpA 能够通过特定功能域来调控某些重要代谢途径中的基因, 如何通过功能域改造实现其调控功能, 由复杂多效变为简单专效将是今后研究的重点之一。在 *B. megaterium* 中已有通过对 CcpA 进行随机突变以剥离 CCR 效应的报道^[79]。因此, 不难想象, 今后在其他一些重要的工业微生物中, 我们亦可通过类似的手段改造 CcpA 的功能, 通过屏蔽或强化 CcpA 的某些功能域实现其调控的精细操作, 从而获得理想的工业菌株。

[参 考 文 献]

- [1] Magasanik B. Catabolite repression. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1961, 26: 249-56
- [2] Perlman RL, De Crombrughe B, Pastan I. Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in *E. coli*. Nature, 1969, 223(5208): 810-2
- [3] Warner JB, Lolkema JS. CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(4): 475-90
- [4] Stulke J, Hillen W. Carbon catabolite repression in bacteria. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(2): 195-201
- [5] Gorke B, Stulke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(8): 613-24
- [6] Perumov DA, Machkovskii VV, Iakovlev D, et al. Effect of *O*-hydroxylamine on the transforming DNA from *Bacillus subtilis*. Correlation of chemical modifications with genetic consequences. Bioorg Khim, 1984, 10(12): 1695-7
- [7] Henkin TM, Grundy FJ, Nicholson WL, et al. Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. Mol Microbiol, 1991, 5(3): 575-84
- [8] Ren C, Gu Y, Hu S, et al. Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. Metab Eng, 2010, 12(5): 446-54
- [9] Egeter O, Bruckner R. Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. Mol Microbiol, 1996, 21(4): 739-49
- [10] Lokman BC, Heerikhuisen M, Leer RJ, et al. Regulation

- of expression of the *Lactobacillus pentosus xylAB* operon. *J Bacteriol*, 1997, 179(17): 5391-7
- [11] Luesink EJ, van Herpen RE, Grossiord BP, et al. Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol Microbiol*, 1998, 30(4): 789-98
- [12] Behari J, Youngman P. A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J Bacteriol*, 1998, 180(23): 6316-24
- [13] van den Bogaard PT, Kleerebezem M, Kuipers OP, et al. Control of lactose transport, β -galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol*, 2000, 182(21): 5982-9
- [14] Leboeuf C, Leblanc L, Auffray Y, et al. Characterization of the *ccpA* gene of *Enterococcus faecalis*: identification of starvation-inducible proteins regulated by *ccpA*. *J Bacteriol*, 2000, 182(20): 5799-806
- [15] Moon MW, Park SY, Kim HK, et al. Cloning and expression of the *ccpA* gene encoding catabolite control protein from *Thermoactinomyces* sp. E79. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(10): 2254-8
- [16] Nicholson WL, Park YK, Henkin TM, et al. Catabolite repression-resistant mutations of the *Bacillus subtilis* α -amylase promoter affect transcription levels and are in an operator-like sequence. *J Mol Biol*, 1987, 198(4): 609-18
- [17] Miwa Y, Fujita Y. Determination of the *cis* sequence involved in catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon; implication of a consensus sequence in catabolite repression in the genus *Bacillus*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(23): 7049-53
- [18] Miwa Y, Fujita Y. Promoter-independent catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon. *J Biochem*, 1993, 113(6): 665-71
- [19] Jacob S, Allmansberger R, Gartner D, et al. Catabolite repression of the operon for xylose utilization from *Bacillus subtilis* W23 is mediated at the level of transcription and depends on a *cis* site in the *xylA* reading frame. *Mol Gen Genet*, 1991, 229(2): 189-96
- [20] Inacio JM, de Sa-Nogueira I. Trans-acting factors and *cis* elements involved in glucose repression of arabinan degradation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2007, 189(22): 8371-6
- [21] Kim JH, Guvener ZT, Cho JY, et al. Specificity of DNA binding activity of the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *J Bacteriol*, 1995, 177(17): 5129-34
- [22] Fujita Y, Miwa Y, Galinier A, et al. Specific recognition of the *Bacillus subtilis gnt* *cis*-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol Microbiol*, 1995, 17(5): 953-60
- [23] Jones BE, Dossonnet V, Kuster E, et al. Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem*, 1997, 272(42): 26530-5
- [24] Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, et al. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HPrK. *J Bacteriol*, 2005, 187(22): 7826-39
- [25] Chauvaux S. CcpA and HPr(ser-P): mediators of catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol*, 1996, 147(6-7): 518-22
- [26] Voskuil MI, Chambliss GH. Significance of HPr in catabolite repression of α -amylase. *J Bacteriol*, 1996, 178(23): 7014-5
- [27] Boel G, Mijakovic I, Maze A, et al. Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in Gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2003, 5(4): 206-15
- [28] Schumacher MA, Seidel G, Hillen W, et al. Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *J Mol Biol*, 2007, 368(4): 1042-50
- [29] Seidel G, Diel M, Fuchsbauer N, et al. Quantitative interdependence of coeffectors, *CcpA* and *cre* in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *FEBS J*, 2005, 272(10): 2566-77
- [30] Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(2): 245-59
- [31] Galinier A, Haiech J, Kilhoffer MC, et al. The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(16): 8439-44
- [32] Darbon E, Galinier A, Le Coq D, et al. Phosphotransfer functions mutated *Bacillus subtilis* HPr-like protein Crh carrying a histidine in the active site. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, 3(3): 439-44
- [33] Warner JB, Lolkema JS. A Crh-specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 220(2): 277-80
- [34] Schumacher MA, Seidel G, Hillen W, et al. Phosphoprotein Crh-Ser46-P displays altered binding to CcpA to effect carbon catabolite regulation. *J Biol Chem*, 2006, 281(10): 6793-800
- [35] Kruger S, Gertz S, Hecker M. Transcriptional analysis of *bgIPH* expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *J Bacteriol*, 1996, 178(9): 2637-44
- [36] Monedero V, Boel G, Deutscher J. Catabolite regulation of the cytochrome *c550*-encoding *Bacillus subtilis cccA* gene. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, 3(3): 433-8
- [37] Asai K, Baik SH, Kasahara Y, et al. Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 2000, 146 (Pt 2): 263-71
- [38] Darbon E, Servant P, Poncet S, et al. Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression. *Mol Microbiol*, 2002, 43(4): 1039-52

- [39] Puri-Taneja A, Paul S, Chen Y, et al. CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, P(A6). *J Bacteriol*, 2006, 188(4): 1266-78
- [40] Grundy FJ, Waters DA, Allen SH, et al. Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J Bacteriol*, 1993, 175(22): 7348-55
- [41] Turinsky AJ, Grundy FJ, Kim JH, et al. Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J Bacteriol*, 1998, 180(22): 5961-7
- [42] Moir-Blais TR, Grundy FJ, Henkin TM. Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* promoter requires sequences upstream of the CcpA binding site. *J Bacteriol*, 2001, 183(7): 2389-93
- [43] Presecan-Siedel E, Galinier A, Longin R, et al. Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1999, 181(22): 6889-97
- [44] Tojo S, Satomura T, Morisaki K, et al. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol Microbiol*, 2005, 56(6): 1560-73
- [45] Turinsky AJ, Moir-Blais TR, Grundy FJ, et al. *Bacillus subtilis* ccpA gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. *J Bacteriol*, 2000, 182(19): 5611-4
- [46] Wray LV, Jr., Pettengill FK, Fisher SH. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis hut* operon requires a cis-acting site located downstream of the transcription initiation site. *J Bacteriol*, 1994, 176(7): 1894-902
- [47] Hueck CJ, Kraus A, Schmiedel D, et al. Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium*. *Mol Microbiol*, 1995, 16(5): 855-64
- [48] Monedero V, Gosalbes MJ, Perez-Martinez G. Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J Bacteriol*, 1997, 179(21): 6657-64
- [49] Varga J, Stirewalt VL, Melville SB. The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (*cpe*) regulation in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, 2004, 186(16): 5221-9
- [50] Tobisch S, Zuhlke D, Bernhardt J, et al. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1999, 181(22): 6996-7004
- [51] Fillinger S, Boschi-Muller S, Azza S, et al. Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J Biol Chem*, 2000, 275(19): 14031-7
- [52] Ludwig H, Stulke J. The *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA exerts all its regulatory functions by DNA-binding. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 203(1): 125-9
- [53] Ludwig H, Rebhan N, Blencke HM, et al. Control of the glycolytic gapA operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol Microbiol*, 2002, 45(2): 543-53
- [54] Grundy FJ, Turinsky AJ, Henkin TM. Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *J Bacteriol*, 1994, 176(15): 4527-33
- [55] Krebs HA. The role of fumarate in the respiration of *Bacterium coli* commune. *Biochem J*, 1937, 31: 2095-124
- [56] Kim HJ, Roux A, Sonenshein AL. Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Mol Microbiol*, 2002, 45(1): 179-90
- [57] Yamamoto H, Murata M, Sekiguchi J. The CitST two-component system regulates the expression of the Mg-citrate transporter in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2000, 37(4): 898-912
- [58] Gaudy P, Lamberet G, Poncet S, et al. CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*, 2003, 50(1): 183-92
- [59] Repizo GD, Blancato VS, Sender PD, et al. Catabolite repression of the citST two-component system in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 260(2): 224-31
- [60] Choi SK, Saier MH, Jr. Mechanism of CcpA-mediated glucose repression of the *resABCDE* operon of *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2006, 11(1-2): 104-10
- [61] Puri-Taneja A, Schau M, Chen Y, et al. Regulators of the *Bacillus subtilis cydABCD* operon: identification of a negative regulator, *CcpA*, and a positive regulator, *ResD*. *J Bacteriol*, 2007, 189(9): 3348-58
- [62] Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemistry[M]*. 5th edition. New York: W H Freeman, 2002
- [63] Wacker I, Ludwig H, Reif I, et al. The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 10): 3001-9
- [64] Belitsky BR, Kim HJ, Sonenshein AL. CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. *J Bacteriol*, 2004, 186(11): 3392-8
- [65] Ludwig H, Meincken C, Matin A, et al. Insufficient expression of the *ilv-leu* operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis* ccpA mutant. *J Bacteriol*, 2002, 184(18): 5174-8
- [66] Deutscher J, Herro R, Bourand A, et al. P-Ser-HPr--a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1-2): 118-25
- [67] Seidl K, Stucki M, Ruegg M, et al. *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(4): 1183-94
- [68] Poncet S, Milohanic E, Maze A, et al. Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol*, 2009, 16: 88-102
- [69] Castaldo C, Siciliano RA, Muscariello L, et al. CcpA affects expression of the *groESL* and *dnaK* operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 35
- [70] Chagneau C, Saier MH, Jr. Biofilm-defective mutants of *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, 8(3):

- 177-88
- [71] Seidl K, Goerke C, Wolz C, et al. *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun*, 2008, 76(5): 2044-50
- [72] Mendez M, Huang IH, Ohtani K, et al. Carbon catabolite repression of type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, 2008, 190(1): 48-60
- [73] Varga JJ, Therit B, Melville SB. Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*, 2008, 76(11): 4944-51
- [74] Schumacher MA, Allen GS, Diel M, et al. Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell*, 2004, 118(6): 731-41
- [75] Loll B, Saenger W, Biesiadka J. Structure of full-length transcription regulator CcpA in the apo form. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774(6): 732-6
- [76] Loll B, Kowalczyk M, Alings C, et al. Structure of the transcription regulator CcpA from *Lactococcus lactis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007, 63(Pt 4): 431-6
- [77] Singh RK, Palm GJ, Panjikar S, et al. Structure of the apo form of the catabolite control protein A (CcpA) from *Bacillus megaterium* with a DNA-binding domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2007, 63(Pt 4): 253-7
- [78] Schumacher MA, Sprehe M, Bartholomae M, et al. Structures of carbon catabolite protein A-(HPr-Ser46-P) bound to diverse catabolite response element sites reveal the basis for high-affinity binding to degenerate DNA operators. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(7): 2931-42
- [79] Kuster E, Hilbich T, Dahl MK, et al. Mutations in catabolite control protein CcpA separating growth effects from catabolite repression. *J Bacteriol*, 1999, 181(13): 4125-8
- [80] Kraus A, Kuster E, Wagner A, et al. Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. *Mol Microbiol*, 1998, 30(5): 955-63
- [81] Sprehe M, Seidel G, Diel M, et al. CcpA mutants with differential activities in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2007, 12(1-2): 96-105