

• 医药生物技术 •

分枝菌酸小杆菌不同生长周期的磷酸化蛋白质定量表达比较

徐丹洋¹, 高媛², 施佳辉³, 姜松昊³, 薛宇^{1*}, 张瑶^{3*}

1 华中科技大学 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074

2 南京农业大学 园艺学院中心实验室, 江苏 南京 210095

3 军事科学院军事医学研究院 中国医学科学院蛋白质组学与药物研发新技术创新单元 国家蛋白质科学中心(北京) 北京蛋白质组研究中心 医学蛋白质组全国重点实验室, 北京 102206

徐丹洋, 高媛, 施佳辉, 姜松昊, 薛宇, 张瑶. 分枝菌酸小杆菌不同生长周期的磷酸化蛋白质定量表达比较[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4098-4110.

XU Danyang, GAO Yuan, SHI Jiahui, JIANG Songhao, XUE Yu, ZHANG Yao. Quantitative comparison of phospho-proteins of *Mycobacterium smegmatis* at different growing phases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4098-4110.

摘要: 蛋白质磷酸化修饰在结核病致病菌——结核分枝杆菌中扮演重要角色, 有望成为抗结核药的新靶点。本研究以结核分枝杆菌近源菌——分枝菌酸小杆菌为研究对象, 分析其在不同生长时期的磷酸化蛋白质。从分枝菌酸小杆菌对数期和平台期样品中共鉴定并定量了来自 385 个蛋白质的 573 个磷酸化肽段和 816 个磷酸化位点, 构建了分枝菌酸小杆菌不同生长期的磷酸化蛋白质组数据集。之后定量比较了该菌在对数期和平台期显著差异表达的磷酸化蛋白质, 经选择性离子检测(selected ion monitoring, SIM)验证了 68 个磷酸化水平上调的蛋白质, 主要参与细胞增殖和蛋白质翻译等通路; 69 个磷酸化水平下调的蛋白质, 主要参与三羧酸循环的通路。差异磷酸化蛋白质在细菌生长、增殖等重要生命活动过程显著富集, 为分枝菌酸小杆菌和结核分枝杆菌蛋白质磷酸化功能的揭示提供了蛋白质组学数据支撑。

关键词: 分枝菌酸小杆菌; 定量磷酸化蛋白质组; 细胞延长; 细胞分裂

资助项目: 国家自然科学基金(32141003, 31901037); 京津冀基础研究合作专项(J200001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32141003, 31901037) and the Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research Cooperation Project (J200001).

*Corresponding authors. Tel: +86-10-61777119; E-mail: ZHANG Yao, zhangyaowsw@163.com; XUE Yu, xueyu@hust.edu.cn

Received: 2024-04-29; Accepted: 2024-06-03; Published online: 2024-06-04

Quantitative comparison of phospho-proteins of *Mycobacterium smegmatis* at different growing phases

XU Danyang¹, GAO Yuan², SHI Jiahui³, JIANG Songhao³, XUE Yu^{1*}, ZHANG Yao^{3*}

¹ School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China

² Central Laboratory of College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

³ State Key Laboratory of Medical Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences (Beijing), Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug of Chinese Academy of Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences of Academy of Military Science, Beijing 102206, China

Abstract: Protein phosphorylation plays a key role in *Mycobacterium tuberculosis*, the pathogen of tuberculosis, holding promise as a new target of anti-tuberculosis drugs. We used *M. smegmatis*, a close relative of *M. tuberculosis*, as a model organism to study the protein phosphorylation at different growth phases. We identified 573 phosphorylated peptides and 816 phosphorylated sites of 385 proteins in the *M. smegmatis* samples at both logarithmic and stationary phases, and then established a comprehensive dataset of phosphorylated proteins in *M. smegmatis*. By comparing the expression levels of phosphorylated proteins between the logarithmic and the stationary phase with the selected ion monitoring (SIM) strategy, we verified 68 upregulated proteins involved in cell division and protein translation, and 69 downregulated proteins mainly involved in the tricarboxylic acid cycle pathway. The differentially expressed phosphorylated proteins were significantly enriched in important cellular cycle events such as cell elongation and division. The findings of this study provide proteome evidence for elucidating the phosphorylation in both *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*; quantitative phosphoproteomics; cell elongation; cell division

结核病在全球传播广、危害大，2023 年全球结核病报告显示：2022 年新增确诊结核病患者约 750 万例；我国是全球结核病高负担国家之一，排名第三，仅次于印度和印度尼西亚^[1]，严重制约着我国经济社会发展和健康中国建设。结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)引起的慢性传染病，全球约 1/4 的人口感染了 *Mtb*，其中 5%–10% 的感染者，因自身免疫功能降低，会逐渐发展为活动性结核病^[2]。数目庞大的潜伏感染人群以及潜伏向活动性结核转化的高风险，给全球结核病患者的诊治带来挑战。

20 世纪 20 年代初，结核病疫苗株卡介苗 (*Mycobacterium tuberculosis* variant *bovis* Bacillus Calmette-Guérin vaccine, BCG) 的推广使用，促进了结核病防控事业的发展^[3]。自 1944 年开始，抑制结核菌的药物如链霉素、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇以及利福平的发现，开启了结核病的抗生素治疗时代^[4]。但随着为数不多的抗结核药的广泛使用，耐药 *Mtb* 泛滥^[5]，使得结核病死灰复燃，对人类健康形成威胁。因此，全球亟需深入开展 *Mtb* 和结核病的基础研究，全力探究结核病发生发展的关键机制，从而研发结核病诊治的新靶点和新技术。

在攻克包括肿瘤在内的人类多发难治疾病的过程中,以蛋白质磷酸化修饰关键酶作为靶点已有 72 个药物进入了临床,开创了临床疾病靶向治疗新局面^[6]。与真核细胞类似,磷酸化在原核生物中的信号级联反应中也广泛存在。以原核生物中重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine protein kinases, STPKs) 为例^[7],可通过磷酸化细胞内的底物蛋白,调节多数信号转导通路,对微生物的增殖和分化发挥着重要的调控作用^[8]。在 *Mtb* 中,STPKs 共有 5 类 11 种,分别是 Clade I (PknA, PknB, PknL)、Clade II (PknD, PknE, PknH)、Clade III (PknF, PknI, PknJ)、Clade IV (PknG) 和 Clade V (PknK)^[9]。受限于原核生物适用的深度覆盖磷酸化蛋白质组技术,目前对这些激酶在分枝杆菌生存和分化中功能、作用还缺乏系统性理解。Prisic 等^[10]在 *Mtb* 磷酸化蛋白质组研究中,共鉴定到来自于 300 多个蛋白质的 500 余个 S/T 磷酸化位点,远低于真核生物磷酸化蛋白质组的覆盖度。

本研究以在普通微生物学实验室可开展研究的 *Mtb* 模式近源菌株——分枝菌酸小杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* MC² 155) 为对象,利用实验室已经建立的原核生物适用的固定化钛离子亲和色谱法 (immobilized metal affinity chromatography using titanium ion, Ti⁴⁺-IMAC) 磷酸化蛋白质组分析技术^[11],定量比较其在对数生长期和平台期的磷酸化蛋白质表达,以期揭示磷酸化事件以及对应的信号传导途径在 MC² 155 生长、分化中的生物学功能。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及试剂

M. smegmatis MC² 155 来自中国医学科学院医药生物技术研究所余利岩研究员实验室。

液体培养基 (Difco™ Middlebrook 7H9 Broth) 和分枝杆菌增菌添加剂 (Middlebrook ADC Enrichment) 购自 BD 公司;蛋白酶 r-Ac-trypsin 和 Lys-C 为实验室自制^[12-13];氟化钠、焦磷酸钠、二硫苏糖醇购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;β-甘油磷酸二钠、碳酸氢铵、碘乙酰胺、三氟乙酸、蛋白酶抑制剂 2 和 3 以及色谱级甲醇购自 Sigma-Aldrich 公司;色谱级乙腈购自 J.T. Baker 公司;尿素购自 GPC Biotech 公司;通用化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸盐缓冲液 PBS 购自 HyClone 公司;C18 膜和填料分别购自 3M Empore 和 Dr. Maisch 公司;Ti⁴⁺-IMAC 富集材料来自中国科学院大连化学物理研究所^[14]。

1.1.2 仪器设备

超声破碎仪和 DH-II 旋转混合仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;EASY-nLC 1000 纳升级液相色谱和 LTQ Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪 ThermoFisher Scientific 公司。

1.2 菌体培养

参考实验室前期 MC² 155 的培养条件^[11],将甘油管保存的 MC² 155 菌种接种于 7H10 培养平板中,37 °C 倒置培养出单菌落。挑取单菌落,接种于 10 mL 7H9 液体培养基中,220 r/min 培养 48 h,以起始 OD₆₀₀=0.1 的接种量分别转接于 4 个含有 50 mL 的 7H9 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,220 r/min 平行培养。生物学重复 1 和 2,待生长至 OD₆₀₀ 为 1.5 时收集,为对数期样本;生物学重复 3 和 4,待生长至 OD₆₀₀ 为 5.0 时收集,为平台期样本。收集的菌体用预冷的 PBS 清洗 3 次。

1.3 蛋白质组样本制备

参考实验室成熟的磷酸化样本制备流程^[15],向菌体中加入适量的蛋白质裂解缓冲液,重悬菌体后进行超声破碎(35%功率,超声 2 s,冰浴

4 s, 12 min)。菌体裂解液于 13 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 上清液为 MC² 155 全细胞蛋白。取 1 μg 全细胞蛋白, 用 12% SDS-PAGE 凝胶进行蛋白分离, 银染后检查全细胞蛋白的分布、蛋白质条带的清晰度, 并检测蛋白提取质量。

1.4 肽段样本准备

(1) 还原: 4 个生物学重复, 各取 2 mg 全细胞蛋白, 分别加入终浓度为 5 mmol/L 的二硫苏糖醇, 混匀后于 37 °C 静置反应 30 min。

(2) 烷基化: 恢复至室温后, 分别添加终浓度为 20 mmol/L 的碘乙酰胺, 混匀后避光反应 30 min。

(3) 纯化: 还原、烷基化后的样本, 基于 10% SDS-PAGE 分离 0.7 cm^[16], 考马斯亮蓝染色。

(4) 切胶: 着色区的纯化蛋白质条带切为 1 mm³ 胶粒。

(5) 脱色脱水: 用脱色液(30%乙腈, 7% 0.5 mmol/L 碳酸氢铵, 63%双蒸水)进行胶粒脱色, 乙腈脱水, 45 °C 真空干燥。

(6) 酶切: 蛋白质样品用重组乙酰化胰蛋白酶(r-Ac-trypsin)^[13]和赖氨酸蛋白酶 C 酶(Lys-C)^[12]为 2:1 比例的混合酶于 37 °C 过夜酶解, 抽提得到消化肽段。

1.5 磷酸化肽段富集

以实验室优化的 Ti⁴⁺-IMAC 技术进行 MC² 155 磷酸化肽段富集^[11]。(1) 溶解: 向蒸干后的肽段中加入 500 μL 溶解液(5%乙腈, 50 mmol/L 碳酸氢铵), 使得肽段充分溶解。(2) 结合: 加入等体积的结合液(6%三氟乙酸, 80%乙腈), 以降低非特异性结合肽段。(3) 富集: 加入 25 mg Ti⁴⁺-IMAC 富集材料, 室温涡旋振荡 30 min。(4) 二次富集: 13 300 r/min 室温离心 6 min 后, 轻取上清液, 转移至新的离心管中, 再加入 25 mg Ti⁴⁺-IMAC 材料, 室温涡旋振荡 30 min, 13 300 r/min 室温离心 6 min, 弃上清。(5) 合并: 向 2 次富集后的 Ti⁴⁺-IMAC 材料中, 缓缓加入 1.8 mL 清

洗液 1 (6%三氟乙酸, 50%乙腈, 200 mmol/L 氯化钠)重悬, 振荡 30 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 弃上清。(6) 清洗: 加入 1.8 mL 清洗 2 (0.1% 三氟乙酸, 30%乙腈), 振荡 30 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 弃上清, 重复 1 次。(7) 洗脱: 加入 1 mL 洗脱液(10%氨水), 振荡 15 min, 冰浴超声 15 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 取上清。(8) 二次洗脱: 将上清液转移至新离心管后, 再加入 500 μL 洗脱液, 振荡 15 min, 13 300 r/min 离心 6 min, 合并所得上清, 45 °C 真空干燥。

1.6 磷酸化肽段的分馏

参考实验室已有方法^[11], 向蒸干磷酸化肽段中, 加入 40 μL 10%氨水, 充分溶解后转移至 C18 StageTip 柱中, 进行梯度离心洗脱分馏, 800 r/min 离心 5–8 min。洗脱液梯度依次为: (1) 10%氨水; (2) 2%乙腈, 9.8%氨水; (3) 5%乙腈, 9.5%氨水; (4) 8%乙腈, 9.2%氨水; (5) 10%乙腈, 9%氨水; (6) 20%乙腈, 8%氨水; (7) 40%乙腈, 6%氨水; (8) 50%乙腈, 5%氨水; (9) 80%乙腈, 2%氨水。洗脱溶液进行样本合并, 共合并为 3 个样本, 1、4 和 7 合并为 F1; 2、5 和 8 合并为 F2; 3、6 和 9 合并为 F3。合并样本分别于 45 °C 真空干燥。

1.7 磷酸化肽段的 LC-MS 分析

用 10 μL 含有 0.1%甲酸的上样缓冲液重悬合并的磷酸化肽段, EASY nLC 1000 纳升级液相色谱自动上样, 使用实验室自制长 15 cm, 内径 75 μm, 装填有 1.9 μm C18 填料纳喷色谱柱进行分离, 流速为 600 nL/min (A 相, 0.1%甲酸, 99.9%双蒸水; B 相, 0.1%甲酸, 99.9%乙腈)。B 相梯度依次为 6%, 0 min; 6%–12%, 8 min; 12%–30%, 50 min; 30%–40%, 12 min; 40%–95%, 1 min; 95% B, 7 min。洗脱肽段用 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪进行检测, 数据采集模式为数据依赖方式(data-dependent acquisition,

DDA), 质荷比为 300–1 400 m/z 。一级谱模式参数: 母离子分辨率, 1.2×10^5 ; 离子自动增益控制(automatic gain control, AGC), 5×10^5 ; 最大离子注入时间(max injection time, MIT), 50 ms; 二级谱模式参数: 高能碰撞解离(high energy collision induced dissociation, HCD)碎裂模式; 能量, 35%; 二级碎裂离子, 丰度最高的前 20 个离子; AGC, 5 000; 动态排除(dynamic exclusion)时间, 20 s。

1.8 数据库搜索统计分析

Raw 文件用 pFind (v3.2.0)进行数据库搜索^[17]。MC²155 注释蛋白库为从 UniProt 下载的数据库(UP000000757, 6 602 个蛋白质), 反库为软件自动生成。搜库参数如下: (1) 蛋白酶, Trypsin 和 LysC, 最多 2 个漏切位点; (2) 肽段长度, ≥ 7 个氨基酸; (3) 固定修饰, 半胱氨酸的烷基化修饰 Carbamidomethyl [C]; (4) 可变修饰, 甲硫氨酸氧化修饰, Oxidation [M]; 蛋白质氨基端乙酰化修饰, Acetyl [Protein N-term]; 磷酸化修饰, Phospho [STY]; (5) 误差, 母离子质量(mass tolerance)为 20 ppm, 子离子为 0.5 Da; (6) 过滤, 目标-诱饵库策略; 假阳性率(false discovery rate, FDR)在谱图、肽段和蛋白质层面均小于 1%。

1.9 磷酸化肽段定量分析

用 pQuant^[18]对 pFind 搜索到的肽段在所有样本中进行定量分析。pQuant 首先会对所有样本进行色谱保留时间的对齐, 然后定量。用 Perseus (v2.0.9.0)软件^[19]中的 Significant B 算法^[19]计算其 P -value。

2 结果与分析

2.1 定量蛋白质组研究的策略

基于非标定量的技术流程开展了 MC²155 对数期和平台期的磷酸化蛋白质及位点表达量比较研究。对经胰酶-赖氨酸蛋白酶 C 组合酶切

的肽段, 用 Ti⁴⁺-IMAC 技术进行富集, 并用实验室自制的 StageTip 进行分馏。对数期及平台期样本分别设置了 2 个生物学重复, 进行对数期-平台期的组内和组间比较(图 1A)。

高质量蛋白质组样品是进行 MC²155 磷酸化蛋白质组研究的基础。对所制备的对数期、平台期 2 个生物学重复的 4 个总细胞蛋白质组样品进行 SDS-PAGE 分析(图 1B), 发现所有样品蛋白质条带从上到下分布均匀, 凝胶前端没有可见降解产物; 且各蛋白质条带边缘清晰, 表明所提取的蛋白质组样品质量高, 样品干净。其中 2 个对数期样品蛋白质条带带型基本一致; 2 个平台期样品的蛋白质条带带型也一致, 但与对数期相比, 在 80 kDa 以上的高分子量区域和 35 kDa 以下的低分子量区域均染色略深, 说明 MC²155 不同生长阶段蛋白质组成可能存在部分差异。对银染的 SDS-PAGE 分离的 4 个蛋白组样品进行灰度定量分析, 量基本一致, 可进行后续的定量蛋白质组研究。

2.2 不同生长期分枝菌酸小杆菌磷酸化蛋白质组研究

对谱图、肽段和蛋白质水平进行严格质控, 分别从 MC²155 的对数中期($OD_{600}=1.5$)和平台期样品鉴定到分属于 147、119、288、292 个磷酸化蛋白的 204、172、390、418 个磷酸化肽段和 256、216、505、521 个磷酸化位点(图 2A)。其中生物学重复 Log-1 和 Log-2 共同鉴定的磷酸化肽段为 136 个, 分别占 Log-1 的 66.7%和 Log-2 的 79.1% (图 2B), 表明磷酸化蛋白质组技术的稳定性和重复性好, 生物学重复 Sta-1 和 Sta-2 得到相似的结果, 两者共同鉴定的磷酸化肽段为 289 个, 分别占 Sta-1 的 74.1%和 Sta-2 的 69.1% (图 2C)。平台期两个生物学重复之间, 共同鉴定的磷酸化肽段占比略低于对数生长期, 说明平台期 MC²155 磷酸化蛋白质组间的

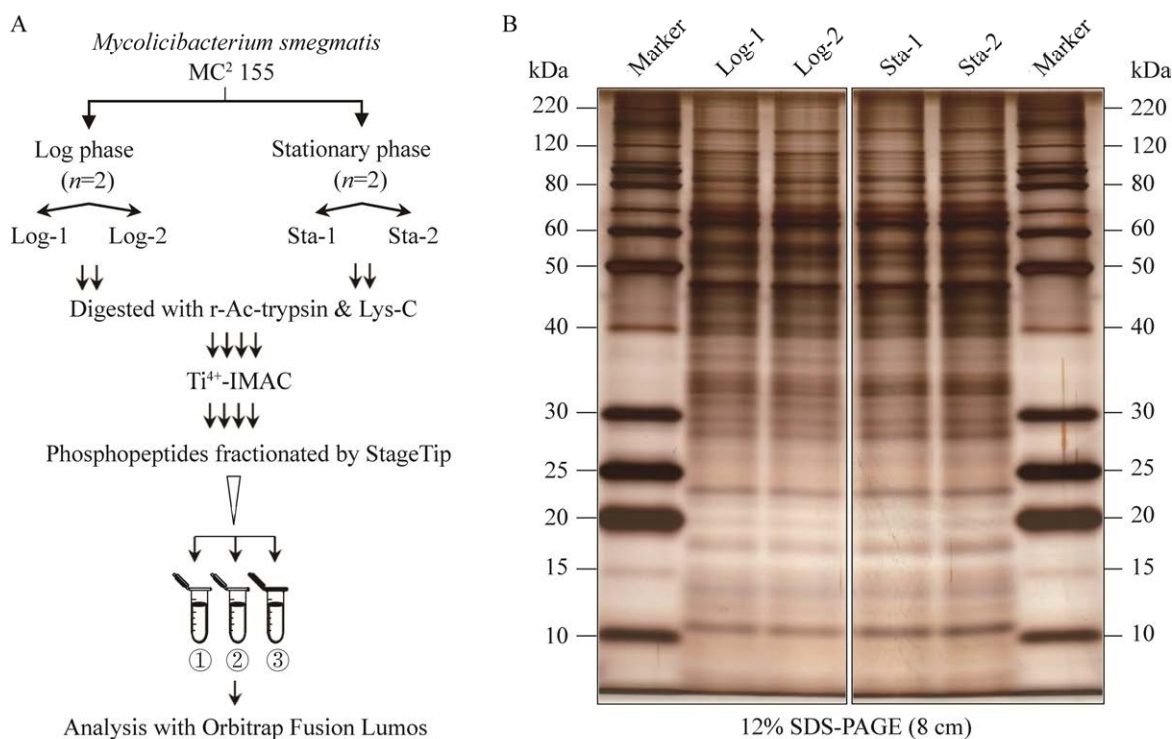


图 1 分枝菌酸小杆菌磷酸化蛋白质组学研究流程

Figure 1 Phosphoproteomic profiling for *Mycolicibacterium smegmatis* MC² 155. A: Overview of phosphoproteomic workflow of *M. smegmatis*. B: Protein samples preparation from *M. smegmatis*.

多样性高于对数生长期菌体(图 2D)。

对数期样品平均鉴定到 188 条磷酸化肽段,是平台期平均鉴定数 404 条的 46.5%,表明平台期样品有更多的蛋白质被磷酸化修饰。比较对数期合并鉴定的 240 个磷酸化肽段和平台期合并鉴定的 519 个磷酸化肽段,两者共同鉴定的磷酸化肽段为 186 个,而对数期单独鉴定的磷酸化肽段为 54 个,平台期单独鉴定的磷酸化肽段为 333 个(图 2D)。平台期单独鉴定的磷酸化肽段是对数期的 6 倍多,略低于两个生长时期的平均鉴定数,进一步说明平台期的磷酸化肽段多样性显著高于对数期。

MC² 155 共鉴定到 816 个 S/T/Y 磷酸化位点,其中 T 位点数最多,为 58.21%;其次是 S 位点,41.54%;Y 位点仅占 0.25%(图 2E)。MC² 155 与已报道的真核生物相比,如人(S/T/Y, 84.1%/15.5%/0.4%)^[20]、小鼠(S/T/Y, 83%/

15%/2%)^[21]、拟南芥(S/T/Y, 85.87%/13.70%/0.43%)^[22],磷酸化修饰位点比例差异比较大。原核生物中,磷酸化位点数最多的是 T,且 T 和 S 的位点数占比相差远不及真核生物大,意味着磷酸化修饰在原核生物和真核生物中的调控作用存在较大的异同。MC² 155 磷酸化位点附近序列保守性分析发现,发生磷酸化修饰的后一位氨基酸中,甘氨酸(G)频率比较高(图 2F)。

2.3 磷酸化蛋白质组定量分析

对所鉴定的 385 个磷酸化蛋白进行 KEGG 分析,发现这些蛋白主要参与翻译和 DNA 复制等生物学过程,其细胞定位上主要位于细胞质和核糖体中,分子功能上表现出 ATP 结合和水解、Mg²⁺结合以及核糖体结构组分等较为集中的功能类别和信号通路中(图 3A),暗示磷酸化修饰可能参与了 MC² 155 生命过程的调控(图 3A)。

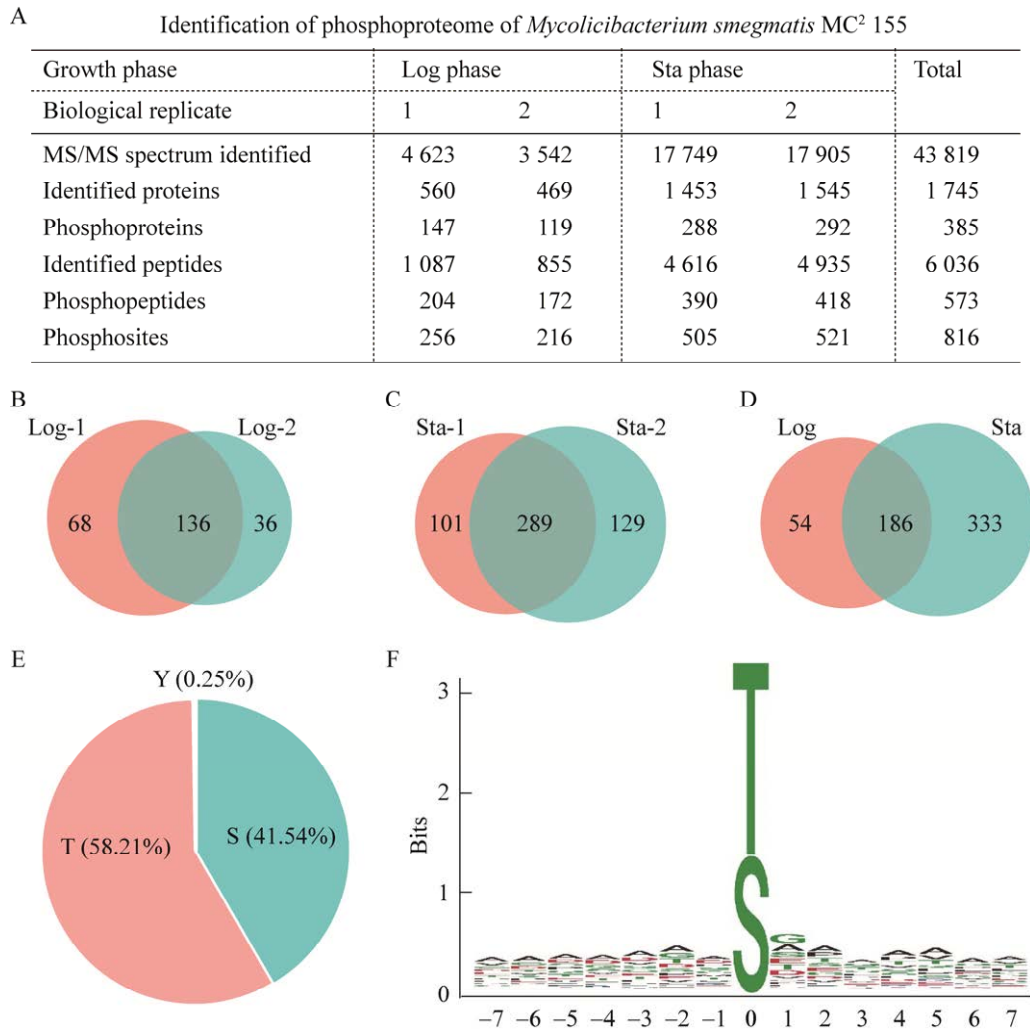


图 2 不同生长期分枝菌酸小杆菌磷酸化蛋白质组的比较

Figure 2 Characterization of the *Mycolicibacterium smegmatis* MC² 155 phosphoproteome at different states. A: Identification of phosphoproteome of *Mycolicibacterium smegmatis* MC² 155. B: Venn diagram showing number of phosphorylated peptides identified in biological replication one of logarithmic phase compared to biological replication two of logarithmic phases. C: Venn diagram showing number of phosphorylated peptides identified in biological replication one of stationary phase compared to biological replication two of stationary phase. D: Venn diagram showing number of phosphorylated peptides identified in logarithmic phase compared to stationary phase. E: Proportion of the phosphorylated S/T/Y sites in *Mycolicibacterium smegmatis* MC² 155. F: The motif analysis of the identified sequences containing phosphorylated sites in *Mycolicibacterium smegmatis* MC² 155.

对数期和平台期 4 个样品中共同鉴定到 573 个磷酸化肽段, 从对数期/平台期的对数值分布看, 两次生物学重复的结果位于对角线上, 且处于一个相对较窄的分布范围, 进一步说明磷酸化蛋白质组技术稳定、重现性好, 也说明

了定量结果的可信性(图 3B)。

定量 ≥ 4 倍差异倍数且 P 值 ≤ 0.05 的蛋白质, 定义为差异表达磷酸化蛋白质。定量比较共鉴定到 69 个上调和 68 个下调磷酸化蛋白质, 差异蛋白质占有所有鉴定 385 个磷酸化蛋白质的

35.6% (图 3B)。

2.4 蛋白质磷酸化参与调控分枝菌酸小杆菌细胞延伸和分裂

对差异磷酸化修饰蛋白用 Cytoscape 绘制互作网络图, 发现连接节点数最多的上调蛋白

有 rpsA、greA、ftsZ、rpsJ、rpsM、rpsC 和 rpsP 等与细胞分裂、增殖显著相关的蛋白(图 4A)。连接蛋白和通路数最多的磷酸化蛋白质 rpsA 是一种核糖体亚基蛋白, 其在蛋白质翻译、核糖体结合以及 mRNA 结合过程中发挥重要作用,

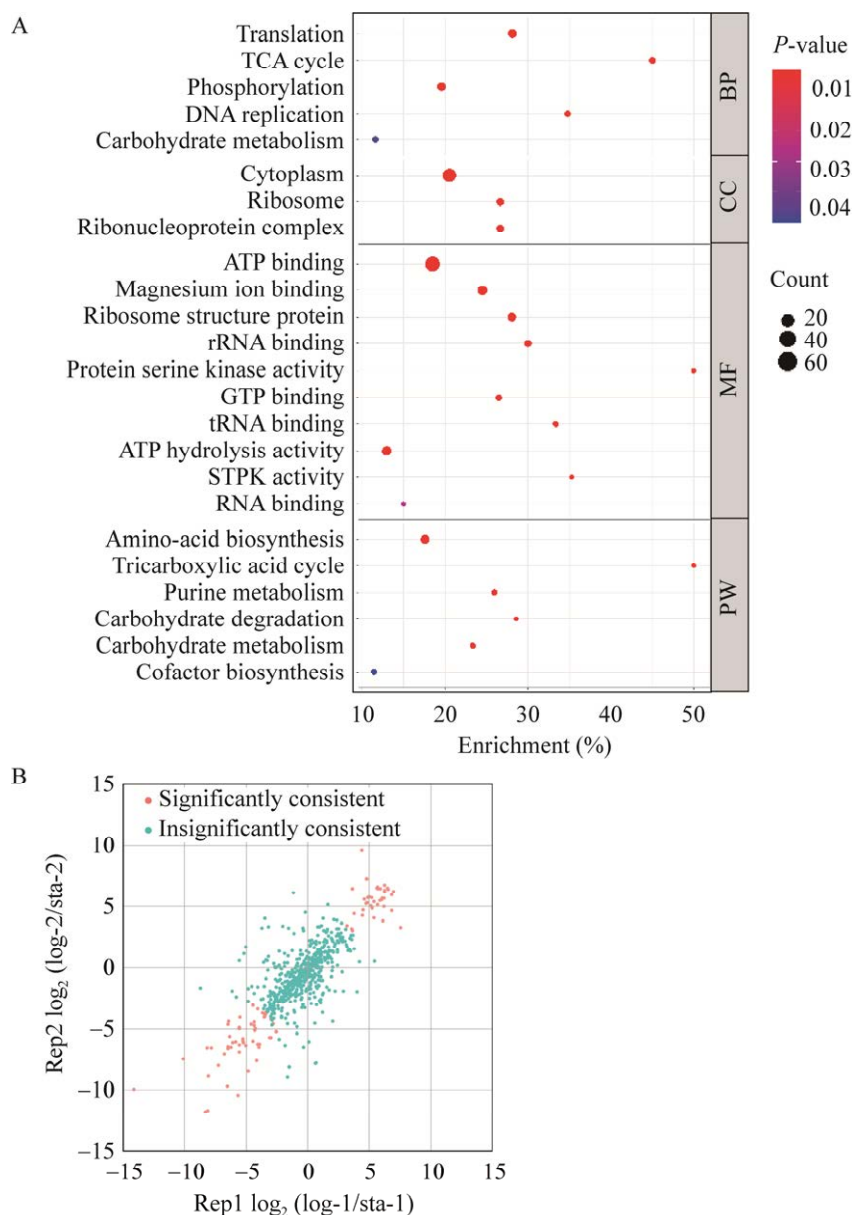


图 3 磷酸化蛋白的功能和定量分析

Figure 3 Function analysis and quantification of phosphorylated proteins. A: Functional enrichment analysis of phosphorylated proteins at S/T/Y sites in terms of biological process (BP), cellular compartment (CC), molecular function (MF) and pathway (PW). B: All identified phosphorylation sites precursor ion abundance from logarithmic phase to stationary phase.

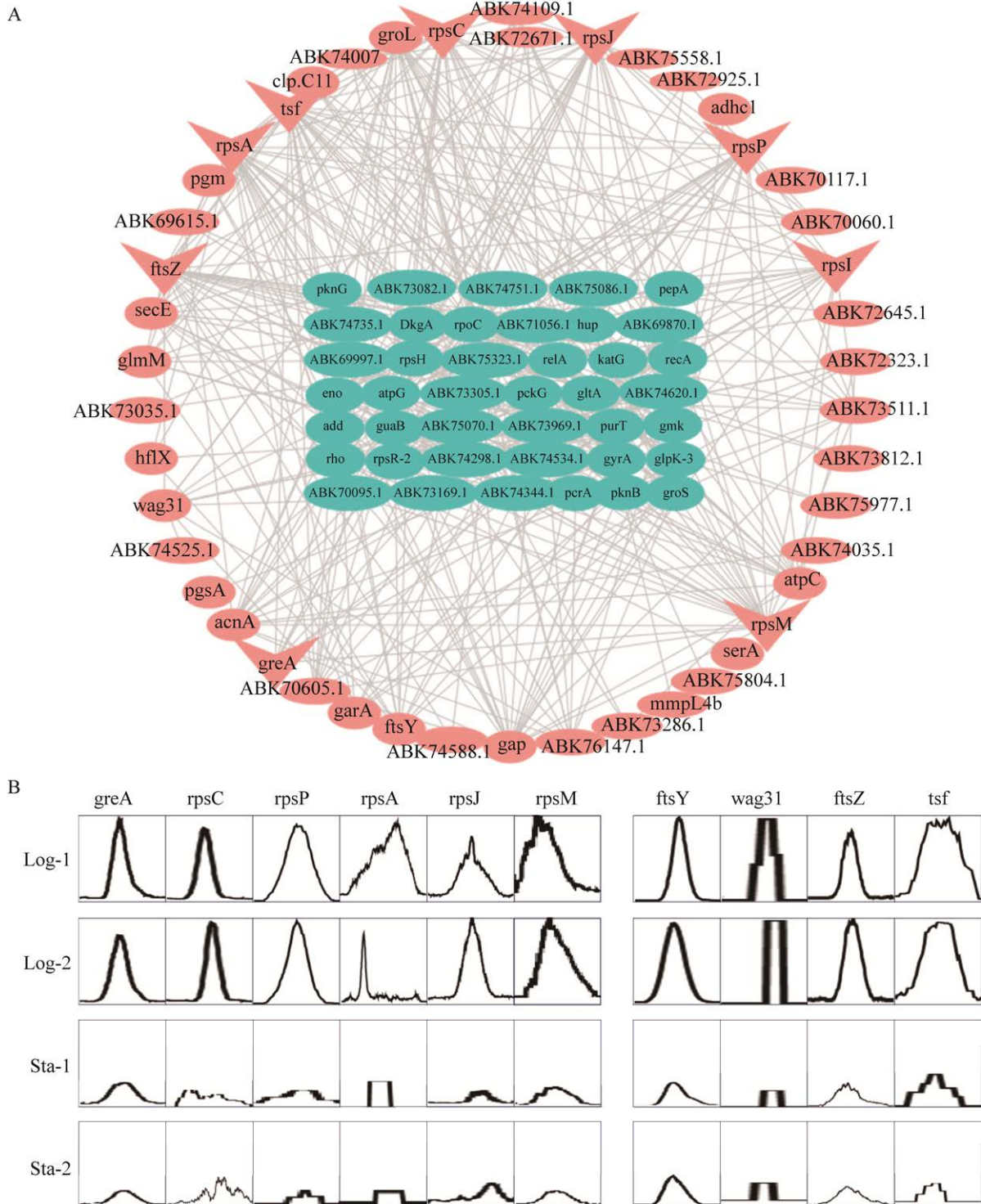


图 4 差异表达磷酸化蛋白质的互作网络

Figure 4 Network of differentially expressed phosphorylated proteins. A: Functional protein association network analysis for the phosphorylated proteins with significantly consistent change in abundance from logarithmic phase to stationary phase. B: Precursor ion abundance changes of the 10 phosphopeptides with significant and consistent change from logarithmic phase to stationary phase in biological replicates.

其 C 末端通过与 tmRNA 特异性结合, 参与了 MC² 155 的反式翻译系统, 是细菌翻译质量控制的关键蛋白。greA 是一种高度保守的转录延伸因子, 通过促进 RNA 聚合酶的结合过程重启基因的转录。由于 MC² 155 只有单个 greA 因子, 因此该蛋白表达降低或者消失可能显著影响 MC² 155 的生长繁殖。rpsJ、rpsM、rpsC 和 rpsP 均是小核糖体亚基蛋白, 参与细菌的蛋白质合成。这些结果意味着 MC² 155 对数期高表达的磷酸化蛋白质可能参与了细菌生长、增殖生物学过程, 揭示了磷酸化对调控细胞分裂、增殖的潜在功能。

在分枝杆菌中, 菌丝体分化受诸多相关复合物的调控。该复合物通过水解和合成作用在生长过程中调节肽聚糖重组。wag31 是分化相关复合物的重要成分, 由 PknA 磷酸化调控, 在分枝杆菌正确的极性定位和肽聚糖生物合成中必不可少^[23-24]。此外, 此研究发现 wag31 在对数生长期会被磷酸化, 这与已有发现相符(图 4B)。除定性的磷酸化蛋白鉴定外, 精准定量便于揭示重要磷酸化蛋白参与的表达调控机制。这些差异蛋白质经选择性离子检测(selected ion monitoring, SIM)验证, 发现在平台期, wag31 保持非磷酸化或少磷酸化状态, 且无论对数期还是平台期, wag31 磷酸化还是非磷酸化或少磷酸化变化趋势一致。这与已有的 wag31 被磷酸化修饰的知识一致(图 4B), 不仅证实 wag31 确实会发生磷酸化修饰, 而且表明该蛋白的磷酸化修饰状态可能与 MC² 155 对数期到平台期细胞状态的切换紧密关联, 因此, 其在分枝杆菌生长过程中的精准调控、环境应激的机制及其可能的应用值得深入研究。

MC² 155 的分裂体负责该菌的菌丝体分裂过程, 且该复合体的组装和解体受蛋白质磷酸化修饰的调节。其中, ftsZ 是一种高度保守的

蛋白质, 在 MC² 155 分裂过程中会首先被招募到分裂位点, 聚合形成 Z 环并且与锚定蛋白 ftsA 一起作为招募下游蛋白的支架, 最终形成一个大的分裂机器。与 wag31 在对数期高磷酸化修饰状态以及平台期低磷酸化修饰状态相似, ftsY 和 ftsZ 等 2 个分裂组成蛋白在对数中期的磷酸化水平比平台期分别上升了 5.8 倍和 5.1 倍(图 4B), 进一步说明 MC² 155 可能利用蛋白质磷酸化调控分裂体组装, 从而影响细胞分裂进程。

3 讨论与结论

Albeldas 等^[25]对 MC² 155 开展了大规模的磷酸化蛋白质组学研究, 鉴定到来自 154 个磷酸化蛋白的 206 个磷酸化肽段和 224 个磷酸化位点。本研究在 MC² 155 不同生长时期, 通过 pFind 搜索引擎共鉴定 385 个磷酸化蛋白中 573 个磷酸化肽段和 816 个磷酸化位点(图 2A)。

与传统的细菌相比, 分枝杆菌以不对称的方式生长和分裂, 产生大小不等的子分枝^[26-29], 该独特模式为其适应高度可变的宿主环境提供更明显的生存优势。由肽聚糖合成酶、肽聚糖水解酶及结构蛋白组成的伸长复合物调控分枝杆菌细胞的伸长和分裂。wag31 和 cwsA 是已知的伸长复合物的结构蛋白。wag31 负责招募伸长复合物其余组分, 同时将新生成的伸长复合物锚定在极点^[30]。而 cwsA 则在极点招募或稳定 wag31^[31]。已知 wag31 可以被丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(STPK) PknA 磷酸化。Nakedi 等^[2]发现在对数生长阶段 BCG 中存在 wag31 (S245)和 cwsA (T77)的磷酸化, 但是在 *M. smegmatis* 中未鉴定到。本研究鉴定到 wag31 的磷酸化, 而且 wag31 在对数生长期菌体中高度磷酸化, 但是在平台期其磷酸化形式明显减少(图 4B), 且变化趋势与之前的结果一致^[32-33], 进一步说明

了本研究鉴定结果的可靠性。

细胞分裂是由 *ftsZ* 聚合形成 Z 环引发的, 随后其他结构元件包括 *fhaB*、*ftsW*、*ftsQ*、*crgA* 和 *cwsA* 等也会被招募到一起形成分裂体, 进一步调控细胞分裂。已知分枝杆菌 *ftsZ* 可以被 STPK 类 PknA 磷酸化, 从而减少 *ftsZ* 对 GTP 的水解, 抑制体外 *ftsZ* 聚合^[34]。而这正是 Z 环收缩以促进分裂所必需的^[35]。此研究鉴定到 *ftsZ* 的磷酸化修饰, 主要发生在对数生长期阶段(图 4B), 其变化趋势与 *wag31* 的磷酸化修饰类似, 意味着磷酸化修饰在分枝杆菌细胞伸长和分裂中发挥着重要的作用, 也暗示着该过程中其他调控蛋白也有可能存在磷酸化修饰。

此外本研究还鉴定到与转录和蛋白质合成密切相关的蛋白(包括 *greA*、*tsf*、*rpsA*、*rpsJ*、*rpsM*、*rpsC* 和 *rpsP*)存在磷酸化修饰, 定量分析表明这些蛋白在对数期细胞中高度磷酸化, 而在平台期细胞中磷酸化修饰水平降低(图 4B), 与 *wag31* 和 *ftsZ* 的磷酸化修饰变化趋势一致, 暗示磷酸化修饰调控着分枝杆菌的转录和蛋白质合成, 从而最终影响分枝杆菌的菌丝体生长和分裂。

本研究利用课题组建立的原核磷酸化蛋白质组适用的 Ti^{4+} -IMAC 富集方法^[11], 对 MC² 155 不同生长阶段的磷酸化肽段进行了富集, 鉴定了来自 385 个磷酸化蛋白质的 816 个磷酸化位点。且定量比较对数中期和平台期的 MC² 155 磷酸化蛋白质组, 发现差异的磷酸化蛋白质集中参与了 MC² 155 蛋白质翻译、ATP 结合、细胞分裂等重要的生命活动过程, 参与了氨基酸合成和各种代谢途径。

REFERENCES

[1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2023[R]. Geneva: World Health Organization,

2023.

- [2] NAKEDI KC, NEL AJM, GARNETT S, BLACKBURN JM, SOARES NC. Comparative Ser/Thr/Tyr phosphoproteomics between two mycobacterial species: the fast growing *Mycobacterium smegmatis* and the slow growing *Mycobacterium bovis* BCG[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 237.
- [3] MANGTANI P, ABUBAKAR I, ARITI C, BEYNON R, PIMPIN L, FINE PEM, RODRIGUES LC, SMITH PG, LIPMAN M, WHITING PF, STERNE JA. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials[J]. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2014, 58(4): 470-480.
- [4] MIKUŠOVÁ K, EKINS S. Learning from the past for TB drug discovery in the future[J]. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(3): 534-545.
- [5] SEUNG KJ, KESHAVJEE S, RICH ML. Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, 5(9): a017863.
- [6] ROSKOSKI R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2024 update[J]. *Pharmacological Research*, 2024, 200: 107059.
- [7] BELLINZONI M, WEHENKEL AM, DURÁN R, ALZARI PM. Novel mechanistic insights into physiological signaling pathways mediated by mycobacterial Ser/Thr protein kinases[J]. *Genes and Immunity*, 2019, 20(5): 383-393.
- [8] MORI M, SAMMARTINO JC, COSTANTINO L, GELAIN A, MENEGHETTI F, VILLA S, CHIARELLI LR. An overview on the potential antimycobacterial agents targeting serine/threonine protein kinases from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019, 19(9): 646-661.
- [9] NARAYAN A, SACHDEVA P, SHARMA K, SAINI AK, TYAGI AK, SINGH Y. Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function[J]. *Physiological Genomics*, 2007, 29(1): 66-75.
- [10] PRISIC S, DANKWA S, SCHWARTZ D, CHOU MF, LOCASALE JW, KANG CM, BEMIS G, CHURCH GM, STEEN H, HUSSON RN. Extensive phosphorylation with overlapping specificity by

- Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(16): 7521-7526.
- [11] 蒙书红, 常蕾, 柳峰松, 徐平, 张瑶. 基于 Ti^{4+} -IMAC 富集的分枝菌酸小杆菌深度覆盖磷酸化蛋白质组研究[J]. 微生物学报, 62(10): 3768-3783.
- MENG SH, CHANG L, LIU FS, XU P, ZHANG Y. In-depth characterization of *Mycobacterium smegmatis* MC2155 phosphoproteome based on the Ti^{4+} -IMAC enrichment strategy[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 3768-3783 (in Chinese).
- [12] ZHAO M, WU F, XU P. Development of a rapid high-efficiency scalable process for acetylated *Sus scrofa* cationic trypsin production from *Escherichia coli* inclusion bodies[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 116: 120-126.
- [13] ZHAO M, CAI M, WU F, ZHANG Y, XIONG Z, XU P. Recombinant expression, refolding, purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2016, 126: 69-76.
- [14] ZHOU H, YE M, DONG J, CORRADINI E, CRISTOBAL A, HECK AJR, ZOU H, MOHAMMED S. Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography[J]. Nature Protocols, 2013, 8(3): 461-480.
- [15] LONG Q, ZHANG Z, LI Y, ZHONG Y, LIU H, CHANG L, YING Y, ZUO T, WANG YA, XU P. Phosphoproteome reveals long-term potentiation deficit following treatment of ultra-low dose soman exposure in mice[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 459: 132211.
- [16] WANG H, WAN L, SHI J, ZHANG T, ZHU H, JIANG S, MENG S, WU S, SUN J, CHANG L, ZHANG L, WAN K, YANG J, ZHAO X, LIU H, ZHANG Y, DAI E, XU P. Quantitative proteomics reveals that dormancy-related proteins mediate the attenuation in mycobacterium strains[J]. Virulence, 2021, 12(1): 2228-2246.
- [17] CHI H, LIU C, YANG H, ZENG WF, WU L, ZHOU WJ, WANG RM, NIU XN, DING YH, ZHANG Y, WANG ZW, CHEN ZL, SUN RX, LIU T, TAN GM, DONG MQ, XU P, ZHANG PH, HE SM. Comprehensive identification of peptides in tandem mass spectra using an efficient open search engine[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(11): 1059-1061.
- [18] KONG S, GONG P, ZENG WF, JIANG B, HOU X, ZHANG Y, ZHAO H, LIU M, YAN G, ZHOU X, QIAO X, WU M, YANG P, LIU C, CAO W. pGlycoQuant with a deep residual network for quantitative glycoproteomics at intact glycopeptide level[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 7539.
- [19] COX J, MANN M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(12): 1367-1372.
- [20] SHARMA K, D'SOUZA ROCHELLE CJ, TYANOVA S, SCHAAB C, WIŚNIEWSKI JACEK R, COX J, MANN M. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling[J]. Cell Reports, 2014, 8(5): 1583-1594.
- [21] HUTTLIN EL, JEDRYCHOWSKI MP, ELIAS JE, GOSWAMI T, RAD R, BEAUSOLEIL SA, VILLÉN J, HAAS W, SOWA ME, GYGI SP. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression[J]. Cell, 2010, 143(7): 1174-1189.
- [22] MERGNER J, FREJNO M, LIST M, PAPACEK M, CHEN X, CHAUDHARY A, SAMARAS P, RICHTER S, SHIKATA H, MESSERER M, LANG D, ALTMANN S, CYPRYS P, ZOLG DP, MATHIESON T, BANTSCHIEFF M, HAZARIKA RR, SCHMIDT T, DAWID C, DUNKEL A, et al. Mass-spectrometry-based draft of the *Arabidopsis* proteome[J]. Nature, 2020, 579(7799): 409-414.
- [23] JANI C, EOH H, LEE JJ, HAMASHA K, SAHANA M B, HAN JS, NYAYAPATHY S, LEE JY, SUH JW, LEE SH, REHSE SJ, CRICK DC, KANG CM. Regulation of polar peptidoglycan biosynthesis by Wag31 phosphorylation in mycobacteria[J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 327.
- [24] LEE JJ, KAN CM, LEE JH, PARK KS, JEON JH, LEE SH. Phosphorylation-dependent interaction between a serine/threonine kinase PknA and a putative cell division protein Wag31 in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. New Microbiologica, 2014, 37(4): 525-533.
- [25] ALBELDAS C, GANIEF N, CALDER B, NAKEDI K C, GARNETT S, NEL AJM, BLACKBURN JM, SOARES NC. Global proteome and phosphoproteome

- dynamics indicate novel mechanisms of vitamin C induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*[J]. Journal of Proteomics, 2018, 180: 1-10.
- [26] ALDRIDGE BB, FERNANDEZ-SUAREZ M, HELLER D, AMBRAVANESWARAN V, IRIMIA D, TONER M, FORTUNE SM. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility[J]. Science, 2012, 335(6064): 100-104.
- [27] JOYCE G, WILLIAMS KJ, ROBB M, NOENS E, TIZZANO B, SHAHREZAEI V, ROBERTSON BD. Cell division site placement and asymmetric growth in mycobacteria[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44582.
- [28] SANTI I, DHAR N, BOUSBAINÉ D, WAKAMOTO Y, MCKINNEY JD. Single-cell dynamics of the chromosome replication and cell division cycles in mycobacteria[J]. Nature Communications, 2013, 4(1): 2470.
- [29] SINGH B, NITHARWAL RG, RAMESH M, PETERSSON BMF, KIRSEBOM LA, DASGUPTA S. Asymmetric growth and division in *Mycobacterium*: compensatory mechanisms for non-medial septa[J]. Molecular Microbiology, 2013, 88(1): 64-76.
- [30] MENICHE X, OTTEN R, SIEGRIST MS, BAER CE, MURPHY KC, BERTOZZI CR, SASSETTI CM. Subpolar addition of new cell wall is directed by DivIVA in mycobacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(31): E3243-E3251.
- [31] PLOCINSKI P, ARORA N, SARVA K, BLASZCZYK E, QIN H, DAS N, PLOCINSKA R, ZIOLKIEWICZ M, DZIADEK J, KIRAN M, GORLA P, CROSS T, MADIRAJU M, RAJAGOPALAN M. *Mycobacterium tuberculosis* CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(23): 6398-6409.
- [32] PARK ST, KANG CM, HUSSON RN. Regulation of the SigH stress response regulon by an essential protein kinase in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(35): 13105-13110.
- [33] KANG CM, ABBOTT DW, PARK ST, DASCHER CC, CANTLEY LC, HUSSON RN. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape[J]. Genes and Development, 2005, 19(14): 1692-1704.
- [34] DZIEDZIC R, KIRAN M, PLOCINSKI P, ZIOLKIEWICZ M, BRZOSTEK A, MOOMEY M, VADREVU IS, DZIADEK J, MADIRAJU M, RAJAGOPALAN M. *Mycobacterium tuberculosis* ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11058.
- [35] LI Y, HSIN J, ZHAO L, CHENG Y, SHANG W, HUANG KC, WANG HW, YE S. FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation[J]. Science, 2013, 341(6144): 392-395.

(本文责编 郝丽芳)