



## 霍乱弧菌 ToxS 蛋白间的互作增强 ToxR 蛋白诱导毒力基因的表达

王相洪<sup>1</sup>, 张婷<sup>2</sup>, 涂飞<sup>2</sup>, 史梦婷<sup>1</sup>, 王卉<sup>1\*</sup>, 杨梦华<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095

<sup>2</sup>浙江农林大学动物科技学院, 浙江 杭州 311300

**摘要:**【目的】阐明霍乱弧菌 ToxR 蛋白功能调控的分子机制。【方法】利用巯基捕获(thiol-trapping)的方法分析 DsbA 蛋白对 ToxR 周质空间结构域半胱氨酸残基的氧化作用; 采用定点突变的方法构建 ToxR 半胱氨酸突变株(*ToxR<sub>C236/293S</sub>*); 利用荧光素酶基因作为报告基因分析 ToxR 野生型(*ToxR<sub>wt</sub>*)和半胱氨酸突变体(*ToxR<sub>C236/293S</sub>*)诱导下游基因表达的活性; 通过细菌双杂交系统分析 *ToxR<sub>wt</sub>* 和 *ToxR<sub>C236/293S</sub>* 蛋白之间、ToxR 与 ToxS 之间以及 ToxS 之间的相互作用。【结果】ToxR 周质空间结构域半胱氨酸残基确实可以被 DsbA 蛋白氧化, 且当 ToxR 与 ToxS 共表达时, ToxR 诱导 *ctxAB* 转录表达的活性显著增强, 且在 *dsbA* 基因缺失突变株中 ToxR 诱导 *ctxAB* 转录表达的活性更高; 成功构建株霍乱弧菌 ToxR 半胱氨酸突变株 (*ToxR<sub>C236/293S</sub>*), 在没有 ToxS 存在的条件下, *ToxR<sub>C236/293S</sub>* 诱导毒力基因表达的活性与 *ToxR<sub>wt</sub>* 相当; 细菌双杂交系统分析发现当 ToxR 与 ToxS 共转录表达时, ToxS 极大增强 ToxR 蛋白之间的互作; 在 *dsbA* 基因缺失突变株中, ToxS 之间的相互作用显著增强。【结论】ToxR 蛋白本身的氧化状态对其诱导毒力基因表达的活性没有影响; ToxS 通过增强 ToxR 形成二聚体的能力从而增强其诱导毒力基因的表达, 而 DsbA 对 ToxS 蛋白之间的相互作用具有抑制作用, DsbA 通过影响 ToxS 的蛋白互作从而影响 ToxR 蛋白的功能。本文为进一步阐明霍乱弧菌毒力基因表达调控的分子机制提供重要的理论依据。

**关键词:** 霍乱弧菌, 表达调控, ToxRS, 氧化状态, 蛋白互作

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)是一种引起霍乱的革兰氏阴性细菌。而霍乱是一种烈性肠道传染病, 被列为我国传染病防治法规定的两种甲类传染病之一, 也是国际 3 种检疫传染性疾病中危害最为严重的一种<sup>[1-2]</sup>。研究发现霍乱弧菌毒力基因的表

达一方面受到细胞内级联调控系统的控制, 另一方面受到体外环境信号因子的诱导<sup>[3-4]</sup>。许多研究表明环境中温度、pH 值、氧气浓度、胆汁酸分子、钙离子以及某些营养元素的浓度等, 对霍乱毒力基因的表达有不同的影响<sup>[5-8]</sup>。而霍乱弧菌本身的

基金项目: 国家自然科学基金(31470244, 31770151); 浙江农林大学科研发展基金(2013FR012)

\*通信作者。王卉, Tel: +86-25-84396645, E-mail: wanghui@njau.edu.cn; 杨梦华, Tel: +86-571-63754650, E-mail: yangmh@zafu.edu.cn

收稿日期: 2018-07-13; 修回日期: 2018-09-11; 网络出版日期: 2018-12-01

基因转录调控蛋白通过改变蛋白的构象对环境因子作出应答,从而在不同的生存环境中调控不同的基因的表达,以便最好地适应其生存环境<sup>[8]</sup>。

ToxR 蛋白是霍乱弧菌重要的基因转录调控蛋白,除了调控与毒力基因相关的 *toxT* 基因以外,还调控一系列与霍乱弧菌生理和致病相关的基因<sup>[9-10]</sup>。ToxS 是在霍乱弧菌基因组中与 ToxR 处于同一个转录操纵子与 ToxR 共转录的一个跨膜蛋白,ToxR 的蛋白活性依赖于 ToxS<sup>[11]</sup>,有研究指出在霍乱弧菌生长至稳定期,ToxS 可帮助 ToxR 免受蛋白酶的降解<sup>[12-13]</sup>。然而 ToxS 究竟如何增强 ToxR 的蛋白活性,具体的分子机制目前还不是很清楚。

ToxR 与另一个毒力表达调控蛋白 TcpP 都是细胞内膜调控蛋白,跨膜调控蛋白很可能通过感知外界环境信号的改变对蛋白功能进行调控,从而使得细菌适应不同的生存环境<sup>[14]</sup>。前期研究发现,TcpP 周质空间结构域的两个半胱氨酸残基是霍乱弧菌对肠道信号因子胆汁酸分子作出应答的重要调控位点,通过改变这两个氨基酸残基的氧化状态从而调控 TcpP 蛋白的活性<sup>[15-16]</sup>。然而,ToxR 是通过什么样的分子机制感知外界环境信号从而对蛋白功能进行调控,目前还不清楚。ToxR 蛋白的周质空间结构域也含有两个半胱氨酸残基 C236 和 C293,那么这两个半胱氨酸残基在 ToxR 的蛋白功能中发挥怎么样的作用呢? DsbA 蛋白是位于革兰氏阴性细菌的周质空间的二硫键氧化蛋白,协助分泌到周质空间含有半胱氨酸残基的蛋白质形成二硫键,从而折叠成正确的蛋白构象<sup>[17]</sup>。位于周质空间的半胱氨酸残基很可能受到 DsbA 蛋白的氧化催化作用。因此,本研究通过检测 DsbA 蛋白对 ToxR 与 ToxS 蛋白的功能及蛋白之间相互作用的影响,结合基因定点突变的方法,

确定霍乱弧菌 ToxR 蛋白的氧化状态对 ToxR 蛋白功能的作用,初步探讨 ToxR 蛋白应答环境因子进行功能调控的分子机制,从而为进一步阐明霍乱弧菌毒力基因表达调控的分子机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和培养条件:** 霍乱弧菌 C6706 (野生型菌株,由南京农业大学朱军老师实验室馈赠,本实验室保存)、*toxRS* 突变株、*dsbA* 基因缺失突变株(*dsbA*-)、*E. coli* DH5 $\alpha$ 、重组质粒 *toxR*::pBAD24 和 *PctxAB*::pBBR-lux, *PompT*::pBBR-lux 均由本实验室保存。所用到的菌株于 37 °C 在 LB 培养基中培养。抗生素使用浓度分别为: 氨苄青霉素(Ap) 100  $\mu$ g/mL, 氯霉素(Cm) 20  $\mu$ g/mL。本实验室是病原微生物二级实验室,可进行涉及第一类、第二类动物病原微生物有关实验活动。

**1.1.2 主要试剂:** PCR 扩增酶: KOD-Plus-Neo, *Taq* 酶等,购自 TOYOBO 公司。限制性内切酶: *Nco* I-HF, *Hind* III-HF, *Eco*R I-HF, *Pst* I-HF, T4 连接酶等,购自 NEB 公司。DNA Ladder, Prestained Protein ladder 等均购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒小提试剂盒,PCR 产物或凝胶回收试剂盒,购自天根生物。引物由苏州金唯智公司合成。AMS (4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonic Acid, Disodium Salt)购自赛默飞世尔公司(Thermo-Fisher)。ToxR 抗体由金斯瑞公司合成。

### 1.2 ToxR 蛋白的氧化状态分析

利用巯基捕获的方法<sup>[18]</sup>验证 ToxR 蛋白周质空间结构域的两个半胱氨酸残基能否被 DsbA 氧化形成二硫键。简述如下,把 ToxR 蛋白重组表达质粒转入大肠杆菌或霍乱弧菌 *dsbA* 基因缺失株,

在 37 °C 下振荡培养细菌至对数生长期( $OD_{600} \approx 0.5$ ), 然后加入阿拉伯糖诱导剂, 诱导蛋白表达 2 h 后, 用终浓度为 10% 的三氯乙酸(TCA)沉淀蛋白, 在 4 °C 放置 8 h 或冰上放置 2 h。蛋白经 12000 r/min 离心收集后, 弃掉上清液, 蛋白沉淀用冰预冷的丙酮洗涤沉淀 3 次, 然后用含有或不含有 10 mmol/L AMS 的 Tris-SDS 缓冲液溶解蛋白, 在 37 °C 孵育 30 min, 蛋白样品经 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析 ToxR 蛋白氧化状态。

### 1.3 荧光素酶报告基因表达分析

为了研究 ToxR 对下游基因 *ctxAB* 和 *ompT* 表达的影响, 将含有 *ctxAB* 和 *ompT* 启动子与荧光素酶基因融合表达质粒分别转入含有 ToxR 重组表达质粒的大肠杆菌菌株中, 将菌株分别稀释接种至 96 孔板, 在 37 °C 静置培养。用酶标仪分别检测 600 nm 和 420 nm 吸光值, 计算单位荧光值 ( $OD_{420}/OD_{600}$ )。

### 1.4 细菌双杂交系统验证 ToxR 蛋白之间的相互作用

细菌双杂交系统是检验细胞体内蛋白之间相

互作用的重要遗传工具, 尤其是对于膜蛋白胞内互作研究。本方法主要参考 Euromedex 公司的细菌双杂交系统试剂盒说明书(Cat N°: EUK001)。简述如下, 利用基因克隆的方法, 把 ToxR 蛋白分别与大肠杆菌腺苷酰环化酶两个功能结构域的羧基端进行融合表达的质粒转入大肠杆菌检测菌株 BTH101<sup>[19]</sup>, 细菌在含有 0.5 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中, 在 30 °C 下培养 8 h, 通过测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性确定蛋白互作的强弱。

## 2 结果和分析

### 2.1 霍乱弧菌 ToxR 蛋白可以被 DsbA 氧化

利用巯基捕获的方法, 分别检测大肠杆菌和霍乱弧菌 DsbA 蛋白对 ToxR 蛋白氧化状态的影响, 结果发现无论是在大肠杆菌或霍乱弧菌中, 当有 DsbA 存在时, ToxR 都是以氧化态的形式存在, 而在 *dsbA* 基因缺失突变株(*EcdsbA-*和 *VcdsbA-*)中, ToxR 蛋白主要以还原态的形式存在(图 1)。因此, ToxR 蛋白周质空间的半胱氨酸残基主要被 DsbA 蛋白氧化形成二硫键。

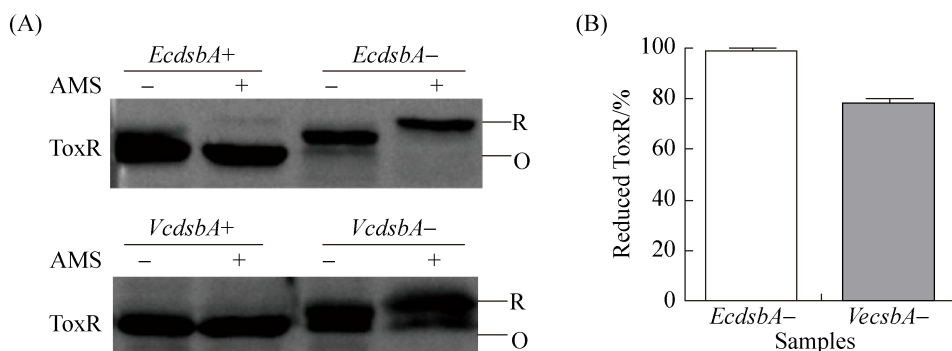


图 1. ToxR 蛋白氧化状态分析

Figure 1. ToxR redox status assay. A: Expression of ToxR was induced before AMS trapping. Reduced ToxR shows a 1 kDa upshift on SDS-PAGE. ToxR was detected by Western blotting using anti-ToxR antibody. Blot shown is representative of at least three separate experiments. B: Quantification of band intensities from blot shown in panel A was performed using ImageJ software. Graph represents percentages of reduced ToxR. Data shown are averages of three independent experiments. R: reduced ToxR; O: oxidized ToxR.

## 2.2 DsbA 对 ToxR 蛋白功能的影响

ToxR 蛋白的氧化状态受 DsbA 蛋白的氧化催化, 为了研究 ToxR 蛋白的氧化状态对其蛋白功能的影响, 在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株和 *dsbA* 基因缺失突变株中检测 ToxR 蛋白对霍乱弧菌毒素基因 *ctxAB* 的诱导调控功能。结果发现在大肠杆菌的 *dsbA* 基因缺失突变株中, 在 ToxR 与 ToxS 共表达的条件下, ToxR 激活 *ctxAB* 的表达显著增强(图 2)。这表明在有 ToxS 存在的条件下, DsbA 会抑制 ToxR 诱导下游基因的表达。

## 2.3 ToxR<sub>C236/293S</sub> 诱导下游基因表达的功能分析

根据 ToxR 在大肠杆菌 *dsbA* 基因缺失突变株中诱导 *ctxAB* 表达的活性增强(图 2), 我们推测还原态的 ToxR 蛋白可能具有更强的诱导活性。因此, 利用定点突变的方法, 把 ToxR 蛋白周质空间结构域的 2 个半胱氨酸残基都突变为丝氨酸, 得

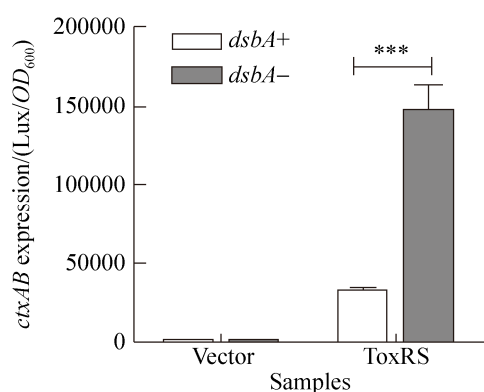


图 2. 大肠杆菌中 ToxR 诱导 *ctxAB* 表达分析

Figure 2. *ctxAB* expression assay in *E. coli* activating by ToxR. *E. coli* strains DH5 $\alpha$  and *dsbA*<sup>-</sup> containing *PctxAB-lux* transcriptional fusion plasmids and *P<sub>BAD</sub>* vector control (vector) or *P<sub>BAD</sub>-ToxRS* (ToxRS) were grown in LB with 0.01% arabinose at 37 °C until  $OD_{600} \approx 0.2$ . Luminescence was measured and reported as light units/ $OD_{600}$ . Data are the means  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \*\*\*,  $P < 0.0001$ .

到 ToxR<sub>C236/293S</sub>, 在与 ToxS 共表达的条件下, 通过检测 ToxR<sub>C236/293S</sub> 诱导 *ctxAB* 的转录水平, 结果却发现在 *dsbA*<sup>+</sup>和 *dsbA*<sup>-</sup>菌株中, ToxR<sub>C236/293S</sub>(M) 诱导 *ctxAB* 转录表达的活性与 ToxR<sub>WT</sub>(WT)的活性没有显著区别(图 3-A)。在霍乱弧菌中检测 ToxR 对 *ompT* 的调控作用中也发现同样的表型, 当 ToxR 与 ToxS 共转录表达时, 在霍乱弧菌 *dsbA* 基因缺失突变株中, ToxR 抑制 *ompT* 表达的活性增强, 然而不管是否有 DsbA 存在, ToxR<sub>WT</sub> 与 ToxR<sub>C236/293S</sub> 对 *ompT* 具有相似的抑制活性(图 3-B)。

在这些检测体系中, ToxR 与 ToxS 是在同一个重组质粒上共转录表达的, 为了分析在没有 ToxS 的条件下 ToxR 诱导 *ctxAB* 表达的活性, 构建了单独表达 ToxR 蛋白的重组质粒, 分析在没有 ToxS 蛋白的条件下, ToxR 对 *ctxAB* 转录的激活作用。结果表明在没有 ToxS 的条件下, ToxR 诱导下游基因的表达活性显著降低(图 3-C)。比较 ToxR<sub>WT</sub> 在 *dsbA*<sup>+</sup>和 *dsbA*<sup>-</sup>菌株中的活性发现, 在没有 ToxS 蛋白存在的条件下, DsbA 对 ToxR 的功能几乎没有影响(图 3-D)。

这些结果表明 ToxS 对 ToxR 诱导 *ctxAB* 基因转录表达的活性具有重要作用, 而 ToxR 蛋白本身的氧化状态对其蛋白功能并没有太大的影响, 而只有当 ToxR 与 ToxS 共同转录表达的条件下, DsbA 很可能通过影响 ToxR 与 ToxS 的相互作用, 从而影响 ToxR 的功能。

## 2.4 ToxR 与 ToxS 蛋白之间的相互作用

为了进一步探究 DsbA 如何通过影响 ToxR 与 ToxS 的相互作用从而影响 ToxR 的功能, 我们首先把 *toxRS* (VC0983-VC0984)基因、单独的 *toxR* (VC0984)基因以及单独的 *toxS* (VC0983)与细菌双杂交系统的 2 个检测质粒融合表达, 通过在 *dsbA*<sup>+</sup>和 *dsbA*<sup>-</sup>菌株中检测菌体的  $\beta$ -半乳糖苷

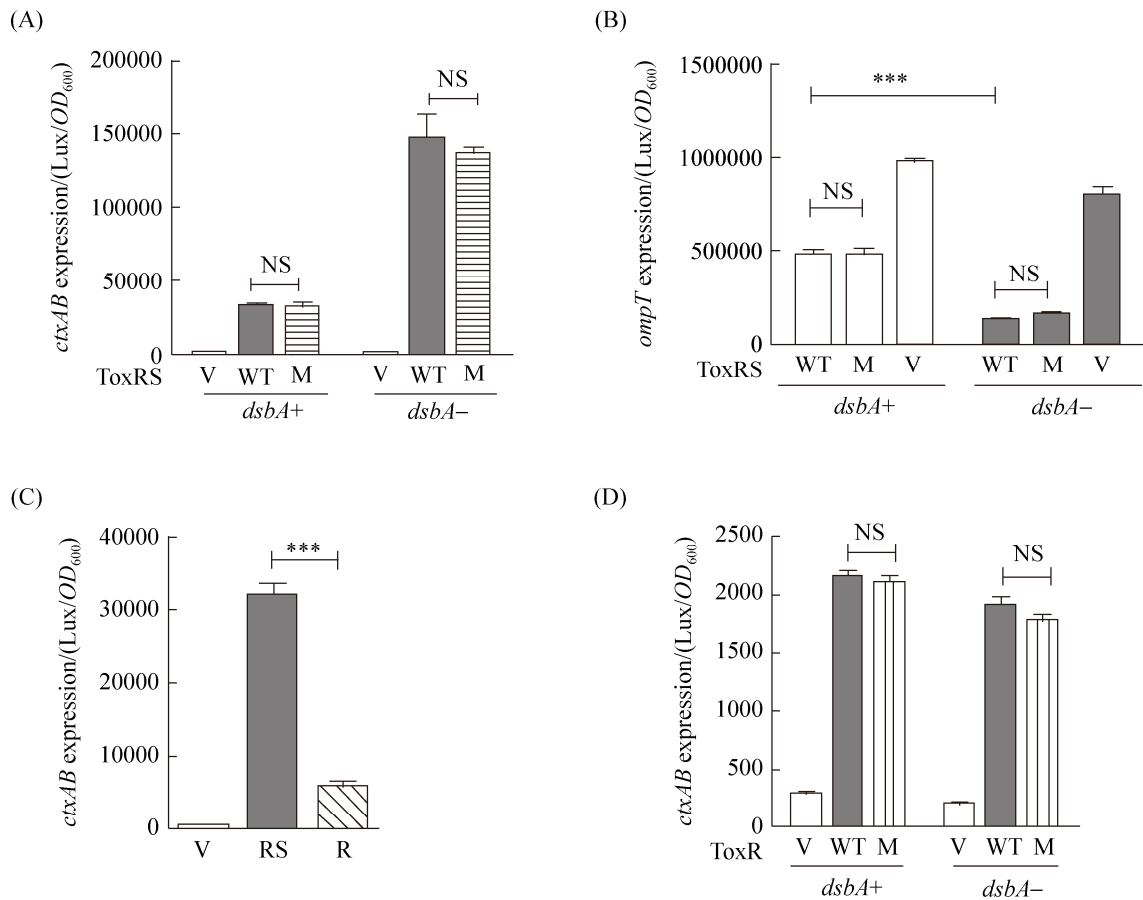


图 3. 大肠杆菌中  $\text{ToxR}_{\text{WT}}$  与  $\text{ToxR}_{\text{C236/293S}}$  诱导 *ctxAB* 和 *ompT* 的表达分析

Figure 3. *ctxAB* or *ompT* expression assay activating by  $\text{ToxR}_{\text{WT}}$  or  $\text{ToxR}_{\text{C236/293S}}$ . A and D: *E. coli* strains DH5 $\alpha$  and *dsbA*-containing *PctxAB*-lux transcriptional fusion plasmids and  $P_{\text{BAD}}$  vector control (V) or  $P_{\text{BAD}}\text{-ToxR}_{\text{WT}}$  (WT) or  $P_{\text{BAD}}\text{-ToxR}_{\text{C236/293S}}$  (M) were grown in LB with 0.01% arabinose at 37 °C until  $OD_{600} \approx 0.2$ . Luminescence was measured and reported as light units/ $OD_{600}$ . B: *V. cholerae* strains *toxRS*-or *toxRS/dsbA*-containing *PompT*-lux transcriptional fusion plasmids and  $P_{\text{BAD}}$  vector control (V) or  $P_{\text{BAD}}\text{-ToxRS}_{\text{WT}}$  (WT) or  $P_{\text{BAD}}\text{-ToxRS}_{\text{C236/293S}}$  (M) were grown in LB with 0.01% arabinose at 37 °C until  $OD_{600} \approx 0.2$ . Luminescence was measured and reported as light units/ $OD_{600}$ . C: *E. coli* strains DH5 $\alpha$  containing *PctxAB*-lux transcriptional fusion plasmids and  $P_{\text{BAD}}$  vector control (V) or  $P_{\text{BAD}}\text{-ToxRS}$  (RS) or  $P_{\text{BAD}}\text{-ToxR}$  (R) were grown in LB with 0.01% arabinose at 37 °C until  $OD_{600} \approx 0.2$ . Luminescence was measured and reported as light units/ $OD_{600}$ . Data are the means  $\pm$  SD ( $n=3$ ). NS, non-significant; \*\*\*,  $P < 0.0001$ .

酶活性。结果发现在  $\text{ToxS}$  与  $\text{ToxR}$  共转录的情况下,  $\text{ToxR}$  蛋白之间有很强烈的相互作用(图 4-A 白色柱), 而且在 *dsbA*-突变株中,  $\text{ToxR}$  的互作更强。然而, 当没有  $\text{ToxS}$  蛋白存在的条件下,  $\text{ToxR}$  蛋白之间的互作要弱得多(图 4-A 灰

色柱), 而且  $\text{DsbA}$  对  $\text{ToxR}$  的互作影响不大, 这说明  $\text{ToxS}$  蛋白可增强  $\text{ToxR}$  蛋白之间的相互作用。而且  $\text{ToxR}_{\text{C236/293S}}$  的互作与  $\text{ToxR}_{\text{WT}}$  相当, 这说明  $\text{ToxR}$  蛋白本身的氧化状态对蛋白的相互作用没有影响。

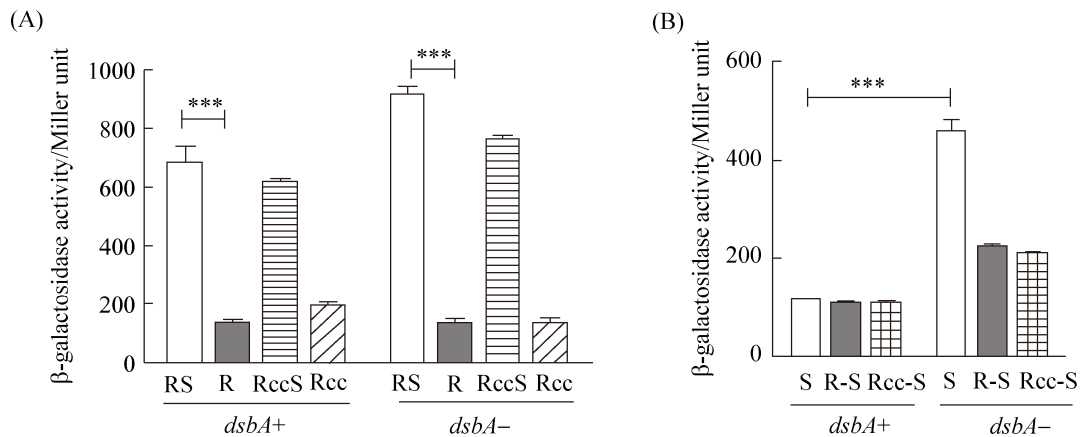


图 4. 利用细菌双杂交系统分析 ToxR 与 ToxS 蛋白互作

Figure 4. ToxR or ToxS protein interaction assay in bacterial two-hybrid system. Full length ToxR or ToxS was fused with the T25 and T18 domains of adenylate cyclase (CyaA) from *Bordetella pertussis*, respectively, and the T25, T18 fusion pairs were introduced into *E. coli* *cyaA* mutants<sup>[19]</sup> or *cyaA/dsbA* double mutants<sup>[20]</sup>. Cultures were grown in LB medium with 0.5 mmol/L IPTG at 30 °C for 8 h without shaking and β-galactosidase activity was measured and reported as Miller Units<sup>[21]</sup>. Data are means±SD (n=3). \*\*\*, P<0.0001. RS: ToxR<sub>WT</sub> and ToxR<sub>WT</sub> interaction with co-transcribed ToxS; R: ToxR<sub>WT</sub> and ToxR<sub>WT</sub> interaction without ToxS; RccS: ToxR<sub>C236/293S</sub> and ToxR<sub>C236/293S</sub> interaction with co-transcribed ToxS; Rcc: ToxR<sub>C236/293S</sub> and ToxR<sub>C236/293S</sub> interaction without ToxS; S: ToxS and ToxS interaction; R-S: ToxR<sub>WT</sub> and ToxS interaction; Rcc-S: ToxR<sub>C236/293S</sub> and ToxS interaction.

把 ToxS(VC0983)与细菌双杂交系统的 2 个检测质粒融合表达, 通过在 *dsbA+*和 *dsbA-*菌株中检测菌体的 β-半乳糖苷酶活性, 发现在 *dsbA-*突变株中, ToxS 之间的相互作用显著增强(图 4-B 白色柱), ToxS 的互作使得 β-半乳糖苷酶活性在 *dsbA-*突变株中比 *dsbA+*增加 4 倍以上。而 ToxR 与 ToxS 的相互作用在 *dsbA-*突变株与 *dsbA+*菌株中也有约 2 倍的差异(图 4-B 灰色柱), 而 ToxR 的氧化状态对 ToxR 与 ToxS 的互作没有显著的影响。这些结果表明, DsbA 主要通过抑制 ToxS 蛋白之间的相互作用, 从而抑制 ToxR 蛋白之间的互作, 进而影响 ToxR 蛋白的功能。

### 3 讨论

本研究发现, ToxR 蛋白周质空间结构域的半

胱氨酸残基可被 DsbA 蛋白氧化, 然而, ToxR 蛋白本身的氧化状态对其诱导毒力基因 *ctxAB* 的转录表达没有影响。ToxS 蛋白通过增强 ToxR 蛋白形成二聚体, 从而促进 ToxR 诱导下游毒力基因的表达。而 DsbA 蛋白通过抑制 ToxS 蛋白之间的相互作用从而影响 ToxR 蛋白的调控功能。研究发现 ToxR 蛋白是霍乱弧菌中诱导多种基因表达的重要调控因子, 包括与致病性相关的毒力基因、与生物被膜合成相关的基因、外膜蛋白 OmpT 和 OmpU 基因等<sup>[10,22-23]</sup>。在霍乱弧菌 *toxR* 基因缺失突变株中, 这些基因的表达会发生显著的变化, 然而在霍乱弧菌中, ToxR 通常不是单独激活这些基因的表达, 而往往是与其他一些调控因子共同调控下游基因的表达。因此, ToxR 蛋白对下游基因的调控功能在霍乱弧菌中显得更为复杂<sup>[10]</sup>。如

在霍乱弧菌中 ToxR 与另一个膜蛋白 TcpP 共同调控 ToxT 的表达, ToxT 进而激活霍乱弧菌与致病相关的一系列毒力基因的表达, 如毒素协同菌毛 (Toxin cooperative pilus, TCP)、霍乱毒素 (Cholera toxin, CTX)、黏附因子等<sup>[24]</sup>。在霍乱弧菌中 ToxT 是直接激活 CTX 基因表达的调控因子, 而 ToxR 是通过激活 ToxT 的表达从而诱导 CTX 的表达。然而, 在大肠杆菌中 ToxR 蛋白可以直接激活 CTX 的表达, 因此, 通过在大肠杆菌中检测 ToxR 诱导 CTX 的表达, 可以直接确定 ToxR 蛋白对下游基因的转录调控功能<sup>[25]</sup>。本研究主要是通过检测在大肠杆菌中 ToxR 诱导 CTX 的表达活性, 研究 ToxR 蛋白的氧化状态对其蛋白功能的影响, 从而确定环境信号因子是否可通过影响 ToxR 蛋白的氧化状态从而影响 ToxR 蛋白的调控功能。

霍乱弧菌生活环境复杂多变, 要适应不同的生境就需要调控不同的基因的表达, 细菌体内的基因转录调控蛋白通过感知外界环境信号因子, 改变蛋白的功能, 从而使得细菌最好地适应生存环境<sup>[4,26]</sup>。作为霍乱弧菌最重要的基因表达调控蛋白之一的 ToxR 蛋白的功能也需要根据外界环境的变化对自身的功能进行调控, 从而诱导或抑制不同的基因的表达。前期研究发现, 霍乱弧菌 TcpP 蛋白的氧化状态对蛋白的转录调控功能具有重要的影响<sup>[16]</sup>。而本研究却发现 ToxR 蛋白本身的氧化状态对蛋白功能的影响不大(图 3), 然而, 细胞周质空间的二硫键氧化蛋白 DsbA 却对 ToxR 的转录调控功能具有抑制作用(图 2)。这些结果表明 ToxR 蛋白很可能通过一种未知的分子机制感知周质空间氧化状态的变化, 从而对其蛋白功能进行调控。本研究初步探讨了 ToxR 蛋白功能受 DsbA 蛋白调控的分子机制, 发现 DsbA 很可能间接通过调控

ToxS 的互作从而影响 ToxR 蛋白的功能。然而 ToxS 蛋白本身并不含有半胱氨酸残基, 而 DsbA 是二硫键氧化蛋白, 那么 DsbA 究竟是如何影响 ToxS 蛋白的相互作用呢? 我们推测, DsbA 很可能通过周质空间或细胞膜上其他的调控因子影响 ToxS 的蛋白互作。另外, 我们前期研究发现, 肠道中的胆汁酸分子会抑制 DsbA 蛋白被 DsbB 蛋白再氧化<sup>[15]</sup>, 那么胆汁酸分子是否可通过抑制 DsbA 蛋白的功能从而促进 ToxR 蛋白诱导霍乱弧菌毒力基因表达的活性呢? 我们将在本研究的基础上对这些问题进行更深入的探讨, 这必将有助于我们更清楚地阐明霍乱弧菌毒力基因表达调控的分子机制。因此, 本研究的结果为进一步研究霍乱弧菌的致病机制提供重要的理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Davies HG, Bowman C, Luby SP. *Cholera - management and prevention. Journal of Infection*, 2017, 74 (Suppl 1): S66–S73.
- [2] Hall RH. Curbing cholera. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(445): eaat9483.
- [3] Krukonis ES, DiRita VJ. From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 6(2): 186–190.
- [4] Matson JS, Withey JH, DiRita VJ. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 2007, 75(12): 5542–5549.
- [5] Hung DT, Mekalanos JJ. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(8): 3028–3033.
- [6] Taylor JL, de Silva RS, Kovacicova G, Lin W, Taylor RK, Skorupski K, Kull FJ. The crystal structure of AphB, a virulence gene activator from *Vibrio cholerae*, reveals residues that influence its response to oxygen and pH. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(3): 457–470.
- [7] Mazumdar S, Bhattacharyya S, Ghosh S, Majumdar S, Ganguly NK. The role of a heat shock protein from *V. cholerae* 0139 in the gut immune response. *Molecular and*

- Cellular Biochemistry*, 2007, 297(1/2): 9–19.
- [8] Spagnuolo AM, Dirita V, Kirschner D. A model for *Vibrio cholerae* colonization of the human intestine. *Journal of Theoretical Biology*, 2011, 289: 247–258.
- [9] Morgan SJ, Felek S, Gadwal S, Koropatkin NM, Perry JW, Bryson AB, Krukons ES. The two faces of ToxR: activator of *ompU*, co-regulator of *toxT* in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(1): 113–128.
- [10] Kazi MI, Conrado AR, Mey AR, Payne SM, Davies BW. ToxR antagonizes H-NS regulation of horizontally acquired genes to drive host colonization. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(4): e1005570.
- [11] DiRita VJ, Mekalanos JJ. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell*, 1991, 64(1): 29–37.
- [12] Midgett CR, Almagro-Moreno S, Pellegrini M, Taylor RK, Skorupski K, Kull FJ. Bile salts and alkaline pH reciprocally modulate the interaction between the periplasmic domains of *Vibrio cholerae* ToxR and ToxS. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(2): 258–272.
- [13] Almagro-Moreno S, Root MZ, Taylor RK. Role of ToxS in the proteolytic cascade of virulence regulator ToxR in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(5): 963–976.
- [14] Peterson KM. Expression of *Vibrio cholerae* virulence genes in response to environmental signals. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2002, 3(2): 29–38.
- [15] Xue YY, Tu F, Shi MT, Wu CQ, Ren GP, Wang XJ, Fang WH, Song HH, Yang MH. Redox pathway sensing bile salts activates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 2016, 102(5): 909–924.
- [16] Yang MH, Liu Z, Hughes C, Stern AM, Wang H, Zhong ZT, Kan B, Fenical W, Zhu J. Bile salt-induced intermolecular disulfide bond formation activates *Vibrio cholerae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(6): 2348–2353.
- [17] Heras B, Shouldice SR, Totsika M, Scanlon MJ, Schembri MA, Martin JL. DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(3): 215–225.
- [18] Ren GP, Champion MM, Huntley JF. Identification of disulfide bond isomerase substrates reveals bacterial virulence factors. *Molecular Microbiology*, 2014, 94(4): 926–944.
- [19] Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(10): 5752–5756.
- [20] Lippa AM, Goulian M. Perturbation of the oxidizing environment of the periplasm stimulates the PhoQ/PhoP system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(6): 1457–1463.
- [21] Miller J. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [22] Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK, Levine MM. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 1988, 168(4): 1487–1492.
- [23] Miller VL, Taylor RK, Mekalanos JJ. Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*, 1987, 48(2): 271–279.
- [24] Goss TJ, Seaborn CP, Gray MD, Krukons ES. Identification of the TcpP-binding site in the *toxT* promoter of *Vibrio cholerae* and the role of ToxR in TcpP-mediated activation. *Infection and Immunity*, 2010, 78(10): 4122–4133.
- [25] Champion GA, Neely MN, Brennan MA, DiRita VJ. A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Molecular Microbiology*, 1997, 23(2): 323–331.
- [26] Wang QM, Ma Y, Liu LJ, Zhu J, Liu Z. Biofilm development and environmental determinants in *Vibrio cholerae*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(9): 1533–1546. (in Chinese) 王全民, 马遥, 刘丽钧, 朱军, 刘智. 霍乱弧菌生物被膜发育与环境调控. *生物工程学报*, 2017, 33(9): 1533–1546.



## ToxS homodimerization enhances ToxR activating virulence gene expression in *Vibrio cholerae*

Xianghong Wang<sup>1</sup>, Ting Zhang<sup>2</sup>, Fei Tu<sup>2</sup>, Mengting Shi<sup>1</sup>, Hui Wang<sup>1\*</sup>, Menghua Yang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Hangzhou 311300, Zhejiang Province, China

**Abstract:** [Objective] In this study, we demonstrated the mechanism of ToxR activating virulence gene expression by modifying its protein function in *Vibrio cholerae*. [Methods] ToxR redox status assay with or without DsbA was analyzed by thiol-trapping assay. ToxR cysteine mutant ToxR<sub>C263/293S</sub> was obtained by site-directed mutagenesis. *Escherichia coli* strains containing *ctxAB* promoter *luxCDABE* transcriptional fusion and a plasmid-coded ToxR expressed under the control of arabinose were used to analyze the transcriptional level. ToxR and ToxS proteins interaction was detected by the bacterial two-hybrid system. [Results] The two cysteines in the periplasmic domain of ToxR could be oxidized by DsbA. When ToxR and ToxS were co-transcribed under the control of the same promoter, ToxR activated *ctxAB* expression to a higher level in *E. coli dsbA* knock out mutant. However, when ToxR was expressed alone without ToxS, the redox status of ToxR had no effect on its activation of *ctxAB* expression in *E. coli*. Bacterial two-hybrid system assay showed that ToxS greatly enhanced ToxR homodimerization regardless of the redox status of ToxR, and DsbA strongly repressed ToxS-ToxS interaction. [Conclusion] The redox status of ToxR has no effect on its activating virulence gene expression and ToxS enhances ToxR activity by promoting ToxR homodimerization. DsbA indirectly affects ToxR activating virulence genes expression by repressing ToxS homodimerization.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, expression regulation, ToxRS, redox status, protein interaction

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31470244, 31770151) and by the Science Development Foundation of Zhejiang Agricultural and Forestry University (2013FR012)

\*Corresponding author. Hui Wang, Tel: +86-25-84396645, E-mail: wanghui@njau.edu.cn; Menghua Yang, Tel: +86-571-63754650, E-mail: yangmh@zafu.edu.cn

Received: 13 July 2018; Revised: 11 September 2018; Published online: 1 December 2018