



大肠杆菌机械敏感性离子通道 MscS 失活特性分析

王晓敏^{1#}, 张怡^{1#}, 吕梦丹^{1#}, 王志坚¹, 应瑾瑶¹, 殷乐依¹, 吴宇涛¹, 刘胜兵¹, 敖雷¹, 郑永霞¹, 徐莹¹, 潘巍巍^{1*}, 李月舟^{2*}

1 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314000

2 浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310000

王晓敏, 张怡, 吕梦丹, 王志坚, 应瑾瑶, 殷乐依, 吴宇涛, 刘胜兵, 敖雷, 郑永霞, 徐莹, 潘巍巍, 李月舟. 大肠杆菌机械敏感性离子通道 MscS 失活特性分析. 微生物学报, 2022, 62(9): 3529–3541.

Wang Xiaomin, Zhang Yi, Lv Mengdan, Wang Zhijian, Ying Jinyao, Yin Leyi, Wu Yutao, Liu Shengbing, Ao Lei, Zheng Yongxia, Xu Ying, Pan Weiwei, Li Yuezhou. Analysis of inactivation characteristics of *Escherichia coli* mechanosensitive ion channel MscS. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3529–3541.

摘要: 【目的】细菌机械敏感性离子通道 MscS 能够在细菌周围环境渗透压急剧降低时, 打开并释放胞内内容物, 平衡内外渗透压差, 使细菌存活。鉴于其广泛分布在各种细菌中, 而在哺乳动物中未发现其同源体, MscS 被认为是一种新型抗生素靶点。MscS 一个独特的开放特征是具有失活特性, 即在持续的机械刺激条件下, MscS 从开放状态进入一种非离子通透的失活状态, 从而避免因通道持续开放引起大量内容物流失导致细菌死亡。该研究的目的是鉴定影响 MscS 失活的关键氨基酸, 为靶向 MscS 的药物设计提供思路。【方法】采用分子克隆方法制备 MscS Cyto-helix(P166–I170) 半胱氨酸突变体, 利用巯基化合物 MTSET⁺ 结合半胱氨酸从而对其侧链基团进行修饰, 并通过低渗刺激实验, 检测表达 MscS 半胱氨酸突变体的大肠杆菌分别在无或有 MTSET⁺ 处理下, 低渗刺激诱发通道开放后的存活率筛选显著影响通道功能的突变体。利用电生理膜片钳方法检测突变体在

基金项目: 科技部重点研发计划(2018YFE0112900); 嘉兴市科技计划(2020AD10018); 嘉兴学院科研启动项目(CD70519018); 国家自然科学基金(31871402); 浙江省基础公益研究计划(LY21H160047, LGD22H160004); 国家大学生创新训练计划(202113291002); 浙江省新苗项目(2021R417028); 嘉兴学院大学生 SRT 项目(CD8517211489)

Supported by the National Key Research and Development Program (2018YFE0112900), by the Jiaying Science and Technology Planning Project (2020AD10018), by the Jiaying University Scientific Research Start-up Project (CD70519018), by the National Natural Science Foundation of China (31871402), by the Public Welfare Project of Zhejiang Province (LY21H160047, LGD22H160004), by the National College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (202113291002), by the College Student Innovation Program of Zhejiang Province (2021R417028) and by the College Student SRT Program of Jiaying University (CD8517211489)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: LI Yuezhou, Yuezhou-Li@zju.edu.cn; PAN Weiwei, wwpan@mail.zjxu.edu.cn

Received: 21 January 2022; Revised: 8 April 2022; Published online: 26 May 2022

MTSET⁺处理前后通道失活特性的变化,结合定点突变手段进一步探讨失活机制。【结果】MTSET⁺处理导致表达半胱氨酸突变体 G168C-MscS 的大肠杆菌在低渗刺激后存活率极大降低; G168C-MscS 在结合 MTSET⁺后失去失活特性,保持持续开放,是导致细菌胞内内容物大量流失并死亡的重要原因;酪氨酸突变 G168Y-MscS、亮氨酸突变 G168L-MscS 和赖氨酸突变 G168K-MscS 的失活特性与野生型 WT-MscS 一致,而天冬氨酸突变 G168D、缬氨酸突变 G168V 和异亮氨酸突变 G168I 的失活速率显著降低,尤其是 G168I-MscS 失去失活特性,表明 MscS 168 位点是影响通道失活的关键位点,并且通道失活特性与该位点氨基酸侧链基团的大小及电荷性质相关。【结论】G168 位点甘氨酸是影响 MscS 通道失活的关键氨基酸。

关键词: 机械敏感性离子通道; MscS; 大肠杆菌; 低渗刺激; 膜片钳

Analysis of inactivation characteristics of *Escherichia coli* mechanosensitive ion channel MscS

WANG Xiaomin^{1#}, ZHANG Yi^{1#}, LV Mengdan^{1#}, WANG Zhijian¹, YING Jinyao¹, YIN Leyi¹, WU Yutao¹, LIU Shengbing¹, AO Lei¹, ZHENG Yongxia¹, XU Ying¹, PAN Weiwei^{1*}, LI Yuezhou^{2*}

1 College of Medicine, Jiaxing University, Jiaxing 314000, Zhejiang, China

2 The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310000, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] The mechanosensitive channel of small conductance (MscS) in bacteria releases solutes and water when a hypo-osmotic shock raises the pressure in the cells, thereby enabling the survival of bacteria. Given its wide distribution in various bacteria and no homologues found in mammals, MscS is considered a novel antibiotic target. A hallmark of MscS is that it enters a tension-insensitive inactivated state upon prolonged mechanical stimulation, thereby avoiding the loss of a large amount of cell content and preventing cell death. This study aims to identify the key residues related to the inactivation of MscS, which is expected to serve as a reference for the development of MscS-targeting drugs. [Methods] The cysteine mutants of MscS Cyto-helix (P166-I170) were prepared with molecular cloning method. The thiol compound MTSET⁺ binds to cysteine and thus modify cysteine's side chain group. In this study, osmotic downshock assay was used to examine the viability of *Escherichia coli* expressing cysteine mutants of MscS Cyto-helix (P166-I170) upon hypotonic stimulation without or with MTSET⁺ treatment and screened for cysteine mutant that significantly affected the channel function. The inactivation of MscS mutants before and after MTSET⁺ treatment was examined by electrophysiological experiments. In addition, the inactivation mechanism of MscS was further explored by eletrophysiology combined with site-directed mutagenesis. [Results] MTSET⁺ led to a great decrease in the survival rate of *E. coli* expressing G168C-MscS upon hypotonic stimulation. G168C-MscS lost its inactivation property after binding to MTSET⁺ and remained open, resulting in great loss of intracellular contents and bacterial death. The inactivation properties of G168Y-MscS, G168L-MscS, and G168K-MscS mutants were consistent with WT-MscS, while the inactivation rates of

the three mutants G168D, G168V, and G168I were significantly reduced, especially G168I-MscS which lost the inactivation properties. Therefore, MscS G168 affected channel inactivation, and the channel inactivation characteristics were related to the size and charge of the residue side chain group at 168 site. **[Conclusion]** MscS G168 is a key residue that affects the inactivation of MscS.

Keywords: mechanosensitive ion channel; MscS; *Escherichia coli*; osmotic downshock; patch clamp

对机体内外机械刺激的感知和应答是生命体的重要能力。从细菌分裂, 植物生长, 到高等动物触觉、听觉、平衡等感觉的产生, 机械响应涉及众多的生理过程^[1]。机械敏感性离子通道作为一类特殊的膜蛋白, 通过通道分子构象的变化将机械刺激转化为化学信号或生物电信号, 在机械响应中起着重要作用^[2]。

最早发现的是细菌中的机械敏感性离子通道, 包括大电导机械敏感性离子通道(mechanosensitive channel of large conductance, MscL)和小电导机械敏感性离子通道(mechanosensitive channel of small conductance, MscS)。它们主要作为细胞的“紧急释放阀门”, 能够在周围环境渗透压急剧降低导致细菌体积膨胀时, 感受到膜张力的变化、打开并释放内容物, 从而平衡细胞内外渗透压差, 防止细菌因过度膨胀而破裂死亡^[3]。MscL 和 MscS 高度保守, 广泛分布在细菌中, 包括许多致病菌株, 如结核分枝杆菌^[4]、金黄色葡萄球菌^[5]、淋病奈瑟氏球菌^[6]等, 在真菌、植物中也存在 MscS 的同源物, 然而在高等哺乳动物中未发现其家族成员^[7]。多项研究表明 MscL 和 MscS 可作为一类新型抗生素药物靶点^[8]。近来研究人员采用计算机分析方法设计了一种靶向金黄色葡萄球菌 MscL 的抗菌剂, 并且该抗菌剂在秀丽隐杆线虫的感染模型中表现出抗感染功效^[9]。Wang 等研究显示 MscS 对于淋病奈瑟菌在小鼠阴道感染模型中的定殖和存活很重要, 指出 MscS 有可能成为治疗淋病的一种药物靶点^[6]。因此研究 MscL 和 MscS 结构和功能的关系将有助于理解影响通道开放特

性的关键结构域或氨基酸, 从而为靶向药物的设计打下基础。

MscS 开放时形成一个直径约为 16 Å, 电导约为 1 nS 的孔道, 具有轻微的阴离子选择性 (P_{Cl^-}/P_{K^+} 约为 1.5–3)^[10–11]。区别于 MscL, MscS 一个独特的开放特征是具有失活特性, 即在持续的机械刺激条件下, MscS 从开放状态进入一种非离子通透的失活状态, 不再响应机械刺激^[12]。当在无机械刺激的“休息”后, 通道能够从失活状态恢复, 再次给予机械刺激时, 通道再次开放。MscS 的失活特性可能是维持细胞稳态的一种保护机制。细菌周围环境渗透压降低时, MscS 感受到膜张力的变化开放, 一方面将胞内内容物释放到胞外, 平衡细胞内外渗透压; 另一方面, 大量内容物流出胞外, 对细胞无疑是一种损耗, 而且一些离子顺浓度梯度运输, 比如 H^+ , Na^+ 从胞外流向胞内, 导致细胞难以维持正常的膜电位, 而 MscS 的失活特性避免了这些弊端, 从而使细胞行使正常的生理功能。研究表明, 通过改变 MscS 关键区域氨基酸性质, 将引起通道持续开放, 内容物大量流失导致细胞死亡^[13–14]。这提示我们可以鉴定得到影响 MscS 失活的关键氨基酸, 通过化合物修饰使得 MscS 失去失活特性引起细菌死亡。然而关于 MscS 失活特性的研究很少。

大肠杆菌野生型 MscS X 衍射晶体结构^[15]显示 MscS 是同源七聚体, 由跨膜结构域和胞质结构域两部分组成(图 1)。跨膜结构域含有 3 个跨膜 α 螺旋, TM1 (29–57)、TM2 (68–91) 和 TM3 (96–127)。TM3 在 113 位甘氨酸(Gly113)处发生转折, 分为

TM3a (96–113)和TM3b (114–127)。TM3a 形成孔道区域。TM3b 位于膜脂质双分子层与胞质的交界处,与膜平面几乎平行,起着连接跨膜结构域和胞质结构域的作用。胞质区由两个结构域组成:β 结构域(132–177)和 C 端结构域(188–280)。β 结构域处存在一个小的 α 螺旋 Cyto-helix (166–170),在空间位置上与 TM3b 相靠近。研究表明, Cyto-helix 和 TM3b 在维持 MscS 通道功能中起着重要作用,位于 MscS TM3b 的 G113 和 G121 两个氨基酸影响通道的失活^[12,16]。另有研究表明将 Cyto-helix 与 TM3b 通过半胱氨酸二硫键交联引起通道进入一种非离子通透状态^[17],提示 Cyto-helix 可能参与 MscS 的失活过程。然而 Cyto-helix 如何参与 MscS 失活过程并不清楚。

本研究中,为探究 Cyto-helix 是否影响 MscS 失活,我们将 166–170 位氨基酸逐个替换为半胱氨酸,进而利用巯基化合物 MTSET⁺结合半胱氨酸侧链巯基基团对其带电性质和侧链结构进行进一步修饰,通过结合低渗实验和电生理实验鉴定得到了影响大肠杆菌 MscS 失活

的关键氨基酸,即位于 Cyto-helix 的第 168 位甘氨酸 G168 (图 1)。该研究揭示了 MscS 胞质结构域 Cyto-helix 在通道失活过程中起重要作用,并为以 MscS 为靶点的抗生素药物的设计提供了思路。

1 材料与方法

1.1 菌株,质粒,细菌培养

本研究所用菌株与质粒见表 1。大肠杆菌菌株 MJF465 (Frag1, $\Delta mscL::Cm$, $\Delta mscS$, $\Delta mscK::Kan$)用于携带质粒。DH10β 感受态细胞用于克隆质粒。PB10b 质粒载有大肠杆菌 WT-MscS 基因 (PB10b-Ec-MscS)。所有菌株储存于冻存液(65% glycerol, 0.1 mol/L MgSO₄, 0.025 mol/L Tris·Cl)中,−80 °C 冻存。细菌生长于新鲜 LB 培养液 (5 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract, 10 g/L trptone),并适当添加氨苄青霉素(100 μg/mL)。对于高渗培养基,需要在 LB 培养基中再添加 1 mol/L NaCl。1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG)诱导通道表达。

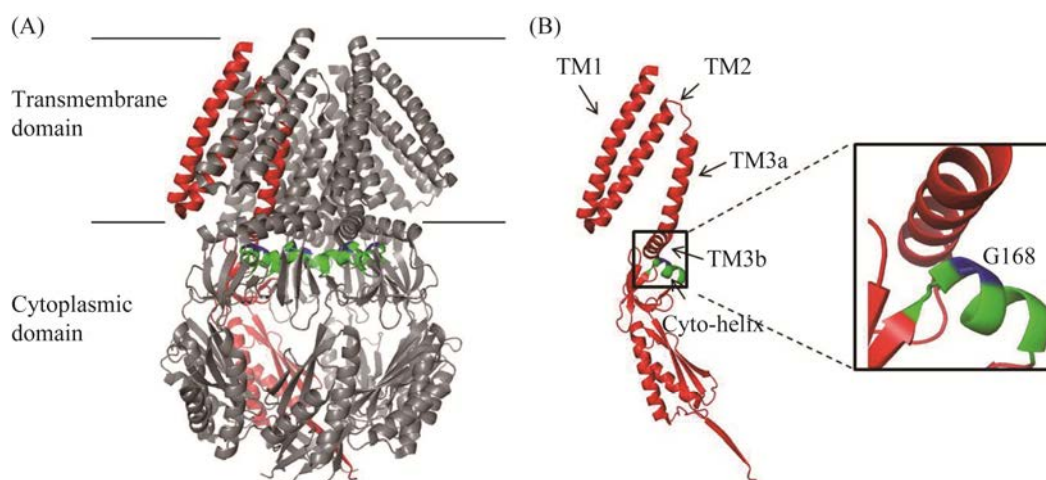


图 1 大肠杆菌 MscS 晶体结构模式图^[15](PDB ID: 2OAU)

Figure 1 Schematic diagram of the crystal structure of *Escherichia coli* MscS^[15] (PDB ID:2OAU). A: side view of MscS heptamer. MscS is composed of transmembrane domain and cytoplasmic domain; B: side view of an individual MscS subunit. The transmembrane domain contains three membrane-spanning helices (TM1, TM2 and TM3). TM3 is divided into two helical segments (TM3a and TM3b) with a kink at G113. The Cyto-helix in the cytoplasmic region is colored in green. The position of G168 in Cyto-helix is colored in blue. The TM3b and Cyto-helix were enlarged in the box.

表 1 菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains/plasmids	Features	Source
<i>Escherichia coli</i>		
MJF465	Frag1; $\Delta mscL::Cm\Delta mscS\Delta mscK::Kan$	Our laboratory
DH10 β	Cloning host	Our laboratory
Plasmids		
PB10b-Ec-MscS	Amp ^r ; vector PB10b expressing Ec- <i>mscS</i> from an IPTG-inducible promoter	Our laboratory
PB10b-Ec-MscS(P166C)	Amp ^r ; vector PB10b-Ec- <i>mscS</i> derivative containing a Ec- <i>mscS</i> (P166C) mutation	This study
PB10b-Ec-MscS(N167C)	Amp ^r ; vector PB10b-Ec- <i>mscS</i> derivative containing a Ec- <i>mscS</i> (N167C) mutation	This study
PB10b-Ec-MscS(G168C)	Amp ^r ; vector PB10b-Ec- <i>mscS</i> derivative containing a Ec- <i>mscS</i> (G168C) mutation	This study
PB10b-Ec-MscS(K169C)	Amp ^r ; vector PB10b-Ec- <i>mscS</i> derivative containing a Ec- <i>mscS</i> (K169C) mutation	This study
PB10b-Ec-MscS(I170C)	Amp ^r ; vector PB10b-Ec- <i>mscS</i> derivative containing a Ec- <i>mscS</i> (I170C) mutation	This study

1.2 MscS 突变体构建

本部分参照定点突变试剂盒步骤(Vazyme, #C214), 根据突变位点设计相应上下游引物, 以 PB10b-Ec-MscS 质粒为模板, PCR 扩增获得线性化质粒 DNA。采用 *Dpn* I 酶消化, 去除甲基化模板质粒。利用重组酶将线性化质粒 DNA 环化, 将重组产物转化进入感受态细胞 DH10 β , 涂板, 挑取单克隆, 测序鉴定。用于制备 *E. coli* MscS 突变体的引物见表 2。

1.3 低渗刺激实验

挑取表达 WT-MscS 或 MscS 突变体的 MJF465 菌株至新鲜 LB 培养基中, 加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素, 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养过夜。将过夜培养的菌液按照 1:100 比例稀释至 LB 培养液中振荡培养。1 h 后, 加入等体积的含有 1 mol/L

NaCl 的高渗培养基, 继续振荡培养。当 OD_{600} 至 0.2 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 培养 1 h。将菌液按照 1:10 的比例分别稀释到含 0.5 mol/L NaCl 的 LB 培养基(等渗刺激)、含有 1 mmol/L MTSTE⁺的 0.5 mol/L NaCl 的 LB 培养基(等渗刺激+MTSET⁺)、蒸馏水(低渗刺激)和含有 1 mmol/L MTSTE⁺的蒸馏水(低渗刺激+1 mmol/L MTSET⁺)中处理。20 min 后, 按照 1:10 比例将菌液分别进行梯度稀释 6 次。取 2.5 μ L 菌液点到 LB 固体培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。将低渗刺激下稀释 10⁴ 倍的菌落个数除以等渗刺激相对应稀释倍数下菌落个数, 计算细菌存活率。

1.4 原生质球制备

过夜培养的菌液按 1:100 的比例稀释至 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养。当 OD_{600} 至

表 2 本研究中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
Ec-MscS(P166C)-F	ATTATCGTTATTgcaACCGGTA AAAATTATTGCCGG
Ec-MscS(P166C)-R	CCGGCAATAATTTTACCGTTgcaAATAACGATAAT
Ec-MscS(N167C)-F	ATTATCGTTATTCCGtgcaGGTAAAATTATTGCCGG
Ec-MscS(N167C)-R	CCGGCAATAATTTTACCGcaCGGAATAACGATAAT
Ec-MscS(G168C)-F	ATCGTTATTCCGAACtgcAAAATTATTGCCGG
Ec-MscS(G168C)-R	CCGGCAATAATTTTgcaGTTTCGGAATAACGAT
Ec-MscS(K169C)-F	ATTCCGAACGGTtgcATTATTGCCGGAAATATT
Ec-MscS(K169C)-R	AATATTTCCGGCAATAATgcaACCGTTCGGAAT
Ec-MscS(I170C)-F	ATTCCGAACGGTAAAtgcATTGCCGGAAATATT
Ec-MscS(I170C)-R	AATATTTCCGGCAATgcaTTTACCGTTCGGAAT

0.2 时,将菌液以 1:10 的比例稀释至 LB 液体培养基中,加入 cephalixin 至终浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,继续培养 1.5–2.0 h,然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导目的通道蛋白表达。40 min 后,2 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,去上清。加入 0.8 mol/L 蔗糖 2.5 mL,轻轻摇晃,将沉淀悬浮。然后依次加入 1 mol/L Tris·Cl 125 μL ; 5 mg/mL lysozyme 30 μL ; 5 mg/mL DNase 30 μL ; 125 mmol/L Na·EDTA 30 μL 摇匀,计时共反应 5 min。5 min 后,加入 1 mL 终止反应液(0.8 mol/L 蔗糖, 20 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L Tris·Cl),轻轻混匀,并立即置于冰上,终止反应。将溶液慢慢滴到预冷的 10 mL 稀释液(0.8 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L Tris·Cl)的上层,1 800 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min。去上清,保留大约 300 μL 的上清液,将底部的原生质球沉淀轻轻悬浮起来,即可用于膜片钳记录。

1.5 电生理分析

本研究采用 inside-out 记录模式,电极内液和电极外液是同一种溶液(200 mmol/L KCl, 90 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L CaCl_2 , 5 mmol/L HEPES, pH 6.0)。取电极内液加入浴槽中,加入原生质球,轻轻混匀,置于显微镜下。选取状态好的细胞,电极靠近细胞,施加负压形成高阻封接。将电极及其钳制细胞稍微提起,轻拍防震工作台,除了电极尖端钳制的膜片外,原生质球上其他部分的膜片由于浴液的振动会从电极上脱落,形成 inside-out recording 模式。通过给予负压和电压,激活通道,使用 AxoPatch 200B 放大器和 Clampex 以 20 kHz 的采样率和 5 kHz 滤波器采集记录通道电流,用 clampfit 软件分析数据。

1.6 统计分析

所有实验均重复 3 次以上。使用 GraphPad Prism 软件(GraphPad 8.0)进行统计分析。使用

Student's two-tailed unpaired *t* test 进行差异比较。显著性水平用星号表示,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 MTSET⁺导致表达 G168C-MscS 的细菌在低渗刺激时死亡

本研究将 *E. coli* MscS Cyto-helix (166–170) 上的氨基酸逐个突变为半胱氨酸(Cys, C),首先通过低渗刺激实验,检测这些半胱氨酸突变体是否具有正常生理功能。通过将生长于高渗培养基中的表达 WT、P166C、N167C、G168C、K169C、I170C MscS 的大肠杆菌分别置于高渗培养基(mock, 等渗刺激)或蒸馏水(shock, 低渗刺激)(图 2A),计算 2 种处理后细菌的存活率,结果显示表达 WT、P166C、N167C、K169C、I170C MscS 菌株在低渗刺激后的存活率与等渗刺激一致,而表达 G168C-MscS 菌株在低渗刺激后的存活率明显下降(图 2B 与 2C),说明 G168C-MscS 影响了通道的开放特性,使得 MscS 不能行驶其正常功能。

此外利用巯基化合物 MTSET⁺特异性结合半胱氨酸,且大肠杆菌 WT-MscS 本身不含半胱氨酸,只有突变位点为半胱氨酸的特性,通过检测表达 WT-MscS 和半胱氨酸突变体 MscS 大肠杆菌在 MTSET⁺处理后低渗刺激时的存活率,反映突变位点在 MTSET⁺修饰后通道功能的变化。当我们在等渗刺激或低渗刺激时同时用 MTSET⁺化合物处理即 mock+MTSET⁺, shock+MTSET⁺,发现表达 WT、P166C、N167C、K169C、I170C MscS 菌株在两种处理后的存活率与等渗刺激无显著性差异,说明 MTSET⁺和这些位点的半胱氨酸结合后并不会引起 MscS 通道功能的显著变化。然而尽管表达 G168C-MscS 菌株在 mock+MTSET⁺处理后的存活率与等渗刺激一致,却在 shock+MTSET⁺处理后其存活

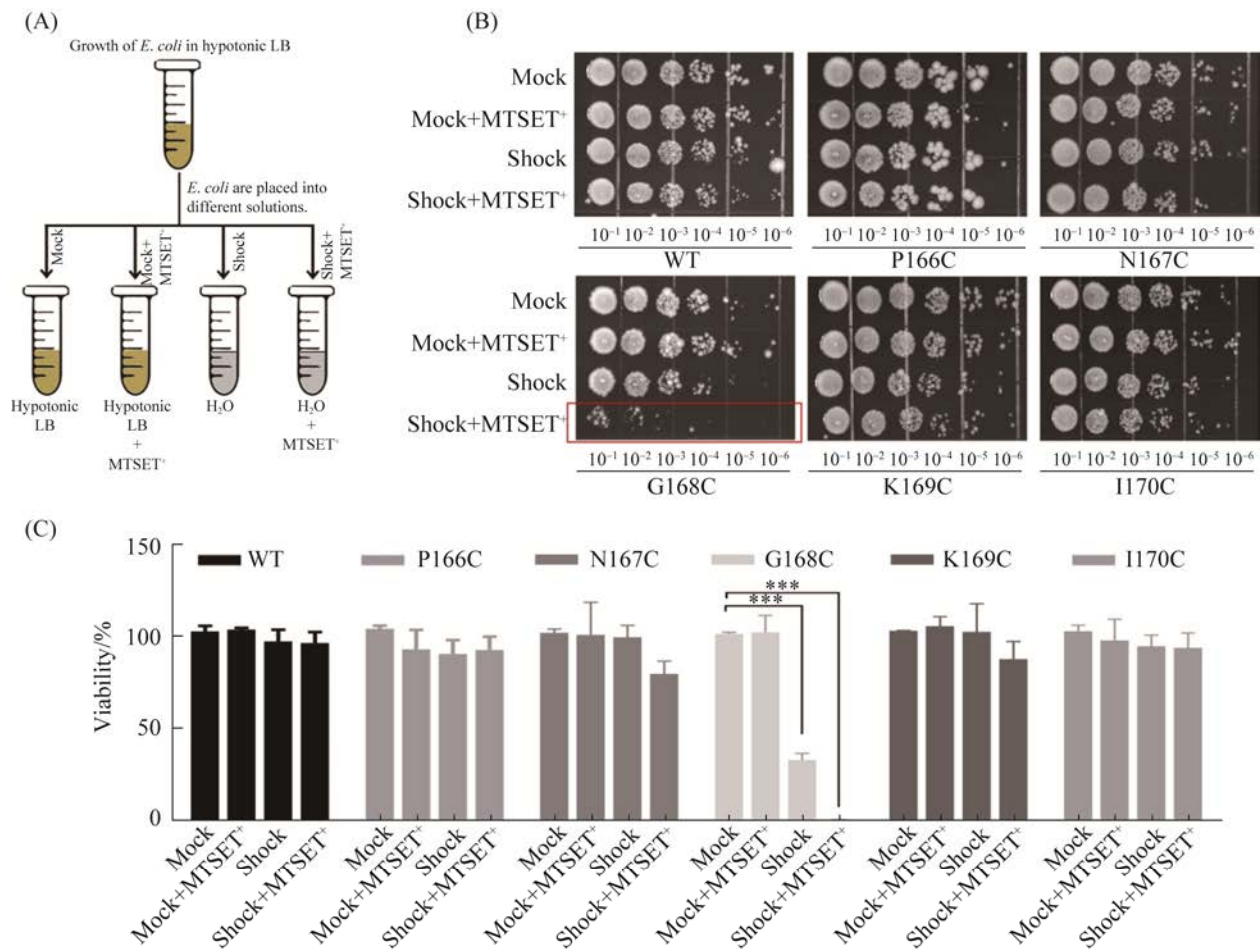


图 2 MTSET⁺处理导致表达 G168C-MscS 的细菌在低渗刺激时死亡

Figure 2 MTSET⁺ treatment leads to the death of *Escherichia coli* strain MJF465 ($\Delta mscL$, $\Delta mscS$, $\Delta mscK$) expressing G168C-MscS upon hypotonic stimulation. A: schematic diagram of osmotic downshock assay. MJF465 expressing wild-type MscS or MscS mutants was first cultured in hypertonic LB medium, and then placed into hypertonic LB (mock), hypertonic LB supplemented with 1 mmol/L MTSET⁺ (mock+MTSET⁺), H₂O (shock), and H₂O supplemented with 1 mmol/L MTSET⁺ (shock+MTSET⁺) respectively. Mock: isotonic treatment. Shock: hypotonic treatment. MTSET⁺: a sulfhydryl compound. B: growth of MJF465 strain expressing wild-type MscS or MscS mutants (P166C, N167C, K169C, I170C) upon mock, mock+MTSET⁺, shock, shock + MTSET⁺ respectively. The panels show the 2.5 μ L drop-plates at each tenfold dilution (10⁻¹ to 10⁻⁶) of cells. The growth of MJF465 expressing G168C-MscS upon shock+MTSET⁺ was shown in red box. C: percentage viability of cells exposed to mock+MTSET⁺, shock, shock+MTSET⁺ relative to mock. Data are represented as mean \pm SEM. Significant differences were identified by Student's two-tailed unpaired *t* test, ***: *P*<0.001.

率极低(图 2B 与 2C), 说明在通道开放过程中, MTSET⁺通过结合 G168C 改变了通道开放特性引起细菌死亡。

2.2 MTSET⁺导致 G168C-MscS 失去失活特性

低渗刺激实验表明 MTSET⁺处理导致表达 G168C-MscS 的细菌在低渗刺激时几乎全部死

亡。导致这一现象的原因很可能是 MscS 第 168 位点半胱氨酸在结合 MTSET⁺后其侧链结构和带电性质发生了变化, 以致于 MscS 通道开放异常(图 3A)。本研究进一步利用电生理膜片钳技术采用 inside-out 记录模式检测了 WT-MscS 和 G168C-MscS 在 MTSET⁺处理前后的开放特征

的变化(图 3B)。结果显示当负压达到一定阈值时, WT-MscS 瞬间开放, 电流达到最大值 I_{\max} , 然后迅速失活, 电流降低回到基线; MTSET⁺处理后, WT-MscS 的开放特性与处理前保持一致(图 3C)。我们将从 I_{\max} 下降到 50% I_{\max} 所需的时

间 $t_{1/2}$ 衡量通道的失活速率。MTSET⁺处理前后, WT-MscS $t_{1/2}$ 无显著性差异(MTSET⁺处理前后 WT $t_{1/2}=1.5\pm 0.21\text{s}$, $1.8\pm 0.85\text{s}$, $n=4$)(图 3D)。G168C-MscS 在负压增大到一定值时, 瞬间开放, 然后缓慢进入失活状态, 其 $t_{1/2}$ 约 34 s (33.89 ± 7.77 ,

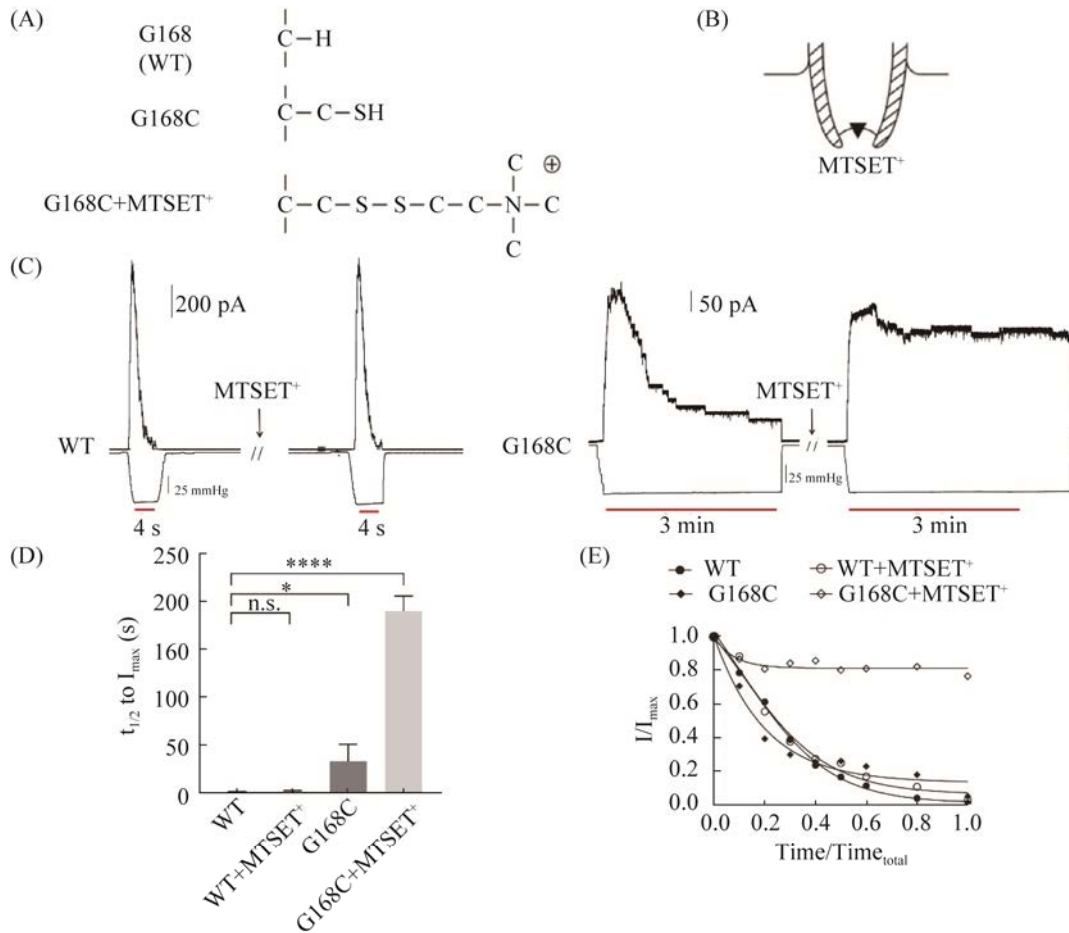


图 3 MTSET⁺导致 G168C-MscS 失去失活特性

Figure 3 G168C-MscS loses its inactivation property upon MTSET⁺ treatment. A: the side chain group of the 168th residue of MscS when it is glycine, cysteine, and cysteine combined with MTSET⁺. B: in the inside-out recording mode, a part of the membrane of the spheroplast were sealed by electrode. When MscS (the black triangle) on the membrane is opened, ions pass through to generate current. MscS opening changes were recorded by adding MTSET⁺ to the bath. C: representative patch clamp recordings from the same patch before and after addition of MTSET⁺ to the bath at 20 mV membrane potential. Lower traces: applied negative pressure. Upper traces: current curve. D: changes in $t_{1/2}$ of WT-MscS or G168C-MscS before and after MTSET⁺ treatment. $t_{1/2}$ represents the time it takes for the current to drop from the maximum I_{\max} to 1/2 I_{\max} and reflects inactivation rate of the channel. Data are shown as mean \pm SEM. Significant differences were identified by Student's two-tailed unpaired t test, *: $P<0.05$, ***: $P<0.001$. E: $\Delta\text{Time}/\text{Time}_{\text{total}}$ and the normalized value I/I_{\max} were plotted with Boltzman formula to reflect inactivation curve. The total time required for channel inactivation ($\text{Time}_{\text{total}}$) was referred as the time at which current reaches maximum value (Time_{\max}) minus the time at which current has just dropped to the baseline ($\text{Time}_{\text{baseline}}$). ΔTime represents the time at which the current drops to a certain value minus the time at which the current reaches maximum.

$n=5$), 显著高于 WT-MscS; 并且在 MTSET⁺处理后, G168C-MscS 基本不失活, 保持持续开放, 我们将从 I_{\max} 到最终释放负压电流回到基线的记录时间算为其 $t_{1/2}$, 约为 190 s ($190.06 \pm 9.14, n=3$) (图 3C 与 3D)。图 3E 失活曲线同样表明 G168C-MscS 在 MTSET⁺处理后失去失活特性。该部分结果表明, G168C-MscS 能够失活, 但其失活速率显著低于 WT-MscS。而 G168C-MscS 半胱氨酸在结合 MTSET⁺后, 通道持续开放, 失去失活特性, 以致于胞内内容物持续外流, 导致几乎所有细菌死亡, 与低渗刺激实验结果一致(图 3C-D, 图 2B)。

2.3 MscS 第 168 位氨基酸侧链基团带有正电荷不影响其失活特性

电生理结果表明 MTSET⁺导致 G168C-MscS 保持持续开放, 失去失活特性。原因是带有正电荷的巯基化合物 MTSET⁺能够结合 G168C 半胱氨酸的侧链基团, 改变了其结构和带电性质。为进一步探究是否是由于侧链基团带有正电荷的性质影响了通道开放特性, 我们将 G168 位点甘氨酸突变为另一侧链基团带有正电荷的氨基酸赖氨酸(Lys, K)。电生理结果表明, G168K-MscS 开放特性与 WT-MscS 基本一致, 在负压达到一定阈值时, 通道开放, 然后失活(图 4A), 其 $t_{1/2}$

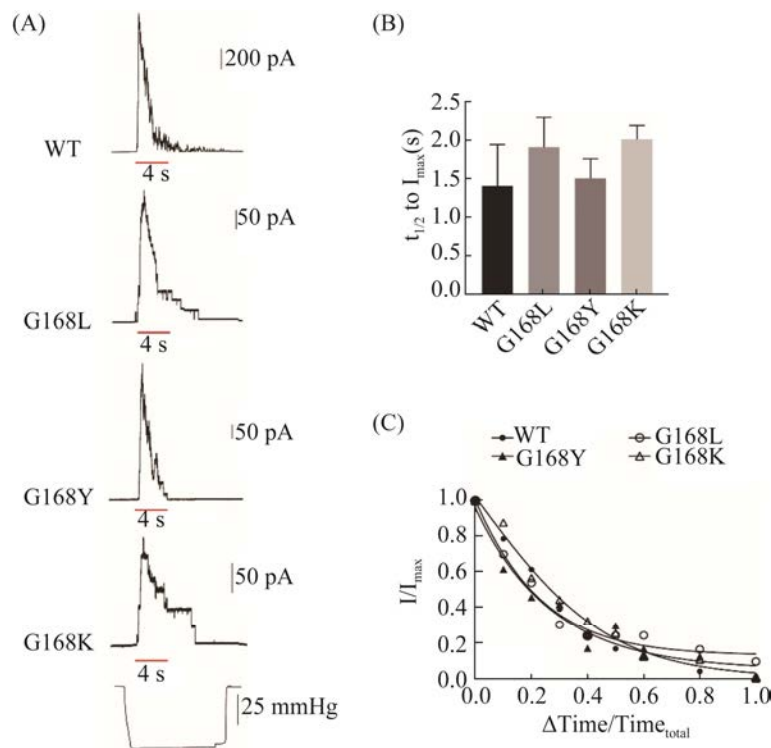


图 4 G168L-MscS, G168Y-MscS 和 G168K-MscS 失活特性与 WT-MscS 一致

Figure 4 The inactivation properties of G168K-MscS were similar to that of WT-MscS. A: representative patch clamp recordings of WT-MscS and MscS mutants (G168L, G168Y and G168K) at 20 mV membrane potential. Lower traces: applied negative pressure. Upper traces: current curve. B: changes in $t_{1/2}$ of WT-MscS or MscS mutants (G168L, G168Y and G168K). $t_{1/2}$ represents the time it takes for the current to drop from the maximum I_{\max} to $1/2 I_{\max}$. Data are shown as mean \pm SEM. C: $\Delta\text{Time} / \text{Time}_{\text{total}}$ and the normalized value I/I_{\max} were plotted with Boltzmann formula. ΔTime represents the time at which the current drops to a certain value minus the time at which the current reaches maximum. The total time required for channel inactivation ($\text{Time}_{\text{total}}$) was referred as the time at which current reaches maximum value (Time_{\max}) minus the time at which current has just dropped to the baseline ($\text{Time}_{\text{baseline}}$).

约为 2 s (2.02 ± 0.12 , $n=3$), 与 WT-MscS 无显著性差异(图 4B), 说明 168 位氨基酸侧链基团带有正电荷不是通道失去失活特性的原因。我们又将 G168 位点甘氨酸突变为侧链基团较大的亮氨酸(Leu, L)和酪氨酸(Tyr, Y), 发现 G168L 和 G168Y 两个 MscS 突变体的开放特征与 WT-MscS 一致, 其 $t_{1/2}$ 分别为 1.9 s (1.92 ± 0.22 , $n=3$), 1.5 s (1.52 ± 0.14 , $n=3$), 与 WT-MscS 无显著性差异(图 4A 与 4B)。图 4C 失活曲线表明 G168L, G168Y 和 G168K 均能够失活。

2.4 G168I-MscS 失去失活特性

为进一步探究 G168 氨基酸性质如何影响

了通道的失活特性, 我们将 G168 甘氨酸又突变为侧链带有负电荷的天冬氨酸(Asp, D), 以及侧链较大的缬氨酸(Val, V)和异亮氨酸(Ile, I)。电生理结果表明 G168D 和 G168V 在负压增大到一定值时开放, 然后缓慢进入失活状态, 其 $t_{1/2}$ 分别为 69.6 s (69.60 ± 20.22 , $n=3$) 和 222.2 s (222.02 ± 40.62 , $n=3$), 显著高于 WT-MscS, 说明其失活速率降低。有趣的是, G168I-MscS 保持持续开放, 失去失活特性, 说明 G168 位点氨基酸侧链电荷性质和体积大小影响通道失活(图 5A 与 5C)。

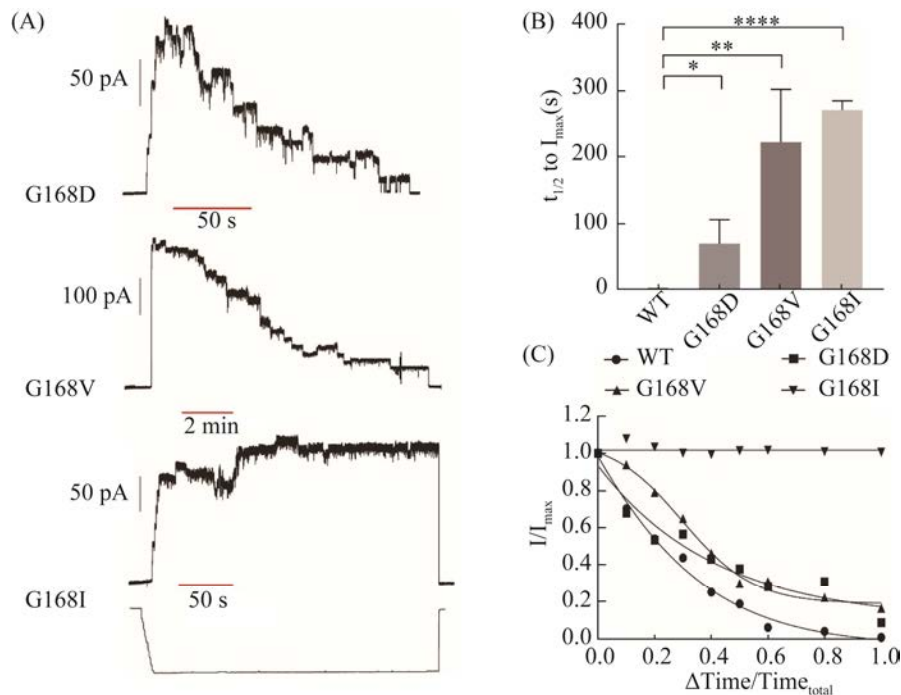


图 5 G168D-MscS、G168V-MscS、G168I-MscS 失活速率显著变慢

Figure 5 The inactivation rate of G168D-MscS, G168V-MscS and G168I-MscS was significantly slower than that of WT-MscS. A: representative patch clamp recordings of WT-MscS and MscS mutants (G168D, G168V and G168I) at 20 mV membrane potential. Lower traces: applied negative pressure. Upper traces: current curve. B: changes in $t_{1/2}$ of WT-MscS or MscS mutants (G168D, G168V and G168I). $t_{1/2}$ represents the time it takes for the current to drop from the maximum I_{max} to $1/2 I_{max}$. Data are shown as mean \pm SEM. Significant differences were identified by Student's two-tailed unpaired t test, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. C: $\Delta Time / Time_{total}$ and the normalized value I / I_{max} were plotted with Boltzman formula. $\Delta Time$ represents the time at which the current drops to a certain value minus the time at which the current reaches maximum. The total time required for channel inactivation ($Time_{total}$) was referred as the time at which current reaches maximum value ($Time_{max}$) minus the time at which current has just dropped to the baseline ($Time_{baseline}$).

3 讨论

最新一项研究通过冷冻电镜解析了 *E. coli* MscS 处于失活状态时的结构, 发现 MscS 处于开放状态时, TM1-TM2 螺旋对与同一亚基的 TM3b 相互作用; 而 MscS 处于失活或关闭状态时, TM1-TM2 螺旋对与相邻亚基的 TM3b 相互作用^[18]。作者认为 MscS 处于失活状态与 TM1-TM2 螺旋对是否与相邻亚基的 TM3b 发生相互作用紧密相关。此外, Sukharev 团队通过结合分子动力学模拟和膜片钳实验结果得出 MscS TM3b 的 G113 和 G121 两个氨基酸影响通道失活^[12]。这些说明 TM3b 参与通道失活过程。我们之前的研究表明 MscS 开放过程中, TM3b 与胞质结构域 Cyto-helix 相互作用^[17], 通过半胱氨酸二硫键交联的方法将 TM3b 与 Cyto-helix 交联, 则通道进入一种非离子通透状态, 提示 Cyto-helix 可能通过 TM3b 参与 MscS 失活进程。而且 Grajkowski 等^[19]发现在一些多聚体存在的情况下, 比如将聚乙二醇、右旋糖苷、聚蔗糖等加入到 MscS 的胞质部分, MscS 的失活速率加速, 说明 MscS 的胞质结构域参与调节通道失活, 然而 MscS 胞质结构域 Cyto-helix 是否影响通道失活并不清楚。本研究制备 MscS Cyto-helix (P166-I170) 半胱氨酸突变体, 利用巯基化合物 MTSET⁺能够结合半胱氨酸从而对其侧链基团修饰特性, 通过低渗刺激实验检测表达 MscS 半胱氨酸突变体的大肠杆菌分别在无或有 MTSET⁺处理后细菌低渗刺激后存活率筛选得到 Cyto-helix G168 显著影响通道功能。进一步研究发现巯基化合物 MTSET⁺结合 G168C-MscS 半胱氨酸后, G168C-MscS 失去失活特性, 从而解释了 MTSET⁺处理导致表达 G168C-MscS 大肠杆菌在低渗刺激时几乎全部死亡这一现象。早前 Booth IR 和 Li Y 团队通过

将 MscS 孔道区域关键氨基酸亮氨酸 L109 突变为亲水性氨基酸丝氨酸 L109S, L109S-MscS 成为功能获得性突变体, 通道具有自发开放特性, 诱导表达 L109S-MscS 使内容物大量流失导致细胞死亡^[13-14,17]。这些均说明 MscS 通道的开放异常会导致细胞死亡。

将 G168 突变为侧链基团体积较大, 不带电荷的半胱氨酸 C, G168C-MscS 具有失活特性, 但其失活速率显著变慢, 说明氨基酸侧链体积大小影响通道失活。利用 MTSET⁺结合半胱氨酸特性对 G168C 侧链基团进行修饰使其侧链基团体积更大, 并且带有正电荷。结果显示 G168C-MscS 在 MTSET⁺修饰后, 通道却失去失活特性, 这种特性有可能是 168 位点侧链体积更大引起的, 也有可能是带有正电荷引起的。而将 G168 突变为带有正电荷的赖氨酸 K, G168K-MscS 呈现与 WT-MscS 相类似的失活特征, 说明该位点正电荷性质不是通道失活异常的主要机制。相反负电荷的天冬氨酸突变 G168D 导致失活速率降低, 提示该位点负电荷性质影响通道失活。另一方面, 进一步验证 G168 位点氨基酸侧链体积大小是影响通道失活重要因素的是 G168I 和 G168V。I 和 V 侧链基团体积均较大, 不带电荷, 并且 I 的侧链体积比 V 大。G168I 失去失活特性, 保持持续开放; G168V 失活速率显著变慢, 提示该位点氨基酸侧链体积越大, 通道失活速率越低。然而同样体积较大的氨基酸 G168L 和 G168I 其侧链基团大小和疏水性相近, 但只有一个甲基基团的位置不同, G168L-MscS 失活特征与 WT-MscS 相近, 而 G168I-MscS 却失去失活特性, 这些说明即使 168 位点氨基酸侧链体积相近, 但是其基团空间位置不同也会影响通道失活。此外, 突变体 G168L、G168Y 及 G168K 的失活特性与 WT 相近, 说明并不是 168 位点氨

氨酸被突变或者被修饰, MscS 通道失活特性就会改变。因此 G168 位点是影响通道失活的关键位点, 但其具体机制复杂, 还有待研究。研究表明构成通道氨基酸并不是孤立的, 在通道开放过程中需要与通道其他区域氨基酸发生相互作用, 比如改变 MscS 跨膜区域天冬氨酸 Asp-62 与胞质结构域精氨酸 Arg-128 或 Arg-131 的相互作用会影响通道失活^[20-21], 改变 MscS TM3b N117 与 Cyto-helix N167 相互作用会影响通道开放^[17]等, 因此 G168 位点影响通道失活很可能通过与其他位点发生相互作用而进行, 而 G168 位点的氨基酸侧链基团的大小和电荷性质影响这种相互作用。总之, 本研究鉴定得到胞质结构域 Cyto-helix 168 位点氨基酸显著影响通道失活, 为理解 MscS 失活特性机制提供了新的视角。

鉴于多项研究指出, 细菌机械敏感性离子通道可以作为一类新型抗生素靶点, 例如我们之前的一项研究表明导致淋病的淋病奈瑟球菌 MscS 不仅保护淋球菌在低渗刺激时免遭裂解死亡, 同时它对于淋病奈瑟球菌在感染阴道过程中有重要作用。本研究的结果给出一个很重要的提示, 可以设计靶向淋球菌 MscS 的药物使通道失去失活特性, 导致细菌流失大量内容物死亡, 失去感染能力。而本研究发现的 MscS G168 位点无疑为药物的设计提供思路。某些细菌的 MscS 可能具有另外的作用, 例如谷氨酸棒状杆菌在工业上常被用于谷氨酸生产, 即味精的生产。研究表明, 谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* ATCC 13869 MscS 是谷氨酸分泌到胞外的通道^[22], 由于该菌株中的 MscS 发生突变导致通道不断开放, 导致在没有诱导条件下该菌株持续向胞外分泌谷氨酸, 用于工业生产。因此, 研究细菌机械敏感性离子通道 MscS 的结构和开放特性有助于其在医学和工业领域的应用。

参考文献

- [1] Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically activated ion channels. *Neuron*, 2015, 87(6): 1162–1179.
- [2] Katta S, Krieg M, Goodman MB. Feeling force: physical and physiological principles enabling sensory mechanotransduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2015, 31: 347–371.
- [3] Martinac B, Saimi Y, Kung C. Ion channels in microbes. *Physiological Reviews*, 2008, 88(4): 1449–1490.
- [4] Zhong DL, Blount P. Phosphatidylinositol is crucial for the mechanosensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* MscL. *Biochemistry*, 2013, 52(32): 5415–5420.
- [5] Carniello V, Peterson BW, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Role of adhesion forces in mechanosensitive channel gating in *Staphylococcus aureus* adhering to surfaces. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2020, 6: 31.
- [6] Wang ZM, Wang XM, Lu P, Ni CS, Li YZ, Van Der Veen S. Identification and characterization of the *Neisseria gonorrhoeae* MscS-like mechanosensitive channel. *Infection and Immunity*, 2018, 86(6): e00090-18.
- [7] Kung C, Martinac B, Sukharev S. Mechanosensitive channels in microbes. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 313–329.
- [8] Naismith JH, Booth IR. Bacterial mechanosensitive channels—MscS: evolution’s solution to creating sensitivity in function. *Annual Review of Biophysics*, 2012, 41: 157–177.
- [9] Iscla I, Wray R, Blount P, Larkins-Ford J, Conery AL, Ausubel FM, Ramu S, Kavanagh A, Huang JX, Blaskovich MA, Cooper MA, Obregon-Henao A, Orme I, Tjandra ES, Strocher UH, Brown MH, Macardle C, Van Holst N, Ling Tong CE, Slattery AD, Gibson CT, Raston CL, Boulos RA. A new antibiotic with potent activity targets MscL. *The Journal of Antibiotics*, 2015, 68(7): 453–462.
- [10] Sukharev S. Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): the subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. *Biophysical Journal*, 2002, 83(1): 290–298.
- [11] Anishkin A, Sukharev S. Water dynamics and dewetting transitions in the small mechanosensitive channel MscS. *Biophysical Journal*, 2004, 86(5): 2883–2895.

- [12] Belyy V, Anishkin A, Kamaraju K, Liu NL, Sukharev S. The tension-transmitting ‘clutch’ in the mechanosensitive channel MscS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(4): 451–458.
- [13] Edwards MD, Li YZ, Kim S, Miller S, Bartlett W, Black S, Dennison S, Iscla I, Blount P, Bowie JU, Booth IR. Pivotal role of the glycine-rich TM3 helix in gating the MscS mechanosensitive channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12(2): 113–119.
- [14] Miller S, Bartlett W, Chandrasekaran S, Simpson S, Edwards M, Booth IR. Domain organization of the MscS mechanosensitive channel of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 2003, 22(1): 36–46.
- [15] Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC. Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science*, 2002, 298(5598): 1582–1587.
- [16] Koprowski P, Sliwinska MA, Kubalski A. Negative and positive temperature dependence of potassium leak in MscS mutants: implications for understanding thermosensitive channels. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Biomembranes*, 2015, 1848(8): 1678–1686.
- [17] Wang XM, Tang SY, Wen XX, Hong L, Hong FF, Li YZ. Transmembrane TM3b of mechanosensitive channel MscS interacts with cytoplasmic domain cyto-helix. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1389.
- [18] Zhang YX, Daday C, Gu RX, Cox CD, Martinac B, De Groot BL, Walz T. Visualization of the mechanosensitive ion channel MscS under membrane tension. *Nature*, 2021, 590(7846): 509–514.
- [19] Grajkowski W, Kubalski A, Koprowski P. Surface changes of the mechanosensitive channel MscS upon its activation, inactivation, and closing. *Biophysical Journal*, 2005, 88(4): 3050–3059.
- [20] Nomura T, Sokabe M, Yoshimura K. Voltage-dependent inactivation of MscS occurs independently of the positively charged residues in the transmembrane domain. *BioMed Research International*, 2016, 2016: 2401657.
- [21] Nomura T, Sokabe M, Yoshimura K. Interaction between the cytoplasmic and transmembrane domains of the mechanosensitive channel MscS. *Biophysical Journal*, 2008, 94(5): 1638–1645.
- [22] Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(14): 4491–4498.