



# 谷氨酸棒杆菌 anti- $\sigma$ 因子 CseE 及其突变体与 $\sigma$ 因子 SigE 的相互作用分析

上官春雨, 徐美娟\*, 夏博雅, 杨套伟, 张显, 饶志明\*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

上官春雨, 徐美娟, 夏博雅, 杨套伟, 张显, 饶志明. 谷氨酸棒杆菌 anti- $\sigma$  因子 CseE 及其突变体与  $\sigma$  因子 SigE 的相互作用分析. 微生物学报, 2022, 62(9): 3542–3557.

Shangguan Chunyu, Xu Meijuan, Xia Boya, Yang Taowei, Zhang Xian, Rao Zhiming. Interaction of anti- $\sigma$  factor CseE and its mutants with  $\sigma$  factor SigE from *Corynebacterium glutamicum*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3542–3557.

**摘 要:**【目的】谷氨酸棒杆菌是重要的氨基酸生产菌株,本研究针对 SigE 与 ZAS 家族蛋白 CseE 相互作用机制进行探索研究,重点分析 CseE 突变体影响与 SigE 结合能力的机制。【方法】本研究选择谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 来源的 SigE 和 CseE 蛋白为研究目标,利用遗传学方法获得过表达的重组谷氨酸棒杆菌,通过 RT-qPCR 研究 SigE 调控 *sigE* 和 *cseE* 的转录情况。同时,利用 ITC 和 His pull-down 实验验证 ZAS 家族的 CseE 蛋白与  $Zn^{2+}$  及 SigE 的结合情况。之后对 CseE 蛋白进行功能域分析、多序列比对,研究功能域关键氨基酸位点对 SigE 结合能力的影响。其次对 SigE 和 CseE 蛋白进行分子对接和动力学模拟,分析关键氨基酸影响其结合的机制。【结果】谷氨酸棒杆菌 SigE 调控基因 *sigE* 和 *cseE* 的转录并且其活性受 CseE 蛋白控制。CseE 蛋白为 ZAS 家族蛋白,具有  $Zn^{2+}$  结合能力。CseE<sub>His83A</sub>、CseE<sub>cys87A</sub> 和 CseE<sub>cys90A</sub> 突变体不会影响与 SigE 的结合能力,而 CseE<sub>C87A-C90A</sub> 和 CseE<sub>His83A-C87A-C90A</sub> 突变体与 SigE 的结合能力略有下降。分子动力学模拟发现 SigE-CseE<sub>C87A-C90A</sub> 和 SigE-CseE<sub>His83A-C87A-C90A</sub> 之间的结合能量为 -17.23 kcal/mol 和 -14.06 kcal/mol,

**基金项目:** 国家自然科学基金(32070035); 国家重点研发计划(2021YFC2100900); 宁夏回族自治区重点研究开发计划(2019BCH01002)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32070035), by the National Key Research and Development Program (2021YFC2100900) and by the Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2019BCH01002)

\*Corresponding author. XU Meijuan, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; RAO Zhiming, Tel/fax: +86-510-859169881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 24 January 2022; Revised: 18 February 2022; Published online: 22 March 2022

分别比未突变体系结合能量降低 22.8% 及 36.9%。【结论】谷氨酸棒杆菌 SigE 通过聚集 RNA 聚合酶来调控基因 *sigE* 和 *cseE* 的表达。CseE 蛋白属于 ZAS 家族, 具有  $Zn^{2+}$  结合能力同时通过与 SigE 蛋白互作来抑制 SigE 活性。CseE<sub>C87A-C90A</sub> 及 CseE<sub>His83A-C87A-C90A</sub> 突变体能影响与 SigE 结合的能力, 减弱对 SigE 活性的控制。本研究产生的三维结构和确定的氨基酸关键位点为后续探索谷氨酸棒杆菌 SigE 和 CseE 响应环境压力机制提供了理论基础。

关键词: SigE; CseE; anti- $\sigma$  因子; ZAS 家族; 谷氨酸棒杆菌

## Interaction of anti- $\sigma$ factor CseE and its mutants with $\sigma$ factor SigE from *Corynebacterium glutamicum*

SHANGGUAN Chunyu, XU Meijuan\*, XIA Boya, YANG Taowei, ZHANG Xian, RAO Zhiming\*

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] *Corynebacterium glutamicum* is an important amino acid producer. In this study, we explored the mechanisms of interaction between SigE and ZAS family protein CseE, particularly the interaction between CseE mutants and SigE. [Methods] SigE and CseE proteins from *C. glutamicum* ATCC 13032 were used. The *sigE*-overexpressing and *cseE*-overexpressing strains were developed with the genetics method. Through RT-qPCR, we explored the influence of SigE on the transcription of *sigE* and *cseE*. At the same time, we tested the binding of CseE proteins to  $Zn^{2+}$  and SigE through isothermal titration calorimetry (ITC) and His pull-down experiments, followed by functional domain analysis and multiple sequence alignment of CseE protein to study the effect of key amino acid sites in the domain on the binding ability of SigE. Then, we conducted molecular docking and molecular dynamic simulation of SigE and CseE proteins to analyze the mechanisms of key amino acids affecting their binding. [Results] SigE of ATCC 13032 regulated the transcription of *sigE* and *cseE* and its activity was regulated by the CseE protein. CseE, a ZAS family protein, bound to  $Zn^{2+}$ . CseE<sub>His83A</sub>, CseE<sub>Cys87A</sub>, and CseE<sub>Cys90A</sub> mutants did not affect the binding ability to SigE, while the binding ability of CseE<sub>C87A-C90A</sub> and CseE<sub>His83A-C87A-C90A</sub> mutants to SigE decreased slightly. Molecular dynamic simulation showed that the SigE-CseE<sub>C87A-C90A</sub> binding energy and SigE-CseE<sub>His83-C87A-C90A</sub> binding energy were -17.23 kcal/mol and -14.06 kcal/mol, respectively, 22.8% and 36.9% lower than the binding energy between SigE and CseE, respectively. [Conclusion] SigE regulates the expression of *sigE* and *cseE* by aggregating RNA polymerase, and its protein activity is regulated by CseE. CseE protein belongs to the ZAS family, which binds to  $Zn^{2+}$  and inhibits SigE activity by interacting with SigE protein. CseE<sub>C87A-C90A</sub> and CseE<sub>His83A-C87A-C90A</sub> affect the ability to bind to SigE and weaken the control of SigE activity. The three-dimensional structures and the identified key amino acid sites in this

study lay a theoretical basis for further exploring the mechanism of SigE and CseE in *C. glutamicum* in response to environmental stresses.

**Keywords:** SigE; CseE; anti- $\sigma$  factor; ZAS family; *Corynebacterium glutamicum*

细菌 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP) 需要与  $\sigma$  因子结合形成 RNAP 全酶, 才能开始负责启动子识别和随后的转录<sup>[1]</sup>。因此,  $\sigma$  因子是每个细菌转录起始所必需的调节因子。 $\sigma$  因子通过竞争核心 RNA 聚合酶从而调控特定基因来响应各种环境压力, 例如抗生素、表面或氧化应激、热休克等<sup>[2-4]</sup>。而 anti- $\sigma$  因子又通过调节膜内蛋白水解、伴侣开关、氧化还原结构域直接感应等方式对  $\sigma$  因子活性进行调节<sup>[3-6]</sup>。其中部分位于 ECF  $\sigma$  因子 (extra cytoplasmic function  $\sigma$  factor, ECF  $\sigma$  factor) 下游, 属于 ZAS 家族(zinc-binding anti-sigma factor family)的 anti- $\sigma$  因子结构域中含有与锌结合的基序 HisXXXCysXXCys, 可以通过基序中半胱氨酸的氧化形成二硫键, 改变构象, 从而调控  $\sigma$  因子的活性<sup>[7-8]</sup>。例如天蓝色链霉菌 RsrA (anti- $\sigma^R$ ) 利用其疏水性核心来结合  $\sigma^R$ , 防止其与 RNAP 聚集, 并且锌在维持这种高亲和力复合物中起着核心作用<sup>[8]</sup>。当 RsrA 半胱氨酸残基氧化后形成二硫键使其构象改变, 释放各自结合的  $\sigma$  因子与 RNAP 结合, 从而激活  $\sigma$  因子。同属于 ZAS 家族的枯草芽孢杆菌 RsiW 与 SigW 之间的相互作用却不受基序的锌配位调节, 而是通过调节跨膜底物蛋白酶 PrsW 和 RasP 切割 RsiW 从而释放 SigW<sup>[9]</sup>。

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 作为重要的工业生产菌株, 含有 7 类 sigma 因子: SigA、SigB 和 5 个 ECF  $\sigma$  因子(SigC、SigD、SigE、SigH 和 SigM)<sup>[10]</sup>。其中 sigma 因子的活

性受 anti- $\sigma$  因子调节的有 RshA (SigH)<sup>[11]</sup>、CseE (SigE)<sup>[12]</sup>和 RsdA (SigD)<sup>[13]</sup>。ECF  $\sigma$  因子的 SigE 参与各种胁迫中, 如氮源的饥饿胁迫<sup>[14]</sup>、鸟苷四磷酸 ppGpp 合成酶编码基因 *rel* 的敲除<sup>[15]</sup>、长时间的酸胁迫等<sup>[16]</sup>。与 *sigH-rshA* 操纵子类似, *sigE* 与编码 anti- $\sigma^E$  因子的 *cseE* 也有可能构成操纵子, SigE 与 CseE 表达受 SigE 转录调控<sup>[17]</sup>。编码 anti- $\sigma$  因子的 *cseE* 基因位于 *sigE* 基因的下游, 因其结构域含有 HisXXXCysXXCys 基序被认为是 ZAS 家族蛋白质, 可在无压力的细胞环境中通过与 SigE 紧密相互作用来控制 SigE 的活性<sup>[12]</sup>。尽管 CseE 蛋白中 4 个保守半胱氨酸残基的存在表明了其可能是以构象变化的方式调控 SigE 的活性, 但枯草芽孢杆菌的 SigW 和大肠杆菌的 SigE 相应 anti- $\sigma$  因子都是通过蛋白降解的方式进行调控  $\sigma$  因子活性<sup>[18]</sup>。另外也有人提出含 ZAS 家族结构域中的锌结合半胱氨酸的氧化并不总是足以解离抗  $\sigma$  因子- $\sigma$  因子复合物<sup>[9]</sup>。因此谷氨酸棒杆菌  $\sigma^E$  的活性调控方式仍然有待确认。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)及谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032 由实验室保藏<sup>[19]</sup>。重组质粒 pXMJ19-*sigE*-Flag、pXMJ19-*cseE*、pGEX-6P-1-*sigE* 等由本研究构建。本研究使用的菌株、质粒和引物见表 1 和表 2。

表 1 本实验所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Host for gene expression	Our lab
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	A paradigm strain of amino acid production	Our lab
Plasmids		
pXMJ19	Shuttle vector, $\text{Chl}^R$	Our lab
pXMJ19- <i>sigE</i> -Flag	Shuttle vector, Flag-tag, $\text{Chl}^R$	This study
pXMJ19- <i>cseE</i>	A derivative of pXMJ19, harboring the wild-type <i>cseE</i> gene	This study
pXMJ19- <i>cseE</i> <sub>H83A</sub>	A derivative of pXMJ19, harboring the mutant <i>cseE</i> <sub>H83A</sub> gene	This study
pXMJ19- <i>cseE</i> <sub>C87A</sub>	A derivative of pXMJ19, harboring the mutant <i>cseE</i> <sub>C87A</sub> gene	This study
pXMJ19- <i>cseE</i> <sub>C90A</sub>	A derivative of pXMJ19, harboring the mutant <i>cseE</i> <sub>C90A</sub> gene	This study
pXMJ19- <i>cseE</i> <sub>C87A-C90A</sub>	A derivative of pXMJ19, harboring the mutant <i>cseE</i> <sub>C87A-C90A</sub> gene	This study
pXMJ19- <i>cseE</i> <sub>H83A-C87A-C90A</sub>	A derivative of pXMJ19, harboring the mutant <i>cseE</i> <sub>H83A-C87A-C90A</sub> gene	This study
pGEX-6p-1	Expression vector, GST-tag, $\text{Amp}^R$	Our lab
pGEX-6p-1- <i>sigE</i>	A derivative of pGEX-6P-1, harboring the <i>C. glutamicum sigE</i> gene, respectively	This study

$\text{Chl}^R$  indicates resistance to chloromycetin;  $\text{Amp}^R$  indicates resistance to ampicillin.

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	DNA sequences (5'→3')	Primer usage
P6p-F	CATGGACCCAATGTGCCTGGATG	Universal primer
P6p-R	CTATCGCTACGTGACTGGGTC	Universal primer
pXMJ19-F	AGCTGATCCGGGCTTATCGA	Universal primer
pXMJ19-R	GCATGGGGAGACCCAC	Universal primer
P19- <i>sigE</i> -F	AAACAGAATTAATT <u>AAGCT</u> TAAAGGAGGAAAATCATGAAAAAGAAGT	Gene amplification
P19- <i>sigE</i> -R	CCCGAGATGACG CAAAACAGCCAAGCT <u>GAAATTC</u> TACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCG	Gene amplification
SigE-RT-F	TGGGTTGGAACCAACAAAGAAAC	RT-qPCR
SigE-RT-R	ACGCACCCGTCGTAATC	RT-qPCR
CseE-RT-F	GGCGGTAAACGCTATCTG	RT-qPCR
CseE-RT-R	CGACACCACCGCGAATC	RT-qPCR
16s rRNA-F	CGGCGTCTGCTGAAAGG	RT-qPCR
16s rRNA-R	GCCCAGGTAAGGTTCTTC	RT-qPCR
P6p-1- <i>sigE</i> -F	GGTGTAGCGGTGAAATGC	RT-qPCR
P6p-1- <i>sigE</i> -R	TCCAGGGGCCCCTGGGATCCATGAAAAAGAAGTCCCAGATGACG	Gene amplification
P19- <i>cseE</i> -F	TCACGATGCGCCG <u>CTCGAG</u> TTAGTGGGTTGGAACCAACAAAGAAAC	Gene amplification
P19- <i>cseE</i> -R	AAACAGAATTA <u>AAGCT</u> TAAAGGAGGAAAATCATGTTCAATCCGACAC CACCG	Gene amplification
P19- <i>cseE</i> -R	AAAACGCACAAGCT <u>GAAATTC</u> TAAATGATGATGATGATGATGGCGGCCT TGGTTCTTACGAAC	Gene amplification
P19- <i>cseE</i> -H83A-F	CGCCAGGCTGGCCATTGTGCACTGCGCTGAATGTA	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -H83A-R	GCACAATGGCCAGCCTGGCGCGATGCATGGCGCCAC	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -C87A-F	CATTGTGCACGCCGCTGAATGTAGGGAAGAGATTAACCGTCAGC	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -C87A-R	GCACAATGGCCAGCCTGGCGCGATGCATGGCGCCAC	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -C90A-F	GCGCTGAAGCTAGGGAAGAGATTAACCGTCAGCGGGAAACC	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -C90A-R	CTCTCCCTAGCTTCAGCGCAGTGCACAATGTGCAGCC	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -C87A-C90A-F	CCGCTGAAGCTAGGGAAGAGATTAACCGTCAGCGGGAAACC	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -C87A-C90A-R	CTCTCCCTAGCTTCAGCGCAGTGCACAATGGCCAGCCT	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -H83A-C87A-C90A-F	CGCCAGGCTGGCCATTGTGCACTGCGCTGAAGCTA	Mutant plasmid construction
P19- <i>cseE</i> -H83A-C87A-C90A-R	GCACAATGGCCAGCCTGGCGCGATGCATGGCGCCAC	Mutant plasmid construction

Restriction sites are shown in underlined parts.

## 1.2 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒和 RNeasy Pure Cell/Bacteria Kit (DP430)由天根生化科技(北京)有限公司提供; RT-qPCR 实验所使用的试剂盒: ClonExpress® II One Step Cloning Kit、2× Phanta® Max Master Mix、HiScript® IIQ RT SuperMix for qPCR (+gDNA) wiper (R323-01)和 ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix (Q711-02/03)均由南京诺唯赞生物科技有限公司提供; His pull-down 实验所用试剂: His MagBeads 和 Glutathione MagBeads 由南京金斯瑞生物科技有限公司提供; 限制性内切核酸酶如 *Xho* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Hind* III 和 *Dpn* I 等由宝日医生物技术(北京)有限公司提供; 抗生素如氯霉素、氨苄霉素等由上海阿拉丁生化科技有限公司提供; 其他试剂均由国药集团化学试剂有限公司提供。Flag 标签抗体购自生工生物工程(上海)股份有限公司; GST 标签抗体购自 Proteintech。

## 1.3 培养基与培养条件

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10。该培养基用于大肠杆菌培养, 培养条件为 37 °C、180 r/min。LBG 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 葡萄糖 7。该培养基用于谷氨酸棒杆菌培养, 培养条件为: 30 °C、180 r/min。RT-qPCR 实验使用的培养基为 CGXII 基本培养基(g/L): 葡萄糖 50, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 尿素 5, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, 原儿茶酸 0.000 3, CuSO<sub>4</sub> 0.000 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25, 3-丙磺酸 42, NiCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.000 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.04, 生物素 0.000 2, CaCl<sub>2</sub> 0.01, pH 7.0。

## 1.4 大肠杆菌 SigE 过表达菌株构建

提取谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基因组

DNA, 使用引物 P6p-1-*sigE*-F/R 扩增目标基因 *sigE* (表 2)。对 *sigE* 片段及载体 pGEX-6p-1 使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 于 37 °C 酶切 1 h, 然后利用同源重组酶将回收的 *sigE* 片段与 pGEX-6p-1 载体于 37 °C 酶连 1 h 并转化 *E. coli* BL21 感受态细胞中培养 2 h。涂布于含氨苄霉素 100 mg/mL 的 LB 培养基上。隔天用通用引物 P6p-F/R 验证菌落, 并对含有正确条带的菌落用 1 mmol/L IPTG 诱导表达 *sigE*。通过 12%蛋白胶验证 *sigE* 表达结果以证明 *E. coli*-SigE 表达成功。

## 1.5 大肠杆菌 CseE 过表达菌株构建

使用引物对 P19-*cseE*-F/R 从谷氨酸棒杆菌 ATCC 132032 基因组中扩增目标基因 *cseE* (表 2)。对 *cseE* 片段及载体 pXMJ19 使用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Hind* III 于 37 °C 酶切 1 h, 然后利用同源重组酶将回收的 *cseE* 片段与 pXMJ19 载体于 37 °C 酶连 1 h 并转化 *E. coli* BL21 感受态细胞并培养 2 h。涂布含氯霉素 50 mg/mL 的 LB 培养基。隔天用通用引物 pXMJ19-F/R 验证菌落, 并对含有目的条带的菌落用 1 mmol/L IPTG 诱导表达 CseE。通过 12%蛋白胶验证 *cseE* 表达结果以证明 *E. coli*-CseE 构建成功。

## 1.6 谷氨酸棒杆菌过表达 SigE 菌株构建

按照方法 1.5 首先在大肠杆菌中构建带 Flag 标签的能表达 *sigE* 的质粒 pXMJ19-*sigE*-Flag, 然后将测序正确的质粒电转到谷氨酸棒杆菌中, 利用引物对 pXMJ19-F/R 对菌落进行验证。对含有 *sigE* 条带的菌落用 1 mmol/L IPTG, 30 °C 诱导表达, 并 4 °C 离心破细胞, 取上清进行 Western blotting 验证过表达 SigE 以证明菌株 Cg-SigE 构建成功。

## 1.7 RT-qPCR 实验

将谷氨酸棒杆菌 SigE 过表达菌 Cg-SigE 和原始菌株 ATCC 13032 分别接种于 CGXII 基本

培养基中 30 °C、180 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 2, 加入 IPTG 诱导 SigE 蛋白表达 12 h。取 2 mL 样品, 使用 Tiangen 生物公司的 RNAPrep PureCell/Bacteria Kit (DP430)试剂盒提取细菌总 RNA。然后使用诺唯赞公司的 HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (R323-01)试剂盒进行反转录, 再使用 ChamQ<sup>™</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Q711-02/03) 进行样品准备。然后使用荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)进行 RT-qPCR 分析, 并选取 16s rRNA 基因作为内参基因进行定量。每个目的基因均进行了 3 次生物学重复, 计算平均阈值循环。最后使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算相对表达水平。本研究中所用的 RT-qPCR 引物如表 2 所示。

### 1.8 ITC 测定蛋白与 Zn<sup>2+</sup>结合

使用 Micro VP-ITC (Malvern, UK)等温滴定热量仪测定 CseE 与 Zn<sup>2+</sup>结合的热量变化。将纯化后的 CseE 蛋白浓度浓缩为 50 μmol/L。Zn<sup>2+</sup>溶液由 1 mmol/L DTT、0.5 mmol/L tris-HCl (pH 8.0)以及 1 mmol/L 的 ZnCl<sub>2</sub> 组成。为使蛋白及 Zn<sup>2+</sup>溶液成分一致, 使用透析袋透析蛋白。透析液为含 1 mmol/L DTT、0.5 mmol/L tris-HCl (pH 8.0)缓冲液。将 CseE 装入仪器中, 然后用滴定针吸取 Zn<sup>2+</sup>溶液, 在 25 °C、394×g 转速, 每隔 210 s 滴定 10 μL 的 Zn<sup>2+</sup>溶液, 总共滴定 28 次。利用 Micro VP-ITC 软件(Malvern, UK)分析原始数据拟合结合等温线。

### 1.9 蛋白质体外结合 His pull-down

方法按照参考文献 20 所述。首先使用金斯瑞 GST 磁珠及 His 磁珠分别纯化含 GST 标签和 His 标签的 GST-SigE 和 His-CseE 蛋白。4 °C 过夜透析蛋白中的咪唑和还原性谷胱甘肽。再利用生物工程(上海)股份有限公司 Bradford 法蛋白质定量检测试剂盒完成纯化 GST-SigE 和 His-CseE 蛋白浓度的测定。将 50 μg 的 His-CseE

蛋白与预先处理好的 100 μL 的 His 磁珠混合后置于垂直混合器上于 4 °C 孵育 2 h。随后加入 50 μg 的 GST-SigE 蛋白继续孵育 2 h。孵育结束后用洗脱液除去非特异性结合, 配置 His 磁珠洗脱缓冲液进行洗脱。CseE 突变体的 SigE 结合能力分析所使用的蛋白总量均为 200 μg。

### 1.10 Western blotting 实验

取 40 μL His pull-down 洗脱液与 10 μL 5×蛋白上样缓冲液混匀煮沸进行 SDS-PAGE, 然后电泳后的蛋白胶用 TBST 缓冲液浸泡 5 min 洗去盐成分, 再用 Western blotting 电转仪于 120 V 低温转膜 90 min。取出 PVDF 膜后用 TBST 缓冲液清洗 10 min, 加入 50 mL 含 5%脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭过夜。封闭结束后用 TBST 缓冲液清洗 PVDF 膜 3 次, 再加入 GST 标签抗体孵育 7–8 h。结束后取 500 μL 的 BeyoECL Plus Reagent A 和 500 μL Plus Reagent B 溶液混合均匀配制成工作液, 用凝胶成像仪成像并拍照。

### 1.11 突变质粒的构建

采用反向 PCR 方法构建突变质粒 (CseE<sub>H83A</sub>、CseE<sub>C87A</sub>、CseE<sub>C90A</sub>、CseE<sub>C87A-C90A</sub> 及 CseE<sub>H83A-C87A-C90A</sub>)。以重组质粒 pXMJ19-*cseE* 为模板, 用引物 P19-*cseE*-H83-F/R 进行反向 PCR 整个质粒, 再加入 1 μL *Dpn* I 37 °C 消化模板 1 h, 得到突变质粒 pXMJ19-*cseE*<sub>H83A</sub>。构建好的质粒经过测序后转化到大肠杆菌 BL21 菌株。突变质粒 pXMJ19-*cseE*<sub>C87A</sub>、pXMJ19-*cseE*<sub>C90A</sub>、pXMJ19-*cseE*<sub>C87A-C90</sub> 和 pXMJ19-*cseE*<sub>H83A-C87A-C90A</sub> 的构建均采用相同的方法进行。

### 1.12 CseE 蛋白序列分析及同源序列比对

靶基因保守序列分析由 MEME Suit (<http://meme.ncbr.net/meme4-6-1/intro.html>) 以及用 PREDetector (<http://predetector.fsc.ulg.ac.be/>) 软件完成。之后再利用 NCBI BLASTp (<https://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/)查找 CseE 的同源序列, 然后利用 Clustal X 软件(<http://www.clustal.org/>)进行多序列比对。

### 1.13 分子对接与分子动力学模拟分析方法

先用 Modeller 4 软件(<https://salilab.org/modeller/>)对 SigE 及 CseE 蛋白进行同源建模, 再利用 Swiss 软件(<https://spdbv.unil.ch/gallery.html/>)评估 SigE 和 CseE 的模型质量。之后使用 Pymol 软件(<https://pymol.org/2/>)进行结构分析。然后通过 Rosetta 软件(<http://rosetta.bakerlab.org/>)进行分子对接。具体流程为: 用围绕受体活性位点的氨基酸残基形成一个范围更大的 Box, 然后用不同类型的原子作为探针进行扫描, 计算格点能量。然后对配体在 Box 范围内进行构象搜索, 最后根据配体的不同构象、方向、位置及能量进行评分, 并最终对结果进行排序。分别得到 50 个对接位相, 挑选其中能量最低的多肽, 作为各体系的最佳代表。对分子对接结果利用 Amber14 软件(<http://ambermd.org/>)进行分子动力学优化。分子动力学时间: 50 ns, 而后停止分子动力学模拟。整个蛋白体系都采用 gaff 和 ff14SB 力场, 以蛋白为中心, 加 1 nm 的立方水盒子, 加 Na<sup>+</sup>使体系呈电中性, 保存拓扑和坐标结构, 然后进行模拟, 模拟流程如下: 两步能量最小化: 先限制蛋白, 最小化水分子的能量, 然后放开蛋白, 整个体系的能量最小化。第一次能量最小化一共 5 000 次循环, 先采用最速下降法进行 1 500 次循环, 第二次能量最小化一共 5 000 次循环, 先采用最速下降法进行 2 000 次循环。体系平衡: 采用郎之万控温方法平衡 100 ps。然后进行升压平衡过 3 程, 一共平衡 100 ps, 采用各向同性的 Berendsen 控压方法。动力学模拟无限制自由模拟阶段。控温控压方法与前一阶段相同, 范德华能和短程静电能的截断距离为 10 Å, 采用 PME 方法计

算长程静电能。

## 2 结果与讨论

### 2.1 sigE-cseE 转录调控分析

为研究谷氨酸棒杆菌中 sigE 与 cseE 之间的调控关系, 本研究构建了过表达 sigE 基因的谷氨酸棒杆菌 Cg-SigE。如图 1A–C 所示, 利用 Flag 标签抗体成功在钝齿棒杆菌中检测 SigE 蛋白条带, 说明 Cg-SigE 菌株构建成功。之后, 按照方法 1.7 比较 SigE 过表达菌株和原始菌株中 SigE 和 CseE 的表达情况。结果如图 1D 所示, 与原始菌株相比, 在过表达菌株 Cg-SigE 中 SigE 和 CseE 表达分别提高了 13.5 倍和 6.4 倍, 说明 sigE 和 cseE 表达受 SigE 调控。

### 2.2 SigE 与 CseE 结合能力分析

本研究采用 His pull-down 蛋白互作的方法体外验证了谷氨酸棒杆菌 SigE 与 CseE 的结合。如图 2A–C 所示, 在重组菌 *E. coli*-SigE 中检测到分子量为 50 kDa 左右的蛋白条带, 说明重组菌 *E. coli*-SigE 构建成功。如图 2D–E 所示, 带有 His 标签的 CseE 蛋白在大肠杆菌中成功过表达。随后利用 GST 标签抗体, 将带有 GST 标签的 pGEX-6p-1 空载体和纯化好的 SigE 蛋白作为对照。如图 2F 所示, 通过 His pull-down 发现 His-CseE 蛋白能与 GST-SigE 蛋白特异性结合, 说明 CseE 确实可以通过与 SigE 结合来调控 SigE 活性。

### 2.3 CseE 蛋白序列 motif 及同源性序列分析

为了更好地理解 CseE 发挥功能的方式, 本研究对 CseE 进行功能域 BLAST、氨基酸序列同源比对。将谷氨酸棒杆菌 Cg\_CseE 蛋白的氨基酸序列与其他 6 种不同来源 anti-σ 因子用 Clustal X 软件进行比对。其余 6 种 anti-σ 因子分别来源 *Bacillus subtilis* 的 Bcub\_RsiW、

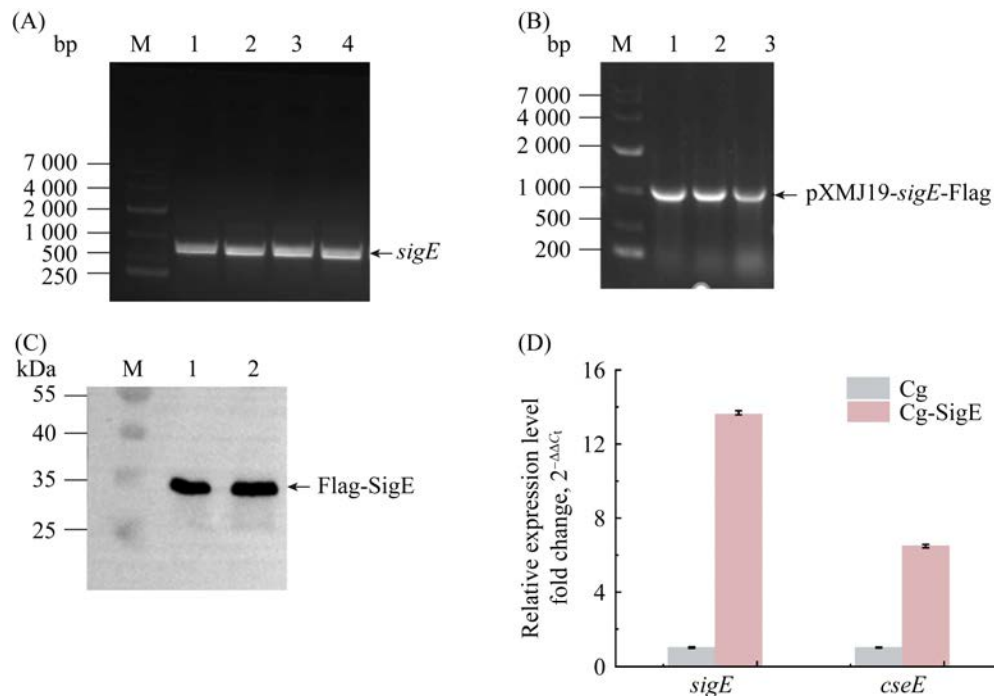


图 1 RT-PCR 分析基因 *sigE* 和 *cseE* 在 *C. glutamicum* 和 Cg-SigE 相对转录水平

Figure 1 RT-PCR analysis of the relative transcription levels of *sigE* and *cseE* in *C. glutamicum* and Cg-SigE. A: PCR results of *sigE* gene amplification; M: DNA Marker; B: identification of pXMJ19-*sigE*-*E. coli* BL21 by colony PCR; M: DNA Marker C: Western blotting to verify the expression of *sigE* in *C. glutamicum*; M: Protein Marker; D: RT-PCR analysis of the relative transcription levels of *sigE* and *cseE* in *C. glutamicum* and Cg-SigE. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

*Mycobacterium tuberculosis* 的 *Mutb\_RseA*、*Mutb\_RshA*、*Mutb\_RslA* 和来源 *Rhodobacter sphaeroides* 的 *Rsph\_ChR* 以及 *Streptomyces coelicolor* 的 *Scoe\_RsrA*。如图 3A、3B 所示, 结果发现 CseE 可能属于 ZAS 家族蛋白, 具有 ZAS 家族蛋白保守结构域(HisXXXCysXXCys 序列)和 anti- $\sigma$  因子所共有的 Zf-HC2 锌指结构。CseE 感应到外界的氧化应激后, 其中 87 位及 90 位半胱氨酸可能通过响应氧化还原反应形成二硫键, 改变构象, 解除对 SigE 的抑制。

#### 2.4 ITC 验证 CseE 与 $Zn^{2+}$ 的结合

如前面所述, CseE 蛋白结构域中含有用于锌结合的基序 HisXXXCysXXCys, 因此被推测为 ZAS 家族蛋白。为了进一步验证这一结论,

本研究按照材料与方法 1.8, 使用 ITC 验证 CseE 蛋白与  $Zn^{2+}$  结合时热力学参数的变化。如图 4A、4B 所示, CseE 与  $Zn^{2+}$  结合产生的焓变为  $\Delta H = (-21.9 \pm 0.6)$  kcal/mol, 熵变为  $T\Delta S = -14.3$  kcal/mol, 分离常数  $K_d = (2.7 \pm 0.5)$   $\mu$ mol/L, 表明 CseE 与  $Zn^{2+}$  相互结合, 符合 ZAS 家族特征。

#### 2.5 CseE 蛋白突变体与 SigE 结合能力分析

根据结构域分析结果, 分别将 CseE 蛋白中 His83、Cys87、Cys90 关键位点突变为丙氨酸, 构建了 CseE<sub>H83A</sub>、CseE<sub>C87A</sub>、CseE<sub>C90A</sub>、CseE<sub>C87A-C90A</sub>、CseE<sub>H83A-C87A-C90A</sub> 5 种蛋白突变体, 利用方法 1.9 进行蛋白互作, 然后 Western blotting 观察突变体蛋白与 SigE 结合能力的变化。如图 5 所示, 单独突变 His83、Cys87 和 Cys90 任何一个氨基



酸残基, 其 SigE 条带粗细基本一致, 基本不影响 CseE 和 SigE 的结合能力。而 CseE<sub>C87A-C90A</sub> 会使 CseE 和 SigE 结合能力减弱, SigE 蛋白条带稍微细于对照。而 CseE<sub>H83A-C87A-C90A</sub> 突变体能使 SigE 和 CseE 结合进一步减弱, 但是不会使蛋白之间的结合能力丧失。这说明半胱氨酸之间形成二硫键导致与 Zn<sup>2+</sup> 的金属螯合作用丧失, 导致 CseE 与 SigE 结合能力减弱, 但是并不会使 CseE 完全不结合 SigE, 还存在其他的调控机制。

## 2.6 SigE 与 CseE 复合体分子对接及动力学优化

为更清楚解析 SigE 与 CseE 间的相互作用模式, 本研究对这 2 个蛋白进行分子模拟分析。

用 Modeller 4 建模软件对 SigE 和 CseE 蛋白进行同源建模。同源建模模板均采用 RCSB PDB 数据库中 RsiW 和 SigW 蛋白匹配的共结晶晶体结构(RCSB PDB ID: 5WUQ), 同源建模序列相似度分别为 33.94%和 22.94%。如图 6A、6B 所示, SigE 和 CseE 蛋白质分别由 helix 和 loop 两种结构亚型组成。其中 SigE 蛋白中含有 9 个 helix 螺旋结构区域, 各个螺旋结构均由 loop 长链结构链接, 蛋白中 Helix 占据绝大多数, 因此 SigE 蛋白结构保守, 非常稳定。CseE 蛋白中, 含有 4 个螺旋结构, 其中 H3 和 H4 结构中间含有一条较长的 loop 区域链接, 而在 H1、H2 和 H3 蛋白结构域三者之间相互交叉形成一个三角形

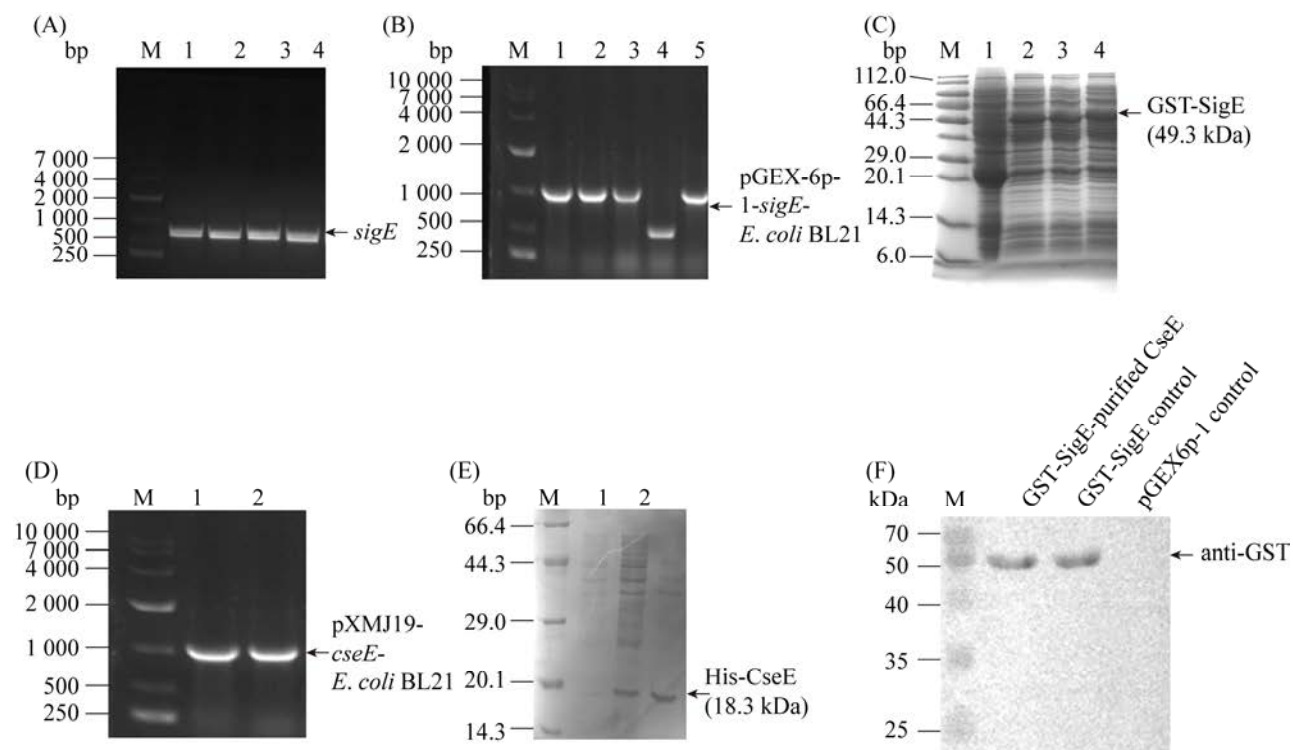


图 2 His pull-down 验证 SigE 与 CseE 间的相互作用

Figure 2 Detection of the interaction between SigE and CseE by His pull-down assays. A: PCR results of *sigE* gene amplification; B: identification of pGEX-6p-1-*sigE*-*E. coli* BL21 by colony PCR; C: SDS-PAGE analysis of crude proteins and GST-SigE purification; D: identification of pXMJ19-*cseE*-*E. coli* BL21 by colony PCR; E: SDS-PAGE analysis of crude proteins and His-CseE purification; F: direct binding of SigE to CseE detected via Western blotting. The left panel indicated the detection of SigE and CseE in the eluent of the His pull-down assays; the middle panel indicated the detection of SigE purified control in the His pull-down assays; the right panel indicated the detection of pGEX-6p-1 control in the eluent of the His pull-down assays.

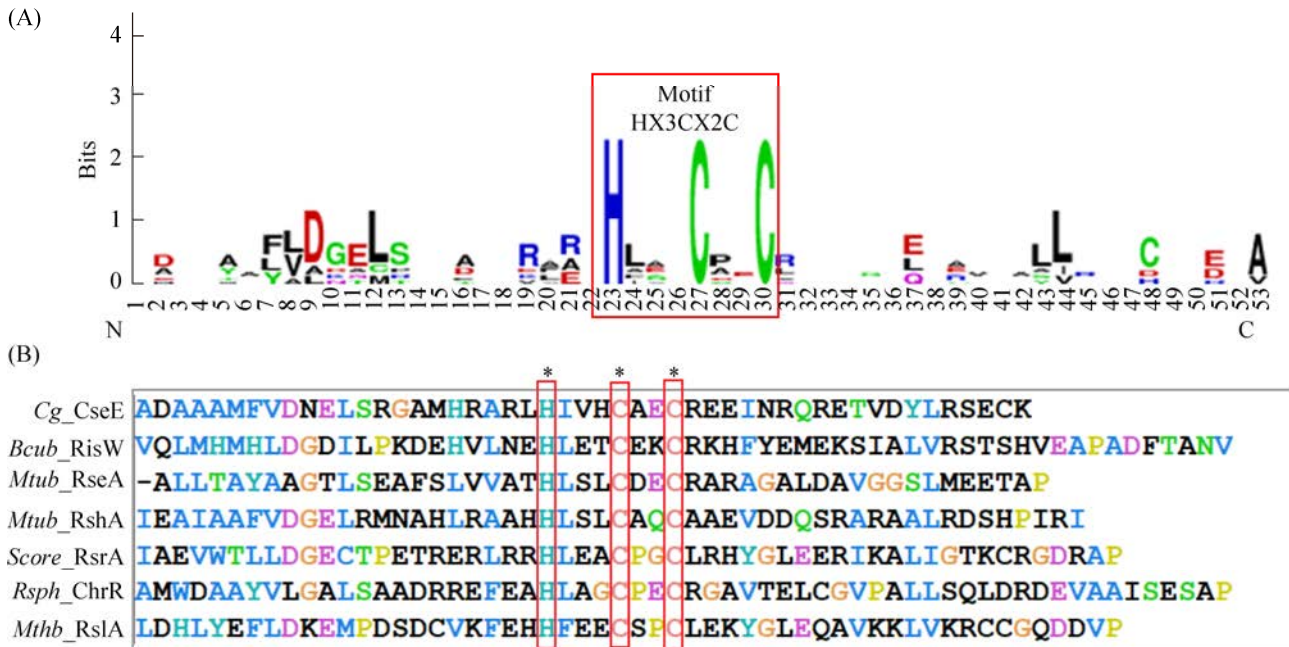


图3 CseE 蛋白氧化还原响应域预测分析及不同来源的 anti- $\sigma$  因子氨基酸序列同源性比对

Figure 3 CseE protein redox response domain prediction analysis and anti- $\sigma$  factor amino acid sequence homology of different sources. A: motif analysis of CseE protein sequence; B: anti- $\sigma$  factor amino acid sequence homology from different sources.

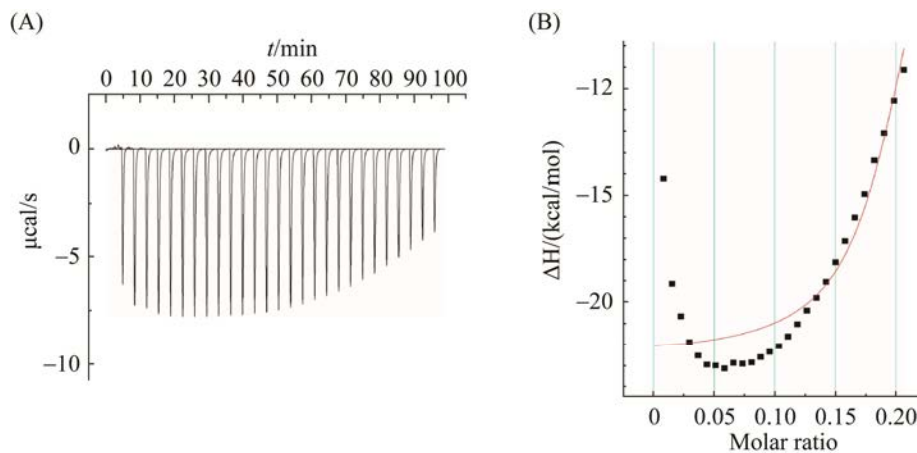


图4 ITC 测定 CseE 和 Zn<sup>2+</sup> 结合的热力学变化

Figure 4 Thermodynamic changes of CseE binding to Zn<sup>2+</sup> detected by ITC. A: titration curve of Zn<sup>2+</sup> binding to CseE; B: Zn<sup>2+</sup> and CseE binding process during thermodynamic change curve.

稳定结构区域，能够容纳 Zn<sup>2+</sup>。随后，采用 Rosetta 软件对 SigE 和 CseE 进行分子对接并用 Amber14 进行动力学优化，分析参与复合体结合的氨基酸。如图 6C、6D，最终获得了最优的

SigE-CseE 结合模式。而参与复合体结合的氨基酸如图 6E-H 所示。在图 6E 中，Zn<sup>2+</sup> 周围氨基酸 His83、Cys87 和 Cys90 与 Zn<sup>2+</sup> 之间形成金属螯合作用，对该蛋白质的回环结构起到稳定作用。

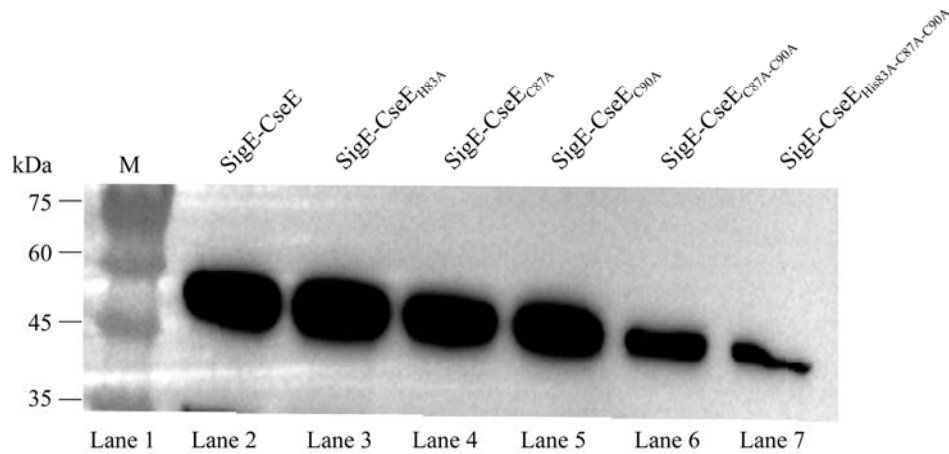


图 5 Western blotting 验证 CseE 与 SigE 的结合能力

Figure 5 Western blotting verifies the binding ability of CseE mutants to SigE. lane 1: marker; lane 2: Western blotting was used to detect the positive control of CseE and SigE; lane 3: the direct combination of CseE<sub>H83A</sub> and SigE was detected by Western blotting; lane 4: the direct combination of CseE<sub>C87A</sub> and SigE was detected by Western blotting; lane 5: the direct combination of CseE<sub>C90A</sub> and SigE was detected by Western blotting; lane 6: the direct combination of CseE<sub>C87A-C90A</sub> and SigE was detected by Western blotting; lane 7: the direct combination of CseE<sub>H83A-C87A-C90A</sub> and SigE was detected by Western blotting.

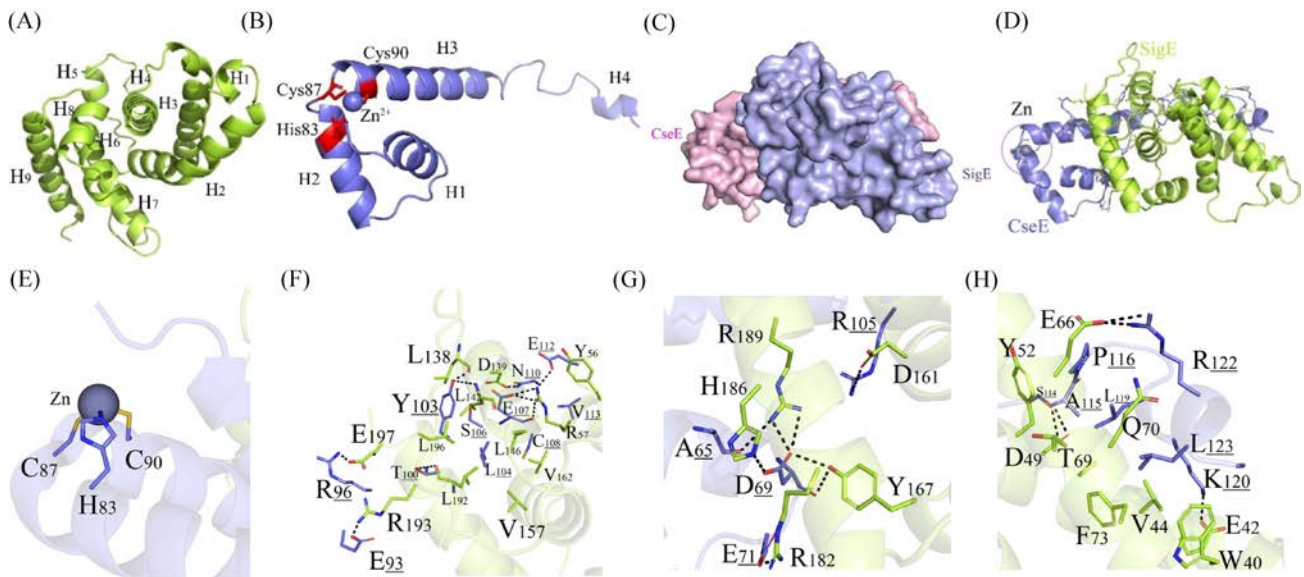


图 6 SigE-CseE 复合物的三维模型

Figure 6 Three-dimensional model of the SigE-CseE complex. A: modelled 3D structure of SigE. B: three-dimensional model of monomeric CseE shown as cartoon form; Amino acids around Zn<sup>2+</sup> are His83, Cys87, Cys90 in the CseE protein. C: overall structures of the simulated SigE-CseE complex shown as surfaces. D: overall structures of the simulated SigE-CseE complex shown as cartoon. E: amino acid sites involved in metal chelation in the interaction mode of SigE and CseE. F: amino acids involved in the interaction of SigE and CseE. G: amino acids involved in the interaction of SigE and CseE. H: amino acids involved in the interaction of SigE and CseE.

其次, 在图 6F-H 中 L138\_Y103、L142\_Y103、D139\_N110、R189\_A65、Y167\_D69、T69\_S114 和 D69\_S114 形成氢键极性作用。而 D161\_R105、D69\_R189、D69\_H186、R182\_E71、E66\_R122、E42\_K120、R193\_E93、R96\_E197、R57\_E107 和 R57\_E112 形成作用极强的盐桥, 对稳定 SigE 和 CseE 结合起重要作用。图 6F-H 中 L192/V157/V162\_C108/L104、L196/L138/L142\_Y103、Y56\_V113/F73/V44/W40\_L123、E66/Y52/Q70\_A115/P116/L119 形成较好的疏水性结合作用。SigE 与 CseE 蛋白之间的结合能量为 -23.17 kcal/mol, 结合能力较好。

## 2.7 分子动力学分析 CseE 突变体对 SigE 结合能力的影响

为了分析 CseE 突变体具体是如何影响与 SigE 的结合能力, 本研究将双突变体系和三突变体系蛋白结构按方法 1.13 进行分子对接和动力学模拟。如图 7A 所示, 未突变体系中 SigE 与 CseE 蛋白之间形成致密的极性与疏水性结合作用, CseE 蛋白中与 SigE 之间结合的极性和非极性氨基酸共计 23 个。野生蛋白 SigE-CseE 之间的结合能力为 -22.31 kcal/mol。如图 7B 所示, 在 CseE<sub>C87A-C90A</sub> 中, 由于 Zn<sup>2+</sup> 仅仅能与 His83 氨基酸之间保留金属螯合键。单一金属螯合作用并不稳定, CseE<sub>C87A-C90A</sub> 整体蛋白上的 H4 结构域向 H1-H2-H3 方向发生塌缩。CseE<sub>C87A-C90A</sub> 蛋白上参与形成结合界面的氨基酸共计 16 个: Y167、H186、R189、S190、R193、Y52、Y56、D49、S50、R53、V163、R57、D161、D139、L142 和 L138。其中与 SigE 蛋白质之间形成极性相互作用的氨基酸有 15 个: D69、H58、V56、D57、L59、E111、E112、V162、N110、K109、C108、E107、R105、Y103 和 L104。CseE 蛋白与 SigE 蛋白之间形成了极性氢键作用的氨

基酸有: Y167\_D69、S50\_N110、R53\_N110、R53\_C108 和 D139\_Y103。值得注意的是, SigE-CseE 之间仅仅形成了 4 个盐桥作用: H186\_D69、R189\_D69、R57\_E107 和 R57\_E107, 使得两者之间的极性相互作用降低。另外, CseE 蛋白上 13 个氨基酸和 SigE 蛋白上的 13 个氨基酸之间形成疏水性匹配作用。因此, CseE<sub>C87A-C90A</sub> 无论参与极性相互作用和疏水性相互作用的氨基酸, 相较于野生蛋白体系均下降较为明显。SigE-CseE<sub>C87A-C90A</sub> 之间的结合能量降低为 -17.23 kcal/mol, 比未突变体系结合能量降低 22.8%。如图 7C 所示, 三突变体系 CseE<sub>H83A-C87A-C90A</sub> 由于 Zn<sup>2+</sup> 与氨基酸 His83、Cys87、Cys90 之间的金属共价键螯合作用完全丧失。与 Zn<sup>2+</sup> 紧邻的 H1 螺旋结构域完全由 helix 二级结构转变为三级结构, H1 螺旋与 H2 螺旋结构之间的 loop 区域增长, H2 螺旋结构变短, H3 螺旋 helix 结构域中间变为 loop 区域, 并使得 H3 结构呈现为折线形结构。其中 CseE 蛋白上与 SigE 之间形成极性作用的氨基酸仅 5 个, 为 D62、Y103、N110、A124 和 K120。而 SigE 蛋白上仅 A35、M37、P38、G41、D49、D139、P140、L138 和 N137 共 9 个氨基酸之间形成极性相互作用。另外, 可以看出 CseE-SigE 蛋白质之间, 并没有形成作用较强的盐桥作用, 因此极性作用能量降低。相对疏水性作用, CseE 蛋白上仅 15 个氨基酸和 SigE 蛋白上仅 15 个之间形成了较好的疏水性贴合。相较于二突变体系 CseE<sub>C87A-C90A</sub>, 三突变体系 CseE<sub>H83A-C87A-C90A</sub> 疏水性结合作用增强, 但是三突变体系中极性作用丧失极为明显。因此这两者之间的结合能量降低最为明显, 为 -14.06 kcal/mol, 比未突变体系结合能量降低 36.9%。

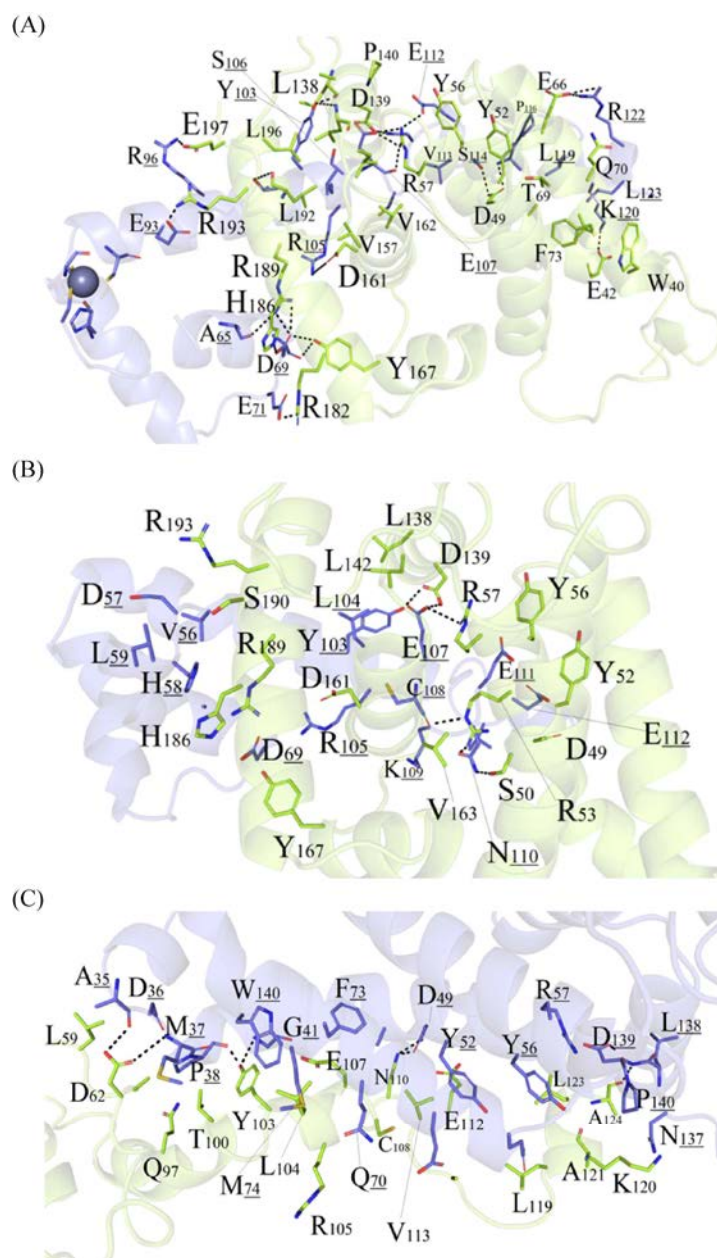


图 7 SigE-CseE 及 CseE 突变体相互作用模式图

Figure 7 SigE-CseE and CseE mutants interaction model diagram. A: key residues of the binding interface. Residues of SigE and CseE are shown as stick models and colored in blue and green, respectively; B: key residues of the binding interface. Residues of SigE and CseE<sub>C87A-C90A</sub> are shown as stick models and colored in blue and green, respectively; C: key residues of the binding interface. Residues of SigE and CseE<sub>His83-C87A-C90A</sub> are shown as stick models and colored in blue and green, respectively. SigE protein: blue; amino acids involved in the role of polar salt bridge: sticks, black underlined alphanumeric identification; CseE protein: light cyan, polar salt bridge function; Amino acid: sticks, black alphanumeric logo.

### 3 讨论与结论

$\sigma$  因子通过形成转录调节网络, 响应热、

冷、细胞表面和氧化应激等各种应激, 因而被广泛研究<sup>[21-23]</sup>。谷氨酸棒杆菌具有的 ECF  $\sigma$  因子的功能已被深入探索, 但是其活性受 anti- $\sigma$

因子调控的具体机制却尚不明确<sup>[24]</sup>。本文以谷氨酸棒杆菌  $\sigma$  因子和 anti- $\sigma$  因子中 SigE 和 CseE 为研究对象, 研究 SigE 和 CseE 之间相互调控机制。SigE 可以通过聚集 RNAP 调控 *sigE* 和 *cseE* 的转录, 且 SigE 的活性受 CseE 蛋白控制。之后对 CseE 氨基酸序列进行比对发现 CseE 结构域影响与 SigE 结合能力关键氨基酸位点及其位点影响与 SigE 结合的分子机制。本研究产生的三维结构和确定的结合位点残基为后续探索谷氨酸棒杆菌 SigE 和 CseE 响应环境压力的调控机制提供了新的线索, 也为  $\sigma$  因子的诱变并筛选突变体重新改变细胞代谢奠定基础。

本研究通过 RT-qPCR 发现 SigE 可以调控 SigE 和 CseE 蛋白转录水平。过表达 SigE 后, SigE 和 CseE 表达分别高出对照组 13.5 倍和 6.4 倍。这说明 *sigE* 和 *cseE* 类似结合分枝杆菌的 *sigE* 和 *rshA*, 通过组成型操纵子, 从转录水平调控自身表达<sup>[2]</sup>。之后的 His pull-down 实验发现 CseE 在未受到外界环境压力下通过跟 SigE 紧密结合从而控制 SigE 的活性<sup>[12]</sup>。总之, 与结核分枝杆菌的 SigE 和 RseA 调控方式相似, SigE 与 CseE 也是通过多重调控方式, 快速精确调控细胞生理及代谢过程来适应外界环境变化<sup>[25]</sup>。

ZAS 家族的 anti- $\sigma$  因子可以通过利用其疏水性核心来结合  $\sigma$  因子, 并且锌在维持这种高亲和力复合物中起着核心作用<sup>[26]</sup>。当受到氧化应激后, anti- $\sigma$  因子氨基酸序列具有的 HX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C 基序的 motif 区的半胱氨酸会形成二硫键, 减弱对锌离子的结合能力, 从而释放  $\sigma$  因子响应外界环境变化<sup>[27]</sup>。本研究通过对 CseE 蛋白的氨基酸序列进行比对, 发现其为 ZAS 家族的 anti- $\sigma$  因子, 具有 HX<sub>3</sub>CX<sub>2</sub>C 基序的 Motif。经 ITC 实验发现, CseE 与 Zn<sup>2+</sup> 的热力学变化为: 焓变  $\Delta H =$

(-21.9±0.6) kcal/mol, 熵变  $\Delta S = -14.3$  kcal/mol, 分离常数  $K_d = 2.7 \pm 0.5$   $\mu\text{mol/L}$ 。这表明 CseE 蛋白与 Zn<sup>2+</sup> 相互结合, 与报道的 ZAS 家族蛋白的特征相符合<sup>[8]</sup>。通过 His pull-down 实验发现 CseE<sub>C87A-C90A</sub> 及 CseE<sub>His83A-C87A-C90A</sub> 会使 CseE 与 SigE 的结合能力减弱。这说明 CseE 蛋白丧失了与 Zn<sup>2+</sup> 的金属螯合作用, 导致与 SigE 的亲和能力下降<sup>[8]</sup>。通过分子对接发现, CseE<sub>C87A-C90A</sub> 蛋白上参与形成结合界面的氨基酸减少。其中与 SigE 蛋白质之间形成极性相互作用的氨基酸降低为 4 个, 结合能量降低了 22.8%。而三突变体系 CseE<sub>His83-C87A-C90A</sub>, 因为丧失金属螯合作用导致突变蛋白结构发生较大变化, 使参与形成极性作用的氨基酸仅为 6 个, 两者之间的结合能量降低为 -14.06 kcal/mol, 比未突变体系结合能量降低 36.9%。上述结果发现, 结构域的突变并不能完全使 CseE 与 SigE 的结合能力丧失, 这意味着需要额外的结构域或者序列参与感应细胞内部环境的变化<sup>[28]</sup>。后期我们将进一步研究 SigE 的调节代谢网络及其生理功能, 建立棒杆菌全局调控网络模型, 阐释 CseE 核心调节作用, 进一步加深  $\sigma$  和 anti- $\sigma$  功能的理解。

## 参考文献

- [1] Li L, Fang C, Zhuang N, Wang T, Zhang Y. Structural basis for transcription initiation by bacterial ECF  $\sigma$  factors. *Nature Communications*, 2019, 10: 1153.
- [2] Boldrin F, Cioetto Mazzabò L, Anoosheh S, Palù G, Gaudreau L, Manganelli R, Provvedi R. Assessing the role of Rv1222 (RseA) as an anti-sigma factor of the *Mycobacterium tuberculosis* extracytoplasmic sigma factor SigE. *Scientific Reports*, 2019, 9: 4513.
- [3] Park JH, Lee JH, Roe JH. SigR, a hub of multilayered regulation of redox and antibiotic stress responses. *Molecular Microbiology*, 2019, 112(2): 420–431.

- [4] Wei Z, Chen C, Liu YJ, Dong S, Li J, Qi K, Liu SY, Ding XK, Ortiz De Ora L, Muñoz-Gutiérrez I, Li YF, Yao HW, Lamed R, Bayer EA, Cui Q, Feng YG. Alternative  $\sigma$ /anti- $\sigma$ I factors represent a unique form of bacterial  $\sigma$ /anti- $\sigma$  complex. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(11): 5988–5997.
- [5] Iyer SC, Casas-Pastor D, Kraus D, Mann P, Schirner K, Glatter T, Fritz G, Ringgaard S. Transcriptional regulation by  $\sigma$  factor phosphorylation in bacteria. *Nature Microbiology*, 2020, 5(3): 395–406.
- [6] Paget MS. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors structure, function and distribution. *Biomolecules*, 2015, 5(3): 1245–1265.
- [7] Lee KL, Yoo JS, Oh GS, Singh AK, Roe JH. Simultaneous activation of iron- and thiol-based sensor-regulator systems by redox-active compounds. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 139.
- [8] Rajasekar KV, Zdanowski K, Yan J, Hopper JTS, Francis MLR, Seepersad C, Sharp C, Pecqueur L, Werner JM, Robinson CV, Mohammed S, Potts JR, Kleanthous C. The anti-sigma factor RsrA responds to oxidative stress by burying its hydrophobic core. *Nature Communications*, 2016, 7: 12194.
- [9] Devkota SR, Kwon E, Ha SC, Chang HW, Kim DY. Structural insights into the regulation of *Bacillus subtilis* SigW activity by anti-Sigma RsiW. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174284.
- [10] Dostálová H, Holátko J, Busche T, Rucká L, Rapoport A, Halada P, Nešvera J, Kalinowski J, Pátek M. Assignment of sigma factors of RNA polymerase to promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express*, 2017, 7(1): 133.
- [11] Toyoda K, Teramoto H, Yukawa H, Inui M. Expanding the regulatory network governed by the extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma$ H in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(3): 483–496.
- [12] Park SD, Youn JW, Kim YJ, Lee SM, Kim Y, Lee HS. *Corynebacterium glutamicum* sigmaE is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE. *Microbiology: Reading, England*, 2008, 154(Pt3): 915–923.
- [13] Toyoda K, Inui M. Extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma$ D confers resistance to environmental stress by enhancing mycolate synthesis and modifying peptidoglycan structures in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 2018, 107(3): 312–329.
- [14] Silberbach M, Hüser A, Kalinowski J, Pühler A, Walter B, Krämer R, Burkovski A. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2005, 119(4): 357–367.
- [15] Brockmann-Gretza O, Kalinowski J. Global gene expression during stringent response in *Corynebacterium glutamicum* in presence and absence of the *rel* gene encoding (p)ppGpp synthase. *BMC Genomics*, 2006, 7: 230.
- [16] Jakob K, Satorhelyi P, Lange C, Wendisch VF, Silakowski B, Scherer S, Neuhaus K. Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(15): 5582–5590.
- [17] Dostálová H, Busche T, Holátko J, Rucká L, Štěpánek V, Barvík I, Nešvera J, Kalinowski J, Pátek M. Overlap of promoter recognition specificity of stress response sigma factors SigD and SigH in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3287.
- [18] Yakhnin H, Aichele R, Ades SE, Romeo T, Babitzke P. Circuitry linking the global csr- and  $\sigma$  E-dependent cell envelope stress response systems. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(23): e00484–17.
- [19] Wang Q, Jiang A, Tang JB, Gao H, Zhang X, Yang TW, Xu ZH, Xu MJ, Rao ZM. Enhanced production of L-arginine by improving carbamoyl phosphate supply in metabolically engineered *Corynebacterium crenatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(8): 3265–3276.
- [20] 唐蜜, 王晴, 杨套伟, 张显, 徐美娟, 饶志明. 钝齿棒杆菌 GlnK 在氮代谢调控及 L-精氨酸合成中的功能. *微生物学报*, 2020, 60(10): 2323–2340. Tang M, Wang Q, Yang TW, Zhang X, Xu MJ, Rao ZM. Role of GlnK in regulating nitrogen metabolism and L-arginine synthesis in *Corynebacterium crenatum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(10): 2323–2340. (in Chinese)
- [21] Rodriguez Ayala F, Bartolini M, Grau R. The stress-responsive alternative sigma factor SigB of *Bacillus subtilis* and its relatives: an old friend with

- new functions. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1761.
- [22] Srivastava A, Summers ML, Sobotka R. Cyanobacterial sigma factors: current and future applications for biotechnological advances. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107517.
- [23] Nakamura K, Shinoda N, Hiramatsu Y, Ohnishi S, Kamitani S, Ogura Y, Hayashi T, Horiguchi Y. BspR/BtrA, an anti- $\sigma$  factor, regulates the ability of *Bordetella bronchiseptica* to cause cough in rats. *mSphere*, 2019, 4(2): e00093–19.
- [24] Toyoda K, Inui M. The extracytoplasmic function  $\sigma$  factor  $\sigma_C$  regulates expression of a branched quinol oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(3): 486–509.
- [25] Zorzan I, Del Favero S, Giaretta A, Manganeli R, Di Camillo B, Schenato L. Mathematical modelling of SigE regulatory network reveals new insights into bistability of mycobacterial stress response. *BMC Bioinformatics*, 2021, 22(1): 558.
- [26] Chabert V, Lebrun V, Lebrun C, Latour JM, S  n  que O. Model peptide for anti-sigma factor domain HHCC zinc fingers: high reactivity toward 1 O<sub>2</sub> leads to domain unfolding. *Chemical Science*, 2019, 10(12): 3608–3615.
- [27] Imber M, Pietrzyk-Brzezinska AJ, Antelmann H. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in Gram-positive bacteria. *Redox Biology*, 2019, 20: 130–145.
- [28] Schumacher MA, Gallagher KA, Holmes NA, Chandra G, Henderson M, Kysela DT, Brennan RG, Buttner MJ. Evolution of a  $\sigma$ -(c-di-GMP)-anti- $\sigma$  switch. *PNAS*, 2021, 118(30): e2105447118.