



鼠疫耶尔森氏菌基因转录调控的研究进展

刘磊^{1,2} 郑山根^{*1} 郑娅琼¹ 蔡李平¹ 杨瑞馥²

1 中国人民解放军武汉总医院输血科 湖北 武汉 430070

2 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

摘要: 细菌基因转录调控是多种调控机制中研究最为广泛的一种模式。复杂而精细的基因转录调控网络有助于细菌应答外界环境压力,在病原菌致病与传播中均发挥着关键作用。本文以鼠疫耶尔森氏菌基因转录调控的相关研究进展为基础展开论述,重点阐述细菌的转录调控机制、转录调控的研究策略及鼠疫菌致病与传播中转录调控的作用,以期为深入研究鼠疫菌致病与传播中的基因转录调控分子机制提供新思路。

关键词: 鼠疫耶尔森氏菌, 基因转录调控, 生物膜, 毒力

Progress of *Yersinia pestis* gene transcriptional regulation

LIU Lei^{1,2} ZHENG Shan-Gen^{*1} ZHENG Ya-Qiong¹ CAI Li-Ping¹ YANG Rui-Fu²

1 Department of Transfusion, Wuhan General Hospital of PLA, Wuhan, Hubei 430070, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Bacterial gene transcriptional regulation is one of the most widely studied mechanisms. Complex, but precise gene transcription regulatory network helps bacteria respond to environmental changes and plays a key role in the pathogenesis and transmission of pathogens. This paper discussed research progress of *Yersinia pestis* gene transcriptional regulation, the transcriptional regulation mechanism, strategies for transcriptional regulation, and the function of transcriptional regulation in *Yersinia pestis* pathogenesis and transmission, to provide new ideas for further research.

Keywords: *Yersinia pestis*, Gene transcriptional regulation, Biofilm, Virulence

为了更好地适应复杂而多变的环境压力,细菌在漫长的进化过程中形成了复杂而精细的调控网络来应答这些改变,从而有利于细菌在不同宿主环境中自身的生长增殖。细菌的基因调控,尤其是转录水平的基因调控发挥了重要的作用。尽管细菌中

多种基因调控机制共同发挥作用,转录调控却是最基础也是最为广泛研究的一种调控方式。转录因子在基因转录调控的进程中发挥着举足轻重的作用,因此也是广大学者的研究热点。本文主要围绕以下3个方面展开讨论:细菌的转录调控机制、

Foundation items: Hubei Provincial Natural Science Foundation (2018CFB184); Hubei Provincial Health and Family Planning Scientific Research Project (WJ2018H0070)

***Corresponding author:** E-mail: z_shanggen@hotmail.com

Received: 29-03-2018; **Accepted:** 04-07-2018; **Published online:** 20-07-2018

基金项目: 湖北省自然科学基金(2018CFB184); 湖北省卫生计生科研基金(WJ2018H0070)

***通信作者:** E-mail: z_shanggen@hotmail.com

收稿日期: 2018-03-29; **接受日期:** 2018-07-04; **网络首发日期:** 2018-07-20

转录调控的研究方法以及鼠疫耶尔森氏菌转录调控的相关研究进展。

1 细菌的转录调控机制

细菌内的基因调控主要发生在转录水平,而且大部分转录调控都发生于转录进程的起始阶段。转录因子是一类通过结合其靶标 DNA 分子从而激活或抑制靶基因转录的 DNA 结合蛋白。细菌拥有众多的转录因子,它们通过控制生命活动中各种功能相关的靶基因而形成了一张复杂而又精确有序的调控网络。

在细菌中,功能相关的基因大多以操纵子的形式存在,细菌大多数的基因转录调控也是通过操纵子机制实现的。操纵子包含结构基因、操纵基因以及启动基因的一些相邻基因组成的 DNA 片段,其中结构基因的表达受到操纵基因的调控。一个操纵子内的一串基因可以转录形成一个完整的 RNA 片段。RNA 合成以 DNA 作为模板在 RNA 聚合酶的催化下进行,细菌的 RNA 聚合酶主要由控制 RNA 合成的核心酶以及识别启动子区 DNA 序列的 σ 因子组成^[1-2]。 σ 因子对于转录起始有着至关重要的作用。

某些转录因子仅能结合并调控其靶基因启动子区域中的顺式作用元件,如鼠疫菌的铁代谢调控子 Fur^[3]。除此之外,某些转录因子还能与其他转录因子或自身发生作用,从而通过各级转录因子的协同作用有序地控制细菌的生命进程,如鼠疫菌的毒力调控子 RovA^[4],既可促进自身基因表达,又可抑制自身基因表达。某些转录因子只能激活或抑制靶基因的表达,如小肠结肠炎菌的整体调控子 HNS^[5],几乎抑制所有其调控元基因的表达;而某些既可以激活部分靶基因的表达,又可以同时抑制其他靶基因的表达,如鼠疫菌的二元调控系统 PhoP-PhoQ^[6]。转录激活子促进某个基因的转录一般是通过结合到该基因启动子核心区域的上游 DNA 序列改变 DNA 分子的结构,使其有利于 RNA 聚合酶的进入,从而促进转录的进行。转录抑制子抑制某个基因的转录往往是通过结合到

该基因的启动子核心区域阻碍 RNA 聚合酶的进入,或者是转录后阻碍核糖体的结合,从而抑制该基因的表达^[7]。

2 转录调控的研究方法

某个转录因子与其调控的一个靶基因,称为一个调控对。而某个转录因子与其调控的所有靶基因,称为该转录因子的调控元。为深入研究转录调控子与调控元之间的相互作用,多种实验方法的建立十分必要。

2.1 全基因组预测转录因子

为了了解基因转录调控的机制,转录因子的鉴定是首要考虑的研究途径。全基因组的测序并通过与已知转录因子的同源比对可以有效地帮助确定新的调控子^[8],也可以根据按功能分类的名目去将未知的转录因子归类^[9]。而且,更多的转录因子预测要以它们结合不同靶标 DNA 分子基序的收集和分析作为基础。研究者可以根据同源比对模式菌株大肠杆菌或近缘菌株来有效地预测已获得基因组测序的未知调控子。

2.2 基于亲和色谱策略的 DNA pull-down 技术鉴定特殊转录因子

DNA pull-down 包括亲和色谱以及凝胶迁移,是从细胞提取物中分离并鉴定转录因子的关键方法。此技术方法大体是:包含结合基序的 DNA 探针通过吸附或共价连接到色谱支撑物,与存在细胞提取物内的转录因子相结合,使其被分离提取。分离出来的转录因子可以通过凝胶电泳进行分离,并通过质谱分析进行鉴定^[10]。

2.3 DNA 微阵列以及 RNA 测序技术鉴定靶基因

DNA 微阵列(DNA 芯片)的测序原理是杂交测序,即通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定,在一块基片表面固定了序列已知的靶核苷酸探针。当溶液中带有荧光标记的核酸序列与基因芯片上对应位置的核酸探针产生互补匹配时,通过确定荧光强度最强的探针位置,获得一组序列

完全互补的探针序列,并据此可重组出靶核酸的序列。DNA 芯片技术已广泛应用于不同菌株间 mRNA 表达水平的比较,选择感兴趣的转录因子并将其编码基因敲除后,基于 cDNA 微阵列方法的一个典型的两样品试验就可被设定。分别从野生株以及转录因子编码基因突变株中提取 RNA 样品,并用不同的荧光素进行标记,然后与来源于基因组信息的互补 DNA (cDNA)杂交,得到的数据可根据荧光敏感度不同进行分析,以两倍差异作为判定标准^[11-12]。同时,将转录表达水平存在显著差异的靶基因根据不同功能分类,以便于数据分析。RNA 测序技术即转录组测序技术,能够利用高通量测序技术测定 mRNA、sRNA 以及非编码 RNA 等的核酸序列,并反映出它们的表达水平。RNA 测序技术同样可用于不同菌株间的转录组差异分析,其研究方法及策略与 DNA 芯片技术相似,但测序无需预先针对已知序列设计探针,即可对任意物种的整体转录活动进行检测,提供更精确的数字化信号、更高的检测通量以及更广泛的检测范围,是目前深入研究转录组复杂性的强大工具。

2.4 染色质免疫共沉淀技术应用于分析转录因子与靶基因的作用

染色质免疫共沉淀技术常被用于转录因子结合基序的分析,是研究蛋白与 DNA 分子之间相互作用的有效手段。将此项技术与第二代测序方法结合在一起可以应用于全基因的监测和组蛋白分析,以及转录因子与靶标 DNA 分子间的相互作用^[13]。靶标 DNA 分子结合了特异标记后的转录因子抗体标签,然后进行纯化并建库。DNA 的信息可以通过高通量测序的手段获取并收集,从众多作用于基因组序列的标签中筛选出与目的转录因子相互作用的靶标 DNA 分子。

2.5 探究转录因子对靶基因调控机制的方法

当确定了想要研究的转录因子以及该转录因子相互作用的靶基因后,下列的一些方法可以帮助我们深入了解转录因子与靶基因的具体作用机制。

基因调控实验主要包括引物延伸、实时荧光定量 PCR 及 LacZ 报告基因融合实验等,这 3 种实验方法均可检测转录因子对靶基因的调控关系,即对靶基因的激活或者抑制。引物延伸实验:分别提取野生株以及转录因子编码基因突变株的总 RNA,利用 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 标记一段特异性引物的 5'末端,并用该引物退火至 mRNA 链的互补区域,以 mRNA 为模板在 AMV 逆转录酶的作用下逆转录获得 cDNA,将 cDNA 产物配伍测序条带进行 6.0%的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳,放射自显影后可找到靶基因的转录起始位点,并根据产物丰度判定调控关系。实时荧光定量 PCR 实验:分别提取野生株以及转录因子编码基因突变株的总 RNA,各菌株取等量的 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板、管家基因 16S rRNA 的特异引物对进行定量 PCR 扩增,绘制相对标准曲线;利用该标准曲线对靶基因的转录水平进行相对定量,从而分析靶基因在不同菌株内的转录水平差异。LacZ 报告基因融合实验:将靶基因的启动子区克隆至无启动子区的 pRW50 质粒上 β -半乳糖苷酶基因的上游,构建重组载体;将重组载体通过电转化转入各菌株中以获得 LacZ 实验菌株。各菌株经培养后通过超声裂解菌体检测各菌株中 β -半乳糖苷酶的表达活性,从而判定转录因子对靶基因的转录调控关系。体外蛋白结合实验主要包括凝胶阻滞实验和 DNase I 足迹实验,凝胶阻滞实验可以筛选到转录因子直接作用的靶基因,而 DNase I 足迹实验可以帮助进一步找到转录因子结合的 DNA 序列,有助于分析引发正调控或负调控的转录调控机制。

3 鼠疫耶尔森氏菌转录调控的研究进展

鼠疫是由鼠疫耶尔森氏菌(简称“鼠疫菌”)引起的一种烈性传染病,曾在世界范围内引发 3 次大流行,给人类带来了深重的灾难^[14]。鼠疫具有广阔的疫源地分布,近些年被划为重新抬头的传染病^[15]。鼠疫菌能够引起急性感染,主要包括腺

鼠疫、肺鼠疫以及败血症鼠疫 3 种类型。在自然界中,鼠疫菌主要通过跳蚤在啮齿类动物间传播,偶然间的叮咬会引发人间鼠疫。当鼠疫菌经跳蚤传播到哺乳动物体内时,它的生存环境也发生了巨大变化,为了能够更好地适应这些环境压力,鼠疫菌通过自身精确而有序的调控网络控制着多种功能基因的表达,从而有效应答环境改变。

3.1 鼠疫菌生物膜形成中的基因转录调控

鼠疫菌是由其祖先假结核耶尔森氏菌(简称“假结核菌”)进化而来的,假结核菌主要通过食物或饮水的方式进行传播,而鼠疫菌能够通过跳蚤进行传播^[16]。鼠疫菌在经跳蚤传播过程中在前胃处产生生物膜而形成“堵塞”,阻碍了血液回流到蚤胃,使跳蚤一直处于饥饿状态,从而不断地叮咬新宿主,也就促进了鼠疫菌的传播^[17]。因此,鼠疫菌生物膜的形成在鼠疫菌经跳蚤传播的过程中发挥重要作用;同时,鼠疫菌生物膜形成过程中的多基因调控机制在此过程中扮演重要的角色。

hmsHFRS 基因在鼠疫菌中编码生物膜胞外多糖合成与运输的酶,其表达受到 c-di-GMP 的调节^[18]。c-di-GMP 是由两分子 GTP 在鸟苷酸环化酶催化作用下合成的一个第二信使分子,在许多细菌中都发挥重要作用。在鼠疫菌中, HmsT 和 HmsD 是仅有的负责合成 c-di-GMP 的两个鸟苷酸环化酶^[19],而 HmsP 是唯一催化 c-di-GMP 降解的磷酸二酯酶^[20]。GmhA 能够催化合成脂多糖的重要组成成分——庚糖,而且 *gmhA* 基因敲除后导致鼠疫菌在跳蚤体内形成生物膜的能力大大降低^[21]。鼠疫菌的脂多糖主要由脂质 A 以及核心多糖(Kdo)组成,而 YrbH 能够催化前体阿拉伯糖-5-磷酸合成 Kdo, WaaA 合成的糖基转移酶负责将 Kdo 连接到脂质 A 以形成完整的脂多糖; YrbH 和 WaaA 缺失后都导致鼠疫菌形成生物膜的能力发生不同程度的减弱,这说明鼠疫菌形成生物膜的能力与脂多糖的合成有着重要联系^[22]。精氨酸脱羧酶(SpeA)和鸟氨酸脱羧酶(SpeC)控制着多胺的合

成,多胺的合成可以通过转录后调控的方式影响重要的 Hms 蛋白(如 HmsR、HmsS、HmsT)的表达,因此 *speA* 或者 *speC* 敲除后都大大减弱了鼠疫菌生物膜的合成能力^[23]。

Rcs 磷酸接力系统(Rcs phosphorelay system)是一个非典型的二元调控系统,主要包括 RcsB、RcsC 和 RcsD^[24]。RcsC 和 RcsD 都是膜蛋白, RcsC 同时是磷酸激酶,可以催化自身磷酸化,然后将磷酸基团通过 RcsD 传递给 RcsB,被磷酸活化后的 RcsB 可以直接调控靶基因,也可以与辅助蛋白 RcsA 相互作用后共同调控基因表达。在假结核菌中 RcsA 是有功能的,形成的 RcsAB 复合体可以有效地抑制生物膜的形成,因此假结核菌表现为生物膜缺陷型^[25-26]。在鼠疫菌中 RcsA 由于编码区内一段 30 bp 的重复序列插入导致基因失活,形成的假基因大大地增强了鼠疫菌生物膜形成能力,以及经跳蚤传播的能力^[26]。RcsAB 可以通过直接抑制 *hmsHFRS*、*hmsT*、*hmsCDE* 的转录并间接激活 *hmsP* 的转录,从而抑制鼠疫菌生物膜的形成^[27]。RcsA 的失活导致 RcsB 本来抑制的促生物膜形成因子表达释放而抑制生物膜形成因子表达减弱,使得鼠疫菌由假结核菌中进化而来后在跳蚤内形成生物膜的能力显著增强,是具有代表性的一种适应性进化。

铁摄取调控子蛋白 Fur (Ferric uptake regulator)控制着细菌中绝大部分的铁代谢通路^[3]。在鼠疫菌中, Fur 不仅调控几乎所有与铁代谢相关的基因,也直接影响许多非铁代谢相关的靶基因表达^[28-29]。*fur* 基因缺失后导致鼠疫菌生物膜形成能力急剧增强,以至于严重结块,导致其只能丢失 *hms* 位点才能正常生长。Fur 可以直接抑制 *hmsT* 的转录,从而抑制 c-di-GMP 以及生物膜的合成^[30]。

细菌中 LysR 家族的调控子是数量最多、分布最广泛的, LysR 家族的调控子普遍存在氨基末端的 DNA 结合域螺旋-转角-螺旋以及羧基末端的诱导物结合域。然而, LysR 家族的调控子却控制着细菌中多种生理功能途径的基因调控,主要涉及生

物膜、毒力、运动性以及代谢等^[31]。RovM (Regulator of virulence M)调控子是 LysR 家族的一员,在假结核菌中它可以直接抑制 *rovA* 基因的转录,它是首个被发现参与对人致病细菌毒力调控的 LysR 家族调控子^[32]。而且,在鼠疫菌中 RovM 能够感应跳蚤特殊的营养条件并被激活,能够促进鼠疫菌在跳蚤体内的定殖,从而有利于鼠疫菌的传播^[33]。我们的研究也证实了 RovM 可以通过直接激活 *hmsT* 和 *hmsCDE* 的转录并间接激活 *hmsHFRS* 的转录,同时抑制 *hmsP* 的转录从而促进鼠疫菌生物膜的形成;同时,RovM 还可通过影响 RovA 的表达水平间接调控鼠疫菌毒力,RovM 利用温度转换下的自调控机制在鼠疫菌经跳蚤传播和哺乳动物致病中发挥着关键作用^[34],实现了对鼠疫菌经跳蚤传播(生物膜形成)的正调控及哺乳动物致病性(毒力)的负调控。YfbA (*Yersinia pestis* flea biofilm A)也属于 LysR 家族的一员,并且对于鼠疫菌在跳蚤肠内的定殖以及生物膜形成发挥重要作用^[35]。然而,YfbA 通过调控哪些生物膜决定性因子而影响生物膜形成,且 YfbA 是否也影响鼠疫菌的毒力仍需深入研究。

3.2 鼠疫菌毒力的基因转录调控

耶尔森氏菌属有 3 个种类对于人类是致病的:小肠结肠炎菌、假结核菌以及鼠疫菌。这 3 种致病菌拥有共同的毒力决定性因子,又分别有各自特殊的毒力因子。鼠疫菌有许多毒力相关的决定性因子以及调控子,而且大多数的毒力因子都是受到调控的。很多毒力因子的表达都是受到温度影响的,有些在 26 °C (跳蚤肠内环境温度)表达水平较高,有些在 37 °C (哺乳动物体内环境温度)表达水平高。然而,这种普遍存在温度调控模式可以通过多种机制的作用下实现。一般来说,调控的发生可以通过许多其他环境因素影响,例如 pH、离子浓度、营养物质、渗透压、氧化压力以及 DNA 损伤等^[36]。

鼠疫菌在染色体上有一个 102 kb 的大片段区域称为 *pgm* 位点,对于鼠疫菌毒力表现有重大贡

献。*pgm* 位点由两部分组成:一个 35 kb 大小的毒力岛,带有许多重要的毒力基因^[37-38];以及一个 68 kb 大小的片段,带有编码鼠疫菌胞外多糖的 *hms* 基因座位^[39]。这两部分带有的基因对于鼠疫菌的致病和传播都有重要的作用。鼠疫菌 *psa* 位点主要包括两个操纵子:*psaABC* 和 *psaEF*^[40]。*psaABC* 的表达只有在酸性条件以及 37 °C 环境下被激活,*psaEF* 编码的转录因子可以促进 *psaABC* 的转录表达^[41]。pH6 抗原在小鼠的腺鼠疫和肺鼠疫致病模型中都发挥重要作用,它可以通过介导病原菌黏附到肺泡上皮细胞,增强鼠疫菌在宿主体内的定殖^[42-43]。而且,pH6 抗原可以促使鼠疫菌与宿主细胞接触,有助于鼠疫菌将决定性的毒力因子 Yops (三型分泌系统效应蛋白)交付到靶标细胞内^[44]。pH6 抗原可以作为一个抗吞噬因子阻碍宿主细胞摄取鼠疫菌,也可以有效地结合到人血浆中血清载脂蛋白 B 包含的脂蛋白上^[45-46]。据推断,一旦鼠疫菌从巨噬细胞内被释放而获得胞外生存后,pH6 抗原结合到脂蛋白可以阻碍鼠疫菌被食菌细胞吞噬^[46]。

经典的鼠疫菌包含 3 个毒力质粒: pCD1、pMT1 和 pPCP1,携带有大量的毒力基因。70 kb 的 pCD1 控制着两个重要毒力因子的合成: Yops (鼠疫菌外膜蛋白)对于鼠疫菌宿主入侵起关键作用,另一个毒力决定因子 YadA 对于亲附宿主细胞起到重要作用,并且可以抵御宿主的非特异性免疫杀伤^[36]。F1 抗原是鼠疫菌抗吞噬的重要毒力抗原,主要由 4 个(*cafI*、*cafIA*、*cafIM*、*cafIR*)位于 110 kb pMT1 质粒上的基因编码。*caf* 操纵子的表达也是受温度调控的,例如,当温度从 28 °C 升高至 37 °C 时,Caf1A 的表达量明显提高,AraC 家族的调控子 Caf1R 也参与了此过程的调控^[47]。另一个 pMT1 质粒编码的毒力因子鼠毒素对于鼠疫菌经蚤传播起到决定性作用^[48]。pPCP1 质粒上存在编码纤维蛋白溶酶原激活因子 Pla 的基因,在腺鼠疫与肺鼠疫的致病过程中发挥重要作用^[49-50]。

MarR 家族的调控子在细菌调控毒力因子的表达、抵抗抗生素压力以及氧化压力等方面都扮演重要角色^[51]。RovA (Regulator of virulence A) 作为 MarR 家族的一员, 可以通过调控大量毒力基因而在 3 种致病耶尔森氏菌中都扮演着全局毒力调控子的重要角色^[43,52-55]。RovA 可以直接促进 *inv* 的转录, *inv* 编码的侵袭因子可以促使假结核菌和小肠结肠炎菌穿过肠上皮细胞^[53-56]。然而, 在鼠疫菌中 *inv* 基因却被自然选择性地失活了^[57]。在鼠疫菌中, RovA 可以直接激活 *psaABC*、*psaEF* 和 CUS-2 原噬菌体位点的转录表达, CUS-2 原噬菌体在东方型中能够稳定完整的存在, 但在古典型、中世纪型以及田鼠型鼠疫菌中都不稳定^[58-59]。这个原噬菌体位点的获得与鼠疫菌经跳蚤传播的能力无关, 却与小鼠的致病性有重要联系^[58]。同时, 我们的相关研究还指出, RovA 是鼠疫菌生物膜形成的重要抑制子, 可以通过直接抑制 *hmsT* 的表达, 并间接抑制 *waaAE-coaD* 的表达来阻碍鼠疫菌 c-di-GMP 及生物膜的合成^[34]。RovA 与 RovM 构成了一对特殊的调控子对, 能够通过分别抑制和激活鼠疫菌生物膜基因来抑制和促进生物膜形成, 并通过分别促进和抑制毒力基因来促进和抑制鼠疫菌毒力, 相互拮抗地调控鼠疫菌的致病与传播。

在许多致病菌中, CRP (Cyclic AMP receptor protein) 都是与毒力相关的全局调控子, 它调控超过 6% 的鼠疫菌基因表达^[60]。只有小分子诱导物 cAMP 存在时, CRP 才可以被激活, 从而结合到靶基因的启动子区上调或下调基因转录。CRP 可以直接影响三型分泌系统效应蛋白 Yops 以及纤维蛋白溶酶原激活因子 Pla 的转录表达, 通过这种方式 CRP 可以直接影响腺鼠疫以及肺鼠疫的发生^[61-62]。同时, CRP 也可以间接作用于非编码小 RNA, 通过转录后调控的方式影响鼠疫菌的毒力^[63]。近期, 我们的研究还表明 CRP 是鼠疫菌生物膜形成的关键激活子, 能够通过直接激活 *gmhA* 的表达, 并间接促进 *waaAE-coaD* 的表达来增强鼠

疫菌生物膜形成能力, 但并不影响 c-di-GMP 的合成^[64]。可见, CRP 影响鼠疫菌生物膜合成的方式不同于大多数生物膜相关调控子, 不是通过调控 c-di-GMP 的合成来影响生物膜形成能力, 而是通过影响脂多糖合成来实现调控, 脂多糖可能在鼠疫菌生物膜基质多糖胞外运输中发挥重要作用。

PhoP (Phosphorylation P) 和 PhoQ (Phosphorylation Q) 组成了重要的二元调控系统^[65]。感应蛋白 PhoQ 在感受到环境信号刺激后, 可以自身磷酸化并将磷酸基团传递给效应蛋白 PhoP, 使其磷酸化激活后发挥转录因子调控靶基因转录的功能。*phoP* 基因敲除后, 鼠疫菌在巨噬细胞内和在体外低 pH 值及过氧化物存在环境下的生存能力都大大降低, 这说明了 PhoP 对于鼠疫菌感染初期在巨噬细胞内的存活起到至关重要的作用, 它可以通过调控相关靶基因来抵抗特殊的生存环境^[6]。然而, PhoP 不影响鼠疫菌对小鼠的致病性。而且, PhoP-PhoQ 二元调控系统对于鼠疫菌在跳蚤体内的生存与定殖至关重要, 能够激活 *waaAE-coaD* 的表达来增强鼠疫菌生物膜形成能力, 即鼠疫菌跳蚤体内定殖能力与经蚤传播能力^[66]。

4 结语与展望

综上所述, 鼠疫菌在漫长的进化演变过程中形成了一套自上而下的基因转录调控网络, 有助于鼠疫菌在跳蚤和哺乳动物两个传播媒介中更好地生存、增殖、侵袭及致病, 在其经跳蚤传播和哺乳动物致病中均发挥着重要作用。目前, 关于鼠疫菌基因转录调控的相关研究已经取得了较好的进展, 但大部分报道仍然停留在转录因子与靶基因调控关系判定的浅层研究, 详细而精确的分子机制描绘较为匮乏。我们团队长期致力于鼠疫菌传播与致病中转录调控分子机制的研究, 鉴定并深入探究了以 PhoP、CRP、RovA、RovM、Fur、RcsAB 为代表的全局调控子及其分子调控机制。这些调控子在鼠疫菌的传播与致病中均发挥着重要的作用, 调控着

大量生物膜基因与毒力因子的转录表达,调控子与调控子之间还存在着复杂的调控机制,构成了鼠疫菌自上而下的基因调控网络。正是这复杂而又精细的基因调控网络,帮助鼠疫菌在不同的宿主环境下感受到不同的环境信号刺激后能够迅速作出回应,通过自上而下的基因调控机制促进鼠疫菌更好地生存、繁殖、传播与致病。

同时,在研究中我们也发现,这些全局调控子影响的不仅仅是鼠疫菌生物学功能中的某个方面,往往在鼠疫菌的生存、传播与致病等多个方面中均扮演重要角色,因此,这些调控机制的解析能够帮助我们更好地认识鼠疫菌的生物学功能及流行病学特征,并促进我们了解鼠疫菌在进化过程中某些基因水平或生物学特性改变的意义。我们发现,对单个调控子来讲,它对鼠疫菌的生物膜形成与毒力的影响往往是相反的,激活生物膜形成的调控子往往同时抑制鼠疫菌毒力因子的表达,而抑制生物膜形成的调控子却反而同时促进鼠疫菌毒力,最典型的如 RovA 与 RovM 调控子对、PhoP-PhoQ 二元调控系统等。我们认为这可能是鼠疫菌在漫长的进化过程中通过不断地发生适应性的改变而形成的机制。不同于假结核菌,鼠疫菌在传播过程中要经历跳蚤和哺乳动物两个宿主,这两个宿主内的生存环境是截然不同的;在跳蚤体内时,鼠疫菌的致病因子大都处于低表达状态,而生物膜因子处于高表达状态,因为此时鼠疫菌要通过增强生物膜形成能力来提高自身的经跳蚤传播能力;而进入哺乳动物体内后,鼠疫菌的生物膜因子大都处于低表达状态,而毒力因子处于高表达状态,因为此时鼠疫菌为了更好地生存、侵袭与致病要通过毒力因子的大量激活来增强自身的存活能力与致病性。由此可见,无论鼠疫菌在跳蚤体内或哺乳动物体内,其生物膜因子与毒力因子的表达水平均是相反的,这也解释了为何许多全局调控子对鼠疫菌生物膜与毒力的调控往往是相反的,是适应鼠疫菌生存、传播与致病的一个重要体现。而且,这些重要调控子自身的表

达往往都会受到环境信号因子如温度、pH 值、离子浓度、代谢物水平等的影响;如温度影响 RovM 的表达,特定的 pH 值、 Mg^{2+} 浓度下 PhoP 才可正常表达,碳代谢水平影响 CRP 表达,铁代谢水平影响 Fur 表达等。这也是鼠疫菌各级调控子能够精确有序地调控各功能基因表达的重要基础,即通过感受特定环境信号的刺激后,调控子才得到激活或抑制,使得相关的基因调控环路有序地开启与闭合。同时,不同调控子之间也存在相互作用,从而形成一张复杂而有序的鼠疫菌基因调控网络,将负责鼠疫菌生存、增殖、传播、侵袭、致病的功能基因有机地结合起来。基因调控网络的深入解析能够帮助我们充分认识鼠疫菌的传播及致病机制,寻找影响鼠疫菌生命活动的关键靶点对鼠疫的防治及未来战场中鼠疫菌可能作为生物战剂的防护均有重要意义。

我们相信,随着生物信息学、测序技术及基因组学、蛋白质组学等各项组学技术的飞速发展,也必将为细菌基因转录调控的研究方法、研究策略及研究成果带来深远而巨大的影响,帮助我们宏观、微观两个角度更充分地认识细菌基因转录调控网络,为通过控制传播途径来防控鼠疫策略的实施奠定理论基础。

REFERENCES

- [1] Hastie JL, Williams KB, Bohr LL, et al. The anti-sigma factor RsiV is a bacterial receptor for lysozyme: co-crystal structure determination and demonstration that binding of lysozyme to RsiV is required for σ activation[J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(9): e1006287
- [2] Davis MC, Kesthely CA, Franklin EA, et al. The essential activities of the bacterial sigma factor[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 63(2): 89-99
- [3] Perry RD, Craig SK, Abney J, et al. Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of *Yersinia pestis*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(3): 804-815
- [4] Zhang YQ, Gao H, Wang L, et al. Molecular characterization of transcriptional regulation of rovA by PhoP and RovA in *Yersinia pestis*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25484
- [5] Baños RC, Pons JI, Madrid C, et al. A global modulatory role for the *Yersinia enterocolitica* H-NS protein[J]. *Microbiology*, 2008, 154(5): 1281-1289
- [6] Vadyvaloo V, Viall AK, Jarrett CO, et al. Role of the PhoP-PhoQ

- gene regulatory system in adaptation of *Yersinia pestis* to environmental stress in the flea digestive tract[J]. *Microbiology*, 2015, 161(6): 1198-1210
- [7] Zhou D, Yang R. Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(19/20): 2260-2290
- [8] Kontur C, Kumar S, Lan X, et al. Whole genome sequencing identifies a novel factor required for secretory granule maturation in *Tetrahymena thermophila*[J]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2016, 6(8): 2505-2516
- [9] Borrill P, Harrington SA, Uauy C. Genome-Wide sequence and expression analysis of the NAC transcription factor family in polyploid wheat[J]. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2017, 7(9): 3019-3029
- [10] LeBmeier L, Alkhateeb RS, Schulte F, et al. Applying DNA affinity chromatography to specifically screen for sucrose-related DNA-binding transcriptional regulators of *Xanthomonas campestris*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 232: 89-98
- [11] Si HM, Zhang F, Wu AN, et al. DNA microarray of global transcription factor mutant reveals membrane-related proteins involved in n-butanol tolerance in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 114
- [12] Feng YW, Zheng M, Gan SJ, et al. Identification of potential gene targets in systemic vasculitis using DNA microarray analysis[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(6): 3665-3673
- [13] Schmid CD, Bucher P. ChIP-Seq data reveal nucleosome architecture of human promoters[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 831-832
- [14] Bos KI, Herbig A, Sahl J, et al. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus[J]. *eLife*, 2016, 5: e12994
- [15] Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*—etiologic agent of plague[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1997, 10(1): 35-66
- [16] Zhou DS, Yang RF. Formation and regulation of *Yersinia* biofilms[J]. *Protein & Cell*, 2011, 2(3): 173-179
- [17] Fang N, Qu S, Yang HY, et al. HmsB enhances biofilm formation in *Yersinia pestis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 685
- [18] Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, et al. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(6): 1419-1432
- [19] Bobrov AG, Kirillina O, Ryjenkov DA, et al. Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(2): 533-551
- [20] Ren GX, Fan S, Guo XP, et al. Differential regulation of c-di-GMP metabolic enzymes by environmental signals modulates biofilm formation in *Yersinia pestis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 821
- [21] Darby C, Ananth SL, Tan L, et al. Identification of *gmhA*, a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage, by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm system[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(11): 7236-7242
- [22] Tan L, Darby C. *Yersinia pestis* is viable with endotoxin composed of only lipid A[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(18): 6599-6600
- [23] Patel CN, Wortham BW, Lines JL, et al. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(7): 2355-2363
- [24] Majdalani N, Gottesman S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2005, 59: 379-405
- [25] Sun YC, Guo XP, Hinnebusch BJ, et al. The *Yersinia pestis* Rcs phosphorelay inhibits biofilm formation by repressing transcription of the diguanylate cyclase gene *hmsT*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(8): 2020-2026
- [26] Sun YC, Hinnebusch BJ, Darby C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(23): 8097-8101
- [27] Fang N, Yang HY, Fang HH, et al. RcsAB is a major repressor of *Yersinia* biofilm development through directly acting on *hmsCDE*, *hmsT*, and *hmsHFRS*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9566
- [28] Zhou DS, Qin L, Han YP, et al. Global analysis of iron assimilation and fur regulation in *Yersinia pestis*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 258(1): 9-17
- [29] Gao H, Zhou DS, Li YL, et al. The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(8): 3063-3075
- [30] Sun FJ, Gao H, Zhang YQ, et al. Fur is a repressor of biofilm formation in *Yersinia pestis*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52392
- [31] Maddocks SE, Oyston PCF. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 12): 3609-3623
- [32] Heroven AK, Dersch P. RovM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(5): 1469-1483
- [33] Vadyvaloo V, Hinz AK. A LysR-Type transcriptional regulator, RovM, senses nutritional cues suggesting that it is involved in metabolic adaptation of *Yersinia pestis* to the flea gut[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137508
- [34] Liu L, Fang HH, Yang HY, et al. Reciprocal regulation of *Yersinia pestis* biofilm formation and virulence by RovM and RovA[J]. *Open Biology*, 2016, 6(3): 150198
- [35] Tam C, Demke O, Hermanas T, et al. YfbA, a *Yersinia pestis* regulator required for colonization and biofilm formation in the gut of cat fleas[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(6): 1165-1173
- [36] Marceau M. Transcriptional regulation in *Yersinia*: an update[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2005, 7(2): 151-177
- [37] Boolgakova EG, Krasnov YM, Sukhonosov IY, et al. Structural organization of intact and damaged by IS100 element porin genes adjacent to the PGM region in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains[J]. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2016, 31(2): 58-68
- [38] Tencati M, Tapping RI. Resistance of mice of the 129 background to *Yersinia pestis* maps to multiple loci on chromosome 1[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(10): 2904-2913
- [39] Rempe KA, Hinz AK, Vadyvaloo V. Hfq regulates biofilm gut blockage that facilitates flea-borne transmission of *Yersinia pestis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(8): 2036-2040
- [40] Zhang YQ, Wang L, Fang N, et al. Reciprocal regulation of pH 6

- antigen gene loci by PhoP and RovA in *Yersinia pestis* biovar *Microtus*[J]. *Future Microbiology*, 2013, 8(2): 271-280
- [41] Bao R, Nair MKMN, Tang WK, et al. Structural basis for the specific recognition of dual receptors by the homopolymeric pH 6 antigen (Psa) fimbriae of *Yersinia pestis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(3): 1065-1070
- [42] Weening EH, Cathelyn JS, Kaufman G, et al. The dependence of the *Yersinia pestis* capsule on pathogenesis is influenced by the mouse background[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(2): 644-652
- [43] Cathelyn JS, Crosby SD, Lathem WW, et al. RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(36): 13514-13519
- [44] Felek S, Tsang TM, Krukons ES. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(10): 4134-4150
- [45] Huang XZ, Lindler LE. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(12): 7212-7219
- [46] Makoveichuk E, Cherepanov P, Lundberg S, et al. pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(2): 320-330
- [47] Waller H, Ulusu Y, Lakey JH. CafI of *Yersinia pestis* forms complex highly stable protein polymers and hydrogel scaffolds[J]. *Biophysical Journal*, 2016, 110(3): 339a
- [48] Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, et al. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector[J]. *Science*, 2002, 296(5568): 733-735
- [49] Lathem WW, Price PA, Miller VL, et al. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague[J]. *Science*, 2007, 315(5811): 509-513
- [50] Zimble DL, Schroeder JA, Eddy JL, et al. Early emergence of *Yersinia pestis* as a severe respiratory pathogen[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7487
- [51] Wilkinson SP, Grove A. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2006, 8(1): 51-62
- [52] Dube PH, Handley SA, Revell PA, et al. The rovA mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(6): 3512-3520
- [53] Nagel G, Lahrz A, Dersch P. Environmental control of invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(6): 1249-1269
- [54] Revell PA, Miller VL. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(3): 677-685
- [55] Ellison DW, Lawrenz MB, Miller VL. Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA[J]. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(6): 296-300
- [56] Heroven AK, Nagel G, Tran HJ, et al. RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(3): 871-888
- [57] Simonet M, Riot B, Fortineau N, et al. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(1): 375-379
- [58] Derbise A, Chenal-Francisque V, Pouillot F, et al. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(4): 1145-1157
- [59] Li YJ, Dai EH, Cui YJ, et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China[J]. *PLoS One*, 2008, 3(5): e2166
- [60] Zhan LJ, Han YP, Yang LP, et al. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is required for both virulence and expression of the minimal CRP regulon in *Yersinia pestis* biovar *Microtus*[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(11): 5028-5037
- [61] Kim TJ, Chauhan S, Motin VL, et al. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(24): 8890-8900
- [62] Liu HH, Wang H, Qiu JF, et al. Transcriptional profiling of a mice plague model: insights into interaction between *Yersinia pestis* and its host[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2009, 49(1): 92-99
- [63] Lathem WW, Schroeder JA, Bellows LE, et al. Posttranscriptional regulation of the *Yersinia pestis* cyclic AMP receptor protein Crp and impact on virulence[J]. *mBio*, 2014, 5(1): e01038-13
- [64] Liu L, Fang HH, Yang HY, et al. CRP is an activator of *Yersinia pestis* biofilm formation that operates via a mechanism involving *gmhA* and *waaAE-coaD*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 295
- [65] Rebeil R, Jarrett CO, Driver JD, et al. Induction of the *Yersinia pestis* PhoP-PhoQ regulatory system in the flea and its role in producing a transmissible infection[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(9): 1920-1930
- [66] Liu L, Fang N, Sun YC, et al. Transcriptional regulation of the *waaAE-coaD* operon by PhoP and RcsAB in *Yersinia pestis* biovar *Microtus*[J]. *Protein & Cell*, 2014, 5(12): 940-944