

细菌警报素(p)ppGpp 代谢的关键调控者：RSH 蛋白的功能多样性

王淼^{1,2}, 项雨霏^{1,2}, 贺龙龙^{1,2}, 周秦^{1,2}, 许丹^{1,3*}

1 西安交通大学口腔医院, 陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室, 陕西 西安

2 西安交通大学口腔医院, 口腔种植科, 陕西 西安

3 西安交通大学 生命科学与技术学院, 教育部生物医学信息工程重点实验室, 线粒体生物医学研究所, 陕西 西安

王淼, 项雨霏, 贺龙龙, 周秦, 许丹. 细菌警报素(p)ppGpp 代谢的关键调控者：RSH 蛋白的功能多样性[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 1958-1975.

WANG Miao, XIANG Yufei, HE Longlong, ZHOU Qin, XU Dan. Functional diversity of RSH proteins, key regulators of bacterial alarmone (p)ppGpp metabolism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(5): 1958-1975.

摘要：细菌的严紧反应(stringent response)是细菌在面临恶劣生存环境时，通过改变新陈代谢并降低生长速度，以增强存活和适应环境能力的一种适应性反应。此反应由鸟苷四磷酸(guanosine tetraphosphate, ppGpp)和鸟苷五磷酸(guanosine pentaphosphate, pppGpp) (合称(p)ppGpp)的快速积累所介导，在微生物应对环境变化中发挥关键作用。细菌内的(p)ppGpp 水平由 RelA/SpoT 同源蛋白(RelA/SpoT homologues, RSH)调控，包括小警报素合成酶(small alarmone synthetases, SAS)、小警报素水解酶(small alarmone hydrolases, SAH)以及双功能蛋白 Rel。此外，近期研究发现了一种新的细菌警报素腺苷四磷酸(adenosine tetraphosphate, ppApp)和腺苷五磷酸(adenosine pentaphosphate, pppApp) (合称(p)ppApp)，它能调控细菌的多种生物过程。鉴于不同细菌中涉及(p)ppGpp 代谢的酶有所不同，本文对已知的 RSH 蛋白的结构及其生化特性进行系统的分类与综述，并总结其生物学功能，以促进未来在这一领域的深入研究与发展。

关键词：(p)ppGpp; 细菌严紧反应; (p)ppApp; RelA/SpoT 同源蛋白; 核苷酸代谢

资助项目：国家自然科学基金(32270188)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270188).

*Corresponding author. E-mail: dan.xu@xjtu.edu.cn

Received: 2024-11-15; Accepted: 2025-01-23; Published online: 2025-03-05

Functional diversity of RSH proteins, key regulators of bacterial alarmone (p)ppGpp metabolism

WANG Miao^{1,2}, XIANG Yufei^{1,2}, HE Longlong^{1,2}, ZHOU Qin^{1,2}, XU Dan^{1,3*}

1 Key Laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research, Hospital of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China

2 Department of Implant Dentistry, Hospital of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China

3 Institute of Mitochondrial Biology and Medicine, Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of the Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China

Abstract: The bacterial stringent response refers to the adaptive reaction that bacteria exhibit when faced with adverse environmental conditions, altering their metabolism and reducing the growth rate to enhance survival and adaptability. The rapid accumulation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) and guanosine pentaphosphate (pppGpp), collectively referred to as (p)ppGpp in this article, mediates the stringent response, playing a crucial role in microbial adaptation to environmental changes. The levels of (p)ppGpp within bacteria are regulated by RelA/SpoT homologue (RSH) proteins, which include small alarmone synthetases (SASs), small alarmone hydrolases (SAHs), and bifunctional proteins such as Rel. Furthermore, recent studies have identified a new bacterial alarmone, adenosine tetraphosphate (ppApp) and adenosine pentaphosphate (pppApp), collectively referred to as (p)ppApp, which is involved in the regulation of various biological processes in bacteria. The enzymes involved in (p)ppGpp metabolism vary among different bacterial species. This study systematically classifies and reviews the structural and biochemical characteristics of the known RSH proteins and summarizes their biochemical functions, aiming to promote further exploration and development in this field.

Keywords: (p)ppGpp; bacterial stringent response; (p)ppApp; RelA/SpoT homologue proteins; nucleotide metabolism

当细菌感知到环境中存在酸碱变化、温度变化、营养不足和抗生素等不良因素时,细菌会通过严紧反应(stringent response)调整自身的生理状态,以节省资源,改变新陈代谢,降低生长速度,从而提高在不同环境中的适应能力和在恶劣环境中的存活率^[1-2](图1)。严紧反应主要通过(p)ppGpp这2种线性核苷酸的快速积累来介导,因其强大的全局调控能力,(p)ppGpp也被称为“魔点核苷酸(magic spot nucleotide)”^[3]。通过正构或变构的方式,(p)ppGpp与下游各种酶靶点结合,全局调控细菌的多种生物过程,

包括DNA复制、转录、翻译、核苷酸代谢、毒力、抗生素耐受性、持留性、生物被膜形成、产孢甚至肠道定殖等^[3-5]。研究表明,(p)ppGpp的信号通路在不同细菌中存在差异,革兰氏阴性菌主要通过直接结合RNA聚合酶调控基因转录,而革兰氏阳性菌则主要通过间接方式影响GTP水平^[6],进而影响基因表达、细胞周期等过程,调控核糖体和代谢类蛋白等资源的分配,帮助细菌提高抗生素耐受性、适应营养缺乏等不利环境^[7]。因此,细菌内部的(p)ppGpp水平在维持细胞稳态及适应性变化中发挥重要作用^[8]。

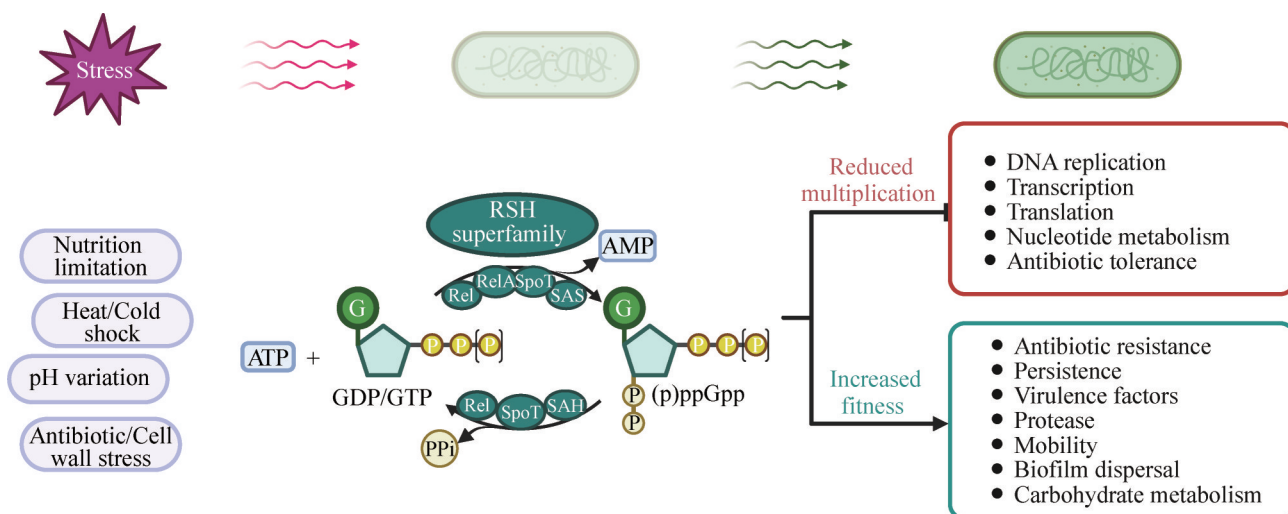


图1 (p)ppGpp代谢在细菌严紧反应中对细菌毒力、抗生素耐药等细菌活动的影响

Figure 1 The effects of (p)ppGpp metabolism on bacterial virulence, antibiotic resistance, and other bacterial activities during the stringent response.

细菌内的(p)ppGpp水平由 RelA/SpoT 同源蛋白(RelA/SpoT homologues, RSH)家族蛋白生成及调节, 包括小警报素合成酶(small alarmone synthetases, SAS)、小警报素水解酶 (small alarmone hydrolases, SAH)以及含有合成酶/水解酶结构域的双功能(多结构域)蛋白 Rel^[9]。目前, 对 RSH 家族蛋白的理解主要基于对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)中 2 个 RSH 蛋白的广泛实验研

究。RSH 蛋白的分布呈现出显著的多样性, 这与其在不同细菌中的生物学功能密切相关。大多数 γ -变形菌门(*Gammaproteobacteria*)和许多 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)编码 2 个 Rel 蛋白(如大肠杆菌中的 RelA 和 SpoT), 这可能是因 *rel* 基因经历了基因复制(图 2)。相比之下, 其他大部分细菌只编码 1 个具有合成/水解双向功能的 Rel 蛋白。大多数革兰氏阳性菌, 如厚壁

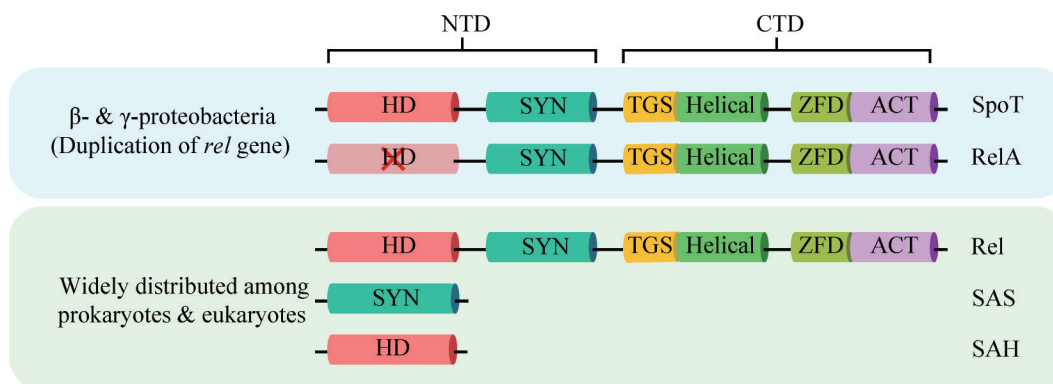


图2 细菌中RSH的结构域结构图

Figure 2 Domain structure of the RSHs in bacteria. SYN: Synthetase domain; HD: Hydrolase domain; TGS: TGS domain (Threonyl-tRNA synthetase-GTPase-SpoT); Helical: α -helical domain; ZFD: Putative zinc finger domain; ACT: Acetolactate synthetase-chorismate mutase-tyrR domains.

菌门(*Firmicutes*)和放线杆菌纲(*Actinobacteria*), 能够编码 1 个双功能的 Rel 蛋白和 1 个或 2 个单功能 SAS 和/或 SAH。值得注意的是, SAS 和 SAH 在革兰氏阴性菌中较为罕见, 仅存在于少数特定菌种中, 如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中的 RelV^[10]。

RSH 蛋白对(p)ppGpp 的代谢主要依靠保守的合成功能域(synthetase domain, Syn)和水解功能域(hydrolase domain, HD)来完成。Rel 和 SAS 蛋白的合成功能域主要负责 (p)ppGpp 的合成, 由 ATP 向底物 GDP/GTP 贡献双磷酸盐(PPi)生成 ppGpp/pppGpp 和副产物 AMP。相比之下, (p)ppGpp 的水解则通过 Rel 和 SAH 的水解功能

域完成, 将(p)ppGpp 水解为 GDP/GTP 和 PPi^[11] (图 3)。除了(p)ppGpp, 在细菌中也发现了鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, pGpp) (由 GMP 和 ATP 生成), 且已经证实 pGpp 能够与(p)ppGpp 一样感知细菌外部环境的变化^[12]。最新研究发现, RSH 家族蛋白及其类似同源蛋白还可以合成(p)ppApp, 细菌内部(p)ppApp 的快速积累会导致 ATP 的消耗和细菌基本代谢途径的广泛失调, 从而导致细菌死亡^[9,13-14], 因此(p)ppApp 有望成为继(p)ppGpp 之后下一个备受关注的细菌全局调控因子。因此, pGpp 和(p)ppApp 这 2 种新核苷酸类似物信号分子也是研究 RSH 家族蛋白功能时必须考虑的因素。

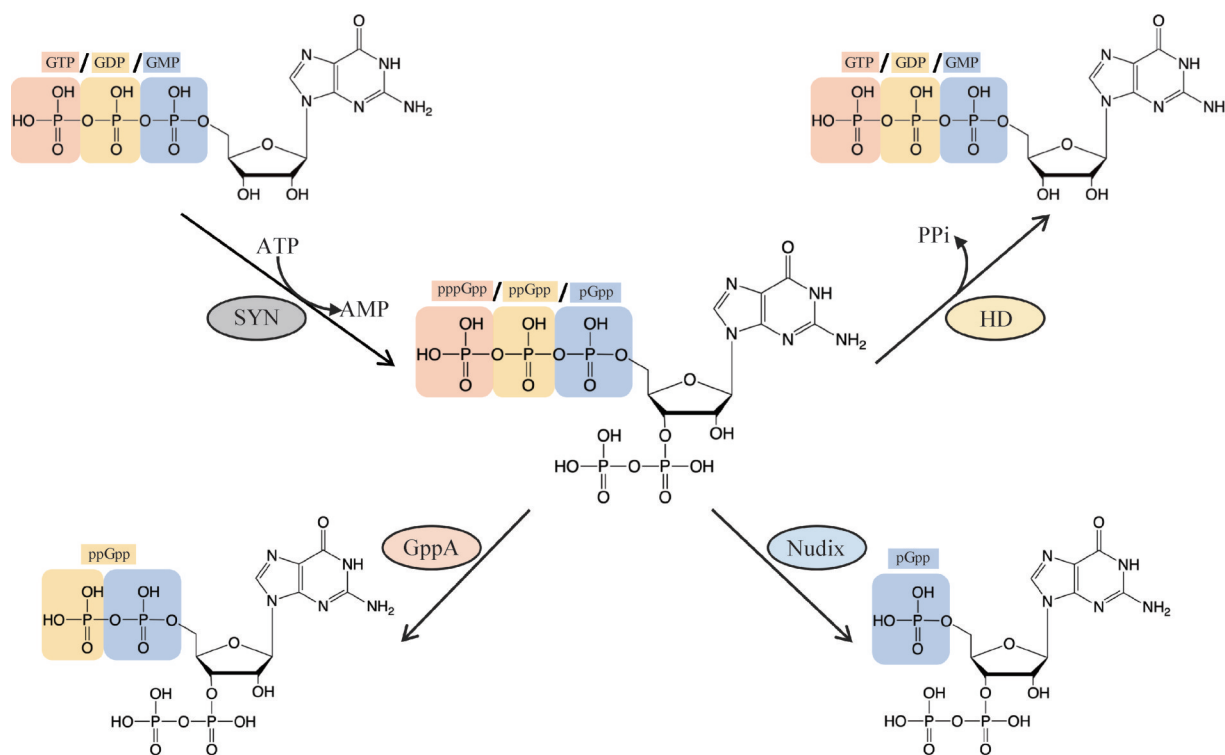


图3 (p)ppGpp在细菌中的代谢

Figure 3 Metabolism of (p)ppGpp in bacteria. The synthetase domain (SYN, grey) of RSH enzymes facilitates the transfer of a pyrophosphate group from ATP to the ribose portion of GTP, GDP or GMP, creating pppGpp, ppGpp or pGpp, respectively. This reaction also results in the production of an AMP molecule. The hydrolase domain (HD, yellow) is accountable for reforming GTP, GDP or GMP by removing the pyrophosphate group (PPi). The metabolism of (pp)pGpp also involves enzymes beyond the RSH superfamily. GppA (pink) hydrolyzes pppGpp to ppGpp, while Nudix (blue) hydrolyzes pppGpp/ppGpp to pGpp.

Jimmy 等^[9]对来自不同生命形式的 24 072 个基因组中的 RSH 同源蛋白进行了系统发育分析及分类, 定义了 SAS 的 30 个亚类、SAH 的 11 个亚类和 Rel 的 13 个亚类。目前, 有关(p)ppGpp 的研究大多聚焦于生物学功能层面^[6-7], 对其内部生化功能的探索尚处于初步阶段。本文旨在对已报道细菌中合成和水解(p)ppGpp 的 RSH 家族蛋白进行系统分类并予以综述, 同时全面归纳各类的生化功能, 以期为该领域的深入研究提供重要的参考依据。

1 (p)ppGpp 的合成

1.1 (p)ppGpp 合成酶概述

细菌、藻类和植物均能合成 RSH 家族蛋白^[15]。RSH 蛋白结构中包含(p)ppGpp 合成结构域(Syn), 该结构域中有 5 个高度保守的氨基酸序列, 命名为 Syn1–Syn5 (图 4)。其中, Syn1 负责 ATP 底物的协调; Syn2 含有协调镁离子(Mg^{2+})和 ATP 的 Asp 和 Arg 残基; Syn3 含有协调 GDP/GTP 鸟苷部分的 Tyr 和 His 残基; Syn4

含有协调 Mg^{2+} 的 Glu 残基和有助于 ATP 结合的 Gln 残基; Syn5 中的 His 残基与 ATP 的核糖部分相互作用。目前, 大量的结构和生化研究已经证实, Syn1–Syn5 在 RSH 合成(p)ppGpp 的活性中发挥着重要作用^[16-19]。

目前, RSH 家族蛋白中负责(p)ppGpp 合成的蛋白质主要分为 2 类: 长 RSH 蛋白和 SAS 蛋白。长 RSH 蛋白除了具备功能域外, 通常还包含额外的调控结构域, 这些结构域已被证实参与了更复杂的细菌生存调控过程。相比之下, SAS 蛋白结构较为简单, 仅含有负责(p)ppGpp 合成的功能域, 而不具备其他调控结构域。本研究总结了几种已报道的典型 SAS 蛋白(包括 RelQ、RelP、ActRel、RelV)的生化功能及活性特点(表 1)。这些研究不仅深化了目前对 RSH 蛋白结构与功能的理解, 还揭示了不同 RSH 蛋白在合成 pGpp、ppGpp 和 pppGpp 方面的倾向性差异, 暗示它们可能在细菌中承担着不同的响应机制。这些发现将增进对(p)ppGpp 在细菌严紧反应中的作用及其内在关系的认识, 同时也为后续探究其在细菌应对不同压力条件时的作

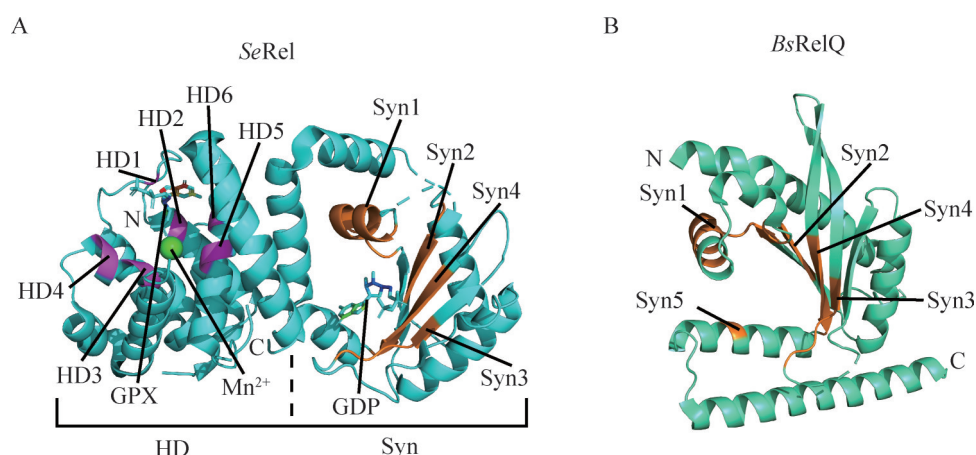


图4 代表性长RSH合成酶和小警报素合成酶(SAS)的晶体结构

Figure 4 Crystal structure of representative long RSH and small alarmone synthetase. A: Bifunctional SeRel (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Rel) containing the hydrolase and synthetase domains bound to GPX and GDP, respectively (PDB: 1VJ7 chain B)^[16]; B: Synthetase domain of BsRelQ (*Bacillus subtilis* RelQ, PDB: 5DEC)^[17]. HD1–HD6 motifs are shown in purple; Syn1–Syn5 are shown in orange. Figures were generated with PyMOL.

表1 细菌中的小警报素合成酶

Table 1 Small alarmone synthetases in bacteria

Bacteria	SAS type	Biochemical function	Other references
<i>Staphylococcus aureus</i>	RelP (tetramer)	Substrates: GMP, GDP, GTP, IDP, ITP Prefers: GDP>GTP>GMP ^[20] Stronger (pp)pGpp-synthesis activity than RelQ ^[20] Activated by Zn ²⁺ ^[21]	[22-25]
	RelQ (tetramer)	Substrates: GMP, GDP, GTP, IDP, ITP Prefers: GDP>GTP>GMP ^[20] (pp)pGpp allosterically regulates ^[20]	
<i>Streptococcus mutans</i>	RelP	Substrates: GMP, GDP, GTP Prefers: GTP>GDP>GMP ^[20,26] Weakly synthesize pGpp ^[20,26] Stronger (pp)pGpp-synthesis activity than RelQ ^[20,27]	[28-32]
	RelQ	Substrates: GMP, GDP, GTP Prefers: GTP>GDP>GMP ^[20] Weakly synthesize pGpp ^[20,26] (pp)pGpp allosterically regulates ^[20]	
<i>Bacillus subtilis</i>	RelP (tetramer)	Substrates: GMP, GDP, GTP, ADP, ATP Synthesize of (pp)pGpp, ppApp and AppppA ^[33]	[17,33-34]
	RelQ (tetramer)	Substrates: GMP, GDP, GTP Prefers: GDP>GTP ^[17] pppGpp allosterically regulates ^[17]	
<i>Enterococcus faecalis</i>	RelQ (tetramer)	Substrates: GMP, GDP, GTP, IDP, ITP Synthesize pGpp ^[26,35] Prefers: GDP>GMP>GTP ^[26] (pp)pGpp allosterically regulates ^[20] Negative allosteric regulation by ssRNA ^[35]	[8,26,35-36]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	RelQ	Substrates: GDP, GTP ^[37]	[37]
<i>Mycolicibacterium (Mycobacterium) smegmatis</i>	ActRel (RelZ)	Substrates: GMP, GDP, GTP Synthesize pGpp ^[39] Prefers: GMP>GDP>GTP ^[39] 64.5 kDa protein with RNase HII domain Bifunctional protein with (p)ppGpp synthetase and RNase HII activity ^[40] ssRNA inhibits pGpp synthesis ^[39]	[41]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	RelP	No activity ^[42]	
	ActRel (RelS)	Substrates: GMP, GDP, GTP Prefers: GDP>GTP>GMP ^[42] 39.8 kDa longer than representative SAS Most active at neutral pH conditions and at low temperatures ^[42]	
<i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i>	RelQ	Substrates: GMP, GDP, GTP Utilize GMP, GDP and GTP form pGpp ^[43]	[44]
<i>Vibrio cholerae</i>		Substrates: GDP, GTP 259 aa (minimal activity length is 189 aa)	[10,45-46]

用机制提供了线索。未来深入的研究将逐步揭开 RSH 家族蛋白及 (p)ppGpp 在不同微生物中调控细菌响应环境变化所涉及的复杂机制。

1.2 长 RSH 合成酶 [long RSH synthetases (Rel/RelA/SpoT)]

长 RSH 合成酶是多功能域蛋白, 主要包括 N 端 (p)ppGpp 合成水解催化结构域 (N-terminal domain, NTD) 和 C 端调控结构域 (carboxy-terminal domain, CTD)。其中 NTD 的典型结构包含水解酶结构域 (HD) 和合成酶结构域 (Syn), 而 CTD 则由多个具有特定调控或配体结合功能的结构域组成, 如 TGS 结构域 (threonyl-tRNA synthetase-GTPase-SpoT)、 α -螺旋结构域 (α -helical domain)、锌指结构域 (putative zinc finger domain) 和 ACT 结构域 (acetolactate synthetase-chorismate mutase-tyrR) (图 2)。研究表明, RSH 的 C 端结构域能够整合环境信号并调节酶活性, 确保细菌在动态变化的环境中维持适宜的代谢状态, 然而其更多功能尚待进一步探索。

在不同环境条件下, 细菌会启动不同的 (p)ppGpp 合成机制。在氨基酸饥饿条件下, 脱酰化的 tRNA 作为关键的激活信号, 会激发 RelA 和 Rel 合成酶的活性。具体而言, 当这些

脱酰化的 tRNA 占据核糖体上空的 A 位点时, 会激活 RelA/Rel, 进而触发 (p)ppGpp 的合成 (图 5A)。相反, 当 RelA 处于核糖体外, 或者与未充载的 tRNA 形成复合结构时, 其自身会呈现出“闭合”或“半开”的构象状态, 在这种状态下, RelA 无法有效激活 (p)ppGpp 的合成反应^[1,47]。

然而在脂肪酸饥饿条件下, 大肠杆菌中 (p)ppGpp 的合成由 SpoT 负责, 这与氨基酸缺乏时 RelA 单独发挥作用的模式不同。细胞内的酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 是脂肪酸代谢通路中的关键成分, 其具备激活 SpoT 的合成酶活性的能力^[48-49] (图 5B)。脂肪酸饥饿促使 SpoT 的 TGS 结构域与 ACP 发生相互作用, 进而引发 SpoT 构象变化, 促进 (p)ppGpp 的合成^[49]。因此, ACP 可能充当着代谢传感器的角色, 感知细胞脂肪酸状态并向 SpoT 传递信息。值得注意的是, ACP 对 SpoT 的调控作用似乎仅存在于同时拥有 RelA 和 SpoT 蛋白的细菌中, 如大肠杆菌和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。然而, SpoT 与 ACP 之间相互作用以及二者结合过程的中间环节仍需进一步研究^[37]。

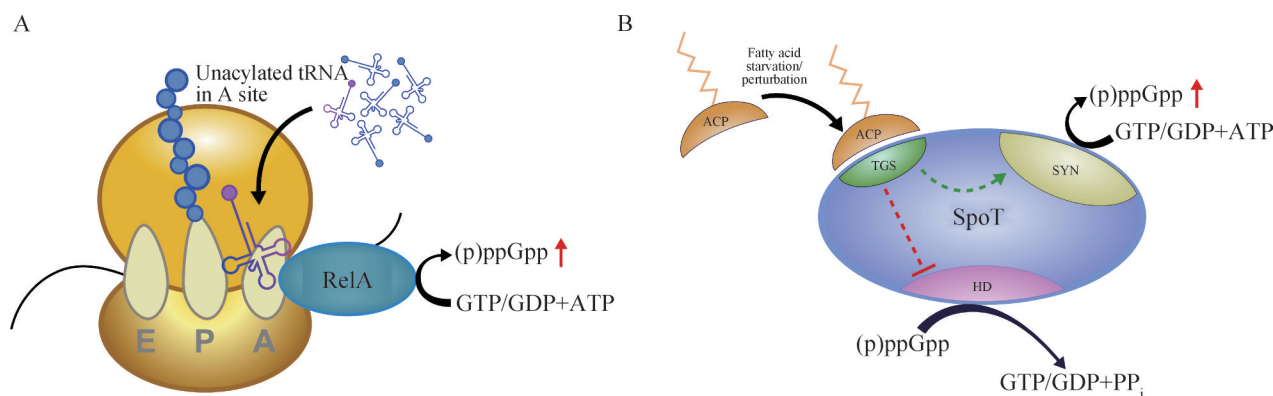


图5 长RSH蛋白调节的(p)ppGpp水平受未充载的tRNA和ACP调控

Figure 5 (p)ppGpp levels from long RSH proteins are regulated by uncharged tRNA and ACP. A: Under conditions of amino acid starvation, ribosome-bound RelA detects uncharged tRNA leading to (p)ppGpp accumulation; B: Under conditions of fatty acid starvation, TGS domain within SpoT interacts with ACP, enhancing the activity of (p)ppGpp synthesis and inhibiting (p)ppGpp hydrolysis.

1.3 小警报素合成酶(SAS)

1.3.1 RelP 和 RelQ

RelP (也称 YwaC 和 SAS2)和 RelQ (也称 YjbM 和 SAS1)是目前研究最深入的 SAS 蛋白,主要存在于厚壁菌门的细菌中,例如变异链球菌 (*Streptococcus mutans*)^[27]、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[34]、单核增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)^[50]、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) (仅 RelQ)^[26,35-36] 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)^[20,22]。RelQ 具有与长 RSH 蛋白类似的合成结构域(Syn)^[17],并通过 $\alpha 1$ 和 $\alpha 5$ 螺旋的延伸形成一个具有中央裂隙的对称四聚体,其中 4 个活性位点紧密协作(图 4B)。RelP 和 RelQ 的主要区别在于 G-Loop

区域的灵活性,这影响了它们对 GDP 和 GTP 底物的协调能力,进而导致它们在合成(p)ppGpp 的能力上有所不同。具体而言,RelQ 的 G-Loop 呈无序状态,而 RelP 的 G-Loop 则呈有序结构(图 6)。因此,RelP 的(p)ppGpp 合成活性高于 RelQ,并且其活性不依赖外部信号的触发^[20,22,26-27]。尽管存在这些差异,RelP 和 RelQ 也有相似之处:两者都更倾向于选择 GDP 而非 GTP 作为底物,且在合成效率上,ppGpp 的生成速率约为 pppGpp 的 4 倍^[20,51]。这种偏好性和合成效率揭示了它们在不同环境条件下调节细菌内(p)ppGpp 水平的独特机制。

RelQ 蛋白的活性受(p)ppGpp 和单链 RNA (ssRNA)双重调控。一方面,(p)ppGpp 能够正向

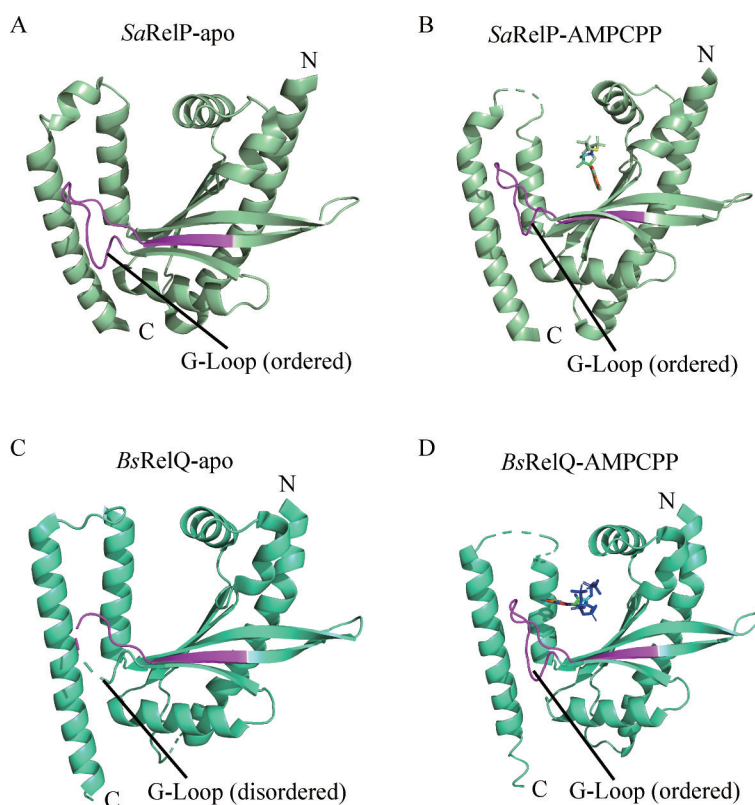


图6 G-Loop对RelP和RelQ活性的影响

Figure 6 The role of G-Loop in RelP and RelQ activity. A–B: Crystal structures of *Staphylococcus aureus* RelP in the apo- and AMPCPP-bound states (PDB: 6FGJ and 6FGX) show an ordered G-Loop (purple color)^[21]; C–D: Crystal structures of *Bacillus subtilis* RelQ in the apo- and AMPCPP-bound states (PDB: 5DEC and 5DED) show a disordered (dashed line) and ordered G-Loop (purple color)^[17]. Figures were generated with PyMOL.

调控 RelQ 合成(p)ppGpp 的活性^[17,20,26]。以枯草芽孢杆菌 RelQ (Bs-RelQ)为例,其四聚体结构中的中央裂隙可以结合 2 个别构(p)ppGpp 分子,使 (p)ppGpp 合成活性提高约 10 倍,其中 pppGpp 的正向调节效果优于 ppGpp^[17,35]。另一方面,研究发现 ssRNA 也能结合至同一裂隙位置,从而抑制粪肠球菌 RelQ (Ef-RelQ)的活性^[35],并且这一作用需要特定的 GGAGG 氨基酸序列存在。当(p)ppGpp 和 ssRNA 竞争结合同一结合位点时,(p)ppGpp 可以逆转 ssRNA 的抑制作用。然而,RelP 缺乏像 RelQ 那样的别构调控位点,因此不受 (p)ppGpp 和 ssRNA 的调控^[51]。

RelP 包含 Zn^{2+} 结合位点。金黄色葡萄球菌中的 RelP 蛋白(Sa-RelP)的晶体结构中,发现了一个由 His-73 和 His-74 组成的潜在金属离子结合位点^[21]。研究表明,低浓度 Zn^{2+} 能够激活 Sa-RelP 的 pppGpp 合成活性,而高浓度 Zn^{2+} 则表现出抑制作用。对 His-73 和 His-74 进行点突变会导致酶活性的完全丧失,这充分凸显了“His-His”对于维持蛋白活性的重要性^[21]。综上所述,RelP 和 RelQ 中发现的这些重要特征,包括 ssRNA、(p)ppGpp 别构刺激以及 Zn^{2+} 作为潜在激活剂等方面,有助于理解细菌在恶劣环境中的适应性反应。

1.3.2 ActRel: RelS 和 RelZ (MS_RHII-RSD)

ActRel 亚类^[9]蛋白以谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)的 RelS 和耻垢分枝菌酸小杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)的 RelZ 为典型代表^[40]。RelS 与 RelZ 的合成酶结构域有较高的相似性,但 RelZ 存在 2 个特殊的结构域: N 端的核糖核酸酶 HII (ribonuclease HII, RNase HII)结构域和 C 端的催化结构域,使其既能够行使 RNA 酶活性,又能合成 pGpp^[40]。活性位点突变研究表明,RelZ 一个结构域的失活并不影响另一个结构域的正常功能。耻垢分枝菌酸小杆菌中的 RelZ 在合成警报素时优先使用 GMP 生成 pGpp,表明 pGpp 在环境响应中可

能具有特殊的生物学功能;谷氨酸棒杆菌中的 RelS 具有温度依赖性,在低温下活性最高,表明 pGpp 的合成可能参与细菌对低温环境的响应^[42]。

1.3.3 RelV

RelV 亚类以霍乱弧菌编码的蛋白为代表^[46,52],由 259 个氨基酸组成,略长于大多数已知的 SAS 蛋白(如 RelQ 和 RelP,约 220 个氨基酸)。RelV 的(p)ppGpp 合成酶活性依赖于合成酶结构域中的 5 个特定氨基酸残基: K107、D129、R132、L150 和 E188^[10]。进一步研究其结构与活性之间的关系,发现维持 RelV 活性所需的最小序列长度为 189 个氨基酸,其中包含由 94 个氨基酸构成的合成酶结构域。这一发现表明,除了核心合成结构域外,RelV 中围绕该合成结构域的侧翼结构在保持(p)ppGpp 合成酶活性时起着至关重要的作用^[10]。

1.3.4 ToxSAS

ToxSAS 是近期发现的编码于毒素-抗毒素 (toxin-antitoxin, TA) 操纵子中的 SAS 蛋白 (ToxSAS)。这些 TA 操纵子在多种细菌物种中普遍存在^[9]。已确认属于 TA 系统的 SAS 酶包括: 枯草芽孢杆菌的 PhRel2、粪杆菌属 (*Coprobacillus* sp.)的 FaRel2、分枝杆菌属噬菌体 (*Mycobacterium phage*)的 PhRel、海纤维单胞菌 (*Cellulomonas marina*)的 FaRel 和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)的 CapRel^[9,53]。ToxSAS 毒性的中和可以通过 2 种方式实现: (1) 相邻的抗毒素蛋白直接与 ToxSAS 毒素结合并使其失活,类似于 II 型毒素-抗毒素系统,即通过蛋白-蛋白结合直接抑制; (2) ToxSAS 的毒性也可以通过具有水解酶活性的 SAH 蛋白间接消除,即替代抗毒素降解(p)ppGpp,类似于 IV 型毒素-抗毒素系统^[54]。

1.3.5 pGpp 的合成

研究发现,除 ppGpp 和 pppGpp 外,鸟苷单磷酸 (guanosine monophosphate, GMP) 也可作为 SAS 蛋白的底物,用于合成第 3 种警报素——

pGpp。这一发现扩展了细菌警报素的种类,从原先的 2 种[(p)ppGpp, 即 pppGpp 和 ppGpp]增加到了 3 种[(pp)pGpp, 包括 pppGpp、ppGpp 以及新发现的 pGpp]。研究表明, pGpp 在功能上与 pppGpp 和 ppGpp 类似, 但也可能具备独特的生物学功能^[26,55]。目前已经证实, 枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、谷氨酸棒杆菌、艰难拟梭菌(*Clostridioides difficile*)、金黄色葡萄球菌和变异链球菌等细菌的 SAS 蛋白能够利用 GMP 作为底物来合成 pGpp (目前 RSH 蛋白合成 pGpp 的能力总结于表 1)。然而, 这些酶合成 pGpp 的效率通常低于合成 ppGpp 和 pppGpp 的效率^[12,26,42-43,56-57]。在已知的 SAS 蛋白中, 只有耻垢分枝菌酸小杆菌的 RelZ 表现出对 GMP 的亲合力高于 GDP 或 GTP^[39]。更特殊的是, 艰难拟梭菌中的 RSH 蛋白(Cdi-RSH 和 Cdi-RelQ)能够使用 GDP 和 GTP 作为底物合成 pGpp。这种功能在其他生物体编码的 RSH 酶中极为罕见, 因为它们通常不会催化 ATP 的磷酸转移至 GDP 或 GTP 以产生 pGpp, 而是生成 ppGpp 或 pppGpp。

总之, pGpp 的合成增加了细菌警报素系统的复杂性, 但目前关于 pGpp 具体生物学功能的探索仍处于初步阶段。未来的研究将致力于阐明不同警报素之间的功能差异, 深入剖析 pGpp 的具体作用机制, 探讨其在不同细菌中的分布规律及其所承载的重要生物学意义。

2 (p)ppGpp 水解

2.1 (p)ppGpp 水解酶结构域概述

(p)ppGpp 的降解关键在于从核糖部分的 3' 位置移除焦磷酸基团, 过程需要锰离子(Mn^{2+})的参与以协助底物结合并促进催化反应(图 3)。水解酶结构域中包含 6 个保守的催化基序(HD1-HD6), 这些基序中的特定氨基酸残基确保了底物的正确排列与酶活性中心的有效催化。例如, HD2、HD3 和 HD5 中的氨基酸通过协调 Mn^{2+} 来稳定底物的位置, 而 HD1 和 HD6 则确

保了鸟嘌呤碱基的精确识别。此外, HD4 中的氨基酸残基对于实际的水解步骤是必不可少的^[16,58]。以下是已知具有警报素水解活性的各个蛋白家族的特性总结。

2.2 长 RSH 水解酶[long RSH hydrolases (Rel/SpoT)]

长 RSH 水解酶(Rel/SpoT, 不包括 RelA)能够将 pppGpp、ppGpp、pGpp 水解为 GTP、GDP、GMP。目前, 已经对来自多种生物体的 Rel/SpoT 蛋白的水解酶结构域进行了结构特性表征研究, 包括嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)、枯草芽孢杆菌、结核分枝杆菌、大肠杆菌和停乳链球菌马样亚种(*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*)等^[1,16,59-61]。这些蛋白的 N 端含有编码 6 个保守催化基序(HD1-HD6)的水解酶结构域, 该结构域由 10 个 α -螺旋和 2 个 β -折叠组成, 形成一个包含 Mn^{2+} 结合位点的活性中心, 这对于发挥水解功能至关重要。

在大肠杆菌中, Rsd 蛋白被鉴定为 SpoT 的直接调节因子, 它与 TGS 结构域相互作用, 激活 SpoT 水解酶活性^[62]。Rsd 蛋白还可能与增强 SpoT 合成酶活性的酰基载体蛋白(ACP)(图 5B)存在竞争关系, 细菌可根据碳水化合物的可用性和代谢状态, 选择性地触发 SpoT 的水解酶或合成酶活性。此外, CgtA (一种与大肠杆菌核糖体相关的关键 GTP 酶)可以结合 GDP、GTP 或 ppGpp, 并作为磷酸化鸟苷的感应器, 调节 SpoT 的水解酶活性, 从而调控细菌内(p)ppGpp 的水平^[63]。在荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)中, 双功能 Rel 酶(Rc-Rel)可以结合支链氨基酸(BCAA), 当 BCAA 浓度较高时, 这种活性能够防止(p)ppGpp 在体内过度积累^[64]。这些调控机制展示了(p)ppGpp 水解酶在不同细菌中的多样性和复杂性, 有助于更好地理解细菌如何在不同环境条件下维持代谢平衡。

2.3 小警报素水解酶(SAH)

SAH 同源物通常由约 200 个氨基酸组成,

相较于长 RSH 水解酶, SAH 拥有高度保守的水解酶活性中心, 但缺乏调控结构域。尽管 SAH 酶在多种生物中广泛存在, 但其确切的催化机制和调控方式至今仍未完全明了。截至目前, 已有 3 种细菌来源的 SAH 酶的晶体结构被解析, 分别是铜绿假单胞菌 SAH^[65]、谷氨酸棒杆菌 SAH 和钩端螺旋体属(*Leptospira*) SAH^[66]。

SAH 酶在体外条件下以 Mn^{2+} 依赖的形式催化 (pp)pGpp 的水解, 而谷氨酸棒杆菌的 SAH 酶则表现出 pH 依赖性的 (pp)pGpp 水解特性^[67]。值得注意的是, 细菌的 SAH 以二聚体形式发挥催化活性, 且不同物种之间的二聚体构象存在差异, 这可能会影响酶的调控机制、稳定状态或对二者同时产生影响。

以谷氨酸棒杆菌 SAH 为例, 该蛋白的 HD1 和 HD6 基序负责协调位于活性位点中心的底物

(p)ppGpp 的鸟嘌呤碱基, 而 HD2、HD3 和 HD5 基序中的特定氨基酸残基则参与 Mn^{2+} 离子的协调(图 7)。研究发现, 对谷氨酸棒杆菌 SAH 中这些关键位点进行突变(如 HD1 中的 R24Q、HD4 中的 E62N/D63N 和 HD6 中的 N126D/N126L)会导致酶活性丧失^[66]。此外, 底物依赖的竞争机制也在一定程度上调控了 SAH 的活性。研究发现, 在 $50 \mu\text{mol/L}$ (p)ppGpp 存在时, (p)ppGpp 的水解活性会受到抑制; 并且随着产物浓度的增加, 水解活性也会受到抑制, 其中 GTP 的抑制作用比 GDP 更为明显。然而, 在钩端螺旋体 SAH 中并未发现两者的抑制效应存在显著差异^[66]。这些发现为进一步理解 SAH 酶的功能机制及其在微生物生理过程中的作用提供了参考。

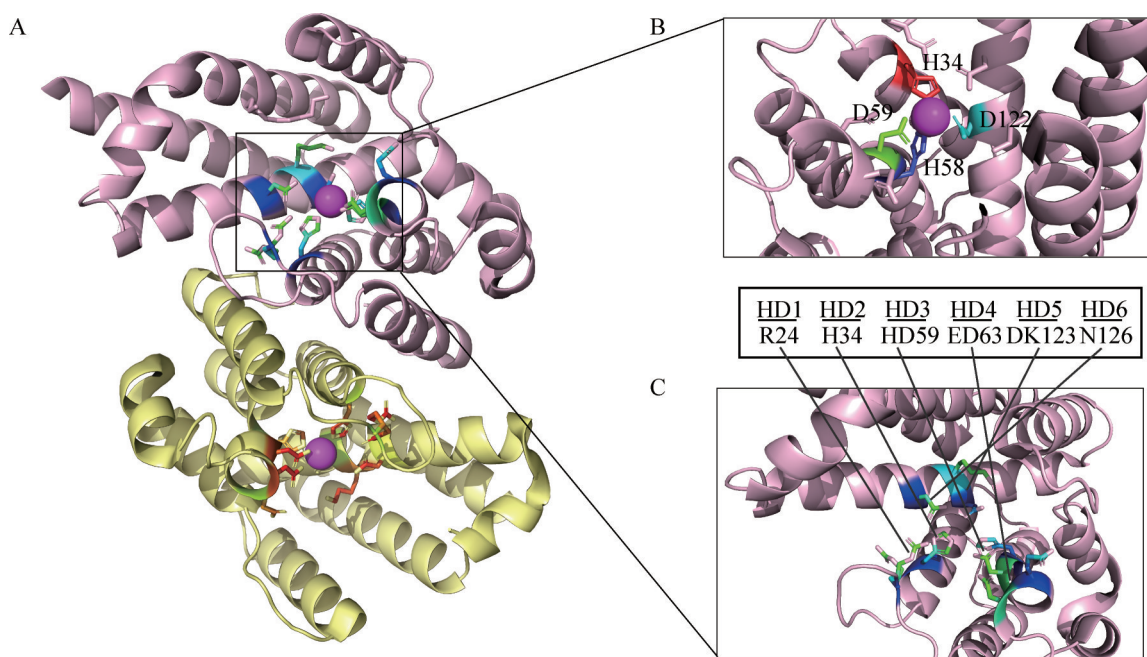


图7 谷氨酸棒杆菌SAH的晶体结构和水解酶结构域HD基序

Figure 7 Crystal structures and HD motifs in *Corynebacterium glutamicum* SAH. A: Crystal structure of the *Corynebacterium glutamicum* SAH dimer, with a single monomer colored in pink and yellow, respectively (PDB: 7QOD)^[66]; B: The Mn^{2+} ion in the active site is represented as a purple sphere and the coordinating residues are illustrated as sticks (H34, H58, D59, D122 shown in red, purple, green, and blue, respectively); C: The closer view highlights the position of 6 HD motifs. Figures were generated with PyMOL.

3 (p)ppGpp 代谢

(p)ppGpp 的内部代谢过程, 主要涉及 pppGpp、ppGpp 和 pGpp 之间通过在 5'-或 3'-位置添加或移除磷酸基团实现相互转换。这也表明这 3 种不同形式的(p)ppGpp 在细胞内的生理调控活性存在差异。已有研究表明, 相较于 pppGpp, ppGpp 在细胞生长速度、RNA/DNA 比例、核糖体 RNA 合成以及转录起始等方面的调控效果更为显著^[5,68-69]。因此, (p)ppGpp 的新陈代谢对于微生物应对外界压力或适应环境变化显得尤为重要。

目前已知参与(p)ppGpp 内部代谢的蛋白, 除了 RSH 家族蛋白之外, 还包括 GPPA、Nudix 和 ApaH 家族的成员(图 3)。RSH 家族蛋白主要负责(p)ppGpp 的合成与降解, 而 GPPA、Nudix 和 ApaH 家族则通过特异性地识别(p)ppGpp 的不同形式, 并对其进行针对性处理, 参与了警报素的互变过程。这种复杂的代谢网络不仅反映了(p)ppGpp 在微生物生理学中的核心地位, 也展示了微生物利用 pGpp、ppGpp、pppGpp 优化自身适应性生存的策略。

4 (p)ppApp 的新陈代谢

4.1 (p)ppApp 的合成

磷酸化的嘌呤分子并非仅限于鸟苷衍生物。

已有研究表明, 在放线菌中发现了能够产生(p)ppApp 的蛋白^[70], 并且在芽孢杆菌进行孢子形成的过程中, 观察到了核糖体依赖的高水平(p)ppApp 积累^[71]。近期, 大肠杆菌 RNA 聚合酶结合 ppApp 的晶体结构被成功解析, 使(p)ppApp 受到了广泛关注^[72]。解析结果表明, ppApp 结合于一个独特的位点, 该位点位于靠近催化中心的 2 个(p)ppGpp 结合位点之外。与(p)ppGpp 不同, (p)ppApp 在特定启动子处能够促进转录, 而 DksA (DnaK 抑制因子 A, 一种 RNA 聚合酶结合蛋白)则抑制这一效应。目前, 细菌内(p)ppApp 的合成主要由 2 个蛋白家族参与: RSH 蛋白和 Tas1 蛋白(表 2)。

在负责合成(p)ppApp 的 RSH 蛋白中, 部分属于毒素-抗毒素(TA)系统中的 ToxSAS 亚类^[9]。然而, 也有不属于 TA 系统的 RSH 蛋白显示出合成(p)ppApp 的能力, 例如在扭托甲基红杆菌(*Methylobacterium extorquens*)中发现的长 RSH 蛋白^[73], 以及在枯草芽孢杆菌^[33]和齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)中发现的 SAS 蛋白也具备合成(p)ppApp 的能力^[74]。

近期, 在铜绿假单胞菌 PA14 株中发现了一种新型 VI 型分泌系统的效应蛋白, 命名为 Tas1 (PA14_01140), 其结构与 RSH 酶家族中的(p)ppGpp 合成酶类似^[13], 但它并不合成(p)ppGpp。相反, Tas1 能够将 ATP 的焦磷酸基

表2 催化(pp)App合成的酶

Table 2 Enzymes catalyzing (pp)App-synthesis

Bacteria/Phage host	SAS type	Biochemical function	References
<i>Methylobacterium (Methylobacterium) extorquens</i>	Rel	Synthesize pppApp and (p)ppGpp	[73]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	Tas1	Synthesize pppApp, ppApp, and pApp	[13]
<i>Bacillus subtilis</i>	RelP	Synthesize ppApp, AppppA, and (pp)ppGpp	[33]
<i>Treponema denticola</i>	SAS	Synthesize pppApp, ppApp, and pApp	[74]
<i>Bacillus subtilis</i> la1a	PhRel2	Toxin SAS	[9]
<i>Coprobacillus</i> sp. D7	FaRel2	Synthesize (p)ppGpp and ppApp	
<i>Mycobacterium phage Phrann</i>	PhRel		
<i>Cellulomonas marina</i>	FaRel		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> AB308	CapRel		

团转移到 ADP 和 ATP 的 3'-OH 基团上, 分别合成 ppApp 和 pppApp。VI 型分泌系统帮助细菌能够直接向邻近细菌注射抗菌毒素。Tas1 作为一种细菌间毒素, 其生成(p)ppApp 的效率非常高, 每分钟可生成近 180 000 个分子的 pApp、ppApp 和 pppApp, 可导致目标细菌内的 ATP 快速消耗, 干扰多个关键代谢途径, 最终导致其他细菌死亡。同时, Tas1 毒素的效果可以通过相应的免疫蛋白 Tis1 (PA14_01130)来中和, Tis1 直接与 Tas1 的活性中心结合, 阻止其毒性作用。此外, SAH 酶可通过降解(p)ppApp 为宿主提供保护^[13], 表明 SAH 酶在细菌间的竞争中也扮演着防御者的角色^[65]。这些发现不仅加深了对 (p)ppApp 生物合成和功能的认识, 还揭示了细菌间相互作用的新机制。

4.2 (p)ppApp 的降解

现已证实 SAH 对(p)ppApp 具有显著的水解活性。铜绿假单胞菌和齿垢密螺旋体中的 SAH 研究揭示了这些酶以 Mn^{2+} 依赖的方式, 非专一性地水解 (p)ppGpp 和 (p)ppApp^[65]。类似地, 在野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和人类 (*Homo sapiens*) 中, 均发现了另一种具有双重活性的 SAH 也能水解 (p)ppGpp 和 ppApp^[75-76]。此外, TA 系统中 FaRel (ToxSAS) 的抗毒素 ATFaRel (属于 SAH 家族) 也能降解 (p)ppGpp 和 ppApp, 以防止 FaRel 介导的警报素中毒^[9]。同时, 也有 SAH 被发现仅水解 (p)ppApp, 而对 (p)ppGpp 无水解活性, 比如扭托甲基红杆菌中的 SAH^[75]。然而, 该酶的分布及其对 (p)ppApp 表现出特异性的分子基础, 仍有待进一步研究。

最近, 一种专门针对 (p)ppApp 的高效水解酶被发现并命名为 Aph1 (adenosine 3'-pyrophosphohydrolase 1)。该蛋白首先在粪拟杆菌 (*Bacteroides caccae*) 中被发现, 并在不同物种中呈现出保守性, 表明 Aph1 在自然界中广泛分布^[14]。粪拟杆菌 Aph1 (BACCAC_01146) 的晶

体结构和活性分析揭示了其与其他 (p)ppGpp 水解酶之间具有显著区别, Aph1 缺乏 (p)ppGpp 的结合位点, 因此只水解 (p)ppApp, 且 Aph1 水解 (p)ppApp 的效率远高于其他已知的 SAH 蛋白。

Aph1 位于一个包含 MuF (protein F of temperate phage Mu) 毒素 Apk2 的基因簇中, 后者通过生成 (p)ppApp 来抑制大肠杆菌的生长。因此, Aph1 是一种能够中和 Apk2 毒素效应的免疫蛋白。此外, Aph1 与粪拟杆菌中另一种非酶性质的免疫蛋白 Tis1 协同作用, 共同抵御毒素的影响。进一步的研究显示, *aph* 基因的变异情况与 Apk2 同源物的多样性相匹配, 这揭示了非酶类免疫蛋白在对抗毒素的过程中可能存在功能差异。综上所述, 这些发现不仅增加了对 (p)ppApp 代谢调控网络的理解, 也为开发全新的抗菌策略提供了思路。

5 总结与展望

(p)ppGpp 作为微生物中的一种重要信号分子, 参与多种生命过程的调控, 包括细胞生长速率、RNA/DNA 比率、核糖体 RNA 合成、转录起始, 并能够助力宿主响应环境不良因素、适应不同生存环境。RSH (RelA/SpoT homologues) 家族蛋白在细菌中广泛存在, 是 (p)ppGpp 合成与降解的主要执行者, 对于维持细胞内 (p)ppGpp 的动态平衡至关重要。由以上文献回顾发现, RSH 家族包含多种亚类蛋白, 且各亚类具有独特的结构组成和生化特性, 这些特性可能在细菌适应特定环境、进行生存竞争中发挥着核心作用, 并为其特异性生物学功能提供了理论基础。

(p)ppGpp 的具体分子机制, 特别是它如何精准调控细胞内的各种代谢活动, 依然是一个需要深入探索的课题。当前的研究多集中于少数几种典型细菌 (如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌), 对于 (p)ppGpp 在不同微生物种类间所展现的作用差异及其背后的调控机制的认识仍有不足,

特别是在病原菌中,它与毒力因子的表达、抗生素抗性等现象紧密相连,这些功能的具体机制仍有待进一步阐明。未来的研究应当更加关注非模式生物和致病菌株,以揭示更多的调控模式。

(p)ppGpp 不仅作为独立的调控分子,还与其他重要的信号分子(如 cAMP、c-di-GMP 等)之间存在复杂的交互作用。这些交互作用在细菌的代谢调节、群体感应、生物膜形成等方面发挥着重要作用。未来的研究应深入探讨(p)ppGpp 与其他信号分子之间的相互作用,揭示其在复杂生物网络中的调控机制。例如,(p)ppGpp 可能通过调控转录因子 DksA,影响 RNA 聚合酶的活性,进而调控基因表达;同时,它也可能与其他第二信使分子协同作用,共同调节细菌的生理状态。

深入理解(p)ppGpp 在宿主-病原体互作中的具体功能,对于开发新型抗菌疗法具有重要意义。研究表明,(p)ppGpp 不仅影响病原菌的毒力,还可能调控宿主的免疫反应。例如,(p)ppGpp 的积累可能导致细菌进入持久态(persister cells),这些持久态细菌对传统抗生素具有极高的耐药性,会导致慢性感染。此外,(p)ppGpp 还可能通过调控细菌的代谢途径,影响宿主的免疫识别和炎症反应。因此,未来的研究应重点探讨(p)ppGpp 在宿主-病原体互作中的具体功能,揭示其如何影响病原菌的毒力和宿主的免疫反应,为开发新型抗菌疗法提供理论依据。

鉴于(p)ppGpp 在细菌生理和病理过程中的重要作用,深入研究 RSH 家族蛋白的结构及生化特性,并开发针对这些蛋白的(p)ppGpp 合成或降解结构域的小分子抑制剂,可能为对抗细菌感染提供新的策略^[77]。具体而言,未来的研究可以从以下几个方面展开:(1)抑制(p)ppGpp 合成:开发能够阻断 RSH 家族蛋白中 GTP 结合位点或转移焦磷酸基团催化中心的小分子药物,以干扰(p)ppGpp 的合成途径。例如,设计针对

RelA 蛋白或 SpoT 蛋白 GTP 结合位点的抑制剂,阻止(p)ppGpp 的生成,从而削弱细菌的严谨反应和生存能力。(2)促进(p)ppGpp 降解:设计能够增强 RSH 家族蛋白降解结构域活性的小分子,或者研发模拟天然(p)ppGpp 水解酶的人工酶,以加速(p)ppGpp 的降解。这将有助于恢复细菌正常的代谢状态,减少其对抗生素的耐药性。(3)联合治疗策略:将上述小分子药物与其他抗生素或抗菌剂联合使用,以期产生协同效应,从而更有效地对抗细菌感染。例如,通过抑制(p)ppGpp 的合成或促进其降解,可以降低细菌的耐药性,从而使传统抗生素重新发挥作用。

总之,(p)ppGpp 作为细菌严谨反应的关键调控分子,其研究不仅有助于揭示微生物的基本生物学过程,还为开发新型抗菌药物提供了新的思路 and 方向。未来的研究将继续推动这一领域的进展,带来更多创新性的发现和应用。

作者贡献声明

王森:论文撰写、绘图和修改;项雨霏:论文撰写和修改;贺龙龙:文献收集和论文指导;周秦:论文指导和审阅;许丹:论文构思、指导和审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] BROWN A, FERNÁNDEZ IS, GORDIYENKO Y, RAMAKRISHNAN V. Ribosome-dependent activation of stringent control[J]. *Nature*, 2016, 534(7606): 277-280.
- [2] IRVING SE, CHOUDHURY NR, CORRIGAN RM. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(4): 256-271.
- [3] DALEBROUX ZD, SWANSON MS. ppGpp: magic beyond RNA polymerase[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(3): 203-212.
- [4] SCHOFIELD WB, ZIMMERMANN-KOGADEEVA M, ZIMMERMANN M, BARRY NA, GOODMAN AL. The

- stringent response determines the ability of a commensal bacterium to survive starvation and to persist in the gut[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(1): 120-132.e6.
- [5] POTRYKUS K, CASHEL M. (p)ppGpp: still magical?[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2008, 62: 35-51.
- [6] 胡晓, 沈盆闪, 许健萍, 余佳琪, 音建华. ppGpp 介导的抗生素胁迫应答机制研究进展[J]. *微生物学报*, 2024, 64(3): 687-700.
- HU X, SHEN PS, XU JP, YU JQ, YIN JH. Research progress in ppGpp-mediated antibiotic stress response[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(3): 687-700 (in Chinese).
- [7] 宋阳, 王译婕, 王瑞, 申屠旭萍, 俞晓平. (p)ppGpp: “魔斑”核苷酸在细菌中的研究进展[J]. *微生物学报*, 2024, 64(2): 378-390.
- SONG Y, WANG YJ, WANG R, SHENTU XP, YU XP. (p)ppGpp: “magic point” nucleotide in bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(2): 378-390 (in Chinese).
- [8] GACA AO, KAJFASZ JK, MILLER JH, LIU KQ, WANG JD, ABRANCHES J, LEMOS JA. Basal levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: the magic beyond the stringent response[J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00646-13.
- [9] JIMMY S, SAHA CK, KURATA T, STAVROPOULOS C, OLIVEIRA SRA, KOH A, CEPASKAS A, TAKADA H, REJMAN D, TENSION T, STRAHL H, GARCIA-PINO A, HAURYLIUK V, ATKINSON GC. A widespread toxin-antitoxin system exploiting growth control via alarmone signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(19): 10500-10510.
- [10] DASGUPTA S, BASU P, PAL RR, BAG S, BHADRA RK. Genetic and mutational characterization of the small alarmone synthetase gene *relV* of *Vibrio cholerae*[J]. *Microbiology*, 2014, 160(Pt 9): 1855-1866.
- [11] RONNEAU S, HALLEZ R. Make and break the alarmone: regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(4): 389-400.
- [12] YANG J, ANDERSON BW, TURDIEV A, TURDIEV H, STEVENSON DM, AMADOR-NOGUEZ D, LEE VT, WANG JD. The nucleotide pGpp acts as a third alarmone in *Bacillus*, with functions distinct from those of (p)ppGpp[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5388.
- [13] AHMAD S, WANG BY, WALKER MD, TRAN HR, STOGIOS PJ, SAVCHENKO A, GRANT RA, McARTHUR AG, LAUB MT, WHITNEY JC. An interbacterial toxin inhibits target cell growth by synthesizing (p)ppApp[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 674-678.
- [14] AHMAD S, GORDON IJ, TSANG KK, ALEXEI AG, SYCHANATHA D, COLAUTTI J, TRILESKEY SL, KIM Y, WANG BY, WHITNEY JC. Identification of a broadly conserved family of enzymes that hydrolyze (p)ppApp[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(14): e2213771120.
- [15] ATKINSON GC, TENSION T, HAURYLIUK V. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23479.
- [16] HOGG T, MECHOLD U, MALKE H, CASHEL M, HILGENFELD R. Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response[J]. *Cell*, 2004, 117(1): 57-68.
- [17] STEINCHEN W, SCHUHMACHER JS, ALTEGOER F, FAGE CD, SRINIVASAN V, LINNE U, MARAHIEL MA, BANGE G. Catalytic mechanism and allosteric regulation of an oligomeric (p)ppGpp synthetase by an alarmone[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(43): 13348-13353.
- [18] MECHOLD U, MURPHY H, BROWN L, CASHEL M. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(11): 2878-2888.
- [19] BAG S, DAS B, DASGUPTA S, BHADRA RK. Mutational analysis of the (p)ppGpp synthetase activity of the Rel enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2014, 196(8): 575-588.
- [20] YANG N, XIE SJ, TANG NY, CHOI MY, WANG Y, WATT RM. The Ps and Qs of alarmone synthesis in *Staphylococcus aureus*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0213630.
- [21] MANAV MC, BELJANTSEVA J, BOJER MS, TENSION T, INGMER H, HAURYLIUK V, BRODERSEN DE. Structural basis for (p)ppGpp synthesis by the *Staphylococcus aureus* small alarmone synthetase RelP[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(9): 3254-3264.
- [22] GEIGER T, KÄSTLE B, GRATANI FL, GOERKE C, WOLZ C. Two small (p)ppGpp synthetases in *Staphylococcus aureus* mediate tolerance against cell envelope stress conditions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(4): 894-902.
- [23] GRATANI FL, HORVATEK P, GEIGER T, BORISOVA M, MAYER C, GRIN I, WAGNER S, STEINCHEN W, BANGE G, VELIC A, MAČEK B, WOLZ C. Regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase and hydrolase activities in a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Staphylococcus aureus*[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(7): e1007514.
- [24] BHAWINI A, PANDEY P, DUBEY AP, ZEHR A, NATH G, MISHRA MN. RelQ mediates the expression of β -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 339.
- [25] LI L, BAYER AS, CHEUNG A, LU L, ABDELHADY W, DONEGAN NP, HONG JI, YEAMAN MR, XIONG YQ. The stringent response contributes to persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endovascular infection through the purine biosynthetic pathway[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020, 222(7): 1188-1198.
- [26] GACA AO, KUDRIN P, COLOMER-WINTER C, BELJANTSEVA J, LIU KQ, ANDERSON B, WANG JD, REJMAN D, POTRYKUS K, CASHEL M,

- HAURYLIUK V, LEMOS JA. From (p)ppGpp to (pp)pGpp: characterization of regulatory effects of pGpp synthesized by the small alarmone synthetase of *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(18): 2908-2919.
- [27] LEMOS JA, LIN VK, NASCIMENTO MM, ABRANCHES J, BURNE RA. Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(6): 1568-1581.
- [28] LEMOS JA, NASCIMENTO MM, LIN VK, ABRANCHES J, BURNE RA. Global regulation by (p)ppGpp and CodY in *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(15): 5291-5299.
- [29] SEATON K, AHN SJ, SAGSTETTER AM, BURNE RA. A transcriptional regulator and ABC transporters link stress tolerance, (p)ppGpp, and genetic competence in *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(4): 862-874.
- [30] KIM JN, AHN SJ, SEATON K, GARRETT S, BURNE RA. Transcriptional organization and physiological contributions of the relQ operon of *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(8): 1968-1978.
- [31] SHIELDS RC, KIM JN, AHN SJ, BURNE RA. Peptides encoded in the *Streptococcus mutans* RcrRPQ operon are essential for thermotolerance[J]. Microbiology, 2020, 166(3): 306-317.
- [32] LEMOS JAC, BROWN TA Jr, BURNE RA. Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(3): 1431-1440.
- [33] FUNG DK, YANG J, STEVENSON DM, AMADOR-NOGUEZ D, WANG JD. Small alarmone synthetase SasA expression leads to concomitant accumulation of pGpp, ppApp, and AppppA in *Bacillus subtilis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 2083.
- [34] NANAMIYA H, KASAI K, NOZAWA A, YUN CS, NARISAWA T, MURAKAMI K, NATORI Y, KAWAMURA F, TOZAWA Y. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2008, 67(2): 291-304.
- [35] BELJANTSEVA J, KUDRIN P, ANDRESEN L, SHINGLER V, ATKINSON GC, TENSION T, HAURYLIUK V. Negative allosteric regulation of *Enterococcus faecalis* small alarmone synthetase RelQ by single-stranded RNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(14): 3726-3731.
- [36] ABRANCHES J, MARTINEZ AR, KAJFASZ JK, CHÁVEZ V, GARSIN DA, LEMOS JA. The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(7): 2248-2256.
- [37] BATTESTI A, BOUVERET E. Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(2): 616-624.
- [38] KAZMIERCZAK KM, WAYNE KJ, RECHTSTEINER A, WINKLER ME. Roles of rel(Spn) in stringent response, global regulation and virulence of serotype 2 *Streptococcus pneumoniae* D39[J]. Molecular Microbiology, 2009, 72(3): 590-611.
- [39] PETCHIAPPAN A, NAIK SY, CHATTERJI D. RelZ-mediated stress response in *Mycobacterium smegmatis*: pGpp synthesis and its regulation[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(2): e00444-19.
- [40] MURDESHWAR MS, CHATTERJI D. MS_RHII-RSD, a dual-function RNase HII-(p)ppGpp synthetase from *Mycobacterium smegmatis*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(15): 4003-4014.
- [41] KRISHNAN S, PETCHIAPPAN A, SINGH A, BHATT A, CHATTERJI D. R-loop induced stress response by second (p)ppGpp synthetase in *Mycobacterium smegmatis*: functional and domain interdependence[J]. Molecular Microbiology, 2016, 102(1): 168-182.
- [42] RUWE M, KALINOWSKI J, PERSICKE M. Identification and functional characterization of small alarmone synthetases in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1601.
- [43] POUDEL A, POKHREL A, OLUDIRAN A, CORONADO EJ, ALLEYNE K, GILFUS MM, GURUNG RK, ADHIKARI SB, PURCELL EB. Unique features of alarmone metabolism in *Clostridioides difficile*[J]. Journal of Bacteriology, 2022, 204(4): e0057521.
- [44] POKHREL A, POUDEL A, CASTRO KB, CELESTINE MJ, OLUDIRAN A, RINEHOLD AJ, RESEK AM, MHANNA MA, PURCELL EB. The (p)ppGpp synthetase RSH mediates stationary-phase onset and antibiotic stress survival in *Clostridioides difficile*[J]. Journal of Bacteriology, 2020, 202(19): e00377-20.
- [45] DAS B, BHADRA RK. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* Deltarela DeltaspoT double mutants[J]. Archives of Microbiology, 2008, 189(3): 227-238.
- [46] DAS B, PAL RR, BAG S, BHADRA RK. Stringent response in *Vibrio cholerae*: genetic analysis of spoT gene function and identification of a novel (p)ppGpp synthetase gene[J]. Molecular Microbiology, 2009, 72(2): 380-398.
- [47] ARENZ S, ABDEL SHAHID M, SOHMEN D, PAYOE R, STAROSTA AL, BERNINGHAUSEN O, HAURYLIUK V, BECKMANN R, WILSON DN. The stringent factor RelA adopts an open conformation on the ribosome to stimulate ppGpp synthesis[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(13): 6471-6481.
- [48] SEYFZADEH M, KEENER J, NOMURA M. spoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(23): 11004-11008.
- [49] BATTESTI A, BOUVERET E. Acyl carrier protein/SpoT

- interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(4): 1048-1063.
- [50] WOLZ C, GEIGER T, GOERKE C. The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(2/3): 142-147.
- [51] STEINCHEN W, VOGT MS, ALTEGOER F, GIAMMARINARO PI, HORVATEK P, WOLZ C, BANGE G. Structural and mechanistic divergence of the small (p)ppGpp synthetases RelP and RelQ[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 2195.
- [52] OH YT, LEE KM, BARI W, RASKIN DM, YOON SS. (p)ppGpp, a small nucleotide regulator, directs the metabolic fate of glucose in *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(21): 13178-13190.
- [53] HARMS A, BRODERSEN DE, MITARAI N, GERDES K. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology[J]. *Molecular Cell*, 2018, 70(5): 768-784.
- [54] DEDRICK RM, JACOBS-SERA D, GUERRERO BUSTAMANTE CA, GARLENA RA, MAVRICH TN, POPE WH, CERVANTES REYES JC, RUSSELL DA, ADAIR T, ALVEY R, ALFRED BONILLA J, BRICKER JS, BROWN BR, BYRNES D, CRESAWN SG, DAVIS WB, DICKSON LA, EDGINGTON NP, FINDLEY AM, GOLEBIEWSKA U, et al. Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 16251.
- [55] MALIK A, HEPT MA, PURCELL EB. Sound the (smaller) alarm: the triphosphate magic spot nucleotide pGpp[J]. *Infection and Immunity*, 2023, 91(4): e0043222.
- [56] BURLEY SK, BERMAN HM, BHIKADIYA C, BI CX, CHEN L, di COSTANZO L, CHRISTIE C, DALENBERG K, DUARTE JM, DUTTA S, FENG ZK, GHOSH S, GOODSSELL DS, GREEN RK, GURANOVIC V, GUZENKO D, HUDSON BP, KALRO T, LIANG YH, LOWE R, et al. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D464-D474.
- [57] TAGAMI K, NANAMIYA H, KAZO Y, MAEHASHI M, SUZUKI S, NAMBA E, HOSHIYA M, HANAI R, TOZAWA Y, MORIMOTO T, OGASAWARA N, KAGEYAMA Y, ARA K, OZAKI K, YOSHIDA M, KUROIWA H, KUROIWA T, OHASHI Y, KAWAMURA F. Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp(0) mutant of *Bacillus subtilis* triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome[J]. *MicrobiologyOpen*, 2012, 1(2): 115-134.
- [58] SUN DW, LEE G, LEE JH, KIM HY, RHEE HW, PARK SY, KIM KJ, KIM Y, KIM BY, HONG JI, PARK C, CHOY HE, KIM JH, JEON YH, CHUNG J. A metazoan ortholog of SpoT hydrolyzes ppGpp and functions in starvation responses[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17(10): 1188-1194.
- [59] TAMMAN H, van NEROM K, TAKADA H, VANDENBERK N, SCHOLL D, POLIKANOV Y, HOFKENS J, TALAVERA A, HAURYLIUK V, HENDRIX J, GARCIA-PINO A. A nucleotide-switch mechanism mediates opposing catalytic activities of Rel enzymes[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(8): 834-840.
- [60] PAUSCH P, ABDEL SHAHID M, STEINCHEN W, SCHÄFER H, GRATANI FL, FREIBERT SA, WOLZ C, TURGAY K, WILSON DN, BANGE G. Structural basis for regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase and hydrolase within the stringent response orchestrator rel[J]. *Cell Reports*, 2020, 32(11): 108157.
- [61] SINGAL B, BALAKRISHNA AM, NARTEY W, MANIMEKALAI MSS, JEYAKANTHAN J, GRÜBER G. Crystallographic and solution structure of the N-terminal domain of the Rel protein from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(15): 2323-2337.
- [62] LEE JW, PARK YH, SEOK YJ. Rsd balances (p)ppGpp level by stimulating the hydrolase activity of SpoT during carbon source downshift in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(29): E6845-E6854.
- [63] RASKIN DM, JUDSON N, MEKALANOS JJ. Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in *Vibrio cholerae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(11): 4636-4641.
- [64] FANG MX, BAUER CE. Regulation of stringent factor by branched-chain amino acids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(25): 6446-6451.
- [65] STEINCHEN W, AHMAD S, VALENTINI M, EILERS K, MAJKINI M, ALTEGOER F, LECHNER M, FILLOUX A, WHITNEY JC, BANGE G. Dual role of a (p)ppGpp- and (p)ppApp-degrading enzyme in biofilm formation and interbacterial antagonism[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 115(6): 1339-1356.
- [66] BISIÁK F, CHRENKOVÁ A, ZHANG SD, PEDERSEN JN, OTZEN DE, ZHANG YE, BRODERSEN DE. Structural variations between small alarmone hydrolase dimers support different modes of regulation of the stringent response[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(7): 102142.
- [67] RUWE M, RÜCKERT C, KALINOWSKI J, PERSICKE M. Functional characterization of a small alarmone hydrolase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 916.
- [68] MURPHY H, CASHEL M. Isolation of RNA polymerase suppressors of a (p)ppGpp deficiency[J]. *Methods in Enzymology*, 2003, 371: 596-601.
- [69] MECHOLD U, POTRYKUS K, MURPHY H, MURAKAMI KS, CASHEL M. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(12): 6175-6189.

- [70] OKI T, YOSHIMOTO A, OGASAWARA T, SATO S, TAKAMATSU A. Occurrence of pppApp-synthesizing activity in actinomycetes and isolation of purine nucleotide pyrophosphotransferase[J]. Archives of Microbiology, 1976, 107(2): 183-187.
- [71] RHAESE HJ, GRADE R, DICHTELMÜLLER H. Studies on the control of development. correlation of initinucleotides in *Bacillus subtilis*[J]. European Journal of Biochemistry, 1976, 64(1): 205-213.
- [72] BRUHN-OLSZEWSKA B, MOLODTSOV V, SOBALA M, DYLEWSKI M, MURAKAMI KS, CASHEL M, POTRYKUS K. Structure-function comparisons of (p)ppApp vs. (p)ppGpp for *Escherichia coli* RNA polymerase binding sites and for rrnB P1 promoter regulatory responses *in vitro*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2018, 1861(8): 731-742.
- [73] SOBALA M, BRUHN-OLSZEWSKA B, CASHEL M, POTRYKUS K. *Methylobacterium extorquens* RSH enzyme synthesizes (p)ppGpp and pppApp *in vitro* and *in vivo*, and leads to discovery of pppApp synthesis in *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 859.
- [74] WANG M, TANG NY, XIE SJ, WATT RM. Functional characterization of small alarmone synthetase and small alarmone hydrolase proteins from *Treponema denticola*[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(4): e0510022.
- [75] POTRYKUS K, THOMAS NE, BRUHN-OLSZEWSKA B, SOBALA M, DYLEWSKI M, JAMES T, CASHEL M. Estimates of Rel_{Seq}, Mesh1, and SAH_{Mex} hydrolysis of (p)ppGpp and (p)ppApp by thin layer chromatography and nadp/nadh coupled assays[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 581271.
- [76] FUNG DK, BAI KH, YANG J, XU XL, STEVENSON DM, AMADOR-NOGUEZ D, LUO LX, WANG JD. Metabolic promiscuity of an orphan small alarmone hydrolase facilitates bacterial environmental adaptation[J]. mBio, 2022, 13(6): e0242222.
- [77] PACIOS O, BLASCO L, BLERIOT I, FERNANDEZ-GARCIA L, AMBROA A, LÓPEZ M, BOU G, CANTÓN R, GARCIA-CONTRERAS R, WOOD TK, TOMÁS M. (p)ppGpp and its role in bacterial persistence: new challenges[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(10): e01283-20.