

· 综述 ·

基于酸信号转导系统的细菌耐酸机制及其应用

胡彤, 李爽, 钟卫鸿*

浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

胡彤, 李爽, 钟卫鸿. 基于酸信号转导系统的细菌耐酸机制及其应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 644-664.

HU Tong, LI Shuang, ZHONG Weihong. Bacterial acid tolerance mechanism based on acid signal transduction system and its applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 644-664.

摘要: 酸信号转导系统能够感知酸性环境并转化为信号来调控细菌内的各种耐酸机制, 帮助细菌应对酸环境的压力, 是耐酸细菌能够在酸性环境下存活的重要原因。本文介绍了在耐酸细菌中发挥重要作用的几种主要的酸信号转导系统: EvgS/EvgA、PhoQ/PhoP、ArsS/ArsR 和 CadC。从这些系统的结构组成及对耐酸系统的调控角度分析耐酸细菌在酸环境中如何进行信号转导, 从而激活相应的耐酸机制, 并有效应对酸胁迫。深入认识耐酸系统的调控机制, 有助于多种耐酸元件的挖掘、优化设计与构建, 能够提高目标菌株在酸性环境中的生长和代谢能力, 有助于更好地利用高耐酸工程微生物进行有价值的代谢物的工业生产、酸性环境污染的生物修复, 也为抑制耐酸致病菌的生长提供全新靶点。

关键词: 酸信号转导系统; 耐酸机制; 耐酸系统的应用

Bacterial acid tolerance mechanism based on acid signal transduction system and its applications

HU Tong, LI Shuang, ZHONG Weihong*

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: The acid signal transduction system can sense the acidic environment and translate it into signals to regulate various acid tolerance mechanisms within bacteria, helping them to cope with the stress of the acidic environment and survive the acidic environments. This review describes several major acid signal transduction systems that play important roles in acid-tolerant bacteria: EvgS/EvgA, PhoQ/PhoP, ArsS/ArsR, and CadC. The structural

资助项目: 浙江省自然科学基金(LQ23C010004)

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LQ23C010004).

*Corresponding author. E-mail: whzhong@zjut.edu.cn

Received: 2023-05-07; Accepted: 2023-08-22

components of these systems and their regulation of acid-tolerant systems were used to analyze how acid-tolerant bacteria transduce signal in an acid environment to activate the corresponding acid-tolerance mechanisms and cope with the acid stress. An in-depth understanding of the regulatory mechanisms of acid-tolerant systems can help the mining, optimal design and construction of multiple acid-tolerant parts to improve the growth and metabolism of target strains in acidic environments. It helps to better utilize engineered microorganisms with super acid-resistance for industrial production of valuable metabolites, bioremediation of pollution in acidic environments. Moreover, it also helps to provide novel targets for inhibiting the growth of acid-tolerant pathogenic bacteria.

Keywords: acid signal transduction systems; acid resistance mechanisms; applications of acid-resistance systems

耐酸细菌抵抗低 pH 的特性依赖于多种耐酸机制的共同调节,包括:(1) 葡萄糖阻碍耐酸系统;(2) 氨基酸(谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸)依赖型耐酸系统,对大肠杆菌耐酸能力的影响尤为重要^[1];(3) 质子泵^[2];(4) 分子伴侣^[3];(5) 改变细胞膜的结构及流动性^[4];(6) 代谢调节^[5]等。细菌面对酸胁迫时,耐酸系统会通过多种细胞信号转导途径被激活,例如双组分系统和单组分系统等,它们不仅能感知外界环境中的酸信号,还能感受其他信号,如金属离子、O₂浓度等。本文将可以感知酸信号并把酸信号传导至细菌内部的信号转导系统归纳为酸信号转导系统,它们能够激活相应的耐酸调控机制,使细菌的耐酸能力得以提高。

目前,关于细菌耐酸方面的综述报道多以阐述耐酸机制为主^[6],关于细菌的酸信号转导系统对耐酸机制的激活与调控以及耐酸系统实际应用的综述尚未见报道。本文详细介绍细菌在酸性环境下的信号转导机理,包括通过双组分信号转导系统 EvgS/EvgA、PhoQ/PhoP、ArsS/ArsR 以及单组分信号转导系统 CadC 对酸信号的感知与传递来提高细菌耐酸能力的调控过程,并讨论了耐酸系统在有价值代谢物工业生产、环境污染处理和耐酸致病菌的抑制等方面的应用与前景。

1 细菌酸信号转导系统的概述及研究现状

酸信号转导系统由细胞膜上的跨膜感应蛋白和细胞质内的反应调节蛋白组成,其中感应蛋白能感知到外界低 pH 环境,并通过自磷酸化作用将信号转导至调节蛋白,被激活的调节蛋白能调控耐酸相关基因的转录,从而实现了对细菌的耐酸机制的调控。酸信号转导系统包括双组分和单组分信号转导系统,其中常见的双组分信号转导系统有 EvgS/EvgA、PhoQ/PhoP 和 ArsS/ArsR;单组分信号转导系统有 CadC。

1.1 双组分信号转导系统-EvgS/EvgA

EvgS/A 系统(*Escherichia virulence gene*, Evg)最早在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中被发现,活化后的 EvgS/EvgA 能够启动相应的转录因子表达,进而诱导大量耐酸基因的表达,提高细菌的耐酸能力^[7]。其中 EvgS 为感应蛋白, EvgA 为反应调节蛋白。

EvgS 是二聚体蛋白结构,包含 7 种结构域,由周质空间到胞内分别是:(1) 2 个串联的金星捕蝇草(venus flytrap, VFT)结构域^[8];(2) 1 个大的周质空间结构域;(3) 跨膜(transmembrane, TM)结构域;(4) PAS (Per-ARNT Sim, PAS)结构域;(5) 组氨酸激酶(histidine kinase, HK)结构域;(6)

接收结构域；(7) 组氨酸磷酸转移(histidine phosphate transfer, Hpt)结构域(图 1)^[7,9]。当遇到酸环境(pH 5.5–5.7)时，大肠杆菌中 EvgS 的 VFT 结构域与 1 个或多个配体(配体的性质目前尚不

清楚)结合导致结构重排，并通过该结构域中 His-226 和 Pro-522 将信号传递至跨膜结构域，跨膜结构域再将信号传递到细胞质中，接着，细胞质 HK 结构域催化 ATP 的 γ -磷酸盐转移到

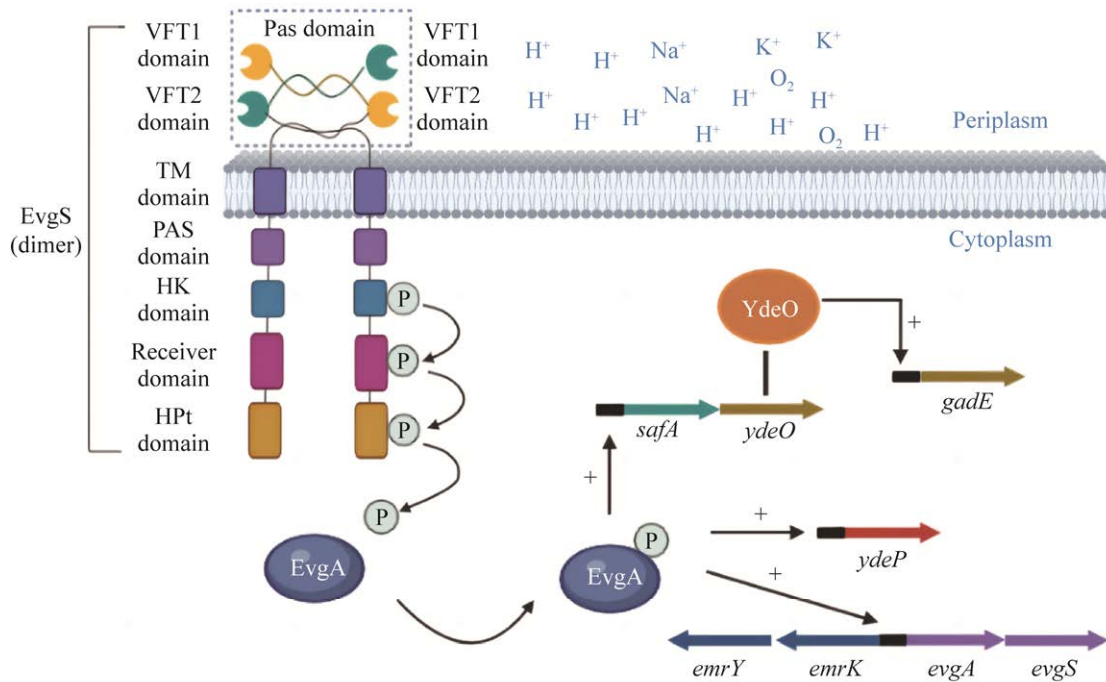


图 1 大肠杆菌中活化的 EvgS/EvgA 双组分转导系统结构简图以及激活相关基因模式图^[7,9] EvgS 是二聚体，EvgS 的每个亚单位包含 2 个 VFT (金星捕蝇草)结构域、1 个 Pas (周质)结构域、1 个 TM (跨膜)结构域、1 个 PAS (Per-ARNT Sim)结构域、1 个 HK (组氨酸激酶)结构域、1 个接收器结构域和 1 个 HPt (组氨酸磷酸转移)结构域；磷酸基团将以顺式方式从 HK 结构域转移到 EvgA，以完成 EvgS/EvgA 的激活；+表示激活；黑框表示 EvgA 和 YdeO 激活相应基因的结合位点；耐药基因(蓝色): *ermY*、*ermK*；耐酸基因(红色): *ydeP*；耐酸系统的调节基因(黄色): *ydeO*、*gadE*；双组分转导系统的基因(紫色): *evgA*、*evgS*；*safA* 编码 1 个连接蛋白，将双组分信号系统 EvgS/EvgA 与 PhoQ/PhoP 联系起来； H^+ 代表低 pH 值； Na^+ 、 K^+ 代表碱金属； O_2 代表有氧条件

Figure 1 Structure diagram of activated EvgS/EvgA two-component transduction system and pattern diagram of activation-related genes in *Escherichia coli*^[7,9]. EvgS functions as dimer, each subunit of EvgS contains two VFT (venus flytrap) domain, a Pas (periplasm) domain, a TM (transmembrane) domain, a PAS (Per-ARNT Sim) domain, an HK (histidine kinase) domain, a receiver domain and an HPt (histidine phosphate transfer) domain. The phosphate group will be transferred from the HK domain to EvgA in a *cis* manner to complete the activation of the EvgS/EvgA. + indicates activation; The black boxes indicate the binding sites where EvgA and YdeO activate the corresponding genes. Drug resistance genes (blue): *ermY*, *ermK*; Acid-resistant genes (red): *ydeP*; Regulation of acid-resistant system genes (yellow): *ydeO*, *gadE*; Two-component transduction system genes (purple): *evgA*, *evgS*; The *safA* encodes a linker protein that associates the two-component signaling system EvgS/EvgA with PhoQ/PhoP. H^+ represents low pH; Na^+ , K^+ represent alkali metals; O_2 represents aerobic conditions.

该结构域中保守的组氨酸残基上,磷酸盐再依次转移到接收结构域的天冬氨酸残基和 Hpt 结构域的组氨酸,最终转移到 EvgA 的天冬氨酸残基上,以完成 EvgS/A 的活化^[10](图 1)。EvgA 属于 FixJ 家族典型的反应调节蛋白,具有 N 端受体和 C 端 DNA 结合域,磷酸化 EvgA 的 DNA 结合域可以结合到相应基因的启动子序列来发挥激活或者抑制作用。而 EvgS 中的 VFT 结构域包含 2 个亚结构域,其中大部分含有交替的 α 螺旋和 β 折叠,VFT 结构域可以根据是否有配体的结合,在“开放”或“封闭”两种状态之间切换,若 VFT 结构域缺失则会导致 EvgS 感知低 pH 的能力丧失。跨膜结构域与 HK 结构域之间的 PAS 结构域通过调节感应蛋白的二聚化状态来调节其活性,这对酸信号的传输至关重要^[11]。研究表明,EvgS 有两种模型即非活性状态与活性状态,PAS 结构域中的突变使得二聚体结构中作用力减弱,导致 EvgS 的活化,其中 EvgS 非活性状态预测的模型是一个紧密的非活性二聚体,而当二聚体变为松散时则有活性^[12]。

EvgS 激活是有条件的:第一,需要酸性 pH 的刺激^[13];第二,需要高浓度碱金属的存在;第三,EvgS 仅在需氧生长条件下被激活,在厌氧生长条件下不被激活^[14]。在这一过程中,泛醌作为电子传递链的电子载体和需氧生长过程中的氧化还原剂,起着关键作用,研究推测,EvgS 传感器的细胞质 PAS 结构域是一个中间氧化还原开关,通过氧化的泛醌被打开,通过还原的泛醌被关闭。激活的 EvgS/EvgA 能够启动耐酸相关的转录因子 YdeO、GadE 以及氧化还原酶 YdeP 的表达(图 1),YdeO 与 GadE 可诱导大量的耐酸基因如 *gadC*、*gadA*、*gadB*、*hdeA* 和 *hdeB* 等的表达,YdeP 在耐酸系统中起到重要作用,但其机理尚未被阐明^[15-16]。另外,YdeO

转录因子也会诱导细胞色素 bd II 泛醌氧化酶的表达^[17],该酶与 O_2 氧化反应时产生 H_2O 和泛醌,产生的泛醌会激活 PAS 结构域的开关,继续维持 EvgS 氧化还原开关的 ON 状态^[18]。此外,有研究发现了 EvgS 的另外一个信号分子吡啶,它是大肠杆菌和其他肠道细菌的代谢产物,能够抑制 EvgS/EvgA 的激活。

EvgS/EvgA 的激活不仅能提高细菌的耐酸性,还可以调控其他多种功能基因的表达,提高菌株对药物和毒素的耐受性^[19-20]。例如在致病性大肠杆菌 O157:H7 中,EvgS/EvgA 能够响应低 pH 值及碱金属浓度变化,调节多种与药物外排泵相关编码基因的表达,从而改善菌株的多药耐药能力^[21]。

1.2 双组分信号转导系统-PhoQ/PhoP

PhoQ/PhoP 系统(phosphate limitation, Pho)存在于大肠杆菌和沙门氏菌(*Salmonella*)中。PhoQ/PhoP 的激活不仅需要外界环境的刺激,还需要相应的特异性蛋白的介导,其中,PhoQ 是感应蛋白,PhoP 是反应调节蛋白^[22]。

PhoQ 是一种结合于细胞膜上的二聚体蛋白结构,由周质空间到胞内分别包括 5 种不同的结构域:(1)周质(periplasm, Pas)结构域;(2)跨膜(transmembrane, TM)结构域;(3)组氨酸激酶、腺苷酸环化酶、甲基-受体趋化蛋白和磷酸酶(histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis protein and phosphatase, HAMP)结构域;(4)二聚化和组氨酸磷酸转移(dimerization and histidine phosphotransfer, DHp)结构域;(5)高度保守的激酶结构域(图 2)^[23]。PhoQ 的 Pas 结构域能感知酸环境的刺激,并通过 TM 结构域和 HAMP 结构域将信号传递到细胞质中,激酶结构域中 ATP 的 γ -磷酸化基团会转移到 DHp 结构域中保守组氨酸残基上并与 PhoP 对接,进而 PhoP 将磷酸化的组氨酸作为底物催化其自

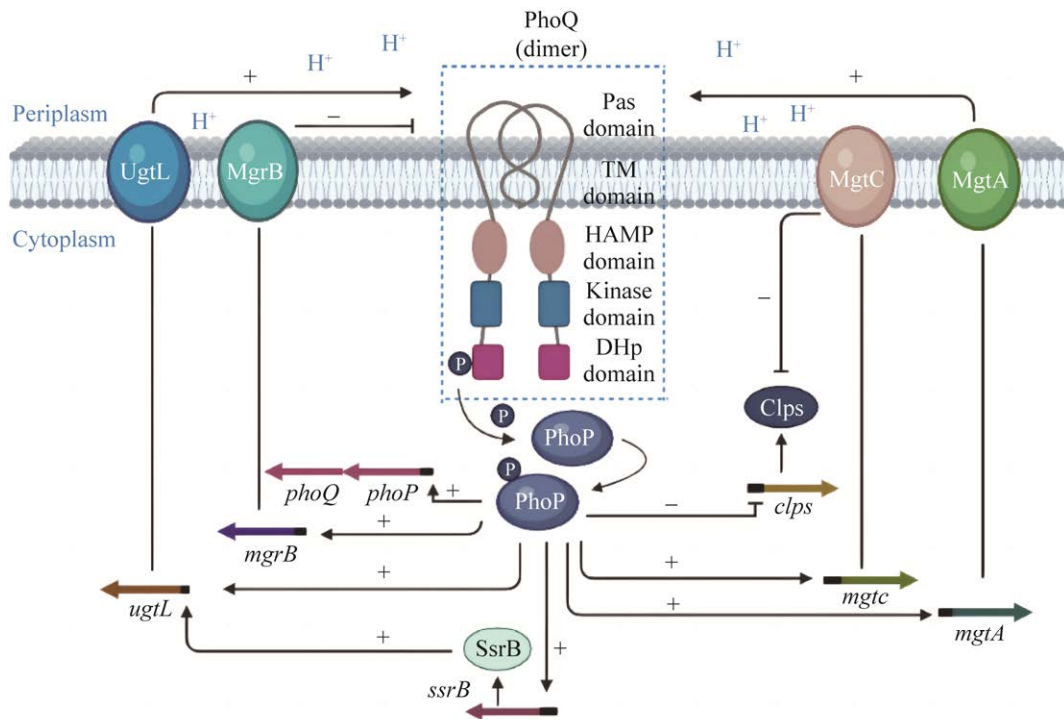


图 2 沙门氏菌中活化的 PhoQ/PhoP 双组分信号转导系统简图以及控制 PhoP-p 数量的反馈机制^[23] PhoQ 是二聚体, PhoQ 的每个亚单位都包含 1 个 Pas (周质)结构域、1 个 TM (跨膜)结构域、1 个 HAMP (组氨酸激酶、腺苷环化酶、甲基接受趋化蛋白和磷酸酶)结构域、1 个激酶结构和 1 个 DHp (二聚体化和组氨酸磷酸转运)结构域; 磷酸基团将以顺式方式从激酶结构域转移到 PhoP 上, 以完成 PhoQ/PhoP 的激活; +表示激活; -表示抑制; 黑框表示 PhoP-p 激活或抑制相应基因时结合的部位; SsrB 促进 *ugtL* 转录; UgtL 和 MgtA 分别促进 PhoQ 和 PhoP 的自动磷酸化; MgrB 抑制 PhoQ 的自动磷酸化; MgtC 抑制蛋白酶适配器 Clps 对 PhoP 和 PhoP-p 的水解, 从而增加 PhoP 和 PhoP-p 的数量; H⁺代表低 pH 值

Figure 2 Schematic diagram of activated PhoQ/PhoP two-component signal transduction system and feedback mechanism for controlling the number of PhoP-p in *Salmonella*^[23]. PhoQ functions as dimer, each subunit of PhoQ contains a Pas (periplasm) domain, a TM (transmembrane) domain, an HAMP (histidine kinase, adeny cyclase, methyl-accepting chemotaxis protein and phosphatase) domain, a kinase domain and a DHp (dimerization and histidine phosphotransfer) domain. The phosphate group will be transferred from the kinase domain to PhoP in a *cis* manner to complete the activation of the PhoQ/PhoP. “+” indicates activation; “-” indicates inhibition; The black box indicates the site that PhoP-p binds when it activates or inhibits the corresponding gene. SsrB promotes *ugtL* transcription; UgtL and MgtA promote autophosphorylation of PhoQ and PhoP, respectively; MgrB inhibits PhoQ autophosphorylation; MgtC inhibits the hydrolysis of protease adaptor Clps protein to PhoP and PhoP-p, so as to increase the number of PhoP and PhoP-p. H⁺ represents low pH.

身的天冬氨酸磷酸化。HAMP 结构域是细胞质区 N 末端的一个小的信号转导结构域, 与 EvgS 中 PAS 结构域作用相似, 将 Pas 结构域感知的信号转导至细胞质的结构域中或者作为额外的

信号输入结构域, 当 HAMP 结构域接受跨膜信号时, HAMP 结构域通过构象的改变来完成信号传递^[24]。DHp 结构域通常形成稳定的同源二聚体, 为四螺旋束结构, 该结构域构象有螺旋

弯曲和螺旋倾向的特点,这可能有助于将组氨酸放置于激酶结构域附近,来完成磷酸化反应^[25]。弱酸性 pH^[26]、低 Mg²⁺浓度^[27]、某些抗菌肽^[28]、不饱和长链脂肪酸^[29]、醋酸盐浓度^[30]和周质空间的氧化还原状态^[31]对 PhoQ 均有激活作用。PhoP 是一种调节蛋白, PhoP-p 是 PhoP 磷酸化后的活性状态, PhoP-p 通过与靶基因的启动子序列结合来达到激活或者抑制基因的转录^[32], PhoP 蛋白控制沙门氏菌约 9%的基因的表达,这些基因与菌株的毒力、Mg²⁺稳态、酸耐受能力密切相关。

PhoQ 能够独立感知环境中的酸性 pH、亚毫摩尔级的二价阳离子和阳离子抗菌肽。核磁共振数据表明,当 pH 为 5.5 时,PhoQ 传感器的激活强度最大。PhoQ 被酸性 pH 激活的机制似乎不同于阳离子抗菌肽,涉及周质结构域 α/β 核心内围绕 His-157 的残基网络的扰动,在被 pH 激活的条件下,PhoQ 周质结构域中 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 结构柔韧性更加灵活^[33-34]。His-157 位于 PhoQ 周质结构域 α/β 核心,它与 $\alpha 4$ 上的 Thr-129 和 $\beta 7$ - $\alpha 6$ 环上 Thr-180 的主羟基形成氢键,酸性环境的转变促进 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 的灵活性运动。 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$ 的运动使酸性氨基酸和内膜之间的盐桥不稳定,扰动 PhoQ 周质结构域中 Thr48-Asp179-Lys186 网络,导致 PhoQ 激活。PhoQ 对酸性 pH 的响应是由 PhoQ 的细胞质结构域介导的,推测可能是 PhoQ 的 His-409 通过影响域间相互作用的构象变化^[35]和/或通过稳定连接域中的螺旋束^[36]来介导 pH 响应。

在沙门氏菌中,PhoQ 在弱酸性 pH 条件下激活 PhoP 还需要特异性蛋白 UgtL 的调节,UgtL 在体外促进 PhoQ 自磷酸化,在体内增强 PhoP 磷酸化。除了 *ugtL* 启动子外,弱酸性 pH 激活沙门氏菌 PhoQ/PhoP 系统还需要抗沉默蛋

白编码基因 *ssrB* 的参与, SsrB (single-stranded region, Ssr)蛋白能与 *ugtL* 启动子结合,从而克服组蛋白样类核结构蛋白 H-NS 的沉默效应,直接促进 *phoP* 基因的转录^[37]。然而,在大肠杆菌中则是通过特异性蛋白传感器关联因子 A (sensor associating factor A, SafA)来介导 PhoQ/PhoP 激活^[31]。

反馈调节在细胞稳态中发挥重要的作用, PhoQ 的周质结构域通过与膜结合蛋白 MgrB (Mg²⁺-responsive, Mgr)的相互作用来发挥负反馈作用,*mgrB* 的转录是由 PhoP-p 激活的,MgrB 跨越内膜,通过抑制 PhoQ 激酶活性、激活磷酸酶活性或者抑制 PhoP 磷酸化来发挥作用^[38]。同时,磷酸化的 PhoP 也是 Mg²⁺转运蛋白编码基因 *mgtA*、*mgtC* (Mg²⁺-transporter, Mgt)的直接转录激活因子(图 2)^[23]。

1.3 幽门螺杆菌双组分信号转导系统-ArsS/ArsR

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)是常见的细菌病原体,能够引起人类慢性胃炎、胃和十二指肠溃疡^[39]和癌症^[40]。由于幽门螺杆菌具有独特的酸适应机制,能通过胃酸腔并移动到胃黏液中,并在极低 pH 的胃液环境中保持存活并生长繁殖,是唯一能够在灵长类动物的胃中定殖的细菌。深入了解其酸耐受机制,能够为有效防治幽门螺杆菌感染提供全新作用靶点,其中自主复制序列 S/R (autonomously replicating sequence S/R, ArsS/R)双组分系统在幽门螺旋杆菌对环境中的酸信号的感知与传导方面发挥着重要的作用。

在幽门螺杆菌中, ArsS/R 系统由感应蛋白 ArsS 和响应调节蛋白 ArsR 组成(图 3)^[41]。ArsS 包含 4 种结构域,由周质空间到胞内分别是:周质(periplasm, Pas)结构域、跨膜(transmembrane, TM)结构域、HAMP 结构域、高度保守的激酶

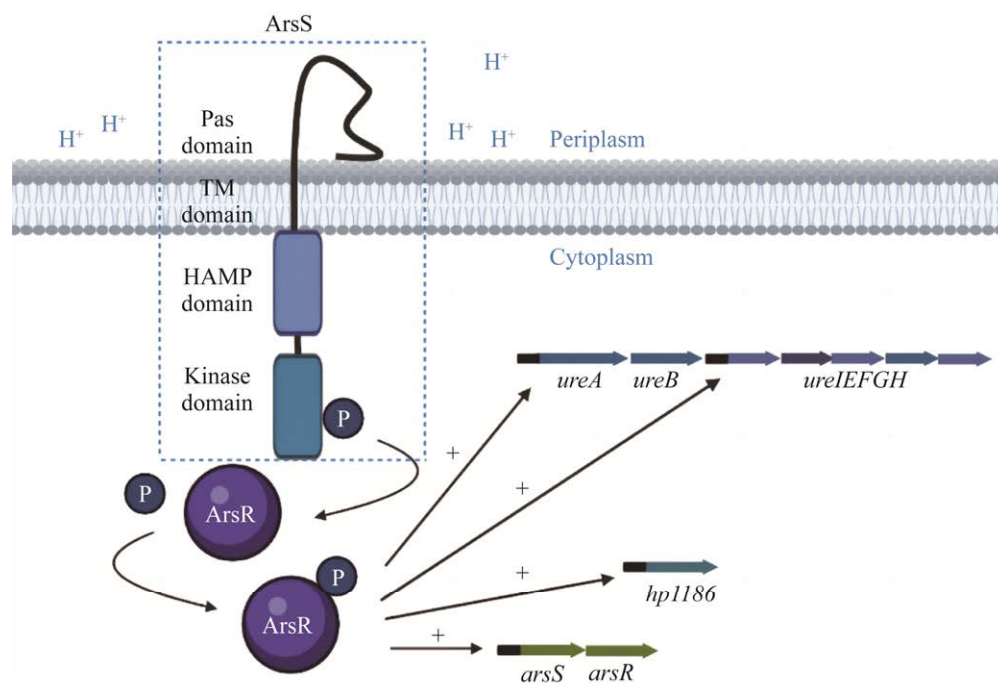


图3 幽门螺杆菌中激活的ArsS/ArsR双组分转导信号以及所激活的耐酸基因简图^[41] ArsS包含1个Pas(周质传感器)结构域、1个TM(跨膜)结构域、1个HAMP(组氨酸激酶、腺苷环化酶、甲基接受趋化蛋白和磷酸酶)结构域、1个激酶结构域;磷酸基团将以顺式方式从激酶结构域转移到ArsR,以完成AsrS/ArsR的激活;+表示激活;黑框表示ArsR-p激活相应基因时的结合位点;耐酸基因(蓝色):*ureAB*、*ureIEFGH*、*hp1186*;双组分转导系统基因(绿色):*arsR*、*arsS*; H^+ 代表低pH值

Figure 3 Schematic diagram of activated ArsS/ArsR two-component transduction signal and activated acid-resistant gene in *Helicobacter pylori*^[41]. ArsS contains a Pas (periplasm) domain, a TM (transmembrane) domain, an HAMP (histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis protein and phosphatase) domain and a kinase domain. The phosphate group will be transferred from the kinase domain to ArsR in a *cis* manner to complete the activation of the AsrS/ArsR. + indicates activation; Black box indicates the binding site when ArsR-p activates the corresponding gene; Acid-tolerant genes (blue): *ureAB*, *ureIEFGH*, *hp1186*; Two-component transduction system genes (green): *arsR*, *arsS*. H^+ represents low pH.

结构域(图3)^[41]。Pas构域中的组氨酸His-94对酸感知至关重要,Pas结构域对酸的感知转化为信号通过跨膜和HAMP结构域传递到细胞质中,在细胞质激酶结构域中保守的组氨酸残基处触发ATP依赖性的自磷酸化反应,随后通过磷酸化的组氨酸与ArsR中保守的天冬氨酸Asp-52的发生磷酸转移反应将信号转导至ArsR^[42]。根据Pas结构域的质子化程度不同,不同激活状态的ArsS具有不同的构象。ArsR

是一种类似于外膜蛋白的转录调控因子(outer membrane protein regulator, OmpR)结构的反应调节器,ArsR以非磷酸化的形式控制着幽门螺杆菌生长过程中不可缺失的基因的转录,而磷酸化后的ArsR则调节与耐酸密切相关的多种基因^[43]。

ArsS/R双组分系统调节多个涉及耐酸性的基因,包括脲酶编码基因、酰胺酶编码基因*amiE*和*amiF*和 α -碳酸酐酶编码基因*hp1186*,其中脲

酶系统对幽门螺杆菌耐酸能力至关重要^[44]。脲酶基因簇的酸诱导上调需要传感器激酶 ArsS 的存在,脲酶是一种六聚异二聚体,当底物尿素存在时,它能水解尿素、产生氨和二氧化碳,氨在细胞质和周质环境中对酸起到缓冲作用,而快速扩散到周质空间的二氧化碳被周质 α -碳酸酐酶转化为 HCO_3^- , 提供另外一种缓冲化合物。

此外, ArsS/R 双组分系统也调控幽门螺杆菌其他功能基因的表达,包括细菌氧化应激反应、多药耐药性和生物膜形成等^[43-45]。

1.4 单组分信号转导系统-CadC

镉(cadmium, Cad)存在于大肠杆菌、沙门氏

菌、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中,属于毒素调节剂(toxin regulator, ToxR)样受体家族,是一种膜结合的转录调节因子^[46]。CadC 是一种完整的膜蛋白,具有二聚体蛋白结构,包含3种结构域,由周质空间到胞内分别是:1个C端周质(periplasm, Pas)结构域、1个跨膜(transmembrane, TM)结构域、1个N端细胞质DNA结合(DB)结构域(图4)^[47]。CadC 的 Pas 结构域在感知酸环境的刺激后会发二聚化,并且将信号通过跨膜结构传递给 TM 结构域和 DNA 结合结构域之间的连接区,使得该连接区的构象发生转变从而将信号传递给DNA结合结构域,

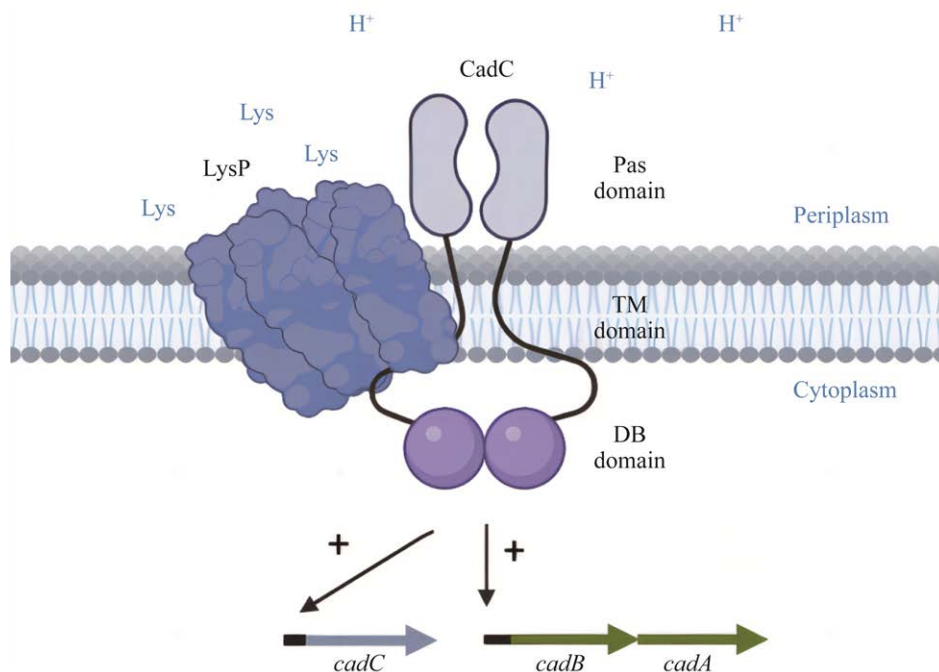


图4 大肠杆菌中激活的 CadC 单组分信号转导系统和赖氨酸转运体 LysP 结构图^[47] CadC 包含1个 Pas (周质)结构域、1个 TM (跨膜)结构域、1个 DB (DNA 结合)结构域; +表示激活; 黑框表示 CadC 激活相应基因时的结合位点; 耐酸基因(绿色): *cadB*、*cadA*; 单组分转导系统基因(蓝色): *cadC*; H^+ 代表低 pH 值; Lys 代表赖氨酸

Figure 4 Structural diagram of activated CadC single-component signal transduction system and lysine transporter LysP in *Escherichia coli*^[47]. CadC contains a Pas (periplasm) domain, a TM (transmembrane) domain, a DB (DNA-binding) domain. + indicates activation; Black box indicates the binding site when CadC activates the corresponding gene; The acid-resistant genes (green): *cadB*, *cadA*; Two-component transduction system genes (blue): *cadC*. H^+ represents low pH; Lys represents lysine.

最终激活靶基因^[48]。另外,有研究已证明连接区对于信号转导和 DNA 结合结构域的二聚体形成至关重要,在 *cadBA* 表达水平上,截断 CadC 的连接区会导致 CadC 反向 pH 依赖或 pH 不依赖的发生^[49]。

在外部酸性环境($< \text{pH } 6.6$)和赖氨酸($> 2 \mu\text{mol/L}$)同时存在下, CadC 才能完全被激活并促进 CadBA 操纵子的转录。另外, CadBA 的表达还会受到尸胺和 CO_2 的负反馈调控。有研究表明, CadC 的二聚化是细胞响应酸胁迫所必需的, pH 传感是由 2 个 CadC 单体之间的周质域界面上的一些横跨 2 个子域的酸性氨基酸负责的。这些酸性氨基酸可以稳定 CadC 传感域的二聚体状态,其中周质域的 (Asp-198、Asp-200、Glu-461、Glu-468 和 Asp-471) 对 pH 的感知至关重要^[50]。2 个 CadC 单体之间界面的酸性氨基酸质子化会减弱 2 个 CadC 单体之间的静电排斥作用,导致 pH 依赖的寡聚化和相应的跨细胞膜信号转导, CadC 传感器域中各种氨基酸替换会导致 CadBA 的 pH 依赖性失活,但 CadBA 赖氨酸依赖性表达则不会受到影响,因为 CadBA 操纵子的转录受到严格的控制,必须要有低 pH 水平、高赖氨酸水平以及低尸胺水平的同时作用才能被激活^[51]。因此, CadC 不是外部赖氨酸浓度的直接传感器,相反,赖氨酸是通过与赖氨酸特异性渗透酶 LysP (lysozyme, Lys) 相互作用而共同感知的^[47, 52-53] (图 3)。

LysP 是一种高亲和转运体[表观 K_m (Lys) 为 $2.5 \mu\text{mol/L}$], 属于氨基酸转运体家族^[54]。研究表明,当在非 Cad 诱导的情况下, LysP 与 CadC 紧密结合来抑制酸信号转导。具体来说, LysP 的氨基酸 Asp-275 和 Asp-278 以及 CadC 中氨基酸 Arg-265 和 Arg-268 通过形成盐桥来稳定异质寡聚物,当赖氨酸存在时,其与底物结合位点的结合和/或赖氨酸易位引起 LysP 的构象变

化,改变 LysP 与 CadC 之间的紧密的相互作用。当低 pH 刺激时, LysP 与 CadC 之间的周质盐桥的相互作用被进一步削弱,从而激活 CadC^[55]。对 CadC 周质传感器结构域晶体结构域分析结果表明,每个周质结构域有 2 个子域,2 个子域的界面有 1 个腔体,适合容纳尸胺。另外 1 个结合位点位于 CadC 的二聚体界面,当细胞外的尸胺超过阈值浓度,尸胺就会与 2 个子域界面的中央腔结合,使二聚体界面的结合位点暴露,对 CadC 产生负反馈调节,能够最大程度降低细胞的代谢负担,节约资源。

另外, CadC 能够通过沙门氏菌转录因子 *ompR* 的启动子直接作用来抑制 *ompR* 的表达,但具体的调控作用尚未阐明^[56],在食源性致病菌单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 中, CadC 能够通过抑制编码脂蛋白信号肽酶的基因 *lspB* 的表达来间接地抑制脂蛋白促进进入 A (lipoprotein promoting entry A, LpeA) 蛋白的胞外释放,避免 LpeA 被宿主免疫系统识别,使 *L. monocytogenes* 在宿主细胞中得以存活^[57]。

综合上述,酸信号转导系统 EvgS/EvgA、PhoQ/PhoP、ArsS/ArsR 以及 CadC 对酸信号的感知与传递是一个复杂的转导过程,本文将以上 4 个转导系统进行归纳总结,如表 1 所示。

2 酸信号转导系统对细菌耐酸机制的调控作用

酸信号转导系统感知酸性环境后通过复杂的通路来调控细菌体内的耐酸机制。细菌面临酸胁迫时,双组分转导系统 EvgS/A、PhoQ/PhoP 会通过信号的传递调控谷氨酸脱羧系统以及伴侣蛋白的修复功能,双组分转导系统 ArsS/R 会调控脲酶代谢途径,而单组分转导系统 CadC 则是通过激活赖氨酸脱羧从而调控菌株的耐酸能力。

表 1 酸信号转导系统的汇总

Table 1 Summary of acid signal transduction systems

Components	Strains	Structural domains	Activation conditions	Activation of related acid tolerance genes	References
EvgS/A	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella flexneri</i>	Pas, VFT, TM, PAS, HK, Receiver, HPt	Acidic pH, >150 mmol/L of alkali metal and aerobic environment	<i>ydeO, gadE, ydeP,</i> <i>safA, hdeA, hdeB</i>	[9,18,20,41]
PhoQ/P	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i>	Pas, TM, HAMP, DHP, Kianse	Sub-millimolar divalent cations or acidic pH or anti-bacterial peptide	<i>iraM, gadW, hdeD,</i> <i>hdeA, hdeB</i>	[23,26-28]
ArsR/S	<i>Helicobacter pylori</i>	Pas, TM, HAMP, Kinase	Acidic pH	<i>ureAB, ureIEFGH,</i> <i>amiE, amiF, hp1186</i>	[41-43]
CadC	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholera</i> <i>Salmonella Typhimurium</i>	Pas, TM, DB	Acidic pH and lysine	<i>cadA, cadB</i>	[47,52]

Pas: Periplasm; VFT: Venus flytrap; TM: Transmembrane; PAS: Per-ARNT Sim; HK: Histidine kinase; HPt: Histidine phosphate transfer; HAMP: Histidine kinase, adenyl cyclase, methyl-accepting chemotaxis protein and phosphatase; DHP: Dimerization and histidine phosphotransfer; DB: DNA-binding.

2.1 酸信号转导系统对氨基酸脱羧的调控作用

细菌中目前有 4 种基于氨基酸脱羧的耐酸系统(acid resistant system, AR), 由细胞质吡哆醛-5'-磷酸 PLP 依赖性脱羧酶和相应的反转运蛋白构成, 包括谷氨酸依赖耐酸系统(AR1)、赖氨酸依赖耐酸系统(AR2)、精氨酸依赖耐酸系统(AR3)和鸟氨酸依赖耐酸系统(AR4)。它们通过脱羧酶将 4 种氨基酸转化为碱性产物, 同时消耗 H^+ , 碱性产物被反转运蛋白排出以交换新的氨基酸, 从而使细胞内外环境的 pH 升高。

在极端酸胁迫中, 谷氨酸依赖耐酸系统(AR1)为微生物提供了强大的保护作用, 是最有效的 AR。AR1 系统是将胞外的谷氨酸通过谷氨酸/ γ -氨基丁酸反转运蛋白 GadC 泵入胞内, 再依赖于 2 种谷氨酸脱羧同工酶 GadA/GadB 和 H^+ 反应生成二氧化碳和 γ -氨基丁酸, GadC 泵出 γ -氨基丁酸以后再次换取谷氨酸泵入, 该过程消耗质子, 达到降低细胞内质子水平的目的(图 5)^[58]。GadE, 是 AR1 系统的中央调节蛋白, 在大肠杆菌中, 双组分调节系统 EvgS/EvgA、PhoQ/PhoP, 还有胶囊合成调节子(regulator of capsule synthesis,

Rcs)三组分系统 RcsC/RcsD/RcsB 通过间接或直接的作用促进 GadE 的表达, 从而激活 AR1 效应基因 *gadAB* 和 *gadC* 的表达。EvgS/EvgA 会触发 SafA-YdeO 操纵子的表达, YdeO 是阿拉伯糖/木糖(arabinose/xylose, AraC/XylS)调节器, 其上调激活 GadE。PhoQ/PhoP 则是由连接蛋白 SafA 激活的, SafA 由 EvgS/EvgA 诱导产生, 是 2 个组分连接的桥梁。PhoQ/PhoP 进而激活另一个连接蛋白 IraM, 该蛋白通过抑制蛋白酶连接子 RssB 的活性来抑制 RssB 对 RNA 聚合酶的稳定阶段 σ 因子(stable phase σ factor of RNA polymerase, RopS)的降解, RopS 的增加促进 GadE 的表达^[59](图 5)。在沙门氏菌中, PhoP 能够促进抗蛋白酶连接子 IraP 的表达来阻止 RopS 被降解^[60]。

赖氨酸依赖系统(AR2)由单个赖氨酸脱羧酶 CadA、赖氨酸/尸胺反转运蛋白 CadB 和感知外部酸化单组分分子 CadC 组成。CadC 在和 LysP 相互作用下, 能够直接感知酸性环境和间接感知赖氨酸, 从而激活 *cadBA* 的转录。在沙门氏杆菌中, *cadAB* 会被基因沉默因子 H-NS 抑制表达, 而 PhoP 能够克服 H-NS 蛋白的基因

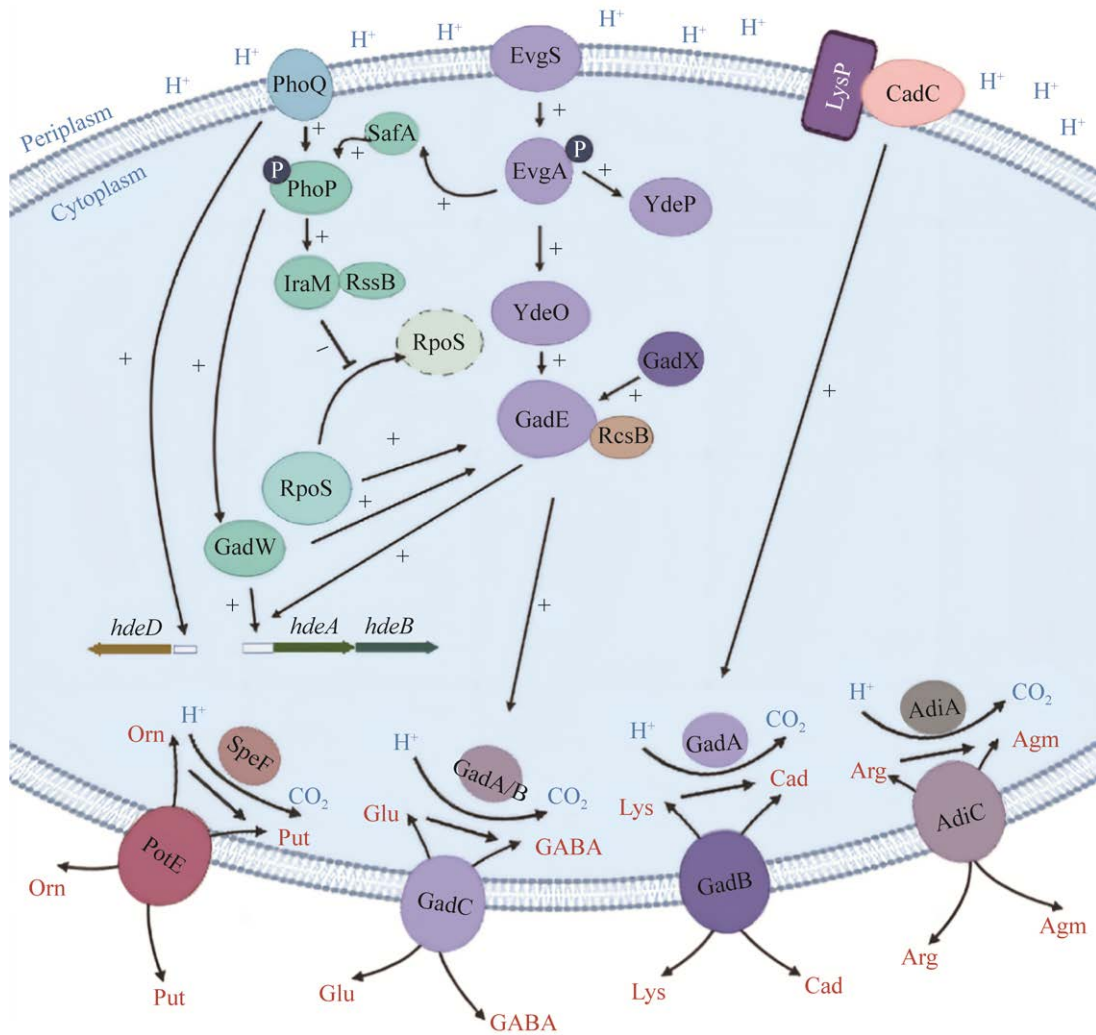


图5 在大肠杆菌中基于酸信号转导系统的耐酸机制的调控网络^[58] Orn: 鸟氨酸; Put: 腐胺; SpeF: 鸟氨酸脱羧酶; PotE: 鸟氨酸/腐胺转运体; Glu: 谷氨酸; GABA: γ -氨基丁酸; GadC: 谷氨酸/ γ -氨基丁酸转运体; GadA/B: 谷氨酸脱羧酶; Lys: 赖氨酸; Cad: 尸胺; CadB: 赖氨酸/尸胺转运体; CadA: 赖氨酸脱羧酶; Arg: 精氨酸; Agm: 胍丁胺; AdiC: 精氨酸/胍丁胺转运体; AdiA: 精氨酸脱羧酶; +表示激活; -表示抑制; 白框表示转录因子激活相应基因时的结合位点; 耐酸基因: *hdeD*、*hdeA*、*hdeB*; H^+ 代表低 pH 值

Figure 5 Regulatory network of acid tolerance mechanism based on acid signal transduction system in *Escherichia coli*^[58]. Orn: Ornithine; Put: Putrescine; SpeF: Ornithine decarboxylase; PotE: Ornithine/Putrescine transporter; Glu: Glutamate; GABA: γ -aminobutyric acid; GadC: Glutamate/ γ -aminobutyric acid transporter; GadA/B: Glutamate decarboxylase; Lys: Lysine; Cad: Cadaverine; CadB: Lysine/Cadaverine transporter; CadA: Lysine decarboxylase; Arg: Arginine; Agm: Agmatine; AdiC: Arginine/Agmatine transporter; AdiA: Arginine decarboxylase. + indicates activation; - indicates repression; White box indicates the binding site when the transcription factor activates the corresponding gene; Acid-tolerant genes: *hdeD*, *hdeA*, *hdeB*; H^+ represents low pH.

沉默,帮助 *cadAB* 表达。赖氨酸脱羧酶 CadA 通过消耗 1 个 H^+ , 将赖氨酸转化为尸胺和二氧化碳, 赖氨酸/尸胺反转运蛋白 CadB 将尸胺输出胞外并输入赖氨酸(图 5)。由于尸胺比赖氨酸更具碱性, CadB 介导的两种分子的逆向转运会导致胞外 pH 升高^[61]。赖氨酸脱羧酶 CadA 在 pH 为 5.7 时, 活性最佳, 所以赖氨酸依赖系统在轻度酸胁迫中最有效^[2]。

另外, 精氨酸依赖系统(AR3)和鸟氨酸依赖系统(AR4)不依赖于 EvgS/EvgA 激活, 它们脱羧酶的最佳活性 pH 分别为 4.9–5.2 和 7.0 (图 5)^[58]。以上 4 种 AR 在酸胁迫中抵御效率是 AR1>AR3>AR2>AR4, 而细菌拥有强大的耐酸系统, 可能是因为不同 AR 系统的重叠活性^[2]。

2.2 酸信号转导系统对伴侣蛋白修复功能的调控作用

在酸性环境中, 细菌周质空间 pH 值会快速下降, 周质蛋白折叠所需要的氢键和盐桥会被破坏, 导致蛋白质无法正确折叠。周质伴侣 HNS 依赖性表达(HNS-dependent expression, Hde) HdeA 和 HdeB 是两种小的 α -螺旋蛋白, HdeA 含有 2 个参与底物结合的疏水表面位点(I: 49–55 AA, 位点 II: 28–35 AA)和 3 个酸敏感区域 A、B 和 C (A: 46–51 AA; B: 34–40 AA; C: 24–29 AA), 它们可以在低 pH 时(pH<3.0)与酸变性的底物蛋白结合, 防止变性蛋白聚集并促进蛋白活性恢复。当在中性 pH 值时, HdeA 和 HdeB 均是二聚体形式的非活性状态, 在酸性条件下(pH<3.0), 它们会解离为活性单体, 暴露出疏水区与底物结合, 发挥伴侣活性^[62]; 当 pH 值恢复到中性时, HdeA 和 HdeB 以可重折叠构象缓慢释放底物蛋白。

在大肠杆菌中, EvgS/EvgA 通过 EvgA-YdeO-GadE 上调 DNA 结合转录调节因子 YdeO 的表达, 该调节因子过量产生会诱导 *hdeAB* 的

转录^[58,63](图 5)。YdeO 属于 AraC/XylS 家族^[64], 会激活其他耐酸基因的表达, 如 *gadBC*、*gadA*、*hdeD* 和 *yhiE* 等, 有研究表明大肠杆菌中敲除 *ydeO* 基因后会降低宿主通过 EvgA 介导的耐酸性。另外, 磷酸化的 PhoP 蛋白促进调节因子 *gadW* 的转录, GadW 蛋白与 *hdeA* 启动子结合, 会促进大肠杆菌特异性 HdeAB 操纵子的转录(图 5)^[58]。还有 RNA 聚合酶全酶组装因子 Crl 通过调节核糖核酸聚合酶(RNA polymerase, Rpo) RpoS 也可以进一步增加 *hdeAB* 的表达^[65]。此外, PhoP 能够直接激活 *hdeD* 基因的转录, HdeD 是一种生化功能未知的膜蛋白, 在大肠杆菌高细胞密度的生长条件下, 能增强大肠杆菌的耐酸性^[66]。

2.3 酸信号转导系统对脲酶代谢的调控作用

嗜中性细菌幽门螺旋杆菌在哺乳动物胃中遇到极酸性条件仍能茁壮生长的能力依赖于含镍的脲酶。ArsS/R 双组分系统对脲酶的表达具有重要的作用, 目前已确定缺失 *arsS* 基因的幽门螺旋杆菌突变株不能在小鼠胃内定殖感染。

幽门螺旋杆菌的脲酶基因簇中有 7 个基因, 分布于 2 个不同的脲酶(urease, ure)转录单元 *ureAB* 和 *ureIEFGH*, 包括编码脲酶亚单位的基因 *ureA* 和 *ureB*, 内膜 pH 门控尿素通道 *ureI* (该 pH 门控尿素通道能在酸性条件下帮助尿素进入细胞, 进而增加与脲酶的接触机会)以及组装活性脲酶所必需的基因 *ureE*、*ureF*、*ureG* 和 *ureH*^[67-68]。*ureAB* 和 *ureIEFGH* 的转录受低 pH 的正调控, 这种正调控主要由 ArsS/R 双组分系统介导。磷酸化的反应调节器 ArsR 结合到 *P_{ureA}* 和 *P_{ureI}* 启动子重叠延伸区域, 正向调节脲酶基因的转录, 而 ArsS 的缺失几乎完全解除了对 *ureA* 和 *ureI* 的调控^[69]。除了依赖 pH 的调控外, *ureAB* 的转录随着 Ni^{2+} 离子的浓度的增加而受到正调节^[70]。幽门螺杆菌中的脲酶是一把双刃

剑,一方面,它对幽门螺旋杆菌在哺乳动物高酸性胃表面的生存和定殖十分重要;另一方面,没有酸和尿素存在的条件下,它对幽门螺旋杆菌却是致命的。所以,菌株可能通过下调脲酶活性的策略来确保生存。Wen 等^[71]发现一种新的脲酶调控机制,该机制由 ArsR 介导。在中性的条件下,非磷酸化的 ArsR 结合到 5'*ureB*-sRNA 启动子序列,发挥正调控作用。5'*ureB*-sRNA 是一个反义 sRNA,通过与 *ureAB* mRNA 进行碱基配对,sRNA-*ureB* mRNA 双核苷酸的短暂形成使其成为选择性下游降解的靶标,导致 *ureB* 转录物的 *ureB* 的 3'区被截短,脲酶活性下降^[71]。ArsS/R 对 5'*ureB*-sRNA 起着双重调节作用:在中性 pH 下,5'*ureB*-sRNA 的表达受 ArsS/R 正调控;在酸性环境下,5'*ureB*-sRNA 的表达受 ArsS/R 的负调控^[72]。

幽门螺旋杆菌是迄今为止基因组序列特征化的双组分系统数量最少的生物之一,且未发现氨基酸脱羧酶或精氨酸脱氨酶同源物和 RpoS。综上所述,脲酶系统对幽门螺旋杆菌酸适应的调控作用至关重要,因此受到脲酶调控的双组分转导系统 ArsS/R 可以作为抗幽门螺旋杆菌感染的潜在治疗靶点。

3 基于细菌耐酸系统的生物工程领域应用研究

耐酸系统广泛存在于细菌中,如乳酸菌、大肠杆菌、幽门螺旋杆菌和沙门氏菌等,随着研究的深入和生物工程领域相关操作技术的进步,基于细菌高效的耐酸系统的改造广泛应用于多种高产活性物质工程菌株构建、环境生物修复、肠道病原生物的预防等方面。

3.1 耐酸系统在耐酸生产菌株构建中的应用

乳酸菌广泛应用于食品发酵领域,如奶酪、

酪乳、酸奶的生产等,并能够作为益生菌定殖于肠道,调节宿主健康。但是乳酸菌的生长通常会面临发酵过程中产生的乳酸或肠道酸性物质的抑制,所以增强乳酸菌的耐酸性对发挥其益生作用至关重要^[73]。目前已有较多研究,通过对益生菌的耐酸系统进行改造或修饰,达到显著提升其酸耐受能力的目的。例如,Zhang 等^[74]在产乳酸链球菌菌株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) NZ9000 (产量 2 810 IU/mL)中导入了来自 *E. coli* 的耐酸基因 *hdeA/B* 以及参与细菌细胞壁的肽聚糖合成的糖基转移酶 MurG 的编码基因,获得高表达 *hdeAB*、*murG* 的工程菌株,其乳酸链球菌产量分别增加到 3 850 IU/mL 和 4 377 IU/mL^[74]。由于热休克蛋白 Lo18 在细菌受到酸胁迫时能够提供细胞质蛋白保护作用,并有效维持其细胞膜的稳定性,Weidmann 等^[75]将来自嗜酸菌的酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)的 Lo18 编码基因在 *L. lactis* MG1363 中实现异源表达,获得的 *L. lactis* 工程菌株耐酸能力得到显著提升,达到提高工业菌株生产性能的目的^[75]。

另外,有研究者通过过表达外源或内源性耐酸基因的方式来提高产酸微生物的耐酸性和有机酸产量,与传统的菌株诱变及筛选相比,这种方法更有效、成本更低,并且目的更明确。例如,丁酸是一种四碳羧酸,广泛用于食品工业、工业化学品、动物饲料补充剂、药物和香水的制造,梭状芽孢杆菌(*Clostridium prazmowski*)是工业中常用的丁酸生产菌株,但在发酵过程中常常会遇到丁酸的胁迫导致后期生产效率大幅度下降。为了解决这一生产难题,有研究者在酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*) ATCC 25755 中过度表达编码 I 类热休克蛋白编码基因 *hsp*,实现了该菌株的丁酸耐受性和产量的提高。其中,热休克蛋白(heat shock protein, HSP),也称

为分子伴侣,广泛存在于生物体中,并通过确保新的蛋白质正确折叠或帮助错误折叠的蛋白质重新正确折叠来执行伴侣功能^[76]。

除此之外,丙酸是一种常见的化学材料,广泛应用于食品、药品和化学品加工领域,而传统工艺中利用詹氏丙酸杆菌(*Propionibacterium jensenii*)生产丙酸时,在生产后期也会面临丙酸抑制 *P. jensenii* 生长的情况,因此生产菌株的耐酸性对丙酸的效价和生产率至关重要。Guan 等^[77]提出利用工程化精氨酸脱氨酶和谷氨酸脱羧酶这 2 个关键的耐酸元素,来增加细胞维持细胞内 pH 稳态的能力,以保护 *P. jensenii* 免受丙酸胁迫。研究者通过在 *P. jensenii* 中过表达编码精氨酸脱氨酶和谷氨酸脱羧酶的 5 个基因(*arcA*、*arcC*、*gadB*、*gdh* 和 *ybaS*)增强了菌株的耐酸能力,有效地提高了菌株对丙酸的抗性与丙酸产量,与原始菌株相比,突变菌株的丙酸产量增加了 22.0%^[77]。

3.2 耐酸系统在环境生物修复中的应用

研究耐酸机制有利于污染环境中微生物修复方法的建立及进一步优化。例如,一些具有复杂耐酸机制的嗜酸细菌可以实现酸性污染物的高效生物降解,将微生物中与耐酸性密切相关的基因元件引入中性污染物降解细菌中,可以提高细菌对酸性环境的生物修复的效率。

酸在制造业中的广泛使用导致排放到环境中的酸性废物流的增加,酸和其他有机污染物的共同污染限制了中性粒细胞降解剂的生物降解能力。Zhou 等^[78]通过基因工程手段引入外源的谷氨酸脱羧酶(*glutamate decarboxylase*, GAD)依赖系统和极端辐射抗性全球调节器(*IrrE*),提高了污染物降解恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) S16 的耐酸性。与野生型相比,具有 GAD 系统或 *IrrE* 调节器的工程菌株可以在 pH 4.5 下生长^[78]。本实验室研究发现,甲醛降解菌甲基

杆菌(*Methylobacterium* sp.) XJLW 降解室内污染物甲醛时,细胞内甲酸的积累,限制了细胞的生长与代谢,降低了甲醛的降解能力。王彦心^[79]构建了异源表达来自大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶依赖的耐酸系统 GAD 的菌株,提高了甲基杆菌降解甲醛时对甲酸的耐受力以及对甲醛的降解速率,24 h 后重组菌株的甲醛降解能力与野生型菌株相比提升 10%左右^[79]。另外,提高其他污染物降解菌的酸耐受能力,如能降解多环芳烃的恶臭假单胞菌 B6-2^[80]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) DQ8^[81]以及醋杆菌(*Acetobacter Beijerinck*)^[82],无疑有助于改善酸污染环境的研究。

因此,优化耐酸元件作为酸性环境中促进细菌生长的工具,对于酸性条件下的生物修复十分重要,需要结合合成生物学,更深入地了解微生物的耐酸机理,从而对耐酸微生物的生物修复作出巨大贡献。

3.3 基于耐酸系统的肠道疾病预防

食源性致病菌与人类生活息息相关并对人类健康产生威胁,最常见的食源性致病菌包括沙门氏菌、致病性大肠杆菌、幽门螺杆菌等,它们都有抵抗低 pH 环境的能力,能够穿过哺乳动物酸性环境下的胃,然后以较低感染剂量引起疾病。如果能够抑制致病菌中耐酸系统,对人类或其他哺乳动物预防和治疗肠道疾病将具有重要意义。

已有研究将目标投向酸信号转导系统,以它们被激活所必需的位点或者以它们调控的基因等为靶点,酸信号转导系统存在于细菌中,但不存在于动物界,这使得它们成为寻找新抗菌化合物有吸引力的靶点^[83]。例如, González 等^[84]以反应调节剂 *ArsR* 作为抗幽门螺杆菌感染的治疗靶点,成功筛选到了石胆酸为抑制剂,这种胆汁酸将克拉霉素对幽门螺杆菌克拉霉素

耐药菌株 ATCC 700684 的杀菌能力提高了 32 倍。沙门氏菌 PhoP/PhoQ 双组分信号转导系统是主要的毒力调节因子之一, Cabezudo 等^[85-86]鉴定出 PhoP/PhoQ 的抑制剂芳香酰基脲, 有望作为沙门氏菌的抗菌化合物。因此, 以酸信号转导被激活所必需的位点或者以它们调控的耐酸基因等作为新型抗菌治疗的靶点, 来抑制致病菌的耐酸能力是可行的。

因此全面深入了解耐酸机制被激活的原理以及调控机制为杀死致病菌提供了全新的靶点及更多可能性。

3.4 新型耐酸调控元件的应用

除了传统的耐酸系统及耐酸调控网络外, 细菌中还具有一些复杂的新型耐酸调控元件, 可作为药物靶点或用于耐酸菌株的构建。

阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)是寄生在人和动物肠道内的一种革兰氏阴性无芽孢杆菌, 可以引起任何年龄的人发病, 尤其是对于婴幼儿, 能够引起败血症、脑膜炎和坏死性小肠结肠炎等疾病, 致死率高达 40%–80%, 并可能留下严重的神经系统后遗症, 因此成为研究者重点关注的肠道致病菌。Ji 等^[87]的研究结果表明, 阪崎克罗诺杆菌中的酸调控因子新型脂蛋白(novel lipoprotein, nlp) *nlpD* 在遇到酸胁迫时表达量显著增加, 使得该致病菌株的耐酸能力增强, 在胃酸环境中仍具有较高的致病能力。由于 *nlpD* 能够编码细菌脂蛋白, Ji 等^[87]推测, *nlpD* 能够响应酸环境胁迫并保持细胞膜的完整性, 从而提高其耐酸能力。后期试验结果证明了相应的猜测, 敲除了 *nlpD* 的菌株在酸环境下细胞膜完整性受到破坏, 酸耐受能力显著下降。因此该研究提出可以将 *nlpD* 作为潜在的药物靶点, 通过降低该致病菌株的酸耐受能力从而削弱其在宿主肠道环境中的存活能力, 达到降低毒性的目的。

Zhu 等^[88]将 *L. lactis* NZ9000 参与基因组同源重组并与菌株酸耐受能力密切相关的重组(recombination, rec)基因 *recT* 过表达, 获得的重组菌株对乳酸(pH 4.0)的耐受力比野生型菌株提高了 10.4 倍, 为酸耐受工程菌株的构建提供新思路和新元件。

一些未知的调控因子可能在感知到外界酸环境的压力后对细胞的耐酸能力起到调控作用。例如, 苗森^[89]发现 *L. lactis* 细胞中 1 个未知的 sRNA 277 与 *L. lactis* 的耐酸能力密切相关。在受到 pH 5.0 酸性环境胁迫时, sRNA 的表达量提高了 3.3 倍^[89]。而且, sRNA 277 可直接抑制与酸胁迫相关调控因子 YthA 的表达, 从而间接抑制精氨酸和组氨酸的代谢, 对菌株的耐酸能力产生负调控作用。因此, 通过敲除 sRNA 277, 成功地构建了高耐酸性的乳酸乳球菌工程菌株, 提高了该乳酸菌在宿主胃酸环境中的存活率。

本实验室近期通过增强酸的下游代谢流, 改善了甲醛消减菌株甲基杆菌 XJLW 面临酸胁迫时的生长与代谢能力。主要通过对相关基因的启动子进行替换与改造, 获得的新型工程菌株在甲醛降解时其甲酸积累含量比野生型菌株减少 57.35%, 细胞存活率提升约 26.32%, 也为提高微生物耐酸能力提供了一种新的策略。这些新型耐酸调控机制和元件的发现与利用丰富了耐酸系统实际应用元件库和策略。

综合上述, 本文将细菌耐酸系统在生物工程领域中的应用进行了归纳总结, 如表 2 所示。

4 展望

本文基于对耐酸细菌中酸信号转导系统的结构组成及工作机制的概述, 详细阐明对细菌中相关耐酸机制的调控作用, 更加全面、深入地了解了耐酸细菌在酸胁迫中发生的一系列复杂

表 2 耐酸系统在生物工程领域的应用

Table 2 Application of acid-resistant system in the field of biotechnology

Field	Strain	Genes	Method	Results	References
Construction of engineering strain	<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	<i>hdeA, hdeB</i>	Exogenous transfer	Streptomycin lactate (IU/mL) 2 810→3 850	[74-77]
		<i>murG</i>		2 810→4 377	
	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	<i>Lo18</i>	Exogenous transfer	Anti-resistant ability increased	
		<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<i>hsp</i>	Over express	Butyric acid tolerance and yield increased
Bioremediation of environment	<i>Pseudomonas putida</i> S16	<i>arcA, arcC, gadB, gdh, ybaS</i>	Over express	The propionic acid yield increased by 22.0%	
		<i>IrrE</i>	Exogenous transfer	More than 90% of pollutants were degraded within 48 h at pH 5.0	[78-79]
		GAD system	Exogenous transfer	The degradation rate of formaldehyde was improved	
Prevention of intestinal disease	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>arsR</i>	Inhibited express	Survival ability is reduced by 32 times	[80,85-87]
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>PhoP</i>	Inhibited express	<i>PhoP</i> transcription level decreased	
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>nlpD</i>	Knockout	Survival rate increased	
Discovery of new acid resistant system	<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	<i>recT</i>	Over express	Survival rate increased by 10.4 times at pH 4.0	[88-89]
		<i>sRNA 277</i>	Knockout	Survival rate increased	

的生理反应。期望以全面深入了解细菌耐酸系统为出发点,运用合成生物学领域的相关实验技术,构建高耐酸微生物工程菌株以更好地生产高附加值的功能性物质并实现酸性污染环境的高效修复,相比于传统的诱变育种以及新菌株的广泛筛选,基于合成生物学手段的酸耐受提升操作方法具有目的性明确、效果显著、节省人力物力等优势,并能缩减生产成本及周期,因此具有极大的应用前景。目前对于部分益生菌株如乳酸菌、酿酒酵母等菌株的酸信号转导系统的研究较少,研究多集中于对相关酸耐受基因的研究与挖掘,因此对益生菌株基于酸信号转导系统的耐酸调控机制进行深入研究将有利于相关菌株发挥更广泛的益生功能,满足更多消费及生产需求,或者在医药开发领域,基于细菌的酸信号感应机制寻找新的作用靶点,

来减弱耐酸致病菌的对酸的感知以及耐酸能力,为耐酸致病菌引起疾病的预防及治疗提供全新的思路。

REFERENCES

- [1] AQUINO P, HONDA B, JAINI S, LYUBETSKAYA A, HOSUR K, CHIU JG, EKLADIOUS I, HU DJ, JIN L, SAYEG MK, STETTNER AI, WANG JL, WONG BG, WONG WS, ALEXANDER SL, BA C, BENSUSSEN SI, BERNSTEIN DB, BRAFF D, CHA S, et al. Coordinated regulation of acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *BMC Systems Biology*, 2017, 11(1): 1.
- [2] MALLICK S, DAS S. Acid-tolerant bacteria and prospects in industrial and environmental applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(11): 3355-3374.
- [3] WESTON N, SHARMA P, RICCI V, PIDDOCK LJV. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae[J]. *Research in Microbiology*, 2018,

- 169(7/8): 425-431.
- [4] HUWB, TONG YJ, LIU JJ, CHEN PY, YANG HL, FENG SS. Improving acid resistance of *Escherichia coli* base on the CfaS-mediated membrane engineering strategy derived from extreme acidophile[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1158931.
- [5] GUAN NZ, LIU L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 51-65.
- [6] LI ZD, JIANG BY, ZHANG XY, YANG Y, HARDWIDGE PR, REN WK, ZHU GQ. The role of bacterial cell envelope structures in acid stress resistance in *E. coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(7): 2911-2921.
- [7] EGUCHI Y, UTSUMI R. Alkali metals in addition to acidic pH activate the EvgS histidine kinase sensor in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(17): 3140-3149.
- [8] SEN H, AGGARWAL N, ISHIONWU C, HUSSAIN N, PARMAR C, JAMSHAD M, BAVRO VN, LUND PA. Structural and functional analysis of the *Escherichia coli* acid-sensing histidine kinase EvgS[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(18): e00310-e00317.
- [9] KINOSHITA-KIKUTA E, KINOSHITA E, EGUCHI Y, YANAGIHARA S, EDAHIRO K, INOUE Y, TANIGUCHI M, YOSHIDA M, YAMAMOTO K, TAKAHASHI H, SAWASAKI T, UTSUMI R, KOIKE T. Functional characterization of the receiver domain for phosphorelay control in hybrid sensor kinases[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132598.
- [10] PERRAUD AL, KIMMEL B, WEISS V, GROSS R. Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPT domains of the sensor proteins[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 27(5): 875-887.
- [11] MÖGLICH A, AYERS RA, MOFFAT K. Structure and signaling mechanism of per-ARNT-sim domains[J]. *Structure*, 2009, 17(10): 1282-1294.
- [12] BURTON NA, JOHNSON MD, ANTCZAK P, ROBINSON A, LUND PA. Novel aspects of the acid response network of *E. coli* K-12 are revealed by a study of transcriptional dynamics[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 401(5): 726-742.
- [13] MA Z, MASUDA N, FOSTER JW. Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(21): 7378-7389.
- [14] BOON N, KAUR M, AZIZ A, BRADNICK M, SHIBAYAMA K, EGUCHI Y, LUND PA. The signaling molecule indole inhibits induction of the AR2 acid resistance system in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 474.
- [15] SCHWAN WR, LUEDTKE J, ENGELBRECHT K, MOLLINGER J, WHEATON A, FOSTER JW, WOLCHAK R. Regulation of *Escherichia coli* *fim* gene transcription by GadE and other acid tolerance gene products[J]. *Microbiology*, 2022, 168(3): 001149.
- [16] JOHNSON MD, BELL J, CLARKE K, CHANDLER R, PATHAK P, XIA YD, MARSHALL RL, WEINSTOCK GM, LOMAN NJ, WINN PJ, LUND PA. Characterization of mutations in the PAS domain of the EvgS sensor kinase selected by laboratory evolution for acid resistance in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(5): 911-927.
- [17] YAMANAKA Y, OSHIMA T, ISHIHAMA A, YAMAMOTO K. Characterization of the YdeO regulon in *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111962.
- [18] INADA S, OKAJIMA T, UTSUMI R, EGUCHI Y. Acid-sensing histidine kinase with a redox switch[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 652546.
- [19] WAN F, XULN, RUAN Z, LUO QX. Genomic and transcriptomic analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant isolates identify two-component system EvgS/EvgA associated with colistin resistance in *Escherichia coli*[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2021, 14: 2437-2447.
- [20] PASQUA M, GROSSI M, SCINICARIELLO S, AUSSEL L, BARRAS F, COLONNA B, PROSSEDA G. The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of *Shigella* within macrophages[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 2906.
- [21] SHARMA VK, AKAVARAM S, BAYLES DO. Genomewide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to norepinephrine[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 1-20.
- [22] GROISMAN EA, CHIAO E, LIPPS CJ, HEFFRON F. *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(18): 7077-7081.
- [23] GROISMAN EA, DUPREY A, CHOI J. How the PhoP/PhoQ system controls virulence and Mg²⁺ homeostasis: lessons in signal transduction,

- pathogenesis, physiology, and evolution[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2021, 85(3): e0017620.
- [24] HULKO M, BERNDT F, GRUBER M, LINDER JU, TRUFFAULT V, SCHULTZ A, MARTIN J, SCHULTZ JE, LUPAS AN, COLES M. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 929-940.
- [25] WANG C, SANG JY, WANG JW, SU MY, DOWNEY JS, WU QG, WANG SD, CAI YF, XU XZ, WU J, SENADHEERA DB, CVITKOVITCH DG, CHEN L, GOODMAN SD, HAN AD. Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains[J]. *PLoS Biology*, 2013, 11(2): e1001493.
- [26] HANJN, GAO X, LUO X, ZHU LX, ZHANG YM, DONG PC. The role of PhoP/PhoQ system in regulating stress adaptation response in *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Food Microbiology*, 2023, 112: 104244.
- [27] MENSA B, POLIZZI NF, MOLNAR KS, NATALE AM, LEMMIN T, DeGRADO WF. Allosteric mechanism of signal transduction in the two-component system histidine kinase PhoQ[J]. *eLife*, 2021, 10: 73336.
- [28] BADER MW, SANOWAR S, DALEY ME, SCHNEIDER AR, CHO U, XU WQ, KLEVIT RE, LE MOUAL H, MILLER SI. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase[J]. *Cell*, 2005, 122(3): 461-472.
- [29] VIARENGO G, SCIARA MI, SALAZAR MO, KIEFFER PM, FURLÁN RLE, VÉSCOVI EG. Unsaturated long chain free fatty acids are input signals of the *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ regulatory system[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(31): 22346-22358.
- [30] LESLEY JA, WALDBURGER CD. Repression of *Escherichia coli* PhoP-PhoQ signaling by acetate reveals a regulatory role for acetyl coenzyme A[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(8): 2563-2570.
- [31] LIPPA AM, GOULIAN M. Perturbation of the oxidizing environment of the periplasm stimulates the PhoQ/PhoP system in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(6): 1457-1463.
- [32] YOSHITANI K, ISHII E, TANIGUCHI K, SUGIMOTO H, SHIRO Y, AKIYAMA Y, KATO A, UTSUMI R, EGUCHI Y. Identification of an internal cavity in the PhoQ sensor domain for PhoQ activity and SafA-mediated control[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(4): 684-694.
- [33] TSAI KC, HUNG PP, CHENG CF, CHEN C, TSENG TS. Exploring the mode of action of inhibitors targeting the PhoP response regulator of *Salmonella enterica* through comprehensive pharmacophore approaches[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(16): 9308-9312.
- [34] HICKS KG, DELBECQ SP, SANCHO-VAELLO E, BLANC MP, DOVE KK, PROST LR, DALEY ME, ZETH K, KLEVIT RE, MILLER SI. Acidic pH and divalent cation sensing by PhoQ are dispensable for systemic *Salmonella* virulence[J]. *eLife*, 2015, 4: 06792.
- [35] MATAMOUROS S, HAGER KR, MILLER SI. HAMP domain rotation and tilting movements associated with signal transduction in the PhoQ sensor kinase[J]. *mBio*, 2015, 6(3): 616-715.
- [36] WANG LC, MORGAN LK, GODAKUMBURA P, KENNEY LJ, ANAND GS. The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm[J]. *The EMBO Journal*, 2015, 34(19): 2481.
- [37] CHOI J, GROISMAN EA. Horizontally acquired regulatory gene activates ancestral regulatory system to promote *Salmonella* virulence[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(19): 10832-10847.
- [38] YADAVALLI SS, GOH T, CAREY JN, MALENGO G, VELLAPPAN S, NICKELS BE, SOURJIK V, GOULIAN M, YUAN J. Functional determinants of a small protein controlling a broadly conserved bacterial sensor kinase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(16): e00305-20.
- [39] de BRITO BB, DA SILVA FAF, SOARES AS, PEREIRA VA, SANTOS MLC, SAMPAIO MM, NEVES PHM, de MELO FF. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(37): 5578-5589.
- [40] ALIPOUR M. Molecular mechanism of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer[J]. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 2021, 52(1): 23-30.
- [41] SCHWARZ J, SCHUMACHER K, BRAMEYER S, JUNG K. Bacterial battle against acidity[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(6): fuac037.
- [42] MÜLLER S, GÖTZ M, BEIER D. Histidine residue 94 is involved in pH sensing by histidine kinase ArsS of

- Helicobacter pylori*[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e6930.
- [43] LOH JT, SHUM MV, JOSSART SDR, CAMPBELL AM, SAWHNEY N, McDONALD WH, SCHOLZ MB, McCLAIN MS, FORSYTH MH, COVER TL. Delineation of the pH-responsive regulon controlled by the *Helicobacter pylori* ArsRS two-component system[J]. Infection and Immunity, 2021, 89(4): e00597-20.
- [44] CASADO J, LANAS Á, GONZÁLEZ A. Two-component regulatory systems in *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*: attractive targets for novel antibacterial drugs[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 977944.
- [45] SERVETAS SL, DOSTER RS, KIM A, WINDHAM IH, CHA JH, GADDY JA, MERRELL DS. ArsRS-dependent regulation of homB contributes to *Helicobacter pylori* biofilm formation[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1497.
- [46] DIRITA VJ, MEKALANOS JJ. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation[J]. Cell, 1991, 64(1): 29-37.
- [47] GU D, WANG KR, LU TY, LI LZ, JIAO XN. *Vibrio parahaemolyticus* CadC regulates acid tolerance response to enhance bacterial motility and cytotoxicity[J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(8): 1155-1168.
- [48] BUCHNER S, SCHLUNDT A, LASSAK J, SATTLER M, JUNG K. Structural and functional analysis of the signal-transducing linker in the pH-responsive one-component system CadC of *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(15): 2548-2561.
- [49] SCHLUNDT A, BUCHNER S, JANOWSKI R, HEYDENREICH T, HEERMANN R, LASSAK J, GEERLOF A, STEHLE R, NIESSING D, JUNG K, SATTLER M. Structure-function analysis of the DNA-binding domain of a transmembrane transcriptional activator[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 1051.
- [50] HANEBURGER I, EICHINGER A, SKERRA A, JUNG K. New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(12): 10681-10689.
- [51] DELL CL, NEELY MN, OLSON ER. Altered pH lysine signalling mutants of *cadC*, a gene encoding a membrane-bound transcriptional activator of the *Escherichia coli cadBA* operon[J]. Molecular Microbiology, 1994, 14(1): 7-16.
- [52] TETSCH L, KOLLER C, HANEBURGER I, JUNG K. The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP[J]. Molecular Microbiology, 2008, 67(3): 570-583.
- [53] TETSCH L, JUNG K. The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria[J]. Molecular Microbiology, 2009, 73(6): 982-991.
- [54] JACK DL, PAULSEN IT, SAIER MH. The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations[J]. Microbiology, 2000, 146(8): 1797-1814.
- [55] RAUSCHMEIER M, SCHÜPPEL V, TETSCH L. New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Biology, 2014, 426(1): 215-229.
- [56] LEE YH, KIM JH. Direct interaction between the transcription factors CadC and OmpR involved in the acid stress response of *Salmonella enterica*[J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(12): 966-972.
- [57] POMBINHO R, CAMEJO A, VIEIRA A, REIS O, CARVALHO F, TERESA ALMEIDA M, PINHEIRO JC, SOUSA S, CABANES D. *Listeria monocytogenes* CadC regulates cadmium efflux and fine-tunes lipoprotein localization to escape the host immune response and promote infection[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2017, 215(9): 1468-1479.
- [58] SHEIKH SW, ALI A, AHSAN A, SHAKOOR S, SHANG F, XUE T. Insights into emergence of antibiotic resistance in acid-adapted enterohaemorrhagic *Escherichia coli*[J]. Antibiotics, 2021, 10(5): 522.
- [59] EGUCHI Y, ISHII E, HATA K, UTSUMI R. Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(5): 1222-1228.
- [60] TU XL, LATIFI T, BOUGDOUR A, GOTTESMAN S, GROISMAN EA. The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in *Salmonella enterica*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(36): 13503-13508.
- [61] SOKSAWATMAEKHIN W, KURAISHI A, SAKATA K,

- KASHIWAGI K, IGARASHI K. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(5): 1401-1412.
- [62] 朱浩, 刘楠. 分子伴侣蛋白介导的革兰阴性菌耐酸机制研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(2): 164-170.
- ZHU H, LIU N. Advances in research progress on acid tolerance mechanism of Gram-negative bacteria mediated by molecular chaperone protein[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2021, 52(2): 164-170 (in Chinese).
- [63] KIM H, WU K, LEE CH. Stress-responsive periplasmic chaperones in bacteria[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 678697.
- [64] GALLEGOS MT, SCHLEIF R, BAIROCH A, HOFMANN K, RAMOS JL. Arac/XylS family of transcriptional regulators[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 1997, 61(4): 393-410.
- [65] DUDIN O, LACOUR S, GEISELMANN J. Expression dynamics of RpoS/Crl-dependent genes in *Escherichia coli*[J]. *Research in Microbiology*, 2013, 164(8): 838-847.
- [66] MATES AK, SAYED AK, FOSTER JW. Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(7): 2759-2768.
- [67] SCOTT DR, MARCUS EA, WEEKS DL, LEE A, MELCHERS K, SACHS G. Expression of the *Helicobacter pylori ureI* gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(2): 470-477.
- [68] WEEKS DL, ESKANDARI S, SCOTT DR, SACHS G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization[J]. *Science*, 2000, 287(5452): 482-485.
- [69] PFLOCK M, DIETZ P, SCHÄR J, BEIER D. Genetic evidence for histidine kinase HP165 being an acid sensor of *Helicobacter pylori*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 234(1): 51-61.
- [70] van VLIET AH, KUIPERS EJ, WAIDNER B, DAVIES BJ, de VRIES N, PENN CW, VANDENBROUCKE-GRAULS CM, KIST M, BERESWILL S, KUSTERS JG. Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(8): 4891-4897.
- [71] WEN Y, FENG J, SCOTT DR, MARCUS EA, SACHS G. A cis-encoded antisense small RNA regulated by the HP0165-HP0166 two-component system controls expression of *ureBin Helicobacter pylori*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(1): 40-51.
- [72] MARCUS EA, MOSHFEGH AP, SACHS G, SCOTT DR. The periplasmic α -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(2): 729-738.
- [73] XU JN, GUO L, ZHAO N, MENG XM, ZHANG J, WANG TR, WEI XY, FAN MT. Response mechanisms to acid stress of acid-resistant bacteria and biotechnological applications in the food industry[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023, 43(2): 258-274.
- [74] ZHANG J, CAIYIN Q, FENGWJ, ZHAO XL, QIAO B, ZHAO GR, QIAO JJ. Enhance nisin yield via improving acid-tolerant capability of *Lactococcus lactis* F44[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27973.
- [75] WEIDMANN S, MAITRE M, LAURENT J, COUCHENEY F, RIEU A, GUZZO J. Production of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* in *Lactococcus lactis* improves its stress tolerance[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 247: 18-23.
- [76] SUO YK, LUO S, ZHANG YN, LIAO ZP, WANG JF. Enhanced butyric acid tolerance and production by class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(8): 1145-1156.
- [77] GUAN NZ, LI JH, SHIN HD, DU GC, CHEN J, LIU L. Metabolic engineering of acid resistance elements to improve acid resistance and propionic acid production of *Propionibacterium jensenii*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(6): 1294-1304.
- [78] ZHOU ZK, LIU YP, ZANAROLI G, WANG ZQ, XU P, TANG HZ. Enhancing bioremediation potential of *Pseudomonas putida* by developing its acid stress tolerance with glutamate decarboxylase dependent system and global regulator of extreme radiation resistance[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2033.
- [79] 王彦心. 甲基杆菌 XJLW 降解甲醛时甲酸积累去除策略研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2021.
- WANG YX. Study on the removal strategy of formic

- acid accumulation when formaldehyde degraded by *Methylobacterium* sp. XJLW[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [80] WANG WW, LI QG, ZHANG LG, CUI J, YU H, WANG XY, OUYANG XY, TAO F, XU P, TANG HZ. Genetic mapping of highly versatile and solvent-tolerant *Pseudomonas putida* B6-2 (ATCC BAA-2545) as a 'superstar' for mineralization of PAHs and dioxin-like compounds[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(8): 4309-4325.
- [81] ZHANG ZZ, HOU ZW, YANG CY, MA CQ, TAO F, XU P. Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(5): 4111-4116.
- [82] XU K, XU P. Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based *in situ* product removal[J]. Bioresource Technology, 2014, 163: 33-39.
- [83] CARABAJAL MA, ASQUITH CRM, LAITINEN T, TIZZARD GJ, YIM L, RIAL A, CHABALGOITY JA, ZUERCHER WJ, GARCÍA VÉSCOVI E. Quinazoline-based antivirulence compounds selectively target *Salmonella* PhoP/PhoQ signal transduction system[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2019, 64(1): e01744-19.
- [84] GONZÁLEZ A, CASADO J, CHUECA E, SALILLAS S, VELÁZQUEZ-CAMPOY A, SANCHO J, LANAS Á. Small molecule inhibitors of the response regulator ArsR exhibit bactericidal activity against *Helicobacter pylori*[J]. Microorganisms, 2020, 8(4): 503.
- [85] CABEZUDO I, LOBERTTI CA, VÉSCOVI EG, FURLAN RLE. Effect-directed synthesis of PhoP/PhoQ inhibitors to regulate *Salmonella* virulence[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(22): 6755-6763.
- [86] STAES I, PASSARIS I, CAMBRÉ A, AERTSEN A. Population heterogeneity tactics as driving force in *Salmonella* virulence and survival[J]. Food Research International, 2019, 125: 108560.
- [87] JI XM, LU P, XUE J, ZHAO N, ZHANG Y, DONG L, ZHANG XJ, LI P, HU YZ, WANG J, ZHANG BW, LIU JM, LV H, WANG S. The lipoprotein NlpD in *Cronobacter sakazakii* responds to acid stress and regulates macrophage resistance and virulence by maintaining membrane integrity[J]. Virulence, 2021, 12(1): 415-429.
- [88] ZHU ZM, JI XM, WU ZM, ZHANG J, DU GC. Improved acid-stress tolerance of *Lactococcus lactis* NZ9000 and *Escherichia coli* BL21 by overexpression of the anti-acid component *recT*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(12): 1091-1101.
- [89] 苗森. 乳酸乳球菌 F44 耐酸相关 SRNA C277 功能研究及高产菌株构建[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2018.
- MIAO S. Study on acid-resistant sRNA c277 in *Lactococcus lactis* F44 and construction of high-yield strains[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2018 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)