



希瓦氏菌铁稳态及调控的研究进展

梁惠惠 冯雪 高海春*

浙江大学生命科学学院微生物研究所 浙江 杭州 310058

摘要: 铁元素通常以蛋白辅因子的形式参与一系列重要的生命过程,是绝大多数生命必需的营养物质。在细菌生命过程中,一方面铁短缺是必须克服的严峻挑战,另一方面铁过量又会危及生命。铁的这种二元性质要求细菌必须严格保持体内的铁稳态。当前革兰氏阴性菌铁稳态的作用模式及理解主要基于肠道细菌大肠杆菌的长期探索成果。近年来,在环境细菌中开展的相关研究揭示了革兰氏阴性菌的铁稳态机制存在出乎意料的多样性:细菌中铁稳态相关的生物途径及组成蛋白、关键调控系统的生理影响以及铁稳态与其他生物过程的相互影响等方面都显示不同菌种的生存和进化特征。本综述以希瓦氏菌中的相关发现为基础,分析总结革兰氏阴性菌铁稳态重要途径及其组成的多样性、不同途径的相互影响以及调控因子的生理影响和调控机理等方面的研究进展和未解决的问题,以期对革兰氏阴性菌铁稳态的研究提供参考。

关键词: 铁稳态, 希瓦氏菌, 革兰氏阴性菌, 铁摄取, 铁载体, 转录调控

Iron homeostasis and its regulation in *Shewanella*: a review

LIANG Hui-Hui FENG Xue GAO Hai-Chun*

Institute of Microbiology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China

Abstract: Iron, an essential nutrient for the survival of virtually all living organisms, participates in a variety of important biological processes mainly in the form of protein cofactors. For bacteria, iron shortage is a severe challenge to overcome and iron overload imposes an equally critical threat. The dualistic properties of iron prompt bacterial cells to carefully maintain intracellular iron homeostasis. Current mechanistic model for iron homeostasis in gram-negative bacteria is mainly derived from the extensive studies of model bacterium *Escherichia coli*. In recent years, investigations into iron homeostasis in environmental bacteria have revealed surprising diversities in iron-controlling mechanisms among gram-negative bacteria. With respect to iron homeostasis, the biological pathways and their components, major regulators and their physiological impacts, and interactions between iron homeostasis and other physiological activities display a myriad of species-specific characteristics formed by evolution. This review, stemming from the discoveries in *Shewanella*, summarizes recent advances about the biological processes involved in iron homeostasis, their reciprocal influences, and physiological consequences of imbalanced iron homeostasis due to altered regulation, as well as lists out the questions to

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31930003)

*Corresponding author: Tel: 86-571-88981107; E-mail: haichung@zju.edu.cn

Received: 03-06-2020; Accepted: 12-08-2020; Published online: 22-08-2020
基金项目: 国家自然科学基金(31930003)

*通信作者: Tel: 0571-88981107; E-mail: haichung@zju.edu.cn

收稿日期: 2020-06-03; 接受日期: 2020-08-12; 网络首发日期: 2020-08-22

be addressed, aiming at facilitate future explorations in the field of iron homeostasis.

Keywords: Iron homeostasis, *Shewanella*, Gram-negative bacteria, Iron uptake, Siderophore, Transcriptional regulation

铁是蛋白质中具有氧化还原活性的最常见的金属营养元素,对几乎所有生命的生存和生长必不可少。兼性厌氧细菌,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)一般拥有上百个含铁蛋白,包括代谢酶、电子传递蛋白、感应与调控蛋白等,参与一系列重要的生物过程^[1]。尽管地球上铁元素含量极其丰富,但在有氧环境中,绝大部分都以高度难溶的三价铁(Fe^{3+})形式存在,很难被细菌摄取利用^[2],使得铁摄取成为细菌面临的一项重要挑战。与此同时,铁一旦过量又会给生命带来氧化胁迫的严重威胁:在胞内,铁以二价铁(Fe^{2+})为主要存在形式,易与过氧化氢(H_2O_2)发生芬顿(Fenton)反应,产生具有极高细胞毒性的羟自由基($\text{OH}\cdot$),损伤DNA、蛋白质以及脂类大分子^[3]。因此,细菌必须每时每刻都维持胞内铁元素水平的相对稳定,即铁稳态(iron homeostasis),既要保证铁的充足摄入以满足代谢需求,又要防止铁过量累积诱发氧化胁迫。

可以预见,铁稳态生理学是一个涉及细菌多个生理层面的网络,包括铁的感应、调控、摄入、储存、消耗(铁蛋白的合成)和外排等生理过程。为了促进对铁的吸收,细菌进化出多种策略以获得周围环境中各种形式的铁。在革兰氏阴性菌中, Fe^{2+} 可以经外膜孔道自由扩散进入周质,再通过特异性转运系统进入细胞质中^[4-7],其中以广泛存在的Feo系统最为重要^[8]。在贫铁环境中,铁载体依赖性的铁摄取途径扮演主要角色,对细菌的生存和竞争至关重要^[1]。铁载体具有多样化且分布广泛的特点,是 Fe^{3+} 的高亲和力螯合剂,合成后被运送到胞外,与周围环境中的 Fe^{3+} 结合形成铁-铁载体复合物,并通过特异性转运系统进入胞内,在胞质中 Fe^{3+} 被还原成 Fe^{2+} 后脱离复合物被释放^[9]。铁(Fe^{2+})在细胞质中以游离态和结合态两种形式存在。游离铁可被用来直接合成含铁蛋白,如单、双核铁蛋白,

或先被组装成含铁小分子,如Fe-S簇和血红素(heme),再通过含铁小分子基团与多肽链以非共价或共价方式相互作用形成稳定的含铁蛋白^[10]。如果胞质中游离铁的含量超过安全阈值,细胞通常会增加储铁蛋白的表达,提高细胞对游离铁的束缚能力,使之转变为结合铁,使胞内游离铁的水平回归安全阈值之下;当胞内游离铁水平较低时,储铁蛋白释放结合铁,保证游离铁含量达到能够满足细胞正常新陈代谢的水平;此外,细菌细胞还利用其他方式,启动表达外排系统以迅速降低胞内包括结合铁在内的总铁水平^[11]。显然,为了维持铁稳态,细菌需要统一调控铁稳态涉及的各种生理过程和途径。在革兰氏阴性菌和低(G+C)mol%含量的革兰氏阳性菌中,转录调节蛋白Fur (ferric uptake regulator)是最关键的、研究最透彻的铁稳态调控因子^[12]。除了蛋白质,还存在多个sRNA调控因子参与细菌铁稳态的调控,其中最著名的是RyhB^[13]。

细菌铁稳态调控的分子基础在大肠杆菌中得到了广泛研究,建立的作用模型已经成为教科书式的经典,极大地影响着几乎所有其他细菌铁稳态生物学的研究^[11]。然而,细菌作为物种最多、生存环境变化最大和代谢多样性最高的类群,可以预见其铁稳态调控必然也存在一定的多样性。事实的确如此,随着研究范围的扩展,近20年来积累的大量数据显示,建立在大肠杆菌为代表的肠道细菌的铁稳态调控模式无法解释一些环境细菌铁的生理学特性^[11,14-15]。希瓦氏菌(*Shewanella*)是一类具有金属还原能力的 γ -变形菌门革兰氏阴性菌,遍布世界水体和沉积物体系,以呼吸途径丰富多样著称,能以包括铁矿石在内的多种化学物质作为电子受体进行呼吸作用,支持生存和生长^[16]。多样化的呼吸途径赋予了希瓦氏菌异乎寻常的物质转化

能力,使之不但成为生物修复和生物电能的研究模式,而且具有巨大的应用潜力。目前对该细菌的理解大部分建立在对该属模式种菌株——奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*)开展的研究。除非特殊说明,本文使用希瓦氏菌统一表述该属细菌的共同特征。与大肠杆菌相比,希瓦氏菌多样化呼吸途径的物质基础为含铁蛋白,因此其胞内该类蛋白特别丰富,尤其是含有血红素的 *c* 型细胞色素(cytochrome *c*),因此该菌对铁的需求显著高于大肠杆菌^[17]。高海春课题组长期专注于希瓦氏菌的环境适应机制,重点解析影响其呼吸多样性的相关生物过程及其生理影响^[18-31]。由于铁元素是希瓦氏菌呼吸途径的关键物质,铁稳态生物学从根本上决定着希瓦氏菌以 *c* 型细胞色素为基础的呼吸多样性和效率,并在很大程度上塑造了该菌很多独特的环境适应机制,因此近些年高海春课题组围绕 *c* 型细胞色素的研究自然而然地延伸入铁稳态生物学,开展的工作揭示希瓦氏菌进化出了很多独特的维持铁稳态的机制^[32-36]。本文结合革兰氏阴性菌铁稳态生物学的最新理解,着重介绍希瓦氏菌铁摄取、铁载体生物合成以及 Fur 调控铁稳态等方面的特点,以期促进希瓦氏菌的应用研究,并为革兰氏阴性菌铁稳态的研究提供参考。

1 铁载体的分类与合成

铁载体是低分子量的金属螯合剂,大小通常为 400–1 200 Da,对 Fe^{3+} 的亲合力极高($K_p > 10^{30}$),对 Fe^{2+} 亲合力相对较弱^[37]。铁载体是微生物从贫铁环境中摄取铁的最有效方式^[38]。

1.1 铁载体的分类

根据铁载体的化学结构和铁螯合基团,铁载体可分为三大类:异羟肟酸类(hydroxamate)、儿茶酚类(catecholate)和羧酸盐类(carboxylate),其中异羟肟酸类在自然界中最常见(图 1A)。大多数异羟肟酸基团由 $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{OH})\text{R}$ 组成,其中 R 是氨基酸或其衍生物,如 Desferrioxamine (DFO),是多种细菌可以产生并在科学研究中广泛使用的商业化

(deferrioxamine)的铁载体^[37]。每个异羟肟酸基团的 2 个氧原子与 Fe^{3+} 形成双齿配体,因此每个铁载体都能够与 Fe^{3+} 形成六齿八面体络合物。儿茶酚类铁载体常见于肠道细菌,由儿茶酚和羟基基团组成, Fe^{3+} 能够与邻近的儿茶酚或羟基基团结合,通过 2 个氧原子与铁螯合,形成六齿八面体络合物^[39]。一个著名的例子是大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)和肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)产生的 Enterobactin^[39](图 1A)。羧酸盐类铁载体主要由少数细菌如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、根瘤菌(*Rhizobium*)和真菌如毛霉菌目(*Mucorales*)产生,通过羧基和羟基与铁结合的方式络合铁^[40](图 1A)。此外,还有很多铁载体包含两种及以上的铁螯合基团,被归类为混合型铁载体,例如假单胞菌(*Pseudomonas*)产生的 Aerobactin(图 1A)^[37]。

1.2 铁载体的合成

铁载体的合成通常有两种途径:一是依赖非核糖体肽合酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)的合成途径^[41-43],二是通过不依赖 NRPS 的合成途径^[44-45]。带有芳基基团的儿茶酚类铁载体如铜绿假单胞菌的铁载体 Pyochelin 和 Pyoverdine,大肠杆菌和肠道沙门氏菌的 Enterobactin,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的 Mycobactin 合成主要依赖于 NRPSs 合成途径^[39]。例如,在大肠杆菌的 Enterobactin 的生物合成过程中,蛋白 EntB、EntC 和 EntA 负责 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-dihydroxybenzoic acid, DHB)的合成。一旦 DHB 被合成,就会与氨基酸(L-丝氨酸)一起通过 NRPSs 系统组装成 Enterobactin^[39]。Enterobactin 的 NRPS 系统由 EntE、EntB、EntF 这 3 种酶组成,负责 Enterobactin 的组装^[46]。异羟肟酸类铁载体和羧酸盐类铁载体,如炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)的 Petrobactin^[47]和百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)的 Alcaligin^[48]及希瓦氏菌中的 Putrebactin 是通过不依赖 NRPS 的方式合成的^[36]。

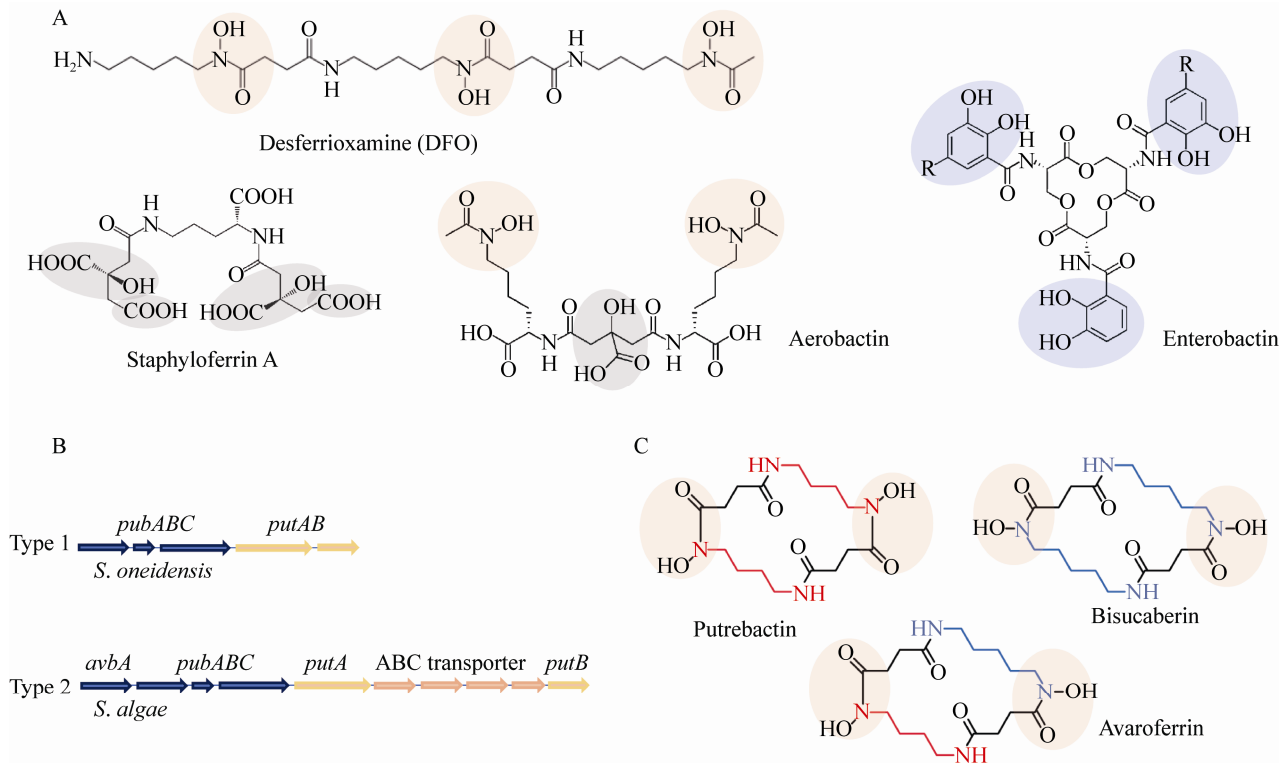


图 1 铁载体及其合成基因簇

Figure 1 Structures of siderophores and their synthetic gene clusters

注: A: 代表性铁载体的结构, 异羟肟酸类(螯合基团, 橙色): DFO; 羧酸盐类(螯合基团, 灰色): Staphyloferrin A; 儿茶酚类(螯合基团, 浅蓝): Enterobactin; 混合型: Aerobactin. B: 希瓦氏菌铁载体合成基因簇, 在两种类型中, 蓝色显示的基因组成操纵子编码铁载体合成系统, *putA* 编码自身合成铁载体受体, *putB* 编码铁-铁载体复合体还原酶. C: 希瓦氏菌合成的铁载体, 3 种铁载体均为异羟肟酸类(螯合基团, 橙色), 红色代表腐胺分子, 蓝色代表尸胺分子.

Note: A: Structures of representative siderophores. Hydroxamate siderophore (chelating groups in orange): DFO; Carboxylate siderophore (chelating groups in gray): Staphyloferrin A; Catecholate siderophore (chelating groups in light blue): Enterobactin; and hybrid siderophore: Aerobactin. B: Siderophore synthetic gene cluster in *Shewanella* spp. In both Type 1 and Type 2, genes in blue constitute an operon encoding siderophore synthesis system. *putA* and *putB* encode siderophore receptor protein and ferric-siderophore reductase respectively. C: Structures of cyclic hydroxamate siderophores produced by *Shewanella* spp. All three siderophores belong to the hydroxamate class. The putrescine backbone is shown in red while the cadaverine backbone is in blue.

细菌中已知的绝大多数铁载体合成系统具有极高的专一性, 只能合成一种铁载体。然而, 希瓦氏菌却能利用一个合成系统产生一系列铁载体(图 1B)^[36]。早在 20 多年前, 希瓦氏菌产生的铁载体就被确定为 Putrebactin, 是一种新型环状异羟肟酸类铁载体^[49-50]。Kadi 等解析了 Putrebactin 生物合成基因簇(*pubABC*)及其生物合成途径^[51]。Putrebactin 由前体腐胺(putrescine)合成, PubA 催化腐胺羟基化合成 N-羟基腐胺; PubB 利用琥珀酰辅酶 A 琥珀酰化 N-羟基腐胺, 产生 N-羟基-N-琥

珀酰-腐胺(N-hydroxy-N-succinyl-putrescine, HSP); PubC 将 2 分子 HSP 头尾二聚化产生 Putrebactin 前体, 随后大环化产生 Putrebactin^[51]。一直以来, Putrebactin 被认定为希瓦氏菌属细菌合成的唯一铁载体。然而, 近年来情况发生了变化。海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae* B516)自然产生 3 种铁载体: Putrebactin、Avaroferrin 和 Bisucaberin^[52-53](图 1C)。与 Putrebactin 相同, Avaroferrin 和 Bisucaberin 也属于环状的异羟肟酸类铁载体。此外, 如果以人工合成的前体为底物, PubABC 能够合成几十种

多种多样的环状异羟肟酸类铁载体^[54]。Putrebactin 和 Bisucaberin 分别是由 2 分子腐胺和 2 分子尸胺(cadaverine)为前体合成的对称环, 而 Avaroferrin 是由 1 分子腐胺和 1 分子尸胺为前体合成的杂环嵌合体^[53]。在海藻希瓦氏菌中, 尸胺是由假定的赖氨酸脱羧酶同源物 AvbA 以赖氨酸为底物脱羧合成的^[53]。

尽管所有已知基因组序列的希瓦氏菌都包含 *pubABC* 生物合成基因簇, *avbA* 基因却并不保守, 只存在于少数几个菌种中^[36]。然而缺失 *avbA* 同源基因的希瓦氏菌在贫铁条件下也能够产生 Putrebactin、Avaroferrin 和 Bisucaberin 三种铁载体, 其中 Putrebactin 占比超过 90%, 毫无疑问是绝对优势铁载体^[36]。深入的遗传和生化分析揭示该类希瓦氏菌合成这些铁载体必需前体的途径非常独特。腐胺主要依赖精氨酸脱羧酶途径间接合成, 与常见的包括大肠杆菌和假单胞菌在内的革兰氏阴性菌中的鸟氨酸脱羧合成途径不同^[55], 而尸胺则利用兼具赖氨酸和鸟氨酸双功能脱羧酶 SpeC 和 SpeF 合成, 其中以 SpeC 的贡献为主^[36]。这些发现说明缺失 AvbA 的希瓦氏菌能够利用进化上功能相似/相近脱羧酶的底物非特异性合成铁载体 Avaroferrin 和 Bisucaberin 的底物尸胺, 提高细菌铁载体的多样性^[36]。尽管如此, 对比 AvbA, 这些底物非特异性脱羧酶的效率有限, 致使铁载体 Avaroferrin 和 Bisucaberin 在 AvbA 缺失的希瓦氏菌中含量很低。这种相关性明确了希瓦氏菌底物池的组成决定不同铁载体的合成及丰度^[36]。在贫铁条件下, 这类希瓦氏菌以 Putrebactin 为主的铁载体合成显著增加, 但胞内 Putrebactin 的前体腐胺的水平却意外地维持基本稳定。与铁元素一样, 胞内腐胺的稳态也由合成和消耗两种途径控制^[55]。除了用于合成铁载体, 腐胺也是具有重要生理学作用和意义的多胺的主要合成前体。研究发现希瓦氏菌腐胺降解途径对腐胺水平的影响几乎可以忽略, 而是通过调节腐胺在不同

使用途径中的比例来增加铁载体的合成力度; 即, 在贫铁条件下下调甚至停止多胺的合成, 将大部分或全部腐胺用于铁载体的合成, 以提高获取环境中铁的能力^[36]。此外, 需要特别指出的是, 除了参与铁的摄入, 这些铁载体还展现不同的生物活性, 影响细菌的其他生物过程。例如, 合成 Putrebactin 能力的丧失严重影响希瓦氏菌的锰还原能力^[56], 但该现象有待进一步验证。此外, 铁载体 Avaroferrin 能够显著抑制弧菌(*Vibrio*)的运动能力^[52,54]。在自然环境中, 希瓦氏菌与弧菌常常生活在共同的环境中, 因此这种铁载体被认为是希瓦氏菌适应环境和取得竞争优势的一种新手段^[54]。

2 铁载体依赖的铁转运机制

在革兰氏阴性菌中, 铁-铁载体复合物从细胞外到周质的转运主要依赖外膜上的 TonB 铁载体受体(TonB-dependent siderophore receptors, TBSRs)及跨越内膜和周质的 TonB-ExbB-ExbD 能量转导系统^[57](图 2)。TBSRs 大多具有相似的结构域: 22 条 β 折叠形成的桶状结构和 N 端球状塞子结构域^[57]。塞子结构域在外膜的细胞外侧结合底物, 当铁-铁载体复合物与 TBSR 结合后, TBSR 与 TonB 相互作用的结构域发生变化, 利用 TonB 复合物提供由电化学质子动力势转化的能量, 将铁-铁载体复合物转运入周质^[58]。随后, 铁-铁载体复合物通过 ABC 转运蛋白或通透酶穿越内膜, 在胞质中, 铁-铁载体复合物中的铁被还原酶还原得以释放; 此外, 某些菌在特定条件下, 铁-铁载体复合物也可在周质中被降解, 随后被释放的 Fe^{3+} 被还原成 Fe^{2+} ^[59]。在此类菌中, 铜绿假单胞菌是一个极端例子。铜绿假单胞菌铁载体 Pyoverdine 介导的铁摄取过程在周质释放还原铁的阶段不涉及 Pyoverdine 的降解, 而是直接释放 Fe^{3+} , 这样铁载体可以被排出胞外继续循环利用^[60-61], 因此降低了细菌铁载体合成相关的底物和能量成本。截至目前, 在已有报道中, Pyoverdine 是唯一在

周质中释放铁载体且能循环利用铁载体摄取铁的实例^[61-63]。

到目前为止, 已开展的研究基本确定希瓦氏菌铁载体依赖的铁转运途径。在该菌基因组存在近 10 个编码与大肠杆菌 TonB 依赖铁载体受体同源蛋白的基因^[64], 但只有 TonB 依赖铁载体受体 PutA 对该菌自身合成铁载体介导的铁摄取具有特异性, PutA 缺失导致细胞完全丧失铁载体介导的铁摄取^[33]。然而, 其余铁载体受体, 至少其中的一部分也具有生物功能, 因为奥奈达希瓦氏菌能够利用多种细菌产生的铁载体从环境中获取铁, 包括大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 以及霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)^[33]。有些铁载体受体还参与铁还原过程, 尽管其作用机制目前还不清楚^[33]。对希瓦氏菌具有特别意义的是, 细胞外膜的众多细胞色素 *c*、铁载体受体和其他通道蛋白(至少其中的一部分)在发挥其本职功能之外可能还在稳定该菌细胞外膜方面扮演重要角色^[31-32]。如上所述, 进入细胞周质的铁-铁载体复合物存在两种可能的命运: 被部分降解或直接跨越内膜进入胞内^[61-63]。目前没有发现支持降解过程存在的证据, 而负责转运铁-铁载体复合物跨越内膜的 ABC 转运系统虽尚未确定, 但基于信息学分析预测 FbpABC 是可能性最大的系统^[33] (图 2)。进入胞内的铁-铁载体复合物在还原酶 PutB 的作用下分解, 释放 Fe^{2+} 和铁载体, 完成一个铁载体依赖铁摄取循环^[33]。

PutA 缺失尽管对细胞生长影响很小, 却引发一个特别的现象: 缺失突变株中细胞色素 *c* 的合成严重受损^[33]。奥奈达希瓦氏菌基因组至少编码 40 种不同的细胞色素 *c*, 这些与血红素(最高达 16 个)共价结合的蛋白主要参与电子传递和氧化还原反应, 不但是该菌呼吸多样性的物质基础, 而且赋予其菌落呈现独特的橘红色^[24]。细胞色素 *c* 的血红素辅基含有铁元素, 可以想象胞内铁稳态是细胞色素 *c* 正常合成的前提条件^[33]。在正常生

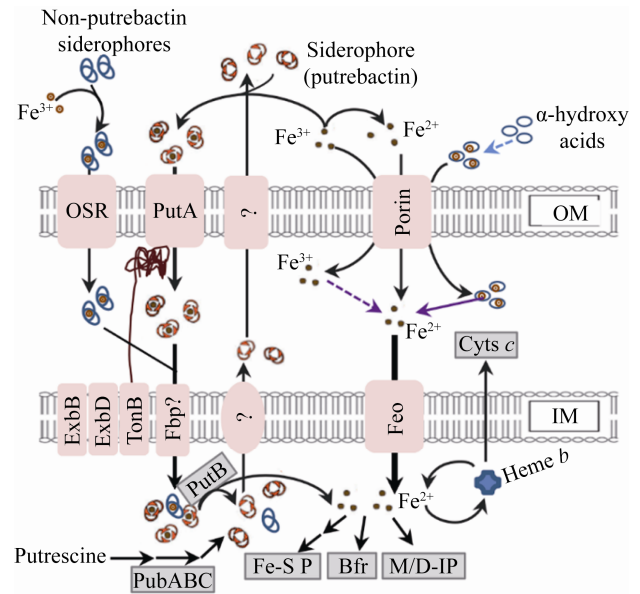


图 2 希瓦氏菌的铁稳态模型

Figure 2 Model for iron uptake in *Shewanella*

注: 铁转运主要途径: Fe^{2+} (环境中或由 Fe^{3+} 还原产生) 扩散通过外膜(OM)进入周质, 随后被 Feo 系统转入胞内。环境中的 α -羟基酸可以螯合 Fe^{2+} , 增强 Feo 系统在低铁环境下的铁摄取能力。环境中的 Fe^{3+} 可被铁载体(putrebaactin)螯合, 通过 TonB 依赖的铁载体受体 PutA 进入周质, 再经 ABC 转运系统转入胞内(Fbp?), Fe^{3+} 被 PutB 还原为 Fe^{2+} 后被释放。Putrebaactin 由 PubABC 合成, 但其外排途径目前未知。环境中的 Fe^{3+} 也可由非自产(其他菌所产)铁载体协助通过 OSR (其他铁载体受体) 摄入。胞内的游离 Fe^{2+} 可以与储铁蛋白(Bfr)结合转为结合铁, 或被用以合成 Fe-S 蛋白(Fe-S P), 包括细胞色素 *c* (Cyts *c*) 在内的含血红素(heme)蛋白和单/双核铁蛋白(M/D-IP)。模型忽略了目前未知的铁载体外排系统。

Note: Major siderophore transport pathway: Fe^{3+} in the environment can be reduced to Fe^{2+} and entered the periplasm by diffusing through the outer membrane (OM). Transportation of Fe^{2+} across the inner membrane (IM) is primarily mediated by Feo. Alpha-hydroxy acids in the environment are able to chelate Fe^{2+} and promote the Feo system to uptake ferrous ion. Fe^{3+} in the environment can be scavenged by siderophores (putrebaactin) to form Fe^{3+} -siderophore complexes, which enter the periplasm through PutA and the cell through an ABC transporter (Fbp?). In the cell, Fe^{2+} is released from the complex after reduction catalyzed by PutB. Putrebaactin is synthesized by PubABC, but its export pathway remains unknown. Fe^{3+} can also be captured by siderophores secreted by other bacteria in the environment and the resulting complexes cross OM through other siderophore receptors (OSR). Free Fe^{2+} in the cell can be bound by iron storage proteins (Bfr) or used to synthesize Fe-S proteins (Fe-S P), such as heme-containing proteins including cytochrome *c* (Cyts *c*) and mono- and di-nuclear iron proteins (M/D-IP). Unknown siderophore export systems are omitted in the model.

长条件下, Fe^{2+} 转运系统 Feo 在铁摄取方面扮演更重要的角色, 尤其对希瓦氏菌而言, 因为该菌是著名的铁还原细菌, 可以将胞外 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ^[33]。正因如此, PutA 缺失引起的表型相当意外, 但深入研究发现这与希瓦氏菌自身合成的铁载体相关^[33]。PutA 缺失导致细菌自身合成分泌的铁载体(putrebactin)与胞外 Fe^{3+} 形成的铁-铁载体复合物无法进入细胞, 使细胞产生胞内缺铁的错觉, 从而合成和分泌更多的铁载体。过量的铁载体螯合环境中的 Fe^{3+} , 其结果是极大地降低了胞外可被摄取铁(Fe^{3+} 和 Fe^{2+})的水平, 严重制约了 Feo 转运系统的效率, 造成细胞严重缺铁, 影响了细胞色素 *c* 的正常合成^[35]。显然, 这个现象依赖于铁载体。的确, 当铁载体合成能力丧失时, PutA 缺失不再影响胞内细胞色素 *c* 的水平^[35]。

3 Feo 依赖的铁转运机制

尽管 Fe^{3+} 在环境中居于主导地位, Fe^{2+} 依然普遍存在于无氧和低 pH 环境。与 Fe^{3+} 不同, Fe^{2+} 通常以游离形式存在, 能够通过革兰氏阴性菌外膜孔道自由扩散进入周质, 在此被内膜上的转运系统接力运入胞内^[65]。迄今为止, 已经在细菌中发现了许多 Fe^{2+} 摄取系统, 包括 MntH、ZupT、YefABCD、FutABC、EfeUOB 以及 Feo 系统^[8]。其中大多数摄取系统是某些细菌所特有的, 并且能够识别多种二价金属离子, 但 Feo 系统却是一种在细菌中分布广泛专门用于运输 Fe^{2+} 的系统^[8]。

3.1 Feo 系统的特点

1987 年, Hantke 等在大肠杆菌中通过研究一系列二价铁转运系统的突变株首次发现 Feo 系统, 随后在 2003 年证实大肠杆菌的 Feo 系统由 *feoABC* 三基因操纵子编码^[66]。事实上这种三亚基 Feo 系统在细菌中比较少见, 绝大多数(89%)细菌(包括奥奈达希瓦氏菌)的 Feo 系统是由 2 个亚基 FeoA 和 FeoB 组成, 由 *feoAB* 操纵子编码^[8]。FeoB 是 Feo 系统中较大的核心蛋白, 一般是由 600–850 个氨基酸残基构成的多次跨膜蛋白; 该蛋白具有 3 个主

要的结构域: G 蛋白结构域、GDP (guanosine diphosphate)解离抑制结构域(GDI)以及跨膜结构域^[65-68]。其中最主要的结构域是跨膜结构域, 位于细胞质膜上, 由 8–10 个跨膜螺旋组成^[69]。该结构域是蛋白中最重要的结构域, 但目前对其了解非常有限。跨膜结构域负责将亚铁从周质转运到细胞质, 然而确切机制尚不清楚。FeoA 蛋白是由 75–85 个氨基酸残基构成的胞内蛋白^[65]。根据解析的蛋白晶体结构, FeoA 整体上高度保守, 含有 2–3 个 α -螺旋和 5–6 个 β -片段, 通过氢键形成一个决定蛋白功能的 β -桶状结构^[8]。FeoA 蛋白可能与内膜上的 FeoB 蛋白相互作用, 从而促进 FeoB 对铁离子的摄入。有研究发现 *feoA* 基因的缺失会使 *feoB* 摄取铁的功能减弱至野生型的 60%^[70], 但其具体的功能以及与 FeoB 相互作用的方式仍然需要进一步研究。FeoC 的确切功能未知, 在某些菌株中参与或帮助 FeoA 和 FeoB 复合物的形成^[71-72]。

3.2 Feo 系统的生理作用与影响

已有的研究充分证明了 Feo 是细菌摄取铁的关键系统, 其缺失通常致使突变株丧失二价铁的吸收功能, 生长显著变慢, 生存能力下降^[35,73-75]。此外, 因 Feo 缺失导致的生理影响极其广泛, 并且因菌而异。大肠杆菌的 *feo* 突变株无法在小鼠肠道中增殖^[73]。铜绿假单胞菌利用 Feo 系统获得的二价铁能够减少其在铁过剩条件下生物膜的形成^[76]。同时, 铜绿假单胞菌的 Feo 还与柠檬酸介导的铁获取有关^[77]。与缺失铁载体介导的铁摄取系统不同, Feo 对奥奈达希瓦氏菌的正常生长非常关键, 是该菌最主要的铁摄取途径(图 2)。进一步的研究排除了其余铁摄取途径的显著作用, 因为 Feo 和铁载体介导的铁摄取系统表现出合成致死^[35]。这个合成致死现象对课题组全面解析希瓦氏菌铁摄取途径帮助极大。例如, PutB 缺失没有表型, 其生理功能只有在 Feo 缺失时才可以清楚确定; 与 PutA 缺失相比, 尽管 Feo 系统的缺失显著损害细胞生长, 但对细胞色素 *c* 合成的影响却不明显^[35]。

生化遗传分析揭示其分子机制与生长速率紧密相关：*feo* 突变株铁摄入功能严重受损，但因其生长缓慢，使细胞可以通过铁载体介导的铁摄取累积提升胞内的铁水平，最终满足细胞色素 *c* 合成的需要^[35]。很明显，奥奈达希瓦氏菌的 *Feo* 和铁载体介导铁摄取的缺失触发不同的应对机制，其中之一是调节不同的蛋白组表达以满足生存和生长需要。研究还发现常用复合培养基 LB (lysogeny broth) 在灭菌过程中产生多种不同的 α -羟氨基酸，这些 α -羟氨基酸具有较强的铁螯合能力，可以与铁载体竞争环境中的铁，并通过 *Feo* 系统运入胞内，促进奥奈达希瓦氏菌的铁吸收^[35](图 2)。

4 Fur 主导的铁稳态调控

鉴于铁的“阴”“阳”两面性，细胞内铁浓度变化必须受到精准的调控，即铁稳态调控^[11]。在细菌中，维持铁稳态的两种主要机制均已得到了充分的研究：一是通过控制含铁蛋白的丰度调节铁的使用和存储，二是通过调节铁的吸收和输出维持铁的平衡。毫无疑问，细胞需要能够感应胞内铁水平的变化并对这两种机制做出相应的调控。在细菌中，最广泛、研究最透彻的铁稳态转录调控因子是 *Fur*^[78]。

4.1 Fur 调控及 Fur-box

Fur 蛋白的序列具有高度保守性，其 N 端有一个 DNA 结合结构域，C 端组氨酸丰富，具有二聚化的结构域和包括二价铁离子结合位点在内的多个金属离子结合位点，分子量为 17–21 kD^[79](图 3A)。*Fur* 调控的分子基础已经在大肠杆菌中得到广泛研究，并提出了转录抑制的经典模型^[11]。在铁充足的条件下，*Fur* 单体感应 Fe^{2+} 并与其相互作用，形成 *Fur-Fe*²⁺ 复合物，该复合物二聚化后与位于铁响应基因启动子区域的顺式作用调控元件 *Fur-box* 结合，抑制基因的转录；当铁不足时，二聚体解聚导致抑制解除，从而启动靶基因的转录^[80]。*Fur-box* 是靶基因操纵子上游一段富含 AT 的序列，该段序列高度保守，与 *Fur* 特异性结合调

节转录^[80]。目前提出的细菌 *Fur-box* 序列有两种存在形式：一种是一段 21 bp 的 10-1-10 排列的回文序列(Motif^{Fur-P}, P 代表回文)^[81-82]；另一种是一段 19 bp 的 F-F-x-R 排列的序列，序列中至少含有 3 段 GATAAT 的重复[2 个正向(F)和 1 个反向(R)，中间隔有一个碱基对(x)，记为 Motif^{Fur-R}(R 代表重复)]^[80,83](图 3B)。希瓦氏菌的 *Fur-box* 序列最初被认为属于 Motif^{Fur-P} 类型，但使用该型 *Fur-box* 预测的 *Fur* 调控元件(regulon)中与转录组和蛋白组数据一致性较低^[81-82,84]。通过研究 *Fur* 与 DNA 序列的直接作用确定希瓦氏菌的 *Fur* 明显更倾向于与 Motif^{Fur-R} 而不是 Motif^{Fur-P} 结合^[34]。基于希瓦氏菌 *Fur* 序列的高度保守性^[81-82]，有理由认为这一类细菌使用 Motif^{Fur-R} 类型的 *Fur-box*。

4.2 Fur 调控的生物学本质

尽管自发现以来，*Fur* 一直是最关键的铁稳态转录调控因子，但近年来的研究已使研究者们越来越清楚地认识到 *Fur* 蛋白实际上是一个全局转录调节因子，参与不同生物过程中大量基因的调控，例如氧化还原调节、能量代谢、抗氧化和亚硝化应激反应、核酸生物合成、细胞形态和运动等^[80,85-86]。但是，无论 *Fur* 参与调控的生物途径如何多样，其主业还是调控铁稳态，发挥阻遏蛋白的功能抑制细菌铁摄入途径相关基因的表达^[78,80]，其核心包括铁摄取相关基因和储铁蛋白 *Bfr*、*FtnA*、*FtnB* 和 *Dps* 等^[87]。储铁蛋白具有极高的储铁能力，铁/蛋白结合分子比率通常超过 100 (近 3 000 铁原子/24 聚体)，是决定细菌细胞总铁水平的关键因素^[11]。*Fur* 功能的丧失必然导致铁摄取相关蛋白表达的增加，使细胞铁摄取的能力和速度增加，最终导致铁过量。在很多细菌中的确如此^[88-91]，但更常见的一种情况是细菌(例如大肠杆菌)胞内总铁水平下降但游离铁水平升高^[33,67,83,92]。根据在大肠杆菌中开展的研究，目前的理解为 *Fur* 缺失显著下调了储铁蛋白的胞内含量，导致总铁和游离铁水平变化相反的现象^[92-93]。

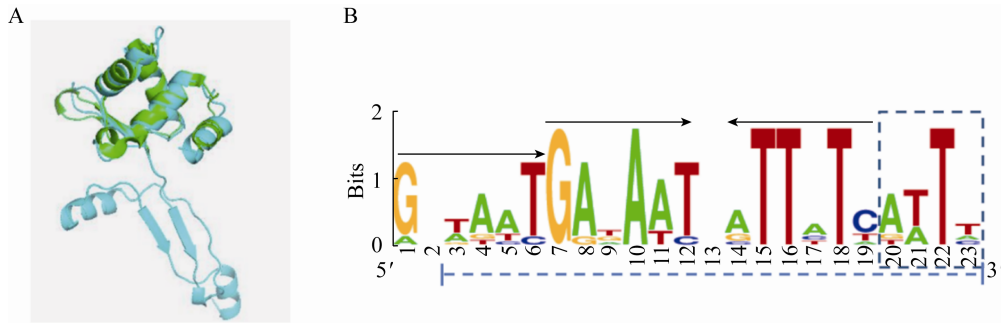


图3 Fur的结构及DNA结合序列

Figure 3 Structure and DNA binding motif of Fur

注: A: Fur的结构, 希瓦氏菌和大肠杆菌 Fur 蛋白的结构比较. 大肠杆菌 Fur 蛋白(PDB No. 2fu4, 绿色)、希瓦氏菌 Fur 蛋白结构(青色), 利用 Phyre 预测产生. B: 希瓦氏菌 Fur 蛋白的 DNA 结合序列. 所示的 19 bp 序列具有 F-F-x-R (实线箭头线)排列的鲜明特征, 而非 21 bp 的 10-1-10 排列的回文序列(虚线区).

Note: A: Structure of Fur. Structure comparison of Fur proteins of *Shewanella* and *E. coli*. *E. coli* Fur (PDB No. 2fu4) is shown in green and *Shewanella* Fur which was predicted by Phyre is shown in cyan. B: Predicted Fur-binding motifs in *Shewanella*. The 19-bp motif proposed contains F-F-x-R arrangement (solid line) rather than a 10-1-10 palindromic sequence arrangement of the 21-bp motif (dash line).

与大肠杆菌相同, 在希瓦氏菌中 Fur 几乎参与调控所有影响铁稳态的途径。通过扫描两种希瓦氏菌 *S. oneidensis* 和 *S. piezotolerans* 基因组中 Motif^{Fur-P} 序列, 发现其 Fur 调节子都包含一些编码有关铁代谢和呼吸作用蛋白质的操纵子^[81-82]。其中, 可靠性较高的前 20 个操纵子中的大多数都编码铁转运和代谢有关的蛋白质^[34], 包括响应铁的小 RNA (sRNA)调节基因 *ryhB*^[94]。另外, 与大肠杆菌 *fur* 突变株一样, 希瓦氏菌的对应菌株胞内总铁水平降低而游离铁含量升高。与总铁水平的变化一致, *fur* 缺失株中细胞色素 *c* 的丰度也显著下降。与大肠杆菌不同, 其主要储铁蛋白为 Ftn, 希瓦氏菌的关键储铁蛋白是 Bfr^[94]。但是, 过表达 Bfr 能够显著提高野生型的胞内总铁水平, 却对 Fur 缺失株细胞的总铁水平作用不大, 也无法恢复其细胞色素 *c* 的合成能力。研究同时探讨了储铁蛋白 Dps 的作用, 其编码基因在希瓦氏菌面对氧化胁迫时受诱导高水平表达, 通过结合胞内的自由铁抑制芬顿反应发生, 保护细胞免受损伤^[95-96]。然而, Dps 不受 Fur 直接调控, 其过表达也对细胞总铁水平的影响有限^[94]。这些对比研究说明储铁

蛋白不可能是 Fur 缺失影响细胞色素 *c* 合成现象的关键因素。更重要的是, 提高培养基中外源 Fe³⁺或 Fe²⁺的浓度能够小幅度提高 Fur 缺失株细胞的总铁水平, 但所有 *fur* 缺失引起的变化却都无法得到恢复, 意味着细胞感应或摄入外源铁的能力严重受损, 但具体分子机制的阐明仍有待未来深入研究。

5 总结与展望

铁不但是保障微生物正常生理活动的重要辅因子, 同时也是一种重要的环境信号和调控组分。由于铁的二元性, 细菌必须能够感应胞内和环境中铁水平的变化, 产生快速有效的反应, 保障自身的生存和增殖。在细菌中, 尽管存在多种 Fe²⁺吸收系统, 但 Feo 系统无疑居于绝对主导地位。与之相反, 铁载体在不同细菌中变化万千, 因此其介导的 Fe³⁺摄取系统极富细菌特异性。同样重要的是, 很多铁载体同时具有其他生理功能。在铁载体应用研究方面, 当前比较重要的方向包括: (1) 通过抑制病原菌的铁载体合成或阻断铁吸收通路, 开发出新的药物靶点^[97]; (2) 利用合成的铁载体-药物耦合物帮助药物转运进入病原菌内, 提高治疗多耐药性细菌

感染和其他人类疾病的效果^[98-99]；(3) 使用不同生理活性的铁载体影响环境中微生物与微生物、微生物与植物之间的相互作用，实现生态环境的自然修复和农作物的生物防病促产等^[100-101]。与次生代谢产物一样，新颖铁载体和具有新生理功能铁载体的挖掘获取最重要途径是通过扩大筛查自然环境中存在的微生物，因此环境微生物学已位于铁载体生物学研究前沿。此外，目前对铁载体合成和转运路径的了解仍留有很大的知识空缺，亟需进一步研究阐明；同时需加强对铁载体生物合成途径的合成生物学探索开发，以获得结构新颖、功能稳定的新分子。

希瓦氏菌是目前生物电能研究的模式菌株，近 30 年的深入研究已经明确了胞外电子传递的所有途径和相关调控体系，为开发利用电能细胞奠定了坚实的理论基础。基于胞外电子传递完全由含铁蛋白承担，因此，该菌的铁稳态是其电能产生的关键因素之一。然而，关于希瓦氏菌的铁稳态生物学，尚有不少重要科学问题亟待解答。众所周知，以 RyhB 为首的 sRNA 调控分子在革兰氏阴性菌铁稳态调控方面具有关键作用，而希瓦氏菌的 RyhB 显示了许多不同的活性，但具体作用机制依然不明。联接铁元素和细胞色素 *c* 的核心分子是血红素，截至目前，铁稳态与血红素稳态的相互影响及其分子机制仍属空白。希瓦氏菌胞内铁元素的水平显著高于大肠杆菌等革兰氏阴性菌，由此带来的氧化胁迫潜在威胁可能是影响该菌存活能力的重要因素，其解决方案仍依赖于更深入的机制研究。因此，对希瓦氏菌复杂的铁转运和调控系统的进一步探究，将有助于理解目前制约该菌作为电能细胞所面临的两大瓶颈(产电能力提高困难的问题和细菌存活下降导致的系统稳定性问题)的分子机制，以利于早日实现规模应用。

REFERENCES

- [1] Miethke M. Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems[J]. *Metallomics*, 2013, 5(1): 15-28
- [2] Melton ED, Swanner ED, Behrens S, et al. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(12): 797-808
- [3] Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(7): 443-454
- [4] Ge RG, Sun XS. Iron trafficking system in *Helicobacter pylori*[J]. *BioMetals*, 2012, 25(2): 247-258
- [5] Grass G, Franke S, Taudte N, et al. The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(5): 1604-1611
- [6] Perry RD, Mier I Jr, Fetherston JD. Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth[J]. *BioMetals*, 2007, 20(3/4): 699-703
- [7] Cao JN, Woodhall MR, Alvarez J, et al. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-PH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4): 857-875
- [8] Lau CKY, Krewulak KD, Vogel HJ. Bacterial ferrous iron transport: The Feo system[J]. *FEMS Microbiol Reviews*, 2016, 40(2): 273-298
- [9] Crosa JH, Walsh CT. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria[J]. *Microbiol and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2): 223-249
- [10] Liu J, Chakraborty S, Hosseinzadeh P, et al. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(8): 4366-4469
- [11] Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F. Bacterial iron homeostasis[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(2/3): 215-237
- [12] Hantke K. Iron and metal regulation in bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(2): 172-177
- [13] Gottesman S, Storz G. Bacterial small RNA regulators: Versatile roles and rapidly evolving variations[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, 3(12): a003798
- [14] O'Brian MR. Perception and homeostatic control of iron in the *Rhizobia* and related bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2015, 69: 229-245
- [15] Kaushik MS, Singh P, Tiwari B, et al. Ferric uptake regulator (Fur) protein: Properties and implications in cyanobacteria[J]. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(1): 61-75
- [16] Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, et al. Towards environmental systems biology of *Shewanella*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 592-603
- [17] Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, et al. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance[J]. *Science*, 2004, 306(5698): 1025-1028

- [18] Shi MM, Wu L, Xia Y, et al. Exoprotein production correlates with morphotype changes of nonmotile *Shewanella oneidensis* mutants[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(7): 1463-1474
- [19] Fu HH, Chen HJ, Wang JX, et al. Crp-dependent cytochrome *bd* oxidase confers nitrite resistance to *Shewanella oneidensis*[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(8): 2198-2212
- [20] Zhou GQ, Yin JH, Chen HJ, et al. Combined effect of loss of the *caa3* oxidase and Crp regulation drives *Shewanella* to thrive in redox-stratified environments[J]. The ISME Journal, 2013, 7(9): 1752-1763
- [21] Yuan J, Chen YW, Zhou GQ, et al. Investigation of roles of divalent cations in *Shewanella oneidensis* pellicle formation reveals unique impacts of insoluble iron[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013, 1830(11): 5248-5257
- [22] Fu HH, Jin M, Ju LL, et al. Evidence for function overlapping of CymA and the cytochrome *bc₁* complex in the *Shewanella oneidensis* nitrate and nitrite respiration[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(10): 3181-3195
- [23] Chen HJ, Luo QX, Yin JH, et al. Evidence for the requirement of CydX in function but not assembly of the cytochrome *bd* oxidase in *Shewanella oneidensis*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2015, 1850(2): 318-328
- [24] Fu HH, Jin M, Wan F, et al. *Shewanella oneidensis* cytochrome *c* maturation component CcmI is essential for heme attachment at the non-canonical motif of nitrite reductase NrfA[J]. Molecular Microbiology, 2015, 95(3): 410-425
- [25] Jin M, Fu HH, Yin JH, et al. Molecular underpinnings of nitrite effect on CymA-dependent respiration in *Shewanella oneidensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1154
- [26] Jin M, Zhang QY, Sun YJ, et al. NapB in excess inhibits growth of *Shewanella oneidensis* by dissipating electrons of the quinol pool[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 37456
- [27] Meng Q, Yin JH, Jin M, et al. Distinct nitrite and nitric oxide physiologies in *Escherichia coli* and *Shewanella oneidensis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(12): e00559-18
- [28] Meng Q, Sun YJ, Gao HC. Cytochromes *c* constitute a layer of protection against nitric oxide but not nitrite[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(17): e01255-18
- [29] Feng X, Sun WN, Kong LG, et al. Distinct roles of *Shewanella oneidensis* thioredoxin in regulation of cellular responses to hydrogen and organic peroxides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(21): e01700-19
- [30] Guo KL, Wang W, Wang HX, et al. Complex oxidation of apocytochromes *c* during bacterial cytochrome *c* maturation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(24): e01989-19
- [31] Liang HH, Zhang YT, Wang SJ, et al. Mutual interplay between ArcA and σ^E orchestrates envelope stress response in *Shewanella oneidensis*[J]. Environmental Microbiology, 2020
- [32] Gao T, Ju LL, Yin JH, et al. Positive regulation of the *Shewanella oneidensis* Omps38, a major porin facilitating anaerobic respiration, by Crp and Fur[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 14263
- [33] Dong ZY, Guo SP, Fu HH, et al. Investigation of a spontaneous mutant reveals novel features of iron uptake in *Shewanella oneidensis*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11788
- [34] Fu HH, Liu LL, Dong ZY, et al. Dissociation between iron and heme biosyntheses is largely accountable for respiration defects of *Shewanella oneidensis fur* mutants[J]. Applied Environmental Microbiology, 2018, 84(8): e00039-18
- [35] Liu LL, Li SS, Wang SJ, et al. Complex iron uptake by the putrebactin-mediated and Feo systems in *Shewanella oneidensis*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2018, 84(20): e01752-18
- [36] Wang SJ, Liang HH, Liu LL, et al. Promiscuous enzymes cause biosynthesis of diverse siderophores in *Shewanella oneidensis*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2020, 86(7): e00030-20
- [37] Hider RC, Kong XL. Chemistry and biology of siderophores[J]. Natural Product Reports, 2010, 27(5): 637-657
- [38] Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, et al. Siderophores in iron metabolism: From mechanism to therapy potential[J]. Trends in Molecular Medicine, 2016, 22(12): 1077-1090
- [39] Dave BP, Anshuman K, Hajela P. Siderophores of halophilic archaea and their chemical characterization[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2006, 44(4): 340-344
- [40] Dave BP, Dube HC. Chemical characterization of fungal siderophores[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2000, 38(1): 56-62
- [41] Gehring AM, Bradley KA, Walsh CT. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: Isochorismate lyase (Entb) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2, 3-dihydroxybenzoate[J]. Biochemistry, 1997, 36(28): 8495-8503
- [42] Quadri LEN, Keating TA, Patel HM, et al. Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: *In vitro* reconstitution of aryl-4,2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF[J]. Biochemistry, 1999, 38(45): 14941-14954
- [43] Keating TA, Marshall CG, Walsh CT. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH[J]. Biochemistry, 2000, 39(50): 15522-15530
- [44] Challis GL Dr. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases[J]. ChemBioChem, 2005, 6(4): 601-611
- [45] Oves-Costales D, Kadi N, Challis GL. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-

- independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis[J]. *Chemical Communications*, 2009, 43: 6530-6541
- [46] Ehmann DE, Shaw-Reid CA, Losey HC, et al. The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: Sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(6): 2509-2514
- [47] Lee JY, Janes BK, Passalacqua KD, et al. Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(5): 1698-1710
- [48] Moore CH, Foster LA, Gerbig DG, et al. Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(4): 1116-1118
- [49] Ledyard KM, Butler A. Structure of putrebactin, a new dihydroxamate siderophore produced by *Shewanella putrefaciens*[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1997, 2(1): 93-97
- [50] Watrous J, Roach P, Heath B, et al. Metabolic profiling directly from the Petri dish using nanospray desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(21): 10385-10391
- [51] Kadi N, Arbache S, Song LJ, et al. Identification of a gene cluster that directs putrebactin biosynthesis in *Shewanella* species: PubC catalyzes cyclodimerization of N-hydroxy-N-succinylputrescine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(32): 10458-10459
- [52] Böttcher T, Clardy J. A chimeric siderophore halts swarming *Vibrio*[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(13): 3510-3513
- [53] Rutschlin S, Gunesch S, Böttcher T. One enzyme, three metabolites: *Shewanella algae* controls siderophore production via the cellular substrate pool[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(5): 598-604.e10
- [54] Rutschlin S, Gunesch S, Böttcher T. One enzyme to build them all: Ring-size engineered siderophores inhibit the swarming motility of *Vibrio*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(5): 1153-1158
- [55] Michael AJ. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules[J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(15): 2315-2329
- [56] Kouzuma A, Hashimoto K, Watanabe K. Roles of siderophore in manganese-oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 326(1): 91-98
- [57] Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, et al. TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 43-60
- [58] Bolam DN, van den Berg B. TonB-dependent transport by the gut microbiota: Novel aspects of an old problem[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2018, 51: 35-43
- [59] Schalk IJ, Guillon L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: Different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways[J]. *Amino Acids*, 2013, 44(5): 1267-1277
- [60] Greenwald J, Hoegy F, Nader M, et al. Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: A role for ferrous iron[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(5): 2987-2995
- [61] Yeterian E, Martin LW, Lamont IL, et al. An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(3): 412-418
- [62] Schalk IJ, Abdallah MA, Pattus F. Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(5): 1663-1671
- [63] Imperi F, Tiburzi F, Visca P. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(48): 20440-20445
- [64] Qian YF, Shi L, Tien M. SO2907, a putative TonB-dependent receptor, is involved in dissimilatory iron reduction by *Shewanella oneidensis* strain MR-1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(39): 33973-33980
- [65] Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, et al. Feo-transport of ferrous iron into bacteria[J]. *Biometals*, 2006, 19(2): 143-157
- [66] Hantke K. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil?[J]. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(5): 192-195
- [67] Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, et al. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(25): 16243-16248
- [68] Eng ET, Jalilian AR, Spasov KA, et al. Characterization of a novel prokaryotic GDP dissociation inhibitor domain from the g protein coupled membrane protein FeoB[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 375(4): 1086-1097
- [69] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(3): 567-580
- [70] Kammler M, Schön C, Hantke K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(19): 6212-6219
- [71] Stevenson B, Wyckoff EE, Payne SM. *Vibrio cholerae* FeoA, FeoB, and FeoC interact to form a complex[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(7): 1160-1170
- [72] Weaver EA, Wyckoff EE, Mey AR, et al. FeoA and FeoC are essential components of the *Vibrio cholerae* ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(21): 4826-4835
- [73] Stojiljkovic I, Cobeljic M, Hantke K. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to

- colonize the mouse intestine[J]. FEMS Microbiology Letters, 1993, 108(1): 111-115
- [74] Dashper SG, Butler CA, Lissel JP, et al. A novel *Porphyromonas gingivalis* FeoB plays a role in manganese accumulation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(30): 28095-28102
- [75] Aranda J, Cortés P, Garrido ME, et al. Contribution of the FeoB transporter to *Streptococcus suis* virulence[J]. International Microbiology, 2009, 12(2): 137-143
- [76] Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development[J]. Nature, 2002, 417(6888): 552-555
- [77] Marshall B, Stintzi A, Gilmour C, et al. Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter[J]. Microbiology, 2009, 155: 305-315
- [78] Seo SW, Kim D, Latif H, et al. Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*[J]. Nature Communications, 2014, 5(1): 4910
- [79] Coy M, Neilands JB. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein[J]. Biochemistry, 1991, 30(33): 8201-8210
- [80] Fillat MF. The Fur (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014, 546: 41-52
- [81] Yang YF, Harris DP, Luo F, et al. Characterization of the *Shewanella oneidensis* Fur gene: Roles in iron and acid tolerance response[J]. BMC Genomics, 2008, 9(S1): S11
- [82] Yang XW, He Y, Xu J, et al. The regulatory role of ferric uptake regulator (Fur) during anaerobic respiration of *Shewanella piezotolerans* wp3[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e75588
- [83] Lavrrar JL, McIntosh MA. Architecture of a Fur binding site: A comparative analysis[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(7): 2194-2202
- [84] Wan XF, VerBerkmoes NC, Mccue LA, et al. Transcriptomic and proteomic characterization of the Fur modulon in the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(24): 8385-8400
- [85] Yu CX, Genco CA. Fur-mediated global regulatory circuits in pathogenic *Neisseria* species[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(23): 6372-6381
- [86] González A, Angarica VE, Sancho J, et al. The FurA regulon in *Anabaena* sp. PCC 7120: *In silico* prediction and experimental validation of novel target genes[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(8): 4833-4846
- [87] Kim IH, Wen YC, Son JS, et al. The fur-iron complex modulates expression of the quorum-sensing master regulator, smcr, to control expression of virulence factors in *Vibrio vulnificus*[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(8): 2888-2898
- [88] Sheikh MA, Taylor GL. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination[J]. Molecular Microbiology, 2009, 72(5): 1208-1220
- [89] Becerra G, Merchán F, Blasco R, et al. Characterization of a ferric uptake regulator (Fur)-mutant of the cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 190: 2-10
- [90] Jittawuttipoka T, Sallabhan R, Vattanaviboon P, et al. Mutations of ferric uptake regulator (*Fur*) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192(5): 331-339
- [91] Vajrala N, Sayavedra-soto LA, Bottomley PJ, et al. Role of a Fur homolog in iron metabolism in *Nitrosomonas europaea*[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1): 37
- [92] Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang YS, et al. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(5): 1415-1428
- [93] Keyer K, Imlay JA. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(24): 13635-13640
- [94] Massé E, Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(7): 4620-4625
- [95] Jiang YM, Dong YY, Luo QX, et al. Protection from oxidative stress relies mainly on derepression of OxyR-dependent KatB and Dps in *Shewanella oneidensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(2): 445-458
- [96] Wan F, Kong LG, Gao HC. Defining the binding determinants of *Shewanella oneidensis* OxyR: Implications for the link between the contracted OxyR regulon and adaptation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(11): 4085-4096
- [97] Khan A, Singh P, Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: A review[J]. Microbiological Research, 2018, 212-213: 103-111
- [98] Möllmann U, Heinisch L, Bauernfeind A, et al. Siderophores as drug delivery agents: Application of the "Trojan Horse" strategy[J]. Biometals, 2009, 22(4): 615-624
- [99] Dobias J, Déneraud-Tendon V, Poirel L, et al. Activity of the novel siderophore cephalosporin cefiderocol against multidrug-resistant gram-negative pathogens[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2017, 36(12): 2319-2327
- [100] Dimkpa CO, Merten D, Svatoš A, et al. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(5): 1687-1696
- [101] Saha M, Sarkar S, Sarkar B, et al. Microbial siderophores and their potential applications: A review[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(5): 3984-3999