

## 微生物金属响应蛋白研究进展

朱振宇 华珪堃 胡婷婷 张梦君 杨宇\* 高宇

(中南大学资源加工与生物工程学院 生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083)

**摘要:** 微生物金属响应蛋白(Metal responsive proteins)是一类具有金属传感效应的 DNA 转录调节因子。目前,已研究的该调节因子家族有 7 个(Ars R-Smt B 等)。每个响应蛋白家族的不同代表都可以调节基于不同金属效应物的基因表达,它们不仅调节微生物细胞内与金属内稳态直接相关的基因表达,还可以调节细胞代谢以减少细胞对供应短缺的金属的需求。目前,金属响应蛋白的研究已有一定成果,部分金属响应结合位点的氨基酸残基及调节机制都被确定。本综述总结了不同金属响应蛋白家族的金属转录调节因子,介绍了关于金属调节基因表达机制的现有研究进展,并以 Ars R-Smt B 家族和 Fur 家族为例,详细介绍了金属响应结合位点的结构特征与相关表达调控机制。此外,还介绍了不同响应蛋白控制微生物细胞金属水平作用方面的最新进展,以及在生物冶金与微生物环境治理方面的应用前景。

**关键词:** 金属响应蛋白, 转录调节因子, 代谢调控

## Advances in microbial metal response proteins

ZHU Zhen-Yu HUA Yao-Kun HU Ting-Ting ZHANG Meng-Jun YANG Yu\* GAO Yu

(Key Laboratory of Biometallurgy of Ministry of Education of China, School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

**Abstract:** Microbial metal responsive proteins are a class of DNA transcriptional regulators with metal sensing effect. There are seven families of regulators now been characterized (Ars R-Smt B etc.). Different representatives of each sensor families can regulate gene expression in response to different metals, they not only modulate the expression of genes directly associated with metal homeostasis of microbial cells, but can also alter metabolism to reduce the cellular demand for metals in short supply. At present, the metal response protein research has been some success, and the residues that form the sensory metal-binding sites have been defined in a number of these proteins. This review summarized the different families of bacterial metal-sensing transcriptional regulators

**Foundation items:** Central South University Innovation Foundation for Postgraduate of China (2017zzts382); Central South University Graduate excellent course (2014jpkc003); Natural Science Foundation of Hunan Province (2015JJ2165); Fundamental Research Funds for the Central Universities of Central South University (165611031)

\*Corresponding author: E-mail: csuyangyu@csu.edu.cn

**Received:** June 22, 2017; **Accepted:** December 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): July 14, 2018

基金项目: 中南大学研究生自主创新探索创新项目(2017zzts382); 中南大学研究生精品课程项目(2014jpkc003); 湖南省自然科学基金(2015JJ2165); 中南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(165611031)

\*通信作者: E-mail: csuyangyu@csu.edu.cn

收稿日期: 2017-06-22; 接受日期: 2017-12-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-07-14

and discussed current knowledge regarding the mechanisms of metal-regulated gene expression. Details of the structural features of sensory metal-binding sites focusing on the Ars R-Smt B family and the mechanisms of Fur gene expression. In addition, recent progress in understanding the coordination of the different sensors to control microbial cellular metal levels was discussed, as well as in the application of bio-metallurgy and environmental management prospects.

**Keywords:** Metal responsive proteins, Transcriptional regulator, Metabolic regulation

金属离子对生物体的生长代谢具有重要意义,尤其在细菌中,大部分蛋白质功能结构的实现都需要金属的参与。由于低浓度的金属离子也有可能对细胞造成毒害,所以对细菌来说,以某种方式感应金属存在并迅速适应外界环境是非常重要的,这需要多个金属响应蛋白家族的参与。本实验室在对隐藏嗜酸菌 Cr(VI)还原特性及相关基因的差异表达研究中,发现菌种金属响应蛋白在微生物抗逆性、金属氧化还原能力等有着重要的作用,进而开展金属响应蛋白下游基因结合位点等方面的进一步研究<sup>[1]</sup>。

环境中金属含量、生物有效性变化及细菌本身代谢活动都能引起金属内需变化,如含氧量、含水量、pH 值、吸附/解吸过程、盐度、有机质含量、硫酸盐和碳酸盐含量等外界环境变化,都能使细菌遭遇金属过量或缺乏的状况。因此,金属响应转录调节因子必须起到调节金属内稳态的作用,包括调节细胞代谢与环境金属生物有效性。

目前,在细菌中研究较为透彻的金属响应蛋白主要有 7 个家族<sup>[2]</sup>,分为 Ars R-Smt B、Mer R、Cso R-Rcn R、Cop Y、Dtx R、Fur 和 Nik R。金属响应蛋白属于调节蛋白家族,其主要功能为调节下游相关基因的转录,不属于主要与金属感应相关的感

应蛋白家族,不包括金属响应(Extra cytoplasmic function, ECF)起始转录因子和双组分调节系统。

1 金属响应蛋白家族简介

金属响应蛋白的 7 个主要家族中,每个家族的不同代表蛋白响应不同的金属以调节基因的表达,而不同家族的代表蛋白也可能响应相同的金属。如表 1 所示:Fur 家族包括铁吸收调节蛋白 Fur、锌吸收调节蛋白 Zur<sup>[3-4]</sup>、锰吸收调节蛋白 Mur 和镍吸收调节蛋白 Nur<sup>[5]</sup>。Dtx R 家族包括铁响应蛋白(白喉毒素调节蛋白 Dtx R,铁依赖性调节蛋白 Ide R,葡萄球菌铁调节阻遏物 Sir R)、锰和镉响应蛋白(锰转运调节蛋白 Mnt R,链球菌共聚焦-介电粘合调节蛋白 Sca R)、锰和锌响应蛋白(操纵子调节蛋白 Tro R)<sup>[6-8]</sup>。Nik R 家族代表只响应镍,为镍响应蛋白<sup>[9]</sup>。Mer R 家族包含汞响应蛋白 Mer R<sup>[10]</sup>,镉、铅、锌响应蛋白(锌输送调节蛋白 Znt R<sup>[11]</sup>,铅响应调节蛋白 Pbr R<sup>[12]</sup>,铜和金响应蛋白(铜外排调节蛋白 Cue R;金抗逆性响应蛋白 Gol S)<sup>[13-14]</sup>,钴响应蛋白(钴输送 P 型 ATPase 调节蛋白 Coa R)。Ars R-Smt B 家族包含锌响应蛋白(金属硫蛋白调节蛋白 Smt B;锌转运 P 型 ATP 酶调节蛋白 Zia R),锌和钴响应蛋白(钴和锌抗逆性调节蛋白 Czr A)<sup>[15]</sup>,

表 1 金属响应蛋白的 7 个主要结构族

Table 1 The seven main structural families of soluble metal-sensing proteins

Type	Metal responsive proteins families	Metal availability	Family other representatives
Co-repression	Fur	Fe, Zn, Mn, Ni	Zur, Mur, Nur
	Dtx R	Fe, Mn, Cd, Zn	Ide R, Mnt R, Sca R, Sir R, Tro R
	Nik R	Ni	None
Activation	Mer R	Hg, Zn, Cd, Pb, Cu, Au, Ag, Co	Znt R, Pbr R, Cue R, Gol S, Coa R
De-repression	Ars R-Smt B	As, Sb, Bi, Zn, Cd, Pb, Co, Ni, Cu, Ag	Cad C, Azt R, Zia R, Cmt R, Czr A, Nmt R, Kmt R, Bxm R
	Cso R-Rcn R	Cu, Ni, Co	None
	Cop Y	Cu	None

砷、锑、铋响应蛋白(砷调节蛋白 *Ars R*)<sup>[16]</sup>, 镉、铅、锌响应蛋白(镉抗逆性调节蛋白 *Cad C*)<sup>[17]</sup>, 鱼腥藻锌转运调节蛋白 *Azt R*<sup>[18]</sup>, 镉、铅响应蛋白(结核分枝杆菌调节蛋白 *Cmt R*)<sup>[19]</sup>, 镍、钴响应蛋白(镍结核分枝杆菌调节蛋白 *Nmt R*; 镍结核分枝杆菌调节蛋白 *Kmt R*)<sup>[20]</sup>, 铜、银、锌、镉响应蛋白(颤藻属短的 P 型 ATP 酶和金属硫蛋白调节蛋白 *Bxm R*)<sup>[21]</sup>. *Cso R*-*Rcn R* 家族包括铜响应蛋白(铜响应操纵子调节蛋白 *Cso R*)<sup>[22-23]</sup>, 镍、钴响应蛋白(钴和镍阻遏物调节蛋白 *Rcn R*)<sup>[24]</sup>. *Cop Y* 家族代表全为铜离子响应蛋白, 为铜 P 型 ATPase 调节蛋白<sup>[25]</sup>.

此外, 还有一些属于其他结构不同调节因子的金属响应蛋白, 其家族成员并不主要参与金属响应<sup>[26]</sup>, 但能调节下游基因表达。如: *Tet R* 家族锌响应蛋白, *Scz A*<sup>[27]</sup>和 *Lys R* 家族钼酸盐响应蛋白 *Mod E* 等<sup>[28-29]</sup>; 还存在多个双组分调节系统, 能通过检测细胞质膜外金属水平以控制相关基因的表达<sup>[30]</sup>, 如 *Cus R/S* 双组分系统响应大肠杆菌细胞周质中的过剩铜, 并触发 *Cus* 系统控制的铜离子输出泵<sup>[30-31]</sup>。胞质内(*ECF*)  $\sigma$  因子也可以通过跨膜信号传导级联响应胞外金属效应物而改变基因表达<sup>[32-34]</sup>, 与大肠杆菌 *Fec IRA* 信号级联类似, 即在 *Fec I* 二核酸柠檬酸铁与外膜中的 *Fec A* 结合的情况下, 将信号传递到细胞质膜中的 *Fec R*, 诱导细胞溶质 *Fec I* 的激活进而启动了 *fec ABCDE* 转运基因的转录<sup>[32]</sup>。

## 2 金属响应蛋白调节机制简述

金属响应蛋白家族的调节反应, 需要结合正确的金属效应物(金属离子、金属伴侣蛋白、金属转运蛋白等), 继而引发基因表达的变构调控。金属响应转录调节因子可以响应胞内不同金属离子水平, 这些金属响应蛋白的特异性来源于每个响应蛋白对特定金属效应物具有高度亲和力, 而对其他金属效应物亲和力较弱。这些蛋白质的金属亲和力可能遵循一种普遍的偏好顺序。对于必需的二价金属离子, 遵循 Irving-Williams 稳定性顺

序:  $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} (Cu^+) > Zn^{2+}$ 。因此, 稳定性顺序中, 位置越高的金属(如锌和铜)倾向于与所有金属响应蛋白具有高度亲和力。

此外, 影响金属响应蛋白结合并响应金属效应物的因素, 还包括响应蛋白与金属转运蛋白或金属伴侣蛋白的特异性相互作用。例如, 来自肠球菌的铜响应蛋白 *Cop Y* 可以从 *Cop Z* 铜伴侣蛋白中获得铜。因此, 响应蛋白与特定金属转运蛋白形成异源二聚体的能力也可以确定它们是否可以结合细菌内的特定金属效应物<sup>[35]</sup>。所以, 对于一些金属响应蛋白, 可能通过金属效应物与相应的氨基酸残基结合来感应金属, 也可能通过与其他蛋白质附加配体相结合来感应。

一些金属响应蛋白作用于单个靶基因, 而另一些金属响应蛋白作为全局调控因子起作用, 并响应于特定金属的含量从而改变多个基因的表达, 包括编码主要参与金属内稳态的蛋白质基因, 如金属离子的输入、输出、隔离(如金属硫蛋白)、储存(如储铁蛋白)、解毒(如金属还原酶和氧化酶)和胞内金属转运(金属伴侣蛋白)。此外, 一些金属响应蛋白还具有调控除金属稳态以外的蛋白表达, 如氧化应激抗逆性(*Nur* 和 *Fur*)、酸适应性(*Nik R*)、白喉毒素合成(*Dtx R*)<sup>[8]</sup>、呼吸(*Fur*)<sup>[36-37]</sup>和核糖体生物合成(*Zur*)<sup>[38]</sup>。

大肠杆菌金属响应蛋白调节机制如图 1A 所示, 大肠杆菌 *Fur* 控制多种基因的铁依赖性表达, 在铁吸收、铁储存、三羧酸循环、致病性和氧化还原应激抗逆性中都有作用<sup>[37]</sup>。虽然它主要作为阻遏物存在, 但 *Fur* 还可以直接和间接地作为转录激活因子, 并涉及 *Ryh B* 的基因调节<sup>[39]</sup>。 *Mnt R* 响应锰和镉的金属含量水平, 负调节表达锰质子的协同载体 *Mnt H*<sup>[40]</sup>。两种锌响应蛋白 *Zur* 和 *Znt R* 分别调节了 ABC 型锌特异性输入泵(*Znu ABC*)<sup>[41]</sup>和锌输出泵 P 型 ATP 酶(*Znt A*)的表达。 *Nik R* 抑制了编码 *Nik ABCDE* 输入转运蛋白的 *Nik* 操纵子响应镍的转录<sup>[42-43]</sup>, 而 *Rcn R* 触发金属输出蛋白 *Rcn A* 响应于镍和钴水平升高的表达<sup>[24]</sup>。 *Cue R* 响应铜

(附加银和金),并激活铜输出的 P 型 ATP 酶(Cop A)和赋予铜抗逆性的多铜氧化酶(Cue O)的转录<sup>[44]</sup>。Ars R 响应砷,以触发砷抗逆性操纵子的表达。Mod E 响应钼酸盐并调控钼酸盐吸收(mod)、钼喋呤合成(moa)、钼霉素硝酸还原酶(nap)、二甲基亚砷还原酶(dms)、发酵性二氢生产(fdh F 和 hyc)和呼吸性硝酸还原酶(nar XL)。

枯草芽孢杆菌金属响应蛋白调节机制如图 1B 所示,枯草芽孢杆菌的 Fur 也对多种基因进行全局性的调节,以协调铁消耗过程中的铁摄取和铁储备反应,包括储铁蛋白质合成如琥珀酸脱氢酶、乌头碱、细胞色素以及血红素、半胱氨酸和支链氨基酸的生物合成酶的下调<sup>[36]</sup>。锰响应蛋白 Mnt R 抑制编码 ABC 型锰输入泵和质子锰协同载体 Mnt H 的 2 个操纵子<sup>[45]</sup>。Zur 具有锌限制性调控,Zur 控制锌摄取基因(包括 Znu ABC)的表达,以及几种响应锌水平升高的核糖体蛋白质旁系同源物 Czc A,其调节 2 个锌输出泵 Czc D 和 Cad A 的表达<sup>[46]</sup>。

2 个相关的砷响应蛋白(Ars R 和 Ase R)调节具有砷抗逆性作用的基因。Cso R 感应铜并触发铜输出泵的 P 型 ATP 酶(Cop A)和铜金属伴侣蛋白(Cop Z)的表达<sup>[47-48]</sup>。

经图 1 对比分析大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中金属响应转录调控因子的调节机制,可以发现在大肠杆菌中,Znt R 和 Cue R 可以分别响应被 Mer R 家族激活蛋白提高的锌和铜水平,但在枯草芽孢杆菌中,这 2 种金属浓度水平的提高分别被去阻遏物 Czc A 和 Cso R 响应。在这 2 种情况下,这些响应蛋白都起着引发参与锌和铜抗逆性蛋白质表达的作用。所以,不同的细菌所含有的金属响应蛋白类型可能不同,但通常结构不同的响应蛋白在不同的细菌中可能起到相似的作用,这与金属响应蛋白的特异性及下游基因结合位点的结构特征有关,可能由于细菌横向基因转移以及广泛的融合和协调演化而产生。下面,对最具代表性的 2 个响应蛋白家族 Ars R-Smt B 和 Fur 进行详细介绍。

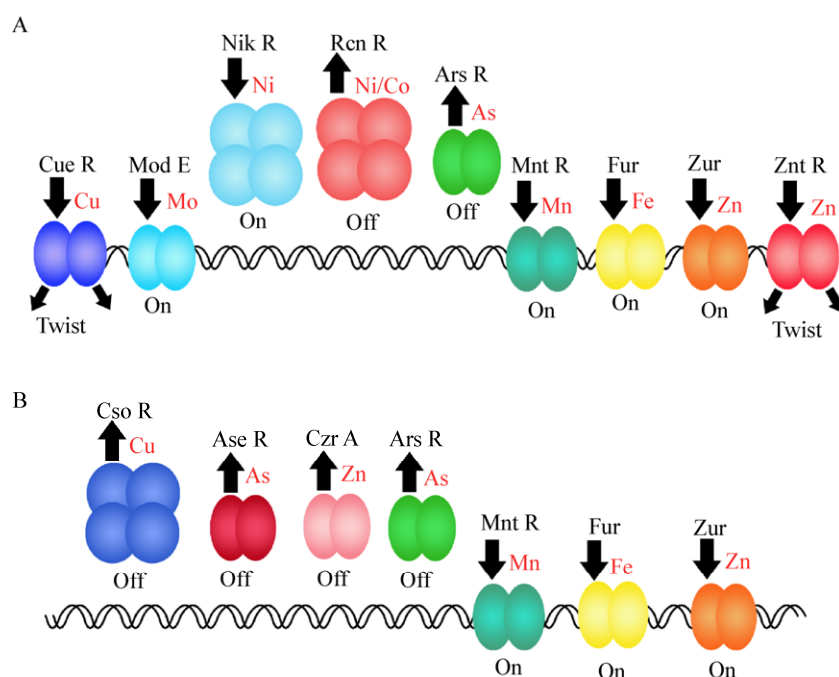


图 1 大肠杆菌(A)和枯草芽孢杆菌(B)中的可溶性金属响应蛋白

Figure 1 The complement of soluble metal-sensors in *Escherichia coli* (A) and *Bacillus subtilis* (B)

注: 不包括双组分调节蛋白系统和 ECF 起始转录因子。

Note: Two component regulator systems and ECF sigma factors are not included.

### 3 Ars R-Smt B 响应蛋白家族及结合位点结构特征简述

#### 3.1 Ars R-Smt B 响应蛋白家族

Ars R-Smt B 家族金属调节蛋白是目前在细菌中研究较为透彻的金属响应蛋白之一,该家族包含多种金属效应物的响应(表 2),并可对下游基因转录进行全局性调节。

Ars R-Smt B 家族已经进化出不同的家族成员以响应不同离子半径、配合物结构和价态的金属离子。如聚球藻属 PCC 7942 菌的 Smt B 作为 Zn(II) 响应阻遏物,在缺乏金属离子的情况下,抑制 *smt A* 基因的转录,编码包含螯合过量 Zn 的 II 类金属硫蛋白(Smt A II)。虽然 Smt B 还在体内和体外的某些条件下也响应 Co(II)和 Cd(II)变化,但 Zn(II) 是特异性与亲和力最高的金属效应离子<sup>[49]</sup>。聚球藻属 PCC 7942 菌的 Smt B 在集胞藻属 PCC 6803 中称为 Zia R,是一种高度 Zn(II) 的特异性响应蛋白<sup>[50]</sup>,与聚球藻属 PCC 7942 菌的 Smt B 有大于 50% 的序列相似性,并调节相异的 *zia* 操纵子的表达,如编码 Zia R 和 Zia A (P 型 ATPase 金属外排泵)。金黄色葡萄球菌还含有染色体的 Zn(II) 或 Co(II) 特异性金属调节转录抑制子 C<sub>zr</sub> A (也称为 Znt R),负调控 *c<sub>zr</sub>* 操纵子的表达,能编码除 C<sub>zr</sub> A 之外的阳离子扩散促进蛋白家族的膜结合 Zn(II) 转运体 C<sub>zr</sub> B (Znt A)<sup>[51-52]</sup>。C<sub>zr</sub> A 与 Smt B 具有

最高的序列相似性,与 Zn(II) 是 *smt*、*c<sub>zr</sub>* 和 *zia* 操纵子最强的诱导物一致。金黄色葡萄球菌还含有 Cad C,其编码在多重抗性性质粒 pI258 上或在一些菌株中整合到细菌染色体中<sup>[53]</sup>,在质粒 pI258 上编码的 Cad C 在体内和体外结合包括 Cd(II)、Pb(II)和 Bi(III)以及 Zn(II)等亲硫的有毒金属离子。Cad C 还调节编码膜结合 Cd(II)/Pb(II) 特异性 P 型 ATP 酶外排泵的 *cad* 操纵子的表达。

最近又确定了一种称为结核分枝杆菌的 Nmt R 的 Ni(II)/Co(II) 响应阻遏物<sup>[54-55]</sup>。*nmt* 操纵子包含 *nmt A* 基因,其蛋白质产物与来自蓝藻集胞藻属的与 Co(II) 输出的 ATP 酶输出泵相关的 Coa T 具有序列相似性;Nmt A 也被认为在结核分枝杆菌中具有相同的功能<sup>[49]</sup>。

#### 3.2 Ars R-Smt B 响应蛋白家族结合位点结构特征

对金属敏感性蓝细菌 apo-Smt B 操纵子建模,预测了同源二聚体 apo-Smt B 结构的三维模型。在使用乙酸汞浸泡 apo-Smt B 晶体后获得的差异电子密度图表明每个二聚体具有 2 个对称相关的金属结合位点。体内外研究证实了每对二聚体有两对金属结合位点(图 2),一对与  $\alpha 3$  螺旋相关,包括由相对单体( $\alpha 3$ N)位点的氨基末端区域提供的 2 个配体,和桥联反平行羧基末端  $\alpha 5$  螺旋( $\alpha 5$  位点)的第二对位点。

表 2 Ars R-Smt B 家族转录调节的金属抗性操纵子

Table 2 The metal-sensor operon regulated by Ars R-Smt B family transcriptional regulator

Metal availability	Inhibitory factor	Resistant protein	Resistant protein regulating mode
Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>	Smt B	Smt A	Metallothionein
As <sup>3+</sup> , Sb <sup>3+</sup>	Ars R (Ars D)	(Ars A) Ars B, Ars C	Atpase exporter Diffusion transporter Arsenate reductase
Zn <sup>2+</sup>	Zia R	Zia R	Atpase exporter
Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Bi <sup>3+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Cad C	Cad A	Atpase exporter
Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	C <sub>zr</sub> A	C <sub>zr</sub> B	Diffusion transporter
Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	Nmt R	Nmt A	Atpase exporter

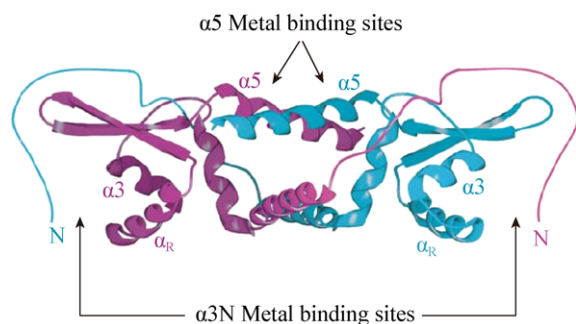


图2 同型二聚体 apo-Smt B 的结构预测<sup>[56]</sup>  
Figure 2 The structure of homodimeric apo-Smt B<sup>[56]</sup>

#### 4 Fur 家族调节因子调节机制

Fur 响应蛋白家族在国内研究相对较少,其主要负责调控细菌中铁、锌、锰、镍等二价金属离子的吸收。Fur 蛋白属于普遍存在的保守的超家族原核调节因子,参与维持不同金属离子和氧化应激反应的稳态<sup>[57]</sup>。刘晓隽等<sup>[58]</sup>也对 Fur 蛋白家族的研究现状进行了讨论。由于 Fur 响应蛋白家族具有极强的金属依赖性,并具有在多个位点上结合启动子的寡聚化能力,是研究金属依赖性 DNA 转录

调节因子的理想调节蛋白。

Roncarati 等<sup>[59]</sup>使用幽门螺杆菌 Fur 调节因子作为模型来探索参与转录调控的金属依赖性短链 DNA 缩合机制<sup>[60]</sup>,如图 3 所示。为此,通过 DNase I 足迹,AFM 和启动子功能分析相结合来研究受 Fur 调节的 ars R (细菌耐酸性调节基因)启动子,即 Fur 靶向调节 ars RS 操纵子<sup>[61-62]</sup>。为了研究金属稳态调节如何转录进入 Ars R 调节子,从对数期幽门螺杆菌培养物提取总 RNA 进行天然 Pars R 启动子的引物延伸分析,并比较在不同的遗传背景下,用不同金属离子( $\text{Fe}^{2+}$ 和  $\text{Ni}^{2+}$ )或铁螯合蛋白(Dipy)处理 Fur 引起 Pars R 启动子的变化。

结果表明,基本的 Ars R 酸响应操纵子处于由 Fur 和 Nik R 调节的金属离子通路的转录控制之下,前者作为金属响应的主阻遏物( $\text{Fe OFF}$ ),holo-Fur 结合 Pars R 启动子抑制 Pars R 表达,后者作为 ars R 转录的正调节蛋白,可以作为 I 类激活蛋白直接激活 ars 启动子,或间接地通过阻止 Fur 与 ars R 启动子结合的抗抑制机制。通过 DNase I 足迹研究,ars R 调控的分子机制也被探明。

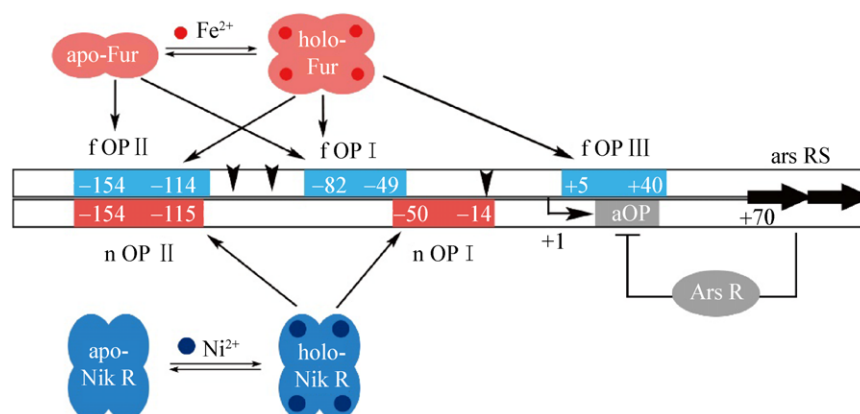


图3 Pars R 启动蛋白中操纵子布局的推断示意图

Figure 3 Inferred schematic representation of the operator layout in the Pars R promoter

注:蓝色框为 fOP I, fOP II 和 fOP III 的 Fur 操纵子;红色框为 nOP I 和 nOP II 的 Nik R 操纵子;apo-Fur 为缺铁条件下的 Fur 调节蛋白;holo-Fur 为铁结合状态的 Fur 调节蛋白;apo-Nik R 为缺镍状态的 Nik R 调节蛋白;holo-Nik R 为镍结合状态下的 Nik R 调节蛋白。

Note: Fur operators named fOP I, fOP II and fOP III are depicted as blue boxes; While Nik R operators named nOP I and nOP II are depicted as red boxes; apo-Fur is iron-sensitive operators and holo-Fur is iron-dependent operators; apo-Nik R is nickel-sensitive operators; holo-Nik R is nickel-dependent operators.



Fur 响应蛋白家族能够根据蛋白质的金属结合状态而诱导不同的 DNA 缩合反应。在低铁浓度时, apo-Fur 与上游操纵子 f OP I 和 f OP II 结合形成二聚体, 使中间 DNA 环化, 但开放了启动子元件对 RNAP 的结合和转录。在铁浓度较高时, holo-Fur 形成四聚体和高级寡聚体, 其通过结合到 f OP I, f OP II 和 f OP III 的 3 个操纵子位点而缩合启动子 DNA, 从而封闭 RNAP 的结合(Fe OFF)。在镍的存在下, holo-Nik R 结合操纵子 n OP I 和 n OP II, 阻止 Fur 与启动子结合, 激活了 RNAP 结合和 ars R 转录(Nik R ON)的条件<sup>[59]</sup>。

Seo 等<sup>[63]</sup>研究了大肠杆菌中 Fur 蛋白除了铁代谢之外的复杂调控作用。共研究了 81 个 Fur 下游靶基因, 结果显示, Fur 利用负反馈回路连接铁运输和利用酶来维持铁稳态, 且发现 Fur 也直接参与

DNA 合成, 能量代谢和生物膜发育调控等方面。许多学者的研究结果都显示, Fur 表现出全局调节作用, 影响与铁代谢有关的许多基本细胞过程, 包括协调大肠杆菌对铁的可利用性的总体反应, 如图 4 所示。

## 5 不同金属响应蛋白控制细胞金属水平的作用

细菌金属响应转录因子常与金属内稳态基因的调控有关, 影响细胞中金属的生物有效性。因此, 它们对其金属效应物的亲和力被认为与这些金属在细胞中的阈值相关, 其水平高于该值导致它们抑制金属输入泵基因的转录和/或触发金属抗性、隔离或储存相关基因的表达。因此, 为保证金属响应蛋白的有效结合, 需要维持特定的金属效应物浓度。

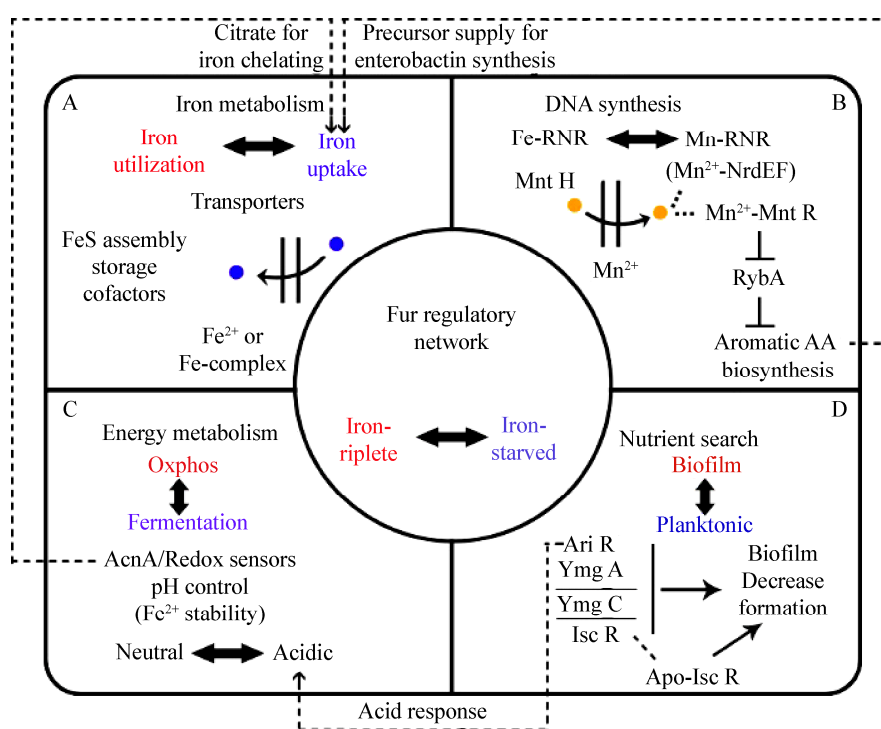


图 4 Fur 调控网络在大肠杆菌中的全局调控作用

Figure 4 Global coordination roles of the Fur regulatory network in *E. coli*

注: A: 铁代谢相关基因; B: DNA 合成; C: 向发酵途径重新定向代谢; D: 生物膜形成。这些网络通过 Fur 扮演不同的角色而相互联系。

Note: A: Iron metabolism; B: DNA synthesis; C: Redirection of metabolism towards fermentative pathways; D: Biofilm formation. These networks are linked through the coordination role that Fur plays.

金属响应蛋白对金属效应物的亲和力随着金属在 Irving-Williams 顺序中位置的上升而增加。因此,更具竞争力的金属(如锌和铜)的响应蛋白会将这些金属维持在极低的浓度,从而防止其与其他的竞争力较小的金属响应蛋白(如锰和铁)结合位点相结合。而竞争较弱的金属的响应蛋白为有效结合其效应物将维持更高的金属效应物浓度。

大肠杆菌中,Zur 和 Znt R 的 2 个锌响应蛋白具有  $10^{-15}$  mol/L 的锌亲和力<sup>[64]</sup>,因此在高于平均摩尔浓度的锌浓度下,锌结合的 Zur 抑制编码 Znu ABC 基因的转录和锌结合的 Znt R 激活锌输出的 P 型 ATP 酶(Znt A)的表达<sup>[65-66]</sup>。因此,当 Zur 和 Znt R 检测到的锌浓度非常低,这意味着锌输入泵受到调节,并且所有过量胞质锌必须被结合和储存,以保持极低的游离锌浓度。类似地,大肠杆菌铜响应蛋白 Cue R 的铜亲和力估计为  $10^{-21}$  mol/L,与 Cue R 调节铜输出泵所需感应的铜浓度一致<sup>[67]</sup>,枯草芽孢杆菌锰感应蛋白 Mnt R 对锰的亲和力相对较低(约  $10^{-4}$  mol/L),但与根据大肠杆菌中 Mnt R 亲和力所估计的  $10^{-5}$  mol/L 相一致<sup>[68]</sup>。

综上,在不同细菌中细胞内金属含量的差异可以改变响应蛋白在胞内的金属特异性,说明在不同的物种中金属响应蛋白所响应的金属效应物的浓度可以不同,响应蛋白的体内金属特异性可能受特定细胞胞质溶胶中的该组响应蛋白的相对亲和力的影响<sup>[69]</sup>。因此,尽管 Irving-Williams 级数下游的金属响应蛋白可能在体外结合或响应更具竞争力的金属,但在体内,竞争性金属对其金属结合位点的结合可能会因同一胞质溶胶中存在该金属的第二响应蛋白而被抑制。这意味着,特定金属响应蛋白需要在细菌体内维持金属效应物在一个特定的浓度,可以通过检测金属效应物在细菌体内的浓度,推测其金属响应蛋白的分类与亲和力大小。

## 6 小结与展望

细菌在长久的进化过程中,产生了一系列的金属响应转录调节家族,可以在金属过量或缺乏时响应特定的金属效应物来调节相关基因表达,从而维

持稳定的细胞内金属平衡。结构不同的金属响应蛋白家族可能在不同生物体中发挥相同的作用,而结构相似的金屬响应蛋白也可以响应不同的金属效应物,并对不同的靶基因起作用。这与金属响应蛋白演变的“混合匹配”方式一致,并且也可能由于横向基因转移以及广泛的融合和协调演化而产生。

金属响应转录调节家族具有广阔的研究前景。研究金属响应转录调节家族,将对细菌代谢过程与基因调控过程的研究具有重要意义。如 Ars R-Smt B 响应蛋白的研究可以深入了解结核分枝杆菌细胞毒性,为设计破坏这些金属应力或破坏细菌病原体金属抗逆性的药物提供理论指导。存在于不同致病细菌中的金属响应蛋白,其靶基因以及影响其金属特异性因素的研究成果将更好地为未来的控制策略提供信息,并增加基于金属调节的治疗方式的可能性。此外,对金属响应蛋白的深入研究,对工业工程菌株的改造具有重要的指导意义,如对 Fur 响应蛋白的研究,可深入了解 *A. ferrooxidans* 等铁代谢嗜酸菌株的代谢过程与基因调控过程,针对其金属抗逆性、金属氧化/还原、酸适应性等能力做工程改造;对 Mer R 等重金属离子响应蛋白等的研究,可通过基因改造提高 *Acidiphilium cryptum* XTS 等菌株对极端环境的抗逆性及 Cr 等重金属污染的治理能力。金属响应蛋白必将成为生物医学、生物冶金与重金属污染生物治理等领域的重要研究手段之一。

## REFERENCES

- [1] Yang Y, Huang L, Yang L, et al. Reduction characteristics and differential expression of *Acidiphilium cryptum* XTS Cr(VI)-reduced related gene[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 64-73 (in Chinese)  
杨宇, 黄露, 杨罗, 等. 隐藏嗜酸菌 *Acidiphilium cryptum* XTS 的 Cr(VI)还原特性及相关基因的差异表达[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 64-73
- [2] Waldron KJ, Robinson NJ. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(1): 25-35
- [3] Choi SH, Lee KL, Shin JH, et al. Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by zur[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15812
- [4] Shin JH, Helmann JD. Molecular logic of the zur-regulated zinc deprivation response in *Bacillus subtilis*[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12612



- [5] Musiani F, Zambelli B, Bazzani M, et al. Nickel-responsive transcriptional regulators[J]. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 2015, 7(9): 1305-1318
- [6] Liu Y, Li W, Wei YZ, et al. Efficient preparation and metal specificity of the regulatory protein from the human pathogen *Treponema pallidum*[J]. *Metallomics*, 2013, 5(10): 1448-1457
- [7] Stoll KE, Draper WE, Kliegman JJ, et al. Characterization and structure of the manganese-responsive transcriptional regulator scar[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(43): 10308-10320
- [8] Leyn SA, Rodionov DA. Comparative genomics of DtxR family regulons for metal homeostasis in *Archaea*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(3): 451-458
- [9] Wang SC, Dias AV, Zamble DB. The "metallo-specific" response of proteins: a perspective based on the *Escherichia coli* transcriptional regulator NikR[J]. *Dalton Transactions*, 2009(14): 2459-2466
- [10] Allen RC, Tu YK, Nevarez MJ, et al. The mercury resistance (*mer*) operon in a marine gliding flavobacterium, *Tenacibaculum discolor* 9A5[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(1): 135-148
- [11] Shusterman E, Beharier O, Shiri L, et al. ZnT-1 extrudes zinc from mammalian cells functioning as a  $Zn^{2+}/H^{+}$  exchanger[J]. *Metallomics*, 2014, 6(9): 1656-1663
- [12] Julian DJ, Kershaw CJ, Brown NL, et al. Transcriptional activation of MerR family promoters in *Cupriavidus metallidurans* CH34[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009, 96(2): 149-159
- [13] Checa SK, Espariz M, Audero MEP, et al. Bacterial sensing of and resistance to gold salts[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(5): 1307-1318
- [14] Wei W, Zhu TZ, Wang Y, et al. Engineering a gold-specific regulon for cell-based visual detection and recovery of gold[J]. *Chemical Science*, 2012, 3(6): 1780-1784
- [15] Valencia EY, Braz VS, Guzzo C, et al. Two RND proteins involved in heavy metal efflux in *Caulobacter crescentus* belong to separate clusters within proteobacteria[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 79
- [16] Yu XF, Zheng W, Bhat S, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of *Bacillus* sp. CDB3 arsenic-resistance operon *arsI*[J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1230
- [17] Ye J, Kandegedara A, Martin P, et al. Crystal structure of the *Staphylococcus aureus* p1258 CadC Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(12): 4214-4221
- [18] Liu T, Golden JW, Giedroc DP. A zinc(II)/lead(II)/cadmium(II)-inducible operon from the cyanobacterium *anabaena* is regulated by AztR, an  $\alpha$ 3N ArsR/SmtB metalloregulator[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(24): 8673-8683
- [19] Cavet JS, Graham AI, Meng WM, et al. A cadmium-lead-sensing ArsR-SmtB repressor with novel sensory sites. Complementary metal discrimination by NmtR AND CmtR in a common cytosol[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(45): 44560-44566
- [20] Campbell DR, Chapman KE, Waldron KJ, et al. Mycobacterial cells have dual nickel-cobalt sensors: sequence relationships and metal sites of metal-responsive repressors are not congruent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(44): 32298-32310
- [21] Liu T, Chen XH, Ma Z, et al. A Cu<sup>I</sup>-sensing arsr family metal sensor protein with a relaxed metal selectivity profile[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(40): 10564-10575
- [22] Lee CW, Chakravorty DK, Chang FMJ, et al. Solution structure of *Mycobacterium tuberculosis* NmtR in the apo state: insights into Ni(II)-mediated allostery[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(12): 2619-2629
- [23] Smaldone GT, Helmann JD. CsoR regulates the copper efflux operon *copZA* in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 12): 4123-4128
- [24] Iwig JS, Leitch S, Herbst RW, et al. Ni(II) and Co(II) sensing by *Escherichia coli* RcnR[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(24): 7592-7606
- [25] Matsuzaki S, Enomoto T, Serada S, et al. Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A[J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 134(8): 1796-1809
- [26] Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing[J]. *Chemical Reviews*, 2009, 109(10): 4644-4681
- [27] Kloosterman TG, van der Kooi-Pol MM, Bijlsma JJE, et al. The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against  $Zn^{2+}$  stress by activation of the  $Zn^{2+}$ -resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4): 1049-1063
- [28] Tao H, Hasona A, Do PM, et al. Global gene expression analysis revealed an unsuspected *deo* operon under the control of molybdate sensor, ModE protein, in *Escherichia coli*[J]. *Archives of Microbiology*, 2005, 184(4): 225-233
- [29] Hoffmann MC, Wagner E, Langklotz S, et al. Proteome profiling of the *Rhodobacter capsulatus* molybdenum response reveals a role of IscN in nitrogen fixation by Fe-nitrogenase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(4): 633-643
- [30] Ogawa T, Bao DH, Katoh H, et al. A two-component signal transduction pathway regulates manganese homeostasis in *Synechocystis* 6803, a photosynthetic organism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(32): 28981-28986
- [31] Jacob K, Rasmussen A, Tyler P, et al. Regulation of acetyl-CoA synthetase transcription by the CrbS/R two-component system is conserved in genetically diverse environmental pathogens[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177825
- [32] Braun V, Mahren S, Ogierman M. Regulation of the feci-type ECF sigma factor by transmembrane signalling[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(2): 173-180
- [33] Grosse C, Friedrich S, Nies DH. Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007, 12(3/4): 227-240
- [34] Helmann JD. *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, 30: 122-132
- [35] Corbett D, Schuler S, Glenn S, et al. The combined actions of the copper-responsive repressor CsoR and copper-metallochaperone CopZ modulate CopA-mediated copper efflux in the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(2): 457-472
- [36] Gaballa A, Antelmann H, Aguilar C, et al. The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a fur-regulated small RNA and three small, basic proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(33): 11927-11932
- [37] McHugh JP, Rodríguez-Quinones F, Abdul-tehrani H, et al. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new

- mechanism for iron homeostasis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(32): 29478-29486
- [38] Gabriel SE, Helmann JD. Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(19): 6116-6122
- [39] Lee JW, Helmann JD. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators[J]. *BioMetals*, 2007, 20(3/4): 485-499
- [40] Kliegman JJ, Griner SL, Helmann JD, et al. Structural basis for the metal-selective activation of the manganese transport regulator of *Bacillus subtilis*[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(11): 3493-3505
- [41] Bobrov AG, Kirillina O, Fetherston JD, et al. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicemic plague in mice[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(4): 759-775
- [42] Chivers PT, Benanti EL, Heil-Chapdelaine V, et al. Identification of Ni-(L-His)<sub>2</sub> as a substrate for NikABCDE-dependent nickel uptake in *Escherichia coli*[J]. *Metallomics*, 2012, 4(10): 1043-1050
- [43] Barberzucker S, Shaanan B, Zarivach R. Transition metal binding selectivity in proteins and its correlation with the phylogenomic classification of the cation diffusion facilitator protein family[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16381
- [44] Wijekoon CJK, Udagedara SR, Knorr RL, et al. Copper atpase *copA* from *Escherichia coli*: quantitative correlation between atpase activity and vectorial copper transport[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(12): 4266-4269
- [45] Moore CM, Helmann JD. Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(2): 188-195
- [46] Harvie DR, Andreini C, Cavallaro G, et al. Predicting metals sensed by ArsR-SmtB repressors: allosteric interference by a non-effector metal[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(4): 1341-1356
- [47] Porto TV, Wilson MT, Worrall JAR. Copper and nickel bind via two distinct kinetic mechanisms to a CsoR metalloregulator[J]. *Dalton Transactions*, 2015, 44(46): 20176-20185
- [48] Stoyanov JV, Mancini S, Lu ZH, et al. The stress response protein Gls24 is induced by copper and interacts with the CopZ copper chaperone of *Enterococcus hirae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 302(1): 69-75
- [49] Cavet JS, Meng WM, Pennella MA, et al. A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(41): 38441-38448
- [50] Mahadev SR, Hayashi H, Ikegami T, et al. Improved protein overexpression and purification strategies for structural studies of cyanobacterial metal-responsive transcription factor, SmtB from marine *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *The Protein Journal*, 2013, 32(8): 626-634
- [51] Henshall SM, Afar DEH, Rasiah KK, et al. Expression of the zinc transporter ZnT4 is decreased in the progression from early prostate disease to invasive prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(38): 6005-6012
- [52] Lasry I, Seo YA, Ityel H, et al. A dominant negative heterozygous G87R mutation in the zinc transporter, ZnT-2 (SLC30A2), results in transient neonatal zinc deficiency[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(35): 29348-29361
- [53] Hoogewerf AJ, van Dyk LA, Buit TS, et al. Functional characterization of a cadmium resistance operon in *Staphylococcus aureus* ATCC12600: CadC does not function as a repressor[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(2): 148-159
- [54] Reyes-Caballero H, Lee CW, Giedroc DP. *Mycobacterium tuberculosis* NmtR harbors a nickel sensing site with parallels to *Escherichia coli* RcnR[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(37): 7941-7952
- [55] Lee CW, Giedroc DP. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N resonance assignments of NmtR, a Ni(II)/Co(II) metalloregulatory protein of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Biomolecular NMR Assignments*, 2013, 7(2): 145-148
- [56] Cook WJ, Kar SR, Taylor KB, et al. Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 275(2): 337-346
- [57] 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
- [58] Liu XJ, Wang T, Qiu GZ, et al. Research progresses on fur uptake regulator[J]. *Life Science Research*, 2014, 18(4): 357-362 (in Chinese) 刘晓隽, 王涛, 邱冠周, 等. 铁吸收调节蛋白的研究现状[J]. *生命科学研究*, 2014, 18(4): 357-362
- [59] Roncarati D, Pellicciari S, Doniselli N, et al. Metal-responsive promoter DNA compaction by the ferric uptake regulator[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12593
- [60] Dorman CJ. Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model?[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(5): 349-355
- [61] Danielli A, Roncarati D, Delany I, et al. *In vivo* dissection of the *Helicobacter pylori* fur regulatory circuit by genome-wide location analysis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(13): 4654-4662
- [62] Gancz H, Censini S, Merrell DS. Iron and pH homeostasis intersect at the level of fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(1): 602-614
- [63] 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: 4910
- [64] Kim JH, Hwang IH, Jang SP, et al. Zinc sensors with lower binding affinities for cellular imaging[J]. *Dalton Transactions*, 2013, 42(15): 5500-5507
- [65] Maynaud G, Brunel B, Yashiro E, et al. CadA of *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a zinc-rich mining soil is a P<sub>1B</sub>-2-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance[J]. *Research in Microbiology*, 2014, 165(3): 175-189
- [66] Lu MM, Li ZF, Liang JQ, et al. Zinc resistance mechanisms of P<sub>1B</sub>-type ATPases in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29355
- [67] Kajikawa T, Sugiyama R, Kataoka K, et al. A novel resting form of the trinuclear copper center in the double mutant of a multicopper oxidase, CueO, Cys500Ser/Glu506Ala[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2015, 149: 88-90
- [68] Golynskiy MV, Gunderson WA, Hendrich MP, et al. Metal binding studies and EPR spectroscopy of the manganese transport regulator MntR[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(51): 15359-15372
- [69] Osman D, Cavet JS. Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(5): 668-680