

Halolysin SptA 有助于嗜盐古菌 *Natrinema* sp. J7-2 长期生存

位秀丽¹, 卢慧改¹, 王森², 骆泓宇³, 万唐江³, 肖潇¹, 李默然*¹

1 湖北医药学院基础医学院, 湖北 十堰 442000

2 湖北医药学院生物医学工程学院, 湖北 十堰 442000

3 湖北医药学院第一临床学院, 湖北 十堰 442000

位秀丽, 卢慧改, 王森, 骆泓宇, 万唐江, 肖潇, 李默然. Halolysin SptA 有助于嗜盐古菌 *Natrinema* sp. J7-2 长期生存[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4021-4032

Wei Xiuli, Lu Huigai, Wang Miao, Luo Hongyu, Wan Tangjiang, Xiao Xiao, Li Moran. Halolysin SptA boosts the long-term survival of haloarchaea *Natrinema* sp. J7-2[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4021-4032

摘要:【背景】嗜盐古菌可以在盐沉积物中存活长达几百万年, 是著名的长寿菌。许多嗜盐古菌分泌胞外蛋白酶, 大多数分泌的胞外蛋白酶被称为 Halolysin, 具有以下特征: 属于枯草杆菌蛋白酶类蛋白酶; 在胞内折叠后经 Tat 途径高效分泌至胞外; 可自加工形成成熟酶; 尤其在天然宿主中大多数 Halolysin 在对数生长后期表达并在稳定期达到最高水平。目前 Halolysin 的酶学性质、加工成熟及分泌机制已被广泛研究, 然而其生理功能的研究较少。Halolysin SptA 是嗜盐古菌 *Natrinema* sp. J7-2 的主要胞外蛋白酶, 前期研究发现多个顺式调控元件协同调节 SptA 的生长期依赖性表达, 使 SptA 参与 J7-2 菌株不同生长期之间的转变, 而且在衰亡期之后 SptA 有助于 J7-2 菌株继续生存。【目的】研究 Halolysin SptA 对 *Natrinema* sp. J7-2 长期生存的作用。【方法】将 J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 分别在寡营养、无外源营养物质(液体)及营养丰富(固体)条件下长期培养, 通过比较二者的生长、生存和 SptA 的表达分泌情况进一步探讨 SptA 的作用。【结果】J7-2 菌株在寡营养条件下产生更多 SptA, 培养后期(33 d) J7-2 菌株活细胞数显著高于 $\Delta sptA1$ 。在无外源营养物质情况下长期温育, J7-2 菌株和 $\Delta sptA1$ 经历多次细胞分裂和细胞死亡, 在延长温育期间(73–200 d)存活的 J7-2 菌株细胞数量均显著多于存活的 $\Delta sptA1$ 细胞数量。在营养丰富的固体平板上培养的后(160 d), 由于营养物质消耗, J7-2 菌株通过 SptA 吸收和利用来源于死细胞蛋白的降解产物, 帮助其群体长期生存。【结论】SptA 介导的细胞死亡和死细胞蛋白降解, 促进 J7-2 菌株利用来源于死细胞的营养物质,

基金项目: 湖北医药学院人才启动资金(2021QDJZR021, 2018QDJZR12); 湖北省大学生创新创业训练计划(202110929008)

Supported by: Faculty Development Grants from Hubei University of Medicine (2021QDJZR021, 2018QDJZR12); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Hubei Province (202110929008)

*Corresponding author: E-mail: moranli@whu.edu.cn

Received: 2022-02-21; Accepted: 2022-03-17; Published online: 2022-04-14

从而有助于菌株群体在营养缺乏条件下长期存活。本研究提供了关于 Halolysin 生理作用的新见解。

关键词: 嗜盐古菌; Halolysin; SptA; 长期生存

Halolysin SptA boosts the long-term survival of haloarchaea *Natrinema* sp. J7-2

WEI Xiuli¹, LU Huigai¹, WANG Miao², LUO Hongyu³, WAN Tangjiang³, XIAO Xiao¹, LI Moran^{*1}

1 School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

2 School of Biomedical Engineering, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

3 The First Clinical School, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

Abstract: [Background] Haloarchaea are able to survive in salt deposits for millions of years. Many haloarchaea produce extracellular subtilisin-like proteases (Halolysins). The Halolysins are folded in cells and transported across cytoplasmic or thylakoid membranes by Tat pathway. In addition, they mature automatically and most of them are produced at the late log phase and peak when the culture enters stationary phase. At the moment, the enzymatic properties, autocatalytic activation, and secretion mechanisms of Halolysins have been widely characterized. However, the physiological functions are rarely studied. Halolysin SptA is the major extracellular protease of *Natrinema* sp. J7-2. Previous studies showed that the growth phase-dependent production of SptA relies on the cooperative action of multiple *cis*-acting elements, allowing SptA to participate in the growth-phase transition of strain J7-2. SptA also contributes to the continued survival of strain J7-2 after the death phase. **[Objective]** To study the effect of SptA on long-term survival of strain J7-2. **[Methods]** Strain J7-2 and $\Delta sptA1$ mutant were cultured under nutrient-deficient, non-exogenous nutrient (liquid), and nutrient-rich (solid) conditions for a long time, respectively. The growth, survival, and SptA expression of the two strains were compared to further investigate the role of SptA. **[Results]** J7-2 strain produced more SptA under nutrient-deficient conditions, and number of viable J7-2 strain cells was significantly larger than that of viable $\Delta sptA1$ cells after 33 days of growth under such conditions. strain J7-2 and $\Delta sptA1$ underwent multiple events of cell division and cell death during long-term incubation in the absence of exogenous nutrients. The number of viable J7-2 strain cells was significantly larger than that of viable $\Delta sptA1$ cells during the prolonged incubation (73–200 days). At the late stage of culture (160 days) on nutrient-rich solid plates, due to nutrient depletion, J7-2 strain benefited from SptA in terms of long-term survival by assimilating and utilizing the degradation products of proteins derived from dead cells. **[Conclusion]** The SptA-mediated cell death and degradation of dead cell-derived proteins enhance the long-term survival of J7-2 strain in response to nutrient starvation by helping J7-2 strain to scavenge dead cell-derived nutrients. This study provides new insight into the physiological role of Halolysins.

Keywords: haloarchaea; Halolysin; SptA; long-term survival

嗜盐古菌作为古菌的一个重要类群,是目前研究最深入广泛的古菌之一。其生长依赖高盐浓度,主要分布在盐湖、盐场等高盐环境^[1]。嗜盐古菌还可以在盐沉积物中存活长达几百万年,是著名的长寿菌^[2]。嗜盐古菌可能采用几种策略来促进其在高盐条件下长期生存,如产生类胞囊休眠形态(halocysts)、杆状细胞转变为小球状细胞、形成富含水分的胶囊以防止细胞干燥,以及存在多倍体以应对 DNA 损伤等^[2]。根据古老盐岩流体包裹体中嗜盐古菌和杜氏盐藻细胞共存的证据,有研究者推测来源于杜氏盐藻的甘油和细胞裂解产物可以作为能量和碳源促进嗜盐古菌长期生存^[3-5]。多倍体 *Haloferax volcanii* 不仅利用外源 DNA 作为碳、氮和磷的来源,还利用内部 DNA 作为磷酸盐存储聚合物,在未添加磷的情况下生长^[6-7]。该发现提出了嗜盐古菌可能利用其自身细胞成分在饥饿条件下维持最低代谢而长期存活的可能性。因此,深入探讨水解性酶类(如蛋白酶)在降解细胞组分以支持嗜盐古菌长期生存中的作用和机制具有重要意义。

许多嗜盐古菌分泌胞外蛋白酶,在其天然环境中降解外源蛋白质和多肽,产生能够进入中央代谢的寡肽、二肽和氨基酸中间体,为细胞生命活动提供营养^[8]。大多数嗜盐古菌产生的胞外蛋白酶被称为 Halolysin,属于枯草杆菌蛋白酶类蛋白酶^[9]。截至目前,已经研究的 Halolysin 包括 *Natrialba asiatica* 的 172P1^[10]、*Hfx. mediterranei* 的 R4^[11-12]、*Natrialba magadii* 的 Nep^[13]、*Natrinema* sp. J7-2 的 SptA^[14]和 SptC^[15],以及来自 *Halococcus salifodinae* 的 HlyA^[16-17]。此外,越来越多的 Halolysin 编码基因在已测序的嗜盐古菌基因组中被鉴定出来,突显了 Halolysin 在嗜盐古菌中的重要性。Halolysin 在胞内被合成为一个由信号肽、N 端

前肽、subtilisin-like 催化功能域和 C 端延伸区组成的无活性前体,在胞内折叠后经 Tat 途径跨细胞质膜转运,在信号肽被信号肽酶去除后,酶原通过自加工切除 N 端前肽形成有活性的成熟酶^[13,18-20]。值得注意的是,在天然宿主中, Halolysins (如 172P1、Nep 和 SptA)在对数生长后期表达并在稳定期达到最高水平^[20-22]。前期研究表明多个顺式调控元件协同调节 SptA 的生长期依赖性表达,使得 SptA 参与 J7-2 菌株不同生长期之间的转变^[23]。Chen 等^[12]发现 R4 导致 *Hfx. mediterranei* 抑菌和杀菌活性,认为 Halolysin 可能是某些嗜盐古菌生态适应和生存竞争的利器。目前 Halolysin 的酶学性质、加工成熟及分泌机制已被广泛研究,然而其生理功能尤其是对嗜盐古菌长期生存的作用仍有待进一步研究。

Halolysin SptA 是嗜盐古菌 *Natrinema* sp. J7-2 的主要胞外蛋白酶,前期研究表明 SptA 能在胞外和胞内自加工成熟,胞内积累的 SptA 成熟酶会对宿主细胞造成损伤甚至细胞死亡裂解; SptA 在 J7-2 菌株对数生长后期才开始大量表达分泌并在稳定期达到峰值,而在稳定期和衰亡期细胞内积累并自加工活化为有活性的成熟酶^[14,20,24]。在营养丰富条件下 SptA 在胞外和胞内均发挥功能,在对数后期分泌的 SptA 通过帮助嗜盐古菌降解和吸收外源蛋白质底物来支持 J7-2 菌株的生长,而在稳定期细胞内积累和活化 SptA 有助于 J7-2 菌株进入衰亡期,在衰亡期及之后 SptA 促进活细胞利用来源于死细胞的营养物质^[23]。为进一步探究在营养缺乏条件下 SptA 对 J7-2 菌株生长和长期生存的作用,本研究将 J7-2 菌株和突变体 Δ sptA1 在不同营养条件下长期培养,通过比较二者的生长、生存和 SptA 的表达分泌情况来进一步探讨 SptA 的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

研究所用菌株为嗜盐古菌 *Natrinema* sp. J7-2 及其突变体 $\Delta sptA1$ 。*Natrinema* sp. J7-2 是 *Natrinema* sp. J7 菌株(分离自湖北应城盐矿)在传代培养过程中丢失了质粒 pHH205 的亚培养物,前期已完成全基因组测序和分泌蛋白质组分析^[24]。突变体 $\Delta sptA1$ 是敲除 J7-2 染色体上 *sptA* 核心启动子和编码区所获得的敲除菌株^[23]。

1.1.2 培 养 基

18% MGM (g/L): 酵母粉 1.00, 蛋白胨 5.00, NaCl 144.00, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 21.00, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 18.00, KCl 4.20, $CaCl_2$ 0.33, Tris base 0.36, pH 7.5。23% MGM (g/L): 酵母粉 1.00, 蛋白胨 5.00, NaCl 184.10, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 26.90, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 23.00, KCl 5.40, $CaCl_2$ 0.42, Tris base 0.46, pH 7.5。23% diluted MGM (DMGM): 寡营养培养基, 蛋白胨和酵母粉含量仅为 23% MGM 的 1/5。23% salt water (SW): 无外源营养物质, 含有与 23% MGM 相同的盐成分但缺乏蛋白胨和酵母粉。固体培养基(g/L): 琼脂粉 15.0。牛奶平板(g/L): 脱脂奶粉 10.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

Azocasein, Sigma 公司; Blue Plus Protein Marker, 北京全式金生物技术有限公司; 碱磷酸酶标记羊抗兔 IgG(H+L), 武汉飞羿科技有限公司(进口分装); 琼脂粉、蛋白胨、酵母粉等, Oxoid 公司; 硝酸纤维素膜, MilliPore 公司; 脱脂牛奶, BD 公司; NaCl、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、TCA、丙酮等, 国药集团化学试剂有限公司; APS、SDS、丙烯酰胺等, Amresco 公司。空气浴振荡器, 中国哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; 分光光度计, Eppendorf 公司; 电热恒

温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; 恒流恒压电泳仪、转移电泳槽、垂直电泳槽和水平电泳槽, 北京六一生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细菌培养

菌株 J7-2 及突变体 $\Delta sptA1$ 接种至 23% MGM 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养; 在某些情况下, 在营养缺乏的 23% DMGM 及相同条件下培养嗜盐菌菌株; 为研究在无外源营养物质情况下嗜盐古菌的生存情况, 将菌株在 23% SW 中长期培养。当测生长曲线时, 先将菌株 J7-2 及突变体 $\Delta sptA1$ 接种到 23% MGM 中于 37 °C 活化过夜, 再以 1%接种量转接入新鲜 23% MGM 培养基中培养至 OD_{600} 约为 1.0, 再转接入 50 mL 23% DMGM 或 100 mL 23% SW 中连续培养, 取样测 OD_{600} 值。为确定活菌数, 将培养物涂布在 18% MGM 平板上, 37 °C 培养 5–10 d。将活化至对数生长期(OD_{600} 约为 0.6)的菌株 J7-2 及突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% MGM 平板上划线, 37 °C 培养, 拍照记录培养 16、96、160 d 的菌落特征, 同时取 16、160 d 菌落接种至 23% MGM 试管中活化过夜, 然后用相差显微镜观察菌体形态。

1.2.2 检测蛋白酶活性

以 azocasein 为底物检测菌株 J7-2 及突变体 $\Delta sptA1$ 培养物上清液的蛋白酶活性^[23]。取 100 μ L 培养物上清液, 加入 100 μ L 0.5% azocasein 配制成 200 μ L 反应液, 于 37 °C 反应 60 min, 然后加入 200 μ L 40% TCA 终止反应。振荡混匀后室温放置 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 测定上清液在 335 nm 波长处的吸光值(OD_{335})。酶活力单位(U)定义为: 在上述条件下, 使反应体系上清的 OD_{335} 每分钟升高 0.01 所需要的酶量。用酶活力 U 除以培养物上清液体积再除以 OD_{600} 计算胞外蛋白酶比活力。

1.2.3 Western blotting

SDS-PAGE 根据文献[25]中方法进行。为防止蛋白酶在样品制备过程中自降解, 蛋白用 20% TCA 沉淀, 丙酮洗涤后在含有 8 mol/L 尿素的上样缓冲液中溶解, 然后进行 SDS-PAGE。电泳完成后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 然后用抗 SptA 多克隆抗体进行免疫印迹分析。

1.2.4 统计分析

数据分析使用 Microsoft Excel 进行, 采用双尾非配对 *t* 检验来检测菌株 J7-2 及突变体 $\Delta sptA1$ 之间的统计学差异。当 $P < 0.05$ 时被认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 SptA 有利于 *Natrinema* sp. J7-2 在寡营养条件下长期存活

前期研究发现, 在 23% MGM 中培养后期营养基本耗尽时, SptA 有助于 J7-2 菌株群体的继续存活^[23]。为进一步探究营养缺乏时 SptA 对嗜盐古菌生长和长期生存的作用, 将 J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 在营养物质稀释的 23% MGM (23% DMGM) 中培养, 通过比较二者的生长、生存和 SptA 的表达分泌情况进一步探讨 SptA 的作用。

比较 2 株菌在寡营养(23% DMGM)及丰富营养(23% MGM)条件下的生长曲线发现, 与在 23% MGM 中相比, 它们在 23% DMGM 中的生长量显著偏低, 并且从对数生长期到稳定期的转变更早(图 1A 和 1B), 这显然是因为营养的限制。然而, 同在 23% MGM 中一样, 当处于营养缺乏的 23% DMGM 中时, J7-2 菌株的胞外蛋白酶活性仍然在对数后期开始增加并在稳定期达到最高水平(图 1A 和 1B), 这意味着 SptA 的生长期依赖性表达模式不受营养条件变化的影响。同时, 通过比较不同生长时期单位菌量

的蛋白酶活性还发现, 在 23% DMGM 中 J7-2 菌株胞外蛋白酶比活力高于 23% MGM 中的比活力(图 1B), 这表明在寡营养条件下 J7-2 菌株产生更多的 SptA, 可能用来降解蛋白质和多肽, 从而为细胞提供更多营养。

Western blotting 结果显示, 在 J7-2 菌株稳定期及之后的培养物上清液中检测到 SptA 成熟酶(图 1C)。同样也检测了 2 株菌在 23% DMGM 培养过程中的活菌数, 结果如图 1D 所示, J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 在稳定期(5 d)的活菌数相当, 随着培养时间的延长二者的活菌数不断减少, 这可能是由于营养物质消耗引起的; 然而, 在 23% DMGM 中生长 33 d 后, 存活的 J7-2 菌株细胞数量(2.48×10^8 CFU/mL)显著多于存活的 $\Delta sptA1$ 细胞数量(1.09×10^8 CFU/mL), 表明在寡营养条件下 SptA 有利于 J7-2 菌株的长期存活。

2.2 SptA 有助于 J7-2 菌株在无外源营养物质的情况下长期生存

接下来探究了在无外源营养物质情况下 SptA 是否有助于嗜盐古菌的生存。将 J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% MGM 中培养至对数生长后期(OD_{600} 约为 1.0), 收集菌体并用不含碳源和氮源的 23% 盐溶液(23% SW)清洗去除残留培养基, 将二者菌量调整为一致后重悬于 23% SW 中, 然后在 37 °C 培养箱中静置温育。通过检测温育过程中 J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 的生长、酶活、活菌数及菌体形态来探索 SptA 在这种情况下的功能。发现温育 50 d 之后, 在 J7-2 菌株悬浮液的上清液中可以检测到胞外蛋白酶水解活性(图 2A), 结果表明 J7-2 菌株能够在无外源营养物质的情况下产生 SptA。在 200 d 的孵育过程中, J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 的活细胞数量显示出类似的波动模式(图 2B), 这一结

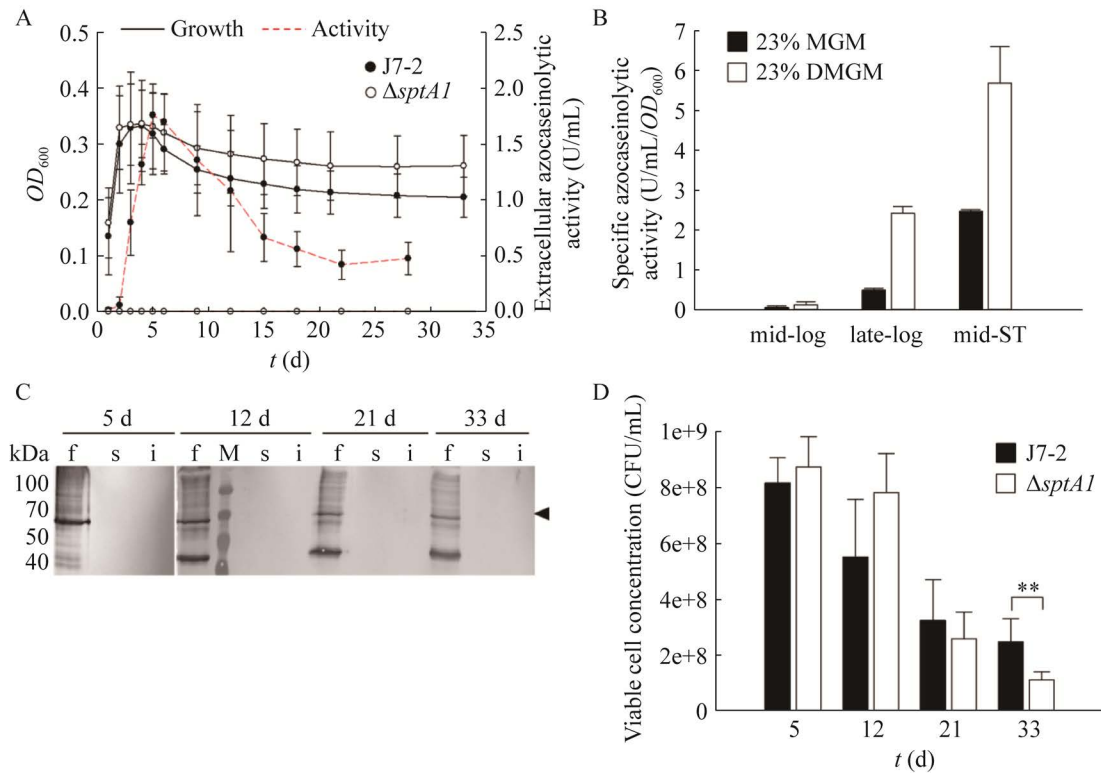


图 1 SptA 对在 23% DMGM、37 °C 条件下培养的 *Natrinema sp.* J7-2 生长和存活的影响 A: J7-2 菌株及其突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% DMGM 中的生长曲线和胞外蛋白酶活性, 通过 OD_{600} 的变化监测菌株的生长, 并以 azocasein 为底物进行胞外蛋白酶活性测定; B: J7-2 菌株在 23% MGM 和 23% DMGM 中的胞外蛋白酶比活力, 分别取对数中期、对数后期和稳定中期的培养物测定 OD_{600} , 取培养上清液以 azocasein 为底物测定胞外蛋白酶活性并计算蛋白酶比活力; C: J7-2 菌株的免疫印迹分析, 在指定的时间点, 将来自于 500 μ L 23% DMGM 培养物的胞外上清(f)、细胞可溶组分(s)和细胞不溶组分(i)进行以 SptA 多克隆抗体为一抗的 Western blotting 检测, 右侧箭头表示胶上 SptA 成熟酶的位置; D: 活菌计数, 取部分 23% DMGM 培养物进行适当稀释, 将适量稀释液涂布在 18% MGM 琼脂平板上, 然后在 37 °C 培养 10 d 以测定活细胞的数量; A、B 和 D 中数值表示为 3 次独立实验的平均值和标准偏差(误差线) (**: $P < 0.01$)

Figure 1 The effect of SptA on the growth and survival of *Natrinema sp.* J7-2 cultivated in 23% DMGM at 37 °C. A: Growth and extracellular protease production. The growth of strain J7-2 or mutant $\Delta sptA1$ cultivated in 23% DMGM was monitored by the change in OD_{600} , and the culture supernatants were subjected to azocaseinolytic activity assay; B: The extracellular specific azocaseinolytic activity of strain J7-2 grown in 23% MGM and 23% DMGM. The cultures in mid-log phase, late-log phase and mid-stationary phase were measured OD_{600} , respectively. The culture supernatants were subjected to azocaseinolytic activity assay and calculated specific proteolytic activity; C: Immunoblot analysis of strain J7-2. At the time points indicated, the culture supernatants (f), cell extracts (s), and cell debris (i) from 500 μ L of 23% DMGM cultures were subjected to anti-SptA immunoblot analysis. The position of mature SptA on the gel is indicated by an arrowhead; D: Viable cell counting. Aliquots taken from 23% DMGM cultures were appropriately diluted, plated on 18% MGM agar plates, and then incubated at 37 °C for 10 days to determine the numbers of viable cells. Values are expressed as the means and standard deviations (error bars) of three independent experiments (A, B, and D) (**: $P < 0.01$).

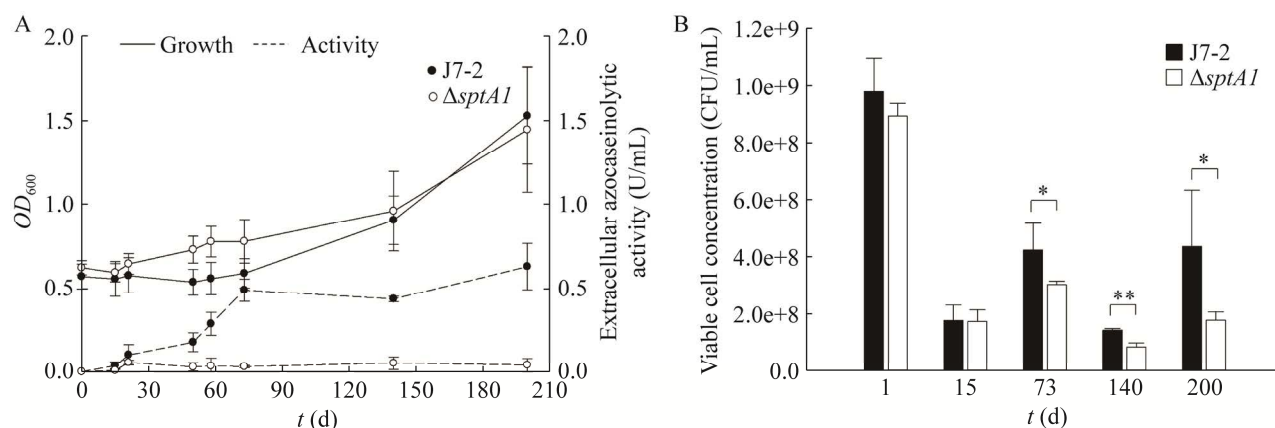


图 2 SptA 对在 23% SW 中 37 °C 条件下温育的 *Natrinema* sp. J7-2 生长和存活的影响 A: J7-2 菌株及其缺失突变体 $\Delta sptA1$ 的生长曲线和胞外蛋白酶活性; B: J7-2 菌株及突变体 $\Delta sptA1$ 的活菌计数, 在计算活细胞数时, 考虑了 200 d 孵育期间 23% SW 的水分蒸发; 数值表示为 3 次独立实验的平均值和标准偏差(误差线) (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

Figure 2 The effect of SptA on the growth and survival of *Natrinema* sp. J7-2 incubated in 23% SW at 37 °C. A: The growth curve and extracellular azocaseinolytic activity of strain J7-2 and mutant $\Delta sptA1$; B: Viable cell counting of strain J7-2 and mutant $\Delta sptA1$. The water evaporation during 200 days of incubation in 23% SW was considered. Values are expressed as the means and standard deviations (error bars) of three independent experiments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

果表明在这种条件下它们经历了多次细胞分裂和细胞死亡。

另外, 利用相差显微镜观察了温育开始和结束时的细胞形态, 发现结果与之前的报道^[26]一致, 在经过 200 d 的孵育后, J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 的大多数杆状细胞转变为球状细胞, 这与古老岩盐流体包裹体中嗜盐古菌的细胞形态相似; 但也观察到少量杆状细胞(箭头所指)(图 3), 它们最有可能代表新生细胞。值得一提的是, 将温育时间延长至 200 d 导致 J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 悬浮液的总体积由于水分蒸发而减少约 1.5 倍, 同时伴随着两者细胞密度增加约 1.5 倍(图 2A), 这意味着在孵育过程中细胞总数基本保持不变。因此, J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 活细胞数量的波动变化反映了活细胞和死细胞之间的动态平衡, 其中新生细胞的产生伴随着衰老细胞的死亡。值得注意的是, 在

延长的温育期间(73–200 d, 图 2B), 存活的 J7-2 菌株细胞的数量均显著多于存活的 $\Delta sptA1$ 细胞的数量, 这一现象强调了 SptA 在 J7-2 菌株利用死细胞来源营养物质中的重要性, 因此更突显了在无外源营养物质的情况下 SptA 对嗜盐古菌长期生存的重要性。

2.3 SptA 有助于 J7-2 菌株在 23% MGM 牛奶平板上长期生存

前面发现 SptA 有利于 J7-2 菌株在液体环境中长期存活, 考虑到嗜盐古菌在自然界可能处于固体环境, 同时将菌株 J7-2 和突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% MGM 牛奶平板上划线于 37 °C 长期培养, 比较菌落特征和菌体形态。发现随着培养时间的延长, 菌株 J7-2 的菌落颜色发生显著变化(图 4A)。培养 16 d 时, 菌株 J7-2 的菌落均为淡红色且菌落周围有明显水解圈, 随着培养时间延长, 菌落颜色逐渐变为白色(图 4A, 96 d), 继续

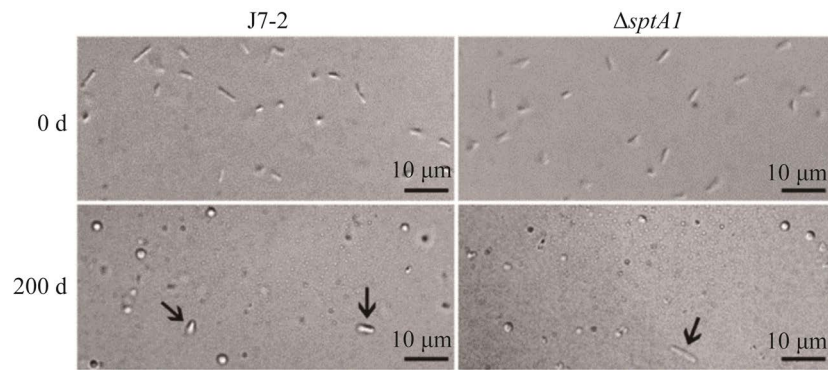


图 3 相差显微镜镜检结果 J7-2 菌株及其突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% SW 中 37 °C 长期温育, 取温育开始 (0 d) 和结束 (200 d) 的菌液观察细胞形态, 其中箭头表示孵育 200 d 时样品中的杆状细胞, 标尺: 10 μm
 Figure 3 Phase-contrast microscopic results. Strain J7-2 and mutant $\Delta sptA1$ were incubated in 23% SW for a long time. The bacterial fluid at the beginning (0 d) and end (200 d) of incubation were taken to observe the cell morphology. The arrows indicate the rod-shaped cells in the samples after 200 days of incubation. Bars: 10 μm .

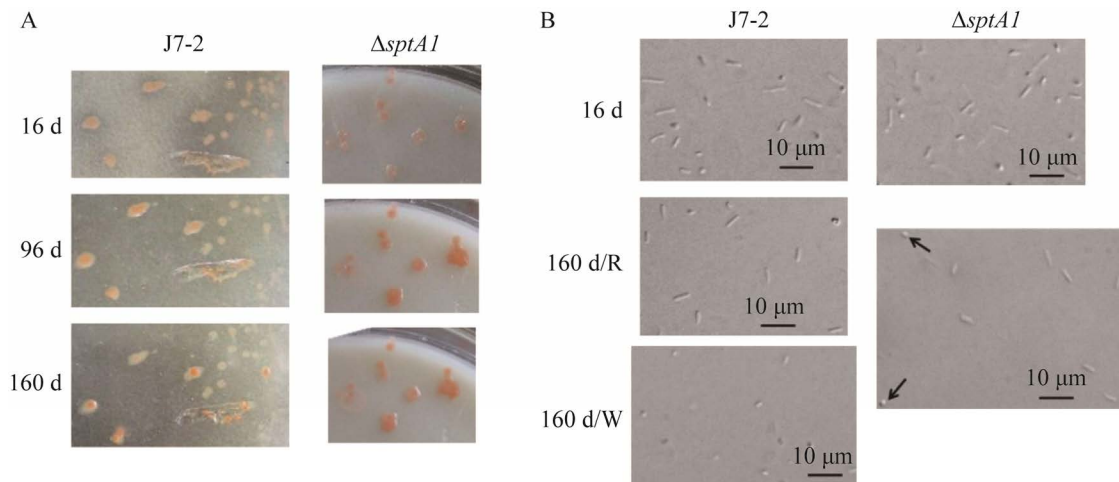


图 4 J7-2 菌株及其突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% MGM 牛奶平板上的菌落(A)和相差显微镜镜检结果(B)
 A: J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% MGM 牛奶平板上培养 16、96 和 160 d 的菌落特征; B: J7-2 菌株和突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% MGM 平板上培养 16 d 和 160 d 后的菌落在 23% MGM 试管中活化过夜后相差显微镜镜检结果, 其中 R 指 J7-2 菌株培养 160 d 后的红色菌落, W 指白色菌落, 箭头表示突变体 $\Delta sptA1$ 培养 160 d 活化后样品中的球状细胞; 标尺: 10 μm

Figure 4 The colonies (A) and phase-contrast microscopy (B) of strain J7-2 and mutant $\Delta sptA1$ cultivated on 23% MGM plates containing 1% skim milk. A: The colony characteristics of strain J7-2 and mutant $\Delta sptA1$ cultivated 16, 96 and 160 days on 23% MGM plate; B: After cultivated 16 days and 160 days on 23% MGM plate, the colonies of strain J7-2 and mutant $\Delta sptA1$ were cultured in 23% MGM liquid medium overnight and observed by phase-contrast microscopy. R represents red colony of strain J7-2 cultivated 160 days, W represents white colony, and the arrows indicate the spheres-shaped cells in the samples of mutant $\Delta sptA1$ cultivated 160 days. Bars: 10 μm .

培养至 160 d 整个牛奶平板几乎完全透明, 白色菌落上又产生少量较小的淡红色菌落。相较而言, 突变体 $\Delta sptA1$ 在整个培养过程中呈现淡红色且未产生牛奶水解圈。表明菌株 J7-2 和突变体 $\Delta sptA1$ 在 23% MGM 牛奶平板上长期培养的菌落特征差异与 SptA 活性有关。这一现象与前期发现的表达 SptA 双精氨酸突变体 RR/KK 及其活性位点突变体 RR/KK-S/A 的 *Hfx. volcanii* 重组菌株菌落特征一致^[20]。

观察细菌形态发现, 在培养初期(16 d), 菌株 J7-2 和突变体 $\Delta sptA1$ 均为杆状细胞, 到培养末期(160 d), 菌株 J7-2 淡红色菌落细胞几乎全为杆状(图 4B, 160 d/R), 而白色菌落细胞基本为球状(图 4B, 160 d/W), 而突变体 $\Delta sptA1$ 淡红色菌落大多数为杆状细胞, 仅出现少量球状细胞(箭头所指)(图 4B)。*Natrinema* 由于细胞膜上含有类胡萝卜素而呈现淡红色, 菌株 J7-2 细胞最外部为由 S 层蛋白构成的 S 层结构^[24]。推测菌株 J7-2 菌落颜色和菌体形态的改变可能是由于培养后期细胞衰老或 Tat 转运体饱和使胞内滞留的 SptA 含量增多, 胞内积累的 SptA 自加工成熟, 有活性的 SptA 成熟酶水解宿主细胞蛋白。该结果与 23% SW (无外源营养物质)长期温育的细胞形态变化稍有差异, 可能是因为营养物质或培养时间所致。在 23% MGM 牛奶平板上的培养后期, 由于营养物质消耗, 菌株 J7-2 通过 SptA 吸收和利用来源于死细胞蛋白的降解产物, 从而有利于其群体长期生存。

3 讨论与结论

虽然 Halolysin 的生化性质、成熟机制和分泌机制研究比较深入, 但其生理功能的研究较少。Halolysin SptA 是 *Natrinema* sp. J7-2 的主要胞外蛋白酶, 在天然宿主中的产生与生长期有关, 在对数后期才开始大量表达分泌, 在稳定

期达到最高值。Halolysin 的这种生长期依赖性产生的现象已经被发现存在于一些其他嗜盐古菌中, 如 *Natronococcus occultus*^[27]、*Nab. asiatica*^[22] 和 *Nab. magadii*^[21]。最近, Chen 等发现来源于 *Hfx. mediterranei* 的 Halolysin R4 为组成型表达, 其分泌与生长期无关; R4 与宿主菌的抑菌和杀菌活性直接相关, 可以裂解生活在同一环境中的竞争细胞, 细胞碎片可能被用作营养物质^[12]。前期研究发现, SptA 的这种生长期依赖性表达模式依靠多个正、负顺式调控元件的协同作用, 使得 SptA 参与 J7-2 菌株不同生长期之间的转变; 在营养丰富条件下, 随着培养时间延长(衰亡期之后), SptA 有利于 J7-2 菌株的继续生存, 此时外部营养物质被逐渐消耗直至最终耗尽^[23]。在自然环境中, 嗜盐古菌有时可能保持静止状态和/或处于寡营养条件, 一个典型的例子是在高盐、低氧、高辐射和低营养条件下的岩盐流体包裹体。已有多个研究报道嗜盐微生物(其中大多数为嗜盐古菌)能在古代岩盐流体包裹体中存活很长时间甚至数百万年^[2]。考虑到在寡营养环境中嗜盐古菌明显的“长寿”特征, 本文进一步探究了在营养缺乏条件下 SptA 对 J7-2 菌株生长和长期生存的作用, 发现当缺乏营养物质时, SptA 促进存活细胞利用来源于死细胞的营养物质(尤其是蛋白质), 从而有利于 J7-2 菌株群体的长期存活。

在无外源营养物质的条件下, 在无碳和无氮盐溶液(23% SW)中长达 200 d 的长期孵育期间, J7-2 菌株的活细胞数量处在波动状态(图 2B)。这一结果表明 J7-2 菌株经历了多次生长和死亡阶段的转变, 并且该嗜盐古菌种群处于一个动态的时期。细菌也有类似的现象被称为长期稳定期, 研究者发现大肠杆菌在衰亡期后, 可以在不添加营养物质的情况下于分批培养中长时间生存, 并且与早期稳定期不同, 长期稳定期的细胞分裂很少, 是一个高度动态的时期, 其

中产生率和死亡率是平衡的^[28]。由于 J7-2 菌株不能固定 N_2 ^[29]，在无氮盐溶液中可用于其生长的氮源仅来源于死细胞。尽管在相同条件下 *sptA* 缺失突变体的种群也处于动态，但是 SptA 的缺失导致活细胞的数量在长期孵育后期明显减少(图 2B)。所以菌株 J7-2 通过吸收和利用来源于死细胞蛋白质的蛋白水解降解产物，在长期存活方面受益于 SptA 的作用。此外，SptA 介导的细胞蛋白质降解有可能促进其他营养成分(例如碳水化合物、脂质、甚至 DNA)^[6]从死细胞中释放以支持 J7-2 菌株细胞的生长和长期存活。据报道，

嗜盐古菌的“长寿”策略可能包括以下方面：ATP 减少、细胞变小、多倍体、产生球形休眠体、嗜盐黏蛋白(halomucin)和使用 DNA 作为磷酸盐存储聚合物^[2]。根据研究结果推测，Halolysin 似乎是嗜盐古菌长期生存的一个新策略。从生理学角度来看，嗜盐古菌种群的部分细胞死亡为存活细胞提供了生存所需的营养和能量，从而提高了整个嗜盐古菌种群群体的生存力。

结合本研究及前期实验结果，图 5 对 SptA 在 *Natrinema sp. J7-2* 生长过程中的表达调控和发挥功能的过程进行了总结。

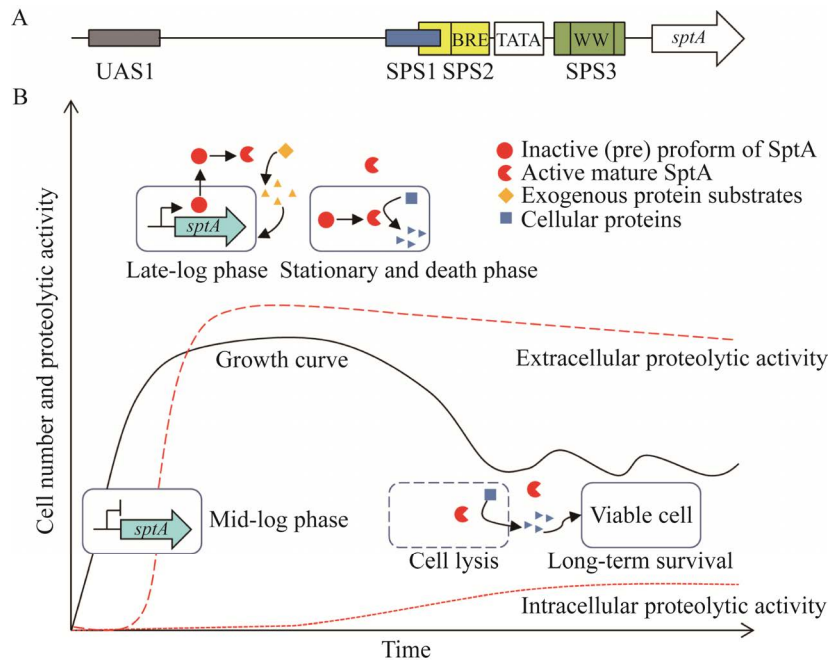


图 5 SptA 在 *Natrinema sp. J7-2* 生长过程中表达调控及发挥功能过程的示意图 A: *Natrinema sp. J7-2* 中调控 *sptA* 表达的多种顺式作用元件示意图，其中启动子的 BRE 模体、TATA box、WW 模体被标出，SPS1 为正顺式调控元件，SPS2 和 SPS3 为负顺式调控元件，UAS1 为远距离增强子；B: SptA 在 J7-2 菌株生长过程中发挥功能过程的示意图，黑色实线代表生长曲线，红色短虚线代表胞内蛋白酶活性，红色长虚线代表胞外蛋白酶活性

Figure 5 Schematic diagrams of SptA expression regulation and exerting functions during the growth of *Natrinema sp. J7-2*. A: Schematic diagram of multiple *cis*-acting elements in the regulation of *sptA* expression in *Natrinema sp. J7-2*. The BRE motif, TATA box and WW motif of promoter are marked. SPS1 is a positive *cis*-regulatory element. SPS2 and SPS3 are negative *cis*-regulatory elements. UAS1 is a distant enhancer; B: Schematic diagrams of SptA exerting functions during the growth of strain J7-2. The black solid line represents growth curve. The red short dotted line represents intracellular proteolytic activity. The red long dotted line represents extracellular proteolytic activity.

当菌株 J7-2 生长到对数中期时, 培养基中氮分解代谢物如 NH_4^+ 的存在促使抑制子结合 *sptA* 上游的负顺式调控元件 SPS2 和 SPS3, 此时 *sptA* 的转录被抑制, 因而不能表达; 当菌株 J7-2 生长到对数后期时, 激活子与正顺式调控元件 SPS1 结合, 由于 SPS1 与 SPS2 重叠会导致抑制子从 SPS2 上释放, 促进前起始复合物的正确组装, 而增强子结合蛋白与远距离增强子 UAS1 结合之后, 通过环化作用与前起始复合物相互作用, 从而促进 *sptA* 转录, 因此在这一阶段 SptA 开始在胞内大量表达^[23]。胞内表达的 SptA 前体完成折叠之后被迅速高效分泌至胞外并且信号肽被切除, 所形成的酶原在胞外加工成熟转变为有活性的成熟酶, 这时胞外蛋白酶活性可以检测到并随着培养时间延长升高, 胞外 SptA 成熟酶通过将外源蛋白质底物降解为短肽和氨基酸, 从而为 J7-2 菌株的生长提供营养。当菌株 J7-2 生长进入稳定期时胞外蛋白酶活性达到最高水平, 由于 Tat 转运体饱和或(和)细胞衰老导致 SptA 分泌量不及合成量, 此时未及分泌的少量 SptA 前体开始在胞内积累并自加工成熟, 形成有活性的成熟酶, 胞内 SptA 成熟酶降解细胞蛋白, 从而造成细胞死亡甚至裂解, 促进 J7-2 菌株进入衰亡期。衰亡期 J7-2 菌株细胞内累积的 SptA 成熟酶含量增加, 导致更多衰老细胞死亡和裂解并释放出胞内物质, SptA 通过促进存活细胞利用来源于死细胞的营养物质(尤其是蛋白质), 从而有助于 J7-2 菌株群体的长期存活。

REFERENCES

- [1] Amoozegar MA, Siroosi M, Atashgahi S, Smidt H, Ventosa A. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes[J]. Microbiology: Reading, England, 2017, 163(5): 623-645
- [2] Stan-Lotter H, Fendrihan S. Halophilic archaea: life with desiccation, radiation and oligotrophy over geological times[J]. Life: Basel, Switzerland, 2015, 5(3): 1487-1496
- [3] Schubert BA, Timofeeff MN, Lowenstein TK, Polle JEW. *Dunaliella* cells in fluid inclusions in halite: significance for long-term survival of prokaryotes[J]. Geomicrobiology Journal, 2010, 27(1): 61-75
- [4] Winters YD, Lowenstein TK, Timofeeff MN. Starvation-survival in haloarchaea[J]. Life: Basel, Switzerland, 2015, 5(4): 1587-1609
- [5] Oren A. Glycerol metabolism in hypersaline environments[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(3): 851-863
- [6] Zerulla K, Chimileski S, Näther D, Gophna U, Papke RT, Soppa J. DNA as a phosphate storage polymer and the alternative advantages of polyploidy for growth or survival[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94819
- [7] Hua Z, Ouellette M, Makkay AM, Papke RT, Zhaxybayeva O. Nutrient supplementation experiments with saltern microbial communities implicate utilization of DNA as a source of phosphorus[J]. The ISME Journal, 2021, 15(10): 2853-2864
- [8] Białkowska AM, Morawski K, Florczak T. Extremophilic proteases as novel and efficient tools in short peptide synthesis[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(9): 1325-1342
- [9] De Castro RE, Maupin-Furlow JA, Giménez MI, Herrera Seitz MK, Sánchez JJ. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(1): 17-35
- [10] Kamekura M, Seno Y, Holmes ML, Dyall-Smith ML. Molecular cloning and sequencing of the gene for a halophilic alkaline serine protease (Halolysin) from an unidentified halophilic archaea strain (172P1) and expression of the gene in *Haloferax volcanii*[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(3): 736-742
- [11] Kamekura M, Seno Y, Dyall-Smith M. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*; gene cloning, expression and structural studies[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1996, 1294(2): 159-167
- [12] Chen SX, Sun SQ, Wang R, Feng HL, Xiang H. Halolysin R4 of *Haloferax mediterranei* confers its host antagonistic and defensive activities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(8): e02889-e02820

- [13] Ruiz DM, Paggi RA, Giménez MI, De Castro RE. Autocatalytic maturation of the Tat-dependent halophilic subtilase Nep produced by the archaeon *Natrialba magadii*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(14): 3700-3707
- [14] Xu ZS, Du X, Li TT, Gan F, Tang B, Tang XF. Functional insight into the C-terminal extension of Halolysin SptA from haloarchaeon *Natrinema* sp. J7[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23562
- [15] Zhang YX, Wang MX, Du X, Tang W, Zhang L, Li MR, Wang J, Tang B, Tang XF. Chitin accelerates activation of a novel haloarchaeal serine protease that deproteinizes chitin-containing biomass[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(18): 5698-5708
- [16] Hou J, Han D, Zhou Y, Li Y, Cui HL. Identification and characterization of the gene encoding an extracellular protease from haloarchaeon *Halococcus salifodinae*[J]. *Microbiological Research*, 2020, 236: 126468
- [17] Hou J, Yin XM, Li Y, Han D, Lü B, Zhang JY, Cui HL. Biochemical characterization of a low salt-adapted extracellular protease from the extremely halophilic archaeon *Halococcus salifodinae*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 176: 253-259
- [18] Rose RW, Brüser T, Kissinger JC, Pohlschröder M. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 943-950
- [19] Shi WL, Tang XF, Huang YP, Gan F, Tang B, Shen P. An extracellular halophilic protease SptA from a halophilic archaeon *Natrinema* sp. J7: gene cloning, expression and characterization[J]. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2006, 10(6): 599-606
- [20] Du X, Li MR, Tang W, Zhang YX, Zhang L, Wang J, Li TT, Tang B, Tang XF. Secretion of Tat-dependent Halolysin SptA capable of autocatalytic activation and its relation to haloarchaeal growth[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(3): 548-565
- [21] Paggi RA, Madrid EA, D'Alessandro CP, Cerletti M, De Castro RE. Growth phase-dependent biosynthesis of Nep, a Halolysin-like protease secreted by the alkaliphilic haloarchaeon *Natrialba magadii*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(1): 36-41
- [22] Kamekura M, Seno Y. A halophilic extracellular protease from a halophilic archaeobacterium strain 172 P1[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 1990, 68(1): 352-359
- [23] Li MR, Yin J, Mei S, Wang XH, Tang XF, Tang B. Halolysin SptA, a serine protease, contributes to growth-phase transition of haloarchaeon *Natrinema* sp. J7-2, and its expression involves cooperative action of multiple *cis*-regulatory elements[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1799
- [24] Feng J, Wang J, Zhang YX, Du X, Xu ZS, Wu YF, Tang W, Li MR, Tang B, Tang XF. Proteomic analysis of the secretome of haloarchaeon *Natrinema* sp. J7-2[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(3): 1248-1258
- [25] King J, Laemmli UK. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1971, 62(3): 465-477
- [26] Fendrihan S, Dornmayr-Pfaffenhuemer M, Gerbl FW, Holzinger A, Grösbacher M, Briza P, Erler A, Gruber C, Plätzer K, Stan-Lotter H. Spherical particles of halophilic archaea correlate with exposure to low water activity-implications for microbial survival in fluid inclusions of ancient halite[J]. *Geobiology*, 2012, 10(5): 424-433
- [27] Studdert CA, De Castro RE, Seitz KH, Sánchez JJ. Detection and preliminary characterization of extracellular proteolytic activities of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*[J]. *Archives of Microbiology*, 1997, 168(6): 532-535
- [28] Finkel SE. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(2): 113-120
- [29] Feng J, Liu B, Zhang ZQ, Ren Y, Li Y, Gan F, Huang YP, Chen XD, Shen P, Wang L, et al. The complete genome sequence of *Natrinema* sp. J7-2, a haloarchaeon capable of growth on synthetic media without amino acid supplements[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41621