

细菌组氨酸激酶的信号转导机制及其在逆境响应中的作用

赵晓薇¹, 梅方炜¹, 匡素芳^{*2}, 彭仁^{*1}

1 江西师范大学 生命科学学院, 江西 南昌 330022

2 江西师范大学 健康学院, 江西 南昌 330022

赵晓薇, 梅方炜, 匡素芳, 彭仁. 细菌组氨酸激酶的信号转导机制及其在逆境响应中的作用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 3877-3896.

ZHAO Xiaowei, MEI Fangwei, KUANG Sufang, PENG Ren. Bacterial histidine kinases: signal transduction mechanisms and roles in stress responses[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 3877-3896.

摘要: 组氨酸激酶参与的信号转导途径在细菌响应逆境过程中发挥了重要作用。经过 60 多年的研究, 人们在多种细菌中发现了组氨酸激酶。细菌组氨酸激酶分为 11 个家族, 每个家族涵盖多个类型。它们通过一步磷酸化或多步级联磷酸化的调节方式完成信号转导过程, 调控多种逆境响应相关的基因表达, 由此形成复杂而多样的信号感知系统。这使得细菌能够有效地响应温度变化、适应抗生素压力、产生毒力、顺应酸性环境和抵抗有机化合物胁迫等过程。通过综述组氨酸激酶的作用和机制, 为理解细菌的生存策略和适应性提供见解, 有助于拓展组氨酸激酶在生物学、医学和小分子检测等领域的应用研究。

关键词: 组氨酸激酶; 响应逆境; 作用机制; 调节作用

Bacterial histidine kinases: signal transduction mechanisms and roles in stress responses

ZHAO Xiaowei¹, MEI Fangwei¹, KUANG Sufang^{*2}, PENG Ren^{*1}

1 College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

2 School of Health, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

Abstract: Histidine kinases are a crucial class of protein kinases involved in signal transduction pathways, playing a key role in bacterial responses to environmental stress. After more than 60 years

资助项目: 国家自然科学基金(32160011, 31960011)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160011, 31960011).

*Corresponding authors. E-mail: KUANG Sufang, kuangsufang@jxnu.edu.cn; PENG Ren, renpeng@jxnu.edu.cn

Received: 2024-01-12; Accepted: 2024-02-18; Published online: 2024-04-09

of research, researchers have identified histidine kinases in a variety of bacteria. Bacterial histidine kinases are classified into 11 families, each encompassing multiple types. They accomplish the signal transduction process through one-step phosphorylation or multi-step cascading phosphorylation, thus regulating the expression of genes associated with stress responses and forming complex and diverse signal perception systems. This enables bacteria to effectively respond to temperature changes, adapt to antibiotic pressure, produce virulence, acclimate to acidic environments, and resistance to organic compounds. This review provides insights into the roles and mechanisms of histidine kinases, bacterial survival strategies and adaptability and facilitating the research on the application of histidine kinases in biology, medicine, and detection of small molecules.

Keywords: histidine kinase; response to environmental stress; mechanism; regulatory role

组氨酸激酶(histidine kinase, HK)与其下游的反应调节子(response regulator, RR)共同组成典型的双组分调节系统(two-component regulatory system, TCS),是细菌信号转导过程中的主要调节方式之一。它们通过调节基因的转录与表达,完成对多种环境信号的响应,包括响应温度变化、适应抗生素压力、产生毒力、顺应酸性环境和抵抗有机化合物胁迫等。例如, HK 介导的信号转导过程参与赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) SD3 对有机化合物胁迫的响应^[1-2]。此外,也有研究报道组氨酸蛋白激酶介导的信号转导在细菌耐药性中发挥作用,这对于开发新的抗感染药物至关重要^[3]。根据 KEGG 数据库可知大多数细菌存在 20 个或更多的 HK,其中许多可能具有冗余或重叠的功能。相较于蛋白激酶,这些组氨酸激酶存在不稳定性,这在测定细菌的 HK 活性时存在困难^[4]。因此,本文综述 HK 在细菌响应逆境过程中的作用、机制及活性研究方法,旨在为 HK 在生物学、医学和小分子检测等领域中的应用提供参考价值。

1 组氨酸激酶的发现与分类

1.1 发现历程

在 50 年代,Edmond Fischer 与 Edwin Krebs

合作发现第一个蛋白激酶^[5],由于在蛋白质磷酸化和去磷酸化方面的突出贡献,他们共同获得了 1992 年诺贝尔生理学或医学奖。据诺贝尔奖官方网站(<https://www.nobelprize.org/laureates>)报道,时隔 20 多年后,William G. Kaelin Jr、Sir Peter J. Ratcliffe 和 Gregg L. Semenza 因发现细胞如何感知和适应氧气水平而共同获得 2019 年诺贝尔生理学或医学奖。David Julius 和 Ardem Patapoutian 因发现了人类的温度和触觉感知器而获得 2021 年诺贝尔生理学或医学奖。由此可见理解生物如何感知环境信号具有重大的科学价值和实践意义。细菌中对信号感应的蛋白激酶主要是 HK,对这一激酶的发现和研究也有助于理解细菌的适应性机制。从 HK 研究的发展脉络来看,它的起源可以追溯到 1962 年,Boyer 等^[6]用 Pi^{32} 同位素标记的方法对牛线粒体蛋白提取物展开了研究,他们发现了组氨酸磷酸化的现象。此后,许多细菌中也发现了 HK。1985 年,Bueno 等^[7]发现氮缺乏时,组氨酸酶 GlnL (NtrB) 的产生形式发生变化,但尚未证实其磷酸化作用。1986 年,Nixon 等^[8]在研究大肠杆菌(*Escherichia coli*)氮调节蛋白时,首次发现了 NtrB 能够将 NtrC 进行磷酸化,并推断 NtrB 为 HK。1988 年,Igo 等^[9]在体外证实了对大肠杆

菌中 EnvZ 的磷酸化作用, 并且磷酸化的 EnvZ 可能作为转录激活因子 OmpR 的磷酸供体。随后, Forst 等^[10]也证明了 EnvZ 的磷酸根基团确实可以转移至转录激活因子 OmpR。1995 年, 盐沼盐杆菌中的趋化性和趋光性受体 HK-CheA 调控的作用被证实^[11]。1998 年和 1999 年, Tanaka 等^[12]和 Bilwes 等^[13]对 HK 的三维结构进行了深入研究, 他们先后揭示了大肠杆菌的 EnvZ 蛋白和海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的 CheA 蛋白具有代表性的 HK 结构。2001 年, 在沙门氏菌(*Salmonella*)中发现一种能够响应金属离子 Mg^{2+} 的 PhoQ, 它对于细菌生存适应起到关键作用^[14]。此后, 随着各种细菌全基因组测序的不断完成, 研究者发现所有已测序的细菌基因组几乎都有由 HK 组成的 TCS^[15]。总之, 组氨酸磷酸化的现象发现较早, 细菌中 HK 的发现数量较多, 具体历程总结如图 1 所示。根据 P2CS 数据库(<http://www.p2cs.org/>)可知, 在原核生物中已报道或注释的 HK 有 74 029 个。这些庞大数量 HK 的发现和研究表明为我们理解细

菌信号转导和生物适应性提供了重要线索。

1.2 分类

根据 HK 与反应调节子组成的方式不同可以分为 3 种类型: (1) 与反应调节子共同形成典型 TCS 系统的 HK^[16]; (2) 与反应调节子形成一个杂合蛋白的 HK^[16]; (3) 单独编码的孤儿 HK^[17-19]。

根据 KEGG 数据库(https://www.genome.jp/kegg-bin/show_brite?ko01001.keg)对 HK 功能不同进行分类, 可以分为 11 个家族, 分别是 OmpR 家族、Sporulation 家族、CitB 家族、LytTR 家族、NarL 家族、NtrC 家族、Chemotaxis 家族、Cell cycle 家族、Lux 家族、LuxR 和其他家族。一般来说, 平均每个细菌存在 20 个或更多的 HK 作为受体蛋白的信号转导途径, 完成对外界信号的响应。本实验室也鉴定了赤红球菌中参与有机溶剂响应的 2 种新型 HK, 但尚未对其家族进行分类^[1-2]。综上, 将常见细菌中的 HK 总结如表 1 所示。

OmpR 家族是已知的最简单形式的细菌信号转导系统, 其组成的 HK 也是研究最为充分

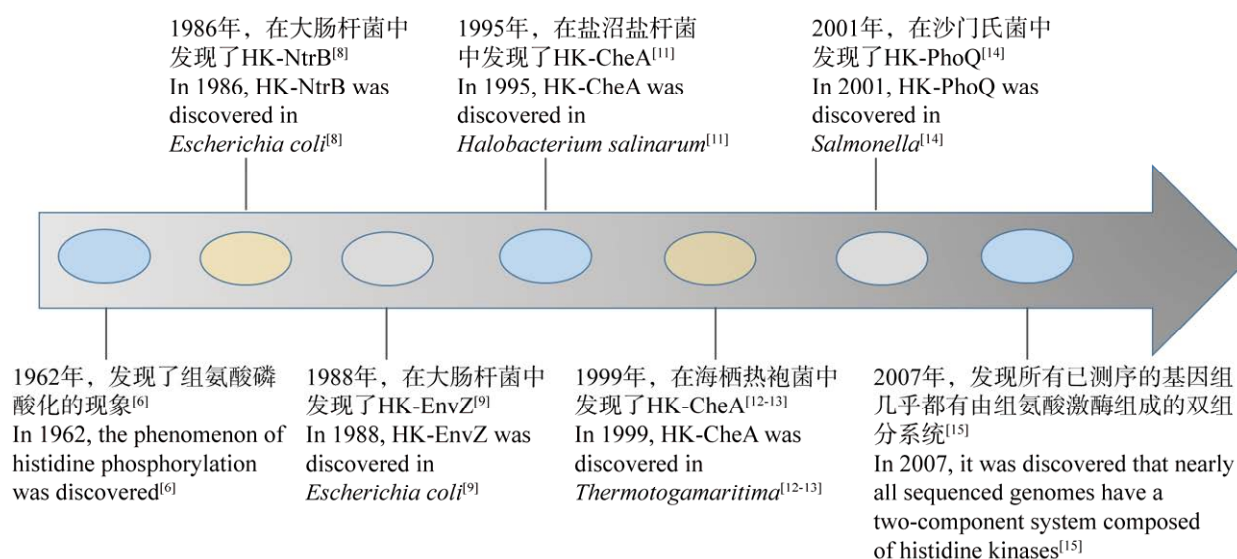


图 1 HK 的发现历程

Figure 1 Chronology of histidine kinase discovery.

表 1 常见细菌中的组氨酸激酶
Table 1 Histidine kinases in common bacteria

菌株 Strain	OmpR 家族 OmpR family	Sporulation 家族 Sporulation family	CitB 家族 CitB family	LytR 家族 LytR family	NarL 家族 NarL family	NtrC 家族 NtrC family	Chemotaxis 家族 Chemotaxis family	Cell cycle 家族 Cell cycle family	Lux 家族 Lux family	LuxR 家族 LuxR family	Other 家族 Other family	参考数据库 数据库链接 Reference database link
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	PhoR, CssS, ResE, VicK, BceS, YxdK, ArlS	KinA, KinB, KinC, KinD, KinE	CitS, DctS, MalK/ yufL	LytS, NatK	Comp, DegS, DesK, DesK/YvfT, LiaS, YdfH, YhcY	0	CheA	0	0	0	GlnK/GlnJ, YesM	https://www.genome.jp/brite/bsu01001+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	PhoR, KdpD/ CA347_69, KdpD/CA347_2159, SrrB/ ResE, VicK/WalK, SaeS, BraS, GraS, ArlS, CA347_2441	0	0	LytS, AgrC	DesK, VraS, NreB, CA347_1837	0	0	0	0	0	HptS	BSU33020 https://www.genome.jp/brite/sauc01001+ CA347_2110
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	PhoR, PhoQ, EnvZ, CpxA, RstB, CreC, BaeS, BasS, CusS, QseC, KdpD, TorS, ArcB, HprS	0	CitA/ DptB, DcuS	BtsS, PyrS	NarX, NarQ, UhpB, RcsC, RcsD, BarA, EvgS	GlnL, HydH/ ZraS, AtoS, GtrK	CheA	0	0	0	0	https://www.genome.jp/brite/eco01001+b0400
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	PhoR, PhoQ, EnvZ, CpxA, RstB, CreC, BaeS, BasS, CusS, QseC/ YgiY, KdpD, ArcB, SilS, AdeS	0	CitA, DcuS, KPN_00054	YehU, YpdA	NarX, UhpB, RcsC, BarA, EvgS, RcsD/YojN	GlnL, HydH/ ZraS, PgtB, GtrK/ YfhK	0	0	0	0	0	https://www.genome.jp/brite/kpn01001+KPN_00341

(待续)

(续表 1)												
菌株	OmpR 家族	Sporulation 家族	CitB 家族	LytTR 家族	NarL 家族	NtrC 家族	Chemotaxis 家族	Cell cycle 家族	Lux 家族	LuxR 家族	Other 家族	参考数据库 链接
Strain	OmpR family	Sporulation family	CitB family	LytTR family	NarL family	NtrC family	Chemotaxis family	Cell cycle family	Lux family	LuxR family	Other family	Reference database link
肠炎沙门氏菌	PhoR, PhoQ, EnvZ, CpxA, RstB, CreC, BaeS, BasS, QseC, KdpD, ArcB, TctE, I137_08920	0	CitA/DpiB/ I137_00255, DcuS, CitA (DpiB/ I137_10665)	K02478	NarQ, UhpB, BarA, RcsD	GlnL, HydH/ ZraS, PgtB, GlrK	CheA	0	0	Trs, SsrA	0	https://www.genome.jp/brte/seep01001+I137_19495
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	PhoR, EnvZ, RstB, CpxA, KdpD, TorS, ArcB	0	CitA/ DpiB, K02476		NarQ, FusK, BarA, EvgS, K02480	GlnL, PgtB, DctB, FlgS/ VC_1084, FlgS/ VC_1521	CheA/ Vch1786_10897, CheA/ Vch1786_11556, CheA/ Vch1786_110779	0	LuxQ, CqsS	0	FlrB, ChiS	https://www.genome.jp/brte/vce01001+Vch1786_11151
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	PhoR, EnvZ, CpxA, RstB, CreC, TorS, ArcB	0	0	N646_2692	NarQ, UhpB, BarA/ N646_1660, N646_3065, BarA/ N646_0419, N646_3441, EvgS, N646_0989	GlnL, DctB/ N646_1660, N646_3065, DctB/ N646_0419, N646_3441, FlgS	CheA	0	LuxQ, CqsS, LuxN	Trs	FirB/FlaL, NIK1, PA1611/ N646_3472, ChiS	https://www.genome.jp/brte/vag01001+N646_2345
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	PhoR, EnvZ, CpxA, RstB, CusS, QseC, TorS, ArcB	0	CitA	VP0539	NarQ, UhpB, BarA, EvgS, VP1908	GlnL, PgtB, DctB/ VP0915, DctB/ VPA1731, FlgS	CheA	0	LuxQ, CqsS, LuxN	Trs/ VP2010, Trs/ VP1201	FirB/FlaL, ChiS	https://www.genome.jp/brte/vpa01001+VP0155

(待续)

(续表 1)

菌株 Strain	OmpR 家族 OmpR family	Sporulation 家族 Sporulation family	CitB 家族 CitB family	LytTR 家族 LytTR family	NarL 家族 NarL family	NtrC 家族 NtrC family	Chemotaxis 家族 Chemotaxis family	Cell cycle 家族 Cell cycle family	Lux 家族 Lux family	LuxR 家族 LuxR family	Other 家族 Other family	参考数据库 链接 Reference database link
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	PhoR, KdpD, SrrB, YycG, SaeS, GraS, BraS/BceS, ArlS	0	0	LytS, AgrC	DesK, VraS, NreB, K02480/ SERP1385	0	0	0	0	0	HptS	https://www. genome.jp/ brite/ ser01001+ SERP1255
酿脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	VicK, CiaH, ArlS, Ihk	0	DptB	AgrC/ MGAS15252_ 0231, AgrC/ MGAS15252_ 1203, AgrC/ MGAS15252_ 0232	LiaS	0	0	0	0	0	YesM/ MGAS15252_1191, YesM/ MGAS15252_1162	https://www. genome.jp/ brite/ stg01001+ MGAS15252_ 0311
单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	PhoR, KdpD, ResE, VicK, BraS/BceS, VanS, ArlS	0	0	AgrC	LiaS	0	CheA	0	0	0	YesM, PdiaS	https://www. genome.jp/ brite/ Imo01001+ Imo2500
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	PhoR, VicK, SaeS, BraS/BceS, CiaH	0	0	AgrC/BlpH, ComD	DesK, LiaS	0	0	0	0	0	YesM/SP_0155, YesM/SP_0662	https://www. genome.jp/ brite/ spn01001+ SP_2083
结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	SenX3, KdpD, MprB, MtrB, PrrB, TrcS, K02484/ BCG_3823c, K02484/BCG_ 0646c, PhoR	0	0	0	DevS, DosT, K02480/ BCG_0897	0	0	0	0	0	PdiaS/BCG_3247c, PdiaS/BCG_3340c	https://www. genome.jp/ brite/ mbb01001+ BCG_0810

(待续)

(续表 1)

菌株	OmpR 家族	Sporulation 家族	CitB 家族	LytR 家族	NarL 家族	NtrC 家族	Chemotaxis 家族	Cell cycle 家族	Lux 家族	LuxR 家族	Other 家族	参考数据库链接
Strain	OmpR family	Sporulation family	CitB family	LytR family	NarL family	NtrC family	Chemotaxis family	Cell cycle family	Lux family	LuxR family	Other family	Reference database link
野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	PhoR, PhoQ, CreC, KdpD, TctE, K02484/XCC3395	0	0	AlgZ	DesK	0	CheA/XCC1885, CheA/XCC2700, CheA/XCC1903, ChpA	0	0	0	RpfC, RegB	https://www.genome.jp/brite/xcc01001+ XCC0962
皮特不动杆菌 <i>Acinetobacter pittii</i>	PhoR, EnvZ, RstB, CreC, BaeS, CusS, QseC, KdpD, AdeS, K02484	0	0	AlgZ	BarA	GlnL, PilS	0	0	0	0	0	https://www.genome.jp/brite/acc01001+ BDGL_003146
赤红球菌 <i>Rhodococcus ruber</i>	SenX3, KdpD, MprB, MtrB, PrrB, K02484/CS378_20165, K02484/CS378_24005	0	K02476/CS378_21255	K02478/CS378_21610	DevS/CS378_21800, DevS/CS378_02525, K02480/CS378_10150	0	0	0	0	FixL	PtdaS, RHK (unknown family), DGCIP1 (unknown family)	https://www.genome.jp/brite/rrz01001+ CS378_21415
叶缘焦枯病菌 <i>Xylella fastidiosa</i>	PhoR, PhoQ, TctE	0	0	AlgZ	0	GlnL, PilS	ChpA	0	0	0	RpfC, RegB	https://www.genome.jp/brite/xf01001+ XF_0323
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PhoR, EnvZ/AmgS, CpxA, RstB, CusS/PA1438, CusS/PA2810, CusS/PA4886, CusS/PA2524, QseC/	0	0	AlgZ	NarX, BarA/GacS, EvgS/RocS1, EvgS/PA2583, PprA	GlnL/NtrB, DetB/PA5165, DetB/PA5512, PilS,	CheA/PA0178, CheA/PA1458, ChpA	0	0	0	FirB/FleS, AauS, RegB/RoxS, SagS, PA1611, PA1976, LadS, MifS	https://www.genome.jp/brite/pae01001+ PA5199 and https://www.genome.jp/

(待续)

(续表 1)

菌株 Strain	OmpR 家族 OmpR family	Sporulation 家族 Sporulation family	CitB 家族 CitB family	LytTR 家族 LytTR family	NarL 家族 NarL family	NtrC 家族 NtrC family	Chemotaxis 家族 Chemotaxis family	Cell cycle 家族 Cell cycle family	Lux 家族 Lux family	LuxR 家族 LuxR family	Other 家族 Other family	参考数据库 链接 Reference database link
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	PA4777, QseC/ PA2480, KdpD, TctE, ParS, PfeS/PA2687, PfeS/PA0930, PA3206, TorS, ArcB PhoR, EnvZ, RstB, BaeS, CusS, QseC, KdpD, AdeS, AIS_2287	0	0	AlgZ	BarA	GlnL, Pils	0	0	0	0	0	https://www. genome.jp/ brite/ acb01001+ AIS_3230 https://www. genome.jp/ brite/ctr01001+ ETA_E_1081
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	PhoR, PhoQ, EnvZ, CpxA, RstB, BaeS, BasS, CusS, QseC, KdpD, TorS, ArcB	0	CitA/DpiB	0	NarQ, UhpB, FusK, ResC, RcsD, BarA	GlnL, AtoS, PgtB, GlrK	CheA	0	0	Trs, SsrA	0	https://www. genome.jp/ brite/ him01001+ HI_1707 https://www. genome.jp/ brite/ cak01001+ Caul_2480
流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i>	PhoR, QseC/ YgiY	0	0	0	NarQ	0	0	0	0	0	0	https://www. genome.jp/ brite/ him01001+ HI_1707 https://www. genome.jp/ brite/ cak01001+ Caul_2480
柄杆菌 <i>Caulobacter</i> sp.	PhoR, EnvZ, KdpD/ Caul_2695, KdpD/ Caul_4239, ChvG/ Caul_4629, ChvG/ Caul_3968, Caul_1586	0	0	0	Caul_2480	GlnL, NtrY	CheA/ Caul_0612, CheA/ Caul_0279, CheA/ Caul_3301	PleC, 0 DivJ, CckA	0	FixL/ Caul_0631, FixL/ Caul_2345, FixL/ Caul_2969	RegB, K20974/Caul_2790, K20974/Caul_3572, K20974/Caul_4471, K20974/Caul_3693, K20974/Caul_4725, K20974/Caul_2547, K20974/Caul_5254, K20974/Caul_1977, K20974/Caul_0659, K20974/Caul_1079, K20974/Caul_1314	https://www. genome.jp/ brite/ him01001+ HI_1707 https://www. genome.jp/ brite/ cak01001+ Caul_2480

的。OmpR 家族最为庞大, 在绝大多数细菌中均存在, 负责感知包括渗透压调节、温度变化、抗生素压力、酸性环境、离子浓度变化等外部环境^[20]。Sporulation 家族主要涉及细菌的孢子形成过程, 调控孢子形成的基因表达。通常与发育、耐受性等有关, 常见于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中^[21]。CitB 家族则负责细菌对柠檬酸和其他酸的传感与响应, 也与细菌的致病过程相关, 存在于大肠杆菌、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和沙门氏菌等多种细菌中^[22]。LytTR 家族参与控制细菌素的合成、自然竞争发展、细胞死亡途径及碳源摄取, 在多数菌株中均存在, 但已知的种类尚少^[23-26]。NarL 家族主要参与氮代谢的调控和有机化合物的降解, 存在于红球菌等细菌中^[27-29]。NtrC 家族参与氮利用的调控、生物膜形成的调节和有机化合物的降解, 常见于革兰氏阴性菌中^[30-31]。Chemotaxis 家族主要负责感知细胞周围的化学物质, 调控细菌的运动行为, 以寻找更适宜的环境, 这一家族研究最为清晰的 HK 为 CheA, 也是当前在多数细菌中最为常见的 HK^[32-35]。Cell cycle 家族与细胞周期的调控有关, 涉及细胞的生长、分裂、DNA 复制等过程, 该家族中最为常见的 HK 为 CckA^[36]。Lux 家族参与生物膜的形成、群体感应和细菌的生物发光调控, 在弧菌较为典型^[37-39]。LuxR 家族参与调控生物合成和细菌毒力, 常见于沙门氏菌和弧菌^[40-41]。

2 组氨酸激酶的结构和作用机制

2.1 二级结构

HK 通常含有多个 α -螺旋结构, 这些结构呈螺旋状空间排列, 并由螺旋上的氢键稳定。除了 α -螺旋结构外, HK 中还可能存在一些由多个 β -折叠构象组成的 β -折叠片段。HK 通常是由 2 个单体组成的同源二聚体并作为跨膜受

体承担作用^[42]。Casino 等^[43]通过晶体结构发现了一个不对称的 HK 二聚体, 其中一个亚基进行自磷酸化反应, 而另一个亚基处于非活化状态, 这表明组氨酸蛋白激酶的自磷酸化以不对称的方式进行。单体 HK 包括氨基末端的胞外感受区域和羧基末端的胞内信号转导区域, 分别对应感受域和转导域。转导域包括了蛋白二聚化和组氨酸磷酸转移结构域 (dimerization and histidine phosphotransfer, DHp) 即 HisKA 结构域和催化域 (catalytic and ATP-binding, CA), DHp 结构域以保守的磷酸化位点即组氨酸残基为典型特征, CA 结构域则具有 ATP 酶结构域功能, 也称为 HATPase_C^[44]。此外, 在感受域和转导域之间还包括了跨膜区和连接区, 以完成各种输入信号的传递, 这个区域通常为一个或多个细胞内信号结构域, 如 HAMP、PAS 和 GAF 等。其中, HAMP 存在于 31% 的 HK 中和一些腺苷酸环化酶 (adenylyl cyclase)、甲基结合蛋白 (methyl-accepting protein) 和磷酸酶 (phosphatase) 中, 并以这些酶的首字母进行命名, 参与酸性环境和渗透压变化相关的信号转导; Per-ARNT-Sim (PAS) 存在于 33% 的 HK 中, 主要与柠檬酸盐、氧气和光感应相关; GAF, 一种发现于 cGMP 特异性磷酸二酯酶、腺苷酸环化酶和 FhlA 中的结构域, 存在于 9% 的 HK 中, 可以结合氧气、一氧化氮和一氧化碳等^[44]。

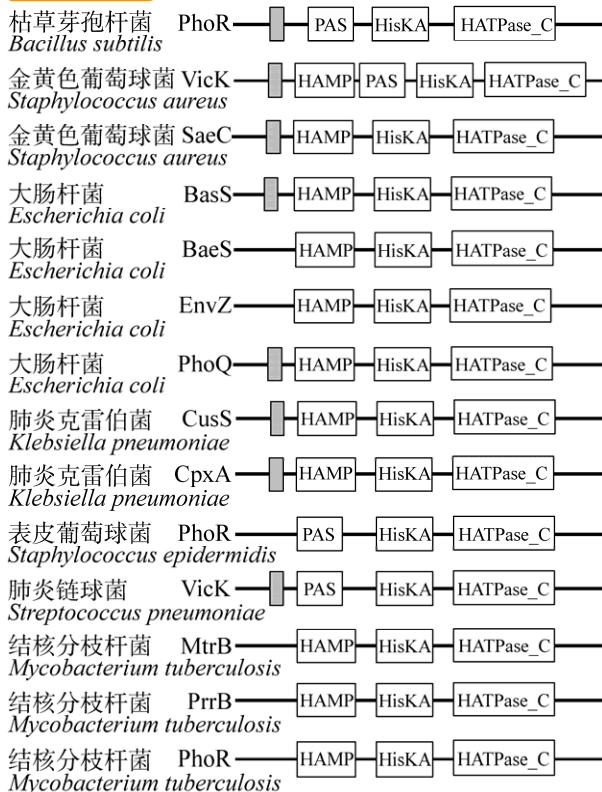
然而, 在复杂的信号转导途径中, 通常以混合型组氨酸蛋白激酶 (hybrid histidine kinase, HHPK) 发挥作用, 除了感受域和转导域外, 还有额外的羧基端接收结构域 (receiver domain, REC) 和组氨酸磷酸转移结构域 (histidine phosphotransfer, Hpt), REC 和 Hpt 分别以保守的天冬氨酸/谷氨酸和组氨酸残基为典型特征^[44-45]。这说明不同组氨酸蛋白激酶的序列结构存在巨大差异, 但又存在保守的氨基酸残基, 为发挥

多种信号转导功能提供了可能性, 并且 Hpt 的有无决定了信号转导方式的复杂程度。

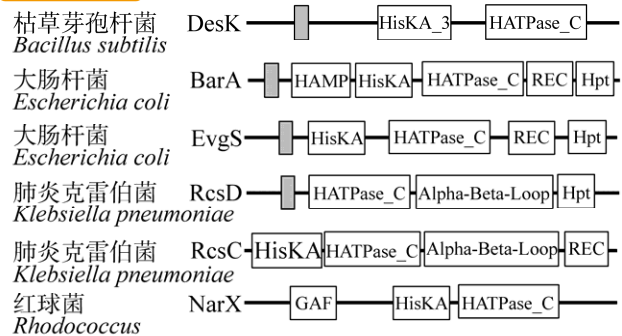
根据 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>), 将一些常见的与逆境响应相关的 HK 二级结构域进行总结如图 2 所示。可见 OmpR 家族的 HK 二级结构域显示出典型的简单型 HK 二级结构域特征, 主要表现为无羧基端的 REC 或 Hpt 结构域。而 NarL 家族、Chemotaxis 家族、Cell cycle 家族和 Other 家族则主要表现出混合型 HK 的二级结构域特征。属于 Chemotaxis 家族的大肠杆菌 CheA 作为抗菌药物靶点, 根据 Pfam 数据库包括了蛋白二聚化结构域(homodimeric domain, H-kinase_dim), 但未见 DHp 和 Hpt 结构域。然而, 在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)的 CheA 中也包

括了 Hpt 结构域(https://www.kegg.jp/ssdb-bin/ssdb_motif?kid=vce:Vch1786_I0897)。因此, 不同物种中 HK 的结构域可能存在差异, 或者其结构域还有待鉴定完善。本实验室鉴定的赤红球菌中的 2 种组氨酸激酶尚未进行家族分类, 其二级结构域特征与 OmpR 家族最为相似, 这些结构域信息为后续的研究奠定了良好的基础^[1-2]。此外, 也有个别组氨酸蛋白激酶无胞外感受域, 如枯草芽孢杆菌的组氨酸蛋白激酶 DesK, 它对胞外信号的传感是通过未知结构排列的 10 个跨膜螺旋(来自 2 个单聚体)进行的。每个单聚体的第五个跨膜螺旋连接至位于细胞质中的 DHp 结构域, 以完成信号转导^[46]。

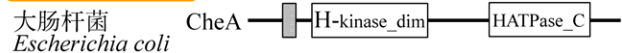
OmpR family



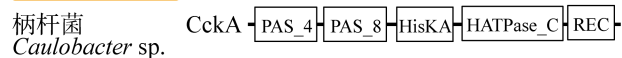
NarL family



Chemotaxis family



Cell cycle family



Other family

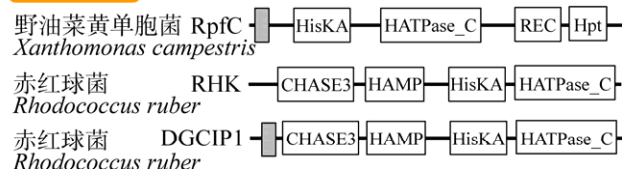


图 2 参与细菌逆境响应的 HK 二级结构域 灰色柱子为尚未鉴定功能的结构域

Figure 2 HK secondary domains involved in bacterial stress response. The gray bars represent structural domains whose functions have not yet been identified.

2.2 作用机制

组氨酸蛋白激酶是一类重要的信号转导蛋白，其作用过程涉及感知外部信号、磷酸化及将信号传递给反应调节子，最终调控细胞内的生物学响应。按照结构域的不同划分为简单 HK 和混合型 HK 两类，其作用方式对应为一步磷酸化调节和多步级联磷酸化调节。

2.2.1 简单型组氨酸蛋白激酶的磷酸化调节

简单型组氨酸蛋白激酶含有 DHp 结构域，而不含 REC 和 Hpt 结构域，以一步磷酸化调节的方式进行。在信号刺激后，HK 胞外感受区域结构发生变化，外膜区域的信号传递到跨膜区域，通过跨膜螺旋的构象变化，将信号传递到胞质区域。例如，在 HK-CitA 中，柠檬酸结合引起与胞外感受区域的收缩，这会拉动 C 端的 β -折叠，导致 TM 螺旋的柱塞状运动^[13]。此后，HK 以 ATP 为磷酸供体，通过特异性磷酸化自身的二聚体结构域内的保守组氨酸(His)位点，随后作为磷酸供体来磷酸化下游的反应调节子 RR 的天冬氨酸(Asp)位点，从而实现对基因表达的调节(图 3)。周元^[47]在研究海栖热袍菌的组氨酸蛋白激酶的调节方式时，发现 HK 被黄酮类小分子木犀草素外界信号刺激后，HK 与 ATP 反应进行自磷酸化，当自磷酸化完成后，HK 可以将磷酸基团转移到相应的下游 RR 蛋白使 RR 蛋白磷酸化，被活化的 RR 蛋白可以结合到相应的启动子区域，从而启动下游基因的表达。另一个典型的例子是，EnvZ 的磷酸化结构域与激酶的催化结构域对称组装，形成以 DHp 为核心的四螺旋，从而发挥磷酸化调节作用，并且不存在 Hpt 结构域^[48]。

2.2.2 混合型组氨酸激酶的磷酸化调节

混合型 HK 除了具有 DHp 结构域外，还含有 REC 和 Hpt 结构域，以多步级联磷酸化调节

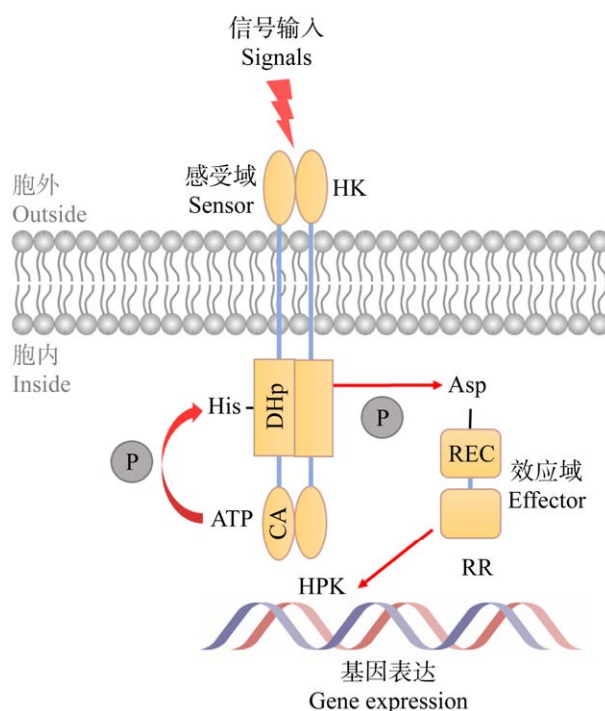


图 3 一步磷酸化调节方式

Figure 3 One-step phosphorylation regulatory system.

的方式进行。与简单型 HK 相同地完成信号刺激地感受和转导入胞内后，HK 以 ATP 为磷酸供体，通过特异性磷酸化自身的二聚体结构域内的保守组氨酸(His)位点，随后作为磷酸供体将信号传递到 REC 结构域中保守的天冬氨酸(Asp)位点，再以 Hpt 的保守组氨酸(His)位点作为信号中介，来磷酸化下游的反应调节子 RR 的天冬氨酸(Asp)位点，以 His-Asp-His-Asp 顺序的级联方式完成磷酸传递，从而实现对基因表达水平调节(图 4)^[49]。可见，这一反应调节远比 EnvZ 要复杂，以适应多种逆境等。结合图 2，可知 NarL 家族、Chemotaxis 家族、Cell cycle 家族和 Other 家族中多种 HK 含有 REC 或 Hpt 结构域，这些 HK 的作用机制可能属于混合型 HK 的磷酸化调节方式。

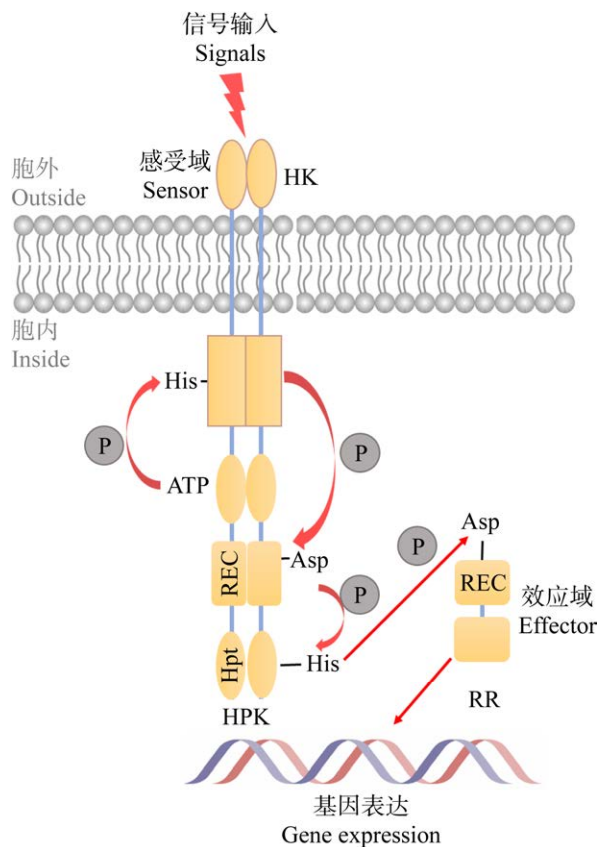


图4 多步级联磷酸化调节方式

Figure 4 Multi-step cascading phosphorylation regulatory mechanism.

3 组氨酸激酶在细菌响应逆境过程中的作用

组氨酸蛋白激酶参与的信号转导功能对细菌响应逆境环境至关重要。例如，参与细菌响应温度的变化、适应抗生素的压力、调节毒力因子、适应酸性环境、抵抗有机化合物等过程(表2)。

3.1 响应温度的变化

在对属于HK的多通道跨膜DesK研究过程中，DesK在枯草芽孢杆菌的调节下，对于外界环境温度的变化较为敏感，在处于低温状态时，DesK的细胞质催化结构域表现为组氨酸激酶状态，而处于高温状态下，DesK则表现为组氨酸

磷酸酶^[50]。TCS的DesK-DesR调控土壤细菌枯草芽孢杆菌中不饱和脂肪酸的合成。该系统在低温下激活，并在温度变化时维持膜脂质的流动性^[46,51]。此外，KEGG数据库(https://www.genome.jp/pathway/sauc02020+CA347_21)显示VicK也是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的响应温度变化的HK。

3.2 适应抗生素压力

HK通过感知抗生素压力，从而激活下游的信号转导途径，通过激活细菌的耐药基因、增强药物外排泵编码基因的表达、调节细胞壁合成等机制来减少抗生素进入胞内，从而产生耐药性^[52]。HK-CusS与下游的RR-CusR参与调节四环素耐药性。肺炎克雷伯菌对四环素耐药时，CusR出现高表达^[53]。属于TCS的BarA/UvrY则参与调节头孢地尔的耐药性；CpxA/CpxR共同调节细菌对多种抗生素的耐药性，如四环素、β-内酰胺酶类、红霉素、利福平、链霉素、氯霉素等；PhoR/PhoB调节细菌对头孢类、羧苄青霉素和喹诺酮类等抗生素的耐药性；PhoQ/PhoP、BasS/BasR则共同调节细菌对多黏菌素的耐药性^[54]。AmgS/AmgR、BaeS/BaeR、BraR/BraS、EnvZ/OmpR、EvgS/EvgA可以通过上调外排泵系统来促进铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和霍乱弧菌等细菌对多种抗生素的耐药性^[55]。因此，可以通过挖掘新的抑制靶点，实现抑制HK及其反应调节子的活性并阻止HK的二聚化来开发新的抗菌药物。

当前，许多抗菌药物以HK为靶点正在研究中，并主要作用于HK的CA结构域、DHp结构域或感受域，也有一些HK抑制剂的具体靶点尚未阐明。截至2022年的统计，靶向HK的CA结构域的抗菌药物有21种，主要有针对大肠杆菌CheA、PhoQ，枯草芽孢杆菌PhoR，

表 2 参与细菌逆境响应的 HK

Table 2 Bacterial histidine kinases involved in stress response

物种 Strain	温度的变化 Temperature change	抗生素的压力 Antibiotic pressure	毒力 Virulence	酸性环境 Acidic environment	有机溶剂胁迫 Organic solvent stress
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	DesK (NarL)	PhoR (OmpR)	/	DesK (NarL)	/
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	VicK (OmpR)	VicK (OmpR), PhoR (OmpR)	SaeS (OmpR)	/	/
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	/	BarA (NarL), BasS (OmpR), BaeS (OmpR), EvgS (NarL), EnvZ (OmpR), CheA (Chemotaxis), PhoQ (OmpR)	/	EvgS (NarL), PhoQ (OmpR), EnvZ (OmpR)	/
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	/	CusS (OmpR), CpxA (OmpR), PhoR (OmpR), PhoQ (OmpR), BasS (OmpR), BarA (NarL)	RcsC/RcsD (NarL), CpxA (OmpR)	RcsD (NarL)	/
沙门氏菌 <i>Salmonella enterica</i>	/	/	PhoQ (OmpR)	/	/
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	/	EvgS (NarL)	/	/	/
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	/	PhoR (OmpR)	/	/	/
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	/	VicK (OmpR)	/	/	/
柄杆菌 <i>Caulobacter sp.</i>	/	CckA (Cell cycle)	/	/	/
结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	/	/	MtrB (OmpR), PrrB (OmpR), PhoR (OmpR)	/	/
野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	/	/	RpfC (other), VgrS/ColS (other)	/	/
红球菌 <i>Rhodococcus</i>	/	/	/	/	NarX (NarL)
醋酸不动杆菌	/	/	/	/	MopR (NtrC)
赤红球菌 <i>Rhodococcus ruber</i>	/	/	/	/	RHK (unknown), DGCIP1 (unknown)

/: 文中未涉及该类菌株响应相应应激的组氨酸激酶

/: The histidine kinase of this strain in response to the corresponding environmental stress is not involved in this article.

表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) WalK、PhoR, 金黄色葡萄球菌 VicK 即 WalK、PhoR, 柄杆菌(*Caulobacter* sp.)CckA, 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) VicK 等抗菌药物^[3]。靶向 HK 的 DHP 结构域的抗菌药物有 2 种, 主要有针对革兰氏阳性菌 VicK 即 WalK 等抗菌药物, 特别是表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌^[3]。靶向 QseC 感受域或前药抑制剂也有 2 种。此外, 还有 14 种针对多种 HK 在内的抗菌药物作用位点尚不清晰^[3]。

3.3 调节毒力因子

病原菌感染宿主细胞必须逃过免疫屏障, 通常借助菌毛、荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和铁载体等毒力因子削弱宿主的免疫反应来实现感染^[56-57]。这些因子共同作用, 决定了感染的严重程度和病程, 因此研究调节这些毒力因子的方式有助于开展更有效的治疗和预防措施。结核分枝杆菌中与调节毒力相关的组氨酸蛋白激酶有 MtrB、PrrB 和 PhoR^[58]。EnvZ 蛋白通过其反应调节子的柔性连接器和 C-末端 β -发夹上的残基与硫氧还蛋白结合, 混合相互作用促进了信息的传递, 从而使沙门氏菌致病性基因完成转录, 进而实现对宿主的感染^[59]。属于 HK 的 RcsC、RcsD 与下游的 RcsA、RcsB 通过激活 Mat/Ecp 菌毛基因转录调节子 YkgK, 以正调控生物膜的形成, 从而影响毒力^[60]。不同的是, TCS 系统的 CpxA/CpxR 负调控细菌菌毛基因的表达, 并通过点突变证实了这一现象^[61]。金黄色葡萄球菌通过 HK-SaeS 及其反应调节子 SaeR 促进生物膜形成和抵御免疫攻击, 但这一作用可被脂肪酸抑制^[62-63]。通过开发一系列以马来酰亚胺为基础的衍生物, 并在体外和体内对 HK853 的抑制作用进行了评估, 发现含有苯基/吡啶基 (PMI-1、PMI-5) 的衍生物是最有效抑制剂^[3]。其

中 PMI-5 的抑制作用能够降低耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的毒力, 使得人肺泡上皮细胞 A549 感染病变大小减少了 65%^[3]。Cai 等^[64]揭示了脂肪酸可以通过异构的方式激活细菌组氨酸激酶, 中链脂肪酸可扩散信号因子 DSF 直接结合到野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*) HK-RpfC 的感知区域, 当这一结合作用被破坏后, 细菌毒性和生物膜发育则出现缺陷。后续研究中, 还发现了 HK-VgrS 即 ColS 也是野油菜黄单胞菌毒力发挥的关键感知器^[65]。这些结果表明 HK 参与的信号转导通路对细菌毒力因子的产生至关重要, 因此 HK 可能成为防止细菌毒力发挥作用的一个潜在靶点。

3.4 适应酸性环境

在肺炎克雷伯菌 CG43S3 中, 反应调节子编码基因 *rscB* 的缺失降低了细菌暴露于酸胁迫时的存活率, 这一酸性环境的适应能力取决于 HK-RcsD 对 RR-RcsB 的磷酸化状态^[66]。枯草芽孢杆菌在低 pH 下, HK-DesK 的谷氨酸残基发生质子化, 破坏了信号转导过程, 抑制了不饱和脂肪酸的合成, 并使膜变得更加刚硬以抵御酸性环境^[51]。对大肠杆菌进行酸胁迫进化, 通过基因组测序比对发现所有的突变位点均 HK-EvgS 的 PAS 结构域中, 证明了 EvgS 的突变是酸抗性表型发生的唯一原因^[67]。EvgS 与其反应调节子 EvgA 组成的 TCS 在弱酸性 pH 条件下被激活, EvgS 从紧密的非活性二聚体向弱活性二聚体的转变, 以诱导耐酸性的基因表达从而产生耐酸性^[68-69]。随后的研究表明大肠杆菌 EvgS/EvgA 的作用不仅可以通过调控 *ydeO* 基因和 *gadE* 基因来实现, 还可以与 HK-PhoQ 及其反应调节子 PhoP 发挥协同作用, 对 H^+ 做出调控^[70-71]。胆汁酸可防止肠道微生物的过度增长并抵挡病原体的入侵, 具有抗菌活性。然而, 某些病原体在受到胆汁酸的压力时仍能存

活。Liu 等^[72]以天然胆酸分子结构为基础,设计了一系列可以模拟其生物学功能的光交联胆酸分子探针,并结合定量蛋白质组学技术,在大肠杆菌中确定了胆汁酸结合的靶点为 HK-EnvZ。EnvZ 感应胆汁酸信号后,通过反应调节子 OmpR 作为转录因子增加膜蛋白 OmpC 的表达,促进细菌中胆酸的外排,从而实现对抗酸性环境的耐受^[72]。因此合理利用 HK 的活性位点和信号转导调控作用,可以改变细菌的酸适应能力,如乳酸菌在酸胁迫下会降低细胞活力和发酵产量,在精准调控后有利于提高工业化生产效率。

3.5 抵抗有机化合物胁迫

随着 HK 的不断研究,这一激酶能够参与细菌响应多种逆境的信号转导过程已有报道。研究表明 NarL 家族的 HK-NarX 参与红球菌降解有机化合物^[28-29],NtrC 家族的 HK-MopR 参与醋酸钙不动杆菌对苯酚的响应并促使其降解^[31]。本实验室也长期致力于赤红球菌 SD3 对苯酚和甲苯等耐受的信号转导途径和调控机制研究^[73-76]。近年来,本实验室通过蛋白质组学方法,发现了赤红球菌在甲苯胁迫下,膜蛋白 S2P 类似物表达上调最大,进一步以生物信息学手段分析其互作蛋白,鉴定得到一种新的 HK,命名为 RHK (表 1)^[1,77]。此外,本实验室还发现一个与二鸟苷酸环化酶存在互作的蛋白 DGCIP1, DGCIP1 中存在 CHASE3、HAMP、HisKA 和 HATPase 保守结构域,也可能为 HK^[2]。也有研究表明通过同时敲除孤儿 HK 基因 *cac3319* 和 *cac0437* 以对丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 进行改良,提升了菌株的耐受性和工艺的稳健性,使其能够高效、节能地生产丁醇^[19,78]。这些研究为细菌充分发挥有机化合物耐受性,拓宽在生物修复、生物催化、生物合成等领域的应用提供理论基础。

4 组氨酸激酶的筛选和活性检测

蛋白激酶小分子抑制剂的临床试验信息显示,目前有约 110 种新型激酶作为靶点进行的研究,此外,经 FDA 批准的激酶抑制剂约 71 个,这些获批的激酶抑制剂中尚未有靶向 HK 的抑制剂^[79]。HK 作为临床应用靶点的进展缓慢的一个挑战是磷酸化的组氨酸存在不稳定性,尤其在酸性条件下,磷酸化的咪唑氮易质子化,使得组氨酸成为良好的离去基团。此外,与含有磷酸酯(P-O)键的磷酸羟基氨基酸不同,磷酸组氨酸含有磷酸酰胺(P-N)键。然而,P-N 键也比 P-O 键更热力学不稳定,磷酸组氨酸的水解 ΔG 值为 -12 ~ -14 kcal/mol,而磷酸羟基氨基酸为 -6.5 ~ -9.5 kcal/mol^[4]。因此,相较于其他蛋白激酶,HK 的活性检测更为困难,需要开发新型检测技术。

4.1 新型组氨酸激酶的筛选

对于新型 HK 的筛选,以高通量筛选的方法较为快速。通常,通过基因组测序和生物信息学分析同源序列,以典型的 HK 酶结构域特征进行判别,可以挖掘一些新型的组氨酸蛋白激酶^[80]。此外,对低 pH 条件下处理的大肠杆菌进行全基因组测序分析,结果表明多个点突变均来源于 *evgS* 基因,由此揭示了 HK-EvgS 耐受酸性环境的活性^[67]。以耐有机溶剂的赤红球菌 SD3 进行有机溶剂胁迫,蛋白质组学表明金属蛋白酶 S2P 类似蛋白的上调比例最大,进一步筛选 S2P 类似蛋白的互作蛋白时,发现一种尚未报道的 HK,并证实了该 HK 具有适应有机溶剂胁迫的活性^[1-2]。在 Kinoshita-Kikuta 等^[81]的研究过程中,为了更好地研究 HK 的活性,在实验过程中使用一种非凝胶基免疫点印迹法,并运用了可以特异性识别抗 N3 组氨酸磷酸化抗体进行高通量筛选 HK 抑制剂。另外一种使

用固定化金属离子亲和色谱(Fe^{3+} -immobilized metal ion affinity chromatography, Fe^{3+} -IMAC)对组氨酸磷酸化肽进行富集的方法,可以有效避免磷酸化组氨酸的不稳定性,这为新型活性的发现提供可能^[82]。

4.2 组氨酸激酶活性的检测技术

在检测 HK 活性时,由于磷酸化组氨酸中的 P-N 键不稳定性和短半衰期,使用 LC-MS 检测含有磷酸化组氨酸的肽段面临挑战。为了评估 HK 的活性并检测 TCS 中的磷酸基团转移,研究人员基于 HK 的底物硫代磷酸化 ATP ($\text{ATP}\gamma\text{S}$)设计了一种新型 BODIPY-FL- $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (B- $\text{ATP}\gamma\text{S}$)探针,并利用了硫能够增强 P-N 键稳定性的特性^[4]。通过对海洋热袍菌的 HK853 蛋白进行实验证明了 B- $\text{ATP}\gamma\text{S}$ 探针作为 HK 底物的可行性,以及其在 TCS 过程中检测磷酸基团转移的潜力;然而,对于鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)的 PhoQ (含有 ATP 结合结构域但缺乏 DHp 结构域)却未能探测到活性,证明了探针标记的活性可能存在 DHp 结构域依赖性^[4]。然而,也有研究表明这一探针作为底物的亲和力不理想^[83]。

5 问题与展望

关于细菌 HK 的信号转导机制及其在逆境响应中的作用的研究,目前存在的问题有:(1)除 OmpR 家族外,其他家族的 HK 在多数物种中的数量仍有限,尤其是 Sporulation 家族和 Cell cycle 家族,还有待发现新的 HK 及其功能。(2)新的 HK 活性鉴定和新的信号转导通路的解析也存在一定的挑战,这是由于 HK 稳定性差和细菌信号转导通路在体内可能存在相互影响,而体外条件下单独研究特定通路变得更为困难。(3)细菌 HK 在响应多种逆境环境中具有重要功能,如何将其应用于实践生产仍是一项复杂而关键的任务。

针对以上问题,对未来研究的建议有:(1)在温度变化、酸性环境或有机溶剂胁迫等应激中, HK 起着重要作用,但当前的数量较为有限,未来可以对应激反应相关的 HK 进行筛选,并揭示信号转导机制。(2)在筛选新型 HK 时,可参考已知的耐酸性或耐有机溶剂等逆境的细菌,并对其 HK 系统进行深入研究。通过对这些细菌中 HK 结构和功能的分析,有助于识别出与特定逆境相关的关键结构域或氨基酸残基。此外,还可以利用高通量筛选技术,如蛋白质组学、转录组学和代谢组学方法,以快速有效地寻找新型 HK。通过大规模的样本分析和筛选,加速对 HK 的功能评估,并为特定逆境条件下的激酶筛选提供更多的候选目标。更重要的是,可以利用基因工程和蛋白工程技术,对已识别的 HK 进行改造和优化,以增强其在特定逆境下的活性和稳定性。例如,通过引入特定的氨基酸突变或结构域替换,以改变 HK 的底物特异性或调节其对特定信号的敏感性。(3)将 HK 引入生物工程领域,设计合成生物学系统,实现对细菌行为的精准调控,如在有机化合物降解、抑制病原体的感染和抗生素的耐药性、工业催化生产生物燃料和小分子检测等领域中的广泛应用。

REFERENCES

- [1] 吴钟昊, 彭仁. 赤红球菌组氨酸激酶的融合表达和功能分析[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 98-104.
WU ZH, PENG R. Fusion expression and functional analysis of histidine kinase from *Rhodococcus ruber*[J]. Food Science, 2021, 42(22): 98-104 (in Chinese).
- [2] 黄玉珠. 赤红球菌 SD3 二鸟苷酸环化酶互作蛋白的筛选、验证及功能研究[D]. 南昌: 江西师范大学硕士学位论文, 2023.
HUANG YZ. Screening, validation and functional study of diguanylate cyclase interacting proteins from *Rhodococcus ruber* SD3[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Normal University, 2023 (in Chinese).

- [3] ESPINASSE A, GOSWAMI M, YANG JS, VORASIN O, JI YD, CARLSON EE. Targeting multidrug resistant *Staphylococcus* infections with bacterial histidine kinase inhibitors[J]. *Chemical Science*, 2023, 14(19): 5028-5037.
- [4] WILKE KE, FRANCIS S, CARLSON EE. Activity-based probe for histidine kinase signaling[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(22): 9150-9153.
- [5] RAJU TN. The Nobel chronicles. 1992: Edmond H Fischer (b 1920) and Edwin G Krebs (b 1918)[J]. *Lancet*, 2000, 355(9219): 2004.
- [6] BOYER PD, DELUCA M, EBNER KE, HULTQUIST DE, PETER JB. Identification of phosphohistidine in digests from a probable intermediate of oxidative phosphorylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237: PC3306-PC3308.
- [7] BUENO R, PAHEL G, MAGASANIK B. Role of glnB and glnD gene products in regulation of the glnALG operon of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164(2): 816-822.
- [8] NIXON BT, RONSON CW, AUSUBEL FM. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(20): 7850-7854.
- [9] IGO MM, SILHAVY TJ. EnvZ, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K-12, is phosphorylated *in vitro*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(12): 5971-5973.
- [10] FORST S, DELGADO J, INOUE M. Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the ompF and ompC genes in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(16): 6052-6056.
- [11] RUDOLPH J, OESTERHELT D. Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarium*[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(4): 667-673.
- [12] TANAKA T, SAHA SK, TOMOMORI C, ISHIMA R, LIU DJ, TONG KI, PARK H, DUTTA R, QIN L, SWINDELLS MB, YAMAZAKI T, ONO AM, KAINOSHO M, INOUE M, IKURA M. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ[J]. *Nature*, 1998, 396: 88-92.
- [13] BILWES AM, ALEX LA, CRANE BR, SIMON MI. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase[J]. *Cell*, 1999, 96(1): 131-141.
- [14] MONTAGNE M, MARTEL A, LE MOUAL H. Characterization of the catalytic activities of the PhoQ histidine protein kinase of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1787-1791.
- [15] LAUB MT, GOULIAN M. Specificity in two-component signal transduction pathways[J]. *Annual Review of Genetics*, 2007, 41: 121-145.
- [16] ISHII E, EGUCHI Y. Diversity in sensing and signaling of bacterial sensor histidine kinases[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1524.
- [17] PETERS T, ZHANG X, NESPER J, TREUNER-LANGE A, GOMEZ-SANTOS N, HOPPERT M, JENAL U, SØGAARD-ANDERSEN L. The orphan histidine protein kinase SgmT is a c-di-GMP receptor and regulates composition of the extracellular matrix together with the orphan DNA binding response regulator DigR in *Myxococcus xanthus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(1): 147-165.
- [18] ZHENG GS, LIU PP, HE WY, TAO HN, YANG Z, SUN CW, WANG WF, LU YH, JIANG WH. Identification of the cognate response regulator of the orphan histidine kinase OhkA involved in both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(14): 5905-5914.
- [19] DU GQ, ZHU C, WU YD, KANG W, XU MM, YANG ST, XUE C. Effects of orphan histidine kinases on clostridial sporulation progression and metabolism[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(1): 226-235.
- [20] ITOU H, TANAKA I. The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2001, 129(3): 343-350.
- [21] PEREGO M. A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(1): 133-143.
- [22] CHEN JQ, ZHOU X, TANG YT, JIANG ZJ, KANG XM, WANG JF, YUE M. Characterization of two-component system CitB family in *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 278: 109659.
- [23] ZOU ZZ, QIN H, BRENNER AE, RAGHAVAN R, MILLAR JA, GU Q, XIE ZJ, KRETH J, MERRITT J. LytTR Regulatory systems: a potential new class of prokaryotic sensory system[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(10): e1007709.
- [24] HE HC, PENG SN, YUAN SQ, TANG JL, LIU ZD, RANG J, XIA ZY, HU JJ, CHEN JM, DING XZ, HU SB,

- SUN YJ, XIA LQ. Effects of *lytS-L* on the primary metabolism and butenyl-spinosyn biosynthesis in *Saccharopolyspora pogona*[J]. *Gene*, 2021, 766: 145130.
- [25] VILHENA C, KAGANOVITCH E, SHIN JY, GRÜNBERGER A, BEHR S, KRISTOFICOVA I, BRAMEYER S, KOHLHEYER D, JUNG K. A single-cell view of the BtsSR/YpdAB pyruvate sensing network in *Escherichia coli* and its biological relevance[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 200(1): e00536-17.
- [26] JIA FF, PANG XH, ZHU DQ, ZHU ZT, SUN SR, MENG XC. Role of the *luxS* gene in bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391: a proteomic analysis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13871.
- [27] NOHNO T, NOJI S, TANIGUCHI S, SAITO T. The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(8): 2947-2957.
- [28] KAN J, PENG T, HUANG TW, XIONG GM, HU Z. NarL, a novel repressor for CYP108j1 expression during PAHs degradation in *Rhodococcus* sp. P14[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 983.
- [29] LIU TT, XU Y, LIU H, LUO S, YIN YJ, LIU SJ, ZHOU NY. Functional characterization of a gene cluster involved in gentisate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(2): 671-678.
- [30] CHENG AT, ZAMORANO-SÁNCHEZ D, TESCHLER JK, WU D, YILDIZ FH. NtrC adds a new node to the complex regulatory network of biofilm formation and *vps* expression in *Vibrio cholerae*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(15): e00025-18.
- [31] SINGH J, ANAND R, HOROVITZ A. Cooperativity in ATP hydrolysis by MopR is modulated by its signal reception domain and by its protein and phenol concentrations[J]. *Journal of Bacteriology*, 2022, 204(8): e0017922.
- [32] LIU XL, LIU YN, JOHNSON KS, DONG XY, XIE ZH. Protein residues and a novel motif involved in the cellular localization of CheZ in *Azorhizobium caulinodans* ORS571[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 585140.
- [33] HUANG Z, WANG YH, ZHU HZ, ANDRIANOVA EP, JIANG CY, LI DF, MA LY, FENG J, LIU ZP, XIANG H, ZHULIN IB, LIU SJ. Cross talk between chemosensory pathways that modulate chemotaxis and biofilm formation[J]. *mBio*, 2019, 10(1): e02876-18.
- [34] KIRBY JR. Chemotaxis-like regulatory systems: unique roles in diverse bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 45-59.
- [35] SHI T, LU YX, LIU XY, CHEN YY, JIANG HL, ZHANG J. Mechanism for the autophosphorylation of CheA histidine kinase: QM/MM calculations[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115(41): 11895-11901.
- [36] PURCELL EB, BOUTTE CC, CROSSON S. Two-component signaling systems and cell cycle control in *Caulobacter crescentus*[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 631: 122-130.
- [37] LIU M, ZHU XY, ZHANG C, ZHAO Z. LuxQ-LuxU-LuxO pathway regulates biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbiological Research*, 2021, 250: 126791.
- [38] ZHANG C, LIU M, WU Y, LI XX, ZHANG C, CALL DR, LIU M, ZHAO Z. ArcB orchestrates the quorum-sensing system to regulate type III secretion system 1 in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2): 2281016.
- [39] FREEMAN JA, LILLEY BN, BASSLER BL. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(1): 139-149.
- [40] ZHANG L, TENG KL, WANG J, ZHANG Z, ZHANG J, SUN ST, LI LL, YANG XP, ZHONG J. CerR, a single-domain regulatory protein of the LuxR family, promotes cerecidin production and immunity in *Bacillus cereus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(5): e02245-17.
- [41] ZHANG SY, KAN JH, LIU X, WU Y, ZHANG MY, OU JQ, WANG J, AN L, LI DF, WANG L, WANG XJ, FANG RX, JIA YT. Phytopathogenic bacteria utilize host glucose as a signal to stimulate virulence through LuxR homologues[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2023, 24(4): 359-373.
- [42] WEST AH, STOCK AM. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(6): 369-376.
- [43] CASINO P, MIGUEL-ROMERO L, MARINA A. Visualizing autophosphorylation in histidine kinases[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3258.
- [44] ATTWOOD PV. Histidine kinases from bacteria to humans[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2013, 41(4): 1023-1028.
- [45] 于静晨, 张文婷, 姚玉峰. 细菌蛋白质磷酸化修饰研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(2): 357-367.
- YU JC, ZHANG WT, YAO YF. Research progress in bacterial protein phosphorylation[J]. *Acta Microbiologica*

- Sinica, 2021, 61(2): 357-367 (in Chinese).
- [46] ABRIATA LA, ALBANESI D, PERARO MD, de MENDOZA D. Signal sensing and transduction by histidine kinases as unveiled through studies on a temperature sensor[J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50(6): 1359-1366.
- [47] 周元. 细菌双组分信号转导系统中组氨酸激酶 HK853 的功能及其抑制剂机制研究[D]. 武汉: 中国科学院大学博士学位论文, 2019.
- ZHOU Y. Function and inhibitor mechanism study of histidine kinase HK853 in two-component signal transduction system[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese).
- [48] PARK H, SAHA SK, INOUE M. Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(12): 6728-6732.
- [49] 孟娇, 陈晶瑜. Rcs 双组分调节系统对细菌环境应答的分子调控研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 210-222.
- MENG J, CHEN JY. Role of Rcs two-component regulatory system in environmental responses of bacteria: a review[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 210-222 (in Chinese).
- [50] INDA ME, VANDENBRANDEN M, FERNÁNDEZ A, de MENDOZA D, RUYSSCHAERT JM, CYBULSKI LE. A lipid-mediated conformational switch modulates the thermosensing activity of DesK[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(9): 3579-3584.
- [51] BORTOLOTTI A, VAZQUEZ DB, ALMADA JC, INDA ME, DRUSIN SI, VILLALBA JM, MORENO DM, RUYSSCHAERT JM, CYBULSKI LE. A transmembrane histidine kinase functions as a pH sensor[J]. Biomolecules, 2020, 10(8): 1183.
- [52] DE GAETANO GV, LENTINI G, FAMÀ A, COPPOLINO F, BENINATI C. Antimicrobial resistance: two-component regulatory systems and multidrug efflux pumps[J]. Antibiotics, 2023, 12(6): 965.
- [53] CHEN DJ, ZHAO YN, QIU YQ, XIAO LY, HE HQ, ZHENG DM, LI XQ, YU XL, XU NL, HU XL, CHEN FL, LI HR, CHEN YS. CusS-CusR two-component system mediates tigecycline resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3159.
- [54] BORSA BA, DEMIRCI M, GUNGORDU-DALAR Z, KARABIYIK G, AYGUN G, KUCUKBASMALI O. Molecular mechanisms of colistin resistance among *Klebsiella pneumoniae* strains[J]. Clinical Laboratory, 2019, 65(7). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.180705.
- [55] TIERNEY AR, RATHER PN. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance[J]. Future Microbiology, 2019, 14(6): 533-552.
- [56] LI LF, MA JY, CHENG P, LI MC, YU ZY, SONG XR, YU ZD, SUN HQ, ZHANG WC, WANG ZB. Roles of two-component regulatory systems in *Klebsiella pneumoniae*: regulation of virulence, antibiotic resistance, and stress responses[J]. Microbiological Research, 2023, 272: 127374.
- [57] SONG HH, LI YY, WANG Y. Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors[J]. Engineering Microbiology, 2023, 3(1): 100051.
- [58] LI X, LV X, LIN YP, ZHEN JF, RUAN C, DUAN W, LI Y, XIE JP. Role of two-component regulatory systems in intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(8): 12197-12207.
- [59] KIM JS, BORN A, TILL JKA, LIU L, KANT S, HENEN MA, VÖGELI B, VÁZQUEZ-TORRES A. Promiscuity of response regulators for thioredoxin steers bacterial virulence[J]. Nature Communications, 2022, 13: 6210.
- [60] SHEN LF, ZHANG JX, XUE J, DU L, YUAN LY, NIE H, DAI SE, YU Q, LI YL. Regulation of ECP fimbriae-related genes by the transcriptional regulator RcsAB in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044[J]. Journal of Basic Microbiology, 2022, 62(5): 593-603.
- [61] KUO CH, LIN WF, LIU CJ, WANG ZC, LIU TY, PENG HL. Role of the stress-responsive two-component system CpxAR in regulating fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* CG43[J]. Journal of Microbiology, Immunology, and Infection, 2023, 56(3): 464-476.
- [62] DeMARS ZR, KRUTE CN, RIDDER MJ, GILCHRIST AK, MENJIVAR C, BOSE JL. Fatty acids can inhibit *Staphylococcus aureus* SaeS activity at the membrane independent of alterations in respiration[J]. Molecular Microbiology, 2021, 116(5): 1378-1391.
- [63] PENDLETON A, YEO WS, ALQAHTANI S, DiMAGGIO DA Jr, STONE CJ, LI ZT, SINGH VK, MONTGOMERY CP, BAE T, BRINSMAD SR. Regulation of the sae two-component system by branched-chain fatty acids in *Staphylococcus aureus*[J]. mBio, 2022, 13(5): e0147222.
- [64] CAI Z, YUAN ZH, ZHANG H, PAN Y, WU Y, TIAN XQ, WANG FF, WANG L, QIAN W. Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(4): e1006304.

- [65] WANG FF, QIAN W. The roles of histidine kinases in sensing host plant and cell-cell communication signal in a phytopathogenic bacterium[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2019, 374(1767): 20180311.
- [66] LIU CJ, LIN CT, CHIANG JD, LIN CY, TAY YX, FAN LC, PENG KN, LIN CH, PENG HL. RcsB regulation of the YfdX-mediated acid stress response in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3[J]. PLoS One, 2019, 14(2): e0212909.
- [67] JOHNSON MD, BELL J, CLARKE K, CHANDLER R, PATHAK P, XIA YD, MARSHALL RL, WEINSTOCK GM, LOMAN NJ, WINN PJ, LUND PA. Characterization of mutations in the PAS domain of the EvgS sensor kinase selected by laboratory evolution for acid resistance in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2014, 93(5): 911-927.
- [68] INADA S, OKAJIMA T, UTSUMI R, EGUCHI Y. Acid-sensing histidine kinase with a redox switch[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 652546.
- [69] SEN H, AGGARWAL N, ISHIONWU C, HUSSAIN N, PARMAR C, JAMSHAD M, BAVRO VN, LUND PA. Structural and functional analysis of the *Escherichia coli* acid-sensing histidine kinase EvgS[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199(18): e00310-17.
- [70] van RIET S, TADESSE W, MORTIER J, SCHLEGEL S, SIMOENS K, BERNAERTS K, CO AD, AERTSEN A. Heterogeneity and evolutionary tunability of *Escherichia coli* resistance against extreme acid stress[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(6): e0375722.
- [71] 韩吉娜, 罗欣, 朱立贤, 张一敏, 董鹏程. 大肠埃希氏菌的诱导耐酸响应及其交叉保护作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 214-221.
- HAN JN, LUO X, ZHU LX, ZHANG YM, DONG PC. Research progress on the mechanisms of the acid tolerance response and cross-protection in *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2023, 44(11): 214-221 (in Chinese).
- [72] LIU BW, ZHUANG ST, TIAN RZ, LIU Y, WANG YQ, LEI XG, WANG C. Chemoproteomic profiling reveals the mechanism of bile acid tolerance in bacteria[J]. ACS Chemical Biology, 2022, 17(9): 2461-2470.
- [73] AI L, MEI FW, PENG R. An overview of the role of membrane proteins in microbial solvents tolerance[J]. Protein and Peptide Letters, 2023, 30(2): 137-145.
- [74] YUAN Y, ZHANG F, AI L, HUANG YZ, PENG R. Insight into the role of a novel c-di-GMP effector protein in *Rhodococcus ruber*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 608: 177-182.
- [75] 匡素芳, 彭仁. 赤红球菌二鸟苷酸环化酶基因的克隆、信息学分析和转录变化研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(3): 1128-1136.
- KUANG SF, PENG R. Cloning, bioinformatics analysis and transcription variation of diguanylate cyclase gene from *Rhodococcus ruber* SD3[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(3): 1128-1136 (in Chinese).
- [76] 樊欣, 彭仁. 赤红球菌 SD3 全基因组测序及其热休克蛋白 DnaK 的表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(4): 1613-1620.
- FAN X, PENG R. Whole-genome sequencing and expression analysis of heat shocking protein DNA K from *Rhodococcus ruber* SD3[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(4): 1613-1620 (in Chinese).
- [77] 吴钟昊, 彭仁. 赤红球菌位点-2 蛋白酶类似蛋白底物的筛选及其基因克隆和表达变化分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(11): 5115-5130.
- WU ZH, PENG R. Screening of the substrate of S2P like protein from *Rhodococcus ruber* and its gene cloning and expression variation analysis[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(11): 5115-5130 (in Chinese).
- [78] DU GQ, ZHU C, XU MM, WANG L, YANG ST, XUE C. Energy-efficient butanol production by *Clostridium acetobutylicum* with histidine kinase knockouts to improve strain tolerance and process robustness[J]. Green Chemistry, 2021, 23(5): 2155-2168.
- [79] ATTWOOD MM, FABRO D, SOKOLOV AV, KNAPP S, SCHIÖTH HB. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2021, 20: 839-861.
- [80] 李竺婷, 师舷, 范若辰, 王路路, 卜婷婷, 郑维, 张旭强, 权春善. 具核梭杆菌 CarRS 双组分系统组氨酸激酶 CarS 的表达、纯化及生化活性测定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1596-1608.
- LI ZT, SHI X, FAN RC, WANG LL, BU TT, ZHENG W, ZHANG XQ, QUAN CS. Expression, purification, and characterization of the histidine kinase CarS from *Fusobacterium nucleatum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1596-1608 (in Chinese).
- [81] KINOSHITA-KIKUTA E, MARUTA S, EGUCHI Y, IGARASHI M, OKAJIMA T, UTSUMI R, KINOSHITA E, KOIKE T. An immuno-dot blot assay for screening histidine kinase inhibitors[J]. Analytical Biochemistry, 2020, 600: 113765.
- [82] HUANG XH, ZHANG YY, GE HT, LU DD, WANG YC. Plant phosphopeptides enrichment by immobilized metal ion affinity chromatography[J]. Methods in Molecular Biology, 2021, 2358: 145-157.
- [83] LEMBKE HK, CARLSON EE. Activity-based ATP analog probes for bacterial histidine kinases[J]. Methods in Enzymology, 2022, 664: 59-84.