



蛋白质过硫化修饰研究进展

张博^{1,2}, 潘佳园^{1,2}, 柳志强^{1,2*}, 郑裕国^{1,2}

1 浙江工业大学 手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学生物工程学院 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310014

张博, 潘佳园, 柳志强, 郑裕国. 蛋白质过硫化修饰研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1348-1363.

ZHANG Bo, PAN Jiayuan, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Research progress in protein persulfidation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1348-1363.

摘要: 过硫化修饰在保护蛋白质的正常功能和信号传递过程中起着重要作用, 对维持细胞的正常生理代谢平衡、保护细胞抵抗氧化应激及硫稳态调控等方面具有重要影响。本文综述了硫化氢、活性硫及半胱氨酸代谢的内在关联以及硫稳态调控, 阐述了蛋白质过硫化修饰的机制及在微生物硫稳态调节中的作用, 对未来的研究方向和趋势提供了新的思路。

关键词: 过硫化修饰; 硫化氢; 活性硫; 蛋白质

Research progress in protein persulfidation

ZHANG Bo^{1,2}, PAN Jiayuan^{1,2}, LIU Zhiqiang^{1,2*}, ZHENG Yugu^{1,2}

1 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Persulfidation plays a role in protein functioning and signaling, maintaining the physiological and metabolic balance of cells, protecting cells from oxidative stress, and regulating sulfur homeostasis. This article summarized the internal relationship of hydrogen sulfide, reactive sulfur species, and cysteine metabolism, expounded the mechanism of sulfur homeostasis

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400); 国家自然科学基金(32070099, 31971342)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400) and the National Natural Science Foundation of China (32070099, 31971342).

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

Received: 2023-10-16; Accepted: 2024-02-07; Published online: 2024-02-26

regulation, and introduced the role of persulfidation in microbial sulfur homeostasis, providing new thoughts for the future research.

Keywords: persulfidation; hydrogen sulfide; reactive sulfur species; protein

随着对生物体内硫代谢越来越多的深入研究, 多种与含硫化合物相关的代谢调控与功能机制已被发现。过硫化修饰是近年来发现的一种重要蛋白质翻译后修饰, 具有参与维持细胞正常生理活动和调节代谢稳态的作用。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)和活性硫(reactive sulfur species, RSS)被认为能够直接参与细胞的信号调控, 两者在功能发挥上具有紧密联系。在生物体内, RSS 与 H₂S 具有多种生成转化途径, 包括三巯基丙酮酸转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3-MST)、胱硫醚 β-合成酶(cystathionine β-synthase, CBS)、胱硫醚 γ-裂解酶(cystathionine γ-lyase, CSE)、半胱氨酸脱硫酶(L-cysteine desulfhydrases, CDs)介导的 H₂S 生成途径, 以及硫氧化系统、醌氧还原酶等介导的 RSS 生成途径, 其在不同的细胞间也存在一定的差异。通过调节细胞内 H₂S/RSS 平衡, 过硫化修饰在微生物硫稳态调控中发挥重要作用。

1 过硫化修饰简介

蛋白质翻译后修饰(protein translational modifications, PTMs)是指在蛋白质合成过程中或合成后酶介导的功能基团共价添加来增加蛋白质组的功能多样性^[1]。目前磷酸化、乙酰化、甲基化等 PTMs 已被广泛报道, 近年来, 一种新的 PTMs——过硫化修饰被发现能够广泛影响蛋白质的功能。过硫化修饰是一种可逆的氧化还原依赖性蛋白质修饰, 通常蛋白质的半胱氨酸残基作为氧化还原最敏感的氨基酸残基, 其活性受到 pKa 的影响, 其氧化还原状态通常会改变蛋白质的结构和功能^[2]。理论上, H₂S 中的硫原子

与蛋白质半胱氨酸残基的-SH 基团处于相同的还原状态, 因此 H₂S 不能直接与蛋白质半胱氨酸残基的-SH 基团反应生成过硫化物^[3], 然而 H₂S 可以与蛋白质中半胱氨酸残基的一些氧化形式, 如磺酸、亚硝基硫醇反应生成过硫化物^[4-5]。

过硫化修饰是一种重要的 PTMs, 具有参与维持细胞正常生理活动和代谢调控稳态的作用, 在保护蛋白质的正常功能、信号的传递以及维持细胞正常的生理代谢中扮演着重要的角色, 蛋白质过硫化修饰机制如图 1 所示^[6]: (1) 蛋白质的半胱氨酸残基不能直接与 H₂S 发生过硫化修饰反应^[5]; (2) 在生理条件下, 低 pKa 蛋白质半胱氨酸残基位点通常以硫酸盐阴离子(SO₄²⁻)的形式存在, 对氧化还原高度敏感^[7-8], 它们的氧化形式, 例如磺酸(-SOH)和亚硝基硫醇(-SNO), 易与 H₂S 反应生成过硫化物(-SSH)^[9]; (3) H₂S 可以与半胱氨酸二硫化物(-S-S-)反应形成过硫化物(-SSH); (4) -SH 能够与有机过硫化物(RSSH)反应生成-SSH; (5) 经过过硫化修饰的半胱氨酸残基可以通过硫氧还原蛋白(thioredoxin, Trx)进行蛋白质脱硫反应^[10]。越来越多的证据表明, 蛋白质的过硫化修饰能够使关键半胱氨酸残基在氧化应激下抵抗不可逆氧化^[11]。近期研究发现, 在化学品生物合成过程中, 由代谢改造引起的细胞生理应激反应, 如代谢通量压力、中间代谢物或产物胁迫、氧胁迫等, 以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生可能均与过硫化修饰相关^[12-13]。这一点在 L-半胱氨酸的代谢改造中更为明显, 多个研究已经证实了, 含硫氨基酸代谢、过硫化修饰、细胞胁迫间紧密关联^[14-16]。

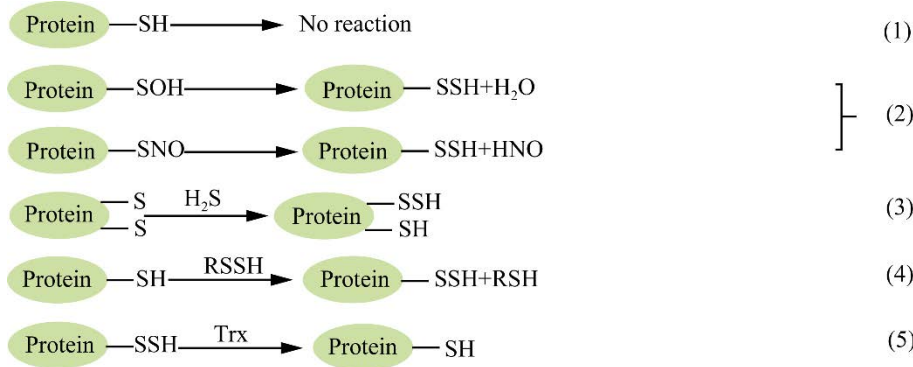


图 1 蛋白质过硫化修饰机理示意图^[6]

Figure 1 Schematic representation of the mechanism underlying protein persulfidation^[6]. (1) Protein thiols cannot react with H₂S directly; (2) H₂S can react with sulfenic acids and S-nitrosated for sulfhydration; (3) H₂S reacts with cysteine disulfides (-S-S) for sulfhydration formation; (4) -SH reacts with RSSH to generate -SSH; (5) Protein persulfidation could potentially be reduced by thioredoxin/thioredoxin reductase system (Trx/TrxR).

2 H₂S 及 RSS

H₂S 一直以来被认为是对环境及生命有毒的物质, 直至 20 世纪末, H₂S 作为一种神经调节剂的信号传导功能才首次被确认^[17]。H₂S 具有二元性, 其浓度超过一定阈值是有毒分子, 但低于这个阈值, 会行使不同的生理功能。H₂S 在细胞中广泛存在, 研究者发现 H₂S 在帮助细菌对抗抗生素^[18]、抗氧化、保护细胞对抗凋亡等方面发挥重要作用, 因此科学家把 H₂S 看作是继 CO、NO 之后的第三类信号分子^[19]。

H₂S 的作用机制主要和它的化学性质相关, 在生物体内, H₂S 参与的生化反应主要可以分为 3 类: (1) 与金属蛋白活性中心的金属离子结合形成配位复合物^[20]; (2) 与 ROS、活性氮(reactive nitrogen species, RNS)等发生反应^[3,21]; (3) 通过对蛋白质中氧化形式的半胱氨酸残基进行修饰, 形成相对应的过硫化物^[3](图 2A)。H₂S 是小分子物质且极具亲脂性^[23], 能够以扩散的方式通过细胞膜, 在细胞之间传递信号, 由于 H₂S 与蛋白质半胱氨酸残基的-SH 基团处于相同还原状态, 因此 H₂S 不能直接与蛋白质半胱氨酸残基

(-SH)反应生成过硫化物^[22], 所以在胞内还有一类特殊的含硫化合物——硫烷硫(reactive sulfane sulfur), 这种形式的硫氧化还原价态通常显示为 0 价或-1 价, 也被称为“零价硫”。硫烷硫中反应活性比较强的化合物被称为 RSS^[24](图 2B)。RSS 包括无机多硫化物(H₂S_n, n≥2)、有机多硫化物(RS_nR, RS_nH, n≥2)以及有机过硫化物(RSSH)(图 2B), 它们在生物体内广泛存在, RSS 不能自由通过细胞膜, 因此 H₂S 到达靶点后向 RSS 的转化过程在整个信号传递中发挥了重要的作用^[21]。

Kumar 等推测 H₂S 和 RSS 不是对立的个体, H₂S 在体内可以转化为 RSS, 二者通常共存, 在不同细胞组织间以 H₂S 的形式传递, 到达靶点后 H₂S 生成 RSS 完成对蛋白质的过硫化修饰^[26], 因此 H₂S 和 RSS 是以相互补充的形式共同传递信号^[27]。H₂S 和 RSS 在维持细胞的生理活动中具有密切的联系, 并且越来越多的研究认为 RSS 是 H₂S 发挥信号分子功能的关键^[10,28-30](图 3)。Mishanina 等也认为 H₂S 是细胞间信号传递的主要形式, 而 H₂S 参与的 RSS 生成是实现信号传

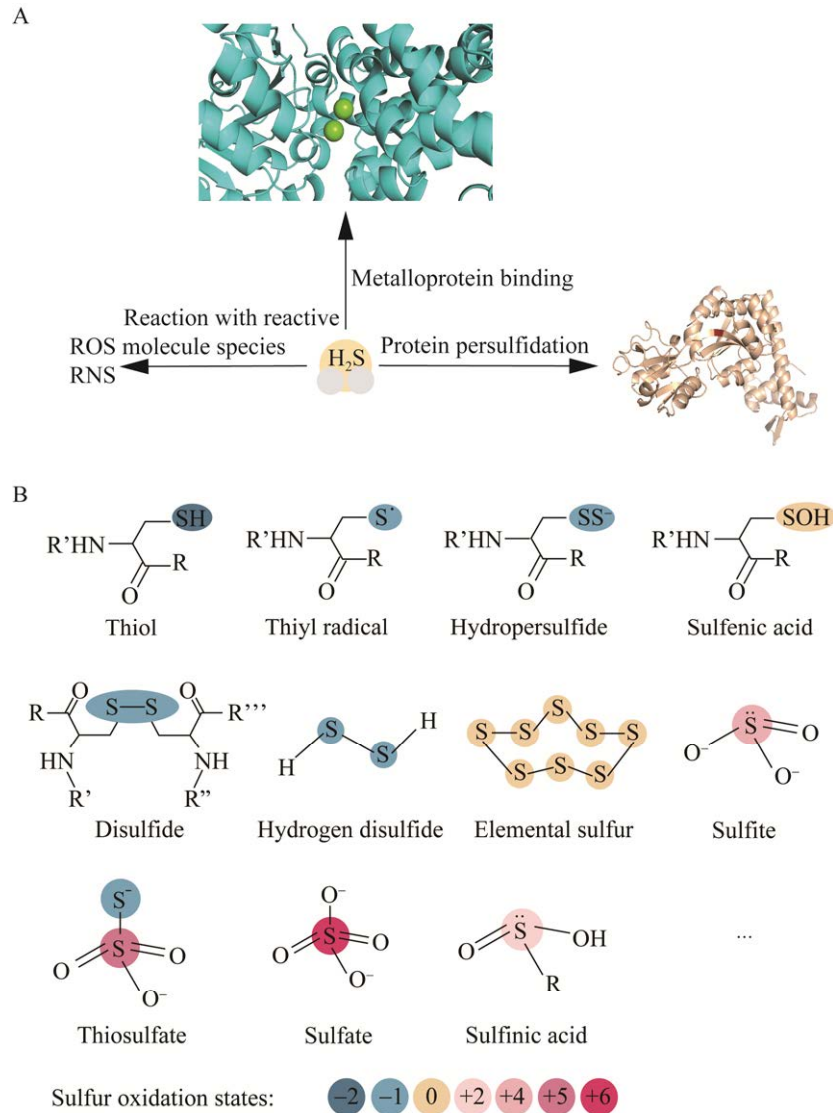


图 2 H_2S 的功能^[22]及 RSS 的部分化学结构^[25]

Figure 2 The function of H_2S and chemical structure of RSS. A: Schematic representation of the hydrogen sulfide (H_2S) action mechanism in biological processes^[22]. B: Structures of some biologically relevant RSS chemotypes^[25].

递的关键步骤^[25]。 H_2S 介导的过硫化修饰已经被认为是调节细胞应激反应从而增强细胞对多种环境应激的耐受性机制之一^[31-32]，在维持细胞内稳态以应对各种内外刺激方面发挥着重要作用。

2.1 内源 H_2S 的生成

内源 H_2S 的生物合成途径(图 4)包括 CBS 和

CSE 途径；3-MST 和半胱氨酸氨基转移酶 (cysteine aminotransferase, CAT)途径^[33-35]，以及大肠杆菌(*Escherichia coli*)中 CDs 途径。大多数细菌含有上述一个或者多个 H_2S 生成酶。例如，*E. coli* 含有具有 CDs 活性的 O-乙酰丝氨酸硫基酶 A (CysK)、O-乙酰丝氨酸硫基酶 B (CysM)、L-半胱氨酸脱硫基酶(TnaA)、3-MST 等都会催

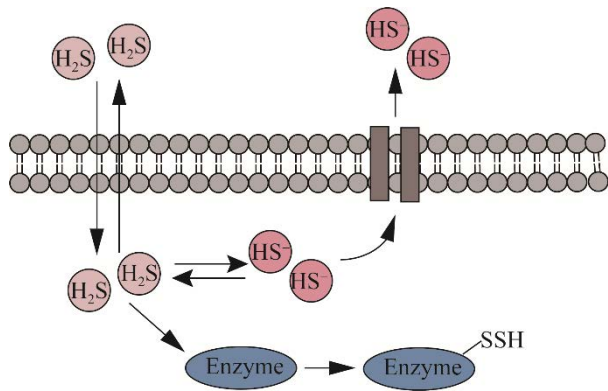


图 3 H₂S 与过硫化物(RSSH)作用实现信号传输功能

Figure 3 The interactions between H₂S and persulfide (RSSH) for achieving signal transmission function. The H₂S diffuses across the cell membrane, where it reacts with oxidized or nitrilized thiol groups to form persulfidation, and is subsequently exported from the cell as HS⁻.

化 L-半胱氨酸分解产生 H₂S、丙酮酸和氨^[36-38]。同时最新研究结果表明^[39], 3-MST 是蛋白过硫化酶, 其半胱氨酸残基可以被过硫化修饰, 且其直接参与硫代硫酸盐的转运; 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中含有 CBS 和 CSE, 敲除铜绿假单胞菌中编码这 2 种酶的基因后可以大大降低 H₂S 的生成量^[40]; 而在 *E. coli* 中敲除 *mstA* 编码的 3-MST 后, 其在 LB 培养基中产生 H₂S 的能力显著下降^[11], 同时 *E. coli* 在不同硫源培养基中生成 H₂S 的能力不同, Yang 等以硫酸盐和硫代硫酸盐作为不同硫源进行实验时发现, 改造后生产 L-半胱氨酸的 *E. coli* 可利用硫代硫酸盐产生 H₂S, 而以硫酸盐为唯一硫源时未检测到 H₂S 的生成^[13]。

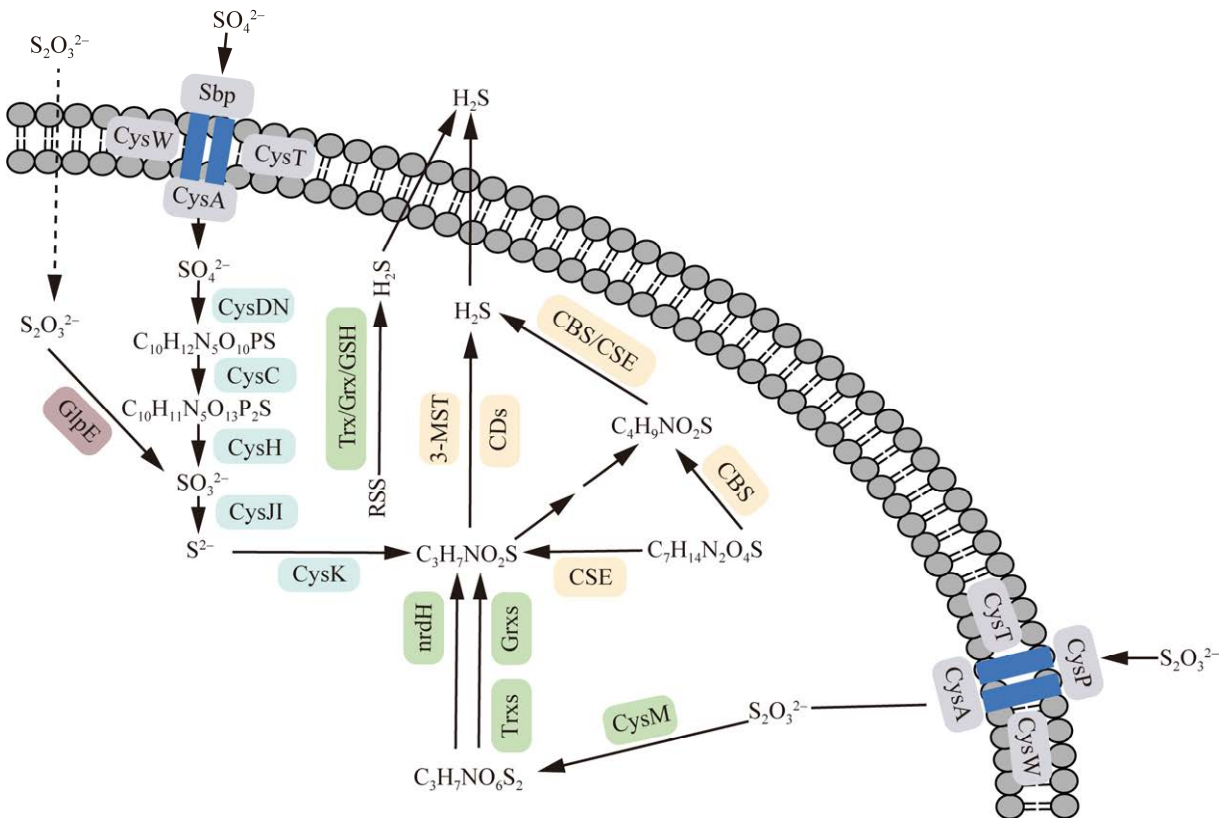


图 4 微生物中 H₂S 生成模型

Figure 4 H₂S production model in microorganisms. The processes encompass the transport of thiosulfate and sulfate, the synthesis, metabolism, and degradation of L-cysteine, as well as the degradation of RSS and the transportation of H₂S.

2.1.1 CBS 和 CSE

细胞中内源 H_2S 的产生主要由 L-半胱氨酸和 L-同型半胱氨酸的降解产生, 而 CSE 和 CBS 是其中的 2 个关键酶^[41-42]。CBS 在细菌中位于甲硫氨酸循环和转硫途径, 使硫参与 L-半胱氨酸的合成和分解代谢, 进而影响 H_2S 的生物合成, CBS 催化 L-半胱氨酸与 L-同型半胱氨酸生成胱硫醚和 H_2S , CBS 还可以催化 2 个 L-半胱氨酸或 2 个 L-同型半胱氨酸分子之间的交替反应形成 H_2S ^[43]。CSE 通过催化 L-半胱氨酸的 β -消除或 L-同型半胱氨酸的 γ -消除生成 H_2S ^[44]。由于在生理条件下 L-半胱氨酸的浓度高于 L-同型半胱氨酸的浓度, 因此 L-半胱氨酸的 β -消除产生 H_2S 是 CSE 产生 H_2S 的主要机制^[45]。

2.1.2 3-MST 和 CAT

3-MST 催化 L-半胱氨酸降解是 *E. coli* 产生 H_2S 的主要来源, 而 3-MST 的缺失限制了 L-半胱氨酸向 H_2S 的转化, 使细胞内 L-半胱氨酸积累^[46]。在线粒体中 3-MST 和 CAT 能够协同作用将 L-半胱氨酸分解产生 H_2S , CAT 将氨基从 L-半胱氨酸转移到 α -酮戊二酸中, 产生 3-巯基丙酮酸(3-mercaptopyruvate, 3-MP), 3-MP 是 3-MST 的底物, 3-MST 在磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)的存在下, 接收来自 3-MP 上的硫原子生成 3-MST-过硫化物, 3-MST-过硫化物在含二硫醇的还原剂如 Trx 或二氢硫辛酸的存在下, 将 3-MP 转化为丙酮酸和 H_2S ^[47]。同时通过使用醋酸铅试纸以及基于扭转分子内电荷转移(twisted intramolecular charge transfer, TICT)构建的荧光探针都发现 3-MST 缺陷细胞产生的 H_2S 量更少^[46,48-49]。

2.1.3 其他途径

H_2S 除了内源合成, 还可由 RSS 还原生成。硫还原菌(sulfur-reducing bacteria, SRB)是一类普遍存在于矿区、水稻和土壤等生态系统中的厌

氧菌^[50]。SRB 的呼吸作用利用无机物(如亚硫酸盐、硫酸盐等)作为电子受体, 氢和有机物(如乙酸酯、二氧化碳等)作为电子供体, 最终将硫酸盐还原为 H_2S ^[51]; 而对于多数 SRB 来说更倾向于利用硫代硫酸盐作为电子受体^[52], 因为菌体内硫代硫酸盐还原酶(thiosulfate reductase, Tsr)的存在, 可以跨越硫代硫酸盐还原的第一步能量消耗反应, 而直接将硫代硫酸盐还原生成亚硫酸盐进而再产生 H_2S ^[53]。

2.2 RSS 的生成

RSS 在细胞信号传导、氧化还原的稳态调节和代谢调节中发挥着重要作用^[19,54] (图 5A), 目前也已经发现了多个 RSS 的内源生成途径(图 5B)。细胞中 RSS 主要来源于 CSE 和 CBS 催化 L-胱氨酸产生半胱氨酸过硫化物(Cys-SSH)、硫醌氧化还原酶(sulfide:quinone oxidoreductase, SQR)以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)氧化 H_2S 等途径。

2.2.1 3-MST

3-MST 能够以 Trx 作为硫受体产生多硫化物和 H_2S , 第一步是硫代硫酸盐或三巯基丙酮酸上的多个硫原子转移到 *E. coli* 3-MST 的第 247 位半胱氨酸上, 第二步硫原子转移到还原型的 Trx 的 32 位半胱氨酸上; 第三步是 Trx 上的 32 位半胱氨酸与 35 位半胱氨酸被氧化形成二硫键, 接着多硫化物被释放出来。被氧化的 Trx 再被 Trx 还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)和 NADPH 还原重新利用, 此过程消耗了 NADPH^[27]。此外, 动物细胞中 3-MST 也可催化其底物 3-MP, 产生中间产物 3-MST-S_nSH, 该中间产物能够被降解为 H_2S_n , H_2S_n 再将硫原子转移到其他硫醇(Cys、GSH 等)上从而形成过硫化物(Cys-SSH 等)或该中间产物直接将硫原子转移到其他硫醇或 H_2S 上^[55-56]。

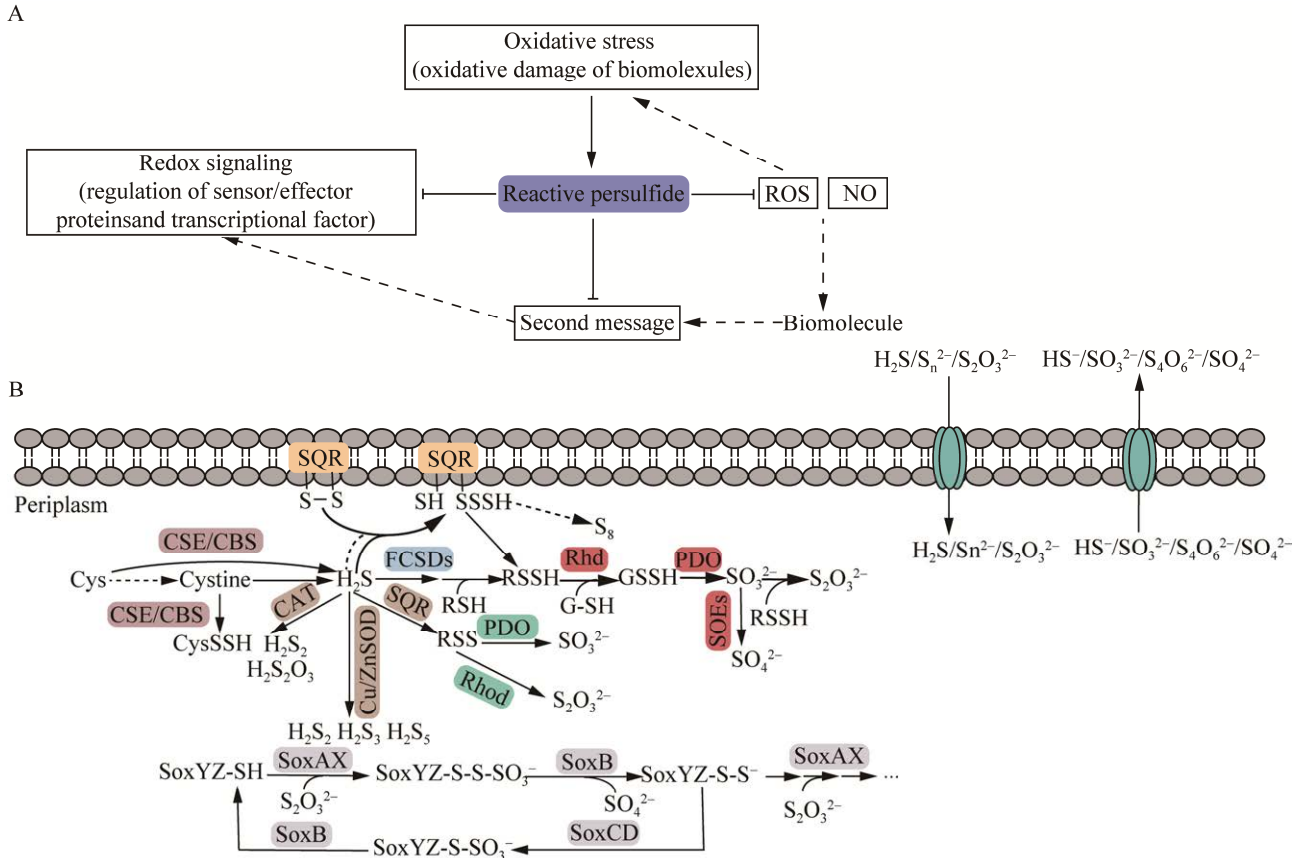


图 5 RSS 的生理作用^[23]及其生成途径示意图^[55]

Figure 5 Physiological functions of RSS in microorganisms and a schematic diagram illustrating the pathway for RSS generation. A: Biological reactivity of RSS. Regulation of oxidative stress and redox signaling by reactive persulfide species. Excess production of ROS and NO causes oxidative stress. In contrast, ROS and NO also function as redox signals *via* formation of electrophilic second messengers such as 8-nitro-cGMP^[23]. B: Pathways for bacterial sulfur transformation in the periplasm. Oxidation of S²⁻ and S⁰: Flavocyt *c* sulfide dehydrogenases (FCSDs) can oxidize H₂S to the final product polysulfide. In dissimilatory sulfur-oxidizing bacteria, Rhds and PDOs are located in the periplasm, and the oxidation of H₂S is catalyzed by SQRs, which consistently expose the reaction to the periplasm space. Oxidation of S⁰ and S²⁺: Unconjugated SoxYZ is catalyzed by SoxAX with S₂O₃²⁻, generating SoxYZ-S-S-SO₃⁻, which is subsequently converted to SoxYZ-S-S⁻, releasing one molecular of SO₄²⁻ under the catalysis of SoxB^[55].

2.2.2 CBS 和 CSE

在哺乳动物组织中, CBS 和 CSE 作为转硫途径的关键酶, 可以以胱氨酸作为底物通过 β-消除反应产生半胱氨酸过硫化物(Cys-SSH)、丙酮酸和氨, 以半胱氨酸作为底物产生 H₂S。通过 Cys-SSH 与谷胱甘肽(glutathione, GSH)或蛋白质半胱氨酸硫醇的进一步交换反应, 可以形成各自

的过硫化物(GSSH 和蛋白质过硫化物), 但是由于胞内的还原性环境, 胱氨酸浓度远低于半胱氨酸, 因此在生理条件下相比于 H₂S 的产生, CBS 和 CSE 催化的 Cys-SSH 生成量较低, 其中 CSE 催化生成 Cys-SSH 的活性是 CBS 的 20 倍, 同时 CSE 还能催化同型胱氨酸产生同型半胱氨酸过硫化物^[45]。

2.2.3 SQR

SQR 属于谷胱甘肽还原酶家族, 广泛分布于自养和异养细菌中。SQR 是一种膜蛋白, 依赖其表面的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)催化 H_2S 中的硫生成零价硫(S^0), 其过程为 H_2S 中的硫将脱下的电子转移给细胞膜上的辅酶 Q 或甲基萘醌, 再通过呼吸链传递给氧, 最后生成 S^0 。 S^0 在有合适受体(如 GSH)和下游酶(如 PDO)时, 会形成 GSSH 进而被 PDO 氧化为亚硫酸盐; 在无合适受体时则结合在 SQR 的保守性半胱氨酸残基上, 形成 SQR-S-S 中间体, 并随着 H_2S 的多轮氧化而逐渐加长, 直到形成 S_8 环, 从 SQR 上脱落下来, 从而胞内积累单质硫^[58](图 5B)。

2.2.4 硫氧化系统

无机硫、硫化物等能够通过黄素细胞色素 *c*- 硫化物脱氢酶(flavocyt *c* sulfide dehydrogenases, FCSDs)、胞质铜/锌超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)以及硫磺氧化系统(sulfur oxidizing system, SOX)氧化成 RSS(图 5B)。FCSDs 是硫氧化细菌中呼吸链的中心酶之一^[59-61], 由一个大的硫化物结合蛋白(FccB)和一个小的细胞色素 *c* (FccA)组成, 能够将细菌中的硫化物氧化为 RSS^[62-63], 其主要存在于光合硫氧化细菌和化能无机硫氧化细菌中, 分布不如 SQR 广泛^[64]。在泛养副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)及其他细菌中, *fccA* 和 *fccB* 的同源基因常被称为 *soxE* 和 *soxF*, 通常 *fccA* 和 *fccB* 会与其他参与硫代硫酸盐氧化的 *sox* 基因聚集在一起, 然而在绿硫细菌(green sulfur bacteria, GSB)中这种聚集现象并不发生^[65]。钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*) H16 在没有 SQR 的情况下通过 FCSDs 氧化硫化物, FCSDs 与 PDO 结合类似于 SQR-PDO 途径, 将硫化物氧化为亚硫酸盐和硫代硫酸盐^[60]。SOD 能够催化 H_2S 氧化产生

硫烷, 还能够代谢硫化物以及催化超氧化物歧化为氧和过氧化氢。SOD 的 H_2S 代谢可能是使硫化物解毒或调节 RSS 的古老机制。SOX 系统是一套完整的硫氧化系统, 主要由周质空间中的 SoxYZ 、 SoxAX 、 SoxB 和 $\text{Sox}(\text{CD})_2$ 构成, 能够通过氧化硫代硫酸盐、硫化物等含硫无机化合物, 产生硫酸盐, 同时根据文献^[66]报道, H_2S 进入 SOX 系统是在氧化态 SoxXA 的辅助下进行的, H_2S 先与 SoxYZ 的 SoxY 上的半胱氨酸残基结合, 形成 SoxZY-S-S^- , 之后进入正常的代谢, 由 SoxCD 脱氢氧化硫烷形成 SoxZY-S-SO_3^- , 再由 SoxB 水解形成 SO_4^{2-} 。然而, 在贪铜菌(*Cupriavidus pinatubonensis*) JMP134 中包含一个完整的 *sox* 系统, 敲除 *soxCD* 后, PDO 和 H_2S 释放在减轻 RSS 毒性方面起着关键作用^[67]。

3 硫稳态调控机制

RSS 是一种潜在的重要信号和效应分子, 通过维持胞内氧化压力^[68]及影响蛋白活性^[69]进而来维持细胞生理平衡, 但是高浓度的 RSS 在生物体内具有毒害作用^[70]。因此, 细胞内的 RSS 浓度受到严谨调控并保持在一定范围内^[71](图 6)。RSS 传感器在细菌中广泛存在, 其能够调节内源 H_2S 及 RSS 的产生从而达到 $\text{H}_2\text{S}/\text{RSS}$ 平衡。例如, 来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[73]和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中的 CstR^[74]、来自红菱膜红杆菌(*Rhodobacter capsulatus*)的 SqrR^[75]、来自鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的 BigR^[76]、来自 *C. pinatubonensis* 的 FisR^[77-79]以及来自 *E. coli* 的 OxyR^[28,80-81]等。

3.1 OxyR

OxyR 是一个全局转录调控因子, 它可以感应氧化压力的变化, 同时也可以响应 RSS。

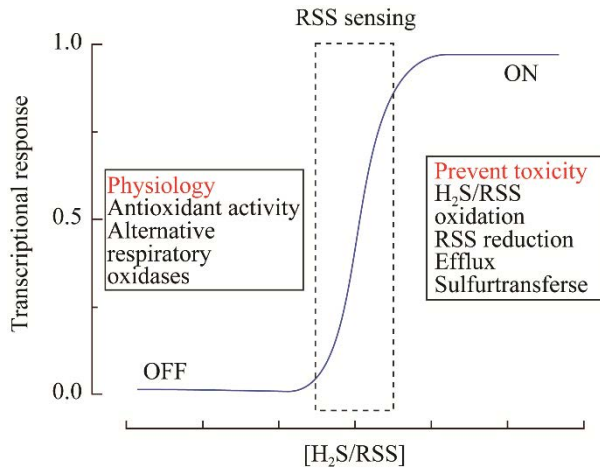


图 6 微生物中硫稳态调节系统^[72]

Figure 6 H_2S/RSS homeostasis is achieved by a single RSS sensor that transcriptionally regulates the expression of enzymes involved in the biogenesis, clearance, transport, and assimilation of H_2S/RSS ^[71].

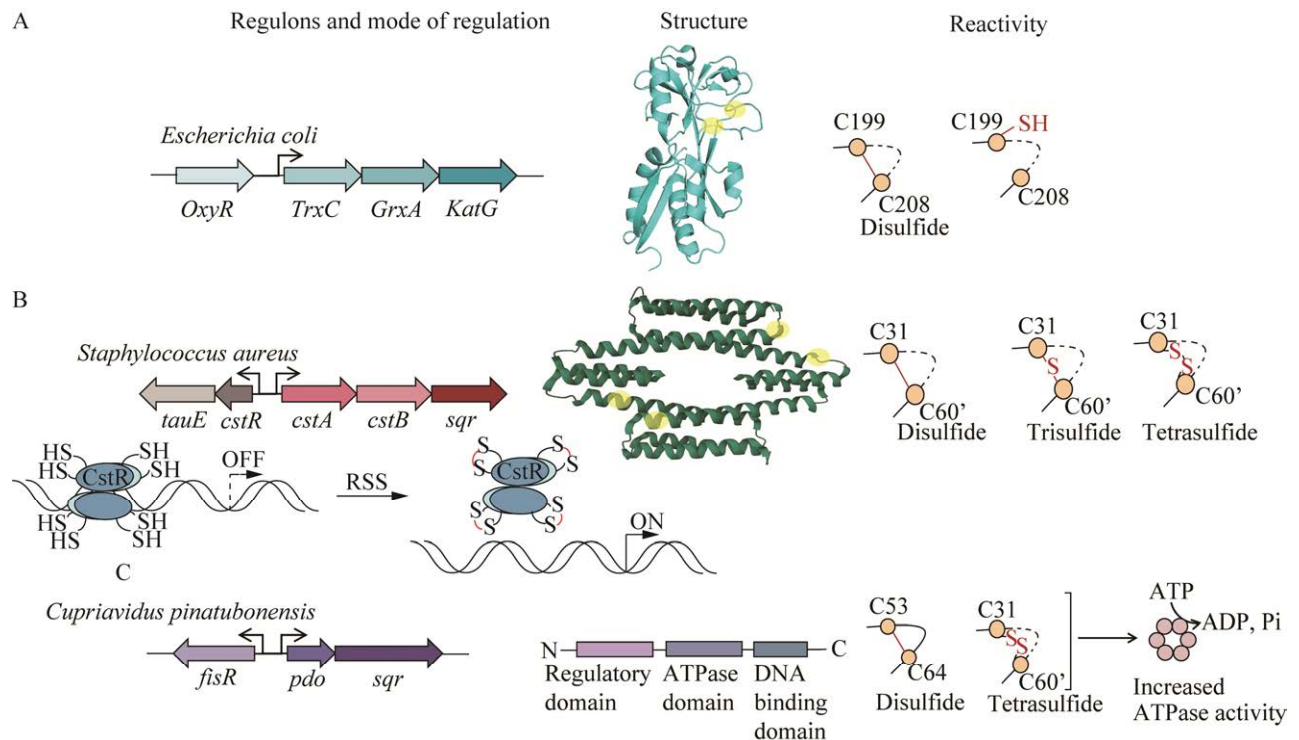


图 7 微生物 RSS 传感器的调节操作子、调节方式、结构和 RSS 反应产物^[72]

Figure 7 Regulated operons, modes of regulation, structure, and RSS reactivity products of bacterial RSS sensors. A: The expression of GrxA, TrxC, and KatG (catalase) is regulated by OxyR upon exposure to H_2O_2 . B: CstR has four peripheral dithiol-sensing sites in the tetrameric structure (middle). The reaction products of CstR with RSS reveal a mixture of di-, tri-, and tetrasulfide interprotomer linkages^[72]. C: FisR is σ^{54} -dependent transcriptional activator and activates the expression of a sulfide detoxification operon. FisR is organized into three domains (regulatory, ATPase, and DNA-binding domain), but to date, there are no structures of a functionally characterized RSS-sensing FisR (middle)^[72].

(图 7A)。OxyR 的 C199 和 C208 是 2 个可以感应 ROS 的半胱氨酸残基,在氧化压力下,C199 首先会被氧化成 Cys-SOH,再与 C208 脱水形成二硫键^[80],同时 OxyR 的氧化状态是可逆的,DTT 等还原剂可以将其还原。在 C199 形成 Cys-SOH 或 C199 与 C208 形成二硫键后,受 OxyR 控制的下游基因 *trxC*、*grxA*、*katG* 开始转录。 H_2S_n 能够修饰 OxyR 形成 OxyR-SSH,进而激活 Trx 和谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx) 的表达,将 RSS 还原成 H_2S ^[81]。在 *E. coli* 中 OxyR 的缺失会使胞内 RSS 浓度上升,*E. coli* 对 RSS 的胁迫更敏感,RSS 通过激活 *E. coli* 中 TrxC、GrxA 以及 KatG 的表达降低胞内 RSS 浓度,使 *E. coli* 胞内 RSS 的浓度控制在正常范围内^[28]。

3.2 CstR

CstR 是转录阻遏物 CsoR (铜敏感操纵子阻遏物)家族的成员,最早在 *S. aureus* 中发现^[82](图 7B)。*S. aureus* 中的 CstR 通过过硫化物中间体将硫化物氧化成硫代硫酸盐。CstR 由 88 个氨基酸组成,包含 2 个半胱氨酸残基(C31 和 C60),可以感受外界的 RSS 信号。*cst* 操纵子是由外源性细胞硫化物胁迫瞬时诱导的,*cst* 编码的蛋白 CstR 被认为是可以清除细胞中应激升高的低过硫化物(low persulfide, LMW),其既能感知无机(多)硫化物,也能感知 LMW 硫醇的有机过硫化物,并在 C31 和 C60 之间形成二硫化物、三硫化物和四硫化物的混合物。由 *cst* 操纵子控制的基因包括 *cstA*、*cstB* 和 *sqr*,能够减轻细胞硫化物毒性的影响。通常 CstR 结合在启动子上游的调控区,而 RSS 能修饰 CstR 上的半胱氨酸残基,使 C31 和 C60 之间形成二、三、四硫键发生构象改变,阻止 CstR 与 *cst* 操纵子的结合,解除对下游硫代谢相关基因的抑制^[83],因此在 RSS 存在的情况下,CstR 被 RSS 修饰后,从操纵子上释放下来。

3.3 FisR

来源于 *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 的 FisR 是一类增强子蛋白,具有增强子蛋白的典型结构(图 7C),该蛋白内部分有 R 结构域和 D 结构域,R 结构域的 3 个半胱氨酸残基是感应 RSS 调控的关键位点,D 结构域可以和启动子上游序列结合^[77]。FisR 调控 2 个关键的硫化物氧化基因 *sqr* 和 *pdo*,二者能够共同将硫化物氧化为多硫化物、亚硫酸盐和硫代硫酸盐,RSS 作用于 FisR 上的 2 个保守的半胱氨酸残基 C53 和 C64,使之同时形成二硫键和四硫键,FisR 构象的改变引起了 ATP 水解酶活性改变,激活启动子,增强 PDO 和 SQR 的表达量,加速硫化物氧

化^[78]。FisR 感应多硫化物后,自身会激活从而提高下游硫氧化操纵子基因的表达水平,增强硫耐受性。通过 FisR 转录因子的 GFP 报告系统的构建,发现多硫化物是 FisR 表达的直接诱导物。在硫化物或多硫化物浓度升高时,FisR 可以迅速响应,产生 ATP 酶活,因此,整个“转录-激活过程”始终保持一个“待命状态”,以确保 *C. pinatubonensis* JMP134 对硫化物产生快速应答^[79]。

4 蛋白过硫化修饰在生物学合成中的应用

微生物合成 L-半胱氨酸的过程与过硫化修饰密切相关,通过对 L-半胱氨酸代谢、过硫化修饰、氧化应激间的调控机制解析,不但有助于了解上述生理过程的生物学意义,对含硫氨基酸的代谢改造也有重要指导意义。 H_2S 在水溶液中以 H_2S 、 HS^- 、 S^{2-} 形式存在,其中 S^{2-} 能够在 CysK 的催化下重新生成 L-半胱氨酸,L-半胱氨酸通过 CAT/MST 转化成 RSS, H_2O_2 可以氧化 RSS 为硫代硫酸盐,同时在氧气的存在下 S^{2-} 容易发生氧化形成 RSS^[84],硫代硫酸盐转移酶(thiosulfate sulfurtransferase, PspE)会催化硫代硫酸盐中硫的转移从而形成一种酶-硫中间体^[85](图 8)。通过对 CstB、Sqr 代谢调控机制的解析,Du 等在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中成功将 H_2S 转化为硫代硫酸盐,实现硫的再利用^[87];Zhang 等通过对硫途径的进一步强化策略使硫利用率达到 52.8%^[88],但 CDs 能够将 L-半胱氨酸降解成 H_2S 导致硫利用率降低;Huang 等通过对碳硫模块的协同表达显著提升了甲硫氨酸的产量^[89];同时对菌株提供不同的硫源也会影响其本身的状态,Huang 等在培养基中添加硫代硫酸钠使甲硫氨酸产量提高了 11.45%^[90]。

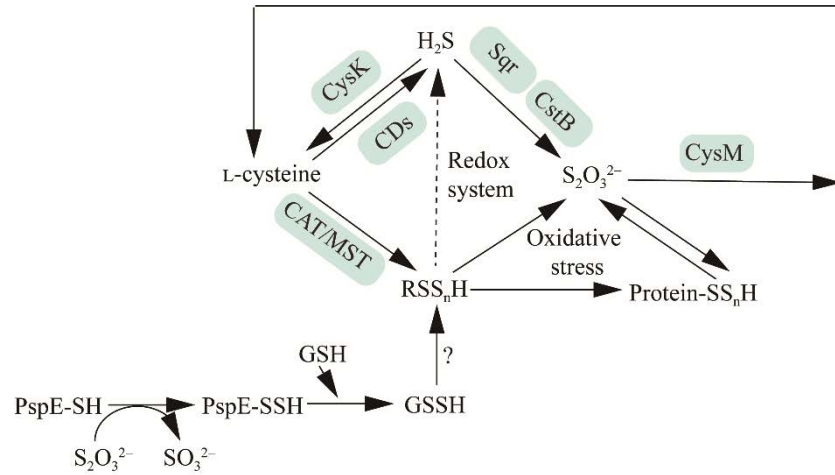


图 8 *Escherichia coli* 中 H₂S 和 RSS 产生的模型

Figure 8 Model of *Escherichia coli* production of H₂S and RSS. CDs convert L-cysteine to H₂S. Most of the produced H₂S is lost via evaporating, the rest of the hydrogen sulfide is used by CysK and CysM to produce L-cysteine^[86]. H₂O₂ can oxidize reactive sulfane sulfur to thiosulfate^[46]. Sqr and CstB can use H₂S to produce thiosulfonate^[87]. CAT/MST metabolizes L-cysteine to produce reactive sulfur, which causes protein sulfhydrylation. Cellular mercaptans and thioredoxin/pentadidoxin reduce excess active sulfathionate to H₂S, but this is not an efficient way to produce H₂S during normal growth.

5 研究展望

本文综述了蛋白质过硫化修饰的形成过程及细菌内的硫稳态调控机制，不仅有助于了解 H₂S、RSS 生成机制，而且进一步阐述了 H₂S 和 RSS 之间的联系及细菌内硫稳态调控的机制。然而在对过硫化修饰研究中还存在以下问题：(1) 在细胞内 RSS 种类繁多且有着复杂的转换关系，因此在微生物内硫的转化和代谢过程中实现对胞内 RSS 水平实时、动态、精确的检测对于过硫化修饰来说十分重要；(2) 其次过硫化修饰可能会受到环境中氧化还原条件等的影响，蛋白中存在着多个潜在的过硫化修饰位点，每个位点都可能改变蛋白质的结构和功能，最终导致蛋白质的结构功能差异，若经过过硫化修饰的半胱氨酸残基在蛋白质结构和功能的关键区域外则是无效过硫化；(3) 维持硫稳态的潜在机制仍不明确^[5]等原因导致过硫化修饰的研究仍处于发展阶段；(4) 在微生物及动植物体内蛋白质的半胱氨酸

残基除了能够发生过硫化修饰之外，硫原子还能与氮、氧原子形成氮氧硫桥(-N-O-S-)^[91]，因此半胱氨酸残基及硫原子不仅与过硫化修饰相关，还存在着与其他原子的相互作用，其中复杂的作用关系还需要进一步探索。因此通过详细介绍蛋白质过硫化修饰机制及其在代谢工程中的应用，提出以下几点展望：(1) 微生物合成 L-半胱氨酸的过程与过硫化修饰密切相关，通过对半胱氨酸代谢、过硫化修饰、氧化应激间的调控机制解析，不但有助于了解上述生理过程的生物学意义，对含硫氨基酸的代谢改造也有重要指导意义；(2) 蛋白质中半胱氨酸残基上的硫原子除了形成二硫桥外，还能与其他氨基酸形成共价交联，例如半胱氨酸-赖氨酸残基之间的氮氧硫桥，这些新结构的发现对蛋白质的功能结构有了更深入的了解，因此硫原子与其他原子之间的相互作用、半胱氨酸残基与其他氨基酸残基之间的作用关系也值得进一步探索；(3) 蛋白质过硫化的检测技术仍需要进一步发展。

参考文献

- [1] CHEN L, KASHINA A. Post-translational modifications of the protein termini[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 719590.
- [2] VALBERG SJ, PERUMBAKKAM S, MCKENZIE EC, FINNO CJ. Proteome and transcriptome profiling of equine myofibrillar myopathy identifies diminished peroxiredoxin 6 and altered cysteine metabolic pathways[J]. *Physiological Genomics*, 2018, 50(12): 1036-1050.
- [3] WANG LJ, MU XJ, CHEN X, HAN Y. Hydrogen sulfide attenuates intracellular oxidative stress via repressing glycolate oxidase activities in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 98.
- [4] SUN HJ, WU ZY, NIE XW, BIAN JS. Role of hydrogen sulfide and polysulfides in neurological diseases: focus on protein S-persulfidation[J]. *Current Neuropharmacology*, 2021, 19(6): 868-884.
- [5] LIN VS, CHEN W, XIAN M, CHANG CJ. Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(14): 4596-4618.
- [6] HE B, ZHANG Z, HUANG Z, DUAN XR, WANG Y, CAO JJ, LI L, HE K, NICE EC, HE WF, GAO W, SHEN ZS. Protein persulfidation: rewiring the hydrogen sulfide signaling in cell stress response[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2023, 209: 115444.
- [7] HOLZEROVÁ E, PROKISCH H. Mitochondria: much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015, 63: 16-20.
- [8] PAUL BD, SNYDER SH. Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health and disease[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2018, 149: 101-109.
- [9] PARK CM, WEERASINGHE L, DAY JJ, FUKUTO JM, XIAN M. Persulfides: current knowledge and challenges in chemistry and chemical biology[J]. *Molecular BioSystems*, 2015, 11(7): 1775-1785.
- [10] WEDMANN R, ONDERKA C, WEI SW, SZIJÁRTO IA, MILJKOVIC JL, MITROVIC A, LANGE MK, SAVITSKY S, YADAV PK, TORREGROSSA R, HARRER EG, HARRER T, ISHII I, GOLLASCH M, WOOD ME, GALARDON E, XIAN M, WHITEMAN M, BANERJEE R, FILIPOVIC MR. Improved tag-switch method reveals that thioredoxin acts as depersulfidase and controls the intracellular levels of protein persulfidation[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(5): 3414-3426.
- [11] ONO K, AKAIKE T, SAWA T, KUMAGAI Y, WINK DA, TANTILLO DJ, HOBBS AJ, NAGY P, XIAN M, LIN J, FUKUTO JM. Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: implications of their possible biological activity and utility[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 77: 82-94.
- [12] ABE K, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1996, 16(3): 1066-1071.
- [13] YANG H, ZHANG B, WU ZD, CHEN LF, PAN JY, XIU XL, CAI X, LIU ZQ, ZHENG YG. Combinatorial metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced L-cysteine production: insights into crucial regulatory modes and optimization of carbon-sulfur metabolism and cofactor availability[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(36): 13409-13418.
- [14] OLSON KR. Are reactive sulfur species the new reactive oxygen species?[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 33(16): 1125-1142.
- [15] MIRONOV A, SEREGINA T, SHATALIN K, NAGORNYKH M, SHAKULOV R, NUDLER E. CydDC functions as a cytoplasmic cystine reductase to sensitize *Escherichia coli* to oxidative stress and aminoglycosides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(38): 23565-23570.
- [16] OHTSU I, WIRIYATHANAWUDHIWONG N, MORIGASAKI S, NAKATANI T, KADOKURA H, TAKAGI H. The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(23): 17479-17487.
- [17] 张玲娜, 董丽, 廖红梅. 细菌响应过量活性氧的存活策略及相关研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1249-1259.
- ZHANG LN, DONG L, LIAO HM. Survival strategies of bacteria in response to excessive reactive oxygen species: a review[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(4): 1249-1259 (in Chinese).
- [18] GERRITY S, KENNELLY C, CLIFFORD E, COLLINS G. Hydrogen sulfide oxidation in novel horizontal-flow biofilm reactors dominated by an *Acidithiobacillus* and a *Thiobacillus* species[J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(17): 2252-2264.

- [19] POKORNA D, ZABRANSKA J. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 1246-1259.
- [20] FILIPOVIC MR, ZIVANOVIC J, ALVAREZ B, BANERJEE R. Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(3): 1253-1337.
- [21] LI Q, JR LANCASTER JR. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology[J]. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 2013, 35: 21-34.
- [22] GOTOR C, GARCÍA I, AROCA Á, LAUREANO-MARÍN AM, ARENAS-ALFONSECA L, JURADO-FLORES A, MORENO I, ROMERO LC. Signaling by hydrogen sulfide and cyanide through post-translational modification[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(16): 4251-4265.
- [23] FENG JN, LU XX, LI H, WANG SX. The roles of hydrogen sulfide in renal physiology and disease states[J]. *Renal Failure*, 2022, 44(1): 1289-1308.
- [24] 王清达. 硫转移酶维持真核细胞线粒体健康的机制研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2022.
WANG QD. The mechanism of sulfurtransferase to maintain mitochondrial health in eukaryotic cells[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2022 (in Chinese).
- [25] MISHANINA TV, LIBIAD M, BANERJEE R. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11: 457-464.
- [26] KUMAR R, BANERJEE R. Regulation of the redox metabolome and thiol proteome by hydrogen sulfide[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 56(3): 221-235.
- [27] SHIBUYA N, TANAKA M, YOSHIDA M, OGASAWARA Y, TOGAWA T, ISHII K, KIMURA H. 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(4): 703-714.
- [28] 侯宁可. 大肠杆菌中 OxyR 对活性硫烷硫的调控以及异养细菌氧化硫化氢的应用研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2019.
HOU NK. The regulation of reactive sulfane sulfur by OxyR in *E. coli* and application of H₂S oxidation by heterotrophic bacteria[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2019 (in Chinese).
- [29] TOOHEY JI, COOPER AJL. Thiosulfoxide (sulfane) sulfur: new chemistry and new regulatory roles in biology[J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12789-12813.
- [30] KIMURA Y, MIKAMI Y, OSUMI K, TSUGANE M, OKA JI, KIMURA H. Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain[J]. *The FASEB Journal*, 2013, 27(6): 2451-2457.
- [31] SUN F, LUO JH, YUE TT, WANG FX, YANG CL, ZHANG S, WANG XQ, WANG CY. The role of hydrogen sulphide signalling in macrophage activation[J]. *Immunology*, 2021, 162(1): 3-10.
- [32] PAUL BD, SNYDER SH. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13: 499-507.
- [33] MA Y, YANG XM, WANG HO, QIN ZX, YI CR, SHI CP, LUO M, CHEN GZ, YAN J, LIU XY, LIU Z. CBS-derived H₂S facilitates host colonization of *Vibrio cholerae* by promoting the iron-dependent catalase activity of KatB[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(7): e1009763.
- [34] OLSON KR. A practical look at the chemistry and biology of hydrogen sulfide[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 17(1): 32-44.
- [35] PREDMORE BL, LEFER DJ, GOJON G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 17(1): 119-140.
- [36] DWIVEDI CM, RAGIN RC, UREN JR. Cloning, purification, and characterization of beta-cystathionase from *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 1982, 21(13): 3064-3069.
- [37] AWANO N, WADA M, KOHDOH A, OIKAWA T, TAKAGI H, NAKAMORI S. Effect of cysteine desulfhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(2): 239-243.
- [38] AWANO N, WADA M, MORI H, NAKAMORI S, TAKAGI H. Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 4149-4152.
- [39] PEDRE B, YALWAR D, BARAYE U, SCHILLING D, LUZAROWSHI M, SOKOLOWSHI M, GLATT S, DICK TP. 3-Mercaptopyruvate sulfur transferase is a protein persulfidase[J]. *Nature Chemical Biology*, 2023, 19(4): 507-517.
- [40] SHATALIN K, SHATALINA E, MIRONOV A, NUDLER E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria[J]. *Science*, 2011, 334(6058): 986-990.

- [41] GADALLA MM, SNYDER SH. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2010, 113(1): 14-26.
- [42] SHACKELFORD RE, ABDULSATTAR J, WEI EX, COTELINGAM J, COPPOLA D, HERRERA GA. Increased nicotinamide phosphoribosyltransferase and cystathionine- β -synthase in renal oncocytomas, renal urothelial carcinoma, and renal clear cell carcinoma[J]. *Anticancer Research*, 2017, 37(7): 3423-3427.
- [43] SINGH S, PADOVANI D, LESLIE RA, CHIKU T, BANERJEE R. Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(33): 22457-22466.
- [44] KABIL O, BANERJEE R. Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 20(5): 770-782.
- [45] YADAV PK, MARTINOV M, VITVITSKY V, SERAVALLI J, WEDMANN R, FILIPOVIC MR, BANERJEE R. Biosynthesis and reactivity of cysteine persulfides in signaling[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(1): 289-299.
- [46] MIRONOV A, SEREGINA T, NAGORNYKH M, LUHACHACK LG, KOROLKOVA N, LOPES LE, KOTOVA V, ZAVILGELSKY G, SHAKULOV R, SHATALIN K, NUDLER E. Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(23): 6022-6027.
- [47] KIMURA H, SHIBUYA N, KIMURA Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, 17(1): 45-57.
- [48] STIPANUK MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2004, 24: 539-577.
- [49] STIPANUK MH, BECK PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat[J]. *The Biochemical Journal*, 1982, 206(2): 267-277.
- [50] ANANDKUMAR B, GEORGE RP, MARUTHAMUTHU S, PARVATHAVARTHINI N, MUDALI UK. Corrosion characteristics of sulfate-reducing bacteria (SRB) and the role of molecular biology in SRB studies: an overview[J]. *Corrosion Reviews*, 2016, 34(1/2): 41-63.
- [51] MÜLLER AL, KJELDSEN KU, RATTEI T, PESTER M, LOY A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(5): 1152-1165.
- [52] 卢婷. 硫烷硫在天蓝色链霉菌次级代谢和分化发育过程中的调控机制研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2022.
- LU T. The mechanism of sulfane sulfur regulating secondary metabolism and differentiation in *Streptomyces coelicolor*[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2022 (in Chinese).
- [53] AKETAGAWA J, KOBAYASHI K, ISHIMOTO M. Purification and properties of thiosulfate reductase from *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki F[J]. *Journal of Biochemistry*, 1985, 97(4): 1025-1032.
- [54] GRUHLKE MCH, SLUSARENKO AJ. The biology of reactive sulfur species (RSS)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 59: 98-107.
- [55] HAN SR, LI YX, GAO HC. Generation and physiology of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in bacteria[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(12): 2487.
- [56] LIU H, RADFORD MN, YANG CT, CHEN W, XIAN M. Inorganic hydrogen polysulfides: chemistry, chemical biology and detection[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2019, 176(4): 616-627.
- [57] KHARMA A, GRMAN M, MISAK A, DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ E, NASIM MJ, ONDRIAS K, CHOVANEC M, JACOB C. Inorganic polysulfides and related reactive sulfur-selenium species from the perspective of chemistry[J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1359.
- [58] CHERNEY MM, ZHANG YF, SOLOMONSON M, WEINER JH, JAMES MNG. Crystal structure of sulfide: quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: insights into sulfidotrophic respiration and detoxification[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 398(2): 292-305.
- [59] LÜ CJ, XIA YZ, LIU DX, ZHAO R, GAO R, LIU HL, XUN LY. *Cupriavidus necator* H16 uses flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase to oxidize self-produced and added sulfide[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(22): e01610-e01617.
- [60] FUKUMORI Y, YAMANAKA T. Flavocytochrome *c* of *Chromatium vinosum*. Some enzymatic properties and subunit structure[J]. *Journal of Biochemistry*, 1979, 85(6): 1405-1414.

- [61] VISSER JM, de JONG GAH, ROBERTSON LA, KUENEN JG. A novel membrane-bound flavocytochrome *c* sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5[J]. *Archives of Microbiology*, 1997, 167(5): 295-301.
- [62] XIA YZ, LÜ CJ, HOU NK, XIN YF, LIU JH, LIU HL, XUN LY. Sulfide production and oxidation by heterotrophic bacteria under aerobic conditions[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(12): 2754-2766.
- [63] KOSTANJEVECKI V, BRIGÉ A, MEYER TE, CUSANOVICH MA, GUISEZ Y, van BEEUMEN J. A membrane-bound flavocytochrome *c*-sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic sulfur bacterium *Ectothiorhodospira vacuolata*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(11): 3097-3103.
- [64] 胡欣, 刘纪化, 刘怀伟, 庄光超, 荀鲁盈. 异养细菌硫代谢及其在海洋硫循环中的作用[J]. *中国科学: 地球科学*, 2018, 48(12): 1540-1550.
HU X, LIU JH, LIU HW, ZHUANG GC, XUN LY. Sulfur metabolism by marine heterotrophic bacteria involved in sulfur cycling in the ocean[J]. *Scientia Sinica (Terrae)*, 2018, 48(12): 1540-1550 (in Chinese).
- [65] GREGERSEN LH, BRYANT DA, FRIGAARD NU. Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 116.
- [66] CHEN LX, REN YL, LIN JQ, LIU XM, PANG X, LIN JQ. *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e39470.
- [67] XIN YF, WANG YX, ZHANG HL, WU Y, XIA YZ, LI HJ, QU XH. *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 alleviates sulfane sulfur toxicity after the loss of sulfane dehydrogenase through oxidation by persulfide dioxygenase and hydrogen sulfide release[J]. *Metabolites*, 2023, 13(2): 218.
- [68] IDA T, SAWA T, IHARA H, TSUCHIYA Y, WATANABE Y, KUMAGAI Y, SUEMATSU M, MOTOHASHI H, FUJII S, MATSUNAGA T, YAMAMOTO M, ONO K, DEVARIE-BAEZ NO, XIAN M, FUKUTO JM, AKAIKE T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(21): 7606-7611.
- [69] PAUL BD, SNYDER SH. Protein sulfhydration[J]. *Methods in Enzymology*, 2015, 555: 79-90.
- [70] XU ZB, QIU ZY, LIU Q, HUANG YX, LI DD, SHEN XG, FAN KL, XI JQ, GU YH, TANG Y, JIANG J, XU JL, HE JZ, GAO XF, LIU Y, KOO H, YAN XY, GAO LZ. Converting organosulfur compounds to inorganic polysulfides against resistant bacterial infections[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3713.
- [71] LU T, CAO Q, PANG XH, XIA YZ, XUN LY, LIU HW. Sulfane sulfur-activated actinorhodin production and sporulation is maintained by a natural gene circuit in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(6): 1917-1932.
- [72] WALSH BJC, GIEDROC DP. H₂S and reactive sulfur signaling at the host-bacterial pathogen interface[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(38): 13150-13168.
- [73] GROSSOEHME N, KEHL-FIE TE, MA Z, ADAMS KW, COWART DM, SCOTT RA, SKAAR EP, GIEDROC DP. Control of copper resistance and inorganic sulfur metabolism by paralogous regulators in *Staphylococcus aureus*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(15): 13522-13531.
- [74] SHEN JC, WALSH BJC, FLORES-MIRELES AL, PENG H, ZHANG YF, ZHANG YX, TRINIDAD JC, HULTGREN SJ, GIEDROC DP. Hydrogen sulfide sensing through reactive sulfur species (RSS) and nitroxyl (HNO) in *Enterococcus faecalis*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(6): 1610-1620.
- [75] SHIMIZU T, SHEN JC, FANG MX, ZHANG YX, HORI K, TRINIDAD JC, BAUER CE, GIEDROC DP, MASUDA S. Sulfide-responsive transcriptional repressor SqrR functions as a master regulator of sulfide-dependent photosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(9): 2355-2360.
- [76] BARBOSA RL, BENEDETTI CE. BigR, a transcriptional repressor from plant-associated bacteria, regulates an operon implicated in biofilm growth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(17): 6185-6194.
- [77] 李娟. *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 中 Fis 家族调控子对硫化物氧化途径的调控作用研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2016.
LI J. Study on the regulation of Fis family regulators in *Cupriavidus pinatubonensis* JMP 134 on sulfide oxidation pathway[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2016 (in Chinese).
- [78] LI HJ, LI J, LÜ CJ, XIA YZ, XIN YF, LIU HL, XUN LY, LIU HW. FisR activates σ^{54} -dependent transcription of sulfide-oxidizing genes in *Cupriavidus*

- pinatubonensis* JMP134[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(3): 373-384.
- [79] 李焕杰. 活性硫烷硫的荧光特性及生理功能研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2019.
- LI HJ. Study on fluorescence characteristics and physiological function of active thioalkyl sulfur[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2019 (in Chinese).
- [80] ZHENG M, ASLUND F, STORZ G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation[J]. *Science*, 1998, 279(5357): 1718-1721.
- [81] HOU NK, YAN ZZ, FAN KL, LI HJ, ZHAO R, XIA YZ, XUN LY, LIU HW. OxyR senses sulfane sulfur and activates the genes for its removal in *Escherichia coli*[J]. *Redox Biology*, 2019, 26: 101293.
- [82] LIU T, RAMESH A, MA Z, WARD SK, ZHANG LM, GEORGE GN, TALAAT AM, SACCHETTINI JC, GIEDROC DP. CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3: 60-68.
- [83] LUEBKE JL, SHEN JC, BRUCE KE, KEHL-FIE TE, PENG H, SKAAR EP, GIEDROC DP. The CsoR-like sulfurtransferase repressor (CstR) is a persulfide sensor in *Staphylococcus aureus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 94(6): 1343-1360.
- [84] ALPER E, OZTURK S. Kinetics of oxidation of aqueous sodium sulphide solutions by gaseous oxygen in a stirred cell reactor[J]. *Chemical Engineering Communications*, 1985, 36(1/2/3/4/5/6): 343-349.
- [85] CHENG H, DONAHUE JL, BATTLE SE, RAY WK, LARSON TJ. Biochemical and genetic characterization of PspE and GlpE, two single-domain sulfurtransferases of *Escherichia coli*[J]. *The Open Microbiology Journal*, 2008, 2: 18-28.
- [86] LI K, XIN YF, XUAN GH, ZHAO R, LIU HW, XIA YZ, XUN LY. *Escherichia coli* uses separate enzymes to produce H₂S and reactive sulfane sulfur from L-cysteine[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 298.
- [87] DU HM, QIAO JF, QI YT, LI LC, XU N, SHAO L, WEI L, LIU J. Reprogramming the sulfur recycling network to improve L-cysteine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Green Chemistry*, 2023, 25(8): 3152-3165.
- [88] ZHANG B, YANG H, WU ZD, PAN JY, LI SR, CHEN LF, CAI X, LIU ZQ, ZHENG YG. Spatiotemporal gene expression by a genetic circuit for chemical production in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(3): 768-779.
- [89] HUANG JF, SHEN ZY, MAO QL, ZHANG XM, ZHANG B, WU JS, LIU ZQ, ZHENG YG. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranch and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2577-2589.
- [90] HUANG JF, LIU ZQ, JIN LQ, TANG XL, SHEN ZY, YIN HH, ZHENG YG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial production of L-methionine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 843-851.
- [91] WENSIEN M, von PAPPENHEIM FR, FUNK LM, KLOSKOWSKI P, CURTH U, DIEDERICHSEN U, URANGA J, YE J, FANG P, PAN KT, URLAUB H, MATA RA, SAUTNER V, TITTMANN K. A lysine-cysteine redox switch with an NOS bridge regulates enzyme function[J]. *Nature*, 2021, 593: 460-464.