



相容溶质四氢嘧啶与羟基四氢嘧啶的代谢调控研究进展

张芳, 沈国平, 李永臻, 朱德锐*

青海大学医学院基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

摘要: 四氢嘧啶(Ectoine)及其衍生物羟基四氢嘧啶(5-hydroxyectoine, 5-HE)是嗜盐微生物胞内合成的一类能够抵抗外界高盐胁迫的相容溶质, 具有细胞、细胞膜、蛋白质和核酸的保护作用, 可抵抗高盐、高温、冷冻和干燥等极端环境因素的刺激, 从而倍受关注。本文对不同类型微生物 Ectoine/5-HE (Ects)生物合成代谢、分解代谢以及吸收/转运系统涉及的调控机制进行综述, 以期 Ects 合成产量的提升与高效积聚策略的优化, 提供一定的理论参考依据。

关键词: Ectoine, 5-hydroxyectoine, 调节因子, 转录调控, 分解代谢, 转运调节

四氢嘧啶(1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸, Ectoine)及衍生物羟基四氢嘧啶(5-羟基四氢嘧啶, 5-hydroxyectoine[5-HE])是典型的相容溶质(Compatible solute)有机化合物, 具有亲水性和两性离子特征^[1], 分子量分别为 142.16 和 158.16。嗜盐或耐盐微生物胞内大量积聚 Ects, 以此应对高盐或超盐等极端环境的渗透压胁迫^[2]。1985年, Ectoine 首次从极端嗜盐外硫红螺菌属(*Ectothiorhodospira*)的光合紫细菌 *Halochloris* 中发现^[2], 此后陆续发现于芽孢杆菌(*Bacillus*)、链霉菌(*Streptomyces*)、甲烷菌(*Methylococcum*)、盐单胞菌(*Halomonas*)以及色盐杆菌

(*Chromohalobacter*)等菌株之中。但因生物合成代谢途径、基因组多元化以及代谢调控方式的差异, 不同菌株的 Ectoine 积聚量有明显差异。通常, Ectoine 高效积聚的模式菌株以盐单胞菌属(*Halomonas*)和色盐杆菌属(*Chromohalobacter*)菌株为代表, 均隶属于 γ -变形菌纲海洋螺菌目盐单胞菌科, 如延长盐单胞菌 *H. elongata* DSM2581^T 与需盐色盐杆菌 *C. salexigens* DSM3043^T。诸多研究表明, Ectoine 通过协助细胞内外的渗透压平衡, 提高脂膜表面的水合作用, 增强脂膜流态化, 从而提高细胞膜承受极端环境的能力。其次, 胞内高浓度的 Ectoine 与蛋白分子相互作用, 强化

基金项目: 国家自然科学基金(31760034, 21967018); 青海省重点研发与转化计划(2019SF121); 青海省基础应用研究计划(2018ZJ778, 2020ZJ767); 高原特色盐湖生物资源的集成研发与转化团队计划(2018KYT1)

*通信作者。Tel/Fax: +86-971-6153778; E-mail: zhuderui2005@126.com

收稿日期: 2019-11-21; 修回日期: 2020-01-30; 网络出版日期: 2020-06-16

蛋白折叠结构的紧凑性和功能稳定性。相对 Ectoine 而言, 5-HE 因多拥有一个羟基(-OH)基团, 能够替代性补偿蛋白质的表面失水, 其保护作用更加有效。此外, Ectoine 还能够防止限制性内切酶的切割作用, 从而稳定 DNA 的分子结构。Ects 作为嗜盐微生物重要的次级代谢物, 具有细胞、细胞膜、蛋白质和核酸的保护作用, 可抵抗冷冻、高温、高盐、高压、干旱和辐射等各种逆境因素的影响^[3-6]。目前, Ects 已广泛应用于药物制备佐剂、器官移植与保存、皮肤创伤修复以及新型化妆品研发等生物医学领域^[4], 从而备受关注。

在 Ects 生物合成途径中, 以天冬氨酸半醛为前体底物, 依赖于进化高度保守的基因簇操纵子 *ectABC* 或 *ectABCD-ask* (*ect*-operon), 其结构基因 *ectB*、*ectA* 和 *ectC* 分别编码 L-二氨基丁酸转氨酶、L-二氨基丁酸乙酰转移酶和四氢嘧啶合酶, 经 3 步催化合成 Ectoine。此外, *ectD* 基因可编码四氢嘧啶羟化酶, 将 Ectoine 转化为 5-HE (图 1)。2011 年, Schwibbert 等^[7]首次解析 *H. elongata* DSM2581^T 的 Ectoine 分解代谢途径, 由 *doeA*、*doeB*、*doeC* 和 *doeD* 4 个基因分别编码四氢嘧啶水解酶(DoeA)、N_α-乙酰基-L-2,4-二氨基丁酸脱乙酰酶(DoeB)、天冬氨酸-半缩醛脱氢酶(DoeC)和 L-2,4-二氨基丁酸转氨酶(DoeD)联合分解 Ectoine (图 1)。通常, 胞内的 Ects 浓度能够随着细菌所处环境的变化而响应变化, 如在菌株 *C. salexigens* 的细胞静止生长期, Ects 积累量最大, Ectoine 积累量受到盐度的上调作用而增加, 而 5-HE 积累量受高盐和高温的上调作用而增加^[8]。目前, Ects 的生物合成途径在基因和酶蛋白水平已进行较为深入的研究, 然而在低渗-高渗环境变化下, Ects 的诱导启动、转录调控以及吸收转运机制等,

尚未系统阐明。近年来, 关于 Ects 的吸收与转运调控研究, 在不同菌株之中已发现许多类型的调节因子家族参与其中, 如 MarR 家族(Multiple antibiotic resistance regulator)、OmpR 家族(Outer membrane proteins regulation)和 TRAP-T 家族(Tripartite ATP-independent periplasmic transporter)等。本文系统综述了不同类型的微生物涉及 Ects 合成代谢(如 *EctR* 与 *CosR* 因子)、分解代谢(如 *EhuR* 因子)以及吸收/转运系统(如 *TeaABC* 与 *ProP*)调控机制的最新进展, 为后续 Ects 的生物合成与代谢调控研究提供一定的参考依据。

1 Ects 生物合成的分子调控机制

1.1 操纵子 *ect* 与渗透压全局调节关联基因

Ects 的合成代谢调控, 常以进化高度保守的连锁 *ectABC* 或 *ectABCD-ask* 基因簇操纵子 (*ect*-operon 模式)进行。如分析 *H. elongata* 菌株的 *ectABC* 基因簇, 发现在 *ectA* 基因上游和 *ectC* 基因上游存在两个转录起始位点, 参与基因转录, 其中 *ectA* 由两个控制性启动子组成(δ^{70} 和 δ^{38}), 而 *ectC* 存在一个控制性启动子(δ^{54})^[9-12]。然而, 不同的微生物 *ectABC* 与 *ectABCD* 基因簇组织结构差异, 如在 *C. salexigens* 菌株中, 结构基因 *ectA*、*ectB* 与 *ectC* 串联形成 *ectABC* 操纵子, 而 *ectD* 则独立存在于启动子之后; 又如所有的弧菌属(*Vibrio*)中, 仅 *ectABC* 与基因 *ask* 形成 *ectABC-ask* 操纵子, 而缺失 *ectD* 基因; 又如天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)则以 *ectABCD* 操纵子存在。近年来, 通过人为阻断 *EctD* 的活性, 胞内仍有少许 5-HE 合成, 可能存在其他的未知途径参与合成 5-HE^[13]。

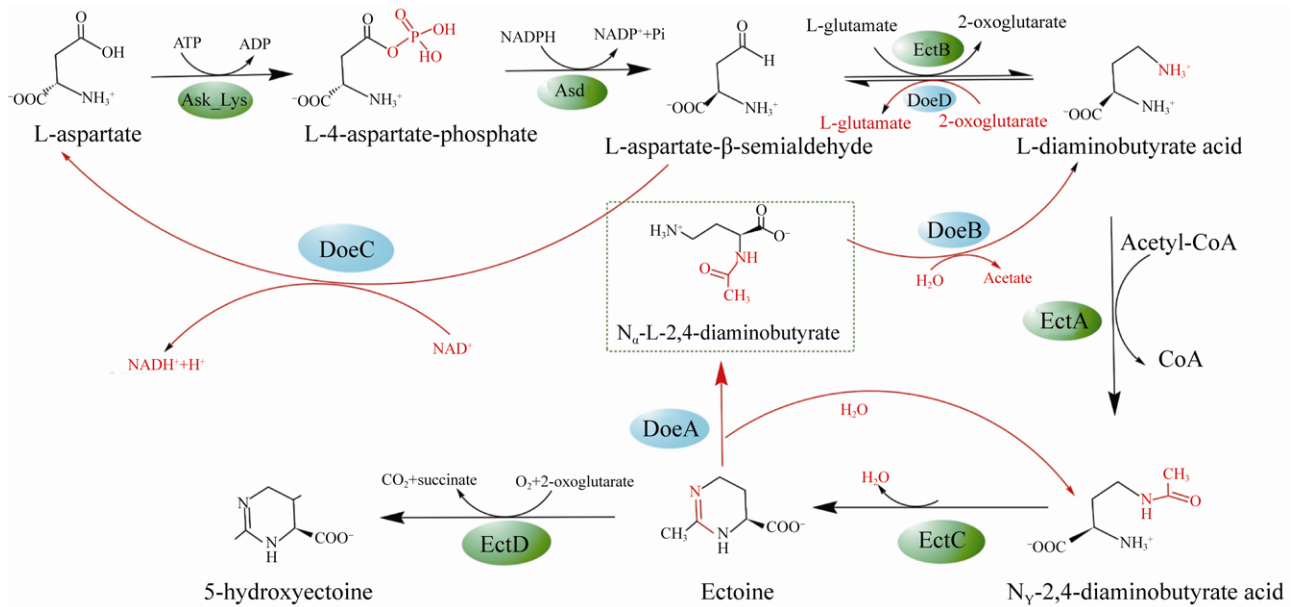


图 1. Ectoine 与 5-HE 的生物合成和分解代谢途径^[7]

Figure 1. The biosynthetic and catabolic pathway of ectoine and 5-HE^[7].

随着转录组高通量测序技术的广泛应用, 研究细胞群体感应、表型变化、代谢功能适应及关键靶向基因差异调控已日趋成熟。Harding 等^[14]通过转录组和蛋白组预测分析嗜盐菌 *Halocafeteria seosinensis* 和 *Pharyngomonas kirbyi* 的渗透压适应策略, 表明相容溶质 5-HE、肌醇 (Myo-inositol) 和转运蛋白大量合成, 以维持渗透压平衡。Carlson 等^[15]采用葡萄糖或柠檬酸盐培养盐单胞菌 *H. meridiana*, 研究高盐和高 pH 条件下的适应机制。转录组差异分析显示 43 个 Up-regulated 基因与醇解途径 (酒精/乙醛脱氢酶)、氧化磷酸化和相容溶质 Ects 生物合成密切相关。Chen 等^[16]研究盐单胞菌 *H. beimenensis* 在高盐状态下转座子诱变的转录组学差异, 分析表明直系同源突变基因 (*nqrA*、*TrkA*^[17]、*atpC*、*nadA* 和 *gdhB*^[18]) 与吸 K^+ 排 Na^+ 、氧化磷酸化和相容溶质合成等适应策略密切相关, 而基因 *spoT*^[19]、*prkA*、*mtnN*、*rsbV*、*lon*、*smpB*^[20]、*rfbC*、*rfbP*、*tatB*^[21]、

acrR1 和 *laca*^[22] 与细胞信号传递、群体感应、转录/翻译调控和细胞运动有关。至此, 基于转录组学研究不同条件下基因表达差异和基因结构变异, 有可能揭示基因间互作网络等信息, 亦可能为 *ect*-operon 网络调控研究提供新的思考方向。

1.2 甲烷氧化菌与 EctR 转录调控

Mustakhimov 等^[23-24]最早从甲烷氧化菌 *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z 和 *Methylophaga thalassica* 之中发现 Ectoine 生物合成的转录调控因子 EctR, 其后发现在 *Roseobacter*、*Aliivibrio*、*Cellvibrio* 与 *Alcanivorax* 等属的细菌中亦广泛存在^[25]。EctR 蛋白由 180 个氨基酸组成, 分子量 20.6 kDa, 等电点 pI 7.17, 隶属 MarR 家族转录调节因子。EctR 蛋白与 MarR 家族其他成员一样, 位于受控基因簇结构的反义链, 具有保守的翼状螺旋-转角-螺旋基序, 以同型二聚体与 DNA 结合, 但在 MarR 家族蛋白系统发育树上, EctR 呈现单独的进化分支。菌株 *M. alcaliphilum* 20Z 和

M. thalassica 的 Ectoine 生物合成由操纵子 *ectABC-ask* 转录调控, 操纵子内有 2 个间隔紧密的启动子 *ectAp1* 和 *ectAp2*, 与大肠杆菌 σ^{70} 启动子同源。EctR 可特异性结合启动子 *ectAp1* 中的 -10 box 区域, 抑制 *ectABC-ask* 操纵子的转录, 从而负调控 Ectoine 的生物合成。在 *M. alcaliphilum* 20Z 中, *ectABC-ask* 转录在低盐和高盐度下均可进行^[23], 而 *M. thalassica* 在低盐度下则不能合成 Ectoine^[24]。

1.3 霍乱弧菌(*Vibrio*)与 CosR 转录调控

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)是一种水生细菌和人体胃肠道病原体, 栖息在人体消化道引发霍乱病。感染期间, *V. cholerae* 通过摄取或合成相容溶质 Ectoine, 以应对人体消化道环境中盐度和渗透压的变化^[26]。Shikuma 等^[27]通过盐梯度实验进行 *V. cholerae* 全局性转录组学分析, 发现转录调节因子 CosR。CosR 隶属 MarR 型家族转录调节因子, 其表达受离子强度(K^+ 和 Na^+)的影响而被激活。基因 *cosR* 定位于 *V. cholerae* 染色体 I 上, 抑制相容溶质转运体相关的 *opuD* 基因和 *ectABC* 基因簇的转录表达, 从而抑制 Ectoine 生物合成。此外, CosR 还能激活 *V. cholerae* 中生物膜形成, 并抑制其运动性。

1.4 链霉菌(*Streptomyces*)与 GlnR 转录调控

链霉菌属(*Streptomyces*)具有积聚天然次级代谢物的强大能力, 如生物合成抗生素、抗癌药物、免疫抑制剂和驱虫剂等。通常, 次级代谢物的生物合成受到复杂的网络调控, 许多全局/多效性和通路特异性的调控因子参与其中^[28]。早期研究表明, GlnR 是氮代谢调控的一个全局性转录调控因子, 积聚参与氮代谢相关的基因表达调控, 如在天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、委内瑞

拉链霉菌(*S. venezuelae*)和人源肺结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)等之中^[29]。当氮源缺乏时, GlnR 通过抑制 Ects 的生物合成, 以维持胞内谷氨酸代谢池的平衡, 减少细菌 *S. coelicolor* 对环境氮源的消耗需求。在链霉菌双因子组分系统中, GlnR 是典型的应答调节蛋白, 属于 OmpR 家族调节子成员, 包括至少 15 个基因编码的蛋白质(主要是酶), 涉及参与氮源摄取、信号传感(*amtB-glnK-glnD*)、氮源选择性利用(*nirB*、*nasA* 和 *ureA*)以及 Glu/Gln 生物合成(*glnA*、*glnII* 和 *gdhA*)^[30]。Shao 等^[31]研究发现 GlnR 也是菌株 *S. coelicolor* 胞内 Ects 生物合成操纵子(*ectABCD*-operon)的转录负性调节因子。在 *S. coelicolor* 中, GlnR 能够直接结合 *ect*-operon 的启动子(-204 到 -153 区域), 参与 Ects 生物合成的负调控。又如在地中海拟无枝酸菌 *Amycolatopsis mediterranei* 和阿维链霉菌 *S. avermitilis* 中, GlnR 也能够直接结合 *ect*-operon 的启动子(分别是-45 到-3 区域和 -89 到-47 区域), 从而负调控 Ects 的生物合成。

1.5 大肠杆菌(*Escherichia*)与调节因子 RpoS

早期研究证实, RpoS 是大肠杆菌(*E. coli*)应激反应(如高渗透压、高盐或低温等)的主要调节因子, 参与环境胁迫相关的诸多基因转录调控^[32]。Salvador 等^[33]在需盐色盐杆菌(*C. salexigens*)也发现 RpoS 调节因子的存在, 参与 Ectoine 的生物合成调控。在 *C. salexigens* 中, RpoS 虽不是参与渗透压或高温应急反应的主要调节因子, 但可激活 *ect*-operon 基因簇的转录, 启动 Ectoine 的生物合成, 促进细胞抵抗低盐-高盐渗透压的冲击变化。RpoS 不仅参与了低盐度下细胞 *ectA* 基因的转录激活, 还可能参与翻译后的加工调控, 促进 Ectoine 的生物合成, 但在高盐度下 *ectA* 基因的

诱导表达,受非 RpoS 因子(ρ^S)依赖的作用机制介导。此外,Chen 等^[34]利用系统工程化原理改造大肠杆菌 *E. coli*,对参与 L-阿拉伯糖分解代谢的调节基因 *araC* 进行人工突变处理,结果显示 AraC 突变蛋白能特异识别并激活 *ect* 操纵子转录,从而促进 Ectoine 的生物合成。

2 Ects 吸收与转运的分子调节机制

2.1 盐单胞菌(*Halomonas*)与 TeaABCD 吸收系统

延长盐单胞菌(*H. elongate* DSM2581^T)中存在一种新型的渗透调节摄取与转运系统,称之为 TeaABC (Transporter of ectoine accumulation ABC),参与 Ectoine 的吸收和排泄,甚至调节 Ectoine 的生物合成^[35]。转运系统 TeaABC 与 TRAP-T 转运体家族,具有高度的序列和结构相似性,隶属于 TRAP-T 转运体家族成员,参与渗透压调节。TeaABC 是由 3 个独立的 ATP 结合胞质转运蛋白构成,包括底物结合蛋白 TeaA (38.24 kDa, 编码基因 1023 bp)、跨膜蛋白 TeaC (分子量 44.93 kDa, 基因 1281 bp)和跨膜蛋白 TeaB (22.17 kDa, 基因 603 bp)。转运蛋白体系 TeaABC 对 Ects 分子具有高亲和力(5-HE $K_d=21.7 \mu\text{mol/L}$; Ectoine $K_d=21.7 \mu\text{mol/L}$),不仅能摄取外源 Ects 进入胞内,还可通过细胞膜排泄内源性 Ects 至胞外^[35]。

此外, Schweikhard 等^[36]还在 *H. elongata* DSM 2581^T 中发现第 4 个 TRAP-T 转运体蛋白 TeaD,具有应激蛋白特性。TeaD 蛋白是一种 ATP 结合蛋白,分子量 15.5 kDa,每个单体亚基可结合 1 个 ATP,由 4 个亚基构成二聚体-二聚体组合复合体,整体形成 Rossmann 样的 R/ β 折叠结构。*teaD* 基因位于 *teaC* 基因的下游区域,RT-PCR 实

验证明基因 *teaD* 与 *teaABC* 基因簇共转录。若 TeaD 缺失,则导致转运系统 TeaABC 增加摄取 Ectoine,推断 TeaD 可能参与 TeaABC 转运 Ectoine 的负性调节^[35]。

2.2 鲁杰氏菌(*Ruegeria*)和 UehA 诱导吸收

Moran 等报道^[37]海洋细菌 *Ruegeria* (原 *Silicibacter*) *pomeroyi* DSS-3 能够有效摄取外源 Ects,作为细胞生存的唯一碳源和氮源营养,而不以 Ects 作为渗透压保护剂。分析表明 DSS-3 菌株通过 UehABC (Uptake ectoine-hydroxyectoine ABC) 转运体系诱导吸收外源性 Ects,不是采用常见的渗透压胁迫吸收系统 TeaABC 进行。UehABC 转运体对 Ects 具有高亲和力 and 转运活性,Ectoine 和 5-HE 的 K_d 值分别为 $1.4\pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ 和 $1.1\pm 0.1 \mu\text{mol/L}$,主要由 UehA 蛋白诱导结合底物 Ectoine,并形成 UehA-Ectoine 复合物。Lecher 等^[38]已证明 UehA 是一种 Ects 特异性底物结合蛋白,分子量为 34 kDa,具有两个结构域,结构域 I 包含 6 个 α 螺旋,而结构域 II 则包含 8 个 α 螺旋和 1 个 β 折叠,两个结构域的中心区域由 5 个反向平行的 β -折叠相连接构成。氨基酸相似性分析显示,*R. pomeroyi* DSS-3 的 UehA 蛋白与盐单胞菌 *H. elongata* 的 TeaA 蛋白氨基酸序列相似度 62%;小亚基 UehB 与 TeaB 的相似度 56%,大亚基 UehC 与 TeaC 的相似度 74%,由此表明转运体系 UehABC 和 TeaABC 可能具有一定的功能关联性和进化同源^[39]。

此外,Lecher 等^[38]深入分析菌株 DSS-3 的 Ects 摄取和分解代谢基因簇,发现 13 个相关基因聚集(*uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*)组成 3 个功能模块(图 2): (1) 第 1 模块基因簇 *uehABC* 编码 TRAP 转运家族蛋白成员,其中底物结合蛋

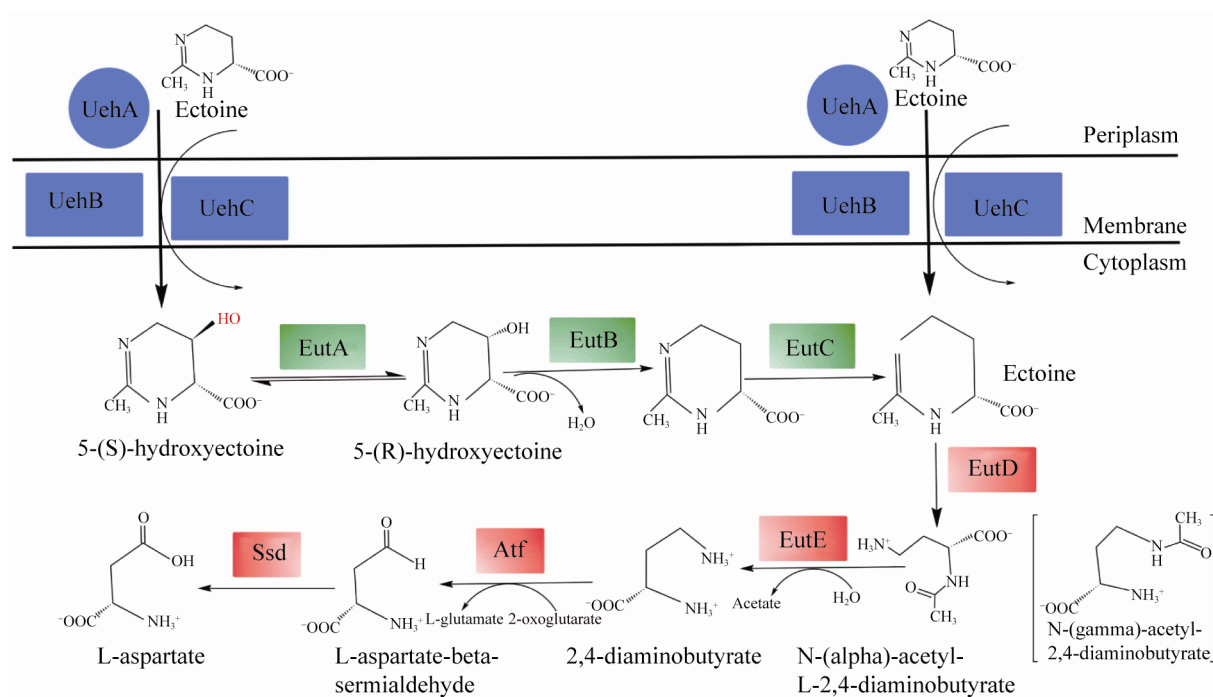


图 2. 鲁杰氏菌 Ectoine 与 5-HE 分解代谢途径^[56]

Figure 2. The catabolic pathway of ectoine and 5-HE in the genus *Ruegeria*^[56].

白(UehA)与 Ectoine/5-HE 特异性结合形成底物-蛋白复合物; (2) 第 2 个模块基因簇 *eutABC*, 3 个基因编码 5-HE 脱羟基生成 Ectoine 所必需的酶蛋白 EutA、EutB 和 EutD; (3) 第 3 个模块是基因簇 *eutDE-ssd-atf*, 编码水解 Ectoine 外环的氨肽酶 (EutD), 以及参与中间产物 N_{α} -乙酰基-L-2,4-二氨基丁酸(N_{α} -ADABA)进一步分解为 L-天冬氨酸的酶类(EutE、Ssd 和 Atf)。

2.3 色盐杆菌(*Chromohalobacter*)与 EupR 吸收

色盐杆菌 *C. salexigens* 是典型的中度嗜盐模式细菌, 隶属 γ -变形杆菌纲, 能够渗透摄取和转运 Ectoine, 作为碳源营养和渗透压保护剂。Rodríguez-Moya 等^[40]研究发现 *C. salexigen* 胞内摄取 Ectoine 与 EupR 蛋白密切相关。EupR 蛋白可能归属于细胞膜信号双因子组分, 与固氮双因子系统 LuxR (NarL/FixJ)的 C 末端具有类似的蛋

白-DNA 结合结构域, 即为螺旋-转角-螺旋。在低盐度下, EupR 能够对胞外 Ectoine 进行渗透摄取与转运, 并作为唯一碳源加以利用, 但摄取 Ectoine 的具体调控机制尚不明确, 有待深入研究。同时, 发现基因 *eupR* 的下游基因编码同源的组氨酸蛋白激酶(Histidine protein kinases, HPK)。典型 HPK 是一个跨膜受体, 由氨基末端的胞外感受区和 C 末端的胞内信号区域组成, 多以二聚体形式存在。HPK 可能是 EupR 的分子传感伴侣, 参与感知外部(如离子梯度、膨胀应力与运输)和内部(如细胞质溶质或蛋白质、氧化还原状态)的信息, 并进行整合传递。

2.4 大肠杆菌(*Escherichia*)与 ProU/P 转运吸收系统

大肠杆菌 *E. coli* 的细胞膜上存在转运系统 ProU 和转运蛋白 ProP (图 3), 参与 Ectoine 渗透

吸收,前者隶属于 ABC 转运家族系统(ATP binding cassette),而后者隶属主要易化子超家族 MFS (Major facilitator superfamily)的转运蛋白^[41]。转运系统 ProU 是由 3 个结构基因组成的 *proVWX* 操纵子转录表达,并组装形成结合蛋白转运系统,其转录水平受到胞内渗透压升高和胞外谷氨酸钾的诱导^[42]。转运系统 ProU 具有高亲和力特性,其中组分 ProV 蛋白属于 ATP 结合盒超家族成员(ATP-binding cassette [ABC] superfamily),参与水解 ATP,为底物转运提供能量;组分 ProX 是周质可溶性底物结合蛋白,参与结合和转运甘氨酸甜菜碱至内膜蛋白 ProW^[42]。ProP 转运蛋白属于次级转运系统,具有低亲和力特性,主要参与 Ectoine 的摄取和转运。ProP 蛋白具有跨膜整合结构域和胞质 C-末端结构域,前者由小周质环和大胞质环组成,而后者相比于其他非渗透压信

号(或同源)感应受体,C-末端结构域通常较大^[43]。

ProP 和 ProU 均可转运各种相容溶质,如渗透保护剂脯氨酸、甘氨酸甜菜碱、 γ -丁基甜菜碱和 Ectoine 等,但二者在渗透压保护剂的转运选择方面存在明显差异。当渗透保护剂浓度低于 200 nmol/L 时,ProU 基因缺陷菌株不能在高渗环境中生存,而 ProP 基因缺陷株则能适应生存,由此表明 *E. coli* 的转运系统 ProU 主要参与自然状态下(或低浓度 Ectoine)的相容溶质渗透和吸收,而转运蛋白 ProP 可能在高渗情况下发挥其转运功能^[43]。当外界渗透压剧增时,外源性 Ectoine 通过细胞壁上膜孔蛋白(OmpC)扩散进入壁膜周质空间,再由细胞膜上的转运系统 ProU 和 ProP 实现胞内 Ectoine 积累,以响应外界的高渗环境刺激^[44]。此外,Choquet 等^[45]在菊欧文氏杆菌(*Erwinia chrysanthemi*)中也发现两种渗透转运体:

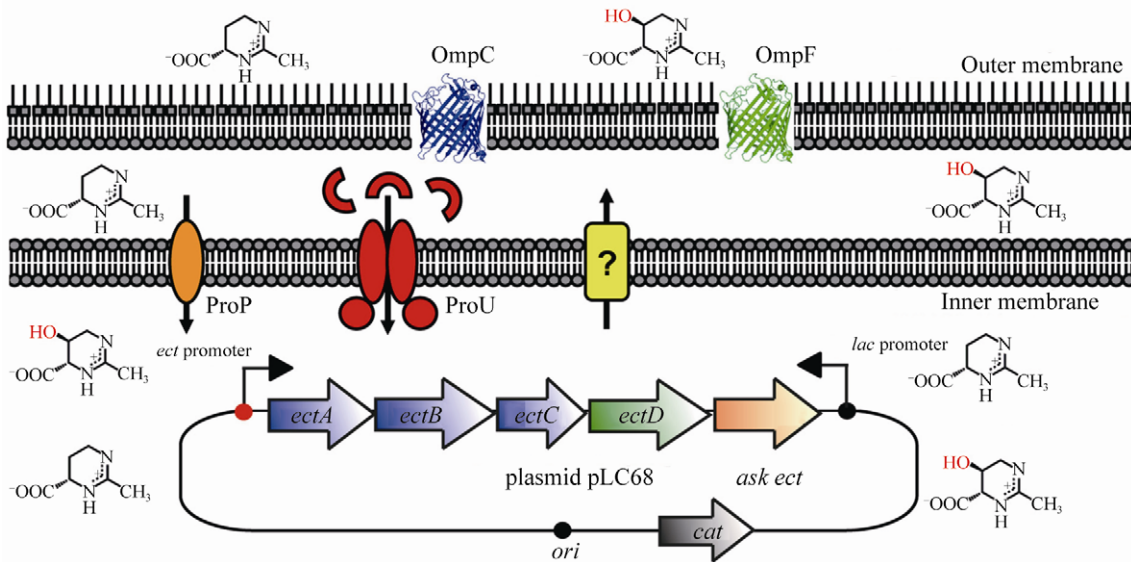


图 3. 转运吸收系统 ProU 与 ProP 调控模式^[41]

Figure 3. Regulation mode of transport absorption system by ProU and ProP^[41]. The *E. coli* cell factory carries a low-copy-number plasmid (*pLC68*) harboring the *ectABCD-ask* genes cluster and the *lac* promoter. ProP and ProU are osmotically inducible transport systems for osmoprotectants. ProP is a member of the MFS family, and ProU is a binding-protein-dependent ABC transporter. The trimeric OmpC and OmpF proteins function as general porins that are inserted into the *E. coli* outer membrane.

即 ABC 转运家族系统 OusB 和 MFS 转运家族蛋白 OusA, 均参与 Ectoine 的渗透吸收。其中, 转运系统 OusB 由 3 个结构基因(*ousV*、*ousW* 与 *ousX*) 编码表达, 其蛋白产物组分(OusVWX)与 *E. coli* 的 ProU 组分(ProVWX)具有高度的序列相似性。

2.5 嗜盐菌(*Marinococcus*)与 EctM 渗透吸收

嗜盐嗜盐菌(*Marinococcus halophilus*)通过从头合成或从胞外摄取 Ectoine, 以应对渗透压胁迫。Kunte 等^[46]发现 *M. halophilus* DSM20408^T 存在相容溶质转运系统 EctM, 参与外源 Ectoine 的渗透摄取与转运。蛋白序列相似性显示, EctM 隶属于 BCCT 转运家族成员(Betaine-carnitine-choline transporter)。BCCT 家族成员广泛分布于细菌和古生菌两域, 常采用 H⁺/Na⁺驱动力激活, 或由 Na⁺同向共转运体系协同参与三甲胺类化合物的吸收与转运, 如甘氨酸甜菜碱与肉毒碱等。然而, 研究发现 EctM 是第一个不能转运三甲基铵化合物的 BCCT 成员, 可能仅是一种高度专一性的 Ectoine/5-HE 转运蛋白。疏水蛋白 EctM 分子量为 58.48 kDa, 由 525 个氨基酸残基组成, 其中非极性氨基酸残基约占 62.9%, 其 C 末端含有超过 50% 极性氨基酸(包括 7 个 Glu、2 个 Asp、3 个 Lys 和 7 个 Asn 残基)。EctM 转运系统对 Ectoine 具有高亲和力, $K_d = 1.6 \mu\text{mol/L}$ 。当盐度升高时, EctM 立即吸收并累积 Ectoine 至最大浓度, 以应对外界环境的渗透压胁迫。

2.6 棒状杆菌(*Corynebacterium*)与 ProP/EctP/LcoP 转运系统

Peter 等^[47]研究发现谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中存在两种 Ects 渗透转运系统: 转运蛋白 ProP 与 EctP。转运蛋白 ProP 是一种次级转运系统, 属于主要的易化子超家

族 MFS 成员, 具有中等亲和力特性, 参与转运脯氨酸($K_d=48 \mu\text{mol/L}$)和 Ectoine ($K_d=132 \mu\text{mol/L}$)。ProP 可能是通过 C 末端结构域参与渗透压胁迫感知, 但具体机制尚不明确。转运蛋白 EctP 属于 Na⁺-协同转运超家族 SSSS (Sodium-solute symporter superfamily)亚类成员, 同时可协助和参与多种相容溶质的跨膜转运, 但总体亲和力偏低, 其中 Ectoine 的亲和力最大($K_d=63 \mu\text{mol/L}$), 可能是 Ectoine 的最佳渗透调节和运载体。EctP 是一个双功能蛋白质, 约 12 个氨基酸肽段的 C 末端结构域可以感知环境渗透压的变化, 而 N 末端则负责控制 Ectoine 转运起始和调节渗透压平衡。EctP 对外界渗透压的变化不能立即作出反应, 跨膜转运 Ects 的起始应答时间大约需要 10 s。此外, Steger 等^[48]通过构建 *C. glutamicum* ATCC13032 渗透相关基因(*betP*、*putP*、*proP* 和 *ectP*)缺失的突变菌株, 结果显示甜菜碱和 Ectoine 仍有较低的摄取率, 从而发现一个低通量渗透调节通透酶(LcoP), 参与相容溶质的摄取与转运。LocP 蛋白共有 630 个氨基酸残基, 属于 BCCT 家族成员。基因 *locP* 的转录与表达严格依赖于外界渗透压的变化。

2.7 枝芽孢杆菌(*Virgibacillus*)与 EctT/OpuC 渗透吸收

泛酸枝芽孢杆菌 *Virgibacillus* (原 *Bacillus pantothenicus*) 是革兰阳性土壤细菌, 通过渗透诱导合成相容溶质脯氨酸和 Ectoine ($K_d=44 \mu\text{mol/L}$), 抵御外界高盐或低温环境(15 °C), 但不会生产 5-HE^[49]。Kuhlmann 等^[50]证实外源性 Ectoine/5-HE 能够作为 *V. pantothenicus* 的渗透保护剂, 发现胞内存在一种相容溶质摄取与转运蛋白 EctT。EctT 分子量 55.1 kDa, 由 501 个氨基酸残基组成,

属于 BCCT 家族成员。EctT 可优先摄取 Ectoine/5-HE, 而对脯氨酸和甘氨酸甜菜碱具有较小的摄取活性。基因 *ectT* 的转录调控主要由原核 σ^B (σ^B) 启动因子介导, 从而促进 Ects 摄取转运^[50]。 σ^B 属于杆菌常见的主要应激调节因子, 可转录启动细胞抵抗各种极端环境的胁迫, 如高盐、低温或乙醇压力等。EctT 的氨基酸序列与 EctM 转运蛋白的氨基酸序列(源自 *M. halophilus* DSM20408T)相似度为 49%, 与 EctP 双功能蛋白质的氨基酸序列(来自 *C. glutamicum*)相似度为 32%, 但 EctT 的底物谱(Ectoine, 甘氨酸甜菜碱和脯氨酸)却最接近于后者 EctP^[50]。

此外, 在枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[51]和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[52]中, 还发现一种隶属于 ABC 转运家族成员的 OpuC 蛋白, 参与摄取外源 Ectoine。OpuC 蛋白是一个多组分组成的 ATP 依赖性转运系统, 包括底物结合蛋白 OpuC、跨膜通道 OpuCB/OpuCD 以及 ATP 水解酶 OpuA。除了协助 Ectoine 的跨膜转运, OpuC 还能转运其他多种相容溶质, 如甜菜碱和胆碱等。

3 Ects 分解代谢的分子调控机制

3.1 根瘤菌(*Sinorhizobium*)分解代谢 Ectoine 与 EhuR 调控

Ectoine 是苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)主要的渗透压保护剂, 能够被分解利用, 而胞内不会维持高浓度的积累量。Jebbar 等^[53]发现 *S. meliloti* 连锁的基因簇 *ehuABCD-eutABCDE* 操纵子, 参与 Ectoine 摄取和分解代谢, 其中由 4 个基因(*ehuA*、*ehuB*、*ehuC* 和 *ehuD*)编码隶属于 ABC 转运家族成员的相关蛋白, 负责 Ectoine 的摄入(其中蛋白 EhuB 结合的 Ectoine 和 5-HE 亲和力常数 K_d

分别 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$), 而 *eutABCD* 基因簇编码涉及 Ects 分解代谢的相关酶类。基因相似性分析显示, *eutABCDE* 操纵子的部分结构基因与 *doeABCD* 操纵子(源自 *H. elongata*)的相关基因同源^[7], 其中 *eutD* 与 *doeA*、*eutE* 与 *doeB* 同源, *eutA* 并未发现同源基因; 基因簇 *eutBC* 与基因簇 *eutDE* 被 3 个 ORF 所隔开, 其 ORF 分别编码同源的转录调节因子 DoeX (基因 *doeX* 位于 *doeB* 与 *doeC* 之间)、脱氢酶 DoeC 和转氨酶 DoeD。然而, 在菌株 *S. meliloti* 中, *ehuABCD-eutABCDE* 操纵子主要由 Ectoine 诱导表达, 而非其他渗透压保护剂。

此外, Jebbar 等^[53]研究认为 *ehuABCD-eutABCDE* 基因簇的转录表达受到底物诱导启动, 而不是由渗透压升高激发所致。Yu 等^[54]研究发现在 *S. meliloti* 中存在一种新型的负性调节因子 EhuR, 参与 Ectoine 的吸收和分解代谢。EhuR 属于 MocR (Probable rhizopine catabolism regulator) 转录调节因子家族成员, MocR 亚家族又隶属 GntR (Gluconate regulator) 超家族, 通常具有螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)的 DNA 结合域和效应物结合域^[55]。EhuR 分子量为 50.2 kDa, 由 461 个氨基酸组成, 基因 *ehuR* 位于 *ehuABCD-eutABCDE* 操纵子的上游区域, 与基因簇共转录表达。当胞内 Ectoine 存在时, EhuR 可特异性结合到 *ehuA* 启动子的-35 区域和 *ehuR* 启动子的重叠 DNA 区域(+1 位点), EhuR 与 *ehuA* 启动子的结合亲和力高于 *ehuR* 启动子, 从而抑制 *ehuABCD-eutABCDE* 操纵子的转录, 调节 Ectoine 的吸收和分解^[54]。底物 Ectoine 与其下游分解产物均可以抑制 EhuR 的 DNA 结合活性, 但 Ectoine 自身的抑制作用能够使细胞快速感应, 有利于启动 Ectoine 的吸收过程。

3.2 鲁杰氏菌(*Ruegeria*)分解代谢 Ectoine 与 EnuR 调控

海洋细菌 *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 中存在多串联的基因簇 *uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf*, 具有 Ectoine 高亲和力, 可被底物诱导, 但不能被高盐渗透刺激^[38](图 3)。同时, Schulz 等^[56]发现上述基因簇的上游区域存在一种调节基因 *enuR*。蛋白 EnuR 隶属 MocR 亚家族/GntR 超家族成员, 分子量 51.97 kDa, 由 464 个氨基酸残基组成。EnuR 蛋白因子具有保守位点 Lys₃₀₂, 可共价结合辅基 5-磷酸-吡哆醛, 参与外源底物 5-HE/Ectoine 的摄取, 并诱导 Ects 分解代谢基因的表达, 实现整个 *uehABC-usp-eutABCDE* 操纵子的诱导转录和表达调控^[55]。Suvorova^[57]等进一步证明, 外源 Ectoine 不仅可作为生长营养源, 还能够诱导和强化 *uehABC-usp-eutABCDE-asnC-ssd-atf* 操纵子的表达。分析显示, 调节基因 *enuR* 与操纵子基因簇 *uehA* 共转录, 该过程由 2 个完全不同的调控启动子所介导, 分别是基因簇上游的底物诱导型启动子和调节基因 *enuR* 的上游启动子。然而, 基因 *enuR* 的启动子属于弱启动子, 与 Ectoine 的存在无直接关系; 相反, 存在于该基因簇前面的启动子, 依赖 EnuR 诱导分解 Ectoine (约 36 倍)。阻遏蛋白 EnuR 与 Ectoine 结合致使构象变化, 操纵序列去阻遏作用, 结构基因簇开放并表达。由于操纵子的诱导激活和表达, 转运系统 UehABC 介导的 Ectoine 摄取转运能力亦同步加强, 进一步强化操纵子中分解代谢基因簇的表达, 直至外源 Ectoine 被完全消耗殆尽。

4 小结

嗜盐或耐盐微生物胞内合成或摄取积聚相

容溶质 Ectoine 与 5-HE, 以应对高盐或超盐等极端环境的渗透压胁迫。然而, 自然界生物多样性丰富, 因物种分歧进化致使个体的 Ects 生物合成、分解代谢以及吸收与转运调控模式或参与因子既具共性特征又存在差异性(表 1)。文献综合分析显示一些转录调控因子积极参与 Ects 生物合成代谢调控, 如 EctR (*Methylobacterium* 和 *Methylophaga*)、CosR (*Vibrio*)、GlnR (*Streptomyces*) 和 RpoS (*Chromohalobacter*)等。具体的调控机制或其他未知的新型调控机制, 有待深入研究。现已报道的 2 个负性调节因子 EhuR (*Sinorhizobium*) 和 EnuR (*Ruegeria*), 积极参与了胞外 Ectoine 摄取与分解代谢调控。外源性 Ects 不仅可作为氮源或碳源供应细胞生长代谢, 而且作为相容溶质参与极端环境胁迫保护。至此, Ects 生物合成代谢调控势必成为今后的研究热点, 尤其涉及正向调控因子重组或构建系统代谢工程菌株, 可为高效积聚 Ects 的策略优化提供新的思考方向。

此外, 涉及 Ects 吸收与转运的研究报道相对较多, 因研究对象的差异, 参与的转运系统/家族成员存在菌株选择的偏好, 或是几种吸收转运系统的共存协同作用, 常见如 TRAP-T 家族(TeaABCD 与 UehABC)、ABC 转运家族(ProU 与 OpuC)、MFS 超家族(ProP)、BCCT 家族(EctM 与 EctT)和 SSSS 超家族(EctP)等。综上所述, 对不同类型微生物的 Ects 代谢调控理论研究, 众多学者已经做了许多广泛和深入的工作, 但涉及 Ects 感应盐环境刺激、Ects 生物合成的应答启动、关联基因的网络调控以及多组学共现性分析(转录组、蛋白组与代谢组)方面, 尚有待深入研究, 尤其是涉及到的新型/未知调节因子的发现与调控机理。

表 1. Ects 生物合成与分解代谢及吸收转运的相关因子
Table 1. Factors related to Ects biosynthesis, catabolism, absorption and transport

Factor	Strain type	Function	Reference
EctR	<i>M. alcaliphilum</i> 20Z, <i>M. thalassica</i>	Inhibits <i>ectABC-ask</i> operon transcription	[23–24]
CosR	<i>V. cholerae</i>	Inhibits and regulates <i>ectABC</i>	[27]
GlnR	<i>S. coelicolor</i> , <i>A. mediterranei</i> , <i>S. avermitilis</i>	Inhibit the transcription regulation of <i>ectABCD</i>	[30]
RpoS	<i>C. salexigens</i>	Promotes <i>ectABC</i> expression	[32]
AraC (mutation)	<i>E. coli</i>	Activates <i>ect</i> gene cluster transcription	[34]
TeaABCD	<i>H. elongata</i> DSM2581 ^T	Absorption and synthesis of Ects	[35–36]
UehA	<i>S. pomeroyi</i> DSS-3	Induces absorption and synthesis of Ects	[38]
EupR	<i>C. salexigens</i>	Osmotic absorption ectoine	[40]
ProP	<i>E. coli</i> , <i>C. glutamicum</i>	Osmotic absorption ectoine	[41–42,47]
ProU	<i>E. coli</i>	Osmotic absorption ectoine	[37,41,43]
OusB	<i>E. chrysanthemi</i>	Osmotic absorption ectoine	[45]
OusA	<i>E. chrysanthemi</i>	Osmotic absorption ectoine	[45]
EctM	<i>M. halophilus</i> DSM20408	Osmotic absorption Ects	[46]
EctP	<i>C. glutamicum</i>	Osmotic absorption ectoine	[47]
LcoP	<i>C. glutamicum</i>	Osmotic absorption ectoine	[48]
EctT	<i>V. pantothenicus</i>	Osmotic absorption ectoine	[50]
OpuC	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	Absorption and synthesis of Ects	[51–52]
EhuR	<i>S. meliloti</i>	Absorption synthesis and catabolism of ectoine	[54]
EnuR	<i>R. pomeroyi</i> DSS-3	Absorption synthesis and catabolism of ectoine	[56]

参 考 文 献

- [1] Zhu DR, Han R, Shen GP, Long QF, Li DD, Liu J, Liu DL. Recombinant co-expression of the Ectoine biosynthesis gene cluster *ectABC* in *Halomonas* from Qinghai Lake. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 358–367. (in Chinese)
朱德锐, 韩睿, 沈国平, 龙启福, 李丹丹, 刘建, 刘德立. 青海湖盐单胞菌 Ectoine 合成基因簇 *ectABC* 的重组共表达. *水生生物学报*, 2015, 39(2): 358–367.
- [2] Galinski EA, Pfeiffer HP, Trüper HG. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid: a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 149(1): 135–139.
- [3] Zhang X, Liu J, Zhu DR. Review on bioengineering and biomedical applications of natural products Ectoine and Hydroxyectoine. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(5): 882–887. (in Chinese)
张欣, 刘静, 朱德锐. 天然产物 Ectoine 与 Hydroxyectoine 的生物工程及医学应用研究进展. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(5): 882–887.
- [4] Ning YK, Wu XJ, Zhang CL, Xu QY, Chen N, Xie XX. Pathway construction and metabolic engineering for fermentative production of ectoine in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2016, 36: 10–18.
- [5] Piubeli F, Salvador M, Argandoña AM, Nieto JJ, Bernal V, Pastor JM, Cánovas M, Vargas C. Insights into metabolic osmoadaptation of the ectoines-producer bacterium *Chromohalobacter salexigens* through a high-quality genome scale metabolic model. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 2.
- [6] Zaccari G, Bagyan I, Combet J, Cuello GJ, Demé B, Fichou Y, Gallat FX, Galvan Josa VM, von Gronau S, Haertlein M, Martel A, Moulin M, Neumann M, Weik M, Oesterhelt D. Neutrons describe ectoine effects on water H-bonding and hydration around a soluble protein and a cell membrane. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 31434.
- [7] Schwibbert K, Marin-Sanguino A, Bagyan I, Heidrich G, Lentzen G, Seitz H, Rampp M, Schuster SC, Klenk HP, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Kunte HJ. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 1973–1994.
- [8] Salvador M, Argandoña M, Naranjo E, Piubeli F, Nieto JJ,

- Csonka LN, Vargas C. Quantitative RNA-seq analysis unveils osmotic and thermal adaptation mechanisms relevant for ectoine production in *Chromohalobacter salexigens*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1845.
- [9] Czech L, Höppner A, Kobus S, Seubert A, Riclea R, Dickschat JS, Heider J, Smits SHJ, Bremer E. Illuminating the catalytic core of ectoine synthase through structural and biochemical analysis. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 364.
- [10] Widderich N, Kobus S, Höppner A, Riclea R, Seubert A, Dickschat JS, Heider J, Smits SHJ, Bremer E. Biochemistry and crystal structure of ectoine synthase: a metal-containing member of the cupin superfamily. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151285.
- [11] León MJ, Hoffmann T, Sánchez-Porro C, Heider J, Ventosa A, Bremer E. Compatible solute synthesis and import by the moderate halophile *Spiribacter salinus*: physiology and genomics. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 108.
- [12] Richter AA, Mais CN, Czech L, Geyer K, Hoepfner A, Smits SHJ, Erb TJ, Bange G, Bremer E. Biosynthesis of the stress-protectant and chemical chaperone ectoine: biochemistry of the transaminase EctB. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2811.
- [13] Czech L, Stöveken N, Bremer E. EctD-mediated biotransformation of the chemical chaperone ectoine into hydroxyectoine and its mechanosensitive channel-independent excretion. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 126.
- [14] Harding T, Brown MW, Simpson AGB, Roger AJ. Osmoadaptative strategy and its molecular signature in obligately halophilic heterotrophic protists. *Genome Biology and Evolution*, 2016, 8(7): 2241–2258.
- [15] Carlson RP, Oshota O, Shipman M, Caserta JA, Hu P, Saunders CW, Xu J, Jay ZJ, Reeder N, Richards A, Pettigrew C, Peyton BM. Integrated molecular, physiological and in silico characterization of two *Halomonas* isolates from industrial brine. *Extremophiles*, 2016, 20(3): 261–274.
- [16] Chen YH, Lu CW, Shyu YT, Lin SS. Revealing the saline adaptation strategies of the halophilic bacterium *Halomonas beimenensis* through high-throughput omics and transposon mutagenesis approaches. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 13037.
- [17] Lehigh KM, West KM, Ginty DD. Retrogradely transported TrkA endosomes signal locally within dendrites to maintain sympathetic neuron synapses. *Cell Reports*, 2017, 19(1): 86–100.
- [18] Belda E, van Heck RGA, José Lopez-Sanchez M, Cruveiller S, Barbe V, Fraser C, Klenk HP, Petersen J, Morgat A, Nickel PI, Vallenet D, Rouy Z, Sekowska A, Martins Dos Santos VAP, de Lorenzo V, Danchin A, Médigue C. The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(10): 3403–3424.
- [19] Germain E, Guiraud P, Byrne D, Douzi B, Djendli M, Maisonneuve E. YtfK activates the stringent response by triggering the alarmone synthetase SpoT in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5763.
- [20] Webb HE, Bugarel M, den Bakker HC, Nightingale KK, Granier SA, Scott HM, Loneragan GH. Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the high plains region of the USA. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147363.
- [21] Fröbel J, Blümmel AS, Drepper F, Warscheid B, Müller M. Surface-exposed domains of TatB involved in the structural and functional assembly of the Tat translocase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(38): 13902–13914.
- [22] Wang WW, Liu PF, Lu Q, Ling XF, Zhang JW, Chen MS, Chen H, Chen XM. Potential pathways and genes involved in *lac* synthesis and secretion in *Kerria chinensis* (Hemiptera: Kerriidae) based on transcriptomic analyses. *Insects*, 2019, 10(12): 430.
- [23] Mustakhimov II, Reshetnikov AS, Glukhov AS, Khmelenina VN, Kalyuzhnaya MG, Trotsenko YA. Identification and characterization of EctR1, a new transcriptional regulator of the ectoine biosynthesis genes in the halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(2): 410–417.
- [24] Mustakhimov II, Reshetnikov AS, Fedorov DN, Khmelenina VN, Trotsenko YA. Role of EctR as transcriptional regulator of ectoine biosynthesis genes in *Methylophaga thalassica*. *Biochemistry (Moscow)*, 2012, 77(8): 857–863.

- [25] Czech L, Hermann L, Stöveken N, Richter AA, Höppner A, Smits SHJ, Heider J, Bremer E. Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes*, 2018, 9(4): 177.
- [26] Meyer S, Schröter MA, Hahn MB, Solomun T, Sturm H, Kunte HJ. Ectoine can enhance structural changes in DNA *in vitro*. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 7170.
- [27] Shikuma NJ, Davis KR, Fong JNC, Yildiz FH. The transcriptional regulator, CosR, controls compatible solute biosynthesis and transport, motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(5): 1387–1399.
- [28] Xu L, Ye KX, Dai WH, Sun C, Xu LH, Han BN. Comparative genomic insights into secondary metabolism biosynthetic gene cluster distributions of marine *Streptomyces*. *Marine Drugs*, 2019, 17(9): 498.
- [29] Jiang H, Tian J, Ying B, Wu NF, Xu B. Research progress on GlnR-mediated regulation. *Current Biotechnology*, 2014, 4(2): 90–95. (in Chinese)
江湖, 田健, 应碧, 伍宁丰, 徐波. GlnR 介导的代谢调控研究进展. *生物技术进展*, 2014, 4(2): 90–95.
- [30] He JM, Zhu H, Zheng GS, Liu PP, Wang J, Zhao GP, Zhu GQ, Jiang WH, Lu YH. Direct involvement of the master nitrogen metabolism regulator GlnR in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(51): 26443–26454.
- [31] Shao ZH, Deng WX, Li SY, He JM, Ren SX, Huang WR, Lu YH, Zhao GP, Cai ZM, Wang J. GlnR-mediated regulation of *ectABCD* transcription expands the role of the GlnR regulon to osmotic stress management. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(19): 3041–3307.
- [32] Hui S, Silverman JM, Chen SS, Erickson DW, Basan M, Wang JL, Hwa T, Williamson JR. Quantitative proteomic analysis reveals a simple strategy of global resource allocation in bacteria. *Molecular Systems Biology*, 2015, 11(2): 784.
- [33] Salvador M, Argandoña M, Pastor JM, Bernal V, Cánovas M, Csonka LN, Nieto JJ, Vargas C. Contribution of RpoS to metabolic efficiency and ectoines synthesis during the osmo- and heat-stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Environmental Microbiology Reports*, 2015, 7(2): 301–311.
- [34] Chen W, Zhang S, Jiang PX, Yao J, He YZ, Chen LC, Gui XW, Dong ZY, Tang SY. Design of an ectoine-responsive AraC mutant and its application in metabolic engineering of ectoine biosynthesis. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 149–155.
- [35] Grammann K, Volke A, Kunte HJ. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(11): 3078–3085.
- [36] Schweikhard ES, Kuhlmann SI, Kunte HJ, Grammann K, Ziegler CM. Structure and function of the universal stress protein TeaD and its role in regulating the ectoine transporter TeaABC of *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Biochemistry*, 2010, 49(10): 2194–2204.
- [37] Moran MA, Buchan A, González JM, Heidelberg JF, Whitman WB, Kiene RP, Henriksen JR, King GM, Belas R, Fuqua C, Brinkac L, Lewis M, Johri S, Weaver B, Pai G, Eisen JA, Rahe E, Sheldon WM, Ye WY, Miller TR, Carlton J, Rasko DA, Paulsen IT, Ren QH, Daugherty SC, Deboy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Nelson WC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Haft DH, Selengut J, Ward N. Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature*, 2004, 432(7019): 910–913.
- [38] Lecher J, Pittelkow M, Zobel S, Bursy J, Bönig T, Smits SHJ, Schmitt L, Bremer E. The crystal structure of UehA in complex with ectoine-A comparison with other TRAP-T binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 389(1): 58–73.
- [39] Kuhlmann SI, Terwisscha van Scheltinga AC, Bienert R, Kunte HJ, Ziegler C. 1.55 Å structure of the ectoine binding protein TeaA of the osmoregulated TRAP-transporter TeaABC from *Halomonas elongata*. *Biochemistry*, 2008, 47(36): 9475–9485.
- [40] Rodríguez-Moya J, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Iglesias-Guerra F, Jebbar M, Vargas C. Involvement of EupR, a response regulator of the NarL/FixJ family, in the control of the uptake of the compatible solutes ectoines by the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *BMC Microbiology*,

- 2010, 10(1): 256.
- [41] Czech L, Poehl S, Hub P, Stöveken N, Bremer E. Tinkering with osmotically controlled transcription allows enhanced production and excretion of ectoine and hydroxyectoine from a microbial cell factory. *Applied & Environmental Microbiology*, 2017, 84(2): e01772-17.
- [42] Mahmoud RY, Li WQ, Eldomany RA, Emara M, Yu J. The *Shigella* ProU system is required for osmotic tolerance and virulence. *Virulence*, 2017, 8(4): 362–374.
- [43] Culham DE, Shkel IA, Record MT Jr, Wood JM. Correction to “Contributions of coulombic and hofmeister effects to the osmotic activation of *Escherichia coli* transporter ProP”. *Biochemistry*, 2018, 57(33): 5072.
- [44] Cosquer A, Pichereau V, Pocard JA, Minet J, Cormier M, Bernard T. Nanomolar levels of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and glycine betaine are sufficient to confer osmoprotection to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3304–3311.
- [45] Choquet G, Jehan N, Pissavin C, Blanco C, Jebbar M, OusB, a broad-specificity ABC-Type transporter from *Erwinia chrysanthemi*, mediates uptake of glycine betaine and choline with a high affinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 3389–3398.
- [46] Vermeulen V, Kunte HJ. *Marinococcus halophilus* DSM 20408^T encodes two transporters for compatible solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM. *Extremophiles*, 2004, 8(3): 175–184.
- [47] Peter H, Weil B, Burkovski A, Krämer R, Morbach S. *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(22): 6005–6012.
- [48] Steger R, Weinand M, Krämer R, Morbach S. LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Letters*, 2004, 573(1/3): 155–160.
- [49] Kuhlmann AU, Bursy J, Gimpel S, Hoffmann T, Bremer E. Synthesis of the compatible solute ectoine in *Virgibacillus pantothenicus* is triggered by high salinity and low growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14): 4560–4563.
- [50] Kuhlmann AU, Hoffmann T, Bursy J, Jebbar M, Bremer E. Ectoine and hydroxyectoine as protectants against osmotic and cold stress: uptake through the sigB-controlled betaine-choline-carnitine transporter-type carrier EctT from *Virgibacillus pantothenicus*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 4699–4708.
- [51] Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, Smith LT. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, 130(3): 437–460.
- [52] Schuster CF, Bellows LE, Tosi T, Campeotto I, Corrigan RM, Freemont P, Gründling A. The second messenger c-di-AMP inhibits the osmolyte uptake system OpuC in *Staphylococcus aureus*. *Science Signaling*, 2016, 9(441): ra81.
- [53] Jebbar M, Sohn-Bösser L, Bremer E, Bernard T, Blanco C. Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(4): 1293–1304.
- [54] Yu QL, Cai HL, Zhang YF, He YZ, Chen LC, Merritt J, Zhang S, Dong ZY. Negative regulation of ectoine uptake and catabolism in *Sinorhizobium meliloti*: characterization of the EhuR gene. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(1): e00119-16.
- [55] Suvorova IA, Korostelev YD, Gelfand MS. GntR family of bacterial transcription factors and Their DNA Binding Motifs: Structure, Positioning and Co-Evolution. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0132618.
- [56] Schulz A, Stöveken N, Binzen IM, Hoffmann T, Heider J, Bremer E. Feeding on compatible solutes: a substrate-induced pathway for uptake and catabolism of ectoines and its genetic control by EnuR. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(3): 926–946.
- [57] Suvorova IA, Rodionov DA. Comparative genomics of pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcription factor regulons in *Bacteria*. *Microbial Genomics*, 2016, 2(1): e000047.

Metabolic regulation of compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine

Fang Zhang, Guoping Shen, Yongzhen Li, Derui Zhu*

Research Center of Basic Medical Science, Medical College, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai Province, China

Abstract: Ectoine and its derivative 5-hydroxyectoine (5-HE) are compatible solutes synthesized intracellularly by halophiles in response to high salinity/osmolarity, heat, freezing, and dryness extremes. They have drawn a lot of attention lately due to their protective effects on maintaining cell survival, membrane integrity, as well as protein and DNA functionality. This article comprehensively reviews the regulatory mechanisms of intracellular biosynthesis and catabolism of ectoine and 5-HE in different types of microorganisms, and summarizes the latest research progress in the regulation of extracellular uptake and transport systems of ectoine and 5-HE. This review may provide a certain theoretical reference for the subsequent optimization of the production and efficient accumulating strategies of ectoine and 5-HE.

Keywords: Ectoine, 5-hydroxyectoine, regulating factor, transcriptional regulation, catabolism, uptake and transport

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760034, 21967018), by the Key Research Foundation of Development and Transformation of Qinghai Province (2019SF121), by the Basic Applied Research Plan of Qinghai Province (2018ZJ778, 2020ZJ767), and by the Team's Research Program of Microbial Resources in Salt-lakes of Qinghai-Tibetan Plateau (2018KYT1)

*Corresponding author. Tel/Fax: + 86-971-6153778; E-mail: zhuderui2005@126.com

Received: 21 November 2019; Revised: 30 January 2020; Published online: 16 June 2020