



严格厌氧菌铁氧还蛋白的研究进展

张屹清, 林路友, 路争*

汕头大学理学院, 生物系, 广东 汕头 515063

张屹清, 林路友, 路争. 严格厌氧菌铁氧还蛋白的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(1): 24–32.

Zhang Yiqing, Lin Luyou, Lu Zheng. Advances of ferredoxins from strictly anaerobic bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 24–32.

摘要: 铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)是一类含有铁硫簇的小分子蛋白质, 广泛存在于自然界中, 参与生物体内的呼吸、发酵、固氮、二氧化碳固定和制氢等生理过程。Fd 对于严格厌氧的细菌尤为重要, 是因为这类细菌的能量代谢高度依赖于低氧化还原电势的生物组分, 而 Fd 能够利用铁硫中心灵活调节其氧还电势, 适应低电势需求。本文选取厌氧细菌来源的 Fd 为对象, 围绕其铁硫簇的结构类型、分类、Fd 的生理功能等, 对相关文献报道进行了总结; 另外, 结合本课题组的研究工作, 文章对近年来 Fd 可能产生活性氧的观点做了讨论。本文将有助于理解 Fd 这类低电势组分对于厌氧细菌的重要性, 也将加深对“活性氧在细菌体内的来源”这一问题的认识。

关键词: 铁氧还蛋白; 严格厌氧菌; 铁硫簇; 活性氧

Advances of ferredoxins from strictly anaerobic bacteria

ZHANG Yiqing, LIN Luyou, LU Zheng*

Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, Guangdong, China

Abstract: Ferredoxins (Fds) are small proteins containing iron-sulfur clusters. They widely exist in nature and participate in biological physiological processes such as respiration, fermentation, nitrogen fixation, carbon dioxide fixation and hydrogen production, etc. Fd is particularly important for strictly anaerobic bacteria, because the energy metabolism of these organisms is highly dependent on biological

基金项目: 国家自然科学基金(31970101); 广东省自然科学基金(2019A1515011685); 汕大科研启动项目(NTF18018)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970101), by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2019A1515011685) and by the Research Start-up Funding of Shantou University (NTF18018)

*Corresponding author. Tel: +86-754-86503157; E-mail: lzhang09@stu.edu.cn

Received: 8 March 2021; Revised: 13 April 2021; Published online: 22 April 2021

components with low redox potential. Fd can flexibly adjust the redox potential by using their iron-sulfur centers to cater to the requirements of different redox potentials. Here, we take the Fd of anaerobic bacteria as examples and summarize related literatures about their structural types and physiological functions. Combined with the relevant work of our group, we dissect the possibility that Fd could produce reactive oxygen species (ROS). It may help to understand the importance of low-potential components such as Fd for anaerobes and could give clues and shed light on the question of intracellular ROS sources.

Keywords: ferredoxin; strictly anaerobic bacteria; iron-sulfur clusters; ROS

严格厌氧的细菌生存于自然界中各种氧气含量极低的环境里, 如哺乳动物的肠道、海洋深处和火山口等。这类细菌的生理代谢高度依赖于低氧化还原电势(E'_0)的组分, 借助组分里灵活多变的金属中心, 细菌可以完成发酵、无氧呼吸等重要生理过程, 进而产生能量, 得以繁衍。铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)就是这样的组分。Fd, 是由杜邦公司(DuPont Co.)的科研人员于 1962 年发现并命名的, 用来描述巴氏梭菌 *Clostridium pasteurianum* 来源的一种不含血红素的褐色蛋白; 此后, Fd 被广泛定义为小分子可溶性铁硫蛋白^[1-2]。Fd 普遍存在于各种生物体中, 包括细菌、藻类、植物及动物, 但从基因组分析结果来看, 自然界中编码 Fd 的基因多数还是集中在细菌和古细菌界^[3]。尽管不同类型 Fd 的化学结构有差异, 但它们都表现出相似的生物学功能, 即作为细胞中的电子载体, 参与代谢中的电子传递。Fd 最重要的特性是其电负性极低, E'_0 约为 -400 mV; 另一特点则是这类蛋白质的分子量普遍较小, 通常为 6 000–13 000 Da^[4-5]。从系统进化上将分子量较小(约 55 个氨基酸残基)的 Fd 归为一类, 相对分子量大(90–130 个氨基酸残基)的 Fd 归属第二类^[6]。

对于细菌来源的 Fd 来说, 虽然它们在兼性厌氧菌及好氧菌内也有存在, 但更多的还是在严格厌氧的细菌体内执行生理功能。作为严格

厌氧菌细胞内的关键组分, Fd 相关的报道并不多。本文综述了厌氧细菌来源的 Fd 的结构特点、分类及生理功能, 并对近年来 Fd 可能产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)的文献观点进行了总结、讨论。论文内容将有助于我们理解 Fd 对于严格厌氧菌的重要性以及 Fd 的功能与结构间的关系。

1 细菌 Fd 的结构

Fd 以铁硫簇(Fe-S cluster)为辅基。铁硫簇, 是含 Fe^{2+} 和硫(S^{2-})的无机化合物, 是最古老的生命物质之一, 存在于所有原核和真核生物的生命细胞中。铁硫簇的功能多样化, 涉及各种新陈代谢过程, 如呼吸、细胞中央代谢、酶与底物结合、DNA 修复及基因转录表达调控等^[4]。生命进化最早期的生物体所采用的含铁硫簇的酶(铁硫蛋白)以及各种古老的代谢途径, 在几十亿年的进化过程中被所有生物沿承下来, 成为细胞代谢过程中必不可少的组分和环节^[7-9]。

Fd 的铁硫簇位于蛋白折叠的疏水模块中, 赋予 Fd 独特的褐色。细菌来源的 Fd 可含有一个或两个簇, 根据簇中铁原子的数量, 铁硫簇可分为 3 种: [2Fe-2S]、[3Fe-4S]^[10]和[4Fe-4S](图 1)。簇中的铁原子都由硫原子配位, 与无机硫或肽链中 Cys 残基侧链的巯基硫结合。

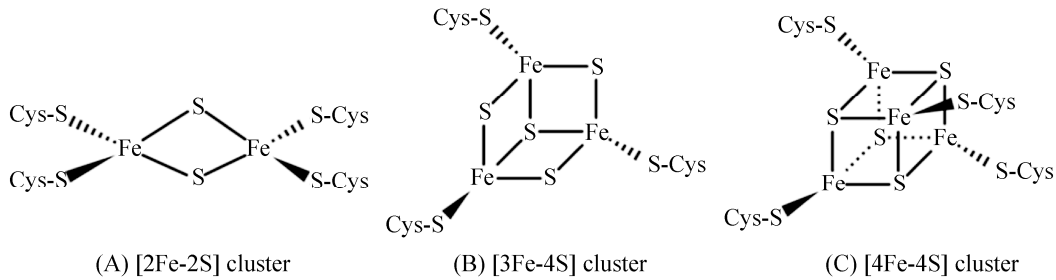


图 1 3 种铁硫簇的结构示意图^[7,11-12]

Figure 1 Structure diagram of three kinds of Fe-S clusters^[7,11-12].

Fd 可以适应广泛的还原电位，是因为其多样的结构基序允许它们与不同的分子发生氧化还原作用，从而在各种生物过程中充当电子载体。铁硫簇不同的几何形状会引起电子结构的微小差异，四面体结构的微小变化将导致其还原电位发生变化^[13-14]。不同类型的铁硫簇具有不同的氧化还原电位，而 Fd 的 E'_0 之所以变动范围较大(表 1)，取决于蛋白所含铁硫簇的类型、簇中氧化还原中心的数量和簇的氧化还原状态、氢键网络等因素^[16]。Fd 具有一个、两个或多个铁硫簇，每个簇都可以被一个电子还原，然后再将该电子传递出去，因此是单电子载体^[17]。

1.1 [2Fe-2S]型铁硫簇

[2Fe-2S]型铁硫簇呈菱形，含有 2 个铁原子，由 2 个无机硫和 4 个 Cys 以扭曲的四面体构型配位，其结构并不是完全平面的，在 2 个铁形成的平面上有小的倾斜。[2Fe-2S]簇靠近蛋白质表面，被疏水残基包围，簇的表面呈高度酸性，覆盖着大量 Asp 和 Glu 残基，用来与其他分子发生氧化还原反应^[4,12]。

表 1 细菌 Fd 铁硫簇的 E'_0

Table 1 E'_0 of bacterial Fd Fe-S clusters

Fe-S clusters	Average E'_0 value/mV*	References
[2Fe-2S]	-300	[6]
[3Fe-3S]	-100— -150	[12]
[4Fe-4S]	-400	[15]

*Under the standard condition: the concentration of substrate and product is 1 mol/L or 10^5 Pa (gas), pH 7.0.

1.2 [3Fe-4S]簇

这一类型的簇可被认为是缺少一个铁原子的 [4Fe-4S]簇，主要存在于厌氧菌中，并参与厌氧代谢。[3Fe-4S]簇可以来自[4Fe-4S]簇的氧化损伤，而且已有研究表明[3Fe-4S]和[4Fe-4S]簇在特定生理条件下可以相互转化，[3Fe-4S]簇和[4Fe-4S]簇之间的转换可以作为调节机制，通过铁响应元件 mRNA-binding 蛋白来平衡细胞铁代谢和调节铁的毒性^[18]。[3Fe-4S]簇和肽链中的 3 个 Cys 残基相结合，从而被固定在蛋白骨架上，3 个 Cys 形成类似于[4Fe-4S]簇的 Cys-(XX)₂-Cys-(XX)₂-Cys 基序(X 为任意残基)^[19-20]。[3Fe-4S]簇与[4Fe-4S]簇的结构非常相似，其中 Fe-Fe 间距比 S-S 间距短，而 Fe-S 间的距离相近；不同之处是，蛋白空间构象扭曲了[3Fe-4S]簇，而[4Fe-4S]簇则更对称^[12]。

1.3 [4Fe-4S]簇

[4Fe-4S]簇呈立方体形，是在早期地球环境中形成的第一个铁硫簇^[21]，分布于多种厌氧细菌中，具有不等且极低的还原电位，在厌氧菌产氢过程中起着传递电子的作用。该簇呈立方体形，铁和硫原子交替，3 个无机硫和肽链中的 1 个 Cys 的巯基硫分别与每个铁原子配对。Cys 配体形成 1 个 Cys-(XX)₂-Cys-(XX)₂-Cys 基序，该结构被称作“经典的[4Fe-4S]基序”，具有 4 个 β 折叠、2 个 α 螺旋，中间有结合环，形成“ $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ”的结构^[22]。

2 厌氧细菌 Fd 的生理功能

细菌 Fd 广泛存在于严格厌氧菌中, 它作为可逆的水溶性电子载体, 在一系列氧化还原过程中接受来自其他酶蛋白的电子, 并将电子分配给其他受体。这样的电子传递过程可以将底物氧化与 NAD(P)⁺还原、FMN、FAD、核黄素、亚硫酸盐和 N₂ 还原等偶联起来^[12,23], 借此就可以实现 Fd 在各种代谢过程中发挥作用, 包括厌氧发酵、产氢、二氧化碳固定、固氮及呼吸等^[6,24-26], 涉及上述反应的胞内常见氧化还原物质的 E'_0 如表 2 所示。

Fd 是细菌和真核细胞线粒体的细胞色素 P450 酶系的重要电子中间传递体, 与铁氧还蛋白还原酶(ferredoxin reductase, FdR)、细胞色素 P450 还原酶构成电子传递链。在 Fd 介导的反应中, 最突出的是将还原电子向 NADP 或 NAD 转移, 同时 Fd 也是唯一已知的在 NAD 和 NADP 的“氢侧”起作用的细胞电子载体组^[33]。

表 2 胞内常见氧化还原物质的 E'_0

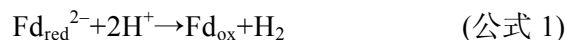
Table 2 E'_0 of common intracellular redox substances

Redox substances	Average E'_0 value/mV*	References
NAD(P)H	-320	[27]
NAD ⁺ /NADH	-300	[28]
H ⁺ /H ₂	-414	[17]
FNR (ferredoxin-NADP ⁺ reductase)	-340	[29]
Crotonyl-CoA	-10	[27]
Formate	-430	[30]
Fld (flavodoxin)	-420	[30]
Pyruvate	-190	[30]
Lactate	-190	[5]
CO ₂ /CO	-520	[17]
CO ₂ /formate	-420	[17]
CO ₂ /pyruvate	-500	[17]
Acetaldehyde/ethanol	-197	[31]
FAD/FADH	-205	[32]
FAD/FADH ₂	-155	[32]

*Under the standard condition: the concentration of substrate and product is 1 mol/L or 10⁵ Pa (gas), pH 7.0.

Fd 最主要的功能是在两个连续的步骤中将两个单电子转移到铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶(ferredoxin-NADP⁺ reductase, FNR)的 FAD 中心, 在那里为 NADP⁺还原成 NADPH 提供电子^[4]。随后电子再传递到 Fd, 最后传到细胞色素 P450 活性中心, 使 O₂ 还原, 并将其中一个氧原子加到底物中(图 2)^[34-36]。

我们课题组以人体肠道厌氧菌——拟杆菌为研究对象, 围绕厌氧菌厌氧的分子机理做了多年研究。在拟杆菌的糖分解途径中, Fd 是一种将氢化酶与多种电子供体或受体相连的电子转移蛋白, 它通过丙酮酸氧化获得电子, 进而将电子传递给氢化酶(hydrogenase), 电子被转移到 H⁺上产生 H₂^[24](公式 1, 图 3)。



丙酮酸分解采用 Fd 取代了 NAD⁺作为电子载体, 这样的选择具有重要生理意义, 如果细菌使用 NAD⁺接受电子产生额外的 NADH, 那么 NADH 的氧化就需要消耗代谢产生的乙酰辅酶 A, 从而使得细胞内脂肪酸、氨基酸的合成代谢缺乏原材料, 同时也扰乱了发酵过程的氧化还原平衡^[37-39]。

此外, 根据报道, 迄今为止, Fd 是电子分叉酶(electron-bifurcating enzyme)催化的所有反应都必需的底物^[15,28,31-32,40-43]。基于黄素的电子分叉(flavin-based electron bifurcation, FBEB)最早是由 Herrmann 等在 2007 年提出来的^[27,44], 它类似于线粒体中基于泛醌的电子分叉, 是厌氧菌和古细菌中新发现的一种在能量有限的环

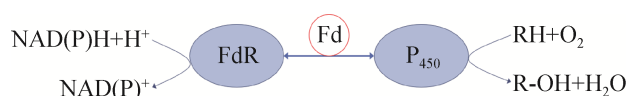


图 2 细胞色素 P450 电子传递链^[36]

Figure 2 Cytochrome P450 electron transport chain^[36].

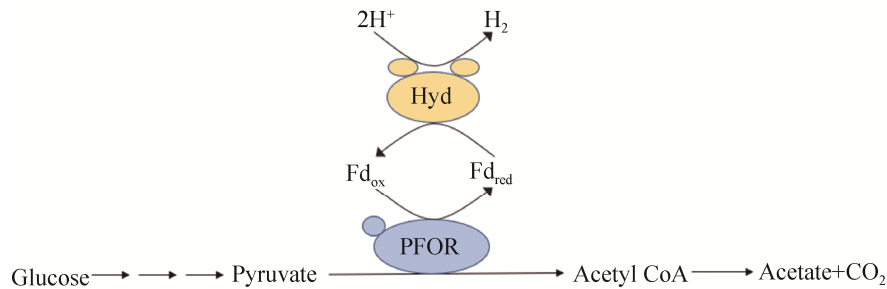


图3 Fd 是厌氧菌糖代谢中的重要辅酶^[28]

Figure 3 Fd is an important coenzyme in anaerobic glucose metabolism^[28]. [PFOR], pyruvate : ferredoxin oxidoreductase; [Hyd], hydrogenase.

境中产生能量的耦合机制^[45], 可以看作是除底物水平磷酸化(SLP)和电子传递磷酸化(ETP)之外的第三种产能模式^[17]。电子分叉是在酶复合物中使用单个电子供体同时还原两个电子受体, 使其岔开两路, 一个电子走向能量更低的状态来驱动另一个电子走向能量更高的状态, 其本质是在酶复合物内耦合的一个放能反应驱动原本热力学上原本不自发的耗能反应^[46]。而 Fd 的 E'_0 极低, 就意味着还原形式的 Fd(Fd_{red}) 有很大的能量潜力, 可以用于捕获势能, 这些势能随后可用于驱动其他的耗能反应, 如在高分压下产生氢气(H₂)或产生用于 ATP 合成的膜电位^[47]。传统的氢化酶只能自发地从低电位供体还原 Fd 中产生 H₂, 不能自发地从 NADH 中产生 H₂, 但是分叉的氢化酶(如[FeFe]氢化酶)同时催化 Fd 和 NADH 氧化产生 H₂, 还会增加 ATP 的释放量^[48]。因此黄素蛋白可以将来自 NAD(P)H、H₂ 或甲酸盐的氢化物电子对分裂成

2 个单个的电子, 一个电子具有比电子对更高的 E'_0 , 另一个的 E'_0 则较低, 微生物通过这一机制以牺牲一个电子的能量为代价放大另一个电子的还原能力, 从而使得微生物可以产生还原 Fd 的低电位电子(图 4)^[5,17,30,48]。

3 厌氧细菌 Fd 涉及 ROS 产生的可能性

ROS 是化学性质活泼的含氧物质的统称, 主要包括 O₂⁻(超氧阴离子)、H₂O₂(过氧化氢)、HO•(羟自由基)这 3 类强氧化剂, O₂⁻是由 O₂ 的单线态电子还原产生的, 然后 O₂⁻被 SOD(超氧化物歧化酶)催化或自身发生反应快速歧化, 产生 H₂O₂, H₂O₂ 又可以通过 Fenton 反应产生氧化性极强的 HO•^[37]。ROS 是生物代谢过程中必然产生的一种有害副产物, 可以对细胞造成氧化损伤, 包括脂质过氧化、蛋白质氧化、酶抑制和核酸损伤等, 最终导致细胞死亡^[49-53]。

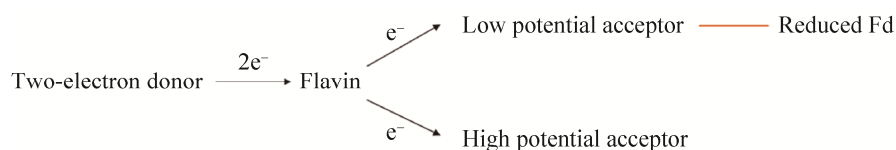


图4 基于黄素的电子分叉示意图^[30]

Figure 4 Diagram of flavin-based electron bifurcation^[30].

ROS 本质上是 O_2 的单电子还原过程中产生的中间产物, 由于 O_2 包含两个具有相同自旋态的未配对的电子, 这种电子结构使具有相反自旋的“电子对”难以插入到 O_2 的未配对电子中, 否则会使成对的两个电子具有相同的自旋态。这在能量上是不稳定的^[54]。因此, O_2 的还原反应一次只加入一个电子。绝大多数 Fd 的铁硫簇一次只能转移一个电子, 只有呈双立方体状的铁硫簇才能一次传递两个电子^[55], 因此 Fd 在细胞内属于单电子转移蛋白; 同时, 当细菌暴露于氧气环境中时, O_2 分子能自由穿过细胞膜进入细胞内部, 给予了 O_2 与小分子量 Fd 充分接触的机会, 使得 Fd 很可能会将电子传递给 O_2 , 产生 ROS。

另外, 专性厌氧菌比需氧菌更有可能将电子转移到低电位受体, 催化该过程的酶可能更倾向于将电子偶然转移到分子氧, 产生超氧化物和 H_2O_2 。在前期研究中, 本课题组以严格厌氧菌多形拟杆菌为研究模型, 证实该菌在空气中会快速产生 ROS, ROS 在细胞内累积, 破坏了细菌中央代谢中的关键酶, 如含[4Fe-4S]型铁硫簇的脱水酶类, 导致细胞代谢中断, 失去能量来源, 逐渐死亡^[38-39,56]。有关厌氧菌内 ROS 的来源, 相关研究正在进行中, 而铁氧还蛋白是可能的来源之一。生理条件下, 细胞内的 Fd 传递单个电子给下游的电子受体; 而 Fd 的 E'_0 近 -400 mV, 这一数值比 O_2/O_2^- 的电势 -330 mV^[38,56-57] 还要低, 这就提供了一种可能性, 当细胞处于空气中时, 电子会从还原形式的 Fd 上面转移给 O_2 , O_2 则得到部分还原, 产生 O_2^- 。所以当厌氧菌暴露在空气中时, 还原形式的 Fd 可能传递电子给 O_2 而生成 ROS (图 5)。而在此前的报道中, 梭菌和菠菜来源的 Fd 被证实能够发生氧化反应产生 O_2^- ^[52]。另外, Allen 报道了植物型的铁氧还蛋白能发生自氧化生成超氧化物和过氧化物^[58]。

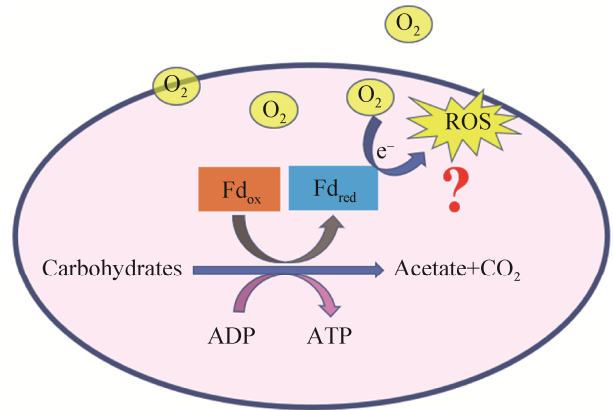


图 5 厌氧菌 Fd 可能产生 ROS 的示意图

Figure 5 Diagram of possible ROS production by anaerobic Fd. Fd_{ox}/Fd_{red}: the oxidized/reduced state of Fd.

Hosein 和 Palmer 还报道了 O_2 对 Fd 的氧化及其自催化性质^[59]。在最近的一项研究中, Koo 等使用 $^{18}O_2$ 证实了在生物制氢过程中, 还原形式的 Fd 能将电子传递 O_2 , 从而流向氢化酶的电子通量减少^[60]。因此, 在基于黄素的电子分叉过程中, Fd 会发生自氧化, 产生 ROS, 电子分叉可以看作是厌氧菌暴露在空气中的致命弱点。

4 总结和展望

Fd 是如何传递电子的? 目前尚未有具体报道。Fd 与其氧化还原伴侣的相互作用模式是铁氧还蛋白研究领域的热点之一, 研究者们已采用核磁共振(NMR)、等温滴定量热法(ITC)和定点诱变等技术对这些复合物进行了研究, 但目前还不完全了解铁氧还蛋白是使用相同的表面、部分重叠的表面还是完全不同的表面与氧化还原伴侣相互作用。铁氧还蛋白很可能是在氧化还原伙伴之间起着移动电子载体的作用, 相关研究将是未来 Fd 的研究方向, 可以具体阐释铁氧还蛋白的作用机理。

基于黄素的电子分叉途径对于理解厌氧菌

的能量合成十分重要，而作为厌氧菌电子分叉途径通用的电子载体，Fd 对这类细菌的生存、代谢具有重要意义，因此进一步研究 Fd 的蛋白结构、电子传递机制，有助于加深相关认识，继续拓展 Fd 在厌氧能量代谢网络中心枢纽上所起的关键作用。基于氧化还原的电子分叉反应可能进一步明确 Fd 在厌氧菌与生态环境相互作用中的作用，在绿色能源研究中也有潜在的应用价值。

此外，Fd 是生命进化早期生物普遍使用的电子传递体，但其历史演化、生物进化史以及在系统发育学中的地位尚未明确。对 Fd 的探究有助于更好地理解早期生命形式的进化^[61-62]，还可以利用 Fd 作为一项指标来进行系统进化研究。

参考文献

- [1] Valentine RC. Bacterial ferredoxin. *Bacteriological Reviews*, 1964, 28(4): 497–517.
- [2] Kümmerle R, Kyritsis P, Gaillard J, Moulis JM. Electron transfer properties of iron-sulfur proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2000, 79(1-4): 83–91.
- [3] Elsen S, Efthymiou G, Peteinatos P, Diallinas G, Kyritsis P, Moulis JM. A bacteria-specific 2[4Fe-4S] ferredoxin is essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 2010, 10(1): 271.
- [4] Sticht H, Rösch P. The structure of iron-sulfur proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1998, 70(2): 95–136.
- [5] Buckel W, Thauer RK. Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin, and anaerobic respiration with protons (ech) or NAD⁺ (rnf) as electron acceptors: a historical review. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 401.
- [6] Meyer J. Ferredoxins of the third kind. *FEBS Letters*, 2001, 509(1): 1–5.
- [7] Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 74(1): 247–281.
- [8] Fontecave M. Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(4): 171–174.
- [9] Jensen KP. Iron-sulfur clusters: why iron? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100(8): 1436–1439.
- [10] Kissinger CR, Sieker LC, Adman ET, Jensen LH. Refined crystal structure of ferredoxin II from *Desulfovibrio gigas* at 1.7 Å. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 219(4): 693–715.
- [11] Py B, Barras F. Building Fe–S proteins: bacterial strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(6): 436–446.
- [12] Liu J, Chakraborty S, Hosseinzadeh P, Yu Y, Tian SL, Petrik I, Bhagi A, Lu Y. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chemical Reviews*, 2014, 114(8): 4366–4469.
- [13] Dauter Z, Wilson KS, Sieker LC, Meyer J, Moulis JM. Atomic resolution (0.94 Å) structure of *Clostridium acidurici* ferredoxin. Detailed geometry of [4Fe-4S] clusters in a protein. *Biochemistry*, 1997, 36(51): 16065–16073.
- [14] Duée ED, Fanchon E, Vicat J, Sieker LC, Meyer J, Moulis JM. Refined crystal structure of the 2[4Fe-4S] ferredoxin from *Clostridium acidurici* at 1.84 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 243(4): 683–695.
- [15] Kaster AK, Moll J, Parey K, Thauer RK. Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(7): 2981–2986.
- [16] Balk J, Lill R. The cell's cookbook for iron-sulfur clusters: recipes for fool's gold? *ChemBioChem*, 2004, 5(8): 1044–1049.
- [17] Buckel W, Thauer RK. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2013, 1827(2): 94–113.
- [18] Klausner RD, Rouault TA, Harford JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell*, 1993, 72(1): 19–28.
- [19] Hannan JP, Busch JLH, Breton J, James R, Thomson AJ, Moore GR, Davy SL. Characterisation of oxidised 7Fe dicluster ferredoxins with NMR spectroscopy. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2000, 5(4): 432–447.
- [20] Busch JL, Breton JL, Bartlett BM, Armstrong FA, James R, Thomson AJ. [3Fe-4S] ↔ [4Fe-4S] cluster interconversion in *Desulfovibrio africanus* ferredoxin

- III: properties of an Asp14 → Cys mutant. *The Biochemical Journal*, 1997, 323(Pt 1): 95–102.
- [21] Meyer J. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008, 13(2): 157–170.
- [22] Carter CW, Jr., Kraut J, Freer ST, Alden RA, Sieker LC, Adman E, Jensen LH. A comparison of Fe₄S₄ clusters in high-potential iron protein and in ferredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1972, 69(12): 3526–3529.
- [23] Mondal J, Bruce BD. Ferredoxin: the central hub connecting photosystem I to cellular metabolism. *Photosynthetica*, 2018, 56(1): 279–293.
- [24] Bruschi M, Guerlesquin F. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiology Letters*, 1988, 54(2): 155–175.
- [25] Fukuyama K. Structure and function of plant-type ferredoxins. *Photosynthesis Research*, 2004, 81(3): 289–301.
- [26] Matsubara H, Saeki K. Structural and functional diversity of ferredoxins and related proteins. *Advances in Inorganic Chemistry*, 1992, 38: 223–280.
- [27] Herrmann G, Jayamani E, Mai G, Buckel W. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 784–791.
- [28] Li FL, Hinderberger J, Seedorf H, Zhang J, Buckel W, Thauer RK. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 843–850.
- [29] Diakonova AN, Khrushchev SS, Kovalenko IB, Riznichenko GY, Rubin AB. Influence of pH and ionic strength on electrostatic properties of ferredoxin, FNR, and hydrogenase and the rate constants of their interaction. *Physical Biology*, 2016, 13(5): 056004.
- [30] Buckel W, Thauer RK. Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews*, 2018, 118(7): 3862–3886.
- [31] Weghoff MC, Bertsch J, Müller V. A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(3): 670–677.
- [32] Wang SN, Huang HY, Moll J, Thauer RK. NADP⁺ reduction with reduced ferredoxin and NADP⁺ reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5115–5123.
- [33] Buchanan BB, Arnon DI. Ferredoxins: chemistry and function in photosynthesis, nitrogen fixation, and fermentative metabolism. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1970, 33: 119–176.
- [34] 宋锦松. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌铁氧还蛋白还原酶的表达纯化及酶活测定. 中南大学硕士学位论文, 2010.
- [35] 许兰, 陈思航, 田瑞莹, 尚书凤. 人铁氧还蛋白表达载体构建. 科技创新导报, 2019, 16(7): 82–84, 86. Xu L, Chen SH, Tian RY, Shang SF. Construction of human ferredoxin expression vector. *Science and Technology Innovation Herald*, 2019, 16(07): 82–84, 86. (in Chinese)
- [36] 张婷. 细胞色素 P450 酶系统中电子传递蛋白的晶体学研究. 南开大学硕士学位论文, 2014.
- [37] Imlay JA. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental Microbiology*, 2019, 21(2): 521–530.
- [38] Lu Z, Sethu R, Imlay JA. Endogenous superoxide is a key effector of the oxygen sensitivity of a model obligate anaerobe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(14): E3266–E3275.
- [39] Lu Z, Imlay JA. A conserved motif liganding the [4Fe-4S] cluster in [4Fe-4S] fumarases prevents irreversible inactivation of the enzyme during hydrogen peroxide stress. *Redox Biology*, 2019, 26: 101296.
- [40] Chowdhury NP, Kahnt J, Buckel W. Reduction of ferredoxin or oxygen by flavin-based electron bifurcation in *Megasphaera elsdenii*. *The FEBS Journal*, 2015, 282(16): 3149–3160.
- [41] Huang HY, Wang SN, Moll J, Thauer RK. Electron bifurcation involved in the energy metabolism of the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica* growing on glucose or H₂ plus CO₂. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(14): 3689–3699.
- [42] Wang S, Huang H, Kahnt J, Thauer RK. A reversible electron-bifurcating ferredoxin- and NAD-dependent [FeFe]-hydrogenase (HydABC) in *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(6): 1267–1275.
- [43] Wang S, Huang H, Kahnt J, Mueller AP, Kopke M, Thauer RK. NADP-specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium*

- autoethanogenum* grown on CO. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(19): 4373–4386.
- [44] Orme-Johnson WH. Iron-sulfur proteins: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 1973, 42(1): 159–204.
- [45] Liang JY, Huang HY, Wang SN. Distribution, evolution, catalytic mechanism, and physiological functions of the flavin-based electron-bifurcating NADH-dependent reduced ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 373.
- [46] Poudel S, Dunham EC, Lindsay MR, Amenabar MJ, Fones EM, Colman DR, Boyd ES. Origin and evolution of flavin-based electron bifurcating enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1762.
- [47] Metcalf WW. Classic spotlight: electron bifurcation, a unifying concept for energy conservation in anaerobes. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(9): 1358.
- [48] Peters JW, Miller AF, Jones AK, King PW, Adams MW. Electron bifurcation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 31: 146–152.
- [49] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9): 405–410.
- [50] Sharma P, Dubey RS. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 2005, 46(3): 209–221.
- [51] Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 2003, 164(4): 645–655.
- [52] Mishra S, Jha AB, Dubey RS. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma*, 2011, 248(3): 565–577.
- [53] Meriga B, Krishna Reddy B, Rajender Rao K, Ananda Reddy L, Kavi Kishor PB. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161(1): 63–68.
- [54] Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 1998, 201(Pt 8): 1203–1209.
- [55] Peters JW, Stowell MH, Soltis SM, Finnegan MG, Johnson MK, Rees DC. Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry*, 1997, 36(6): 1181–1187.
- [56] Lu Z, Imlay JA. The fumarate reductase of *Bacteroides thetaiotaomicron*, unlike that of *Escherichia coli*, is configured so that it does not generate reactive oxygen species. *mBio*, 2017, 8(1): e01873-16. DOI:10.1128/mbio.01873-16.
- [57] Wood PM. The potential diagram for oxygen at pH 7. *The Biochemical Journal*, 1988, 253(1): 287–289.
- [58] Allen JF. A two-step mechanism for the photosynthetic reduction of oxygen by ferredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1975, 66(1): 36–43.
- [59] Hosein B, Palmer G. The kinetics and mechanism of oxidation of reduced spinach ferredoxin by molecular oxygen and its reduced products. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1983, 723(3): 383–390.
- [60] Koo J, Cha Y. Investigation of the ferredoxin's influence on the anaerobic and aerobic, enzymatic H₂ production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 641305. DOI:10.3389/fbioe.2021.641305.
- [61] Sousa FL, Preiner M, Martin WF. Native metals, electron bifurcation, and CO₂ reduction in early biochemical evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 43: 77–83.
- [62] Schoelmerich MC, Müller V. Energy-converting hydrogenases: the link between H₂ metabolism and energy conservation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(8): 1461–1481.

(本文责编 张晓丽)