



CRISPR-Cas 系统转录调控机制的研究进展

卢亚兰¹, 唐标², 杨华², 孙东昌^{1*}

1 浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

2 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 浙江 杭州 310021

卢亚兰, 唐标, 杨华, 孙东昌. CRISPR-Cas 系统转录调控机制的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(4): 1308–1321.

Lu Yalan, Tang Biao, Yang Hua, Sun Dongchang. Advances in transcriptional regulation mechanisms of CRISPR-Cas systems. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1308–1321.

摘要: 原核生物可利用由 CRISPR-Cas 系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated)介导的适应性免疫机制防御外源核酸入侵。在适应性免疫过程中, 原核生物将外源核酸部分片段整合至自身 CRISPR 阵列中, 表达并加工的 CRISPR RNA 和相关 Cas 蛋白形成的蛋白核酸复合物靶向识别并切割相应的外源 DNA 或 RNA。虽然人们对 CRISPR-Cas 系统的作用机制已开展较深入的研究, 但其转录调控机制的研究却相对较少。近年来, I、II 以及 III 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控研究揭示不同原核生物的 CRISPR-Cas 系统调控模式存在较大差异。本综述将重点介绍 I 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控分子机制, 并简述 II 型以及 III 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控途径的研究进展。最后, 本综述将展望该领域今后需进一步研究的问题。

关键词: CRISPR-Cas 系统; 转录调控机制; 转录调控因子

基金项目: 国家自然科学基金(32170083, 31670084); 浙江省重点研发项目(2020C02031); 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室开放基金(2021DG700024-KF202105)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32170083, 31670084), by the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2020C02031) and by the State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products (2021DG700024-KF202105)

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

Received: 19 August 2021; Revised: 2 December 2021; Published online: 17 December 2021

Advances in transcriptional regulation mechanisms of CRISPR-Cas systems

LU Yalan¹, TANG Biao², YANG Hua², SUN Dongchang^{1*}

1 College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

Abstract: Prokaryotes defend against the invasion of foreign nucleic acids through the adaptive immune system named clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems. During the adaptive immune responses, prokaryotes integrate partial fragments of foreign nucleic acids into their own CRISPR arrays, and then express and process CRISPR RNA and related Cas protein to form a nucleoprotein complex for the recognition and cleavage of corresponding foreign nucleic acids. Although the working mechanisms of CRISPR-Cas systems have been extensively studied, little is known about the transcriptional regulation. In recent years, researchers have investigated the transcriptional regulation mechanisms of type I, II, and III CRISPR-Cas systems, revealing diverse regulation models of CRISPR-Cas systems in different prokaryotic species. This review expounds the transcriptional regulation mechanisms of type I CRISPR-Cas systems, and briefs the research progresses in the transcriptional regulation mechanisms of type II and III CRISPR-Cas systems. Finally, this review puts forward the questions to be addressed in this field.

Keywords: CRISPR-Cas system; transcriptional regulation mechanism; transcriptional regulator

为了抵御噬菌体或质粒等的侵袭, 原核生物进化产生多种防御机制^[1]。由成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和 CRISPR 相关(CRISPR-associated, Cas)蛋白组成的 CRISPR-Cas 系统是原核生物进化产生的适应性免疫系统^[2-5]。其中, CRISPR 序列包括一个前导序列(leader)、一个或多个间隔序列(spacer)和多个重复序列(repeat)。CRISPR-Cas 系统的作用机制可分为 3 个过程: 适应(adaptation)、表达(expression)和干扰(interference)^[6-10]。在适应阶段, 外源核酸首次入侵细胞时, Cas 整合酶将其序列中的部分核酸整合至 CRISPR 序列中, 形成新的间隔序

列^[11-14]; 当宿主再次遇到类似外源核酸入侵时, *cas* 基因表达生成 Cas 蛋白, 同时 CRISPR 序列转录产生的前体 crRNA (pre-crRNA)经 Cas 蛋白加工后形成成熟的 crRNA^[15-16]; 在干扰过程中, 成熟的 crRNA 与 Cas 蛋白形成的核酸蛋白复合物(ribonucleoprotein complex, RNP)可识别并降解进入宿主菌的外源核酸^[17-18]。基于其作用机制, 可将 CRISPR-Cas 系统分为两大类(class 1 和 class 2)^[19-22]。第一类 CRISPR-Cas 系统利用多亚基 Cas 蛋白和成熟的 CRISPR RNA (crRNA)组成的效应复合物识别和切割靶标核酸, 包括 I、III 和 IV 型; 第二类 CRISPR-Cas 系统通过单个 Cas 蛋白和 crRNA 组成的效应复合物发挥作用, 包括 II、V 和 VI 型^[23]。

CRISPR-Cas 系统可防御质粒编码的转座子或噬菌体的入侵。然而, CRISPR-Cas 系统的持续性表达不仅增加了原核生物的代谢负担, 而且可引发自我免疫(autoimmunity), 导致原核生物自身的基因组 DNA 遭受来自 CRISPR-Cas 系统的损伤。因此, 原核生物需要通过精准地调控 CRISPR-Cas 系统平衡外源核酸的摄取和防御。虽然人们对 CRISPR-Cas 系统的作用机制已开展了十分深入的研究, 但是对其转录调控机制的研究相对较少^[1]。探讨 CRISPR/Cas 系统的调控机制, 不仅有助于正确认识原核生物

利用适应性免疫防范水平基因转移风险的生理机制, 和进一步完善原核生物转录调控理论; 而且在开发更精准的基因编辑系统和利用细菌内源 CRISPR-Cas 系统防御耐药基因转移具有重要应用价值。近年来, 人们在 I 型、II 型以及 III 型 CRISPR-Cas 系统中陆续开展了转录调控机制的研究(表 1)。其中, I 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控机制相对较深入。因此, 本文将重点阐述 I 型 CRISPR-Cas 系统转录调控模式的最新研究, 并简要介绍 II 型和 III 型系统转录调控机制的进展。

表 1 CRISPR-Cas 系统的调控

Table 1 The regulation of CRISPR-Cas system

Types	<i>cis</i> -acting elements	<i>trans</i> -acting factors	Regulatory mechanism	Species
I-A	P_{cas1}	Csa3a ^[24-25]	Transcriptional activator	<i>Sulfolobus islandicus</i>
		Csa3b ^[26-27]	Transcriptional repressor	<i>Sulfolobus islandicus</i>
	P_{cas}	Csa3b ^[26]	Transcriptional repressor	<i>Sulfolobus islandicus</i>
I-E	P_{cas3}	H-NS ^[28]	Transcriptional repressor	<i>Escherichia coli</i>
		cAMP-CRP ^[29]	Transcriptional activator	<i>Escherichia coli</i>
	P_{cas}	BaeSR ^[30]	Transcriptional activator	<i>Escherichia coli</i>
		H-NS ^[31]	Transcriptional repressor	<i>Escherichia coli</i>
		StpA ^[32]	Transcriptional activator in low level	<i>Escherichia coli</i>
		LeuO ^[33]	Relieves repression by H-NS	<i>Escherichia coli</i>
		LRP ^[34]	Transcriptional repressor	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhi
		cAMP-CRP ^[35]	Transcriptional repressor	<i>Escherichia coli</i>
SmaIR ^[36]	Transcriptional activator mediated by QS in high cell density	<i>Serratia</i> sp.		
	P_{CRISPR}	H-NS ^[31]	Transcriptional repressor	<i>Escherichia coli</i>
I-F	P_{cas1}	cAMP-CRP ^[37]	Transcriptional activator	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
		SmaIR ^[36] , LasIR, RhIR ^[38]	Transcriptional activator mediated by QS in high cell density	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	P_{csy}	AlgU, AlgR, AmrZ ^[39]	Transcriptional repressor	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	P_{cas1}	PvdS ^[40]	Iron responsive transcriptional activator	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
II-A	P_{cas9}	trL ^[41]	Guide Cas9 autoimmune suppression	<i>Staphylococcus aureus</i>
III-A	<i>cas</i> operon	SmaIR ^[36]	Transcriptional activator mediated by QS in high cell density	<i>Serratia</i> sp.
III-B	<i>cmr</i> operon	DdvS, CarD/G ^[42]	Transcriptional activator	<i>Myxococcus xanthus</i>
		Csa3b ^[27]	Transcriptional activator	<i>Sulfolobus islandicus</i>

1 I型 CRISPR-Cas 系统的转录调控途径

I型 CRISPR-Cas 系统广泛存在于细菌和古菌中, 主要标志是一个 N 端含 HD 磷酸水解酶结构域和 C 端含 DExH 解旋酶结构域的 Cas3 蛋白^[43-44]。在 Cas3 介导下, 成熟的 crRNA 与 CasA-D 蛋白形成的 cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defence) 复合物可靶标并切割 DNA。I 型 CRISPR-Cas 系统包含 6 种亚型 (I-A、I-B、I-C、I-D、I-E 和 I-F 型)。目前, 人们对 I-A、I-E 和 I-F 3 种亚型的 CRISPR-Cas 系统调控机制了解较深入。后文将在简要说明表达上述 3 种亚型 CRISPR-Cas 系统操纵子结构的基础上, 分别介绍它们的转录调控模式。

1.1 调控 I 型 CRISPR-Cas 系统表达的顺式作用元件

古菌冰岛硫化叶菌 (*Sulfolobus islandicus*) 是研究 I-A 型 CRISPR-Cas 系统的模式菌株。在冰岛硫化叶菌 REY15A 中, I-A 型 CRISPR-Cas 系统的 *cas* 基因表达由 2 个启动子控制: 参与适应过程的 *csa1*、*cas1*、*cas2* 和 *cas4* (又称 *acas* 操纵子) 基因拥有一个共同的 *csa1* 启动子^[24]。 P_{cas} 启动子控制由 *csa5*、*cas7*、*cas5*、*cas3*、*cas3HD*、*cas8a* 和 *cas6* (以下称为干扰基因簇) 组成的操纵子的转录^[25] (图 1)。干扰基因簇表达的蛋白与 crRNA 组成的 cascade 复合物可靶向切割外源核酸^[26]。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是研究 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的模式菌株。在大肠杆菌中, I-E 型 CRISPR-Cas 系统由 2 个 CRISPR 阵列和 8 个 *cas* 基因 (*cas1*、*cas2*、*cas3* 和 *casA-E*) 编码的 Cas 蛋白组成 (图 1)^[31]。I-E 型 CRISPR-Cas 系统的表达由 3 个启动子控制: P_{cas3} 控制 *cas3*

基因的转录, *cas1-2* 和 *casA-E* 组成的操纵子由位于 *cas1* 上游的 P_{cas} 启动子启动转录, 位于前导序列的 P_{CRISPR} 启动子控制 CRISPR 基因座的转录^[31]。

大气果胶杆菌 (*Pectobacterium atrosepticum*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 均是研究 I-F 型 CRISPR-Cas 系统调控的模式菌株。在 I-A 和 I-E 型 CRISPR-Cas 系统中, *cas* 基因的转录由多个启动子控制。而在 I-F 型 CRISPR-Cas 系统中, 其 *cas* 基因的转录由一个或多个启动子控制^[45]。在大气果胶杆菌的 I-F 型 CRISPR-Cas 系统中, 其所有的 *cas* 基因 (*cas1*、*cas3* 和 *csy1-4*) 组成的 *cas* 操纵子受单一启动子调控 (图 1)^[37]; 而在铜绿假单胞菌的 I-F 型 CRISPR-Cas 系统中, *cas1* 和 *cas2-3* 组成的操纵子和 *csy1-4* 组成的操纵子分别受启动子 P_{cas1} 和 P_{csy} 控制^[39]。

1.2 I-A 型 CRISPR-Cas 系统的调控途径

在冰岛硫化叶菌 REY15A 中, I-A 型 CRISPR-Cas 系统受转录调控因子 Csa3a 和 Csa3b 调节 (图 2)。当无病毒感染时, Csa3b 不仅与 P_{csa1} 启动子结合, 抑制 *acas* 操纵子表达, 从而降低 I-A 型 CRISPR-Cas 系统获取新闻隔区的能力^[26-27]; 而且与 Cascade 复合物共结合在 P_{cas} 上, 使干扰基因的转录完全被抑制^[26]。当噬菌体侵袭宿主时, Csa3a 与 P_{csa1} 启动子和 CRISPR 前导序列结合, 从而激活 *acas* 操纵子和 CRISPR 序列的转录, 进而提高 I-A 型 CRISPR-Cas 系统的适应和干扰能力^[24-25]; 冰岛硫化叶菌 REY15A 中, III-B 型 CRISPR-Cas 的 Cas10 蛋白介导产生的信号分子环状寡聚腺苷酸 (cyclic oligoadenylate, cOAs) 可增强 Csa3b 与 P_{csa1} 启动子的结合, 这表明 cOAs 可能增强 Csa3b 对 *acas* 基因的抑制作用, 进而可能影响 I-A 型 CRISPR-Cas 系统的免疫活性^[27]。

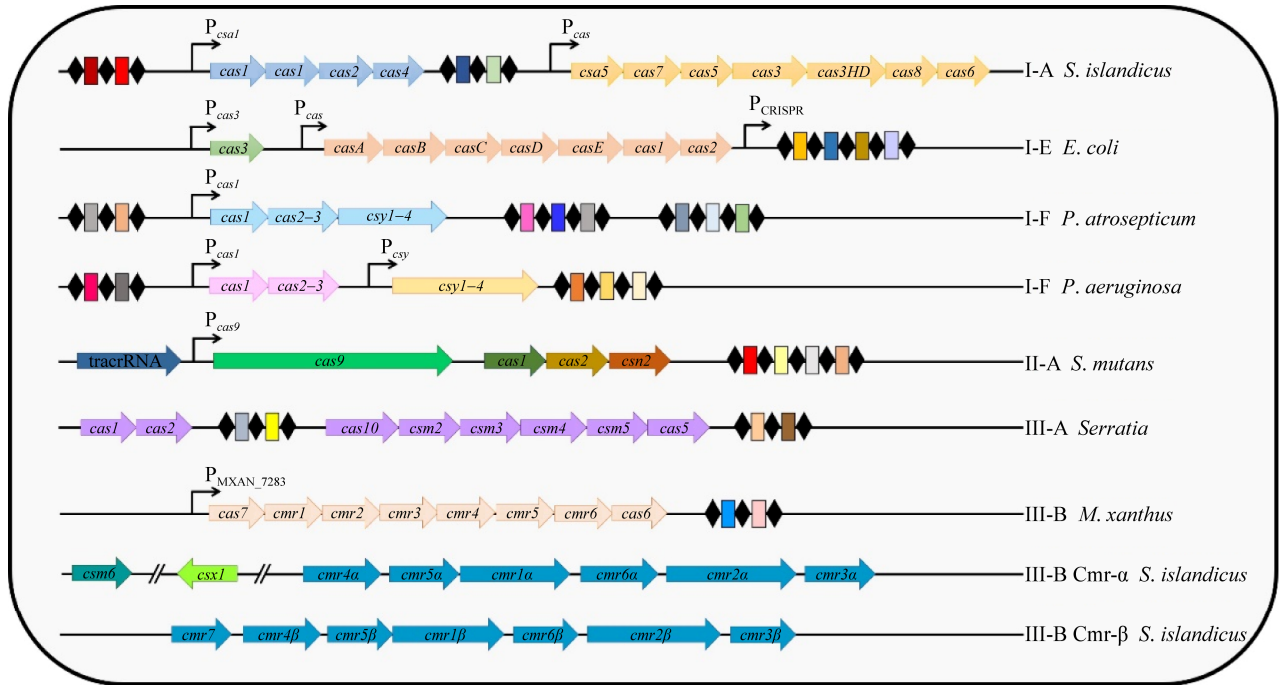


图 1 CRISPR-Cas 操纵子结构图

Figure 1 Structure diagram of CRISPR-Cas operons. Arrow boxes represent *cas* genes; black arrows represent promoters; black diamonds represent repeats; small rectangular boxes represent spacers.

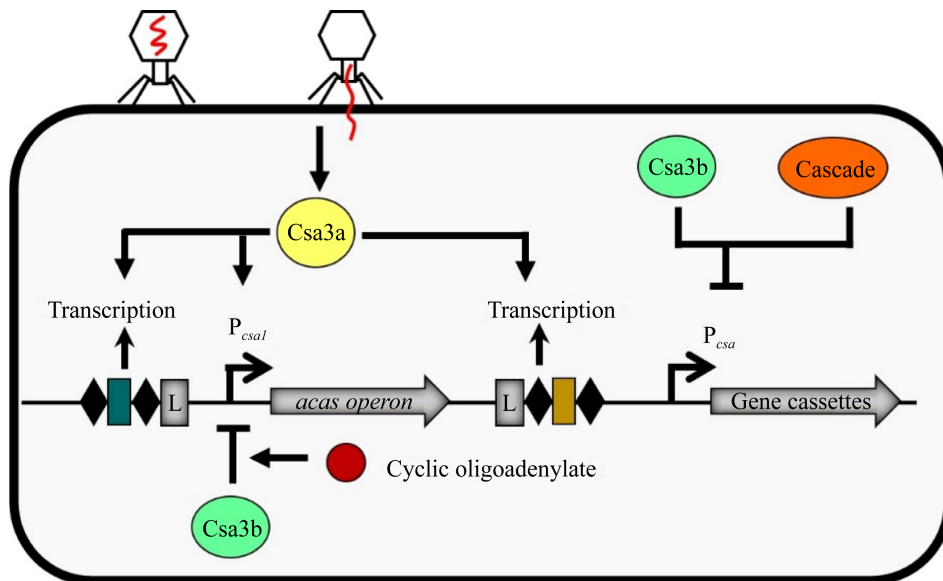


图 2 I-A 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控机制

Figure 2 The mechanism of transcriptional regulation of the type I-A CRISPR-Cas system. L: leader sequence; *acas* operon (adaptation genes) includes *cas1*, *cas1*, *cas2* and *cas4*; gene cassettes: interference gene cassettes, consisting of *csa5*, *cas7*, *cas5*, *cas3*, *cas3HD*, *cas8a* and *cas6*.

1.3 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的调控途径

在大肠杆菌中, 类组蛋白 H-NS、StpA 和转录调控因子 LeuO 等 DNA 结合蛋白调控 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的表达(图 3)。通常, I-E 型 CRISPR-Cas 系统在类组蛋白 H-NS 的转录抑制作用下处于沉默状态^[31]。H-NS 与 P_{cas3} ^[28]、 P_{cas} 和 P_{CRISPR} 结合抑制 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的活性^[31]。H-NS 的同源蛋白 StpA 与 P_{cas} 结合后激活 *cas* 基因的表达, 增加 I-E 型 CRISPR-Cas 系统对靶标 DNA 的切割能力^[32]。LeuO 与 P_{cas} 结合可解除 H-NS 的抑制作用, 从而激活 I-E 型 CRISPR-Cas 系统表达^[33]。虽然亮氨酸反应性调节蛋白(leucine-responsive regulatory protein, LRP)与 H-NS 同属类组蛋白, 但是在大肠杆菌中, LRP 不参与 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的调控^[31]。然而, 在伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* Serovar Typhi)中, LRP 与 H-NS 均与 *cas* 启动

子结合抑制 *casA* 基因的转录, 进而影响 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的活性^[34]。

某些调控因子(如双组分系统 BaeSR、异源二聚体 RcsB-BglJ、全局调控因子 cAMP-CRP 等)可通过 H-NS 或 LeuO 间接调节 I-E 型 CRISPR-Cas 系统(图 3)。双组分调控系统 BaeSR (two-component BaeSR regulatory system)由位于细胞膜上的组氨酸激酶和胞内的反应调控因子 BaeR 组成。膜压力作用下, 活化的 BaeS 导致 BaeR 磷酸化, 进而缓解 H-NS 对 *cas* 基因的抑制, 激活 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的活性^[30]。RcsB-BglJ 可通过提高 LeuO 的转录水平, 从而激活启动子 P_{cas} ^[46]。cAMP-CRP (cAMP activated global transcriptional regulator)可双向调控 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的表达。cAMP-CRP 可与 LeuO 竞争 P_{cas} 启动子的结合位点, 从而抑制 *cas* 操纵子的转录, 降低宿主菌对 P1 噬菌体感

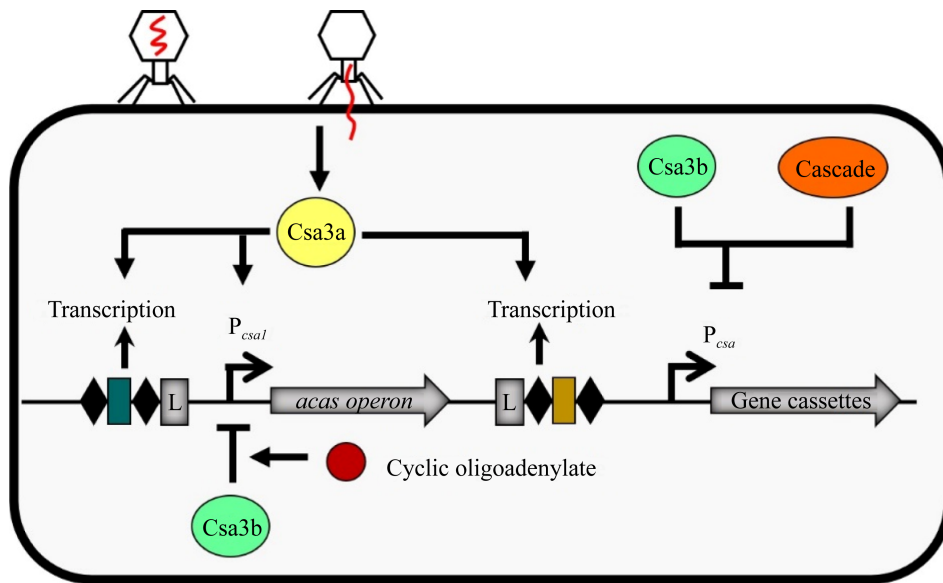


图 3 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控机制

Figure 3 The mechanism of the transcriptional regulation of the type I-E CRISPR-Cas system. H-NS: heat-stable nucleoid-structuring protein; StpA: H-NS paralogue; LeuO: LysR-type transcription factors; LRP: leucine-responsive regulatory protein; cAMP: cyclic adenosine 3,5-monophosphate; CRP: cAMP regulatory protein; RcsB-BglJ: heterodimers; BaeSR: envelope stress responsive two-component regulatory system; SmaIR: quorum sensing system; AI: autoinducer; P: phosphorylated; Imipenem: antibiotic.

染的免疫能力^[35]。此外, cAMP-CRP 可与 P_{cas3} 启动子结合, 激活 *cas3* 基因的表达, 进而提高 I-E 型 CRISPR-Cas 系统抵御质粒入侵的能力^[29]。

大肠杆菌中的 I-E 型 CRISPR-Cas 系统不仅在转录水平上受严密的调控, 而且在翻译后水平上也受调控。Cas3 蛋白是影响 CRISPR-Cas 系统活性的关键蛋白。热稳定蛋白 G (heat shock protein G, HptG) 可通过增强 Cas3 蛋白的稳定性, 进而提高 I-E 型 CRISPR-Cas 系统对靶标 DNA 的干扰作用^[47]。

在沙雷氏菌 ATCC 39006 中, 群体感应 (quorum sensing) 参与 I-E 型 CRISPR-Cas 系统的调控^[36]。当细胞密度升高时, *smaI* 基因的表达增加, 导致信号分子 N-酰基高丝氨酸内酯(AHL) 的产量增多, AHL 与 SmaR 结合后阻碍了 SmaR 对 *cas* 操纵子和 CRISPR 序列转录的抑制作用,

从而激活了 I-E 型 CRISPR-Cas 系统对靶标质粒的适应和干扰能力。

1.4 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的调控途径

在 I-E 型和 I-A 型中, 人们对胞内因子(如 Csa3a、H-NS 和 LeuO 等)调控 CRISPR-Cas 系统表达的研究较多, 而对外界信号如何影响 CRISPR-Cas 系统表达的认识相对不足。在调查 I-F 型 CRISPR-Cas 系统调控机制过程中, 人们发现外界信号(如葡萄糖水平、铁含量、温度等)可通过多种途径影响胞内因子, 进而调节 CRISPR-Cas 系统表达(图 4)。在大气果胶杆菌中, 环境中葡萄糖水平可调控 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的表达^[37]。葡萄糖的添加可降低细胞内 cAMP-CRP 的水平, 进而释放 cAMP-CRP 对 P_{cas1} 启动子的激活作用, 从而降低 I-F 型 CRISPR-Cas 活性对靶标质粒的适应和干扰能力。

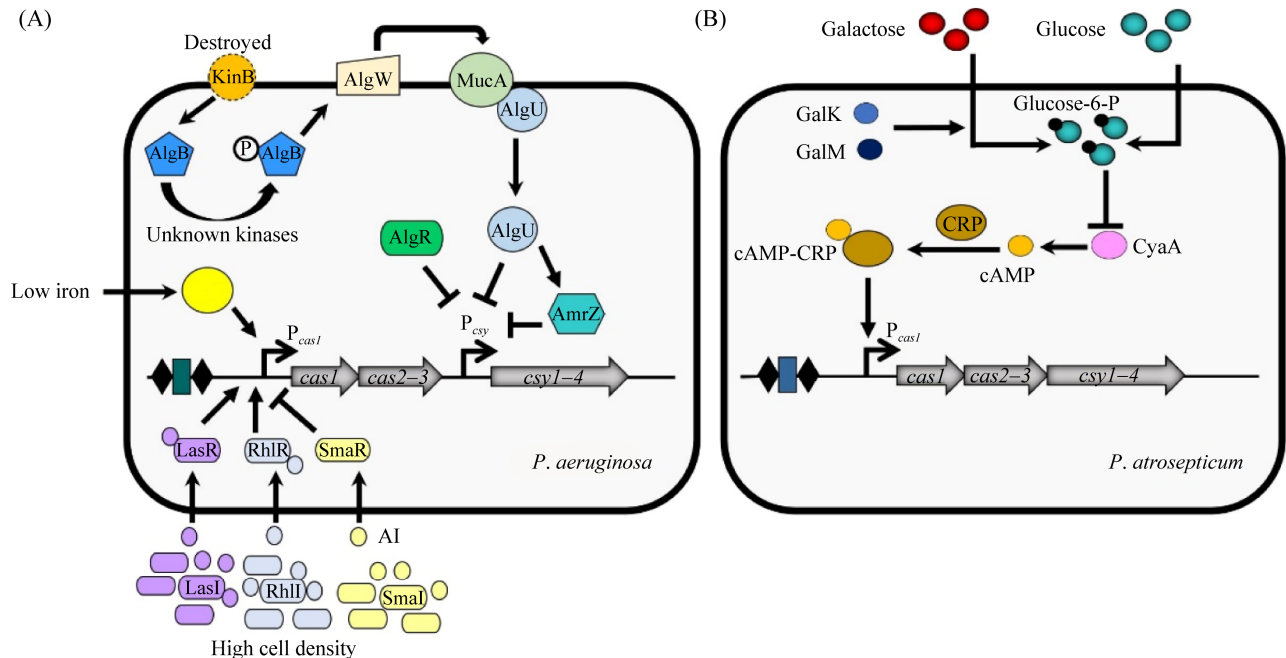


图 4 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控机制

Figure 4 The mechanism of transcriptional regulation of the type I-F CRISPR-Cas system. A: the regulation pathway of the I-F CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*; B: the regulation pathway of the I-F CRISPR-Cas system of *Pectobacterium atrosepticum*; P: phosphate group.

此外, GalM 和 GalK 是参与乳糖代谢的酶, 均可降低细胞内的 CyaA (cAMP 合成酶)水平, 从而下调 *cas* 操纵子表达^[48]。在铜绿假单胞菌 UCBPP-PA14 (以下简称 PA14)中, 外界环境中的温度和铁含量可影响 I-F 型 CRISPR-Cas 系统表达。在低温环境中, I-F 型 CRISPR-Cas 系统介导的将外源核酸片段整合至 CRISPR 阵列 (适应)的能力增强^[49]。在细胞缺铁时, 细胞外 γ 功能因子 PvdS 的表达被上调, PvdS 与核心 RNA 聚合酶(core RNA polymerase, cRNAP)结合形成复合物, 通过与 P_{cas1} 上的结合位点结合增强 *cas* 基因的表达, 并影响 CRISPR-Cas 系统的活性^[40]。参与调控藻酸盐生物合成的双组分调控系统 KinB-AlgB 是 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的调控因子^[39]。环境因素导致的膜蛋白 KinB 失活会促使 AlgB 磷酸化, 从而激活周质蛋白酶 AlgW 降解 MucA, 进而导致与 MucA 结合的 AlgU 被释放, 随后游离的 AlgU 激活 AlgR 和 AmrZ。AlgU、AlgR 和 AmrZ 均可抑制 *csy1-4* 操纵子的转录水平, 进而影响 I-F 型 CRISPR-Cas 系统防御噬菌体感染的的能力^[39]。此外, 细胞密度也与 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的调控有关。铜绿假单胞菌 PA14 中, 高细胞密度会增加噬菌体感染的风险; 同时, 群体感应系统的 SmaIR、LasIR 和 RhlIR 激活 I-F 型系统 *cas* 基因的表达, 增强其对噬菌体感染的免疫能力^[36,38]。

细菌内的小调节 RNA (small regulatory RNAs, sRNAs)可快速响应外界环境信号, 调控相应基因的表达^[50]。在铜绿假单胞菌中, sRNAs 参与 I-F 型 CRISPR-Cas 系统的调控。PhrS 作为 sRNA 的一种, 可阻碍 Rho 蛋白与前导序列的结合, 降低 Rho 蛋白对 CRISPR 序列转录的终止作用, 促进 CRISPR 阵列的表达, 进而增强 I-F 型 CRISPR-Cas 系统防御噬菌体入侵的能力^[50]。

2 II 型 CRISPR-Cas 系统的转录调控途径

II 型 CRISPR-Cas 系统中, 人们较为熟知的是 II-A 型 CRISPR-Cas9 系统。该系统包括反式激活 CRISPR-RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)基因, Cas 蛋白的编码基因(*cas9*、*cas1*、*cas2* 和 *csn2*)和 CRISPR 阵列, 其中 P_{cas9} 启动子控制由 *cas9*、*cas1*、*cas2* 和 *csn2* 组成的操纵子转录^[51-52]。tracrRNA 可与前体 crRNA 中的重复序列配对结合, 随后被细胞内核糖核酸内切酶 RNase III 处理形成成熟 crRNA。成熟 crRNA 与大分子蛋白 Cas9 组成核糖核蛋白复合体对目标序列进行识别和切割。CRISPR-Cas9 系统介导的基因编辑技术已广泛应用于生命科学研究与应用。然而, 直到最近, 人们才初步认识其调控机制。

在变形链球菌(*Streptococcus mutans*) UA159 中发现 CRISPR-Cas9 系统受生物被膜形成有关的组氨酸传感器激酶 VicK 和反应调节器 VicR 组成的双组分系统调控^[53], 暗示 VicK 可感应环境中某信号并将其传递给 VicR, 进而影响 CRISPR-Cas9 系统表达。除此之外, II 型 CRISPR-Cas9 系统还含有一条 RNA 介导的自我免疫途径^[41]。在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 II 型 CRISPR-Cas9 系统中, tracrRNA 基因有 2 个启动子, 转录后形成长短 2 种构型的 tracrRNA。其中, 短构型的 tracrRNA(tr_s)与前体 crRNA 互补配对, 长构型的 tracrRNA(tr_L)能够引导 Cas9 蛋白与 P_{cas9} 的结合, 从而抑制 *cas* 操纵子的表达, 进而影响 CRISPR-Cas9 系统的免疫能力^[41]。然而, tr_L 并不完全抑制 CRISPR-Cas9 系统, *cas* 操纵子仍可维持低水平表达^[41]。这种调控模式既能减轻细胞的代谢负

担以及防止细胞产生自我免疫，又能维持一定的免疫防御外源核酸入侵的能力。

3 III型 CRISPR-Cas 系统的转录调控途径

III型 CRISPR-Cas 系统虽多发现于古菌中，但也在少数细菌中存在，主要标志是 Cas10 蛋白。III 型 CRISPR-Cas 系统存在与 I 型的 cascade 类似的干扰复合物^[3]。III-A/D 型 CRISPR-Cas 系统中，成熟 crRNA 与 Csm 蛋白(III-B/C 型是 Cmr 蛋白)组成干扰复合物^[54]。然而，与其他 I 型和 II 型 CRISPR-Cas 系统不同的是，III 型 CRISPR-Cas 系统同时靶标入侵 DNA 的单链 DNA (ssDNA)和 DNA 的转录产物 RNA^[54]。III 型 CRISPR-Cas 系统的干扰复合物可与靶标 RNA 结合，并由具有 RNA 酶活性的 Csm3 (或 Cmr4)降解靶标 RNA。ssDNA 则由具有 DNA 酶活性的 Cas10 降解。目前，在沙雷氏菌 (*Serratia* sp.) ATCC 39006、黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*) DK1050 和冰岛硫化叶菌 REY15A 中揭示了 III-A 和 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的调控机制。

在沙雷氏菌 ATCC 39006 中，III-A 型系统由 *cas1*、*cas2*、*cas10*、*csm3-5*、*cas6* 和 2 个 CRISPR 序列组成^[36]。该系统受群体感应系统 SmaIR 调控。当细胞密度升高时，*smaI* 基因的表达增加，导致信号分子 N-酰基高丝氨酸内酯 (AHL)的产量增多，AHL 与 SmaR 结合后阻碍了 SmaR 对 *cas* 操纵子和 CRISPR 序列转录的抑制作用，从而激活了 III-A 型 CRISPR-Cas 系统对靶标质粒的适应和干扰能力^[36]。

在黄色粘球菌 DK1050 中，III-B 型 CRISPR-Cas 系统由 *cas6*、*cmr1-6* 和 CRISPR 阵列组成(图 1)^[42]。CRISPR 阵列与 *cmr* 操纵子

共用一个启动子，其转录产物为多顺反子 mRNA，经 Cas6 加工后形成成熟的 crRNA。III-B 型 CRISPR-Cas 系统受 σ 因子(DdvS)和全局调控复合物(CarD-CarG)的调节。DdvS 和 CarD-CarG 共同驱动 *cas* 基因的转录^[42]。DdvS 通常被膜结合的抗 σ 因子 DdvA 隔离，导致 III-B 型 CRISPR-Cas 系统沉默。外部刺激(例如噬菌体或细胞外 DNA 入侵)导致 DdvA 的失活，使得 DdvS 从 DdvA 中释放出来；在 CarD-CarG 的协助下，DdvS 与 RNA 聚合酶结合并激活 *cmr* 操纵子的转录，同时提高成熟 crRNA 的表达水平，从而激活 CRISPR-Cas 适应性免疫系统。目前，黄色粘球菌中 CarD-CarG 和 DdvS 激活 III-B 型 CRISPR-Cas 系统表达的具体机制仍有待进一步研究。

在冰岛硫化菌 REY15A 中，除 I-A 型 CRISPR-Cas 系统外，还存在 2 个 III-B 型 CRISPR-Cas 系统(III-B Cmr α 和 III-B Cmr β)^[27]。III-B Cmr α 的 *cmr* 基因包括 *csm4a*、*csm5a*、*csm1a*、*csm6a*、*csm2a* 和 *csm3a*。III-B Cmr β 的 *cmr* 基因包括 *csm7*、*csm4 β* 、*csm5 β* 、*csm1 β* 、*csm6 β* 、*csm2 β* 和 *csm3 β* 。Csa3b 是 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的激活因子^[27]。Csa3b 可与 *cmr* 基因的启动子(*cmr4* 启动子和 *csm7* 启动子)结合，从而激活 *cmr* 基因的表达，进而增强 III-B 型 CRISPR-Cas 对靶标基因的干扰能力。但需要注意的是，Csa3b 仅能增强 III-B 型 CRISPR-Cas 对靶标 RNA 的切割能力，而对 III-B 型 CRISPR-Cas 介导的 DNA 干扰能力没有影响^[27]。

4 应答环境因子平衡 CRISPR-Cas 适应性免疫与水平基因转移

水平基因转移(horizontal gene transfer,

HGT)是驱动原核生物进化的重要推动力^[55]。在自然界中,水平基因转移包括3种方式:接合、自然转化和转导^[55]。CRISPR-Cas系统可选择性降解通过水平基因转移进入细胞的外源核酸,保护宿主免受噬菌体等的侵害。然而CRISPR-Cas系统在细胞内持续性地表达会增加代谢负担并引起宿主的自身免疫,从而降低宿主在环境中的竞争力。因此,原核生物需要应答环境信号平衡水平基因转移和CRISPR-Cas介导的适应性免疫。目前,人们对于原核生物如何应答环境因子协调水平基因转移和CRISPR-Cas介导的适应性免疫的认知仍十分有限。

有线索表明环境因子参与平衡CRISPR-Cas介导的适应性免疫与自然转化介导的水平基因转移。在大肠杆菌中,环境中碳源(如葡萄糖)可调节细胞中cAMP的水平。cAMP与其受体蛋白CRP组成的复合物cAMP-CRP,不仅通过降低自然转化的激活因子RpoS的水平抑制自然转化^[56],而且还通过与I-E型CRISPR-Cas系统的激活剂LeuO竞争来抑制宿主对P1噬菌体入侵的免疫能力^[35]。同时,cAMP-CRP通过激活*cas3*基因的转录水平提高大肠杆菌防御质粒入侵的能力^[31]。因此,cAMP-CRP可同时影响自然转化和CRISPR-Cas系统,这提示环境中的碳源可通过cAMP-CRP调控自然转化介导和适应性免疫系统。类组蛋白H-NS和同源物StpA不仅调节大肠杆菌的免疫活性^[32-33],而且在沙门氏菌中影响自然转化的调控因子RpoS的表达水平^[57-58]。我们最新的研究表明H-NS可同时抑制大肠杆菌自然转化和CRISPR-Cas系统^[59]。环境中抗生素可能也是参与平衡水平基因转移和CRISPR-Cas介导的适应性免疫的重要因子。在某些细菌中,抗生素可加速自然转化和接合介导的水平基因转移^[60-61]。而在

另外的细菌中,抗生素可通过H-NS抑制CRISPR-Cas系统^[62]。例如,在肺炎克雷伯氏菌中,抗生素亚胺培南(imipenem)引起的细胞压力诱导转录沉默因子H-NS表达,降低*cas3*的表达水平,进而降低I-E型CRISPR-Cas系统对靶标质粒的切割能力^[62](图3)。群体感应也可能是调控CRISPR-Cas适应性免疫和自然遗传转化所共有的环境信号。细胞密度的增加可增加某些细菌被环境中噬菌体感染的风险^[36]。在铜绿假单胞菌中,群体感应会激活I-F型CRISPR-Cas系统,从而抵御噬菌体的入侵^[38]。

5 总结与展望

原核生物中CRISPR-Cas系统可降低外源核酸入侵的风险。然而,CRISPR-Cas系统持续表达不仅消耗细菌的资源,降低其环境适应能力;而且增加将细菌自身基因组的DNA片段整合至CRISPR序列,引发自我免疫的风险。因此,当原核生物处于噬菌体入侵的低风险时期时,其CRISPR-Cas系统处于沉默状态或只有较低的表达水平;而在原核生物处于易受外源核酸入侵的高风险情况下,原核生物或通过细胞膜上的膜蛋白,或通过影响细胞内某些基因的表达,将信号从胞外传递至胞内的调控因子,再由胞内的调节因子精细地调控CRISPR-Cas系统表达,降低外源核酸入侵的风险。

除转录调控外,人们还发现了调控CRISPR-Cas系统的其他机制。近年来,研究揭示了III-A和III-B型CRISPR-Cas系统的功能调控机制^[63-65]。III-A和III-B型CRISPR-Cas系统的干扰复合物与靶标RNA结合,导致Cas10蛋白将ATP转化为环形寡聚腺苷酸(cyclic oligoadenylates, cOAs)。cOAs可激活Csm6(或Csx1)的RNA酶活性,使得目标RNA被非特异性地降解^[54]。在清除入侵者后,cOAs被宿主细胞内的环状

核酸酶降解^[54]。抗 CRISPR 蛋白是人们在噬菌体中发现的能抑制 CRISPR-Cas 系统活性的天然抑制剂,可帮助噬菌体逃逸 CRISPR-Cas 系统的攻击^[66]。最近的研究表明,抗 CRISPR 蛋白(anti-CRISPR protein)—AcrIII-1 蛋白可特异性降解 cOA₄,表明抗 CRISPR 蛋白可通过 cOA₄ 调控 CRISPR-Cas 系统^[67]。另外,人们发现转录调控因子 Csa3a 可同时上调冰岛硫化叶菌的 I-A 型 CRISPR-Cas 系统适应基因和 DNA 损伤修复相关基因的表达,从而修复由 I-A 型 CRISPR-Cas 系统造成的宿主基因组的损伤,加深了对 CRISPR-Cas 介导的自我免疫与基因组稳定性的认知^[68]。

综上所述,原核生物中 CRISPR-Cas 系统的转录调控方式多样,且细菌多通过全局或多效应调控因子(如 H-NS、cAMP-CRP 和 BaeSR 等)控制 CRISPR-Cas 系统的表达。在大肠杆菌中,全局调控因子 H-NS 和 cAMP-CRP 均可调控 I-E 型 CRISPR-Cas 系统和自然转化介导的水平基因转移^[35,56,59]。这暗示了当受到外界刺激时,细菌可能通过多效应因子偶联自然转化介导的水平基因转移与 CRISPR-Cas 介导的适应性免疫,从而使得宿主在摄取外源核酸的同时,启动胞内的 CRISPR-Cas 系统,降低危险核酸入侵的风险。此外,噬菌体感染会影响细菌的氨基酸代谢^[2]。转录调节因子 LeuO 既能响应氨基酸饥饿,也可通过阻遏 H-NS 促进 I-E 型 CRISPR-Cas 的表达^[2],从而使得细菌既能防御噬菌体的入侵,又能维持氨基酸代谢的正常进行。然而,目前我们对原核生物利用全局调控因子调节 CRISPR-Cas 系统的机理认知十分有限,仍有待进一步的探究。

认识细菌利用 CRISPR-Cas 系统防御核酸入侵机制,将有助于我们了解自然环境中微生物的进化机制,并为控制耐药性和毒力

基因在细菌中的传播提供新的策略。大肠杆菌中 cAMP-CRP 和 H-NS 同时抑制 I-E 型 CRISPR-Cas 系统和自然转化,表明某些环境因子(如葡萄糖)可通过细胞内信号途径同时调控 CRISPR-Cas 系统和自然转化,但详细机理仍有待进一步探索。其他一些环境因子(如细胞密度、抗生素等)可在不同的细菌中分别调控 CRISPR-Cas 系统和水平基因转移,但仍不清楚在同一体系中这些环境因子是否及如何通过胞内途径同时调控水平基因转移和 CRISPR-Cas 系统。笔者认为鉴定调控水平基因转移和 CRISPR-Cas 系统共有的环境信号及相应的细胞内调控网络,将为深入认识在原核生物进化过程中 CRISPR-Cas 系统的生物学意义具有重要价值。

参考文献

- [1] Patterson AG, Yevstigneyeva MS, Fineran PC. Regulation of CRISPR-Cas adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 1–7.
- [2] Dorman CJ, Ni Bhriain N. CRISPR-Cas, DNA supercoiling, and nucleoid-associated proteins. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(1): 19–27.
- [3] Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, 2018, 172(6): 1239–1259.
- [4] Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 67–78.
- [5] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 244–246.
- [6] Behler J, Hess WR. Approaches to study CRISPR RNA biogenesis and the key players involved. *Methods*, 2020, 172: 12–26.
- [7] Faure G, Shmakov SA, Yan WX, Cheng DR, Scott DA, Peters JE, Makarova KS, Koonin EV. CRISPR-Cas in mobile genetic elements: counter-defence and beyond. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(8): 513–525.

- [8] Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin EV, Van Der Oost J. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 2016, 353(6299): aad5147.
- [9] Shivram H, Cress BF, Knott GJ, Doudna JA. Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(1): 10–19.
- [10] Xiao YB, Luo M, Dolan AE, Liao MF, Ke AL. Structure basis for RNA-guided DNA degradation by Cascade and Cas3. *Science*, 2018, 361(6397): eaat0839.
- [11] Amitai G, Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(2): 67–76.
- [12] Jackson SA, Birkholz N, Malone LM, Fineran PC. Imprecise spacer acquisition generates CRISPR-Cas immune diversity through primed adaptation. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 250–260.
- [13] Radović M, Killelea T, Savitskaya E, Wettstein L, Bolt EL, Ivančić-Baće I. CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(19): 10173–10183.
- [14] Shiriaeva A, Fedorov I, Vyhovskiy D, Severinov K. Detection of CRISPR adaptation. *Biochemical Society Transactions*, 2020, 48(1): 257–269.
- [15] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van Der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964.
- [16] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao YJ, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [17] Nishimasu H, Nureki O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 43: 68–78.
- [18] Plagens A, Richter H, Charpentier E, Randau L. DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(3): 442–463.
- [19] Koonin EV, Makarova KS. Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back. *Genome Biology and Evolution*, 2017, 9(10): 2812–2825.
- [20] Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2019, 374(1772): 20180087.
- [21] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnyš V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, Van Der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67–83.
- [22] Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Classification and nomenclature of CRISPR-Cas systems: where from here? *The CRISPR Journal*, 2018, 1(5): 325–336.
- [23] Murugan K, Babu K, Sundaresan R, Rajan R, Sashital DG. The revolution continues: newly discovered systems expand the CRISPR-Cas as toolkit. *Molecular Cell*, 2017, 68(1): 15–25.
- [24] Liu T, Li YJ, Wang XD, Ye Q, Li H, Liang YX, She QX, Peng N. Transcriptional regulator-mediated activation of adaptation genes triggers CRISPR *de novo* spacer acquisition. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(2): 1044–1055.
- [25] Liu T, Liu ZZ, Ye Q, Pan SF, Wang XD, Li YJ, Peng WF, Liang YX, She QX, Peng N. Coupling transcriptional activation of CRISPR-Cas system and DNA repair genes by Csa3a in *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(15): 8978–8992.
- [26] He F, Vestergaard G, Peng WF, She QX, Peng X. CRISPR-Cas type I—a Cascade complex couples viral infection surveillance to host transcriptional regulation in the dependence of Csa3b. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(4): 1902–1913.
- [27] Ye Q, Zhao XQ, Liu JL, Zeng ZF, Zhang ZF, Liu T, Li YJ, Han WY, Peng N. CRISPR-associated factor Csa3b regulates CRISPR adaptation and Cmr-mediated RNA interference in *Sulfolobus islandicus*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2038.
- [28] Majsec K, Bolt EL, Ivančić-Baće I. Cas3 is a limiting factor for CRISPR-Cas immunity in *Escherichia coli* cells lacking H-NS. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 28.
- [29] Yang DH, Wang ZF, Ma JJ, Fu Q, Wu LF, Wang HG, Wang SH, Yan YX, Sun JH. Glycine cleavage system and cAMP receptor protein co-regulate CRISPR/*cas3* expression to resist bacteriophage. *Viruses*, 2020, 12(1): 90.

- [30] Perez-Rodriguez R, Haitjema C, Huang QQ, Nam KH, Bernardis S, Ke AL, DeLisa MP. Envelope stress is a trigger of CRISPR RNA-mediated DNA silencing in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(3): 584–599.
- [31] Pul Ü, Wurm R, Arslan Z, René geißen, Hofmann N, Wagner R. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-Cas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(6): 1495–1512.
- [32] Sun DC, Mao XD, Fei MY, Chen ZY, Zhu TH, Qiu JP. Histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS) paralogue StpA activates the type I-E CRISPR-Cas system against natural transformation in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(14): e00731-00720.
- [33] Westra ER, Pul Ü, Heidrich N, Jore MM, Lundgren M, Stratmann T, Wurm R, Raine A, Mescher M, Van Heereveld L, Mastop M, Wagner EGH, Schnetz K, Van Der Oost J, Wagner R, Brouns SJJ. H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6): 1380–1393.
- [34] Medina-Aparicio L, Rebollar-Flores JE, Gallego-Hernández AL, Vázquez A, Olvera L, Gutiérrez-Ríos RM, Calva E, Hernández-Lucas I. The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10): 2396–2407.
- [35] Yang CD, Chen YH, Huang HY, Huang HD, Tseng CP. CRP represses the CRISPR/Cas system in *Escherichia coli*: evidence that endogenous CRISPR spacers impede phage P1 replication. *Molecular Microbiology*, 2014, 92(5): 1072–1091.
- [36] Patterson AG, Jackson SA, Taylor C, Evans GB, Salmond GPC, Przybilski R, Staals RHJ, Fineran PC. Quorum sensing controls adaptive immunity through the regulation of multiple CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell*, 2016, 64(6): 1102–1108.
- [37] Patterson AG, Chang JT, Taylor C, Fineran PC. Regulation of the Type I-F CRISPR-Cas system by CRP-cAMP and GalM controls spacer acquisition and interference. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(12): 6038–6048.
- [38] Høyland-Kroghsbo NM, Paczkowski J, Mukherjee S, Broniewski J, Westra E, Bondy-Denomy J, Bassler BL. Quorum sensing controls the *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR-Cas adaptive immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(1): 131–135.
- [39] Borges AL, Castro B, Govindarajan S, Solvik T, Escalante V, Bondy-Denomy J. Bacterial alginate regulators and phage homologs repress CRISPR-Cas immunity. *Nature Microbiology*, 2020, 5(5): 679–687.
- [40] Ahator SD, Wang JH, Zhang LH. The ECF sigma factor PvdS regulates the type I-F CRISPR-Cas system in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.01.31.929752.
- [41] Workman RE, Pammi T, Nguyen BTK, Graeff LW, Smith E, Sebald SM, Stoltzfus MJ, Euler CW, Modell JW. A natural single-guide RNA repurposes Cas9 to autoregulate CRISPR-Cas expression. *Cell*, 2021, 184(3): 675–688.
- [42] Bernal-Bernal D, Abellón-Ruiz J, Iniesta AA, Pajares-Martínez E, Bastida-Martínez E, Fontes M, Padmanabhan S, Elías-Arnanz M. Multifactorial control of the expression of a CRISPR-Cas system by an extracytoplasmic function σ /anti- σ pair and a global regulatory complex. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(13): 6726–6745.
- [43] Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82: 237–266.
- [44] 孙东昌, 裘娟萍. I-E 型 CRISPR/Cas 系统介导适应性免疫分子机制研究进展. *微生物学报*, 2016, 56(1): 1–7.
- Sun DC, Qiu JP. Advances in molecular mechanisms of adaptive immunity mediated by type I-E CRISPR/Cas system—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 1–7. (in Chinese)
- [45] Xue CY, Sashital DG. Mechanisms of type I-E and I-F CRISPR-Cas systems in *Enterobacteriaceae*. *EcoSal Plus*, 2019, 8(2).
- [46] Arslan Z, Stratmann T, Wurm R, Wagner R, Schnetz K, Pul Ü. RcsB-BglJ-mediated activation of Cascade operon does not induce the maturation of CRISPR RNAs in *E. coli* K12. *RNA Biology*, 2013, 10(5): 708–715.
- [47] Yosef I, Goren MG, Kiro R, Edgar R, Qimron U. High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(50): 20136–20141.

- [48] Hampton HG, Patterson AG, Chang JT, Taylor C, Fineran PC. GalK limits type I-F CRISPR-Cas expression in a CRP-dependent manner. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(11): fnz137.
- [49] Høyland-Kroghsbo NM, Muñoz KA, Bassler BL. Temperature, by controlling growth rate, regulates CRISPR-Cas activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 2018, 9(6): e02184-18.
- [50] Lin P, Pu QQ, Wu Q, Zhou CM, Wang B, Schettler J, Wang ZH, Qin SG, Gao P, Li RP, Li GP, Cheng ZY, Lan LF, Jiang JX, Wu M. High-throughput screen reveals sRNAs regulating crRNA biogenesis by targeting CRISPR leader to repress Rho termination. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3728.
- [51] Le Rhun A, Escalera-Maurer A, Bratovič M, Charpentier E. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. *RNA Biology*, 2019, 16(4): 380–389.
- [52] Mosterd C, Moineau S. Characterization of a type II-A CRISPR-Cas system in *Streptococcus mutans*. *mSphere*, 2020, 5(3).
- [53] Serbanescu MA, Cordova M, Krastel K, Flick R, Beloglazova N, Latos A, Yakunin AF, Senadheera DB, Cvitkovitch DG. Role of the *Streptococcus mutans* CRISPR-Cas systems in immunity and cell physiology. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(4): 749–761.
- [54] Huang FT, Zhu B. The cyclic oligoadenylate signaling pathway of type III CRISPR-Cas systems. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 602789.
- [55] Sun DC. Pull in and push out: mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2154.
- [56] Guo MY, Wang HY, Xie NB, Xie ZX. Positive effect of carbon sources on natural transformation in *Escherichia coli*: role of low-level cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein in the derepression of *rpoS*. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(20): 3317–3328.
- [57] Battesti A, Tsegaye YM, Packer DG, Majdalani N, Gottesman S. H-NS regulation of IraD and IraM antiadaptors for control of RpoS degradation. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(10): 2470–2478.
- [58] Lucchini S, McDermott P, Thompson A, Hinton JCD. The H-NS-like protein StpA represses the RpoS (σ^{38}) regulon during exponential growth of *Salmonella Typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(5): 1169–1186.
- [59] 陈紫燕. 类组蛋白调控大肠杆菌摄取和免疫防御质粒机制研究. 浙江工业大学硕士论文, 2021.
- [60] Lu Y, Zeng JM, Wang LJ, Lan K, Shunmei E, Wang LN, Xiao Q, Luo Q, Huang XZ, Huang B, Chen C. Antibiotics promote *Escherichia coli*-*Pseudomonas aeruginosa* conjugation through inhibiting quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(12): e01284-01217.
- [61] Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 2006, 313(5783): 89–92.
- [62] Lin TL, Pan YJ, Hsieh PF, Hsu CR, Wu MC, Wang JT. Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31644.
- [63] Han WY, Stella S, Zhang Y, Guo T, Sulek K, Peng-Lundgren L, Montoya G, She QX. A type III-B Cmr effector complex catalyzes the synthesis of cyclic oligoadenylate second messengers by cooperative substrate binding. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(19): 10319–10330.
- [64] Kazlauskienė M, Kostiuk G, Venclovas Č, Tamulaitis G, Siksnys V. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems. *Science*, 2017, 357(6351): 605–609.
- [65] Niewoehner O, Garcia-Doval C, Rostøl JT, Berk C, Schwede F, Bigler L, Hall J, Marraffini LA, Jinek M. Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature*, 2017, 548(7669): 543–548.
- [66] Jia N, Patel DJ. Structure-based functional mechanisms and biotechnology applications of anti-CRISPR proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(8): 563–579.
- [67] Athukoralage JS, McMahon SA, Zhang CY, Gruschow S, Graham S, Krupovic M, Whitaker RJ, Gloster TM, White MF. An anti-CRISPR viral ring nuclease subverts type III CRISPR immunity. *Nature*, 2020, 577(7791): 572–575.
- [68] Liu ZZ, Sun MM, Liu JL, Liu T, Ye Q, Li YJ, Peng N. A CRISPR-associated factor Csa3a regulates DNA damage repair in Crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(17): 9681–9693.

(本文责编 张晓丽)