2026, 66(10): 4900-4919
CSTR: 32112.14.j.AMS.20260203
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20260203

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

谷氨酸棒杆菌 EsrISR 系统响应高渗胁迫与维持细胞壁完整性的机制研究

季傲艺，范志豪，罗薪涛，高惠，徐美娟*

江南大学 生物工程学院，工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡

季傲艺, 范志豪, 罗薪涛, 高惠, 徐美娟. 谷氨酸棒杆菌 EsrISR 系统响应高渗胁迫与维持细胞壁完整性的机制研究[J]. 微生物学报, 2026, 66(10): 4900-4919.

JI Aoyi, FAN Zhihao, LUO Xintao, GAO Hui, XU Meijuan. Mechanisms of the response of EsrISR system of *Corynebacterium glutamicum* to hyperosmotic stress and maintenance of cell wall integrity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(10): 4900-4919.

摘　要：【目的】解析由辅助蛋白 EsrI、组氨酸激酶 EsrS 与响应调节子 EsrR 组成的三组分 EsrISR 系统在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)应对高渗胁迫中的信号感应逻辑及其维持细胞壁稳态的分子机制。【方法】通过转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)筛选锁定应激核心基因簇，利用同源重组技术构建了一系列缺失突变体及过表达株，并结合转录融合报告系统、电子显微镜成像、凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)以及实时荧光定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)定量分析深入探讨了该系统的感应阈值、应激模式及全局靶基因网络。【结果】转录组学测序显示，在 1.7 mol/L NaCl 胁迫下 *esrISR* 基因簇呈显著上调。在同等胁迫下，响应调节子 EsrR 的缺失会导致生物量显著降低，最大 OD_{600} 下降至野生型的 47.8%；且电镜观察到细胞壁发生严重的破损塌陷现象。通过构建、分析报告质粒，发现此系统受到内部启动子驱动；在 1.7 mol/L NaCl 胁迫时 *esrISR* 基因表达呈峰值，最大荧光强度达 880 RFU/OD_{600}。本研究提出的调控模型表明，在无外界胁迫时 EsrS 主要发挥磷酸酶活性以维持系统的抑制状态(缺失 *esrS* 导致 *esrI* 表达上调约 15.0 倍)；感知高渗信号后 EsrS 活性发生改变，促使响应调节子 EsrR 发生磷酸化。随后，磷酸化后的 EsrR 特异性结合至核心调控区，进而开启正反馈调控回路。转录组学分析表明，Δ*esrR* 中涉及细胞壁稳态的关键基因表达发生改变，尤其是肽聚糖合成基因(如 *murB*、*CGL_RS01830* 等)显著下调。RT-qPCR 实验证实，EsrR 具有调节细胞壁合成的功能，其主要通过正向激活细胞壁合成途径的关键基因响应高渗胁迫。其中，肽聚糖合成基因 *murB* 与 *CGL_RS01830* 在 Δ*esrR* 中下调约 95.0%，在 *esrR* 过表达(*esrR*-OE)菌

资助项目：国家自然科学基金(32570026)；国家重点研发计划(2023YFD1300700)；江南大学工业生物技术教育部重点实验室项目(KLIB-KF202504)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32570026), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1300700), and the Program of Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education in Jiangnan University (KLIB-KF202504).

*Corresponding author. E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn

Received: 2026-03-11; Accepted: 2026-04-21; Published online: 2026-06-03

株中上调 2.0−6.5 倍；海藻糖合成基因 *treS*、*treY* 与 *treZ* 在缺失株中表达量下降了 75.0%−83.0%，在过表达株中上调 2.5−4.2 倍；*cmrA* 与 *gatC* 在缺失株中表达量下调并在过表达株中上调 3.5 倍，从而有效维持了细胞壁的物理稳态。【结论】本研究为三组分 EsrISR 系统参与棒状菌属细胞壁稳态的调控提供了新的见解，并为工业底盘菌株的鲁棒性改造提供了关键遗传靶点。

关键词：谷氨酸棒杆菌；三组分系统；细胞壁结构；高渗胁迫

Mechanisms of the response of EsrISR system of *Corynebacterium glutamicum* to hyperosmotic stress and maintenance of cell wall integrity

JI Aoyi, FAN Zhihao, LUO Xintao, GAO Hui, XU Meijuan*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To elucidate the signal sensing logic of the three-component EsrISR system, which is composed of the accessory protein EsrI, the histidine kinase EsrS, and the response regulator EsrR, in *Corynebacterium glutamicum* under hyperosmotic stress and its molecular mechanism for maintaining cell wall homeostasis. **[Methods]** The core stress-responsive gene cluster was identified through RNA-seq. A series of deletion mutants and overexpression strains were constructed through homologous recombination technology. The transcriptional fusion reporter system, field emission scanning electron microscopy/transmission electron microscopy (FESEM/TEM), electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and real-time quantitative reverse transcription PCR, (RT-qPCR) were employed to systematically investigate the sensing threshold, stress response patterns, and global target gene networks of this system. **[Results]** RNA-seq showed that the *esrISR* gene cluster was significantly upregulated under 1.7 mol/L NaCl stress. Under the same stress conditions, the deletion of the regulator EsrR led to a significant decrease in biomass, with the maximum OD_{600} dropping to 47.8% of that of the wild type. Moreover, severe damage and collapse of the cell wall were observed *via* electron microscopy. The construction and analysis of reporter plasmids showed that this system was driven by an internal promoter, peaking at 1.7 mol/L NaCl, with a maximum fluorescence intensity of 880 RFU/OD_{600}. The proposed regulatory model indicated that in the absence of external stress, EsrS mainly exerted phosphatase activity to repress the transcription of *esrI*, thereby maintaining the repressed state of the system (deletion of *esrS* led to an approximately 15.0-fold upregulation of *esrI*). Upon sensing hyperosmotic signals, EsrS changed its activity, promoting the phosphorylation of the regulator EsrR. Subsequently, the phosphorylated EsrR specifically bound to the core regulatory region, thereby activating the positive feedback regulatory loop. Transcriptomic analysis revealed significant alterations in the expression of key genes associated with cell wall homeostasis in the

esrR deletion mutant (Δ*esrR*). RT-qPCR analysis confirmed that EsrR functioned as a crucial regulator of cell wall biosynthesis primarily by positively activating key pathway genes. Specifically, the peptidoglycan synthesis genes *murB* and *CGL_RS01830* were downregulated by 95.0% in Δ*esrR* and upregulated by 2.0−6.5 fold in *esrR*-OE; the trehalose biosynthesis genes *treS*, *treY*, and *treZ* were downregulated by 75.0%−83.0% in Δ*esrR* and upregulated by 2.5−4.2 fold in *esrR*-OE; *cmrA* and *gatC* were significantly repressed in Δ*esrR* and upregulated by 3.5-folds in *esrR*-OE, thereby effectively maintaining the physical homeostasis of the cell wall. **[Conclusion]** This study provides new insights into the regulation of cell wall homeostasis by the three-component EsrISR system in *Corynebacterium*, providing critical genetic targets for the robustness engineering of industrial chassis strains.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; three-component system; cell wall structure; hyperosmotic stress

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种非致病性、无芽孢的革兰氏阳性土壤细菌，属于棒状菌属中的生物安全菌[1]。同时也是一种重要的高产氨基酸工业底盘菌株，被广泛应用于大规模生物制造，如生产 L-谷氨酸、L-亮氨酸等[2-4]。在工业发酵过程中，由于补料、机械搅拌及产物积累，胞外环境常处于剧烈波动中，其中渗透压胁迫(osmotic stress)是影响菌株生长与生产水平的核心限制因素[4-7]。底盘细胞在面对上述渗透压胁迫时能否通过高效的信号转导与代谢重排来维持生理机能的稳定，直接决定了菌株的鲁棒性(即在多变压力下维持代谢稳态与生理平衡的能力)[8-10]。因此，深入解析谷氨酸棒杆菌感应并应对高渗环境的分子机制，不仅是提升底盘细胞鲁棒性的核心途径，对于构建高强度工业底盘也具有重要的理论与实践意义[11]。特别是近年来，各类合成生物学工具(如新型生物传感器的设计以及基于 CRISPRi 的动态代谢调控等)在谷氨酸棒杆菌中的广泛应用[12-13]，使得挖掘天然的环境响应网络并将其转化为智能调控元件成为了工业底盘改造的前沿热点。

作为棒状菌属的代表菌种之一，谷氨酸棒杆菌拥有极其复杂的细胞壁(cell wall)结构。该屏障由内层的肽聚糖(peptidoglycan)、中层的阿拉伯半乳聚糖(arabinogalactan)以及外层特有的分枝菌酸层(mycolic acids)共同组成[14-17]，这 3 种物质构成了抵御外界物理化学损伤的第一道防线。研究表明，细胞壁的结构完整性与化学组成是菌株鲁棒性的物质基础，当细胞面临高渗胁迫时需要迅速激活特定的响应系统，通过加强细胞壁的物理强度、积累海藻糖等相容性溶质以抵御胞内渗透压失衡引发的生长抑制[18-19]。

为了应对多变的环境胁迫并维持细胞壁稳态，细菌形成了高度复杂的信号转导网络，以精准感知外界或自身的压力信号。虽然经典的双组分信号转导系统(two-component system, TCS)在感知渗透压、pH 值等外部刺激并重编排生理功能中发挥了基础作用，但在应对更为复杂的工业发酵环境时，细菌通常依赖于更加精细的调控机制[20-22]。近年来，三组分系统逐渐引起关注，其中 EsrISR 三组分系统便是典型代表。研究表明，该系统中的第三组分(辅助蛋白)通常通过与组氨酸激酶(histidine kinase, HK)或响应调节因子(response regulator, RR)发生直接物理互作来调控磷酸化级联反应[23-24]。本文对 EsrISR 三组分系统的定义并不是指 3 条独立的信号传导链，而是根据 *esrISR* 基因簇的形式，以及辅助蛋白 EsrI 与组氨酸激酶(HK)、响应调节因子(RR)之间的转录调控关联所定义的复合调控系统。

为了实现这种系统级的控制，谷氨酸棒杆菌中存在一个进化保守且与外界胁迫应激反应高度相关的三组分基因簇 *esrISR*。该模块编码一个假定的组氨酸激酶(EsrS)、一个响应调节因子(EsrR)以及一个小分子辅助蛋白(EsrI)。在无胁迫条件下，辅助蛋白 EsrI 与组氨酸激酶 EsrS 之间存在显著的转录调控关联，并对系统发挥抑制作用。然而，尽管已知该系统参与了菌株的抗逆响应，但在环境胁迫发生时 EsrI 确切的作用机制以及它是如何在转录层面与 EsrS-EsrR 协同调控以解除抑制并驱动下游靶基因的表达，至今尚未完全阐明[25-26]。

本研究以 EsrISR 系统为切入点，全面解析三组分系统内部的转录调控及响应高渗胁迫的分子调控网络。本研究旨在探究在无胁迫条件下 EsrI 对 EsrS 在转录水平上的关联及其对系统的潜在抑制作用，并进一步考察面临高渗胁迫时 EsrS 向响应调节因子 EsrR 传递信号的动态过程及激活机制。此外，本研究还将评估被激活的 EsrISR 信号枢纽对肽聚糖、分枝菌酸及海藻糖协同合成的驱动作用，阐明该过程在代谢流量重分配和细胞壁屏障加固中的生理功能。在此基础上进一步解析谷氨酸棒杆菌复杂信号转导网络，以填补相关理论空白，并为高鲁棒性工业底盘细胞的理性设计提供具有潜力的基因元件与干预靶点。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

本研究所使用的菌株和质粒如表 1 所示，所用引物信息如表 2 所示。

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L)：NaCl 10.0，蛋白胨 10.0，酵母粉 5.0。固体 LB 培养基(g/L)：NaCl 10.0，蛋白胨 10.0，酵母粉 5.0，琼脂粉 17.0。大肠杆菌感受态制备试剂：A 液-$CaCl_2$ 0.1 mol/L；B 液-$CaCl_2$ 0.1 mol/L，15% 甘油。BHI 培养基(g/L)：脑心浸出肉汤 38.5。固体 BHI 培养基(g/L)：脑心浸出肉汤 38.5，琼脂粉 17.0。LBGS 培养基(g/L)：酵母提取物 5.0，NaCl 10.0，蛋白胨 10.0，葡萄糖 7.0，20% 蔗糖。谷氨酸棒杆菌感受态培养基(g/L)：脑心浸出肉汤 38.5，甘氨酸 3.0，0.01% 吐温-80。TB 培养基(g/L)：酵母粉 24.00，蛋白胨 12.00，甘油 4.00，K_2HPO_4 12.54，KH_2PO_4 2.31。

LB 于 121 ℃灭菌 15 min，TB 于 115 ℃灭菌 20 min。

谷氨酸棒杆菌培养条件为 30 ℃、220 r/min。培养时抗生素终浓度为：氨苄青霉素 100 μg/mL、卡那霉素 50 μg/mL、氯霉素 20 μg/mL。

1.3 缺失菌株的构建

利用 pK18mob*sacB* 穿梭质粒携带的蔗糖致死基因 *sacB*，使菌株进行二次同源重组，达到敲除基因的目的。

表1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Plasmid/Strain	Feature
Plasmid	
pET28a	Shuttle vector between *E. coli* and *C. glutamicum*, Kan^R, P_{lac}
pXMJ19	Shuttle vector between *E. coli* and *C. glutamicum*, Chl^R, P_{tac}
pK18mob*sacB*	Suicide plasmid carrying *sacB* for gene deletion in *C. glutamicum*, Kan^R
pET28a-*esrR*	pET28a harboring *esrR*, Kan^R
pXMJ19-*esrI*	pXMJ19 harboring *esrI*, Chl^R

(待续)

(续表 1)

Plasmid/Strain	Feature
pXMJ19-*esrS*	pXMJ19 harboring *esrS*, Chl^R
pXMJ19-*esrR*	pXMJ19 harboring *esrR*, Chl^R
pXMJ19-P_{esrIS}-*mKate2*	pXMJ19 harboring P_{esrIS} and *mKate2*, Chl^R
pXMJ19-P_{esrR}-*mKate2*	pXMJ19 harboring P_{esrR} and *mKate2*, Chl^R
pK18-Δ*esrI*	pK18mob*sacB* for *esrI* deleting
pK18-Δ*esrS*	pK18mob*sacB* for *esrS* deleting
pK18-Δ*esrR*	pK18mob*sacB* for *esrR* deleting
pK18-Δ*Cg0424*	pK18mob*sacB* for *Cg0424* deleting
pK18-Δ*murB*	pK18mob*sacB* for *murB* deleting
pK18-Δ*treY*	pK18mob*sacB* for *treY* deleting
pK18-Δ*treS*	pK18mob*sacB* for *treS* deleting
pK18-Δ*treZ*	pK18mob*sacB* for *treZ* deleting
pK18-Δ*gatC*	pK18mob*sacB* for *gatC* deleting
Strain	
E. coli BL21(DE3)	The expressing host for recombinant protein
E. coli DH5α	The expressing host for recombinant protein
CA00	*C. glutamicum* ATCC 13032
ES01	BL21 harboring pET28a
ES02	BL21 harboring pXMJ19
ES03	BL21 harboring pK18mob*sacB*
ES04	BL21 harboring pET28a-*esrR*
ES05	DH5α harboring pXMJ19-*esrI*
ES06	DH5α harboring pXMJ19-*esrS*
ES07	DH5α harboring pXMJ19-*esrR*
ES08	DH5α harboring pXMJ19-P_{esrIS}-*mKate2*
ES09	DH5α harboring pXMJ19-P_{esrR}-*mKate2*
ES10	BL21 harboring pK18-Δ*esrI*
ES11	BL21 harboring pK18-Δ*esrS*
ES12	BL21 harboring pK18-Δ*esrR*
CA01	CA00 harboring pXMJ19-*esrI*
CA02	CA00 harboring pXMJ19-*esrS*
CA03	CA00 harboring pXMJ19-*esrR*
CA04	CA00 harboring pXMJ19-P_{esrIS}-*mKate2*
CA05	CA00 harboring pXMJ19-P_{esrR}-*mKate2*
CA06	CA00Δ*esrI*
CA07	CA00Δ*esrS*
CA08	CA00Δ*esrR*

表2 本研究所用引物

Table 2 The primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5′→3′)
pET28A-F	AGCAACCGCACCTGTGGC
pET28A-R	GCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGC
pET28A-*esrR*-F	CGCGGATCCATGGTTGATGTGTTTTTGGTCG
pET28A-*esrR*-R	CGACGGAGCTCGAATTCTTAGTCAAG
F-pET28A-*esrR*-F	CACTCGAGGGATCTTGACTAAGAATTCGAGCTCC
F-pET28A-*esrR*-R	CAACCATGGATCCGCGACCCATTTG
P19-*esrI*-F	CGAAAGGAGATGAGTACTTTTCAGGAGC
P19-*esrI*-R	GATCCTCTAGAGCTAGTCATTCTGATCAGC
F-P19-*esrI*-R	CTCATCTCCTTTCGACCTGCAGGCATG
FF-P19-*esrI*-F	CTAGCTCTAGAGGATCCCCGGGTACC
P19-*esrS*-F	CAGGTCGAAAGGAGGTGCCTTTATATCC
P19-*esrS*-R	GATCCTCTAGAGCTACACATCCATGGTG
F-P19-*esrS*-R	CTCCTTTCGACCTGCAGGCATG
F-P19-*esrS*-F	GTAGCTCTAGAGGATCCCCGGGTAC
P19-*esrR*-F	CTTGCAATGCATCATCATCATCACGTTGATGTGTTTTTG
P19-*esrR*-R	CTGCAGGCATTAGTCAAGATCCCTCGAGTGAG
P19-F-*esrR*-F	GAGGGATCTTGACTAATGCCTGCAGGTCG
P19-F-*esrR*-R	GATGATGCATTGCAAGCTTAATTAATTCTGTTTCC
p19-P_{esrIS}-*mKate2*-F	CAGGTCGACGTGAACGTGGCCAAG
p19-P_{esrIS}-*mKate2*-R	TCCTCCTTTATCCTGCACCGCGGTC
p19-P_{esrIS}-*mKate2*-F-F	GTCGACCTGCAGGCATGCAAGC
p19-P_{esrIS}-*mKate2*-F-R	TCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGC
p19-P_{esrR}-*mKate2*-F	GGAGGACAACCATGCTATCCGAATTG
p19-P_{esrR}-*mKate2*-R	GGAAGCTTTTATCGATGTCCGAGTTTAGAC
p19-P_{esrR}-*mKate2*-F-F	GATAAAAGCTTCCCCGCGAAAGCGGGGTTTTTTTTTTTG
p19-P_{esrR}-*mKate2*-F-R	CTTAATTAATTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTC
esrI-S-F	CATGATTACGAATTCAGACTCTATTGTGGAGTGTTGAGG
esrI-S-R	GCAGGCGTCACAGGCACGATAC
esrI-X-F	CCTGTGACGCCTGCCATACGAG
esrI-X-R	CGAGCTCCCCGACCCTATGTGAG
pk18-F-*esrI*-F	GTCGGGGAGCTCGGTACCCG
pk18-F-*esrI*-R	GAGTCTGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCC
esrS-S-F	CAGCTATGACATGATTACGAATTCCTTCAAAGTAGATGGGATCG
esrS-S-R	GTACGACCAACGCTTGCCCCGCAG
esrS-X-F	CTGCGGGGCAAGCGTTGGTCGTAC
esrS-X-R	GGTCGACTCTAGAGGATCCCATTTCGATCAACTTGAGGTTTGCCC
pk18-F-*esrS*-F	GGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGG
pk18-F-*esrS*-R	GAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG

(待续)

(续表2)

Primer names	Primer sequences (5′→3′)
esrR-1-F	CATGATTACGAATTCGAAAAAGGGGAGTGGGG
esrR-1-R	CTTTTTAGCCGCCAGCCTTTCAGGTTAC
esrR-2-F	GAAAGGCTGGCGGCTAAAAAGAGTGGCG
esrR-2-R	GTACCGAGCTCCTGCTACACCGGGTGG
pk18-F-*esrR*-F	GTGTAGCAGGAGCTCGGTAC
pk18-F-*esrR*-R	CGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCC
esrIS 5′ UTR-F	GCTTGGCAGGGATGCGTGCGG
esrIS 5′ UTR-R	GATATAAAGGCACCGCTTGCCCCGCAG
esrR 5′ UTR-F	CCTGAAAAGTACTCATAGACTCTATTGTGGAGTGTTGAGG
esrR 5′ UTR-R	CGCTTGCCCCGCAGGCTG

1.4 生长曲线的测定

将待测菌株保菌管分别划线于相应 BHI 抗性固体培养基上，在 30 ℃恒温培养箱中倒置培养 24 h，进行菌种活化。培养结束后，从平板上挑取单菌落，在超净台中进行无菌操作，接种至装有 10 mL 液体 BHI 相应抗性的培养基中，30 ℃、200 r/min 培养 12 h，至对数生长中后期 OD_{600} 为 4.0，获得活化种子液。将上述制备的种子液按体积分数为 1% 的接种量，转接至装有 50 mL 新鲜 BHI 相应抗性液体培养基的 250 mL 不带挡板的三角瓶中，30 ℃、200 r/min 培养。接种后的初始 OD_{600} 值为 0.1。自接种起，每隔 2 h 取样 1 次，每次吸取 200 μL 培养液，以未接种的空白培养基作为对照，使用紫外-可见分光光度计测定波长 600 nm 处的吸光度值(OD_{600})。

在菌液浓度超出仪器准确测量范围(OD_{600}= 0.1−0.8)的情况下，使用无菌生理盐水对样液进行适当倍数的稀释后再行测定。每个重组菌株及野生型对照均设置 3 个生物学重复。最终以培养时间为横坐标、对应的 OD_{600} 值为纵坐标，利用 GraphPad Prism 软件绘制并比较各菌株的生长曲线。

1.5 突变株制样及形态观察

使用无菌刮刀从 BHI 培养基平板上刮取单菌落，转移至已灭菌的 1.5 mL 离心管中，以 4 ℃、2 500 r/min 离心 1 min，收集到约黄豆大小的菌体沉淀。沿管壁缓慢加入 2.5% 戊二醛固定液将沉淀完全浸没，于 4 ℃静置固定过夜。弃去固定液后，加入 0.1 mol/L PBS 轻柔漂洗 3 次，每次 10 min。随后使用梯度浓度的无水乙醇进行脱水。处理完成后的样品使用电子显微镜(Hitachi 公司)进行观察检测[27]。

1.6 突变株高渗耐受性点板实验

将相应的谷氨酸棒杆菌培养至对数生长期(OD_{600} 为 4.0)，然后以 10 倍稀释梯度连续稀释至 10^{-7}，每个稀释梯度各取 1.5 μL 稀释液，在含有相应氯化钠浓度胁迫的 BHI 平板上进行点板，于 30 ℃下培养 24 h 至菌落长出，观察结果。

1.7 RNA 的提取、反转录

RNA 提取方法见 RNA simple 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]说明书。实时荧光定量逆转录 PCR (real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)使用 ChamQ SYBR-qPCR Master Mix 试剂盒(武汉爱博泰克生物科技有限公司)，体系详见说明书。

1.8 转录组测序分析

将谷氨酸棒杆菌接种于 BHI 培养基中，30 ℃培养至 OD_{600} 为 0.6 时，4 ℃、12 000 r/min 离心 2 min，收集菌体沉淀，用液氮保存。选择在对数前期取样，主要是为了排除后期由于营养受限带来的次级干扰，从而反映突变株早期

的基因表达状态。经 NanoDrop ND-1000 核酸检测仪(LabTech 公司)检测 RNA 的浓度与纯度。基于 Illumina 二代高通量测序平台(HiSeq 4000)测序，由金唯智科技有限公司完成。

1.9 实时荧光定量逆转录 PCR

选择了 14 个相关基因，以高水平、恒定表达的 16S rRNA 基因为内参基因，以逆转录后的 cDNA 为模板，使用 ChanQ Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 RT-qPCR 分析，检测 mRNA 相对表达量。qPCR 结果与转录组测序数据结果均以|$\log_2$ fold change|表示。

1.10 凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基因组为模板，使用表 2 中的引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25.0 μL)：2×KeyPo SE Master Mix 12.5 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL，DNA 模板 0.5 μL，ddH_2O 10.0 μL。PCR 反应条件：94 ℃预变性 2 min；98 ℃变性 10 s，58 ℃退火 30 s，68 ℃延伸 30 s，共 35 个循环；72 ℃终延伸 10 min。切胶纯化后获得目的基因的 5′-UTR 启动子探针。将 EsrR 蛋白、EMSA 结合缓冲液与探针于 25 ℃条件下孵育 30 min 后，加入上样缓冲液，并在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上 4 ℃、100 V 电泳 2 h，使用光谱成像系统可视化结合带。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸棒杆菌在高渗胁迫下的生长抑制程度及 *esrISR* 核心靶点的确立

本研究首先通过生长曲线测定，量化评估了不同程度的渗透压胁迫对野生型(WT)菌株生长的抑制程度。生长曲线(图 1)显示，随着 NaCl 浓度升高，WT 菌株的倍增时间显著延长，最大 OD_{600} 值在 1.7 mol/L NaCl 条件下较对照组下降约 32%。1.9 mol/L NaCl 对生长的抑制更为显著，OD_{600} 仅为 5.5 左右，而当胁迫浓度进一步提升至 2.1 mol/L 时，菌株的生长受到了极大的抑制，最大 OD_{600} 仅在 1.5 左右，当 2.3 mol/L 时菌株生长则被完全抑制。

表 3 结果显示，编码三组分系统的基因簇 *esrISR* 转录水平显著上调。数据显示，在 1.7 mol/L NaCl 胁迫下，基因 *esrI* 的 FPKM 值从无胁迫时的 30.9 显著升至 3 324.3，差异倍数高达 107.3；基因 *esrS* 与基因 *esrR* 的 FPKM 值也

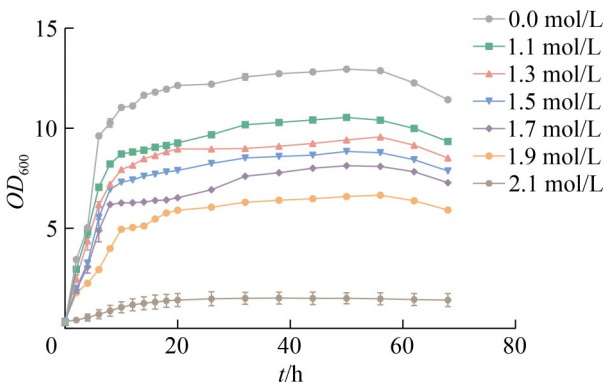


图1 不同程度的渗透压胁迫对谷氨酸棒杆菌生长的影响

Figure 1 Effects of hyperosmotic stress under varying NaCl concentrations on the growth of *Corynebacterium glutamicum*. Growth curves of *Corynebacterium glutamicum* under various osmotic pressures (0.0−2.1 mol/L NaCl) were measured over time, with a control group (without added stress) for comparison. The 0.0 mol/L NaCl group is the control group. Data represent the mean of three independent replicates.

表3 三组分系统*esrISR*在1.7 mol/L NaCl浓度下的转录组数据

Table 3 Transcriptome data of the three-component system *esrISR* at a 1.7 mol/L NaCl concentration

Gene	FPKM values (WT *vs*. 1.7 mol/L NaCl)	Fold change
esrI	30.9 *vs*. 3 324.3	107.3 ↑
esrS	28.0 *vs*. 349.7	12.5 ↑
esrR	76.3 *vs*. 402.9	5.3 ↑

↑ indicates up-regulation.

分别由 28.0 和 76.3 显著升至 349.7 和 402.9，上调倍数分别为 12.5 和 5.3。由于该组分系统显著的上调表达，该系统被确认为本研究的核心靶点。

2.2 EsrISR 三组分系统的结构域鉴定与序列保守性分析

本研究利用 UniProt 数据库(https://www.uniprot.org/)对其编码蛋白的结构域进行分析，并采用 TMHMM Server v.2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)对蛋白跨膜区进行预测[28-29]。结构域预测分析结果如图 2A 所示，*esrISR* 基因簇编码 3 种核心蛋白。其中，传感器激酶 EsrS 在 N 端(6−59 aa)存在 PspC 结构域，其 C 端(293−379 aa)含有典型组氨酸激酶催化与 ATP 结合结构域(HATPase_dom)，负责消耗 ATP 进行自身磷酸化，是信号向下游传递的基础[25,30]。信号执行由响应调节因子 EsrR 完成，其 N 端(3−117 aa)包含 REC 结构域，负责接收来自 EsrS 的磷酸基团；其 C 端(163−228 aa)拥有的 HTH_luxR 型结构域，预示其具备特异性结合靶基因启动子并驱动防御网络的能力[31-32]。该系统区别于典型双组分系统的显著特征是额外编码了辅助跨膜蛋白 EsrI。EsrI 包含 N 端 PspC 结构域(51−98 aa)与 C 端 LiaF 样结构域(300−385 aa)。现有的同源蛋白功能研究表明，N 端的 PspC 结构域在多种细菌的噬菌体休克系统中广泛存在，并被证实能够直接感知细胞被膜完整性的破坏或跨膜电位的异常波动，是触发细胞壁应激响应的核心传感模块；而 C 端的 LiaF 样结构域在经典的 LiaFSR 三组分包膜应激系统中已被证实为关键的抑制性元件。在无外界胁迫的状态下，LiaF 样结构域能够通过与组氨酸激酶发生直接的物理互作，将其锁定在无活性的状态，从而对整个系统发挥负向调节作用。这表明 EsrI 可通过这两大结构域实现对应激信号的敏感捕捉与感应阈值的精确控制[24,33-34]。

多重序列比对结果如图 2B 所示，EsrS 的 H207 磷酸化位点与 EsrR 的 D51 磷酸化受体位点在多种细菌的同源系统中高度保守，暗示该系统具备精密的信号传导潜力。基于上述结构特征与保守性分析，本研究随后对其启动子区域架构及应激环境下的转录活性展开了深入分析。

2.3 *esrISR* 基因座的双向启动子架构鉴定及其对梯度渗透胁迫的差异性响应

本研究通过使用 BPROM 进行了生物信息学分析，预测出该基因簇存在着复杂的双向转录模式[35]。如图 3A 所示，调节基因 *esrI* 与传感器基因 *esrS* 相邻且转录方向相反，两者共享一段上游基因间区。该区域包含一个共享启动子区 P_{esrIS}，其能够沿正向(5′→3′)驱动 *esrS* 的转录，并沿反向驱动 *esrI* 的转录。此外，预测结果表明在 *esrS* 的编码序列(coding sequence, CDS)内部存在一个内部启动子 P_{esrR}，用于沿正向独立驱动下游响应调节因子 *esrR* 的表达。

为验证这种独特的转录架构，本研究构建了 2 个转录融合报告质粒：将 *esrIS* 启动子 P_{esrIS} 与预测的 *esrR* 启动子 P_{esrR} 分别融合至红色荧光蛋白 *mKate2* 的编码基因。这些报告菌株在 1.3−2.1 mol/L 的 NaCl 浓度梯度中培养，通过比荧光强度(RFU/OD_{600})评估启动子活性。如图 3B 所示，携带空载体 pXMJ19 的对照菌株在所有测试条件下均呈现微弱荧光，排除了背景干扰的可能性。P_{esrIS} 和 P_{esrR} 启动子均呈现显著的应激诱导激活的特性，但两者展现出截然不同的响应特征。P_{esrIS} 启动子的活性呈现渐进式增长，在 1.7−1.9 mol/L NaCl 浓度区间达到稳定期。P_{esrR} 启动子在 1.7 mol/L NaCl 的胁迫条件下出现明显而强烈的诱导峰值，其最大比荧光强度约达 880 RFU/OD_{600}。与 1.3 mol/L NaCl 胁迫条件下相比，表达水平明显上调，这表明响应调节基因 *esrR* 对该特定渗透阈值具有高度敏感性。在 1.9 mol/L 的渗透胁迫条件下，P_{esrIS} 活性始终

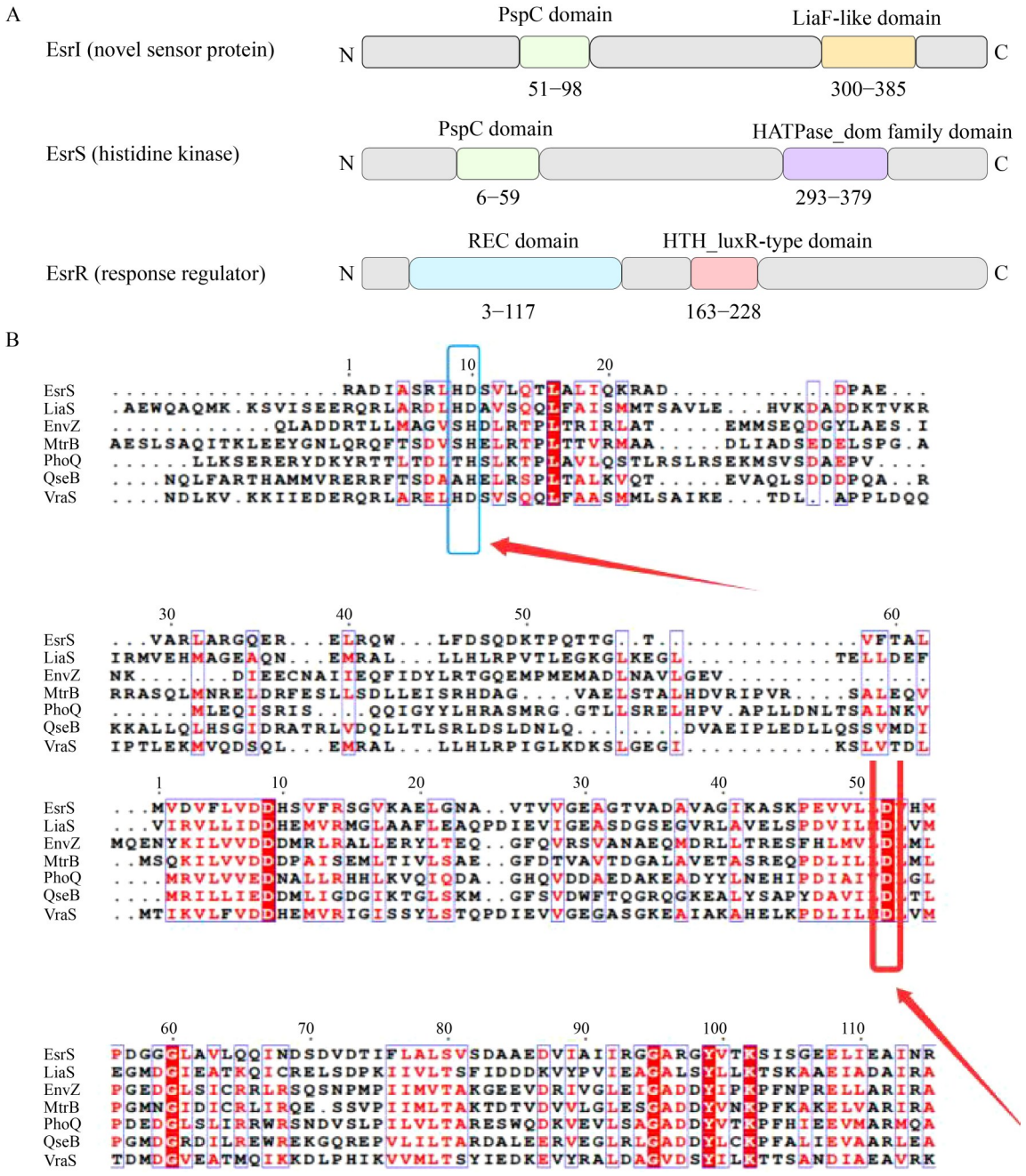


图2 EsrISR结构域预测及多序列比对分析磷酸化位点

Figure 2 Structural domain architecture and amino acid sequence alignment of the EsrISR system proteins. A: Schematic diagram of the domain structures of EsrI (novel sensor protein), EsrS (histidine kinase), and EsrR (response regulator) (Numbers indicate the amino acid positions of conserved domains); B: Multiple amino acid sequence alignments of EsrS with homologous kinase proteins (top), and EsrR with homologous response regulators (bottom). The blue box indicates the conserved histidine (His) phosphorylation site, and the red box indicates the conserved aspartate (Asp) phosphorylation site. The letters highlighted with a red background represent highly conserved amino acid residues across different species.

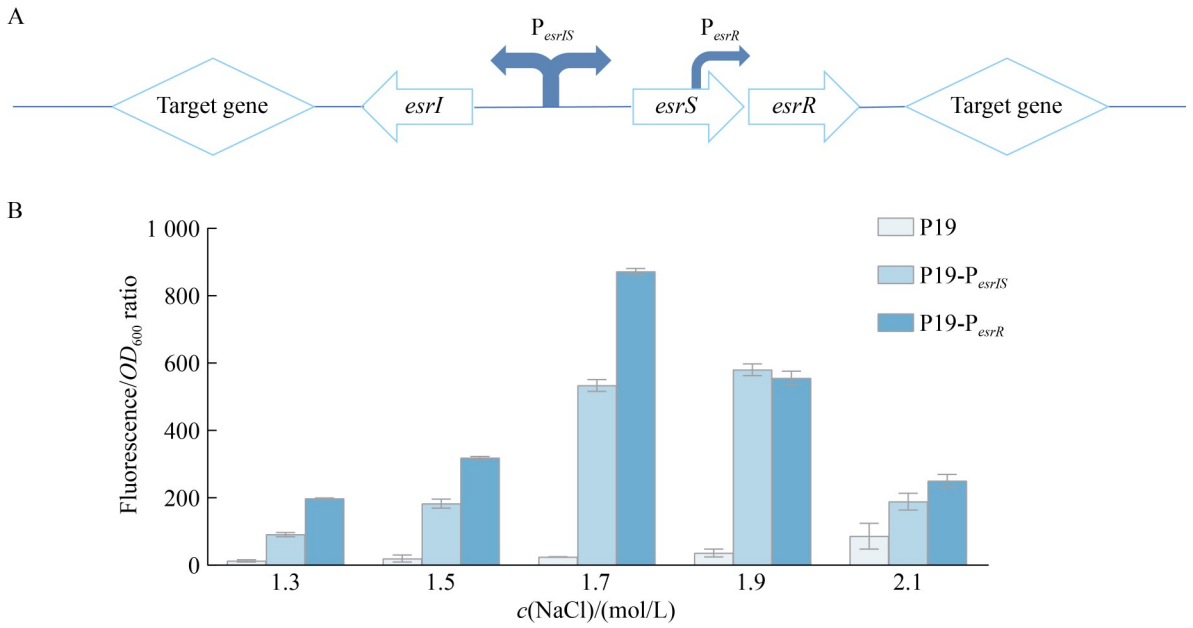


图3　EsrISR三组分系统启动子转录方向及在高渗胁迫下的荧光强度

Figure 3　Transcriptional orientation and specific fluorescence intensity of the EsrISR system promoters under hyperosmotic stress. A: Schematic diagrams of the P_{esrIS} and P_{esrR} promoters; B: specific fluorescence intensity (fluorescence/OD_{600} ratio) of the P_{esrIS} and P_{esrR} reporter systems under hyperosmotic stress conditions (1.3−2.1 mol/L NaCl) in the wild-type pXMJ19 and reporter strains (P19-P_{esrIS} and P19-P_{esrR}).

保持较高水平，而 P_{esrR} 活性则明显下降。这表明 P_{esrR} 启动子在 1.7 mol/L 浓度下促进菌株的快速适应，而 P_{esrIS} 启动子则在极端近致死条件下(1.9 mol/L)仍能维持信号感知模块(EsrS 和 EsrI)的关键活性水平。然而，当盐浓度升至 2.1 mol/L 时，2 个启动子的活性均急剧下降，这可能是由于生长受到严重抑制，超出了生理耐受极限。

报告基因检测证实了 EsrISR 系统的转录激活与应激强度紧密相关。*esrR* 不仅作为操纵子的一部分被驱动，还受一个高度敏感的独立内部启动子调控，这表明其调控机制具有复杂的层次结构。这种精密且复杂的转录输出受控于传感器激酶 EsrS 与调节子 EsrR 之间的动态反馈逻辑。

2.4　基于缺失突变与 EMSA 的 EsrISR 系统反馈调控机制解析

为了深入探究 P_{esrIS} 与 P_{esrR} 启动子响应高渗胁迫的分子机制，本研究构建了相关基因的缺失突变体并进行了 RT-qPCR 检测。在负调控方面，之前的假设认为 EsrI 可能是主要的抑制因子。然而，机制分析表明，在非应激条件下，传感器激酶 EsrS 主要作为磷酸酶发挥作用，通过持续不断地对 EsrR 去磷酸化防止信号通路过早激活。*esrS* 的缺失会导致磷酸酶活性的丧失，可能使 EsrR 极易受内源性磷酸供体或交叉作用的磷酸化影响，导致系统被持续激活。RT-qPCR 结果有力地证实了这一机制特征：与 EsrI 作为主要抑制因子的假设不同，Δ*esrS* 突变体展现出了显著的转录激活，其 *esrI* 转录本上调了约 15.0 倍(图 4A)。关于正向调控，RT-qPCR 结果证实该基因簇的双向转录高度依赖于响应调节子 EsrR。在 Δ*esrR* 突变体中，*esrI* 基因的转录水平基本丧失，表明 EsrR 对激活驱动 *esrI* 基因的核心启动子至关重要。

为验证该正向调控是否是直接作用，本研

究进一步开展了凝胶迁移实验。结果显示，当纯化的磷酸化 EsrR (EsrR-P)蛋白与包含 *esrI-esrS* 基因共有启动子区以及 *esrR* 自身启动子区的 DNA 探针共同孵育时，随着 EsrR-P 蛋白浓度的梯度增加，游离的 DNA 探针信号逐渐减弱，并出现了一条明显的迁移率滞后(shift)条带。本研究引入了转录组分析中受 EsrR 影响较小的基因 *treZ* 的启动子区 P_{treZ} 作为阴性对照探针，结果显示即使在最高蛋白浓度下也未观察到结合条带(图 4B)。靶基因启动子呈现的实验结果与阴性对照的未结合结果相互验证，在一定程度上协助排除了蛋白非特异性结合的可能，进一步支持了 EsrR-P 能够特异性结合在该基因簇核心调控区的结论。上述结果揭示了强效正反馈回路：激活的 EsrR 通过结合该核心枢纽驱动双向转录，既增强抑制元件 *esrI* 的表达，又强化调控模块(*esrS-esrR*)的功能。

基于这些发现，我们提出 EsrISR 系统的磷酸酶激活模型。(1)基础抑制：正常状态下，EsrS 通过其磷酸酶活性维持 EsrR 处于未磷酸化的状态，从而抑制系统的激活；(2)胁迫触发：当感知到外界渗透胁迫时，该磷酸酶活性被抑制或消除，使 EsrR 通过接受内源性磷酸基团而以磷酸化形式进行积累。(3)反馈调控的放大效应：活化的 EsrR-P 结合靶基因的核心区，同时启动 *esrI* 基因与 *esrS-esrR* 模块的转录。在理清该三组分系统内部的自调控逻辑后，需进一步解析 EsrR 调控的全局防御网络[36-37]，从而评估该系统对维持细菌高渗耐受性的全局性贡献。

2.5 EsrISR 系统高渗胁迫下的生长表型分析

本研究在 NaCl 诱导的高渗胁迫条件下对野

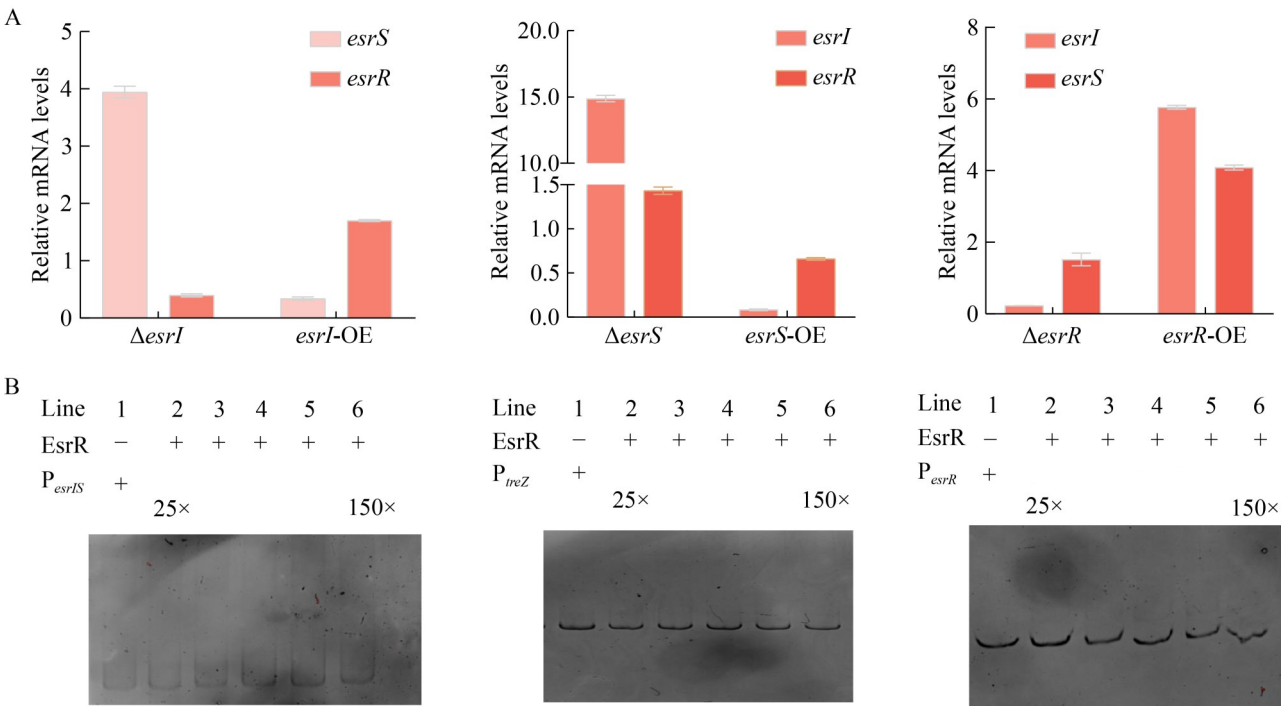


图4 EsrISR三组分系统的调控机制

Figure 4 Regulatory mechanism of the EsrISR system. A: Relative messenger RNA (mRNA) levels of the *esrISR* genes in mutant strains; B: EMSA analysis of EsrR binding to the promoter regions of P_{esrIS}, P_{esrR}, and the negative control P_{treZ}. The + and − denote the presence or absence of the EsrR protein, respectively. The 25× and 150× indicate the molar ratios of the added EsrR protein to the DNA probe in the reaction mixtures.

生型和 *esrS* 缺失突变体进行了点板实验，实验结果如图 5A 所示，WT 菌株仍能维持较强的耐受性，生长良好；在 1.3 mol/L NaCl 胁迫下 WT 与敲除株相比并无明显差异。在 1.5 mol/L NaCl 胁迫下，Δ*esrS* 菌株生长落后于 WT。在 1.7 mol/L NaCl 胁迫下表型差异最为明显，Δ*esrS* 菌株形成的菌落明显小于 WT。这些结果表明 EsrISR 系统对谷氨酸棒杆菌在高渗透压条件下生存至关重要，尤其在胁迫强度较高时。

在标准 BHI 培养基中的生长分析显示，野生型菌株表现出强劲的生长能力，其延滞期约为 4 h，对数期持续 4–24 h，最终在 32 h 达到约 13.3 的最大 OD_{600} 值(图 5B)。相比之下，突变体表现出不同程度的生长缺陷。Δ*esrI* 突变体生物量降低，OD_{600} 峰值仅为 9.1，约为 WT 的 68.4%。值得注意的是，分别缺失传感器激酶和响应调节因子导致生物量更严重下降：Δ*esrS* 和 Δ*esrR* 突变体的 OD_{600} 峰值分别仅达 8.0 和 4.6 (分别仅为 WT 的 60.2% 和 34.6%)。这些结果表明 EsrISR 系统在细菌的正常生长繁殖中发挥着关键作用，且响应调节因子的缺失比传感器激酶的缺失造成更严重的损害。

在高渗胁迫条件下(1.7 mol/L NaCl)，各菌株的生长相较于 BHI 培养基呈现全面抑制。生长

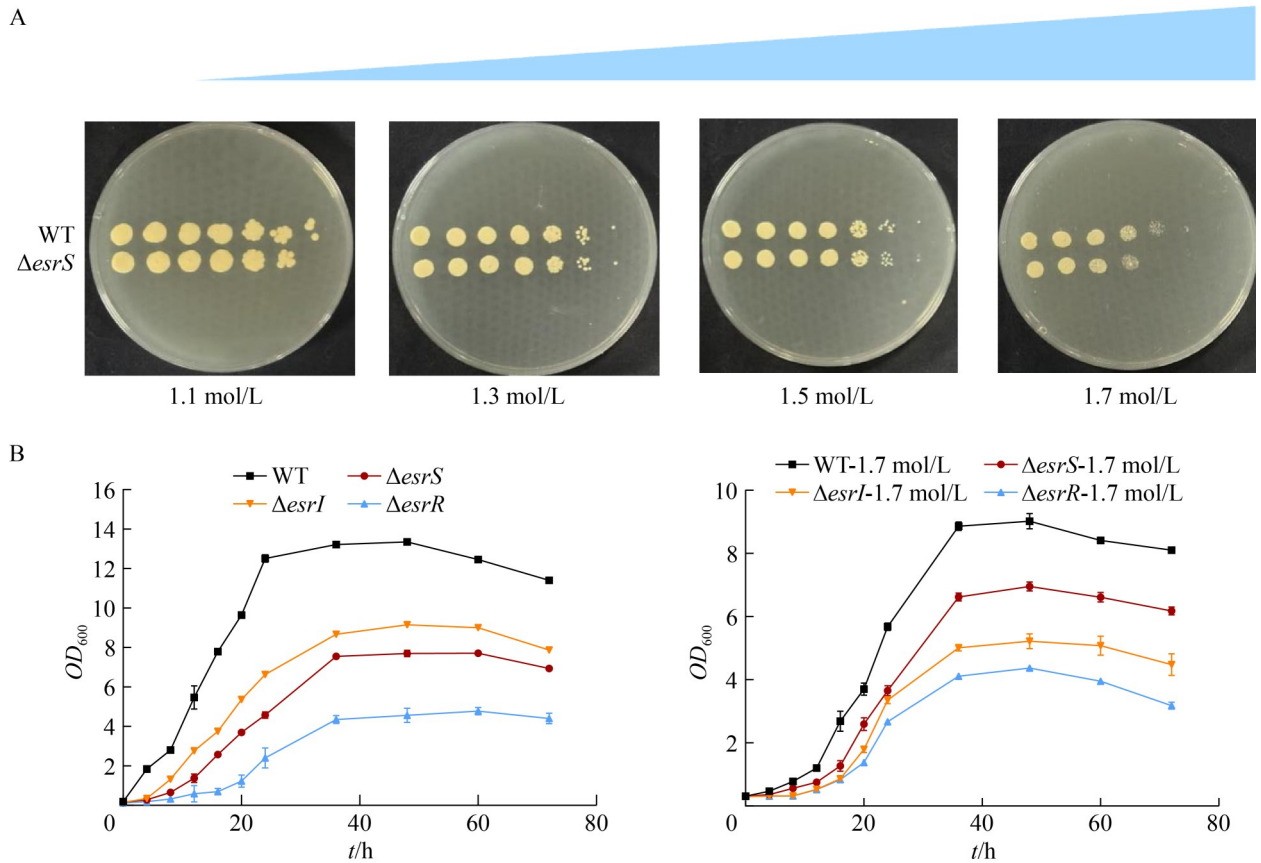


图5　EsrISR组分系统缺失对谷氨酸棒杆菌高渗耐受性与生长的影响

Figure 5　Effects of the EsrISR system deletions on the hyperosmotic stress tolerance and growth of *Corynebacterium glutamicum*. A: Spot assays of the wild-type (WT) and mutant Δ*esrS* under different hyperosmotic stress conditions (1.1−1.7 mol/L NaCl); B: Growth curves of the WT and mutants under normal conditions (left panel) and 1.7 mol/L NaCl hyperosmotic stress (right panel).

曲线分析显示，渗透胁迫显著延长了菌株的延滞期(从 4 h 延长至约 12 h)，对数生长期相应推迟至 12−32 h。其中，野生型菌株依旧表现出最强耐受性(最大 OD_{600} 为 9.0)，而缺失突变体则呈现出与基因型相关的生长缺陷。与正常培养条件下的趋势一致，Δ*esrR* 突变体的受损最为严重，OD_{600} 峰值仅为 4.3 (约为 WT 的 47.8%)，Δ*esrS* 突变体可达 7.0 (约为 WT 的 77.8%)。综合非胁迫与胁迫条件下的数据可知，尽管高盐环境对总体生长具有普遍的抑制作用，但关键调控元件缺失带来的影响依然显著：野生型表现出最高耐受性，而 Δ*esrS* 与 Δ*esrR* 突变株始终表现出严重的生长缺陷，且响应调节因子的缺失(Δ*esrR*)造成的损害在任何条件下均为最大。这证实了随着环境压力加剧，EsrISR 系统在维持细菌增殖中的重要性日益凸显。由于生长能力的丧失通常源于细胞壁膜等物理屏障的破坏，本研究进一步利用扫描与透射电子显微镜对高渗胁迫下细胞超微结构的变化进行了深入观察。

2.6 Δ*esrS* 与 Δ*esrR* 突变体的电镜分析揭示细胞表面的结构缺陷

基于先前研究的生长表型，本研究推测 EsrISR 系统的缺失直接导致了菌体物理防御屏障能力的受损。为直观验证这一假设，本研究选取 Δ*esrS* 和 Δ*esrR* 突变体，利用冷场发射扫描电镜(field emission scanning electron microscopy, FESEM)技术，对正常培养条件下的菌体表面形态及内部超微结构进行了深入观察。

如图 6 所示，扫描电镜(FESEM)分析揭示了各菌株之间显著的表面形态差异。野生型细胞形态饱满、表面光滑，是典型的短杆状结构(图 6A)。相比之下，突变株细胞则呈现不同程度的结构塌陷，且其受损程度与其生长表型的缺陷相一致。其中 Δ*esrS* 突变体表面出现了不规则的皱褶和凹陷(图 6B)；而 Δ*esrR* 突变株的形态受损最为严重，细胞明显萎缩变形，表面可见破裂，短杆状结构完整性丧失(图 6C)。

这些直观的形态学观察结果表明，即使在正常培养条件下突变体的细胞外围物理屏障也已发生了显著的结构性破损。这种基础防御结构的丧失从物理层面解释了为何这些突变体在高渗胁迫下无法正常增殖这一现象，进一步证实了响应调节因子 EsrR 在维持基础细胞壁完整性中发挥着不可或缺的决定性作用[35,37]。

2.7 Δ*esrR* 突变体的转录组分析及细胞壁合成靶基因网络鉴定

为识别 EsrR 调节子对维持细胞壁稳态的靶基因网络，本研究在正常条件下进行了 WT 与

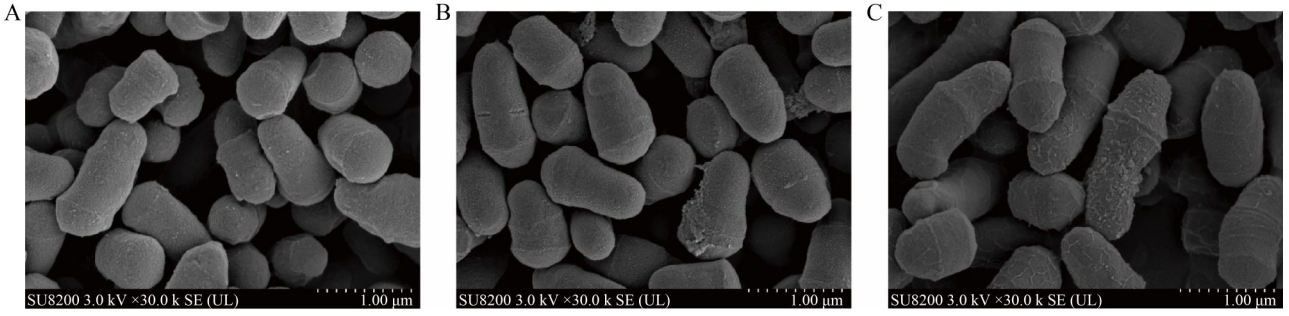


图6 正常培养条件下EsrISR系统缺失对谷氨酸棒杆菌细胞形态的影响

Figure 6 Effects of the EsrISR system deletions on the cell morphology of *Corynebacterium glutamicum* under normal conditions. A: Surface morphology of the wild-type (WT); B: Surface morphology of the mutant Δ*esrS*; C: Surface morphology of the mutant Δ*esrR*. The cells were observed using field emission scanning electron microscopy (FESEM).

Δ*esrR* 的转录组学分析。比较分析揭示，即使在无外部胁迫的情况下，EsrR 的缺失仍然导致了显著的转录影响。如图 7 所示，野生型与 Δ*esrR* 突变株之间共存在 703 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。其中，相较于野生型菌株，突变体中有 510 个基因下调表达，而 193 个基因上调表达。下调基因数量远超上调基因这一现象，揭示了 EsrR 在全局调控中主要作为转录激活因子发挥作用，维持着对细胞稳态至关重要的庞大基因网络的基础表达水平。进一步的 KEGG 通路富集分析显示，这些差异基因主要富集于“微生物在不同环境中的代谢(microbial metabolism in diverse environments)” “双组分系统” “硫代谢” “碳代谢”及“ABC 转运蛋白”等核心途径。在细菌的代谢网络中，细胞壁合成依托这些基础代谢的协同作用完成。“碳代谢”等途径负责为肽聚糖和海藻糖的合成提供充足的糖基前体与能量。基础代谢的广泛受阻在本质上直接切断了细胞壁大分子组装的物质来源，导致细胞壁合成受阻。这表明 EsrISR 系统在细胞信号网络中处于枢纽位置，广泛负责协调基础代谢流。

结合电镜观察与前体代谢数据，本研究从转录组中梳理了细胞壁合成与修饰相关的差异基因网络(表 4)。数据显示，在 Δ*esrR* 突变株中肽聚糖合成途径基因显著下调，UDP-*N*-乙酰胞壁酸脱氢酶基因 *murB* 在转录本中 FPKM 为 N.D. (not detected)，另一前体合成基因 *CGL_RS01830* 也显著被抑制(FPKM 从 593.4 骤降至 0.2)。与此同时，海藻糖与分枝菌酸合成基因(如 *treS*、*treY*、*pks13* 等)呈现出微弱的上调趋势，这可能是突变体在面临致命的细胞壁结构崩塌时为勉强维持细胞基础完整性而激发的短暂代偿反应。

2.8 RT-qPCR 验证 EsrR 对肽聚糖合成、分枝菌酸修饰及海藻糖代谢通路的多靶点正向调控

为了探究在细菌的持续生长过程中这些关键基因的转录水平是否会发生变化，并进一步确证 EsrR 的核心调控功能，本研究随后在 OD_{600} 为 1.0、2.0、3.0 三个阶段采用 RT-qPCR 对上述调控网络进行定量验证(图 8)。结果显示，在 Δ*esrR* 突变株中不同代谢通路随 OD_{600} 值的变化呈现出明显的转录差异。负责维持内层肽聚糖骨架强度的关键合成基因 *murB* 及 *CGL_RS01830* 在 OD_{600} 为 1.0−3.0 范围内其表达量显著被抑制，并在整个生长周期内持续处于极低水平(图 8A)。2.7 节的转录组数据显示，在 OD_{600} 为 0.6 时海藻糖合成和分枝菌酸合成途径中的多数关键靶基因尚能维持正常的转录水平；随着生长推进(OD_{600} 为 1.0 时)，海藻糖合成簇(*treS*、*treY*、*treZ*)及分枝菌酸合成与转运靶基因(*cmrA*、*gatC*)的表达量开始微有下降；但 OD_{600} 为 2.0 及 3.0 时，上述基因急剧下降了 75%−83%，导致这 2 条代谢途径最终被全面抑制(图 8B)。相反，在 *esrR*-OE 中这些基因在整个实验周期内(OD_{600} 为 1.0−3.0)均保持着一定强度的转录。海藻糖合成与分枝菌酸合成及转运的多个基因在 3 个生长时期均稳定保持着 1.2−4.8 倍的显著上调；肽聚糖合成基因 *murB* 及 *CGL_RS01830* 的表达量较野生型也有 2.0−6.5 倍的显著提升；而 *pks13* 的转录水平在 2 株重组菌的各个生长阶段均未表现出明显波动(图 8C)。

综合转录组学与 RT-qPCR 数据，突变株中相关代谢途径基因的转录水平随时间推移逐渐下降，而过表达株中相关基因则呈现持续激活，充分证明了 EsrR 在驱动并维持细胞壁骨架中发挥着不可或缺的作用。这种受控于 EsrR 的细胞壁合成基因转录机制，不仅从分子层面解释了突变体细胞壁受损的原因，更阐明了其在持续生长的胁迫环境下，维持工业底盘细胞形态完整性与鲁棒性的重要生理功能。

3 讨论与结论

本研究整合表型分析、转录组测序及 RT-qPCR 等验证实验，系统解析了谷氨酸棒杆菌

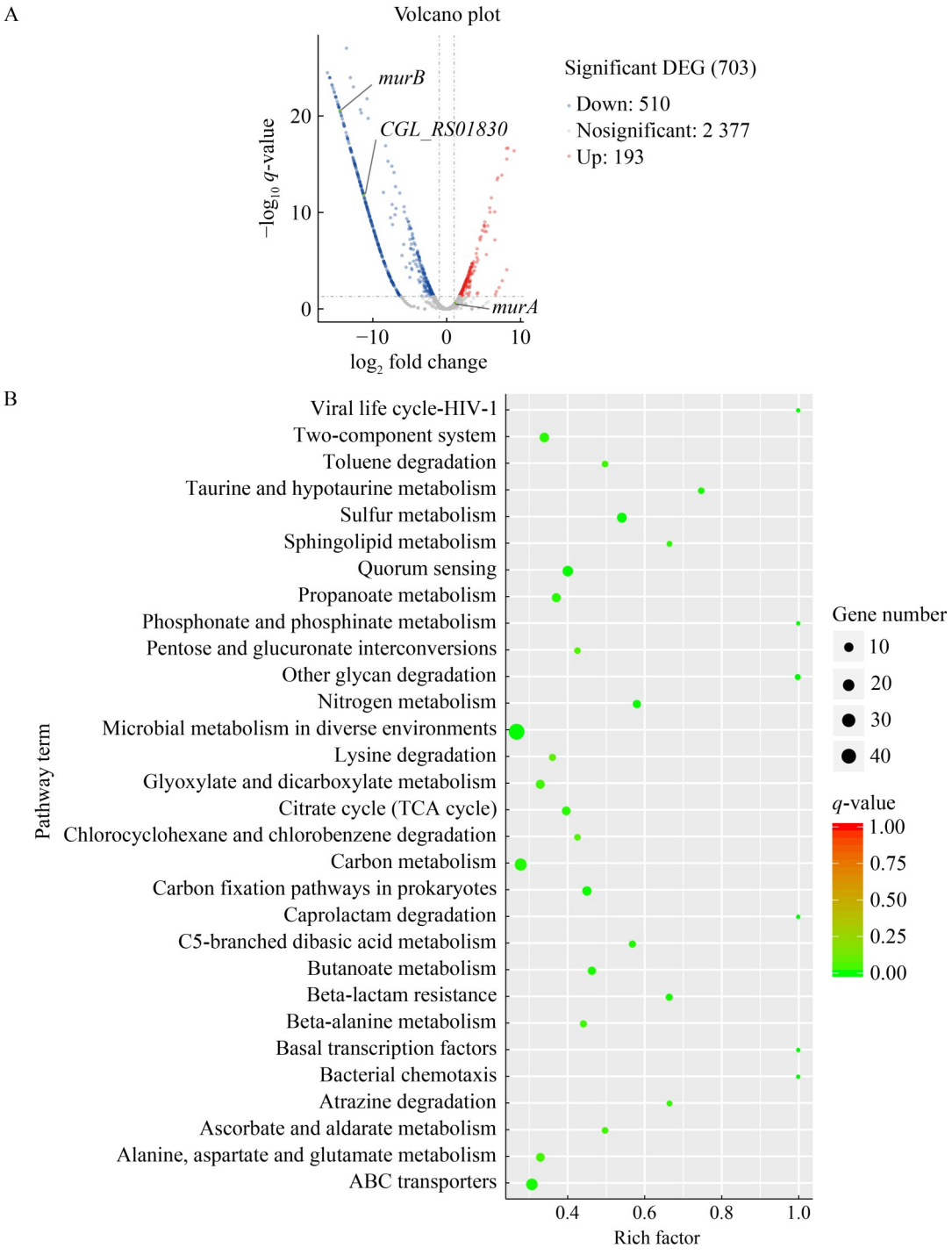


图7　正常培养条件下Δ*esrR*突变体的转录组学分析

Figure 7　Transcriptomic analysis of the Δ*esrR* mutant under normal conditions. A: A volcano plot showing differentially expressed genes (DEGs) between the wild-type (WT) and the Δ*esrR* mutant (A total of 703 significant DEGs are highlighted, including 193 up-regulated and 510 down-regulated genes); B: KEGG pathway enrichment analysis of the DEGs (The color of the bubbles represents the *q*-value, with greener colors indicating smaller *q*-values and greater statistical significance, while the size of the bubbles represents the number of genes).

表4　野生型及突变株中细胞壁稳态相关关键基因的转录水平

Table 4　Transcriptional levels of key genes involved in cell wall homeostasis in wild-type and mutant strains

Gene locus	Gene	Function	WT FPKM	Δ*esrR* FPKM
NCgl2470	*murA*	UDP-*N*-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	299.5	476.6
NCgl0346	*murB*	UDP-*N*-acetylmuramate dehydrogenase	804.6	N.D.
NCgl0345	*CGL_RS01830*	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	593.4	0.2
NCgl2221	*treS*	Maltose alpha-D-glucosyltransferase	13.9	2.0
NCgl2037	*treY*	Malto-oligosyltrehalose synthase	63.3	103.7
NCgl2045	*treZ*	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	99.5	133.4
NCgl2534	*otsA*	Trehalose-6-phosphate synthase	389.1	370.7
NCgl2537	*otsB*	Trehalose-6-phosphate phosphatase	508.7	528.1
NCgl2385	*cmrA*	Mycolate reductase CmrA	90.6	113.7
NCgl1198	*gatC*	Asp-tRNA (Asn)/Glu-tRNA (Gln) amidotransferase subunit GatC	158.8	65.5
NCgl2773	*pks13*	Polyketide synthase Pks13	141.3	237.5

N.D. indicates not detected.

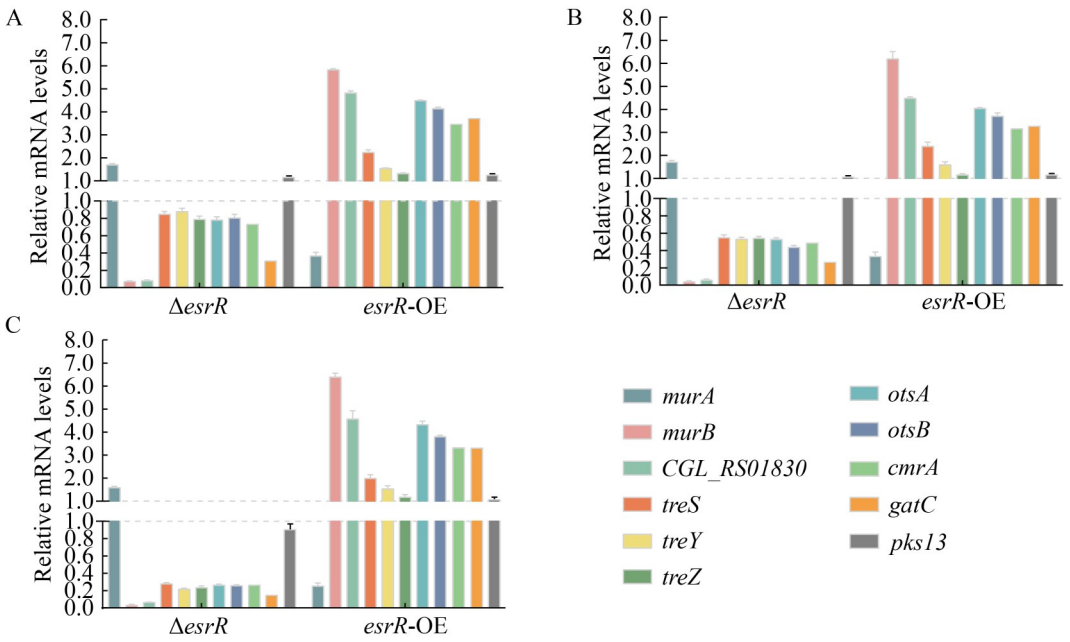


图8　Δ*esrR*及*esrR*-OE菌株中靶基因随OD_{600}变化的RT-qPCR分析

Figure 8　RT-qPCR analysis of target gene expression in Δ*esrR* and *esrR*-OE strains across different growth phases. Relative mRNA levels of genes involved in peptidoglycan synthesis, stress response, and cell envelope modification (*murA*, *murB*, *CGL_RS01830*, *treS*, *treY*, *treZ*, *otsA*, *otsB*, *cmrA*, *gatC*, *pks13*) in the *esrR* knockout mutant (Δ*esrR*) and *esrR* overexpression (*esrR*-OE) strains were determined relative to the wild-type strain across multiple growth phases. A: OD_{600}=1.0; B: OD_{600}=2.0; C: OD_{600}=3.0. The 16S rRNA gene was used as an internal reference gene for normalization. The horizontal dashed line at y=1 represents the baseline relative expression level of the wild-type strain. Error bars represent the standard deviations of three independent biological replicates.

EsrISR 系统应对高渗胁迫的全局调控机制。

结合上述结果，本研究提出了 EsrISR 三组分系统的调控机制模式图(图 9)。在非胁迫条件下，辅助跨膜蛋白 EsrI 与传感器激酶 EsrS 协同作用，EsrS 主要发挥磷酸酶功能，维持系统的基础稳态。这种调控在避免能量无效消耗、维持细胞正常生长的同时，保证了细胞壁的完整性。当遭遇高渗胁迫时，该静息稳态被打破，EsrS 激酶活性被激活并发生自身磷酸化，随后将信号传递给响应调节因子 EsrR；叠加 EsrR 自身的正反馈放大效应，促使细胞大量表达抗逆相关基因以应对极端环境造成的损伤。进一步的靶基因分析表明，EsrR 是驱动抗逆代谢重编程的核心枢纽。在 Δ*esrR* 突变株中，*murB* 等靶基因转录受到高达 95% 的显著抑制，为突变株即使在正常条件下也呈现出细胞壁破损表型提供了直接的证据。

综上所述，本研究鉴定的靶基因调控网络为工业底盘菌株的抗逆改造提供了明确的遗传操作位点。该系统所展现出的磷酸酶特性为合成生物学中动态调控线路的构建提供了极具潜力的天然元件。相较于传统的静态表达系统，

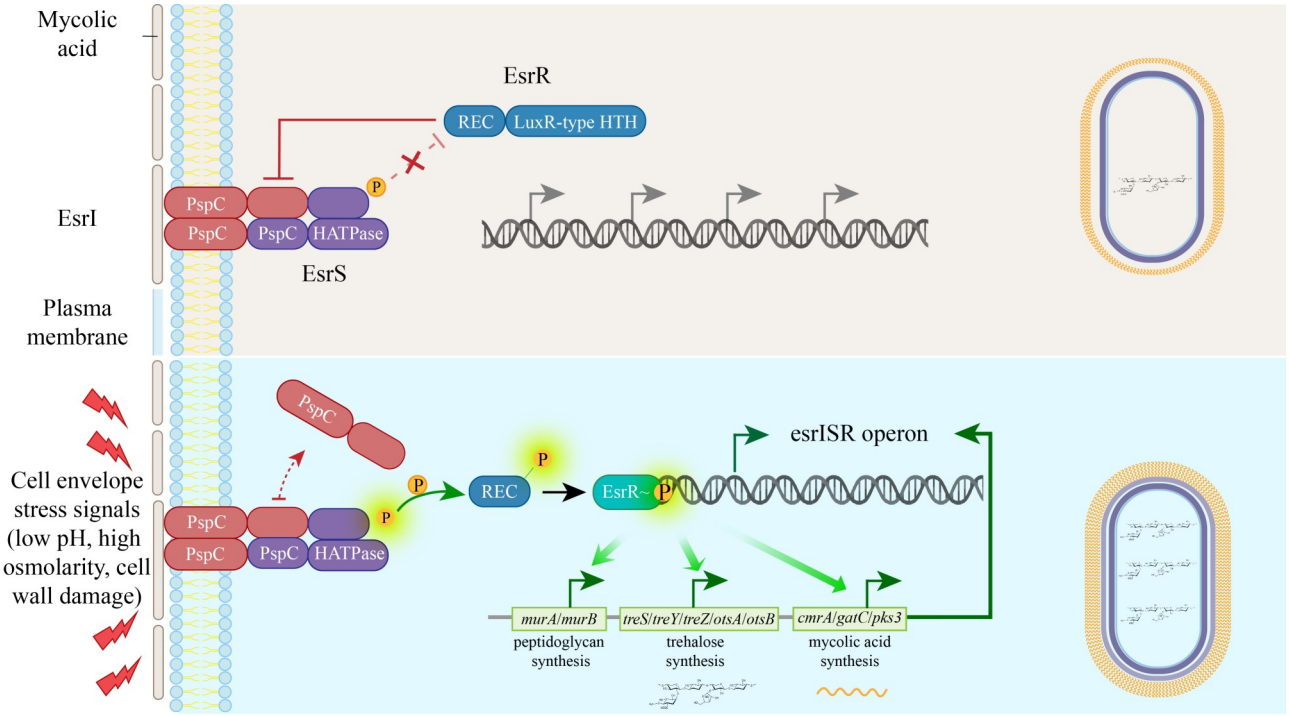


图9 EsrISR三组分系统响应胁迫的调控机制模式图

Figure 9 Proposed working model of the regulatory mechanism mediated by the EsrISR three-component system in response to cell envelope stress. Under non-stress conditions (upper panel), the auxiliary membrane protein EsrI interacts with the sensor kinase EsrS, inhibiting its autophosphorylation and keeping the response regulator EsrR in an inactive state. Upon exposure to cell envelope stress signals such as high osmolarity (lower panel), the inhibitory effect of EsrI is relieved. EsrS autophosphorylates and subsequently transfers the phosphoryl group to EsrR. The phosphorylated EsrR (EsrR-P) then binds to the promoter regions of target genes, activating the transcription of its own *esrISR* operon (positive feedback loop) as well as genes involved in peptidoglycan (*murA*/*murB*), trehalose (*treS*/*treY*/*treZ*/*otsA*/*otsB*), and mycolic acid (*cmrA*/*gatC*/*pks13*) biosynthesis, thereby reinforcing the cell envelope to combat the environmental stress.

这种依赖环境感知的机制能够有效平衡细胞生长与产物合成之间的代谢负担。例如，未来可借鉴此机制，通过对 EsrS 的感应结构域进行工程化改造，创建能够特异性响应酸胁迫、醇胁迫等其他复杂工业发酵应激信号的合成启动子。基于此，后续可通过对 EsrR 及其靶启动子进行工程化改造，构建更加智能的人工响应网络，进而综合提升谷氨酸棒杆菌在复杂发酵环境中的鲁棒性与转化率。此外，尽管本研究在转录层面证实了 EsrI 与 EsrS 存在紧密的遗传学联系，但受限于实验方法，尚未在蛋白水平直接验证二者的物理结合。在未来的研究中，我们将进一步利用细菌双杂交与 Pull-down 等生化实验明确 EsrI 与 EsrS 的蛋白互作关系，并检测 Δ*esrI* 菌株中 EsrR 的磷酸化状态，从而更全面地揭示该三组分系统的精密物理调控网络。

作者贡献声明

季傲艺：数据收集和处理、论文撰写和修改；范志豪：协助实验操作、参与论文讨论；罗薪涛：数据收集和处理；高惠：研究构思和设计、论文审阅和修改；徐美娟：研究构思和设计、项目经费支持与实验平台资源、论文审阅与修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] Qi L, He H, Xiang SH, Cao H. A two-enzyme entry module triggers an endogenous biocatalytic cascade for green biosynthesis of pyridoxal 5′-phosphate in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Catalysts, 2026, 16(2): 195.

[2] Walter T, Al Medani N, Burgardt A, Cankar K, Ferrer L, Kerbs A, Lee JH, Mindt M, Risse JM, Wendisch VF. Fermentative *N*-methylanthranilate production by engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 866.

[3] Zahoor A, Lindner SN, Wendisch VF. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2012, 3(4): e201210004.

[4] Li MH, Li H, Zhang X, Liang YC, Li C, Sun ML, Li K, Liu CG, Sinskey AJ. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*: unlocking its potential as a key cell factory platform for organic acid production[J]. Biotechnology Advances, 2024, 77: 108475.

[5] Schalck T, Katyal M, De Graeve S, Roba L, Baldoma JV, Swings T, Van den Bergh B, Michiels J. Reprogramming the EnvZ-OmpR two-component system confers ethanol tolerance in *Escherichia coli* by stabilizing the outer membrane and altering ferric homeostasis[J]. PLoS Genetics, 2025, 21(12): e1011707.

[6] Yang LB, Zhan XB, Zheng ZY, Wu JR, Gao MJ, Lin CC. A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol[J]. Bioresource Technology, 2014, 151: 120-127.

[7] Khider MLK, Irla M, López MG, Gispert A, Konjetzko T, Meliawati M, Schmid J, Brautaset T, Brito LF. CRISPR-Cas9-driven genome editing in *Bacillus methanolicus* MGA3[J]. Frontiers in Microbiology, 2026, 16: 1728984.

[8] Mohedano MT, Konzock O, Chen Y. Strategies to increase tolerance and robustness of industrial microorganisms[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(1): 533-540.

[9] Gong ZW, Nielsen J, Zhou YJ. Engineering robustness of microbial cell factories[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(10): 1700014.

[10] Guan AL, He ZX, Wang X, Jia ZJ, Qin JF. Engineering the next-generation synthetic cell factory driven by protein engineering[J]. Biotechnology Advances, 2024, 73: 108366.

[11] Takahashi Y, Hirasawa T. Enhancement of ergothioneine production in *Corynebacterium glutamicum* by increasing osmotic pressure[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2025, 109: 255.

[12] Jeon S, Sohn YJ, Lee H, Park JY, Kim D, Lee ES, Park SJ. Recent advances in the design-build-test-learn (DBTL) cycle for systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Microbiology, 2025, 63(3): e2501021.

[13] Kim GY, Kim J, Park G, Kim HJ, Yang JN, Seo SW. Synthetic biology tools for engineering *Corynebacterium glutamicum*[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2023, 21: 1955-1965.

[14] De Sousa-d'Auria C, Constantinesco F, Bayan N, Constant P, Tropis M, Daffé M, Graille M, Houssin C. Cg1246, a new player in mycolic acid biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 2022, 168(4): 001171.

[15] Kumagai Y, Hirasawa T, Wachi M. Requirement of the LtsA protein for formation of the mycolic acid-containing layer on the cell surface of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microorganisms, 2021, 9(2): 409.

[16] Isbilir B, Yeates A, Alva V, Bharat TAM. Mapping the ultrastructural topology of the corynebacterial cell surface[J]. PLoS Biology, 2025, 23(4): e3003130.

[17] 楼洁, 胡晓, 梁延群, 朱怡铃, 音建华. 肽聚糖的生物合成及其调控机制研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 106-123.

Lou J, Hu X, Liang YQ, Zhu YL, Yin JH. Peptidoglycan biosynthesis and the regulatory mechanism[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 106-123 (in Chinese).
[18] Liu HJ, Liu DH, Zhong JJ. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 473-476.
[19] MacIntyre AM, Barth JX, Pellitteri Hahn MC, Scarlett CO, Genin S, Allen C. Trehalose synthesis contributes to osmotic stress tolerance and virulence of the bacterial wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2020, 33(3): 462-473.
[20] Zou Y, Huang DN, Liu XX, Yang YK, Liu CL, Li Y, Bai ZH. Two-component MprAB system regulates the expression of genes involved in cell envelope biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microorganisms, 2025, 13(5): 1120.
[21] Barretto LAF, Van PT, Fowler CC. Conserved patterns of sequence diversification provide insight into the evolution of two-component systems in *Enterobacteriaceae*[J]. Microbial Genomics, 2024, 10(3): 001215.
[22] Liu YX, Rose J, Huang SJ, Hu YB, Wu Q, Wang D, Li CG, Liu ML, Zhou P, Jiang L. A pH-gated conformational switch regulates the phosphatase activity of bifunctional HisKA-family histidine kinases[J]. Nature Communications, 2017, 8: 2104.
[23] Mitchell SL, Ismail AM, Kenrick SA, Camilli A. The VieB auxiliary protein negatively regulates the VieSA signal transduction system in *Vibrio cholerae*[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 59.
[24] Fritsch F, Mauder N, Williams T, Weiser J, Oberle M, Beier D. The cell envelope stress response mediated by the LiaFSR Lm three-component system of *Listeria monocytogenes* is controlled *via* the phosphatase activity of the bifunctional histidine kinase LiaS Lm[J]. Microbiology, 2011, 157(2): 373-386.
[25] Kleine B, Chattopadhyay A, Polen T, Pinto D, Mascher T, Bott M, Brocker M, Freudl R. The three-component system EsrISR regulates a cell envelope stress response in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Molecular Microbiology, 2017, 106(5): 719-741.
[26] 陈晓婷, 乾莲, 陈卫国, 孙士正, 白宗凯, 赵纯静, 武有聪. 表皮葡萄球菌*vraSR-srrAB*突变株的构建及生物学表型[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3562-3574.
Chen XT, Qian L, Chen WG, Sun SZ, Bai ZK, Zhao CJ, Wu YC. Construction and biological phenotype characterization of *vraSR-srrAB* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3562-3574 (in Chinese).
[27] Wenzel M, Dekker MP, Wang BW, Burggraaf MJ, Bitter W, van Weering JRT, Hamoen LW. A flat embedding method for transmission electron microscopy reveals an unknown mechanism of tetracycline[J]. Communications Biology, 2021, 4: 306.
[28] Kim JH, Kang YJ, Kang YW, Park SE, Jin HB, Hong E, Park HH. A putative membrane-associated YdjB-like protein from *Salmonella enterica* exhibits a non-canonical ACT-like fold[J]. PLoS One, 2025, 20(12): e0336436.
[29] 张清仪, 王阶平, 程钢, 刘钟慧, 范文瑾, 何进. 苏云金芽孢杆菌双组分信号转导系统的生物信息学分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1385-1392.
Zhang QY, Wang JP, Cheng G, Liu ZH, Fan WJ, He J. Bioinformatics analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus thuringiensis*[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1385-1392 (in Chinese).
[30] Wang MJ, Gu SY, Guo J, Wu JY, Wang XH, Noman M, Wang JY, Li L. BcHK71 and BcHK67, two-component histidine kinases, regulate conidial morphogenesis, glycerol synthesis, and virulence in *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Fungi, 2025, 11(12): 850.
[31] Abhishek S, Deeksha W, Rajakumara E. Mechanistic insights into allosteric regulation of methylated DNA and histone H3 recognition by SRA and SET domains of SUVH5 and the basis for di-methylation of lysine residue[J]. The FEBS Journal, 2023, 290(4): 1060-1077.
[32] Watanabe N, Savchenko A. Molecular insights into the initiation step of the Rcs signaling pathway[J]. Structure, 2024, 32(9): 1381-1393.e4.
[33] Sewgoolam B, Jim KK, de Bakker V, Bock FP, Gibson PS, Veening JW. Genome-wide antibiotic-CRISPRi profiling identifies LiaR activation as a strategy to resensitize fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*[J]. Nature Communications, 2025, 16: 6491.
[34] Guffey AA, Loll PJ. Regulation of resistance in vancomycin-resistant enterococci: the VanRS two-component system[J]. Microorganisms, 2021, 9(10): 2026.
[35] Cassiano MHA, Silva-Rocha R. Benchmarking bacterial promoter prediction tools: potentialities and limitations[J]. mSystems, 2020, 5(4): e00439-20.
[36] Landry BP, Palanki R, Dyulgyarov N, Hartsough LA, Tabor JJ. Phosphatase activity tunes two-component system sensor detection threshold[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1433.
[37] Cao Q, Feng FF, Wang H, Xu XJ, Chen HC, Cai XW, Wang XR. *Haemophilus parasuis* CpxRA two-component system confers bacterial tolerance to environmental stresses and macrolide resistance[J]. Microbiological Research, 2018, 206: 177-185.