PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2016, 43(10): 952~961
www.pibb.ac.cn

细菌中Ⅰ型毒素-抗毒素系统的研究进展*

王　臣[1, 2, 3, 4)]　宣劲松[1)**]　冯银刚[2, 3, 4)**]

([1)] 北京科技大学化学与生物工程学院生物科学与工程系，北京 100083；
[2)] 中国科学院青岛生物能源与过程研究所生物燃料重点实验室，青岛 266101；
[3)] 中国科学院青岛生物能源与过程研究所青岛市单细胞油脂工程实验室，青岛 266101；
[4)] 中国科学院青岛生物能源与过程研究所山东省合成生物学重点实验室，青岛 266101)

摘要　毒素 - 抗毒素系统是广泛存在于细菌和真菌细胞内的一对小型遗传控制元件，毒素基因编码稳定的蛋白质分子，抗毒素基因编码的则是稳定性较差的蛋白质或者是具有调控功能的 RNA. 人们对于毒素分子在细胞内的生物靶标、分子结构与功能、体内调节机制等进行了大量的研究，不仅揭示了毒素 - 抗毒素的生理功能，而且为多种生物技术中的应用提供了新的素材. 目前发现共有 5 大类型的毒素 - 抗毒素系统，其中Ⅰ型毒素 - 抗毒素系统的抗毒素分子为调节型 RNA，可以通过多种不同途径与毒素蛋白质的 mRNAs 结合从而中和毒素的细胞毒性. Ⅰ型毒素 - 抗毒素系统以其独特的调节性 RNA 的调控方式，成为目前毒素 - 抗毒素研究中的重要热点. 本文将对目前Ⅰ型毒素 - 抗毒素系统的研究进展进行综述，并对其可能的应用前景进行展望.

关键词　Ⅰ型毒素 - 抗毒素系统，调节型 RNA
学科分类号　Q71　　**DOI**: 10.16476/j.pibb.2016.0217

细胞的死亡调控对于生物体至关重要. 真核生物利用程序性细胞死亡调控胚胎的正常发育，保持正常细胞的体内平衡，清除体内由于病毒感染等外因导致损伤的细胞[1]. 细菌等原核生物需要适应的外界环境更加复杂多变，因此细胞死亡调控对于原核生物种群的维持更为重要. 在细菌和古菌细胞内广泛存在有一对毒素 - 抗毒素基因(toxin-antitoxin，TA)，毒素基因编码稳定的蛋白质分子，抗毒素基因编码的则是稳定性较差的蛋白或者是具有调控功能的 RNA. 毒素蛋白在细胞中过量表达时会导致细胞生长缓慢甚至死亡，抗毒素分子则可以中和毒素对于细胞的毒副作用[2]. 当出现外界环境胁迫时，这对具有稳定性差异的小型遗传控制元件将被条件性激活，促使细胞进行自我进化和筛选以逐渐适应多变的环境.

自 1983 年人们在大肠杆菌的 F 质粒上发现了第一个 TA 系统——可以通过杀死不含有质粒的后代细胞保证质粒稳定遗传的 ccd 系统(CcdA 和 CcdB)以来[3-4]，大量的 TA 系统陆续不断地从不同的细菌、古菌的染色体或质粒上被发现[5-8]. 近年来，人们还在真核生物单细胞真菌的线性染色体上发现了有助于质粒稳定遗传的类似于 TA 系统的调控元件[9]. 迄今为止，人们已经发现了 5 大类 TA 系统，它们的毒素分子均为蛋白质，而抗毒素的组成和功能各异，如表 1 所示[10].

最初发现的Ⅰ型 TA 系统是 *Escherichia coli* R1 质粒的 hok/Sok 和 *Enterococcus faecalis* pAD1 质粒上的 *fst*/RNAⅡ[11-12]，这些存在于质粒上的 TA 系统的主要功能是分裂后致死效应(post-segregational

* 国家自然科学基金(31270784，31300635)，国家留学基金(201506465020)资助项目.
** 通讯联系人.
宣劲松. Tel: 010-62334497, E-mail: jsxuan@sas.ustb.edu.cn
冯银刚. Tel: 0532-80662706, E-mail: fengyg@qibebt.ac.cn
收稿日期：2016-07-05，接受日期：2016-09-27

Table 1 Five types of TA systems

表 1 TA 系统的 5 种类型

类型	抗毒素性质	中和毒素机理
Ⅰ	sRNA	与毒素的 mRNA 相结合，抑制毒素蛋白质的翻译
Ⅱ	蛋白质	直接与毒素蛋白结合形成蛋白质复合物
Ⅲ	sRNA	直接和毒素蛋白结合形成蛋白质 -RNA 复合物
Ⅳ	蛋白质	通过保护毒素的靶分子干扰毒素的毒性
Ⅴ	蛋白质	剪切毒素蛋白质的 mRNA，阻止毒素合成

killing systems，PSK)，阻止质粒在后代细胞中发生丢失[13]．随后人们在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的染色体上陆续又发现了大量Ⅰ型毒素 - 抗毒素系统，其中一些与 *hok*/Sok 或 *fst*/RNAⅡ同源[8]．此外人们利用生物信息学的方法在 774 个细菌基因组中又搜索获得了大量新型的Ⅰ型 TA 系统，其中大部分同样存在于染色体上，但是这些染色体上编码的 TA 系统的生物学功能至今尚不明确[8]．

长期以来，蛋白质一直被认为是基因调控的主力军，而 RNA 只是遗传信息传递的载体．但是近 20 年来，具有调控作用的 RNA 陆续被发现，开始迎来一个新的 RNA 调控时代．下面我们将对抗毒素为调控型 RNA 分子的Ⅰ型毒素 - 抗毒素系统的研究进展加以介绍．

1 Ⅰ型毒素-抗毒素系统中抗毒素分子 sRNA 的作用机制

破译 TA 系统中毒素分子的功能和生物靶标对于帮助我们理解 TA 系统在生物体内的地位具有重要的意义．在正常生长的细胞中，Ⅰ类 TA 系统中的毒素蛋白和抗毒素蛋白均为组成型转录，不断产生的抗毒素 sRNA(small RNA)通过多种不同的机制与不断转录得到的毒素 mRNA 发生不可逆的相互结合，从而中和毒素的细胞毒性．

典型的Ⅰ型 TA 系统中编码毒素蛋白的基因通常与编码抗毒素 sRNA 的基因位置相邻、方向相反、存在基因重叠现象，例如 *hok*/Sok，这种抗毒素分子属于 *cis*-encoded sRNA；但是有些Ⅰ型 TA 系统中的毒素基因和抗毒素基因也会相互独立存在，例如 *tisB*/IstR1 系统(*tisB*，toxicity induced by SOS；IstR1，Inhibitor of SOS-induced toxicity by RNA)，属于 trans-encoded sRNA[14-16]．大多数毒素 mRNA 的翻译既需要其核糖体结合位点折叠成相应的高级结构以助于与核糖体结合，同时还需要其他辅助因子或者基因的参与，因此抗毒素可以通过多种途径直接或间接地阻止毒素 mRNA 的翻译，抑制毒素的合成．人们根据Ⅰ型 TA 系统中 sRNA 作用于毒素 mRNA 位点的不同将Ⅰ型 TA 系统划分为 6 类(表 2)[17]．

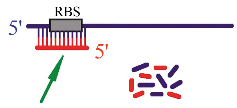
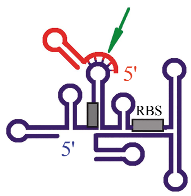
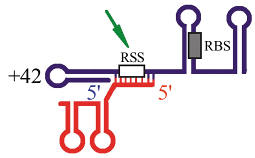
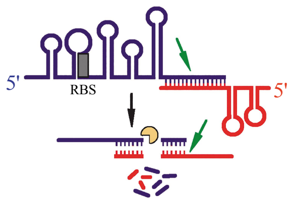
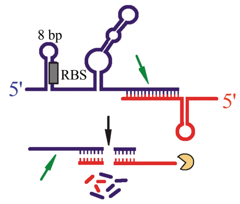
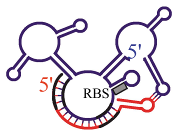
a．抗毒素 sRNA 直接与毒素分子 mRNA 的核糖体结合位点(ribosome binding site，RBS)结合[18]．*symE*/SymR 系统是位于 *E. coli* 染色体上的 TA 系统，它的毒素蛋白 SymE 比较大，有 113 个氨基酸，且不是疏水性蛋白，因此并不是典型的Ⅰ型 TA 系统[18]．抗毒素 *symR* sRNA 通过与毒素基因 *symE* 的起始密码子及前面的 RBS 互补结合直接阻止了毒素蛋白的表达．伴随着 *symR* 启动子的突变，*symE* mRNA 水平会随之增长，同时 SymE 蛋白表达量增至原来的 7 倍，进一步证明了 SymR 可以影响 *symE* 的翻译，但不影响其稳定性．

b．抗毒素 sRNA 抑制毒素蛋白翻译所需的前导多肽的翻译[19-20]．在 *E. coli hok*/Sok 系统中，毒素蛋白 *hok* 基因自身很难直接进行翻译，需要先合成前导多肽 Mok[21]．而抗毒素 Sok 通过与 Mok 的 Shine Dalgarno (SD)序列进行结合，从而间接抑制了 *hok* mRNA 的翻译．与此类似的还有 *ldr2*/Rdl 系统[20]．

c．抗毒素 sRNA 通过与毒素分子 mRNA 的 ribosome standby site(RSS)结合抑制毒素蛋白的翻译[16]．*E. coli* 染色体上的 *tisB*/IstR1 系统是第一个被发现可以由 SOS 反应介导的Ⅰ型 TA 系统．*tisB*、IstR1 共享一个参与 SOS 反应的 LexA 结合位点，并从相反的方向分别被编码．毒素基因 *tisB* 有 3 种均含有 *tisB* ORF 的不同形式的 mRNA：+1 mRNA、+42 mRNA、+106 mRNA，其中只有+42 mRNA 具有生物活性[22]．+42 mRNA 的 5′端距 *tisB* ORF 上游约 100 nt 处，有一段 mRNA 的非特异性序列 RSS(ribosome standby site)可以起始毒素蛋白

Table 2　Six different mechanisms of type Ⅰ sRNA antitoxin action

表 2　Ⅰ型抗毒素 sRNA 分子的 6 种作用机制

Ⅰ型抗毒素分子作用机制	TA 系统及其细胞内定位	作用机制图示 *
1．与毒素分子 mRNA 的核糖体结合位点(RBS)结合	*symE*/SymR *E. coli* 染色体	
2．抑制前导多肽的翻译	*hok*/Sok *E. coli* R1 质粒	
3．与毒素蛋白 mRNA 的核糖体等候位点(RSS)结合	*tisB*/IstR1 *E. coli* 染色体	
4．降解毒素蛋白 mRNA	*txpA*/RatA *B. subtilis* 染色体	
5．抑制毒素 mRNA 翻译，促进毒素 mRNA 降解	*bsrG*/SR4 *B. subtilis* 染色体	
6．通过增加毒素蛋白 mRNA 的稳定性抑制毒素蛋白的翻译	RNA Ⅰ/RNA Ⅱ *E. faecalis* pAD1 质粒	

* 蓝色线条为毒素 mRNA 分子，红色线条为抗毒素 sRNA 分子，绿色箭头为核酸酶酶切位点，黄色图形为 RNase Ⅲ.

TisB 的翻译，而抗毒素 IstR1 sRNA 也正是通过与这段 RSS 序列结合抑制了毒素基因 *tisB* mRNA 的翻译[16, 23]．利用这一机制抑制毒素蛋白合成的 TA 系统还有 *shoB*/OhsC、*zorO*/OrzO、*dinQ*/AgrAB 和 *bsrE*/SR5[24-25]．

d．促进毒素 mRNA 的降解．首个在 *Bacillus subtilis* 中发现的Ⅰ型 TA 系统 *tpxA*/RatA 的抗毒素 RatA(RNA antitoxin A)sRNA 与毒素基因 *tpxA* (toxic peptide A)mRNA 间约有 75 nt 的重叠区域，但是这段重叠区域并非位于毒素 mRNA 的编码区或者翻译起始区，所以抗毒素 sRNA 不是通过抑制 *txpA* 的翻译来阻止 TxpA 蛋白合成的．进一步的体外实验表明 *txpA* mRNA 与 RatA 能够通过发生相互作用形成 RNase Ⅲ的切割位点，而 *ratA* 基因的敲除会导致 *txpA* mRNA 水平的增加，这些结果均表明抗毒素 sRNA 是通过与毒素蛋白 mRNA 结合促使其降解，从而抑制毒素蛋白的合成[26-27]．

e．抗毒素 sRNA 既能抑制毒素 mRNA 的翻译，又能促进其降解．2013 年，Jahn 和 Brantl[23]在 *B.subtilis* 中首次发现了双管齐下抑制细胞内毒素合成的抗毒素分子 SR4，它既可以阻止毒素蛋白基因 *bsrG* mRNA 的翻译，同时还会加速其降解．此外，

bsrG/SR4 系统也是第一个被发现的热敏感Ⅰ型 TA 系统[28]．与 *tpxA*/RatA 系统类似，抗毒素 SR4 sRNA 通过与毒素蛋白 mRNA 3′端互补的～120 bp 序列发生结合，在 *bsrG* mRNA 的第 185 位形成 RNase Ⅲ酶切位点，促进毒素 *bsrG* mRNA 的降解[29]．此外，复合物的晶体结构显示 SR4 sRNA 与 *bsrG* mRNA 的结合还会使得核糖体结合位点(RBS)得以隐藏，阻止核糖体结合，从而进一步从翻译水平阻碍毒素蛋白的合成[28]．

以上这些抗毒素 sRNA 与毒素 mRNA 的结合均是只通过一段互补区域实现的．

f．抗毒素 sRNA 通过增加毒素 mRNA 的稳定性抑制毒素 mRNA 的翻译．*En. faecalis* 质粒 pDA1 上 *fst*/RNAⅡ系统是在革兰氏阳性菌发现的第一个可以稳定质粒的 TA 系统，并且其抗毒素 RNAⅡ与毒素基因 *fst* mRNA RNAⅠ在多个不同的区域存在相互作用[30-31]．RNAⅠ、RNAⅡ的 3′端有共同的双向终止序列(～35 nt)，同时在 5′端都存在有 2 个正向重复序列 direct repeats(DRa 和 DRb)，这 3 个区域都暴露在 RNA 茎环的外侧，形成了特殊的抑制方式——RNAⅡ同时与毒素蛋白 mRNA RNAⅠ的 5′端和 3′端发生结合．进一步的突变体研究显示，RNAⅠ/RNAⅡ相互作用至少需要两个步骤：首先 RNAⅠ/RNAⅡ的 3′端初步相互作用，使得 RNAⅠ、RNAⅡ的 5′端相互靠近；然后 RNAⅡ 5′端的 2 个正向重复序列分别与 RNAⅠ的 5′端相互配对形成稳定的 RNAⅠ/RNAⅡ复合物．如果敲除 RNAⅠ的 5′端，RNAⅠ/RNAⅡ复合体无法形成，突变体毒素基因的翻译效率将是野生型 *fst* 的 300 倍，进一步说明 RNAⅡ通过 5′端重复序列与 RNAⅠ相互作用抑制了 Fst 蛋白的表达．只是 RNAⅡ与 RNAⅠ形成复合物后，并没有像 *tpxA*/RatA、*bsrG*/SR4 系统那样促进毒素 mRNA 的降解，反而增强了毒素 RNAⅠ(半衰期由原来的 9 min 增加到 40 min)、抗毒素 RNAⅡ(半衰期由原来的 4 min 增加到 16 min)的稳定性，这可能是因为 RNAⅠ/RNAⅡ复合体中 5′端的配对导致了 RNaseV1 在 36～39 nt 酶切位点的消失所致[30]．与此相似的家族还有 *E. coli*中的 *ibs*/Sib 家族，抗毒素 Sib 可以识别和结合 *ibs* mRNA 中的 2 个区域 TRD1 和 TRD2 (target recognition domains)来抑制毒素基因 *ibs* 的翻译[32-33]．

随着越来越多的Ⅰ类 TA 系统的涌现，人们也发现了一些新型的抗毒素 sRNA 抑制毒素蛋白质合成的方式．例如 *E. coli* rac 噬菌体中的 *ralR*/RalA 系统，抗毒素 RalA 功能的实现需要有分子伴侣 Hfq 的辅助[34]，这可能是因为 *ralR* mRNA、RalA 之间互补序列过短的原因(16 nt)，但是人们尚不清楚分子伴侣具体的作用机制是促进 *ralR*/RalA 复合物的形成、还是影响 RNA 分子的稳定性或是其他．*ralR*/RalA 系统是到目前为止唯一发现的需 Hfq 辅助的Ⅰ型 TA 系统，但是不能排除生物体中还存在有其他参与 RNA 互补序列较短的毒素 - 抗毒素系统调节的 RNA 结合蛋白．

2 Ⅰ型毒素-抗毒素系统中毒素蛋白的作用机制及其结构基础

在Ⅰ型 TA 中，除了 SymE 和 RalR 毒素蛋白，所有的Ⅰ型毒素都具有比较典型的共同特征：它们为 20～65 个氨基酸的小型疏水多肽，分子质量较小，其二级结构中含有一个 α 螺旋结构的跨膜结构域，可能定位于细胞内膜[35-37]，通过类似噬菌体 holins 的作用机制破坏细胞膜形成孔状结构，造成膜电位的破坏，从而抑制 ATP 的合成[35, 38]．但是人们对于这些毒素蛋白的作用机制和细胞内的生物靶标依然知之甚少，因为在很多的细胞体系中抗毒素基因的敲除并不会直接导致细胞表现型的变化，因此很难从细胞水平确定毒素蛋白的生物学效应．目前多数的实验数据来自于毒素基因的过表达实验，并且结果显示大多数的毒素会导致细胞的死亡．

2.1 Ⅰ型 TA 系统中毒素蛋白的作用机制

hok、*relF*、*srnB*、*pndA*、*fst*、*ibsC*、*shoB*、*tisB* 和 *dinQ* 等毒素基因的表达会导致膜电位或者膜自身的破坏[11, 24, 35, 39-40]．考虑到这些毒素蛋白的疏水特性及其与噬菌体 holins[41]、抗菌多肽[42]的相似性，它们的这种生物学效应并不令人惊讶[35]．位于 *E. coli* pR1 上的毒素基因 *hok* 过量表达时会导致“幽灵”细胞的形成，这些细胞两端凝集、中部清澈，最终死亡，人们推测这是由于 Hok 蛋白引发了细胞膜不可逆的损伤所致[11]．编码于 pAD1 上的毒素蛋白 Fst 的毒性不具有宿主特异性，不仅对自身宿主 *En. faecalis* 有毒性，而且对于其他的菌株如 *B. subtilis*、*S. aureus* 和 *E. coli* 也具有毒害作用[40, 43-44]，最基本的细胞学效应是导致细菌拟核区的浓缩聚集，引发细胞分裂缺陷如子代细胞中基因组 DNA 的缺失；此外 Fst 还会导致细胞膜上需能转运泵的上调和细胞膜通透性的增加．与 Fst 同源的编码于染色体上的毒素蛋白 LdrD 能够引发细菌染色体快

速凝集，抑制所有基因的翻译，并且最新的研究表明 LdrD 可能还影响 ATP 的合成，可能也与其定位于细胞膜上有关[45-46].

毒素蛋白可能参与环境胁迫的响应，*tisB*、*dinQ*、*symE* 等毒素基因会在 SOS 胁迫响应下被诱导发生基因的转录．TisB 蛋白的作用靶标是 *E.coli* 的细胞内膜，它的过表达会导致膜极性降低、胞内 ATP 水平下降、DNA 的复制等大分子合成关闭，最终致使细胞死亡[38, 47]．*E. coli* 染色体上编码的毒素蛋白 DinQ 功能与 TisB 类似，并且它还参与影响基因重组等细胞膜依赖过程[24].

与其他Ⅰ型毒素蛋白不同，*E.coli* 中 SOS 诱导表达的毒素蛋白 SymE 是一个含有 113 个氨基酸的非疏水性蛋白，具有核酸酶活性，可能与环境胁迫下损伤 RNA 的循环再利用有关[18]．SymE 在生物学功能上类似 AbrB 折叠蛋白家族中的Ⅱ型 TA 系统的抗毒素 MazE，具有转录调节作用，并且 JPRED 结构预测显示 SymE 蛋白折叠状况与 AbrB 一致，是迄今发现的第一个具有抗毒素 AbrB 结构的毒素[18]．另一方面，SymE 也具有和Ⅱ型毒素 MazF 相似的功能：剪切 RNA 核糖体、促进 mRNA 和除自身抗毒素 SymR 以外的非编码 sRNA 的降解[18].

2014 年，在 *E.coli* rac 噬菌体中发现的Ⅰ型毒素蛋白 RalR 是首个具有非特异性 DNA 内切酶功能的毒素，可能定位于细胞质中，既可以剪切甲基化的 DNA 也可以剪切非甲基化 DNA[34].

除了具有细胞内毒性，有些Ⅰ型毒素蛋白还具有类似于抗菌肽的细胞外毒性．*S. aureus* 中的Ⅰ型毒素蛋白 SprA1 属于 *fst* 家族蛋白，它不仅对于自身宿主细胞具有毒害作用[8]，而且可以作为毒素杀死共同培养的其他细菌及溶解人类血红细胞，而这一对抗其他细胞类型的特性可能有助于自身宿主细胞的存活[48].

由此可见，除了 SymE 和 RalR 毒素蛋白具有核酸酶活性外，其他的Ⅰ型毒素均以细胞膜为共同的作用靶标，但是不排除随着更多的Ⅰ型毒素被发现，人们还会发现具有其他作用机制的毒素蛋白．

2.2 Ⅰ型 TA 系统中毒素蛋白的分子结构

为了能够更好地理解Ⅰ型毒素的生物学功能，人们也正在试图通过各种方法获得它们的原子级分辨率的分子结构．但是由于Ⅰ型毒素蛋白分子质量小、疏水性强、溶解性差，因此在结构研究中存在有很多困难，而且相对于其他类型的毒素 - 抗毒素系统中的蛋白质分子的结构研究要滞后很多．比如在Ⅱ型毒素 - 抗毒素系统中，人们不仅已经得到了大量毒素蛋白和抗毒素蛋白的结构(Ccd、Kid、MazE 等)[49-52]，获得了毒素 - 靶标复合物(CcdB-GyrA14)[53]、毒素 - 抗毒素复合物(MazE/MazF、RelB/RelE)的结构[54-55]，甚至还获得了毒素 - 抗毒素 -DNA 复合物(FitA/FitB-DNA)的结构[56]．相比之下，迄今为止只有两种Ⅰ型毒素蛋白的结构被报导：Fst 和 PepA1，它们在氨基酸一级序列上没有同源性，但是在结构上却十分相似．

Fst 是位于革兰氏阳性菌 *Enterococcus faecalis* pAD1 质粒上的 par 毒素 - 抗毒素系统中的Ⅰ型毒素蛋白，含有 33 个氨基酸，疏水性很强，不溶于水，但是可溶于细胞质膜类似物(membrane mimetics)DPC-d_{38}．Göbl 等[36]利用核磁共振的方法获得了 Fst 蛋白的分子结构，其主要是 α 螺旋(Fst_{5-26})，C 端的 7 个氨基酸则处于完全无序的状态，顺磁驰豫增强 PRE (paramagnetic relaxation enhancements)实验显示 Fst 蛋白直接插入脂质双分子层，α 螺旋形成跨膜结构，而 N 端 2 个氨基酸和 C 端 7 个氨基酸均伸出脂质双分子层外，其中 C 端伸向细胞质内．体外的功能实验结果显示 Fst 不具有之前预测的抗菌肽类似功能，也不具有溶血特性和细胞毒性，这可能也与其 C 端的特征结构有关．Fst 的作用靶标可能位于细胞质内，通过 C 端与特异的细胞膜结合靶标相互作用参与抑制细胞内大分子的生物合成．Fst 通过锚定在细胞膜上有助于其快速筛选靶标分子，而 C 端的无序性结构则给其与靶标分子的结合带来了更多的便利[36].

PepA1 是位于 *S. aureus* 细胞膜上的Ⅰ型毒素蛋白，含有 30 个氨基酸，具有不连续的螺旋结构．但是当其插入细胞膜内时，其蛋白结构通过压缩变为与细胞膜上其他孔道形成多肽类似的可延伸的、连续螺旋结构，并通过在膜上形成孔道改变细胞膜的完整性，最终引发细胞的死亡．核磁共振和分子动力学研究表明，PepA1 虽然与 Fst 相似主要为螺旋结构，但是在结构和功能上依然有很大的差别．Fst 不含半胱氨酸，而 PepA1 含有 1 个半胱氨酸，可以形成灵活的铰链结构，采用不连续的螺旋结构并通过分子间二硫键形成双体构成兼性多肽所特有的支架，方便其压缩形成具有弹性的螺旋结构插入细胞膜内(图 1)．与 Fst 具有柔性 C 端不同，PepA1 的 N 端处于无序状态并且对环境非常敏感，其 C 端却富含精氨酸并具有有序的结构，可能与

细胞膜上的甘油分子的阴离子基团发生相互作用．也正是由于结构上的差异使得 PepA1 具有与 Fst 不同的生物学功能，PepA1 具有细胞毒性，能够通过在细胞膜上形成空洞破坏红细胞及其宿主菌 *S. aureus* 的细胞膜，最终导致细胞发生类似凋亡的过程[37].

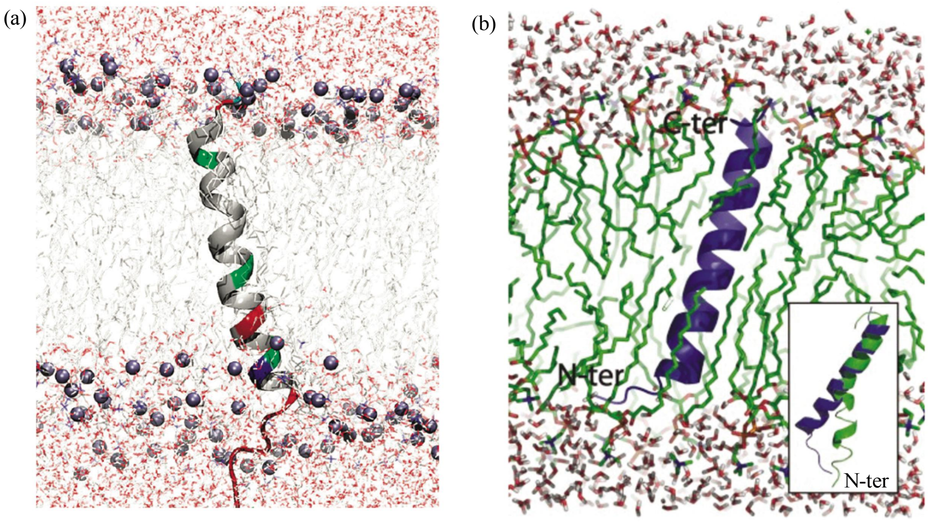


Fig. 1　Molecular dynamics simulation of Fst and PepA1 insertion into cell membrane

图 1　细胞膜脂双层中的 Fst、PepA1 分子结构模拟

(a) 细胞膜脂双层中的 Fst 分子结构模拟，红色表示负电荷区域，蓝色表示正电荷区域，绿色表示极性区域包括甘氨酸，白色表示非极性区域，蓝色球表示磷脂分子的头部[36]. (b) 细胞膜脂双层中的 PepA1 分子结构模拟，红色和白色为水分子，绿色为 DPPC 脂肪链，蓝色为细胞膜脂双层中的 PepA1 分子. 内图中，绿色为插入细胞膜前的 PepA1 分子结构，蓝色为插入细胞膜后的 PepA1 分子结构[37].

在目前已经确定的Ⅰ型毒素分子中大多功能尚不明确，通过解析毒素蛋白的分子结构揭开毒素在细菌生长、扩增和感染过程中的作用将是一个巨大的挑战．

3　Ⅰ型毒素-抗毒素系统的生理功能

质粒编码的Ⅰ型 TA 系统的生物学功能十分显著：它们是 PSK 系统，当子代细胞中的质粒发生丢失后，半衰期较短的抗毒素分子快速降解，毒素蛋白的表达不再受到抑制，最后导致质粒缺失的子代细胞死亡，从而保证质粒在子代细胞中的稳定遗传，比如 *E. coli* 中的 *hok*/Sok 系统和 *En. faecalis* 中的 *fst*/RNAⅡ系统[19, 57-58].

然而，染色体上编码的Ⅰ型 TA 系统，包括 *hok*/Sok 和 *fst*/RNAⅡ的同源系统，它们的生物学功能尚不清楚．研究表明染色体编码的Ⅱ型 TA系统能够帮助细胞进入休眠状态，度过环境胁迫期[59]. 迄今在染色体编码的Ⅰ型 TA 系统中只发现 *E. coli* 中的 *tisB*/IstR1 具有类似的生物学功能[60]．在逆境中，TisB 毒素蛋白的 SOS 诱导表达可以显著地提高休眠细胞对于环丙沙星的耐受能力，如果敲除 *tisB*/IstR1 基因对则会造成细胞休眠能力的明显下降[60-61]. *Streptococcus mutans* 染色体上编码的 *fst*-Sm/SrSm TA 系统也具有类似的提高细胞休眠能力的生物学功能[62].

虽然 *E. coli* 中的 *dinQ*/AgrB 与 *tisB*/IstR1 有很多相似之处，但是 *dinQ*/AgrB TA 系统却具有稳定染色体的功能，而未发现具有促进细胞休眠的功能．*agrB* 基因敲除实验显示毒素蛋白表达量升高、染色体的同源重组频率降低，但不影响大肠杆菌间的转导[24].

最新发现的 *ralR*/RalA 系统具有抵抗磷霉素攻击细胞壁的功能[34]，而含有具 RNAase 活性毒素的 *symE*/SymR 系统则可能有助于宿主细胞抵御 RNA 噬菌体的侵入[20].

B. subtilis 中的许多毒素基因(*txpA*、*yonT*、*bsrG*、*bsrE*、*bsrH*)定位于原噬菌体或原噬菌体类似区域，它们可能具有与 *E. coli* 中质粒编码的 TA 系统 PSK 类似的生物学功能，可以稳定这些遗传元件在细胞中的存在[63]，如 *txpA*/RatA 可以稳定 *skin*

元件的存在，该元件在细胞孢子发生过程中通过DNA 重排从基因组中切除，这种切除能够确保控制母细胞特异性基因表达的转录因子基因 *sigK*，在孢子发生的后期重新发挥功能．并且这些 TA 系统能够在代谢胁迫或氧胁迫下被诱导启动，相应的毒素基因 *txpA*、*yonT*、*bsrG*、 *bsrH* 表达量随之升高，发挥抑菌作用降低细胞对于营养或氧气的需求，从而促进细胞对于胁迫环境的适应[64]，其中 *bsrG* 的表达还受到温度的影响，高温时(48℃或 55℃)*bsrG* mRNA 会快速降解[65].

4 Ⅰ型毒素-抗毒素系统的应用及展望

目前对于Ⅰ型 TA 系统最直接的应用就是利用它们稳定染色体外遗传物质的功能．染色体外质粒的扩增或是基因的表达会给细胞带来一定的生理负担，由此常常发生质粒的丢失或者基因表达效率降低[66]．质粒上的抗生素标记有助于质粒的稳定存在，但是当难以找到合适的抗生素标记时，Ⅰ型 TA 系统不失为一种很好的选择，它同样可以有助于质粒的稳定遗传[67].

TA 系统条件性诱导表达的特点还可以用于有效地控制实验室细胞污染问题．将Ⅰ型毒素基因构建于酵母菌株内的葡萄糖阻遏操纵子下，当酵母生长于葡萄糖培养基中，组成型表达的抗毒素能够保证细胞的正常生长；而当酵母细胞从发酵罐中意外逃逸时，毒素蛋白的表达将被外界环境中的低葡萄糖浓度诱导启动，从而导致细胞的“自我毁灭”[68].

Ⅰ型毒素 - 抗毒素系统中毒素蛋白的可控表达、特异性地影响部分个体的生存状态可能是 TA 元件在细菌和古菌中广泛存在的主要原因，但是由于Ⅰ型毒素蛋白分子质量小、具有疏水特性，Ⅰ型抗毒素 sRNA 半衰期短、较难操作等特点，到目前为止人们对于Ⅰ型 TA 系统的了解依然十分有限．随着对于该领域研究的进一步深入，不可排除人们还会发现新型的Ⅰ型 TA 元件，而对于它们毒素作用机理的揭示也必将有助于我们更全面地理解毒素 - 抗毒素系统在细菌和古菌生理过程中扮演的多元化角色．已有文献报道，TA 系统可以被改造用来开发合成生物学的特殊元件、开发新的抗菌策略、甚至在真核生物中用于消除特定类型细胞、抵抗病毒和癌症治疗等[69-72]．虽然这些应用多采用研究较为透彻的Ⅱ型 TA 系统，但随着对Ⅰ型 TA 研究的深入，其基于 RNA 的调控方式必将具有更加广泛的应用前景．

参 考 文 献

[1] Orrenius S. Early work on apoptosis, an interview with Sten Orrenius. Cell Death Differ, 2006, **13**(1): 1-4

[2] Brantl S. Bacterial type Ⅰ toxin-antitoxin systems. RNA Biol, 2012, **9**(12): 1488-1490

[3] Ogura T, Hiraga S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, **80**(15): 4784-4788

[4] Jaffé A, Ogura T, Hiraga S. Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. J Bacteriol, 1985, **163**(3): 841-849

[5] Hayes F, Van Melderen L. Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2011, **46**(5): 386-408

[6] Blower T R, Short F L, Rao F, *et al*. Identification and classification of bacterial Type Ⅲ toxin- antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. Nucleic Acids Res, 2012, **40**(13): 6158-6173

[7] Grønlund H, Gerdes K. Toxin-antitoxin systems homologous with relBE of *Escherichia coli* plasmid P307 are ubiquitous in prokaryotes. J Mol Biol, 1999, **285**(4): 1401-1415

[8] Fozo E M, Makarova K S, Shabalina S A, *et al*. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. Nucleic Acids Res, 2010, **38** (11): 3743-3759

[9] Yamaguchi Y, Park J H, Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. Annu Rev Genet, 2011, **45**: 61-79

[10] Schuster C F, Bertram R. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. FEMS Microbiol Lett, 2013, **340**(2): 73-85

[11] Gerdes K, Rasmussen P B, Molin S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83**(10): 3116-3120

[12] Weaver K E, Clewell D B. Construction of *Enterococcus faecalis* pAD1 miniplasmids: identification of a minimal pheromone response regulatory region and evaluation of a novel pheromone-dependent growth inhibition. Plasmid, 1989, **22** (2): 106-119

[13] Hernández-Arriaga A M, Chan W T, Espinosa M, *et al*. Conditional activation of toxin-antitoxin systems: postsegregational killing and beyond. Microbiol Spectr, 2014, **2**(5): 1-17

[14] Brantl S. Bacterial chromosome-encoded regulatory RNAs. Future Microbiol, 2009, **4**(1): 85-103

[15] Brantl S. Acting antisense: plasmid- and chromosome-encoded sRNAs from Gram-positive bacteria. Future Microbiol, 2012, **7**(7): 853-871

[16] Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, *et al*. An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. Mol Cell, 2007, **26**(3): 381-392

[17] Brantl S, Jahn N. sRNAs in bacterial type Ⅰ and type Ⅲ toxin-antitoxin systems. FEMS Microbiol Rev, 2015, **39** (3): 413-427

[18] Kawano M, Aravind L, Storz G. An antisense RNA controls

synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. Mol Microbiol, 2007, **64**(3): 738−754

[19] Gerdes K, Wagner E G. RNA antitoxins. Curr Opin Microbiol, 2007, **10**(2): 117−124

[20] Kawano M. Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli*: hok/sok, ldr/rdl, symE/symR. RNA Biol, 2012, **9**(12):1520−1527

[21] Franch T, Gultyaev A P, Gerdes K. Programmed cell death by hok/sok of plasmid R1: processing at the hok mRNA 3'-end triggers structural rearrangements that allow translation and antisense RNA binding. J Mol Biol, 1997, **273**(1): 38−51

[22] Vogel J, Argaman L, Wagner E G, *et al*. The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. Curr Biol, 2004, **14**(24): 2271−2276

[23] Wagner E G, Unoson C. The toxin-antitoxin system tisB-istR1: expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. RNA Biol, 2012, **9**(12): 1513−1519

[24] Weel-Sneve R, Kristiansen K I, Odsbu I, *et al*. Single transmembrane peptide DinQ modulates membrane-dependent activities. PLoS Genet, 2013, **9**(2): e1003260

[25] Wen J, Won D, Fozo E M. The ZorO-OrzO type Ⅰ toxin-antitoxin locus: repression by the OrzO antitoxin. Nucleic Acids Res, 2014, **42**(3):1930−1946

[26] Pellegrini O, Mathy N, Gogos A, *et al*. The Bacillus subtilis ydcDE operon encodes an endoribonuclease of the MazF/PemK family and its inhibitor. Mol Microbiol, 2005, **56**(5): 1139−1148

[27] Silvaggi J M, Perkins J B, Losick R. Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2005, **187** (19): 6641−6650

[28] Jahn N, Brantl S. One antitoxin--two functions: SR4 controls toxin mRNA decay and translation. Nucleic Acids Res, 2013, **41** (21): 9870−9880

[29] Jahn N, Preis H, Wiedemann C, *et al*. BsrG/SR4 from *Bacillus subtilis*——the first temperature-dependent type Ⅰ toxin-antitoxin system. Mol Microbiol, 2012, **83**(3): 579−598

[30] Greenfield T J, Ehli E, Kirshenmann T, *et al*. The antisense RNA of the par locus of pAD1 regulates the expression of a 33-amino-acid toxic peptide by an unusual mechanism. Mol Microbiol, 2000, **37**(3): 652−660

[31] Greenfield T J, Franch T, Gerdes K, *et al*. Antisense RNA regulation of the par post-segregational killing system: structural analysis and mechanism of binding of the antisense RNA, RNA Ⅱ and its target, RNAI. Mol Microbiol, 2001, **42**(2): 527−537

[32] Fozo E M. New type Ⅰ toxin-antitoxin families from “wild” and laboratory strains of *E. coli*: Ibs-Sib, ShoB-OhsC and Zor-Orz. RNA Biol, 2012, **9**(12): 1504−1512

[33] Han K, Kim K S, Bak G, *et al*. Recognition and discrimination of target mRNAs by Sib RNAs, a *cis*-encoded sRNA family. Nucleic Acids Res, 2010, **38**(17): 5851−5866

[34] Guo Y, Quiroga C, Chen Q, *et al*. RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type Ⅰ toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, 2014, **42**(10): 6448−6462

[35] Fozo E M, Hemm M R, Storz G. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, **72**(4): 579−589

[36] Göbl C, Kosol S, Stockner T, *et al*. Solution structure and membrane binding of the toxin fst of the par addiction module. Biochemistry, 2010, **49**(31): 6567−6575

[37] Sayed N, Nonin-Lecomte S, Réty S, *et al*. Functional and structural insights of a *Staphylococcus aureus* apoptotic-like membrane peptide from a toxin-antitoxin module. J Biol Chem, 2012, **287**(52): 43454−43463

[38] Unoson C, Wagner E G. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2008, **70**(1): 258−270

[39] Ono T, Akimoto S, Ono K, *et al*. Plasmid genes increase membrane permeability in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1986, **867**(3): 81−88

[40] Weaver K E, Weaver D M, Wells C L, *et al*. *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded Fst toxin affects membrane permeability and alters cellular responses to lantibiotics. J Bacteriol, 2003, **185**(7): 2169−2177

[41] Wang I N, Smith D L, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. Annu Rev Microbiol, 2000, **54**: 799−825

[42] Henriques S T, Melo M N, Castanho M A. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: How different are they? Biochem J, 2006, **399**(1): 1−7

[43] Weaver K E, Reddy S G, Brinkman C L, *et al*. Identification and characterization of a family of toxin-antitoxin systems related to the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 par addiction module. Microbiology, 2009, **155**(9): 2930−2940

[44] Patel S, Weaver K E. Addiction toxin Fst has unique effects on chromosome segregation and cell division in *Enterococcus feacalis* and *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2006, **188**(15): 537453−537484

[45] Kawano M, Oshima T, Kasai H, *et al*. Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2002, **45**(2): 333−349

[46] Yamaguchi Y, Tokunaga N, Inouye M, *et al*. Characterization of LdrA (long direct repeat A) protein of *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2014, **24**(2): 91−97

[47] Gurnev P A, Ortenberg R, Dörr T, *et al*. Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. FEBS Lett, 2012, **586**(16): 2529−2534

[48] Sayed N, Jousselin A, Felden B. A *cis*-antisense RNA acts in trans in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. Nat Struct Mol Biol, 2011, **19**(1): 105−112

[49] De Jonge N, Hohlweg W, Garcia-Pino A, *et al*. Structural and thermodynamic characterization of Vibrio fischeri CcdB. J Biol Chem, 2010, **285**(8): 5606−5613

[50] Loris R, Dao-Thi M H, Bahassi E M, *et al*. Crystal structure of CcdB, a topoisomerase poison from *E. coli*. J Mol Biol, 1999, **285**(4): 1667−1677

[51] Hargreaves D, Santos-Sierra S, Giraldo R, *et al*. Structural and functional analysis of the kid toxin protein from *E. coli* plasmid R1. Structure, 2002, **10**(10): 1425-1433

[52] Loris R, Marianovsky I, Lah J, *et al*. Crystal structure of the intrinsically flexible addiction antidote MazE. J Biol Chem, 2003, **278**(30): 28252-28257

[53] Dao-Thi M H, Van Melderen L, De Genst E, *et al*. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. J Mol Biol, 2005, **348**(5): 1091-1102

[54] Kamada K, Hanaoka F, Burley S K. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. Mol Cell, 2003, **11**(4): 875-884

[55] Takagi H, Kakuta Y, Okada T, *et al*. Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects. Nat Struct Mol Biol, 2005, **12** (4): 327-331

[56] Mattison K, Wilbur J S, So M, *et al*. Structure of FitAB from *Neisseria* gonorrhoeae bound to DNA reveals a tetramer of toxin-antitoxin heterodimers containing pin domains and ribbon-helix-helix motifs. J Biol Chem, 2006, **281** (49): 37942-37951

[57] Weaver K E. The par toxin-antitoxin system from *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1 and its chromosomal homologs. RNA Biol, 2012, **9**(12): 1498-1503

[58] Weaver K E. The type Ⅰ toxin-antitoxin par locus from *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1: RNA regulation by both *cis*- and trans-acting elements. Plasmid 2015, **78**: 65-70

[59] Maisonneuve E, Shakespeare L J, Jørgensen M G, *et al*. Bacterial persistence by RNA endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(32): 13206-13211

[60] Dörr T, Vulic M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. PLoS Biol, 2010, **8**(2): e1000317

[61] Dörr T, Lewis K, Vulic M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. PLoS Genet, 2009, **5** (12): e1000760

[62] Koyanagi S, Lévesque C M. Characterization of a *Streptococcus mutans* intergenic region containing a small toxin peptide and its *cis*-encoded antisense small RNA antitoxin. PLoS One, 2013, **8**(1): e54291

[63] Durand S, Jahn N, Condon C, *et al*. Type Ⅰ toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. RNA Biol, 2012, **9**(12): 1491-1497

[64] Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, *et al*. Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. Science, 2012, **335**(6072): 1103-1106

[65] Domka J, Lee J, Bansal T, *et al*. Temporal gene expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. Environ Microbiol, 2007, **9** (2): 332-346

[66] Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2004, **86**: 47-82

[67] Kroll J, Klinter S, Schneider C, *et al*. Plasmid addiction systems: perspectives and applications in biotechnology. Microb Biotechnol, 2010, **3**(6): 634-657

[68] Kristoffersen P, Jensen G B, Gerdes K, *et al*.Bacterial toxin-antitoxin gene system as containment control in yeast cells. Appl Environ Microbiol, 2000, **66**(12): 5524-5526

[69] Martinez-Garcia E, Benedetti I, Hueso A, *et al*. Mining environmental plasmids for synthetic biology parts and devices. Microbiol Spectr, 2015, **3**(1): PLAS-0033-2014

[70] Williams J J, Hergenrother P J. Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. Trends Microbiol, 2012, **20**(6): 291-298

[71] Park S J, Son W S, Lee B J. Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: a target for developing antimicrobial agents. Biochim Biophys Acta, 2013, **1834**(6): 1155-1167

[72] Yeo C C, Abu Bakar F, Chan W T, *et al*. Heterologous expression of toxins from bacterial toxin-antitoxin systems in eukaryotic cells: Strategies and applications. Toxins, 2016, **8**(2): 49

The Progress of Researches on Bacterial Type Ⅰ Toxin-Antitoxin Systems*

WANG Chen[1,2,3,4], XUAN Jin-Song[1)**], FENG Yin-Gang[2,3,4)**]

([1)] *Department of Biological Science and Engineering, School of Chemistry and Biological Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing* 100083, China;

[2)] *CAS Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao* 266101, China;

[3)] *Qingdao Engineering Laboratory of Single Cell Oil, QingdaoInstitute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao* 266101, China;

[4)] *Shandong Key Laboratory of Synthetic Biology, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao* 266101, China)

Abstract Toxin-antitoxin (TA) loci encode two-component genetic elements: a stable "toxin" protein and an unstable "antitoxin" (a protein or a regulatory RNA) that neutralizes the toxin action. A lot of researches have been done on the cellular targets of toxins, the molecular structures and biological functions, and the mechanisms of antitoxin actions. The studies not only discovered a multitude of physiology roles of TA systems, but also led to a number of applications for various purposes. Currently, five TA systems have been discovered in countless bacteria and archaea. The antitoxins in type Ⅰ systems are regulatory RNAs which can employ several different modes to counteract toxin proteins and their special RNA regulatory strategies have made type Ⅰ TA systems become a focus of TA researches. Within this review, we will summarize our current knowledge on type Ⅰ TA system and look into the future of their potential applications.

Key words type Ⅰ toxin-antitoxin system, regulatory RNA

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0217

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31270784, 31300635) and Chinese Government Scholarship (201506465020).

**Corresponding author.

XUAN Jin-Song: Tel: 86-10-62334497, E-mail: jsxuan@sas.ustb.edu.cn

FENG Yin-Gang: Tel: 86-532-80662706, E-mail: fengyg@qibebt.ac.cn

Received: July 5, 2016 Accepted: September 27, 2016