



# 细菌中 I 型毒素蛋白与细胞膜相互作用机制的研究进展\*

于 茹\*\* 赵立岭\*\* 李娥娥 陈明翠 赵 立 郭陈刚 于家峰\*\*\* 曹赞霞\*\*\*

(山东省生物物理重点实验室, 德州学院生物物理实验室, 德州 253023)

**摘要** I型毒素-抗毒素(TA)系统在细菌基因组中广泛存在,在细菌的生长、生存中发挥多种生物学功能,包括抗菌、红细胞毒性、促进持留菌形成、抑制细菌生长或导致细菌休眠等。绝大部分I型毒素蛋白以细胞膜作为靶标,目前已知的一种作用机制是在细胞膜上形成孔洞结构,造成膜电位的下降或细胞膜的破坏,从而抑制ATP的合成或导致细菌死亡;另一种可能的作用机制是毒素蛋白作用在细胞膜上,改变细胞的形状,导致细胞进入休眠状态。I型毒素蛋白-细胞膜作用机制的复杂性和生物功能的多样性远超预期。因此,解析I型毒素蛋白在不同细胞膜中的组装机制及其所形成结构特征就变得非常重要,这也是揭示其结构-功能关系的关键。本文通过综述已报道的I型TA系统的结构特征与生物学功能,结合对其跨膜结构域的预测,探讨了其可能在细胞膜中形成的不同结构及其对功能的影响,分析了影响作用机制的关键因素。这些研究既给耐药细菌的治疗带来机遇,又为新型抗菌药物的研发带来思路。

**关键词** 毒素-抗毒素系统, I型毒素蛋白, 结构特征, 生物学功能, 耐药菌

**中图分类号** Q7, Q93

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0383

细菌中I型毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统一般是由两个基因组成的单个操纵子。其中,毒素基因编码稳定的毒素蛋白,其过表达可抑制细菌生长或导致细菌死亡;抗毒素基因编码不稳定的抗毒素分子小RNA(small RNA, sRNA),其一般通过配对与毒素蛋白的mRNA相互作用,抑制毒素蛋白mRNA的翻译和/或诱导其降解<sup>[1]</sup>。I型TA系统在细菌基因组中广泛存在,在人类微生物群系中也能发现部分I型毒素蛋白如TisB、Hok等,其生物功能和细菌的生物进化密切相关,包括促进耐药菌形成、抑制细菌生长或引发细菌程序性死亡等<sup>[2]</sup>。I型TA系统中的毒素蛋白通常是小的疏水跨膜蛋白(一般<60个氨基酸),具有预测的 $\alpha$ 螺旋跨膜结构域,不同的毒素蛋白生物活性各不相同。当细菌正常生长时,抗毒素分子的存在会阻止毒素蛋白的活性,TA系统不会对细菌产生任何威胁作用。但当细菌受营养、压力、毒性、低氧、高温、抗生素等外界环境胁迫时,不稳定的抗毒素分子转录水平下调或者被快速降解,引起I型毒素蛋白在细菌中过量表达并累计。这时游离的毒素蛋白与其作用靶标结合,抑制细菌中多个重要的细胞过程,减缓

细菌的生长甚至导致细菌死亡。因此I型TA系统能在细菌的生长、生存过程中发挥多种生物学功能,包括强的红细胞毒性或抗菌功能、促进持留菌形成或抑制细菌生长及导致细菌休眠等。尽管对I型TA系统的研究已有数十年之久,但对其生物学功能和潜在分子机制的解析仍然滞后。当前针对细菌研究的热点是在细菌基因组中寻找新颖TA系统并对其结构特征、功能及作用机制等进行研究,这些研究既为耐药细菌的治疗带来机遇,又为新型抗菌药物的研发带来思路。

## 1 I型毒素-抗毒素系统的生物学功能

大多数I型毒素蛋白的作用被认为类似于噬菌体孔蛋白,即诱导细胞膜成孔,这会影

\* 国家自然科学基金(32171249, 61771093, 31670727), 山东省自然科学基金(ZR2016CQ15, ZR2020QC124)和山东省教育厅青创人才引育计划资助项目。

\*\* 并列第一作者。

\*\*\* 通讯联系人。

曹赞霞 Tel: 0534-8985879, E-mail: qiayilai@mail.ustc.edu.cn

于家峰 Tel: 0534-8985825, E-mail: jfyu1979@126.com

收稿日期: 2021-12-10, 接受日期: 2022-02-17

成, 进而影响DNA的复制、转录和翻译。极少数I型毒素是核酸酶, 如RNase SymE和DNase RalR<sup>[3-4]</sup>。目前关于I型TA系统的研究主要集中在肠道细菌和病原菌中, 如革兰氏阴性菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)<sup>[5]</sup>、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)<sup>[6]</sup>、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)<sup>[7]</sup>、梨火疫病原菌 (*Erwinia amylovora*)<sup>[8]</sup>, 及革兰氏阳性菌: 艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*)<sup>[9]</sup>、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)<sup>[10]</sup>、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[11]</sup>、粪肠球菌 (*Enterococcus*

*faecalis*)<sup>[12]</sup>、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)<sup>[13]</sup>等。对I型TA系统的研究主要包括3方面: a. 通过生物信息学方法在转录组测序数据中挖掘潜在的新颖I型TA系统; b. 利用实验方法分析I型TA系统中抗毒素分子sRNA抑制毒素蛋白功能发挥的机制; c. 实验方法分析I型TA系统中毒素蛋白可能的作用靶标和生理功能。表1和表2中列出了部分常见革兰氏阴性菌和阳性菌中定位于细胞膜的I型TA系统及其生物功能、作用机制, 并利用TMPRED<sup>[14]</sup>预测了毒素蛋白的跨膜结构域。

**Table 1 Target, biological function and mechanism of type I TA system in Gram-negative bacteria**

**表1 部分I型TA系统在革兰氏阴性菌中的靶标、生物功能及作用机制**

毒素蛋白	细菌	靶标	生物功能	作用机制	毒素蛋白序列	抗毒素	跨膜区	PubMed 编号
DinQ	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	干扰膜极性, 降低细胞内ATP浓度	MIDKAIIVK GALIALLELIRFLLQLLN	AgrB	5~24残基	23408903
HokA	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	细胞膜去极化, 破坏细胞膜的完整性	MPQKYRLLSLIVICFTLLFFTW MIRD SL- CELHIKQESYELAAFLACKLKE	SokA	7~24残基	29398446
HokB	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成	在内膜上形成小孔, 导致膜渗漏, 降低质子动力和ATP水平	MKHNPVLVCLLIHCITILTFTLLTRQ TLY- ELRFRDGDGKEVAALMACTSR	SokB	7~29残基	26051177
HokC	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	细胞膜去极化, 破坏细胞膜的完整性	MKQHKAMIVALIVICITAVVAALVTRK- DLCEVHIRTGQTEVAVFTAYESE	SokC	7~24残基	29398446
HokD	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成	细胞膜去极化, 破坏细胞膜的完整性	MKQQKAMLIALIVICLTVIVTALVTRK- DLCEVRIRTGQTEVAVFTAYEPEE	SokD	6~24残基	29398446
HokE	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成	细胞膜去极化, 破坏细胞膜的完整性	MLTKYALAAVIVLCLTVLGFLLVGD SL- CEFTVKERNIEFKAVLAYEPKK	SokE	5~24残基	29398446
IbsA	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成		MMKHVILVILLVISFQAY	SibA	3~19残基	18710431
IbsB	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成		MMKLLIIVLLVISFPAY	SibB	2~18残基	18710431
IbsC	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成	改变膜电位	MMRLVILVLLISFSAY	SibC	1~19残基	32516493
IbsD	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成		MMKLVILVLLVLSFAAY	SibD	4~18残基	18710431
IbsE	大肠杆菌	细胞膜	促进持留菌形成		MMKLVILVLLLLSFPY	SibE	3~19残基	18710431
LdrA	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	破坏细胞膜的完整性, 抑制ATP合成	MTLAQFAMIFWHDLAAPILAGIITA- AIVSWWRNRK	RdlA	10~32残基	24513967
LdrB	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	在内膜上形成小孔, 导致膜渗漏, 降低质子动力和ATP水平	MTLAQFAMTFWHDLAAPILAGIITA- AIVGWWRNRK	RdlB	10~32残基	31330822
LdrD	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	导致类核缩合, 细胞活力丧失	MTFAELGMAFWHDLAAPVIAGILASMI- VNWLNKRRK	RdlD	10~32残基	12123448

续表1

毒素蛋白	细菌	靶标	生物功能	作用机制	毒素蛋白序列	抗毒素	跨膜区	PubMed 编号
PndA	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	破坏细胞膜的渗透能力	MPQRTFLMMLIVICVTILCFVWMVRD-SLCGLRLQQGNTVLVATLAYEVKR	PndB	5~24残基	7783193
ShoB	大肠杆菌	细胞膜	促进滞留菌形成	细胞膜去极化, 破坏细胞膜的完整性	MTDCRYLIKRVIKIIIHAVLQLILLFL	ObsC	7~24残基	18710431
TisB	大肠杆菌	细胞内膜	导致细菌死亡	在内膜上形成小孔, 导致膜渗漏, 降低质子动力和ATP水平	MNLVDIAILIKLIVAALQLLDAVLKYLK	IstR1	1~18残基	33231643
ZorO	大肠杆菌	细胞膜	导致细菌死亡	破坏细胞膜的渗透能力	MDTLTQKLTVLIIVLELLVALLRLIDLLK	OrzO	7~25残基	24203704
AapA1	幽门螺杆菌	细胞内膜	促进滞留菌形成	不影响膜的完整性和膜电位	MATKHGKNSWKTLYLKISFLGCKVVV-LLKR	IsoA1	12~28残基	33229580
AapA3	幽门螺杆菌	细胞内膜	导致细菌死亡		MKHKSGKRSWKTLYFEFAFLGLKVIVS-VKR	IsoA3	12~29残基	31411564
Hok	沙门氏菌	细胞膜	抑制细菌生长		MPQRTFLMMLIVICVTILCFVWMVRD-SLCGLRLQQGNTVLVATLAYEVKR	Sok	6~22残基	25792384
IbsA	沙门氏菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MMHQVILIVLLISFPAY	SibA	3~19残基	25792384
LdrA	沙门氏菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MTLTLQGVVFWIVNWLDRDK	RdIA	1~17残基	25792384
LdrB	沙门氏菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MTLTELITIHWDLAAPTLVGIATGLFL-GWWHRRK	RdIB	13~31残基	25792384
TisB	沙门氏菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MSVVDITLILIKLIVAALQLLDAVL-KYLK	IstR	6~26残基	25792384
TimP	沙门氏菌	细胞内膜	促进滞留菌形成	合成毒性肽, 在内膜上形成小孔, 导致膜渗漏	MKVRCFCVVLVSGTLCLHADRSYP-GNSVPVTLNVQSR	TimR	2~20残基	33172998
Hok	梨火疫病菌	细胞膜	导致细菌死亡	影响细胞膜形态	MKLPRSSLVWCVLIVCLTLIFTYLTRK-SLCEIRYRDGHREVAAFMAYESGK	Sok	7~26残基	33482720

Table 2 Target, biological function and mechanism of type I TA system in Gram-positive bacteria

表2 部分I型TA系统在革兰氏阳性菌中的靶标、生物功能及作用机制

毒素蛋白	细菌	靶标	生物功能	作用机制	毒素蛋白序列	抗毒素	跨膜区	PubMed 编号
CD0440.1	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MENLMMSIITGVIASYIYDKLKSH-SERPTKSGWELNIKFQKSKSSK	CD630_n00150	1~18残基	31064056
CD0904.1	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MLINFLLSIVAGIVSAYIYEKIKNHPNAN-KGDLKK	RCd13	2~19残基	33247281
CD0956.2	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MNNFLLNVIAGVIASLIFCLICKVFLKVK-SHSTRGKSKSGWEFDFKIKFHKFK	RCd10	4~26残基	29529286
CD0956.3	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MIGFLLSILAGVISAYIYDKIKNHPDANKG-DLKK	RCd14	1~17残基	33247281
CD0977.1	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MSEFLLGVLASLTASFITYIISRKVKSHS-GRSDFELDVKIKLNKKQH	RCd11	4~21残基	33247281
CD1233.1	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MDNFLFNVLASLTASVVVYLISKLFKKAK-SHSRTKSDLRVEFKFIFKSKK	SQ808	4~21残基	29529286

续表2

毒素蛋白	细菌	靶标	生物功能	作用机制	毒素蛋白序列	抗毒素	跨膜区	PubMed 编号
CD1418.2	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MDNFLQGVLASLVASLIVYLNSKLFK- KVKSHSGRSDFSFELKIKFKKNKH	CD630_n00500	4~21残基	29529286
CD2299.1	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MDNFLFNVLASVTASYIVYLISKLIKVK- SHSTAKSDLKIDINFKYHRKK	SQ1641	4~21残基	29529286
CD2517.1	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MDNFLQGILASLSASLIVYIASKLFRKRK- KPLKAATKSGWEFDLKIRFHKT	RCd8	4~26残基	29529286
CD2889	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MSEFLLGVLASLTASFITYIISRKVKSHS- GRSDFELDVKIKFNKKRH	RCd12	4~21残基	33247281
CD2907.1	艰难梭菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MNNFLNVIAGVIASLIFCLICKVFLKVK- SHSTRGKSKSGWEFDKIKFHKFK	RCd9	4~26残基	29529286
Fst	金黄色葡萄球菌	细胞膜	促进滞留菌形成	在细胞内形成孔洞, 破坏细菌细胞壁, 干扰细胞分裂	VMLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK	RNAII	1~21残基	30441856
PepA1	金黄色葡萄球菌	细胞膜	不仅对自身宿主细胞有毒害作用, 还可杀死其它细菌和溶解红细胞	破坏细胞膜结构	MLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK	SprA1 <sub>AS</sub>	2~24残基	23129767
PepA2	金黄色葡萄球菌	细胞膜	不裂解细菌细胞, 但可高效裂解红细胞	破坏细胞膜结构	MFNLLINIMTSAISGCLVAFFAHWLR- TRNNKKGDK	SprA2 <sub>AS</sub>	4~26残基	30544243
SprG1	金黄色葡萄球菌	细胞膜	不仅导致金黄色葡萄球菌死亡, 还会裂解宿主细胞	促进细胞壁隔膜形成, 干扰细胞分裂	SprG1 <sub>44</sub> : MVALLKSLERRRLMITISTM- LQFGLFLIALIGLVIKLIELSNKKSprG1 <sub>31</sub> : MITISTMLQFGLFLIALIGLVIKLIELSNKK	SprF1	13~35残基	34070083
SprG2	金黄色葡萄球菌	细胞膜	促进滞留菌形成		VISIANALHMLSFGMFIVTFIGIVVAIINL- SNKK	SprF2	10~32残基	30551143
SprG3	金黄色葡萄球菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MSDFEMLMVVLTIIIGLVLISTQDHKK	SprF3	4~21残基	30551143
SprG4	金黄色葡萄球菌	细胞膜	促进滞留菌形成		MINLNKKQPSFPNFDNE	SprF4	-	30551143
Fst <sub>EF0409</sub>	粪肠球菌	细胞膜	导致细菌死亡		MYEIVTKILVPIFVGIVLKLVTIWLEKQNEE	RNAII	4~26残基	34062876
Fst <sub>pADI</sub>	粪肠球菌	细胞膜	导致细菌死亡	导致染色体凝聚, 干扰分离和细胞分裂, 增加膜的通透性	MKDMLSLVIAPIFVGLVLEMISRV- LDEEDDSRK	RNAII	3~22残基	34062876
Fst-Sm	变异链球菌	细胞膜	导致细菌死亡	抑制细胞壁合成	MWHNFFIYIVAPIFVGIVLALFSEWLDK- KDDD	srSm	5~22残基	23326602

续表2

毒素蛋白	细菌	靶标	生物功能	作用机制	毒素蛋白序列	抗毒素	跨膜区	PubMed 编号
Lpt	鼠李糖乳 杆菌	细胞 内膜	细菌生长 抑制、类 核凝聚和 细胞完整 性受损	类似洗涤剂的机制， 通过胶束化去除双 分子层的小块，从 而破坏细胞膜磷脂 层的完整性	MNSFDKAIHAPLLVGVFLLLLKYALDNHK	RNAII	7~25残基	31645607
TxpA	枯草芽孢 杆菌	细胞膜	导致宿主 细胞裂解	影响细胞膜形态， 溶解细胞膜	MSTYESLMVMIGFANLIGGIMT- WVISLLTLFLMLRKKDTHPIYITVKEKCL- HEDPPIKG	ratA	10~32残基	27450630
BsrE	枯草芽孢 杆菌	细胞 内膜	导致宿主 细胞裂解		MSTFQALMLMLAIGSFIIALLTYIEKIDLP	SR5	7~24残基	26940229
BsrG	枯草芽孢 杆菌	细胞 内膜	导致宿主 细胞裂解	诱导膜的异常拓扑 结构，导致膜连续 内陷	MTVYESLMIMINFGGLILNTVLLIFNIMMI- VTSSQKKK	SR4	9~31残基	23969414
BsrH	枯草芽孢 杆菌	细胞 内膜	导致宿主 细胞裂解		MHVSTFQALMLMLAFGSFIIALLTYIKKK	as-BsrH	4~26残基	25670700
yonJ	枯草芽孢 杆菌	细胞膜	导致宿主 细胞裂 解，毒性 较低		MNFSFSSYPYYNMIKHIANMKRFSLWF- THITFIGLFLMFQLIKDYFSSEGQALINT- IFVV	SR6	23~42残基	29414903
yonT	枯草芽孢 杆菌	细胞膜	导致宿主 细胞裂解		VLEKMGIVVAFLISLTVLTINSLTIVE- KVRNLKNGTSKKKKRIKRLRP- KRQRQIRRR	SR6	5~27残基	29414903

### 1.1 革兰氏阴性菌I型TA系统

大肠杆菌是一种革兰氏阴性杆状细菌，是I型TA系统中研究最广泛的细菌之一。在模式生物大肠杆菌中已证实有20种I型TA系统<sup>[5]</sup>，其中18种TA系统中的毒素蛋白作用靶标为细胞膜（分别为DinQ、HokA、HokB、HokC、HokD、HokE、IsbA、IsbB、IsbC、IsbD、IsbE、LdrA、LdrB、LdrD、PndA、ShoB、TisB、ZorO），另两种SymE和RalR毒素蛋白靶标不同，是作为核酸酶来介导毒性的<sup>[3-4]</sup>。第一对被鉴定的I型TA基因是大肠杆菌中R1质粒的*hok/sok*位点，其中Hok是毒素蛋白，*sok*是抗毒素sRNA<sup>[15]</sup>。*hok* mRNA的半衰期较长，而*sok* sRNA的半衰期较短。当细胞分裂发生时，未继承R1质粒的子细胞将由于*sok* sRNA的快速降解和更稳定的*hok* mRNA翻译而死亡。Hok家族毒素蛋白通过破坏膜的完整性，从而杀死细菌<sup>[16]</sup>。研究发现，部分Hok蛋白可以通过调节膜去极化的水平，使细菌以可逆休眠的形式持续存在。Gerdes<sup>[17]</sup>提出一种稳态调控机制调节HokB

水平，使膜去极化不会导致细胞活力的不可逆损失，其过程为：由于抗毒素分子*sokB*的RNase E活性与膜缔合相关，假设膜去极化可能会使RNase E失活，提高*sokB*的表达量，从而抑制HokB的翻译，遵循这一原理的反馈机制将提供一种保护措施，将HokB的膜去极化作用限制在抑菌水平。与HokB类似，Ldr家族毒素蛋白和TisB毒素蛋白均是在内膜上形成小孔，导致膜渗漏，降低质子动力和ATP水平，从而抑制DNA复制、转录和翻译，最终阻碍细菌的生长，促进滞留菌的形成<sup>[18]</sup>。抗毒素分子*rdl*调控Ldr转录后水平，而RNA*istR-I*则通过与翻译起始区上游的待核糖体竞争抑制TisB毒素的翻译<sup>[19]</sup>。毒素蛋白DinQ不仅可以使细胞膜去极化致使细菌死亡，同时还可以促进DNA压缩成为类似拟核的结构或者高级的纤维状结构，从而使细胞丧失活力<sup>[20]</sup>。Elizabeth团队<sup>[21]</sup>获得5个Ibs毒素蛋白，都具有抑制细菌生长的功能，其中抗毒素分子*sibC*可以防止*ibsC*的过量表达而导致的毒性作用<sup>[22]</sup>。与其作用机制类似的还有

*pndA/pndB*、*shoB/ohsC* 和 *zorO/orzO* TA 系统中的毒素蛋白<sup>[21, 23-24]</sup>, 且 *ZorO* 在发挥细胞毒性作用时没有形成明显的大孔隙<sup>[25]</sup>。此外, RNase III 是一种双链核糖核酸酶, 对切割成对的毒素-抗毒素复合物 (包括 *hok/sok*、*tisB/istR*、*zorO/orzO*) 至关重要<sup>[23, 26-27]</sup>。

幽门螺杆菌可以通过多种独特策略来调节其基因表达以适应人体胃内的生存环境。Vogel 课题组<sup>[28]</sup> 通过全基因组测序和生物信息学技术分析了幽门螺杆菌转录组, 发现存在 4 个保守型 I 型 TA 系统家族 (A、B、C、D) 在其染色体上表达, 其中由 A 类 TA 系统的 5 组同源表达模块 (*aapA1/IsoA1*、*aapA3/IsoA3*、*aapA4/IsoA4*、*aapA5/IsoA5*、*aapA6/IsoA6*) 构成了一个新的染色体编码的 I 型 TA 系统家族。随后, Darfeuille 课题组<sup>[29]</sup> 通过实验方法首次描述了 *aapA1/IsoA1* 系统的作用特征及调控机制。*aapA1* 基因的全转录本是翻译失活的, 其 3' 端加工处理后可翻译获得一条长度为 30 个氨基酸的疏水性毒性蛋白; 同时 *IsoA1*sRNA 抗毒素直接靶向毒素基因的翻译起始区, 阻止其翻译且加速其降解。*AapA1* 毒素蛋白在幽门螺杆菌中的表达导致其由螺旋形细菌向圆球菌的快速形态转化, 且生长停滞并进入休眠状态, 这是一种有活力但不可培养状态, 是比滞留状态更深程度的休眠。*AapA1* 毒素蛋白是第一个被鉴定的圆球菌形成效应物, 它以幽门螺杆菌的细胞内膜为靶点但不破坏其内膜。在没有 *IsoA3* 抗毒素的情况下, *AapA3* 毒素蛋白在染色体上的表达可以导致幽门螺杆菌死亡。*IsoA3* 通过形成稳定的 RNA 双链, 在翻译水平上抑制 *aapA3* 的组成性表达; 且研究表明单核苷酸替换就足以阻碍 *AapA3* 毒素翻译, 如 A40T 改变了 *aapA3* mRNA 结构, 从而阻止其正常翻译<sup>[30]</sup>。

沙门氏菌是一种食源性致病菌, 迄今为止在其中发现 8 种大肠杆菌同源的 I 型 TA 系统 (分别为 *Hok*、*IsbA*、*IsbB*、*LdrA*、*LdrB*、*TisB*、*SymE*、*TimP*)。其中, *SymE* 和 *IsbB* 均未检测到抑制细菌生长的作用, 而 *Hok*、*IsbA*、*LdrA*、*LdrB* 和 *TisB* 均表现出抑制细菌生长的现象<sup>[7]</sup>。*TimP* 毒素蛋白作用在细胞膜上的机制与 *Hok* 和 *TisB* 等毒素不同, 其 N 端为一个跨膜信号肽, 通过其将多肽直接插入细胞膜, 过表达 *timP* 会导致生长抑制和膜渗漏。抗毒素 *timR* 是一种反义 sRNA, 通过与 *timP* 5' UTR 结合来抑制其翻译<sup>[31]</sup>。

梨火疫病菌是一种典型的引起苹果和梨等植物

毁灭性火疫病的植物致病菌。经研究发现的梨火疫病菌 I 型 TA 系统是 *hok/sok*。该 *Hok* 毒素与大肠杆菌 *HokB* 序列同源性为 48%, 实验表明其也可以通过破坏细胞膜的去极化从而杀死细菌。另外研究还表明, 梨火疫病菌 *Hok* 在激活 ATP 生物合成和激发细菌细胞对细胞膜和抗生素损伤的耐受性方面发挥重要作用。*Hok* 的低水平表达也激活了与应激反应相关的多个基因, 并触发了噬菌体休克蛋白基因 *pspA* 的表达, 从而起到保护梨火疫病菌细胞免受进一步膜应激源伤害的作用<sup>[8]</sup>。该研究表明, 应激调控是 TA 系统在细菌中低水平表达条件下的重要选择优势。

## 1.2 革兰氏阳性菌 I 型 TA 系统

艰难梭状芽胞杆菌是一种医学上重要的人类肠道病原体, 被认为是导致成人抗生素相关性院内腹泻的主要病原菌。Olga 研究组揭示了这类细菌上多组 I 型 TA 系统 (*CD0440.1/CD630\_n00150*、*CD0904.1/RCd13*、*CD0956.2/RCd10*、*CD0956.3/RCd14*、*CD0977.1/RCd11*、*CD1233.1/SQ808*、*CD1418.2/CD630\_n00500*、*CD2299.1/SQ1641*、*CD2517.1/RCd8*、*CD2889/RCd12*、*CD2907.1/RCd9*) 的特征<sup>[8-9, 32-33]</sup>。这类毒素蛋白都跟细胞膜相关, 能抑制细菌生长并促进其休眠。这类毒素蛋白疏水的 N 端高度保守, 带正电荷的 C 端区域含有丰富的赖氨酸, 且与其他细菌的 I 型毒素蛋白没有序列同源性。

金黄色葡萄球菌是一种重要病原菌, 是革兰氏阳性菌的代表, 可引起的感染范围从浅表感染到危及生命的炎症和败血症。在金黄色葡萄球菌中已发现多种 I 型 TA 毒素蛋白, 包括 *Fst*、*PepA1*、*PepA2*、*SprG1*、*SprG2*、*SprG3* 和 *SprG4* 及其抗毒素分子 sRNA。*Fst* 毒素蛋白在细胞内形成孔洞, 破坏细胞壁, 裂解活性强。*SprG1* 毒素蛋白既不导致穿孔也不导致破裂, 而是通过增加细胞壁的分隔影响细胞分裂<sup>[34]</sup>。*SprG1* RNA 编码两条长度不同的毒性小肽 *SprG1<sub>31</sub>* 和 *SprG1<sub>44</sub>*, *SprG1<sub>44</sub>* 的 N 端存在更多的正电荷残基使得其裂解红细胞的能力要高于 *SprG1<sub>31</sub>*, 而 *SprG1<sub>31</sub>* 抗菌能力更强。抗毒素分子 *SprF1* sRNA 一方面可以跟毒素蛋白的 mRNA 相互结合, 抑制其翻译成毒素蛋白 *SprG1*; 另一方面跟核糖体相互作用, 抑制细胞内蛋白质的合成, 最终导致金黄色葡萄球菌持留菌的形成<sup>[10]</sup>。*SprG* 的额外拷贝能编码两个较短的毒素蛋白 (*SprG2* 和 *SprG3*), 其过表达导致金黄色葡萄球菌生长停滞

而不是死亡。这几组同源TA系统之间存在交叉调控作用,例如当SprF2或SprF3过度表达时,SprG2和SprG3在生长期均无法检测到;另外,SprF1、SprF2或SprF3的表达都可以抑制SprG1的毒性作用<sup>[35]</sup>。PepA1不仅对自身细胞具有毒害作用,而且可以作为毒素杀死其他细菌及溶解人类红细胞。与PepA1不同,PepA2具有破坏真核生物细胞膜的巨大潜能,表现为很强的细胞毒性,对人红细胞的作用大约是PepA1的10倍<sup>[36]</sup>,而对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的作用不是很强。中国科学技术大学孙宝林课题组<sup>[37]</sup>一直致力于研究金黄色葡萄球菌中的毒素-抗毒素系统,其报道了一个由毒素、抗毒素和转录因子3个基因组成的I型TA系统,其中的毒素蛋白具有选择性地抑制细胞生长并阻碍细胞膜上多重耐药外排泵norA的功能。

粪肠球菌是人和动物肠道内主要菌群之一,是一种重要的医院病原菌。Fst<sub>pAD1</sub>是位于粪肠球菌质粒上的I型毒素蛋白,体外实验显示,其既无细胞毒性和溶血特性,也不具有抗菌肽类似功能,但过表达后会导致类核凝聚、染色体分裂和细胞分裂缺陷,进而导致膜通透性增加<sup>[38]</sup>。Fst<sub>EF0409</sub>是位于粪肠球菌染色质上的I型毒素蛋白,表现有细胞毒性。Fst<sub>EF0409</sub>的表达可降低sRNA抗毒素的稳定性或转录水平,具体毒素机制尚不清楚,但可以确定其发挥功能方式与Fst<sub>pAD1</sub>不同<sup>[12]</sup>。此外,变异链球菌中Fst-Sm/srSm I型TA系统的过量产生会降低持久性细胞对细菌细胞壁合成抑制剂的耐受水平<sup>[39]</sup>。鼠李糖乳杆菌中Fst类似物Lpt与细胞膜的作用被认为是通过一种类似洗涤剂的机制,通过胶束化去除双分子层的小块,破坏磷脂层的稳定性,从而导致细胞生长抑制、类核凝聚和细胞膜完整性受损<sup>[13]</sup>。

枯草芽孢杆菌是芽孢杆菌属的一种,广泛分布在土壤及腐败的有机物中,因易在枯草浸汁中繁殖而得名。2005年在枯草芽孢杆菌染色体上首次鉴定出I型TA系统TxpA-ratA<sup>[40]</sup>。TxpA基因编码一种含有59个氨基酸的毒素蛋白,该蛋白质N端有一个预测的跨膜结构域,C端有带电的氨基酸,可以直接影响细胞膜的结构从而导致细胞裂解。BsrG/SR4是第一个发现的温度敏感型I型TA系统。BsrG不影响膜的通透性,而是诱导膜的异常拓扑,使膜连续内陷,最终导致自溶<sup>[41]</sup>。BsrE RNA和BsrG RNA的二级结构非常相似,然而与SR4不同,SR5是一种单功能抗毒素,它只能通过招募

RNase III促进BsrE毒素mRNA的降解<sup>[42]</sup>,SR6则可以同时抑制毒素蛋白yonT和yonJ的表达<sup>[43]</sup>。虽然RNase III对大肠杆菌的生长不是必需的,但在枯草芽孢杆菌中,该基因的缺失是致命的。Durand等<sup>[44]</sup>研究表明,RNase III在枯草杆菌中的重要性在于它能裂解I型毒素TxpA、BsrE和yonT。有趣的是,枯草芽孢杆菌中BsrG/SR4的RNA被RNase III剪切,而毒素的抑制并不需要这种核糖核酸酶<sup>[42]</sup>。此外,BsrH/as-BsrH与TxpA/ratA位于同一基因间区域,但BsrH对RNase III不敏感<sup>[45]</sup>。因此,尽管RNase III在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的I型TA系统中发挥作用,但其抑制作用的重要性在不同的系统中可能是不同的。

绝大部分I型TA系统中的毒素蛋白(除SymE和RalR外)以细胞膜作为靶标,但它们靶向细胞膜时所发挥的生物学功能是多样而复杂的,对其作用机制的系统研究有利于理解其功能。

## 2 I型毒素蛋白的结构特征

I型毒素蛋白作用机制的复杂性和生物功能的多样性远超预期,揭示其作用机制的关键是解析其在细胞膜中的三维结构<sup>[2]</sup>。但I型毒素蛋白在脂质双分子层中并不是形成单一稳定的结构,而是存在多个亚稳态,且这些不同构象态之间处于动态平衡。此外,I型毒素蛋白在脂质双分子层中易聚集,存在多种不同的组装机制,从而导致其可能在细胞膜中形成不同结构进而影响其功能。这些I型毒素蛋白作用的特异性使得实验方法解析其在细胞膜中的结构特征存在很多困难。

### 2.1 I型毒素蛋白单体结构

迄今为止,已有5种I型毒素蛋白单体的结构被报导(图1):AapA1(PDB 6GIG<sup>[46]</sup>)、PepA1(PDB 4B19<sup>[47]</sup>)、FstpAD1(PDB 2KV5<sup>[12]</sup>)、LdrD(PDB 5LBJ<sup>[48]</sup>)和SprG1<sub>31</sub>(PDB 7NS1<sup>[2]</sup>)。AapA1毒素蛋白在40%TFE溶液的分子结构中,S9-L28倾向于形成 $\alpha$ 螺旋结构,N端的8个氨基酸则处于完全无序的状态。C端的两个带正电荷残基K29、R30对小肽的毒性影响很大,V26A突变虽然不能改变小肽的结构和带电情况,但对其细胞毒性有很大影响。PepA1毒素蛋白含有30个氨基酸,作用于金黄色葡萄球菌细胞膜上。当PepA1以 $\alpha$ 螺旋跨膜形式插入细胞膜时,会由不连续螺旋结构变为可延伸的连续螺旋结构,并通过在膜上形成孔洞结构以破坏细胞膜的完整性,最终引发细菌死亡或

红细胞裂解。PepA1的N端呈无序状态, C端富含精氨酸。FstpAD1毒素蛋白含有33个氨基酸, 以 $\alpha$ 螺旋形成跨膜结构, 而C端7个氨基酸残基以无序状态存在于细胞之内。LdrD具有 $\alpha$ 螺旋跨膜结构域, 并与磷酸胆碱胶束结合而不改变其大小。有趣的是, LdrD在其C端结构域有两个保守的阳离子氨基酸, 这种情形与AapA1相同并对AapA1毒性有重要影响。SprG1<sub>31</sub>肽采用单孔折叠构象。在大多数情况下, 膜相关的I型毒素蛋白通过去极化和/或与细胞内ATP下降相关的渗透作用干扰膜的完整性, 并显示其毒性。只有两种I型毒素HokB和TisB, 已经被实验证实可在细胞膜上形成孔洞。与

TisB导致细菌死亡不同, HokB的孔隙形成直接与持留菌形成相关。如果它们不形成孔隙, 这些I型毒素肽结合到膜的表面, 会引发类似于抗菌肽的洗涤剂效应。大多数I型毒素蛋白单体具有相似的序列特征及保守的 $\alpha$ 螺旋结构, 但以上关于I型毒素蛋白单体实验结构的研究, 并不能解释为何这些具有相似序列特征及保守 $\alpha$ 螺旋结构的毒素蛋白在靶向细胞膜时却具有不同的生物学功能。因此, 将I型毒素蛋白-细胞膜作为一个整体研究对象, 考虑蛋白质-蛋白质或蛋白质-脂质之间的相互作用并解析其动态结构才能有助于对其作用机制的理解。

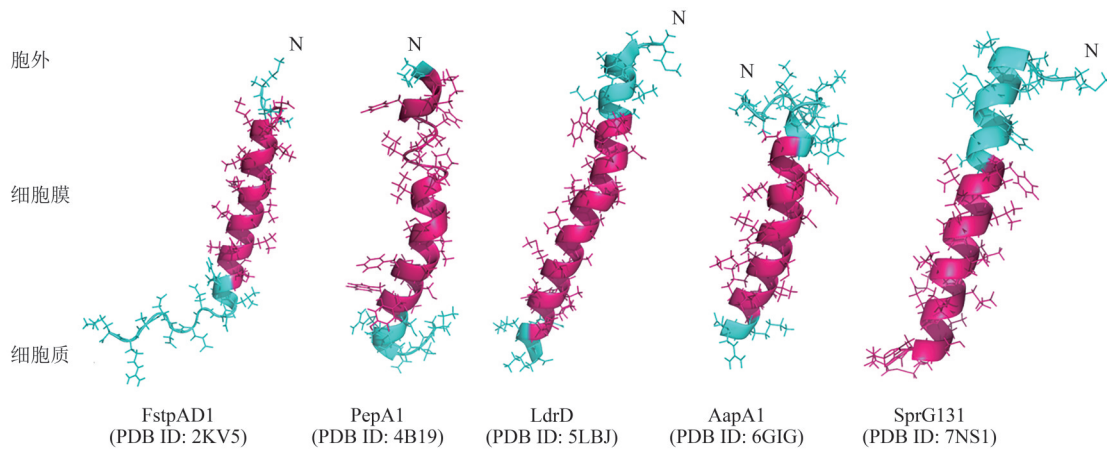


Fig. 1 Membrane-associated type I toxin protein structure

图1 膜相关I型毒素蛋白结构

粉色区域为跨膜区, 蓝色为非跨膜区。

## 2.2 I型毒素蛋白组装机制

大部分I型毒素蛋白序列短、疏水性强、溶解性差, 在细胞膜中易聚集, 且不同毒素蛋白的序列之间没有同源性。因此, 利用传统结构生物学实验方法解析这类蛋白质在细胞膜中的结构存在很多困难。毒素蛋白/多肽破坏细胞膜的方式主要有以下两类。第一类是跨膜孔模型, 毒素蛋白/多肽在细胞膜上形成“桶-板”或“环孔”型孔洞破坏细胞膜; 第二类是非孔模型, 毒素蛋白/多肽在细胞膜表面形成“地毯”裂解脂质双分子层。目前, 只有两种I型毒素HokB和TisB, 有相关实验研究其组装机制和可能的跨膜结构。大肠杆菌毒素蛋白HokB是由49个氨基酸残基组成的单跨膜蛋白, 其中C端带负电位于细胞周质, N端带正电位于胞质。该蛋白质中有3个半胱氨酸残基(C9、C14和

C46), 现已证实C9和C14位于跨膜区, C46暴露。Michiels团队<sup>[49]</sup>的系列研究揭示, 氧化还原酶DsbA可以催化两个单体的C46间形成的二硫键, 从而稳定HokB二聚体的结构并使其多聚化形成孔洞结构; 这些孔洞导致细胞膜去极化和ATP的泄漏, 从而形成持留菌; 细胞膜上的HokB蛋白越多, 持留菌的休眠期越长。HokB孔洞的大小及活性对膜电位敏感, 低膜电位倾向于形成中间孔类型, 高膜电位倾向于形成成熟孔类型, 但是现有实验研究不能区分中间孔洞与成熟孔洞的区别<sup>[49]</sup>。胁迫条件消失后, 细菌的复苏过程是由HokB的单体化及降解和细胞膜的重新极化共同控制的: 氧化还原酶DsbC还原多聚体中的二硫键使HokB单体化, 从而破坏孔洞; 孔洞被破坏后胞内的电子传递链使细胞膜重新极化并生成ATP, 导致胞内pH降



低,从而激活蛋白酶DegQ降解单体化的HokB<sup>[49]</sup>。大肠杆菌毒素蛋白TisB是由29个氨基酸残基组成的跨膜蛋白,其中带大量正电荷残基<sup>[48]</sup>。实验及分子动力学模拟表明,插入细胞膜的TisB通过由4个盐桥组成的电荷拉链组装成反平行二聚体<sup>[50]</sup>,并通过反平行二聚体-二聚体形成四聚体束的形式垂直插入膜中<sup>[51]</sup>,形成直径很小的阴离子选择性孔洞结构<sup>[48]</sup>;组成孔洞结构的跨膜四聚体通过一种规则动态的盐桥和氢键来稳定<sup>[51]</sup>,四聚体中的两亲螺旋与细菌内膜相互作用,从而破坏跨内膜的pH梯度,进而破坏跨膜质子动力势并耗尽ATP,使细菌进入休眠并形成生物膜<sup>[51]</sup>。第二类作用机制中,毒素蛋白通过其所带正电荷残基与磷脂膜中带负电荷的头部基团发生相互作用,使得膜张力发生改变;当毒素蛋白积累到一定浓度,膜张力使细胞膜变薄,最终导致细胞膜的破裂。毒素蛋白/多肽破坏/影响细胞膜的作用机制非常复杂,揭示其作用机制的关键是解析其三维结构。因此将多肽-细胞膜作为一个整体研究对象,考虑多肽-多肽或多肽-脂质之间的相互作用并解析其动态结构才能有助于对其作用机制的理解。

### 3 分子动力学模拟能研究I型毒素蛋白-细胞膜体系结构-功能关系及作用机制

I型TA系统中,毒素蛋白序列结构特征以及细胞膜组成是影响毒素蛋白作用机制及生物功能的两个重要因素。例如,PepA1和PepA2毒素蛋白有50%的序列同源性,其N端都富含疏水氨基酸,C端富含带正电荷氨基酸。但这两个毒素蛋白的功能差异显著,PepA2对人红细胞的毒性作用大约是PepA1的10倍,PepA1不仅对自身细胞具有毒害作用,而且可以作为毒素杀死其他细菌。为何序列相似的两个毒素蛋白其功能却差异显著?PepA1毒素蛋白以跨膜 $\alpha$ 螺旋形式在细胞膜上形成孔洞结构而破坏膜的完整性,最终引发细菌死亡或红细胞裂解,其孔洞的形成路径及结构特征仍不清楚。另外,AapA1毒素蛋白能在不破坏细胞膜的情况下,使幽门螺杆菌由螺旋形细菌向圆球菌转化,且使其生长停滞并进入休眠状态,是否细胞膜结构的改变影响其转运?I型毒素蛋白-细胞膜体系具有较大的作用特异性,这使得生物信息学预测软件及常规实验方法在研究其序列-结构-功能关系及作用机制方面存在很多困难。由于分子动力学模拟能够观察研究对象结构的细微变化,有利于上述问题的研究,

因而该方法被认为是研究蛋白质/多肽-细胞膜体系的动态结构及其作用机制的重要工具。Steinbrecher等<sup>[50]</sup>基于常规的粗粒化模拟,研究了TisB毒素蛋白在DMPC细胞膜表面或以跨膜形式存在时的结构特征,发现TisB毒素蛋白单体会很快结合到细胞膜表面,其二聚体的跨膜结构很稳定。Schneider等<sup>[51]</sup>将粗粒化模型与全原子模拟结合,研究了TisB毒素蛋白二聚体及四聚体在POPC细胞膜里的孔道结构、特征及关键相互作用,认为TisB毒素蛋白会在反平行二聚体基础上形成四聚体结构(图2)。Sayed等<sup>[47]</sup>基于常规的全原子模拟,研究了PepA1单体在DPPC膜里的跨膜结构特征。Korkut等<sup>[46]</sup>利用模拟方法研究了AapA1单体以跨膜形式在POPC膜内部和POPC/POPG膜表面的结构特征,发现AapA1单体的跨膜结构很稳定。这些模拟工作通常是将单个或多个毒素蛋白放在细胞膜表面或直接以跨膜螺旋的形式放在细胞膜内部,以研究毒素蛋白-细胞膜体系的结构特征,包括细胞膜性质和多肽构象的变化,多肽浓度、残基突变及不同细胞膜对相互作用的影响,毒素蛋白所形成孔洞结构的大小性质,不同细胞膜成份如何影响孔洞结构等。受采样方法和采样时间限制,这类模拟研究很难直接观察到毒素蛋白在细胞膜中的多种自由能极小状态及可能形成的不同大小的孔洞结构。

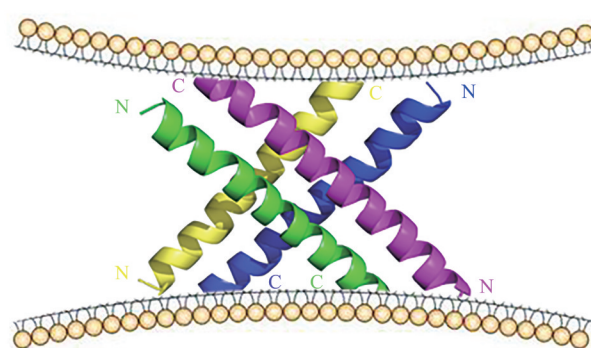


Fig. 2 Arrangement of TisB strands in the tetrameric assembly embedded in a POPC bilayer

图2 TisB毒素蛋白的四聚体在POPC细胞膜中的结构

### 4 总结与展望

I型毒素蛋白(除SymE和RalR毒素蛋白外)单体具有相似的序列特征(序列长度为20~65个氨基酸的疏水多肽)及保守的 $\alpha$ 螺旋结构,但它们靶

向细胞膜时所呈现的生物学功能是多样而复杂的。实验证实的生物学功能主要分为以下3类: a. 有细胞毒性或杀菌功能; b. 促使持留菌形成或抑制细胞生长; c. 致细菌形态变化但不破坏细胞膜完整性。I型TA系统通过多种复杂的作用机制发挥多样生物学功能, 对其作用机制的系统研究既能够给耐药细菌的治疗带来机遇, 又为新型抗菌药物的研发带来思路。

对I型TA系统作用机制及生物功能的理解, 能加强对耐药菌形成机制及调控机制的认识, 为耐药细菌的治疗提供新的途径。I型毒素蛋白作用机制复杂多样, 目前已知的一种作用机制是在细胞膜上形成孔洞结构, 造成膜电位的下降或细胞膜的破坏, 从而抑制ATP的合成或导致细菌死亡。这些孔洞结构的大小、性质及特征是影响其作用机制的关键因素。另一种可能的作用机制是毒素蛋白作用在细胞膜上, 改变细胞的形状, 导致细胞进入休眠状态。

细胞膜相关的I型毒素蛋白被认为是设计新的抗菌药物的先导化合物, 对I型毒素结构的解析有利于认识其结构-功能关系, 从而推进抗菌药物和新型抗生素研发的进程。在体外培养基内加入SprG1<sub>31</sub>、SprG1<sub>44</sub>和SprA1对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等具有杀菌作用<sup>[52-53]</sup>。SprA1毒素的特殊化学修饰能极大地提高其在人血清中的抗菌潜力和稳定性, 具有一定的耐药性, 同时大大降低了其对人的毒性, 证实了毒素可以转化为强效抗生素<sup>[54]</sup>。ZorO毒素中ALLRL肽段对革兰氏阳性菌, 包括金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌, 均有抗菌作用<sup>[55]</sup>。此外, 作为抗菌剂研发的候选药物DinQ, 已证实对治疗大肠杆菌感染具有疗效<sup>[56]</sup>。

大部分I型毒素蛋白以细胞膜作为靶标, 在脂质双分子层中并不是形成单一稳定的结构, 而是存在多个亚稳态, 且这些不同构象态之间处于动态平衡。并且, I型毒素蛋白在脂质双分子层中易聚集, 存在多种不同的组装机制, 从而导致其可能在细胞膜中形成不同结构进而影响其功能。但是, 目前对I型毒素蛋白的作用机制及影响其作用机制的关键序列及结构因素依然知之甚少。寻找新颖I型TA系统并对其结构特征、功能及作用机制进行研究是当前针对细菌的研究热点, 但实验方法很难解析I型毒素蛋白在细胞膜中的结构。因此, 如何基于机器学习及分子动力学模拟发展一套适用于I型毒素

蛋白-细胞膜体系的计算模拟方法, 揭示I型毒素蛋白-细胞膜体系的结构-功能关系是系统研究其作用机制的有效途径。

## 参 考 文 献

- [1] Brielle R, Pinel-Marie M L, Felden B. Linking bacterial type I toxins with their actions. *Curr Opin Microbiol*, 2016, **30**: 114-121
- [2] Nonin-Lecomte S, Fermon L, Felden B, *et al*. Bacterial type I toxins: folding and membrane interactions. *Toxins (Basel)*, 2021, **13**(7): 490
- [3] 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
- [4] 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
- [5] Harms A, Brodersen D E, Mitarai N, *et al*. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Mol Cell*, 2018, **70**(5): 768-784
- [6] El Mortaji L, Tejada-Arranz A, Rifflet A, *et al*. A peptide of a type I toxin-antitoxin system induces *Helicobacter pylori* morphological transformation from spiral shape to coccoids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(49): 31398-31409
- [7] Lobato-Marquez D, Moreno-Cordoba I, Figueroa V, *et al*. Distinct type I and type II toxin-antitoxin modules control *Salmonella* lifestyle inside eukaryotic cells. *Sci Rep*, 2015, **5**: 9374
- [8] Peng J, Triplett L R, Sundin G W. Activation of metabolic and stress responses during subtoxic expression of the type I toxin *hok* in *Erwinia amylovora*. *BMC Genomics*, 2021, **22**(1): 74
- [9] Peltier J, Hamiot A, Garneau J R, *et al*. Type I toxin-antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile*. *Commun Biol*, 2020, **3**(1): 718
- [10] Chlebicka K, Bonar E, Suder P, *et al*. Impacts of the type I toxin-antitoxin system, SprG1/SprF1, on *Staphylococcus aureus* gene expression. *Genes (Basel)*, 2021, **12**(5): 770
- [11] Durand S, Jahn N, Condon C, *et al*. Type I toxin-antitoxin systems in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol*, 2012, **9**(12): 1491-1497
- [12] Holmes A, Sadlon J, Weaver K. Charged residues flanking the transmembrane domain of two related toxin-antitoxin system toxins affect host response. *Toxins (Basel)*, 2021, **13**(5): 329
- [13] Maggi S, Yabre K, Ferrari A, *et al*. Functional characterization of the type I toxin Lpt from *Lactobacillus rhamnosus* by fluorescence and atomic force microscopy. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 15208
- [14] Hofmann K, Tmbase S. TMBASE - a database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1992, **374**: 166
- [15] Gerdes K, Larsen J E, Molin S. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J Bacteriol*, 1985, **161**(1): 292-298
- [16] Gerdes K, Bech F W, Jorgensen S T, *et al*. Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product

- of the *E. coli relB* operon. EMBO J, 1986, **5**(8): 2023-2029
- [17] Gerdes K. Hypothesis: type I toxin-antitoxin genes enter the persistence field—a feedback mechanism explaining membrane homeostasis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016, **371**(1707): 20160189
- [18] 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
- [19] Dorr T, Vulic M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. PLoS Biol, 2010, **8**(2): e1000317
- [20] Weel-Sneve R, Kristiansen K I, Odsbu I, *et al.* Single transmembrane peptide DinQ modulates membrane-dependent activities. PLoS Genet, 2013, **9**(2): e1003260
- [21] Fozo E M, Kawano M, Fontaine F, *et al.* Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs. Mol Microbiol, 2008, **70**(5): 1076-1093
- [22] Jahanshahi S, Li Y. An effective method for quantifying RNA expression of IbsC-SibC, a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. ChemBiochem, 2020, **21**(21): 3120-3130
- [23] 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
- [24] Nielsen A K, Gerdes K. Mechanism of post-segregational killing by hok-homologue pnd of plasmid R483: two translational control elements in the *pnd* mRNA. J Mol Biol, 1995, **249**(2): 270-282
- [25] Bogati B, Wadsworth N, Barrera F, *et al.* Improved growth of *Escherichia coli* in aminoglycoside antibiotics by the zor-orz toxin-antitoxin system. J Bacteriol, 2021, **204**(1): JB0040721
- [26] Gerdes K, Nielsen A, Thorsted P, *et al.* Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable hok, *srnB* and *pndA* effector messenger RNAs. J Mol Biol, 1992, **226**(3): 637-649
- [27] 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
- [28] Sharma C M, Hoffmann S, Darfeuille F, *et al.* The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, 2010, **464**(7286): 250-255
- [29] Arnion H, Korkut D N, Masachis Gelo S, *et al.* Mechanistic insights into type I toxin antitoxin systems in *Helicobacter pylori*: the importance of mRNA folding in controlling toxin expression. Nucleic Acids Res, 2017, **45**(8): 4782-4795
- [30] Masachis S, Tourasse N J, Lays C, *et al.* A genetic selection reveals functional metastable structures embedded in a toxin-encoding mRNA. Elife, 2019, **8**: e47549
- [31] Andresen L, Martinez-Burgo Y, Nilsson Zangelin J, *et al.* The small toxic salmonella protein TimP targets the cytoplasmic membrane and is repressed by the small RNA TimR. mBio, 2020, **11**(6): e01659-20
- [32] Soutourina O. Type I toxin-antitoxin systems in *Clostridia*. Toxins (Basel), 2019, **11**(5): 253
- [33] Maikova A, Peltier J, Boudry P, *et al.* Discovery of new type I toxin-antitoxin systems adjacent to CRISPR arrays in *Clostridium difficile*. Nucleic Acids Res, 2018, **46**(9): 4733-4751
- [34] Habib G, Zhu Q, Sun B. Bioinformatics and functional assessment of toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. Toxins (Basel), 2018, **10**(11): 473
- [35] Riffaud C, Pinel-Marie M L, Pascreau G, *et al.* Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res, 2019, **47**(4): 1740-1758
- [36] Germain-Amiot N, Augagneur Y, Camberlein E, *et al.* A novel *Staphylococcus aureus* cis-trans type I toxin-antitoxin module with dual effects on bacteria and host cells. Nucleic Acids Res, 2019, **47**(4): 1759-1773
- [37] Habib G, Zhu J, Sun B. A novel type I toxin-antitoxin system modulates persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 2020, **310**(2): 151400
- [38] Weaver K E, Chen Y, Müller E M, *et al.* Examination of enterococcus faecalis toxin-antitoxin system toxin Fst function utilizing a pheromone-inducible expression vector with tight repression and broad dynamic range. J Bacteriol, 2017, **199**(12): e00065-17
- [39] Koyanagi S, Levesque C M. Characterization of a *Streptococcus mutans* intergenic region containing a small toxic peptide and its cis-encoded antisense small RNA antitoxin. PLoS One, 2013, **8**(1): e54291
- [40] Silvaggi J M, Perkins J B, Losick R. Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2005, **187**(19): 6641-6650
- [41] Jahn N, Brantl S, Strahl H. Against the mainstream: the membrane-associated type I toxin BsrG from *Bacillus subtilis* interferes with cell envelope biosynthesis without increasing membrane permeability. Mol Microbiol, 2015, **98**(4): 651-666
- [42] 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
- [43] Reif C, Loser C, Brantl S. *Bacillus subtilis* type I antitoxin SR6 promotes degradation of toxin yonT mRNA and is required to prevent toxic yoyJ overexpression. Toxins (Basel), 2018, **10**(2): 74
- [44] Durand S, Gilet L, Condon C. The essential function of *B. subtilis* RNase III is to silence foreign toxin genes. PLoS Genet, 2012, **8**(12): e1003181
- [45] Irnov I, Sharma C M, Vogel J, *et al.* Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res, 2010, **38**(19): 6637-6651
- [46] Korkut D N, Alves I D, Vogel A, *et al.* Structural insights into the AapA1 toxin of *Helicobacter pylori*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2020, **1864**(1): 129423
- [47] 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

- [48] Göbl C, Dulle M, Hohlweg W, *et al.* Influence of phosphocholine alkyl chain length on peptide-micelle interactions and micellar size and shape. *J Phys Chem B*, 2010, **114**(13): 4717-4724
- [49] Wilmaerts D, Dewachter L, De Loose P J, *et al.* HokB monomerization and membrane repolarization control persister awakening. *Mol Cell*, 2019, **75**(5): 1031-1042
- [50] Steinbrecher T, Prock S, Reichert J, *et al.* Peptide-lipid interactions of the stress-response peptide TisB that induces bacterial persistence. *Biophys J*, 2012, **103**(7): 1460-1469
- [51] Schneider V, Wadhvani P, Reichert J, *et al.* Tetrameric charge-zipper assembly of the TisB peptide in membranes-computer simulation and experiment. *J Phys Chem B*, 2019, **123**(8): 1770-1779
- [52] Solecki O, Mosbah A, Baudy Floc'h M, *et al.* Converting a *Staphylococcus aureus* toxin into effective cyclic pseudopeptide antibiotics. *Chem Biol*, 2015, **22**(3): 329-335
- [53] Pinel-Marie M L, Brielle R, Felden B. Dual toxic-peptide-coding *Staphylococcus aureus* RNA under antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally. *Cell Rep*, 2014, **7**(2): 424-435
- [54] Nicolas I, Bordeau V, Bondon A, *et al.* Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. *PLoS Biol*, 2019, **17**(7): e3000337
- [55] Otsuka Y, Ishikawa T, Takahashi C, *et al.* A short peptide derived from the ZorO toxin functions as an effective antimicrobial. *Toxins (Basel)*, 2019, **11**(7): 392
- [56] Booth J A, Suganthan R, Gaustad P, *et al.* Development of DinQ from *Escherichia coli* as an anti-cell-envelope antibiotic. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, **45**(2): 196-197

## Research Progress on Interaction Mechanisms of Type I Toxin Protein-membrane in Bacteria\*

YU Ru\*\*, ZHAO Li-Ling\*\*, LI E-E, CHEN Ming-Cui, ZHAO Li, GUO Chen-Gang,  
YU Jia-Feng\*\*\*, CAO Zan-Xia\*\*\*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Biophysics, Institute of Biophysics, Dezhou University, Dezhou 253023, China)

**Abstract** The type I toxin-antitoxin (TA) system is widespread in the bacterial genome and can play a variety of biological functions in the growth and survival of bacteria, including antibacterial function, red blood cell toxicity, promoting the formation of persistent bacteria, inhibiting bacterial growth, or causing bacterial dormancy, *etc.* The vast majority of type I toxin proteins target the cell membrane. One known mechanism of action is the formation of pores in the cell membrane, resulting in a decrease in membrane potential or destruction of the cell membrane, thereby inhibits the ATP synthesis or leads to the bacterial death; another possible mechanism of action is that the toxin proteins act on the cell membrane, changing the shape of the cell and causing it to enter a dormant state. The complexity of the type I toxin protein-membrane mechanism and the diversity of its biological functions are much more complex beyond our expectations. Therefore, it is important to analyze the assembly mechanism of type I toxin protein in different membranes and their structural characteristics, which is also the key to revealing its structure-function relationship. This article summarizes the reported structural characteristics and biological functions of the type I TA system, explores the formation of different structures in the cell membrane that affect its function combined with the prediction of its transmembrane domains, and analyzes the key factors affecting its mechanism of action. It brings opportunities for the treatment of drug-resistant bacteria, and also brings ideas for the research of new antibacterial drugs.

**Key words** toxin-antitoxin system, type I toxin protein, structural characteristics, biological function, drug-resistant bacteria

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0383

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32171249, 61771093, 31670727), Shandong Province Natural Science Foundation (ZR2016CQ15, ZR2020QC124) and Youth Innovation Team Lead-education Project of Shandong Educational Committee.

\*\* These authors contributed equally to this work.

\*\*\* Corresponding author.

CAO Zan-Xia. Tel: 86-534-8985879, E-mail: qjayilai@mail.ustc.edu.cn

YU Jia-Feng. Tel: 86-534-8985825, E-mail: jfyu1979@126.com

Received: December 10, 2021 Accepted: February 17, 2022