

分枝杆菌噬菌体整合及裂解的分子机理

申严杰¹ 胡昌华¹ 王洪海² 谢建平^{1,2*}

(¹ 西南大学生命科学学院现代生物医药研究所 重庆 400715)

(² 复旦大学生命科学学院遗传研究所 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 结核病仍旧威胁着全球人类健康,中国是结核病高发国家之一,寻求新的药物和疫苗势在必行。随着对噬菌体研究的深入,分枝杆菌噬菌体成为结核病新型药物发现和药敏实验的研究热点之一。噬菌体进入宿主菌体内,以裂解和溶源两种途径进入循环。以分枝杆菌的溶源性噬菌体为例,综述了分枝杆菌噬菌体整合和裂解分子机理。分枝杆菌溶源性噬菌体的整合需噬菌体基因组的附着位点 attachment site(attP),宿主菌分枝杆菌基因组的附着位点 attachment site(attB),整合酶 integrase(Int)和整合宿主因子 integration host factor(mIHF)。部分溶源性噬菌体如 Ms6 进入裂解循环,复制转录组装成新的子代噬菌体,在裂解素(Lysin)和穿孔素(Holin)的协同作用下裂解宿主菌,释放子代噬菌体。目前国内未见对分枝杆菌噬菌体的研究报道。研究分枝杆菌噬菌体整合及裂解机理对结核病治疗新药开发有一定的启示。

关键词 分枝杆菌噬菌体 整合 裂解

中图分类号: Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)05-0808-04

结核病仍威胁着全球人类健康。随着耐药结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, 以下简称 MTB)的日益增多,开发新抗生素势在必行。噬菌体是细菌的病毒,在细菌致病性和宿主免疫反应中具有重要作用。噬菌体对其宿主细菌往往具有特异的裂解作用,这使新思路噬菌体相关治疗又成为研究热点之一。1947 年首次报道分离到分枝杆菌噬菌体^[1],迄今已分离到 30 余种分枝杆菌噬菌体。分枝杆菌噬菌体广泛存在于各种土壤、水体、动物的排泄物和其他环境中。分枝杆菌噬菌体分为溶源性和裂解性噬菌体,这两类噬菌体分别通过整合和裂解进入溶源周期和裂解循环。整合使宿主菌成为溶源菌,而部分溶源性噬菌体进入裂解循环,在自身合成的裂解素(Lysin)和穿孔素(Holin)的协同作用下将宿主菌裂解^[2]。研究分枝杆菌噬菌体,利用噬菌体可以产生抑制宿主菌生长的蛋白,高通量筛选可以模拟噬菌体该抑制蛋白的化学小分子为先导物,获得新的抗生素,对开发新型结核病治疗药物具有启示^[3]。国内尚未见分枝杆菌噬菌体相关研究。

1 分枝杆菌噬菌体的整合

位点特异性重组(Site-specific recombination)是常见的生物学现象,包括 DNA 颠倒,噬菌体基因组的整合和切离等过程^[4]。溶源性噬菌体基因组整合到宿主菌基因组后,随宿主菌复制,进入溶源状态,从而形成溶源菌。溶源菌的建立是噬菌体基因组整合到宿主染色体和抑制裂解基因表达的结

果^[4]。分枝杆菌溶源性噬菌体 L5 的整合机理研究较为透彻。L5 基因组为线性双链 DNA 分子,可特异整合到 *M. smegmatis*, MTB 和 *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin(以下简称 BCG)的基因组中^[5]。整合需要 4 种因子:噬菌体 L5 的附着位点(Attachment site, attP),宿主菌分枝杆菌的附着位点(Attachment site, attB),噬菌体编码的整合酶(Integrase, Int)和分枝杆菌编码的整合宿主因子(Integration host factor, mIHF)^[3-5]。

1.1 整合所需因子

1.1.1 attP 和 attB 分枝杆菌噬菌体 L5 的整合位点 attP 靠近基因组中间,将噬菌体基因组分成左臂和右臂。L5 的 attP 与 *M. smegmatis* 的 attB 有 43bp 的共有核心序列,链交换就发生在该核心序列中。attB 发挥功能无需全部 43bp 共有核心序列,29bp 片段就足够^[7]。attP 包括多个 Int 结合位点,结合位点为 413bp。Int 结合位点可分成两类:核心型位点和臂型位点。L5 的 attP 共有 7 个 Int 结合位点 P1-P7(图 1),除 P3 外的位点均成对出现。attP 中的 P3, P6 和 P7 等 3 个臂型位点并非整合所必需^[3-5]。



图 1 L5 的整合酶结合位点^[6]

Fig. 1 Binding sites for Int-L5^[6]

L5 和 BCG 的共有核心序列有一个碱基的差异,但该差异不妨碍其作为 BCG 的附着位点^[7]。研究较透彻的噬菌体

基金项目: 国家自然科学基金(30270072)、教育部科学技术研究重点项目资助(105146)、重庆市科委应用基础项目(2003-8119)、西南大学微生物与生化药理学学科建设基金资助

* 通讯作者。Tel: 86-23-68254062; Fax: 86-23-68252365; E-mail: jianpingxie@vip.sina.com

作者简介: 申严杰(1979-),女,山西长治人,硕士研究生,生物化学和分子生物学专业。E-mail: seagullo@swnu.edu.cn

收稿日期: 2005-01-25, 修回日期: 2005-04-05

共有4个Int结合位点,其attP位点也包含臂型和核心型Int结合位点,但与核心相关的臂型位点的位置、排列和方向与分枝杆菌噬菌体完全不同。

1.1.2 噬菌体编码的整合酶Int:根据氨基酸同源性和催化模式,位点特异性重组酶主要分为两类:酪氨酸重组酶(Tyrosine recombinase)和丝氨酸重组酶(Serine recombinases)。现鉴定的大多数噬菌体利用酪氨酸重组酶催化整合,仅有少部分噬菌体整合酶为丝氨酸重组酶家族^[8]。丝氨酸重组酶家族一般通过DNA底物的拓扑特异性来调节活性^[6],该家族中的噬菌体整合酶在催化整合的过程中使用复合的DNA位点和其他蛋白质调控相关反应,并且在催化整合的过程中不需要宿主编码的辅因子。分枝杆菌噬菌体的整合需其编码的整合酶Int催化。L5的Int属酪氨酸重组酶家族^[4]。

1.1.3 分枝杆菌编码的宿主整合因子mIHF:现在尚未阐明细菌被感染期间,其DNA复制、细胞分化和基因表达等过程的动态变化。但在其他细菌中,热稳定的DNA结合蛋白诸如整合宿主因子(Integration host factor),IHF和热不稳定拟核

蛋白(Heat-unstable nucleoid protein,HU)是上述过程的关键调节因子^[9]。*M. smegmatis* BCG编码的mIHF,其胞内转录翻译水平随细菌的生长阶段而变化,对数后期达最大值。研究表明,mIHF是一个特殊的宿主整合因子,它与L5的attP非特异结合,为形成重组复合物intasome所必需的,同时也是*M. smegmatis*生存所必需^[10]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)的IHF细胞内水平在达到细菌稳定期之前也达到峰值,但却非*E. coli*存活所必需。*E. coli*的IHF可能参与调节稳定期的有关基因,分枝杆菌mIHF在稳定期之前达最大,故其功能可能与*E. coli*的IHF类似。但L5的mIHF是否真的调节稳定期有关基因,以及如何调节尚无报道。

对公布的6种分枝杆菌的mIHF用Vector NTI Suite 9对其基因和蛋白进行比对(图2)。由图中可见*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551和*Mycobacterium bovis* 3种缓慢生长分枝杆菌的起源基本相同,而快速生长分枝杆菌与缓慢生长分枝杆菌起源上则具有一定距离。

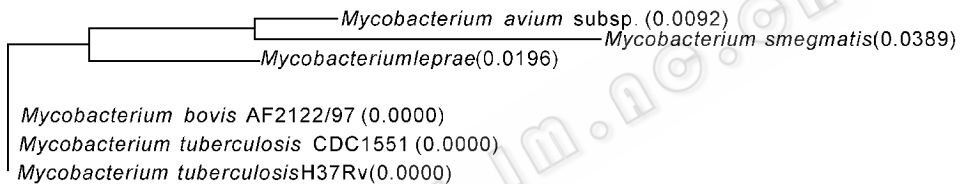


图2 6种分枝杆菌mIHF的蛋白的比对

Fig.2 Alignment of mIHF protein of six *Mycobacteria*

1.2 整合过程

分枝杆菌噬菌体L5的位点特异性重组——整合由噬菌体编码的整合酶Int-L5催化,在噬菌体和分枝杆菌的特异性附着位点attP和attB之间发生重组,并且需要分枝杆菌编码的mIHF来稳定形成的复合物。

L5噬菌体attP的P4-P5位点和核心位点通过Int相连,从而使噬菌体的线性attP弯曲,形成一个分子内桥,分枝杆菌所编码的mIHF负责稳定该结构。attP,Int-L5和mIHF组成的复合物称为Intasome,同时attP的P1-P2位点通过Int捕获attB,从而形成染色体接合复合物(Synaptic complex)1即SC1。单独的P1-P2位点与attB经整合酶作用,称为染色体接合复合物2即SC2。SC1和SC2呈有活性的开环结构^[3,5]。attP和attB若要发生链的交换,则DNA在P1-P2和核心位点之间必须再次弯曲,形成一个分子内桥,但该复合物无法检测到,该复合物是否有活性也不清楚。

噬菌体P2、P22和 ϕ Rv2的attP均含臂型结合位点^[6],这些噬菌体的整合与分枝杆菌噬菌体的整合相似,但整合酶和整合宿主因子与噬菌体的特异性位点结合的功能尚不清楚。是否所有的噬菌体在整合过程中都形成相似的intasome结构,且4种整合因子均必须?还有待深入研究。

1.3 切离

噬菌体基因组可整合到宿主基因组中,同时也可被切

离。研究发现,L5的基因36编码噬菌体切离酶Excisionase(Xis),它是由56aa组成的热稳定蛋白,该蛋白在体内和体外都能刺激切离重组。整合和切离的取向性由Xis所决定^[11]。分枝杆菌噬菌体L5中的Xis可能阻止了联会重组复合物的暂时形成,因为Xis可强烈抑制Int介导的整合重组,但不阻止Int与DNA的相互作用和attB的捕获。(噬菌体的Xis为一半衰期短于Int的酶,Xis在体内被2个依赖ATP的蛋白酶所降解。在降解Xis的蛋白酶突变体中,切离酶的集聚也会干扰整合酶建立并维持整合前噬菌体的能力^[12]。

丝氨酸整合酶(Serine-integrase)催化分枝杆菌噬菌体Bxb1的基因组整合到宿主染色体上。在attP和attB中心的中心二核苷酸(5'-GT)是Bxb1前噬菌体整合和切离重组取向的唯一决定因子,替代这两个位点的单碱基对可使调控弱化,表明Bxb1重组取向依赖attP和attB的中心二核苷酸^[13]。

2 分枝杆菌噬菌体的裂解

裂解性噬菌体进入宿主菌后,进行裂解循环。部分溶源性噬菌体基因组也会脱离宿主基因组,进入裂解循环,通过复制转录组装成新的子代噬菌体,裂解宿主菌,得以释放。

噬菌体可形成与某些胞质前体分子结合的分分子,从而阻断宿主细胞壁的合成,逃离宿主菌细胞。例如,噬菌体 Φ X174会分泌一种与移位酶(Translocase,MraY)结合的蛋白。

结合于细胞膜内侧的疏水膜蛋白 $MraY^{[14]}$, 可辅助合成的胞壁质前体穿越细胞膜, 到达细胞壁, 构成细胞壁。ΦX174 分泌的蛋白与 $MraY$ 结合使处于平衡的细胞壁合成代谢被打断, 细胞膜破裂, 噬菌体释放。而 Q_{β} 噬菌体表面衣壳蛋白 A2, 在细胞质中能与胞壁质前体的烯醇丙酮酸转移酶 (UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase, $MurA$) 结合, 从而阻止胞壁质前体的继续合成, 导致裂解。MTB 基因组中具 $MurA$ ($Rv1315$), 其噬菌体是否产生类似结合分子有待研究。细胞壁的肽葡聚糖生物合成中的酶均可作为抗病原菌的新型药物靶标。

裂解宿主菌的 dsDNA 噬菌体均合成两种蛋白质, 即胞壁质裂解酶或裂解素和穿孔素。穿孔素为疏水膜蛋白, 该蛋白可在胞膜上形成孔或侵蚀斑, 裂解素经该孔或侵蚀斑释放到外周胞质, 与肽葡聚糖底物接触, 从而使细胞裂解, 噬菌体释放。这种双成分裂解系统在 G^+ 、 G^- 菌的噬菌体中均存在^[2]。分枝杆菌噬菌体 Ms6 为 dsDNA 噬菌体。

Ms6 是一种溶源性的分枝杆菌噬菌体, 其 5 个 ORF 中的 3 个分别编码胞壁质裂解酶裂解素、在细胞裂解中起作用的蛋白和与乳酸乳球菌 rH1 噬菌体的穿孔素蛋白高度同源的多肽。第一个被鉴定的分枝杆菌噬菌体裂解酶来自 Ms6。

裂解素基因与穿孔素基因有协同作用, 且穿孔素基因的表达对细胞裂解起较大作用。研究表明, 构建含 Ms6 穿孔素基因与裂解素基因的质粒载体, 使其在 *E. coli* 中表达, 当穿孔素基因表达降低时, 与仅裂解素基因的过度表达无明显差别, 即不抑制大肠杆菌的生长, 除非外加氯仿, 而穿孔素基因的过度表达对大肠杆菌的生长却有严重影响, 可导致致死表型, 如 λ 、Φ29 穿孔素^[2]。现在还不清楚二者的表达如何协同? Ms6 的穿孔素基因产物能互补 λ 噬菌体穿孔素(蛋白 S) 突变体, 说明即使在异源系统中, 穿孔素也允许裂解素非特异性的释放到外周胞质。这为新药开发提供了新的思路。

3 分枝杆菌噬菌体与新药开发

噬菌体进入宿主菌, 合成自身蛋白而抑制宿主菌的生长。研究分枝杆菌噬菌体, 寻求噬菌体产生的抑制宿主菌生长的蛋白, 用亲和层析等技术高通量筛选噬菌体抑制结核分枝杆菌的小分子, 可获得治疗 MTB 的新型抗生素^[3]。细菌细胞壁的代谢是合成与分解的平衡, 细胞壁的生成需一系列的酶辅助完成, 与宿主细胞壁合成相关的酶相互作用的噬菌体编码的蛋白为 MTB 新药开发提供了广阔的视野。噬菌体表达的 holin 可异源表达, 形成孔使异源宿主的内部物质得以泄漏, 这为高产目的蛋白的获取提供了新思路。分离 lysin 和 holin, 确定其活性结构和条件以及协同作用机制, 有助于新药开发。某些分枝杆菌噬菌体的特异尾部蛋白可作为信号分子, 使休眠细菌复苏^[15], 为开发治疗结核病的新药提供新思路。

分枝杆菌噬菌体已用于分枝杆菌及其药敏的鉴定, 如融合萤光素酶报告基因的分枝杆菌噬菌体已用于检测样品中是否含分枝杆菌以及检测 MTB 的药物敏感性, 分枝杆菌噬菌体也可能用作高通量新型结核病药物筛选系统^[16]。总之,

广泛存在于环境中的多样性的分枝杆菌噬菌体研究可能启发结核病相关研究, 尤其是新型药物研究与开发。

参 考 文 献

- [1] McNemey R. TB: the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1999, **3** (3): 179 - 184.
- [2] Garcia M, Pimentel M, Moniz-Pereira J. Expression of mycobacteriophage Ms6 lysis genes is driven by two λ -like promoters and is dependent on a transcription termination signal present in the leader RNA. *J Bacteriol*, 2002, **184** (11): 3034 - 3043.
- [3] Liu J, Dehbi M, Moeck G, et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nature Biotechnology*, 2004, **22** (2): 185 - 191.
- [4] Pena C E, Kahlenberg J M, Hatfull G F. Assembly and activation of site-specific recombination complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (14): 7760 - 7765.
- [5] Lee M H, Pascepella L, Jacobs W R, et al. Site-specific integration of mycobacteriophage L5 integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 3111 - 3115.
- [6] Pena C E, Kahlenberg J M, Hatfull G F. Protein-DNA complex in mycobacteriophage L5 integrative recombination. *J Bacteriol*, 1999, **181** (2): 454 - 461.
- [7] Pena C E, Stoner J E, Hatfull G F. Positions of strand exchange in mycobacteriophage L5 integration and characterization of the attB site. *J Bacteriol*, 1996, **178** (18): 5533 - 5536.
- [8] Amy C G, Michele P C. Phage integrases: biology and applications. *J Mol Biol*, 2004, **335** (3): 667 - 678.
- [9] Pedulla M L, Lee M H, Lever D C, et al. A novel host factor for integration of mycobacteriophage L5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 15411 - 15416.
- [10] Pedulla M L, Hatfull G F. Characterization of the mIHF gene of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 1998, **180** (20): 5473 - 5477.
- [11] Lewis J A, Hatfull G F. Control of directionality in L5 integrase-mediated site-specific recombination. *J Mol Biol*, 2003, **326** (3): 805 - 821.
- [12] Leffers Jr G G, Gottesman S. Lambda Xis degradation in vivo by Lon and FtsH. *J Bacteriol*, 1998, **180** (6): 1573 - 1577.
- [13] Ghosh P, Kim A I, Hatfull G F. The orientation of mycobacteriophage Bxb1 integration is solely dependent on the central dinucleotide of attP and attB. *Mol Cell*, 2003, **12** (5): 1101 - 1111.
- [14] Hatfull G F. The great escape. *Science*, 2001, **292**: 2263 - 2264.
- [15] Pedulla M L, Ford M E, Houtz J M, et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*, 2003, **113** (2): 171 - 182.
- [16] Banaiee N, Bobadilla-del-valle M, Bardarov Jr S, et al. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *Clinical Microbiology*, 2001, **39** (11): 3883 - 3888.

Molecular mechanism of the integration and lysis of mycobacteriophage

SHEN Yan-jie¹ HU Chang-hua¹ WANG Hong-hai² XIE Jian-ping^{1,2*}

(¹ Institute of Modern Biopharmaceuticals , School of Life Sciences , Southwest China University , Chongqing 400715 , China)

(² State Key Laboratory of Genetic Engineering , School of Life Sciences , Institute of Genetics , Fudan University , Shanghai 200433 , China)

Abstract : Tuberculosis remains one of the major threats to public health . China is one of the heavy TB burden countries . Novel drugs and vaccines are urgently needed to combat the increasingly multidrug resistant TB . Mycobacteriophage is one of the hot topic in TB novel drugs discovery and drug susceptibility test . Phages can multiply via two alternative mechanisms : the lytic cycle or the lysogenic cycle . The lytic cycle ends with the lysis and death of the host cell , whereas the host cell remains alive in the lysogenic cycle . Lysogenic mycobacteriophages were intensively studied to elucidate the integration and lysis mechanisms of mycobacteriophage . The integration of mycobacteriophage requires for *attP* of bacteriophage genome , *attB* of *Mycobacterium* genome , integrase and integration host factor . Some lysogenic phage , eg. mycobacteriophage Ms6 employ lytic cycle , form new phage , lysis host by the cooperation of lysin and holin , and release phages . There is no reports as to the mycobacteriophage unique to China clinical or environmental isolates . Studies on the integration and lysis molecular mechanism of mycobacteriophage might facilitate future new anti-TB drugs development .

Key words : Mycobacteriophage , Integration , Lysis

Foundation item : National Natural Science Foundation of China(30270072) Science and Technology Key Program of Ministry of Education(105146) .

* Corresponding author . Tel 86-23-68254062 ; Fax 86-23-68252365 ; E-mail jianpingxie@vip . sina . com

Received date 01-25-2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>