

梭菌神经毒素分子遗传学研究进展

王颖群 严共华 雷祚荣

(军事医学科学院微生物流行病所 北京 100071)

梭菌神经毒素是一类剧毒蛋白,包括破伤风梭菌产生的破伤风神经毒素(TeNT)和肉毒梭菌产生的肉毒神经毒素(BoNT),分子量约150ku,以一条多肽链形式合成,经菌体蛋白酶或体外蛋白酶切割成双链形式才有毒性,即L链(轻链,50ku,位于氨基端)和H链(重链,100ku,位于羧基端)通过一个二硫键相连。迄今TeNT只发现一种血清型,BoNT则发现七型,产这七型毒素的菌株的生理特征有所不同,故将其分为四个生物学组(biological group): I组菌株产BoNT/A、B和F, II组菌株产BoNT/B、E和F, III组菌株产BoNT/C和D, IV组菌株产BoNT/G。近来发现*Clostridium butyricum*和*C. baratii*的某些株分别产生BoNT/E和BoNT/F,故将这些株分别归入V和VI生物学组^[1]。所有这些毒素的基因均已克隆并测序,从而奠定了毒素分子遗传学的基础。同时,通过比较核苷酸序列推知的氨基酸序列,得以认识到梭菌神经毒素具有金属蛋白酶的活性,使得对毒素分子作用机制的研究有了重大突破^[2]。

细菌培养物或食物中的BoNT常与非毒性蛋白形成复合物,即前体毒素(progenitor toxin), TeNT则单独存在,不形成前体毒素。前体毒素共分三型: M型,分子量中,300ku; L型,分子量大,500ku; LL型,分子量极大,900ku。M型由BoNT和同等大小的非毒性蛋白(NTNH, 150ku)组成, L型和LL型还含有血凝素(HA)。NTNH对BoNT具有保护作用,使其耐受消化道中的强酸和蛋白酶。已有证据表明前体毒素越大,其口服毒力越强^[1],这也可以解释为何TeNT通过

创伤而非食物引起神经中毒。因此,毒素复合物基因的克隆对于阐明其结构与功能具有重要意义。

1 毒素基因的克隆与鉴定

1.1 结构基因的克隆

1986年两个研究小组分别独立地克隆了破伤风梭菌两不同株的TeNT基因,序列完全相同^[3,4]。1990年克隆了NoNT/A基因^[5,6]。以后其它几型BoNT基因也相继克隆^[1]。

1.2 梭菌神经毒素间的关系^[1]

比较各类毒素据核苷酸序列所得氨基酸序列,发现毒素由高度保守区与非保守区相间而成。以BoNT/A为参照标准,轻链(平均439个氨基酸)有66个氨基酸绝对保守,重链(平均843个氨基酸)则有97个。显著的保守区有3个:参与重轻链间二硫键形成的两个Cys(430和454位);与金属蛋白酶活性相关的His富集区(216~234);与毒素跨膜序列相邻的区域(635~642)。差别最大的区域在轻链羧基端(1124以后),提示此区域可能参与毒素与受体的特异结合。

前已叙及据生理特征将产BoNT梭菌分为I~VI六个生物学组,近来梭菌分子遗传学的进展使得对肉毒梭菌进行分子遗传学分类成为可能,据此已将其分为不同的基因型组(genetic group)。有趣的是,同型的BoNT基因可为不同基因型组的肉毒梭菌携带,表明该基因可能在其间发生水平转移,并且基因间的差异

程度可为确定水平转移在进化中的发生时间提供线索。例如,肉毒梭菌和 *C. butyricum* 所产 BoNT / E 的氨基酸序列 97% 相同,基因型 I 组和 II 组的肉毒梭菌所产 BoNT / B 的氨基酸序列 93% 相同,表明这两类毒素基因转移发生相对较晚。基因型 I 组和 II 组的肉毒梭菌所产 BoNT / F 的氨基酸序列 87.3% 相同,与 *C. baratii* 所产 BoNT / F 则分别为 74% 和 69.4% 相同,表明 BoNT / F 基因转移发生相对较早。

1.3 毒素基因检测

毒素基因的序列已知,为快速检测临床、环境和食物中的产毒梭菌提供了新途径。1993 年 Szabo 等设计五对引物分别扩增 A-E 型 BoNT 基因,敏感性达 10fgDNA (3 个细菌)^[7]。Campbell 等针对 BoNT / A、B、E、F 和 G 的重链保守区设计一对简并引物扩增这五型基因,产物 1.1kb^[8]。1995 年 Fach 等设计另一对简并引物扩增这五型基因,产物 260bp,更便于检测,还设计了五型特异探针对其分型^[9]。

1995 年 Minton 用聚合酶链式反应检测 BoNT 基因时发现 I 生物学组的某些菌株携带两型毒素基因,其中一株携带 BoNT / A 和 BoNT / B 基因但只产 BoNT / A,因而推测其 BoNT / B 基因处于沉默状态,并不表达^[1]。

2 毒素基因的遗传学定位

2.1 噬菌体

1988 年 Fujii 等根据 BoNT / C 已知的部分氨基酸序列设计寡核苷酸探针,与产毒株的噬菌体 DNA 特异杂交,证实 BoNT / C 基因位于噬菌体^[10]。1991 年分别克隆出 BoNT / C 和 BoNT / D 基因^[11,12]。

BoNT / C 和 D 基因的克隆成功应归因于携带该基因的噬菌体的“假溶源性”,即噬菌体不能稳定整合入宿主染色体而是以染色体外状态存在,因而易于将其清除出产毒株而利于遗传学分析。

与此相反,I 和 II 生物学组的肉毒梭菌的噬菌体处于真正的溶源状态,不易得到消除了噬菌体的菌株,给分析带来困难。1988 年 Eklund 等设法消除了噬菌体,分析表明对产毒没有影响^[13]。

2.2 质粒

早在 1984 年 Finn 等通过质粒消除和基因杂交证实 TeNT 基因位于 75kb 的质粒 pCL1 上^[14]。I 和 II 生

物学组的肉毒梭菌含有隐性质粒,但消除后对产毒无影响^[13]。1993 年 Campbell 等从 G 型肉毒梭菌的质粒中克隆出 BoNT / G 基因,从而证实 BoNT / G 基因也位于质粒上^[15]。

2.3 染色体

由于 I 和 II 生物学组的肉毒梭菌的产毒与噬菌体和质粒均无关,因而认为其毒素基因位于染色体上。NCTC2916 株 BoNT / A 基因位于染色体上,其下游约 1kb 处还有一个开放阅读框 (ORF) 编码溶菌酶 *lycA*。Langeland 株在 BoNT / F 基因下游也有此类 ORF,但尚未见之于其它肉毒梭菌的染色体。

毒素由菌体释出是与菌体的自溶密切相关的,因此 BoNT / A 与 *lycA* 两基因相邻并不足为奇。但有趣的是噬菌体基因组中有与 *lycA* 类似的基因存在,因而推测 *lycA* 及其邻近的 BoNT / A 基因可能定位于 I 生物学组的肉毒梭菌染色体的前噬菌体。

此外,产 BoNT / E 的 *C. butyricum* 和产 BoNT / F 的 *C. baratii* 的 BoNT 基因可能也位于染色体的前噬菌体,并分别由 E、F 型肉毒梭菌的 BoNT 基因水平转移而来。

2.4 转座子

某些 BoNT 基因非常保守,但其终止子下游一些位点的序列则相差很大,暗示 BoNT 基因通过转座子发生水平转移。例如 NCTC2916 和 62A 两株 BoNT / A 基因下游自 100bp 起序列显著不同,可能为 BoNT / A 基因转座至两不同基因组所致。与此相反,NCTC2916 株 BoNT / A 基因与 Langeland 株 BoNT / F 基因的不同则仅延缓至基因终止子后 600bp,往下 1.2kb 却显示 99% 的同源性(这 1.2kb 中含有 *lyc* 基因),这可能是两不同 BoNT 基因(A 型和 F 型)转座至相同基因组(这两菌株均属 I 生物学组)的结果。

3 肉毒毒素复合物基因

3.1 HA 基因

1990 年 Tsuzuki 等构建了噬菌体基因库并用 HA 抗体筛选,将 HA (33ku) 基因定位于 BoNT / C 基因上游 4.3kb 处^[16]。1991 年 Somers 和 DasGupta 接着发现 HA33 基因下游 60bp 处有一个不完全的 ORF 编码 HA17 (17ku)^[17]。

1995 年 Minton 发现 NCTC2916 株 BoNT / A 基因

上游4.55kb处有一个ORF,其产物(34ku)与HA33的氨基酸序列39.6%相同,且都从与BoNT基因相对的DNA链开始转录。HA34基因下游还有两个ORF分别编码HA17和HA71,序列分析表明它们都是前体毒素的组成成分^[1]。

3.2 NTNH基因

1992年Tsuzuki等发现BoNT/C和HA33基因间有一个ORF,经分析其产物即为NTNH/C^[18],1993年该小组在BoNT/E基因上游也找到NTNH/E基因^[19]。

1995年Minton在BoNT/A基因上游找到了NTNH/A基因,经比较NTNH/A与NTNH/C和NTNH/E的相似率分别为66%和68%,而对应的BoNT间的相似率分别为33%和39%,表明NTNH比BoNT更加保守。有趣的是NTNH和BoNT有相同的氨基酸序列(尤其在氨基端),其意义尚不明。可能这两类蛋白需与某共同成分作用而形成前体毒素,或者与分泌系统某成分如分子伴侣的保守区作用以便使毒素分泌出细胞^[1]。

4 毒素基因的表达调控

4.1 转录信号

1988年Niemann等发现TeNT基因转录起始于-127位核苷酸且基因3'端有不依赖于rho的转录终止子序列,从而认为其为单顺反子^[20]。1990年Binz等对BoNT/A基因的分析也得出类似结论^[6]。后来发现所有BoNT基因上游均有NTNH基因,C、D和F型菌株这两基因间距只有10~14个核苷酸,B型为24,E型为25,A型为43,G型为84。如此短的距离内不大可能存在启动子,Binz等鉴定的启动子序列^[6]其实位于NTNH基因近3'端区域内^[1]。

由于NTNH/E和BoNT/E两基因间距很近,Fujii等认为两者为NTNH/E基因5'端启动子起始的多顺反子转录^[19]。Minton发现NCTC2916株BoNT/A基因有两种转录方式,一为起始于BoNT/A基因5'端的单顺反子转录,一为起始于NTNH/A基因5'端的多顺反子转录,且HA34、HA17和HA71三基因组成操纵子^[1]。这与此三基因紧密相连(间距62和14bp)相吻合。

4.2 调节因子

目前已发现很多致病菌通过两组分信号转导系统来调控自身毒力。既然氮是该系统的常见信号之一,又

已知氮可显著影响产毒梭菌的产毒能力,因而产毒梭菌是否通过两组分信号系统来调节其毒力值得研究。

值得注意的是Minton发现NTNH/BoNT操纵子与HA34/HA17/HA71操纵子间存在一个ORF,称为ORFX,其产物(21.7ku)与某些细菌的转录调节因子有部分氨基酸序列相似,尤其是其中的螺旋-转角-螺旋区可能具有结合操纵子的能力^[1]。因而ORFX极可能为一种产毒调节因子。

参 考 文 献

- [1] Minton NP. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995, 195: 161~194.
- [2] Montecucco C, Schiavo G. *Mol Microbiol*, 1994, 13: 1~8.
- [3] Eisel U, Jarausch W, Goretzki K, *et al.* *EMBO J*, 1986, 5: 2495~2502.
- [4] Fairweather NF, Lyness VA. *Nucl Acids Res*, 1986, 14: 7809~7812.
- [5] Thompson DE, Brehm JK, Oultram JD, *et al.* *Eur J Biochem*, 1990, 189: 73~81.
- [6] Binz T, Kurazono H, Wille M, *et al.* *J Biol Chem*, 1990, 265: 9153~9158.
- [7] Szabo EA, Demberton JM, Desmarchelier PM. *App Environ Microbiol*, 1993, 59: 3011~3020.
- [8] Campbell K D, Collins MD, East AK. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 2255~2262.
- [9] Fach P, Gibert M, Griffais R. *App Environ Microbiol*, 1995, 61: 389~392.
- [10] Fujii N, Oguma K, Yokosawa N, *et al.* *App Environ Microbiol*, 1988, 54: 69~73.
- [11] Hauser D, Eklund MW, Kurazono H, *et al.* *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 4924.
- [12] Binz T, Kurazono H, Eklund MW. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 5556.
- [13] Eklund MW, Poysky FI, Habig WH. *Bacteriophages and plasmids in Clostridium botulinum and Clostridium tetani and their relationships to production of toxins*. In: Simpon LL ed. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic, 1989: 26~52.
- [14] Finn CW, Silver RP, Habig WH, *et al.* *Science*, 1984, 224: 881~884.
- [15] Campbell KD, Collins MD, East AK. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1216: 487~491.
- [16] Tsuzuki K, Kimura K, Fujii N, *et al.* *Infect Immun*, 1990, 58: 3173~3177.

- [17] Somers E, DasGupta BR. *J Pro Chem*, 1991, 10: 415~425.
- [18] Tsuzuki K, Kimura K, Fujii N, *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 183:1273~1279.
- [19] Fujii N, Kimura K, Yokosawa N, *et al.* *J Gen Microbiol*, 1993, 139:79~86.
- [20] Niemann H, Anderson-Beckh, Binz T, *et al.* *Zentralbl Bakteriologie*, 1988, Sup 17: 29~38.