

## 专论与综述

## 微生物对重金属的抗性及其解毒机理

林稚兰 田哲贤

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

随着采矿业的发展和重金属在冶金、化工、造纸、农业和制药业等方面的应用,重金属对环境的污染和治理日益受到重视。业已发现,许多微生物能在较高浓度的金属离子环境中生存,解除重金属对自身的毒害。长期以来,人们从生理学、生态学、生物化学、遗传学和分子生物学等方面就微生物对重金属的抗性及其解毒机理进行了大量深入的研究,提出了种种解释。微生物对重金属抗性机制是非常复杂的。环境中的污染源又多是几种金属伴生,微生物对重金属的解毒机理,还有待于继续深入研究和探讨。

某些金属元素的离子(如锌、铜、锰、镁、钙、钾、钴等)在浓度低至毫微克分子时,作为营养性阳离子,是微生物生长必需的微量元素,当浓度高至微克分子或毫克分子离子浓度时,对微生物细胞生长、发育造成毒害;但某些金属元素的离子(如镉、银、钼、汞等),即使很低的浓度,也会对微生物细胞产生很强的毒性。在上述两种情况下,只靠单纯调节阳、阴离子转运系统的转运蛋白的合成和活性,是不能降低这些有毒金属离子在细胞内的浓度而达到解毒效果的。微生物细胞对重金属离子的拮抗,只有通过调节和限制细胞内自由金属离子浓度来实现。

通常微生物拮抗高浓度金属离子的毒害,采用三种解毒机制。即:(1)通过酶促或化学反应,将有毒的物质还原成无毒或低毒物质,如汞;(2)通过阳离子外流系统(cation efflux system)促进阳离子排放,如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)对镉、锌、钴等离子的抗性;(3)通过合成某种螯合剂或结合因子(binding components)将有毒金属离子螯合成复合物,避免对细胞的毒害,如蓝细菌(*Synechococcus* sp. *Cyanobacterium*)、酵母菌、粗糙链孢菌(*Neurospora crassa*)中的金属硫蛋白或类金属硫蛋白(metallothionein简称MT,或metallothionein like protein简称类MT),粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*),光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)中的重金属螯合肽(phytochelatins,

简称PCs或chelatin)。一般认为,原核微生物对重金属离子的抗性机制以建立阳离子、阴离子外流系统为主,真核微生物对重金属离子的抗性机制以诱导合成金属硫蛋白或重金属螯合肽为主。但上述规律也有例外,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)对重金属离子的解毒作用除诱导合成铜或镉的金属硫蛋白外,也有结合铜或镉、锌的跨膜或膜结合蛋白的阳离子外流系统;蓝细菌对重金属离子的解毒机制以外流蛋白系统为主,细胞内也可诱导合成螯合铜、镉、锌金属离子的金属硫蛋白,作为拮抗重金属离子毒害的第二道防御线。

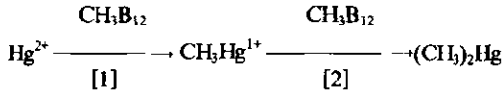
众所周知,大多数营养性的阳离子、阴离子转运系统由染色体基因编码的一系列蛋白质所组成。几乎所有此类系统均由染色体基因编码的反式作用因子(trans-acting factor)和染色体DNA序列上的顺式作用元件(cis-acting element)对mRNA转录合成进行调控。如:参与磷酸离子转运的Pit系统和Pst系统、钾离子转运的Trk系统和Kdp系统、镁离子转运的Cor系统和Mgt系统。相比之下,大多数微生物对有毒阳离子、阴离子的抗性系统主要是由质粒上的基因编码的。当然也有例外,如:所有原核、真核微生物中诱导合成的类金属硫蛋白都是由染色体上的基因调控;而分子量较小的重金属螯合肽则是由谷胱甘肽经谷氨酰半胱氨酸二肽转氨酶、谷胱甘肽合成酶在细胞质中合成的,由镉离子浓度自动调节上述两个酶的活性;又如已知金黄色葡萄球菌对汞的抗性是由染色体上6.4kb片段编码的,可又发现此片段与该菌质粒pI258上的6.4kb抗性片段有很强的同源性。由此推断,某些重金属抗性可能是从质粒转移到染色体上,或从染色体转移到质粒上。某些转座子如Tn21、Tn501上就发现了抗汞片段,也说明了这一点。以下简要介绍研究比较深入的几种抗重金属离子系统。

## 1 酶促或非酶促反应

1997-03-10收稿

此法将有毒物质还原成无毒或低毒物质,其中抗汞系统研究的最为清楚。汞的解毒基本有两种机制<sup>[1]</sup>。

### (1)微生物对汞的甲基化作用:



甲基汞脂溶性高,易和蛋白质中的-SH 结合,又是潜在的神经毒素,其毒性为无机汞的 100 倍;但甲基汞易挥发,推测微生物通过合成甲基汞是一种解毒机制。由于甲基钴胺素是能转移负碳离子甲基的基团,被公认为汞甲基化时提供甲基的供体。目前还不清楚甲基化是酶促过程还是非酶促过程,已知反应 [1] 的速度是反应 [2] 的 6000 倍。微生物对汞甲基化能力:好氧菌>兼性厌氧菌>厌氧菌。

(2)微生物通过有机汞裂解酶(organomercurial lyase)催化有机汞中的碳-汞键断裂,再由依赖 NADPH 和 FAD 为辅酶的二聚体酶-汞还原酶(mercuric reductase)把无机  $\text{Hg}^{2+}$  还原成挥发性  $\text{Hg}^0$ ,使之挥发离开菌细胞。汞抗性系统是一个可诱导的系统,有机汞裂解酶和汞还原酶的底物都是其酶的诱导剂,但也发现一些非酶催化的底物,如荧光素汞乙酸(FMA)和汞溴红也可诱导酶的合成,称为义务诱导剂(gratuitous inducer)。有机汞裂解酶、汞还原酶和其它转运系统组分及相关调控因子共同组成一个操纵子<sup>[2]</sup>。定位于转座子 Tn21 和 Tn501 上或质粒 pDU1358、p1258 上或芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)的染色体上。merR 编码调节蛋白,merT 和 merC 编码有关  $\text{Hg}^{2+}$  吸收的内膜蛋白(分子量为 15.1ku 和 14ku),merP 编码位于周质空间结合  $\text{Hg}^{2+}$  的蛋白(12ku),merA 编码汞还原酶,该酶常以二聚体(66ku)形式在细胞质内与内膜呈疏松的结合,汞还原酶与谷胱甘肽还原酶、硫辛酸酰胺脱氢酶有很高的同源性。merB 编码有机汞裂解酶,该酶难以分离纯化,定位问题尚未确定。merD 是 G<sup>-</sup> 菌中除 merR 以外的第二个调节基因。转录调节蛋白 MerD 和 MerR 一样,有螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix)构型,结合于操纵子的 OP 位点(operator-promoter),来调节 mer 操纵子基因。MerR 的结合位点,位于转录起始点上游-35 和-10 序列之间。-35 和-10 序列是 RNA 聚合酶专性识别位点。MerR 结合在 OP 上,阻止 RNA 聚合酶与 DNA 结合。当  $\text{Hg}^{2+}$  存在时, $\text{Hg}^{2+}$  与 MerR 结合, $\text{Hg}^{2+}$  与 MerR 复合物并不离开 DNA,而是在 OP 处使 DNA 发生扭曲、折叠,使 RNA 聚合酶与 DNA 结合,激活 MerT、MerP 和 MerC 及

MerA、MerB 转录,MerT、MerP、MerC 三个蛋白组成  $\text{Hg}^{2+}$  吸收、结合转运系统,将  $\text{Hg}^{2+}$  运至 MerA(汞还原酶)作用部位,从而高效、快速地将  $\text{Hg}^{2+}$  还原为  $\text{Hg}^0$ ,降低  $\text{Hg}^{2+}$  对细胞的毒性。

## 2 通过阳离子外流系统促进阳离子排放

某些两价金属阳离子  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  等由于没有足够的还原酶所需的 NADPH,又缺乏甲基化或其它共价修饰机制,这些金属离子不能像  $\text{Hg}^0$  那样直接挥发出细胞外,所以不能按  $\text{Hg}^{2+}$  的方式解毒,促进阳离子外排是减少细胞内积累的主要解毒机制。

2.1 抗镉系统:在细菌中发现两种不同的抗镉系统<sup>[3]</sup>,一种是在金黄色葡萄球菌中发现的 G<sup>+</sup> 细菌对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  外排的 cadCA 阳离子外流系统;另一种是在真产碱杆菌等发现的 G<sup>-</sup> 菌对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  外排的 czc 系统。这两个系统除都排放  $\text{Cd}^{2+}$  外,在排放机制、底物专一性组成特点等方面都有很大差异。真菌中发现的抗镉系统,主要是螯合金属的类金属硫蛋白和重金属螯合肽。

金黄色葡萄球菌中  $\text{Cd}^{2+}$  是通过  $\text{Mn}^{2+}$  吸收系统进入胞内的, $\text{Zn}^{2+}$  可能是通过  $\text{Mg}^{2+}$  的吸收系统进入细胞。金黄色葡萄球菌中发现有三种  $\text{Cd}^{2+}$  抗性决定子:cadCA 操纵子位于质粒 p1258 上,编码外流蛋白;cadB 操纵子位于质粒 p1147 上,编码结合蛋白,结合  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ ;另外在染色体上也发现了编码促进  $\text{Cd}^{2+}$  外排的外流蛋白。p1258 质粒上 cadCA 操纵子上有两个可读框(ORF),编码两种蛋白,小蛋白(122 个氨基酸)是含有三个金属结合部位的可溶性 CadC 蛋白,其具体功能尚未查清,可能从细胞中捕获阳离子,输送至 CadA 蛋白。大蛋白(727 个氨基酸)是位于膜上的主要泵蛋白-CadA 蛋白,具有 E1-E2 型 ATP 水解酶活性。与其它 E1-E2 型 ATP 水解酶一样,CadA 蛋白有膜内的通道。CadA 蛋白在细胞质内有四个结构域:ATP 结合位点、蛋白激酶位点、能量传导结构域及底物结合位点。当 ATP 结合至 CadA 蛋白结合位点后,ATP 水解下来的磷酸基团结合至 CadA 结合磷酸根离子的结构域,ATP 水解释放出的能量使 CadA 蛋白构象改变呈高能态,高能态再次降低使阳离子运出膜外。cadCA 系统的调控是诱导型的,但迄今尚未发现 CadR 调节因子。利用逆转录酶进行引物延伸法试验,在 cadA 启动子上游发现有一小段重复序列,去掉此段重复序列,CadA 蛋白表达量下降,推测有可能是 CadR 蛋白的作用位点。除抗  $\text{Cd}^{2+}$  外,cadCA 系统也提供对  $\text{Zn}^{2+}$  的抗性,也有可能提供  $\text{Bi}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  抗性。

在真产碱杆菌中  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  是通过  $\text{Mg}^{2+}$

吸收系统进入细胞的。真养产碱杆菌中发现拮抗  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  的 *czcCBAD* 系统基因位于质粒 pMOL30 (238Kb) 上,而拮抗  $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  和  $\text{Cr}20_4^{2-}$  的 *chr* 系统基因位于质粒 pMOL28 (163Kb) 上<sup>[4]</sup>。*czcCBAD* 操纵子编码 *CzcA*、*CzcB*、*CzcC*、*CzcD* 四个蛋白。*CzcA* 蛋白 (1064 个氨基酸) 是系统的核心,它具有跨膜性的  $\alpha$ -螺旋构型,在膜上能形成转运质子的通道,由四个结构域组成,两个亲水性的和两个疏水性的。*CzcA* 蛋白上 Cys 和 His 含量很低,所以没有金属结合区,也没有金黄色葡萄球菌中那样的 ATP 结合位点,但 *CzcA* 自己可能有较慢的  $\text{Co}^{2+}$  排放功能。*czc* 系统中结合金属离子的蛋白是有三个结构域的 *CzcB* 蛋白 (521 个氨基酸),中间的结构域有 8 个 His 残基,构成 2 个金属结合位点,*CzcB* 蛋白有  $\text{Zn}^{2+}$  的排放功能。*CzcC* 蛋白 (346 个氨基酸) 是结构修饰因子,使底物专一性从唯一只对  $\text{Zn}^{2+}$  转变为  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$ 。最小的蛋白是 *CzcD* (200 个氨基酸),不直接参与离子的排放系统,而是调节蛋白。

**2.2 抗铜系统:**目前细菌中有两种不同质粒控制的抗铜系统研究得比较深入<sup>[5]</sup>。一种是在丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 中发现的 *cop* 系统;一种是从大肠杆菌中分离得到 *pco* 系统。真菌中发现的抗铜系统主要为类金属硫蛋白。

丁香假单胞菌的 *cop* 系统中 *CopA* 和 *CopB* 行使部分抗铜活性,但只有在 *CopC* 和 *CopD* 存在下,才能行使全部抗铜活性。在 *CopB* 中有一个 8 肽序列 (Asp-His-Ser-Gln / lys-Met-Gln-Gly-Met) 重复出现五次,在 *CopA* 中,虽然保守性不如 *CopB*,但仍有四个重复的 8 肽序列,这些重复序列可能是铜离子的结合位点。*CopA* 和 *CopC* 是周质空间蛋白,*CopB* 是外膜蛋白,*CopD* 蛋白的定位及功能尚未弄清楚。有人提出 *cop* 系统的铜抗性机制是  $\text{Cu}^{2+}$  在周质空间被 *CopA* 和 *CopC* 结合,在细胞质中  $\text{Cu}^{2+}$  被封闭,从而使细胞质中游离的  $\text{Cu}^{2+}$  离子浓度受到控制。*cop* 系统的调节是由 *CopR* 和 *CopI* 来实现的。*CopR* 是阻遏蛋白,由染色体基因编码,阻遏质粒上 *cop* 操纵子表达,质粒上 *cop* 操纵子下游 1.6kb 处有 *copI* 基因,其产物 *CopI* 蛋白在  $\text{Cu}^{2+}$  诱导下与 *CopR* 蛋白结合,破坏 *CopR* 对质粒上 *cop* 操纵子的阻遏。此调控机制尚需严密验证。

大肠杆菌中铜的抗性系统非常特殊,由质粒编码的蛋白因子和染色体编码的蛋白因子共同完成对  $\text{Cu}^{2+}$  的转运、胞内结合和排放调控。*CutA* 和 *CutB* 是染色体基因编码的  $\text{Cu}^{2+}$  吸收系统,染色体基因编码的 *CutE* 和 *CutF* 在细胞内参与  $\text{Cu}^{2+}$  的结合,染色体基因编码的 *CutC* 和 *CutD* 参与  $\text{Cu}^{2+}$  的排放,在染色体上 *cut* 操

纵子是由 *CutR* 和不在 *cut* 操纵子上的 *CutS* 共同调节。在正常生理条件下,染色体上 *cut* 操纵子负责  $\text{Cu}^{2+}$  的转运和保持,在过量  $\text{Cu}^{2+}$  条件下,质粒上 *pco* 操纵子开始转录,其上有 *pcoA*、*pcoR*、*pcoB*、*pcoC* 四个基因,*PcoR* 蛋白从序列分析得知,是典型的磷酸转移两组份调节系统的传感器蛋白,质粒上无相应的编码反应调节器蛋白的基因,推测可能在染色体上,作为 *cut* 系统的一员。过量  $\text{Cu}^{2+}$  时,*PcoC* 结合胞内的  $\text{Cu}^{2+}$ ,通过 *PcoA* 和 *PcoB* 与 *CutC* 和 *CutD* 构成的四组份排放系统,将  $\text{Cu}^{2+}$  排出胞外。更深入的调节机制还未弄清。

### 3 合成类金属硫蛋白和重金属螯合肽

真核微生物在  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  或  $\text{Ag}^+$  诱导下合成类金属硫蛋白和重金属螯合肽,减少自由重金属离子在细胞内的积累,以达到解毒效果。金属硫蛋白是一类广泛存在于生物中的低分子量。富含 Cys、能被金属诱导的金属结合蛋白。氨基酸组成中 Cys 含量丰富 (7~43%),借助 Cys 中的 -SH 与重金属结合,已在酵母菌的四个属 (酵母属,裂殖酵母属,假丝酵母属和毕赤酵母属) 中证实类金属硫蛋白的重金属解毒作用<sup>[6]</sup>。粟酒裂殖酵母和光滑球拟酵母由重金属诱导合成的重金属螯合肽,基本结构为 Cys、Glu 和 Gly 三种氨基酸组成的基肽亚单位 (cadystin),基本结构为  $\gamma$ -谷氨酰胺 ( $\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly,  $n = 2 \sim 8$ ,通过 Cys 巯基配位键螯合重金属。酿酒酵母金属硫蛋白的操纵子位于染色体 VIII 远离着丝粒 42 分摩位置,MT 结构基因 (*cup1* 基因) 编码 61 个氨基酸的蛋白质 (6570u),成熟的 Cu-MT (5655u) 在转录后加工中去掉了前 8 个氨基酸。如在酵母菌 MT 基因启动子元件及 Cu 诱导转录调控模型中可见<sup>[7]</sup>,上游激活序列 (UAS) 在转录起始点上游 -100 至 -150bp 处,TATA 元件位于 -20 至 -100bp 处,OP 位于转录起始点至 -100bp 间,转录调节蛋白 ACE1 的基因位于染色体 VII 长臂着丝粒远端 9 分摩附近位置,转录调节蛋白 ACE1 与 UAS 上的 16 个核苷酸中三个特异位点核苷酸识别。没有  $\text{Cu}^{2+}$  存在时,ACE1 蛋白为自由线型构型,不与 UAS 结合;高浓度  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$  时,ACE1 蛋白氨基端结构域螯合  $\text{Cu}^{2+}$  形成 "Cu-S" 簇核心结构,从 "Cu-S" 铜簇立方体的三面凸出形成强  $\beta$ -折叠的类锌指蛋白的四个碱性 loops 环结合到 UAS 的 16 个碱基识别序列上,ACE1 蛋白羧基终端结构域与其它通用转录因子、TATA、RNA 聚合酶等相互作用<sup>[8]</sup>,形成转录起始复合物,继而复合物分解,MT 开始转录。转录后形成的 MT,在 OP 位点就成为一个有活性的阻遏子,阻遏其自身基因转录。酵母菌中抗铜、镉、银系统除金属硫蛋白、重金属螯合肽外,在酿酒酵母中还发现细胞膜上有对铜高亲和性的 *Cutr*p 蛋白

(406 个氨基酸)<sup>[9]</sup>。在缺失 *cup1* 或 *acel* 基因的突变株中,发现由染色体 16 上 *cup9* 基因编码的维持细胞内 Cu 平衡的同源域蛋白 (homeodomain protein), 使酵母细胞在有毒的  $\text{Cu}^{2+}$  离子浓度下生长<sup>[10]</sup>, 酿酒酵母的抗镉系统中也有由染色体 11 上 *cad2* 基因编码的镉结合蛋白<sup>[11]</sup>。真菌 *Daetylium dendroides* 中也曾报道存在低分子量 (7500u)、低 Cys 含量 (4.5%), 每分子蛋白只结合 2 个铜原子的铜结合蛋白<sup>[12]</sup>。

综上所述,随着分子生物学的不断发展,虽然在很大程度上揭示了微生物对重金属抗性的本质,但仍有许多问题待深入研究和探索。

## 参 考 文 献

- [1] Robinson J B, Tuovinen O. Microbiol Rev, 1984, 48(2):95~124.
- [2] Silver S, Misra T K. Ann Rev Microbiol, 1988,42:

717~743.

- [3] Nies D H. Plasmid, 1992, 27:17~28.
- [4] Nies D H. J Bacteriol, 1987, 169(10):4865~4868.
- [5] Silver S, Walderhaug M. Microbiol Rev, 1992, 56(1):195~228.
- [6] 林稚兰,常立梅.生物工程进展,1996, 16(3):33~43.
- [7] Butt T R, Ecker D J. Microbiol Rev, 1987, 51(3):351~364.
- [8] Furst P, Hu S, Hackett R et al. Cell, 1988, 55(4):705~717.
- [9] Dancis A, Haile D, Yuan D S et al. J Biol Chem, 1994, 269(41):25660~25667.
- [10] Knight S A B, Taman K T, Kosman D J et al. Mol Cell Biol, 1994, 14(12):7792~7804.
- [11] Zhou P B, Thiele D J. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(14):6112~6116.
- [12] Shatzman A R, Kosman D J. Arch Biochem Biophys, 1979, 194(1):226~235.