

mazEF 系统介导胁迫诱导细菌细胞程序性死亡

庄强^{1,2} 宁德刚^{1*}

(1. 江苏大学环境学院 江苏 镇江 212013)
(2. 江苏大学生命科学研究院 江苏 镇江 212013)

摘要: *mazEF* 是细菌染色体上的“毒素-抗毒素系统”基因(Toxin-antitoxin system, TA 系统), 可介导胁迫诱导细菌细胞程序性死亡。本文介绍了 *mazEF* 系统的遗传结构特征、生理生化功能、环境胁迫激活 *mazEF* 系统介导的细菌细胞程序性死亡的机制, 参与细胞死亡过程中的细胞信号和细胞因子的调控, 以及关于 *mazEF* 系统介导的细菌细胞程序性死亡理论的争论, 提出了进一步丰富和完善细菌细胞程序性死亡理论亟待解决的问题。

关键词: 毒素-抗毒素系统, *mazEF* 基因, 环境胁迫, 细菌细胞程序性死亡

Bacterial Programmed Cell Death Mediated by *mazEF* System Under Stressful Conditions

ZHUANG Qiang^{1,2} NING De-Gang^{1*}

(1. Environmental School, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)
(2. Institute of life science, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: *mazEF*, which is a toxin-antitoxin system located in bacterial chromosome, can mediate programmed cell death induced by various stressful conditions. In this review, the genetic structure, physiological and biochemical function of *mazEF* system were outlined, cellular signals and the regulation of cell factors involved in the process of cell death were introduced, and the controversy on the theory of *mazEF*-mediated programmed cell death was discussed. Based on the present results, It is pointed out that some questions about bacterial programmed cell death should be taken into more consideration.

Keywords: Toxin-antitoxin, *MazEF* gene, Environmental stress, Bacterial programmed cell death

细胞程序性死亡是通过细胞表面受体激活细胞凋亡信号转导途径, 导致细胞主动的自杀性死亡。在这种死亡过程中一般伴随着细胞功能和形态学上的改变, 如蛋白质水解、DNA和RNA降解、细胞收缩, 以及细胞碎裂形成凋亡小体(Apoptotic bodies)等^[1], 这种细胞死亡现象最初称为细胞凋亡。随着研究的深入细胞程序性死亡理论内容更为丰富: 不论

何种因素诱导, 以及是否表现出细胞凋亡的特征, 激活细胞内由死亡相关蛋白组成的级联反应的死亡程序所导致的细胞自杀性死亡, 均为细胞程序性死亡^[2]。细胞程序性死亡是维系个体结构稳定、功能平衡和生长发育所必需的生物学过程。过去曾认为细菌不存在细胞程序性死亡, 但近十余年的研究结果表明, 环境胁迫可诱导细菌细胞程序性死亡^[2,3]。

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30771176)

* 通讯作者: ☒ 306502@ujs.edu.cn

收稿日期: 2008-11-05; 接受日期: 2008-12-11

1 细菌染色体上的 *mazEF* 系统基因特征

*mazEF*为细菌染色体上的毒素-抗毒素系统 (Toxin-antitoxin system, TA 系统)^[3]。TA系统基因最早发现于低拷贝数质粒中,维持质粒在细胞中的稳定遗传。此后的研究发现,在细菌染色体上也存在TA系统^[4],特别是自由生活的(Free-living)细菌染色体上,但生活在稳定环境条件下的专性宿主依赖细菌没有TA系统^[5,6]。根据TA系统基因编码产物的同源性,染色体上的TA系统分别有*ccd*、*relBE*、*mazEF*、*parDE*、*higBA*、*phd/doc*、*vapBC*七大家族^[7],其中对其结构和功能研究最清楚的是大肠杆菌染色体上的*mazEF*系统。

大肠杆菌*mazEF*系统具有与基因组中其他典型的毒性-抗毒性系统类似的特性:由两个相邻的基因*mazE*和*mazF*组成,*mazE*位于*mazF*上游,二者共同表达;*mazE*和*mazF*分别编码蛋白MazE和MazF,MazF是稳定的毒素蛋白,而MazE是不稳定的抗毒素蛋白,可被ClpPA复合体降解^[3]。ClpPA由一依赖ATP的丝氨酸蛋白酶酶促亚单位ClpP和ATP酶(ATPases)ClpA构成的具有催化活性的全酶,并与其他内肽酶(Endopeptidase)Clp共同构成细胞蛋白质质量监控系统^[8]。MazE形成特殊构象后,能识别MazF并与其相互作用形成MazF₂-MazE₂-MazF₂六聚体,MazF毒性作用被抑制^[9];当环境胁迫导致MazE和MazF表达受到抑制时,不稳定的抗毒素蛋白MazE被ClpPA降解,稳定的毒性蛋白MazF相对含量增加,由此启动细胞的死亡程序^[5]。*mazEF*系统的启动子(P₂)受MazE或MazE-MazF复合体的负反馈调控^[10],MazE的N-末端与启动子调控序列结合,C-末端与MazF结合,MazF与MazE的结合可加强MazE与启动子的结合能力^[11]。

与典型的毒素-抗毒素系统基因不同,粘细菌(*Myxococcus Xanthus*)染色体上由*mrpC/mazF-mx*组成的TA系统中,*mazF*的同源基因*mazF-mx*与具有*mazE*相同功能的*mrpC*基因并不相邻排列,*mazF-mx*编码毒素蛋白MazF-mx;*mrpC*编码抗毒素蛋白MrpC,与MazF-mx形成复合体,抑制MazF-mx的毒性作用;MrpC可被依赖ATP的蛋白酶LonD降解,并能与*mazF-mxd*启动子的DNA序列结合调控*mazF-mx*的表达,但调控功能与它的磷酸化状态有关^[12]。

2 *mazEF* 系统介导的细菌细胞程序性死亡

大肠杆菌*mazEF*系统具有与其他TA系统不同特点:*mazEF*系统能介导一些胁迫条件诱导的约90%的野生型细胞死亡,而在相同条件下,*mazEF*或ClpPA缺失突变株细胞存活率均在60%以上。这些胁迫条件包括:氨基酸缺乏导致产生信号分子ppGpp^[5];抑制转录或/和翻译的抗生素^[13];原噬菌体(Prophage)P1的“沉溺模块”*phd-doc*中抑制翻译的毒性蛋白Doc^[14];导致DNA损伤的环境因素^[15,16]和氧化胁迫(H₂O₂)^[16]。粘细菌在营养胁迫时,表现出营养生长和子实体分化的多细胞发育的社会行为。在粘孢子发育过程中,通过一系列的细胞内信号途径顺序的激活死亡相关蛋白,导致约80%的细胞利他性死亡,其余细胞转化为粘孢子。而*mazF-mx*基因缺失突变株在子实体形成时发育细胞的死亡率降低(野生型的死亡率为77%,突变株的死亡率约18%),但孢子的形成率仅为野生型的8%。*mrpC*缺失突变株可减少发育细胞的死亡,但不能形成子实体。通过磷酸化调控MrpC活性的丝氨酸/苏氨酸激酶[Pkn8(Pkn14 激酶)-Pkn14(MrcP 激酶)]基因突变时,可加速子实体的形成,但孢子形成率显著下降。因此,在粘细菌孢子形成过程中,*pkn8-pkn14*参与由*mrpC/mazF-mx*介导的细胞利他性死亡^[12]。

这种由一定强度的胁迫因素诱导,细胞内*mazEF*系统介导、已知功能蛋白(ClpP或Lon, Pkn8-Pkn14)和未知基因产物共同参与、通过一定程序控制的细胞自杀性死亡,即是细胞程序性死亡^[2,3,17](图1)。

3 *mazEF* 介导的细胞程序性死亡的分子机制

MazF是核糖核酸内切酶,能识别mRNA和tmRNA中的XACA序列,并优先将序列中连接第一个腺嘌呤核苷酸的磷酸二酯键水解,从而抑制所编码蛋白质的合成和断裂mRNA上核糖体的释放^[18]。tmRNA是一种tRNA和mRNA的杂种分子,编码产物具有细胞内蛋白质质量监测的功能。tmRNA能结合于被停止在断裂的mRNA分子上的核糖体A位点,并使核糖体转移到tmRNA上编码一个蛋白质降解标签的短多肽编码序列上,使翻译得以拯救,核

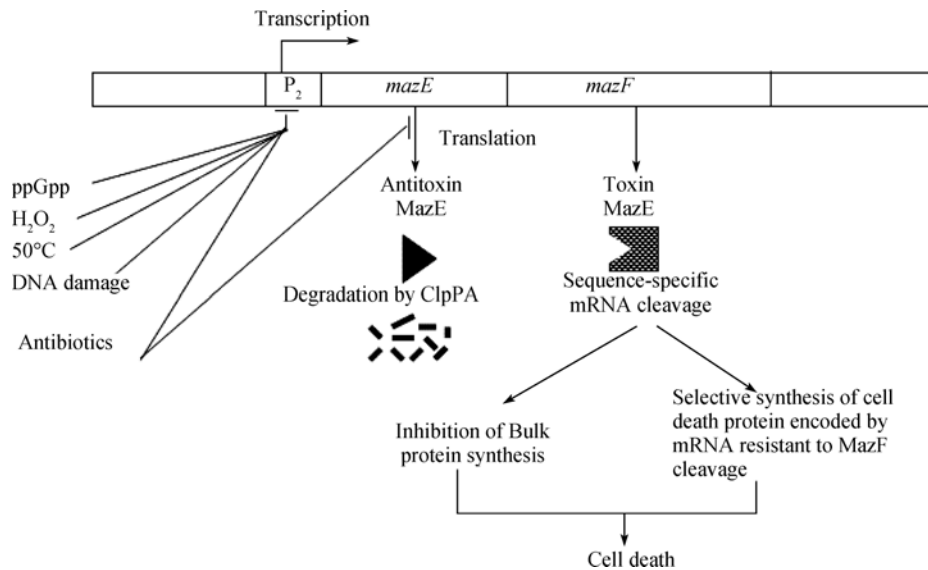


图1 *mazEF*系统介导的胁迫诱导细菌细胞程序性死亡(引自Engelberg-kulka H, *et al*^[17], 略有修改)

Fig. 1 A schematic representation of the cell death *E. coli mazEF*-mediated cell death pathway (From Engelberg-kulka H, *et al*^[17], simply revised by the authors of this paper)

糖体被释放。当核糖体到达tmRNA开放阅读框末端的终止位点时,不正常多肽被释放,被蛋白质降解标签所标记,并迅速被细胞内蛋白酶降解^[18]。粘细菌MazF-mx也是位点特异性mRNA内切酶,识别的位点为GUUGC,并在序列中的两个U之间进行切割^[12]。在发育的早期和中期,MrpC的高水平表达^[19],一部分与MazF-mx形成复合体后抑制MazF-mx对细胞的毒性作用,游离的MrpC上调MazF-mx表达^[12]。在芽孢开始形成时,MrpC可能被LonD或/和细胞其他不明的蛋白酶降解,由此激活MazF-mx对mRNA的降解功能,导致一些细胞(约80%)发育性自溶而使其他(约20%)细胞获得营养形成子实体并随后形成粘孢子^[12]。

Engelberg-Kulka H等认为MazF的酶切作用可能是*mazEF*系统介导的胁迫诱导细胞死亡途径中的起始步骤^[20,21]。开始启动时MazF对mRNA和tmRNA的降解可被MazE抑制,已被酶切的mRNA可被尚未降解的tmRNA所拯救而从核糖体上释放出来。但MazE不能逆转已被MazF启动进入死亡程序下游的细胞死亡,并最终导致细胞不可逆的永久性死亡。这一推测得到证实:大量诱导表达MazF使细胞处于静止状态,但MazF的细胞毒性作用可被随后大量诱导表达的MazE所抑制,使细胞恢复分裂活性^[22]。当细胞内游离MazF存在时间和量超

过某一临界点,MazF的细胞毒性作用不能被大量诱导表达的MazE所抑制,导致不可逆的细胞活性丧失,即细胞死亡^[20]。因此*mazEF*系统介导的细胞死亡是通过MazF对mRNA以及tmRNA的酶切作用实现的,但导致细胞死亡的下游机制尚不清楚。

4 *mazEF*介导的细胞程序性死亡中的信号转导

自然界中细菌通过细胞间的通讯以协调社会行为的群体存在。大肠杆菌*mazEF*介导的环境胁迫诱导细胞死亡是依赖于胞外死亡因子(Extracellular death factor, EDF)的群体行为,这种死亡因子与细菌密度有关,其活性出现在对数生长期,静止期EDF活性丧失,不能诱导细胞的程序性死亡^[23]。EDF是线型的五肽(NNWNN),其中每个氨基酸对维持其活性都至关重要。MazF的激活可增加EDF合成,EDF的产生也依赖于蛋白酶ClpXP,其机制尚待阐明。ClpXP是由依赖ATP的丝氨酸蛋白酶酶促亚单位ClpP和另一种ATP酶(ATPases)ClpX亚单位构成的具有蛋白质降解活性的全酶^[8]。序列分析发现,6-磷酸-葡萄糖脱氢酶(Zwf)中的氨基酸序列NNWDN可能是EDF的前体,氨基化过程可能发生在某种蛋白酶加工过程前后,推测ClpXP是Zwf产生EDF的剪切酶。EDF参与*mazEF*介导的细胞程

序性死亡,表明细菌细胞程序性死亡依赖于细胞之间的通讯联系^[24]。当遭遇环境胁迫时,细菌群体表现出类似多细胞生物体特征:细菌启动 *mazEF* 介导的死亡程序,部分细胞死亡后释放出营养或信号分子,从而使其余部分个体得以生存^[24]。但细胞外死亡因子作为胞外信号如何通过信号转导进入细胞内,并启动 *mazEF* 系统介导的细胞程序性死亡仍不清楚。

在粘细菌中由 *mazF* 介导的细胞死亡过程中尚未发现胞外短肽,但存在类似真核细胞程序性死亡中的细胞因子磷酸化调控现象。在营养丰富的条件下, MazF-mx 与非磷酸化的 MrpC 形成稳定的复合物,而其余游离的 MrpC 被类似于真核生物 Ser/Thr 蛋白激酶 [Pkn8-Pkn14 (MrpC kinase)] 磷酸化^[19], MrpC 的转录激活功能被抑制。因此, MrpC/MazF-mx 系统的表达受磷酸化 MrpC 负调控。当因营养饥饿而形成子实体时, MrpC N-末端的 25 个残基(位于磷酸化位点)被在发育过程中诱导激活的蛋白酶 LonD 切割形成 MrpC2, MrpC2 不能被 Pkn8-Pkn14 磷酸化^[19],但可上调 MazF-mx 的表达,细胞内对 MazF-mx 敏感的 mRNA 被降解,由此诱导一些自溶酶表达使细胞自溶^[19]。

5 *mazEF* 系统介导的细菌细胞程序性死亡理论的质疑

mazEF 系统介导的细胞死亡是一种利他性的细胞程序性死亡,环境胁迫诱导并激活 *mazEF* 系统,使大部分个体细胞死亡而少数细胞得以生存。但对该理论的质疑认为:环境胁迫激活细菌染色体上的 *mazEF* 系统并使大部分细胞处于“准休眠状态”而不是细胞的死亡,尽管细胞不能分裂形成菌落,但仍具有细胞代谢活性。当外界环境胁迫解除后,可使细胞恢复分裂形成菌落^[22]。这种质疑的依据是人为诱导表达 MazF 的细胞不能分裂,但细胞的新陈代谢没有完全停止,能使不含 MazF 酶切位点的 mRNA 合成蛋白质^[25];另外,诱导表达 MazF 后的细胞再进一步诱导抗毒素蛋白 MazE 表达时,细胞恢复菌落形成的能力,表明 MazF 对细胞的毒性作用是一个可逆的非致死作用^[22]。但有实验结果证明:当细胞内游离 MazF 存在时间和量超过某一临界点时, MazF 对细胞的毒性作用不能被大量诱导表达的

MazE 所抑制,导致不可逆的细胞活性丧失,即细胞死亡^[21]。另外环境胁迫因素如氨基酸饥饿、DNA 损伤、抑制蛋白质或 RNA 合成的抗生素、噬菌体感染等胁迫诱导一定时间后,导致不可逆的细胞活性丧失^[20]。营养胁迫诱导细胞主动的利他性死亡在枯草芽孢杆菌芽孢形成以及粘细菌孢子形成过程中同样观察到,并且粘细菌细胞死亡也是由染色体上的 *mazF* 所介导^[12]。

mazEF 系统介导的细菌细胞程序性死亡理论似乎与达尔文的进化理论相悖。根据现有研究结果,在某种环境胁迫诱导后, TA 系统失活突变株的存活率远高于野生型菌株。因此,当两种菌株在同一系统中存在并遭遇环境胁迫时, TA 系统突变株将总是以野生型利他性死亡的细胞为食,突变的细胞得以优先生存,而野生型细胞将从群体中消失,显然有悖于自然界物种自然选择进化的理论。但细菌细胞程序性死亡理论认为,细菌群体不是简单的个体细胞的集合,而是由细胞间通讯作用使细菌具有类似真核生物相似的分化特性,这种通讯作用以诸如 EDF 作为信号,通过目前尚不完全清楚的机制来完成。并且现有的试验结果也并不支持在同一系统中 TA 突变株在环境胁迫时将优先于野生型细胞得以生存的推测^[26]。

6 *mazEF* 系统介导的细菌细胞程序性死亡理论的未来发展

mazEF 系统介导的细菌细胞程序性死亡理论经历了 10 余年的研究,并已得到大量试验的支持。尤其是大肠杆菌中参与 *mazEF* 介导的环境胁迫诱导细胞死亡的胞外信号肽,以及粘细菌子实体形成时, *mazF* 介导的细胞死亡过程存在类似真核细胞程序性死亡的细胞因子的磷酸化调控现象,这些结果丰富并完善了细菌细胞程序性死亡的理论。但关于 *mazEF* 系统介导细胞程序性死亡的研究仍然任重道远。譬如,细胞死亡过程中细胞信号的转导过程; MazF 是否能够通过特异性地降解 mRNA 启动细胞的程序性死亡;利他性死亡的细胞和存活的细胞如何被选择; *mazEF* 系统也广泛存在于其他细菌染色体上,这些系统是否具有大肠杆菌和粘细菌染色体上同源系统相同的生理功能等。通过对上述问题的研究将进一步完善 *mazEF* 系统介导的细菌细胞程序性

死亡的理论。同时,这一理论的完善将为阐明细菌细胞群体行为、生物膜形成机制和控制,病原菌的抗药机制以及 *mazEF* 系统为靶点的新型抗菌药物的开发具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, *et al.* Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res*, 1990, **10**(5A): 1153–1159.
- [2] Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, *et al.* Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genetics*, 2006, **2**(10): 1518–1526.
- [3] Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G, *et al.* An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine 3’5’-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**(12): 6059–6063.
- [4] 常家宁, 宁德刚. 蓝细菌 PCC6803 染色体上的一对毒素-抗毒素基因的鉴定. *微生物学通报*, 2009, **36**(1): 2030–2035.
- [5] Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(3): 966–976.
- [6] Lioy VS, Martin MT, Camacho AG, *et al.* pSM19035-encoded zeta toxin induces stasis followed by death in a subpopulation of cells. *Microbiol*, 2006, **152**(8): 2365–2379.
- [7] Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Rev Microbiol*, 2005, **3**(5): 371–382.
- [8] Porankiewicz J, Wang JM, Clarke AK. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol*, 1999, **32**(3): 449–458.
- [9] Kamada K, Hanaoka F, Burley SK. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol Cell*, 2003, **11**(4): 875–884.
- [10] Marianovsky I, Aizenman E, Engelberg-Kulka H, *et al.* The regulation of the *Escherichia coli mazEF* promoter involves an unusual alternating palindrome. *J Biol Chem*, 2001, **276**(8): 5975–5984.
- [11] Zhang JJ, Zhang YL, Inouye M. Characterization of the interactions within the *mazEF* addiction module of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2003, **278**(34): 32300–32306.
- [12] Nariya H, Inouye M. MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell*, 2008, **132**(1): 55–66.
- [13] Sat B, Hazan R, Fisher T, *et al.* Programmed cell death in *Escherichia coli*: Some antibiotics can trigger the MazEF lethality. *J Bacteriol*, 2001, **183**(6): 2041–2045.
- [14] Hazan R, Reches M, Engelberg-kulka H, *et al.* The post-segregational killing mediated by the phage P1 “addiction module”: *phd-doc* requires the *Escherichia coli* programmed cell death system *mazEF*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(6): 2046–2050.
- [15] Sat B, Reches M, Engelberg-Kulka H. The *Escherichia coli* chromosomal “suicide module” *mazEF* is involved in thymine-less death. *J Bacteriol*, 2003, **185**(6): 1803–1807.
- [16] Hazan R, Sat B, Engelberg-Kulka H. *Escherichia coli mazEF*-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *J Bacteriol*, 2004, **186**(11): 3663–3669.
- [17] Engelberg-kulka H, Hazan R, Amitai S. *mazEF*: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *J Cell Sci*, 2005, **118**(19): 4327–4332.
- [18] Zhang Y, Zhang J, Hoeflich KP, *et al.* MazF cleaves cellular mRNA specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, 2003, **12**(4): 913–923.
- [19] Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H. The extracellular death factor: physiological and genetic factors influencing its production and response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2008, **190**(9): 3169–3175.
- [20] Nariya H, Inouye S. A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol*, 2006, **60**(5): 1205–1217.
- [21] Amitai S, Yassin Y, Engelberg-Kulka H. MazF-mediated cell death in *Escherichia coli*: A point of no return. *J Bacteriol*, 2004, **186**(24): 8295–8300.
- [22] Kolodkin-Gal I, Engelberg-Kulka H. Induction of *Escherichia coli* Chromosomal *mazEF* by stressful conditions causes an irreversible loss of viability. *J Bacteriol*, 2006, **188**(9): 3420–3423.
- [23] Pedersen K, Christensen SK, Gerdes K. Rapid induction and reversal of bacteriostatic conditions by controlled expression of toxins and antitoxins. *Mol Microbiol*, 2002, **45**(2): 501–510.
- [24] Kolodkin-Gal I, Hazan R, Gaathon A, *et al.* A linear pentapeptide is a quorum-sensing factor required for *mazEF* mediated cell death in *Escherichia coli*. *Science*, 2007, **318**(5850): 652–654.
- [25] Suzuki M, Zhang J, Liu M, *et al.* Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol Cell*, 2005, **18**(2): 253–261.
- [26] Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G, Mine N, *et al.* What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *J Bacteriol*, 2007, **189**(17): 6089–6092.