

λ 噬菌体穿孔素 (holin) 蛋白触发裂菌的分子机制

史一博, 孙建和*

上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

摘要:穿孔素-裂解酶二元裂解系统是双链 DNA 噬菌体普遍采用的裂菌模式, 以 λ 噬菌体为例, 系统地揭示了噬菌体穿孔素的结构与功能。λ 噬菌体的 S 基因的特征是呈双起始基序 (dual-start motif), 编码穿孔素 (holin) S105 和抗穿孔素 (antiholin) S107, 通过二者不同水平的表达及相互作用, 触发裂菌过程。作者综述了 λ 噬菌体穿孔素的膜拓扑结构和成孔机制的最新研究进展, 并展望了穿孔素的研究热点和应用前景。

关键词: λ 噬菌体, 穿孔素, 抗穿孔素, 裂菌触发机制

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 02-0141-05

穿孔素-裂解酶二元裂解系统是双链 DNA 噬菌体普遍采用的裂菌模式。裂解酶是噬菌体增殖晚期合成的一类细胞壁水解酶, 是裂解宿主菌的重要功能蛋白。穿孔素是噬菌体基因编码的小分子膜蛋白, 通过在细胞膜上形成跨膜孔使裂解酶到达细胞壁肽聚糖层而发挥裂菌功能^[1]。穿孔素不仅是构成跨膜孔的重要元件, 而且是触发细菌裂解的“分子定时器”, 在噬菌体的裂菌过程中扮演着关键角色。鉴于研究小分子膜蛋白的高难度和穿孔素的作用特性, 研究穿孔素极具挑战性。目前, 基于穿孔素的裂菌触发机制的研究已取得较大进展^[2-4], 尤其是 λ 噬菌体的穿孔素蛋白。对 λ 噬菌体穿孔素的研究不仅深入揭示了噬菌体的裂菌机制, 而且为研究其它噬菌体穿孔素提供了策略和技术支持。本文就 λ 噬菌体穿孔素蛋白的结构与功能的研究进展进行综述。

1 S 基因的双起始基序特征

λ 噬菌体的 S 基因具有双起始基序特征, 可编码 S107 和 S105 两种功能相反的蛋白^[5]。其中, S105 发挥穿孔素功能, S107 在触发裂解时也参与跨膜孔的形成, 但是在触发裂解前则具拮抗 S105 的功能, 防止过早形成跨膜孔, 因此 S107 称为抗穿孔素。S105 和 S107 相互作用不可分割, 统称为 S 蛋白。S 基因的结构引导启动元件 (structure directed initiation, sdi) 在编码 S107 的核糖体结合位点 (ribosome binding sites, RBS) 序列 GGGGG 处可以形成或打开茎环结构, 从而调控 S107 和 S105 两种蛋白的合成比例 (图 1)。

穿孔素 S105 具有 3 个跨膜区 (transmembrane domain, TMD), N 端位于胞外^[6], C 端伸向胞内^[7] (图 2)。S105 的每个 TMD 均具典型的亲水特征:

基金项目: 国家自然科学基金 (31172381)

* 通信作者。Tel: +86-21-34206926; Fax: +86-21-64799604; E-mail: sunjhe@sjtu.edu.cn

作者简介: 史一博 (1981-), 女, 河北省人, 博士研究生, 主要从事微生物蛋白质功能研究。Tel: +86-21-34206635; E-mail: yibolucky@126.com

收稿日期: 2011-09-07; 修回日期: 2011-11-14

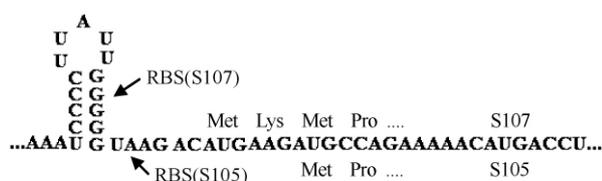


图1 λ 噬菌体穿孔素S基因的双起始模式

Fig. 1 The dual-start motif of S gene encoding holin from bacteriophage Lambda.

TMD₁和TMD₂富含带电荷的氨基酸残基,TMD₃含有羟基化的氨基酸残基。每个TMD都是穿孔素发挥功能所必需的,尤其是TMD₁。与S105相比,抗穿孔素S107除N端多了两个氨基酸残基Met₁-Lys₂外,其N端伸向胞质并受到胞质去甲酰酶的作用。因此,Lys₂和N端去甲基化产生的氨基酸基团提供

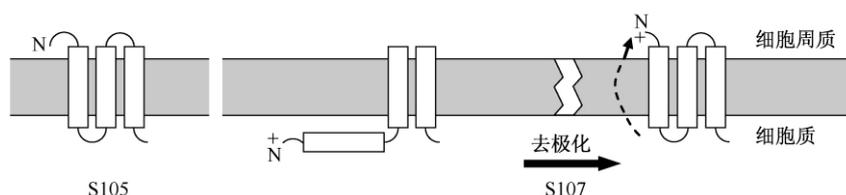


图2 穿孔素S105和抗穿孔素S107的拓扑结构

Fig. 2 Topological structure of holin S105 and antiholin S107.

2 基于S蛋白的细胞膜成孔机制

S蛋白的单体仅有3个TMD,必须形成多聚体才能在细胞膜上产生供裂解酶通过的跨膜孔。基于生物化学、生理学和分子生物学方法获得的大量数据,Wang IN等于2003年提出S蛋白形成膜损伤的两步聚集模型^[8]。在该模型中穿孔素聚集于细胞膜并最终形成大面积的蛋白聚合体,称之为“死亡之筏”(death raft);通过穿孔素蛋白TMD间的密切相互作用,将脂质分子排斥在外。瞬时通道的打开随之引起细胞膜局部去极化,触发穿孔素构象改变;局部发生的变化随后扩大蔓延,最终导致膜损伤。随着S蛋白研究的不断深入,该模型也逐渐得到证实。

2.1 S蛋白聚集形成“死亡之筏”

直到裂解前15 min,S基因的mRNA水平平均维持在每个细胞170个分子。平均每个mRNA每分钟合成不到1分子S蛋白,合成的S蛋白均积聚于细胞膜上。S105和S107的合成总量约为4600个

分子,两个正电荷,使得S107蛋白的N端不能插入能化的细胞膜,即不能形成与S105相同的拓扑结构。最近,通过分析缺失TMD₁的S105 Δ TMD₁的生物学活性发现不能在脂质双分子层上形成TMD₁是S107表现拮抗S105功能的直接原因^[6]。研究表明,S107的N端会随细胞膜去极化而穿过细胞膜并形成N端TMD^[5]。据此,推测S107正是基于动态的拓扑结构实现其拮抗S105成孔的生物学功能:在触发裂菌前,S107在能化的细胞膜上仅具有两个TMD,通过与S105形成异源二聚体,发挥拮抗S105的作用;在触发细菌裂解时细胞膜发生去极化,S107的N端转而由胞内伸向胞外,该TMD的形成使S107失去拮抗S105的功能并表现出穿孔素活性(图2)。

分子,两种蛋白合成比例约为2:1^[9]。用去垢剂提取膜蛋白和对膜进行氧化处理,提取的S蛋白都呈现由唯一的半胱氨酸Cys₅₁形成共价结合的二聚体^[10]。结合S105和S107的相互作用,推测S蛋白二聚体的形成模式:一个S107分子通过结合一分子的S105形成异源二聚体S107-S105,而S105蛋白之间还可以形成同源二聚体S105-S105。按照S105与S107的合成比例,S105-S105同源二聚体的数量为异源二聚体S107-S105的50%。此时,每个不表现成孔活性的异源二聚体中都巧妙地隐藏了两个潜在的成孔蛋白。当触发裂解时,随着异源二聚体中S107的构象变化,异源二聚体也表现出成孔活性。因此,有成孔活性的蛋白数量骤增,导致快速裂菌^[11]。噬菌体裂解模拟实验证实了S蛋白之间存在相互作用,而且发现S蛋白间的作用强度最大程度地保证了裂解发生时间的精度^[12]。用交联剂DSP处理过的细胞膜上提取的S蛋白呈现为共价相连的寡聚体,最多可形成六聚体^[13];而许多导致裂解缺陷的S蛋白突变往往不能形成寡聚体^[14]。因此,推测S蛋白在形成二聚体后会进一步聚合成

寡聚体。

S 蛋白的寡聚体继续聚合会形成更大蛋白聚合体,即“死亡之筏”。Ryan 通过模拟 λ 噬菌体的裂解过程发现,在裂解触发时平均每个细菌细胞膜上有 10 个“死亡之筏”;另外,能形成跨膜孔的“死亡之筏”平均含有 48 个穿孔素分子^[12]。最近,White R 等通过反卷积荧光显微镜实时记录了 S105-GFP 融合蛋白在膜上的聚集情况,首次直观地在体内观察到“死亡之筏”^[13],揭示噬菌体发生裂解的前提是穿孔素积累到相当的浓度并聚集成筏。野生型 S 蛋白和引起提前裂解的 S 蛋白突变都是在致死性触发前突然聚合形成“死亡之筏”的;而无致死作用的 S 蛋白突变仅分布于膜上却不发生聚合。在积累过程中,S 蛋白在膜上保持着良好的运动性,但聚合形成“死亡之筏”后则为稳定的、无运动性的复合物。

2.2 “死亡之筏”触发形成跨膜孔

普遍认为穿孔素在细胞膜上形成的跨膜孔对裂解酶是非特异性的,或者跨膜孔对裂解酶的特异性仅取决于裂解酶的分子大小和净电荷数。S 蛋白介导形成的跨膜孔允许大于 480 kDa 的蛋白通过^[8]。因此,跨膜孔必然是由“死亡之筏”转变而成。通过细菌裂解的模拟实验推算,穿孔素 S105 形成的跨膜孔孔径约为 10 nm,推测其由 16 个穿孔素分子组成^[12]。由于跨膜孔一旦形成将立即导致裂菌发生,因此观察细菌细胞膜上跨膜孔的形态非常困难。最近,Savva 等首次描述了 S 蛋白在体外形成的与跨膜孔具有相似结构特征的环状结构^[16]。用非离子去垢剂或温和的两性离子去垢剂纯化的 S105 经凝胶层析可获得 670 kDa 和 5 MDa 的复合物。通过透射

电镜观察发现去垢剂溶解的穿孔素会形成大的分散良好的环形结构。670 kDa 的复合体与环形结构的二聚体大小相当,5 MDa 的复合体是环形结构堆积成的管状聚合物。单个环内径 8.5 nm,外径 23 nm,高度为 4 nm,接近脂质双分子层的厚度。单个环由 72~80 个 S105 单体构成。穿孔素突变同步实验表明,不能在细胞膜上形成聚合体的穿孔素突变,同样不能在体外形成环状结构。不过,噬菌体 21 的穿孔素蛋白仅能形成小孔 (pinhole),说明不同穿孔素之间成孔机制存在差异^[4]。2010 年,借助冷冻电子显微镜,首次观察到了 S105 在体内形成的跨膜孔^[17]。跨膜孔的大小比其他已知的膜通道大一个数量级,直径约为 340 nm,有些甚至达到 1 μ m。跨膜孔大多随机分布于细胞膜且形状不规则。

那么,“死亡之筏”如何介导形成跨膜孔?通过对 λ 噬菌体的穿孔素 S 和 T4 噬菌体的穿孔素 T 这两种异源的穿孔素在细菌内同时表达引发细菌裂解的分析,推测跨膜孔是由一个“死亡之筏”内自发的构象变化导致,并随整个细胞膜去极化而向周围扩大形成。通过观察经鞭毛固定于玻璃片的细菌在诱导和裂解过程中的运动情况^[18],发现细菌的旋转速度与膜上的平均力势 (potential of mean force, PMF) 呈线性函数关系;根据诱导后细菌的翻转速度推断:形成跨膜孔前,穿孔素聚集成导致膜紊乱的潜力区,但是不会引起宿主细胞膜的任何损伤,也不会增加膜对质子或其他离子的通透性;但是在菌体裂解前的几秒钟细胞膜上的 PMF 突然下降。实验表明,细胞膜去极化,当 PMF 降至约 50% 时,会立即触发穿孔素成孔引起细菌裂解。目前,尚未发现引起 PMF 突然下降的原因。

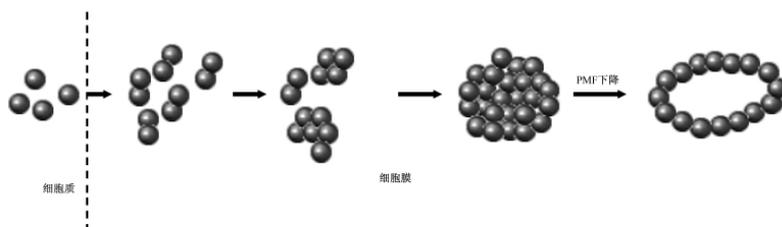


图3 穿孔素细胞膜成孔示意图

Fig. 3 Schematic presentation of holin hole formation.

3 基于 S 蛋白的裂菌时间的调控策略

S 蛋白合成速率和比例相对稳定地决定了 λ 噬

菌体的裂菌时间。裂解触发的时间与 S105 超过 S107 的量呈反相关,当 S107 的合成量较 S105 多时,在正常的程序化裂解时间内不会发生细胞裂解^[5,19]。因此, S105 在细胞膜上积累到临界浓度是

穿孔素触发裂解的必要条件,而 S105 和 S107 的比例则可以较大幅度地调整 λ 噬菌体的裂菌触发时间。S 蛋白的合成速率会因宿主菌的生长速度缓慢而下降。宿主细胞密度等外界环境信号可调控 S 基因的双起始基序,并改变两个不同起始密码子起始翻译产物的比例^[11]。那么,这些 S 蛋白合成速率和比例的变化必然导致细菌裂解时间的随机性^[20]。另外, S 蛋白还可通过等位基因突变介导裂菌时间的变化。对 S 等位基因和裂菌表型相关性的研究表明即使是单个氨基酸突变也可能导致 S 蛋白裂菌特性的巨大变化,即 S 蛋白具有很高的表型重塑性^[21]。因此,噬菌体可以通过 S 蛋白的质和量两条途径调控细菌裂解的时间。

4 问题和展望

λ 噬菌体穿孔素 S 虽是小分子蛋白,其巧妙的双起始基序特征、精准的裂菌模式以及突出的表型重塑性都体现出穿孔素的生物学进化优势。目前,在 S 蛋白研究中仍有许多难题尚待解答,比如 S 基因的 sdi 序列具体受怎样的机制调控, S105 和 S107 合成的先后顺序,引发细菌细胞膜 PMF 下降的因素是什么等等。另外, λ 噬菌体的穿孔素 S 蛋白的应用性研究有待加强。研究表明, S 基因具有用于癌症基因治疗的潜力^[22-23]。另外,笔者实验室研究结果证实,猪链球菌噬菌体穿孔素不仅具有抑菌活性,还能提高同源裂解酶的裂菌效率,而且类似的结论在其他穿孔素研究中亦有报道^[24],推测 S 蛋白也可能具有胞外抑菌活性。随着 S 蛋白功能研究的深入和蛋白表达策略的成熟^[25],加强穿孔素 S 的应用性研究必将促进基于噬菌体裂菌系统的抗菌新药的早日问世^[26]。S 蛋白是研究穿孔素的经典范例,但是不同细菌噬菌体的穿孔素虽然功能相似,但编码穿孔素的基因却存在高度的遗传多样性,这决定穿孔素结构和作用机制的多样性。因此,在参考 S 蛋白研究思路和成果揭示其它噬菌体穿孔素的功能时,应具备创新思维。

参考文献

- [1] Park T, Struck DK, Deaton JF, Young R. Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (52): 19713-19718.
- [2] Catalão MJ, Gil F, Moniz-Pereira J, Pimentel M. Functional analysis of the holin-like proteins of mycobacteriophage Ms6. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (11): 2793-2803.
- [3] Briers Y, Peeters LM, Volckaert G, Lavigne R. The lysis cassette of bacteriophage Φ KMV encodes a signal-arrest-release endolysin and a pinholin. *Bacteriophage*, 2011, 1 (1): 25-30.
- [4] Pang T, Savva CG, Fleming KG, Struck DK, Young R. Structure of the lethal phage pinhole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106 (45): 18966-18971.
- [5] Bläsi U, Chang CY, Zagotta MT, Nam KB, Young R. The lethal lambda S gene encodes its own inhibitor. *The EMBO Journal*, 1990, 9 (4): 981-989.
- [6] White R, Tran TA, Dankenbring CA, Deaton J, Young R. The N-terminal transmembrane domain of lambda S is required for holin but not antiholin function. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (3): 725-733.
- [7] Gründling A, Bläsi U, Young R. Biochemical and genetic evidence for three transmembrane domains in the class I holin, lambda S. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (2): 769-776.
- [8] Wang IN, Deaton J, Young R. Sizing the holin lesion with an endolysin-beta-galactosidase fusion. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (3): 779-787.
- [9] Chang CY, Nam K, Young R. S gene expression and the timing of lysis by bacteriophage lambda. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (11): 3283-3294.
- [10] Gründling A, Smith DL, Bläsi U, Young R. Dimerization between the holin and holin inhibitor of phage lambda. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (21): 6075-6081.
- [11] Young R. Bacteriophage holins: deadly diversity. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2002, 4 (1): 21-36.
- [12] Ryan GL, Rutenberg AD. Clocking out: modeling phage-induced lysis of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (13): 4749-4755.
- [13] Smith DL, Struck DK, Scholtz JM, Young R. Purification and biochemical characterization of the lambda holin. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (9): 2531-2540.
- [14] Gründling A, Bläsi U, Young R. Genetic and biochemical analysis of dimer and oligomer interactions of the lambda S holin. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (21): 6082-6090.

- [15] White R , Chiba S , Pang T , Dewey JS , Savva CG , Holzenburg A , Pogliano K , Young R. Holin triggering in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2011 , 108 (2) : 798-803.
- [16] Savva CG , Dewey JS , Deaton J , White RL , Struck DK , Holzenburg A , Young R. The holin of bacteriophage lambda forms rings with large diameter. *Molecular Microbiology* , 2008 , 69 (4) : 784-793.
- [17] Dewey JS , Savva CG , White RL , Vitha S , Holzenburg A , Young R. Micron-scale holes terminate the phage infection cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2010 , 107 (5) : 2219-2223.
- [18] Gründling A , Manson MD , Young R. Holins kill without warning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 2001 , 98 (16) : 9348-9352.
- [19] Chang CY , Nam K , Young R. S gene expression and the timing of lysis by bacteriophage lambda. *Journal of Bacteriology* , 1995 , 177 (11) : 3283-3294.
- [20] Dennehy JJ , Wang IN. Factors influencing lysis time stochasticity in bacteriophage lambda. *BMC Microbiology* , 2011 , 11 (1) : 174.
- [21] Johnson-Boaz R , Chang CY , Young R. A dominant mutation in the bacteriophage lambda S gene causes premature lysis and an absolute defective plating phenotype. *Molecular Microbiology* , 1994 , 13 (3) : 495-504.
- [22] Agu CA , Klein R , Lengler J , Schilcher F , Gregor W , Peterbauer T , Bläsi U , Salmons B , Günzburg WH , Hohenadl C. Bacteriophage-encoded toxins: the lambda-holin protein causes caspase-independent non-apoptotic cell death of eukaryotic cells. *Cellular Microbiology* , 2007 , 9 (7) : 1753-1765.
- [23] Agu CA , Klein R , Schwab S , König-Schuster M , Kodajova P , Ausserlechner M , Binishofer B , Bläsi U , Salmons B , Günzburg WH , Hohenadl C. The cytotoxic activity of the bacteriophage lambda-holin protein reduces tumour growth rates in mammary cancer cell xenograft models. *The Journal of Gene Medicine* , 2006 , 8 (2) : 229-241.
- [24] Anthony T , Chellappa GS , Rajesh T , Gunasekaran P. Functional analysis of a putative holin-like peptide-coding gene in the genome of *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Archives of Microbiology* , 2010 , 192 (1) : 51-56.
- [25] Dewey JS , Struck DK , Young R. Thiol protection in membrane protein purifications: a study with phage holins. *Analytical Biochemistry* , 2009 , 390 (2) : 221-223.
- [26] Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* , 2010 , 300 (6) : 357-362.

Current advance in the topological structure and function of holin encoded by bacteriophage Lambda—A review

Yibo Shi Jianhe Sun*

School of Agriculture and Biology , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200240 , China

Abstract: The holin-lysin two-step lysis system widely exists in double stranded DNA bacteriophages for the release of progeny bacteriophage from an infected bacterial cell at the final stage of phage infection. Lambda bacteriophage is a prototype for studying holin. The S gene in Lambda bacteriophage has a dual-start motif and encodes holin S105 and antiholin S107. Here , we reviewed the progress in topological structure of holin from Lambda bacteriophage and its formation of membrane lethal holes. We also discussed the potential of the holin in the control of bacterial infection.

Keywords: Lambda bacteriophage , holin , antiholin , lysis trigger

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation (31172381)

* Corresponding author. Tel: +86-21-34206926; Fax: +86-21-64799604; E-mail: sunjhe@sjtu.edu.cn

Received: 7 September 2011 / Revised: 14 November 2011