

细菌抗砷特性研究进展

徐海岩 颜望明

(山东大学微生物系, 济南 250100)

砷化物(本文主要指砷酸盐、亚砷酸盐)曾被用作抗菌剂、饲料添加剂和除莠剂,但是,随着人们对重金属盐认识的不断深入,砷化物对于人和动物体的毒害作用也日益被人们所重视,因而对其使用愈加限制。砷化物对细菌的毒害作用,主要是因为砷酸盐是磷酸盐的类似物,可被细菌的磷酸盐转移系统所转移^[1],干扰细胞内磷酸化中间体的形成,使细菌表现出“磷酸盐饥饿”的症状^[2]。亚砷酸盐比砷酸盐毒性更大,因为它可与蛋白质的巯基作用,使酶失活^[3]。但是,某些细菌却具有抵抗砷化物的能力,可在较高浓度的砷酸盐、亚砷酸盐环境中生长,这一特性引起了人们的极大兴趣。

长期以来,许多学者对细菌的抗砷机理进行了大量的研究,在生理代谢方面提出了许多假设和解释。一般认为,细菌之所以能抗砷是由于细菌细胞经过诱导后,能够减少砷化物在体内的累积,即能专一性地排出砷化物,从而保证了磷酸盐转移系统正常地发挥作用,避免了细菌出现“磷酸盐饥饿”症状,使自身免于毒害作用。但这些解释并未从根本上对细菌的抗砷机理进行阐明,原因在于细菌的抗砷机理是非常复杂的,既有生理上的因素,也有遗传方面的影响。60年代以来,随着分子遗传学和重组DNA技术的不断发展,人们对细菌的抗砷机理也有了进一步的认识。本文仅就近几十年对细菌抗砷研究的进展情况作一简单介绍。

1 细菌抗砷研究的回顾与现状

1968年,Novick等人对金黄色葡萄球菌进行的研究表明,该菌的砷抗性与三个质粒(现已知是 pI258, pI147 和 pI524)有关,决定砷酸盐和亚砷酸盐抗性的遗传决定子是相互独立

的^[4]。1973年,Hedges等人在大肠杆菌中发现质粒 R773 对砷酸盐和亚砷酸盐具有抗性^[5]。他们的工作证明了在革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中决定砷抗性的是质粒,为从分子和基因水平上了解细菌抗砷机理打下了基础。1981年, Silver 等人发现大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的砷抗性是可诱导的,砷酸盐、亚砷酸盐和亚碲酸盐都可作为诱导物,另外还发现,抗性质粒的存在,不改变大肠杆菌已有的磷酸盐吸收系统,表明抗性质粒提供了一个专一性的砷酸盐转移系统^[6]。1982年, Silver 和 Keach 以及 Mobley 和 Rosen 都证明了在大肠杆菌中,由质粒控制的对于砷酸盐、亚砷酸盐和亚碲酸盐的抗性包括一个初级的含氧阴离子泵的作用,该作用不依赖电化学的质子梯度,而是利用细胞内的 ATP 作为阴离子转移的直接化学能^[7,8]。1983年, Mobley 等首先将大肠杆菌质粒 R773 上的 4.3kb 抗砷片段克隆到质粒 pBR322 中,得到一个重组抗砷的质粒 pUM3,证明了在大肠杆菌中决定抗砷特性的是一个单一基因簇编码的含氧阴离子转移系统,此基因簇位于 91kb 的抗性质粒 R773 上^[9],称为 *ars* 操纵元^[9],该操纵元可被元素周期表第 V 族元素的含氧阴离子诱导。Chen 等 1986 年和 San Francisco 等 1990 年分别对大肠杆菌 *ars* 操纵元进行了序列分析,证明了该操纵元含有四个基因,分别命名为 *arsR*, *arsA*, *arsB*, *arsC* 基因^[10,11]。1992年, Ji 和 Silver 将含有抗砷决定子的金黄色葡萄球菌质粒 pI258 以两种方向克隆到质粒 pSK265 中,得到质粒 pGJ101 和

pGJ102, 这两个质粒都表现出了与 p1258 相同的抗砷酸盐、亚砷酸盐和亚锑酸盐的特性, 说明砷抗性与 pSK265 的阅读框架 (ORF) 方向无关。另外, 他们将 p1258 克隆到质粒 pUC19 的 LacZ 基因位点中, 得到一个新的抗性质粒 pGJ103, 将该质粒转入大肠杆菌中, 发现转化子对砷酸盐和锑酸盐有较低水平的抗性, 对亚砷酸盐则有较强的抗性, 说明葡萄球菌的抗砷决定子能够在大肠杆菌中发挥作用。通过对 p1258 的序列分析, 他们证明了在 p1258 中, 决定砷抗性的主要是三个基因: *arsR*、*arsB*、*arsC*^[12]。从以上实验结果可以看出, 大肠杆菌的 *ars* 操纵元与金黄色葡萄球菌的 *ars* 操纵元在结构上是不完全相同的。在金黄色葡萄球菌中, 与大肠杆菌 *arsA* 基因同源的基因是缺失的, *arsR* 基因与 *arsB* 基因直接相连^[12]。但这两种菌的抗砷过程是非常相似的, 都是由 *arsR* 基因编码的阻遏蛋白 ArsR 调控的。关于这两种菌的 *ars* 操纵元结构示意图见图 1。

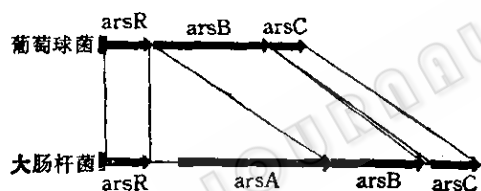


图 1 葡萄球菌和大肠杆菌 *ars* 操纵元结构示意图^[12]

2 ArsR 蛋白的特性

利用启动子探测载体, 从质粒 R773 上克隆到的 727bp 的 EcoRI-HindIII 片段与 *ars* 操纵元的抗砷调控有关^[13], 这一片段包含了 *arsR* 基因, 其基因产物 ArsR 蛋白经证明是一种反式作用调节蛋白^[13], 分子量为 13kD, 尽管它必须结合到 DNA 的操纵部位才能发挥作用, 但未发现有可识别的 DNA 结合位点。另外, 质粒 R773 的砷抗性是诱导型的, 而重组质粒 pUM3 的砷抗性则是组成型的, 这说明在 pUM3 中, 起调控作用的 *arsR* 基因是缺失的, 现证明, 在 pUM3 中, 操纵元结构基因的表达是依靠质粒 pBR322 的 P_i 启动子的^[9]。令人

感兴趣的是, 菌体抗砷的快速调控是通过许多不同的含氧阴离子进行的, 这些阴离子包括砷酸盐 (AsO_4^{3-})、亚砷酸盐 (AsO_2^{1-}) 和亚锑酸盐 (SbO_2^{1-}) 等^[12]。利用 *arsR* 基因与 β -内酰胺酶基因 (*blaM*) 的融合实验发现, β -内酰胺酶在靠近 ArsR 蛋白 (共 117 个残基) 的 C 末端 (102 或 105 残基处) 融合形成的嵌合蛋白保持了 ArsR 的调节活性, 因此, 基因的表达是诱导型的; 而在靠近 N-末端 (10—83 残基处) 融合形成的嵌合蛋白则失去了调节作用, 基因的表达是组成型的。但当 *arsR* 基因与这些组成型融合子在一起以反式方式表达时, 其调节活性仍能保持。现已搞清, *arsR* 基因的下游 DNA 序列对于调节不是必需的^[14]。综上所述可以得出结论, *arsR* 的表达是自动调节的, 在没有砷诱导物存在时, ArsR 蛋白抑制表达, 而当诱导物存在时, 表达可顺利进行, 因此, 尽管 ArsR 蛋白较小, 又明显地缺乏 DNA 结合位点, 但 ArsR 蛋白确是一种反式作用抑制物。

3 ArsA 蛋白的结构与作用

由 *arsA* 基因编码的 ArsA 蛋白已被纯化, 是一种外周膜蛋白^[14], 并经证明是一种可被含氧阴离子激活的 ATP 酶^[15], 严格要求亚砷酸盐或亚锑酸盐为其底物, 其余的含氧阴离子, 如砷酸盐或磷酸盐都不能替代^[16]。ArsA 蛋白是一个 63kD 的蛋白质分子, 其 N-、C-末端相互间表现出同源性, 这是基因在进化过程中发生了复制和融合的结果^[10]。研究发现 ArsA 蛋白不同于以往发现的离子转移 ATP 酶, 因为对离子转移 ATP 酶有抑制作用的物质, 对 ArsA 蛋白活性没有影响。目前看来, ATP 似乎是 ArsA 蛋白唯一的核苷酸底物, 而 GTP、UTP、CTP 或 ITP 的水解与 ATP 相比, 活性小于 15%^[16], 但 ArsA 对于 ATP 的结合和水解是两个不相关的部分。ArsA 与 ATP 结合时不需要含氧阴离子, 而 ArsA 以 ATP 酶形式发挥作用时, 则需要核苷酸和含氧阴离子。ArsA 蛋白同其它蛋白一样, 都可被蛋白酶降解, 在胰蛋白酶作用下, 首先形成一系列较小的片段, 然后这些片段在很短时间内被降解掉^[16]。

但这种作用是受 ArsA 蛋白底物影响的。当亚砷酸盐单独存在时,胰蛋白酶可将 ArsA 降解,说明 ArsA 与含氧阴离子底物结合时,其表面构象保持相对的稳定;当 ATP 单独存在时,胰蛋白酶对 ArsA 只有部分降解作用,说明 ArsA 结合核苷酸底物后,其表面构象发生了变化,不利于蛋白酶的作用;当 ATP 和亚砷酸盐都存在时,ArsA 蛋白形成的酶维持其原来的状态,几乎完全不被胰蛋白酶降解,这说明该蛋白与阴离子和核苷酸结合的区域是不同的,而且单独与一种底物结合与二种底物同时结合时的表面构象也是完全不同的。现已搞清,由 ArsA 蛋白构成的具有催化能力的酶是由二个 63 kD ArsA 蛋白分子组成的二聚体。通常,ArsA 是以单聚体和二聚体混合的状态存在的,单聚体可聚合成二聚体,二聚体也可解聚成单聚体,二者维持着一种动态平衡,当加入阴离子后,这种平衡即被打破,向着形成二聚体的方向进行。所以阴离子在催化过程中的一个作用就是诱导形成二聚体。研究结果证明,ArsA 蛋白的每一个单聚体上有二个内在的核苷酸结合部位(在二聚体上有四个),尽管这二个部位相互间很相似,但它们不是等同的,功能也有差别。但是这二个部位都有催化作用,或它们相互间发生作用,现在还不很清楚^[2]。

arsA 基因是目前仅在大肠杆菌中发现的抗砷结构基因,它与 arsR 基因之间间隔着一段 430bp 的核苷酸序列。但在金黄色葡萄球菌中,arsA 基因是缺失的,而其砷化物排出系统也是依赖能量的。那么能量的来源是什么呢?对此,大致有二种可能性。其一,葡萄球菌的排出系统中含有由染色体基因编码的 ATP 酶亚单位,水解 ATP 以供给排出系统所需的能量;其二,由不同的系统(如质子动力)供给必需的能量,但二者都没有被证实。实验表明,葡萄球菌的 ars 操纵元在大肠杆菌中和在葡萄球菌中抗亚砷酸盐的浓度大致相等,但在大肠杆菌中未检测出砷酸盐抗性^[17]。

4 arsB 基因的表达特点及 ArsB 蛋白的作用

arsB 基因是大肠杆菌和葡萄球菌所共有的,由 arsB 基因编码的 ArsB 蛋白,分子量为 45.5kD,它在大肠杆菌和葡萄球菌中大小是基本相同的,其整体氨基酸组成的相似性达 58%^[17]。初步证明,arsB 基因产物是一个整合到膜上的蛋白,位于大肠杆菌膜内侧^[18]。arsB 基因的表达不依赖该基因的剂量,砷化物的排出和抗性是受位于膜上的 ArsB 蛋白的量限制的。ArsA 蛋白存在于胞质中,当有 ArsB 蛋白存在时,ArsA 蛋白通过 ArsB 蛋白与膜内侧结合(在膜外侧未发现 ArsA 蛋白),构成了膜结合的 ATP 酶,催化含氧阴离子的转移。已证明,ArsA 蛋白与膜内侧的结合需要完整的 ArsB 蛋白,这意味着这两个基因产物间有相互作用,但由于种种原因,证明这种相互作用还缺乏一种直接的方法。在缺失 arsA 基因的菌株中,其 ArsB 蛋白仍可以其功能形式插入到膜中。研究发现,不管是以复合体形式从细胞中分离得到的与膜结合的 ArsA 蛋白,还是在体外结合到分离的膜上的 ArsA 蛋白,都具有含氧阴离子激活的 ATP 酶活性,该活性与可溶状态下的 ArsA 蛋白是相近的。这些结果说明,arsB 基因的表达对于 ArsA 蛋白与膜内侧的结合是必不可少的,从而证实了膜组分 ArsB 蛋白起着将 ArsA 蛋白固定在膜上的作用这一假设^[14]。

arsB 基因表达不良会限制抗砷的水平。尽管所有的 ars 基因都包含在同一个多顺反子操纵元中,但它们的表达是有差别的,ArsA 和 ArsC 蛋白是大量产生的,是与操纵元中质粒的拷贝数成正相关的。虽然 arsC 基因位于 arsB 基因的下流,但 ArsB 蛋白的量却与 ArsA 和 ArsC 蛋白的量相差甚大。那么是什么原因限制了 ArsB 蛋白的量呢?通过 ars mRNA 的 Northern 分析证明,ars 操纵元首先转录成为一个总长 4,400 核苷酸的 RNA^[19],然后再迅速裂解为两个较小的片段,一个为 2,700 核苷酸,其中包含有 arsR 和 arsA 序列,另一个为 500 核苷酸,包含有 arsC 序列,而裂解部位恰在 arsB 序列内。4,400 核苷酸转录物的半衰期小

于 4min, 而 2,700 和 500 核苷酸转录物的半衰期大约为 10min. 对 *arsB* 翻译起始区域的分析表明, 由于其结构的特殊性, 所以, 当转录开始时, 只会有相当少的核糖体结合在上面, 因而易于受核酸内切酶的作用。因此, 低效的翻译起始再加上 *arsB* 信息的迅速损失, 便导致了该蛋白的产量较少, 这或许是细胞避免膜蛋白基因的过分表达所形成的普遍机制^[2]。

5 ArsC 蛋白的作用

通过含氧阴离子泵而产生的砷化物的抗性(和转移)除需要 *arsA* 和 *arsB* 基因产物外, 还需要 *arsC* 基因产物。*arsC* 基因是 *ars* 操纵元中最小的结构基因, 其转录产物 ArsC 蛋白为可溶性的, 分子量为 15.8kD, 位于胞质中。研究发现, ArsA 和 ArsB 蛋白对于砷酸盐和亚砷酸盐的抗性是必需的, 而 ArsC 蛋白对于亚砷酸盐的抗性和转移并非必需, 但对于砷酸盐的抗性和转移则是必不可少的。这意味着 ArsC 蛋白肯定是以某种方式参与了 ArsA 和 ArsB 蛋白的催化过程^[10]。Ji 等人的试验证明, ArsC 在其它 *ars* 操纵元基因产物缺失的情况下, 能将砷酸盐还原为亚砷酸盐, 后者被 ArsB 蛋白运出细胞。无细胞提取物的还原检测显示, 还原性的硫化物——二硫苏糖醇 (DTT) 可以强烈地刺激依赖 ArsC 的砷酸盐还原反应。纯化的 ArsC 蛋白在加入 DTT 和硫氧还蛋白时, 可将砷酸盐还原为亚砷酸盐, 是一种砷酸盐还原酶, 该酶活性存在于胞质中, 而不在膜结合的部分或周质中。至于砷酸盐是以何种机制与能量相偶联, 目前尚缺乏足够的证据。大肠杆菌的含氧阴离子泵可以归纳为图 2。

综上所述, 对大肠杆菌和葡萄球菌的某些菌种中的抗砷操纵元, 进行的基因克隆、序列分析等一系列研究, 虽然在很大程度上揭示了细菌抗砷的本质, 但仍有许多问题有待于解决, 如亚砷酸盐和亚砷酸盐是通过什么途径进入到细胞中的等, 尚需要进一步研究和探索。

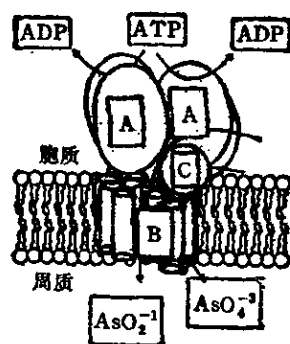


图 2 大肠杆菌的含氧阴离子泵示意图^[21]

参考文献

- [1] Willsky G R, Malamy M H. *J Bacteriol*, 1981, 144:366—374.
- [2] Kaur P, Rosen B P. *Plasmid*, 1992, 27:29—40.
- [3] Knowles F C, Benson A A. *Trends Biochem Sci*, 1983, 8: 178—180.
- [4] Novick R P, Roth C. *J Bacteriol*, 1968, 95:1335—1342.
- [5] Hedges R W, baumberg S. *J Bacteriol*, 1973, 115:459—460.
- [6] Silver S, Budd K, Leahy K M, *et al.* *J Bacteriol*, 1981, 146:983—996.
- [7] Silver S, Keach D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 6114—6118.
- [8] Mobley H L T, Rosen B P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 6119—6122.
- [9] Mobley H L T, Chen CM, Silver S, *et al.* *Mol. Gen Genet*, 1983, 191: 421—426.
- [10] Chen C M, Misra T, Silver S. *J Biol Chem*, 1986, 261:15030—15038.
- [11] San Francisco M J D, Hope C L, Owolabi J B, *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1990, 18:619—624.
- [12] Ji G Y, Silver S. *J Bacteriol*, 1992, 174: 3684—3694.
- [13] Wu J, Rosen B. P. *Mol Microbiol*, 1991, 5(6): 1331—1336.
- [14] Tisa L S, Rosen B P. *J Biol Chem*, 1990, 265: 190—194.
- [15] Rosen B P, Weigel U, Karkaria C, *et al.* *J Biol Chem*, 1988, 263: 3067—3070.
- [16] Hsu C M, Rosen B P. *J Biol Chem*, 1989, 264: 17349—17354.
- [17] Rosentein R, Peschel A, Wiclan B, *et al.* *J Bacteriol*, 1992, 174(11):3676—3683.
- [18] San Francisco M J D, Tisa L, Rosen B P. *Mol Microbiol*, 3: 15—21.
- [19] Owolabi J B, Rosen B P. *J Bacteriol*, 1990, 172: 2367—2371.
- [20] Ji G Y, Silver S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9474—9478.