

DOI:10.13350/j.cjpb.180522

• 综述 •

## 分枝杆菌噬菌体裂解系统及其相关蛋白的研究进展\*

孙伟力, 王国英, 刘子正, 滕铁山\*\*

(河南大学基础医学院, 医学生物信息学研究所, 河南开封 475004)

**【摘要】** 噬菌体进化出多种裂解系统, 以裂解宿主菌的细胞壁来释放子代噬菌体, 并进行下一轮感染。与常见的 Endolysin-Holin 裂解系统不同, 分枝杆菌噬菌体裂解系统由 LysinA、LysinB 及 Holin 蛋白组成。分枝杆菌具有特殊的细胞壁结构, 其具有非典型的 A1 $\gamma$  型肽聚糖, 且在肽聚糖外有一层致密的分枝菌酸。LysinA 可以裂解宿主菌的肽聚糖层; LysinB 具有酯酶活性, 裂解分枝菌酸与阿拉伯半乳糖之间的共价键——分枝酰阿拉伯半乳糖苷键; 而 Holin 蛋白属于小分子极性跨膜蛋白, 可在细胞膜形成稳定的跨膜孔。在噬菌体感染晚期, LysinA 及 LysinB 蛋白正是通过此孔到达细胞壁发挥作用。与其他革兰阳性菌噬菌体不同, 外源添加 LysinA/LysinB 不能有效裂解其宿主菌。本文综述了分枝杆菌噬菌体裂解系统相关蛋白的研究进展, 并着重介绍了 LysinA 蛋白的保守的结构域, 以期分枝杆菌噬菌体及其相关蛋白的研究与临床应用带来新思路。

**【关键词】** 分枝杆菌噬菌体; 裂解系统; 噬菌体裂解酶; 综述

**【中图分类号】** R378.911

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2018)05-0547-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2018 May; 13(5): 547-552.]

### Advances in the study of mycobacteriophage lysis cassettes and their related proteins

SUN Wei-li, WANG Guo-ying, LIU Zi-zheng, TENG Tie-shan (Institute of Biomedical Informatics, Medical School, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China)

**【Abstract】** Bacteriophage has evolved a variety of lysis systems to digest the bacterial cell wall in order to release progeny phages and carry out the next round of infection. Unlike the common endolysin-holin system, the lysis system of mycobacteriophages consists of LysinA, LysinB, and Holin proteins. The cell wall structure of a mycobacterium contains atypical A1  $\gamma$  type peptidoglycan and a mycolic acid-rich outer membrane covalently attached to the arabinogalactan-peptidoglycan complex. Lysin A hydrolyzes peptidoglycan, and Lysin B, a novel mycolylarabinogalactan esterase, cleaves the mycolylarabinogalactan bond to release free mycolic acids. Holins are small molecular transmembrane proteins that control the length of the infective cycle and are associated with a collapse of the membrane potential and permeabilization of the membrane. This allows LysinA and LysinB proteins to gain access to the membrane's substrate, the cell wall, immediately resulting in destruction of murein and bursting of the cell. Addition of exogenous LysinA/LysinB does not result in the lysis of mycobacteria as it does with Gram-positive bacteria. This paper reviews advances in the study of proteins related to the mycobacteriophage lysis system, with an emphasis on the conserved domain of the LysinA protein. This paper will provide new ideas for research on and clinical use of mycobacteriophages and their related proteins.

**【Key words】** Mycobacteriophage; lysis cassettes; lysin; review

\*\*\*结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 是结核病 (tuberculosis, TB) 的病原菌。传统药物在治疗多耐药结核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)、广泛耐药结核病 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)、全耐药的结核病 (totally drug-resistant tuberculosis, TDR-TB) 及与 HIV 共感染的结核病患者时不能取得较好的效果<sup>[1]</sup>。控制结核病需要在传统治疗的基础上另辟蹊径, 发展新型且与现存药物没有交叉抗性的抗结核药物迫在眉睫。噬菌体 (Bacteriophage) 是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的特异性病毒。噬菌体用于抗菌治疗和预防诊断的研究有较长的历史, 在抗生素被广泛使用之前, 噬菌体就被设想用作治疗细菌感染<sup>[2]</sup>。近年来, 随着病原菌不断对抗生素产生耐药性, 特别是“超级细菌”的出现, 使得噬菌体重新进入了研究人员的视野<sup>[3]</sup>。

据 Actinobacteriophage Database (<http://phagesdb.org/>)

记录, 以耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) mc2 155 为宿主分离到的噬菌体共有 8 138 株, 其中已全基因组测序的有 1 201 株。这些噬菌体核酸类型属于双链 DNA, 形态学上都属于有尾噬菌体, 其裂解系统由 LysinA、LysinB 及 Holin 组成。LysinA 可以裂解宿主菌的肽聚糖层, 大部分 LysinA 有三个保守的结构域, 分别为 C 末端的细胞壁结合结构域、中间的肽聚糖水解酶结构域及 N 末端的肽酶结构域。LysinB 具有酯酶活性, 裂解分枝菌酸与阿拉伯半乳糖之间的共价键——分枝酰

\* **【基金项目】** 河南省高等学校重点科研项目 (No. 17A310015)。

\*\* **【通讯作者】** 滕铁山, E-mail: xiaoshan1220@163.com

**【作者简介】** 孙伟力 (1959—), 男, 河南开封, 本科, 助理实验师, 主要从事病原生物学研究。E-mail: kfswl@163.com

阿拉伯半乳糖苷键(图1)。Holin能控制噬菌体的感染周期,调节细菌裂解的时间,是噬菌体的“时钟”。分枝杆菌噬菌体的裂解系统与革兰阴性菌及阳性菌都有显著不同,分析其裂

解系统相关蛋白的活性机制,有助于提高对分枝杆菌噬菌体的研究及相关临床应用。

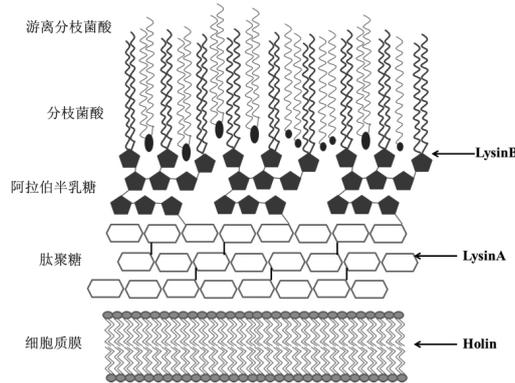


图1 分枝杆菌细胞壁结构  
Fig. 1 The structure of mycobacterial cell wall

### 1 噬菌体裂解系统的一般特征

按照噬菌体裂解宿主时是否需要裂解酶,噬菌体裂解系统可分为两类:(1)单链DNA噬菌体(如丝状噬菌体 $\phi$ X174)<sup>[4]</sup>或单链RNA噬菌体(如MS2)<sup>[5]</sup>等小噬菌体不依赖裂解酶的裂解系统,其可抑制宿主的细胞壁合成酶并以独特的出芽方式释放子代噬菌体;(2)双链DNA噬菌体依赖裂解酶的裂解系统,其一般包括两种蛋白,即细胞壁裂解酶(Lysin)和穿孔素蛋白(或称穴蛋白,Holin),两者在宿主菌内部裂解细菌并释放其子代噬菌体<sup>[6]</sup>。噬菌体裂解酶是双链DNA噬菌体表达的一类肽聚糖水解酶,在感染宿主后期合成并以无活性形式存在于胞质中,在Holin蛋白协助下穿过细胞膜孔洞,进而抵达细胞壁上的肽聚糖靶点,然后对其进行切割水解,帮助子代噬菌体释放到胞外。Holin蛋白的作用是通过在细胞膜上形成低聚物对细胞膜进行穿孔,改变宿主细菌细胞膜的通透性,类似信号肽的功能<sup>[7-8]</sup>。部分双链DNA噬菌体基因组中未发现holin基因,但其裂解酶具有Sec分泌系统信号肽<sup>[9]</sup>或信号锚定释放序列(signal arrest release,SAR)<sup>[10]</sup>,这种裂解酶可不依赖Holin蛋白独立分泌至胞膜外<sup>[11]</sup>。

革兰阳性菌与革兰阴性菌噬菌体裂解系统也有区别。革兰阳性菌细胞壁主要成分为肽聚糖结构,异源表达噬菌体裂解酶,可以从胞外直接裂解革兰阳性菌的细胞壁<sup>[12]</sup>。另外,革兰阳性细菌噬菌体编码的裂解酶在结构上为模块结构,由结合区域(Cell wall binding domain,CBD)和催化裂解区域(Catalytic domain,CD)构成,这种结构特征使得裂解酶可以通过遗传工程手段进行“结构域交换”形成“嵌合蛋白”来改变裂解酶活性或者裂解谱<sup>[13]</sup>。而革兰阴性菌细胞壁的主要成是较厚的脂多糖等,其噬菌体裂解酶为单一的球状结构,一般不能直接从胞外裂解革兰阴性菌。因此,革兰阴性细菌是噬菌体裂解酶应用的一个重大挑战。有趣的是,几乎所有的革兰阴性细菌的噬菌体中都编码有Rz/Rz1蛋白<sup>[14]</sup>,推断由于阴性菌细胞壁外膜的存在,噬菌体即使能够在Lysin-Holin的作用下裂解细胞壁中的肽聚糖层,但细胞壁外膜的存在也不利于子代噬菌体的释放,而具有内肽酶活性的Rz/Rz1蛋白可攻击外膜上的胞质和脂蛋白之间的寡肽连接键来协助子代噬菌体的快速释

放<sup>[15]</sup>。

虽然分枝杆菌属于革兰阳性菌,但其细胞壁结构比较特殊,既有类似阳性菌的较厚的肽聚糖结构,又有类似阴性菌的细胞壁外膜,其外膜主要成分为分枝菌酸(图1)。分枝杆菌噬菌体的裂解系统与革兰阳性菌及阴性菌也有显著差异,其主要有LysinA、LysinB及Holin蛋白构成。本文综述了分枝杆菌独特裂解系统及其相关蛋白的活性机制,以为分枝杆菌噬菌体及其相关蛋白的研究提供新的思路。

### 2 分枝杆菌噬菌体裂解系统-LysinA蛋白

分枝杆菌噬菌体LysinA蛋白的功能,类似于其他噬菌体中的Lysin蛋白,具有肽聚糖水解酶活性。LysinA蛋白对于分枝杆菌噬菌体的生命周期是不可或缺的,同源重组缺失lysinA基因会导致噬菌体不能裂解宿主菌,进而无法形成噬菌斑。此外,分枝杆菌噬菌体编码的LysinA蛋白还具有一些特殊的活性机制及保守结构域。

首先,Ms6等F1家族的分枝杆菌噬菌体,其基因组可编码伴侣蛋白Gp1。Gp1属于可分泌型的伴侣蛋白,与LysinA的N末端结合并协助其到达胞质环境,使其发挥更好的肽聚糖水解作用<sup>[16-17]</sup>。在Ms6基因组中,gp1紧邻lysinA并位于其上游,同源重组方法缺失gp1,可导致Ms6不能正常裂解宿主菌。在*E. coli*中共表达lysinA/holin,不能裂解*E. coli*,而lysinA/gp1共表达却可以裂解宿主菌*E. coli*,表明即使没有Holin的存在,Gp1仍可以与LysinA结合,并将其运输到其作用靶标—肽聚糖。除分枝杆菌噬菌体外,高温噬菌体TSP4也编码有分子伴侣蛋白-CPN47,后者可以提高噬菌体裂解酶的活性<sup>[18]</sup>。分子伴侣是一类在进化上十分保守的蛋白家族,它们能催化不同蛋白质形成特定构象,对于蛋白质功能的正常发挥具有十分重要的作用。噬菌体的分子伴侣系统相对简单,这种“简化版”的分子伴侣系统有望作为一种系统模型,对高等真核生物分子伴侣系统的研究做出重要贡献<sup>[19]</sup>。其次,部分F1家族的分枝杆菌噬菌体基因组中具有两个LysinA的编码基因,其编码蛋白长度分别为384

个氨基酸与241个氨基酸,LysinA241完全包含在LysinA384的基因编码框内<sup>[20]</sup>,且二者具有共同的核糖体结合位

点。与野生噬菌体相比,  $\Delta$ LysinA241 噬菌体感染潜伏期延长 30 min, 且裂解期子代噬菌体数量也显著减少, 表明 LysinA241 的缺失导致噬菌体释放的延迟。另外,  $\Delta$ LysinA384 噬菌体侵染宿主后, 其形成噬菌斑的直径显著小于野生株噬菌体, 表明 LysinA384 对子代噬菌体的释放更为重要。上述结果表明两个裂解酶都具有肽聚糖水解酶活性, 对噬菌体的正常功能都不可或缺。但一个 lysinA 基因编码两种 LysinA 蛋白, 证明 lysinA 基因存在镶嵌结构, 这种镶嵌结构在分枝杆菌噬菌体基因组中广泛存在<sup>[21]</sup>, 表明分枝杆菌噬菌体基因组之间共享某些基因, 并在进化上发生了基因的水平转移<sup>[22]</sup>。

第三, 一般噬菌体 Lysin 蛋白只包含两个裂解酶结构域—

一催化结构域和细胞壁结合结构域<sup>[23]</sup>。但 90% 以上的分枝杆菌噬菌体 LysinA 蛋白包含三个保守结构域, 分别是: C 末端的细胞壁结合结构域、中间的催化结构域(常见为糖苷水解酶, 如溶菌酶与糖基转移酶)及 N 末端的肽酶结构域<sup>[24]</sup>。且分枝杆菌噬菌体 LysinA 的肽酶结构域与其他噬菌体 Lysin 蛋白没有同源关系, 表明分枝杆菌肽聚糖具有独特的内肽链接。HH-pred 预测分析显示<sup>[25]</sup>: 分枝杆菌噬菌体 LysinA 共包含 5 个不同的肽酶结构域、5 个酰胺酶/糖苷酶结构域及 4 个保守的 C 末端细胞壁结合结构域(表 1)<sup>[26]</sup>。下面将详述几种结构域的类型。

表 1 分枝杆菌噬菌体 LysinA 蛋白的结构域类型  
Table 1 Features of the putative mycobacteriophage LysinA domains

结构域 Domain	活性推测 Putative Activity	切割/结合位点 Cleavage / binding site	分枝杆菌噬菌体举例 Mycobacteriophage example	参考文献 Ref.
GH25	glycoside hydrolase	N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase	Mycobacteriophage Myrna	[31]
GH19	glycoside hydrolase	N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase	Mycobacteriophage D29	[32]
TRANG	Transglycosylase	N-acetyl- $\beta$ -D-muramidase	Mycobacteriophage Blue7	[33]
Ami-2A	Amidase	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Mycobacteriophage Tweety	[34]
Ami-2B	Amidase	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Mycobacteriophage Corndog	[34]
PET-M15-4	peptidase	m-DAP-m-DAP endopeptidase	Mycobacteriophage Timshel	[26]
PET-M23	peptidase	m-DAP-m-DAP endopeptidase/ D-Ala-m-DAP (DD) endopeptidase	Mycobacteriophage Giles	[35]
PET-C39-2	peptidase	c-D-glutamyl-m-diaminopimelic acid peptidase	Mycobacteriophage Phlei	[26]
NLPC-P60	peptidase	c-D-glutamyl-m-diaminopimelic acid (DL) peptidase	Mycobacteriophage Dori	[36]
NLPD	peptidases	unknown	Mycobacteriophage Timshel	[37]
PG-1	CBD	Peptidoglycan-binding	Mycobacteriophage Hertubise	[38]
LYSM	CBD	recognizes the N-acetylglucosamine	Mycobacteriophage Corndog	[39]
LGFP	CBD	unknown	Mycobacteriophage Barnyard	[40]
CPL7	CBD	unknown	Mycobacteriophages Optimus	[41]

(1) 糖苷酶: 噬菌体的糖苷酶包括  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(简称糖苷酶)与  $\beta$ -N-乙酰胞壁酸酶(简称胞壁酸酶, 图 2)。分枝杆菌噬菌体 LysinA 中包含两个糖苷水解酶-GH25 和 GH19。GH25 在革兰阳性菌噬菌体的裂解酶中比较常见, 如来源于芽孢杆菌、葡萄球菌及链球菌的噬菌体。GH19 在噬菌体裂解酶中并不常见, 除分枝杆菌及棒状杆菌噬菌体外, 存在 GH19 结构域的裂解酶只存在于革兰阴性菌的噬菌体裂解酶中, 且主要是在假单胞菌噬菌体中存在。胞壁酸酶包括糖基转移酶(Transglycosylase, TG)与溶菌酶的活性。分枝杆菌噬菌体中只有 A 家族的 LysinA 中存在糖基转移酶, 除了分枝杆菌噬菌体外, 包含 TG 结构域的噬菌体 Lysin 主要存在于革兰阴性菌噬菌体中, 如  $\lambda$ R 裂解酶及 T7 噬菌体裂解酶等都包含 TG 结构域<sup>[27]</sup>。

(2) 酰胺酶 (Amidase, AMI): 也称作 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酶(图 2), 可以切割多肽与糖骨架之间的酰胺键, 造成聚糖结构与肽链之间的分离, 是降解肽聚糖结构的最有效方法。在细菌分裂及肽聚糖重塑时, 酰胺酶发挥重要作用。许多噬菌体的裂解酶也广泛存在酰胺酶。噬菌体酰胺酶主要由 AMI-2, AMI-3, AMI-5 和 AMI02-C 类型的结构域组成, 而在分枝杆菌噬菌体裂解酶中只存在 AMI-2 结构域, 且存在两个进化分支, 分别为酰胺酶-2A 和酰胺酶-2B, 前者比后者更常见。

(3) 肽酶: 分枝杆菌噬菌体 LysinA 共有五种类型肽酶结构域: PET-M15-4、PET-M23、PET-C39-2、NLPC-P60 及 NLPD。

PET-M23 是最早鉴定的肽酶结构域(pfam01551), 属于锌离子金属蛋白酶的一种, 可切割 D-Ala 与 m-DAP(4R3)之间的内肽键。有趣的是, 来源白细胞的趋化因子 2(LECT2)也具有 M23 肽酶结构域, 推测与肝细胞生长相关<sup>[28]</sup>。NLPC-P60 仅存在于阴性菌噬菌体裂解酶与分枝杆菌噬菌体裂解酶中, 切割 D-Glu 与 m-DAP 之间的肽键。结核菌中具有 NlpC / P60 结构域蛋白包括 Rv0024、Rv1477、Rv1478、Rv1566c 及 Rv2190c, 其功能涉及到结核菌的生长、发育、细胞分裂、细胞壁成熟以及毒力<sup>[29]</sup>。PET-C39-2 是首先在分枝杆菌 LysinA 蛋白中被鉴定, 属于半胱氨酸蛋白酶的一种, 可切割 D-Glu 与 m-DAP 之间的肽键, 主要存在于分枝杆菌噬菌体。PET-M15-4 显示切割 L-Ala 与 D-Glu 之间的肽键, 这个结构域在存在于分枝杆菌噬菌体和一些感染阴性菌的噬菌体中。NLPD 的切割位点还没有被研究, 其只存在于分枝杆菌噬菌体 Timshel 中。

(4) 细胞壁结合结构域: 分枝杆菌噬菌体 LysinA 蛋白共包含 4 个细胞壁结合结构域: PG-1、LysM、CPL-7 及 LGFP。PG-1 含有三个  $\alpha$  螺旋结构, 能识别肽聚糖中 D-Asn 肽桥。PG-1 主要存在于革兰阳性菌的噬菌体裂解酶, 大部分革兰阴性菌的细胞壁肽聚糖都属于 A1 $\gamma$  型, 而分枝杆菌细胞壁同样属于 A1 $\gamma$  型肽聚糖, 预测 PG-1 能特异识别 A1 $\gamma$  肽聚糖。LysM 结构域是一类古老且普遍存在的结构域, 广泛存在于细菌、真菌、植物、动物的蛋白质中, 但迄今为止还没有在古细菌中发现该结构域<sup>[30]</sup>。分枝杆菌噬菌体中的 LysM 只存在于 C1 家族中, 主

要识别肽聚糖的 N-乙酰葡萄糖胺结构。CPL-7 在噬菌体裂解酶中比较少见,只存在于分枝杆菌噬菌体 Optimus 与 Baka 中,其裂解酶结构域组合类型为 NLPC-P60/GH25/ Cpf7。LGFP 是一个在噬菌体中罕见的细胞壁结合结构域,其结构域共有 54 个氨基酸残基组成。分枝杆菌噬菌体中只有 Barnyard Gp39 的 C 末端含有三个串联重复的 LGFP。LGFP 与分枝杆菌 Ag85 蛋

白具有同源性。另外,结核菌蛋白 Rv3811 除含有 Ami2 结构域外,同时也具有 LGFP 重复序列。推测 LGFP 绑定的底物是分枝杆菌阿拉伯半乳糖链,后者与肽聚糖共价相连。在其他噬菌体中 LGFP 也不常见,仅在 Tsukamurella phage TPA2 中发现此序列的存在。

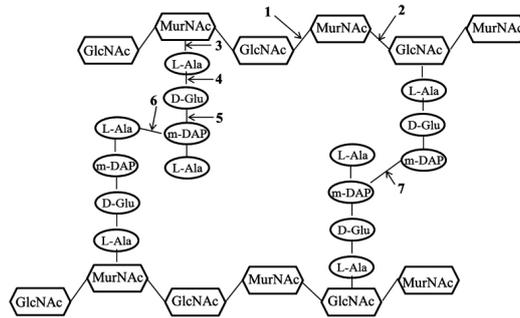


图 2 结核分枝杆菌细胞壁的 A1 $\gamma$  型肽聚糖结构  
Fig. 2 The A1 $\gamma$  peptidoglycan structure of *M. tuberculosis* cell wall

### 3 分枝杆菌噬菌体裂解系统-LysinB 蛋白

分枝杆菌属于一类特殊的革兰阳性菌,其细胞壁最外层不是常见的肽聚糖结构,而是富含分枝菌酸的脂质结构<sup>[42]</sup>。分枝菌酸是具有  $\alpha$ -烷基/ $\beta$ -羟基、长度为 C60-90 的脂肪酸。分枝菌酸对分枝杆菌的存活是必须的,它也是抗结核药物异烟肼的作用靶标<sup>[43]</sup>。在释放子代噬菌体时,分枝菌酸的存在对于单一裂解酶裂解系统 Lysin-Holin,是一个潜在的裂解障碍。LysinB 属于分枝酰阿拉伯半乳糖酯酶,切割分枝酰阿拉伯半乳糖键,释放分枝菌酸<sup>[44]</sup>。在其他非分枝杆菌噬菌体中未发现 LysinB 或其同源蛋白,表明 LysinB 蛋白为分枝杆菌噬菌体所特有。LysinB 被证明有脂肪酶活性并具有在丝氨酸酯酶中保守的 GX SXG 位点<sup>[45]</sup>。LysinB 被认为是在噬菌体裂解晚期,通过切割分枝杆菌外膜与细胞壁之间的化学键以彻底裂解宿主细胞。而同源重组缺失 lysinB 基因不会影响噬菌斑的形成,但  $\Delta$ lysinB 噬菌体形成噬菌斑直径显著小于野生株,表明 lysinB 基因的缺失显著影响噬菌体裂解周期与裂解效率。但有四个分枝杆菌噬菌体 Che12、Rosebush、Qyrzula 与 Myrna,其基因组缺少 lysinB 基因,但与  $\Delta$ lysinB 突变体具有较小的噬菌斑形态不同,此四种噬菌体也可形成大噬菌斑,推测此四种噬菌体可利用宿主细胞编码的几丁质酶,对细胞壁的分枝酰阿拉伯半乳糖苷键进行水解。另外,阿拉伯半乳糖-分枝菌酸结构在细菌中并不常见,其主要存在于放线菌属的棒状杆菌亚目中,包括棒状杆菌<sup>[46]</sup>、高尔迪氏菌<sup>[47]</sup>、红球菌<sup>[48]</sup>和分枝杆菌等<sup>[49]</sup>。除分枝杆菌噬菌体外,其他棒状杆菌亚目的细菌的噬菌体,如谷氨酸棒状杆菌的噬菌体 P2101 和黄色短杆菌的 BFK20,不编码 LysinB 蛋白或其类似蛋白,其具体裂解机制还待继续研究。

### 4 分枝杆菌噬菌体裂解系统-Holin 蛋白

Holin 蛋白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细菌裂解功能。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”,在噬菌体的裂解宿主菌的过程中扮演着关键角色。Ms6 基因组中 gp4 与 gp5 分别编码两个穿孔

素蛋白(Holin)-Gp4 和 Gp5,这两种蛋白质在程序化裂解宿主细胞时是不可或缺的。Gp4 属于 II 型 holin 蛋白,具有两个跨膜区(trans-membrane domain, TMD),且预测 Gp4 的 N 末端具有信号抑制释放序列(signal-arrest-release, SAR),这类类似于  $\lambda$  噬菌体的针眼穿孔素,是针眼穿孔素(pinholin)的典型特征。Gp5 具有单个 TMD 并带有高电荷性,且 C 端有亲水性结构域,Catalao 等<sup>[50]</sup>推测其具有 Holin 蛋白的特性。同源重组方法缺失基因 gp4 和 gp5,结果并不影响噬菌体侵染并裂解宿主。但 gp4 缺失显示可加速宿主细胞裂解,而 gp5 的删除延迟宿主细胞裂解,并形成较大噬菌斑。这表明与  $\lambda$  噬菌体的 Holin-Anti-holin 机制不同,Gp5 的功能不是作为 anti-holin 蛋白而存在。在宿主细胞裂解时,Gp4 与 Gp5 共同发挥作用,来协调宿主细胞。双 Holin 及双 LysinA 蛋白的存在赋予了噬菌体选择性优势,便于使噬菌体适应不同环境条件。

### 5 分枝杆菌噬菌体裂解酶与抗生素研发

结核分枝杆菌是引起结核病的病原菌。由于多重耐药性(Multidrug-resistant, MDR)与广泛耐药性(Extensively drug-resistant, XDR)结核菌、完全耐药结核菌(Total drug-resistant, TDR)及 HIV 共同感染的结核菌株的大量出现,给结核病的治疗带来了巨大困难<sup>[51-52]</sup>。噬菌体裂解系统中的裂解酶对病原菌,尤其是耐药性细菌,有良好的杀灭能力。与传统抗生素相比,裂解酶作为新型抗菌药物具有独特的优势,如较高的宿主特异性、高效的杀菌活性、较低的耐药性几率等<sup>[53-54]</sup>。然而外源添加噬菌体裂解酶 LysinA/LysinB,可以抑制耻垢分枝杆菌生长,但对处于潜伏期的分枝杆菌没有杀菌活性,而人体内结核菌主要以潜伏期的形式存在。推测原因是 LysinA 与 LysinB 的作用靶标都在分枝菌酸内部,而致密的分枝菌酸层具有高度的疏水性及不可渗透性,对蛋白分子进入分枝杆菌内造成障碍。将不同来源的催化功能域和细胞壁结合功能域进行组合,发展嵌合裂解酶,有望能克服分枝杆菌噬菌体裂解酶的使用障碍。

嵌合裂解酶可以克服天然裂解酶活力低、可溶性差及作用靶点单一等缺点,而且具有更多的功能、更适于耐药菌治疗。

嵌合裂解酶的设计和改造是今后裂解酶研发和运用的一种重要方向,也是裂解酶用于耐药菌控制和治疗最具有希望的增长点。分枝杆菌噬菌体 LysinA 具有多样化的活性结构域,而 LysinB 也有特异的活性位点,将来源于不同蛋白的活性结构域嵌合表达,可以作为潜在的结核菌的抑制剂或药物佐剂。分枝杆菌噬菌体还编码一些具有抗结核菌活性蛋白或多肽,也可作为发展嵌合裂解酶的元件,且可协助 LysinA/LysinB 穿过分枝杆菌酸层:(1)在分枝杆菌噬菌体感染宿主时,需要尾部的卷尺蛋白穿过细胞壁,并形成孔洞,以利于噬菌体 DNA 进入宿主体内<sup>[55]</sup>;卷尺蛋白富含 Ala-Gly 结构,并有  $\alpha$  螺旋与跨膜结构域,它具有分枝杆菌降解活性及较弱的肽聚糖水解活性,可协助 LysinA 与 LysinB 穿过分枝杆菌酸层到达其靶点<sup>[56]</sup>。另外,卷尺蛋白具有 Rpf 保守序列,后者可以切割细胞壁而刺激潜伏期结核菌转变为活跃生长期<sup>[57]</sup>。(2)来源于分枝杆菌噬菌体 SWU1 的 Gp39 具有多糖解聚酶的功能,可以破坏宿主的脂质代谢并增加细胞壁通透性,增强多种抗生素的杀菌效果<sup>[58-59]</sup>。(3)来源于分枝杆菌噬菌体 D29 的小分子多肽 PK34,其可与海藻糖二霉菌酸酯 (Trehalose-6,6-dimycolate, TDM) 结合,杀灭小鼠体内结核菌,表明 PK34 有望成为一种治疗结核杆菌感染的辅助药物,或作为研发抗结核药物的模板<sup>[60]</sup>。将 LysinA/LysinB 结构域与上述抗结核菌蛋白或多肽融合表达,或几种共同添加使用,是利用分枝杆菌噬菌体控制结核菌的一个重要研究方向。

#### 【参考文献】

- [1] Lambert N, Abdalla AE, Duan X, et al. Emerging drugs and drug targets against tuberculosis[J]. J Drug Target, 2017, 25(4): 296-306.
- [2] O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(4): 801-19.
- [3] Sybesma W, Pirnay JP. Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy[J]. Biotechnol J, 2016, 11(5): 595-600.
- [4] Redondo RA, de Vlarar HP. Evolutionary interplay between structure, energy and epistasis in the coat protein of the varphiX174 phage family[J]. J R Soc Interface, 2017, 14(126): 247-56.
- [5] Koning RI, Gomez-Blanco J, Akopjana I, et al. Asymmetric cryo-EM reconstruction of phage MS2 reveals genome structure in situ [J]. Nat Commun, 2016(7): 12524-9.
- [6] Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation[J]. Microbiol Rev, 1992, 56(3): 430-81.
- [7] Lella M, Mahalakshmi R. Solvation driven conformational transitions in the second transmembrane domain of mycobacteriophage Holin[J]. Biopolymers, 2016, 108(1): 1097-2012.
- [8] Fernandes S, Sao-Jose C. More than a hole: the holin lethal function may be required to fully sensitize bacteria to the lytic action of canonical endolysins[J]. Mol Microbiol, 2016, 102(1): 92-106.
- [9] Sao-Jose C, Parreira R, Vieira G, et al. The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on *oenococcal* cells[J]. J Bacteriol, 2000, 182(20): 5823-31.
- [10] Briery Y, Peeters LM, Volckaert G, et al. The lysis cassette of bacteriophage varphiKMV encodes a signal-arrest-release endolysin and a pinholin[J]. Bacteriophage, 2011, 1(1): 25-30.
- [11] Pang T, Park T, Young R. Mapping the pinhole formation pathway of S21[J]. Mol Microbiol, 2010, 78(3): 710-9.
- [12] Nakonieczna A, Cooper CJ, Gryko R. Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria [J]. J Appl Microbiol, 2015, 119(3): 620-31.
- [13] Yang H, Yu J, Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives[J]. Front Microbiol, 2014, 5(5): 542-7.
- [14] Summer EJ, Berry J, Tran TA, et al. Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts[J]. J Mol Biol, 2007, 373(5): 1098-112.
- [15] Berry J, Summer EJ, Struck DK, et al. The final step in the phage infection cycle: the Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes[J]. Mol Microbiol, 2008, 70(2): 341-51.
- [16] Catalao MJ, Gil F, Moniz-Pereira J, et al. The mycobacteriophage Ms6 encodes a chaperone-like protein involved in the endolysin delivery to the peptidoglycan[J]. Mol Microbiol, 2010, 77(3): 672-86.
- [17] Catalao MJ, Gil F, Moniz-Pereira J, et al. The endolysin-binding domain encompasses the n-terminal region of the mycobacteriophage ms6 Gp1 chaperone[J]. J Bacteriol, 2011, 193(18): 5002-6.
- [18] Lin L, Hong W, Ji X, et al. Isolation and characterization of an extremely long tail Thermus bacteriophage from Tengchong hot springs in China[J]. J Basic Microb, 2010, 50(5): 452-6.
- [19] Chamakura KR, Tran JS, Young R. MS2 Lysis of *Escherichia coli* depends on Host Chaperone DnaJ[J]. J Bacteriol, 2017, 199(12): e00058-17.
- [20] Abdelhay ESW, Catalao MJ, Milho C, et al. A second endolysin gene is fully embedded in-frame with the lysa gene of mycobacteriophage Ms6[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20515.
- [21] Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes[J]. Cell, 2003, 113(2): 171-82.
- [22] Hatfull GF, Pedulla ML, Jacobs-Sera D, et al. Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform[J]. PLoS Genet, 2006, 2(6): e92.
- [23] Doss J, Culbertson K, Hahn D, et al. A review of pPhage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms [J]. Viruses, 2017, 9(3): 50-9.
- [24] Oliveira H, Melo LD, Santos SB, et al. Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins[J]. J Virol, 2013, 87(8): 4558-70.
- [25] Soding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction[J]. Mol Microbiol, 2005, 33(Web Server): W244-8.
- [26] Payne KM, Hatfull GF. Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34052.
- [27] Miroshnikov KA, Faizullina NM, Sykilinda NN, et al. Properties of the endolytic transglycosylase encoded by gene 144 of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage phiKZ[J]. Biochemistry (Mosc), 2006, 71(3): 300-5.
- [28] Zheng H, Miyakawa T, Sawano Y, et al. Crystal structure of human leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) reveals a mechanistic basis of functional evolution in a mammalian protein with an m23 metalloendopeptidase fold[J]. J Biol Chem, 2016,

- 291(33): 17133–42.
- [29] Manganelli R, Parthasarathy G, Lun S, et al. Rv2190c, an NlpC/P60 family protein, is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e43429.
- [30] Uehara T, Dinh T, Bernhardt TG. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(16): 5094–107.
- [31] Van WN, Drancourt M, Henrissat B, et al. Current perspectives on the families of glycoside hydrolases of *Mycobacterium tuberculosis*: their importance and prospects for assigning function to unknowns[J]. Glycobiology, 2017, 27(2): 112–22.
- [32] Walmagh M, Briens Y, dos Santos SB, et al. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201phi2-1 and PVP-SE1[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36991.
- [33] Briens Y, Volckaert G, Cornelissen A, et al. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages  $\phi$ KZ and EL[J]. Mol Microbiol, 2007, 65(5): 1334–44.
- [34] Pritchard DG, Dong S, Kirk MC, et al. LambdaSa1 and LambdaSa2 Prophage Lysins of *Streptococcus agalactiae*[J]. Appl Environ Microb, 2007, 73(22): 7150–4.
- [35] Sudiarta IP, Fukushima T, Sekiguchi J. Bacillus subtilis CwlP of the SP- $\beta$  prophage has two novel peptidoglycan hydrolase domains, muramidase and cross-linkage digesting dd-endopeptidase [J]. J Biol Chem, 2010, 285(53): 41232–43.
- [36] Xu Q, Mengin-Lecreux D, Liu XW, et al. Insights into substrate specificity of NlpC/P60 cell wall hydrolases containing bacterial SH3 domains[J]. MBio, 2015, 6(5): e02327–14.
- [37] Stohl EA, Lenz JD, Dillard JP, et al. The gonococcal Nlpd protein facilitates cell separation by activating peptidoglycan cleavage by AmiC[J]. J Bacteriol, 2016, 198(4): 615–22.
- [38] Schmitz JE, Schuch R, Fischetti VA. Identifying active phage lysins through functional viral metagenomics[J]. Appl Environ Microb, 2010, 76(21): 7181–7.
- [39] Hu S, Kong J, Kong W, et al. Characterization of a Novel LysM domain from lactobacillus fermentum bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria[J]. Appl Environ Microb, 2010, 76(8): 2410–8.
- [40] Petrovski S, Seviour RJ, Tillett D. Genome sequence and characterization of the tsukamurella bacteriophage TPA2 [J]. Appl Environ Microb, 2011, 77(4): 1389–98.
- [41] Donovan DM, Foster-Frey J. LambdaSa2 prophage endolysin requires Cpl-7-binding domains and amidase-5 domain for antimicrobial lysis of streptococci[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 287(1): 22–33.
- [42] Wei L, Wu J, Liu H, et al. A mycobacteriophage-derived trehalose-6,6'-dimycolate-binding peptide containing both antimycobacterial and anti-inflammatory abilities. [J] FASEB J, 2013, 27(8): 3067–77.
- [43] North EJ, Jackson M, Lee RE. New approaches to target the mycolic acid biosynthesis pathway for the development of tuberculosis therapeutics[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(27): 4357–78.
- [44] Gil F, Grzegorzewicz AE, Catalao MJ, et al. Mycobacteriophage Ms6 LysB specifically targets the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*[J]. Microbiology, 2010, 156(5): 1497–504.
- [45] Payne K, Sun Q, Sacchetti J, et al. Mycobacteriophage LysinB is a novel mycolylarabinogalactan esterase[J]. Mol Microbiol, 2009, 73(3): 367–681.
- [46] Lan elle M-A, Tropis M, Daff  M. Current knowledge on mycolic acids in *Corynebacterium glutamicum* and their relevance for biotechnological processes[J]. Appl Microbiol Biot, 2013, 97(23): 9923–30.
- [47] Nishiuchi Y, Baba T, Yano I. Mycolic acids from Rhodococcus, Gordonia, and Dietzia[J]. J Microbiol Methods, 2000, 40(1): 1–9.
- [48] de Carvalho CCCR, Fischer MA, Kirsten S, et al. Adaptive response of *Rhodococcus opacus* PWD4 to salt and phenolic stress on the level of mycolic acids[J]. AMB Express, 2016, 6(1): 66–73.
- [49] Marrakchi H, Lan elle MA, Daff  M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond[J]. Chem Biol, 2014, 21(1): 67–85.
- [50] Catalao MJ, Gil F, Moniz-Pereira J, et al. Functional analysis of the holin-like proteins of mycobacteriophage Ms6[J]. J Bacteriol, 2011, 193(11): 2793–803.
- [51] Valafar F. Pathogenesis of multi drug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis as a determinant of future treatment success[J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5(Suppl 1): S64–S65.
- [52] Vasava MS, Bhoi MN, Rathwa SK, et al. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. Ind J Tuberc, 2017, 64(4): 252–7.
- [53] Park S, Jun SY, Kim CH, et al. Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against *Bacillus anthracis*. Sci Rep, 2018, 8(1): 8–18.
- [54] Young R, Gill JJ. Phage therapy redux—What is to be done? [J]. science, 2015, 350(6265): 1163–4.
- [55] Lai X, Weng J, Zhang X, et al. MSTF: a domain involved in bacterial metallopeptidases and surface proteins, mycobacteriophage tape-measure proteins and fungal proteins[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 258(1): 78–82.
- [56] Piuri M, Hatfull GF. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells[J]. Mol Microbiol, 2006, 62(6): 1569–85.
- [57] Dusthacker A, Hassan VN, Kumar V. Tape measure protein having MT3 motif facilitates phage entry into stationary phase cells of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Comput Biol Chem, 2008, 32(5): 367–9.
- [58] Yan S, Xu M, Duan X, et al. Mycobacteriophage putative GT-Pase-activating protein can potentiate antibiotics[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(18): 8169–77.
- [59] Li Q, Zhou M, Fan X, et al. Mycobacteriophage SWU1 gp39 can potentiate multiple antibiotics against *Mycobacterium* via altering the cell wall permeability[J]. Sci Rep, 2016(6): 28701–6.
- [60] Wei L, Wu J, Liu H, et al. A mycobacteriophage-derived trehalose-6,6'-dimycolate-binding peptide containing both antimycobacterial and anti-inflammatory abilities[J]. FASEB J, 2013, 27(8): 3067–77.

【收稿日期】 2018-02-27 【修回日期】 2018-04-23