

毒素-抗毒素系统的作用机制及其生物学功能的研究进展*

周世文 张俊杰[†]

(北京师范大学生命科学学院, 北京师范大学细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 100875, 北京)

摘要 毒素-抗毒素(toxin-antitoxin)系统(简称 TA 系统)广泛存在于原核生物的基因组和质粒中, 它们由 2 种基本元件组成: 稳定的毒素, 其作用是抑制与细菌生长相关的关键环节, 如 DNA 的复制、mRNA 的稳定性、蛋白翻译和代谢调控等; 不稳定的抗毒素, 可以发挥拮抗毒素的作用。在某些特定条件下, 抗毒素分解或丧失拮抗毒素的作用, 从而使毒素发挥作用, 抑制细胞生长。迄今已经发现了 8 种类型的 TA 系统, 它们的作用机制各不相同, 参与多种生命活动的调控, 在细菌应激反应、抵御噬菌体、细菌持留形成以及致病菌耐药性形成中发挥重要作用。此外, TA 系统还被作为工具用于研发新的生物技术, 应用于科学研究和疾病防治。本文将综述 TA 系统的作用机制及其生物学功能, 并介绍 TA 系统相关的生物技术研发进展。

关键词 毒素-抗毒素系统; 应激反应; 细菌持留; 细菌耐药; 生物技术

中图分类号 Q93, Q71

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2023125

0 引言

毒素-抗毒素(TA)系统存在于几乎所有的细菌以及许多古菌中, 该系统编码一种通过干扰重要生命过程来抑制细菌生长的毒素和一种保护细菌免受毒素作用的抗毒素^[1]。起初人们认为, TA 系统参与细菌的死亡调控^[2], 但是后期大量的研究表明, TA 系统主要功能是抑制细菌的生长, 在细菌应激反应、抵抗噬菌体、持留菌形成、致病菌免疫逃逸以及抗药性中发挥重要作用^[3-4]。

2023 年是 TA 系统被发现的第 40 年, 由于技术手段的原因, 在前 20 年的研究工作中, 只发现了 2 种类型的 TA 系统, 即以 *hok/sok* 为代表的 I 型 TA 系统, 以 *ccdA/ccdB* 和 *MazE/MazF* 为代表的 II 型 TA 系统^[2, 5-6]。但随着技术的进步和物种基因组测序数据的涌现, 依靠生物信息学可以进行 TA 系统预测, 如 RASTA-Bacteria、TADB 2.0、TASmania、T1Tadb 等, 将生物信息学与功能实验相结合, 人们发现了更多的 TA 系统。随着许多新型 TA 系统的发现, 不同 TA 系统的生物学功能被进一步阐释。这些 TA 系统不仅参与保留质粒, 还参与保留其他遗传元件, 例如基因组岛、整合接合元件和原噬菌体^[7]。TA 系统与致病菌的毒力有

关^[8]。它们通过调节生物膜和持留细胞形成, 在细菌对各种环境胁迫的抵抗中发挥作用^[7]。此外, 染色体 TA 模块还参与噬菌体抑制^[9]。由于 TA 系统作用机制的多样性, 人们对于某些新发现的 TA 系统的功能还存在争议^[10]。目前, TA 系统的应用也引起了人们越来越多的兴趣, 基于 TA 系统开发的多种生物技术已经应用于科研, 并用于疾病防治新策略的研发^[11-12]。

1 毒素-抗毒素系统的分类

在 TA 系统被发现的 40 年里, 世界各地科学家发现了具有不同调节模式和毒性机制的 TA 系统, 极大地扩展了毒素和抗毒素家族的数量及其可能的组合。已知的毒素靶点非常多, 包括 DNA 的复制、RNA 的翻译、细胞包膜、细胞骨架和代谢过程等^[13]。目前, 根据 TA 系统性质和作用机制被分为 8 类^[12]。

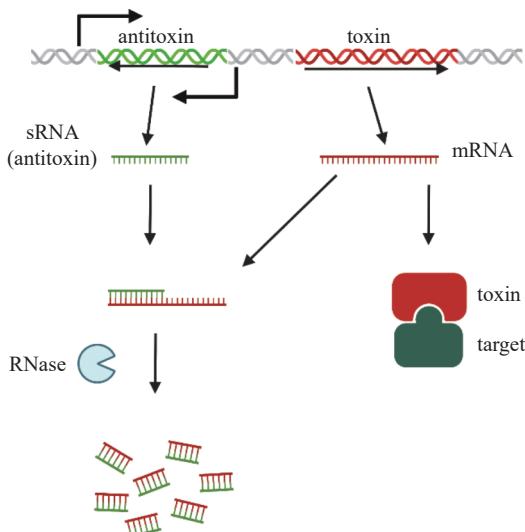
在 I 型 TA 系统中, 抗毒素是在毒素基因反方向转录的反义 RNA。它们可以与毒素 mRNA 结合并形成双链 RNA, 促进毒素 mRNA 的降解或阻断核糖体结合, 最终使毒素的产生受到抑制(图 1)^[1]。I 型毒素可以根据其定位和作用机制分为膜相关毒素和胞质毒素^[14]2 类: 膜相关的 I 型毒素通过引起膜的去极化或膜通透性的改变, 从而抑制 ATP 合成; 胞质内的

* 国家自然科学基金资助项目(81972604, 32171138)

[†] 通信作者: 张俊杰(1970—), 男, 教授。研究方向: 细胞增殖调控。E-mail: jjzhang@bnu.edu.cn

收稿日期: 2023-05-08

I 型毒素可以对 DNA 或 RNA 进行切割^[15]. *hok/sok* 模块通过分离后杀伤维持质粒稳定性^[5], 是第一个描述的 I 型 TA 系统, 其他的 I 型 TA 系统包括 *SymE/SymR*、*IstR-1/TisB*、*bsrE/SR5*、*SprA2/SprA2AS* 和 *zor/orz* 等.

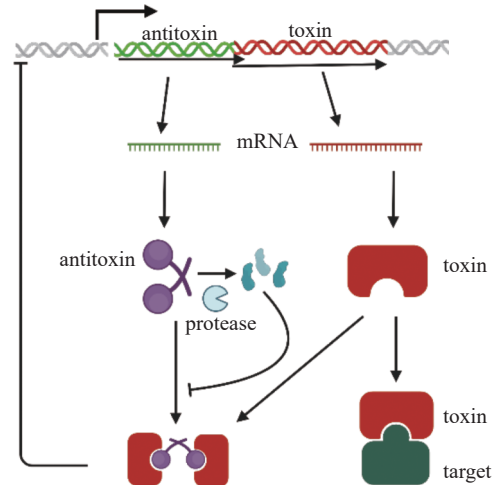


在 I 型 TA 系统中, 抗毒素是毒素 mRNA 的反义 RNA, 可与毒素 mRNA 结合并形成双链 RNA, 促进毒素 mRNA 的降解或阻断核糖体结合, 最终使毒素的产生受到抑制, 反之毒素蛋白抑制细菌生长.

图 1 I 型 TA 系统作用机制

II 型 TA 系统是最丰富和研究最广泛的 TA 系统. 在 II 型 TA 系统中, 抗毒素和毒素都是蛋白质^[1]. *ccdA/ccdB* 是第一个被发现的维持质粒稳定性的 TA 模块^[2], 是一种 II 型 TA 系统. 更新的数据库 TADB2.0 中记录了细菌和古菌中超过 6 000 个生物信息学分析获得的 II 型 TA 模块^[16]. 通常, II 型 TA 系统具有几个共同特征(图 2): 1) 有一个操纵子编码, 该操纵子包含 2 个重叠或由几个碱基分开的小基因; 2) 每种毒素及其对应的抗毒素形成稳定的蛋白质-蛋白质复合物, 抑制毒素蛋白的作用; 3) 毒素稳定, 而抗毒素较不稳定, 因此, 需要不断产生抗毒素以中和毒素; 4) 在应激条件下, 抗毒素可被蛋白酶(如 Lon、ClpAP 和 ClpXP)降解, 毒素从复合物中释放出来, 发挥杀菌或抑菌作用; 5) 抗毒素和 TA 复合物均可与 TA 操纵子的启动子区域结合, 从而实现自我调节^[1, 17]. 在大多数 II 型 TA 系统中, 抗毒素基因位于毒素基因的上游. 然而, 在一些特殊情况下, 例如 *higB/higA*、*MqsR/YgiT* 和 *MqsR/MqsA*, 上游基因编码毒素^[18]. 通常, II 型 TA 系统由 2 个基因组成, 但有些系统具有 3 个组成部分, 包括 ω - ϵ - ζ 、*pasA/pasB/pasC*、*paaR/paaA/parE*、*aMEF/mazE/mazF* 和 *asRelE2/RelB2/RelE2*. 将 II 型 TA 系统进一步分类到超家族中似乎很困难, 因为分类在一个

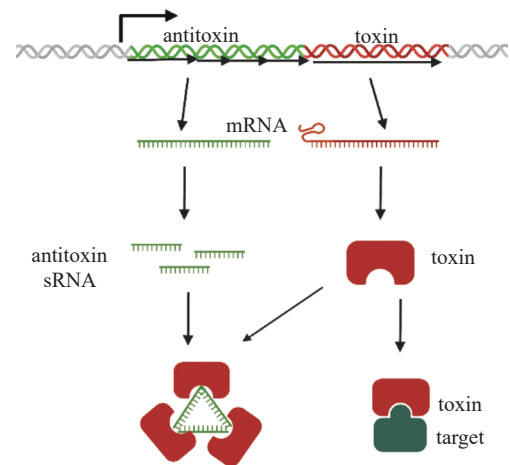
超家族中的毒素可能与另一个超家族中的抗毒素相关联^[19]. 因此, 已提议将 II 型毒素和抗毒素分别分为 12 和 20 个超家族^[19]. 尽管如此, 根据结构相似性, 目前已知的 II 型毒素和抗毒素分别分为 9 和 4 类^[20].



在 II 型 TA 系统中, 毒素及其对应的抗毒素形成稳定的蛋白质-蛋白质复合物, 抑制毒素蛋白的作用. 在应激条件下, 抗毒素可被蛋白酶降解, 毒素释放出来, 发挥杀菌或抑菌作用.

图 2 II 型 TA 系统作用机制

在 III 型 TA 系统中, 抗毒素也是 RNA, 与结合毒素 mRNA 的 I 型抗毒素不同, III 型抗毒素 RNA 直接结合毒素, 来抑制毒素的毒性(图 3)^[21]. 第 1 个发现的 III 型 TA 系统是 *toxI/ToxN*, 它是欧文氏苜蓿亚种中的一种噬菌体流产感染系统^[22]. 第 2 种已知的 III 型 TA 系统是 *antiQ/AbiQ*, 在乳酸乳球菌中鉴定. *AbiQ* 毒素与 *ToxN* 具有 31% 的同源性, 并作为一种核糖核酸内切酶发挥作用, 可特异性切割 *antiQ* 抗毒素. 根据毒素的序列相似性, III 型 TA 系统分为 3 个家族: *toxI/ToxN*、*cptI/CptN* 和 *tenpI/TenpN*^[23]. 计算机

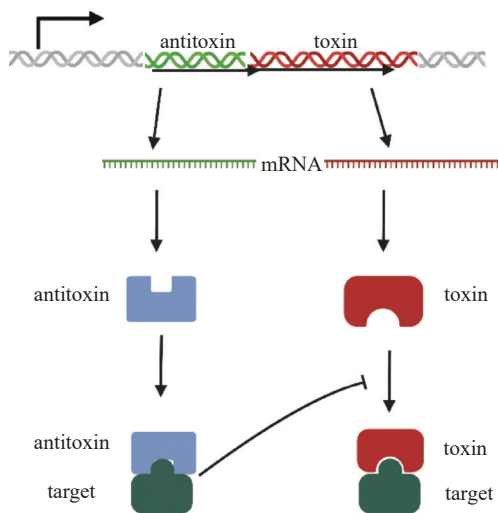


在 III 型 TA 系统中, 抗毒素是 RNA. 抗毒素 RNA 直接结合毒素, 来抑制毒素的毒性.

图 3 III 型 TA 系统作用机制

分析还表明, III型 TA 系统的 3 个家族在细菌中含量丰富且广泛存在^[23].

与 II 型 TA 系统类似, IV、V 和 VI 型 TA 系统具有蛋白质形式的毒素和抗毒素^[13]. 在 IV 型 TA 系统中, 抗毒素不直接与毒素相互作用, 而是与毒素的靶标结合, 从而保护这些靶标(图 4)^[12]. 第 1 个描述的 IV 型 TA 系统是 CbeA/CbtA(也称为 YeeU/YeeV). 在该系统中, 抗毒素 CbeA 直接与 MreB 和 FtsZ 相互作用, 阻断 CbtA 对 MreB 和 FtsZ 聚合的抑制作用. IV 型 TA 系统的其他示例包括 AbiEi/AbiE II、YkfI/YafW、YpjF/YfjZ^[24]、PygA/PygT^[25] 和 CptB/CptA(YgfY/YgfX)^[26].

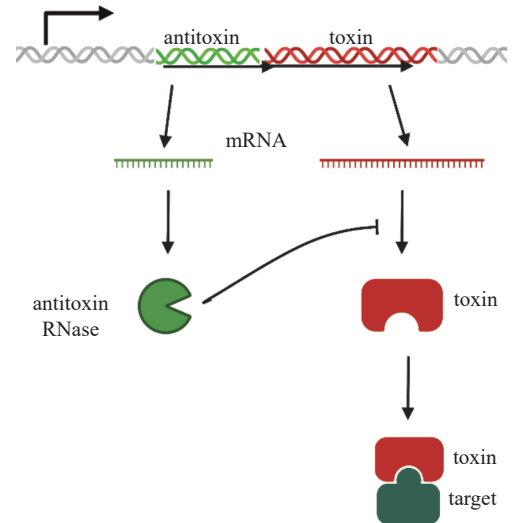


在 IV 型 TA 系统中, 抗毒素不直接与毒素相互作用, 而是与毒素的靶标结合, 从而保护这些靶标.

图 4 IV 型 TA 系统作用机制

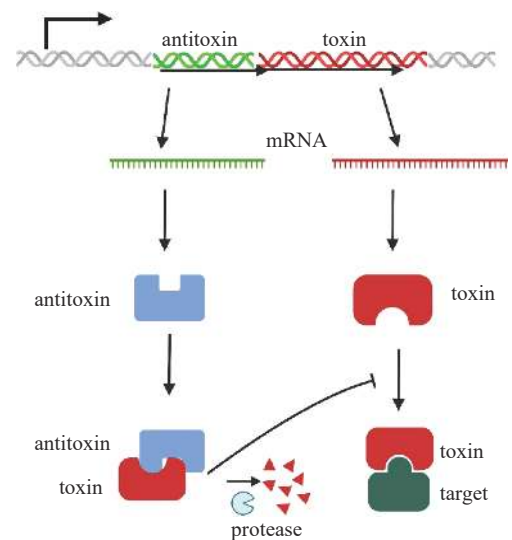
GhoT/GhoS 和 SocA/SocB 分别是 V 型和 VI 型 TA 系统的唯一代表^[13, 17]. 在 GhoT/GhoS 中, 毒素 GhoT 通过瞬时孔形成破坏脂质膜并增加持久性, 而抗毒素 GhoS 是一种核糖核酸酶, 通过特异性切割 *ghoT* 的 mRNA 来抵消 GhoT 毒性(图 5)^[27]. 此外, GhoS 的 mRNA 可在应激条件下被 II 型毒素 MqsR 降解, 从而允许 *ghoT* mRNA 翻译产生 GhoT^[28]. 在 SocA/SocB 中, 毒素 SocB 与 β 滑动夹相互作用, 阻碍复制的延伸. 然而它不稳定, 可以被 ClpXP 蛋白酶降解, 而抗毒素 SocA 则充当中间介质来介导蛋白酶降解 SocB(图 6).

VII 和 VIII 型 TA 系统是最近才发现的 2 个 TA 模块. 在 VII 型 TA 系统中, 抗毒素和毒素是蛋白质^[13]. 抗毒素是一个酶, 通过催化对毒素蛋白翻译后修饰来抑制毒素的作用(图 7)^[29]. 至少 3 个不同的 TA 模块, 即 Hha/TomB、TglT/TakA (MenT3/MenA3) 和 HepT/MntA 已被认为是 VII 型 TA 系统^[29]. Hha/TomB 模块在大肠杆菌中充当氧敏感 TA 系统^[30]. YmoB 的单半胱氨酸



在 V 型 TA 系统中, 抗毒素是一种核糖核酸酶, 通过特异性切割毒素的 mRNA 来抵消毒性.

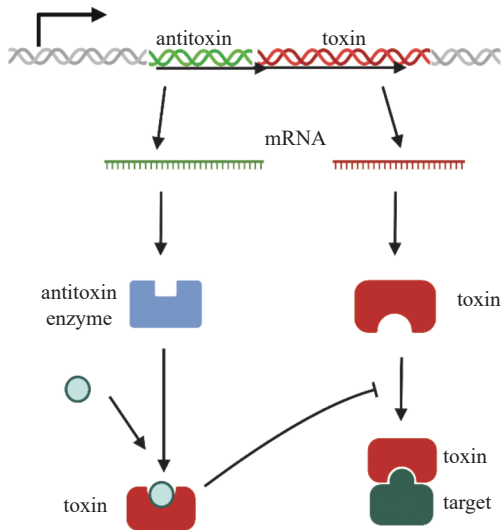
图 5 V 型 TA 系统作用机制



在 VI 型 TA 系统中, 抗毒素充当中间介质来介导蛋白酶降解毒素蛋白, 使毒性受到抑制.

图 6 VI 型 TA 系统作用机制

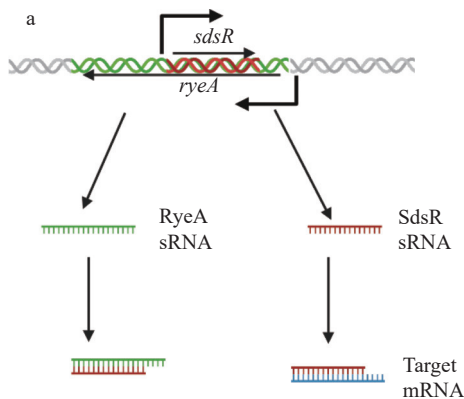
变体(TomB 的 *Yersinia* 同源基因), 即 [C117S]YmoB, 可以替代 TomB 作为大肠杆菌中的抗毒素. [C117S]YmoB 与毒素 Hha 瞬时相互作用, 并促进 Hha 的保守半胱氨酸残基自发氧化为含 -SO₃H 的物质, 导致 Hha 的毒性降低^[30]. 结核分枝杆菌的 *Rv1044-Rv1045* 基因座已被确定为 TA 系统, 其中 *Rv1045* 是编码鸟苷酸转移酶 TglT 的毒素基因, 而 *Rv1044* 编码的抗毒素 TakA 是一种新型非典型丝氨酸蛋白激酶. TakA 在 Ser78 残基处特异性磷酸化 TglT, 从而抑制 TglT 的毒性^[31]. 在另外一项研究中, *Rv1044-Rv1045* 被命名为 MenT3/MenA3 TA 模块, 毒素 MenT3 是可以使 tRNA 受体臂失活的核苷酸转移酶^[32]. 在 HepT/MntA TA 模块中, 毒素 HepT 是一种核糖核酸酶, 而抗毒素 MntA 作为



在 VII 型 TA 系统中, 抗毒素是一种酶, 通过催化对毒素蛋白翻译后修饰来抑制毒素的作用。

图 7 VII 型 TA 系统作用机制

腺苷酸转移酶发挥作用, 以 ATP 作为底物将 3 个 AMP 转移到 HepT 的 Tyr104 残基, 从而抑制 HepT



a. SdsR/RyeA 系统作用机制; b. CreT/CreA 系统作用机制。

的毒性^[33]。

在 VIII 型 TA 系统中, 抗毒素和毒素都是 RNA (图 8)^[13]。第 1 个确定的 VIII 型 TA 系统是 SdsR/RyeA (图 8-a)。小 RNA SdsR 的异常表达导致细胞死亡, 主要是由于 SdsR 介导的 *yhcB* 抑制, *yhcB* 是一种编码内膜蛋白的基因; 然而, RyeA (一种在相反 DNA 链上转录的小 RNA) 过表达时, RyeA 和 SdsR 相互结合形成双链体, 可被 RNase III 降解, 从而抑制 SdsR 驱动的细胞死亡。RyeA 和 SdsR 表达水平存在相互调节, 通过转录干扰, 来自 *sdsR* 启动子 (σ^S 依赖性) 的转录可以被 *ryeA* 启动子 (σ^{70} 依赖性) 的转录抑制。这种类型的 TA 模块的另一个例子是 CreT/CreA (图 8-b), 其中级联抑制毒素 CreT 是一种抑菌 RNA, 它阻止稀有的精氨酸 tRNA^{UCU} 或异亮氨酸 tRNA^{CAU} 参与翻译进程, 而抗毒素 CreA 是一种 CRISPR RNA 变体, 其间隔部分与 *creT* 启动子匹配^[34-35]。CreA 可以与 Cascade 形成复合物, 并通过与 *creT* 启动子的部分互补来引导它抑制 CreT 转录^[35]。

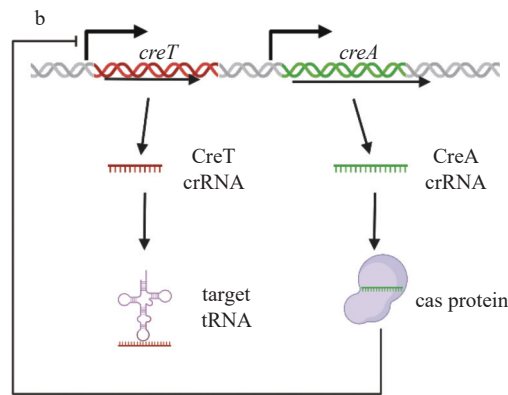


图 8 VIII 型 TA 系统作用机制

2 毒素-抗毒素系统的调控

毒素-抗毒素(TA)系统通常受到严格调控, 应对环境变化或应激需求, 来维持或打破“中和”的状态。大多数正常生长条件下, 这套调控机制确保在稳态条件下抗毒素超过其相应毒素的物质的量, 以抑制毒素发挥作用^[13]。本节介绍 TA 系统不同水平的各种调节机制。

2.1 TA 系统的转录调控 在 TA 系统, 尤其是大多数 II 型 TA 系统中, 抗毒素编码区在前, 毒素编码区在后; 毒素与抗毒素的编码区相互重叠几个碱基, 或者二者的编码区被非常短的基因间区域分隔^[19]。III 型 TA 操纵子遵循类似的组织结构, 首先编码抗毒素 RNA; 然而, 它们通过 Rho 不依赖的终止子与毒素

开放阅读框分开^[23]。这种机制可能会限制毒素的产生, 并优先合成短寿命的抗毒素。然而, 有几种 II 型 TA 系统具有相反的机制, 毒素编码基因位于抗毒素编码基因前面, 在其中一些系统中存在特异性转录抗毒素的组成型启动子^[10]。

II 型 TA 操纵子的表达通常在转录水平上由 TA 复合物自动调节。这些系统的抗毒素由一个结构化的 DNA 结合结构域和一个内在无序结构域组成, DNA 结合结构域识别并结合位于毒素-抗毒素启动子内的特定操作区域, 内在无序结构域在与相应的毒素相互作用时发生折叠。在许多 II 型系统中, 转录抑制与毒素中和密切相关。在这样的系统中, 根据抗毒素与毒素的比率, 形成了对操纵子区域具有不同亲和力的异源寡聚复合物, 当毒素水平超过抗毒素水平时,

同源寡聚复合物对其启动子的亲和力通常较低,抑制就会减轻,从而使抗毒素的从头转录和翻译成为可能。这种被称为条件协同性的负反馈回路会形成严格的稳态调节机制,可以防止由于TA操纵子的转录波动而导致的意外毒素释放。然而,从无序到有序的认识模型并不适用于所有II型系统,因为即使没有同源毒素,抗毒素的一些看似无用的结构域也会形成稳定的折叠结构,来参与TA系统的转录调控。此外,还有几个II型系统的例子,其中转录调控由单独的第3种成分实施,并且抗毒素仅具有中和功能。在新描述的VIII型RNA-RNA TA对中,抗毒素RNA使CRISPR效应蛋白成为毒素RNA表达的转录抑制因子^[35]。在这种情况下,抗毒性机制主要依赖于转录抑制。

2.2 TA系统的转录后调控 I型TA系统的调控模式依赖于互补RNA抗毒素对毒素表达的抑制,这些抗毒素通常编码在与毒素编码基因相对的链上。在大肠杆菌K-12 *hok-sok* 和 *tisB-istR* 系统中发现了复杂的调控模式,涉及RNA加工、二级结构和核糖体从临时可访问的核糖体结合位点上游的备用位点重新定位^[36]。在没有抗毒素的情况下,30S核糖体亚基结合在毒素mRNA核糖体结合位点序列的上游,从而使掩盖核糖体结合位点的发夹结构展开,使其能够启动毒素翻译^[37-38]。I型RNA抗毒素与核糖体竞争该区域,由此产生的TA RNA双链体可被RNase III进一步切割,以消除毒素转录本。这些RNA抗毒素也被证明不如其相应的毒素转录本稳定,因此当抗毒素RNA转录减少时,能够优先保留毒素转录本和毒素翻译。据报道,在II型TA系统中,毒素的翻译效率远低于抗毒素的翻译效率,这会使抗毒素水平过量以确保毒素被完全中和。有意思的是,*parD* II型系统的Kid毒素的转录本在编码序列的特定位点被切割,导致毒素表达量较少,这种模型是否适用于其他II类系统还有待研究。

在III型系统中,中和TA复合物的形成需要抗毒素RNA的转录后成熟。RNA抗毒素由重复序列组成并照此转录。然后,毒素发挥核糖核酸内切酶将抗毒素前体RNA转录本切割成单个重复序列,这些重复序列自主折叠形成能够中和毒素的“假结构”^[22]。

2.3 TA系统的翻译后调控 在II型和III型TA系统中,中和复合体一旦合成,II型和III型毒素就会通过与其相应的抗毒素形成紧密复合物而被中和。在中和复合体中毒素通过各种机制失活,例如封闭毒素的催化部位、形成空间位阻阻止底物进入毒素的活性中心、二级结构的破坏或抑制催化活性毒素二聚体的形成^[39]等。

许多II型抗毒素的稳定性低于其同源毒素,这很可能是由于ATP依赖性蛋白酶(如Lon、ClpXP或ClpAP)识别抗毒素中的无序结构域所致。然而,参与TA复合物的II型抗毒素的降解以及随后从这些复合物中释放毒素的报道要少得多。抗毒素在体内和体外与其相应的毒素结合时表现出更高的稳定性^[40]。在II型TA系统研究中,研究者认为压力条件会刺激抗毒素的降解并促进毒素的释放。然而,就几种大肠杆菌染色体TA系统而言,最近的研究表明压力对抗毒素稳定性的影响微乎其微,不能解释毒素释放。已经报道的II型TA系统的一个亚群中,第3个基因编码SecB样分子伴侣(TA-分子伴侣(TAC)系统),抗毒素中存在与分子伴侣互作的基序,该基序中包含一个蛋白酶识别区域。在这些情况下,需要分子伴侣来正确折叠抗毒素,防止被ATP依赖性蛋白酶降解。在没有伴侣的情况下,抗毒素发生聚集,无法中和毒素。相比之下,SocA VI型抗毒素起着衔接子的作用,通过介导ClpXP蛋白酶对相应的毒素降解进而发挥中和作用。

在VII型系统中,抗毒素是一个酶,通过催化在毒素蛋白特定氨基酸残基处的翻译后修饰,来抑制毒素蛋白的活性。迄今为止,已经报道例证包括通过毒素的磷酸化^[31]、氨酰化^[41]或氧化^[30]进行的中和。此外,一些通过对靶标的翻译后修饰发挥活性的II型毒素,也被证明可以在保守残基上进行自我修饰,这在某些情况下导致了它们的失活。

3 毒素活性和作用靶标

通常,毒素是在宿主细菌的细胞质或内膜中具有活性的小的单结构域蛋白质或肽,最近也报道了RNA毒素^[35]。我们在此将毒素的靶点及其作用机制总结于表1。

3.1 切割DNA和影响复制的毒素 在*ccdA/ccdB*系统中,毒素CcdB II型毒素靶向DNA促旋酶的GyrA亚基,抑制DNA复制并导致DNA损伤。通过抑制DNA促旋酶催化循环中的DNA重新连接,CcdB将DNA上的酶锁定为所谓的裂解复合物,其作用方式与喹诺酮类抗生素非常相似。CcdB活性被认为会诱导复制叉的崩溃,从而导致双链断裂、SOS反应的诱导和细胞死亡。尽管有些毒素在结构上与CcdB^[42-43]无关,ParE II型毒素的表达也会诱导SOS反应。目前尚不清楚ParE毒性的分子机制是否与CcdB相似,因为对CcdB具有抗性的GyrA₄₆₂突变体仍然不能抵抗ParE的毒性^[44-45]。II型Fic毒素靶点是DNA促旋酶和拓扑异构酶IV,Fic可抑制DNA促旋酶和拓扑异构酶

表 1 毒素的作用靶标及其作用机制

| 毒素作用靶标 | 毒素作用机制 | 举例 |
|--------|---|---|
| DNA | 抑制DNA促旋酶催化循环中的DNA重新连接 | CcdB ^[42-43] |
| | 将ADP-核糖部分从NAD ⁺ 转移到单链DNA上, 导致DNA损伤 | DarT ^[46] |
| | 切割甲基化和未甲基化的DNA | RalR ^[47] |
| | 与DNA聚合酶的 β - sliding clamp相互作用, 降低DNA复制的持续性 | SocB ^[49] |
| | 抑制DNA促旋酶和拓扑异构酶IV的ATP水解活性, 导致DNA降解或抑制复制 | Fic ^[48] |
| RNA | 切割mRNA | MazF ^[50-51] , RelE ^[52-53] |
| | 切割rRNA | MazF ^[50-51] |
| | 切割tRNA | VapC ^[54-55] , HEPN ^[41] |
| | 阻止tRNA氨酰化 | FaRel2 ^[56] |
| | 乙酰化tRNA, 使其失活 | GNAT-fold acetyltransferase ^[57-58] |
| | 阻止tRNAs与氨基酸结合 | MenT ^[32] |
| 参与翻译蛋白 | 阻断稀有 tRNA 与氨基酸的结合 | CreT ^[34-35] |
| | 特异性磷酸化氨酰-tRNA 合成酶, 抑制特定tRNA与氨基酸结合 | HipA ^[59-60] |
| | 延伸因子 Tu (EF-Tu) 磷酸化并失活 | Doc ^[61] |
| 包膜 | 使细胞膜去极化 | Hok, TisB, Lsr等 ^[5, 62-63] |
| | 抑制肽聚糖和脂多糖的生物合成 | ζ -毒素 ^[64-65] |
| 骨架 | 阻止MreB和FtsZ的聚合, 影响有丝分裂 | CbtA ^[66-67] |
| 小分子化合物 | 水解并耗尽 NAD ⁺ | MbcT ^[68] |
| | 焦磷酸化消耗GTP-GDP和ATP-ADP池 | ToxSAS ^[69] |

IV的ATP水解活性, 并导致DNA损伤和复制的抑制^[48]. 与上述作用于DNA促旋酶的毒素相反, 一些毒素显示直接靶向DNA. IV型DarT毒素是一种ADP-核糖基转移酶, 可将ADP-核糖部分从NAD⁺转移到单链DNA上, 导致DNA损伤并引发SOS反应^[46]. I型RalR毒素是一种非特异性DNase, 可切割甲基化和未甲基化的DNA^[47]. VI型SocB毒素通过直接与DNA聚合酶的 β - sliding clamp相互作用, 降低DNA复制的持续性^[49].

3.2 切割RNA和阻止翻译的毒素 抑制蛋白质合成似乎是II型毒素的主要目标. 许多这些毒素是具有不同程度特异性的RNase. 例如, 来自MazF家族的毒素以低特异性降解游离RNA, 靶向mRNA以及核糖体RNA (rRNA) 前体^[50-51]. 然而, 一些MazF毒素被证明对单一种类的tRNAs具有特异性. 相比之下, VapC家族的毒素则特异性切割不同目标tRNA的反密码子茎环^[54-55], 以及23S rRNA的sarcin-ricin环, 该环与反密码子茎环具有结构相似性. RelE和相关毒素通过进入翻译核糖体的A位点, 以共翻译方式切割mRNA, 切割通常发生在目标密码子的第2和第3个位置之间^[52-53]. HicA毒素具有RNase活性, 但是它们的底物特异性仍有待研究.

多种II型毒素通过对tRNAs或为tRNAs辅助因子的翻译后修饰影响tRNA的功能. HipA毒素特异性磷酸化氨酰-tRNA合成酶, 抑制特定tRNA与氨基酸结合^[59-60]. Doc毒素使延伸因子Tu (EF-Tu) 磷酸化并失活, 从而抑制tRNA呈递给翻译核糖体^[61]. 毒素蛋白GNAT-fold乙酰转移酶通过乙酰化特定tRNA上的氨基酸使tRNA失活^[57-58]. 最近发现的ToxSAS(毒素小信号素合成酶)家族FaRel2毒素, 将焦磷酸部分从ATP转移到tRNA接受臂的CCA末端, 从而损害tRNA的氨酰化^[56]. VII型毒素还通过将嘧啶与接受臂连接来抑制tRNAs的功能, 其中MenT毒素阻止tRNAs与氨基酸结合^[32], HEPN毒素则切割tRNAs亚群的接受臂^[41]. 最新的研究发现, CreT VIII型毒素可以阻断稀有tRNA与氨基酸的结合, 因此导致生长停滞^[34-35].

3.3 破坏细胞膜、细胞壁和细胞骨架完整性的毒素

最小的毒素是单螺旋跨膜肽, 通常由I型系统编码, 例如Hok、TisB、Lsr、DinQ和Fst. 大多数这类毒素能引起膜去极化, 并在插入内膜时扰乱质子动力势^[5, 62-63, 70-71], 但也有一些被报道通过引发类核凝聚而干扰细胞分裂^[62]. V型GhoT毒素具有2个穿膜螺旋, 其过度表达会导致无内容物的幽灵细胞的形成,

类似于 I 型 TA 系统^[27]。II 型 ζ -毒素通过磷酸化消耗 UDP 活化的糖,来抑制肽聚糖和脂多糖的生物合成,从而导致细胞壁完整性丧失^[64-65]。IV 型 CbtA 毒素被证明可通过直接相互作用阻止 MreB 和 FtsZ 的聚合,抑制细菌的胞质分裂^[66-67]。

3.4 诱导代谢应激的毒素 最近的研究报道,一些毒素降解或合成小的代谢物,从而诱导代谢应激并抑制细菌增殖。例如,II 型 MbcT 毒素能水解并耗尽 NAD^+ , NAD^+ 是氧化还原反应所必需的中心电子载体^[68]。来自 II 型和 IV 型系统的一个 ToxSAS 毒素亚家族(Farel)具有一个 REL 样的(p)ppGpp 合成酶结构域,并通过焦磷酸化消耗 GTP-GDP 和 ATP-ADP 池,分别导致 (p)ppGpp 和 (p)ppApp 的积累^[69]。

4 TA 系统的生物学作用

最初对质粒上的 TA 系统的研究表明,该系统可以杀死分离后丢失质粒的子代细菌,从而发挥维持宿主中质粒稳定存在的功能^[2-5]。如果子细胞失去携带 TA 系统的质粒,不稳定的抗毒素就会降解,释放出稳定的毒素,因此无质粒细胞会出现生长抑制或死亡,被称为分离后杀伤或质粒依赖的机制^[11]。染色体 TA 系统的发现,如 *mazE/mazF*, 揭示了 TA 系统发挥着质粒维持以外的功能。通过大量的深入研究,人们发现 TA 系统具有多种生物学功能,包括维持遗传元件、毒力调控、抗逆性和抑制噬菌体侵染等。

4.1 TA 系统参与维持遗传元件 *ccdA/ccdB* 和 *hok/sok* 是 2 个最早被研究的 TA 模块,它们介导质粒的维持^[2-5]。自发现以来,许多 TA 系统被发现具有相同的功能。例如,IncC 质粒中的 *higB/higA* TA 模块充当有效的质粒维持系统,对于在无抗生素的环境中稳定地维持质粒存在至关重要。大多数 IncX4 质粒编码有 2 个 TA 系统,即 *HicB/HicA* 和 *TsxA/TsxB*。虽然 *HicB/HicA* 在最适生长条件下对质粒稳定性没有作用,但 *TsxA/TsxB* 是大肠杆菌中维持该质粒所必需的。这种由 TA 系统介导的质粒维持主要是通过分离后杀伤或质粒依赖的机制^[5]。

基因组岛是相对较大的 DNA 片段,其核苷酸特征不同于染色体的其余部分。由于基因组岛总是携带为宿主细菌提供选择优势的基因,因此通常根据相应基因的功能来描述它们,例如致病性岛和抗性岛。某些 TA 系统参与基因组岛的维持。例如,位于致病性岛 SsPI-1 中的 *SezA/SezT* TA 模块,有助于在猪链球菌分离株中维持该岛的存在。*HipA/HipB* TA 模块可以稳定腐败希瓦氏菌 CN-32 中的复合基因组岛 CGI48^[72]。在沙门氏菌中,多药耐药性沙门氏菌基因

组岛 1 (SGI1) 和 IncA/C 质粒不相容。尽管如此,由于 *SgiA/SgiT*(一种 SGI1 编码的 TA 模块)的关键作用,当 IncA/C 同时存在时,该岛可以被稳定地维持在宿主染色体中。

除了质粒和基因组岛,其他遗传元件,包括超整合子、整合接合元件、噬菌体、CRISPR-Cas 系统,甚至染色体,也可以通过 TA 系统来维护其稳定性。位于霍乱弧菌超整合子中的 2 个 *higB/higA* 基因座,可以有效地稳定大肠杆菌中的测试质粒,表明它们具有维持该超整合子稳定性的潜力。此外,对霍乱弧菌 N16961 中 18 个 TA 模块的全面功能分析证实,它们具有稳定超整合子的作用。然而,只有少数研究报道了 TA 系统在维护整合接合元素和噬菌体的作用。例如,*mosA/mosT* TA 系统促进整合共轭元件 SXT 的维持。CP4So 噬菌体中的 II 型 TA 模块 *ParESO/CopASO* 和 *phiCD630-1* 噬菌体中的 I 型 TA 模块,可以分别稳定它们在希瓦氏菌和艰难梭菌中的存在^[73]。*CreT/CreA* 是一种 VIII 型 TA 系统,通过细胞对它们存在的依赖性来维持 CRISPR-Cas 系统^[35]。此外,TA 系统具有确保染色体稳定遗传的潜力。在丢失了 II 号染色体的霍乱弧菌细胞中,该染色体编码的 3 种 *ParE* 毒素可以降解 I 号染色体,因此,*ParD/ParE* TA 模块促进了染色体 II 的稳定遗传。

4.2 TA 系统在细菌毒力中的作用 TA 系统对细菌毒力的贡献已得到充分证实。结核分枝杆菌是结核病的病原体,结核病是世界上最致命的疾病之一。结核分枝杆菌 H37Rv 至少有 85 个 TA 系统(包括已确认和预测的),而相关的非致病性耻垢分枝杆菌只有 4 个,这一发现表明 TA 模块可能与细菌毒力有关。研究表明,结核分枝杆菌中的某些 TA 系统或组件,包括 *VapB11/VapC11*、*HigB1*、*VapC22* 和 *MazF* 毒素,有助于增强结核分枝杆菌的毒力。在伤寒沙门氏菌中,抗毒素 *SehB* 的活性对毒力是必不可少的,因为在小鼠模型中 *SehB* 活性所需的 8 个氨基酸的突变会减弱鼠伤寒沙门氏菌的毒力。此外,II 型毒素 *Hha* 可增强鼠伤寒沙门氏菌的毒力,*hha* 的缺失会减少鼠伤寒沙门氏菌在小鼠的全身定植和炎症反应。在猪链球菌中,*Xress* 抗毒素的缺失突变体在小鼠中表现出荚膜合成减少和毒力减弱^[74]。这些 TA 系统或组件直接参与细菌毒力,但其他系统或组件可能起到间接作用。例如,*SezA/SezT* TA 模块赋予致病性基因岛 SsPI-1 遗传稳定性,这与中国猪链球菌 2 型的二次流行有关^[75],因此,*SezA/SezT* 在参与猪链球菌毒力的变化中具有间接作用。

大多数 TA 系统或成分可以提升细菌的毒力,但

也有少数 TA 系统具有抑制毒力的作用。例如,在金黄色葡萄球菌中,抗毒素 SavR 和 SavR-Savr TA 复合体可以通过直接与其启动子结合来抑制 2 个毒力基因 *hla* 和 *efb* 的表达。因此,金黄色葡萄球菌中该 TA 模块的缺失增强了其在小鼠模型中的溶血活性和致病性^[76]。此外,敲除编码 MazF 毒素的基因 *mazF* 会增加金黄色葡萄球菌的致病性。另一个例子是铜绿假单胞菌的抗毒素 HigA。HigA 可以与 *myfR*(一种编码关键毒力调节因子的基因)的启动子结合并抑制其表达,因此 HigA 可能参与毒力网络监管^[77]。此外,HigA 还直接与 *amrZ* 和 *exsA* 的启动子结合,从而抑制 III 型和 VI 型分泌系统的表达,这二者对于铜绿假单胞菌的毒力都很重要^[78]。

4.3 TA 系统对抗逆性的作用 TA 系统在能够自由生存的原核生物,特别是一些致病菌(例如硫化叶菌、结核分枝杆菌和霍乱弧菌)中非常丰富,但在专性寄生生物体(例如沙眼衣原体和普氏立克次体)中却不存在。这一发现支持 TA 模块可能是对自由生活的原核生物有益的应激反应元件。确实,许多 TA 模块通过各种机制参与抗逆和应激反应。

生物膜是包裹在由多糖、蛋白质、脂质和核酸组成的细胞外基质中的微生物细胞群落^[79]。细菌形成生物膜以抵抗各种压力,例如宿主免疫防御和抗生素。许多 TA 模块在生物膜形成中发挥作用。在恶臭假单胞菌中,MqsR/MqsA TA 模块调节生物膜形成,*mqsR*、*mqsA* 的缺失会减少生物膜的形成^[18]; RelB/RelE 这类 TA 模块有助于霍乱弧菌的生物膜发育和肠道定植^[80]; *yefM/yoeB* TA 模块促进肺炎链球菌的生物被膜的形成,但它抑制了杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)的生物被膜的形成^[81-82]。此外,破坏毒素基因 *mazF* 会增加生物膜的形成,但它会降低金黄色葡萄球菌的生物膜抗生素耐受性;因此,MazF 毒素会抑制生物膜的形成并增强生物膜的抗生素耐受性,这对慢性感染十分重要。

持留细胞构成了一小部分遗传相同且生理上处于休眠状态的细胞亚群,这些细胞对抗生素处理和其他压力具有高度耐受性,并保留了压力消除后重新开始生长的能力^[4]。持留细胞形成是细菌抵抗抗生素和其他压力的另一种策略,持留细胞的形成也有 TA 系统的参与^[4]。杀鱼爱德华氏菌 *yefM/yoeB* TA 模块抑制生物膜的形成,但是在持留细胞形成中发挥了积极作用,删除毒素基因 *yoeB* 或整个 TA 模块,会显著降低病原体在用致死浓度的氯霉素处理后形成持留细胞的能力^[82]。在铜绿假单胞菌中,毒素 ResA 的过表达通过降低细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的水平,促进

持留细胞的形成^[83]。已有研究阐释了大肠杆菌 HokB 毒素诱导持留细胞形成及其复苏的机制。HokB 是一种小的膜相关肽,插入细胞质膜并形成孔隙,导致细胞膜去极化和细胞内 ATP 泄漏,从而诱导持留的发生。氧化还原酶 DsbA 通过 Cys46 残基催化 HokB 二聚化,这对于孔隙形成和肽稳定性至关重要。然而,氧化还原酶 DsbC 介导 HokB 单体化,单体 HokB 被蛋白酶 DegQ 降解。孔解体后,电子传递链的复合物 I 赋予膜复极化和能量补充,使 HokB 诱导的持留细胞复苏。除了 HokB,还有一些 TA 模块或组件,包括 TA 模块 MqsR/MqsA、毒素 HipA、MazF 和 TisB,参与大肠杆菌持留细胞的形成。

除了生物膜和持留细胞形成之外,TA 系统还通过其他的机制促进抗逆性。例如,结核分枝杆菌的 VapC4 毒素切割并使唯一的 tRNA^{Cys} 失活,模拟半胱氨酸饥饿,进而导致结核分枝杆菌代谢的重新编程和一组限制性途径的激活,这些途径促进该病原体对抗氧化和铜应力。

4.4 TA 系统可以抑制噬菌体侵染 被噬菌体感染的细菌可能会在噬菌体复制周期完成之前自我牺牲,从而防止噬菌体扩散到其他细菌种群,这个过程称为流产感染,是细菌进化出的抵抗噬菌体感染的机制之一^[84]。TA 系统通过流产感染参与噬菌体抑制^[85]。例如,来自 R1 质粒的 I 型 TA 模块 *hok/sok* 在 T4 噬菌体抑制中起作用^[86];大肠杆菌的 MazE/MazF 模块通过引起细胞死亡来抑制 P1 噬菌体的传播^[87]。其他 TA 系统,包括 *rnlA/rnlB*、AbiEi/AbiE II、*toxI/ToxN*、PemK/PemI 和 antiToxSAS-ToxSAS,也参与噬菌体抑制。对于某些模块,例如 *toxI/ToxN* 和 antiToxSAS-ToxSAS,已经很好地建立了 TA 系统介导的噬菌体抑制机制。在 T4 噬菌体感染后,宿主转录(尤其是 *toxI/ToxN*)被阻断,导致不稳定的抗毒素 *toxI* 丢失和稳定毒素 ToxN 的激活。毒素 ToxN 是一种序列特异性内切核糖核酸酶,可以切割噬菌体 mRNA 并抑制其翻译,从而阻止噬菌体组装。

在应激条件下,细菌利用 RelA-SpoT 同源酶合成信号分子(ppGpp),来重整细菌的生理机能。这类警报因子合成酶的 5 个亚家族,包括 PhRel2、FaRel2、PhRel(gp29)、FaRel 和 CapRel,已被验证为 TA 系统的毒素(ToxSAS),其中 6 个相邻基因编码抗毒素^[69]。虽然 FaRel 通过积累 ppGpp 和 ppApp(ppGpp 的不寻常类似物)并消耗细胞 GTP 和 ATP 发挥作用,但其他 4 种毒素会焦磷酸化 tRNA CCA 末端以抑制蛋白质合成^[56, 69]。在这些毒素中,PhRel(gp29)参与防御噬菌体 Tweety 和 Gaia 的侵染,而 CapRel 保护大肠杆

菌免受多种噬菌体的侵害。值得注意的是, PhRel (gp29) 介导的防御与流产感染无关。有人提出, 噬菌体感染会诱导一种持留状态, 在这种状态下细胞生长会因 (p)ppGpp 积累而停止, 从而阻止噬菌体复制进程。CapRel 的 C 端结构域充当抗毒素样元件, 可以自动抑制 N 端毒素结构域。噬菌体感染后, 合成的主要衣壳蛋白直接与 C 末端结构域结合, 以解除 CapRel 的自身抑制, 使毒素结构域能够焦磷酸化 tRNA, 从而抑制翻译以限制噬菌体感染。重要的是, CapRel 可以被噬菌体衣壳蛋白直接激活, 而无须对其相应的抗毒素进行蛋白水解。

虽然细菌已将 TA 系统进化为噬菌体防御机制, 但噬菌体也进化出多种策略来对抗或利用 TA 模块。例如, T4 噬菌体表达 Dmd 作为抗毒素发挥作用, 中和来自大肠杆菌的 LsoA 和 RnlA 毒素。tifA 是 *dmd-tifA* 操纵子中的一个基因, 编码一种可以抑制大肠杆菌 ToxN 毒素的蛋白质。某些噬菌体可以通过在单个病毒基因中表达 *toxI* 抗毒素的模拟物或突变来逃避 *toxI*/ToxN TA 模块, 以抑制流产感染。噬菌体 Tweety 编码一种四肽重复蛋白 gp54, 它与 gp29-gp30 TA 复合物结合来防止毒素被释放, 从而对抗该系统。此外, *hokW/sokW* 是 Sakai 噬菌体 5 中编码的一个 I 型 TA 模块, 它可以辅助噬菌体介导大肠杆菌的裂解和促进噬菌体的释放。

5 TA 系统的应用

随着对 TA 系统作用机制和生物学特性的深入了解, TA 系统的应用也日益受到广泛重视。目前, TA 系统已在生物技术和生物医学领域得到开发和利用, 并取得了一系列有价值的进展。

5.1 TA 系统在生物技术中的应用 常规 DNA 克隆载体的一个主要缺点是阳性转化体的筛选效率低。目前, 已经使用 TA 系统构建了可以进行阳性选择的新克隆载体, 以提高筛选效率。克隆载体 pKIL18/19 中含有在 *lacP* 启动子控制下的毒素基因 *ccdB*。如果将空载质粒转化到大肠杆菌 *gyrA*⁺ 细胞中, 诱导 *ccdB* 表达会抑制细菌生长; 如果将外源 DNA 片段插入质粒, 毒素基因就会失活, 因此在诱导条件下含有重组质粒的细胞可以形成菌落。StabyCloning 系统是使用 TA 模块进行阳性选择的另一个例子。在该系统中, *ccdB* 被引入细菌染色体, 而截短的抗毒素基因 *ccdA* 存在于质粒中。当携带 14 bp 序列的目的 DNA 片段被克隆到质粒中时, 抗毒素基因得到恢复, 其产物可抑制毒素的作用^[11]。 *ccdB* 也在另一个称为 Gateway 的商业系统中得到利用, 其中 *ccdB* 被目标 DNA 片段取

代以生成所需的重组体。

在蛋白质表达过程中, 必须向培养基中补充抗生素以维持表达质粒。该方案成本高昂, 并且存在抗生素污染产品和环境的风险^[11]。考虑到 TA 系统有助于质粒维护, 已经提出了一种使用 TA 模块来稳定表达质粒的替代策略。Szpirer 等^[88] 开发了一种用于蛋白质和 DNA 生产的独立组分稳定系统, 通过该系统将 *ccdB* 引入细菌染色体, 同时将 *ccdA* 引入质粒。该系统允许在没有抗生素的情况下稳定质粒, 并将蛋白质产量提高 3~5 倍。通过分别使用 II 型 TA 模块 *ydcD/ydcE* 和 *yefMsl/yoeBsl*, 类似的策略也被用于在枯草芽孢杆菌和链霉菌中构建蛋白质表达平台。此外, 为了在植物病原体苛养木杆菌 (*Xylella fastidiosa*) 中进行基因互补, Burbank 等^[89] 构建了 2 个质粒, 它们是由 PemI/PemK TA 系统而不是添加抗生素来维持。

毒素可以对细菌发挥杀菌或抑菌活性。某些毒素基因已被开发为遗传操作的反选择标记物。例如, 来自大肠杆菌的 *mazF* 已被用作枯草芽孢杆菌^[90]、毕赤酵母^[91] 和多形汉逊酵母^[92] 无标记染色体操作的反选择标记。使用类似的策略, 最近为猪链球菌建立了一个无标记的基因删除系统。在该系统中, 副溶血性弧菌的 *yoeB* 充当反选择标记物^[93]。TA 组件还在其他应用中被用作反选择标记物, 包括来自拟态弧菌的毒素基因 *vmi480*^[94]、来自大肠杆菌的 *relB/relE* TA 模块和来自 *Pyrococcus furiosus* 的 *vapB/vapC* TA 模块。

除了 DNA 克隆、质粒维护和反选择外, 还有涉及 TA 系统及其组件的其他生物技术应用。例如, 利用 MazF 独特的 RNA 降解特性设计了在活的大肠杆菌细胞中的单一蛋白质生产系统。在该系统中目标蛋白能够独自持续、高水平地表达, 并且适用于表达大肠杆菌、酵母和人类的蛋白质。此外, Beyer 等^[95] 建立了一种基于大肠杆菌 CcdA/CcdB TA 系统的蛋白质剪接筛选方法。总体而言, 这些案例表明 TA 系统在生物技术领域具有广阔的应用前景。

5.2 TA 系统的医学研究应用 TA 系统也被应用于医学研究领域, 作为抗菌药物的靶点, 用于抗病毒和抗癌新技术的开发。

由于抗生素的过度使用, 抗生素耐药性已成为引起全球关注的严重问题。TA 系统是细菌和古菌特有的, 毒素过表达可以抑制细菌生长甚至杀死细菌, 因此 TA 系统被认为是设计新型抗菌药物的有吸引力的目标^[11]。目前, 已经提出了几种针对 TA 模块的策略来开发抗菌药物:

1) 毒素被设计成抗菌药物。来自金黄色葡萄球菌的 I 型毒素 PepA1 具有杀菌作用, 但它可以裂解

人类红细胞,因此 PepA1 被转化为非溶血性衍生物,其中最具有前途的一种具有较强的人血清稳定性和较高的抗菌活性.另一个例子是 ParELC3,一种源自毒素 ParE 的合成肽. ParELC3 是一种很好的细菌拓扑异构酶抑制剂,但它不能穿过细菌膜.然而,当将 ParELC3 封装在基于鼠李糖脂的脂质体中时,ParELC3 抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长的能力显著增强.

2)人工激活毒素.这种策略通常适用于 II 型 TA 系统,其毒素和抗毒素都是蛋白质^[11].毒素可以通过多种方法激活,包括破坏 TA 复合物、防止 TA 复合物形成和抑制抗毒素表达.例如, V30-SP-8 是一种新型固定肽,可干扰结核分枝杆菌 VapB30/VapC30 TA 复合物内的相互作用并发挥抗菌活性. V26-SP-8 是另一种固定肽,可与抗毒素 VapB26 结合并阻止 VapB26/VapC26 形成,从而诱导针对结核分枝杆菌的抗菌活性.此外,当 MazE 和 HipB 的翻译被反义肽核酸抑制时, MazF 和 HipA 被激活,从而引发对大肠杆菌的抗菌活性.

3)工程化噬菌体携带毒素基因进入病原菌.这些基因可以设计为通过噬菌体感染进入细菌,整合到它们的基因组中,并产生毒素来抑制或杀死细菌^[12].

某些毒素的核糖核酸内切酶活性已用于开发抗病毒疗法.大肠杆菌的 MazF 是一种特异性靶向 ACA 序列的核糖核酸内切酶^[6].有研究者创建了一种逆转录病毒载体,其中修饰的 *mazF* 基因(无 ACA)置于人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)的长末端重复序列(LTR)启动子的控制之下.然后,将载体转导到 CD4⁺T 淋巴 CEM-SS 细胞中,在 HIV-1 感染后,病毒 Tat 蛋白被表达,诱导 *mazF* 和整个 HIV-1 前病毒基因组的转录.产生的 MazF 蛋白可以切割病毒 mRNA,从而抑制 HIV-1 复制.此外,当将类似的 MazF 表达载体转导到 HIV-1 潜伏感染细胞系 OM-10.1 中时, MazF 诱导不仅抑制 HIV-1 的产生,还导致细胞凋亡.另一种方法是将 MazF 和 MazE 片段(MazEc)与可被病毒蛋白酶特异性切割的接头(linker)融合,形成无活性 MazF-linker-MazEc 融合蛋白.病毒感染后,病毒蛋白酶,如 HIV RR(HIV-1 蛋白酶)和 NS3(丙型肝炎病毒蛋白酶),可以将融合蛋白切割,生成游离的 MazF,后者发挥核糖核酸内切酶活性降解病毒 RNA^[96].此外, Park 等^[96]报告说, MazF 的释放不仅会抑制病毒复制,还会导致感染柯萨奇病毒 B3 的 HeLa 细胞死亡.

大肠杆菌 *relE* 毒素基因的表达可以抑制酵母细胞的生长,表明 TA 模块可能具有控制真核细胞增殖的潜力.因此,人们探索利用 TA 模块来设计抗癌疗

法.在人骨肉瘤细胞系中 RelE 的诱导表达可以导致细胞凋亡;在裸鼠成瘤实验中,在肿瘤细胞中诱导大肠杆菌毒素 MazF 表达可以显著减小荷瘤小鼠实体瘤的大小,表明这种毒素可能是一种很有前途的抗癌治疗工具. Shapira 等^[97]构建了含有大肠杆菌 *mazE/mazF* TA 盒的重组腺病毒载体,其中 *mazF* 由 SV40 启动子控制,而 *mazE* 由 CMV 启动子控制.在结直肠癌细胞中, RAS 通路过度活跃. Py4 增强子(一种 RAS 响应元件)显著增加 MazF 表达;与此同时, Tet 阻遏物高表达并与 Tet 操纵子结合,抑制 MazE 表达,从而导致 MazF 发挥其活性并消除癌细胞.在正常细胞中, Py4 增强子没有活性,由于 CMV 启动子的活性略强于 SV40 启动子,细胞产生的抗毒素多于毒素.因此,抗毒素可以中和毒素,从而保护正常细胞.此外,人们还建立了一个新的双系统,通过重组腺病毒载体来清除癌细胞,在该系统中 *mazF* 和 *mazE* 分别受 RAS 和 p53(一种肿瘤抑制因子)调节.除了 MazE/MazF 之外, Kis/Kid 和 YefM/YoeB TA 模块已应用于设计抗癌疗法. Preston 等^[98]使用 Kis/Kid TA 系统构建了一个合成系统,在表达癌蛋白 E6 的人类细胞中, Kis 抗毒素变体被降解,从而释放出 Kid 毒素,诱导程序性细胞死亡.在另一个方案中, *kis* 和 *kid* 基因 mRNA 分别从不同载体中的转录单位转录而来; *kis* 基因与编码肿瘤 miRNA 反向序列的元件(onco-miRT)融合表达,该序列与致癌的人类 microRNA(onco-miRNA)完全互补.在表达特定肿瘤 miRNA 的癌细胞中,该 miRNA 与肿瘤 miRT 的结合会诱导 *kis* mRNA 的降解, Kid 被激活以杀死癌细胞.使用类似的策略, Hourie 等^[99]利用肺炎链球菌 YefM/YoeB TA 模块选择性地杀死过表达 miR-21 的人类乳腺癌细胞.

6 展望

尽管对 TA 系统进行了 40 年的研究,但许多问题仍未得到解答.最令人费解的可能是它们在细菌基因组中的惊人数量.这些 TA 模块(特别是 II 型)非常丰富,即使在密切相关的基因组中也通常不保守.到目前为止,生物信息学分析表明它们往往与基因组岛相关,例如转座子、隐蔽和活跃的前噬菌体或防御岛,或者它们本身构成小的基因组岛^[100].近期报道的 CreTA 系统参与维持 CRISPR-Cas 系统的稳定性,在细菌抵抗噬菌体过程中具有重要的生物学意义^[35].

另一个关键问题涉及激活 TA 系统的条件.由于毒素和抗毒素成分的半衰期不同,经典观点认为,任何损害抗毒素合成的情况原则上都会促进毒素过量 and 激活.就某些大肠杆菌染色体 II 型系统而言,最近

的数据表明情况并非如此,因为与毒素结合的抗毒素似乎不易降解,即使在抗毒素表达受到抑制的条件下也是如此。然而,在Ⅲ型毒素系统中,由T4噬菌体介导的转录关闭,导致抗毒素降解和ToxN毒素的激活。所研究的大肠杆菌Ⅱ型系统是否代表在测试条件下毒素不能从毒素-抗毒素复合物中释放出来的特殊情况,仍有待研究。本课题组的研究发现,在分枝杆菌中的一些毒素或抗毒素蛋白可以发生Pup化修饰,表明Pup-蛋白酶体系统可能参与分枝杆菌中TA系统的活性调控^[10]。由于TA系统在毒素活性、抗毒性模式、调节机制等方面的多样性,因此在不同的细菌中应根据具体情况进行研究。

TA系统在生物技术中的应用取得了一系列新的进展。目前,基于TA系统构建了基因克隆工具以及抗病毒和抗癌新疗法。在结核分枝杆菌等致病菌中含有大量的TA系统,鉴于抗生素耐药性问题日益严重,研发基于TA系统的新型抗菌疗法将是未来的重要方向。此外,将TA系统与其他生物系统相结合,开发新型生物调控元件,也将在合成生物学领域具有应有前景。

7 参考文献

- [1] YAMAGUCHI Y, PARK J H, INOUE M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and Archaea[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 61
- [2] OGURA T, HIRAGA S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80(15): 4784
- [3] QIU J, ZHAI Y M, WEI M, et al. Toxin-antitoxin systems: classification, biological roles, and applications[J]. *Microbiological Research*, 2022, 264: 127159
- [4] PAGE R, PETI W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence[J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(4): 208
- [5] GERDES K, RASMUSSEN P B, MOLIN S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(10): 3116
- [6] ZHANG Y L, ZHANG J J, HOEFLICH K P, et al. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Cell*, 2003, 12(4): 913
- [7] KAMRUZZAMAN M, WU A Y, IREDELL J R. Biological functions of type II toxin-antitoxin systems in bacteria[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(6): 1276
- [8] LOBATO-MÁRQUEZ D, DÍAZ-OREJAS R, GARCÍA-DEL PORTILLO F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(5): 592
- [9] SONG S, WOOD T K. A primary physiological role of toxin/antitoxin systems is phage inhibition[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1895
- [10] FRAIKIN N, ROUSSEAU C J, GOEDERS N, et al. Reassessing the role of the type II MqsRA toxin-antitoxin system in stress response and biofilm formation: *mqsA* is transcriptionally uncoupled from *mqsR*[J]. *mBio*, 2019, 10(6): e02678.
- [11] UNTERHOLZNER S J, POPPENBERGER B, ROZHON W. Toxin-antitoxin systems: biology, identification, and application[J]. *Mobile Genetic Elements*, 2013, 3(5): e26219
- [12] SRIVASTAVA A, PATI S, KAUSHIK H, et al. Toxin-antitoxin systems and their medical applications: current status and future perspective[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(5): 1803
- [13] JURÉNAS D, FRAIKIN N, GOORMAGHTIGH F, et al. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(6): 335
- [14] BRIELLE R, PINEL-MARIE M L, FELDEN B. Linking bacterial type I toxins with their actions[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2016, 30: 114
- [15] NONIN-LECOMTE S, FERMON L, FELDEN B, et al. Bacterial type I toxins: folding and membrane interactions[J]. *Toxins*, 2021, 13(7): 878
- [16] XIE Y Z, WEI Y Q, SHEN Y, et al. TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D749
- [17] SINGH G, YADAV M, GHOSH C, et al. Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence[J]. *Current Research in Microbial Sciences*, 2021, 2: 100047
- [18] SUN C L, GUO Y X, TANG K H, et al. MqsR/MqsA toxin/antitoxin system regulates persistence and biofilm formation in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 840
- [19] LEPLAE R, GEERAERTS D, HALLEZ R, et al. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(13): 5513
- [20] GU D, ZHANG Y B, WANG Q Y, et al. S-nitrosylation-mediated activation of a histidine kinase represses the type 3 secretion system and promotes virulence of an enteric pathogen[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5777

- [21] BRANTL S, JAHN N. sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(3): 413
- [22] FINERAN P C, BLOWER T R, FOULDS I J, et al. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(3): 894
- [23] BLOWER T R, SHORT F L, RAO F, et al. Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(13): 6158
- [24] WEN Z L, WANG P X, SUN C L, et al. Interaction of type IV toxin/antitoxin systems in cryptic prophages of *Escherichia coli* K-12[J]. *Toxins*, 2017, 9(3): 77
- [25] LI Z, SONG Q H, WANG Y Z, et al. Identification of a functional toxin-antitoxin system located in the genomic island PYG1 of piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanos* II [J]. *Extremophiles*, 2018, 22(3): 347
- [26] ZHANG M X, ZHENG K L, TANG A G, et al. YgfY contributes to stress tolerance in shewanella oneidensis neither as an antitoxin nor as a flavinylation factor of succinate dehydrogenase[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11): 2316
- [27] WANG X X, LORD D M, CHENG H Y, et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(10): 855
- [28] WANG X X, LORD D M, HONG S H, et al. Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(6): 1734
- [29] WANG X X, YAO J Y, SUN Y C, et al. Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(5): 388
- [30] MARIMON O, TEIXEIRA J M C, CORDEIRO T N, et al. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13634
- [31] YU X, GAO X P, ZHU K X, et al. Characterization of a toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis* suggests neutralization by phosphorylation as the antitoxicity mechanism[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 216
- [32] CAI Y M, USHER B, GUTIERREZ C, et al. A nucleotidyltransferase toxin inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* through inactivation of tRNA acceptor stems[J]. *Science Advances*, 2020, 6(31): eabb6651
- [33] YAO J Y, ZHEN X K, TANG K H, et al. Novel polyadenylation-dependent neutralization mechanism of the HEPN/MNT toxin/antitoxin system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(19): 11054
- [34] CHENG F Y, WANG R, YU H Y, et al. Divergent degeneration of *creA* antitoxin genes from minimal CRISPRs and the convergent strategy of tRNA-sequestering CreT toxins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(18): 10677
- [35] LI M, GONG L Y, CHENG F Y, et al. Toxin-antitoxin RNA pairs safeguard CRISPR-Cas systems[J]. *Science*, 2021, 372(6541): eabe5601
- [36] MASACHIS S, DARFEUILLE F. Type I toxin-antitoxin systems: regulating toxin expression via shine-dalgarno sequence sequestration and small RNA binding[J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(4): RWR-0030-2018
- [37] ROMILLY C, DEINDL S, WAGNER E G H. The ribosomal protein S1-dependent standby site in *tisB* mRNA consists of a single-stranded region and a 5' structure element[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(32): 15901
- [38] ROMILLY C, LIPPEGAUS A, WAGNER E G H. An RNA pseudoknot is essential for standby-mediated translation of the *tisB* toxin mRNA in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(21): 12336
- [39] LI G Y, ZHANG Y L, INOUE M, et al. Inhibitory mechanism of *Escherichia coli* RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(21): 14628
- [40] ZIEMSKI M, LEODOLTER J, TAYLOR G, et al. Genome-wide interaction screen for *Mycobacterium tuberculosis* ClpCP protease reveals toxin-antitoxin systems as a major substrate class[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(1): 99
- [41] SONGAILIENE I, JUOZAPAITIS J, TAMULAITIENE G, et al. HEPN-MNT toxin-antitoxin system; the HEPN ribonuclease is neutralized by OligoAMPylation[J]. *Molecular Cell*, 2020, 80(6): 955
- [42] JIANG Y, POGLIANO J, HELINSKI D R, et al. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 44(4): 971
- [43] AMES J R, MUTHURAMALINGAM M, MURPHY T, et al. Expression of different ParE toxins results in conserved phenotypes with distinguishable classes of toxicity[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(10): e902

- [44] BERNARD P, COUTURIER M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 226(3): 735
- [45] ROBERTS R C, STRÖM A R, HELINSKI D R. The *parDE* operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth inhibition associated with plasmid loss[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 237(1): 35
- [46] JANKEVICIUS G, ARIZA A, AHMEL M, et al. The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA[J]. *Molecular Cell*, 2016, 64(6): 1109
- [47] GUO Y X, QUIROGA C, CHEN Q, et al. RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(10): 6448
- [48] HARMS A, STANGER F V, SCHEU P D, et al. Adenylation of gyrase and topo IV by FicT toxins disrupts bacterial DNA topology[J]. *Cell Reports*, 2015, 12(9): 1497
- [49] AAKRE C D, PHUNG T N, HUANG D, et al. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp[J]. *Molecular Cell*, 2013, 52(5): 617
- [50] METS T, LIPPUS M, SCHRYER D, et al. Toxins MazF and MqsR cleave *Escherichia coli* rRNA precursors at multiple sites[J]. *RNA Biology*, 2017, 14(1): 124
- [51] METS T, KASVANDIK S, SAARMA M, et al. Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR[J]. *Biochimie*, 2019, 156: 79
- [52] GOEDERS N, DRÈZE P L, VAN MELDEREN L. Relaxed cleavage specificity within the RelE toxin family[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(11): 2541
- [53] SCHURECK M A, REPACK A, MILES S J, et al. Mechanism of endonuclease cleavage by the HigB toxin[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(16): 7944
- [54] CRUZ J W, SHARP J D, HOFFER E D, et al. Growth-regulating *Mycobacterium tuberculosis* VapC-mt4 toxin is an isoacceptor-specific tRNase[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7480
- [55] CINTRÓN M, ZENG J M, BARTH V C, et al. Accurate target identification for *Mycobacterium tuberculosis* endoribonuclease toxins requires expression in their native host[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 5949
- [56] KURATA T, BRODIAZHENKO T, ALVES OLIVEIRA S R, et al. RelA-SpoT Homolog toxins pyrophosphorylate the CCA end of tRNA to inhibit protein synthesis[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(15): 3160
- [57] JURÉNAS D, CHATTERJEE S, KONIJNENBERG A, et al. AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA^{fMet}[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(6): 640
- [58] WILCOX B, OSTERMAN I, SEREBRYAKOVA M, et al. *Escherichia coli* ItaT is a type II toxin that inhibits translation by acetylating isoleucyl-tRNA^{Ile}[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(15): 7873
- [59] KASPY I, ROTEM E, WEISS N, et al. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 3001
- [60] VANG NIELSEN S, TURNBULL K J, ROGHANIAN M, et al. Serine-threonine kinases encoded by split *hipA* homologs inhibit tryptophanyl-tRNA synthetase[J]. *mBio*, 2019, 10(3): 01138
- [61] CASTRO-ROA D, GARCIA-PINO A, DE GIETER S, et al. The Fic protein Doc uses an inverted substrate to phosphorylate and inactivate EF-Tu[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(12): 811
- [62] FOZO E M, KAWANO M, FONTAINE F, et al. Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(5): 1076
- [63] WEEL-SNEVE R, KRISTIANSEN K I, ODSBU I, et al. Single transmembrane peptide DinQ modulates membrane-dependent activities[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(2): e1003260
- [64] MUTSCHLER H, GEBHARDT M, SHOEMAN R L, et al. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis[J]. *PLoS Biology*, 2011, 9(3): e1001033
- [65] ROCKER A, PESCHKE M, KITTILÄ T, et al. The ng ζ 1 toxin of the gonococcal epsilon/zeta toxin/antitoxin system drains precursors for cell wall synthesis[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1686
- [66] MASUDA H, TAN Q A, AWANO N, et al. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(5): 979
- [67] TAN Q, AWANO N, INOUE M. YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(1): 109
- [68] FREIRE D M, GUTIERREZ C, GARZA-GARCIA A, et al. An NAD⁺ phosphorylase toxin triggers *Mycobacterium tuberculosis* cell death[J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(6): 1282
- [69] JIMMY S, SAHA C K, KURATA T, et al. A widespread

- toxin-antitoxin system exploiting growth control via alarmone signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(19): 10500
- [70] UNOSON C, WAGNER E G H. A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 70(1): 258
- [71] GERDES K, BECH F W, JØRGENSEN S T, et al. Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon[J]. *The EMBO Journal*, 1986, 5(8): 2023
- [72] ZHAO Y, WANG W Q, YAO J Y, et al. The HipAB toxin-antitoxin system stabilizes a composite genomic island in *Shewanella putrefaciens* CN-32[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 858857
- [73] YAO J Y, GUO Y X, WANG P X, et al. Type II toxin/antitoxin system ParESO/CopASO stabilizes prophage CP4So in *Shewanella oneidensis*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(3): 1224
- [74] GU Q B, HE P J, WANG D, et al. An auto-regulating type II toxin-antitoxin system modulates drug resistance and virulence in *Streptococcus suis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 671706
- [75] YAO X Y, CHEN T A, SHEN X D, et al. The chromosomal SezAT toxin-antitoxin system promotes the maintenance of the SsPI-1 pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(2): 243
- [76] WEN W, LIU B H, XUE L, et al. Autoregulation and virulence control by the toxin-antitoxin system SavRS in *Staphylococcus aureus*[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(5): 00032
- [77] GUO Y X, SUN C L, LI Y M, et al. Antitoxin HigA inhibits virulence gene *mvfR* expression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(8): 2707
- [78] SONG Y J, ZHANG S P, LUO G H, et al. Type II antitoxin HigA is a key virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2021, 7(10): 2930
- [79] YIN W, WANG Y T, LIU L, et al. Biofilms: the microbial protective clothing in extreme environments[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3423
- [80] WANG Y N, WANG H, HAY A J, et al. Functional RelBE-family toxin-antitoxin pairs affect biofilm maturation and intestine colonization in *Vibrio cholerae*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135696
- [81] CHAN W, DOMENECH M, MORENO-CÓRDOBA I, et al. The streptococcus pneumoniae *yefM-yoeB* and *relBE* toxin-antitoxin operons participate in oxidative stress and biofilm formation[J]. *Toxins*, 2018, 10(9): 378
- [82] MA D M, GU H J, SHI Y J, et al. Edwardsiella piscicida YefM-YoeB: a type II toxin-antitoxin system that is related to antibiotic resistance, biofilm formation, serum survival, and host infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 646299
- [83] ZHOU J Y, LI S Y, LI H Z, et al. Identification of a toxin-antitoxin system that contributes to persister formation by reducing NAD in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 753
- [84] EGIDO J E, COSTA A R, APARICIO-MALDONADO C, et al. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2022, 46(1): fuab048
- [85] LOPATINA A, TAL N, SOREK R. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy[J]. *Annual Review of Virology*, 2020, 7(1): 371
- [86] PECOTA D C, WOOD T K. Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(7): 2044
- [87] HAZAN R, ENGELBERG-KULKA H. *Escherichia coli mazEF*-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272(2): 227
- [88] SZPIRER C Y, MILINKOVITCH M C. Separate-component-stabilization system for protein and DNA production without the use of antibiotics[J]. *BioTechniques*, 2005, 38(5): 775
- [89] BURBANK L P, STENGER D C. Plasmid vectors for *Xylella fastidiosa* utilizing a toxin-antitoxin system for stability in the absence of antibiotic selection[J]. *Phytopathology*, 2016, 106(8): 928
- [90] ZHANG X Z, YAN X, CUI Z L, et al. *mazF*, a novel counter-selectable marker for unmarked chromosomal manipulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(9): e71
- [91] YANG J J, JIANG W H, YANG S. *mazF* as a counter-selectable marker for unmarked genetic modification of *Pichia pastoris*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2009, 9(4): 600
- [92] SONG P P, LIU S, GUO X N, et al. Scarless gene deletion in methylotrophic *Hansenula polymorpha* by using *mazF* as counter-selectable marker[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 468: 66
- [93] ZHENG C K, WEI M, QIU J, et al. A markerless gene

- deletion system in streptococcus suis by using the copper-inducible vibrio parahaemolyticus YoeB toxin as a counterselectable marker[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 1095
- [94] LUO P, HE X Y, LIU Q T, et al. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in vibrio species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, vmi480[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144465
- [95] BEYER H M, IWAÏ H. Off-pathway-sensitive protein-splicing screening based on a toxin/antitoxin system[J]. *ChemBioChem*, 2019, 20(15): 1933
- [96] PARK J H, YAMAGUCHI Y, INOUE M. Intramolecular regulation of the sequence-specific mRNA interferase activity of MazF fused to a MazE fragment with a linker cleavable by specific proteases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(11): 3794
- [97] SHAPIRA S, SHAPIRA A, KAZANOV D, et al. Selective eradication of cancer cells by delivery of adenovirus-based toxins[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 38581
- [98] PRESTON M A, PIMENTEL B, BERMEJO-RODRÍGUEZ C, et al. Repurposing a prokaryotic toxin-antitoxin system for the selective killing of oncogenically stressed human cells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 540
- [99] HOURI H, GHALAVAND Z, FAGHIHLOO E, et al. Exploiting *yoeB-yefM* toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae* on the selective killing of *miR-21* overexpressing breast cancer cell line (MCF-7) [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(3): 2925
- [100] HALLEZ R, GEERAERTS D, STERCKX Y, et al. New toxins homologous to ParE belonging to three-component toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* O157: H7[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 76(3): 719
- [101] CHI X D, CHANG Y Q, LI M M, et al. Biochemical characterization of mt-PemIK, a novel toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *FEBS Letters*, 2018, 592(24): 4039

Biological functions of toxin-antitoxin systems

ZHOU Shiwen ZHANG Junjie

(School of Life Sciences, Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulatory Biology, Ministry of Education, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract Toxin-antitoxin (TA) systems widely exist in the genomes and plasmids of prokaryotes. They are composed of two basic elements: stable toxins, whose role is to inhibit key progresses related to bacterial growth such as DNA replication, mRNA stability, protein translation and metabolic regulation, and unstable antitoxin antagonizing toxins. Under certain conditions, antitoxin is degraded or loses antagonistic function against cognate toxin, so that the toxin could inhibit cell growth. Eight types of TA systems have been discovered thus far, each with different mechanisms of action, and participating in the regulation of various biological activities. TA systems play important roles in bacterial stress response, resistance to bacteriophages, bacterial persistence, formation of drug resistance in pathogenic bacteria. TA systems have been used as tools to develop novel biotechniques both in scientific research and disease prevention and treatment.

Keywords toxin-antitoxin system; stress response; bacterial persistence; drug resistance; biotechnology

【责任编辑: 武 佳】