

变异链球菌的 VicRK 双组分信号传导系统

田媛媛综述 胡涛审校

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 成都 610041)

[摘要] 变异链球菌是人类龋病的主要病原菌, 它通过蔗糖依赖性黏附形成生物膜并在其中产酸耐酸, 最终导致龋病。VicRK 是变异链球菌 13 种双组分信号传导系统之一, 可调节变异链球菌致龋性毒力相关因子的表达。本文就 VicRK 的作用机制、结构组成、生理特性, 及其对变异链球菌致龋性的影响, VicRK 和 VicX 间的关系等研究进展作一综述。

[关键词] 变异链球菌; 双组分信号传导系统; 基因表达; VicRK

[中图分类号] R 780.2 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.01.025

VicRK two-component signal transduction system of *Streptococcus mutans* Tian Yuanyuan, Hu Tao. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), which is considered as the chief pathogen of human caries, possesses the ability to form biofilm via sucrose-dependent adhesion, genesis and endure acids in the biofilm that may ultimately lead to dental caries. VicRK is one of the 13 putative two-component signal transduction systems of *S.mutans* that modulate the expression of cariogenesis related virulence factors. This review summarized the mechanism, structural organization, physiological characteristics and the impact on the cariogenesis capabilities of VicRK, as well as the correlation between VicRK and VicX in *S.mutans*.

[Key words] *Streptococcus mutans*; two-component signal transduction system; gene expression; VicRK

2005 年, Ulrich 等^[1]对 145 种细菌基因组进行了测序, 在此过程中他们发现了至少 4 000 对双组分信号传导系统(two-component signal transduction system, TCSTS)。TCSTS 对于细菌的环境适应性有着巨大的影响, 在变异链球菌中也不例外。TCSTS 在多种生物致病性因子的表达中有着重要的作用, 而 VicRK 是重要的 TCSTS 之一。

1 VicRK 的作用机制

在原核生物中, TCSTS 调控其基因表达, 而对温度、渗透压休克、低氧气、pH 和营养不足等外界环境变化作出适应性改变^[2-3]。经典的 TCSTS 由一个细胞质内的调控效应子(response regulator, RR)和一个膜结合的组氨酸激酶(histidine kinase, HK)组成。VicRK 中, VicR 为细胞质内 RR, VicK 为 HK。以磷酸化为基础的 TCSTS 作用机制: 细胞外环境刺激信号由 HK 的 N 末端输入

域感受后, 其细胞质信号域内约 200 个保守的组氨酸残基发生自磷酸化, 然后磷酸基团由 VicK 传递给同源的 VicR 上特异的天冬氨酸残基, 激活 DNA 结合蛋白与相应的靶基因结合, 从而使其基因表达产物上调或抑制。细菌经此途径适应外环境的变化和刺激; 但是在大多数病原菌中, 关于 TCSTS 在调节细菌毒力中所起作用的分子基础的报告还很少^[4]。

2 VicRK 结构组成及其生理特性

2002 年, 一些学者^[5-6]对血清 c 型变异链球菌 UA159 株基因组行序列分析发现, 有 13 个 TCSTS 和 1 个独立的 RR(GcrR)。Biswas 等^[7]用 PCR 和基于局部比对算法的搜索工具-p 技术, 发现了由 smu₄₅/smu₄₆ 基因编码的第 14 个 TCSTS, 但其只存在于血清 c 型的 UA159 和 8VS3 菌株中。VicRK (曾随其在酿脓链球菌中的同系物被称为 CovRK) 作为变异链球菌中 13 个 TCSTS 之一, 在调节其毒力、适应性和生存力中起重要的作用。VicRK 由 vicRK 基因编码。UA159 株变异链球菌的 vicRK 基因位于负链染色体上。vicR 编码序列为

[收稿日期] 2010-08-28; [修回日期] 2011-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81041104)

[作者简介] 田媛媛(1986—), 女, 四川人, 硕士

[通讯作者] 胡涛, Tel: 028-85407723

705 bp, 它所编码的 VicR 蛋白的相对分子质量为 26 900, 是一种球形的 DNA 结合蛋白。当细菌受到外环境刺激时, 它与特异的靶基因结合调节细菌的生物学特性。vicK 的序列为 1.350 bp, 其所编码的 VicK 的相对分子质量为 51.686, 是一种跨膜受体。VicK 将感受到的环境刺激传递给反应调节器 VicR, 通过一系列生化反应调节细菌适应性反应。

除变异链球菌以外, 其他的一些细菌中也存在着 VicRK 双组分调节系统, 如枯草杆菌、肺炎链球菌等, 它们有高度的同源性。在枯草杆菌中, VicRK 是其生长所必需的唯一 TCSTS; 在肺炎链球菌中, 功能性的 VicRK 为细菌的生长和毒力表达所必须。VicRK 在不同的细菌种群中调节不同的基因亚群。在变异链球菌中, 可对每个 TCSTS 中的 HK 进行插入失活^[8], 说明 VicK 的失活对于变异链球菌并非致命; 相反, Bhagwat 等^[9]在发现, 将 UA159 株 vicR 基因敲除来构建突变体是无意义的, 而且 NG8 菌株的 vicR 无效突变体也会导致变异链球菌失去生活力, 即 VicR 可是变异链球菌存活所必须的。

Tremblay 等^[10]发现, VicR 在细胞生长对数期的中、晚期以及在 pH7.8 的缓冲培养基中生长时的转录水平较高。这提示 VicRK 双组分系统的表达受培养时 pH、生长期影响, 而 VicRK 的表达还受抗生素的影响, 且由 LiaFRS 三组份调节系统调控, 但是其表达不受糖类的影响。也有研究^[11]显示, VicR 的表达水平受细胞生长时期的影响, 而且在对数期早期的表达水平相对较低, 其表达受糖类的影响较小。变异链球菌 Gs5 株在生物膜环境下, VicR 的表达较在浮游环境下的表达上调了 12 倍^[12]。这说明生物膜环境可诱导其表达 VicR 蛋白, 而且 VicR 的表达还具有菌株特异性。

PAS (period clock protein-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-single-minded) 域是许多蛋白家族所共有的特征之一, 最初发现于果蝇属周期时钟蛋白、脊椎动物芳香烃受体核转位子和果蝇属 SIM (single-minded) 蛋白中, 并且以其英文缩写首字母命名为 PAS。在原核生物细胞中, PAS 都无一例外地在信号传导系统中的感受器上被发现, 能感受氧气和细胞内氧化还原电势的变化。VicK 作为 VicRK 中的感受器, Bateman 等^[13]对 VicK 进行蛋白质家族数据库分析发现了 4 个片段: 1) N 末端 10 和 32 残基间的跨膜束; 2) 84 和

198 之间的 PAS 域; 3) HK 域; 4) HK 样三磷酸腺苷酶域。在变异链球菌中, VicK 是 13 个 TCSTS 中唯一一个有 PAS 域的感受器蛋白。有学者^[14]通过构建 UA159 菌株 vicK 基因缺失突变体发现, 在过氧化氢的应激作用下, 突变体对过氧化氢较野生株更加敏感。这说明 VicK 与变异链球菌感受外界氧化应激, 并对其作出相应的适应性反应有关; 而且在氧化应激状态下, 绿色荧光蛋白结合 vic 基因启动子的菌株的荧光密度增加, 即氧化应激能使 vic 基因的表达增加。

3 VicRK 对变异链球菌致龋性的影响

3.1 VicRK 与变异链球菌的产酸耐酸能力

变异链球菌能够在牙菌斑生物膜中迅速产酸和耐酸, 当 pH 下降到临界值(一般为 5.5)以下时, 釉质脱矿进而出现龋坏。这是变异链球菌致龋的主要病理机制。Senadheera 等^[15]构建 vicK 无效突变株, 在加入蔗糖的培养基中测定 vicK 无效突变株和野生株的糖酵解速率时发现, 突变株的糖酵解速率明显较野生株降低。即突变株的产酸性能遭到破坏。虽然 vicK 基因缺失型突变株产生较少的乳酸, 但 vicK 的缺失增加了细菌的耐酸能力; 在 pH3.5 的环境中, vicK 基因突变株的存活率明显高于野生株。这些研究证实, VicK 有调节细菌细胞内 pH 稳态的功能, VicRK 可影响变异链球菌的产酸耐酸能力, 从而影响釉质的致龋性。

3.2 对生物膜形成和结构的影响

菌斑生物膜是变异链球菌进行产酸代谢的微环境, 细菌对牙面的蔗糖依赖性黏附和生物膜形成是变异链球菌致龋的首要条件。Ahn 等^[16]在构建了 UA159 株的 vicK 缺失突变体后发现: 在静止状态下, 突变株在生长过程中的生长率发生了改变, 其形成生物膜的能力较野生株明显降低, 且生物膜细胞链变长, 细胞成块聚集; 但是在有氧环境下, 突变株生物膜细胞几乎与野生株相同。vicK 基因缺失突变体还可以使没有特殊病原菌小鼠的平滑面菌斑的形成较 UA159 野生株增多, 但是对于龋病的发病率却没有影响。以上研究表明, VicRK 可影响变异链球菌生物膜的形成和结构。

3.3 对 vicK 缺失突变体中相关基因表达的影响

葡萄糖基转移酶 (glucosyltransferase, gtf) B/C/D 基因分别编码 GtfB/C/D, 其中 GtfB/C 催化利用蔗糖合成的水不溶性葡聚糖是生物膜形成过程中促进细胞黏附和集聚的重要因子; 由果糖基转移

酶(fructosyltransferase, ftf)基因编码合成的 Ftf 催化合成的果聚糖,主要是作为细胞外能量储存物质且在细菌集聚过程中作为结合位点^[17];而葡聚糖结合蛋白(glucan binding protein, gbp)基因编码至少 4 种蛋白质,其中, GbpA/C/D 对于变异链球菌生物膜的形成和成熟皆具有特异的作用^[18]。Senadheera 等^[19]通过构建 UA159 菌株 vicK 缺失突变体和 vic 过表达突变体,用定量反转录 PCR 技术进行研究发现:vicK 基因缺失突变体中 gtfD、ftf、gbpB 基因的表达与野生株相比有不同程度的下调,即 VicK 对这些基因进行正性调节,但是在加入葡萄糖的培养基中,gtfB/C 的表达都增加;在 vic 过表达的突变体中,gtf、ftf、gbpB 等基因的表达都有不同程度的增加。他们还通过电泳迁移率变动分析发现,VicR 可直接与 gtfB/C、ftf 的启动子区域结合。即 VicR 能与这些基因的启动子结合从而调节其表达水平,但机制尚待研究。

3.4 对细胞外糖类合成的影响

细胞外多糖包括葡聚糖和果聚糖,尤其是水不溶性葡聚糖,是变异链球菌对牙面的黏附和定植过程中重要的毒力因子。vicK 基因缺失突变体可以导致葡聚糖的形成速率降低。Lee 等^[20]用同源重组的方法构建了变异链球菌 NG8 株的 covR(vicR)突变株,突变株引起胞外糖类增多,这些糖类明显含有葡萄糖和葡萄糖醛酸。

3.5 其他

VicRK 还调节变异链球菌的遗传感受性。遗传感受性可以使细菌吸收和融入异种基因,从而出现耐药性,也可以促进其遗传变异。

4 VicRK 和 VicX 间的关系

vicX 基因的编码序列为 801 bp,它所编码的蛋白质 VicX 的相对分子质量为 29.68。vicX 与 vicRK 在染色体上串联排列,共同组成三联操纵子。在 vicR 上游有一个启动子,在 vicX 下游大约 100 bp 有一个不依赖于 Rho 的终止子。与 VicR 相比较,关于 VicX 的研究相对较少。Senadheera 等^[21]在构建 UA159 菌株 vicX 缺失突变体后发现,vicX 与调控 gtfB/C 的表达有关,还调控细菌的生长、黏附、生物膜形成、遗传转化和氧化应激等与变异链球菌致病性密切相关的生理特性。研究 VicR 是否与 VicK 相互作用,或二者间是怎样进行相互作用的,以揭示 vicX 在 vicRKX 三联操纵子上的作用及其怎样影响 VicRK,从而

影响变异链球菌的致病生理特性是非常重要的。

5 结束语

VicRK 是变异链球菌中重要的与其致病性相关的 TCSTS 之一,它通过激活或抑制靶基因的表达对外界刺激作出反应,从而适应细胞外环境的变化。TCSTS 长时间被认为是阻止病原菌微生物有意义的靶点^[22],所以揭示 VicRK 作用的分子机制,可为龋病的预防和治疗提供新的有意义的靶位点。

6 参考文献

- [1] Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes[J]. Trends Microbiol, 2005, 13(2): 52-56.
- [2] Mascher T, Helmann JD, Uden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(4): 910-938.
- [3] El-Sharoud WM. Two-component signal transduction systems as key players in stress responses of lactic acid bacteria[J]. Sci Prog, 2005, 88(Pt 4): 203-228.
- [4] Beier D, Gross R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems[J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(2): 143-152.
- [5] Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 14434-14439.
- [6] Idone V, Brendro S, Gillespie R, et al. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis[J]. Infect Immun, 2003, 71(8): 4351-4360.
- [7] Biswas I, Drake L, Erkina D, et al. Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2008, 190(1): 68-77.
- [8] Lévesque CM, Mair RW, Perry JA, et al. Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties[J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(4): 398-404.
- [9] Bhagwat SP, Nary J, Burne RA. Effects of mutation putative two-component systems on biofilm formation by *Streptococcus mutans* UA159[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205(2): 225-230.
- [10] Tremblay YD, Lo H, Li YH, et al. Expression of the *Streptococcus mutans* essential two-component regulatory system VicRK is pH and growth-phase dependent and controlled by the LiaFSR three-component regulatory system[J]. Microbiology, 2009, 155(Pt 9): 2856-2865.
- [11] Shemesh M, Tam A, Feldman M, et al. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* ftf, gtf and vicR

genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases[J]. Carbohydr Res, 2006, 341(12) :2090-2097.

[12] Shemesh M, Tam A, Steinberg D. Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(11) : 1528-1535.

[13] Bateman A, Coin L, Durbin R, et al. The Pfam protein families database[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32 :D138-D141.

[14] Deng DM, Liu MJ, ten Cate JM, et al. The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress[J]. J Dent Res, 2007, 86(7) :606-610.

[15] Senadheera D, Krastel K, Mair R, et al. Inactivation of VicK affects acid production and acid survival of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(20) :6415-6424.

[16] Ahn SJ, Burne RA. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2007, 189(17) :6293-6302.

[17] Rozen R, Bachrach G, Bronshteyn M, et al. The role of fructose on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 195(2) :205-210.

[18] Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE, et al. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 268(2) :158-165.

[19] Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, et al. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and fit expression, biofilm formation, and genetic competence development[J]. J Bacteriol, 2005, 187(12) :4064-4076.

[20] Lee SF, Delaney GD, Elkhateeb M. A two-component covRS regulatory system regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular carbohydrate in *Streptococcus mutans*[J]. Infect Immun, 2004, 72(7) :3968-3973.

[21] Senadheera MD, Lee AWC, Hung DC, et al. The *Streptococcus mutans* vicX gene product modulates gtfB/C expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance[J]. J Bacteriol, 2007, 189(4) :1451-1458.

[22] Stephenson K, Hoch JA. Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(6) :765-773.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第88页)

and maintenance of osteoblast progenitors[J]. Development, 2006, 133(16) :3231-3244.

[11] Hu H, Hilton MJ, Tu X, et al. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development[J]. Development, 2005, 132(1) :49-60.

[12] Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures[J]. J Cell Biol, 2001, 155(1) :157-166.

[13] Kanatani N, Fujita T, Fukuyama R, et al. Cbfa1 beta regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development[J]. Dev Biol, 2006, 296(1) :48-61.

[14] Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency[J]. Dev Dyn, 2007, 236(7) :1876-1890.

[15] Nakashima K, Crombrughe BD. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation[J]. Trends Genet, 2003, 19(8) :458-466.

[16] 戚孟春, 梁永强, 孙红, 等. 张应力下成骨性转录因子在骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 实用口腔医学杂志, 2008, 24(5) :654-658.

[17] Kearney EM, Farrell E, Prendergast PJ, et al. Tensile strain as a regulator of mesenchymal stem cell osteogenesis[J]. Ann Biomed Eng, 2010, 38(5) :1767-1779.

[18] Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, et al. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(26) :23934-23941.

[19] 时函, 陈远萍, 史瑞新, 等. 核心结合因子(Cbfa1)与正畸牙移动中牙槽骨改建的相关性研究[J]. 上海口腔医学, 2007, 10(16) :507-511.

[20] Reijnders CM, Bravenboer N, Tromp AM, et al. Effect of mechanical loading on insulin-like growth factor-gene expression in rat tibia[J]. J Endocrinol, 2007, 192(1) :131-140.

[21] Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, et al. Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts[J]. 2007, 101(5) :1266-1277.

[22] 曹阳, 郑翼, 罗颂椒. 酪氨酸蛋白激酶抑制剂和细胞松弛素D对应力下成骨细胞ERK1/2早期变化的调控[J]. 中华口腔医学研究杂志 :电子版, 2008, 2(4) :352-358.

(本文编辑 吴爱华)