

# 酪蛋白裂解酶 P 对变异链球菌致龋性的影响

王拓综述 于丹妮审校

(天津医科大学第二医院口腔科 天津 300211)

[摘要] 变异链球菌是人类龋病的主要致病菌,不仅在数量上优势明显,而且其产酸和耐酸能力较强,其生物膜黏附于牙表面是其毒性致龋的首要步骤。酪蛋白裂解酶P(ClpP)是细菌体内一种介导蛋白质水解的热休克蛋白,可清除细菌体内的变性蛋白质,影响细菌的生物膜形成并且在细菌对生存环境的诸多应激反应中发挥着一定的作用。本文就 ClpP,变异链球菌 ClpP,其他致病微生物的 ClpP 等研究进展作一综述。

[关键词] 变异链球菌; 酪蛋白质裂解酶; 应激反应; 生物膜

[中图分类号] Q 51 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.02.026

**Influence of the caseinolytic protease on the ability of *Streptococcus mutans* to cause dental caries** Wang Tuo, Yu Danni. (Dept. of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[Abstract] *Streptococcus mutans* is known as a primary pathogen of dental caries, it not only has an advantage over amount, but also has a strong ability to produce and resist acid. However, forming biofilms to adhere to the surface of the teeth is the most important step. The caseinolytic protease is a kind of heat shock protein, which mediates the proteolysis. This protease can remove the denatured proteins in the bacterial and play a particular role in biofilm formation and stress response reaction of the bacterial.

[Key words] *Streptococcus mutans*; caseinolytic protease; stress response; biofilm

变异链球菌是人类龋病的主要致病因子,是口腔医学领域的重要研究内容之一。该菌通常寄居于牙表面的生物膜上,其主要的致病特性有:在牙表面形成生物膜,代谢大量的糖类,耐受口腔环境快速和频繁的变化。除龋病之外,变异链球菌还常常导致亚急性细菌性心内膜炎。酪蛋白裂解酶P(caseinolytic protease P, ClpP)是细菌体内的一种热休克蛋白,是丝氨酸蛋白质家族的重要成员。当细菌生存的环境温度升高时,热休克蛋白可诱导 ClpP 介导的蛋白质水解。该作用的主要功能是降解和清除细菌在一般应激状态下产生且堆积的变性蛋白质,以维持细菌内部的蛋白质稳态<sup>[1]</sup>。下面就 ClpP 与变异链球菌致龋性间的相关性研究进展作一综述。

## 1 酪蛋白裂解酶 P

### 1.1 酪蛋白裂解酶 P 的功能

细菌在环境中发生应激反应的结果,往往缘

于其基因转录和翻译错误而导致其异常蛋白质的堆积。蛋白质稳态是通过使必要的功能蛋白质保持稳定和错叠以及异常的蛋白质重折叠和降解来实现的,这种能力对于宿主体内的病原菌非常重要。细菌中有 4 种腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)依赖性的蛋白酶。其中, Clp 族蛋白酶首先发现于大肠杆菌中,含有 ATP 酶(adenosine triphosphatase, ATPase)的特异因子,含丝氨酸蛋白酶活性位点的蛋白质水解区域<sup>[1]</sup>。在大肠杆菌中, ClpP 介导的蛋白质水解作用的主要功能是清除在应激状态下积累的异常蛋白质,回收饥饿状态下来自非必需蛋白质的氨基酸并清除来自失去作用的核糖体的缩短的肽链。此外,该蛋白质水解还可控制大肠杆菌中调节蛋白的半衰期。ClpP 系统除了在应激反应方面的作用外,还在降解异常蛋白质方面起着重要的作用。

高度保守的 ATP 依赖性的 ClpP 是一种双组件蛋白酶,包含独立编码 ATPase 和肽酶的亚单位。ClpP 的相对分子质量接近  $2.4 \times 10^5$ ,其核心的 14 个 ClpP 丝氨酸肽酶亚基堆叠在 2 个七聚体环中,形成一个容纳着活性位点的腔<sup>[2]</sup>。为了获得

[收稿日期] 2011-05-21; [修回日期] 2011-12-21

[作者简介] 王拓(1985—),女,河北人,硕士

[通讯作者] 于丹妮, Tel: 022-88329150

蛋白质水解活性, ClpP 多聚体便结合到 ATPase 的一二个七聚体环上形成含 ClpP 的蛋白质水解复合物。该复合物包括分子伴侣和 ATP 依赖性的蛋白酶。分子伴侣可以阻止部分变性蛋白质的错叠和聚集, 而 ATP 依赖性的蛋白酶则负责降解变性蛋白质<sup>[3]</sup>。

## 1.2 酪蛋白裂解酶 P 的活性和肽识别

ClpP 及其 ATPase 成分 ClpX 或 ClpA 负责清除细胞中错叠的蛋白质, 而且在蛋白质质量控制方面起着十分重要的作用。为了了解底物识别和降解变性蛋白质的分子机制, Maurizi 等<sup>[4]</sup>对幽门螺旋杆菌的 ClpP 的晶体结构进行了研究, 发现其在载脂蛋白基因状态下与结合在活性位点的产物肽形成结合物。在这个复杂的结构中, 肽链与反向平行的 2 条 ClpP 链压缩并结合到邻近的活性位点, 为广泛的底物特异性、产物抑制作用和底物的持续降解提供了结构上的诠释。该结构同时表明, 底物结合会导致活性位点周围局限性的构象变化, 最终诱导出 ClpP 的活性构象。

## 2 变异链球菌酪蛋白裂解酶 P

口腔环境变化较快, 在变异链球菌定植于口腔期间要经历诸多不利的生长环境, 譬如温度的变化、pH 的波动以及氧分压和渗透压的变动等; 而且, 宿主对食物间歇性地摄取和口腔护理措施的干预也导致了营养的利用和口腔环境的巨大变化。有关变异链球菌 ClpP 的研究主要集中于生物膜的形成能力, 生物膜对抗生素和口腔常用护理试剂耐受能力的影响等方面<sup>[5-11]</sup>。

### 2.1 变异链球菌 clpP 基因缺陷株的生长特点

Kajfasz 等<sup>[11]</sup>为扩大分析范围, 在试验过程中敲除了已在变异链球菌基因组中鉴定出的 clp 基因家族的各种基因(clpB、clpC、clpE、clpL、clpP 和 clpX), 经过对缺陷株在 42 °C 或酸化至 pH5.5 的培养基中的生长状况进行观测发现: 在这两种生长条件下, clpP 基因缺陷株的生长速度较野生菌株慢, 而且生长速度在最后阶段明显减慢; 在需氧环境下, clpP 基因缺陷株的生长严重受到抑制。clpB、clpC、clpE 基因缺陷株在上述相同条件下, 其生长状况与亲代菌株之间无明显区别。以上结果表明, clpP 基因对于变异链球菌的生存能力起着较为关键的作用。此外, DnaK、ClpC 和 ClpE 蛋白等 clpP 基因缺陷株中的分子伴侣上调, 表明 ClpP 缺失引起的细胞内的应激反应, 也

可能是引起变性蛋白质堆积的原因之一<sup>[9]</sup>。

### 2.2 ClpP 在变异链球菌对药物应激反应中的作用

Chattoraj 等<sup>[10]</sup>在关于变异链球菌的 clpP 基因缺陷株对甲氧苄啶敏感性方面的研究中发现, SMU.947 基因编码的二氢叶酸还原酶可以将二氢叶酸转化成甲氧苄啶, 而甲氧苄啶为嘌呤合成、胸苷酸合成以及一些特定氨基酸合成所必需。为了研究 clpP 基因是否调节 SMU.947 基因的表达, 他们以序列反转录分析以直接测出转录量, 结果在 clpP 基因缺陷株中, SMU.947 基因的表达量较野生菌株降低了 50%。通过测试甲氧苄啶的最低抑菌质量浓度发现, clpP 基因缺陷株的最低抑菌质量浓度是野生菌株的 1/4。即 clpP 基因缺失导致细菌对甲氧苄啶的敏感性增强, ClpP 蛋白在变异链球菌对该药物的耐受性方面起着一定的作用。

为了进一步地明确 ClpP 的作用, Deng 等<sup>[8]</sup>进行了有关变异链球菌对过氧化氢、氟化物和氯己定等口腔常用护理试剂应激反应的试验。在试验过程中, 他们以双向变异分析法比较了 clpP 基因缺陷株与野生菌株间的生长抑制区域。结果显示, clpP 基因缺陷株和野生菌株均用过氧化氢或氯己定处理后, 缺陷株的受抑制区域直径明显大于野生菌株。在正常的 pH(7.2) 环境下, 以琼脂稀释方法比较 clpP 基因野生菌株与缺陷株的生长情况发现, 两者间没有差异。将 2.7 mmol 的氟化钠或 0.5 mol 氯化钠放入 pH5.0 的培养基中时, 则这两种菌株的生长都被抑制, 且对缺陷株的影响大于野生株。以上结果表明, ClpP 在变异链球菌对常规的口腔护理试剂的耐受性方面发挥着一定的作用, 而且可以推测, 口腔常用的护理药剂可有效地抑制变异链球菌 clpP 基因缺陷株的生长。

### 2.3 ClpP 在变异链球菌生物膜形成中的作用

作为人类龋病的主要致病菌, 变异链球菌生物膜黏附于牙表面是其发挥毒性的关键步骤。变异链球菌定植于牙面有两种不同的机制, 即蔗糖依赖性和蔗糖非依赖性。其中, 蔗糖依赖性途径包括通过三种葡糖基转移酶和葡聚糖结合蛋白生成胞外聚合物, 如葡萄糖、葡聚糖等。在 Kajfasz 等<sup>[11]</sup>对变异链球菌各种 clp 基因缺陷株的生物膜形成能力进行的评估研究中: 当培养基以葡萄糖作为糖源时, clpX 和 clpP 基因缺陷株的生物膜形成量较其亲代菌株明显减少, 而 clpB、clpC、clpE 等基因缺陷株与其亲代间的生物膜形成量没有明显的差别; 当培养基以蔗糖作为糖源时, clpP、

clpL、clpX 三种基因缺陷株形成生物膜的能力明显增强。这就表明, ClpX 和 ClpP 蛋白的水解作用控制着变异链球菌的生物膜形成;而在蔗糖培养基中, clpP、clpL、clpX 三种基因缺陷株中葡聚糖的生成增多,其具体的作用机制还有待进一步的明确。

### 3 其他致病微生物的酪蛋白裂解酶 P

#### 3.1 肺炎链球菌 ClpP 在应激反应和生理方面的调节作用

在正常的生长条件下,肺炎链球菌的最适生长温度为 35~37 °C。Robertson 等<sup>[1]</sup>发现: 型肺炎链球菌 clpP 基因缺失变异株在 30 °C 时生长情况较差,而在 40 °C 时停止生长;通过平板扩散试验比较 clpP 基因缺陷株及其亲代菌株,缺陷株对嘌呤霉素这种翻译抑制剂更加敏感。与以上结果一样,对缺陷菌株使用亚抑菌质量浓度的嘌呤霉素后,通过 DNA 微阵列分析显示,肺炎球菌的热休克调节子发生了强烈的诱导。也有研究证实,该缺陷菌株对过氧化氢也较其亲代菌株敏感。此外,在肺炎链球菌中, clpP 基因缺陷可以导致 Ply、PsaA、LytA 和 CbpA 等毒力因子的表达明显地下降<sup>[12-19]</sup>。上述研究表明, ClpP 介导的蛋白质水解作用在肺炎链球菌的应激反应、感受态形成和毒性方面都起着复杂而关键的作用。

#### 3.2 金黄色葡萄球菌 ClpP 的作用

金黄色葡萄球菌是人类主要的病原菌,有着独特的生存能力,主要可以引起医院获得性感染<sup>[20-22]</sup>。Frees 等<sup>[22]</sup>在用微量滴定板分析 clpP 基因缺陷株的生物膜形成能力时发现,在滴定板中加入 clpP 基因缺陷菌株时观察不到聚集现象,而且在相同的光密度下, clpP 基因缺陷株形成的菌落数目是野生菌株的 2 倍。在显微镜下, clpP 基因缺陷株细胞绝大部分为单个细胞,而野生菌株细胞绝大部分为双球菌。相对于野生菌株, clpP 基因缺陷菌株不以细胞团块形式生长,表明缺陷株中细胞间相互作用降低。因此,金黄色葡萄球菌的 ClpP 在其致病力、生存力和应激反应方面都起着关键性的作用。

#### 3.3 枯草杆菌 ClpP 的作用

在光学显微镜下,枯草杆菌 clpP 基因缺陷株呈丝状;在电子显微镜下,枯草杆菌 clpP 基因缺陷株细胞伸长并且有钩形结构,而野生菌株在生长阶段产生视杆细胞<sup>[23-27]</sup>。这些表型在压力环境

及静止期时尤其明显。枯草杆菌细胞形态的改变,表明其 ClpP 蛋白参与维持细胞的形态和细胞分裂。Frees 等<sup>[2]</sup>通过测定在无压力状态下生长的枯草杆菌的整体蛋白质降解率时发现,指数生长阶段的枯草杆菌细胞内的蛋白质基本保持稳定,但在进入静止期后,其整体的蛋白质降解率相对较高,而这种生长阶段依赖性的细胞蛋白质破坏在 clpP 基因缺陷株中不会发生。上述研究强调了 ClpP 在枯草杆菌蛋白质周转方面的决定性作用。

### 4 结束语

ClpP 作为一种热休克蛋白,直接或间接地影响着口腔变异链球菌的生物膜形成,对调节其致病性及在口腔环境中的应激反应起着较为重要的作用。虽然其具体机制尚不清楚,但无论在理论上还是在实践上,目前的有关研究都可以为将来进一步的研究打下必要的基础。随着其研究的进一步深入,对今后人工干预菌斑的生长和形成,达到预防龋病发生的目的均有着深远的意义。

### 5 参考文献

- [1] Robertson GT, Ng WL, Foley J, et al. Global transcriptional analysis of clpP mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(13): 3508-3520.
- [2] Frees D, Savijoki K, Varmanen P, et al. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 63(5): 1285-1295.
- [3] Gerth U, Krüger E, Derré I, et al. Stress induction of the *Bacillus subtilis* clpP gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 28(4): 787-802.
- [4] Maurizi MR, Clark WP, Katayama Y, et al. Sequence and structure of ClpP, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(21): 12536-12545.
- [5] Kim DY, Kim KK. The structural basis for the activation and peptide recognition of bacterial ClpP [J]. *J Mol Biol*, 2008, 379(4): 760-771.
- [6] Chong P, Drake L, Biswas I. LiaS regulates virulence factor expression in *Streptococcus mutans* [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(7): 3093-3099.
- [7] Welin-Neilands J, Svensäter G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5633-5638.
- [8] Deng DM, ten Cate JM, Crielaard W. The adaptive response of *Streptococcus mutans* towards oral care produ-

- cts :Involvement of the ClpP serine protease[J]. Eur J Oral Sci, 2007, 115(5) :363-370.
- [9] Lemos JA, Burne RA. Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2002, 184(22) :6357-6366.
- [10] Chatteraj P, Banerjee A, Biswas S, et al. ClpP of *Streptococcus mutans* differentially regulates expression of genomic islands, mutacin production, and antibiotic tolerance [J]. J Bacteriol, 2010, 192(5) :1312-1323.
- [11] Kajfasz JK, Martinez AR, Rivera-Ramos I, et al. Role of Clp proteins in expression of virulence properties of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(7) :2060-2068.
- [12] Kwon HY, Ogunniyi AD, Choi MH, et al. The ClpP protease of *Streptococcus pneumoniae* modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge[J]. Infect Immun, 2004, 72(10) :5646-5653.
- [13] 张群, 胥文春, 尹一兵, 等. clpP基因缺陷对肺炎链球菌毒力表达降低的研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(4) :307-310.
- [14] 李岱容, 曹炬, 王虹, 等. 肺炎链球菌候选蛋白质疫苗 ClpP的保守性和抗原性[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(19) :1741-1744.
- [15] de Bruijn I, Raaijmakers JM. Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP protease[J]. J Bacteriol, 2009, 191(6) :1910-1923.
- [16] 袁军, 陈耀, 曹炬, 等. 肺炎链球菌毒力因子ClpP蛋白酶的体外表达及纯化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18) :1753-1755.
- [17] Frees D, Ingmer H. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*[J]. Mol Microbiol, 1999, 31(1) :79-87.
- [18] Zhang J, Banerjee A, Biswas I. Transcription of clpP is enhanced by a unique tandem repeat sequence in *Streptococcus mutans* [J]. J Bacteriol, 2009, 191(3) :1056-1065.
- [19] Len AC, Harty DW, Jacques NA. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 5) :1339-1351.
- [20] Michel A, Agerer F, Hauck CR, et al. Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair[J]. J Bacteriol, 2006, 188(16) :5783-5796.
- [21] Chatterjee I, Becker P, Grundmeier M, et al. *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, acetylase activity, growth recovery, and death[J]. J Bacteriol, 2005, 187(13) :4488-4496.
- [22] Frees D, Chastanet A, Qazi S, et al. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*[J]. Mol Microbiol, 2004, 54(5) :1445-1462.
- [23] 黄晓晶, 邱明, 江一平. 变异链球菌生物膜成熟初期蛋白质表达分析[J]. 中华口腔医学研究杂志 :电子版, 2008, 2(5) :445-451.
- [24] Derrien B, Majeran W, Wollman FA, et al. Multistep processing of an insertion sequence in an essential subunit of the chloroplast ClpP complex[J]. J Biol Chem, 2009, 284(23) :15408-15415.
- [25] Bewley MC, Graziano V, Griffin K, et al. Turned on for degradation :ATPase-independent degradation by ClpP[J]. J Struct Biol, 2009, 165(2) :118-125.
- [26] 陆玉, 刘天佳, 杨锦波. 变异链球菌gtfs在不同pH条件下表达的差异性[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(6) :667-669.
- [27] 张立恒, 孙涛生, 邹宏亮, 等. 口腔龋坏组织中变异链球菌与乳酸杆菌的作用研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(6) :657-659.

(本文编辑 刘世平)

(上接第225页)

- of transcription 3 translocation and activity in human breast and ovarian cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(15) :6701-6710.
- [7] 卢朝晖, 陈杰, 谷丽君, 等. ARH 在胰腺癌组织中 mRNA水平及蛋白表达[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(4) :324-327.
- [8] 汪淑娟, 李亚里, 蒋红清. 新抑癌基因ARH 在子宫内膜异位症中的表达及其意义[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(11) :851-853.
- [9] Feng W, Marquez RT, Lu Z, et al. Imprinted tumor suppressor genes ARH and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation[J]. Cancer, 2008, 112(7) :1489-1502.
- [10] Bao JJ, Le XF, Wang RY, et al. Reexpression of the tumor suppressor gene ARH induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway[J]. Cancer Res, 2002, 62(24) :7264-7272.
- [11] Wang L, Hoque A, Luo RZ, et al. Loss of the expression of the tumor suppressor gene ARH is associated with progression of breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(10 Pt 1) :3660-3666.
- [12] Zlatev R, Magnin JP, Ozil P, et al. Bacterial sensors based on *Acidithiobacillus ferrooxidans* Part . Cr( ) determination[J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21(8) :1501-1506.
- [13] Dalai I, Missiaglia E, Barbi S, et al. Low expression of ARH is associated with shorter progression-free survival in pancreatic endocrine tumors[J]. Neoplasia, 2007, 9(3) :181-183.

(本文编辑 刘世平)