

文章编号: 1004-0374(2010)11-1092-05

## 鼠疫菌毒力调控研究

周冬生, 杨瑞馥\*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

**摘要:** 鼠疫菌通过一系列转录调控子(如CRP、PhoP、RovA和Fur)控制着一些关键毒力因子(如Pla、强毒力岛、III型分泌系统等)的基因表达。鼠疫菌可感应宿主体内信号刺激, 紧密调控毒力因子的表达。在这个紧密调控过程中, 调控子、毒力相关基因构成了一个动态网络。鼠疫菌在从假结核菌祖先演化的进程中, 基因表达调控网络的重塑在鼠疫菌毒力进化过程中发挥着不可取代的作用。

**关键词:** 鼠疫菌; 转录调控; 毒力

**中图分类号:** R378.61; R516.8 **文献标识码:** A

## Studies on virulence regulation of *Yersinia pestis*

ZHOU Dong-sheng, YANG Rui-fu\*

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences (AMMS), Beijing 100071, China)

**Abstract:** A set of transcriptional regulators such as CRP, PhoP, RovA and Fur have been characterized to regulate virulence-related genes in *Yersinia pestis*, especially including those encoding Pla, high pathogenicity island and type III secretion system. *Y. pestis* has evolved the ability to sense host signals and then to closely regulate the expression of virulence factors, for which regulators and their target virulence-related genes constitute a dynamic gene regulatory network. The remodeling of gene regulatory network promotes the evolution of *Y. pestis*, which is a deadly pathogen causing systemic infections, from its ancestor *Y. pseudotuberculosis* that is a mild enteropathogenic bacterium.

**Key words:** *Yersinia pestis*; transcriptional regulation; virulence

鼠疫是一种自然疫源性疾病, 是以发病急、传播快、病死率高、传染性强为特征的烈性传染病, 是《中华人民共和国传染病防治法》规定的甲类传染病。鼠疫的病原体是鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*, 以下简称鼠疫菌)。人类历史上, 曾先后发生过三次鼠疫世界大流行, 导致至少一亿六千万人死亡。鼠疫在历史上同样也给中国人民带来过深重灾难。20世纪80年代以来, 鼠疫在全球重新进入一个活跃时期, 其自然疫源地不断扩大, 动物间鼠疫重新活跃, 人间鼠疫接连发生, 使得世界卫生组织(WHO)在2000年将鼠疫列为重新抬头的传染病。2009年, 青海爆发了原发性肺鼠疫, 导致11人发病, 3人死亡。鼠疫菌是传统的细菌性生物战剂之

一, 也是国际恐怖分子可能获得的廉价而方便的资源。由此可见, 鼠疫对经济建设、人民生活和国家安全的威胁仍然比较严重, 对鼠疫菌致病机制的深入研究是国民经济和社会发展中亟待解决的重要科技问题。

鼠疫菌含有4 000多个基因<sup>[1]</sup>, 目前已经确知了一些毒力相关基因, 毒力基因的功能及其调控机制是阐明鼠疫菌致病机制的重要研究领域。鼠疫菌

收稿日期: 2010-04-20

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年基金(30525025); 国家自然科学基金重点项目(30430620; 30930001)

\*通讯作者 E-mail: ruifuyang@gmail.com

的基因间必然形成了一个复杂的调控网络, 各个基因的程序性或协调性表达, 特别是鼠疫菌在与宿主机体相互作用过程中, 毒力相关基因是如何协调表达的, 是当前鼠疫菌致病机制研究的一个热点。

## 1 鼠疫菌的毒力因子与致病机制

在自然界动物鼠疫流行过程中, 鼠疫菌寄居在特定的宿主动物(主要是啮齿动物)上, 通过媒介蚤在宿主和其他动物间传播, 偶然与患畜接触或被带菌跳蚤叮咬而感染到人。宿主动物被疫蚤叮咬后, 可感染数千个鼠疫菌。但进入皮下的鼠疫菌大多数被防卫而至的中性粒细胞吞噬, 并很快就被杀死。少量细菌会被组织巨噬细胞吞噬, 在巨噬细胞中鼠疫菌不仅不被杀死, 反而能够生存繁殖, 并合成大量毒力相关因子。最终巨噬细胞破裂, 释放出的鼠疫菌具备了强大的抗吞噬能力。此时, 无论是嗜中性粒细胞还是巨噬细胞, 都无法有效地吞噬鼠疫菌。细菌沿淋巴流到达局部淋巴结, 引起严重的淋巴结炎, 称为腺鼠疫。鼠疫菌可由淋巴转移至血液和全身脏器中, 形成高致死性的败血症型鼠疫(黑死病)和肺鼠疫。肺鼠疫可通过空气飞沫传播。

细菌侵入机体后, 能否突破机体的防御功能, 破坏机体的生理平衡而引起疾病, 主要取决于细菌毒力和机体易感程度。在致病过程中, 鼠疫菌完成在机体内黏附、侵袭、扩散、抗吞噬以及细胞毒性等多个步骤, 涉及到众多毒力因子。鼠疫菌的毒力基因在质粒和染色体上均有分布<sup>[2-4]</sup>。染色体上的毒力因子包括 pH6 抗原(在菌体表面形成纤维状结构, 具有抗吞噬作用)、强毒力岛(耶氏杆菌素的生物合成与转运, 执行铁摄入功能)、LPS(LPS 结构变异与胞内生存、逃避宿主免疫反应相关; 与血清抗性有关; 感染后期作为内毒素损伤宿主)、黏附素与侵袭素分子, 如 Ai1 等。毒力完整的鼠疫菌含有三个质粒: pCD1 质粒为鼠疫菌、假结核菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌所共有。pCD1 质粒携带 III 型分泌系统(组装 III 型分泌系统元件, 分泌效应子蛋白并注射入宿主细胞, 从而干扰宿主信号转导, 抑制细胞因子合成, 削弱细胞介导的免疫反应, 发挥免疫抑制作用; 毒杀噬菌细胞作用; 通过封闭凝血酶调节炎症反应等); pMT1 质粒携带 F1 荚膜抗原操纵子, 其编码的 F1 荚膜具有抗吞噬作用; pPCP1 质粒携带血浆酶原激活因子, 与鼠疫菌在机体内侵袭、扩散紧密相关。

## 2 转录调控子与细菌毒力<sup>[5]</sup>

转录调控子是细菌本身表达的蛋白质, 是转录起始过程中 RNA 聚合酶所需的辅助因子。转录调控子能够结合在其识别的 DNA 序列(位于启动子区)上, 从而介导靶基因的转录上调或下调。概言之, 转录调控子、RNA 聚合酶、启动子 DNA 三者之间的相互作用, 控制着靶基因的转录。转录调控子与启动子区 DNA 结合的区域, 一般位于基因编码区的上游 500 bp 以内。特定的转录调控子通常识别有一定保守性的 DNA 序列, 正是通过这种保守性, 转录调控子能识别特定的靶基因(一个或多个)。转录调控子结合位点中的保守区通常被称作基序(consensus), 一般 10~30 bp。如果在一个基因的启动子区存在某一转录调控子基序的相似 DNA 序列, 提示该基因受该转录调控子的调控。

病原细菌从感应信号刺激到表达毒力因子是个紧密调控(tightly regulated)的过程, 即特定信号刺激控制着特定毒力因子的高表达。在这个紧密调控过程中, 毒力调控子起着不可替代的作用。鼠疫菌的致病是细菌适应宿主环境, 在宿主体内大量繁殖并发挥自身侵袭力和毒力的过程, 从分子水平上看, 这是一个紧密调控的由复杂细胞途径构成的网络。鼠疫菌的一些调控子能够感应由宿主环境带来的刺激信号, 经受刺激的调控子将直接激活或抑制相应靶基因(包括关键毒力基因)的转录和表达。无疑鼠疫菌的毒力调控是一个复杂的基因转录与表达调控网络。

## 3 鼠疫菌毒力基因调控的研究概况

鼠疫菌在宿主体内生存繁殖和侵染致病的过程中, 不可避免地经受着特定信号(如温度、渗透压、pH 等)的单个或协同刺激。一旦进入宿主体内, 鼠疫菌即能够有效地感应这些信号的作用, 随后自身做出应答反应, 即一系列的毒力基因被激活, 合成相应毒力因子, 并被转运或分泌至相应位置, 或彼此间形成特定的复合体, 最终表现为病原细菌适应宿主环境大量繁殖, 耐受或逃避宿主的防卫机制, 引发宿主致病。在这个过程中, 调控子(如转录因子、小 RNA 等)起着不可替代的作用。

利用全基因组 DNA 芯片, 可开展模拟鼠疫菌侵入机体后体内胁迫条件刺激表达谱的研究, 包括温度变化、pH 变化、渗透压改变、过氧化氢刺激、盐离子浓度变化、冷休克和热休克、抗生素作用等



都是相同(或几乎相同)的。调控网络重塑与鼠疫菌的毒力进化直接相关,可总结出以下四点实验证据。

#### 4.1 通过基因水平转移,新加入靶基因(编码毒力因子)

CPR和RovA保守存在于三个致病性耶尔森氏菌,各自的编码基因敲除后,三个致病性耶尔森氏菌的毒力均下降。它们都是整体调控子,分别调控着众多的靶基因。CPR直接正调控 $pla$ 和 $pst$ 基因<sup>[7]</sup>。 $pla$ 和 $pst$ 位于pPCP1质粒上,该质粒是由鼠疫菌在其起源进化过程中外源获得的。 $pla$ 基因编码血浆酶原激活因子(P1a),是鼠疫菌重要的毒力因子。显然,CPR是个“古老”的调控子,而 $pla$ 作为一个“新”毒力基因通过进化其表达已经整合入CPR调控元。YP02272-2281是个编码原噬菌体的基因簇,仅仅存在于东方型鼠疫菌中,被认为与东方型鼠疫菌强大的人间传播能力相关。类似地,YP02272-2281作为一个“新”毒力相关基因已整合入“古老”的RovA调控元<sup>[8]</sup>。

#### 4.2 原有靶基因失活

$inv$ 和 $yadA$ 基因分别受RovA<sup>[16]</sup>和VirF<sup>[17]</sup>的正调控。 $inv$ 和 $yadA$ 编码侵袭素和黏附素,与小肠结肠炎菌和假结核菌的肠道致病力紧密相关。因为肠道致病力对鼠疫菌来说已是多余, $inv$ 和 $yadA$ 在鼠疫菌中均已进化成假基因而失活。但是,作为上游调控子的RovA和VirF在鼠疫菌中仍起重要作用,调控其他的毒力基因。比如VirF正调控T3SS的若干启动子,且这种调控在三个致病性耶尔森氏菌是保守的<sup>[18]</sup>。

#### 4.3 调控子失活

RcsB-RcsA-RcsC-RcsD是个二元调控系统。RcsC是组氨酸蛋白激酶,RcsD是磷酸基团转移中介蛋白,RcsB和RcsA是调控蛋白。细胞感受外在信号后,RcsD的组氨酸残基能够自我磷酸化,磷酸基团经由RcsD传递至RcsB,得到磷酸基团的RcsB将作为被激活的调控蛋白调控靶基因的表达。通常RcsB可以单独结合靶基因的启动子区,调控靶基因的表达。但是,对于部分靶基因,RcsB执行调控功能需要辅助蛋白RcsA。

在假结核菌中,RcsB-RcsA-RcsC-RcsD作为一个负调控子抑制了生物膜形成相关基因的表达<sup>[19]</sup>。在鼠疫菌中, $rcaA$ 基因失活,因此RcsB-RcsA-RcsD对生物膜形成的抑制作用丧失,使鼠疫菌具备了极强的形成生物膜的能力<sup>[19]</sup>。鼠疫菌在蚤体内形成生物膜,与蚤作为媒介传播鼠疫菌直接相关。因此,

在鼠疫菌中RcsB-RcsA-RcsD失去对生物膜形成的抑制作用,与鼠疫菌的毒力进化直接相关。

#### 4.4 外源获得毒力基因,并自带调控子

F1抗原在鼠疫菌表面形成一层厚的凝胶状荚膜或包膜。F1荚膜与鼠疫菌抵抗宿主细胞吞噬作用直接相关。F1抗原结构基因 $caf1$ 与其相关基因 $caf1M$ 、 $caf1A$ 、 $caf1R$ 形成一个基因簇,位于pMT1质粒上。与pPCP1质粒类似,pMT1也是由鼠疫菌在其起源进化过程中外源获得的。 $caf1$ 、 $caf1M$ 、 $caf1A$ 构成一个操纵子, $caf1R$ 是另一个操纵子。两个操纵子逆向转录,两者的间区是启动子区。Caf1M是分子伴侣,Caf1A是锚定蛋白,对F1荚膜的形成起辅助作用。Caf1R是转录因子,正向调控 $caf1M/A-caf1$ 操纵子<sup>[20]</sup>。

## 5 总结与展望

鼠疫菌在媒介和宿主间循环过程中,不可避免地遭遇多个信号的协同刺激作用,决定了该菌在不同生长环境下基因表达的复杂性,我们已在国家自然科学基金重点项目(30430620)的支持下,开展了在转录组水平的复杂变化规律的相关研究<sup>[21]</sup>。这种复杂性体现在:鼠疫菌感应特定的外界信号,分别介导特定基因表达的上调和下调。2006—2009年,我们得到了国家自然科学基金杰出青年基金(30525025)的资助,进行了鼠疫菌多个关键毒力相关调控子的功能研究。如前文所述,毒力基因调控研究是鼠疫菌研究的一个热点,因此本文综述了该领域的总体进展,也简要涵盖了我们的工作。

目前虽然已经鉴定出一系列的鼠疫菌毒力因子,并对其功能有了一定的认识;但鼠疫菌致病是个极其复杂的过程,对鼠疫菌的毒力因子及其与宿主的作用还有诸多未解之谜,针对毒力基因及其编码蛋白质进行深入的功能研究,对揭示鼠疫菌独特的毒力表型特征具有重要意义。在鼠疫菌与宿主的相互作用中,毒力相关基因的表达受控于一个紧密调控的动态网络。基因调控网络重塑与鼠疫菌的毒力进化直接相关。鼠疫菌在从假结核菌祖先演化的进程中,基因表达调控网络的重塑对鼠疫菌的宿主适应、毒力、传播机制的进化发挥着不可取代的作用。通过构建假结核菌、非典型鼠疫菌(对人 not 致病株)、典型鼠疫菌的基因转录调控网络,精细分析各数据单元(生化表型、毒力表型、单个基因转录调控、调控元),比较它们在假结核菌、非典型鼠疫菌、典型鼠疫菌间的差异性,综合分析基因调

控网络在上述三株菌中的动态变化, 并将之与表型特征结合起来, 可以探究如下命题: 与其祖先假结核菌相比, 鼠疫菌的宿主适应力、致病力、经蚤传播机制是如何演化而来的。

从 2010 年开始, 我们获得了国家自然科学基金重点项目(30930001)的资助, 试图通过比较研究典型的对人致病和非典型的对人非致病的鼠疫菌及其祖先假结核菌(三者属于鼠疫菌进化的三大分枝)中重要调控子直接调控的毒力相关基因的差异, 构建相应的毒力相关基因转录调控网络, 从而探究鼠疫菌毒力进化与调控网络重塑的关系。

### [参 考 文 献]

- [1] Trosky JE, Liverman AD, Orth K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol*, 2008, 10(3): 557-65
- [2] Zhou D, Yang R. Molecular Darwinian evolution of virulence in *Yersinia pestis*. *Infect Immun*, 2009, 77(6): 2242-50
- [3] Zhou D, Han Y, Yang R. Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology. *Microbes Infect*, 2006, 8(1): 273-84
- [4] Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10(1): 35-66
- [5] Zhou D, Yang R. Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(19-20): 2260-90
- [6] Han Y, Qiu J, Guo Z, et al. Comparative transcriptomics in *Yersinia pestis*: a global view of environmental modulation of gene expression. *BMC Microbiol*, 2007, 7(1): 96
- [7] Zhan L, Han Y, Yang L, et al. The cyclic AMP receptor protein, CRP, is required for both virulence and expression of the minimal CRP regulon in *Yersinia pestis* biovar microtus. *Infect Immun*, 2008, 76(11): 5028-37
- [8] Cathelyn JS, Crosby SD, Lathem WW, et al. RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(36): 13514-9
- [9] Oyston PC, Dorrell N, Williams K, et al. The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3419-25
- [10] Fetherston JD, Bearden SW, Perry RD. YbtA, an AraC-type regulator of the *Yersinia pestis* pesticin/yersiniabactin receptor. *Mol Microbiol*, 1996, 22(2): 315-25
- [11] Geng J, Song Y, Yang L, et al. Involvement of the post-transcriptional regulator Hfq in *Yersinia pestis* virulence. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6213
- [12] Flashner Y, Mamroud E, Tidhar A, et al. Generation of *Yersinia pestis* attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. *Infect Immun*, 2004, 72(2): 908-15
- [13] Gao H, Zhou D, Li Y, et al. The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol*, 2008, 190(8): 3063-75
- [14] Li YL, Gao H, Qin L, et al. Identification and characterization of PhoP regulon members in *Yersinia pestis* biovar Microtus. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 143
- [15] Skurnik M, Peippo A, Ervela E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol*, 2000, 37(2): 316-30
- [16] Heroven AK, Nagel G, Tran HJ, et al. RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasins and rovA expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2004, 53(3): 871-88
- [17] Skurnik M, Toivanen P. LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol*, 1992, 174(6): 2047-51
- [18] Lambert de Rouvroit C, Sluiter C, Cornelis GR. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol*, 1992, 6(3): 395-409
- [19] Sun YC, Hinnebusch BJ, Darby C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(23): 8097-101
- [20] Karlyshev AV, Galyov EE, Abramov VM, et al. CafIR gene and its role in the regulation of capsule formation of *Y. pestis*. *FEBS Lett*, 1992, 305(1): 37-40
- [21] 杨瑞馥. 鼠疫疫苗相关基础研究. *生命科学*, 2007, 19(6): 598-606