

细菌毒素-抗毒素系统在噬菌体流产感染中的作用

海洋, 王小雨, 谢建平

西南大学 生命科学学院 现代生物医药研究所, 重庆 400715

海洋, 王小雨, 谢建平. 细菌毒素-抗毒素系统在噬菌体流产感染中的作用. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3291-3300.

HAI Y, WANG XY, XIE JP. The role of bacterial toxin-antitoxin systems in phage abortive infections. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3291-3300.

摘 要: 细菌常受到数量众多的噬菌体感染, 宿主细菌在和噬菌体竞赛中进化出多样化的分子策略, 流产感染 (abortive infection, Abi) 是其中之一。毒素-抗毒素系统 (toxin-antitoxin system, TA) 会在细菌受到压力胁迫时表达并介导细菌的低代谢甚至休眠, 还能直接减少子代噬菌体形成。此外, 部分毒素序列和结构与 Cas 蛋白高度同源, 噬菌体甚至会编码抗毒素类似物来阻遏对应毒素的活性。这表明流产感染中细菌死亡过程导致的噬菌体感染失败与 TA 功能高度重合, TA 可能是噬菌体侵染宿主的主要阻力和防御力量之一。文中基于 TA 系统的分类和功能, 对参与噬菌体流产感染的 TA 系统进行了综述, 并预测具有流产功能的 TA 系统和其在抗生素开发和疾病治疗中的应用前景。这有助于认识细菌-噬菌体相互作用, 并指导噬菌体治疗和合成生物学。

关键词: 毒素-抗毒素系统; 流产感染; 噬菌体; 代谢重塑; CRISPR-Cas

The role of bacterial toxin-antitoxin systems in phage abortive infections

HAI Yang, WANG Xiaoyu, XIE Jianping

Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Bacteria are often infected by large numbers of phages, and host bacteria have evolved diverse molecular strategies in the race with phages, with abortive infection (Abi) being one of them. The toxin-antitoxin system (TA) is expressed in response to bacterial stress, mediating hypometabolism

Received: February 26, 2022; Accepted: May 7, 2022; Published online: May 12, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82072246, 81871182)

Corresponding author: XIE Jianping. Tel: +86-23-68253392; E-mail: georgex@swu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (82072246, 81871182)

and even dormancy, as well as directly reducing the formation of offspring phages. In addition, some of the toxins' sequences and structures are highly homologous to Cas, and phages even encode antitoxin analogs to block the activity of the corresponding toxins. This suggests that the failure of phage infection due to bacterial death in abortive infections is highly compatible with TA function, whereas TA may be one of the main resistance and defense forces for phage infestation of the host. This review summarized the TA systems involved in phage abortive infections based on classification and function. Moreover, TA systems with abortive functions and future use in antibiotic development and disease treatment were predicted. This will facilitate the understanding of bacterial-phage interactions as well as phage therapy and related synthetic biology research.

Keywords: toxin-antitoxin systems; abortive infection; phage; metabolic remodeling; CRISPR-Cas

噬菌体是地球上分布最广泛的病毒, 细菌基因组中大量存在的前噬菌体 (prophage) 证明多数细菌都受到过其感染^[1]。噬菌体的祖先在细菌和古菌前就已形成, 在细菌和古菌出现后就寄生在其内部^[2]。噬菌体和细菌基于这种寄生和防御的关系已进行了数亿年的军备竞赛。令人惊讶的是, 面对噬菌体的丰富和多样性细菌进化出包括限制性修饰、流产感染和 CRISPR-Cas 等多样化的分子策略来抵御噬菌体入侵。细菌被感染后在噬菌体完成繁殖前“自杀”或停滞自己的新陈代谢, 防止噬菌体扩散并感染更多“同胞”, 这被称为流产感染。已在多种细菌中检测到存在这种系统, 种类繁多的毒素-抗毒素系统 (toxin-antitoxin system, TA) 也通过流产感染保护细菌^[3]。噬菌体的感染破坏了毒素和抗毒素之间的平衡, 导致毒素功能被激活, 进而使细菌 DNA 复制、蛋白翻译等功能受到干扰, 阻止噬菌体的繁殖^[4]。

1 细菌毒素-抗毒素系统的分类

TA 由一种抑制细菌生长的毒素和一种保护细菌免受毒素损害的抗毒素组成, 毒素使细菌生长停滞和休眠^[5]。根据抗毒素抑制毒素的方式, TA 系统分为 7 种类型 (图 1, 图中绿色图

形代表抗毒素基因及其转录和翻译产物, 红色图形代表毒素基因及其转录和翻译产物, 蓝色图形代表蛋白酶, 该图的绘制参考了^[6])。I 型和 III 型 TA 系统的抗毒素是非编码 RNA, I 型 RNA 抗毒素直接结合毒素 mRNA 阻止毒素翻译, III 型的抗毒素与毒素蛋白直接相互作用^[6]。II 型抗毒素蛋白与毒素可逆地结合。IV 型系统的抗毒素和毒素蛋白不直接作用, 而是与同一靶标结合^[7]。V 型毒素 GhoT 是膜裂解肽, 会裂解细胞膜介导细菌滞留。抗毒素 GhoS 蛋白特异性降解 GhoT mRNA 中和其毒性^[8]。SocA 和 SocB 属于 VI 型 TA 系统, 毒素 SocB 通过与 DNA 聚合酶 III 的 β 滑动钳相互作用阻止复制延伸并导致复制叉崩溃。VI 型 TA 与经典 TA 系统不同, 蛋白酶 ClpXP 会降解不稳定的毒素 SocB, 这一过程需要抗毒素 SocA 参与^[9]。

最近报道了 3 对独特的 TA 被归为 VII 型系统, 其特征是抗毒素作为酶对毒素进行修饰^[10]。第一对是 Hha/TomB, 毒素 Hha 通过减少菌毛 (fimbriae) 抑制细菌形成生物膜, 并激活前噬菌体裂解基因 *rzpD*、*yfjZ*、*appY* 和 *alpA* 并导致细菌死亡^[10]。抗毒素 TomB 与 Hha 相互作用 (形成不稳定复合物) 并氧化 Hha 保守的半胱氨酸残基, 使其转化为含有 -SO₂H 的亚磺酸或磺

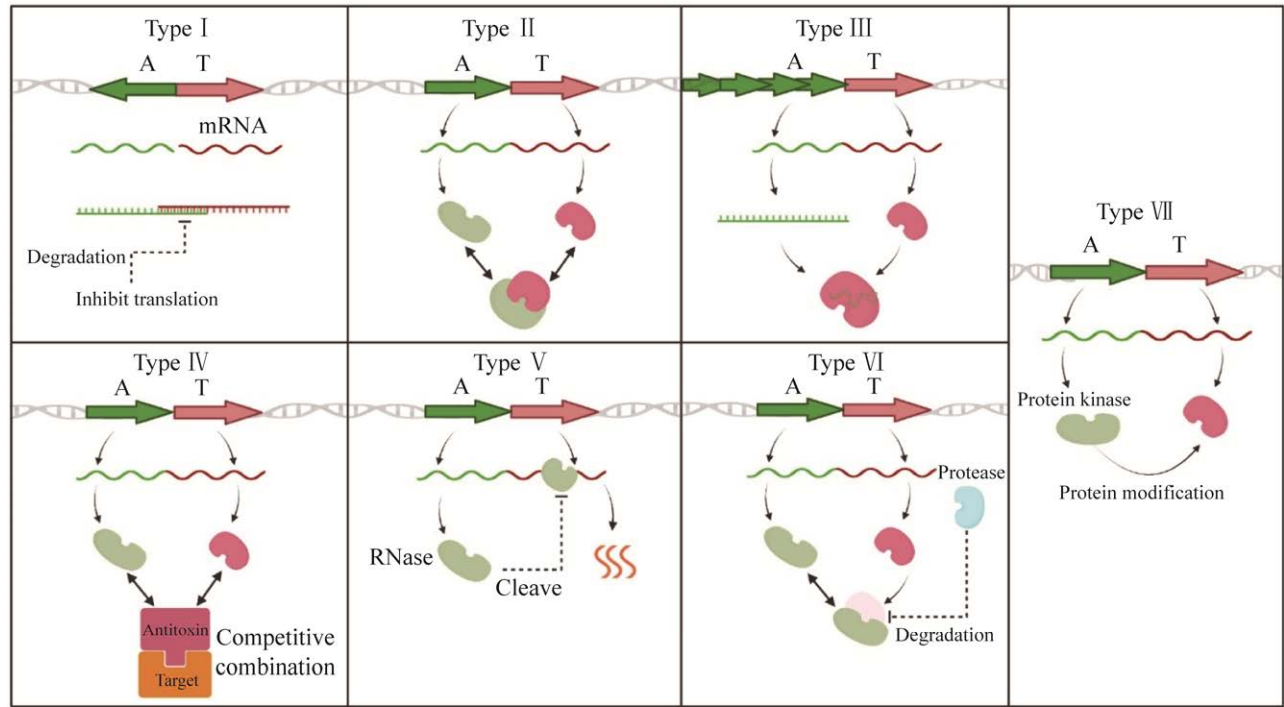


图 1 细菌 TA 系统的分类^[6]

Figure 1 Classification of bacterial toxin-antitoxin systems^[6].

酸类，从而破坏毒素稳定性^[11]。第二对命名为 HepT/MntA，毒素 HepT 有高等真核和原核生物核苷酸结合域 (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HEPN)^[12]。HEPN 结构域由 4 个长度不等的 α -螺旋 (α_1 、 α_2 、 α_3 、 α_4) 形成折叠后上下排列，拥有 HEPN 结构域的蛋白家族通常是 RNase，RNA 酶毒素 HepT 含有特征序列 Rx4-6H (x 代表任意氨基酸，4-6 代表 R 和 H 之间的氨基酸数量)，能切割 mRNA 进而抑制细菌生长^[13]。核苷酸转移酶抗毒素 MntA 能以 ATP 为底物将 3 个 AMP (adenosine monophosphate, AMP) 转移到毒素结构的裂隙中进行多聚腺苷酸化，缩小或阻断了毒素的 RX4-6H 位点，抑制其与 RNA 底物的结合能力^[14-15]。第三对是 MenA3/MenT3。毒素 MenT3 通过将嘧啶 (胞嘧啶或尿嘧啶) 加在空载的 tRNA 3'-CCA 上

(尤其偏好加载到 tRNA^{Ser}) 阻止了 tRNA 装载 (charging)，使细菌生长停滞^[16]。丝氨酸蛋白激酶抗毒素特异性磷酸化毒素 S78 位点，抑制毒素蛋白活性^[17]。

2 细菌毒素-抗毒素系统导致噬菌体流产感染的证据

流产感染是“崇高的牺牲”，牺牲个体换来整个种群的存活、延续，TA 介导的流产感染系统在细菌防御噬菌体的过程中发挥了重要作用。I 型 TA 系统 Hok/Sok 中，*hok* 基因编码有毒跨膜蛋白破坏细胞膜使细菌死亡。*mok* 阅读框与 *hok* 在基因组上存在重叠，能调节 *hok* 的转录活性，*sok* 编码的 RNA 阻止 Mok 的翻译间接抑制了 Hok 蛋白翻译^[18-19]。Hok/Sok 通过作用于 T4 噬菌体的装配和释放过程使噬菌体的

成斑率降低了 86%，噬菌体成熟时间增加了 50%，细菌被裂解的时间增加了 107%^[20]。这一过程的机制可能是因为细菌被感染的初期 T4 噬菌体阻断了宿主细菌的转录，而不稳定的抗毒素 Sok RNA 优先被降解，使 Hok 毒素不受抑制地释放出来，杀死细菌的同时也干扰了形成子代噬菌体的过程。

当 T4 噬菌体的 *dmd* 基因缺陷时，大肠杆菌中核酸内切酶 LS 的结构基因 *rnlA* 编码一种毒素 RnlA，RnlA 通过非特异性地降解细菌和噬菌体的 mRNA，抑制细菌生长导致噬菌体死亡。*rnlA* 下游的 *rnlB* 基因编码不稳定的抗毒素 RnlB，RnlB 易被 ClpXP 降解，使大肠杆菌被 T4 噬菌体感染后释放出更多毒素导致细菌死亡^[21]。III 型 TA 介导流产感染的一个例子是胡萝卜软腐欧文氏菌黑腐亚种 (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) 的 AbiQ 系统，毒素 ToxN 序列在乳球菌属 AbiQ 中完全保守^[22]。从 ToxN-ToxI 复合物的晶体结构分析，ToxI 是由 36 个核苷酸组成的 RNA 假结结构 (pseudoknot)，3 个 RNA 抗毒素 ToxI 单体与 3 个 ToxN 毒素蛋白单体结合，形成一个 ToxN-ToxI 三聚复合物抑制了毒素蛋白的活性^[23]。细菌受到噬菌体感染后会激活核酸内切酶 ToxN，并降解细胞和噬菌体的 RNA 导致细菌生长停滞，噬菌体无法完成装配和释放^[22]。

一项研究预测了名为 AbiE 的流产感染家族，其中蛋白家族 AbiEi 和 AbiEii 高度相关。AbiEi 属于 COG5340，作为转录因子起作用。AbiEii 属于 COG2253 超家族，是核苷酸转移酶^[7]。AbiE 家族在结核分枝杆菌存在一对同源 TA *Rv1044-Rv1045*，但它们在流产感染中的作用还是未知的。II 型 TA 中的 mRNA 干扰酶 MazF 毒素能特异性识别并切割 U↓ACAU 序列 (↓表

示切割位点)，进而阻止蛋白质合成并抑制细菌生长^[24]。抗毒素 MazE 的 C 端螺旋位于 MazF 二聚体的 RNA 结合区域，阻止了 MazF 结合、切割 mRNA 的作用。尽管大肠杆菌中的 MazF 已被证明能导致细菌死亡，但这有效防止了 p1 噬菌体在整个细菌群体中的传播^[25]。尚不清楚毒素致死细菌导致了对噬菌体的间接杀伤还是直接作用于噬菌体本身，因为毒素抵御噬菌体和过表达毒素的过程中都没有证据表明细菌死亡。已被证实的 TA 功能主要有抑制噬菌体、维持质粒的稳定性、参与应激反应、调节生物膜形成和细菌持留^[26-28]。这些功能都围绕着 TA 系统的作用本质是可逆地重塑细菌代谢^[29]。

3 噬菌体应对细菌毒素-抗毒素系统的措施

除 TA 系统外，细菌已经进化出多种流产感染方式，如 CRISPR-Cas 和基于环状寡核苷酸的抗噬菌体信号系统 (cyclic oligonucleotide-based anti-phage signaling system, CBASS) 等，但噬菌体同样进化出了应对策略。在结核分枝杆菌编码的 II 型 TA 系统 MbcT/MbcA 中，毒素 MbcT 作为 NAD⁺ 磷酸化酶催化胞内 NAD⁺ 的降解，引起结核菌的死亡，这一过程可以被抗毒素 MbcA 抑制。分枝杆菌噬菌体 Ibhuesi 编码一个抗毒素 MbcA 的同源类似物——PBI_IBHUBESI_52，在 Ibhuesi 侵染过程中 PBI_IBHUBESI_52 能与毒素蛋白竞争性结合，抑制毒素的活性^[30]。细菌基因组中的前噬菌体基因除了编码噬菌体复制、结构和组装功能的核心基因外，还包括附属基因^[31]。铜绿假单胞菌基因组中的前噬菌体 Pf4 附属基因形成了一对 II 型 TA 系统，被命名为 PfiT/PfiA。毒素基因 *pfiT* 被敲除的细菌受到 Pf4 噬菌体侵染后，子代噬菌体的形成数量显

著增加^[32]。毒素介导的流产感染对细菌本身和噬菌体均是致命的，但噬菌体 Φ TE 能“逃脱”流产感染，因为 Φ TE 会编码与 RNA 抗毒素 ToxI 相似的序列^[33]。上文提到的 T4 噬菌体 *dmd* 基因能编码抗毒素 RnlB 类似物，直接与毒素 RnlA 结合抑制其活性^[34]。噬菌体编码抗毒素类似物与毒素结合并抑制毒素毒性，能有效防止毒素功能对细菌和噬菌体本身的影响，这正是噬菌体和细菌长期进行军备竞赛不断进化的结果。

4 细菌的毒素-抗毒素系统与其他流产感染系统的联系

CRISPR-Cas 系统会将噬菌体 mRNA 片段整合到 CRISPR 基因座，其中 Cas2 蛋白负责获取外源 DNA 片段，能在富含 U 的区域降解单链 RNA，Cas2 同样会降解噬菌体的 mRNA^[35]。II 型 TA 系统 Vap 家族中的核酸内切酶毒素 VapC 和 VapD 均与 Cas2 存在高度同源关系^[36]。这一发现暗示 Vap TA 家族与 Cas2 所属蛋白家族可能存在某种进化关系。无独有偶，V 型 TA 中的抗毒素 GhoS 作为核酸内切酶降解毒素 GhoT mRNA，阻止其翻译，GhoS 结构也与 Cas2 极为相似^[8]。

细菌不单独依靠 TA 或 CRISPR-Cas 起作用，这些防御机制形成了针对噬菌体的统一防线。一个经典的例子是 III-A 型 CRISPR-Cas 系统使用 Cas10-Csm 复合物攻击噬菌体，这一过程中核酸内切酶 Csm6 会导致细菌的短期生长停滞，为细菌防御系统生效争取时间^[37]。VI 型核酸酶 Cas13 会降解顺式和反式 RNA，其中反式 RNA 被降解会使细菌生长停滞，中止噬菌体的侵染^[38]。限制-修饰 (restriction-modification, R-M) 系统由一个限制性核酸内切酶和一个甲

基转移酶 (修饰) 组成，是一种普遍存在的抗噬菌体方式，R-M 会加强 CRISPR 对外源间隔片段的捕获能力^[39]。地中海单胞菌 (*Marinomonas mediterranea*) 中的两个 CRISPR-Cas 系统，I-F 和 III-B 型协同作用以防止噬菌体从其中一种系统中“逃脱”^[40]。细菌和古菌编码的防御系统如 TA 和 CRISPR-Cas 等流产感染系统均位于防御岛中，这些防御系统与细菌的休眠和死亡紧密联系^[41]。TA 的主要功能是降低细菌的代谢保护其在不利环境下存活，而细菌的低代谢同样会影响噬菌体的正常生理过程。由此可以合理推测休眠诱导元件 (TA 系统) 和 CRISPR、RM 系统之间可能存在协同作用。

似乎 CRISPR-Cas 系统中的核酸整合酶和 TA 系统中具有核酸酶功能的抗毒素或毒素有紧密的联系，这种联系意味着 TA 与 CRISPR-Cas 和 R-M 的协同作用是未来研究的一个重要方向。下面我们列出了几个可能在协同作用中扮演重要角色的抗毒素和毒素 (表 1)。其中还包括我们鉴定的一对 II 型 TA 系统 Vap 家族成员 (*Rv2871-Rv2872*)，毒素 VapC (*Rv2872*) 是一种依赖 Mg^{2+} 激活的序列特异性 RNase，毒素抑制细菌生长并使分枝杆菌耐受万古霉素^[42]。除了抗毒素 GhoS 有精确的作用靶点外，剩下的核酸酶可能会不加区分地降解细菌本身或噬菌体的 RNA，进而使细菌能抵抗噬菌体的侵染，或使细菌进入代谢停滞，使噬菌体无法完成正常的装配释放，从而影响子代噬菌体产生的过程。

我们对分枝杆菌中的 CRISPR 系统进行分析发现，14 种分枝杆菌的染色体中都存在 CRISPR 结构，结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 和鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*) 编码较长的 CRISPR 序列。无启动子且有高度保守重复序列和较短前导序列的整合型 CRISPR-Cas

表 1 可能参与噬菌体流产感染并具有核酸酶功能的 TA 系统

Table 1 TA systems having nuclease functions that may be involved in abortive infections

Name	Types	Sources	Function	Substrates	References
SymE	I	<i>Escherichia coli</i>	RNase	mRNA	[43]
RalR	I	<i>Escherichia coli</i>	Non-specific DNase	DNA	[44]
ChpBK	II	<i>Escherichia coli</i>	RNase	mRNA	[45]
MazF	II	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RNase	mRNA, tRNA, rRNA	[46]
MoxT	II	<i>Bacillus anthracis</i>	RNase	mRNA	[47]
MqsR	II	<i>Escherichia coli</i>	RNase	mRNA, rRNA	[48]
VapD	II	<i>Helicobacter pylori</i>	RNase	mRNA	[49]
VapC	II	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RNase	mRNA, tRNA	[50]
YafQ	II	<i>Helicobacter pylori</i>	RNase	mRNA	[51]
ToxN	III	<i>Escherichia coli</i>	RNase	mRNA	[52]
GhoT	V	<i>Escherichia coli</i>	RNase	mRNA	[8]
HepT	VII	<i>Escherichia coli</i>	RNase	mRNA	[53]

系统只在 *M. tuberculosis* 和 *M. bovis* 中发现, 且不能形成稳定的 RNA 二级结构, 表明 *M. tuberculosis* 和 *M. bovis* 的 CRISPRs 可能会干扰入侵病毒的核酸, 但已失去纳入间隔物的能力^[54]。塞翁失马焉知非福, 结核分枝杆菌会编码数量庞大的 TA (88 对)^[55], 也许如此多的 TA 系统足以帮助结核菌抵御噬菌体侵袭。为了初步揭示 TA 系统与 Cas2 蛋白间的同源关系, 我们对结核分枝杆菌中 CRISPR 相关核酸内切酶 Cas2 编码基因 (Rv2816c) 进行了功能鉴定, 发现 Cas2 蛋白在分枝杆菌家族中高度保守。在耻垢分枝杆菌中重组 Cas2 蛋白使分枝杆菌对诺氟沙星和氧氟沙星处理敏感, Cas2 蛋白过表达下调 *sigB*、*sigE*、*sigH* 等压力基因的表达, 降低了耻垢分枝杆菌在 THP-1 巨噬细胞内的存活率^[56]。

5 总结与展望

噬菌体无处不在, 细菌时刻面临着噬菌体的选择压力。建立起对多种噬菌体的防御是细菌存活的首要条件。细菌进化出了 CRISPR-Cas、

R-M、基于环状寡核苷酸的抗噬菌体信号和流产感染系统等。编码如此多的噬菌体防御系统是十分必要的, 一旦噬菌体从一个防御系统中成功逃逸之后, 需要有多套后备方案解决。噬菌体成功感染后的代价是细菌无法承受的。

VI型和VII型 TA 的发现极大丰富了毒素-抗毒素系统, 这不禁让人感到疑惑, 为什么细菌包含如此多的 TA 系统? 这些 TA 究竟是细菌的“毒药”还是“解药”? 探讨这个问题需要从 TA 本身功能出发, TA 如此多的功能其实可以归结为一点, 即降低细菌的代谢。改变或降低细菌的代谢可以让细菌像动物一样“冬眠”, 进而在不利的环境中存活下来。可以推断面对环境中数量众多的噬菌体, TA 最主要的功能就是抵抗噬菌体的侵袭, 保证细菌存活。噬菌体 Ibhuesi 和 Φ TE 能通过编码针对毒素的抗毒素类似物抑制对应毒素的毒性, 这表明 TA 是噬菌体成功感染必须克服的难题之一。R-M 系统和 CRISPR-Cas 存在协同作用, I-F 型和 III-B CRISPR-Cas 之间合作防止噬菌体“逃脱”, TA 系统可能也参与上述过程。目前合理的推测是

TA 系统通过降低细菌代谢为其他防御系统的启动争取时间,使噬菌体无法快速地进入裂解周期,释放子代噬菌体。从毒素 VapD 与 Cas 存在的同源关系中可以推测,所有充当核酸酶的毒素一定在流产感染中发挥着重要作用,因为它们的正常功能是非特异性降解 RNA,这极大地克制了噬菌体。所以我们预测,这些毒素-抗毒素系统一定还有更加重要的意义。

传染性疾病仍是全球公共卫生的威胁。多项研究证实了 TA 系统拥有成为抗生素设计药靶的潜力,因为它们广泛分布在病原体细菌中,但不存在于真核细胞中^[57]。IV型 TA 系统中,毒素和抗毒素会与同一作用靶标结合。可通过设计抗毒素结构类似物与底物竞争性结合,让毒素无法结合该底物,使毒素抑制或杀死病原菌。另一种药物开发思路是促进 Lon、Clp 蛋白酶对抗毒素的降解速率,这能促进毒素的释放,导致细菌死亡^[58]。除IV型系统外,其他 TA 中抗毒素和毒素通常会结合成一个较为稳定的复合物,在筛选、开发药物时可考虑破坏这种复合物结构,进而释放出游离的毒素杀死病原菌。

结核分枝杆菌在宿主体内有较长的潜伏期,且结核病患者在疾病治愈后仍有高复发率。结核分枝杆菌在宿主体内存在一小部分非复制群体,这部分群体处于一种可逆的代谢关闭状态——持留。抗生素通常不能杀死这部分处于持留状态的细菌,导致结核病复发^[59]。多项证据表明 TA 系统(特别是II型 TA)在持留细菌形成过程发挥着核心作用,一个经典的例子是毒素 HipA 的 G22S 和 D291A 点突变体 HipA7 使细菌持留性增加 100 倍以上,该突变使 HipA 毒素活性位点暴露,增强了毒素活性^[60-61]。这些证据显示毒素过量表达是细菌产生持留性的原因之一,如何适度激活毒素毒性使其杀死细

菌,但又不会使细菌进入持留状态是 TA 相关抗菌药物开发的难题之一。抑制抗毒素并促进毒素表达有助于杀死病原菌,提高对传染性疾病的治愈率。一种可能的手段是利用重组噬菌体将毒素基因注入病原体细菌内部,这一方法能可控地表达毒素,在一定程度上避免持留菌的产生^[55]。编码对应抗毒素结构类似物的噬菌体 Ibhuesi 和 ΦTE 理论上能在裂解细菌的同时抑制毒素活性,阻止细菌进入持留状态。这也为开发噬菌体与抗生素的联合治疗方法提供可能。

目前这一领域的研究还很少,未来的研究方向可围绕在进一步寻找 TA 系统和噬菌体感染宿主后共同的作用靶点,鉴定更多具有流产功能的 TA 系统,了解不同流产感染系统之间的协同机制等。TA 系统与流产感染的关系是揭示噬菌体感染后细菌调控网络的第一步。

REFERENCES

- [1] Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol*, 2005, 13(6): 278-284.
- [2] Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. The ancient virus world and evolution of cells. *Biol Direct*, 2006, 1: 29.
- [3] Lopatina A, Tal N, Sorek R. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy. *Annu Rev Virol*, 2020, 7(1): 371-384.
- [4] Koonin EV, Makarova KS, Wolf YI. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71: 233-261.
- [5] Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(4): 208-214.
- [6] Wang XX, Yao JY, Sun YC, et al. Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins. *Trends Microbiol*, 2021, 29(5): 388-393.
- [7] Dy RL, Przybilski R, Semeijn K, et al. A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism.

- Nucleic Acids Res, 2014, 42(7): 4590-4605.
- [8] Wang XX, Lord DM, Cheng HY, et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(10): 855-861.
- [9] Aakre CD, Phung TN, Huang D, et al. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Mol Cell*, 2013, 52(5): 617-628.
- [10] García-Contreras R, Zhang XS, Kim Y, et al. Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2394.
- [11] Marimon O, Teixeira JMC, Cordeiro TN, et al. An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system. *Nat Commun*, 2016, 7: 13634.
- [12] Pillon MC, Gordon J, Frazier MN, et al. HEPN RNases—an emerging class of functionally distinct RNA processing and degradation enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2021, 56(1): 88-108.
- [13] Yao JY, Guo YX, Zeng ZS, et al. Identification and characterization of a HEPN-MNT family type II toxin-antitoxin in *Shewanella oneidensis*. *Microb Biotechnol*, 2015, 8(6): 961-973.
- [14] Jia XY, Yao JY, Gao ZQ, et al. Structure-function analyses reveal the molecular architecture and neutralization mechanism of a bacterial HEPN-MNT toxin-antitoxin system. *J Biol Chem*, 2018, 293(18): 6812-6823.
- [15] Yao JY, Zhen XK, Tang KH, et al. Novel polyadenylation-dependent neutralization mechanism of the HEPN/MNT toxin/antitoxin system. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(19): 11054-11067.
- [16] Cai YM, Usher B, Gutierrez C, et al. A nucleotidyltransferase toxin inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* through inactivation of tRNA acceptor stems. *Sci Adv*, 2020, 6(31): eabb6651.
- [17] Yu X, Gao XP, Zhu KX, et al. Characterization of a toxin-antitoxin system in *Mycobacterium tuberculosis* suggests neutralization by phosphorylation as the antitoxicity mechanism. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 216.
- [18] Thisted T, Gerdes K. Mechanism of post-segregational killing by the *hok/sok* system of plasmid R1: SOK antisense RNA regulates *hok* gene expression indirectly through the overlapping *mok* gene. *J Mol Biol*, 1992, 223(1): 41-54.
- [19] Kawano M. Divergently overlapping *cis*-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli*: *hok/sok*, *ldr/rdl*, *symE/symR*. *RNA Biol*, 2012, 9(12): 1520-1527.
- [20] Pecota DC, Wood TK. Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *J Bacteriol*, 1996, 178(7): 2044-2050.
- [21] Koga M, Otsuka Y, Lemire S, et al. *Escherichia coli rnlA* and *rnlB* compose a novel toxin-antitoxin system. *Genetics*, 2011, 187(1): 123-130.
- [22] Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, et al. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *PNAS*, 2009, 106(3): 894-899.
- [23] Blower TR, Pei XY, Short FL, et al. A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(2): 185-190.
- [24] Simanshu DK, Yamaguchi Y, Park JH, et al. Structural basis of mRNA recognition and cleavage by toxin MazF and its regulation by antitoxin MazE in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell*, 2013, 52(3): 447-458.
- [25] Hazan R, Engelberg-Kulka H. *Escherichia coli mazEF*-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Mol Genet Genomics*, 2004, 272(2): 227-234.
- [26] Yang QE, Walsh TR. Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(3): 343-353.
- [27] Kim L. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 357-372.
- [28] Harms A, Brodersen DE, Mitarai N, et al. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Mol Cell*, 2018, 70(5): 768-784.
- [29] Song S, Wood TK. Post-segregational killing and phage inhibition are not mediated by cell death through toxin/antitoxin systems. *Front Microbiol*, 2018, 9: 814.
- [30] Freire DM, Gutierrez C, Garza-Garcia A, et al. An NAD⁺ phosphorylase toxin triggers *Mycobacterium tuberculosis* cell death. *Mol Cell*, 2019, 73(6): 1282-1291.e8.
- [31] Feiner R, Argov T, Rabinovich L, et al. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol*,

- 2015, 13(10): 641-650.
- [32] Li YM, Liu XX, Tang KH, et al. Prophage encoding toxin/antitoxin system PfiT/PfiA inhibits Pf4 production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(4): 1132-1144.
- [33] Blower TR, Evans TJ, Przybilski R, et al. Viral evasion of a bacterial suicide system by RNA-based molecular mimicry enables infectious altruism. *PLoS Genet*, 2012, 8(10): e1003023.
- [34] Otsuka Y, Yonesaki T. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnIA toxins. *Mol Microbiol*, 2012, 83(4): 669-681.
- [35] Beloglazova N, Brown G, Zimmerman MD, et al. A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20361-20371.
- [36] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 2006, 1: 7.
- [37] Rostøl JT, Marraffini LA. Non-specific degradation of transcripts promotes plasmid clearance during type III-a CRISPR-Cas immunity. *Nat Microbiol*, 2019, 4(4): 656-662.
- [38] Meeske AJ, Nakandakari-Higa S, Marraffini LA. Cas13-induced cellular dormancy prevents the rise of CRISPR-resistant bacteriophage. *Nature*, 2019, 570(7760): 241-245.
- [39] Tock MR, Dryden DTF. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(4): 466-472.
- [40] Silas S, Lucas-Elio P, Jackson SA, et al. Type III CRISPR-Cas systems can provide redundancy to counteract viral escape from type I systems. *eLife*, 2017, 6: e27601.
- [41] Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(8): 4360-4377.
- [42] Wang XY, Zhao XK, Wang H, et al. *Mycobacterium tuberculosis* toxin Rv2872 is an RNase involved in vancomycin stress response and biofilm development. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(16): 7123-7133.
- [43] Thompson MK, Necedal I, Culviner PH, et al. *Escherichia coli* SymE is a DNA-binding protein that can condense the nucleoid. *Mol Microbiol*, 2022, 117(4): 851-870.
- [44] Guo YX, Quiroga C, Chen Q, et al. RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(10): 6448-6462.
- [45] Zhang YL, Zhu L, Zhang JJ, et al. Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2005, 280(28): 26080-26088.
- [46] Tiwari P, Arora G, Singh M, et al. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in Guinea pigs. *Nat Commun*, 2015, 6: 6059.
- [47] Verma S, Kumar S, Gupta VP, et al. Structural basis of *Bacillus anthracis* MoxXT disruption and the modulation of MoxT ribonuclease activity by rationally designed peptides. *J Biomol Struct Dyn*, 2015, 33(3): 606-624.
- [48] Mets T, Lippus M, Schryer D, et al. Toxins MazF and MqsR cleave *Escherichia coli* rRNA precursors at multiple sites. *RNA Biol*, 2017, 14(1): 124-135.
- [49] Kwon AR, Kim JH, Park SJ, et al. Structural and biochemical characterization of HP0315 from *Helicobacter pylori* as a VapD protein with an endoribonuclease activity. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(9): 4216-4228.
- [50] Sharrock A, Ruthe A, Andrews ESV, et al. VapC proteins from *Mycobacterium tuberculosis* share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0203412.
- [51] Boampong K, Smith SL, Delahay RM. Rapid growth inhibitory activity of a YafQ-family endonuclease toxin of the *Helicobacter pylori* tfs4 integrative and conjugative element. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18171.
- [52] Guegler CK, Laub MT. Shutoff of host transcription triggers a toxin-antitoxin system to cleave phage RNA and abort infection. *Mol Cell*, 2021, 81(11): 2361-2373.e9.
- [53] Yao JY, Guo YX, Zeng ZS, et al. Identification and characterization of a HEPN-MNT family type II toxin-antitoxin in *Shewanella oneidensis*. *Microb Biotechnol*, 2015, 8(6): 961-973.
- [54] He LM, Fan XY, Xie JP. Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas. *J Cell*

Biochem, 2012, 113(7): 2464-2473.

- [55] Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. PLoS Genet, 2009, 5(12): e1000767.
- [56] Huang QQ, Luo HP, Liu MQ, et al. The effect of *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR-associated Cas2 (Rv2816c) on stress response genes expression, morphology and macrophage survival of *Mycobacterium smegmatis*. Infect Genet Evol, 2016, 40: 295-301.
- [57] Lee KY, Lee BJ. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. Toxins, 2016, 8(10): 305.
- [58] Muthuramalingam M, White JC, Bourne CR. Toxin-antitoxin modules are pliable switches activated by multiple protease pathways. Toxins, 2016, 8(7): 214.
- [59] Caño-Muñiz S, Anthony R, Niemann S, et al. New approaches and therapeutic options for *Mycobacterium tuberculosis* in a dormant state. Clin Microbiol Rev, 2017, 31(1): e00060-e00017.
- [60] Moyed HS, Bertrand KP. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. J Bacteriol, 1983, 155(2): 768-775.
- [61] Schumacher MA, Balani P, Min J, et al. HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. Nature, 2015, 524(7563): 59-64.

(本文责编 郝丽芳)