

# 结核分枝杆菌 ESX-1 分泌蛋白 EspB 结构和功能分析\*

唐晓萌<sup>1,2)</sup> 王大成<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; (<sup>2)</sup>中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要** 结核分枝杆菌作为肺结核病的病原菌, 在人类中致死率远高于其他病原菌. 结核分枝杆菌具有特殊的疏水性细胞壁结构, 这种致密的细胞壁结构帮助结核分枝杆菌抵御外界环境压力和来自宿主细胞的毒素. 同时, 它利用特殊的分泌系统将体内的毒力蛋白输出体外, ESX-1 分泌系统就是其中之一. 结核分枝杆菌 ESX-1 系统在结核分枝杆菌进入宿主细胞吞噬小体、逃逸至细胞质以及杀死吞噬细胞这些过程中发挥重要作用. 研究表明, 在结核分枝杆菌内膜上存在一个由多亚基组成、旨在帮助结核分枝杆菌向外输送分泌蛋白的分泌装置. 在这个分泌装置的帮助下, 结核分枝杆菌重要的毒力蛋白 ESAT-6 跨内膜向外分泌, EspB 也通过这个内膜上的分泌装置被转运至胞外. EspB 存在于静置培养的结核分枝杆菌的胶囊层中, 也可在振荡培养的结核分枝杆菌的培养液中被检测. 通过 X 射线晶体衍射分析, 我们解析了 EspB 的晶体结构, 相比于其他同源结构, 发现了 EspB 的不同构象, 即 EspB 单体能够自组装成为七聚体的规则结构, 联系其与毒力因子 ESAT-6 具有共分泌的特点, 七聚体构象的发现为解释 EspB 在结核分枝杆菌向外分泌蛋白的过程中发挥的作用提供线索, 即 EspB 具有锚定在结核分枝杆菌胶囊层中, 作为运输 ESAT-6 的孔道而存在的可能.

**关键词** 结核分枝杆菌, EspB, 分泌系统, 晶体结构, 结构-功能关系

**学科分类号** Q71

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2017.0052

结核分枝杆菌是人类重要的致病菌, 威胁人类生命. 目前针对结核分枝杆菌的疫苗并不能在成年人中提供全面的保护作用, 随着逐年增多的耐药株的出现<sup>[1]</sup>, 寻求有效治疗结核病的新药迫在眉睫. 这要求我们更深刻理解结核分枝杆菌与宿主细胞的相互作用及其在宿主细胞中的致病机制. 结核分枝杆菌具有致密的细胞壁结构, 包括四个部分: 内膜、肽聚糖/阿拉伯半乳糖层、分枝菌酸层和最外部的胶囊层. 致密紧实的细胞壁结构帮助结核分枝杆菌抵御包括宿主免疫系统在内的严苛生存环境<sup>[2]</sup>. 结核分枝杆菌拥有至少四种分泌系统: Sec、SecA2、twin-arginine 以及 ESX 分泌系统. ESX 分泌系统因其底物不具有典型的信号肽而区别于其他传统分泌系统, ESX 分泌系统包括五条分支途径: ESX1~5. 目前获得主要关注的是 ESX-1 分泌途径, 因为它参与了结核分枝杆菌两个重要的毒力蛋白 ESAT-6 和 CFP10 的分泌<sup>[1]</sup>. ESAT-6 具有裂解细胞膜的能力, 是结核分枝杆菌逃逸至细胞周质所

必需的毒力因子<sup>[3-5]</sup>. CFP-10 是 ESAT-6 的分子伴侣. ESAT-6 的编码基因位于结核分枝杆菌基因组的 RD1 区, RD1 区域是结核分枝杆菌在宿主细胞内存活并且成功致病的关键基因<sup>[6]</sup>. 结核分枝杆菌 RD1 区缺陷株致病力大大下降, 不能在宿主细胞内存活. 目前使用的减毒疫苗就是 RD1 区缺陷型, 但现有的减毒活疫苗保护力有限. 研究表明, RD1 区的基因编码锚定在结核分枝杆菌内膜上协助分泌蛋白向外运输的多亚基分泌装置, 以及一些在结核分枝杆菌侵染宿主细胞, 引起免疫反应等过程中起重要作用的毒力因子<sup>[7-9]</sup>.

ESAT-6 跨内膜向外分泌需要锚定在结核分枝杆菌内膜上分泌装置的帮助, 这个分泌装置由

\* 中国科学院战略性先导科技专项(XDB08020202), 国家生物大分子重点实验室资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888548, E-mail: dcwang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2017-02-17, 接受日期: 2017-04-10

EccB、EccC、EccD、EccE 和 MycP1 组成。其中, EccB、EccC 具有 ATP 酶活性, EccD 是一种多次跨膜蛋白, EccE 具体功能未知, MycP1 是一种枯草杆菌蛋白酶<sup>[10]</sup>。实验证明, ESX-1 分泌途径的底物 EspB, 向外分泌时需要 EccC 的协助, EspB 可以与 EccC 的一个亚基 -EccC<sub>b</sub> 相互作用<sup>[11]</sup>。另一方面, EspB 缺陷株的培养液中 ESAT-6 未被检测到, 反之亦然。EspB 与 ESAT-6 之间具有 ESX 分泌系统底物之间特有的相互辅助分泌的特点<sup>[12-13]</sup>。

我们以 X 射线晶体衍射分析获得了结核分枝杆菌 EspB 的高分辨三维结构, 发现在这个结构中, EspB 单体具有重要的 ESX 系统分泌相关结构域。同时, EspB 单体之间通过临近残基的相互作用形成七聚体。EspB 七聚体螺旋套筒状结构具有较强的刚性, 构成 EspB 具有结核分枝杆菌细胞壁结构内独立孔道的结构基础。更重要的是, 七聚体具有可容纳 ESAT-6/CFP-10 异源二聚体通过的内径, 揭示了 EspB 与 ESAT-6 相互依存分泌关系的坚实结构基础。该项研究为探索结核分枝杆菌致病机制提示了新方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 基因、表达菌株和表达载体

实验采用的基因 Rv3881c 为从中国科学院生物物理研究所毕利军实验室结核分枝杆菌金银组克隆得到, GenBank 编号 886214 采用的表达菌株为 B21(DE3), 表达载体为 pET-28a。

#### 1.1.2 试剂

DNA 聚合酶 Primer star 购自 TAKARA 公司; 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I 购自 NEB 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 EspB 野生型 EspB<sub>w</sub> 的构建

设计引物 5' ATGACGCAGTCGCAGA 3' 和 5' TCACTTCGACTCCTTACTGTCCT 3' 以表达载体 pET-28a 为载体 PCR, 所得产物用 *Xho* I 和 *Nde* I 酶切, 酶切产物直接用于转化大肠杆菌感受态细胞 Trans10, 涂布 LB 平板(含 30 mg/L 卡那霉素)获得单菌落, 接种于 5 ml LB 培养基中(含 30 mg/L 卡那霉素) 310 K, 220 r/min 下培养 12 h, 提取质粒测序验证。

#### 1.2.2 EspB 的表达

将表达载体 pET-28a 转化入 BL21 菌株, 涂布 LB 平板(含 30 mg/L 卡那霉素, 以后所使用的培养

基均含有相同含量的抗生素), 310 K 培养 12 h, 挑取单菌落接种于 50 ml LB 液体培养基中, 310 K 下 220 r/min 培养 12 h 或过夜, 以 3% 接种量转入 5 ml LB 培养基中, 培养 3 h, 再以 3% 的接种量转接入 1L 培养基中扩大培养, 大约 3 h 后, 在细菌  $A_{600}$  达到 0.6 时将温度迅速降至 289 K, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达, 继续培养 16 h 后 277 K, 4000 r/min 离心 30 min 收集细菌。

#### 1.2.3 EspB 的纯化

将细菌重悬于裂解缓冲液(500 mmol/L HEPES pH 7.5、10 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 氯化钠), 超声破碎(超声 4 s、间隔 10 s、功率 220W, 重复 99 次)。裂解液在 277 K 下, 14 000 r/min 离心 30 min。取上清用蠕动泵以 0.5 ml/min 的流速缓缓加入 Ni-NTA 柱中(Ni-NTA 柱在上样前需用裂解缓冲液平衡 4 个柱体积), 上样完成后用清洗缓冲液(50 mmol/L HEPES pH 7.5、20 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 氯化钠)清洗 Ni-NTA 结合的杂蛋白, 至紫外分光光度法检测  $A_{280}$  的示数无变化, 以洗脱缓冲液(50 mmol/L HEPES pH7.5、250 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 氯化钠)洗脱蛋白。所得蛋白质溶液经过低速离心(4000 r/min)浓缩后, 使用 HiLoad10/300 Superdex 200 GL 分子筛进一步纯化, 分子筛层析柱首先用 50 ml 分子筛缓冲液(50 mmol/L HEPES pH 7.5、150 mmol/L 氯化钠)平衡, 保持 0.5 ml/min 的流速上样和洗脱蛋白, 收集相应的洗脱产物, 低速离心(4 000 r/min)浓缩至大约 30 g/L 后保存在 193 K 下备用。提纯过程中的每一步都使用 15% SDS-PAGE 检测目的蛋白的纯度, 确保最终得到的蛋白质纯度 >95%, 可以用于蛋白质结晶实验。

#### 1.2.4 EspB 的结晶

蛋白质经过分子筛的纯化, 低速离心(4 000 r/min)浓缩至终浓度为 10 g/L 用于蛋白质结晶。使用悬滴法结晶蛋白, 沉淀剂溶液为 0.1 mmol Bis-Tris, 10% PEG-3350, pH 5.6 和 0.1 mol/L 氯化镁。将蛋白质溶液与沉淀剂以 1:1 在硅化的盖玻片上混合后倒置于含有 450  $\mu$ l 沉淀剂的反应池上, 用真空脂密封。液滴在 29 K 下静置 2 周可以收集到用于衍射数据采集的杆状晶体。

#### 1.2.5 数据收集与结构解析同步修正

在上海同步辐射站 beam line 17U 收集到可用于结构解析的晶体衍射数据。采用 MX225CCD 探测器, 数据采集使用的 X 射线波长为 0.9795Å。用

XDS 指标化和积分, 并进行数据的统一和合并, 以 4XXX 的结构为模板用 Phenix 的 AutoMR 进行分子置换, 得到初步模型后, 使用 Coot 手动调节模型和 PHENIX 的 PhenixRefine 自动优化进行循环修正. EspB 最终模型通过 PHENIX 的

Comprehensive Validation 计算所得各项指标均在合理范围内(表 1).

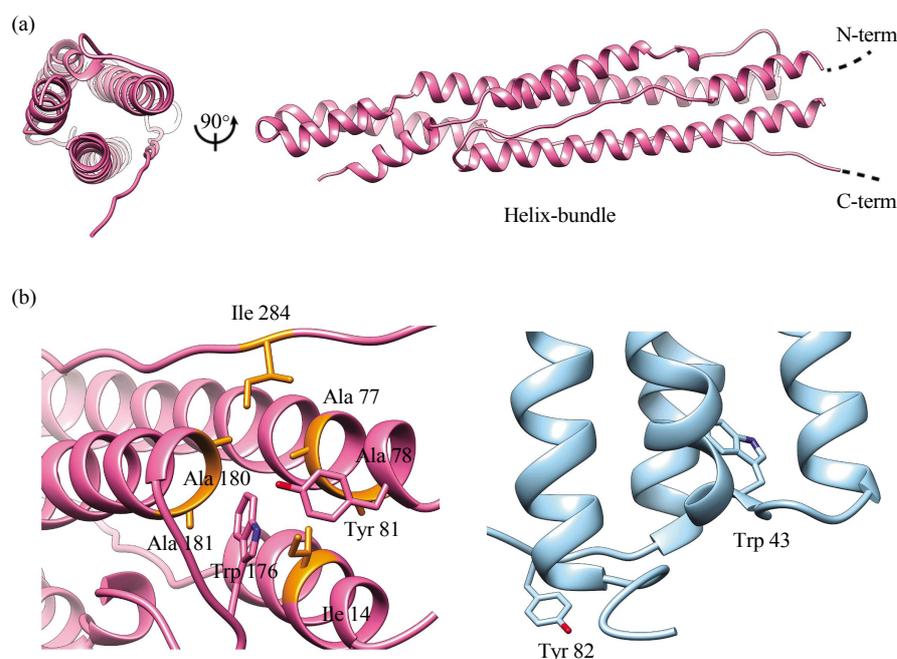
## 2 结 果

### 2.1 EspB 单体中 WxG 和 YxxxD 结构域形成重要疏水作用面

EspB 晶体结构的分辨率为  $2.4\text{\AA}$ , 结构优化的  $R$  因子为 0.2029,  $R_{\text{free}}$  为 0.2303. EspB 蛋白含有 460 个氨基酸, 单体分子由七段相对平行的螺旋组成, 螺旋之间由柔性结构区相连接, 形成一股刚性较强的螺旋束(图 1a). 研究表明, EspB 通过与分泌装置的组分 -EccCb1 ATP 酶相互作用被转运出结核分枝杆菌内膜. WxD 和 YxxxD 结构域在 ESX-1 系统分泌蛋白中高度保守, EspB 中的 YxxxD 结构域位于与 EccCb1 相互作用的螺旋中. YxxxD 结构域中 Tyr-81 苯环上的氧原子和 WxG 区域中 Trp-176 吲哚环上的氮原子之间形成氢键, 键长为  $3.02\text{\AA}$ (图 1b). 周围的疏水残基为这对氢键提供了稳定作用, 这些疏水残基包括: Ala-180、Ala-181、Ile-14、Ala-77、Ala-78、Ile-284. 其中 Ile-14、Ala-77、Ala-78 通过与 Tyr-76 的芳香环相互作用而稳定氢键, Ile-14、Ala-180、Ala-181、Ile-284 通过与 Trp-176 的吲哚环相互作用来稳定氢键. Tyr-81 和 Trp-176 的侧链

**Table 1 Statistics on data collection, structure refinement, model assessment**

Crystal	EspB
Space group	P1
Cell parameters/ $\text{\AA}$	88.016, 106.207, 151.634
Wavelength/ $\text{\AA}$	0.9795
Res.(last shell) / $\text{\AA}$	37.43-2.404 (2.49-2.404)
Total reflections	187762
Completeness(last shell)	96.0 (96.0)
Redundancy (last shell)	2.0 (2.0)
$I/\sigma(I)$ (last shell)	8.78 (1.50)
Rmerge (last shell)	0.07711 (0.6087)
Refinement statistics	
$R$	0.2029
Free $R$	0.2303
Protein atoms	25896
Water molecules	1158
R.M.S. deviations	
Bond/ $\text{\AA}$	0.006
Angles	0.74



**Fig. 1 Overall structure of EspB monomer**

(a) EspB monomer consists of seven helices, presents as a helix-bundle. (b) WxG domain and YxxxD domain are conserved between EspB and ESAT6/CFP-10 dimer. In EspB monomer, there exist several hydrophobic residues around the aromatic surface formed by Tyr 81 and Trp 176, contributing to the stability of this conformation.

形成了一个相互垂直的芳香基团表面, 由此推测, 在 EspB 由胞内向内膜分泌装置移动的过程中, 由 WxD 和 YxxxD 两部分结构域共同组成, 并被周围疏水氨基酸稳定的这个芳香基团表面可以作为一个相互作用的表面, 在 EspB 接近 EccC 时通过 EccCb1 亚基的疏水表面而被转运。

## 2.2 EspB 七聚体是一个稳定的套筒结构, 具有运输 EsxAB 的潜力

EspB 七聚体由单体螺旋束通过临近侧链间的相互作用聚合形成, 主要为氢键和静电作用。重要的静电作用包括: Glu-58 与 Arg-192、Tyr-59 与 Arg-192、Arg-69 与 Glu-177、Glu-258 与 Arg-221。弱静电相互作用包括: Lys-277 与 Asp-189。氢键: Gln-48 与 Gln-163、Gln-48 与 Gln-164、Asn-266 与 Gln-214。这些相互作用对称存在于每一对由单体组成的 EspB 二体之间, 为维持 EspB 七聚体构象稳定提供结构基础(图 2b)。

EspB 七聚体是一个由螺旋束组成的套筒状结构, 由于螺旋结构本身延展性以及柔性非常有限, EspB 七聚体可以成为刚性较强的孔道结构。EspB 七聚体长 85Å, 宽 77Å, 内径为 45Å, 可容纳 ESAT-6/CFP-10 二体通过(图 2a)。为 EspB 运输 ESAT-6/CFP-10 提供结构上的可能性。为测试 EspB 七聚体的稳定性, 我们用 pH2~10 (pH 每隔 0.2 设置一个梯度)洗脱缓冲液和蛋白质样品, 之后用分子筛检测蛋白质样品分子质量变化。实验结果表明 EspB 在不同 pH 条件下均保持七聚体状态。同样, 在不同离子强度条件下(NaCl 浓度 0.2~2 mol/L, 每隔 0.2 mol/L 设置一个浓度梯度), EspB 同样保持七聚体状态。并且, 通过单点突变的方法来破坏维持 EspB 七聚体构象的主要相互作用也不能使 EspB 转变为单体。上述实验结果表明, EspB 具有极强的稳定性, 外界环境很难影响 EspB 七聚体的构象。

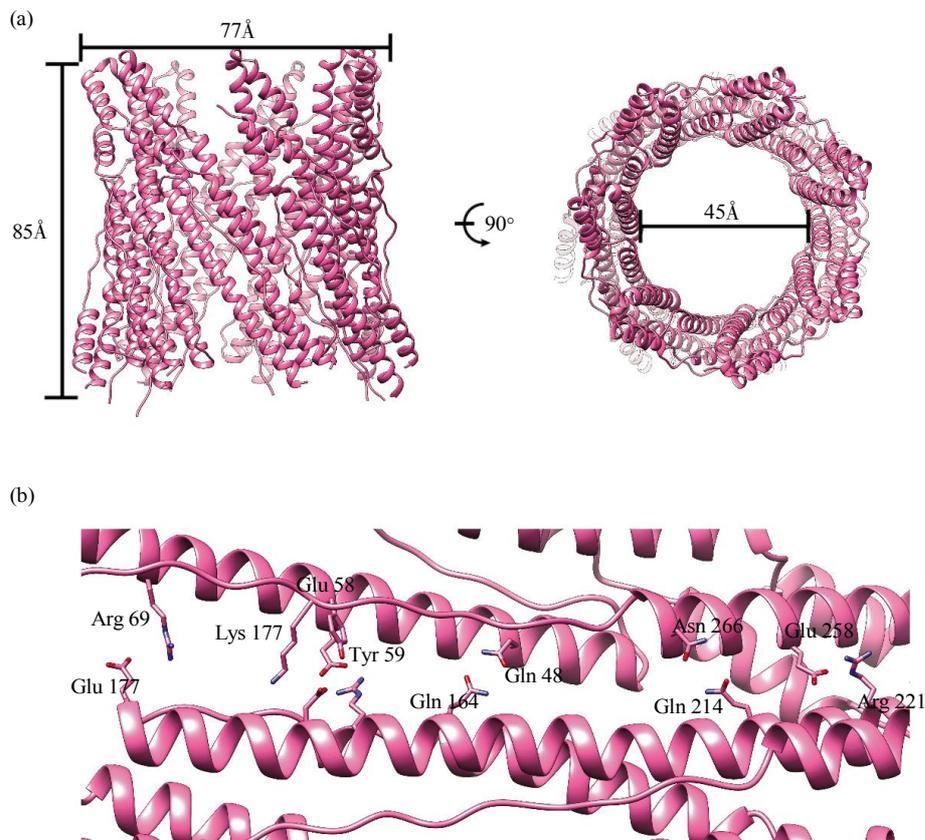


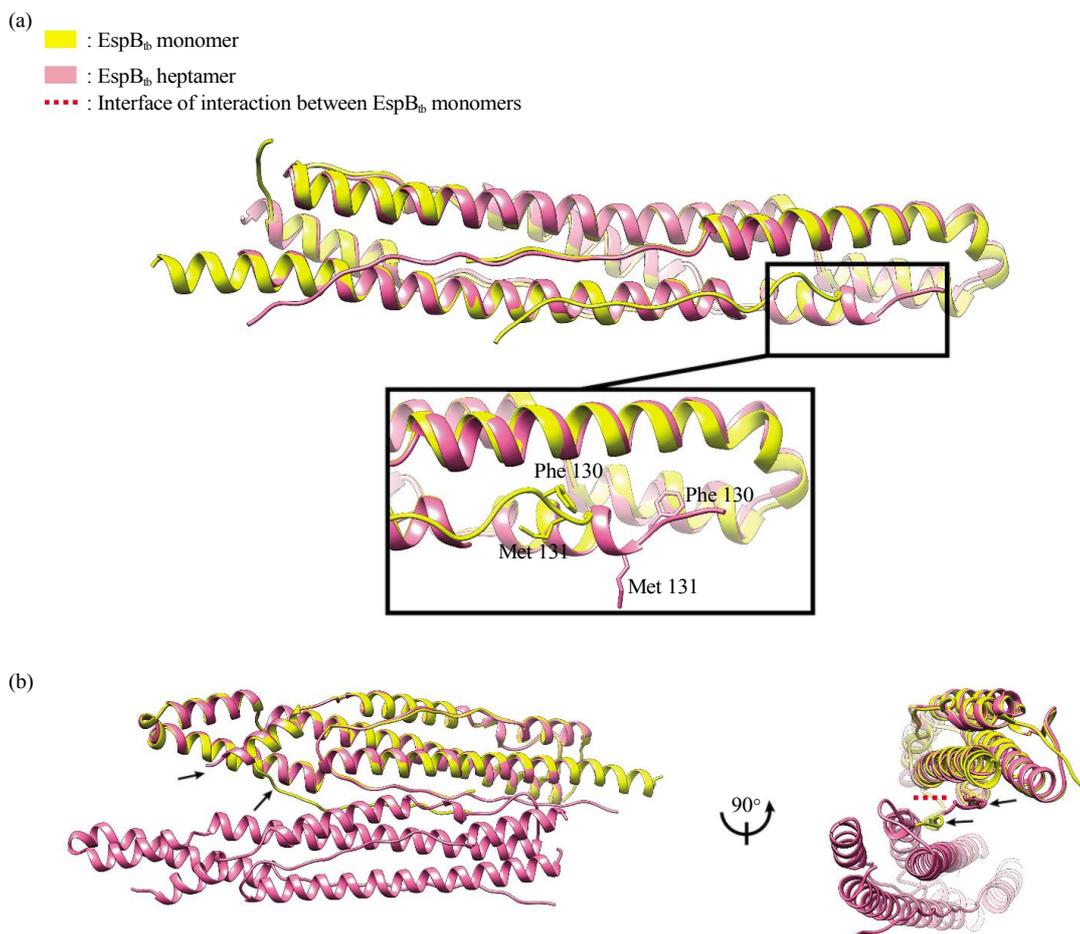
Fig. 2 Overall structure of EspB heptamer

(a) EspBheptamer is relative rigid for the reason of being constituted by seven helix-bundles. In addition, it has a height of 85Å, a width of 77Å and a inner-diameter of 45Å. (b) Major contribution in preserving heptamer conformation for EspB is made by hydrogen bonds and electronic interactions formed by residues reside between monomers.

### 2.3 一段柔性较强的 loop 在 EspB 自组装过程中做出贡献

通过与已发表的 EspB(PDB: 4XXX)单体结构比对,我们发现一段 loop 结构域在 EspB 七聚体以及 EspB 单体 2 个结构中具有完全不同的走向,而这段 loop 就位于 EspB 七聚体中 2 个单体相互作用的作用界面上(图 3b). 在这段 loop 中, Phe-130、Met-131 2 个残基在 EspB 七聚体中相比于在 EspB 单体中的取向倾转了约  $90^\circ$ , 这 2 个关键残基位置取向的不同造成在 EspB 七聚体中, 这段 loop 结构域离开单体之间的相互作用界面, 摆动到完全相

反的位置(图 3a), 从而给 EspB 单体之间相互作用的形成留出了足够的空间. 也就是说, 只有在这段 loop 离开单体间相互作用界面的情况下, EspB 单体间的氢键和范德华力才能形成, EspB 才得以组装成为七聚体. 在进行 EspB 纯化时, 没有获得 EspB 的单体, 分子筛的结果显示只有 EspB 七聚体蛋白峰. 据此, 我们推测 EspB 的自组装过程是随着蛋白质表达同时进行的, EspB 单体与七聚体构象之间并不存在一种动态平衡, 一旦七聚体形成, EspB 不会再解聚成为单体形式, 而是以七聚体形式稳定存在.



**Fig. 3 Structure alignment with EspB monomer**

(a) Compared with EspB monomer structure, residue Phe 130 and residue 131 present totally different orientations in EspB heptamer, leading to a loop following these two residues turns about  $180^\circ$  in direction. (b) Since this loop in EspB monomer lies right in the interface of interaction between monomers, we assume it takes part in EspB polymerization under modulation unknown.

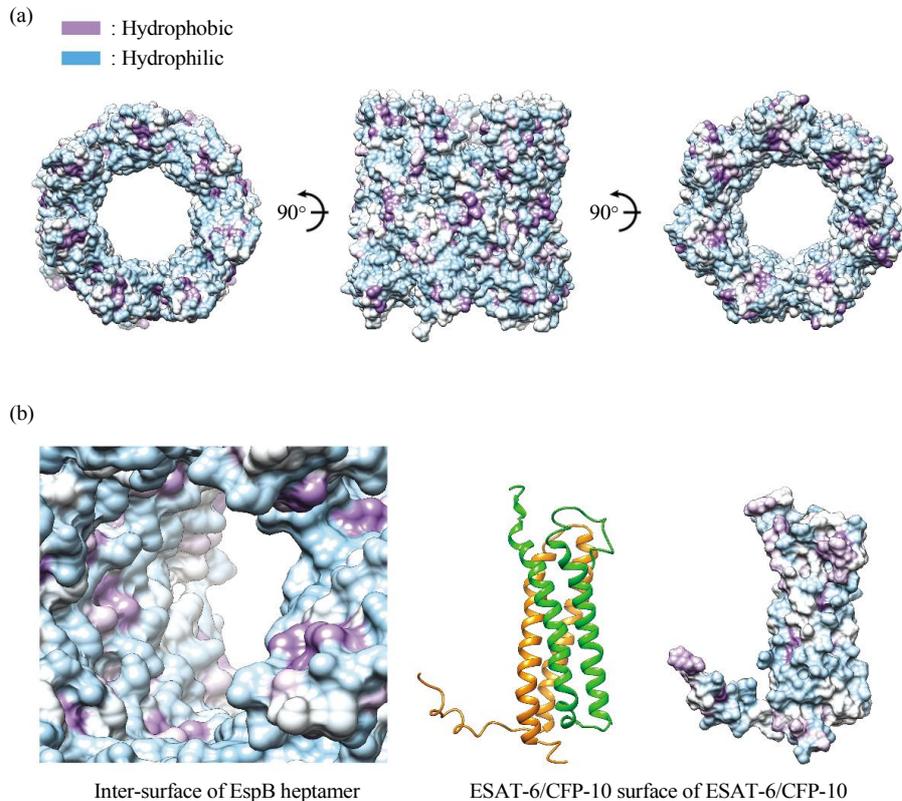
### 2.4 EspB 具有亲水性较强的表面

结核分枝杆菌的研究表明, EspB 存在于结核分枝杆菌细胞壁最外层的胶囊层中<sup>[14]</sup>. 胶囊层的主要成分是多糖和蛋白质, 还有约 6% 的脂质<sup>[2]</sup>. 胶

囊层是结核分枝杆菌细胞壁中相对亲水的结构, EspB 的亲水性表面从结构角度验证其存在于这一层的可行性(图 4a). 胶囊层多糖的成分十分复杂, 目前的研究并不能确定这些多糖的详细结构. 现阶

段已知组成胶囊层复杂多糖的最主要的基本单糖是葡萄糖、阿拉伯糖和甘露糖。使用 ITC(isothermal titration calorimetry)等温量热滴定的方法检测 EspB 与单糖 - 葡萄糖、阿拉伯糖以及甘露糖的相互作用。结果为阴性, 并且 EspB 与多糖 - 葡萄糖、阿拉伯糖以及甘露糖也没有检测出相互作用。我们猜测 EspB 只跟特定组成的多糖具有相互作用, 而与单糖以及完全由同一种单糖组成的多糖没有相互作用。对 ESAT-6/CFP-10 的结构(PDB: 1WA8)进行分析, 这一对二体的结构具有亲水表面, ESAT-6 的疏水表面因与其分子伴侣 CFP-10 的结合而被掩

盖。EspB 具有亲水的内腔, 即 ESAT-6/CFP-10 二体可穿过 EspB 孔道而不会被排斥(图 4b)。体外纯化 EspB 与 ESAT-6/CFP-10 二体蛋白, 通过表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)检测两者间的相互作用, 结果为阴性。之前的研究表明, EspB 与 ESAT-6 在胞内存在相互作用, 胞内的 EspB 应为单体形式存在, 因为将七聚体通过分泌机器运输出内膜对生物体而言是非常不高效的。基于这个假设, 我们推测 EspB 的聚合掩盖了 EspB 与 ESAT-6 的结合位点, 故而体外纯化的 EspB 不能与 ESAT-6 检测出相互作用。



**Fig. 4** EspB heptamer is quite hydrophilic, as well as ESAT-6/CFP-10 dimer

(a) Outer-surface of EspB is quite hydrophilic, as well as the two ends of EspB heptamer. (b) Inner-surface of EspB is also hydrophilic, and structure of ESAT-6/CFP-10 shows a hydrophilic surface, too.

### 3 讨 论

结核分枝杆菌 ESX 分泌系统因与结核分枝杆菌感染宿主的过程密切相关, 受到极大关注, ESX 分泌系统的分泌蛋白序列中未发现统一的可作为分类标识信号肽, 给 ESX 分泌系统转运机制的研究带来困难<sup>[15]</sup>。结核分枝杆菌 EspB 晶体结构提示

EspB 很有可能通过 WxG 与 YxxxD 2 个结构域共同组成的一个芳香基团表面来结合分泌装置组分 EccC, 并在 EccCb1 亚基的 ATP 酶活性的帮助下, 通过分泌装置被运输到周质空间。由于 WxG 和 YxxxD 2 个结构域在 ESX 分泌蛋白中具有保守性, 这个分析结果给 ESX 分泌系统信号肽的找寻提供了重要线索, 即 ESX 分泌系统的底物标识可由

WxG 与 YxxxD 两个结构域共同组成, 具备这两个结构域或具备类似这两个结构域蛋白很有可能是 ESX 分泌系统底物而被转运. 基于上述结构基础, 我们曾尝试进行 EccCb1 与 EspB 体外相互作用检测. 经尝试发现 EccCb1 全长蛋白表达, 然而蛋白稳定性非常不好, 不断沉淀. 更换标签并不能改善 EccCb1 样品的性质. 而 EccCb1 截短体则均不能在大肠杆菌表达系统中表达.

ESX-1 作为 ESX 分泌系统中的重要分支, 在结核分枝杆菌逃逸出宿主细胞致病的过程中发挥关键性作用<sup>[1]</sup>. 研究显示, ESX-1 支路重要的毒力因子 ESAT-6 与 ESX-1 分泌蛋白 EspB 在由结核分枝杆菌胞内向胞外运输时具有共分泌的特性<sup>[12]</sup>, EspB 敲除株无法在细胞培养液中检测到 ESAT-6. EspB 晶体结构揭示 EspB 具有七聚体的构象, 七聚体螺旋套筒结构具有极强的刚性, 为 EspB 成为独立于内膜分泌装置之外的新孔道提供坚实的结构基础. 同时, EspB 亲水性的表面与其在结核分枝杆菌胶囊层被检测到的事实呼应, 表明其可作为存在于胶囊层的独立孔道结构. EspB 具有亲水的内腔, 可允许 ESAT-6/CFP-10 二体通过而不产生排斥, 并且, EspB 七聚体具有可容纳 ESAT-6/CFP-10 二体进出的内径. 以上事实暗示 EspB 有可能成为在结核分枝杆菌细胞壁中运输 ESAT-6/CFP-10 的关键通道. 不同 pH 条件, 不同浓度的离子强度均不能使 EspB 七聚体构象崩塌, 从生物化学的角度说明 EspB 七聚体具有极强的稳定性, 这样的孔道结构可以保证结核分枝杆菌在宿主细胞的不利生活环境下仍然保持正常分泌关键的致病因子. 因体外未能检测到七聚体 EspB 与 ESAT-6/CFP-10 二体的相互作用, 我们推测在 EspB 将底物向外运输的过程中可能存在一个起承接作用的蛋白分子, 循环存在于二者之间, 将 ESAT-6/CFP-10 二体运送到 EspB 腔内. 此种运送方式在 T7S 中已有先例<sup>[16]</sup>.

通过结核分枝杆菌 EspB 晶体结构的解析, 我们对 EspB 与分泌装置组分 EccCb1 的相互作用提出了可能的机制. EspB 七聚体构象以及相关的结构性质符合之前关于其生化性质的报道, 也显示其具备成为结核分枝杆菌细胞壁内分泌孔道的潜力, 其运输底物极可能是 ESX-1 重要毒力蛋白 ESAT-6, 这一发现为探索结核分枝杆菌致病机制提示了新方向.

## 参 考 文 献

- [1] Russell D G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, **2**: 569–586
- [2] Stokes R W, Norris-Jones R, Brooks D E, *et al.* The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infection and Immunity*, 2004, **72**(10): 5676–5686
- [3] De Jonge M I, Pehau-Arnaudet G, Fretz M M, *et al.* ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of Bacteriology*, 2007, **189**(16): 6028–6034
- [4] Smith J, Manoranjan J, Pan M, *et al.* Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infection and Immunity*, 2008, **76**(12): 5478–5487
- [5] De Leon J, Jiang G, Ma Y, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 exhibits a unique membrane-interacting activity that is not found in its ortholog from non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**(53): 44184–44191
- [6] Gao L Y, Guo S, McLaughlin B, *et al.* A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular Microbiology*, 2004, **53**(6): 1677–1693
- [7] Pym A S, Brodin P, Majlessi L, *et al.* Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nature Medicine*, 2003, **9**(5): 533–539
- [8] Teutschbein J, Schumann G, Möllmann U, *et al.* A protein linkage map of the ESAT-6 secretion system 1 (ESX-1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological Research*, 2009, **164**(3): 253–259
- [9] Kristi M, Guinn M J H, Sanjeev K, *et al.* Individual RD-1 genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 2006, **51**(2): 359–370
- [10] Yamini M, Ohol D H G, Kaman Chan, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe*, 2010, **7**(3): 210–220
- [11] Solomonson M, Setiাপutra D, Makepeace Karla T, *et al.* Structure of EspB from the ESX-1 type VII secretion system and insights into its export mechanism. *Structure*, 2015, **23**(3): 571–583
- [12] McLaughlin B, Chon J S, Macgurn J A, *et al.* A *Mycobacterium* ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS Pathogens*, 2007, **3**(8): e105
- [13] Fortune S M, Jaeger A, Sarracino D A, *et al.* Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(30): 10676–10681

- [14] Ramakrishnan L, Sani M, Houben E N G, *et al.* Direct visualization by Cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. PLoS Pathogens, 2010, **6**(3): e1000794
- [15] Simeone R, Bottai D, Brosch R. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. Current Opinion in Microbiology, 2009, **12**(1): 4-10
- [16] Korotkova N, Freire D, Phan T H, *et al.* Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* type VII secretion system chaperone EspG5 in complex with PE25-PPE41 dimer. Mol Microbiol, 2014, **94**(2): 367-382

## Crystal Structure of EspB From *Mycobacterium tuberculosis*: Insights on Possible Secretion Mechanism of ESX-1 Pathway\*

TANG Xiao-Meng<sup>1,2)</sup>, WANG Da-Cheng<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China;

<sup>2)</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** *Mycobacterium tuberculosis* is a successful pathogen of human being that causes about millions people death annually. *M. tuberculosis* posses an unique cellular envelop which can protect itself from the attack of immune system and harsh environment. The mycobacterial cell wall consists of inner membrane, peptidoglycan/arabinogalactan layers, a mycolic acid-containing layer, and the outer capsular layer. ESX secretion system is involved in transporting substrates through cellular envelop to extracellular environment. ESX secretion system has five pathways: ESX1-5. ESX-1 pathway contributes most in pathogenicity of *M. tuberculosis* and became a continuing concern on interaction between *M. tuberculosis* and host. EspB shares a co-dependent secretion way with ESAT-6, a key virulence of ESX-1 which is responsible for the escape of *M. tuberculosis* from host cell to cytoplasm. We solved the crystal structure of EspB from *M. tuberculosis*. EspB posses conserved WxG domain and YxxxD domain, and so does other substrates of ESX-1 pathway. Research on EspB shows that it can interact with a component of secretion apparatus-EccC. We suppose that WxG domain and YxxxD domain may function together as a signal peptide for the recognition of secretion apparatus during the secretion of EspB. In addition, EspB heptamer has a relative rigid structure and a large enough inner-diameter for the transport of ESAT-6/CFP-10 dimer, which makes it possible to function as a channel for ESAT-6/CFP-10.

**Key words** *Mycobacterium tuberculosis*, EspB, secretion system, crystal structure, structure-function relationship  
**DOI:** 10.16476/j.pibb.2017.0052

\*This work was supported by grants from The Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences(XDB08020200), the National Laboratory of Biomacromolecules.

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888548, E-mail: dcwang@sun5.ibp.ac.cn

Received: February 17, 2017 Accepted: April 10, 2017