



细菌分泌系统的结构及作用机制研究进展*

刘 静¹⁾ 张昭寰^{1)**} 吴 倩¹⁾ 陶 倩¹⁾ 黄振华¹⁾ 潘迎捷^{1,2,3)} 赵 勇^{1,2,3)**}

¹⁾ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ²⁾ 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306;

³⁾ 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要 细菌分泌系统 (bacterial secretion systems) 是一类存在于细菌细胞膜上的大分子复合物, 是结构复杂的跨膜分子机器, 可为多种细菌的效应物提供分泌途径。目前已经发现了9种细菌分泌系统, 即T1SS~T9SS, 在细菌的生存及致病力方面发挥着重要作用。随着X射线晶体学 (X-ray crystallography)、核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 及冷冻电镜 (cryo-electron microscopy, Cryo-EM) 等技术手段的发展与应用, 这些大分子复合物的三维结构也得到了一定程度的解析, 极大增强了人类对于细菌分泌系统转运底物复杂机制的理解。因此, 本文结合近年来关于细菌T1SS~T9SS的研究进展, 对各分泌系统的结构信息进行了系统整合, 总结了这些分泌系统的分子作用机制, 并对其未来的发展方向进行了展望, 以期与细菌蛋白质分泌相关的致病、耐药、环境适应性等机制的研究奠定理论基础, 为进一步开发以分泌系统结构为基础的小分子抑菌物质提供精准的三维靶标。

关键词 细菌, 分泌系统, 三维结构, 作用机制

中图分类号 Q5, Q71, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0005

蛋白质分泌是细菌最基本的功能之一, 在细菌发挥致病性、适应环境、生存及繁殖等生理过程中起着关键作用^[1]。分泌系统是细菌体内一类结构复杂的跨膜蛋白质机器, 负责相关蛋白质的合成、转运及胞外分泌^[2]。目前已经确定了9种分泌系统 (图1): 按发现时间顺序, 分别命名为第I型到第IX型分泌系统 (T1SS~T9SS)。这些分泌系统依据其转运机制可被分为一步分泌和两步分泌^[3]: 一步分泌系统不需要依赖Sec等通用分泌途径, 可直接将底物从细胞质运输到细胞外环境或进入靶细胞, 主要包括I型 (T1SS)、III型 (T3SS)、IV型 (T4SS)、VI型分泌系统 (T6SS) 和VII型分泌系统 (T7SS); 而在两步分泌系统中, 底物首先通过内膜跨越转运体 (如SecYEG转位蛋白或双精氨酸易位Tat系统) 转运到周质空间, 然后通过专门的外膜分泌系统分泌到细胞外空间, 包括II型 (T2SS)、V型 (T5SS)、VIII型分泌系统 (T8SS) 以及IX型分泌系统 (T9SS)。明晰这些分泌系统具体的三维结构, 能够使人们在原子水平上更好地理解其生命调控机制^[4], 有助于细菌的多元利用

和有效控制^[5]。

近年来, 随着X射线晶体学 (X-ray crystallography)、核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 及冷冻电镜 (cryo-electron microscopy, Cryo-EM) 等结构生物学技术的发展与应用^[6], 细菌分泌系统结构及分子机制的研究取得了长足进展^[7], 对此类研究进行全面系统的综述, 有助于对分泌系统跨膜转运机制的理解和认知。在国际上, 2015年, Costa等^[7]对T1SS~T6SS的主要结构和分泌机制进行了综述。2020年, Umrekar等^[8]基于Cryo-EM解析的T2SS、T3SS、T4SS以及T6SS部分复合物的具体结构进行了综述。国内也有类似的综述报道, 2009年谭双等^[9]对T1SS~T5SS进行了综述。2019年, 岑雪等^[10]简

* 上海市优秀学术带头人计划 (21XD1401200) 和国家自然科学基金 (31972188) 资助项目。

** 通讯联系人。

张昭寰 Tel: 021-61900503, E-mail: zh-zhang@shou.edu.cn,

gongziwuhun@126.com

赵勇 Tel: 021-61900768, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

收稿日期: 2022-01-06, 接受日期: 2022-03-29

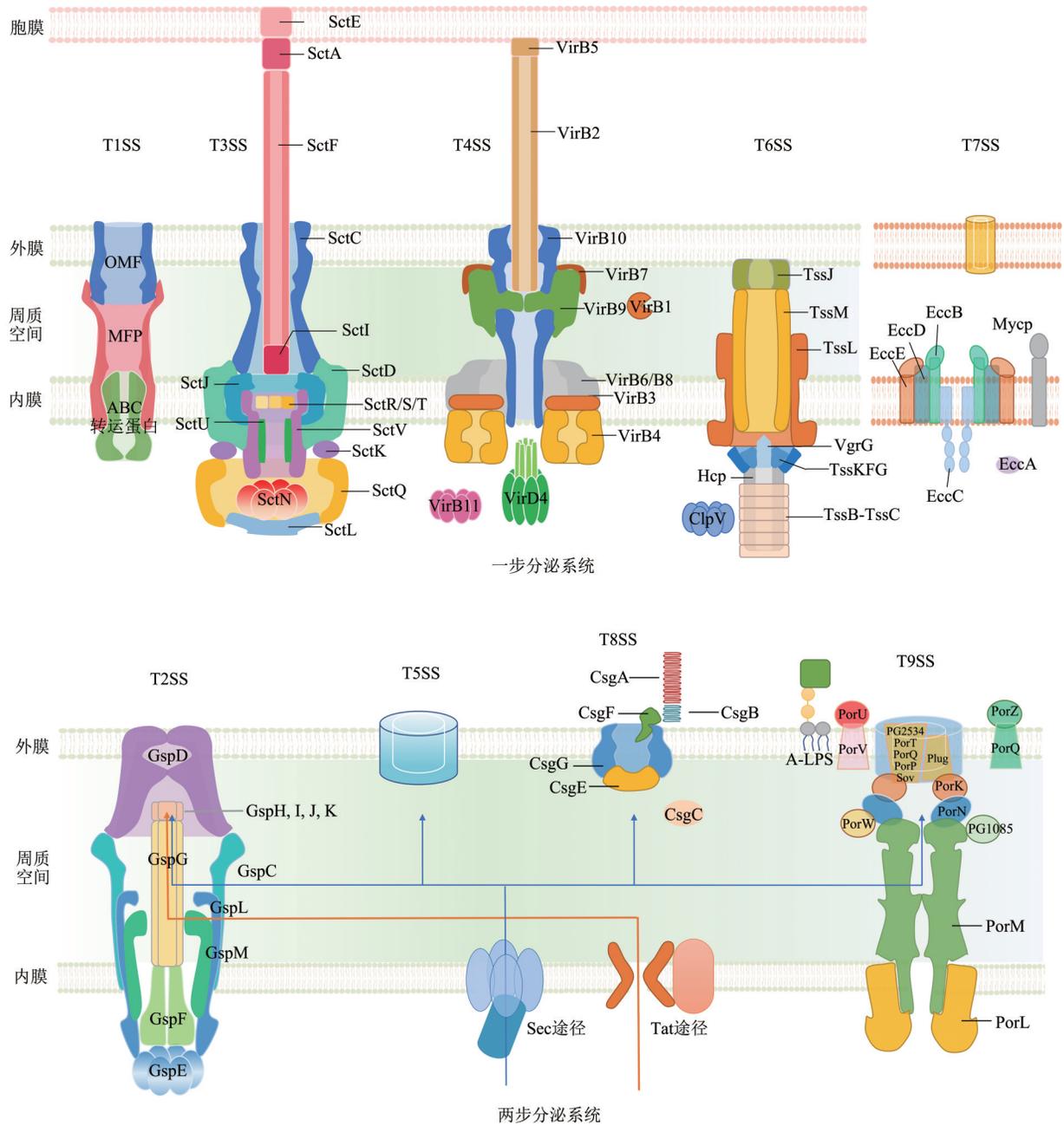


Fig. 1 Illustration of bacterial secretion system
图1 细菌分泌系统示意图

要介绍了细菌的9种分泌系统。2016年，本课题组^[11]也对副溶血性弧菌T3SS和T6SS进行了综述。但是，以上这些综述多聚焦于分泌系统的功能，缺乏具体结构的深入介绍，而且部分综述仅针对个别系统进行总结，关于细菌分泌系统全面详尽的综述亟待开展。

因此，本文结合近年来围绕细菌T1SS~T9SS

的研究，对各分泌系统的结构信息进行了系统整合（表1），总结了这些分泌系统的分子作用机制，并对其未来的发展方向进行了展望，以期与细菌蛋白质分泌相关的致病、耐药、环境适应性等机制的研究奠定理论基础，为进一步开发以分泌系统结构为基础的小分子抑菌物质提供精准的三维靶标。

Table 1 The key structural features of bacterial secretion systems

表1 细菌分泌系统关键结构特征

名称	结构组成	主要组成成分	代表性结构	PDB 编号	参考文献
T1SS	内膜蛋白	ABC转运蛋白	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) PrtD	5L22	[12]
	周质膜融合蛋白	MFP	<i>Escherichia coli</i> HlyD	5C21	[13]
	外膜孔蛋白	OMP	<i>Escherichia coli</i> TolC	1EK9	[14]
T2SS	内膜蛋白	GspE (ATP酶)	霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>) EspE	4KSS	[15]
		GspL	<i>Vibrio cholerae</i> EspL 细胞质结构域	2BH1	[16]
		GspC、GspM、GspF	-	-	-
	周质蛋白	GspG	产酸克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella oxytoca</i>) PulD	5WDA	[17]
		GspH-K	-	-	-
	外膜蛋白	GspD	<i>Escherichia coli</i> GspD <i>Vibrio cholerae</i> GspD	5WQ7 5WQ8	[18]
T3SS	基底	SctC	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) InvG	5TCQ	[19]
		SctD-SctJ	<i>Salmonella typhimurium</i> PrgH-PrgK	3J6D	[20]
	底物输出装置	SctU	<i>Salmonella typhimurium</i> SpaS	3C01	[21]
		SctV	福氏志贺氏菌 (<i>Shigella flexneri</i>) MxiA	4A5P	[22]
		SctR、SctS、SctT	-	-	-
	胞质环与分选平台	SctO	沙眼衣原体 (<i>Chlamydia trachomatis</i>) CT670	3K29	[23]
		SctN	肠致病性大肠杆菌 (<i>Enteropathogenic E. coli</i>) EscN	6NJO	[24]
		SctL-SctQ	<i>Salmonella typhimurium</i> OrgB- SpaO	4YXA	[25]
		针状复合物	SctF	<i>Salmonella typhimurium</i> PrgI	2LPZ
	SctA		<i>Salmonella typhimurium</i> SipD	3NZZ	[27]
	内杆		SctI	-	-
	转运孔	SctB/E	嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>) AcrH-AopB	3WXX	[28]
T4SS	ATP酶	VirB4	乙醇栖热厌氧杆菌 (<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>) VirB4 C端结构域	4AG5	[29]
		VirB11	幽门螺旋杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) HP0525	1OPX	[30]
		VirD4	<i>Escherichia coli</i> TrwB	1E9R	[31]
	内膜复合物	VirB8	根癌农杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) VirB8周质结构域	2CC3	[32]
		VirB3、VirB6	-	-	-
	外膜复合物	VirB7-VirB9-VirB11	柑桔黄单胞菌 (<i>Xanthomonas citri</i>) VirB7-VirB9-VirB11	6GYB	[33]
	菌毛	VirB2	pED208 F菌毛	5LEG	[34]
VirB5		pKM101 TraC	1R8I	[35]	
T5SS	乘客结构域	-	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) EstA	3KVN	[36]
	易位单元	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EstA		
T6SS	膜复合物	TssJ-TssM	<i>Escherichia coli</i> TssJ-TssM	4Y7O	[37]
		基板复合物	TssK-TssF-TssG	<i>Escherichia coli</i> TssK-TssF-TssG	6GIY
	刺突蛋白	VgrG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VgrG	4MTK	未发表
	尾鞘与内管	TssB-TssC	<i>Vibrio cholerae</i> VipA-VipB-Hcp-tube	5OJQ	[39]
	T7SS	膜蛋白	EccB、EccC、EccD、EccE、MycP	-	-
	ATP酶	EssA	-	-	
T8SS	外膜复合物	CsgG- CsgF	<i>Escherichia coli</i> CsgFG	6L7A	[40]
		CsgE	-	-	-

续表1

名称	结构组成	主要组成成分	代表性结构	PDB 编号	参考 文献
T9SS	外膜蛋白	Sov	牙龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) SprA	6H3I	[41]
		PorV	<i>Porphyromonas gingivalis</i> PorV	6H3I	[41]
		PorZ	<i>Porphyromonas gingivalis</i> PorZ	5M11	[42]
		PorQ、PorU	-	-	-
	周质蛋白	PorK、PorN、PorW、PG1085	-	-	-
	内膜蛋白	PorM、PorL	-	-	-

1 I型分泌系统 (type I secretion system, T1SS)

T1SS是一种广泛存在于革兰氏阴性菌细胞膜上的蛋白质分泌装置,介导多种底物从细胞质一步分泌到细胞外环境,通常与营养获取和毒力有关^[12]。研究表明,该系统与多药外排泵(resistance-nodulation-cell division, RND)家族的结构组成密切相关^[13],主要由内膜蛋白(inner membrane component, IMC)、周质膜融合蛋白(membrane-fusion protein, MFP)和外膜孔蛋白(outer-membrane porin, OMP)组成,这3个组分组装成1个跨越内膜和外膜的复合体,为底物提供一条跨膜转运的通道(图2a)。

1.1 内膜蛋白 (IMC)

在T1SS中,IMC主要属于ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter)家族,能够利用ATP水解产生的能量,将结合的底物从细胞质通过内膜转移到MFP的周质腔^[12]。ABC转运蛋白的最小功能单元由2个核苷酸结合域(nucleotide-binding domains, NBDs)和2个跨膜结合域(transmembrane binding domains, TMDs)组成(图2a)。2个TMD结合形成底物识别位点和底物易位路径,NBDs则通过结合和水解2个ATP分子为底物的运输提供动力。

2003年,Schmitt等^[43]采用X射线晶体解析技术,首次解析了大肠杆菌(*Escherichia coli*)运输 α 溶血素T1SS内膜蛋白HlyB的NBD结构域(图2b),其主要由2个结构域构成。第1个结构域(图2b橙色)由2个 β 片层和 α 螺旋组成,第1个 β 片层由4条反平行 β 折叠(S1~S4)组成,第2个 β 片层由6条平行 β 折叠(S3, S8~S12)组成,9号 β 折叠N端相邻的Pro-loop与NBD的热稳定性和表达量密切相关。 α 螺旋与典型ABC转运体NBD大致

保持一致,该螺旋上包含保守的Walker A基序,C端3个残基呈现 3_{10} 螺旋构象,导致Walker A与9号 β 折叠的Walker B基序发生相互作用。第2个结构域(图2b蓝色)为信号域,主要由5条 α 螺旋组成,在底物识别及NBD与TMD的特异性和功能化连接中起到重要作用。此外,通过对比多个已知的NBD结构域发现,NBD的第二个结构域中包含一段由约30个氨基酸残基组成的结构多样化区域(structurally diverse region, SDR),可与HlyB蛋白的TMD特异地相互作用,因此该区域可能在不同NBD对其同源TMD的靶向性中发挥重要作用。2017年,Morgan等^[12]采用X射线晶体学技术解析了嗜嗜热菌(*Aquifex aeolicus*)T1SS内膜蛋白PrtD,该结构呈现为典型的同源二聚体,每个单体包含1个由6个N端跨膜螺旋(TM1~TM6)构成的TMD和1个C端NBD。其中6个TM螺旋在NBD上方形成了大约长40 Å的连续通道,提供底物进入窗口。PrtD在TM3和TM6发生了高度扭曲,这些扭曲螺旋在T1SS ABC转运蛋白与底物的结合中起着关键作用。

1.2 膜融合蛋白 (MFP)

在T1SS中,MFP参与底物识别,预先与IMC结合形成稳定的IM复合物^[44],通过与底物的结合,诱导IMC与OMP接触,进一步通过改变3个组分的构象来实现底物的成功分泌。Kim等^[13]于2016年首次发表了大肠杆菌T1SS膜融合蛋白HlyD可溶性片段的晶体结构(图2c)。HlyD具有高度延长的 α 螺旋结构域,长度约为115 Å,由3个 α 螺旋($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$)和2个连接环(L1、L2)组成。其中, $\alpha 3$ 比 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 长,导致了 $\alpha 3$ 能够与 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 发生相互作用: $\alpha 3$ 的上半部分区域与 $\alpha 2$ 盘绕形成 α 螺旋发夹结构,其中L2在 α 螺旋结构域的顶端区域连接 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 。 $\alpha 3$ 和 $\alpha 1$ 的下半部分形成螺旋状结构。目前解析的HlyD结构尚缺少N端的95个氨基酸残基,以及C端的106个氨基酸残基,其完整的

结构有待于进一步解析。

1.3 外膜孔蛋白 (OMP)

1997年, Koronakis等^[45]解析了大肠杆菌T1SS外膜蛋白TolC的周质结构域, 但是该结构的分辨率较低, 仅为12 Å。2000年, 该作者进一步提升了TolC晶体结构的分辨率, 达到2.1 Å^[14], TolC是由β折叠、α螺旋和混合α/β结构域组成的桶装三聚体, 蛋白质总长度为140 Å (图2d)。在三聚体中, 12条β折叠链采用反平行的方式以右手

螺旋形式形成β桶状结构, 12条α螺旋链以左手螺旋形式形成α桶状结构, 2个桶状结构间通过含有脯氨酸的结构相连接。α螺旋形成的桶状结构内部通常保持部分或完全闭塞的状态, 而β桶顶端的环状结构具有相对较高的原子位移参数, 赋予其一定的构象迁移性, 可作为该桶状结构的“盖子”以控制其开启或闭合。α桶的7、8号位螺旋组成外螺旋圈, 能够与3、4号位内螺旋圈进行相互作用并发生解旋行为, 从而实现通道的打开和底物的转运。

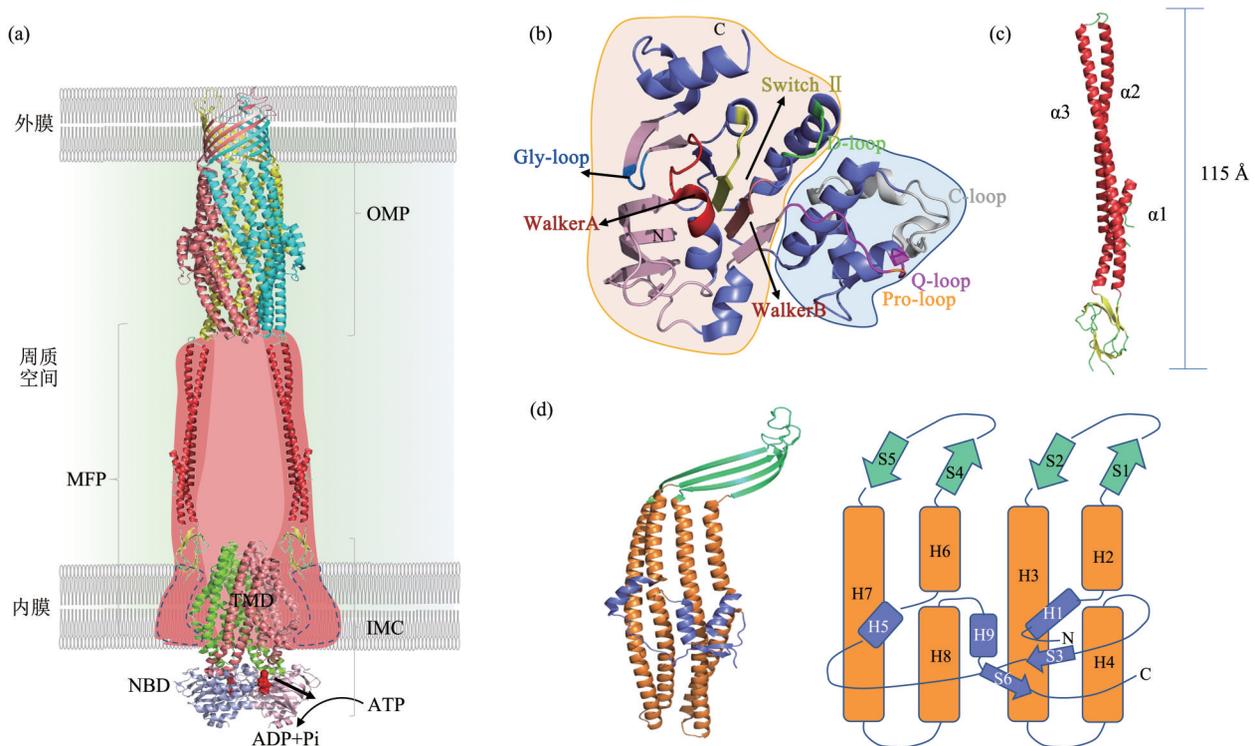


Fig. 2 Illustration of the structural model of the localization of T1SS

图2 T1SS的结构示意图

(a) T1SS示意图, 包含IMC (PDB: 5L22)^[12]、MFP (PDB: 5C21)^[13]、OMP (PDB: 1EK9)^[14]。(b) NBD (HlyB)的结构图 (PDB: 1MT0)^[43]。(c) MFP (HlyD)的结构图 (PDB: 5C21)^[13]。(d) OMP (TolC)结构拓扑图 (PDB: 1EK9)^[14] (以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

2 II型分泌系统 (type II secretion system, T2SS)

T2SS广泛存在于革兰氏阴性细菌中, 属于两步分泌, 首先通过Sec/Tat途径将未折叠的蛋白质以多肽形式转运至周质空间^[46-47], 并在此处实现蛋白质的折叠, 进而将完全折叠的蛋白质通过T2SS分泌到细胞外环境, 其底物包括各种水解酶, 也可分泌许多细菌的重要毒素, 如霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的霍乱毒素、产肠毒素大肠杆菌

(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC) 和肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)^[48-50] 的不耐热肠毒素。以大肠杆菌为例, T2SS主要由总分泌途径跨膜蛋白 (general secretory pathway transmembrane protein, GSP) 基因簇调控的12~15个蛋白质组成^[51], 按位置可分为3个部分, 内膜部分主要由内膜蛋白GspC、GspL、GspM、多孔膜蛋白GspF以及1个六聚体ATP酶 (ATPase) GspE组成, 位于周质空间部分主要由GspG-K组成的假菌毛结构, 外膜蛋白为GspD多聚体 (图3a)。

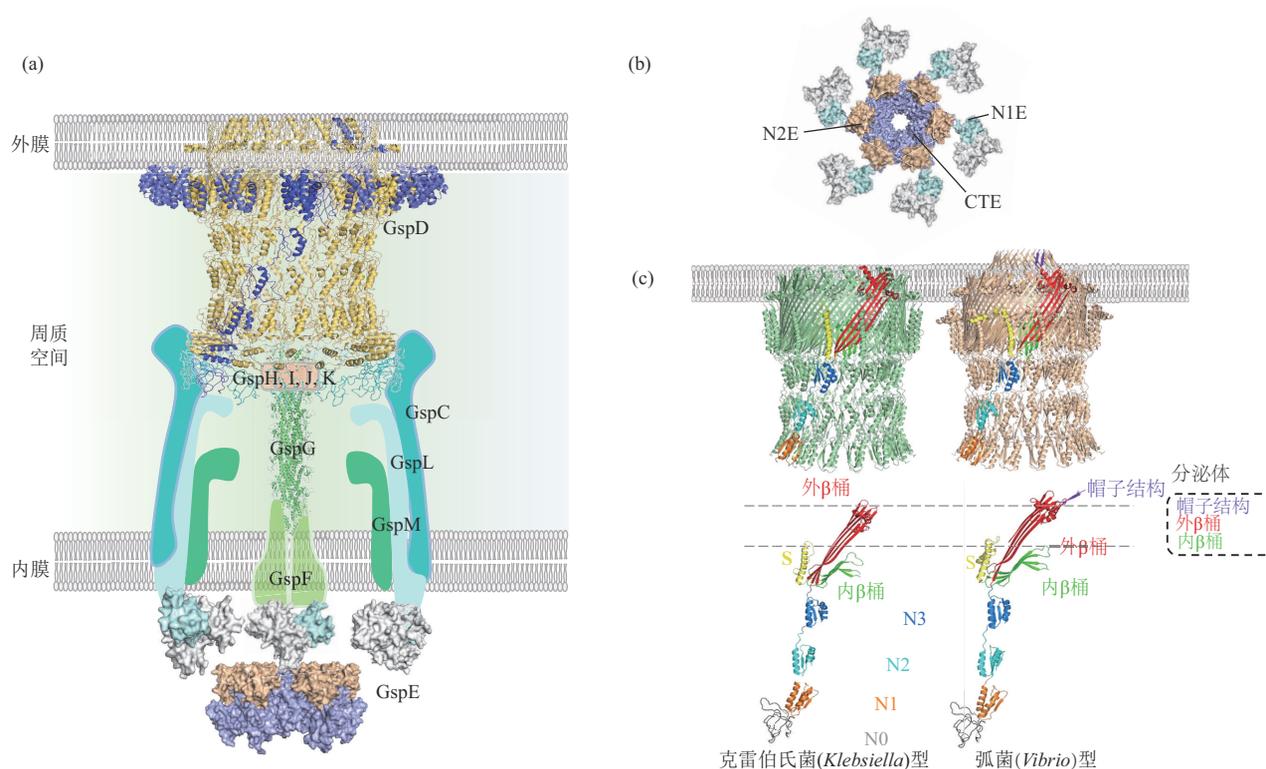


Fig. 3 Illustration of the structural model of the localization of type II secretion system

图3 II型分泌系统的结构示意图

(a) T2SS示意图, 包含GspE inner ring (PDB: 4KSS)^[15]、GspE-N1和GspL细胞质结构域 (PDB: 2BH1)^[16]、GspG (PDB: 5WDA)^[17]、GspD (PDB: 6HCG)^[52]。(b) GspE的环状六聚体结构, 包含内环 (PDB: 4KSS)^[15]、外环 (PDB: 2BH1)^[16]。(c) 弧菌属的代表为霍乱弧菌T2SS的GspD (PDB: 5WQ8)^[18], 克雷伯氏菌属的代表为*E.coli* T2SS的GspD (PDB: 5WQ7)^[18] (以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

2.1 内膜组分

在T2SS中, GspC、GspL和GspM是膜结合蛋白, 均由跨膜片段和周质域组成, 这些蛋白质与GspF和GspE结合, 形成内膜组装平台 (assembly platform, AP)。GspL和GspM可通过相互作用形成稳定的同源/异源二聚体^[53], 并与GspC和GspE相互作用, 在内膜平台的稳定性中发挥关键作用。GspE是位于细胞质内的环状六聚体ATPase (图3b), 能够与GspL和GspF相互作用。GspE的N端N1E结构域通过扩展接头连接到N2E结构域, N2E结构域又通过1个较短的柔性接头连接到C端ATPase CTE结构域。GspE固有的灵活性会在与ATP/ADP结合后发生较大范围的构象变化, GspC、GspL、GspM和GspF 4种内膜蛋白的构象也会随之产生相应改变, 从而保证整体结构的稳定性^[24]。但目前这4种膜蛋白以及AP核心GspF结构尚未解析, 对整个AP机制的认识有待进一步的探索。

2.2 周质空间组分

T2SS包含一类假菌毛 (pseudopilus) 蛋白GspG-K, 与延伸到细胞膜外形成的菌毛不同, 这种假菌毛结构往往局限于周质空间中 (图3a)。最主要的假菌毛蛋白GspG通过N端螺旋锚定在内膜上, 其他假菌毛蛋白GspH、GspI、GspJ和GspK聚集在GspG的螺旋结构顶端 (图3a), 共同形成T2SS的周质结构。在底物插入GspD通道后, 通过假菌毛结构的延伸, 以活塞或螺旋推进的方式将底物推出通道, 从而实现底物的转运^[54]。

2.3 外膜

分泌蛋白GspD是T2SS最主要的外膜蛋白, 由6个不同的结构域构成, 包括N0、N1、N2、N3、分泌体 (secretin) 和S (图3c)^[55], 其中, N0、N1、N2和N3组成N端结构域 (N-terminal domain, NTD), 与底物和T2SS的内膜组分相互作用; Secretin和S结构域构成C端结构域 (C-terminal domain, CTD), 形成外膜孔状结构。

2005年, Chami等^[56]运用冷冻电镜结合单颗粒分析(single particle analysis, SPA)技术首次解析了产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*) GspD结构, 该结构呈现为十二聚体, 基本特征是由2个环状结构在两侧形成腔室, 中间存在1个具有堵塞通道的“塞子”结构, 以防止细胞液外渗。2010年, Reichow等^[55]运用冷冻电镜解析了霍乱弧菌GspD的结构, 该结构也为十二倍对称的多聚体, 但较克雷伯氏菌GspD结构多出1个向外膜突出的结构, 长约80Å(图3c)。因此, GspD外膜分泌蛋白被分为弧菌型和克雷伯氏菌型2个亚类(图3c)。

2017年, Yan等^[18]采用冷冻电镜单颗粒重构的方法解析了GspD全长复合物的结构(图3c)。该研究首次揭示了GspD复合物为十五倍对称多聚体, 不同于之前报道的十二倍对称多聚结构。该研究清晰展示了GspD的N端为环形通道结构, C端为双层β桶结构, 由1个内β桶(inner barrel)和1个外β桶(outer barrel)组成, 由外表面上的S结构“手握手”围绕起来, 从而维持双层β桶的稳定性。中间通道上保守的甘氨酸为其底物分泌的关键

位点, 能够使关闭的通道变成半开放状态, 促进底物通过GspD通道向外分泌。

3 III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)

T3SS是9种分泌系统中组成最复杂的分泌系统, 广泛存在于沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、弧菌(*Vibrio* spp.)、志贺氏菌(*Shigella* spp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)等致病性革兰氏阴性菌中, 可将效应物直接注射到宿主细胞的细胞质或质膜上, 以实现细菌的定殖和入侵^[57]。T3SS由20多种蛋白质组成, 在物种间广泛保守, 以一步机制分泌不同的底物(图4a), T3SS各亚基在不同物种中命名不同, 因此本文采用标准化的“Sct”命名进行描述^[58]。截至目前, 人们已经对许多物种的T3SS进行了研究, 并借助X射线晶体学技术及冷冻电镜技术确定了多数亚基的精确位置(图4)。该系统主要包括: 基底(basal body)、底物输出装置(export apparatus)、胞质环与分选平台(cytoplasmic ring and sorting platform)、内杆及针

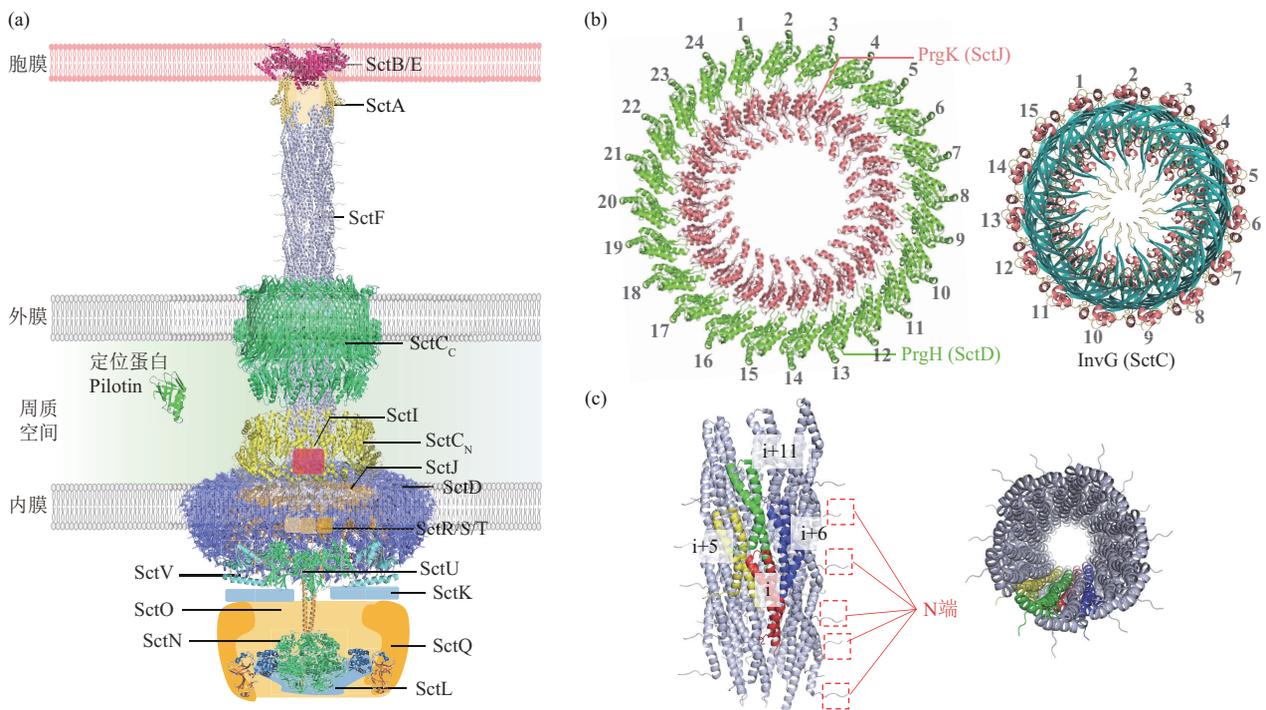


Fig. 4 Illustration of the structural model of the localization of type III secretion system

图4 III型分泌系统的结构示意图

(a) T3SS示意图, 包含SctC-SctJ-SctD (PDB: 5TCR)^[19]、SctU (SpaS; PDB: 3C01)^[21]、SctV (PDB: 4A5P)^[22]、SctO (PDB: 3K29)^[23]、SctN (PDB: 6NJO)^[24]、SctL-SctQ (PDB: 4YXA)^[25]、SctF (PDB: 2LPZ)^[26]、SctA (PDB: 3NZZ)^[27]、SctB/E (PDB: 3WXX)^[28]。(b) 左: SctJ-SctD (PDB: 3J6D)^[20]; 右: SctC (PDB: 5TCQ)^[19]。(c) SctF (PDB: 2LPZ)^[26]亚基间的排列示意图(以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

状复合物 (inner rod, needle and tip complex)、转运孔 (translocation pore)。

3.1 基底

T3SS 基底是嵌入细菌内膜和外膜的一系列环状结构^[59], 主要由 SctC、SctD 和 SctJ 构成, 其中 SctC 形成外膜环, SctJ 和 SctD 在内膜形成同心环。SctC、SctD 和 SctJ 都含有 1 个结构保守的楔形折叠, 这是内膜环和外膜环共同的成环基序, 有助于环的组装^[60]。SctC 的 N 端结构域深入周质, 与 SctD 直接接触, 实现内外膜的连接 (图 4a)。2016 年, Worrall 等^[19] 运用冷冻电镜解析了鼠伤寒沙门氏菌 T3SS 基底的结构, 呈现为典型的“螺母”与“螺栓”结构特征。其中, 内膜环由 PrgH (SctD) 和 PrgK (SctJ) 组成, PrgH 包裹 PrgK 形成 2 个呈二十四倍对称的嵌套同心环; 外膜环为 InvG (SctC) 蛋白 (图 4b), 为十五倍对称多聚体, 并在外膜中形成双层 β 桶, 其中外层桶状结构由 β 三明治结构组成, 内层 β 桶形成“周质门”, 确保底物选择性地通过 β 桶。

3.2 底物输出装置

底物输出装置位于基底下, 嵌入在内膜中, 充当底物的入口, 由 5 种膜蛋白组装而成: SctR、SctS、SctT、SctU 和 SctV (图 4a)。据估计, 共有 104 种跨膜结构域参与了内膜输出装置的形成^[61], 呈现高度的结构复杂性。SctR、SctS 和 SctT 构成 1 个以 SctR 中心的五聚体, 对底物输出装置的装配至关重要^[62]。SctV 形成 1 个同源异构环, 位于基底和 ATPase 复合体之间, 能够被整合到由 SctR、SctS 和 SctT 预组装形成的“注射器”基体中。SctU 是一种自体蛋白酶 (autoprotease), 其 C 端结构域在切割前后呈现不同的构象, 促使其与不同 T3SS 元件发生相互作用, 从而适应底物分泌过程中蛋白质结构转换^[21]。目前仍缺乏 SctR、SctS 和 SctT 的结构信息以及 SctU 和 SctV 的跨膜结构域, 有待进一步研究。

3.3 胞质环与分选平台

胞质环 (SctQ) 位于底物输出装置下方, 与 ATPase 复合体 (SctN、SctL、SctO) 一起组成底物的装载和分选平台 (图 4a)^[63]。志贺氏菌、沙门氏菌等细菌的 T3SS 分选平台都呈现为 1 个六倍旋转对称性结构, 其具有中心枢纽和 6 个辐条 (Spoke), 每个辐条末端具有豆荚状结构。在分选平台中, ATPase 复合体中的 SctN 由连接蛋白 SctO 锚定在 SctV 的异构环上, 从而连接 ATPase 复合体

与底物输出装置。而胞质环 (SctQ) 和 SctK 位于 SctL 的辐条末端, 为 SctN 提供对接位点, 将 SctN 锚定在胞质环上, 并调节其活性^[64]。整体而言, 胞质环负责底物的装载与卸载^[65], ATPase 复合体为整个 T3SS 的运行提供能量^[66]。

3.4 内杆及针状复合物

内杆 (inner rod) 由 SctI 亚基螺旋组装而成, 通过“插座 (socket)”结构连接到内膜环, 可将针状复合物 (needle complex) 锚定到基体^[59]。针状复合物由数百个 SctF 亚基螺旋组装而成 (图 4c)。每个单体的 N 端结构域位于针管表面, C 端指向针腔, 非保守的残基暴露在针状复合物表面, 这可能反映了细菌逃避宿主细胞免疫反应的策略^[26]。针状复合物在细胞外被尖端复合体 (tip complex) SctA 覆盖, 可以阻止针状复合物的伸长, 也可防止效应物的过早分泌, 帮助转运孔在宿主细胞膜的表面定位^[67]。

3.5 转运孔

转运孔是由 T3SS 转运子 SctB 和 SctE 在宿主细胞膜脂质双分子层中形成的异源低聚复合体^[68], 也可自组装成异源十六聚体跨膜复合物^[69]。最近的全基因组筛查显示, 转运孔的组装和对接需借助宿主细胞的趋化因子受体^[70]、表面硫酸化和岩藻糖化^[71]、波形中间丝蛋白^[72]等。但目前该结构缺乏高分辨率信息, 其具体的机制和功能未知。

4 IV 型分泌系统 (type IV secretion system, T4SS)

IV 型分泌系统 (Type IV secretion system, T4SS) 是一种广泛存在于细菌中多功能、多组分的跨膜转运系统。与已发现分泌系统不同, T4SS 可对 DNA 进行转运, 因此该系统可实现细菌的接合转移、DNA 释放和摄取、效应蛋白分泌等功能, 以帮助细菌增强适应性和生存能力^[73]。其中, T4SS 所介导的接合转移是基因水平转移的重要机制之一, 多数接合型质粒和整合性接合元件都依靠自身编码的 T4SS 实现耐药性和致病性等生物学性状的传播^[74]。植物病原菌根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) Ti 质粒、大肠杆菌 R388、pKM101 等接合质粒所编码的 VirB/VirD4 系统是 T4SS 的典型例子^[75-76], 该系统由 12 个亚基组成, VirB1、VirB2、VirB3、VirB4、VirB5、VirB6、VirB7、VirB8、VirB9、VirB10、VirB11 和 VirD4 (图 5a)。其中, VirB6、VirB7、VirB8、

VirB9 和 VirB10 与 VirB3 形成支架和转位装置, VirB2 和 VirB5 形成延伸到细胞外空间的菌毛, VirB1 是一类周质溶菌糖基转移酶 (lytic transglycosylase), 可降解肽聚糖层, VirB4、

VirB11 和 VirD4 则是该系统 3 个重要的供能 ATPase, 按各亚基所处位置将该系统分为 ATPase、内膜复合物、外膜复合物及菌毛 4 个部分。

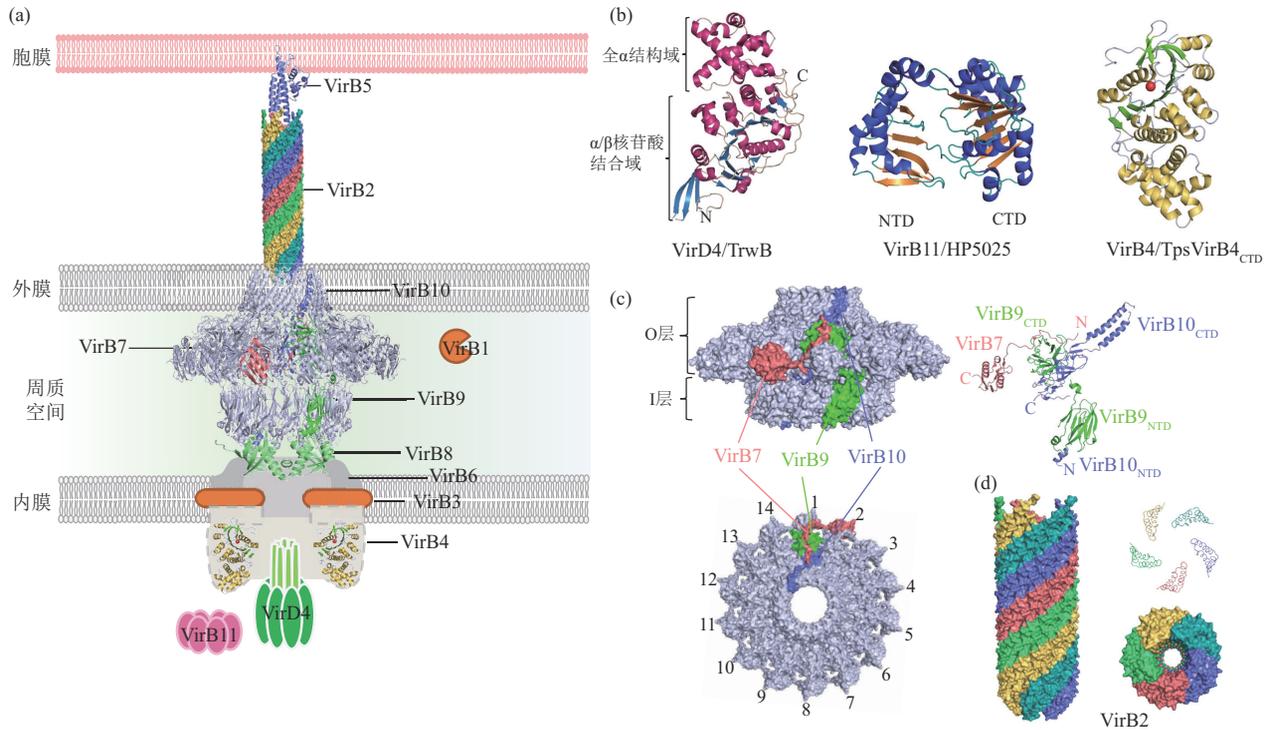


Fig. 5 Illustration of the structural model of the localization of type IV secretion system

图5 IV型分泌系统的结构示意图

(a) T4SS示意图, 包含VirB4 (4AG5)^[28]、VirB5 (PDB: 1R8I)^[35]、VirB8 (PDB: 2CC3)^[32]、VirB7-VirB9-VirB10 (PDB: 6GYB)^[33]、VirB2 (PDB: 5LEG)^[34]。(b) T4SS 3种ATPase的亚基图, 包含VirD4/TrwB (1E9R)^[30]、VirB11/HP5025 (PDB: 1OPX)^[29]、VirB4/TpsVirB4_{CTD} (4AG5)^[28]。(c) T4SS外膜复合物结构图 (PDB: 6GYB)^[32]。(d) pED208质粒编码T4SS菌毛结构的螺旋组装 (PDB: 5LEG)^[33] (以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

4.1 ATPase

T4SS的3个ATPase (VirD4、VirB4、VirB11) 均为环状六聚体, 位于易位通道的底部, 构成细胞质能量中心并在底物转运过程中起到重要作用 (图5b)。

VirB11属于“Traffic ATPases”家族, 该蛋白质的自磷酸化被认为在激活底物运输中起重要作用^[77]。2000年, Yeo等^[78]运用X射线晶体解析技术解析了幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) HP0525 (VirB11) ADP结合形式的结构, 该结构由CTD组装成1个“六爪抓钩”, 附着在由NTD组成的六聚环上, 将结合的核苷酸夹在中间, 通过调控ATP结合或释放实现该结构的开放与封闭^[79]。

VirD4是底物进入易位通道之前的结合受体, 对接合过程至关重要^[80-81]。R388质粒编码的TrwB是VirD4超家族的结构原型, 2001年, Gomis-Ruth等^[31]运用X射线晶体解析技术解析了TrwB可溶部分的结构, 该结构具有1个保守 α/β 核苷酸结合域 (NBD) 和1个与底物结合有关且序列可变的 α 结构域 (AAD), 通过N端的膜锚定序列拴在内膜上, 为底物提供受体或识别模块, 并参与单链DNA转移^[82-83]。此外, VirD4还被证明存在1个N端跨膜结构域^[80], 但该结构目前尚未解析, 因此底物在内膜的转运机制仍然未知。

VirB4通常也由CTD和NTD 2个结构域构成, 其CTD是VirB4蛋白在进化上最保守的部分。2012

年, Walldén等^[29]运用冷冻电镜解析了乙醇栖热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) VirB4的CTD, 该结构包含催化必需的Walker A和Walker B基序(图5b)。其保守程度较低的NTD被认为能够与细胞膜形成相互作用, 根据物种的不同, 预测有1~3个跨膜区, 其酶活性对底物从VirB11到内膜通道VirB6/VirB8的移交至关重要^[84]。此外, 该蛋白质对菌毛的产生^[85]和毒力^[86]至关重要。

VirD4、VirB4和VirB11被证明可能存在一定地相互作用^[87], 2018年, Chetrit等^[88]运用冷冻电镜断层扫描技术解析了嗜肺军团菌Dot系统结构, 其中DotO (VirB4)与DotB (VirB11)组装产生了1个细胞质通道, DotL (VirD4)则临时地与效应物或细胞信号组装, 引导底物的转运。因此, 这3个ATPase很可能形成1个大的ATPase复合体, 为底物的转位提供通道及能量, 但仍需要进一步验证。

4.2 内膜复合物

内膜复合物主要由VirB3、VirB6、VirB8组成, 以不同方式促进转运通道的形成。VirB8是一种双功能内膜蛋白, 由NTD和1个较大的周质CTD组成, 2006年, Bailey等^[32]运用X射线晶体解析技术解析了根癌农杆菌VirB8的周质CTD, 呈现为同源二聚体, 在二聚体接触界面存在2个高度保守域, 对二聚体的相互作用及稳定性起到重要作用, 并为其他VirB蛋白和DNA底物提供潜在结合位点, 但目前该蛋白质的NTD尚未解析。现有数据表明, VirB3与VirB2和VirB4在内膜上相互作用, 但其结构尚未解析, 对T4SS的确切作用尚不清楚^[89]。VirB6是一种多位点内膜蛋白, 由1个周质NTD、5个TM和1个细胞质内的CTD构成^[90], 对底物跨内膜的分泌具有重要作用^[91], 但目前该蛋白质的结构尚未解析, 仍有待进一步解析。

4.3 外膜复合物

2018年, Sgro等^[33]运用冷冻电镜解析了柑桔黄单胞菌 (*Xanthomonas citri*) T4SS外膜复合物, 该结构由VirB7、VirB9和VirB10组成, 呈十四倍对称, 由插入外膜的外层(O层)和内层(I层)组成, 构成1个中空腔室。其中, I层由VirB9和VirB10的N端结构域组成, 通过VirB10_{NTD}锚定在内膜上, 在底部形成1个直径为80Å的孔。O层由VirB7以及VirB9和VirB10的CTD构成(图5c), VirB10_{CTD}在顶部形成“盖子”, 并存在1个直径为

45Å的孔, 允许O层的腔室和细胞外环境相联系, 该结构还存在1个脯氨酸富集域, 负责核心复合体组装和底物分泌^[92]。VirB7是一种插入外膜的小分子脂蛋白, 主要由1个 α/β 构成的球状CTD、1个与VirB9_{CTD}相互作用的N端序列以及1个可与其他VirB7亚基相互作用的 α 螺旋组成, 在外膜复合物的形成中起到重要作用。VirB9由2个结构域组成, 其NTD由1个 β 三明治结构及1个 α 螺旋组成, CTD则为1个由 β 折叠组成的结构域, 这2个结构域由1个柔性 α 螺旋连接子连接^[93]。VirB10_{NTD}与VirB9_{NTD}具有一定的柔性, 可在底物转运过程中产生相应的构象变化, 以适应底物的加载及转运。

4.4 菌毛

T4SS菌毛由主要蛋白VirB2和次要蛋白VirB5构成^[94]。目前, VirB2蛋白的结构解析主要围绕F菌毛的研究展开。F菌毛是延伸到细菌细胞外空间的细丝, 介导细菌对靶细胞的附着, 通过收缩将2个细胞拉在一起, 从而建立直接的细胞-细胞接触, 并最终形成耐SDS和抗剪切的“交配连接”^[95]。2016年, Costa等^[34]运用冷冻电镜解析了分别由F质粒和pED208质粒编码T4SS的F型菌毛结构, 二者均由VirB2五聚体堆积而成(图5d)。在该结构中, 磷脂酰甘油(PG)与VirB2以1:1的比例存在于菌毛中, 以促进菌毛与宿主细胞膜融合、重新插入供体细胞、最终菌毛解聚等动态过程。VirB5位于菌毛的顶端, 在菌毛组装、DNA转移及特异性识别等方面发挥重要作用^[94]。2003年, Yeo等^[35]运用X射线晶体解析技术解析了pKM101质粒编码的VirB5同源物TraC, 该蛋白质由三螺旋束和松散的球状附属物组成, 位点突变结果表明VirB5在菌毛组装中发挥重要作用。

5 V型分泌系统 (type V secretion system, T5SS)

T5SS也被称自主转运蛋白系统 (autotransporters), 其特点在于该系统的分泌蛋白C端 β 结构域一旦插入OM, 就形成了允许分泌转运的 β 桶状结构, 从而驱动蛋白胞外分泌^[96]。与T2SS相似, T5SS也为两步分泌系统(图6a), 主要参与细胞间的黏附和生物被膜的形成^[97]。

自主转运系统主要由信号肽 (signal peptide)、乘客结构域 (“Passenger” domain)及易位单元 (translocation domains)^[4]3个结构域构成。信号肽存在于自主转运蛋白的N端, 可将其定位到内膜

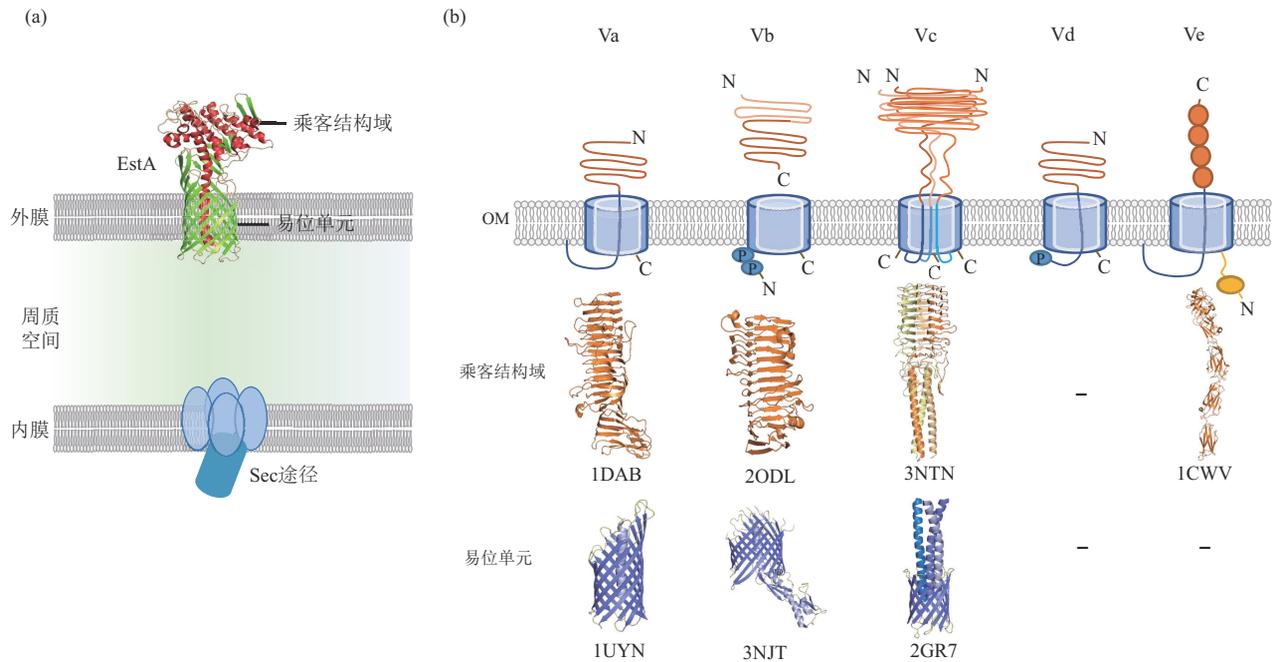


Fig. 6 Illustration of the structural model of the localization of type V secretion system

图6 V型分泌系统的结构示意图

(a) T5SS示意图, 以Va为例, 包含EstA (PDB: 3KVN)^[36]。(b) Va~Ve组装示意图, 具体蛋白质对应信息如图所示^[98-103] (以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

Sec转运蛋白; 乘客结构域, 又被称为 α 结构域或N结构域, 它可赋予自主转运蛋白不同的功能; 易位单元也被称为 β 结构域或C结构域, 便于乘客结构域的转运^[104]。目前, 根据T5SS不同的结构及跨膜特性将其分为5类, 即Va~Ve (图6b)。

5.1 Va

Va为经典的自主转运系统 (autotransport systems, ATS), 2010年, van den Berg^[36]运用X射线晶体学技术解析了第一个全长自主转运蛋白EstA, 该蛋白质存在1个相对狭窄的12股 β 桶状结构, 该结构通过 β 桶管腔内的 α 螺旋连接到乘客结构域。该蛋白质乘客结构域呈现为1个以 α 螺旋和环状结构为主的球形折叠, 为底物换乘提供动力。不过, 大多数Va的乘客结构域呈现为螺旋状 β 折叠结构, 如百日咳杆菌黏附素 (pertactin) (PDB: 1DAB) (图6b)。对Va而言, 自体转运蛋白通过Sec转运体穿过内膜, 其所含的延伸信号肽仍附着在Sec上。在周质中, 伴侣蛋白与自主转运蛋白结合并打开, 随后信号肽被信号肽酶切割, 释放自体转运蛋白。自主转运蛋白C端被BamA的POTRA结构域识别, 连接域在 β 桶内形成1个发夹, 并将乘客结构域拉至分泌孔, 进而在蛋白酶的作用下将

其转运至胞外^[104]。

5.2 Vb

Vb又称为双伴侣转运系统 (two-partner secretion systems, TPSS), 与经典的自主转运蛋白不同, TPSS中乘客结构域和易位单元位于不同的多肽链中, 乘客结构域被称为TpsA, 易位单元被称为TpsB^[102]。与众多自主转运蛋白一样, TpsA蛋白含有1个延伸的信号肽^[105], 其N端含有1个高度保守的结构域, 约300个残基构成, 被称为双伴侣分泌 (TPS) 结构域^[106]。百日咳博代式杆菌 (*Bordetella pertussis*) 丝状血凝素黏附素 (FHA) / FhaC是典型的双伴侣分泌系统^[107]。2004年, Clantin等^[108]利用X射线晶体学技术解析了FHA的TPS结构域, 呈现为一个 β 螺旋, 同时携带3个螺旋外基序, 其中 β 螺旋为FHA整体结构的构建提供支架, 螺旋外基序则起到识别易位单元等作用。2007年, 该作者解析了FhaC的结构, 该结构呈现为一个16股 β 桶, 与EstA同源。 β 桶内存在一个N端 α 螺旋, 周质部分由2个POTRA(P)结构域构成, 该结构域提供了TpsA的结合位点^[109]。TpsA的TPS结构域能够与其同源TpsB的POTRA结构域相互作用^[110], 进而通过自主转运蛋白水解

机制将TpsA蛋白转移到细胞外空间^[111]。

5.3 Vc

Vc为三聚体自主转运蛋白的转运系统，该类蛋白通常为黏附素（trimeric autotransporter adhesins, TAAs），能够不依赖自主转运蛋白的水解机制进行释放。TAAs具有模块化和重复的结构，常以三聚体的形式存在。2006年，Meng等^[104]解析了流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）黏附素Hia易位单元的结构，为三聚体组成的β桶状结构，每个亚基由4条β链和1条α螺旋构成，桶内由3条α螺旋贯穿。2012年，Shahid等^[112]利用固态核磁共振技术解析了小肠结肠炎耶尔森菌（*Yersinia enterocolitica*）黏附素YadA易位单元的结构，也呈现为三聚体组成的β桶状结构。

5.4 Vd及Ve自主转运系统

Vd自主转运系统最早被发现于铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）Patatin样酯酶PlpD的分泌过程，其乘客结构域是一种解脂酶，在自身转运完成后被自动催化水解。但与Va系统不同，其乘客结构域通过POTRA结构域连接到易位单元β桶结构域^[113]，但其具体结构仍未解析。Ve自主转运

系统是T5SS的新成员，2012年，Leo等^[111]根据结构特征首次将紧密黏附素/侵袭素家族蛋白称为Ve转运系统，其乘客结构域与易位单元的位置与Va系统相反，并且在细菌表面形成寡聚复合物，该复合物C端的易位单元能够相互作用形成1个β桶状结构，起到膜锚定作用。但目前仍缺乏Ve的整体结构，有待进一步解析。

6 VI型分泌系统（Type VI secretion system, T6SS）

T6SS是一种类似“弩”的跨越细胞膜的大分子机器，首次发现于非O1/O139的霍乱弧菌中^[114]，它可将底物注入靶细胞或环境中，从而实现致病性、细菌间交流、生物被膜形成、环境应激等细菌生理反应^[115-116]。与其他分泌系统不同，该系统可同时多个效应物输送到靶细胞。T6SS主要由13个保守的、必不可少的核心部件和几个附属部件组成（图7a）^[117-118]，依据其所处位置大致可分为膜复合体和尾部复合物。其中，尾部复合体与噬菌体的可收缩尾部具有一定相似性^[119]，通过膜复合体锚定在细胞膜上。

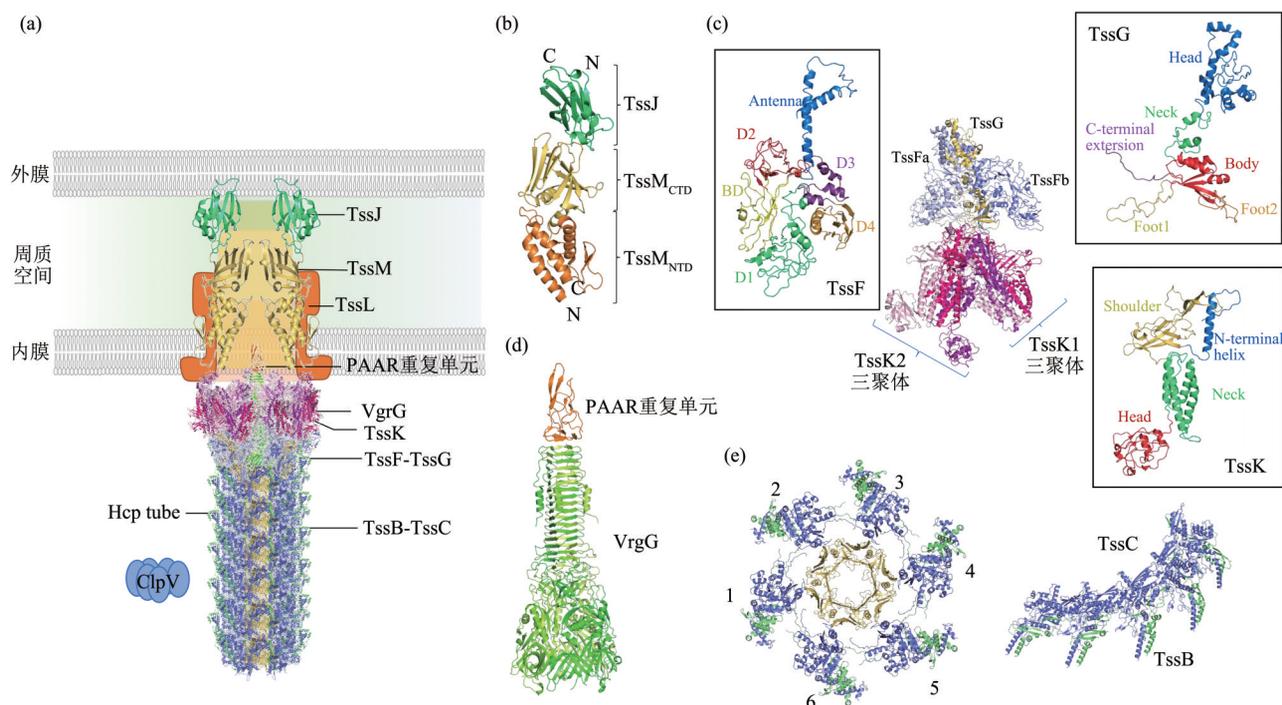


Fig. 7 Illustration of the structural model of the localization of type VI secretion system

图7 VI型分泌系统的结构示意图

(a) T6SS示意图，包含TssJ-TssM (PDB: 4Y7O)^[37]、TssK-TssF-TssG (PDB: 6GIY)^[38]、TssB-TssC-Hcp tube复合物 (5OJQ)^[39]、PAAR-Repeat-VgrG复合物 (PDB: 1K28)^[120]。(b) TssJ-TssM复合物亚基 (PDB: 4Y7O)^[37]。(c) TssK-TssF-TssG基板复合物亚基 (PDB: 6GIY)^[38]。(d) PAAR-VgrG示意图，包含PAAR (PDB: 4JIV)、VgrG (PDB: 4MTK)^[120]。(e) TssB(VipA)-TssC(VipB)-Hcp tube复合物 (PDB: 5OJQ)^[39] (以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

6.1 膜复合物

T6SS 膜复合物由 TssJ、TssL 和 TssM 组成, TssM 将外膜脂蛋白 TssJ 与内膜蛋白 TssL 连接^[118], 组成从细胞质延伸到周质空间的蛋白质复合物。2015 年, Durand 等^[37] 利用负染电子显微镜确定了完全组装的复合物结构, 该复合物呈现五倍对称构象, 其中, TssM 由 2 个结构域组成, 其 NTD 是由 4 个 α 螺旋组成的 1 个螺旋束, 一侧被 β 发夹覆盖, 另一侧被 C 端伸展部分覆盖。CTD 则是由 9 条 β 链组成的 β 三明治结构, 该结构与 TssJ 相连 (图 7b)。TssJ 结构与 TssM 的 CTD 类似, 由 2 个 4 条 β 链组成的 1 个 β 片层和 1 个 α 螺旋组成。

6.2 尾部复合物

研究表明, T6SS 尾部复合体由类似于噬菌体可收缩尾巴的结构元件组成, 包括基板 TssK-TssF-TssG、刺突蛋白 VgrG、尾鞘 TssB-TssC 和内管 Hcp 管 (Hcp tube)。其中, 尾鞘为垂直于内膜的长管状结构并深入细胞质^[121], 刺突蛋白、内管和尾鞘在基板平台组装而成, TssK 将膜复合物与尾部复合物连接在一起。

6.2.1 基板复合物 TssK-TssF-TssG

在 T6SS 组装过程中, 基板对接膜复合物, 可引发尾部管/鞘聚合, 还可作为效应物分拣平台^[121-122], 通过 VgrG 绑定效应因子^[123], 因此基板是 T6SS 的核心部件。2018 年, Cherrak 等^[38] 运用冷冻电镜解析了大肠杆菌的基板复合物, 该结构呈现为由楔形复合物亚基组成的六聚体, 在楔形复合物中, TssG 和 2 个 TssF (TssFa 和 TssFb) 组装成 T6SS 楔形复合物的金字塔帽, 2 个 TssK 三聚体与 TssG 相互作用实现楔形复合物的组装, 在每个分泌周期中, 楔形复合物的延迟聚合和快速循环组装有助于 VgrG 及效应物的释放。

TssK 三聚体亚基从 N 端到 C 端依次可分为 N 端 α 螺旋、 β 夹心结构域 (也称为 Shoulder 域)、4 条 α 螺旋组成的螺旋束 (也称为 Neck 区) 和 C 端 α/β 结构域 (也称为 Head 域) (图 7c) 4 个部分, TssK 是介导基板对接膜复合物的主要因素。最近发现^[124], TssK 结构域与长尾噬菌体 (Siphophage) 受体结合蛋白具有同源性, 但它已经进化出一个特定的 C 端 Head 结构域, 以膜复合物为受体, 实现连接。

TssG 由 2 个球形区域组成, TssG-D1 由 Head 域组成, TssG-D2 则由 Body 域和 Foot 域组成, Neck

域将其分开 (图 7d)。TssG 是楔形复合体的中心骨架, 将 TssFa 与 TssFb 相连 (图 7d)。

TssF 是一种球状蛋白, 其 N 端延伸部分称为 Antenna 结构域, 由 2 条 α 螺旋组成, 而 C 端球形结构域可分为 5 个亚域。结构域 1 (TssF-D1) 呈现 β 三明治结构, 两侧是含有短 α 螺旋的环; 结构域 2 (TssF-D2) 也是 β 三明治结构; 结构域 3 (TssF-D3) 是 α 螺旋结构域, 由 3 个短螺旋组成; 结构域 4 (TssF-D4) 是由 1 个螺旋和 4 条 β 折叠链组成的 α/β 片层; 结构域 5 (TssF-BD) 称为分支域, 将 Antenna 与 TssF-D1、TssF-D2 以及 TssF-D3 连接组成 β -三明治结构。

6.2.2 VgrG 刺突蛋白

VgrG 刺突蛋白位于内管前端, 其 C 端针状 β 螺旋能够穿透宿主细胞膜, 并可连接其他效应物的结构域^[121]。PAAR 蛋白可在 VgrG 三聚体顶端形成圆锥形结构, 使尖端变尖 (图 7d), 帮助 VgrG 对宿主细胞的插入。2013 年, Shneider 等^[120] 运用 X 射线晶体学技术解析了 PAAR-VgrG 复合物的结构, 其中, 仅解析了 VgrG 的可溶性部分, 为 3 个 β 片层组成的针状 β 螺旋, PAAR 呈现为 9 条 β 折叠链构成的锥形结构, 其中 3 条 β 折叠链形成锥形结构底座与 VgrG 结合, 另外 6 个 β 折叠链形成 3 个指向锥体顶点的 β 发夹结构, 该结构完全占据 β 螺旋的 C 端结构域, 负责在靶细胞细胞膜上产生开口, 并且作者预测 PAAR 蛋白可携带效应结构域与 VgrG 结合, 通过 T6SS 转移到靶细胞^[125]。因此, T6SS 可在鞘收缩驱动的易位中向宿主细胞运送多个效应因子。

6.2.3 尾鞘 TssB-TssC

2014 年, Kube 等^[126] 运用冷冻电镜解析了霍乱弧菌尾鞘的结构, 由 6 个 TssB-TssC 丝状复合物构建, 以 30° 旋转角度堆叠在一起, 形成六倍对称的齿轮状结构 (图 7e), 并且该结构存在 1 个由 4 条 β 链组成的核心区, 用于稳定尾鞘结构。2017 年, Wang 等^[39] 通过在 VipA (TssB) N 端插入 3 个氨基酸残基, 获得了延伸状态的霍乱弧菌 T6SS 尾鞘-内管复合物, 作者进一步揭示了 T6SS 通过推动和旋转内管来进行尾鞘收缩, 以穿透靶细胞膜。此外, ATPase ClpV 可实现对尾鞘的分解, 以确保尾鞘亚基的循环组装^[121]。

6.2.4 内管 Hcp 管

内管由溶血素共调节蛋白 (hemolysin-

coregulated protein, Hcp) 构成, Hcp 既可介导细菌的宿主体内定殖, 还可实现对宿主的接触性溶血^[127], 具有结构蛋白和效应蛋白的双重作用^[128]。到目前为止, 已经确定了6个Hcp的晶体结构, 均具有相似的六面体环状结构, 其亚基通常由2个 β 片层和1个 α 螺旋组成^[129-132], 但其功能差异较大。Suarez等^[133]研究表明, 铜绿假单胞菌的Hcp降低了巨噬细胞对细菌的摄取, 抑制宿主免疫反应, 促进细菌复制和传播, 但Lim等^[134]对类鼻疽伯克氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*) Hcp的研究中, 并没有发现Hcp对细胞信号或细菌致病性存在任何影响。因此, Hcp在不同细菌中可能存在一定差异, 需要得到进一步的探究。

7 VII型分泌系统 (Type VII secretion system, T7SS)

T7SS是革兰氏阳性菌所特有的蛋白分泌系统, 用于代替Sec或Tat途径, 最早在疫苗株牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 中被发现^[135]。研究表明, 该菌携带5个相邻的T7SS (Esx-1至Esx-5), 且具有不同的生理功能, 其中研究较多的是Esx-1和Esx-5^[136-137]。Esx-1参与细菌对吞噬小体的逃逸, 对细菌的毒力至关重要。Esx-5只存在于生长缓慢的分枝杆菌中, 参与宿主的免疫反应调节和细菌生物被膜完整性的调控^[136]。目前, T7SS的结构尚未得到完整解析, 且由于该系统外膜蛋白尚未明确, 因此本文仅对该系统的组成进行介绍。

目前, 预测形成T7SS的蛋白质有EccA、EccB、EccC、EccD、EccE和MycP 6种 (图1)。除可溶性ATPase EccA外, 其余均为膜蛋白。EccC是属于FtsK/SpoIIIE家族的ATPase, 其远端NBD与底物EsxB结合, 激活ATPase的寡聚及酶活性。EccD亚基预测有11个的跨膜螺旋, 因此推测它可能参与了转位通道的形成^[138]。然而, 关于它的确切作用或其他T7SS亚单位EccB和EccE的功能尚不清楚。2017年, Beckham等^[139]运用负染电镜解析了蟾分枝杆菌 (*Mycobacterium xenopi*) ESX-5亚复合体的三维结构, EccB₅、EccC₅、EccD₅和EccE₅呈现为1个5 nm孔洞的六倍对称复合物, 约1.5 Mu, 足以允许折叠的EsxA/EsxB底物转运。但目前T7SS外膜蛋白的具体结构和底物的分泌机制未知, 有待进一步探索。

8 VIII型分泌系统 (type VIII secretion system, T8SS)

T8SS被称为淀粉样卷曲纤维 (Curli) 生物合成途径, 多存在于肠杆菌科中, 用来分泌Curli, 该纤维蛋白由CsgA和CsgB两种亚基组成, 能够促进生物被膜的形成, 并与宿主免疫系统相互作用, 以保护细菌抵御恶劣环境^[140]。作为两步分泌系统, T8SS需要依赖Sec将底物转运至周质空间, 再由外膜蛋白运输到膜外 (图8a)。

T8SS的外膜复合物主要由可溶性辅助因子CsgE、CsgF以及外膜脂蛋白CsgG组成。CsgE和CsgF介导Curli蛋白的分泌和定位^[141]。这些蛋白质发挥不同作用, 其中CsgE被认为是CsgA的特异性伴侣, 既帮助CsgA分泌, 还会抑制体外CsgA聚合。CsgF则为CsgB的伴侣蛋白, 确保CsgB表面暴露, 从而与CsgA发生聚合^[142]。2014年, Goyal等^[143]运用X射线晶体学技术解析了大肠杆菌CsgG的结构, 由9个亚基组成寡聚体, 每个亚基提供4条 β 链, 组成36链 β 桶状结构。整个复合物在周质侧形成1个内径为35 Å、高度为40 Å的空腔, 由2号位 α 螺旋形成周质开口, 约50 Å。空腔内衬为氨基酸残基Tyr、Asn和Phe形成的3个同心环堆叠构成。通过CsgG及其同源物的多序列比对表明, Phe或Asn的改变可能会终止Curli的合成。

2020年, Yan等^[40]运用冷冻电镜解析了大肠杆菌CsgG-CsgF复合物结构 (图8b), CsgF的N端结构域与CsgG连接, C端结构域通过与CsgB的特异性结合与Curli相连接。在CsgF-CsgG通道的周质侧, 存在9个裂隙能够捕获CsgA的N端结构域, 从而为CsgA提供特异性和高度保守的识别位点。该研究还证明, CagA可通过其C端残基与CsgE相互作用, 显著增强转运效率。同年, Zhang等^[144]也运用冷冻电镜解析了大肠杆菌CsgG-CsgF复合物的结构, 如前所述, 在管腔内部也存在由Tyr、Asn和Phe的侧链形成的同心环 (图8c)。综上所述, CsgG-CsgF相互作用具备2个主要特征。首先, CsgF的N端结构域与CsgG结合, 1个连接环延伸到CsgG通道中心, 形成插入CsgG通道的漏斗状结构, 从而与CsgG形成稳定复合物。其次, CsgF可同时结合2个相邻的CsgG, 增强CsgG-CsgF复合体通道的稳定性, 以完成Curli亚基的分泌和聚合。

此外, Curli 主要亚基 CsgA 和次要亚基 CsgB 位于细胞表面, 均为 β 片层结构, CsgA 通过与细胞表面 CsgB 相连核化成淀粉样纤维^[145]。CsgC 是一种天然的细菌淀粉样蛋白抑制剂, 被证明可通过静电相互作用来抑制 CsgA 初级成核和/或延伸, 保

持其无定形、无链状态, 以防止其对宿主细胞的毒性^[146-147]。然而, 在 Curli 生物合成过程中, CsgC、CsgE 的细节结构及其机制目前尚不清楚, 有待进一步研究。

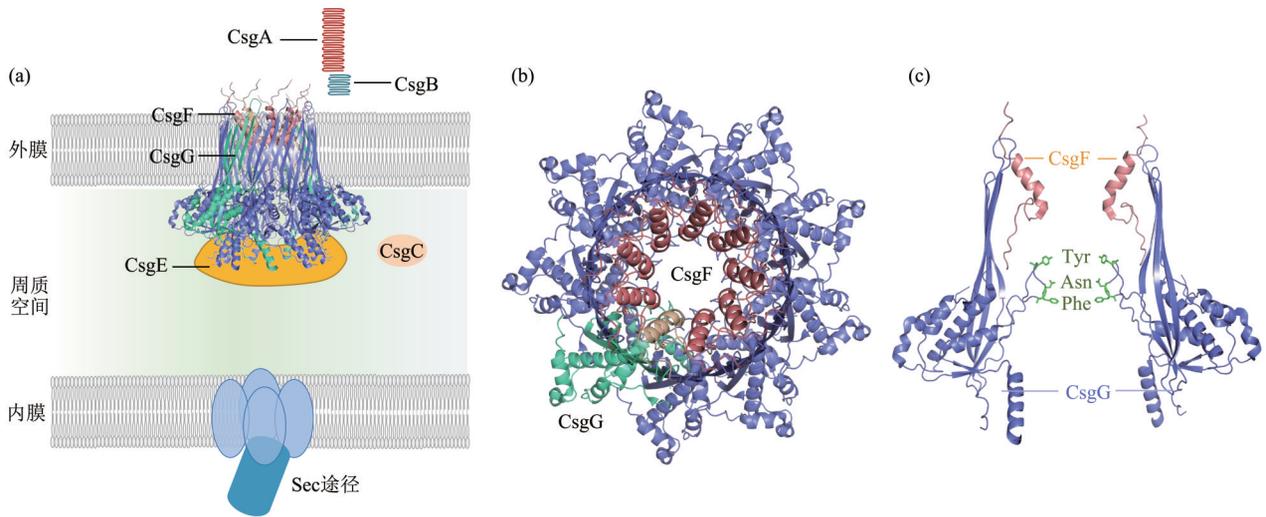


Fig. 8 Illustration of the structural model of the localization of type VIII secretion system

图8 VIII型分泌系统的结构示意图

(a) T8SS示意图, 包含CsgF-CsgG (PDB: 6L7A)^[40]。(b) CsgF-CsgG复合体 (PDB: 6L7A)^[40]顶部图, 呈现为九倍对称。(c) CsgF-CsgG复合体剖面图 (以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

9 IX型分泌系统 (type IX secretion system, T9SS)

T9SS目前仅在拟杆菌门 (Bacteroidetes) 中被发现, 用于分泌蛋白质或实现滑行运动。该系统根据细菌不同的生活方式发挥不同作用, 可为环境细菌提供滑行运动, 如经常在水和土壤中发现的共生微生物——约式黄杆菌 (*Flavobacterium johnsoniae*)^[148]; 也可分泌细菌的黏附素和毒力因子等^[149], 如人类牙周炎主要病原体——牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)^[150]。T9SS由1个双组分系统调节, 确切的触发信号还未明确。T9SS分泌蛋白通常具有保守的CTD, 将其靶向到T9SS, 滑行运动则是依赖运动性黏附素实现^[149]。由于不同细菌T9SS的结构有所区别, 因此, 本文仅基于已获取的三维结构信息 (图9a), 对部分T9SS结构蛋白进行综述。

2018年, Lauber等^[41]运用冷冻电镜对牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) T9SS外膜蛋

白Sov (SprA) 的结构进行了解析, 为36条链组成的 β 桶状结构, 其内部孔直径约为70Å, 允许折叠后的蛋白质通过。SprA孔的周质侧被Plug蛋白堵塞, 外膜侧被PorV交替堵塞, 这可防止非特异性物质的渗漏。在SprA-PorV复合体中, 侧壁开口完全被PorV阻塞, 并通过其外表面结合 (图9b左), 允许从周质接收底物进入SprA通道, 底物释放后, Plug再将SprA通道的周质口封闭 (图9b右)。

PorV、PorU、PorZ和PorQ能够形成复合物, 修饰分泌物并将其黏附到细胞表面^[151]。除PorQ、PorU外, 其他蛋白质均得到了一定程度的解析。PorV属于FadL家族, 为14条 β 折叠链组成的外膜孔蛋白, 孔被N端结构域堵塞, 在该系统中PorV可护送分泌蛋白通过SprA通道运输到胞外^[151]。PorU是一种肽酶, 负责在底物分泌后, 清除分泌蛋白的C端信号域^[152], 也可通过“sortaslike”机制将新暴露的分泌蛋白C端共价连接到脂多糖A-LPS上^[153], PorU的精确定位和稳定性依靠

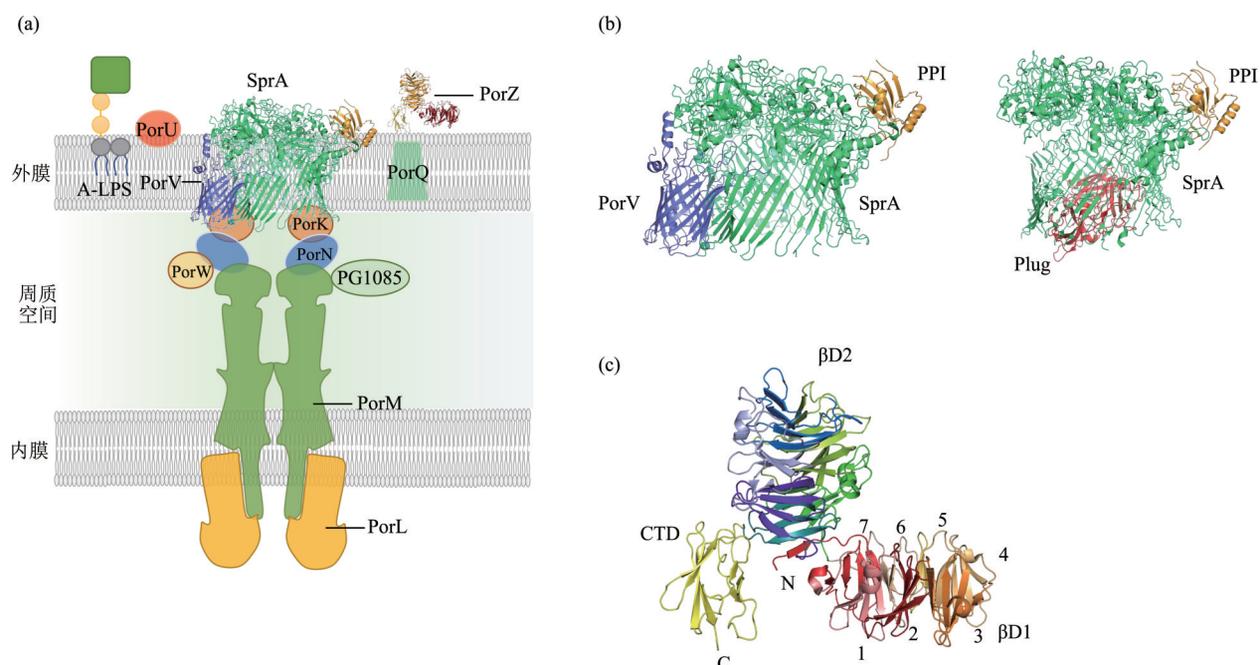


Fig. 9 Illustration of the structural model of the localization of type IX secretion system

图9 IX型分泌系统的结构示意图

(a) 牙龈卟啉单胞菌T9SS示意图, 包含PorV-SprA (PDB: 6H3I)^[41]、PorZ (PDB: 5M11)^[42]。(b) PorV-SprA-PPI复合体 (PDB: 6H3I)^[41] 结构图 (左), Plug-SprA-PPI复合物 (PDB: 6H3J)^[41] 结构图 (右)。(c) PorZ的2个β螺旋桨 (PDB: 5M11)^[42] 结构图 (以上各图均按照对应的PDB信息进行绘制)。

PorZ。PorZ是T9SS在膜表面的必要组成部分, 2016年, Lasica等^[42]运用X射线晶体学技术对牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) PorZ进行了解析, 该结构由3个亚基组成, 前2个为N端7股β螺旋桨βD1和βD2, 每个β螺旋桨具有“入口侧”和“出口侧”。CTD为七股反平行的β折叠构成的类免疫球蛋白状结构 (图9c), 但该蛋白质与分泌蛋白的结合方式尚未确定, 有待进一步探索。

10 靶向细菌分泌系统的抗菌剂研发

全球范围的抗生素滥用加剧了细菌耐药性的发展, 对公众健康构成巨大威胁, 因此开发可替代抗生素的新型抗菌剂极为迫切^[154]。与抗生素相比, 以细菌分泌系统重要毒力蛋白为靶点, 筛选和设计的靶向小分子药物, 可有效抑制细菌基础生命活动, 降低细菌的毒力, 且不易产生耐药性。本章将讨论以细菌分泌系统为靶标开发新型抗菌药物的最新进展。

T3SS可作为开发抗菌治疗药物重要靶点^[155], 目前已经展开广泛研究。在T3SS表达及转录层面, 发现了一系列靶向抗菌剂, 如水杨醛酰肼、N-羟基苯并咪唑、苯氧基乙酰亚胺、2-亚氨基-5-

芳基乙基唑烷酮等, 可有效防止细菌注射效应蛋白而引起宿主感染^[156]。近年来, 随着T3SS复合体结构的逐步解析, 许多靶向T3SS蛋白结构的抗菌剂也得到进一步开发。2011年, Swietnicki等^[157]以鼠疫杆菌 (*Yersinia pestis*) T3SS SctN (YscN) 为靶标, 筛选出6个可有效抑制该蛋白质的化合物, 显著降低了鼠疫杆菌的毒力。2014年, 美国制药公司Kalobios首次报道以铜绿假单胞菌T3SS尖端蛋白PcrV为靶点, 开发了抗体KB001-A作为铜绿假单胞菌T3SS抑制剂, 用于治疗由慢性铜绿假单胞菌感染引起的呼吸道炎症和囊性纤维化 (CF) 的患者, 这也是已知的第一种用于临床治疗的T3SS抑制剂药物^[158]。2019年, Feng等^[159]基于荧光偏振的高通量筛选方法, 发现了可有效抑制T3SS针复合物组装的天然草药化合物-丹参酮, 并通过体内外实验验证了该化合物可有效缓解铜绿假单胞菌引起的肺部感染。2020年, Case等^[160]利用志贺氏菌T3SS的ATP酶Spa47晶体结构, 计算筛选760万种药物化合物, 表征并鉴定了多种新型Spa47抑制剂, 并且该研究表明, 这种新型抑制剂可靶向大肠杆菌、沙门氏菌等细菌T3SS的ATP酶, 显著降低这些致病菌的毒性。

此外, 研究人员针对其他分泌系统也展开了新型抗菌剂的研究。2019年, Massal等^[161]以铜绿假单胞菌双精氨酸易位(Tat)系统和T2SS为靶点, 通过高通量筛选确定出3种Tat抑制剂和1种T2SS抑制剂, 为开发抗铜绿假单胞菌的新型抗菌剂奠定基础。2011年, Paschos等^[162]针对布鲁氏菌(*Brucella abortis*) T4SS VirB8筛选出48种特异性的小分子物质, 其中化合物B81-2可有效影响VirB8的二聚化, 从而抑制布鲁氏菌在巨噬细胞中的生长, 并降低其对宿主细胞的毒性。2019年, Arya等^[163]以幽门螺旋杆菌T4SS CagA (VirB11)为靶点, 筛选出可抑制该ATP酶六聚化的抑制剂, 可有效降低其酶活性, 进而降低该菌毒力。2021年, Cherrak^[164]等靶向大肠杆菌T6SS基板复合物TssK-TssF-TssG, 设计了一种可阻断基板复合物组装的仿生环肽(BCP), 该肽是第一个完全根据先前的结构信息设计的具有抗T6SS活性的化合物, 为抗T6SS抑制剂的开发提供思路。综上, 针对细菌分泌系统重要毒力蛋白, 已开发的新型抗菌剂验证了该思路的有效性及其可靠性, 为后续靶向抗菌剂的开发奠定良好基础。

11 展 望

近年来, 作为一大类与致病力、生存力等密切相关的大分子复合物, 细菌分泌系统得到了广泛研究, 明晰了大部分细菌分泌系统的主要组成, 结构生物学的发展也为揭示各种分泌系统的结构及其部分亚基结构的解析提供了良好基础。细菌分泌系统最少的由3个亚基单位构成, 复杂的T3SS及T9SS则多达20~30个亚基单位, 这些复杂的大分子复合物为细菌的分泌蛋白、DNA及小分子物质等提供了通道。因此, 对细菌分泌系统的深入探究, 有助于进一步理解细菌的致病、耐药、环境适应等机制。但由于细菌分泌系统结构的复杂性, 对其结构的解析还较为局限, 例如T7SS、T9SS这些分泌系统的具体结构仍处于未知, 此外对于一些已经得到解析的分泌系统, 其底物的具体转运过程也属于研究空白, 限制了人类对这些系统转运机制的深入了解。因此, 本文针对细菌分泌系统的未来研究提出以下3点展望。

11.1 进一步探索细菌分泌系统结构及转运机制

电镜技术的发展及蛋白质相关生化数据的积累, 推动了细菌分泌系统具体结构的阐明, 使多种

细菌分泌系统的结构及组成得到了较好的解析。但目前, 由于蛋白质复合物难以表达、不够稳定、产量较低等一系列问题, 导致一些分泌系统结构的解析十分困难。此外, 传统X射线晶体学技术虽被视为结构解析的“金标准”, 但具有结晶困难、周期较长、晶体不稳定等缺陷。随着单颗粒冷冻电镜(single particle cryo-EM)和冷冻电镜断层成像(cryo-electron tomography, cryo-ET)等技术的迅猛发展, 可为分泌系统结构及转运机制研究提供绝佳的科研手段。此外, 目前主要解析了革兰氏阴性细菌的众多细菌分泌系统, VII型分泌系统等革兰氏阳性细菌的分泌系统尚未得到彻底研究, 限制了针对革兰氏阳性细菌分泌系统的新型抑菌剂开发。因此, 明晰这些未知结构的组成及功能, 以及这些结构在效应物转运过程中的变化及互作位点, 以期全面认识细菌分泌系统。

11.2 不同细菌分泌系统相互作用机制的进一步探索

分泌系统在细菌发挥致病性过程中起到重要作用, 同一细菌细胞内可能存在多种不同类型的分泌系统, 例如, 本课题组前期研究表明, 副溶血性弧菌同时存在T3SS和T6SS, 并在该菌致病过程中发挥中重要作用, 且二者均受到AphA、ToxR、OpaR的调控^[11]。铜绿假单胞菌也存在T3SS和T6SS, 二者分别通过c-di-GMP和RetS/GacS途径来协同调控病原菌的生存方式及其感染策略^[165]。因此, 应充分探索不同细菌分泌系统间的相互作用, 以明晰其在发挥致病过程中潜在的协同互作机制。

11.3 靶向细菌分泌系统的抗菌剂研发

基于细菌分泌系统进行新型抗菌剂的研发, 为取代或帮助传统抗生素疗法开辟了新的治疗途径。近年来, 细菌分泌系统高分辨率结构的解析, 为靶向抑菌小分子的高通量筛选及抗菌肽设计提供了重要基础。但目前针对细菌分泌系统的新型抗菌剂研发尚未得到全面探究, 仅局限于一些细菌分泌系统的部分毒力蛋白, 并且这些新型抑菌剂从实验室开发到临床应用还存在一定距离。因此, 未来研究可进一步开拓细菌分泌系统的毒力蛋白相关结构, 并将其作为潜在的药物靶点, 进行靶向抑菌剂的筛选和研发, 为有效解决抗生素耐药性问题提供新的策略。

参 考 文 献

- [1] Park J, Zhang Y, Chen C, *et al.* Diversity of secretion systems associated with virulence characteristics of the classical bordetellae. *Microbiology*, 2015, **161**(12): 2328-2340
- [2] Waters C M, Bassler B L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, **21**: 319-346
- [3] Rego A T, Chandran V, Waksman G. Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone - usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J*, 2010, **425**(3): 475-488
- [4] Silva Y R D, Contreras-Martel C, Macheboeuf P, *et al.* Bacterial secretins: mechanisms of assembly and membrane targeting. *Protein Sci*, 2020, **29**(4): 893-904
- [5] Jana B, Salomon D. Type VI secretion system: a modular toolkit for bacterial dominance. *Future Microbiol*, 2019, **14**(16): 1451-1463
- [6] Nitta R, Imasaki T, Nitta E. Recent progress in structural biology: lessons from our research history. *Microscopy (Oxf)*, 2018, **67**(4): 187-195
- [7] Costa T R D, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, *et al.* Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**(6): 343-359
- [8] Umrekar T R, Cohen E, Drobnic T, *et al.* Cryo-EM of bacterial secretion systems: a primer for microbiologists. *Mol Microbiol*, 2020, **115**(3): 366-382
- [9] 谭双,余旭平,袁俊杰,等. 革兰氏阴性菌蛋白分泌系统研究进展. *中国兽药杂志*, 2009, **43**(9): 45-48
Tan S, Yu X P, Yuan J J, *et al.* *Chin J Vet Drug*, 2009, **43**(9): 45-48
- [10] 岑雪,丁雪燕,娄昆鹏,等. 细菌分泌系统研究进展. *中国预防兽医学报*, 2019, **41**(3): 317-322+327
Cen X, Ding X Y, Lou K P, *et al.* *Chin J Prev Vet Med*, 2019, **41**(3): 317-322+327
- [11] 穆丽丽. VI型分泌系统在副溶血性弧菌种内竞争中的作用初探[D]. 上海: 上海海洋大学食品学院, 2019
Mu L L. Preliminary Study on The Role of Type VI Secretion System in Intraspecific Competition of *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Shanghai: College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, 2019
- [12] Morgan J L W, Acheson J F, Zimmer J. Structure of a type-I secretion system ABC transporter. *Structure*, 2017, **25**(3): 522-529
- [13] Kim J S, Song S, Lee M, *et al.* Crystal structure of a soluble fragment of the membrane fusion protein HlyD in a type I secretion system of Gram-negative bacteria. *Structure*, 2016, **24**(3): 477-485
- [14] Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, *et al.* Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000, **405**(6789): 914-919
- [15] Lu C, Turley S, Marioni S T, *et al.* Hexamers of the type II secretion ATPase GspE from *Vibrio cholerae* with increased ATPase activity. *Structure*, 2013, **21**(9): 1707-1717
- [16] Abendroth J, Murphy P, Sandkvist M, *et al.* The X-ray structure of the type II secretion system complex formed by the N-terminal domain of EpsE and the cytoplasmic domain of EpsL of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol*, 2005, **348**(4): 845-855
- [17] Lopez-Castilla A, Thomassin J L, Bardiaux B, *et al.* Structure of the calcium-dependent type 2 secretion pseudopilus. *Nat Microbiol*, 2017, **2**(12): 1686-1695
- [18] Yan Z F, Yin M, Xu D D, *et al.* Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(2): 177-183
- [19] Worrall L J, Hong C, Vuckovic M, *et al.* Near-atomic-resolution cryo-EM analysis of the *Salmonella* T3S injectisome basal body. *Nature*, 2016, **540**(7634): 597-601
- [20] Bergeron J R C, Worrall L J, De S, *et al.* The modular structure of the inner-membrane ring component PrgK facilitates assembly of the type III secretion system basal body. *Structure*, 2015, **23**(1): 161-172
- [21] Zarivach R, Deng W Y, Vuckovic M, *et al.* Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS. *Nature*, 2008, **453**(7191): 124-127
- [22] Abrusci P, Vergara-Irigaray M, Johnson S, *et al.* Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, **20**(1): 99-104
- [23] Lorenzini E, Singer A, Singh B, *et al.* Structure and protein-protein interaction studies on *Chlamydia trachomatis* protein CT670 (YscO homolog). *J Bacteriol*, 2010, **192**(11): 2746-2756
- [24] Majewski D D, Worrall L J, Hong C, *et al.* Cryo-EM structure of the homohexameric T3SS ATPase-central stalk complex reveals rotary ATPase-like asymmetry. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 626
- [25] Notti R Q, Bhattacharya S, Lilic M A, *et al.* A common assembly module in injectisome and flagellar type III secretion sorting platforms. *Nat Commun*, 2015, **6**: 7125
- [26] Loquet A, Sgourakis N G, Gupta R, *et al.* Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature*, 2012, **486**(7402): 276-279
- [27] Chatterjee S, Zhong D L, Nordhues B A, *et al.* The crystal structures of the *Salmonella* type III secretion system tip protein SipD in complex with deoxycholate and chenodeoxycholate. *Protein Sci*, 2011, **20**(1): 75-86
- [28] Nguyen V S, Jobichen C, Tan K W, *et al.* Structure of AcrH-AopB chaperone-translocator complex reveals a role for membrane hairpins in type III secretion system translocon assembly. *Structure*, 2015, **23**(11): 2022-2031
- [29] Wallden K, Williams R, Yan J, *et al.* Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(28): 11348-11353
- [30] Savvides S N, Yeo H J, Beck M R, *et al.* VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J*, 2003, **22**(9): 1969-1980
- [31] Gomis-Ruth F X, Moncalian G, Perez-Luque R, *et al.* The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and F1-ATPase. *Nature*, 2001, **409**(6820): 637-641
- [32] Bailey S, Ward D, Middleton R, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* VirB8 structure reveals potential protein-protein interaction sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(8): 2582-2587
- [33] Sgro G G, Costa T R D, Cenens W, *et al.* Cryo-EM structure of the bacteria-killing type IV secretion system core complex from *Xanthomonas citri*. *Nat Microbiol*, 2018, **3**(12): 1429-1440

- [34] Costa T R D, Ilangovan A, Ukleja M, *et al.* Structure of the bacterial sex F pilus reveals an assembly of a stoichiometric protein-phospholipid complex. *Cell*, 2016, **166**(6): 1436-1444.e10
- [35] Yeo H J, Yuan Q, Beck M R, *et al.* Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(26): 15947-15952
- [36] van den Berg B. Crystal structure of a full-length autotransporter. *J Mol Biol*, 2010, **396**(3): 627-633
- [37] Durand E, Nguyen V S, Zoued A, *et al.* Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature*, 2015, **523**(7562): 555-560
- [38] Cherrak Y, Rapisarda C, Pellarin R, *et al.* Biogenesis and structure of a type VI secretion baseplate. *Nat Microbiol*, 2018, **3**(12): 1404-1416
- [39] Wang J, Brackmann M, Castano-Diez D, *et al.* Cryo-EM structure of the extended type VI secretion system sheath – tube complex. *Nat Microbiol*, 2017, **2**(11): 1507-1512
- [40] Yan Z, Yin M, Chen J, *et al.* Assembly and substrate recognition of curli biogenesis system. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 24
- [41] Lauber F, Deme J C, Lea S M, *et al.* Type 9 secretion system structures reveal a new protein transport mechanism. *Nature*, 2018, **564**(7734): 77-82
- [42] Lasica A M, Goulas T, Mizgalska D, *et al.* Structural and functional probing of PorZ, an essential bacterial surface component of the type-IX secretion system of human oral-microbiomic *Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep*, 2016, **6**: 37708
- [43] Schmitt L, Benabdelhak H, Blight M A, *et al.* Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol*, 2003, **330**(2): 333-342
- [44] Balakrishnan L, Hughes C, Koronakis V. Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2001, **313**(3): 501-510
- [45] Koronakis V, Li J, Koronakis E, *et al.* Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol*, 1997, **23**(3): 617-626
- [46] Pugsley A P, Kornacker M G, Poquet I. The general protein-export pathway is directly required for extracellular pullulanase secretion in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol*, 1991, **5**(2): 343-352
- [47] Voulhoux R, Ball G, Ize B, *et al.* Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion *via* the type II pathway. *EMBO J*, 2001, **20**(23): 6735-6741
- [48] Nivaskumar M, Francetic O. Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim Biophys*, 2014, **1843**(8): 1568-1577
- [49] Kulkarni R, Dhakal B K, Slechta E S, *et al.* Roles of putative type II secretion and type IV pilus systems in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2009, **4**(3): e4752
- [50] Latham W W, Grys T E, Witowski S E, *et al.* StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol*, 2002, **45**(2): 277-288
- [51] Korotkov K V, Sandkvist M, Hol W G J. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Rev Microbiol*, 2012, **10**(5): 336-351
- [52] Chernyatina A A, Low H H. Core architecture of a bacterial type II secretion system. *Nat Commun*, 2019, **10**: 5437
- [53] Lallemand M, Login F H, Guschinskaya N, *et al.* Dynamic interplay between the periplasmic and transmembrane domains of GspL and GspM in the type II secretion system. *PLoS One*, 2013, **8**(11): e79562
- [54] Nivaskumar M, Bouvier G, Campos M, *et al.* Distinct docking and stabilization steps of the pseudopilus conformational transition path suggest rotational assembly of type IV pilus-like fibers. *Structure*, 2014, **22**(5): 685-696
- [55] Reichow S L, Korotkov K V, Hol W G, *et al.* Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(10): 1226-1232
- [56] Chami M, Guilvout I, Gregorini M, *et al.* Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. *J Biol Chem*, 2005, **280**(45): 37732-37741
- [57] Galan J E, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 2006, **444**(7119): 567-573
- [58] Hueck C J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol R*, 1998, **62**(2): 379-433
- [59] Schraidt O, Marlovits T C. Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science*, 2011, **331**(6021): 1192-1195
- [60] Spreter T, Yip C K, Sanowar S, *et al.* A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, **16**(5): 468-476
- [61] Zilkenat S, Franz-Wachtel M, Stierhof Y D, *et al.* Determination of the stoichiometry of the complete bacterial type III secretion needle complex using a combined quantitative proteomic approach. *Mol Cell Proteomics*, 2016, **15**(5): 1598-1609
- [62] Dietsche T, Mebrhatu M T, Brunner M J, *et al.* Structural and functional characterization of the bacterial type III secretion export apparatus. *PLoS Pathog*, 2016, **12**(12): e1006071
- [63] Hu B, Morado D R, Margolin W, *et al.* Visualization of the type III secretion sorting platform of *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(4): 1047-1052
- [64] Imada K, Minamino T, Uchida Y, *et al.* Insight into the flagella type III export revealed by the complex structure of the type III ATPase and its regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(13): 3633-3638
- [65] Diepold A, Kudryashev M, Delalez N J, *et al.* Composition, formation, and regulation of the cytosolic C-ring, a dynamic component of the type III secretion injectisome. *PLoS Biol*, 2015, **13**(1): e1002039
- [66] Akeda Y, Galan J E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, **437**(7060): 911-915
- [67] Yip C K, Finlay B B, Strynadka N C J, *et al.* Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, **12**(1): 75-81
- [68] Portaliou A G, Tsolis K C, Loos M S, *et al.* Type III secretion:

- building and operating a remarkable nanomachine. Trends Biochem Sci, 2016, **41**(2): 175-189
- [69] Romano F B, Tang Y Z, Rossi K C, *et al.* Type 3 secretion translocators spontaneously assembles a hexadecameric transmembrane complex. J Biol Chem, 2016, **291**(12): 6304-6315
- [70] Sheahan K L, Isberg R R. Identification of mammalian proteins that collaborate with type III secretion system function: involvement of a chemokine receptor in supporting translocon activity. mBio, 2015, **6**(1): e02023-14
- [71] Blondel C J, Park J S, Hubbard T P, *et al.* CRISPR/Cas9 screens reveal requirements for host cell sulfation and fucosylation in bacterial type III secretion system-mediated cytotoxicity. Cell Host Microbe, 2016, **20**(2): 226-237
- [72] Russo B C, Stamm L M, Raaben M, *et al.* Intermediate filaments enable pathogen docking to trigger type 3 effector translocation. Nat Microbiol, 2016, **1**(4): 16025
- [73] Meng R, Jiang M Q, Cui Z C, *et al.* Structural basis for the adsorption of a single-stranded RNA bacteriophage. Nat Commun, 2019, **10**: 3130
- [74] Waksman G. From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. EMBO Rep, 2019, **20**(2): e47012
- [75] Alvarez-Martinez C E, Christie P J. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. Microbiol Mol Biol Rev, 2009, **73**(4): 775-808
- [76] Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, *et al.* Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. Nature, 2009, **462**(7276): 1011-1015
- [77] Christie P J, Ward J E, Gordon M P, *et al.* A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, **86**(24): 9677-9681
- [78] Yeo H J, Savvides S N, Herr A B, *et al.* Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. Mol Cell, 2000, **6**(6): 1461-1472
- [79] Hare S, Bayliss R, Baron C, *et al.* A large domain swap in the VirB11 ATPase of *Brucella suis* leaves the hexameric assembly intact. J Mol Biol, 2006, **360**(1): 56-66
- [80] Llosa M, Alkorta I. Coupling proteins in type IV secretion. Curr Top Microbiol Immunol, 2018, **413**: 143-168
- [81] Alvarez-Rodriguez I, Ugarte-Urbe B, de la Arada I, *et al.* Conjugative coupling proteins and the role of their domains in conjugation, secondary structure and *in vivo* subcellular location. Front Mol Biosci, 2020, **7**: 185
- [82] Whitaker N, Chen Y Q, Jakubowski S J, *et al.* The all-alpha domains of coupling proteins from the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/VirD4 and *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded type IV secretion systems confer specificity to binding of cognate DNA substrates. J Bacteriol, 2015, **197**(14): 2335-2349
- [83] Kwak M J, Kim J D, Kim H, *et al.* Architecture of the type IV coupling protein complex of *Legionella pneumophila*. Nat Microbiol, 2017, **2**(9): 17114
- [84] Cascales E, Christie P J. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. Science, 2004, **304**(5674): 1170-1173
- [85] Fullner K J, Lara J C, Nester E W. Pilus assembly by a bacterium t-DNA transfer genes. Science, 1996, **273**(5278): 1107-1109
- [86] Watarai M, Makino S, Shirahata T. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain. Microbiology, 2002, **148**(5): 1439-1446
- [87] Noiroit P, Noiroit-Gros M F. Protein interaction networks in bacteria. Curr Opin Microbiol, 2004, **7**(5): 505-512
- [88] Chetrit D, Hu B, Christie P J, *et al.* A unique cytoplasmic ATPase complex defines the *Legionella pneumophila* type IV secretion channel. Nat Microbiol, 2018, **3**(6): 678-686
- [89] Sagulenko V, Sagulenko E, Jakubowski S, *et al.* VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. J Bacteriol, 2001, **183**(12): 3642-3651
- [90] Jakubowski S J, Krishnamoorthy V, Cascales E, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 domains direct the ordered export of a DNA substrate through a type IV secretion system. J Mol Biol, 2004, **341**(4): 961-977
- [91] Judd P K, Kumar R B, Das A. The type IV secretion apparatus protein VirB6 of *Agrobacterium tumefaciens* localizes to a cell pole. Mol Microbiol, 2005, **55**(1): 115-124
- [92] Jakubowski S J, Krishnamoorthy V, Christie P J. *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. J Bacteriol, 2003, **185**(9): 2867-2878
- [93] Bayliss R, Harris R, Coutte L, *et al.* NMR structure of a complex between the VirB9/VirB7 interaction domains of the pKM101 type IV secretion system. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, **104**(5): 1673-1678
- [94] Aly Khaled A, Baron Christian. The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiology, 2007, **153**: 3766-3775
- [95] Arutyunov D, Frost L S. F conjugation: back to the beginning. Plasmid, 2013, **70**(1): 18-32
- [96] Provence D L, Curtiss R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Infect Immun, 1994, **62**(4): 1369-1380
- [97] Henderson I R, Navarrogarcia F, Desvaux M, *et al.* Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, **68**(4): 692-744
- [98] Emsley P, Charles I G, Fairweather N F, *et al.* Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. Nature, 1996, **381**(6577): 90-92
- [99] Yeo H J, Yokoyama T, Walkiewicz K, *et al.* The structure of the *Haemophilus influenzae* HMW1 pro-piece reveals a structural domain essential for bacterial two-partner secretion. J Biol Chem, 2007, **282**(42): 31076-31084
- [100] Agnew C, Borodina E, Zaccari N R, *et al.* Correlation of *in situ* mechanosensitive responses of the *Moraxella catarrhalis* adhesin UspA1 with fibronectin and receptor CEACAM1 binding. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(37): 15174-15178
- [101] Hamburger Z A, Brown M S, Isberg R R, *et al.* Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. Science, 1999,

- 286(5438):291-295
- [102] Oomen C J, van Ulsen P, Van Gelder P, *et al.* Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J*, 2004, **23**(6): 1257-1266
- [103] Delattre A S, Clantin B, Saint N, *et al.* Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J*, 2010, **277**(22): 4755-4765
- [104] Meng G Y, Surana N K, St Geme J W, *et al.* Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *EMBO J*, 2006, **25**(11): 2297-2304
- [105] Coutte L, Antoine R, Drobecq H, *et al.* Subtilisin - like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J*, 2014, **20**(18):5040-5048
- [106] Lambert-Buisine C, Willery E, Loch C, *et al.* N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(6): 1283-1293
- [107] Jacob-Dubuisson F, Loch C, Antoine R. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol*, 2001, **40**(2): 306-313
- [108] Clantin B, Hodak H, Willery E, *et al.* The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(16): 6194-6199
- [109] Clantin B, Delattre A S, Rucktoo P, *et al.* Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science*, 2007, **317**(5840): 957-961
- [110] Delattre A S, Saint N, Clantin B, *et al.* Substrate recognition by the POTRA domains of TpsB transporter FhaC. *Mol Microbiol*, 2011, **81**(1):99-112
- [111] Leo J C, Grin I, Linke D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, **367**: 1088-1101
- [112] Shahid S A, Bardiaux B, Franks W T, *et al.* Membrane-protein structure determination by solid-state NMR spectroscopy of microcrystals. *Nat Methods*, 2012, **9**(12): 1212-1217
- [113] Desvaux M, Parham N J, Scott-Tucker A, *et al.* The general secretory pathway: a general misnomer?. *Trends Microbiol*, 2004, **12**(7): 306-309
- [114] Pukatzki Stefan, Ma Amy T, Sturtevant Derek, *et al.* Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(5): 1528-1533
- [115] Lertpiriyapong K, Gamazon E R, Feng Y, *et al.* *Campylobacter jejuni* type VI secretion system: Roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and *in vivo* colonization. *PLoS One*, 2012; **7**(8): e42842
- [116] Russell A B, Peterson S B, Mougous J D. Type VI secretion effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol*, 2014, **12**(2): 137-148
- [117] Boyer F, Fichant G, Berthod J, *et al.* Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?. *BMC Genomics*, 2009, **10**: 104
- [118] Zoued A, Brunet Y R, Durand E, *et al.* Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2014, **1843**: 1664-1673
- [119] Leiman P G, Basler M, Ramagopal, U A, *et al.* Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(11): 4154-4159
- [120] Shneider M M, Buth S A, Ho B T, *et al.* PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 2013, **500**(7462): 350-353
- [121] Basler M, Pilhofer M, Henderson G P, *et al.* Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 2012, **483**(7388): 182-186
- [122] Brackmann M, Wang J, Basler M. Type VI secretion system sheath inter - subunit interactions modulate its contraction. *EMBO Rep*, 2018, **19**(2): 225-233
- [123] Durand E, Cambillau C, Cascales E, *et al.* VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of type VI secretion effectors. *Trends Microbiol*, 2014, **22**(9): 498-507
- [124] Nguyen V S, Logger L, Spinelli S, *et al.* Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex. *Nat Microbiol*, 2017, **2**: 17103
- [125] Silverman J M, Agnello D M, Zheng H, *et al.* Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol Cell*, 2013, **51**(5): 584-593
- [126] Kube S, Kapitein N, Zimniak T, *et al.* Structure of the VipA/B type VI secretion complex suggests a contraction-statespecific recycling mechanism. *Cell Rep*, 2014, **8**(1): 20-30
- [127] Bleumink-Pluym N M C, van Alphen L B, Bouwman L I, *et al.* Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. *PLoS Pathog*, 2013, **9**(5): e1003393
- [128] Mougous J D, Cuff M E, Raunser S, *et al.* A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 2006, **312**(5779): 1526-1530
- [129] Osipiuk J, Xu X, Cui H, *et al.* Crystal structure of secretory protein Hcp3 from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Struct Funct Genomics*, 2011, **12**(1): 21-26
- [130] Ruiz F M, Santillana E, Spinola-Amilibia M, *et al.* Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: a component of the type VI secretion system. *PLoS One*, 2015, **10**(6): e0129691
- [131] Jobichen C, Chakraborty S, Li M, *et al.* Structural basis for the secretion of EvpC: a key type VI secretion system protein from *Edwardsiella tarda*. *PLoS One*, 2015, **5**(9): e12910
- [132] Noreen Z, Jobichen C, Abbasi R, *et al.* Structural basis for the pathogenesis of *Campylobacter jejuni* Hcp1, a structural and effector protein of the type VI secretion system. *FEBS J*, 2018, **285**(21): 4060-4070
- [133] Suarez G, Sierra J C, Kirtley M L, *et al.* Role of Hcp, a type 6 secretion system effector, of *Aeromonas hydrophila* in modulating activation of host immune cells. *Microbiology*, 2010, **156**(Pt 12): 3678-3688
- [134] Lim Y T, Jobichen C, Wong J, *et al.* Extended loop region of Hcp1 is critical for the assembly and function of type VI secretion system

- in *Burkholderia pseudomallei*. Sci Rep, 2015, **5**: 8235
- [135] Guinn K M, Hickey M J, Mathur S K, *et al.* Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2004, **51**(2): 359-370
- [136] Abdallah A M, Bestebroer J, Savage N D L, *et al.* Mycobacterial secretion systems ESX-1 and ESX-5 play distinct roles in host cell death and inflammasome activation. J Immunol, 2011, **187**(9): 4744-4753
- [137] Ates L S, van der Woude A D, Bestebroer J, *et al.* The ESX-5 system of pathogenic mycobacteria is involved in capsule integrity and virulence through its substrate PPE10. PLoS Pathog, 2016, **12**(6): e1005696
- [138] Rosenberg O S, Dovala D, Li X, *et al.* Substrates control multimerization and activation of the multi-domain APTase motor of type VII secretion. Cell, 2015, **161**(3): 501-512
- [139] Beckham KS, Ciccarelli L, Bunduc CM, *et al.* Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. Nat Microbiol, 2017, **2**: 17047
- [140] Olsen A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. Nature, 1989, **338**(6217): 652-655
- [141] Blanco L P, Evans M L, Smith D R, *et al.* Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. Trends Microbiol, 2012, **20**(2): 66-73
- [142] Nenninger A A, Robinson L S, Hammer N D, *et al.* CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. Mol Microbiol, 2011, **81**(2): 486-499
- [143] Goyal P, Krasteva P V, Van Genven N, *et al.* Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG. Nature, 2014, **516**(7530): 250-253
- [144] Zhang M F, Shi H G, Zhang X M, *et al.* Cryo-EM structure of the nonameric CsgG-CsgF complex and its implications for controlling curli biogenesis in Enterobacteriaceae. PLoS Biol, 2020, **18**(6): e3000748
- [145] Hammer N D, Mcguffie B A, Zhou Y, *et al.* The C-terminal repeating units of CsgB direct bacterial functional amyloid nucleation. J Mol Biol, 2012, **422**(3): 376-389
- [146] Sleutel M, Van den Broeck I, Van Gerven N, *et al.* Nucleation and growth of a bacterial functional amyloid at single-fiber resolution. Nat Chem Biol, 2017, **13**(8): 902-908
- [147] Taylor J D, Hawthorne W J, Lo J, *et al.* Electrostatically-guided inhibition of Curli amyloid nucleation by the CsgC-like family of chaperones. Sci Rep, 2016, **6**: 24656
- [148] McBride M J, Nakane D. Flavobacterium gliding motility and the type IX secretion system. Curr Opin Microbiol, 2015, **28**: 72-77
- [149] Guo Y, Hu D, Guo J, *et al.* *Riemerella anatipestifer* Type IX secretion system is required for virulence and gelatinase secretion. Front Microbiol, 2017, **8**: 2553
- [150] Sato K, Yukitake H, Narita Y, *et al.* Identification of *Porphyromonas gingivalis* proteins secreted by the Por secretion system. FEMS Microbiol Lett, 2013, **338**(1): 68-76
- [151] Glew M D, Veith P D, Chen D, *et al.* PorV is an outer membrane shuttle protein for the type IX secretion system. Sci Rep, 2017, **7**: 8790
- [152] Glew M D, Veith P D, Peng B, *et al.* PG0026 is the C-terminal signal peptidase of a novel secretion system of *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem, 2012, **287**(29): 24605-24617
- [153] Gorasia D G, Veith P D, Chen D, *et al.* *Porphyromonas gingivalis* type IX secretion substrates are cleaved and modified by a sortase-like mechanism. PLoS Pathog, 2015, **11**(9): e1005152
- [154] Jackson N, Czaplowski L, Piddock L J V. Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience?. J Antimicrob Chemother, 2018, **73**(6): 1452-1459
- [155] Deng W, Marshall N C, Rowland J L, *et al.* Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. Nat Rev Microbiol, 2017, **15**(6): 323-337
- [156] Gu L, Zhou S, Zhu L, *et al.* Small-molecule inhibitors of the type III secretion system. Molecules, 2015, **20**(9): 17659-17674
- [157] Swietnicki W, Carmany D, Retford M, *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of *Yersinia pestis* type III secretion system YscNATPase. PLoS One, 2011, **6**(5): e19716
- [158] Milla C E, Chmiel J F, Accurso F J, *et al.* Anti-PerV antibody in cystic fibrosis: a novel approach targeting *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. Pediatr Pulmonol, 2014, **49**(7): 650-658
- [159] Feng C, Huang Y, He W, *et al.* Tanshinones: first-in-class inhibitors of the biogenesis of the type 3 secretion system needle of *Pseudomonas aeruginosa* for antibiotic therapy. ACS Central Sci, 2019, **5**(7): 1278-1288
- [160] Case H B, Mattock D S, Miller B R, *et al.* Novel noncompetitive type three secretion system atpase inhibitors shut down *Shigella* effector secretion. Biochemistry, 2020, **59**(28): 2667-2678
- [161] Massai F, Saleeb M, Doruk T, *et al.* Development, optimization, and validation of a high throughput screening assay for identification of tat and type II secretion inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Cell Infect Microbiol, 2019, **9**: 250
- [162] Paschos A, Den H A, Smith M A, *et al.* An *in vivo* high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation. Infect Immun, 2011, **79**(3): 1033-1043
- [163] Arya T, Oudouhou F, Casu B, *et al.* Fragment-based screening identifies inhibitors of ATPase activity and of hexamer formation of Cag alpha from the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. Sci Rep, 2019, **9**: 6474
- [164] Cherrak Y, Filella-Merce I, Schmidt V, *et al.* Inhibiting type VI secretion system activity with a biomimetic peptide designed to target the baseplate wedge complex. mBio, 2021, **12**(4): e01348-21
- [165] Moscoso J A, Mikkelsen H, Heeb S, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. Environ Microbiol, 2011, **13**(12): 3128-3138

Research Progress on The Structure and Mechanism of Bacterial Secretion Systems*

LIU Jing¹⁾, ZHANG Zhao-Huan^{1)**}, WU Qian¹⁾, TAO Qian¹⁾, HUANG Zhen-Hua¹⁾,
PAN Ying-Jie^{1,2,3)}, ZHAO Yong^{1,2,3)**}

¹⁾College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

²⁾Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai),
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;

³⁾Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract Bacterial secretion systems are sophisticated nanomachines that are used by bacteria for selective transport of macromolecules across membrane. These membrane protein complexes play critical roles in bacterial pathogenicity, antibiotic resistance and ecological adaptation. Hitherto, a total of nine secretion systems have been identified and named as type I to type IX secretion systems (T1SS–T9SS) according to the chronological order of discovery. Recent advances in X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance and cryo-electron microscopy increased the understanding of the architecture and structure of these macromolecular machineries. That provided unprecedented views to explain the mechanisms of how secretion systems release the effectors to the extracellular environment or host cells. Herein, this review summarizes the best knowledge of the progress of bacterial secretion systems (T1SS–T9SS), with a focus on their structure and function. We also highlight major advances in novel antimicrobials targeting these large protein machineries. Finally, we provide new perspectives for the future studies about structure identification and drug screening of secretion systems.

Key words bacteria, secretion systems, three-dimensional structure, mechanisms

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0005

* This work was supported by grants from Program of Shanghai Academic Research Leader (21XD1401200) and The National Natural Science Foundation of China (31972188).

** Corresponding author.

ZHANG Zhao-Huan. Tel: 86-21-61900503, E-mail: zh-zhang@shou.edu.cn, gongziwuhen@126.com

ZHAO Yong. Tel: 86-21-61900768, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Received: January 6, 2022 Accepted: March 29, 2022