

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2024.03.007

• 综述 •

从效应蛋白多样性看革兰氏阳性菌 VII 型分泌系统功能多样性

张旻, 王德禹, 吴旻

复旦大学上海医学院基础医学院教育部、卫健委、医科院医学分子病毒学重点实验室, 上海市病原微生物与感染前沿科学研究基地, 上海 200032

摘要: VII 型分泌系统 (type VII secretion system, T7SS) 是唯一的仅存在于革兰氏阳性细菌中的分泌系统。T7SS 在细菌与细菌、细菌与宿主、细菌与环境的相互作用中发挥着重要功能, 与细菌的生长和致病性密切相关。T7SS 的功能多样性与其所分泌的效应蛋白的多样性密切相关。因此, 本文将围绕 T7SS 所分泌的效应蛋白展开讨论, 对效应蛋白的结构和功能、分泌机制及其基因转录水平的调控方式等研究进行综述, 以期为进一步研究细菌的 T7SS 提供新的思路。

关键词: VII 型分泌系统; 结核分枝杆菌; 金黄色葡萄球菌; 效应蛋白

中图分类号: R378

文献标识码: A

Exploring the functional diversity of type VII secretion systems in gram-positive bacteria through the effector proteins

ZHANG Yang, WANG Deyu, WU Yang

Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: The type VII secretion system (T7SS) is the only secretion system exclusively found in Gram-positive bacteria. It closely links to bacterial growth and virulence, which plays an important role in the interaction between bacteria-bacteria, bacteria-host, and bacteria-environment. Overall, the functional diversity of T7SS is associated with its effector proteins. Therefore, this study discussed the effector proteins secreted by T7SS, providing a comprehensive review of their structure and function, secretion mechanisms, and the regulatory modes of gene transcription, with the aim to offer new perspectives for further research into bacterial T7SS.

Keywords: T7SS; *Mycobacterium tuberculosis*; *Staphylococcus aureus*; Effector proteins

细菌的分泌系统参与细菌的物质运输, 它通过将不同功能的效应蛋白转运出胞, 在细菌的生存、致病性及菌群与宿主的相互作用等方面具有重要作

用。迄今为止, 已发现 9 种细菌分泌系统类型 (T1SS~T9SS)。其中, T7SS 是目前唯一的仅被发现存在于革兰氏阳性细菌中的分泌系统。它的发现

通信作者: 吴旻

Correspondence to: WU Yang E-mail: yangwu@fudan.edu.cn

源于对致病性结核分枝杆菌的研究。1995年, Andersen及其同事^[1]从结核分枝杆菌的培养滤液中分离鉴定出了2种不含有传统 Sec 或是 Tat 途径的典型信号肽序列的效应蛋白:6-kDa 早期分泌抗原靶标(early secreted antigenic target 6, ESAT-6)和与其共分泌的伴侣蛋白 10-kDa 培养滤液蛋白(10-kDa culture filtrate protein, CFP-10)(后分别更名为 EsxA 和 EsxB)。针对这2种重要蛋白的分泌方式,他们猜想并通过消减杂交实验证明了结核分枝杆菌的遗传差异区1(region of difference-1, RD1)的基因编码的蛋白构成了一种全新的蛋白质分泌系统,介导了 ESAT-6 和 CFP-10 的分泌,后将该分泌系统命名为“Ⅶ型分泌系统(type Ⅶ secretion system, T7SS)”^[2]。

T7SS 作为一种仅存在于革兰氏阳性细菌中的分泌系统,其所分泌的效应蛋白在细菌与细菌、细菌与宿主细胞、细菌与环境等多维度、多层面的相互作用中发挥着重要功能。比如:T7SS 可帮助细菌在种内竞争中取得优势,同时也可辅助细菌入侵宿主细胞,并在胞内生存、繁殖、扩散。但目前对于 T7SS 效应蛋白的界定尚不明确,并且对其功能的研究也并不全面。因此,本文将 T7SS 基因簇所编码的效应蛋白以及由 T7SS 基因簇之外的基因编码但通过 T7SS 分泌的蛋白都归为 T7SS 的效应蛋白,后围绕它们展开讨论。本文主要从效应蛋白角度分析 T7SS 功能的多样性,有望加深对 T7SS 的认识,并为发现全新的效应蛋白提供参考。

1 革兰氏阳性菌 T7SS 的分类

自从高 G+C 含量的放线菌门细菌——结核分枝杆菌中发现 T7SS 后,研究人员又在低 G+C 含量的厚壁菌门细菌(如金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等)中发现了与之同源的基因簇,但由于放线菌门和厚壁菌门细菌 T7SS 的序列相似性极低,遗传上不具有保守性,故将 T7SS 分为 T7SSa(放线菌门)和 T7SSb(厚壁菌门)两类^[3](见图 1)。

其中,放线菌门的代表细菌结核分枝杆菌具有 5 种 T7SSa 亚型(ESX-1~ESX-5),它们分别由 5 个同源 *esx* 基因簇(*esx-1*~*esx-5*)编码^[4]。*esx* 基因簇在分枝杆菌属中分布广泛,但在不同种分枝杆菌中的数量存在差异,比如:病原菌致病性结核分枝杆菌基因组中含有 5 种 *esx* 基因簇,但麻风分枝杆菌和脓肿分枝杆菌仅分别含有 4 种和 2 种 *esx* 基因簇;而非致病菌耻垢分枝杆菌也仅含有 4 种 *esx* 基

因簇。目前,在 5 种 T7SSa 亚型中,ESX-1 亚型由于参与细菌重要效应蛋白 EsxA 和 EsxB 的分泌,故研究较多,而针对其余 4 种 T7SSa 亚型的研究较少。

厚壁菌门的金黄色葡萄球菌的基因组中存在与结核分枝杆菌同源的 *esx* 基因簇^[5]。但不同于结核分枝杆菌所含有的 5 种 T7SSa 亚型,金黄色葡萄球菌的 T7SSb 仅由单一的 *esx* 基因簇所编码,且与结核分枝杆菌的基因簇在序列上不具有相似性。

不同的基因簇序列编码了不同的蛋白质,从而导致 T7SSa 和 T7SSb 会分泌不同的效应蛋白,进而发挥不同的生理功能。因此,为了更全面地认识 T7SS,下文主要围绕 T7SSa(以结核分枝杆菌作为代表菌株)和 T7SSb(以金黄色葡萄球菌作为代表菌株)这两类 T7SS 的效应蛋白分别展开讨论(见表 1、表 2)。

2 革兰氏阳性菌 Ⅶ型分泌系统效应蛋白的多样性

2.1 T7SS 效应蛋白的分类、结构和功能

2.1.1 结核分枝杆菌 T7SSa 效应蛋白的多样性

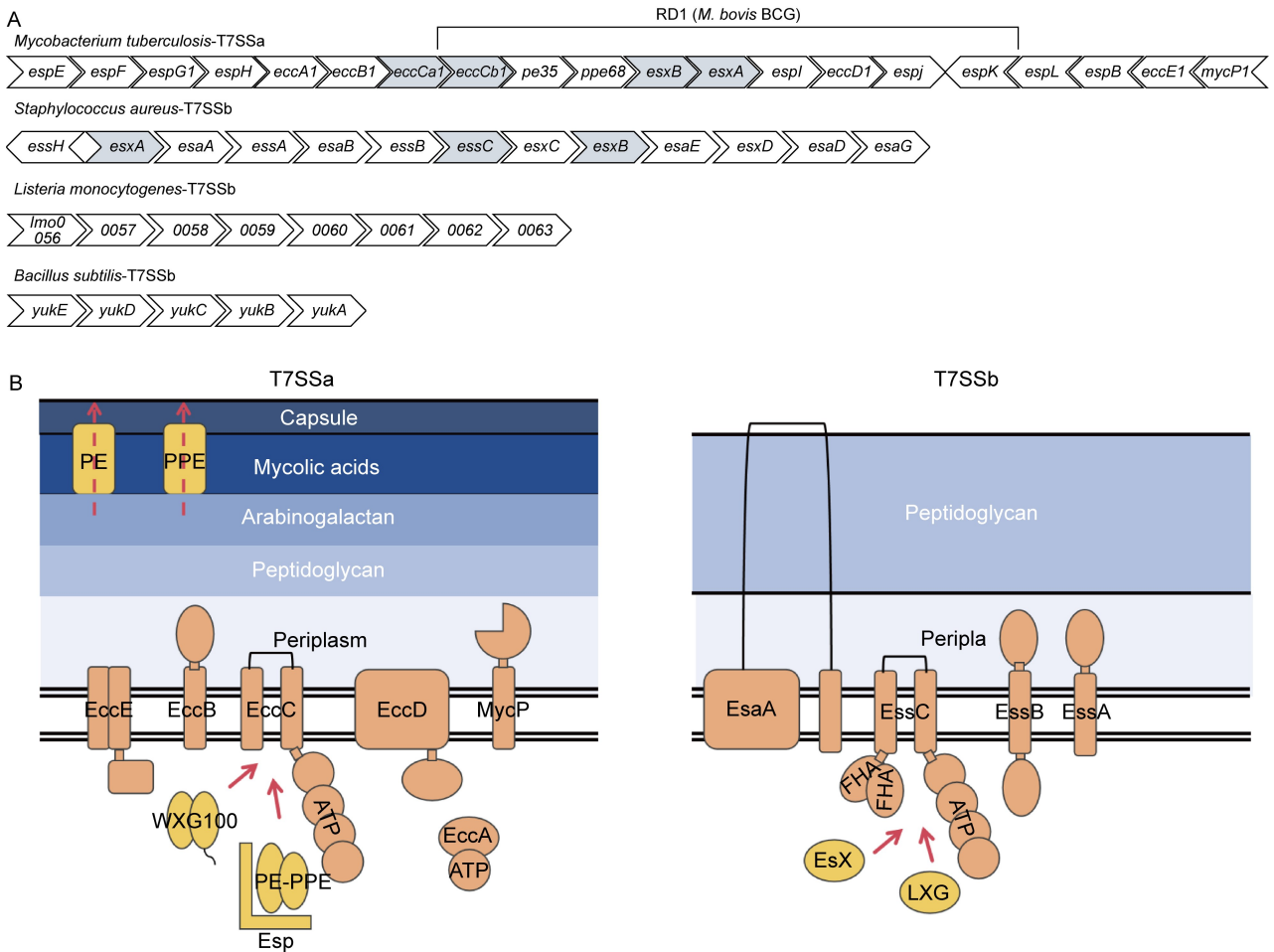
正如前文所述,在结核分枝杆菌的 5 种 T7SSa 亚型中,针对 ESX-1 亚型的研究较多,因此,ESX-1 亚型所分泌的效应蛋白的功能也得到了较为充分的研究(见表 1)。

其中,WXG100 蛋白家族是由 *esx-1* 基因簇所编码的典型 T7SSa 效应蛋白,该家族成员均由约 100 个氨基酸组成,因中心区域具有保守的 WXG (Try-X-Gly)氨基酸序列结构域而得名。在结核分枝杆菌中,WXG100 蛋白家族包含 ESAT-6 (EsxA) 和 CFP-10 (EsxB) 2 种效应蛋白。EsxA 和 EsxB 以异源二聚体的形式分泌出胞,研究表明,二者分泌相互依赖。当抑制了 EsxA 或 EsxB 中任何一方的分泌时,另一方也无法分泌^[6]。在功能上,EsxA 和 EsxB 是结核分枝杆菌的重要毒力因子,通过干扰宿主细胞因子的分泌帮助结核分枝杆菌入侵宿主细胞,并在细胞内存活和繁殖;此外,它们还会诱导巨噬细胞的凋亡并抑制吞噬体的成熟,实现免疫逃逸^[7-8],以上均是刺激肉芽肿形成的关键因素。与此同时,*esx-1* 基因簇还编码了另一类 ESX-1 亚型所特有的效应蛋白:Esp 蛋白 (ESX-secretion associated proteins, Esp)。Esp 蛋白一方面具有与上述效应蛋白类似的毒力,与结核分枝杆菌的致病性相关。比如:以单体形式分泌的 EspB 会通过其

疏水结构插入并破坏宿主细胞的细胞膜,造成宿主细胞裂解^[9]。另一方面,Esp 蛋白还可以作为伴侣蛋白,稳定其他 T7SSa 效应蛋白的结构,帮助它们分泌出胞。比如:EspA^[10]、EspC^[11]和 EspD^[12]是分泌其他 ESX-1 亚型效应蛋白所必需的;EspH^[13]辅助 EspE 和 EspF 的折叠和分泌;EspL 也具有与 EspH 类似的伴侣蛋白功能等^[14]。

此外,研究人员也从 *esx-5* 基因簇所编码的蛋

白中发现了另一类具有重要功能的 T7SSa 效应蛋白: PE (proline-glutamic acid)-PPE (proline-proline-glutamic acid)蛋白家族。PE-PPE 蛋白家族的成员因在 N 末端具有典型的 P(Pro)-E(Glu)序列,或是 P (Pro)-P (Pro)-E(Glu)序列而得名。在结构上,PE-PPE 蛋白家族的成员通常具有跨膜结构,使得它们可以在转运出内膜后稳定地嵌入分枝杆菌酸层中,并通过自身结构的变化聚合形成孔



In panel A, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) contains the T7SSa gene cluster, where genes in the RD1 region encode various virulence proteins, and the deletion of RD1 is precisely the reason for the attenuation of the tuberculosis vaccine strain, Bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) contains the T7SSb gene cluster, but has extremely low sequence similarity to *M. tuberculosis*. *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis* also contain the T7SSb gene cluster, but the relevant researches are not in-depth. In panel B, the orange illustrations represent the membrane protein structures of the secretion system, such as EccE, EccB, EccC, EccD for T7SSa, and EssA, EssB, EssC for T7SSb. The yellow illustrations represent the effector proteins of the secretion system, such as the WXG100 proteins, PE-PPE proteins, Esp proteins secreted by T7SSa, and the Esx proteins, LXG proteins secreted by T7SSb. In T7SSa, effector proteins are secreted outside the cell through the pore formed by EccC. PE-PPE proteins have a transmembrane structure, are transported out of the inner membrane by EccC, stably embedded in the mycobacterial acid layer, and form a pore by aggregating through their own structural changes. The effector proteins of T7SSb are secreted out of the cell through the pore formed by EssC. EsaA is the only component of T7SSb that spans the entire cell envelope, presenting a ‘needle tip-like’ appearance.

图 1 含 T7SSa 和 T7SSb 的代表菌株基因簇构成 (A) 及分泌系统结构示意图 (B)

Fig. 1 The composition of gene clusters containing T7SSa and T7SSb from representative strains (A) and the schematic diagrams of the two secretion system structures (B)

表 1 T7SSa 效应蛋白的分类及功能

Tab. 1 Classification and function of T7SSa effector proteins

Classification	Effector proteins	Function
WXG100 protein family ^[7-8]	ESAT-6(EsxA)	Interfere with the secretion of host cytokines; Help bacteria invade into host cells
	CFP-10(EsxB)	Induce apoptosis in macrophages and inhibit phagosome maturation; Promote the formation of granulomas
	EspA, EspC, EspD ^[10-12]	Act as chaperone proteins
Esp effector proteins	EspB ^[8]	Insert and disrupt the host cell membrane, causing cells lysis
	EspH, EspL ^[13-14]	Stabilize the structure of other effector proteins and assist in their secretion out of the cell
PE-PPE protein family ^[15-16]		Stably embed in bacterial cell envelop, and aggregate to form pores through structural changes; Nutrient absorption; Regulate the secretion of host cytokines or modulate macrophage apoptosis

道。PE-PPE 蛋白所形成的孔道可帮助细菌跨膜时选择性地摄取小分子物质,例如脂肪酸、阳离子、阴离子等营养物质^[15]。这对于结核分枝杆菌营养吸收至关重要。另一方面,PE-PPE 蛋白也同样具有细菌毒力功能,它可以通过调控宿主细胞因子的分泌或调节巨噬细胞的凋亡,帮助结核分枝杆菌在宿主细胞内存活以及免疫逃逸^[16]。

2.1.2 金黄色葡萄球菌 T7SSb 效应蛋白的多样性

由于金黄色葡萄球菌 T7SSb 仅由单一的 *esx* 基因簇编码,因此相较于结核分枝杆菌 T7SSa,其分泌的效应蛋白在数量上明显较少,但在结构和功能上却具有一定的相似性。比如:Esx 效应蛋白可以细分为从属于 WXG100 蛋白家族的 EsxA 和 EsxB,以及非 WXG100 蛋白家族的 EsxC 和 EsxD。其中,金黄色葡萄球菌的 EsxA 和 EsxB 在结构上分别与结核分枝杆菌 T7SSa 中的 EsxA 和 EsxB 具有相似性,它们都同属于 WXG100 蛋白家族。但区别在于,结核分枝杆菌中的 EsxA-EsxB 以异源二聚体的形式分泌出胞,而在金黄色葡萄球菌中,EsxA、EsxB 和 EsxC 蛋白自身均会形成同源二聚体^[5],并且 EsxA 与 EsxB 的分泌也并不相互依赖。这也体现出 T7SSa 和 T7SSb 在效应蛋白分泌机制上的差异。EsxA 是金黄色葡萄球菌 T7SSb 分泌的关键毒力蛋

白,它能够干扰宿主巨噬细胞的凋亡途径,与 EsxB 一起介导细菌的免疫逃逸,增强细菌的侵袭力^[17-18]。此外,EsxA 和 EsxB 作为 T 细胞抗原,也被当作金黄色葡萄球菌疫苗的候选组分^[19]。EsxC 是另一种金黄色葡萄球菌 Esx 效应蛋白,它虽然在脓肿形成初期所发挥的作用较小,但与细菌滞留和脓肿持续性密切相关^[20]。EsxD 也是 Esx 效应蛋白的一员,但其具体作用尚不明晰。

T7SSb 的效应蛋白分类及功能具体如表 2 所示。除了含有与 T7SSa 类似的效应蛋白类型以外,也有其所独有的效应蛋白。比如:LXG 蛋白家族是由金黄色葡萄球菌 T7SSb 分泌的具有大型抗菌毒素功能的效应蛋白,主要参与金黄色葡萄球菌与其他细菌的相互作用。LXG 蛋白家族的成员具有一个保守的 N 末端 LXG(Leu-X-Gly)结构域,该结构域与蛋白的分泌有关;同时,它还具有一个可变的发挥毒素功能的 C 末端结构域^[21]。在 LXG 蛋白分泌过程中,它会与 2~3 个 WXG100 样蛋白形成复合物,这些 WXG100 样伴侣蛋白被称为 Lap(LXG-associated α -helical proteins)。伴侣蛋白与 LXG 蛋白的 N 末端结构域相互作用,帮助 LXG 蛋白经由 *essC* 基因所编码的 EssC 孔道分泌出胞^[22]。近期通过定量蛋白质组学发现,另一种 T7SSb 效应蛋

白 TspA^[23] 也从属于 LXG 蛋白家族。TspA C 末端的跨膜结构使其可以在被分泌出胞后直接定位到其他细菌的细胞膜上,使细胞膜去极化而导致细菌

死亡,从而帮助金黄色葡萄球菌在种内竞争中取得优势。但目前仍未明确 Lap 伴侣蛋白具体有哪些种类和功能。

表 2 T7SSb 效应蛋白的分类及功能

Tab. 2 Classification and function of T7SSb effector proteins

Classification	Effector proteins	Function
Esx WXG100 protein family effector proteins	EsxA, EsxB	Interfere with the host macrophage apoptosis pathway and mediate bacterial immune evasion with EsxB; Enhance bacterial invasiveness, and induce abscess formation
Non-WXG100 protein family	EsxC ^[20]	Involved in bacterial persistence and causing persistent abscesses
Esx effector proteins	EsxD	Function is unclear
LXG protein family-lap chaperone proteins	LXG-Lap ^[21-22]	LXG proteins exert antibacterial toxin functions, participating in intraspecies competition of bacteria; WXG100-like chaperone protein Lap assists in the secretion of LXG effector proteins out of the cell
	TspA ^[23]	TspA exerts membrane depolarization toxicity through contact, helping <i>Staphylococcus aureus</i> gain an advantage in bacterial competition
Other T7SSb-secreted effector proteins	EsaD-EsaG-EsaE ^[24] TslA-TilA ^[22]	Intraspecies competition of <i>Staphylococcus aureus</i> TslA exerts cytotoxicity by disrupting bacterial cell membranes through its N-terminal phospholipase domain

除了以上两类之外, T7SSb 还具有一些发挥着重要功能的效应蛋白。比如:形成毒素-抗毒素系统的 EsaD 和 EsaE,二者在 EsaE 的帮助下形成稳定的复合物,并经由 EsaE 引导至 EssC 所形成的孔道分泌出胞。其中, EsaD 是一种核酸酶毒素,参与金黄色葡萄球菌的种内竞争^[24]。与此同时,近期有研究发现另一种 T7SSb 效应蛋白 TslA 也是一种由 T7SSb 分泌的菌间毒素,它通过其 N 末端的磷脂酶结构域破坏细菌细胞膜而发挥细胞毒性,实现对 TslA 敏感型菌株的杀伤^[22]。同时, *tslA* 基因毗邻多个 *tilA* 基因拷贝,后者所编码的蛋白具有抗 TslA 功能,可保护细菌免受自身和其他细菌 TslA 的毒害作用。

2.2 T7SS 效应蛋白的分泌机制

不同类型的 T7SS 效应蛋白的转运机制较为保守,均由属于 FtsK-SpoIIIE 家族的 ATP 酶马达蛋白^[25]介导,该蛋白在 T7SSa 和 T7SSb 中分别称为

EccC 和 EssC。EccC/EssC 是 T7SS 的保守成分之一,它是介导效应蛋白分泌的核心组件。EccC/EssC 包含一个 2 次跨膜结构域、一个未知功能域 (domain of unknown function, DUF) 以及 3 个 FtsK-SpoIIIE 样 ATP 酶结构域。了解效应蛋白的分泌机制对于更好地认识效应蛋白的结构和功能具有重要的意义。

在信号肽识别层面,有研究表明目前已知的 T7SSa 分泌的效应蛋白均具有高度保守的 Yxxx [D/E]基序。该基序已被证明发挥了“信号肽”功能,并与 EsxB 的 C 末端的 7 个残基组成“双重信号”,共同介导关键效应蛋白 EsxA-EsxB 复合物的分泌^[26]。而金黄色葡萄球菌 T7SSb 分泌的效应蛋白之间在一级结构上并不含有类似的保守基序,故不存在典型的“信号肽”结构。但是,部分效应蛋白会在 N 末端形成螺旋-转角-螺旋结构域(通常包含 WXG 或 LXG 基序),而该结构域已被证明是蛋白

二聚化和分泌所必需^[25]。因此,对于分泌而言,与 T7SSa 效应蛋白具有明确的基序作为“信号肽”相比,T7SSb 效应蛋白在结构上的相似性可能比在序列上的相似性更为重要。

在分泌方式层面,T7SSa 和 T7SSb 的差异更为显著。针对 T7SSa,研究人员根据效应蛋白分泌出胞的孔道不同,提出了 2 种较为成熟的分泌假想模型^[27],即中心孔道模型和原生孔隙模型。前者蛋白从同一孔道出胞,而后者从不同孔道出胞:PE-PPE 蛋白通过 EccC 四周的疏水孔道出胞,而 WXG100 蛋白则通过位于 EccC 中间位置的孔道出胞。此外,由于 PE-PPE 蛋白家族结构的特殊性,会嵌入分枝杆菌酸层中呈“导管样”,因此研究人员猜想并证明了它也具有跨膜运输底物的功能潜力^[15]。T7SSa 还存在 EspG、EccA 以及 MycP 三个与分泌相关的关键蛋白:EspG^[28]和 EccA^[29]作为分子伴侣参与了效应蛋白的折叠和稳定;MycP 是一种蛋白酶,对分泌后的效应蛋白进行加工使其能够进入宿主细胞并发挥作用^[30]。对于 T7SSb 的效应蛋白,它们会与 EssC 的不同结构域相互作用,进而分泌出胞^[3]。例如:EsxB 和 EsxC 分别结合 EssC 的 D2 和 D3 区,而 EsxA 并不直接与 EssC 作用[EsxA 在枯草芽孢杆菌^[31]中被证明其分泌与 FHA (forkhead-associated domain, FHA)结构域相关]。T7SSb 也有类似于 T7SSa 中 PE-PPE 蛋白的跨膜结构,即膜蛋白 EsaA^[32]。EsaA 作为 T7SSb 中唯一横跨整个细胞被膜的组分,呈现“针尖样”,也具有帮助 T7SSb 效应蛋白转运出胞并进一步递送至靶细胞的重要功能。

2.3 T7SS 效应蛋白的基因转录调控方式

在结核分枝杆菌 T7SSa 中,ESX-1 亚型与关键效应蛋白 EsxA 和 EsxB 的分泌有关,因此 *esx-1* 基因簇的转录调控机制备受关注。*esx-1* 基因簇的基因转录水平受到多层调节。其中,双组分信号转导系统^[33] (two-component signal transduction systems, TCSs)可以通过感应环境条件的变化,进而调控其下游编码效应蛋白的基因转录水平。这种方式主要经由位于 *esx-1* 基因簇上游的 *espACD* 操纵子发挥作用。以 PhoPR 双组分信号转导系统为例^[34]:位于细胞膜上的组氨酸激酶 PhoR 感应到环境变化(例如吞噬体中的酸性环境),从而自身磷酸化并将磷酸基团转移至相应的转录调节蛋白 PhoP。磷酸化的 PhoP 通过上调 *esx-1* 上游 *espACD* 操纵子的转录水平,从而促进 T7SSa 效应蛋白的基因转

录。另一种 TCS MprAB 以及其他调控因子 EspR、CRP 和 Lsr2,也对编码 T7SSa 效应蛋白的基因转录具有调节功能^[35-36]。此外,T7SSa 的效应蛋白多为毒力蛋白。为了避免由分泌系统的分泌能力不足造成毒力蛋白在细胞内积累过多,从而对细菌自身产生毒害作用,T7SSa 还会通过转录因子 WhiB6 所介导的负反馈调控机制,自动调整编码效应蛋白的基因的转录水平^[37]。

T7SSa 其他亚型 (ESX-2 ~ ESX-5) 的研究较少,但弄清楚它们的基因转录调节也同样具有重要意义。比如:在缺乏磷酸盐的条件下,结核分枝杆菌可通过 Pst/SenX3-RegX3 系统上调 *esx-5* 基因簇的基因转录水平,而 ESX-5 表达的增加有助于细菌在宿主细胞内的生存和复制,这与该菌在不同环境条件下的适应性有关^[38]。

在含 T7SSb 的细菌中,也具有多种信号通路,能够发挥调控其效应蛋白基因转录水平的作用。总体而言,可以分为 σ^B 依赖型调控通路和非 σ^B 依赖型调控通路。前者效应蛋白的基因转录水平由 σ^B 因子主导调控,并与全局调节因子 *arlR*、*spoVG*、*agr* 呈正相关,与调节因子 *sarA* 呈负相关。对于后者,效应蛋白的基因转录水平不受 σ^B 因子调控。例如:TCS SacRS 等双组分信号转导系统可以独立地接收并处理来自环境的信号,实现对下游编码 T7SSb 效应蛋白的基因的调控^[39]。除了基因层面的调控方式之外,T7SSb 效应蛋白还会对外界环境变化产生响应。近期研究人员发现,宿主的血清、鼻腔分泌物、肺表面活性剂中均含有能够刺激 T7SSb 分泌的活性成分,并成功鉴定其为“顺式不饱和脂肪酸”,可通过掺入金黄色葡萄球菌的细胞膜以降低细菌细胞膜的流动性,而膜动力学的改变可引起 T7SSb 活化^[40]。但目前对 T7SSb 活化机理的研究较少,仍有待进一步揭示。

3 小结与展望

随着对革兰氏阳性菌 T7SS 及其所分泌的效应蛋白研究的不断推进,从放线菌门到厚壁菌门,研究对象的范围逐渐扩大;从结构研究到功能研究,研究内容不断加深。相较于最早研究的 T7SSa, T7SSb 的发现较晚,有待更深入的研究。

其一,发现 T7SSb 的潜在效应蛋白有助于更完整地认识 T7SSb。T7SSa 可以通过蛋白之间的保守基序发现潜在的效应蛋白,但目前已知的 T7SSb 效应蛋白之间并不存在序列相似性,因此无法从序列

层面直接筛选,这无疑增加了新蛋白的发现难度。但是,正如前文中所提示,改变外界环境条件会刺激 T7SSb 已知效应蛋白的分泌^[40],因而通过改变环境条件很可能是发现新蛋白的一个契机。此外,结构层面的相似性也是未来可以考虑研究的方向。虽然序列层面差异较大,但从结构入手,很有可能实现类似 T7SSa 中以分泌基序为基础的分泌系统的“工程化”^[41],从而将 T7SS 塑造成一种“可人为操控的分泌装置”。这在未来具有较为广阔的应用前景。

其二, T7SS 所分泌的效应蛋白大多为毒力蛋白,因此若能抑制这些蛋白的分泌,对实现致病菌“减毒”具有重大意义。在 T7SSa 研究中已提出 Esp 类底物有成为“伴侣蛋白”的能力,并在此基础上提出将此作为药物靶点的巨大潜力。而在 T7SSb 研究中并未出现“通用伴侣”的相关报道,抑或是明确药物靶点的研究,而这些方面的研究也具有潜在的应用价值。

综上所述,对 T7SSa 和 T7SSb 的研究可以相互参考和借鉴。从效应蛋白多样性角度看分泌系统功能的多样性,对于更完整地认识这个仅革兰氏阳性菌具有的蛋白分泌系统 T7SS,具有重要的理论和应用价值。

参考文献

- [1] Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice [J]. *J Immunol*, 1995, 154: 3359-3372.
- [2] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG [J]. *Infect Immun*, 1996, 64: 16-22.
- [3] Abdallah AM, Pittius NCGV, Champion DG, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmek BJ, Bitter W. Type VII secretion—mycobacteria show the way [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(11): 883-891.
- [4] Newton-Foot M, Warren RM, Sampson SL, Van Helden PD, Claudius GVPN. The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems [J]. *BMC Evol Biol*, 2016, 16: 62.
- [5] Bowman L, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2021, 75: 471-494.
- [6] Anes E, Pires D, Mandal M, Azevedo-Pereira JM. ESAT-6 a major virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(6): 968.
- [7] Bao Y, Wang L, Sun J. A small protein but with diverse roles: a review of EsxA in mycobacterium-host interaction [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1645.
- [8] Sun J, Champion PA, Bigi F. Editorial: cellular and molecular mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* virulence [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 331.
- [9] Sengupta N, Padmanaban S, Dutta S. Cryo-EM reveals the membrane-binding phenomenon of EspB, a virulence factor of the mycobacterial type VII secretion system [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(4): 104589. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104589.
- [10] Chen JM, Zhang M, Rybniker J, Basterra L, Dhar N, Tischler AD, Pojer F, Cole ST. Phenotypic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* EspA point mutants reveals that blockage of ESAT-6 and CFP-10 secretion in vitro does not always correlate with attenuation of virulence [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(24): 5421-5430.
- [11] Guo Q, Bi J, Wang H, Zhang X. *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1-secreted substrate protein EspC promotes mycobacterial survival through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1): 19-36.
- [12] Chen JM, Boy-Röttger S, Dhar N, Sweeney N, Buxton RS, Pojer F, Rosenkrands I, Cole ST. EspD is critical for the virulence-mediating ESX-1 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(4): 884-893.
- [13] Phan TH, van Leeuwen LM, Kuijl C, Ummels R, van Stempvoort G, Rubio-Canalejas A, Piersma SR, Jiménez CR, van der Sar AM, Houben ENG, Bitter W. EspH is a hypervirulence factor for *Mycobacterium marinum* and essential for the secretion of the ESX-1 substrates EspE and EspF [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(8): e1007247. doi: 10.1371/journal.ppat.1007247.
- [14] Sala C, Odermatt NT, Soler-Arnedo P, Gülen MF, von Schultz S, Benjak A, Cole ST. EspL is essential for virulence and stabilizes EspE, EspF and EspH levels in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(12): e1007491. doi: 10.1371/journal.ppat.1007491.
- [15] Wang Q, Boshoff HIM, Harrison JR, Ray PC, Green SR, Wyatt PG, Barry CE 3rd. PE/PPE proteins mediate nutrient transport across the outer membrane of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Science*, 2020, 367(6482): 1147-1151.
- [16] 樊博, 王巍, 程小星. 结核分枝杆菌 PE 和 PPE 家族研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2011, 31(6): 454-457.
- [17] Burts ML, Williams WA, DeBord K, Missiakas DM. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(4): 1169-1174.
- [18] Cao Z, Casabona MG, Kneuper H, Chalmers JD, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria

- [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16183. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.183.
- [19] Bagnoli F, Fontana MR, Soldaini E, Mishra RP, Fiaschi L, Cartocci E, Nardi-Dei V, Ruggiero P, Nosari S, De Falco MG, Lofano G, Marchi S, Galletti B, Mariotti P, Bacconi M, Torre A, Maccari S, Scarselli M, Rinaudo CD, Inoshima N, Savino S, Mori E, Rossi-Paccani S, Baudner B, Pallaoro M, Swennen E, Petracca R, Brettoni C, Liberatori S, Norais N, Monaci E, Bubeck-Wardenburg J, Schneewind O, O'Hagan DT, Valiante NM, Bensi G, Bertholet S, De Gregorio E, Rappuoli R, Grandi G. Vaccine composition formulated with a novel TLR7-dependent adjuvant induces high and broad protection against *Staphylococcus aureus* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(12): 3680-3685.
- [20] Kneuper H, Cao ZP, Twomey KB, Zoltner M, Jäger F, Cargill JS, Chalmers J, van der Kooi-Pol MM, van Dijk JM, Ryan RP, Hunter WN, Palmer T. Heterogeneity in *ess* transcriptional organization and variable contribution of the *Ess*/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylococcus aureus* strains [J]. *Mol Microbiol*, 2015, 93(5): 928-943.
- [21] Klein TA, Pazos M, Surette MG, Vollmer W, Whitney JC. Molecular basis for immunity protein recognition of a type VII secretion system exported antibacterial toxin [J]. *J Mol Biol*, 2018, 430(21): 4344-4358.
- [22] Garrett SR, Mietrach N, Deme J, Bitzer A, Yang Y, Ulhuq FR, Kretschmer D, Heilbronner S, Smith TK, Lea SM, Palmer T. A type VII-secreted lipase toxin with reverse domain arrangement [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8438.
- [23] Ulhuq FR, Gomes MC, Duggan GM, Guo M, Mendonca C, Buchanan G, Chalmers JD, Cao Z, Kneuper H, Murdoch S, Thomson S, Strahl H, Trost M, Mostowy S, Palmer T. A membrane-depolarizing toxin substrate of the *Staphylococcus aureus* type VII secretion system mediates intraspecies competition [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(34): 20836-20847.
- [24] Cao Z, Casabona MG, Kneuper H, Chalmers JD, Palmer T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16183. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.183.
- [25] Wang S, Zhou K, Yang X, Zhang B, Zhao Y, Xiao Y, Yang X, Yang H, Guddat LW, Li J, Rao Z. Structural insights into substrate recognition by the type VII secretion system [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(2): 124-137.
- [26] Daleke MH, Ummels R, Bawono P, Heringa J, Vandenbroucke-Grauls CM, Luirink J, Bitter W. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(28): 11342-11347.
- [27] Rivera-Calzada A, Famelis N, Llorca O, Geibel S. Type VII secretion systems: structure, functions and transport models [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(9): 567-584.
- [28] Ekiert DC, Cox JS. Structure of a PE-PPE-EspG complex from *Mycobacterium tuberculosis* reveals molecular specificity of ESX protein secretion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(41): 14758-14763.
- [29] Crosskey TD, Beckham KSH, Wilmanns M. The ATPases of the mycobacterial type VII secretion system: structural and mechanistic insights into secretion [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2020, 152: 25-34.
- [30] van Winden VJ, Ummels R, Piersma SR, Jiménez CR, Korotkov KV, Bitter W, Houben EN. Mycosins are required for the stabilization of the ESX-1 and ESX-5 Type VII secretion membrane complexes [J]. *mBio*, 2016, 7(5): e01471-16. doi: 10.1128/mBio.01471-16.
- [31] Mietrach N, Damián-Aparicio D, Mielich-Süss B, Lopez D, Geibel S. Substrate interaction with the *EssC* coupling protein of the type VIIb secretion system [J]. *J Bacteriol*, 2020, 202(7): e00646-19. doi: 10.1128/JB.00646-19.
- [32] Dreisbach A, Hempel K, Buist G, Hecker M, Becher D, van Dijk JM. Profiling the surfacome of *Staphylococcus aureus* [J]. *Proteomics*, 2010, 10(17): 3082-3096.
- [33] Kundu M. The role of two-component systems in the physiology of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(8): 710-717.
- [34] Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sassetti CM, Sherman DR, Bloom BR, Rubin EJ. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(30): 10676-10681.
- [35] Pang X, Samten B, Cao G, Wang X, Tvinnereim AR, Chen XL, Howard ST. *MprAB* regulates the *espA* operon in *Mycobacterium tuberculosis* and modulates ESX-1 function and host cytokine response [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(1): 66-75.
- [36] Blasco B, Chen JM, Hartkoorn R, Sala C, Uplekar S, Rougemont J, Pojer F, Cole ST. Virulence regulator *EspR* of *Mycobacterium tuberculosis* is a nucleoid-associated protein [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(3): e1002621. doi: 10.1371/journal.ppat.1002621.
- [37] Bosserman RE, Nguyen TT, Sanchez KG, Chirakos AE, Ferrell MJ, Thompson CR, Champion MM, Abramovitch RB, Champion PA. *WhiB6* regulation of ESX-1 gene expression is controlled by a negative feedback loop in *Mycobacterium marinum* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(50): E10772-E10781. doi: 10.1073/pnas.1710167114.
- [38] Elliott SR, Tischler AD. Phosphate starvation: a novel signal that triggers ESX-5 secretion in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Microbiol*, 2016, 100(3): 510-526.
- [39] Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus*

- virulence* [J]. *Microbiol Spectr*, 2018, 7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
- [40] Lopez MS, Tan IS, Yan D, Kang J, McCreary M, Modrusan Z, Austin CD, Xu M, Brown EJ. Host-derived fatty acids activate type VII secretion in *Staphylococcus aureus* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(42): 11223-11228.
- [41] Champion PA, Stanley SA, Champion MM, Brown EJ, Cox JS. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1632-1636.

(收稿日期:2024-02-06)

“一健康基金”成立

本刊名誉主编闻玉梅院士及其丈夫宁寿葆教授以个人名义捐赠的“一健康基金”于2013年1月16日在复旦大学上海医学院正式成立。

“一健康”，是英文“*One Health*”的中文缩写，意指“一体化健康”。它突出了人的健康是一个“系统工程”，需要整合基础医学、临床医学、公共卫生学、药理学、生命科学和人文社会科学等诸多学科共同研究与实施保障。也就是说，人类健康问题不仅仅是医学的事、医生的事，而是涉及多个学科交叉的系统性科学领域，是“一体化”事业。

“一健康基金”，就是为了在中国大力倡导“一体化健康”的理念，鼓励更多的医科教师和学生开拓跨学科的视野，主动融合其他学科，一齐致力于“一体化健康”的创新性教学、科研和人才培养，从而更好地服务于人群的整体健康。

例如，在微生物传染病的防控中，“一体化健康”理念要求医学学者联合人及动物微生物学、临床微生物学、环境微生物学、感染病学与流行病学等其他领域的力量，共同为控制传染与感染性疾病的蔓延做出贡献。上述各领域的整合不仅可在研究、检测技术方面互相借鉴，更重要的是通过微生物学各分支间的相互沟通能聚集科学问题，对从个体患者拓展至公共卫生群体健康的重要问题提出解决措施。

复旦大学“一健康基金”以留本基金的方式，每年奖励在微生物学、感染病学、公共卫生学、药理学等领域为“一体化健康”研究与教学做出突出成绩的品学兼优的学生和教师。奖励对象每年由相关学者和专家评出。

《微生物与感染》编辑部