



专论与综述

细菌三型分泌系统输出蛋白分泌信号研究进展

罗宇¹ 牛建军^{2,3,4} 柏卜鸾¹ 王岱^{*1}

1 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室 厦门大学 福建 厦门 361102

2 厦门大学附属中山医院 福建 厦门 361004

3 厦门大学公共卫生学院 福建 厦门 361102

4 福建医科大学公共卫生学院 福建 福州 350004

摘要: 自提出三型分泌系统的概念以来, 相关分子机制的研究让人们对其有了更深入的了解。与依赖信号肽分泌途径形成鲜明对比的是, 蛋白通过细菌三型分泌系统分泌或者转运时没有可识别的保守信号序列。近期对三型分泌蛋白的研究发现了多种可以引导其分泌的分泌信号。本文分别介绍了细菌三型分泌系统的种类, 分泌系统分泌蛋白的种类, 并着重阐述了分泌信号的分子特性及其机制, 以期新型抗菌药物的研发提供新的思路。

关键词: 细菌三型分泌系统, 分泌信号, 新型抗菌药物

Advance in secretion signal of type 3 secreted proteins

LUO Yu¹ NIU Jian-Jun^{2,3,4} BAI Bo-Luan¹ WANG Dai^{*1}

1 State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

2 Zhongshan Hospital Xiamen University, Xiamen, Fujian 361004, China

3 Public Health School of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

4 Public Health School of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China

Abstract: Since the concept of a type 3 secretion system was proposed, the study of related molecular mechanisms has furthered our understanding of it. In contrast to the signal peptide in other secretory machineries, there is no conserved signal sequence when the protein is secreted or transported through the bacterial type 3 secretion system. A variety of secretory signals that guide the secretion of type 3 secreted protein have been discovered in the recent study. This article introduces the categories of bacterial type 3 secretion system, the types of secreted proteins in the secretory system and focuses on molecular characters of secretion signals, providing new ideas for the development of new antibacterial drugs.

Keywords: Type 3 secretion system, Type 3 secretion signal, New antibacterial drugs

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81473251, 31370166, 31741006); President of Xiamen University Foundation (20720160060)

***Corresponding author:** Tel: 86-592-2880630; E-mail: daiwang@xmu.edu.cn

Received: 27-11-2018; **Accepted:** 12-03-2019; **Published online:** 28-03-2019

基金项目: 国家自然科学基金(81473251, 31370166, 31741006); 厦门大学校长基金(20720160060)

***通信作者:** Tel: 0592-2880630; E-mail: daiwang@xmu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-27; **接受日期:** 2019-03-12; **网络首发日期:** 2019-03-28

许多革兰氏阴性致病菌和革兰氏阳性致病菌都拥有独特的效应蛋白因子转运输出机制, 目前已经发现 8 种分泌系统, 分别命名为 T1SS–T8SS。其中细菌三型分泌系统(Type 3 secretion system, T3SS)产生的效应蛋白是许多革兰氏阴性致病菌最关键的致病因子。细菌三型分泌系统是由约 20 种蛋白组成的多蛋白复合体^[1], 形似注射器, 横跨细菌内外包膜, 与鞭毛(Flagellum)输出装置有共同的起源^[2]。细菌可利用 T3SS 将效应蛋白直接注入到宿主细胞细胞质中, 从而调节宿主细胞功能、信号转导途径, 破坏宿主防御机制, 促进细菌增殖, 导致疾病的发生。

鉴于细菌三型分泌系统在细菌侵染宿主这一过程中具有关键作用, 对于细菌与宿主的紧密结合、宿主细胞膜的穿透以及宿主胞内生存等重要阶段具有决定性意义, 近年来世界范围内多个研究小组试图通过抑制 T3SS 的功能来拮抗病原菌。已有研究发现: 应用 T3SS 介导的肠道病原性大肠杆菌溶血作用筛选系统, 从链霉菌菌属的发酵液中鉴定了一个线性的聚酮化合物——金多司, 它可以特异性抑制 T3SS 的分泌蛋白如 EspB、EspF 和 Map, 但不影响胞质蛋白 GroEL 的表达; 该研究还发现, 金多司会抑制细菌三型分泌系统介导的溶血作用, 半抑制浓度(IC₅₀)为 1.5 µg/mL 且在液体培养基中不会影响细菌生长。因此研究者认为, 细菌三型分泌系统抑制剂有可能在不影响细菌生长的情况下减少其毒力, 进而减少甚至避免细菌耐药性的发展^[3]。我们也发现了 Salicylidene acylhydrazides 类化合物在病原菌中的多个作用蛋白位点, 揭示了该类化合物抑制 T3SS 的分子机制^[4]。这些结果表明, T3SS 小分子特异性抑制剂具有一些优于传统抗生素的独特功能, 有望开发成为控制病原菌的新型药物, 并且能够有效遏制耐药性的产生。然而, 细菌三型分泌系统蛋白表达及其分泌调控的具体机制目前尚不清楚, 阻碍了该类药物的开发进程。因此, 通过对细菌三型分泌系统相关分子机制进行深入研究, 可以为新型抗生素的研发提供新的思路。

1 三型分泌系统种类

1.1 鞭毛三型分泌系统

鞭毛三型分泌系统和与转运相关的细菌三型分泌系统有共同的祖先。在致病菌侵染人类、动物和植物时均是必不可少的。实验表明, 鞭毛三型分泌系统是昆虫病原线虫共生菌中关键毒力蛋白的输出装置^[5]。

鞭毛三型分泌系统和与转运相关的细菌三型分泌系统的结构具有高度相似性, 鞭毛丝直径为 230 Å, 主要成分蛋白为 FliC, 单体的鞭毛丝蛋白可以通过聚合作用形成鞭毛^[6-7]。鞭毛三型分泌系统相关组分的装配需要 ATP 酶 FliI 的驱动。已经证实转运相关细菌三型分泌系统和鞭毛三型分泌系统可以通过伴侣蛋白和复合调控通路在不同阶段分别发生作用, 二者有各自独特的功能去分泌不同的基质, 确保在感染初期不会被意外地释放鞭毛蛋白, 从而避免过早激活免疫信号通路^[2]。

1.2 注射器状三型侵染系统

转运相关三型分泌系统是一个与鞭毛装置进化有联系的多重蛋白组成的针状复合物, 有时也被称为非鞭毛细菌三型分泌系统^[8], 其结构以及生物合成机制均与鞭毛装置十分相似。如在肠致病性大肠杆菌中, LEE 毒力岛编码的细菌三型分泌系统细丝状结构是由 EspA 单体组成的, 其直径为 120 Å^[6-7], EspA 亚基之间可以通过卷曲螺旋(Coiled-coil)结构域作用形成 EspA 细丝状结构。EspA 亚基被添加到细丝状结构的尖端部位, 这一点也与鞭毛的形成方式相似^[9-11]。已证实 EspA 与鞭毛丝蛋白被预测很有可能形成卷曲螺旋的羧基端区域相似的序列。转运三型分泌系统相关组分的装配过程也与鞭毛三型分泌系统类似, 需要 ATP 酶 EscN 的驱动。尽管 EspA 和 FliC 在结构上相似, 但是 EspA 缺少了可以激活 TLR5 信号的主要区域 D0, 而 FliC 则存在这个关键区域^[12]。

许多细菌包含不止一种三型分泌系统, 它们可能在感染过程的不同阶段发挥不同的功能。例如, 沙门氏菌 SPI-1 编码的三型分泌系统在入侵宿主细胞之前发挥作用, 在细菌与肠上皮细胞初始接触期

间表达相应的基因；而 SPI-2 编码的三型分泌系统仅在细菌进入真核细胞胞质后才被激活，使细菌在宿主细胞中更好地繁殖^[13]。归纳总结见表 1。

2 分泌系统分泌蛋白种类

为了确保效应蛋白能够有效地转运至宿主细胞，其分泌过程会受到严格调控，包括三组分泌基质即装置蛋白、转运蛋白和效应蛋白^[1]，如图 1 所示。研究发现细菌分泌三型分泌系统的组分——转运蛋白、毒力岛和非毒力岛编码的效应蛋白氨基末

端全部携带三型分泌信号和转运信号^[14]。

2.1 “早期”分泌基质——装置蛋白

最先通过分泌装置的是“早期”基质，即组成针状结构和基底等结构的装置蛋白。如肠致病性大肠杆菌 LEE 毒力岛(Locus of enterocyte effacement)编码的装置蛋白 EscC 和 EscD 等。已知细菌三型分泌系统针状结构是由 EscF 单体组成的，有实验表明敲除基因 *escF* 后,细菌三型分泌系统不会分泌转运蛋白和效应蛋白^[2]。

表 1 鞭毛三型分泌系统与注射器状三型侵染系统对比
Table 1 Comparison of the flagellum-T3SS and the injectisome-T3SS

T3SS	Flagellum-T3SS	Injectisome-T3SS
Difference	(1) Number=1 (2) Not released at the beginning of infection (3) Can activates TLR5 signaling (4) FliC flagella diameter 230 Å	(1) Number≥1 (2) Plays different roles during different stages (3) Cannot activates TLR5 signaling (4) EspA filament diameter 120 Å
Similarity	(1) Commom ancestor with evolutionary relevance (2) Similar in structure (3) Similar biosynthetic mechanism (4) Both require ATPase to provide energy	

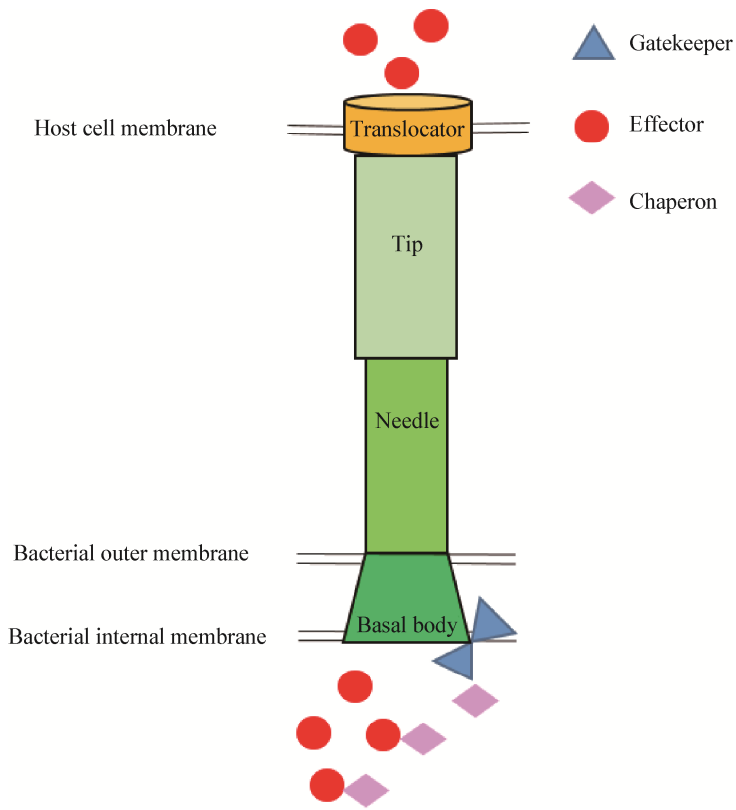


图 1 细菌三型分泌系统结构装置
Figure 1 Structural organization of the T3SS

2.2 “中期”分泌基质——转运蛋白

完成针状结构的装配后,“中期”基质,即转运蛋白开始分泌,转运蛋白能够在宿主细胞膜上装配一个转运通道^[15-17]。肠致病性大肠杆菌细丝状结构 EspA 与蛋白 EscF 相连,研究发现 EspA 氨基末端序列含有可以调控标签蛋白分泌的信号。2010 年有研究表明肠致病性大肠杆菌的转运蛋白 EspB 和 EspD 氨基末端序列含有可以调控标签蛋白分泌的信号^[18]。还有研究表明 EspB 的前 20 个氨基酸残基含有三型分泌和转运的信号^[14]。假结核耶尔森氏菌的转运蛋白 YopD 的前 5 个密码子可以作为最小长度的氨基端分泌信号^[19]。铜绿假单胞菌的转运蛋白 PopD 的氨基端分泌信号和伴侣蛋白 PcrH 都是其分泌所必需的^[16]。

2.3 “后期”分泌基质——效应蛋白

一旦与宿主细胞结合完成,会开始进行“后期”基质,即毒力岛编码效应蛋白的分泌,如肠致病性大肠杆菌中 EspF、EspG、EspH、Tir 和 Map,沙门氏菌中 GtgA、CigR、GogB、SseL、SteD,耶尔森氏菌中 YopH、YopM 等^[20]。当细菌紧密结合到宿主细胞表面时,会在细胞表面形成肌动蛋白富集的基底状结构,从而破坏肠上皮细胞的完整性,导致 A/E 黏附和抹平损伤的发生^[21]。具有黏附和抹平损伤能力的致病菌还会分泌一系列非毒力岛编码的效应蛋白,如肠致病性大肠杆菌以特定方式附着于宿主细胞时会产生 NleA,其靶标是宿主细胞的高尔基体,可以抑制宿主的分泌和

炎症通路^[22]。

2.4 其他

先前的研究表明,在缺乏鞭毛输出系统时,鞭毛丝蛋白 FliC 可以通过毒力岛编码的完整细菌三型分泌系统进行分泌^[2]。铜绿假单胞菌 FliC 蛋白前 20 个氨基酸足够使其通过细菌三型分泌系统注射装置分泌^[23]。

另有研究表明肠致病性大肠杆菌三型分泌系统中开关蛋白 SepL 类似于效应蛋白,可以与伴侣蛋白 Orf12 结合^[24]。我们针对肠出血性大肠杆菌 O157 进行的实验表明,开关蛋白 SepL 羧基末端 48 个氨基酸区域可以通过与效应蛋白 Tir 的结合来调控转运蛋白和效应蛋白的输出^[25]。将 SepL 氨基末端 70 个氨基酸与 β -内酰胺酶标签蛋白融合后发现其可以分泌^[24]。归纳总结见表 2。

3 分泌蛋白的分泌信号

与依赖信号肽分泌途径形成鲜明对比的是,蛋白通过细菌三型分泌系统分泌或者转运时没有可识别的保守信号序列,所分泌的效应蛋白不在胞浆间隙中停留,也不被切割,直接从胞质输送到细胞表面^[26]。细菌三型分泌系统分泌蛋白的分泌信号不依赖于信号肽,那么这些蛋白是如何靶向细菌三型分泌系统的?或者它们的分泌信号序列又是什么呢?早在 1997 年就有研究者提出了耶尔森氏菌中三型分泌系统分泌效应蛋白的两种独立分泌信号假说,即效应蛋白拥有至少两个独特的区域引导其

表 2 肠致病性大肠杆菌细菌三型分泌系统相关蛋白
Table 2 Components of type III secretion systems from EPEC

T3SS	Component	Function
Pore forming element	EspB, EspD	Forming translocation pore
Tip	EspA	Elements of the apparatus
Basal body	EscC, EscD, EscI, EscJ, Orf16, etc	Elements of the apparatus
Needle	EscF	Elements of the apparatus
Gatekeeper	SepD, SepL	“Switch” from secretion of translocators to secretion of effectors
Effector	Map, NleA, SepZ, Tir, etc	Virulence factors
Chaperon	CesA, CesB, CesD, CesF, CesT, etc	Stabilize proteins and aiding secretion
ATPase	EscN	Providing energy to the system

到达分泌装置处^[27]。第一个区域位于氨基末端约前 20 个氨基酸,即氨基末端分泌信号(N-terminal secretion signal, NSS),第二个区域位于约前 140 个氨基酸,即伴侣蛋白结合区域信号(Chaperone binding domain, CBD),这两种分泌信号可以独立地行使功能并能够互相促进^[27],如图 2 所示。

3.1 伴侣蛋白结合区域信号

细菌三型分泌系统中许多效应蛋白依赖伴侣蛋白进行有效的分泌,它们通常与遵循分泌信号的分子伴侣结合区域结合,而伴侣蛋白的作用是辅助效应蛋白的转运和在胞内的稳定。晶体结构分析揭示了三型分泌基质的伴侣蛋白结合区域位于氨基末端 50–100 个氨基酸区域,并以伸展的构象缠绕在伴侣蛋白周围,因此被认为是三维靶向信号^[28–29]。而一些效应蛋白没有同源的伴侣蛋白,可以不依赖于分子伴侣进行转运。

除此之外,伴侣蛋白结合区域还可以作为膜靶向信号,如在耶尔森氏菌中,伴侣蛋白 SycO 结合到效应蛋白 YopO 的伴侣蛋白结合区域后,可以阻止 YopO 在细菌内部的膜定位^[30]。

3.2 氨基末端分泌信号

氨基末端分泌信号被认为是在进化过程中遗留下来的原始分泌信号,它可以独立引导效应蛋白通过细菌三型分泌系统或三型鞭毛系统输出,效应蛋白氨基末端前 20–30 个氨基酸通常足够其分泌。分泌信号的位置通常是确定的,存在争议的是这个信号的分子组成是 mRNA 还是蛋白质。

3.2.1 核酸信号

(1) 位于 5'非翻译区前导序列中的 RNA 信号
有研究从沙门氏菌 42 种不同效应蛋白中筛选

出 5 种效应蛋白(GtgA, CigR, GogB, SseL, SteD),实验表明其位于 5'非翻译区前导序列中的 25 bp RNA 序列足够使 CyaA 融合蛋白转运至宿主细胞^[31]。

另有研究表明编码鞭毛丝蛋白的 *fliC* 基因,位于其非翻译区的起始密码子上游 173 bp 序列,足以使鞭毛分泌大肠杆菌烯醇化酶和来自空肠弯曲菌的 PebI 蛋白到培养基中^[32],其中前者是糖酵解酶,后者是感染过程中由空肠弯曲杆菌利用的主要细胞黏附因子。

(2) 位于编码区域的 mRNA 信号

有更多的研究围绕着编码区域的 mRNA 信号进行。已经发现将耶尔森氏菌中效应蛋白 YopN、丁香疫霉菌中蛋白 AvrB 和 AvrPto 以及野油菜黄单胞菌中蛋白 AvrBs2 的前 15 个氨基酸进行移码突变后,其分泌信号功能不受影响^[33–35];且有研究表明这几种蛋白上游非翻译区 mRNA 不参与到这种 mRNA 信号中;其中,将 YopN 进行同义突变后会阻断其分泌,实验结果验证了这几种蛋白的分泌信号由 mRNA 组成。

另有研究得出相同的结论,并证实耶尔森氏菌中转运 YopQ 蛋白的 mRNA 信号位于其 5'端的前 30 个碱基内, YopQ_{1–10}-Npt (新霉素磷酸转移酶 II) 足够通过三型分泌系统分泌;若将 5'端第 8 或 9 个碱基进行同义突变后 YopQ_{1–10}-Npt 就不能分泌出来,这说明 YopQ_{1–10} 的 mRNA 信号是其分泌信号的分子组成;作者也发现当进行移码突变之后 YopQ_{1–10}-Npt 不能分泌,但是 YopQ_{1–15}-Npt 仍然可以分泌,作者对该现象进行的解释是分泌信号确实存在于 mRNA 中,但是信号需要特殊的 tRNA 和 mRNA 相互作用^[36]。

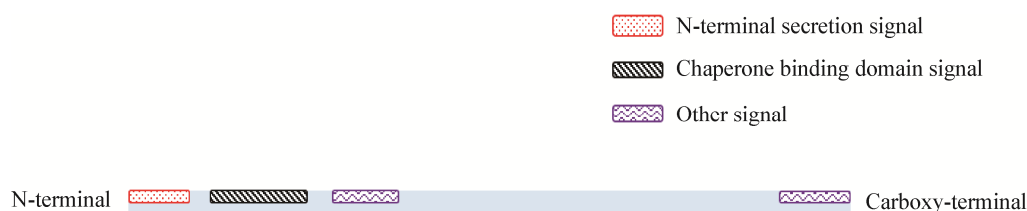


图 2 分泌信号示意图

Figure 2 Schematic representation of the secretion signals

目前尚未发现存在保守的 RNA 序列或二级结构可以作为分泌信号。对效应蛋白转运的实时分析揭示了在感染过程中的前几分钟内效应蛋白的快速转运^[37]。然而以上基于 mRNA 的三型分泌信号模型并不能完全解释细菌三型分泌底物的高效输出现象。

3.2.2 蛋白信号

鼠伤寒沙门氏菌中有一种效应蛋白 SopE (鸟嘌呤核苷酸交换因子, 可以诱导膜皱缩和肌动蛋白重排), 已有实验表明 SopE 5'UTR 的 mRNA 序列不参与分泌过程。为了阐明分泌信号的分子组成, Karavolos 等在鼠伤寒沙门氏菌效应蛋白 SopE 的氨基末端区域进行了移码突变, 结果显示仅分泌具有原始氨基酸序列的蛋白; 此外, 该实验还表明前 15 个氨基酸对于 SopE 的分泌是十分重要的。这些数据揭示了在分泌过程中氨基末端氨基酸序列的重要性^[38]。针对沙门氏菌蛋白 InvJ 的研究也得出相同的结论, 位于其氨基末端第 4–7 个氨基酸的分泌信号, 将其所在区域碱基进行同义突变后分泌不会受到影响^[39]。对沙门氏菌效应蛋白 SptP 的 5'端第 33 个碱基进行移码突变后, 很大程度上影响了它的分泌^[40]。

YopD 是假结核耶尔森氏菌的转运蛋白, 将 YopD 的 5'端 mRNA 序列打乱不会影响其分泌, 但是将氨基酸序列破坏会使其分泌水平下降^[17]。为了探究耶尔森氏菌中效应蛋白 YopE 的分泌信号, 将其 5'端第 33 个碱基做突变处理, 在编码伴侣蛋白基因 *yerA* 缺陷株中 YopE 的 5'端第 4–33 碱基移码突变后, 其分泌大幅减少; 与之相反, 进行同义突变则不会使 YopE 的分泌减少, 因此 YopE 的氨基末端氨基酸序列是三型分泌系统的靶标信号^[41]。

针对耶尔森氏菌属、假单胞菌属、肠致病性大肠杆菌、志贺氏菌属、黄单胞菌属等效应蛋白氨基末端分泌信号的分析显示其含有丰富的丝氨酸、异亮氨酸、天冬酰胺和苏氨酸, 而缺少半胱氨酸和色氨酸^[42]。分析丁香假单胞菌效应蛋白的前 50 个氨

基酸, 发现其在统计学上显著富含丝氨酸, 而缺乏天冬氨酸、亮氨酸和赖氨酸^[42]。分析肠道沙门氏菌的前 50 个氨基酸显示其富含丝氨酸而缺乏天冬氨酸^[43]。与 mRNA 信号假设一样, 氨基酸信号也没发现存在保守的序列。

3.2.3 氨基末端分泌信号识别机制

针对位于 5'非翻译区前导序列中的 RNA 信号引导转运蛋白或者效应蛋白分泌的分子机制, Niemann 等提出一种假设, 即发现沙门氏菌中 Hfq (多种 RNA 的伴侣蛋白) 可以特异性地结合 *gtgA* RNA, 而 Hfq-RNA 复合物可能参与到信号识别这一过程中^[31]。

对于氨基酸序列信号提出了如下几种假设:

(1) 肠出血性大肠杆菌转运蛋白 EspD 的氨基末端第 1–171 个残基包含 2 个两亲性结构域, 其螺旋对于 EspD 的功能十分关键; 荧光与圆二色谱分析表明, His₆-EspD_{1–171} 在溶液中为天然无序结构。然而当结合由磷脂酰丝氨酸组成的阴离子小单层囊泡时, His₆-EspD_{1–171} 会经历 pH 依赖性的构象变化, 使该蛋白质的 α -螺旋含量增加约 7 倍; 在海拉细胞膜上, His₆-EspD_{1–171} 形成同源二聚体, 推测这一过程可以促进 EspD-EspD 寡聚化和在细胞膜上成孔^[44]。

(2) 研究表明将博德特氏菌三型分泌系统的效应蛋白 BteA287 定性为可溶性且高度稳定富含 α 螺旋的结构域, 在性质上是单体的, 在 200 mmol/L 浓度下具有寡聚化的趋势。扩散核磁共振实验证明 BteA287 氨基末端前 31 个残基是其表现出聚集的原因; BteA 氨基末端结构域是多功能的, 前 130 个氨基酸可以充当细菌中其同源伴侣蛋白 BtcA 的对接平台, 并将蛋白质靶向真核宿主细胞内的脂筏微区^[45–46]。

(3) 有文章揭示了卷曲螺旋倾向和内在结构紊乱通常是在细菌三型分泌系统中产生功能性相互作用的先决条件; 细菌三型分泌系统效应蛋白的氨基末端序列在其有序和无序促进残基中经常表现出特异性偏差, 氨基末端的结构紊乱可以起到分泌信号的作用^[47]。早期的研究表明, 为细菌三型分泌

系统提供能量的 ATP 酶在蛋白质分泌过程中起到底物识别、伴侣分子释放以及细菌三型分泌系统底物的去折叠等重要作用,这一研究结果也暗示了氨基末端无序结构有助于识别和展开分泌底物,因此可以假设氨基末端的灵敏度可能作为分泌信号^[47]。这些信号引导分泌底物到达分泌装置处,底物得以展开并被递送至输出装置处的跨膜区域以及针状分泌通道,通过针尖复合物来介导感知宿主细胞进行后续的分泌过程^[48]。

4 分泌信号研究方法

目前的多种三型分泌系统分泌信号的研究都是通过融合蛋白的分泌来完成,此类研究方法基于移码突变和同义突变来探究蛋白的表达情况、蛋白实时分泌实验以及效应蛋白转运实验等,使用到的标签蛋白包括腺苷酸环化酶(Adenylate cyclase, CyaA)、 β -内酰胺酶(β -Lactamase, Bla)和半胱氨酸(Cys)等广泛适用性标签蛋白,还包括碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)、绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)以及二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, DHFR)的 α -肽等非广泛适用性标签蛋白。通常当 EPEC 的三型分泌蛋白与有分泌能力的标签蛋白如 CyaA 等相融合,其氨基末端约 20 个氨基酸残基足够调节细菌三型蛋白分泌和转运。而 Bla、CyaA 和 GFP 等标签蛋白灵敏度较高,Cys 和 GFP 等标签蛋白可以用于实时分泌的检测,Bla 则用来分析效应蛋白转运至宿主细胞中的情况。

运用移码突变和同义突变来深入研究分泌信号的分子组成是目前最为普遍的实验方法。其中移码突变指在起始密码子 AUG 后插入或敲除核苷酸,使其氨基酸序列改变而保持 mRNA 序列基本不变。同义突变则是指 DNA 片段中有时某个碱基对的突变并不会导致所编码氨基酸的改变,其原因在于该位置的密码子突变前后为简并密码子,这种实验方法会改变 mRNA 序列,但不会改变氨基酸序列。

5 问题与展望

有实验表明三型分泌信号是可以互换的,将肠致病性大肠杆菌中蛋白 EspA 氨基末端序列用效应蛋白 Map 的前 20 个氨基酸替换之后,会获得部分效应蛋白的分泌特性^[15]。另有实验发现这种互换甚至可以发生在鞭毛三型分泌系统和与转运相关的三型分泌系统之间^[27],这表明底物识别机制在 2 个系统中是保守的。用假丁香单胞菌膜相关蛋白 FtsX 的前 12 个氨基酸替代的 AvrPto 蛋白仍然可以分泌,说明细菌三型分泌系统的靶向信号是高度可变的^[49]。在未来的研究中可以借鉴上述实验方法,通过交换分泌信号深入阐释某种蛋白分泌信号的具体识别机制以及该种蛋白的功能。

除了效应蛋白的两种独立分泌信号以外,用铜绿假单胞菌转运蛋白 PopD 作为模型研究其分泌信号时发现蛋白 PopD 中有 2 个新的转运蛋白特异性信号。一个靠近分子伴侣结合位点,另一个位于蛋白质的羧基末端,如图 2 所示,他们对于 PopD 的输出是十分必要的^[16]。而在假结核耶尔森氏菌中同样发现蛋白 YscUCC 的羧基末端 15 个氨基酸残基可以作为其分泌信号^[50]。我们已经知道位于不同位置对于将效应蛋白递送到宿主细胞这一过程是十分重要的,虽然对这些新发现分泌信号的功能知之甚少,但这些发现逐渐使人们认识到其位置不仅仅局限于氨基端区域。

此外,由于三型分泌系统具有分泌蛋白质的能力被应用于医疗和工业,例如提供保护性抗原和蛋白质纯化等。2018 年有研究发现在鼠伤寒沙门氏菌中效应蛋白 SipA 氨基末端 169 个氨基酸可与金黄色葡萄球菌抗原融合以实现转运,且这一过程会在小鼠体内引发免疫反应^[51]。这是首次针对金黄色葡萄球菌感染的减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗的研发。通过对细菌三型分泌系统分泌信号进行更加深入的研究,不但能够推进新型抗菌药物的研发,还可以促进这些应用的发展。

致谢:感谢厦门大学公共卫生学院研究生曾洁、程

谦、方鼎丽和郭沁园对文章撰写所提出的宝贵意见和建议。

REFERENCES

- [1] Shaulov LH, Gershberg J, Deng WY, et al. The ruler protein EscP of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system is involved in calcium sensing and secretion hierarchy regulation by interacting with the gatekeeper protein SepL[J]. mBio, 2017, 8(1): e01733-16
- [2] Badea L, Beatson SA, Kaparakis M, et al. Secretion of flagellin by the LEE-encoded type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 30
- [3] Kimura K, Iwatsuki M, Nagai T, et al. A small-molecule inhibitor of the bacterial type III secretion system protects against *in vivo* infection with *Citrobacter rodentium*[J]. The Journal of Antibiotics, 2011, 64(2): 197-203
- [4] Tree JJ, Wang D, McInally C, et al. Characterization of the effects of salicylidene acylhydrazide compounds on type III secretion in *Escherichia coli* O157:H7[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(10): 4209-4220
- [5] Givaudan A, Lanois A. Flagellar regulation and virulence in the entomopathogenic bacteria — *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*[A]//French-Constant R. The Molecular Biology of Photorhabdus Bacteria[M]. Cham: Springer, 2016, 402: 39-51
- [6] Furukawa Y, Inoue Y, Sakaguchi A, et al. Structural stability of flagellin subunit affects the rate of flagellin export in the absence of FlhS chaperone[J]. Molecular Microbiology, 2016, 102(3): 405-416
- [7] Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy[J]. Nature, 2003, 424(6949): 643-650
- [8] Abby SS, Cury J, Guglielmini J, et al. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23080
- [9] Delahay RM, Knutton S, Shaw RK, et al. The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(50): 35969-35974
- [10] Gaytán MO, Martínez-Santos VI, Soto E, et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 129
- [11] Daniell SJ, Kocsis E, Morris E, et al. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(2): 301-308
- [12] Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(26): 9247-9252
- [13] Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. *Salmonella* SPI-2 type III secretion system effectors: Molecular mechanisms and physiological consequences[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 22(2): 217-231
- [14] Deng WY, Yu HB, Li YL, et al. SepD/SepL-dependent secretion signals of the type III secretion system translocator proteins in enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(7): 1263-1275
- [15] Deng WY, Li YL, Hardwidge PR, et al. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens[J]. Infection and Immunity, 2005, 74(3): 2135-2146
- [16] Tomalka AG, Stopford CM, Lee PC, et al. A translocator-specific export signal establishes the translocator-effector secretion hierarchy that is important for type III secretion system function[J]. Molecular Microbiology, 2012, 86(6): 1464-1481
- [17] Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, et al. The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function[J]. Cell Host & Microbe, 2007, 2(6): 383-392
- [18] Munera D, Crepin VF, Marches O, et al. N-terminal type III secretion signal of enteropathogenic *Escherichia coli* translocator proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(13): 3534-3539
- [19] Amer AAA, Åhlund MK, Bröms JE, et al. Impact of the N-terminal secretor domain on YopD translocator function in *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(23): 6683-6700
- [20] Evdokimov AG, Tropea JE, Routzahn KM, et al. Structure of the N-terminal domain of *Yersinia pestis* YopH at 2.0 Å resolution[J]. Acta Crystallographica Section D-Structural Biology, 2001, 57: 793-799
- [21] Wong ARC, Pearson JS, Bright MD, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements[J]. Molecular Microbiology, 2011, 80(6): 1420-1438
- [22] Katsowich N, Elbaz N, Pal RR, et al. Host cell attachment elicits posttranscriptional regulation in infecting enteropathogenic bacteria[J]. Science, 2017, 355(6326): 735-739
- [23] Ince D, Sutterwala FS, Yahr TL. Secretion of flagellar proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion-injectisome system[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(12): 2003-2011
- [24] Younis R, Bingle LEH, Rollauer S, et al. SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(22): 6093-6098
- [25] Wang D, Roe AJ, McAteer S, et al. Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from *Escherichia coli* O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir[J]. Molecular Microbiology, 2008, 69(6): 1499-1512
- [26] Wei CW, Zheng M. Secretion of *E. coli* virulence factors[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2000, 34(6): 38-43 (in Chinese)
魏财文, 郑明. 大肠杆菌毒力因子的分泌[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(6): 38-43
- [27] Cheng LW, Anderson DM, Schneewind O. Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(4): 757-765
- [28] Lilic M, Vujanac M, Stebbins CE. A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones[J]. Molecular Cell, 2006, 21(5): 653-664
- [29] Birtalan SC, Phillips RM, Ghosh P. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens[J]. Molecular Cell, 2002, 9(5): 971-980
- [30] Letzelter M, Sorg I, Mota LJ, et al. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector

- chaperones[J]. The EMBO Journal, 2006, 25(13): 3223-3233
- [31] Niemann GS, Brown RN, Mushamiri IT, et al. RNA type III secretion signals that require Hfq[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(10): 2119-2125
- [32] Majander K, Anton L, Antikainen J, et al. Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(4): 475-481
- [33] Anderson DM, Fouts DE, Collmer A, et al. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(22): 12839-12843
- [34] Anderson DM, Schneewind O. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*[J]. Science, 1997, 278(5340): 1140-1143
- [35] Mudgett MB, Chesnokova O, Dahlbeck D, et al. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(24): 13324-13329
- [36] Ramamurthi KS, Schneewind O. *Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons[J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(4): 1189-1198
- [37] Büttner D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012, 76(2): 262-310
- [38] Karavolos MH, Wilson M, Henderson J, et al. Type III secretion of the *Salmonella* effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(5): 1559-1567
- [39] Rüssmann H, Kubori T, Sauer J, et al. Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(3): 769-779
- [40] Lee SH, Galán JE. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(2): 483-495
- [41] Lloyd SA, Norman M, Rosqvist R, et al. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals[J]. Molecular Microbiology, 2001, 39(2): 520-531
- [42] Lloyd SA, Sjöström M, Andersson S, et al. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(1): 51-59
- [43] Guttman DS, Vinatzer BA, Sarkar SF, et al. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*[J]. Science, 2002, 295(5560): 1722-1726
- [44] Dasanayake D, Richaud M, Cyr N, et al. The N-terminal amphipathic region of the *Escherichia coli* type III secretion system protein EspD is required for membrane insertion and function[J]. Molecular Microbiology, 2011, 81(3): 734-750
- [45] Guttman C, Davidov G, Shaked H, et al. Characterization of the N-terminal domain of BteA: a *Bordetella* type III secreted cytotoxic effector[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e55650
- [46] French CT, Panina EM, Yeh SH, et al. The *Bordetella* type III secretion system effector BteA contains a conserved N-terminal motif that guides bacterial virulence factors to lipid rafts[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11(12): 1735-1749
- [47] Gazi AD, Charova SN, Panopoulos NJ, et al. Coiled-coils in type III secretion systems: structural flexibility, disorder and biological implications[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11(5): 719-729
- [48] Wagner S, Grin I, Malmshemer S, et al. Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(19): fny201
- [49] Schechter LM, Valenta JC, Schneider DJ, et al. Functional and computational analysis of amino acid patterns predictive of type III secretion system substrates in *Pseudomonas syringae*[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36038
- [50] Login FH, Wolf-Watz H. YscU/FlhB of *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a C-terminal type III secretion signal[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(43): 26282-26291
- [51] Xu C, Zhang BZ, Lin QB, et al. Live attenuated *Salmonella* typhimurium vaccines delivering SaEsxA and SaEsxB via type III secretion system confer protection against *Staphylococcus aureus* infection[J]. BMC Infectious Diseases, 2018, 18: 195