



研究报告

霍乱弧菌VI型分泌系统的效应蛋白对细菌细胞壁的降解机制

王增航 董涛*

上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240

摘要:【背景】肽聚糖(Peptidoglycan, PG)是细菌细胞壁的重要组成部分,而霍乱弧菌VI型分泌系统(Type VI Secretion System, T6SS)可以分泌具有肽聚糖水解酶活性的效应蛋白到受体细菌中杀死细胞,这类水解酶的作用机制尚未研究清楚。【目的】通过对细菌细胞壁的PG成分进行研究,建立细胞壁PG成分分析方法,并对霍乱弧菌T6SS分泌的2个破坏细胞壁的效应蛋白TseH和VgrG3的作用机制进行解析。【方法】使用显微镜观察TseH和VgrG3异位表达对宿主细菌生长的影响;纯化大肠杆菌细胞壁,使用透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM)观察提纯的细胞壁形态;使用纯化的TseH和VgrG3分解消化PG,利用超高效液相色谱-飞行时间质谱(Ultra-Performance Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry, UPLC-TOFMS)分析鉴定消化后的产物成分;通过分析结果推导结构。【结果】通过透射电子显微镜观察,发现提纯的PG呈现半透明的薄膜泡状;通过UPLC-TOFMS的分析以及逆向推导,得到了提纯的PG被VgrG3水解酶降解之后的3种主要产物,分别是二糖二肽(Disaccharide, Di)、二糖三肽(Disaccharide Tripeptide, Tri)和二糖四肽(Disaccharide Tetrapeptide, Tetra)。【结论】建立了提纯PG和UPLC-TOFMS分析PG成分的方法,揭示了效应蛋白VgrG3而非TseH可以降解PG多糖链N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的 $\beta(1-4)$ 糖苷键的功能。由于攻击细胞壁的效应蛋白在革兰氏阴性细菌中广泛存在,本研究不仅为鉴定这类重要效应蛋白的功能提供了有效的方法,而且对研究靶向细胞壁的新型抗生素也有重要的指导作用。

关键词: 细菌细胞壁, 肽聚糖, VI型分泌系统(T6SS), TseH, VgrG3

Bacterial cell wall degradation by type VI secretion system effector proteins in *Vibrio cholerae*

WANG Zenghang DONG Tao*

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Peptidoglycan (PG) is an important component of the bacterial cell wall. The type VI secretion system (T6SS) can secrete effectors with peptidoglycan hydrolase activities into a neighbor bacterial cell to kill the recipient. However, the enzymatic functions of these effectors have not been fully characterized due to the technical challenges in PG analysis. [Objective] We aim to establish an

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31770082)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34205709; E-mail: tdong@sjtu.edu.cn

Received: 26-05-2020; **Accepted:** 07-07-2020; **Published online:** 29-07-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31770082)

*通信作者: Tel: 021-34205709; E-mail: tdong@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-26; **接受日期:** 2020-07-07; **网络首发日期:** 2020-07-29

analytical method using liquid chromatography and mass spectrometry to qualitatively determine the PG-hydrolyzing activities of two *Vibrio cholerae* effectors TseH and VgrG3. **[Methods]** The antibacterial effects of TseH and VgrG3 were determined by survival assays and microscopy analysis when ectopically expressed in *Escherichia coli*. Peptidoglycan was purified from *E. coli*, and morphologically characterized by transmission electron microscopy (TEM). The ultra-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOFMS) was used to identify the products of peptidoglycan from digestion by TseH or VgrG3. **[Results]** TEM micrograph showed that the purified peptidoglycan is translucent. Using UPLC-TOFMS to analyze VgrG3-treated PG, we identified three products including disaccharide dipeptide (Di), disaccharide tripeptide (Tri), and disaccharide tetrapeptide (Tetra). **[Conclusion]** VgrG3, rather than TseH, can digest the $\beta(1-4)$ covalent bond between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid. The established method could facilitate the characterization of other cell-wall targeting antibacterial effectors and chemical compounds.

Keywords: bacterial cell wall, peptidoglycan, type VI secretion system (T6SS), TseH, VgrG3

细菌细胞壁对于细菌的形态维持有着重要的支持作用,同时,其可以作为基质锚定一些蛋白质和脂多糖,从而行使一些重要的生物学功能^[1]。肽聚糖(Peptidoglycan, PG)是大多数细菌细胞壁中都存在的重要结构成分^[1]。PG的一般化学结构在所有细菌种类中都相同,并且由多糖链形成的聚糖骨架组成,该多糖链由通过 $\beta(1-4)$ 糖苷键连接的N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸的重复二糖单元组成^[2-3]。二糖单元与短肽连接,聚合并交联以形成包裹细胞的连续网络结构^[3-4]。在大肠杆菌和其他大多数革兰氏阴性细菌中,该短肽的氨基酸顺序为l-Ala-d-Glu-m-Dap-d-Ala-d-Ala (m-Dap, meso-Diaminopimelic acid),其中相邻的两条多糖链可以通过短肽第3位m-Dap的 ϵ -氨基与另一条短肽第4位d-Ala的羧基交联^[2,5],从而形成交织的网状结构。

细胞壁在维持细菌细胞形态的同时,还起到抵抗细菌内部渗透压以及抵御外源裂解酶侵害的作用^[6-7]。由于细胞壁对细菌的生长和存活至关重要,因此是抗生素的主要作用靶标^[8]。例如,青霉素和其他 β -内酰胺类(如碳青霉烯类和头孢菌素类)抗生素就是通过抑制细菌复制期间PG的合成来发挥抗菌作用^[9]。因此,研究细胞壁成分对理解抗生素分子的作用机制十分重要。

在革兰氏阴性细菌中,跨越细菌包膜的蛋白质运输具有很大的挑战性,因为蛋白质必须穿过至少3个屏障:外膜、PG层和内膜^[10]。近年来,国内外

对VI型分泌系统(Type VI Secretion System, T6SS)的研究发现,T6SS可以跨过细胞壁将其Hcp (Haemolysin Co-Regulated Protein)内管、由VgrG (Valine-Glycine Repeat Protein G)和PAAR (Proline-Alanine-Alanine-Arginine)蛋白组成的尖端复合物以及毒性效应蛋白注射到临近的细胞中^[11-15]。因此,T6SS作为一种细菌武器,能够穿透受体细菌的细胞膜和细胞壁将毒性效应蛋白注射到相邻的细胞中^[12-13,16]。该分泌系统可以通过分泌具有肽聚糖水解酶活性的效应蛋白到相邻细菌中,从而引起相邻细菌细胞壁的降解,导致细菌死亡^[7,17-18]。通过T6SS分泌的毒性效应蛋白都有其对应的免疫蛋白的存在,后者通过蛋白间直接结合中和效应蛋白的毒性来防止受到同种细菌伤害^[14,18-19]。除此之外,细菌为了防御T6SS的攻击,还有其他非特异性的防御手段,例如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)可以通过产生可分泌的胞外多糖,在供体和受体之间建立屏障,以限制T6SS的杀伤和修复细菌的应激反应系统对效应蛋白造成的损伤^[20-22]。另外,革兰氏阳性细菌中的PG层可作为物理屏障来防御革兰氏阴性竞争对手的T6SS攻击^[20]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)还可以通过感知来源于外界的T6SS的攻击,进而利用自身T6SS对其进行反击^[23]。

近年来,针对靶向PG的水解酶作用位点和分泌途径的研究在国内外有着相当高的热度。例如在

铜绿假单胞菌中, 已经鉴定出多种具有肽聚糖水解酶活性的 T6SS 效应蛋白, 其中 Tse1 和 Tse3 分别具有肽聚糖酰胺酶和肽聚糖水解酶活性^[7]。Tse1 作用于 PG 上短肽第 2 位 d-Glu 和第 3 位 *m*-Dap 之间的酰胺键, 而 Tse3 作用于 PG 多糖链上的 β (1-4)糖苷键, 并且两者都可以通过 T6SS 进入到受体细菌中导致其死亡^[7,24]。AmpDh3 是铜绿假单胞菌中的一种周质锌蛋白, 与细胞壁重塑密切相关^[25]。AmpDh3 通过 H2-T6SS 进入受体细胞, 其在 PG 上的作用位点不同于 Tse1 以及 Tse3, 而是 PG 的双糖单位与短肽之间的酰胺键^[26]。最近的报道中, 霍乱弧菌 T6SS 的分泌蛋白 TseH 也是靶向受体细菌细胞壁的毒性蛋白, 当其在宿主细菌周质空间表达时显示出对宿主的毒性, 但其具体作用位点尚未完全明确^[27-29]。霍乱弧菌中另一 T6SS 效应蛋白 VgrG3 是具有肽聚糖结合区域的 T6SS 结构蛋白, 可以降解革兰氏阴性菌细胞壁^[18,30]。本研究建立在对 PG 成分分析的基础上, 对这 2 种毒性效应蛋白 TseH 和 VgrG3 进行研究, 旨在分析这 2 种蛋白的具体作用位点, 并建立 PG 成分分析的方法, 以期后续研究细菌 PG 的损伤和损伤后的修复机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养方法

实验所使用的菌株以及质粒如表 1 所示。细菌于 37 °C 环境培养; 所用 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 13.0 (固体培养基)。培养基于 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 之后使用, 若无特殊说明, 卡那霉素的使用浓度均为 50 μg/mL。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白纯化所用磷酸缓冲液为: Buffer 0: 磷酸氢二钠 50 mmol/L, 氯化钠 300 mmol/L, pH 8.0; Buffer 1: 磷酸氢二钠 50 mmol/L, 氯化钠 300 mmol/L, 咪唑 10 mmol/L, pH 8.0; Buffer 2: 磷酸氢二钠 50 mmol/L, 氯化钠 300 mmol/L, 咪唑 40 mmol/L, pH 8.0; Buffer 3: 磷酸氢二钠 50 mmol/L, 氯化钠 300 mmol/L, 咪唑 100 mmol/L, pH 8.0; Buffer 4: 磷酸氢二钠 50 mmol/L, 氯化钠 300 mmol/L, 咪唑 250 mmol/L, pH 8.0; Buffer 5: 磷酸氢二钠 50 mmol/L, 氯化钠 300 mmol/L, 咪唑 400 mmol/L, pH 8.0。

TransStart[®] *TopTaq* 酶, 北京全式金生物技术有限公司; Gibson 组装试剂盒, NEB 公司; 溶菌酶 (Lysozyme), 生工生物工程(上海)股份有限公司。显微镜, 尼康公司; 生物型透射电镜, Thermo Fisher

表 1 实验所用菌株以及质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	描述 Description	来源 Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> T-Fast	Used for plasmids construction	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Used for proteins purification and toxicity verification <i>in vivo</i>	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Used for peptidoglycan purification	Lab stock
Plasmids		
pETSUMO-TseH	Used for TseH expression with a N-terminal 6×His epitope tag in SUMO-tag	This study
pET-28a-VgrG3	Used for VgrG3 expression with a N-terminal 6×His epitope tag	This study
pETSUMO-VgrG3 ^C	Used for VgrG3 ^C expression with a N-terminal 6×His epitope tag in SUMO-tag	This study
pSF1877-scUlp1	Used for SUMO-specific protease Ulp1 (scUlp1) purification	[31]

Scientific 公司; 超高效液相色谱-飞行时间质谱, Agilent Technologies 公司。

1.3 *E. coli* MG1655 细胞壁肽聚糖分离

PG 的分离方法参照文献[32]。将 *E. coli* MG1655 接种到 10 mL 新鲜液体 LB 中, 然后 37 °C、200 r/min 培养 8 h。取 2 mL 菌液将其接种于 2 L 新鲜 LB 中, 在 37 °C 下培养 8 h, 4 °C、3 000×g 离心 30 min 收集细胞。用超纯水洗涤细胞一次, 然后将沉淀重悬至 OD₆₀₀ 为 70, 在缓慢搅拌条件下逐滴加入至等体积沸腾的 8% SDS 溶液中, 过程中保持混合物沸腾状态。将混合物缓慢搅拌并继续煮沸 3 h, 然后室温冷却, 于 20 °C、100 000×g 离心 1 h 收集粗产物 PG 沉淀。用无菌超纯水洗涤 4 次以上除去 SDS, 每次 20 °C、100 000×g 离心 1 h 收集沉淀。将最终产物重悬于 10 mL pH 7.0 的 10 mmol/L Tris-HCl 中, 并加入 5 mg DNase I 和 16 mg 胰蛋白酶, 然后在 37 °C 下孵育 16 h。混合物于室温、100 000×g 离心 1 h 之后, 用 20 mL 无菌超纯水将沉淀重悬, 再次用等体积的 8% SDS 溶液煮沸并再次去除 SDS。终产物 PG 用无菌超纯水重悬至终浓度 20 mg/mL。

1.4 肽聚糖水解酶纯化

vgrG3 和 *vgrG3^C* 基因以铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 进行扩增; pET-28a 和 pETSUMO 载体片段分别以 pET-28a 和 pETSUMO 质粒为模板, 通过 PCR 进行扩增。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成(表 2)。PCR 反应体系

(50 μL): ddH₂O 37 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 1 μL, 细菌基因组 DNA 1 μL 或者质粒 DNA (1 mmol/L) 1 μL, *TransStart[®] TopTaq* 酶(2.5 U/μL) 1 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 10×*TransStart[®] TopTaq* Buffer 5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 3 min; 12 °C 保存。PCR 扩增片段通过 Gibson 组装的方式连接到 pET-28a 或者 pETSUMO 载体质粒上, 然后导入到 *E. coli* T-Fast 和 BL21(DE3)感受态细胞中用于验证、扩增和下一步的实验。

将导入重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3)菌株接种在含有卡那霉素的 LB 平板上, 并在 37 °C 培养箱中培养过夜。在平板上生长的细菌接种至 10 mL LB 中孵育 3 h, 然后转接至 2 L 新鲜 LB 中。在培养物 OD₆₀₀ 为 0.6 以上时, 将 IPTG 加入培养物中至终浓度为 1 mmol/L, 并在 20 °C 培养箱中诱导 16 h。诱导后的细菌通过 4 °C、2 500×g 离心 10 min 收集, 重悬于 20 mL Buffer 1 中, 使用超声破碎仪在 240 W 功率下破碎 20 min (工作 7 s, 间隔 5 s)。破碎产物在 4 °C 环境下 10 000×g 离心 10 min, 收集上清, 使用镍离子金属螯合亲和层析柱收集目的蛋白, 依次使用 Buffer 2、Buffer 3、Buffer 4 洗涤并收集目的蛋白, 最后使用 Buffer 5 冲洗层析柱。收集的蛋白封装于半透膜袋中, 在 Buffer 0 中进行脱盐, 最后使用超滤离心管浓缩至 10 mg/mL。以上蛋白纯化步骤均在 4 °C 环境下进行。

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in the experiment

引物名称	序列
Primers name	Sequence (5'→3')
pET28a-VgrG3-hifi-F	AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGCAAGGTTACAGTTTCAATTAAAGGTG
pET28a-VgrG3-hifi-R	TTGTCGACGGAGCTCGAATTCCATTTTATATCAACCTCCAAACCGTCAATTC
pET28a-hifi-F	TGGAATTCGAGCTCCGTCGACAA
pET28a-hifi-R	GGATCCGCGACCCATTGTCT
pETSUMO-hifi-F	CTCGAGGTCGACAGACAAGCTTAGGT
pETSUMO-hifi-R	GGATCCACCACCAATCTGTTCTCTGTG
pETSUMO-VgrG3 ^C -F	CACAGAGAACAGATTGGTGGTGGATCCCTCAAACCATCCGATGAGTTAGAGAACTC
pETSUMO-VgrG3 ^C -R	ACCTAAGCTTGCTGTGTCGACCTCGAGTCATTTTATATCAACCTCCAAACCGTCAAT

对于 TseH 效应蛋白的纯化,使用纯化脱盐后的 scUlp1 蛋白与 SUMO-TseH 蛋白按质量比 1:50 混合,并在室温下孵育 30 min,使用镍离子金属螯合亲和层析柱去除带有组氨酸标签的 scUlp1 蛋白、SUMO-tag 以及未被切除标签的 SUMO-TseH 蛋白,收集流出液中未带组氨酸标签的 TseH 蛋白。

1.5 显微镜观察肽聚糖水解酶体内毒性

将导入重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3)菌株接种在含有卡那霉素的 LB 平板上,并在 37 °C 培养箱中培养过夜。在平板上生长的细菌挑单菌落接种至 2 mL LB 中,37 °C 生长至 OD_{600} 为 1.0,平均分成 2 管,常温下 2 500×g 离心浓缩至 OD_{600} 为 5.0,分别使用含有或者不含有 1 mmol/L IPTG 的新鲜 LB 重悬,取 2 μ L 滴在含有或者不含有 1 mmol/L IPTG 的琼脂糖胶层上,将其置于干净无尘的载玻片上并盖上盖玻片,使用显微镜的 DIC 明场观察宿主在时间轴上的变化。

1.6 细胞壁肽聚糖形态观察

提取纯化的 PG 样品用无菌超纯水稀释至 0.1 mg/mL,振荡混匀,取 2 μ L 滴于电镜专用铜网之上,使其自然晾干。待铜网表面没有明显液体痕迹后,滴加 5 μ L 磷钨酸进行负染,1 min 后将多余染液使用无尘吸水纸吸走,然后自然风干,使用透射电子显微镜进行观察。

1.7 肽聚糖水解酶体外消化 PG

将提纯的 PG 样品添加到含 0.1% Triton X-100 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中,使 OD_{600} 为 0.2。然后取 100 μ L PG 样品 4 份,分别添加 0.2 mg/mL GFP、溶菌酶、TseH,或者 0.02 mg/mL VgrG3 (每种蛋白溶液各 2.5 μ L),置于 37 °C 环境中振荡孵育,每 5 min 在 OD_{600} 处检测吸光度值。

1.8 UPLC-TOFMS 分析细胞壁肽聚糖降解产物

PG 用乙醇洗涤 2 次,并用无菌超纯水洗涤 4 次以上去除乙醇。由于 Tris 缓冲液体系会干扰

UPLC-TOFMS 仪器的检测,因此将 500 μ g PG 与 500 μ g 肽聚糖水解酶在缓冲液(50 mmol/L 磷酸氢二钠,300 mmol/L 氯化钠,pH 8.0)中混合,并在 37 °C 振荡孵育 2 h。将反应产物用等体积的甲醇溶解,在室温下 21 000×g 离心 20 min 收集上清溶液。这些产物的分析参照文献[33],通过 UPLC-TOFMS 在阳性模式下检测。UPLC-TOFMS 分析使用 ACE Eclipse C18 色谱柱,梯度条件为 1%缓冲液 B (100% 甲醇)和 99%缓冲液 A (超纯水,0.1% 甲酸),然后在 65 min 内梯度洗脱变化至 20%缓冲液 B,继续变化至 70%缓冲液 B 的梯度时间为 65 min,并保持此条件继续洗脱 10 min,最后变化至 1%缓冲液 B 的梯度时间为 1 min。

2 结果与分析

2.1 肽聚糖水解酶体内毒性

为了测定 2 种靶向 PG 的水解酶毒力水平,用 IPTG 诱导肽聚糖水解酶在 *E. coli* BL21(DE3)内表达并检测其对细胞的杀伤力。为了辅助 TseH 的表达,在其 N 端连接了增强可溶性的蛋白标签 SUMO (Small Ubiquitin-Related Modifier)。如图 1 所示,SUMO-TseH 在进行体内表达时并未显示其杀菌活性。野生型 VgrG3 以及其携带氨基酸序列 648–708 区域的 C 端截短突变体仍具有体内毒性^[34],因此选用该水解酶的野生型以及氨基酸序列 709–1 017 区域(VgrG3^C)的 2 种蛋白进行实验。为了辅助 VgrG3^C 蛋白的表达,在其 N 端连接了 SUMO 蛋白标签。VgrG3 在被诱导表达时对宿主细菌具有毒性,而 SUMO-VgrG3^C 具有比全长 VgrG3 蛋白稍弱的毒性(图 1)。显微镜下观察体内表达情况时,发现表达 VgrG3 和 SUMO-VgrG3^C 的细胞在被诱导后会破裂,未被诱导的宿主则正常生长;表达 TseH 的宿主在被诱导以及未被诱导情况下均能正常生长(图 2)。这些结果表明 VgrG3 在体内表达时能够表现出杀菌活性,并且在 C 末端区域可能具有未知的跨膜功能。

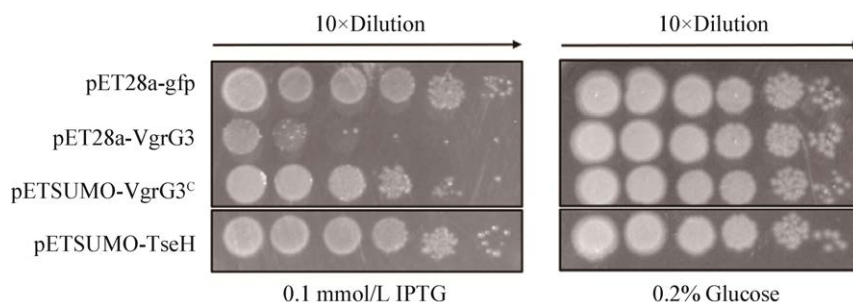


图1 T6SS效应蛋白VgrG3和TseH对*E. coli*的毒性

Figure 1 Survival of *E. coli* when VgrG3 or TseH was expressed

注：转入重组质粒的*E. coli* BL21(DE3)在不添加诱导剂的液体LB中37℃、200 r/min培养至 OD_{600} 为1.0，梯度稀释后取3 μ L滴至含有0.1 mmol/L IPTG或者0.2%葡萄糖的新鲜LB平板上，置于37℃恒温培养箱中培养12 h

Note: *E. coli* BL21(DE3) with plasmids expressing TseH, SUMO-VgrG3^c or VgrG3 were grown in liquid LB at 37℃, 200 r/min until OD_{600} =1.0. Survival was examined by serial dilution and plating on LB plates containing 0.1 mmol/L IPTG or 0.2% glucose, which were subsequently incubated at 37℃ for 12 h

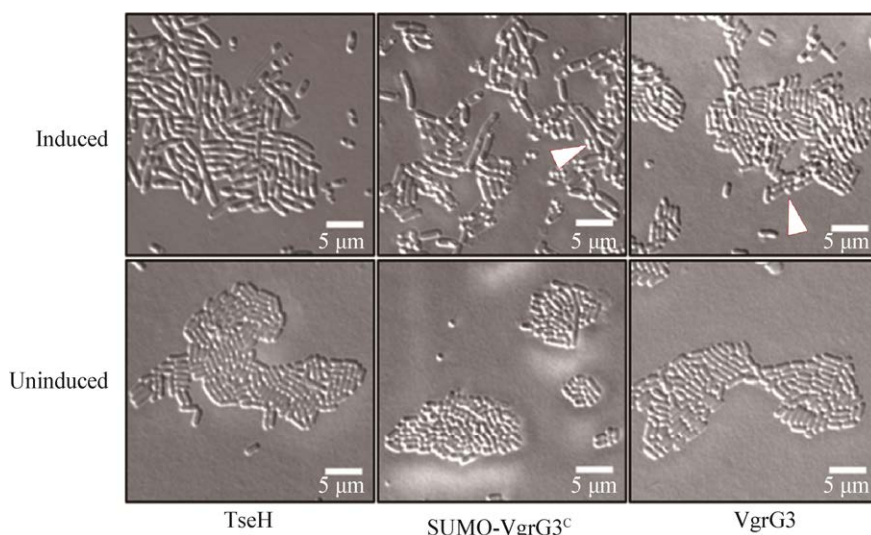


图2 体内表达VgrG3导致细菌死亡

Figure 2 Expression of VgrG3 *in vivo* causes bacterial death

注：使用显微镜观察转入重组质粒的*E. coli* BL21(DE3)的生长状态。箭头指示细菌破裂现象

Note: *E. coli* BL21(DE3) with plasmids expressing TseH, SUMO-VgrG3^c or VgrG3 were examined by microscopy. The arrow indicates bacterial death

2.2 肽聚糖水解酶体外活性

为了研究所选水解酶的体外活性，提纯了*E. coli* MG1655 PG进行进一步的实验。通过电子透射显微镜的观察，发现提纯的PG呈现半透明的薄膜泡状(图3)。VgrG3和TseH的纯化结果如

图4所示。由于VgrG3体内表达时对宿主细胞具有毒性，因此纯化蛋白产量较低。因此，选用大规模培养的方式来提高VgrG3蛋白的获得量，最终在500 mL细菌培养物中纯化得到了10 mg目标蛋白。SUMO-TseH在纯化并经scUlp1蛋白酶处

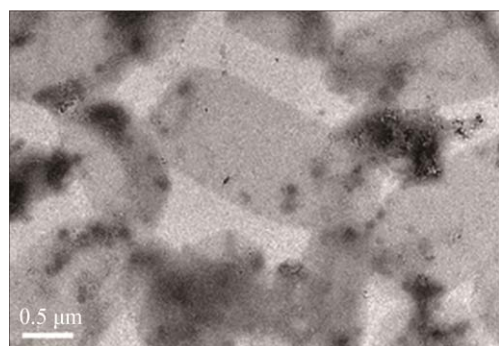


图3 透射电子显微镜下 *E. coli* MG1655 PG 形态
Figure 3 TEM imaging of purified *E. coli* MG1655 peptidoglycan

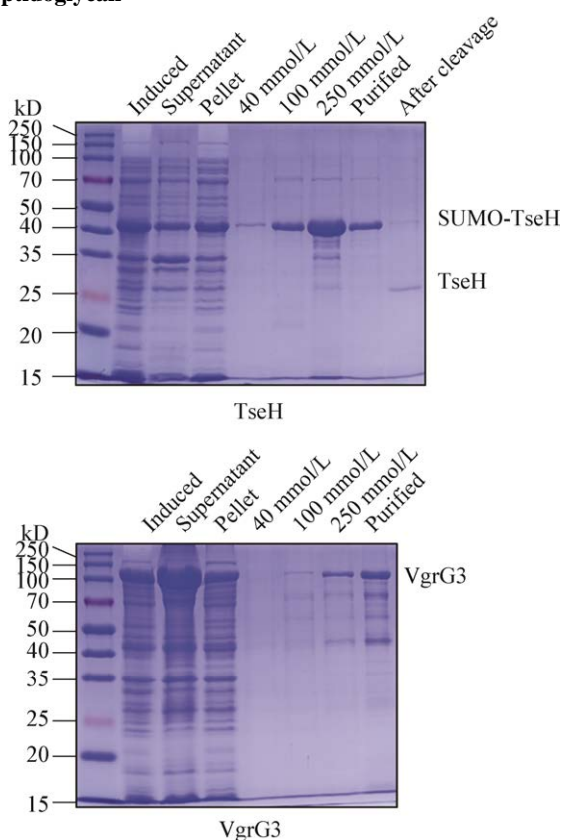


图4 两种效应蛋白 TseH 和 VgrG3 的纯化结果
Figure 4 Purification results of TseH and VgrG3

注: A: TseH 蛋白纯化结果; B: VgrG3 蛋白纯化结果。40、100、250 mmol/L 分别代表洗脱液中咪唑浓度; Purified 样品代表最终的纯化蛋白; After cleavage 样品代表所纯化的 SUMO-TseH 去掉 SUMO 蛋白标签之后的 TseH 样品。各样品上样量为 10 μ L
Note: A: Purification of TseH; B: Purification of VgrG3. The lanes named 40, 100 and 250 mmol/L represent the concentration of imidazole used in the elution buffers. "Purified" represents the final purified protein. The lane named "After cleavage" represents the TseH protein after the removal of the SUMO tag. Each lane was loaded with 10 μ L of sample

理去除 SUMO 标签后, 从 100 mL 细菌培养物纯化得到了 2 mg 目标蛋白。由于肽聚糖水解酶可以将不溶的大分子 PG 降解成小分子的可溶片段, 将提纯的 PG 与提纯的水解酶以及溶菌酶进行体外共孵育, 并通过检测 OD_{600} 的光密度值变化发现, 溶菌酶和 VgrG3 这 2 种水解酶可以大幅度降低混合物的光密度值, 而 TseH 所处理的样品并未有明显的光密度值变化(图 5)。这些结果表明, 与商品化的溶菌酶类似, VgrG3 可以有效地在体外降解消化提纯的 PG, 并且具有更高的体外活性。相反, TseH 不具备体外 PG 降解活性。

2.3 细胞壁肽聚糖层成分分析

细胞壁 PG 骨架主要是以交替排列的糖链与其上连接的短肽链组成。为了进一步分析几种水解酶的作用位点以及 PG 的构成成分, 使用溶菌酶和 VgrG3 对分离纯化得到的薄膜泡状 *E. coli* MG1655 PG 进行体外的消化水解, 并对消化水解的产物进行分析。实验中发现 PG 消化水解的产物中有很多不能溶解的成分, 但本研究只对可溶解的产物进行了进一步的分析鉴定。因为 TseH 没有造成明显的细胞壁水解(图 5), 无法得到可溶解的产物进行下一步分析, 因此聚焦于 VgrG3 对 PG 降解产物的分析。通过 UPLC-TOFMS 的分析结果鉴定出 PG 消化后的产物中有 3 种主要成分: 二糖二肽(Disaccharide Dipeptide, Di)、二糖三肽(Disaccharide Tripeptide, Tri)和二糖四肽(Disaccharide Tetrapeptide,

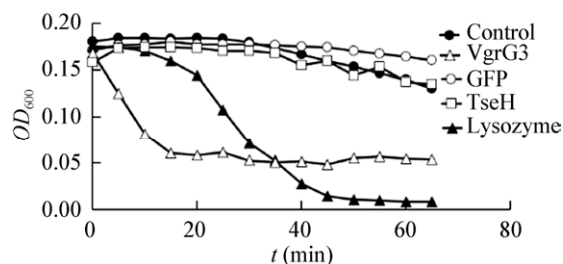


图5 肽聚糖水解酶体外消化 PG

Figure 5 PG digested by peptidoglycan hydrolase *in vitro*

注: 100 μ L OD_{600} 为 0.2 的 PG 悬浮液分别添加 0.2 mg/mL GFP、溶菌酶或 TseH 或者 0.02 mg/mL VgrG3 (每种蛋白溶液各 2.5 μ L), 每隔 5 min 测定其在 600 nm 处的光密度值

Note: 2.5 μ L of 0.2 mg/mL GFP, lysozyme, TseH or 0.02 mg/mL VgrG3 was added into 100 μ L of PG suspension ($OD_{600}=0.2$), respectively. And the optical density at 600 nm was measured every 5 min

Tetra) (图 6A)。通过对 MASS 的检测结果分析得到这 3 种化合物成分所对应的分子质量,并由此推测出该 3 种化合物的化学结构式(图 6B–6D)。详细的数据见表 3。UPLC-TOFMS 的结果表明,这 3 种糖肽是构成 PG 的重要成分。因此,我们推测效应蛋白 VgrG3 通过水解 PG 多糖链上双糖单位之间的 $\beta(1-4)$ 糖苷键来降解 PG,使其成为小分子的可溶性片段。

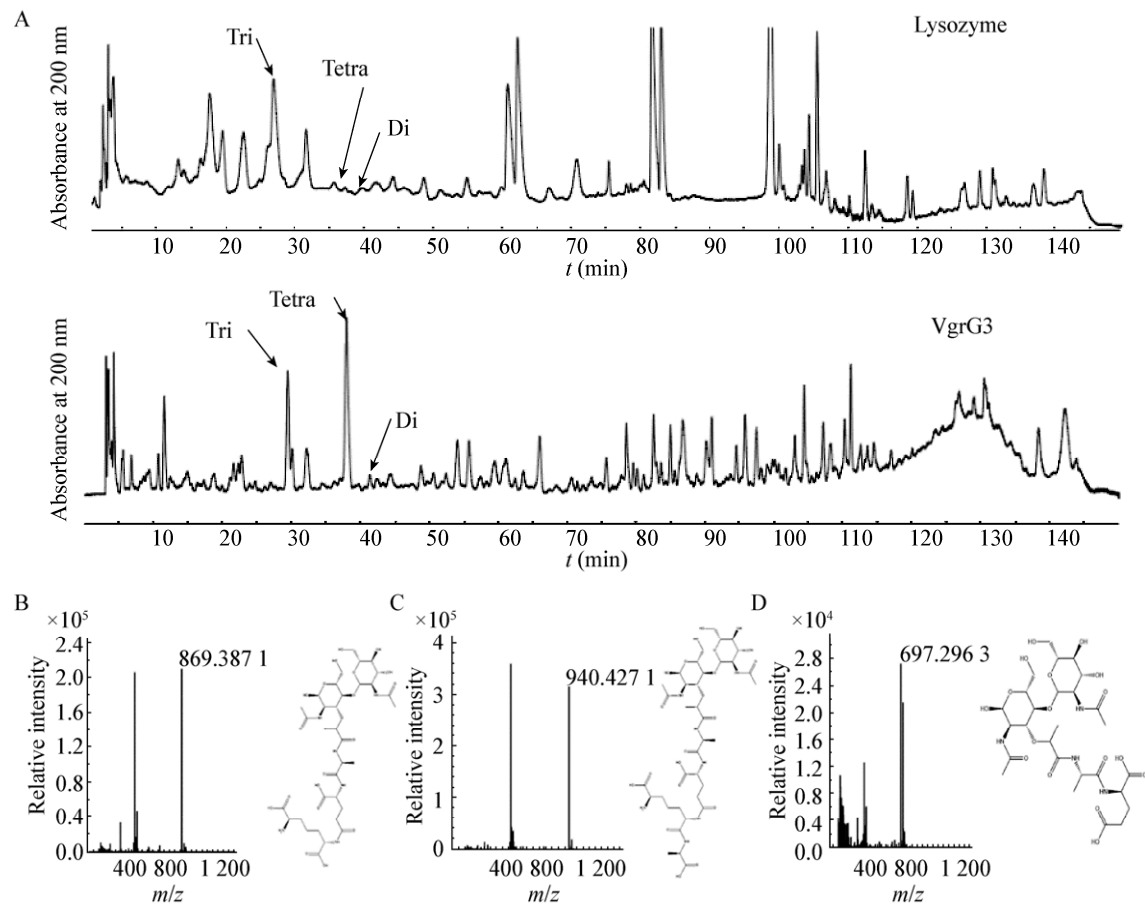


图 6 UPLC-TOFMS 分析 PG 消化产物结果
Figure 6 UPLC-TOFMS analysis of PG digestion

注：A：PG 被水解酶消化后可溶产物的 UPLC 分析，Tri：二糖三肽；Tetra：二糖四肽；Di：二糖二肽。B：通过电喷雾电离质谱法检测到的 Tri 的质量和推测的结构式。C：通过电喷雾电离质谱法检测 Tetra 的质量和推测的结构式。D：通过电喷雾电离质谱法检测 Di 的质量和推测的结构式

Note: A: The UPLC analysis of the soluble products after PG digestion. Tri: Disaccharide tripeptide; Tetra: Disaccharide tetrapeptide; Di: Disaccharide dipeptide. B: Mass of Tri detected by electrospray ionization mass spectrometry and predicted structural formula. C: Mass of Tetra detected by electrospray ionization mass spectrometry and predicted structural formula. D: Mass of Di detected by electrospray ionization mass spectrometry and predicted structural formula

表 3 经 UPLC-TOFMS 检测得到的 PG 消化后产物
Table 3 Products detected in UPLC-TOFMS after PG digestion

结构	化学式	保留时间	绝对质量	理论检测质量	实际检测质量
Structure	Chemical formula	Retention time (min)	Exact mass (Da)	Calculated (m/z)	Measured (m/z)
Tri	$C_{34}H_{56}N_6O_{20}$	29.4	868.354 9	869.362 2	869.387 1
Tetra	$C_{37}H_{61}N_7O_{21}$	37.9	939.392 1	940.399 3	940.427 1
Di	$C_{27}H_{44}N_4O_{17}$	41.3	696.270 2	697.277 4	697.296 3

3 讨论与结论

VI 型分泌系统(T6SS)作为一种在革兰氏阴性菌中常见的分泌体系和细菌武器,可以通过其分泌的肽聚糖降解酶打破细菌细胞壁的屏障,致使受体细菌死亡。这一类溶菌酶到达受体细菌的周质空间后,可以靶向 PG 并且将其水解成可溶的小分子片段,导致细菌细胞壁骨架结构的裂解。本文探讨了 2 个 T6SS 效应蛋白 TseH 和 VgrG3 的作用机制,表明效应蛋白 VgrG3 可以有效降解 PG,其作用位点是多糖链的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 $\beta(1-4)$ 糖苷键。本文还通过分析降解产物对 PG 的结构进行了合理的推测。

来源于霍乱弧菌中的 T6SS 结构蛋白 VgrG3 表现出对 PG 的体外降解活性。在之前的报道中,VgrG3 体内表达的毒性是由其携带的氨基酸序列 648–708 区域跨膜结构域决定的^[34]。然而本文发现,没有携带氨基酸序列 648–708 区域的 C 端截短突变体仍然表现出了较弱的体内表达的毒性,表明在 VgrG3 的毒性区域端可能具有未知的跨膜功能。虽然霍乱弧菌的效应蛋白 TseH 在细菌周质空间内表达时对细胞壁有破坏作用并且其结构与 NlpC/P60-家族内肽酶类似^[35],但是在本文研究中 TseH 没有表现出水解纯化的细胞壁的体外活性。其中一个原因可能是体外实验中缺少一个未知的辅助因子,因此该蛋白的具体作用机理有待更进一步的研究。

关于细胞壁结构的相关报道已经阐明,PG 骨架的结构由 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸组成的重复二糖单元构成,多糖链之间通过连接在 N-乙酰胞壁酸上的多肽链相互交联形成稳定的网状结构。在本研究中,我们鉴定出 PG 的降解产物中主要成分是 3 种糖肽,这表明 PG 网状的骨架结构中存在许多未交联的多肽,相关报道^[36]表明这可能与细菌对 NaCl 的敏感性有关。

综上所述,本研究建立了细胞壁 PG 的成分分析方法,揭示了靶向肽聚糖多糖链的 T6SS 效应蛋白 VgrG3 的作用位点,并表明 PG 的结构成分中存在一些未交联的多肽链。本研究的结果将有助于理

解 T6SS 的杀菌机制及细菌细胞壁的结构组成,为后续研究细胞壁相关抗生素的作用机制提供一种可行的分析方法。同时,与商业化的溶菌酶相比,VgrG3 体现出了高效降解 PG 的活性,说明 VgrG3 和其他类似的效应蛋白也具有广阔的应用潜力。

REFERENCES

- [1] Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 149-167
- [2] Tong G, Pan Y, Dong H, Pryor R, Wilson GE, Schaefer J. Structure and dynamics of pentaglycyl bridges in the cell walls of *Staphylococcus aureus* by ^{13}C - ^{15}N REDOR NMR[J]. Biochemistry, 1997, 36(32): 9859-9866
- [3] Braun V. Bacterial cell wall research in Tübingen: A brief historical account[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2015, 305(2): 178-182
- [4] Turner RD, Vollmer W, Foster SJ. Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan[J]. Molecular Microbiology, 2014, 91(5): 862-874
- [5] Egan AJF, Biboy J, van't Veer I, Breukink E, Vollmer W. Activities and regulation of peptidoglycan synthases[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences, 2015, 370(1679): 20150013
- [6] Wang TY, Ding JJ, Zhang Y, Wang DC, Liu W. Complex structure of type VI peptidoglycan muramidase effector and a cognate immunity protein[J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2013, 69: 1889-1900
- [7] Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells[J]. Nature, 2011, 475(7356): 343-347
- [8] Romaniuk JAH, Cegelski L. Bacterial cell wall composition and the influence of antibiotics by cell-wall and whole-cell NMR[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2015, 370(1679): 20150024
- [9] Botella H, Yang GL, Ouerfelli O, Ehrh S, Nathan CF, Vaubourgeix J. Distinct spatiotemporal dynamics of peptidoglycan synthesis between *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*[J]. mBio, 2017, 8(5): e01183-17
- [10] Geiger T, Pazos M, Lara-Tejero M, Vollmer W, Galán JE. Peptidoglycan editing by a specific LD-transpeptidase controls the muramidase-dependent secretion of typhoid toxin[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(11): 1243-1254
- [11] Burkinshaw BJ, Liang XY, Wong M, Le ANH, Lam L, Dong TG. A type VI secretion system effector delivery mechanism dependent on PAAR and a chaperone-co-chaperone complex[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(5): 632-640
- [12] Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio*

- cholerae* using the *Dictyostelium* host model system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(5): 1528-1533
- [13] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus[J]. Science, 2006, 312(5779): 1526-1530
- [14] Hood RD, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl MA, Trinidad RRS, Silverman JM, Ohlson BB, Hicks KG, Plemel RL, et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria[J]. Cell Host & Microbe, 2010, 7(1): 25-37
- [15] Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the Type VI secretion system spike[J]. Nature, 2013, 500(7462): 350-353
- [16] Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(2): 137-148
- [17] Ma JL, Sun M, Pan ZH, Lu CP, Yao HC. Diverse toxic effectors are harbored by *vgrG* islands for interbacterial antagonism in type VI secretion system[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects, 2018, 1862(7): 1635-1643
- [18] Dong TG, Ho BT, Yoder-Himes DR, Mekalanos JJ. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(7): 2623-2628
- [19] Yang XB, Long MX, Shen XH. Effector-immunity pairs provide the T6SS nanomachine its offensive and defensive capabilities[J]. Molecules, 2018, 23(5): 1009
- [20] Toska J, Ho BT, Mekalanos JJ. Exopolysaccharide protects *Vibrio cholerae* from exogenous attacks by the type 6 secretion system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(31): 7997-8002
- [21] Ho BT. From wall to wall: how the type 6 secretion system knows to stop growing[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 202(1): e00647-19
- [22] Kamal F, Liang XY, Manera K, Pei TT, Kim H, Lam LG, Pun A, Hersch SJ, Dong TG. Differential cellular response to translocated toxic effectors and physical penetration by the type VI secretion system[J]. Cell Reports, 2020, 31(11): 107766
- [23] Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-for-tat: Type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions[J]. Cell, 2013, 152(4): 884-894
- [24] Chou S, Bui NK, Russell AB, Lexa KW, Gardiner TE, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system[J]. Cell Reports, 2012, 1(6): 656-664
- [25] Lee M, Artola-Recolons C, Carrasco-López C, Martínez-Caballero S, Heseck D, Spink E, Lastochkin E, Zhang WL, Hellman LM, Boggess B, et al. Cell-wall remodeling by the zinc-protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(34): 12604-12607
- [26] Wang TT, Hu ZY, Du X, Shi Y, Dang J, Lee M, Heseck D, Mobashery S, Wu M, Liang HH. A type VI secretion system delivers a cell wall amidase to target bacterial competitors[J]. Molecular Microbiology, 2020. DOI: 10.1111/mmi.14513
- [27] Altindis E, Dong T, Catalano C, Mekalanos J. Secretome analysis of *Vibrio cholerae* type VI secretion system reveals a new effector-immunity pair[J]. mBio, 2015, 6(2): e00075-15
- [28] Liang XY, Kamal F, Pei TT, Xu P, Mekalanos JJ, Dong TG. An onboard checking mechanism ensures effector delivery of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(46): 23292-23298
- [29] Crisan CV, Hammer BK. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: toxins, regulators and consequences[J]. Environmental Microbiology, 2020. DOI: 10.1111/1462-2920.14976
- [30] Brooks TM, Unterwieser D, Bachmann V, Kostiuik B, Pukatzki S. Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(11): 7618-7625
- [31] Frey S, Görlich D. A new set of highly efficient, tag-cleaving proteases for purifying recombinant proteins[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1337: 95-105
- [32] Glauner B. Separation and quantification of mucopeptides with high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1988, 172(2): 451-464
- [33] Bui NK, Gray J, Schwarz H, Schumann P, Blanot D, Vollmer W. The peptidoglycan sacculus of *Myxococcus xanthus* has unusual structural features and is degraded during glycerol-induced myxospore development[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(2): 494-505
- [34] Ho BT, Fu Y, Dong TG, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* type 6 secretion system effector trafficking in target bacterial cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(35): 201711219
- [35] Hersch SJ, Watanabe N, Stietz MS, Manera K, Kamal F, Burkinshaw B, Lam L, Pun A, Li MX, Savchenko A, et al. Envelope stress responses defend against type six secretion system attacks independently of immunity proteins[J]. Nature Microbiology, 2020, 5(5): 706-714
- [36] Schuster CF, Wiedemann DM, Kirsebom FCM, Santiago M, Walker S, Gründling A. High-throughput transposon sequencing highlights the cell wall as an important barrier for osmotic stress in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and underlines a tailored response to different osmotic stressors[J]. Molecular Microbiology, 2020, 113(4): 699-717