

裂解系统在细菌载体疫苗中的应用

唐一波, 刘青, 李沛, 罗红艳, 孔庆科

西南大学 动物科技学院, 重庆 400715

唐一波, 刘青, 李沛, 等. 裂解系统在细菌载体疫苗中的应用. 生物工程学报, 2019, 35(3): 375-388.

Tang YB, Liu Q, Li P, et al. Application of lysis system in bacterial vector vaccines. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 375-388.

摘要: 重组细菌载体疫苗因其能够诱导机体产生粘膜免疫、体液免疫和细胞免疫的特点, 已经被广泛用作递送保护性抗原和核酸疫苗的载体来预防某些传染病。但是重组到细菌载体疫苗中的保护性抗原和核酸难以穿越细菌细胞壁释放到宿主细胞内发挥作用, 残留在动物或畜禽产品中的疫苗菌株还可能造成环境的污染和疫苗菌株的传播。而有效解决这些问题的方法是构建一种细菌自动裂解系统, 使疫苗菌株能够在体外培养时正常生长而在体内环境中自动裂解死亡。目前主要应用的细菌裂解系统包括: 基于调控延迟肽聚糖合成的裂解系统、基于噬菌体裂解蛋白调控的裂解系统、基于毒素-抗毒素系统 (Toxin-antitoxin system) 的裂解系统。此外, 一种潜在的基于细菌VI型分泌系统 (Type VI secretion system, T6SS) 的裂解系统也有望成为构建自动裂解菌株的新方法。文中将着重对这几种裂解系统的调控机制进行阐述。

关键词: 活载体疫苗, 延迟裂解, 裂解蛋白, 毒素-抗毒素, T6SS

Application of lysis system in bacterial vector vaccines

Yibo Tang, Qing Liu, Pei Li, Hongyan Luo, and Qingke Kong

College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Recombinant bacterial vector vaccines have been widely used as carriers for the delivery of protective antigens and nucleic acid vaccines to prevent certain infectious diseases because of their ability to induce mucosal immunity, humoral immunity and cellular immunity. However, protective antigens and nucleic acids recombined into bacterial vector vaccines are difficult to be released into host cells because of the presence of bacterial cell wall. Vaccine strains that are residual in animals or livestock products may also cause environmental contamination and spread of the vaccine strains. The effective solution for these problems is to construct an auto-lysis system that can regulate the vaccine strains to grow normally *in vitro* while lysis *in vivo*. The lysis systems that have been applied in germs mainly include: the lysis system based on regulated delayed peptidoglycan synthesis, the lysis system based on the regulation of bacteriophage lysis protein and the lysis system based on the toxin-antitoxin system. In addition, a potential lysis system based on bacterial Type VI Secretion System (T6SS) is also expected to be a new method for the construction of auto-lysis strains. This review will focus on the regulatory mechanisms of these bacterial lysis systems.

Keywords: live vector vaccine, delayed lysis, lysis protein, toxin-antitoxin, T6SS

Received: July 6, 2018; **Accepted:** August 22, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31472179, 31570928).

Corresponding author: Qingke Kong. Tel/Fax:+86-23-68251196; E-mail: kongqiki@163.com

国家自然科学基金 (Nos. 31472179, 31570928) 资助。

网络出版时间: 2018-09-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180914.1513.002.html>

疫苗接种是预防和控制人和动物传染病传播和流行的一种重要手段,传统疫苗如灭活疫苗和弱毒疫苗由于存在生产工艺限制、毒力回复和需多次免疫等弊端,逐渐呈现出被新型生物疫苗所取代的趋势。近年来发展出了一种新型的重组活载体疫苗,它以减毒的活细菌或病毒作为载体将携带的外源保护性抗原或者重组到真核表达质粒的外源核酸递送至宿主细胞内而发挥免疫作用^[1-2]。活载体疫苗的出现也克服了亚单位疫苗免疫原性差和核酸疫苗接种用量大以及接种方式繁琐等缺点^[3-4],逐渐受到了研究学者的广泛关注和研究。其中重组减毒沙门菌疫苗 (Recombinant attenuated *Salmonella* vaccine, RASV) 因其可以诱导粘膜免疫、体液免疫和细胞免疫已经被广泛作为疫苗载体来递送外源抗原和核酸疫苗,用于预防某些细菌、病毒、真菌的感染或治疗某些癌症^[5-8],其一些脂类成分还可以发挥佐剂的作用,制成的口服疫苗便于接种,成本较低,适用于大规模接种免疫。

部分血清型的沙门菌属于细胞内寄生菌,野生型和普通减毒型的沙门菌在进入宿主细胞内繁殖到一定程度时,为避免被宿主免疫系统清除会释放沙门菌囊泡 (*Salmonella* containing vacuole, SCV)^[9-10],诱导宿主细胞的焦亡/凋亡 (Pyroptosis/Apoptosis)。形成 SCV 后,疫苗菌株难以被宿主机体裂解,重组到载体疫苗的保护性抗原很难从菌株中释放,进而难以被免疫细胞捕获加工递呈诱导免疫反应,降低了疫苗的免疫效果。此外,接种疫苗后的动物体内残留的沙门菌还可能在环境中进行传播造成污染,这对于活细菌载体疫苗的生产应用也是一大考验。因此如何构建一种自动裂解系统让减毒沙门菌在体内繁殖到一定程度而自发裂解菌体使外源核酸或保护性抗原能够释放到宿主细胞内,并且尽可能在侵染过程中不诱导宿主细胞的焦亡/凋亡,最终在体内检测不到沙

门菌的残留并产生较好的体液、细胞和粘膜免疫效果成为了目前研究的难点。目前应用的细菌裂解系统主要包括:基于调控延迟肽聚糖合成的裂解系统、基于噬菌体裂解蛋白调控的裂解系统、基于毒素-抗毒素系统 (Toxin-antitoxin system) 的裂解系统。文中将结合上述几种裂解系统以及本实验室正在构建的基于细菌 T6SS 相关肽聚糖水解因子调控的沙门菌自动裂解系统等方面进行综述,为重组细菌载体疫苗的应用研究提供科学依据。

1 基于调控延迟肽聚糖合成的裂解系统

该裂解系统是由 Roy Curtiss III^[11-12]实验室开发的一种基于抑制沙门菌细胞壁肽聚糖层合成的活疫苗裂解系统。二氨基庚二酸 (Diaminopimelic acid, DAP) 和胞壁酸 (Muramic acid) 是组成细菌细胞壁肽聚糖层必需的成分, *asdA* 基因编码一种合成 DAP 必不可少的酶,而 *murA* 基因编码胞壁酸合成途径的第 1 个酶^[13],二者的缺失将导致细菌无法合成细胞壁。Roy Curtiss III 团队首先利用 UK-1 鼠伤寒沙门菌 *Salmonella typhimurium* 构建了 *asdA* 基因缺失株 χ 8276^[11],他们又在该菌株中引入了由 *araC* P_{BAD} 启动子调控 *asdA* 基因表达的重组质粒 pYA3530。*araC* P_{BAD} 依赖于阿拉伯糖 (Arabinose) 的调控,在含有阿拉伯糖的培养基中菌株可以合成 AraC 蛋白,该蛋白可以激活启动子 P_{BAD} 进而调控 *asdA* 基因的表达,使 Δ *asdA* 菌株仍然能够合成 DAP 维持完整的细胞壁结构;而在缺少阿拉伯糖的条件下,质粒上的 *asdA* 基因无法表达造成细菌细胞壁合成受阻而裂解死亡。在缺少阿拉伯糖的条件下, *asdA* 基因残留的转录水平依然能够合成 DAP,于是该研究团队将 pYA3530 质粒上 *asdA* 基因的起始密码子 ATG 突变为 GTG 以降低 *asdA* 基因的转录水平。

为达到组合 *asdA* 基因和 *murA* 基因的目的, Roy Curtiss III 团队在 P_{BAD} 和 *asdA* 基因间插入了

一段起始密码子优化的 *murA* 基因形成了质粒 pYA3681。为了降低 *asdA* 基因和 *murA* 基因残留的转录水平,他们在 *asdA* 基因末尾的 3'端引入了来自 P22 噬菌体的启动子 P_R 来指导反义 mRNA 的合成,以此来关闭 *asdA* 基因和 *murA* 基因转录后的翻译过程。 P_R 启动子还会受到 C2 蛋白的阻遏,在 C2 蛋白存在的情况下 P_R 的功能会受到抑制。他们将 pYA3681 引入到了具有 $\Delta asdA$ 突变的菌株 $\chi 8937$ 中最终构建了自动裂解菌株 $\chi 8937$ (pYA3681)。该菌株在阿拉伯糖存在的条件下会激活 P_{BAD} , 启动 *murA*、*asdA* 和 *c2* 的转录保证菌株正常合成细胞壁,产生的 C2 蛋白则会抑制 P22 P_R 启动子的功能;在缺少阿拉伯糖时, P_{BAD} 由于无

法被激活造成 *murA*、*asdA* 和 *c2* 的转录受阻,Asd、MurA 和 C2 蛋白无法继续合成而随着细胞分裂浓度降低,Asd 和 MurA 蛋白的减少导致 DAP 和胞壁酸无法合成,菌株因无法产生细胞壁肽聚糖层而裂解,C2 的减少激活了 P22 P_R 启动子形成反义 mRNA 阻遏 Asd 和 MurA 蛋白的合成。为了测试调控延迟裂解系统递送抗原的效果,Roy Curtiss III 团队将携带有肺炎链球菌 Rx1 PspA 蛋白的调控延迟裂解沙门菌载体疫苗以口服的方式接种到小鼠体内,结果小鼠产生了针对 PspA 和沙门菌外膜蛋白的抗体反应,免疫 21 d 后检测到宿主组织内无疫苗细菌存在。基于调控延迟肽聚糖合成的裂解系统的原理见图 1。

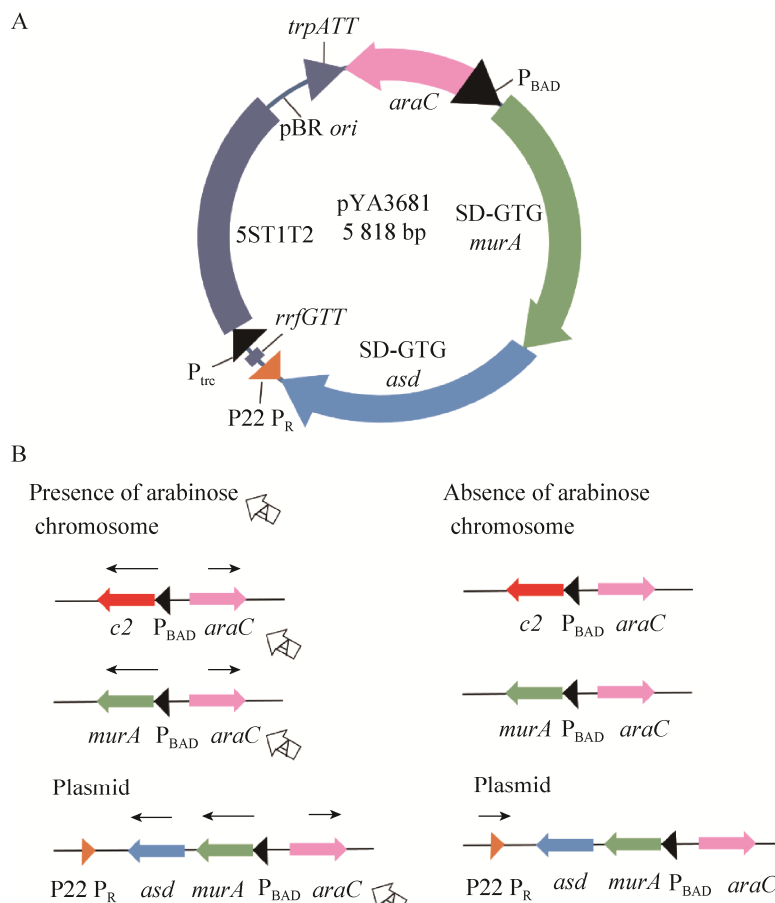


图 1 基于调控延迟肽聚糖合成的裂解系统 (改编自文献[11])

Fig. 1 The lysis system based on regulated delayed peptidoglycan synthesis (adapted from the reference [11]). (A) Map of plasmid pYA3681. (B) Diagram of model illustrating the regulatory interactions in the regulated delayed lysis system. If arabinose is present, arabinose will bind to AraC and the P_{BAD} will be activated. If there is no arabinose, P_{BAD} will not be activated.

Roy Curtiss III团队基于上述裂解载体,又构建了一系列重组沙门菌疫苗载体去递送其他抗原,以验证疫苗在体内的裂解效果和递送抗原的免疫保护效果。Ameiss等^[14]应用上述构建的延迟裂解沙门菌株去递送携带有流感M2e抗原的土拨鼠肝炎病毒颗粒,结果表明具有延迟裂解表型的载体疫苗比不具有裂解表型的对照组载体疫苗产生了更好的免疫保护效果。Juárezrodríguez等^[15]构建了具有不同复制起始位点的pYA3681裂解载体质粒的衍生质粒,并将裂解质粒和优化的牛结核分枝杆菌抗原基因进行组合转入RASVs中,结果构建好的RASVs在口服免疫的小鼠体内显示了调控延迟裂解和延迟抗原合成的表型,产生了对比对照组BCG疫苗更高水平的体液和细胞免疫应答。Ashraf等^[16]构建了携带有流感病毒NP抗原的调控延迟裂解RASV菌株 χ 11246(pYA4858),他们分别通过口腔、鼻腔和腹腔等不同途径免疫小鼠,结果在小鼠上分别产生了针对致死性流感病毒rWSN株80%(口腔)、100%(鼻腔)和100%(腹腔)的保护效果,并且都激发了Th1型细胞免疫。2012年,Kong等^[12]在原来延迟裂解载体的基础上又构建了一种具有编码阿拉伯糖调控裂解表型和真核细胞表达质粒的重组沙门菌DNA疫苗递送载体,他们通过在真核表达质粒中插入一段用于高效核酸转运和基因表达的多重DNA核酸靶向序列,以及通过增加核酸酶抗性来保护质粒免受宿主降解等方法提高了疫苗载体的递送效果。他们将筛选出的具有最佳遗传属性的延迟裂解表型的沙门菌疫苗载体用于递送编码流感病毒WSN株HA抗原的DNA疫苗,结果疫苗在免疫的小鼠中实现了对致死性流感病毒的完全保护效果,这为有效递送DNA疫苗提供了一种新思路。此外,Zhang等^[17]还将携带有禽流感病毒基因组的重组沙门裂解疫苗转染至禽类细胞当中,结果在从26个鸡胚胎成纤维细胞(CEF)和Madin-Darby犬

肾(MDCK)细胞共培养物中的11个细胞中回收到了高达 10^7 TCID₅₀/mL的甲型流感病毒,证明了延迟裂解疫苗载体可以递送流感病毒基因组进入真核细胞内进行表达产生完整的病毒结构。虽然该沙门菌延迟裂解系统在递送外源抗原和DNA疫苗进入真核细胞发挥免疫作用方面取得了不错的效果,但其安全性和裂解效果还需进一步探索和完善。

2 基于噬菌体裂解蛋白调控的裂解系统

该系统是由细菌菌蛻(Bacterial ghost,简称BG)衍化而来的一种裂解系统。BG是一种无生命活性的细菌包膜复合体空壳结构,它是由 Φ X174噬菌体的裂解基因E在革兰阴性菌中表达产生的E蛋白使细菌表面产生跨膜孔洞而形成的一种结构^[18-23]。E蛋白是一种膜蛋白,能够寡聚化形成一个跨越细菌内外膜的通道^[21,24],电镜下显示,E蛋白产生的特定通道与内外膜融合在一起,密封了周质空间。由于细胞内的高渗透压,包括DNA在内的细胞质内容物从通道中排出留下了包膜复合体的空壳结构^[21,23-24]。但是BG空壳结构仍然保持着类似天然细菌的细胞形态,整个细胞表面结构包括外膜蛋白、粘附素、脂多糖(LPS)和肽聚糖层被保留^[23]。一些小分子物质可以在BG细胞内存储并从E蛋白裂解细胞形成的通道释放出来,基于以上特性,BG现在已经发展成为一种用于递送保护性抗原、DNA疫苗以及某些药物的载体工具^[21,23]。由于BG表面仍然保留着低毒性的LPS,所以BG也用作佐剂或候选疫苗^[23,25]。后来基于噬菌体相关裂解蛋白又发展出了一些用于调控活细菌疫苗的自动裂解系统。

在2009年,Zhang等^[26]构建了由Mg²⁺调控噬菌体裂解基因表达的自动裂解系统。在鼠伤寒沙门菌基因组中编码mgtB基因的启动子P_{mgt}是由Mg²⁺严谨调控的,在不含Mg²⁺离子的条件下

该启动子才会启动表达。 λ 噬菌体的裂解基因由 *R* 基因 (编码内容素水解细胞壁肽聚糖层)、*S* 基因 (编码穿孔素攻击细胞内膜) 以及 *Rz1* 和 *Rz2* 基因 (编码裂解辅助因子) 组成^[27]。Zhang 等将野生型 λ 噬菌体裂解基因 *SRR_Z* 连接到重组质粒上, 在 *SRR_Z* 基因的上游引入了 *P_{mgt}* 启动子, 并将质粒转化到大肠埃希菌 *Escherichia coli* 内进行表达。结果在不含 Mg^{2+} 的培养基中, *P_{mgt}-SRR_Z* 组合造成了细菌的快速裂解; 在外源性添加 10 mmol/L Mg^{2+} 的培养基中细菌显示出了和阴性对照组相似的生长曲线, 说明该裂解系统受到 Mg^{2+} 的严谨调控。在同一年, Liu 和 Curtiss^[28] 又报道了由 Ni^{2+} 调控噬菌体裂解基因表达的裂解系统。镍感应/反应信号系统能控制 *nrsBACD* 操纵子的表达^[28-29], 在 Ni^{2+} 存在条件下该操纵子才启动表达。Liu 将该系统与一系列噬菌体裂解基因进行组合后连接到了质粒载体上, 并将质粒转化至蓝藻中表达。结果在外源性添加 Ni^{2+} 的条件下裂解基因启动表达合成裂解蛋白造成宿主细胞壁结构的破坏。电镜下显示, 分别在加入 7.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ni^{2+} 6 h 和 12 h 后蓝藻细胞壁的厚度下降, 并在 24 h 后形成 BG。而 Guan 等^[30] 在霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 中找到了一种由 Fe^{2+} 严谨调控的启动子 *P_{viuB}*。 *P_{viuB}* 受到 *Fur-Fe²⁺* 复合物的调控, 在富含 Fe^{2+} 的条件下 *Fur-Fe²⁺* 复合物能够结合到 *Fur* 盒上阻遏 *P_{viuB}* 的转录, 而在缺少 Fe^{2+} 的环境中该启动子正常表达^[30-31]。他们将 *P_{viuB}* 和 ΦX174 噬菌体裂解基因 *E* 融合到 pUT 质粒载体上形成质粒 pUTaBE, 并将 pUTaBE 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中。在富含 Fe^{2+} 的培养基中 *P_{viuB}* 的转录受到抑制造成基因 *E* 的表达受阻, 菌株正常生长并表达异源抗原; 而在 Fe^{2+} 限制的培养基中或在体内环境时, *P_{viuB}* 正常启动基因 *E* 的表达合成裂解蛋白 E 造成大肠埃希菌的裂解死亡形成 BG, 同时异源抗原会从 BG 中释放出来发挥作用。由 Fe^{2+} 调控的裂解系统见图 2。

这些由金属离子调控噬菌体裂解基因表达的裂解系统虽然在体外试验取得了不错的裂解效果, 但还需进一步完善体内试验来验证它们的自发裂解效果。目前大多数递送抗原、药物或者 DNA 疫苗的方式还是通过表达 E 蛋白形成灭活的 BG 空壳来实现, 而最近 Won 等^[32] 通过将 λ 噬菌体的穿孔素-内容素基因和 ΦX174 噬菌体的裂解 *E* 基因组合一起共同表达而提高了细菌的裂解效果, 使产生的 BG 表面的细胞毒性降低并更易递送外源性物质, 有着很好的应用前景。

3 基于毒素-抗毒素系统的裂解系统

毒素-抗毒素系统 (TAs) 广泛存在于细菌中, 它被认为是一种和细胞程序化死亡相关的系统^[33-35]。该系统广泛存在于细菌染色体和质粒当中, 它由毒素蛋白和抗毒素蛋白两部分组成^[36-39]。通常毒素和抗毒素会在细菌体内形成稳定的复合体, 但是当外界环境改变给细菌带来生长压力时例如 C、N 等营养成分缺少, 毒素蛋白就会从毒素-抗毒素系统中释放出来造成细菌自身的中毒死亡或生长停滞, 从而实现一种细胞程序化死亡调节机制^[40]。例如, Nariya 等^[36] 发现在黄色粘球菌 *Myxococcus xanthus* 中 *mazF* 基因编码一种 MazF 毒素, 而 *mrpC* 是一个潜在的抗 MazF 毒素基因。他们发现在粘球菌子实体形成期间 MazF 毒素会自动释放强制性裂解细胞而有效地实现子实体和孢子的形成, MrpC 蛋白可以中和剩余的 MazF 对处于其他生长期细胞的毒性作用。此外, 细菌在受到噬菌体侵染时也会出现由 TAs 介导的“自杀”行为来裂解细菌^[35]。例如, 存在于欧文杆菌 *Erwinia carotovora* 中的 ToxIN 系统会在噬菌体侵入时自动释放出 ToxN 毒素蛋白来抑制细菌自身的生长, 防止噬菌体进一步繁殖和侵染^[41]。当然除了以上调控细胞程序化死亡之外, TA 系统也参与 DNA 复制^[42]、维持细胞膜完整性^[43] 以及细胞壁合成^[44] 等环节。

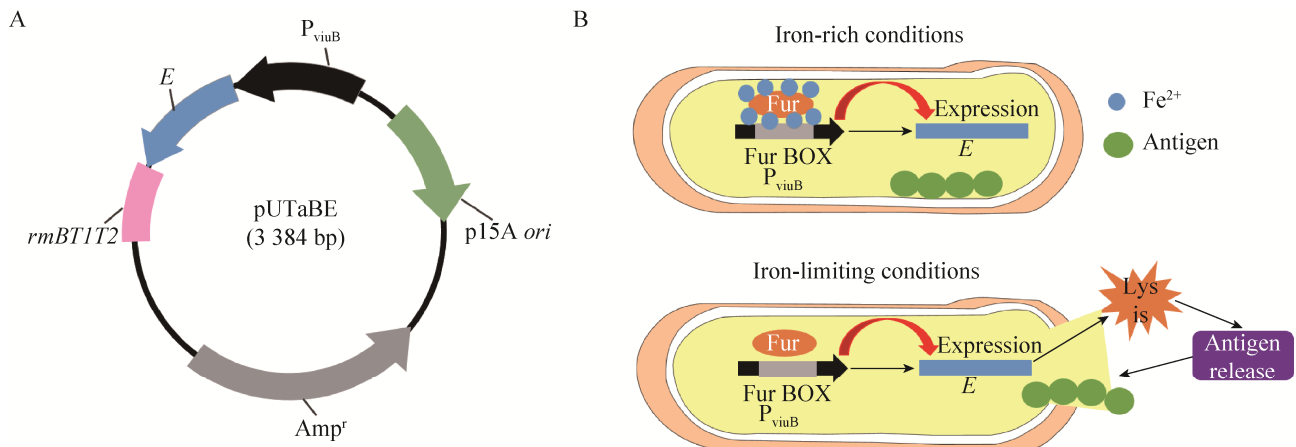


图 2 Fe^{2+} 调控的裂解系统 (改编自文献[30])

Fig. 2 The Fe^{2+} -regulated lysis system (Fig. 2 adapted from the reference [30]). (A) Map of plasmid pUTaBE. (B) Bacterial cells lysis and the heterologous antigen release caused by protein E. In iron-rich conditions, the Fe^{2+} -Fur complex binds to the Fur box of P_{viuB} and represses the transcription of the *E* gene. In iron-limiting conditions, the Fe^{2+} -Fur complex is dissociated and the transcription of the *E* gene initiated. Bacterial cells are rapidly lysed by protein E to achieve the heterologous antigen release.

2011年 Mutschler 等^[45]报道了一种和细菌细胞壁合成相关的 TA 系统造成细菌自动裂解的机制。他们发现在 Epsilon-Zeta (ϵ - ζ) TA 系统中, Zeta 毒素或者是肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* 中的 Zeta 毒素 PezT 能够磷酸化合成肽聚糖的前体物质 UDP-N-乙酰葡萄糖胺 (UNAG), 磷酸化的 UNAG-3P 会积聚在细胞质内而抑制 MurA 蛋白的功能, MurA 蛋白合成受到抑制导致胞壁酸无法合成进而肽聚糖合成受阻而造成细菌裂解。他们又将克隆出来的 *pezT* 基因转入大肠埃希菌内进行诱导表达, 诱导 30 min 后电镜下观察到细菌中央部形成隆起, 诱导 1 h 后细菌大量死亡, 仅剩的一些完整细胞结构的细菌也呈现出小尺寸形态和卵圆形形态, 这些现象与细胞壁结构受损有着密切关系。肺炎链球菌在受到环境压力或者侵染宿主细胞的过程中可能激活自身的 PezT 毒素造成肺炎链球菌的裂解而释放肺炎球菌溶血素 (Pneumolysin), 这一现象可能与肺炎链球菌菌株的毒力增强有一定的联系, 但目前尚不清楚具体的机制与联系^[46-47]。肺炎链球菌 PezT 毒素造成的细菌裂解和肺炎链球菌溶血素释放的模式图见图

3。此外, 还有一些学者认为降低 UNAG 的水平使细菌无法合成细胞壁的现象可能只是 Zeta/PzaT 毒素在面对生存压力条件下表达的几种形式之一^[47-48]。最近, Rocker 等^[49]就报道了革兰阴性菌淋球菌中 *zeta* 毒素基因 *ng_ζ1* 不仅能够磷酸化 UNAG, 也能够磷酸化 UNAM (UDP-muramic acid, UDP-胞壁酸) 以及磷酸化 UDP-葡萄糖。磷酸化的 UNAM 积聚在细胞质内能够抑制 MurC 蛋白的活性从而抑制胞壁酸的合成。淋球菌通过 *ng_ζ1* 毒素抑制 MurA 和 MurC 合成的双重作用来抑制自身细胞壁合成实现自动裂解调控自身生长的功能。此外, Zeta/PezT 毒素不仅会激发细菌自身的裂解死亡, 也有可能对感染的宿主细胞造成毒害作用^[47]。Ng 等^[50]发现在真核微藻类的小球菌 *Chlorella vulgaris* 当中表达的肺炎链球菌 PezT 毒素也导致了藻类细胞的损伤和裂解, 该毒素可能也对哺乳动物的细胞有着潜在的毒性, 但还没有试验证实这一点。

根据抗毒素的性质和活性, 目前已经有超过 100 种的 TAs 被鉴定和归类, 它们总共被分为六大类 (I 型-VI 型)^[38]。虽然 TAs 广泛存在于细菌

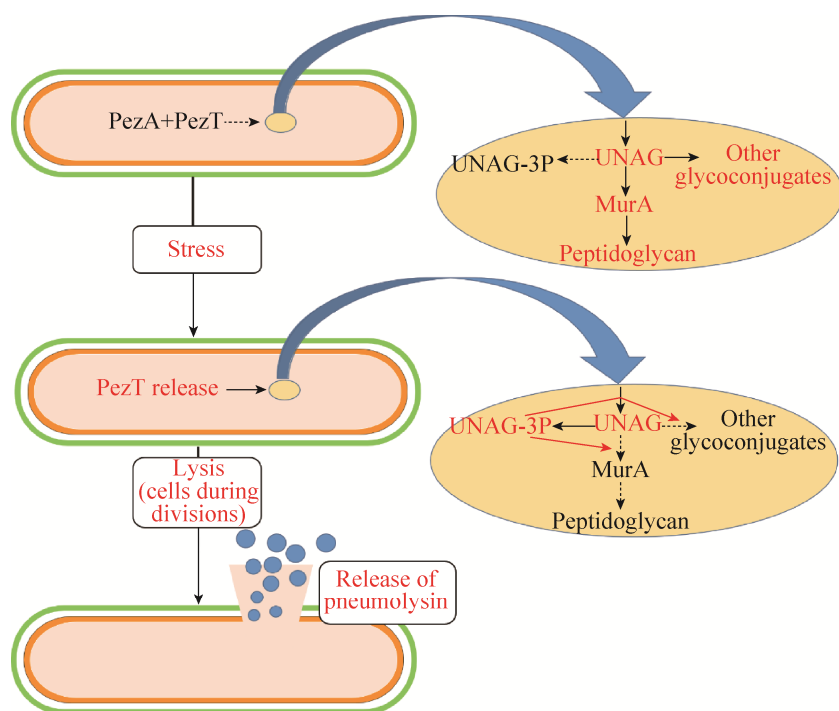


图3 肺炎链球菌 PezT 毒素造成细菌裂解的模式图 (改编自文献[45])

Fig. 3 Model diagram of bacterial lysis caused by the pneumococcal PezT toxin (adapted from the reference [45]). Stress conditions lead to release of the UNAG kinase PezT via degradation of the antitoxin PezA. PezT converts UNAG to UNAG-3P, which leads to inhibition of peptidoglycan synthesis. The rapidly dividing cells will undergo lysis, and the cytosolic pneumolysin will be released from these lysed cells.

当中, 但还有许多 TAs 没有被人们发现, 即使对已经发现的这些 TAs 来说其部分功能可能还未鉴定, 对于 TAs 能否在细菌载体疫苗中运用以及其安全性还有待进一步探索。

4 基于细菌 T6SS 的裂解系统

4.1 T6SS 结构及肽聚糖水解效应因子

VI型分泌系统 (T6SS) 是革兰氏阴性细菌的一种独特分泌方式, 在 25% 的革兰氏阴性细菌中都发现了相关基因簇^[51]。T6SS 是一种类似 T4 噬菌体尖状尾部的细胞穿刺装置, 它通过接触-依赖的方式刺入到受体细胞内并释放相应的效应蛋白而发挥作用^[52-54]。随着近几年的深入研究, T6SS 的结构逐渐被科学家们揭示出来。T6SS 其实是一种纳米收缩鞘装置, 它由跨膜复合物、基底和鞘-管复合体三部分组成^[55-57]。跨膜复合物和基底由

一系列蛋白质组成^[58-59], 基底用作连接跨膜复合物和鞘-管复合体的平台^[60], 鞘-管复合体的管状部分由 HCP 蛋白 (溶血素共调节蛋白) 构成, VipA 和 VipB 等结构蛋白围绕 HCP 管形成鞘状结构^[61-63]。由 VgrG 三聚体蛋白和 PAAR 蛋白组成的尖状复合物位于 HCP 管的尖端^[54,64], 而一些效应因子 (Effector) 通过非共价键的方式结合到了这些尖状复合物上。具有 T6SS 装置的细菌通过直接接触宿主细胞或者竞争菌将收缩鞘装置刺入受体细胞内, 进而释放相应的效应因子对受体细胞造成损伤^[65-68]。T6SS 装置的结构示意图见图 4。

最早关于 T6SS 相关效应因子功能的报道起始于 Tse (Type six exported) 蛋白家族的研究。Hood 等^[68]首先在铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* HCP 分泌毒力岛-1 编码的 T6SS (H1-T6SS) 中鉴定出了 3 种严谨翻译后调控的毒

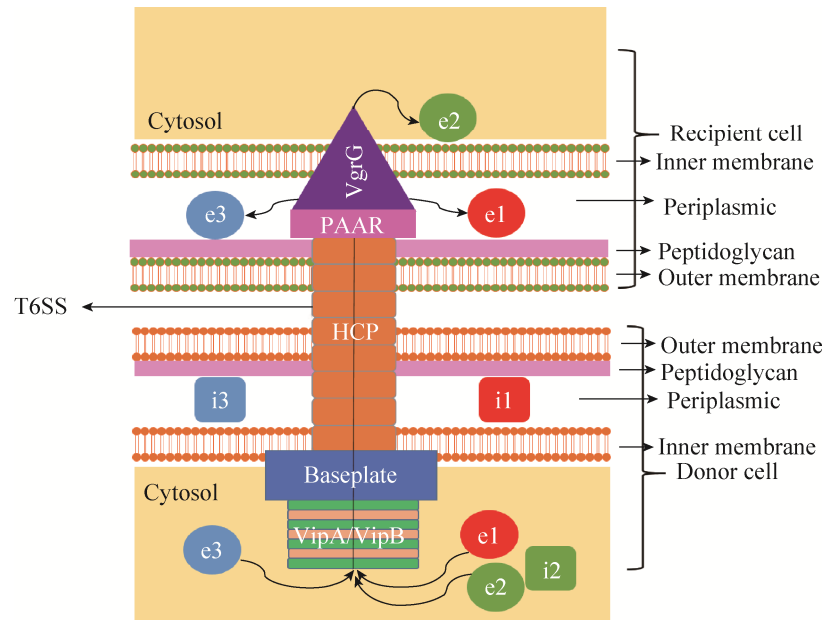


图4 铜绿假单胞菌 T6SS 效应因子的递送机制 (改编自文献[69])

Fig. 4 The mechanism of delivery of T6SS effectors from *P. aeruginosa* (adapted from the reference [69]). *P. aeruginosa* delivers the Tse effector proteins to adjacent recipient cell through a T6SS device, and the recipient cell will lyse due to lack of the Tsi proteins. Effectors and immunity proteins are shown as circles and rounded rectangles, respectively.

力分泌蛋白 Tse1-3, 同时有 3 种同源免疫蛋白 Tsi1-3 (Type six immuned 1-3) 伴随这 3 种毒力蛋白产生。他们发现在大肠埃希菌和真核细胞质中表达的 Tse2 蛋白都对细胞的生长起着明显的抑制作用, 而细胞质中的免疫蛋白 Tsi2 可以中和 Tse2 毒性防止铜绿假单胞菌自身中毒。后来 Russell 等^[69]在 Nature 上报道了铜绿假单胞菌能够借助接触-依赖性的 T6SS 方式分泌 Tse1 和 Tse3 进入到受体细菌的周质空间中, 造成受体菌的裂解死亡。通过液相色谱和质谱分析二者纯化产物, 他们发现 Tse1 能切割肽聚糖肽链中的酰胺键以及肽链残基中的 γ -D-谷氨酰基-L-内消旋-二氨基庚二酸键 (γ -D-glutamyl-L-meso-diaminopimelic acid bond, D-Glu-m-DAP), Tse3 能切割乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid, MurNAc) 和 N-乙酰氨基葡萄糖 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 残基之间的碳骨架, 二者能够破坏细菌细胞壁肽聚糖层。Tse1 和 Tse3 不会进入供体菌自身的周质空间

中表达, 而是在细胞质内表达后通过 T6SS 的跨膜装置转运到受体菌的周质空间发挥作用, 而存在于供体菌周质空间的免疫蛋白 Tsi1 和 Tsi3 可以中和供体菌间彼此接触时释放的 Tse1 和 Tse3 的毒性, 防止自身中毒。Russell 研究团队在大肠埃希菌中分别诱导表达了周质空间定位的 Peri-Tse1 和 Peri-Tse2, 分别在 5 h 和 6 h 后检测不到活菌, 电镜下观察到细胞膨大变形裂解, 说明 Tse1 和 Tse3 具有破坏细菌细胞壁结构造成细菌裂解死亡的功能。Tse1、Tse2 和 Tse3 从供体菌递送至受体菌的机制见图 4。

除了 Tse1 和 Tse3 之外, 研究学者陆续还发现了一些其他能够水解细胞壁肽聚糖层的效应因子。具有酰胺酶活性的 Tae (Tae1-Tae4) 蛋白超家族^[70-72], 具有肽聚糖 DL-内肽酶活性的小分子蛋白 Ssp1 和 Ssp2^[73], 肽聚糖糖苷键水解效应因子 Tge (Tge1-Tge3) 家族^[74], 以及一种细胞壁降解酶家族的新成员 TseH^[75]等效应因子也具有水

解细胞壁肽聚糖层的功能。此外, T6SS 中一些非效应因子也具有肽聚糖水解效应。例如, 不动杆菌 *Acinetobacter* 中的一种肽聚糖水解酶 TagX^[76] 以及霍乱弧菌 VgrG 家族中的 VgrG3 蛋白^[77-78] 能分别在供体菌和受体菌的肽聚糖层产生孔洞以实现 T6SS 装置的跨膜组装和接触穿刺功能。除了以上水解肽聚糖相关的效应因子外, T6SS 还能够分泌一些脂肪酶、核酸酶、Rhs-重复蛋白和 Non-VgrG 蛋白等效应因子^[79], 这些效应因子共同作用发挥抑菌或损伤宿主细胞的作用。

4.2 基于肽聚糖水解因子调控的裂解系统的构建

本研究团队的研究方向之一就是构建基于 T6SS 效应因子调控的沙门菌裂解系统。构建该系统的关键就在于要将 *tse1* 或 *tse3* 等编码肽聚糖水解因子的基因引入到沙门菌基因组中, 使其能够稳定遗传表达。要实现疫苗菌株进入体内增殖后裂解而体外培养时不裂解, 其难点是在于如何找到一种能严谨调控 *tse1* 或 *tse3* 基因在体内表达而在体外不表达的启动子。此外, 效应因子因缺少信号肽序列无法进入细菌自身周质空间内表达^[69], 因此还需在启动子和 *tse1* 或 *tse3* 基因之间插入一段信号肽序列去引导效应因子进入沙门菌的周质空间中表达, 例如 β -lactamase 和 PelB 等蛋白的信号肽序列^[80-81]。本团队的工作就是构建一系列启动子-信号肽序列-*tse1/tse3* 的组合整合到减毒沙门菌基因组的特定位点, 并筛选出具有最佳遗传属性和裂解效果的候选疫苗菌株, 而这方面的工作还未见相关报道。

近些年, 一些研究学者在 SPI-6 (沙门菌毒力岛-6) 编码的鼠伤寒沙门菌的 T6SS 中都发现了具有酰胺酶活性的效应因子 Tae4 及其免疫蛋白 Tai4^[70-71]。Tae4 的晶体结构显示其属于细胞壁半胱氨酸肽酶 N1pC/P60 超家族, 与细胞壁的水解和循环利用有关^[70,82]。一些体外试验证明了只表

达 Peri-Tae4 蛋白能够造成大肠埃希菌的显著裂解死亡^[70-71]。T6SS 效应-免疫系统中的免疫因子一般编码在与效应因子邻近的下游^[63], 因此也可以考虑将鼠伤寒沙门菌染色体中的 *tai4* 基因敲除并在 *tae4* 基因的上游引入严谨的启动子-周质引导信号肽序列的组合, 调控 *tae4* 基因能在体外培养时不表达而在体内环境中表达。但是 Sana 等^[83] 在体外试验证明了鼠伤寒沙门菌 T6SS 的 Hcp1 蛋白能够和 Tae4 相互作用杀死产酸克雷伯菌 *Klebsiella oxytoca*, 这种 T6SS 的抗菌机制对于鼠伤寒沙门菌在宿主肠道内的定植是至关重要的。因此在构建该裂解系统的同时还需考虑是否会对疫苗菌株在肠道内的定植能力产生影响。

5 总结与展望

虽然本文介绍的几种细菌自动裂解系统在体外试验或者临床试验当中取得了不错的成就, 但一些裂解系统都还存在着一定的缺陷。例如阿拉伯糖调控的延迟裂解系统虽然在临床体内试验取得了不错的效果, 但是人或动物体内也会有痕量的阿拉伯糖存在, 可能会导致低剂量的沙门菌长期残留在体内^[11-12]; 而由金属离子诱导噬菌体相关裂解基因表达的裂解系统只是在细胞表面形成孔洞产生菌蛻释放内容物, 并不能完全裂解菌体^[26,28,30], 而且这种菌蛻载体庞大无法充分刺激机体产生免疫^[21,28,30]; 而毒素-抗毒素系统大多体现在细菌面对环境压力时的程序化死亡^[18-19], 虽然 Zeta/PzaT 毒素能够抑制细菌细胞壁的合成, 但是有相关报道其可能损害真核细胞^[45,47,84], 因此将其用在疫苗上的安全性还有待验证; 而细菌 T6SS 分泌的肽聚糖水解因子在体外表达时显示出了不错的裂解效果^[69,71,83], 但还没有见到应用该方法构建体内自动裂解菌株的报道, 其体内裂解效果还有待进一步去探索和验证。除了上文介绍的几种裂解系统外, 还有研究学者通过表达溶菌酶去构建裂

解菌株^[85], 但溶菌酶成分复杂可能会对疫苗递送的保护性抗原产生影响, 其递送抗原的效果还有待进一步验证。

在构建自动裂解菌株的同时, 还需要在沙门菌染色体中引入一些其他突变来减弱沙门菌对宿主的毒性以及提高疫苗递送的效果。例如可以利用调控延迟减毒技术去调控 *rfaH* 基因, 构建的突变株可以在体外合成类似野生型沙门菌的 O-抗原, 保持侵染定植能力, 到体内会自动停止 O-抗原的合成, 减少宿主对沙门 O-抗原的免疫反应, 提高对异源抗原的免疫反应^[86]; 一些小分子刺激物如 LPS 能诱导宿主细胞产生 caspase-1 依赖的细胞凋亡^[87], 因此也要适当引入一些突变降低 LPS 的毒性; 同时也要引入一些其他突变来保持 DNA 疫苗在沙门菌疫苗内的稳定复制, 剔除抗性基因作为筛选标记等。当然对于细菌染色体上的突变要适度, 过多的突变可能会造成菌株的一些特性发生改变, 反而达不到较好的疫苗免疫效果。将来构建成功的自动裂解疫苗载体不仅能够递送保护性抗原和 DNA 疫苗, 也有望递送糖蛋白抗原、多糖抗原甚至抗肿瘤药物, 有着广泛的应用范围。当然基于 T6SS 相关效应因子构建自动裂解菌株是有一定难度, 但是凭借本实验室多年积累的减毒沙门菌疫苗载体构建技术以及和 Curtiss 实验室长期的技术合作关系, 我们是有能力完成这方面工作的。

总之, 减毒活疫苗载体是目前疫苗研究的热点之一, 构建疫苗载体不仅要考虑应如何减弱其毒性, 保持其侵袭和定植能力以及诱导免疫的效果, 还要考虑如何减弱其对宿主的诱导死亡以及如何清除体内残留的疫苗菌株等问题。自动裂解载体疫苗有着良好的应用前景, 但还需要进一步去验证其在临床上的裂解效果、免疫效果以及对宿主的副作用等。我们相信随着技术的不断进步会逐步解决这些问题, 最终能发展出较为完善的活疫苗载体。

REFERENCES

- [1] Clarke DK, Hendry RM, Singh V, et al. Live virus vaccines based on a vesicular stomatitis virus (VSV) backbone: standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*, 2016, 34(51): 6597–6609.
- [2] Dharmasena MN, Osorio M, Takeda K, et al. Stable chromosomal expression of *Shigella flexneri* 2a and 3a O-antigens in the live *Salmonella* oral vaccine vector Ty21a. *Clin Vaccine Immunol*, 2017, 24(12): e00181–17.
- [3] Jorritsma SHT, Gowans EJ, Grubor-Bauk B, et al. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. *Vaccine*, 2016, 34(46): 5488–5494.
- [4] Vartak A, Sucheck SJ. Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines (Basel)*, 2016, 4(2): E12.
- [5] Tian P, Xu D, Huang ZX, et al. Evaluation of truncated G protein delivered by live attenuated *Salmonella* as a vaccine against respiratory syncytial virus. *Microb Pathog*, 2018, 115: 299–303.
- [6] Liu XY, Liu Q, Xiao KP, et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* delivery of a novel DNA vaccine induces immune responses and provides protection against duck enteritis virus. *Vet Microbiol*, 2016, 186: 189–198.
- [7] Mei Y, Zhao LX, Liu YH, et al. Combining DNA vaccine and AIDA-1 in attenuated *Salmonella* activates tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(6): 503–514.
- [8] Liang K, Liu Q, Li P, et al. Endostatin gene therapy delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* in murine tumor models. *Cancer Gene Ther*, 2018, 25(7/8): 167–183.
- [9] Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol*, 2010, 9(11): 2562–2570.
- [10] Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, et al. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis

- in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9833–9838.
- [11] Kong W, Wanda SY, Zhang X, et al. Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(27): 9361–9366.
- [12] Kong W, Brovold M, Koeneman BA, et al. Turning self-destructing *Salmonella* into a universal DNA vaccine delivery platform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(47): 19414–19419.
- [13] Brown ED, Vivas EI, Walsh CT, et al. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1995, 177(14): 4194–4197.
- [14] Ameiss K, Ashraf S, Kong W, et al. Delivery of woodchuck hepatitis virus-like particle presented influenza M2e by recombinant attenuated *Salmonella* displaying a delayed lysis phenotype. *Vaccine*, 2010, 28(41): 6704–6713.
- [15] Juárez-Rodríguez MD, Yang J, Kader R, et al. Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2012, 80(2): 815–831.
- [16] Ashraf S, Kong W, Wang SF, et al. Protective cellular responses elicited by vaccination with influenza nucleoprotein delivered by a live recombinant attenuated *Salmonella* vaccine. *Vaccine*, 2011, 29(23): 3990–4002.
- [17] Zhang XM, Kong W, Wanda SY, et al. Generation of influenza virus from avian cells infected by *Salmonella* carrying the viral genome. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0119041.
- [18] Walcher P, Mayr UB, Azimpour-Tabrizi C, et al. Antigen discovery and delivery of subunit vaccines by nonliving bacterial ghost vectors. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3(6): 681–691.
- [19] Hatfaludi T, Liska M, Zellinger D, et al. Bacterial ghost technology for pesticide delivery. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(18): 5627–5634.
- [20] Chetan J, Nithiphonh S, Seong E, et al. Evaluation of *Salmonella gallinarum* ghost formulated with Montanide™ ISA 70 VG adjuvant as a vaccine against fowl typhoid. *Acta Vet Hung*, 2015, 63(4): 401–412.
- [21] Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, et al. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs*, 2010, 1(5): 326–336.
- [22] Hajam IA, Dar PA, Appavoo E, et al. Bacterial Ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): e0144397.
- [23] Hajam IA, Dar PA, Won G, et al. Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Vet Res*, 2017, 48: 37.
- [24] Witte A, Lubitz W. Biochemical characterization of ΦX174-protein-E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 1989, 180(2): 393–398.
- [25] Tabrizi CA, Walcher P, Mayr UB, et al. Bacterial ghosts—biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(6): 530–537.
- [26] Zhang XM, Pan ZM, Fang Q, et al. An auto-inducible *Escherichia coli* lysis system controlled by magnesium. *J Microbiol Meth*, 2009, 79(2): 199–204.
- [27] Wang IN, Smith DL, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 799–825.
- [28] Liu XY, Curtiss III R. Nickel-inducible lysis system in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21550–21554.
- [29] García-Domínguez M, Lopez-Maury L, Florencio FJ, et al. A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, 2000, 182(6): 1507–1514.
- [30] Guan LY, Mu W, Champeimont J, et al. Iron-regulated lysis of recombinant *Escherichia coli* in host releases protective antigen and confers

- biological containment. *Infect Immun*, 2011, 79(7): 2608–2618.
- [31] Butterton JR, Calderwood SB. Identification, cloning, and sequencing of a gene required for ferric vibriobactin utilization by *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 1994, 176(18): 5631–5638.
- [32] Won G, Hajam IA, Lee JH. Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella* ghosts mediated by co-expression of λ phage holin-endolysin and Φ X174 gene *E*. *Sci Rep*, 2017, 7: 45139.
- [33] Jensen RB, Gerdes K. Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. *Mol Microbiol*, 2010, 17(2): 205–210.
- [34] Engelberg-Kulka H, Hazan R, Amitai S. MazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *J Cell Sci*, 2005, 118(19): 4327–4332.
- [35] Mruk I, Kobayashi I. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(1): 70–86.
- [36] Nariya H, Inouye M. MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Mycococcus* development. *Cell*, 2008, 132(1): 55–66.
- [37] Lobato-Márquez D, Díaz-Orejás R, García-Del Portillo F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, 40(5): 592–609.
- [38] Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(4): 208–214.
- [39] Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(11): 779–790.
- [40] Wang XX, Kim Y, Hong SH, et al. Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(6): 359–366.
- [41] Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, et al. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 894–899.
- [42] Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol*, 1992, 226(3): 735–745.
- [43] Cheng HY, Soo VW, Islam S, et al. Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environ Microbiol*, 2014, 16(6): 1741–1754.
- [44] Silvaggi JM, Perkins JB, Losick R. Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2005, 187(19): 6641–6650.
- [45] Mutschler H, Gebhardt M, Shoeman RL, et al. A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin-antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS Biol*, 2011, 9(3): e1001033.
- [46] Chan WT, Espinosa M. The *Streptococcus pneumoniae* PezAT toxin-antitoxin system reduces β -lactam resistance and genetic competence. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1322.
- [47] Díaz-Orejás R, Espinosa M, Yeo CC. The importance of the expendable: toxin-antitoxin genes in plasmids and chromosomes. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1479.
- [48] Tabone M, Liroy VS, Ayora S, et al. Role of toxin ζ and starvation responses in the sensitivity to antimicrobials. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e86615.
- [49] Rocker A, Peschke M, Kittila T, et al. The ng ζ 1 toxin of the gonococcal ϵ/ζ toxin/antitoxin system drains precursors for cell wall synthesis. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1686.
- [50] Ng SL, Harikrishna JA, Bakar FA, et al. Heterologous expression of the *Streptococcus pneumoniae* *yoeB* and *pezT* toxin genes is lethal in *Chlorella vulgaris*. *Algal Res*, 2016, 19: 21–29.
- [51] Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(1): 3–8.
- [52] Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein

- complexes share a common evolutionary origin. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(11): 4154–4159.
- [53] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. Science, 2006, 312(5779): 1526–1530.
- [54] Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, et al. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(39): 15508–15513.
- [55] Basler M, Mekalanos JJ. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. Science, 2012, 337(6096): 815.
- [56] Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, et al. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. Nature, 2012, 483(7388): 182–186.
- [57] Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. Cell, 2013, 152(4): 884–894.
- [58] Durand E, Nguyen VS, Zoued A, et al. Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. Nature, 2015, 523(7562): 555–560.
- [59] Brunet YR, Zoued A, Boyer F, et al. The type VI secretion TssEFGK-VgrG phage-like baseplate is recruited to the TssJLM membrane complex via multiple contacts and serves as assembly platform for tail tube/sheath polymerization. PLoS Genet, 2015, 11(10): e1005545.
- [60] Planamente S, Salih O, Manoli E, et al. TssA forms a gp6-like ring attached to the type VI secretion sheath. EMBO J, 2016, 35(15): 1613–1627.
- [61] Clemens DL, Ge P, Lee BY, et al. Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. Cell, 2015, 160(5): 940–951.
- [62] Kudryashev M, Wang RY, Brackmann M, et al. Structure of the type VI secretion system contractile sheath. Cell, 2015, 160(5): 952–962.
- [63] Ringel PD, Hu D, Basler M. The role of type VI secretion system effectors in target cell lysis and subsequent horizontal gene transfer. Cell Rep, 2017, 21(13): 3927–3940.
- [64] Shneider MM, Buth SA, Ho BT, et al. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. Nature, 2013, 500(7462): 350–353.
- [65] Ma JL, Pan ZH, Huang JH, et al. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. Virulence, 2017, 8(7): 1189–1202.
- [66] Bondage DD, Lin JS, Ma LS, et al. VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(27): E3931–E3940.
- [67] Hachani A, Allsopp LP, Oduko Y, et al. The VgrG proteins are “à la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. J Biol Chem, 2014, 289(25): 17872–17884.
- [68] Hood RD, Singh P, Hsu F, et al. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. Cell Host Microbe, 2010, 7(1): 25–37.
- [69] Russell AB, Hood RD, Bui NK, et al. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. Nature, 2011, 475(7356): 343–347.
- [70] Russell AB, Singh P, Brittnacher M, et al. A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. Cell Host Microbe, 2012, 11(5): 538–549.
- [71] Benz J, Reinstein J, Meinhart A. Structural insights into the effector-immunity system Tae4/Tai4 from *Salmonella typhimurium*. PLoS ONE, 2013, 8(6): e67362.
- [72] Dong C, Zhang H, Gao ZQ, et al. Structural insights into the inhibition of type VI effector Tae3 by its immunity protein Tai3. Biochem J, 2013, 454(1): 59–68.
- [73] Srikannathasan V, English G, Bui NK, et al. Structural basis for type VI secreted peptidoglycan DL-endopeptidase function, specificity and neutralization in *Serratia marcescens*. Acta

- Crystallogr D, 2013, 69(Pt 12): 2468–2482.
- [74] Whitney JC, Chou S, Russell AB, et al. Identification, structure, and function of a novel type VI secretion peptidoglycan glycoside hydrolase effector-immunity pair. *J Biol Chem*, 2013, 288(37): 26616–26624.
- [75] Altindis E, Dong T, Catalano C, et al. Secretome analysis of *Vibrio cholerae* type VI secretion system reveals a new effector-immunity pair. *mBio*, 2015, 6(2): e00075.
- [76] Weber BS, Hennon SW, Wright MS, et al. Genetic dissection of the type VI secretion system in *Acinetobacter* and identification of a novel peptidoglycan hydrolase, TagX, required for its biogenesis. *mBio*, 2016, 7(5): e01253–16.
- [77] Brooks TM, Unterweger D, Bachmann V, et al. Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB. *J Biol Chem*, 2013, 288(11): 7618–7625.
- [78] Dong TG, Ho BT, Yoder-Himes DR, et al. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(7): 2623–2628.
- [79] Alteri CJ, Mobley HL. The versatile type VI secretion system. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(2): 1–26.
- [80] Le Calvez H, Green JM, Baty D. Increased efficiency of alkaline phosphatase production levels in *Escherichia coli* using a degenerate PelB signal sequence. *Gene*, 1996, 170(1): 51–55.
- [81] Kadonaga JT, Plückthun A, Knowles JR. Signal sequence mutants of β -lactamase. *J Biol Chem*, 1985, 260(30): 16192–16199.
- [82] Zhang H, Zhang H, Gao ZQ, et al. Structure of the type VI effector-immunity complex (Tae4-Tai4) provides novel insights into the inhibition mechanism of the effector by its immunity protein. *J Biol Chem*, 2013, 288(8): 5928–5939.
- [83] Sana TG, Flaughnatti N, Lugo KA, et al. *Salmonella typhimurium* utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(34): E5044–E5051.
- [84] Yeo CC, Bakar FA, Chan WT, et al. Heterologous expression of toxins from bacterial toxin-antitoxin systems in eukaryotic cells: strategies and applications. *Toxins*, 2016, 8(2): 49.
- [85] Borrero-de Acuña JM, Hidalgo-Dumont C, Pacheco N, et al. A novel programmable lysozyme-based lysis system in *Pseudomonas putida* for biopolymer production. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4373.
- [86] Kong QK, Liu Q, Roland KL, et al. Regulated delayed expression of *rfaH* in an attenuated *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* vaccine enhances immunogenicity of outer membrane proteins and a heterologous antigen. *Infect Immun*, 2009, 77(12): 5572–5582.
- [87] You LH, Yan CZ, Zheng BJ, et al. Astrocyte hepcidin is a key factor in LPS-induced neuronal apoptosis. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2676.

(本文责编 陈宏宇)