



## 整合性接合元件 SXT-R391 分子生物学特性及其转移系统的研究进展

贺羽 王帅\* 李慧 冯小刚 商学兵

徐州工程学院食品(生物)工程学院 江苏 徐州 221111

**摘要:** 整合性接合元件(Integrative and conjugative elements, ICEs)主要介导原核生物间遗传信息的横向基因交换,在细菌毒性、耐药性、抗重金属等特性传播上发挥关键作用。ICEs的水平转移极大地加速了抗性基因在同种及不同种属之间的传播,造成细菌的耐药以至多重耐药问题日益严重,耐药机制日趋复杂;同时ICEs的接合转移过程受细菌IV型分泌系统(Type IV secretion system, T4SS)影响。本文着重从ICEs的基因结构、接合转移过程以及T4SS组成元件的结构进行概述,并对T4SS各组件间相互作用的研究进展进行了初步探讨。

**关键词:** 整合性结合元件, IV型分泌系统, 基因结构, 接合转移

## Research progress in molecular characteristics and transconjugation system of SXT-R391 integrative and conjugative elements

HE Yu WANG Shuai\* LI Hui FENG Xiao-Gang SHANG Xue-Bing

School of Food (Biology) Engineering, Xuzhou University of Technology, Xuzhou, Jiangsu 221111, China

**Abstract:** Integrative and conjugative elements (ICEs) mediate bacteria bestow resistance to multiple antibiotics and some complex new traits through horizontal gene transfer (HGT). They encoded a wide variety of genetic information, including resistance to antibiotics and heavy metals and the capacity to degrade aromatic compounds which are affected by bacterial type IV secretion system (T4SS), the transfer of these genetic elements would speed up the dissemination of antibiotic resistance genes within and between microbial genera. It results in the growing problems of drug resistance, even multi-drug resistance and makes the mechanism of resistance become exceedingly complex. In this review, the structure and conjugation process of ICEs and the interactions with the components of T4SS are discussed.

**Keywords:** Integrative and conjugative elements (ICEs), Type IV secretion system (T4SS), Genetic structure, Gene transfer

**Foundation items:** National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (31701566); Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (18KJB550011); Research Projects of Xuzhou University of Technology (XKY2018248, XKY2019136)

\*Corresponding author: E-mail: handsomew@foxmail.com

Received: 22-02-2019; Accepted: 01-04-2019; Published online: 30-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31701566); 江苏省高校自然科学基金面上项目(18KJB550011); 徐州工程学院校级课题(XKY2018248, XKY2019136)

\*通信作者: E-mail: handsomew@foxmail.com

收稿日期: 2019-02-22; 接受日期: 2019-04-01; 网络首发日期: 2019-05-30

整合性接合元件(Integrative and conjugative elements, ICEs)是介导原核生物间遗传物质的横向(水平)基因交换[Lateral gene transfer, LGT (Horizontal gene transfer, HGT)]的一种可移动的遗传元件(Mobile genetic elements, MGEs),携带耐药基因、抗重金属基因、烃类化合物降解基因等,赋予宿主对外界环境的胁迫获得适应性,对细菌的进化具有十分重要的意义<sup>[1-2]</sup>。ICEs 兼具转座子、质粒和噬菌体的特性,ICEs 和转座子一样,都可以在染色体上跳跃,但是转座子不能发生 HGT; ICEs 和质粒都能以接合形式在细胞与细胞间进行 DNA 转移,但是大部分 ICEs 不能像质粒一样进行自我复制;与噬菌体相比,两者都能够从宿主染色体上切离、整合并随染色体一起复制,区别之处在于 ICEs 是以整合接合形式而非转导形式转移 DNA<sup>[3]</sup>。有关 ICEs 的研究主要集中在其结构与功能预测,大量学者通过基因组学研究了 ICEs 保守结构域、功能基因簇,又以接合实验验证其接合转移过程等,用以阐述 ICEs 在环境细菌中的分布、进化及相关耐药基因的转移传播机制<sup>[4-5]</sup>。在 2002 年首次以 ICEs 命名了该类元件,此类元件还包括接合型转座子、接合型质粒、基因组岛等<sup>[4]</sup>。

SXT/R391 家族目前是成为 ICEs 中多样性最为丰富、成员最多的一个家族,是一类可自我转移的遗传元件,它们可自主从宿主染色体剪切并通过宿主与受体菌接合形成的通道进入受体菌,然后整合到受体菌的染色体上。随着 O139 群霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的问世,SXT 被人们发现,近年来,国内外对于 SXT-R391 家族 ICEs 的起源、结构和接合转移机制方面做了大量的研究,在越来越多隶属于不同种属原核生物中发现了 ICEs 的存在<sup>[6]</sup>。本实验室在前期研究中建立了一种抗生素平板与分子检测相结合的高效筛选水产品中携带 SXT/R391 家族 ICEs 的多重耐药菌株的方法<sup>[7]</sup>,并首次于环境水样和虾样中分离鉴定含 ICEs 的 *V. cholera*,由菌株耐受性及脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)图谱发现,ICEs 在

菌株耐受性的传播上扮演重要角色<sup>[8]</sup>。此外,含有 ICEs 的革兰氏阴性细菌中存在与接合质粒的转运装置——IV 型分泌系统(Type IV secretion system, T4SS)高度相似的编码基因,在接合转移过程中,形成的单链 DNA 是 T4SS 通过菌毛连接通道由供体细胞转移到受体细胞中<sup>[9]</sup>。F 质粒中最先发现 T4SS,是多基因编码实现单一功能的系统,与细菌接合机制有关,介导基因水平转移及底物分泌<sup>[10]</sup>。因此,本文以 SXT-R391 家族为例,从其基因结构、转移调控机制及接合转移涉及的分泌系统等方面概述了 ICEs 近年来的研究成果和存在的问题,并对今后的研究进行展望。

## 1 SXT-R391 的结构特点

1992 年印度和孟加拉首次暴发了血清型 O139 群 *V. cholera* MO10 菌株引发的霍乱流行,研究中发现其对磺胺甲基异恶唑(Sulfamethoxazole, Su)、甲氧苄氨嘧啶(Trimethoprim, Tm)、链霉素(Streptomycin, Sm)和氯霉素(Chloramphenicol, Cm) 4 种抗生素耐药,都携带了约 62 kb 的染色体整合遗传因子,由于 O139 群霍乱弧菌的典型株 MO10 的耐药性是由其染色体上一种可自我转移的遗传元件 SXT 介导的,后命名为 SXT<sup>MO10</sup><sup>[11-12]</sup>。SXT 全长 99 483 bp,包含整合酶基因簇、抗生素抗性基因簇、接合转移基因簇、调控基因簇和未知功能基因簇。其中,整合酶基因簇位于 SXT 的 5' 端;抗生素抗性基因簇位于整合酶基因簇下游,靠近 SXT 5' 端;接合转移基因簇分布于靠近 3' 端的 3 个区域;调控基因簇基因位于 3' 端(图 1)<sup>[13]</sup>。研究发现,R391 包含了 8 个区域,分别是卡那霉素抗性区、插入元件区、TRAI、II、III、IV 区、甲基化酶亚单位 ORF27 和汞抗性操纵子区,且 R391 的 5' 端存在属于酪氨酸重组酶的整合酶基因(Integrase gene, *int*),长达 1.3 kb<sup>[14]</sup>。

SXT-R391 类 ICEs 家族并非霍乱弧菌所特有,在弧菌属(*Vibrio*)的其他种及变形菌属(*Proteus*)中也相继有该家族成员的报道<sup>[6-8]</sup>。SXT<sup>MO10</sup> 和 R391

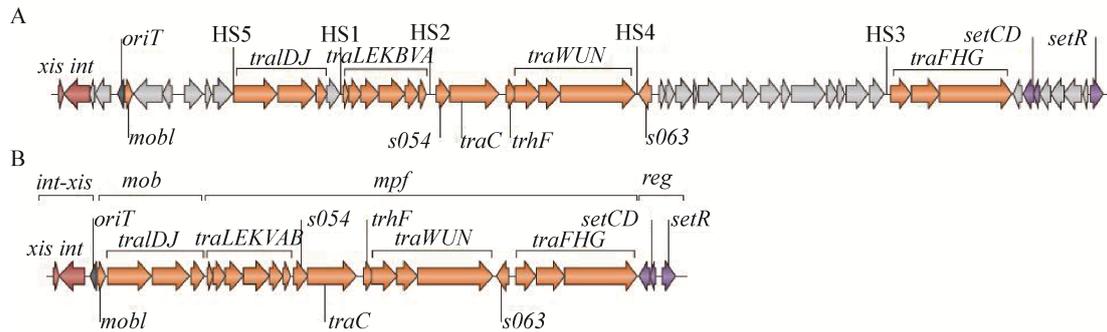


图 1 SXT/R391 家族 ICE 的基因结构示意图<sup>[13]</sup>

Figure 1 Schematic of the genetic organization of SXT/R391 family ICE<sup>[13]</sup>

注: A: SXT/R391 家族的 52 个核心基因, 在 5 个 HS 处可插入不同的 DNA 序列; B: SXT 所需的最基本的基因集合, 主要包含 4 个模块: 整合与剪切模块(Integration and excision, *int-xis*), 接合对形成模块(Mating-pair formation, *mpf*), DNA 移动和加工模块(Mobilization and processing, *mob*), 调节模块(Regulation, *reg*). 橙色基因与接合相关, 紫色基因参与调控, 红色基因参与整合和切除, 灰色基因具有辅助或未知功能. *int*: 整合酶基因; *oriT*: 转移起始位点; *tra*: 转移相关基因; *xis*: 切除酶编码基因.

Note: A: All SXT/R391 family ICE have 52 nearly identical core genes, these ICE contain different DNA insertions at five hotspots; B: The proposed minimal gene set required for SXT function. These can be divided into four modules: *int-xis* is the integration and excision module; *mob* is the DNA mobilization and processing module; *mpf* is the mating-pair formation module and *reg* is the regulation module. Orange genes are conjugation related, purple genes are involved in regulation, red genes are involved in integration and excision, and grey genes have accessory or unknown functions. *int*: Integrase; *oriT*: Origin of transfer; *tra*: Conjugal transfer; *xis*: Excisionase.

很相似, 两者具有 65 kb 保守骨架区, 携带多药抗性(Multiple drug resistance, MDR)基因簇和整合酶基因 *int*, 两者在染色体上均有同一整合位点, 位于蛋白链释放因子编码基因 *prfC* 的 5' 端上, 在宿主细胞内均能稳定存在, 两者拥有几乎相同的整合酶, 并且拥有相似的转移相关基因<sup>[15-16]</sup>。SXT 和 R391 可以在 *prfC* 形成串联排列, 共同稳定存在于同一染色体中, 自身也可以形成几个拷贝的串联组<sup>[17]</sup>。

### 1.1 整合酶基因簇

整合酶基因 *int* 大小约 1.2 kb, 在 SXT 和 R391 中, *int* 同相邻的 *s002* 和 *s003* 两个基因在 3' 端构成了类操纵子结构, *s002* 和 *s003* 的丢失不影响 SXT 的剪切和转移, 在 *int* 3' 端上游的 *xis* 编码 Xis 蛋白, 可促使 SXT 从宿主染色体上剪切并抑制其与之之重新整合<sup>[18]</sup>。O'Halloran 等<sup>[19]</sup>于 2007 年报道的 R391 中 *orf4* 在基因序列功能上与 *xis* 类似。Gonzalez 等<sup>[14]</sup>在序列分析和基因缺失实验中证实, SXT 在删除和重新整合在染色体的过程中不含额外的类似 *xis* 的基因, *int* 起到了关键的作用, 此类基因在 SXT 家族中较为保守。

### 1.2 抗生素抗性基因簇

SXT<sup>MO10</sup> 对磺胺甲基异恶唑(Su)、甲氧苄氨嘧

啉(Tm)、氯霉素(Cm)和链霉素(Sm) 4 种抗生素耐药, 其所对应的耐药基因分别为 *sullI*、*dfr18*、*floR*、*strA* 和 *strB*<sup>[20]</sup>。Hochhut 等<sup>[21]</sup>早在 2001 年已证实了 *sullI*、*floR*、*strA* 和 *strB* 与以前报道的耐药基因序列一致, 且发现了甲氧苄氨嘧啶的抗性基因 *dfr18* 编码二氢叶酸还原酶, 可消除 Tm 对四氢叶酸的合成阻碍, 导致细菌对 Tm 耐药。*floR* 基因编码 FloR 蛋白, 对 FloR 蛋白进行疏水性分析, 推测出其具有 12 个疏水跨膜区, 为泵出蛋白 MFS 超家族一员, *floR* 通过泵出机制来完成药物外排, 介导细菌对 Cm 的抗性<sup>[22]</sup>。据推测, SXT<sup>MO10</sup> 的抗生素抗性区从 *tmp* 到 *tnpA* 约 23 kb, 位于 *int* 下游, 在 SXT 5' 末端形成转座子样的结构, 插入到 *rumB* 的 ORF 中, 外侧 8 bp 正向重复序列和 16 bp 反向重复序列耐药基因两侧序列与已知转座酶编码基因具有较高的同源性, 由此推测 SXT 的耐药基因簇是通过转座而获得<sup>[23-24]</sup>。

### 1.3 接合转移基因簇

SXT 的 DNA 序列分析发现, SXT 的接合转移系统在序列上高度同源于伤寒沙门氏菌中的接合型质粒 R27, 同时又与 F 质粒的转移基因的体系相似<sup>[25]</sup>。F 质粒中与接合转移相关的基因具备两种

基本的性质: (1) 编码与接合转移相关的装配, 包括菌毛并完成配对连接。(2) 编码转运蛋白来完成 DNA 由供体到受体的转移。由于 SXT 的基因与 F 质粒相关基因高度同源, 由此推测 SXT 也具备上述两种性质。

SXT 的 *tra* 基因同系物成簇分布在其 3' 末端, 形成了 3 个操纵子: *traI-s043* 编码 DNA 加工运输过程中所需功能蛋白, *traL-traN* 和 *traF-traG* 涉及到菌毛的装配和配对连接的形成<sup>[26]</sup>。其中, *traL-traN* 被 3 个基因阻断(*s052*、*s053* 和 *s054*), *s052* 和 *s053* 与根瘤农杆菌 Ti 质粒中未知功能的 ORFs 相似, *s054* 编码产物与二硫键异构酶 DsbC 相似。在与 SXT 接合转移系统极为相近的质粒中发现, 其转移基因区存在编码 DsbC 的同源基因<sup>[27]</sup>。由以上推断, SXT 部分基因与已发现的 F 质粒和其他接合型质粒接合转移系统基因同源, 此类基因簇构成了 SXT 的接合转移区。

#### 1.4 调控基因簇

SXT 的 3' 端是调控关键区(*s079-setR*), 这一区域包括 9 个 ORFs, 分别为 *s079*、*setC*、*setD*、*s082*、*s083*、*s084*、*s085*、*s086* 和 *setR*, 其中有 8 个方向相同(*s079-s086*), 最后一个 *setR* 呈相反方向<sup>[24]</sup>。SXT 调控区的 *setC* 和 *setD* 编码的 SetC 和 SetD 类似于鞭毛激活子 F1Hc 和 F1hD, 作为 SXT 的转录激活子, 促进 *int* 的表达, *setR* 编码转录抑制子 SetR, 类似  $\lambda$  噬菌体阻遏蛋白 cI, 抑制 *setC* 和 *setD* 表达<sup>[28-29]</sup>。 $P_L$ 、 $P_R$  位于 *s086* 和 *setR* 之间, 两者均被 SetR 抑制。 $P_L$  作为 *setC* 和 *setD* 的启动子, 位于 *s086* 上游, 而  $P_R$  是 *setR* 的启动子, 位于 *setR* 上游。在 SXT 的接合转移系统中同配对连接形成相关的功能区有 3 个基因簇构成: *traLEKBVA*、*traC/trsF/traWUN* 和 *traFHG*, 当细菌受到外界环境因子胁迫 DNA 受损后, 会诱导 SOS 修复反应, 促进接合转移区的基因表达<sup>[13,30]</sup>。

#### 1.5 未知功能基因簇

在 SXT 基因中, 有两大区域功能未知<sup>[24]</sup>。第一个区域处于抗生素抗性区和第一个接合转移区

之间, 推测含有 17 个 ORFs (*s024-s040*), 其中有 14 个在 GenBank 中未找到同源序列, 研究证实此段区域的缺失不会影响 SXT 的剪切和转移。第二个未知功能区为 21 kb, 预测含有 16 个 ORFs (*s060-s073*), 位于第二、三接合转移区之间, 部分 ORFs 可编码相似功能的蛋白质, 其中一个为接合转移系统中常见的单链 DNA 结合蛋白 SSB。在 SSB 下游的 *s065* 和 *s066* 与噬菌体蛋白编码基因相似。*s074* 和 *s075* 编码推测的双组分系统, 但是在 SXT 剪切转移过程不起作用。

## 2 SXT-R391 的接合转移机制

顺式作用元件(Cis-acting element)也称转移起始序列(Origin of transfer, *oriT*), 位于 *s003* 和 *rumB'* 之间, 约 299 bp, 在 SXT 家族中较为保守, 是接合转移过程中不可缺少的特异性位点<sup>[31]</sup>。转移起始需要弛酶(Relaxase)和一个新注释的位于 *oriT* 下游的基因 *mobI* 共同来识别 *oriT*, 从此处打开缺口形成单链, 接合转移过程可以分为 3 步: 剪切、转移和整合。

### 2.1 染色体外环形中间产物的形成

在整合酶 Int 作用下, SXT 剪切后, 宿主染色体切口处连接形成 *attB* 位点, SXT 左右两侧 *attR* 和 *attL* 特异性重组为 *attP* 位点, 形成染色体外环形中间形式<sup>[16]</sup>。此时, 宿主转变为新的受体细胞, 针对剪切后 SXT 上形成的 *attP* 位点进行 PCR 扩增, 也证实了这一环形中间产物的存在<sup>[30]</sup>。

### 2.2 单链 DNA 的形成与转移

SXT-R391 的接合转移系统与 F 质粒极为相似, 从供体细胞转移至受体细胞, 需要 SXT-R391 接合转移区操纵子中的 *traI* 和 *traG* 参与。在 *traI* 编码的 DNA 释放酶作用下, 于 *oriT* 处断裂形成单链 DNA, 经偶联蛋白 TraG 运送至细胞连接处<sup>[24]</sup>。推测在转移单链 DNA 的过程中, 其稳定性是由未知功能区编码的单链 DNA 结合蛋白 SSB 来维持, 形成的单链 DNA 是通过菌毛连接通道由供体细胞转移到受体细胞中, 此过程需要细菌 IV 型分泌系

统来完成<sup>[32]</sup>。

### 2.3 SXT-R391 整合于受体细胞染色体

SXT-R391 单链 DNA 进入到受体菌后, 在整合酶 Int 的作用下, *attP* 和 *attB* 位点于 *prfC* 的 5' 端特异性重组, 打断宿主菌染色体 *prfC* 的开放阅读框架, 重新整合于宿主染色体, *prfC* 获得一个新的 5' 端编码序列, 用以编码蛋白链释放因子<sup>[15]</sup>。以上 3 步完成了 ICEs 在细菌间的水平转移。由于其携带抗生素抗性基因而增强了宿主菌的耐药性, 增强了宿主对环境胁迫的适应性, 使得其在细菌中广泛传播。

## 3 SXT-R391 接合转移系统

细菌的分泌系统介导大分子转运穿过细胞膜, 不同细菌分泌的蛋白质功能各异, 但系统发育和遗传进化的分析表明, 这些蛋白质分泌至胞外仅通过相对较少的几种分泌机制实现, 目前在细菌中共发现有 9 种分泌系统(I-IX 型)。在 ICEs 接合转移过程中, 形成的单链 DNA 是通过菌毛连接通道由供体细胞转移到受体细胞中, 此过程是细菌 IV 型分泌系统完成的<sup>[33]</sup>。IV 型分泌系统最初来源于 F 质粒的发现, 是多基因编码实现单一功能的系统, 与细菌接合机制有关, 介导基因水平转移<sup>[34]</sup>, 在 SXT-R391 的接合转移过程中起到重要的作用。根据 T4SS 在基因含量、基因序列及同源性方面的不同, 可将 T4SS 分型: 第一种是根据代表性质粒分为 3 类, 编码在 IncF (F 质粒) 上为 F 型; 在 IncP (RP4 质粒) 上为 P 型; 在 IncI (R64) 上为 I 型。另外一种分类是将与 *A. tumefaciens* 的 VirB/D4 系统类似的 F 型和 P 型合为 IVA 型; 在与 F 型和 P 型组分模型上差异较大的 I 型被归类于 IVB 型, 与嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*) Dot/Icm 系统相似; 其他与 IVA 和 IVB 型同源性较低或无同源性的其他 T4SS 称为 GI 型<sup>[35]</sup>。研究表明, B 链链球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS) 中 ICE\_515\_tRNA<sup>Lys</sup> 可在不同菌株之间传递编码多种假定表面蛋白的遗传信息, 其中一种属于表面蛋白抗原 I/II 型, 参

与生物被膜及多价粘附素的形成, 介导菌株环境适应性及毒性<sup>[36]</sup>。另一方面, 细菌的分泌系统可介导大分子转运穿过细胞膜, 分泌毒性蛋白或效应因子, 进入外界环境或直接作用于宿主靶位点时引发宿主不同的应激反应。条件致病菌铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中, 毒力岛 PAPI-1 属于 ICEs 家族<sup>[37]</sup>。

*A. tumefaciens* 的 VirB/D4 系统是典型的 T4SS, 大部分革兰氏阴性菌中发现的 T4SS 与 VirB/D4 T4SS 相似, 由 12 个蛋白质组成, 包括 VirB1-VirB11 和 VirD4, 可以形成一条包括胞外菌毛、胞质 ATP 酶、核心复合物、转运通道等结构的横跨整个细菌内外膜的通道<sup>[38]</sup>。以下以根瘤农杆菌为例, 介绍 T4SS 主要的生物学结构。

### 3.1 胞外菌毛

胞外菌毛的研究已达 40 年之久, 其结构在 T4SS 中研究得比较全面, 其外直径为 8 nm-10 nm, 内腔为 2 nm-3 nm, 是从受体细胞表面延伸出的细长筒状结构, 作为底物在供体菌与受体菌之间的转移通道<sup>[39]</sup>。T4SS 胞外菌毛是由 VirB2 和 VirB5 构成, 其中 VirB5 位于菌毛顶部, 在菌毛构成中起辅助作用, 同大肠杆菌接合型质粒 pKM101 编码的 TraC 同源, 经实验证实其具有粘附素特性, 可以使供体菌与受体菌建立一种稳定的特异性接触。VirB2 由 VirB10 包裹构成引导底物由内膜到达外膜的筒状通道<sup>[40]</sup>。

### 3.2 胞质 ATP 酶

胞质 ATP 酶 VirB4、VirB11 和 VirD4 三者相互作用, 可以激活系统, 为底物分泌转运和系统装配提供能量, 是 T4SS 分泌和菌毛起源的基础。T4SS 中 VirB4 较保守, 同大肠杆菌 pKM101 编码的 TraB 同源, 在 600-900 残基之间形成 2 个区域: C 末端结构域 (C-terminal domain, CTD) 和 N 末端结构域 (N-terminal domain, NTD)<sup>[41]</sup>。CTD 约 400 残基, 是 VirB4 中高度保守的部分, 囊括了 ATP 酶活性的关键区域, 包括催化所必需的 WalkerA (WA) 和 WalkerB (WB) 模体, 具有类 RecA 活性<sup>[42]</sup>。保守

性相对较弱的 NTD 通常被认为与膜相互作用形成 1–3 个跨膜区域, 依据在细胞中的不同定位执行不同的功能。VirB4 的单体、二聚体、三聚体和六聚体形式已有报道, 且从胞质和膜中纯化成功, 但是其寡聚状态及细胞内定位尚不明确。VirB11 属于转运 ATP 酶超家族, 是菌毛形成和 DNA 转运的开关, 与 T4SS 和 T2SS 相关, 同大肠杆菌 pKM101 编码的 TraG 同源<sup>[43]</sup>。幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)中, VirB11 呈六聚体形式, 其单体包含由 CTD 和 NTD 的一半形成的两个环形结构域, 直径均为 50 Å, CTD 为类 RecA 折叠, NTD 是 VirB11 家族蛋白<sup>[44]</sup>。VirD4 为偶联蛋白(Coupling protein, CP), 通过 N 末端嵌入细菌内膜, 主要负责底物募集, 将识别的底物传递给 VirB11, 接下来 3 个 ATP 酶激活系统将底物传递给 VirB6 和 VirB8, 最后底物经由 VirB9 和 VirB2 完成分泌<sup>[45]</sup>。

### 3.3 核心复合物

VirB7、VirB9 和 VirB10 构成了分子量 1.05 MD, 横跨细胞内外膜稳定的核心复合物<sup>[46]</sup>。运用分辨率 15 Å 低温电子显微技术分析此复合物的结构, 发现该复合物由 I 和 O 层组装在一起, 形成中空的圆筒状, 每层形成一个双层环状结构。I 层由 VirB9 (TraO)和 VirB10 (TraF)同源体的 NTD 构成, 类似于直径为 55 Å 底部开口的杯子状结构, 通过 VirB10 的 NTD 跨膜螺旋嵌入内膜。O 层嵌入细胞外膜, 由 VirB7 同源体(TraN)全长和 VirB9、VirB10 同源体的 CTD 的 14 个拷贝构成, 形成分子量为 590 kD, 嵌入外膜直径 10Å 的帽子状结构。I 层的一个含  $\alpha$ -螺旋束的疏水性环通过内膜形成一条 32Å 的通道, 与 VirB10 组装成的螺旋结合在一起, 供底物转运至胞外环境<sup>[47]</sup>。VirB10 是构成 T4SS 通道的嵌入内膜的外膜蛋白, 包裹 VirB2 形成菌毛筒状通道, VirB7、VirB9 和 VirB10 对核心复合物至关重要, 缺失任何一个都会影响到核心结构装配<sup>[44]</sup>。

### 3.4 内膜通道

内膜通道由 VirB6 和 VirB8 构成, 两者区别于 VirB10 的是, 在 *A. tumefaciens* 底物分泌过程中可

直接与底物接触<sup>[45]</sup>。VirB6 是由一个周质 N 末端、5 个跨膜元件和胞质 CTD 构成的多组分内膜蛋白, 同时包含由一个较大周质环构成的中心区域, 在 *A. tumefaciens* 中该环诱导 VirB6 与 T4SS 底物相互作用, VirB8 是由 N 末端跨膜片段和一个较大胞质 C 末端结构域构成的一个较小的内膜蛋白, 直接参与到底物分泌<sup>[39]</sup>。

### 3.5 外膜通道

外膜通道包括核心复合物的整个 O 层, 直径为 172 Å, 包含 VirB7 及 VirB9、VirB10 CTD 除嵌入内膜以外的剩余成分<sup>[39]</sup>。通过对外膜通道的测定, VirB7 和 VirB9 复合物包裹 VirB10 CTD 形成一个内环, VirB7 辐射状交叉于整个复合装置, 底物分泌过程中内膜通道与外膜通道组成蛋白相互作用, 底物从 VirB6 转移至 VirB8, 后交由 VirB7 和 VirB9 至外膜<sup>[43]</sup>。

### 3.6 孤蛋白

VirB1 和 VirB3 不参与构成分泌装置, 但它们以不同的形式参与到分泌机制中。*A. tumefaciens* 中 *virB* 缺失会减慢底物分泌, 不再生成 T 型菌毛<sup>[48]</sup>。VirB1 的 NTD 存在于细胞周质中, 带有胞壁质酶活性, 可降解肽聚糖, 其 CTD 延伸至外环境, 可能与 T 型菌毛生成相关; VirB3 是个小蛋白, 推测在其 N 末端含有 1–2 个跨膜组件。在数个 T4SS 里鉴定到了 VirB3-VirB4 的蛋白复合物, 由此推测 VirB3 可能存在于内膜上, 与 VirB4 形成功能复合物。但是 VirB3 的其他功能未知<sup>[45]</sup>。

## 4 结论

近年来, 国内外对于 SXT-R391 家族 ICEs 的起源、结构和接合转移机制方面做了大量的研究, 在越来越多隶属于不同种属原核生物中发现了 ICEs 的存在<sup>[6]</sup>。在 SXT 元件结构中尚未解决如下问题: (1) 接合转移相关的基因簇中, 推测与菌毛装配及配对连接相关的基因作用机制尚未明确; (2) 新注释的 *mobI* 基因参与 *oriT* 识别的详细情况未搞清; (3) SXT 中 TraG 和 Eex 介导的排斥机制未知。

对于 SXT 接合转移过程涉及的 T4SS, 目前的研究主要是在组成元件的结构上, 而待解决的问题主要集中在底物分泌机制上: (1) SXT<sup>MO10</sup> 是否包含完整的 T4SS 组件, 所对应的编码基因是否全部位于 SXT 上; (2) T4SS 底物转移到受体细胞的过程中, 各蛋白组件之间如何相互作用; (3) 核心孔道嵌入内膜及核心复合物相互作用的机制仍未搞清; (4) 核心复合物同菌毛之间协同作用机制未知; (5) 孤蛋白在细胞中的定位及具体功能尚未明确。

因此, 未来的工作应结合 T4SS 组成元件的结构, 利用功能基因组学、蛋白质组学和生物信息学等技术更深层次地阐述 SXT 接合转移机制, 以期对致病菌流行预警和防控提供理论支撑和指导价值。

## REFERENCES

- [1] Tundis R, Frattaruolo L, Carullo G, et al. An ancient remedial repurposing: synthesis of new pinocembrin fatty acid acyl derivatives as potential antimicrobial/anti-inflammatory agents[J]. *Natural Product Research*, 2019, 33(2): 162-168
- [2] Ryan MP, Armshaw P, O'halloran JA, et al. Analysis and comparative genomics of R997, the first SXT/R391 integrative and conjugative element (ICE) of the Indian Sub-Continent[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 8562
- [3] Colombi E, Straub C, Künzel S, et al. Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(2): 819-832
- [4] Pan ZH, Liu J, Zhang Y, et al. A novel integrative conjugative element mediates transfer of multi-drug resistance between *Streptococcus suis* strains of different serotypes[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 229: 110-116
- [5] Delahay RM, Croxall NJ, Stephens AD. Phylogeographic diversity and mosaicism of the *Helicobacter pylori* tfs integrative and conjugative elements[J]. *Mobile DNA*, 2018, 9: 5
- [6] Liu M, Li XB, Xie YZ, et al. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D660-D665
- [7] Sun FJ, He Y, Chen LM. Effective screening for multiple-drug resistant bacteria harboring SXT/R391 family of integrative and conjugative elements[J]. *Food Science*, 2015, 36(13): 79-83 (in Chinese)  
孙凤娇, 贺羽, 陈兰明. 携带 SXT/R391 家族整合接合元件多重耐药菌株的高效筛选与分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(13): 79-83
- [8] He Y, Tang YY, Sun FJ, et al. Detection and characterization of integrative and conjugative elements (ICEs)-positive *Vibrio cholerae* isolates from aquacultured shrimp and the environment in Shanghai, China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 101(2): 526-532
- [9] Li XB, Xie YZ, Liu M, et al. oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W229-W234
- [10] Wang JW, Yang BJ, An Y, et al. Systematic analysis and prediction of type IV secreted effector proteins by machine learning approaches[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2019, 20(3): 931-951
- [11] Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, et al. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(11): 2991-3000
- [12] Waldor MK, Tschäpe H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(14): 4157-4165
- [13] Wozniak RAF, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(8): 552-563
- [14] Gonzalez M, Huston D, McLenigan MP, et al. SetR<sub>ICE391</sub>, a negative transcriptional regulator of the integrating conjugative element 391 mutagenic response[J]. *DNA Repair*, 2019, 73: 99-109
- [15] Haskett TL, Ramsay JP, Bekuma AA, et al. Evolutionary persistence of tripartite integrative and conjugative elements[J]. *Plasmid*, 2017, 92: 30-36
- [16] Johnson CM, Grossman AD. Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work[J]. *Annual Review of Genetics*, 2015, 49: 577-601
- [17] Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, et al. The hidden life of integrative and conjugative elements[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(4): 512-537
- [18] Nonaka L, Yamamoto T, Maruyama F, et al. Interplay of a non-conjugative integrative element and a conjugative plasmid in the spread of antibiotic resistance via suicidal plasmid transfer from an aquaculture *Vibrio* isolate[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198613
- [19] O'Halloran JAO, McGrath BM, Pembroke JT. The *orf4* gene of the enterobacterial ICE, R391, encodes a novel UV-inducible recombination directionality factor, Jef, involved in excision and transfer of the ICE[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 272(1): 99-105
- [20] Mala W, Faksri K, Samerpitak K, et al. Antimicrobial resistance and genetic diversity of the SXT element in *Vibrio cholerae* from clinical and environmental water samples in northeastern Thailand[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2017, 52: 89-95
- [21] Hochhut B, Beaver JW, Woodgate R, et al. Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(4): 1124-1132
- [22] Ding YC, Teo JWP, Drautz-Moses DI, et al. Acquisition of resistance to carbapenem and macrolide-mediated quorum sensing inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* via ICE<sub>Tn4371</sub>6385[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 57
- [23] Cury J, Touchon M, Rocha EPC. Integrative and conjugative

- elements and their hosts: composition, distribution and organization[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(15): 8943-8956
- [24] Cury J, Jové T, Touchon M, et al. Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(10): 4539-4550
- [25] Carraro N, Poulin D, Burrus V. Replication and active partition of integrative and conjugative elements (ICEs) of the SXT/R391 family: the line between ICEs and conjugative plasmids is getting thinner[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(6): e1005298
- [26] Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, et al. Serotype distribution, antimicrobial resistance and prevalence of pilus islets in pneumococci following the use of conjugate vaccines[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2017, 66(5): 643-650
- [27] Huang JW, Deng SS, Ren JM, et al. Characterization of a *bla*<sub>NDM-1</sub>-harboring plasmid from a *Salmonella enterica* clinical isolate in China[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(2): 1087-1092
- [28] Kühne C, Singer HM, Grabisch E, et al. RflM mediates target specificity of the RcsCDB phosphorelay system for transcriptional repression of flagellar synthesis in *Salmonella enterica*[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 101(5): 841-855
- [29] Chevance FFV, Hughes KT. Coupling of flagellar gene expression with assembly in *Salmonella enterica*[A]/Minamino T, Namba K. *The Bacterial Flagellum: Methods and Protocols*[M]. New York, NY: Humana Press, 2017: 47-71
- [30] Brophy JAN, Triassi AJ, Adams BL, et al. Engineered integrative and conjugative elements for efficient and inducible DNA transfer to undomesticated bacteria[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(9): 1043-1053
- [31] Carraro N, Libante V, Morel C, et al. Plasmid-like replication of a minimal streptococcal integrative and conjugative element[J]. *Microbiology*, 2016, 162(4): 622-632
- [32] Juhas M, Ajioka JW. Integrative bacterial artificial chromosomes for DNA integration into the *Bacillus subtilis* chromosome[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 125: 1-7
- [33] Li XB, Xie YZ, Liu M, et al. oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W229-W234
- [34] Wang JW, Yang BJ, Leier A, et al. Bastion6: a bioinformatics approach for accurate prediction of type VI secreted effectors[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(15): 2546-2555
- [35] Abby SS, Cury J, Guglielmini J, et al. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23080
- [36] Chuzeville S, Dramsi S, Madec JY, et al. Antigen I/II encoded by integrative and conjugative elements of *Streptococcus agalactiae* and role in biofilm formation[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 88: 1-9
- [37] Hong TP, Carter MQ, Struffi P, et al. Conjugative type IVb pilus recognizes lipopolysaccharide of recipient cells to initiate PAPI-1 pathogenicity island transfer in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17: 31
- [38] Wagner A, Dehio C. Role of distinct Type-IV-secretion systems and secreted effector sets in host adaptation by pathogenic *Bartonella* species[J]. *Cellular Microbiology*, 2019, 21(3): e13004
- [39] Silverman PM, Clarke MB. New insights into F-pilus structure, dynamics, and function[J]. *Integrative Biology*, 2010, 2(1): 25-31
- [40] Trokter M, Waksman G. Translocation through the conjugative type IV secretion system requires unfolding of its protein substrate[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(6): e00615-17
- [41] Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, et al. Structure of a type IV secretion system[J]. *Nature*, 2014, 508(7497): 550-553
- [42] Redzej A, Ukleja M, Connery S, et al. Structure of a VirD4 coupling protein bound to a VirB type IV secretion machinery[J]. *The EMBO Journal*, 2017, 36(20): 3080-3095
- [43] Mary C, Fouillen A, Bessette B, et al. Interaction via the N terminus of the type IV secretion system (T4SS) protein VirB6 with VirB10 is required for VirB2 and VirB5 incorporation into T-pili and for T4SS function[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(35): 13415-13426
- [44] Chang YW, Shaffer CL, Rettberg LA, et al. *In vivo* structures of the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system[J]. *Cell Reports*, 2018, 23(3): 673-681
- [45] Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(6): 343-359
- [46] Costa TRD, Ilangovan A, Ukleja M, et al. Structure of the bacterial sex F pilus reveals an assembly of a stoichiometric protein-phospholipid complex[J]. *Cell*, 2016, 166(6): 1436-1444.e10
- [47] Prevost MS, Waksman G. X-ray crystal structures of the type IVb secretion system DotB ATPases[J]. *Protein Science*, 2018, 27(8): 1464-1475
- [48] Flores-Ríos R, Moya-Beltrán A, Pareja-Barrueto C, et al. The type IV secretion system of ICEAfe1: formation of a conjugative pilus in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 30