



革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运机制研究进展*

童金蓉¹⁾ 张昭寰^{1,2)**} 黄振华¹⁾ 张旭¹⁾ 史俊¹⁾刘海泉^{1,3,4)} 潘迎捷^{1,3,4)} 赵勇^{1,3,4)**}⁽¹⁾ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ⁽²⁾ 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;⁽³⁾ 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306;⁽⁴⁾ 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要 革兰氏阴性细菌的外膜由脂多糖、磷脂、外膜蛋白和脂蛋白等成分组成, 是细菌抵御外界有害物质的首要物理屏障, 与细菌致病性和耐药性密切相关. 外膜各组分依赖特定的系统进行跨膜转运, 包括脂多糖转运系统 (lipopolysaccharide transport, Lpt)、脂质不对称维持系统 (maintenance of lipid asymmetry, Mla)、 β -桶状装配机器 (β -barrel assembly machinery, Bam) 以及脂蛋白定位系统 (localization of lipoprotein, Lol). 这些系统能够保证细菌外膜的完整与稳定, 被视为维持细菌生命活动的“命门”. 因此, 本文系统地综述革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运系统结构与功能, 并对其未来研究方向进行展望, 为新型靶向抗菌类药物研发提供新的思路.

关键词 革兰氏阴性细菌, 外膜主要成分, 跨膜转运系统结构与功能

中图分类号 Q5, Q71, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0022

根据革兰氏染色法的原则, 可将细菌分为两大类: 革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌. 与革兰氏阳性细菌相比, 革兰氏阴性细菌拥有更为复杂的细胞外膜结构, 容易导致细菌耐药性的产生. 革兰氏阴性细菌拥有特殊的外膜 (outer membrane, OM), 由脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、磷脂 (phospholipids, PLs)、外膜蛋白 (outer membrane proteins, OMPs) 和脂蛋白 (lipoproteins, Lpp) 组成. 这些组分在外膜结构上的具体分布如图 1 所示, 细菌外膜周质侧磷脂与外侧脂多糖构成不对称的脂质双分子层结构, 脂蛋白主要通过 N 端脂酰基团锚定在外膜周质侧, 其余外膜蛋白多以 β 桶状结构镶嵌在细菌外膜内. 外膜脂质双分子层形成疏水带, 能够防止极性溶质的渗透^[1], 而外膜外侧的脂多糖碳链又能构成复杂的极性网络, 使细菌抵御外界疏水性成分的进入. 这些细菌外膜的特殊结构与成分形成了有效的保护性屏障^[1], 防止包括洗涤剂、抗生素等有害化合物的侵害^[2-3], 使细菌能够适应不同的环境. 与此同

时, 外膜作为革兰氏阴性细菌接触外界的首要界面, 在细菌与外界物质、信息交流的过程中起到了不可或缺的作用^[4]. 因此, 研究革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运机制, 对细菌生理学、细菌致病与耐药机理、新型靶向抗菌剂的开发等具有十分重要的意义.

为维持革兰氏阴性细菌外膜的完整性, 这些关键外膜组分依赖特定的合成转运系统进行合理、正确地装配. 图 2 总结了革兰氏阴性细菌各类外膜合

* 国家自然科学基金面上项目(31972188, 31671779), 国家博士后创新人才支持计划(BX20190194), 上海市“超级博士后”激励计划(2019348), 上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056), 国家重点研发计划(2018YFC1602205), 上海市科技兴农项目(沪农科推字2017第4-4号)和中国博士后科学基金第66批面上项目(2019M661469)资助.

** 通讯联系人.

赵勇. Tel: 021-61900768, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

张昭寰. Tel: 021-61900503, E-mail: gongziwuhen@126.com,

zh-zhang@shou.edu.cn

收稿日期: 2020-01-15, 接受日期: 2020-04-27

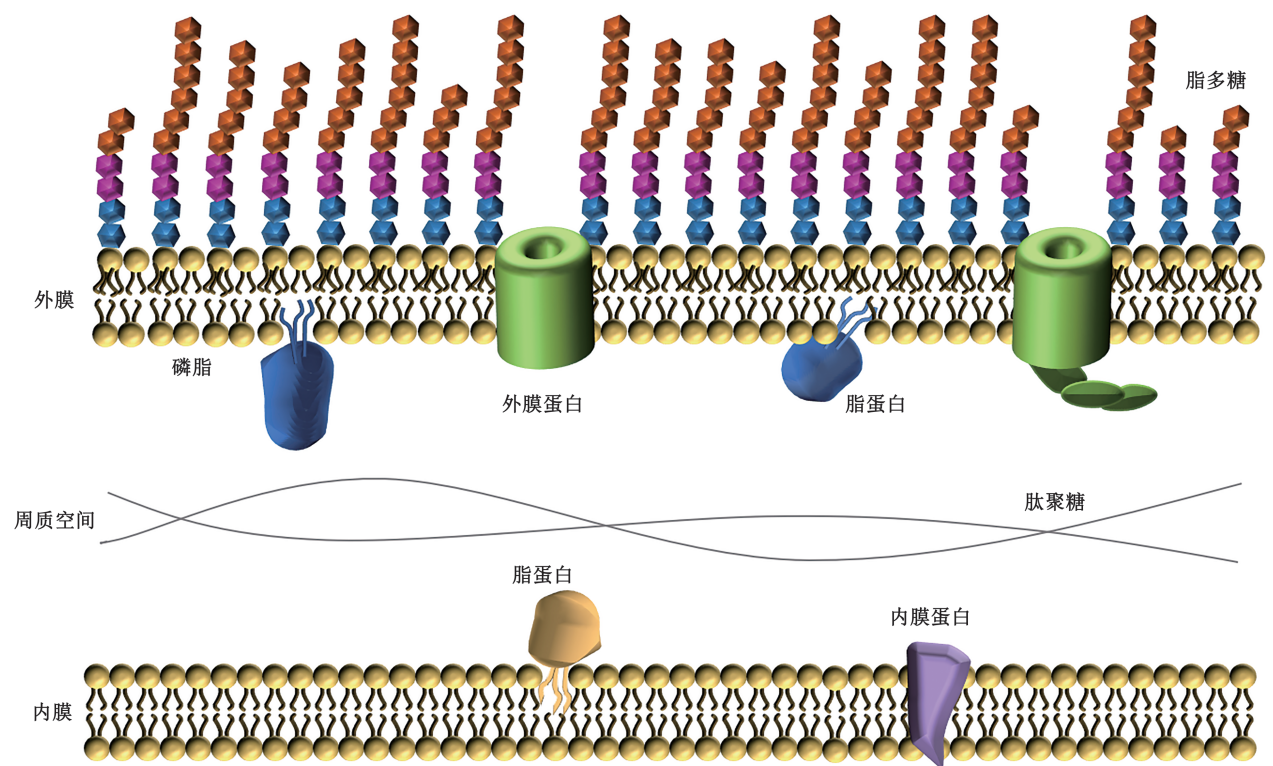


Fig. 1 The main components of Gram-negative bacterial double-layer membrane
图1 革兰氏阴性细菌细胞膜主要组分

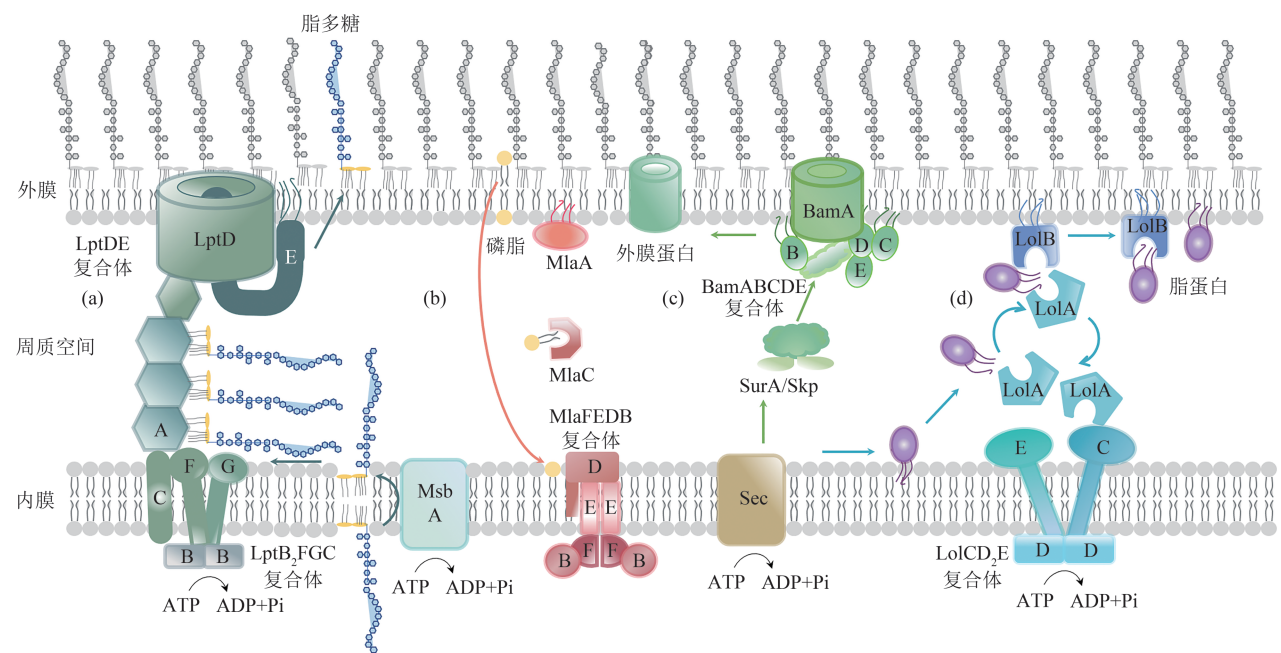


Fig. 2 Transmembrane transport pathways for the main components of the outer membrane in Gram-negative bacteria
图2 革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运途径
(a) Lpt途径; (b) Mla途径; (c) Bam途径; (d) Lol途径.

成转运系统. 如图所示, 细胞周质蛋白、分泌蛋白和各类膜蛋白的跨膜转运都依赖 Sec 通用途径 (general secretory pathway), 其中心组件是跨膜 SecYEG 通道, 负责将新生肽转运至周质空间或插入内膜. 脂多糖的跨膜转运依赖脂多糖转运系统 (lipopolysaccharide transport, Lpt); 磷脂需要通过脂质不对称维持系统 (maintenance of lipid asymmetry, Mla) 将细菌外膜外侧错配磷脂进行逆向转运; 外膜蛋白的正确折叠与镶嵌主要依赖 β -桶状装配机器 (β -barrel assembly machinery, Bam); 脂蛋白依赖脂蛋白定位系统 (localization of lipoprotein, Lol) 锚定在细菌外膜周质侧^[5].

这些外膜主要成分的跨膜转运系统并不是孤立存在的, 它具有其复杂性与系统性, 往往需要各外膜成分跨膜转运系统协同配合, 保证细菌外膜的完整与稳定, 被视为维持细菌生命活动的“命门”, 引起了广泛的关注. 因此, 本文系统地革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运系统结构与功能进行综述, 并阐述各系统之间的相互作用关系, 最后对外膜主要成分跨膜转运系统的进一步研究提出展望.

1 脂多糖转运系统 (lipopolysaccharide transport, Lpt)

外膜的主要成分脂多糖是双亲性大分子, 由类脂 A (lipid A)、核心寡糖 (core oligosaccharide) 以及 O-抗原链 (O-antigen) 组成, 能够阻止疏水性分子进入细菌, 与细菌耐药性、黏附、侵袭和生物被膜形成等具有密切联系^[6-10]. 脂多糖的初始合成发生在细菌内膜的内侧, 类脂 A 首先与核心寡糖结合形成粗糙型脂多糖 (rough-LPS, R-LPS)^[11], 再通过 ABC (ATP-binding cassette) 转运体 MsbA 转运至内膜外侧^[12], O-抗原链则通过特定的翻转酶翻转至内膜外侧^[13], 然后通过脂多糖连接酶 WaaL 将 O-抗原链与 R-LPS 相连, 最终形成成熟的光滑型脂多糖 (smooth-LPS, S-LPS)^[14-15]. 合成完毕的脂多糖通过 Lpt 进行转运, 该系统包括 7 个转运蛋白 LptA-G^[16-20], 分别在内膜形成 LptB₂GFC 复合物, 在周质中形成 LptA “跨膜桥”, 在外膜上形成 LptD/E 复合体. LptB₂GFC 转运体通过水解 ATP 方式将成熟的脂多糖由内膜传递至 LptA, 再依次穿过 LptA “跨膜桥” 到达外膜上的 LptD/E, 最终定位于细菌外膜外侧^[21] (图 3).

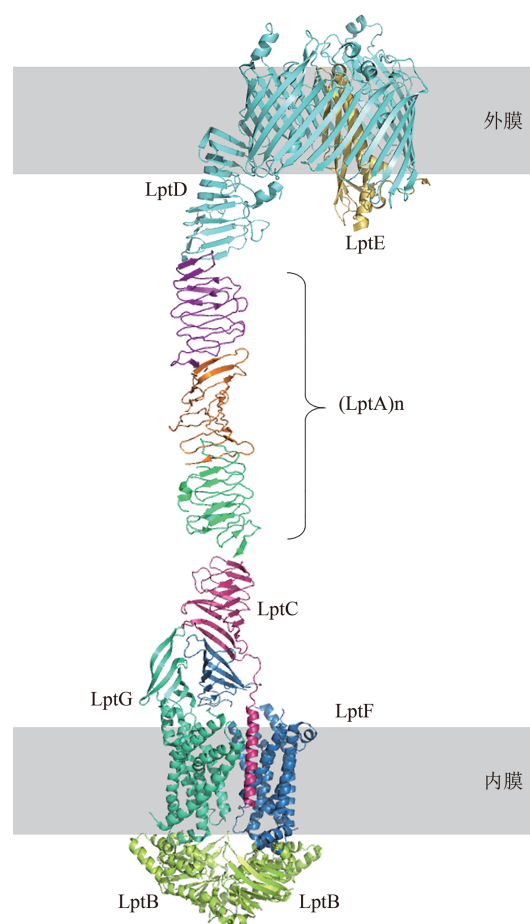


Fig. 3 The structural model of the lipopolysaccharide transport pathway^[25, 31, 34]

图3 脂多糖转运系统的结构模型^[25, 31, 34]

LptB₂GFC根据PDB中的6MJP蛋白信息进行绘制^[25], LptA根据PDB中的2R1A蛋白信息进行绘制^[31], LptD/E根据PDB中的4Q35蛋白信息进行绘制^[34].

1.1 内膜上ABC转运体LptB₂GFC

LptB₂GFC复合物是位于细菌内膜上的ABC转运体, 由LptB、LptC、LptF和LptG构成. 细胞质中LptB同源二聚体形成该转运体的核苷酸结合区 (nucleotide-binding domains, NBDs), 能够通过水解ATP的方式为该转运系统供能. 跨膜蛋白LptC、LptF和LptG位于细胞内膜上, 构成该转运体的跨膜结构域 (transmembrane domains, TMDs), 能够通过构象改变的方式抽提和转运脂多糖.

2017年, Dong等^[22]和Luo等^[23]分别基于铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 解析出了LptB₂FG的晶体结构. 2019年, Li等^[24]解析了大肠杆菌LptB₂GFC复合物晶体结构, 阐述了LptC对

脂多糖转运的重要性. Owens 等^[25]则展示了来自霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) LptB₂FGC 的晶体结构, 揭示了 LptB₂FGC 系统向外膜运输脂多糖是一个不可逆的过程. Tang 等^[26]运用冷冻电镜解析了弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) LptB₂FGC 的结构, 进一步阐释了其转运脂多糖的原子细节.

研究结果表明, LptC 由 1 个内膜上的 N 端跨膜螺旋和 1 个周质空间中的 β 卷筒蛋糕状结构 (β -jellyroll) 组成. LptF 和 LptG 具有相似的结构, 由 6 个 α 螺旋跨膜片段 (TM1-6-LptF 和 TM1-6-LptG) 和 1 个 β 卷筒蛋糕状结构 (β -jellyroll) 组成. 在内膜内侧, LptF 和 LptG 的 2、3 号 α 螺旋跨膜片段之间通过耦合螺旋 (coupling helix) 的形式与 LptB 相连^[27]. 在内膜外侧, LptF 和 LptG 的 3、4 号 α 螺旋跨膜片段之间, 均连接着自身的 β 卷筒蛋糕状结构, 其中 LptF 的 β 卷筒蛋糕状结构与 LptC 的 β 卷筒蛋糕状结构紧密地结合. 在内膜中, LptF 和 LptG 的 α 跨膜螺旋均向内膜外侧弯曲, LptF 的 1 号 α 螺旋跨膜片段与 LptG 的 5 号 α 螺旋跨膜片段相互作用, 形成 1 个闭合的类似侧门的结构 (lateral gates); LptF 的 5 号 α 螺旋跨膜片段和 LptG 的 1 号 α 螺旋跨膜相互作用, 形成 1 个开放的类似侧门的结构; LptC 的 N 端跨膜螺旋以一定的倾斜角度位于 LptF 和 LptG 开放的侧门结构之间, 共同构成 1 个特殊的 V 形腔体状结构.

Li 等^[24]的研究表明, LptB₂FGC 在内膜中 V 型腔体的残基高度保守, 在内表面形成疏水环境, 同时其内膜-周质界面携带正电荷, 这些性质使该 V 型腔体具备接收内膜外侧脂多糖的功能. 脂多糖通过开放的侧门进入 LptB₂FGC 内腔, 随着 LptB 结合并水解 ATP 供能, 带动 LptF 和 LptG 跨膜螺旋结构向内折叠, 导致脂多糖从腔体内抽提出, 传递给 LptF 的 β 卷筒蛋糕状结构, 再通过 LptF 和 LptC 的 β 卷筒蛋糕状结构之间的连接, 传递给 LptA “跨膜桥”. Owens 等^[25]进一步阐释了这一脂多糖转运过程的不可逆性: 从 V 型腔体内抽提出的脂多糖开启了 LptF 和 LptC 之间的连接, 进入 LptC 的 β 卷筒蛋糕状结构后连接将自动关闭, 防止脂多糖反向运动回内膜上, 保证了 LptB₂FGC 运输脂多糖的过程为单向运输^[28-30].

1.2 周质空间的 LptA “跨膜桥”

含有脂酰链的脂多糖不能自发地穿过充满水的周质空间, 需要位于周质空间中 LptA 的协助^[31],

与其他周质伴侣蛋白的转移机制不同, LptA 能够以多聚物的形式构成稳定的“跨膜桥”结构, 使脂多糖穿过周质空间^[32]. Suits 等^[31]报道了大肠杆菌 LptA 结构, 该蛋白质包含了 16 个连续的反向平行 β 链, 形成 1 个独特的 β 折叠结构, 与 LptC 的 C 端可溶性区域和 LptD 的 N 端可溶性区域具有同源性, 结构类似于 β 卷筒蛋糕状结构. LptA 蛋白的 N 端与 LptC 的 C 端相互作用, C 端与 LptD 的 N 端相互作用, 在周质空间中形成一段连续的 β 卷筒蛋糕状“跨膜桥”^[32, 28]. 这些 β 卷筒蛋糕状结构属于连续疏水槽结构, 能够与脂多糖的疏水部分相结合, 从而使脂多糖穿过充满水的周质环境.

1.3 外膜桶状蛋白与脂蛋白复合物 LptD/E

脂多糖穿过 LptA “跨膜桥”后, 由外膜上 β -桶状蛋白 LptD 与脂蛋白 LptE 形成的异二聚体 LptD/E 转运至外膜外侧, 最终用于细菌外膜的组装. 现阶段, 沙门氏菌、志贺氏菌和大肠杆菌等革兰氏阴性细菌的 LptD/E 结构均已被解析^[33-36]. 研究表明, LptD 含有 1 个由 26 条 β 股组成的 β 桶状结构, 是迄今为止革兰氏阴性细菌外膜中最大的 β 桶状蛋白, LptD 的 N 端区域与 LptA 结构类似, 形成 1 个由 22 条 β 股构成的 β 卷筒蛋糕状结构^[34-35]. LptE 由 2 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠组成, 与 LptD 的 C 端紧密结合, 嵌入在 LptD 的 β 桶内形成类似于“桶与塞子”的结构^[37-38].

当前 LptD/E 转运脂多糖的机制为: 脂多糖通过周质空间到达 LptD 的 N 端, 然后 LptD 的构象发生轻微改变, 使脂多糖的类脂 A 进入 LptD 的 β 桶内部, 再通过 LptD 第 1 和 26 号 β 股之间的“侧门”到达外膜外侧^[33-34], 而脂多糖的 O 抗原和核心寡糖则直接通过 LptD/E 的亲水性腔体到达外膜外侧^[39-40]. 在运输过程中, LptE 不仅是 LptD 的一个插入物, 还可能参与脂多糖的组装^[38], 但其具体的转运功能目前尚不清楚.

2 脂质不对称维持系统 (maintenance of lipid asymmetry, Mla)

磷脂是外膜脂质双分子层的重要组成部分之一, 其在细胞质中开始合成, 在内膜内侧完成后期合成^[41]. 合成完毕的磷脂分布在内膜两侧和外膜的周质侧, 分别构成内膜的磷脂双分子层和外膜的脂质不对称结构^[42], 但尚未发现协助其完成周质内移动的关键跨膜转运机制^[2]. 此外, 在细菌生长或受到应激时, 一些磷脂可能会错误定位在外膜外

侧^[43-44], 这将破坏外膜的脂多糖层, 不利于外膜脂质不对称结构的稳定性. 目前, 已知有3个系统能够帮助恢复外膜的脂质不对称性: 外膜磷脂酶 PldA 能够水解外膜外侧的磷脂^[45-46]; 脂多糖棕榈酰转移酶 PagP 能够利用外膜外侧的磷脂, 进行脂多糖类脂 A 的棕榈酰基化^[47-48]; 而 Mla 能够直接提取外膜外侧的磷脂, 使磷脂逆向运输回内膜^[2, 49].

Mla 系统由6个转运蛋白 MlaA-F 组成, 分别在内膜形成 MlaBDEF 复合物, 在周质中形成伴侣蛋白 MlaC, 在外膜周质侧形成脂蛋白 MlaA^[50]. 与其他外膜组分从内膜转运到外膜的方式不同, Mla 系统能以外膜到内膜的方向来运输磷脂: 外膜周质侧转运蛋白 MlaA 首先在不消耗 ATP 情况下, 将外膜外侧的磷脂传递给周质中伴侣蛋白 MlaC, 再通过 MlaC 将磷脂转运给内膜上的 MlaBDEF, 最终以水解 ATP 耗能的方式将磷脂插入内膜^[5]. 目前 Mla 系统中只有 MlaA、MlaC 以及 MlaD 的结构已被解析^[49, 51] (图4).

2.1 外膜蛋白 MlaA

MlaA 是锚定在外膜周质侧的脂蛋白, 能够选择性地作用于外膜外侧的磷脂, 帮助维持细菌外膜的基本屏障. Javier 等^[51] 解析了 MlaA 结构, 研究表明 MlaA 由6个围绕成环形的 α 螺旋 (H1-H6) 构

成, 2号螺旋的亲水残基、4号和5号 α 螺旋之间的膜内环 (Intra-membrane loop)、5号 α 螺旋和6号 α 跨膜螺旋共同组成一个中心孔洞, 使 MlaA 形成类似“甜甜圈”的环形结构. MlaA 中心孔洞上存在一个明显的半圆形脊状结构, 由5号 α 螺旋、6号 α 螺旋和连接它们的环路构成. MlaA 中心孔洞的内部具有双亲性, 为磷脂进入外膜的通道. MlaA 位于外膜 β 桶状蛋白 OmpF 单体之间的沟槽中, 通过疏水残基间的范德华力与 OmpF 结合, 形成稳定复合物, 嵌入在外膜的内膜 (图4). 研究表明, OmpF 可能不直接参与磷脂的转运, 仅能用于 MlaA 蛋白的支撑和正确定位^[50].

MlaA 的中心孔洞被周围螺旋结构包围, 形成外膜周质侧磷脂与中心孔洞之间的“墙壁”, 阻止外膜周质侧磷脂进入孔道. 而外膜外侧磷脂能够特异性地结合在 MlaA 中心孔洞周围的脊上, 造成 MlaA 的结构重排, 导致中心孔洞扩大, 使磷脂能够顺利穿过中心孔洞并向周质中扩散. 这种构象变化可能是自发的, 也可能是 MlaC 与 MlaA 周质域的相互作用而导致^[51].

2.2 周质空间的伴侣蛋白 MlaC

MlaC 是与磷脂结合的周质伴侣蛋白, 协助磷脂穿过充满水的周质空间. Ekiert 等^[49] 测定了 MlaC 的晶体结构, 分辨率为 ~ 1.50 Å. 研究表明 MlaC 由4个 β 股和7个 α 螺旋混合构成, 其中心具有疏水囊腔结构, 可用于结合磷脂的两条酰基链, 通过这样的方式参与磷脂的转运. 此外, MlaC 能与内膜上的 MlaFEDB 复合物和外膜的 MlaA-OmpF 特异性结合, 进一步说明 MlaC 能够通过结合内、外膜磷脂转运复合物的方式, 参与磷脂在外膜和内膜之间的转运.

2.3 内膜上 ABC 转运体 MlaFEDB

MlaFEDB 复合物是位于细菌内膜上的 ABC 转运体, 由 MlaB、MlaD、MlaE 和 MlaF 构成. 如图4所示, 内膜外侧的 MlaD 具有可溶性结构域, 参与周质内磷脂的识别与转运^[45]. 内膜中的 MlaE 以同源二聚体的形式存在, 构成该转运体的跨膜结构域 (TMDs)^[44]. 细胞质中, MlaF 与 MlaB 以二聚体形式相结合, 形成该转运体的核苷酸结合结构域 (NBDs)^[52-53], 可能通过水解 ATP 的方式进行磷脂的转运.

目前, MlaFEDB 复合物的结构尚属未知, 仅有 MlaD 周质域的结构于2017年被 Ekiert 等^[49] 解析. 研究结果表明, MlaD 通过1个N端跨膜螺旋锚

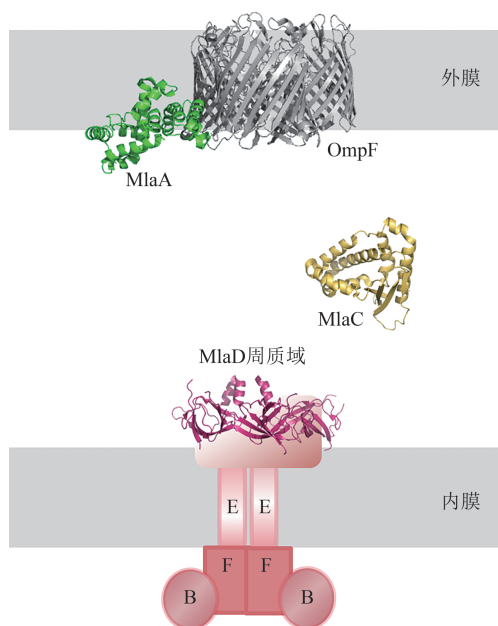


Fig. 4 The structural model of the maintenance of lipid asymmetry pathway^[49, 51]

图4 脂质不对称维持系统的结构模型^[49, 51]

MlaD 周质域结构与 MlaC 结构分别根据 PDB 中的 5UW2 和 5UWA 蛋白信息进行绘制^[49], MlaA 结构根据 PDB 中的 5NUQ 蛋白信息进行绘制^[51].

定在内膜上, 其周质区域由6个哺乳动物细胞侵袭蛋白 (mammalian cell entry, MCE) 组成, 以“首尾相连”方式相互作用形成一个具有中心疏水孔的六聚环, 每个MCE的C端 α 螺旋聚集在环中心形成一个向周质侧延伸的通道, 可能为促进磷脂进入内膜的关键区域. 但是由于MlaB、MlaE和MlaF结构目前尚未解析, 所以该系统转运磷脂的机制还未被具体阐明^[44, 54].

3 β -桶状装配机器 (β -barrel assembly machinery, Bam)

外膜蛋白是细菌外膜不可或缺的重要组成部分, 通常拥有8条以上的 β 股 (一般为偶数), 通过相邻的氢键相互作用形成 β -桶状结构, 可作为细菌被动运输的通道蛋白 (如孔蛋白), 也可用于输送特定的营养成分^[1]. 外膜蛋白在细胞质中初步合成并携带有信号肽, 当外膜蛋白N端锚定在内膜上时, 内膜上的Sec途径识别该蛋白质的信号肽, 使外膜蛋白转运穿过内膜进入周质空间, 通过分子伴侣如Skp或SurA等运送到外膜周质侧^[55-56]. 每一条外膜蛋白的 β 股均具有双亲性, 不具备嵌入外膜的稳定性 (图5), 需要依赖Bam来完成对外膜蛋白最后的整合并装配到外膜^[5].

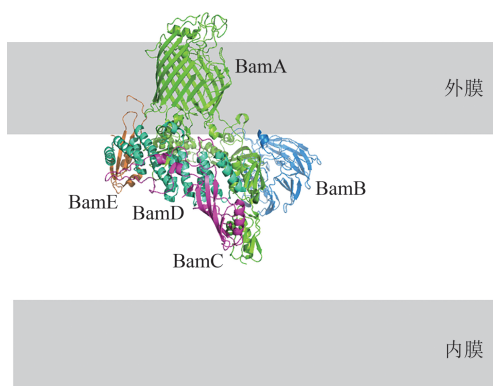


Fig. 5 The structural model of the β -barrel assembly machinery^[63]

图5 β -桶状装配机器结构模型^[63]

BamABCDE结构根据PDB中的5LJ0蛋白信息进行绘制^[63].

BAM 复合体由5个转运蛋白 BamA-E 组成^[57-58], 以完整的外膜蛋白 BamA 为核心, 其余 BamB-E 为锚定在外膜周质侧的脂蛋白^[1]. BamA 通过 β 桶状域的C端锚定在外膜上, 其N端包含5个经周质处理的多肽转运相关结构域 (polypeptide

transport-associated, POTRA)^[59-60]. 目前, BAM 复合物的结构解析表明: BAM 复合体为一个“礼帽”状的结构, BamA 的 β 桶状结构形成它的“帽冠”, BamA 的 POTRA 结构与 BamB-E 构成环状结构的“帽檐”^[60-63].

BamA 包含一个由16股 β 折叠形成的不规则跨膜 β 桶状结构域, 其桶内腔具有亲水性^[64-65]. BamA 的胞外环状结构在其顶部形成一个圆顶, 防止外源物质通过 BamA 的桶径^[60]. BamA 的5个 POTRA 结构域从N端依次编号为P1-5, 各 POTRA 结构域的序列差异性较大, 但其结构非常相似: 均由1对反平行螺旋和3股 β 折叠组成^[66-67]. BamA 通过 POTRA 结构域与 BamD 和 BamB 结合^[68]: BamA 的3号 POTRA 结构与 BamB 连接, 1号和2号 POTRA 结构与 BamD 的C端相互作用, 5号 POTRA 结构与 BamD 的N端结合形成 Bam 复合体主要的闭合周质环^[69]. BamB 呈现“八叶螺旋桨”结构, 每个叶片由3个短环和4个 β 股组成, 各叶片之间由1个长环连接, 参与 BamA 构象的改变^[63, 70]. BamD 由5个与外膜平行的四聚体多肽 (tetratricopeptide-repeat motifs, TPR) 组成^[71-72], 是新生外膜蛋白与 Bam 识别的区域^[73]. BamC 和 BamE 并未与 BamA 直接相连, 位于 BamD 两端, 其中 BamC 结合在 BamD 的疏水腔内^[69, 57], BamE 通过 BamD 的4号和5号 TPR 区域与 BamD 相结合^[60]. 尽管 Bam 复合体的结构已被解析, 但是对于其作用机制尚不完全明确. 现阶段, 对于 Bam 复合体转运外膜蛋白机制最为主流的观点有两种, 分别为“出芽模型”和“BamA 支持模型”^[1, 62, 74-75].

“出芽模型”表明 BamA 可能通过改变构象来完成外膜蛋白的装配与转运^[62, 76-77]. BamA 桶状结构的N端1号 β 股和C端16号 β 股之间相互作用较弱^[62], 在桶腔和膜之间形成了一个关闭的“侧门”. 首先, 外膜蛋白进入 BamA 桶状结构的内腔, 在 BamB 的调节下, BamA 桶状结构的第1到8号 β 股发生大约45°的旋转, 从而打开了1号和16号 β 股之间的“侧门”, 暴露出“侧门”处未配对的 β 股^[75], 为外膜蛋白的结合提供了模板. 然后, 外膜蛋白的 β 股与“侧门”处的 β 股结合, 形成一个 BamA-外膜蛋白的复合桶状结构. 再通过 BamA 的胞外环状结构的打开, 将外膜蛋白以“出芽”的形式整合进入外膜.

对于“BamA 支持模型”, 外膜蛋白的 β -桶状结构具有异常高的自由能^[74], 能够在热力学性质

驱动下, 在外膜的周质侧自发折叠. BamA 在外膜蛋白转运过程中起到支持和辅助作用, 通过外膜与 BamA 桶状结构芳香环之间的疏水错配, 造成细菌外膜的不稳定, 以此减少折叠后外膜蛋白进入外膜的动力学障碍, 从而促进外膜蛋白直接整合进入外膜^[76].

4 脂蛋白定位系统 (localization of lipoprotein, Lol)

革兰氏阴性细菌脂蛋白, 又称脂锚定蛋白 (lipid-anchored proteins), 含有酰基基团, 通过 N 端脂酰基团锚定在外膜周质侧, 是细菌外膜的重要组成部分^[78]. 成熟细菌脂蛋白的形成是一个多步骤过程: 首先, N 端含有信号序列 (signal sequence, SS) 的蛋白质前体在细胞质中合成, 依赖通用分泌途径 Sec 识别该信号序列, 使脂蛋白前体转运穿过内膜^[79]. 然后依赖前脂蛋白二酰甘油基转移酶 (Lgt)、脂蛋白信号肽酶 II (LspA)、脂蛋白 N-酰基转移酶 (Lnt) 在内膜外侧对脂蛋白前体进行加工, 最终形成成熟的三酰化脂蛋白^[80-81]. 在成熟的脂蛋白中, 含有 Lol 回避信号 (Lol avoidance signal) 的脂蛋白被保留在内膜上^[78], 其余通过脂蛋白定位系统 (localization of lipoprotein, Lol) 转运至细胞外膜并锚定在周质侧.

Lol 系统包含 5 个转运蛋白 LolA-E^[82-84] (图 6), 分别在内膜上形成 LolCD₂E 复合物, 在周质中形成伴侣蛋白 LolA, 在外膜周质侧形成脂蛋白 LolB. LolCD₂E 复合物消耗 ATP 将内膜外侧脂蛋白传递给 LolA, LolA 协助脂蛋白穿越周质空间并将它呈递给 LolB, 最终 LolB 协助脂蛋白正确锚定在外膜周质侧. 在一些革兰氏阴性细菌如土拉热杆菌 (*Francisella tularensis*) 和鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 中, 存在一种特殊的蛋白质 LolF, 可取代 LolC 和 LolE, 同 LolD 装配成对称的 LolDF 复合体^[85].

4.1 内膜上 ABC 转运体 LolCD₂E

LolCD₂E 复合物是位于内膜上的 ABC 转运体, 由 LolC、LolD 和 LolE 构成. 同源建模发现 LolCD₂E 复合物与 MacB 具有很高的相似度, 推测其可能具有类似 MacB 的转运机制^[54]. 细胞质中 LolD 同源二聚体形成该转运体核苷酸结合区 (NBDs), 能够通过水解 ATP 为该转运系统供能. 跨膜蛋白 LolC 和 LolE 异二聚体, 构成转运体的跨

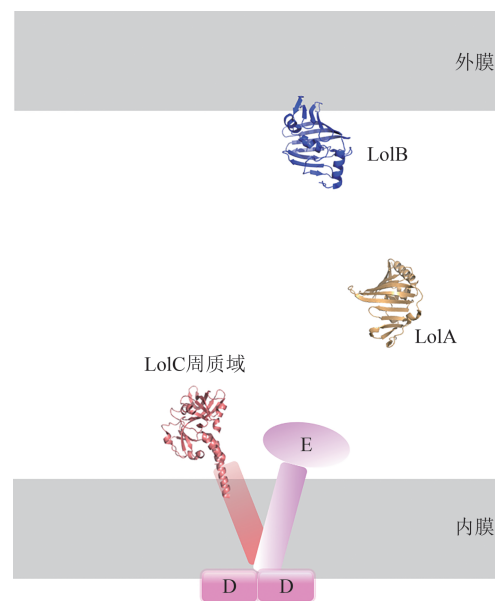


Fig. 6 The structural model of the localization of lipoprotein pathway^[78, 90]

图6 脂蛋白定位系统的结构模型^[78, 90]

LolC周质域结构根据PDB中的6F3Z蛋白信息进行绘制^[78], LolA和 LolB结构根据PDB中的1IWL和1IWM蛋白信息进行绘制^[90].

膜结构域 (TMDs), 通过构象改变的方式转运脂蛋白. 目前, LolCD₂E 的结构与功能仍存在许多未知, 仅对其周质域以及 NBDs 区域信息有一定的研究. Kaplan 等^[78] 研究表明, LolC 周质域中含有独特的 β -发夹结构 (该发夹环结构称为 “Hook”) 以及 “Pad” 结构, LolCD₂E 通过 LolC 的 Hook 和 Pad 结构与 LolA 识别并结合, 从而完成脂蛋白从内膜向周质空间的转移. 研究表明, LolE 可能具有与 LolC 相同的折叠结构, 但与 LolC 的功能不同, LolE 可能仅作为脂蛋白结合的位点, 而不参与 LolA 的识别和连接^[86-87]. LolD 与 ATP 的结合和水解可能会引起 LolCD₂E 复合物构象的改变, 从而导致脂蛋白向 LolA 转移^[88-89].

4.2 周质空间的伴侣蛋白 LolA

脂蛋白在周质空间中依赖伴侣蛋白 LolA 进行转运, Takeda 等^[90] 解析了 LolA 结构, 研究表明 LolA 由 11 股反平行 β 折叠形成 1 个不完全 β 桶状结构, 其桶腔为疏水腔, 还有 1 个短螺旋位于 β 桶腔中心. 在与 LolC 结合的过程中, LolA 发生构象变化, 其 β 桶口加宽和桶腔中心的螺旋发生位移, 这种构象变化可能代表了脂蛋白结合处于 “接受状态”. 多项研究表明, LolA 桶部的开口处可能是与脂蛋白相互作用的位点^[91-93], 这表明脂蛋白可能

通过与 LolC 竞争 LolA 上的结合位点, 从而取代 LolC 与 LolA 结合, 实现脂蛋白从内膜到周质空间的转移。

4.3 外膜蛋白 LolB

位于外膜周质侧的脂蛋白 LolB 接收来自 LolA 的脂蛋白, 并将其整合到外膜中。Takeda 等的研究表明, LolB 具有类似于 LolA 的蛋白质折叠结构^[90], 拥有 1 个 β 桶状结构, 由 11 股反平行 β 股折叠形成, 其内部有 1 个疏水腔, β 桶上覆盖有 2 个环状结构, 在桶和环之间含有 3 个 α 螺旋。通过光交联实验表明, LolA 和 LolB 通过各自 β 桶状结构的入口区域进行结合, 其转移脂蛋白的过程类似于一种“口对口”的方式^[91]。

5 展 望

革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运系统能够保证细菌外膜的完整与稳定, 是维护细菌生命活动的核心机器, 与细菌致病性和耐药性的产生密切相关。外膜主要成分的跨膜转运是一个非常复杂的过程, 结构生物学技术的兴起, 为人们了解外膜主要成分的跨膜转运系统的结构和功能提供了绝佳的技术手段。现阶段, 关于细菌外膜脂多糖转运系统、脂质不对称维持系统、 β -桶状装配机器和脂蛋白定位系统结构与功能方面的研究已陆续开展, 在微观层面展现了这些系统的分子机制与生命调控过程。但是, 关于革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运系统的结构和功能仍存在许多研究空白, 需要进一步的研究以揭示其潜藏的“未解之谜”。此外, 外膜组分的跨膜转运往往不依赖于单一的系统, 而这些系统间的相互协调及作用机制目前尚不明确。因此, 本文基于当前细菌外膜主要成分的跨膜转运系统的研究现状, 对未来此类系统的研究方向提出以下 3 点展望。

5.1 进一步揭示外膜主要成分的跨膜转运系统的未知结构与功能

在所有外膜合成转运系统之中, Lpt 是目前结构和功能最为明确的系统, 对于其内膜上的 LptB₂GFC、周质中的 LptA “跨膜桥”、外膜上的 LptD/E, 都有相关研究报道。但是, LptA 转运脂多糖时的“跨膜桥”组成数量尚不明确, Lpt 转运蛋白与脂多糖间的结合位点和相互作用也存在许多未知。Bam 的结构也已基本明晰, 但 Bam 复合物能够在不消耗 ATP 的条件下完成各种外膜蛋白的装配, 对其装配过程中的能量来源还不甚明确。目前,

Mla 和 Lol 结构和功能的了解最为有限, 仅解析了部分转运蛋白的结构, 如 MlaA、MlaC、LolB、LolA 等。位于内膜的 ABC 转运体 MlaFEDB 和 LolCD₂E 的三维结构尚未有研究报道, 大大制约了人们对这 2 类系统功能的理解。因此, 后续研究应针对以上空白展开, 明确这些转运系统的分子细节及转运机制。

5.2 探究外膜主要成分的跨膜转运系统间的相互作用机制

外膜主要成分的跨膜转运系统间的相互作用机制也是当前研究热点之一。首先, 单一跨膜转运系统可能参与不止一种外膜成分的转运, 例如部分脂蛋白依靠 Bam 系统跨越外膜暴露在细胞表面^[94], 也有部分外膜蛋白的合成依赖 Lol 系统的参与^[5]。其次, 由于这些跨膜转运蛋白的本质也是脂蛋白、外膜 β -桶状蛋白等, 因此 Lol 以及 Bam 等功能的缺失, 也有可能对这些跨膜转运系统的运转造成影响。第三, 外膜主要成分的跨膜转运系统间是如何通过相互作用, 并克服跨膜区域与富含水的周质空间, 将外膜组分正确转运与装配的机制, 还未完全明晰, 这值得进一步的研究。因此, 应针对各系统间的相互作用展开研究, 以全面系统地阐明革兰氏阴性细菌外膜主要成分的跨膜转运系统的作用机制。

5.3 基于外膜主要成分的跨膜转运系统研发新型抗菌类药物

细菌外膜是革兰氏阴性细菌抵御外部环境、产生抗生素耐药性的重要屏障, 跨膜转运途径是转运细菌外膜主要组分的重要通道。如果将这一通道切断, 细菌会因难以抵抗外部环境而死亡, 因此可针对细菌外膜主要成分的跨膜转运系统研发新型抗菌类药物, 将有助于解决超级细菌耐药性问题。针对细菌外膜主要成分跨膜转运系统的新型抗菌类药物已被陆续开发, 例如以瑞士 Polyphor 生物制药公司和苏黎世大学为首的研发团队, 于 2010 年设计了具有 β 发夹结构的新型环状拟肽抗生素 Murepavadin, 该药物能够靶向作用于 LptD 蛋白, 具有很好的抑菌活性, 尤其能够靶向杀灭耐药性的假单胞菌^[95-96]。2019 年将此类抗生素与多粘菌素进行嵌合, 构成新型拟肽化合物, 该药物能够靶向作用于 LptD 和 BamA 蛋白, 较 Murepavadin 杀菌效果更强, 具有广阔的应用前景^[97]。2019 年, 美国东北大学团队在线虫肠道微生物群提取物中提取出 Darobactin 抗生素, 能够靶向作用于 BamA, 对革

兰氏阴性致病菌具有良好的活性^[98]. Nickerson等^[99]的研究结果表明, 吡咯并嘧啶二酮化合物G0507能够靶向抑制细菌的LolCD₂E系统, 对缺乏外排泵组分TolC的大肠杆菌有很强的抗菌活性. 然而, 基于外膜主要成分的跨膜转运系统的新型抗菌类药物研发还处于起步阶段, 后续研究应针对外膜主要成分的跨膜转运系统结构和功能做进一步探索, 并大力推进此类新型靶向抗菌药物的研发.

参 考 文 献

- [1] Konovalova A, Kahne D E, Silhavy T J. Outer membrane biogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2017, **71**(1): 539-556
- [2] Henderson J C, Zimmerman S M, Crofts A A, *et al.* The power of asymmetry: architecture and assembly of the Gram-negative outer membrane lipid bilayer. *Annu Rev Microbiol*, 2016, **70**(1): 255-278
- [3] May K L, Silhavy T J. Making a membrane on the other side of the wall. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2017, **1862**(11): 1386-1393
- [4] Schertzer J W, Whiteley M. Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction. *J Mol Microb Biotech*, 2013, **23**(1-2): 118-130
- [5] Ranava D, Caumontsarcos A, Albenne C, *et al.* Bacterial machineries for the assembly of membrane-embedded β -barrel proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 2018, **365**(10): 1-12
- [6] Raetz C R H, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 2002, **71**: 635-700
- [7] Ruiz N, Kahne D, Silhavy T J. Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7**(9): 677-683
- [8] Bishop R E. Structural biology: lipopolysaccharide rolls out the barrel. *Nature*, 2014, **511**: 37-38
- [9] Tan Y, Kagan J C. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol Cell*, 2014, **54**(2): 212-223
- [10] Hoare A, Bittner M, Carter J, *et al.* The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect Immun*, 2006, **74**(3): 1555-1564
- [11] Li H, Yang T D, Liao T T, *et al.* Insights from the redefinition of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide O-antigen and core-oligosaccharide domains. *Microbial Cell*, 2017, **4**(5): 175-178
- [12] Ward A, Reyes C L, Yu J, *et al.* Flexibility in the ABC transporter MsbA: alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(48): 19005-19010
- [13] Doerfler W T, Gibbons H S, Raetz C R, *et al.* MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(43): 45102-45109
- [14] Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 2006, **75**(1): 39-68
- [15] Greenfield L K, Whitfield C. Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr Res*, 2012, **356**: 12-24
- [16] Ruiz N, Gronenberg L S, Kahne D, *et al.* Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(14): 5537-5542
- [17] Freinkman E, Okuda S, Ruiz N, *et al.* Regulated assembly of the transenvelope protein complex required for lipopolysaccharide export. *Biochemistry*, 2012, **51**(24): 4800-4806
- [18] Villa R, Martorana AM, Okuda S, *et al.* The *Escherichia coli* Lpt transenvelope protein complex for lipopolysaccharide export is assembled via conserved structurally homologous domains. *J Bacteriol*, 2013, **195**(5): 1100-1108
- [19] Sperandio P, Deho G, Polissi A, *et al.* The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, **1791**(7): 594-602
- [20] Narita S, Tokuda H. Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides. *FEBS Lett*, 2009, **583**(13): 2160-2164
- [21] Sherman D J, Xie R, Taylor R J, *et al.* Lipopolysaccharide is transported to the cell surface by a membrane-to-membrane protein bridge. *Science*, 2018, **359**(6377): 798-801
- [22] Dong H, Zhang Z, Tang X, *et al.* Structural and functional insights into the lipopolysaccharide ABC transporter LptB₂FG. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 222
- [23] Luo Q, Yang X, Yu S, *et al.* Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB₂FG. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(5): 469-474
- [24] Li Y, Orlando B J, Liao M. Structural basis of lipopolysaccharide extraction by the LptB₂FGC complex. *Nature*, 2019, **567**(7749): 486-490
- [25] Owens T W, Taylor R J, Pahil K S, *et al.* Structural basis of unidirectional export of lipopolysaccharide to the cell surface. *Nature*, 2019, **567**(7749): 550-553
- [26] Tang X, Chang S, Luo Q, *et al.* Cryo-EM structures of lipopolysaccharide transporter LptB₂FGC in lipopolysaccharide or AMP-PNP-bound states reveal its transport mechanism. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 4175
- [27] Simpson B W, Owens T W, Orabella M J, *et al.* Identification of residues in the lipopolysaccharide ABC transporter that coordinate ATPase activity with extractor function. *mBio*, 2016, **7**(5): e01729-16
- [28] Tran A X, Dong C, Whitfield C. Structure and functional analysis of LptC, a conserved membrane protein involved in the lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2017, **292**(45): 18731
- [29] Schultz K M, Klug C S. Characterization of and lipopolysaccharide binding to the *E. coli* LptC protein dimer. *Protein Sci*, 2018, **27**(2): 381-389
- [30] Okuda S, Freinkman E, Kahne D. Cytoplasmic ATP hydrolysis

- powers transport of lipopolysaccharide across the periplasm in *E. coli*. *Science*, 2012, **338**(6111): 1214-1217
- [31] Suits M D L, Sperandio P, Dehò G, *et al.* Novel structure of the conserved Gram-negative lipopolysaccharide transport protein A and mutagenesis analysis. *J Mol Biol*, 2008, **380**(3): 476-488
- [32] Okuda S, Sherman D J, Silhavy T J, *et al.* Lipopolysaccharide transport and assembly at the outer membrane: the PEZ model. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14**(6): 337-345
- [33] Dong H, Xiang Q, Gu Y, *et al.* Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature*, 2014, **511**(7507): 52-56
- [34] Qiao S, Luo Q, Zhao Y, *et al.* Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. *Nature*, 2014, **511**(7507): 108-111
- [35] Botos I, Majdalani N, Mayclin S, *et al.* Structural and functional characterization of the LPS transporter LptDE from Gram-negative pathogens. *Structure*, 2016, **24**(6): 965-976
- [36] Malojčić G, Andres D, Grabowicz M, *et al.* LptE binds to and alters the physical state of LPS to catalyze its assembly at the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(26): 9467-9472
- [37] Wu T, Mccandlish A C, Gronenberg L S, *et al.* Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(31): 11754-11759
- [38] Chng S S, Ruiz N, Chimalakonda G, *et al.* Characterization of the two-protein complex in *Escherichia coli* responsible for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(12): 5363-5368
- [39] Gu Y, Stansfeld P, Zeng Y, *et al.* Lipopolysaccharide is inserted into the outer membrane through an intramembrane hole, a lumen gate, and the lateral opening of LptD. *Structure*, 2015, **23**(3): 496-504
- [40] Li X, Gu Y, Dong H, *et al.* Trapped lipopolysaccharide and LptD intermediates reveal lipopolysaccharide translocation steps across the *Escherichia coli* outer membrane. *Sci Rep*, 2015, **5**(1): 1188
- [41] Cronan J E. Bacterial membrane lipids: where do we stand? *Annu Rev Microbiol*, 2015, **57**(1): 203-224
- [42] Donohue-Rolfe A M, Schaechter M. Translocation of phospholipids from the inner to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**(4): 1867-1871
- [43] Bishop R E. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol*, 2005, **57**(4): 900-912
- [44] Malinverni J C, Silhavy T J. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(19): 8009-8014
- [45] Snijder H J, Ubarretxena-Belandia I, Blaauw M, *et al.* Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature*, 1999, **401**(6754): 717-721
- [46] Dekker N. Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Molecular Microbiology*, 2000, **35**(4): 711-717
- [47] Bishop R E, Gibbons H S, Guina T, *et al.* Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. *EMBO J*, 2000, **19**(19): 5071-5080
- [48] Dalebroux Z D, Matamouros S, Whittington D, *et al.* PhoPQ regulates acidic glycerophospholipid content of the *Salmonella Typhimurium* outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(5): 1963-1968
- [49] Ekiert D C, Bhabha G, Isom G L, *et al.* Architectures of lipid transport systems for the bacterial outer membrane. *Cell*, 2017, **169**(2): 273-285
- [50] Chong Z S, Woo W F, Chng S S. Osmoporin OmpC forms a complex with MlaA to maintain outer membrane lipid asymmetry in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2015, **98**(6): 1133-1146
- [51] Abellón-Ruiz J, Kaptan S S, Baslé A, *et al.* Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry. *Nat Microbiol*, 2017, **2**(12): 1616-1623
- [52] Ovchinnikov S G, Kinch L N, Park H, *et al.* Large-scale determination of previously unsolved protein structures using evolutionary information. *Elife*, 2015, **4**: e09248
- [53] Casali N, Riley L W. A phylogenomic analysis of the *Actinomycetales* mce operons. *BMC Genomics*, 2007, **8**(1): 60
- [54] Crow A, Greene N P, Kaplan E, *et al.* Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(47): 12572-12577
- [55] Schwalm J, Mahoney TF, Soltes GR, *et al.* Role for Skp in LptD assembly in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2013, **195**(16): 3734-42
- [56] Vertommen D, Ruiz N, Leverrier P, *et al.* Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics. *Proteomics*, 2009, **9**(9): 2432-2443
- [57] Sklar J G, Wu T, Gronenberg L S, *et al.* Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(15): 6400-6405
- [58] Wu T, Malinverni J, Ruiz N, *et al.* Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*, 2005, **121**(2): 235-245
- [59] S'anchez-Pulido L, Devos D, Genevrois S, *et al.* POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**(10): 523-526
- [60] Bakelar J, Buchanan SK, Noinaj N. The structure of the β -barrel assembly machinery complex. *Science*, 2016, **351**(6269): 180-186
- [61] Han L, Zheng J, Wang Y, *et al.* Structure of the BAM complex and its implications for biogenesis of outer-membrane proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, **23**(3): 192-196
- [62] Gu Y, Li H, Dong H, *et al.* Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex. *Nature*, 2016, **531**(7592): 64-69
- [63] Iadanza M G, Higgins A J, Schiffrin B, *et al.* Lateral opening in the intact β -barrel assembly machinery captured by cryo-EM. *Nat Commun*, 2016, **7**: 12865
- [64] Albrecht R, Schutz M, Oberhettinger P, *et al.* Structure of BamA, an essential factor in outer membrane protein biogenesis. *Acta*

- Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, **70**(6): 1779-1789
- [65] Ni D, Wang Y, Yang X, *et al.* Structural and functional analysis of the β -barrel domain of BamA from *Escherichia coli*. FASEB J, 2014, **28**(6): 2677-2685
- [66] Gatzeva-Topalova P Z, Warner LR, Pardi A, *et al.* Structure and flexibility of the complete periplasmic domain of BamA: the protein insertion machine of the outer membrane. Structure, 2010, **18**(11): 1492-1501
- [67] Kim S, Malinverni J C, Sliz P, *et al.* Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. Science, 2007, **317**(5840): 961-964
- [68] Vuong P, Bennion D, Mantei J, *et al.* Analysis of YfgL and YaeT interactions through bioinformatics, mutagenesis, and biochemistry. J Bacteriol, 2008, **190**(5): 1507-1517
- [69] Malinverni J C, Werner J, Kim S, *et al.* YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2006, **61**(1): 151-164
- [70] Jansen K B, Baker S L, Sousa M C, *et al.* Crystal structure of BamB bound to a periplasmic domain fragment of BamA, the central component of the β -barrel assembly machine. J Biol Chem, 2015, **290**(4): 2126-2136
- [71] Dong C, Hou H F, Yang X, *et al.* Structure of *Escherichia coli* BamD and its functional implications in outer membrane protein assembly. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2012, **68**(2): 95-101
- [72] Sandoval C M, Baker S L, Jansen K, *et al.* Crystal structure of BamD: an essential component of the β -barrel assembly machinery of Gram-negative bacteria. J Mol Biol, 2011, **409**(3): 348-357
- [73] Hagan C L, Wzorek J S, Kahne D. Inhibition of the β -barrel assembly machine by a peptide that binds BamD. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, **112**(7): 2011-2016
- [74] Kleinschmidt JH. Folding of beta-barrel membrane proteins in lipid bilayers-unassisted and assisted folding and insertion. Biochim Biophys Acta, 2015, **1848**(9): 1927-1943
- [75] Noinaj N, Kuszak A, Balusek C, *et al.* Lateral opening and exit pore formation are required for BamA function. Structure, 2014, **22**(7): 1055-1062
- [76] Noinaj N, Kuszak A J, Gumbart J C, *et al.* Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. Nature, 2013, **501**(7467): 385-90
- [77] Rigel N W, Ricci D P, Silhavy T J. Conformation-specific labeling of BamA and suppressor analysis suggest a cyclic mechanism for β -barrel assembly in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, **110**(13): 5151-5156.
- [78] Kaplan E, Greene N P, Crow A, *et al.* Insights into bacterial lipoprotein trafficking from a structure of LolA bound to the LolC periplasmic domain. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, **115**(31): E7389-E7397
- [79] Okuda S, Tokuda H. Lipoprotein sorting in bacteria. Annu Rev Microbiol, 2011, **65**(1): 239-259
- [80] Gupta S D, Gan K, Schmid M B, *et al.* Characterization of a temperature-sensitive mutant of *Salmonella typhimurium* defective in apolipoprotein N-acyltransferase. J Biol Chem, 1993, **268**(22): 16551-16556
- [81] Gupta S D, Wu H C. Identification and subcellular localization of apolipoprotein N-acyltransferase in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 1991, **62**(1): 37-41
- [82] Matsuyama Si, Yokota N, Tokuda H. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. EMBO J, 1997, **16**(23): 6947-6955
- [83] Tajima T, Yokota N, Matsuyama S, *et al.* Genetic analyses of the *in vivo* function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. FEBS Lett, 1998, **439**(1-2): 51-54
- [84] Yakushi T, Masuda K, Narita S, *et al.* A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. Nat Cell Biol, 2000, **2**(4): 212-218
- [85] LoVullo E D, Wright L F, Isabella V, *et al.* Revisiting the Gram-negative lipoprotein paradigm. J Bacteriol, 2015, **197**(10): 1705-1715
- [86] Mizutani M, Mukaiyama K, Xiao J, *et al.* Functional differentiation of structurally similar membrane subunits of the ABC transporter LolCDE complex. FEBS Lett, 2013, **587**(1): 23-29
- [87] Tokuda H, Matsuyama S I. Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Cell Research, 2004, **1693**(1): 5-13
- [88] Ito Y, Kanamaru K, Taniguchi N, *et al.* A novel ligand bound ABC transporter, LolCDE, provides insights into the molecular mechanisms underlying membrane detachment of bacterial lipoproteins. Mol Microbiol, 2006, **62**(4): 1064-1075
- [89] Taniguchi N, Tokuda H. Molecular events involved in a single cycle of ligand transfer from an ATP binding cassette transporter, LolCDE, to a molecular chaperone, LolA. J Biol Chem, 2008, **283**(13): 8538-8544
- [90] Takeda K, Miyatake H, Yokota N, *et al.* Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB. EMBO J, 2003, **22**(13): 3199-3209
- [91] Okuda S, Tokuda H. Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(14): 5877-5882
- [92] Oguchi Y, Takeda K, Watanabe S, *et al.* Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release. J Biol Chem, 2008, **283**(37): 25414-25420
- [93] Watanabe S, Oguchi Y, Takeda K, *et al.* Introduction of a lethal redox switch that controls the opening and closing of the hydrophobic cavity in LolA. J Biol Chem, 2008, **283**(37): 25421-25427
- [94] Kononova A, Silhavy T J. Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015, **370**(1679): 20150030

- [95] Srinivas N, Jetter P, Ueberbacher B J, *et al.* Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 2010, **327**(5968): 1010-1013
- [96] Werneburg M, Zerbe K, Juhas M, *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide transport to the outer membrane in *Pseudomonas aeruginosa* by peptidomimetic antibiotics. *ChemBioChem*, 2012, **13**(12): 1767-1775
- [97] Luther A, Urfer M, Zahn M, *et al.* Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria. *Nature*, 2019, **576**(7787): 452-458
- [98] Imai Y, Meyer K J, Iinishi A, *et al.* A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 2019, **576**(7787): 459-464
- [99] Nickerson N N, Jao C C, Xu Y, *et al.* A novel inhibitor of the LolCDE ABC transporter essential for lipoprotein Trafficking in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, **62**(4): e02151-17

Research Progress on Transmembrane Transport Mechanisms for the Main Components of the Outer Membrane in Gram-negative Bacteria*

TONG Jin-Rong¹⁾, ZHANG Zhao-Huan^{1,2)**}, HUANG Zhen-Hua¹⁾,
ZHANG Xu¹⁾, SHI Jun¹⁾, LIU Hai-Quan^{1,3,4)}, PAN Ying-Jie^{1,3,4)}, ZHAO Yong^{1,3,4)**}

¹⁾College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

²⁾College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

³⁾Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai),
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;

⁴⁾Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract The outer membrane of Gram-negative bacteria is composed of lipopolysaccharide, phospholipid, β -barrel protein and lipoprotein, which is the primary physical barrier protecting bacterial cell from harmful substances, and associated with bacterial pathogenicity and antibiotic resistance. The components of the outer membrane depend on specific systems for transmembrane transport, including the lipopolysaccharide transport system (Lpt), maintenance of lipid asymmetry (Mla), β -barrel assembly machinery (Bam) and localization of lipoprotein (Lol). These systems can ensure the integrity and stability of the bacterial outer membrane, which play important roles in bacterial growth and survival. Therefore, this review summarized the research progress on structure and function of these transmembrane transport systems in Gram-negative bacteria, and prospected the future research direction, which provided new insights for developing the novel antibiotics.

Key words Gram-negative bacteria, main components of the outer membrane, structure and function of transmembrane transport systems

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0022

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31972188, 31671779), National Postdoctoral Program for Innovation Talent (BX201901940), Shanghai Post-doctoral Excellence Program (2019348), Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (2017-01-07-00-10-E00056), National Key Research and Development Program (2018YFC1602205), Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (T20170404) and China Postdoctoral Science Foundation (2019M661469).

** Corresponding author.

ZHAO Yong. Tel/Fax: 86-21-61900768, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

ZHANG Zhao-Huan. Tel: 86-21-61900503, E-mail: gongziwuhen@126.com, zh-zhang@shou.edu.cn

Received: January 15, 2020 Accepted: April 27, 2020