



细菌六型分泌系统的研究进展*

孔天翔¹⁾ 赵依昕²⁾ 杜 婧²⁾ 李颖杰^{3)**}

(1) 山东大学泰山学堂, 济南 250100; (2) 山东大学生命科学院, 青岛 266237; (3) 山东大学微生物技术研究院, 青岛 266237)

摘要 六型分泌系统 (type VI secretion system, T6SS) 作为一种广泛存在于革兰氏阴性细菌中的可收缩纳米装置, 通过将有毒物质, 即效应因子 (effector) 注射于真核或原核细胞体内, 杀死真核捕食者或原核竞争对手. 近年来, T6SS 基因的多样性、纳米装置的组装和效应因子的致病机制等都获得了广泛关注, 取得了重大的突破. 本综述基于 T6SS 的基因组成、组件装配、效应因子种类和调节机制等, 分析总结 T6SS 基因组成的多样性, 不同元件组装机制和对应的结构基础, 效应因子种类和致病机理, 以及 T6SS 复杂的调控网络等方面的研究进展和未解决的问题, 以期 T6SS 的研究提供参考.

关键词 六型分泌系统, 基因多样性, 组装元件, 效应因子, 调控网络

中图分类号 Q5, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0148

细菌能够利用特殊的蛋白质分泌系统与宿主、竞争细菌和其他环境因素等相互作用. 目前, 在革兰氏阴性细菌中已发现了 6 种主要的分泌系统, 称为分泌系统 I-VI^[1-2]. 其中, 六型分泌系统 (type VI secretion system, T6SS) 作为新近确定的细菌分泌系统, 于 2006 年在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 中被正式命名^[3]. 研究发现, T6SS 广泛存在于革兰氏阴性细菌中, 与细菌的致病性息息相关^[4]. 常见致病菌, 如霍乱弧菌^[3]、伯克霍尔德菌属细菌 (*Burkholderia*)^[5] 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)^[6] 等均可以通过 T6SS 分泌拮抗细菌甚至宿主细胞的效应因子来破坏宿主体内的微生态. 近年来, 随着生物信息学和结构生物学等技术的飞速发展, 人们对于 T6SS 的认识和了解日益深入, 尤其是冷冻电镜技术的应用对于 T6SS 大型复合物结构特征的解析起到关键作用, 为 T6SS 组装、分泌和致病机制的揭示提供了非常有价值的研究. 本综述将围绕 T6SS 的分类和基因组成、核心元件组装的结构特点、效应因子种类以及 T6SS 调控网络等方面进行阐述, 为 T6SS 的研究提供参考.

1 T6SS 的分类和组成

迄今发现的 T6SS 纳米装置可分为 4 种不同的类型, 称为 T6SSⁱ、T6SSⁱⁱ、T6SSⁱⁱⁱ 和 T6SS^{iv}. T6SSⁱ

作为存在最为广泛、研究最为清晰和最经典的六型分泌系统, 主要包括 13 个核心元件, 即 TssA-M^[7] (图 1a). 其中, TssD 一般称为 Hcp, TssH 称为 ClpV, TssI 称为 VgrG. 根据核心元件的定位和功能, 可将 T6SSⁱ 分为 3 个主要部分 (图 1a): TssJLM 跨膜复合体、TssEFGK 楔形复合体与 VgrG 刺突蛋白组成的基板和 Hcp 内管/TssBC 外鞘复合体. 虽然 T6SSⁱ 核心元件组成基本一致, 但不同细菌编码 T6SSⁱ 的基因簇数量却各不相同. 在已测序的霍乱弧菌中共发现 1 个 T6SS 核心基因簇和 5 个辅助基因簇 (图 1a), 其中辅助基因簇 1 和 2 存在于所有测序的霍乱弧菌基因组中, 而辅助基因簇 3~5 仅在部分霍乱弧菌中发现^[8]. 铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的基因组则含有 3 个 T6SS 基因簇 (H1-T6SS、H2-T6SS、H3-T6SS, 图 1a). 其中, H1-T6SS 主要用于向其他细菌中释放多种毒素, 进而维持细菌在复杂微生物菌群的竞争优势^[9]. H2-T6SS 和 H3-T6SS 的功能是向原核细胞和真核细胞注射其他非毒素类效应因子. 动物和植物感染模型表明, H2-

* 山东大学基本科研业务费专项资金项目和青岛市应用基础研究计划项目青年专项 (18-2-2-60-jch) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0532-58631569, E-mail: yingjie.li@sdu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-17, 接受日期: 2020-06-30

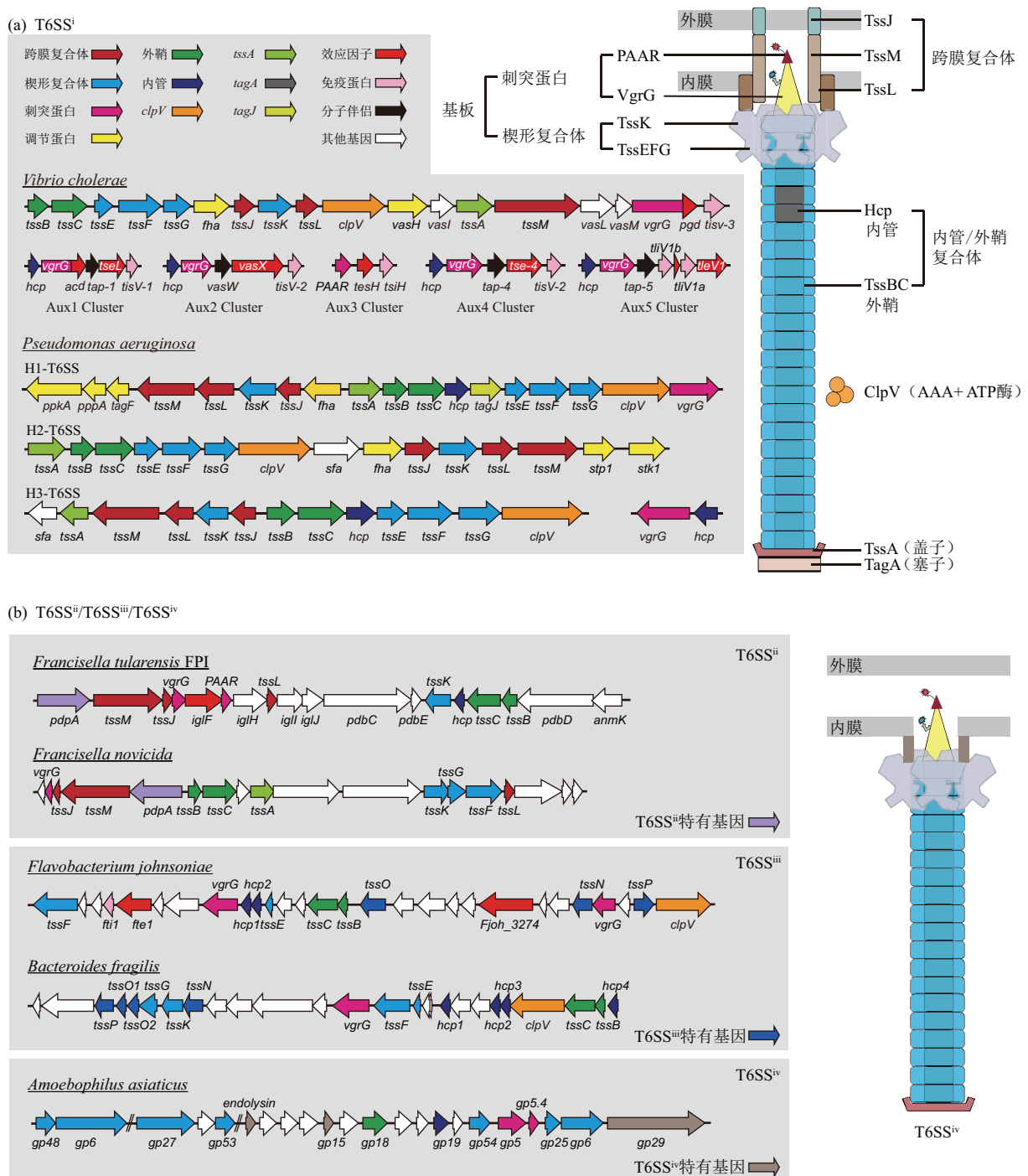


Fig. 1 Genetic compositions and schematic representation of the T6SSs

图1 不同种类T6SS的基因组成和模式图

(a) T6SSⁱ基因组成和模式图 (修改自文献 [8, 14]); (b) T6SSⁱⁱ、T6SSⁱⁱⁱ和T6SS^{iv}基因组成及T6SS^{iv}模式图 (修改自文献 [11-13])。 (b) 中 T6SSⁱⁱ特有基因 $pdbA$ 编码VgrG-N端结构域; T6SSⁱⁱⁱ特有基因 $tssN$ 、 $tssO$ 和 $tssP$ 可能编码形成跨膜复合体; T6SS^{iv}特有基因与T4噬菌体具有高度保守性。*Vibrio cholerae*, 霍乱弧菌; *Pseudomonas aeruginosa*, 铜绿假单胞菌; *Francisella tularensis* FPI, 土拉弗朗西斯菌FPI; *Francisella novicida*, 新凶手弗朗西斯菌; *Flavobacterium johnsoniae*, 约氏黄杆菌; *Bacteroides fragilis*, 脆弱拟杆菌; *Amoebophilus asiaticus*, 类亚洲嗜阿米巴杆菌。

和 H3-T6SS 均与铜绿假单胞菌的致病性密切相关^[10]. T6SSⁱⁱ 仅在弗朗西斯菌属细菌 (*Francisella*) 中发现并鉴定, 其与经典 T6SSⁱ 序列相似性低^[11]; T6SSⁱⁱⁱ 只存在于拟杆菌门细菌 (*Bacteroidetes*) 中, 含有 12 个核心蛋白质, 特有基因 *tssN*、*tssO* 和 *tssP* 可能替代 T6SSⁱ 中 *tssJ*、*tssL* 和 *tssM* 的功能^[12], 但需要实验的进一步验证. 近期, 在类亚洲嗜阿米巴杆菌 (*Amoebophilus asiaticus*) 发现的 T6SS^{iv} 则缺少编码跨膜复合体和用于外鞘解聚的 *clpV* 基因等, 其结构更接近于 T4 噬菌体^[13] (图 1b).

2 T6SS的结构和功能

在 T6SS 的组装过程中, 首先是跨膜复合体定位后结合基板, 以此作为内管和外鞘组装的平台, 招募 Hcp 内管和 TssB/TssC 外鞘聚合延伸, 形成针筒状结构; TssA 与 TagA 控制内管/外鞘长度; 外鞘收缩产生推力, 推动内管刺穿靶标细胞的内膜, 注入效应因子; ClpV 分解回收外鞘蛋白以供新的组装利用 (图 2).

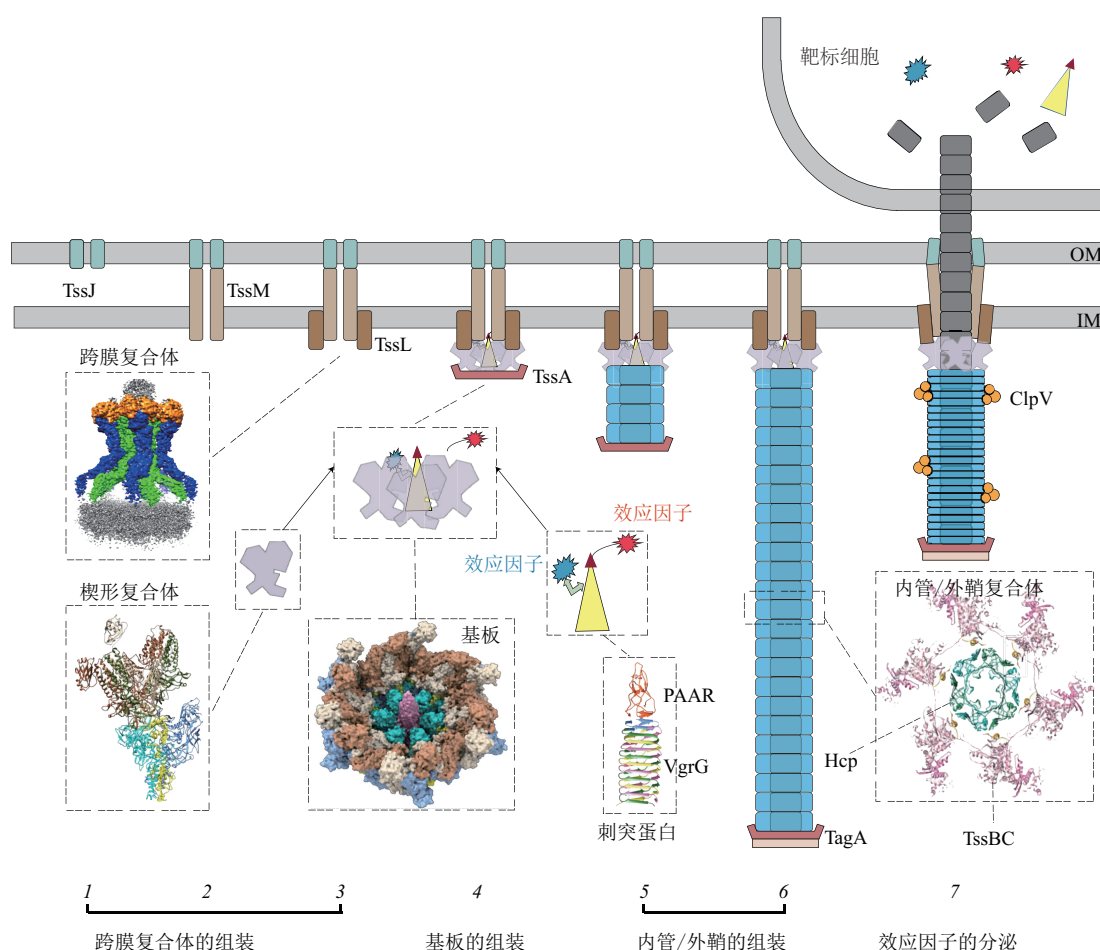


Fig. 2 Assembly of the T6SS [7, 15–18]

图2 T6SS组装模式图 [7, 15–18]

在 T6SS 组装过程, 首先由 TssJ、M、L 依次组装形成跨膜复合体 (步骤 1–3), 随后 TssEFGK 楔形复合体围绕 VgrG/PAAR 刺突蛋白组成基板 (步骤 4), 内管/外鞘组装聚合并延伸, TssA 与 TagA 控制内管/外鞘长度 (步骤 5–6). 在特定信号诱导下, 外鞘收缩推动内管冲开细菌外膜到达靶标细胞, 释放效应因子, ClpV 回收外鞘 (步骤 7).

2.1 跨膜复合体

跨膜复合体由 TssJ 外膜蛋白、TssL 和 TssM 内膜蛋白组成. TssJ 是一个面向周质空间的脂蛋

白^[19], 不同物种的 TssJ 结构相似, 是一个典型的类甲状腺素运载蛋白结构^[20–22]. 跨膜复合体的形成从 TssJ 的定位开始, 再依次组装 TssM 和 TssL. 但

TssJ 并没有特定的锚定位点, 而是一个随机过程^[20, 23]. TssM 是跨膜复合体中最为主要的骨架成分, 通过 3 个跨膜螺旋锚定在内膜上, 其周质空间结构域与 TssJ 接触, 而跨膜区和胞质区结构则与 TssL 相互作用^[18]. TssM 蛋白单体间的相互作用力, 既可维持跨膜复合体结构的稳定, 又具有较高的柔性, 可以保证跨膜复合体结构的灵活变化^[24]. 此外, TssM 还能够激活裂解转糖基酶 MltE 的活性, 打开细胞壁的肽聚糖, 进而协助跨膜复合体的组装. TssL 与 TssM 序列同源, 呈钩状结构, 包括 1 个跨膜螺旋和 1 个与 TssM 结合的胞质结构域^[25], 其最小功能单位为二聚体形式^[26]. 在大多数 T6SS 系统中, TssL 还具有一个额外的肽聚糖结合结构域, 不含有该结构域的细菌往往会利用附加膜蛋白 TagL 代替 TssL 肽聚糖结合结构域, 并与 TssL 相互作用, 帮助跨膜复合体锚定在肽聚糖层上^[27], 所以有时也将 TagL 作为 T6SS 跨膜复合体的一部分.

2015 年, Durand 等^[23]通过电镜负染技术首次成功解析了来源于肠聚集性大肠杆菌 (enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC) 的完整 TssJLM 复合体结构, 分辨率为 11.6 Å. 2019 年 Yin 等^[18]通过冷冻电镜得到了分辨率更高 (4 Å) 的晶体结构. 研究表明^[18, 23], T6SS 的 TssJLM 跨膜复合体形状像一个具有 C5 对称性的中空火箭, TssL 和 TssM 胞质结构域和内膜结构域共同组成火箭的底座, 底座上竖立着由 TssM 周质空间结构域和 TssJ 组成的支柱, 横跨细菌的内膜和外膜. 每个不对称单元含有 2 个 TssM 亚基、2 个 TssL 亚基和 3 个 TssJ 亚基, 故复合体由 10 拷贝 TssM、10 拷贝 TssL 和 15 拷贝 TssJ 组成^[23]. TssJ 与 TssM 独特的 3:2 比例在细菌其他分泌系统 (通常 1:1) 中并不常见^[18], 这可能是由于 T6SS 收缩时 TssM 具有一定的柔性, 需要通过 TssJ 与相邻 TssJ (TssJ') 相互作用来增强相邻 TssJ-TssM 复合物之间的结合^[18], 使整个跨膜复合体在保持柔性的同时, 仍具有相对稳定的结构. 与这个猜测一致的是, 当 TssJ-TssJ' 相互作用力被干扰时, 跨膜复合体的功能会被破坏, 进而导致 T6SS 活性丧失^[24]. 而在其他分泌系统, 如二型分泌系统 (T2SS) 中, 跨膜复合体组成蛋白 AspS-GspD 以 1:1 的形式结合即可维持该复合体结构的稳定, 且 AspS 蛋白之间也无相互作用力^[28].

此外, TssJLM 复合体中间虽然有一个狭窄的小孔, 但直径却不足以让内管通过^[23]. 结合复合

体 TssJLM 蛋白之间的相互作用, 研究者推测在 T6SS 启动分泌时, 内管 Hcp 的推动力会迫使 TssM 的 C 端结构域冲破细菌外膜, 使跨膜复合体打开一个足够大的孔洞, 进而释放效应因子; 当 Hcp 内管和效应因子释放后, TssM 会自动恢复到原来的“休眠”状态^[23]. 近期, Durand 等^[24]通过原位冷冻电镜技术进一步获得了 TssJLM 跨膜复合体的精细结构, 发现具有 C5 对称性的 TssJLM 跨膜复合体小孔在正常情况下是关闭的, 以保护细胞的完整性, 并阻止外界有害物质进入, 只有当需要分泌效应因子时, 跨膜复合体结构才会在外力冲击下发生明显改变, 将原来用以维持小孔封闭的 TssM 冲击到细胞外, 使小孔打开, 以完成分泌过程^[24].

2.2 基板

基板是由 6 个 TssEFGK 楔形复合体围绕 VgrG/PAAR 刺突蛋白的 N 端结构域形成的一个环状复合体^[29]. 该复合体的主要作用是引发内管/外鞘复合物的聚合, 将其锚定到跨膜复合体上, 触发外鞘收缩, 并在外鞘收缩期间, 保持整个系统组装的牢固^[15]. 楔形复合体 TssE、TssF、TssG 和 TssK 按化学计量比 1:2:1:6^[15]或 1:2:1:3^[30]组装而成. 整个基板呈 C6 对称性, 分上下两个部分, 包括上端的 TssK 三聚体和下端以 TssG 为核心的 TssFG 三叉单元^[15]. 其中, TssK 三聚体主要用于基板与跨膜复合体的对接, TssK 单体含有 4 个结构域, N 端 α 螺旋、 β 片层结构域 (肩结构域)、4 α 螺旋结构域 (颈结构域) 和 C 端 α/β 结构域 (头结构域)^[31]. 纳米抗体竞争性结合实验表明, TssK 通过肩结构域的底部与 TssFG 结合, 头部结构域则锚定在跨膜复合体上^[15]. 基板下半部分的 TssFG 三叉单元以 TssG 为中心, 两个 TssF 位于 TssG 两侧, 呈翼状结构, TssF 分子之间几乎没有相互作用^[15]. 其中, TssF 主要负责基板与外鞘 TssBC 的结合, TssK 和 TssF 通过 TssG 形成 TssFGK 复合物^[15].

基板复合体中 TssE 的功能以及结构目前尚未清楚. 在霍乱弧菌基板复合物的晶体结构中并没有观察到 TssE 的存在^[30]. 而在肠聚集性大肠杆菌 (EAEC) 的基板结构中, TssE 位于复合物远离 TssF 的一端, 与 TssG 相互作用, 作者推测其可能在维持外鞘和基板结构稳定方面发挥作用^[15]. 但在 TssFGK 围绕 VgrG 聚合形成楔形复合物的过程并没有 TssE 的参与, 暗示着 TssE 可能是在 TssFGK 聚合之前或之后才被招募^[15]. 在铜绿假单胞菌中, *tssE1* 基因的缺失会导致外鞘蛋白 TssB1/TssC1 不能

组装, 暗示着 TssE 在该过程发挥重要作用^[32]. 但近期靶向蛋白质组研究发现, 霍乱弧菌的 TssE 蛋白极不稳定, 当 T6SS 核心元件合成受到抑制后, TssE 的丰度会快速下降, 导致 T6SS 组装效率大幅降低^[33]. 但 T6SS 的功能并未完全消失, 霍乱弧菌 $\Delta tssE$ 突变株仍具有部分 T6SS 活性^[33-34]. 而当 *tssE* 和效应因子 *vasX* 同时缺失后, 霍乱弧菌 T6SS 的组装则会完全阻断, 各核心元件游离于细胞质中^[33], 暗示着 TssE 可能不是基板合成的必需蛋白质.

2.3 内管/外鞘复合体

T6SS 内管/外鞘复合体可横跨整个细胞, 从细胞内膜一端延伸到另一端, 包括装有 VgrG/PAAR 刺突蛋白的 Hcp 内管和可收缩的 TssB/TssC 外鞘. 大多数 VgrG/PAAR 刺突蛋白是由嵌合体蛋白 VgrG 与 PAAR (脯氨酸-丙氨酸-丙氨酸-精氨酸) 蛋白组成的复合物, PAAR 结合在 VgrG 尖端形成更为尖锐的锥形延伸, 两者共同形成 T6SS 的针头^[35]. 其中, VgrG 是三聚体结构, 每个单体由三对反向平行的 β 折叠组成^[36], 包含几个与 T4 噬菌体相似的保守结构域^[37]. 其 N 端结构域类似于噬菌体 T4 gp27 蛋白, 可以与 Hcp 环形成头尾相向的相互作用, 并通过与第一个 Hcp 环对接启动 Hcp 内管的生成^[38]. 因此, VgrG 既是 T6SS 尾部穿刺装置的连接器, 又是基板的中心元件, 用于基板楔形复合体 TssFGK 的招募. Hcp 以头-尾结合的方式, 有序堆叠构成 Hcp 六聚体环, 在 VgrG/PAAR 刺突蛋白底部平台上聚合^[38], 形成中空管状结构, 即为内管^[39]. 内管内径约为 40 Å, 外径为 80~85 Å^[40], 是 T6SS 注射效应因子的通道.

T6SS 的外鞘由 TssB 和 TssC 异源二聚体组成, 是外鞘聚合的基本重复单元. TssB 的 C 端结构域含有 1 个长螺旋和 1 个螺旋发卡结构, 在外鞘组装中发挥重要作用^[41], 而 TssC 则利用 N 端结构域与 ClpV ATPase 相互作用, 使得 TssBC 可以被解聚并回收^[42]. 6 个 TssBC 二聚体可以形成缠绕 Hcp 环的链, 使得外鞘的内径大于 Hcp 直径, 以便 Hcp 内管通过. TssBC 通过齿轮状形式上下紧密结合和堆积来保持整个外鞘结构的稳定^[43-44]. 最初, 人们虽然通过冷冻电镜技术解析了多个外鞘收缩状态的结构^[45-47], 但外鞘的延伸状态十分不稳定, 仅得到分辨率较低的晶体结构^[48]. 因此, 为了得到更为清晰的外鞘延伸结构, 更好地理解内管/外鞘复合体如何收缩以释放效应因子, Wang 等^[43] 通过向霍乱弧菌 TssB-N 端插入 3 个氨基酸残基 (TssB-

N3) 的方法, 使外鞘保持一个稳定的延伸状态. 在此基础上, 作者获得了分辨率~3.5 Å 的内管/外鞘复合体的延伸态结构. 研究发现, 外鞘的延伸态和收缩态均为螺旋上升结构, 但两个状态中每一个螺旋上升的距离不同, 从延伸时的 38.0 Å 缩小到收缩时的 21.8 Å (减少了~42%), 且扭曲螺旋角从 23.6° 增大到 29.9°^[43]. 其中, TssB-N3 与 TssA 以及 Hcp 的相互作用与野生型 TssB 相似, 不同点在于 3 个插入残基所在的连接区, 暗示着 TssB-N 端连接肽的长度及其拓扑连通性对于外鞘收缩是至关重要的^[43]. 当 T6SS 外鞘收缩后, ClpV 会与 TssC 暴露的 N 端结构域结合, 将 T6SS 的外鞘分解成 TssB 和 TssC 单体并回收, 使其可被重复利用^[32, 49]. ClpV 是一种 AAA+ (ATPases associated with various cellular activities) ATP 酶, 属于 Hsp100 家族^[42], 其活性受到 TssB/TssC 复合物构象的特异性调控^[49].

2.4 TssA 盖子

相较于上述 T6SS 元件蛋白, TssA 的功能更为神秘. 根据系统进化树分析可将 TssA 分为 3 大类, 分别是 TssA1、TssA2 和 TssA3. 虽然不同 TssA 执行的功能相似, 即控制内管/外鞘的组装, 但不同种类 TssA 的作用模式存在明显差异. 如在铜绿假单胞菌中, TssA1 可能是作为基板的一部分, 参与外鞘 TssB/TssC 的组装^[47]; 而在肠聚集性大肠杆菌 (EAEC) 中, TssA2 则可能先与跨膜复合体相互作用, 并在此基础上招募基板形成, 启动并协调内管/外鞘的聚合^[50]. 近期, 根据 TssA 结构组成的不同, 如是否存在中间结构域 Dix 等^[51] 进一步将 TssA 分为 TssA1 和 TssA2 两类. 研究发现, 这两类 TssA 具有保守但功能未知的 N 端结构域和可变的 C 端结构域 (C-terminal domain, CTD)^[50, 52-53], 其中不同种类 TssA 的 CTD 结构存在较大差异. 在伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*) 中, CTD 结构域呈现 C16 对称性^[51], 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 中其为 C5 对称性^[51], 而在肠聚集性大肠杆菌 (EAEC) 中, CTD 结构为 C6 对称性^[50]. 尽管 TssA 的 CTD 序列和结构多变, 但由于 TssA 中发挥作用的主要是保守的 N 端, 灵活多变的 C 端只是起到一个控制 N 端与内管/外鞘相对位置的作用, 所以不同结构 TssA 仍在 T6SS 中执行相似的功能^[51], 但这些 CTD 结构域是否功能互补目前尚不清楚. 此外, 在某些细菌, 如上文提到的拟杆菌中, TssA 并不存在, 而是由其他与其

功能相似的蛋白质代替其作用^[12]。

2.5 TagA塞子

由于 *tagA* 只存在于部分细菌的基因组中, 因此不属于 T6SS 的核心组件。研究发现, TagA 位于外鞘 TssB/TssC 远离基板的一端, 起到终止并保持内管/外鞘延伸状态的作用^[54-55]。在此过程中, TagA 可能通过与 TssA 的相互作用, 结合在内管/外鞘延伸的最前端, 控制其长度^[54]。在肠聚集性大肠杆菌 (EAEC) 中, *tagA* 基因的缺失不但会导致外鞘的延伸无法终止, 使其发生弯曲并沿细胞膜方向平行聚合, 同时还使内管/外鞘快速收缩而无法保持较长时间的延伸状态^[54]。在霍乱弧菌中也发现相似的现象, 当霍乱弧菌的细胞壁去除后, T6SS 虽然正常形成, 但内管/外鞘组装无法终止, 使得 T6SS 呈现出弯曲的形状, 而过量的 TagA 会减少外鞘的弯曲, 进一步证实了 TagA 在控制内管/外鞘聚合过程的关键作用^[55]。同时, 作者也通过上述实验首次揭示了细胞壁在 T6SS 形态及功能维持方面充当的重要角色^[55]。对于 TagA 的这两个功能, 即终止并维持内管/外鞘的延伸, 其作用机制仍然未知。

3 效应因子

T6SS 作为许多细菌用来杀死真核捕食者或原核竞争对手的致命武器, 其杀伤作用是通过释放有毒物质, 即效应因子来实现的。

3.1 效应因子的种类

T6SS 效应因子种类多样, 可以有不同的分类形式。a. 根据效应因子的运输机制, 可分为“货物”效应因子 (cargo effectors) 和“特异性”效应因子 (specialized effectors)。其中, 货物效应因子是通过与特定的 Hcp、VgrG 或 PAAR 蛋白结合, 被携带至靶细胞内; 而特异性效应因子则是作为 Hcp、VgrG 或 PAAR 蛋白的一个结构域, 被运输至靶细胞内^[4]。b. 根据效应因子靶标微生物的种类, 可将其分为抗细菌、抗真核生物以及对两个靶标均具有活性的效应因子^[56]。c. 根据作用机制, 可将其分为细胞壁裂解类效应因子、细胞膜损伤类效应因子、核酸降解类效应因子、生长抑制类效应因子及促进金属离子吸收的胞外效应因子等 (表 1)。此外, 很多效应因子都含有保守的 MIX 基序, 主要包括一个高度保守的核心基序 hRxGhhYhh (其中 h 代表疏水性氨基酸)、两个相对保守的 N 端

shhPhR 基序和 C 端 hhF/YSxxxWS/T 基序^[57]。d. 根据 MIX 代表性序列, 可将其分成 5 个不同的家族, 命名为 MIX I-V。其中, MIX V 的所有成员 (一个除外) 仅在海洋细菌的基因组中发现, 因此也被称为“孤儿”效应因子。这些“孤儿”效应因子除了有对应的免疫蛋白外, 往往与转座因子相邻, 因此很可能是作为一种可移动的毒素, 通过水平基因转移的方式在海洋细菌之间共享, 使 T6SS 效应因子更加多样化^[58]。

3.2 分子伴侣蛋白

有些 T6SS 效应因子的募集和分泌往往需要伴侣蛋白的辅助, 现已发现多个参与效应因子运输的分子伴侣家族。根据其保守结构域特征, 可分为 DUF4123、DUF1795 和 DUF2169 伴侣蛋白等^[64-71]。DUF4123 家族的 Tap-1^[13] 和 TecL^[68] 伴侣蛋白可分别将效应因子 TseL 和 Tde1 装载到特定 VgrG 上^[67]。DUF1795 家族的 EagR^[65-66] 和 EagT6^[71] 伴侣蛋白则可能通过与效应因子 Rhs 毒素和 Tse6 的 PAAR 结构域结合, 使效应因子加载在同源 VgrG 蛋白上。首次在根癌农杆菌发现的 DUF2169 伴侣蛋白 Atu3641, 其功能推测与上文 DUF4123 伴侣蛋白相似, 即通过与 PAAR 的结合将效应因子 Tde2 传递到 VgrG 上^[64]。值得注意的是, 这些伴侣分子似乎并没有随效应因子共同分泌至胞外, 而是在分泌前将效应因子运输到特定的运载蛋白上。

3.3 免疫基因

由于 T6SS 效应因子的杀伤不具有选择性, 所以会导致供体细菌自身也会受到效应因子的攻击。对此, 供体细菌会以双顺反子的形式编码与效应因子对应的免疫基因, 形成特定的“效应-免疫”对, 这些免疫蛋白能够与效应因子相互作用, 使其失去活性 (表 1)。除了与效应因子配对的免疫蛋白外, 人肠道菌群的拟杆菌目中还广泛存在一个 AID (acquired interbacterial defence) 基因簇, 该基因簇包含不同的免疫基因, 且许多免疫基因没有对应的效应因子, 所以称为“孤儿”免疫基因^[72]。这些“孤儿”免疫基因可以利用 AID 基因簇相邻的可移动元件, 使小鼠体内产生抗性, 免受 T6SS 介导的种内和种间细菌的拮抗作用^[72]。因此, 破译“孤儿”免疫基因与携带“效应-免疫”对细菌的互作关系, 将有助于阐明人类肠道微生物群落中各细菌之间的联系以及对肠道菌群的影响。

表1 T6SS效应因子的分类及作用机制^[59-61]
Table 1 T6SS effectors with defined biochemical activities^[59-61]

靶标细胞 种类及定位	作用机制	效应因子	代表性微生物 ¹⁾	功能	免疫蛋白
真核细胞	破坏细胞骨架	VgrG1	<i>A. hydrophila</i>	ADP核糖转移酶活性	—
		VgrG-1	<i>V. cholerae</i>	肌动蛋白交联	—
		VgrG2b	<i>P. aeruginosa</i>	与微管相互作用	—
		CNF1 ^[62]	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	诱导肌动蛋白重排	—
	促进膜融合	VgrG-5	<i>Burkholderia thailandensis</i>	膜融合活性	—
	炎症反应	TecA	<i>B. cenocepacia</i>	Rho GTPase脱氨基, 引起Pyrin炎症小体活化	—
		EvpP	<i>Edwardsiella tarda</i>	抑制NLRP3炎症小体	—
真菌 ^[63]	破坏新陈代谢	KatN	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)	含Mn ²⁺ 过氧化氢酶	—
		Tfe1	<i>Serratia marcescens</i>	破坏真菌营养吸收 和氨基酸代谢	—
	细胞膜损伤	Tfe2	<i>S. marcescens</i>	细胞膜电位丧失	—
真核细胞 和细菌	细胞膜损伤	PldA/Tle5, PldB	<i>P. aeruginosa</i>	磷脂酶, Akt信号通路 的激活	Tli5
		VasX	<i>V. cholerae</i>	膜损伤	TsiV2
		TseL/Tle2	<i>V. cholerae</i>	磷脂酶	TsiV1/Tli2
细菌	细胞膜损伤	Tle1	<i>B. thailandensis</i>	磷脂酶	Tli1
		Tle1	EAEC	磷脂酶	Tli1
	细胞壁裂解	Tse1	<i>P. aeruginosa</i>	酰胺酶	Tsi1
		Tse3	<i>P. aeruginosa</i>	溶菌酶	Tsi3
		TseH	<i>V. cholerae</i>	细胞壁降解酶	TsiH
		VgrG-3	<i>V. cholerae</i>	肽聚糖降解	TsaB(TsiV3)
		Tge2	<i>P. aeruginosa</i>	糖苷水解酶	Tgi2
		核酸降解	Tde1, Tde2	DNase	Tdi1, Tdi2
			RhsA, RhsB	DNase	RhsIA, RhsIB
	生长抑制因子	Hcp-ET1	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC)	DNase	ETi1
		Rhs2	<i>S. marcescens</i>	DNase	RhsI2
		Tse2	<i>P. aeruginosa</i>	NAD ⁺ 介导的毒性	Tsi2
		Tse6	<i>P. aeruginosa</i>	NAD(P)糖水解酶	Tsi6
		金属离子吸收	TseM	Mn ²⁺ 结合蛋白	—
			YezP	Zn ²⁺ 结合蛋白	—
			TseF	结合OMV ²⁾ 以捕获铁	—

¹⁾ 代表性微生物, *Vibrio parahaemolyticus*, 副溶血弧菌; *Burkholderia thailandensis*, 泰国伯克霍尔德氏菌; *Edwardsiella tarda*, 迟钝爱德华氏菌; Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), 肠出血性大肠杆菌; *Serratia marcescens*, 粘质沙雷氏菌; *Agrobacterium tumefaciens*, 根癌农杆菌; *Dickeya dadantii*, 达旦提狄克氏菌; Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), 产志贺毒素毒素大肠杆菌; *Yersinia pseudotuberculosis*, 假结核耶尔森菌. ²⁾ OMV, outer membrane vesicle, 外膜囊泡.

4 T6SS的调控机制

虽然 T6SS 的组装在某种程度上具有“随机性”, 且不同细菌 T6SS 的数量及启动方式各不相同, 但其诱发机制总体上可分为两种: 防御型(有针对性的分泌)和进攻型(任意分泌). 其中, 铜

绿假单胞菌是 T6SS 发挥防御性功能的典型代表. 该细菌一般不会主动攻击无 T6SS 分泌系统的微生物, 但会在受到其他细菌 T6SS 攻击后立即于被攻击部位组装形成 T6SS^[73], 因此这种机制也被称为“以牙还牙”. 该过程由铜绿假单胞菌的苏氨酸磷酸化途径调节, 主要包括起激活作用的丝氨酸-苏氨酸

酸激酶 PpkA 和起拮抗作用的丝氨酸-苏氨酸磷酸酶 PppA, 两者分别通过磷酸化和去磷酸化作用控制 Fha 蛋白的 FHA (forkhead-associated domain) 结构域, 进而调控 T6SS 的分泌^[74]. 当铜绿假单胞菌遭受其他细菌攻击时, 辅助蛋白 TagQRST 接收信号被激活, 并通过级联反应放大信号, 使 TagR 诱导 PpkA 二聚化和自磷酸化, 激活 Fha, 使其诱导 T6SS 组装以精准反击^[73].

然而, T6SS 被动防御的功能并不常见. 在许多细菌中, T6SS 主要起到进攻杀死其他临近微生物的作用^[4]. 这种情况下, 细菌不需受攻击或与细胞接触, 而是利用其他环境信号来激活 PpkA, 使 PpkA 可通过磷酸化 Fha 来激活 T6SS 的组装. 如鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 是通过丢失带有抗生素的基因来激活 T6SS, 从而杀死其他细菌^[75]. 此时, T6SS 基因仅编码苏氨酸磷酸化途径的基本元件 PpkA/PppA, 而 TagQRST 则不存在. 在黏质沙雷氏菌中, 其特有调节蛋白 RtkS 可以作为进攻信号与 PpkA 的信号转导结构域作用, 促进 PpkA 催化 Fha 磷酸化, 活化的 Fha 能够解除负调控因子 TagF 对跨膜复合体的抑制作用, 进而激活 T6SS, PpkA 和 TagF 的缺失会导致黏质沙雷氏菌抗菌活性明显降低. PppA 负责 Fha 的去磷酸化, $\Delta PppA$ 突变株会因无法抑制 T6SS 的分泌而导致在同一位置重复组装 T6SS^[76]. 根据这些证据也可以解释, 当细菌 (如霍乱弧菌) 中不存在苏氨酸磷酸化途径与 TagF 时, 其需要组装多个 T6SS, 进而以随机方式向外高频分泌蛋白^[32] 达到高效杀伤其他细菌的效果. 此外, 还有一些其他调控因子直接参与了 T6SS 的分泌, 如在铜绿假单胞菌中存在一种 sRNA (小 RNA) 介导的调控途径, 双组分系统 GacS/GacA 可以级联激活 sRNA RsmZ 和 RsmY 的转录, 解除 RNA 结合蛋白 RsmA 对 T6SS 翻译的抑制, 从而诱导 T6SS 基因表达^[77-78].

除了上文提到的这些直接调控因子外, T6SS 的转录还与一些常见环境因子相互关联. 如 σ^{54} 依赖性激活因子 RpoN, 在霍乱弧菌中, RpoN 的激活可以诱导 *hcp* 操纵子的转录^[79]. 铁摄取调控因子 Fur (ferric uptake regulator) 可以在铁丰富环境中结合在 T6SS 相关基因的启动子区, 阻止 RNA 聚合酶与靶标 DNA 的结合, 进而抑制 T6SS 的转录^[80]. 此外, H-NS 调节子也可以通过控制基因组中大量基因, 包括 T6SS 的表达而起到全局调节的作用^[80].

5 总结与展望

随着电镜技术的日益发展, T6SS 各组件的结构和功能日益清晰, 也为我们展示了 T6SS 整个分泌过程不同阶段的结构特征. 相信在不久的将来, 完整的 T6SS 结构也会被解析出来, 甚至整个 T6SS 的动态分泌过程也可以被“看到”, 这样就可以更好地去解释 T6SS 组装和分泌的作用机制, 如 TssA 和 TagA 如何配合控制内管/外鞘的延伸、终止和延伸态维持, 以及其他 3 种非典型 T6SS 的组装模式, 它们分布于哪些细菌和微生态中, 发挥着怎样的生物学功能等. 另一方面, “孤儿”效应因子和“孤儿”免疫蛋白的起源和多样性, 以及其与对应微生物菌群、宿主和非生物环境之间的关系等这些问题的进一步解答, 也将有助于我们更加深入地了解 T6SS 在细菌整个社会群体活动中的作用和存在意义. 除此之外, T6SS 作为一个纳米级的可收缩生物装置, 除了运输自身的效应因子外, 未来我们甚至可尝试利用生物工程改造的手段, 使之变成一个可以运载药物以及不同标记物等外源分子的纳米机器人, 对特定的细胞或病原微生物进行精确攻击, 用于疾病的精准治疗.

参 考 文 献

- [1] Galan J E, Waksman G. Protein-injection machines in bacteria. *Cell*, 2018, **172**(6):1306-1318
- [2] Costa T R, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, *et al.* Secretion systems in gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, **13**(6):343-359
- [3] Pukatzki S, Ma A T, Sturtevant D, *et al.* Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(5):1528-1533
- [4] Cianfanelli F R, Monlezun L, Coulthurst S J. Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. *Trends in Microbiology*, 2016, **24**(1):51-62
- [5] Schwarz S, Singh P, Robertson J D, *et al.* VgrG-5 is a *Burkholderia* type VI secretion system-exported protein required for multinucleated giant cell formation and virulence. *Infection and Immunity*, 2014, **82**(4):1445-1452
- [6] Coulthurst S J. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Research in Microbiology*, 2013, **164**(6):640-654
- [7] Cherrak Y, Flaughnatti N, Durand E, *et al.* Structure and activity of the type VI secretion system. *Microbiology Spectrum*, 2019, **7**(4): PSIB-0031-2019
- [8] Crisan C V, Hammer B K. The *Vibrio cholerae* type VI secretion

- system: toxins, regulators and consequences. *Environmental Microbiology*, 2020, DOI: 10.1111/1462-2920.14976
- [9] Russell A B, Peterson S B, Mougous J D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, **12**(2):137-148
- [10] Sana T G, Berni B, Bleves S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and their effectors: beyond bacterial-cell targeting. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, **6**:61
- [11] Clemens D L, Lee B Y, Horwitz M A. The *Francisella* type VI secretion system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, **8**:121
- [12] Russell A B, Wexler A G, Harding B N, *et al.* A type VI secretion-related pathway in *Bacteroidetes* mediates interbacterial antagonism. *Cell Host Microbe*, 2014, **16**(2):227-236
- [13] Bock D, Medeiros J M, Tsao H F, *et al.* *In situ* architecture, function, and evolution of a contractile injection system. *Science*, 2017, **357**(6352):713-717
- [14] Chen L, Zou Y, She P, *et al.* Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Research*, 2015, **172**:19-25
- [15] Cherrak Y, Rapisarda C, Pellarin R, *et al.* Biogenesis and structure of a type VI secretion baseplate. *Nature Microbiology*, 2018, **3**(12):1404-1416
- [16] Zoued A, Durand E, Santin Y G, *et al.* TssA: The cap protein of the type VI secretion system tail. *BioEssays*, 2017, **39**(10):1600262
- [17] Basler M. Type VI secretion system: Secretion by a contractile nanomachine. *Philosophical Transactions B*, 2015, **370**(1679):20150021
- [18] Yin M, Yan Z, Li X. Architecture of type VI secretion system membrane core complex. *Cell Research*, 2019, **29**(3):251-253
- [19] Aschtgen M S, Bernard C S, De Bentzmann S, *et al.* SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2008, **190**(22):7523-7531
- [20] Robb C S, Assmus M, Nano F E, *et al.* Structure of the T6SS lipoprotein TssJ1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallographica Section F*, 2013, **69**(6):607-610
- [21] Rao V A, Shepherd S M, English G, *et al.* The structure of *Serratia marcescens* Lip, a membrane-bound component of the type VI secretion system. *Acta Crystallographica Section D*, 2011, **67**(12):1065-1072
- [22] Felisberto-Rodrigues C, Durand E, Aschtgen M S, *et al.* Towards a structural comprehension of bacterial type VI secretion systems: characterization of the TssJ-TssM complex of an *Escherichia coli* pathovar. *Plos Pathogens*, 2011, **7**(11):1-11
- [23] Durand E, Nguyen V S, Zoued A, *et al.* Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature*, 2015, **523**(7562):555-560
- [24] Rapisarda C, Cherrak Y, Kooger R, *et al.* *In situ* and high-resolution cryo-EM structure of a bacterial type VI secretion system membrane complex. *EMBO Journal*, 2019, **38**(10):e100886
- [25] Ma L S, Lin J S, Lai E M. An IcmF family protein, ImpLM, is an integral inner membrane protein interacting with ImpKL, and its walker a motif is required for type VI secretion system-mediated Hcp secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 2009, **191**(13):4316-4329
- [26] Durand E, Zoued A, Spinelli S, *et al.* Structural characterization and oligomerization of the TssL protein, a component shared by bacterial type VI and type IVb secretion systems. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**(17):14157-14168
- [27] Aschtgen M S, Thomas M S, Cascales E. Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan TssL, TagL, TagP,... what else?. *Virulence*, 2010, **1**(6):535-540
- [28] Yin M, Yan Z, Li X. Structural insight into the assembly of the type II secretion system pilotin-secretin complex from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Nature Microbiology* 2018, **3**(5):581-587
- [29] Brunet Y R, 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 Genetics*, 2015, **11**(10):e1005545
- [30] Nazarov S, Schneider J P, Brackmann M, *et al.* Cryo-EM reconstruction of type VI secretion system baseplate and sheath distal end. *EMBO Journal*, 2018, **37**(4):e97103
- [31] Nguyen V S, Logger L, Spinelli S, *et al.* Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex. *Nature Microbiology*, 2017, **2**:1-9
- [32] Basler M, Pilhofer M, Henderson G P, *et al.* Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 2012, **483**(7388):182-186
- [33] Lin L, Lezan E, Schmidt A, *et al.* Abundance of bacterial type VI secretion system components measured by targeted proteomics. *Nature Communications*, 2019, **10**(1):2584
- [34] Vettiger A, Basler M. Type VI secretion system substrates are transferred and reused among sister cells. *Cell*, 2016, **167**(1):99-110.e112
- [35] Shneider M M, Buth S A, Ho B T, *et al.* PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 2013, **500**(7462):350-353
- [36] Uchida K, Leiman P G, Arisaka F, *et al.* Structure and properties of the C-terminal β -helical domain of VgrG protein from *escherichia coli* O157. *Journal of Biochemistry*, 2014, **155**(3):173-182
- [37] Leiman P G, Basler M, Ramagopal U A, *et al.* Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, **106**(11):4154-4159
- [38] Renault M G, Zamarreno Beas J, Douzi B, *et al.* The gp27-like hub of VgrG serves as adaptor to promote Hcp tube assembly. *Journal of Molecular Biology*, 2018, **430**(18):3143-3156
- [39] Brunet Y R, Hénin J, Celia H, *et al.* Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway.

- EMBO Reports, 2014, **15**(3):315-321
- [40] Ballister E R, Lai A H, Zuckermann R N, *et al.* *In vitro* self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(10):3733-3738
- [41] Douzi B, Logger L, Spinelli S, *et al.* Structure – function analysis of the C-terminal domain of the type VI secretion TssB tail sheath subunit. *Journal of Molecular Biology*, 2018, **430**(3):297-309
- [42] Douzi B, Brunet Y R, Spinelli S, *et al.* Structure and specificity of the type VI secretion system ClpV-TssC interaction in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 2016, **6**:34405
- [43] Wang J, Brackmann M, Castaño-Díez D, *et al.* Cryo-EM structure of the extended type VI secretion system sheath – tube complex. *Nature Microbiology*, 2017, **2**(11):1507-1512
- [44] Brackmann M, Wang J, Basler M. Type VI secretion system sheath inter-subunit interactions modulate its contraction. *EMBO Reports*, 2018, **19**(2):225-233
- [45] Kube S, Kapitein N, Zimniak T, *et al.* Structure of the VipA/B type VI secretion complex suggests a contraction-state-specific recycling mechanism. *Cell Reports*, 2014, **8**(1):20-30
- [46] Clemens D L, Ge P, Lee B Y, *et al.* Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell*, 2015, **160**(5):940-951
- [47] Kudryashev M, Wang R Y, Brackmann M, *et al.* Structure of the type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, 2015, **160**(5):952-962
- [48] Chang Y W, Rettberg L A, Ortega D R, *et al.* *In vivo* structures of an intact type VI secretion system revealed by electron cryotomography. *EMBO Reports*, 2017, **18**:1090-1099
- [49] Kapitein N, Bönemann G, Pietrosiuk A, *et al.* ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. *Molecular Microbiology*, 2013, **87**(5):1013-1028
- [50] Zoued A, Durand E, Brunet Y R, *et al.* Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature*, 2016, **531**(7592):59-63
- [51] Dix S R, Owen H J, Sun R, *et al.* Structural insights into the function of type VI secretion system TssA subunits. *Nature Communications*, 2018, **9**(1):4765
- [52] Shalom G, Shaw J G, Thomas M S. *In vivo* expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology*, 2007, **153**(8):2689-2699
- [53] Planamente S, Salih O, Manoli E, *et al.* TssA forms a gp6-like ring attached to the type VI secretion sheath. *EMBO Journal*, 2016, **35**(15):1613-1627
- [54] Santin Y G, Doan T, Lebrun R, *et al.* *In vivo* TssA proximity labelling during type VI secretion biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath. *Nature Microbiology*, 2018, **3**(11):1304-1313
- [55] Stietz M S, Liang X, Wong M, *et al.* Double tubular contractile structure of the type VI secretion system displays striking flexibility and elasticity. *Journal of Bacteriology*, 2019, **202**(1):e00425-00419
- [56] Jiang F, Waterfield N R, Yang J, *et al.* A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe*, 2014, **15**(5):600-610
- [57] Salomon D, Kinch L N, Trudgian D C, *et al.* Marker for type VI secretion system effectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(25):9271-9276
- [58] Salomon D. MIX and match: mobile T6SS MIX-effectors enhance bacterial fitness. *Mobile Genetic Elements*, 2016, **6**(1):e1123796
- [59] Lien Y, Lai E. Type VI secretion effectors: methodologies and biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, **7**:254
- [60] Yang X, Long M, Shen X. Effector – immunity pairs provide the T6SS nanomachine its offensive and defensive capabilities. *Molecules*, 2018, **23**(5):1009
- [61] Allsopp L, Bernal P, Nolan L M, *et al.* Causalities of war: the connection between type VI secretion system and microbiota. *Cellular Microbiology*, 2020, **22**(3):e13153
- [62] Unterweger D, Kostiuik B, Otjengerdes R, *et al.* Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*. *EMBO Journal*, 2015, **34**(16):2198-2210
- [63] Trunk K, Peltier J, Liu Y C, *et al.* The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nature Microbiology*, 2018, **3**(8):920-931
- [64] Bondage D, Lin J, Ma L, *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):201600428
- [65] Cianfanelli F R, Diniz J A, Guo M, *et al.* VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system. *Plos Pathogens*, 2016, **12**(6):e1005735
- [66] Diniz J A, Coulthurst S J. Intraspecies competition in *Serratia marcescens* is mediated by type VI-secreted Rhs effectors and a conserved effector-associated accessory protein. *Journal of Bacteriology*, 2015, **197**(14):2350-2360
- [67] Liang X, Moore R A, Wilton M, *et al.* Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(29):9106-9111
- [68] Ma L, Hachani A, Lin J, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe*, 2014, **16**(1):94-104
- [69] Unterweger D, Kostiuik B, Otjengerdes R, *et al.* Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*. *EMBO Journal*, 2015, **34**(16):2198-2210
- [70] Unterweger D, Kostiuik B, Pukatzki S. Adaptor proteins of type VI secretion system effectors. *Trends in Microbiology*, 2017, **25**(1):8-10
- [71] Whitney J C, Quentin D, Sawai S, *et al.* An interbacterial NAD(P)⁺ glycohydrolase toxin requires elongation factor Tu for delivery to target cells. *Cell*, 2015, **163**(3):607-619

- [72] Ross B D, Verster A J, Radey M C, *et al.* Human gut bacteria contain acquired interbacterial defence systems. *Nature*, 2019, **575**(7781):224-228
- [73] Basler M, Ho B T, Mekalanos J J. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 2013, **152**(4):884-894
- [74] Mougous J D, Gifford C A, Ramsdell T L, *et al.* Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Cell Biology*, 2007, **9**(7): 797-803
- [75] Weber B S, Ly P M, Irwin J N, *et al.* A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(30):9442-9447
- [76] Ostrowski A, Cianfanelli F R, Porter M, *et al.* Killing with proficiency: integrated post-translational regulation of an offensive type VI secretion system. *Plos Pathogens*, 2018, **14**(7): 1-25
- [77] Brencic A, McFarland K A, McManus H R, *et al.* The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology*, 2009, **73**(3):434-445
- [78] Leroux M, Kirkpatrick R L, Montauti E I, *et al.* Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *eLife*, 2015, **4**:e05701
- [79] Dong T G, Mekalanos J J. Characterization of the RpoN regulon reveals differential regulation of T6SS and new flagellar operons in *Vibrio cholerae* O37 strain V52. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(16):7766-7775
- [80] Porcheron G, Dozois C M. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 2015, **179**(1-2):2-14

The Type VI Secretion System*

KONG Tian-Xiang¹⁾, ZHAO Yi-Xin²⁾, DU Jing²⁾, LI Ying-Jie^{3)**}

¹⁾Tianshan College, Shandong University, Jinan 250100, China;

²⁾College of Life Sciences, Shandong University, Qingdao 266237, China;

³⁾State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China)

Abstract The type VI secretion system (T6SS) is a nanoscale contractile device, which is widely found in the gram negative bacteria. This machine can kill eukaryotic predators or prokaryotic competitors by injecting toxic effectors into target cells. In the past decades, the diversity of T6SS gene clusters, the assembly of the T6SS, and the infection mechanism of the effectors have been investigated extendedly, making great progress. This review summarizes the knowledge of the T6SS from four aspects, including the composition and diversity of the T6SS gene clusters, the structure and assembly of the T6SS machine, the type of the effector, as well as the regulation network to provide insights for further T6SS research.

Key words type VI secretion system, genetic diversity, key component, effector, regulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0148

* This work was supported by grants from The Fundamental Research Funds of Shandong University and Qingdao Basic Applied Research Project (Youth Project, 18-2-2-60-jch).

** Corresponding author.

Tel: 86-532-58631569, E-mail: yingjie.li@sdu.edu.cn

Received: May 17, 2020 Accepted: June 30, 2020