



革兰氏阴性菌VI型分泌系统及其参与金属离子转运的研究进展

刘琬洋^{1,2,3#}, 权国梅^{1,2,3#}, 刘家奇^{1,2,3}, 连思琪^{1,2,3}, 朱国强^{1,2,3*}

¹扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

²江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 江苏 扬州 225009

³江苏省动物重要疫病和重要人兽共患病防控技术国际合作联合实验室, 江苏 扬州 225009

摘要: 细菌通过其分泌系统将特定的效应蛋白输送到外界环境或进入靶细胞中, 从而在细菌和宿主、细菌和微生物群落的相互作用中占据适应性优势。VI型分泌系统(The type VI secretion system, T6SS)是革兰氏阴性菌中广泛存在的大分子分泌装置, 其结构和功能类似于可收缩的噬菌体尾针样, 通过细胞间直接接触将细菌各种酶或毒素效应蛋白转运到原核和真核生物中, 从而介导细菌间竞争以及对宿主的致病过程。有些效应蛋白还可通过非接触依赖的方式进入胞外环境来帮助细菌获取稀缺金属离子, 并且它们对应激条件下细胞内金属稳态的维持至关重要。这篇综述总结了VI型分泌系统的结构、组装及其分泌的效应蛋白, 并重点阐述了VI型分泌系统在多种金属离子转运机制中作用的研究进展, 有助于理解 T6SS 在细菌间相互作用和细菌感染过程中发挥的重要作用。

关键词: VI型分泌系统, 效应蛋白, 细菌间竞争, 致病性, 金属转运

在生存和适应环境的过程中, 细菌会有效地利用一切资源来保护自身免受外界不良环境影响或机体免疫系统攻击。一方面细菌彼此间会通过合作如交换营养和资源以促进自身生存; 另一方面细菌会进化出多种机制以增强其对宿主的侵袭定植能力并引起疾病, 这个过程需要蛋白分泌系统的参与, 分泌系统负责将胞内物质运输到胞外, 对细菌的生长繁殖具有重要作用。目前在细菌中

发现了 9 种不同类型的分泌系统, 分别命名为 I 型分泌系统(type I secretion system, T1SS)至 IX 型分泌系统(type IX secretion system, T9SS)^[1]。

2006 年 Pukatzki 等首先在霍乱弧菌中发现了 T6SS^[2], 随后铜绿假单胞菌、伯克霍尔德氏菌、嗜水气单胞菌等菌株也陆续报道了 T6SS 的存在^[3], 如今 T6SS 已在超过 25% 的革兰氏阴性菌中得到证实^[4]。与 T1SS、T3SS 和 T4SS 相似, T6SS 也

基金项目: 江苏省高级优势学科; 国家自然科学基金(31873010)

*通信作者。Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzqzhu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-25; 修回日期: 2021-03-26; 网络出版日期: 2021-04-06

属于双膜镶嵌分泌系统,装置横跨细菌细胞内膜-周质-外膜,能够一步将效应蛋白分泌至细胞外或者直接转运至原核/真核细胞内。这些效应蛋白通常缺乏 N-端信号肽序列,在细胞膜之间直接接触时通过特定的通道被转运出去,进而发挥影响细菌或感染宿主的作用,这个过程需要消耗能量。其余 5 种分泌系统 T2SS、T5SS、T7SS、T8SS 和 T9SS 都为单膜镶嵌分泌系统,其效应蛋白含有 N-端信号肽序列,依赖普通分泌途径(Sec)或双精氨酸途径(Tat)穿过细胞质膜,以两步法被分泌至细胞外^[5]。VI 型分泌系统作为一种重要的蛋白分泌系统,在细菌间竞争和对宿主的致病性中都发挥着重要作用,此外也参与了细菌生物膜的形成、耐药基因的水平转移和金属离子的摄取。本综述将对 T6SS 的结构组装、效应蛋白和防御机制等方面进行简单介绍,并且重点阐述 T6SS 参与金属离子转运机制的研究进展。

1 VI 型分泌系统的结构与组装

T6SS 广泛分布于革兰氏阴性变形杆菌中,包含 12–25 个组分,它在结构和功能上与 T4 噬菌体尾部结构高度同源^[6]。T6SS 的结构主要包括跨膜复合体(membrane complex, MC)、基座复合体(baseplate complex, BC)和管状结构 3 个部分^[7]。其中跨膜复合体横跨细菌细胞内膜和外膜,由 TssJ-TssM-TssL 组成,既可作为基座的停靠站,又是效应蛋白转运的通道^[8]。基座复合体由 TssE-TssF-TssG-TssK 组成,它是 T6SS 鞘管的组装平台并通过构象改变触发外鞘收缩^[4]。管状结构的相关组件包括 Hcp 内管、TssB-TssC 外鞘和位于鞘管顶端的 VgrG-PAAR (Valine-glycine repeat protein G-proline-alanine-alanine-arginine) 针尖复

合体^[6],它们不仅是 T6SS 的重要组成成分,还可作为效应蛋白的转载体或伴侣蛋白辅助运输^[9]。

在 T6SS 组装过程中,跨膜复合体首先锚定到细胞膜上并招募基座复合体,随后 Hcp 六聚体不断堆叠形成内管,TssB-TssC 二聚体在周围聚合形成外鞘^[10],VgrG 和 PAAR 在鞘管顶端形成穿刺结构。当 T6SS 延伸至对侧细胞膜时,外鞘远端的 TssA 与细胞膜上的 TagA 结合终止延伸^[11]。效应蛋白被招募到 Hcp-VgrG-PAAR 结构的特定部位等待转运^[12]。接下来外鞘收缩释放能量,推动 Hcp-VgrG-PAAR 复合体分泌至胞外或进入靶细胞的适当位置释放效应蛋白,随后该复合结构发生解离^[13]。最后收缩状态的外鞘被 AAA⁺ATP 酶 ClpV 分解为 TssB 和 TssC 单体并回收,允许 T6SS 的下次组装和分泌^[1,14](图 1)。

2 VI 型分泌系统的效应蛋白

T6SS 具有介导细菌间竞争、增强对宿主的致病性、提高环境适应性表型和介导金属离子摄取等多种功能^[15],T6SS 功能的多样性取决于其分泌的效应蛋白。根据结构可将效应蛋白分为携带延伸功能域的结构蛋白和非结构性分泌蛋白,前者可与 Hcp-VgrG-PAAR 的某个组分共价结合,后者则与这些组分非共价连接^[16]。效应蛋白既可靶向原核细胞的保守结构,如细胞壁、核酸和细胞膜,又可靶向真核细胞和一些特定的细胞分子,有些效应蛋白还可靶向胞外环境以吸收金属离子^[17],如表 1 所示。

2.1 靶向细胞壁的效应蛋白

细胞壁是细菌细胞的基本结构,在维持渗透压和细胞形态方面具有重要作用,一旦细胞壁屏

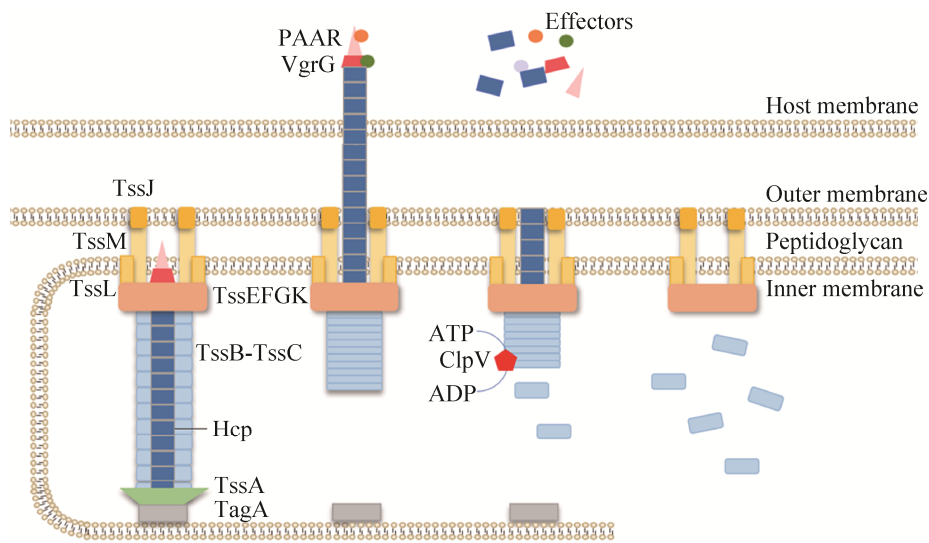


图 1. VI型分泌系统的结构与组装^[17]

Figure 1. The structure and assembly of type VI secretion system^[17].

表 1. VI型分泌系统效应蛋白及功能

Table 1. The functions for the effector proteins of type VI secretion system

Target	Effector	Organism	Effector activity	Function	Reference
Cell wall	Tse1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Peptidoglycan amidase	Peptidoglycan lysis	[18]
	Tse3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Peptidoglycan glycoside hydrolase		
	Ssp1/2	<i>Serratia marcescens</i>	Peptidoglycan amidase		[29]
	Tide1	<i>Salmonella enteritidis</i>	L,D-carboxypeptidase, L,D-transpeptidase	Impair synthesis of peptidoglycan	[20]
Nucleic acid	Tse2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RNase	Degrade RNA,	[26]
	Tde	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	DNase	Cause DNA damage, growth inhibition	[22]
	PoNe	<i>Vibrio Parahemolyticus</i>	DNase		[30]
Membrane	Tle1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Phospholipase	Hydrolyze phosphati-dylethanolamine	[24]
	Tle5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Phospholipase D enzymes		
	VasX	<i>Vibrio cholerae</i>	Pore-forming	Ion-selective pores	[26]
Eukaryotic cell	VgrG1	<i>Vibrio cholerae</i>	Actin cross-linking domain	Prevent cell cytoskeleton rearrangements, Inhibit phagocytosis	[28]
	VgrG1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ADP-ribosyltransferase domain	Modifies host actin, induces apoptosis	[9]
	VgrG5	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Cell-fusion domain	Induce multinucleated giant cell	[31]

障被破坏，则细胞生存受威胁甚至死亡，因此细胞壁是抗菌效应蛋白的重要靶标^[1]。效应蛋白对细菌细胞壁的破坏主要是通过降解肽聚糖实现的，但是作用位点却存在差异。例如铜绿假单胞菌的

Tse1 和 Tse3 是最早被鉴定出水解肽聚糖的效应蛋白^[18]，但是 Tse1 具有酰胺酶活性，通过降解肽聚糖五肽交联桥的肽键而裂解细胞壁；而 Tse3 具有糖苷水解酶活性，通过水解肽聚糖多糖主链的

β -1,4 糖苷键而使细胞壁出现孔洞甚至解体,进而杀死细菌^[19]。此外效应蛋白也可通过干扰肽聚糖的合成来破坏细胞壁。例如肠炎沙门菌的 Tlde1 具有 L,D-转肽酶和 L,D 羧肽酶双重活性,通过裂解并修饰肽聚糖前体来降低其可获得性,从而干扰细胞壁的合成并达到杀菌目的^[20]。

2.2 靶向核酸的效应蛋白

靶向核酸的效应蛋白实质上发挥核酸酶活性,包括核糖核酸酶 RNase 和脱氧核糖核酸酶 DNase,根据 DNase 的作用部位又可分为限制性内切酶和核酸外切酶。这些效应蛋白通过降解 RNA 分子或者切割特定核苷酸序列上的磷酸二酯键来水解 DNA,从而导致细菌生长抑制甚至死亡^[1]。例如铜绿假单胞菌的 Tse2 蛋白是一种 RNase,能够降解靶细胞 mRNA 并干扰基因表达,从而抑制细菌生长^[21]。根瘤农杆菌的 Tde1 和 Tde2 蛋白为双指核酸酶内切酶 (His-Me finger endonucleases),可在靶细胞中诱导 SOS 反应和靶细胞 DNA 降解,从而导致细菌生长停滞并最终死亡^[22]。粘质沙雷氏菌 Rhs 蛋白的 C-末端区域编码 DNase,利用其 N-末端 PAAR 结构域与 VgrG1b 结合转运至靶细胞内,能够降解靶细胞 DNA,中断复制进而抑制细菌增殖^[23]。

2.3 靶向细胞膜的效应蛋白

细胞膜也是细胞的基本结构,它以磷脂双分子层作为基本支架,在维持内环境稳态、调节和控制物质进出细胞、分泌与运输蛋白质方面发挥着重要作用,因此细胞膜也是抗菌效应蛋白的重要靶标。一旦细胞膜脂质被降解,则细胞内外渗透压失衡并且细胞损伤。VI型脂肪酶(磷脂酶)就是典型的靶向细胞膜的效应蛋白,它包括 Tle1-5 五个蛋白家族,通过水解细胞膜主要脂质成分磷脂

酰乙醇胺来破坏细胞膜,从而发挥抗菌活性^[24]。除了降解膜脂外,效应蛋白还可以穿孔的方式破坏细胞膜。例如致孔毒素(pore-forming toxins)通过插入细胞内膜,导致内膜去极化并在细胞膜表面形成离子选择性孔隙,从而改变细胞内外渗透压并最终导致细菌死亡^[25],例如霍乱弧菌的 VasX 蛋白具有 C-端 colicin 结构域,能够在内膜表面形成孔道并损伤膜电位,从而损害细菌细胞^[26]。

2.4 靶向特定细胞分子的效应蛋白

除了靶向细胞壁、细胞膜等细菌保守结构外,效应蛋白还可以作用于特定的细胞分子,影响细胞代谢从而发挥毒性作用。例如铜绿假单胞菌的 Tse6 蛋白可将靶细胞 NAD(P)⁺降解为烟酰胺和 ADP-核糖,从而抑制细胞呼吸和合成代谢^[25]。蛋白沙雷氏菌的 Tre1 蛋白是一种腺苷二磷酸转移酶,通过使精氨酸残基核糖化而阻碍细菌微管样蛋白 FtsZ 的聚合,抑制细胞分裂并导致死亡^[22]。铜绿假单胞菌的 Tas1 蛋白是一种腺苷酸焦磷酸激酶,在营养胁迫条件下使靶细胞(p)ppApp [adenine 5'-triphosphate-3'-diphosphate and adenine 3', 5'-bis(diphosphate)]快速积累并耗尽 ADP 和 ATP,从而导致细胞内能量失衡以及细胞基本代谢途径的失调^[27]。

2.5 抗真核细胞效应蛋白

T6SS 的抗真核细胞效应主要包括破坏肌动蛋白细胞骨架、促进细菌的侵袭和定殖、免疫逃逸、激活炎性应答、抗阿米巴和抗真菌等^[28]。目前已知的抗真核细胞效应蛋白分为与效应结构域融合的 VgrG 蛋白和单独的分泌蛋白^[26]。例如霍乱弧菌 VgrG1 蛋白具有肌动蛋白交联结构域,能够阻止宿主肌动蛋白细胞骨架重排、抑制吞噬并刺激宿主免疫应答^[28]。嗜水气单胞菌的 VgrG1

蛋白具有 ADP-核糖基转移酶活性, 能够抑制宿主肌动蛋白聚合, 激活 caspase-9 并最终导致细胞凋亡^[9]。此外粘质链霉菌的 Tfe1 和 Tfe2 蛋白可作用于真菌细胞, 前者引起细胞质膜去极化 并最终导致真菌死亡; 后者诱发饥饿反应, 使真菌细胞内环境紊乱并导致细胞自噬的发生^[17]。总之, 靶向真核细胞的效应蛋白通过介导细菌与真核宿主之间的相互作用而引发感染或导致疾病。

3 VI型分泌系统的防御机制

细菌对 T6SS 最有效的防御机制是同源免疫蛋白的保护作用。在 T6SS 基因簇中编码效应蛋白的基因附近通常具有编码同源免疫蛋白的基因, 二者可形成同源免疫对 (effector-immunity)。当效应蛋白被转运至靶细胞后, 同源免疫蛋白利用蛋白质间相互作用与效应蛋白的活性位点结合消除毒素效应。需要强调的是这种特异性保护作用仅针对菌株自身及其亲缘菌株^[29]。除了免疫蛋白外, 细菌还具有其他机制抵御 T6SS 的攻击, 包括物理屏障、遗传解毒剂和保护性应激^[32]。物理屏障是指细菌产生的抑制细胞间紧密接触的物理结构, 例如胞外多糖、生物膜基质和死亡细胞“尸体屏障”(corpse barrier)^[32]。遗传解毒剂是指由细菌水平基因转移获得的“孤儿”免疫基因, 它在肠道微生物群落中比较常见^[26]。保护性应激是指在 T6SS 介导的竞争环境中, 靶细菌及其邻近细菌发生应激反应以促进自身生存, 即细菌的竞争感知 (competition sensing) 现象^[33], 例如铜绿假单胞菌在受到霍乱弧菌 TseL 蛋白攻击时会激活 H1-T6SS (Hcp 分泌岛 I 编码的 T6SS^[34]), 从而

反过来对霍乱弧菌进行攻击^[17]。

4 VI型分泌系统参与金属离子转运的机制

金属离子是细菌生长发育所必需的微量元素, 在多种生命活动过程中都发挥着重要作用, 例如充当蛋白质或酶的辅因子, 参与糖类、脂质等的合成代谢过程。然而过量的金属离子会催化 Fenton 反应生成剧毒的羟基自由基, 损害细胞的 DNA、蛋白质和脂肪等生物大分子, 从而对细菌造成毒害作用^[35], 因此细胞内金属离子的浓度受到严格调控。在对宿主进行侵袭定殖的过程中, 细菌进化出有效的金属摄取和调控机制以控制金属离子的吸收和外排, 从而维持金属离子的稳态, T6SS 就是其中重要的一种^[36]。2012 年 Sana 等报道铜绿假单胞菌的铁摄取调控因子 (ferric uptake regulator, Fur) 能够感应环境中铁离子浓度并负调控 H2-T6SS (Hcp 分泌岛 II T6SS) 的表达^[37], 初步提示 T6SS 与金属离子之间可能存在相关关系。2015 年 Wang 等发现假结核耶尔森氏菌的 T6SS4 (假结核耶尔森氏菌基因组编码的第 4 个 T6SS 基因簇) 能够摄取细胞外环境中的锌离子^[38], 首次揭示了 T6SS 在金属离子转运过程中的重要作用。

目前研究已经发现 T6SS 可以参与锌离子、铁离子和铜离子的转运, 三者的转运机制相似, 基本过程都是由 T6SS 向细胞外分泌特定的金属结合蛋白, 然后在不同类型外膜蛋白的协助下以非接触依赖的方式将环境中的金属离子转运至胞内。不同点在于 T6SS 分泌金属结合蛋白对胞外金属离子的结合方式不同。金属结合蛋白对铜离子和锌离子采取直接结合的方式, 而对铁离子的结合需要外膜囊泡作为铁离子载体参与其中。载有

不同金属离子的 T6SS 金属结合蛋白将离子运送至外膜蛋白, 从而在外膜蛋白的协助下将环境中的稀缺金属离子转运进细胞内以满足细菌的营养需要^[39], 并在不直接对其他细菌造成伤害的情况下通过竞争必需营养来占据生长优势^[40]。T6SS 介导的金属离子转运机制如图 2 所示。

4.1 T6SS 参与锌离子的转运

锌是生物体内仅次于铁的第二丰富的过渡金属元素, 对于维持蛋白质结构和各种生物大分子的稳定性具有重要作用, 它对细菌的生长发育、

抗氧化、感染和免疫都是极其重要的。共生生物适应宿主的能力或致病菌对宿主的致病程度都取决于它们对宿主体内锌的最大利用度, 说明锌对肠道有益菌群以及感染宿主的病原菌的生存定植均非常重要^[41]。但是过量的锌也会对细菌表现出毒性作用, 如阻滞细菌的生长和代谢等^[42]。正常情况下, 细菌通过高亲和力的 ZnuABC 锌转运系统(一组对锌具有高度特异性的 ABC 型金属转运蛋白)或低亲和力的 ZRT/IRT 相关蛋白(ZIP)家族转运蛋白 ZupT 从外界环境或宿主体内摄取锌离

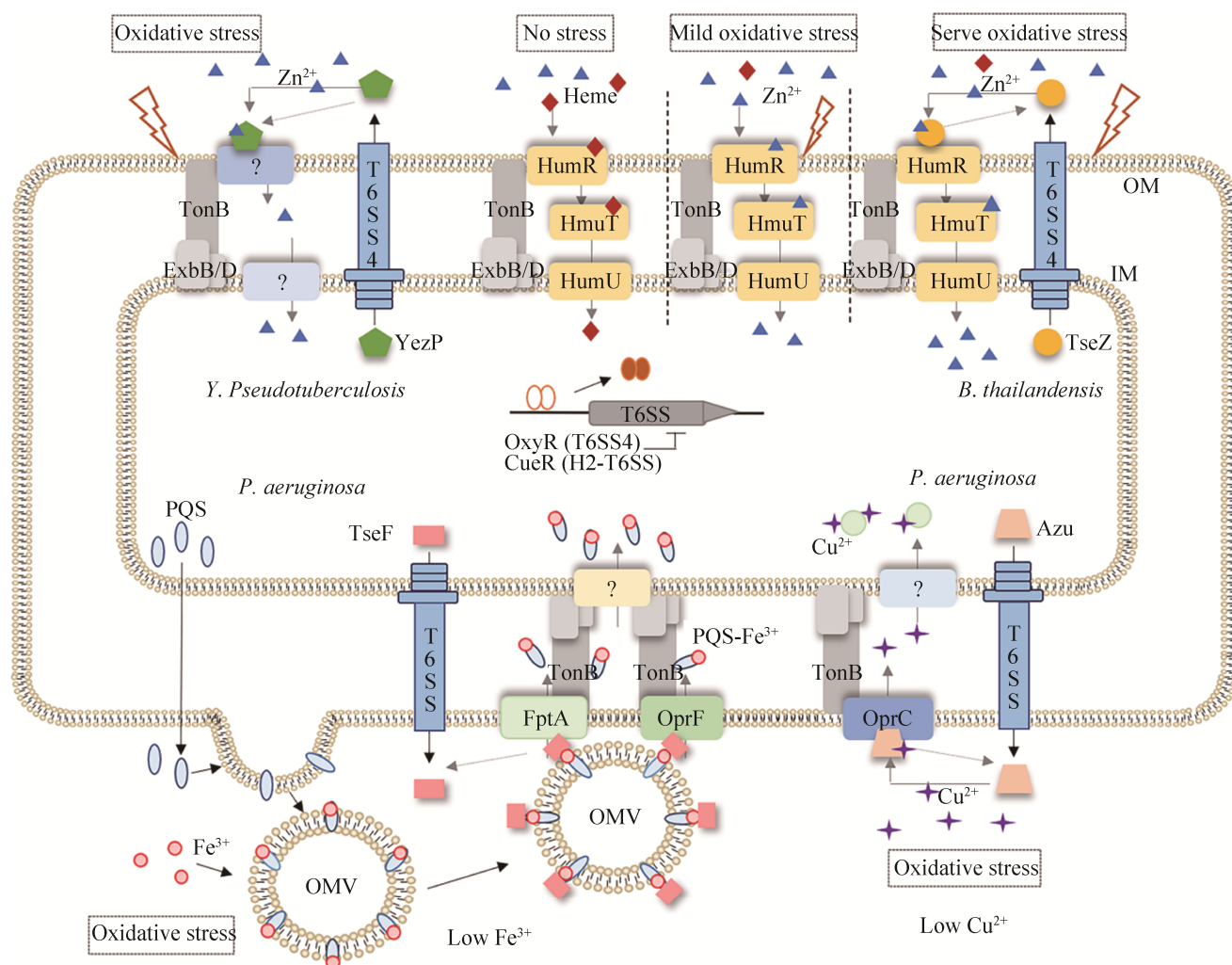


图 2. VI型分泌系统金属离子转运机制^[40,45,51]

Figure 2. The mechanism of metal ion translocation in type VI secretion system^[40,45,51].

子以供自身利用^[38]。然而在环境胁迫状态下, 转录调节因子响应应激信号并激活细菌 T6SS 的表达以及金属结合蛋白的分泌, 促使细菌通过 T6SS 摄取环境中的锌离子^[43]。T6SS 向细胞外分泌金属结合蛋白与环境中的锌离子结合, 然后在 TonB 依赖性外膜转运蛋白的作用下将锌离子转运至细胞内, 从而提高细菌的抗胁迫能力, 进而增加细菌在氧化应激或营养缺乏环境中的生长优势^[36]。T6SS 的表达受氧化应激感应调节蛋白 OxyR 和环境中锌离子浓度的严格调控。T6SS 启动子区域含有 OxyR 结合位点, 通过与 OxyR 结合抑制转录。但是氧化应激条件下 OxyR 构象改变不再与 T6SS 的启动子区域结合, 从而负调控 T6SS 的表达^[40]。另外, 锌限制环境中锌摄取调节因子 Zur 通过感应锌离子浓度变化激活 T6SS 的表达, 而锌富集环境则抑制 T6SS 的表达^[9]。下面将以假结核耶尔森菌和泰国伯克霍尔德菌为例对 T6SS 参与锌离子转运的机制进行详细阐述。

假结核耶尔森菌的 T6SS4^[44]是首个被发现具有金属吸收功能的非接触依赖性 T6SS, 其作用机制比较典型^[40]。在假结核耶尔森菌感染宿主的过程中, 宿主为了抑制病原菌的生长进化出一种营养免疫(nutrition immunity)策略, 限制病原菌对宿主体内锌离子的获取和利用从而发挥抑菌作用。因此病原菌也进化出相应的机制有效对抗宿主营养免疫, 通常是利用经典锌转运系统 ZnuABC 将锌离子运输至细菌细胞内以达到细菌的生长要求。但是在氧化应激条件下, ZnuABC 转运系统的功能受抑制以至于不能满足细菌细胞对锌离子的需求。此时 OxyR 响应氧化应激信号并发生构象改变, 不再与假结核耶尔森氏菌 T6SS4 启动子区域的 OxyR 结合位点结合, 解除对 T6SS4 的转

录抑制并激活其表达^[40]。随后 T6SS4 向细胞外分泌锌离子结合蛋白 YezP (*Yersinia extracellular zinc-binding protein*), 能够结合环境中的锌离子并在 TonB 依赖性外膜转运蛋白的协助下将锌离子输送至细胞内, 缓解细菌细胞内的缺锌状态, 从而提高细菌在恶劣环境中或与宿主互作期间的生存能力^[38]。总之由 T6SS4 介导的锌离子转运机制与假结核耶尔森菌的抗胁迫能力和对真核宿主毒力密切相关。

与假结核耶尔森菌相比, 泰国伯克霍尔德菌的 T6SS 参与锌离子摄取和转运的机制更加复杂。该机制由 T6SS 分泌的锌结合效应蛋白 TseZ 和 TonB 依赖性外膜血红素转运蛋白 HmuR 组成, 二者相互作用共同完成锌离子的跨外膜主动转运。HmuR 是一种受氧化还原信号调节的双功能转运蛋白, 正常情况下运输血红素铁, 但是在氧化应激条件下通过形成分子内二硫键切换底物特异性, 从而成为锌离子的转运载体^[45]。因此, HmuR 可作为感应细胞外氧化应激信号的“氧化还原传感器”, 确保细胞对外界应激信号作出即时反应。在轻微的氧化应激条件下, 这种“微调”机制就可以满足细菌对锌离子的需求。但是当细菌面对严重的氧化应激挑战时, 细菌细胞内 ROS 水平显著增高, OxyR 激活 T6SS4 的表达, 促使 T6SS4 向细胞外分泌锌结合效应蛋白 TseZ, 吸收环境中的锌离子^[46]。随后 TseZ 在 TonB 依赖性外膜转运蛋白 HmuR 的作用下将锌离子转运到细胞内, 这个过程受 Zur 的负调控^[47]。在细胞质中锌离子作为抗氧化酶的辅助因子或者竞争性抑制芬顿反应的发生, 从而对抗氧化应激^[40]。总之, 由 T6SS-TseZ-HmuR 介导的锌离子转运机制通过竞争必需养分增强细菌在恶劣环境中的适应性, 同

时对于非接触性细菌间竞争和细菌毒力也非常重要。另外, Si 等发现泰国伯克霍尔德菌的 T6SS4 还可通过类似的机制转运锰离子。通过分泌锰结合效应蛋白 TseM 结合细胞外的锰离子, 然后与 TonB 依赖性外膜转运蛋白 MnoT 直接相互作用运输锰离子, 从而满足氧化应激条件下细胞对锰离子增长的需求^[48]。

4.2 T6SS 参与铁离子的转运

铁是几乎所有活细胞所必需的微量营养素, 对于生物的多种生命活动过程都至关重要, 通过充当许多蛋白和酶的重要辅助因子, 广泛参与电子转移、DNA 合成等过程。在细菌感染期间, 无论是入侵的病原体还是宿主细胞都需要铁来维持其基本功能、新陈代谢和细胞增殖^[42]。病原菌入侵宿主后, 必须从宿主体内获取铁离子才能满足正常的生长和代谢需求。当细胞内铁离子浓度低于 10^{-6} mol/L 时称为铁饥饿现象(iron-starvation)^[49], 此时不利于细菌的生长。为了抵抗恶劣环境, 细菌进化出多种机制来获取铁离子, T6SS 就在其中扮演着重要的角色。具体机制为: 在环境胁迫条件下, T6SS 被激活并向细胞外分泌效应蛋白, 吸收外膜囊泡(outer membrane vesicle, OMVs)中的 Fe^{3+} -铁载体复合物, 然后与外膜受体蛋白结合, 将 Fe^{3+} -铁载体复合物转运至细胞内^[50]。在胞浆中铁离子被释放出来并被细菌利用。铁摄取机制与锌摄取机制的区别在于 T6SS 效应蛋白不是直接与铁离子结合, 而是识别 OMVs 中的 Fe^{3+} -铁载体间接结合铁离子。例如在铜绿假单胞菌中, H3-T6SS 分泌效应蛋白 TseF, 可与 OMVs 中的 PQS- Fe^{3+} 结合^[51]。PQS (*Pseudomonas* quinolone system)是一种群体感应信号分子, 能够插入细胞外膜并诱导其弯曲形成 OMVs, 随后 PQS 迅速结

合胞外铁离子形成紧密连接的 PQS- Fe^{3+} 复合物^[41]。最后 TseF 通过与铁载体受体蛋白 FptA 和孔蛋白 OprF 特异性相互作用而将 PQS- Fe^{3+} 转运至细胞内, 从而完成对铁离子的摄取。在这个过程中, TseF 作为连接 PQS 信号分子和 FptA/OprF 表面受体蛋白的桥梁, 以间接的作用参与铁离子的主动转运过程, 它对铜绿假单胞菌的毒力具有重要意义, 并且能够提高在恶劣环境中的竞争能力^[50]。

4.3 T6SS 参与铜离子的转运

铜是维持细菌正常生理活动所必需的一种微量金属元素, 可作为多种合成代谢酶的辅助因子发挥重要作用, 其中最主要的铜蛋白酶为细胞色素 c 氧化酶和铜超氧化物歧化酶, 它们可以发挥抗氧化功能。但是细胞内铜过量蓄积会产生损伤性羟基自由基或破坏氧化呼吸链的 Fe-S 中心, 严重时可导致细胞死亡^[52]。有时铜的这种毒性作用可被宿主免疫系统利用, 例如细菌感染后铜在巨噬细胞吞噬小体中大量积累, 从而吞噬并杀死入侵的细菌^[53]。细胞内铜的浓度受到严格控制, 因此细菌进化出多种机制来维持铜的稳态平衡, 其关键在于 Cu^{2+} 摄取和外排的相对一致。跨内膜的 $\text{P}_{1\text{B}}$ 型 ATP 酶 CopA 是细胞内铜外排的主要通道, CopA 将 Cu^{2+} 从胞质转运至周质后, 与跨膜的 CusCAB 孔道系统相互作用将多余的 Cu^{2+} 转运至细胞外^[54]。一般情况下 Cu^{2+} 的摄取主要依靠高亲和力的铜转运蛋白 Ctr^[55], 但是在环境胁迫条件下, T6SS 对细菌摄取 Cu^{2+} 的过程起着重要作用。转录调节因子 CueR 感应环境中铜离子浓度变化并通过直接结合 T6SS 启动子区域来调控 T6SS 的表达和装配。在低铜环境中, CueR 响应环境胁迫信号激活 T6SS 并促使 T6SS 向细胞外分泌效应蛋白, 这些效应蛋白可以结合环境中的 Cu^{2+} , 然后

与 TonB 依赖性外膜转运蛋白相互作用将 Cu^{2+} 转运至细胞内^[35]。在细胞内 Cu^{2+} 与特异性铜伴侣蛋白结合并转运到特定的靶蛋白, 防止游离 Cu^{2+} 对细胞产生毒害作用^[55]。铜绿假单胞菌的 H2-T6SS 就是一个典型的例子^[35]。当环境中 Cu^{2+} 浓度较低时, 为了维持细胞内铜稳态, CueR 通过激活 H2-T6SS 的表达和装配, 使铜结合蛋白 Azu 与运载蛋白 VgrG2b 一起被分泌到环境中。同时 CueR 激活 TonB 依赖性外膜转运蛋白 OprC, 将与 Azu 结合的 Cu^{2+} 转运至细胞内, 增加细菌对胞外 Cu^{2+} 的摄取, 从而提高细菌在恶劣环境中的生存能力^[39]。这种由 T6SS-Azu-OprC 介导的铜转运机制对铜绿假单胞菌的抗菌活性和毒力至关重要, 并且有利于细菌适应复杂多变的外界环境。

4.4 金属离子参与 T6SS 基因表达的调控

T6SS 的调控机制非常复杂, 不同细菌之间存在一定的差异^[14], 但基础机制包括群体感应 (quorum sensing, QS)、氧化应激 (oxidative Stress, OS)、苏氨酸磷酸化途径、双组分系统 GacS/GacA 和 BaeSR 等^[56]。此外, 金属离子也在细菌 T6SS 的表达调控中发挥着重要作用, 例如 Burtnick 和 Brett 发现鼻疽伯克霍尔德菌和类鼻疽伯克霍尔德菌中 T6SS-1 (cluster1 T6SS) 的表达受铁离子和锌离子的负调控^[57]。

Fur 是最早发现的金属调节蛋白之一, 它与细胞内的铁稳态有关, 通过感应铁离子浓度来调节 T6SS 的基因表达^[9]。当细胞内铁离子含量充足时, Fur 可与 T6SS 启动子区的 Fur 盒结合并阻止 RNA 聚合酶进入, 从而抑制 T6SS 的转录, 该过程需要 DNA 腺嘌呤甲基转移酶参与。当铁不足时, Fur 脱离 Fur 盒, 暴露出的 GATC 基序发生甲基化, 阻止 Fur 的再次结合, 此时 T6SS 基因处于激活状

态^[15]。目前, Fur 可结合区已被证明存在于铜绿假单胞菌的 H2-T6SS、肠聚集性大肠杆菌的 T6SS 和迟缓爱德华菌的 T6SS 中^[57]。与之类似, 类鼻疽伯克霍尔德菌 T6SS4 (cluster4, 类鼻疽伯克霍尔德菌基因组编码的 6 个 T6SS 基因簇中的第 4 个^[58]) 的表达受到锌结合蛋白 Zur 的调控^[40]。Zur 属于铁摄取调控因子家族成员, 通常编码在锌离子摄取和利用相关基因的上游, 通过感应细胞内锌离子浓度变化来调节 T6SS 的表达和装配, 从而维持细胞内锌的动态平衡^[41]。当锌离子富集且无氧化应激时, Zur 可与 T6SS 启动子区域的 Zur 盒特异性结合, 抑制 T6SS 的转录; 但是当细胞外锌离子浓度降低时, 锌离子不能再作为 Zur 的感应信号, 这种抑制作用也随之解除, T6SS 被激活^[40]。Zur 作为是否启动 T6SS 转录的开关, 受到环境中锌离子浓度的严格调控。即低浓度锌离子诱导表达, 而高浓度锌离子却抑制表达。

5 总结和展望

VI 型分泌系统是革兰氏阴性菌中广泛存在的大型分泌装置, 它在细菌竞争、宿主致病性以及环境适应等方面都发挥着重要作用。近些年随着冷冻电镜技术的发展, 对 T6SS 的具体结构包括核心组件和其他相对不保守的组分有了比较清晰的认识, 但是 T6SS 的分泌机制以及多样化效应蛋白的交付机制仍需进一步研究。T6SS 效应蛋白主要包括两类: “货物”效应蛋白 (cargo effectors) 和“特殊化”效应蛋白 (specialized effectors), 它们都需要与 (Hcp)-VgrG-PAAR 相互作用或进行末端融合而装载到 T6SS 机器上。理论上讲, T6SS 组件可同时装载多种不同的效应蛋白并在一次收缩事件中将它们全部分泌出去, 并且一种效应蛋白也可

以分别装载到不同的 T6SS 组件上进行转运。异源效应蛋白转运试验揭示了 T6SS 介导的效应蛋白转运的特异性和局限性, 效应蛋白的转运并不是广泛非特异性的, 它在转运过程中也需要一定的条件, 包括与特定组分的结合以及组分周围可容纳的空间。那么不同的 T6SS 组件识别并结合某种或多种效应蛋白的依据是什么, 它们如何选择特异性的效应蛋白进行转运? 不同的装载事件对效应蛋白转运的效率是否构成影响? 多种效应蛋白在一次分泌过程中的协调机制是怎样的? 这些问题都有待探讨。效应蛋白的种类和作用靶点的多样性也使得 T6SS 更加吸引关注。T6SS 效应蛋白家族在不同细菌中广泛存在, 并且可能作用于不同的细胞靶标, 同时水平基因转移和孤儿免疫基因的存在也更加丰富了效应蛋白的多样性。作用于细胞周质的效应蛋白主要发挥溶解活性, 而作用于细胞质的效应蛋白则发挥更为广泛的作用。近些年通过比较基因组学和遗传筛选相结合的方法以及生物信息学分析(利用特征基因簇或保守结构域进行预测)鉴定出多样的新型 T6SS 效应蛋白, 大大扩展了我们对 T6SS 的功能及其用于细菌竞争和宿主致病等的不同机制的认识。T6SS 可以对抗或取代共生微生物群落, 从而成功在宿主生态位上定植并夺取显著的竞争优势, 进而影响微生物群落的结构组成, 因此对 T6SS 及其效应蛋白的研究可能为治疗多种细菌混合感染提供新的线索。另外, 由于 T6SS 效应蛋白转运功能, 可以开发针对 T6SS 靶点的抗菌药物抑制效应蛋白的有效分泌和转运。也可通过开发 T6SS 的活性抑制剂降低病原菌在宿主体内健康菌群中的竞争能力从而抵抗细菌感染。近期对 T6SS 的金属摄取功能的研究为 T6SS 在细菌竞争中的相互作用提供了新的视角, 细菌以非接触依赖的方式将效应蛋白直

接分泌至胞外环境, 吸收环境中的金属离子, 从而抵抗宿主营养免疫和对抗氧化应激。这种无毒的细胞外作用允许分泌细菌与宿主防御机制共存, 并可能作为抗菌药物开发的一个新的有效靶点。未来可以对 T6SS 进行改造, 使其能够运载药物和抗体等到达特定的靶细胞或者细胞的特定部位, 从而实现疾病的精准治疗。

参考文献

- [1] Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(2): 137–148.
- [2] Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1528–1533.
- [3] Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(1): 3–8.
- [4] Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 2012, 483(7388): 182–186.
- [5] Yu LZ, Liu FJ, Yan NN, Cheng X, Li YZ, Guo YZ. Progress on secretion systems and secretory products of gram-negative bacteria. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(8): 80–84. (in Chinese)
余乐正, 柳凤娟, 鄢南南, 程旭, 李益洲, 郭延芝. 革兰阴性菌分泌系统及其分泌产物研究进展. *动物医学进展*, 2017, 38(8): 80–84.
- [6] Kudryashev M, Wang RYR, Brackmann M, Scherer S, Maier T, Baker D, DiMaio F, Stahlberg H, Egelman EH, Basler M. Structure of the type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, 2015, 160(5): 952–962.
- [7] Navarro-Garcia F, Ruiz-Perez F, Cataldi Á, Larzábal M. Type VI secretion system in pathogenic *Escherichia coli*: structure, role in virulence, and acquisition. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1965.
- [8] Durand E, Nguyen VS, Zoued A, Logger L, Péhau-Arnaudet

- G, Aschtgen MS, Spinelli S, Desmyter A, Bardiaux B, Dujancourt A, Roussel A, Cambillau C, Cascales E, Fronzes R. Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature*, 2015, 523(7562): 555–560.
- [9] Journet L, Cascales E. The type VI secretion system in *Escherichia coli* and related species. *EcoSal Plus*, 2016, DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2015.
- [10] Zoued A, Durand E, Brunet YR, Spinelli S, Douzi B, Guzzo M, Flaugnatti N, Legrand P, Journet L, Fronzes R, Mignot T, Cambillau C, Cascales E. Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature*, 2016, 531(7592): 59–63.
- [11] Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 2013, 500(7462): 350–353.
- [12] Brunet YR, Zoued A, Boyer F, Douzi B, Cascales E. 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. DOI:10.1371/journal.pgen.1005545.
- [13] Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, Burley SK, Almo SC, Mekalanos JJ. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(11): 4154–4159.
- [14] Kong TX, Zhao YX, Du J, Li YJ. The type VI secretion system. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2020, 47(12): 1273–1284. (in Chinese)
孔天翔, 赵依昕, 杜婧, 李颖杰. 细菌六型分泌系统的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(12): 1273–1284.
- [15] Yuan SQ, Li Q, Mao XH. Advances in regulation and function of the bacterial type VI secretion system. *Microbiology China*, 2021, 48(2): 620–626. (in Chinese)
袁思琪, 李倩, 毛旭虎. 细菌VI型分泌系统的调控与功能研究进展. *微生物学通报*, 2021, 48(2): 620–626.
- [16] Liang XY, Xu P, Dong T. Effector recognition and translocation by type VI protein secretion system in Gram-negative bacteria. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 339–344. (in Chinese)
梁小夜, 许平, 董涛. 从效应蛋白视角看革兰氏阴性细菌VI型蛋白分泌系统底物转运机理. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 339–344.
- [17] Kamal F, Liang XY, Manera K, Pei TT, Kim H, Lam LG, Pun A, Hersch SJ, Dong TG. Differential cellular response to translocated toxic effectors and physical penetration by the type VI secretion system. *Cell Reports*, 2020, 31(11): 107766.
- [18] Hood RD, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl MA, Trinidad RRS, Silverman JM, Ohlson BB, Hicks KG, Plemel RL, Li M, Schwarz S, Wang WY, Merz AJ, Goodlett DR, Mougous JD. A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host & Microbe*, 2010, 7(1): 25–37.
- [19] Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 2011, 475(7356): 343–347.
- [20] Sibinelli-Sousa S, Hespanhol JT, Nicastro GG, Matsuyama BY, Mesnage S, Patel A, de Souza RF, Guzzo CR, Bayer-Santos E. A family of T6SS antibacterial effectors related to I, d-transpeptidases targets the peptidoglycan. *Cell Reports*, 2020, 31(12): 107813.
- [21] Li M, Le Trong I, Carl MA, Larson ET, Chou S, de Leon JA, Dove SL, Stenkamp RE, Mougous JD. Structural basis for type VI secretion effector recognition by a cognate immunity protein. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(4): e1002613. DOI:10.1371/journal.ppat.1002613.
- [22] Jurénas D, Journet L. Activity, delivery, and diversity of Type VI secretion effectors. *Molecular Microbiology*, 2020: span.
- [23] Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(1): 9–21.
- [24] Russell AB, LeRoux M, Hathazi K, Agnello DM, Ishikawa T, Wiggins PA, Wai SN, Mougous JD. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, 2013, 496(7446): 508–512.
- [25] Hernandez RE, Gallegos-Monterrosa R, Coulthurst SJ. Type VI secretion system effector proteins: Effective weapons for bacterial competitiveness. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(9): e13241.
- [26] Alcoforado Diniz J, Liu YC, Coulthurst SJ. Molecular

- weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(12): 1742–1751.
- [27] Ahmad S, Wang BY, Walker MD, Tran HKR, Stogios PJ, Savchenko A, Grant RA, McArthur AG, Laub MT, Whitney JC. An interbacterial toxin inhibits target cell growth by synthesizing (p)ppApp. *Nature*, 2019, 575(7784): 674–678.
- [28] Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(39): 15508–15513.
- [29] Russell AB, Singh P, Brittnacher M, Bui NK, Hood RD, Carl MA, Agnello DM, Schwarz S, Goodlett DR, Vollmer W, Mougous JD. A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. *Cell Host & Microbe*, 2012, 11(5): 538–549.
- [30] Jana B, Fridman CM, Bosis E, Salomon D. A modular effector with a DNase domain and a marker for T6SS substrates. *Nature Communications*, 2019, 10: 3595.
- [31] Burtnick MN, Brett PJ, Harding SV, Ngugi SA, Ribot WJ, Chantratita N, Scorpio A, Milne TS, Dean RE, Fritz DL, Peacock SJ, Prior JL, Atkins TP, Deshazer D. The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity*, 2011, 79(4): 1512–1525.
- [32] Robitaille S, Trus E, Ross BD. Bacterial defense against the type VI secretion system. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(3): 187–190.
- [33] Cornforth DM, Foster KR. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 285–293.
- [34] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 2006, 312(5779): 1526–1530.
- [35] 韩玉莹. 铜绿假单胞菌VI型分泌系统(T6SS)介导铜离子转运的分子机制研究. 西北大学博士学位论文, 2020.
- [36] Coulthurst S. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology: Reading, England*, 2019, 165(5): 503–515.
- [37] Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, Termine E, Engel J, Filloux A, Bleves S. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(32): 27095–27105.
- [38] Wang TT, Si MR, Song YH, Zhu WH, Gao F, Wang Y, Zhang L, Zhang WP, Wei GH, Luo ZQ, Shen XH. Type VI secretion system transports Zn^{2+} to combat multiple stresses and host immunity. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1005020. DOI:10.1371/journal.ppat.1005020.
- [39] Han YY, Wang TT, Chen GK, Pu QQ, Liu Q, Zhang YN, Xu LH, Wu M, Liang HH. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(12): e1008198.
- [40] DeShazer D. A novel contact-independent T6SS that maintains redox homeostasis via Zn^{2+} and Mn^{2+} acquisition is conserved in the *Burkholderia pseudomallei* complex. *Microbiological Research*, 2019, 226: 48–54.
- [41] Gilston BA, Wang SN, Marcus MD, Canalizo-Hernández MA, Swindell EP, Xue Y, Mondragón A, O'Halloran TV. Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. *PLoS Biology*, 2014, 12(11): e1001987.
- [42] Nairz M, Weiss G. Iron in infection and immunity. *Molecular Aspects of Medicine*, 2020, 75: 100864.
- [43] 高奋. 假结核耶尔森氏菌中 Zur 差异调控 T6SS4 和 ZnuABC 的研究. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016.
- [44] Zhang WP, Xu SJ, Li J, Shen XH, Wang Y, Yuan ZM. Modulation of a thermoregulated type VI secretion system by AHL-dependent Quorum Sensing in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Archives of Microbiology*, 2011, 193(5): 351–363.
- [45] Si MR, Wang Y, Zhang B, Zhao C, Kang YW, Bai HN, Wei DW, Zhu LF, Zhang L, Dong TG, Shen XH. The type VI secretion system engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition. *Cell Reports*, 2017, 20(4): 949–959.
- [46] Chiang SM, Schellhorn HE. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 525(2): 161–169.
- [47] Mazzon RR, Braz VS, da Silva Neto JF, do Valle Marques M. Analysis of the *Caulobacter crescentus* Zur regulon reveals

- novel insights in zinc acquisition by TonB-dependent outer membrane proteins. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1–14.
- [48] Si MR, Zhao C, Burkinshaw B, Zhang B, Wei DW, Wang Y, Dong TG, Shen XH. Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(11): E2233–E2242.
- [49] Zhang PY, Liu MF, Cheng AC. Bacterial iron uptake system and anti-infectious immunity of the host. *Life Science Research*, 2016, 20(1): 82–88. (in Chinese)
张鹏云, 刘马峰, 程安春. 细菌铁离子利用系统与宿主抗感染免疫. *生命科学研究*, 2016, 20(1): 82–88.
- [50] Wang RY, Zhang J, Wang B, Hou YW, Wu BY, Hu HZ. Research progress in the type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* and mechanism of its participation in transport of iron ions. *Life Science Research*, 2020, 24(5): 404–409, 414. (in Chinese)
王瑞营, 张娟, 王碧, 侯亚文, 吴斌艳, 扈会整. 铜绿假单胞菌中VI型分泌系统及其参与铁离子转运机制的研究进展. *生命科学研究*, 2020, 24(5): 404–409, 414.
- [51] Lin JS, Zhang WP, Cheng JL, Yang X, Zhu KX, Wang Y, Wei GH, Qian PY, Luo ZQ, Shen XH. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 2017, 8: 14888.
- [52] Williams CL, Neu HM, Gilbreath JJ, Michel SLJ, Zurawski DV, Merrell DS. Copper resistance of the emerging pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(20): 6174–6188.
- [53] Shi XS, Darwin KH. Copper homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Metallomics*, 2015, 7(6): 929–934.
- [54] Sheldon JR, Skaar EP. Metals as phagocyte antimicrobial effectors. *Current Opinion in Immunology*, 2019, 60: 1–9.
- [55] Ai WL, Cheng N, Han YZ. Molecular mechanisms of copper homeostasis in the cells. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2013, 17(5): 724–726. (in Chinese)
艾文龙, 程楠, 韩咏竹. 细胞内铜稳态的分子调控机制研究进展. *安徽医药*, 2013, 17(5): 724–726.
- [56] Hu LL, Wang CC, Lu WJ, Lu H, Chen HC, Tan C. BaeSR activates type VI secretion system expression in porcine extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* to enhance bacterial resistance to zinc stress. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104357.
- [57] Burtnick MN, Brett PJ. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* cluster 1 type VI secretion system gene expression is negatively regulated by iron and zinc. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e76767. DOI:10.1371/journal.pone.0076767.
- [58] Shalom G, Shaw JG, Thomas MS. *In vivo* expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology: Reading, England*, 2007, 153(Pt 8): 2689–2699.

Advances of the Gram-negative bacterial type VI secretion system and its function for metal ion acquisition

Wanyang Liu^{1,2,3#}, Guomei Quan^{1,2,3#}, Jiaqi Liu^{1,2,3}, Siqi Lian^{1,2,3}, Guoqiang Zhu^{1,2,3*}

¹ College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

² Important Disease Animal and Zoonosis Prevention and Control Collaborative Innovation Center of Jiangsu Province, Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety of Ministry of Education, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

³ Joint International Research Laboratory of Important Disease Animal and Zoonosis Prevention and Control Technology of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: Bacterial secretion systems can deliver specific effector molecular to outer environment or directly into target cells, resulting in the adaptive advantage from interaction between bacteria and host or bacteria in microbial communities. The type VI secretion system (T6SS) is a macromolecular secretory apparatus which is functionally and structurally analogous to the needle-like contractile tail of bacteriophages, wide-spreading in Gram-negative bacteria. It can translocate diverse enzyme and toxins of bacteria into eukaryotic or prokaryotic target cells in a contact-dependent manner. After delivery, the effector proteins can make an impact on both interbacterial competition and pathogenicity. In addition, some effectors can also enter the extracellular milieu in a non-contact dependent manner to help bacteria obtain scarce metal ions, which is essential for the maintenance of intracellular metal homeostasis under stress conditions. In this review, we summarize the advances in understanding the relevant aspects from the structure and assembly to the function of T6SS. We also focus on the broad area of T6SS effector and its mechanism of metal ion translocation, which contributes to our comprehension of the crucial role of T6SS in the microbial competition and host infection.

Keywords: type VI secretion system, effector proteins, interbacterial competition, pathogenicity, metal ion acquisition

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the University Superior Disciplines of Jiangsu Province and by the National Natural Science Foundation of China (31873010)

*Corresponding author. Tel: +86-514-87972590; Fax: +86-514-87972218; E-mail: yzgzhu@yzu.edu.cn

Received: 25 January 2021; Revised: 26 March 2021; Published online: 6 April 2021