



细菌 VI 型分泌系统效应蛋白的装配及功能的研究进展

安影, 董涛*

南方科技大学生命科学院, 广东 深圳 518000

安影, 董涛. 细菌 VI 型分泌系统效应蛋白的装配及功能的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3428-3440.

AN Ying, DONG Tao. Advances in assembly mechanisms and functions of bacterial type VI secretion system effectors[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(9): 3428-3440.

摘要: 蛋白分泌作为细胞之间传递信号的途径之一, 在微生物生存竞争中也扮演着重要的角色。革兰氏阴性菌可以通过 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)将效应蛋白传递至胞外或原核和真核微生物中, 从而介导微生物间的竞争或宿主-细菌的相互作用, 最终建立竞争优势。本文主要总结了 T6SS 的结构与组成, 并重点对效应蛋白的装配以及其与免疫蛋白的作用机制的研究进展进行阐述, 为以后靶向 T6SS 抗菌药物的研制提供新思路。

关键词: VI 型分泌系统; 效应蛋白; 装载; 免疫蛋白; 抑制机制

Advances in assembly mechanisms and functions of bacterial type VI secretion system effectors

AN Ying, DONG Tao*

School of Life Sciences, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518000, Guangdong, China

Abstract: Bacterial protein secretion is an important way of cell-cell interaction between species, which plays a crucial role in interbacterial competition and pathogenesis. Gram-negative bacteria could use the type VI secretion system (T6SS) to deliver effector proteins to the extracellular environment or prokaryotic and eukaryotic cells, thereby

资助项目: 国家自然科学基金(32030001)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32030001).

*Corresponding author. Tel: +86-755-88018724, E-mail: dongt@sustech.edu.cn

Received: 2023-02-06; Accepted: 2023-05-12; Published online: 2023-05-17

promoting their fitness during competition between microorganisms or host-microbe interactions. This paper summarizes the latest advances in the structures and components of T6SS, with focus on effector assembly and effector-immunity pairs, providing new strategies for the development of antibacterial drugs in the future.

Keywords: type VI secretion system; effector protein; assembly; immunity protein; mechanism of inhibition

为了在有限的生存空间获得生存优势, 微生物进化出了多种生物大分子机器, 例如细菌的 I-X 型分泌系统(type I secretion system–type X secretion system, TISS–TXSS)^[1–3]。微生物借助天然的分子机器将小分子、蛋白质或 DNA 分泌到胞外环境或靶细胞内, 进而调节与宿主间的互作、抑制微生物生长或直接裂解微生物, 使自身成为优势菌群。在革兰氏阴性菌中, 根据组装位置, 可分为位于细菌内膜的分子机器(如 Sec 分泌系统)、位于细菌外膜的分子机器(如 T5SS)和同时位于细菌的内膜和外膜的分子机器(如 T6SS)^[1]。2006 年, VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)由 Mekalanos 等在霍乱弧菌和铜绿假单胞菌中首次发现, 是一种主要依赖接触进行攻击的分子武器^[4–5]。随后大量的研究表明 T6SS 是一种在革兰氏阴性菌中广泛存在且高度保守的蛋白分泌系统^[6–9]。2021 年, Song 等发现假结核耶尔森菌 T6SS-3 通过分泌具有 DNA 水解酶活性的 Tce1, 可实现非依赖接触的杀伤靶细胞, 扩展了该领域对 T6SS 功能的认识^[10]。同时, 他们还鉴定出细菌的多个 T6SS 效应蛋白, 例如 YezP^[11]、TseZ^[12]、TseM^[13]和 TssS^[14], 这些效应蛋白通过介导离子转运, 调节其致病性。本文将围绕 T6SS 核心元件结构与组装、效应蛋白的结构与装配及其相应的免疫机制进行讨论, 为后续 T6SS 组装和功能的研究提供参考。

1 T6SS 结构与组成

T6SS 是一个纳米级长度且可收缩的双层管

状结构, 通过刺穿分泌效应蛋白使该细菌在与其他原核生物竞争或与真核细胞相互作用时具有优势, 促进其生存与发展^[15–18]。经典的 T6SS (canonical T6SS)是由 13 个核心蛋白组成^[19], 主要分为跨膜复合物、基底复合物和管鞘复合物, 而非经典的 T6SS (non-canonical T6SS)缺失了跨膜复合物^[20]。Durand 和 Rapisarda 等分别解析了肠集聚性大肠埃希菌 (enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC)中 T6SS 的跨膜复合物结构^[21–22](图 1A)。该复合物是 1 个 C5 对称结构^[21–22], 由锚定在细胞外膜的脂蛋白 TssJ 招募内膜蛋白 TssL 和 TssM 组成, 每个对称单元包括 3 个 TssJ、2 个 TssL 和 2 个 TssM^[22]。冷冻电镜结构还显示 TssJLM 复合物不仅作为 T6SS 装配的支点来招募基底复合物; 5 个对称单元还形成了 1 个空腔管道, 用于输送效应蛋白^[21–22]。另外, Rapisarda 等还发现位于空腔管道内侧的 5 个 TssM 的 loop 区 776–786 会形成 1 个周质门(图 1B), 正常条件下, 该门处于关闭状态, 以此防止胞内物质的溢出和有害物质的进入; 它的打开可能与 T6SS 分泌有关^[22], 但具体的开合机制仍然有待进一步研究。

基底复合物由 VgrG 蛋白(valine-glycine repeat protein G, VgrG)、PAAR 蛋白(proline-alanine-alanine-arginine, PAAR)和 TssKFG 复合物组成。研究显示 VgrG 三聚体和锥形 PAAR 蛋白装配在管鞘复合物前端, 通过刺穿靶细胞, 辅助 T6SS 有效地分泌效应蛋白; 而 6 个 TssKFG 复合物形成的楔子结构则

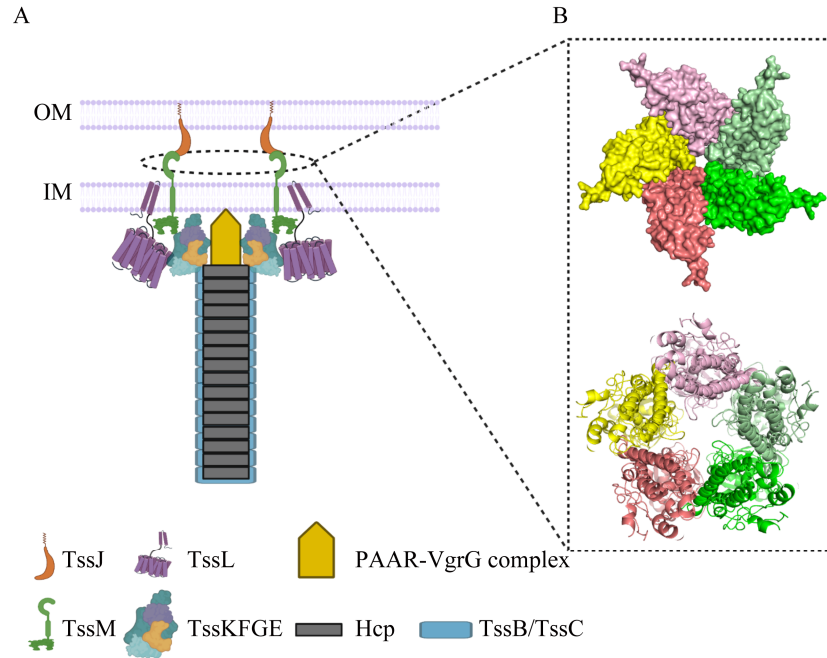


图 1 VI型分泌系统的结构示意图^[22]

Figure 1 Overview of the T6SS^[22]. A: Schematic structure of the T6SS. OM: Outer membrane; IM: Inner membrane. B: Top view of the periplasmic gate formed by TssM, which is shown in the surface representation (top) and the ribbon representation (bottom), respectively. Five TssM molecules were depicted in different colors (PDB code: 6HS7).

对称地分布在 VgrG/PAAR 复合物外围, 通过与 VgrG 和蛋白 TssL/TssM 相互作用, 将基底复合物链接到跨膜复合物上^[23-25]。每个 TssKFGGE 复合物是由 6 个 TssK、2 个 TssF、1 个 TssG 和 1 个 TssE 组成; 主要通过 TssK 和 TssL/TssM 相互结合, 使基底复合物固定在膜上^[24-26]。

管鞘复合物是由数百个溶血素共调节蛋白 (hemolysin coregulated protein, Hcp) 形成的内管和 TssB/TssC (VipA/VipB) 复合物形成的外鞘构成; 内管装置是由 Hcp 六聚体组成的内环堆叠而成, 外鞘装置则是由 6 个 TssB/C 异源二聚体组成的外环聚合而成^[4,27-29]。Hcp 与 VgrG 相结合可能启动了内管的合成; 同时 TssE/TssF/TssG 能够与外鞘蛋白 TssB/TssC 结合以稳定 T6SS 结构^[28]。

蛋白 TssA 和 TagA 分别调节 T6SS 外鞘组

装的起始和终止^[30-33]。2020 年 Stietz 等发现霍乱弧菌的 TssM 除了具有结构蛋白的功能外, 还可作为 TssA-TssM-TagA 模块中一员, 参与调节外鞘装置的终止^[34]。另外, Liang 等发现在霍乱弧菌中效应蛋白对 T6SS 正确装配是至关重要的, 敲除效应蛋白导致 T6SS 的装配显著地减少^[35]。在未知信号的刺激下, 外鞘 TssB/C 复合物通过构象变化, 将内管、VgrG/PAAR 复合物及效应蛋白输送到胞外或相邻的靶细胞内; 外鞘收缩后, ATP 蛋白酶 ClpV 特异性识别 TssC 的 N 端暴露出来的 α 螺旋, 将 TssB/C 复合物解聚成单体, 以供循环利用^[28,36]。目前仍有部分机制尚不清楚, 如作为连接跨膜复合物和管鞘复合物的桥梁, 基底复合物是怎样将 T6SS 的各个核心元件组装起来的, 各个核心元件又是被怎样调控来起始组装的, 这些问题亟待解决。

2 PAAR-VgrG-效应蛋白在 T6SS 装配中的核心作用

由于 T6SS 组装和分泌的过程中都需要消耗大量的能量,那么宿主微生物是如何降低由 T6SS 错装或漏装等无效装配导致的能量的消耗?效应蛋白又在 T6SS 组装中扮演着怎样的角色?Liang 等在 2019 年发现霍乱弧菌中存在一种“登机检查”机制,能够确保效应蛋白的有效装配和递送^[35]。研究发现与野生型相比,同时敲除基因 *tseL/vasX/vgrG3* 明显降低了 T6SS 装配效率和 Hcp 的分泌水平;而当只突变效应蛋白的活性位点时(*tseL^{D425A}/vasX^{ΔC16}/vgrG3^{D842A}*), T6SS 装配活性和 Hcp 的分泌水平并未受到影响^[35]。以上结果说明 T6SS 正确组装和分泌依赖于效应蛋白的物理存在而非其毒性,这可能与效应蛋白参与调控 T6SS 装置的稳定性有关。这一结论也在 Wu 等的植物致病菌根癌农杆菌 T6SS 研究中得到验证^[37]。2021 年 Liang 等发现在致病性达卡气单胞菌中同时敲除基因 *tseP*、*tecl* 和 *tseC* 会破坏 Hcp 分泌,当回补其中任何一个效应蛋白,都可以部分恢复 Hcp 的分泌和抗菌性;而当同时将 3 个效应蛋白的活性位点失活(*tseP^{E663A}*、*tseI^{HFH-AAA}* 和 *tseC^{Δ14}*, 即 *3effc*), *3effc* 突变株的 T6SS 依然可以正常分泌 Hcp,但是失去其抗菌性;研究还表明 T6SS 合成对 VgrG 异源三聚体的依赖性是由其运载的效应蛋白组合决定的^[38]。同年他们还发现 TseP 和 TseC 能够与 T6SS 核心元件 TssK 和 TssA 相互作用^[39]。这些结果进一步表明效应蛋白对 T6SS 正确装配的重要性,并且其与 TssK/TssA 相互作用可能参与维持 T6SS 的稳定性。有趣的是, Liang 等将致病性达卡气单胞菌的 VgrG3 的 C 端嵌入了霍乱弧菌 VgrG2 的效应蛋白识别序列(VgrG3^{VC-2TL}),同时在达卡气单胞菌中表达霍乱弧菌的效应蛋

白 VasX,发现达卡气单胞菌 T6SS 可以将异源效应蛋白 VasX 分泌到姐妹细胞中^[39]。这为以后开发 T6SS 应用价值提供了理论基础。2023 年 Liang 等开展了 PAAR 在 T6SS 装配的机理研究,发现在达卡气单胞菌中单独敲除基因 *PAAR* 或 *vgrG* 都不会影响 T6SS 的杀菌活性;但同时敲除 *PAAR* 和 *vgrG* 则会显著地下调其功能,这表明 PAAR 协同 VgrG 在 T6SS 功能上具有不可或缺的地位;研究还表明位于 T6SS 主基因簇的 *PAAR/vgrG* 与辅助基因簇的 *PAAR/vgrG* 相比更加重要^[40]。以上研究表明 PAAR-VgrG-效应蛋白复合物在 T6SS 装配及功能上极其重要,但其详细的作用机制有待进一步的阐明。

3 T6SS 效应蛋白的装配

革兰氏阴性菌通过 T6SS 分泌的效应蛋白来参与微生物间的生存竞争。目前针对细菌类或真核类的效应蛋白主要分为 5 种,分别是(1)可降解细胞壁的毒素,如霍乱弧菌中 VgrG3^[41]和铜绿假单胞菌中 Tse1 及 Tse3^[42]; (2)可破坏细胞膜的毒素,如霍乱弧菌中 TseL 和 VasX^[41]; (3)可降解细胞质内物质的毒素,如重排热点(rearrangement hotspot, Rhs)家族蛋白,包括致病性达卡气单胞菌的 TseI^[43]和西瓜嗜酸菌中 RhsB^[44]等; (4)生长抑制类毒素,如铜绿假单胞菌中 Tse2^[45]和 Tse6^[46]等; (5)介导金属离子转运的毒素,如铜绿假单胞菌的 TseF^[47]和 Azu^[48]等。

革兰氏阴性菌的效应蛋白主要通过两种方式装载到 T6SS 上,分别是共价结合和非共价结合(图 2)。效应蛋白通过共价键结合的方式,将毒素结构域融合在 T6SS 的结构蛋白(Hcp、VgrG 和 PAAR)上,使其具备了结构蛋白和毒性蛋白的双重功能(图 2)。Mougous 和 Noreen 等解析的铜绿假单胞菌和空肠弯曲菌 Hcp 蛋白结构中 6 个

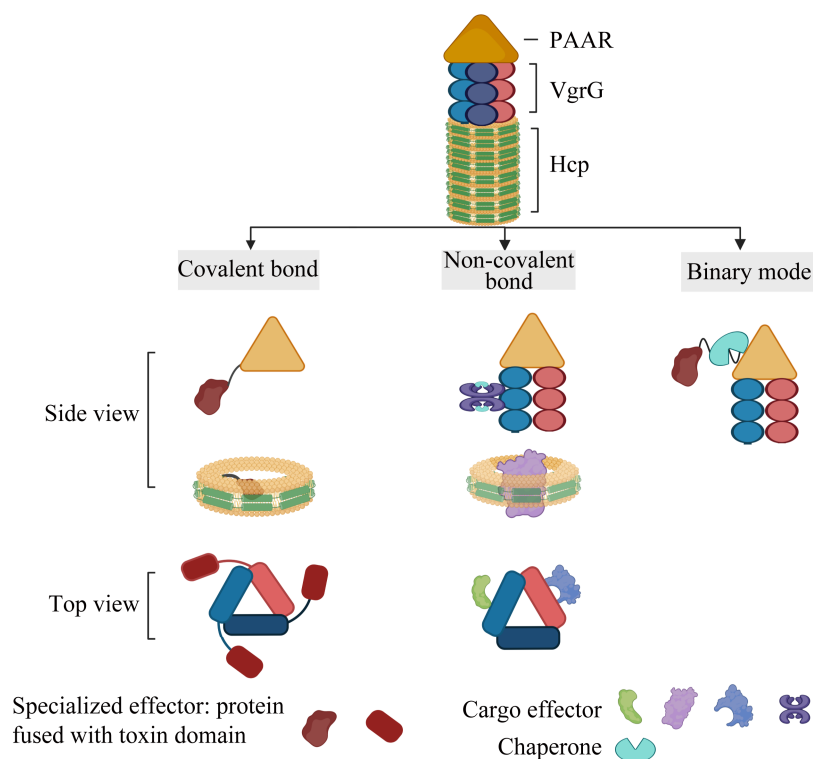


图 2 T6SS 效应蛋白的装配机制

Figure 2 T6SS effector loading mechanisms through the covalent bonding by attaching a toxin domain to T6SS structure proteins (left), non-covalent interactions between cargo effector and structure protein (middle), and binary interaction mode (right).

Hcp 组成直径约 40 Å 的内环^[4,49]。结构分析表明位于 Hcp 六元环的顶部和底部氨基酸高度保守，主要介导了与其他 Hcp 的聚合作用，参与内管结构的延伸；而位于 Hcp 六元环的内外侧上的氨基酸保守性则比较差，推测 Hcp 环内氨基酸的多样性可能与携带的毒素有关^[4,49]。Ma 等发现肠集聚性大肠埃希菌中 Hcp 蛋白都融合了 1 个延伸的 C 端毒素区(extension toxin, ET 结构域)，主要分为 5 种，分别是 Hcp-ET1 到 Hcp-ET5^[50]。肠集聚性大肠埃希菌的 T6SS2 特异性分泌 Hcp-ET1，进而利用 Hcp-ET1 降解核酸物质的活性，导致靶细菌死亡；而任意敲除肠集聚性大肠埃希菌的基因 *hcp2A/hcp2B* 都会导致该菌株丧失抗菌性。研究还表明 Hcp-ET1 可能与 Hcp2A 和 Hcp2B 蛋白形成异源六聚体，

将 ET1 结构域包裹在内管中，完成 T6SS 毒素的装配^[50]。由于还未解析 Hcp-ET1-Hcp2A-Hcp2B 复合物的结构，ET1 结构域与 Hcp2A/Hcp2B 形成的环内氨基酸的具体作用机制还有待挖掘。

VgrG 是 T6SS 重要组成元件，可通过在 C 端会融合毒素区成为专属效应蛋白^[15,51]。霍乱弧菌主要包含 3 种 VgrG，分别是 VgrG1、VgrG2 和 VgrG3，VgrG1 和 VgrG3 分别包含具有肌动蛋白交联活性(actin cross-linking activity, ACD)和水解肽聚糖的活性的 C 端功能域^[15,41]。在 T6SS 组装的过程中，VgrG 聚合形成 1 个异源三聚体，其中 VgrG2 是组成 T6SS 必不可少的结构蛋白^[52]。在嗜水气单胞菌中，编码 *vgrg1* 的基因位于 T6SS 基因簇外的细菌染色体上，融合 ADP-核糖基转移酶活性的功能域的 VgrG1

可作为效应蛋白行使功能^[51,53]。迄今为止,关于霍乱弧菌介导 VgrG 组成特定的异源复合物的机制以及嗜水气单胞菌中不同 VgrG 蛋白的相互作用仍需要继续探索。

效应蛋白也可以通过非共价键的方式装配到 T6SS 装置的不同部位(图 2), 这类蛋白被称为货物效应蛋白。如铜绿假单胞菌中通过与 Hcp1 蛋白相互作用, 被包裹在 H1-T6SS 内管的效应蛋白 Tse1-4 (10-30 kDa)^[54-55]。研究表明 Hcp1 通过不同的氨基酸残基参与 Tse 家族蛋白的分泌: 氨基酸 Thr-59 和 Ser-115 同时介导了 Tse1-4 的分泌; 氨基酸 Leu-28、和 Ala-29 同时参与了 Tse2 和 Tse3 的分泌, 氨基酸 Ser-31 只参与了 Tse2 的分泌^[54-55]。虽然 Hcp 上参与分泌 Tse 的关键氨基酸已被鉴定出, 但 Tse 蛋白在纳米级长度的 Hcp 内管中的作用机制还不清楚。未来有关 Hcp-效应蛋白复合物的结构研究可能会有助于了解 T6SS 内管的毒素装配。除了借助 T6SS 内管运输外, 效应蛋白也可以通过与 VgrG 结合, 将其装载到 T6SS 上。Flaunatti 等在 2020 年用单颗粒冷冻电镜的方法解析了肠聚合性大肠杆菌中(VgrG)₃-(Tle1)₃ 复合物三维结构, 首次揭示了效应蛋白 Tle1 与 VgrG [DUF2345 结构域和 TTR 结构域(transthyretin-like domain)]之间的相互作用。结构显示 3 个 Tle1 分子与 VgrG 三聚体结合形成异源六聚体, 其中每个 Tle1 都会同时与 3 个 VgrG 的不同区域相互作用, 分别依附在 VgrG 三聚体的侧面, 最终实现效应蛋白的装配^[56]。但该复合物中 Tle1 是否会与 T6SS 的其他蛋白相互作用, 以及分泌到靶细菌的 Tle1 又是如何从复合物上解离并发挥其磷酸酶活性的分子机制仍需要继续探索。

货物效应蛋白可在分子伴侣 Tec/Tap 家族(即含 DUF4123 结构域蛋白)的帮助下, 通过 VgrG/PAAR 核心元件, 装配到 T6SS 上^[57-59]。

2015 年, Liang 等首先在霍乱弧菌中发现 T6SS 效应蛋白 TseL 的分泌需要分子伴侣 VC1417 (TecL), 并证明分子伴侣 TecL 通过与结构蛋白 VgrG1 和效应蛋白 TseL 相互作用, 辅助效应蛋白 TseL 的装配^[57]。同时, 他们也鉴定并验证了嗜水气单胞菌效应蛋白 TseC 的分子伴侣 TecC, 发现效应蛋白 TseC 的递送需要 VgrG1 和 TecC 的参与^[57]。之后, Bondage 等发现在根癌农杆菌中, 核酸酶 Tde1 只有在结合了 Tap-1 之后才能被 VgrG1 识别并装配到 T6SS 上^[60]。基因 *tap-1* 的敲除明显地降低了细胞内 Tde1 蛋白稳定性及其分泌水平, 但不影响 T6SS 组装及其他效应蛋白 Tae 的分泌, 这说明 Tap-1 不仅特异性的辅助 Tde1 结合 VgrG1, 也参与调节 Tde1 蛋白的稳定性^[60]。有趣的是, 研究还发现 PAAR 蛋白可以明显提高 Tde1 分泌效率和抗菌性^[60], 但由于缺乏对 Tde1-Tap-1-VgrG1 复合物和 Tde1-Tap-1-VgrG1-PAAR 复合物结构的研究, 目前并不清楚这 2 种复合物在 T6SS 分泌 Tde1 的作用原理。

效应蛋白也可以在分子伴侣 Eag 家族(即含 DUF1795 结构域蛋白)的帮助下, 通过与 VgrG 蛋白相互作用, 装配到 T6SS 上。例如, 专属效应蛋白 PAAR 需要通过共价键和非共价键共同结合的方式完成 T6SS 装配。PAAR 效应蛋白通常含有多个结构域, 如 prePAAR 基序(包含一段 AARxxDxxxH 氨基酸序列)、跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)、Rhs 结构域和毒素区等。铜绿假单胞菌的效应蛋白 Tse6 由 430 个氨基酸组成, 包含了 2 个 TMDs、1 个 PAAR 结构域和 1 个 NADase 结构域^[61]。Quentin 等发现 Tse6 的 2 个 TMDs 分别结合在 EagT6 二聚体的疏水性的凹槽上, EagT6-Tse6 的相互作用一方面提高 Tse6 蛋白在胞质的稳定性, 防止蛋白聚集降解; 另一方面介导了 Tse6-VgrG1 复合物的形成^[61]。研究还发现 EagT6 未伴随 Tse6-VgrG1 复合物分泌到

靶细胞,说明 EagT6 仅参与了 Tse6 蛋白的装配^[61]。EagT6-Tse6 相互作用模型可能在一定程度上模拟了 Tse6 跨过靶细胞内膜实现毒素递送的过程,但 EagT6 是如何从 EagT6-Tse6-VgrG1 复合物上解离的机制仍然未知。同时 Wu 等在用工程化铜绿假单胞菌 DUEC 传递 Tse6-Cre 融合蛋白时,发现 Tse6 的 TMD1 在传递过程中是非常重要的^[62],但详细的分子机制还有待进一步的研究。

分子伴侣 Eag 家族蛋白还可以辅助装配大型的 Rhs 效应蛋白,包含了 prePAAR 基序、1 个 TMD、1 个 PAAR 结构域、1 个 Rhs 结构域和 1 个毒素区,如 RhsA^[63]和 Rhs1^[64-65]。发光杆菌(*Photobacterium laumondii*)的 VgrG-EagR-Rhs1 复合物结构表明 2 分子 EagR1 结合 1 个 Rhs1 的 N 端结构域(N-terminal region, Rhs1^{NT}),并间接地促进了 Rhs1-VgrG1 复合物形成^[64]。鼠伤寒沙门氏菌 SciW-Rhs1^{NT} 复合物结构详细展示二者间的作用网络,首先 2 分子 SciW 形成“V”型二聚体,然后 Rhs1 的 N 端结构域结合在“V”字口袋区,以非对称的结合模式与 2 分子的 SciW 相互作用^[65]。SciW 与 Rhs1 相互作用能够稳定 prePAAR-PAAR 的构象,最终促进了 Rhs1 与 VgrG1 的相互作用^[65]。研究还发现不同菌群中 Rhs-VgrG 相互作用机制略有不同, Jurénas 等和 Ahmad 等发现仅 Rhs^{NT} 参与了和 VgrG 相互作用^[64-65];而 Pei 等的研究表明 Rhs^{NT} 和 Rhs 的 C 端毒素区(C-terminal toxin domain, Rhs^{CT})都会与 VgrG 相互作用,调控着 Rhs 蛋白的装载^[43]。分子伴侣-Rhs-VgrG 复合物结构将为解析分子伴侣在 Rhs-VgrG 复合物中的作用机制提供十分重要的实验依据。

4 细菌免疫蛋白抑制毒素作用的机制

革兰氏阴性菌 T6SS 将装配好的效应蛋白

借助管鞘复合物收缩将其投递到胞外环境或周围靶细胞(包括姐妹菌群),进而通过效应蛋白作用于靶细胞的不同位点发挥毒性^[66]。试想 T6SS 宿主细菌在合成效应蛋白时,自身是如何避免效应蛋白的毒性?抑或是当细菌将毒素投送到姐妹细胞时,受攻击的姐妹细菌又是启动怎样的防御措施呢?研究表明被攻击的靶细菌也进化出多种防御措施,主要分为非特异性抵抗和特异性^[67-68]。非特异性防御主要通过靶细胞激活体内的某些信号通路,包括细胞外多糖合成通路、包膜应激反应以及普通压力应激信号通路等,从而实现自我保护^[67],而特异性防御主要指靶细菌会合成特异的免疫蛋白,从而抑制效应蛋白的毒性^[68]。

特异性中和毒素的作用机制主要体现在特异的效应蛋白-免疫蛋白对。接下来将从典型的效应蛋白-免疫蛋白复合物结构阐述免疫蛋白的抑制机理。铜绿假单胞菌的 Tse1-Tsi1 复合物结构表明 Tsi1 以 1:1 分子比结合在 Tse1 底物催化区^[69]。Tse1 单体和 Tse1-Tsi1 复合物的结构比对分析表明 Tsi1 的结合并未改变 Tse1 三维构象,而是以一种“钥匙-锁”的相互作用模型,发挥其中和毒素的作用^[69-71],这一作用模式也适用于铜绿假单胞菌 Tsi3 对 Tse3 的免疫机制。在解析的 Tse3-Tsi3 复合物结构中,Tsi3 的 3 个柔性 loop 区同样结合在 Tse3 底物结合区(“Y”活性位点),同时不诱发 Tse3 产生较大的构象变化^[72-73](图 3A)。另外,研究还发现钙离子对 Tse3 催化活性以及 Tse3 与 Tsi3 相互作用都非常重要^[72-73]。

免疫蛋白也可通过形成空间位阻,影响效应蛋白的活性位点与底物的相互作用,达到抑制毒素的作用,例如铜绿假单胞菌 Tsi2 免疫机制。2013 年 Robb 等解析了 Tse2-Tsi2 复合物结构,Tsi2 二聚体结合 2 个分子 Tse2,通过特异性的氢键和电荷间相互作用,形成了稳定的 2:2

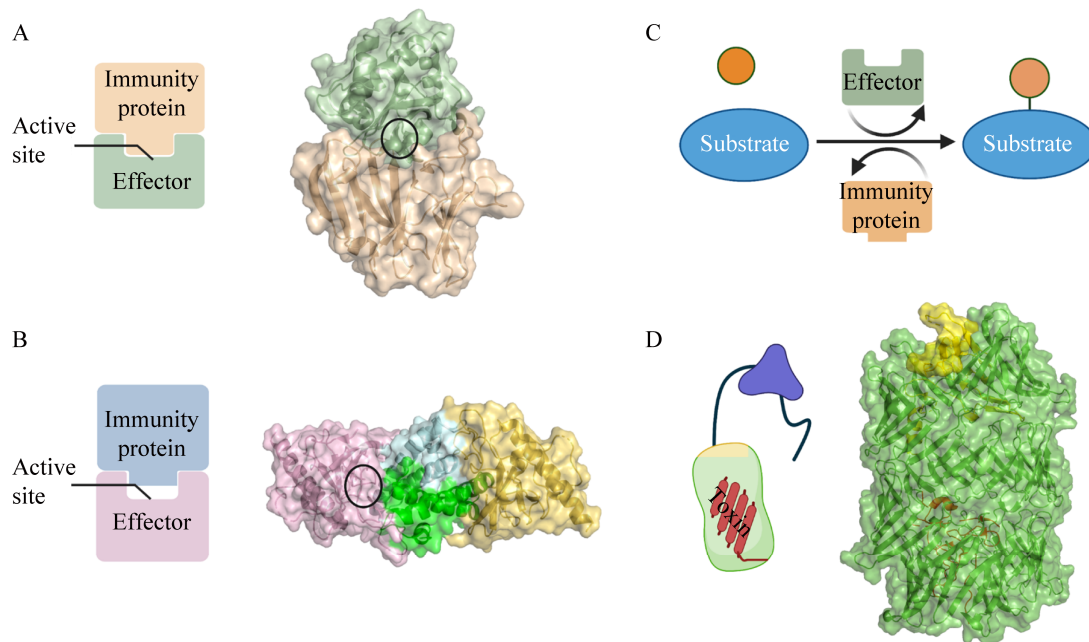


图3 革兰氏阴性菌对 T6SS 毒素的免疫机制

Figure 3 Gram-negative bacteria neutralize effector-induced toxicity. A: Lock-key model (left) and overall structure of Tse1-Tsi1 pair shown in cartoon representation with a transparent surface (right); PDB code: 3VPJ^[71]. Tse1 is shown in green and Tsi1 in wheat. B: Steric hindrance model (left) and overall structure of Tse2-Tsi2 pair depicted in cartoon representation with a transparent surface (right). Tse2: Pink/Yellow; Tsi2: Green/Cyan; PDB code: 5AKO^[74]. C: Inhibition via enzymatic reversal of the modification. D: Self-inhibition model (left) and cryo-EM structure of RhsA, which is shown in cartoon representation with a transparent surface (right); PDB code: 7Q97^[63]. Plug domain: Yellow; Rhs domain: Green; Toxin domain: Red; Black circle indicates the active sites of effector.

异源四聚体(图 3B 右)。结构中 Tsi2 尚未直接与 Tse2 活性位点(Arg-14, Ser-80, His-122)相互作用, 但通过空间位阻, 使 Tse2 无法结合底物(图 3B)^[74]。另外, 研究还表明 Tse2 催化活性区的氨基酸序列是高度保守的, 而与 Tsi2 相结合的氨基酸序列并不保守, 存在特异性, 这也侧面说明了 Tsi2 的免疫机制具有种群特异性^[74]。Zhang 等解析的固氮阴沟肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的 Tae4-Tai4 复合物结构^[75]揭示了 Tai4 抑制机制与 Tsi2 相似。同时 *St*Tae4-*Ec*Tai4 复合物结构表明, 虽然 *St*Tai4 和 *Ec*Tai4 氨基酸序列的同源性不高, 但都形成了相似的三维结构, 因此可以结合同一类的毒素(Tae4)^[76]。这也解释了不

同微生物之间的交叉免疫机理^[76]。另外, 2018 年 Ting 等解析了变形斑沙雷氏菌 Tre1-Tri1 复合物结构, 发现 Tri1 具有双重的免疫机制, 除了通过与 Tre1 催化位点 Glu-415 相互作用抑制毒性外, 还可通过移除 Tre1 对 FtsZ 的 ADP 核糖修饰, 发挥免疫的作用(图 3A 和 3C)^[77]。

除了上述免疫机制外, T6SS 宿主细菌还可利用效应蛋白自身的结构特征来抑制其毒性, 这类效应蛋白通常含有多个结构域。霍乱弧菌 VgrG1 的肌动蛋白交联结构域结构呈“V”字型^[78]。该结构表明 VgrG1 的 N 端和 VgrG1 的肌动蛋白交联结构域之间的 loop 区具有重要的生物功能^[78]。正常情况下, 这段无序的 loop 区会结

合“V”型的空腔区, 封锁其活性位点, 起到自我保护的功能; 当 ATP 和二价阳离子(Mg^{2+} 或 Mn^{2+}) 存在时, 此时这段无序的 loop 区会发生偏转, 离开空腔区, 从而激活 VgrG1 催化活性^[78]。还有 Günther 等和 Jurénas 等解析的效应蛋白 Rhs 的冷冻电镜结构, 该蛋白中心区 Rhs 会形成 1 个 β -桶状结构, 将 C 端毒素区嵌入桶内, 而 N 端和部分 Rhs 区分别形成桶的顶盖和底盖, 从而使其毒素区与底物分开, 最终实现自我保护(图 3D)^[63-64]。

5 小结

近年来, 研究者运用 X 射线晶体衍射学和冷冻电镜技术已经解析了 T6SS 部分核心复合物的三维结构, 了解了主要结构蛋白在 T6SS 装配中的位置与功能, 但至今还未解析完整的 T6SS 结构。猜测这可能与各个复合物连接处的蛋白间相互作用力的强弱有关。T6SS 是由 14–20 个蛋白组成的复杂的分泌系统, 各个组件装配的顺序和核心复合物连接区蛋白的结构仍需要大量研究工作。另一方面, 效应蛋白可以作为 T6SS 骨架蛋白或与骨架蛋白相互作用装配到该分泌系统上, 目前只有极少数的效应蛋白-结构蛋白复合物结构被解析出来, 仍有大量的效应蛋白的结构与功能, 以及其装配机制需要进一步探索。这方面的研究成果将有助于加强人们对 T6SS 的认识, 同时为 T6SS 的应用奠定基础。另外, 虽然已经解析了部分免疫蛋白-效应蛋白复合物的三维结构, 但免疫蛋白与效应蛋白特异的毒素中和机制还有待发掘, 这将为以后研制靶向药物或抗生素提供基础。

参考文献

[1] COSTA TR, FELISBERTO-RODRIGUES C, MEIR A, PREVOST MS, REDZEJ A, TROKTER M,

- WAKSMAN G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(6): 343-359.
- [2] LASICA AM, KSIAZEK M, MADEJ M, POTEMPA J. The type IX secretion system (T9SS): highlights and recent insights into its structure and function[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 215.
- [3] PALMER T, FINNEY AJ, SAHA CK, ATKINSON GC, SARGENT F. A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 115: 345-355.
- [4] 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[J]. *Science*, 2006, 312(5779): 1526-1530.
- [5] PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, KRSTINS 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[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(5): 1528-1533.
- [6] BINGLE LE, BAILEY CM, PALLEEN MJ. Type VI secretion: a beginner's guide[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(1): 3-8.
- [7] SCHELL MA, ULRICH RL, RIBOT WJ, BRUEGGEMANN EE, HINES HB, CHEN D, LIPSCOMB L, KIM HS, MRAZEK J, NIERMAN WC, DESHAZER D. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 64(6): 1466-1485.
- [8] DUDLEY EG, THOMSON NR, PARKHILL J, MORIN NP, NATARO JP. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1267-1282.
- [9] MOUGOUS JD, GIFFORD CA, RAMSDELL TL, MEKALANOS JJ. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(7): 797-803.
- [10] SONG L, PAN J, YANG Y, ZHANG Z, CUI R, JIA S, WANG Z, YANG C, XU L, DONG TG, WANG Y,

- SHEN XH. Contact-independent killing mediated by a T6SS effector with intrinsic cell-entry properties[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 423.
- [11] WANG T, SI M, SONG Y, ZHU W, GAO F, WANG Y, ZHANG L, ZHANG W, WEI G, LUO ZQ, SHEN X. Type VI secretion system transports Zn²⁺ to combat multiple stresses and host immunity[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(7): e1005020.
- [12] SI M, WANG Y, ZHANG B, ZHAO C, KANG Y, BAI H, WEI D, ZHU L, ZHANG L, DONG TG, SHEN X. The type VI secretion system engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition[J]. *Cell Reports*, 2017, 20(4): 949-959.
- [13] SI M, ZHAO C, BURKINSHAW B, ZHANG B, WEI D, WANG Y, DONG TG, SHEN X. Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(11): E2233-E2242.
- [14] ZHU L, XU L, WANG C, LI C, LI M, LIU Q, WANG X, YANG W, PAN D, HU L, YANG Y, LU Z, WANG Y, ZHOU D, JIANG Z, SHEN X. T6SS translocates a micropeptide to suppress STING-mediated innate immunity by sequestering manganese[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(42): e2103526118.
- [15] 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[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(39): 15508-15513.
- [16] BASLER M. Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015, 370(1679): 20150021.
- [17] ALCOFORADO DINIZ J, LIU YC, COULTHURST SJ. Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the type VI secretion system[J]. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(12): 1742-1751.
- [18] DURAND E, CABBILLAU C, CASCALES E, JOURNET L. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of type VI secretion effectors[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(9): 498-507.
- [19] BOYER F, FICHANT G, BERTHOD J, VANDENBROUCK Y, ATTREE I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide *in silico* analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 104.
- [20] BÖCK D, MEDEIROS JM, TSAO HF, PENZ T, WEISS GL, AISTLEITNER K, HORN M, PILHOFER M. *In situ* architecture, function, and evolution of a contractile injection system[J]. *Science*, 2017, 357(6352): 713-717.
- [21] DURAND E, NGUYEN VS, ZOUED A, LOGGER L, PÉHAU-ARNAUDET G, ASCHTGEN MS, SPINELLI S, DESMYTER A, BARDIAUX B, DUJEANCOURT A, ROUSSEL A, CABBILLAU C, CASCALES E, FRONZES R. Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex[J]. *Nature*, 2015, 523(7562): 555-560.
- [22] RAPISARDA C, CHERRAK Y, KOOPER R, SCHMIDT V, PELLARIN R, LOGGER L, CASCALES E, PILHOFER M, DURAND E, FRONZES R. *In situ* and high-resolution cryo-EM structure of a bacterial type VI secretion system membrane complex[J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38(10): e100886.
- [23] SHNEIDER MM, BUTH SA, HO BT, BASLER M, MEKALANOS JJ, LEIMAN PG. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike[J]. *Nature*, 2013, 500(7462): 350-353.
- [24] CHERRAK Y, RAPISARDA C, PELLARIN R, BOUVIER G, BARDIAUX B, ALLAIN F, MALOSSE C, REY M, CHAMOT-ROOKE J, CASCALES E, FRONZES R, DURAND E. Biogenesis and structure of a type VI secretion baseplate[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(12): 1404-1416.
- [25] NGUYEN VS, LOGGER L, SPINELLI S, LEGRAND P, HUYEN PHAM TT, NHUNG TRINH TT, CHERRAK Y, ZOUED A, DESMYTER A, DURAND E, ROUSSEL A, KELLENBERGER C, CASCALES E, CABBILLAU C. Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17103.
- [26] WANG J, BRODMANN M, BASLER M. Assembly and subcellular localization of bacterial type VI secretion systems[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 621-638.
- [27] NAZAROV S, SCHNEIDER JP, BRACKMANN M, GOLDIE KN, STAHLBERG H, BASLER M. Cryo-EM reconstruction of type VI secretion system baseplate

- and sheath distal end[J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37(4): e97103.
- [28] SALIH O, HE S, PLANAMENTE S, STACH L, MACDONALD JT, MANOLI E, SCHERES SHW, FILLOUX A, FREEMONT PS. Atomic structure of type VI contractile sheath from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Structure*, 2018, 26(2): 329-336.e3.
- [29] KUDRYASHEV M, WANG RY, 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[J]. *Cell*, 2015, 160(5): 952-962.
- [30] PLANAMENTE S, SALIH O, MANOLI E, ALBESA-JOVÉ D, FREEMONT PS, FILLOUX A. TssA forms a gp6-like ring attached to the type VI secretion sheath[J]. *The EMBO Journal*, 2016, 35(15): 1613-1627.
- [31] 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[J]. *Nature*, 2016, 531(7592): 59-63.
- [32] SANTIN YG, DOAN T, LEBRUN R, ESPINOSA L, JOURNET L, CASCALES E. *In vivo* TssA proximity labelling during type VI secretion biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(11): 1304-1313.
- [33] SCHNEIDER JP, NAZAROV S, ADAIXO R, LIUZZO M, RINGEL PD, STAHLBERG H, BASLER M. Diverse roles of TssA-like proteins in the assembly of bacterial type VI secretion systems[J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38(18): e100825.
- [34] STIETZ MS, LIANG X, LI H, ZHANG X, DONG TG. TssA-TssM-TagA interaction modulates type VI secretion system sheath-tube assembly in *Vibrio cholerae*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5065.
- [35] LIANG X, KAMAL F, PEI TT, XU P, MEKALANOS JJ, DONG TG. An onboard checking mechanism ensures effector delivery of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(46): 23292-23298.
- [36] KAPITEIN N, BÖNEMANN G, PIETROSIUK A, SEYFFER F, HAUSSER I, LOCKER JK, MOGK A. ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(5): 1013-1028.
- [37] WU CF, LIEN YW, BONDAGE D, LIN JS, PILHOFER M, SHIH YL, CHANG JH, LAI EM. Effector loading onto the VgrG carrier activates type VI secretion system assembly[J]. *EMBO Reports*, 2020, 21(1): e47961.
- [38] LIANG X, PEI TT, WANG ZH, XIONG W, WU LL, XU P, LIN S, DONG TG. Characterization of lysozyme-like effector TseP reveals the dependence of type VI secretion system (T6SS) secretion on effectors in *Aeromonas dhakensis* strain SSU[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87: e00435-00421.
- [39] LIANG X, PEI TT, LI H, ZHENG HY, LUO H, CUI Y, TANG MX, ZHAO YJ, XU P, DONG T. VgrG-dependent effectors and chaperones modulate the assembly of the type VI secretion system[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(12): e1010116.
- [40] LIANG X, ZHENG HY, ZHAO YJ, ZHANG YQ, PEI TT, CUI Y, TANG MX, XU P, DONG T. VgrG spike dictates PAAR requirement for the assembly of the type VI secretion system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2023, 205(2): e0035622.
- [41] DONG TG, HO BT, YODER-HIMES DR, MEKALANOS JJ. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(7): 2623-2628.
- [42] RUSSELL AB, HOOD RD, BUI NK, LEROUX M, VOLLMER W, MOUGOUS JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells[J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 343-347.
- [43] PEI TT, LI H, LIANG X, WANG ZH, LIU G, WU LL, KIM H, XIE Z, YU M, LIN S, XU P, DONG TG. Intramolecular chaperone-mediated secretion of an Rhs effector toxin by a type VI secretion system[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1865.
- [44] PEI TT, KAN Y, WANG ZH, TANG MX, LI H, YAN S, CUI Y, ZHENG HY, LUO H, LIANG X, DONG T. Delivery of an Rhs-family nuclease effector reveals direct penetration of the Gram-positive cell envelope by a type VI secretion system in *Acidovorax citrulli*[J]. *mLife*, 2022, 1(1): 66-78.
- [45] HOOD RD, SINGH P, HSU F, GÜVENER T, CARL MA, TRINIDAD RR, 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[J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 7(1): 25-37.
- [46] WHITNEY JC, QUENTIN D, SAWAI S, LEROUX M, HARDING BN, LEDVINA HE, TRAN BQ, ROBINSON H, GOO YA, GOODLETT DR, RAUNSER S, MOUGOUS JD. An interbacterial NAD(P)⁺ glycohydrolase toxin requires elongation factor Tu for delivery to target cells[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 607-619.
- [47] LIN J, ZHANG W, CHENG J, YANG X, ZHU K, WANG Y, WEI G, QIAN PY, LUO ZQ, SHEN X. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14888.
- [48] HAN Y, WANG T, CHEN G, PU Q, LIU Q, ZHANG Y, XU L, WU M, LIANG H. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(12): e1008198.
- [49] NOREEN Z, JOBICHEN C, ABBASI R, SEETHARAMAN J, SIVARAMAN J, BOKHARI H. Structural basis for the pathogenesis of *Campylobacter jejuni* Hcp1, a structural and effector protein of the type VI secretion system[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(21): 4060-4070.
- [50] MA J, PAN Z, HUANG J, SUN M, LU C, YAO H. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems[J]. *Virulence*, 2017, 8(7): 1189-1202.
- [51] SUAREZ G, SIERRA JC, EROVA TE, SHA J, HORNEAMAN AJ, CHOPRA AK. A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(1): 155-168.
- [52] ZHENG J, HO B, MEKALANOS JJ. Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23876.
- [53] SHA J, ROSENZWEIG JA, KOZLOVA EV, WANG S, EROVA TE, KIRTLEY ML, van LIER CJ, CHOPRA AK. Evaluation of the roles played by Hcp and VgrG type 6 secretion system effectors in *Aeromonas hydrophila* SSU pathogenesis[J]. *Microbiology (Reading)*, 2013, 159(Pt 6): 1120-1135.
- [54] HOWARD SA, FURNISS RCD, BONINI D, AMIN H, PARACUELLOS P, ZLOTKIN D, COSTA TRD, LEVY A, MAVRIDOU DAI, FILLOUX A. The breadth and molecular basis of Hep-driven type VI secretion system effector delivery[J]. *mBio*, 2021, 12: e00262-00221.
- [55] SILVERMAN JM, AGNELLO DM, ZHENG H, ANDREWS BT, LI M, CATALANO CE, GONEN T, MOUGOUS JD. Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates[J]. *Molecular Cell*, 2013, 51(5): 584-593.
- [56] FLAUGNATTI N, RAPISARDA C, REY M, BEAUVOIS SG, NGUYEN VA, CANAAN S, DURAND E, CHAMOT-ROOKE J, CASCALES E, FRONZES R, JOURNET L. Structural basis for loading and inhibition of a bacterial T6SS phospholipase effector by the VgrG spike[J]. *The EMBO Journal*, 2020, 39(11): e104129.
- [57] LIANG X, MOORE R, WILTON M, WONG MJ, LAM L, DONG TG. Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(29): 9106-9111.
- [58] UNTERWEGER D, KOSTIUK B, ÖTJENGERDES R, WILTON A, DIAZ-SATIZABAL L, PUKATZKI S. Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*[J]. *The EMBO Journal*, 2015, 34(16): 2198-2210.
- [59] MANERA K, KAMAL F, BURKINSHAW B, DONG TG. Essential functions of chaperones and adaptors of protein secretion systems in Gram-negative bacteria[J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(16): 4704-4717.
- [60] BONDAGE DD, LIN JS, MA LS, KUO CH, LAI EM. VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor-effector complex[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(27): E3931-3940.
- [61] QUENTIN D, AHMAD S, SHANTHAMOORTHY P, MOUGOUS JD, WHITNEY JC, RAUNSER S. Mechanism of loading and translocation of type VI secretion system effector Tse6[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(10): 1142-1152.
- [62] WU LL, YAN S, PEI TT, TANG MX, LI H, LIANG X, SUN S, DONG T. A dueling-competent signal-sensing module guides precise delivery of cargo proteins into target cells by engineered *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(2): 360-368.

- [63] GÜNTHER P, QUENTIN D, AHMAD S, SACHAR K, GATSOGIANNIS C, WHITNEY JC, RAUNSER S. Structure of a bacterial Rhs effector exported by the type VI secretion system[J]. *PLoS Pathogens*, 2022, 18(1): e1010182.
- [64] JURÉNAS D, ROSA LT, REY M, CHAMOT-ROOKE J, FRONZES R, CASCALES E. Mounting, structure and autocleavage of a type VI secretion-associated Rhs polymorphic toxin[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6998.
- [65] AHMAD S, TSANG KK, SACHAR K, QUENTIN D, TASHIN TM, BULLEN NP, RAUNSER S, MCARTHUR AG, PREHNA G, WHITNEY JC. Structural basis for effector transmembrane domain recognition by type VI secretion system chaperones[J]. *Elife*, 2020, 9: e62816.
- [66] JURÉNAS D, JOURNET L. Activity, delivery, and diversity of type VI secretion effectors[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 115(3): 383-394.
- [67] HERSCH SJ, MANERA K, DONG TG. Defending against the type six secretion system: beyond immunity genes[J]. *Cell Reports*, 2020, 33(2): 108259.
- [68] HO BT, DONG TG, MEKALANOS JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system[J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(1): 9-21.
- [69] BENZ J, SENDLMEIER C, BARENDTS TR, MEINHART A. Structural insights into the effector-immunity system Tse1/Tsi1 from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40453.
- [70] CHOU S, BUI NK, RUSSELL AB, LEXA KW, GARDINER TE, LEROUX M, VOLLMER W, MOUGOUS JD. Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system[J]. *Cell Reports*, 2012, 1(6): 656-664.
- [71] DING J, WANG W, FENG H, ZHANG Y, WANG DC. Structural insights into the *Pseudomonas aeruginosa* type VI virulence effector Tse1 bacteriolysis and self-protection mechanisms[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(32): 26911-26920.
- [72] LU D, SHANG G, ZHANG H, YU Q, CONG X, YUAN J, HE F, ZHU C, ZHAO Y, YIN K, CHEN Y, HU J, ZHANG X, YUAN Z, XU S, HU W, CANG H, GU L. Structural insights into the T6SS effector protein Tse3 and the Tse3-Tsi3 complex from *Pseudomonas aeruginosa* reveal a calcium-dependent membrane-binding mechanism[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 92(5): 1092-1112.
- [73] LI L, ZHANG W, LIU Q, GAO Y, GAO Y, WANG Y, WANG DZ, LI Z, WANG T. Structural insights on the bacteriolytic and self-protection mechanism of muramidase effector Tse3 in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(42): 30607-30613.
- [74] ROBB CS, ROBB M, NANO FE, BORASTON AB. The structure of the toxin and type six secretion system substrate Tse2 in complex with its immunity protein[J]. *Structure*, 2016, 24(2): 277-284.
- [75] ZHANG H, ZHANG H, GAO ZQ, WANG WJ, LIU GF, XU JH, SU XD, DONG YH. Structure of the type VI effector-immunity complex (Tae4-Tai4) provides novel insights into the inhibition mechanism of the effector by its immunity protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(8): 5928-5939.
- [76] ZHANG H, GAO ZQ, WEI Y, XU JH, DONG YH. Insights into the cross-immunity mechanism within effector families of bacteria type VI secretion system from the structure of *StTae4-EcTai4* complex[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73782.
- [77] TING SY, BOSCH DE, MANGIAMELI SM, RADEY MC, HUANG S, PARK YJ, KELLY KA, FILIP SK, GOO YA, ENG JK, ALLAIRE M, VEESLER D, WIGGINS PA, PETERSON SB, MOUGOUS JD. Bifunctional immunity proteins protect bacteria against FtsZ-targeting ADP-ribosylating toxins[J]. *Cell*, 2018, 175(5): 1380-1392. e14.
- [78] DURAND E, DERREZ E, AUDOLY G, SPINELLI S, ORTIZ-LOMBARDIA M, RAOULT D, CASCALES E, CABBILLAU C. Crystal structure of the VgrG1 actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* type VI secretion system[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(45): 38190-38199.