

效应-免疫蛋白对所介导细菌接触依赖型拮抗作用研究进展

李潇丁, 吴欢, 关洪鑫*

福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350117

李潇丁, 吴欢, 关洪鑫. 效应-免疫蛋白对所介导细菌接触依赖型拮抗作用研究进展[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 1987-2000.

LI Xiaoding, WU Huan, GUAN Hongxin. Research progress in bacterial contact-dependent antagonism mediated by effector-immunity pairs[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 1987-2000.

摘要: 效应-免疫蛋白对(effector-immunity pairs, E-I pairs)在细菌的种间竞争中发挥重要作用, 随着人们研究的不断深入和基因组数据的大量涌现, 新鉴定的 E-I pairs 的数量正在快速增长, 其多样化的作用机制也不断地被报道。鉴于此, 本文基于不同的细菌分泌系统, 对 E-I pairs 所介导的细菌接触依赖型拮抗作用的最新研究进展进行综述, 系统总结了接触依赖性生长抑制(contact-dependent growth inhibition, CDI)系统、VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)和 VII 型分泌系统(type VII secretion system, T7SS)中的 E-I pairs, 简要介绍了未来该领域面临的挑战, 旨在为进一步揭示 E-I pairs 细菌种间竞争中的作用研究提供新思路。

关键词: 种间竞争; 分泌系统; 接触依赖性生长抑制; 毒性效应蛋白; 免疫蛋白

Research progress in bacterial contact-dependent antagonism mediated by effector-immunity pairs

LI Xiaoding, WU Huan, GUAN Hongxin*

School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, Fujian, China

Abstract: Effector-immunity pairs (E-I pairs) play a crucial role in interspecific competition among bacteria. As the research in this field advances and genomic data become increasingly available, increasing E-I pairs have been identified, and their diverse mechanisms of action have been reported. In light of this, this paper reviews the latest advancements in bacterial contact-dependent antagonism mediated by E-I pairs according to different bacterial secretion

资助项目: 国家自然科学基金(32171265)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171265).

*Corresponding author. E-mail: guanhongxin@fjnu.edu.cn

Received: 2024-08-08; Accepted: 2025-01-03; Published online: 2025-01-23

systems. It systematically summarizes the E-I pairs associated with the contact-dependent growth inhibition (CDI) system, type VI secretion system (T6SS), and type VII secretion system (T7SS), while briefing future challenges within this field. The objective of this review is to provide novel insights for elucidating the role of E-I pairs in bacterial interspecific competition. **Keywords:** interspecific competition; secretion system; contact-dependent growth inhibition (CDI); toxic effector proteins; immune proteins

细菌作为自然界中分布最为普遍的生物,通过复杂的相互作用维持“生态平衡”。在此相互作用的过程中,尽管细菌之间存在形式多样的合作,但总体而言,竞争才是它们之间的核心关系。细菌需要与相同或不同的细菌种群相互竞争生存空间和资源,并最终建立和维持优势生态位,这种普遍存在的竞争现象随后被研究人员定义为“细菌的种间竞争”^[1]。在长期的进化过程中,几乎所有主要细菌门类都进化出了2种种间竞争的拮抗系统,分类如图1所示,包括可以“远程”攻击的非接触依赖型系统和可以“近程”攻击的接触依赖型系统。

非接触依赖型的拮抗作用主要通过一些有扩散性质的抗生素、细菌素(抗菌肽或某些蛋白质)发挥作用^[2]。接触依赖型的拮抗作用则更加复杂,需要借助细菌多种多样的蛋白质分泌系统将更加靶向性的蛋白样毒素递送进竞争者细菌并发挥杀菌作用^[3]。这些效应蛋白不仅对其他细菌有毒性,对分泌者自身也有毒性。因此,为了中和这种毒性,细菌还会在这些毒性效应蛋白编码的基因的上游或下游同时编码一个免疫蛋白,以保护自己免受效应蛋白的毒性杀伤。毒性效应蛋白和免疫蛋白组成效应-免疫蛋白对(effector-immunity pairs, E-I pairs),二者共同

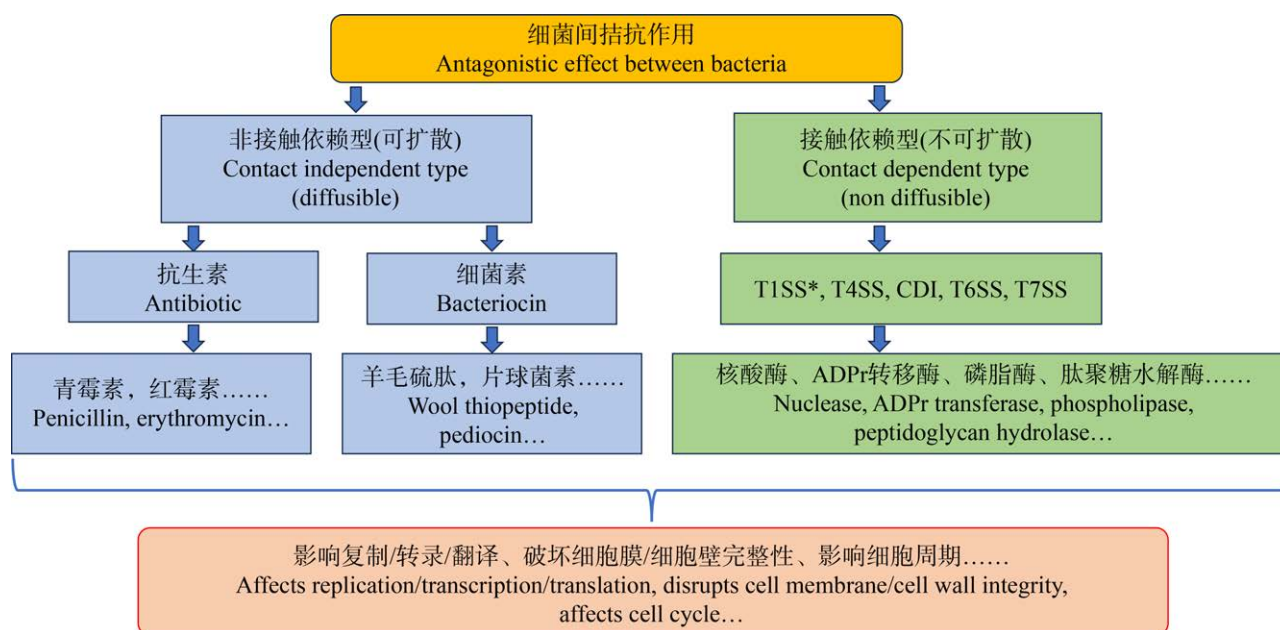


图1 细菌间拮抗作用分类 某些物种的 T1SS 可分泌细菌素, 发挥接触依赖型拮抗作用。一些效应蛋白可通过非接触途径被靶细胞摄取。

Figure 1 Classification of antagonistic effects between bacteria. T1SS of certain species can secrete bacteriocins, exerting contact dependent antagonistic effects and some effector can be taken up by target cells through non-contact pathways.

参与并协调细菌的种间竞争过程^[4]。目前,对四型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)、T5SS 的亚型 T5SSb 即“接触依赖性生长抑制(contact-dependent growth inhibition, CDI)系统”与 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)和 VII 型分泌系统(type VII secretion system, T7SS)介导的细菌种间竞争研究相对比较深入。效应蛋白可以通过发挥多种多样的酶活,如核酸酶、NAD 酶、磷脂酶和肽聚糖水解酶来产生对竞争细菌的毒性杀伤作用。它们通常以细菌体内保守且重要的核酸、初级代谢物、蛋白质甚至是细胞壁或细胞膜等必需成分为靶标^[5-7]。免疫蛋白一般通过直接结合并封闭蛋白酶活性中心的方式中和毒性效应蛋白的毒性。此外,一些免疫蛋白还具备与效应蛋白相反的酶活,通过对底物蛋白进行可逆化修饰作用来解除毒性,甚至以独特的双重中和机制参与调控种间竞争^[8]。

E-I pairs 在细菌的种间竞争过程中发挥了重要的作用,并且在未来具备被开发成替代抗生素的工具,如通过粪便移植治疗艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)的感染。因此,本文将对 T4SS 系统、CDI 系统、T6SS 系统和 T7SS 系统 E-I pairs 介导的种间竞争的最新研究进展进行总结,以期为后续研究提供新思路。

1 T4SS 中的 E-I pairs

许多细菌利用其 T4SS 将 DNA、蛋白质或其他大分子输送到其他目标细菌或真核细胞中。T4SS 主要可分为 2 个亚类:接合系统 T4SSa 和效应蛋白转运体 T4SSb^[9]。T4SSa 在细菌散播编码对重金属和抗生素等抗性的可移动遗传元件(mobile genetic element, MGE)的过程中发挥着重要作用^[10],T4SSb 则可以将种类繁多的效应蛋白转运进真核细胞中,是多种革兰氏阴性病原体发挥其毒力不可或缺的一部分^[11],如嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)独特的 T4SSb 型分泌系统——细胞器运输/细胞内增殖缺陷(defect in organelle trafficking/intracellular multiplication,

Dot/Icm)向宿主体内分泌 300 多种效应蛋白以抑制宿主免疫信号传导、劫持宿主胞内重要调控蛋白并诱导宿主细胞的凋亡和裂解^[12-14]。

长久以来,人们认为 T4SS 主要将效应蛋白运送到真核细胞中,并破坏宿主细胞的生理过程从而协助病原体感染,而最近研究发现柑橘黄单胞菌(*Xanthomonas citri*)和产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*)可以利用 T4SS 将毒性效应的蛋白转运到竞争者细菌中,以在竞争环境下取得竞争优势,同时效应蛋白对分泌者的毒性效应可以被免疫蛋白所中和^[15]。这些研究结果表明,细菌的 T4SS 在细菌的种间竞争中也可能具有重要作用。

X. citri 与大肠杆菌(*Escherichia coli*)共培养时,可以迅速裂解 *E. coli*,表明 *X. citri* 可能通过种间竞争杀伤 *E. coli*,而进一步研究显示,*X. citri* 可能通过 E-I pairs——XAC2609-XAC2610 参与种间竞争的调控:XAC2609 具有类似肽聚糖水解酶的三维结构,作为毒性效应蛋白发挥作用,体外试验表明它能够降解藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)细胞壁肽聚糖,甚至可以降低枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的培养物的浓度,使其生长曲线明显滞后^[16]。XAC2610 作为免疫蛋白,通过直接结合 XAC2609 的方式,中和后者的毒性作用。尽管它与其他已知功能的蛋白质具有极低的序列同源性,但结构生物学研究表明,它与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的周质 I 型溶菌酶抑制蛋白(periplasmic lysozyme inhibitor of I-type lysozyme from *aeromonas hydrophila*, Plil-Ah)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的免疫蛋白 Tsi1 具有结构相似性^[17]。此外,也有研究初步推测 *X. citri* 的 XAC2247-XAC2246 也可能是另一个非典型的 T4SS E-I pairs^[18]。

另有研究表明 *L. enzymogenes* 也可以利用 T4SS 分泌的效应蛋白-免疫蛋白参与接触依赖型种间竞争,例如 Le908-Le909 和 Le1637-Le1636;其中 *L. enzymogenes* OH11 利用 Le908 竞争性杀

伤胡萝卜软腐坚固杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),并保护胡萝卜免受 *P. carotovorum* 的感染,Le1637 则可以竞争性杀伤阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)^[18-19]。

目前, T4SS E-I pairs 介导种间竞争报道的研究相对较少, 人们主要在 *X. citri* 和 *L. enzymogenes* 中进行了初步研究, 其他细菌是否利用 T4SS 参与种间竞争还有待深入研究。

2 接触依赖性生长抑制系统中的 E-I pairs

CDI 系统也被称双伙伴分泌(two-partner secretion, TPS)系统, 由基因簇上串联编码的桶状蛋白和乘客蛋白组成^[20-21]。CDI 系统的基因簇通常由排列在单个操纵子 CdiB-A-I 中的 3 个基因组成, CdiB 编码 β 桶状外膜蛋白, 它负责将 CdiA 从细菌内输出并呈现在细菌的外膜表面^[22]; CdiA 的 N 端结构域负责与 CdiB 结合, C 端结构域 (CdiA-CT)则为毒素结构域。CdiA 在接触目标细菌外膜受体时将其 C 末端毒素结构域递送到其中, 进而发挥效应蛋白的毒性^[23], 而 CdiI 则作为免疫蛋白, 通过与毒素效应蛋白形成复合

物并中和其活性来防止自身中毒^[24]。

从 2019 年至 2023 年底, 共有 8 对 CDI 系统的 E-I pairs 被比较完善的研究, 如表 1 所示。结合其他统计与报道, CDI 系统的研究主要集中在埃希氏菌属(*Escherichia*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)中^[34-36]。此外, 研究人员通过生物信息学分析在 *Acinetobacter* 基因组中预测了超过 40 种 CDI 系统, 但尚未进行深入研究^[37]。

CdiA-CT 是毒性效应蛋白参与杀伤作用的主要结构域, 其在进化过程中具有多样性, 可以通过多种酶活发挥作用, 最为常见的活性为核酸酶; 基于该类效应蛋白的底物类型、裂解位点以及所需的辅助因子的特异性和结构特点, 可将其分为 Barnase/EndoU/Colicin/RelE (BECR)超家族、PD-(D/E)XK 超家族和 RNase A 超家族三类。

BECR 超家族—除 RNase CdiA-CT^{ECL} 外, 均具有 tRNase 活性, 可裂解多种不同的 tRNA; 这个超家族蛋白的结构特点是它们有一个共同的结构核心——在一个 α -螺旋之后有 4 个反平行的 β 折叠($\alpha\beta\beta\beta$), 但这个超家族蛋白在发挥 tRNase 的机制方面多种多样^[38]。典型代表为 CdiA-CT^{NC101},

表 1 2019–2024 年 CDI 系统 E-I pairs 研究汇总

Table 1 Summary of CDI system E-I pairs studies, 2019–2024

年份 Year	E-I pairs 名称 Name of E-I pairs	来源物种 Source species	机理 Mechanism	来源 Source
2019	BcpAIB-2 BcpAIOB-1	<i>Burkholderia multivorans</i>	其他 Others	[25]
2019	CdiACT ^{EC3006} -CdiICT ^{EC3006} CdiAKp342-CdiIKp342	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumonia</i>	核酸酶 Nuclease	[26]
2019	CdiA-CT ^{MHI813} -CdiI ^{MHI813}	<i>E. coli</i>	其他 Others	[27]
2020	YeeF-YezG	<i>Bacillus subtilis</i>	核酸酶 Nuclease	[28]
2021	Cdi1 Cdi2	<i>E. coli</i>	成孔蛋白 Pore-forming protein	[29]
2021	CdiA-CT ^{GN05224} CdiA-CT ^{o10} ^{EC869}	<i>E. coli</i>	核酸酶 Nuclease 其他 Others	[30]
2022	CdiA-CT ^{EC869} -CdiI-CT ^{EC869}	<i>E. coli</i>	核酸酶 Nuclease	[31]
2023	CdiA-CdiI ^{TYTH1}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	其他 Others	[32]
2024	EAAEB30_18465-EAAEB_18460	<i>Enterobacter asburiae</i>	其他 Others	[33]

其发挥酶活需要热不稳定延伸因子(elongation factor thermo unstable, EF-Tu)、热稳定延伸因子(elongation factor thermo stable, EF-Ts)和 GTP 作为辅助因子。此外, BECR 超家族的效应蛋白对应的免疫蛋白也是多种多样的, 只有与效应蛋白结合界面上的相互作用类似^[39-40]。PD-(D/E)XK 超家族蛋白的结构特点是有一个 $\alpha\beta\alpha\beta$ 核心、保守的催化 Lys 和 Asp 残基, 以及一个或多个含羧基氨基酸(即 Asp 或 Glu 残基)配位的金属结合位点。该家族的核酸酶可作为内切酶、重组酶或缺口酶^[41], 典型代表为 CdiA-CT^{TA271}, 它是一种金属离子依赖性 DNase, 在 Zn^{2+} 存在的情况下可完全降解质粒 DNA; 如果二价金属是 Mg^{2+} , 则 DNase 的活性会大大降低^[42]。另外, 该超家族的效应蛋白和免疫蛋白形成的异二聚体会进一步寡聚化, 如 tRNA 与 CdiA-CT^{E479} 复合物形成四聚体蛋白^[43]。细菌 RNase A 家族, 典型代表为 CdiA-CT^{Ykris}, 该家族的效应蛋白具有不依赖金属的 RNase 活性, 其结构特点为 2 个弯曲的 β -折叠进一步组合形成蚕豆状的结构, 其免疫蛋白通过直接结合的方式封闭毒素蛋白的活性中心使其失活^[44]。

有一些 CdiA-CT 毒素发挥作用需要额外的元件起作用, 比如某些 CdiA-CT 毒素进入正确的细胞区域发挥毒性需要额外一个位于毒素 N 端的转运结构域协助, 该结构域可与特定的内膜受体结合, 是毒素穿过内膜所必需, 比如敲除 *P. aeruginosa* 内膜蛋白受体——二肽 ABC 转运蛋白渗透酶 B (dipeptide ABC transporter permease B, DppB)和 DppC, 可解除 CdiA-CT^{PABL017} 对 *P. aeruginosa* 的毒性效应^[45]。

尽管之前的研究表明 CDI 系统在细菌间拮抗过程中发挥作用, 但效应蛋白的传递是否仅限于相同或近亲物种等问题还需深入研究。

3 T6SS 系统中的 E-I pairs

T6SS 介导的细菌种间竞争研究相对较多, 它是一个多分子蛋白复合物组成的噬菌体样的

注射器结构, 可以将效应蛋白运输到邻近的其他细菌中, 进而杀伤目标细胞^[46]。T6SS 可通过 2 种方式递送效应蛋白: 第一种是使 T6SS 元件的分泌型缬氨酸-甘氨酸重复蛋白 G (valine-glycine repeat protein G, VgrG)直接作为效应蛋白或者携带效应蛋白进入靶细胞; 第二种是使额外的效应蛋白通过溶血素共调节蛋白(hemolysin co-regulated protein, HCP)六聚体组成的通道进入靶细胞, 但这些编码效应蛋白的基因和编码 T6SS 分泌系统复合物的基因一般没有直接关系^[47]。

通过生物信息学方法已在约 25% 的革兰氏阴性细菌中成功鉴定出一个或多个 T6SS 基因簇, 其中包括多种致病性菌的 T6SS^[48-49], 最早报道的 T6SS 的 E-I pairs 的毒性效应蛋白是 2010 年 Russell 等^[50]在 *P. aeruginosa* 中的发现的 Tse1、Tse2 和 Tse3。近 5 年, 共有 32 对 T6SS 系统的 E-I pairs 得到了比较完善的研究, 详见表 2。其中, 假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)的 Tce1-Tci1 和鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的 TafE-TaeI 具有明显的独特性: Tce1 可以通过不依赖于直接接触的方式对靶细胞进行杀伤, 而 TafE 具有非常广泛的杀伤范围, 可同时针对细菌、真菌和哺乳动物细胞^[87-88]。它们的发现表明 T6SS E-I pairs 对于种间竞争具有多样的工作机制。此外, 就种间竞争而言, 早在 2017 年, 人们就发现霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)可通过其 T6SS 分泌的效应蛋白参与其种间竞争并获得生存优势, 以协助其在小鼠体内的定殖^[89-90]。在一项对临床样本中分出的一株肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)的研究中, 研究人员证明了参与效应蛋白递送到靶细胞过程的 T6SS 的内膜蛋白——细胞内增殖 F1 蛋白 (intracellular multiplication F1, IcmF1)、IcmF2 和 HCP 对于 *K. pneumoniae* 的种间和种内的竞争是必要的^[91]。

3.1 作用于细胞壁的 T6SS 的 E-I pairs

最近在河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)发现了一对 E-I pairs——TssI2-TsiI2, 其效应蛋白 TssI2 定位

表 2 2019–2024 年 T6SS 系统 E-I pairs 研究汇总

Table 2 Summary of T6SS system E-I pairs studies, 2019–2024

年份 Year	E-I pairs 名称 Name of E-I pairs	来源物种 Source species	机理 Mechanism	来源 Source
2019	Tle3-Tli3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	磷脂酶 Phospholipase	[51]
2019	PoNe-PoNi	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DNA 酶 DNase	[52]
2019	TleV1-TliV1a	<i>Vibrio cholerae</i>	脂酶 Lipase	[53]
2019	VgrG2b-PA0261	<i>P. aeruginosa</i>	金属肽酶 Metallopeptidase	[54]
2019	TseT-TsiT	<i>P. aeruginosa</i>	核酸酶 Nuclease	[55]
2020	TseI (VIRC)-TsiI	<i>Aeromonas dhakensis</i>	内切酶 Endonuclease	[56]
2020	Tld1-Tldi1	<i>Salmonella typhimurium</i>	羧肽酶 Carboxypeptidase	[57]
2020	Tle1AH-Tli1&Tli2AH	<i>Aeromonas hydrophila</i>	磷脂酶 Phospholipase	[58]
2021	TseTBg-TsiTBg	<i>Burkholderia Yabunchi</i>	核酸酶 Nuclease	[59]
2021	Tce1-Tci1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	核酸酶 Nuclease	[60]
2021	TseP-TsiP	<i>A. dhakensis</i>	肽聚糖水解酶 Peptidoglycan hydrolase	[61]
2021	Tse3-Tsi3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	其他 Others	[62]
2021	TseV-TsiV	<i>P. aeruginosa</i>	核酸酶 Nuclease	[63]
2021	Tae/Tde-Tai	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	肽聚糖酰胺酶/核酸酶 Peptidoglycan amidase/Nuclease	[64]
2021	TpeV-TpiV	<i>V. cholerae</i>	成孔蛋白 Pore-forming protein	[65]
2021	MXAN_RS36995-MXAN_RS24590 MXAN_RS08765-MXAN_RS08760	<i>Myxococcus xanthus</i>	核酸酶 Nuclease	[66]
2021	Tse8-Tsi8	<i>P. aeruginosa</i>	其他 Others	[67]
2022	SED_RS01930 SED_RS01935 SED_RS06235 SED_RS06230 SED_RS06335 SED_RS06340	<i>Salmonella Dublin</i>	其他 Others	[68]
2022	TseLPA-TsiP1&TsiP2	<i>P. aeruginosa</i>	脂酶 Lipase	[69]
2022	TseV1-4-TsiV1-4	<i>Salmonella bongori</i>	其他 Others	[70]
2022	Txe1-4-Txi1-4	<i>Pseudomonas plecoglossida</i>	核酸酶 Nuclease	[71]
2022	TssI2-TsiI2	<i>Vibrio fluvialis</i>	肽聚糖水解酶 Peptidoglycan hydrolase	[72]
2023	Tle3-Tli3	<i>Escherichia coli</i>	磷脂酶 Phospholipase	[73]
2023	Tde1-Tdi1	<i>Bacteroidales</i>	核酸酶 Nuclease	[74]
2023	Tle-Tli	<i>Enterobacter loacae</i>	磷脂酶 Phospholipase	[75]
2023	TafE-TaeI	<i>A. baumannii</i>	DNA 酶 DNase	[76]
2023	Tfe8-Tfi8	<i>Pseudomonas ogarae</i>	成孔蛋白 Pore-forming protein	[77]
2023	Tle1Vc-Tli1tox-	<i>V. cholerae</i>	磷脂酶 Phospholipase	[78]
2023	Tae3Pf-Tai3Pf	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	淀粉酶 Amylase	[79]
2023	Re78-Re79	<i>Rhizobium etli</i>	其他 Others	[80]

(待续)

(续表 2)

年份 Year	E-I pairs 名称 Name of E-I pairs	来源物种 Source species	机理 Mechanism	来源 Source
2023	VgrG3cp-TsiV3cp	<i>Vibrio cholerae</i>	其他 Others	[81]
2024	TepC-TipC	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	DNA 酶 DNase	[82]
2024	YPK_0952-YPK_0953	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	DNA 酶 DNase	[83]
2024	Tde1-Tde1ia&Tde1ib Tde4-Tde4i	<i>Pseudomonas syringae</i>	DNA 酶 DNase	[84]
2024	Tse1-Tsi1 Tse2-Tsi2 Tse3-Tsi3	<i>Aeromonas veronii</i>	磷脂酶(Tse1/Tse3) 肽聚糖水解酶(Tse2) Phospholipase (Tse1/Tse3) Peptidoglycan hydrolase (Tse2)	[85]
2024	TseG-TsiG	<i>Pantoea ananatis</i>	其他 Others	[86]

在细菌细胞的外周质中,发挥肽聚糖水解酶活性,从而影响细胞形态、大小和渗透压稳定,而其免疫蛋白通过直接相互作用中和 TssI2 的毒性^[72]。在 *V. cholerae* E1 中鉴定出一种新的 VgrG3 变体,命名为 VgrG3cp,它通过靶向细胞壁的酪氨酸酶活性进而影响细菌分裂直至膜电位丧失和细胞壁破裂,其毒性可被同源免疫蛋白 TsiV3cp 通过直接结合的方式中和^[81]。

A. baumannii 的效应蛋白 Tse4 具有肽聚糖水解酶活性,D-赖氨酸的存在可以增强其活性;进一步对 Tse4 的结构域分析发现,它还具有溶解性转糖基化酶和内肽酶活性,因此 Tse4 很可能是一种双功能效应蛋白,能够针对多种细菌的细胞壁^[92]。

3.2 作用于细胞膜的 T6SS 的 E-I pairs

研究表明肠集聚性大肠杆菌(enteroaggregative *Escherichia coli*)可分泌具有磷脂酶 A1 和 A2 活性的 Tle1,膜脂蛋白 Tli1 作为免疫蛋白可通过直接结合的方式抑制 Tle1 的磷脂酶活性^[93]。之前的研究表明 *P. aeruginosa* 的 VgrG2b 是具有真核细胞毒性的效应蛋白^[94],然而,最近研究发现,它的 C 端结构域可以在细菌的外周质中发挥毒性,并被同源免疫蛋白 PA0261 直接结合并抵消毒性;VgrG2b 属于金属肽酶家族的成员,其作用机制类似于 β -内酰胺类抗生素,可能通过裂解细胞膜上的脂质锚将脂蛋白从膜中

释放出来,最终使细胞膜起泡进而干扰细胞分裂^[54]。*V. cholerae* E1 的 Tle1Vc 是一种脂肪酶效应蛋白,含有一个 DUF2235 结构域;细菌毒性试验、脂肪酶活性试验和突变试验表明,Tle1Vc 具有磷脂酶 A1 活性和磷脂酶 A2 活性,可以对细胞膜进行去极化并改变其通透性,同源免疫蛋白 Tli1tox⁻可直接与 Tle1Vc 相互作用,中和其毒性^[78]。

此外,靶向内质网的 *P. aeruginosa* 效应蛋白 TplE 是 *P. aeruginosa* 中发现的第三种跨王国效应蛋白^[95](可同时针对原核和真核细胞):TplE 类似于真核生物的糖基化后磷脂酰肌醇附着蛋白 1 (post-glycosylphosphatidylinositol attachment to protein 1, PGAP 1),可以靶向并破坏宿主细胞的内质网,从而通过肌醇需求酶 1 α -X 框结合蛋白 1 (inositol-requiring enzyme-1 α , x-box binding protein 1, IRE1 α -XBP1)途径激活未折叠蛋白反应,增强细胞本身的自噬反应;此外,TplE 额外的脂酶活性赋予其水解多种长链甘油三酯的能力,有助于 *P. aeruginosa* 的种内和种间竞争,其毒性可以被免疫蛋白 Tli4 中和^[96]。

3.3 作用于核酸的 T6SS 的 E-I pairs

Y. pseudotuberculosis 分泌的效应蛋白 Tce1 是一种 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 依赖的 DNase,它通过 DNase 活性发挥毒性,并可被其同源免疫蛋白 Tci1 中和;Tce1 既可以通过接触依赖的方式参

与种间竞争,也可以通过与靶细胞外膜上的蛋白(如 BtuB 和 OmpF)相互作用直接进入靶细胞,以非接触依赖的方式参与种间竞争^[60],这种独特的双功能效应蛋白为我们了解 T6SS 在竞争中的生理作用提供了新的视角。脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)的效应蛋白 Tde1 具有核酸酶活性,能介导拟杆菌属(*Bacteroides*)细菌之间的拮抗作用,其同源免疫蛋白 Tdi1 或孤儿免疫蛋白,不仅可与 Tde1 发生直接相互作用,还可以将核酸酶折叠分成 2 个亚结构域,导致 Tde1 发生明显构象变化,破坏酶活性位点并改变 DNA 结合位点,最终抑制 Tde1 的毒性^[74],Tde1-Tdi1 这种免疫蛋白诱导构象变化的中和机制与其他 E-I pairs 的中和作用方式明显不同。

假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)的效应蛋白 TepC 不光具有 DNase 活性,它也可以螯合 Fe^{3+} : 在 Fe^{3+} 缺乏的条件下, TepC 能够被表达外膜受体 TdsR 的靶细胞所摄取,并帮助编码了同源免疫蛋白 TipC 的亲属细胞获取 Fe^{3+} ,然而缺乏 TipC 的非亲属细胞摄取了 TepC 则会被其 DNase 活性杀死^[82]。这是除了 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 外,第 3 例 T6SS 效应蛋白促进金属离子吸收的纪录^[97]。

3.4 其他类型的 T6SS 的 E-I pairs

大多数 T6SS 效应蛋白以核酸、细胞膜或细胞壁为作用对象,也有一些 T6SS 效应蛋白能以竞争细菌的某些重要蛋白质为作用对象,通过劫持这些蛋白影响竞争对手的正常生理过程,从而展现出细菌毒性。例如 *P. aeruginosa* 的效应蛋白 Tse8,尽管生物信息学预测表明 Tse8 可能是一种酰胺酶,但其毒性并不依赖于该酶活,它通过与靶细胞的谷氨酰-tRNA 氨基转移酶(glutamyl-tRNA aminotransferase, Gat)复合物组分 GatA、GatB 和 GatC 结合,改变该复合物的组成,进而限制了竞争细菌的蛋白质合成能力,从而表现毒性;Tse8 的同源免疫蛋白 Tsi8 通过直接结合的方式抑制其毒性^[68]。

最后,弧菌科(*Vibrionaceae*)细菌中发现了

一类新型结构域——富含精氨酸的六型结构域(aRginine-rich type sIX, RIX); RIX 结构域位于多种抗菌和抗真核蛋白质的 N 端,可以协助效应蛋白经 T6SS 递送到邻近细胞^[98]。含 RIX 结构域的效应蛋白的发现大大增加了 T6SS 效应蛋白的种类,拓展了我们对 T6SS 效应蛋白分泌方式的认知。

4 T7SS 系统中的 E-I pairs

T7SS 是革兰氏阳性菌所独有的分泌系统,它最早在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)被发现,主要可分为 T7SSa [放线菌门(*Actinomycetota*),如 *M. tuberculosis*、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)]和 T7SSb [芽孢杆菌门(*Bacillota*),如蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)]这 2 个亚型^[99-101]。许多致病性分枝杆菌的细菌利用 T7SSa 发挥致病性,并参与吞噬体逃逸、金属离子稳态等重要过程^[102]。而 *Bacillota* 的某些细菌则利用 T7SSb 分泌含亮氨酸-X-甘氨酸(Leu-X-Gly, LXG)基序的效应蛋白和免疫蛋白参与致病过程与细菌间竞争,比如 *S. aureus*、*B. subtilis*、单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)^[103]。效应蛋白通常包括 N 端保守的 LXG 结构域、中间结构域和 C 端的毒性结构域这 3 个部分,相应的免疫蛋白可以中和前者的毒性,二者共同组成 T7SSb E-I pairs^[104-105]。

相较于 T6SS 和 CDI 系统, T7SSb 中 E-I pairs 介导的种间竞争的相关研究相对较少。2011 年在 *B. subtilis* 中报道了 YobL-YobK、YxiD-YxxD 和 YqcG-YqcF 这 3 对 E-I pairs,它们的效应蛋白都包含一个保守的 N 端区域, C 端具有 RNase 活性的结构域则灵活多变^[106]。在 *S. aureus* 中发现了另一对 E-I pairs——EsaD-EsaG, EsaD 具有核酸酶活性, EsaG 是 DUF600 蛋白家族的蛋白; EsaD 的递送较为复杂, EsaD 需要与伴侣蛋白 EsaE 结合,并最终形成 EsaE-EsaD-EsaG 三元复合物,在 EsaE 协助下

将 EsaD-EsaG 转移至 T7SS EssC, 然后该复合物解离进入递送过程; 另有实验证明 EsaG 可保护 *S. aureus* 免受 EsaD 的毒性影响^[107-108]。*S. aureus* 中还报道了另外一对 E-I pairs——TspA-TsaI, TspA 的 C 端毒素结构域可以使 *E. coli* 的细胞膜去极化从而发挥毒性, TsaI 可直接中和其毒性; 同时, 研究人员利用斑马鱼后脑室感染模型及细菌竞争实验证明了 TspA 为另一种跨王国效应蛋白, 并且其存在有助于 *S. aureus* 的种内竞争^[109]。

此外, 在中间葡萄球菌 (*Staphylococcus intermedius*) 中也报道了 TelA-TipA、TelB-TipB 和 TelC-TipC 这 3 对 E-I pairs, TelA 在细菌细胞质中表达是有毒的, 但其毒性机理未知; TelB 是一种 NADase, 对 *E. coli* 具有强烈的毒性; TelC 是一种脂质 II 磷酸酶, 可以水解肽聚糖的直接前体脂质 II, 进而对多种革兰氏阳性菌表现出毒性^[110-111]。最近在 *S. intermedius* 中报道的含有 LXG 基序的效应蛋白 TelE 具有成孔蛋白活性, 该蛋白富含膜蛋白 α -螺旋和甘氨酸拉链基序两大特征, 该蛋白具有形成离子通道的倾向性^[112]。在 *E. coli* 过表达 TelE, TelE 会在细胞上形成膜孔, 造成失水或细胞质内容物渗漏, 从而表现出细胞毒性; 同源免疫蛋白 TipE 可直接通过蛋白质相互作用抑制 TelE 的毒性^[113]。

5 总结与讨论

在生物漫长的进化过程中, 细菌凭借着多种多样的分泌系统分泌毒性效应蛋白参与细菌种间竞争, 或对真核宿主的致病过程^[114-115]。在此过程中, 为了避免毒性效应蛋白对自身的毒性作用, 细菌会表达相应的免疫蛋白中和效应蛋白的毒性。这些 E-I pairs 在复杂的细菌菌群中协助特定细菌获取营养、杀死竞争对手, 在建立有利生态位, 甚至在一些致病菌的肠道定殖过程中发挥了重要作用。对细菌种间竞争的研究不仅可以帮助我们更加深刻理解菌群生态, 还可以基于此开发治疗某些肠道疾病的方法, 例如通过粪菌移植治疗艰难梭菌感染。因此, 鉴于 T4SS、CDI 系统、T6SS 和 T7SS 分泌的毒性效应蛋白在种间竞争中的关键作用, 本文综述了相关的 E-I pairs 的研究进展。

虽然人们在该领域取得了不少进展, 但还存在一些问题亟须解决, 比如: 目前鉴定效应蛋白的确切生物学功能仍然是一项挑战; E-I pairs 分泌的激活和调控网络仍缺乏研究; E-I pairs 在细菌优势种群形成过程中的作用也不清楚。除此之外, 鉴定 E-I pairs 的方法也存在一定的缺陷, 尚无方便准确且高通量的筛选手段, 表 3 列举

表 3 目前常用 E-I pairs 的鉴定手段

Table 3 Currently commonly used E-I pairs identification methods

鉴定手段	优点	缺点
Method of identification	Advantage	Disadvantage
生物信息学分析	高效快捷, 无须实际实验	需要已有知识提供筛选依据
Bioinformatics analysis	Efficient and fast, no need for actual experiments	Need existing knowledge to provide screening criteria
分泌系统基因组分析	基础方法, 方便快捷	只能发现分泌系统基因簇附近的蛋白
Genomic analysis of secretion system	Basic methods, convenient and fast	Only proteins near the gene cluster of the secretion system can be found
蛋白质组学分析	基础方法, 无须得知蛋白质特征	只限于具有显著分泌特征的蛋白质
Proteomic analysis	Basic method, no need to know protein characteristics	Limited to the proteins with significant secretion characteristics
基于蛋白质库的突变筛选	高通量, 可筛选出无已知特征的蛋白	无法区分相同表型的非效应蛋白; 无法发现无表型或弱表型的蛋白质
Mutation screening based on protein library	High throughput, capable of screening proteins without known features	Unable to distinguish non effector proteins with same phenotype; Unable to detect proteins with non or weak phenotype

了目前 E-I pairs 的常见研究手段, 以及它们的优缺点。不过, 伴随着近几年由于人工智能的突破, 以及结构预测的准确性大幅度提高, 未来基于生物信息以及结构生物学的 E-I pairs 挖掘和功能分析可能更加高效且准确, 这将为探索 E-I pairs 的生物功能以及应用提供巨大帮助。

综上所述, E-I pairs 以及相关分泌系统的研究在生物学和生物医学领域具有重要的意义和广阔的前景, 随着科技发展与人们对相关研究的不断深入, 相信人们对各种 E-I pairs 的机制乃至其他相关生命现象的理解将越来越清晰。

作者贡献声明

李潇丁: 文献收集分析总结以及绝大部分的文字与图表撰写; 吴欢: 部分文字撰写与审核; 关洪鑫: 本文理论的构思、相关资源获取、写作的审核与编辑。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] PETERSON SB, BERTOLLI SK, MOUGOUS JD. The central role of interbacterial antagonism in bacterial life[J]. *Current Biology*, 2020, 30(19): R1203-R1214.
- [2] GRANATO ET, MEILLER-LEGRAND TA, FOSTER KR. The evolution and ecology of bacterial warfare[J]. *Current Biology*, 2019, 29(11): R521-R537.
- [3] KLEIN TA, AHMAD S, WHITNEY JC. Contact-dependent interbacterial antagonism mediated by protein secretion machines[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(5): 387-400.
- [4] ALVES JA, LEAL FC, PREVIATO-MELLO M, Da SILVA NETO JF. A quorum sensing-regulated type VI secretion system containing multiple nonredundant VgrG proteins is required for interbacterial competition in *Chromobacterium violaceum*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e0157622.
- [5] LIN HH, FILLOUX A, LAI EM. Role of recipient susceptibility factors during contact-dependent interbacterial competition[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 603652.
- [6] ZHANG DP, de SOUZA RF, ANANTHARAMAN V, IYER LM, ARAVIND L. Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics[J]. *Biology Direct*, 2012, 7: 18.
- [7] JAMET A, NASSIF X. New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria[J]. *mBio*, 2015, 6(3): e00285-15.
- [8] 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, BROOK PETERSON S, MOUGOUS JD. Bifunctional immunity proteins protect bacteria against FtsZ-targeting ADP-ribosylating toxins[J]. *Cell*, 2018, 175(5): 1380-1392.e14.
- [9] FILLOUX A. A variety of bacterial pili involved in horizontal gene transfer[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(13): 3243-3245.
- [10] GONZÁLEZ-RIVERA C, KHARA P, AWAD D, PATEL R, LI YG, BOGISCH M, CHRISTIE PJ. Two pKM101-encoded proteins, the *Pilus*-tip protein TraC and Pep, assemble on the *Escherichia coli* cell surface as adhesins required for efficient conjugative DNA transfer[J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 111(1): 96-117.
- [11] DREHKOPF S, SCHEIBNER F, BÜTTNER D. Functional characterization of VirB/VirD4 and Icm/Dot type IV secretion systems from the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas euvesicatoria*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1203159.
- [12] FU JQ, LI PW, GUAN HX, HUANG D, SONG L, OUYANG SY, LUO ZQ. *Legionella pneumophila* temporally regulates the activity of ADP/ATP translocases by reversible ADP-ribosylation[J]. *mLife*, 2022, 1(1): 51-65.
- [13] 林念念, 甄向凯, 欧阳松应. 磷酸化修饰介导的病原微生物致病机制研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2024, 40(1): 14-22, 33.
- [14] LIN NN, ZHEN XK, OUYANG SY. Study on the pathogenic mechanism mediated by phosphorylation modification-in pathogenic microorganisms[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2024, 40(1): 14-22, 33 (in Chinese).
- [15] 刘子赫, 吴书娴, 甄向凯. 嗜肺军团菌效应蛋白 Lpg1972 与 CNOT7 相互作用研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2024, 40(1): 23-33.
- [16] LIU ZH, WU SX, ZHEN XK. Interaction of *Legionella pneumophila* effector protein Lpg1972 with CNOT7[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2024, 40(1): 23-33 (in Chinese).
- [17] SOUZA DP, OKA GU, ALVAREZ-MARTINEZ CE, BISSON-FILHO AW, DUNGER G, HOBEIKA L, CAVALCANTE NS, ALEGRIA MC, BARBOSA LRS, SALINAS RK, GUZZO CR, FARAH CS. Bacterial killing via a type IV secretion system[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6453.
- [18] OKA GU, SOUZA DP, CENENS W, MATSUYAMA BY, CARDOSO MVC, OLIVEIRA LC, Da SILVA LIMA F, CUCCOVIA IM, GUZZO CR, SALINAS RK, FARAH CS. Structural basis for effector recognition by an antibacterial type IV secretion system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(1): e2112529119.
- [19] OKA GU, SOUZA DP, SGRO GG, GUZZO CR, DUNGER G, FARAH CS. *Xanthomonas* immunity proteins protect against the *Cis*-toxic effects of their cognate T4SS effectors[J]. *EMBO Reports*, 2024, 25(3): 1436-1452.
- [20] SHEN X, YANG ZX, LI ZH, XIONG D, LIAO JX, HE WM, SHEN DY, SHAO XL, NIU B, HE YX, GAO YG,

- QIAN GL. Identification of atypical T4SS effector proteins mediating bacterial defense[J]. *mLife*, 2023, 2(3): 295-307.
- [19] SHEN X, WANG BX, YANG ND, ZHANG LL, SHEN DY, WU HJ, DONG Y, NIU B, CHOU SH, PUOPOLO G, FAN JQ, QIAN GL. *Lysobacter enzymogenes* antagonizes soilborne bacteria using the type IV secretion system[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(8): 4673-4688.
- [20] FAN EG, CHAUHAN N, GUPTA UDATHA DK, LEO JC, LINKE D. Type V secretion systems in bacteria[J/OL]. *Microbiology Spectrum*, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0009-2015.
- [21] MEUSKENS I, SARAGLIADIS A, LEO JC, LINKE D. Type V secretion systems: an overview of passenger domain functions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1163.
- [22] GUERIN J, BOTOS I, ZHANG ZJ, LUNDQUIST K, GUMBART JC, BUCHANAN SK. Structural insight into toxin secretion by contact-dependent growth inhibition transporters[J]. *eLife*, 2020, 9: e58100.
- [23] RUHE ZC, LOW DA, HAYES CS. Bacterial contact-dependent growth inhibition[J]. *Trends in Microbiology*, 2013, 21(5): 230-237.
- [24] WILLETT JLE, GUCINSKI GC, FATHERREE JP, LOW DA, HAYES CS. Contact-dependent growth inhibition toxins exploit multiple independent cell-entry pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(36): 11341-11346.
- [25] MYERS-MORALES T, ELIZABETH OATES A, BYRD MS, GARCIA EC. *Burkholderia cepacia* complex contact-dependent growth inhibition systems mediate interbacterial competition[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(12): e00012-19.
- [26] GUCINSKI GC, MICHALSKA K, GARZA-SÁNCHEZ F, ESCHENFELDT WH, STOLS L, NGUYEN JY, GOULDING CW, JOACHIMIAK A, HAYES CS. Convergent evolution of the barnase/EndoU/colicin/ReLE (BECR) fold in antibacterial tRNase toxins[J]. *Structure*, 2019, 27(11): 1660-1674.e5.
- [27] BARTELLI NL, SUN S, GUCINSKI GC, ZHOU HJ, SONG K, HAYES CS, DAHLQUIST FW. The cytoplasm-entry domain of antibacterial CdiA is a dynamic α -helical bundle with disulfide-dependent structural features[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(17): 3203-3216.
- [28] KAUNDAL S, DEEP A, KAUR G, THAKUR KG. Molecular and biochemical characterization of YeeF/YezG, a polymorphic toxin-immunity protein pair from *Bacillus subtilis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 95.
- [29] WÄNESKOG M, HALVORSEN T, FILEK K, XU FF, HAMMARLÖF DL, HAYES CS, BRAATEN BA, LOW DA, POOLE SJ, KOSKINIEMI S. *Escherichia coli* EC93 deploys two plasmid-encoded class I contact-dependent growth inhibition systems for antagonistic bacterial interactions[J]. *Microbial Genomics*, 2021, 7(3): mgen000534.
- [30] JONES AM, VIRTANEN P, HAMMARLÖF D, ALLEN WJ, COLLINSON I, HAYES CS, LOW DA, KOSKINIEMI S. Genetic evidence for SecY translocon-mediated import of two contact-dependent growth inhibition (CDI) toxins[J]. *mBio*, 2021, 12(1): e03367-20.
- [31] WANG J, YASHIRO Y, SAKAGUCHI Y, SUZUKI T, TOMITA K. Mechanistic insights into tRNA cleavage by a contact-dependent growth inhibitor protein and translation factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(8): 4713-4731.
- [32] CHEN CL, JANAPATLA RP, DUDEK A, CHEN YR, LEE HY, CHIU CH. Functional characterization and clinical implication of a novel epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* genetic marker[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2023, 62(2): 106879.
- [33] TRAN TD, LEE SI, HNASKO R, MCGARVEY JA. Biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 by *Enterobacter asburiae* AEB30 on intact cantaloupe melons[J]. *Microbial Biotechnology*, 2024, 17(3): e14437.
- [34] RUHE ZC, SUBRAMANIAN P, SONG K, NGUYEN JY, STEVENS TA, LOW DA, JENSEN GJ, HAYES CS. Programmed secretion arrest and receptor-triggered toxin export during antibacterial contact-dependent growth inhibition[J]. *Cell*, 2018, 175(4): 921-933.e14.
- [35] HAYES CS, KOSKINIEMI S, RUHE ZC, POOLE SJ, LOW DA. Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014, 4(2): a010025.
- [36] IKRYANNIKOVA LN, KURBATOV LK, GOROKHOVETS NV, ZAMYATNIN AA Jr. Contact-dependent growth inhibition in bacteria: do not get too close![J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7990.
- [37] de GREGORIO E, ZARRILLI R, Di NOCERA PP. Contact-dependent growth inhibition systems in *Acinetobacter*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 154.
- [38] LI H, TAN YJ, ZHANG DP. Genomic discovery and structural dissection of a novel type of polymorphic toxin system in gram-positive bacteria[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 4517-4531.
- [39] CUTHBERT BJ, HAYES CS, GOULDING CW. Functional and structural diversity of bacterial contact-dependent growth inhibition effectors[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 866854.
- [40] JONES AM, GARZA-SÁNCHEZ F, SO J, HAYES CS, LOW DA. Activation of contact-dependent antibacterial tRNase toxins by translation elongation factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(10): E1951-E1957.
- [41] KNIZEWSKI L, KINCH LN, GRISHIN NV, RYCHLEWSKI L, GINALSKI K. Realm of PD-(D/E)XK nuclease superfamily revisited: detection of novel families with modified transitive meta profile searches[J]. *BMC Structural Biology*, 2007, 7: 40.
- [42] MORSE RP, NIKOLAKAKIS KC, WILLETT JLE, GERRICK E, LOW DA, HAYES CS, GOULDING CW. Structural basis of toxicity and immunity in contact-dependent growth inhibition (CDI) systems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(52): 21480-21485.
- [43] JOHNSON PM, GUCINSKI GC, GARZA-SÁNCHEZ F, WONG T, HUNG LW, HAYES CS, GOULDING CW. Functional diversity of cytotoxic tRNase/immunity protein complexes from *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(37): 19387-19400.
- [44] CUTHBERT BJ, BURLEY KH, GOULDING CW.

- Introducing the new bacterial branch of the RNase A superfamily[J]. *RNA Biology*, 2018, 15(1): 9-12.
- [45] ALLEN JP, OZER EA, MINASOV G, SHUVALOVA L, KIRYUKHINA O, SATCHELL KJF, HAUSER AR. A comparative genomics approach identifies contact-dependent growth inhibition as a virulence determinant[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(12): 6811-6821.
- [46] GELLER AM, SHALOM M, ZLOTKIN D, BLUM N, LEVY A. Identification of type VI secretion system effector-immunity pairs using structural bioinformatics[J]. *Molecular Systems Biology*, 2024, 20(6): 702-718.
- [47] BONGIOVANNI TR, LATARIO CJ, Le CRAS Y, TRUS E, ROBITAILLE S, SWARTZ K, SCHMIDTKE D, VINCENT M, KOSTA A, ORTH J, STENGEL F, PELLARIN R, ROCHA EPC, ROSS BD, DURAND E. Assembly of a unique membrane complex in type VI secretion systems of *Bacteroidota*[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 429.
- [48] LIN L, LEZAN E, SCHMIDT A, BASLER M. Abundance of bacterial type VI secretion system components measured by targeted proteomics[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2584.
- [49] ABBY SS, CURY J, GUGLIELMINI J, NÉRON B, TOUCHON M, ROCHA EPC. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23080.
- [50] 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.
- [51] BERNI B, SOSCIA C, DJERMOUN S, IZE B, BLEVES S. A type VI secretion system trans-Kingdom effector is required for the delivery of a novel antibacterial toxin in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1218.
- [52] JANA B, FRIDMAN CM, BOSIS E, SALOMON D. A modular effector with a DNase domain and a marker for T6SS substrates[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3595.
- [53] CRISAN CV, CHANDE AT, WILLIAMS K, RAGHURAM V, RISHISHWAR L, STEINBACH G, WATVE SS, YUNKER P, KING JORDAN I, HAMMER BK. Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 163.
- [54] WOOD TE, HOWARD SA, FÖRSTER A, NOLAN LM, MANOLI E, BULLEN NP, YAU HCL, HACHANI A, HAYWARD RD, WHITNEY JC, VOLLMER W, FREEMONT PS, FILLOUX A. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS delivers a periplasmic toxin that disrupts bacterial cell morphology[J]. *Cell Reports*, 2019, 29(1): 187-201.e7.
- [55] WEN HY, LIU GF, GENG Z, ZHANG H, LI YH, SHE Z, DONG YH. Structure and SAXS studies unveiled a novel inhibition mechanism of the *Pseudomonas aeruginosa* T6SS TseT-TsiT complex[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 188: 450-459.
- [56] PEI TT, LI H, LIANG XY, WANG ZH, LIU GF, WU LL, KIM H, XIE ZP, YU M, LIN SJ, 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.
- [57] 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 1, d-transpeptidases targets the peptidoglycan[J]. *Cell Reports*, 2020, 31(12): 107813.
- [58] MA SY, DONG YH, WANG NN, LIU J, LU CP, LIU YJ. Identification of a new effector-immunity pair of *Aeromonas hydrophila* type VI secretion system[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 71.
- [59] YADAV SK, MAGOTRA A, GHOSH S, KRISHNAN A, PRADHAN A, KUMAR R, DAS J, SHARMA M, JHA G. Immunity proteins of dual nuclease T6SS effectors function as transcriptional repressors[J]. *EMBO Reports*, 2021, 22(6): e51857.
- [60] SONG L, PAN JF, YANG YT, ZHANG ZX, CUI R, JIA SK, WANG Z, YANG CX, 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.
- [61] LIANG XY, PEI TT, WANG ZH, XIONG WL, WU LL, XU P, LIN SJ, 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(12): e0043521.
- [62] LOPEZ J, LE NH, MOON KH, SALOMON D, BOSIS E, FELDMAN MF. Formylglycine-generating enzyme-like proteins constitute a novel family of widespread type VI secretion system immunity proteins[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(21): e0028121.
- [63] WANG SY, GENG Z, ZHANG H, SHE Z, DONG YH. The *Pseudomonas aeruginosa* PAAR2 cluster encodes a putative VRR-NUC domain-containing effector[J]. *The FEBS Journal*, 2021, 288(19): 5755-5767.
- [64] YU MD, WANG YC, HUANG CJ, MA LS, LAI EM. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a versatile antibacterial strategy to increase its competitiveness[J]. *Journal of Bacteriology*, 2021, 203(3): e00490-20.
- [65] CRISAN CV, CHANDRASHEKAR H, EVERLY C, STEINBACH G, HILL SE, YUNKER PJ, LIEBERMAN RR, HAMMER BK. A new contact killing toxin permeabilizes cells and belongs to a broadly distributed protein family[J]. *mSphere*, 2021, 6(4): e0031821.
- [66] LIU Y, WANG JN, ZHANG Z, WANG F, GONG Y, SHENG DH, LI YZ. Two PAAR proteins with different C-terminal extended domains have distinct ecological functions in *Myxococcus xanthus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(9): e00080-21.
- [67] NOLAN LM, CAIN AK, CLAMENS T, CHRISTOPHER D, FURNISS R, MANOLI E, SAINZ-POLO MA, DOUGAN G, ALBESA-JOVÉ D, PARKHILL J, MAVRIDOU DAI, FILLOUX A. Identification of Tse8 as a Type VI secretion system toxin from *Pseudomonas aeruginosa* that targets the bacterial transamidosome to inhibit protein synthesis in prey cells[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(9): 1199-1210.
- [68] AMAYA FA, BLONDEL CJ, BARROS-INFANTE MF, RIVERA D, MORENO-SWITT AI, SANTIVIAGO CA, PEZOA D. Identification of type VI secretion systems

- effector proteins that contribute to interbacterial competition in *Salmonella* Dublin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 811932.
- [69] REN AM, JIA ML, LIU JH, ZHOU T, WU LW, DONG T, CAI Z, QU JX, LIU Y, YANG L, ZHANG YD. Acquisition of T6SS effector TseL contributes to the emerging of novel epidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(1): e0330822.
- [70] HESPANHOL JT, SANCHEZ-LIMACHE DE, NICASTRO GG, MEAD L, LLONTOP EE, CHAGAS-SANTOS G, FARAH CS, de SOUZA RF, GALHARDO RDS, LOVERING AL, BAYER-SANTOS E. Antibacterial T6SS effectors with a VRR-Nuc domain are structure-specific nucleases[J]. *eLife*, 2022, 11: e82437.
- [71] LI YY, YAN XJ, TAO Z. Two type VI secretion DNase effectors are utilized for interbacterial competition in the fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 869278.
- [72] HUANG YM, HAN Y, LI ZP, LI XR, LI Z, LIU P, LIU XS, CHENG Q, FAN FX, KAN B, LIANG WL. TssI2-TsiI2 of *Vibrio fluvialis* VfiT6SS2 delivers pesticin domain-containing periplasmic toxin and cognate immunity that modulates bacterial competitiveness[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2136460.
- [73] LE TTH, KELLENBERGER C, BOYER M, SANTUCCI P, FLAUGNATTI N, CASCALES E, ROUSSEL A, CANAAN S, JOURNET L, CAMBILLAU C. Activity and crystal structure of the adherent-invasive *Escherichia coli* Tle3/Tli3 T6SS effector/immunity complex determined using an AlphaFold2 predicted model[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1740.
- [74] BOSCH DE, ABBASIAN R, PARAJULI B, BROOK PETERSON S, MOUGOUS JD. Structural disruption of Ntox15 nuclease effector domains by immunity proteins protects against type VI secretion system intoxication in Bacteroidales[J]. *mBio*, 2023, 14(4): e0103923.
- [75] JENSEN SJ, RUHE ZC, WILLIAMS AF, NHAN DQ, GARZA-SANCHEZ F, LOW DA, HAYES CS. Paradoxical activation of a type VI secretion system (T6SS) phospholipase effector by its cognate immunity protein[J]. *bioRxiv*, 2023: 2023.03.28.534661.
- [76] LUO JJ, CHU X, JIE J, SUN Y, GUAN QT, LI D, LUO ZQ, SONG L. *Acinetobacter baumannii* kills fungi via a type VI DNase effector[J]. *mBio*, 2023, 14(1): e0342022.
- [77] DURÁN D, VAZQUEZ-ARIAS D, BLANCO-ROMERO E, GARRIDO-SANZ D, REDONDO-NIETO M, RIVILLA R, MARTÍN M. An orphan VrgG auxiliary module related to the type VI secretion systems from *Pseudomonas ogarae* F113 mediates bacterial killing[J]. *Genes*, 2023, 14(11): 1979.
- [78] LIU M, WANG H, LIU Y, TIAN M, WANG Z, SHU RD, ZHAO MY, CHEN WD, WANG H, WANG H, FU Y. The phospholipase effector Tle1^{Vc} promotes *Vibrio cholerae* virulence by killing competitors and impacting gene expression[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2241204.
- [79] BOURIGAULT Y, DUPONT CA, DESJARDINS JB, DOAN T, BOUTEILLER M, Le GUENNO H, CHEVALIER S, BARBEY C, LATOUR X, CASCALES E, MERIEAU A. *Pseudomonas fluorescens* MFE01 delivers a putative type VI secretion amidase that confers biocontrol against the soft-rot pathogen *Pectobacterium atrosepticum*[J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25(11): 2564-2579.
- [80] de SOUSA BFS, DOMINGO-SERRANO L, SALINERO-LANZAROTE A, PALACIOS JM, REY L. The T6SS-dependent effector Re78 of *Rhizobium etli* Mim1 benefits bacterial competition[J]. *Biology*, 2023, 12(5): 678.
- [81] LIU M, ZHAO MY, WANG H, WANG ZH, WANG Z, LIU Y, LI YP, DONG T, FU Y. Pesticin-like effector VgrG3^{CP} targeting peptidoglycan delivered by the type VI secretion system contributes to *Vibrio cholerae* interbacterial competition[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(1): e0426722.
- [82] SONG L, XU L, WU T, SHI ZK, KAREEM HA, WANG Z, DAI QY, GUO CH, PAN JF, YANG MM, WEI XM, WANG Y, WEI GH, SHEN XH. Trojan horselike T6SS effector TepC mediates both interference competition and exploitative competition[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrad028.
- [83] YANG LL, JIA SK, SUN SH, WANG L, ZHAO BB, ZHANG MS, YIN YL, YANG MM, FULANO AM, SHEN XH, PAN JF, WANG Y. A pyocin-like T6SS effector mediates bacterial competition in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(6): e0427823.
- [84] YU X, YAN YB, ZENG J, LIU YX, SUN XW, WANG ZY, LI L. T6SS nuclease effectors in *Pseudomonas syringae* act as potent antimicrobials in interbacterial competition[J]. *Journal of Bacteriology*, 2024, 206(6): e0027323.
- [85] JIANG XL, LI HZ, MA JY, LI H, MA X, TANG YQ, LI JJ, CHI X, DENG Y, ZENG S, LIU Z. Role of Type VI secretion system in pathogenic remodeling of host gut microbiota during *Aeromonas veronii* infection[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrac053.
- [86] ZHAO XZ, GAO L, ALI Q, YU CJ, YUAN BQ, HUANG H, LONG JY, GU Q, WU HJ, GAO XW. A type VI secretion system effector TseG of *Pantoea ananatis* is involved in virulence and antibacterial activity[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2024, 25(3): e13442.
- [87] KAPITEIN N, MOGK A. Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 52-58.
- [88] 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[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 508-512.
- [89] FU Y, HO BT, MEKALANOS JJ. Tracking *Vibrio cholerae* cell-cell interactions during infection reveals bacterial population dynamics within intestinal microenvironments[J]. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(2): 274-281.e2.
- [90] ZHAO WJ, CARO F, ROBINS W, MEKALANOS JJ. Antagonism toward the intestinal microbiota and its effect on *Vibrio cholerae* virulence[J]. *Science*, 2018, 359(6372): 210-213.
- [91] HSIEH PF, LU YR, LIN TL, LAI LY, WANG JT. *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system

- contributes to bacterial competition, cell invasion, type-1 fimbriae expression, and *in vivo* colonization[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 219(4): 637-647.
- [92] LE NH, PINEDO V, LOPEZ J, CAVA F, FELDMAN MF. Killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by a bifunctional cell wall-targeting T6SS effector[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(40): e2106555118.
- [93] FLAUGNATTI N, LE TTH, CANAAN S, ASCHTGEN MS, NGUYEN VS, BLANGY S, KELLENBERGER C, ROUSSEL A, CAMBILLAU C, CASCALES E, JOURNET L. A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 99(6): 1099-1118.
- [94] SANA TG, BAUMANN C, MERDES A, SOSCIA C, RATTEI T, HACHANI A, JONES C, BENNETT KL, FILLOUX A, SUPERTI-FURGA G, VOULHOX R, BLEVES S. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 into epithelial cells is promoted by interaction of a T6SS effector with the microtubule network[J]. *mBio*, 2015, 6(3): e00712.
- [95] YANG XB, LONG MX, SHEN XH. Effector-immunity pairs provide the T6SS nanomachine its offensive and defensive capabilities[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1009.
- [96] JIANG F, WANG X, WANG B, CHEN LH, ZHAO ZD, WATERFIELD NR, YANG GW, JIN Q. The *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion PGAP1-like effector induces host autophagy by activating endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Reports*, 2016, 16(6): 1502-1509.
- [97] 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*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(11): E2233-E2242.
- [98] KANAREK K, FRIDMAN CM, BOSIS E, SALOMON D. The RIX domain defines a class of polymorphic T6SS effectors and secreted adaptors[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 4983.
- [99] GARRETT SR, HIGGINSON AB, PALMER T. Multiple variants of the type VII secretion system in Gram-positive bacteria[J]. *microLife*, 2024, 5: uqae013.
- [100] KANAREK K, FRIDMAN CM, BOSIS E, SALOMON D. A new class of polymorphic T6SS effectors and tethers[EB/OL]. *bioRxiv*, 2022. DOI: 10.1101/2022.10.27.514009.
- [101] HOUBEN ENG, KOROTKOV KV, BITTER W. Take five: type VII secretion systems of *Mycobacteria*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2014, 1843(8): 1707-1716.
- [102] RIVERA-CALZADA A, FAMELIS N, LLORCA O, GEIBEL S. Type VII secretion systems: structure, functions and transport models[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(9): 567-584.
- [103] KLEIN TA, SHAH PY, GKRAKOPOULOU P, GREBENC DW, KIM Y, WHITNEY JC. Structure of a tripartite protein complex that targets toxins to the type VII secretion system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(3): e2312455121.
- [104] FAMELIS N, GEIBEL S, van TOL D. Mycobacterial type VII secretion systems[J]. *Biological Chemistry*, 2023, 404(7): 691-702.
- [105] FAMELIS N, RIVERA-CALZADA A, DEGLIESPOSTI G, WINGENDER M, MIETRACH N, MARKSKEHEL J, FERNANDEZ-LEIRO R, BÖTTCHER B, SCHLOSSER A, LLORCA O, GEIBEL S. Architecture of the mycobacterial type VII secretion system[J]. *Nature*, 2019, 576(7786): 321-325.
- [106] HOLBERGER LE, GARZA-SÁNCHEZ F, LAMOUREUX J, LOW DA, HAYES CS. A novel family of toxin/antitoxin proteins in *Bacillus* species[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(2): 132-136.
- [107] CAO ZP, GUILLERMINA CASABONA M, KNEUPER H, CHALMERS JD, PALMER T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria[J]. *Nature Microbiology*, 2016, 2: 16183.
- [108] GARRETT SR, MARIANO G, PALMER T. Genomic analysis of the progenitor strains of *Staphylococcus aureus* RN6390[J]. *Access Microbiology*, 2022, 4(11): acmi000464.v3.
- [109] ULHUQ FR, GOMES MC, DUGGAN GM, GUO MM, MENDONCA C, BUCHANAN G, CHALMERS JD, CAO ZP, KNEUPER H, MURDOCH S, THOMSON S, STRAHL H, TROST M, MOSTOWY S, PALMER T. A membrane-depolarizing toxin substrate of the *Staphylococcus aureus* type VII secretion system mediates intraspecies competition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(34): 20836-20847.
- [110] WHITNEY JC, PETERSON SB, KIM J, PAZOS M, VERSTER AJ, RADEY MC, KULASEKARA HD, CHING MQ, BULLEN NP, BRYANT D, GOO YA, SURETTE MG, BORENSTEIN E, VOLLMER W, MOUGOUS JD. A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria[J]. *eLife*, 2017, 6: e26938.
- [111] KLEIN TA, PAZOS M, SURETTE MG, VOLLMER W, WHITNEY JC. Molecular basis for immunity protein recognition of a type VII secretion system exported antibacterial toxin[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(21): 4344-4358.
- [112] TEH WK, DING YC, GUBELLINI F, FILLOUX A, POYART C, GIVSKOV M, DRAMSI S. Characterization of TelE, a T7SS LXG effector exhibiting a conserved C-terminal glycine zipper motif required for toxicity[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0148123.
- [113] KIM S, JEON TJ, OBERAI A, YANG D, SCHMIDT JJ, BOWIE JU. Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(40): 14278-14283.
- [114] NUNES-ALVES C. Bacterial secretion: a trans-Kingdom effector[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(7): 460-461.
- [115] BERNAL P. T6SS-effector hunters uncover PIX: a novel delivery/marker domain[J]. *Trends in Microbiology*, 2024, 32(7): 617-619.