



细菌 VI 型分泌系统调节因素的研究进展

李梦石 邹清华*

北京大学医学部基础医学院病原生物学系 北京 100191

摘要: 细菌的 VI 型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)是一种新发现的分泌系统,在病原菌对宿主黏附、侵入及杀伤等方面均发挥了重要作用。目前的研究主要集中在 T6SS 在细菌致病、细菌间竞争等作用方面。然而对于其调控因素的研究尚处于初级阶段。对于大多数细菌而言, T6SS 的表达并不是恒定的。现已发现温度、渗透压、抗生素、离子等环境因素均可调节 T6SS。此外,在分子层面, H-NS 蛋白、RpoN 转录因子、c-di-GMP 等也可发挥对 T6SS 的调节作用。在这些调控因素的调节下,细菌可以适时地开启或关闭其 T6SS 的表达,从而更好地感知并适应环境。对 T6SS 调控因素的研究对于充分认识细菌致病性并进行有效控制至关重要。本文将对调节 T6SS 的环境因素与调节因子做一综述。

关键词: VI 型分泌系统, 调节, 环境因素, 调控因子

Research progress in the regulatory factors of the bacteria type VI secretion system

LI Meng-Shi ZOU Qing-Hua*

Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Abstract: The type VI secretion system (T6SS) of bacteria is a newly discovered secretion system. It plays an important role in the adhesion and invasion of bacteria pathogens to their host and destruction of their host. Currently, most studies focused on the functions of T6SS in bacteria pathogenesis, bacterial competition, et al, but the research on its regulatory factors is still in the preliminary stage. For most bacteria, the expression of T6SS is not steady, which could be regulated by environmental factors such as temperature, osmotic pressure, antibiotics and ions. At the molecular level, H-NS protein, RpoN transcription factor and c-di-GMP may also help regulate T6SS. Under the regulation of these multiple factors, the expression of T6SS can be on and off so as to better adapt to the environment. Hence, it is very important to understand comprehensively the regulatory factors of T6SS to fully understand the pathogenicity of bacteria. This review summarizes the environmental factors and regulatory factors that regulate T6SS.

Keywords: Type VI secretion system (T6SS), Regulation, Environmental factors, Regulatory factors

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81572041)

*Corresponding author: Tel: 86-10-82805070; E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

Received: 07-02-2020; Accepted: 17-04-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(81572041)

*通信作者: Tel: 010-82805070; E-mail: zouqinghua@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-07; 接受日期: 2020-04-17; 网络首发日期: 2020-05-09

细菌的致病过程需要一系列与黏附、侵袭以及毒力蛋白分泌等相关的毒力因子的协同作用, VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)便是这些毒力因子中的一个。越来越多的研究表明T6SS在细菌致病过程中发挥了重要作用, 从而使其成为近些年学术界研究的热点。T6SS是一种由膜复合物(membrane complex)、底板(baseplate)及尾管/鞘复合物(tail tube/sheath complex)三部分组成的多蛋白复合结构, 其利用类似弹簧的机制将效应物分泌到原核以及真核细胞中^[1]。这些效应物在病原菌对宿主细胞的黏附、侵入以及对宿主的杀伤等方面发挥了重要作用。细菌可利用T6SS分泌作用于真核细胞的效应物, 也可分泌能杀伤其他细菌的效应因子, 从而使自己获得生存优势而引起疾病^[1]。

然而, T6SS并非在细菌生命过程中的每时每刻都发挥作用, 其功能的实施需要多个蛋白进行有机的组装和分泌, 这些蛋白的永久表达和分泌无疑是一种浪费, 所以所有蛋白都在严密的调控下进行表达, 并时刻随周围环境的变化而进行相应的改变, 以便有条不紊地发挥作用^[1-2]。因此, 对T6SS调控因素的研究有助于更好地认识细菌的致病性, 从而对其进行控制。目前对细菌T6SS的分泌调节方面所做的研究仍然有限, 相关的中文综述也较少。本文对目前研究中T6SS常见的调控因素进行归纳与整理, 并试图概括T6SS的调控与细菌致病性之间的关系。

1 调节T6SS的环境因素

细菌往往需要通过适应不同的生存环境来实现生长。研究发现T6SS可能在细菌适应环境中发挥了一定作用, 这主要体现在一些环境因素对T6SS的调节上。

1.1 温度及渗透压

温度和渗透压均是常见的环境信号, 研究发现细菌会在类似于其自然生存环境的条件下表达T6SS。例如鼠疫耶尔森氏菌T6SS基因簇的表达在

26 °C被诱导而在37 °C被抑制^[3]。鼠疫耶尔森氏菌在自然界是以鼠-蚤-鼠的形式循环传播的, 在漫长的疫病间歇期内, 鼠疫耶尔森氏菌主要以蚤类单独保存的形式存在, 这种低温环境类似于蚤类体内的温度。在假结核耶尔森氏菌基因组中, 相比于37 °C, 28 °C可更有效诱导T6SS4的表达^[4], 与鼠疫耶尔森氏菌的结果类似, 假结核耶尔森氏菌T6SS4的表达条件类似于其环境存活条件。对水生细菌而言, 常见的生存环境是20–30 °C的河流或海洋环境。河流弧菌VfT6SS2在25 °C及30 °C条件下被功能性激活, 而在37 °C条件下则不具备活性^[5]。对于霍乱弧菌O1菌株A1552, 其T6SS效应蛋白Hcp分泌的最佳温度为23 °C^[6]。除了温度, 渗透压对细菌也是一种重要的环境条件。研究发现霍乱弧菌在类似于其河口栖息地的高渗环境(255 mmol/L蔗糖或340 mmol/L NaCl)中可以分泌Hcp^[7]。一些生活周期不同阶段有不同生存环境的细菌可以启动不同的T6SS以适应各种环境。副溶血弧菌具有两种T6SS系统——T6SS1及T6SS2, T6SS1在高盐度培养基及温暖(30 °C)条件下最活跃; 而T6SS2在寒冷(23 °C)或温暖(30 °C)及低盐(LB培养基)条件下活性最高^[8]。T6SS1的活跃条件类似于夏季的海洋条件, 而T6SS2的活跃条件类似于海洋动物体内环境, 二者皆为副溶血弧菌的不同生存环境。本课题组对鼠伤寒沙门氏菌的T6SS研究发现, 其T6SS的两个Hcp效应蛋白受温度和盐浓度的调节不同, Hcp1在23 °C时高表达, 在高盐环境中表达受抑制, 而Hcp2在37 °C时高表达, 在高盐环境中不表达, 这些结果提示鼠伤寒沙门氏菌T6SS可能在不同的环境中通过调节不同的效应蛋白的表达发挥不同的作用^[9]。

1.2 生长时相

研究发现对于一些微生物而言, T6SS的分泌具有生长时相依赖性。Ishikawa等将霍乱弧菌O1菌株A1552在LB培养基中培养, 并通过免疫印迹分析细菌不同生长期Hcp的表达水平, 结果发现, 在 OD_{600} 为1.0时检测到了Hcp的表达, 在 OD_{600}

为 2.0 时检测到了最高的 Hcp 水平, 而无法在对数期其他时间或培养过夜后的稳定后期的上清液中检测出 Hcp, 究其原因是 Hcp 表达缺失及表达产物降解(被某些稳定期表达蛋白酶降解)共同导致^[10]。Hcp 仅在细菌对数生长期的某些特定时刻表达, 这种现象也存在于其他一些微生物中。以河流弧菌为例, Huang 等将河流弧菌 85003 菌株在不同的生长时刻(OD_{600} 为 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.8 及过夜)进行检测, 结果显示, 除培养过夜条件外, 其他时刻均可检测到 *hcp* 基因表达, 但 Hcp 的分泌仅可在 OD_{600} 为 1.0、1.5、2.0 时检测到。然而培养过夜后细菌群体进入稳定期, Hcp 的表达可能已经关闭或 Hcp 被蛋白酶水解^[5]。在不同的细菌中, 生长周期现象稍有不同。Sheng 等发现, 在鱼类溶藻弧菌生长的对数期与稳定期均可检测到 *hcp* 基因的表达, 但随着培养时间的延长(2、4、8、12 h), 其表达水平明显降低^[11]。然而, 无论哪个时间均无法在上清液中检测到分泌出的 Hcp 蛋白。

1.3 抗生素

研究表明, 多种类别的亚抑制浓度抗生素可以充当信号分子, 激活或抑制大量细菌基因的转录, 例如亚抑制性甲氧苄啶诱导泰国芽孢杆菌产生 100 多种次级代谢产物^[12]。研究发现当肺炎克雷伯氏菌 HS11286 菌株暴露于亚抑制浓度的 β -内酰胺类抗生素(美罗培南 4 mg/L 或头孢他啶 32 mg/L) 时, 其 T6SS 会被诱导表达, 而在无抗生素的 LB 培养基或 M9 培养基培养时 T6SS 无活性; 除此之外, 用阿普霉素也可以得到相似的结果, 说明 β -内酰胺等抗生素可以诱导 T6SS 的分泌^[13]。同样, 亚抑制浓度的卡那霉素可以诱导铜绿假单胞菌 H1-T6SS 的表达, 这种诱导效果在卡那霉素浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最大, 但其并未促进 T6SS 的分泌, 这种诱导需要功能性的 LadS/Gac/Rsm 途径^[14]。可能的推测是, 在抗生素存在的条件下, H1-T6SS 仅仅被组装, 但需要其他信号(如细胞间的接触)来激活分泌。Losada 等发现, 亚抑制浓度的喹诺酮类抗生素激活了类鼻疽伯克氏菌 T6SS-2 的表达;

亚抑制浓度环丙沙星还增加了其 T6SS-3、T6SS-4、T6SS-6 的表达, 但具体的分子机制仍有待研究^[15]。综合以上报道, 我们可以提出一个假设, 即在有抗生素和生存竞争等环境压力存在的情况下, 细菌可以通过表达 T6SS 来对抗环境压力, 从而增强自身的生长优势, 比如前文提到 β -内酰胺类抗生素可诱导肺炎克雷伯菌 T6SS 表达, 并发挥杀灭作用以获得生长优势^[13]。

然而, 对于抗生素的作用也存在不同的实验证据。Weber 等的结果显示, 对于鲍曼不动杆菌, 在其感染患者(尤其是正在接受抗菌治疗的患者)期间, 抑制 T6SS 表达或删除该基因簇对细菌生长是有利的, 因为鲍曼不动杆菌不太可能在接受治疗的患者体内(高抗生素环境)遇到竞争对手, 因此无需 T6SS 介导杀伤, 此时节约更多的能量以表达抗生素抗性基因无疑是有益的^[16]。相关的证据也陆续被发现, 例如在一些鲍曼不动杆菌临床分离株中, T6SS 基因簇被发现缺失^[17]。此外, 多药耐药株往往会抑制 T6SS 表达^[18-19], 这可能是由于当细菌同时携带几个抗生素抗性基因时, 表达 T6SS 的成本过于高昂。

1.4 离子/分子

细菌需要启动不同的生存对策以应对不同的环境, 而不同的环境中往往有不同的离子/分子浓度, 因此, 一些细菌进化出感知机制去响应环境中某种特定离子/分子浓度的变化, 以启动不同的基因表达。已发现一些离子/分子会影响多种细菌 T6SS 的表达。

1.4.1 铁离子

环境中铁离子对于 T6SS 的作用可以通过铁摄取调节蛋白(Fur)实现的, 这是一种二聚体金属依赖性 DNA 结合蛋白。Fe 可以通过 Fur 结合启动子 Fur 盒抑制 T6SS, 例如在迟钝爱德华菌中, Fur 直接与 T6SS 基因簇中第一个基因上游的启动子结合以抑制转录, 并且这种结合只能在高铁的环境中进行^[20]。铜绿假单胞菌 H2-T6SS 与鼠伤寒沙门菌 T6SS 核心组分 ClpV 均可受此途径调节^[21-22]。在肠

聚集性大肠杆菌的 T6SS 启动子中存在两个 Fur 盒, Fur 可与之结合降低 T6SS 转录。此外, 该启动子区域还存在 3 个 GATC 基序(可被 DNA 腺嘌呤甲基化酶 Dam 识别并甲基化), Fur 可抑制该基序的甲基化, 而该位点的甲基化可反过来抑制 Fur 与 Fur 盒的结合^[23]。

1.4.2 磷酸盐

磷是生物体中第六丰富的元素, 磷酸盐(Pi)是其体内存在的重要形式。已有研究表明, Pi 与铜绿假单胞菌、大肠杆菌、根瘤农杆菌、霍乱弧菌等细菌的毒性、生物膜形成、定殖能力等均有关系; Pi 在细菌内由 Pho 调节子感知与调控, 而 Pho 调节子又可由双组分系统控制^[24]。在迟钝爱德华菌中, 低 Pi 浓度会被 PhoR 感知, 这将导致 PhoR 自身磷酸化, 使得 PhoB 被进一步磷酸化, 磷酸化的 PhoB 暴露自身 DNA 结合位点与 T6SS 启动子 Pho 盒结合, 促进基因的转录; 而高 Pi (>4 $\mu\text{mol/L}$) 环境会使 Pst 系统(高亲和力磷酸盐特异性转运系统)与 PhoR 形成抑制复合物以阻止 PhoB 的活化^[20]。除了直接影响 T6SS 的转录以外, Pi 水平或许还可以通过 PhoB 间接影响 T6SS。已知在霍乱弧菌中, 低水平的 c-di-GMP 可以促进 T6SS 的表达^[25], 而 PhoB 可以影响细菌中 c-di-GMP 的水平, 这种影响直接导致了霍乱弧菌生物被膜形成及运动性的改变^[26]。

1.4.3 锌离子

Zn 对 T6SS 的影响主要通过 ZntR 与 Zur 两种途径进行。ZntR 是 MerR 家族转录调控因子, 在假结核耶尔森氏菌中, ZntR 可与 T6SS4 启动子区域结合以促进 T6SS4 的表达, 而 T6SS4 反过来也可以吸收环境中 Zn 以维持细菌的 ROS 稳态^[27]。与 Fur、Fur 盒类似, Zur 与 Zur 盒也在一些微生物中被发现^[28-30]。Zur 可与泰国芽孢杆菌 T6SS4 启动子前类似 Fur 盒的区域结合, 抑制其 T6SS4 基因(*icmF4*, *clpV4*, *hcp4*)表达^[31]。

2 调节 T6SS 的调控因子

2.1 H-NS 蛋白

H-NS 蛋白具有 N 端寡聚域和 C 端 DNA 结合域^[32], 既可以自体聚合, 也可以与 DNA 相结合。H-NS 蛋白通过识别高亲和力成核位点结合富含 AT 基序、带有弯曲的 DNA 序列, 然后在其上进行寡聚, 形成核蛋白丝, 这将使 DNA 被压缩, 或解卷为扩展的构象, 从而影响转录、DNA 折叠、基因组进化等^[33]。H-NS 主要负责约 5% 细菌基因组的沉默, 其中许多基因与细菌毒力相关。在副溶血弧菌中, H-NS 对该菌主要的毒力位点(T3SS1, Vp-PAI, T6SS2)均有直接的负向调节作用, 其可以识别 T6SS2 基因座中的 3 个操纵子, 每个 H-NS 结合位点均与靶操纵子的核心启动子区域重叠^[34]。H-NS 似乎还在低盐条件下抑制副溶血性弧菌的 T6SS1, 但并未发现 H-NS 介导温度依赖性 T6SS1 的抑制^[35]。此外, H-NS 介导环境因子对 T6SS 的影响也在肺炎克雷伯菌中被报道, 已在 3 种肺炎克雷伯菌的 T6SS 基因上游检测出了 H-NS 结合位点, 并有明确的实验证据指出 H-NS 与 NTUH-K2044 菌株 T6SS 成分 *tssD* 基因启动子结合并沉默了 TssD^[36]。来自巨噬细胞感染的证据则显示在感染早期肺炎克雷伯菌 H-NS 表达而 T6SS 表达下降^[37]。除此之外, 在鼠伤寒沙门氏菌中, H-NS 先与 SPI-6 T6SS 的两个操纵子启动子的高亲和力成核位点相结合, 然后从这些位点开始形成延伸的核蛋白丝, 占据上游和下游广泛的 DNA 区域^[38]。这种对 T6SS 的沉默模型也在爱德华菌属细菌中被发现, H-NS 介导了 DNA 发夹环的形成并捕获 RNA 聚合酶, 最终的结果是沉默 EvpX 蛋白家族成员(一种 T6SS 分泌蛋白家族, 具有毒力、介导侵袭等作用)^[39]。

2.2 双组分系统(two components system, TCS)

在细菌中, 周围环境变化所导致的基因表达改变经常是通过 TCS 的方式进行的。经典的 TCS 包括一个响应物理/化学变化的传感器蛋白及一个

同源调节蛋白, 传感器蛋白可以控制调节蛋白的磷酸化状态, 而调节蛋白通常是与 DNA 直接结合的转录激活/抑制因子, 调节蛋白磷酸化通常会增强其与 DNA 的亲合水平^[40-41]。当细菌经历某种 TCS 的诱导条件时, 磷酸化调节蛋白的水平会上升。TCS 对 T6SS 的作用已经在多种细菌中被发现并描述。如鱼类病原体迟钝爱德华菌, PhoR-PhoB 系统介导了环境中 Pi 对 T6SS 的调控; 当环境 Pi 含量下降时, PhoR 作为传感器蛋白被激活并被磷酸化, 随即将磷酸基团传递给 PhoB 使其磷酸化, 磷酸化的 PhoB 释放其原本结合的 DNA 区域, 这使得 Pho 启动子得以结合 DNA, 促进 T6SS 的转录^[20]。另一种爱德华菌——*Edwardsiella piscicida* 的致病性也受 TCS 影响, 其中 EsrA-EsrB 是对致病性最重要的 TCS, EsrB 通过结合 DNA 而促进 T3SS 及 T6SS 的表达^[42]。对于霍乱弧菌的研究显示, 其基因组共编码 52 种 TCS 的调节蛋白, 其中 VCA0566 基因编码的 VxrB 蛋白磷酸化对于激活 T6SS 表达 (包括 Hcp 分泌, 细菌间竞争等) 十分重要^[43]。VxrA 是 VxrB 上游的传感器蛋白, 但控制 VxrAB 表达与活性的信号及其如何整合进 T6SS 调节网络仍有待研究。霍乱弧菌的 T6SS 还受 ChiS 传感器蛋白的影响, 当 ChiS 感受到霍乱弧菌在几丁质表面生长的环境信号时, 其可以激活 TfoX 而促进 T6SS 表达, 这有利于霍乱弧菌在水生环境中的存活, 但 ChiS 下游的调节蛋白也仍未确定^[44]。在假结核耶尔森氏菌中, EnvZ-OmpR 可以响应薄膜损伤及高渗透压, 激活 T6SS-4 基因座的转录^[45]。除了动物病原体, TCS 也在植物病原体的 T6SS 中发挥作用, 如 VfmL-VfmH 在 *Dickeya zea* 中积极调节毒性基因, *vfmH* 的缺失突变株的 T1SS、T2SS、T3SS、T6SS 表达均会下降, 并且 T6SS 受到的影响最严重^[46]。此外, 对于根瘤农杆菌, 环境的酸性信号可以使 *exoR* 失去对传感器蛋白 ChvG 的物理接触抑制, ChvG 使调节蛋白 ChvI 磷酸化并结合 T6SS 启动子而促进表达, 该通路导致了细菌生长及根瘤形成^[47]。

2.3 RpoN 及 bEBP

RpoN (σ_{54} factor) 是一种细菌常用的转录调控因子, 可通过结合 DNA 启动子区域而引导 RNA 聚合酶以控制转录^[48]。RpoN 的作用需要其同源的细菌增强子结合蛋白 (bacterial enhancer-binding protein, bEBP) 协助, bEBP 先与启动子上游约 100–150 bp 的增强子结合 DNA 区域相互作用, 然后进行自身寡聚, 通过 DNA 弯折与 RpoN 直接接触作用, 水解 ATP 供能以帮助 RNA 聚合酶进行 DNA 的解链^[48-50]。在 T6SS 的调节方面, RpoN 及 bEBP 对不同菌种显示出不同的调节活性。*Pectobacterium atrosepticum*、*A. hydrophila*、*Marinomonas* 的 T6SS 均需要 RpoN 及其同源 bEBP 激活转录^[51]。同样地, bEBP 家族成员 VP1391 对副溶血弧菌 T6SS1 在海洋条件下具有活性十分重要^[8]。但正如前文所述, RpoN 及 bEBP 对 T6SS 的作用是双向的。以霍乱弧菌为例, 在 V52 菌株中, *hcp* 操纵子的表达需要 RpoN 及 VasH (一种 bEBP), 但该菌株主要 T6SS 基因簇的表达则不受其调控; 但在经典 O1 株及 E1 Tor O1 株中, *rpoN* 的突变导致 T6SS 基因簇表达的上调^[52], 可以推测在这两种菌株中, RpoN 对 T6SS 起到了负向调控作用。RpoN 及 bEBP 的双向调控作用甚至体现在同一种细菌的不同 T6SS 间。铜绿假单胞菌拥有 3 种 T6SS 系统 (H1-T6SS、H2-T6SS 和 H3-T6SS), 它们分别介导不同的生物作用。RpoN 可以抑制 H2-T6SS 及 H3-T6SS 右操纵子, 但却促进 H3-T6SS 左操纵子的表达, 分别位于 H2-T6SS 及 H3-T6SS 基因位点的基因 *sfa2* 及 *sfa3* 编码推定的 bEBP, 在 *sfa2* 突变体中, H2-T6SS 的表达上调了 3.7 倍, 这或许是 bEBP 对细菌 T6SS 抑制方面的又一个证据^[53]。

2.4 c-di-GMP

c-di-GMP 是在细菌机体中广泛存在的一种第二信使分子, 其在细菌的生长和机体行为中发挥着重要的协调作用, 其中包括细菌的运动能力、毒力、生物膜形成以及细胞周期进程等。c-di-GMP 对基因表达的调控是通过与转录因子或

核糖开关的结合而实现的。T6SS 作为重要的细菌毒力、运动性、生物膜执行成分,已发现在多种细菌中被 c-di-GMP 调节^[54]。在弧菌属的不同种细菌中, c-di-GMP 有着类似的生理作用。霍乱弧菌 *tfoY* 基因上游存在 c-di-GMP 核糖开关,细菌内 c-di-GMP 浓度下降会诱导 TfoY 蛋白的合成,进而激活 T6SS,此处 T6SS 的主要作用为调控运动性等以防卫真核捕食者^[25]。这种 c-di-GMP 与防御反应的耦联也在副溶血弧菌中被发现,表面感应可以触发副溶血弧菌内 c-di-GMP 浓度下降,这将诱导 TfoY 以激活 T6SS1,介导细菌的防御性逃逸反应^[55]。在鱼类溶藻弧菌中, PppA 可以诱导 c-di-GMP 的含量下降与 Hcp1 表达分泌下降^[56],但降低的 Hcp1 水平是否由 c-di-GMP 介导仍有待研究。

除弧菌科外,在铜绿假单胞菌中,较高水平的 c-di-GMP 会使 Hcp1 产量升高^[21],推测 c-di-GMP 是铜绿假单胞菌毒力所涉及的 T3SS、T6SS 的主要调控信号分子。还有研究提出,当 O₂ 存在时, OdaI 通过双鸟苷酸环化酶 SadC 抑制 c-di-GMP 的合成,而在厌氧过程中, SadC 则催化 c-di-GMP 的生成^[57]。O₂ 介导的变化可以看作是铜绿假单胞菌对不同生存环境所进行的策略转换。因为 c-di-GMP 可被视为铜绿假单胞菌浮游与附着生活方式间过渡的信号,高水平的 c-di-GMP 会促进生物膜的形成及感染,而低水平则促进浮游生活与毒力。然而,铜绿假单胞菌的双鸟苷酸环化酶 SadC 可以抑制根癌农杆菌 C58 的 T6SS 活性,正如同根癌农杆菌内源双鸟苷酸环化酶产生的效应,这意味着高水平 c-di-GMP 会抑制其 T6SS,这种抑制发生在转录水平^[58]。一种推测是, c-di-GMP 在根癌农杆菌刚到达植物伤口准备入侵时含量升高,下调 T6SS,这是一种经济措施,细菌可以用更多的资源去刺激 EPS 生物膜的形成,便于建立稳定的定殖。

2.5 群体感应(quorum sensing, QS)

细菌的 QS 涉及到自我产生的可以分泌到细胞外的化学信号,这些信号会在局部环境中积累到

激活特定基因转录所需的水平,常见的 QS 信号有高丝氨酸内酯(acylated homoserine lactone, AHL)、自诱导物-2 (autoinducer-2, AI-2)、2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(pseudomonas quinolone signal, PQS)、可扩散信号分子(diffusible signaling factor, DSF)等^[59]。QS 对细菌的调节体现在与细菌群体相关的许多方面。AHL 型 QS 信号调控了泰国芽孢杆菌的生命活动,其可以激活 T6SS 以表达一些特征性毒素、同源免疫或抗毒素基因,而这些基因的产物可以抑制敏感细胞的生长或保护芽孢杆菌自身不被毒素伤害^[60],这是一种对种内竞争及种间竞争的策略。QS 对 T6SS 的控制铜绿假单胞菌及弧菌属细菌中被研究得较为详细。铜绿假单胞菌拥有 3 个 QS 系统: LasI/LasR、RhlI/RhlR、PQS/PqsR (MvfR),编码 T6SS 的 3 个基因座受 QS 蛋白 LasR 及 MvfR 的控制;在 POA1 菌株中, H2-T6SS 受 Las 与 RhlQS 系统的调控^[61]。对霍乱弧菌而言,较低的群体密度会使 LuxQ 与 CqsS 传感器激酶磷酸化 LuxU,这将进一步导致一系列后续事件,主要包括 LuxO 磷酸化, Small regulatory RNA (sRNA)被激活并与 σ_{54} 协调作用, HapR 被抑制,最终导致的结果是 T6SS 表达被抑制^[61-62]。在溶藻弧菌中, QS 对 T6SS 的调控还涉及到了其两个 T6SS 系统的串扰。当周围细菌密度较低时,与霍乱弧菌类似,溶藻弧菌的 LuxO 被磷酸化以激活 sRNA 表达, sRNA 与 σ_{54} 协调作用以抑制 LuxR,而 LuxR 的作用是抑制 T6SS1 的表达或促进 T6SS2 的表达^[63]。

3 总结与展望

T6SS 作为细菌的武器及防御工具,其合成与表达并不是时刻都进行的,使用 T6SS 与否反映出一种对生存策略的选择。对于细菌而言,使用 T6SS 是一种代价高昂的行为,这意味着大量物质与能量的耗费,还伴随着被真核生物捕食者消灭的可能。因此在不恰当的环境中开启 T6SS 是一种浪费或风险。对 T6SS 调控的研究仍存在诸多问题与局限。例如我们仍未完全清楚整个 T6SS 系统的调控通

路、启动或抑制 T6SS 的环境信号(温度、渗透压、离子等)产生影响的具体分子机制、各种信号间相互的沟通与串扰等。而且, 目前已有的研究也多是针对几种重要的细菌如霍乱弧菌、铜绿假单胞菌、根癌农杆菌等, 对更多细菌的研究仍有待进行。此外, 目前已研究的大部分调控因子均为全局性调控因子, 例如 H-NS 蛋白、双组分系统、RpoN 等, 这些蛋白在细菌其他方面也发挥调控作用, 如何寻找关于 T6SS 独特的调控因子尚是目前存在的难题。在未来的研究中, 或许可以通过对 T6SS 调控的研究, 找到相应的靶点以干扰 T6SS 的功能, 对细菌的致病力与毒力等方面产生干扰, 这有望成为新的抗细菌感染的途径。

REFERENCES

- [1] Cherrak Y, Flaugnatti N, Durand E, et al. Structure and activity of the Type VI secretion system[A]//Sandkvist M, Cascales E, Christie PJ. Protein Secretion in Bacteria[M]. Washington, DC: ASM Press, 2019
- [2] Alteri CJ, Mobley HLT. The versatile Type VI secretion system[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(2): VMBF-0026-2015
- [3] Pieper R, Huang ST, Robinson JM, et al. Temperature and growth phase influence the outer-membrane proteome and the expression of a Type VI secretion system in *Yersinia pestis*[J]. *Microbiology*, 2009, 155(2): 498-512
- [4] Yang XB, Pan JF, Wang Y, et al. Type VI secretion systems present new insights on pathogenic *Yersinia*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 260
- [5] Huang YM, Du PC, Zhao M, et al. Functional characterization and conditional regulation of the Type VI secretion system in *Vibrio fluvialis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 528
- [6] Townsley L, Mangus MPS, Mehic S, et al. Response of *Vibrio cholerae* to low-temperature shifts: CspV regulation of Type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(14): 4441-4452
- [7] Joshi A, Kostiuk B, Rogers A, et al. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(4): 267-279
- [8] Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, et al. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61086
- [9] Zhao P, Zou QH. Studies on the function of hemolysin co-regulated protein in the type VI secretion system of *Salmonella typhimurium*[A]//Proceedings of the 12th National Annual Conference on Clinical Microbiology and the 11th Global Chinese Annual Conference on Clinical Microbiology and Infectious Diseases[C]. 2015 (in Chinese) 赵潘, 邹清华. 鼠伤寒沙门氏菌 VI 型分泌系统溶血素共调节蛋白的功能探讨[A]//中华医学会第十二次全国临床微生物学术年会暨第十一次全球华人临床微生物学与感染症学术年会论文汇编[C]. 2015
- [10] Ishikawa T, Rompikuntal PK, Lindmark B, et al. Quorum sensing regulation of the two *hcp* alleles in *Vibrio cholerae* O1 strains[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6734
- [11] Sheng LL, Gu D, Wang QY, et al. Quorum sensing and alternative sigma factor RpoN regulate type VI secretion system I (T6SSVA1) in fish pathogen *Vibrio alginolyticus*[J]. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(5): 379-390
- [12] Okada BK, Wu YH, Mao DN, et al. Mapping the trimethoprim-induced secondary metabolome of *Burkholderia thailandensis*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 11(8): 2124-2130
- [13] Liu L, Ye MP, Li XB, et al. Identification and characterization of an antibacterial Type VI secretion system in the carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 442
- [14] Jones C, Allsopp L, Horlick J, et al. Subinhibitory concentration of kanamycin induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81132
- [15] Losada L, Shea AA, DeShazer D. A MarR family transcriptional regulator and subinhibitory antibiotics regulate type VI secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Microbiology*, 2018, 164(9): 1196-1211
- [16] Weber BS, Kinsella RL, Harding CM, et al. The secrets of *Acinetobacter* secretion[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(7): 532-545
- [17] Wright MS, Haft DH, Harkins DM, et al. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis[J]. *American Society for Microbiology*, 2014, 5(1): e00963-13
- [18] Repizo GD, Gagné S, Foucault-Grunenwald ML, et al. Differential role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138265
- [19] Weber BS, Ly PM, Irwin JN, et al. A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for Type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2015, 112(30): 9442-9447
- [20] Chakraborty S, Sivaraman J, Leung KY, et al. Two-component PhoB-PhoR regulatory system and ferric uptake regulator sense phosphate and iron to control

- virulence genes in Type III and VI secretion systems of *Edwardsiella tarda*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(45): 39417-39430
- [21] Chen LH, Zou YR, Li PF, et al. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiological Research*, 2015, 172: 19-25
- [22] Wang SH, Yang DH, Wu XJ, et al. The ferric uptake regulator represses Type VI secretion system function by binding directly to the *clpV* promoter in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium[J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(10): e00562-19
- [23] Brunet YR, Bernard CS, Gavioli M, et al. An epigenetic switch involving overlapping fur and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(7): e1002205
- [24] Chekabab SM, Harel J, Dozois CM. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence[J]. *Virulence*, 2014, 5(8): 786-793
- [25] Metzger LC, Stutzmann S, Scrignari T, et al. Independent regulation of Type VI secretion in *Vibrio cholerae* by TfoX and TfoY[J]. *Cell Reports*, 2016, 15(5): 951-958
- [26] Pratt JT, McDonough EK, Camilli A. PhoB regulates motility, biofilms, and cyclic di-GMP in *Vibrio cholera*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6632-6642
- [27] Wang TT, Chen KQ, Gao F, et al. ZntR positively regulates T6SS4 expression in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. *Journal of Microbiology*, 2017, 55(6): 448-456
- [28] Prestel E, Noirot P, Auger S. Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* Zur-binding sites associated with a Zur box expands its known regulatory network[J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 13
- [29] Fojcik C, Arnoux P, Ouerdane L, et al. Independent and cooperative regulation of staphylopine biosynthesis and trafficking by Fur and Zur[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 108(2): 159-177
- [30] Bütof L, Schmidt-Vogler C, Herzberg M, et al. The components of the unique Zur regulon of *Cupriavidus metallidurans* mediate cytoplasmic Zinc handling[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(21): e00372-17
- [31] Si MR, Wang Y, Zhang B, et al. The Type VI secretion system engages a redox-regulated dual-functional heme transporter for zinc acquisition[J]. *Cell Reports*, 2017, 20(4): 949-959
- [32] Gao YF, Foo YH, Winardhi RS, et al. Charged residues in the H-NS linker drive DNA binding and gene silencing in single cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2017, 114(47): 12560-12565
- [33] Singh K, Milstein JN, Navarre WW. Xenogeneic silencing and its impact on bacterial genomes[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2016, 70: 199-213
- [34] Sun FJ, Zhang YQ, Qiu YF, et al. H-NS is a repressor of major virulence gene loci in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 675
- [35] Salomon D, Klimko JA, Orth K. H-NS regulates the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1[J]. *Microbiology*, 2014, 160(9): 1867-1873
- [36] Barbosa VAA, Lery LMS. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 506
- [37] Bent ZW, Poorey K, LaBauve AE, et al. A rapid spin column-based method to enrich pathogen transcripts from eukaryotic host cells prior to sequencing[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168788
- [38] Brunet YR, Khodr A, Logger L, et al. H-NS silencing of the *Salmonella* pathogenicity island 6-encoded Type VI secretion system limits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium interbacterial killing[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(7): 2738-2750
- [39] Cui SL, Xiao JF, Wang QY, et al. H-NS binding to *evpB* and *evpC* and repressing T6SS expression in fish pathogen *Edwardsiella piscicida*[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(7): 653-661
- [40] Groisman EA. Feedback control of Two-component regulatory systems[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2016, 70: 103-124
- [41] Gao R, Stock AM. Temporal hierarchy of gene expression mediated by transcription factor binding affinity and activation dynamics[J]. *American Society for Microbiology*, 2015, 6(3): e00686-15
- [42] Liu Y, Zhao LY, Yang MJ, et al. Transcriptomic dissection of the horizontally acquired response regulator EsrB reveals its global regulatory roles in the physiological adaptation and activation of T3SS and the cognate effector repertoire in *Edwardsiella piscicida* during infection toward turbot[J]. *Virulence*, 2017, 8(7): 1355-1377
- [43] Cheng AT, Ottemann KM, Yildiz FH. *Vibrio cholerae* response regulator VxrB controls colonization and regulates the Type VI secretion system[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(5): e1004933
- [44] Chourashi R, Das S, Dhar D, et al. Chitin-induced T6SS in *Vibrio cholerae* is dependent on ChiS activation[J]. *Microbiology Society*, 2018, 164(5): 751-763
- [45] Gueguen E, Durand E, Zhang XY, et al. Expression of a *Yersinia pseudotuberculosis* Type VI secretion system is responsive to envelope stresses through the OmpR transcriptional activator[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66615
- [46] Lv MF, Hu M, Li P, et al. A two-component regulatory system VfmIH modulates multiple virulence traits in *Dickeya zea*[J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 111(6): 1493-1509
- [47] Wu CF, Lin JS, Shaw GC, et al. Acid-induced Type VI secretion system is regulated by ExoR-ChvG/ChvI signaling cascade in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(9): e1002938
- [48] Danson AE, Jovanovic M, Buck M, et al. Mechanisms of

- σ^{54} -dependent transcription initiation and regulation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(20): 3960-3974
- [49] Wigneshweraraj S, Bose D, Burrows PC, et al. Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the σ^{54} promoter-specificity factor[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(3): 538-546
- [50] Zhang N, Buck M. A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase[J]. *Biomolecules*, 2015, 5(2): 1012-1019
- [51] Bernard CS, Brunet YR, Gavioli M, et al. Regulation of Type VI secretion gene clusters by σ^{54} and cognate enhancer binding proteins[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(9): 2158-2167
- [52] Syed KA, Beyhan S, Correa N, et al. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6555-6570
- [53] Sana TG, Soscia C, Tonglet CM, et al. Divergent control of two type VI secretion systems by RpoN in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76030
- [54] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 271-284
- [55] Metzger LC, Matthey N, Stoudmann C, et al. Ecological implications of gene regulation by TfoX and TfoY among diverse *Vibrio* species[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(7): 2231-2247
- [56] Sheng LL, Lv YZ, Liu Q, et al. Connecting type VI secretion, quorum sensing, and c-di-GMP production in fish pathogen *Vibrio alginolyticus* through phosphatase PppA[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/4): 652-662
- [57] Schmidt A, Hammerbacher AS, Bastian M, et al. Oxygen-dependent regulation of c-di-GMP synthesis by SadC controls alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(10): 3390-3402
- [58] McCarthy RR, Yu MD, Eilers K, et al. Cyclic di-GMP inactivates T6SS and T4SS activity in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 112(2): 632-648
- [59] Whiteley M, Diggie SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 313-320
- [60] Majerczyk C, Schneider E, Greenberg EP. Quorum sensing control of Type VI secretion factors restricts the proliferation of quorum-sensing mutants[J]. *elife*, 2016, 5: e14712
- [61] Pena RT, Blasco L, Ambroa A, et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1100
- [62] Jung SA, Chapman CA, Ng WL. Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): e1004837
- [63] Yang Z, Zhou XH, Ma Y, et al. Serine/threonine kinase PpkA coordinates the interplay between T6SS2 activation and quorum sensing in the marine pathogen *Vibrio alginolyticus*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(2): 903-919