

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220398

植物病原细菌VI型分泌系统研究进展

夏雄飞¹, 薄淑文¹, 韩长志^{1,2*}

(1. 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南 昆明 650224; 2. 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: [目的] VI型分泌系统 (T6SS) 作为植物病原细菌发挥重要功能的调控系统之一, 主要表现为通过效应子的释放对宿主植物的攻击性和自身在种间竞争过程中面对胁迫反应的防御性等方面, 明确重要植物病原细菌的 T6SS 蛋白及功能差异, 有助于推动预防和治疗植物病害的新型农药的开发和利用。[方法] 通过对比分析 5 种重要植物病原细菌 (丁香假单胞菌、青枯雷尔氏菌、根癌农杆菌、梨火疫病菌、稻生黄单胞菌) 中 138 个 T6SS 蛋白的保守结构域以及遗传关系, 同时, 基于对国内外文献数据库中有关上述 5 种细菌的 T6SS 功能研究的文献开展分析。[结果] 明确 5 种植物病原细菌中 T6SS 蛋白在种类和数量上存在差异性。根据蛋白序列同源性及结构域, 上述蛋白分为 3 大类, 其中, 含有 VgrG、HCP 等结构域的 T6SS 蛋白具有很好的聚类区分度, 而含有 TssA、TssG 等结构域的 T6SS 蛋白则可分散在不同类别中。[结论] 明确 5 种植物病原细菌中 T6SS 蛋白及功能具有一定保守性和独特性特征。该研究为进一步开展不同植物病原细菌中 T6SS 蛋白的预测分析, 以及不同 T6SS 蛋白之间的关系解析提供理论基础。

关键词: 植物病原细菌; T6SS; 结构域; 功能; 遗传关系; 研究综述

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2023)04-0183-10

细菌可以引起植物、动物以及人类严重的病害, 在其侵染过程中, 主要通过多种分泌系统以完成与宿主之间的互作^[1-2]。其中, VI型分泌系统 (T6SS, Type VI secretory system) 可以通过释放效应蛋白至邻近靶细胞, 包括对于宿主的攻击性和种间竞争的防御性等作用^[3]。此外, T6SS 还具有参与生物被膜形成等能力^[4], 在细菌的营养竞争、生存定殖、侵染宿主致病等过程中发挥着重要作用^[5]。

有关 T6SS 的研究可以追溯至 1996 年, 当时, 学者对霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 中一个缺乏可识别信号肽的序列 HCP (Hemolysin Coregulated Protein) 横跨细胞内外膜分泌蛋白开展研究, 明确其对病原细菌的毒力、定殖能力以及环境适应性等有重要影响^[6]。2006 年, Pukatzki 等人发现除 HCP 外, *V. cholerae* 中的 VgrG 蛋白同样存在胞外输出现象, 然而, 其均不含信号肽且与 T3SS

或 T4SS 并不相同, 因此, 首次提出了 T6SS 概念^[7]。此后, 2012 年《Nature》论文系统阐述了 T6SS 分泌模型, 即一个通过独特的基座结构与内膜相连, 往复于延伸或收缩构象的长管外包弹簧状结构鞘 (主要由 HCP、TssB/C 组成), 保持在组装、快速收缩、释放、拆卸和重新组装之间循环^[8], 与 T4 噬菌体类似, 基座结构将收缩信号传递给鞘, 并且拥有保守的触发机制^[9]。通常细菌基于 T6SS 系统以接触依赖性传输毒性蛋白, 诸如肽聚糖酶^[10]、磷脂酶^[11]、ATP 酶等效应子^[12], 面对营养压力时通过 T6SS 将其输送至竞争细胞, 从而导致靶细胞死亡。

学术界关于细菌中 T6SS 的研究多以铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 为主^[13], 而有关植物病原细菌 T6SS 的研究, 最早见于 2010 年关于梨火疫病菌 (*Erwinia amylovora*)^[14] 的报道。鉴于丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)^[15]、

收稿日期: 2022-08-05 修回日期: 2022-09-05

基金项目: 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才专项 (YNWR-QNBJ-2020-188)、国家自然科学基金项目 (31960314)、云南省研究生导师团队建设项目“森林病理学硕士生导师团队”(2022100)

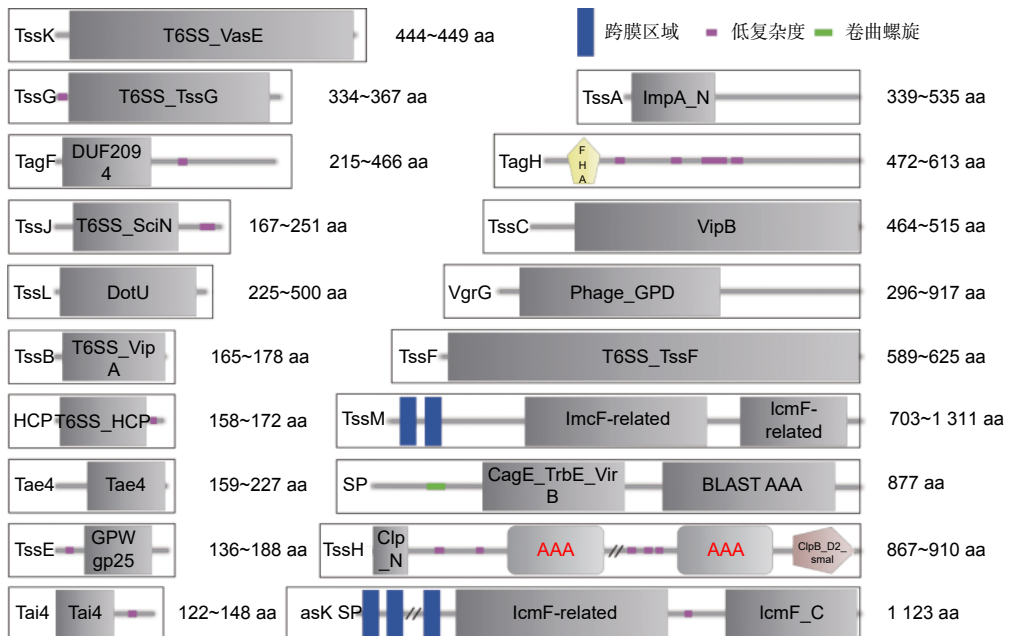
* 通讯作者: 韩长志, 博士, 教授。主要研究方向: 经济林木病害防治。电话: 15877923075, Email: hanchangzhi2010@163.com

青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)^[16]、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)^[17]、梨火疫病菌^[18]、稻生黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*)^[19] 等 5 种植物病原细菌对农林业生产危害的严重性, 有关上述细菌 T6SS 的调控机制^[20]、作用机制^[18] 以及结构功能^[21] 等研究报道逐年增加。然而, 尚未见不同植物病原细菌中 T6SS 的系统性对比分析报道。因此, 本研究以前人研究成果为基础, 对上述植物病原细菌中 T6SS 蛋白的数量、种类、遗传分类以及结构功能进行综述, 以期明确不同植物病原细菌中 T6SS 在其功能蛋白及遗传关系等方面存在的差异性, 并指出了 T6SS 研究中存在的一些问题。

1 T6SS 的结构

T6SS 主要存在于革兰氏阴性细菌中^[6,22], 以 *P. aeruginosa* 为例, 典型的 T6SS 装配结构与噬菌体尾部穿膜结构类似^[23-24], 存在于内外膜组织之间, 是基于细胞接触依赖性的多组件跨膜通道。笔者利用美国国立卫生院 (NCBI) 数据库, 对 5 种植物病原细菌 (*P. syringae*、*R. solanacearum*、*A. tumefaciens*、*E. amylovora*、*Xoc*; 登录号分别为: GCF_016694755.2、GCF_001587155.1、GCF_003667905.1、GCF_000091565.1、GCF_

001021915.1) 中共 138 个 T6SS 蛋白序列进行搜索下载、整理, 利用蛋白保守结构域分析软件 SMART^[25] 进行预测分析, 发现 19 种 T6SS 蛋白存在于 5 种细菌中, 且不同种细菌拥有蛋白的类别与数量不尽相同, 具有一定多样性。同时, 除 VgrG 的蛋白序列长度在不同细菌之间差异较大, 为 296~917 aa, 其余同种 T6SS 蛋白之间长度差别相对较小, 具有一定保守性 (图 1)。T6SS 蛋白种类主要包括跨膜复合体 TssM (IcmF)、TssJ (SciN)、TssL (DotU); 基座亚基 TssE (GPW_gp25)、TssF、TssG、TssK (VasE); 弹簧状伸缩鞘大亚基 TssC (VipB)、小亚基 TssB (VipA)、管状蛋白 HCP; 尖端效应子结合蛋白 VgrG (Phage_GPD); 装卸辅助蛋白 TssA (ImpA_N); 调控蛋白 TagF (DUF2094)、TagH (FHA)、TssH (Cip_N); 酰胺酶效应蛋白 Tae4、酰胺酶免疫蛋白 Tai4。此外, *E. amylovora* 与 *Xoc* 分别独有 IcmF (Vask)、CagE_TrbE_VirB 等结构域的 T6SS 分泌蛋白 (蛋白 ID 分别为 WP_004160264.1、WP_047340360.1)。通过对 T6SS 蛋白结构域进行解析, 明确不同病原细菌具有相似的 T6SS 蛋白组成、不同的蛋白数量以及部分物种特有的结构域, 与前人明确 *R. solanacearum* 中 HCP、VgrG 蛋白的三级结构分



注: 框中左侧字母和数字为 T6SS 蛋白功能名称, 右侧数字为蛋白序列长度

图 1 T6SS 在 5 种不同植物病原细菌中的相关蛋白保守结构域种类情况

Fig. 1 Conserved domains of T6SS related proteins in five different plant pathogenic bacteria

别与 *P. aeruginosa*、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 HCP、VgrG 相似等结果类似^[26]。

具体而言, VgrG 是一个三聚体状的尖端效应子结合蛋白, 是对靶细胞执行毒性功能的核心蛋白^[27], 在 5 种植物病原细菌中均具有较多的数量 (表 1); TssM/J/L 是一个跨内外膜复合体结构, 是效应子等蛋白的膜运输通道^[28]; TssE/F/G/K 是一个锚定于内膜并链接 TssM/J/L 结构的漏斗状复合体基座, 用以 VgrG 蛋白的识别与吸附^[29]; HCP 是一个管状蛋白, 当 T6SS 开始装配时, 其一端依附于 VgrG, 行使 VgrG 等尖端蛋白受力功能^[16]; TssB/C 是一个空心弹簧状蛋白复合体, 包裹于 HCP 外侧, 是 VgrG 与 HCP 等结构被执行推

力的来源^[28]; TssA 是一个 T6SS 装卸辅助识别蛋白, 当 T6SS 开始装配时, 其一侧可分别粘连 VgrG、TssB/C 和 HCP, 并有序进行组装^[30]; TssH 属于 AAA + ATP 酶超家族和 ClpV 亚家族, 主要在 TssB/C 鞘收缩释放 T6SS 效应子过程中起作用^[31]; TagF 通过与 TagH 相互作用来调节 T6SS 效应子的分泌过程^[32]; Tae4 作为效应子参与细菌竞争中对目标细菌肽聚糖和膜脂的侵蚀; Tai4 作为免疫蛋白用于抵御 Tae4, 它们与 VgrG 基因编码相关联。上述蛋白具有不同的功能, 使 T6SS 在不同环境下执行多种生存策略, 分泌多种效应蛋白, 从而在结构域之间以及结构域与效应子之间具有相互紧密配合的特点, 进而适应多变的细胞环境。

表 1 5 种不同植物病原细菌所包含 T6SS 相关蛋白情况对比

Table 1 Comparison of T6SS related proteins in five different plant pathogenic bacteria

蛋白 Protein	<i>P. syringae</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>E. amylovora</i>	Xoc	合计 Total
VgrG	6	6	1	5	2	20
TssM	2	1	1	2	2	8
TssJ	2	1	0	3	1	7
TssL	0	0	1	2	0	3
TssE	2	1	1	2	2	8
TssF	2	1	1	2	2	8
TssG	2	1	1	2	2	8
TssK	2	1	1	2	2	8
HCP	7	1	1	2	2	13
TssB	2	1	1	2	2	8
TssC	2	1	2	2	2	9
TssA	2	1	1	3	2	9
TssH	2	1	1	2	2	8
TagF	1	1	1	2	2	7
TagH	0	0	0	2	1	3
Tae4	1	1	1	1	0	4
Tai4	2	1	0	2	0	5
VasK SP	0	0	0	1	0	1
CagE SP	0	0	0	0	1	1
合计 Total	37	20	15	39	27	138

一般而言, T6SS 中的 TssM/J/L、TssE/F/G/K 分别被组装成跨膜通道和基座复合体^[8], 随后 TssB/C 弹簧鞘的收缩推动 HCP 管、VgrG 突刺和效应子并通过 T6SS 跨膜通道离开细胞, 进入细胞外环境或附近的另一个细胞^[33] (图 2), 毒性效应

子发挥作用从而导致靶细胞生长抑制或死亡^[10-11]。

2 T6SS 蛋白的遗传分类

基于 MEGA11 软件并根据序列同源性对上述 5 种植物病原细菌中 138 个 T6SS 蛋白进行遗传关

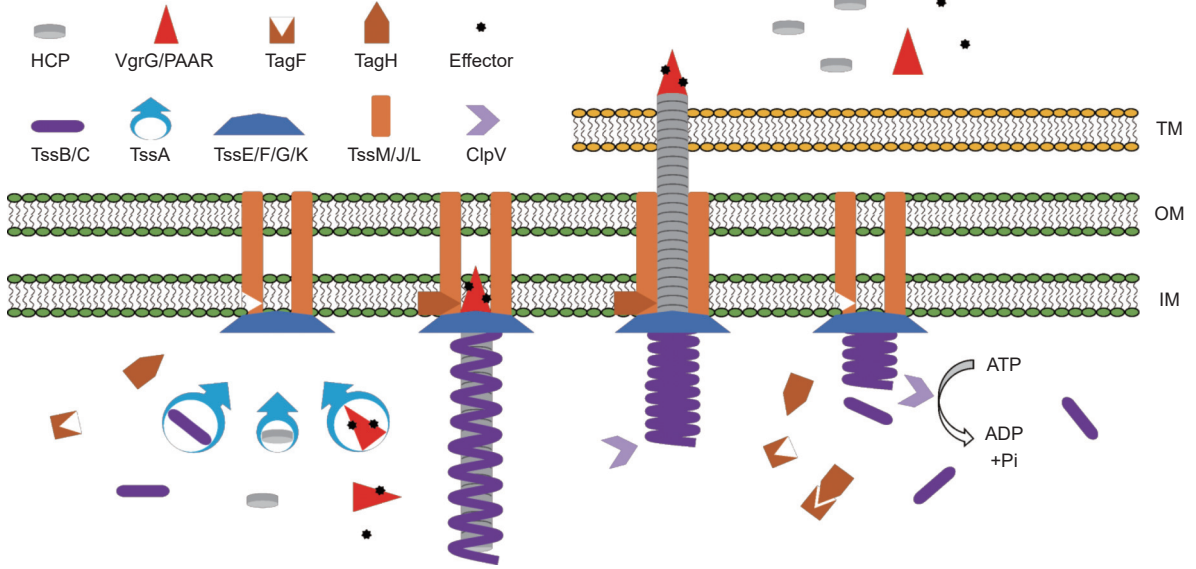


图 2 T6SS 在植物病原细菌中相关蛋白的基本装卸结构及功能示意图

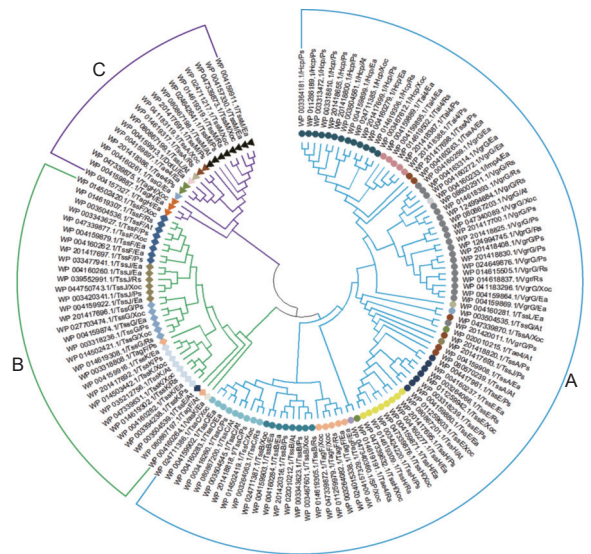
Fig. 2 Schematic diagram of basic loading and unloading structure and function of T6SS related proteins in plant pathogenic bacteria

系分析,明确其可以分为 3 个亚家族,分别命名为 A、B、C,其中 TssB、TssC、TssH、Tai4 等蛋白聚为 A 类,而 TssF、TssK 等聚为 B 类, TssM、TagH 聚为 C 类(图 3)。在遗传关系方面,一些蛋白同时存在于上述两种或 3 种亚家族中,如 TssE、TssJ、TagF 等蛋白存在于 A、B 两大类中; TssA、TssL、Tae4 存在于 A、C 两大类; TssG 在 A、B、C 类中则分别存在 1、6、1 个蛋白,其中 A 类中仅包含 *A. tumefaciens* 的 TssG, C 类中仅包含 *E. amylovora* 的 TssG,这一现象与 T6SS 基因可以通过水平转移所获得的特性相一致^[34],又或许是单菌种具有多个 T6SS 基因簇导致,例如, *P. aeruginosa* 携带 H1、H2 和 H3-T6SS 3 个基因簇^[22,35],而 *V. cholerae* 只携带一个^[7]。对上述病原细菌 T6SS 蛋白结构域进一步预测分析,显示 C 类中 *A. tumefaciens* 的 TssL 包含 OmpA 结构域(蛋白 ID 为 WP_080867199.1),不同于 A 类中 *E. amylovora* 的 TssL,其余蛋白聚类差异均与其保守结构域无关。HCP 与 VgrG 聚为一类,说明 HCP 与 VgrG 具有一定的共进化特性^[36]。

3 T6SS 蛋白的功能

3.1 侵染宿主的毒性功能

植物病原细菌通过 T6SS 中 VgrG 绑定毒性效应子(细胞壁降解酶、核酸酶、膜穿孔蛋白、磷脂酶和 NADase 等)传递至邻近宿主细胞,通常在寄



注/Notes: Ps: *Pseudomonas syringae*;Rs: *Ralstonia solanacearum*; At: *Agrobacterium tumefaciens*; Ea: *Erwinia amylovora*; Xoc: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; SP: CagE-TrbE_VirB

图 3 T6SS 在 5 种不同植物病原细菌中的相关蛋白遗传关系

Fig. 3 Genetic relationship of T6SS related proteins in five different plant pathogenic bacteria

主组织内大量定殖,引起寄主细胞质壁分离、细胞器降解等,以达到营养汲取的目的^[4]。当前,已经明确 *P. syringae*、*R. solanacearum*、*E. amylovora* 等细菌中有较多 T6SS 蛋白参与侵染宿主植物的过程。*P. syringae* 可以对豆科、茄科、蔷薇科以及十字花科等 300 多种经济作物致病,是当前变种最多的植物病原细菌之一。前人对 *P. syringae* 中

T6SS 参与侵染过程的研究多集中于 TssM、TssJ 蛋白以及 RetS、LadS 和 GacS/GacA 调控途径。就其蛋白功能而言, 当 TssM、TssJ 沉默时该菌致病性分别下降了 78.7% 和 71.3%, 同时伴随生物膜形成与蛋白水解能力下降, 然而其胞外多糖的分泌及运动性不受影响, 并且存在突变复原现象^[37], 推测 TssM、TssJ 影响了 *P. syringae* 的自身保护膜而未参与鞭毛膜的形成, 并且发生了基因水平转移, 从而导致突变失效; 就其调控方式而言, T6SS 与 T3SS 可以共同被 (P) ppGpp、RetS 和 LadS 调控表达并影响细胞运动^[38], 其中 RetS 负向控制粘液性, LadS 负向调节成群运动^[39]; 此外, 低温和植物免疫物质也会影响 T6SS 基因的表达, 且该过程受 GacS/GacA 双组分系统的调控^[40]。

R. solanacearum 可以侵染茄科、豆科等双子叶草本植物及桑树、木麻黄等双子叶木本植物, 相关研究多集中于 TssM、TssB、VgrG、HCP 和 TssL 等蛋白。就其蛋白功能而言, TssM 和 TssB 参与了该菌的生物膜 (自身保护膜和运动鞭毛膜) 的形成过程, 当 TssM 和 TssB 沉默时, 外膜蛋白、鞭毛相关基因 *flhC*、*flhD*、*flgM*、*fliA* 以及环磷酸腺苷受体蛋白等表达受阻^[21,41]。保护生物膜的失活导致菌株无法有效抵御来自宿主的活性氧免疫攻击, 进而导致毒力减弱, 然而与 Wang 等人^[37] 研究结果不同的是, 鞭毛的失活导致运动受阻, 进而影响菌株在宿主植物组织的定殖能力, 与此相似的是该菌中 VgrG1、VgrG2 也参与了菌株的运动形成过程, 并且存在突变复原的现象^[42]。此外, 该菌的 T6SS 蛋白在同宿主不同组织中所表现的致病能力也不同, 例如在叶柄致病过程中 TssL 相比其他蛋白将发挥更大作用, 而在根部致病过程中 VgrG3 占主体影响因素^[16], 这表明在不同的侵染环境中, 不同 T6SS 蛋白贡献力不同。就其调控方式而言, 该菌存在多种分泌系统互作调控^[43], 诸如编码 VgrG1、VgrG2、HCP 等蛋白的基因簇在参与 T6SS 的同时也影响着 T3SS 效应子基因的表达^[42]。

E. amylovora 可以引起蔷薇科植物火疫病, 主要侵染叶、花、嫩枝、果实等。相关研究集中于 TssH、TssA、TssB、TssC、HCP、VgrG 等蛋白。就其蛋白功能而言, 位于 T6SS1 基因座的 *ClpV* 基因 (TssH 相关) 与该菌中的致病效应子梨火疫病菌素 (Amylovoran) 的产量、生物膜呈正相关, 同为致病效应子的果聚糖却不受该基因影响^[18], 这

表明不同 T6SS 蛋白、效应子之间可能存在兼容性差别。同时, 编码 TssA1、TssB1、TssC1 和 HCP1 等蛋白的基因与梨火疫病毒素产量呈负相关^[18]。就其调控方式而言, T6SS 的 HCP、VgrG 与 T3SS 的 *SpaR3* 基因被证明参与联合调控, 此外, HCP、VgrG 还与鞭毛 (*FlgB3*)、菌毛 (*EAMY_0247*)、磷酸盐转运过程 (*pstA3*、*pstC3*、*pstS3*)、硫代谢过程 (*cysC*、*cysI3*、*cysJ*、*cysN*、*tauA*、*tauB*、*tauC*、*tauD3*)、趋化性 (*cheA1*、*cheB1*、*cher1*、*cheY1*、*cheZ1*) 和细胞运动 (*motA1*、*motB1*) 等功能相关基因呈正相关^[44]。

3.2 种间竞争的拮抗功能

在细菌竞争中发挥重要作用的各种抗菌毒素可以通过 T6SS 传递至靶细胞, 当不同植物病原细菌拥有共同的宿主侵染目标时, 便会启用 T6SS 分泌多种降解酶, 作为抗菌武器用以尝试杀死营养竞争者。诸如在 *P. aeruginosa* 中含有 H1、H2 和 H3-T6SS3 个基因簇, 其中 H1-T6SS 专注于自身防御^[9], 仅用于检测到被异种细菌攻击时的反击作用^[45], 同时, 细菌同种群之间相互接收信号并分泌对应的免疫蛋白从而避免误伤^[46]。前人对于 *A. tumefaciens* 的 T6SS 的研究多集中于 Tae、Tai、VgrG、基因转移、调控方式等, 其 T6SS 通过分泌肽聚糖酰胺酶效应子 Tae, 裂解肽聚糖中的 D-丙氨酸和谷氨酸键引起细胞增大从而抑制 *E. coli* 生长, 并在漫长的进化中产生特异性免疫蛋白 Tai, 用于竞争过程中保护自身细胞不被 Tae 杀伤^[47]。同时, 该菌还具有两种依赖于保守 HxxD 基序的 DNA 酶效应子 Tde, 通过引起 DNA 降解及细胞伸长导致 *E. coli* 凋亡^[17]。因此, *A. tumefaciens* 通常将 Tae 和 Tde 联合参与营养竞争, 且在不同竞争环境下均可杀死 *E. coli*、*P. aeruginosa* 等细菌^[48]。此外, 该细菌中 T6SS 的 *VgrG-a* 相关基因 *V2a* 编码一个 AHH 家族核酸酶, 同样作为种间竞争的重要效应子^[49]。其效应子多样性或许与其相关基因高效转移机制有关, 在营养竞争过程中导致部分细胞 DNA 裂解, 随后被同种间其他活细菌基因组整合^[50], 并利用整合的特异性免疫蛋白基因抵抗攻击者^[51]。基于免疫基因转移机制使得细菌竞争过程中的毒性功能发挥更具挑战性, 同时也提供了更多效应子的进化途径^[52]。产生 T6SS 特异性免疫的被攻击者可以大大增强其竞争优势^[53], 诸如在 *E. coli* 中 *ClpA/ClpP*

基因的突变使其提高了对来自 *A. tumefaciens* 的 T6SS 毒性攻击, 其中 ClpA 与 ClpP 相互作用是 *A. tumefaciens* 的 T6SS 效应子识别目标之一^[54]。就其调控方式而言, T6SS 的激活与 ChvI 组分或 TssL 的磷酸化作用有关^[20], 该蛋白调控途径与另一项关于 *P. aeruginosa* 的 T6SS 调控方式相似^[55]。

前人对于 *P. syringae* 利用 T6SS 参与种间竞争的研究多集中于 HCP、金属离子转运机制等。该菌中 HCP2 的分泌依赖于 IcmF2 (由 *HSI-II* 编码)^[15], *HCP2* 基因的特点在于其与 *E. coli*、酵母菌的竞争过程中分泌活跃, 而在侵染宿主植物过程中则保持沉默。然而, 在 *HSI-I* 基因簇中 *HCP2* 相关的编码基因被转座酶终止, 导致其相关功能丧失^[56], 该相似结果发现于 *P. aeruginosa*^[57], 说明不同 T6SS 基因簇的功能存在专一性。此外, 研究表明 *P. syringae* 中 T6SS 蛋白的运转与金属离子有关, 诸如 VgrG 相关细胞壁靶向效应子 PSPTO_5413 的活性依赖于钙离子浓度, 通过 EF-Hand 基序调节^[58]。同时, *P. syringae* 中 T6SS 蛋白的运转还与环境胁迫相关, 诸如在渗透压升高后表现为 T6SS 相关基因上调^[59]。

Xoc 主要危害水稻分蘖期到抽穗前期的水稻叶片, 且幼龄叶片最易受害, 受害较严重时会导致减产 50% 以上甚至颗粒无收^[60]。前人对于其 T6SS 的研究相对较少, 主要涉及 HCP、VgrG 等蛋白。该菌编码 2 套 T6SS 基因簇, 与细胞游动、趋化性、生物被膜及群体感应等表达有关, 并参与调控胞外多糖和黄色素, 通常利用 T6SS 效应子作为群体感应信号分子调控种间竞争趋势, 相比于 HCP, VgrG 有着明显的分化现象, 进化速度更快, 并且其表达都与 HCP 呈正相关^[36]。与上述 *P. syringae* 相同^[15], *Xoc* 的 T6SS2 在细菌竞争中发挥了重要作用, 其中 *HCP2* 基因表达最为活跃^[19], 进一步说明了 T6SS 基因簇的专一性。

4 讨论

4.1 不同植物病原细菌中 T6SS 蛋白数量之间差异性

不同植物病原细菌中 T6SS 蛋白数量之间存在着较大的差异性。其中, *E. amylovora* 中 T6SS 蛋白数量最多, 为 39 个; *P. syringae* 中 T6SS 蛋白数量次之, 为 37 个; 而 *A. tumefaciens* 仅为 15 个, 明显少于 *P. syringae* 与 *E. amylovora*。推测不同细菌中 T6SS 蛋白数量的差异性可能与侵染宿

主的种类数量有关, 有待于进一步深化对比研究。通过对 5 种细菌中的 T6SS 蛋白种类数量进行分析, 明确 VgrG 的数量明显高于其他蛋白, 为 20 个, HCP 次之, 为 13 个; 除特有分泌蛋白 VasK、CagE_TrpE_VirB 外, TssL、TagH 最少, 仅有 3 个。上述不同蛋白之间数量的差异, 推测 VgrG 作为效应子结合蛋白相比其他蛋白具有更深的进化水平, 从而保证了其携带多种效应子以及靶向多种细胞的毒性能力。此外, 部分细菌中不含特定蛋白, 如 *P. syringae*、*R. solanacearum* 不含 TssL、TagH; *A. tumefaciens* 不含 TssJ、TagH、Tai4 等 (表 1)。这种数量上的差异是否与细菌在营养获取、种间竞争过程中的生长发育、毒性强弱有关, 有待于进一步深入研究。

4.2 不同植物病原细菌中 T6SS 蛋白种类之间的差异性

在功能近似的蛋白中, 如 TssM/J/L 作为跨膜复合体结构, 其中, TssM 均来自于同一个进化分支 C, 而 TssJ/L 却分别聚为 A、B 与 A、C 类, 且 3 个 TssL 蛋白所包含的结构域不尽相同, 推测是水平基因转移所造成, 然而各种 T6SS 相关基因如何进行高效的转移还有待进一步深入研究。HCP 与 VgrG 的数量、结构域以及遗传分类均具有一定共性, 其协同进化特性与毒性功能的发挥具有怎样的联系? 有待于进一步探究。此外, 独特的 T6SS 相关分泌蛋白 CagE_TrpE_VirB、VasK 分别聚类为 A、B 类群 (图 3), 推测其作用主要由系统分泌的效应子的功能驱动。

4.3 不同植物病原细菌中 T6SS 蛋白功能研究方面的差异性

前人关于植物病原细菌 T6SS 的相关研究主要涉及效应子释放对宿主植物的攻击性以及自身在种间竞争过程中面对胁迫反应的防御性两大方面, 其功能具有保守性和独特性, 其中包括结构、分类、功能机制等的研究已经取得了较多成果^[5]。然而, 当前在植物病原细菌的 T6SS 相关研究具有一定差异性, 一方面, 对于不同研究面其研究侧重点不同, 如在侵染宿主方面的 T6SS 研究主要涉及 VgrG、HCP、TssM/J/L、TssB/C、TssA、TssH 等众多蛋白, 而在种间竞争方面主要涉及 VgrG、HCP、Tai、Tae 等较少的蛋白; 另一方面, 研究所涉及的细菌种类较少, 在十大植物病原细菌中, *X. oryzae* pv. *oryzae*、*X. campestris* 等目前鲜有

相关报道^[61], 未来还有很大的发展空间。在上述5种植物病原细菌的T6SS研究报道中, 多次出现T6SS组件参与生物膜的形成^[18,21,36-37,41,44]。最近研究发现, 外膜发生的必要基因 *bamA*、*tolB* 和 *lptD* 并不影响 *P. aeruginosa* 中 T6SS 的激活, 其中 *bamA* 的缺失却导致了 T6SS 的非靶向性攻击, 说明外膜的破坏导致 T6SS 上游激活信号更加敏感^[62], 然而外膜发生必要基因和参与生物膜形成的 T6SS 基因有何联系? 有待于进一步研究。此外, 在植物病原细菌的 T6SS 中关于金属离子的转运机制也鲜有报道, 前人已通过对泰国伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia thailandensis*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 等细菌的 T6SS 研究明确了锰、铁、锌离子作为抗氧化酶的结构成分或辅因子的转运机制^[63-65]。未来还需对植物病原细菌 T6SS 作出进一步深入研究, 将有助于细菌多种分泌系统的完善。

5 展望

植物病原细菌通过 T6SS 释放效应蛋白进而对宿主或其它竞争菌种实现接触性破坏, 以达到营养摄取的目的。最新研究表明, T6SS 也可以采用非接触依赖性毒性策略^[66]。在细菌与宿主以及种间协同进化的过程中, 为了克服侵染过程中的免疫障碍及竞争压力, T6SS 进化出复杂多样的生存机制, 如锰离子结合蛋白应对宿主免疫^[67]、特异性免疫蛋白 Tai^[47]、相关基因的高效水平转移机制^[68] 等。前期, 本实验组基于生物信息学与比较基因组学方法分析黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *raphanin*) VI型分泌蛋白的信号肽、跨膜结构、保守基序、遗传关系等^[69]。随着诸多植物病原菌全基因组序列的释放, 为植物病原细菌特别是林木病原细菌致病基因的进一步研究夯实了理论基础^[70], 更多的植物病原细菌中 T6SS 相关蛋白被不断发现, 对于进一步对比分析不同植物病原细菌的毒性特点与进化差异, 以及不同 T6SS 相关结构和功能之间的关系, 发挥着重要的作用。未来学术界对于植物病原细菌中 T6SS 功能的进一步解析, 将有助于找寻和识别植物病原细菌的作用新靶点, 有助于推动预防和治疗植物病害的新型农药的开发和利用。

参考文献:

[1] WILKINSON SW, MAGERØY MH, LÓPEZ SÁNCHEZ A, *et al.*

Surviving in a hostile world: plant strategies to resist pests and diseases[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2019, 57: 505-529.

[2] GREEN ER, MECSAS J. Bacterial secretion systems: an overview[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(1): 13.

[3] BASLER M, HO B, MEKALANOS J. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions[J]. *Cell*, 2013, 152(4): 884-894.

[4] BERNAL P, LLAMAS MA, FILLoux A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(1): 1-15.

[5] COULTHURST S. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon[J]. *Microbiology*, 2019, 165(5): 503-515.

[6] WILLIAMS S, VARCOE L, ATTRIDGE S R, *et al.* *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA[J]. *Infection and Immunity*, 1996, 64(1): 283-289.

[7] PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, *et al.* 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*, 2006, 103(5): 1528-1533.

[8] BASLER Á, PILHOFER Á, HENDERSON G, *et al.* Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure[J]. *Nature*, 2012, 483(7388): 182-186.

[9] TAYLOR N M, PROKHOROV N S, GUERRERO-FERREIRA R C, *et al.* Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 346-352.

[10] RUSSELL A B, HOOD R D, BUI N K, *et al.* Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells[J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 343-347.

[11] RUSSELL A B, LEROUX M, HATHAZI K, *et al.* Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 508-512.

[12] AHMAD S, WANG B, WALKER M D, *et al.* An interbacterial toxin inhibits target cell growth by synthesizing (p) ppApp[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 674-678.

[13] BLEVES S, VIARRE V, SALACHA R, *et al.* Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(8): 534-543.

[14] SMITS T H, REZZONICO F, DUFFY B. Evolutionary insights from *Erwinia amylovora* genomics[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155(1): 34-39.

[15] HAAPALAINEN M, MOSORIN H, DORATI F, *et al.* Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 4810-4822.

[16] ASOLKAR T, RAMESH R. The involvement of the Type Six Se-

- cretion System (T6SS) in the virulence of *Ralstonia solanacearum* on brinjal[J]. 3 Biotech, 2020, 10(7): 324-333.
- [17] MA L S, HACHANI A, LIN J S, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta[J]. Cell Host & Microbe, 2014, 16(1): 94-104.
- [18] TIAN Y, ZHAO Y, SHI L, *et al.* Type VI secretion systems of *Erwinia amylovora* contribute to bacterial competition, virulence, and exopolysaccharide production[J]. Phytopathology, 2017, 107(6): 654-661.
- [19] ZHU P C, LI Y M, YANG X, *et al.* Type VI secretion system is not required for virulence on rice but for inter-bacterial competition in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*[J]. Research in Microbiology, 2020, 171(2): 64-73.
- [20] LIN J S, WU H H, HSU P H, *et al.* Fha interaction with phosphothreonine of TssL activates type VI secretion in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(3): e1003991.
- [21] ZHANG L, XU J, XU J, *et al.* TssM is essential for virulence and required for type VI secretion in *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2012, 119(4): 125-134.
- [22] MOUGOUS J D, CUFF M E, RAUNSER S, *et al.* A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus[J]. Science, 2006, 312(5779): 1526-1530.
- [23] HO B T, DONG T G, MEKALANOS J J. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system[J]. Cell Host & Microbe, 2014, 15(1): 9-21.
- [24] BADR S, LI Y, DUAN K. Comparison of the structure, regulation and functions between type three and type six secretion system in gram-negative bacteria[J]. Journal of Medical Microbiology & Diagnosis, 2016, 5(4): 1000243.
- [25] LETUNIC I, BORK P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D493-D496.
- [26] 宋莎莎, 徐进, 许景升, 等. 植物青枯菌Po82菌株VI型分泌系统中hcp基因的克隆及其功能研究[J]. 植物保护, 2012, 38(5): 16-21.
- [27] RUHE Z C, LOW D A, HAYES C S. Polymorphic toxins and their immunity proteins: diversity, evolution, and mechanisms of delivery[J]. Annual Review of Microbiology, 2020, 74(1): 497-520.
- [28] CORBITT J, YEO J S, DAVIS C I, *et al.* Type VI secretion system dynamics reveals a novel secretion mechanism in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(11): e00744-17.
- [29] SANTIN Y G, DOAN T, LEBRUN R, *et al.* In vivo TssA proximity labelling during type VI secretion biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(11): 1304-1313.
- [30] STIETZ M S, LIANG X, LI H, *et al.* TssA-TssM-TagA interaction modulates type VI secretion system sheath-tube assembly in *Vibrio cholerae*[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5065-5075.
- [31] BARBOSA V A A, LERY L M S. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 506-517.
- [32] LIN J S, PISSARIDOU P, WU H H, *et al.* TagF-mediated repression of bacterial type VI secretion systems involves a direct interaction with the cytoplasmic protein Fha[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(23): 8829-8842.
- [33] DURAND E, NGUYEN V S, ZOUED A, *et al.* Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex[J]. Nature, 2015, 523(7562): 555-560.
- [34] BERNAL P, ALLSOPP L P, FILLOUX A, *et al.* The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens[J]. The ISME Journal, 2017, 11(4): 972-987.
- [35] BARRET M, EGAN F, FARGIER E, *et al.* Genomic analysis of the type VI secretion systems in *Pseudomonas* spp.: novel clusters and putative effectors uncovered[J]. Microbiology, 2011, 157(6): 1726-1739.
- [36] 牛苗静, 谢清标, 李婷, 等. 细菌VI型分泌系统Hcp与VgrG蛋白的共进化分析[J]. 热带生物学报, 2018, 9(1): 90-100.
- [37] WANG N, HAN N, TIAN R, *et al.* Role of the Type VI Secretion System in the Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the Causative Agent of Kiwifruit Bacterial Canker[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 297.
- [38] LIU J, YU M, CHATNAPARAT T, *et al.* Comparative transcriptomic analysis of global gene expression mediated by (p) ppGpp reveals common regulatory networks in *Pseudomonas syringae*[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 296-313.
- [39] RECORDS A R, GROSS D C. Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(14): 3584-3596.
- [40] ARVIZU-GÓMEZ J L, HERNÁNDEZ-MORALES A, JOFREGARFIAS A E, *et al.* Temperature, the GacS/GacA system, and host metabolites regulate the type VI secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2013, 79(3): 194-197.
- [41] ZHANG L, XU J, XU J, *et al.* TssB is essential for virulence and required for type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*[J]. Microbial Pathogenesis, 2014, 74: 1-7.
- [42] 罗亚婷, 许景升, 徐进, 等. 青枯菌Po82菌株VI型分泌系统基因簇功能研究[J]. 植物保护, 2016, 42(6): 38-45.
- [43] ASOLKAR T, RAMESH R. Development of T3SS Mutants (hrp⁻ and hrcV⁻) of *Ralstonia solanacearum*, Evaluation of Virulence Attenuation in Brinjal and Tomato—A Pre-requisite to Validate T3Es of *R. solanacearum*[J]. Indian Journal of Micro-

- biology, 2018, 58(3): 372-380.
- [44] KAMBER T, POTHIER J F, PELLUDAT C, *et al.* Role of the type VI secretion systems during disease interactions of *Erwinia amylovora* with its plant host[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 628-639.
- [45] HO B T, BASLER M, MEKALANOS J J. Type 6 secretion system-mediated immunity to Type 4 secretion system-mediated gene transfer[J]. Science, 2013, 342(6155): 250-253.
- [46] BASLER Á, MEKALANOS J. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells[J]. Science, 2012, 337(6096): 815-815.
- [47] YU M, WANG Y C, HUANG C J, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* deploys a versatile antibacterial strategy to increase its competitiveness[J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203(3): e00490-20.
- [48] SANTOS M N M, CHO S T, WU C F, *et al.* Redundancy and specificity of type VI secretion vgrG loci in antibacterial activity of *Agrobacterium tumefaciens* 1D1609 strain[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3004.
- [49] BELLIENY-RABELO D, TANUI C K, MIGUEL N, *et al.* Transcriptome and comparative genomics analyses reveal new functional insights on key determinants of pathogenesis and interbacterial competition in *Pectobacterium* and *Dickeya* spp[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(2): e02050-18.
- [50] WU C F, SANTOS M N M, CHO S T, *et al.* Plant-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* strains have diverse type VI effector-immunity pairs and vary in in-planta competitiveness[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2019, 32(8): 961-971.
- [51] BORGEAUD S, METZGER L C, SCRIGNARI T, *et al.* The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer[J]. Science, 2015, 347(6217): 63-67.
- [52] THOMAS J, WATVE S S, RATCLIFF W C, *et al.* Horizontal gene transfer of functional type VI killing genes by natural transformation[J]. MBio, 2017, 8(4): e00654-00617.
- [53] STEELE M I, KWONG W K, WHITELEY M, *et al.* Diversification of type VI secretion system toxins reveals ancient antagonism among bee gut microbes[J]. MBio, 2017, 8(6): e01630-17.
- [54] LIN H H, YU M, SRIRAMOJU M K, *et al.* A high-throughput interbacterial competition screen identifies ClpAP in enhancing recipient susceptibility to type VI secretion system-mediated attack by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 10: 3077.
- [55] CASABONA M G, SILVERMAN J M, SALL KM, *et al.* An ABC transporter and an outer membrane lipoprotein participate in posttranslational activation of type VI secretion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(2): 471-486.
- [56] CHIEN C F, LIU C Y, LU Y Y, *et al.* HSI-II gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 encodes a functional type VI secretion system required for interbacterial competition[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1118.
- [57] ALLSOPP L P, COLLINS A C, HAWKINS E, *et al.* RpoN/Sfa2-dependent activation of the *Pseudomonas aeruginosa* H2-T6SS and its cognate arsenal of antibacterial toxins[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(1): 227-243.
- [58] LIANG X, MOORE R, WILTON M, *et al.* Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2015, 112(29): 9106-9111.
- [59] FREEMAN BC, CHEN C, YU X *et al.* Physiological and transcriptional responses to osmotic stress of two *Pseudomonas syringae* strains that differ in epiphytic fitness and osmotolerance[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(20): 4742-4752.
- [60] 杨俊, 王星, 王彦芳, 等. 云南省水稻细菌性条斑病菌的致病型划分和水稻抗性资源的鉴定[J]. 植物病理学报, 2020, 50(2): 218-227.
- [61] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629.
- [62] STOLLE A S, MEADER B T, TOSKA J, *et al.* Endogenous membrane stress induces T6SS activity in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2021, 118(1): e2018365118.
- [63] SI M, ZHAO C, BURKINSHAW B, *et al.* Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2017, 114(11): E2233-E2242.
- [64] LIN J, ZHANG W, CHENG J, *et al.* A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 14888-14899.
- [65] SI M, 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.
- [66] SONG L, PAN J, YANG Y, *et al.* Contact-independent killing mediated by a T6SS effector with intrinsic cell-entry properties[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 423-434.
- [67] ZHU L, XU L, WANG C, *et al.* T6SS translocates a micropeptide to suppress STING-mediated innate immunity by sequestering manganese[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences, 2021, 118(42): e2103526118.
- [68] LI C, ZHU L, WANG D, *et al.* T6SS secretes an LPS-binding effector to recruit OMVs for exploitative competition and horizontal gene transfer[J]. The ISME Journal, 2022, 16(2): 500-510.
- [69] 韩长志, 王娟. 黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*

756C中VI型分泌蛋白的生物信息学分析[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35 (4): 42-48.

[70] 韩长志, 祝友朋, 王韵晴. 核桃细菌性黑斑病的研究进展[J]. 林业科学研究, 2021, 34 (4): 184-190.

A Review on the Type VI Secretion System of Plant Pathogenic Bacteria

XIA Xiong-fei¹, BO Shu-wen¹, HAN Chang-zhi^{1,2}

(1. College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. The Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] Type VI secretion system (T6SS) is one of the regulatory systems that plays important functions in plant pathogenic bacteria. In terms of defense and other aspects, clarifying the T6SS protein and functional differences of important plant pathogenic bacteria will help promote the development and utilization of new pesticides for the prevention and treatment of plant diseases. [Method] In the study, five kinds of important plant pathogenic bacteria (*Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) bacterium in 138 conservative T6SS proteins structure domain and genetic relationships were analyzed, and the literatures about the above five kinds of bacteria in the database of the T6SS function research were also analyzed. [Results] T6SS proteins in the five kinds of plant pathogenic bacteria were different in species and quantity. According to proteins sequence homology and domain, the above proteins could be divided into three categories. Among them, T6SS proteins containing VgrG, HCP and other domains had good clustering discrimination, while T6SS proteins containing TssA, TssG and other domains could be divided into different categories. [Conclusion] The proteins and function of T6SS in the five kinds of plant pathogenic bacteria have certain conservation and unique characteristics. This study provides a theoretical basis for further prediction and analysis of T6SS proteins in different plant pathogenic bacteria and the relationship between different T6SS proteins.

Keywords: Plant pathogens bacteria; T6SS; Structural domain; Function; Genetic relationships; review

(责任编辑: 崔 贝)