

文章编号: 1674-7054(2018)01-0090-11

细菌VI型分泌系统 Hcp 与 VgrG 蛋白的共进化分析

牛苗静, 谢清标, 李 婷, 李春霞, 陈银华, 陶 均

(海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/热带农林学院, 海口 570228)

摘 要: 以组成 VI 型分泌系统(T6SS)鞘结构蛋白 Hcp 和 VgrG 为研究对象, 通过蛋白质序列同源性、进化特征及表达相关性的分析, 以了解 Hcp 和 VgrG 共进化的特征及其在表达上的相互影响。结果表明: Hcp 与其他 T6SS 结构基因共进化, 但 VgrG 却有很大的随机性。1 个细菌可能有多套 T6SS, 一般 1 个 *hcp* 基因对应 1 套系统。*vgrG* 的数目变化很大, 有的细菌只有 1 个 *vgrG* 基因, 有的细菌却多达 30 个, 且与有多少套 T6SS 没有多大的关系。进化分析表明: Hcp 可分为 14 个类, 种间的差异小于种内差异。VgrG 在进化上可分为 3 大类, 种间差异也小于种内差异。VgrG 多样性可能与其识别并辅助不同效应因子转运有关。共进化分析显示 VgrG 与 Hcp 具有一定的共进化特性, 可推测单个细菌中相互配对的 VgrG 与 Hcp。表达分析显示, 在水稻细菌性条斑病菌 RS105 中, 几乎所有的 *vgrG* 都与 *hcp* 基因的表达正相关, 说明在表达水平不能分析两者之间的进化关系, 但可说明 RS105 中 VgrG 与 Hcp 功能的相关性。因此, VgrG 与 Hcp 在进化和功能上具有显著相关性。

关键词: 革兰氏阴性菌; 水稻细菌性条斑病菌; T6SS; Hcp; VgrG

中图分类号: S 718.83; Q 349.53 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.01.012

VI 型分泌系统(Type VI secretion system, T6SS)是细菌将效应因子注射到原核或真核细胞的纳米机器, 在病原菌与宿主及细菌之间的竞争中发挥重要的作用, 是某些细菌在自然界生存的必要条件之一^[1-3]。结构上, T6SS 与噬菌体类似, 有 1 个由多个蛋白组成的基座及 1 个 6 聚体 Hcp 蛋白组成的鞘^[4-5]。基座固定在细胞膜上, 而 Hcp 鞘在 ATP 酶作用下可伸缩, 从而将效应因子注射到其他细胞内^[6]。在鞘的顶端是 VgrG 蛋白, 其功能还不是很清楚, 可能是与效应因子结合后也可能是自由状态下通过 Hcp 鞘运输到顶端的。T6SS 效应因子一般具有毒素的功能, 可抑制细菌或真核细胞的正常活动。细菌本身会合成特定的免疫蛋白中和这些毒素的毒性, 以保障自身的正常活动^[1]。这些免疫蛋白可能与 Hcp, VgrG 等蛋白结合, 可帮助效应因子有效的分泌到其他细胞, 但免疫蛋白、效应因子及 Hcp, VgrG 之间的关系还不清楚。由于 Hcp 和 VgrG 共同组成鞘装置, 二者缺一不可, 因此在进化上 Hcp 和 VgrG 应该共进化。根据已测序的细菌基因组, 大约有 25% 的革兰氏阴性菌编码 T6SS, 而且有的细菌编码多达 8 个 T6SS, 这些 T6SS 在同个细菌中的功能可能是不同的。一般而言, 1 个细菌有多少个 T6SS 就有多少个 Hcp 编码基因, 表现出一对一的关系, 但是 *hcp* 与 *vgrG* 基因数目并不一致。只要细菌编码 T6SS, 至少含有 1 个 *vgrG*, 但其数目并不能反映细菌 T6SS 数目。因此, 了解 Hcp 和 VgrG 的关系将有助于全面认识 T6SS。

1 材料与方法

1.1 材料 Hcp 和 VgrG 蛋白及基因序列下载 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。Xoc RS105 由上

收稿日期: 2017-12-06

修回日期: 2017-12-29

基金项目: 海南大学青年科学基金(hdkyxj201701); 海南省自然科学基金(20163049、20163050); 农业部公益性行业科研专项(201403075)

作者简介: 牛苗静(1992-), 女, 海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生. E-mail: 865338824@qq.com;

通信作者: 陶均(1976-), 男, 副研究员, 博士. 研究方向: 病原微生物与宿主互作机制研究. E-mail: taoj@hainu.edu.cn

海交通大学何亚文教授馈赠,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 度冰箱。化学试剂购自广州化学试剂公司和 Sigma。PCR 试剂购自全式金生物科技有限公司及 Thermo Fisher Scientific。限制性内切酶购自 NEB。

1.2 生物信息学分析 序列比对及进化树分析采用 MEGA6^[7],进化分析采用最大相似法。共进化分析采用 ParalogMatching 法^[8] 采用 String 在线分析法(<https://string-db.org/>)分析共存在。蛋白质 2 级结构分析采用保守结构域数据库搜索法(CDD 法)^[9]。蛋白质保守结构 logo 视图采用 HMM logo 分析法(<http://skyalign.org/>)^[10]。

1.3 RNA 提取及 qPCR 分析 RS105 Δ Xoc1355 Δ Xoc2542 及 Δ dT6SS 接种于 PSA 培养基(1% 牛肉膏, 1% 酵母提取物, 1% 蔗糖)中 20 h 后按 1 : 50 转接到新鲜的 PSA 中,待 $OD_{600} \approx 0.8$ 时收集菌体,液氮速冻后进行 RNA 提取。RNA 提取按照 QIAGEN 公司 RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 说明进行。cDNA 合成按 Thermo 公司的 Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 说明进行。应用 Maxima[®] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) 进行表达量的检测,以 *rpoD* 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算表达量差异^[11]。PCR 引物见表 1。

表 1 qPCR 引物
Tab. 1 Primers for qPCR

名称 Primer	序列 5' - 3' Sequence 5' - 3'	名称 Primer	序列 5' - 3' Sequence 5' - 3'
Xoc1362qF	CTACCGTTCTTCCGCATTGG	Xoc0022qF	CAGGGCATGTTGCTGACCAC
Xoc2545qF	CCACAGTACTTTCCGCCCTCA	Xoc0022qR	CATAGTCCCCCAGCCCCCTTG
Xoc1362/2545qR	GAAACGGAAGCCGCCGCCATC	Xoc1578/1714/1560qF	CAGCTACCGCTTGCCGATAC
Xoc1315qF	GCAGCAGGCGTATCCGTTGCC	Xoc1578qR	GCAGTACGCAACTTCGGGT
Xoc1315qR	CAGGCGATCCAGTCGTTTCATG	Xoc1714qR	CAGTACGCAACTTCGGGGA
Xoc1540qF	TTGCGATCATTACCGACACA	Xoc1560qR	ATGGCAGTACGCAACTTCGC
Xoc1540qR	CACGTCCACCGGCAAGTTGTT	Xoc1584qF	CGCACCTGCCGCATCTTCCAA
Xoc1535qF	GTAGGCAGCCAGTTCCTGCCA	Xoc1584qR	TGGCACTACGCAACTTCGGGG
Xoc1535qR	GGAACGCCGGCTTCGCCCTTG	Xoc4395qF	GCACCTGCCGCATCTTCCAGC
Xoc1526qF	GGCACCGCAGCAGGGCCAGGGC	Xoc4395qR	TGTCCGGCAGCTCTCCTGCT
Xoc1526qR	GTGCTGCGTGCCGCCACCGCG	Xoc4402/4533/2021qF	CGCCTGCCATGGGACGCAGTG
Xoc1348qF	GCGGCCTGGACGCGCGCGCCG	Xoc4402/4533/2021qR	GACAGGTCGTTGGCGTGTTTG
Xoc1348qR	TGTGCTGGACCAGGTAGCCCA	Xoc2478qF	CAGTCCGTTGCCATCAGTCAG
Xoc1327qF	CCGACGGCGCCGCGACGGTG	Xoc4382qF	GGACTTGATGCAGTCCGTTGA
Xoc1327qR	CGCGGATGAGTTTGATCGGTC	Xoc2478/4382qR	CGCTCGCCGTCGTGGTCCCGG
Xoc1337qF	TATGCCGGGCAGGCCCTGCAA	Xoc0718qF	GCGATCACCAACCAGTACC
Xoc1337qR	GCGGCGATGAGTTTGATCGGC	Xoc0718qR	GTCGAAGACCACCAGCGTAT
Xoc1323qF	TGCACAGCGCCAGGCAATCG	Xoc1342qF	CGTCTTGGGTGGGAGATG
Xoc1323qR	GCGTTGGCGCTGATCAGCTTC	Xoc1342qR	GCCACCTCGGCCGCTCCCTG
Xoc1370qF	GCCGCAGCCTGCGCCTGGCC	Xoc2533qF	GTGGGGCAGAGGACTACAAC
Xoc1370qR	TGCTGCGCGCGCGCTGGCCG	Xoc2533qR	GTTTGATCTCGGCGGTTTCG
Xoc3538qF	ACGAAATGGGGCGCATCCTGG	Xoc3452qF	CATCGAACTGCTTTCCGCAC
Xoc3538qR	CGCGGGATGAACTGATGCCCA	Xoc3452qR	TTACCGACCTGGGCAAATC
Xoc2042/3290qF	AGCGGTCCCCCGCCACCCGA	Xoc4252qF	CACTTGCGGATACAGCCCAC
Xoc2042/3290qR	GCCGGCCTTGCCGACCACCGC	Xoc4252qR	GGATTGCTGGCCGATGTT

1.4 数据分析及作图 qPCR 数据分析采用 Applied Biosystems 提供的软件进行分析 ,采用 GraphPad Prism 5 作图 ,图像后期处理采用 Adobe Photoshop 8.0 软件。

2 结果与分析

2.1 Hcp 蛋白进化特征 Hcp 家族蛋白长度大约在 150 ~ 170 个氨基酸之间^[12] ,其中 ,中部 130 个氨基酸较为保守 (图 1) 。除了极少数有额外的结构域外 ,绝大多数 Hcp 蛋白都只有单一的结构域。Hcp2 级结构含 1 个 α 螺旋和 10 个 β 折叠 6 个 Hcp 蛋白单体组成 T6SS 的分泌鞘结构 ,形成 40 Å 的内部通道 ,介导效应因子通过^[6, 13] 。

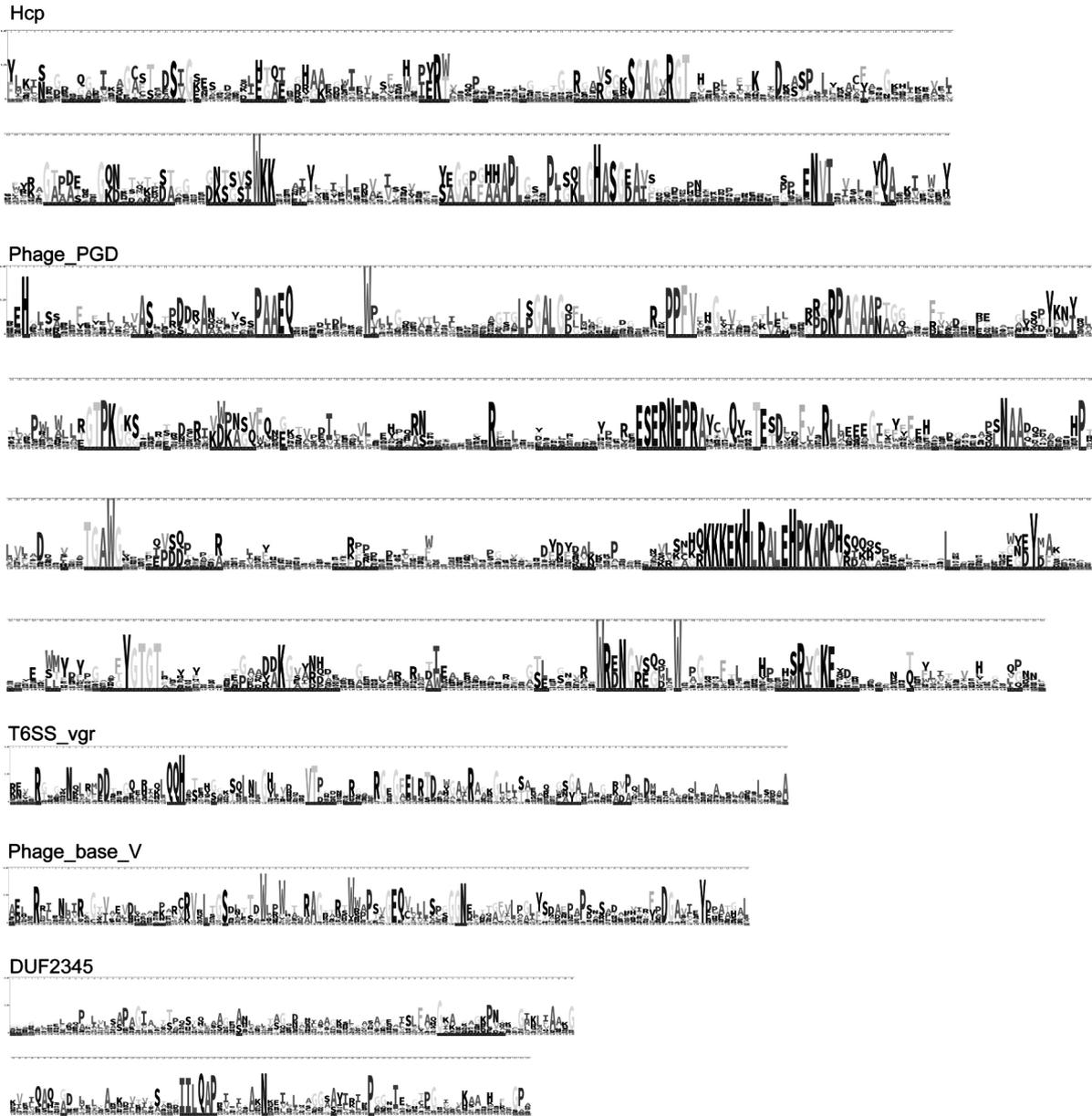


图 1 Hcp 及 VgrG 蛋白结构域的保守性
Fig. 1 The conservation of Hcp and VgrG domains

从表 2 中可知 *hcp* 基因数目在不同的菌中相差很大 ,甚至同一亚种不同的分离株之间都有很大的差异。*Hcp* 基因数目的变化大致反映细菌编码 T6SS 的数目 ,也在一定程度上反映细菌对外界环境的适应能力。除少数特例外 ,*Hcp* 在种间的同源性远高于种内的同源性 ,菌株之间的同源性远高于单一细菌内的不

同 Hcp(图 2)。为进一步比较其进化关系,对 48 个不同种属的菌株,包含致病菌(动物及植物)及非致病菌,编码的 108 个 Hcp 进行聚类分析,发现 Hcp 进化上相关性很大,不能将其明显的分为几类,在同一根目录下可分为 14 类(图 2)。这些分类与其种属及致病性没有显著的相关性,说明 Hcp 在进化上相对保守,受外界环境影响较少,差异性可能主要来源于同一菌株的基因加倍以及菌株间的基因水平转移。

表 2 不同菌株中 hcp 和 vgrG 基因的数目

Tab. 2 Number of hcp and vgrG genes in the bacterial strains used in this study

菌株代码 Organism code	菌株 Strains	hcp	vgrG
stm	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium LT2	4	3
sek	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A AKU12601	4	1
cfar	<i>Citrobacter farmeri</i>	1	3
sty	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Typhi CT18	3	1
yen	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> 8081	1	1
ypa	<i>Yersinia pestis</i> Antiqua	2	10
bxe	<i>Paraburkholderia xenovorans</i> LB400	4	4
btz	<i>Burkholderia thailandensis</i> H0587	4	13
pae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	2	10
pbc	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> DF41	2	6
xcn	<i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i> NT17	1	1
xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	2	2
xac	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> 306	1	1
xor	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> BLS256	2	30
xop	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> PXO99A	2	17
azo	<i>Azoarcus</i> sp. BH72	3	3
azc	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	3	1
xne	<i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061	1	5
rsp	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	1	2
rso	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	1	13
abz	<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR - ZJ06	1	3
bam	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	2	8
bpk	<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 13179	5	14
axy	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8	2	4
ecp	<i>Escherichia coli</i> O6:K15:H31 536	5	4
ron	<i>Raoultella ornithinolytica</i> S12	8	2
kpr	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> SB3432	2	2
vsp	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	2	3
atf	<i>Agrobacterium fabrum</i>	1	2
tol	<i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1	1	1
sde	<i>Saccharophagus degradans</i>	1	2
psm	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM9913	1	1
psyr	<i>Pseudomonas syringae</i> CC1557	7	7
psyg	<i>Psychrobacter</i> sp. P11G5	1	3
vpa	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	1	2
sed	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Dublin	3	2

续表2 Continued tab.2

菌株代码 Organism code	菌株 Strains	hcp	vgrG
kox	<i>Klebsiella michiganensis</i> KCTC 1686	2	5
bav	<i>Bordetella avium</i>	1	1
ppt	<i>Pseudomonas putida</i> S16	3	4
pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000	1	6
pspw	<i>Paraburkholderia sprentiae</i>	4	9
cvi	<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	6
eae	<i>Klebsiella aerogenes</i> KCTC 2190	2	5
bmv	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1	3	8
dac	<i>Delfia acidovorans</i>	1	5
aaa	<i>Acidovorax avenae</i>	1	8
psf	<i>Pseudovibrio</i> sp. FO-BEG1	1	4
atu	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ach5	1	1

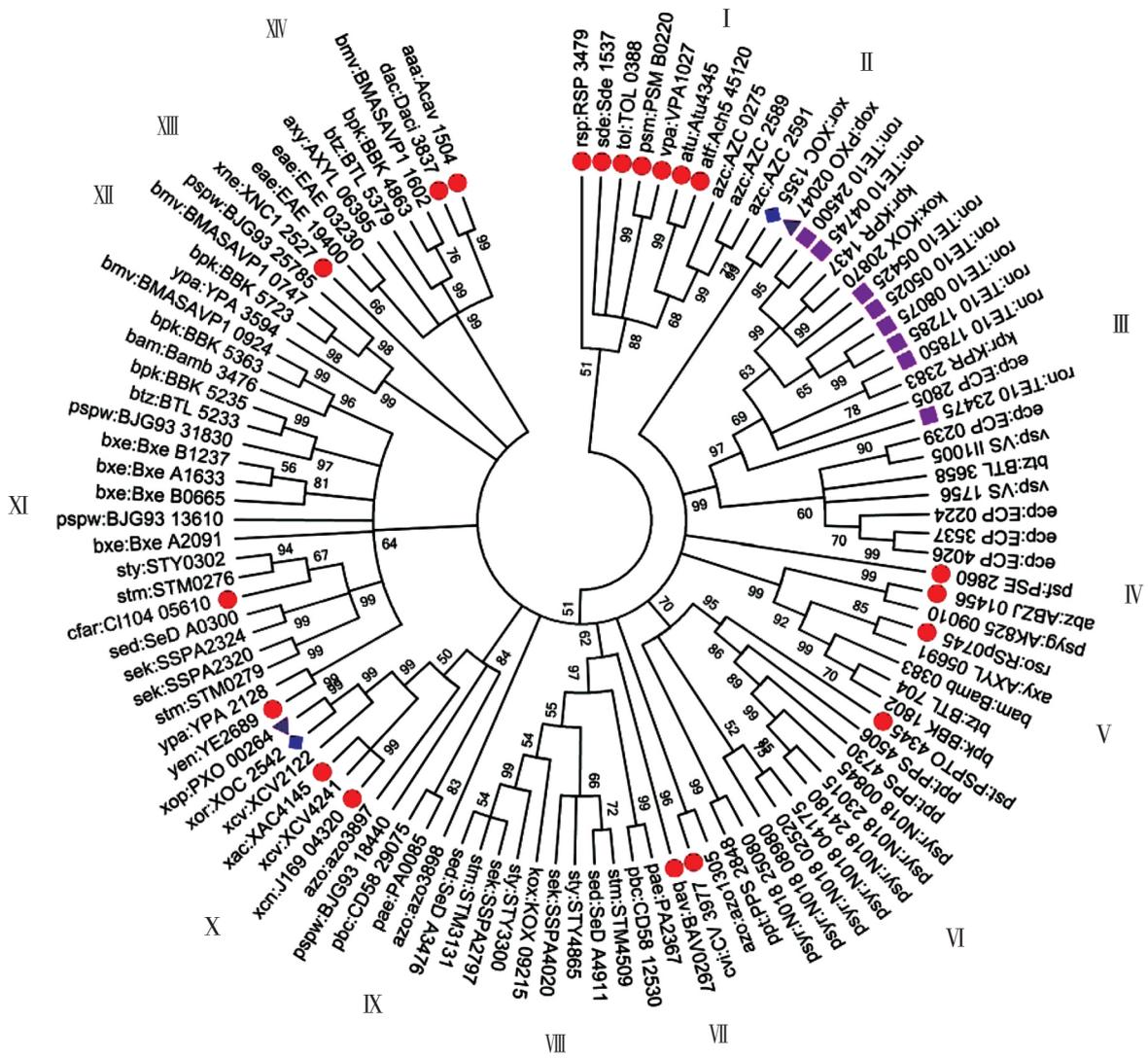


图2 不同细菌编码 Hcp 的进化分析
Fig.2 The phylogenetic tree of Hcp proteins

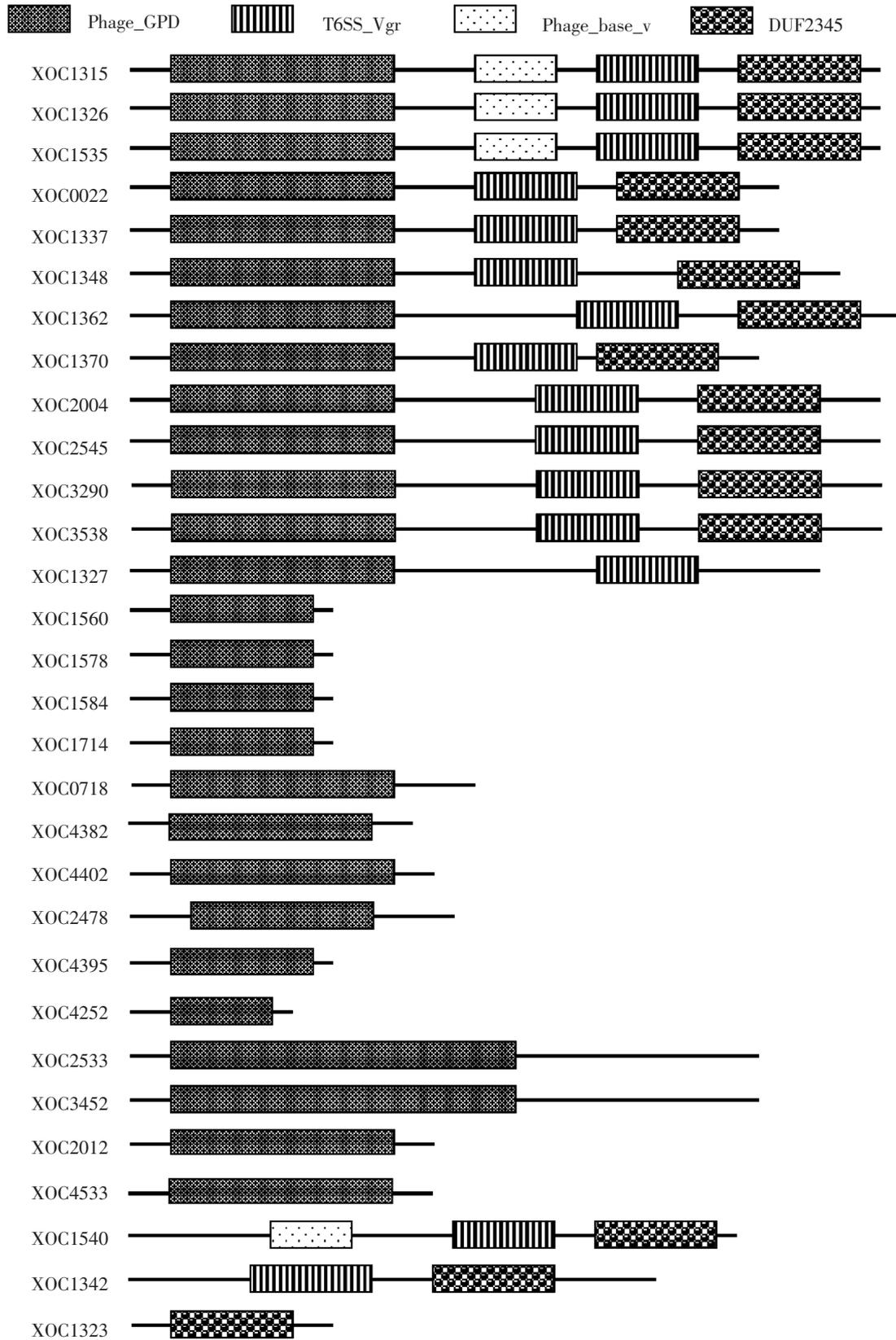


图 3 Xoc RS105 中 VgrG 蛋白的结构组成

Fig.3 The domains of VgrG in Xoc RS105

2.2 VgrG 进化特征 典型的 VgrG 蛋白有 2 个结构域:Phage_GPD 和 T6SS_Vgr。一些 VgrG 只有其中的一个结构域,另外一些还有额外的结构域,如 Phage_base_V, DUF2345 等(图 3)。这些结构域的保守性相对于 Hcp 要低一些,但都有一些相对保守的基元(motif),其中 Phage_GPD 在进化上相对保守,也是 VgrG 相对保守的结构域(图 1)。对 48 个不同菌株编码的 247 个 VgrG 进行聚类分析发现其能归为 3 类,同一细菌编码的 VgrG 可归为一类也可分属不同的类,如燕麦嗜酸菌(*Acidovorax avenae*)的 8 个 VgrG 同归于 III 类,而水稻百叶枯及条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 和 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)编码的 VgrG 则归属于第 I 和 III 类(图 4)。这说明同一细菌 vgrG 基因可能首先通过基因水平转移的方式获得,然后通过基因复制进行加倍。在燕麦嗜酸菌中可能早期获得了 1 个 vgrG 而后在进化过程中复制获得了其他 7 个;在水稻百叶枯及条斑病菌中,早期获得了 2 个 vgrG 基因,然后各自复制获得了 2 类 vgrG,这与燕麦嗜酸菌中只有 1 套 T6SS 而水稻百叶枯及条斑病菌编码 2 套 T6SS 是一致的(表 2)。

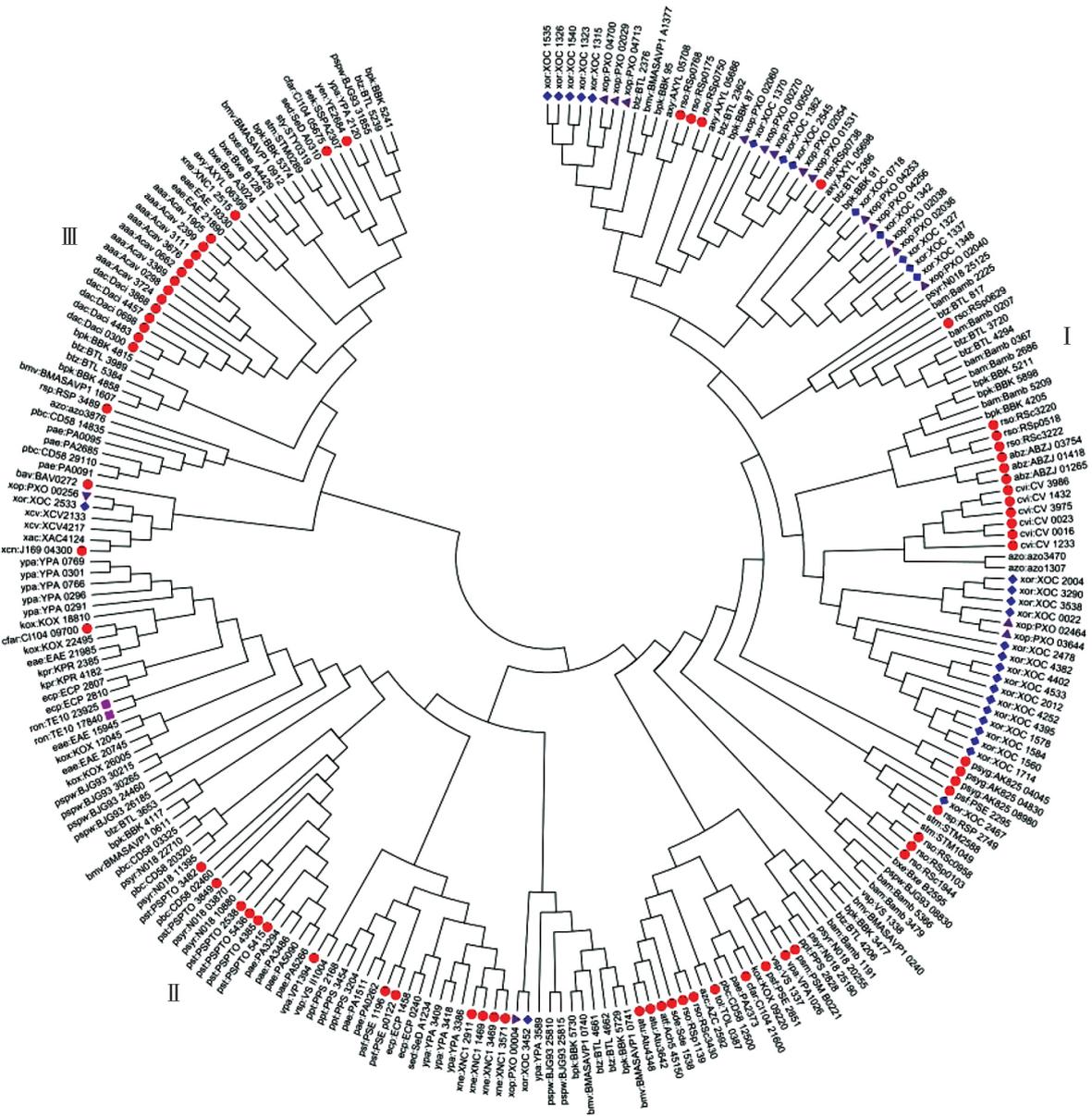


图 4 不同细菌编码 VgrG 的进化分析
Fig.4 The phylogenetic tree of VgrG proteins

表 3 Hcp-VgrG 配对
Tab. 3 The Hcp-VgrG pair in the bacteria

菌株 Strains	溶血素调节 蛋白 Hcp	缬氨酸甘氨酸 重复蛋白 G VgrG	菌株 Strains	溶血素 调节蛋白 Hcp	缬氨酸甘氨酸 重复蛋白 G VgrG	菌株 Strains	溶血素 调节蛋白 Hcp	缬氨酸甘氨酸 重复蛋白 G VgrG
ypa	YPA_3594	YPA_3589	ron	TE10_17285	TE10_17840	eae	EAE_19400	EAE_19330
ypa	YPA_2128	YPA_2120	ron	TE10_08075	TE10_23925	eae	EAE_03230	EAE_21890
yen	YE2689	YE2684	ron	TE10_05425	TE10_23925	dac	Daci_3837	Daci_3868
xor	XOC_2542	XOC_2533	ron	TE10_05025	TE10_17840	cvi	CV_3977	CV_3975
xor	XOC_1355	XOC_1362	ron	TE10_04745	TE10_17840	cfar	CI104_05610	CI104_05675
xop	PXO_02047	PXO_02054	psyr	N018_25080	N018_25190	bxe	Bxe_B1237	Bxe_B2595
xop	PXO_00264	PXO_00256	psyr	N018_24180	N018_22710	bxe	Bxe_B0665	Bxe_B2595
xne	XNC1_2527	XNC1_2515	psyr	N018_23015	N018_22710	bxe	Bxe_A2091	Bxe_B1281
xcv	XCV4241	XCV4217	psyr	N018_08980	N018_25190	bxe	Bxe_A1633	Bxe_B1281
xcv	XCV2122	XCV2133	psyr	N018_04175	N018_25190	btz	BTL_704	BTL_817
xcn	J169_04320	J169_04300	psyr	N018_02520	N018_25190	btz	BTL_5379	BTL_5384
xac	XAC4145	XAC4124	psyr	N018_00845	N018_25190	btz	BTL_5233	BTL_5239
vsp	VS_III005	VS_III004	psyg	AK825_09010	AK825_08980	btz	BTL_3658	BTL_3720
vsp	VS_1756	VS_III004	pst	PSPTO_4345	PSPTO_4385	bpk	BBK_5723	BBK_5729
vpa	VPA1027	VPA1026	pspw	BJG93_31830	BJG93_31855	bpk	BBK_5363	BBK_5211
tol	TOL_0388	TOL_0387	pspw	BJG93_25785	BJG93_25810	bpk	BBK_5235	BBK_5241
sty	STY4865	-	pspw	BJG93_18440	BJG93_31855	bpk	BBK_4863	BBK_4858
sty	STY3300	-	pspw	BJG93_13610	BJG93_08830	bpk	BBK_1802	-
sty	STY0302	STY0319	psm	PSM_B0220	PSM_B0221	bmv	BMASAVP1_1602	BMASAVP1_1607
stm	STM4509	-	psf	PSE_2860	PSE_2851	bmv	BMASAVP1_0924	BMASAVP1_0912
stm	STM3131	-	ppt	PPS_4730	-	bmv	BMASAVP1_0747	BMASAVP1_0741
stm	STM0279	STM0289	ppt	PPS_4506	-	bav	BAV0267	BAV0272
stm	STM0276	STM0289	ppt	PPS_2848	PPS_2828	bam	Bamb_3476	Bamb_3479
sek	SSPA4020	-	pbc	CD58_29075	CD58_29110	bam	Bamb_0383	Bamb_0367
sek	SSPA2797	-	pbc	CD58_12530	CD58_14835	azo	azo3898	Azo3470
sek	SSPA2324	SSPA2307	pae	PA2367	PA2685	azo	azo3897	azo3876
sek	SSPA2320	SSPA2307	pae	PA0085	PA0091	azo	azo1305	azo1307
sed	SeD_A4911	-	kpr	KPR_2383	KPR_2385	azc	AZC_2591	AZC_2591
sed	SeD_A3476	-	kpr	KPR_1437	KPR_4182	azc	AZC_2589	AZC_2591
sed	SeD_A0300	SeD_A0310	kox	KOX_20870	KOX_12045	azc	AZC_0275	AZC_2591
sde	Sde_1537	Sde_1538	kox	KOX_09215	KOX_09220	axy	AXYL_06395	AXYL_06399
rsp	RSP_3479	RSP_2749	ecp	ECP_4026	-	axy	AXYL_05691	AXYL_05686
rso	RSp0745	RSp0750	ecp	ECP_3537	-	atu	Atu4345	Atu4348
ron	TE10_24500	TE10_23925	ecp	ECP_2805	ECP_2807	atf	Ach5_45120	Ach5_45150
ron	TE10_23475	TE10_23925	ecp	ECP_0239	ECP_0240	abz	ABZJ_01456	ABZJ_01418
ron	TE10_17850	TE10_17840	ecp	ECP_0224	-	aaa	Acav_1504	Acav_3724

2.3 Hcp 与 VgrG 的共进化 1 个 Hcp 必须至少需要 1 个 VgrG 才能将效应因子泵出细胞,因此 Hcp 与 VgrG 在功能上的协同性需要在进化上有保障,两者之间需要共同进化。通过共进化 (co-evolution) 及共存在 (co-occurrence) 分析可寻找细胞内单个的 Hcp 亲和力和最高的 VgrG,可以分析单一细胞内 VgrG 的进化关系。结果显示,细胞内的多数 Hcp 都有其配对的 VgrG,未配对的 Hcp 是由于其通过原始的 Hcp 基因复制形成,在这个过程中丢掉了一些保守的信息而无法很好地配对(表 3)。虽然可以找到有可能的 Hcp-VgrG 对,但并不表明其他的 Hcp-VgrG 配对就不发生,只是说明其配对的效率稍小而已。实际上,细胞编码多个 Hcp 和 VgrG 可能是适应其多变的生存环境所必须的,只是在进化的早期阶段满足这种一对一的关系。由于 Hcp 作为 T6SS 结构-鞘-的组成部分,其变异的速度相当较慢,所以保守性高,而 VgrG 作为效应因子外泌的载体,不同的效应因子在结构上的不同需要不同的 VgrG,因此 VgrG 比 Hcp 变异要大很多(图 1)。另外由于 VgrG 与 Hcp 结合的结构域可能是 Phage_GPD,因此,Phage_GPD 的保守性相对要高很多(图 1)。

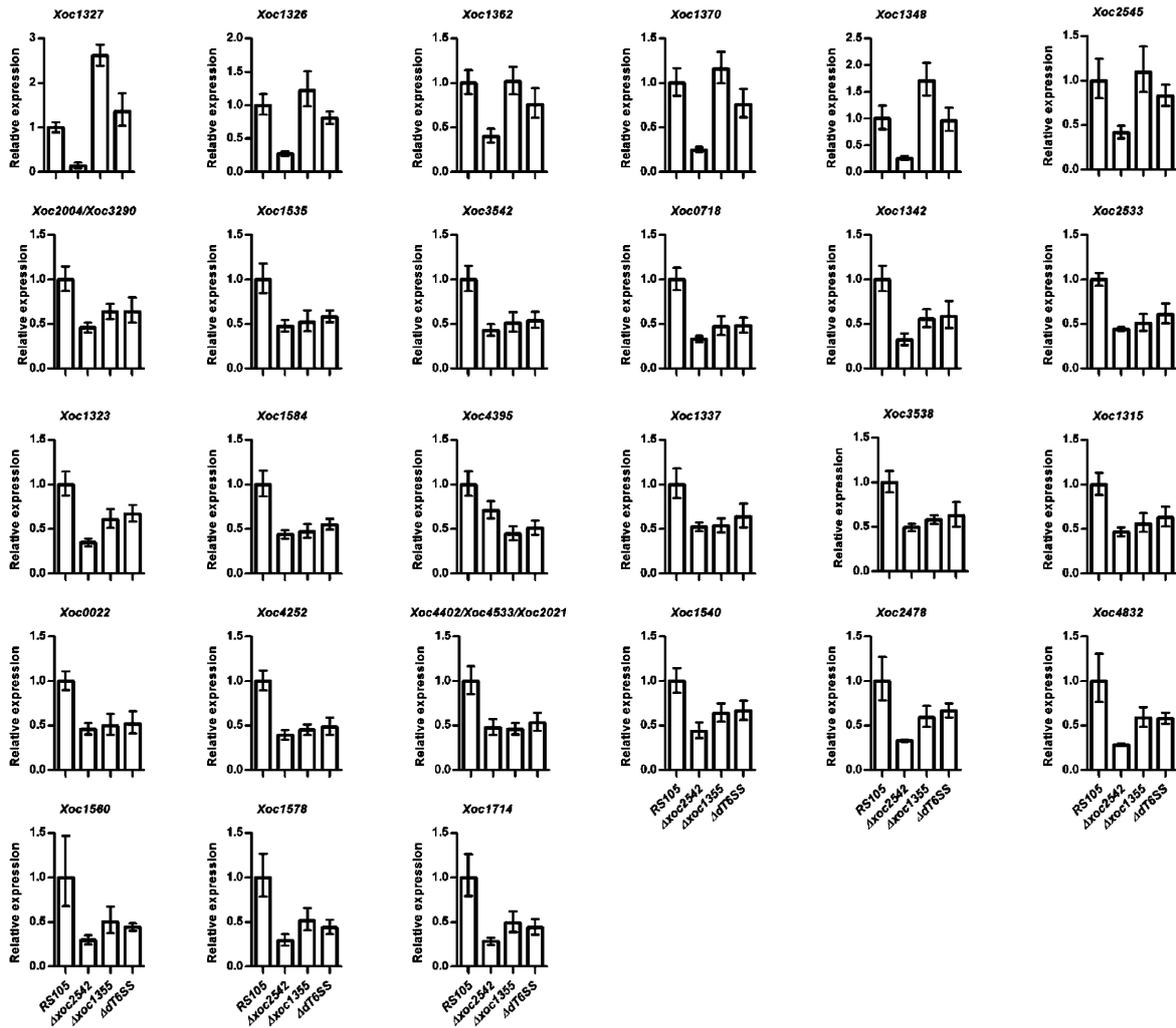


图 5 在 Xoc RS105 hcp 突变体中 vgrG 基因的相对表达水平

Fig. 5 The relative expression levels of vgrG genes in Hcp mutants ($\Delta xoc2542$, $\Delta xoc1355$, $\Delta dT6SS$) in Xoc RS105

2.4 Xoc RS105 中 Hcp 与 VgrG 在表达水平上的关联性分析 Hcp 与 VgrG 存在功能的协调性及进化的协同性 hcp 与 vgrG 可能在表达上也存在着关联性。因此,笔者以编码最多 VgrG 的 Xoc RS105^[14-15] 做实验对象,研究不同遗传背景下 vgrG 的表达水平。首先笔者构建了 2 个 hcp 基因的缺失突变体 ($\Delta Xoc1355$ 和 $\Delta Xoc2542$) 以及它们的双突变体 ($\Delta dT6SS$) 然后检查这些突变体及野生型菌株中各个 vgrG

基因的表达水平。如图 5 所示, Xoc1327, Xoc1348, Xoc1362, Xoc1370, Xoc1526 和 Xoc2545 在 Xoc2542 突变体中的表达量明显低于野生型, 说明这些基因表达主要受到 Xoc2542 的正调控。另外, 这些基因的表达量在 Xoc1355 突变体及 hcp 双突变体明显高于 Xoc2542 突变体, 说明 Xoc1355 同样负调控这些基因的表达。其余的 24 个 *vgrG* 基因表达水平在 3 个突变体中都较野生型低, 突变体之间没有多大的差异, 说明这些基因表达在一定程度上受到 Hcp 的正调控。此外 *vgrG* 基因的表达模式在 Xoc1355 突变体和 hcp 双突变体中相似暗示 Xoc1355 和 Xoc2542 在遗传上可能有上位效应。

3 讨 论

不同的细菌编码多套 T6SS 以适应不同的环境, 在不同种类细菌竞争中可能起到不同的作用。在不同的环境中, 启动不同的 T6SS 表达。因此, Hcp 的进化及分化将影响细菌的生存能力。但是通过同源性及进化分析发现, 这些 Hcp 在序列上具有高度的保守性, 即使是旁系同源物, 其保守性也很高。这表明 Hcp 以及 T6SS 在功能上的相对保守性可能是细菌长期生存选择的结果, 这种保守性可为细菌通过通用机制应对不同环境提供强力保证。但是, VgrG 的同源性及保守性分析发现其进化的速度明显高于 Hcp, 在分类上可分成不同的进化类群, 有着明显的分化现象。而且一个细菌可能编码多达 30 个 VgrG, 他们之间的相似性也很低, 说明其功能存在明显差异性。这些结果在一定程度上反映环境中各种微生物存在空间及营养的竞争, 为了抑制不同微生物的生长, 细菌进化出多种 VgrG 以便运输不同的效应因子靶向不同的细胞, 从而快速建立生长优势。因此, VgrG 蛋白的多样性是细菌为了生存而不断复制加倍形成的, 很好地反映了细菌与环境的互作关系。

由于 VgrG 和 Hcp 共同组成 T6SS 鞘的结构, 其必定存在某种关联性。通过共进化及共存在分析发现单一 Hcp 能够寻找到匹配度最高的 VgrG。虽然单一细菌中 VgrG 种类可能很多, 但是这种最佳拍档的存在说明细菌在进化过程中可利用 *vgrG* 的加倍来实现对不同环境的适应性而不是通过增加 T6SS 的数目, 可以在最佳节能的条件下完成对不同环境的适应能力。

VgrG 和 Hcp 的协调互作不仅表现在进化上, 也可能表现在表达调控上。当细菌感应环境中不利生物存在时, 才可能启动系统的应急表达。因此 *hcp* 的表达与否会调节 *vgrG* 的表达。*vgrG* 基因表达分析证实, 所有的 *vgrG* 基因在 Xoc RS105 中的表达都受到 Hcp 调控, 但在 2 个 T6SS 系统中表现的模式是不一样的, 说明每套系统可能有特异性高亲和的 VgrG, 以便更加高效地应对不同环境变化。

参考文献:

- [1] Alteri C J, Mobley H L. The Versatile Type VI Secretion System [J]. *Microbiology Spectrum* 2016, 4(2): doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0026-2015.
- [2] Coulthurst S J. The Type VI secretion system—a widespread and versatile cell targeting system [J]. *Research in Microbiology*, 2013, 164(6): 640–654.
- [3] Brunet Y R, Espinosa L, Harchouni S, et al. Imaging type VI secretion-mediated bacterial killing [J]. *Cell Reports*, 2013, 3(1): 36–41.
- [4] 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.
- [5] Ruiz F M, Santillana E, Spinola-Amilibia M, et al. Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: a component of the Type VI secretion system [J]. *PloS one*, 2015, 10(6): e0129691.
- [6] Silverman J M, Brunet Y R, Cascales E, et al. Structure and regulation of the Type VI secretion system [J]. *Annual review of microbiology*, 2012, 66(4): 453–472.
- [7] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [8] Gueudre T, Baldassi C, Zamparo M, et al. Simultaneous identification of specifically interacting paralogs and interprotein contacts by direct coupling analysis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(43): 12186–12189.
- [9] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architec-

- tures [J]. *Nucleic acids Research*, 2017, 45(D1): D200 – D203.
- [10] Schuster-Bockler B, Schultz J, Rahmann S. HMM Logos for visualization of protein families [J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, 5(1): 1 – 8.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [12] Filloux A. The rise of the Type VI secretion system [J]. *F1000prime Reports*, 2013, 5(52): 52.
- [13] Pell L G, Kanelis V, Donaldson L W, et al. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(11): 4160 – 4165.
- [14] Bogdanove A J, Koebnik R, Lu H, et al. Two new complete genome sequences offer insight into host and tissue specificity of plant pathogenic *Xanthomonas spp* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(19): 5450 – 5464.
- [15] Zou L F, Wang X P, Xiang Y, et al. Elucidation of the hrp clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 6212 – 6224.

Co-evolution of Hcp and VgrG Proteins of Type VI Secretion System

NIU Miaoqing, XIE Qingbiao, LI Ting, LI Chunxia, CHEN Yinhua, TAO Jun

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources; Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The Type VI secretion system (T6SS) is widely distributed amongst diverse Gram-negative bacterial species. The extracellular components of the T6SS, Hcp and VgrG, form a needle-like injection device that resembles the phage tail. Hcp forms hexameric rings (sheath) and VgrG at the distal tip of the sheath forms a tail spike-like cell-puncturing device. The relationship between Hcp and VgrG was analyzed at evolutionary and expression levels. Results showed that Hcp co-evolved with other T6SS genes while VgrG evolved randomly. One bacterial species may encode more than one T6SS. The number of Hcp is often equal to that of T6SS, but VgrG is not at all the case. A bacterium encoding T6SS may have up to 30 *vgrG* genes which are not related to the number of T6SS. Based on the evolution and homology analysis, Hcp can be classified into 14 types, while VgrG into 3 classes. The orthologs of Hcp and VgrG have higher conservation than the paralogs. The VgrG is believed to act as a carrier of effectors. Thus, the diversity of VgrG might be the reason that a bacterium encodes different effectors to kill different bacterial species. Co-evolution analysis showed that Hcp and VgrG were closely related during evolution, with predictable high affinity partner between Hcp and *vgrG* genes. Expression analysis showed that expression of almost all VgrG genes was positively correlated with the Hcp genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* RS105 which encodes 30 VgrGs, indicating the expression of both VgrG and Hcp can not be used for their relation analysis but for functional relation analysis in RS105. The results support that Hcp and VgrG are functional and evolutionary partners in Gram-negative bacteria.

Keywords: Gram-negative bacterium; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; T6SS; Hcp; VgrG

(责任编辑: 潘学峰)