

III 型分泌系统分子伴侣研究进展

汪 莉¹ 王玉民² 岳俊杰¹ 梁 龙^{1*} 黄培堂¹

(¹军事医学科学院生物工程研究所 医学微生物学与生物安全国家重点实验室 北京 100071)

(²军事医学科学院科技部 北京 100850)

摘 要 :III 型分泌系统广泛存在于革兰氏阴性致病菌中。通过 III 型分泌系统,耶尔森氏菌属、沙门氏菌属、福氏志贺氏菌等革兰氏阴性致病菌注射毒力因子到宿主细胞中,被注入的细菌毒力蛋白在宿主细胞中刺激或干扰宿主细胞的代谢过程,支配细菌与宿主细胞的相互作用,从而引起诸如鼠疫、伤寒、痢疾等许多疾病。III 型分泌系统分子伴侣在帮助毒力蛋白分泌的过程中起到重要作用。尽管发现 III 型分泌系统分子伴侣至今已近十年,但其具体的功能仍不清楚。从分类、功能、与相应底物作用的特点等方面对 III 型分泌系统分子伴侣的研究进展作一简单介绍。

关键词 :III 型分泌,分子伴侣,细菌致病菌

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)06-0840-05

研究发现,很多革兰氏阴性致病菌如耶尔森氏菌属(*Yersinia* spp.)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)等都通过 III 型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)专一性地将蛋白(主要为毒力因子)从细菌胞浆注入到宿主细胞质中,从而导致许多疾病。因此,很多科学家们都致力于 III 型分泌系统的研究,希望找出其分泌的奥妙,进而研制出针对 TTSS 靶点的抗革兰氏阴性致病菌的新药。TTSS 分泌的两大特点是(1)TTSS 只有在细菌和宿主细胞相互作用后才能被激活;(2)一些细菌分泌系统的分泌蛋白含有 N 末端可切除的信号肽序列,而 TTSS 缺乏明确的分泌信号,这是 TTSS 区别于其他分泌系统的一个显著特征^[1]。所有的 TTSS 蛋白可分成 4 类:(1)细菌膜上的装置蛋白(Bacterial membrane apparatus proteins);(2)转位子蛋白(Translocon proteins);(3)被转移的效应蛋白(Translocated effector proteins);(4)TTSS 分子伴侣(Type III chaperones)。TTSS 装置蛋白横跨细胞内、外膜,并延伸形成一个针状结构通向胞外^[2,25]。它分泌两种蛋白到胞外:一种是转位子蛋白,该蛋白在细胞膜上形成一个小孔,使效应蛋白得以通过;另一种是效应蛋白,该蛋白在病原体致病过程中起着关键作用,引起宿主相应的病理变化如修饰宿主细胞肌动蛋白细胞支架功能使其能进入非吞噬细胞内或黏附在上皮细胞表面,诱导感染的巨噬细胞凋亡等等。TTSS 分子伴侣结合相应的效应蛋白,保护相应的效应蛋白在胞质内不被降解,并有效地分泌、转移效应蛋白。TTSS 分子伴侣和参与鞭毛组装的分子伴侣很相似,尽管过去认为鞭毛是 TTSS 的祖先^[3,4],TTSS 分子伴侣从鞭毛伴侣进化而来,但最新一篇报道认为:它们拥有共同的祖先,但却各自独立进化的^[5]。

典型的 TTSS 分子伴侣是低分子量酸性蛋白(大约 15kD),它们都特异性地结合一个或两个效应蛋白或转位子

蛋白,但并非所有效应蛋白或转位子蛋白的分泌都需要 TTSS 分子伴侣。通常,TTSS 分子伴侣的缺失将会导致相应底物不能分泌或分泌锐减,而其他蛋白的分泌却不受影响。一般来说,TTSS 分子伴侣的氨基酸序列缺少同源,不同底物的 TTSS 分子伴侣结合区也不存在同源性^[6]。2001 年 Stashawicz 认为,动物致病菌 TTSS 分泌需要 TTSS 分子伴侣,而植物致病菌 TTSS 中没有 TTSS 分泌伴侣,这可能是动物和植物致病菌 TTSS 的实质性区别^[7]。但是, Karin van Dijk 在 2002 年报道了植物致病菌中的第一个 TTSS 分子伴侣 ShcA,根据对 ShcA 的分析及其他植物 TTSS 分子伴侣的预测发现,植物致病菌 TTSS 分子伴侣和动物致病菌中一样普遍^[8]。

1 TTSS 分子伴侣的共同特点

研究显示,尽管来自不同菌种 TTSS 分子伴侣的氨基酸序列之间几乎没什么同源性,但他们具有某些共同的特征:相对较低的分子量(<20,000),通常等电点较低(4.4~5.2),预测的二级结构以螺旋为主^[6]。它们不含 ATP 结合域,也有别于所有的 Hsp 相关蛋白。通常,TTSS 分子伴侣聚集形成二聚体,结合在相应底物的 N 末端区域上。一般,TTSS 分子伴侣的编码基因都毗邻它作用的底物编码基因^[9]。

2 TTSS 分子伴侣的分类

最新研究显示,TTSS 分子伴侣并非单一家族。总结前人的工作,依据分子伴侣与转位子蛋白或效应蛋白相互作用特点,把 TTSS 分子伴侣分成 3 类^[10,11](表 1)。

第一类:以 SycE 为代表。这类 TTSS 分子伴侣的 C 末端为双性的 α 螺旋小蛋白(14~15kD),多为酸性分子(pI 4.4~5.2)。它们特异地结合在相应底物 N 末端的前 120 个氨基酸上。最主要的特征是,在缺乏 TTSS 分子伴侣时,相应底物

* 通讯作者。Tel/Fax:86-10-63898781;E-mail:ll@bioinf.bmi.ac.cn

作者简介:汪莉(1975-),女,湖北人,博士研究生,主要研究微生物基因组学。E-mail:wangl@bioinf.bmi.ac.cn

收稿日期:2004-02-18,修回日期:2004-05-18

的分泌会受到显著抑制。然而,这些 TTSS 分子伴侣的确切功能仍不清楚^[4,40]。

表 1 III 型分泌系统分子伴侣

Family	Protein	kD	pI	Assisted protein	Strong similarities	
SycE family	SycE	14.7	4.55	YopE (<i>Yersinia</i> spp.) binds to aa 15 ~ 50	ORF1 (<i>P. aeruginosa</i>) Scc1 (<i>Chlamydia psittaci</i>)	
	SycH	14.7	4.88	YopH (<i>Yersinia</i> spp.) binds to aa 20 ~ 70		
	SycT	15.7	4.40	YopT (<i>Yersinia</i> spp.)		
	SycN	15.1	5.20	YopN (<i>Yersinia</i> spp.)	PerX (<i>P. aeruginosa</i>)	
	YscB	15.4	9.30	YopN (<i>Yersinia</i> spp.) (cochaperone)		
	SicP	13.6	4.00	SptH (<i>Salmonella</i> spp.)		
	SpcU		4.40	ExoU (<i>P. aeruginosa</i>)		
	CesT		7.10	Tir (EPECs and EHECs)		
	FlgN	16.5		FlgK and FlgL (Proteus flagellum)		
	FliT	14.0		HAP2 (Proteus flagellum)		
	IpgA	15.0	4.50	IcsB	SicH (<i>Salmonella</i> spp.)	
	SycD family	SycD	19.0	4.53	YopB and YopD (<i>Yersinia</i> spp.)	PerH (<i>P. aeruginosa</i>)
		CesD			Tir (EPECs)	
IpgC		18.0		IpaB and IpaC (<i>Shigella</i> spp.)		
SicA		19.0	4.61	SipB and SipC (<i>Salmonella</i> spp.)		
Spa15 family	Spa15	15.0	4.60	IpaA, IpgB1 and OspC (<i>Shigella flexneri</i>)	InvB (<i>Sodalis glossinidius</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>), YsaK (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	

kD :Molecular mass (Kilodaltons); pI :Isoelectric point; aa :Amino acids; EPEC :Enteropathogenic *Escherichia coli*; EHEC :Enterohemorrhagic *E. coli*.

第二类:以 SycD 为代表,是转位子蛋白 YopB 和 YopD 分泌所必需的 TTSS 分子伴侣。SycD 并不确定结合 YopB 和 YopD 的 N 末端区,而是与它们的多个位点相互作用。如果缺乏 TTSS 分子伴侣 SycD,转位子 YopB 和 YopD 将不能分泌,在细菌细胞内也很难检测到。SycD 与 SycE 明显不同,它能够结合转位子蛋白 YopB 的多个结构域^[4,40]。

第三类:以 Spa15 为代表。2000 年,Cornelis 等根据它们是否和转位子蛋白或者效应蛋白相互作用而分为以上不同的两类。2002 年,Page 等^[11]认为,Spa15 是不同于 SycE 家族和 SycD 家族的一类新的 TTSS 分子伴侣。TTSS 分子伴侣 Spa15 的编码基因位于 TTSS 分泌装置操纵子内,而不是在相应的效应蛋白编码基因附近。目前已证实 TTSS 分子伴侣 Spa15 至少有 3 个结合底物,分别为 IpaA、IpgB1 和 OspC3,而 OspB 和 OspC2 也可能是它的底物。Spa15 与 3 个已知底物的作用区域相同,但这 3 个底物结合区的序列没有相似性,这意味着 Spa15 的结合位点并不保守,与此相比,目前唯一已知作用于多个效应蛋白的 SycE 类 TTSS 分子伴侣 SycH 的结合位点则相对保守。Spa15 对不同底物的作用机制各不相同,对底物 IpgB1 而言,该蛋白是维持底物稳定性所必需的,当 Spa15 缺乏时,在细胞内几乎无法检测到 IpgB1,它在翻译过程中或翻译后不久就被降解了;相对而言,对底物 IpaA, Spa15 不是维持它的稳定性,而是保持着底物处于优先分泌的竞争状态,当 Spa15 缺乏时,底物 IpaA 依然可以在细胞内检测到,但不能被分泌到细胞外。底物 IpaA 自身可以相互作用,作用位点位于 IpaA 序列的 295 ~ 355 氨基酸残基之间,而 Spa15 和底物 IpaA 作用位点位于 IpaA 序列 263 ~ 365 氨基酸残基之间,覆盖了 IpaA 分子间相互作用的区域,因此,TTSS 分子伴侣 Spa15 与底物 IpaA 的结合屏蔽掉了 IpaA 分子间或分子内相互作用的位点,从而使底物 IpaA 处于优先分泌的竞争状态。Spa15 的同源蛋白有鼠疫伤寒沙门氏菌中的 InvB

(31% 相似),小肠结肠炎耶尔森氏菌中的 YsaK (24% 相似)和 *Sodalis glossinidius* 中的 InvH (22% 相似)。

3 TTSS 分子伴侣的作用

TTSS 分子伴侣与底物蛋白的相互作用非常复杂,其功能仍未完全研究清楚。一般来说,TTSS 分子伴侣是稳定细胞质内相应的底物所必需的,另一方面,它也可能阻止了相应底物自身或其它效应蛋白或转位子蛋白未成熟前的同种或异种蛋白的结合,而这种蛋白质未成熟前的结合可能导致结合蛋白的降解。它也参与相应底物的分泌,但不是绝对必需的^[1]。另外,TTSS 分子伴侣还维持相应底物处于优先分泌的竞争状态。通常它们与相应底物分泌信号下游的区域直接结合,此结合可能暴露出分泌信号,从而促进底物的分泌^[12,43]。

3.1 抗底物聚集和稳定底物的作用

TTSS 分子伴侣通过阻止底物在到达最终分泌位置之前的未成熟结合而保护相应的底物不被降解^[10]。1994 年,Me-nard 发现,TTSS 分子伴侣 IpgC 阻止了相应的底物 IpaB 和 IpaC 未成熟前的相互作用,从而维持了它们在细胞内的稳定^[14]。YopE 蛋白在没有相应的 TTSS 分子伴侣 SycE 存在时,非常不稳定,很快就被降解^[15]。但是 SycE 如何维持 YopE 蛋白的稳定性还不清楚。最新的两个研究结果显示,SycE 结合 YopE 的 50 ~ 77 氨基酸残基区域,这个区域具有聚合倾向,SycE 可能是通过屏蔽掉这个区域从而起到稳定 YopE 蛋白的作用^[12,46]。如果从 YopE 中删除掉这个区域,YopE 蛋白仍具有催化活性,因此,还不清楚这个区域在 YopE 蛋白中起什么作用。此外,如果删除这些位点,尽管 YopE 蛋白分泌数量会明显减少,但仍可以分泌,这表明底物和 TTSS 分子伴侣的结合位点本身创造了底物对 TTSS 分子伴侣的需求,因此,在某种程度上,这些位点未成熟前的结合可能导致底物本身的降

解,而 TTSS 分子伴侣阻止了这些位点未成熟前的相互结合。Woestyn 等表示,TTSS 分子伴侣 SycE 的结合位点可能参与底物 YopE 与转位子 YopB、YopD 或 LcrV 相互作用的位点,因此 SycE 阻止了 YopB、YopD 或 LcrV 和 YopE 在未成熟前的相互作用。但是这个假说并不能完全解释 YopE 对 SycE 的需求^[17]。事实上,植物致病菌野油菜黄单胞菌也分泌 YopE,但野油菜黄单胞菌却不能合成类似耶尔森氏菌转位子蛋白。SycE 也是 YopE 在野油菜黄单胞菌内稳定所必需的 TTSS 分子伴侣^[18]。福氏志贺氏菌中的 TTSS 分子伴侣 spa15 对维持 IpaB1 的稳定性非常重要,当缺乏 Spa15 存在时,IpgB1 在翻译过程中或者翻译后不久即被降解^[11]。福氏志贺氏菌中的 TTSS 分子伴侣 IpgC 能阻止转位子 IpaB 和 IpaC 之间在细胞内结合^[19-20],从而维持着这两个蛋白细胞质内的稳定。

3.2 分泌信号和等级分泌决定因子的作用

TTSS 分子伴侣引导底物定位分泌到膜的相应位置^[21-23]。在所有的情况中,TTSS 分子伴侣均与其底物直接结合。TTSS 分子伴侣分泌模型^[24]预测分子伴侣和分泌装置相互作用,然后直接分泌结合的底物。因为 TTSS 结构装置在不同物种细菌中高度保守,因此,在直接引导底物分泌的 TTSS 分子伴侣中很可能存在一个保守的氨基酸序列^[24]。但是,目前的研究结果显示,在 TTSS 分子伴侣中并没有发现分泌识别的共同信号序列^[6],于是有人提出了第二个假说:TTSS 分子伴侣并没有直接和 TTSS 结构装置相互作用,而是结合效应蛋白,形成的分泌信号,然后 TTSS 结构装置识别这个分泌信号,指导底物的正确分泌^[25]。

近来,Birtalan 等^[26]成功地研究了底物 YopE 的 N 末端与 TTSS 分子伴侣 SycE 结合的复合体的空间结构,这个结构和沙门氏菌中 TTSS 分子伴侣 SicP 与底物 Spt 的 N 末端结合的复合体的空间结构非常相似^[6]。虽然无论是结合域之间还是 TTSS 分子伴侣之间都没有明显的序列相似性,但是 Birtalan 等还是认为这些复合体的空间结构具有 TTSS 普遍的三维分泌信号功能^[26]。

Birtalan 等^[26]提出一个非常有意义的假说:TTSS 分子伴侣和它的相应底物结合形成的三维信号促成了暂时的等级分泌(Temporal hierarchy on secretion),也就是说,拥有 TTSS 分子伴侣的 3 个效应蛋白(YopE、YopH 和 YopT)有两个分泌信号:一个定位于 SS 区(N 末端),另一个是分子伴侣和效应蛋白形成的复合体的空间结构。这些蛋白在早期分泌将比没有 TTSS 分子伴侣的效应蛋白(YopM、YopO、YopP)优先分泌,分泌后期,由于含有分子伴侣的效应蛋白因优先分泌在胞质中含量逐渐减少,这时没有 TTSS 分子伴侣的效应蛋白分泌逐渐增多,但至今仍没有有力的证据支持这个假说。不过,还是找到一些等级分泌的证据,如 Boyd 等将由 YopE 蛋白的前 15 个氨基酸融合到腺苷酸环化酶中形成一个融合蛋白,这个融合蛋白可以被野生型鼠疫耶尔森氏菌少量分泌,而在去掉大多数其他 TTSS 底物的多突变鼠疫耶尔森氏菌株中则可以高水平被分泌。这意味着,Yop 蛋白之间存在着竞争分泌。然而,同样地如果将由 YopE 蛋白的前 130 个氨基酸融

合到腺苷酸环化酶中形成一个融合蛋白,这个融合蛋白包含了 TTSS 分子伴侣 SycE 的功能结合域,那么这个融合蛋白既可以被多突变菌高度分泌,也可以被野生菌高度分泌。因此 Boyd 等人认为与 TTSS 分子伴侣的结合赋予了效应蛋白优先分泌的特权^[12]。最近,SycH 也被认为具有等级分泌的功能^[9,27]。

3.3 TTSS 分子伴侣维持着底物有利分泌的非折叠状态

TTSS 分泌的针状结构的直径估计为 3nm^[2],折叠完全的多肽链则明显大于这个直径而不能通过,而未折叠或半折叠的多肽链小于这个直径,因此可以通过。2001 年 Stebbins 报道了沙门氏菌中的效应蛋白 SptP 和 TTSS 分子伴侣 SicP 结合区域的晶体结构。这个结构显示,结合区域一直保持着延伸的、非折叠的状态,在它的周围是 3 个连续的 TTSS 分子伴侣。这个结果暗示,TTSS 分子伴侣维持着相应底物的非折叠或部分折叠状态,而这种非折叠或部分折叠的状态更有利于底物通过分泌装置,分泌到细胞外^[6]。Luo 等进一步给出了生化证据,溶血性致病性大肠杆菌(EHEC)中的 Tir 在和相应的 TTSS 分子伴侣 CesT 结合时,以及沙门氏菌中的 SigD 和相应的 TTSS 分子伴侣 SigE 结合时,Tir 和 SigD 都没有完全折叠^[29]。但是,Birtalan 等研究发现,从大肠杆菌中提纯的 YopE-SycE 复合体具有催化活性^[9],也就是说,YopE 和分子伴侣 SycE 结合时 YopE 折叠完全。另外,不能排除细胞内的情况可能与体外的晶体分析结果不同。因为 TTSS 分泌的过程非常快,不能排除这个复合物可能迅速被其他非 TTSS 分子伴侣的蛋白识别并结合,该蛋白能稳定复合物中底物的非折叠状态,而不是 TTSS 分子伴侣维持着底物的非折叠状态^[9]。

3.4 TTSS 分子伴侣作为表达调控因子

某些 TTSS 分子伴侣参与了 TTSS 某些成分的表达调控。TTSS 分子伴侣 SycH 通过调控蛋白 YscM/LcrQ 起间接的调控作用。由于某种未知的机制,在缺乏 SycH 的情况下,与 SycH 结合的 YscM/LcrQ 蛋白在细胞内积聚,而 YscM 的聚集将导致 Yop 基因的转录明显减少。Wulff 等人认为,TTSS 分子伴侣 SycH 和调控蛋白 LcrQ 更可能是通过激活分泌而非激活转录来起调控作用的,这个调控作用的反馈调控是由 TTSS 分子伴侣 SycD 和转位子蛋白 YopD 来介导的^[27,28]。TTSS 分子伴侣 SicA、SycD/LcrH 和 IpgC 可能是更直接地参与表达调控^[30]。Darwin 和 Miller 等^[31]研究发现,沙门氏菌 TTSS 分子伴侣 SicA 与 InvF 相互作用所形成的复合物是参与 TTSS 一系列基因转录激活所必需的。SicA 是沙门氏菌 SipB 和 SipC 的 TTSS 分子伴侣。有研究发现 SicA 与 DNA 结合蛋白 InvF 相互作用,激活了沙门氏菌中致病岛 TTSS 编码蛋白的表达。小肠结肠炎耶尔森氏菌的 TTSS 分子伴侣 SycD/LcrH 也具有类似 SicA 的激活作用,它对建立 TTSS 分泌蛋白的负反馈调控非常重要^[32]。志贺氏菌的 IpgC 及 MixE 和 SicA 及 InF 分别同源,TTSS 分子伴侣 IpgC 也具有共激活因子的功能,它允许转录因子 MxiE 激活靶位启动子的转录,但它们相互作用的具体方式还未阐明^[33]。

4 TTSS 分子伴侣和底物相互作用的特点

以二聚体形式起作用可能是 TTSS 分子伴侣的一个共同特征^[41]。最近在对 SicP、SycE、SigE 和 CesT 的晶体结构研究中证实了这些 TTSS 分子伴侣都是以二聚体的形式存在^[6,29,34]。SicP、SycE 和 SigE 拥有相同的结构特征:每个单体都包括 5 个 β 折叠,3 个 α 螺旋和由中心 α 螺旋引导的二聚体结构。TTSS 分子伴侣 SycN 和 YscB 结合成异种二聚体,然后再和他们共同的底物 YopN 作用,这暗示着 TTSS 中可能存在的一般规律:即使需要两个 TTSS 分子伴侣的底物分泌,TTSS 分子伴侣也是先形成异种二聚体再和底物相互作用的^[41]。

大部分 TTSS 分子伴侣都结合在底物的 N 末端,SycE 结合在 YopE 的 N 末端 15~50 个氨基酸残基的区域上,SycH 结合在 YopH 的前 20~70 肽段上^[17]。蛋白酶水解实验表明,SptP 中的 35~139 氨基酸残基区域和 YopE 的 17~85 氨基酸残基区域能被相应的 TTSS 分子伴侣保护而不被降解^[6,35]。TTSS 分子伴侣 SicP 结合底物 SptP 的 35~139 肽段的复合物的晶体结构分析显示,TTSS 分子伴侣 SicP 二聚体通过疏水作用与底物 SptP 的 35~139 肽段的 4 个位点相互作用^[6]。不管是 TTSS 分子伴侣 SicP 与 SycE 之间,还是效应蛋白 SptP 和 YopE 之间,都没有明显的序列相似性,但它们分子伴侣和底物结合的复合物的结构却非常相似^[36]。

底物 SptP 的 35~59 肽段和 YopE 的 17~85 肽段通过二级,而不是三级结构与它们相应的 TTSS 分子伴侣相互作用。这意味着 TTSS 分子伴侣阻止底物结合区域的完全折叠,或促使其他非功能结构域的二级结构的形成^[41]。

5 TTSS 中分子伴侣和相应效应蛋白的融合蛋白

2003 年 Ogawa 等在对志贺氏菌的分泌蛋白 IcsB 及其 TTSS 分子伴侣 IpgA 的研究中发现,IcsB 基因有个琥珀终止密码子 UAG,蛋白质翻译时核糖体读过这个终止密码子,从而翻译出 IcsB-IpgA 融合蛋白。尽管现在还不知道这个融合蛋白的意义是什么,但是 IcsB-IpgA 融合蛋白在体外实验可以通过 TTSS 分泌到细胞间质中。另外,在志贺氏菌中还发现,ospB、ospF、ospC2、ospG、spa24、ofr131b、orf22、acp、mxlL 和 mxlA 都含有 UAG 终止密码子。更有趣的是,前六个基因的 3' 端都只含有 UAG 终止密码子,而 ospF、ospC2、ospG 被认为是通过 TTSS 分泌的。在志贺氏菌感染的过程中,它们很可能在促进抑制因子基因表达的条件下翻译出融合蛋白^[37]。

6 展望

自然界大多数革兰氏阴性致病菌诸如耶尔森氏菌、沙门氏菌等通过 TTSS 将毒力蛋白注入到宿主体内,从而导致鼠疫、伤寒等疾病的发生,TTSS 分子伴侣对 TTSS 分泌至关重要。近年来,随着研究的不断深入,发现了越来越多的 TTSS 分子伴侣,TTSS 分子伴侣的功能也正在逐步阐明,本篇综述简明扼要地叙述了近几年 TTSS 分子伴侣的研究进展,总结了 TTSS 分子伴侣的功能,但是,仍有一些功能并不清楚,有

些结论尚处在假说阶段而没有实验证据的支持,并且许多效应蛋白和转位子的 TTSS 分泌研究是在体外的条件下进行的,并没有真正转运到宿主细胞体内,也就无法最后判定 TTSS 分子伴侣在细胞内的实际功能。而且,对 TTSS 底物分泌率的理想估计显示:少于 5% 的效应蛋白可以在体外分泌环境下分泌,而大多数效应蛋白不能在体外环境下分泌^[9],很显然,这不是真正的感染环境。因此,可能会错误地得出 TTSS 分泌的结论,也根本无法研究那些不能在体外环境下分泌,但可以在实际感染环境下分泌的 TTSS 蛋白。在总结 TTSS 系统分子伴侣的研究进展,我们发现某些结果需要审慎定论,某些结果需要重新验证。另外,在我们正在进行的 TTSS 分子伴侣的研究中发现,以前研究得出有关不同菌种 TTSS 分子伴侣的氨基酸序列之间几乎没什么同源性的结论是错误的,仅仅用 Blast、clustalw 等^[6]方法进行同源分析而得出此结论是片面的,并不能排除分子伴侣间远源同源的可能性,实际上我们通过 TTSS 分子伴侣基因组研究,已经发现了分子伴侣很可能存在远源同源关系,同时我们也发现了分子伴侣的一些共性特征,这些共性特征进一步地支持了 Birtalan 等^[26]提出分子伴侣和相应的效应蛋白复合体的空间结构具有 TTSS 普遍的三维分泌信号功能的假说,而且在后续的工作中,我们将进一步研究分子伴侣的进化、结构上的一些共同特征以及分子伴侣与相应底物相互作用区域的特点,为解释分子伴侣可能的分泌机制提供线索。随着研究手段和技术的进步,有关 TTSS 分子伴侣的问题都将得到妥善解决,TTSS 分子伴侣的正确功能和特征将逐步展现在人们面前,作为 TTSS 分泌的重要成员,TTSS 分子伴侣功能的正确阐释将有助于揭开 TTSS 的分泌机制的神秘面纱,并进一步开发针对革兰氏阴性致病菌 TTSS 靶位的新型广谱药物,从而为人类克服这类细菌引起的疾病作出贡献。

参 考 文 献

- [1] Hueck C J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(2): 379-433.
- [2] Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science*, 1998, **280**(5363): 602-605.
- [3] Macnab R M. The bacterial flagellum: reversible rotary propeller and type III export apparatus. *J Bacteriol*, 1999, **181**(23): 7149-7153.
- [4] Page A L, Parsot C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol*, 2002, **46**(1): 1-11.
- [5] Gophna U, Ron E Z, Graur D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer event. *Gene*, 2003, **312**: 151-163.
- [6] Stebbins C E, Galan J E. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, 2001, **414**(6859): 77-81.
- [7] Staskawicz B J, Mudgett M B, Dangl J L. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*, 2001, **292**(5525): 2285-2289.
- [8] van Dijk K, Tam V C, Records A R. The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of Pseudomonas syringae. *Mol Microbiol*, 2002, **44**(6): 1469-1481.

- [9] Feldman M F , Cornelis G R . The multitasking type III chaperones : all you can do with 15 kDa . *FEMS Microbiol Lett* , 2003 , **219** (2) : 151 - 158 .
- [10] Cornelis G R , van Gijsegem F . Assembly and function of type III secretory systems . *Annu Rev Microbiol* , 2000 , **54** : 735 - 774 .
- [11] Page A L , Sansonetti P , Parsot C . Spa15 of *Shigella flexneri* , a third type of chaperone in the type III secretion pathway . *Mol Microbiol* , 2002 , **43** (6) : 1533 - 1542 .
- [12] Boyd A P , Lambemont I , Cornelis G R . Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells : role of the SycE chaperone binding domain of YopE . *J Bacteriol* . 2000 , **182** (17) : 4811 - 4821 .
- [13] Lloyd S A , Forsberg A , Wolf-Watz H . Targeting exported substrates to the Yersinia TTSS : different functions for different signals ? *Trends Microbiol* , 2001 , **9** (8) : 367 - 371 .
- [14] Menard R , Sansonetti P , Parsot C . Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri* . *Cell* , 1994 , **79** (3) : 515 - 525 .
- [15] Frithz-Lindsten E , Rosqvist R , Johansson L . The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensable for targeting to the secretion loci . *Mol Microbiol* , 1995 , **16** (4) : 635 - 647 .
- [16] Feldman M F , Muller S , Wuest E . SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system . *Mol Microbiol* , 2002 , **46** (4) : 1183 - 1197 .
- [17] Woestyn S , Sory M P , Boland A . The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes . *Mol Microbiol* , 1996 , **20** (6) : 1261 - 1271 .
- [18] Rossier O , Wengelnik K , Hahn K . The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1999 , **96** (16) : 9368 - 9673 .
- [19] Kaniga K , Tucker S , Trollinger D . Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells . *J Bacteriol* , 1995 , **177** (14) : 3965 - 3971 .
- [20] Page A L , Fromont-Racine M , Sansonetti P . Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperones of *Shigella flexneri* . *Mol Microbiol* , 2001 , **42** (4) : 1133 - 1145 .
- [21] Cornelis G R , Boland A , Boyd A P . The virulence plasmid of *Yersinia* , an antihist genome . *Microbiol Mol Biol Rev* , 1998 , **62** (4) : 1315 - 1352 .
- [22] Cheng L W , Schneewind O . *Yersinia enterocolitica* type III secretion . On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells . *J Biol Chem* , 1999 , **274** (31) : 22102 - 22108 .
- [23] Wattiau P , Woestyn S , Cornelis G R . Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria . *Mol Microbiol* , 1996 , **20** (2) : 255 - 262 .
- [24] Cheng L W , Schneewind O . Type III machines of Gram-negative bacteria : delivering the goods . *Trends Microbiol* , 2000 , **8** (5) : 214 - 220 .
- [25] Bronstein P A , Miao E A , Miller S I . InvB is a type III secretion chaperone specific for SspA . *J Bacteriol* , 2000 , **182** (23) : 6638 - 6644 .
- [26] Birtalan S C , Phillips R M , Ghosh P . Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens . *Mol Cell* , 2002 , **9** (5) : 971 - 980 .
- [27] Wulff-Strobel C R , Williams A W , Straley S C . LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion . *Mol Microbiol* , 2002 , **43** (2) : 411 - 423 .
- [28] Cambromne E D , Cheng L W , Schneewind O . LcrQ/YscM1 , regulators of the *Yersinia yop* virulon , are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism . *Mol Microbiol* , 2000 , **37** (2) : 263 - 273 .
- [29] Luo Y , Bertero M G , Frey E A , et al . Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE . *Nat Struct Biol* , 2001 , **8** (12) : 1031 - 1036 .
- [30] Francis M S , Wolf-Watz H , Forsberg A . Regulation of type III secretion systems . *Curr Opin Microbiol* , 2002 , **5** (2) : 166 - 172 .
- [31] Darwin K H , Miller V L . Type III secretion chaperone-dependent regulation : activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium* . *Embo J* , 2001 , **20** (8) : 1850 - 1862 .
- [32] Francis M S , Lloyd S A , Wolf-Watz H . The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative , regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis* . *Mol Microbiol* , 2001 , **42** (4) : 1075 - 1093 .
- [33] Mavris M , Page A L , Tournebize R , et al . Regulation of transcription by the activity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus . *Mol Microbiol* , 2002 , **43** (6) : 1543 - 1553 .
- [34] Birtalan S , Ghosh P . Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE . *Nat Struct Biol* , 2001 , **8** (11) : 974 - 978 .
- [35] Evdokimov A G , Tropea J E , Routzahn K M , et al . Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis* . *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* , 2002 , **58** (Pt 3) : 398 - 406 .
- [36] Bennett J C , Hughes C . From flagellum assembly to virulence : the extended family of type III export chaperones . *Trends Microbiol* , 2000 , **8** (5) : 202 - 204 .
- [37] Ogawa M , Suzuki T , Tatsuno I , et al . IcsB , secreted via the type III secretion system , is chaperoned by IpgA and required at the post-invasion stage of *Shigella pathogenicity* . *Mol Microbiol* , 2003 , **48** (4) : 913 - 931 .

Progress in Type III Secretion System

WANG Li¹ WANG Yu-Ming² YUE Jun-Jie¹ LIANG Long^{1*} HUANG Pei-Tang¹

(1 State Key Laboratory of Medical Microbiology and Biosafety , Institute of Biotechnology , Academy of Military Sciences , Beijing 100071 , China)

(2 Department of Science Technology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100850 , China)

Abstract : Many Gram-negative bacteria use the type III secretion system (TTSS) to inject toxin proteins into host cells , then cause the plague disease , typhoid fever , diarrhea disease etc . Chaperone proteins is one of four components of TTSS and play an important role in helping the secretion of toxin proteins . Although these proteins had been found for almost ten years , the detailed function of chaperones is enigmatic . In this review , a brief introduction is given about the progress of classification , function of chaperones and characteristics of the interactions between chaperones and substrates .

Key words : Type III secretion system , Chaperone , Intracellular pathogen

* Corresponding author . Tel/Fax : 86-10-63898781 ; E-mail : ll@bioinf.bmi.ac.cn

Received date : 02-24-2004