

DOI: 10.13376/j.cbls/2016046

文章编号: 1004-0374(2016)03-0377-07

· 评述与综述 ·

农杆菌T4SS的结构及其底物转运机理的最新进展

徐丽萍, 孙 盼, 郭敏亮*

(扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘 要: 细菌 IV 型分泌系统 (type IV secretion system, T4SS) 不仅是农杆菌转运 T-DNA 的通道, 也是多种质粒接合的通道, 还能转运多种底物分子到不同的靶细胞 (包括细菌和真核细胞), 因此, T4SS 的结构及其底物转运机理的研究受到了人们的极大关注, 近几年来, 这方面的研究进展迅速。农杆菌转运 T-DNA 的 T4SS 又叫 VirB/VirD4 系统, 是革兰氏阴性菌中最典型的 T4SS 之一, 有关细菌 IV 型分泌系统的研究均以农杆菌的 VirB/VirD4 系统为参考模型。现将综述这几年来在农杆菌 T4SS 结构研究方面取得的最新进展, 并介绍目前对 T4SS 底物转运机理的一些最新认识。

关键词: IV 型分泌系统 (T4SS); 质粒接合机制; 根癌农杆菌; VirB/VirD4 系统

中图分类号: Q936; Q75 **文献标志码:** A

Recent advances in the structure and substrate-translocating mechanism of *Agrobacterium* type IV secretion system

XU Li-Ping, SUN Pan, GUO Min-Liang*

(College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Type IV secretion system (T4SS) is not only used for T-DNA transfer by *Agrobacterium tumefaciens*, but also used for plasmid conjugation by many bacteria. Moreover, many bacteria use T4SS to translocate various substrates into a wide variety of organisms including bacterial and eukaryotic cells. Therefore, the studies on the structure and substrate-translocating mechanism of T4SS continue to attract the concentration of researchers and many important progresses in this research field have been made recently. *Agrobacterium* T4SS that is used for T-DNA transfer is called VirB/VirD4 system, which is one of the best-characterized T4SSs in Gram-negative bacteria, and thus becomes a typical model of T4SS. This review highlights the recent breakthroughs in the structural biology of *Agrobacterium* VirB/VirD4 system and summarizes current understanding of the molecular mechanism of T4SS substrate translocation.

Key words: type IV secretion systems (T4SSs); plasmid conjugation mechanism; *Agrobacterium tumefaciens*; VirB/VirD4 system

IV 型分泌系统 (type IV secretion system, T4SS) 广泛存在于革兰氏阴性和阳性菌中, 它不仅是许多质粒接合的通道, 也是许多细菌分泌其他多种底物的分泌系统^[1]。T4SS 不仅可以通过参与质粒接合导致抗生素抗性基因在微生物种群中快速横向转移, 还能直接转运细菌毒素或者效应蛋白进入靶宿主细胞^[2-3]。因此, 研究 T4SS 有助于人们更好地理解质粒的接合机理和控制某些传染性疾病的流行。T4SS 的研究始于农杆菌致瘤机理的研究^[3-4]。农杆

菌能够使受其侵染的宿主发生肿瘤。农杆菌的这种致瘤能力是由其细胞内的一种质粒决定的, 这种质粒称为 Ti 质粒 (tumor-inducing plasmid)。农杆菌致瘤的机理是把 Ti 质粒上的一段 DNA 转移至宿主植物细胞, 并整合进宿主基因组, 使该 DNA 片段所

收稿日期: 2015-09-07; 修回日期: 2015-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870054, 31170073)

*通信作者: E-mail: guoml@yzu.edu.cn

携带的基因在宿主细胞中获得表达,这段可转移的DNA片段称为T-DNA。农杆菌中与T-DNA转运和致病有关的基因通称为致毒基因(virulence gene, *vir* gene),根据这些基因被发现和鉴定的时间先后以及在基因组中的排列顺序分别以A、B、C、D、E、F、G等来编号,由这些基因编码的蛋白质通称为致毒蛋白(virulence protein, Vir protein)^[4-6]。农杆菌是利用T4SS来转运T-DNA。农杆菌中转运T-DNA的T4SS由12种不同的蛋白质亚基组成,其中包含11种VirB蛋白和1种VirD4蛋白。11种VirB蛋白分别为VirB1、VirB2、VirB3、VirB4、VirB5、VirB6、VirB7、VirB8、VirB9、VirB10、VirB11,因此,农杆菌中的这种T4SS被称为VirB/VirD4系统^[1,7]。本文以农杆菌的VirB/VirD4系统为参考模型,对农杆菌T4SS结构及其底物转运机理的最新进展进行比较全面和深入的综述。

1 T4SS的分类

T4SS可根据其编码基因的来源、蛋白质的同源性和进化关系进行分类^[8-9]。最初的分类方法是按照编码T4SS所在的质粒不同,将T4SS分为F型、P型和I型,即由IncF质粒(F质粒)编码的T4SS称为F型、由IncP质粒(RP4质粒)编码的T4SS称为P型、由IncI质粒(R64质粒)编码的T4SS称为I型。可随后发现一些T4SS并不是由质粒上的基因编码,于是这种分类方法很快就不适用了。另一种分类方法是根据蛋白质的同源性高低及进化关系远近,将T4SS分为A型、B型和“其他”。其中,F型和P型合称为A型,该类型的亚基在组成上与根癌农杆菌VirB/VirD4系统类似^[2,10],而在分子组成上与F型和P型差异较大的I型被称为B型,该亚型的亚基组成与嗜肺军团菌Dot/Icm系统类似;第三种类型是与A型、B型同源性很低或者没有同源性的所有其他的T4SS,被归为“其他”,以基因组岛(genome island, GI)亚型为代表,这类T4SS由细菌的基因组岛编码^[11]。T4SS也可以按功能分为3类,其中两个主要的类别为接合系统和效应蛋白转运系统。接合系统介导细菌间的DNA转移,与临床上病原菌抗生素抗性基因和毒力决定因子的快速传染密切相关。效应蛋白转运系统在许多革兰氏阴性病原菌将毒力蛋白转运到真核细胞的转运系统。这两个系统在细胞间转运底物都需要建立起细胞与细胞间的直接联系。第三个较小的类别是DNA释放及摄取系统^[12],这类T4SS可以从环境

中吸取DNA或者是向环境中释放DNA或蛋白质底物,不需要与另一个细胞建立联系。以上的这些分类方法也不是完全绝对的^[2,10],有些接合系统同时也转运蛋白底物,效应蛋白转运系统也可通过接合作用将DNA转运至靶细胞。

2 根癌农杆菌VirB/VirD4系统的组成元件

大多数有关T4SS的研究都是以根癌农杆菌的VirB/VirD4系统为材料或原型^[13],因此,一些与之同源性极高的T4SS,如由质粒F、R388和pKM101编码的T4SS^[14],也成为了研究T4SS的重要材料。根癌农杆菌的VirB/VirD4系统是一个由11种VirB蛋白亚基和VirD4亚基组成的超分子复合物,跨越细菌细胞的两层膜(图1)^[15]。根癌农杆菌VirB/VirD4系统中各个组成元件(亚基)的命名方式仅限于农杆菌转运T-DNA的T4SS。在根癌农杆菌的VirB/VirD4系统中,VirD4、VirB11和VirB4蛋白具有ATPase活性,形成动力室(或能量中心),为底物转运和菌毛合成提供能量^[16]。其余的VirB蛋白组成横跨双层膜的转运通道,其中VirB3、VirB6和VirB8与内膜整合,VirB7和VirB9与外膜结合,VirB10是能量感受器,横跨革兰氏阴性菌的两层膜^[17-18]。脂蛋白VirB2和黏附素VirB5为菌毛构成元件,形成转运通道的细胞外延部分——菌毛^[19]。VirB1是周质内的转糖苷酶,能溶解肽聚糖层^[20],为菌毛的合成形成打开通道^[21],但不是VirB/VirD4系统的构成元件。

3 根癌农杆菌VirB/VirD4系统的结构

农杆菌转运T-DNA的T4SS复合物是一个横跨细菌细胞内外膜的超大复合物,目前仍无法获得具有天然结构的、完整的T4SS复合物。根据这几年对T4SS复合物的相关结构单元的结构解析结果,基本上已经能够构建出一个比较完整的T4SS的结构(图1)。完整的T4SS包括以下几个组成部分(或者结构单元):(1)内膜复合物(inner membrane complex, IMC),横跨整个内膜,但大部分在内膜内侧,负责将底物转运通过内膜;(2)核心/外膜复合物(core complex, CC或outer membrane complex, OMC),嵌入细胞外膜,但大部分位于外膜内侧的周质空间,是底物通过周质和外膜的通道;(3)茎(stalk),连接核心复合物和内膜复合物的细弹性区域,位于周质空间,组成还未确定;(4)菌毛(pilus),通过细菌细胞壁延伸至细胞外,目前认为充当将底

物转运到受体细胞的管道。

3.1 内膜复合物(inner membrane complex, IMC)

内膜复合物(IMC)的结构是以质粒 R388 编码的 T4SS 为研究材料获得的研究结果。Low 等^[22]于 2014 年通过大量表达由质粒 R388 编码, 分别与农杆菌 VirB/VirD4 系统中 VirB3~VirB10 同源的 8 种蛋白, 成功地提纯了一个由这些蛋白构成的复合物(叫做 T4SS₃₋₁₀ 复合物)(图 2a)。整个 T4SS₃₋₁₀ 复合物的长度是 340 Å, 最宽部分为 255 Å。该复合物的上半部分为核心/外膜复合物, 下半部分为内膜复合物, 中间为茎。IMC 是由 VirB10 的 N 端、VirB3、VirB4、VirB6 和 VirB8 构成的一个大复合物^[15]。IMC 绕颗粒长轴呈现整体假双重对称。IMC 内最显著的结构是两个桶状结构(barrel), 连接到茎的远端, 长度是 134 Å, 最小直径是 105 Å。每个桶都含 6 个 VirB4 亚基^[23], 每个 VirB4 亚基都与一个 VirB3 亚基相互作用^[24-25]。桶结构包含 3 层: 上层(up-tier)、中层(middle-tier)和下层(lower-tier)。中层和下层在胞质中, 由 VirB4 的胞质 C 末端结构域组成, 两个 VirB4 的 C 末端结构域形成二聚体, 3 个二聚体再形成一个具有中央通道的三重对称三聚体环结构。而上层被认为是部分或全部插入内膜, 更加坚固且中央通道封闭, 含有 VirB4 的 N 末端结构域。IMC 每个桶的正上方都有一个很典型的结构, 叫做拱门(arch)。拱门连接着桶状结构单元和中央的茎, 拱门通过多达 6 个细的连接部位(linker)接触下方的桶。IMC 的上层和拱门包含 12 个 VirB4 N 末端结构域、VirB3 和 VirB8 蛋白, 24 个 VirB6 蛋白和 14 个包含跨膜区的 VirB10 的 N 末端肽段^[15]。目前, 还不清楚是哪个或者哪些亚基形成了拱门, 根据亚基的拓扑学原则, 拱门应该是由 VirB6 周质环或者是 VirB8 周质域形成^[15]。

3.2 核心/外膜复合物(core complex, CC或outer membrane complex, OMC)

核心/外膜复合物的结构最早是在 2009 年以 pKM101 质粒编码的 TraN-TraO-TraF(为了统一名称和描述方便, 在本文中 will 用农杆菌 VirB/VirD4 系统中 VirB7、VirB9 和 VirB10 的名称分别替代相应同源蛋白 TraN、TraO 和 TraF 的名称)复合物为研究材料而获得的研究结果^[26]。我们也曾对该复合物的结构做过简单介绍^[1]。2013 年, Rivera-Calzada 等^[27]获得了分辨率更高的核心/外膜复合物的亚纳米结构。

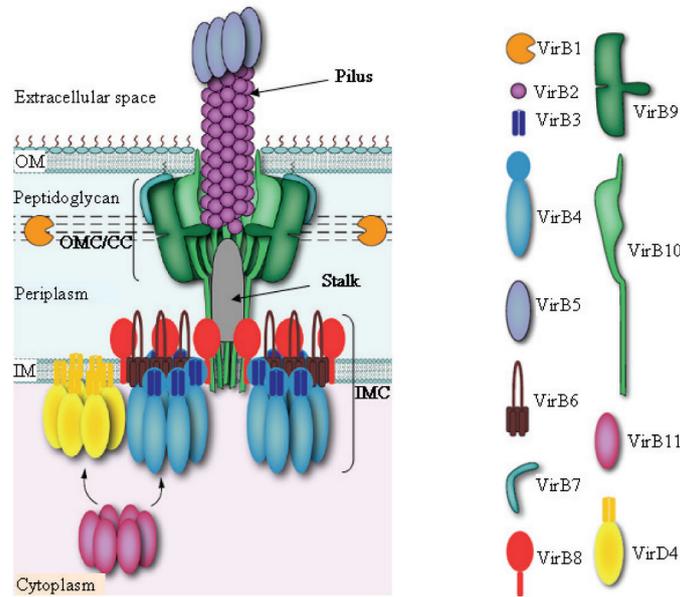
由 pKM101 编码的核心复合物的 3D 图显示^[26],

该复合物是一个十四重对称、高度和直径均为 185 Å、相对分子质量为 1.05×10^6 的圆筒状结构(图 2b), 分为 O 层和 I 层。O 层完全由两壁组成; I 层是部分由两壁组成, 因此, 形成了一个双壁的中空环状结构, 两层整合形成的室(chamber)被一个中央中间平台(middle platform)分开^[22]。O 层包含帽子(cap)和主体(main body)。帽子的直径是 110 Å, 高度是 40 Å。帽子内壁形成的外膜孔直径从 20 Å 逐渐缩小到 10 Å。主体的直径是 185 Å, 高度是 60 Å。主体内壁形成的内室, 宽度从 110 Å 缩小到底部的 55 Å, 高 30 Å。I 层类似一个杯子, 它通过细长的延伸物连接 O 层。I 层内壁形成的室, 宽度与 O 层内室一样, 但在基底(base)处会逐渐缩小到 55 Å, 高度是 60 Å。基底的高为 30 Å, 有 14 个向下的指状突出。

O 层插入细胞外膜, 由 VirB7、VirB9_{CT} 和 VirB10_{CT} 组成^[28-30]。帽子结构由 14 个 VirB10 的一段结构域构成, 这段 VirB10 结构域包含两段 α -螺旋, 它们被天线突出(antennae projection, AP)分开形成帽子结构和外膜孔, 孔的开放和关闭与 VirB10_{CT} 的 N 端水平臂(N-terminal level arm)有关^[29], 这会影 响孔大小, 有助于 T4SS 分泌大小不同的底物。据推测, 核心复合物中央的中间平台能够介导底物转运通过核心复合物内室, 这部分由 VirB9 的两个结构域之间的一些序列和 VirB10 的结构域之间的序列构成^[15,27]。I 层由 VirB9_{NT} 和 VirB10_{NT} 组成^[31-32], 内壁由 14 个柱形物构成, 内壁与外壁相隔 7 Å, 每个柱形物直径 8 Å, 长 70 Å, 由 VirB10_{NT} 构成^[27,31]。I 层的外壁是由 14 个 VirB9 的 N 端结构域构成。基底部直径为 55 Å 的小孔是由 VirB10 的跨膜螺旋形成^[33]。

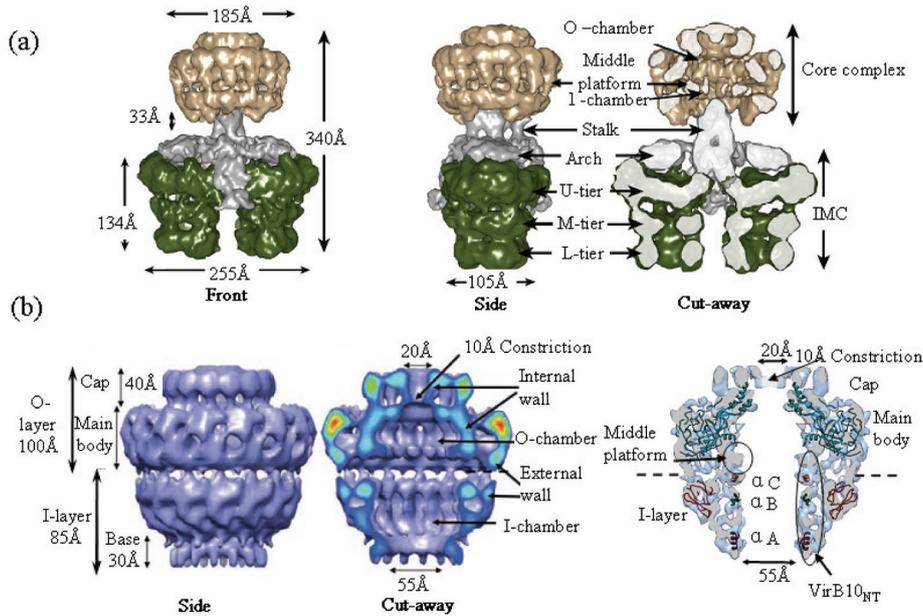
3.3 茎(stalk)

茎结构是在 T4SS₃₋₁₀ 复合物中观察到的。根据 T4SS₃₋₁₀ 复合物的重构图像, 在内膜复合物的上层和核心/外膜复合物之间有一个细长的结构, 叫做“茎”, 这个结构深深地插入核心/外膜复合物的 I 层内室中^[22]。在 T4SS₃₋₁₀ 复合物模型中, 茎结构起源于内膜复合物, 插入细胞内膜, 然后延伸到核心复合物并塞入 I 室内。茎结构没有任何明显的对称性, 它的顶部和中间部分由 4 个连接部位连接, 只有中央的一对连接最稳定。茎结构的组成情况还不清楚^[34], 根据相关数据分析, 茎结构是由 VirB10 靠近 C 端的跨膜序列构成, 14 个 VirB10 的该片段在中央收缩形成茎。在天然完整的 T4SS 复合物中,



右侧不同颜色和形状的图形代表农杆菌VirB/VirD4系统多种不同的蛋白质亚基。模型表示了一个完整的T4SS系统，包括贯穿细胞内外膜和周质空间的各个组成元件以及穿过细胞壁的菌毛。

图1 农杆菌四型分泌系统(T4SS)的模型图^[15]



(a) T4SS₃₋₁₀复合物的正面、侧面和剖面结构图，包括核心复合物(棕色)、拱门(灰色)、茎(在灰色内)和两个内膜复合物VirB4桶(绿色)^[22]；(b)核心复合物的正面、侧面和剖面结构图^[26]和核心复合物冷冻电镜结构与蛋白质亚基晶体结构适配图^[27]

图2 T4SS₃₋₁₀复合物和核心复合物(CC/OMC)的组成结构示意图

茎应该会形成一个包含 VirB5/VirB2 的菌毛组装中心 (或构建平台)，同时 VirB10 将其 N 端延伸并覆盖在它周围^[15]。这些有关茎结构的推测仅仅是一种假设，因为在 T4SS₃₋₁₀ 复合物中没有 VirB2。

3.4 菌毛

许多革兰氏阴性菌的 T4SS 也合成菌毛。菌毛是一类胞外管状聚合物，能促进供体与受体细胞的初始接触和随后配对接合的形成，但是这些接合的

本质还不清楚。根据形态不同可将接合菌毛分为两大类^[33]: F菌毛, 由大肠杆菌的F质粒、IncH1组、IncH2组和其他IncF组质粒产生的菌毛属于这一类; P菌毛, 由大肠杆菌的IncP、IncN或IncW组以及根癌农杆菌VirB/VirD4系统产生的菌毛属于这一类。典型的F菌毛直径大约为90 Å, 具有弹性, 长度可至20 μm。这些菌毛能动态地伸长和收缩, 能使供体细胞结合到受体细胞并拉近受体细胞形成物理接触, 从而建立配对接合。P菌毛较粗, 直径为90 Å~100 Å, 比较硬, 缺少弹性, 且比F菌毛短得多, 长度不到1 μm。P菌毛似乎没有伸缩能力, 但是会通过断裂或者主动脱落的机制在环境中积累。它们倾向于聚集成一种网状的聚合物, 从而促进供体细胞和受体细胞非特异性地聚集成团, 然后使供体细胞和受体细胞形成配对接合。根癌农杆菌T菌毛直径为100 Å, 但具有弹性且长度可变。

农杆菌的菌毛由VirB2和VirB5构成, VirB2是构成菌毛的最基本亚基, VirB5存在于菌毛的顶端, 具有黏附作用。底物的分泌不需要一个完整的菌毛, 但必须要有VirB2和VirB5的表达。因此, 菌毛存在两种状态, 即可分泌状态和可组装菌毛状态。处于可分泌状态的菌毛很短, 已具有分泌功能; 处于可组装菌毛状态的菌毛能进一步延伸成长; 这两种状态的菌毛可以相互转换^[18]。

对于农杆菌的VirB/VirD4系统和其他相关的接合系统来说, 除了VirD4不参与菌毛的产生和VirB1不参与转运通道的组装外, 组装转运通道和菌毛所需的基因几乎是一样的。遗传研究表明, 跨膜的IMC/OMC结构为转运通道和菌毛的组装提供支架作用。来自不同渠道的证据支持这样一个模型: VirB4从内膜中调运成熟的菌毛蛋白, 调节VirB2-VirB5成核复合物的形成, 诱发菌毛的聚合^[35]。正如前述结构所示, VirB4存在于IMC的桶状结构中, VirB4与核心复合物有直接的接触^[36], 这会促进菌毛蛋白单体通过膜进行横向转移进入核心复合物的内室, 然后菌毛蛋白就会聚合形成接合菌毛^[27]。

pKM101编码的核心复合物的直径约为100 Å, 足够容纳菌毛(90 Å~100 Å)。可是外膜环最多只有32 Å, 明显不足以容纳菌毛^[33]。目前, 接合菌毛组装的机制仍然不清楚, 不确定菌毛的组装是从内膜平台开始还是从外膜的帽子复合物开始^[37]。如果菌毛从菌毛蛋白亚基所在的内膜平台上组装, 那么, 菌毛在延伸和通过内室以及穿过外膜时, 必然会在到达核心复合物远端时产生巨大的结构变化。

另一种可能就是菌毛在核心复合物的帽子部分组装^[30,38], 那么, 内膜中的疏水菌毛蛋白在从内膜经过核心复合物的内室, 穿过周质, 到达外膜, 形成核复合物的过程中, 将需要蛋白质伴侣的陪伴, 以防止其结构发生变化^[39-40]。需要重点指出的是, 为了能容纳较宽的菌毛, 核心复合物外膜孔必需扩张许多。通过冷冻电镜和X-射线观察到的结构已经发现, 开放的帽子具有不同直径, 这支持了这种可能性的存在^[19,27]。

4 T4SS转运机制

根癌农杆菌VirB/VirD4系统转运底物的路径是一个非常复杂的过程。通过T-DNA免疫共沉淀加甲醛交联的方法(TrIP assay), 确定了核蛋白底物(VirD2-T-DNA)与VirB/VirD4系统中的各个亚基在转运过程中的接触顺序^[15,18,41]。核蛋白底物的转运路线依次是: 待转运底物首先被膜结合蛋白VirD4识别, 再转移到VirB11, 然后被转运到内膜复合物元件VirB6和VirB8, 最终由VirB9和VirB2转运通过外膜。具有ATP酶活性的VirB4和作为能量感受器的VirB10在这个过程中起着重要的调控作用。我们发现的一种VirD2结合蛋白(VirD2-binding protein, VBP)参与将待转运底物T-复合物招募到VirD4的过程, 因此, 又称为T-复合物招募蛋白(T-complex recruiting protein)^[42]。

虽然最近已经得到了新的T4SS₃₋₁₀复合物的结构, 但由于这个复合物中缺少两个与T-DNA相互作用的主要元件VirD4和VirB11, 因此, 结构和功能之间的联系仅仅是推测。目前, 提出了两种依赖VirD4的转运途径, 区别在于VirD4的定位^[15,22]。一种途径是VirD4定位于T4SS₃₋₁₀复合物的侧边, 底物转运需要两步: 底物首先由VirD4转运通过内膜, 然后通过核心复合物的周质侧进入核心复合物, 因此, 可以观察到T-DNA与VirB6/VirB8拱门接触, 然后通过核心复合物外壁的VirB9, 最终进入VirB2菌毛。另一种途径是VirD4定位在VirB4桶的下方或者替代其中的一个VirB4桶, 理由是VirD4与VirB4在结构上非常相似。在这种情况下, 底物将进入T4SS₃₋₁₀复合物的内膜复合物, 拱门, 然后通过VirB9进入核心复合物, 最后也是到达VirB2。T4SS系统存在两种模式: 即菌毛合成模式和底物转运模式。由于最近发现VirB11既可以与VirB4发生相互作用, 也可以与VirD4发生相互作用^[43], 推测两种模式之间的转换受VirB11的控制。当

VirB11 与 VirB4 结合时, T4SS 系统处于菌毛合成模式。当 VirB11 与 VirD4 结合后, VirD4 可进一步结合到 T4SS₃₋₁₀ 复合物上或替代 VirB4 桶, T4SS₃₋₁₀ 复合物可能就转变成底物转运模式了^[32]。但是, 由于菌毛是底物转运所必需的^[44], 因此, VirB11 会先与 VirB4 结合使 T4SS 系统处于菌毛合成模式, 以便合成菌毛, 然后转而与 VirD4 结合使 T4SS 系统转换成底物转运模式。

5 总结与展望

目前, 在细菌 T4SS 的结构和功能特征研究方面已取得了显著的进展。通过使用冰冻电镜技术和 X-射线晶体学于 2009 年解析了由 VirB7、VirB9 和 VirB10 构成的外膜核心复合物的结构。2013 年进一步获得了分辨率为 8.5 Å 的核心复合物的亚纳米结构。在 2014 年又解析了由 VirB3~VirB10 共 8 种蛋白质亚基构成的 T4SS₃₋₁₀ 复合物的结构。T4SS₃₋₁₀ 复合物结构的解析不仅确定了核心复合物在整个 T4SS 系统中的位置, 而且确定了内膜复合物和茎的存在。由于 T4SS₃₋₁₀ 复合物结构的解析, 分泌底物通过 T4SS 分泌通道的机理也更清晰一些。T4SS 结构方面的研究在近几年取得了这些突破性的进展, 改变了以往我们对于整个 T4SS 结构及其转运机制的理解。

但是, 需要进一步解决的问题还很多。在结构方面, 现在已经得到的最大复合物——T4SS₃₋₁₀ 复合物, 缺少两个重要组成元件 VirB11 和 VirD4, 也不知道菌毛是如何与 T4SS₃₋₁₀ 复合物相接, 因此, 可能需要获得组装更加完备、更大的复合物才能解决这些问题。此外, 拱门、茎、中间平台等的组成仍不清楚, 需要获得更多高分辨率结构信息。在转运机理方面, 底物如何通过 T4SS 分泌的整个动态过程, 仍然有相当多的问题需要进一步深入研究, 如 VirD4 具体定位在何处, 除了为底物转运提供能量, 是否会对底物转运路径产生影响; VirB4_{CT} 与 VirD4 具有重要同源性, 两者之间是否会形成功能互补; VirB11 如何影响 T4SS 菌毛合成模式和底物转运模式之间的转换, 在这个过程中是否会有其他外部信号参与; 菌毛在何处组装、如何组装等。因此, 在 T4SS 中仍然有许多亟待解决的问题, 对于未来的工作, 可以利用生物化学、生物物理和结构等方面的技术, 通过冰冻电镜或 X 射线晶体学等实现对 T4SS 的完全组装和可视化, 并且可结合已知的 T4SS 结构和功能特征阐明其分泌机制。此外, 通

过对于 T4SS 结构和转运机制的深入研究, 可进一步研发新的抑制 T4SS 分泌活性的药物。

[参 考 文 献]

- [1] 郭敏亮, 高佃坤, 金英善. 农杆菌 T-复合物的形成和转运研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36: 1408-14
- [2] Juhas M, Crook DW, Hood DW. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. Cell Microbiol, 2008, 10: 2377-86
- [3] 王景龙, 张瑞, 王兴龙. 细菌 IV 型分泌系统结构的研究进展. 安徽农业科学, 2011, 39: 13979-80, 14020
- [4] Kado CI. Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. Front Microbiol, 2014, 5: 340
- [5] Nester EW. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. Front Plant Sci, 2015, 5: 730
- [6] 赵佩, 王轲, 张伟, 等. 参与农杆菌侵染及 T-DNA 转运过程植物蛋白的研究进展和思考. 中国农业科学, 2014, 47: 2504-18
- [7] Das A, Das A. Delineation of polar localization domains of *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus proteins VirB4 and VirB11. Microbiologyopen, 2014, 3: 793-802
- [8] 赵岩, 李明, 胡福泉. 细菌的 IV 型分泌系统. 生命的化学, 2011, 31: 128-33
- [9] 赵红庆, 熊衍文, 徐建国. 细菌 IV 型分泌系统的研究进展. 疾病监测, 2012, 27: 913-7
- [10] Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, et al. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. Annu Rev Microbiol, 2005, 59: 451-85
- [11] Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. Curr Opin Microbiol, 2006, 9: 207-17
- [12] Christie PJ, Whitaker N, Gonzalez-Rivera C. Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843: 1578-91
- [13] Aguilar J, Zupan J, Cameron TA, et al. *Agrobacterium* type IV secretion system and its substrates form helical arrays around the circumference of virulence-induced cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 3758-63
- [14] Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. Microbiol Mol Biol Rev, 2009, 73: 775-808
- [15] Trokter M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, et al. Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. Curr Opin Struct Biol, 2014, 27: 16-23
- [16] Atmakuri K, Cascales E, Christie PJ. Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. Mol Microbiol, 2004, 54: 1199-211
- [17] Jakubowski SJ, Kerr JE, Garza I, et al. *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. Mol Microbiol, 2009, 71: 779-94
- [18] Banta LM, Kerr JE, Cascales E, et al. An *Agrobacterium* VirB10 mutation conferring a type IV secretion system

- gating defect. *J Bacteriol*, 2011, 193: 2566-74
- [19] Chandran V. Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41: 17-28
- [20] Zahr D, Wagner M, Bischof K, et al. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology*, 2005, 151: 3455-67
- [21] Zupan J, Hackworth CA, Aguilar J, et al. VirB1* promotes T-pilus formation in the *vir*-type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 2007, 189: 6551-63
- [22] Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada A, et al. Structure of a type IV secretion system. *Nature*, 2014, 508: 550-3
- [23] Pena A, Matilla I, Martin-Benito J, et al. The hexameric structure of a conjugative VirB4 protein ATPase provides new insights for a functional and phylogenetic relationship with DNA translocases. *J Biol Chem*, 2012, 287: 39925-32
- [24] Connery S. Reconstitution and localisation studies of a type IV secretion system [D]. Birkbeck, University of London, 2014
- [25] Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 343-59
- [26] Fronzes R, Schafer E, Wang L, et al. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science*, 2009, 323: 266-8
- [27] Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, et al. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J*, 2013, 32: 1195-204
- [28] Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, et al. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*, 2009, 462: 1011-5
- [29] Karupiah V, Berry JL, Derrick JP. Outer membrane translocons: structural insights into channel formation. *Trends Microbiol*, 2011, 19: 40-8
- [30] Bhatti M, Laverde Gomez JA, Christie PJ. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res Microbiol*, 2013, 164: 620-39
- [31] Waksman G, Orlova EV. Structural organisation of the type IV secretion systems. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 17: 24-31
- [32] Ilangovan A, Connery S, Waksman G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol*, 2015, 23: 301-10
- [33] Fronzes R, Christie PJ, Waksman G. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7: 703-14
- [34] Redzej A, Waksman G, Orlova EV. Structural studies of T4S systems by electron microscopy. *AIMS Biophys*, 2015, 2: 184-99
- [35] Kerr JE, Christie PJ. Evidence for VirB4-mediated dislocation of membrane-integrated VirB2 pilin during biogenesis of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 type IV secretion system. *J Bacteriol*, 2010, 192: 4923-34
- [36] Wallden K, Williams R, Yan J, et al. Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11348-53
- [37] Cabezon E, Ripoll-Rozada J, Pena A, et al. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39: 81-95
- [38] Yuan Q, Carle A, Gao C, et al. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem*, 2005, 280: 26349-59
- [39] Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*, 2012, 367: 1112-22
- [40] Geibel S, Waksman G. The molecular dissection of the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843: 1559-67
- [41] Sarkar MK, Husnain SI, Jakubowski SJ, et al. Isolation of bacterial type IV machine subassemblies. *Methods Mol Biol*, 2013, 966: 187-204
- [42] Guo M, Jin S, Sun D, et al. Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 20019-24
- [43] Ripoll-Rozada J, Zunzunegui S, de la Cruz F, et al. Functional interactions of VirB11 traffic ATPases with VirB4 and VirD4 molecular motors in type IV secretion systems. *J Bacteriol*, 2013, 195: 4195-201
- [44] Babic A, Lindner AB, Vulic M, et al. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science*, 2008, 319: 1533-6