

革兰阴性菌中 分子伴侣在双组分蛋白分泌至周质空间过程中的作用

张艳娟, 王 哲, 蔡 锲, 黄丕英, 储引娣, 范恩国*

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 病原生物学系, 北京 100005)

摘要:目的 探究革兰阴性菌中分子伴侣在双组分蛋白跨细菌内膜及周质空间中的作用。方法 以具有代表性的双组分蛋白 FhaB^{*}/FhaC 系统为例,使用不同分子伴侣蛋白的敲除菌株,制备成原生质球后,研究不同的分子伴侣对底物蛋白 FhaB^{*} 分泌至周质空间的影响。结果 与野生型相比,分子伴侣蛋白 Skp、DegP、PpiD、YfgM 单独和 PpiD/YfgM 同时敲除后,对双组分蛋白 FhaB^{*} 蛋白的分泌基本无影响;而单独敲除分子伴侣蛋白 SurA 或双敲除 Skp/DegP 则显著影响了 FhaB^{*} 蛋白跨内膜分泌至周质空间的过程。结论 革兰阴性菌中可能存在由 SurA 蛋白介导或由 Skp 和 DegP 蛋白共同介导的两个分子伴侣途径,以介导双组分蛋白分泌系统的底物蛋白跨内膜分泌至周质空间。

关键词: 双组分蛋白转运系统;分子伴侣;周质空间;基因敲除;革兰阴性菌

中图分类号:R378.99 文献标志码:A

Function of molecular chaperones in the secretion of two-partner-secretion to the periplasm in Gram-negative bacteria

ZHANG Yan-juan, WANG Zhe, CAI Kun, Huang Pi-ying, CHU Yin-di, FAN En-guo*

(Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences/
College of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: Objective To investigate the function of general chaperones in the secretion of two-partner-secretion (TPS) protein across the inner membrane to the periplasm of Gram-negative bacteria. **Methods** The general chaperones were knocked-out and the strains were used to prepare spheroplast to see the effects on the secretion of FhaB^{*}, which is a substrate of the representative model TPS substrates FhaB/FhaC system. **Results** Single knock-out of chaperones Skp, DegP, PpiD, YfgM and double knock-out of PpiD/YfgM has no or little effect on the secretion of FhaB^{*} into the periplasm, while single knock-out of SurA or double knock-out of Skp/DegP severely affect the secretion of FhaB^{*}. **Conclusions** There may be two molecular chaperone pathways mediated by SurA or by both SKP and DegP in Gram-negative bacteria, which can mediate the substrate protein of the two-partner-secretion system secretes into the peripheral space.

Key words: two-partner-secretion; molecular chaperone; periplasm; gene knock-out; Gram-negative bacteria

收稿日期:2019-12-27 修回日期:2020-01-10

基金项目:国家自然科学基金(31770901);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(CAMS-I2M-2017);北京协和医学院“中央高校基本科研业务费”(3332019065)

*通信作者(corresponding author): enguo.fan@ibms.pumc.edu.cn

双组分蛋白质分泌系统 (two-partner-secretion, TPS) 是革兰阴性菌分泌病原蛋白质的手段之一^[1]。TPS 含两个蛋白:分泌到细菌细胞外且具有致病性的毒力因子蛋白 TpsA (two-partner-secretion protein A) 和特异性负责 TpsA 蛋白跨外膜分泌的转运子蛋白 TpsB (two-partner-secretion protein B)。代表性 TPS 系统为百日咳杆菌 (*bordetella pertussis*) 的 FhaB/FhaC^[1-2]。TpsA 蛋白在由跨细菌细胞周质到跨外膜的过程中,处于非折叠且极易凝集并被降解的状态^[3],需有分子伴侣的保护。而对此所涉及到的分子伴侣尚知之甚少。

分子伴侣 (molecular chaperone) 是细胞中的一大类蛋白质,它们介导其他蛋白质的正确装配,但自己不成为最后功能结构中的组分。细菌细胞周质空间中已知的分子伴侣包括 SurA、Skp、DegP、PpiD 和 YfgM 等^[4]。目前为止,除百日咳杆菌中发现 parvulin 蛋白家族的 Par27 蛋白能够与 TPS 中的 FhaB 蛋白作用外^[5],上述分子伴侣蛋白在 TPS 中的作用则未见报道。

大肠杆菌中克隆的 FhaB* /FhaC 可完整重现 TPS 的跨外膜转运过程^[2]。据此,本文通过敲除大肠杆菌周质空间的分子伴侣来探讨其对 TPS 中 FhaB* 蛋白^[2]的跨内膜及其在周质空间的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株:大肠杆菌 K12 MC4100、MC4100 $\Delta ppiD$ 、MC4100 Δskp 、MC4100 $\Delta degP$ 、MC4100 $\Delta surA$ 、MC4100 $\Delta skp+\Delta DegP$ 和 MC4100 $\Delta skp+\Delta PpiD$ 菌株^[6-8] (德国弗莱堡大学 Matthias Mueller 教授提供);大肠杆菌 K12 W3110、W3110 $\Delta ppiD$ 、W3110 $\Delta yfgM$ 、W3110 $\Delta ppiD+\Delta yfgM$ 菌株^[9] (瑞典斯德哥尔摩大学 Daniel Daley 教授提供)。

1.1.2 主要实验试剂及配制方法:氯化钠、胰蛋白酶、酵母提取物、氨基酸、葡萄糖、蔗糖、Tris 碱、IPTG、溶菌酶、EDTA、甘油、SDS、三氯乙酸、牛血清白蛋白 V (BSA)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 [生工生物工程(上海)股份有限公司];甲醇、盐酸、乙酸(国药集团化学试剂有限公司)。

5×E-salts (10 mg/mL 一水柠檬酸、1 mg/mL 七

水合硫酸镁、65.5 mg/mL 三水合磷酸氢二钾、17.5 mg/mL 四水合磷酸氢铵钠);E1 培养基 (1× E-salts、除 Met/Cys 外 100 μmol/L 的 18 种氨基酸、0.4% 葡萄糖);T/S 缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5、0.5 mol/L 蔗糖);L/E 缓冲液 (0.1 mg/mL 溶菌酶、8 mmol/L EDTA, pH 8.0);E2 培养基 (1× E-salts、除 Met/Cys 外 100 μmol/L 的 18 种氨基酸、2% 甘油、0.25 mol/L 蔗糖);35S 标记的 Met/Cys (中国同辐股份有限公司);洗脱液 (甲醇:乙酸=3:1)。

1.2 方法

1.2.1 原生质球的制备方法:野生菌株 (WT) 和转化入 FhaB* 质粒的^[2,10]不同分子伴侣敲除菌株的菌液接种到适量 E1 培养基中,37 °C、220 r/min 过夜培养。第 2 天取出菌液,8 000 r/min、离心 2 min, T/S 缓冲液重悬沉淀 A580 为 4 的菌液,加入等量 L/E 缓冲液,置于冰上 15 min。取出菌液 10 000 r/min、离心 10 min,等量 E2 缓冲液重悬沉淀,得原生质球,置于冰上备用。

1.2.2 FhaB* 原生质球分泌实验:原生质球 37 °C 孵育 15 min。加入终浓度为 4 mmol/L 的 IPTG, 1 min 30 s 后加入终浓度 13.6 μmol/L 35S 标记的 Met/Cys, 37 °C 反应 30 min 后,13 000 r/min 离心 6 min,吸上清入新的离心管中,适量水重悬沉淀,分别加入等体积 10% TCA 来沉淀上清 (S) 或沉淀 (P) 中的蛋白。取 TCA 沉淀后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。电泳结束后,蛋白胶固定 10 min,置于干燥仪上 60 °C、1 h 干燥后,压磷屏用 Typhoon 扫描仪扫描同位素信号。

1.2.3 分子伴侣敲除株的验证:取敲除菌株和野生菌株培养液 1 mL, TCA 沉淀收集菌体蛋白。另外,将野生菌株、敲除菌株制备成原生质球后,13 000 r/min 离心 6 min,将上清吸入一个新的 EP 管中, TCA 进行沉淀。取菌体 (C) 和原生质球 (Sph.) 沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,然后用 PVDF 膜进行蛋白质免疫印迹。分别加入相应分子伴侣蛋白的抗体进行检测,用 Tanon 5800 仪器曝光显色。

2 结果

2.1 部分分子伴侣蛋白敲除菌株的验证

用免疫印迹法对部分分子伴侣蛋白的敲除情况进行检测 (图 1)。结果表明,主要分子伴侣蛋白如

Skp(泳道 3、4)、PpiD(泳道 5、6)、DegP(泳道 7、8)和 SurA(泳道 9、10)等在对应的敲除菌株细胞(C)和原生质球(Sph.)中均未检测到。验证了相关敲除菌株均为目的菌株。

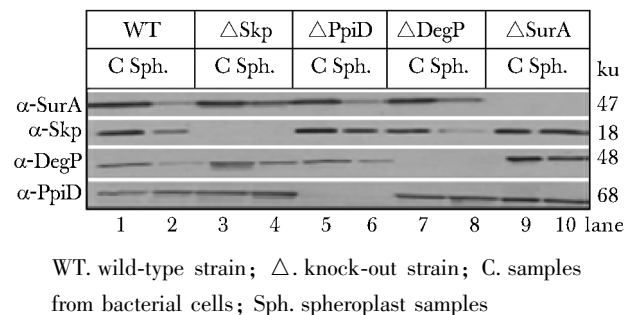


图1 部分伴侣蛋白敲除菌株的验证

Fig 1 Knock-out results of chaperone proteins

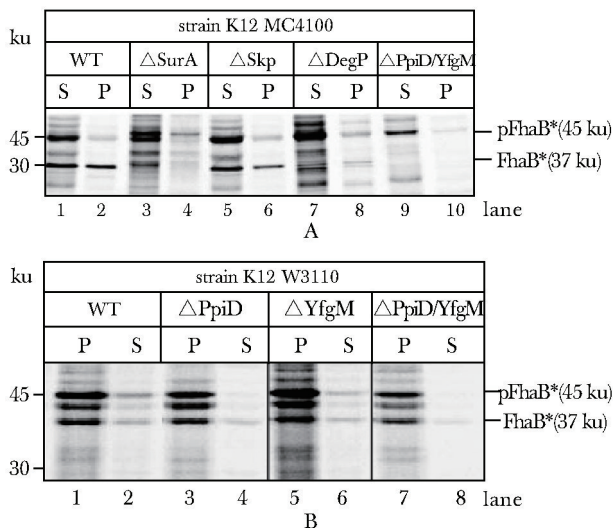
2.2 各分子伴侣蛋白对双组分蛋白底物 FhaB* 分泌至周质空间的影响

所有敲除菌株中 FhaB* 前体蛋白(pFhaB*)的合成不受细菌周质空间中分子伴侣敲除的影响(图2)。单独敲除 SurA 或双敲除 Skp/DegP 后,其原生质球的沉淀中(P)均含有 FhaB* 前体蛋白,而上清(S)均未见分泌到周质空间中的 FhaB* 蛋白(图2)。

与野生型相比,当单独敲除分子伴侣蛋白 Skp(图2A 泳道 5、6)、DegP(图2A 泳道 7、8)、PpiD(图2B 泳道 3、4)、YfgM(图2B 泳道 5、6)或双敲除 PpiD/YfgM(图2B 泳道 7、8)时,FhaB* 蛋白分泌至周质空间基本不受影响。而单独敲除分子伴侣蛋白 SurA(图2A 泳道 3、4)或者双敲除 Skp/DegP(图2A 泳道 9、10)则显著影响了 FhaB* 蛋白的跨内膜分泌至周质空间的过程。

3 讨论

革兰阴性菌细胞的周质空间位于内膜和外膜之间,鉴于外膜上含有大量的非特异性孔道蛋白(porins),分子量 0.6~1 ku 的小分子物质可以自由扩散的形式抵达周质空间,因而周质空间的蛋白更易受周围环境的影响。由于 β -折叠而形成的淀粉样蛋白的结构特点,又使得含有 β -折叠的蛋白在周质空间中更容易形成沉淀^[11-13]。因此,这类蛋白在周质空间中必然需要各类分子伴侣蛋白以避免凝集和被蛋白酶降解。



A. effect of chaperones SurA, Skp, Dkp/DegP on the secretion of two-partner proteins into the periplasmic space; B. effect of chaperones PpiD/YfgM on the secretion of two-partner proteins into the periplasmic space; WT, wild-type strain; Δ , knockout strain; pFhaB* a precursor protein containing a signal peptide; FhaB* a mature protein without a signal peptide; P, the spheroplast pellet; S, the supernatant after centrifuging the spheroplast

图2 SurA、Skp、DegP、PpiD 和 YfgM 等分子伴侣蛋白对双组分蛋白分泌至周质空间的影响

Fig 2 Effect of chaperones SurA, Skp, DegP, PpiD and YfgM on the secretion of two-partner proteins into the periplasmic space

本研究通过敲除周质空间中已知的不同分子伴侣蛋白,以探讨双组分蛋白跨内膜分泌至周质空间对分子伴侣蛋白的依赖情况,从而为充分理解双组分蛋白转运系统的机制提供依据。单独敲除主要分子伴侣蛋白 Skp、DegP、PpiD 或 YfgM 时,FhaB* 蛋白分泌至周质空间不受影响;而单独敲除 SurA 蛋白或者同时敲除 Skp/DegP 两个分子伴侣蛋白时,FhaB* 蛋白的跨内膜分泌至周质空间则被阻止,表明 SurA 蛋白或者 Skp/DegP 两个蛋白的组合分别参与了双组分蛋白 FhaB* 的周质空间分泌。也就是说,当 SurA 或者 Skp/DegP 分子伴侣缺失时,FhaB* 前体蛋白尽管仍在细菌细胞质中合成,但不能有效分泌至细菌周质空间内,表明分子伴侣 SurA 或 Skp/DegP 在 TPS 系统的 TpsA 蛋白跨内膜分泌具有重要作用,进而对维持 TpsA 蛋白在周质空间中的稳定性具有重要作用。这一结果

也与目前部分学者认为的在周质空间中存在同时作用的两个分子伴侣途径:一条途径由 SurA 蛋白

组成,另一条途径则与 Skp 和 DegP 蛋白共同组成的观点相一致^[14]。

参考文献:

- [1] Nash ZM, Cotter PA. *Bordetella Filamentous Hemagglutinin*, a model for the two-partner secretion pathway [J]. *Microbiol Spectr*, 2019,7:1-9.
- [2] Fan E, Fiedler S, Jacob-Dubuisson F, *et al.* Two-partner secretion of gram-negative bacteria: a single beta-barrel protein enables transport across the outer membrane [J]. *Biol Chem*, 2012,287:2591-2599.
- [3] Guedin S, Willery E, Loch C, *et al.* Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin [J]. *Mol Microbiol*, 1998,29:763-774.
- [4] Mas G, Thoma J, Hiller S. The periplasmic chaperones Skp and SurA [J]. *Subcell Biochem*, 2019,92:169-186.
- [5] Hodak H, Wohlkonig A, Smet-Nocca C, *et al.* The peptidyl-prolyl isomerase and chaperone Par27 of *Bordetella pertussis* as the prototype for a new group of parvulins [J]. *Mol Biol*, 2008,376:414-426.
- [6] Furst M, Zhou Y, Merfort J, *et al.* Involvement of PpiD in Sec-dependent protein translocation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018,1865:273-280.
- [7] Schafer U, Beck K, Muller M. Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins [J]. *Biol Chem*, 1999, 274: 24567-24574.
- [8] Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein [J]. *Cell*, 1999,97:339-347.
- [9] Gotzke H, Palombo I, Muheim C, *et al.* YfgM is an ancillary subunit of the SecYEG translocon in *Escherichia coli* [J]. *Biol Chem*, 2014,289:19089-19097.
- [10] Norell D, Heuck A, Tran-Thi TA, *et al.* Versatile in vitro system to study translocation and functional integration of bacterial outer membrane proteins [J]. *Nat Commun*, 2014,5:5396-5404.
- [11] Christensen LFB, Schafer N, Wolf-Perez A, *et al.* Bacterial amyloids: biogenesis and biomaterials [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019,1174:113-159.
- [12] Konovalova A, Kahne DE, Silhavy TJ. Outer Membrane Biogenesis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017,71:539-556.
- [13] Hagan CL, Silhavy TJ, Kahne D. beta-Barrel membrane protein assembly by the Bam complex [J]. *Annu Rev Biochem*, 2011,80:189-210.
- [14] Mas G, Hiller S. Conformational plasticity of molecular chaperones involved in periplasmic and outer membrane protein folding [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2018,13:1-9.

新闻点击

植物性食物有助于改善心脏健康

在《美国心脏协会杂志》上刊登的一项新研究表明,多吃植物性食物和较少的动物性食物有助于改善心脏健康,降低心脏病、卒中或其他心血管疾病的死亡风险。

约翰霍普金斯大学彭博公共卫生学院 (Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health) 的研究人员回顾了来自 10 000 多名中年人的食物摄入量数据库,他们在 1987 至 2016 年进行监测,在研究开始时没有心血管疾病,然后研究人员根据他们所吃的植物性食物和动物性食物的比例对参与者的饮食模式进行分类。结果发现,以植物性食物为主的人降低约 16% 的心血管疾病风险,例如心脏病、卒中、心力衰竭和其他疾病;降低心血管疾病死亡风险达 32%;与食用最少植物性食物的人相比,死于任何原因的风险降低了 25%。研究人员强调,为了减少心血管疾病的风险,人们应该多吃蔬菜、坚果、全谷物、水果、豆类和较少的动物性食物。

刘晓荻 译

薛惠文 编