

革兰氏阳性病原菌表面毒力因子及其宿主识别机制

江永亮, 金腾川, 陈宇星 and 周丛照

Citation: [中国科学: 生命科学](#); doi: 10.1360/N052016-00362

View online: <http://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052016-00362>

Published by the [《中国科学》杂志社](#)

Articles you may be interested in

[结核分枝杆菌ESX分泌系统研究进展](#)

中国科学C辑: 生命科学 **39**, 925 (2009);

[基于同源基因的病原菌鉴定和分型靶位点的功能基因组学研究](#)

中国科学: 生命科学 **41**, 640 (2011);

[水稻免疫机制研究进展](#)

中国科学: 生命科学 **43**, 1016 (2013);

[O热血清分析贝氏柯克斯体亚基因组蛋白质芯片和鉴定主要血清反应蛋白](#)

中国科学: 生命科学 **43**, 397 (2013);

[流感病毒糖蛋白糖链的作用和功能研究](#)

中国科学: 化学 **41**, 424 (2011);



XIX International
Botanical Congress

Travel awards
open for application

www.ibc2017.cn

Shenzhen China
23 - 29 July 2017



革兰氏阳性病原菌表面毒力因子及其宿主识别机制

江永亮, 金腾川*, 陈宇星*, 周丛照*

中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

* 联系人, E-mail: jjnt@ustc.edu.cn; cyxing@ustc.edu.cn; zcz@ustc.edu.cn

收稿日期: 2016-11-13; 接受日期: 2016-11-20; 网络版发表日期: 2017-01-20

摘要 革兰氏阳性病原菌拥有多种毒力因子, 它们在病原菌生长及侵染宿主的各个时期发挥着重要作用. 它们不仅参与病原菌的细胞分裂和增殖, 同时还介导病原菌黏附和侵染宿主. 基于本研究组近十年来对两种重要的人类病原微生物肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌的研究, 并整合国内外相关研究进展, 简要综述了病原菌重要表面毒力因子的结构和功能, 以及与宿主天然免疫模式识别受体相互作用的分子机制.

关键词 病原菌, 毒力因子, 结构与功能, 天然免疫, 宿主识别

革兰氏阳性病原菌导致多种人类疾病, 研究其毒力因子致病的分子机制是目前的研究热点. 本研究组主要以肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为研究对象, 关注其主要致病因子的结构和功能. 肺炎链球菌是引起肺炎、脑膜炎、血流感染、中耳炎等疾病的主要致病菌, 常定植于人体鼻咽、咽喉、口腔等部位, 为条件致病菌, 在免疫功能下降时致病, 婴幼儿和老人是易感人群^[1]. 肺炎链球菌在鼻咽的定植通常不会引起临床症状, 但侵入肺部或血液后可引起侵袭性肺炎链球菌疾病. 全球每年大概有100万儿童死于肺炎链球菌感染. 金黄色葡萄球菌也是一种革兰氏阳性菌. 其排列成葡萄串状, 广泛存在于人的呼吸道和皮肤上, 大约20%的人群长期携带, 是危害人类健康的重要病原菌之一. 金黄色葡萄球菌能引起各种疾病, 如黏膜、皮肤、肺炎、组织的化脓性炎症、败血症、心内膜

炎和脑膜炎等, 是医院感染中最常见的病原菌之一^[2].

影响病原菌致病能力的因素主要包括荚膜多糖、细胞壁、黏附素、胞外酶、细胞毒素等, 这些统称为毒力因子. 近年来, 基因组学技术的发展为细菌毒力因子的研究提供了有利条件, 新的毒力因子不断被发现, 其中相当一部分被作为疫苗研发的靶标. 随着研究的深入, 这些毒力因子致病的分子机制逐渐被阐明, 对抗菌药物及疫苗的研发具有重要指导意义. 本文以本研究组近年的工作为主线, 概述肺炎链球菌主要毒力因子的结构和功能以及病原菌与宿主相互作用的分子机制.

1 荚膜多糖

荚膜既是肺炎链球菌最主要的毒力因子, 也是其防御宿主免疫吞噬的第一道屏障. 荚膜主要由细胞壁

引用格式: 江永亮, 金腾川, 陈宇星, 等. 革兰氏阳性病原菌表面毒力因子及其宿主识别机制. 中国科学: 生命科学
Jiang Y L, Jin T C, Chen Y X, et al. Virulence factors on the surface of Gram-positive pathogens and mechanisms of host-pathogen recognition. Sci Sin Vitae, doi: 10.1360/N052016-00362

外侧一层多糖结构组成, 根据荚膜多糖结构的多样性将肺炎链球菌分为90余种血清型. 荚膜可以保护肺炎链球菌逃避补体介导的中性粒细胞的吞噬作用, 有助于细菌在宿主中存活, 并促进侵袭性肺炎链球菌疾病的发生和发展^[3]. 荚膜能够阻止单核细胞对肺炎链球菌的吞噬作用, 并可通过抑制凋亡的方式下调机体免疫反应^[4]. 同时荚膜可通过减少上呼吸道细胞释放IL-8并限制肺炎链球菌向下呼吸道迁移, 减轻宿主免疫反应, 从而实现其在鼻咽部的长期定植^[5]. 荚膜可促进肺炎链球菌穿过鼻咽部的黏液层, 随着荚膜合成减少而使相关毒力因子位点暴露, 促进肺炎链球菌在上皮细胞的黏附. 进入血液后, 肺炎链球菌则增加荚膜的合成以保护其逃避免疫监视. 参与荚膜多糖合成和调控的蛋白质一直是研发肺炎链球菌疫苗和抗菌药物的重要靶标. 对荚膜多糖合成途径的结构基础和调控机理的研究将有助于理解肺炎链球菌的毒力多态性, 并可以指导新型疫苗和药物的开发. 荚膜多糖的合成由荚膜多糖基因(*cps*)编码调控(图1A)^[6], 其中CpsA~D在各血清型中高度保守, 参与荚膜的合成调控(图1B). CpsA作为调控因子调控*cps*基因的转录. CpsB是一种磷酸化酪氨酸蛋白磷酸酶, 使CpsD去磷酸化来起始荚膜多糖的合成^[7]. CpsC和CpsD作为多糖共聚合酶以及酪氨酸激酶, 在荚膜多糖的磷酸化调控

系统中起到关键作用^[8,9]. CpsC和CpsD相互作用, 限制荚膜多糖进一步合成, 并将合成的荚膜多糖运送至细胞壁, 便于荚膜多糖与细胞壁的连接. CpsC的胞外区可能参与调控荚膜多糖合成的关键酶, 如易位酶CpsA和聚合酶Wzy^[10], C端胞内区激活CpsD的酪氨酸激酶活性, CpsD又参与胞内相关蛋白的调控, 如染色体分裂蛋白ParB^[11]. CpsB和CpsD这种磷酸化-去磷酸化的调控机制对于维持细菌细胞壁表面荚膜多糖的正常形态及其与细胞分裂之间的稳态维持至关重要^[10,12]. 因此, CpsA~D的相互作用和调控荚膜多糖的分子机制是本研究组关注的重点.

2 细胞壁和细胞壁水解酶

2.1 细胞壁

除了荚膜多糖, 肺炎链球菌还有包含多糖的细胞壁. 细胞壁是细菌质膜外的主要成分, 对于细菌存活和形状决定是必需的. 不同于荚膜多糖, 细胞壁多糖的结构更加保守, 其主要组成成分是肽聚糖(peptidoglycan), 由β(1-4)糖苷键相连的N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, NAG)和N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid, NAM)组成的多糖链通过茎肽交联形成的三维网

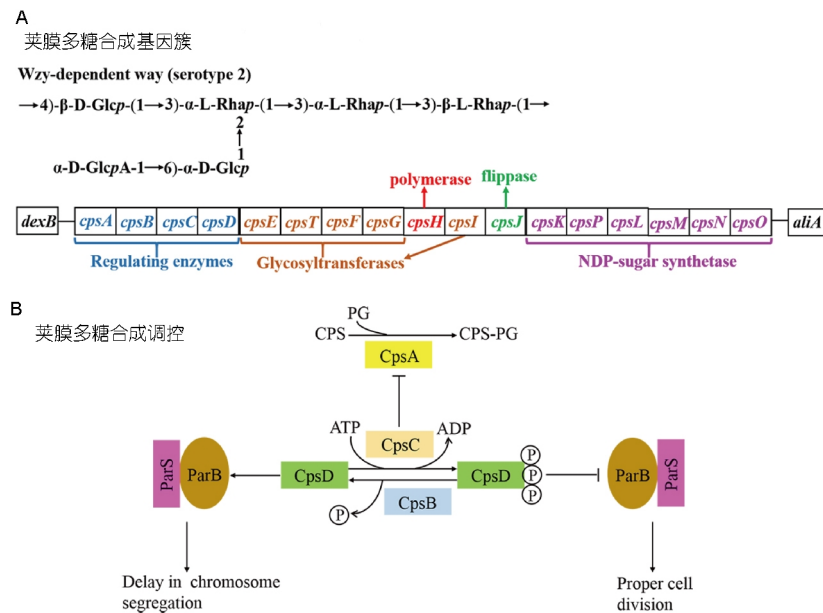


图1 肺炎链球菌Wzy途径荚膜合成通路

A: *cps*基因簇; B: CpsABCD调控网络

状结构(图2)。细胞壁在肺炎链球菌的黏附和炎症反应过程中起着重要作用^[13]。宿主的肽聚糖识别蛋白或NOD受体会通过检测胞壁肽而引起免疫反应,而细菌对胞壁肽的循环利用会减少其释放到细菌外的数量,从而抑制免疫应答,使得细菌能够逃避宿主的免疫反应^[14]。细菌生长过程中需要维持肽聚糖的稳态,这对于细菌生存、生长和分裂十分重要,同时对于肺炎链球菌的致病性至关重要。除了肽聚糖之外,细胞壁还包含磷壁酸,由重复的四糖和核糖醇组成,其存在增强了炎性活性。磷壁酸上共价锚定的磷酸胆碱也是一种关键的炎症因子,它是引起抗体高反应活性的免疫原。

2.2 细胞壁水解酶

大多数细菌都编码有多种肽聚糖水解酶,负责切割多聚肽聚糖网络或可溶肽聚糖片段上的共价键,参与肽聚糖的循环再利用^[15]。肽聚糖水解酶可以分为糖苷酶、肽酶和酰胺酶。肺炎链球菌主要的细胞壁水解酶包括LytA, LytB, LytC, DacA, DacB, PcsB和CpsD等(图2)。LytA是最早被鉴定的肺炎链球菌肽聚糖水解酶,具有酰胺酶活性,切割肽聚糖上N-乙酰胞壁酸残基和L-丙氨酸残基之间的酰胺键,是肺炎链球菌的主要自溶素。在营养物质缺乏或 β -内酰胺类药物存在时,细胞壁合成停滞,LytA激活并作用于细胞壁的肽聚糖,介导细胞壁水解,细菌自溶,促进毒素及相关毒力因子的释放,也可使同类菌株的细胞溶解。而在细菌增殖过程中,*lytA*基因表达的活性降低。LytA还参与细胞分裂、鞭毛形成和基因转移等过程。LytA的活性受到严格调控,既满足其发挥毒力效应,也防止过度自溶^[16,17]。本研究组解析了肺炎链球菌全长LytA的2.1 Å晶体结构^[18],发现LytA为一个飞镖状的同源二聚体,相互作用界面位于C末端。每个亚基都包含有一个N端的酰胺酶结构域和一个C端的胆碱结合结构域,其中胆碱结合结构域有6个胆碱结合重复区,包括5个典

型双层和1个单层胆碱结合位点。LytA的N端酰胺酶结构域为amidase_2家族成员典型的 α/β 混合折叠类型,具有一个Y型的底物结合沟槽,结构分析结合生化实验证明其可能的底物为肺炎链球菌细胞壁的3个分支:糖链、肽链和磷壁酸。点突变结合酶活实验表明,只有二聚化和所有胆碱结合位点被胆碱分子完全占据后,LytA才具有催化活性,进而使其两个酰胺酶结构域维持合适的距离以切割肽聚糖上相距约103 Å的两个酰胺键。这些发现有助于更好地理解LytA如何获得完全活性并在生理上发挥其自溶素作用,也为研发抗肺炎链球菌药物提供了结构依据。

LytB属于胆碱结合蛋白家族,由N端的胆碱结合结构域和C端的催化结构域组成。LytB是一个endo- β -N-乙酰葡萄糖苷酶,它催化水解细胞壁N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸之间的 $\beta(1,4)$ 糖苷键。本研究组解析了LytB的催化结构域的晶体结构(LytB_{CAT})^[19]。LytB_{CAT}由3个独立的结构模块组成:SH3b, WW和GH73,形成一个“T-shaped”构象,组成完整的肽聚糖底物的结合口袋。体外和体内的细胞分裂实验发现这3个结构模块对于LytB的活性都是必需的。进一步的功能实验发现LytB的活性对于肺炎链球菌黏附和侵染肺癌上皮细胞是必要的。

DacB是L,D-羧肽酶,特异水解肽聚糖肽段L-赖氨酸和D-丙氨酸之间的肽键。*dacB*基因的敲除后会导致肺炎链球菌细胞形态以及隔板分裂的缺陷,暗示DacB在肽聚糖的重塑中发挥重要的作用,是一个潜在的抗生素靶标。本研究组解析了2.1 Å分辨率的DacB的晶体结构^[20],代表第一个革兰氏阳性菌的L,D-羧肽酶结构。结构分析显示DacB是M15B蛋白酶家族的成员。与M15B蛋白酶家族不同的是,DacB的活性位点有一个六配位的锌离子组成,锌离子与His-Asp-His-Glu四联体以及另外两个水分子配位。通过生化实验发现肽聚糖的四肽(L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala)是DacB的合适底物。通过分子对接和突变实验,鉴定了DacB结合四肽底物的关键残基。

PcsB不仅是细胞壁水解酶,同时也参与细胞壁分裂、维持细菌正常形态。*pcsB*基因缺失降低了细菌的生长速率,增强了细菌对抗生素的敏感性^[21]。PcsB在很多菌株中高度保守,与致病性密切相关,是一类重要的抗原分子,也是潜在的疫苗研究靶标^[22]。PcsB由4个部分组成:信号肽、coiled-coil结构域、丙氨酸

肽聚糖和肽聚糖水解酶

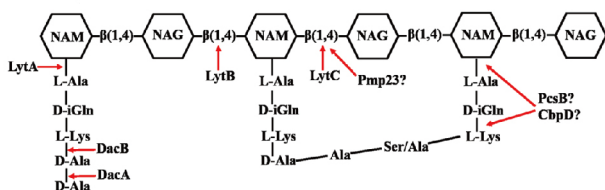


图2 肺炎链球菌肽聚糖模式图以及肽聚糖水解酶

富集区以及C端的CHAP(cysteine, histidine-dependent aminohydrolases/peptidases)结构域。生物信息学分析发现, CHAP可能具有水解酶活性, 但是体外的生化试验并没能检测到该活性。最近研究表明, PcsB与细胞分裂复合物FtsEX相互作用, 从而定位在分裂隔板上, 是分裂小体必不可少的组分之一。FtsEX类似ABC膜转运蛋白, 通过FtsE水解ATP, 引起FtsX的构象变化, 从而改变PcsB二体构象, 解除其自抑制的状态, 从而暴露肽聚糖识别位点, 激活PcsB的肽聚糖水解酶活性^[23,24]。FtsEX是如何引起PcsB的构象变化进而激活PcsB的活性目前仍不清楚, 这也是本课题组目前的研究方向之一。

3 黏附素

3.1 含有LTxTG基序的蛋白

(1) 丝氨酸重复糖蛋白SRRP的功能及其糖基化。

富含丝氨酸重复蛋白(serine-rich repeat proteins, SRRPs)是一类位于革兰氏阳性菌细胞表面, 介导细菌与宿主细胞间或者细菌之间黏附的糖蛋白^[25]。这类蛋白可以导致多种疾病, 包括亚急性细菌性心内膜炎、获得性肺炎以及脑膜炎等。扫描电子显微镜显示, SRRPs为大杆状或者纤毛状结构, 类似于细菌的鞭毛。SRRPs的一级序列主要包括: N端非典型的信号肽、短的富丝氨酸重复区域(SRR1, ~50~170 aa)、配体结合区域(BR, ~250~500 aa)、长的富丝氨酸重复区域(SRR2, ~400~4000 aa)以及C端的细胞壁锚定基序(LPxTG)。其中的两个富丝氨酸重复区域SRR1和SRR2中的丝氨酸交替出现。这些丝氨酸会被糖基化, 对蛋白的稳定性和功能起着重要的作用^[26]。

SRRP蛋白依靠其多样化的配体结合结构域BR识别宿主表面受体, 参与黏附和侵染宿主过程。本课题组解析了金黄色葡萄球菌SRRP蛋白SraP的BR的晶体结构^[27]。晶体结构显示, SraP的BR是由4个独立的功能模块组成的一个伸展的长棒状结构。体外生化和细胞荧光实验发现其N端的凝集素模块特异性地结合唾液酸, 负责介导SraP识别宿主细胞表面的唾液酸化的受体, 进而帮助金黄色葡萄球菌侵染宿主细胞。sraP基因敲除后, 金葡菌黏附和侵染A549细胞的能力大大下降。通过分子动力学模拟、小角散射实验等方法发

现另外3个模块通过结合钙离子维持整体结构的相对刚性, 从而将凝集素模块伸展至细菌细胞壁外以发挥黏附功能。该研究揭示了金黄色葡萄球菌黏附宿主上皮细胞的一种新型分子机制, 为理解金黄色葡萄球菌的致病机理提供了重要的理论依据。

同时, 以肺炎链球菌的SRRP蛋白PsrP为例, 研究其糖基化修饰和生物合成通路。其中GtfA/GtfB复合物催化PsrP第一步糖基化, 将UDP-NAG上的NAG分子共价连接到PsrP重复区的丝氨酸残基上。本课题组解析了糖基转移酶GtfA与产物UDP和GlcNAc的2.0 Å晶体结构^[28]。GtfA的核心结构具有经典的GT-B折叠类型, 同时GtfA具有一个新型 β -meander结构域DUF1975。该结构域不仅参与识别GtfB, 同时也参与识别受体蛋白PsrP。通过质谱分析, 进一步鉴定了PsrP的糖基化位点为间隔重复的丝氨酸残基。这是原核生物中第一次发现的具有新的折叠类型的O-糖基转移酶(O-glycosyl transferases, OGT), 与目前已知的OGT采用不同的折叠模式和催化机制。

本课题组进一步深入研究了PsrP的糖基化机理, 也是首次报道原核生物蛋白质多位点寡糖基化修饰的分子机制。基于在*Escherichia coli*中建立的PsrP糖基化体系, 纯化了第一步、第二步以及第三步糖基化的PsrP蛋白, 并以此为底物, 鉴定了其他糖基转移酶的供体和受体, 从而全面阐述了PsrP发生寡糖基化修饰的分子机制(图3)。本课题组将进一步研究这些不同糖基化的PsrP蛋白对肺炎链球菌致病性的影响, 及其诱发宿主的免疫反应, 从而全面理解PsrP介导肺炎链球菌黏附和侵染宿主的机制。

(2) 黏蛋白结合蛋白。黏蛋白结合蛋白Spr1345能特异性地和人体组织相结合。Spr1345在小鼠(*Mus musculus*)的免疫实验中显示出良好的免疫原性, 及其在细胞壁表面的定位和黏附功能, 使其成为疫苗和药

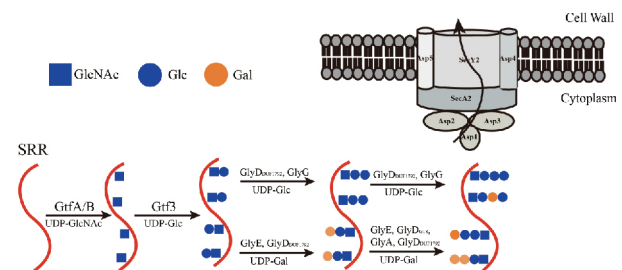


图3 PsrP的糖基化模式图

物靶点的重要候选蛋白。研究表明, 这个预测的黏蛋白结合结构域具有结合活性, 基于该结构预测其所在家族的蛋白质的结构特点。功能实验证实Spr1345能有效结合肺癌上皮细胞, 是一个重要的黏附因子^[29]。

3.2 胆碱结合蛋白

肺炎链球菌的细胞壁含有独特的结合磷酸的胆碱。在肺炎链球菌表面, 许多胆碱结合蛋白可通过大约20 aa重复结构域和磷酸胆碱结合。和其他致病菌相比, 胆碱结合蛋白是肺炎链球菌表面蛋白独特的组成部分。目前已经鉴定的肺炎链球菌胆碱结合蛋白, 除了上述提到的肽聚糖水解酶LytA, LytB和LytC之外, 还包括PspA, PspC, Pce, PcpA, CbpF, CbpJ和CbpG^[30]。肺炎链球菌表面蛋白A(PspA)结构上主要由5个域组成, 依次为信号肽、 α 螺旋区、组氨酸富集区、胆碱结合区和C端结构域。其与乳铁蛋白结合抑制其杀菌或抑菌作用, 并抑制补体活化, 降低补体C3b在肺炎链球菌表面的沉淀, 从而干扰补体介导的调理吞噬作用。PspC可与人多聚免疫球蛋白受体(pIgR)特异性结合, 介导体菌穿越呼吸道的黏膜上皮细胞进入内部组织, 通过与宿主细胞上的糖肽、唾液酸残基等的结合实现感染。PspC缺失表型株黏附的活性明显下降, 实验鼠模型中肺炎链球菌的定植量和穿过上皮进入血液、脑脊液的量明显下降。PspC可与补体C3和H因子结合, 同时还可与人分泌型免疫球蛋白A(sIgA)以种属特异性方式结合, 促进其与黏液上皮细胞的黏附和穿透^[31]。CbpJ(Sp_0378)是一个功能未知的胆碱结合蛋白。晶体结构发现其具有7个典型的胆碱结合重复区和一个功能未知的N端结构域, 体外实验发现CbpJ的N端结构域与人的C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)有相互作用, 用HADDOCK软件预测了CbpJ的N端结构域与CRP的相互作用模式。本研究组将尝试表达CbpJ和CRP的复合物, 研究CbpJ在宿主CRP介导的炎症反应过程中发挥的作用。CbpF(Spr1274)也是一种功能未知的胆碱结合蛋白。晶体结构显示CbpF与CbpJ的整体结构类似, 其具体的生物学功能尚不清楚^[32]。

4 胞外酶

为侵袭和感染需要, 肺炎链球菌进化出许多糖苷酶, 水解碳水化合物, 这些降解的单糖分子不仅可以

作为肺炎链球菌生长的碳源, 同时还有助于细菌黏附和侵袭。StrH(Spr0057)是一个 β -己糖苷酶(*EC* 3.2.1.52), 是糖基水解酶GH20家族成员, 在肺炎链球菌侵袭宿主细胞中发挥重要作用, 它与唾液酸苷酶(NanA)、 β -半乳糖酶(BgaA)依次水解宿主细胞的分泌组分, 乳铁转运蛋白和免疫球蛋白A1上面的唾液酸, 半乳糖和N-乙酰葡萄糖胺残基。暴露宿主细胞表面的肺炎链球菌的黏附受体, 促进细菌的黏附。本研究组解析了StrH第一个水解酶结构域, 其整体结构是一个典型的TIM桶的折叠类型^[33]。通过序列分析可以看出, StrH具有两个糖基水解酶结构域, 两者之间具有50%的序列一致性, 活性实验表明两个水解酶结构域有类似的活性, 同时全长的蛋白活性较单个结构域要高10倍, 推测这两个结构域之间可能有协同效应。另外通过突变分析, 发现活性位点附近两个独特的loop区上的Trp443和Tyr482对决定其 $\beta(1,2)$ 底物特异性是必需的。本研究组还预测了在革兰氏阳性菌中具有和StrH类似催化活性和底物特异性的同源蛋白。

BgaC是一个 β -半乳糖苷酶, 是肺炎链球菌的毒力因子, 能够水解通过 $\beta(1,3)$ 糖苷键连接在单糖、寡糖或糖肽上的半乳糖残基。本研究组解析了1.6 Å的BgaC的晶体结构^[34]。发现其核心催化结构域也是典型的TIM桶的折叠花样, 此外BgaC还具有两个功能未知的全 β 折叠的结构域, 推测其可能与其参与识别底物蛋白。通过结构以及酶活性实验发现Trp240, Trp243以及Tyr455 3个关键芳香族氨基酸与底物特异性有关。

BglA-2是一个 β -葡萄糖-6-磷酸苷酶, 属于糖基水解酶GH1家族。它能催化纤维二糖-6-磷酸水解为葡萄糖和葡萄糖-6-磷酸。目前在肺炎链球菌中的功能未知, 推测可能其水解的产物葡萄糖-6-磷酸参与糖酵解途径。本研究组解析了BglA-2的晶体结构^[35], 其结构也是一个TIM桶的结构模式, 基于结构的定点突变和酶活性实验, 本研究组发现Tyr126, Tyr303和Tyr338对于识别-1位点的6-磷酸-葡萄糖至关重要, Ser424, Lys430和Tyr432对于BglA-2识别磷酸化的底物是必需的。

5 其他毒力因子

参与氧化应激的超氧化歧化酶、丙酮酸氧化酶SpxB、核酸内切酶、基质降解酶、代谢调控蛋白A(CcpA)等也是肺炎链球菌重要的毒力因子^[36]。研究

表明, 在原核和真核细胞基因调控方面有重要作用的 sRNAs 也对肺炎链球菌的致病起重要毒力作用^[37]. 在动物模型实验中, 通过比较刺激前后细菌基因的表达情况, 发现 *aliA*, *malX* 和 *piuA* 基因在肺炎链球菌导致的肺炎发生过程中发挥重要作用^[38,39], 但其作用机制尚待研究. 本研究组也解析了铁转运蛋白 PiuA 和 PiaA 的晶体结构^[40], 并进行了相关的生化研究, 后续的功能研究以及整个 ABC 铁转运蛋白 Pia 和 Piu 的结构研究是重点.

6 革兰氏阳性菌与宿主相互作用的分子机制

肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌, 其模式分子和毒力因子, 能够激活宿主的多条天然免疫炎症通路^[41]. 这些病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 可以被一系列膜上及胞内模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 所识别, 然后激活天然免疫系统, 做出包括炎症、细胞坏死等免疫防御反应^[42-44]. 主要的模式识别受体包括 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs), NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLRs) 和 AIM2 样受体 (AIM-2-like receptors, ALRs), 都能参与对革兰氏阳性菌的免疫识别和应答 (图 4)^[45].

Toll 样受体是一类保守的跨膜蛋白家族, 能广泛识别病原体相关分子模式, 如细菌和真菌的细胞壁成分、细菌脂蛋白、细菌和病毒的核酸, 从而诱导一些免疫效应分子, 促进炎症反应, 激活固有免疫和适应性免疫^[46]. TLRs 结构主要包含 3 个主要的结构域: 膜外区 N 端为亮氨酸重复序列 (leucine rich repeats, LRRs) 区, 为配体结合区, 主要参与识别 PAMPs; 跨膜区为富含半胱氨酸的结构域; C 端为 TIR 结构域 (Toll-IL-1 receptor domain, TIR), 募集下游含有 TIR 结构域的信号分子 (如 MyD88), 两者相互作用组成信号复合体, 激活下

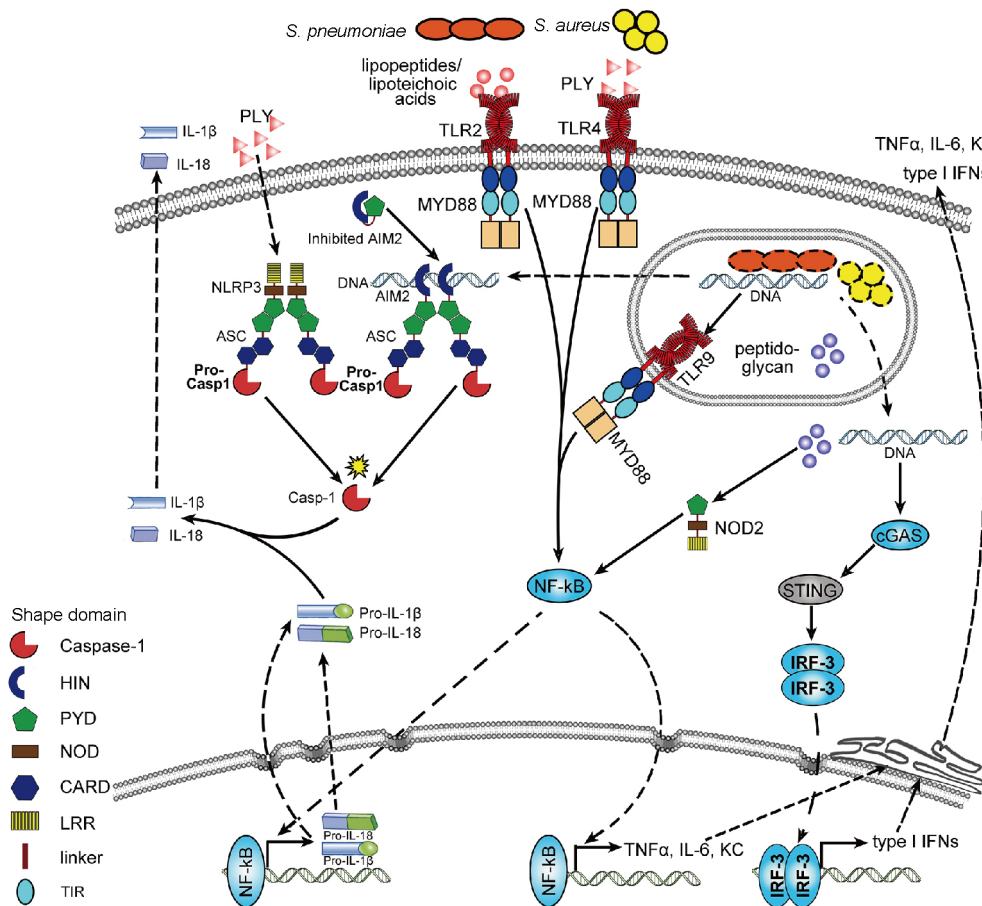


图 4 宿主模式识别受体对革兰氏阳性菌的识别

游信号通路^[47]。目前报道的TLR2, TLR4和TLR9对抗肺炎链球菌的固有免疫中发挥重要的作用, 但它们的防御作用可能存在部分重叠和冗余。肺炎链球菌细胞壁的组分, 如脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)和脂蛋白能被TLR2识别^[48]。肺炎链球菌由吞噬细胞内化, 并随后在吞噬体中被分解, 导致细菌肽聚糖和核酸的释放。TLR9能识别在核内体中含未甲基化CpG基序的DNA^[49]。除了诱导细胞因子, TLR2和TLR9能加强肺炎链球菌吞噬作用。除了TLR2和TLR9, TLR4在抗肺炎链球菌侵染中也起到关键作用。TLR4可以识别革兰氏阴性菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS), 还可识别宿主坏死细胞释放的热休克蛋白(heat-shock proteins, HSP), 但一些研究表明TLR4还可以识别革兰氏阳性菌肺炎链球菌溶血素(pneumolysin, PLY)^[50]。TLR4基因敲除的小鼠肺部感染低剂量的肺炎链球菌, 与野生型小鼠相比其增强了肺炎链球菌的易感性和上呼吸道细胞的凋亡^[50-52]。

肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌, 虽然不是主要以胞内菌的形式寄居于被感染宿主细胞比如巨噬细胞胞内, 但其细胞碎片或降解产物, 也能触发胞内模式识别受体NOD样受体。与TLR样受体相比, 目前本研究组对于NLR家族蛋白的配体的认识, 还有很多不清楚。NOD2能识别来自革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌肽聚糖衍生物MDP^[53]。NOD2能通过与衔接分子RIP2(receptor interacting protein 2, RIP2)相互作用来激活下游NF- κ B, 活化的NF- κ B可以移至细胞核并增强促炎细胞因子的转录^[54]。NOD2在调节宿主免疫反应中起重要作用, 临床研究显示病人NOD2的功能丧失突变, 与Crohn氏症具有很高的关联性^[55]。

除此以外, 以肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌为代表的革兰氏阳性菌感染, 能够激活多种NOD样受体类型的炎症小体复合物, 它们介导了被感染细胞的炎性坏死(焦亡)和炎症信号的放大, 最终帮助宿主对感染源的清除^[56]。炎症小体的主要成分包括感应分子(如NLRP3, AIM2等受体)、接头蛋白(如ASC)和效应分子(如caspase-1)^[45]。NOD样家族受体NLRP3为中心形成的炎症小体, 参与了很多无菌和感染导致的慢性和急性炎症。而微生物的感染, 与无菌条件(自身免疫病如关节炎)相比, 能够提供更强的激活信号, 使机体达到对外来病原体的快速清除^[57]。金黄色葡萄球菌感染原代巨噬细胞后, 能够激活NLRP3和NLRP7两种炎症小

体^[58,59]。然而, 炎症通路的激活是一把双刃剑, 金黄色葡萄球菌感染后, 机体通过炎症小体的激活, 招募中性粒细胞, 从而达到病原体清除的目的。但是, 此过程伴随着严重的组织损伤如细胞死亡^[60]。

除了上述TLR, NLR家族模式识别受体以外, AIM2受体家族(ALR)和RIG-I受体家族(RLR), 它们能够识别胞内核酸的受体, 也有报道证明它们参与了对革兰氏阳性菌识别与应答。例如, AIM2炎症小体通路在小鼠中枢神经系统抗金黄色葡萄球菌急性感染模型中, 发挥了关键作用。依赖于ASC的AIM2炎症小体通路, 能够提高小鼠在中枢系统细菌感染后的成活率^[61]。AIM2炎症小体在抗病毒和抗细菌天然免疫中, 发挥着重要的作用。其下游与NLRP3相同, 都是通过接头蛋白ASC, 激活caspase-1, 促进重要的炎症因子IL-1 β 和IL-18的成熟和分泌^[62]。

本研究组专注于利用生物化学, 特别是结构生物学的手段, 研究宿主与病原体相互作用, 特别是模式识别受体识别病原体的分子机制。通过解析AIM2与双链DNA的复合物结构和研究AIM2与ASC的相互作用, 较清晰地阐述了胞内DNA激活AIM2炎症小体的分子机制。在静息状态下, AIM2通过其氨基端的PYD结构域与羧基端的DNA结合域HIN结构域相互作用, 处在自我抑制的构象。当检测到胞内DNA的时候, HIN结构域能够与DNA结合。因为DNA带有更强的负电荷, 与带正电的HIN结构域有更高亲和力。同时, AIM2氨基端的PYD结构域被暴露出来, 能够招募下游的接头蛋白ASC, 并促进其自我组装成超级螺旋形排列的纤维状结构, 由此激活炎症小体的主要效应蛋白caspase-1, 促进其自我切割, 并剪切pro-IL-1 β , 促进其成熟和分泌^[63-65]。目前对于炎症小体的组成、结构、装配以及激活机制的研究, 是该领域的热点。病原体中能够直接被宿主的模式识别受体所识别的毒力因子的发现和鉴定, 以及其激活下游炎症通路的分子机制也是关注的热点。

7 小结

通过长期专注于人类重要病原菌的毒力因子以及与宿主相互作用分子机制的探索, 本研究组的工作大大加深了对病原微生物本身以及其发病机制的了解。为进一步研发针对这些传染病的疫苗或药物等干预措施提供了理论依据。

参考文献

- 1 Tettelin H, Nelson K E, Paulsen I T, et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 2001, 293: 498–506
- 2 Lowy F D. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998, 339: 520–532
- 3 Salter S J, Hinds J, Gould K A, et al. Variation at the capsule locus, *cps*, of mistyped and non-typable *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Microbiology*, 2012, 158: 1560–1569
- 4 Eberhardt A, Hoyland C N, Vollmer D, et al. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resist*, 2012, 18: 240–255
- 5 Küng E, Coward W R, Neill D R, et al. The pneumococcal polysaccharide capsule and pneumolysin differentially affect CXCL8 and IL-6 release from cells of the upper and lower respiratory tract. *PLoS ONE*, 2014, 9: e92355
- 6 Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol*, 2011, 65: 563–581
- 7 Hagelueken G, Huang H, Mainprize I L, et al. Crystal structures of Wzb of *Escherichia coli* and CpsB of *Streptococcus pneumoniae*, representatives of two families of tyrosine phosphatases that regulate capsule assembly. *J Mol Biol*, 2009, 392: 678–688
- 8 Morona J K, Paton J C, Miller D C, et al. Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2002, 35: 1431–1442
- 9 Bender M H, Cartee R T, Yother J. Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 2003, 185: 6057–6066
- 10 Toniolo C, Balducci E, Romano M R, et al. *Streptococcus agalactiae* capsule polymer length and attachment is determined by the proteins CpsABCD. *J Biol Chem*, 2015, 290: 9521–9532
- 11 Nourikyan J, Kjos M, Mercy C, et al. Autophosphorylation of the bacterial tyrosine-kinase CpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005518
- 12 Olivares-Illana V, Meyer P, Bechet E, et al. Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biol*, 2008, 6: e143
- 13 Skovsted I C, Kern M B, Sonne-Hansen J, et al. Purification and structure characterization of the active component in the pneumococcal 22F polysaccharide capsule used for adsorption in pneumococcal enzyme-linked immunosorbent assays. *Vaccine*, 2007, 25: 6490–6500
- 14 Johnson J W, Fisher J F, Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling. *Ann New York Acad Sci*, 2013, 1277: 54–75
- 15 Shockman G D, Daneo-Moore L, Kariyama R, et al. Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microbial Drug Resist*, 1996, 2: 95–98
- 16 Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, et al. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J Biol Chem*, 2012, 287: 11018–11029
- 17 Mellroth P, Sandalova T, Kikhney A, et al. Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio*, 2014, 5: e01120-13
- 18 Li Q, Cheng W, Morlot C, et al. Full-length structure of the major autolysin LytA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2015, 71: 1373–1381
- 19 Bai X H, Chen H J, Jiang Y L, et al. Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J Biol Chem*, 2014, 289: 23403–23416
- 20 Zhang J, Yang Y H, Jiang Y L, et al. Structural and biochemical analyses of the *Streptococcus pneumoniae* L,D-carboxypeptidase DacB. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2015, 71: 283–292
- 21 Reinscheid D J, Gottschalk B, Schubert A, et al. Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. *J Bacteriol*, 2001, 183: 1175–1183
- 22 Giefing C, Meinke A L, Hanner M, et al. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med*, 2008, 205: 117–131
- 23 Sham L T, Barendt S M, Kopecky K E, et al. Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: E1061–E1069
- 24 Bartual S G, Straume D, Stamsås G A, et al. Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun*, 2014, 5: 3842
- 25 Lizzano A, Sanchez C J, Orihuela C J. A role for glycosylated serine-rich repeat proteins in Gram-positive bacterial pathogenesis. *Mol Oral Microbiol*, 2012, 27: 257–269
- 26 Bensing B A, Gibson B W, Sullam P M. The *Streptococcus gordonii* platelet binding protein GspB undergoes glycosylation independently of

- export. *J Bacteriol*, 2004, 186: 638–645
- 27 Yang Y H, Jiang Y L, Zhang J, et al. Structural insights into SraP-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to host cells. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004169
- 28 Shi W W, Jiang Y L, Zhu F, et al. Structure of a Novel *O*-Linked *N*-Acetyl-D-glucosamine (*O*-GlcNAc) transferase, GtfA, reveals insights into the glycosylation of pneumococcal serine-rich repeat adhesins. *J Biol Chem*, 2014, 289: 20898–20907
- 29 Du Y, He Y X, Zhang Z Y, et al. Crystal structure of the mucin-binding domain of Spr1345 from *Streptococcus pneumoniae*. *J Struct Biol*, 2011, 174: 252–257
- 30 Williams T M, Loman N J, Ebruke C, et al. Genome analysis of a highly virulent serotype 1 strain of *Streptococcus pneumoniae* from West Africa. *PLoS ONE*, 2012, 7: e26742
- 31 Moreno A T, Oliveira M L S, Ho P L, et al. Cross-reactivity of antipneumococcal surface protein C (PspC) antibodies with different strains and evaluation of inhibition of human complement factor H and secretory IgA binding via PspC. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19: 499–507
- 32 Zhang Z, Li W, Frolet C, et al. Structure of the choline-binding domain of Spr1274 in *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun*, 2009, 65: 757–761
- 33 Jiang Y L, Yu W L, Zhang J W, et al. Structural basis for the substrate specificity of a novel β -N-acetylhexosaminidase StrH protein from *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Biol Chem*, 2011, 286: 43004–43012
- 34 Cheng W, Wang L, Jiang Y L, et al. Structural insights into the substrate specificity of *Streptococcus pneumoniae* β (1,3)-galactosidase BgaC. *J Biol Chem*, 2012, 287: 22910–22918
- 35 Yu W L, Jiang Y L, Pikis A, et al. Structural insights into the substrate specificity of a 6-phospho- β -glucosidase BglA-2 from *Streptococcus pneumoniae* TIGR4. *J Biol Chem*, 2013, 288: 14949–14958
- 36 Hajaj B, Yesilkaya H, Benisty R, et al. Thiol peroxidase is an important component of *Streptococcus pneumoniae* in oxygenated environments. *Infect Immun*, 2012, 80: 4333–4343
- 37 Mann B, van Opijnen T, Wang J, et al. Control of virulence by small RNAs in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002788
- 38 Ogunniyi A D, Mahdi L K, Trappetti C, et al. Identification of genes that contribute to the pathogenesis of invasive pneumococcal disease by *in vivo* transcriptomic analysis. *Infect Immun*, 2012, 80: 3268–3278
- 39 Whalan R H, Funnell S G P, Bowler L D, et al. PiuA and PiaA, iron uptake lipoproteins of *Streptococcus pneumoniae*, elicit serotype independent antibody responses following human pneumococcal septicaemia. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005, 43: 73–80
- 40 Cheng W, Li Q, Jiang Y L, et al. Structures of *Streptococcus pneumoniae* PiaA and its complex with ferrichrome reveal insights into the substrate binding and release of high affinity iron transporters. *PLoS ONE*, 2013, 8: e71451
- 41 Bekeredjian-Ding I, Stein C, Uebele J. The innate immune response against *Staphylococcus aureus*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2015, in press, doi: 10.1007/82_2015_5004
- 42 Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity*, 2009, 30: 766–775
- 43 Janeway C A Jr. Approaching the asymptote? evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1989, 54: 1–13
- 44 Zhang Y, Liang C. Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 1210–1217
- 45 Li Y, Li Y, Cao X, et al. Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14: 80–89
- 46 Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, 34: 637–650
- 47 Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 2010, 11: 373–384
- 48 Schmeck B, Huber S, Moog K, et al. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- κ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290: L730–L737
- 49 Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol*, 2007, 9: 633–644
- 50 Malley R, Henneke P, Morse S C, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1966–1971
- 51 Branger J, Knapp S, Weijer S, et al. Role of Toll-like receptor 4 in Gram-positive and Gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun*, 2004, 72: 788–794
- 52 Srivastava A, Henneke P, Visintin A, et al. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun*, 2005, 73: 6479–6487
- 53 Girardin S E, Boneca I G, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, 2003, 278: 8869–8872

- 54 Kobayashi K, Inohara N, Hernandez L D, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*, 2002, 416: 194–199
- 55 Jiang W, Wang X, Zeng B, et al. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med*, 2013, 210: 2465–2476
- 56 Melehani J H, Duncan J A. Inflammasome activation can mediate tissue-specific pathogenesis or protection in *Staphylococcus aureus* infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2016, 397: 257–282
- 57 Bezbradica J S, Coll R C, Schroder K. Sterile signals generate weaker and delayed macrophage NLRP3 inflammasome responses relative to microbial signals. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14: 118–126
- 58 Khare S, Radian A D, Dorfleutner A, et al. Measuring NLR oligomerization I: size exclusion chromatography, co-immunoprecipitation, and cross-linking. *Methods Mol Biol*, 2016, 1417: 131–143
- 59 Melehani J H, James D B A, DuMont A L, et al. *Staphylococcus aureus* leukocidin A/B (LukAB) kills human monocytes via host NLRP3 and ASC when extracellular, but not intracellular. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1004970
- 60 Kitur K, Wachtel S, Brown A, et al. Necroptosis promotes *Staphylococcus aureus* clearance by inhibiting excessive inflammatory signaling. *Cell Rep*, 2016, 16: 2219–2230
- 61 Hanamsagar R, Aldrich A, Kielian T. Critical role for the AIM2 inflammasome during acute CNS bacterial infection. *J Neurochem*, 2014, 129: 704–711
- 62 Man S M, Karki R, Kanneganti T D. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol*, 2016, 46: 269–280
- 63 Jin T, Perry A, Jiang J, et al. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity*, 2012, 36: 561–571
- 64 Jin T, Perry A, Smith P, et al. Structure of the absent in melanoma 2 (AIM2) pyrin domain provides insights into the mechanisms of AIM2 autoinhibition and inflammasome assembly. *J Biol Chem*, 2013, 288: 13225–13235
- 65 Ratsimandresy R A, Indramohan M, Dorfleutner A, et al. The AIM2 inflammasome is a central regulator of intestinal homeostasis through the IL-18/IL-22/STAT3 pathway. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14: 127–142

Virulence factors on the surface of Gram-positive pathogens and mechanisms of host-pathogen recognition

JIANG YongLiang, JIN TengChuan, CHEN YuXing & ZHOU CongZhao

School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

Gram-positive pathogens encode various virulence factors, which are required for their growth and pathogenesis. These virulence factors not only participate in cell division and proliferation, but also mediate adhesion to and invasion of the host. Owing to investigations on the two important human pathogens *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in the last decade, we have obtained some meaningful insights into the virulence factors on the bacterial surface. Here, we focus on the structures and functions of several major virulence factors in order to elucidate the molecular mechanism by which they contribute to pathogen-host recognition.

pathogens, virulence factors, structure and function, innate immunity, host recognition

doi: [10.1360/N052016-00362](https://doi.org/10.1360/N052016-00362)