生物物理所等揭示细菌效应蛋白拮抗宿主细胞焦亡通路的分子机理

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/21608.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

生物物理所等揭示细菌效应蛋
白拮抗宿主细胞焦亡通路的分子机理
。细胞焦亡作为机体重要的天然免疫反应，在拮抗和清除病原菌感染中发挥关键作用。当革兰氏阴性菌侵入宿主细胞后，其外膜的重要病原分子模式LPS（脂多糖，也称内毒素）会被宿主细胞内的天然免疫受体caspase-4/5/11识别，LPS激活的caspase-4/5/11会进一步切割活化焦亡蛋白GSDMD释放其膜打孔活性，导致细胞焦亡，激发宿主的抗菌炎症反应。同时，细菌也采用了多种策略来逃避宿主的免疫防御，例如通过独特的III型分泌系统向宿主细胞“注入”专门的效应蛋白，干扰宿主的免疫防
御通路。2021年，北京生命科学
研究所邵峰团队发现痢疾杆菌（*Shigella*
）分泌的效应蛋白OspC3可以特异识别宿主细胞内的天然免疫受体caspase-4/11，通过催化caspase酶活中心的关键精氨酸发生一种全新的ADP-riboxanation翻译后修饰使caspase-4/11失活，阻断其活化下游GSDMD介导的细胞焦亡免疫防御。然而效应蛋白OspC3是如何特异地识别宿主靶标caspase-4/11，又是如何催化新颖的ADP-
riboxanation修饰拮抗细胞焦亡的精确分子机理等关键科学问题有待进一步回答。

近日，中国科学院生物物理研究所王大成/丁璟珒课题组和邵峰团队合作，在*Nature Structural Molecular Biology*发表题为*Structural mechanisms of calmodulin activation of Shigella effector OspC3 to ADP-riboxanate caspase-4/11 and block*
pyroptosis
的研究论文。该研究揭示了效应蛋白OspC3利用宿主细胞的钙调蛋白（calmodulin，CaM）作为辅助因子激活其酶学活性，特异地识别宿主靶标caspase-4/11并催化全新的精氨酸ADP-riboxanation修饰，阻断宿主细胞caspase-4/11-GSDMD焦亡通路的完整分子机理。

研究人员发现OspC3可以有效地对静息状态未发生自剪切的caspase-4/11和细菌LPS激活后发生自剪切的caspase-4/11两种形式进行修饰，但是激活形式的caspase-4/11活性中心如果被模拟底物切割位点四肽序列的共价抑制剂zVAD不可逆地占据，会极大地削弱OspC3对caspase-4/11的修饰，这表明底物非结合状态的caspase-4/11，不论激活与否都是OspC3的底物。研究人员发现，ADP-核糖基特异性结合蛋白Af1521可与修饰后的caspase-4/11产物形成稳定的1:1复合物，通过解析Af1521与caspase-4被修饰后产物的复合物的高分率晶体结构，研究人员清晰地观察到ADP-riboxanation
修饰的精确化学结构，c

aspase-4修饰位点R314的侧链胍基脱去一个末端
N^{ω}原子后与来自NAD^{+}的ADP-核糖基核糖环上的C1原子和C2位羟基分别连接，形成了一个全新的五元恶唑烷环，该结果为精氨酸ADP-
riboxanation这种全新的翻译后修饰提供了直接的结构证明。

OspC3及其所属的细菌效应蛋白家族具有典型的双结构域特征，其N端结构域和任何已知的蛋白质没有序列同源性，而C端包含一个保守的ankyrin-repeat结构域（ARD），这类结构域通常介导蛋白质相互作用，因此推测该结构域是OspC3的底物识别结构域。研究人员进一步通过解析OspC3 ARD结构域与caspase-4底物复合物的晶体结构，确定了OspC3
ARD结构域通过一系列氢键网络和疏水作用特异地招募宿主靶标caspase-4/11。

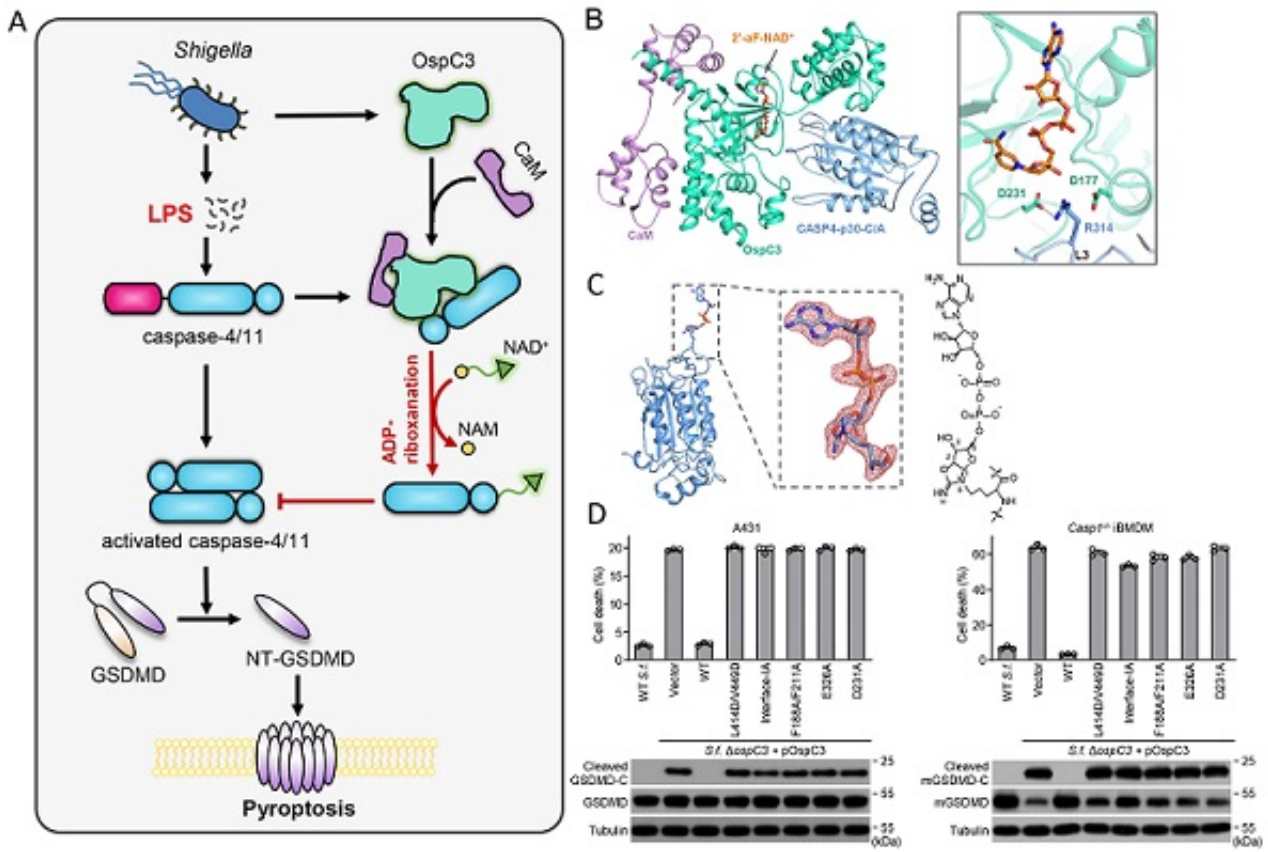
在体外重组OspC3修饰caspase-4/11的酶活实验中，研究人员发现OspC3需要几乎与底物蛋白caspase-4/11相当的量才能实现对底物的完全修饰，这有悖于酶催化底物反应高效性的经典认识。通过免疫共沉淀结合质谱的
方法，研究人员鉴定出宿主的钙调蛋白CaM以C
a^{2+}
-free的形式与OspC3形成稳定的二元复合物，极大提高了OspC3的催化效率。研究人员解析了OspC3与CaM二元复合物的高分辨率晶体结构，
发现Ca^{2+}
未结合状态的CaM通过两个亚结构域分别以广泛的疏水作用牢牢抓住OspC3的N端结构域，而OspC3的N端结构域呈现出经典Rossmann折叠构象，与已知的ADP-
核糖基转移酶结构域具有相似的结构特
征和保守的NAD^{+}
结合基序。为了进一步阐明OspC3利用NAD^{+}作为供体催化caspase-4/11的精氨酸发生ADP-riboxanatio
n修饰
的完整酶学
机理，研究人员解析了O
spC3-CaM-caspase-4三元复合物及其与2-F-NAD^{+}（非水解型NAD^{+}
类似物）的四元复合物晶体结构，发现OspC3的N端的酶活中心通过酸性氨基酸D231固定caspase-4活性中心R314侧链胍基的末端N^{ω}原子，使ADP-
核糖基C1位靠近R314胍基的N^{δ}原子，从而利于NAD^{+}烟酰胺基团的离去和在修饰位点R314
N^{δ}原子上发生第一步经典的ADP-核糖基修饰；而酶活中心的另一个酸性氨基酸D177则负责激活ADP-核糖基C2位的羟基亲核进攻R314侧链胍基C原子发生脱氨反应，使精氨酸侧链胍基和ADP-核
糖基
团形成一
个恶唑烷环。研究
人员将结构研究的发现利用定点突变
的方法在生化、细胞和*Shigella*
感染小鼠三个层面进行了验证，完整地阐明了OspC3利用宿主辅因子CaM特异地对caspase-4/11进行精氨酸ADP-riboxanation修饰的分子机理。

该研究通过一系列三维结构分析与功能实验验证，揭示了痢疾杆菌效应蛋白OspC3特异地识别宿主天然免疫受体caspase-4/11，并利用宿主钙调蛋白CaM作为辅因子催化全新的精氨酸ADP-riboxanation修饰，阻断宿主细胞caspase-4/11-GSDMD焦亡防御通路的完整分子机理，也为ADP-riboxan

ation这种全新的翻译后修饰的酶学反应机理提供了全面深入的理解，为进一步寻找和开发新型抗菌药物或细菌减毒疫苗提供了新策略。

相关研究工作得到中科院战略性先导科技专项、科学技术部重点研发计划、中科院青年创新促进会项目等的支持。

论文链接



痢疾杆菌效应蛋白OspC3拮抗宿主细胞焦亡通路的分子机理。A.痢疾杆菌效应蛋白OspC3阻断caspase-4/11焦亡通
路拮抗宿主天然免疫的模式图
；B.OspC3-CaM-caspase-4-2-F-NAD$^+$四元复合物结构及催化关键残基展示；C.精氨酸ADP-riboxanation修饰后的caspase-4结构；D.OpsC3催化关键位点突变体在痢疾杆菌侵染细胞实验中进行验证
。

研究团队单位：生物物理研究所

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发