



# Gabija细菌免疫系统的抗病毒机制

成锐, 朱斌\*

华中科技大学生命科学与技术学院, 分子生物物理教育部重点实验室, 武汉 430074

\* 联系人, E-mail: [bin\\_zhu@hust.edu.cn](mailto:bin_zhu@hust.edu.cn)

## Antiviral mechanism of the Gabija bacterial defense system

Rui Cheng & Bin Zhu\*

Key Laboratory of Molecular Biophysics, the Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

\* Corresponding author, E-mail: [bin\\_zhu@hust.edu.cn](mailto:bin_zhu@hust.edu.cn)

doi: [10.1360/TB-2023-0808](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0808)

为抵抗病毒的频繁入侵, 原核生物进化出了许多精巧的防御策略, 被统称为“原核免疫系统”<sup>[1-3]</sup>. 原核生物与病毒之间的生存竞争是自然界最大规模的斗争, 也是生物技术的重要来源. 其中, 限制-修饰系统<sup>[4]</sup>和CRISPR-Cas系统<sup>[5]</sup>是分布最为广泛的原核免疫系统, 它们的机制解析分别带来了基因工程和基因编辑的技术革命, 均被授予诺贝尔奖. 微生物宏基因组分析表明, 自然界中存在大量潜在的未发掘原核免疫系统<sup>[6-11]</sup>, 远远超出目前的认知. 2018年, Doron等人<sup>[7]</sup>在*Science*上报到了10种新发现的原核免疫系统, 以立陶宛神话中的守护女神命名的Gabija细菌防御系统就是其中之一. 它存在于~15%已测序微生物基因组中<sup>[7,12,13]</sup>, 在自然界丰度仅次于限制-修饰系统和CRISPR-Cas系统, 仅包含GajA和GajB两个未知功能蛋白质(图1(a)), 其具体作用机制尚不清楚.

本课题组基于长期的核酸代谢酶研究基础首次对Gabija系统的分子机制开展研究. 此前, 我们在*Nucleic Acids Res*上报到了GajA是一个受NTP浓度负调控的DNA切割内切酶, 病毒侵入后高强度的转录降低了细菌细胞内NTP浓度, 使GajA活性得以激活, 对病毒和细菌自身DNA进行切割<sup>[14]</sup>. 然而, 仅有GajA还不足以完成抗病毒免疫, GajB也是Gabija防御的必需元件. 在此基础上, 我们进一步对GajB的功能及Gabija系统的作用机制开展了深入研究, 相关工作发表于*Cell Host Microbe*<sup>[15]</sup>, 并被遴选为亮点论文(Featured Article).

为探索Gabija系统的防御机制, 我们将来源于*Bacillus cereus* VD045的Gabija系统(图1(a))转入大肠杆菌, 可以高效抵抗各类烈性病毒的侵染. 基于GajA能同时有效切割病毒和细菌自身基因组DNA的结果<sup>[14]</sup>, 我们推测Gabija系统可能是一个流产感染系统. 进一步研究发现, 在低MOI侵染条件下, 含Gabija系统的细菌表现出明显的噬菌体抗性; 在高MOI侵

染条件下, 含Gabija系统的细菌裂解更快, 但继续培养几个小时后能够恢复生长(图1(b)), 而且裂解的细菌中子代噬菌体的释放也显著降低, 符合流产感染的典型特征. 以上结果表明, Gabija系统通过一种流产感染的机制执行抗病毒功能. 虽然Gabija系统能有效抵抗各类烈性病毒, 但即使对非天然宿主也完全无细胞毒性, 使Gabija系统成为自然界最广泛高效且精简的免疫系统之一.

虽然前期研究已明确GajB是Gabija系统的必需组分<sup>[14]</sup>, 但GajB的具体功能仍然未知. 生物信息学分析预测GajB是一个UvrD-like解旋酶<sup>[7]</sup>. 然而, 我们研究发现, GajB是一个受DNA末端激活的A/GTP水解酶(图1(c)), 并未检测到预测的解旋酶活性, 其激活信号是具有一定长度DNA的3'末端. 有趣的是, 我们还发现, 来源于*B. cereus* VD045的Gabija系统中存在两种形式的GajB, 这是此前生物信息学分析没有预测到的, 二者仅在N端相差5个氨基酸, 它们在功能上是冗余的, 全长GajB具有更强的体外活性和体内抗病毒功能. GajB的这种表达模式在不同微生物中具有一定保守性. 我们分析发现, 大约21.1%(970/4598)的Gabija系统可能表达2个共线的GajB, 推测GajB这种表达模式在某些特定条件下可能具有调控作用或者有利于抗病毒功能的发挥. 此外, 我们之前的研究发现, GajA活性受NTP浓度负调控<sup>[14]</sup>, 但其抑制机制并不清楚, 本研究发现ATP有效抑制GajA与DNA的结合, 表明ATP通过抑制GajA与DNA的特异结合从而抑制它的DNA切割活性.

GajA和GajB在体内和体外都能结合形成复合体, 且对Gabija系统的防御功能都是必需的, 暗示它们具有相互作用, 共同协调执行抗病毒功能, 进一步研究印证了这一猜测. 体外活性分析实验发现, 适量的GajB可以促进GajA的切割活

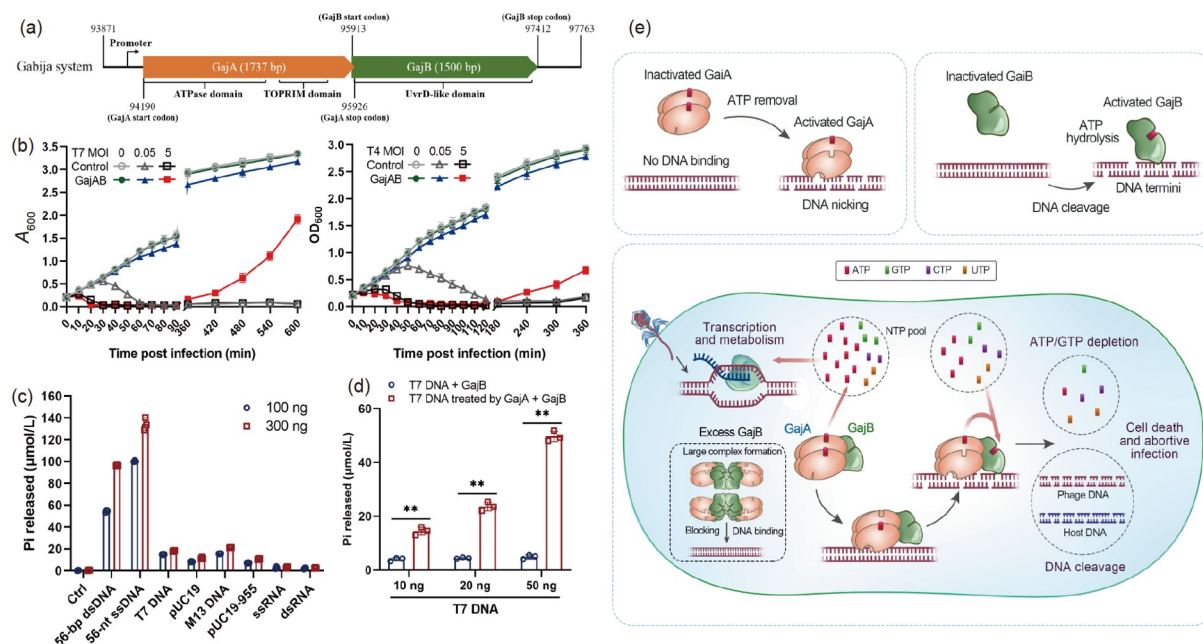


**图1** (网络版彩色) Gabija细菌防御系统的抗病毒防御机制<sup>[15]</sup>. (a) 来源于蜡样芽孢杆菌VD045的Gabija系统的基因结构, 包含GajA(1737 bp)和GajB(1500 bp)两个基因, 二者有14 bp重叠区域. (b) 在MOI分别为0、0.05和5时, 表达Gabija的(实心)和对照(空心)培养物在T7和T4噬菌体感染和未感染时的生长曲线. (c) GajB在多种DNA和RNA存在下的ATP水解活性检测. (d) GajB的ATP水解活性检测, 比较完整的T7基因组DNA和被GajA切割后的T7基因组DNA对GajB的激活作用. (e) Gabija抗病毒防御机制模式图

**Figure 1** (Color online) Antiviral mechanism of the Gabija bacterial defense system<sup>[15]</sup>. (a) The *B. cereus* VD045 Gabija gene cassette contains two genes, GajA(1737 bp) and GajB(1500 bp), with a 14-bp overlap. (b) Growth curves of Gabija-expressing (solid) and control (empty) cultures with and without infection by phages T7 and T4 at MOIs of 0, 0.05, or 5. (c) ATP hydrolysis activity assay to compare the activation of GajB by intact T7 genomic DNA or T7 genomic DNA nicked by GajA. (d) ATP hydrolysis by GajB in the presence of various DNA. (e) Model for the Gabija antiviral defense mechanism

性, 同时GajA也能有效促进GajB的ATP水解活性(图1(d)). 另外, 在T7噬菌体入侵条件下, 含Gabija系统的细菌中噬菌体DNA的积累显著下降, 荧光显微镜检测进一步证实了Gabija系统在防御过程中会造成宿主DNA降解, 这与流产感染的机制是一致的. 同时, 在T7噬菌体入侵后, 含Gabija系统的细菌中A/GTP含量显著下降.

总的来说, 本项工作通过详尽的遗传学和生物化学研究, 揭示了GajB的功能和Gabija系统抗病毒的核心机制. GajA切割DNA活性受核苷酸调控, GajB感知DNA末端水解核苷酸, 它们的激活信号和反应效果恰好互补, 这两个酶分别感知病毒的转录和DNA复制起始反应, 并通过反应效果与激活信号的互补互相激活产生级联放大的正反馈循环, 破坏细胞DNA同时消耗重要代谢物A/GTP, 导致细胞死亡和流产感染(图1(e)). GajA和GajB形成复合物以增强协同效果, 但复合物中GajB的量必须低于GajA才能执行免疫功能, GajA和GajB的剂量比例通过一种转录终止机制进行调控, 过量的GajB会导致形成巨大复合物影响GajA结合DNA(图1(e)). GajA和GajB

都同时作为信号感应器和效应子执行抗病毒功能, 两种前所未见酶活性的巧妙配合使Gabija免疫机制显著区别于已知免疫机制. 限制-修饰系统和CRISPR-Cas系统机制解析早期工作由欧美众多实验室完成, 而Gabija免疫核心机制由本课题组通过生化手段首次阐明.

Gabija细菌免疫系统的核心元件由于其酶学特性也具有应用潜力. GajA作为一个具有序列特异性的缺刻内切酶, 本身可以作为分子生物学工具; 另外, GajA在特定 $Mn^{2+}$ 浓度条件下表现出非序列特异性的DNA缺刻活性<sup>[14]</sup>. 基于此特点, 分子生物学工具酶领域领导企业New England Biolabs正在开发GajA在NicE-seq(nicking enzyme assisted sequencing)技术<sup>[16,17]</sup>中的应用; 而GajB具有特异性的A/GTP水解活性, 可以用于混合物中特异性去除A/GTP; 基于GajB的A/GTP水解活性依赖于DNA末端的特点, 也可开发其用于检测DNA的完整度. 此外, GajA与GajB在体内和体外都能结合形成复合体, 二者的协同配合可将DNA切割与特定核苷酸水解信号相偶联, 提供了Gabija系统在教学上的更多可能.

**致谢** 感谢国家自然科学基金(32150009, 32100025)和深圳市科技创新委员会(JCYJ20210324115811032)的资助.

## 推荐阅读文献

- 1 Dy R L, Richter C, Salmond G P C, et al. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. [Annu Rev Virol](#), 2014, 1: 307–331
- 2 Labrie S J, Samson J E, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. [Nat Rev Microbiol](#), 2010, 8: 317–327
- 3 Stern A, Sorek R. The phage-host arms race: Shaping the evolution of microbes. [BioEssays](#), 2011, 33: 43–51
- 4 Tock M R, Dryden D T. The biology of restriction and anti-restriction. [Curr Opin Microbiol](#), 2005, 8: 466–472
- 5 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. [Science](#), 2007, 315: 1709–1712
- 6 Makarova K S, Wolf Y I, Koonin E V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. [Nucleic Acids Res](#), 2013, 41: 4360–4377
- 7 Doron S, Melamed S, Ofir G, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. [Science](#), 2018, 359: eaar4120
- 8 Gao L, Altae-Tran H, Böhning F, et al. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. [Science](#), 2020, 369: 1077–1084
- 9 Millman A, Bernheim A, Stokar-Avihail A, et al. Bacterial retrons function in anti-phage defense. [Cell](#), 2020, 183: 1551–1561.e12
- 10 Millman A, Melamed S, Leavitt A, et al. An expanded arsenal of immune systems that protect bacteria from phages. [Cell Host Microbe](#), 2022, 30: 1556–1569.e5
- 11 Vassallo C N, Doering C R, Littlehale M L, et al. A functional selection reveals previously undetected anti-phage defence systems in the *E. coli* pangenome. [Nat Microbiol](#), 2022, 7: 1568–1579
- 12 Tesson F, Hervé A, Mordret E, et al. Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. [Nat Commun](#), 2022, 13: 2561
- 13 Payne L J, Meaden S, Mestre M R, et al. PADLOC: A web server for the identification of antiviral defence systems in microbial genomes. [Nucleic Acids Res](#), 2022, 50: W541–W550
- 14 Cheng R, Huang F, Wu H, et al. A nucleotide-sensing endonuclease from the Gabija bacterial defense system. [Nucleic Acids Res](#), 2021, 49: 5216–5229
- 15 Cheng R, Huang F, Lu X, et al. Prokaryotic Gabija complex senses and executes nucleotide depletion and DNA cleavage for antiviral defense. [Cell Host Microbe](#), 2023, 31: 1331–1344.e5
- 16 Ponnaluri V K C, Zhang G, Estève P O, et al. NicE-seq: High resolution open chromatin profiling. [Genome Biol](#), 2017, 18: 122
- 17 Chin H G, Sun Z, Vishnu U S, et al. Universal NicE-seq for high-resolution accessible chromatin profiling for formaldehyde-fixed and FFPE tissues. [Clin Epigenet](#), 2020, 12: 143