

基于生物信息学的海分枝杆菌 ESAT-6 蛋白特征及功能预测^{*}

孙翰昌¹, 陈倩倩^{1,2}, 孙悦¹, 罗璋³, 李芳²

(1. 重庆文理学院 智慧农业学院 生态渔业产业化技术创新中心, 重庆 永川 402160;

2. 西南大学 水产学院, 水产动物营养与饲料实验室, 重庆 400715; 3. 天津农学院 水产学院, 天津 300384)

摘要:为揭示 ESAT-6 蛋白在海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)毒力、免疫反应和细胞功能的重要作用。本研究利用生物信息学的方法对海分枝杆菌 ESAT-6 蛋白的理化性质、亚细胞定位、蛋白结构、共线性、互作蛋白网络等进行分析,推测该蛋白的功能作用。结果表明,ESAT-6 蛋白是一类由约 100 个氨基酸组成的亲水性蛋白,为 T 细胞抗原,多位于细胞核与细胞质中,具有螺旋发夹结构。Motif 分析说明 ESAT-6 蛋白有 3 个基序,与结核分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的共线性分析显示该蛋白具有较高保守性。ESAT-6 蛋白与 *esxG*、*espA*、*espB* 等蛋白有直接的互作,还可与 CFP-10 蛋白形成复合物发挥作用。ESAT-6 蛋白的功能主要是在细胞膜上形成特殊孔道破坏细胞膜,实现免疫逃逸,诱导细胞凋亡等。研究结果可为研究海分枝杆菌在感染宿主的机制中提供理论依据。

关键词:海分枝杆菌;ESAT-6 蛋白;生物信息学

中图分类号:R378.9

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2026)04-0117-08

海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)是分枝杆菌属(*Mycobacterium*)的一个物种,在全球水域皆有分布,有较大的基因组,会通过接触感染变温动物和较凉的人类四肢引起皮肤和软组织损伤^[1]。海分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)与结核分枝杆菌在固体培养基上的菌落形态通常是光滑的,在显微镜下亦难以区分,是一种长 1.0~4.0 μm 、宽 0.2~0.6 μm 的多形杆菌,无芽孢形成,抗酸染色菌体呈红色,类脂含量高^[2]。海分枝杆菌与结核分枝杆菌有较近的亲缘关系^[3],二者基因相似度高达 95%^[4],有相似的致病机理^[5]。海分枝杆菌感染宿主细胞时,通过分泌系统、分泌蛋白等与宿主的免疫细胞相互作用,调节宿主细胞的免疫功能,介导宿主细胞内的存活,引起疾病^[6]。

海分枝杆菌的 EXS 分泌系统,即 VII 型分泌系统(type VII secretion system, T7SS),具有 5 种不同的 ESX 分泌系统,分别为 ESX-1、ESX-2、ESX-3、ESX-4 和 ESX-5,其中,ESX-1、ESX-3、ESX-5 在毒力方面发挥重要作用^[7]。ESAT-6,亦称 *EsxA*,是 ESX-1 系统分泌的一种小蛋白,目前已证明该蛋白在细菌毒力分泌方面发挥重要作用。ESAT-6 蛋白通过抑制 TLR 信号通路、转录因子、干扰素调节因子等^[8]来抑制宿主固有免疫应答^[9],还可减少 T 细胞 IFN- γ 分泌,直接抑制 T 细胞反应^[10]。Munked 等人^[11]的研究表明,海分枝杆菌感染浸润的单核细胞改变细胞因子表达谱,诱导糖酵解代谢、缺氧介导的信号传导、一氧化氮合成、组织重塑,并抑制对干扰素- γ 的反应性。此外,ESAT-6 蛋白还具有激活嗜中性粒细胞诱导的作用^[12]。

本研究利用生物信息学方法,对海分枝杆菌 ESX-1 分泌系统关键效应因子 ESAT-6 蛋白的序列特征、结构与功能进行了系统预测。本研究通过分析 ESAT-6 蛋白的理化性质、保守结构域及互作网络,阐明 ESAT-6 蛋白的基本生物学属性,并结合现有理论对它的功能进行验证与梳理。深入挖掘 ESAT-6 蛋白在感染过程中的潜在作用,以揭示 ESAT-6 蛋白的生物学意义,从而为理解海分枝杆菌的致病机制提供新的线索与研究方向。

1 材料与方法

1.1 ESAT-6 蛋白序列的筛选

从 NCBI 官网(www.ncbi.nlm.nih.gov)下载海分枝杆菌的全基因组蛋白文件。在 Uniprot 网站(www.uniprot.org)

^{*} 收稿日期:2026-01-28 修回日期:2026-03-12 网络出版时间:2026-07-22T09:49

资助项目:国家自然科学基金青年基金项目(No. 32202971);重庆市教育委员会科学技术研究计划重大项目(No. KJZD-M202401301)

第一作者简介:孙翰昌,男,教授,研究方向为水产生物技术,E-mail:sunhanchang199@163.com

网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/50.1165.n.20260721.1907.002>

uniprot.org)找到 PFam 码 PF06013 并由此进入,下载对应的 HMM 文件。利用 TBtools-II 软件筛选出可能是 ESAT-6 蛋白的序列,挑选出 E -value 小于 10^{-3} 的序列,在 NCBI 官网中进一步筛选确认,最后采用 MEGA 11 软件进行多序列联配,保留符合长度条件的序列。

1.2 ESAT-6 蛋白的序列及结构分析

通过生物信息学方法对 ESAT-6 蛋白的序列进行理化性质分析、N-糖基化位点预测、抗原预测、磷酸化位点预测、亚细胞定位、进化树分析、结构分析、互作蛋白网络和共线性分析,相关生物信息学分析软件见表 1。

表 1 生物信息学分析在线工具
Tab. 1 Bioinformatics analysis online tool

工具名称	来源网站	用途
ExPASy	https://web.expasy.org/	理化性质(等电点、分子质量、亲疏水性)
NetPhos-3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	磷酸化位点预测
NetNGlyc1.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/	N-糖基化位点预测
DeepLoc-2.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.1/	亚细胞定位
MEME 5.5.7	http://meme-suite.org/tools/meme	Motif 分析
SOPMA	https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsasopma.html	二级结构预测
Swiss model	https://swissmodel.expasy.org/interactive	三级结构预测
STRING	https://cn.string-db.org/	互作蛋白网络
VaxiJen	https://ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html	抗原预测

2 结果与分析

2.1 ESAT-6 蛋白的序列分析

如表 2 所示,筛选出 14 条 ESAT-6 蛋白的氨基酸序列,氨基酸序列长度为 94~117 个氨基酸,等电点为 4.57~6.42,分子质量约为 10 000 Da,这说明蛋白质存在差异,且分子质量的大小通常与蛋白质的结构复杂性和功能多样性相关。ESAT-6 蛋白多存在于细胞质和细胞核中,抗原预测结果表明绝大多数为抗原。ESAT-6 蛋白的 N-糖基化位点预测表明,在 14 条序列中,仅有 4 条含糖基化位点,糖基化位点的形成可能与蛋白的结构形成或功能行使有一定关系。

表 2 氨基酸理化性质
Tab. 2 Physical and chemical properties of amino acids

编号	氨基酸数量/个	等电点	分子质量/Da	N-糖基化位点	抗原预测
WP_012392186.1	95	4.67	9 871.75	无	抗原
WP_012392192.1	100	5.40	10 928.20	无	抗原
WP_012395207.1	94	5.64	9 956.02	无	抗原
WP_012395281.1	98	5.44	10 884.14	无	抗原
WP_020727682.1	95	4.68	10 275.42	无	抗原
WP_020731141.1	95	4.68	10 038.95	有	抗原
WP_020731160.1	96	6.12	1 046.73	有	抗原
WP_020731989.1	98	5.51	10 947.24	无	抗原
WP_036455447.1	103	5.58	11 098.28	无	抗原
WP_038580099.1	100	5.13	11 090.32	无	非抗原
WP_038581209.1	103	4.57	10 418.49	无	抗原
WP_038582374.1	98	5.44	10 939.06	无	抗原
WP_038582377.1	94	4.97	9 847.84	有	抗原
WP_050674485.1	117	6.42	12 603.03	有	抗原

ESAT-6 蛋白的氨基酸序列中存在的磷酸化有苏氨酸、酪氨酸和丝氨酸,筛选出的序列中苏氨酸磷酸化位点共 39 个、酪氨酸磷酸化位点共 7 个、丝氨酸磷酸化位点共有 59 个。ESAT-6 蛋白为亲水性蛋白,如表 3 所示,分值为正代表蛋白质的性质为疏水,分值为负代表蛋白质的性质为亲水。由表 3 可见,每条 ESAT-6 蛋白序列亲水性、疏水性的最高位不在同一位置,这可能与氨基酸的组成有关。

表 3 ESAT-6 蛋白的亲疏水性
Tab.3 The hydrophilicity and hydrophobicity of ESAT-6 protein

编号	蛋白质性质	最高分位置	最高分值	最低分位置	最低分值
WP_012392186.1	亲水	24、25	0.844	33	-2.100
WP_012392192.1	亲水	53	1.844	84、85	-2.600
WP_012395207.1	亲水	35	1.544	71	-1.678
WP_012395281.1	亲水	69	0.889	83	-2.778
WP_020727682.1	亲水	11	1.944	54	-2.111
WP_020731141.1	亲水	13	0.989	58、59	-2.056
WP_020731160.1	亲水	34	1.433	56、57	-1.456
WP_020731989.1	亲水	75	1.656	59	-2.211
WP_036455447.1	亲水	96	1.556	87	-2.233
WP_038580099.1	亲水	45	1.000	88	-2.911
WP_038581209.1	亲水	71	1.622	62	-1.344
WP_038582374.1	亲水	69	0.889	83	-2.778
WP_038582377.1	亲水	35	1.567	71	-1.689
WP_050674485.1	亲水	43	1.667	103	-1.989

如图 1 所示,ESAT-6 蛋白的氨基酸组成包含大量的甘氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺等极性氨基酸以及较多的丙氨酸等非极性氨基酸,也包含少量量的脯氨酸、苯丙氨酸等非极性氨基酸和酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸等极性氨基酸。这也表明 ESAT-6 蛋白的氨基酸序列亲水区较多,且具有柔性结构,疏水区比较简单。这可能会影响该蛋白的溶解性等性质。

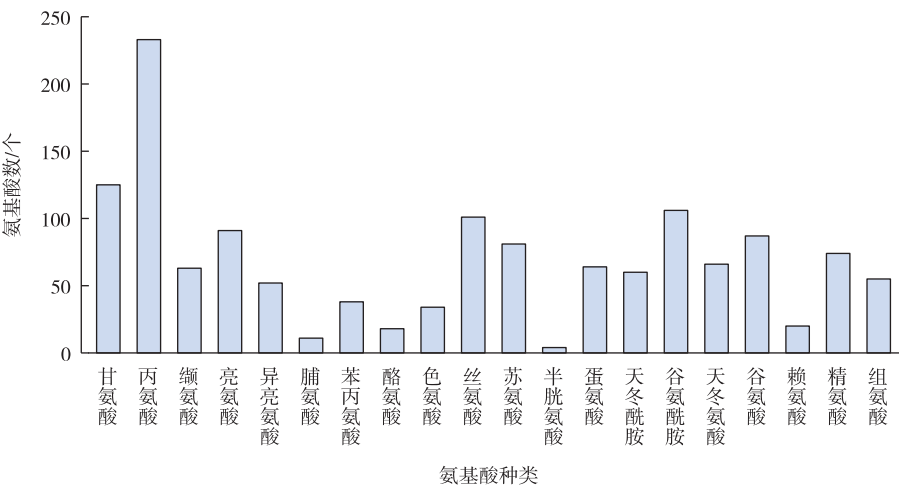


图 1 ESAT-6 蛋白的氨基酸组成
Fig.1 Amino acid composition of ESAT-6 protein

2.2 亚细胞定位预测

ESAT-6 蛋白的亚细胞定位主要集中在细胞核与细胞质。如图 2 所示,有 5 条在细胞核中,5 条在细胞质中,3 条在溶酶体中,1 条在高尔基体中。亚细胞定位不同,则转录后的修饰、选择性剪切和细胞的动态调控可能不同。

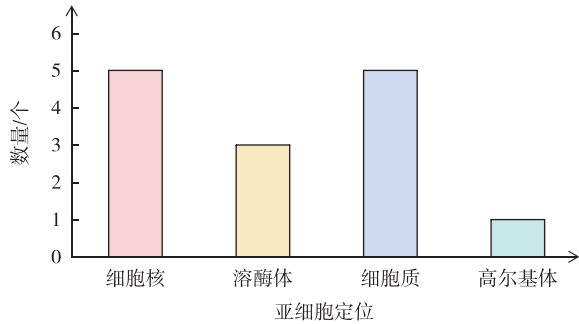


图 2 ESAT-6 的亚细胞定位预测

Fig. 2 Subcellular localization prediction of ESAT-6

2.3 蛋白质的结构分析

ESAT-6 蛋白的氨基酸序列二级结构以 α -螺旋为主,还有一些 β -折叠和无规则卷曲,如图 3 所示。ESAT-6 蛋白的氨基酸序列的 α -螺旋是由氨基酸残基通过氢键等弱相互作用而形成的。ESAT-6 蛋白的氨基酸通过二级结构变化多形成发夹结构,且三级结构并非完全一致。这可能与 ESAT-6 蛋白作用不同或是它所处环境不同有关。ESAT-6 蛋白的三级结构决定了它如何与环境中的其他分子相互作用,从而执行自身的生物学功能。

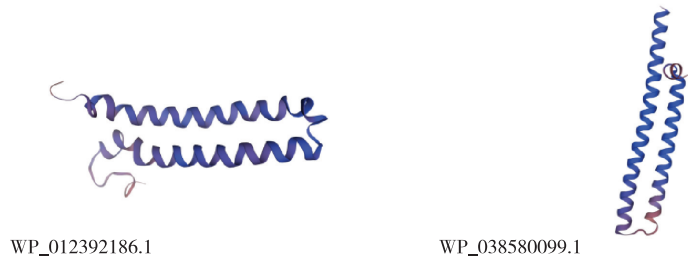


图 3 ESAT-6 蛋白三级结构预测

Fig. 3 Prediction of the tertiary structure of ESAT-6 protein

2.4 Motif 分析

ESAT-6 蛋白的 Motif 有 3 种,3 种 Motif 的一致序列如图 4 中所示。在筛选出的 14 条 ESAT-6 蛋白序列中,大部分序列都有 Motif 1,Motif 1 是甘氨酸和丝氨酸的富集区,通常使蛋白质具有柔性结构和亲水性,这可能与它的构象变化有关。Motif 2 含甲硫氨酸、精氨酸,可能与金属离子结合,或者与蛋白相互作用。Motif 3 中天冬氨酸、谷氨酰胺较多,这些氨基酸可以增加蛋白质的亲水性并提高氢键的形成能力。

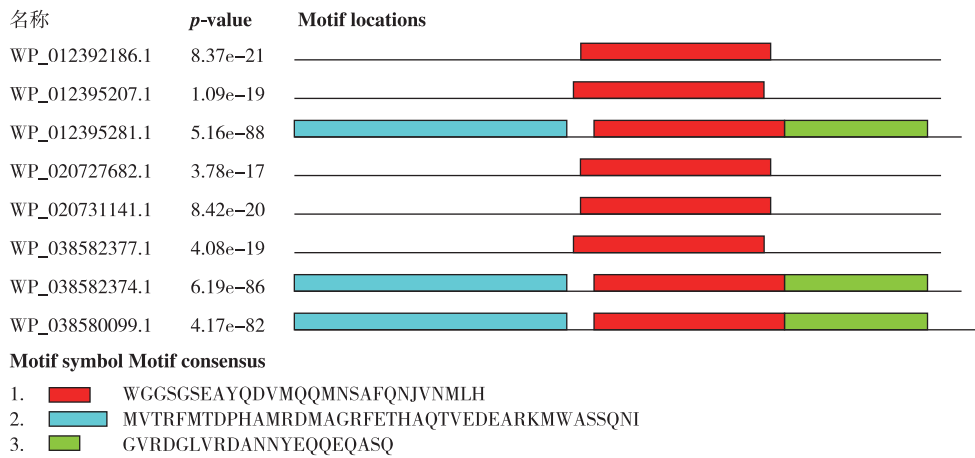


图 4 ESAT-6 蛋白的 Motif 分析

Fig. 4 Motif analysis of ESAT-6 protein

2.5 共线性分析

共线性分析通常用于检测基因组间的保守序列。图 5 是海分枝杆菌与结核分枝杆菌^[13]、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)^[14]、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)^[15]的共线性分析结果。其中,海分枝杆

菌与结核分枝杆菌的 ESAT-6 蛋白有 10 对蛋白存在直接共线性关系,这说明两者在 ESAT-6 的相关基因簇中有着较高的保守性,可能存在相似的致病机制。海分枝杆菌与堪萨斯分枝杆菌的 ESAT-6 蛋白有 11 对蛋白存在直接共线性关系,共线性蛋白数量高于另外 2 组,可能这 2 个物种 ESAT-6 蛋白的协同进化关系更为复杂。海分枝杆菌的 ESAT-6 蛋白与溃疡分枝杆菌的 ESAT-6 蛋白有 9 对蛋白存在直接共线性关系,但仍具有一定的保守性。



图 5 共线性分析
Fig. 5 Collinearity analysis

2. 6 进化树分析

通过引入结核分枝杆菌的相关蛋白,进行多序列联配和进化树分析,结果如图 6 所示。其中,海分枝杆菌和结核分枝杆菌的 ESAT-6 蛋白形成了比较明显的分支聚类,说明两者在进化关系上具有较高的同源性;此外部分序列呈现紧密聚集状态,可能是由于两者在结构或功能上高度保守所致。

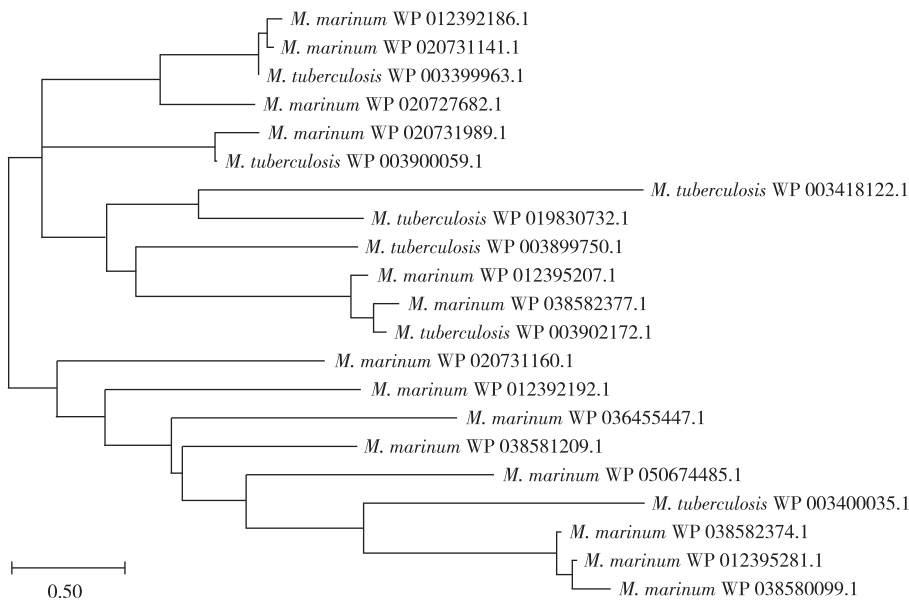


图 6 ESAT-6 蛋白的进化树
Fig. 6 Evolutionary tree of ESAT-6 protein

2. 7 互作蛋白网络分析

根据对蛋白质的结构预测,进一步进行蛋白质互作网络分析。从图 7 中可以看出 ESAT-6 蛋白的功能特

征,即该蛋白可能与 *esxG*、*espA*、*espB* 等蛋白有直接的互作。*ESAT-6* 蛋白与 *esxG* 蛋白的互作可能与干扰宿主免疫信号通路进而实现免疫逃逸有关。*ESAT-6* 蛋白与 *CFP-10* 蛋白能形成复合物,协助分泌毒力因子。*ESAT-6* 蛋白还与 *MMAR_5451*、*MMAR_4596*、*espA*、*espB*、*groEL2*、*esxU* 等蛋白存在相关性,这种相关性可能与 *ESAT-6* 蛋白对应的功能发挥有关。

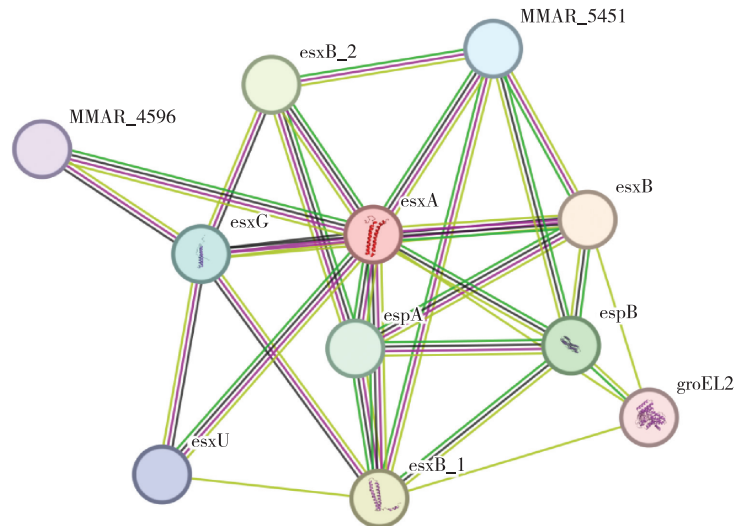


图 7 *ESAT-6* 蛋白的互作蛋白网络

Fig. 7 The interacting protein network of *ESAT-6* protein

3 讨论与结论

海分枝杆菌是一种可引起人兽共患病的非结核抗酸杆菌。该物种细胞壁表面存在大量羟基化支链脂肪酸,共价连接形成疏水的分枝菌酸膜屏障;蛋白分泌需穿越此屏障,这一过程依赖于特殊的Ⅶ型分泌系统^[16-17]。*ESAT-6* 是Ⅶ型分泌系统中 *ESX-1* 分泌系统的关键效应蛋白,通过对该蛋白的生物信息学分析可知它是一种长度较短的非信号肽依赖性分泌蛋白。*ESAT-6* 蛋白的氨基酸序列富含甘氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺和丙氨酸,这可能与该序列的亲水区域较多、具有柔性结构有关。序列分析进一步表明,*ESAT-6* 蛋白缺乏跨膜结构域,仅有部分疏水区域,整体呈现亲水性。亚细胞定位预测提示 *ESAT-6* 蛋白主要分布于细胞质和细胞核,二、三级结构相对简单,呈螺旋发夹结构,常与 *CFP-10* 蛋白形成二聚体发挥功能。值得注意的是,*ESAT-6* 蛋白的分泌与 *CFP-10* 蛋白的分泌相互关联,前者的分泌依赖于后者的存在;这种共同依赖性与金黄色葡萄球菌 *EsxA* 和 *EsxB* 蛋白间的关系极为相似^[18]。*CFP-10* 蛋白作为分子伴侣,与 *ESAT-6* 蛋白相互诱导折叠,形成稳定的异源二聚体^[19],然后与细胞表面受体结合导致宿主细胞行为的调节,从而有利于病原体^[20]。相关研究表明,C末端的完整性是 *Mo* 吞噬体损伤、肉芽肿形成和介导毒力所必需的部分^[21]。系统发育树和序列比对分析发现,海分枝杆菌与结核分枝杆菌的 *ESAT-6* 蛋白在进化关系上同源性较高。

进一步通过 Motif 分析发现,*ESAT-6* 蛋白包含 3 个保守结构域,这 3 部分有的与亲水性有关,有的可能与金属离子结合有关。Motif 分析结果还显示,并不是所有的 *ESAT-6* 蛋白都完整保留这 3 个基序,部分环境中 *ESAT-6* 类似物缺失 C 端可变区。这可能是为了简化自身功能,以达到更好适应环境的目的。Motif 分析有助于阐明蛋白质结构特征与功能关联,为预测 *ESAT-6* 蛋白功能提供依据。共线性分析发现,在海分枝杆菌、结核分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的 *ESAT-6* 蛋白的相关基因簇中,部分具有较高的保守性,反映了海分枝杆菌的生物进化历程。

综合互作蛋白网络分析及相关文献,本研究认为 *ESAT-6* 蛋白为海分枝杆菌的重要毒力因子,在致病中发挥着独特的作用,常与 *CFP-10* 蛋白等其他毒力因子协同作用以增强病原菌毒力。*ESAT-6* 蛋白通过与宿主细胞的细胞膜之间的相互作用,形成特殊孔道,从而使得细胞膜的通透性增大,以此破坏细胞膜的完整性^[22]。此外,*ESAT-6* 蛋白可诱发宿主产生炎症反应,导致宿主组织受损^[23]。*ESAT-6* 蛋白为 1 种有效的 T 细胞抗原^[24],通过抑制宿主的抗原呈递细胞的功能阻碍 T 细胞活化,从而协助病原菌逃避免疫清除。*ESAT-6* 蛋白可以诱导免疫细胞凋亡,削弱宿主免疫防御的能力。已有研究表明,上述中细胞膜穿孔机制与宿主细胞的死亡相关^[25]。

参考文献:

- [1] Zhang M, Adroub S, Ummels R, et al. Comprehensive pan-genome analysis of *Mycobacterium marinum*: insights into genomic diversity, evolution, and pathogenicity[J]. Scientific Reports, 2024, 14: 27723.
- [2] 顾安康, 张宇. 海分枝杆菌的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21 (10): 1048-1052.
Gu Ankang, Zhang Yu. Research progress of *Mycobacterium marinum* [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2022, 21 (10): 1048-1052.
- [3] 王焱焱, 毕斯琪, 陈标, 等. 利用 CRISPRi 技术敲低海分枝杆菌 PPE13 基因[J]. 中国兽医学报, 2023, 43 (8): 1670-1676.
Wang Yaoyao, Bi Siqi, Chen Biao, et al. Knockdown PPE13 gene of *Mycobacterium marinum* using CRISPRi technology [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2023, 43 (8): 1670-1676.
- [4] 林存智. 海分枝杆菌培养及致病性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
Lin Cunzhi. Research on the culture and pathogenesis of *Mycobacterium marinum* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [5] 刘红旭, 何树梅, 张舒林. 海分枝杆菌-斑马鱼模型的抗结核研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27 (2): 261-265.
Liu Hongxu, He Shumei, Zhang Shulin. Progress in the anti-tuberculosis research of the zebrafish model of *Mycobacterium marinum*-tuberculosis[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2019, 27 (2): 261-265.
- [6] 余海燕, 杨国平. 结核分枝杆菌 ESX-1 分泌系统与宿主巨噬细胞相互作用的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2023, 39 (12): 1218-1225.
Yu Haiyan, Yang Guoping. Research progress in the interaction between the *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 secretion system and host macrophages[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2023, 39 (12): 1218-1225.
- [7] 余海燕, 杨国平. 结核分枝杆菌 ESX-5 分泌系统的研究进展[J]. 医学研究与战创伤救治, 2023, 36 (11): 1207-1211.
Yu Haiyan, Yang Guoping. Research progress on ESX-5 secretion system of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Medical Research & Combat Trauma Care, 2023, 36 (11): 1207-1211.
- [8] Pathak S K, Basu S, Basu K K, et al. Corrigendum: direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages[J]. Nature Immunology, 2015, 16 (3): 326.
- [9] 李玉洁, 余海燕, 杨雨婷, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白早期分泌性抗原 6 (ESAT-6) 的免疫学性质及其在新型疫苗中作用的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2024, 40 (1): 89-94.
Li Yujie, Yu Haiyan, Yang Yuting, et al. Research progress on immunological properties of ESAT-6 secreted by *Mycobacterium tuberculosis* and its role in new vaccines[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2024, 40 (1): 89-94.
- [10] Samten B, Wang X S, Barnes P F. *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses[J]. Tuberculosis, 2009, 89: S74-S76.
- [11] Munke K, Wulff L, Lienard J, et al. *In vivo* regulation of the monocyte phenotype by *Mycobacterium marinum* and the ESX-1 type VII secretion system[J]. Scientific Reports, 2025, 15 (1): 4545.
- [12] 高利, 罗丽莎, 吴新雅, 等. 结核分枝杆菌毒力因子 ESAT-6 和 CFP-10 的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19 (1): 96-100.
Gao Li, Luo Lisha, Wu Xinya, et al. Advances in the virulence factors ESAT-6 and CFP-10 of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Pathogen Biology, 2024, 19 (1): 96-100.
- [13] 张丹丹, 万珈旭, 付莎莎, 等. 结核分枝杆菌调控宿主免疫代谢的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2025, 41 (4): 358-363.
Zhang Dandan, Wan Jiaxu, Fu Shasha, et al. Research progress in the regulation of host immune metabolism by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2025, 41 (4): 358-363.
- [14] 王少华, 常文静, 索文帅, 等. 河南省 34 株堪萨斯分枝杆菌分子分型及耐药性研究[J]. 中国热带医学, 2024, 24 (10): 1262-1267.
Wang Shaohua, Chang Wenjing, Suo Wenshuai, et al. Molecular typing and drug resistance of 34 clinical isolates of *Mycobacterium kansasii* in He'nan Province[J]. China Tropical Medicine, 2024, 24 (10): 1262-1267.
- [15] Van Der Werf T S, Stienstra Y, Johnson R C, et al. *Mycobacterium ulcerans* disease[J]. Bulletin of the World Health Organization, 2005, 83 (10): 785-791.
- [16] Ates L S, Houben E N G, Bitter W. Type VII secretion: a highly versatile secretion system[J]. Microbiology Spectrum,

- 2016, 4 (1): VMBF-0011-2015.
- [17] Abdallah A M, Weerdenburg E M, Guan Q T, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of pathogenic mycobacteria and their *esx-1* mutants reveal secretion-dependent regulation of ESX-1 substrates and WhiB6 as a transcriptional regulator[J]. PLoS One, 2019, 14 (1): e0211003.
- [18] 张保海, 姚学萍, 王印, 等. 金黄色葡萄球菌Ⅶ型分泌系统研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35 (12): 1134-1138. Zhang Baohai, Yao Xueping, Wang Yin, et al. Research progress on the secretory system of *Staphylococcus aureus* type Ⅶ[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35 (12): 1134-1138.
- [19] Bates T A, Trank-Greene M, Nguyenla X, et al. ESAT-6 undergoes self-association at phagosomal pH and an ESAT-6 specific nanobody restricts *M. tuberculosis* growth in macrophages[J]. eLife, 2024, 12: RP91930.
- [20] Renshaw P S, Lightbody K L, Veverka V, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6[J]. The EMBO Journal, 2005, 24 (14): 2491-2498.
- [21] Osman M M, Shanahan J K, Chu F, et al. The C terminus of the *Mycobacterium* ESX-1 secretion system substrate ESAT-6 is required for phagosomal membrane damage and virulence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119 (11): e2122161119.
- [22] Peng X L, Sun J J. Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Toxicon, 2016, 116: 29-34.
- [23] Passos B B S, Araújo-Pereira M, Vinhaes C L, et al. The role of ESAT-6 in tuberculosis immunopathology[J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1383098.
- [24] Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, et al. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors?[J]. Trends in Microbiology, 2004, 12 (11): 500-508.
- [25] Derrick S C, Morris S L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression[J]. Cellular Microbiology, 2007, 9 (6): 1547-1555.

Characterization and Functional Prediction of ESAT-6 Protein in *Mycobacterium marinarius* Based on Bioinformatics

SUN Hanchang¹, CHEN Qianqian^{1,2}, SUN Yue¹, LUO Zhang³, LI Fang²

(1. Technology Innovation Center of Ecological Fishery Industrialization, College of Smart Agriculture,

Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan Chongqing 402160;

2. Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Feed, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715;

3. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: To reveal the important roles of the ESAT-6 protein in the virulence, immune response, and cellular functions of *Mycobacterium marinarius*, this study employs bioinformatics methods to analyze the physicochemical properties, subcellular localization, protein structure, synteny, and protein-protein interaction network of the ESAT-6 protein from *Mycobacterium marinarius*, and to predict its functional roles. The results indicate that ESAT-6 protein is a hydrophilic protein composed of approximately 100 amino acids, serving as a T-cell antigen, is predominantly located in the nucleus and cytoplasm, and possesses a helical hairpin structure. Motif analysis reveals that the ESAT-6 protein contains three conserved motifs, and synteny analysis with *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium ulcerans* shows a high degree of conservation. The ESAT-6 protein directly interacts with proteins such as *esxG*, *espA*, and *espB*, and can also form a complex with CFP-10 protein to exert its functions. The functions of the ESAT-6 protein mainly involve the formation of specialized pores on the cell membrane to disrupt membrane, facilitate immune evasion, and induce cell apoptosis, etc., providing theoretical basis for studying the mechanism of *Mycobacterium marinarius* infection in hosts.

Keywords: *Mycobacterium marinarius*; ESAT-6 protein; bioinformatics

(责任编辑 陈新颖)