

微生物新型防御系统的系统性发现与展望

李明, 程飞跃, 龚路遥, 向华

中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 微生物防御系统是生物技术创新与发展的重要工具库, 细菌限制性内切酶的发现催生了现代分子克隆技术, CRISPR 系统的开发利用则使基因组编辑技术取得革命性突破。基于上述原因, 微生物新型防御系统的发现与研究已引起各国科学家的重视, 一些新的防御系统如 pAgos 和 DISARM 等相继被发现和研究。为进一步挖掘微生物中可能蕴藏着的其他未知防御系统, 最近以色列科学家 Sorek 等报道了从海量的微生物基因组序列中系统性发现新型防御系统的研究策略, 并且通过合成生物学思路鉴定了 10 种新型系统的抗病毒或抗质粒功能。本文将首先介绍 Sorek 团队系统性发现新型防御系统的研究工作, 进而总结目前已知的主要微生物新型防御系统的可能机制, 并对该领域的发展态势与挑战进行分析和展望。

关键词: 原核生物防御系统; 噬菌体/病毒; 防御基因家族

Systematic discovery of novel prokaryotic defense systems: progress and prospects

Ming Li, Feiyue Cheng, Luyao Gong, Hua Xiang

State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Microbial defense systems provide fundamental elements for biotechnology development. For example, molecular cloning techniques greatly depend on the discovery of the bacterial restriction-modification system, and similarly, deciphering the CRISPR adaptive immunity gives rise to the revolutionary genome editing technique CRISPR-Cas9. Therefore, exploring novel microbial defense systems has attracted world-wide attention, and new systems like prokaryotic Argonautes (pAgos) and the defense island system associated with restriction-modification (DISARM) were successively discovered and investigated. Recently, Sorek *et al.* reported a systematic strategy to predict novel defense systems within the vast microbial genomes and validated the antiviral or anti-plasmid capability of 10 candidates using synthetic biology procedures. Here, we introduce the systematic analysis pipeline developed by Sorek *et al.*, summarize the characteristics of the novel microbial defense systems, and prospect the research trends and challenges in this rising field.

收稿日期: 2018-03-21; 修回日期: 2018-04-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31571283, 31771381)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31571283, 31771381)]

作者简介: 李明, 博士, 副研究员, 研究方向: CRISPR 分子机制。E-mail: lim_im@im.ac.cn

通讯作者: 向华, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物遗传与代谢。E-mail: xiangh@im.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-075

网络出版时间: 2018/4/17 10:38:31

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180417.1038.002.html>

Keywords: prokaryotic defense system; phage/virus; defense gene family

几乎所有的细胞生命都会时刻面临着病毒的威胁,它们在长期的选择压力下进化出了一系列复杂而精巧的病毒防御机制^[1~3]。原核生物包括细菌和古菌,它们的病毒防御机制十分多样,按照其直接靶向的组分(病毒组分或宿主自身组分)大致可分为两大类(表 1)。第一大类是主动型防御(active defense)机制,例如,人们所熟知的限制-修饰(restriction-modification, R-M)系统,它通过识别特定 DNA 序列(一般具有回文特征)的甲基化状态区分并特异地切割病毒 DNA^[4]。CRISPR-Cas 是另一种靶向病毒 DNA/RNA 的核酸免疫系统,也是原核生物中已知的唯一一种适应性免疫机制,它通过获取病毒的 DNA 序列信息而获得记忆性免疫,利用转录加工产生的 CRISPR RNA 指导 Cas 核酸酶切割病毒基因组^[5,6]。第二大类是自杀型防御(suicidal defense)机制,包括流产感染(abortive infection, Abi)系统^[7]和毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统^[8]。流产感染实际上是一种表型定义,可以泛指各类诱发被感染细胞死亡或代谢停滞的防御机制,也特指各种休眠的毒性蛋白,它们在侵染发生时被病毒组分活化并阻断宿主细胞的关键生理过程,导致进入宿主细胞的病毒 DNA 无法产生(或产生极少量的)子代病毒颗粒,从而保护菌群中的其他个体免于病毒侵染,因此是一种群体水平的防御策略。而毒素-抗毒素系统编码一对稳定的毒素蛋白和不稳定的抗毒素蛋白或 RNA,病毒侵染往往会导致后者(抗毒素)快速降解而释放前者(毒素),最终引发流产感染。

人们基于对上述防御机制,尤其是核酸免疫机制的研究,开发出了一系列重要的分子生物学工具,推动了生命科学的发展。例如,来源于细菌限制-修饰系统的限制性内切酶几乎是分子克隆的必备工具,而 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术也是起源于人们对 CRISPR-Cas 适应性免疫过程的认识和改造^[9~11]。因此,发掘和解析原核生物中新型病毒防御机制无论在理论上还是应用上都具有重要意义。近期,以色列的 Rotem Sorek 研究团队通过分析海量的微生物基因组信息,预测并鉴定了一系列新型的防御系统^[12,13],

拓展了人们对于微生物防御系统复杂性和多样性的认识,并有望为科学家们开发新型分子工具提供丰富的遗传元件。

1 微生物新型防御系统的系统性发掘

不同防御系统的编码基因往往在细菌或古菌基因组上聚簇存在并形成一或多个“防御岛(defense island)”^[14,15]。2009 年, Makarova 等^[16]发现原核 Argonaute(简称 pAgos)的编码基因往往位于各种防御基因(如限制性内切酶、CRISPR-Cas 系统)附近,推测可能是一种新型的防御系统。这一推测后来由 van der Oost J 团队在细菌嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)^[17]和古菌激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)^[18]的 pAgo 研究中得到证实。类似地, Sorek 团队通过分析两种防御基因在微生物基因组中的分布,分别发现了 BREX(bacteriophage exclusion)^[19]和 DISARM(defense island system associated with restriction-modification)^[12]这两个新型防御系统。上述系统的发现说明通过分析已知防御基因相关联的保守未知基因,能够有效预测新型的防御系统。近期, Sorek 实验室进一步沿着这一思路,分析了大量已知防御基因在海量微生物基因组中的分布,并结合合成生物学手段系统性地鉴定了 10 种新型的防御系统,其中的 9 种是抗病毒的,另外 1 种是抵御质粒的^[13]。

首先,根据 Makarova 等^[14]于 2011 年统计的参与抗噬菌体免疫防御的基因家族信息,以及 BREX 和 DISARM 的信息,获得已知参与抗噬菌体免疫的 pfams(蛋白家族,即一组具有相同结构域蛋白)和 COGs(直系同源蛋白簇)数据集。然后,他们分析了 14 083 个 pfam 的成员基因在 45 000 个细菌和古菌的基因组中的分布,并引入了两个统计学概念——防御相关性(defense score)和防御背景复杂度(defense context variability score)。一个 pfam 的防御相关性是指其成员基因“邻近”(比如距离 10 个基因以内)已知防御基因的比例,而防御背景复杂度反

映了其成员基因在不同已知防御系统附近出现的情况。通过参考已知防御系统设定参数阈值,该团队获得了277个可能参与病毒防御的pfam,其中大部分从未报道与防御过程相关。加上2011年Makarova等^[18]预测的35个非pfam(non-pfam)基因家族和23个未通过上述实验阈值的pfams,共得到335个候选的防御基因家族(图1)。

如同CRISPR-Cas、BREX、DISARM等,防御系统通常并非是一个单一基因,而是由来自多个家族的若干基因构成,且这些基因通常形成操纵子,在不同物种之间具有比较保守的基因排布^[20,21]。因此,Sorek团队将每个候选基因家族的所有成员及其上下游基因选出,通过序列同源性进行聚簇分析,进一步筛选出在不同基因组中具有保守基因排布的基因簇作为可能的多基因防御系统。通过分析注释信息,他们人工剔除了一些假阳性结果(可能参与其他生理过程的系统)和一些已知的病毒防御系统。另外,为了获得更多的结果,他们将这些新鉴定的候选防御系统添加到已知数据集中进行二次筛选(图1),最终获得了41个单基因或多基因的候选系统,其中28个具有广泛的系统进化分布,可能代表在原核生物中比较普遍存在的防御机制。

要将上述生物信息学预测的候选系统鉴定为新型的防御系统需要更直接的实验证据。Sorek团队借助合成生物学手段,直接合成它们的全基因序列(包括上下游基因间区以保持其启动子、终止子等调控序列的完整性),并在原有免疫系统失活的模式菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*)MG1655和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)BEST7003中对其病毒防御能力进行验证。由于在选择每个候选防御系统的具体基因序列时尽量选择了与模式菌株亲缘关系较近的原生宿主菌,这一合成生物学的策略非常成功,在28个候选防御系统中,26个系统有至少一个候选序列在模式菌株中成功表达。接下来他们选择了多种不同类型的噬菌体做侵染实验,结果发现,成功表达的26种系统中有9种对至少一种噬菌体有防御作用,而1种在枯草芽孢杆菌中对外源质粒DNA有明显的抵御作用,他们将这10种防御系统分别以各种神话中保护神的名字命名。这些新发现的防御系统具有不同的进化分布、基因构成和病毒抗性特征,暗示了它们在不同的微生物类群中采取了非常多样化的分子防御机制。通过关键基因突变等分析,Sorek团队进一步探讨了其中4个新型系统(Zorya, Thoreris, Druantia和Wadjet)的功能机制(表1)。

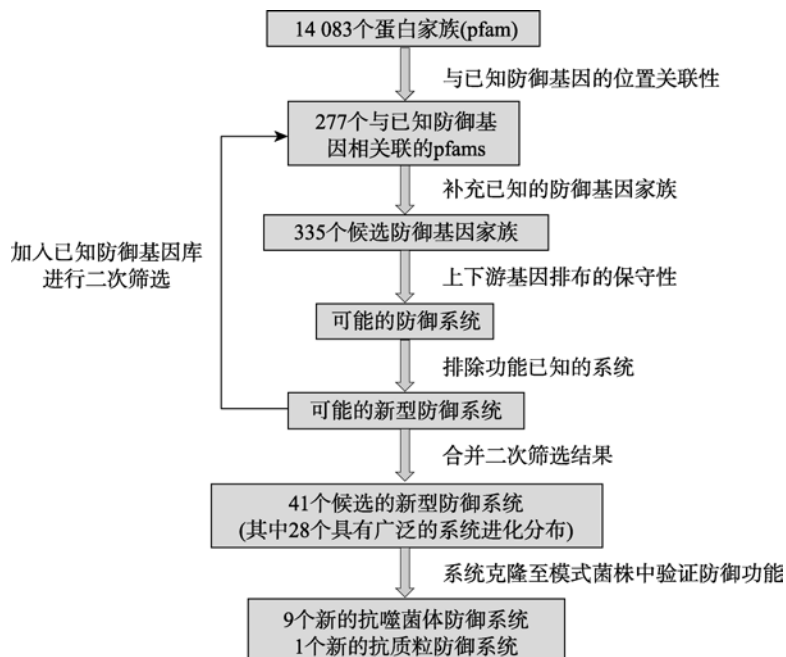


图1 Sorek 研究中新型原核防御系统的预测和鉴定流程

Fig. 1 Schematic illustration of the pipeline to identify novel prokaryotic defense systems

表 1 原核生物中几种主要的防御机制

Table 1 Brief summary of prokaryotic defense mechanisms

类别	防御机制/系统	标志性或关键性组分	分子机理	参考文献
主动防御机制	限制-修饰系统(restriction-modification, R-M)	限制性内切酶和 DNA 甲基化酶	切割病毒 DNA 中未甲基化的特定识别序列(通常有回文特征)	[4]
	CRISPR-Cas 系统	CRISPR 重复序列和 Cas1 等 Cas 蛋白	RNA 指导特异性切割病毒核酸	[5,6]
	原核 Argonautes (pAgos)	PIWI 结构域蛋白	可能由 DNA 或 RNA 指导特异性切割外源核酸	[17,18]
	BREX (bacteriophage exclusion)	<i>pglZ;pglX;brxA-B-C-L</i>	抑制病毒 DNA 复制,具体分子机制未知	[19]
	DISARM (defense island system associated with restriction-modification)	DNA 甲基化酶;解旋酶;DUF1998, PLD 结构域	多基因的限制-修饰系统	[12]
	Zorya 系统	<i>zorA-B-C</i> 核酸酶基因(<i>zorD</i> 或 <i>zorE</i>)	可能以未知机制靶向病毒 DNA, 并引起条件性流产感染	[13]
	Thoeris 系统	<i>thsA</i> (NAD ⁺ 结合结构域) <i>thsB</i> (TIR 结构域)	机制未知, ThsB 可能负责识别病毒组分	[13]
	Druantia 系统	DUF1998 结构域	机制未知	[13]
	Wadjet 系统	<i>jetA-B-C-D</i>	可能在细胞分裂过程中干扰质粒分配	[13]
自杀防御机制	流产感染系统(abortive infection, Abi)	组分多样,一般为休眠的蛋白	休眠的蛋白被病毒组分活化,并阻断宿主细胞的关键生理过程	[7]
	毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin, TA)	一对毒性蛋白和抗毒性蛋白/RNA	抗毒素快速降解,从而释放毒素的细胞毒性	[8]

2 微生物新型防御系统的功能机制多样性

微生物防御系统的功能解析是其实现技术创新转化的关键,如 CRISPR 从 1987 年首次发现到 2007 揭示其功能花了 20 年时间,而从机制解析到发展成为基因组编辑颠覆性技术只用了短短几年时间^[22]。进入 21 世纪以来,CRISPR 的研究热潮也带来了微生物新型防御系统的高度关注,但总体而言人们对这些新系统的功能机制还知之甚少,因此未来新系统的功能解析需进一步加强。部分新型防御系统简介如下:

2.1 pAgos 系统

Argonaute 蛋白在原核生物和真核生物中广泛分布^[23],在真核生物中作为 RNA 干扰通路的关键组分参与基因的转录后调控等过程,而在原核生物中的生理功能直到近几年才逐渐被揭示。2014 年,

Swarts 等^[17]发现来源于嗜热栖热菌(*T. thermophilus*)的细菌 Ago 在体外实验中具有 DNA 指导的 DNA 干扰活性;2015 年,该团队又进一步发现来源于激烈火球菌(*P. furiosus*)的古菌 Ago 同样可以在 DNA 指导下切割同源 DNA^[18]。重要的是,两者在宿主细胞中的表达都能在一定程度上降低外源质粒的转化效率,说明它们至少能够抵御质粒类型的外源 DNA。由于大部分病毒防御系统(如限制-修饰系统、CRISPR-Cas)同样可作用于外源质粒,因此 pAgos 可能也具有病毒防御功能。

2.2 BREX 系统

天蓝色链霉菌中存在一种称为 Pgl (phage growth limitation)的特殊噬菌体防御现象——噬菌体侵染携带 Pgl 系统的菌株后产生的子代无法再次侵染该类型菌株^[24],而 2014 年 Sorek 团队通过分析该系统的 *pglZ* 基因(编码一个可能的碱性磷酸酶)在 1 500 个微生物基因组中的分布,发现该基因和 *pglX*(编码一个

DNA 甲基化酶)往往出现在一个由 6 个基因构成的保守基因簇中,其他 4 个基因分别命名为 *brxA*、*-B*、*-C* 和 *-L*^[19]。有意思的是,这一基因簇在枯草芽孢杆菌中异源表达时并未导致 Pgl 现象,但确实可以使宿主菌产生对多种噬菌体的抗性,说明采取了一种新的防御机制,因此,他们将这一系统命名为 BREX (bacteriophage exclusion)。Southern 实验进一步表明 BREX 的防御功能可能通过某种未知机制抑制病毒 DNA 复制而实现。

2.3 DISARM 系统

含有 DUF1998(pfam0939)结构域蛋白具有未知功能,但它们的编码基因往往分布于“防御岛”内部^[14],因此可能参与防御过程。Sorek 团队分析了该基因在 35 893 个微生物基因组中的分布,发现其中 1 273 个基因组携带该基因(命名为 *drmB*),并往往位于一个解旋酶基因(*drmA*)和一个 PLD(磷脂酶 D)结构域编码基因(*drmC*)之间^[12]。这 3 个核心基因有时与腺嘌呤甲基化酶基因(*drmM1*)和 SNF2 家族解旋酶基因(*drmD*)组成一个基因簇,有时与胞嘧啶甲基化酶基因(*drmMII*)和一个未知基因(*drmE*)组成基因簇,因此,该系统被命名为 DISARM (defense island system associated with restriction-modification),而上述两种形式的基因簇分别定义为 I 型和 II 型。作者将 1 株土壤来源芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis* ATCC 9945a)的 II 型 DISARM 系统克隆至模式菌株枯草芽孢杆菌 BEST7003 中,发现赋予了该宿主对多种双链 DNA 噬菌体的抗性。研究进一步发现,该系统貌似一种多基因的限制-修饰系统,可以对病毒 DNA 进行限制性切割,并通过甲基化修饰宿主 DNA 的 CCWGG(W=A/T)序列避免自我免疫。

2.4 Zorya 系统

Zorya 防御系统可能兼具主动防御和自杀防御两种分子机制。该系统只分布于细菌基因组中,有两种类型, I 型由 4 个基因(*zorA*、*-B*、*-C* 和 *-D*)组成, II 型由 3 个基因(*zorA*、*-B* 和 *-E*)组成。I 型的 *zorD* 基因编码产物 C 端有时具有 Mrr 家族限制性内切酶特征,而 II 型系统的 *zorE* 基因编码一个 HNH 核酸内切酶结构域,暗示该系统可能靶向病毒 DNA。

有意思的是,两类系统的共有基因 *zorA* 和 *zorB* 的蛋白产物与鞭毛马达蛋白 MotA 和 MotB(质子通道组分,可利用质子迁移为鞭毛旋转提供能量^[25,26])分别具有较高同源性,而且当 ZorA 和 ZorB 中可能参与质子迁移的关键残基被突变时,该防御系统失活。因此, ZorD 和 ZorE 等可能参与主动防御并靶向病毒 DNA,而 ZorA 和 ZorB 可能在主动防御失败时打开质子通道,使细胞膜电势去极化,并最终导致细胞死亡。

2.5 Thoeris 系统

分布于细菌和古菌中的 Thoeris 防御系统可能采取与真核生物天然免疫系统相类似的外源分子识别方式。该系统由必需基因 *thsA*(编码一个 NAD⁺结合结构域)和 *thsB* 构成,其中 *thsB* 经常以多拷贝的形式存在,并编码一个常常与 pAgos 基因关联存在^[16]的 TIR (toll-interleukin receptor)结构域。事实上,该结构域在哺乳动物、植物和无脊椎动物的天然免疫系统中作为重要组分(如哺乳动物 Toll 样受体的胞内部分)参与病原分子模式识别^[27],因此,该结构域可能负责识别噬菌体的不同组分,决定了 Thoeris 系统的免疫特异性。这一发现也说明 TIR 结构域在真核生物和原核生物的免疫系统中非常保守地参与了病原分子的特异性识别。

2.6 Druantia 系统

病毒防御系统 Druantia 非常有意思,该系统的编码序列约 12 kb,除了其特征基因编码一个已知的防御相关结构域 DUF1998(该结构域也是 DISARM 系统的核心组分^[12])以外,其他基因几乎不含有任何已知的功能结构域。该系统可分为 3 种类型,它们除了编码特征基因以外,还分别编码 3 个 350~600 氨基酸(amino acid, AA)的(I 型), 2 个 700~900 AA 的(II 型),或者 1 个 1000~1200 AA 的(型)未知基因。可见, Druantia 系统采取一种复杂而独特的未知机制。

2.7 Wadjet 系统

不同于上述几种新型防御系统, Wadjet 系统虽然不能防御病毒侵染,但能够抵御质粒类型的外源

DNA。该系统由 *jetA*、*-B*、*-C* 和 *-D* 四个必需基因组成,广泛分布于细菌和古菌中。虽然该系统的作用机制尚不清楚,但 *JetA*、*JetB* 和 *JetC* 与凝缩蛋白 *MukF*、*MukE* 和 *MukB*^[28,29] 分别具有显著的结构相似性,因此可能通过干扰质粒在子代细胞中的正常分离实现其防御功能。如前所述,由于大部分病毒防御系统一般可同样作用于外源质粒,*Wadjet* 或许能够防御特定的病毒类群,比如某类单链 DNA 病毒(质粒往往以单链 DNA 形式进入宿主细胞)。

3 微生物新型防御系统的研究和应用展望

原核生物防御系统的功能实现依赖于其对外来因子的特异性识别,如限制-修饰系统通过识别特定序列(一般具有回文特征)的甲基化状态区分外源 DNA,而 CRISPR-Cas 系统凭借 CRISPR RNA 序列以及 PAM(protospacer adjacent motif)识别^[6,30,31] 等分子机制特异性靶向病毒 DNA。正是基于对这些特异性分子识别机制的认识,科学家们开发出了限制性内切酶和 CRISPR-Cas9 等重要的分子生物学工具。*Sorek* 团队借助生物信息学和海量的微生物基因组数据,预测了大量新型防御系统,并利用合成生物学手段验证了 BREX、DISARM 和其他 10 种系统的病毒(或质粒)防御能力,这远远超出了已知防御系统的数量。虽然针对其中大部分新型系统,*Sorek* 团队尚未深入解析它们具体如何发挥其免疫功能,但可以肯定的是,这些复杂多样的防御系统蕴藏着丰富的特异性分子靶向机制。尤其是其中可能靶向 DNA 或 RNA 的新型核酸免疫系统,或将为科学家们开发新型的基因组编辑等工具提供重要元件。

值得注意的是,除了作者已验证防御功能的 10 余种新型系统(包括 BREX 和 DISARM)以外,他们预测的其他候选系统也可能本身具有防御功能,只不过在选择两种模式菌株中表达时可能由于缺乏某种辅助因子或调控元件等未知原因,其防御功能没有得以异源重建,抑或是其防御能力特异性地靶向实验设定以外的某种(类)特定病毒,因此,未来在其他模式菌株中开展更多的病毒侵染实验或将有望进一步鉴定其中更多的候选系统。另外,在生物信息学预测过程中作者设定的一些标准可能会导致部

分真实防御系统的遗漏,例如,作者剔除了一些分布于单一进化枝(如古菌、蓝细菌等)的候选系统,但这些系统可能实际上具有防御功能,有待于进一步验证。

总之,*Sorek* 团队报道的这一系列新型防御系统暗示了更多原核生物新型防御系统的存在,这项工作使得人们对于原核生物防御系统和免疫机制的复杂性和多样性有了更深刻的认识。但由于目前预测方法还存在一定局限性,检测系统相对较少,可以相信微生物中蕴藏着的丰富抗病毒机制还远未得到充分挖掘。因此未来如何继续创新该类核酸靶向系统的高通量发现,建立高效的功能评价体系,并对具有重要应用前景的新型系统开展分子机制研究,将是开发新一代颠覆性分子工具(包括新型基因组编辑系统)面临的重要课题。

参考文献(References):

- [1] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(5): 317–327. [DOI]
- [2] Stern A, Sorek R. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays*, 2011, 33(1): 43–51. [DOI]
- [3] Dy RL, Richter C, Salmond GPC, Fineran PC. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annu Rev Virol*, 2014, 1(1): 307–331. [DOI]
- [4] Tock MR, Dryden DT. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(4): 466–472. [DOI]
- [5] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712. [DOI]
- [6] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964. [DOI]
- [7] Anba J, Bidnenko E, Hillier A, Ehrlich D, Chopin MC. Characterization of the lactococcal *abid1* gene coding for phage abortive infection. *J Bacteriol*, 1995, 177(13): 3818–3823. [DOI]
- [8] Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GPC. The phage abortive infection system, *ToxIN*, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair.

- Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 894–899. [DOI]
- [9] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma EB, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2013, 2: e00471. [DOI]
- [10] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [11] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-Guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [12] Ofir G, Melamed S, Sberro H, Mukamel Z, Silverman S, Yaakov G, Doron S, Sorek R. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol*, 2018, 3(1): 90–98. [DOI]
- [13] Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, Amitai G, Sorek R. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 2018, 359(6379): eaar4120. [DOI]
- [14] Makarova KS, Wolf YI, Snir S, Koonin EV. Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems. *J Bacteriol*, 2011, 193(21): 6039–6056. [DOI]
- [15] Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(8): 4360–4377. [DOI]
- [16] Makarova KS, Wolf YI, van der Oost J, Koonin EV. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol Direct*, 2009, 4: 29. [DOI]
- [17] Swarts DC, Jore MM, Westra ER, Zhu YF, Janssen JH, Snijders AP, Wang YL, Patel DJ, Berenguer J, Brouns SJ, van der Oost J. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*, 2014, 507(7491): 258–261. [DOI]
- [18] Swarts DC, Hegge JW, Hinojo I, Shiimori M, Ellis MA, Dumrongkulraksa J, Terns RM, Terns MP, van der Oost J. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(10): 5120–5129. [DOI]
- [19] Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, Cohen O, Doron S, Charpak-Amikam Y, Afik S, Ofir G, Sorek R. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J*, 2015, 34(2): 169–183. [DOI]
- [20] Koonin EV, Makarova KS, Wolf YI. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71(1): 233–261. [DOI]
- [21] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722–736. [DOI]
- [22] Mojica FJM, Montoliu L. On the origin of CRISPR-Cas technology: from prokaryotes to mammals. *Trends Microbiol*, 2016, 24(10): 811–820. [DOI]
- [23] Swarts DC, Makarova K, Wang Y, Nakanishi K, Ketting RF, Koonin EV, Patel DJ, van der Oost J. The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(9): 743–753. [DOI]
- [24] Sumby P, Smith MC. Phase variation in the phage growth limitation system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 2003, 185(15): 4558–4563. [DOI]
- [25] Blair DF, Berg HC. The motA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell*, 1990, 60(3): 439–449. [DOI]
- [26] Hosking ER, Vogt C, Bakker EP, Manson MD. The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged. *J Mol Biol*, 2006, 364(5): 921–937. [DOI]
- [27] Nimma S, Ve T, Williams SJ, Kobe B. Towards the structure of the TIR-domain signalosome. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 43: 122–130. [DOI]
- [28] Hirano T. SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1455): 507–514. [DOI]
- [29] Danilova O, Reyes-Lamothe R, Pinskaya M, Sherratt D, Possoz C. MukB colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol*, 2007, 65(6): 1485–1492. [DOI]
- [30] Li M, Wang R, Xiang H. *Haloarcula hispanica* CRISPR authenticates PAM of a target sequence to prime discriminative adaptation. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(11): 7226–7235. [DOI]
- [31] Westra ER, Semenova E, Datsenko KA, Jackson RN, Wiedenheft B, Severinov K, Brouns SJ. Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003742. [DOI]