

R
008.8
3032
88

私立中山醫學院生物化學研究所

碩士論文

十字花科黑腐致病菌中水溶性與脂溶性

XpsG 蛋白之特性分析

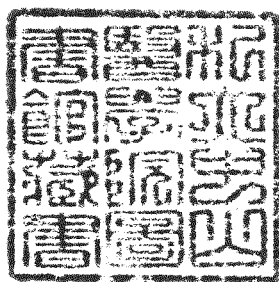
Characterization of soluble and membrane-bound

XpsG proteins in *Xanthomonas campestris*

指導教授： 陳凌雲 (Ling-Yun Chen) 博士

參考書恕不外借

研究生： 宋浴伶 (Yu-Ling Sung)



中華民國八十八年六月

中山醫學院圖書館



C055132

授權書 (博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在中山醫學院生物化學研究所八十七學年度第二學期取得理學碩士學位之論文。

論文名稱：十字花科黑腐病菌中水溶性與脂溶性 XpsG 蛋白的特性分析

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：陳凌雲

研究生簽名：宋瑤佳 學號：R86215
(親筆正楷)

日期：民國八十八年六月三十日

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

國立中興大學生物化學研究所教授

胡念台 博士

胡念台

國立中興大學農業生物科技學研究所副教授

呂維茗 博士

呂維茗

私立中山醫學院生物化學研究所教授

陳凌雲 博士

(論文指導教授)

陳凌雲

中華民國八十八年六月

學生宋浴伶，論文題目為十字花科黑腐病菌中水溶性與脂溶性 XpsG 蛋白的特性分析。其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：陳凌雲 博士

簽名：陳凌雲

中華民國八十八年六月

致謝

兩年來承蒙恩師 陳凌雲博士的悉心指導和照顧，激發了我對實驗的興趣與投入。感謝中興大學生化所胡念台老師、農科所呂維茗老師在論文校稿期間的幫助。謝謝娟妙老師、孟訓學長、雅娟姐、逢昌、倩伶、姍如在生活上的鼓勵和陪伴。一路走來感謝家人對我的支持，使我無後顧之憂的專心做好份內事。最後僅以此論文獻給所有愛護我的長輩和朋友。



目錄

頁次

圖次.....	2
附錄說明.....	4
縮寫表.....	5
中文摘要.....	6
英文摘要.....	8
一、背景介紹.....	9
二、實驗方法.....	18
三、結果.....	25
四、討論.....	33
圖示說明.....	37
參考文獻.....	50
附錄.....	58

圖次

頁次

圖一：XpsG 抗體的鑑定以及 XpsG 蛋白在細胞分佈的探討.....	35
圖二：由膠質篩濾層析法分析水溶性以及脂溶性 XpsG 蛋白分子型 式.....	36
圖三：DOC 與磷酸對水溶性 XpsG 蛋白複合體結構的影響.....	37
圖四：磷酸、EDTA 或 sulfate 在低濃度下對脂溶性 XpsG 蛋白複合 體結構的影響.....	38
圖五：在低濃度 DOC 下高 pH 對水溶性 XpsG 蛋白複合體結構的影 響.....	39
圖六：水溶性 XpsG 蛋白複合體具有耐高溫的特性.....	40
圖七：XC1713 轉接合菌株含不同 xpsG 突變基因的澱粉培養基分泌 測試.....	41
圖八：XC1701 轉接合菌株的澱粉培養基分泌測試.....	43
圖九：XpsG-D103E 變異蛋白不會影響 XpsG 蛋白複合體的分子型 式.....	44
圖十：DOC 與磷酸對水溶性 XpsG 蛋白複合體結構的影響.....	45
圖十一：在低濃度 DOC 下磷酸對脂溶性 XpsG-D103E 變異蛋白複合 體結構的影響.....	46

圖十二：水溶性 XpsG-D103E 變異蛋白具有耐高溫的特性.....47

圖十三：以 gel filtration 分析胞外 XpsG 蛋白複合體.....48

附錄說明

頁次

附錄一：XpsG 之 DNA 順序與其推測之氨基酸.....	58
附錄二：所有參與 Type II secretion pathway 的革蘭氏陰性菌中 的 GspG.蛋白氨基酸序列根據電腦軟體 BLAST 同源比對的結果....	59
附錄三： <i>xpsG</i> 基因定點突變(D70E, D103E, D121E, D128E, D139E)所 需的 primer.....	60
附錄四：pBluescript II KS ⁻ phagemid map.....	61
附錄五：XC1713/pCPP30-D70E 變異蛋白之 DNA 定序圖.....	62
附錄六：XC1713/pCPP30-D103E 變異蛋白之 DNA 定序圖.....	63
附錄七：XC1713/pCPP30-D121E 變異蛋白之 DNA 定序圖.....	64
附錄八：XC1713/pCPP30-D128E 變異蛋白之 DNA 定序圖.....	65
附錄九：XC1713/pCPP30-D139E 變異蛋白之 DNA 定序圖.....	66
附錄十：HPLC 分析之標準分子量計算曲線.....	67

縮寫表

DOC : Deoxycholic acid

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TEMED : N, N, N', N', -Tetramethyl Ethylene Diamine

Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

XC : *Xanthomonas campestris*

中文摘要

革蘭氏陰性菌之胞外蛋白分泌系統至少分為四種，Type II 是其中常見的一種，稱為一般分泌途徑(General Secretion Pathway, GSP)。該系統之外膜分泌機器主要由十二至十三個基因產物所構成，包括 GspC-O。在這些基因蛋白中由於 GspGHIJ 的 NH₂-端具有與 PilA 纖毛的 NH₂-端相當高的同源性，因此這些蛋白被認為是屬於同一家族，可是 GspGHIJ 的纖毛結構一直未被鑑定、分離出。在本研究中，我們主要以生化與遺傳方法對十字花科黑腐病菌蛋白質外膜分泌系統的 GspGHIJ 纖毛結構作一有系統的探討。在過去幾年，我們已成功製備好 XpsG 蛋白的抗體與 *xpsG* 基因 knockout 突變菌種。將細胞打破，以抗體偵測 XpsG 的分布，結果發現 XpsG 蛋白同時存在於可溶與不可溶部分。以膠質篩濾層析法分析這兩種型式的 XpsG 蛋白，結果發現酯溶性是 dimer 型式，而水溶性則是一種 higher-order 的型式。此 higher-order 結構在高濃度清潔劑 DOC 下，會發生解離，成為 dimer 型式。將解離的 dimer 型式集中後，進行第二次膠質篩濾層析，此時緩衝液中不含 DOC，結果 higher-order 的型式不再恢復，表示此型式的形成可能需要細胞內其他蛋白質的參與。higher-order 的型式在高溫八十度處理後仍然很穩定，不會解離。在低濃度(0.1%)清潔劑 DOC 下，此結構在 pH8.0 不會解離，但在 pH10.3 下則發生解離。以定位突變法檢查 XpsG 蛋白五個演化保留的氨基酸 Asp，將 D70、D103、D121、D128 及 D139 均改變成 Glu 後，發現只有 D103E 突變蛋白的功能喪失。以管柱層析法分析 D103E 水溶性與酯溶性突變蛋白的分子大小，發現突變蛋白與野生蛋白並無差異，由此可知 D103E 在蛋白中扮演某種特別功能，而此功能與分子結構可能無關。總結，在本研究中 XpsG 蛋白很可能會形成纖毛類似結構，而水溶性 higher-order form

的 XpsG 蛋白很可能就是從膜上斷裂的纖毛類似結構。

關鍵詞：革蘭氏陰性菌、一般分泌途徑、蛋白分泌、類似纖毛蛋白

Abstract

The protein translocation machinery in Gram-negative bacteria are classified into three types. The type II pathway or the so-called general secretion pathway (GSP) is the most common one. The outer membrane GSP secretion machinery is composed of twelve to thirteen gene products designated as GspCDEFGHIJKLMNO. The N-termini of GspGHIJ are highly homologous to the N-terminus of PilA pilus, and were considered as the same family. However, the pili structure of GspGHIJ structure had never been identified or isolated. In this study, we used biochemical and genetic methods to systematically investigate the GspGHIJ pili structure in the outer membrane protein secretion system of *Xanthomonas campestris*. We had prepared anti-XpsG antibody and $\Delta xpsG$ knockout mutant strain. XpsG protein was found to present in the soluble and insoluble fraction of lysed cells. Gel filtration chromatography analysis showed that the XpsG from membrane fraction was in the dimer form and from soluble fraction was in a higher order form. In the presence of high concentration of detergent DOC, the higher-order form dissociated to dimers. Second gel filtration analysis of the dissociated dimer in the absence of DOC revealed that the proteins could not revert to the higher-order form, indicating that the formation of the higher order form might require the participation of other factors. The soluble high-order form was stable at 80°C and did not be dissociated. Under low concentration of DOC, the structure did not dissociate at pH 8 but dissociated at pH10.3. The XpsG-containing, high-order structures observed in this study could be the pilus-like structure proposed for the pilin-like protein family.

The five-conserved aspartate residues of XpsG protein at the 70, 103, 121, 128 and 139 positions were substituted to glutamate by site-directed mutagenesis. By α -amylase secretion function assay, only mutant D103E was found that could not compensate the secretion ability of XC1713 and could interfere the secretion ability of XC1701. Using gel filtration chromatography analyses, no difference of elution profiles were found between wild type and mutant XpsG proteins in soluble and membrane forms. These results indicated that D103 of XpsG protein might be play a special function on protein secretion mechanism and this function was not related to the multimer function.

In conclusion of this study, XpsG protein might form pilus-like structure, and the soluble higher-order form of XpsG protein might be cleaved from membrane pilus-like structure.

一、背景介紹：

革蘭氏陰性致病菌普遍存在於動植物中。例如：沙門氏桿菌、霍亂弧菌、淋病雙球菌等會造成動物致病。植物致病菌例如十字花科黑腐病菌會造成十字花科植物枯萎。關於革蘭氏陰性致病菌的致病機轉為何呢？在動物致病菌，首先透過纖毛附著在動物宿主細胞，當細菌複製達到一定量時就會分泌一些蛋白質，而這些蛋白質可能是毒素或是一些酵素會傷害宿主細胞，進而造成宿主致病。至於十字花科黑腐病菌可經由植物傷口感染並藉由植物導管蔓延擴散，產生的胞外黏多醣阻礙導管水分輸送致使葉子逐漸枯黃，繼之使植物莖部、葉面出現黑點及腐化現象而導致植株的萎黃壞死。

一般而言，革蘭氏陰性菌的細胞結構較革蘭氏陽性菌複雜，它除了有細胞膜(內、外)、細胞質等基本構造外，在內、外膜之間還有膜外漿質。革蘭氏陰性菌要分泌蛋白質至胞外，必須要先通過內、外膜才行。分泌性蛋白質穿過內、外膜主要可分成三種方式(1,2)。第一種稱為 Sec-independent pathway，此機制只需單一步驟即可完成，分泌性蛋白質直接通過內膜、膜外漿質、外膜而到達胞外，不需 Sec 蛋白的參與。例如：*E. coli* 溶血素 A 的分泌，其過程乃 HlyB, HlyD 和 TolC 形成橫跨內、外兩層膜的複合體，溶血素 A 可穿過此通道而到達胞外。除了典型 *E. coli* 溶血素 A 分泌的例子外，還有一些細菌的胞外蛋白也屬於此分泌機制，如：*Pseudomonas aeruginosa* 的 alkaline protease、*Erwinia chrysanthemi* 的 protease、*Bordetella pertusis* 的 cyclolysin、*Pasteurella haemolytica* 的 leucotoxin。

第二種為 Sec-dependent pathway，此機制分成兩個階段來完成，

第一階段分泌性蛋白質必須藉由內膜分泌系統從內膜到達膜外漿質，接著第二階段藉外膜系統將分泌性蛋白質從膜外漿質穿過外膜到達胞外。關於內膜分泌系統早在 1980 年代就已經開始研究，其機制大致為：當細胞質合成分泌性蛋白後，此分泌性蛋白會和具有 chaperone 功能的 SecB 結合形成複合體，接著此複合體會被攜帶至內膜並和內膜上的 SecA 結合，因為 SecA 具有 ATPase 活性，所以水解 ATP 所釋放的能量可以使分泌性蛋白通過由 SecE、SecG 與 SecY 所形成的通道而分泌到膜外漿質。當分泌性蛋白到達膜外漿質後必須藉由外膜系統才可以通過外膜到達胞外(3)。外膜系統也是由一群蛋白所組成，其命名乃根據英文順序來排列。1990 年法國學者 Pugsley 研究 *Klebsiella oxytoca* 所調控 pullulanase 的分泌(4,5)。結果發現至少有 14 個基因參與 pullulanase 的分泌(7-10)。其名稱根據英文順序來命名，依序為 *pulS* 和 *pulC-O*。後來陸陸續續有一些學者發現其它革蘭氏陰性菌參與蛋白分泌的成員和參與 pullulanase 分泌的蛋白有很高的相似性，例如：*Pseudomonas aeruginosa*、*Aeromonas hydrophilia*、*Erwinia chrysanthemi* 以及 *Xanthomonas campestris* 等，其命名均是依 *pul* 基因英文順序來排列(11-17)。

第三種蛋白分泌機制，稱為 Sec-independent pathway，雖然由兩階段來完成，卻不須藉由 Sec 蛋白將分泌性蛋白由內膜送到膜外漿質，而必須靠外膜系統將分泌蛋白送到胞外。例如：*Yersinia enterocolitica* 所合成的 Yop 蛋白。其作用機制相當複雜，在此不多加詳述。

十字花科黑腐病菌(*Xanthomonas campestris pv. campestris*)是一種革蘭氏陰性菌，會分泌許多與致病性有關的胞外酵素，例如：protease、polygalacturonate lyase 及 cellulase。Dums 等人(1991)與胡

(1992)先後發現參與這些胞外酵素分泌到胞外的基因，胡等人的研究是將 Tn5 插入染色體破壞宿主分泌功能，接著再利用 DNA 片段進行互補實驗，結果成功的從十字花科黑腐病菌中，分離到一段與胞外蛋白分泌有關的基因，約 12 Kb 長。這段 DNA 具有 11 個 open reading frames(ORFs)，根據同源比對的結果發現這 11 個 ORFs 的氨基酸序列與負責 *Klebsiella oxytoca* pullulanase 分泌的蛋白具有很高的相似性，因而胡等人將此 11 個 ORFs 依它們基因的同源性命名為 *xpsE,F,G,H,I,J,K,L,M,N,D*。

在這些參與外膜分泌系統的蛋白質成員中，GspD 蛋白是由約 10 到 14 個次單位所組成的複合體。在 1996 年 Chen 等人將 *Xanthomonas campestris* XpsD 蛋白分成 N 端和 C 端兩部份，並做一系列的刪除突變，然後分析突變蛋白的分泌功能以及干擾實驗，結果發現 C 端刪除會使得複合體無法形成，因而推論 XpsD 蛋白的 C 端與複合體的形成有關(18)。一般外膜蛋白形成的複合體可以形成由許多 antiparallel amphipathic β -strands 組成的 β -barrels 埋入細胞膜，且 β -barrels C 端具有 phenylalanine residue。雖然 GspD family C 端沒有 phenylalanine residue，但仍然可以形成 transmembrane β -strands 的二級結構(19-20)。從電子顯微鏡觀察 GspD 複合體形成類似甜甜圈的環狀構造，但不同的物種其環狀構造直徑不盡相同，在 *P. aeruginosa* XcpQ 直徑約 9 nm (21)，PilQ 其直徑約 5.2 nm(21)，Ysc 直徑約 10~40 nm (22)。此複合體在整個蛋白分泌機制中可能扮演通道的角色，促使蛋白質分泌到胞外。某些菌的 GspD 蛋白穩定性與脂蛋白 GspS 蛋白有關，例如：PulD、OutD。一旦 GspS 蛋白和 GspD 蛋白的 C 端結合後即可保護 GspD 蛋白被分解的命運(23-24)。但 GspS 蛋白與 GspD 蛋白複合體的形成無關(23)。在 *Xanthomonas campestris* 中目

前尚未發現 *xpsS* 基因。

GspO 是一種內膜蛋白(25)，同時具有 prepilin peptidase 和 N-methyltransferase 的活性，可以對在膜外漿質具有很大 domain 的標的物進行蛋白水解以及甲基化作用(26-27)。在蛋白結構上具有兩個相鄰的 Cysteine rich 高度保守 motif(C-X-X-C...X19...G-X-C-X-X-C)，motif 當中的四個 Cysteine 對於 peptidase 和 N-methyltransferase 的活性是必需的，而高度保守的 Glycine 對 methyltransferase 的活性也是必要的。在 *P. aeruginosa*，XcpA/PilD(GspO family)蛋白，與 PilA 纖毛的成熟有關(25)。PilA 纖毛前驅物 N 端有 leader sequence，由六個高度保守的氨基酸(Gly-Phe-X-X-X-Glu)所組成。prepilin peptidase 會將 Gly-Phe 之間的 peptide bond 水解，然後將切割點下游的第一個氨基酸 phenylalanine 甲基化，因而產生成熟的 PilA 纖毛(27)。

GspGHIJ 蛋白，根據同源比對的結果發現和纖毛 PilA 結構相似的特性，例如：1.N 端具有可被 signal peptidase 切斷的 signal peptide，被切斷的 signal peptide 的第一個氨基酸會被甲基化(在十字花科黑腐致病菌為 methionine，在其它革蘭氏陰性菌則為 phenylalanine)；2.N 端具有高度厭水區(約 20-30 個氨基酸所組成)。為了和 PilA 組成的纖毛(type IV pilus)區別，一般稱 GspGHIJ 為 pseudopilins。有關纖毛結構的分析，根據 X 光繞射分析實驗發現纖毛構造是由單體所組成，從清潔劑將纖毛解開、純化、養晶到 X 光繞射分析得知纖毛是藉 N-端 α -helix 連接兩個單體而形成雙體結構。利用電腦軟體分析、X 光繞射數據、電子顯微鏡觀察及原子、分子鍵結長度計算等技術，組成了約十萬種模型來進一步探討有關纖毛的組成型式(28)？結果發現，如果纖毛是由三個雙體所組成，則此論點與電子顯微鏡觀察所

得到的結果有差異，也就是說，三個雙體所組成的纖毛大小是電顯看到的兩倍，如此大的結構似乎不被接受。如果纖毛是由五個單體所組成，則大小與電顯結構一致，五個單體構成類似裝冰淇淋尖尖的筒子，約 5000-6000 個筒子套起來之後即為纖毛構造。至於前面提到有關纖毛所解離出的雙體，可能有三種解釋：雙體在自然狀況下可能是一種待命的狀態，當有分泌訊號產生時，此雙體結構可以組裝成纖毛構造，將分泌性蛋白推出去。或者此雙體是一種纖毛結構的解離現象，亦或是一種人為萃取所致(29-30)。

1993 年，Pugsley 等人從蔗糖梯度實驗發現，部份的內膜蛋白 PulG 和外膜蛋白有 co-fractionation 的現象，但此 pseudopilin 沒有外膜蛋白的一般特性，推測 pseudopilins 會在膜外漿質與外膜之間形成類似纖毛的結構(23)，但一直到目前為止並沒有關於 pseudopilins 可以組裝成 trans-periplasmic complex 的實驗證明。最近有一些實驗結果顯示，pseudopilins 與 PilA 纖毛有類似的結果(26)，Pugsley 的實驗室在 *Klebsiella oxytoca* 中利用 cross-linking(DSP)實驗，發現膜蛋白 PulG 可以形成 homodimer 的現象，且此現象和參與 type IV pilus 組成的蛋白無關。接著他們利用 Triton X-100、EDTA 萃取膜蛋白 PulG，結果發現，當 pH 提高時(7.5 → 9.5)，膜蛋白 PulG 可以被萃取出來(26)，此現象與 type IV pilin 用 n-octyl-β-D-glucopyranside 處理類似，即 pH 為 9.5 時，pilin 以 multimer 出現，一但 pH 提高到 10.5，pilin 以 dimer form 存在(30)。由 pH 效應知，纖毛的組合，可能需要 lysine 或 tyrosine 等高 pKa 的氨基酸參與，已進行離子鍵的結合。藉著 in vivo cross-linking 實驗，發現許多 GspG 蛋白(PulG、XcpT、OutG)可以形成 multimer(28-30)。因此推測 GspG 蛋白似乎具有形成 multimer 的能力，但這種在膜上所觀察到的 multimer 是否

就是纖毛的結構仍有待證實。事實上 XcpT 蛋白在構造上仍有一些疑點無法符合 type IV pilin，例如：*P. aeruginosa* 纖毛的組裝需要靠 PilB、PilC 幫助，但 pseudopilin 形成 multimer 則不需 PilB、PilC 相似蛋白(GspE、GspF)的幫助(31)。pre-XcpT、pre-PilG、pre-OutG precursor 即使沒有 prepilin peptidase 進行切割與甲基化，其 precursor 仍然可以藉 cross-linker 形成 multimer(30、34)，但纖毛的組裝則需要 type IV pilin 的 N-端進行處理才會發生。Pugsley 等人另外也發現，如果 PilG N-端厭水保留區以無關的 membrane anchor 區取代，並不會影響 PilG 的 multimer 的形成，此結果與纖毛的組裝必須要 pilin 的 N-端厭水區參與是不同的(35)。於是在 1996 年 Pugsley 對於 PilG 和 type IV pilin 的差異下了一個定義：PilG 蛋白在細胞膜會形成類似葡萄串的結構，此構造不需 PilO 或是其它 Pil 蛋白的參與(33)。由於菌體內 XpsU、-V、-W (GspH、-I、-J)蛋白含量較少，約佔 XcpT(GspG)蛋白量的 25%~6.25%，所以相關研究較少(36)。在 1997 年，Lu 等人研究 XcpT 和 pseudopilin 成員之間的交互作用，將 XcpT-W 表達在含 histidine 的載體，通過 nickel-affinity chromatography 純化，利用西方點墨法分析，結果發現 XcpT 蛋白可以和自己(XcpT)或 pseudopilins 中任何一個蛋白(XcpU、-V、-W)形成 dimer 的現象，顯示這四個蛋白(pseudopilin)彼此之間有可能形成 multisubunit complex。有趣的是，XcpT、XcpU 與 XcpW 也會和 PilA 形成 heterodimers。當 XcpT-PilA heterodimers 量一旦增加，則 XcpU-PilA heterodimers 的量則會伴隨著下降，因而推測 heterodimers 的形成與否受個別蛋白量的影響。而此 heterodimer 的形成，可能只是纖毛組裝過程的中間產物(37)。當纖毛構造組裝成功時，即可將分泌性蛋白順利的推出去胞外，一旦分泌性蛋白到達胞外，纖毛構造便分解，

以等待下一次的分泌行動。

GspK 蛋白，雖然在 Prepilin peptidase 切割點下游第一及第五個氨基酸不是 Phenylalanine(+1)與 Glutamate(+5)，但由於 Prepilin peptidase 會認識切割點上游的 Glycine(-1)(35)，且 Phenylalanine(+1)對纖毛前驅物的甲基化以及纖毛的組裝沒有影響(34)。另外在 1998 年有研究指出，*P. aeruginosa* XcpX(GspK family)蛋白利用定點突變法將高度保留的 Glycine(-1)以 valine 取代，結果造成 PilD/XcpA 無法辨識切割點，導致切割功能喪失，因而造成蛋白分泌受阻。從上述的實驗結果推測，XcpX(GspK family)是 fifth pseudopilin(35)。

最近幾年，在 *P. aeruginosa* 發現六個基因產物具有 pseudopilin 的特性，如：FimT、FimU、PilV、PilW，PilE、PilX。其中以 PilE 最接近 pseudopilin 的特性。有趣的是，PilX N 端序列和 GspK family 非常相似，在 prepilin peptidase 切割點的下游第一及第五個氨基酸沒有高度保留的 phenylalanine(+1)與 Glutamate (+5)。然而這六個基因產物均有可能扮演類似纖毛組裝過程的角色(38-40)。從 X 光繞射分析 *N. gonorrhoeae* 纖毛晶體結構的研究中，提出一個假設：PilA 的 Glutamate (+5)可能扮演一種單體聚合的辨識標識，許多單體藉著 Glutamate (+5)，一個一個聚集在一起而形成 α -helix 的形狀。由於 GspK family 和 PilX 沒有 Glutamate (+5)，因此如果蛋白質分泌機器與纖毛的組裝機制是相類似的話，GspK 或 PilX 的加入複合體，可能會產生一終止信號，使聚合作用停止 (41-42)。不過這個假設仍有待實驗證明。

從氨基酸序列得知，在所有 Gsp 蛋白中，GspE 蛋白是唯一沒有厭水區域的蛋白(43)。Bally 等人從生化實驗發現 GspE 蛋白是一種

內膜結合蛋白，必需專一性的和 GspL 蛋白結合才可以穩定的附著在內膜上(44)。就結構上的分析得知，所有的 GspE 蛋白具有類似 Walker A(GPTGSGKT)和 walker B(GRTGIYELVVFDD) boxes 的序列(45)。介於這二個 boxes 間有兩個 Aspartate rich 的區域，分別是 Aspartate box 1 (TVEDPIE)和 Aspartate box 2 (PQDPDVVMVGEIRD)(46)。如果將 Walker A 序列中高度保留的 Glycine 置換掉，會影響細胞的分泌功能，因而推測 GspE 蛋白的 Walker A box 對於蛋白分泌是必須的(44、46、47)。相同的結果發生在 Aspartate rich 的區域，當 Aspartate rich 區域的 Aspartate 被 Arginine 取代，也會使得分泌性蛋白分泌功能降低(46)。1993 年有報告指出：GspE 蛋白的一級結構中具有 nucleotide-binding domain，若將其進行定位突變，結果發現蛋白分泌會受到限制(48)。至於 GspE 蛋白是否直接或間接需要藉著水解 ATP 提供能量，促使蛋白分泌則有待實驗來證實。在 1995 年又有報告指出：如果將 GspE 蛋白做成重組蛋白，探討 GspE 蛋白是否具有 ATPase 或者 Kinase 的活性，結果發現 GspE 蛋白具有 autokinase 的活性，也就是可以自己磷酸化，但此磷酸化的現象需要完整的 Walker A box 存在時才會發生，一旦 Walker A box 的 Lysine 被 Alanine 取代，則 GspE 蛋白自己磷酸化的現象就會被終止(44)。磷酸化反應在整個 GSP 中扮演的角色，目前並不清楚。

GspC、-F、-L、-M，是一群內膜蛋白，利用 Alkaline phosphatase 或 β -lactamase topological probes 分析，結果顯示 GspC、-M 蛋白的 C 端可以伸展到膜外漿質，而 GspL 蛋白的 N 端位於細胞質(49)。GspF 是一種 polytopic integral cytoplasmic membrane protein，有一個小的 periplasmic loop 和兩個大的 cytoplasmic domains(50)。目前因為對於 GspC、-F、-L、-M 蛋白的研究較少，故對其了解也不多。

本研究主要以生化與遺傳方法對十字花科黑腐病菌蛋白質外膜分泌系統中 GspG 纖毛類似蛋白的特性做深入的探討。以 XpsG 抗體偵測 XpsG 蛋白的分佈，發現 XpsG 蛋白同時存在於可溶與不可溶部分。以膠質篩濾層析法分析這兩種型式的 XpsG 蛋白，結果發現水溶性 XpsG 蛋白以 multimer (higher-order) 的型式存在，而脂溶性 XpsG 蛋白則以 dimer 的型式出現。藉膠質篩濾層析法，分別進行 Deoxycholic acid、Ethylenedinetetraacetic acid、Ammonia sulfate、pH 值及溫度穩定性等特性來對這兩種 XpsG 蛋白做進一步分析與比較。另外，以定點突變法檢查 XpsG 蛋白五個高度保留的氨基酸 Aspartate 是否對 XpsG 蛋白的分泌功能具有必要性，將 D70、D103、D121、D128、D139 均改變成 Glutamate 後，利用互補、干擾實驗分析突變蛋白，結果發現只有 D103E 突變蛋白的澱粉酵素分泌功能喪失。藉膠質篩濾層析法分析 D103E 突變蛋白的分子大小，結果發現突變蛋白與野生蛋白並無差異。由此可知 D103E 在蛋白中扮演某種特別功能，而此功能與分子大小可能無關。總結，在本研究中所觀察到的 higher-order form 的水溶性 XpsG 蛋白很可能就是從膜上斷裂的纖毛類似結構；而脂溶性 XpsG 蛋白的 dimer 型式，則可能是來自於 detergent 萃取時，纖毛解體所造成的現象。

二、實驗方法與材料

1、抗體與菌種：

(1).菌種：XC1701 為野生株，XC1713/pCPP30-FG 是 *xpsG* 基因大量表達的菌株，XC1713 為 *xpsG* knockout 但其它 *xps* 基因表現正常的菌株，上述菌株均由中興大學生化所胡念台老師提供。

(2).XpsG 抗體：由李孟訓學長碩士班期間製備完成。

2、可溶性蛋白與脂溶性蛋白的製備：

將野生株 XC1701 和突變株 XC1713，分別養在含 50 μ g/ml rifampicin 2 ml LB 的培養液中，並置入 30 $^{\circ}$ C 培育箱震盪約 48 小時，待菌液呈現混濁後，轉移到 200 ml 培養液中繼續培養，一直到菌液混濁為止。接著利用高速離心(10000 rpm，10 min)將細胞收下來，再用適量的二次水將細胞懸浮，高速離心(12000 rpm，10 min)將胞外多醣類洗掉，此時再用 lysis buffer (20mM Tris-HCl pH8.0，1mM PMSF，0.1mM DTT)將細胞懸浮，通過 French Press (18000-20000 Ib /in，流速 1 滴 / 2-4 secs) 二次，將細胞打破後，先用高速離心(12000 rpm，10 min)除去未破細胞，接著進行超高速離心(60000 rpm，60 min)，所得到的上清液為可溶性蛋白部分，利用 centricon-10 將可溶性蛋白部分從 12 ml 濃縮到 2 ml，即為備用的可溶性蛋白萃取液。沉澱物溶解在 2 ml 的 20 mM Tris-HCl，pH8.0，0.5% DOC buffer，4 $^{\circ}$ C 溫和搖晃至少一個小時，超高速離心(30000 rpm，60 min)，並取上清液備用，稱為膜蛋白萃取液。

3、膠質篩濾層析法(gel filtration chromatography)：

將 Superdex HR-200 (size 25 ml，可分 10-600 kDa，Pharmacia) 膠質篩濾層析管安裝於 FPLC 上，以二倍體積(50 ml)的 buffer 平衡，流速為 0.5 ml/min。分析水溶性 XpsG 蛋白時，除非特殊需要，buffer

通常不含 DOC，但分析脂溶性 XpsG 蛋白時 buffer 必須含 DOC。注入樣本前先將已知分子量的各個蛋白(Thyroglobulin, 669kDa; Albumin, 443kDa; Alcohol DHase, 200kDa; Beta-Amylase, 66kDa; Apoferritin, 29kDa; Cytochrome, 12kDa)以微量針筒注射到 FPLC，製成分子量修正曲線。水溶性或脂溶性 XpsG 蛋白的部分皆以微量針筒取 200 μ l 注射到 FPLC，收集 retention time 16-33 mins，共 18 管，每管 0.5 ml。每管取 300 μ l 加四倍體積的丙酮，在 -20°C 沉澱至少一個小時，離心(12000rpm, 10 min)，去上層液。白色沉澱物，有時可再次加入 300 μ l 10% TCA，以去除鹽類，4°C 沉澱 30 分鐘，離心，沉澱物抽乾，最後加入 10 μ l SDS-PAGE 1x sample buffer，進行 SDS-PAGE 以及西方點墨法分析。

4、西方點墨法(western blot)：

SDS-PAGE (13.8%)

(1)Sample: 加入 SDS-PAGE buffer 後，在 loading 到 polyacrylamide gel 之前先煮沸五分鐘，使蛋白變性，整個跑膠過程(上層 stacking gel, 下層 resolving gel)皆用 120 V。

(2)wash: 將跑完電泳之 gel，浸泡 50 ml blotting buffer(43.2 g Glycine, 9.1g Tris, 600 ml 甲醇，最後加水到 3000 ml)，在室溫溫和震盪十分鐘，重覆兩次。

(3)Transfer: 將 gel 緊貼於 PVDF 上，置於 mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad)，100 v，通電一小時。(PVDF 使用前處理：將 PVDF 浸泡在適量甲醇中約十秒，接著用二次水洗去甲醇，並在室溫溫和震盪五分鐘，最後將 PVDF 浸泡在 transfer buffer 至少十分鐘)。

(4)Blocking: 將 PVDF 浸泡於 50 ml TBS buffer(含 3% skim milk)，室溫溫和搖晃三十分鐘或 4°C 放置過夜。(TBS buffer: 20 ml Tris-HCl

pH7.5, 9.1g NaCl, 加水到 1000 ml)

- (5)1st-Ab: 將 PVDF 置於塑膠袋中, 加入 5 ml TBS buffer (含 1% skim milk), 再加入 10 μ l XpsG Ab(1/500x), 將塑膠袋密封, 室溫搖晃一小時。
- (6)wash: 以 50 ml TBS buffer 浸泡 PVDF, 室溫溫和搖晃至少五分鐘, 洗三次。
- (7)2nd-Ab: 將 PVDF 置於塑膠袋中, 加入 5 ml TBS buffer(1% skim milk), 再加入 1.6 μ l anti-rabbit Ab(1/3000x), 將塑膠袋密封, 室溫搖晃一小時。
- (8)wash: 重覆步驟 6。
- (9)substrate: 先將一顆呈色劑(4-chloro-1-naphthol tablet)溶解在 10 ml 的甲醇裡。從中取 1 ml 加 TBS buffer 到 30 ml 即為 substrate solution。將 PVDF 置於 substrate solution 中, 再加入 20 μ l H₂O₂, 室溫溫和搖晃即可呈色。

5、定位突變法：

參照 GeneEditor™ in vitro site-directed mutagenesis system (Promega)：此系統適用於具有 Ampicilin resistance 標誌的載體, 產生的重組載體除了保有 Ampicilin resistance 的特性外, 還會產生一個新的篩選標誌 resistance GeneEditor™ Antibiotic selection Mix。

(1)Primer 5'-Phosphorylation

在 25 μ l 的反應體積中, 加入適當的 Primer (100 pmol), kinase 10x buffer 2.5 μ l, T₄ polynucleotide kinase 5 units, 無菌二次水補到最後體積 25 μ l。37°C, 反應 30 分鐘, 馬上置入 70°C 水浴十分鐘, 以終止 kinase 活性, 即可完成 Primer 5'-Phosphorylation 的反應。反應物可置入 -20°C 冷藏保存或直接進行 Annealing 反應。

(2) Annealing reaction

加入 ssDNA(約>0.5ug/4 µl)8 µl, Top select oligonucleotide 1 µl, phosphorylated mutagenic oligonucleotide (100 pmol/25 µl) 1 µl, annealing 10x buffer 2 µl, 加無菌水到最終體積為 20 µl。接著將反應物 75°C 加熱 5 分鐘, 之後慢慢降溫到室溫(約 20-30 分鐘)。將反應物置於冰上備用。將 synthesis 10x buffer 3.5 µl, 2.5 mM dNTPs 6 µl, T₄ DNA polymerase 10 units, T₄ DNA ligase 2 units, 10x BSA 2 µl 加入上述反應物中。37°C, 反應二小時, 即可完成 mutant strand synthesis 和 ligation。

備註: Top select oligonucleotide 這條 primer 的選擇, 主要根據 fl origin 的方向來決定。

(3) Transformation to BMH71-18 *mutS*

將已經完成 annealing 的 DNA 10 µl 送入 100 µl BMH71-18 *mutS* competent cell 混合均勻, 置於冰上反應 60 分鐘, 42°C 加熱 45-50 秒之後, 馬上置於冰上 2 分鐘, 加入 900 µl LB medium, 37°C 劇烈搖晃(225 rpm)至少一個小時(待菌液混濁), 再加入 4 ml LB medium 及 100 µl GeneEditor™ Antibiotic selection Mix 抗生素, 繼續培養到菌液呈混濁(可能需要到隔夜)。以 CLONTECH Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit 抽取質體, 取 1 µl 送入 JM109 宿主, 此時培養基含 125 µg/ml Ampicillin 及 100 µl/5ml GeneEditor™ Antibiotic selection Mix 抗生素。

(5) Enzyme digestion

在 10 µl 的反應體積中, Plasmid 取 4 µl, 加入 *Bam*HI 和 *Hind*III 各 1 µl, 10x BSA 1 µl, 10x NEB Buf-2 2 µl, PCR H₂O 2 µl。37°C 反應二小時, 用 1% agarose 檢查抽到的 plasmid 是否含有 insert。

(6) DNA sequencing

利用 ABI PRISM 377 Automated Fluorescent DNA Sequencer 進行 DNA 定序。其方法是用 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM™ Cycle sequencing kit，原理是利用 ddNTP 上帶有四種不同顏色的螢光劑以 dideoxynucleotide termination 的方式及 PCR 的方法在 DNA template 上 extension 後，加入 1/10x 體積的 3M NaOAc 及 2.5x 體積的 98% 酒精，冰上作用 10 分鐘，離心倒掉上清液，加入 5 μ l loading dye 後，經 6% Polyacrylamide sequencing gel 分析後，以 sequencer detector 上雷射光束來偵測螢光顏色的訊號，黑色代表 Guanine，綠色代表 Adenosine，紅色代表 Thymidine，藍色代表 Cytidine。

6、xpsG 突變基因的分析

(1) 載體的製備 (prepare vector)

培養 5 ml DH5 α /pCPP30-FG，利用 CLONTECH Nucleospin Plus Plasmid Miniprep Kit 抽 Plasmid。先用限制酶 *Bam*HI 及 *Hind*III 檢查有沒有抽到 plasmid(pCPP30-FG)，若有，再全部用 N-butanol 濃縮，以 1% agarose 分離 DNA 片段，利用 CLONTECH GEL EXTRACTION Kit 將較大分子 7.5 kb 的載體萃取出來。

(2) prepare insert DNA

抽大量定位突變成功的質體 mutant DNA/pBluKS⁻，用限制酶 *Bam*HI 及 *Hind*III 水解 DNA，以 1% agarose 分離 DNA 片段，利用 CLONTECH GEL EXTRACTION Kit 將較小分子 790 bp 的載體萃取出來。

(3) ligation

在 10 μ l 的反應體積中，insert (mutant DNA) : vector (pCPP30)= 1:1，加入 T₄ DNA ligase 1 μ l，10x T₄ DNA ligase buffer 1 μ l。16°C，O/N。

(4) transformation to JM109

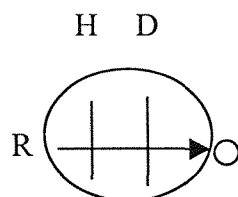
將上述已經 ligation 完成的 10 μ l plasmid 全部送入 50 μ l JM109 complement cell，均勻混合後，置於冰上 30 分鐘，42°C 加熱 2 分 50 秒(勿超過 3 分鐘)，馬上置於冰上 5 分鐘，均勻混合後全部塗在含 Tetracyclin (15 μ g/ml)的 LB plate 上，30°C，O/N。

7、Conjugation

接合作用開始前先將下列三種菌都培養好(盡可能讓菌是新鮮的)。(1)劃 Helper cell (H), *E. coli* DH 5 α (pRK2013)在含 Km(50 μ g/ml)的 LB plate 上。(2)劃 recipient cell (R) (XC 1713)在含 Rif(100 μ g/ml)的 LB plate 上。(3)將 donor cell (D) JM109/pCPP30-FG(mutant) 劃在含 Tc(15 μ g/ml)的 LB plate 上。

Conjugation 步驟如下：

- a. 準備一個 LB plate
- b. 利用竹棒取適量的 Helper cell、Donor cell，如下圖：在 LB plate 劃一縱線
- c. 利用竹棒取適量的 Recipient cell，如下圖：在 LB plate 橫劃過 Helper & Donor cell
- d. 將此 plate 置 30°C 培養 24 小時，將箭頭右側長出的菌落，三區劃線在含 Rif(15 μ g/ml)的 LB plate 上，30°C 培養 3-5 天(甚至一個禮拜)。選三個第三區長出的單一菌落，以斜線的方式劃在同時含 Rif(100 μ g/ml)&Tc(15 μ g/ml)的 LB plate 上，30°C，O/N。(菌養好後，記得貯存菌種)



8、Starch plate(XOL starch)的製備

(a)tryptone 0.625g，yeast extract 0.625g，agar 7.5g，完全溶解在 250 ml 體積的二次水。

(b)starch (soluble protato)10 g， K_2HPO_4 0.35 g， $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g， $MgCl_2$ 0.05 g， $MnCl_2$ 0.0005 g， KH_2PO_4 0.1 g， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g，完全溶解在 250 ml 體積的二次水。

(c)a 和 b 各自(勿混合在一起)高壓滅菌，之後再混合在一起，倒適量體積到 petri dish，凝固後至少需冷藏在 4°C 一個禮拜後方可使用。

9、互補試驗：

利用接合作用(conjugation)將構築好的重組質體(pCPP30)送入 XC1713(*xpsG* knockout)變異株，將此菌點在澱粉培養基(starch plate)，分別以 XC1701 以及 XC1713 當做澱粉酵素分泌的陽性和陰性對照組，觀察菌落周圍透明圈的大小，以測試各變異株澱粉酵素分泌功能正常與否。

10、干擾試驗：

利用接合作用(conjugation)將構築好的重組質體(pCPP30)送入澱粉酵素分泌正常的 XC1701，將此菌點在澱粉培養基(starch plate)，觀察菌落周圍透明圈的大小，以測試各變異株澱粉酵素分泌功能正常與否。

三、結果：

1、分析水溶性與脂溶性 XpsG 蛋白的生化特性

抗體的鑑定：

在分析 XpsG 蛋白是否形成纖毛結構前，首先必須確認 XpsG 抗體的正確性。由胡老師的實驗室提供 *xpsG* 基因突變株(XC1713)，將此突變株當做陰性對照組。再取野生株(XC1701)當實驗組，將兩株菌 total cell(total protein 或 total cellular protein)以西方點墨法分析，結果在 XC1701 看到 15kDa 大小的蛋白而 XC1713 沒有，因為 XpsG 蛋白分子量約為 15kDa，因此證明此 XpsG 抗體為正確的(圖 1A)。

細胞分布(Subcellular location)的探討：

有了 XpsG 抗體之後，接著想要探討 XpsG 蛋白位於十字花科黑腐病菌的那個區域。將十字花科黑腐病菌野生株 1701 以超高速離心分成可溶(細胞質、膜外漿質)與不可溶(細胞膜)兩部分。分別以 RNA polymerase α subunit 和 XpsD 蛋白當做可溶性蛋白與膜蛋白的標識，利用西方點墨法分析，結果發現 XpsG 蛋白同時分佈在細胞質、膜外漿質與細胞膜部分，而 RNA polymerase α subunit 位於細胞質、膜外漿質部分，XpsD 蛋白位於細胞膜部分，表示 XpsG 蛋白可能具有兩種不同的分子型式 (圖 1B)。

由膠質篩濾層析法分析水溶性以及脂溶性 XpsG 蛋白分子型式：

為了探討位於細胞質、膜外漿質及細胞膜的 XpsG 蛋白在分子大小上是否有所不同，分別將野生株 XC1701 之可溶性與膜蛋白萃取液，通過 Superdex HR200 膠質篩濾層析管柱分析，並收集層析後的沖出液，以 4x 體積的 acetone 沉澱抽乾後，再以 SDS-PAGE (13%) 電泳分析及 XpsG 抗體之 western blot 實驗，結果顯示，水溶性 XpsG

蛋白在 retention time 16-21 min 出現，對照校正曲線圖，此時的蛋白質約>600 kDa，為一個含 XpsG 蛋白的大分子複合體。而脂溶性 XpsG 蛋白在 0.5% DOC 緩衝液下，retention time 為 29-33 min，對照校正曲線圖，知其分子量約 30kDa，是雙體型式的 XpsG 蛋白。故初步推測 XpsG 蛋白具有兩種不同型態及大小的分子型式(圖 2)。

DOC 會分解水溶性 XpsG 蛋白的大分子複合體結構：

從前面實驗(圖 2)知 XpsG 蛋白似乎具有水溶及脂溶性兩種型式，接下來想要探討這兩種蛋白的特性為何？由於水溶與脂溶性 XpsG 蛋白在製備時主要差異在 DOC 的有無，所以首先觀察 DOC 對於水溶性 XpsG 蛋白的影響？將可溶性蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 含不同濃度的 DOC，由 0 到 0.5% 遞增，並收集層析後的沖出液，以 4x 體積的 acetone 沉澱抽乾後，以 SDS-PAGE 電泳分析及 XpsG 抗體之 western blot 實驗。結果顯示，隨著 DOC 濃度的增加，XpsG 蛋白出現時間 16-19 分鐘遞增到 29-31 分鐘，對照校正曲線圖知分子量由 600kDa 降到 30kDa。當 DOC 濃度為 0.1%時，XpsG 蛋白出現時間為 16-30 分鐘，表示這個含 XpsG 蛋白的大分子複合體發生部分解離。當 DOC 濃度大於 0.25%時，XpsG 蛋白複合體就會完全解離，成為雙體構造。由此可知低濃度 DOC 會對 XpsG 蛋白複合體進行部分解離，而高濃度 DOC 會對 XpsG 蛋白複合體進行完全解離(圖 3A)。

水溶性 XpsG 蛋白複合體結構一旦被 DOC 分解後就不能再組合回去：

DOC 既可以分解 XpsG 蛋白複合體，我們想知分解後的小分子 XpsG 蛋白在 DOC 消失後，大分子 XpsG 蛋白複合體是否會再恢復。將 DOC 解離的小分子水溶性 XpsG 蛋白(retention time 29-31 分鐘

的 fraction pool 起來)收集起來，再次通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 不含 DOC，收集層析後的沖出液，以 western blot 分析。結果顯示，水溶性 XpsG 蛋白並不在預期的 16-19 分鐘出現，也不在原出現的 29-31 分鐘，而是出現於 18-28 分鐘。由此可知，水溶性 XpsG 蛋白複合體結構一旦被 DOC 分解後就不會再組合回去(圖 3B)。當 DOC 消失後，小分子水溶性 XpsG 蛋白會發生無意義的聚集(圖 3B)。

磷酸在低濃度(0.1%)DOC 時會促使水溶性 XpsG 蛋白 multimer 結構部份分解：

除了 DOC 會分解水溶性 XpsG 蛋白複合體結構外，還有沒有其它因素影響水溶性 XpsG 蛋白的複合體結構？將可溶性蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，當 buffer 含 0.1% DOC、1 mM NaPO_4 時，XpsG 蛋白分別在 retention time 16-18 以及 23-30 分鐘出現。因而推測磷酸在低濃度 DOC 下，會進一步促使水溶性 XpsG 蛋白複合體結構發生解離。如果 buffer 只含 1 mM NaPO_4 ，XpsG 蛋白在 retention time 16-21 分鐘出現，表示單純只含磷酸並不會影響 XpsG 蛋白的複合體結構。(圖 3C)。

低濃度 DOC 會造成脂溶性 XpsG 蛋白聚集，但磷酸會抑制此種聚集現象：

DOC 的濃度會影響水溶性 XpsG 蛋白複合體的結構，而磷酸也可促使水溶性 XpsG 蛋白複合體結構在低濃度 DOC 下，發生進一步的解離。那麼脂溶性 XpsG 蛋白對於 DOC 與磷酸的效應又為何？將膜蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 含 0.1% DOC，結果發現脂溶性 XpsG 蛋白從管柱流出的時間自 16-19 分鐘改變成 22-31 分鐘，表示低濃度 DOC 會造成脂溶性 XpsG

蛋白發生無意義的聚集。當不同濃度的磷酸加入低濃度 0.1% DOC 的緩衝液中，再進行 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，結果顯示，當磷酸濃度增加到 0.1 mM 以上時，XpsG 蛋白流出的時間由原先的 22-31 分鐘延遲到在高濃度 0.5% DOC 時所出現的 29-32 分鐘(圖 4A)。由此可知磷酸可以抑制 XpsG 蛋白在低濃度 DOC 下所造成的聚集現象。

EDTA 或 sulfate 會抑制脂溶性 XpsG 蛋白在低濃度 DOC 下所造成的聚集現象：

由於磷酸為帶負電的陰離子，因此我們想知道是否其他陰離子也有類似磷酸的效應。將膜蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，buffer 此時除了含 0.1% DOC 外，再加入 1 mM EDTA 或 1 mM sulfate。結果顯示，XpsG 蛋白複合體分別在 retention time 27-31 或 26-32 分鐘出現。由此可知 EDTA 或 sulfate 與磷酸一樣均可抑制 XpsG 蛋白複合體在低濃度 DOC 下所造成的聚集現象(圖 4B)。

高 pH 可促使水溶性 XpsG 蛋白複合體在低濃度 DOC 下完全解離成 dimer：

1996 年，Hans E. Parge. 等人在 *Neisseria gonorrhoeae* 發現：將 n-octyl- β -D-glucopyranoside 纖毛萃取液通過 gel filtration S-200 column，當 buffer pH 為 9.5 時，纖毛蛋白以複合體存在。但當 buffer pH 為 10.5 時，纖毛以雙體存在。因而可知，pH 會影響纖毛結構的穩定性。類似的實驗可觀察 pH 是否會影響水溶性或脂溶性 XpsG 蛋白複合體的結構。將可溶性蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，結果顯示，水溶性 XpsG 蛋白複合體在 buffer 只含 50mM Na_2CO_3 ，pH 10.3 時，XpsG 蛋白在 retention time 17-21 分鐘出現，

若 buffer 再加入 0.1% DOC，XpsG 蛋白在 retention time 30-31 分鐘出現(圖 5A)。另外在脂溶性 XpsG 蛋白方面，當 buffer 含 50mM Na₂CO₃，pH10.3、0.1% DOC 時，XpsG 蛋白在 retention time 29-32 分鐘出現，原出現的聚集型式消失(圖 5B)。由此可知，高 pH 與 EDTA、sulfate 或磷酸一樣均可抑制 XpsG 蛋白複合體在低濃度 DOC 下所造成的聚集現象。

水溶性 XpsG 蛋白複合體具有耐高溫的特性：

將可溶性蛋白萃取液先經過高溫 60°C 或 80°C 加熱十分鐘，慢慢降至室溫後，再通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，結果顯示，當處理溫度在 60°C 時，XpsG 蛋白仍在 retention time 17-21 分鐘出現(圖 6)。而處理溫度在 80°C 時，XpsG 蛋白在 retention time 17-22 分鐘出現。因此推測水溶性 XpsG 蛋白複合體具有耐高溫的特性(圖 6)。

2. 以定位突變法研究 XpsG 蛋白複合體

根據電腦軟體 BLAST 同源比對的結果發現，所有參與 Type II secretion pathway 的革蘭氏陰性菌中的 GspG 蛋白氨基酸序列有許多氨基酸具有高度保留性(請見附錄二)。於是選擇出現次數最多的 Aspartate 進行定位突變，以期了解這些高度保留的 Aspartate 在蛋白中可能扮演的角色。高度保留的 Aspartate 分別位於第 70、103、121、128、139 位置上，定位突變法主要是將 Aspartate 改變成構造上差異最小的 Glutamate。突變成功後，依序再進行互補實驗與干擾實驗來確認變異株澱粉酵素的分泌功能。另外，利用膠質篩濾層析法來分析 Aspartate 的突變對 XpsG 蛋白複合體構造的影響。

XpsG 變異蛋白(D → E)對 XC1713 之互補試驗：

XpsG 蛋白是胞外酵素分泌所必需的蛋白，突變後的 XpsG 蛋白

是否失去原蛋白的功能？將含有突變基因(Aspartate → Glutamate)的 XC1713 菌株適量點在澱粉培養基上，30°C，O/N，並以 XC1701 以及 XC1713 當陽性以及陰性對照組，藉由菌落周圍透明圈的大小來觀察各變異株澱粉酵素的分泌情形。結果顯示，除了 D103E 以外，其餘的 D70E、D121E、D128E、D139E 等四株菌皆能使 XC1713 恢復正常胞外酵素分泌功能(圖 7)。

XpsG 變異蛋白(D → E)對 XC1701 之干擾試驗：

將突變後的重組質體(pCPP30-D103E)接合到胞外酵素分泌正常的 XC1701，並以 XC1701、XC1713 當對照組。結果顯示，此 XpsG(D103E)變異蛋白會干擾野生株 XC1701 的澱粉酵素的分泌(圖 8)。

XpsG-D103E 變異蛋白不會影響 XpsG 蛋白複合體的分子型式：

從澱粉酵素分泌功能實驗知 XpsG 變異蛋白株(XC1713/pCPP30-D103E)的分泌功能受阻。因此接下來想要探討 XpsG 變異蛋白複合體的結構是否發生改變？將 XpsG 變異蛋白株的可溶性蛋白、膜蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析分析，收集層析液，以 XpsG western blot 分析，結果顯示，水溶性 XpsG 變異蛋白在 retention time 16-20 分鐘出現，脂溶性 XpsG 變異蛋白在 retention time 29-33 分鐘出現。此結果與野生株 XC1701 沒有差別，因此水溶性 XpsG 變異蛋白還是以 multimer 型式出現，而脂溶性 XpsG 變異蛋白在細胞膜也還是以 dimer form 的型式存在(圖 9)。

磷酸會促使水溶性 XpsG-D103E 變異蛋白 multimer 在低濃度 DOC(0.1%)時解離，且一旦 multimer 解離後就不容易再組裝回去：

從先前實驗(圖 9)知 XpsG 變異蛋白株還是具有水溶性與脂溶性

兩種分子型式。接下來想要探討磷酸效應對於水溶性 XpsG 變異蛋白的影響？將可溶性變異蛋白的部份通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，當 buffer 只含 0.5% DOC 時，水溶性 XpsG 變異蛋白分布很廣但主要在 retention time 29-31 分鐘出現(圖 9A)。將小分子的水溶性 XpsG 變異蛋白 pool 起來，再次通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析時，水溶性 XpsG 變異蛋白在 retention time 19-27 分鐘出現(圖 9B)。當 buffer 含 0.1% DOC、1mM Na-PO₄ 時，水溶性 XpsG 變異蛋白的分佈很廣但主要在 retention time 27-31 分鐘出現(圖 9C)。雖然這些結果與野生株 XC170 有些為差異，但也意味著磷酸會促使水溶性 XpsG 變異蛋白 multimer 在低濃度 DOC 時解離，一旦 multimer 解離後就不容易再組裝回去 (圖 10)。

磷酸會抑制脂溶性 XpsG-D103E 變異蛋白在低濃度 DOC 時發生聚集：

從前面實驗(圖 10)知水溶性 XpsG 變異蛋白磷酸效應和野生株有些為差異，接下來想要探討磷酸效應對脂溶性 XpsG 變異蛋白的影響？將 XpsG 變異蛋白膜萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 含不同濃度的磷酸(0-1 mM)，收集層析液，以 XpsG western blot 分析，結果顯示，當 buffer 只含 0.1% DOC 時，脂溶性 XpsG 變異蛋白分布很廣，但 retention time 主要在 25-28 分鐘出現。當 buffer 含 0.1% DOC、0.1 mM Na-PO₄ 時，脂溶性 XpsG 變異蛋白在 retention time 26-32 分鐘出現，隨著磷酸濃度的增加(0.1→1mM)，脂溶性 XpsG 變異蛋白分布很廣但主要均在 retention time 28-31 分鐘出現。此結果與野生株類似，即磷酸會抑制脂溶性 XpsG-D103E 變異蛋白在低濃度 DOC 時發生聚集(圖 11)。

水溶性 XpsG 變異蛋白具有耐高溫的特性

從前面實驗(圖 6)知野生株(XC1701)的水溶性 XpsG 蛋白具有耐高溫的特性，接下來想要探討水溶性 XpsG 變異蛋白的溫度效應為何？將可溶性變異蛋白部份分別用高溫(60 或 80°C)處理，各別通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，收集層析液，以 XpsG western blot 分析，結果顯示，隨著溫度的增加(60°C → 80°C)，水溶性 XpsG 變異蛋白主要在 retention time 16-18 分鐘出現，這些結果與野生株沒有明顯的差異，意味著水溶性 XpsG 變異蛋白具有耐高溫的特性(圖 12)。

3. XpsG 蛋白大量表現時，XpsG 蛋白複合體存在於胞外

當 pCPP30-FG 在 XC1713 表達 XpsG 蛋白時，發現 XpsG 蛋白存在於胞外部分，而此現象在 XC1701 並未發現(圖 13A)。將上述 10 ml 胞外部分，經由 centricon-10 濃縮到 1 ml，取 200 μ l 通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，收集層析液，以 XpsG western blot 分析，結果顯示，在胞外的部份 XpsG 蛋白主要在 retention time 15-20 分鐘出現，此型的分子大小與前面所觀察到的水溶性 XpsG 蛋白大小一致(圖 13B)。

四、討論：

有研究顯示 GspG 蛋白是一種位於細胞膜的蛋白質，在本研究中將野生株 XC1701 以 Fresh Press 打破細胞進行 subcellular location 實驗，發現可以在細胞質、膜外漿質以及細胞膜看到 XpsG 蛋白。從膠質篩濾層析法，看到 XpsG 蛋白在細胞膜是以 dimer form 型式出現，稱為脂溶性 XpsG 蛋白。而細胞質、膜外漿質的 XpsG 蛋白則是以 multimer 的型式存在，從分子量校正曲線知，它的分子量應大於 600 kDa，稱為水溶性 XpsG 蛋白。

一般革蘭式陰性致病菌靠著細菌表面的大分子纖毛，附著在宿主細胞進行複製。由於 XpsGHIJ 蛋白 signal peptide 和 type IV pilin N 端具有很高的相似性，因此推測 XpsGHIJ 可以形成一種類似纖毛的結構，但目前並沒有證據顯示 XpsGHIJ 可以形成類似纖毛結構。在 1996 年，Pugsley 利用 cross-linking 實驗看到 PulG 可以形成 multimer(dimer-pentamer)，在本研究(圖 2B)推測大分子的水溶性 XpsG 蛋白是一種纖毛結構。

為了進一步探討水溶性和脂溶性 XpsG 蛋白的差異，於是做了一系列的生化反應：

DOC 效應：DOC 是一種帶負電的 ionic detergent，可以非常有效地從細胞膜中將 integral membrane protein 萃取出來，且 DOC 會形成 4-6 kDa 的 small micelles(51)，因此不會干擾膠質篩濾層析的結果。將可溶性蛋白部份通過 HR-200，隨著 buffer DOC 濃度的增加(0-0.5%)，其 retention time 由 16-18 分鐘延長到 29-31 分鐘，此時 XpsG 蛋白由複合體型式的部分解離轉變成完全解離的雙體型，意

謂著 DOC 可促使 XpsG multimer 的解離(圖 3A)。將解離後的 XpsG 蛋白再次通過 HR-200，此時緩衝液中不含 DOC，結果發現 XpsG 蛋白的 retention time 為 19-26 分鐘，XpsG 可能產生了凝集現象。由此可知，XpsG multimer 在細胞中的組裝可能需要某種未知的因子參與，這個未知因子可能屬於 *xps* 基因群裡的成員，或是屬於染色體中的其他成員。當 XpsG 蛋白複合體解離再組裝時，由於缺少了那個未知因子，所以就無法再組合回去(圖 3B)。而在脂溶性 XpsG 蛋白的分析中發現，低濃度 DOC 所造成脂溶性 XpsG 蛋白產生的聚集現象，可能是因為脂溶性 XpsG 蛋白本身在膜上就是一種複合體的型式，低濃度 DOC 造成複合體的部分解離，而高濃度 DOC 造成複合體的完全解離。

磷酸效應：將膜蛋白萃取液通過緩衝液含有低濃度 DOC 的 Superdex HR-200 管柱，隨著磷酸濃度的增加(0-1 mM)，XpsG 蛋白的 retention time 由 22-31 分鐘延遲到 28-32 分鐘，此意謂著磷酸會抑制 XpsG 在低濃度 DOC 下 aggregation 的形成，或者另一說法是磷酸會促使 XpsG 蛋白複合體在低濃度 DOC 下完全解離(圖 4A)。至於水溶性 XpsG 蛋白，在低濃度 DOC 以及 1mM PO_4 下，則解離成兩群不同大小的分子，而非完全解離的雙體型，表示水溶性與脂溶性 XpsG 蛋白在磷酸的效應是不同的(圖 3C)。

EDTA 與硫酸效應：將膜蛋白萃取液通過 Superdex HR-200 管柱，當 buffer 含 1mM EDTA 或 1mM 硫酸時，XpsG 蛋白的 retention time 均為 27-31 分鐘，此結果與磷酸效應是相同的。由於磷酸根、硫酸根或 EDTA 均帶負電，所以很可能只要是負電的環境都會抑制 XpsG 蛋白在低濃度 DOC 下的聚集，或者促使 XpsG 蛋白複合體在低濃度 DOC 下完全解離成雙體 (圖 4B)。此結果也暗示著 XpsG 蛋

白複合體的解離需要某種負電的環境。

pH 效應：1996 年，Parge 等人(30)將 n-octyl- β -D-glucopyranoside 纖毛萃取液通過 gel filtration S-200 column，當 buffer pH 為 9.5 時，纖毛蛋白為 multimer form。當 pH=10.5 時，纖毛以 dimer form 存在，表示 pH 在清潔劑下會改變纖毛的結構。在本研究中(圖 5)，將野生株 XC1701 可溶性蛋白以及膜蛋白萃取液通過 Superdex HR-200 管柱，當 buffer 含 0.1% DOC，pH 10.3 時，XpsG 蛋白以 dimer 的型式出現，當 buffer 不含 0.1% DOC 時，則 XpsG 蛋白複合體結構不會改變。因而推測纖毛蛋白的某些高 pKa 值的氨基酸參與了纖毛的形成。

溫度效應：

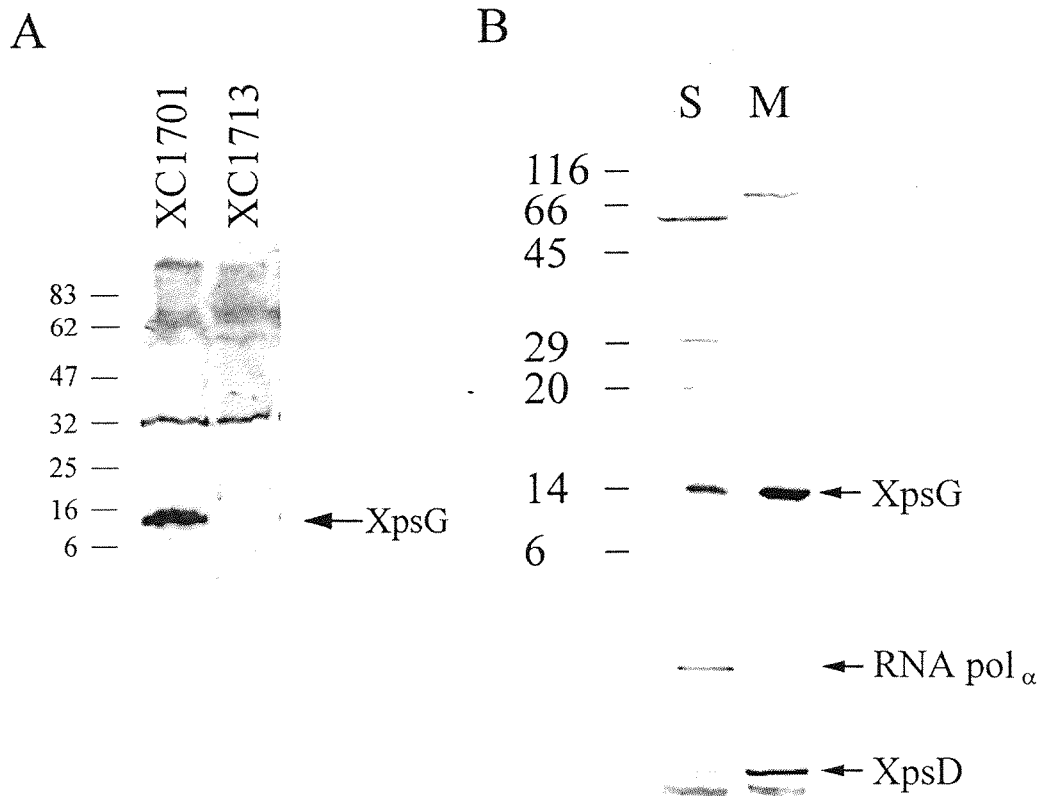
將野生株 XC1701 可溶性蛋白萃取液經過高溫處理後，通過 Superdex HR-200 管柱，XpsG 蛋白的 retention time 仍為 17-20 分鐘(圖 6)，表示水溶性 XpsG 蛋白可耐高溫，原因可能是 XpsG 蛋白複合體本身就是纖毛的構造，所以耐熱。

本論文最主要的發現是，XpsG 蛋白可以同時以兩種型式存在。問題是水溶性 XpsG 蛋白複合體真正存在的位置為何？由於 XpsG 蛋白參與蛋白質的外膜傳送，且水溶性 XpsG 蛋白的分子量非常大，所以不應該位於細胞質內。如果不位於細胞質內，就有可能位於細胞膜漿質中，或者是位於內膜上，在破細胞時把暴露在細胞膜漿質中的纖毛部分弄斷了，導致 XpsG 蛋白在可溶性部分出現。此論點在 XC1713/pCPP30-FG 的菌株研究中得到支持，當 XpsG 蛋白大量表現後，在胞外部分被偵測出。原因很可能是 XpsG 蛋白的表現量太多，使得纖毛的形成失去控制，因而長度變得異常長，最後斷裂

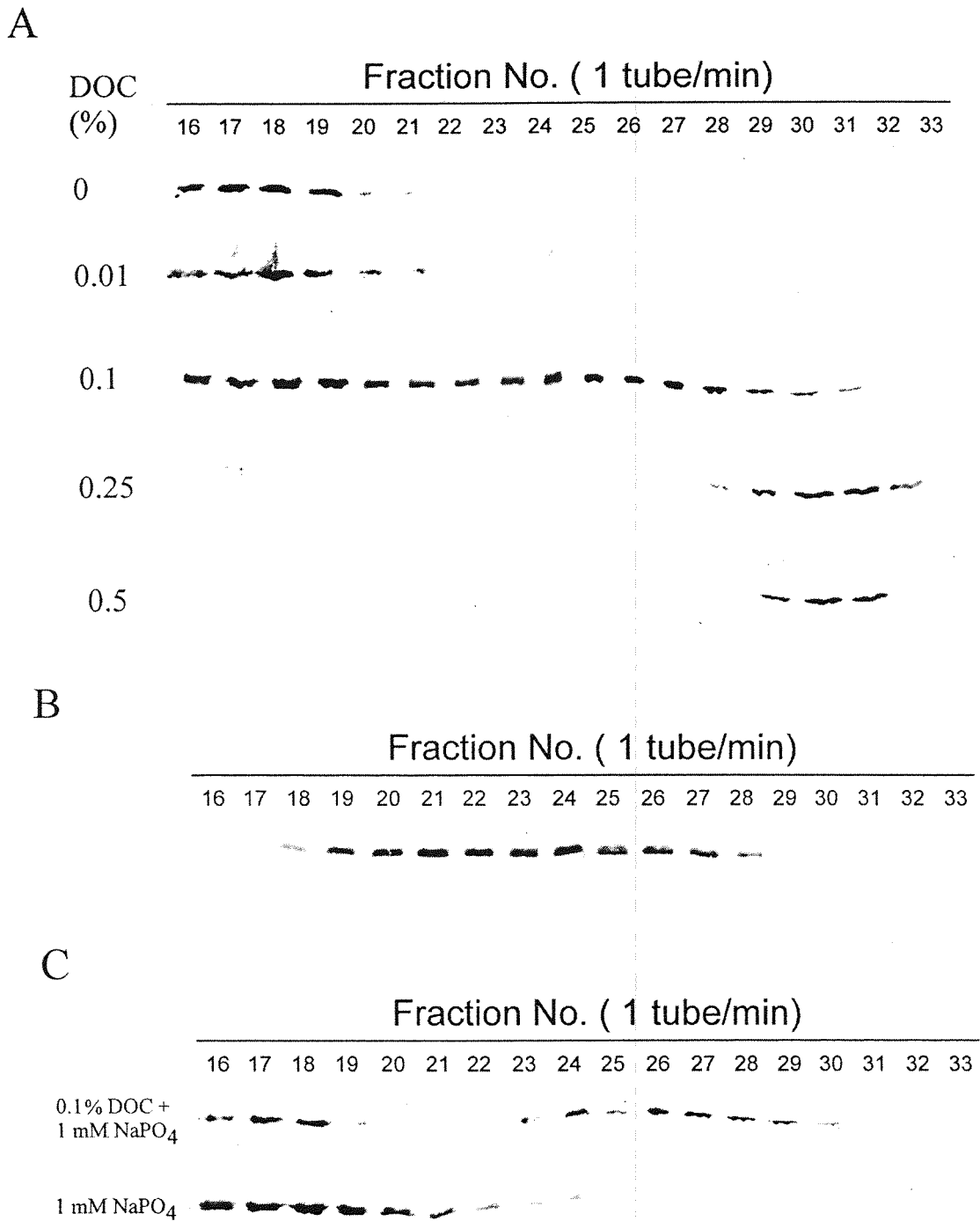
出現於胞外。因此如果此論點是對的，則在正常生理狀態下 XpsG 蛋白於膜上是會形成纖毛結構的。至於 XpsG 蛋白 membrane 的雙體型，可能是組成纖毛的基本單位或是纖毛組裝、解離的中間物，甚至可能是在製備膜萃取液時，清潔劑的加入所造成的。

XpsG(Aspartate → Glutamate)定點突變的探討：

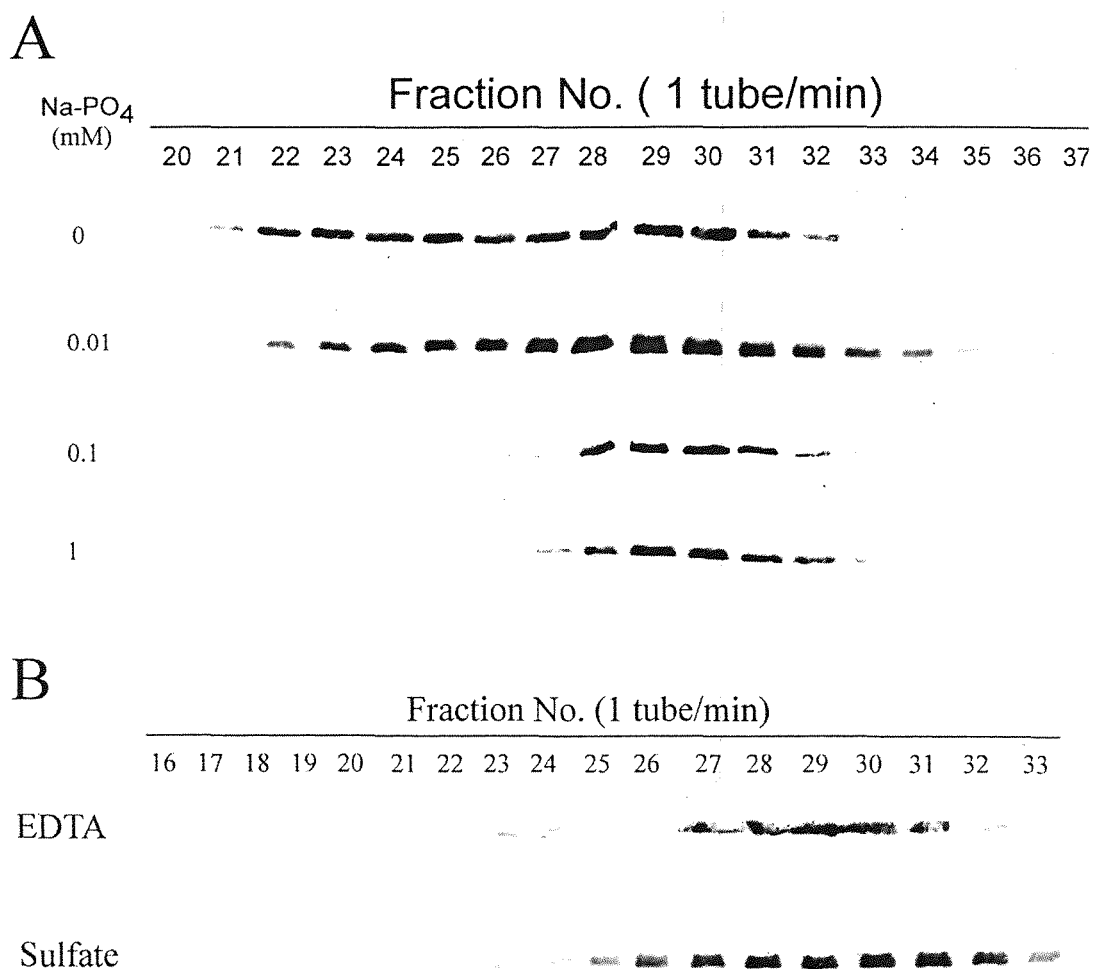
在本研究中，將 XpsG 蛋白高度保留的 Aspartate 以 Glutamate 取代，從互補實驗看到 XpsG-D103E 變異蛋白無法補償 XC1713(xpsG knockout)所失去的蛋白分泌功能。由干擾試驗發現 XpsG-D103E 變異蛋白會干擾 XC1701 澱粉酵素的分泌。干擾試驗可以觀察突變蛋白與野生型蛋白同時在菌體內表現時，突變蛋白對野生型蛋白功能所造成的影響。在膠質篩濾層析法結果中發現 D103E 不影響 XpsG 蛋白複合體的形成，因此突變蛋白與正常蛋白同時存在時，應會互相形成複合體，但為何會干擾正常蛋白的功能，很可能 D103 在 XpsG 蛋白中扮演某種重要的角色，但在目前的分析系統中我們尚無法鑑定出的。



圖一：XpsG 抗體的鑑定以及 XpsG 蛋白在細胞分佈的探討
 A. 將野生株 XC1701 和突變株 XC1713 接種到 2ml LB 培養液，待菌液混濁後，取 1 ml 的菌液離心，用 200 μ l 1x SDS-PAGE sample buffer 將沉澱物懸浮，即為備用的 total cell 部份，做 XpsG western blot。
 B. 將十字花科黑腐病菌野生株 XC1701 分成可溶(細胞質、膜外漿質)與不可溶(細胞膜)兩部份。分別以 RNA polymerase α subunit 和 XpsD 蛋白當做可溶性蛋白與膜蛋白的標誌，做 XpsG western blot。

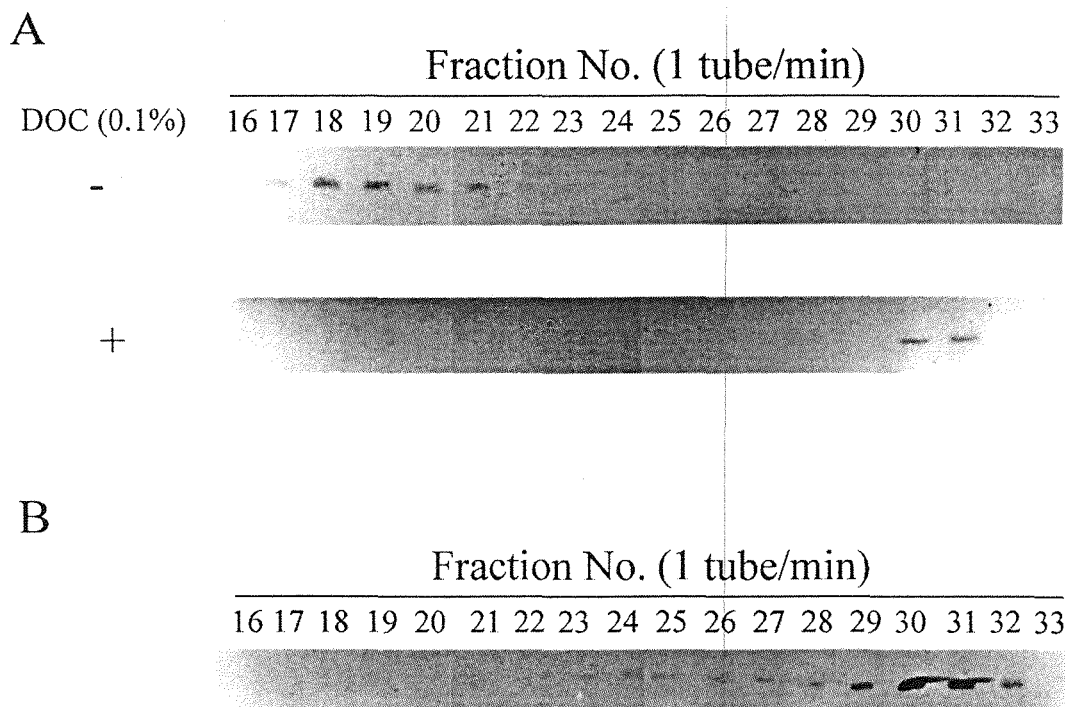


圖三： DOC 與磷酸對水溶性 XpsG 蛋白複合體結構的影響
 將可溶性蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，
 使用的 buffer 分別為 A. 20mM Tris-HCl pH8.0, 0-0.5% DOC,
 200mM NaCl ; B. 20mM Tris-HCl pH8.0, 250mM NaCl ; C.
 20mM Tris-HCl pH8.0, 1mM Na-PO₄, 200mM NaCl 含或不
 含 0.1% DOC，收集 retention time 16-33 分鐘的流出液，做 XpsG
 western blot。



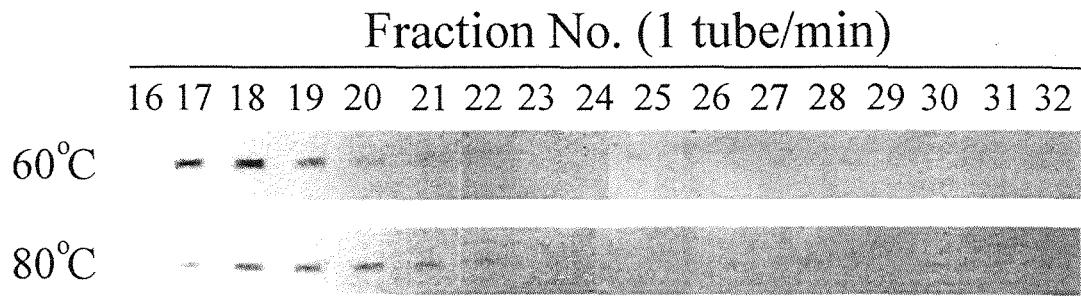
圖四：磷酸、EDTA 或 sulfate 在低濃度 DOC 下對脂溶性 XpsG 蛋白複合體結構的影響

將膜蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 分別為 A. 20mM Tris-HCl pH8.0, 0.1% DOC, 0-1mM Na-PO₄, 200mM NaCl；B. 20mM Tris-HCl pH8.0, 0.1% DOC, 200mM NaCl, 1mM EDTA 或 1mM sulfate。收集 retention time 16-33 分鐘流出液，做 XpsG western blot。



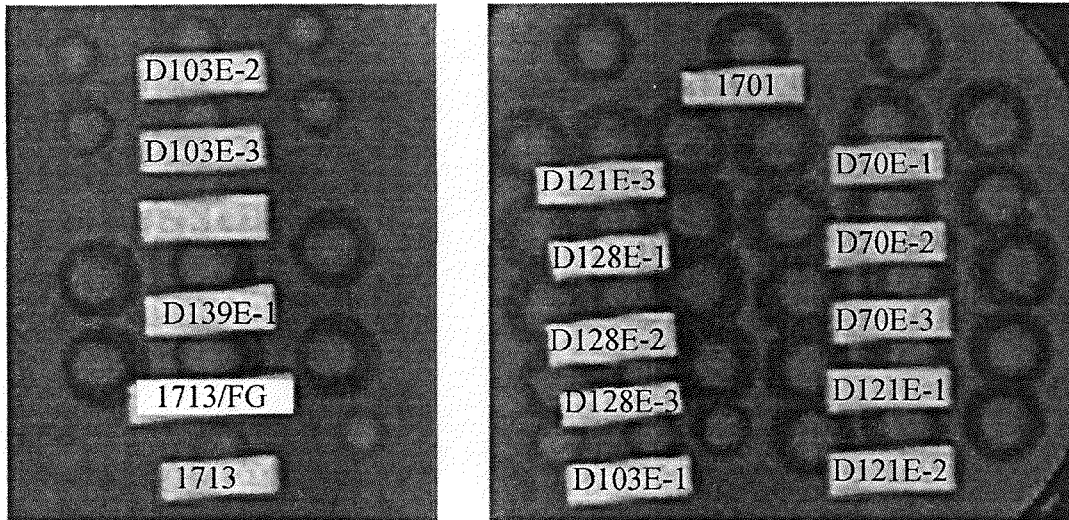
圖五：在高 pH 下低濃度 DOC 對水溶性與脂溶性 XpsG 蛋白複合體結構的影響

A. 將可溶性蛋白萃取通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 為 50mM Na₂CO₃ pH10.3, 200mM NaCl, 含或不含 0.1% DOC。B. 將膜蛋白萃取液通過 HR-200，buffer 為 50mM Na₂CO₃ pH10.3, 200mM NaCl, 含 0.1% DOC。各別收集 retention time 16-33 分鐘流出液，做 XpsG western blot。

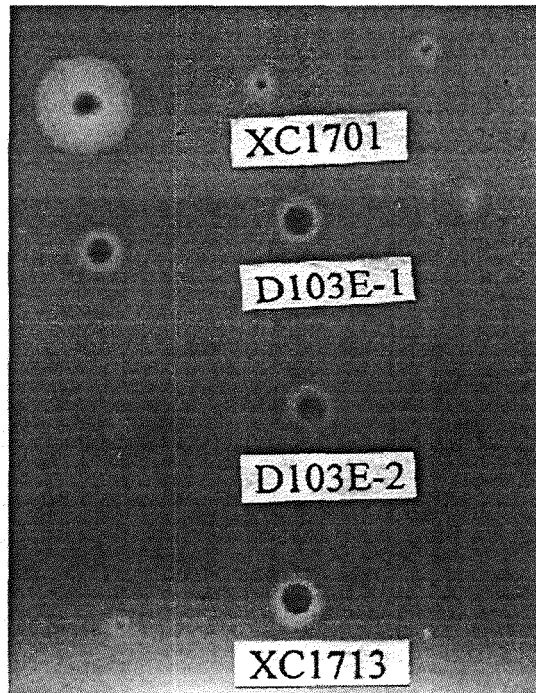


圖六：水溶性 XpsG 蛋白複合體具有耐高溫的特性

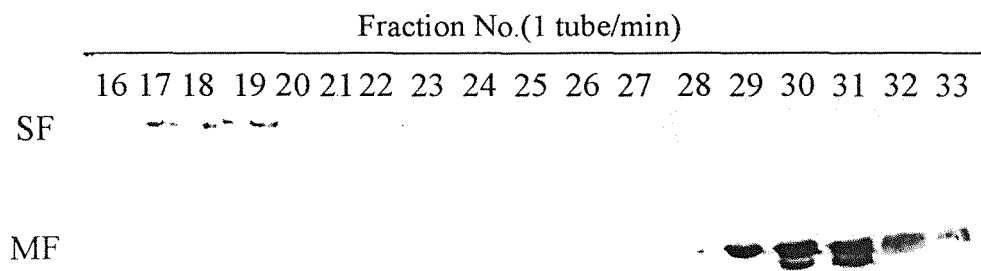
將可溶性蛋白萃取液先經過高溫 60°C 或 80°C 加熱十分鐘，慢慢降至室溫後，再通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，收集 retention time 16-33 分鐘流出液，做 XpsG western blot。



圖七：XC1713 轉接合菌株含不同 *xpsG* 突變基因的澱粉培養基分泌測試
 將含有突變基因(D70E, D103E, D121E, D128E, D139E)的 XC1713 菌株適
 量點在澱粉培養基上，30°C，O/N，並以 XC1701、XC1713/FG 以及
 XC1713 當陽性以及陰性對照組，藉由菌落周圍透明圈的大小來觀察
 各變異株澱粉酵素的分泌情形。

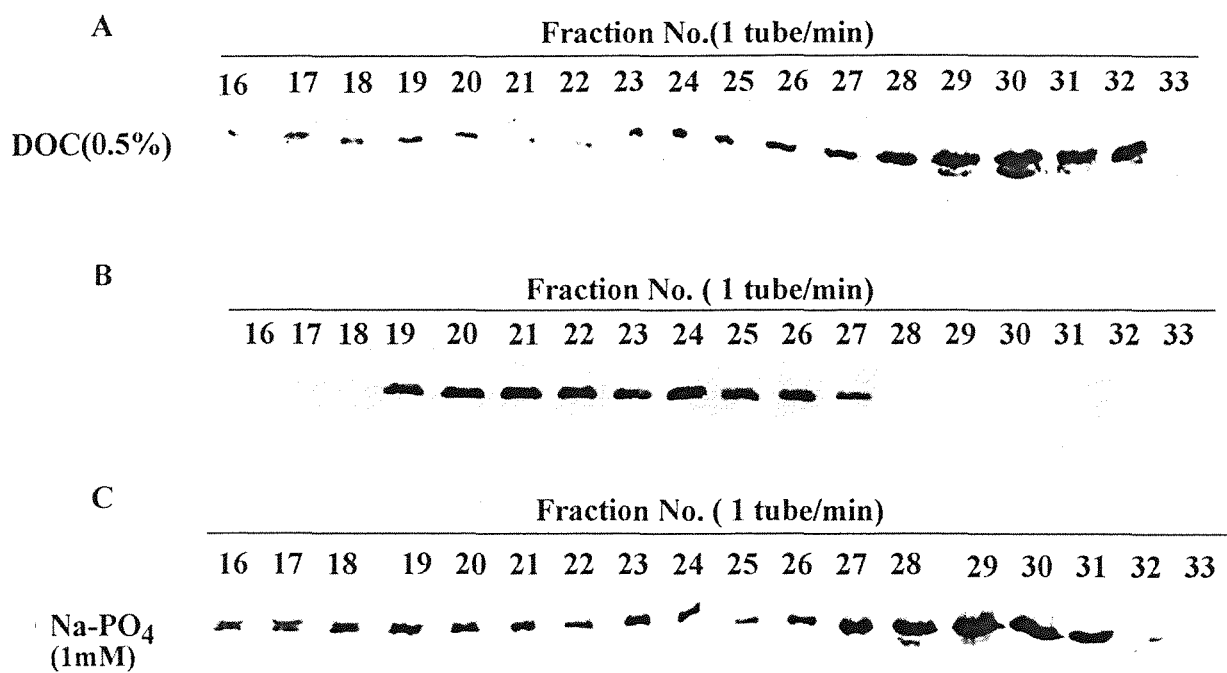


圖八：XC1701 轉接合菌株的澱粉培養基分泌測試。
將含有突變基因(D103E)的 XC1701 菌株適量點在澱粉培養基上，30°C，O/N，並以 XC1701 以及 XC1713 當陽性以及陰性對照組，藉由菌落周圍透明圈的大小來觀察變異株澱粉酵素的分泌情形。



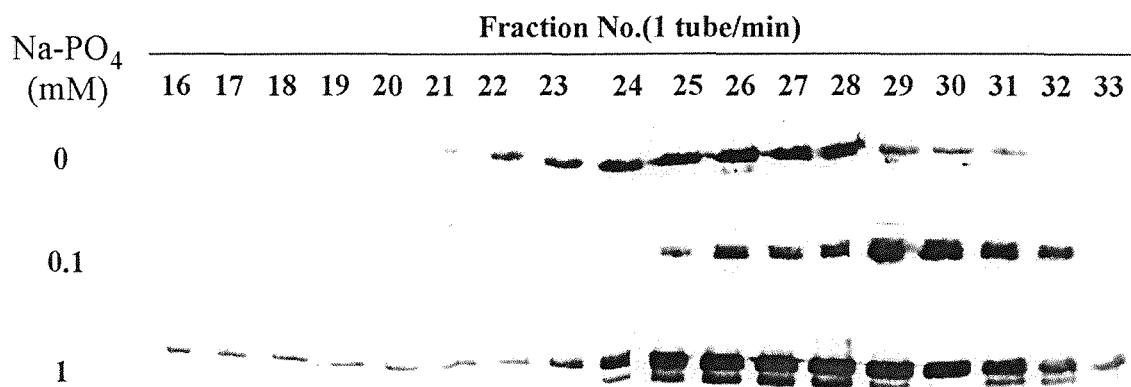
圖九：XpsG-D103E 變異蛋白不會影響 XpsG 蛋白複合體的分子型式

將 XpsG 變異蛋白株的可溶性蛋白、膜蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，可溶性蛋白的 buffer 為 20mM Tris-HCl pH8.0, 250mM NaCl；膜蛋白的 buffer 與可溶性蛋白的 buffer 相同但含有 0.5% DOC。收集 retention time 16-33 分鐘，做 XpsG western blot。



圖十： DOC 與磷酸對水溶性與脂溶性 XpsG 蛋白複合體結構的影響

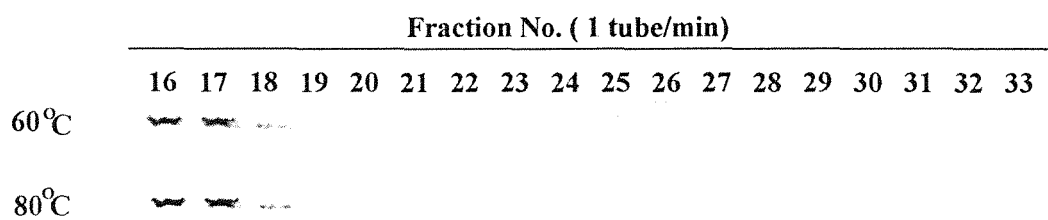
將可溶性蛋白萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 分別為 A. 20mM Tris-HCl pH8.0, 0.5% DOC, 200mM NaCl； B. 20mM Tris-HCl pH8.0, 250mM NaCl； C. 20mM Tris-HCl pH8.0, 1mM Na-PO₄, 200mM NaCl, 0.1% DOC，收集 retention time 16-33 分鐘的流出液，做 XpsG western blot。



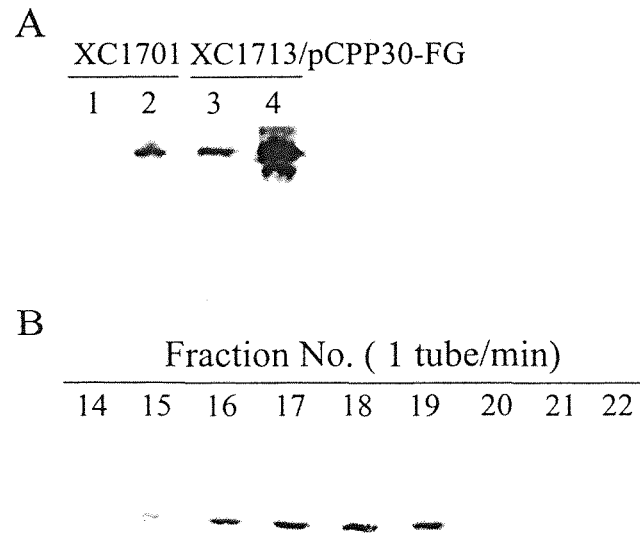
圖十一：在低濃度 DOC 下磷酸對脂溶性 XpsG-D103E

變異蛋白複合體結構的影響

將 XpsG-D103E 變異蛋白膜萃取液通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 為 20mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl, 0-1mM Na-PO₄，收集 retention time 16-33 分鐘流出液，做 XpsG western blot.



圖十二：水溶性 XpsG-D103E 變異蛋白具有耐高溫的特性
 將可溶性變異蛋白部份分別用高溫(60 或 80°C)處理，各別
 通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，此時 buffer 為 20mM
 Tris-HCl pH8.0, 250mM NaCl，收集層析液，以 XpsG western
 blot 分析。



圖十三：以 gel filtration 分析胞外 XpsG 蛋白複合體

A. XC1701、XC1713/pCPP30-FG 取 1ml 的菌液高速離心，上清液為胞外部份(lane1,3)，沉澱物為胞內部份(lane2,4)，XpsG western blot。B. 將 XC1713/pCPP30-FG 10ml 胞外部份經由 centricon-10 濃縮到 2ml，取 200 μ l 通過 HR-200 膠質篩濾層析管柱分析，收集 retention time 14-22 分鐘流出液，做 XpsG western blot。

五、参考文献：

1. Salmond, G. P. C., and Reeves, P. J.(1993) Membrane traffic wardens and protein in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 7-12.
2. Wandersman, C. (1992) Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.*, **8**, 317-322.
3. Wickner, W. A., Driessen, J. M. and Hartl, F. U. (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 101-124.
4. Pugsley, A. P., d'Enfert, C. Reyss, I. and Kornacker, M. G. (1990) Genetics of extracellular protein secretion by Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, **24** . 67-90.
5. Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, **57**, 50-108.
6. d'Enfert, C., Reyss, I., Wandersman, C. and Pugsley, A. P. (1989) protein secretion by Gram-negative bacteria: Characterization of two membrane proteins required for pullulanase secretion by *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, **264**. 17462-17468.
7. Pugsley, A. P., and Reyss, I. (1990) Five genes at 3' end of the *Klebsiella pneumoniae pulC* operon are required for pullulanase secretion. *Mol. Gen. Genet.*, **222**, 176-184.
8. Reyss, I., and Pugsley, A. P. (1990) Five additional genes in the pulC-O operon of the Gram-negative bacterium *Klebsiella oxytoca* UNF5023 that are required for pullulanase secretion. *J. Biol. Chem.*, **264**. 17462-17468.

9. Possot, O., d'Enfert, I., Reyss, I. and Pugsley, A. P. (1992) Pullulanase secretion in *Escherichia coli* K12 requires a cytoplasmic protein and putative polytopic cytoplasmic membrane protein. *Mol. Microbiol.*, **6**, 95-105.
10. Condemine, G., Dorel, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and Robert-Baudouy, J. (1992) Some of the out genes involved in the secretion of pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi* are regulated by kdgR. *Mol. Microbiol.*, **6**, 3199-3211.
11. Dums, F., Dow, J., Dow, M. and Daniel, M. J. (1991) Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion system of other Gram-negative bacterial. *Mol. Gen. Genet.*, **229**, 357-364.
12. Filloux, A., Bally, M., Akrim, M., Tommassen, J. and Lazdunski, A. (1990) Protein secretion in Gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacterial. *EMBO J.*, **9**, 4323-4329.
13. Jiang, B., and S. P. Howard. (1992) The *Aeromonas hydrophila* *exeE* gene, required both for protein secretion and normal outer membrane biogenesis, is a membrane of general secretion pathway. *Mol. Microbiol.*, **6**, 1351-1361.
14. He, S. Y., Linderberg, M., Chatterjee, A. K. and collmer, A. (1991) Vloned *Erwinia chrysanthemi* out genes enable *Escherichia coli* to selectively secret a diverse family of heterologous proteins to its melieu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 1079-1083.
15. Sandvist, M., V. Morales, and Bagdasarian, M. (1993) A soluble

- protein required for cholera toxin through the outer membrane. *Gene*, **123**, 81-86.
16. Hu, N. T., Hung, M.-N., Chiou, S.-J., Chiou, F., Tang, D.-C., Chiang, H.-Y., and Wu, C.-Y. (1992) Cloning and characterization of a gene required for secretion of extracellular enzyme across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.*, **174**, 2679-2687.
 17. Nunn, D. N., and Lory, S. (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3281-3285.
 18. Chen, L.-Y., Chen, D.-Y., Miaw, J. and Hu, N.-T. (1996) XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a multimer. *J. Biol. Chem.* **271**, 2703-2708.
 19. Schirmer, T. and Cowan, S. W. (1993) Prediction of membrane-spanning beta-strands and its application to maltoporin. *Protein Sci.*, **2**, 1361-1363.
 20. Struyve, M., Moons, M. and Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.*, **218**, 141-148.
 21. Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., de Cock, H. and Tommassen, J. (1998) Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ. Which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, **27**, 209-219.

22. Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G. R. and Tommassen, J. (1997) The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.*, **26**, 789-797.
23. Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G. R. and Tommassen, J. (1997) The outer membrane component, YsC. of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.*, **26**, 789-797.
24. Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J. and Condemine, G. (1997) Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of general secretory pathway and secreted proteins. *EMBO J.*, **16**, 3007-3016.
25. Hardie, K. R., Lory, S. and Pugsley, A. P. (1996) Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperon-like protein. *EMBO J.*, **15**, 978-988.
26. Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J. and Condemine, G. (1997) Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of general secretory pathway and secreted proteins. *EMBO J.* **16**, 3007-3016.
27. Bally, M., Filloux, G., Badere, A. and Lazdunski, A. (1991) Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa* : the xcpA gene encodes an integral membrane protein homologous to *Klebsiella pneumoniae* secretion function PulO. *J. Bacteriol.*, **173**, 479-486.
28. Parge, H. E., forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. E., Getzoff, E. D. and Tainer, J. A. (1995) Structure of the fibre forming protein pilin at 2.6Å resolution. *Nature*, **378**, 32-38.

29. Strom, M. S., Bergman, P. and Lory, S. (1993) Identification of active-site cysteines in the conserved domain of PilD. the bifunctional type IV pilin leader peptidase/N-methyltransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15788-15794.
30. Strom, M. S., Nunn, D. N., and Lory, S. (1993) A single bifunctional enzyme. PilD. catalyzes cleavage and N-methylation of protein belonging to the type IV pilin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 2404-2408.
31. Parge, H. E., Bernstein, S. L., Deal, C. D., McRee, D. E., Christensen, D., Cappozza, M. A., Kays, B. W., Fieser, T. M., Draper, D. So., M. Getzoff. E. D. and Tainer, J. A. (1990) Biochemical purification and crystallographic characterization of the fiber forming protein pilin from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 2278-2285.
32. Nunn, D., Bergman, S. and Lory, S. (1990) Product of three accessory genes, pilB, pilC and pilD. are required for the biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J. Bacteriol.*, **172**, 2911-2919.
33. Pugsley, A. P., and Possot, O. (1993) The general secretion pathway of *Klebsiella oxytoca*: no evidence for relocalization or assembly of pilin-like PulG protein into a multiprotein complex. *Mol. Microbiol.*, **10**, 665-674.
34. Lazdunski, A., Filloux, A., Michel, G., Foglino, M., Murgier, M., Latifi, A., Chapon, V., Bleves, S. and Bally, M. (1996) The general secretion pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. molecular mechanisms and regulation. In : *Molecular Biology of Pseudomonas* (Nakazawa. T. Furukawa. K. Haas. D. and Silver. S. Eds.), pp427-437. ASM Press. Washington. DC.

35. Pugsley, A. P. (1996) Multimers of the precursor of a type IV pilin-like component of the general secretory pathway are unrelated to pili. *Mol. Microbiol.*, **20**, 1235-1245.
36. Strom, M. S. and Lory, S. (1991) Amino acid substitutions in pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptide cleavage. amino-terminal methylation. and pilus assembly. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1656-1664.
37. Strom, M. S. and Lory, S. (1993) Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 565-596.
38. Nunn, D. N. and Lory, S. (1993) Cleavage. Methylation. and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT. - U. -V. and -W. *J. Bacteriol.*, **175**, 4375-4382.
39. Lu, H. M., Motley, S. T. and Lory, S. (1997) Interaction of the components of the general secretion pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunits in complex formation and extracellular protein secretion. *Mol. Microbiol.*, **25**, 247-259.
40. Alm, R. A. and Mattick, J. S. (1995) Identification of a gene pilV required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. *Mol. Microbiol.*, **16**, 485-496.
41. Alm, R. A., Hallinan, J. P., Watson, A. A. and Mattick, J. S. (1996) Fimbrial biogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa*. PilW and pilX increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and pilY1 encodes a gonococcal PilC homologue. *Mol. Microbiol.*, **22**, 161-173.

42. Russell, M. A. and Darzins, A. (1994) The pilE gene product of *Pseudomonas aeruginosa*. required for pilus biogenesis shares amino acid sequence identity with the N-termini of type 4 prepilin proteins. *Mol. Microbiol.*, **13**, 973-985.
44. Forest, K. T. and Tainer, J. A. (1997) Type-4 pilus- structure outside to inside and top to bottom -a minireview. *Gene*, **192**, 165-169.
45. Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A. and Tommassen, J.(1992) Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa* : characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol. Microbiol.*, **6**, 1121-1131.
46. Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S. P. and DiRita, V. J. (1995) Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J.*, **14**, 1664-1673.
47. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase. myosin. Kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.
48. Possot, O. and Pugsley, A. P. (1994) Molecular characterization of PulE. A protein required for pullulanase secretion. *Mol. Microbiol.*, **12**, 287-299.
49. Turner, L. H., Cano. Lara, J., Nunn, D. N. and Lory, S. (1993) Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **175**, 4962-4969.

50. Bleves, S., Lazdunski, A. and Filloux, A. (1996) Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **178**, 4297-4300.
51. Thomas, C. Thomas and Mark, G. Mcnamee (1990) Purification of membrane proteins. *Methods in Enzymology*, **182**. 499-520.

ATGATCAAGCGTTCATCACCCGCAGTCCGTTCGCGCGCAGGCCAGGCCGGCATGAGC
 M I K R S I T R S P S R A G Q A G M S 19

TTGCTGGAAATCATCATCGTCATCGTGCTGATCGGCGCGGTGCTCACCTGGTCGGC
 L L E I I I V I V L I G A V L T L[↑] V G 38

AGCCGCGTGCTCGGTGGTGCCGATCGCGGCAAGGCGAACCTTGCCAAGACGCAGATC
 S R V L G G A D R G K A N L A K S Q I 57

CAGACCCTGGCCGGCAAGATCGAGAACTTCCAGCTCGACACGGGTAAGTTGCCGAGC
 Q T L A G K I E N F Q L D T G K L P S 76

AAGCTCGATGACCTGGTCACCCAGCCCGGCGGCAGCAGCGGTTGGCTGGGCCCGTAC
 K L D D L V T Q P G G S S G W L G P Y 95

GCCAAACCGGTGAACTCAACGACCCGTGGGGCCACACCATCGAATACCGCGTGCCC
 A K P V E L N D P W G H T I E Y R V P 114

GCGATGGCCAGGCCTTCGACCTGATCAGCCTCGGCAAGGATGGCCGCCCTGGCGGC
 G D G Q A F D L I S L G K D G R P G G 133

AGCAGCTACGACTCGGACATCAAGTACCAGTAA
 S S Y D S D I K Y Q ***

附錄一：XpsG 之 DNA 順序與推測之氨基酸

GspG

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

GSPG_AERHY . .KRRQSGFTLLEVMVVIVILGILASLVVPNLMGNKEKADQKAVSDIVALENALDMYKLDNNRYPTTEQGLDALVNKPTAAPEPRSYRDGGYIKRLPQ-DPWGNPYQMLSPGQFGKIDIFSMGLDGEAG---TDDDIGNW

GSPG_ERWCARQRGFTLLEIMVVIVILGVLASLVVPNLMGNKEKADRQKAVSDIVSLESALDMYKLDNNRYPSTEQGLKALVTKPTVQPEPRNYPADGYIRRLPQ-DPWGTDYQLLNPGQHKGKLDIFSLGPDGMPG---TEDDIGNW

GSPG_ERWCHRQRGFTLLEIMVVIVILGVLASLVVPNLMGNKEKADKQKAVSDIVALESQLDMYKLDNSRYPTTEQGLGALVKKPTTPEPRNYPQDGYIRRLPQ-DPWGAEYQLVSPGRHGKIDVFSYGPDGMPD---TDDDIGNW

GSPG_KLEPNQRQRGFTLLEIMVVIVILGVLASLVVPNLMGNKEKADRQKVVS DLVALEGALDMYKLDNSRYPTTEQGLQALVSAPSAEPHARNYPEGGYIRRLPQ-DPWGSDYQLLSPGQHGOVDIFSLGPDGVPE---SNDDIGNW

GSPG_ECOLIKQRGFTLLEIMVVIVIIGVLASLVVPNLMGNKEKADKQKAVSDIVALENALDMYKLDNHYPPTNQGLSLEVEAPTLPPLAANYNKEGYIKRLPA-DPWGNDYVLVNPGEHGAYDILLSAGPDGEMG---TEDDITNW

GSPG_VIBCHRKQTGFTLLEVMVVVIVILGILASFVVPNLLGNKEKADQKAVTDIVALENALDMYKLDNSVYPTTDQGLEALVTKPT-NPEPRNYREGGYIKRLPK-DPWGNDYQYLSPGDKGTIDVFTLGADQEGGEGTGADIGNW

GSPG_PSEAE MQRQQSGFTLLEIMVVVIVILGILAAALVVPQVMSRPDQAKVTVAKGDIKATAAALDMYKLDNFAYPSTQGLEALVKKPTGNPQKNWNKDGYLKKLPV-DPWGNPYQYLAPGTKGPFDFLYSLGADGKEGGSDNDADIGNW

GSPG_XANCPQAGMSLLEIIIVIVILGAVLTLVGSRVLGGADRQKANKAKSQTLAGKIENFQLDTGKLPK---LDDLVTQPGGS----SGWLGPYAKPVELNDPWGHTIEYRVPGDQAFDLISLKGDRPGGSSYSDSIKYW

GSPG_XANCPQAGMSLLEIIIVIVILGAVLTLVGSRVLGGADRQKANKAKSQTLAGKIENFQLDTGKLPK---LDDLVTQPGGS----SGWLGPYAKPVELNDPWGHTIEYRVPGDQAFDLISLKGDRPGGSSYSDSIKYW

Consensus ...MQRKQAGFTLLEIMVVIVILGVLASLVVPNVMGNKDKADAQKAKSDIQALEGALDMYKLDNGKYPTEQGLDALVTKPTGNPEPRNYWKGGYIKRLPLNDPWGNDYQYLSPGDHGAFDLISLKGDRPGGSSYSDSDIGNW

附錄二：所有參與 Type II secretion pathway 的革蘭氏陰性菌中的 GspG 蛋白質
氨基酸序列根據電腦軟體 BLAST 同源比對的結果。
箭頭所指之處為高度保留的 Aspartate，分別位於 D70，D103，D121，D128，D139
位置上。

附錄三： *xpsG* 基因定點突變(D70E, D103E, D121E, D128E, D139E)所須的 primer

a、D70E：將 *XpsG* 第 70 個氨基酸 Aspartate 的 GAC 改成 GAG (Glutamate)，其 primer 為：

5'CTTCCAGCTC*GAGACGGGTAAGTT 3'

b、D103E：將 *XpsG* 第 103 個氨基酸 Aspartate 的 GAC 改成 GAG (Glutamate)，其 primer 為：

5'GAACTCAAC*GAGCCGTGGGGCC 3'

c、D121E：將 *XpsG* 第 121 個氨基酸 Aspartate 的 GAC 改成 GAG(Glutamate)，其 primer 為：

5'CAGGCCTTC*GAGCTGATCAGCC 3'

d、D128E：將 *XpsG* 第 128 個氨基酸 Aspartate 的 GAT 改成 GAG (Glutamate)，其 primer 為：

5'CTCGGCAAG*GAGGGCCGCCCTG 3'

e、D139E：將 *XpsG* 第 139 個氨基酸 Aspartate 的 GAT 改成 GAG (Glutamate)，其 primer 為：

5'TACGACTCG*GAGATCAAGTACC 3'

pBluescript® II KS (+/-) phagemid

The pBluescript® II KS (+/-) phagemid is a 2961-bp phagemid derived from pUC19. The KS designation indicates the polylinker is oriented such that *lacZ* transcription proceeds from *Kpn* I to *Sac* I.

f1 (+) origin: (3-459 bp); f1 filamentous phage origin of replication allowing recovery of the sense strand of the *lacZ* gene when a host strain containing the pBluescript II phagemid is co-infected with helper phage.

f1 (-) origin: (3-459 bp) f1 filamentous phage origin of replication allowing recovery of the antisense strand of the *lacZ* gene when a host strain containing the pBluescript II phagemid is co-infected with helper phage.

ColE1 origin: (1032-1972 bp) Plasmid origin of replication used in the absence of helper phage.

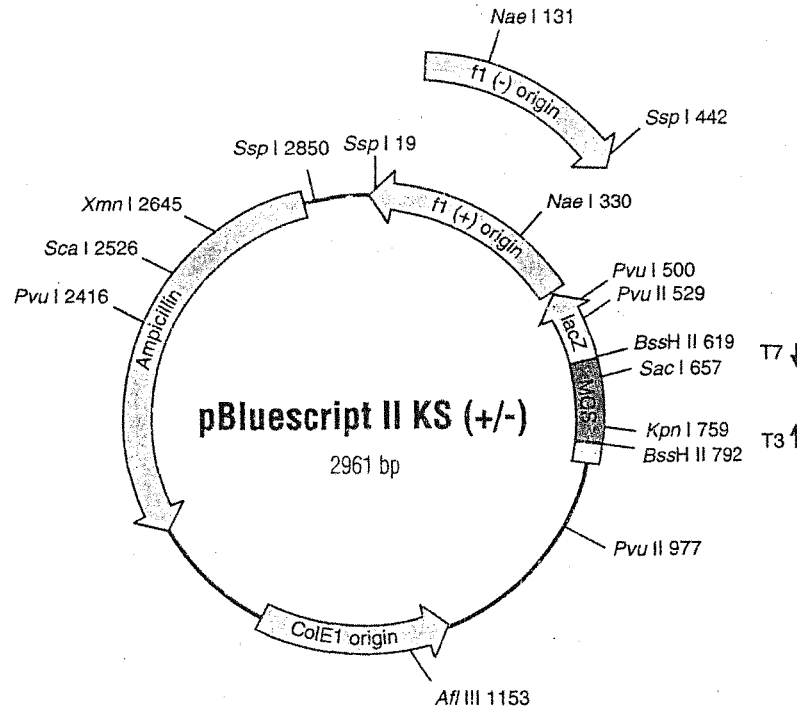
***lacZ* gene:** (*lac* promoter: 816-938 bp) This portion of the *lacZ* gene provides α -complementation for blue/white color selection of recombinant phagemids. An inducible *lac* promoter upstream from the *lacZ* gene permits fusion protein expression with the β -galactosidase gene product.

MCS: (657-759 bp) Multiple cloning site flanked by T3 and T7 RNA promoters (please see the polylinker sequence below).

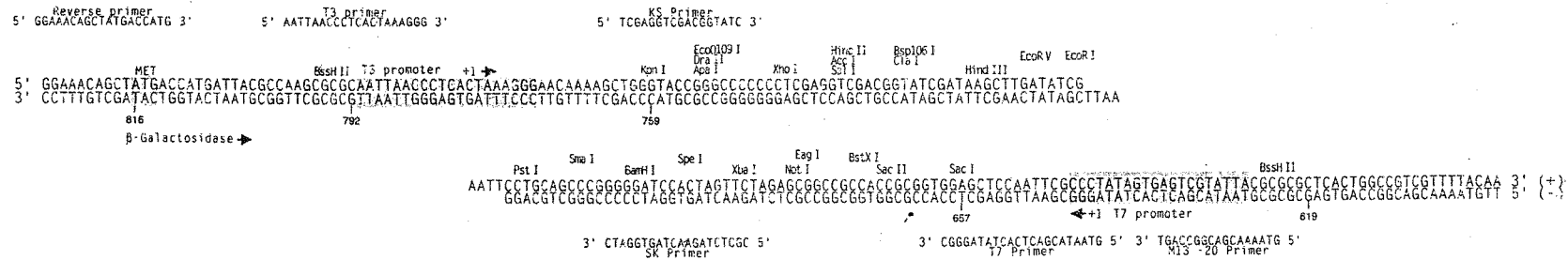
Ampicillin: (1975-2832 bp) Ampicillin-resistance gene (*Amp^r*) for antibiotic selection of the phagemid vector.

Please Note: The upper strand is designated the (+) strand and the lower strand is designated the (-) strand

GenBank® # X52327 [KS(+)] & # X52329 [KS(-)]



19



附錄四：PBluescript II KS phagemid map

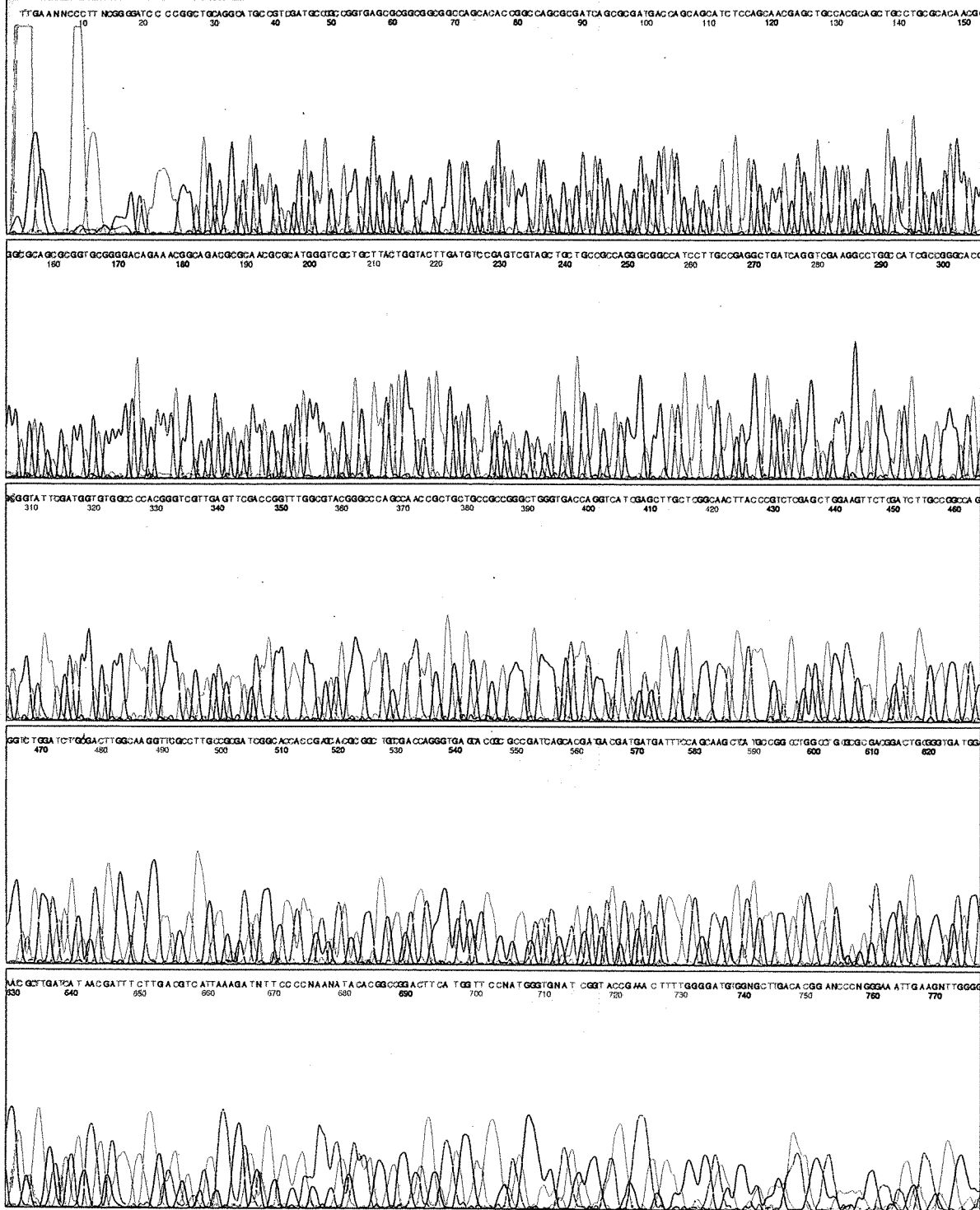


Model 377
Version 2.1.1

01-D70E(3)/PCPP30/M13
D70E(3)/PCPP30/M13
Lane 1

Signal G:228 A:122 T:156 C:175
DT (BD Set Any-Primer)
Matrix0825
Points 801 to 8268 Base 1: 801

Page 1 of 2
Fri, 15 Jan 1999 12:35 PM
Thu, 14 Jan 1999 4:03 PM
Spacing: 0.0



附錄五：XC1713/pCPP30-D70E 變異蛋白之 DNA 定序圖

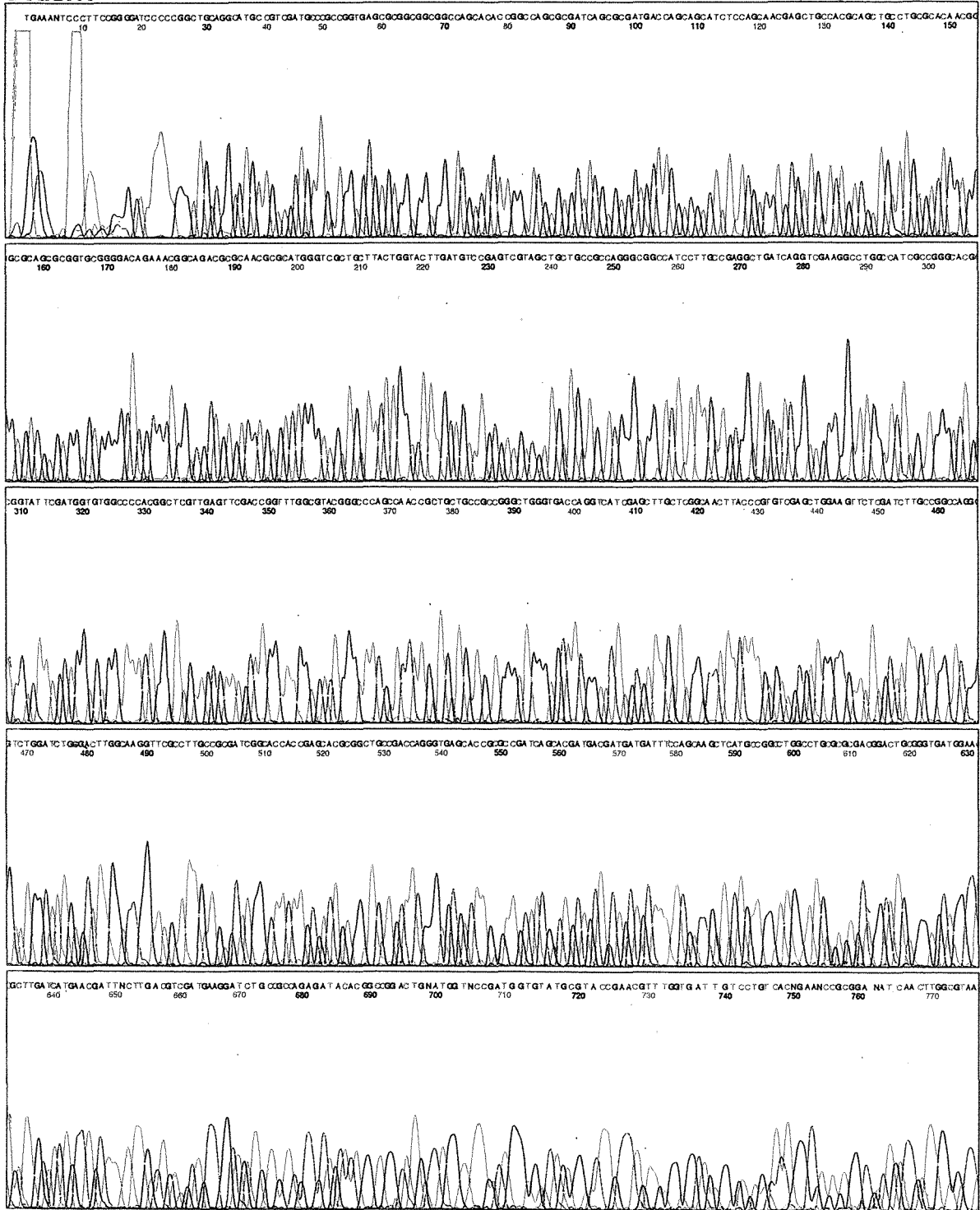
位置 421-444 為 primer，位置 432 的 cytidine 為突變點，位置 639-641(CAT)為起始密碼，位置 210-212(TTA)為終止密碼。



Model 377
Version 2.1.1

03-D103E(3)/PCPP30/M13 Signal G:322 A:171 T:202 C:249
DT (BD Set Any-Primer)
D103E(3)/PCPP30/M13 Matrix0825
Lane 3 Points 801 to 8268 Base 1: 801

Page 1 of 2
Fri, 15 Jan 1999 10:03 AM
Thu, 14 Jan 1999 4:03 PM
Spacing: 0.0



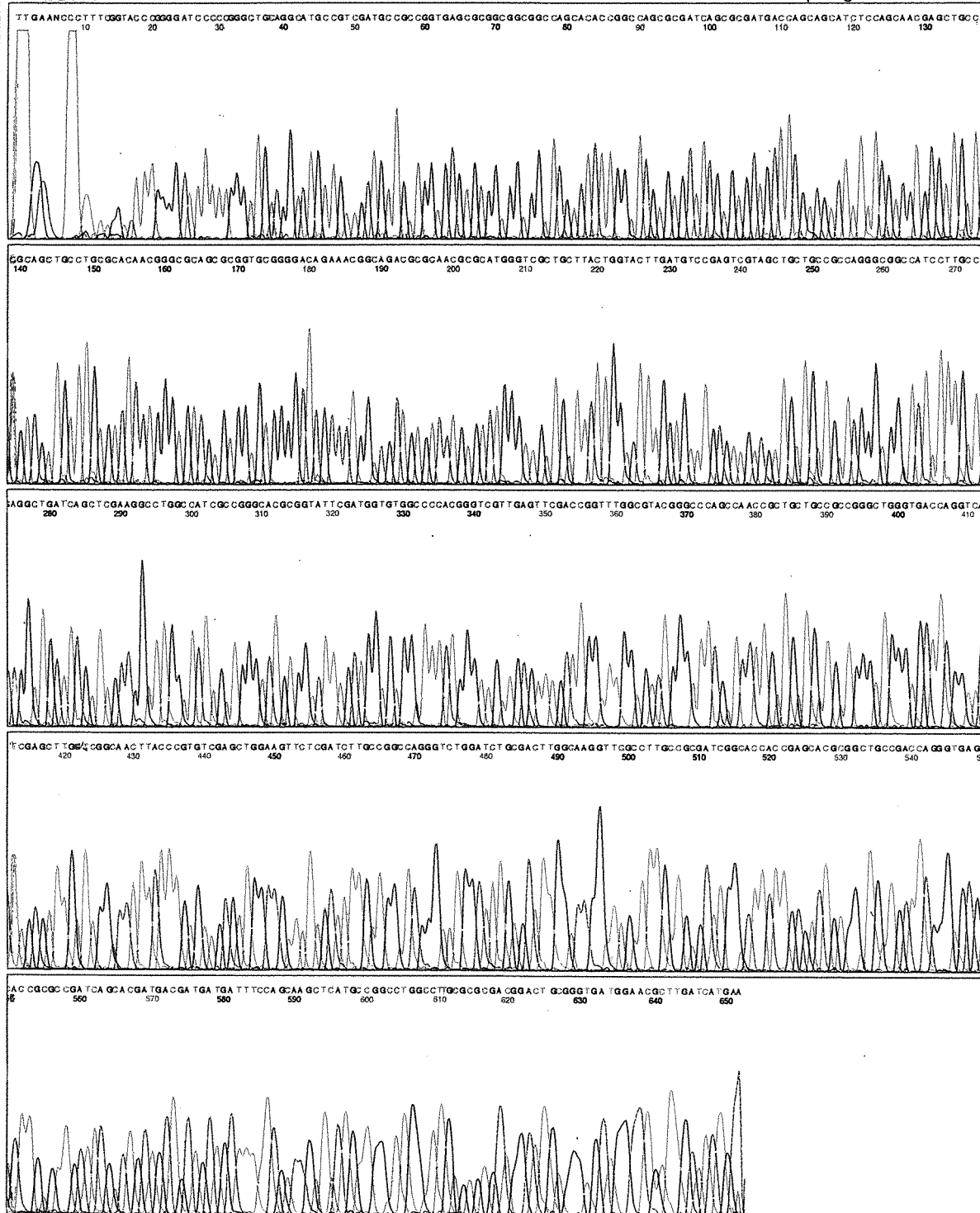
附錄六：XC1713/pCPP30-D103E 變異蛋白之 DNA 定序圖
位置 324-344 為 primer，位置 344 的 cytidine 為突變點，位置 640-642(CAT)為起
始密碼，位置 2111-213(TTA)為終止密碼。



Model 377
Version 2.1.1

19-D121E-1(1/11)/PCPP30 Signal G:497 A:223 T:293 C:275
DT {BD Set Any-Primer}
D121E-1(1/11)/PCPP30 Matrix0825
Lane 19 Points 1002 to 8268 Base 1: 1002

Page 1 of 1
Fri, 15 Jan 1999 10:17 AM
Tue, 12 Jan 1999 4:45 PM
Spacing: 10.98 ABI100



附錄七：XC1713/pCPP30-D121E 變異蛋白之 DNA 定序圖
位置 276-297 為 primer，位置 286 的 cytidine 為突變點，位置 648-649 (CAT) 為
起始密碼，位置 217-219 (TTA) 為終止密碼。

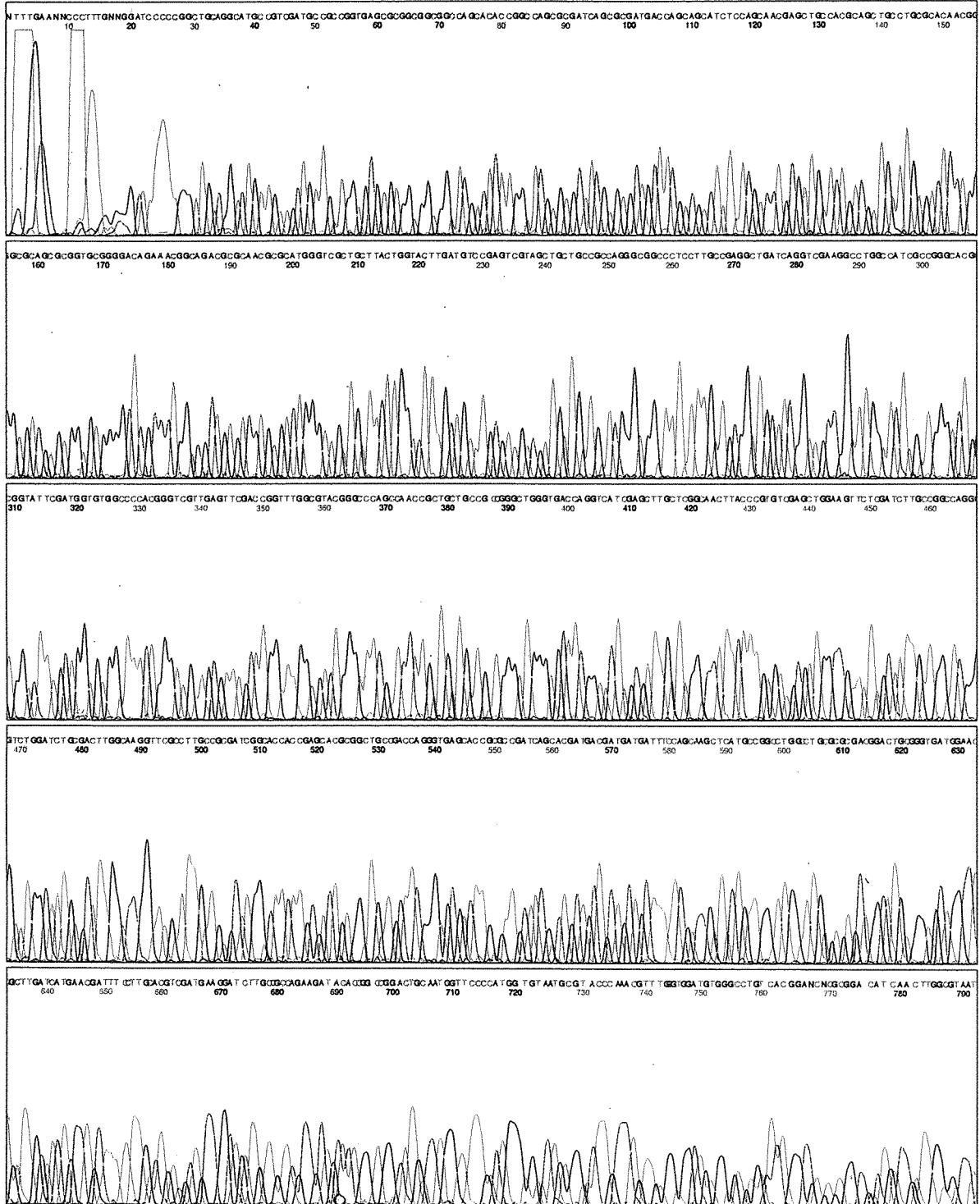


Model 377
Version 2.1.1

05-D128E(3)/PCPP30/M13
D128E(3)/PCPP30/M13
Lane 5

Signal G:290 A:151 T:199 C:237
DT (BD Set Any-Primer)
Matrix0825
Points 800 to 8268 Base 1: 800

Page 1 of 2
Fri, 15 Jan 1999 9:50 AM
Thu, 14 Jan 1999 4:03 PM
Spacing: 0.0



附錄八：XC1713/pCPP30-D128E 變異蛋白之 DNA 定序圖

位置 249-269 為 primer，位置 259 的 cytidine 為突變點，位置 641-643(CAT)為起始密碼，位置 212-214(TTA)為終止密碼。

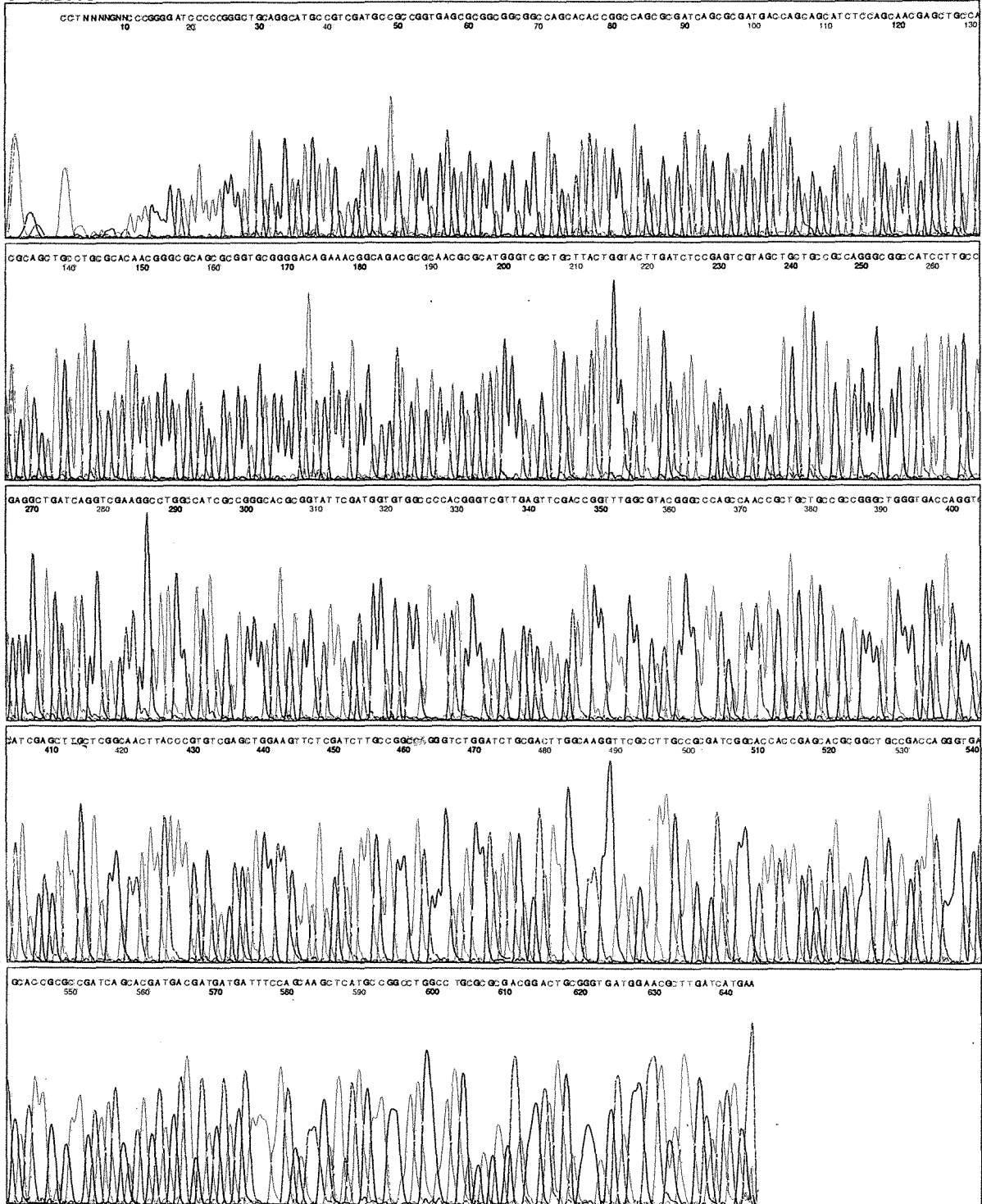


Model 377
Version 2.1.1

21-D139E-3/PCPP30-M13
D139E-3/PCPP30-M13
Lane 21

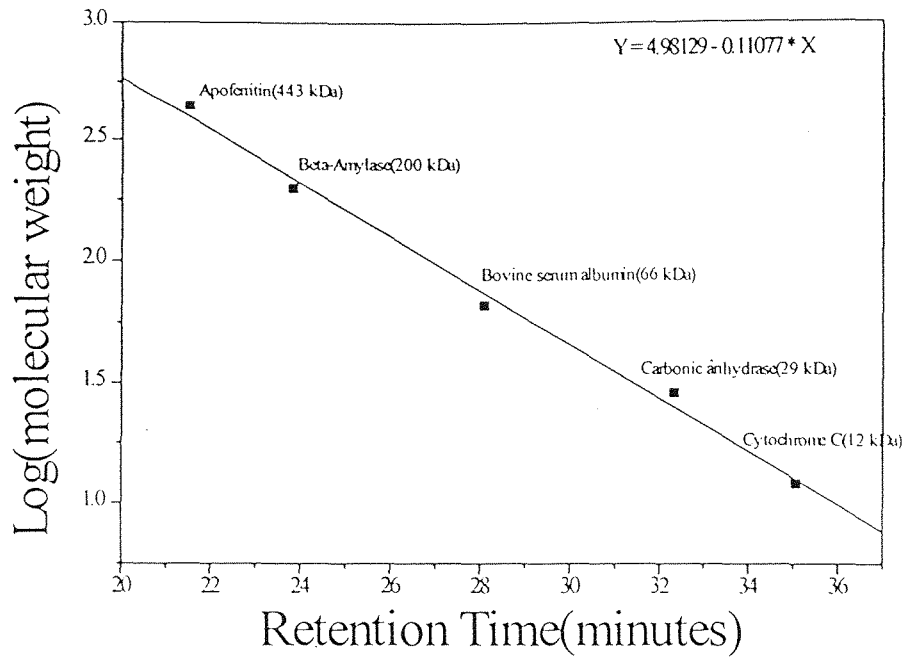
Signal G:337 A:151 T:166 C:202
DT (BD Set Any-Primer)
Matrix0825
Points 1006 to 8268 Base 1: 1006

Page 1 of 1
Fri, 15 Jan 1999 10:27 AM
Tue, 12 Jan 1999 4:45 PM
Spacing: 10.94 ABI100



附錄九：XC1713/pCPP30-D139E 變異蛋白之 DNA 定序圖

位置 215-236 為 primer，位置 225 的 cytidine 為突變點，位置 639-641(CAT)為起始密碼，位置 210-212(TTA)為終止密碼。



附錄十：HPLC 分析之標準分子量計算曲線

縱軸為分子量之對數值，橫軸為滯留時間，圖中直線是經最小平方法計算得之，直線方程式為 $Y = 4.98129 - 0.11077X$ 。管柱是 Superdex 200 HR

10/30(Pharmacia)，液體動相為 20mM Tris-HCl pH8.0，250mM NaCl，偵測波長為 280nm，流速為每分鐘 0.5 ml。