

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

十字花科黑腐病菌胞外蛋白分泌機器的組成分析-子計畫二：十字花科黑腐病菌 pilin-like XpsGHIJ 蛋白在 type II 胞外分泌過程中的角色探討 (3/3)

Study of the roles of pilin-like XpsGHIJ proteins in general secretion pathway of *Xanthomonas campestris*

計畫編號：NSC 89-2311-B-040-007-B32

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：陳凌雲 執行機構及單位名稱：中山醫學大學生化所

一、中文摘要

革蘭氏陰性菌的細胞結構由外而內分別為外膜、胞外漿質、內膜、細胞質四個部分。而胞外蛋白的分泌在細菌的感染過程中是一項非常重要的機制，因為革蘭氏陰性菌的胞外蛋白要分泌至胞外，必須通過內、外兩層膜，於是不同的革蘭氏陰性菌便發展出不同的分泌途徑。Type II pathway 是分泌途徑中的一種，常見於革蘭氏陰性菌中，又稱為一般分泌途徑 (general secretory pathway; GSP)，推測主要是由 12-14 個基因產物構成一個大的複合體，協力將蛋白分泌出。在本論文所研究的對象-十字花科黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris*)，是屬於革蘭氏陰性致病菌，主要感染十字花科類的植物，其蛋白分泌亦是屬於 Type II secretion pathway。其參予蛋白分泌的基因，依基因同源性，依序命名為 *xpsE, F, G, H, I, J, K, L, M, N* 及 *D*。其中 XpsG 是由 143 個氨基酸構成的蛋白，在十字花科黑腐病菌的 Type II 蛋白分泌系統中，認為是構成 pili-like 的成員之一。在之前對 XpsG 蛋白研究發現，XpsG 蛋白存在於水溶性與酯溶性兩部分。可溶部份(細胞質、

膜外漿質)的 XpsG 主要以 multimer 型式存在，不可溶部分(細胞膜)以 dimer 型式存在。當 XpsG 蛋白大量表達時，在胞外可偵測到 XpsG 蛋白，故推測 XpsG 在正常生理狀況下會形成纖毛構造。而在 *xpsG* 基因上作定位突變，其中 D70E、D121E、D128E、D139E 能回復 XC1713 胞外酵素分泌功能，只有 D103E 不能回復。在本論文研究中，在 XpsG 基因第 120 的位置上插入 7 個胺基酸(5'DHHHHHV3')，得到 XpsG-F120 蛋白。利用澱粉酵素電泳分析、膠質篩濾層析法、蔗糖濃度梯度實驗，發現此蛋白失去將胞外蛋白分泌出細胞的功能，同時不干擾正常 XpsG 蛋白的正常蛋白分泌功能，且此變異蛋白主要分佈在細胞內膜並以大分子型式存在，此結果與正常 XpsG 同時分佈在內、外膜不同。由此證實 XpsG 在正常生理狀況下，會形成橫跨內外膜的纖毛構造。進一步利用蔗糖濃度梯度，分析各個 *xps* 基因缺損的菌株中 XpsG 蛋白內外膜分佈，發現在 *xpsH* 及 *xpsD* 基因缺損 (XC1717、XC1708) 的菌株下，其 XpsG 蛋白內外膜分佈有所差異，由此推測在正常生理狀況下，形成橫跨內外膜的 XpsG 纖毛構造與 XpsH 及 XpsD 蛋白有關。但 XpsH 及 XpsD 真正對於 XpsG 纖毛分佈扮演什麼角

色，則需要其他實驗證實。

關鍵詞：葛蘭氏陰性菌、一般分泌途徑、
蛋白分泌、纖毛構造

Abstract

Extracellular secretion of protein has to cross two membrane, cytoplasmic membrane and outer membrane, in Gram-negative bacteria. Type II secretion pathway or general secretion pathway, is widely distributed among Gram-negative bacteria, and composed of 12-14 gene products that are thought to form a multiprotein complex for protein secretion. The general secretory pathway of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* is require for exoprotein across the cell envelope. This machinery consists 11 ORFs (open reading frames), *xpsE-D*. XpsG, a protein of 143 amino acid residue, is a major competent for pili-like structure. To biochemical analysis of XpsG protein, was found to present in the soluble (cytoplasm, plasma) that was in multimer form and insoluble (membrane) fraction that in dimer form, might form pilus-like structure. The site-directed mutant of XpsG protein at the 70, 103, 121, 128, and 139 positions, only D103E was found that could not compensate the secretion ability of XC1713. In this study XpsG-F120 protein which seven residues DHHHHHV inserted downstream of F120 is constructed, that could not compensate the secretion ability of XC1713. Subcellular

distribution analysis shows XpsG-F120 protein present in the insoluble (membrane) fraction of lysed cell. Gel filtration analysis found that XpsG-F120 protein appears dissociable by Triton X-100 or DOC treatment. Besides, this mutant protein was distributed in cytoplasmic membrane by sucrose gradient, differs from wild type XpsG in both cytoplasmic and outer membrane. These results indicated that XpsG protein form pilus-like structure from cytoplasmic membrane to outer membrane. In order to understand the relation of other Xps protein for XpsG MF distribution, each *xps* gene knockout strain MF was analysis by sucrose gradient. This experiment show that XpsG was distributed in outer membrane more than in cytoplasmic membrane when *xpsH* or *xpsD* gene knockout strain, so it is thought that XpsH and XpsD have relation to XpsG MF distribution. But what role XpsH and XpsD for XpsG MF distribution were unknown, it is need to future studying.

二、緣由與目的

葛蘭氏陰性菌之細胞膜分為內膜與外膜，中間區域為膜外漿(periplasm)。蛋白質如果要分泌到細胞外，必須要通過內膜、膜外漿及外膜才能到達胞外。由於胞外蛋白的種類有很多，因此葛蘭氏陰性菌在演化時發展出三種系統來進行胞外蛋白質的分泌 [1, 2]，其中 Type II pathway (又稱為 general secretion pathway, GSP) 為三種中常見的一種，是 signal sequence-dependent，有 *sec* 基因參與，

Klebsiella oxytoca 之 pullulanase 分泌為一典型例子。其分泌機制分成兩階段，第一階段為蛋白以 sec-dependent pathway 通過內膜到達膜外漿；第二階段則以 pul 基因群(gene cluster)所表現之蛋白形成外膜分泌機器，將到達膜外漿之蛋白送至胞外。在 1990 年代，Pugsley 所領導的實驗室[3, 4]首先自 *Klebsiella oxytoca* 染色體中選殖到一 18.6-kb 之 DNA 片段[5]，此片段涵蓋了 pullulanase 之結構基因 *pulA* 以及所有參與 pullulanase 分泌之基因群，從 DNA 順序知此片段含有十三個基因 (pulC-0)，這些基因對 pullulanase 之分泌都是必須的[6-9]。繼 pulC-0 基因群被發現後，陸續有其他參與葛蘭氏陰性菌外膜蛋白分泌系統之基因群被發現[10-17]，例如 *Erwinia chrysanthemi* (Out)，*Pseudomonas aeruginosa* (Xcp)，*Aeromonas hydrophila* (Exe)，*Xanthomonas campestris* (Xps)，*Vibrio cholera* (Eps)。這些基因群從轉譯的蛋白質順序知有相當高之同源性，依照蛋白質之氨基酸順序，以 pulC-0 為基準，一一命名，並且定義為一般分泌途徑終端主分支。

在這些基因群中最引人注意的 GspG、H、I、J，因為它們 NH₂-端 signal peptide 與 type IV fimbriae (pilin) 有同源性。pilin 普遍存於葛蘭氏陰性菌之細胞表面，其功能是可吸附在其他細胞表面之接受器上。至於 GspG、H、I、J 是內膜蛋白[18]，因此在外膜蛋白分泌系統中被認為很可能會形成一 pilus-like 之構造，以連接外膜分泌系統中其他重要之蛋白質[19]。然而此 pilus-like 之構造到目前為止一直未被鑑定出，Lory 所領導的實驗室[20]最近以 cross-linking 分析 Pila 與 GspG、H、I、J，發現 GspG 可與 GspHIJ 及

Pila 分別形成 dimers，因此推測這些 dimer 複合體是屬於一龐大複合體的一部份，但是此龐大複合體受限與分析法，所以目前只能偵測到 dimers；另一種推測是這些複合體屬於胞外蛋白分泌過程中所必需之中間物(intermediate)，由於它們與分泌機器的組合及解離，因而造成蛋白質的分泌[20]。而 Sauvonnnet 等人最近將 *Klebsiella oxytoca* 的 pul 基因群送入 *E. coli*，結果以電顯觀察，發現 PulG 會形成 pilus-like 管束[21]。這是第一個實驗證據，證明 PulG 會形成類似纖毛的結構。但此管束並未在 *Klebsiella oxytoca* 中發現，所以該發現的真正生理意義仍有待進一步的研究。

本實驗室過去對 XpsG 蛋白的研究發現，將十字花科黑腐致病菌野生株 XC1701 以超高速離心後，區分成可溶部份(包括細胞質、胞外漿質)及不可溶部份(細胞膜)，而 XpsG 蛋白會同時分佈在細胞質/膜外漿質與細胞膜兩部分。再以膠質篩濾層析法分析可溶部份及不可溶部份時，發現可溶部份的 XpsG 主要以 multimer 型式存在，不可溶部分以 dimer 型式存在。當 XpsG 蛋白大量表達時，在胞外可偵測到 XpsG 蛋白。由以上實驗結果認為 XpsG 在正常生理狀況下會形成纖毛構造。同時以定位突變法在分別將位於 *xpsG* 基因上第 70、103、121、128、139 高度保留的 Aspartate(D) 改成 glutamate(E)，其中 D70E、D121E、D128E、D139E 能回復 XC1713 胞外酵素分泌功能，只有 D103E 不能回復。

為了進一步研究這些位置對 XpsG 蛋白是否有特殊意義，所以在本研究中，配合限制酶切位與胺基酸的電性，設計在第 69、100、120 位置上插入 7 個胺基酸 (5'DHHHHHV3') 得到突變蛋白。藉突變蛋白的研究來繼續探討 XpsG 在正常生理狀況下的纖毛構造。

三、結果與討論

我們成功得到 F120-I7 插入突變蛋白，此變異蛋白失去將胞外蛋白分泌出細胞的功能，同時不干擾正常 XpsG 蛋白的正常蛋白分泌功能。在細胞分佈上與正常 XpsG 不同，沒有分佈在細胞質、胞外漿質。而以膠質篩濾層析法、蔗糖濃度梯度分析，發現此變異蛋白以 multimer 型式存在，且主要存在內膜上，與正常 XpsG 同時分佈在內、外膜不同。由此推測 XpsG 在正常生理狀況下，會形成橫跨內外膜的纖毛構造。而更進一步利用蔗糖濃度梯度，分析各個 *xps* 基因缺損的菌株中 XpsG 蛋白內外膜分佈，發現在 *xpsH* 及 *xpsD* 基因缺損 (XC1717、XC1708) 的菌株下，其 XpsG 蛋白內外膜分佈有所差異，由此推測在正常生理狀況下，形成橫跨內外膜的 XpsG 纖毛構造與 XpsH 及 XpsD 蛋白有關。

四、計畫成果自評

本研究計畫是三年之計劃，自實施以來進展順利。我們與中興大學胡念台以及呂維茗教授合作多年完成多種 knockout 突變菌株與蛋白之抗體。本研究室接著利用已建立的遺傳工程與蛋白分析系統，比較正常與突變蛋白的差異性，我們的實驗結果強烈的指出 GspG 蛋白在正常生理狀況下，會形成橫跨內外膜的纖毛構造，來參與胞外蛋白的分泌工作。目前上述結果已投稿於 J. Bact.。

五、參考文獻

1. Salmond, G. P. C. and Reeves, P. J. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion 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. 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.
4. Pugsley, A. P. (1993) The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57, 50-108.
5. d'Enfert, C., Ryter, A. and Pugsley, A. P. (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J.*, 6, 3531-3538.
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 the 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-0* operon of the Gram- negative bacterium *Klebsiella oxytoca* UNF5023 that are required for pullulanase secretion. *J. Biol. Chem.*, 264, 17462-17468.
1. Salmond, G. P. C. and Reeves, P. J. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria.,

9. Possot, O., d'Enfert, C., 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. M. and Daniels, M. J. (1991) Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar Campestris: relatedness to secretion systems 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 bacterial: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacterial., *EMBO J.*, **9**, 4323-4329.
13. Jiang, B. and Howard, S. P. (1992) The *Aeromonas hydrophila* exeE gene, required both for protein secretion and normal outer membrane biogenesis, is a member of a general secretion pathway., *Mol. Microbiol.*, **6**, 1351-1361.
14. He, S. Y., Linderberg, M., Chatterjee, A. K., and Collmer, A. (1991) Cloned *Erwinia chrysanthemi* out genes enable *Escherichia coli* to selectively secreted a diverse family of heterologous proteins to its melieu., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 1079-1083.
15. Sandvist, M., Morales, V. 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., Tang, F., Chiang, D.-C., Huang, H.-Y., and Wu, C.-Y. (1992) Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzyme across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*., *J. Bacteriol.*, **174**, 2679-2687.
17. Sandkvist, M., Michel, L. O., Hough, L. P., Morales, V. M., Bagdasarian, M., Koomey, M., J. DiRita, V., and Bagdasarian, M. (1997) General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*., *J. Bacteriol.*, **179**, 6994-7003.
18. Lu, H-M, Motley S. T. and Lory, S. (1997) Interactions 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.
19. Sandkvist, M. and Bagdasarian, M. (1996) Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **7**, 505-511.
20. Hardi, K. R., Lory, S., and Pugsley, A. P. (1996) Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein., *EMBO J.*, **15**, 978-988.