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中外膜傳送機制之研究

Study of the mechanism of outer membrane translocation of extracellular proteins in Xanthomonas campestris

計畫編號：NSC 87-2314-B-040-019
執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日
主持人：陳凌雲　　執行機構及單位名稱：中山醫學院生化所

一、中文摘要

葛蘭氏陰性菌之胞外蛋白分泌系統分為三種，Type II 是其中常見的一種，稱為一般分泌途徑(General Secretion Pathway, GSP)。該系統之蛋白分泌主要分成兩階段：第一階段是蛋白必須先通過內膜到達膜外漿(periplasm)，第二階段則是蛋白從膜外漿穿過外膜到達胞外。內膜分泌系統早自 1980 年代開始研究，分子機制已相當清楚。至於外膜分泌機制的研究則起步較晚，從 1990 年開始，詳細之分子機制知之甚少。在本研究中，我們主要以本研究室已建立之生化與遺傳方法對葛蘭氏陰性菌蛋白質外膜分泌系統做一非常有系統的探討，目標是確定細胞膜上是否確實有一傳送機器來進行蛋白質的分泌工作。目前我們與中興大學胡念台教授及呂維茗副教授合作，現已製備好 XpsDFGLMN 六個蛋白的抗體，而 XpsEHIJKO 六個蛋白的抗體則正在製備中；至於在 knockout 突變菌種方面，已製備好ΔxpsDFGKLMN，而ΔxpsEHIJ 突變菌種則正在製備中；以蔗糖密度梯度分析及膜蛋白差別溶解分析(detergent differential solublization)證明 XpsG 是內膜蛋白；以膠質篩濾層析法證明 XpsG 的分子型式是以 higher-order 的結構存在，此結構非常不穩定，在第二次膠質篩濾層析或緩衝液中含有 EDTA 時，均會發生解離，但在不同 detergent 下，此結構又會呈現不同的穩定性，上述結果現已在投稿中。

關鍵詞：葛蘭氏陰性菌、一般分泌途徑、蛋白分泌

Abstract

In Gram-negative bacteria, the proteins translocation machineries are classified into three type. Protein secretion via the type II pathway, which is signal sequence-dependent and via the periplasm, is one of the most common pathway. Proteins secreted to the extracellular medium through this pathway are divided to two-step process. The first step is thought to be identical to the process of *sec*-dependent export to the periplasm in *E. coli*. The second step involved the movement of the periplasmic form of the proteins across the outer membrane is not much understood. In this study, We want to know whether XpsG, H, I and J could form pilin-like structure. We had prepared XpsG antibodies. XpsH, XpsI and XpsJ antibidies were still preparing. By performing sucrose gradient ultracentrifugation and detergent differential solublization, we demonstrated that the XpsG

is an inner membrane protein. Furthermore, by analyzing the XpsG protein elution profile from gel filtration chromatography, we found that it appears in higher-order structures ranging in size from 30 to 600 kDa. These species varied in their mobilities upon non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Further analysis indicated that the high-molecular-mass multimers were unstable when 1 mM EDTA was present in the chromatography buffer, or upon a second gel filtration chromatography. On the other hand, the XpsG protein appeared in complexes with sizes greater than 200 kDa, when the column buffer contained, instead of DOC, CHAPS or OG. The XpsG-containing, high-order structures observed in this study could be the pilus-like structure proposed for the pilin-like protein family.

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-O),這些基因對 pullulanase 之分泌都是必須的[6-9]。繼 pulC-O 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 *Erwinial 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-O 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 NH_2-端 signal peptide 與 type IV fimbrie (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於分析法，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]。

由於 cross-linking 分析法本身在實驗驗證上略嫌粗糙。所以本研究計劃擬以更精細的膠質篩濾及免疫親和性等管柱層析法來分析上述之複合體。以期證實 GspGHIJ 是否會形成 pilus-like 結構；是否有龐大的傳送機器存在於細胞膜上。

三、結果與討論

我們已製備出 XpsG (GspG)的抗體，至於 XpsH、I、J 則因全長蛋白無法在 *E. coli* 表達，現正縮小表達蛋白的長度以製備抗體。以蔗糖密度梯度分析及膜蛋白差別溶解分析(detergent differential solublization)，證明 XpsG 是內膜蛋白；以膠質篩濾層析(gel-filtration chromatography)分析，發現 XpsG 在層析緩衝液中含有清潔劑 DOC 時，會形成相當複雜之複合體，分子大小從 30 kDa 到 600 kDa，為了方便敘述，將此類複合體分別命名為 XpsG-L 與 XpsG-S。XpsG-L 非常不穩定，在第二次膠質篩濾層析或在層析緩衝液中加入 EDTA 時，XpsG-L 會轉變成 XpsG-S；但當層析緩衝液中含有清潔劑 CHAPS 或 OG 而非原有之清潔劑 DOC 時，XpsG-S 會轉變成 XpsG-L。未來擬進行下列的工作來探討 GspGHIJ 是否會形成 pilus-like 結構；是否有龐大的傳送機器存在於細胞膜上：1. 建立免疫親和性層析法分析系統，以了解 GspGHIJ 的 multimer 型式為 homo-或 hetero-。2. 以同源重組交換法(homologus recombination)製備 *xpsG*、*H*、*I*、*J* 的 knockout 突變菌株，以互補法(complementation test)來了解 *xpsG*、*H*、*I*、*J* 是否為蛋白分泌的必須基因；另外在 knockout 突變菌株中了解，當某一基因產物不存在時，是否會影響到其他基因產物的穩定度、細胞內的位置及複合體的存在。3. 以刪除或定點突變法來細部了解 XpsGHIJ 蛋白與蛋白間的結合區域所在位置。

四、計畫成果自評

本研究計畫自實施以來進展順利，目前與中興大學生化所胡念台教授及農科所呂維茗副教授已通過國科會三年計畫，準備對葛蘭氏陰性菌外膜分泌機制做一有系統有規模的研究。knockout 突變菌株 xpsDFGKLMN 製備已完成，至於 xpsEHIJ 則正在製備中;抗體部份已完成 XpsDFGLMN，XpsEHIJK 則正在製備中；分析系統方面，生化的層析法與遺傳的突變法已相當成熟。相信未來實驗的成功對於蛋白外膜分泌機制的了解將有極大的幫助。

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-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, 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 *Erwinial 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. Microbil.,* **6**, 1351-1361.
14. He, S. Y., Linderberg, M., Chatterjee, A. K., and Collmer, A. (1991) Cloned *Erwinial 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. Microbil.* **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.