

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

假纖毛蛋白 XpsK 在十字花科黑腐病菌 Type II 蛋白分泌系統中的功能探討 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2311-B-040-004-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系生物化學科

計畫主持人：陳凌雲

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：莊政益、張雅惠、趙俊卿、許闊顯

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 01 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱) 假纖毛蛋白 XpsK 在十字花科黑腐病菌 Type II 蛋白
分泌系統中的功能探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2311-B-040-004-

執行期間：95 年 08 月 31 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：陳凌雲

共同主持人：

計畫參與人員：莊政益、趙俊卿、張雅惠、許闊顯

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系生物化學科

中 華 民 國 96 年 10 月 31 日

中文摘要

關鍵詞：類纖毛蛋白、格蘭氏陰性菌外膜蛋白分泌機器

十字花科黑腐病菌為格蘭氏陰性菌的一種，會利用第二型分泌系統分泌蛋白而感染宿主。分泌的蛋白會先藉由 Sec-dependent 系統到達膜間質，再由一群 12~14 個蛋白所組成的分泌機器將分泌蛋白運送出細胞外。其中 XpsG、H、I、J 和 K 蛋白 NH₂-端與第四型纖毛生成系統中的纖毛組成蛋白有同源性，推測可在內外膜之間組裝成類纖毛構造，並推動分泌蛋白進入外膜通道。過去的研究發現 XpsG 蛋白是類纖毛的主要組成，且橫跨於內外膜之間，另外，XpsH 可調節 XpsG 與 XpsJ 之間的交互作用，並推測類纖毛蛋白的排列順序為 XpsG-XpsI-XpsH-XpsJ。由於 XpsK 抗體已製備完成，因此本實驗藉由鎳離子親和性管柱探討五個類纖毛蛋白 XpsG、H、I、J 和 K 在各個缺損株中的交互作用情形。結果發現 XpsI 可以抑制 XpsH 與 XpsJ 彼此間的交互作用，說明了 XpsI 可能扮演一個會與 XpsH 競爭 XpsJ 的負調控角色。另外，發現 XpsK 可促進 XpsI 與 XpsJ 彼此間的交互作用，說明 XpsK 可能位於 XpsI 與 XpsJ 之間而扮演一個正調控的角色。同時也發現 XpsH、XpsI 與 XpsK 可能以兩兩結合(XpsH-XpsI、XpsH-XpsK 和 XpsI-XpsK)的形式出現。綜合以上的結果推測類纖毛的生合成遠比想像中還要複雜，需要更多實驗加以釐清。

Abstract

Keywords: pilus-like protein, Gram-negative bacteria outer membrane protein secretion machinery

Xanthomonas campestris pv. *Campestris* is one of the Gram-negative bacteria which secretes protein to infect plants by type II secretion system. The secreted protein can reach to periplasm by the Sec-dependent system, and to export from cellular matrix by a machine composed of 12~14 proteins. The N terminal of XpsG, H, I, J and K protein are homologous with the pilin of type IV secretion system, those are predicted to be assembled into a pilus-like structure between the cytoplasmic and outer membrane. The pseudopilus is presumed to push exproteins into the outer membrane. On previous studies showed that XpsG was a mainly composed of pseudopilus to span between inner and outer membrane, and could regulate the interaction between XpsG and XpsJ, and thought that XpsG, I, H and J should act sequentially in such order. We have prepared specific antibody against XpsK that be used to analyze the interaction between XpsG, H, I, J and K in various bacterial strains with different *xps* gene knockout after Ni²⁺ affinity chromatography. Result revealed that XpsI could inhibit the interaction between XpsH and XpsJ, and act as a negative regulator. XpsK could promote the interaction between XpsI and XpsJ, act as a positive regulator. Take together, we believed that XpsG and XpsJ are located at a extremity of pseudopilin complex, and there are three interaction forms between XpsH, I and K, including XpsH-XpsI, XpsH-XpsK and XpsI-XpsK. We believe that the composed of the pseudopilus is a complicated mechanism, and need more experiments to explain any possibility.

前言

格蘭氏陰性菌可以藉由分泌蛋白質或是纖毛的生長去感染宿主細胞。目前已知格蘭氏陰性菌可以透過六種途徑將蛋白質分泌到細胞外(Sandkvist, 2001)。分別是 Type I ~ Type VI、TPS (two partner secretion)和 Autotransport pathway。其中第二型分泌系統 (Type II secretion system)的組成蛋白在不同的菌中有不同的簡稱，而目前使用廣泛的名詞為“Gsp”。分泌蛋白是透過兩個階段被分泌出胞外。首先，剛被合成的蛋白質會被位於內膜上的 Sec 蛋白複合體 (SecA、SecYEG 為運送核心部位; SecD 和 SecF 為調節部位) 所辨識而利用 leader peptidase 將蛋白質 NH₂-端的一段訊息序列切除，此時分泌蛋白會被帶至膜間質 (periplasm) 中(de Keyser et al., 2003)。第二階段就由分別位於內外膜中的 12~16 種蛋白組成一套運送機器(Pugsley et al., 1997)，將分泌蛋白質運送出細胞外而完成蛋白分泌工作(Thanassi and Hultgren, 2000)。GspG_T、H_U、I_V、J_W、K_X 位在內膜上的蛋白，又稱為 pseudopilins。除了 GspK_X 外 GspG_T、H_U、I_V、J_W 都與 Type IV pilin 序列的 NH₂-端 (G - 1, F + 1, E + 5) 相似。在 *in vivo* 的環境下由於 pseudopilins 太短，所以難以辨識其所處的部位，但藉由 GspG_T 大量表達的方式可觀察到部分出現在外膜上(Bally et al., 1992)⁵，推測這些蛋白經由切割後可能會改變原本位置而座落到外膜上。利用 *in vivo* 的化學鏈結實驗發現有 dimers 的形成(Lu et al., 1997)，而彼此的相對量 GspG_T : GspH_U : GspI_V : GspJ_W 分別是 16 : 1 : 1 : 4(Nunn and Lory, 1993)。利用 Immunogold-labeling 電顯觀察發現此構造是以 GspG_T 為主要成份(Sauvonnet et al., 2000)。若將 GspG_T 大量表現後會在細胞表面發現 pseudopili 產生，但此構造卻會造成蛋白無法正常分泌(Durand et al., 2003)，有可能是佔據或影響了正常分泌通道所導致。所以推測 pseudopilus 的構造應該是橫跨膜間質之間，而沒有延伸到細胞外(Hu et al., 2002)。我們推測 pseudopilus 長度的控制是藉由這五個 pseudopilins 的含量比例所調控，一旦超過某個閾值 (threshold) 時，pseudopilus 的長度就會失控而延長出胞外。

本實驗室已初步得知 XpsH 調節 XpsG 與 XpsJ 之間的交互作用(賴祥玲, 2002)，而 XpsJ 扮演 pseudopilus 的 Tip 構造(程俊嘉, 2003)，由宏偉學長論文(2002)初步推測 pseudopilin 彼此交互作用的順序為 XpsG-XpsI-XpsH-XpsJ。由於 XpsK 是 pseudopilin 成員之一，目前對其了解不多，所以本篇論文是藉由置備 XpsK 抗體後，來探討 pseudopilin 彼此間的交互作用。主要是利用鎳離子親和性管柱 (nickel chromatography column) 來分析，結果發現 XpsI 蛋白可抑制 XpsH 與 XpsJ 彼此間的交互作用，而扮演一個負調控的角色。XpsK 則可促進 XpsI 與 XpsJ 之間

結合，而扮演一個正調控的角色。

文獻探討

- 賴祥玲 (2002). Study of the interactions between XpsG、H、J in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 私立中山醫學大學生物化學研究所碩士論文.
- 程俊嘉 (2003). Study of the role of XpsJ protein in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 私立中山醫學大學生物化學研究所碩士論文.
- 郭宏偉 (2004). Study of the interactions between XpsG, H, I, J pseudopilins in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. 私立中山醫學大學生物化學研究所碩士論文.
- 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.
- de Keyzer, J., van der Does, C., and Driessen, A. J. (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci* 60, 2034-2052.
- Durand, E., Bernadac, A., Ball, G., Lazdunski, A., Sturgis, J. N., and Filloux, A. (2003). Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. *J Bacteriol* 185, 2749-2758.
- Hu, N.-T., Leu, W.-M., Lee, M.-S., Chen, A., Chen, S.-C., Song, Y.-L., and Chen, L.-Y. (2002). XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. *Biochem J* 365, 205-211.
- 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.
- 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.
- Pugsley, A. P., Francetic, O., Possot, O. M., Sauvonnet, N., and Hardie, K. R. (1997). Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. *Gene* 192, 13-19.
- Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40, 271-283.

Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A. P., and Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *Embo J* 19, 2221-2228.

Thanassi, D. G., and Hultgren, S. J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 12, 420-430.

結果

XpsG、H、I、J、K 蛋白交互作用的探討

a. 觀察 XpsH-his₆ 與其他 pseudopilin 蛋白的交互作用

初步實驗得知 XpsG、H、I、J 四個蛋白具有交互作用形成複合體，且排列順序為 XpsG-XpsI-XpsH-XpsJ。由於 XpsK 抗體已經置備完成，所以將加入 XpsK 蛋白來加以探討，進一步釐清 pseudopilins 之間的交互作用以及可能存在的順序位置。利用鎳離子親合性管柱色層分析為實驗基礎進行分析，在 XC1717(Δ xpsH)/H-his₆ 及 XC1717(Δ xpsH)/pFH(做為對照組)的背景觀察 XpsG、H、I、J、K 五個蛋白交互作用情形。藉由 nickel column 所得的 sample 經分析發現 XpsH、I 和 K 可能有交互作用。接著以 XpsH 接 His-tag 分別在不同的 pseudopilins 缺損株 XC1713 (Δ xpsG)、XC1716 (Δ xpsI)、XC1718 (Δ xpsJ) 和 XC1721 (Δ xpsK) 進行分析。由初步實驗知 XpsG 是位在複合體的最外面，因此推測當缺少 XpsG 時應不影響其他 pseudopilin 的交互作用。為了證實此推論所以用 XC1713(Δ xpsG)/H-his₆ 及 XC1713(Δ xpsG)/pFH 背景下探討。結果發現當 XpsG 缺少的情況下，的確不影響其他 pseudopilins 形成複合體，更加證實 XpsG 是在複合體的最外端。若遵循排列順序 XpsG-I-H-J 的結果時，推測可以在 XC1718(Δ xpsJ) 環境下當 XpsJ 蛋白不在時將不會影響之前的交互作用。由 nickel column 實驗知 XpsH-his₆、XpsI 和 XpsK 複合體的形成不受 XpsJ 影響，所以 XpsJ 蛋白可能位在複合體的外端。最後分別在 XC1716 (Δ xpsI) 及 XC1721 (Δ xpsK) 的環境下以 XpsH 接上 His-tag 來釐清彼此的順序。結果顯示當 XpsI 不存在時除了如預期 XpsH-XpsK 有交互作用外，另外也意外的發現 XpsJ 亦會與 XpsH-XpsK 有交互作用，此結果說明了 XpsI 的不存在有利於 XpsH 與 XpsJ 之間的交互作用，XpsI 可能扮演一個負調控的角色；若當 XpsK 不存在時，XpsH 與 XpsI 仍然有交互作用，表示上述 XpsI-XpsH-XpsK 或 XpsI-XpsK-XpsH 兩種可能結合順序是以 XpsI-XpsH-XpsK 較為正確。總結上述實驗 XpsG、H、I、J、K 的排列順序在 XpsI 不存在時，很可能為 G-H-K-J；而 XpsI 存在時，則轉變為 I-H-K。利用 XpsH-his₆ 在不同的缺損株 XC1713(Δ xpsG)、1717(Δ xpsH)、1716(Δ xpsI)、

1718($\Delta xpsJ$)、和 1721($\Delta xpsK$)已初步得知 XpsI 的存在會抑制 XpsH 與 XpsJ 之間的交互作用，且 pseudopilins 間可能的排列順序是 XpsI 不存在時，為 G-H-K-J。為了加以證實以上的結果，於是利用 XpsJ-his₆ 同樣地送入各個缺損株中來觀察結果為何。首先在 XC1718($\Delta xpsJ$) 的環境下以 XC1718/pFJ 作為對照組觀察互補菌株中的 pseudopilins 交互作用情形。結果發現只有 XpsI、XpsJ、XpsK 三者有交互作用產生。若依照先前利用 XpsH-his₆ 在不同類纖毛蛋白缺損株中的實驗結果顯示：XpsH-XpsI-XpsK 三者有交互作用的情況產生，在本實驗中 XpsJ-his₆ 既然會與 XpsI 有交互作用，則 XpsJ-his₆ 應該會與 XpsH 有交互作用產生，但為什麼沒有觀察到此現象？我們的解釋是 XpsH、XpsI 和 XpsK 三者可能存在一個兩兩結合的複合體 (XpsH-XpsI、XpsH-XpsK 及 XpsI-XpsK)，所以當利用 XpsJ-his₆ 所抓下的複合體可能是以 XpsI-XpsK 的形式出現，且 XpsJ-his₆ 不會與 XpsH-XpsI 複合體結合。

接下來仍是釐清 XpsG 的位置是否與先前實驗相符，所以在 XC1713 ($\Delta xpsG$) 的環境下觀察以了解當 XpsG 不存在時，是否會影響原有的蛋白交互作用。結果得知(圖十四)，XpsG 不存在時同樣也不會影響 XpsI-XpsK-XpsJ 之間的交互作用，此實驗結果也說明了 XpsG 可能位在複合體最外端。另外由前面 XpsH-his₆ 的實驗得知 XpsI 可以對 XpsH 與 XpsJ 交互作用進行負調控。因此想了解在 XC1716 ($\Delta xpsI$) 的環境下送入 XpsJ-his₆ 來觀察結果是否一致。由結果顯示當 XpsI 不存在時，XpsH 與 XpsJ 便有交互作用的情形發生，更加證實之前 XpsI 所扮演的角色。最後要釐清 pseudopilins 這五個蛋白彼此間之交互作用順序，於是分別觀察在 XC1717($\Delta xpsH$)與 XC1721($\Delta xpsK$)的環境下 XpsJ-his₆ 與其他 pseudopilin 交互作用的情形為何。首先得知當 XpsH 不在的情況下，XpsJ-his₆ 仍可以與 XpsI 及 XpsK 有結合產生。也符合了先前的互補菌 (XC1718/pFJ-his) 實驗中，XpsJ-his₆ 所抓到的是 XpsI-XpsK 的複合體，而不受 XpsH 的有無所影響。另人驚訝的發現是在 XC1721($\Delta xpsK$)的環境下發現，當 XpsK 不在時，XpsJ 無發法再跟其他 pseudopilins 有交互作用，XpsK 可以促進 XpsI 與 XpsJ 彼此間的交互作用，而扮演一個正調控的角色。

綜合以上所有實驗結果而得的結論為：1. 推測 pseudopilins 中 XpsG 與 XpsJ 位在複合體最外端，其中的 XpsI、XpsH 和 XpsK 的排列是以兩兩結合的方式呈現(XpsI-XpsH 及 XpsH-XpsK)。2. XpsI 會抑制 XpsH 與 XpsJ 彼此間的交互作用，可能扮演負調控的角色。3. XpsK 會促進 Xps H 與 XpsJ 彼此間的交互作用，可能扮演一個正調控的角色。

為了探討 type II secretion pathway 中類纖毛(pseudopilin)蛋白，XpsG、H、I、J 和 K 之間的交互作用，首要工作便是確定所製備的抗體是否能專一性的辨認所要觀察的蛋白質。本實驗經多年努力並與中興大學胡念台教授合作已成功製備出 XpsG、XpsH、XpsI、XpsJ 與 XpsK 五個類纖毛的抗體與基因缺損菌株。

本研究報告主要的發現是，類纖毛蛋白彼此間的交互作用是相當複雜的，其中 XpsI 蛋白具有抑制 XpsH 與 XpsJ 蛋白之間交互作用，而扮演一個負調控的角色，可能的解釋是 XpsI-XpsH 與 XpsI-XpsJ 結合大於 XpsH-XpsJ，所以在 XpsI 存在下只有 XpsI-XpsK-XpsJ 的交互作用，但無 XpsH-XpsK-XpsJ 的交互作用。另一方面由 XC1718 ($\Delta xpsJ$)/pFJ-his 的實驗已知 XpsJ-his₆ 可以與 XpsI-XpsK 複合體有交互作用形成 XpsI-XpsK-XpsJ 複合體。同時也在 XC1721($\Delta xpsK$)/XpsJ-his 實驗發現 XpsK 不存在時，XpsJ 就無法與 XpsI 有交互作用的情形發生。因此推測 XpsK 蛋白具有促進 XpsI 與 XpsJ 蛋白彼此間的交互作用發生，也就是說 XpsK 可能位在 XpsI、XpsJ (XpsI-XpsK-XpsJ) 之間，扮演一個正調控的角色。