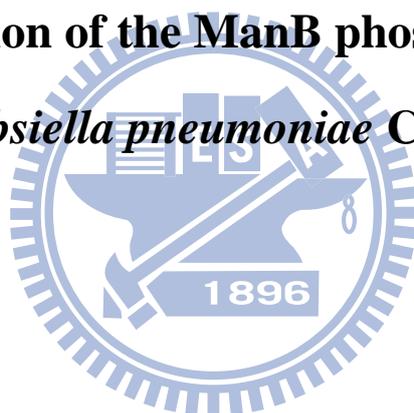


國立交通大學
生物科技研究所
碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中磷酸甘露糖異構酶磷酸化
的特性探討

Characterization of the ManB phosphorylation in
Klebsiella pneumoniae CG43



研究生：萬舉豪 (Chu-Hao Wan)

學號：9928529

指導教授：彭慧玲 博士 (Hwei-Ling Peng)

中華民國一零一年六月

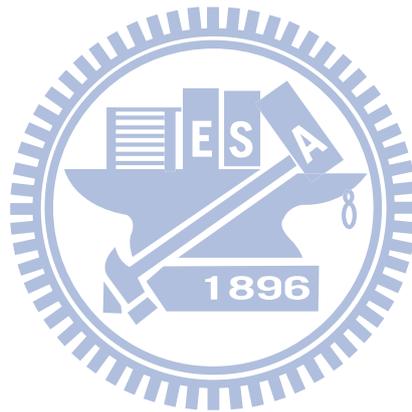
中文摘要

細菌酪胺酸激酶是近年來新建立的蛋白質家族，與真核生物之酪胺酸激酶有著相似的功能。活體外磷酸化實驗證明克雷白氏肺炎菌 CG43 之酪胺酸激酶 Wzc 可以將多醣莢膜基因座上之基因產物包括 6-葡萄糖醛酸脫氫酶 Gnd、甘露糖-1-磷酸鳥苷醯基轉移酶 ManC 及磷酸甘露糖異構酶 ManB 磷酸化，並增加 Gnd 之酵素活性。本實驗建構克雷白氏肺炎菌 CG43 突變株 Δgnd 、 $\Delta manC$ 與 $\Delta manB$ 並分析基因缺失的影響，結果發現 $\Delta manC$ 與 $\Delta manB$ 之多醣莢膜合成量明顯下降而生物膜生成增加，為了證實 ManB 活性與酪胺酸殘基磷酸化的關係，我們藉由比對分析選出可能受磷酸化的酪胺酸殘基做定點突變，接著回補實驗分析發現 *manB* 基因剔除所造成的多醣莢膜含量下降可藉轉殖 $\Delta manB$ 予表現質體 pRK415-*manB*、pRK415-*manBY26F* 或 pRK415-*manB Y341F* 而回補。然而 pRK415-*manBY10F* 僅能回復些微多醣莢膜含量，此暗示著 Tyr10 可能影響 ManB 之活性。而分析全菌裂解液之 ManB 酵素活性發現 Y10F、Y26F 及 Y341F 突變會降低 ManB 酵素活性而以 Y10F 下降程度最大；另外，S98A 突變使 ManB 喪失活性。進一步，在大腸桿菌中大量表現這些重組蛋白，以圓雙色光譜分析這些純化的重組蛋白證實這些酪胺酸殘基突變並不影響 ManB 之二級結構，我們推測 Y10F 可能因降低 ManB 與受質的結合力而影響其催化活性，而 S98 的磷酸化決定其酵素活性。最後，活體外磷酸化實驗顯示單株抗體和 Pro-Q[®] Diamond 均可偵測 ManB 的磷酸化，ManB 的磷酸化些微提升其酵素活性；而 S98A 突變使 ManB 不被磷酸化且活性喪失，而其磷酸化不受酪胺酸激酶或絲胺酸-蘇胺酸激酶的基因缺損影響。

Abstract

Bacterial tyrosine kinases have been recently unified in a new enzyme family because of the similar structural and functional features with their eukaryotic counterparts. Via an in vitro phosphorylation assay, the protein-tyrosine kinase Wzc of *Klebsiella pneumoniae* CG43 was shown capable of phosphorylating the capsular polysaccharide biosynthesis operon *cps* gene products 6-phosphogluconate dehydrogenase (Gnd), GDP-mannose phosphorylase (ManC) and phosphomannomutase (ManB) and the phosphorylation leading to increase of the enzymatic activities. In this study, we generate CG43S3Δ*gnd*, CG43S3Δ*manC* and CG43S3Δ*manB* mutants and the phenotypes analyzed and compared. The analysis revealed that deletion of *manC* or *manB* decreased the glucuronic acid production but increased the biofilm formation. Several of the ManB tyrosine residues were then selected for site directed mutagenesis in order to determine which is the one that subjected to Wzc phosphorylation and if the phosphorylation influences the enzymatic activity. The subsequent complementation analysis revealed that the *manB* deleting effect could be complemented by introducing into the mutant with the ManB expression plasmid pRK415-*manB* or the plasmid pRK415-*manBY26F* and pRK415-*manBY341F* which carrying a point mutation of ManB. Whereas the bacteria CG43S3Δ*manB* carrying pRK415-*manBY10F* exhibited a partially restored phenotype implying the phosphorylation on tyrosine residue 10 of ManB was critical for the enzymatic activity. In addition, the ManB activity was decreased in the bacteria CG43S3Δ*manB* [pETQ33-*manBY10F*] or CG43S3Δ*manB* [pETQ33-*manBY341F*] by comparing to that in CG43S3Δ*manB* [pETQ33-*manB*] or CG43S3Δ*manB* [pETQ33-*manBY26F*]. These recombinant plasmids were then overexpressed in *E. coli* BL21[DE3] and the recombinant proteins purified. The circular dichroism spectra analysis of the purified proteins revealed that the site

directed mutation had no effect on the secondary structure. Finally, the *in vitro* phosphorylation assay showed that the monoclonal antibody and Pro-Q[®] Diamond were able to detect the ManB phosphorylation form and ManB phosphorylation slightly enhanced the enzymatic activity. In addition, the S98 was found to be a critical phosphorylation residue which is required for the enzyme activity. However, the serine phosphorylation was not affected by the deletion of *wzc* or *stk*.



致謝

兩年的碩士生涯轉眼間就要結束了，這時光飛逝的生活節奏並沒有給我太多的空間去仔細的記錄這些生活的點滴，總覺得每天一睜開眼睛就是下意識的洗個澡、刷個牙，然後下意識的出了家門，在來學校的路途上順手買個中…呃，買個早餐帶來學校吃，吃完後就開始準備實驗要用的東西。對我而言，除了久久一次回中壢老家以外，幾乎周一到周日都在學校度過，感覺上實驗室已經取而代之變成了家，而家則成為了沒有客房服務的汽車旅館(笑)，晚上回來洗個澡看個電視，就準備迎接明天的早晨。這兩年來，實驗室帶给了我許許多多有形與無形上的幫助，還記得當初懵懵懂懂的進了這間實驗室，在什麼狀況都還不了解的情景下口出狂言說想要發一篇P開頭的東西…現在想想還真的頗丟臉的。這些日子裡，我最感謝的人無疑是將我帶進這個家庭的彭老師，願意給我這個完全沒有實驗室經驗的人一個機會，並且在我遇到難題的時候，願意陪我一起找尋問題的來源，真的…真的很謝謝老師給我的幫助。歲云與品萱學姐，謝謝妳們給予我實驗上種種的協助與建議，自從妳們這兩朵實驗室之花畢業之後，總覺得實驗室少了些什麼。小波!沒想到我跟妳的緣份竟然從嘉義大學延續到交通大學來了XDD，在這畢業的前夕偷偷跟妳坦白一件事情，其實當初老師說實驗室要多收一位女同學的時候，我真的非常的高興，想說終於可以認識新的女生了，也許能夠順勢讓自己的戀情開花結果，結果…沒想到…竟然…是妳…。Goodbye My Love TAT。大熊，這兩年來被你抓著到處跑，到是讓我有種重新回到大學生時代的感覺，特別感謝你教會我打撞球，讓我以後可以去撞球場騙騙單純天真又無邪的女孩子。力成，呃…，原本以為我跟你這兩個宅男能夠有很多共同的話題，結果沒想到…我跟你宅的領域竟然不一樣ㄟ，沒想到宅的世界也可以如此的寬廣(遠目)。CSI影集一直是我非常喜歡看的節目，由其是邁阿密以及紐約系列。因為我自幼便以偵探自居，人稱辦案不用大腦，破案全靠運氣的低工時高效能偵探簡稱低……以下省略。在這部分的影集裡面，我特別喜歡看邁阿密的警探跨區與紐約的警探

合作的部分，有種王見王的感覺，超酷的！回歸正題，這兩年來，原本以為我的人生就要在交大裏度過，沒想到，我也會有與清大合作的一天=V=(誤)。其實是我要去清大那邊拜託那裡的文藝美少女蕙如學姐幫忙我完成一些實驗。蕙如學姐，坦白說，在遇到妳之前，我一直以為博士班的學長姐好像都不太容易接近~~~但是在遇到妳之後，我改觀了！謝謝妳在這兩年來多次的積極的幫助我完成實驗，真的很謝謝妳一次一次不厭其煩的幫忙我，謝謝妳！祝福妳永遠的青春美麗XD。志賢，說來慚愧，如果我打錯你的名子…你就…也打錯我的名子好了(逃)，想不到要遇到偵探同好是如此的困難，現階段我的偵探能力距離你還有一段差距，但是我相信，我深信！在未來的日子裡我會繼續成長，期待在未來的哪個事件中能夠與你相遇，到時候在來一較高下吧！工藤志賢。柏融~~~~每次報告遇到你心裡都會超級害怕的，還記得碩一時你來我們這邊修課，在同學上台報告完畢時，總是會聽到你率先發問的聲音，那時候聽你問的問題，就知道你不是泛泛之輩。坦白說，我曾跟大熊說過我覺得你是比老師還要可怕的大砲XDDD，該不會哪天你也成為教授了吧=V=。話說回來，最近剛好在帶一批新加入實驗室的初心者，看著她們就讓我想起了兩年前剛進實驗室的自己，也許這就是所謂的時代的傳承吧…就讓這一個研究生的時代在這裡畫下句點，始於夏、終於夏。最後，特別感謝靖婷教授百忙之中從台中北上擔任我的口試委員，給了我實驗上許多很好的建議。特別感謝志生教授抽空擔任我的口試委員召集人，給了我論文寫作上很多很棒的建議，謝謝老師！致謝寫到這了，我人生中最後一個暑假也差不多快過完了。短短兩年雖然短，卻學到許許多多的事情，看到一樣米養出來的百樣人，相較之下，實驗上看到學到的東西似乎微不足道(迷之聲：那是因為你實驗做不多吧！)。最後的最後，對於這兩年中任何幫助過我的人，由衷的感謝妳們！

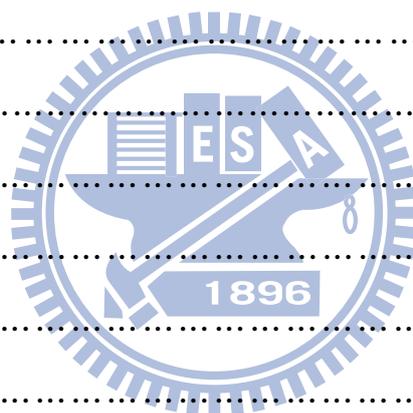
謝謝

舉豪 謹致於

交通大學 生物科技研究所 中華民國一零一年七月

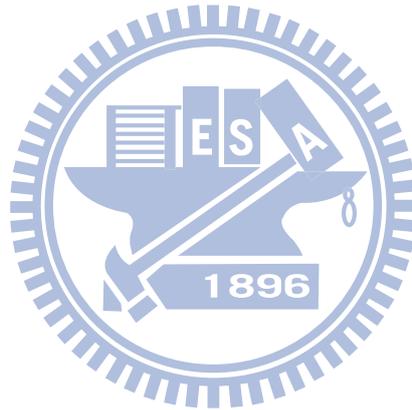
目錄

	頁數
中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
致謝.....	iv
目錄.....	vi
表目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
縮寫.....	x
前言.....	1
實驗材料與方法.....	8
實驗結果.....	15
討論.....	21
相關文獻.....	24
表.....	31
圖.....	37
附錄.....	61



表目錄

	頁數
表一、本次實驗使用與建構之細菌菌株·····	31
表二、本次實驗使用與建構之質體·····	32
表三、本次實驗使用之核苷酸引子·····	35



圖目錄

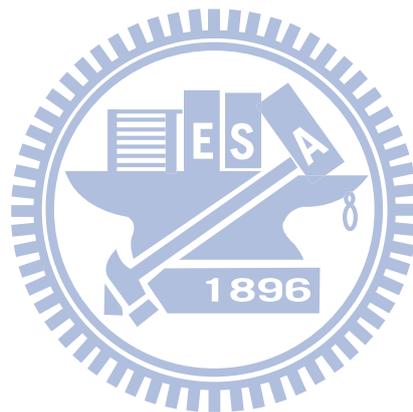
	頁數
圖一、 <i>K. pneumoniae</i> K1 與 K2 莢膜血清型之 CPS 基因座比對 (A) 與標的蛋白質之胺基酸序列 (B)。	37
圖二、多醣莢膜單元醣生成酵素 Gnd、ManC 與 ManB 參與之反應。	38
圖三、 Δgnd 之建構與確認。	39
圖四、 $\Delta manC$ 之建構與確認。	40
圖五、 $\Delta manB$ 之建構與確認。	41
圖六、 <i>K. pneumoniae</i> CG43S3 Δgnd , $\Delta manC$ 與 $\Delta manB$ 突變株之表現型分析。	42
圖七、多醣莢膜單元葡萄糖醛酸之定量。	44
圖八、生物膜生合成能力之測定。	45
圖九、 <i>K. pneumoniae</i> CG43S3 Δgnd , $\Delta manC$ 與 $\Delta manB$ 回補實驗分析。	46
圖十、ManB 序列比對與二級結構預測分析。	47
圖十一、ManB 點突變之表現型分析。	49
圖十二、ManB 酪胺酸殘基定點突變對 ManB 磷酸化之影響。	51
圖十三、以 Pro-Q [®] Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑染色分析 ManB 絲胺酸 98 定點突變對 ManB 磷酸化之影響。	52
圖十四、重組蛋白 ManB 與 Wzc 之誘導表現以及純化。	53
圖十五、純化的重組 ManB 蛋白之圓雙色光譜分析。	54
圖十六、純化 His ₆ -ManB 之酵素活性測定。	55
圖十七、西方墨點法分析 His ₆ -ManB 之磷酸化。	56
圖十八、In vitro 磷酸化實驗對於 His ₆ -ManB 酵素活性之影響。	57
圖十九、In vitro 去磷酸化實驗對於 His ₆ -ManB 酵素活性之影響。	58
圖二十、Pro-Q [®] 染色及分析 His ₆ -ManBS98A 之磷酸化。	59
圖二十一、酪胺酸激酶或絲胺酸-蘇胺酸激酶之基因剔除對 ManB 磷酸化之影響。	60

附錄一、*In vitro* 磷酸化實驗。.....61

附錄二、圖解 *Pseudomonas aeruginosa* PMM/PGM 之催化反應。.....62

附錄三、圖解 QuikChange 定點突變之原理與流程。.....63

圖九附錄圖、ManC 表現質體之建構。.....64



縮寫表

ATP	adenosine triphosphate
BCIP	5- bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
bp	Base pair
CFU	colony forming unit(s)
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CPS	capsular polysaccharide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine-tetraacetic acid
Gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
kb	kilobase(s)
kDa	kiloDalton(s)
LB	Luria-Bertani
ManB	Phosphomannomutase
ManC	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase
μ M	micromolar
mM	millimolar
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PTK	protein-tyrosine kinase
PTP	protein-tyrosine phosphatase
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate

前言

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae 屬腸內菌科，是一伺機性感染的桿狀革蘭氏陰性菌，廣泛分布於大自然環境中包括水以及土壤，以及哺乳類動物的黏膜部位，在健康成人的眼睛、呼吸道、腸胃道甚至是生殖道都可以發現它的蹤跡。*K. pneumoniae* 可在免疫不全的病人身上造成菌血症、敗血症、肺炎、尿道以及呼吸道感染與肝膿瘍，是造成群聚感染以及院內感染常見的病原菌(Podschun et al., 1998; Brisse et al., 2009)。

1989 年，第一株帶有多重抗藥性 *extended-spectrum-beta-lactamase*(ESLB) 基因的 *K. pneumoniae* 在美國境內被發現，隨後高速在全美境內傳播。在某些教學醫院的報告指出，從 1991 年至 1993 年間抵抗 ceftazidime 的 *K. pneumoniae* 比率從 3.6% 成長至 20%。1999 年紐約境內醫院中具有 ESBL 基因的 *K. pneumoniae* 比率更高達 34%。Carbapenems 為當時用來有效治癒多重抗藥性 *K. pneumoniae* 感染之藥物，但很快的在 1990 年初期也出現了具有 carbapenems 抗性的腸內菌，而在接下來的十年也陸陸續續發現了對於 carbapenems 具有抗性的 *K. pneumoniae*，在 2004 年紐約布魯克林的一項監控調查中指出，紐約境內造成感染的臨床 *K. pneumoniae* 中有大約三分之一都帶有水解 carbapenems 的抗性基因 (Patel et al., 2008)。

K. pneumoniae 常見之毒性相關因子包括多醣莢膜(capsule polysaccharide, CPS)、脂多醣(lipopolysaccharide)、螯鐵蛋白(siderophores)與纖毛(fimbriae)；多醣莢膜與脂多醣能夠保護 *K. pneumoniae* 在侵入宿主之後躲過免疫系統例如多型核顆粒球(polymorphonuclear granulocytes)、補體系統等的攻擊；螯鐵蛋白 enterochelin 與 aerobactin 對鐵離子具有高親和力，而且分子量小，有能力競爭結合在宿主蛋白質上的金屬離子，可以幫助 *K. pneumoniae* 攝取生存必須的鐵離子；纖毛可以專一性的辨識並黏附於宿主表面上的特殊受器，繼而繁殖感染宿主。

大多數 *K. pneumoniae* 外表都包覆很厚的多醣莢膜，其菌落型態圓潤、光滑並具有高度黏性，目前被分離出來的莢膜血清型至少有 77 (Pan et al., 2008)種，不同的血清型具有不一樣的毒性，K1 及 K2 血清型毒性最高，也是造成肝膿瘍最主要的血清型。有研究報告顯示 K1 血清型主要造成原發性的肝膿瘍(primary liver abscess)，而 K2 血清型則是導致次發性肝膿瘍(secondary liver abscess)的主因(Liao et al., 2011)。 *K. pneumoniae* CG43 是一肝膿瘍分離的 K2 株，對 Balb/c 小鼠毒性很高，LD₅₀ 只有 10 CFU (Whitfield et al., 1996)。

莢膜生合成

K. pneumoniae CPS 是由 3 至 6 個醣類為重複單元(repeat units)所聚合而成的複雜酸性多醣類，不同的血清型之莢膜其構成的醣類也不同。K1 多醣莢膜的構成單元為 $[\rightarrow 4)\text{-}[2,3\text{-}(\text{S})\text{-pyruvate}]\text{-}\beta\text{-GlcA}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Fuc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ (Ho J-Y et al., 2011)，而 K2 CPS 的構成單元則為 $[\rightarrow 4)\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Man}\text{-}(3\leftarrow 1)\text{-}\alpha\text{-GlcA}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ (Wacharotayankun et al., 1992)。在 *Escherichia coli* 中，依據莢膜生合成的途徑及參與合成的基因之差異分為四群，其中 group 1 與 group 4 之莢膜合成途徑需要 Wzx 與 Wzy 的參與，而 *K. pneumoniae* K2 莢膜生合成途徑與 *Escherichia coli* group 1 血清型莢膜的生合成途徑相似(Whitfield et al., 1999)。

Wzx 與 Wzy 依賴型的莢膜合成途徑：醣類重複單元會以一個脂質載體(undecaprenol diphosphate, und-PP)為中心，並在細胞內膜內依序接上各個醣基團而形成一個重複單元，隨後此重複單元會經由 flippase (Wzx)將其從內膜內翻轉送入膜間質區，再經由 polymerase (Wzy)將重複單元聚合成多醣莢膜並送出外膜。參與 group 2 與 group 3 多醣莢膜聚合與輸送的蛋白質其組成與座落在細胞的位置與 group 1、group 4 相似，但最大的不同在於 group 2 與 group 3 莢膜的多醣鏈是在內膜內聚合，然後經由通道蛋白送出外膜外。在此類的莢膜多醣鏈外釋

的過程中需要 ABC transporter 的幫助，此 ABC transporter 由嵌在內膜上具有穿膜區域的 KpsM 及具有核苷酸結合區域的 KpsT 所組成；KpsT 與三磷酸腺苷結合後改變構型，並與多醣鏈、KpsM 交互作用，經三磷酸腺苷水解後將多醣鏈由 KpsM 送出膜外(Whitfield et al., 2006)。

目前已被研究的 *K. pneumoniae* Chedid K2 血清型 *cps* gene cluster 包含了 19 個開放讀框(open reading frames)，分屬 3 個轉錄單位(transcriptional units)，其中有 4 個基因 *wzi-wza-wzb-wzc* 與 *E. coli* 的相對基因具有高度序列相似性(Rahn et al., 1999)。Wzi 是一外膜蛋白，在 Δwzi 中可以很明顯的看到多醣莢膜大量減少，暗示著 Wzi 參與連接多醣莢膜於細菌表面的工作；嵌在外膜上的 Wza 是一通道蛋白(translocon)，與嵌在內膜上的酪胺酸激酶 Wzc 交互作用而將膜間的多醣莢膜送出外膜；Wzc 是一酪胺酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK)，能自我磷酸化或磷酸化其他蛋白，已知 Wzc 可磷酸化 Ugd 來增加其酵素活性，而 Wzb 酪胺酸去磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTP)，可去除酪胺酸上共價接合的磷酸根 (Dong et al., 2006)。

酪胺酸激酶

已知蛋白質的磷酸化是調控真核細胞多種功能表現的關鍵要素(Hunter et al., 2000)，直到 1980 年代初期，細菌的蛋白質磷酸化與去磷酸化系統才被發現 (Garnak et al., 1979)，細菌的蛋白質磷酸化系統包括雙分子調控系統 (two-component systems, 2CS)、磷酸轉移系統 (phosphotransferase system, PTS) 以及與真核細胞很相似的三磷酸腺苷/三磷酸鳥苷-依賴系統。2CS 系統包含了兩個功能獨特的蛋白質：sensor-kinase 在受到外界訊息刺激時可以藉由消耗三磷酸腺苷將磷酸基團以共價鍵接在自身的組胺酸殘基上，是一自我磷酸激酶；response regulator 以特定的天門冬胺酸殘基接受來自 sensor kinase 的磷酸基團，response regulator 的磷酸化與否決定著其調控功能。PTS 系統同樣也是將磷酸基團接在組

胺酸殘基之上，但是與 2CS 最大的不同在於 PTS 的磷酸基團是由 phosphoenol-pyruvate (PEP) 所提供，然後磷酸基團在一連串的蛋白質中傳遞，最終傳到醣類上。儘管醣類為最終接受者，某些 PTS 中的成員經磷酸化之後可以調控病原菌的毒性以及氮的代謝 (van Tilbeurgh et al., 2001)。在第三個系統中，磷酸化的位置發生於蛋白質的絲胺酸、蘇胺酸 以及酪胺酸，經磷酸化後之蛋白可調控許多的生理反應 (Cozzone, 2005)。

在真核細胞內，酪胺酸激酶及酪胺酸去磷酸化酶協同催化酪胺酸磷酸化以及去磷酸化，此可逆反應影響著許多重要的細胞生理反應，包括訊息傳遞、細胞生長控制與細胞癌化…等等 (Fantl et al., 1993)。有關原核細胞的酪胺酸磷酸化研究，直到 1990 年代中期才漸漸受到重視。第一個酪胺酸磷酸化現象在 *E. coli* 中被發現 (Manai et al., 1983)，而第一個原核生物的酪胺酸激酶卻是在 *Acinetobacter johnsonii* 中發現，首例發現的酪胺酸激酶 Ptk 是一個分子量為 81 kDa 的自我磷酸化激酶，在三磷酸腺苷存在之條件下可以磷酸化多個蛋白質的酪胺酸殘基 (Vincent et al., 1999)。近年來，許多 Ptk 同源蛋白陸續在革蘭氏陽性及陰性菌中被發現，這些具有 PTKs 的細菌也具有 PTPs 來拮抗 PTKs 磷酸化所造成之影響，PTKs 與 PTPs 的基因多半坐落在與製造及運輸多醣莢膜或外釋型多醣 (exopolysaccharides) 有關的基因座上；原核生物的 PTKs 擁有與 MinD/Mrp ATPase 家族相似的特性，在結構上與真核生物的酪胺酸激酶差異很大，因此被歸類到新的蛋白質家族稱為 BY-kinase 家族 (Bacterial tyrosine kinase family)；至今，在其它物種內仍未發現與 BY-kinase 相似的蛋白質，也因為與真核 PTKs 不相似，所以 BY-kinase 在抗菌療法中被視為一個很好的標靶 (Cozzone., 2009)。

Proteobacteria BY-kinase 由嵌在膜上的 N-端區域及位在細胞質的 C-端區域組成，C-端區域包含了與核苷酸結合相關的 Walker A 以及 Walker B motifs，也包含了自我磷酸化時被磷酸化的 C-端酪胺酸殘基，同時也是整個酪胺酸激酶活性的來源 (Grangeasse et al., 2002)。雖然催化酪胺酸磷酸化的反應 (包括結合受質，

水解三磷酸腺苷，轉移磷酸根離子…等等)由 C-端區域執行，N-端區域卻在磷酸化反應中不可或缺，C-端區域必須與 N-端區域的近膜區域(juxtamembrane)交互作用才具有酪胺酸激酶活性(Mijakovic et al., 2003; Soulat et al., 2006; Wugeditsch et al., 2001)。Firmicutes BY-kinase 也有相同構型，不同於 Proteobacteria BY-kinase 由一個基因所轉譯出一條多肽鏈所構成，Firmicutes BY-kinase 是由兩個基因分別轉譯出穿膜蛋白和酪胺酸激酶兩條多肽鏈所構成(Grangeasse et al., 2007)。以 *Streptococcus pneumoniae* 為例，BY-kinase 由穿膜蛋白 Wzd 與酪胺酸激酶 Wze 組成並參與新生細胞膜上多醣莢膜的生合成，缺少 Wzd，Wze 則無法聚集在新生細胞膜附近，也無法合成出新的多醣莢膜(Henriques et al., 2011)。

BY-kinase 為自我磷酸化酶，也能磷酸化其它異於自身的蛋白；*E. coli* Wzc 可以磷酸化 UDP-glucose dehydrogenase(Ugd) Tyr70，使其酵素活性增加(Macek et al., 2007)，*K. pneumoniae* Wzc 也可磷酸化 Ugd-Tyr71，並增加其活性(Lacour et al., 2008)；除了 Ugd 外，sigma factor RpoH 或調控 sigma factor 的 modulator RseA 也藉 Tyr 磷酸化來調控基因表現。我們實驗室研究也發現，除了 Ugd 外，*K. pneumoniae* Gnd、ManC 及 ManB 可能也受 Wzc 磷酸化之調控。

磷酸甘露糖異構酶

磷酸甘露糖異構酶 ManB 是一具有雙重活性的酵素，可以催化 mannose-1-phosphate 與 mannose-6-phosphate 之間的轉換，為可逆反應；也可催化 glucose-1-phosphate 與 glucose-6-phosphate 之間之轉換，因此此酵素稱為 phosphomannomutase 或 phosphoglucomutase (Goldberg et al., 1993)。

Phosphomannomutase 基因 *manB* 座落於多醣莢膜基因座上，與相鄰的基因產物共同參與多醣莢膜或外釋型多醣的生合成；除了協助製造 colanic acid 的 building block guanosine diphosphate fucose 外，也製造多醣莢膜或外釋型多醣的 building block GDP- mannose；如 *K. pneumoniae* K1 莢膜上的 fucose 即由 mannose 轉化而

來(Ho et al., 2011)，而 K2 莢膜則由 mannose 與 glucose 所構成。在 *Mycobacterium tuberculosis* 中，phosphomannomutase 參與 lipoarabinomannan(ManLAM)的合成，ManLAM 類似宿主細胞表面的分子(molecular mimicry)，包圍在菌體外可藉由與 C-type lectins 結合而進入宿主細胞內造成感染。

在 2006 年，一篇針對 *Pseudomonas aeruginosa* 的 ManB 酵素活性區域的研究指出，胺基酸絲胺酸 (Ser108)在催化 glucose-1-phosphate 到 glucose-6-phosphate 反應扮演非常重要且關鍵的角色，在反應中先將第 108 絲胺酸磷酸化，然後以共價鍵接在 glucose-1-phosphate 這個 6 號碳上，形成中間產物 glucose-1,6-bisphosphate，再經由分子翻轉使得 1 號碳接近 Ser108，再以 1 號碳上的磷酸根共價鍵接回 Ser108，並釋出產物 glucose-6-phosphate (Regni et al., 2006)。最近一篇 2009 年發表的文獻指出 *K. pneumoniae* K2044 之 ManB 在第 26 號酪胺酸上帶有磷酸根，而將此酪胺酸定點突變成不能被磷酸化之苯丙胺酸後並不會影響細菌之莢膜型態(Lin et al., 2009)。

6-葡萄糖醛酸脫氫酶

6-phosphogluconate dehydrogenase(Gnd)是座落於多醣莢膜基因座上 *gnd* 基因轉譯後之產物，催化 6-phosphogluconate 轉變為 ribulose-5-phosphate(Ru5P)。此酵素參與 pentose phosphate pathway 的催化反應，是相當重要的醣類代謝途徑，維持細胞內 NADPH 的水平並提供核苷酸合成所需要的前驅物。Gnd 酵素之胺基酸與基因序列在不同細菌內都保有相當高的相似度(Nelson, 1994)。Gnd 酵素的 3D 結構、活性部位及催化機制在早期就被研究透徹 (Adams et al., 1994)，此酵素是經由 Lys183 及 Glu190 催化反應：先氧化 6- phosphogluconate 3 號碳上的氫氧基，釋放出 NADPH 並產生酮基，接著 decarboxylation，釋放出二氧化碳並形成 1,2-enediol Ru5P，最後經由互變異構反應(tautomerization)形成 Ru5P (Hanau et al., 2010)。

甘露糖-1-磷酸 鳥苷醯基轉移酶

甘露糖-1-磷酸 鳥苷醯基轉移酶(mannose-1-phosphate guanylyltransferase or GDP-mannose pyrophosphorylase ; ManC)基因與 *gnd*、*manB* 一同座落於多醣莢膜基因座，位置介於 *gnd* 與 *manB* 之間。ManC 與 ManB 協同將 mannose-6-phosphate 轉變成 GDP-mannose，而 GDP-mannose 為 *K. pneumonia* K2 莢膜的主要結構分子。GDP-mannose 可經由 GDP-mannose dehydratase 與 GDP-fucose synthetase 作用後轉變成構成 K1 莢膜的醣類元件 GDP-fucose，因此 ManC 在 *K. pneumonia* 的莢膜生合成中扮演相當重要的角色。ManC 催化的反應為： $\text{mannose-1-phosphate} + \text{guanosine triphosphate(GTP)} \rightarrow \text{diphosphate} + \text{GDP-mannose}$ 或 $\text{diphosphate} + \text{GDP-mannose} \rightarrow \text{mannose-1-phosphate} + \text{GTP}$ (Ho et al., 2011)。

研究目標

根據本實驗室先前的研究顯示 Ugd 酪胺酸磷酸化會增加酵素活性(附錄一、李, 2006), 除外, 我們在 *in vitro* 磷酸化實驗發現 Gnd、ManC、及 ManB 也會被 KP-Wzc 酪胺酸激酶磷酸化, 磷酸化的酪胺酸位置不明。本實驗目的在確立 Gnd、ManC 與 ManB 對於克雷白氏肺炎菌 K2 多醣莢膜生合成之影響, 進一步探討酪胺酸磷酸化對 Gnd、ManC、及 ManB 活性之影響, 並確認被磷酸化之酪胺酸位置。

實驗材料與方法

細菌菌株、質體及生長條件

本實驗使用之細菌菌株及質體各別詳列於表一與表二，用於鏈聚合酶連鎖反應中作為增幅目標基因之模版之核酸源自於林口長庚紀念醫院臨床分離株 *K. pneumoniae* CG43 (K2)，分離自肝膿瘍病患(Peng et al., 1992)。所有細菌皆培養於 37°C、Luria-Bertani (LB; 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l sodium chloride) 液態培養基或固態 LB 洋菜膠培養基上，依不同使用條件再加入不同濃度之抗生素包括 kanamycin (25 µg/ml)、ampicillin (100 µg/ml)、tetracycline (20 µg/ml) 以及 streptomycin (500 µg/ml)。用於增幅目標基因以及建構目標質體所使用之引子詳列於表三。

重組 DNA 之製作

使用於質體建構與核酸切割、修飾之酵素與聚合目標基因之核酸聚合酵素購自於 MBI Fermentas (Hanover, MD, USA) 與 New England Biolab (Beverly, MA, USA)，其反應條件及使用量皆遵循廠商提供之標準作法。鏈聚合酶連鎖反應之核酸片段以 Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid, Taiwan) 所純化，而欲篩選及重建之質體以 High-Speed Plasmid Mini kit (Geneaid, Taiwan) 純化。建構質體與基因所需之引子則由 MDBio, Inc (Taiwan) 合成。所有關於重組核酸之操作及流程皆遵循 Molecular cloning (Sambrook et al., 2001)。保存質體所需之勝任細胞之製備與轉型作用之流程參照 Dower 法(Dower et al., 1988)。

葡萄糖醛酸定量

莢膜多醣類萃取參考已發表的方法(Domenico et al., 1989)，簡述如下：取 500 µl 細菌培養液混和 100 µl 含有 1% Zwittergent 3-14 detergent (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) 之 100 mM citric acid (pH 2.0) 溶液於 1.5 ml 離心管中，以 50°C 加

熱 20 分鐘後離心 14000 rpm、2 分鐘，取 250 μ l 上清液混合 1 ml 絕對酒精並置於 4°C 30 分鐘，再以 14000 rpm 離心 5 分鐘、去除上清液。接著以 200 μ l 蒸餾水回溶沉澱物，加入 1200 μ l 含 12.5 mM borax 的 H₂SO₄ 溶液，混合後加熱煮沸 5 分鐘，待冷卻即加入 20 μ l 呈色劑 0.15% 3-hydroxydiphenol (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI)。測量樣本在波長 520 nm 下吸光值，將所測值對照葡萄糖醛酸含量與吸光值之標準曲線，即可取得樣本內之葡萄糖醛酸含量。最終實驗數值以 1×10^9 CFU 含有多少含量之葡萄糖醛酸表示之。

克雷白氏肺炎菌之細胞裂解液製備與磷酸甘露糖異構酶酵素活性測定

如參考的方法(Sa-Correia et al., 1987; Coyne et al., 1994)，取定量經 IPTG 誘導表現六小時之菌液離心去上清液後用 0.95% 氯化鈉溶液清洗兩次，並以細胞裂解緩衝液(50 mM Tris PH7.5, 10 mM MOPS, 2 mM DTT)重新懸浮後以超音波震盪儀破菌，不可溶的部份經 13000 rpm 離心 10 分鐘後除去，可溶的部份則以 Bradford 法定量蛋白，取 5~10 μ l 裂解液(約 5 μ g 蛋白質)至含 50 mM Tris, 1 mM β -NADP, 10 mM MgCl₂, 0.25 mM D-glucose-1,6-diphosphate(G-1,6- diP), 1 U ml⁻¹ G-6-PdH, 1 U ml⁻¹ PMI 以及 1 U ml⁻¹ PGI 之反應液中，最後加入 10 mM mannose-1-P 開始磷酸甘露糖異構酶催化反應，在 25°C 測量 OD_{340 nm} 吸光值之變化來回推酵素活性。

生物膜形成測定

根據已發表之方法(O'Toole et al., 1998)，將隔夜培養之菌液以 LB 培養基 1:100 稀釋後分注 150 μ l 於 96-孔盤之孔槽中，置於 37°C 培養 12 或 24 小時使生物膜形成後，用水清洗每個孔槽，再以 1% 結晶紫溶液染色 50 分鐘，接著以清水清洗孔槽後加入 1% SDS 溶液，在室溫下震盪 60 分鐘，使結晶紫溶於 SDS 溶液中，最後藉由測定孔槽內溶液在波長 OD₅₉₅ 之吸光值，換算生物膜形成之量。生物膜

形成能力測定之數據，取最具代表性之三重複數據表示。

***K. pneumoniae* CG43 Δ gnd, Δ manC 與 Δ manB 之建構**

本實驗基因剔除之方法是使用同源互換之原理將目標基因從染色體中剔除。首先使用引子將欲剔除基因之兩側片段增幅分離，隨後以 T4 DNA 連接酶(New England Biolab)將兩側片段接入自殺載體 pKAS46(由 New Hampshire 大學博士 Dr. Skorupski 慷慨提供)中，接著將此重組質體以接合方式由 *E. coli* S17-1 λ pir 送入 *K. pneumoniae* CG43S3 中，並使用篩選性之培養基(含有 Ampicillin 與 Kanamycin 之 M9 minimal medium(M9 minimal salts, Sigma))篩選轉型成功之接合株(transconjugants)。隨後將對 Ampicillin 與 Kanamycin 具有抗性之接合株重新培養於含有 Streptomycin 之 LB 固態培養基上，再轉印至含有 Ampicillin 與 Kanamycin 之 LB 固態培養基上。經二次同源互換後，便可以篩選出對 Ampicillin 及 Kanamycin 敏感但對 Streptomycin 具抗性之菌株。最後，再藉由鏈聚合酶連鎖反應來確認標的基因的剔除。

***ManB* 定點突變之建構**

ManB 之定點突變是使用 QuikChange site-directed mutagenesis method (Stratagene)來完成。簡述之，以攜帶 *manB* 基因之保存載體 yT&A 為鏈聚合酶連鎖反應之膜板，並用設計帶有突變點之引子做黏合(表三)，再以 Finnzymes' Phusion™高忠誠性之 DNA 聚合酶做複製。聚合後之產物包含一端帶有未定點突變之母股、以及兩端都為定點突變之子股。我們用對甲基化核酸具有專一性之核酸內切酶 DpnI(目標序列: 5'-Gm6ATC-3')來去除未定點突變之母股。由於鏈聚合酶連鎖反應之產物為線性核酸，在將母股去除後，再以 T4 DNA 連接酶連接線性核酸之兩端，並轉型至質體保存菌株 JM109 中保存(附錄三)。帶有定點突變之 *ManB* 基因以限制酶 *Bam*HI 與 *Eco*RI 將其從保存載體 yT&A 上切下，並接入表

現載體 pET30a 中，再轉型至蛋白質表現細菌 BL21 內表現定點突變之 ManB 蛋白質。

大量表現與純化 His₆-ManB 以及其點突變株

將表現質體 pET30-ManB 與 pET30-ManB mutant 的 *E. coli* BL21 在含有 kanamycin 之 200 ml LB 培養液中培養，待其生長至 OD₆₀₀ 值 0.5~0.6 時，加入 1 mM IPTG 誘導目標基因表現 6 小時，誘導後之細菌以 3700 Xg、離心 10 分鐘去除培養液後回溶於 binding buffer (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、5 mM imidazole、PH7.9) 中，接著以超音波震盪破菌後以 13000 rpm 離心 10 分鐘去除細胞碎片後將破菌之上清液通過管柱層析，被 His₆ 標定之蛋白質會附著於 His-Bind resin(Novagen) 上，隨後被 elute buffer(20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、1 M imidazole、PH7.9) 將 His₆ 標定之蛋白質從 resin 上置換出來，並以 dialysis buffer(50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、1 mM EDTA 與 10% glycerol、PH7.5) 除去純化過程中接觸之多餘的離子，收集之蛋白質再以 SDS-PAGE 確認蛋白質之純度。

大量表現與純化 His₆-Wzc 之細胞質區域

蛋白質表現細菌 *E. coli* BL21 攜帶 Wzc 細胞質片段之表現載體 pET-KpWzcE23 (表二) 於 37°C、含有 kanamycin 之 200 ml LB 培養液中培養。IPTG 誘導蛋白質表現、蛋白質純化之條件以及步驟與 ManB 之純化相似，不同之處在於使用之 binding buffer(50 mM sodium phosphate、300 mM NaCl、10 mM imidazole、10% (v/v) glycerol、pH 8.0)、elute buffer(50 mM sodium phosphate、300 mM NaCl、100 mM imidazole、10% glycerol、pH 8.0) 以及 dialysis buffer(50 mM sodium phosphate (pH 8.0)、150 mM NaCl、5mM MgCl₂、5mM dithiothreitol 與 10% (v/v) glycerol) 成分不同，而 IPTG 使用之濃度、蛋白質誘導時間、破菌之流程以及離心之速度與時

間皆相同。

純化之磷酸甘露糖異構酶酵素活性測定

此實驗中測量磷酸甘露糖異構酶酵素活性之步驟與使用之藥品皆與細胞裂解液之磷酸甘露糖異構酶酵素活性測定相同(頁 9)。簡述差異之處，本實驗取 0.5 μg 純化之 ManB 與 ManB 定點突變株加入反應液中(50 mM Tris, 1 mM β -NADP, 10 mM MgCl_2 , 0.25 mM D-glucose-1,6-diphosphate(G-1,6- diP), 1 U ml^{-1} G-6-PdH, 1 U ml^{-1} PMI 以及 1 U ml^{-1} PGI)，並在加入 10 mM mannose-1-P 後開始測量 OD_{340 nm} 之吸光值讀值。將取得之吸光值讀值對照產物濃度與吸光值之標準曲線後，可得每分鐘、每 μg 酵素可催化反應之速率。

***In vitro* 磷酸化實驗**

In vitro 磷酸化實驗之操作及條件參照下列文獻(Grangeasse *et al.*, 2003)。簡述如下，加入 2 mg 酪胺酸激酶 Wzc 與 4 μg 欲磷酸化之目標蛋白 ManB 於 40 l 混合液(包含 10 μM ATP、25 mM Tris-HCl、1 mM DTT、5 mM MgCl_2 與 1 mM EDTA、PH 7.0)中，在 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘，隨後以 95°C 乾浴槽加熱 10 分鐘終止反應，並執行 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳。電泳後以 Pro-Q Diamond 磷酸蛋白質螢光染劑染色，進而分析蛋白質之磷酸化之狀況。

SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳

欲做 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳之蛋白質先以等比例混和蛋白質染劑(0.0626 M Tris-HCl pH 6.8、2% (v/v) SDS、10% (v/v) glycerol、0.01% (v/v) bromophenol blue、與 100 mM dithiothreitol)，並置於 95°C 乾浴槽上加熱 10 分鐘後，再注入 12.5%(v/v) 之 SDS-聚丙烯醯胺膠中，以 100 V、200 mA 電泳 140 分鐘。電泳完之 SDS-聚丙烯醯胺膠可做西方免疫墨點分析、Pro-Q Diamond 磷酸蛋白質分析與 Coomassie

Blue 染色分析。Coomassie Blue 染色分析先以 Coomassie Blue 染劑(1.2 mM Brilliant blue, 45% (v/v) methanol 與 10% (v/v) acetic acid)染色 20 分鐘，再以退染劑(5% (v/v) methanol 與 7% (v/v) acetic acid)退染 16 小時，隨後觀察色帶大小或色帶與 marker 之相對位置便可得知蛋白質之分子量以及濃度。

酪胺酸磷酸化之西方免疫墨點分析

電泳後的 SDS-聚丙烯醯胺膠以 140 V、400 mA、電泳 140 分鐘將膠上蛋白質轉漬到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride, PVDF)上，轉漬後之 PVDF 膜以第一抗體 anti-phosphotyrosine clone 4G10 antibody (Upstate, catalog # 05-321)偵測磷酸化之蛋白質，再以帶有鹼性磷酸酶之第二抗體 anti-mouse IgG conjugate alkaline phosphatase antibody (Sigma)偵測第一抗體，隨後加入鹼性磷酸酶之受質 nitro blue tetrazolium chloride (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) 便可催化產生有色產物沉澱於磷酸化蛋白質之位置。

圓雙色光譜分析

蛋白質之二級結構以圓雙色光譜之遠紫外光波域(192-250 nm)分析，因此波長的胺基酸肽鍵會產生顏色，在穩定折疊之環境中，此發光色形成訊號而被偵測 (Kelly and Price, 1997)。在圓雙色光譜之分析中，無規則捲曲(random coil)所產生之訊號會在波長 212 nm ($n \rightarrow \pi^*$)時為正數，在波長 195 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$)時為負數。 β -折版在波長 196 nm ($n \rightarrow \pi^*$)時為正數，波長 218 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$)時為負數。而 α -螺旋則在波長為 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$)時產生趨近垂直之正數訊號，波長 222nm ($n \rightarrow \pi^*$)時產生平行線之負數訊號(Manavalan et al., 1987; Kelly and Price, 1997)。上述之蛋白質二級結構與讀值之關係來自於過去所有圓雙色光譜學研究之文獻以及數據統計。因此，遠紫外光圓雙色光譜分析可適用於任何種蛋白質之二級結構分析。以圓雙色光譜分析 ManB 以及其突變株之二級結構，使用之

儀器型號為 Aviv 62A DS CD spectrophotometer，樣本容器光徑長度為 1 mm，平均掃描時間 3×10^{-1} 秒。樣本之組成為 2.5 μM 目標蛋白質、溶於 50 mM 之緩衝溶液(PH 7.5)中。樣本分析時全程於 25 $^{\circ}\text{C}$ 之下進行，蒐集波長 200 nm 至 260 nm 之間之光譜訊號並將三次掃描之結果取平均值後表示(Coligan, 2003)。實驗結果以單位 molar ellipticity 表示， $[\theta]$ ($\text{degree cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$)源自於 $(\theta \times 1000)/(cl)$ ，其中 θ 為波長 λ 時所測得之 ellipticity(橢圓率)， c 為濃度 dmole/cm^3 ， l 為光徑長 cm 。



實驗結果

K.pneumoniae CG43 Δ *gnd*, Δ *manC* 與 Δ *manB* 之建構與特性分析

如圖三、四及五，將 *gnd*、*manC* 與 *manB* 相鄰的片段選殖入 pKAS46 載體後藉兩次同源互換而剔除染色體上的目標基因，並以鏈聚合酶連鎖反應確認剔除之結果。如圖六 A，如圖六 B， Δ *manC* 與 Δ *manB* 之菌落形態略小於野生株，並且失去黏性與光澤，而 Δ *gnd* 菌落無明顯差異。生長曲線量測結果顯示除了 Δ *manB* 生長較緩慢之外，其它並不影響生長速度(圖六 C)。另外，圖七顯示 Δ *manC* 與 Δ *manB* 葡萄糖醛酸含量明顯低於野生株(依序為 11.1、10.4 與 27.1 μ g/1 \times 10⁹CFU)，而其值與莢膜缺陷組 Δ *wzc* (13.7 μ g/1 \times 10⁹ CFU)相似。 Δ *gnd* 則展現與野生株相同之葡萄糖醛酸含量(25.3 μ g/1 \times 10⁹ CFU)，暗示 *manC* 與 *manB* 基因產物在 K2 多醣莢膜生合成扮演重要角色。先前的研究中指出包覆在細胞外之多醣莢膜會阻礙生物膜之生合成(Pan et al., 2011)，圖八顯示野生株其生物膜合成量比 Δ *manC* 與 Δ *manB* 還要低，而莢膜含量較低之基因剔除株，其生物膜合成量遠高於野生株與 Δ *gnd*。

回補實驗分析

為證實基因剔除株表現型之差異確實是來自於該基因被剔除所造成，因此將被剔除之基因接入表現質體送回基因剔除株中，並觀察表現型態之變化。回補試驗(圖九 A)中 *manB* 回補株之莢膜含量有顯著恢復，*manC* 回補株則無恢復之跡象。 Δ *gnd* 不影響莢膜含量，而 *gnd* 回補株也展現與 Δ *gnd* 相同之莢膜含量。在生物膜生合成實驗中，*manB* 回補株之生物膜生合成量有明顯下降，顯示莢膜含量高於 Δ *manB*，而 *manC* 回補株之莢膜含量並未增加，因此生物膜生合成量與 Δ *manC* 沒有差異。*gnd* 回補株之生物膜合成量則與 Δ *gnd* 相同。對於 *manC* 回補株表現型態未恢復這個問題，我們初步認為原因有兩點，分別為 ManC 表現載體無法在 Δ *manC* 中表現 ManC，因此無法回補表現型態，以及自殺性載體在與 *manC* 行同

源互換時發生預期之外的基因突變，使得 $\Delta manC$ 除了 *manC* 之外尚有其它參予多醣莢膜生合成之基因也發生突變，因此無法只以回補 *ManC* 使 $\Delta manC$ 表現型恢復。為了排除前項原因，我們另外設計了許多不同的 *ManC* 表現載體(圖九附錄圖)，都無法使得 $\Delta manC$ 之表現型態恢復，因此我們認為 $\Delta manC$ 很可能發生了二次突變。

ManB 定點突變之胺基酸選擇

ManB 定點突變之胺基酸選擇主要是以疑似可以被酪胺酸激酶 *Wzc* 磷酸化之酪胺酸為突變對象，將可在 OH-基被磷酸化之酪胺酸突變成不帶有 OH-基之苯丙胺酸。苯丙胺酸在結構上與酪胺酸相似，只差別在於 R 基團之 OH-基上，因此我們希望在不影響蛋白質結構之條件下觀察有無磷酸化對 *ManB* 活性之影響。而定點突變之酪胺酸位置之選擇則詳述如下：在先前的文獻中指出 *E. coli* 之酪胺酸激酶 *Wzc* 可磷酸化尿嘧啶雙磷酸葡萄糖去氫酶 *Ugd* 之第 71 號胺基酸 Tyr71 (Lacour S et al., 2008)，而 *K. pneumoniae* 之酪胺酸激酶 *Wzc* 與 *E. coli* 之酪胺酸激酶 *Wzc* 具有高度相似性(50.4% 相同)，因此便推測這兩種菌株之 *Wzc* 在受質專一性方面會非常類似。我們以 *Ugd* Tyr71 附近之胺基酸序列(HDAYRNA)為模板，並使用 Vector NTI program (InforMax, Inc.)比對 *ManB* 與模板序列，找出在 *ManB* 胺基酸序列中有兩處符合酪胺酸激酶受質之序列，分別為 Tyr26 (DIAYRIG) 與 Tyr341 (DFAYCDS)，隨後以定點突變法將 Tyr26 與 Tyr341 突變成 phenylalanine。此外，在先前的研究中指出 *P. aeruginosa* *ManB* 在 Ser108 的位置帶有磷酸根，此相對於 *K. pneumoniae* *ManB* 之 Ser98(圖十 A)。立體結構分析顯示 Ser98 與 Tyr10 之位置相當接近，皆位於 *ManB* 酵素活性之中心(圖十 B)，為了得知 Tyr10 與 Ser98 的重要性，我們也將 Ser98 與 Tyr10 分別定點突變成 alanine 與 phenylalanine。

ManB 點突變對於酵素活性與多醣莢膜生成之影響

如圖十一 A，回補實驗分析發現 CG43S3 Δ manB[pRK415-ManBY26F]、 Δ manB[pRK415-ManBY341F]、 Δ manB[pRK415-ManBY26F]與 Δ manB[pRK415-ManB]具相同之多醣莢膜含量，而 Δ manB[pRK415-ManBY10F]多醣莢膜含量降低了三分之一，而 Δ manB[pRK415-ManBS98A]僅剩二分之一。在生物膜生成實驗發現低莢膜含量之 Δ manB[pRK415-ManBS98A]與 Δ manB[pRK415-ManBY10F]生物膜生成量高於其它菌株(圖十一 B)。進一步分析發現無法在 Δ manB[pRK415-ManB]全菌裂解液中測得酵素活性，因此，我們分別將 ManB 與具不同 ManB 之基因包含 Y10F、Y26F、S98A、Y341F 與 Y26F-Y341F 接入表現載體 pETQ33 轉殖入 *K. pneumoniae*CG43S3 中，再分析全菌裂解液之酵素活性，如圖十一 C， Δ manB[pETQ33-ManBY10F]酵素活性為 Δ manB[pETQ33-ManB]之四分之一，而 Δ manB[pETQ33-ManBS98A]幾乎測不出活性；有趣的是，雖然 Δ manB[pETQ33-ManBY341F]、 Δ manB[pETQ33-ManBY26F]或 Δ manB[pETQ33-ManBY26F-Y341F]多醣莢膜含量與 Δ manB[pETQ33-ManB]無異，但只有約二分之一的酵素活性，此暗示在克雷白氏肺炎菌內只需少量 ManB 即可提供多醣莢膜前驅物的合成。

大量表現 ManB 與 ManB 定點突變質體並分析其磷酸化狀態

為了確認 ManB 在 *K. pneumoniae* 中會被 Wzc 磷酸化，我們將帶有不同 ManB 基因型的表現載體轉殖入 *K. pneumoniae*CG43S3 Δ manB 中，以 IPTG 誘導大量表現，隨後抽取全體細胞蛋白質執行 SDS-聚丙烯安膠體電泳，並以 anti-phosphotyrosine antibody 4G10 做專一性西方墨點免疫分析，藉此觀察 ManB 之磷酸化狀況。圖十二顯示此抗體可偵測到 Wzc 酪氨酸激酶的自我磷酸化，然而 ManB 在大量表現的狀態下仍無法偵測到任何磷酸化訊號，此暗示 ManB 可能要在特定生長狀態下才會被磷酸化，也可能是此單株抗體專一性極高而致無法檢測 ManB 的磷酸化酪胺酸。

ManB 之磷酸化與 Pro-Q[®] Diamond 磷酸蛋白質螢光染色分析

由於 Pro-Q[®] Diamond 磷酸蛋白質螢光染劑可偵測磷酸化之酪胺酸(tyrosine)、蘇胺酸(threonine)與絲胺酸(serine)，為了避免單株抗體專一性的偵測缺失，我們在 *K. pneumoniae*CG43S3 Δ *manB* 內誘導表現，隨後以高熱破菌法處理菌體並抽取全體細胞蛋白質，再取定量全之體細胞蛋白質執行 SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳。電泳後之 SDS-聚丙稀醯胺膠以 Pro-Q[®] Diamond 染劑染色，並於螢光照相系統下分析 ManB 與 ManB 點突變株之磷酸化狀況。圖十三顯示除了 Δ *manB*[pETQ33-*manBS98A*]的 ManB 無法被 Pro-Q 染色外，其他在 Δ *manB*[pETQ33-*manB*]、 Δ *manB*[pETQ33-*manBY10F*]、 Δ *manB* [pETQ33-*manBY26F*]、 Δ *manB*[pETQ33-*manBY341F*]或 Δ *manB*[pETQ33-*manBY26F-Y341F*]表現的 ManB 均被 Pro-Q 染色，此結果暗示著除了 S98 外其他的酪胺酸定點突變不影響 ManB 的磷酸化。

圓雙色光譜分析 ManB 及 ManB 定點突變蛋白之二級結構

為了避免在 *K. pneumoniae* 中因過量表現 ManB 而造成磷酸激酶與基質間比例差異所造成磷酸化分析的解讀錯誤，我們將帶有不同 ManB 基因型的 DNA 片段殖入表現載體 pET30a、轉型至大腸桿菌 BL21(DE3)中大量誘導其表現（圖十四 A）並純化這些重組蛋白（圖十四 B）。隨後執行圓雙色光譜分析，如圖十五所示，ManB 野生株以及 ManB 點突變株在遠紫外光波域下呈現”W”型之譜型，在波長 218 nm 及 208 nm 時為最低點，其譜型類似於 α -螺旋，暗示 α -螺旋可能為構成 ManB 之主要二級結構。這些類似譜型顯示各 ManB 點突變並不影響其二級結構。

測量純化之 ManB 與 ManB 定點突變蛋白之酵素活性

如圖十六，ManB 與 ManBY26F 蛋白呈現相同之酵素活性，每分鐘可催化 43~44 μ g 受質；而 ManBY341F 與 ManBY26F-Y341F 活性相似，每分鐘催化約 16~18 μ g

受質；ManBY10F 與 ManBS98A 之酵素活性大幅降低，ManBY10F 每分鐘僅能催化 5 μ g 受質，而 ManBS98A 則測不出酵素活性。

***In vitro* 磷酸化實驗**

先前的同位素標定磷酸化實驗中顯示 Wzc 可磷酸化 CPS 基因座上之基因產物包含 Gnd、ManC、ManB 與 Ugd (附錄一、李., 2006)，而以西方墨點分析，如圖十七所示，此純化的 ManB 蛋白可被 Wzc 磷酸化，而有無 ATP 似乎不影響 Wzc 可磷酸化 ManB，然而，ManB 在不加 Wzc 之條件下即有微弱磷酸化訊號，此暗示著 ManB 在大腸桿菌內表現即已被磷酸化，。圖十八顯示經添加 Wzc 後之磷酸化 ManB 和未加 Wzc 處理之 ManB 在酵素活性上並無顯著差異。

***ManB* 去磷酸化實驗與酵素活性測定**

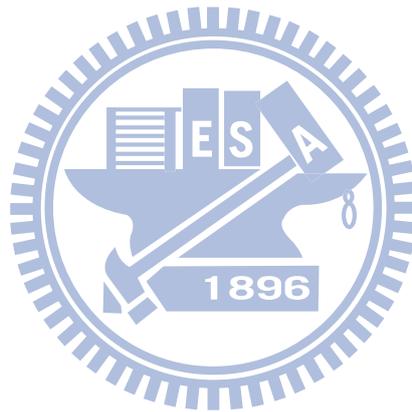
為了排除在蛋白質表現過程中 ManB 即被 *E. coli* BL21(DE3) 中與 *K. pneumoniae* 具有高度相似性(50.4%相同)的酪胺酸激酶 Wzc 所磷酸化，我們將純化之 ManB 先以鹼性磷酸酶 CIAP 在 37°C 處理 30 分鐘，再純化後量測 ManB 活性。結果如圖十九所示，去磷酸化後的 ManB 活性略低於未處理的 ManB，顯示磷酸化對於 ManB 的活性有正向的影響。

以 Pro-Q[®] Diamond 螢光染劑分析 *in vitro* 環境下 Wzc 磷酸化 ManB 之情形

初步以 Pro-Q[®] Diamond 分析 ManB 在 *K. pneumoniae* 內之磷酸化狀況，得知 Ser98 具有磷酸根。而在 anti-phosphotyrosine 專一性免疫分析中發現 Wzc 可在活體外磷酸化 ManB。為確認專一性免疫實驗之準確性，在此使用 Pro-Q[®] Diamond 螢光染劑分析 ManB 之磷酸化狀況。為去除 Ser98 磷酸根之訊號，因此以 ManBS98A 做為 Wzc 之受質。實驗結果(如圖二十)與專一性免疫分析實驗一致，證實 Wzc 可在活體外磷酸化 ManB。

ManBS98 之磷酸根來源探討

如文獻報導 ManB 殘基 S98 共價鍵結之磷酸根對其酵素活性相當重要，為了了解 Ser98 磷酸根是否可由酪胺酸激酶 Wzc 或絲胺酸-蘇胺酸激酶 STK 所提供，我們將 ManBS98A 在 *K. pneumoniae*CG43S3 Δwzc 與 Δstk 中大量表現，再以 Pro-Q[®] Diamond 磷酸化蛋白質螢光染做分析。圖二十一顯示不論在 Δwzc 或 Δstk 中仍可偵測到 ManB 磷酸根訊號，而在 *K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta manB$ [pETQ33-pManBS98A] 中，Pro-Q[®] Diamond 即無法偵測到 ManB 磷酸化之訊號，此暗示 Pro-Q[®] Diamond 對 serine 殘基的磷酸根訊號較敏感，而 S98 的磷酸化與 Wzc 或 STK 無關。



討論

***Gnd*、*ManC* 與 *ManB* 在 *K.pneumoniae* CG43 中對於 CPS 生合成所扮演之角色**

CPS 基因座是由一群直接或間接參與細菌多醣莢膜生合成之酵素基因構成，不同莢膜血清型(K 抗原)之細菌其 CPS 基因座組成也不同。換言之，CPS 基因座不僅決定細菌之 K 抗原種類也決定了細菌的毒性。參與多醣莢膜生合成之基因可略分為兩部分，其一為生合成多醣莢膜之重複單元，其二為將多醣莢膜重複單元聚合並運送至細菌表面。*K. pneumoniae* K2 血清型之莢膜生合成之途徑與 *E. coli* group 1 莢膜相似，而基因座之基因構成也有部分相同，例如合成重複單元之 *ManC*、*ManB* 及 *Ugd*，以及負責重複單元向外運輸之 *Wzi*、*Wza*、*Wzb* 與 *Wzc*。此外，在 *K. pneumoniae* K1 莢膜血清型之 CPS 基因座也有上述相同之基因。*ManC* 與 *ManB* 在 K1 血清型中所扮演之角色為合成莢膜重複單元之一 fucose 之前驅物 GDP-mannose，之後再由 K1 血清型特有之 fucose 生合成基因 *gmd* 以及 *wcaG* 將 GDP-mannose 轉換成 GDP-fucose。

一篇與 K1 莢膜相關之文獻中指出，剔除 *gmd* 與 *wcaG* 之後，K1 莢膜之 fucose 會被 mannose 所取代，使 mannose 成為構成莢膜之主要醣類(Pan et al., 2011)。mannose 是構成 K2 莢膜之主要醣類，本研究將 *ManC* 與 *ManB* 基因剔除後發現 CPS 含量明顯下降，也顯示 *ManC* 及 *ManB* 為 K2 莢膜生合成之要角。在回補實驗中，*ManC* 基因缺損無法經由 *ManC* 表現質體使表現型回復，暗示 $\Delta manC$ 可能發生二次突變或此重組質體的構築無法表現 *ManC*；在本實驗中， Δgnd 之莢膜含量與野生株相同，此與 K1 *gnd* 突變株結果類似，暗示 *Gnd* 不是參與 *K. pneumoniae* 莢膜生合成的主要酵素。

酪胺酸磷酸化對於 *ManB* 活性之影響

酪胺酸激酶(*Wzc*)可以磷酸化尿嘧啶雙磷酸葡萄糖去氫酶(*Ugd*)並增加其酵素活性，進而調控多醣莢膜之生合成。實驗室先前的磷酸化試驗發現 *Wzc* 除了磷

酸化 Ugd 之外，尚可以磷酸化 Gnd、ManC 以及 ManB。其中 Gnd 與 ManC 在經過磷酸化之後酵素活性獲得提升(李, 2006；錢, 2008)。為了解酪胺酸磷酸化對於 ManB 活性之影響以及磷酸化之位置，我們將疑似可以被磷酸化之酪胺酸定點突變成苯丙胺酸，分別為 Tyr10、Tyr26 與 Tyr341 三點，藉此觀察定點突變對於 ManB 活性所造成之影響，並回推酪胺酸激酶磷酸化之位置。在 *K.pneumoniae* K1 血清型之磷酸蛋白質體學的研究中指出，ManB 之 Tyr26 具有磷酸根，暗示 ManB 之 Tyr26 可以被 Wzc 磷酸化(Lin, et al., 2009)。在同篇研究中作者將 ManB 之 Tyr26 定點突變為 Phe26，而此突變並未對莢膜造成任何影響，但菌株之毒性卻大幅降低。在我們的定點突變株表現型測定實驗中顯示 K2 血清型 ManB 之 Y26F 與 Y341F 對於莢膜之生合成並未造成影響，Y10F 則會降低莢膜含量。進一步針對純化的 ManB 以及 ManB 定點突變株做活性測試也得到相似之結果，ManBY26F 展現與野生株相同之活性，Y341F 降低約一半的酵素活性，Y10F 則僅剩野生株活性之四分之一。

in vitro 磷酸化與去磷酸化實驗結果皆顯示酪胺酸磷酸化對於 ManB 之酵素活性只有些微提升。為證實定點突變與酵素親和力之關聯，我們比對了 ManB 與同為 PMM/PGM 家族且其 3D 結構與活性胺基酸皆已被研究的 *Pseudomonas aeruginosa* AlgC (Goldberg et al., 1993；Naught et al., 2003) 之胺基酸序列，發現 ManB 的 Tyr10 在 AlgC 之相對胺基酸 Tyr17 是協助酵素與受質交互作用之重要活性胺基酸，突變後會影響受質與酵素之作用力。ManB Tyr26 之相對胺基酸 Tyr33 則非活性胺基酸，定點突變後並不會對酵素活性造成影響。ManB Tyr341 在 AlgC 中之並無相對胺基酸，而在酵素活性試驗中顯示定點突變 Tyr341 會降低酵素活性，暗示 ManB Tyr341 扮演與受質交互作用之角色。

以免疫分析酪胺酸的磷酸化發現經由 *E. coli* 所表現之 ManB 定點突變蛋白皆被測出具有磷酸化之酪胺酸訊號，暗示 *E. coli* 的酪胺酸激酶在表現 ManB 時便將 ManB 磷酸化，暗示 *K. pneumoniae* 與 *E. coli* 的酪胺酸激酶具有相同受質專一

性；另一方面，將 ManB 疑似酪胺酸磷酸化位置定點突變之後，仍偵測出磷酸化酪胺酸之訊號，顯示酪胺酸激酶磷酸化 ManB 酪胺酸之位置可能不只一個。在先前的一篇 *E. coli* 酪胺酸激酶與 Ugd 作用的文獻中指出，Ugd 的磷酸化與否調控著 Ugd 的活性(Lacour *et al.*, 2008)，說明酪胺酸之磷酸化主導著酵素的活性。然而，在 *K. pneumoniae* 中，酪胺酸之磷酸化只些微提升 ManB 活性，酪胺酸激酶在 ManB 的活性的調控角色仍待進一步探討。

***ManB Ser98* 之磷酸根來源與對活性之重要性**

具有催化活性之 Serine 在 PMM/PGM 家族中是屬於相當保守之胺基酸(Ser108 於 AlgC，Ser98 於 ManB，Ser98 於 CpsG)。AlgC 之 Ser108 在 R 基團位置帶有磷酸根，此磷酸根是開啟酵素催化反應第一步之重要因子。我們曾推論在 ManB 中帶有磷酸根之胺基酸為與 Ser98 在立體結構上相當接近之 Tyr10，然而在經由 Pro-Q 磷酸蛋白質染色分析後證實磷酸根是接在 ManB Ser98 之上，與 AlgC 相同，顯示 PMM/PGM 家族之蛋白質具有相似之胺基酸構造及催化反應。而在酵素活性試驗中，ManB Ser98 在定點突變成 Ala98 之後幾乎失去所有酵素活性，並使得 *K. pneumoniae* 莢膜含量大幅下降，更進一步說明 Ser98 對於 ManB 酵素活性扮演相當重要的角色；而磷酸化實驗分析結果顯示不論是在 Δstk 或是 Δwzc 中，Ser98 之磷酸根訊號仍然存在，說明此磷酸根並非經由 STK 或 Wzc 磷酸化而得。

相關文獻

1. 白平輝.(2004).克雷白氏肺炎桿菌 CG43 莢膜多醣體的產生和酪胺酸磷酸化作用的研究. 碩士論文,生物科技所,國立交通大學.
2. 李智凱.(2006).克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中參與莢膜多醣體生合成之核心蛋白 Wza、Yor5、Yco6 和 Wzx 的功能性研究.碩士論文,生物科技所,國立交通大學.
3. 錢漢聲. (2008).克雷白氏肺炎桿菌酪胺酸激酶 KpWzc 對其下游酵素 ManC, Gnd 活性影響之分析與 Ugd 磷酸酪胺酸殘基鑑定與下游受質之搜尋.碩士論文,分子醫學所,國立清華大學
4. Adams, M. J., Ellis, G. H., Gover, S., Naylor, C. E., and Phillips, C. (1994) Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism. *Structure* 2, 651-668.
5. Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. (2006). The genus *Klebsiella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, eds. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd edition ed. New York: Springer.
6. Chang, H.Y., Lee, J.H., Deng, W.L., Fu, T.F., and Peng, H.L. (1996) Virulence and outer membrane properties of a *galU* mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microb Pathog* 20: 255-261.
7. Coligan, J.E. (2003) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons Inc., Brooklyn, NY, Unit 7.6.
8. Coyne, M.J., Jr, Russell, K.S., Coyle, C.L., and Goldberg, J.B. (1994) The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core. *J Bacteriol* 176:3500–3507.
9. Cozzone, A. J. (2005) Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9,

- 198-213.
10. Cozzone, A. J. (2009) Bacterial tyrosine kinases: novel targets for antibacterial therapy? *Trends Microbiol.* 17 536–543
 11. Domenico, P., Schwartz, S., and Cunha, B.A. (1989) Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumonia* by sodium salicylate. *Infect Immun* 57: 3778-3782.
 12. Dong C, Beis K, Nesper J, Brunkan-Lamontagne AL, Clarke BR, et al. (2006). Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* 444:226–29
 13. Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
 14. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem.* 62:453-81.
 15. Garnak M, Reeves HC (1979) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* 203:1111–1112
 16. Goldberg J. B., Hatano K., Pier G. B. (1993). Synthesis of lipopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J. Bacteriol.* 175, 1605–1611.
 17. Grangeasse C, Doublet P, Cozzone AJ. (2002). Tyrosine phosphorylation of protein kinase Wzc from *Escherichia coli* K12 occurs through a two-step process. *J Biol Chem.* 277(9):7127-35.
 18. Grangeasse C, Obadia B, Mijakovic I, Deutscher J, Cozzone A J and Doublet P. (2003) Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* 278: 39323–39329.

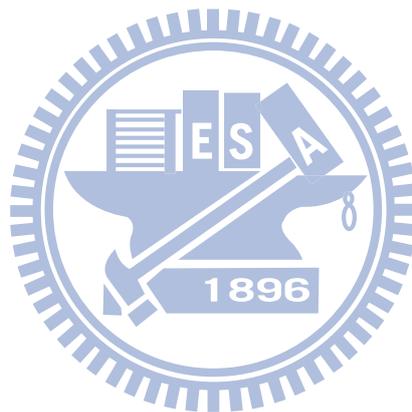
19. Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I. (2007) Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci.* **32(2)**:86-94
20. Hanau, S., Montin, K., Cervellati, C., Magnani, M. and Dallocchio, F. (2010) 6-Phosphogluconate dehydrogenase mechanism: evidence for allosteric modulation by substrate. *J. Biol. Chem.* 285, 21366–21371.
21. Ho J-Y, Lin T-L, Li C-Y, Lee A, Cheng A-N, Chen M-C, Wu S-H, Wang J-T, Li T-L, Tsai M-S. (2011) Functions of Some Capsular Polysaccharide Biosynthetic Genes in *Klebsiella pneumoniae* NTUH K-2044. *PLoS ONE* 6(7):
22. Hunter T (2000) Signaling—2000 and beyond. *Cell* 100:113–127
23. Henriques, M. X., Rodrigues, T., Carido, M., Ferreira, L. and Filipe, S. R. (2011), Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Molecular Microbiology*, 82: 515–534.
24. Joanna B. Goldberg, Kazue Hatano, and Gerald B. Pier. (1993). Synthesis of Lipopolysaccharide O Side Chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Requires the Enzyme Phosphomannomutase. *J Bacteriol.* 1993 March; 175(6): 1605–1611.
25. Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D. and Trollinger, D. (1988) *Gene* 70, 191-197.
26. Kelly S.M., Price N.C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta* 1338:161–185.
27. Lacour S, Bechet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C (2008) Tyrosine Phosphorylation of the UDP-Glucose Dehydrogenase of *Escherichia coli* Is at the Crossroads of Colanic Acid Synthesis and Polymyxin Resistance. *PLoS ONE* 3(8): e3053.
28. Liao CH, Huang YT, Lai CC, Chang CY, Chu FY, Hsu MS, Hsu HS, Hseuh

- PR.(2011). *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and capsular serotypes, Taiwan. Emerg Infect Dis. 17(6): 1113–1115
29. Lin, M. H., Hsu, T. L., Lin, S. Y., Pan, Y. J., Jan, J. T., Wang, J. T., Khoo, K. H., and Wu, S. H. (2009). Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence Mol. Cell. Proteomics 8, 2613 – 2623.
30. Manavalan, P., Johnson, W.C., Jr.(1987). Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. Anal. Biochem. 167: 76-85, 1987.
31. Manai, M., and Cozzone, A. (1983) Characterization of the amino acids phosphorylated in *E. coli* proteins. FEMS Microbiol Lett 17: 87-91.
32. Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J.V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P.R., and Mann, M. (2007) The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* 4: 697–707.
33. Mijakovic, I., Poncet, S., Boel, G., Maze, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., Le Marechal, P., and Deutscher, J. (2003) Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *Embo J* 22: 4709-4718.
34. Naught, L. E., Regni, C., Beamer, L. J., and Tipton, P. A. (2003) Roles of active site residues in *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannomutase/phosphoglucomutase, *Biochemistry* 42: 9946-9951.
35. O’Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449–461.
36. Pan PC, Chen HW, Wu PK, Wu YY, Lin CH, Wu JH.(2011) Mutation in fucose synthesis gene of *Klebsiella pneumoniae* affects capsule composition and

- virulence in mice. *Experimental Biology and Medicine* 236: 219–226.
37. Pan, Y. J., Fang, H. C., Yang, H. C., Lin, T. L., Hsieh, P. F., Tsai, F. C., Keynan, Y. & Wang, J. T. (2008). Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol*; **46**: 2231–2240.
38. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. (2008) Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* ; 29:1099–1106.
39. Peng, H. L., Fu, T. F., Liu, S. F., and Chang, H. Y. (1992) Cloning and Expression of the *Klebsiella pneumoniae* Galactose Operon. *J. Biochem.* 112: 604-608
40. Podschun, R., and Ullmann, U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11: 589-603.
41. Rahn, A., Drummel-Smith, J., and Whitfield, C. (1999) Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 181: 2307-2313.
42. Ray, W. J.; Post, C. B.; Liu, Y.; Rhyu, G. I. (1993) Structural changes at the metal ion binding site during the phosphoglucomutase reaction. *Biochemistry* 32,48–57.
43. Regni, C., Schramm, A. M., and Beamer, L. J. (2006) The Reaction of Phosphohexomutase from *Pseudomonas aeruginosa*: Structural Insights into a Simple Processive Enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 15564–15571.
44. Sa-Correia, I., Darzins, A., Wang, S.K., Berry, A., and Chakrabarty, A.M. (1987)

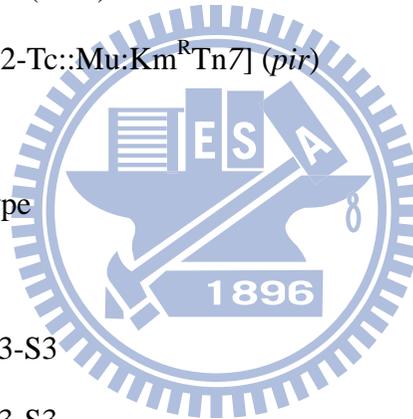
- Alginate biosynthetic enzymes in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*: over-production of phosphomannose isomerase, phosphomannomutase, and GDP-mannose pyrophosphorylase by overexpression of the phosphomannose isomerase (*pmi*) gene. *J Bacteriol* 169: 3224–3231.
45. Schembri, M.A., Dalsgaard, D., and Klemm, P. (2004) Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol* 186: 1249–1257.
 46. Skorupski, K., and Taylor, R.K. (1996) Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* 169: 47–52.
 47. Simon, R, U. Priefer, and A. Puhler. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
 48. Soulat D, Jault JM, Duclos B, Geourjon C, Cozzzone AJ, Grangeasse C (2006) *Staphylococcus aureus* operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism. *J Biol Chem* 281:14048–14056.
 49. Van Tilbeurgh H, Declerck N (2001) Structural insights into the regulation of bacterial signalling proteins containing PRDs. *Curr Opin Struct Biol* 11:685–693
 50. Vincent, C., P. Doublet, C. Grangeasse, E. Vaganay, A. J. Cozzzone, and B. Duclos. (1999). Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.* 181: 3472–3477
 51. Wacharotayankun R, Arakawa Y, Ohta M, Hasegawa T, Mori M, Horii T, Kato N. (1992). Involvement of *rcsB* in *Klebsiella K2* capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 174(3): 1063-7.
 52. Whitfield, C., and Roberts, I.S. (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31: 1307±1319.

53. Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 75:39–68.
54. Wugeditsch T, Paiment A, Hocking J, Drummelsmith J, Forrester C, Whitfield C (2001) Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276:2361–2371.



表一、 本次實驗使用與建構之細菌菌株

菌株	基因型及相關資訊	來源與參考資料
<i>E.coli</i>:		
JM109	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 rolA1 thi</i> $\Delta(lac-proAB)$	Laboratory stock
BL21-RIL	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)gal dcm(DE3)</i>	Laboratory stock
S17-1 λ pir	<i>RecA thi pro hsdR⁻M⁺ [RP4-2-Tc::Mu:Km^RTn7] (pir)</i>	Simon <i>et al.</i> ,1983
<i>K.pneumoniae</i>:		
CG43	Clinical isolate of K2 serotype	Laboratory stock
CG43-S3	<i>rspL</i> mutant, Sm ^R	白, 2004
CG43-S3- <i>wzc</i> ⁻	<i>wzc</i> deletion mutant in CG43-S3	This study
CG43-S3- <i>gnd</i> ⁻	<i>gnd</i> deletion mutant in CG43-S3	This study
CG43-S3- <i>manC</i> ⁻	<i>manC</i> deletion mutant in CG43-S3	This study
CG43-S3- <i>manB</i> ⁻	<i>manB</i> deletion mutant in CG43-S3	This study

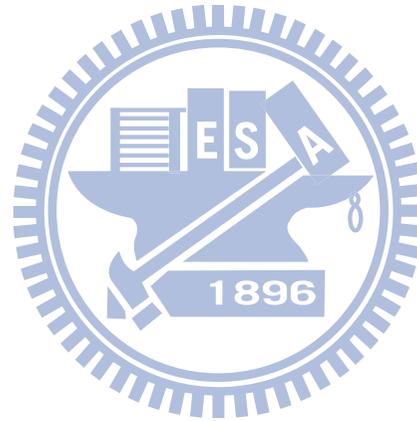


表二、 本次實驗使用與建構之質體

質體	基因型及相關資訊	來源與參考資料
yT&A	PCR cloning vector, Ap ^R	Yeastern Biotech
pKAS46	Suicide vector, <i>rspL</i> , Ap ^R , Km ^R	Skorupski et al., 1996
pRK415	Broad-host-range IncP plasmid, Tc ^R	Keen <i>et al.</i> , 1998
pETQ33	Protein overexpressing vector contain T5 and lacZ promoter	Laboratory stock
pET30a	Overexpression of His6 fusion proteins, Km ^R	Novagen
pKAS46-f- <i>gnd</i>	A 2482-bp fragment containing the flanking sequence of <i>ugd</i> cloned into pKAS46	This study
pKAS46-f- <i>manC</i>	A 2452-bp fragment containing the flanking sequence of <i>manC</i> cloned into pKAS46	This study
pKAS46-f- <i>manB</i>	A 2610-bp fragment containing the flanking sequence of <i>manB</i> cloned into pKAS46	This study
pRK415-pGnd	<i>KpGnd</i> coding sequence with promoter region cloned in <i>HindIII/XbaI</i> sites, Tc ^R	This study
pRK415-pManC	<i>KpManC</i> coding sequence with promoter region cloned in <i>HindIII/XbaI</i> sites, Tc ^R	This study
pRK415-pManB	<i>KpManB</i> coding sequence with promoter region cloned in <i>HindIII/XbaI</i> sites, Tc ^R	This study
pKAS46-pManB	<i>KpManB</i> coding sequence with promoter region cloned in <i>EcoRI/XbaI</i> sites, Km ^R	This study
pKAS46 -pManBY10F	pKAS46-pManB with single residue change of ManB Y10F	This study

pKAS46-pManBY26F	pKAS46-pManB with single residue change of ManB Y26F	This study
pKAS46-pManB S98A	pKAS46-pManB with single residue change of ManB S98A	This study
pKAS46-pManBY341F	pKAS46-pManB with single residue change of ManB Y341F	This study
pKAS46-pManBY26,341F	pKAS46-pManB with double residue change of ManB Y26F and Y341F	This study
pETQ33-pManB	<i>Kp</i> ManB coding sequence with promoter region cloned in <i>KpnI/BamHI</i> sites, Km ^R	This study
pETQ33-pManBY10F	pETQ33-pManB with single residue change of ManB Y10F	This study
pETQ33-pManBY26F	pETQ33-pManB with single residue change of ManB Y26F	This study
pETQ33-pManBS98A	pETQ33-pManB with single residue change of ManB S98A	This study
pETQ33-pManBY341F	pETQ33-pManB with single residue change of ManB Y341F	This study
pETQ33-pManBY26,341F	pETQ33-pManB with double residue change of ManB Y26F and Y341F	This study
pET30a-ManB	His ₆ - <i>Kp</i> ManB (Met ¹ to Lys ⁴⁵⁶) cloned in <i>BamHI/EcoRI</i> sites, Km ^R	This study
pET30a-ManBY10F	pET30a-pManB with single residue change of ManB Y10F	This study
pET30a-ManBY26F	pET30a-pManB with single residue change of ManB Y26F	This study
pET30a-ManBS98A	pET30a-pManB with single residue change of ManB S98A	This study
pET30a-ManBY341F	pET30a-pManB with single residue change of ManB Y341F	This study

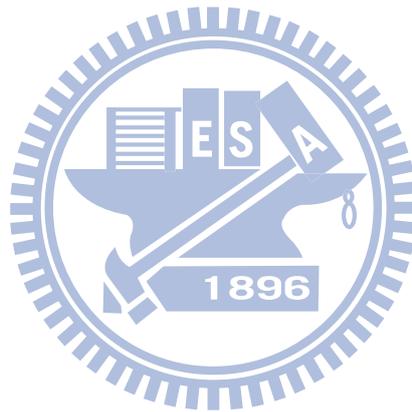
pET30a-ManBY26,341F	pET30a-pManB with with double residue change of ManB Y26F and Y341F	This study
pET-KpWzcE23	His ₆ -KpWzc(Arg ⁴⁵¹ -Lys ⁷²²) cloned in <i>EcoRI/SalI</i> sites, Km ^R	李, 2006



表三、 本次實驗使用之核苷酸引子

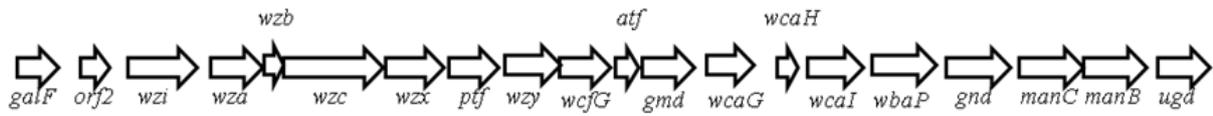
引子	序列(5'→3')
Gnd-A-F	TCTAGAGAGTTGCTTTTGCTGGGTCTTTAC
Gnd-A-R	CCATGGTTTTTCGGCAATAACTTCTTCGGTC
Gnd-B-F	CCATGGTGCGTGATGTCGTGGCGTATG
Gnd-B-R	GAATTCTCGGCGGTTTTCTCCATCAC
ManC-A-F	TCTAGATGGCGCAAACCTTTACCGAATG
ManC-A-R	CCATGGTGGATTTCAAGGCCCGAGAGTC
ManC-B-F	CCATGGAGCACTGGGTTCATTCTCGCC
ManC-B-R	GAATTCACCCAGCAGCCACGGGATC
ManB-A-F	TCTAGACCGCGTCGCCGAGCAG
ManB-A-R	CCATGGGGGTGCCGGCGTCCATCAG
ManB-B-F	CCATGGACATCGACACAACGGACGGTATC
ManB-B-R	GAATTCTTACGGGTACGGTTAGCATCGAC
pGnd-F	AAGCTTTCAGAGGTTGGAGCATTGGTTAG
pGnd-R	TCTAGATGACTGGGGCGGCATATAAAG
pManC-F	AAGCTTATATGCCGCCCCAGTCAGG
pManC-R	TCTAGATGTGTCATTCTGCGATTTGTCCC
pManB-F	AAGCTTGCCGCTGCGACGTGGTG
pManB-R	TCTAGATTAATCTGACCCTATGGCTCCC
ManB-F	GGATCCATGACACAGTTAACATGCTTTAAGGCT
ManB-Y10F-F	AGGCTTTTGACATCCGTGGTGAAGT
ManB-Y10F-R	CAGTTCACCACGGATGTCAAAGCCT
ManB-Y26F-F	GAGGACATCGCCTTCCGTATCGGC
ManB-Y26F-R	GCCGATACGGAAGGCGATGTCCTC

ManB-S98A-F	GTGACGGCGGCCCATACCC
ManB-S98A-R	GGGTTATGGGCCGCCGTCAC
ManB-Y341F-F	GACTTCGCCTTCTGCGACAGCGG
ManB-Y341F-R	CCGCTGTCGCAGAAGGCGAAGTC



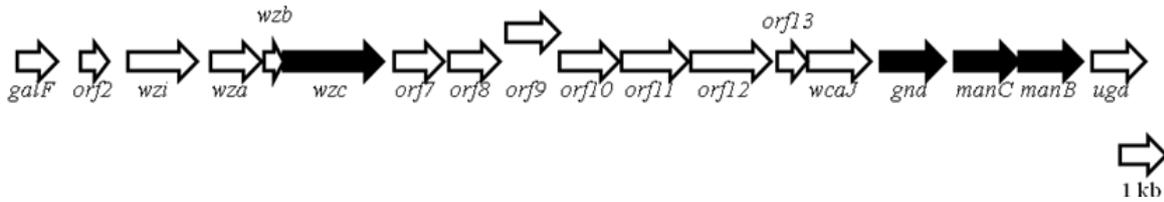
A

K. pneumoniae K2044 K1 strain



(Ho J-Y et al., 2011)

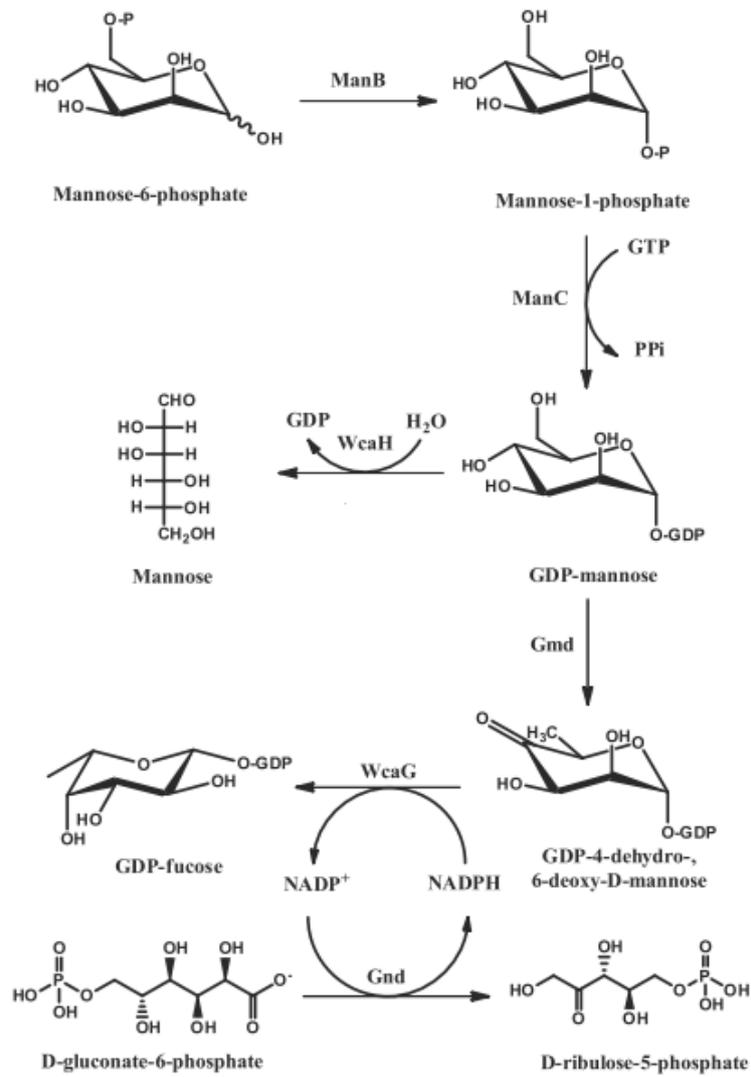
K. pneumoniae CG43 K2 strain



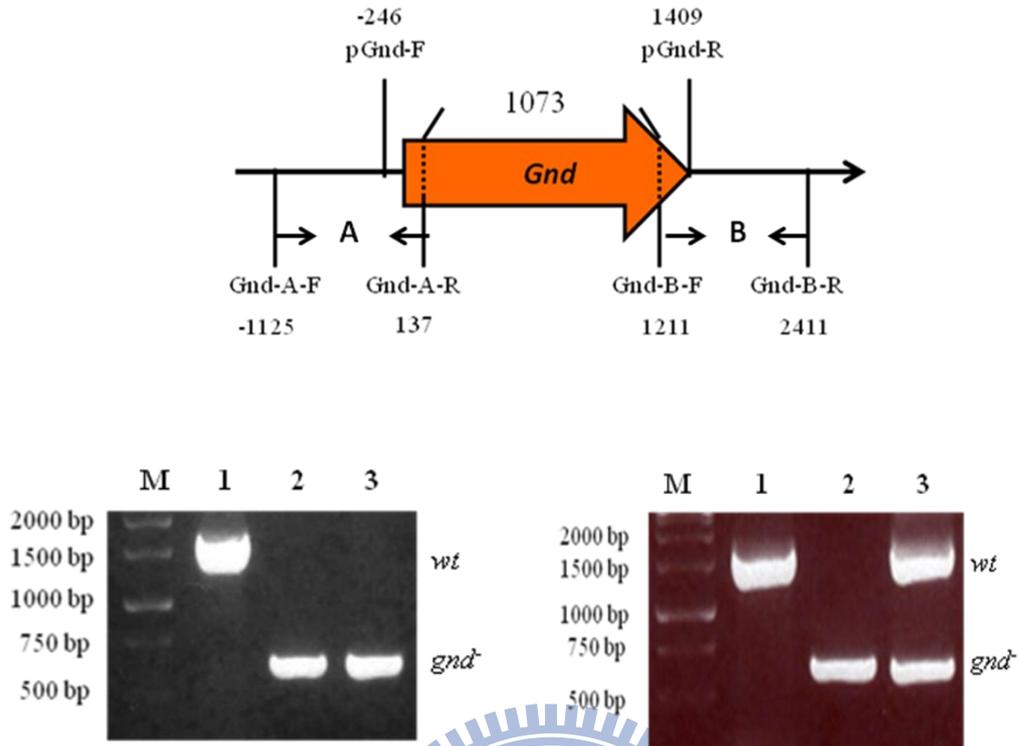
B

Protein	Wzc	Gnd	ManC	ManB
Identity	51.5%	99.4%	99.6%	99.8%

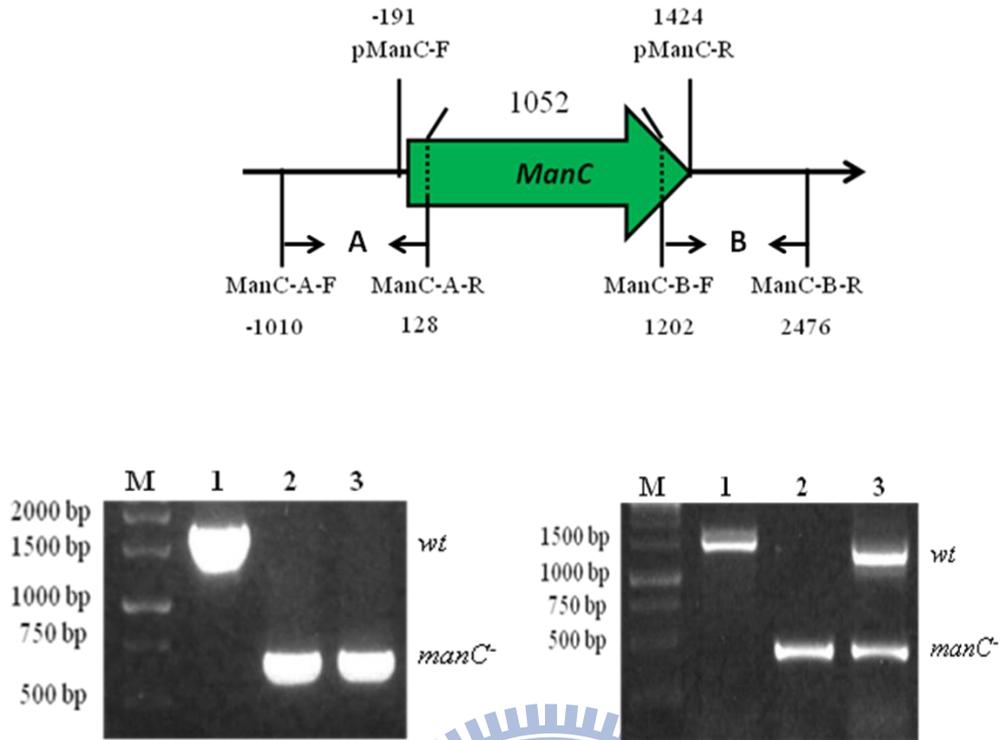
圖一、*K. pneumoniae* K1 與 K2 荚膜血清型之 CPS 基因座比對 (A) 與標的蛋白質之胺基酸序列 (B)。圖 A 黑色實心箭頭表示本實驗中研究之基因，圖 B 為 Wzc、Gnd、ManC 與 ManB 蛋白質序列之相同性。



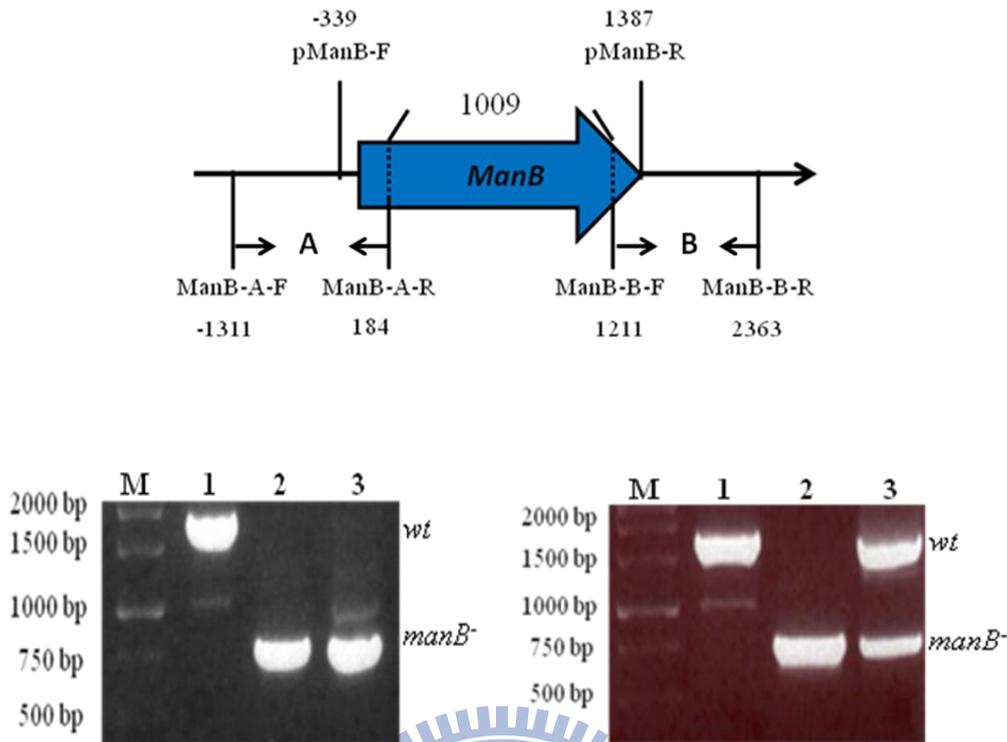
圖二、多醣莢膜單元醣生成酵素 Gnd、ManC 與 ManB 參與之反應。此圖摘自 K1 多醣莢膜單元 GDP-fucose 生合成之途徑(Ho et al., 2011)。



圖三、 Δgnd 之建構與確認。圖上半部描述 *gnd* 基因剔除架構，引子對 Gnd-A-F/Gnd-A-R 和 Gnd-B-F/Gnd-B-R 用於基因剔除，引子 pGnd-F/pGnd-R 用於增幅回補基因缺損所用之引子；圖下左以聚合酶連鎖反應確認基因剔除，行列 1 為 *K. pneumoniae* CG43S3 野生株，2 為自殺性載體 pKAS46-A+B，3 為 Δgnd ；圖下右以聚合酶連鎖反應確認已增幅目標基因 *gnd*，行列 1 為 *K. pneumoniae* CG43S3 野生株，2 為 Δgnd ，3 為 Δgnd [pRK415-*gnd*]。

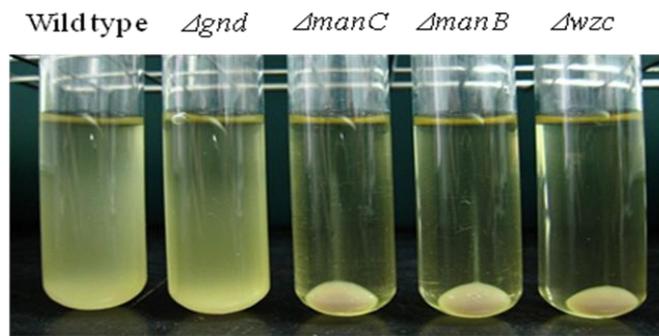


圖四、 $\Delta manC$ 之建構與確認。圖上半部描述 *manC* 基因剔除架構，引子對 ManC-A-F/ManC-A-R 和 ManC-B-F/ManC-B-R 用於基因剔除，引子 pManC-F/pManC-R 用於增幅回補基因缺損所用之引子；圖下左以聚合酶連鎖反應確認基因剔除，行列 1 為 *K. pneumoniae* CG43S3 野生株，2 為自殺性載體 pKAS46-A+B，3 為 $\Delta manC$ ；圖下右以聚合酶連鎖反應確認已增幅目標基因 *manC*，行列 1 為 *K. pneumoniae* CG43S3 野生株，2 為 $\Delta manC$ ，3 為 $\Delta manC$ [pRK415-*manC*]。

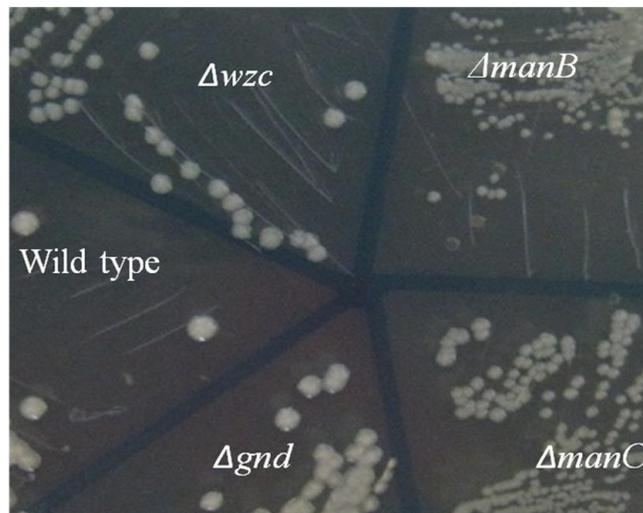


圖五、 $\Delta manB$ 之建構與確認。圖上半部描述 *manB* 基因剔除架構，引子對 ManB-A-F/ManB-A-R 和 ManB-B-F/ManB-B-R 用於基因剔除，引子 pManB-F/pManB-R 用於增幅回補基因缺損所用之引子；圖下左以聚合酶連鎖反應確認基因剔除，行列 1 為 *K. pneumoniae* CG43S3 野生株，2 為自殺性載體 pKAS46-A+B，3 為 $\Delta manB$ ；圖下右以聚合酶連鎖反應確認已增幅目標基因 *manB*，行列 1 為 *K. pneumoniae* CG43S3 野生株，2 為 $\Delta manB$ ，3 為 $\Delta manB$ [pRK415-*manB*]。

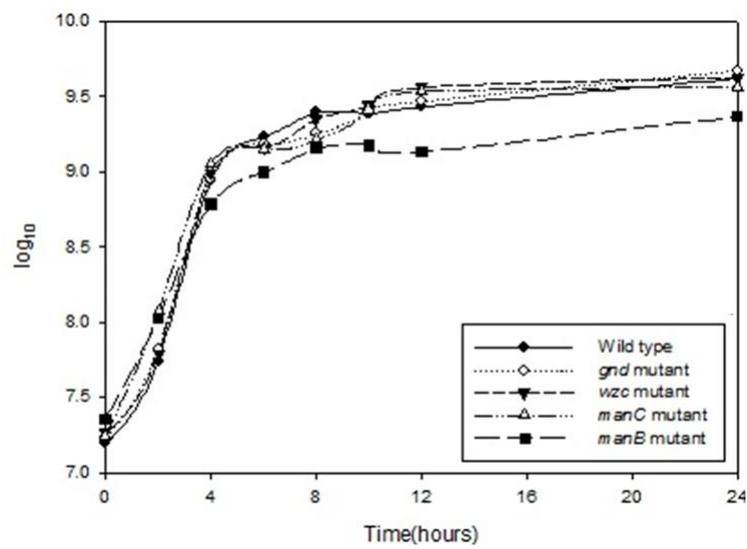
A



B

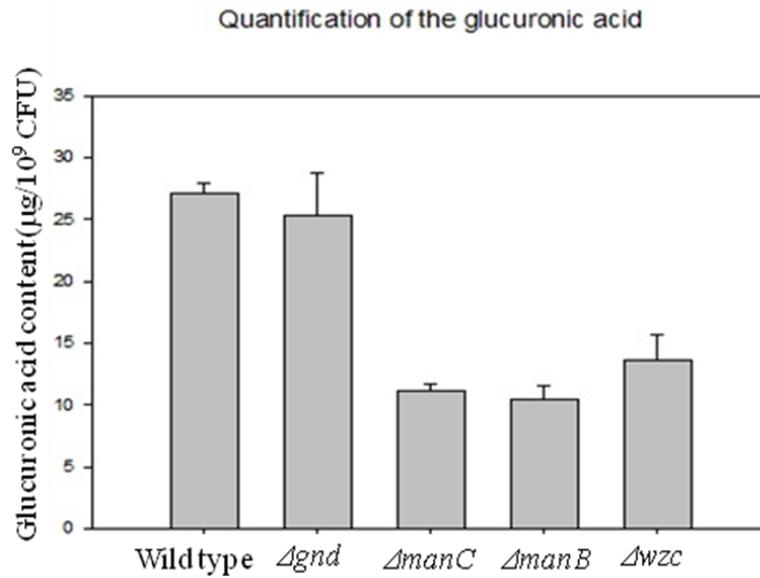


C

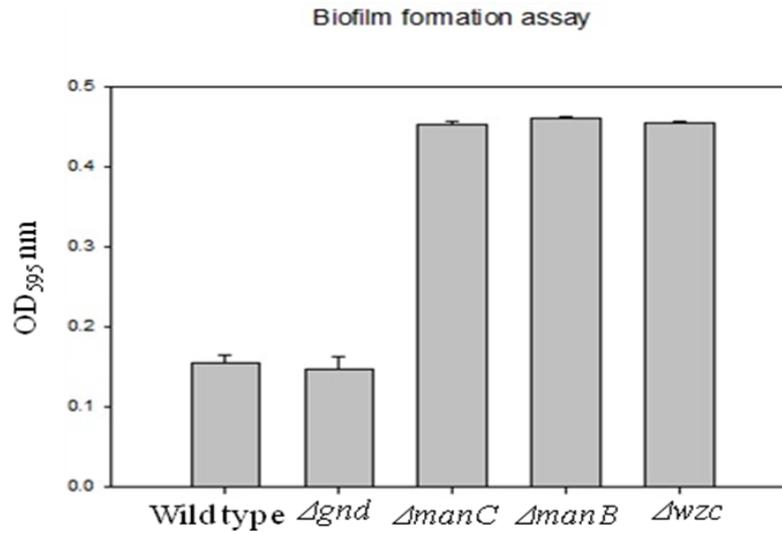


圖六、*K. pneumoniae* CG43S3 Δ gnd, Δ manC 與 Δ manB 突變株之表現型分析。已知 Wzc 磷酸激酶正向調控多醣莢膜的生合成(Lacour *et al.*, 2008)，因此 Δ wzc 為本實驗確認各基因缺損對多醣莢膜生合成影響之控制組。A，隔夜培養於 37°C 之菌株以 4000 rpm 離心沉降 5 分鐘後，比較菌落沉澱情況；B，菌落於 LB 固態培養基 37°C 培養 16 小時後攝影；C，比較各菌株生長曲線。





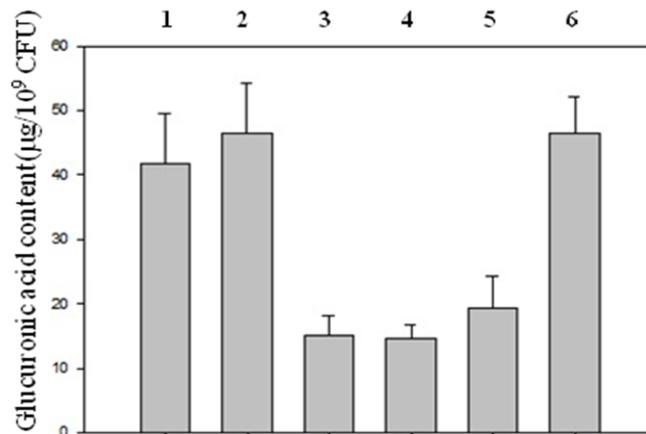
圖七、多醣莢膜單元葡萄糖醛酸之定量。葡萄糖醛酸含量之測定為 500 µl 隔夜培養之細菌培養液經濃硫酸脫水，以呈色劑 3-hydroxydiphenol 呈色後，測量樣本在波長 OD₅₂₀ 下之吸光值，並對照葡萄糖醛酸濃度與吸光值之標準檢量線，回推樣本中葡萄糖醛酸之含量。實驗數據以 1×10⁹ CUF 之細菌含有多少 µg 之葡萄糖醛酸表示之。



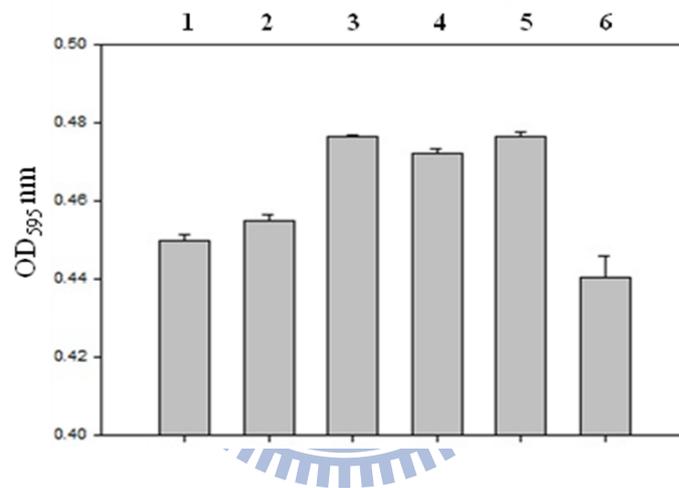
圖八、生物膜生成能力之測定。隔夜培養之菌液以 100 倍稀釋後置入 96 孔微量滴定盤中，於 37°C 培養 12 小時後去除菌液，留下生長於孔壁之生物膜。以結晶紫染色生物膜後，使用 SDS 溶液將管壁上之生物膜連同結晶紫洗下，並測量樣本在波長 OD₅₉₅ 之吸光值。生物膜形成能力測定之數據，取三重複數據表示。



A

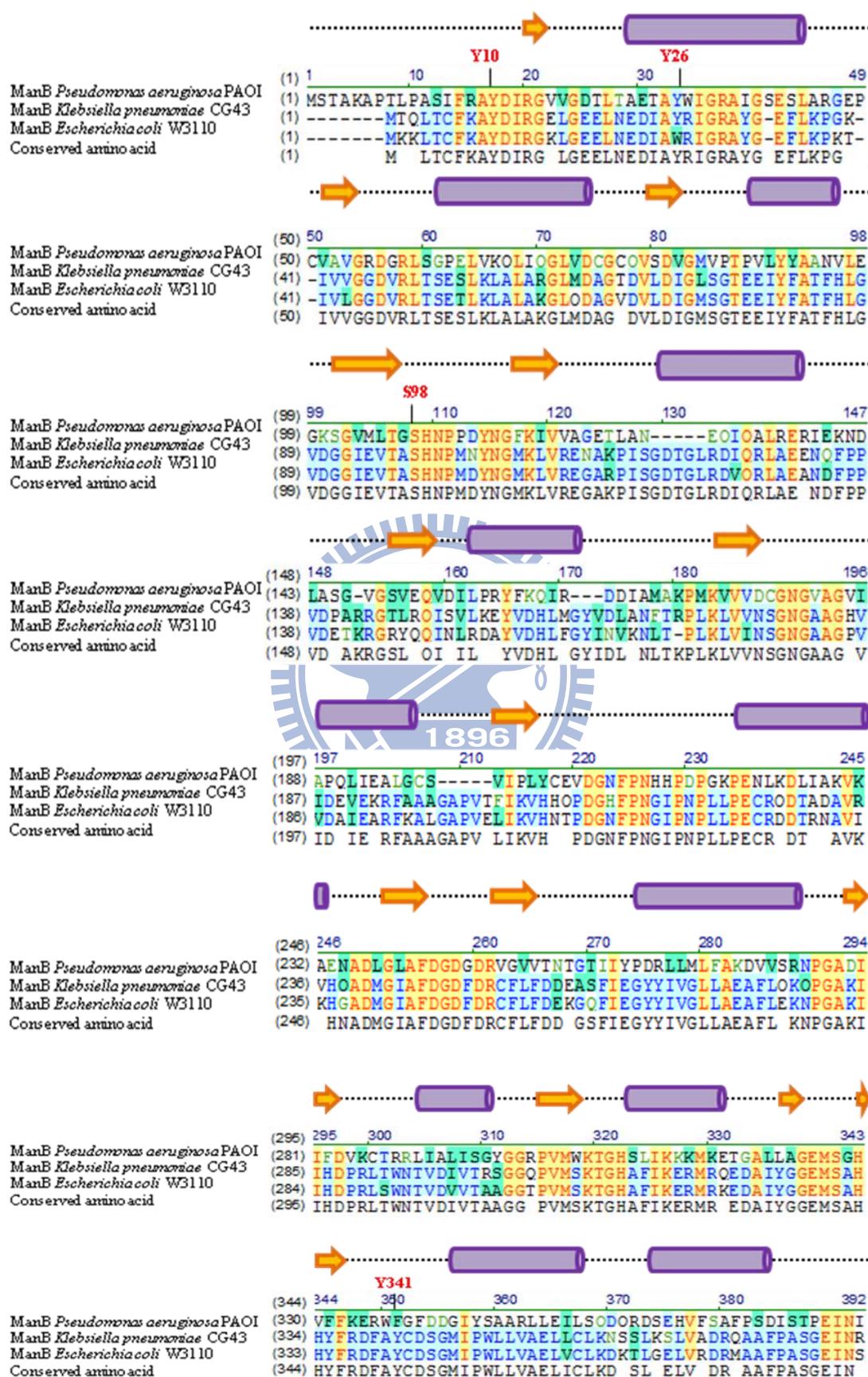


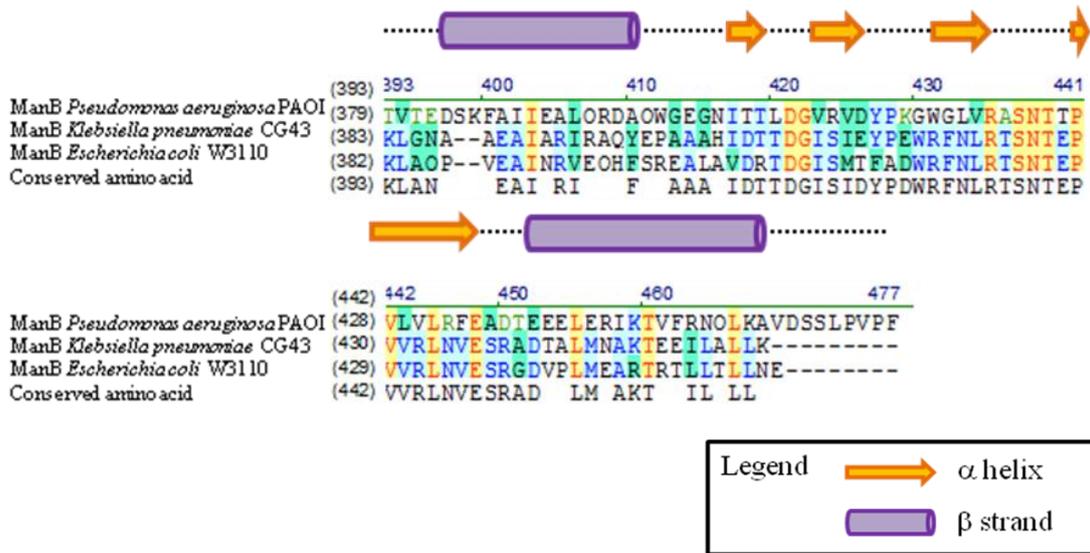
B



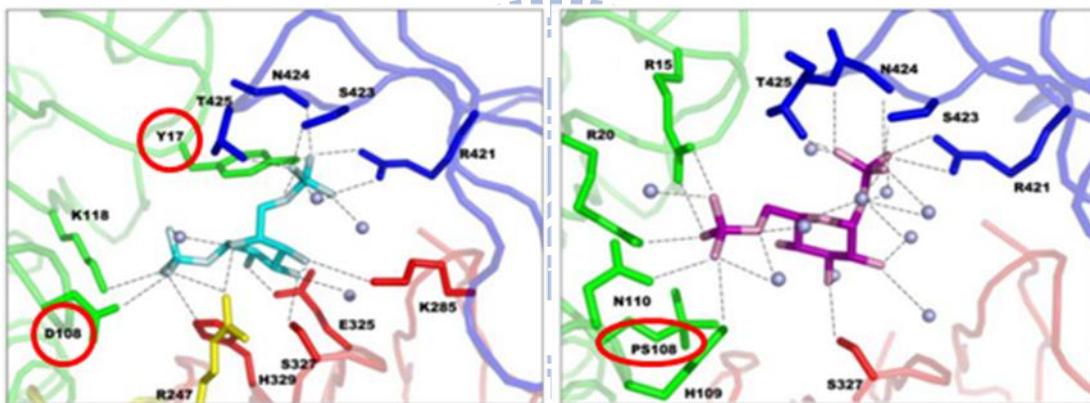
圖九、*K. pneumoniae* CG43S3 Δ *gnd*, Δ *manC* 與 Δ *manB* 回補實驗分析。以廣宿主性表現載體 pRK415 攜帶目標基因，用電穿孔的方式送入各基因缺損株中後測量葡萄糖醛酸含量(A)與生物膜形成能力(B)。行列 1，CG43S3 Δ *gnd*[pRK415]；2，CG43S3 Δ *gnd*[pRK415-*gnd*]；3，CG43S3 Δ *manC*[pRK415]；4，CG43S3 Δ *manC*[pRK415-*manC*]；5，CG43S3 Δ *manB*[pRK415]；6，CG43S3 Δ *manB*[pRK415-*manB*]。

A



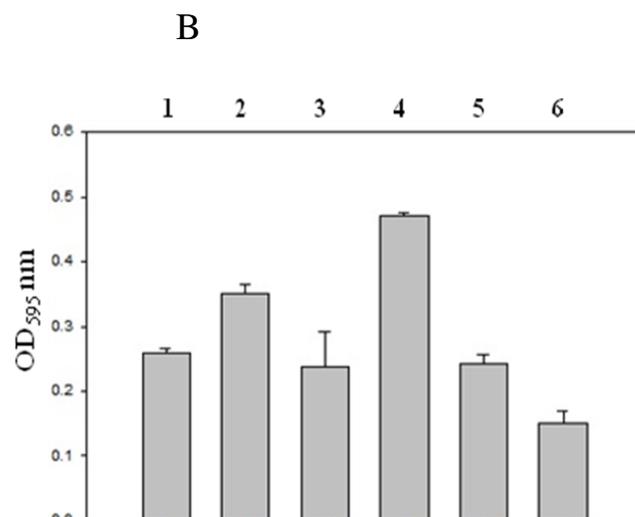
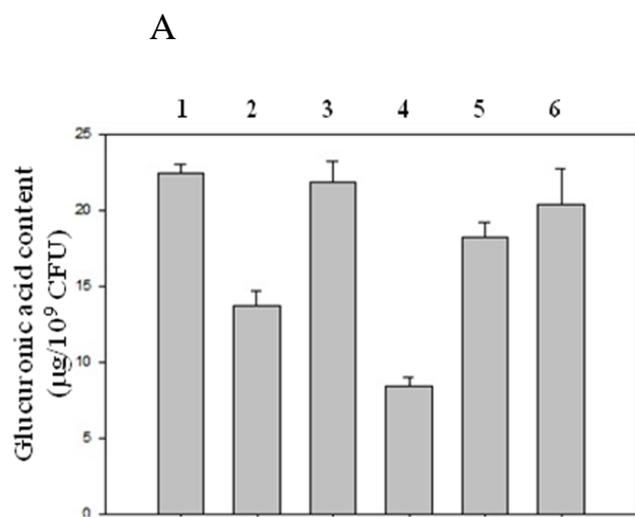


B

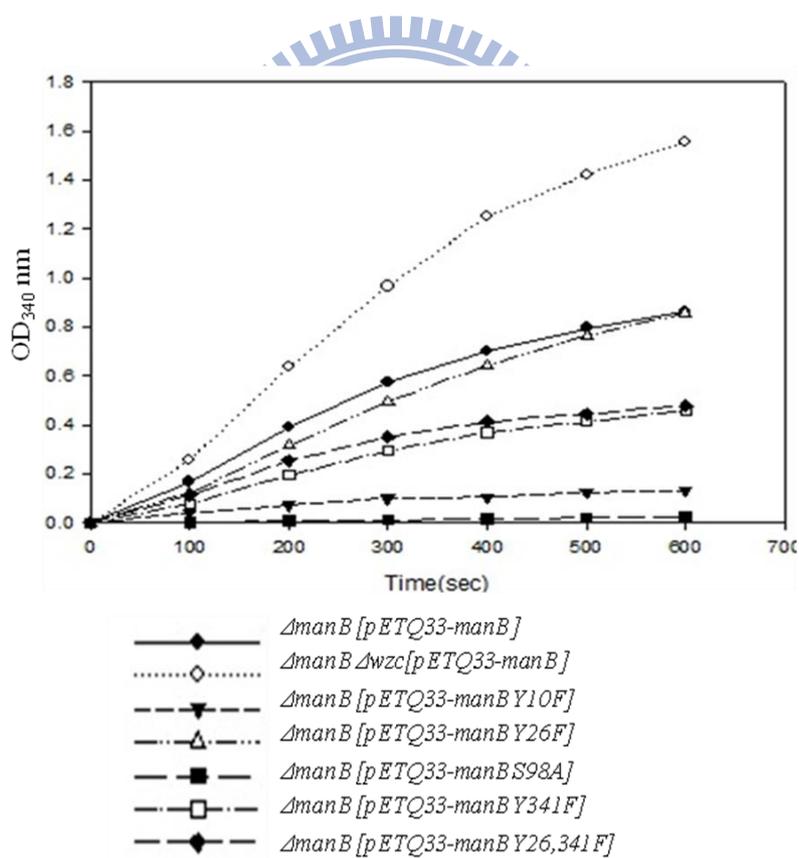


(Catherine Regni et al., 2006)

圖十、ManB 序列比對與二級結構預測分析。(圖 A)以序列分析軟體 Vector NTI program (InforMax, Inc.)分析 *P. aeruginosa* PAOI、*K. pneumoniae* CG43 與 *E. coli* W3110 之 phosphomannomutase 胺基酸序列，並確認標的胺基酸在不同菌株間之保守性。PMM 之二級結構以二級結構分析網站 PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)做分析與預測。本次實驗挑選執行定點突變之胺基酸標示於上圖二級結構之下方。(圖 B) *P. aeruginosa* PAOI phosphomannomutase 酵素活性部位之立體結構(Catherine Regni et al., 2006)。左圖為 S108D，右圖為 Wild type。

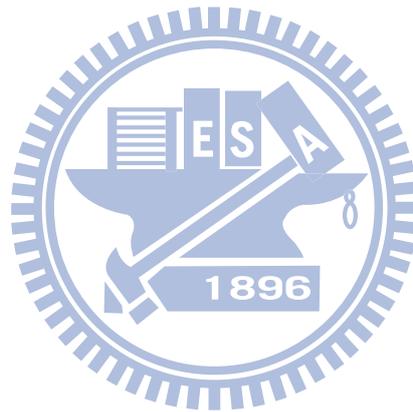


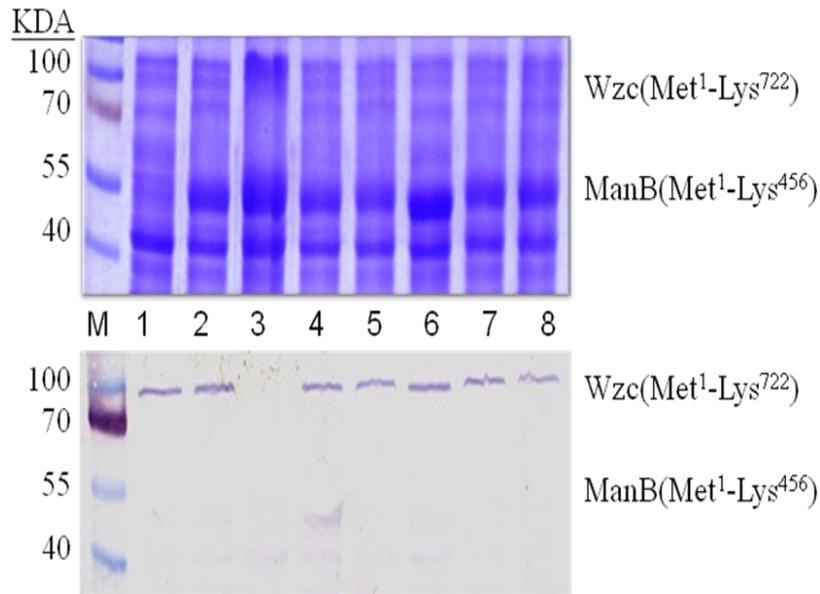
C



圖十一、ManB 點突變之表現型分析。以回補實驗測試各個 ManB 定點突變影響葡萄糖醛酸含量 (A)、生物膜合成能力 (B) 和全細菌裂解液之酵素活性 (C)。

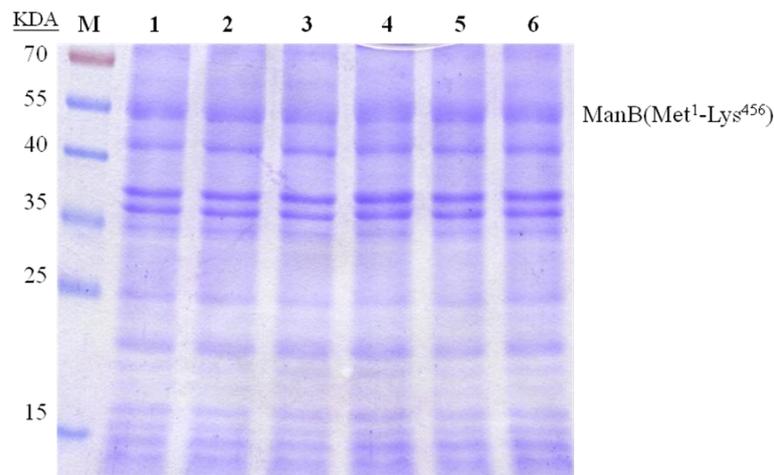
行列 1, CG43S3 Δ *manB*[pKAS46-*manB*]; 2, CG43S3 Δ *manB*[pKAS46-ManBY10F];
3, CG43S3 Δ *manB*[pKAS46-ManBY26F]; 4, CG43S3 Δ *manB*[pKAS46-ManB
S98A]; 5, CG43S3 Δ *manB*[pKAS46-ManB341F]; 6, CG43S3 Δ *manB*[pKAS46-ManB
Y26F -Y341F]。



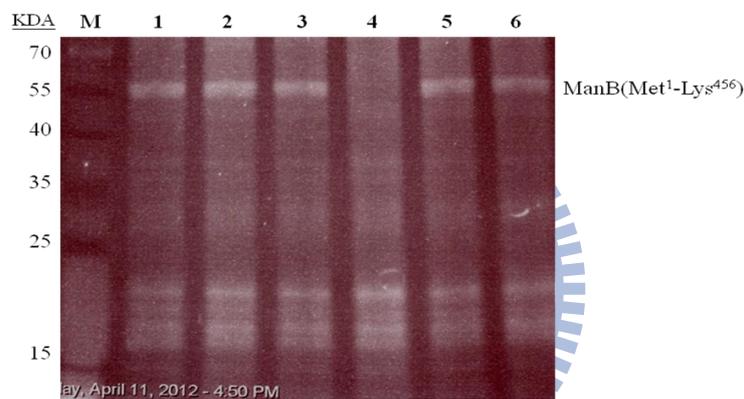


圖十二、ManB 酪胺酸殘基定點突變對 ManB 磷酸化之影響。將攜帶 ManB 與 ManB 定點突變株之表現載體 pETQ33 轉殖至 *K. pneumoniae* 中並以 IPTG 誘導蛋白質表現，取全細胞蛋白質以 SDS-聚丙烯胺膠體電泳展開，再以 anti-phosphotyrosine antibody 偵測 ManB 與其定點突變株之磷酸化情況。行列 1，CG43S3 $\Delta manB$ [pETQ33]；2， $\Delta manB$ [pETQ33-*manB*]；3， $\Delta manB \Delta wzc$ [pETQ33-*manB*]；4， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY10F*]；5， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY26F*]；6， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBS98A*]；7， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY341F*]；8， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY26F-Y341F*]。

A

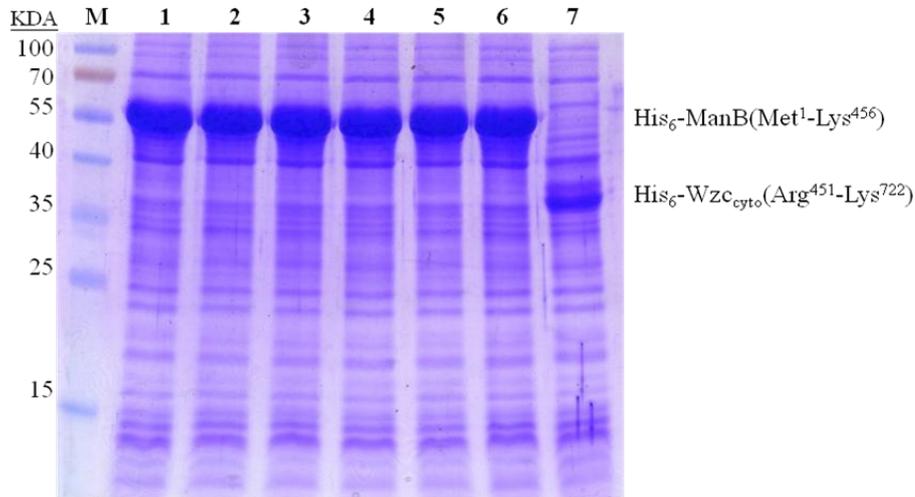


B

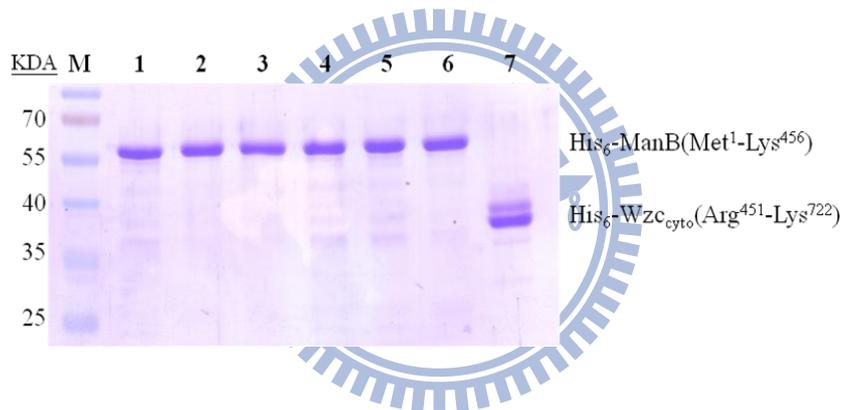


圖十三、以 Pro-Q[®] Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑染色分析 ManB 絲胺酸 98 定點突變對 ManB 磷酸化之影響。以表現載體 pETQ33 大量表現 ManB 與其定點突變株於 *K. pneumoniae* CG43 $\Delta manB$ 中，並以高熱破菌法破菌後取定量蛋白質執行 SDS-聚丙烯醯胺膠電泳，隨後再分別以(A) Commassie Blue 與(B) Pro-Q[®] Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑染色並分析 ManB 磷酸化之狀況。行列 1， $\Delta manB$ [pETQ33-*manB*]；2， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY10F*]；3， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY26F*]；4， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBS98A*]；5， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY341F*]；6， $\Delta manB$ [pETQ33-*manBY26F-Y341F*]。

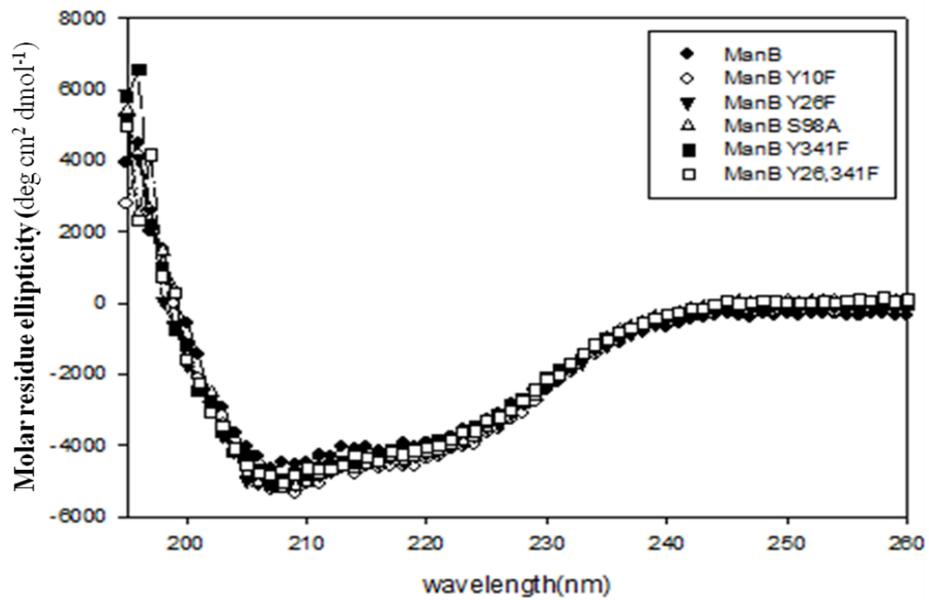
A



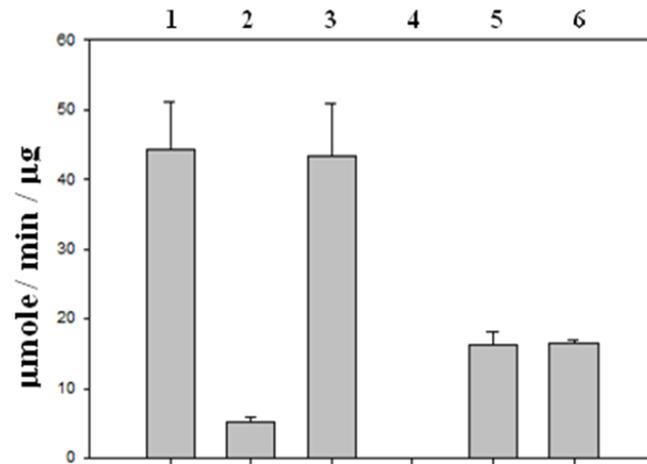
B



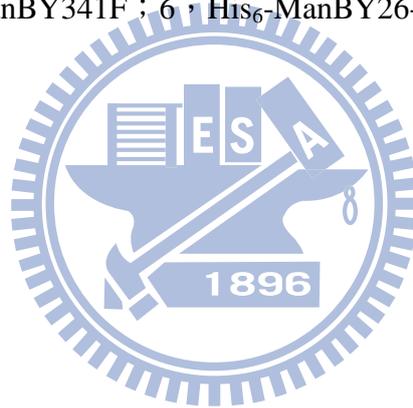
圖十四、重組蛋白 ManB 與 Wzc 之誘導表現以及純化。各表現載體 pET30a-ManB 及其點突變株與 pET30b-Wzc 於 *E. coli* BL21[DE3] 大量表現後取得總蛋白質，經由 resin 純化帶有 His₆-taq 之重組蛋白質後以 SDS-PAGE 電泳分離，再以 Commassie blue 染色分析。(A) 大量表現後的總蛋白質，(B) 純化之 His₆-ManB 及其點突變株與 His₆-Wzc。行列 1，His₆-ManB；2，His₆-ManBY10F；3，His₆-ManBY26F；4，His₆-ManBS98A；5，His₆-ManBY341F；6，His₆-ManBY26-341F；7，His₆-Wzc。



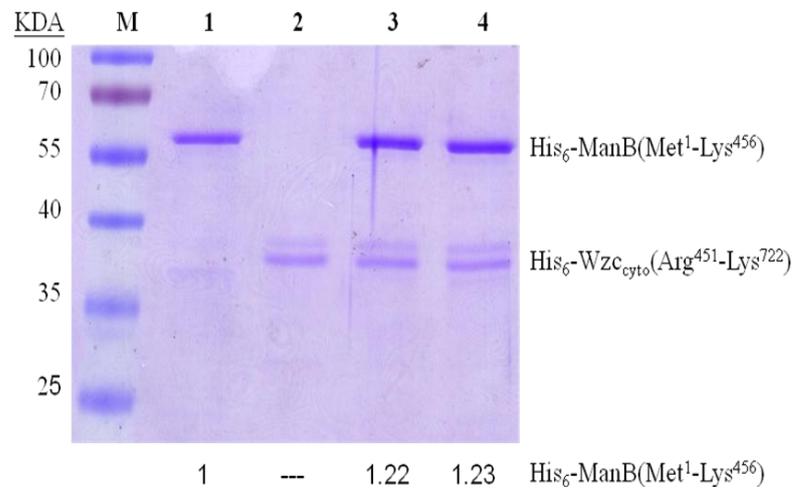
圖十五、純化的重組 ManB 蛋白之圓雙色光譜分析。圓雙色光譜儀之操作全程皆於 25°C 之下進行，蒐集波長 200 nm 至 260 nm 之光譜訊號。測量樣本包含 2.5 μ M 目標蛋白質溶於 50 mM Tris-HCl 保存液中。每個樣本之數據以三次掃描之數據取平均值後表示。



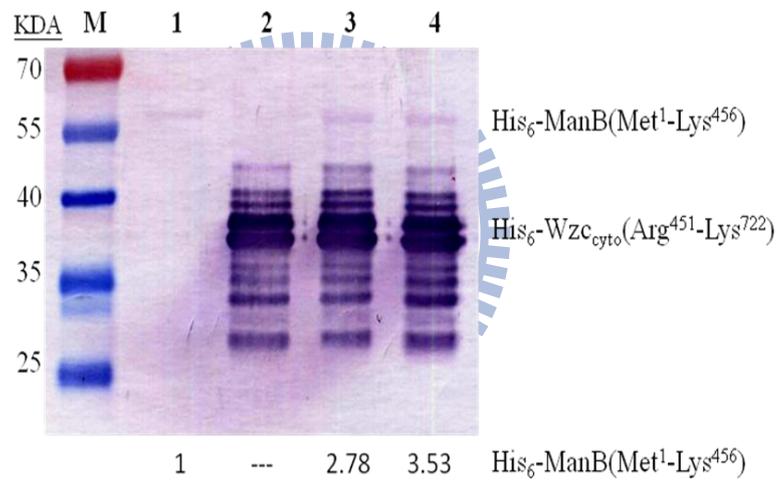
圖十六、純化 His₆-ManB 之酵素活性測定。以純化 ManB 蛋白質做酵素活性測定。行列 1，His₆-ManB；2，His₆-ManBY10F；3，His₆-ManBY26F；4，His₆-ManBS98A；5，His₆-ManBY341F；6，His₆-ManBY26-Y341F。



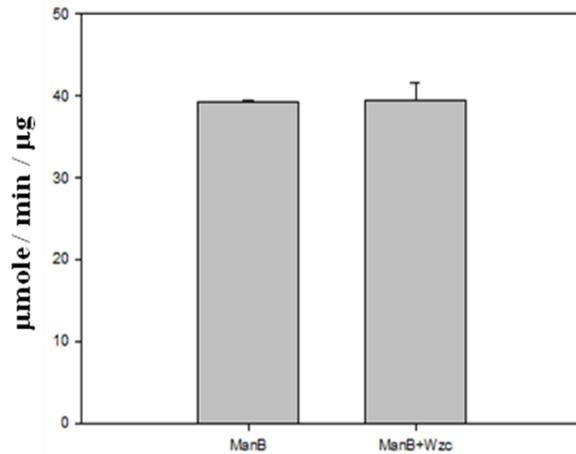
A



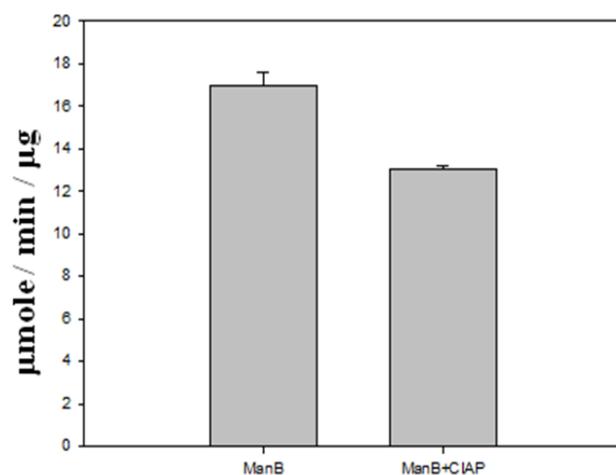
B



圖十七、西方墨點法分析 His₆-ManB 之磷酸化。In vitro 磷酸化實驗以外加酪胺酸激酶 Wzc 之方式執行，在 37°C 之下反應 30 分鐘後以 SDS-PAGE 電泳分離酪胺酸激酶 Wzc 與其受質 ManB，並分別使用(A)Commassie blue 與(B)專一性辨認磷酸化酪胺酸之抗體之西方墨點法進行染色及分析。行列 1，His₆-ManB 與 ATP；行列 2，His₆-Wzc 與 ATP；行列 3，His₆-ManB 與 His₆-Wzc；行列 4，His₆-ManB、His₆-Wzc 與 ATP。

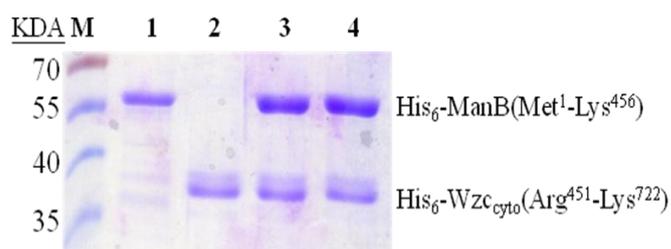


圖十八、In vitro 磷酸化實驗對於 His₆-ManB 酵素活性之影響。ManB 在 in vitro 之環境下與酪胺酸激酶 Wzc 反應 30 分鐘，並取 1 μg 處理後之 ManB 做酵素活性測試。在大量受質(GDP-mannose-1-phosphate)之條件下，影響反應進行之速度為酵素本身活性之高低。本實驗在 25°C 之下反應，每 100 秒紀錄一次波長 OD₃₄₀ 之吸光值，總時間為 600 秒。將所得之時間對比吸光值之數據與產物濃度對比吸光值之標準檢量線做配對，取得時間與產物濃度之數據。以上述數據做圖，可得每 μg ManB 每分鐘之反應速度。

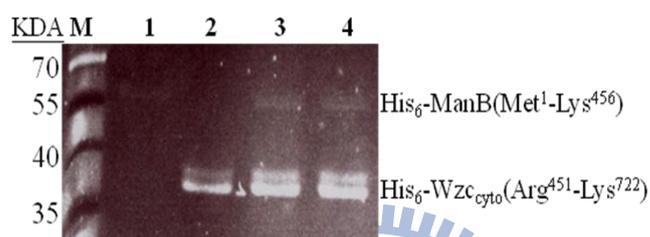


圖十九、In vitro 去磷酸化實驗對於 His₆-ManB 酵素活性之影響。ManB 在 in vitro 之環境下與鹼性磷酸酶(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase : CIAP)反應 1 小時，並取定量處理後之 ManB 做酵素活性測試。在大量受質(GDP-mannose-1-phosphate)之條件下，影響反應進行之速度為酵素本身活性之高低。本實驗之條件及數據處理方式與 In vitro 磷酸化實驗相同。

A

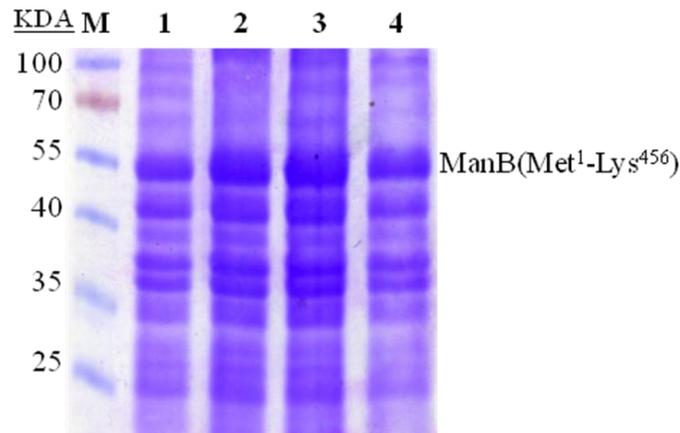


B

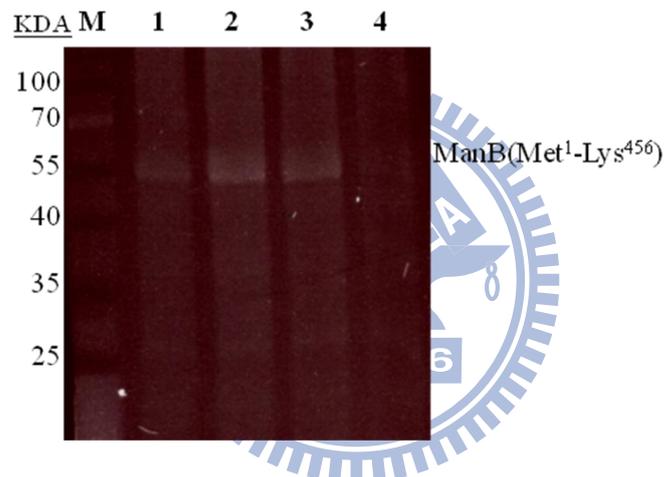


圖二十、Pro-Q[®] 染色及分析 His₆-ManBS98A 之磷酸化。為佐證 In vitro 磷酸化實驗以外加酪胺酸激酶 Wzc 之方式執行，在 37°C 之下反應 30 分鐘後以 SDS-PAGE 電泳分離酪胺酸激酶 Wzc 與其受質 ManBS98A，並分別使用 (A)Commassie blue 與 (B) Pro-Q[®] Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑進行染色及分析。行列 1，His₆-ManBS98A 與 ATP；行列 2，His₆-Wzc 與 ATP；行列 3，His₆-ManBS98A 與 His₆-Wzc；行列 4，His₆-ManBS98A、His₆-Wzc 與 ATP。

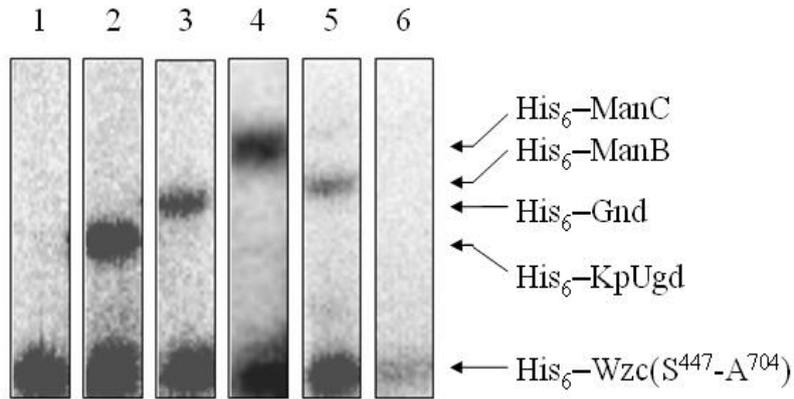
A



B

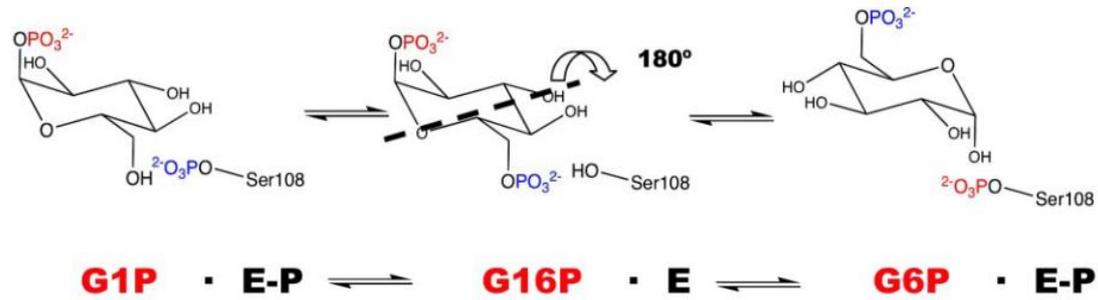


圖二十一、酪胺酸激酶或絲胺酸-蘇胺酸激酶之基因剔除對 ManB 磷酸化之影響。以表現載體 pETQ33 攜帶 ManB 基因並分別轉型至 *K. pneumoniae* Δwzc 與 Δstk 中誘導表現，再使用高熱破菌法破菌後取定量蛋白質執行 SDS-聚丙醯胺膠電泳，隨後再分別以(A) Commassie Blue 與(B) Pro-Q[®] Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑染色並分析 ManB Ser98 之磷酸化狀態。行列 1，*K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta manB$ [pETQ33-pManB]；2，*K. pneumoniae* CG43S3 Δwzc [pETQ33-pManB]；3，*K. pneumoniae* CG43S3 Δstk [pETQ33-pManB]；4，*K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta manB$ [pETQ33-pManBS98A]



附錄一、*In vitro* 磷酸化實驗。將純化的 Gnd、ManC、ManB 及 Ugd 與酪胺酸激酶 Wzc 作用，並以末端磷酸跟帶有放射線之 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 為受質。被酪胺酸激酶磷酸化之蛋白質會帶有放射線使底片曝光。行列 1，His₆-Wzc(Ser⁴⁴⁷-Ala⁷⁰⁴)；2，His₆-Wzc(Ser⁴⁴⁷-Ala⁷⁰⁴)與 His₆-KpUgd；3，His₆-Wzc(Ser⁴⁴⁷-Ala⁷⁰⁴)與 His₆-Gnd；4，His₆-Wzc(Ser⁴⁴⁷-Ala⁷⁰⁴)與 His₆-ManC；5，His₆-Wzc(Ser⁴⁴⁷-Ala⁷⁰⁴)與 His₆-ManB；6，His₆-Wzc(Ser⁴⁴⁷-Ala⁷⁰⁴)與 His₆-Yor5。(李, 2006)。

A

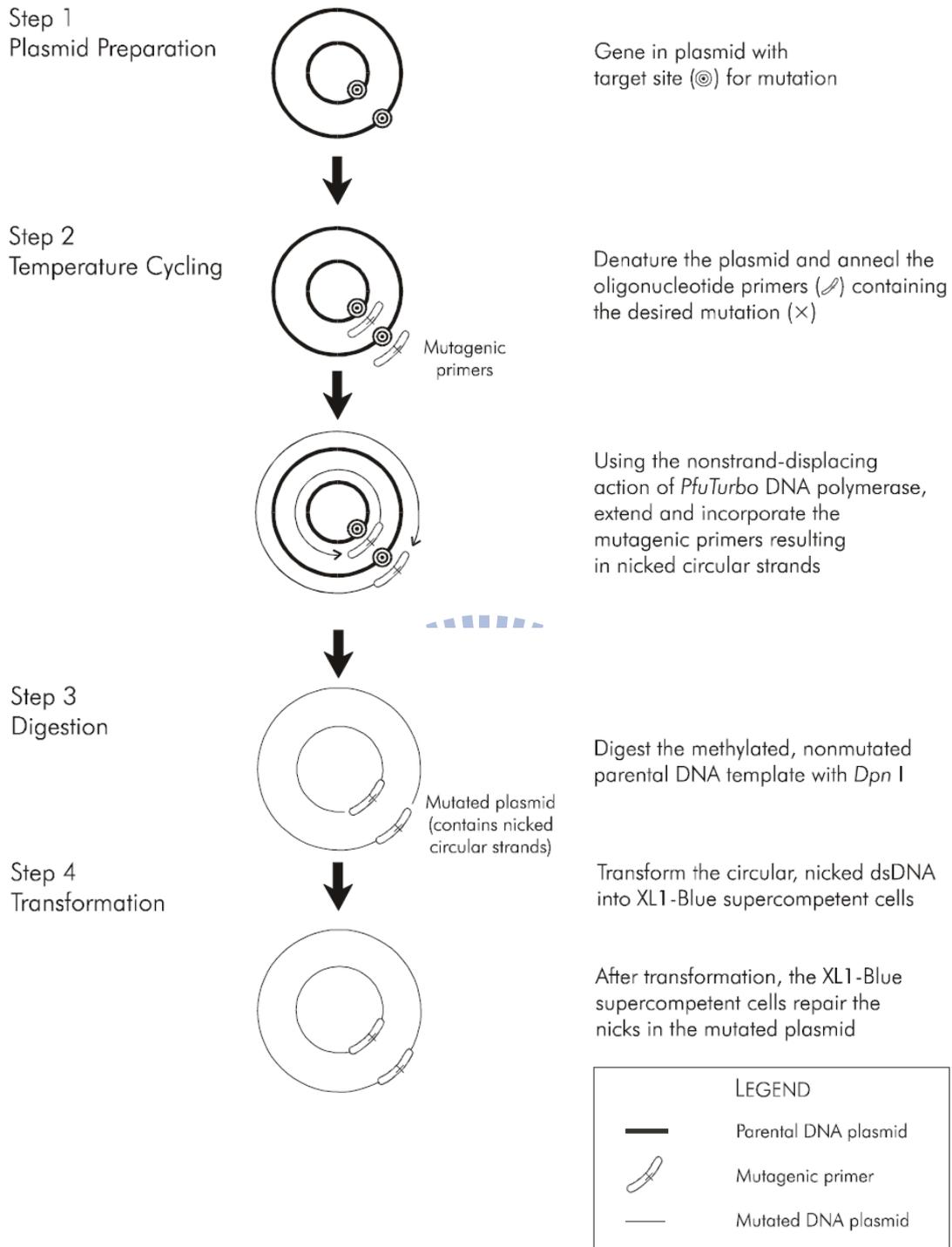


↓ (excess G16P)

G16P

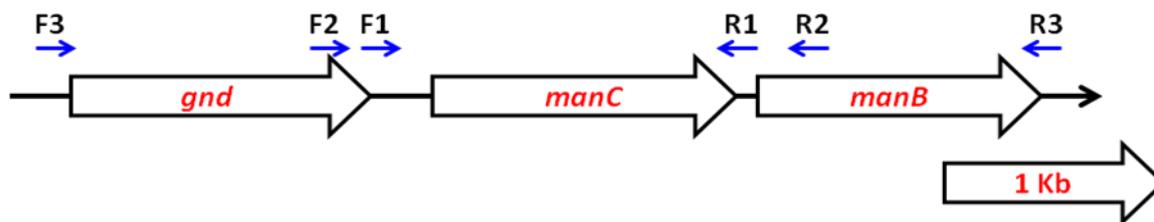
B

附錄二、圖解 *Pseudomonas aeruginosa* PMM/PGM 之催化反應。(A)以 glucose-1-phosphate 為受質闡述 PMM/PGM 之反應催化過程。圖中虛線表示中間產物 glucose-1,6-diphosphate 180° 旋轉之中軸，此旋轉是反應不可或缺之步驟。(B)C₁₄ 標定法追蹤受質 glucose-1-phosphate 由 PMM/PGM 催化轉變成 glucose-6-phosphate 之過程。在過量 glucose-1,6-diphosphate 之條件下，glucose-1-phosphate 轉變成 glucose-1,6-diphosphate 此步驟為不可逆反應。



附錄三、圖解 QuikChange 定點突變之原理與流程。(QuikChange[®] site-directed mutagenesis instruction manual, Stratagene)。

A



B

Complementation plasmids	Primer	length (bp)	gene(s)
pRK415-pManC	F1,R1	1686	<i>manC</i>
pRK415-pManC-II	F2,R2	2237	<i>manC</i>
pRK415-pGnd-ManC	F3,R1	3344	<i>gnd, manC</i>
pRK415-pGnd-ManC-ManB	F3,R3	4746	<i>gnd, manC, manB</i>

圖九附錄圖、ManC 表現質體之建構。圖 A 為嵌入表現載體之基因片段的示意圖，箭頭代表聚合基因片段使用之引子。圖 B 為目前建構之 ManC 表現質體，pRK415- pManC 與 pRK415-pManC-II 差別在於 *manC* 基因前之片段長度。