

國立臺灣大學理學院化學系  
學士班學生論文

Department of Chemistry

College of Science

National Taiwan University

Bachelor Degree Thesis



單醣化腸菌素衍生物的化學酵素法合成  
及其偵測與抗菌應用

Chemoenzymatic Synthesis of Monoglucosylated  
Enterobactin Analogues and their Application in  
Bacterial Detection and Inhibition

陳奕臻

Yi-Chen Chen

指導教授：王宗興 博士

Advisor: Tsung-Shing Wang, Ph.D.

中華民國 106 年 4 月

April 2017



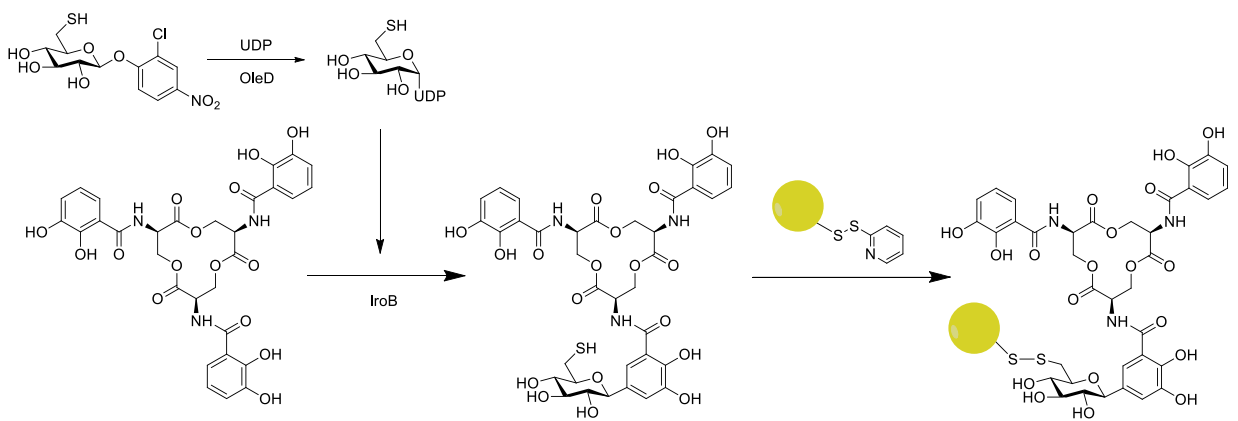
# 摘要



具抗藥性的革蘭氏陰性菌所造成的感染是當今醫學的一大挑戰，不僅要解決其抗藥性的問題，還要能夠讓藥物穿透革蘭氏陰性菌的外層膜進入到細胞內。於是，我們利用細菌的鐵載體運輸系統作為藥物運送的策略。先修飾腸菌素分子連接螢光分子，利用腸菌素對革蘭氏陰性菌的專一性，將螢光基團選擇性地標示細菌，再更進一步將螢光基團換為毒素成為不易產生抗藥性的新型抗生素。

為了讓腸菌素分子能夠簡單的接上具功能性的分子，我們利用化學酵素合成法，以一鍋化的方式在鐵載體上修飾具氫硫基的葡萄糖分子作為連接，接著便能輕易地透過葡萄糖分子上的氫硫鍵進行雙硫鍵反應接上功能性分子(例如：可標示的螢光基團、具抑菌效果的嗎啉基寡核苷酸或能夠使細菌內層膜去極化的通道形成蛋白)。本篇論文以兩種螢光小分子(丹磺醯氯和羅丹明 B)展示單糖化後的腸菌素可以方便的替換不同功能性分子，且能夠專一性的標示出革蘭氏陰性菌。除此之外，我們成功於單糖化的腸菌素上連接上較大的分子-嗎啉基寡核苷酸，也嘗試將具細胞毒性的通道形成蛋白連接上腸菌素，製成新型抗生素。

關鍵字：鐵載體、腸菌素、化學酵素法合成、嗎啉基寡核苷酸、大腸菌素、細菌偵測、抑菌



## Abstract

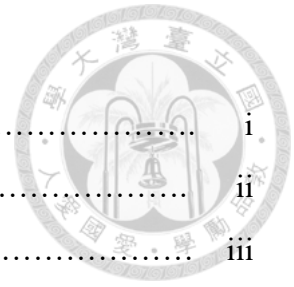


Gram-negative bacteria with drug resistance is one of the most challenging medical issues. Besides solving the problem of drug resistance, it is crucial to deliver the drug pass through the outer membrane into Gram-negative bacteria. Thus, we applied siderophore transport systems in bacteria for drug delivery. First, we modified enterobactin to connect fluorophore with enterobactin, and then the fluorophore can selectively label bacteria by the specificity between the enterobactin and Gram-negative bacteria. After that, we substituted toxin for fluorophore to make enterobactin conjugates as a novel antibacterial agent that is less possible to generate drug resistance.

To synthesize functionalized enterobactin derivatives, we attached a C6-thiol-modified glucose to the naturally occurring enterobactin scaffold via a facile one-pot chemoenzymatic synthesis. Furthermore, we are able to utilize the thiol group to perform disulfide bond formation and link the functional compounds, such as fluorophores for labeling, antibacterial morpholino oligos or proteins that can depolarize the cytoplasmic membrane. Here, we showed that thiol-modified monoglucosylated enterobactin (MGE) can easily connect a variety of fluorophores, and these enterobactin-fluorophore conjugates can label Gram-negative bacteria selectively. We have also successfully attached large cargos such as morpholinos to our thiol-modified MGE. Other cargos, such as cytotoxic channel-forming proteins, will be attached onto enterobactin to develop novel antibacterial agents.

Keywords : siderophore 、 enterobactin 、 chemoenzymatic synthesis 、 morpholino oligonucleotide 、 colicin 、 bacterial detection 、 bacterial inhibition

# 目 錄



|  |     |
|--|-----|
| 口試委員會審定書.....                            | i   |
| 中文摘要.....                                | ii  |
| 英文摘要.....                                | iii |
| 第一章 研究背景與動機.....                         | 1   |
| 1.1 抗藥性細菌的威脅.....                        | 1   |
| 1.2 細菌的鐵載體.....                          | 1   |
| 1.3 腸菌素.....                             | 3   |
| 1.4 鐵載體衍生物.....                          | 5   |
| 1.5 嗎啉基寡核苷酸.....                         | 7   |
| 1.6 大腸菌素.....                            | 7   |
| 第二章 實驗方法及目標.....                         | 9   |
| 2.1 以化學酵素法合成出 MGE 衍生物.....               | 9   |
| 2.1-1 6-SH-CNP-Glucose.....              | 9   |
| 2.1-2 腸菌素.....                           | 10  |
| 2.1-3 MGE 衍生物(6-SH-Glucose 及腸菌素的結合)..... | 11  |
| 2.2 MGE 衍生物連接螢光分子標識出革蘭氏陰性菌.....          | 11  |
| 2.3 MGE 衍生物連接毒素.....                     | 12  |
| 2.3-1 MGE 衍生物連接阻止蛋白質轉譯的嗎啉基寡核苷酸.....      | 12  |
| 2.3-2 MGE 衍生物連接使細胞質膜去極化的大腸菌素 C 端胜肽鏈....  | 14  |
| 第三章 結果討論.....                            | 15  |
| 3.1 實驗結果討論.....                          | 15  |
| 3.1-1 以化學酵素法合成出 MGE 衍生物.....             | 15  |
| 3.1-2 MGE 衍生物連接螢光分子標識出革蘭氏陰性菌.....        | 18  |
| 3.1-3 MGE 衍生物連接毒素.....                   | 22  |
| 3.2 後續實驗以及應用.....                        | 25  |
| 3.3 結論.....                              | 26  |
| 第四章 實驗細節.....                            | 27  |
| 參考文獻.....                                | 39  |
| 附錄.....                                  | 44  |

## 圖目錄



|  |    |
|--|----|
| 圖一：不同種的鐵載體及其螯合結構.....                                  | 2  |
| 圖二：腸菌素的生合成與全合成.....                                    | 3  |
| 圖三：腸菌素的吸收機制.....                                       | 4  |
| 圖四：糖化腸菌素的結構與合成.....                                    | 5  |
| 圖五：MccE492m 的結構及其吸收機制.....                             | 5  |
| 圖六：MGE 衍生物的結構及其合成.....                                 | 6  |
| 圖七：嗎啉基寡核苷酸的結構及其作用機制.....                               | 7  |
| 圖八：大腸菌素的分類.....  | 8  |
| 圖九：大腸菌素 Ia 的結構.....                                    | 8  |
| 圖十：腸菌素連接螢光分子標識細菌示意圖.....                               | 12 |
| 圖十一：腸菌素連接 morpholino oligo 抑菌示意圖.....                  | 13 |
| 圖十二：由顏色及 HPLC 監測 OleD 催化反應.....                        | 17 |
| 圖十三：OleD-IroB 酵素反應產物的 LC/MS 圖譜.....                    | 18 |
| 圖十四：大腸桿菌 CFT073 螢光顯微鏡圖.....                            | 19 |
| 圖十五：以接上 Rhodamine 的 MGE 衍生物標示不同細菌.....                 | 21 |
| 圖十六：綠色螢光蛋白在不同試劑加入下的螢光表現.....                           | 23 |
| 圖十七：C 端大腸菌素 Ib 蛋白質純化 SDS-PAGE 膠圖和基因片段 PCR 擴增...        | 24 |
| 圖十八：化合物 <b>27</b> 和化合物 <b>18</b> 雙硫鍵反應後產物質譜儀及推斷產物..... | 25 |

# 第一章 研究背景及動機



## 1.1 抗藥性細菌的威脅

革蘭氏陰性菌(Gram-negative)包含了大腸桿菌(*Escherichia coli*)、腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)和綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等致病細菌，在人體各處造成不同類型的感染。而他們最大的共同特徵便是在於其具有外層膜的構造，這層外層膜使得抗生素難以進入細胞內，因此無法有效抑制這類細菌的生長。<sup>1</sup>而為了解決這個問題，我們必須要找到能夠進入革蘭氏陰性菌外層膜的方法，才能將藥物運送入革蘭氏陰性菌的細胞內。

將藥物送入細菌內後，新的問題隨之產生。抗生素的使用造成細菌產生了抗生素抗藥性，1940年，在大腸桿菌中發現了β-內醯胺酶(β-lactamases)，可以用來破壞盤尼西林等β-內醯胺類抗生素結構中的四元環，因而使大腸桿菌產生抗藥性。<sup>2,3</sup>美國疾病管制局在2013年的報告中提到，每一年都有至少兩百萬人受到具抗生素抗藥性細菌的感染，造成的死亡人數也有至少23000人。<sup>4</sup>而其中革蘭氏陰性菌發展出最常見的抗藥性，便是透過β-內醯胺酶來水解抗生素。

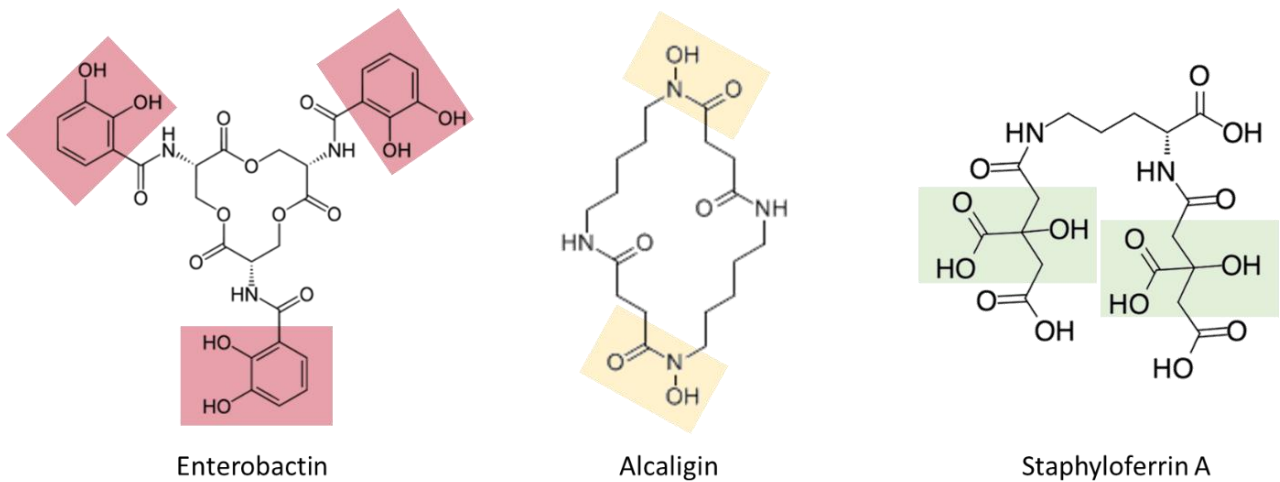
具抗生素抗藥性細菌的出現是現今醫學的一大挑戰，隨著抗生素使用愈趨頻繁，這類的問題也愈趨嚴重。<sup>5</sup>因此我們希望找到一個不僅能夠將藥物送入革蘭氏陰性菌細胞內，且阻止其抗藥性產生的新型抗生素。

## 1.2 細菌的鐵載體

鐵對於維持生命而言是必要的元素，但是鐵離子( $\text{Fe}^{3+}$ )在大多數環境中的溶解度很差，故大多以固體氧化物的形式存在於大自然中。可是鐵的氧化物並不容易被生物所利用，因此微生物會釋放出一種小分子鐵載體(siderophore)和 $\text{Fe}^{3+}$ 結合，其與 $\text{Fe}^{3+}$ 的結合常數可以達到 $10^{30}$ - $10^{49}$ ，因此可在限鐵環境中吸收利用 $\text{Fe}^{3+}$ 。<sup>6-8</sup>不同的細菌會釋放出不同種的鐵載體，並且可以利用特定膜蛋白辨識鐵載體與鐵的錯合物，將其送至膜內。<sup>9-10</sup>鐵載體的特殊運輸系統在藥物設計上具有兩個重要的意義。首先這個運輸系統大多是細菌等原核生物在使用，真核生物會以其他方式來得到鐵，故此藥物可以對細菌有一定的選擇性，降低副作用。另一個就是此運輸系統只有在缺鐵的環境下(例如：人體中)才會執行，才會大量表達相關蛋白，故可以避免抗藥性的快速產生。

雖然鐵載體有許多種，不過我們可以將鐵載體依照其以何種化學結構提供氧與  $\text{Fe}^{3+}$  結合分為三類，分別是：1) 磷苯二酚 2) 醯基羥胺 3) 羧酸（見圖一）。<sup>7</sup> 一般來說，強路易斯酸  $\text{Fe}^{3+}$  會在水溶液中和六個水分子形成八面體的  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6$  的錯合物。因為熵增加的緣故， $\text{Fe}^{3+}$  會釋出六個水分子，傾向於和鐵載體分子以 1:1 的方式結合，而且也會以六配位的方式形成八面體的穩定錯合物，故我們可以看到不論以上三種類型的鐵載體，都能夠提供六個氧與鐵結合。

## Catecholate Type      Hydroxamate Type      Carboxylate Type



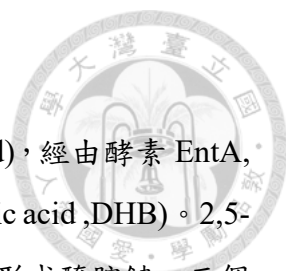
圖一：不同種的鐵載體及其螯合結構

總結來說，鐵載體與鐵之間的強結合力來自以下四個原因：

- 1) 氧配位基與  $\text{Fe}^{3+}$  之間的強作用力
- 2) 鐵載體上的雙牙基部分可以提供一個固定且有利的結構與鐵結合
- 3) 當鐵載體替換原先與鐵結合的水分子時，新的六配位錯合物可以減少熵的流失
- 4) 鐵載體上的六個配位基可以調整成一個有利結構與鐵結合

鐵載體與鐵結合的強度會隨著 pH 的不同而有所改變，因為鐵載體上的氧要與鐵結合，需要先經過去質子的過程。一般來說，結合力會隨著 pH 的降低而減少，因此不同細菌會依照其生活環境的不同產生不同種類的鐵載體。舉例來說：許多真菌類住在酸性環境下，故他們就會使用羧酸類的鐵載體。<sup>7</sup> 然而，在一般的生理條件下，腸菌素(Enterobactin)是與鐵結合力最強的鐵載體。

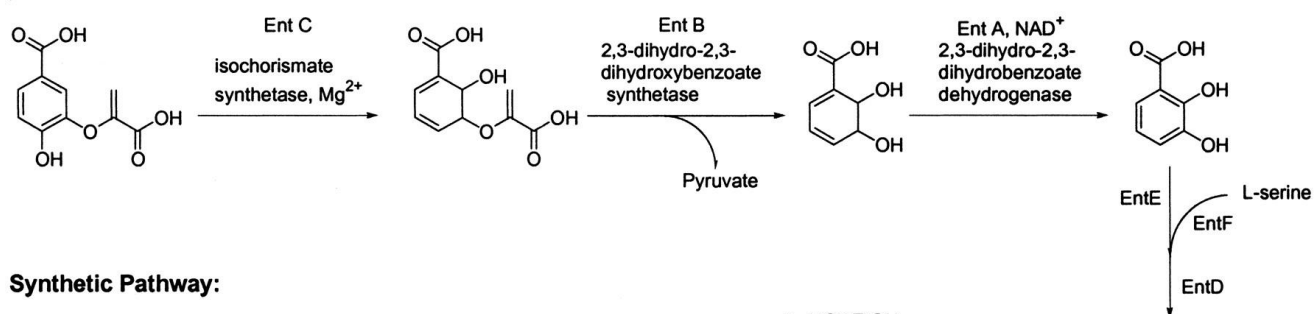




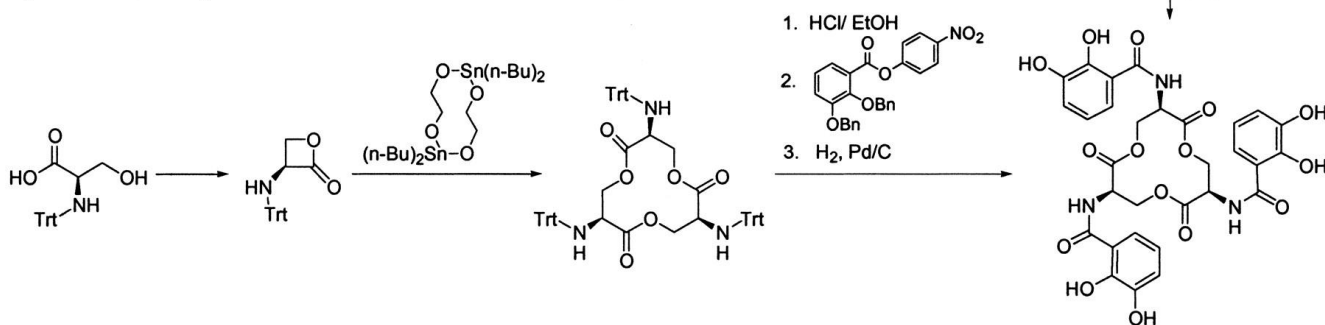
### 1.3 腸菌素

腸菌素(Enterobactin,Ent)的生合成是由分支酸(Chroismic acid)，經由酵素 EntA, EntB, EntC 的作用下，反應成 2,5-二羥基苯甲酸(dihydroxybenzoic acid ,DHB)。2,5-二羥基苯甲酸再經由酵素 EntD, EntE, EntF 的催化和 L-絲胺酸形成醯胺鍵。三個 DHB-Ser 分子會成環得到腸菌素。<sup>11</sup>(見圖二)

#### Biosynthetic Pathway:



#### Synthetic Pathway:

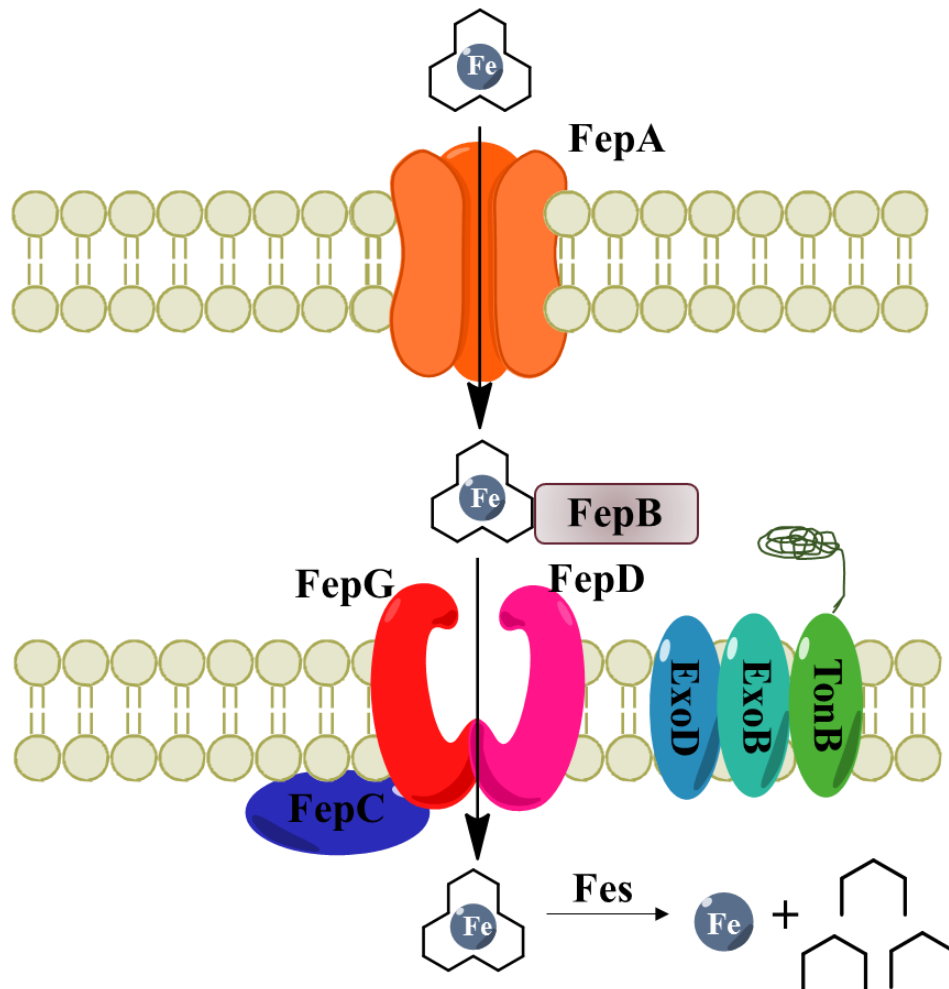


圖二：腸菌素的生合成與全合成

在三十年前，就有文獻記載過腸菌素的全合成，Cerey 和 Rastetter 分別提供兩種方法來合成出腸菌素，但這兩種合成策略都是先將三個絲胺酸結合成線狀，再將他們環化形成腸胃素的骨架。<sup>12,13</sup> 然而，這兩種途徑都需要以多步才能完成，因此整體的產率只有大約 1%。之後一個新的合成腸胃素的方法被報導，利用上了保護基的絲胺酸做一步的成環反應，提升了腸胃素的合成效率。(見圖二)<sup>14-16</sup>

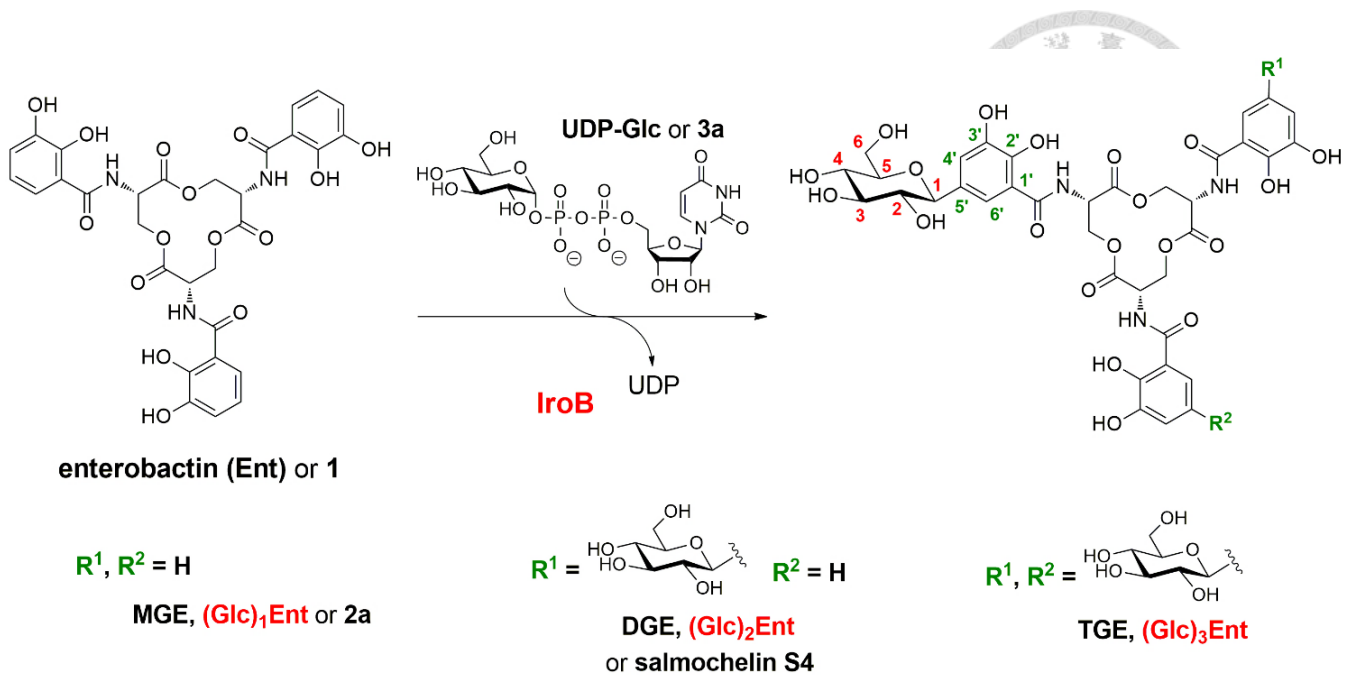
腸菌素(Enterobactin,Ent)是革蘭氏陰性菌(例：大腸桿菌和腸道沙門氏菌)用來抓取鐵離子的鐵載體<sup>17</sup>，鐵載體環上的六個羥基可以和鐵離子形成六配位的錯合物，此錯合物可以被外層膜上的 FepA 接收，再藉由 FepBCDG 運送入基質。<sup>18-20</sup> 被外層膜上的受體 FepA 辨認的過程是鐵載體被吸收的速率決定步驟。FepA 是一個具有 β-筒狀結構(β-barrel domain)的跨膜通道蛋白，一旦鐵載體與鐵的結合面被該蛋白辨識，TonB-ExoB-ExoD 的複合蛋白便會使該蛋白的構型改變，打開通道讓帶

有鐵的鐵載體進入。當通過外層膜後，FepB 就會護送帶有鐵的鐵載體通過周質空間(periplasmic space)。接著，通過一個由 FepD, FepG and FepC 結合形成的 ABC 轉運蛋白(ATP-binding cassette transporter)。最後，在細胞質中的 Fes 會水解腸菌素的骨架使其釋放鐵離子，以利細菌的後續使用。(見圖三)



圖三：腸菌素的吸收機制

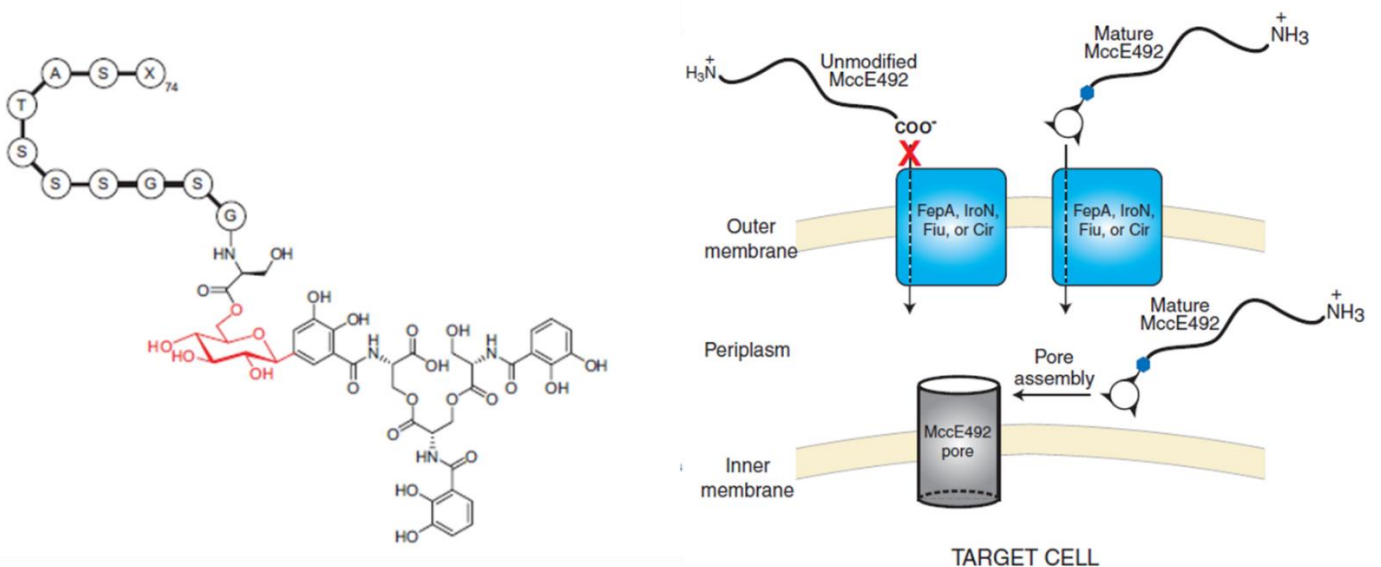
我們在自然界中也發現了腸菌素的相關衍生物- Salmochelin S4，Salmochelin S4 首先在腸道沙門氏菌中被分離出來，其結構為一個腸菌素上的兩個 DHB 五號碳的位置上加上一個葡萄糖分子。根據過去的文獻，認為加上糖之後的腸菌素可以防止被白蛋白及 siderocalin 蛋白螯合或去活化，因此會提高產生 salmochelin 細菌的致病性。<sup>21-22</sup> 同時，接上去的葡萄糖分子也不會破壞鐵載體與鐵的結合。鐵載體與糖分子的結合，可以透過酵素 IroB 的催化，加上一個或兩個葡萄糖，形成 monoglucosylated Ent (MGE), diglucosylated Ent (DGE), 或 triglucosylated Ent (TGE) (見圖四)。<sup>23</sup>



圖四：糖化腸菌素的結構與合成

## 1.4 鐵載體衍生物

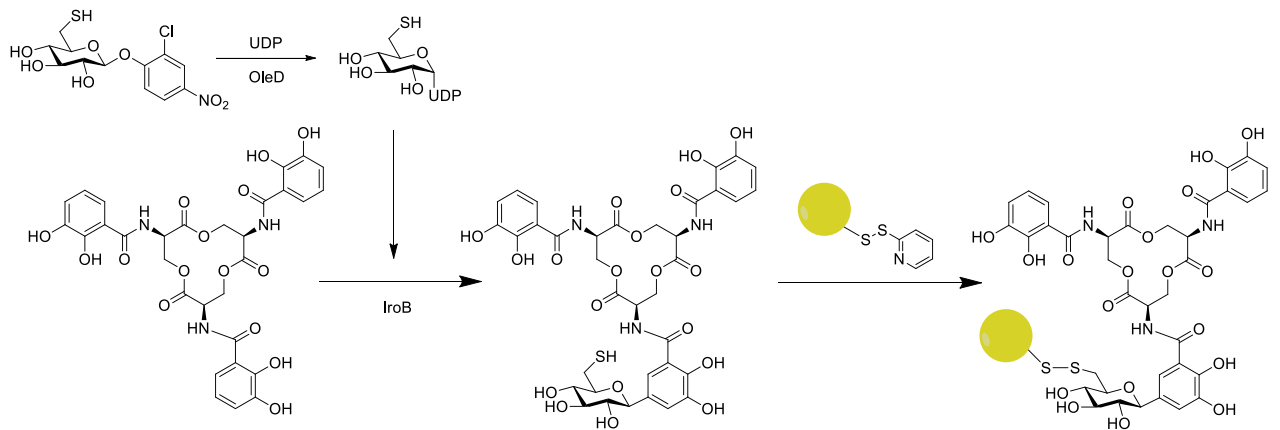
在自然界中也發現了模仿鐵載體的分子稱為 sideromycin<sup>24-25</sup>，sideromycin 可以藉由結合毒素於鐵載體上將毒素選擇性的運送進細菌內。Sideromycin 的發現提供了利用鐵載體選擇性運送標識分子或毒素進入細菌內的可能性。加上細菌與鐵載體的專一性，我們認為鐵載體是作為標識細菌或將藥物引導至細菌內的良好工具，希望可以透過類似「特洛伊木馬」的方式來運送毒素至細菌內。<sup>26-28</sup>



圖五：MccE492m 的結構及其吸收機制<sup>23</sup>

*Klebsiella pneumoniae* 產生的 Microcin E492m(MccE492m)便是一種 sideromycin，由革蘭氏陰性菌的鐵載體 enterobactin(Ent)連結一個醣再加上一段胜肽鏈作為毒素(見圖五)。<sup>29-30</sup> 這一段胜肽鏈就是 MccE492，由 84 個胜肽鏈所組成，可以在甘露糖通透酶(mannose permease.)的幫助下將細菌的內層膜去極化，達到殺菌的效果。然而，如果要用以殺革蘭氏陰性菌，這段胜肽鏈必須要能通過外層膜，再經過特殊通道進入內層膜。為了要能夠通過外層膜，所以 MccE492 和腸菌素以一個葡萄糖分子作為之間的連接物。這個葡萄糖則和 Salmochelin S4 一樣是接在腸菌素 DHB 的五號碳位置上。透過這樣的設計，MccE492m 便可以藉由 Ent-FepA 系統接收。因此我們希望能夠合成出模仿 MccE492 的分子，將鐵載體以醣連接毒素選擇性地送入細菌中。MccE492m 分子的發現在鐵載體相關藥物設計的開發上具有重大的意義，鐵載體在接有胜肽鏈之後的修飾並不會影響到其螯合鐵的能力，且也能夠被細菌吸收，因此或許我們能夠模仿此分子，將毒素與鐵載體透過葡萄糖作為連結，將毒素送入細菌體內。

MccE492m 類似物的合成，若是利用化學合成法，很難將醣分子精準合成在 Ent 環上的 C5，因此我們希望能找尋替代方案，以化學酵素法 (chemoenzymatic)來合成此分子。在文獻中，我們找到一種酵素 OleD 能夠進行逆轉醣化(reverse glycosylation)將 2-chloro-4-nitrophenyl glycosides (CNP-sugars)轉換成 UDP-Glucose。接著就可以利用前述所提的 IroB 來將具有高能的 UDP-Glucose 接上 Ent，形成 monoglucosylated Ent (MGE)或 diglucosylated Ent (DGE)。同時，我們希望將葡萄糖上 C6 的羥基換為硫醇基(見圖六)，未來便能在 C6 位上以雙硫鍵的形成接上不同功能的分子。



圖六：MGE 衍生物的結構及其合成

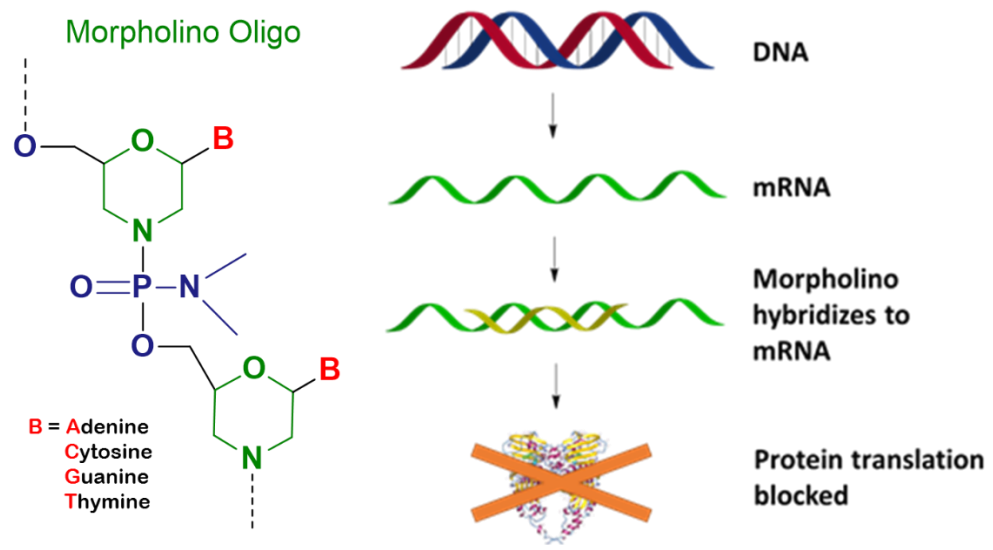


## 1.5 嗎啉基寡核苷酸(Morpholino Oligo)

嗎啉基寡核苷酸分子在結構是以嗎啉基替代原先RNA分子中的去氧核糖環作為骨架連接大約25個寡核苷酸，時常被用於分子生物研究時抑制基因表現的工具。嗎啉基寡核苷酸以磷醯二胺替代原先RNA分子上的磷酸根。磷醯二胺可以避免在一般生理環境的pH下被離子化，因此不帶有電性，不會與帶有電性的蛋白質作用影響其功能。另外，其水溶性也很好，讓實驗的操作更容易。嗎啉基寡核苷酸這個模仿RNA分子的結構，在經過這些修飾後變得更穩定。<sup>31</sup>已有多篇文獻記載利用嗎啉基寡核苷酸於細菌、老鼠、斑馬魚、青蛙和海膽等生物體中來抑制基因表現。<sup>32</sup>

而嗎啉基寡核苷酸抑制基因表現的方式，便是透過與轉錄出來的mRNA以氫鍵結合，使得接下來的轉譯受到阻礙，蛋白質無法順利表現(見圖七)。而將嗎啉基寡核苷酸送入生物體內的方式很多，可以經由顯微注射<sup>33</sup>、電穿孔<sup>34</sup>或是與穿膜蛋白結合<sup>35</sup>等方式將其送入生物體中。

我們計畫以嗎啉基寡核苷酸作為毒素，將其與腸菌素結合，形成模仿MccE492m的分子，將嗎啉基寡核苷酸帶入細菌體內，使其所需的必須蛋白質無法轉譯，達到抑菌效果，成為新型抗生素。



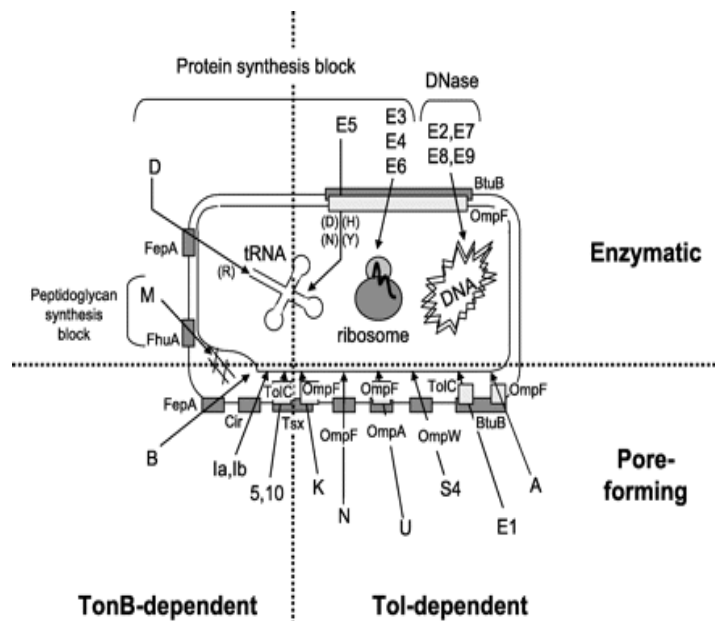
圖七：嗎啉基寡核苷酸的結構及其作用機制

## 1.6 大腸菌素(Colicin)

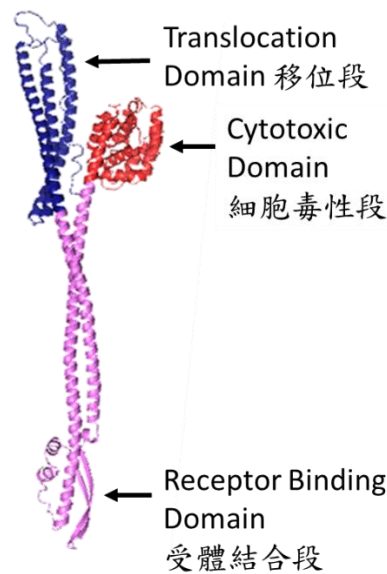
大腸菌素為大腸桿菌分泌的細菌素，通常為具活性的蛋白質，且可用以抑制同種近緣菌株的生長。大腸菌素通常可以由N端至C端分為三段，第一段被細菌外層膜上的受體辨認進行專一性的結合，第二段則是幫助大腸菌素移位至細胞質或

細胞質膜，第三段則是具有細胞毒性的。而大腸菌素產生細胞毒性的方式則有很多種(見圖八)，包括將細胞質膜去極化、阻擋蛋白合成或是具 DNase 活性等，以達到殺菌效果。<sup>39</sup> 例如，大腸菌素 Ia 便是具能使細胞質膜去極化毒素的大腸菌素。(見圖九)

雖然自然界中的大腸菌素是為了毒殺同種以減少競爭而產生，但是我們可以将大腸菌素中第三段具細胞毒性的胜肽鏈作為接在 Enterobactin 上的毒素，產生一種新型的抗生素。此種的新型抗生素更為接近自然界中的 Microcin E492m，因為其接上的毒素同為胜肽鏈，故預測其可抑菌的成功機會更大。



圖八、大腸菌素的分類<sup>39</sup>。



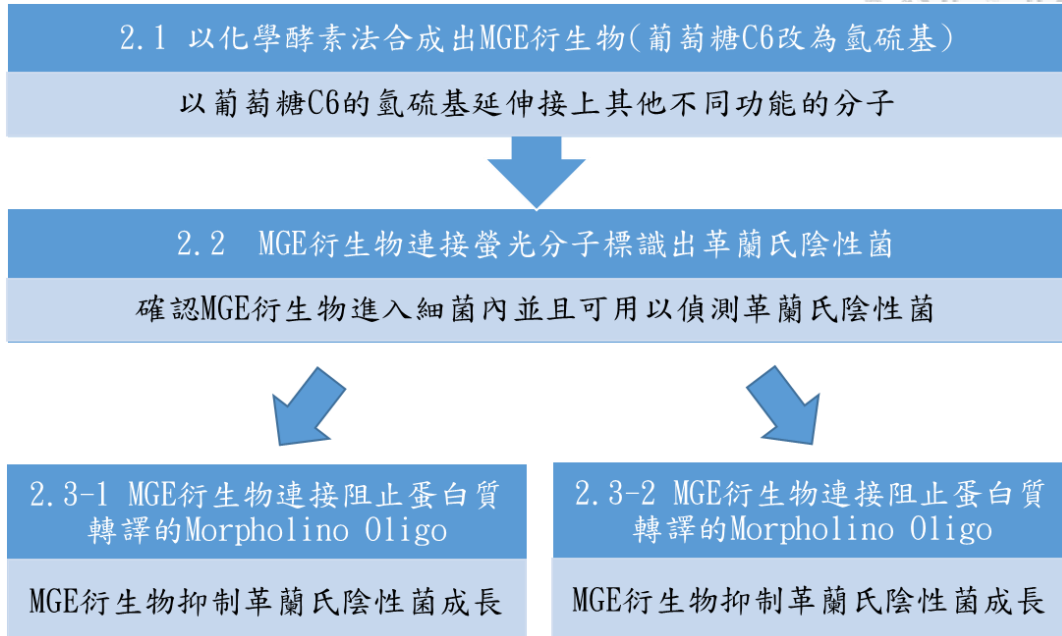
圖九、大腸菌素 Ia 的結構<sup>40</sup>



## 第二章 實驗方法及目標



本研究將分為三大階段：

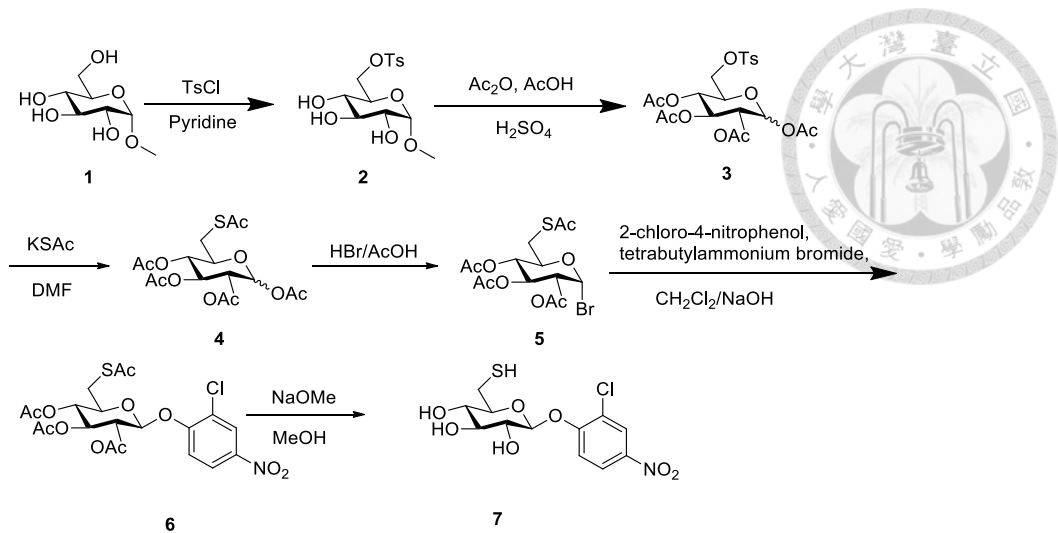


### 2.1 以化學酵素法合成出 MGE 衍生物(葡萄糖 C6 改為氫硫基)

為了利用化學酵素合成法，我們先分別依其可能的路徑來合成(1)6-SH-CNP-Glucose (2)enterobactin，再以酵素連接起這兩個部分完成此 MGE 衍生物。

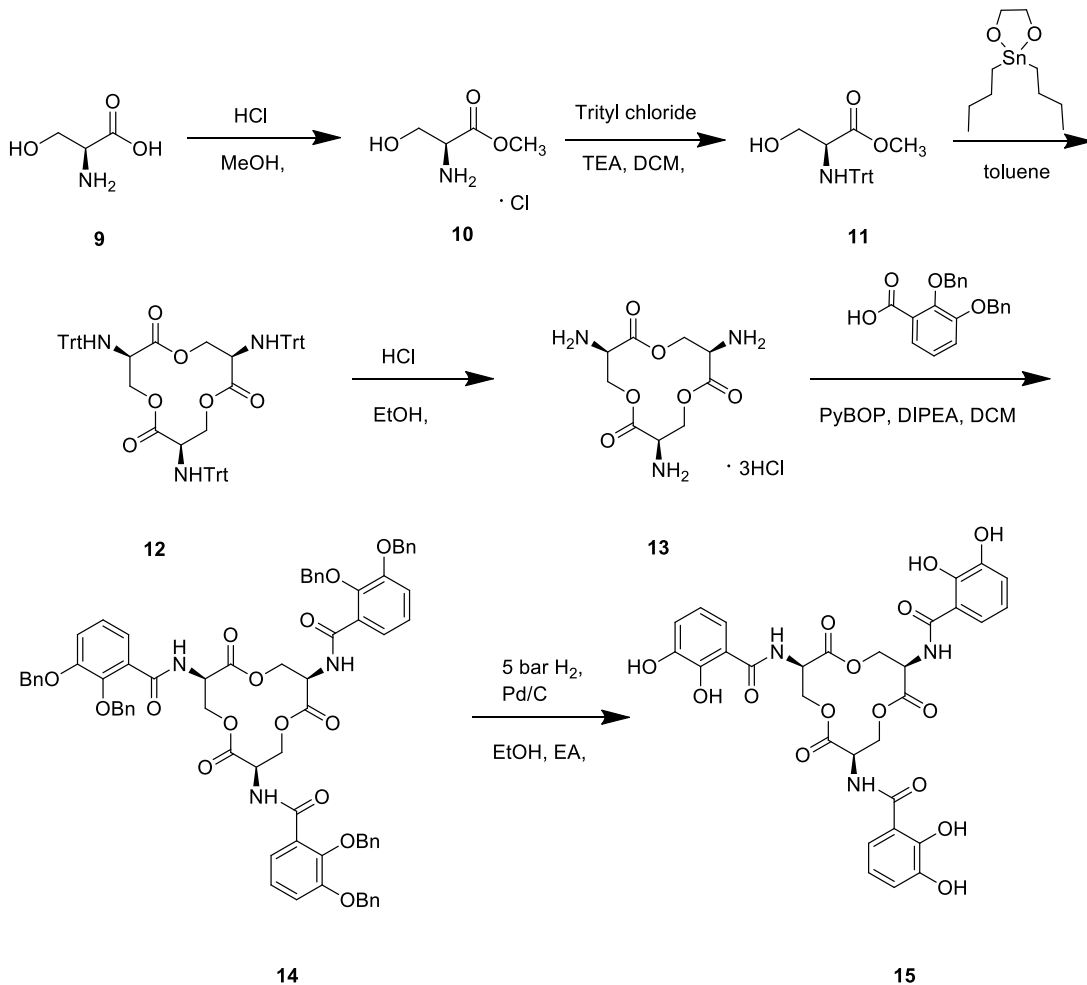
#### 2.1-1 6-SH-CNP-Glucose

我們計畫以化合物 1 為起始物，先選擇性地將 C6 上的醇轉換為對甲苯磺酸酯得到化合物 2。接著，將其他位置上的羥基乙醯化保護起來得到化合物 3，避免後續步驟中可能出現的副反應。再進行 SN2 反應將 C6 上的對甲苯磺酸酯以硫代乙酸取代得到化合物 4。再選擇性地將 -Br 接上 C1 得到化合物 5，接著再以 2-chloro-4-nitrophenol 合成出化合物 6。最後，再去保護得到化合物 7。



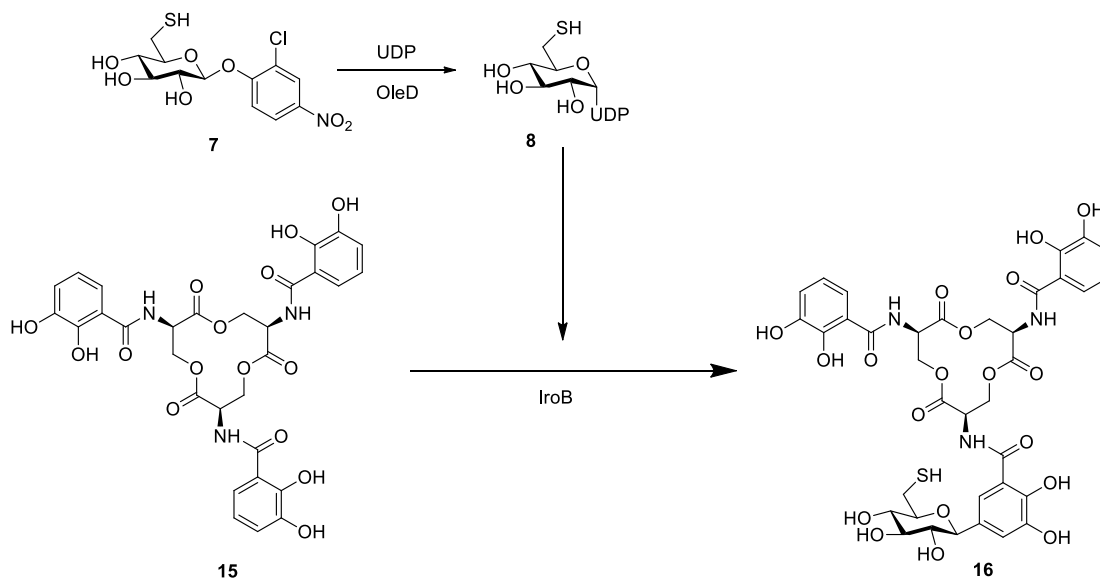
## 2.1-2 腸菌素

已有文獻報導過腸菌素的合成<sup>26-27</sup>，以化合物 **9** 為起始物，將酸轉換為酯得到化合物 **10**。接著以三苯甲基將胺基保護起來得到化合物 **11**，在進行合環反應得到化合物 **12**。接著去保護得到化合物 **13**，再將化合物 **13** 和帶有苄氧基取代基的苯甲酸形成醯胺鍵，得到化合物 **14**，接著去保護得到羥基取代的化合物 **15**。





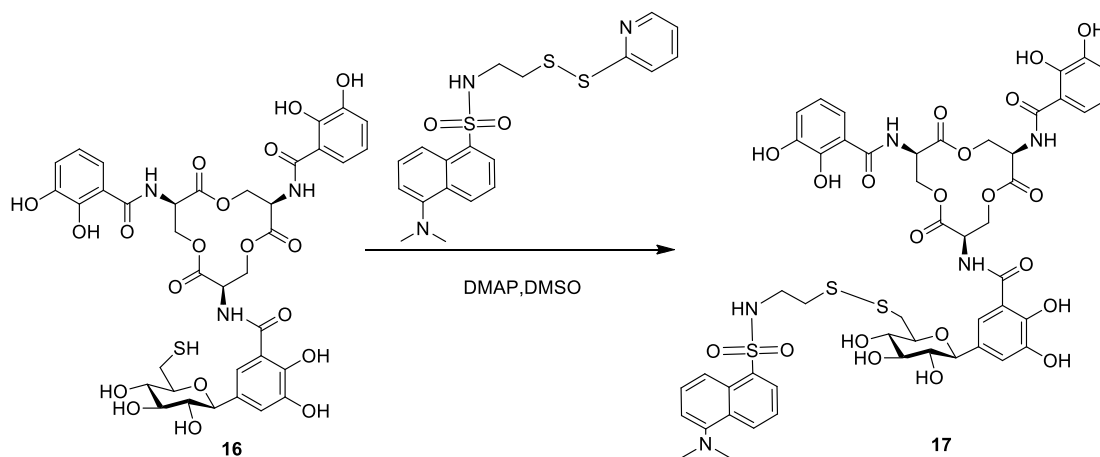
### 2.1-3 MGE 衍生物(6-SH-Glucose 及腸菌素的結合)



最後依照前述文獻所提的酵素法，以 OleD 將化合物 7 上 C1 的 CNP 以 UDP 取代<sup>36</sup>，得到 UDP-glucose 8，再透過 IroB 酵素結合 6-SH-glucose 與 ent 得到 MGE 衍生物 16(葡萄糖 C6 改為氫硫基)。<sup>37-38</sup>

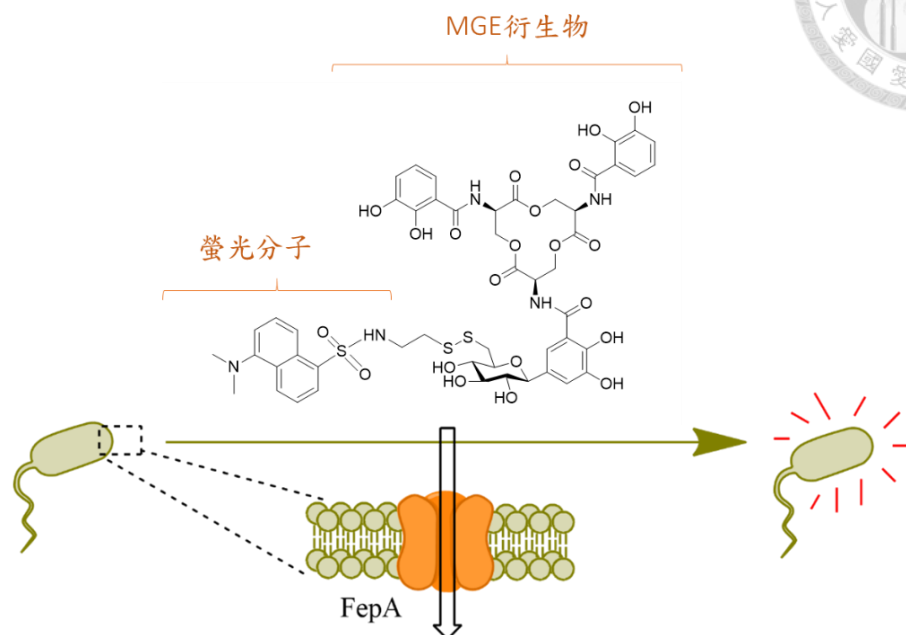
### 2.2 MGE 衍生物連接螢光分子標識出革蘭氏陰性菌

我們計畫利用 MGE 衍生物 16 中的糖 C6 硫醇基，和高活化雙硫鍵的 Dansyl-PDS 形成雙硫鍵連接起來得到化合物 17。化合物 17 的合成路徑如下：



在限鐵環境下，此化合物理論上可藉由前述鐵載體的高度專一性進入可表達 FepA 的革蘭氏陰性菌的中，又因此化合物為一螢光分子，故流式細胞儀 (flow cytometer) 偵測螢光確認此化合物進入細菌中。故我們可以分別在含鐵/限鐵環境中以不同細菌進行實驗，觀察螢光的強度，如此便可確定此化合物此會專一性的在

限鐵環境下被革蘭氏陰性菌利用。此化合物便可作為革蘭氏陰性菌的偵測藥劑。  
(見圖十)



圖十：腸菌素連接螢光分子標識細菌示意圖。在限鐵環境下革蘭氏陰性菌以 Ent 獲取鐵，同時帶入螢光分子，因而產生螢光。

## 2.3 MGE 衍生物連接毒素

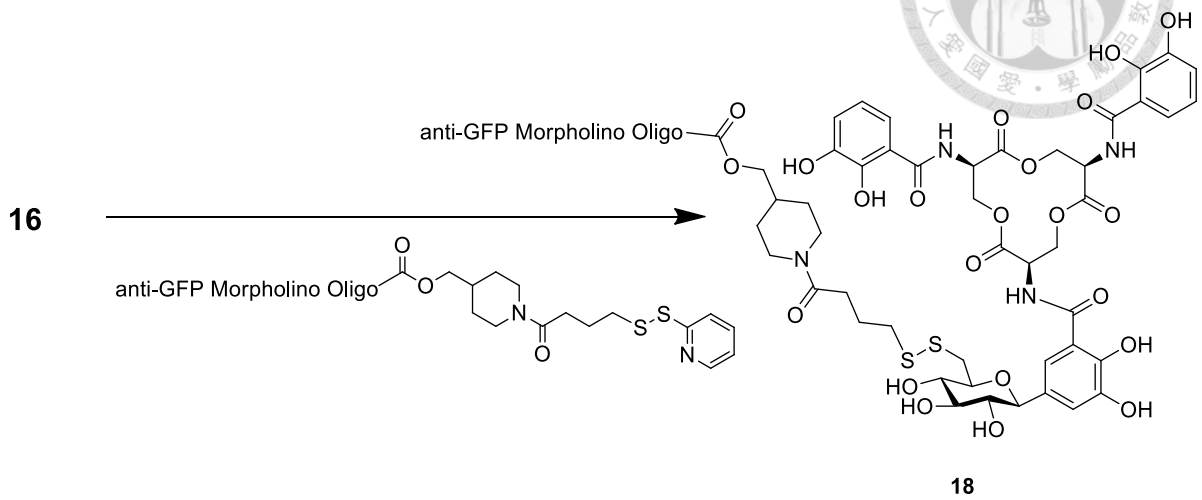
經由連接螢光基團的 MGE 衍生物除了可以用以標識細菌，也可用以證明以鐵載體運送藥物的策略是可行的。因此接下來，我們希望能夠在 MGE 衍生物上面連接具毒性的分子，包括能夠阻止蛋白質轉譯的 morpholino oligo 和能夠使細胞質膜去極化的大腸菌素胜肽鏈，希望能製成新型抗生素。以下將分為兩小節分別討論其實驗設計。

### 2.3-1. MGE 衍生物連接阻止蛋白質轉譯的 morpholino oligo

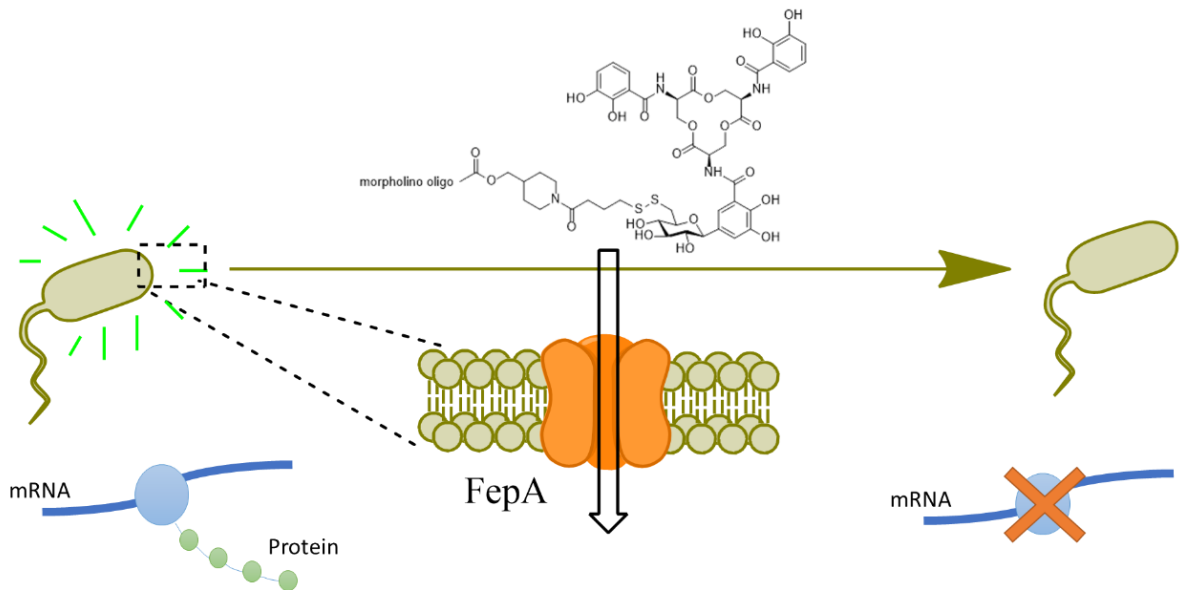
若經流式細胞儀確認此 MGE 衍生物進入細菌中，便可將原先接上的 Dansyl chloride 為接上阻止蛋白質轉譯的 morpholino oligo 以達到殺菌的作用。

過去常使用反義 RNA(antisense RNA)與 mRNA 結合抑制轉譯的進行。但因反義 RNA 較不穩定且專一性差造成實驗有所限制。於是 morpholino oligo 被發明出來，其更具穩定性且阻止轉譯更有效率。目前也有廠商依照需求能夠客製化出能阻止不同蛋白質表達的 morpholino oligo，且可以不同官能基連接。<sup>25</sup> 我們已在廠商的目錄上看到具有雙硫鍵取代基的 morpholino oligo，便可與 MGE 衍生物(化合物

16)上的硫醇作雙硫鍵交換得到接上 morpholino oligo 的 MGE(化合物 18)。其合成路徑如下：



為了確認 morpholino oligo 接上 MGE 衍生物是否可以阻止細菌轉譯，首先可以先接上一段阻止 GFP 轉譯的 morpholino oligo 於 MGE 衍生物上，在限鐵環境中，革蘭氏陰性菌便會以此衍生物來獲取鐵，同時阻止 GFP 轉譯的 morpholino oligo 也一起帶入細胞內，若革蘭氏陰性菌含有表現出綠色螢光 GFP 基因時，則其基因的轉譯會被 morpholino oligo 抑制而無法產生螢光 GFP 蛋白(見圖十一)，我們便可觀察螢光前後的消長來確認以 morpholino oligo 接上 MGE 衍生物來阻止細菌轉譯的可能性，有望以此作為藥物的開發。



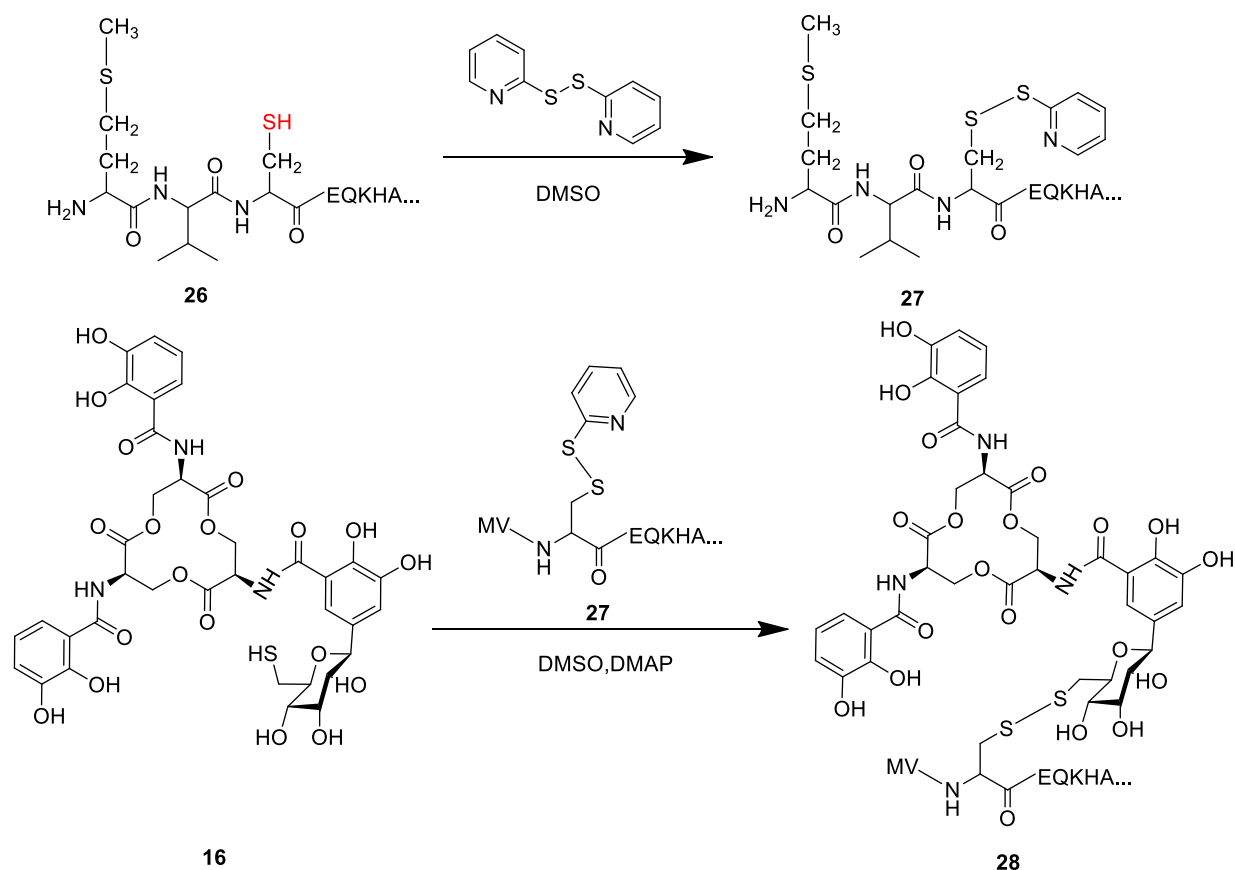
圖十一：腸菌素連接 morpholino oligo 抑菌示意圖。在限鐵環境下革蘭氏陰性菌以 Ent 獲取鐵，同時帶入 morpholino oligo 阻止細菌轉譯蛋白質。

再改接上另一段 morpholino oligo，其可阻止轉譯出細菌生存所必需的蛋白質，使得細菌難以生存，達到抑菌效果。也可以接上一段阻止抗藥性細菌轉譯  $\beta$ -內醯胺酶的 morpholino oligo，使其抗藥性消失，如此便可產生一不具抗藥性的抗菌藥物。

### 2.3-2. MGE 衍生物連接使細胞質膜去極化的大腸菌素 C 端胜肽鏈

因大腸菌素具有多種，且其對細菌的專一性是來自於其第一段和細胞膜受體結合的區域，毒素區和細菌專一性應無太大關連，故我們從多種具有能將細胞質膜去極化的大腸菌素中挑選容易取得的，經過搜尋之後發現中興大學的陳建華教授實驗室有進行大腸菌素 Ib 的相關研究，且能提供產生大腸菌素 Ib 之菌種，故選用大腸菌素 Ib 之 C 端作為毒素。

得到菌種後，我們將其質體抽出，並透過聚合酶連鎖反應及重組 DNA 技術，得到具有細胞毒性的 C 端大腸菌素(化合物 26)，且於此端胜肽鏈上加上具硫醇鍵的半胱胺酸，經活化雙硫鍵後(化合物 27)，可用以和 MGE 衍生物(化合物 16)以雙硫鍵連接，形成新型抗生素(化合物 28)。



## 第三章 結果討論

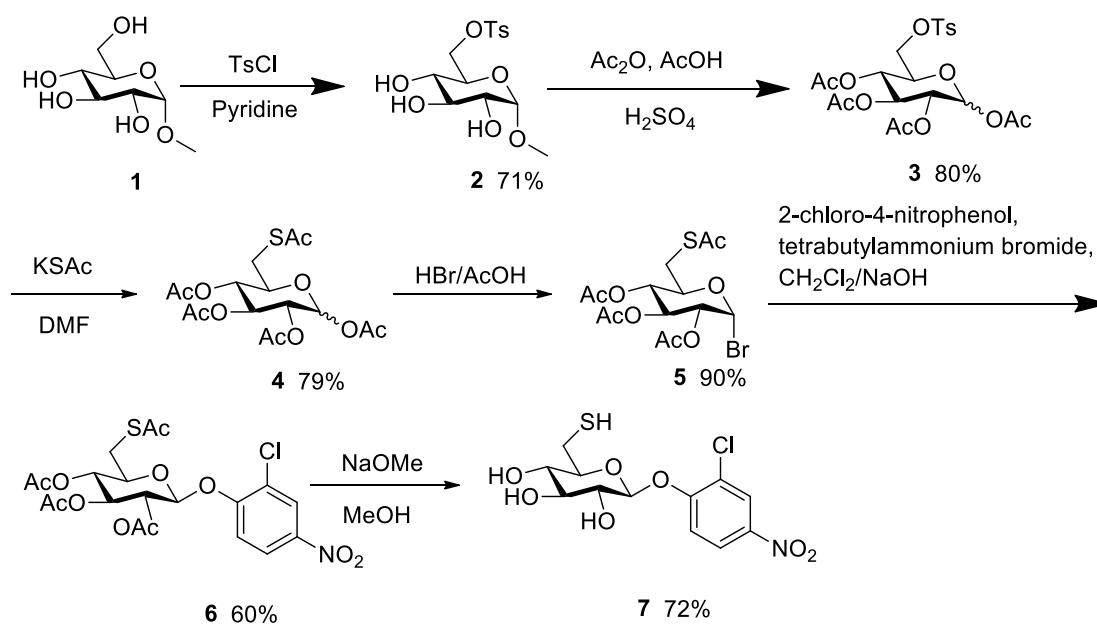


### 3.1 實驗結果討論

#### 3.1-1 以化學酵素法合成出 MGE 衍生物(葡萄糖 C6 改為硫醇基)

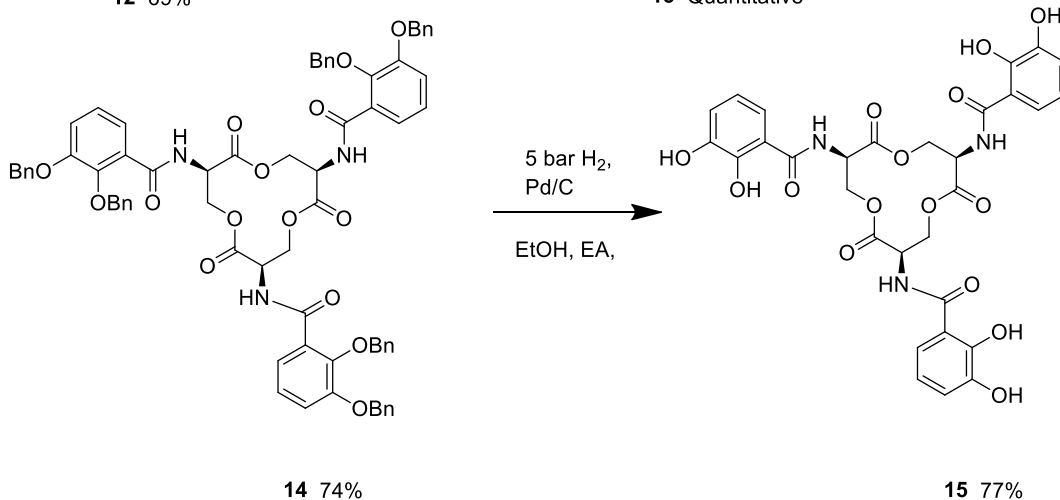
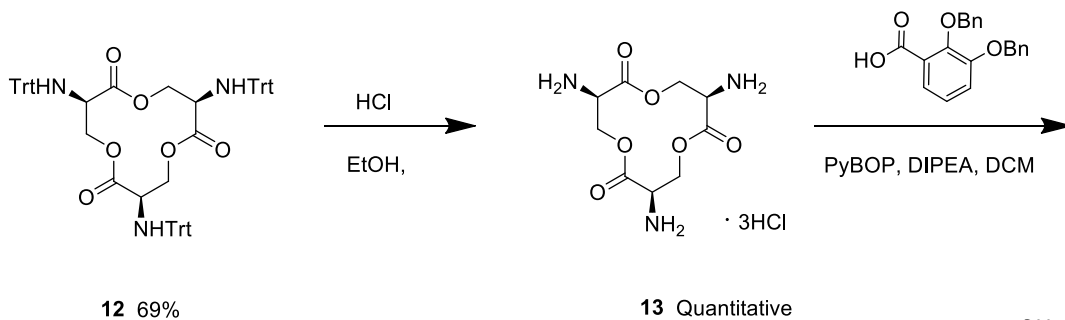
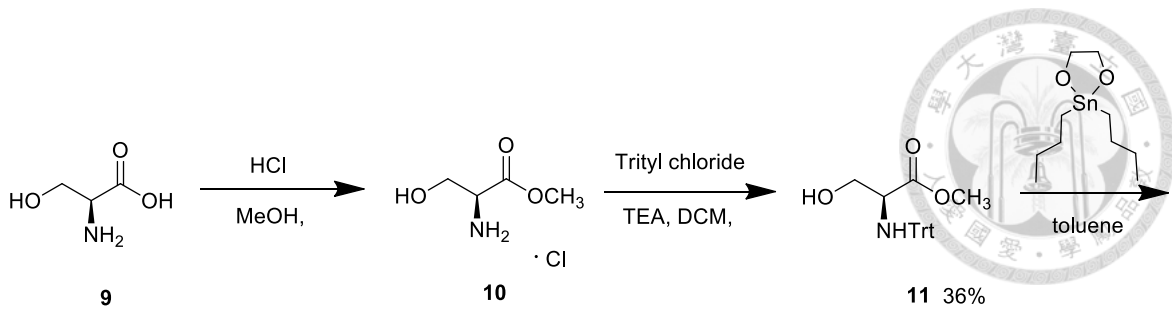
##### (1) 6-SH-CNP-Glucose

由於在設計合成路徑時，已參考過多篇文獻，謹慎設計出最易實現的路徑，故其合成路徑大致和初期所規劃的路徑相同，但仍需透過不斷調整反應物當量數、反應時間和溶劑等反應條件，來優化反應。



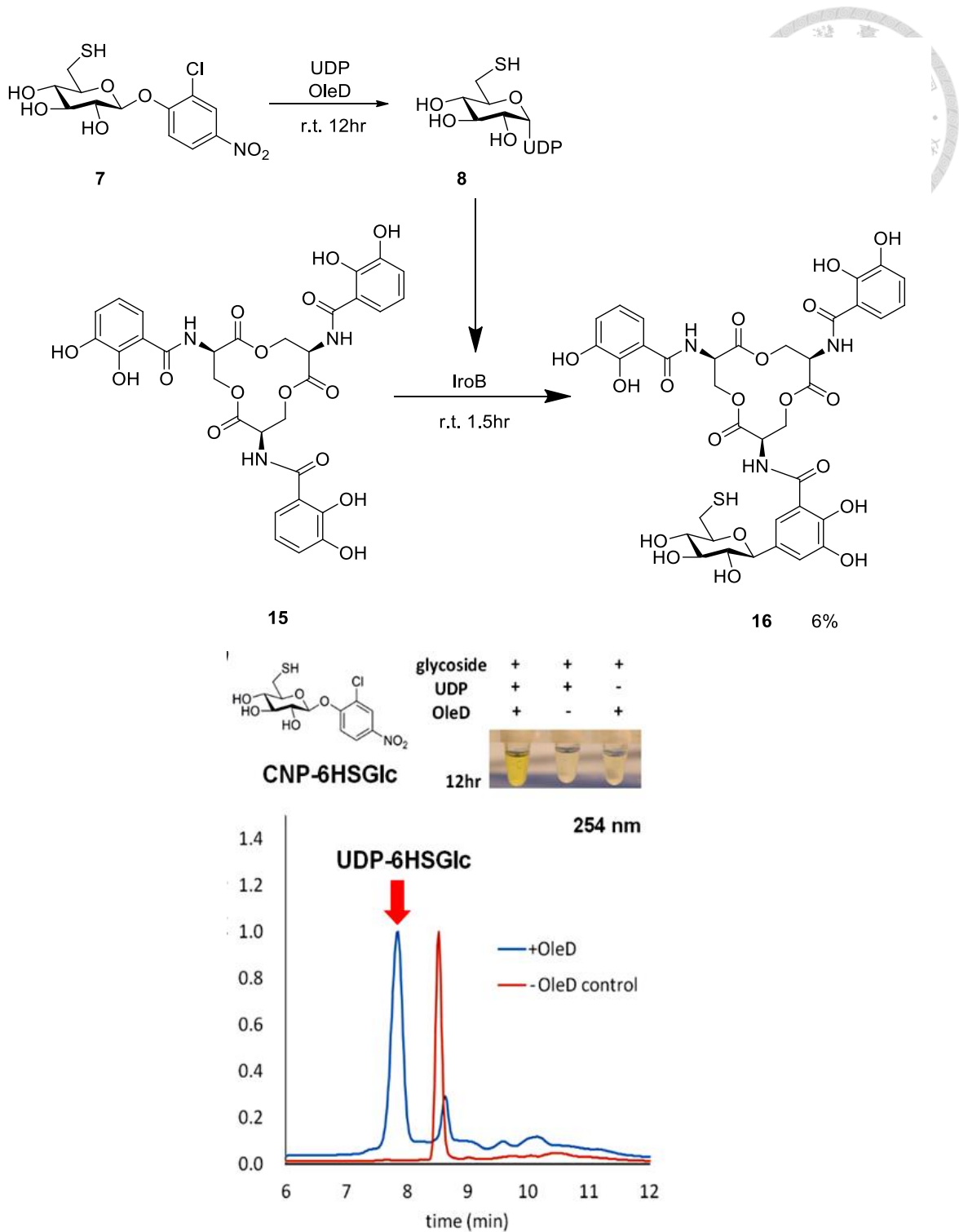
##### (2) 腸菌素

腸菌素的合成已有多篇文獻報導，且都經過優化，按照文獻可以不錯的產率合成出腸菌素。



### (3)MGE 衍生物(6-SH-Glucose 及腸菌素的結合)

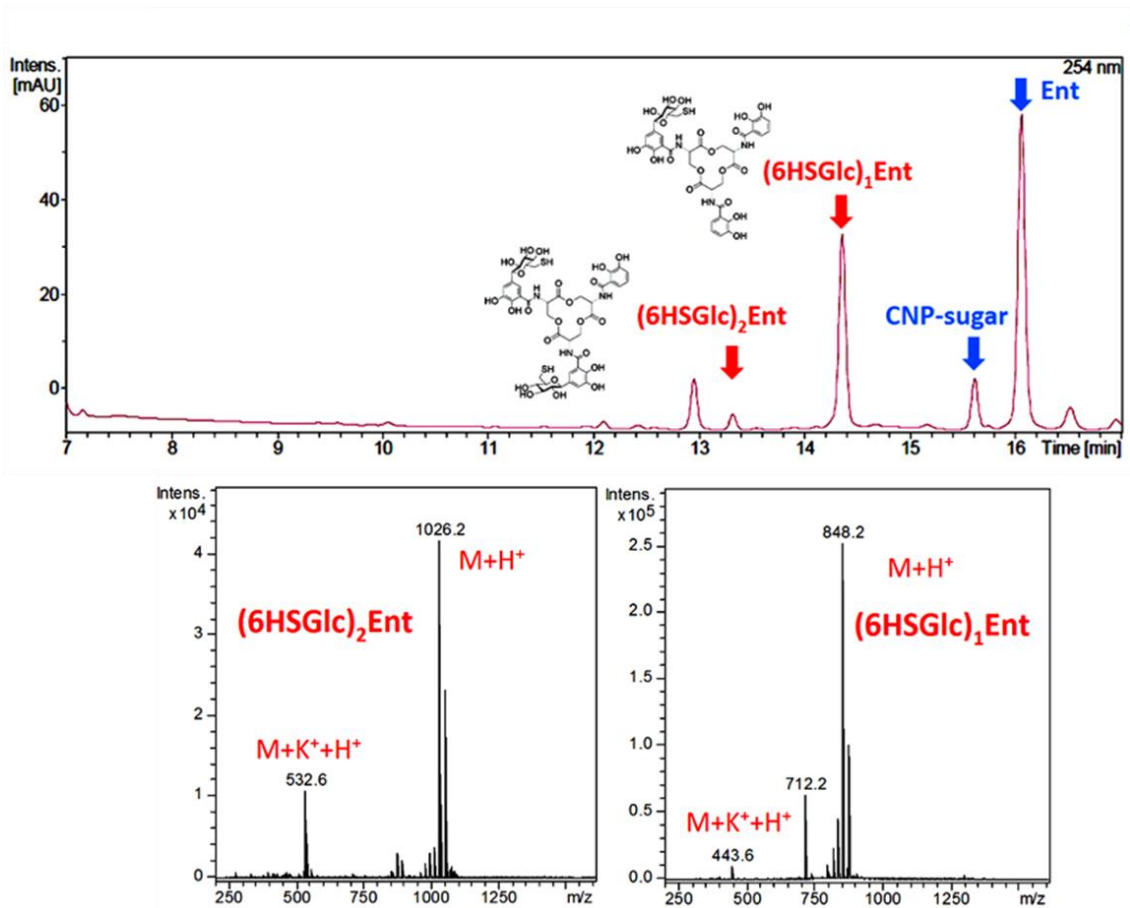
純化出酵素 OleD 及 IroB 後，即可在一鍋內連續利用此兩種酵素合成出 MGE 衍生物，將 6-SH-Glucose 和腸菌素結合，雖然產率看似不高，但透過酵素合成法能在一鍋的反應中，將修飾過的葡萄糖準確的合成在所希望的位置。



圖十二、由顏色及 HPLC 監測 OleD 催化反應<sup>41</sup>

由上圖可以看到，OleD 可以催化逆轉糖化將 2-chloro-4-nitrophenyl glycosides (CNP-sugars)轉換成 UDP-Glucose。由圖中可以看到當缺乏 OleD 或 UDP 時，溶液顏色較為澄清；而當反應順利進行，產生 UDP-Glucose 時，可以看到溶液變為黃色，黃色為 2-chloro-4-nitrophenyl 從糖上掉下來後的顏色。從 HPLC 分析中也可以看到當加有 OleD 時，UDP 明顯變少，且產生了大量 UDP-Glucose。

接著不須純化，直接繼續進行下一步 IroB 催化將具有高能的 UDP-Glucose 接上 Ent，形成 monoglucosylated Ent (MGE)或 diglucosylated Ent (DGE)。由下圖的 LC/MS 圖可以看出起始物(CNP-sugar 和 Ent)及兩種產物(MGE 和 DGE)。

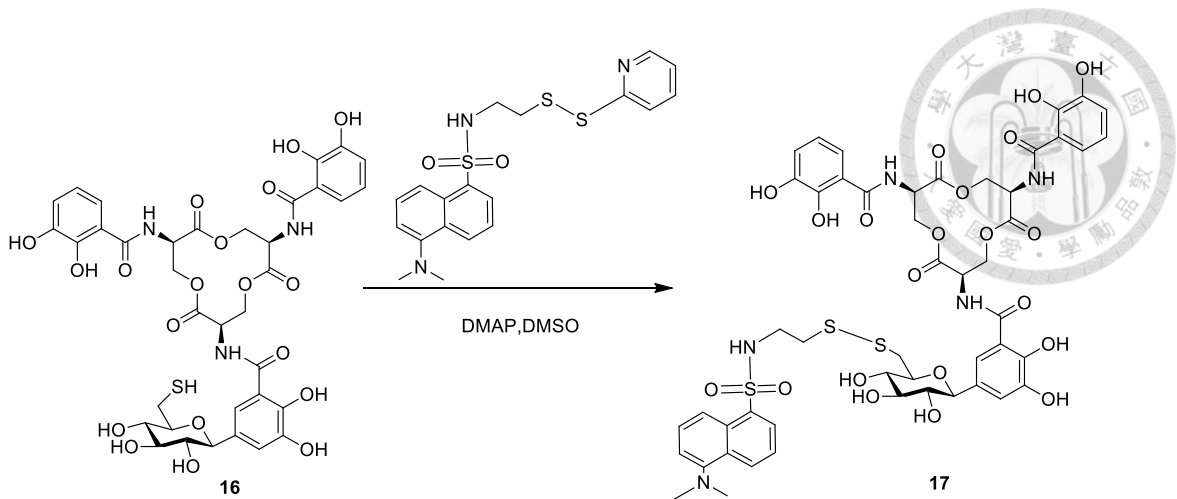


圖十三、OleD-IroB 酵素反應產物的 LC/MS 圖譜<sup>41</sup>

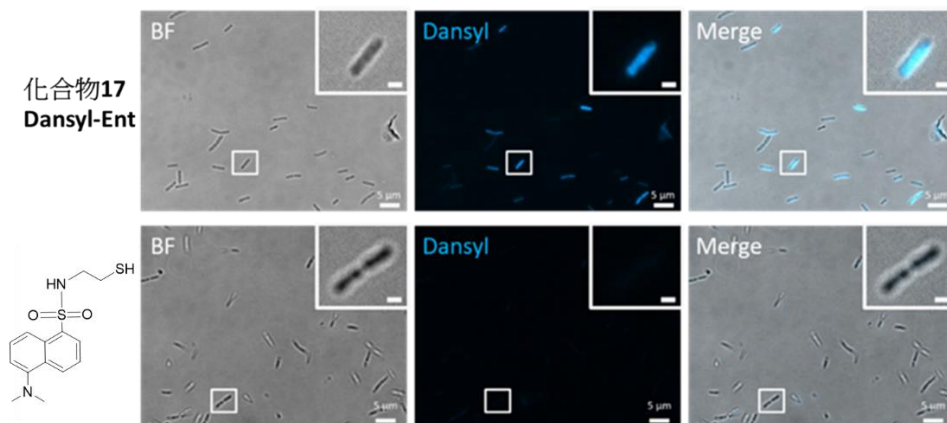
### 3.1-2 MGE 衍生物連接螢光分子標識出革蘭氏陰性菌

在 4-Dimethylaminopyridine(DMAP)的催化下，帶有高活化雙硫鍵的 dansyl 螢光分子可以與 MGE 衍生物上的硫醇基形成新的雙硫鍵，將螢光分子和 MGE 衍生物結合，以標識出革蘭氏陰性菌。



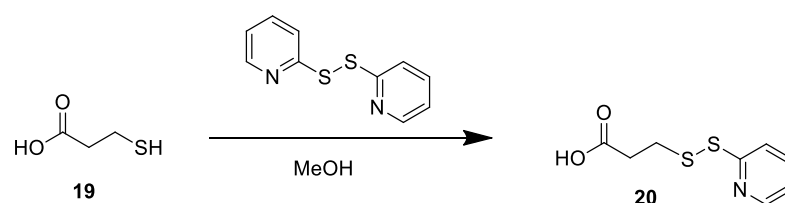


原先我們是計畫可以透過流式細胞儀來觀測細菌被標識的情況，但因為核心生物實驗室中的流式細胞儀激發 dansyl 的雷射光無法使用。因此，我們只好改以螢光顯微鏡作為觀測。我們以帶有硫醇基的 dansyl 分子作為控制組，我們可以從圖十三中的螢光顯微鏡圖發現，連結螢光分子的 MGE 衍生物被細菌吸收後產生螢光。然而，只帶有硫醇基的 dansyl 分子並沒有被細菌吸收利用，細菌大多沒有呈現螢光。故我們推斷此 MGE 衍生物應可被革蘭氏陰性菌吸收利用，用於後續的藥物開發。



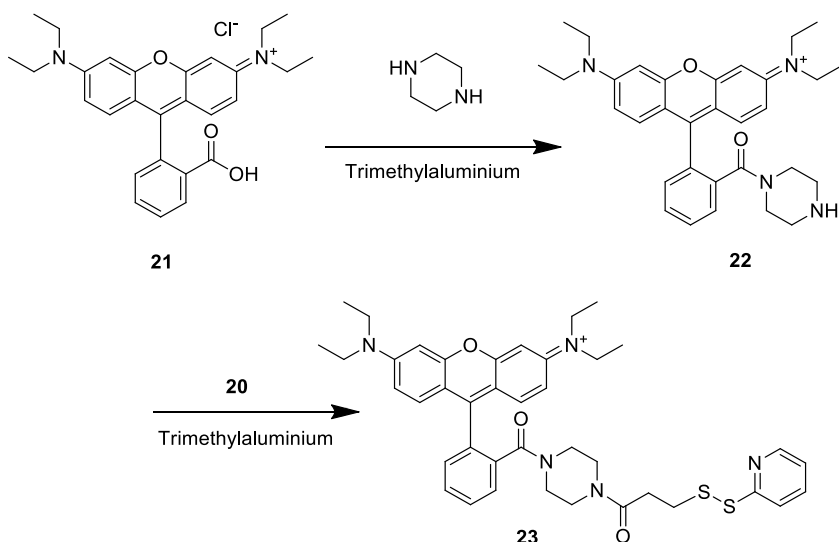
圖十四、大腸桿菌 CFT073 螢光顯微鏡圖。上圖以接有螢光分子的 MGE 衍生物為試劑，下圖則以只帶有硫醇基的螢光分子為控制組。<sup>41</sup>

在利用螢光顯微鏡測試的同時，我們也合成出另一種修飾過的螢光分子，其同樣帶有高能雙硫鍵的 Rhodamine。

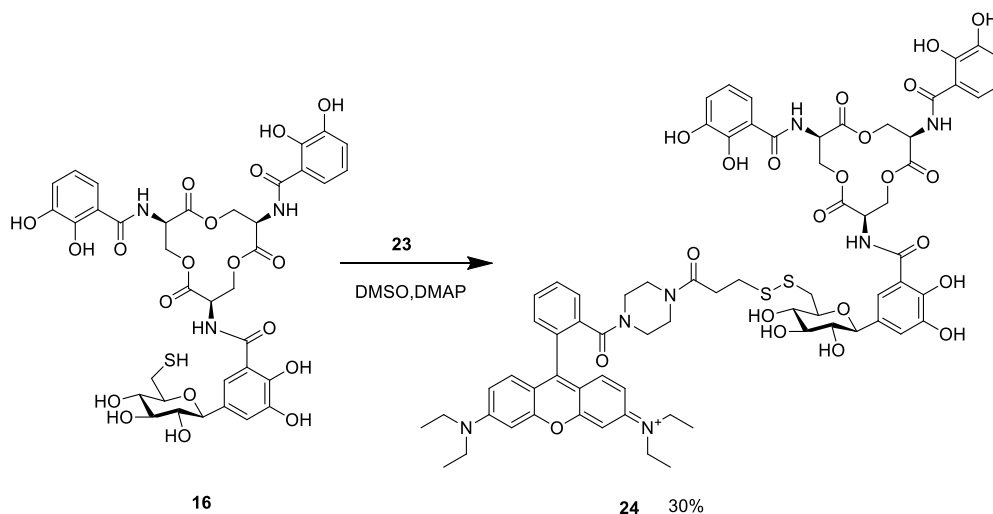




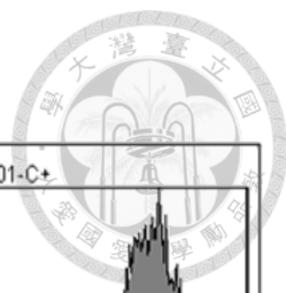
先以化合物 **19** 為起始物，透過雙硫鍵交換得到化合物 **20**。



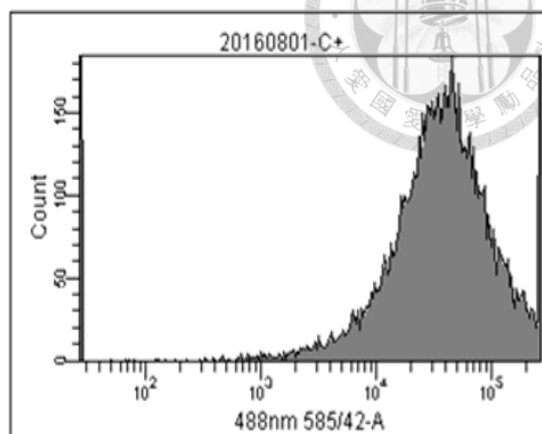
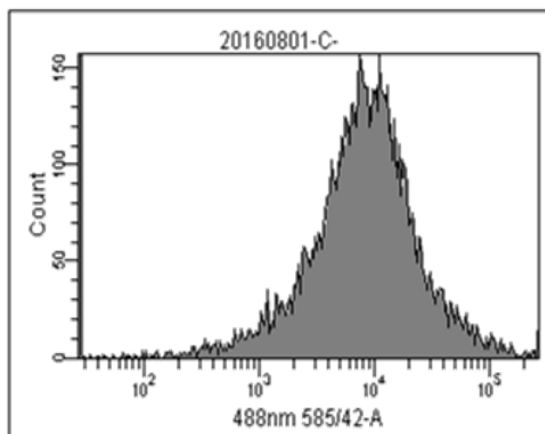
再以 rhodamine B **21** 為起始物，和 piperazine 形成醯胺鍵得到化合物 **22**。接著與化合物 **20** 再形成醯胺鍵得到化合物 **23**。實驗室已有合成好的化合物 **20** 及 **22**，故我們只需要一步驟即可得到 **23** 帶有雙硫鍵的 Rhodamine。



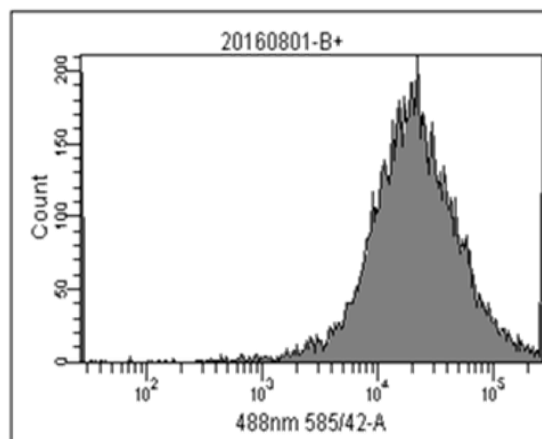
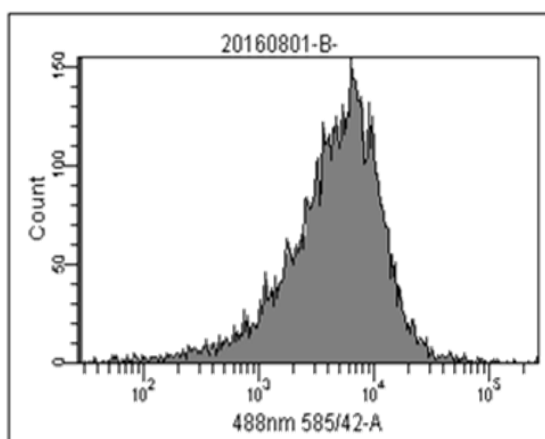
最後將化合物 **16** 和化合物 **23** 以雙硫鍵連接預計可得到化合物 **24**。該分子即可利用流式細胞儀來偵測細菌的辨識情況。圖十四中可以看到該分子在不同細菌中的辨識情形，左圖以 **22** 作為試劑，右圖則以 MGE 衍生物 **24** 作為試劑。我們可以發現帶有螢光分子的 MGE 衍生物可以標識出革蘭氏陰性菌(大腸桿菌 CFT073 及 BL21)，因此細菌的螢光強度增加，其螢光波峰整體右移，大約增加一個數量級。反之，革蘭氏陽性菌(金黃色葡萄球菌)則無此現象。因此我們認為此 MGE 衍生物能夠選擇性地將藥物送入革蘭氏陰性菌中。



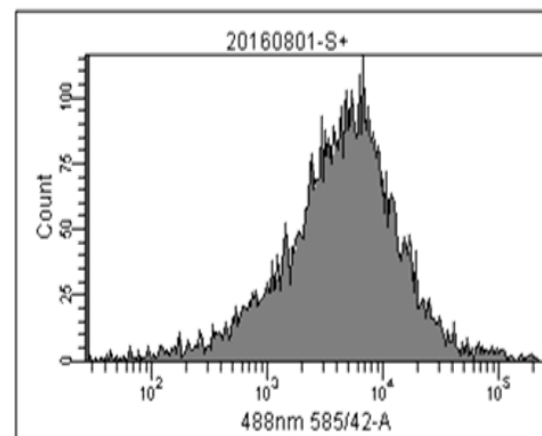
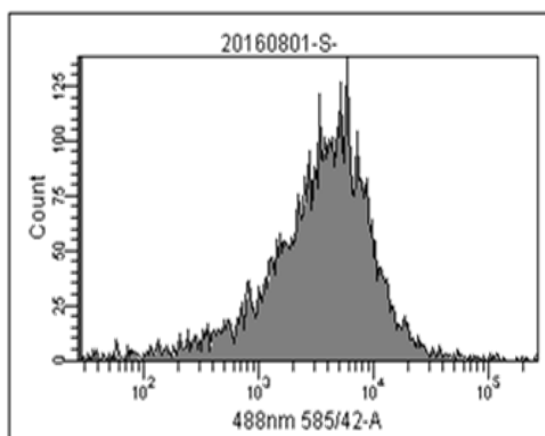
### 大腸桿菌(*E. coli* CFT073)



### 大腸桿菌(*E. coli* BL21)



### 金黃色葡萄球菌(SA113)

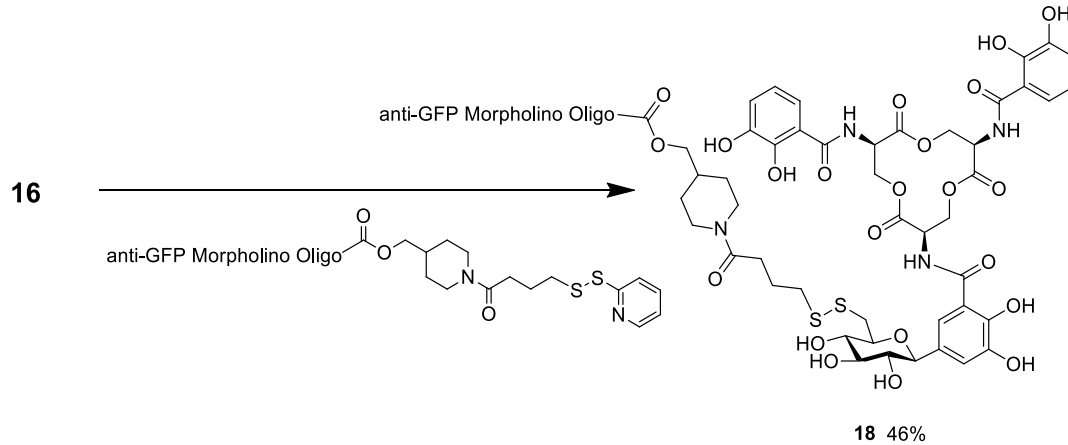


圖十五、以接上 Rhodamine 的 MGE 衍生物標示不同細菌。在不同菌中分別以帶有 linker 的 Rhodamine 化合物 **22** 作為試劑(左圖)和接上 Rhodamine 的 MGE 衍生物 **24** 作為試劑(右圖)。

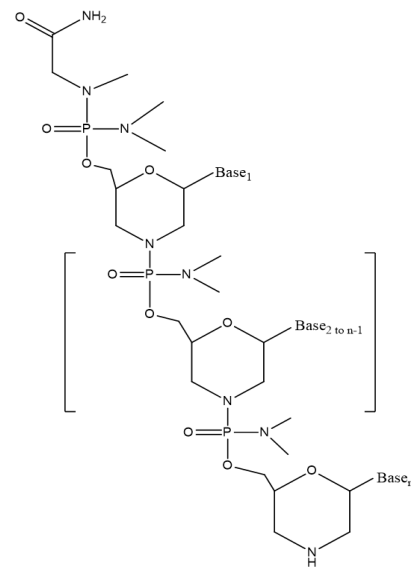
### 3.1-3 MGE 衍生物連接毒素

利用 MGE 衍生物上的硫醇基連接不同毒素，例如：嗎啉基寡核苷酸和大腸菌素 C 端胜肽鏈，製成新型抗菌藥物。

#### 3.1-3 (1) MGE 衍生物連接阻止蛋白質轉譯的嗎啉基寡核苷酸

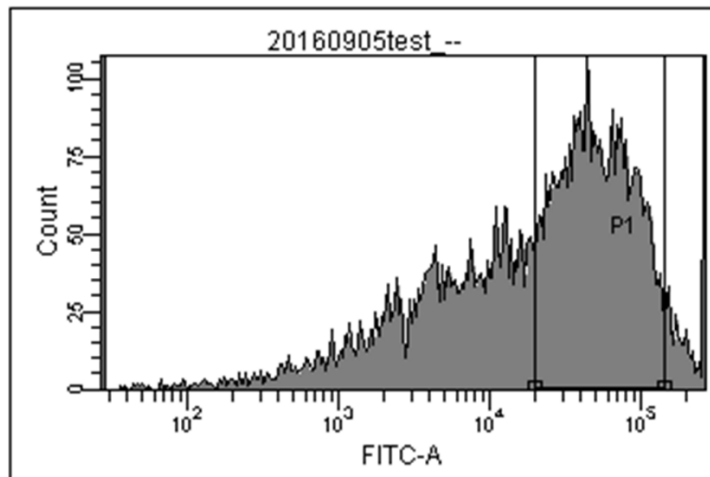


Morpholino 是由 genetool 公司研發製造，故我們向該公司訂購一可以抑制綠色螢光蛋白轉譯的 morpholino，其結構如右圖所示並且在尾端以雙硫鍵修飾。可提供我們直接所合成的 MGE 衍生物以雙硫鍵結合。Morpholino 的序列 5'-TGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCAT-3'

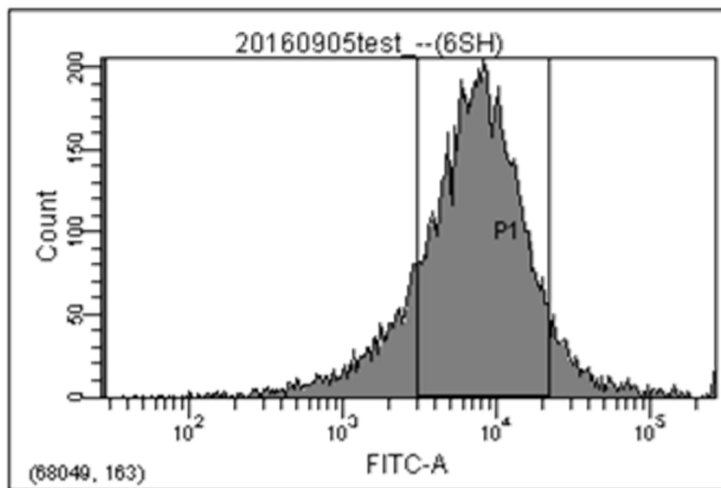


圖十四、Morpholino 結構

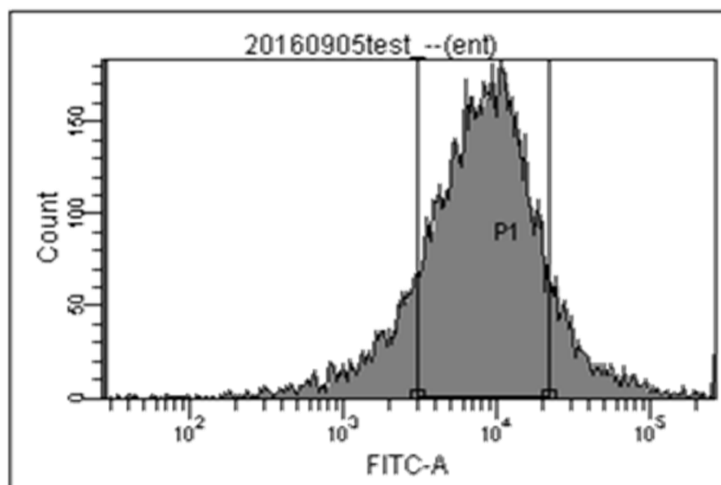
我們原先希望透過流式細胞儀觀察到螢光隨著細菌吸收接有嗎啉基寡核苷酸的 MGE 衍生物後強度降低，來確認接有嗎啉基的 MGE 衍生物可被細菌吸收且能夠阻止蛋白質轉譯。但在實驗中發現只是接有硫醇基的 MGE 衍生物或是腸菌素就能夠阻止細菌轉譯出綠色螢光蛋白(見圖十五)。我們認為可能是因為綠色螢光蛋白的表現極需能量，且需以異丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)誘導才能被表現。但在環境中富有鐵載體的情況下，細菌在缺鐵環境下把大部分的能量用於運送含有鐵的鐵載體進入細胞內，因此無過多能量表達綠色螢光蛋白，因而造成螢光強度下降。



a. 僅加入IPTG

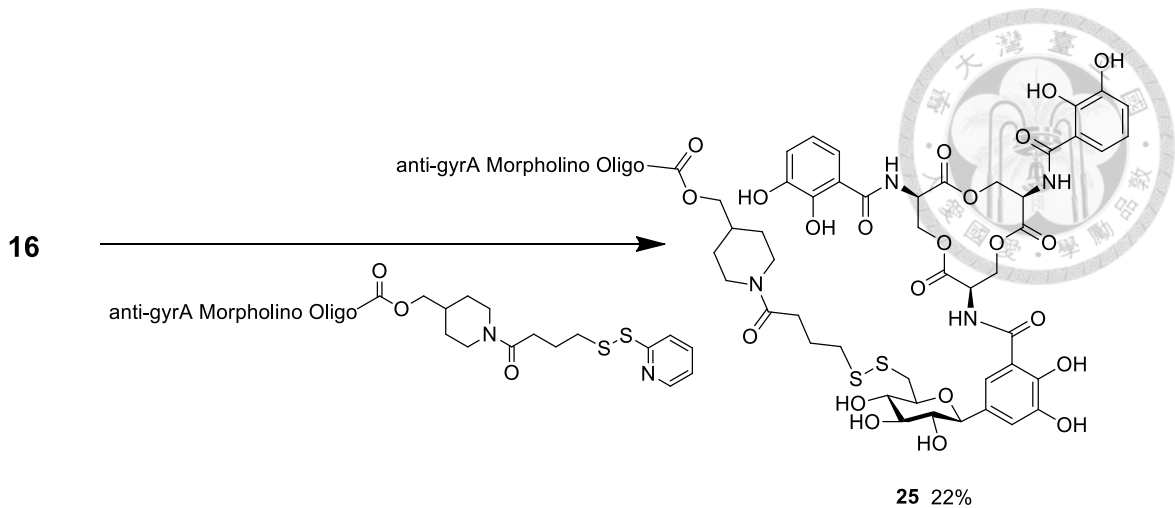


b. 加入IPTG和MGE衍生物



c. 加入IPTG和腸菌素

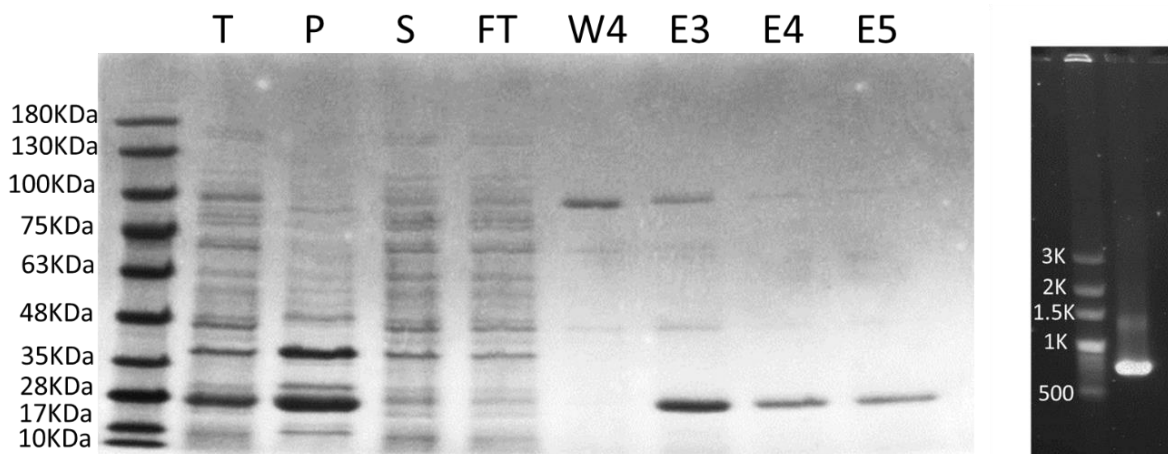
圖十六、綠色螢光蛋白在不同試劑加入下的螢光表現



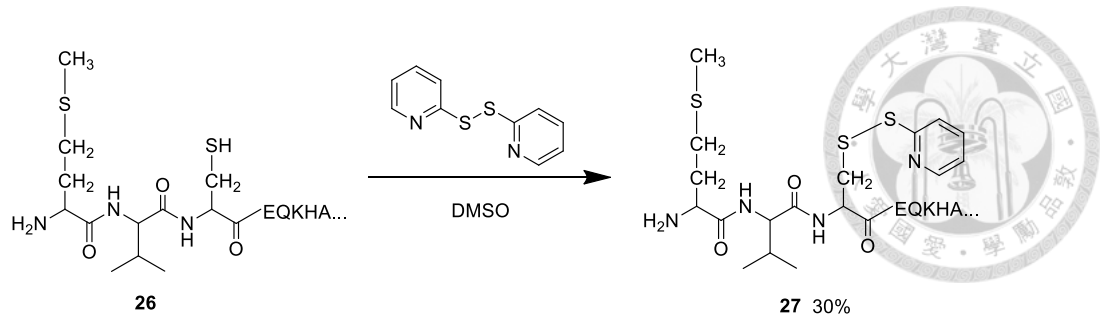
因此我們決定直接接上能夠阻止必須蛋白質轉譯的嗎啉基，我們在參考文獻後，選用能夠阻止 DNA 旋轉酶轉譯的基因<sup>35</sup>，便能直接達到抑菌的效果。同樣由 genetool 公司合成出尾端以雙硫鍵修飾的嗎啉基分子，其序列為 5'-GTTAC-CCTGACCGACCA-3'。

### 3.1-3 (2) MGE 衍生物連接使細胞質膜去極化的大腸菌素 C 端胜肽鏈

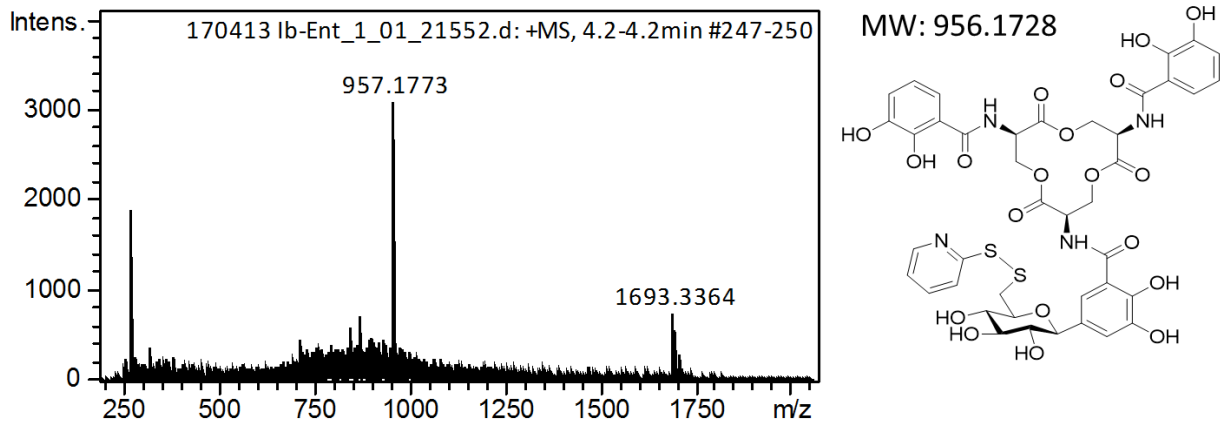
向陳建華教授順利取得菌種後，我們將其質體抽出，並透過聚合酶連鎖反應及重組 DNA 技術，再經蛋白表達及純化得到具有細胞毒性的 C 端大腸菌素 Ib(化合物 26) (見圖十七)，且於 clone 時在此端胜肽鏈上加上具硫醇鍵的半胱胺酸，再接上 2,2'-二硫二吡啶得到具高能雙硫鍵的化合物 27。



圖十七、C 端大腸菌素 Ib 蛋白質(MW=26018)純化 SDS-PAGE 膠圖和基因片段的 PCR 擴增。(T:total lysate; P: pellet fraction; S: supernatant fraction; FT: flow through; W4: wash fraction 3; E3-E4: elution fractions.)。



原先我們預期具高能雙硫鍵的化合物 **27** 可以和 MGE 衍生物(化合物 **18**)連接得到新型抗生素，但在進行雙硫鍵反應時，我們以液相色譜法-質譜聯用監測反應時只有看到  $m/z=957$  的訊號，並沒有看到預期的產物。(見圖十八)我們推斷  $m/z=957$  為帶有吡啶的高能雙硫鍵轉移到腸菌素的訊號，而之所以會產生此產物的原因應該是胜肽鏈上原本修飾上 2,2'-二硫二吡啶之處為一段 $\alpha$ 螺旋結構，故其立體障礙太大，無法接上 MGE 衍生物。之後我們除了在 C 端大腸菌素 Ib 加上半胱胺酸外，再加上幾個無結構的胺基酸作為連接，降低蛋白結構的立體障礙，改進反應。



圖十八、化合物 **27** 和化合物 **18** 雙硫鍵反應後產物質譜儀及推斷產物。

### 3.2 後續實驗及應用

1. 以化合物 **25** 作為試劑進行生物測試，將化合物 **25** 在限鐵環境中加入，再將菌液塗於含有培養基的盤中，待菌落生成，再計算菌落形成數。藉由計算菌落形成單位 (CFU, colony-forming unit) 的方式來觀測接有嗎啉基的 MGE 衍生物其抑菌效果，並預期能夠看到該分子抑制細菌生長，相較於未加入化合物 **25** 形成較少的菌落。接著，再將化合物 **25** 對不同菌種進行同樣的實驗，觀察其是否對革蘭氏陰性菌具有選擇性，我們預期化合物 **25** 只會抑制革蘭氏陰性菌的生長，革蘭氏陽性菌並不會受到該分子的影響。

2. 重新設計化合物 **26** 降低其蛋白結構的立體障礙以接上 MGE 衍生物，再仿照化合物 **25** 進行生物測試，藉由計算菌落形成單位觀測接有細胞毒性胜肽鏈的 MGE 衍生物的對不同細菌的抑菌效果，同樣我們也預期化合物 **27** 只會抑制革蘭氏陰性菌的生長，革蘭氏陽性菌並不會受到該分子的影響。且能將其抑菌效果與接有嗎啉基的 MGE 衍生物做比較。

### 3.3 結論

於本篇論文中，我們合成出以硫醇基修飾的 CNP (2-chloro-4-nitrophenol) 葡萄糖，並按照文獻合成出腸菌素。接著以 Oled 極 IroB 兩種酵素，以一鍋化的化學酵素合成法，將帶有硫醇基的葡萄糖分子和腸菌素連接，得到單醣化的腸菌素。而單醣化的腸菌素便可以方便地藉由雙硫鍵反應連接不同的功能性分子。

我們展示了兩種螢光分子，分別是丹磺醯氯和羅丹明 B 連接於腸菌素上，利用鐵載體運送系統的特性，在限鐵環境下，接有螢光分子的腸菌素可以選擇性地標記出革蘭氏陰性菌。除了展示修飾上螢光分子的單醣化腸菌素能夠選擇性標識細菌外，我們也展示單醣化腸菌素能夠方便地替換接上不同功能性分子。

接著，我們也成功地將能夠阻止綠色螢光蛋白轉譯的嗎啉基寡核苷酸以雙硫鍵接上單醣化腸菌素，不過在阻止綠色螢光蛋白的生物測試上並無預期結果，因此我們改以接上能夠阻止 DNA 旋轉酶的嗎啉基寡核苷酸，期待能直接成為一種新型抗生素。

最後，我們也利用重組 DNA 的技術，利用細菌表達出加上半胱氨酸的大腸菌素 C 端胜肽鏈，希望能夠透過半胱氨酸上的氫硫鍵和單醣化腸菌素進行雙硫鍵反應，在腸菌素上接上能夠使細胞質膜去極化的 C 端胜肽鏈，也就是讓腸菌素帶入一段毒素，達到抑菌效果。不過，因為未考慮到大腸菌素 C 端胜肽鏈的蛋白質結構所造成的立體障礙，無法順利進行雙硫鍵反應。但我們預期在重新設計大腸菌素 C 端胜肽鏈後能夠連接單醣化腸菌素，得到另一種新型抗生素。

另外，在本論文中完成的 MGE 衍生物之化學酵素合成法及 MGE 衍生物連接螢光分子 dansyl 部分已和實驗室成員李昱賢合作發表於文章” Facile and Versatile Chemoenzymatic Synthesis of Enterobactin Analogues and Applications in Bacterial Detection.”之中，於 2016 年九月刊登於 *Angewandte Chemie International Edition*。



## 第四章 實驗細節



### 一、酵素合成法所需之酵素-蛋白表現及純化：

#### His6-OleD:

將實驗室已經cloning好的pET28a-His6-OleD 轉型於 BL21(DE3) 表達細菌, 該菌在37°C下於加有卡那霉素(50 $\mu$ g/mL)的2YT培養基培育一個晚上。該菌液再以新鮮的2YT培養基以1:100稀釋, 在生長到OD<sub>600</sub> 0.6~0.8時, 加入異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (最終濃度0.4 mM), 接著該菌液在18°C, 200rpm下培養一個晚上。在4°C下以3500 rpm離心得細菌, 以細胞裂解液A (Lysis buffer A (10 mM 咪唑、20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8、300 mM 氯化鈉))使其再懸浮, 接著以超音波破菌。透過在4°C, 以12,000 rpm離心45分鐘將細胞殘骸移除。懸浮液則與Ni-nitrilotriacetate在4°C反應1小時。將該液體配置於管柱, 以細胞裂解液A清洗, 再以沖提液A(elution buffer A (250 mM 咪唑、20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8、300 mM 氯化鈉))洗提, 洗提出含有OleD的部分, 以儲存溶液A(20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8、300 mM 氯化鈉)流PD-10去鹽管柱。最後含有蛋白質的溶液以液態氮冷凍, 儲存於-80°C。

#### IroB-His6:

將實驗室已經cloning好的pET22b-IroB-His6轉型於 BL21(DE3) 表達細菌, 該菌在37°C下於加有卡那霉素(50 $\mu$ g/mL)的2YT培養基培育一個晚上。該菌液再以新鮮的2YT培養基以1:100稀釋, 在生長到OD<sub>600</sub> 0.6~0.8時, 加入異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (最終濃度0.1mM), 接著該菌液在18°C, 200rpm下培養一個晚上。在4°C下以3500 rpm離心得細菌, 以細胞裂解液B (Lysis buffer B (10 mM 咪唑、20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8、500 mM 氯化鈉、2mM TCEP(tris(2-carboxyethyl)phosphine)、30%甘油)使其再懸浮, 接著以超音波破菌。透過在4°C, 以12,000 rpm離心45分鐘將細胞殘骸移除。懸浮液則與Ni-nitrilotriacetate在4°C反應1小時。將該液體配置於管柱, 以細胞裂解液A清洗, 再以沖提液B(elution buffer B (250 mM 咪唑、20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8, 25 mM 氯化鉀、2mM TCEP、30%甘油)洗提, 洗提出含有OleD的部分, 以儲存溶液B(20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8, 25 mM 氯化鉀、2mM TCEP、30%甘油)流PD-10去鹽管柱。最後含有蛋白質的溶液以液態氮冷凍, 儲存於-80°C。



## 二、大腸菌素Ib的C端毒素-cloning、蛋白表現及純化

### (1)蛋白質大量表達質體的cloning

前置引子(Forward primer)(5'-ATCGATCCATGGGCTGTGAACAAAAGCATGC  
AAATGACGCT-3')反置引子(reverse primer) (5'-ATCGATCCATGGGCTGTGAAC  
AAAAGCATGCAAATGACGCT-3') 被用以從陳建華教授提供的 *Escherichia coli* K-12 W3110(pQE70)放大大腸菌素 Ib C 端毒素(407-626) 的 DNA。pfu 聚合酶進行聚合酶連鎖反應。聚合酶連鎖反應的產物和 pET28a 質體以限制酶 NcoI 和 EcoRI 切開,再以 Antarctic Phosphatase 將切除的 pET28a 去磷酸化,再以 T4 ligase 將切除過的聚合酶連鎖反應產物和去磷酸化的 pET28a 質體黏合。黏合後的產物再轉形於 DH5 $\alpha$ , 並送定序確認結果。

### (2)蛋白表達及純化

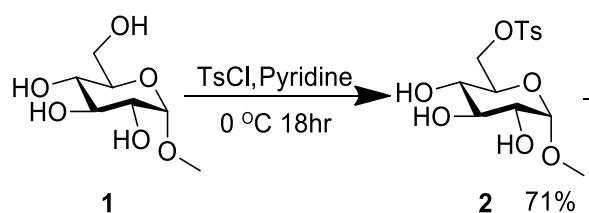
將已經cloning好的pET28a-colicinIb-His6轉型於 BL21(DE3) 表達細菌,該菌在37°C 下於加有卡那霉素(50 $\mu$ g/mL)的LB培養基培育一個晚上。該菌液再以新鮮的LB培養基以1:100稀釋,在生長到OD<sub>600</sub> 0.6~0.8.時,加入異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (最終濃度0.1mM),接著該菌液在18°C, 200rpm下培養一個晚上。在4°C下以3500 rpm離心得細菌,以細胞裂解液C (Lysis buffer C (20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8、500 mM 氯化鈉)使其再懸浮,接著以超音波破菌。透過在4°C, 以12,000 rpm離心45分鐘將細胞殘骸移除。懸浮液則與Ni-nitrilotriacetate在4°C反應1小時。將該液體配置於管柱,以細胞裂解液C清洗,再以梯度沖提液C(elution buffer B (50-250 mM 咪唑、20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8, 25 mM 氯化鉀、2mM TCEP、30%甘油)洗提,洗提出含有大腸菌素Ib的部分,以儲存溶液C(20 mM 三羥甲基氨基甲烷 pH 8, 500 mM 氯化鈉)流PD-10去鹽管柱,得到化合物**26**。

## 三、有機合成的一般性方法：

所有反應試劑皆為試劑級,並在沒有進一步純化的情況下使用。無水二氯甲烷、無水二甲基甲醯胺皆是取自 solvent system。薄層層析使用 Merck 公司的 F254 矽膠片。化合物利用紫外線燈、磷鉬酸酒精,來偵測或顯色。管柱層析矽膠使用 Merck 公司的 Geduran Si 60 矽膠粒。所有對濕氣、氧氣敏感的實驗在氮氣環境下進行。核磁共振光譜使用 Varian 公司的 Unity Plus-400 (400MHz) 或 Bruker 的

AVIII(500MHz) 測得。化學位移( $\delta$ )以百萬分之一(ppm)為單位紀錄，耦合常數(coupling constant)則以赫茲(Hz)為單位紀錄。所有高效液相層析實驗都是以 Waters 1525 binary pump machine、Agilent 1260 infinity Quaternary LC 操作進行。所有液相色譜法-質譜聯用數據都是由 Agilent 1260 infinity Quaternary LC 聯用 Bruker MicrOTOF-QII 質譜儀測得。

### (1) 6-SH-CNP-Glucose



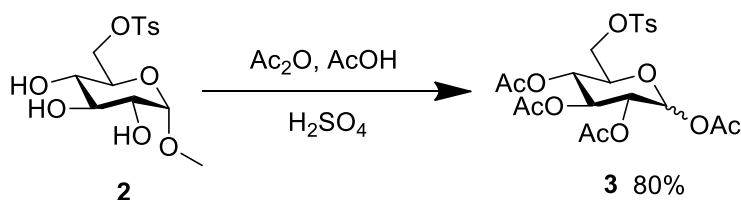
**化合物 2 的合成：**秤取化合物 **1**(5g)於 500mL 圓底瓶中，於冰浴中加入吡啶(50mL)溶解之，攪拌至全溶。秤取 4-甲苯磺酰氯(6g)，攪拌下緩加至圓底瓶中。在冰浴中繼續攪拌 18 小時後，以旋轉濃縮儀抽乾，以加壓管柱層析法(二氯甲烷：甲醇=0.5：9.5)分離純化，可得一白色固體，是為化合物 **2**；產率 71%

### 化合物 2

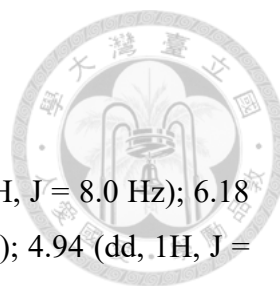
薄層層析(二氯甲烷：甲醇=0.5：9.5)  $R_f = 0.75$

H-NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.77 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz); 7.31 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz); 4.64 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz); 4.28 (dd, 1H,  $J = 10.9, 4.9$  Hz); 4.22 (d, 1H,  $J = 10.8, 1.8$  Hz); 3.73-3.64 (m, 2H); 3.48-3.38 (m, 2H); 3.31 (s, 3H); 2.40 (s, 3H).

$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  145.11; 132.85; 130.02; 128.13; 99.51; 74.22; 71.90; 69.68; 69.55; 69.35; 55.53; 21.79.



**化合物 3 的合成：**秤取化合物 **2**(1g)於 250mL 圓底瓶中，於冰浴中加入醋酸酐/醋酸=1/1(58mL)溶解之，攪拌至全溶。攪拌下緩加硫酸(0.62mL)至圓底瓶中。在室溫繼續攪拌 18 小時後，以旋轉濃縮儀抽乾，蒸餾水/二氯甲烷萃取產物，水層以二氯甲烷萃取二次，合併有機層後再以蒸餾水清洗一次，加無水硫酸鎂乾燥，可得一白色固體，是為化合物 **3**；產率 80%

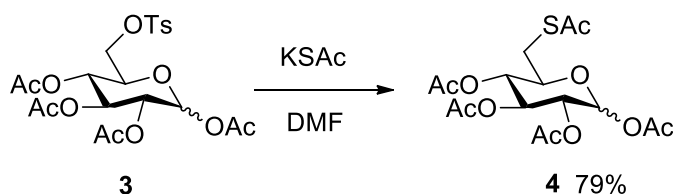


### 化合物 3

薄層層析(乙酸乙酯：正己烷=1：3)  $R_f = 0.13$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.74 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz); 7.33 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz); 6.18 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz); 5.39 (t, 1H,  $J = 9.8$  Hz); 4.99 (t, 1H,  $J = 9.9$  Hz); 4.94 (dd, 1H,  $J = 3.7, 10.3$  Hz); 4.08 (m, 3H); 2.43 (s, 3H); 2.13 (s, 3H); 1.99 (s, 3H); 1.98 (s, 3H); 1.96 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.16; 169.52; 169.25; 168.59; 145.17; 132.33; 129.83; 128.04; 91.47; 88.60; 69.53; 68.89; 67.99; 67.10; 21.60; 20.76; 20.56; 20.43; 20.36



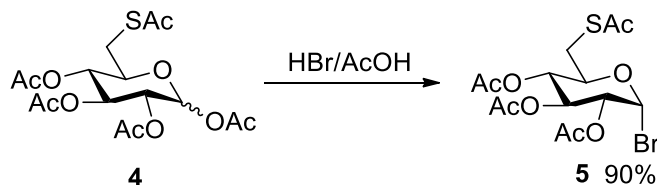
**化合物 4 的合成**：稱取化合物 **3**(0.66g)於 100mL 圓底瓶中，以無水二甲基甲醯胺(58mL)溶解之，攪拌至全溶。稱取硫代乙酸鉀(0.29g)於攪拌下加入，呈現黃色液體，加熱到  $90^\circ\text{C}$ ，回流兩小時後得一咖啡色液體。以旋轉濃縮儀抽乾，再以蒸餾水/二氯甲烷萃取產物，水層以二氯甲烷萃取二次，加無水硫酸鎂乾燥，可得一咖啡色固體，是為化合物 **4**；產率 79%

### 化合物 4

薄層層析(乙酸乙酯：正己烷=1：1)  $R_f = 0.60$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.23 (d, 1H,  $J = 3.7$  Hz); 5.40 (t, 1H,  $J = 9.9$  Hz); 5.04-4.95 (m, 2H); 4.12-4.06 (m, 1H); 3.08-3.19 (m, 2H); 2.31 (s, 3H); 2.13 (s, 3H); 2.06 (s, 3H); 1.98 (s, 3H); 1.97 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  194.84, 170.46, 169.90, 169.88, 169.04, 89.14, 70.89, 70.09, 69.99, 69.43, 30.64, 29.87, 21.10, 20.89, 20.67.



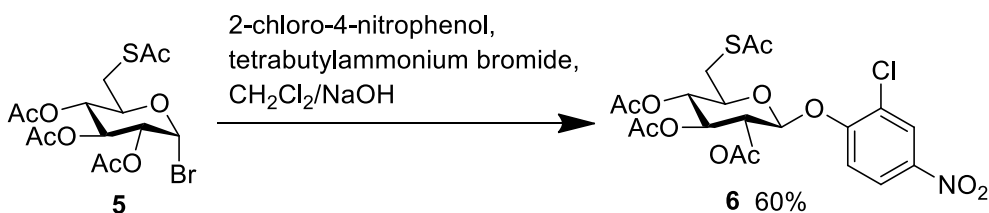
**化合物 5 的合成**：稱取化合物 **4**(0.45g)於 50mL 圓底瓶中，在冰浴中以醋酸(0.9mL)溶解之，攪拌至全溶。溴酸(2mL)於攪拌下緩慢加入，在室溫中反應 15 小時後，再加溴酸(2mL)，再於室溫中反應兩小時，以二氯甲烷稀釋，再以碳酸氫鈉中和，再以蒸餾水/二氯甲烷萃取產物，水層以二氯甲烷萃取二次，合併有機層後再以蒸餾

水清洗一次，加無水硫酸鎂乾燥，可得一咖啡色固體，是為化合物 **5**；產率 90%

### 化合物 5

薄層層析(乙酸乙酯：正己烷=1：3)  $R_f = 0.30$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.52 (d, 1H,  $J = 4.1$  Hz); 5.48 (t, 1H,  $J = 9.7$  Hz); 5.02 (t, 1H,  $J = 9.7$  Hz); 4.76 (dd, 1H,  $J = 10.0, 4.1$  Hz); 4.30-4.24 (m, 1H); 3.22 (dd, 1H,  $J = 14.6, 5.4$  Hz); 3.16 (dd, 1H,  $J = 14.6, 3.4$  Hz); 2.32 (s, 3H); 2.07 (s, 3H); 2.06 (s, 3H); 1.99 (s, 3H).



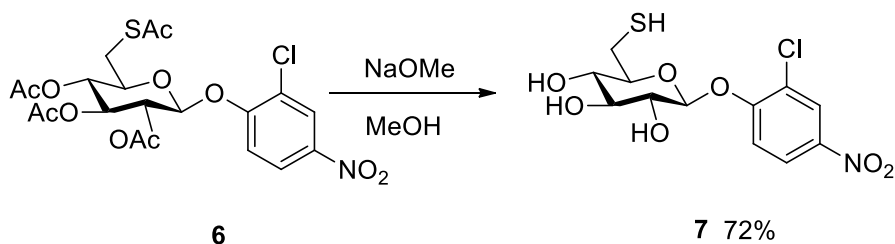
**化合物 6 的合成**：稱取化合物 **5**(0.50g)於 50mL 圓底瓶中，在冰浴中以二氯甲烷(9mL)溶解之，攪拌至全溶。再稱取四丁基溴化銨(0.37g)與 2-氯-4-硝基苯酚(0.30g)於攪拌下緩慢加入，再逐滴加入 1M 氫氧化鈉水溶液(9mL)，可發現液體開始變黃，再於室溫中反應 13.5 小時，依序以乙酸乙酯/氫氧化鈉水溶液/飽和食鹽水萃取產物，加入無水硫酸鎂乾燥，以加壓管柱層析法(乙酸乙酯：正己烷=1：4)分離純化，得一白色固體，是為化合物 **5**；產率 60%

### 化合物 6

薄層層析(乙酸乙酯：正己烷=1：4)  $R_f = 0.17$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.29 (d, 1H,  $J = 2.7$  Hz); 8.16 (dd, 1H,  $J = 2.7, 9.1$ Hz); 7.28 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz); 5.36 (dd, 1H,  $J = 7.7, 9.6$  Hz); 5.28 (t, 1H,  $J = 9.6$  Hz); 5.08 (dd, 1H,  $J = 9.1, 9.8$  Hz); 5.07 (d, 1H,  $J = 7.7$ ); 3.78 (m, 1H); 3.33 (dd, 1H,  $J = 2.8, 14.4$  Hz); 3.02 (dd, 1H,  $J = 7.6, 14.4$  Hz); 2.37 (s, 3H); 2.11 (s, 3H); 2.07 (s, 3H); 2.03 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  194.14; 170.03; 169.63; 168.99; 157.25; 143.24; 126.11; 124.93; 123.63; 116.67; 99.32; 74.17; 72.00; 70.57; 70.43; 30.45; 30.07; 20.61; 20.54; 20.53.



化合物 7 的合成：秤取化合物 6(0.050g)於 50mL 圓底瓶中，在氮氣環境中以無水甲醇(2mL)溶解之，攪拌至全溶。再於攪拌下緩慢加入 0.1M 甲醇鈉(0.1mL)，再於室溫下反應 1.5 小時，以旋轉濃縮儀抽乾，以加壓管柱層析法(二氯甲烷：甲醇=10：1)分離純化，得一白色固體，是為化合物 7；產率 72%

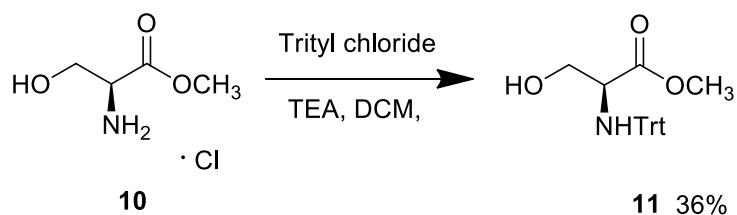
### 化合物 7

薄層層析(二氯甲烷：甲醇=9：1)  $R_f = 0.32$

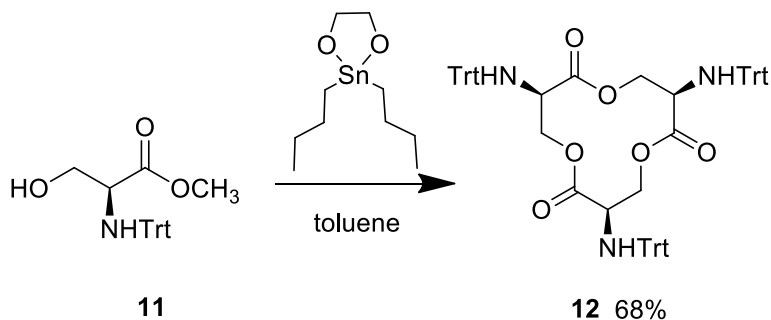
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.34 (d, 1H,  $J = 2.8$  Hz); 8.21 (dd, 1H,  $J = 2.8, 9.2$  Hz); 7.51 (d, 1H,  $J = 9.0$  Hz); 5.52 (d, 1H,  $J = 5.1$  Hz, H1); 5.32 (d, 1H,  $J = 4.8$  Hz); 5.29 (d, 1H,  $J = 7.4$  Hz); 5.25 (d, 1H,  $J = 4.6$  Hz); 3.54 (m, 1H); 3.37 (m, 1H); 3.30 (m, 1H); 3.17 (m, 1H); 2.92 (m, 1H); 2.59 (m, 1H); 2.13 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  157.56; 141.59; 125.53; 124.14; 122.26; 115.77; 99.82; 76.73; 76.16; 73.03; 71.72; 25.66

(2) 腸菌素(腸菌素之合成方法參照文獻報導<sup>14-15</sup>。)

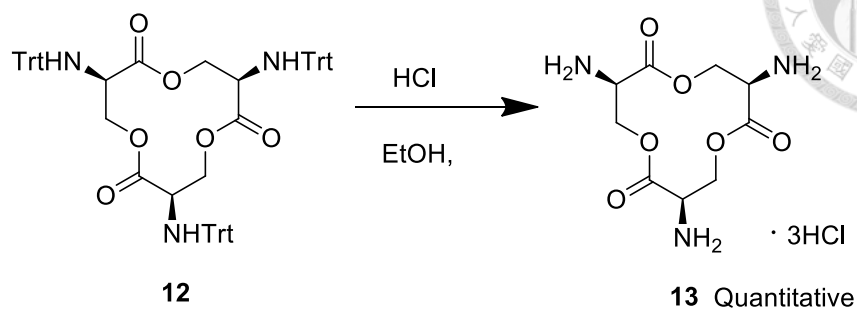


化合物 11 的合成：秤取化合物 10(2.5g)於 100mL 圓底瓶中，在冰浴下以二氯甲烷(11mL)溶解之，攪拌至全溶。再於攪拌下緩慢加入三乙醇胺(3.25g)，接著加如溶於二氯甲烷(8.5ml)的氯化三苯甲基(4.5g)於冰浴下反應一天，以旋轉濃縮儀抽乾，以加壓管柱層析法(二氯甲烷：甲醇=20：1)分離純化，得一白色固體，是為化合物 11；產率 70%

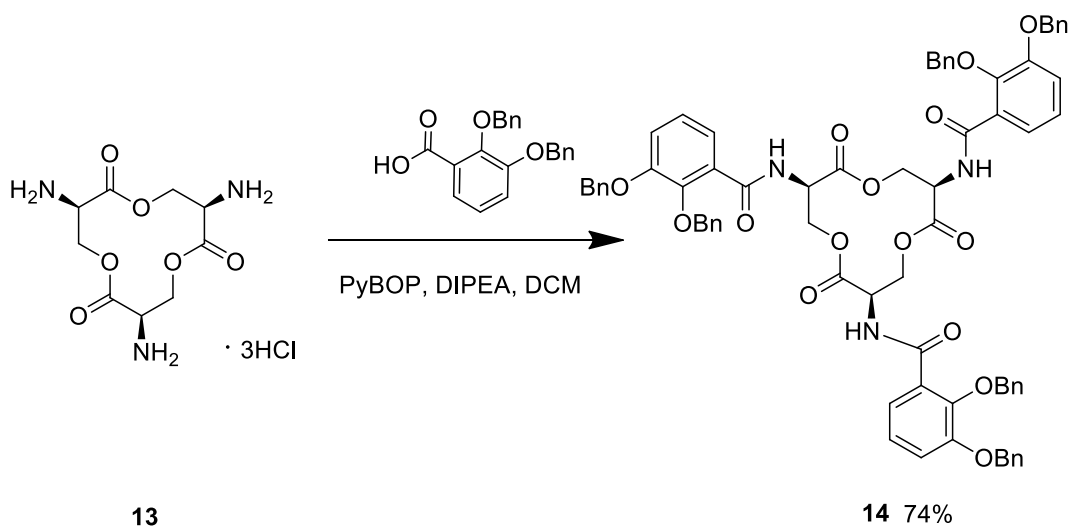


化合物 12 的合成：秤取化合物 11(2g)於 250mL 圓底瓶中，以二甲苯(60mL)溶解之，攪拌至全溶。再於攪拌下緩慢加入 2,2-二丁基-[1,3,2]二氧錫(0.16g)，將裝有活

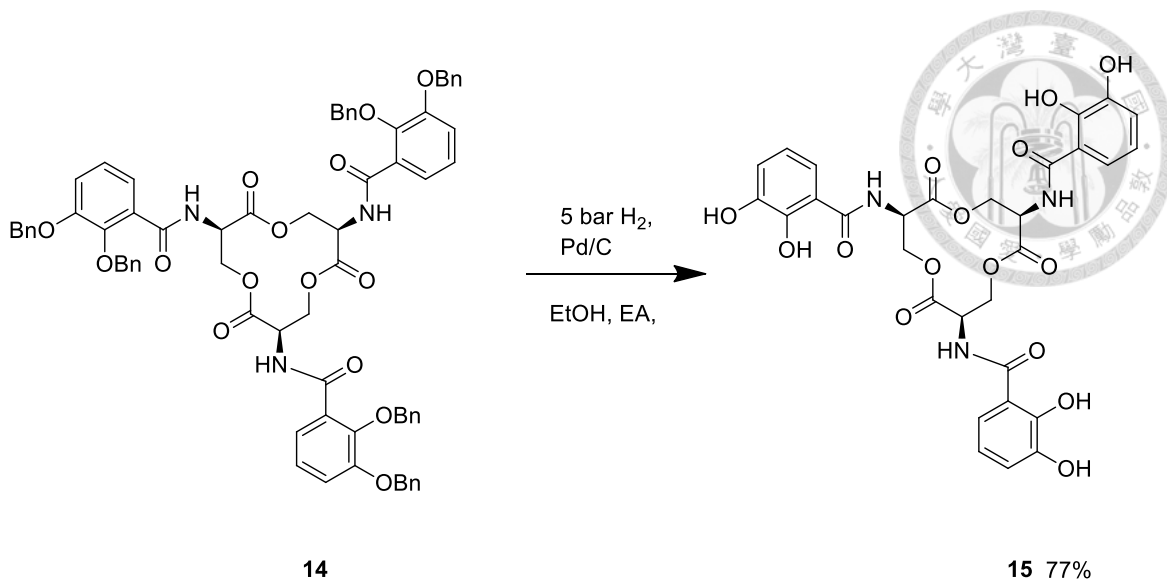
化分子篩的添加漏斗和圓底瓶相接，加熱迴流一天，以旋轉濃縮儀抽乾，再以加壓管柱層析法(二氯甲烷：正己烷=1：1)分離純化，是為化合物 **12**；產率 68%



化合物 **13** 的合成：秤取化合物 **12**(0.58g)於 50mL 圓底瓶中，以乙醇(4.35mL)溶解之，攪拌至全溶。再於攪拌下緩慢加入鹽酸/ 1,4-環氧己烷 (0.55mL)，加熱迴流一個晚上，以乙醇洗抽濾，是為化合物 **13**；產率：Quantitative



化合物 **14** 的合成：秤取化合物 **13**(0.25g)於 50mL 圓底瓶中，以二氯甲烷(16mL)溶解之，再秤取 *N,N*-二異丙基乙基胺(1.02g)攪拌至全溶。同時秤取 2,3-苯甲氧基-苯甲酸(1.02g)於另一 100mL 圓底瓶中，以二氯甲烷(28mL)溶解之，再秤取 PyBOP(benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)(1.89g)一起攪拌。半小時後，將兩個圓底瓶混在一起，於室溫攪拌一個晚上，以旋轉濃縮儀抽乾，再以加壓管柱層析法(二氯甲烷：甲醇=100：1)分離純化，是為化合物 **14**：產率 74%



**化合物 15 的合成：**秤取化合物 **13**(0.23g)於 50mL 圓底瓶中，以乙醇(5.71mL)和乙酸乙酯(6.64mL)溶解之，攪拌至全溶。再於攪拌下加入鈀碳催化劑(0.07g)，將圓底瓶放入高壓反應器，加入 5 bar 氫氣，於室溫下攪拌反應一個晚上，再以濾紙過濾，是為化合物 **15**；產率：77%

#### 化合物 15

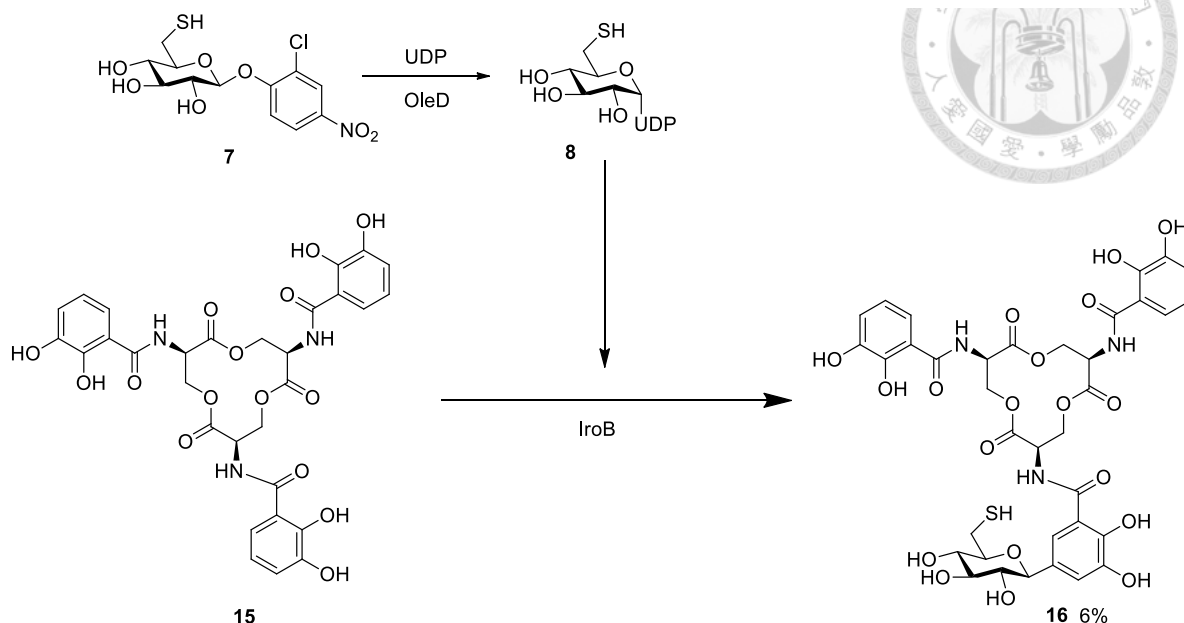
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Acetone- $d_6$ ):  $\delta$  8.48 (d, 3H,  $J = 7.1$  Hz, amide-NH); 7.24 (d, 3H,  $J = 8.1$  Hz, Ar-H6); 7.02 (d, 3H,  $J = 7.9$  Hz, Ar-H4); 6.73 (t, 3H,  $J = 8.0$  Hz, Ar-H5); 5.11 (m, 3H, Serine- $\text{H}_\beta$ ); 4.73 (d, 6H,  $J = 4.6$ Hz, Serine- $\text{H}_\alpha$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.86 (NHC=O); 169.85 (OC=O); 150.22 (Ar-C2); 147.13 (Ar-C3); 120.00 (Ar-C4); 119.61 (Ar-C6); 118.39 (Ar-C5); 115.16 (Ar-C1); 65.46(Serine- $\text{C}_\beta$ ); 53.24 (Serine- $\text{C}_\alpha$ ).

HRMS (ESI $^+$ ): calculated for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 670.1515; found, 670.1524.



### (3)MGE 衍生物



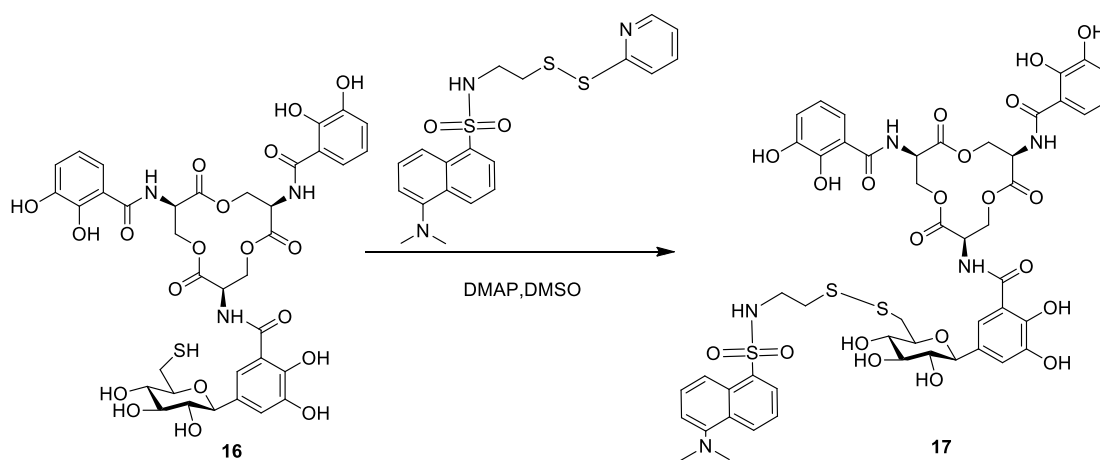
**化合物 16 的合成：**秤取化合物 7(17mg)以二甲基亞砷配成 25mM 的溶液，以 1:10 加入反應溶液(75mM 三羥甲基氨基甲烷 pH8.0, 5mM 氯化鎂, 25mM 尿苷二磷酸)，另外加入總體積 1/100 的 100 $\mu$ M 的 OleD 和最終濃度 1mM 的 TCEP。於室溫下攪拌反應一個晚上，得到產物 8。接著將溶於二甲基亞砷的 100mM 腸菌素溶液以體積比 1:200 加入 2 前步溶液中，接著加入總體積 1/100 的 10 $\mu$ M 的 IroB 和最終濃度 2mM 的 TCEP，於室溫下反應 1.5 小時。接著加入 0.1% 甲酸，以 10,000 rpm 離心去除掉沉澱物，澄清液接著以 0%-50% 的乙腈水溶液流經 BAKERBOND spe Octadecyl (C18) 管柱。含有產物 16 的部分凍乾，接著再以 DMSO/H<sub>2</sub>O=1:1 溶解，以高效液相層析儀純化分離。純化時使用 10%-80% 乙腈水溶液加 0.1% 三氟乙酸的梯度來做為沖提液。是為化合物 16，兩步的整體產率 6%

### 化合物 16

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.36 (d, 1H, J = 1.6 Hz, Glc-Ar-H6); 7.23 (t, 1H, J = 1.3 Hz, Ar-H6); 7.21 (t, 1H, J = 1.3 Hz, Ar-H6); 7.05 (d, 1H, J = 1.6 Hz, Glc-Ar-H4); 6.95 (d, 1H, J = 1.1 Hz, Ar-H4); 6.93 (d, 1H, J = 1.1 Hz, Ar-H4); 6.71 (t, 1H, J = 6.4 Hz, Ar-H5); 6.70 (t, 1H, J = 6.4 Hz, Ar-H5); 5.03 (m, 3H, Serine-H <sub>$\alpha$</sub> ); 4.64 (m, 6H, Serine-H <sub>$\beta$</sub> ); 4.03 (d, 1H, J = 7.5 Hz, Glc-H1); 3.49-3.33 (m, 4H, Glc-H2~H5) 2.92 (dd, 1H, J = 11.1, 1.9 Hz, Glc-H6a); 2.69 (dd, 1H, J = 11.2, 5.1 Hz, Glc-H6b).

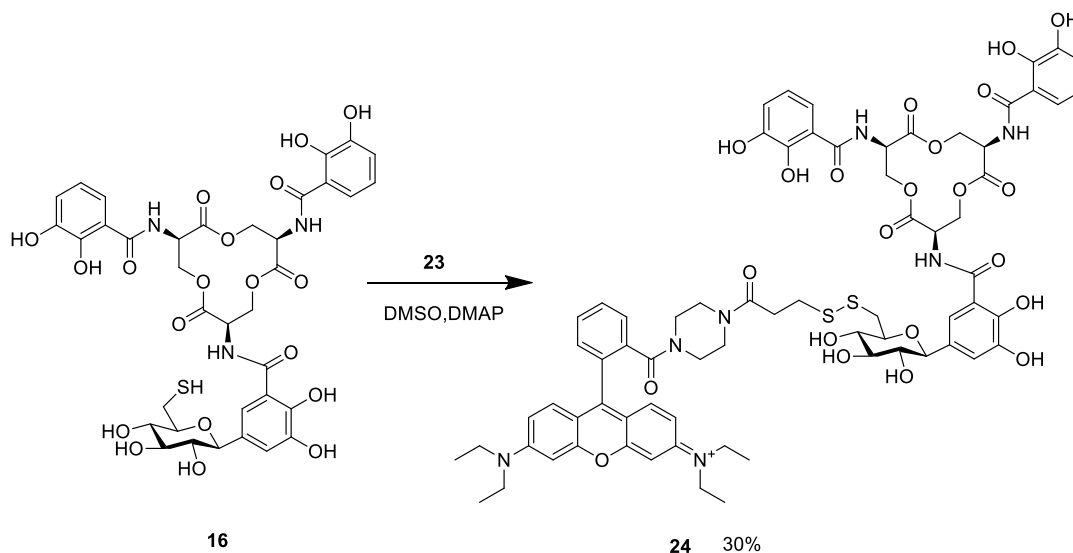
13C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  170.75, 170.70, 170.67, 170.54 (C=O); 149.54 (Ar-C2); 149.27 (Glc-Ar-C2); 147.23, 147.21 (Ar-C3); 147.10 (Glc-Ar-C3); 131.48 (Glc-Ar-C5); 120.09, 120.06, 120.04, 119.77, 119.71, 119.57, 119.27 (Ar-C4 & Ar-C5 & Ar-C6 & Glc-Ar-C4 & Glc-Ar-C6); 116.81, 116.77 (Ar-C1); 116.48 (Glc-Ar-C1); 83.06, 81.69, 79.42, 76.31 (Glc-C1~C5); 65.89, 65.84 (Serine-C $\beta$ ); 53.74, 53.69, 53.51 (Serine-C $\alpha$ ); 27.12 (Glc-C6)

化合物 16 : HRMS (ESI+): calculated for [M+H]<sup>+</sup>, 848.18; found, 848.2.



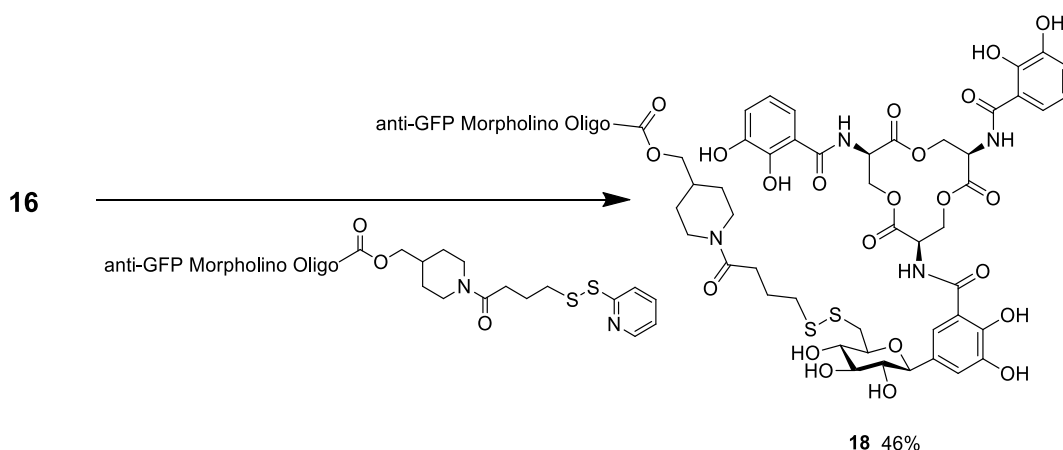
化合物 17 的合成：225  $\mu$ L 的 Dansyl-PDS (10mM 溶於二甲基亞砜)、225  $\mu$ L 的化合物 16 (10mM 溶於二甲基亞砜) 和 22.5  $\mu$ L 4-二甲氨基吡啶 (100mM 溶於二甲基亞砜) 加在一起，於 37°C 下反應一個晚上，以真空離心機移除溶劑。剩餘的固體以 DMSO/H<sub>2</sub>O=1:1 溶解。以高效液相層析儀純化分離。純化時使用 10%-80% 乙腈水溶液加 0.1% 三氟乙酸的梯度來做為沖提液。是為化合物 17，產率 69%

化合物 17 : HRMS (ESI+): calculated for [M+H]<sup>+</sup>, 1156.2468; found, 1156.2506.



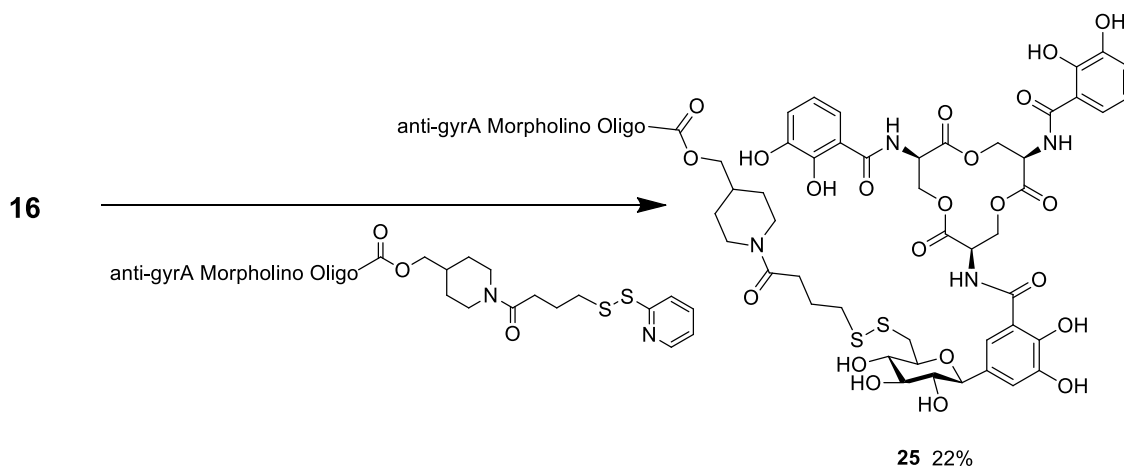
化合物 **24** 的合成：225  $\mu\text{L}$  的化合物 **23**(10mM 溶於二甲基亞砜)、225  $\mu\text{L}$  的化合物 **16**(10mM 溶於二甲基亞砜)和 22.5  $\mu\text{L}$  4-二甲氨基吡啶(100mM 溶於二甲基亞砜)加在一起，於 37°C 下反應一個晚上，以真空離心機移除溶劑。剩餘的固體以 DMSO/H<sub>2</sub>O=1:1 溶解。以高效液相層析儀純化分離。純化時使用 45%-55%乙腈水溶液加 0.1%三氟乙酸的梯度來做為沖提液。是為化合物 **24**，產率 30%

化合物 **24**：HRMS (ESI+): calculated for [M]<sup>+</sup>, 1444.4641; found, 1444.4625  
 calculated for [M]<sup>2+</sup>, 722.2320; found, 722.7336



化合物 **18** 的合成：10  $\mu\text{L}$  的化合物 **16**(10mM 溶於二甲基亞砜)、10  $\mu\text{L}$  嗎啉基寡核苷酸 (1mM 溶於水)和 2 $\mu\text{L}$  4-二甲氨基吡啶(1mM 溶於二甲基亞砜)加在一起，再加入 7 $\mu\text{L}$  二甲基亞砜和 9 $\mu\text{L}$  水於 37°C 下反應一個晚上，以水作為沖提液流經 PD10 管柱純化分離，將含有化合物 **18** 的部分凍乾，是為化合物 **18**，產率：46%

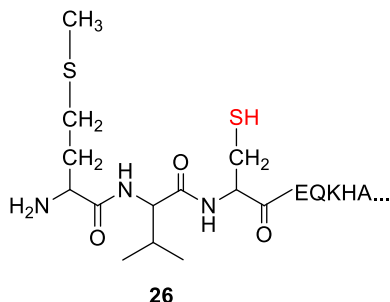
化合物 **18**：HRMS (ESI): calculated for [M+H]<sup>+</sup>, 9447.1550; found, 9448.1551



化合物 **25** 的合成：10  $\mu\text{L}$  的化合物 **16**(10mM 溶於二甲基亞砜)、10  $\mu\text{L}$  嗎啉基寡核苷酸 (1mM 溶於水)和 2 $\mu\text{L}$  4-二甲氨基吡啶(1mM 溶於二甲基亞砜)加在一起，再

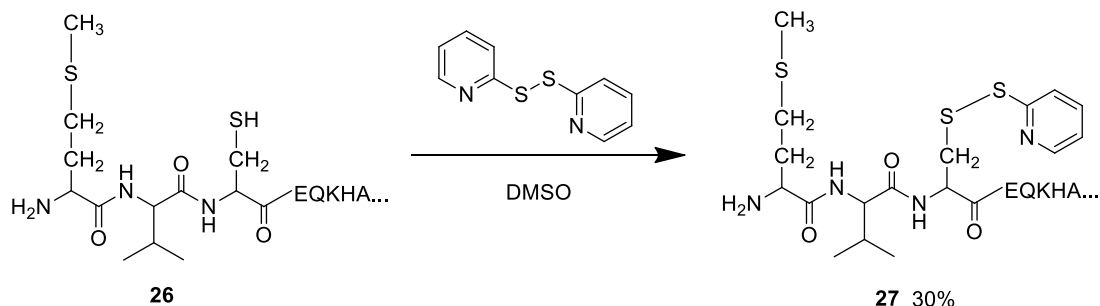
加入 7 $\mu$ L 二甲基亞砷和 9 $\mu$ L 水於 37 $^{\circ}$ C 下反應一個晚上，以水作為沖提液流經 PD10 管柱純化分離，將含有化合物 **25** 的部分凍乾，是為化合物 **25**，產率：22%

化合物 **25**：HRMS (ESI): calculated for [M+H]<sup>+</sup>,6797.2559; found,6797.2749



化合物 **26** 胺基酸序列：

MVCEQKHANDALNALLKEKENIRSQLADINQKIAEEKRKRDEINMVKDAIKLTS  
DFYRTIYDEFGKQASELAKELASVSQGKQIKSVDDALNAFDKFRNNLNKKYNI  
QDRMAISKALEAINQVHMAENFKLFSKAFGFTGKVIDRYDVAVELQKAVKTDN  
WRPFFVKLES LAAGRAASAVTAWAFSVMLGTPVGILGFAIIMAAVSALVNDKFIE  
QVNKLIGIGSRSHHHHHH



化合物 **27** 的合成：2mL 的化合物 **26**(35 $\mu$ M 溶於儲存溶液 C)、100 $\mu$ L 2,2'-二硫二吡啶 (3.5mM 溶於水)於 30 $^{\circ}$ C 下反應兩小時，以儲存溶液 C 作為沖提液流經 PD10 管柱純化分離，是為化合物 **27**，產率：22%

化合物 **27**：HRMS (ESI): calculated for [M]<sup>+</sup>,26127.0341; found,26127.2045

### 三、細菌實驗：

#### 螢光顯微鏡實驗：

從 -80 $^{\circ}$ C 取出 1 $\mu$ L 的冰凍細菌於 1mL 的 LB 培養基中，在 37 $^{\circ}$ C 培育一個晚上，接著取 10 $\mu$ L 的菌液於 1mL 的 M63 培養基，再於 37 $^{\circ}$ C 培育 12 小時。加入 1 $\mu$ L 0.1mM 化合物 **17** 的二甲基亞砷溶液於 100 $\mu$ L 的菌液中，於 37 $^{\circ}$ C 培育 5 小時。接著，以

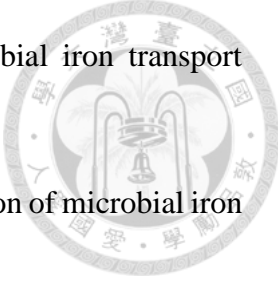
離心基將細菌離心下來，將懸浮液移除，改以 PBS 使細菌再懸浮，之後再離心，重複此動作三次將細菌表面的螢光分子洗淨。5  $\mu\text{L}$  的菌液放於載玻片上，蓋上蓋玻片後以 Axio Observer Z1 (Zeiss)顯微鏡觀測。

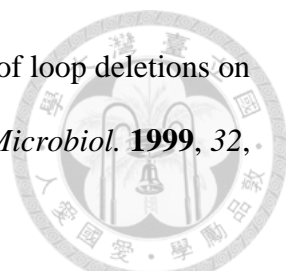
#### 流式細胞儀實驗：

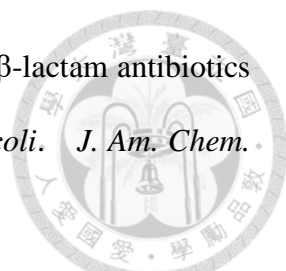
從 $-80^{\circ}\text{C}$ 取出 $1\mu\text{L}$ 的冰凍細菌於 $1\text{mL}$ 的LB培養基中，在 $37^{\circ}\text{C}$ 培育一個晚上，接著取 $10\mu\text{L}$ 的菌液於 $1\text{mL}$ 的TBSM培養基，再於 $37^{\circ}\text{C}$ 培育12小時。加入 $1\mu\text{L}$   $0.1\text{mM}$ 化合物 **17(或 18)**的二甲基亞砷溶液於 $100\mu\text{L}$ 的菌液中，抑制綠色螢光蛋白實驗還會額外添加 $5\mu\text{L}$ 的IPTG，接著於 $37^{\circ}\text{C}$ 培育5小時。接著，以離心基將細菌離心下來，將懸浮液移除，改以 PBS 使細菌再懸浮，之後再離心，重複此動作三次將細菌表面的螢光分子洗淨。 $100\mu\text{L}$ 的菌液加於 $1\text{mL}$ 的PBS中，以BD Canto II 流式細胞儀進行實驗。

## 參考資料


1. Ben, L.; Loek, V.P., Molecular Architecture and Functioning of the Outer Membrane of *Escherichia coli* and Other Gram-negative Bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 737, 51 - 115
2. E. P. Abraham; E. Chain, An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* **1940**, 146, 837-837
3. Harold C. Neu, Effect of  $\beta$ -Lactamase Location in *Escherichia coli* on Penicillin Synergy. *Appl. Microbiol.* **1969**, 17(6), 783-786
4. <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
5. Cesar A. Arias; Barbara E. Murray, Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. *N. Engl. J. Med.* **2009**, 360, 439-443
6. Kraemer, Stephan M, Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat. Sci.* **2005**, 66, 3–18.
7. Miethke, M.; Marahiel, M. A., Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, 71, 413.

- 
8. Neilands, J. B, Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26723.
  9. Krewulak, K. D.; Vogel, H. J., Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1778, 1781.
  10. Winkelmann G., Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, 30, 691.
  11. Raymond, Kenneth N.; Emily A. Dertz & Sanggoo S. Kim Enterobactin: an archetype for microbial iron transport, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (7), 3584–3588
  12. E. Corey & S. Bhattacharyya. Total synthesis of enterobactin, a macrocyclic iron transporting agent of bacteria, *Tetrahedron Letters* **1977**, 18, 3919-3922
  13. W. H. Rastetter, T. J. Erickson & M. C. Venuti. Syntheses of enterobactin and enantioenterobactin. *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, 45, 5011-5012
  14. T. Baramov, K. Keijzer, E. Irran, E. Mosker, M. H. Baik & R. Sussmuth. Synthesis and Structural Characterization of Hexacoordinate Silicon, Germanium, and Titanium Complexes of the E-coli Siderophore Enterobactin.. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 10536-10542.
  15. R. J. A. Ramirez, L. Karamanukyan, S. Ortiz & C. G. Gutierrez. A much improved synthesis of the siderophore enterobactin. *Tetrahedron Lett* **1997**, 38, 749-752 (1997).
  16. A. Shanzer & J. Libman. Total Synthesis of Enterobactin Via an Organotin Template. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1983**, 846-847
  17. Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S., Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 3584.

- 
18. Newton, S. M. C.; Igo, J. D.; Scott, D. C.; Klebba, P. E., Effect of loop deletions on the binding and transport of ferric enterobactin by FepA. *Mol. Microbiol.* **1999**, *32*, 1153.
19. Buchanan, S. K.; Smith, B. S.; Venkatramani, L.; Xia, D.; Esser, L.; Palnitkar, M.; Chakraborty, R.; van der Helm, D.; Deisenhofer, J., Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 56.
20. Stephens, D. L.; Choe, M. D.; Earhart, C. F., *Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin. *Microbiology. Microbiol-Sgm* **1995**, *141*, 1647.
21. K. Konopka & J. Neilands. Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron.. *Biochemistry* **1984**, *23*, 2122-2127 (1984).
22. D. H. Goetz, M. A. Holmes, N. Borregaard, M. E. Bluhm, K. N. Raymond & R. K. Strong. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular cell* **2002**, *10*, 1033-1043.
23. Fischbach, M.A., Lin, H., Liu, D.R. & Walsh, C.T., How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2005**, *102*, 571–576.
24. Braun, V.; Pramanik, A.; Gwinner, T.; Koberle, M.; Bohn, E., Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals* **2009**, *22*, 3.
25. Mollmann, U.; Heinisch, L.; Bauernfeind, A.; Kohler, T.; Ankel-Fuchs, D., Siderophores as drug delivery agents: application of the "Trojan Horse" strategy, *Biometals* **2009**, *22*, 615.
26. Page, M. G. P., Siderophore conjugates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 115.

- 
27. Zheng, T. F.; Nolan, E. M., Enterobactin-mediated delivery of  $\beta$ -lactam antibiotics enhances antibacterial activity against pathogenic *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9677.
28. Chairatana, P.; Zheng, T. F.; Nolan, E. M., Proteolysis Triggers Self-Assembly and Unmasks Innate Immune Function of a Human alpha-Defensin Peptide. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4458.
29. Mercado, G.; Tello, M.; Marin, M.; Monasterio, O.; Lagos, R., The production in vivo of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 5464.
30. Delorenzo, V.; Pugsley, A. P., Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1985**, *27*, 666
31. Summerton, J, Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1999**, 1489 (1): 141–58.
32. Wiley-Liss, Inc. *Special Issue: Morpholino Gene Knockdowns of genesis* **2001**, 30, 3, 89-200
33. Rosen, JN; Sweeny MF; Mably JD. Microinjection of zebrafish embryos to analyze gene function.. *J Vis Exp.* **2009**, 9, 25.
34. Cerda, GA; Thomas JE; Allende ML; Karlstrom RO; Palma V , Electroporation of DNA, RNA, and morpholinos into zebrafish embryos, *Methods.* **2006**, 39, (3):
35. Wesolowski D1, Tae HS, Gandotra N, Llopis P, Basic peptide-morpholino oligomer conjugate that is very effective in killing bacteria by gene-specific and nonspecific modes. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **2011**, 108.40: 16582-16587.



- 
36. Gantt, R. W.; Peltier-Pain, P.; Cournoyer, W. J.; Thorson, J. S., Using simple donors to drive the equilibria of glycosyltransferase-catalyzed reactions. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 685.
37. Bister, B.; Bischoff, D.; Nicholson, G. J.; Valdebenito, M.; Schneider, K.; Winkelmann, G.; Hantke, K.; Sussmuth, R. D., The structure of salmochelins: C-glycosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* **2004**, *17*, 471.
38. Fischbach, M. A.; Lin, H. N.; Liu, D. R.; Walsh, C. T., In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 571.
39. Cascales, Eric, et al. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2007**, 71.1: 158-229.
40. Singh, Jitendra; Ghosh, C. Ribosomal encoded bacteriocins: their functional insight and applications. *J. Microbiol. Res*, **2012**, 2.2: 19-25.
41. Lee, A. A., Chen, Y. C. S., Ekalestari, E., Ho, S. Y., Hsu, N. S., Kuo, T. F., & Wang, T. S. A. Facile and Versatile Chemoenzymatic Synthesis of Enterobactin Analogues and Applications in Bacterial Detection. *Angewandte Chemie International Edition*, **2016**, 55(40), 12338-12342.

## 光譜附錄

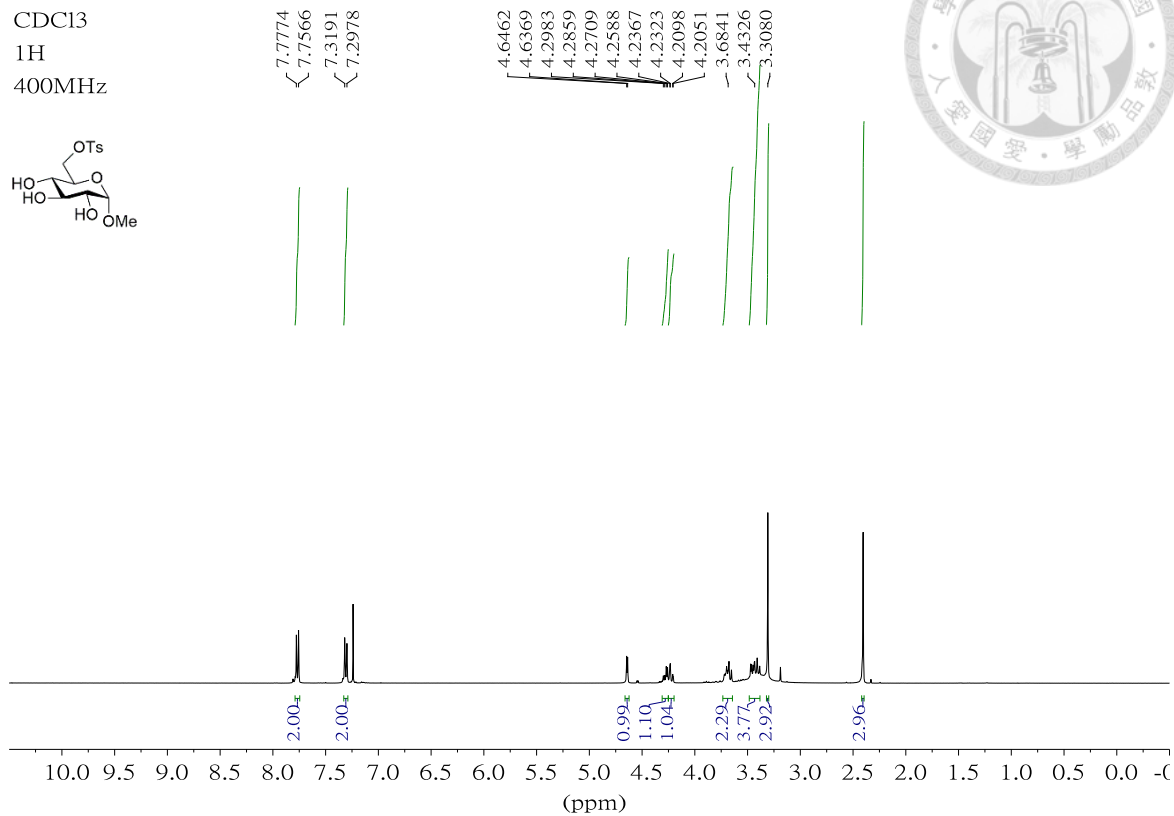
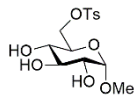


|       |    |
|-------|----|
| 化合物2  | 45 |
| 化合物3  | 46 |
| 化合物4  | 47 |
| 化合物5  | 48 |
| 化合物6  | 49 |
| 化合物7  | 50 |
| 化合物15 | 51 |
| 化合物16 | 52 |
| 化合物17 | 53 |
| 化合物24 | 54 |
| 化合物18 | 55 |
| 化合物25 | 55 |
| 化合物26 | 56 |
| 化合物27 | 56 |

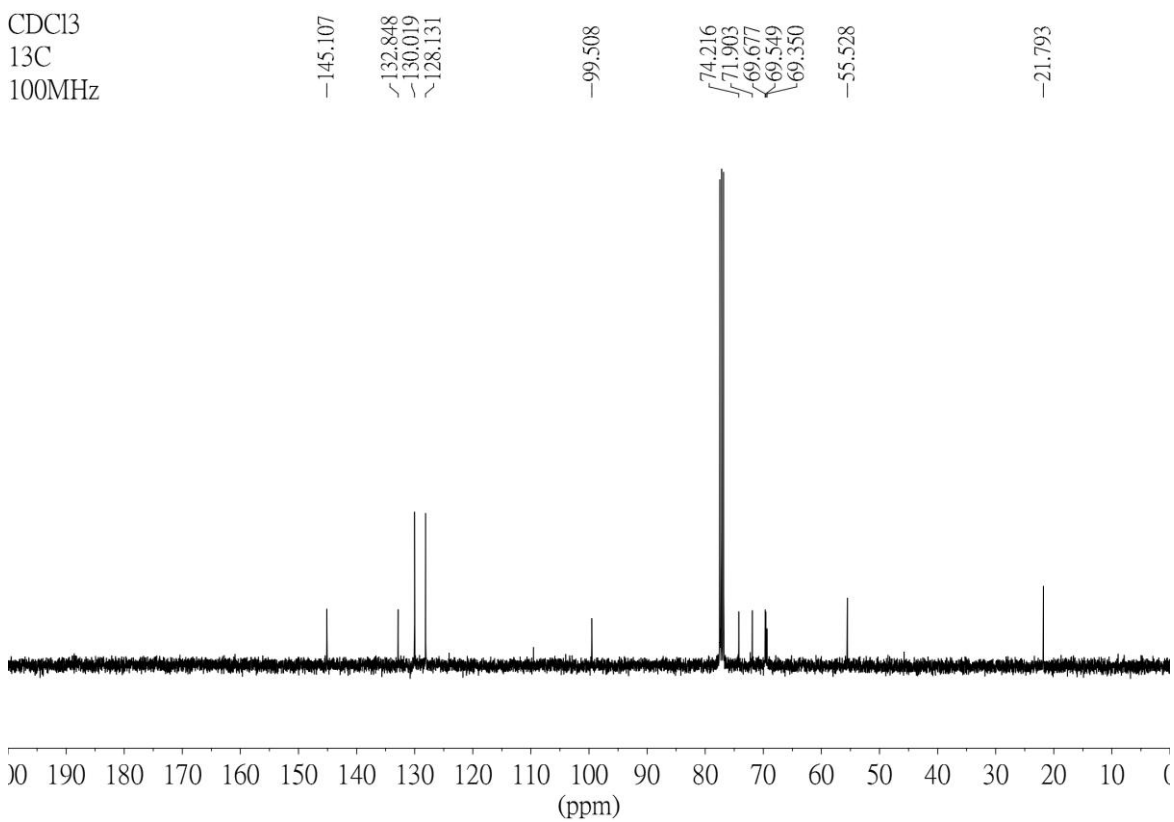
註：化合物 2 至化合物 17 之光譜已發表於文章”Facile and Versatile Chemoenzymatic Synthesis of Enterobactin Analogues and Applications in Bacterial Detection.”之中，於 2016 年九月刊登於 *Angewandte Chemie International Edition*。<sup>41</sup>

# 化合物 2

CDCl<sub>3</sub>  
1H  
400MHz

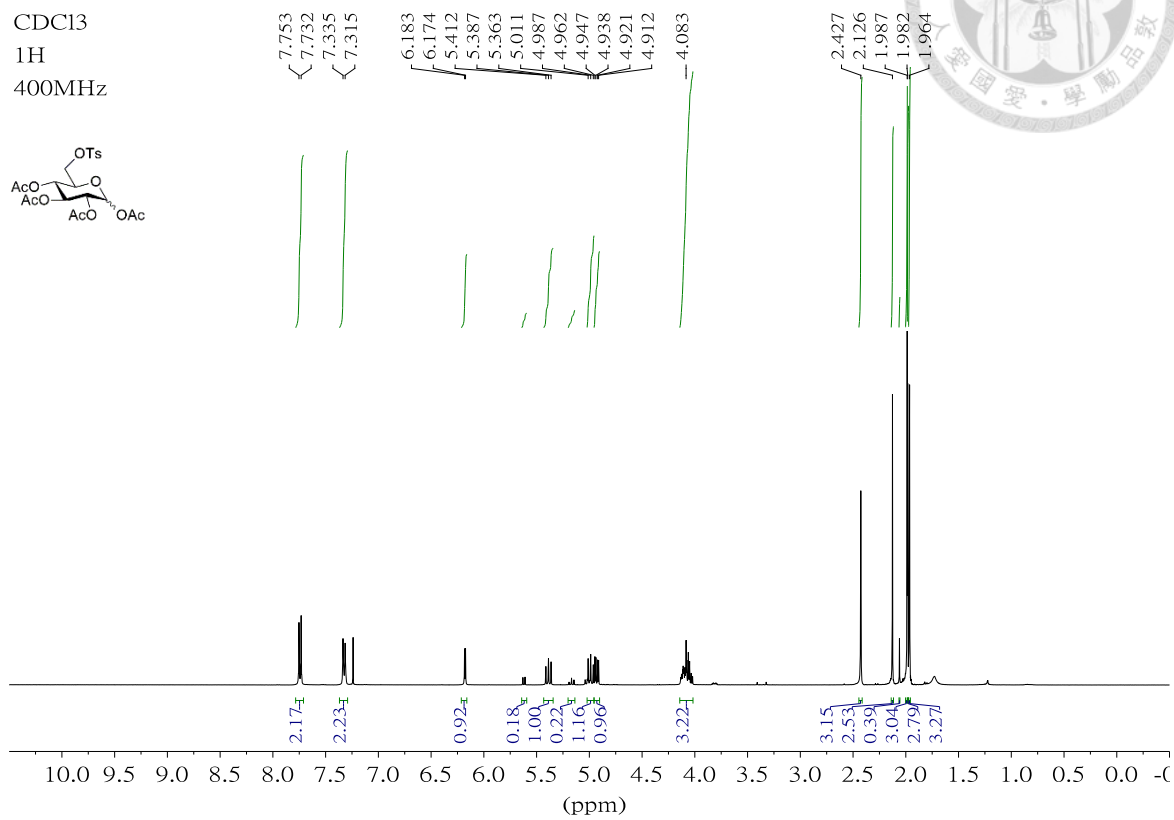
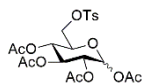


CDCl<sub>3</sub>  
13C  
100MHz

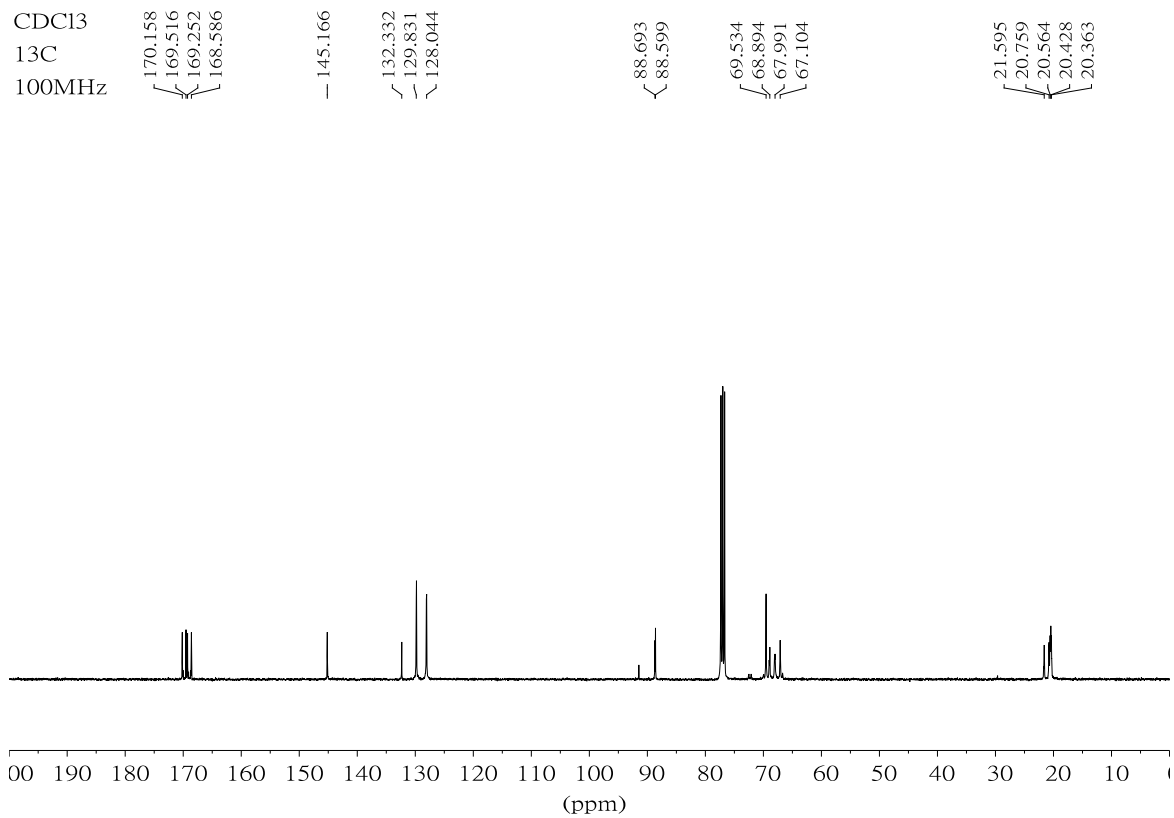


化合物 3

CDC13  
1H  
400MHz



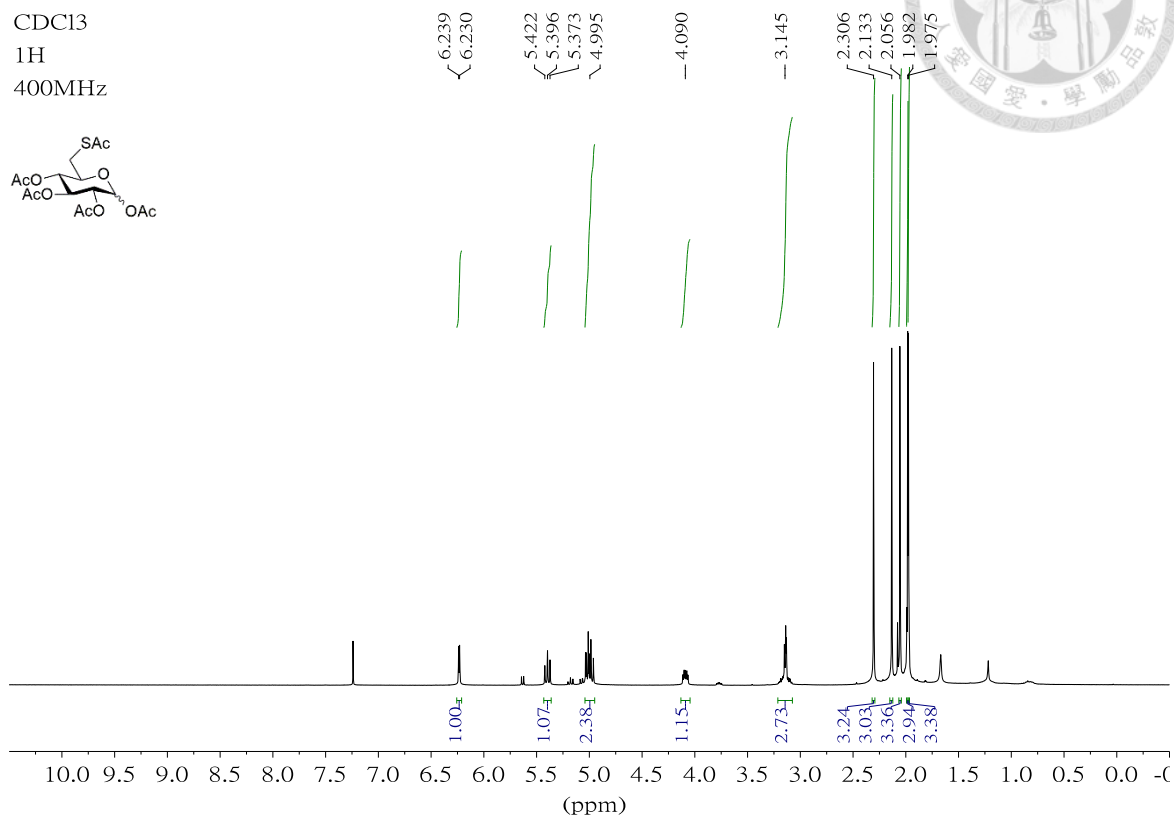
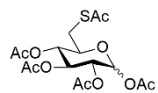
CDC13  
13C  
100MHz



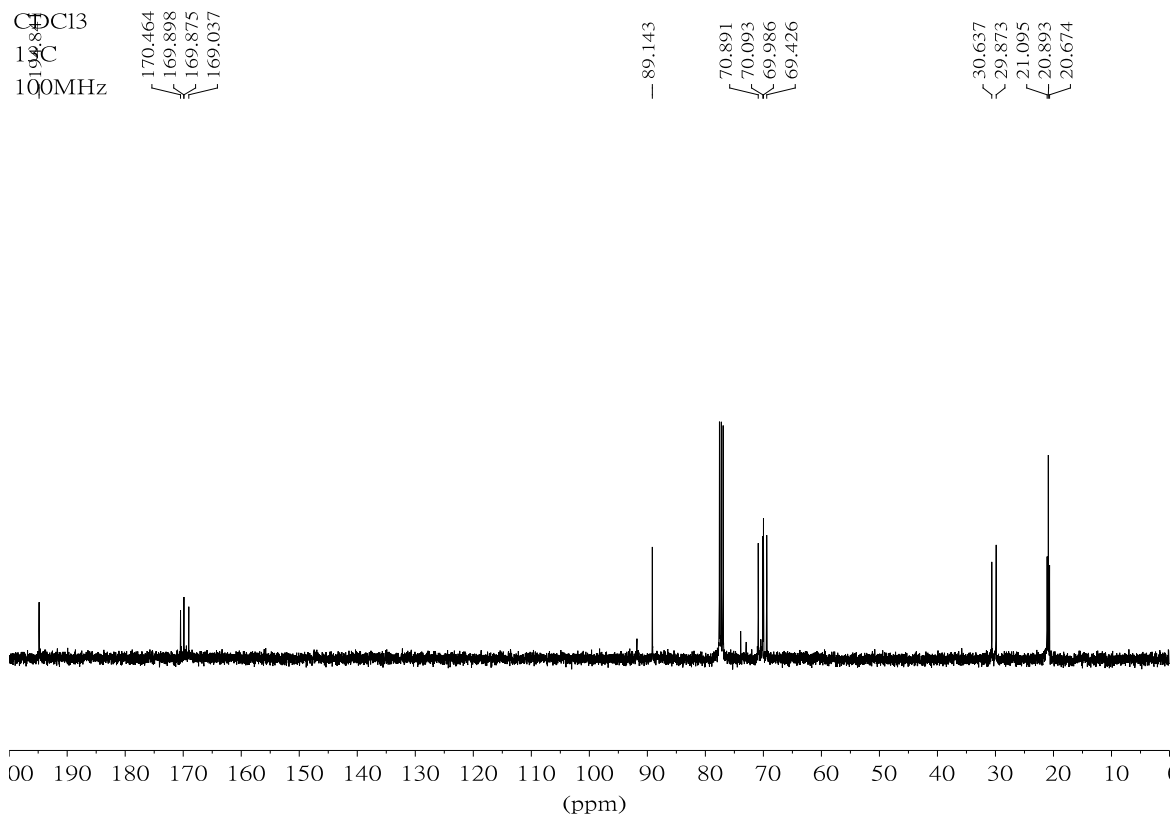
# 化合物 4



CDC13  
1H  
400MHz

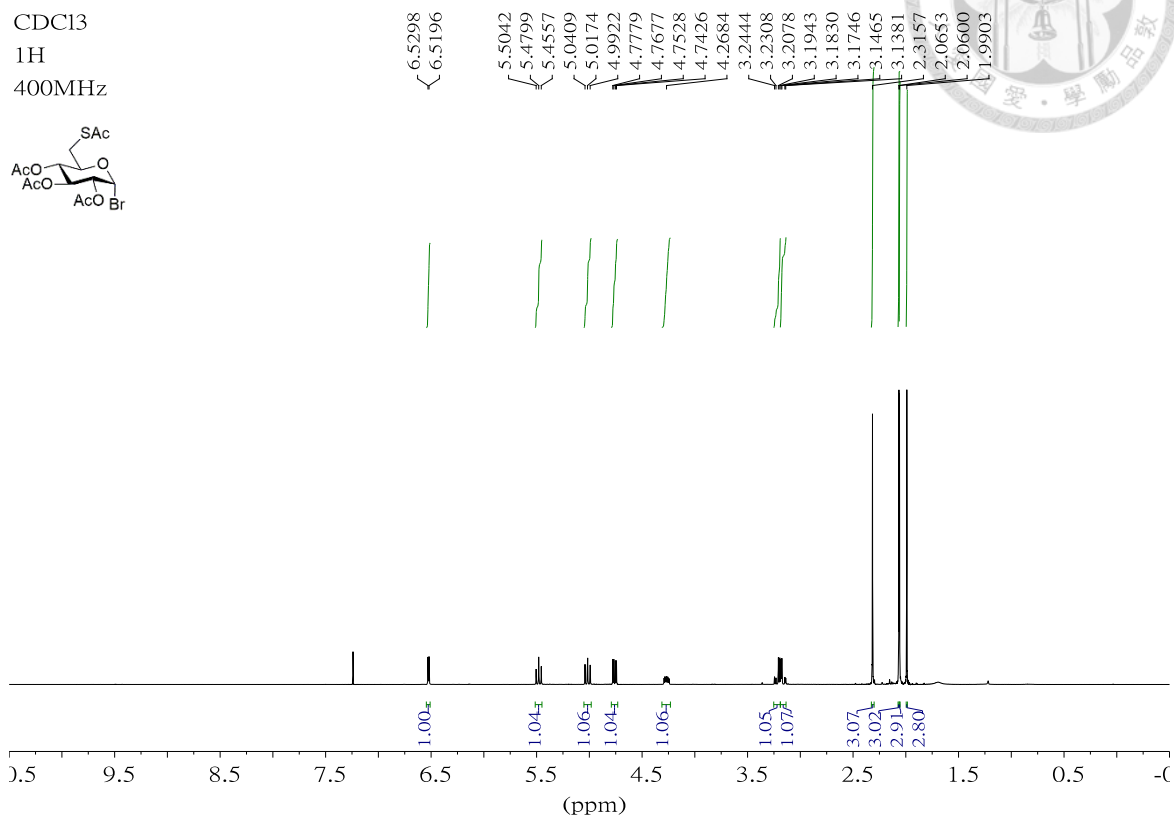
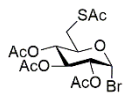


CDC13  
13C  
100MHz

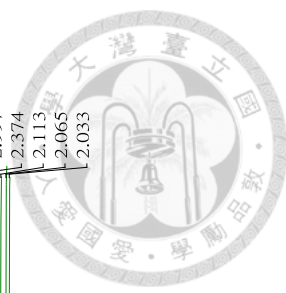
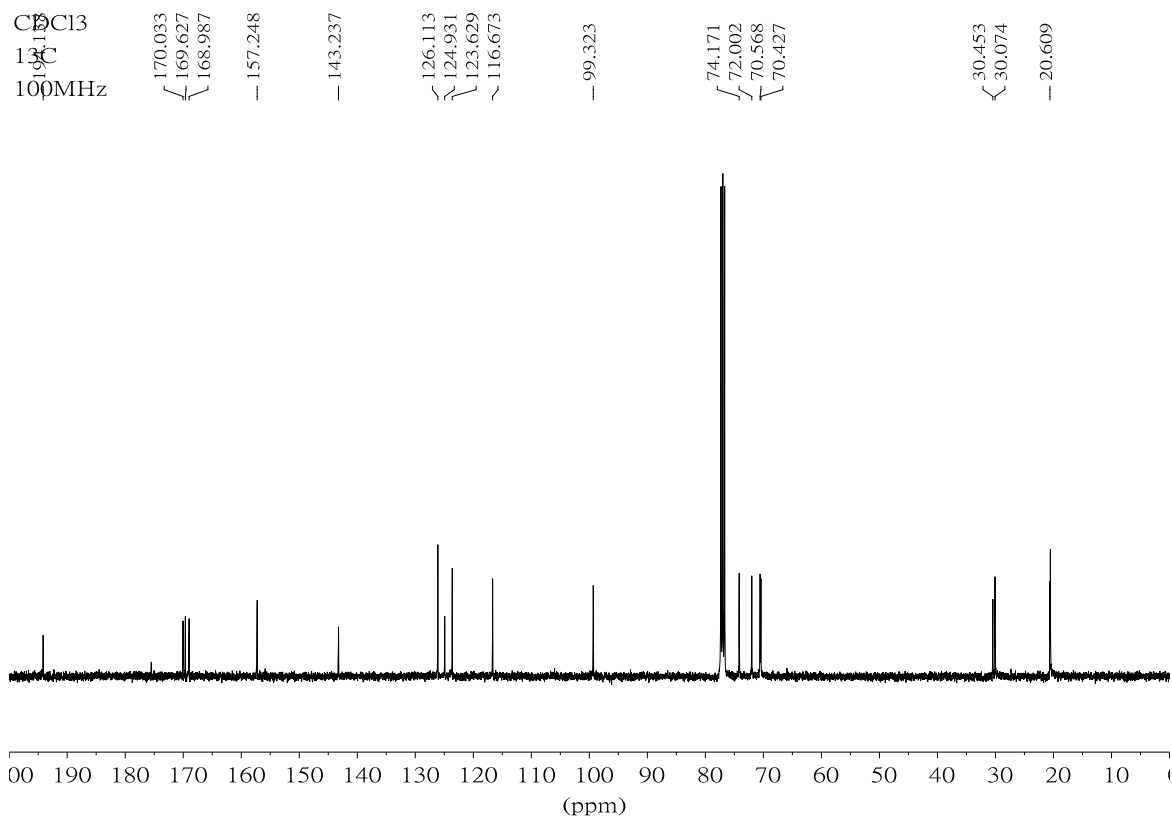
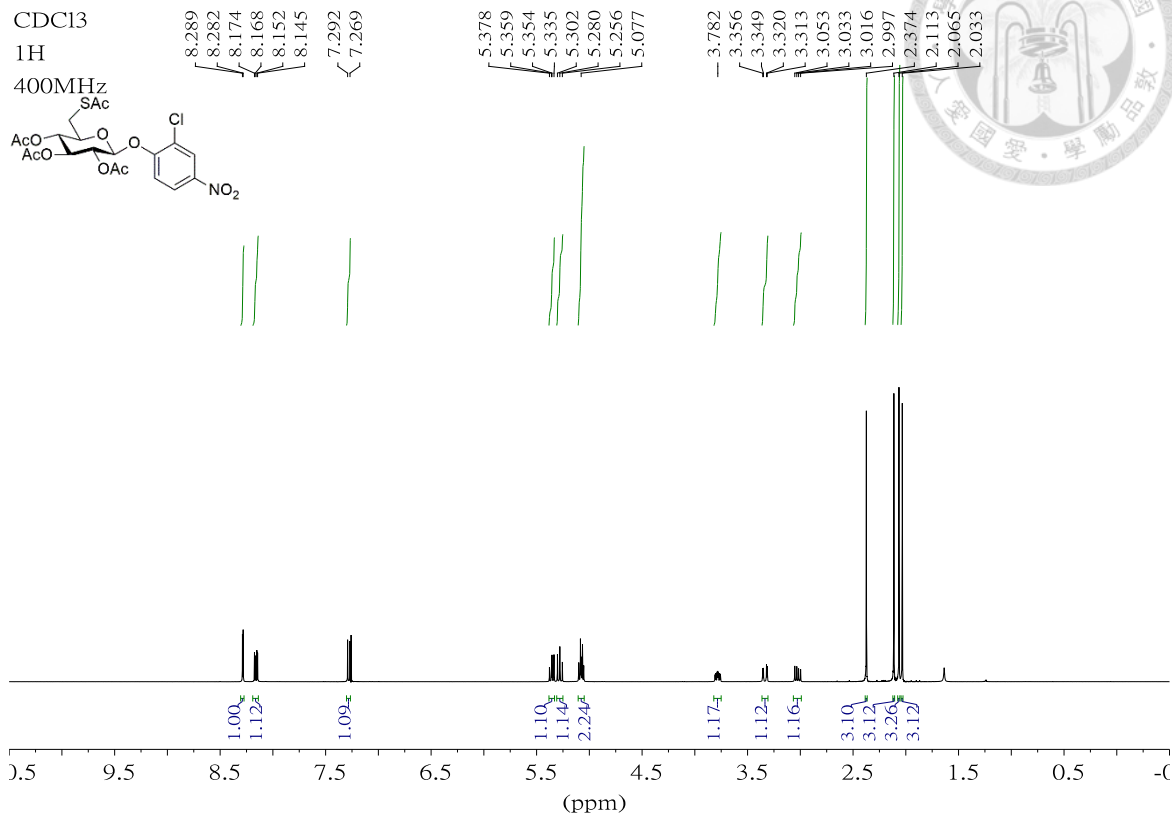


# 化合物 5

CDC13  
1H  
400MHz



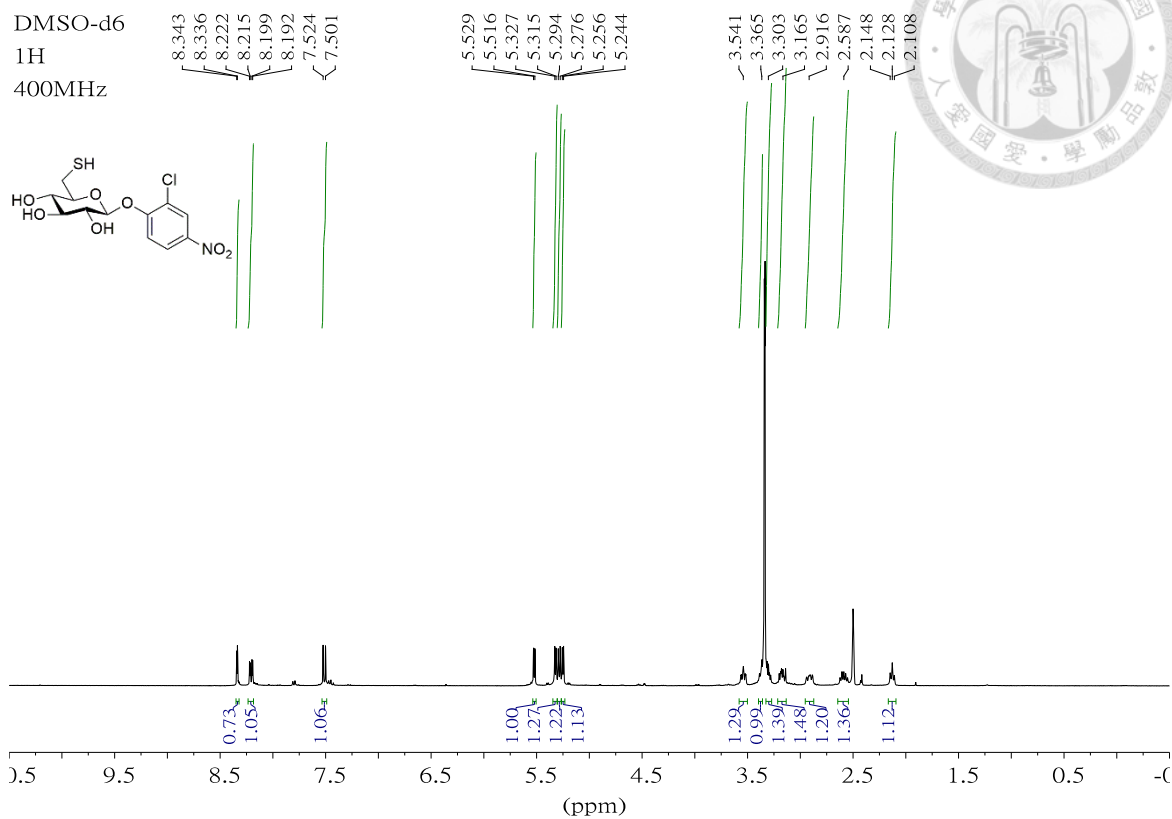
# 化合物 6



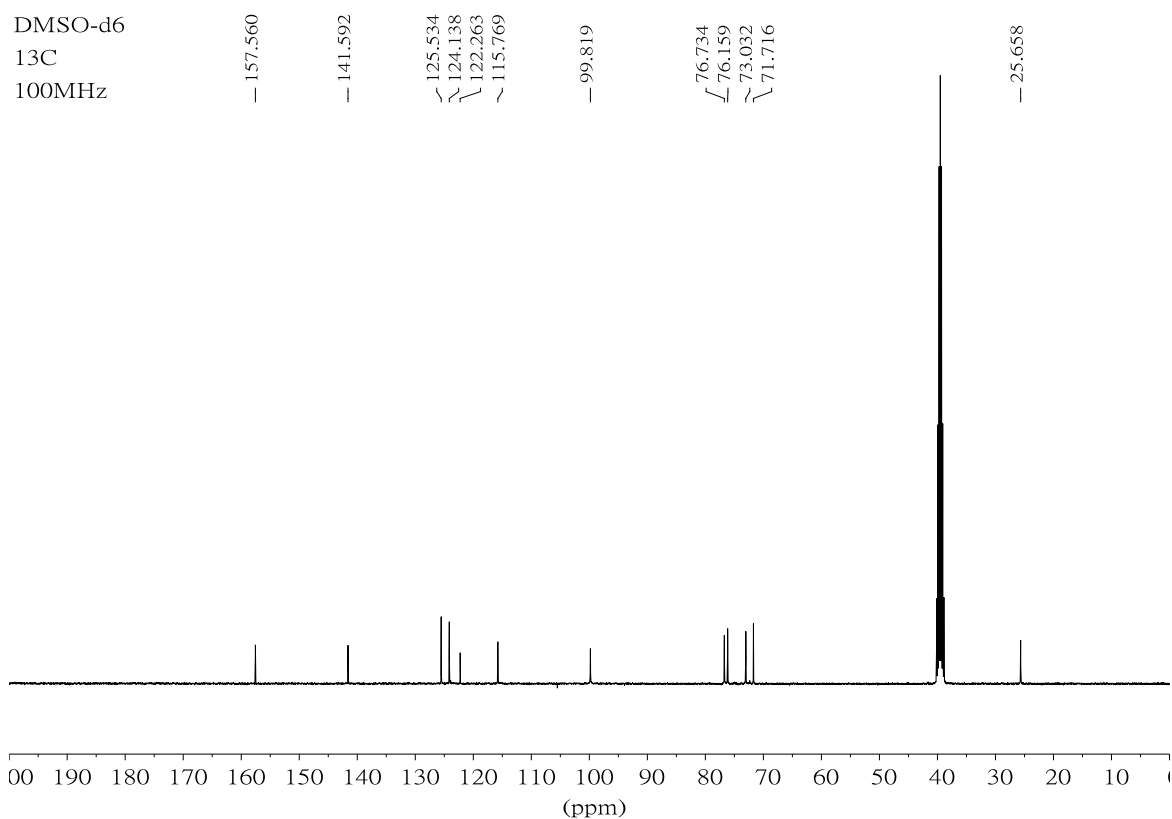


### 化合物 7

DMSO-d6  
1H  
400MHz

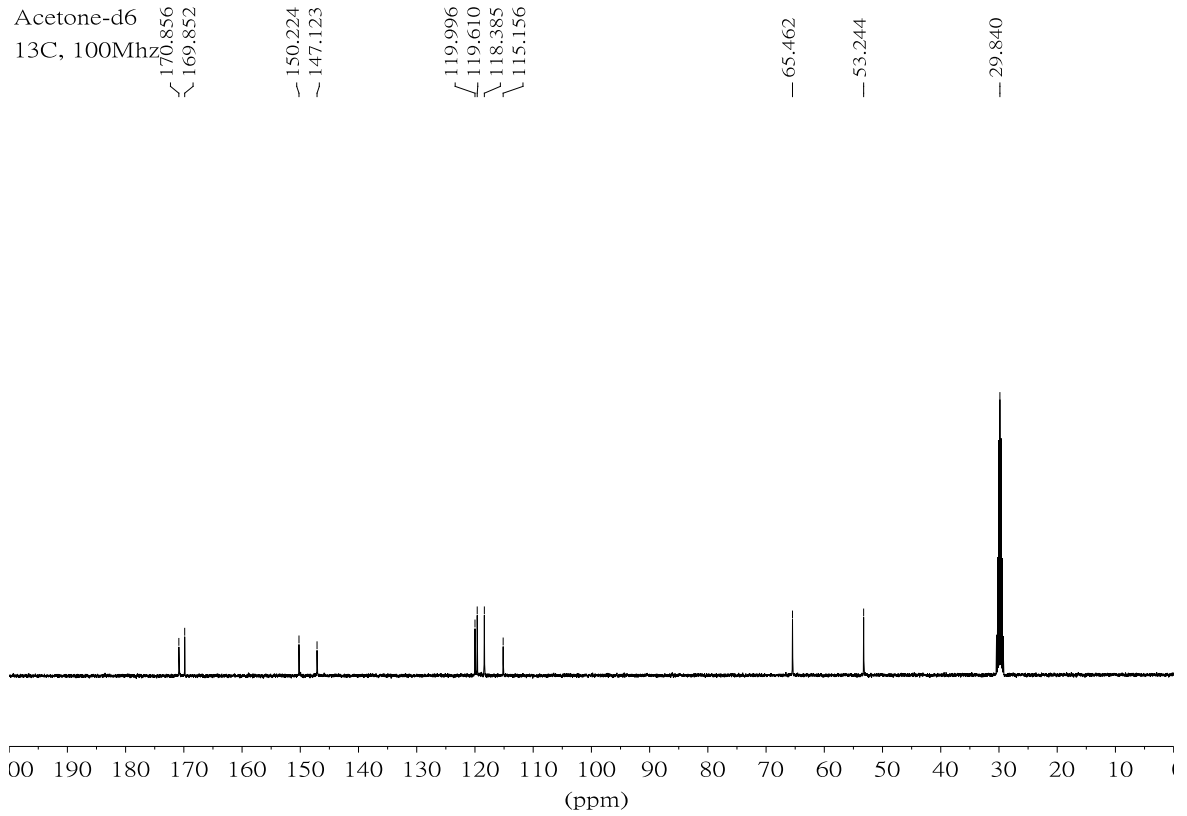
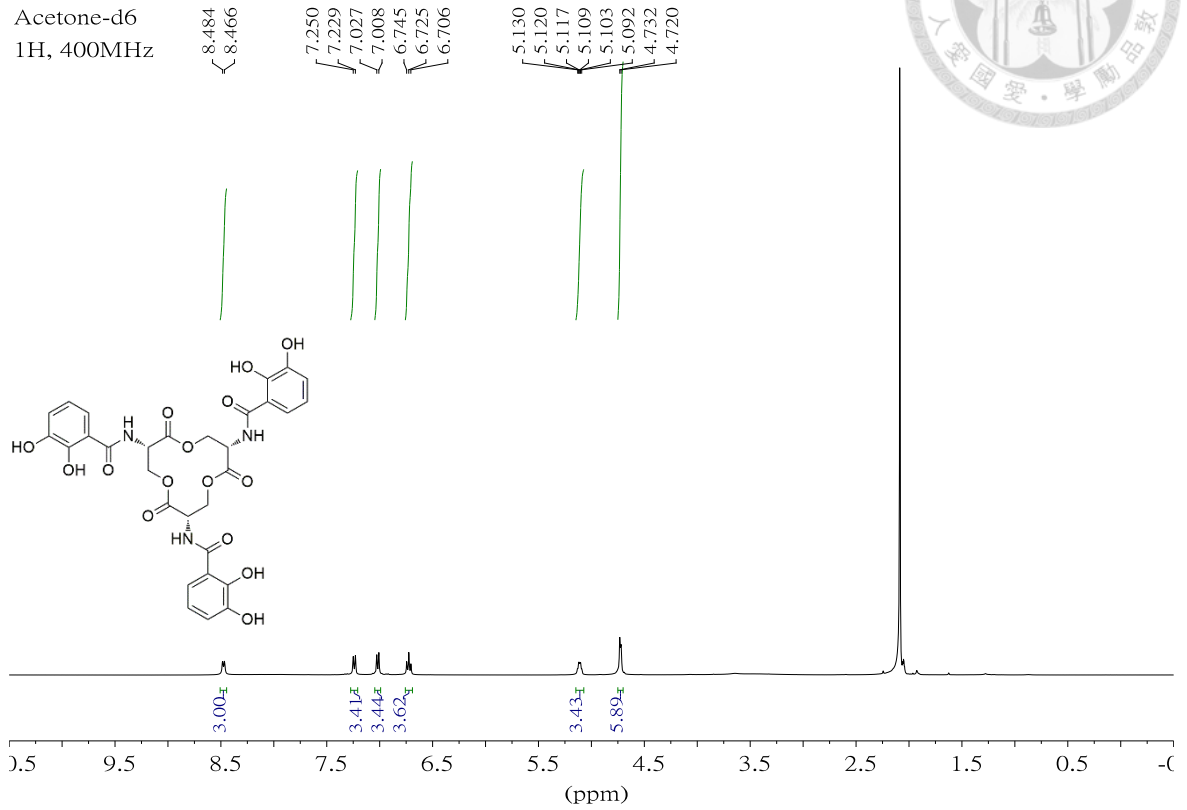


DMSO-d6  
13C  
100MHz

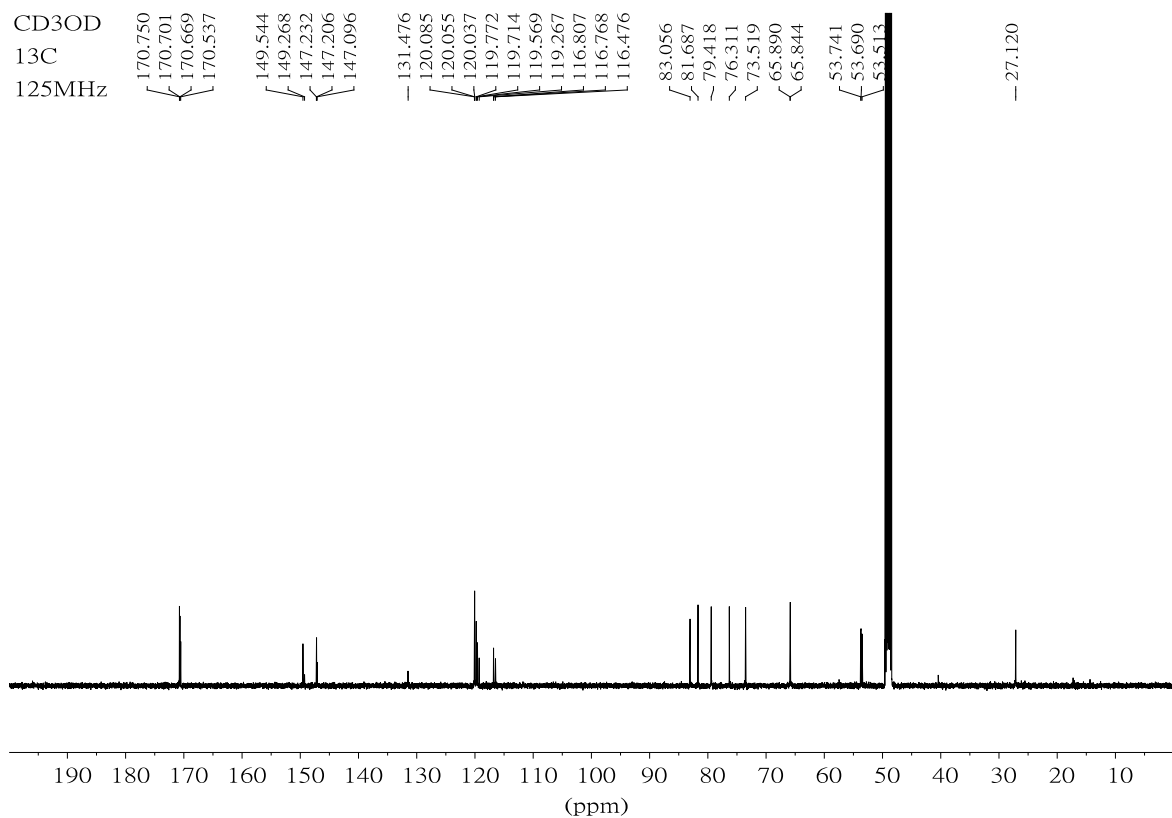
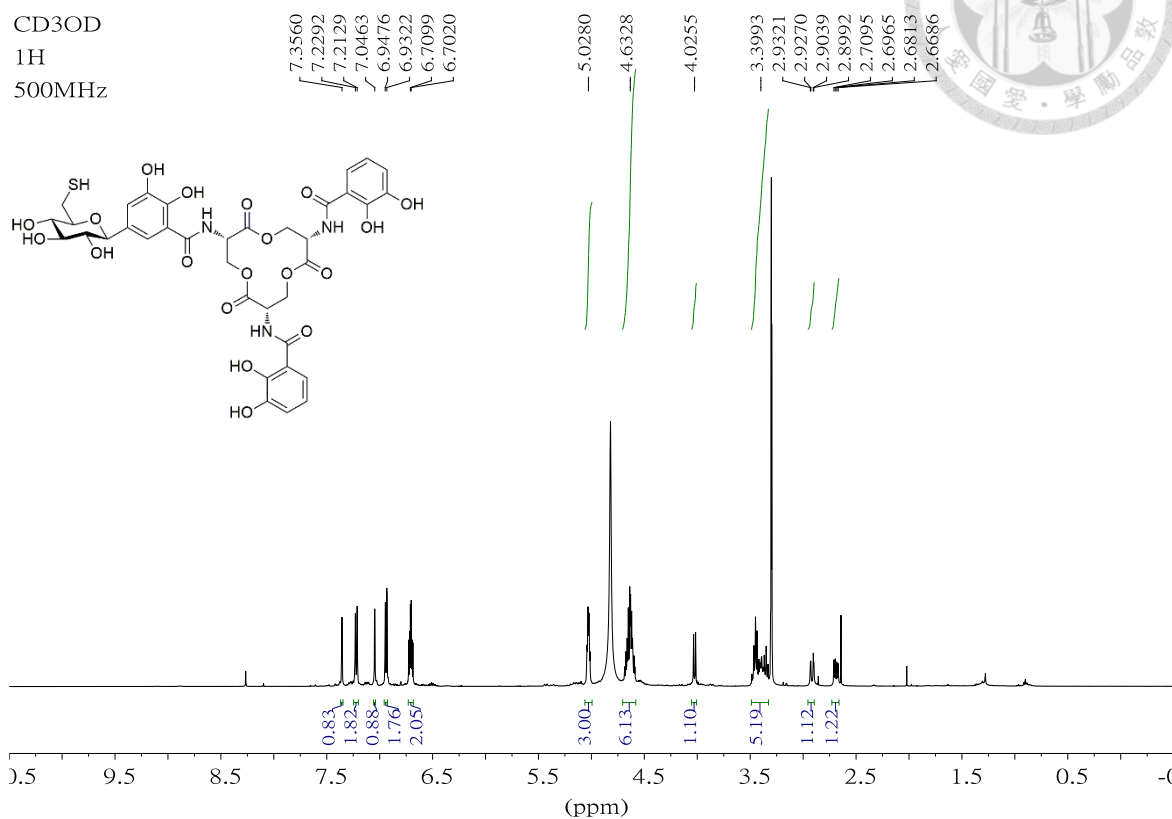




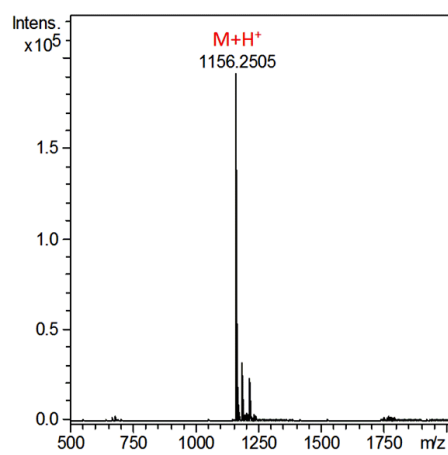
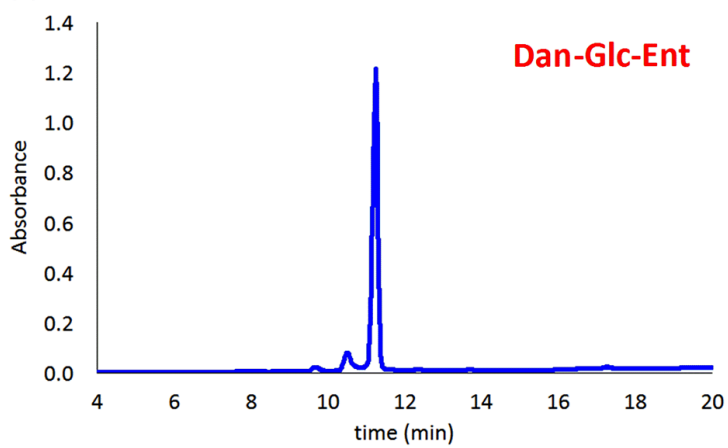
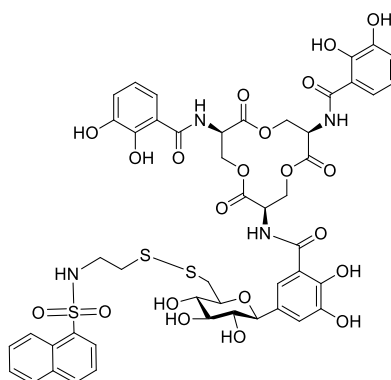
# 化合物 15



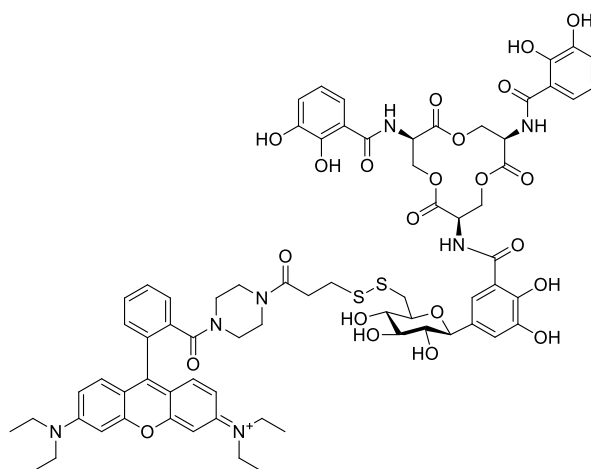
化合物 16



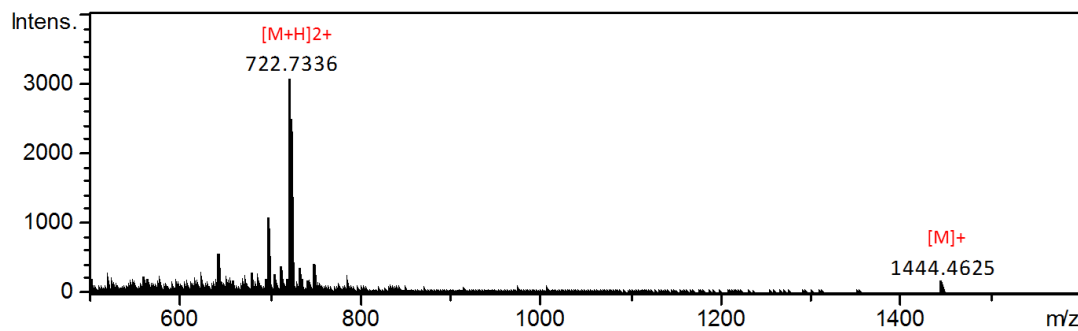
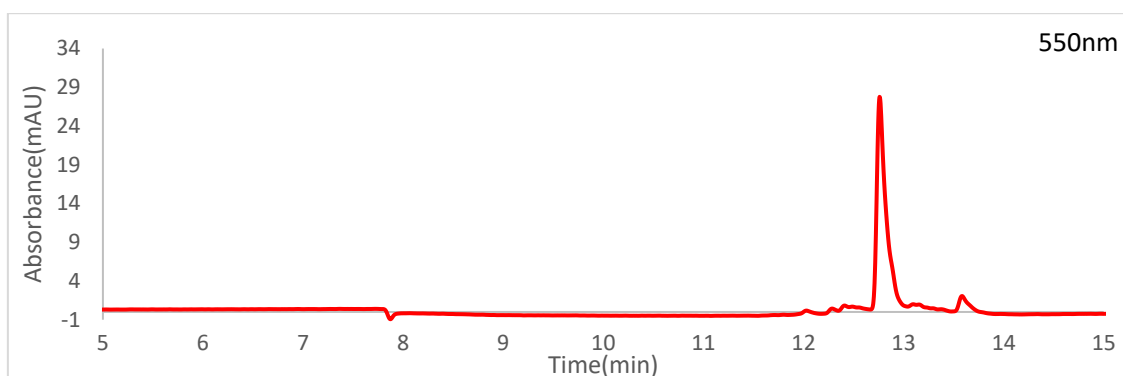
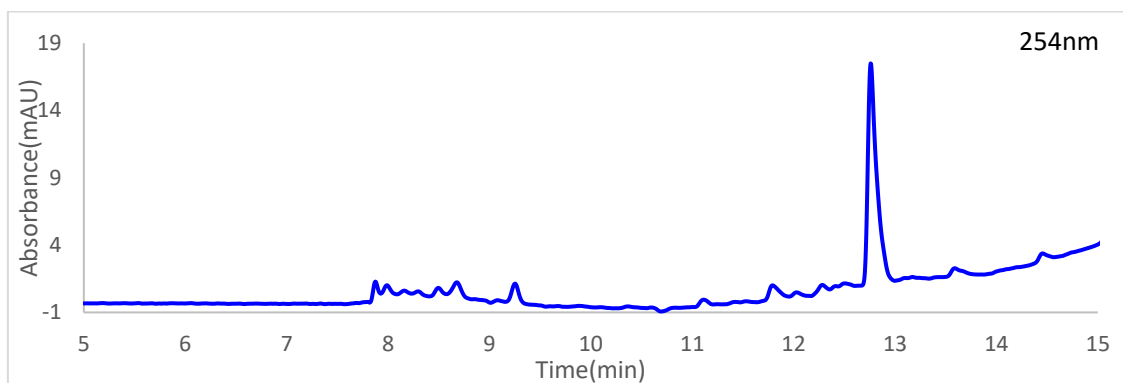
化合物 17



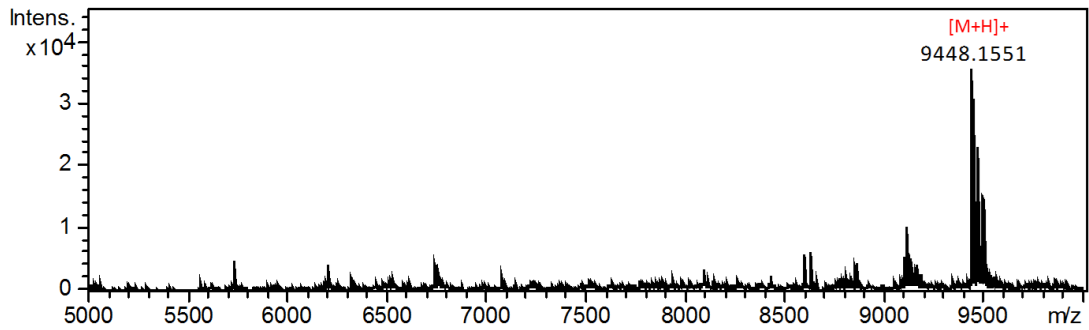
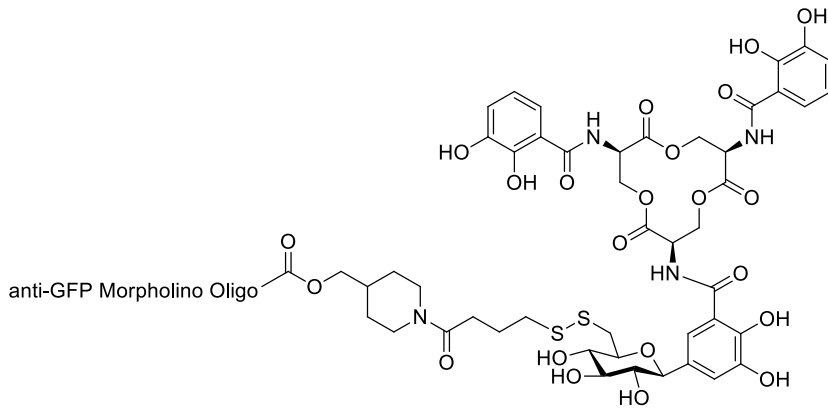
化合物 24



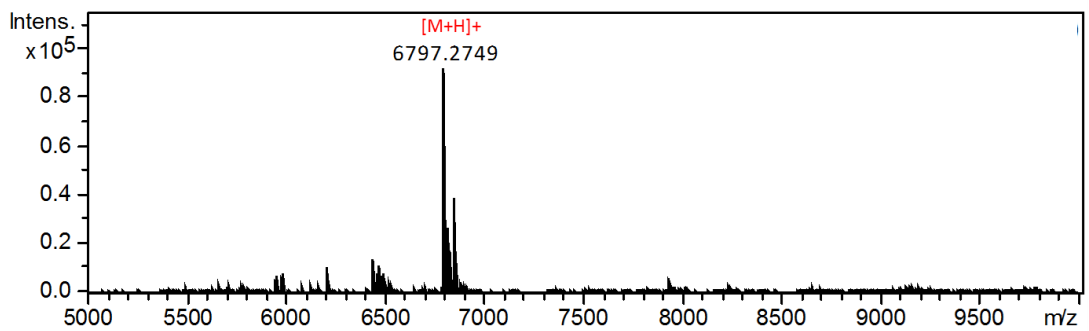
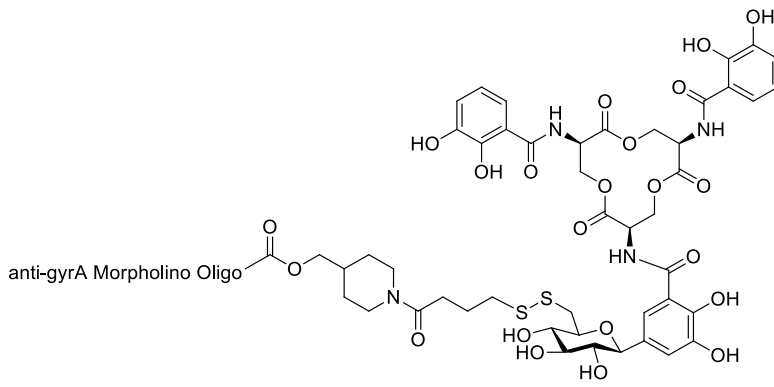
MW=1444.4641



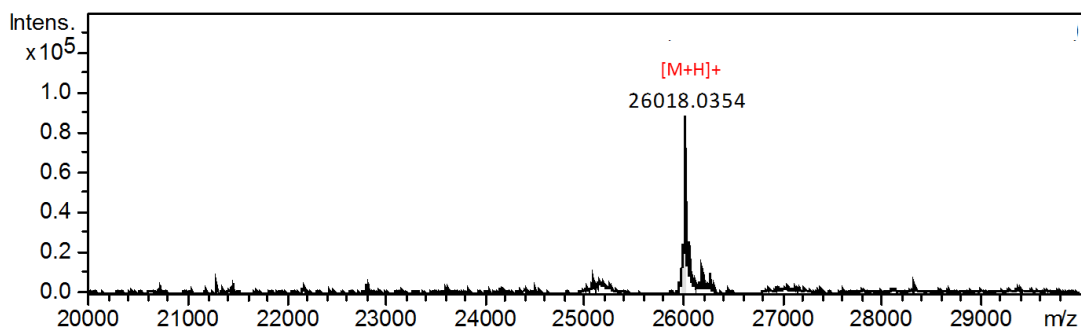
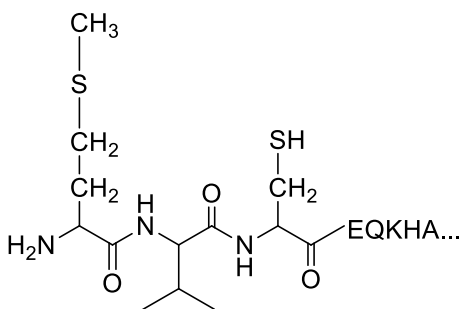
化合物 18



化合物 25



化合物 26



化合物 27

