

國立台灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry  
College of Bioresource and Agriculture  
National Taiwan University  
Master Thesis

Bcp1蛋白在出芽酵母中核糖體生合成途徑之研究

Bcp1 is a protein involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces*

*cerevisiae*

陳柏儒

Bo-Ru Chen

指導教授：羅凱尹 博士

Advisor: Dr. Kai-Yin Lo

中華民國101年7月

July, 2012

## 中文摘要

真核細胞裡核糖體生合成 (Ribosome biogenesis) 過程中，需要很多非核糖體蛋白幫助，這一類協助核糖體生合成的蛋白稱為輔助蛋白(transacting factors)。當這些輔助蛋白發生問題時，會導致核糖體生合成的缺失並進而影響蛋白質的生成，使細胞生長受阻，更嚴重的甚至導致細胞死亡。*BCP1* 是發芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的一個必需基因 (essential gene)，當*BCP1*有缺失時會導致酵母菌死亡。前人研究指出Bcp1與60S核糖體蛋白Rpl23 (large subunit ribosomal protein 23) 之間有交互作用，此外也跟酸肌醇磷酸激酶蛋白Mss4 (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) 的出核運輸有關，因此Bcp1應為一個輔助蛋白，其在核糖體生合成過程中可能的功能與角色是本研究的主要研究方向。

在本研究首先重複前人的研究成果，證明Bcp1蛋白的缺失會造成大核糖體無法被運輸至細胞質而累積在細胞核裡，並造成60S生成的缺陷。

本研究並針對Bcp1蛋白本身可能具有特定功能胺基酸序列進行刪除或突變，製作成*bcp1Δn40*、*bcp1Δc*、*bcp1Δnls*、*bcp1 nes*突變株，研究這些特定胺基酸對於Bcp1蛋白功能上的影響。結果發現這些胺基酸序列的改變都會導致60S核糖體生合成受損，但是我們意外的發現在生長測試結果中*BCP1Δnls*突變株卻能夠存活，其餘的突變株皆會造成細胞死亡，因此，我們認為Bcp1蛋白在細胞質中可能有重要的功能。

接著，本研究針對*BCP1*與export factors (*NMD3*, *ECM1*, *ARX1*, *MEX67*, *MTR2*) 之間基因關聯性的分析，結果顯示*BCP1*和export factors有基因關聯性並且當同時產生缺失時會產生synthetic sick現象，而且60S核糖體生成變的更差。我們想藉由大量表現export factors蛋白來修補Bcp1蛋白失活造成的生長缺陷，但是沒有效果，因此，我們認為Bcp1缺失時可能影響其他途徑，間接影響60S出核運輸。

為了找尋Bcp1的另一個參與的途徑，我們針對能與Bcp1蛋白結合的Rpl23蛋白著手研究，結果顯示Rpl23可以修補Bcp1蛋白失活所導致細胞死亡的現象，是

Bcp1蛋白的高量抑制子 (high copy suppressor) ，且在分析核糖體生合成圖譜時，亦觀察到60S合成的缺失有被修復的現象。

本研究又針對結合於Rpl23上，防止未成熟的60S核糖體與40S結合的Tif6蛋白進行研究。本研究發現在Bcp1蛋白失活的情況下，會造成Tif6留在細胞質的比例增加。而且Bcp1蛋白失活也會導致在核糖體成熟過程中在Tif6下游被釋出的Nmd3蛋白在細胞質分布的比例上升。接著本研究針對協助Tif6從60S釋出的蛋白Sdo1以及Efl1進行研究，發現在*bcp1ts*突變株中Sdo1以及Efl1表現狀況與野生株沒有差異。

根據以上結果，Bcp1參與60S核糖體的生合成，且其缺失可以被Rpl23抑制。Bcp1缺失會造成Tif6及Nmd3的位置改變，進而影響其功能，但其機制為何，尚待進一步的實驗說明。



**關鍵字：**Bcp1蛋白、核糖體生合成 (ribosome biogenesis) 、出核運輸蛋白 (export factors) 、Rpl23、高量抑制子 (high copy suppressor) 、Tif6。

## 英文摘要

*BCP1* is an essential gene in *Saccharomyces cerevisiae*. According to the previous research, Bcp1 is involved in the export of Mss4. Furthermore, when Bcp1 has defects, 60S subunits can't be exported from the nucleus. It implies that Bcp1 is also involved in 60S biogenesis.

First, we mutated or deleted the function domains of Bcp1 and made mutant constructs: *bcp1Δn40* · *bcp1Δc* · *bcp1Δnls* · *bcp1nes*. All these mutants showed 60S ribosomal biogenesis defects. Except *bcp1Δnls* all other mutants can't complement the growth of *bcp1ts* at nonpermissive temperature. .

Then we analyzed the genetic interaction between *BCP1* and 60S export factors ( *NMD3*, *ECM1*, *ARX1*, *MEX67*, *MTR2* ). We found the double mutants grew much sicker than those single mutants, which means Bcp1 has tight functional connection with these export factors. However, overexpression of any of the export factors can't rescue *bcp1ts* and vice versa. Therefore, Bcp1 may involve in another pathway. The accumulation of 60S might be from the secondary effects of the block of primary pathway.

We tried to test if Bcp1 showed any functional connection with Rpl23, which shows physical interaction with Bcp1. Interesting, we found overexpression of Rpl23 could rescue *bcp1ts* growth at nonpermissive temperature. Rpl23 protein levels were also highly elevated when Bcp1 function was inactivated.

To further dissect the mechanism about why Rpl23 could rescue *bcp1ts*, we tested Tif6. Tif6 is a 60S transacting factor which binds at Rpl23 at joining face. It escorts with 60S subunits to the cytoplasm and needs to be released before ribosome maturation. Failure of Tif6 release blocks 40S association with 60S and results in cell lethality. Interesting, Tif6 was mislocalized when *bcp1* was inactivated. However,

mutations of Bcp1 does not impact Tif6 release but stability.

According to our studies, Bcp1 plays an important role in 60S ribosome biogenesis. Its function is tightly connect to Tif6 and Rpl23. However, the mechanism is still unclear and futher studies are required.



**Keywords:** Bcp1, ribosome biogenesis, export factor, Rpl23, high copy suppressor, Tif6.

## 目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
表目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
附圖目錄.....	ix
壹、前言.....	1
一、釀酒酵母簡介.....	1
二、核醣體(Ribosome)簡介.....	1
三、核醣體生合成 (Ribosome biogenesis).....	2
四、核醣體生合成及人類疾病的相關性.....	10
五、研究動機.....	11
貳、    材料與方法.....	13
一、實驗材料:.....	13
二、一般實驗方法.....	13
三、 <i>Bcp1</i> 突變株的建構.....	15
四、核醣體圖譜分析.....	16
五、螢光顯微鏡分析.....	16
六、測試 <i>Bcp1</i> 和核醣體間的結合位置.....	17
七、找出抑制 <i>bcp1ts</i> 生長缺失的基因(High copy suppressors).....	18
參、    實驗結果.....	20
一、分析 <i>Bcp1</i> 是否具有核醣體生合成的能力.....	20
二、 <i>Bcp1</i> 突變株的建構.....	22

三、Bcp1 蛋白和 export factors (Nmd3, Emc1, Arx1, Mex67, Mtr2)之間關聯性分析 .....	25
四、RPL23 是 <i>bcp1ts</i> 的高量抑制子 (high copy suppressor) .....	28
五、Bcp1 蛋白在核糖體成熟過程中角色與功能的分析 .....	29
六、Tif6 與 Bcp1 蛋白之間關係分析 .....	31
肆、討論 .....	33
一、Bcp1 突變株分析的結果 .....	33
二、Bcp1 突變後導致 Tif6 分布於細胞質中 .....	34
伍、參考文獻 .....	37



## 表目錄

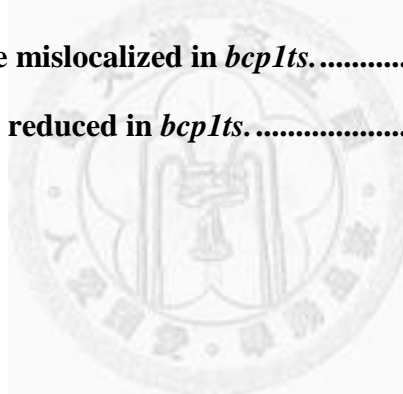
<b>Table 1. Yeast strains used in this study.....</b>	<b>46</b>
<b>Table 2. Plasmids used in this study.....</b>	<b>48</b>
<b>Table 3. Primers used in this study.....</b>	<b>50</b>





## 圖目錄

<b>Fig. 1. <i>BCP1</i> is essential for 60S biogenesis. ....</b>	<b>52</b>
<b>Fig. 2. Constructs of <i>bcp1</i> mutants and functional studies.....</b>	<b>54</b>
<b>Fig. 3. The growth patterns of various <i>bcp1</i> and export factors double mutants. .....</b>	<b>55</b>
<b>Fig. 4. Polysome profiles of various <i>bcp1</i> and export factors double mutants. ....</b>	<b>57</b>
<b>Fig. 5. None of the overexpression of export factors can suppress <i>bcp1ts</i> growth defects and vice versa.....</b>	<b>59</b>
<b>Fig. 6. <i>RPL23</i> is a high copy suppressor of <i>bcp1ts</i>. ....</b>	<b>60</b>
<b>Fig. 7. Rpl23 partially loses 60S association and shows higher expression levels in <i>bcp1ts</i>. ....</b>	<b>62</b>
<b>Fig. 8. Tif6 and Nmd3 are mislocalized in <i>bcp1ts</i>. ....</b>	<b>63</b>
<b>Fig. 9. The level of Tif6 is reduced in <i>bcp1ts</i>. ....</b>	<b>64</b>



## 附圖目錄

<b>Appendix Fig. 1. Yeast pre-rRNA processing pathway. ....</b>	<b>65</b>
<b>Appendix Fig. 2. Proposed pathway of 60S maturation in the cytoplasm. ....</b>	<b>66</b>



## 壹、前言

### 一、釀酒酵母簡介

**釀酒酵母**（學名：*Saccharomyces cerevisiae*），又稱麵包酵母或出芽酵母，釀酒酵母是與人類關係最廣泛的一種酵母菌，不僅因為傳統上它用於製作麵包、饅頭、釀酒等發酵食品，在現代分子生物學中作為真核模式生物，其作用相當於原核模式生物大腸桿菌(*Escherichia coli*)。釀酒酵母的細胞為球形或者卵形，直徑 5–10  $\mu\text{m}$ ，生活史可分成單倍體 (haploid) 及雙倍體 (diploid) 無性繁殖的方法及有性生殖兩種。單倍體的生活史簡單且以細胞分裂 (mitosis) 行出芽生殖方式產生子代，或相反的 mating type: MATa 和 MAT $\alpha$  能交配形成雙倍體；雙倍體能以出芽生殖方式產生子代，或當外在環境養分缺乏形成壓力時，行減數分裂 (meiosis) 產生單倍體孢子 (haploid spores) 增加存活率。釀酒酵母主要營養來源是 glucose、maltose、和 trehalose 等單糖，有氧情況下利用氧氣行呼吸作用產生能量；缺乏氧氣時則進行發酵作用產生能量以維持生長。釀酒酵母是第一個完成基因組定序的真核生物，其基因組包含大約 1200 萬鹼基對，分成 16 組染色體，共有 6275 個基因，其中可能約有 5800 個具有真正功能。此外釀酒酵母具有以下特色因而被用作研究真核生物的模式生物：單細胞、體積小、且生活史短，容易被轉殖 (Transformation) 入基因、剷除染色體上基因，或者進行基因重組 (Recombination)，還有釀酒酵母與同為真核生物的動物和植物細胞具有很多同源性的基因。據估計釀酒酵母基因約有 23% 與人類同源，人體中重要的蛋白質很多都是在酵母中先被發現其同源物，因此，研究者可藉由利用釀酒酵母這類模式生物來研究高等真核生物在分子生物學及細胞生物學上的現象。

### 二、核糖體(Ribosome)簡介

核糖體(Ribosome)是細胞裡的一種胞器，由大的次單位體 (large subunit) 及小的次單位體 (small subunit) 共同組成，其組成次單位體在真核與原核生物中不同。

真核生物中 small subunit 為 40S Ribosome，large subunit 為 60S Ribosome，轉譯時由這兩次單位體共同組成 80S Ribosome；原核生物中則是由 small subunit 30S Ribosome 和 large subunit 50S Ribosome，轉譯時組成 70S Ribosome(Lafontaine and Tollervey, 2001)。核糖體主要是由 rRNA 以及 ribosomal proteins (Rps)所組成，核糖體的主要的功能則是將帶有基因密碼的 DNA 轉錄(Transcription)出的 mRNA 進行轉譯(Translation)產生具有功能的蛋白質，進而調控細胞生長代謝(Korostelev, 2011)。

### 三、核糖體生合成 (Ribosome biogenesis)

核糖體生合成是個很複雜的流程，在核仁中，rRNA 轉錄後，接著經過剪切、修飾(Henras et al., 2008)、及與核糖體蛋白結合，然後經由運輸出細胞核到細胞質中(Tschochner and Hurt, 2003)，最後形成具有轉譯功能的結構(Fromont-Racine et al., 2003)。這個合成過程中，除了 rRNA 以及 Ribosomal Proteins，也需要有與核糖體結構組成無關但卻具有協助核糖體生合成或者協助運輸出核的蛋白，這一些蛋白稱為輔助蛋白(non-ribosomal factors or transacting factors) (Nissan et al., 2002)。核糖體生合成過程可約分為 pre-rRNA 的轉錄、pre-rRNA 的加工(processing)與摺疊 (folding)、同時 pre-rRNA 會與 Ribosomal Proteins 進行結合(assembly) (Venema and Tollervey, 1999)、 Ribosomal subunits 出細胞核運輸(Nuclear export of ribosomal subunits)及核糖體在細胞質中完成最終的成熟(Kressler et al., 2010) (Krokowski et al., 2006) (Lo et al., 2009)。40S 與 60S subunits 在合成階段有不同的核糖體蛋白、non-ribosomal factors 參與，整個過程也不相同(Nissan et al., 2002) (Schafer et al., 2003)。Tandem affinity purification (TAP) Method 常被用來分析核糖體生合成過程中整個蛋白複合物組合的變化，藉由將各個階段的複合物分離出來，分析其中 pre-rRNA、Ribosomal Proteins、non-ribosomal factors 和 snoRNPs 組成的差別，找出每一個蛋白質參加的時間點及功能，來推斷整個生合成的步驟

(Grandi et al., 2002b)。

## 1. pre-rRNA 的轉錄

真核細胞 rRNA 的轉錄主要是藉由 RNA polymerase I 來合成，起初會合成出 35S pre-rRNA(Krokowski et al., 2006; Mayer and Grummt, 2006; Moss et al., 2007; Rudra and Warner, 2004)，帶有 A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 四個切位，其中 A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 三個切位隨後會被約 75 個 small nucleolar ribonucle protein particles (snoRNPs)形成的 snoRNP complexes 切開形成 20S pre-rRNA 及 27S pre-rRNA(Appendix Fig. 1)。

snoRNPs 是一種可以對 ribosomal RNAs、transfer RNAs 及 small nuclear RNAs 進行修飾的 RNA (Fromont-Racine et al., 2003; Henras et al., 2004; Henras et al., 2008; Venema and Tollervey, 1999)。

snoRNPs 可以分成兩類型：藉由 methylation 進行修飾的 C/D box snoRNAs 及藉由 pseudouridylation 進行修飾的 H/ACA box snoRNAs。

20S pre-rRNA 經由熟成後，會產生 18S rRNA，形成 40S 核糖體；27S pre-rRNA、5.8S、及 RNA polymerase III 轉錄出的 5S pre-rRNA 則形成 60S 核糖體 (Granneman and Baserga, 2004; Henras et al., 2008)。

## 2.40S 核糖體生合成(Assembly of 40S subunits):

第一個 40S precursor 是由 UTP-A、UTP-B、UTP-C subcomplexes 與 35S pre-rRNA 一起形成的 90S particle 又稱為 small subunit processome (SSU) (Krogan et al., 2004; Osheim et al., 2004; Perez-Fernandez et al., 2007)。

最先被純化出來的 pre-40S 是由超過 20 個 non-ribosomal factors、U3 snoRNP、一些 Rps 和 35S rRNA 所組成(Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002a; Perez-Fernandez et al., 2007)。

接著 U3 snoRNP 切斷 35S rRNA 上的 A<sub>0</sub>、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 三個切位產生 20S pre-rRNA，這步驟使得 pre-40S 組成發生改變。

接著許多的 non-ribosomal factors 離開 pre-40S，更多的 biogenesis factors 和 Rps 與 pre-40S 結合(Schafer et al., 2003)，這時 pre-40S

具有明顯的 Head 結構以及 platform 和 body 特色構造，接著 pre-40S 被送進細胞質。進入細胞質後的 pre-40S 馬上形成 40S 典型的 beak 結構，並且和 Enp1-Ltv1-Rps3 complex 以及 protein kinase Hrr25 結合在一起 (Schafer et al., 2006)，接著細胞質中的 Nob1 切掉 20S pre-rRNA 上的 D site 形成 18S rRNA (Fatica et al., 2003; Gelperin et al., 2001; Granneman et al., 2005; Vanrobays et al., 2003)，成熟為完整的 40S Ribosome (Fatica et al., 2004; Lamanna and Karbstein, 2009)。

### 3.60S 核糖體生合成 (Assembly of 60S subunits):

第一個 pre-60S 中間產物是藉由 Ssf1 這個蛋白質利用 TAP 純化方法純化取得 (Fatica et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001)，組成包括有 27SA<sub>1</sub>，27SB pre-rRNA 及 ribosomal proteins，約 30 個 non-ribosomal factors (其中包括 early factors Noc1 及 Rrp5)，但在這階段的 pre-60S 中沒有發現到 snoRNPs 的存在 (Kressler et al., 2008a)。第二個 pre-60S 是由 Npa1 純化取得，組成包括有 27SA<sub>2</sub> pre-rRNA，ribosomal proteins，約 40 個 non-ribosomal factors，8 個 RNA helicase，一些 snoRNPs 以及 90S 有關的 factors。下一個中間產物是藉由 Nsa1 這個蛋白純化出來，組成包括有 5S rRNA，27SA<sub>3</sub> pre-rRNA，27SB pre-rRNA (組成從 Noc1-Noc2 變成 Noc2-Noc3) (Kressler et al., 2008b; Milkereit et al., 2001)，外切酶 (exonuclease) Rat1 和 Xrn1，5S RNP complex (包含有 Rpf、Rrs1、Rpl5) 以及 Rpl11 (Zhang et al., 2007)。

接著下一階段純化是透過 Rix1 這個蛋白質；此時 pre-60S 已經被運送到 Nucleoplasm，這個階段有許多蛋白已經離開 pre-60S，像是 Spb1、Erb1、Nop2、Puf6、Ebp2、Ytm1、Noc2-Noc3 subcomplex、DExD/H-ATPases Dbp10、Drs1、Spb4、Dbp9、以及 Has11 (Kressler et al., 2008b)。不過同時也有新的蛋白參與組成，包括 Real、the Rix1-Ipi3-Ipi1 subcomplex、Rsa4、the Arx1-Alb1 subcomplex、Sda1、及 Nug2，此外這階段 pre-rRNA 的組成已經改變為 25S 和 7S/5.8S，並形成蝟

蚪狀 (tadpole-like) 的結構(Harnpicharnchai et al., 2001; Nissan et al., 2004)，尾巴則與Real AAA-ATPase及Rsa4 and the Rix1-Ipi3-Ipi1 subcomplex結合以幫助pre-60S運輸出細胞核(Harnpicharnchai et al., 2001)。

#### 4.核糖體的出核運輸 (Nuclear export of ribosome subunits)

核糖體的兩個次單體 pre-60S subunit 和 pre-40S subunit 在細胞核內生成之後，需要通過細胞核膜到細胞質中，完成最後的成熟過程，並組成完整的 80S 核糖體進而具有合成蛋白質的功能，這個將 pre-ribosome 通過 Nuclear pore complexes (NPC)運送出細胞核的過程稱之為核糖體的出核運輸(Ribbeck and Gorlich, 2002)。幫助 60S 出核的蛋白質包括：Arx1 (Yao et al., 2007)、Nmd3/Crm1、Mex67-Mtr2 heterodimer 及 Ecm1。NPC 是核糖體出核運輸中一個很重要的角色(Chook and Blobel, 2001; Fried and Kutay, 2003)，Nucleoporins 在細胞核膜上形成一個巨大的複合物，形成細胞核內外的通道，核糖體的出核運輸過程需要 export receptors 結合，幫助核糖體通過 NPC 的疏水性通道，將 pre-ribosome particles 送入細胞質中，使 pre-ribosomes 在細胞質中成熟為 60S 和 40S Ribosomes。

#### Pre-60S 核糖體運輸蛋白

##### (1) Crm1(Xpo1)

Nmd3 是具有 nuclear export sequence (NES)訊號的 adapter，當 Nmd3 和 pre-60S 結合後，NES 會展現出來讓 Xpo1 進行辨認及結合，接著會與 RanGTP 結合，幫助 Pre-60S 通過核膜 (Hedges et al., 2006; Thomas and Kutay, 2003; Trotta et al., 2003)。

##### (2) Mex67/Mtr2

接著被發現與 60S 核糖體出核運輸有關的 receptor proteins 是 Mex67-Mtr2 heterodimer 蛋白 (Kadowaki et al., 1994a; Kadowaki et al., 1994b; Rout et al., 2000;

Segref et al., 1997), Mex67-Mtr2 heterodimer 蛋白已經被研究與 mRNA 的出核運輸有關,而在 60S 核糖體出核運輸中當 Mex67-Mtr2 heterodimer 發生缺失時會導致 60S 受到阻礙,並且有研究指出 Mex67-Mtr2 heterodimer 與 nucleoporins 及 5S rRNA 有直接的鍵結 (Strasser et al., 2000; Yao et al., 2007)。

### (3) Arx1

第三個被研究發現參與 60S 核糖體出核運輸的蛋白是 Arx1, Arx1 被研究發現它與 60S 核糖體鍵結的位置靠近核糖體蛋白 Rpl25 (Bradatsch et al., 2007; Hung and Johnson, 2006), 而且 Arx1 會形成一個非極性的結構幫助遮蔽 Pre-60S 帶有的極性部份以協助 Pre-60S 與 NPC 進行結合並通過核膜,更有研究指出 *arx1Δ* 與其他 export factors *nmd3*, *mex67* 以及 *mtr2* 同時發生突變的情況下,因為 Arx1 與這些 export factors 之間功能相似,因而導致缺陷加重以致細胞死亡的 synthetic lethality 現象。

### (4) Ecm1

Ecm1 是經由與 *mtr2-33* mutant 有 synthetic lethality 現象而發現的另一個與 Pre-60S 核糖體出核運輸有關的蛋白(Bassler et al., 2001), 而且 Ecm1 也被證實與 Nmd3、Arx1 及 Mex67 間有交互作用,同時協助 Pre-60S 運輸出細胞核到細胞質中進行核糖體的功用(Bradatsch et al., 2007; Yao et al., 2010)。

當 pre-60S 輸送出細胞核到達細胞質之後,AAA-ATPase Drg1 會將 Nog1、Rlp24 (Pertschy et al., 2007b)從 pre-60S 釋出;phosphatase Yvh1 則是促進 Mrt4 置換成 P0 (Kemmler et al., 2009; Zhang et al., 2007);接著 Rei1 及 Jjj1 將 Arx1 釋出;Efl1 及 Sdo1 將 Tif6 回收,是一個會與 Rpl23 核糖體結構蛋白結合形成一個空間阻礙,限制 60S 核糖體與 40S 核糖體結合的 stalk protein;Lsg1、Sqt1 及 Rpl10 將 Nmd3 置換下來,60S Ribosome 才完成成熟的過程。而這些輔助蛋白會再回到細胞核中,幫助下一個核糖體的合成(Appendix Fig. 2)(Gabel and Ruvkun, 2008; Thomson and Tollervey, 2010; Yao et al., 2007)。



## 5. 核糖體生合成中的耗能酵素 (Energy-consuming enzymes in ribosome biogenesis)

核糖體生合成的各個過程中需要很多的耗能酵素參與協助同時調控各個反應進行。核糖體生合成的過程中參與耗能酵素可以分類成 DExD/DexH ATPase、kinase、GTPase、AAA-ATPase、以及 ABC proteins (Kressler et al., 2010; Kressler et al., 2008a; Mayer and Grummt, 2006; Strunk and Karbstein, 2009)。

### DExD/H-ATPase

Pre-ribosome 會與大量RNPs、rRNA和snoRNA形成複雜的聚合物，而形成這聚合物的能量來源主要是DExD/DExH ATPase這一類型的耗能酵素 (Gorbalenya and Koonin, 1993)。對於pre-40S的組成約有七個DExD/DExH ATPase：Dbp4、Dbp8、Dhr1、Dhr2、Fal1、Rok1、Rrp3；pre-60S則有約十個：Dbp2、Dbp3、Dbp6、Dbp7、Dbp9、Dbp10、Drs1、Mak5、Mtyr4/Dob1參與；另外Has1與Prp43這兩個DExD/DExH ATPase 則是同時參與pre-40S及pre-60S。

DExD/DExH ATPase在核糖體生合成的早期就參與主要的功用有幾種，幫助RNP的重組及RNA與RNA或Protein與Protein之間鍵結的解離，提供能量給pre-rRNA的 exonuclease與endonuclease，及協助snoRNP從pre-rRNA脫離。總括DExD/DExH ATPase的功用主要是藉由消耗ATP的能量以維持pre-ribosomal particles 的完整以及幫助核糖體蛋白或核糖體因子的置換 (Bleichert and Baserga, 2007; Cordin et al., 2006; Jankowsky and Fairman, 2007; Linder, 2006)。

### Kinases

根據研究指出有一些kinases會參與核糖體的生合成過程，其中kinases對於pre-40S的生合成有著重要性的影響。Hrr25 蛋白是casein kinase I的異構型酵素，

Hrr25參與細胞內很多代謝過程的反應像是kinetochore attachment ,DNA repair , cell cycle , Ca<sup>2+</sup> signaling及NPC的磷酸化修飾 (Lusk et al., 2007; Petronczki et al., 2006)。Hrr25對40S的功用主要在late pre-40S particles 階段，Hrr25會磷酸化及去磷酸化 Ltv1-Enp1-Rps3 subcomplex (Schafer et al., 2006; Schafer et al., 2003) ，而這是對40S beak 結構形成是必需的，如果缺少Hrr25 kinase，40S將無法具有正常的構形及功能 (Schafer et al., 2006)。60S核糖體的生合成過程裡Hrr25會磷酸化 Tif6幫助60S可以正常的生合成(Basu et al., 2003)。

Rio1和Rio2是 Homologous，為非典型的 serine protein kinase ， Rio1 protein 在核糖體生合成過程以外的功能也是相當的重要，這蛋白的主要功用在協助 Cell cycle 的進行以及幫助 chromosome 的修復(Angermayr et al., 2002)。Rio1和Rio2 兩個蛋白質都是可以被輸送到細胞核內再從細胞核內被輸送到細胞質中的雙向蛋白(shuttling proteins)。根據研究指出，Rio1和Rio2對於40S核糖體的生合成是必需的酵素，這兩個蛋白質參與 pre-40S在細胞質中20S pre-rRNA的生合成過程(Geerlings et al., 2003; Vanrobays et al., 2003; Vanrobays et al., 2001)，另有研究指出在 TAP 純化的結果中發現Rio2的含量較多，相較之下Rio1幾乎沒有甚麼含量，因此Rio2 在40S核糖體生合成中可能是比較主要的酵素，調控著40S的生成。

Fap7是一個帶有P-loop 的 kinase (Leipe et al., 2003)，Fap7蛋白的缺失會導致20S pre-rRNA的生合成過程出現缺失，同時Fap7是一個直接與核糖體蛋白Rps14結合的蛋白。Fap7蛋白的walker A或 walker B domains (Granneman et al., 2005)的缺失或突變都會造成Fap7功能的下降。

Kinases藉由磷酸化以及去磷酸化調控著一些核糖體蛋白的構型，同樣的也藉此調控一些其他酵素的活性，進而調控核糖體的生合成過程。

### **AAA-ATPase:**

ATPases associated with various cellular activities (AAA-type ATPases)是一種

存在所有生物體中的耗能酵素，研究發現這類酵素參與許許多多細胞內生化反應，也包括核糖體生合成的一些反應過程。AAA-ATPase結構由保守結構的ATPase domain，walker A (P-loop)，walker B (DExx-box) (Erzberger and Berger, 2006)以及其他非保守結構共同組成一個具有六聚體圓環結構的蛋白質，這個結構藉由水解ATP產生的能量就能改變蛋白質的結構或者是將受質從載體上釋放(Hanson and Whiteheart, 2005; Vale, 2000)。根據六聚環結構的差異可將AAA-ATPase分成type I、type II及6 AAA domains三種類型ATPase。在核糖體生合成的過程中有三個AAA-ATPase對於60S ribosome的合成是必需的，分別是Drg1/Afg2, Rix7, Real1/Mdn1。Drg1是具有兩個AAA domains的type I AAA-ATPase，在細胞質中Drg1主要功能是將Rlp24及Nog1在細胞質中從60S核糖體上釋出(Zakalskiy et al., 2002)。Rix7 是一個type II AAA-ATPase，它會將Nsa1從 nucleolar pre-60S ribosome上釋放下來(Gadal et al., 2001)。Real是six AAA domains的AAA-ATPase，它會將Rsa4及Rix1-Ipi3- Ipi1所組成的complex從60S ribosome上釋放，進而協助核糖體形成(Garbarino and Gibbons, 2002; Ulbrich et al., 2009)。

#### **ATP-binding cassette (ABC) superfamily :**

大多數ABC proteins是在膜上扮演將物質由低濃度往高濃度主動運輸的角色，但是在核糖體生合成的過程中有兩個ABC proteins幫助ribosome assembly (Dong et al., 2005; Yarunin et al., 2005)，分別是Arb1及Rli1 (Dong et al., 2005; Dong et al., 2004)。Arb1的缺失會造成40S ribosome生合成的缺陷(Dong et al., 2005)。而Rli1的缺失則是會導致40S及60S出核運輸的缺陷(Kispal et al., 2005)，此外，Rli1與translation initiation factor 3(eIF3)及Hcr1(eIF 3的非必需結構蛋白單體)有相關聯性(Yarunin et al., 2005)。

#### **GTPases :**

GTPase proteins 上具有五個保守性序列，其中包括p-loop所組成具功能性的

G-domain，這類型蛋白主要功能是用來對細胞內生化反應進行調控(Leipe et al., 2002)，已經發現有六個蛋白參與核糖體生合成的過程，分別是Bms1、Efl1/Ria1、Lsg1/Kre35、Nog1、Nug1、Nug2以及Nog2。Bms1與40S生合成相關，Bms1與Rcl1以及GTP形成complex引導U3 snoRNA與90S particle結合進行分割反應，隨後Bms1水解GTP從90S particle上離開(Gelperin et al., 2001; Karbstein et al., 2005; Wegierski et al., 2001)。其他5個GTPases都與60S核糖體生合成相關，Efl1/Ria1幫助在細胞質內pre-60S上的Tif6離開。Nog1參與pre-60S從細胞核輸送到細胞質的過程，它結合在Rlp24 protein上(Saveanu et al., 2003)，直到pre-60S被送到胞質中，才由Drg1釋放Nog1和Rlp24。Lsg1幫助Nmd3的離開(Pertschy et al., 2007a)。Nug1和Nug2/Nog2參與核糖體生合成的步驟尚未清楚，其功能主要是幫助核糖體結構的改變(Karbstein, 2007; Leipe et al., 2002)。

#### 四、核糖體生合成及人類疾病的相關性

核糖體生合成過程中某些輔助蛋白或核糖體蛋白的突變或缺失，已知與一些人類基因疾病有關聯，其中很多都與造血骨髓的病變相關，進而導致紅血球量的下降或是促使細胞癌化。已知因為核糖體生合成過程發生缺陷所造成的疾病有：Diamond-blackfan anemia (DBA)、dyskeratosis congenital (DC)、Shwachman-Diamond syndrome (SDS)、cartilage-hair hypoplasia (CHH)。

##### 1. Blackfan-Diamond氏貧血 (Blackfan-Diamond Anemia):

Blackfan-Diamond氏貧血的發病主要跟紅血球的發育不全，血球細胞發育遲緩以及先天異常有關。所有病人中細胞先天異常引起發病占30-50%，核糖體生合成蛋白突變引起發病占30-40%，*RPL5*、*RPL11*、*RPS17*、*RPS19*及*RPS27*的突變都會引起發病，主要原因是核糖體生成變得遲緩。

##### 2. 先天性角化不良 (Dyskeratosis Congenita):

先天性角化不良的病徵是皮膚有色素沉澱，黏膜有白斑已及指甲發育不良。產生

此疾病的原因是因為protein dyskerin的突變以至不能促進H/ACA snoRNPs的功能而導致的結果。

### 3. Swachman-Diamond syndrome(SDS):

Swachman-Diamond syndrome (SDS)的病徵是造血能力降低，胰臟外分泌下降以及發生白血病的風險增加，這個疾病主要跟SBDS蛋白突變有關，此蛋白跟酵母的Sdo1為同源蛋白。Sdo1蛋白會與Efl1蛋白一起將Tif6從60S上釋放下來，讓60S完成成熟步驟(Menne et al., 2007)。

### 4. Cartilage-hair hypoplasia (CHH):

Cartilage-hair hypoplasia主要的病徵是骨骼發育不良以及侏儒症，主要是由於MRP RNase突變導致rRNA processing不正常所引起的疾病。

核糖體的生合成也會影響細胞週期，根據研究，當核糖體生成減弱時，會產生一種回饋訊號而影響cell cycle，導致cell cycle停止或者是細胞凋亡，有些核糖體蛋白已被研究會影響cell cycle。在哺乳動物中，*RPL11*可以抑制*MYC*的功能，*RPL23*、*RPL11*、*RPL5*及*RPS7*可以減弱MDM2的活性並使p53更為穩定。在癌細胞中，常被發現核糖體生合成的調控出錯，因此，核糖體生合成的機制與人類細胞的功能及控制有相當大的關聯性。

## 五、研究動機

核糖體生合成和細胞內蛋白質的合成密不可分，蛋白質是構成細胞結構的重要成分同時也協助和調控細胞內生化代謝反應的酵素，當核糖體生合成發生缺陷時會導致蛋白質生成受阻進而導致細胞生長缺陷甚至死亡，因此研究核糖體合成機制對於細胞正常的生長是相當重要的領域。*BCP1*是出芽酵母的一個必需基因(essential gene)，當*BCP1*失去功能時會導致酵母菌死亡。根據生物資訊序列分析比對的結果顯示，Bcp1蛋白上帶有幫助出核的NES (Nuclear export signal)以及幫助入核的NLS (Nuclear localization sequence)這兩種運輸訊號序列。前人研究指

出，Bcp1 是調控酸肌醇磷酸激酶 Mss4 (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) 的出核蛋白，當 Bcp1 缺失時會使 Mss4 累積於核中，而不能到細胞膜上進行 phosphoinositol 的磷酸化。但有趣的是，當 Bcp1 缺失時也會導致大核糖體累積在細胞核中，而且 Bcp1 和 60S 核糖體蛋白 Rpl23 (large subunit ribosomal protein 23) 之間有交互作，因此，這都顯示 Bcp1 在核糖體生合成過程中具有功能，但是其角色未知。因此，研究 Bcp1 蛋白在核糖體生合成中扮演的角色以及功能是本篇論文主要的研究方向。



## 貳、材料與方法

### 一、實驗材料:

(一) 菌株與質體：請參照表一、表二。

(二) 本研究所使用引子對：請參照表三。

(三) 本研究所使用的培養基。YPD 成分是 20g peptone, 10g yeast extract 加 H<sub>2</sub>O 至 950mL 進行滅菌後再添加 50mL 40% Glucose 製備而成(製作成培養基需額外添加 20g argar), YPGal 成分是 20g peptone, 10g yeast extract 加 H<sub>2</sub>O 至 900mL 進行滅菌後再添加 100mL 20% Galactose 製備而成;此外在酵母菌培養中使用的選擇性培養液或培養基稱為 dropout media, 主要成分為 yeast nitrogen base 和 dropout powder (組成分為 adenine 800mg, uracil 800mg, tryphan 800mg, histidin 800mg, arginine 800mg, methionine 800mg, tyrosine 1200mg, lysine 1200mg, phenylalanine 2000mg, leucine 2400mg) 在實驗中會根據轉殖到酵母菌中質體上所帶的篩選基因將其中一種或是兩種以上必須物質剷除, 製作成篩選用的培養液或培養基, 製備方法為 6.7g yeast nitrogen base 以及 0.6g dropout powder 加水至 950ml 進行滅菌之後加入 50ml glucose(製作成培養基需額外添加 20g argar), 或是 6.7g yeast nitrogen base 以及 0.6g dropout powder 加水至 900ml 進行滅菌之後加入 100ml galactose 所製成。

### 二、一般實驗方法

(一) 相關套組(Kit)使用

相關套組使用之方法參照各套組使用說明書。

(二) 勝任細胞製備

在我們的實驗中我們利用 *E.coli* DH5 $\alpha$  來製作勝任細胞, 以便我們將質體進行放大, 同時也能用來作 stock 的保存。在製作勝任細胞的過程首先我們先將大腸桿菌 DH5 $\alpha$  以四區劃分法塗在 LB 培養皿上進行隔夜培養, 第二天我們取單一菌落

的 DH5 $\alpha$  培養在 5 mL 由 SOB (10g Tryptone (2%), 2.5g Yeast extract (0.5%), 0.29g NaCl, 0.091g or 1.25ml 1M KCl, 0.602g or 5ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 0.467g MgCl<sub>2</sub> or 5ml 1M MgCl<sub>2</sub>, adjust to 500 ml with water and autoclave) 添加 40% Glucose 使作後製備成含有 1% Glucose 的 SOC 培養液中於 37°C 進行隔夜培養。第三天我們將 5mL 的菌液全部加到 500mL SOB 中於 20°C 培養箱進行繼代培養直到 OD<sub>600</sub> 到 0.5-0.6 然後在 4°C 條件下回收菌體，接著加入 9.5ml TB (10mM PIPES, 15mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 250mM KCl, 55mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6.7 ) 在冰上培養 10 分鐘然後離心去上清，接著再加入 18.6 ml TB 和 1.4 ml DMSO(7%) 混勻放置於冰上靜置 10 分鐘，隨後以 100  $\mu$ l 分裝到一個 1.5ml 試管中放入液態氮瞬間冷凍後保存在 -80°C 備用。

### (三) 轉型作用

#### 1. *E.coli* Heat shock transformation

將 100 $\mu$ l 勝任細胞與 2-20 $\mu$ l 質體混和，冰浴 30 分鐘。42°C 下進行熱休克反應(Heat shock) 90 秒，隨後置於冰上 2 分鐘。加入 LB 100 $\mu$ l，於 37°C 培養 30 分鐘。塗於含適當抗生素的培養基上，置於 37°C 培養箱培養隔夜。

#### 2. Quick Yeast transformation

在 30°C 培養箱，使用 YPD 或者 Drop-out Media 隔夜培養 3 ml yeast，將菌液倒入 1.5 ml 離心管中，以 8000 rpm 離心，重複兩次，倒出上清液以 1 倍 Li/TE (100mM LiOAC/10mM Tris, 1mM EDTA) 回溶，接著離心倒出上清液，以 50-200  $\mu$ l 1 倍 Li/TE 回溶然後分裝菌液，15  $\mu$ l 到一管 1.5ml 離心管為一個反應，加入 5  $\mu$ l ssDNA(10mg/ml)，加入質體 DNA，加入 300  $\mu$ l PEG/Li/TE，混和均勻，在 30°C 下，培養 30 分鐘，之後 42°C 下進行熱休克反應(Heat shock)15 分鐘，加入 1ml 無菌水混勻，以 8000rpm 離心，倒出上清液剩下約 100  $\mu$ l，塗於適當選擇性培養基上，放置在 30°C 培養箱培養 2-3 天。



### 三、Bcp1 突變株的建構

我們利用 PCR 與基因重組技術設計我們實驗的各種菌株，首先以 BY4741 酵母菌的 DNA 作為模板，以 KLO14、KLO15 primer 在條件 95°C 5 分鐘，95°C 30 秒 50°C 30 秒 72°C 1 分鐘共 30 個 Cycles，以及最後反應 72°C 10 分鐘下，選殖出 *BCP1* 基因，再用限制酶 *EagI* 及 *PacI* 剪切後，接入以同樣限制酶酵素剪切的 PAJ1025 質體中，建構 *BCP1-GFP (LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL101，同樣的利用同樣限制酶酵素剪切的 PAJ1026 質體中，建構 *BCP1-MYC (LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL105。我也建構不同的 *Bcp1* 突變株，包括  $\Delta n40$ 、 $\Delta nls$ 、*nes*、 $\Delta c$  mutants。在  $\Delta n40$  的突變株建構中，第一步，我先利用 KLO87、KLO15 增幅出 DNA 片段，再用限制酶 *EcoRI* 及 *PacI* 剪切後，接入以同樣限制酶酵素剪切的 PAJ755 質體中，建構 *bcp1 $\Delta n40$ -GFP (URA3 CEN)* 的質體，命名為 PKL112。利用 *EagI* 及 *PacI* 限制酶酵素剪切 PKL112 並接入 PAJ1025 或 PAJ1026 質體中，建構 *bcp1 $\Delta n40$ -myc (LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL118。 $\Delta nls$  的突變株建構中，第一步，我先利用 KLO14、KLO26 以及 KLO27、KLO15 分別增幅出 5 端及 3 端的 DNA 片段，這兩片段的 DNA 少了原來 *nls* 訊號 14 個氨基酸的 42 核苷酸序列，我們利用引子上帶有的 *BamHI* 限制酶剪切再利用接合酶(Ligase)將兩個片段接合在一起，然後用限制酶 *EagI* 及 *PacI* 剪切後，接入 PAJ1025 質體中，建構 *bcp1 $\Delta nls$ -GFP (LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL103，或接入 PAJ1026 質體中，建構 *BCP1 $\Delta nls$ -myc (LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL107。*nes* 的突變株建構中，第一步，我先利用 KLO14、KLO16 以及 KLO15、KLO117 分別增幅出 5 端及 3 端的 DNA 片段並在引子中設計突變，將可能的 NES 序列中的 L85、L88、L91、I92、L93 改成 Ala，然後以這兩個 DNA 片段為模板，KLO1 及 KLO2 為引子，以 Fusion PCR 的方式，建構出 *nes* 突變菌株，然後用限制酶 *Eag I* 及 *Pac I* 剪切後，接入以同樣限制酶酵素剪切的 PAJ1025 質體中，建構 *bcp1(nes)-GFP (LEU2 CEN)*

的質體，命名為 PKL104，或接入 PAJ1026 質體中，建構 *bcp1(nes)-myc (LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL108。在  $\Delta c$  的突變株建構中，首先我先利用 KLO14、KLO26 增幅出 DNA 片段，再用限制酶 *Eag I* 及 *BamH I* 剪切後，接入以同樣限制酶酵素剪切的 PAJ1025 質體中，建構 *bcp1 $\Delta c$ -GFP (LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL102，或 PAJ1026 質體中，建構 *bcp1 $\Delta c$ -myc(LEU2 CEN)* 的質體，命名為 PKL106。

#### 四、核糖體圖譜分析

為了分析酵母菌核糖體生合成的情形，我們將欲分析的菌株進行核糖體圖譜的分析 (Polysome gradient analysis)。我們將 2ml 隔夜培養液以千分之一體積加到 150mL 相同培養液中進行繼代培養至 OD~0.3，隨後加 750 $\mu$ L cycloheximide (10mg/ml) 到培養液中繼續培養 10 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 低溫回收菌液，將菌體先保存於 -80 $^{\circ}$ C。隨後將回收的菌體進行破菌。首先加入 Lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, and 50  $\mu$ g/mL) 200 $\mu$ L 回溶菌體，將回溶的菌體加到裝有玻璃珠的玻璃試管中準備破菌，以每震盪 30 秒放置冰上靜置 1 分鐘的方式進行 4 個循環，吸取上清液到新的 1.5mL 試管，再加入 200 $\mu$ L Lysis buffer 到玻璃試管洗出更多的 cell lysis，再加入到相同的 1.5mL 試管。接著再以 4 $^{\circ}$ C 13000rpm 離心 10 分鐘，再將上清吸取加到新的 1.5mL 的試管再以相同條件離心，將離心後的樣品進行 OD<sub>260</sub> 測定，將各個測定後的樣品進行濃度平衡後取 9 A<sub>260</sub> 加到由 Sucrose 製成的梯度離心管 (7%-47% , 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, and 12mM  $\beta$ ME)，以 4,0000 rpm 離心 2 小時 30 分鐘，利用紫外線偵測器偵測 OD<sub>254</sub> 進行核糖體圖譜分析。

#### 五、螢光顯微鏡分析

(1) 為了進行 *bcp1* 各個突變株於細胞位置的分析，我們觀察 GFP 螢光蛋白 (Bcp1-GFP,  $\Delta n40$ -GFP,  $\Delta nls$ -GFP, *nes*-GFP,  $\Delta c$ -GFP) 在細胞內的位置。首先

我們將各菌株接在培養液(Leu<sup>-</sup> + Glucose)中培養隔夜，將培養的菌液繼代培養在相同的培養液中 2 小時，將菌液離心下來以適量體積的培養液回溶，取 5 $\mu$ L 到載玻片上利用螢光顯微鏡觀察各突變株在細胞內的位置。

(2)為了觀察 60S 核糖體蛋白 Rpl25 於突變株中細胞位置的分析，我們將 Rpl25 蛋白接上 GFP 製作成 PKL201 (*CEN RPL25-GFP*)然後我們將質體送入欲分析的菌株中表現。首先我們將各菌株接在培養液中培養隔夜，將培養的菌液繼代培養在相同的培養液中 2 小時，將菌液離心下來以適量體積的培養液回溶，取 5 $\mu$ L 到載玻片上利用螢光顯微鏡觀察各突變株在細胞內的位置。

## 六、測試 Bcp1 和核糖體間的結合位置

### (1) Sucrose Cushion

將 2ml 的隔夜培養液繼代培養到 100ml 的培養基中，培養至 OD<sub>600</sub>=0.4-0.6 之間，以 5000rpm 在 4 $^{\circ}$ C 離心沉澱菌體，以 lysis buffer (20mM Tris pH7.5, 100mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol)回溶，再離心去上清液 (菌體可以保存於-80 $^{\circ}$ C)。接著用 500 $\mu$ l lysis buffer 回溶並將溶液吸到裝有玻璃珠(glass beads)的玻璃試管中進行破菌：震盪 30 秒，將試管放回冰上 1 分鐘方式進行 5 到 6 次破菌。之後將試管內的液體吸到 1.5ml 的離心管中以 13000rpm 離心，再取上清液到新的離心管再以同條件離心後，以 OD<sub>280</sub> 進行濃度測試。將不同濃度樣品調整到相同濃度後，保存一部分作為全部蛋白(WCE: whole cell extracts)樣品，隨後進行超高速離心。我用 1M sucrose 作為分離樣品的介質進行離心，取 400 $\mu$ l 1M sucrose 置於離心管底部再加入 300-500 $\mu$ l 的樣品於上方，以 80000rpm 離心 1 小時。離心完成後吸取上層液體保存作為上清液(supernatant)樣品，並以 100 $\mu$ l lysis buffer 回溶底部沉澱物並保存作為(pellet)樣品，加入 5xSDS dye 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後保存於-20 $^{\circ}$ C 冰箱。

## (2)Western blot

我們使用 10% SDS-PAGE 作為電泳的材料，以 150V 進行膠體電泳 50-55 分鐘，使用半乾式(semi-dry)轉印機器進行轉印，轉印條件為 80mA、60 分鐘每一片樣品。轉印完成後進行 Western blot，使用市售的  $\alpha$ -GFP、 $\alpha$ -myc、 $\alpha$ -HA 抗體作為一抗，市售的 HRP-Conjugated  $\alpha$ -rabbit、HRP-Conjugated  $\alpha$ -mouse 抗體作為二抗。一開始用 5%的脫脂牛奶進行 30 分鐘的 block 然後以 TBS 清洗，以 1 比 5000 的比例將抗體溶在 TBST 中，在室溫下進行反應 2hr，之後以 TBST 清洗 3 次每次 5 分鐘，再加入 2 抗反應 30-60 分鐘，之後以 TBST 清洗 3 次每次 5 分鐘，加 1ml ECL 顯影劑顯影。

## 七、找出抑制 *bcp1ts* 生長缺失的基因(High copy suppressors)

### (1) High Efficiency Yeast Transformation from Liquid Culture (The LiAc TRAF0 Method)

*bcp1ts* 菌株於 2-3ml YPD 中，於 30°C 培養隔夜培養，繼代培養到 50ml 的 YPD 中，使起始細胞濃度約  $5 \times 10^6$  (1 O.D.=  $3 \times 10^7$ )，在 30°C 中培養至細胞濃度達  $2 \times 10^7$  (O.D.約 0.7)。將菌液倒入 50ml 無菌試管，以 5000rpm 離心 5 分鐘，倒出上清液，加入 25ml 滅菌去離子水回溶，再次離心，倒出上清液，加入 1ml 100mM LiAc，將液體吸到滅菌的 1.5mL 試管，高速離心後去上清，以 400  $\mu$ l 100mM LiAc 回溶(總體積保持在 500 $\mu$ l)。以 95°C 加熱 ssDNA 5 分鐘，放置冰上。震盪回溶菌體，每 50 $\mu$ l 分成一管，依序加入下列藥品：240  $\mu$ l PEG (50%)、36  $\mu$ l 1.0M LiAc、10  $\mu$ l ssDNA(10mg/mL)、5 $\mu$ L Tiling library plasmid DNA、sterile ddH<sub>2</sub>O 總體積 360  $\mu$ l，之後震盪混勻。30°C 培養 30 分鐘，42°C Heat shock 15 分鐘，之後 8000rpm 離心 1 分鐘，去上清液，加 1ml 無菌水回溶，每 200 $\mu$ l 塗在 Leu<sup>-</sup> Glucose 培養基上，培養在 37°C 下 2-4 天挑選生長較大的菌落在進行生長篩選。

(2)本研究中將步驟一中所挑選出較大的菌落和 Positive (加入 *BCP1* plasmid)及 Negative control (空的載體:pRS416)以四區劃分法畫在同一個選擇性培養基(Leu<sup>-</sup>+Glc)上，每個培養皿畫 8 個不同的菌落培養在 37°C 2-3 天觀察生長情況，生長情形比較接近 Positive control 的菌，表示其中的質體有可能能抑制 *bcp1ts* 的生長缺失，因此，本研究中製備這些菌的酵母質體，進行下一個步驟的分析。

### (3) 製備酵母質體

隔夜培養 5ml 菌液，用 5000 rpm 離心沉澱菌液，加 1ml (0.9M sorbitol,0.1M EDTA) 回溶，離心 1 分鐘去上清液，以 0.4ml 相同溶液回溶再加入 0.1ml Zymolase solution (0.1mg/ml Zymolase,70mM BME, 0.9M sorbitol,0.1M EDTA) 37°C 1 小時，離心去上清液，以 0.4ml 一倍 TE 回溶，之後加入 90 µl lysing stock (1.5ml of 0.5M EDTA, 0.6ml of 2M Tris base ,0.6ml 10% SDS ) 65°C 30 分鐘，再加入 80 µl 5M KOAc 放置於冰上 60 分鐘，再以 13000rpm 離心 15 分鐘，去上清液後，以 70%酒精清洗，酒精揮發後，最後以 50µl TE 回溶。

## 參、實驗結果

### 一、分析Bcp1是否具有核糖體合成的能力

前人研究的結果指出 Bcp1 會參與並協助 Mss4 (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) 酸肌醇磷酸激酶蛋白從細胞核內運送到細胞質中，進而使 Mss4 可以回到細胞膜上，將 PI4P 磷酸化成 PI45P2 (Audhya and Emr, 2003)。此外前人研究利用 GFP 綠色螢光蛋白標定 60S 核糖體結構蛋白 Rpl25 以及 Rpl11 上，觀察 GFP 在 *bcp1ts* 突變株中細胞內分布的情形，發現當 *bcp1* 喪失功能後，會造成 Rpl25-GFP 與 Rpl11-GFP 累積在細胞核內不能被運輸到細胞質中的情況 (Audhya and Emr, 2003)。為了印證前人研究的結果，我們將帶有 Rpl25-GFP 的質體送進 *bcp1ts* 中觀察 Rpl25-GFP 在突變株內分布的情形：首先我們將 200  $\mu$ l 隔夜培養菌液接種到 2ml 相同培養液中在 30°C 進行繼代培養 2h，接著再轉移到 37°C 培養 2h 去抑制 *bcp1* 的活性，觀察綠色螢光在細胞內分布的情況 (Fig. 1A)。Rpl25-GFP 在野生株中不論是在 30°C 或是在 37°C 中主要分布在細胞質中，但在 *bcp1* 突變株中，我們發現在 30°C Bcp1ts 蛋白的功能仍舊正常時，對核糖體蛋白 Rpl25-GFP 的出核運輸沒有影響，但在 37°C 培養下，*bcp1* 喪失原有的功能，Rpl25-GFP 出現累積在細胞核內的情形。因此，根據我們觀察 Rpl25-GFP 在 Bcp1 野生株以及突變株中分布情形，我們印證了前人的研究，認為 Bcp1 會影響核糖體蛋白的出核運輸。

根據此觀察結果，我們想知道 *bcp1* 對於核糖體合成是否有影響，於是我們分析了 Bcp1 野生株與 *bcp1ts* 野生株的多核糖體圖譜 (Fig. 1B)。野生株的圖譜是典型核糖體合成沒有缺失的情形：一開始的第一個波峰代表的是沒有和核糖體結合的游離蛋白，接著出現的第二個波峰代表的是 40S 核糖體，第三個波峰則是 60S 核糖體，第 4 個波峰是 80S 核糖體，接著是多核糖體 (polysome) 所形成的連續波峰，多核糖體指的是當一條 mRNA 上同時有兩個或兩個以上的 80S 核糖體鍵結在上面所形成的結構。一般而言 60S 的波峰比

40S高但當我們觀察*bcp1*突變株的多核糖體圖譜時，發現與野生株比較下，突變株的60S波峰相較40S下降了許多，在80S以及多核糖體出現了halfmer的波峰。halfmer指的是當40S核糖體與mRNA結合後，細胞內的60S核糖體因不夠而不能進一步結合而形成的結構，所以一個完整的80S核糖體再加上一個40S核糖體，會緊鄰80S後面出現，形成一個半山腰的波峰形狀。Halfmer及較低的60S波峰都表示此細胞中60S的含量低，表示60S的合成減少。根據觀察*bcp1*突變株多核糖體圖譜的結果，我們認為Bcp1蛋白參與60S核糖體合成的過程。



## 二、Bcp1突變株的建構

根據前人及以上的結果，我們得知Bcp1蛋白會幫助核糖體蛋白及Mss4的出核運輸，但是Bcp1位於細胞核中，因此，Bcp1蛋白應該帶有入核訊號NLS (nuclear export signal) 及出核訊號NES (Nuclear export signal)。因此，我們利用生物資訊軟體序列分析的方法來分析Bcp1蛋白質序列，發現Bcp1蛋白具有潛在的NES以及NLS(Fig. 2A)。為了測試這是否為真的NES、NLS以及對Bcp1蛋白功能的影響，我們將NES上的Leucine (Leu85、Leu 88、Leu 91、Ile92、Leu 93)突變成Alanine，使出核訊號喪失原有的功能，製作出*nes*突變株。我們將胺基酸213到227帶有NLS的部分，利用PCR進行刪除，製作出*nls*突變株。我們亦將Bcp1蛋白質進行大量表現，交給農化系的徐駿森老師做蛋白質的結構分析，在Bcp1蛋白的X-ray結構中，其N端1到40胺基酸是沒有分析出結構的，這個結果代表的是N端1-40 aa的序列是彈性度高的地方，可能用於和別的蛋白質進行結合或作用，因此，我們利用PCR將N端1-40aa進行刪除製作出*n40*  $\Delta$ 突變株。我們也將C端213胺基酸以後的序列刪除，製作出*c*  $\Delta$ 突變株，觀察這些突變株對Bcp1功能的影響。

我們先將這幾個突變株送進染色體上*BCP1*被刪除並帶有*bcp1ts*於*URA3*植體的菌株中，觀察這些突變株對於酵母菌生長的影響。於是我們利用同源野生株(BY4741)以及*bcp1ts*帶空的載體(pRS415)分別作為陽性對照組(positive control) 及陰性對照組(Negative control)。在生長測試中，30°C時因為*bcp1ts*仍能正常表現，因此，各菌株的生長沒有明顯的差異。然而在37°C時，因*bcp1ts*蛋白失去活性，因而能觀察到各*bcp1*突變株是否仍能具有活性來支持細胞的生長。我們發現*nes*突變株、 $\Delta c$ 突變株、及 $\Delta n40$ 突變株的在37°C會死亡，而*nls*突變株仍能生長，但情況比野生株差，因此，我們認為*nes*、N端40個胺基酸、與C端會使Bcp1失去活性，導致酵母菌死亡，但NLS序列則對Bcp1的功能影響不大。我們同時將這些帶有我們建構不同*bcp1*突變株的



酵母菌培養在5FOA的培養皿上。5FOA是Uracil生成途徑的中間產物的相似物，若細胞可以合成uracil(*URA*<sup>+</sup>)時，會產生毒性導致細胞死亡。因此若這些突變株的Bcp1蛋白具有功能，*bcp1ts (URA3)*的載體可以失去，因而細胞變成*URA*<sup>-</sup>，而能在5FOA培養基存活下來。因此，我們從其生長狀況，亦能知道哪一個*bcp1*突變株具有功能。所以根據在5FOA和37°C的生長測試結果證據*nes* 突變株、 $\Delta$ 突變株、及 $\Delta n40$ 突變株沒有功能，而*nls*突變株仍具有功能 (Fig. 2B)。

接著我們想要了解這些突變對Bcp1蛋白在酵母菌細胞中分布的影響，於是我們將完整的Bcp1以及四個突變株 (*Bcp1-GFP*, *bcp1 $\Delta n40$ -GFP*, *bcp1 $\Delta c$ -GFP*, *bcp1nls-GFP*, *bcp1nes-GFP*) 接上綠色螢光GFP蛋白作為標記，送回*bcp1ts*突變株中，利用螢光顯微鏡觀察GFP蛋白分布情形 (Fig. 2C)。Bcp1-GFP蛋白在細胞質與細胞核內都有螢光的表現，但會有較強的核訊號。反觀*bcp1 $\Delta n40$ -GFP*、*bcp1 $\Delta c$ -GFP*及*bcp1nls-GFP*這三個突變株的螢光只有在細胞質中表現，而*bcp1nes-GFP*的螢光出現集中在細胞核的現象。因此，我們認為當Bcp1蛋白失去NLS訊號，失去N端1-40aa 以及C端213-283aa後會使Bcp1喪失進入細胞核的功能，而喪失了NES出核訊號後會導致Bcp1蛋白被累積在細胞核而無法運輸到細胞質中。

我們進一步分析這些突變株是不是會影響核糖體的生合成過程及是否仍能和60S結合，於是我們將野生株及突變株接上myc tag，製作成*Bcp1-myc*、*bcp1 $\Delta n40$ -myc*、*bcp1 $\Delta c$ -myc*、*bcp1nls-myc*及*bcp1nes-myc*送回*bcp1ts*突變株中，觀察多核糖體圖譜的結果。我們首先將各菌株培養在2ml適當培養液中 (Leu<sup>-</sup>+Glc)於30°C 隔夜培養培養，然後取千分之一150  $\mu$ l繼代培養到150ml 相同培養液中，於30°C 培養到OD<sub>600</sub>~0.15後轉移到37°C 進行培養1-2h到OD<sub>600</sub>~0.3後，加入750 $\mu$ L cycloheximide (10mg/ml)於37°C 繼續培養10分鐘後，在4°C 回收菌體，然後破菌進行多核糖體圖譜分析。在本次實驗中使用野生

株BY4741及*bcp1ts*帶空載體(pRS415)作為陽性對照組(positive control)及陰性對照組(negative control)。我們觀察*bcp1Δn40-myc*、*bcp1Δc-myc*、*bcp1nls-myc*及*bcp1nes-myc*各突變株的polysomes的圖譜(Fig. 2D)，發現60S波峰明顯比野生株的下降很多，許多甚至比40S的波峰更低，並且這些突變株的80S以及多核糖體波峰都有觀察到half-mer的產生。根據這些實驗結果，顯示*bcp1Δn40-myc*、*bcp1Δc-myc*、*bcp1nls-myc*及*bcp1nes-myc*各突變株會導致Bcp1蛋白在核糖體生合功能的缺失。



### 三、Bcp1蛋白和export factors (Nmd3, Ecm1, Arx1, Mex67, Mtr2)之間關聯性分析

根據前人研究的結果發現，當Bcp1蛋白失去功能時會導致Rpl11b蛋白無法被運輸到細胞質，而產生累積在細胞核的現象 (Audhya and Emr, 2003)，因此，Bcp1蛋白有可能直接幫助核糖體的出核運輸，或間接影響核糖體的出核。出核運輸蛋白(Export factors)是一種存在細胞核內協助細胞核內的物質，像是mRNA、rRNA或是protein，從細胞核內運送到細胞質中的蛋白。Crm1會辨認聯結蛋白(Adapter)上的NES (nuclear export signal)，並藉由聯結蛋白(Adapter)跟受質(像是mRNA、rRNA、protein)結合形成複合體，或直接辨認運送蛋白上的NES。有些出核運輸蛋白直接辨認基質，但不通過NES訊號。進而協助受質通過核孔蛋白(Nuclear pore complex (NPC)) (Grunwald et al., 2011)運送到細胞質中。其中已經被研究與60S核糖體出核運輸有關的蛋白有Crm1(Nmd3是其adapter)、Arx1、Mex67-Mtr2以及Ecm1。為了測試Bcp1是否與60S核糖體的出核運輸有關，所以我們利用基因交互作用(genetic interaction)的實驗來研究Bcp1與各個出核運輸蛋白(export factors)之間的關聯性。這個實驗的原理是當兩個基因所轉譯出的蛋白具有相似的功能，或作用在相同的生化代謝途徑上時，當兩者同時產生缺失形成雙突變株(Double mutants)，會導致比單一缺失(single mutant)更嚴重的生長缺陷，稱為synthetic sick，或導致死亡，稱之為synthetic lethal。因此，我們可以使用此方法來推斷未知蛋白的功能。

本次實驗中使用*bcp1ts*突變株與60S出核運輸蛋白(export factors)突變株：*nmd3(AAA)*, *ecm1Δ*, *arx1Δ*, *mex67-5ts*, *mtr2-33ts*進行雜交測試，觀察BCP1和其他60S出核運輸蛋白(export factors)之間是否有genetic interaction。首先我們先將*bcp1ts*突變株和60S Ribosome出核運輸蛋白(export factors)突變株分別雜交後得到雙倍體，再經由產生孢子的方法得到 *nmd3*

(AAA)*Xbcp1ts* , *ecm1ΔXbcp1ts* , *arx1ΔXbcp1ts* , *mex67-5tsXbcp1ts* , *mtr2-33tsXbcp1ts* 的雙突變株。我們將野生株、單一突變株、雙突變株進行生長測試，我們發現這五組的結果都顯示當*bcp1ts*與*nmdts3(AAA)*, *ecm1Δ*, *arx1Δ*, *mex67-5ts*,*mtr2-33ts*形成雙突變株時(Fig. 3)，其生長都比單一突變株更差。因此Bcp1蛋白有可能參與60S核糖體的出核運輸過程。

雖然*bcp1*和60S 出核運輸蛋白(export factors)的雙突變株會造成該菌生長的加成缺失，但是我們要進一步確定這個缺失是源於60S核糖體生合成的缺陷而導致的。因此，我們針對export factor 的單突變株 (*nmd3(AAA)*, *ecm1Δ*, *arx1Δ*, *mex67-5ts*,*mtr2-33ts*) 菌株以及這些單突變株與*bcp1ts*所形成的雙突變株 (*nmd3ts(AAA)Xbcp1ts*、*ecm1ΔXbcp1ts*、*arx1ΔXbcp1ts*、*mex67-5tsXbcp1ts*, *mtr2-33tsXbcp1ts*)進行多核糖體圖譜 分析(Fig. 4)。*bcp1ts*、*nmdts3(AAA)*、*ecm1Δ*、*arx1Δ*、*mex67-5ts*、*mtr2-33ts* 單突變菌株的多核糖體圖譜展現明顯的60S合成缺失，但所有的雙突變株，60S波峰降低的程度以及half-mer 在80S及多核糖體 波峰產生的情況都更加明顯，根據這樣的實驗結果，我們認為*BCP1*與各60S 出核運輸蛋白(export factors) (*NMD3*, *EMC1*, *ARX1*, *MEX67*, *MTR2*)之間基因關聯性所導致的生長缺陷，確實與60S核糖體的生合成有關。

從以上的結果，我們覺得Bcp1蛋白的缺失應會影響60S核糖體的出核運輸，我們接下來想要測試*bcp1*缺失所造成細胞生長的缺陷，是不是可能由大量表現這些export factor來修補使細胞生長恢復正常，因此，我們將能高度表現這些蛋白的質體pKL113 (2 $\mu$  *NMD3*), pKL114 (2 $\mu$  *CRM1*), pKL115 (2 $\mu$  *ARX1*), pKL116 (2 $\mu$  *MEX67-HA*), pK117L (*CEN MTR2-HA*)分別送回到*bcp1ts*突變株中(Fig. 5A)；因Mex67、Mtr2以heterodimer的形式存在，因此，我亦測試將pKL70 (2 $\mu$  *MEX67*)和pKL73 (2 $\mu$  *MTR2*)質體一起送回*bcp1*突變株中共表現(Fig. 5B)，和正對照組(positive control) BY4741(pRS415) 和負對

照組(Negative control) *bcpts* (pRS415)進行生長測試。觀察37°C的生長結果，我們發現沒有任何一個高度表現的核醣體出核蛋白能修補由*bcp1*缺失所造成的生長缺陷。我們也嘗試大量表現*BCP1*(pKL203)於*nmdts3(AAA)*, *ecm1Δ*, *arx1Δ*, *mex67-5ts*, *mtr2-33ts*突變株中，同樣的，*BCP1*亦沒辦法修補生長缺失(Fig. 5C)。因此，我們認為Bcp1缺失時影響60S核醣體出核運輸的情形，應是間接影響，所以我們推測Bcp1蛋白可能參與其他途徑。



#### 四、*RPL23*是*bcp1ts*的高量抑制子 (high copy suppressor)

前人的研究指出，Rpl23 (large subunit ribosomal protein 23)可以和Bcp1蛋白被一起共同純化出來，因此，Bcp1與Rpl23之間可能具有關聯性(Collins et al., 2007; Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002; Krogan et al., 2006)。首先，我們測試*RPL23*是不是*bcp1ts*的高量抑制子。高量抑制子的意義是當一基因在細胞內高度表現時，可以抑制另一個基因所造成的缺陷，我們就稱此蛋白為另一蛋白的高量抑制子。在本實驗中，我們將空載體(pRS416)、pKL192 (2 $\mu$ *RPL23A*)及pKL193 (2 $\mu$  *RPL23B*)分別送回*bcp1ts*突變株以及野生株BY4741中，分別在30°C以及37°C進行生長測試(Fig. 6A)。在30°C時因為Bcp1蛋白的功能依舊正常所以並不會表現出生長缺陷，然而在37°C的情況下，只帶空載體的*bcp1ts*喪失功能而導致細胞死亡，有趣的是，*RPL23A*或*RPL23B*皆能使*bcp1ts*在37°C時生長，雖然生長情況仍比正常野生株較差，但這表示*RPL23A*及*RPL23B*兩者都是*bcp1ts*的高量抑制子，為了觀察這兩個高量抑制子是否有修補Bcp1缺失所造成60S核糖體生成的缺陷，我們進一步利用多核糖體圖譜分析的實驗方法來來分析。我們看到多核糖體圖譜 (Fig. 6B)發現不論是*RPL23A*或是*RPL23B*都能修補Bcp1缺失所造成的60S生成缺陷。因此，Rpl23和Bcp1間應有一個重要的功能關聯性。

## 五、Bcp1蛋白在核糖體成熟過程中角色與功能的分析

為了瞭解RPL23為何是*bcp1ts*的高量抑制子，我們先測試Bcp1是否會影響Rpl23蛋白在細胞內的分布或與60S核糖體間交互作用，首先我們將pKL77(RPL23-GFP)送到野生株(BY4741)以及*bcp1ts*突變株中進行表現，觀察30°C及37°C培養下Rpl23-GFP分布來了解*bcp1*缺失是否對其造成的影響。我們發現Rpl23-GFP在野生株或*bcp1*突變株中，在30°C或37°C時，都出現累積在細胞核內的情形 (Fig. 7A)，因此，我們認為Bcp1蛋白的缺失並不會影響Rpl23在細胞內分布的位置。

為了進一步了解Rpl23與60S核糖體之間的鍵結是否有受到影響 (Lecompte et al., 2002; Planta and Mager, 1998)，我們利用多核糖體圖譜分析 (polysom profile analysis) 的實驗方法來作Rpl23與60S ribosome結合力的測試。我們將多核糖體的樣品進行回收並進行Western blot的分析，透過比照多核糖體圖譜，可以讓我們更分析某一蛋白在細胞內與核糖體鍵結的關係，或者是在突變株中分布的改變情形。為了進行本實驗，我們將pKL78(RPL23-HA)送回到野生株BY4741以及*bcp1ts*突變株中，進行多核糖體分析並同時回收樣品，回收後的樣品我們添加TCA到樣品中至終濃度為10%，進行蛋白質沉澱，將蛋白質進行離心並去除上清液後，以1x SDS sample buffer 50  $\mu$ l進行回溶，然後進行Western blot 分析 (Fig. 7B)。依照我們回收的方式，編號7，8的樣品正好是60S波峰出現的時間，所以我們觀察Western blot的結果顯示在*bcp1ts*突變株中游離態的Rpl23比例增加了，根據這些研究結果，我們認為Bcp1蛋白的缺失會導致造成Rpl23與60S核糖體結合力的下降進而影響了60S核糖體的正常生合成。

因為我們在多核糖體圖譜以及western blot的實驗中發現Bcp1會影響Rpl23與60S核糖體結合，因此，我們想知道Bcp1蛋白失活對Rpl23的表現是否會有改變。首先我們將隔夜培養5ml (Ura<sup>-</sup> + Glc)的野生株以及突變株的菌

液利用OD<sub>600</sub>測定濃度並且將兩隻菌的濃度稀釋到一致，然後分別取500  $\mu$ l到5ml相同培養液中各7管，然後於30°C中培養2h回收一管作為T<sub>0</sub>，其他的轉移至37°C，每30分鐘回收一管，分別為T<sub>30</sub>, T<sub>60</sub>, T<sub>90</sub>, T<sub>120</sub>, T<sub>150</sub>，進行western blot觀察Rpl23的表現量，並使用Rpl8作為總蛋白定量的對照組(Fig. 7C)。我們發現一開始移至37°C，會導致Rpl23在一開始回收的T<sub>30</sub>, T<sub>60</sub>, T<sub>90</sub>表現量上升隨後在T<sub>120</sub>下降接著在T<sub>150</sub>又上升的趨勢，然而不論是在哪一個時間點Rpl23在突變株中的表現量都高於野生株的表現量，因此，*bcp1ts*突變時會使Rpl23在突變株細胞內大量表現。





## 六、Tif6 與 Bcp1 蛋白之間關係分析

根據以上的結果，我們猜測 Bcp1 與 Rpl23 之間有著密切的關係，而這個關係可能直接、間接影響另一個鍵結於 Rpl23 的蛋白 Tif6 (Si and Maitra, 1999)。Tif6 是一個 ribosome transacting protein，Tif6 在核仁中和 60S 結合，鍵結於 60S 的結合面(joining face)上的 Rpl23 蛋白，形成一個空間結構障礙阻礙 60S 核糖體與 40S 核糖體進行結合造成 80S 核糖體。當 60S 核糖體進入到細胞質後，必須經過一段將 60S 核糖體的出核運輸蛋白(export factors)以及輔助蛋白的釋出，及 Rpl24 核糖體蛋白的結合 (Gavin et al., 2006; Horsey et al., 2004; Wood et al., 1999)，才能完成 60S 核糖體的成熟。當 60S 核糖體在細胞質的最後成熟過程中，Tif6 會被 Sdo1 及 Efl1 釋出(Kemmler et al., 2009; Menne et al., 2007)，並啟動另一個結合於結合面(joining face)的蛋白，Nmd3，的釋出，使 60S 完成成熟過程。因此我們想了解 Bcp1 是不是與 Tif6 從 60S 被釋出有關，於是我們將 Tif6-GFP 鑲嵌(integrate)到 *bcp1ts* 中，並送進帶有核仁(nucleolar)標記(Sik1-RFP)的質體，觀察 Tif6 的分布情形。Tif6-GFP 在野生株中，不論在 30°C 或 37°C 都是主要位在細胞核及核仁。但 Tif6-GFP 在 *bcp1* 突變株中，在 37°C 時，Tif6-GFP 在細胞質的分布大量增加了，因此，我們推測當 Bcp1 失去功能後，會導致 Tif6 無法從 60S 上釋出或者是導致 Tif6 無法再次被運輸回細胞核內(Fig. 8A)。

如果 Tif6 出問題時，也可能會導致下游的 Nmd3 出現問題。因此，我們觀察野生株 Nmd3-GFP 及 Nmd3(AAA)-GFP 的分布情形(Ho and Johnson, 1999)。Nmd3(AAA)-GFP 是將 Nmd3 上的 NES 出核訊號的 Leucine 序列突變成 Alanine 的突變蛋白，因為 Nmd3 蛋白是一個會重覆進出核的 shuttle protein，所以當 NES 出問題時，會使 Nmd3(AAA)-GFP 產生較強的細胞核訊號。Nmd3(AAA)-GFP 在 *bcp1* 缺失下，發現 Nmd3 分布在細胞質中，因此，我們認為 *bcp1* 缺失亦會導致 Nmd3 在細胞質的分布上升(Fig. 8B)。

因為Tif6的分布變成較多位於細胞質，因此一個可能的原因是Bcp1與Tif6從60S上被釋出有關，因而導致突變株的生長缺陷。因此，我們在Tif6第192胺基酸位置上的V成F的單一胺基酸突變蛋白TIF6(V192F) (Bussiere et al., 2012)送到野生株以及*bcp1ts*突變株中進行表現，該蛋白會導致Tif6與Rpl23結合較弱，而能不需要釋放蛋白Sdo1、Efl1的幫忙，進而自動從60S上脫落。因此，Sdo1和Efl1缺失時，因Tif6無法從核糖體上落下，造成轉譯無法進行，進而導致細胞死亡。但TIF6(V192F)卻能使Sdo1和Efl1缺失的突變株存活，若Bcp1也是和Tif6的release有關，我們期待看到相似的結果。但根據生長測試的結果，我們發現帶有TIF6(V192F)的*bcp1ts*，在37°C仍無法生長(FIG 9A)。

我們亦進一步分析Tif6的釋放蛋白：Sdo1及Efl1和核糖體的結合在*bcp1ts*中是否有改變。首先將pKL155 (*SDO1-MYC*)和pKL158 (*EFL1-HA*)送回到野生株BY4741以及*bcp1ts*突變株中，進行多核糖體圖譜的分析，並進行樣品的收集，然後進行Western blot 分析。我們發現在Bcp1蛋白失活的情況下並不會影響Efl1與Sdo1兩蛋白與60S核糖體的結合(Fig.9B)。因此，綜合以上的結果，我們認為*bcp1*缺陷造成Tif6 在細胞質的分布上升，並非是單純因為Tif6無法從60S上釋出所造成的。

為了瞭解Tif6與60S間結合情形是否有變化，我們將pKL119 (*CEN TIF6-MYC*)送入野生株以及*bcp1ts*突變株，進一步分析此蛋白於多核糖體的分布。我們發現在*bcp1*缺失的情形下，Tif6的量大量下降(Fig 9C)，因此我嘗試在*bcp1ts*突變株中大量表現Tif6蛋白，發現其可以修補Bcp1蛋白缺失所造成的生長缺陷(Fig. 9D)。

## 肆、討論

### 一、Bcp1 突變株分析的結果

#### Bcp1(nls)仍能存活

在我們針對 *BCP1* 所製作的各種 constructs (*BCP1-myc*、*BCP1 $\Delta$ n40-myc*、*BCP1 $\Delta$ nls-myc*、*BCP1nes-myc*、*BCP1 $\Delta$ c-myc*)的實驗結果發現幾個有趣的現象：首先是在生長測試的結果中，我們發現到 *BCP1 $\Delta$ nls-myc* 這隻突變株即便在 37 °C 的環境下也能夠順利生長，沒有出現 *bcp1* 缺失所造成的生長缺陷。但是我們觀察 *BCP1 $\Delta$ nls-GFP* 時，我們確實看到 *bcp1 $\Delta$ nls-GFP* 蛋白質的分佈僅有在細胞質中，而不像野生株的 *Bcp1-GFP* 蛋白一樣是同時出現在細胞核內以及細胞質中。如果 *Bcp1* 在細胞核內以及在細胞質中都具有必須功能的話，理論上 *BCP1 $\Delta$ nls-myc* 會因為進不到細胞核內去表現正常 *Bcp1* 蛋白在細胞核內的功能，因而導致生長缺陷甚至造成細胞死亡。

我們同時也觀察到 *BCP1 $\Delta$ n40-GFP*、*BCP1 $\Delta$ c-GFP* 只有分布在細胞質中，但是在 37°C 下，此兩個突變株並不能使 *bcp1ts* 生長，表示這兩個突變株失去 *Bcp1* 的功能。當我們觀察 *BCP1ned-GFP* 的情形，發現將 NES 出核訊號修改過之後，*BCP1nes-GFP* 會累積在細胞核中而無法回到細胞質，且此突變株會導致細胞死亡。

根據這些實驗結果，我們猜測有兩個可能性：首先是 NLS 的功能並沒有被我們完全破壞，雖然大部分的 *bcp1(NLS)*位於細胞質中，但只有少量的 *bcp1* 能進入細胞核並行使功能，就足夠細胞的存活。另一個是 *Bcp1* 在細胞質中的功能較重要，*Bcp1* 無法進入到細胞核中去表現功能，但是不影響 *Bcp1* 在細胞質中功能表現，所以不會造成該突變株的死亡，但 *bcp1(NES)*則一直停留於細胞核中，無法到細胞質中而導致死亡。至於 *BCP1 $\Delta$ n40-GFP*、*BCP1 $\Delta$ c-GFP* 也是位於細胞質中的蛋白為什麼無法使細胞存活？我們認為  $\Delta$ n40、 $\Delta$ c 這兩個被刪除的氨基酸序列很可能是 *Bcp1* 用來與其他蛋白結合的位置，因此，不論是 *bcp1 $\Delta$ n40* 或是 *bcp1 $\Delta$ c*

都無法完整的表現正常 Bcp1 蛋白在細胞質的功能造成細胞死亡。至於真正的原因，須待進一步的實驗去證明。

#### ***Δn40* 具有 NLS 訊號但位於細胞質？**

根據我們觀察 *BCP1-GFP*、*BCP1Δn40-GFP*、*BCP1Δnls-GFP*、*BCP1 nes-GFP*、*BCP1Δc -GFP* 的螢光分布結果，我們發現正常的 *BCP1* 是同時分布在細胞質以及細胞核內；*BCP1nes-GFP* 的螢光分布結果如我們預期的只有分布在細胞核中，原因是當 NES 訊號被我們突變後，該蛋白變無法順利的從細胞核內運輸到細胞質中；*BCP1Δnks-GFP*、*BCP1Δc -GFP* 的螢光分布僅分布在細胞質也是我們預期的結果，因為這兩個 construct 的設計時我們都把 NLS 入核訊號給刪除了，所以 *bcp1Δnls-GFP*、*bcp1Δc -GFP* 無法進入細胞核只會分布在細胞質中。

但是令我們感到意外的是 *BCP1Δn40-GFP* 的分布情形竟然是僅分布在細胞質中，*BCP1Δn40* 上的 NLS 訊號及 NES 訊號都是正常的，理論上應該像 Bcp1 蛋白一樣同時分布在細胞核跟細胞質中。因此，我們推測 Bcp1 蛋白的前 40 胺基酸序列可能 Bcp1 跟入核運輸蛋白(importer)結合時，除了 NLS 外，需要被辨認的位置。或是此段序列是 Bcp1 和其他蛋白鍵結的官能基(domain)，而此蛋白需要和 Bcp1 一起結合後才會使 Bcp1 和入核運輸蛋白(importer)結合進入細胞核中，所以當我們刪除這一段序列後，導致 Bcp1 無法正常的被運輸到核中。或者是此蛋白需要使 Bcp1 留在細胞核行使其功能，但 N 端被去除時，使 Bcp1 雖被送入細胞核內，但很快的及被送出核，因而導致 *BCP1Δn40* 的分布產生改變。關於這裡的推測，我們還需要有更進一步的結果才能確定可能的假設。

#### **二、Bcp1 突變後導致 Tif6 分布於細胞質中**

前人的研究指出 Rpl23、Bcp1 兩蛋白之間有物理性的交互作用：在純化 Bcp1 蛋白時 Rpl23 會同時被純化出來；在我們的實驗結果也顯示 Rpl23 是 *bcp1* 的高量抑制子：當我們大量表現 Rpl23 時，可以抑制由於 *BCP1* 缺失所造成的生長缺

陷。我們也觀察到 Rpl23 在 BY4741 野生株以及 *bcp1ts* 突變株表現的差異：在突變株裡 Rpl23 的表現量一直高於野生株中的表現量，因此，我們認為 Rpl23 和 Bcp1 間應有非常緊密的關係。也許 Rpl23 可以用來穩定 *bcp1ts* 蛋白，或是幫助其功能的行使，但是我們仍然沒有直接證據顯示 Rpl23 修補 Bcp1 的作用機制。

我們觀察到當 Bcp1 蛋白喪失功能後，會導致 Tif6 在細胞質分布的增加。而 Tif6 是一個會與在 Joining face 的 Rpl23 結合，形成空間障礙，阻止 60S 核糖體在完全成熟前與 40S 核糖體結合的蛋白。Bcp1 與 Rpl23 有物理性交互作用，Tif6 與 Rpl23 也有物理性交互作用，但是不論是在 Tif6 的純化或是 Bcp1 的純化中都沒有研究指出 Tif6 與 Bcp1 之間有物理性的交互作用，但是 Bcp1 蛋白的缺失確實影響了 Tif6 在細胞內的分佈，使 Tif6 在細胞質含量增加。對於此，我們提出下面幾種假設。

首先，因為不論在野生株或是突變株中 Rpl23 的位置都是集中在細胞核內，但是在 Bcp1 蛋白失活的情況下卻會導致 60S 核糖體生合成的缺陷，因此一個可能性是 Bcp1 在細胞核內能協助 Rpl23 比較有效率的和 60S 核糖體結合，讓核糖體生成能夠正常。

另一個我們推測 Bcp1 與 Rpl23 間可能的關係是發生在細胞質中，根據前人研究指出，Tif6 和 60S 核糖體的結合應該在早期即發生，但是卻不清楚 Tif6 是先與 Rpl23 結合再結合到 60S 上，或是直接結合於 pre-60S 上的 Rpl23。因此，Tif6 與 Rpl23 兩個蛋白可能在細胞質中形成 Rpl23-Tif6 complex，然後才被運輸到細胞核內，結合於 pre-60S 上，Bcp1 可能會協助 Rpl23-Tif6 complex 的產生，或甚至參與其中形成 Bcp1-Rpl23-Tif6 complex，然後促使這 complex 通過 NPC 進入到細胞核。如果少了 Bcp1 導致 Rpl23-Tif6 complex 無法被運輸入細胞核內而無法正常的參與 60S 核糖體生合成，進而使 60S 核糖體生成受阻造成細胞死亡。因此，缺乏 Bcp1 時，我們觀察到 Tif6-GFP 在 *bcp1ts* 突變株中細胞質的訊號有增加的現象，就是因為 Tif6 無法正常的被運輸到細胞核內所產生的。

因此，當我們將 Rpl23 在 *bcp1ts* 突變株中大量表現能夠修補 Bcp1 蛋白缺失的可能原因，我們認為 Bcp1 蛋白先和 Rpl23 鍵結後，再促使 Rpl23 與 Tif6 結合形成 complex，因此 Bcp1 蛋白失去功能，會造成 Rpl23 與 Tif6 的結合效果下降導致 60S 核糖體生合成受阻，所以當我們使 Rpl23 在細胞內表現量增加後，Rpl23 與 Tif6 相遇形成 complex 的機會也增加了，使細胞能夠正常的生長。我們觀察在 *bcp1ts* 中大量表現 Tif6 的結果發現，確實有修補 Bcp1 蛋白缺失所造成的生長缺陷，這結果更支持我們的推論，但是我們仍需要更多的實驗結果來印證。

此推測結果也印證了前面我們所提到的為什麼 *bcp1Δnls* 突變株可以存活，可能就是因為即便 *bcp1Δnls* 無法進入細胞核內表現在細胞核內的功能，但在細胞質中然可以協助 Rpl23 與 Tif6 形成 Rpl23-Tif6 complex 讓 60S 核糖體可以正常，因此，*bcp1Δnls* 突變株也可以正常存活。

另外我們也不排除另一個可能 Rpl23 是幫助穩定 Bcp1 結構促使 Bcp1 可以正常表現其功能，可以順利的幫助 Tif6 及 Nmd3 從 60S 上釋出，使 60S 和 40S 核糖體可以正常結合轉譯蛋白。但為何 *TIF6(V192F)* 不能抑制 *bcp1ts* 的生長缺失，仍不清楚。

總結我們的實驗結果，我們知道 Bcp1 與 Rpl23 蛋白之間有關係且因此影響 Tif6 的功能並導致 60S 生成的問題，但我們需要更多的證據來連接之間的關聯性，這也是我們繼續研究的方向。

## 伍、參考文獻

- Angermayr, M., A. Roidl, and W. Bandlow. 2002. Yeast Rio1p is the founding member of a novel subfamily of protein serine kinases involved in the control of cell cycle progression. *Mol Microbiol.* 44:309-324.
- Audhya, A., and S.D. Emr. 2003. Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *The EMBO journal.* 22:4223-4236.
- Bassler, J., P. Grandi, O. Gadai, T. Lessmann, E. Petfalski, D. Tollervey, J. Lechner, and E. Hurt. 2001. Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Molecular cell.* 8:517-529.
- Basu, U., K. Si, H.T. Deng, and U. Maitra. 2003. Phosphorylation of mammalian eukaryotic translation initiation factor 6 and its *Saccharomyces cerevisiae* homologue Tif6p: Evidence that phosphorylation of Tif6p regulates its nucleocytoplasmic distribution and is required for yeast cell growth. *Mol Cell Biol.* 23:6187-6199.
- Bleichert, F., and S.J. Baserga. 2007. The long unwinding road of RNA helicases. *Molecular cell.* 27:339-352.
- Bradatsch, B., J. Katahira, E. Kowalinski, G. Bange, W. Yao, T. Sekimoto, V. Baumgartel, G. Boese, J. Bassler, K. Wild, R. Peters, Y. Yoneda, I. Sinning, and E. Hurt. 2007. Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Molecular cell.* 27:767-779.
- Bussiere, C., Y. Hashem, S. Arora, J. Frank, and A.W. Johnson. 2012. Integrity of the P-site is probed during maturation of the 60S ribosomal subunit. *Journal of Cell Biology.* 197:747-759.
- Chook, Y.M., and G. Blobel. 2001. Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol.* 11:703-715.
- Collins, S.R., P. Kemmeren, X.C. Zhao, J.F. Greenblatt, F. Spencer, F.C. Holstege, J.S. Weissman, and N.J. Krogan. 2007. Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 6:439-450.
- Cordin, O., J. Banroques, N.K. Tanner, and P. Linder. 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene.* 367:17-37.
- Dong, J.S., R. Lai, J.L. Jennings, A.J. Link, and A.G. Hinnebusch. 2005. The novel ATP-binding cassette protein ARB1 is a shuttling factor that stimulates 40S and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* 25:9859-9873.
- Dong, J.S., R. Lai, K. Nielsen, C.A. Fekete, H.F. Qiu, and A.G. Hinnebusch. 2004. The

- essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem.* 279:42157-42168.
- Dragon, F., J.E.G. Gallagher, P.A. Compagnone-Post, B.M. Mitchell, K.A. Porwancher, K.A. Wehner, S. Wormsley, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, Y. Osheim, A.L. Beyer, D.F. Hunt, and S.J. Baserga. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature.* 417:967-970.
- Erzberger, J.P., and J.M. Berger. 2006. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA plus proteins. *Annu Rev Bioph Biom.* 35:93-114.
- Fatica, A., A.D. Cronshaw, M. Dlakic, and D. Tollervey. 2002. Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Molecular cell.* 9:341-351.
- Fatica, A., M. Oeffinger, M. Dlakic, and D. Tollervey. 2003. Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol.* 23:1798-1807.
- Fatica, A., D. Tollervey, and M. Dlakic. 2004. PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *Rna.* 10:1698-1701.
- Fried, H., and U. Kutay. 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci.* 60:1659-1688.
- Fromont-Racine, M., B. Senger, C. Saveanu, and F. Fasiolo. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene.* 313:17-42.
- Gabel, H.W., and G. Ruvkun. 2008. The exonuclease ERI-1 has a conserved dual role in 5.8S rRNA processing and RNAi. *Nat Struct Mol Biol.* 15:531-533.
- Gadal, O., D. Strauss, J. Braspenning, D. Hoepfner, E. Petfalski, P. Philippsen, D. Tollervey, and E. Hurt. 2001. A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *Embo Journal.* 20:3695-3704.
- Garbarino, J.E., and I.R. Gibbons. 2002. Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. *Bmc Genomics.* 3.
- Gavin, A.C., P. Aloy, P. Grandi, R. Krause, M. Boesche, M. Marzioch, C. Rau, L.J. Jensen, S. Bastuck, B. Dumpelfeld, A. Edlmann, M.A. Heurtier, V. Hoffman, C. Hoefert, K. Klein, M. Hudak, A.M. Michon, M. Schelder, M. Schirle, M. Remor, T. Rudi, S. Hooper, A. Bauer, T. Bouwmeester, G. Casari, G. Drewes, G. Neubauer, J.M. Rick, B. Kuster, P. Bork, R.B. Russell, and G. Superti-Furga. 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature.* 440:631-636.
- Gavin, A.C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J.M.



- Rick, A.M. Michon, C.M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M.A. Heurtier, R.R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, and G. Superti-Furga. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415:141-147.
- Geerlings, T.H., A.W. Faber, M.D. Bister, J.C. Vos, and H.A. Raue. 2003. Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 278:22537-22545.
- Gelperin, D., L. Horton, J. Beckman, J. Hensold, and S.K. Lemmon. 2001. Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *Rna*. 7:1268-1283.
- Gorbalenya, A.E., and E.V. Koonin. 1993. Helicases - Amino-Acid-Sequence Comparisons and Structure-Function-Relationships. *Curr Opin Struc Biol*. 3:419-429.
- Grandi, P., V. Rybin, J. Bassler, E. Petfalski, D. Strauss, M. Marzioch, T. Schafer, B. Kuster, H. Tschochner, D. Tollervey, A.C. Gavin, and E. Hurt. 2002a. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Molecular cell*. 10:105-115.
- Grandi, P., V. Rybin, J. Bassler, E. Petfalski, D. Strauss, M. Marzioch, T. Schafer, B. Kuster, H. Tschochner, D. Tollervey, A.C. Gavin, and E. Hurt. 2002b. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Molecular cell*. 10:105-115.
- Granneman, S., and S.J. Baserga. 2004. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res*. 296:43-50.
- Granneman, S., M.R. Nandineni, and S.J. Baserga. 2005. The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S Pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. *Mol Cell Biol*. 25:10352-10364.
- Grunwald, D., R.H. Singer, and M. Rout. 2011. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature*. 475:333-341.
- Hanson, P.I., and S.W. Whiteheart. 2005. AAA+ proteins: Have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 6:519-529.
- Harnpicharnchai, P., J. Jakovljevic, E. Horsey, T. Miles, J. Roman, M. Rout, D. Meagher,

- B. Imai, Y. Guo, C.J. Brame, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and J.L. Woolford, Jr. 2001. Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Molecular cell*. 8:505-515.
- Hedges, J., Y.I. Chen, M. West, C. Bussiere, and A.W. Johnson. 2006. Mapping the functional domains of yeast NMD3, the nuclear export adapter for the 60 S ribosomal subunit. *J Biol Chem*. 281:36579-36587.
- Henras, A.K., C. Dez, and Y. Henry. 2004. RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs. *Curr Opin Struc Biol*. 14:335-343.
- Henras, A.K., J. Soudet, M. Gerus, S. Lebaron, M. Caizergues-Ferrer, A. Mouglin, and Y. Henry. 2008. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 65:2334-2359.
- Ho, J.H.N., and A.W. Johnson. 1999. NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 19:2389-2399.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G.D. Bader, L. Moore, S.L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A.R. Willems, H. Sassi, P.A. Nielsen, K.J. Rasmussen, J.R. Andersen, L.E. Johansen, L.H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B.D. Sorensen, J. Matthiesen, R.C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M.F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C.W. Hogue, D. Figeys, and M. Tyers. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 415:180-183.
- Horsey, E.W., E. Jakovljevic, T.D. Miles, P. Harnpicharnchai, and J.L. Woolford. 2004. Role of yeast Rrp1 protein in the dynamics of pre-ribosome maturation. *Rna*. 10:813-827.
- Hung, N.J., and A.W. Johnson. 2006. Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 26:3718-3727.
- Jankowsky, E., and M.E. Fairman. 2007. RNA helicases - one fold for many functions. *Curr Opin Struc Biol*. 17:316-324.
- Kadowaki, T., S. Chen, M. Hitomi, E. Jacobs, C. Kumagai, S. Liang, R. Schneider, D. Singleton, J. Wisniewska, and A.M. Tartakoff. 1994a. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *The Journal of cell biology*. 126:649-659.
- Kadowaki, T., M. Hitomi, S. Chen, and A.M. Tartakoff. 1994b. Nuclear mRNA

- accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast mtr2 mutant. *Mol Biol Cell*. 5:1253-1263.
- Karbstein, K. 2007. Role of GTPases in ribosome assembly. *Biopolymers*. 87:1-11.
- Karbstein, K., S. Jonas, and J.A. Doudna. 2005. An essential GTPase promotes assembly of preribosomal RNA processing complexes. *Molecular cell*. 20:633-643.
- Kemmler, S., L. Occhipinti, M. Veisu, and V.G. Panse. 2009. Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *Journal of Cell Biology*. 186:863-880.
- Kispal, G., K. Sipos, H. Lange, Z. Fekete, T. Bedekovics, T. Janaky, J. Bassler, D.J. Aguilar Netz, J. Balk, C. Rotte, and R. Lill. 2005. Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *The EMBO journal*. 24:589-598.
- Korostelev, A.A. 2011. Structural aspects of translation termination on the ribosome. *Rna*. 17:1409-1421.
- Kressler, D., E. Hurt, and J. Bassler. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochimica et biophysica acta*. 1803:673-683.
- Kressler, D., D. Roser, B. Pertschy, and E. Hurt. 2008a. The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *Journal of Cell Biology*. 181:935-944.
- Kressler, D., D. Roser, B. Pertschy, and E. Hurt. 2008b. The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *The Journal of cell biology*. 181:935-944.
- Krogan, N.J., G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A.P. Tikuisis, T. Punna, J.M. Peregrin-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M.D. Robinson, A. Paccanaro, J.E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D.P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M.M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S.R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J.J. Rilstone, K. Gandi, N.J. Thompson, G. Musso, P. St Onge, S. Ghanny, M.H. Lam, G. Butland, A.M. Altaf-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O'Shea, J.S. Weissman, C.J. Ingles, T.R. Hughes, J. Parkinson, M. Gerstein, S.J. Wodak, A. Emili, and J.F. Greenblatt. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 440:637-643.
- Krogan, N.J., W.T. Peng, G. Cagney, M.D. Robinson, R. Haw, G.Q. Zhong, X.H. Guo, X. Zhang, V. Canadien, D.P. Richards, B.K. Beattie, A. Lalev, W. Zhang, A.P. Davierwala, S. Mnaimneh, A. Starostine, A.P. Tikuisis, J. Grigull, N. Datta, J.E. Bray, T.R. Hughes, A. Emili, and J.F. Greenblatt. 2004. High-definition

- macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Molecular cell*. 13:225-239.
- Krokowski, D., A. Boguszewska, D. Abramczyk, A. Liljas, M. Tchorzewski, and N. Grankowski. 2006. Yeast ribosomal P0 protein has two separate binding sites for P1/P2 proteins. *Mol Microbiol*. 60:386-400.
- Lafontaine, D.L., and D. Tollervey. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:514-520.
- Lamanna, A.C., and K. Karbstein. 2009. Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *P Natl Acad Sci USA*. 106:14259-14264.
- Lecompte, O., R. Ripp, J.C. Thierry, D. Moras, and O. Poch. 2002. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res*. 30:5382-5390.
- Leipe, D.D., E.V. Koonin, and L. Aravind. 2003. Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J Mol Biol*. 333:781-815.
- Leipe, D.D., Y.I. Wolf, E.V. Koonin, and L. Aravind. 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*. 317:41-72.
- Linder, P. 2006. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res*. 34:4168-4180.
- Lo, K.Y., Z. Li, F. Wang, E.M. Marcotte, and A.W. Johnson. 2009. Ribosome stalk assembly requires the dual-specificity phosphatase Yvh1 for the exchange of Mrt4 with P0. *The Journal of cell biology*. 186:849-862.
- Lusk, C.P., D.D. Waller, T. Makhnevych, A. Dienemann, M. Whiteway, D.Y. Thomas, and R.W. Wozniak. 2007. Nup53p is a target of two mitotic kinases, Cdk1p and Hrr25p. *Traffic*. 8:647-660.
- Mayer, C., and I. Grummt. 2006. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*. 25:6384-6391.
- Menne, T.F., B. Goyenechea, N. Sanchez-Puig, C.C. Wong, L.M. Tonkin, P.J. Ancliff, R.L. Brost, M. Costanzo, C. Boone, and A.J. Warren. 2007. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet*. 39:486-495.
- Milkereit, P., O. Gadal, A. Podtelejnikov, S. Trumtel, N. Gas, E. Petfalski, D. Tollervey, M. Mann, E. Hurt, and H. Tschochner. 2001. Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell*. 105:499-509.
- Moss, T., F. Langlois, T. Gagnon-Kugler, and V. Stefanovsky. 2007. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life*

*Sci.* 64:29-49.

- Nissan, T.A., J. Bassler, E. Petfalski, D. Tollervey, and E. Hurt. 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *The EMBO journal*. 21:5539-5547.
- Nissan, T.A., K. Galani, B. Maco, D. Tollervey, U. Aebi, and E. Hurt. 2004. A pre-ribosome with a tadpole-like structure functions in ATP-dependent maturation of 60S subunits. *Molecular cell*. 15:295-301.
- Osheim, Y.N., S.L. French, K.M. Keck, E.A. Champion, K. Spasov, F. Dragon, S.J. Baserga, and A.L. Beyer. 2004. Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*. 16:943-954.
- Perez-Fernandez, J., A. Roman, J. De Las Rivas, X.R. Bustelo, and M. Dosil. 2007. The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol Cell Biol*. 27:5414-5429.
- Pertschy, B., C. Saveanu, G. Zisser, A. Lebreton, M. Tengg, A. Jacquier, E. Liebming, B. Nobis, L. Kappel, I. van der Klei, G. Hogenauer, M. Fromont-Racine, and H. Bergler. 2007a. Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein drg1. *Mol Cell Biol*. 27:6581-6592.
- Pertschy, B., C. Saveanu, G. Zisser, A. Lebreton, M. Tengg, A. Jacquier, E. Liebming, B. Nobis, L. Kappel, I. van der Klei, G. Hogenauer, M. Fromont-Racine, and H. Bergler. 2007b. Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol Cell Biol*. 27:6581-6592.
- Petronczki, M., J. Matos, S. Mori, J. Gregan, A. Bogdanova, M. Schwickart, K. Mechtler, K. Shirahige, W. Zachariae, and K. Nasmyth. 2006. Monopolar attachment of sister kinetochores at meiosis I requires casein kinase 1. *Cell*. 126:1049-1064.
- Planta, R.J., and W.H. Mager. 1998. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14:471-477.
- Ribbeck, K., and D. Gorlich. 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *The EMBO journal*. 21:2664-2671.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *The Journal of cell biology*. 148:635-651.
- Rudra, D., and J.R. Warner. 2004. What better measure than ribosome synthesis? *Gene Dev*. 18:2431-2436.
- Saveanu, C., A. Namane, P.E. Gleizes, A. Lebreton, J.C. Rousselle, J. Noaillac-Depeyre,

- N. Gas, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine. 2003. Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol Cell Biol.* 23:4449-4460.
- Schafer, T., B. Maco, E. Petfalski, D. Tollervey, B. Bottcher, U. Aebi, and E. Hurt. 2006. Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature.* 441:651-655.
- Schafer, T., D. Strauss, E. Petfalski, D. Tollervey, and E. Hurt. 2003. The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *The EMBO journal.* 22:1370-1380.
- Segref, A., K. Sharma, V. Doye, A. Hellwig, J. Huber, R. Luhrmann, and E. Hurt. 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)(+) RNA and nuclear pores. *Embo Journal.* 16:3256-3271.
- Si, K., and U. Maitra. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol Cell Biol.* 19:1416-1426.
- Strasser, K., J. Bassler, and E. Hurt. 2000. Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *Journal of Cell Biology.* 150:695-706.
- Strunk, B.S., and K. Karbstein. 2009. Powering through ribosome assembly. *Rna.* 15:2083-2104.
- Thomas, F., and U. Kutay. 2003. Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J Cell Sci.* 116:2409-2419.
- Thomson, E., and D. Tollervey. 2010. The Final Step in 5.8S rRNA Processing Is Cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 30:976-984.
- Trotta, C.R., E. Lund, L. Kahan, A.W. Johnson, and J.E. Dahlberg. 2003. Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *Embo Journal.* 22:2841-2851.
- Tschochner, H., and E. Hurt. 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13:255-263.
- Ulbrich, C., M. Diepholz, J. Bassler, D. Kressler, B. Pertschy, K. Galani, B. Bottcher, and E. Hurt. 2009. Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell.* 138:911-922.
- Vale, R.D. 2000. AAA proteins: Lords of the ring. *Journal of Cell Biology.* 150:F13-F19.
- Vanrobays, E., J.P. Gelugne, P.E. Gleizes, and M. Caizergues-Ferrer. 2003. Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 23:2083-2095.
- Vanrobays, E., P.E. Gleizes, C. Bousquet-Antonelli, J. Noaillac-Depeyre, M.

- Caizergues-Ferrer, and J.P. Gelugne. 2001. Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein. *The EMBO journal*. 20:4204-4213.
- Venema, J., and D. Tollervey. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics*. 33:261-311.
- Wegierski, T., E. Billy, F. Nasr, and W. Filipowicz. 2001. Bms1p, a G-domain-containing protein, associates with Rcl1p and is required for 18S rRNA biogenesis in yeast. *Rna*. 7:1254-1267.
- Wood, L.C., M.N. Ashby, C. Grunfeld, and K.R. Feingold. 1999. Cloning of murine translation initiation factor 6 and functional analysis of the homologous sequence YPR016c in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 274:11653-11659.
- Yao, W., D. Roser, A. Kohler, B. Bradatsch, J. Bassler, and E. Hurt. 2007. Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Molecular cell*. 26:51-62.
- Yao, Y.H., E. Demoinet, C. Saveanu, P. Lenormand, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine. 2010. Ecm1 is a new pre-ribosomal factor involved in pre-60S particle export. *Rna*. 16:1007-1017.
- Yarunin, A., V.G. Panse, E. Petfalski, C. Dez, D. Tollervey, and E.C. Hurt. 2005. Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *Embo Journal*. 24:580-588.
- Zakalskiy, A., G. Hogenauer, T. Ishikawa, E. Wehrschutz-Sigl, F. Wendler, D. Teis, G. Zisser, A.C. Steven, and H. Bergler. 2002. Structural and enzymatic properties of the AAA protein Drg1p from *Saccharomyces cerevisiae*. Decoupling of intracellular function from ATPase activity and hexamerization. *J Biol Chem*. 277:26788-26795.
- Zhang, J.Y., P. Harnpicharnchai, J. Jakovljevic, L. Tang, Y.R. Guo, M. Oeffinger, M.P. Rout, S.L. Hiley, T. Hughes, and J.L. Woolford. 2007. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Gene Dev*. 21:2580-2592.

表一、本實驗所使用之酵母菌菌株

TABLE 1. Yeast strains used in this study.

Strain #	genotype	Source
KLY2	AJY1942 <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	AJ Lab
KLY15	AJY1901 <i>arx1Δ:KanMX MATa his3Δ leu2Δ ura3Δ</i> AJY2115 <i>nmd3Δ:KanmX (pAJ112 NMD3 URA3) ura3Δ his3Δ leu2Δ lys2Δ ade3Δ</i>	AJ Lab
KLY16	<i>trp1-1</i>	AJ Lab
KLY17	AJY2000 <i>mtr2Δ:HIS3 leu2Δ ura3Δ ade2Δ his3Δ trp1Δ (pRS316-MTR2 URA3)</i>	AJ Lab
KLY69	AJY2110 plus plasmid752 ( <i>nmd3AAA-myc LEU2 CEN</i> )	
KLY90	AJY2935 <i>MAT a; ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	2012.03.07
KLY99	AJY2988 <i>MATa can1 Δ MFA/pr-his3 his3Δ1 lyp12Δ met15Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	2012.03.28.KL
KLY100	AJY2989 <i>MATa can1 Δ MFA/pr-his3 his3Δ1 lyp12Δ met15Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>sdo1ts</i>	2012.03.28.KL
KLY101	AJY2909 <i>TIF6-GFP:HIS3MX MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> AJY1231 <i>MATα ura3 trp1 ade2 leu2 lys his3 mex67Δ::HIS3MX</i>	2012.03.28.KL
KLY103	<i>pUN100-LEU2-mex67-5</i>	2012.03.28.KL
KLY106	BY4741 <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bcp1:KanMX</i> carrying pRS416 <i>bcp1ts(URA CEN)</i> spore clone 2B	2012.04.13 humor

表一、本實驗所使用之酵母菌菌株(接續上頁)

TABLE 1. Yeast strains used in this study.(Continued)



<b>Strain #</b>	<b>genotype</b>	<b>Source</b>
KLY117	<i>mtr2Δ: HIS3 bcp1Δ: KanMX (mtr2-33 LEU2) (bcp1 URA3) 5D</i>	2012.04.17 KL
KLY112	<i>arx1Δ:KanMX bcp1Δ:KanMX (bcp1ts URA3) spore clone2B</i>	2012.04.17 KL
KLY141	<i>arx1Δ:KanMX bcp1Δ:KanMX (bcp1ts URA3) spore 3B cross bcp1ts and KLY 15</i>	2012.04.27 humor
KLY142	<i>arx1Δ:KanMX spore 3C cross bcp1ts and KLY 15</i>	2012.04.27 humor
KLY144	<i>ecm1Δ:KanMX bcp1Δ:KanMX (bcp1ts URA3) spore 9A cross bcp1ts and KLY96</i>	2012.04.27 humor
KLY147	<i>ecm1Δ:KanMX spore 9D cross bcp1ts and KLY96</i>	2012.04.27 humor
KLY151	<i>ecm1Δ:KanMX bcp1Δ:KanMX (bcp1ts URA3) spore 11D cross bcp1ts and KLY96</i>	2012.04.27 humor
KLY153	<i>nmd3Δ:KanMX bcp1Δ:KanMX (nmd3[AAA]-myc LEU2) (bcp1ts URA3) spore 4B cross KLY69 and bcp1ts</i>	2012.04.27 humor

表二、本實驗所使用之質體

TABLE 2. Plasmid used in this study.

Plasmid NO.	Gene	Origin	Yeast Marker	<i>E. coli</i> marker	Source(Name)
PKL10	<i>RPL25-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	AJ
PKL31	<i>SIK1-mRFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	Humor
PKL70	<i>MEX67</i>	2 $\mu$	<i>HIS3</i>	Amp	AJ
PKL72	<i>MEX67</i>	2 $\mu$	<i>URA3</i>	Amp	AJ
PKL73	<i>MTR2</i>	2 $\mu$	<i>URA3</i>	Amp	AJ
PKL74	<i>RPL23A-YFP</i>	2 $\mu$	<i>LEU2</i>	Amp	AJ
PKL75	<i>RPL23A-3xHA</i>	2 $\mu$	<i>LEU2</i>	Amp	AJ
PKL76	<i>NMD3-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>URA3</i>	Amp	humor
PKL77	<i>RPL23A-YFP</i>	<i>CEN</i>	<i>URA3</i>	Amp	Humor
PKL78	<i>RPL23A-3xHA</i>	<i>CEN</i>	<i>URA3</i>	Amp	humor
PKL94	<i>nmd3(AAA)-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	AJ
PKL101	<i>BCP1-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar
PKL102	<i>BCP1(deltaC)-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar
PKL103	<i>BCP1(NLS)-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar
PKL104	<i>BCP1(NES)-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar
PKL105	<i>BCP1-myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar

表二、本實驗所使用之質體 (接續上頁)

TABLE 2.Plasmid used in this study. ( Continued )

Plasmid NO.	Gene	Origin	Yeast Marker	E.coli marker	Source(Name)
PKL106	<i>BCP1(DELTAC)-MYC</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar
PKL107	<i>BCP1(NLS)-MYC</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar
PKL108	<i>BCP1(NES)-MYC</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	S. Kumar
PKL112	<i>BCP1(DELTAN40)-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>URA</i>	Amp	Humor
PKL113	<i>NMD3</i>	<i>2 μ</i>	<i>URA</i>	Amp	AJ
PKL114	<i>CRM1</i>	<i>2 μ</i>	<i>URA</i>	Amp	AJ
PKL115	<i>ARX1</i>	<i>2 μ</i>	<i>URA</i>	Amp	AJ
PKL116	<i>MEX67-HA</i>	<i>2 μ</i>	<i>URA</i>	Amp	AJ
PKL117	<i>MTR2-HA</i>	<i>CEN</i>	<i>URA</i>	Amp	AJ
PKL118	<i>BCP1DELTAN40-MYC</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	humor
PKL119	<i>TIF6-MYC</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	AJ
PKL120	<i>TIF6(V192F)</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	AJ
PKL155	<i>SDO1-MYC</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	AJ
PKL158	<i>EFL1-3HA</i>	<i>CEN</i>	<i>HIS</i>	Amp	AJ
PKL192	<i>RPL23A</i>	<i>2 μ</i>	<i>URA3</i>	Amp	Tangent
PKL193	<i>RPL23B</i>	<i>2 μ</i>	<i>URA3</i>	Amp	Tangent

表三、本實驗所使用之引子對

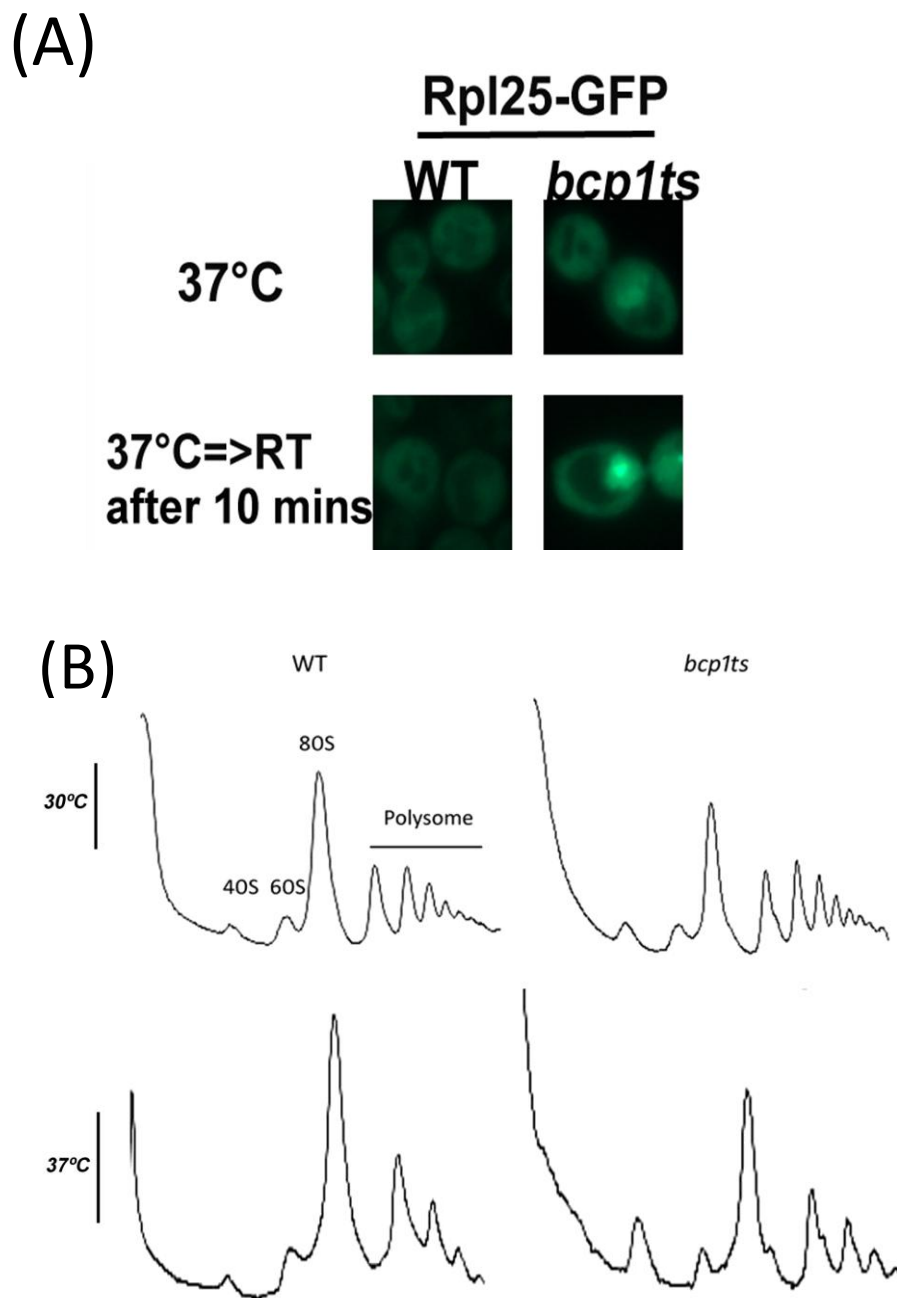
TABLE 3. Primers used in this study

Oligo#	ORF	Sequence	Purpose
KLO7	<i>GFP</i>	TATGTTGCATCACCTTCAC	Sequence ORF upstream of GFP
KLO9	<i>GFP</i>	ACAACTCCAGTGAAAAGTTC	Sequence ORF upstream of GFP
KLO14	<i>BCP1</i>	ctg <b>CGGCCG</b> gcctggctagcactaata	Clone BCP1 from its own promoter
KLO15	<i>BCP1</i>	CAGTTAATTAACCAAGTGGAAATTTCTGTTT	Clone BCP1 inframe with GFP or myc Tag
KLO16	<i>BCP1</i>	TTGGGGAACCTGCGGCCGCATCTGCCGCGCTGCTTGCTTGAATCCTG	Change L85 L88 L91 I92 L93 to Ala
KLO17	<i>BCP1</i>	CAGGATTCAAgcAAGCAGCgcGGCAGATgc <b>Ggccgc</b> AGGTTCCCCAA	Change L85 L88 L91 I92 L93 to Ala
KLO26	<i>BCP1</i>	GGCTTAATTAAGGATCCACCAGAGTCGGTATCATCGT	NLS Deletion or C - Terminal 71 amino acids deletion
KLO27	<i>BCP1</i>	GCCggatccGCCGATGAAGTAGACTACTT	NLS deletion
KLO28	<i>BCP1</i>	GCCggatccATGGTTCAAGCTATCAAATT	Two hybrid construct
KLO29	<i>BCP1</i>	GGCCTGCAGTTACCAAGTGGAAATTTCTG	Two hybrid construct

表三、本實驗所使用之引子對(接續上頁)

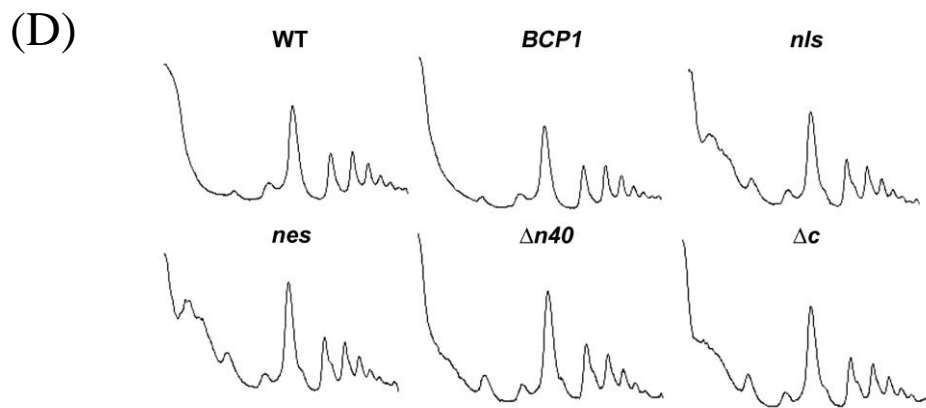
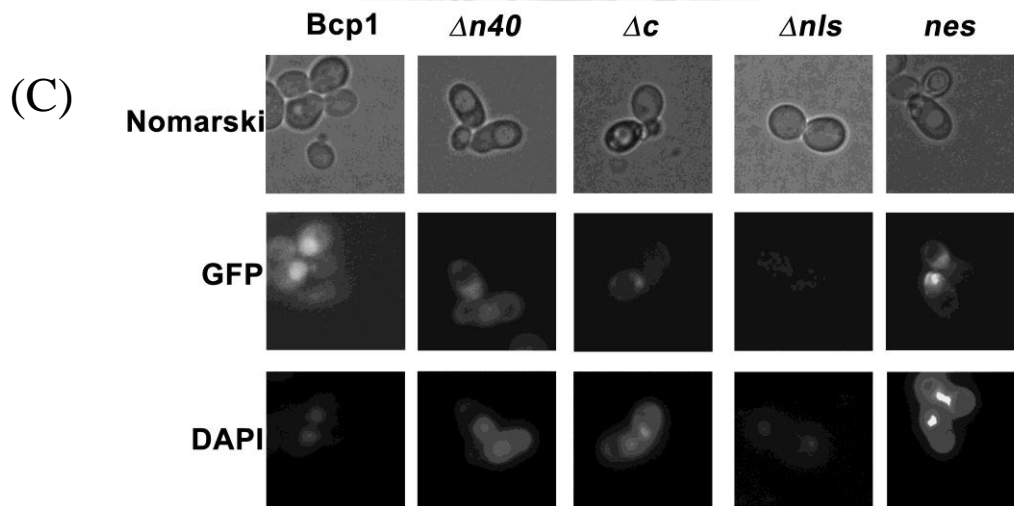
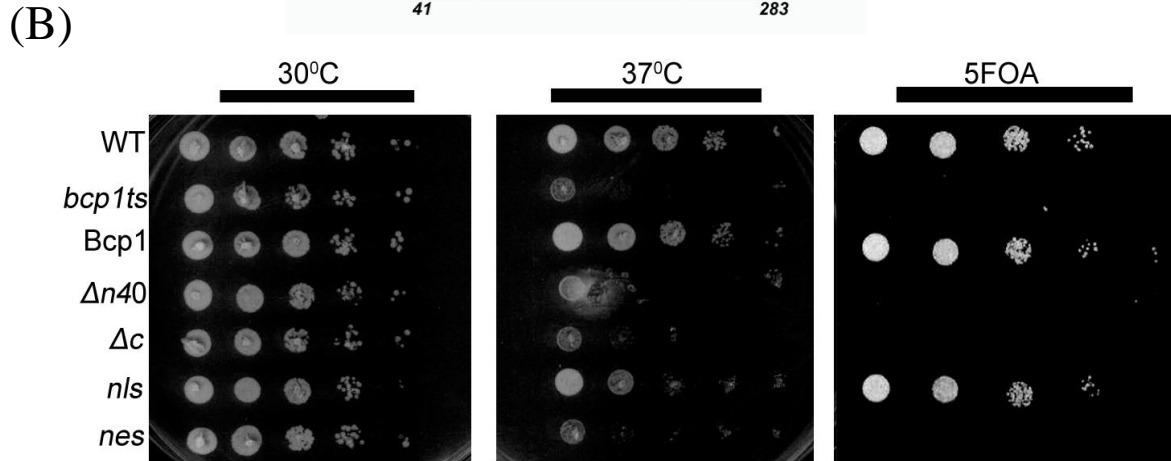
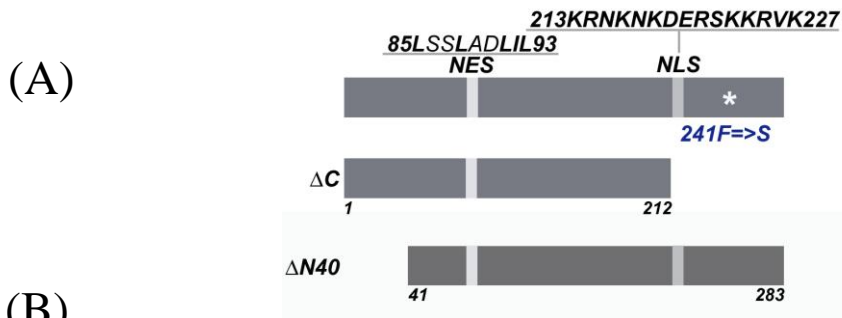
TABLE 3. Primers used in this study. ( Continued )

Oligo#	ORF	Sequence	Purpose
KLO42	<i>BCP1</i>	ctgCATATGGTTCAAGCTATCAAATT	for pET28a pET30a overexpression
KLO43	<i>BCP1</i>	CAGCTCGAGCCAAGTGGAAATTTCTGTTT	for pET28a pET30a overexpression
KLO86	<i>BCP1</i>	CAGGGATCCAGGGTGAATGACCTTTCTTG	Clone BCP1 from its terminator
KLO87	<i>BCP1</i>	ATGGAATTCGAGCAAAATGGAGAAGAAGA	Clone BCP1 deltaN40
KLO92	<i>RPL23A</i>	CTGgagctcTATCGCTTATCCGGCTCA	Clone Rpl23A from its promoter
KLO93	<i>RPL23A</i>	CAGGGATCCCCTCCTATCACGCTCATAAT	Clone Rpl23A from its terminator
KLO94	<i>RPL23B</i>	ctggagctcCTCCAACATGCTGTGCAC	Clone Rpl23B from its promoter
KLO95	<i>RPL23B</i>	CAGGGATCCAGGCAACCGCTTCACTGA	Clone Rpl23B from its terminator
KLO96	<i>TIF6</i>	CtgcggccgaagcTTCCGAGGGCCAAACGAA	Clone TIF6 from its promoter
KLO97	<i>TIF6</i>	CAGGTCGACTGCAATGAATAGTCACCCA	Clone TIF6 from its terminator
KLO105	<i>RPL23A</i>	TTTATGGCCAAGAGTTGCATCTAACTCCGGTGTGTTGTGcggatccccgggtaattaa	C terminal tagging
KLO106	<i>RPL23A</i>	ATTGAAGAATCTAAGAGTATGAGTCAAATAATTTTCCTTTgaattcgagctcggttaaac	C terminal tagging



**Fig. 1. *BCP1* is essential for 60S biogenesis.**

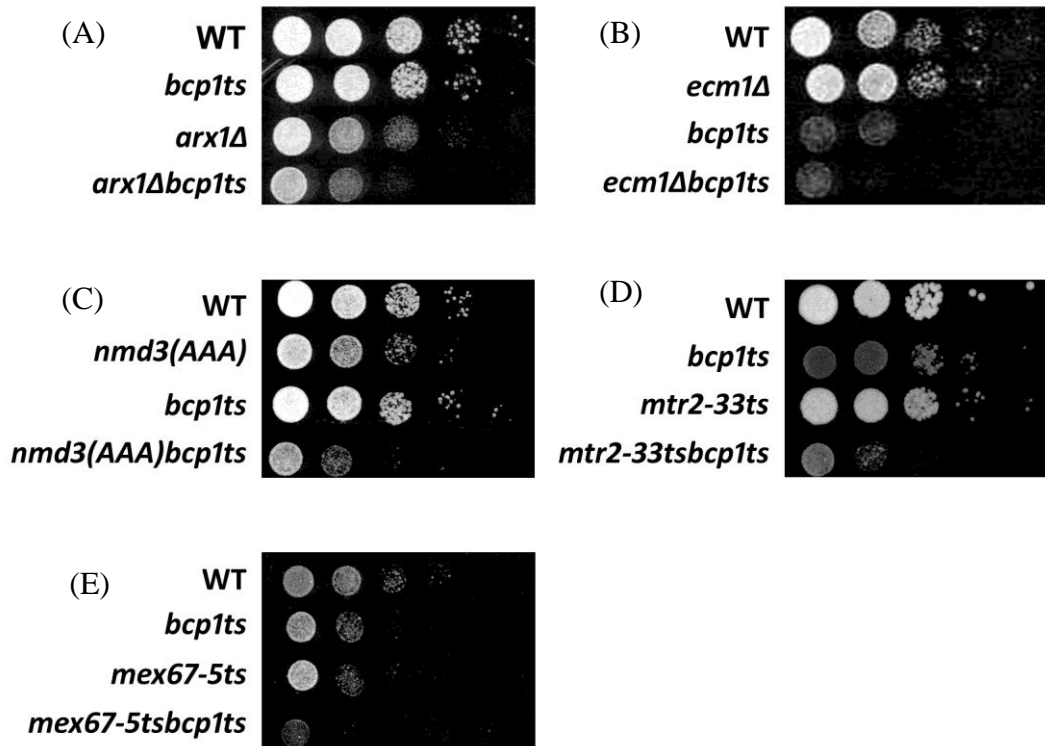
(A) The localization of Rpl25-GFP (PKL201) were visualized in *bcp1ts* (KLY106) with fluorescence microscope. (B) BY4741 and *bcp1ts* cells were culture at 30°C till OD 0.3 or shifted to 37°C for 2 hours. Protein extracts were prepared and fractionated by sedimentation through 7–47% sucrose density gradients.



**Fig. 2. Constructs of *bcp1* mutants and functional studies.**

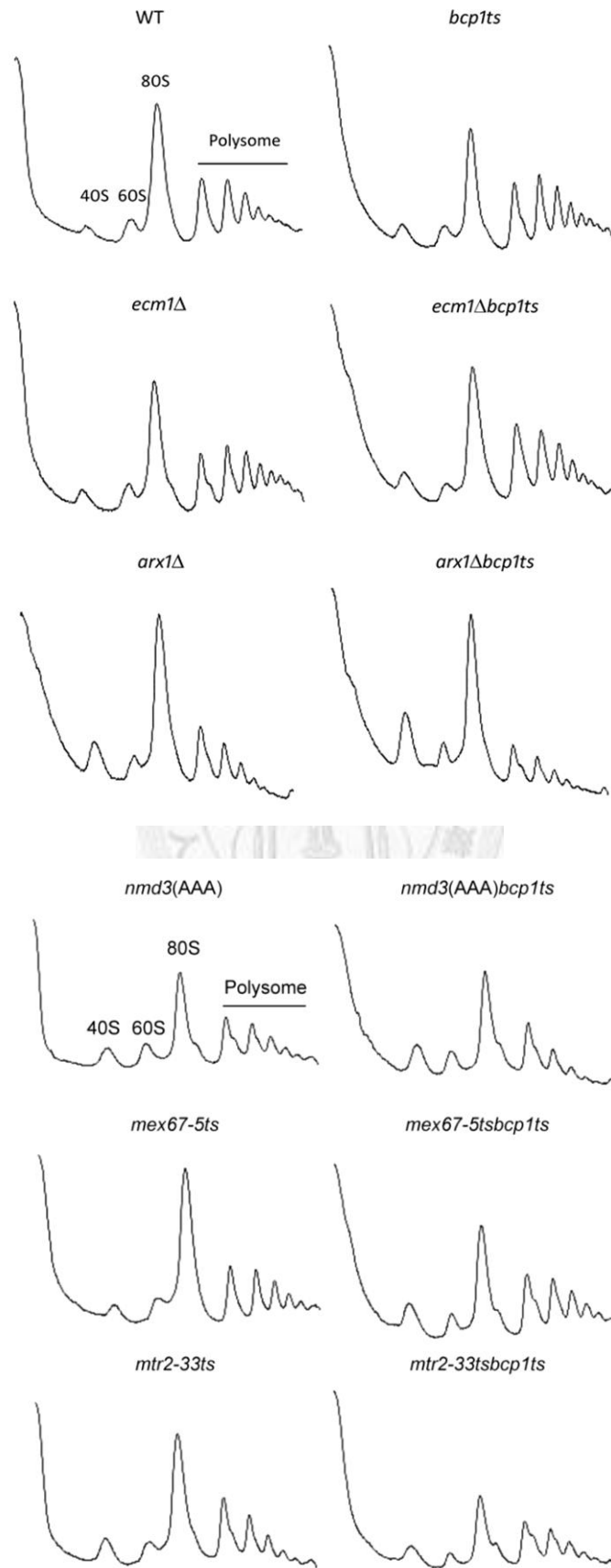
(A) Diagram of Bcp1 and various mutants. (B) Serial dilutions of BY4741 and KLY106 (*bcp1ts*) with vector (PRS415), pKL105 (CEN *BCP1-myc*) pKL118 (CEN *bcp1 Δn40-myc*), pKL106 (CEN *bcp1 Δc-myc*), pKL107 (CEN *bcp1 Δnls-myc*) and pKL108 (CEN *bcp1nes-myc*) were spotted onto LEU dropout medium and incubated at 30°C and 37°C for 2 days or on 5FOA plate at 30°C for 2 days. (C) The localization of Bcp1-GFP (PKL101), *bcp1(nes)*-GFP (PKL104), *bcp1(Δnls)*-GFP (PKL103), *bcp1(Δn40)*-GFP (PKL112), and *bcp1(Δc)*-GFP (PKL102) were visualized in *bcp1ts* (KLY106) with fluorescence microscope. (D) BY4741, KLY106 (*bcp1ts*) with vector, pKL7 (PRS415), pKL105 (CEN *Bcp1-myc*) pKL118 (CEN *bcp1Δn40-myc*), pKL106 (CEN *bcp1Δc-myc*), pKL107 (CEN *bcp1Δnls-myc*) and pKL108 (CEN *bcp1nes-myc*) cells were culture at 30°C till OD 0.3 and shifted to 37°C for 1 hour before harvesting cells. Protein extracts were prepared and fractionated by sedimentation through 7–47% sucrose density gradients.





**Fig. 3. The growth patterns of various *bcp1* and export factors double mutants.**

Serial dilutions of BY4741 and KLY106 (*bcp1ts*), KLY16 (*arx1Δ*), KLY112 (*bcp1ts xarx1Δ*)(A), KLY147 (*ecm1Δ*), KLY151 (*bcp1tsxecm1Δ*) (B), KLY69 (*nmd3(AAA)*), KLY153 (*bcp1tsxnmd3(AAA)*) (C), KLY116 (*mtr2-33ts*), KLY117 (*bcp1tsxmtr2-33ts*) (D), KLY103 (*mex67-5ts*), KLY122 (*bcp1tsxmex67-5ts*) (E), were spotted onto YPD medium and incubated at 30°C.

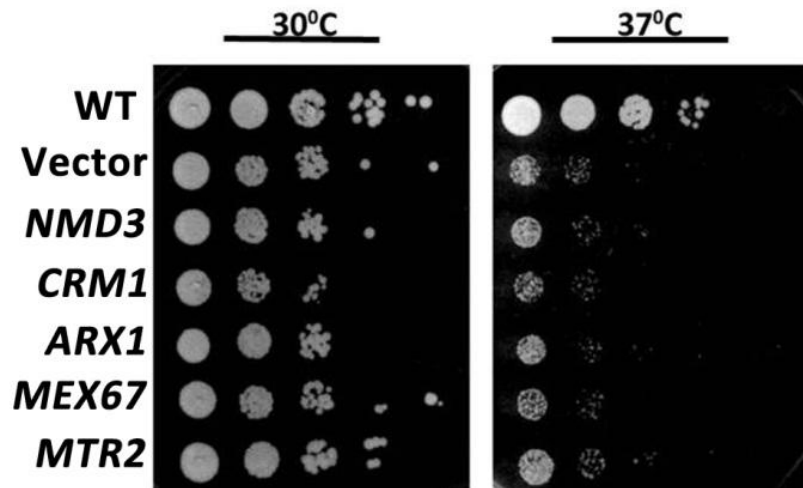


**Fig. 4. Polysome profiles of various *bcp1* and export factors double mutants.**

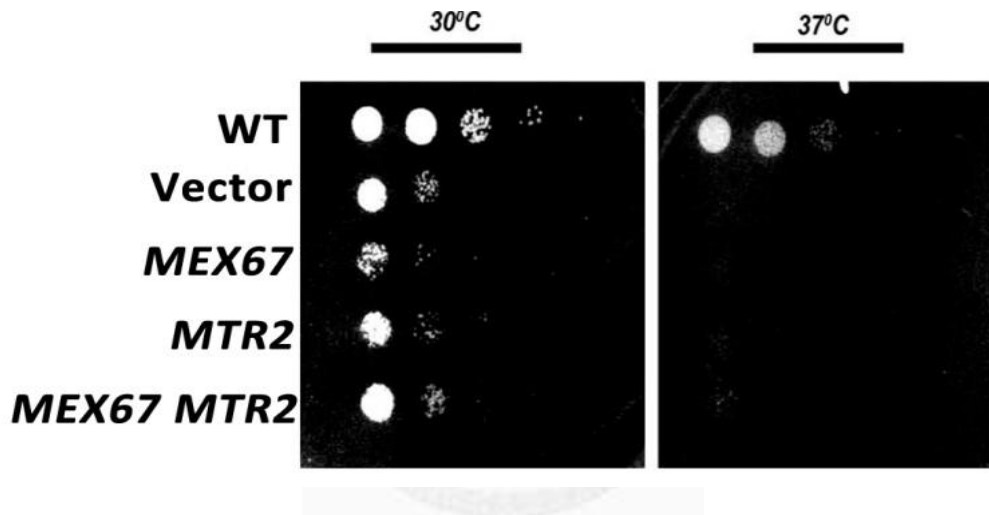
BY4741, *bcp1ts* (KLY106), KLY16 (*arx1Δ*), KLY112 (*bcp1tsarx1Δ*) KLY147 (*ecm1Δ*), KLY151 (*bcp1tsxecm1Δ*), KLY67 (*nmd3(AAA)*), KLY153 (*bcp1tsxnmd3(AAA)*), KLY116 (*mtr2-33ts*), KLY117 (*bcp1tsxmtr2-33ts*), KLY103 (*mex67-5ts*), KLY122 (*bcp1tsxmex67-5ts*) cells were cultured at 30°C till OD 0.3 and shifted to 37°C for 1 hour before harvesting cells. Protein extracts were prepared and fractionated by sedimentation through 7–47% sucrose density gradient.



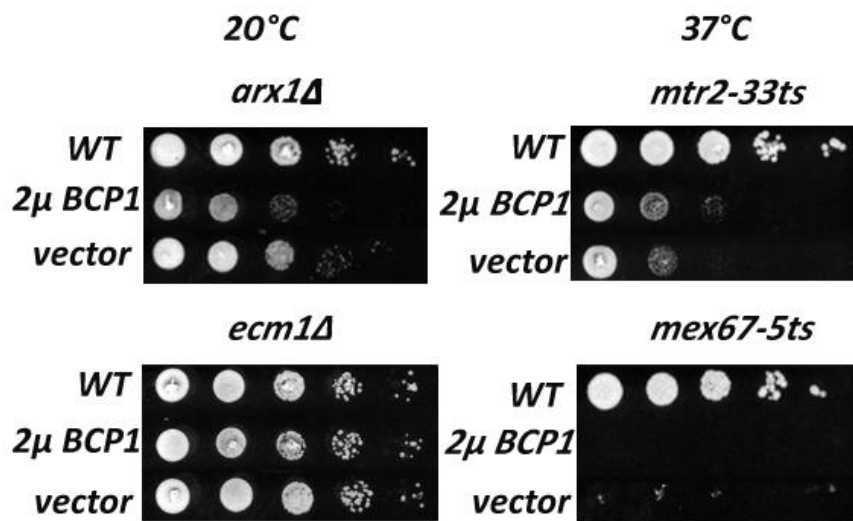
(A)



(B)



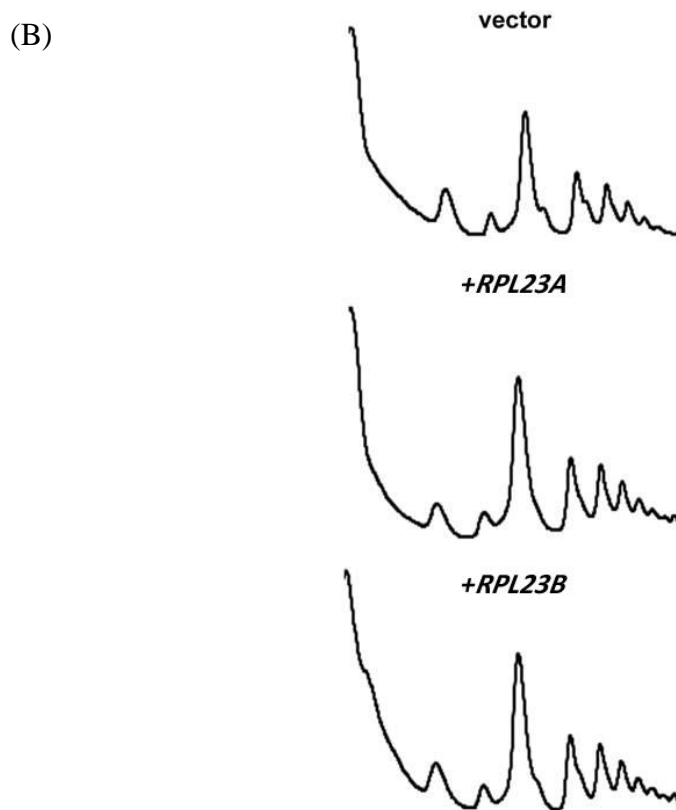
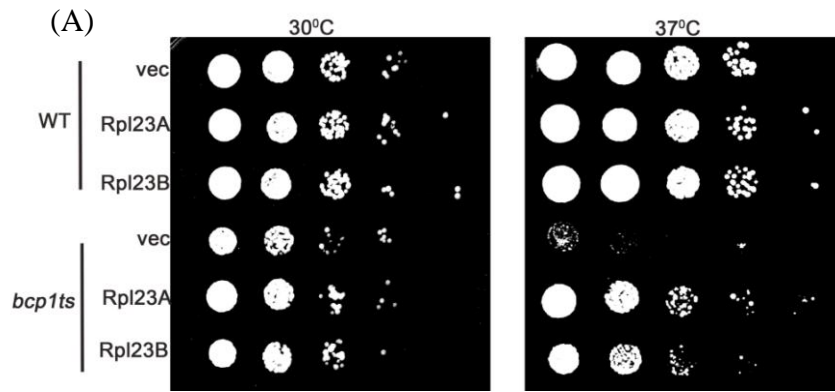
(C)



**Fig. 5. None of the overexpression of export factors can suppress *bcp1ts* growth defects and vice versa.**

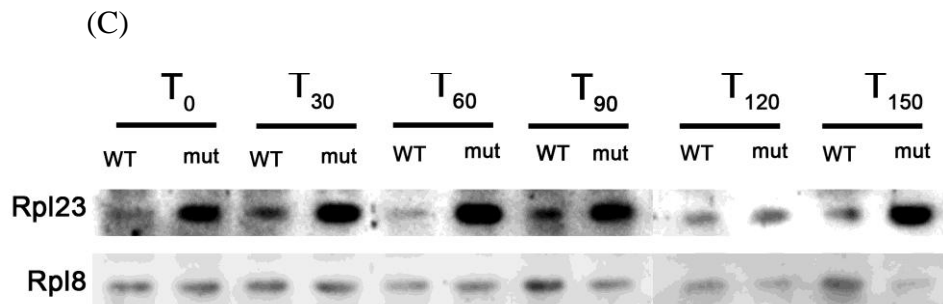
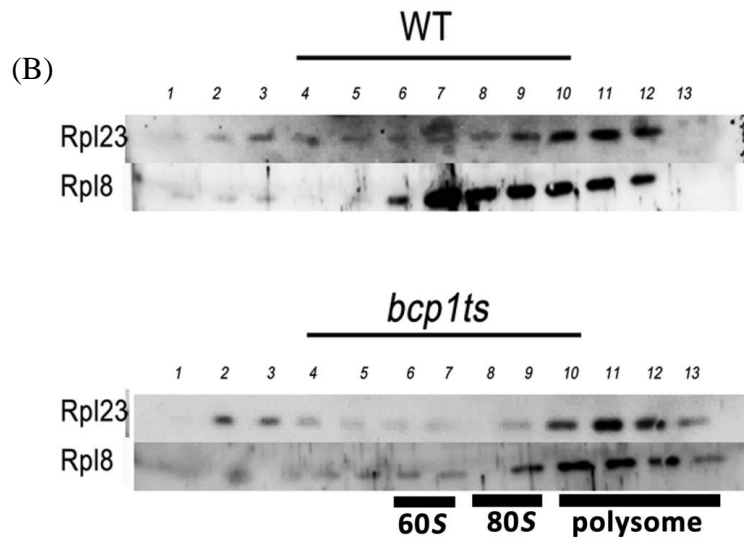
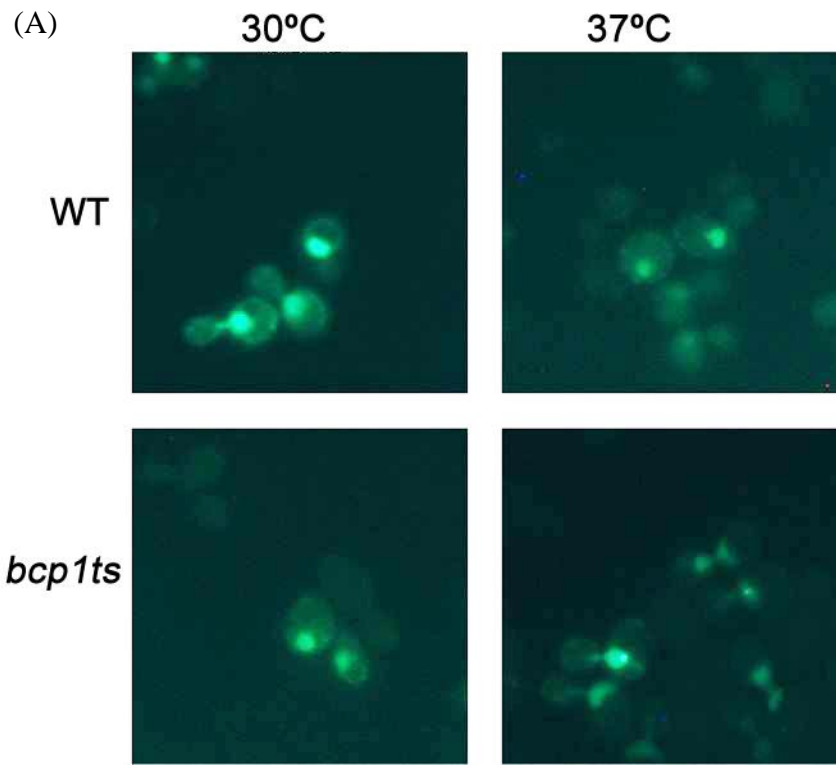
(A) Serial dilutions of BY4741 and KLY106 (*bcp1ts*) with vector, pKL113 ( $2\mu$  *NMD3*), or pKL114 ( $2\mu$  *CRM1*), pKL115( $2\mu$  *ARX1*), pKL116( $2\mu$  *MEX67-HA*), and pKL117 (*CEN MTR2*) were spotted onto URA dropout plate and incubated at 30°C and 37°C for 2 days. (B) Serial dilutions of BY4741 and KLY106 (*bcp1ts*) with vector, pKL72 ( $2\mu$  *MEX67*), pKL73 ( $2\mu$  *MTR2*), or combination of these two vectors were spotted onto URA<sup>-</sup> HIS<sup>-</sup> dropout plate and incubated at 30°C and 37°C for 2 days. (C) Serial dilutions of KLY15 (*arx1Δ*), KLY147 (*ecm1Δ*), KLY17 (*mtr2-33*) and KLY103 (*mex67-5*) with vector and pKL203 ( $2\mu$  *BCP1*) were spotted onto URA dropout plate and incubated at 20°C or 37°C.





**Fig. 6. *RPL23* is a high copy suppressor of *bcp1ts*.**

(A) BY4741 and KLY106 (*bcp1ts*) with vector, pKL192 ( $2\mu$  *RPL23A*), or pKL193 ( $2\mu$  *RPL23B*) were spotted onto URA dropout plate and incubated at 30°C and 37°C for 2 days (B) or were culture at 30°C till OD 0.3 and shifted to 37°C for 1 hour before harvesting cells. Protein extracts were prepared and fractionated by sedimentation through 7–47% sucrose density gradients.

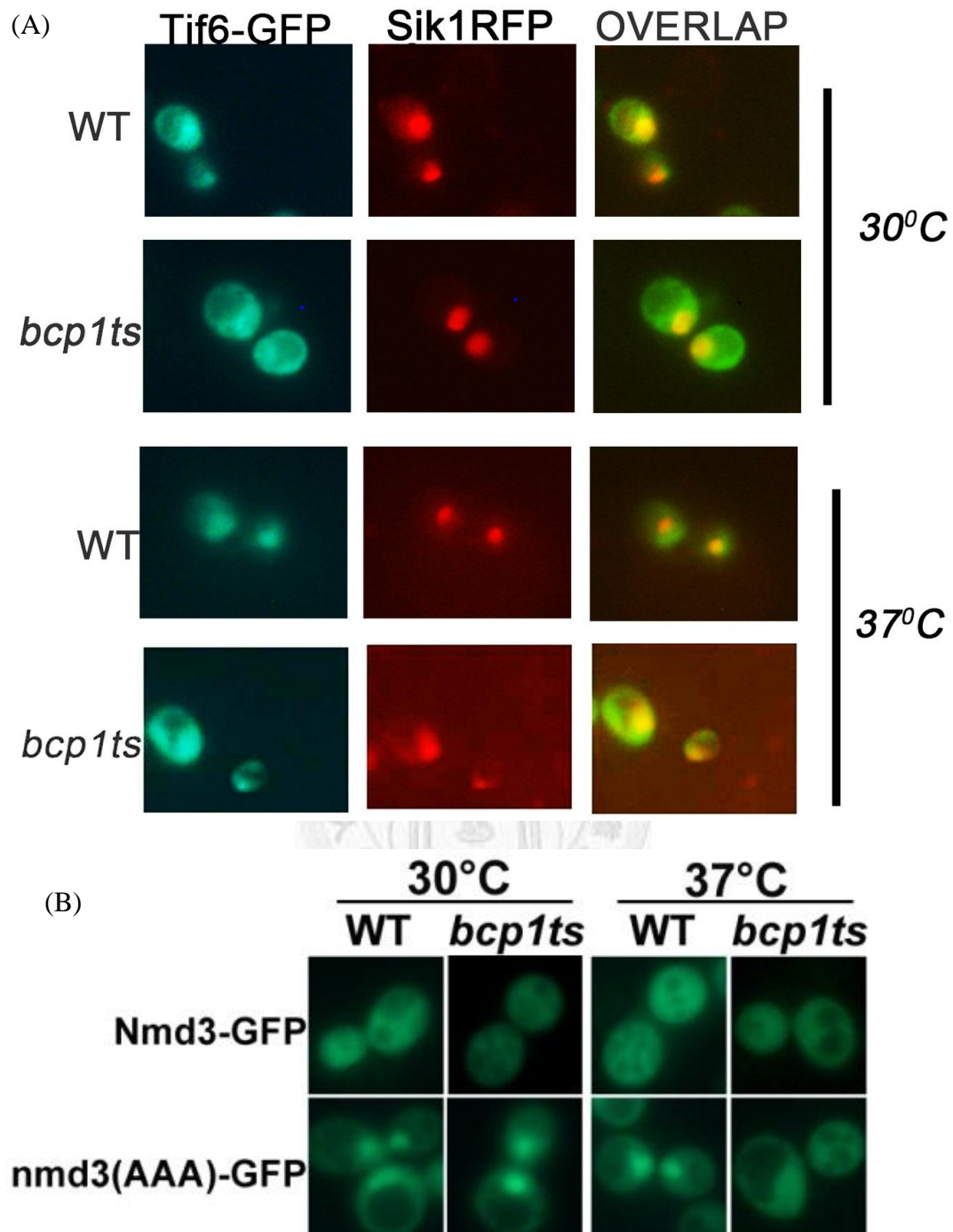


**Fig. 7. Rpl23 partially loses 60S association and shows higher expression levels in *bcp1ts*.**

(A) The localization of Rpl23 was visualized in WT and *bcp1ts* (KLY106) with fluorescence microscope. (B) BY4741 and *bcp1ts* (KLY106) with pKL78 (*CEN RPL23-HA*) cells were cultured at 30°C till OD 0.3 and shifted to 37°C for 1 hour before harvesting cells. Protein extracts were prepared and fractionated by sedimentation through 7–47% sucrose density gradients. Polysome fractions were precipitated with TCA and separated by SDS-PAGE. The presence of Rpl23 and Rpl8 across the gradients was detected by Western blotting. (C) BY4741 and *bcp1ts* (KLY106) plus pKL78 (*CEN RPL23-HA*) were cultured at 30°C and shifted to 37°C for different periods. Protein samples were collected and analyzed by Western blotting.

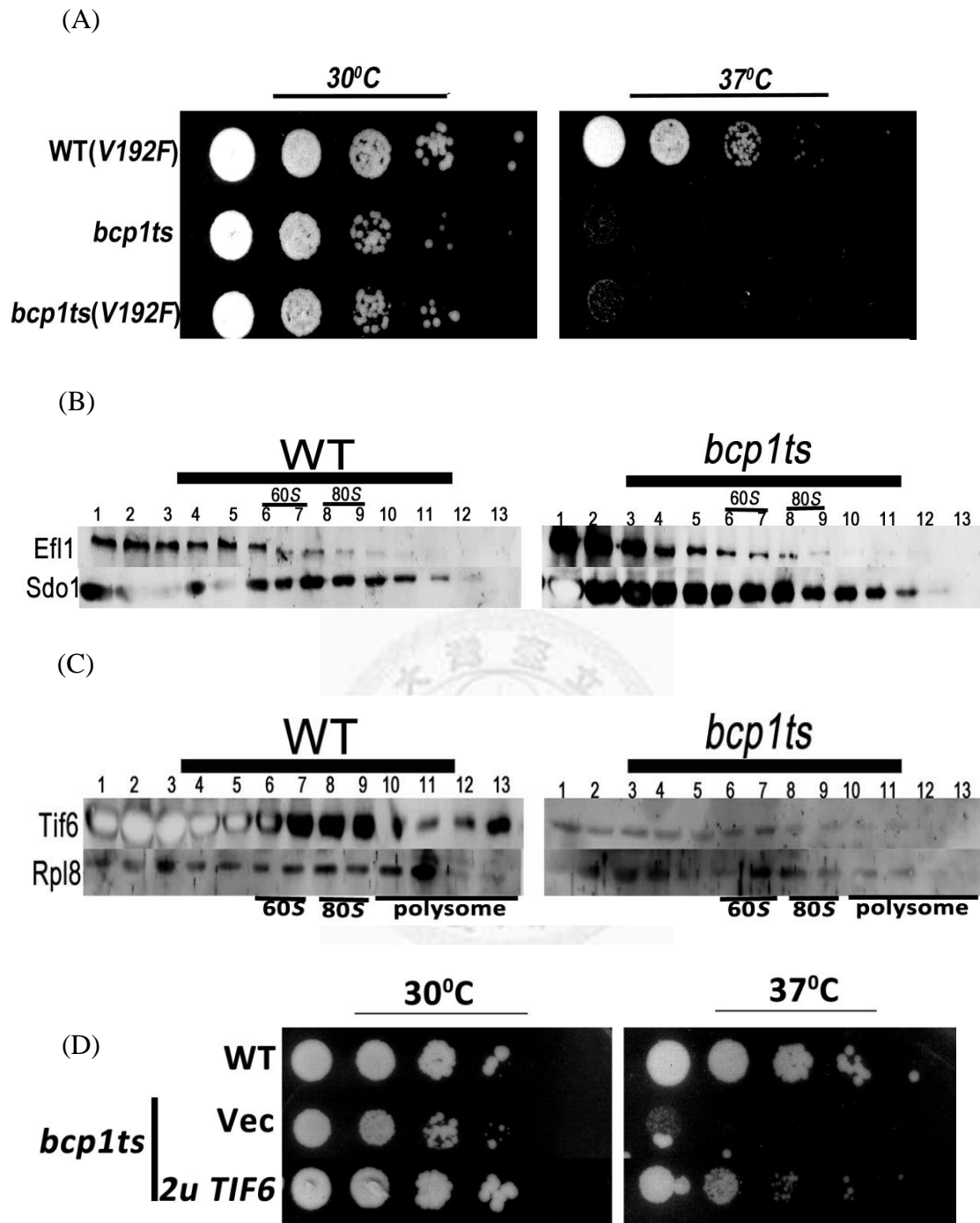






**Fig. 8. Tif6 and Nmd3 are mislocalized in *bcp1ts*.**

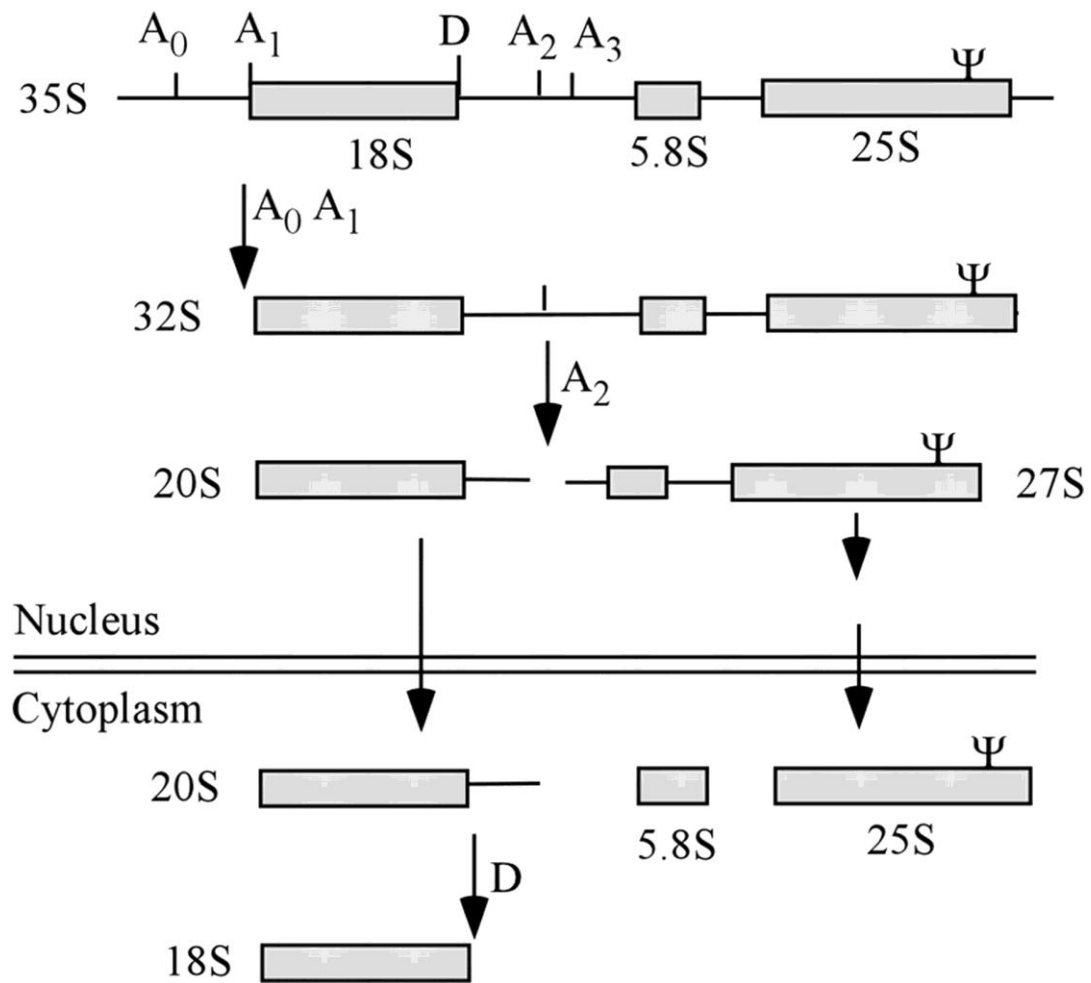
(A) The localization of Tif6 was visualized in AJY2909(*TIF6-GFP*) and KLY169(*bcp1tsXTIF6-GFP*) with fluorescence microscope. (B) The localization of Nmd3-GFP (pKL36) and nmd3(AAA)-GFP (pKL94) were visualized in BY4741 and *bcp1ts* (KLY106) with fluorescence microscope.



**Fig. 9. The level of Tif6 is reduced in *bcp1ts*.**

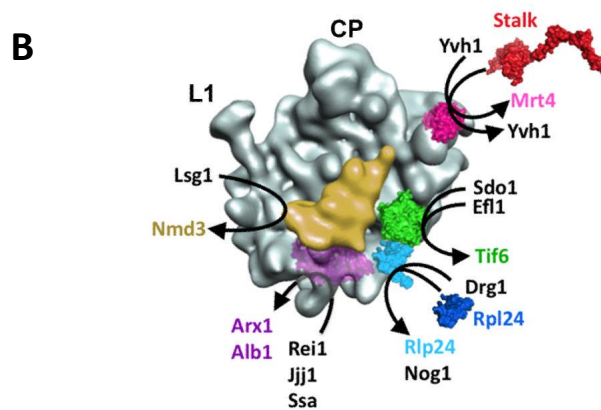
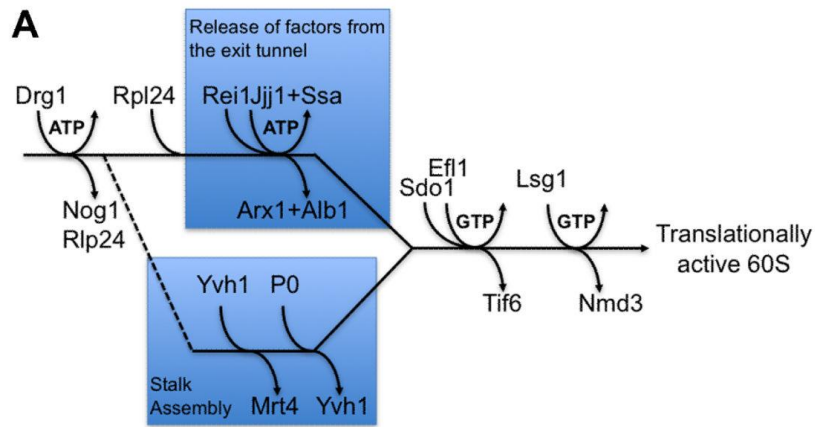
(A) Serial dilutions of BY4741 and KLY106 (*bcp1ts*) with vector, pKL120 TIF6(VI92F), were spotted onto LEU dropout plate and incubated at 30°C and 37°C for 2 days. (B) Polysome fractions were precipitated with TCA, separated by SDS-PAGE, and the presence of Sdo1 and Efl1 across the gradients was detected by Western blotting. (C) Polysome fractions were precipitated with TCA, separated by SDS-PAGE, and the presence of Tif6 and Rpl8 across the gradients was detected by Western blotting. (D) Serial dilutions of BY4741 and KLY106 (*bcp1ts*) with vector, pKL119 (2  $\mu$  TIF6), were spotted onto URA dropout plate and incubated at 30°C and 37°C for 2 days.





(Liang, et al. 2010)

**Appendix Fig. 1. Yeast pre-rRNA processing pathway.** The major rRNA precursors and final products are shown. Cleavage sites relevant to the present study are indicated, as well as the approximate location of the Ψ guided by snR10 in 25S rRNA.



(Lo et al., 2009)

## Appendix Fig. 2. Proposed pathway of 60S maturation in the cytoplasm.

(A) Drg1 facilitates the replacement of Rlp24 by Rpl24, which then recruits Rei1. The latter, together with Jjj1 and Ssa1/Ssa2, enables the release of the export receptor Arx1, located near the polypeptide exit tunnel. In parallel, Yvh1 enables replacement of Mrt4 with P0 to construct the ribosome stalk. In turn, the stalk recruits the GTPase Efl1 to the GTPase-associated center to release Tif6 from the subunit joining face of the particle. The release of Tif6 leads to activation of Lsg1 to release export adapter Nmd3, also from the joining face. It is important to note that the events indicated represent the order of action of these factors but not necessarily their order of association with the pre-60S particle. (B) Cartoon showing the events depicted in (A).