

國立臺灣大學生命科學院漁業科學研究所



博士論文

Institute of Fisheries Science
College of Life Science
National Taiwan University
Doctoral dissertation

金屬膜蛋白對碳氫化合物之代謝作用

Metabolism of Hydrocarbon Compounds By Membrane-
Bound Metalloenzymes

陳耀甥

Yao-Sheng Chen

指導教授：張繼堯 博士

俞聖法 博士

Advisor: Chi-Yao Chang, Ph.D.

Steve, Sheng-Fa Yu, Ph.D.

中華民國 103 年 6 月

June 2014

謝辭



因為興趣而走上了這條漫長的研究生涯，「靜海造就不出好的水手」這句話支持著我渡過每道難關，翻開過去的年少歲月，青澀的研究理念在師長的指導下逐漸蛻變成熟，從陌生到逐漸熟悉，慢慢開啟對研究的熱誠。在八年的博士班歲月，首先感謝我的指導教授張繼堯博士及俞聖法博士，給予學術研究上的環境與指導，讓我能從中摸索與學習到學術研究的精神與可貴之處，培養出對實驗的執著與毅力，並在良師的諄諄教誨與督促下，使完成本論文。

特別感謝口試委員：中央研究院化學所鄒德里博士，國立臺灣大學漁業科學研究所廖文亮博士及國立臺灣海洋大學生物科技研究所林富邦博士，對論文詳細的審閱與訂正、並在百忙親臨指導，由於教授的的不吝指正與惠賜寶貴的意見，使本論文內容更趨完整。

實驗的生活是單純卻又忙碌，過程的滋味點滴在心頭。感謝中央研究院細胞與個體生物研究所及化學研究所實驗室的每一位同仁，在實驗上給予指導與協助，提供許多實驗技巧與注意細節，在我碰到瓶頸時得以順利解決，讓我受益良多。

最後將這篇論文獻給親愛家人，感謝父親與母親在背後默默的支持，讓我能專心的進行研究以完成本論文，感謝姐姐與妹妹在生活上的鼓勵與祝福，因為你們的成全使我能全心全力投注在研究生活中，並順利完成博士學位，在此獻上衷心的祝福與感謝。

摘要



金屬酵素為生物體細胞中重要的催化反應酵素，而其中又以帶有非血基質雙鐵中心的蛋白最為重要。第三類型非血基質雙鐵中心金屬酵素包括膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族之蛋白，對環狀、飽和烷烴類及不飽和烷烴類化合物進行去飽和及單加氧催化反應。

斑馬魚 Δ -5/ Δ -6 脂肪酸去飽和酶(Z-FADS)在長鏈不飽和脂肪酸(long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs)催化與生合成過程中扮演重要角色。以螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)證明斑馬魚 Z-FADS 蛋白會與第二及第三型細胞色素 *b5* 還原酶(cytochrome *b5* reductase, CYB5R2 及 CYB5R3)及四種延長酶(elongation of very long chain fatty acids, ELOVL, ELOVL2, 4, 5 及 7)產生交互作用。將斑馬魚 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因同時轉染至 HeLa 細胞，以 α -次亞麻油酸(α -linolenic acid, ALA)為反應起始物，以氣相層析圖譜分析法，證明斑馬魚 ω 3 系列長鏈不飽和脂肪酸生合成過程中，特別是 DHA 及 EPA 的生合成需要 Z-FADS、ELOVL5、ELOVL2 及 ELOVL4 的協同作用。此外以西方墨點法及免疫螢光染色分析，也證明斑馬魚 Z-FADS 除了在內質網表現外，亦會存在於細胞的粒線體中。為了瞭解金屬酵素之催化反應機制，以同屬於膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族之原核生物蛋白—二甲苯單加氧酶為模式進行研究。免疫共沉澱法及免疫金標誌分析證明，在催化反應過程中，還原酶會與催化酵素本體結合而形成複合體，而未形成複合體之電子傳遞本體會出現在細胞質中靠近細胞膜處，且證明在催化過程中，催化酵素本體與電子傳遞本體比例不等量，催化酵素本體多於電子傳遞本體。以二甲苯單加氧酶對反應物催化活性分析，證明二甲苯單加氧酶除了會催化苯環類化合物，亦會對短鏈不飽和烷烴類化合物進行催化反應，而含氟化合物更證明，含氟化合物更可改善催化反應效率。

本論文同時以真核及原核生物之膜結合型脂肪酸去飽和酶為研究主軸，分析金屬酵素在催化反應過程中，反應口袋與反應物之間的交互作用。證明斑馬魚 Z-

FADS 在 DHA 及 EPA 生合成過程中所扮演之角色，同時透過二甲苯單加氧酶為模式更證明，疏水性反應口袋可有效的對不同反應物進行特定部位的催化反應。



關鍵字：金屬酵素、膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族、長鏈多重不飽和脂肪酸、脂肪酸去飽和酶、延長酶、二甲苯單加氧酶

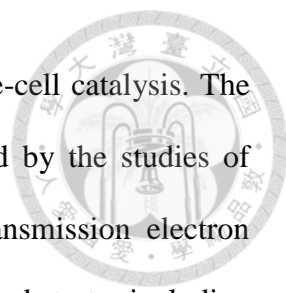
Abstract



The membrane metallo-proteins (MMPs) are important catalytic enzyme in organism, particularly the non-heme diiron containing proteins. Membrane-bound fatty acids desaturase superfamily proteins (membrane-FADS superfamily proteins) are classified into type III non-heme diiron center proteins that catalyze desaturation and/or monooxygenation in hydrocarbons including aromatics, saturated and unsaturated.

Zebrafish Δ -5/ Δ -6 fatty acid desaturase (Z-FADS) catalyzes cascade synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) and plays pivotal roles in many biological functions. In this study, we deployed the technique of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to examine the protein-protein interactions between Z-FADS and cytochrome b5 reductases (CYB5R1-3), elongases 2, 4, 5, 7 (elongation of very long chain fatty acids, ELOVL), respectively and the results indicated that, in endoplasmic reticulum (ER), the Z-FADS can be in close proximity to CYB5R2, 3, and ELOVL protein family, including ELOVL2, 4, 5 and 7, respectively. Furthermore, in the gas chromatography analysis, we proved that the HeLa cells co-transfected with *fads*, *elovl2*, 4 and 5 catalyze α -linolenic acid to ω 3-series LC-PUFAs, especially the docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Additional data from immuno-fluorescence cytochemistry (IFC) and Western blotting studies demonstrated that Z-FADS also resides in the mitochondria of *zebrafish fads* transfected HeLa cells. Our results implicated that Z-FADS, the sole fatty acid desaturase ever been identified in zebrafish, can serve as a universal fatty acid desaturase for the whole lipogenesis process.

Xylene monooxygenase (XylM), a non-heme diiron monooxygenase from the prokaryotic system, *Pseudomonas putida* mt-2, can catalyze toluene to benzyl alcohol and xylene to 4-methylbenzyl alcohol. An *E. coli* system heterogeneously transformed with part of an *TOL* operon including the overexpression of XylM and its partner protein



of oxidoreductase, XylA, is constructed for its application of whole-cell catalysis. The protein expressions of XylM and XylA in this system are verified by the studies of Western blotting analysis, co-immune-precipitation as well as transmission electron microscopy (TEM) with immune-gold staining experiments. Several substrates including fluorinated butane are designed to study their enzymatic activities. Our results indicated that the aromatic residue(s) within this metalloprotein play important roles for its controlled hydroxylation.

In overall, I exploited both the eukaryotic and prokaryotic membrane-bound non-heme iron proteins including FADS superfamily as my target proteins and pave my way towards understanding the role of Z-FADS on DHA and EPA biosynthesis in Zebrafish as well as showing the promiscuity of hydrophobic pocket in xylene monooxygenase can efficiently achieve selective oxidations in a variety of substrates.

Key Words : membrane-metalloprotein 、 membrane-bound fatty acid desaturase superfamily 、 long-chain polyunsaturated fatty acids 、 fatty acid desaturase 、 elongase 、 xylene monooxygenase

目 錄



中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
目錄.....	v
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xi
第一章、前言.....	1
第二章、材料與方法	
2.1 實驗材料.....	13
2.1.1 實驗物種.....	13
2.1.2 實驗菌種.....	13
2.1.3 實驗細胞.....	13
2.1.4 實驗質體.....	13
2.1.5 實驗溶液.....	13
2.1.6 實驗生物培養.....	16
2.2 實驗方法：真核生物.....	18
2.2.1 斑馬魚總體 RNA (Total RNA) 萃取與互補 DNA 合成.....	18
2.2.2 斑馬魚脂肪酸去飽和酶、延長酶及細胞色素 b5 還原酶 (CYB5R) 選殖、序列分析與載體構築.....	18

2.2.3 細胞轉染(Transfection)與免疫螢光染色分析(Immunofluorescence cytochemistry, IFC).....	24
2.2.4 螢光共振能量轉移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 及 ELOVLs 穿膜構造分析.....	25
2.2.5 Z-FADS 在 HeLa 細胞內表現與定位分析 (Subcellular localization).....	27
2.2.6 DHA 及 EPA 生物合成與脂肪酸甲酯 (Fatty acid methyl ester)分析.....	29
2.3 實驗方法:原核生物.....	31
2.3.1 假單孢菌基因體 DNA (Genomic DNA) 萃取.....	31
2.3.2 二甲苯單加氧酶(Xylene monooxygenase, xylM)及其電子傳遞蛋白 (Xylene monooxygenase electron transfer component, xylA)之選殖、基因分析與共同表現載體構.....	31
2.3.3 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現載體誘導表現分.....	32
2.3.4 二甲苯單加氧酶複合體(xylene monooxygenase complex)蛋白活性分析.....	33
2.3.5 定點突變 (Site-directed mutagenesis, SDM).....	34
2.3.6 xylM 及 xylA 蛋白之西方墨點分析 (Western blotting)與免疫共沉澱試驗(Co-Immunoprecipitation assay).....	35
2.3.7 二甲苯單加氧酶複合體免疫金標誌分析 (Immune-gold	



labelling)37

第三章、結果

3.1 真核生物

3.1.1 斑馬魚脂肪酸去飽和酶 (Z-FADS)、延長酶(ELOVLs)及細胞色素
b5 還原酶(CYB5R)之序列分析與表現載體構築.....38

3.1.2 Z-FADS、CYB5R 和 ELOVL 在轉染後 HeLa 細胞中的表現觀
察.....41

3.1.3 螢光共振能量轉移分析.....49

3.1.4 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 膜蛋白之穿膜結構分
析.....53

3.1.5 Z-FADS 在細胞內表現與胞器定位分析.....56

3.1.6 DHA 及 EPA 生物合成與脂肪酸甲酯分析.....58

3.2 原核生物

3.2.1 Xylene monooxygenase complex 序列分析.....61

3.2.2 Xylene monooxygenase 蛋白質複合體共同表現載體構築與蛋白
質誘導表現分析.....64

3.2.3 Xylene monooxygenase 蛋白質複合體活性分析.....65

3.2.4 Xylene monooxygenase 蛋白質複合體定點突變分析.....70

3.2.5 Xylene monooxygenase complex 西方墨點分析與免疫共沉澱試

驗.....	73
3.2.6 Xylene monooxygenase complex 免疫金標誌分析.....	75
第四章、討論	
4.1 真核生物.....	78
4.2 原核生物.....	88
第五章、結論	
100	
第六章、參考文獻	
102	
附圖	
116	





圖目錄

圖一、Z-FADS 與小鼠及人類第一型(FADS1)、第二型(FADS2)及第三型(FADS3)去飽和酶蛋白質序列比分析.....	38
圖二、斑馬魚細胞色素 <i>b5</i> 還原酶蛋白質序列相似性分析.....	40
圖三、斑馬魚 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 蛋白質序列相似性分析...	41
圖四、DsRed-CYB5R1 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析....	42
圖五、DsRed-CYB5R2 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析....	42
圖六、DsRed-CYB5R3 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析....	43
圖七、DsRed-ELOVL2 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析....	43
圖八、DsRed-ELOVL4 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析....	44
圖九、DsRed-ELOVL5 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析....	44
圖十、DsRed-ELOVL7 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析....	45
圖十一、ELOVL2 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析.....	46
圖十二、ELOVL4 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析.....	47
圖十三、ELOVL5 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析.....	48
圖十四、ELOVL7 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析.....	49
圖十五、斑馬魚 Z-FADS 蛋白與 CYB5R 及 ELOVL 蛋白螢光共振能量轉移分析....	52
圖十六、His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白穿膜構造分析.....	54
圖十七、His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白 HeLa 細胞內的免疫螢光染色分.....	55
圖十八、斑馬魚 Z-FADS 於 HeLa 細胞內表現與胞器定位分析.....	58
圖十九、DHA 及 EPA 生物合成與脂肪酸甲酯分析.....	59

圖二十、 <i>Pseudomonas putida</i> mt-2 XylM 與 XylA 蛋白序列保守區資料庫比對 (Conserved Domains Database, CDD), 及以 MEGA5 進行蛋白質序列相似性分析...	63
圖二十一、pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現質體於不同宿主細胞蛋白表現分析.....	64
圖二十二、苯環類化合物以 xylene monooxygenase 作用產生相對應之羥基化產物.....	66
圖二十三、不飽和烷烴類化合物經 xylene monooxygenase 作用產生的相對應之羥基化產物.....	69
圖二十四、Wild type 與突變型 xylene monooxygenase 與 Toluene 反應之 GC-MS 圖譜.....	71
圖二十五、XylM-His 與 XylA-FLAG 蛋白質西方墨點分析.....	73
圖二十六、Xylene monooxygenase complex 以 anti-His tag 抗體進行免疫共沉澱分析.....	74
圖二十七、XylA-FLAG 蛋白於 BL-21 (DE3) 表現部位之免疫金標誌分析.....	75
圖二十八、XylM-His 蛋白於 BL-21 (DE3) 表現部位之免疫金標誌分析.....	77
圖二十九、斑馬魚 ω 3 及 ω 6 系列脂肪酸生合成途徑圖.....	87
圖三十、XylM 蛋白穿膜構造拓譜(topology)預測與定點突變相對位置圖.....	96

表目錄

表一、斑馬魚 <i>fads</i> 、 <i>elovl</i> 及 <i>cyb5r</i> 基因之 PCR 引子對與 PCR 片段之相對應質體， 英文字母下方線條代表限制酶切位，雙重下方線條表示為額外增加之序 列.....	21
表二、pACYC-Duet1-XylM-XylA 表現質體構築之引子對.....	32
表三、Xylene monooxygenase 複合體活性分析之反應物總表.....	34
表四、XylM 定點突變之引子.....	35
表五、斑馬魚 Z-FADS 蛋白與 CYB5R 及 ELOVL 蛋白螢光共振能量轉移及螢光基 團距離.....	52
表六、二甲苯單加氧酶複合體對苯環類化合物、不飽和烷烴類化合物及飽和類氟化 物催化反應效率.....	70
表七、二甲苯單加氧酶 W321A、W333A 及 W355A 定點突變針對甲苯之催化效率 分析.....	73

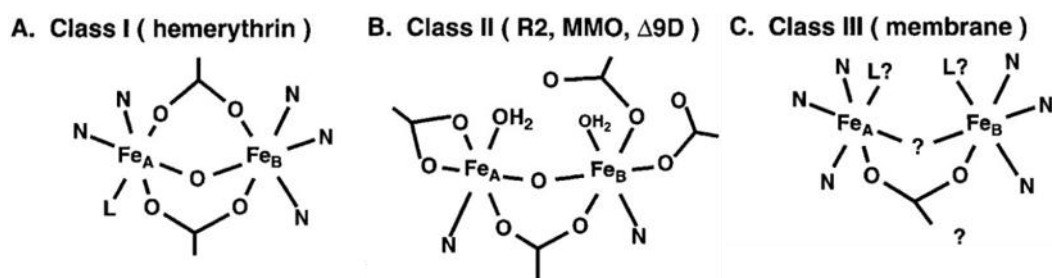
第一章、前言



生物體存在著許多蛋白各司其職，而這些蛋白中有 47% 的蛋白是金屬蛋白 (metalloproteins)，而有 41% 是由其組成活性反應中心 (Waldron, Rutherford et al. 2009)，除了有常見的主元素族中的鈣、鈉、鉀及鎂，亦有不少過度金屬元素，而這些過度金屬元素具備多種氧化態，其主要功能作為基質催化及電子傳遞之功用。而在基質催化反應中，具有催化反應能力的金屬多數為鎂離子 (約佔了 16% 左右)，其次為鐵、鋅及錳 (大約佔了 6-9% 間)，銅離子最為稀少，約只佔了 1%。但其中 81% 的鐵與 93% 的銅均肩負了氧化還原反應的重要角色 (Waldron, Rutherford et al. 2009)，這些金屬離子螯合在蛋白之活性反應中心，形成催化反應部位而針對反應物進行催化，而這類型螯合金屬的蛋白質依照表現位置又可區分為膜結合型與溶解型兩種。

Shanklin 等人依據胺基酸序列比對而將雙鐵酵素區分為三大類群 (Shanklin, Whittle et al. 1994)。其中第一類與第二類的區別在於活性反應中心的組胺酸螯合兩個鐵原子，而在鐵原子中間的軸線 (diiron axis) 與蛋白結構內的四個螺旋束 (four-helix bundle) 垂直與平行，互相垂直為第一類，平行則為第二類。代表性蛋白分別為第一類為具有氧分子結合 (O_2 -binding) 功能之蛋白，包括血紅素 (hemerythrin) 及肌紅蛋白 (myohemerythrin) 及第二類為具有氧氣活性功能 (O_2 -activating enzyme) 之核糖核苷酸還原酶 (ribonucleotide reductase)，溶解型脂肪酸去飽和酶 (soluble form desaturase) 及溶解型甲烷單加氧酶 (soluble methane monooxygenase, sMMO)。第三類為膜結合型脂肪酸去飽和酶，其序列與第一類及第二類明顯不同，主要為 8 個組胺酸所組成的序列螯合兩個鐵離子形成活性反應中心： $Hx(3 \text{ or } 4)Hx(20-50)Hx(2 \text{ or } 3)HHx(100-200)Hx(2 \text{ or } 3)HH$ 。這一類的蛋白除了已知的膜結合型脂肪酸去飽和酶外，xylene monooxygenase 及烷烴羥化酶 (alkane hydroxylase, AlkB) (Shanklin, Whittle et al. 1994; Broadwater, Haas et al. 1998)。

這三大類具有雙鐵反映中心的蛋白第一類為包括蚯蚓血紅蛋白(hemerythrin)或蚯蚓肌紅蛋白(myohemerythrin)這類型的氧氣結合蛋白(O₂-binding proteins)，透過 5 個組胺酸(Histidine, His, H)側鏈上的咪唑環(imidazole ring)及 1 個白胺酸(Leucine, Leu, L)側鏈上的羧酸官能基(-COOH group)穩定雙鐵結構形成其活性反應中心，而穀胺酸(Glutamate, Glu, E)及天門冬胺酸(Aspartate, Asp, D)側鏈上帶負電的羧酸根離子(-COO⁻)則與雙鐵中心上、下配位形成作用力；第二類為包括原核生物的甲烷單加氧酶(methane monooxygenase)及溶解型 Δ9-脂肪醯基質體蛋白去飽和酶(Δ9-acyl-ACP desaturase)這類型的氧氣活化酵素(O₂-activating enzymes)，透過 2 個組胺酸側鏈上的咪唑環、4 個穀胺酸側鏈上帶負電的羧酸根離子及 2 個水分子共同穩定雙鐵結構形成其活性反應中心；而第三類則為具有數個穿膜構造的膜結合型脂肪酸去飽和酶家族(membrane-bound fatty acids desaturase family)之蛋白(Broadwater, Haas et al. 1998)。此家族蛋白的活性反應中心目前尚未有明確的結構解析出(圖解一)，只知道透過此蛋白高保守區之組胺酸螯合雙鐵形成反應中心，但有多少個組胺酸共同參與，是否有其他胺基酸協同，目前仍未有定論(Broadwater, Haas et al. 1998; Lange and Que 1998; Martin, Oh et al. 2007; Shanklin, Guy et al. 2009)。



圖解一、三類型非血基質雙鐵中心(non-heme diiron center)。第一類為包括蚯蚓血紅蛋白及蚯蚓肌紅蛋白這類型的氧氣結合蛋白；第二類為包括核苷酸還原酶 R2 次單位、原核生物的甲烷單加氧酶及溶解型 Δ9-脂肪醯基質體蛋白去飽和酶等，這類型的氧氣活化酵素；第三類為具有數個穿膜構造的膜結合型脂肪酸去飽和酶家族之蛋




白(Broadwater, Haas et al. 1998)。

膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族其活性反應中心被歸類為第三類型非血基質雙鐵中心，此類型蛋白目前已知包括有：1. 去飽和酶類型：包括高等植物、哺乳動物、昆蟲、真菌及藍綠藻的脂肪醯基去飽和酶(fatty acyl desaturase) (Shanklin, Whittle et al. 1994)； 2. 真核生物膜結合型羥化酶類型：此類型目前只有蓖麻(*Ricinus communis*)所特有之油酸-12 羥化酶(oleate 12-hydroxylase) (Vandeloo, Broun et al. 1995)；3. 原核生物膜結合型羥化酶類型：此類型蛋白包括兩種，(1)具有 OCT 質體(OCT plasmid)的菌種，此質體可轉譯出烷烴羥化酶(alkane hydroxylase, AlkB) (Kok, Oldenhuis et al. 1989)，(2)具有 TOL 質體(TOL plasmid)的菌種，此質體可轉譯出二甲苯單加氧酶(xylene monooxygenase, XylM) (Suzuki, Hayakawa et al. 1991; Harayama, Kok et al. 1992)。

而其他具有此反應中心卻不屬於膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族之蛋白，則包括有：酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)及根內球囊霉(*Glomus intraradices*)的固醇甲基氧化酶(sterol methyl oxidase) (Bard, Bruner et al. 1996; Oger, Ghignone et al. 2009)，阿拉伯芥(*Arabidopsis*)的醛類脫羧酶(aldehyde decarboxylase) (Aarts, Keijzer et al. 1995)。這些蛋白最大的特徵為都具有富含組胺酸之區域(Histidine-rich motifs)，同時也皆為具有多重穿膜結構之膜蛋白(Broadwater, Haas et al. 1998)。


帶有非血基質雙鐵中心的蛋白在催化反應過程中，皆需要有外源電子提供至蛋白質本體才可進行催化作用，這些外源電子來自於輔酶(co-enzyme)，輔酶依來源不同分為煙醯胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)及煙醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) (Shaw and Harayama 1992; Broadwater, Haas et al. 1998; Tshuva, Lee et al. 2002; Behan and Lippard 2010)，而這些輔酶在傳遞過程中，需要透過具有黃素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)之還原酶進行氧化還原作用，將輔酶之電子傳遞至具有



電子傳遞功能之中間蛋白，最後再傳遞至蛋白質本體。這些中間蛋白則有許多種形式，包括：具有血基質結合位(heme-binding domain)的細胞色素 *b5* 蛋白(cytochrome *b5* protein) (Schenkman and Jansson 2003)、具有 4 個胱氨酸(cysteine, Cys, C)螯合單鐵離子($\text{Fe}(\text{S-cys})_4$)形成氧化還原中心(redox center)的紅素氧還原蛋白(rubredoxin) (Bau, Rees et al. 1998)、具有 4 個胱氨酸螯合鐵離子，而鐵離子同時螯合硫而形成鐵硫簇之結構(iron-sulfur cluster)以形成氧化還原中心的鐵氧還原蛋白(ferredoxin) (Kurisu, Kusunoki et al. 2001)，其鐵硫簇配位方式又可分為二鐵二硫($2\text{Fe}-2\text{S}$) (Armengaud, Sainz et al. 2001)、三鐵四硫($3\text{Fe}-4\text{S}$) (Nielsen, Harris et al. 2004)及四鐵四硫($4\text{Fe}-4\text{S}$) (Fukuyama, Matsubara et al. 1989)三種。

這些蛋白質在進行催化過程中的反應物是皆由碳、氫及氧所形成不同類型之化合物所組成。自然界與生物體中帶有大量的碳氫化合物，除了可分解以作為能量的來源或儲存，亦可作為生物體組成之部分(Prenafeta-Boldu, Kuhn et al. 2001; van Beilen, Li et al. 2003; Wentzel, Ellingsen et al. 2007)。碳氫類化合物為有機化合物之一種，可再細分為烷烴、烯烴、炔烴、環烴及芳香烴，而其中烷烴與芳香烴，與日常生活息息相關，包括自石油中提煉的汽油、柴油、煤油及天然氣，以及化工方面常使用之甲苯、乙苯及苯乙烯等等。而其中不飽和類之烯烴，則以末端帶有羧酸根之長鏈不飽和脂肪酸被討論最多，其分類上以甲基端為 1 號碳開始計算，於第一個雙鍵位置之碳數而區分為 $\omega 3$ 、 $\omega 6$ 及 $\omega 9$ 系列脂肪酸。


在自然界之生物，特別是脊椎動物，其生長發育過程中需要大量不同來源之營養物質，而長鏈不飽和脂肪酸則為發育過程中不可或缺的营养物，特別是腦部與眼部的發育(Uauy, Hoffman et al. 2001; Uauy and Dangour 2006)。長鏈不飽和脂肪酸除了提供發育過程中所需，對於在生物體的結構形成與能量貯存也扮演重要角色，生物體內脂質分為兩大類，分別為磷脂類與甘油脂類。磷脂類為長鏈不飽和脂肪酸接上鞘氨醇(sphingosine)及磷酸形成鞘磷脂類(sphingolipids)主要為形成細胞膜的脂質雙層結構(Mashaghi, Jadidi et al. 2013)，而大量長鏈不飽和脂肪酸則可增加細胞



膜的流動性，以抵抗環境中溫度變化所造成之緊迫(stress) (Hsieh, Chen et al. 2003)。而同樣的長鏈不飽和脂肪酸接上甘油而形成三酸甘油酯(triacyl-glycerol, TG)，作為生物體脂肪貯存之方式(Yen, Stone et al. 2008)，可做為生物體內除了以肝醣之外的另一種能量來源。

幾種非必須(non-essential)但是卻非常重要的長鏈多元不飽和脂肪酸(long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs)，包括花生四烯酸(arachidonic acid, AA)，二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)及二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)，而生物體可將 $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 系列的亞麻油酸(linoleic acid, LA)及 α -次亞麻油酸(α -inolenic acid, ALA)藉由生物體內的去飽和酶及延長酶(elongation of long chain fatty acids, ELOVL)合成出，但因為人體內缺乏 Δ -12及 Δ -15去飽和酶(Hastings, Agaba et al. 2001)，因此沒有辦法直接合成出LA及ALA，必須依靠攝取食物作為來源。LC-PUFAs生合成過程是一連串複雜的蛋白交互作用，需要依靠細胞色素**b5**還原酶(cytochrome *b5* reductase, CYB5R) (Elahian, Sepehrizadeh et al. 2012)以進行氧化還原反應將輔酶NADH的電子傳遞至具有heme-binding domain的細胞色素**b5**蛋白(cytochrome *b5* protein)、而細胞色素**b5**蛋白則為細胞色素**b5**還原酶與去飽和酶之中間蛋白，在接受電子後再傳遞給去飽和酶(Guillou, D'Andrea et al. 2004)。細胞色素**b5**蛋白為為100個胺基酸組成之小型微粒體蛋白(mitosomal protein)，在其蛋白碳端具有30個胺基酸組成的穿膜區域(Ozols 1989; M.A. Smith 1998)，其分布在細胞內的高基氏體、質膜(plasma membrane)、粒線體的外膜及微粒體的膜上(D'Arrigo, Manera et al. 1993)。其功能為介於還原酶與去飽和酶之中間蛋白，將來自於還原酶之電子傳遞至去飽和酶以進行催化反應，包括脂肪酸去飽和作用及羥基化作用(hydroXylAtion) (Strittmatter, Spatz et al. 1974; M.A. Smith 1998)。而脂肪酸去飽和酶(fatty acids desaturase, FADS)及ELOVL則是直接針對LC-PUFAs進行催化反應的酵素(Qiu 2003; Chen, Luo et al. 2013)。


脂肪酸去飽和酶在細胞內並非只有單獨作用，除了會透過CYB5R傳遞電子進



行催化反應化，在細胞內還會與其他蛋白一起協同作用。例如：Man 等人於 2006 年以螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方式直接證明小鼠在三酸甘油酯生合成過程中，第一型硬脂醯基輔酶 A (Stearoyl-CoA-1, SCD-1)會與第二型雙醯基甘油醯基轉移酶(diglyceride acyltransferase-2, DGAT2)產生交互作用，而將去飽和後之脂肪酸接到雙醯基甘油(diacyl-glycerol)上進而產生三酸甘油酯(Man, Miyazaki et al. 2006)。

脂肪酸去飽和酶在去飽和化的反應過程中需要外源電子參與催化反應，而傳遞過程則需要 CYB5R 的協同作用。CYB5R 廣泛分布於細胞中，是一種 NADH 依賴型黃素還原酶(NADH-dependent flavin reductase)，所以 CYB5R 的電子來源需要仰賴輔酶 NADH 提供電子給 CYB5R (Iyanagi 1977)。CYB5R 除了參與脂肪酸去飽和作用，亦常見於粒線體電子傳遞鏈及肝臟微粒體細胞色素 P450 系統中 (Henderson, McLaughlin et al. 2013; Rodriguez-Bies, Navas et al. 2014)。CYB5R 分為膜結合型(membrane-bound form)與溶解型(soluble form)兩種形式，而其中膜結合型的 CYB5R 分子量較溶解型大，在蛋白序列上具有一小段約 3 kDa 的細胞膜附著區(membrane anchor region)及約 30 kDa 的親水性催化反應區(hydrophilic catalytic region)，而溶解型 CYB5R 則只具有親水性催化反應區(Passon and Hultquis.De 1972; Spatz and Strittmatter 1973)。

脂肪酸去飽和酶除了與這些蛋白協同作用外，在 LC-PUFAs 生合成途徑中也會與 ELOVL 共同作用。脂肪酸延長酶基因廣泛分布於各物種中，截至目前為止，生物體至少發現 7 種 ELOVL 蛋白，而這 7 種 ELOVL 蛋白皆具有多重穿膜結構 (Szafer-Glusman, Giansanti et al. 2008)，在生物體內亦具有反應物專一性及組織專一性表現之特異性(Ohno, Suto et al. 2010)。在 ELOVL 的蛋白序列上，除了有高疏水性胺基酸所組成的穿膜區域，亦具有 1 個 Histidine-rich motifs，而在蛋白質序列 C 端則具有內質網訊息胜肽(ER signal peptide) (Leonard, Pereira et al. 2004)。ELOVL 在脂肪酸生合成代謝途徑中扮演將脂肪酸延長的功能，每次添加兩個碳至羧酸根



上(Leonard, Pereira et al. 2004)。脂肪酸生合成過程中，先會在粒線體內透過脂肪酸合成酶(fatty acid synthase)作用而生合成至 16 個碳的長鏈脂肪酸(Stephens, Lee et al. 2007)，如果是在植物，則會生合成至 18 個碳的長鏈脂肪酸(Shintani and Ohlogge 1994; Gueguen, Macherel et al. 2000)。再透過去飽和酶的協同作用，將脂肪酸不飽和化，再透過脂肪酸延長酶將長鏈不飽和脂肪酸延伸並合成出必需脂肪酸(Leonard, Pereira et al. 2004)。在近期的研究中指出， $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 系列長鏈不飽和脂肪酸的延伸，分別是透過 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 來完成，而長鏈飽和脂肪酸及 $\omega 9$ 系列長鏈不飽和脂肪酸，則分別是透過 ELOVL1、ELOVL3 及 ELOVL6 來完成，而 ELOVL7 則可以接受飽和類、 $\omega 9$ 及 $\omega 6$ 系列不飽和脂肪酸(Ohno, Suto et al. 2010)。


在 FADS 與 ELOVL 對脂肪酸進行催化反應步驟中，首先 LA 和 ALA 要透過輔酶 A 接合酶(CoA-ligase)轉化為亞麻油醯基輔酶 A (linoleic acyl-CoA)及 α -次亞麻油醯基輔酶 A (α -linoleic acyl-CoA)，第二步則透過具有 Δ -6 催化活性的第二型脂肪酸去飽和酶(fatty acids desaturase-2, FADS2)催化 linoleic acyl-CoA 及 α -linoleic acyl-CoA，分別轉變成 γ -亞麻油酸 (γ -linolenic acid, GLA) 和十八碳四烯酸(octadecatetraenoic acid, OTA)。而在經過延長酶的作用後，可在脂肪酸的羧酸根上延長兩個碳而形成二十個碳的 $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 系列的 LC-PUFAs，而這些二十個碳的 LC-PUFAs 則可以藉由具有 Δ -5 催化活性的第一型脂肪酸去飽和酶(fatty acids desaturase-1, FADS1)催化而分別產生 AA 及 EPA(Leonard, Pereira et al. 2004; Castro, Monroig et al. 2012)。DHA 生合成則需要以 EPA 為反應物，延長兩個碳形成二十二個碳五烯酸(Docosapentaenoic Acid, DPA)的脂肪酸，而 DPA 合成 DHA 過程則會因物種不同而有所差異：在海洋藻類中具有 Δ -4 催化活性的去飽和酶會直接以 DPA 為反應物，將 DPA 去飽和化而產生 DHA (Tonon, Harvey et al. 2003; Shi, Yu et al. 2012)。絕大多數脊椎動物皆不具有 Δ -4 催化活性的去飽和酶，因此在 DHA 合成過程中會將 DPA 連續延長兩次，產成二十四個碳五烯酸(Tetracosapentaenoic acid,

THA)的脂肪酸，再透過 1 個具有 Δ -6 催化活性的去飽和酶進行作用後，再進行 β 氧化作用 (β -oxidation) 產生 DHA (Ferdinandusse, Denis et al. 2001; Qiu 2003; Bradbury 2011)。

斑馬魚的脂肪酸去飽和酶(zebrafish fatty acids desaturase, Z-FADS)為具有第三類型非血基質雙鐵中心的膜結合型脂肪酸去飽和酶。多數生物的脂肪酸去飽和酶皆為 2-3 個基因所組成之基因組，分別轉譯出 FADS1、FADS2 及 FADS3 蛋白(Castro, Monroig et al. 2012)。而在已經定序完成之斑馬魚基因組 DNA 中，則只有發現一個脂肪酸去飽和酶基因；同樣的，在另外一種淡水魚—吳郭魚(*Oreochromis niloticus*) 同樣也發現只具有一個脂肪酸去飽和酶基因，顯示這兩種魚類的脂肪酸去飽和酶為多功能性(Tanomman, Ketudat-Cairns et al. 2013)。


除了長碳鏈烯烴，膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族蛋白亦可接受其他不同類型之反應物，其中具有苯環類之化合物便是其中一例。較常見的苯環類化合物包括苯、甲苯、二甲苯、乙苯及苯乙烯等等，這些苯環類化合物主要來自於石油化學工業、農藥工業、電子工業、紡織工業、造紙工業、化妝品與製藥工業等等(Norbert 1995)。苯環類化合物之所以很難被分解，主要原因為具有穩定的環狀結構，所以會長期存在我們的環境中，除非有開環酵素或其他外力參與作用，才能將其變成直鏈狀結構。目前對於能分解苯環類之微生物的相關研究中發現，假單孢菌屬有不少菌種可以利用自己身體內的酵素，代謝具有苯環結構之化合物作為碳源(Yen and Gunsalus 1985; Suen and Gibson 1993; Buhler, Schmid et al. 2000)。這些參與苯環化合物代謝的酵素可區分為兩類：一類為 aromatic ring-hydroXylating dioxygenase；另一類為 aromatic ring-cleavage dioxygenase (Harayama and Rejik 1989; Harayama, Kok et al. 1992)。

而以酵素進行加氧化作用則是屬於 aromatic ring-hydroXylating dioxygenase 系統。這類型蛋白最早是由 *Pseudomonas putida* F1 中所分離出來，所有的 aromatic ring-hydroXylating dioxygenase 都是屬於多重單體酵素系統(multicomponent



enzyme system)，表示是由至少兩至三個蛋白質單體(protein component)所組成的，但是在各個單體的組成上有相當大的差異(Butler and Mason 1997)。Butler 與 Mason 將其分成三大類：第一類為同時具有還原酶與 ferredoxin 功能區之蛋白，蛋白本體攜帶有 FAD 或是黃素單核苷酸(Flavin mononucleotide, FMN)及鐵硫簇區域，亦即同時具有兩個氧化還原反應中心，此類型蛋白系統在進行催化反應時，只會有兩個蛋白形成複合體，電子傳遞直接自輔酶 NADH 傳遞至還原酶的 FAD 區域，再傳遞至 ferredoxin 功能區，而再傳遞至酵素本體，代表蛋白包括進行雙加氧化的鹵代苯 1,2-雙加氧酶(2-halobenzoate 1,2-dioxygenase)催化系統(Fetzner, Muller et al. 1992; Butler and Mason 1997)。第二類為還原酶與 ferredoxin 分開，此類型系統之還原酶皆具有 FAD 氧化還原中心，此類蛋白在進行催化反應時，需要三個蛋白質形成複合體，需要還原酶將輔酶 NADH 的電子傳遞給具有 ferredoxin 功能之蛋白，再傳遞給酵素本體進行催化反應，代表蛋白包括進行雙加氧作用的甲苯 2,3-雙加氧酶(Toluene 2,3-dioxygenase) (Butler and Mason 1997; Lee, Friemann et al. 2005)。第三類則較為特殊，這類型蛋白的還原酶與第一型相同，同時具有 FAD 及 ferredoxin 功能區兩個氧化還原中心，但是在傳遞電子給酵素本體時，還會再需要一個具有 ferredoxin 功能之蛋白介於酵素本體與還原酶中間，亦即電子在傳遞過程中，還原酶會先將電子由輔酶 NADH 傳遞至 FAD 再傳遞至 ferredoxin 功能區—還原酶自己攜帶有的第二的氧化還原中心，而後電子會再傳遞給具有 ferredoxin 功能之蛋白，再傳遞給酵素本體，此類系統具有三個氧化還原中心，此催化系統之蛋白目前只有萘雙加氧酶(naphthalene dioxygenase)被發現(Butler and Mason 1997; Malik, Allen et al. 2002)。

二甲苯單加氧酶(xylene monooxygenase)為假單孢菌(*Pseudomonas putida* mt-2)代謝甲苯或二甲苯而進行開環步驟的第一個酵素(Buhler, Schmid et al. 2000)。xylene monooxygenase 為 3 種直接以甲苯及二甲苯為反應物之相關酵素(Toluene-4-monooxygenase, Toluene 2, -dioxygenase 及 xylene monooxygenase)的其中 1 種



(Zylstra 1994; Nolan and O'Connor 2008)，同時也是這 3 種之中唯一的膜蛋白，根據序列比對具有膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族所特有的組胺酸盒子(histidine box)，而這三個盒子具有之 8 個高保守組胺酸會螯合鐵形成第三類非血基質雙鐵中心(Shanklin, Whittle et al. 1994; Broadwater, Haas et al. 1998)。

Xylene monooxygenase 為 TOL 質體所轉譯出之甲苯或二甲苯代謝相關蛋白，同時也是甲苯或二甲苯開環步驟的第一個酵素，整個 xylene monooxygenase 在進行催化反應過程中，與其他膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族相同，需要電子共同參與其中。在催化過程中是以複合體形式存在，需要透過 xylene monooxygenase 的還原酶(xylene monooxygenase electron transfer component, XylA)。

Shaw 與 Harayama 在 1992 年首次針對 XylA 進行純化與分析發現，純化後的 XylA 直接進行紫外—可見分光光度法(Ultraviolet - visible spectroscopy, UV-Vis)，發現具有在 458 nm 與 372 nm 有明顯吸收波峰，顯示具 FAD 結合位。再以汞撒利酸(mersalyl acid)處理 XylA 後，發現在 336, 400 and 480 nm 具有三個吸收波峰，與甲烷菌(*Methylococcus cupsulutus* Bath)具有 2Fe-2S 氧化還原中心之吸收波峰 340, 420 and 480 nm 相近(Colby and Dalton 1978)，顯示 XylA 為具有 2Fe-2S 之氧化還原中心。純化後的 XylA 在添加 NADH 進行反應時，在 390 nm 及 460 nm 處有明顯的吸收光譜變化，表示 XylA 在反應時會消耗府酶 NADH，顯示此蛋白為輔酶 NADH 依賴型(Shaw and Harayama 1992)。而依照此結果顯示，xylene monooxygenase 在進行催化反應時，在 Butler 與 Mason 的分類系統中為第一類型催化反應系統其還原酶同時具有 FAD 與 ferredoxin 兩個氧化還原反應中心。

XylA 與斑馬魚 CYB5R 相同，均為輔酶 NADH 依賴型黃素還原酶，在蛋白質序列分析上，XylA 蛋白在 N 端具有 ferredoxin 區域，而於蛋白質 C 端區域為具有 FAD 還原酶活性之區域(Suzuki, Hayakawa et al. 1991)。XylA 與斑馬魚 CYB5R 不同的是，XylA 為溶解型氧化還原酶，且專一對 xylene monooxygenase 提供電子；而斑馬魚 CYB5R 則具有四型，根據序列分析有溶解型與為膜結合型(Chen, Luo et

al. 2013)。此外 XylA 同時具有兩個氧化還原中心，分別為 ferredoxin 及 FAD，也與斑馬魚 CYB5R 只具有 FAD 單一氧化還原反應部位明顯不同。

Xylene monooxygenase 對反應物進行催化反應之部位(xylene monooxygenase catalytic component, XylM)與斑馬魚 Z-FADS 相同，皆為具有第三類非血基質雙鐵中心的膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族蛋白(Austin, Buzzi et al. 2003)，但與斑馬魚 Z-FADS 不同的是，XylM 接受之反應物為甲苯或二甲苯，且催化反應作用為針對 C-H 鍵進行單加氧作用(Buhler, Schmid et al. 2000)，而並非對 C-C 進行去飽和作用。而屬於同類型且常被一起提出討論的為烷烴羥化酶(alkane hydroxylase, AlkB)，AlkB 同樣為具有組胺酸盒子螯合鐵形成之第三類非血基質雙鐵中心(Shanklin, Whittle et al. 1994)，但其催化反應物為飽和烷烴類化合物與 XylM 及斑馬魚 Z-FADS 不同。

這類具備碳氫化合物催化活性的金屬單加氧蛋白，是藉由還原性金屬活化中心經過空氣中的氧分子鍵結後，產生具備活性的氧化中間複體，可以促使烷烴化合物之碳氫鍵活化以生成醇類，或將芳香族類或烯烴類化合物內之不飽和鍵進行環氧醚類加成或加氧活化的氧化過程(Gerdemann, Eicken et al. 2002; Kovaleva, Neibergall et al. 2007; Sakurai and Kataoka 2007; Bugg and Ramaswamy 2008)。烷烴化合物通常具備高的鍵能，尤其是不具支鏈 (branched chain) 的烷類化合物(98-104 kcal/mol)，目前以傳統的化學方法，仍難實際有效率地從事具普遍性且高選擇性的碳氫鍵活化或官能基化的轉化過程(Maji, Lee et al. 2012)。

本實驗著重於金屬酵素的催化反應模式，特別是具有非血基質雙鐵反應中心的膜結合型去飽和酶超級家族蛋白，以真核生物的斑馬魚去飽和酶為主，探討斑馬魚去飽和酶在催化反應過程中，如何利用長鏈不飽和脂肪酸為反應物，而同時並以螢光共振能量轉移之方式探討其電子傳遞過程需要那些還原酶參與其中？而同時亦使用同樣方式分析斑馬魚內另一種會使用長鏈不飽和脂肪酸為反應物之蛋白—脂肪酸延長酶，證明斑馬魚在進行催化反應時，需要還原酶與脂肪酸延長酶一起協

同作用。以氣相層析圖譜分析長鏈不飽和脂肪酸生合成量，同時證明斑馬魚去飽和酶對長鏈不飽和脂肪酸的催化反應及其生合成反應的作用途徑。

由於膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族蛋白如何對反應物進行催化的相關研究非常少，再加上至今世界上仍未有任何此家族蛋白的立體結構被解析出，因此在現階段之研究只能夠透過 X 光吸收光譜或電化學分析其反應中心的金屬配位，透過定點突變方式了解催化反應中，反應口袋與反應物之交互作用。目前本實驗室利用等同性官能基(Bioisostere)的概念發展以氟取代氫形成之氟化物作為酵素催化之反應物，並以此分析具有雙鐵反應中心之蛋白(包括甲烷單加氧酶(methane monooxygenase)、細胞色素 P450 BM3(cytochrome P450 BM3, CYP102A1)及 AlkB)的反應口袋，可證明反應物與反應口袋的交互作用及如何影響反應口袋的催化反應效率，同時透過氟化物提高反應後之產物專一性(Ramu, Chang et al. 2011; Chiang, Ramu et al. 2013; Chen, Luo et al. 2014)。

本實驗利用具有多功能性之斑馬魚 Z-FADS 蛋白進一步了解酵素催化反應過程，以脂肪酸去飽和酶對脂肪酸之催化反應為模式，分析與探討具有第三類型非血基質雙鐵中心的膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族蛋白，如何對長碳鏈之烯烴進行催化反應。但由於真核生物膜蛋白在表現與純化上有其難度，因此選用同類型之原核生物蛋白為模式，以免疫共沉澱及免疫金標誌分析證明在催化反應過程中，還原酶如何與酵素形成複合體並提供電子以催化反應，同時以定點突變的方式探討膜結合型去飽和酶的反應口袋與反應物如何進行交互作用，模擬並推測此類型蛋白的催化反應方式。



第二章、材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 實驗物種：斑馬魚 (Zebrafish, *Danio rerio*)

2.1.2 實驗細胞：海拉細胞 (HeLa cells)

2.1.3 實驗菌種

1. *Escherichia coli* DH-5 α
2. *Escherichia coli* XL-10 Gold
3. *Escherichia coli* BL-21(DE3)
4. *Escherichia coli* BL-21(DE3) pLysS
5. *Pseudomonas putida* mt-2

2.1.4 質體 DNA

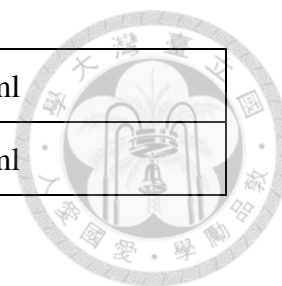
1. pACYC-Duet-1
2. pEGFP-N1
3. pEGFP-C1
4. pDsRed monomer-C1
5. pcDNA3CF

2.1.5 實驗溶液

10 \times Genomic DNA Extraction Buffer (100 ml)

1 M Tris-HCl (pH=8.0)	10 ml
0.5 M EDTA (pH=8.0)	2 ml

5 M NaCl	20 ml
ddH ₂ O	78 ml



1× Genomic DNA Extraction Buffer (20 ml)

10X Genomic DNA Extraction Buffer	2 ml
SDS 10%	0.4 ml
Proteinase K 10 mg/ml	0.8 ml
ddH ₂ O	16.8 ml

5X SDS sample buffer

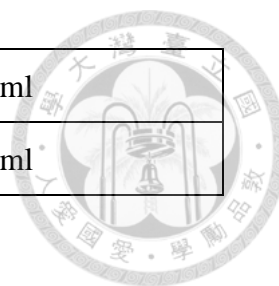
0.5 M Tris, pH 6.8	5 ml
50% Glycerol	8 ml
10% SDS	8 ml
ddH ₂ O	16 ml
使用前添加 2 ml 2-Mercaptoethanol	

Coomassie Brilliant Blue Stain Buffer (CBR stain buffer)

Coomassie Brilliant Blue R-250	2 g
Methanol	90 ml
Acetic acid	14 ml
ddH ₂ O	96 ml

Coomassie Brilliant Blue De-Stain Buffer (CBR de-stain buffer)

Methanol	500 ml
----------	--------



Acetic acid	100 ml
ddH ₂ O	400 ml

0.1% TBST

Tris-base	2.42 g
Sodium chloride	8.77 g
ddH ₂ O	加至 800 ml
以 HCl 調整 pH 值至 7.4，加入 1 ml Tween-20，並以 ddH ₂ O 補至 1,000 ml	

Blocking buffer (5% skim milk)

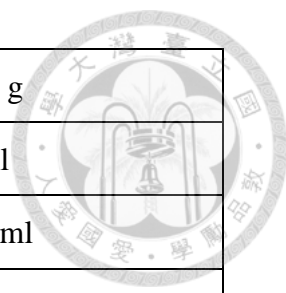
脫脂奶粉	2.5 g
0.1% TBST	加至 50 ml

Cell lysis buffer

1 M Tris-HCl pH 7.4	6.25 ml
Sodium Chloride	4.383 g
Glycerol	50 ml
n-Dodecyl β -D-maltoside (DDM)	0.5 g
Sodium ascorbate	1 g
ddH ₂ O	加至 500 ml
使用時添加 chicken egg Lysozyme 至終濃度為 300 ng/ml	

NKM buffer

1 M Tris-HCl pH7.4	1 ml
--------------------	------



Sodium Chloride	7.61 g
1 M Potassium chloride solution	5 ml
1 M Magnesium chloride solution	7.5 ml
ddH ₂ O	加至 1,000 ml

Homogenization buffer

1 M Tris-HCl pH 6.7	10 ml
1 M Potassium chloride solution	10 ml
1 M Magnesium chloride solution	0.15 ml
DTT (1M)	1 ml
ddH ₂ O	加至 1,000 ml
使用前添加 PMSF (終濃度為 1 mM/ml)、aprotinin (終濃度為 5 µg/ml)、leupeptin (終濃度為 30 µg/ml)及 benzamidine hydrochloride (終濃度為 10 µg/ml)。	

Mitochondrial suspension buffer

1 M Tris-HCl pH 6.7	10 ml
Magnesium chloride solution (1 M)	0.15 ml
Sucrose	85.57 g
DTT (1M)	1 ml
ddH ₂ O	加至 1,000 ml
使用前添加 PMSF (終濃度為 1 mM/ml)、aprotinin (終濃度為 5 µg/ml)、leupeptin (終濃度為 30 µg/ml)及 benzamidine hydrochloride (終濃度為 10 µg/ml)。	

2.1.6 實驗生物與培養

假單孢菌 (*pseudomonas putida mt-2*, ATCC 33015)為購買自美國模式菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)，培養溫度為 30°C，培養液為 ATCC 1271 benzonate/ sodium benzonate medium。斑馬魚 (*Danio rerio*, AB Strains)為台灣斑馬魚中心—中央研究院分站 (Taiwan Zebrafish Core Facility at Academia Sinica, TZCAS)提供，培養環境為循環水流過濾，並培養於 28°C。魚卵採集為上午 10 點 20 分，魚卵發育環境為 28°C 恆溫培養箱，發育期之培養液為 Hank's medium。



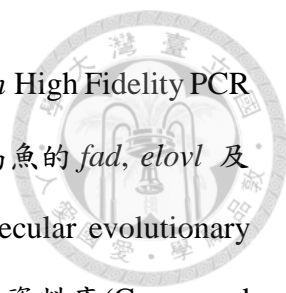


2.2 實驗方法：真核生物

2.2.1 斑馬魚總體 RNA (Total RNA) 萃取與互補 DNA (complementary DNA, cDNA) 合成

將剛孵化之斑馬魚幼魚放置於 1.5 ml 微量離心管中，並加入 0.5 ml TRIzol® Reagent (Life Technologies)，以小型研磨棒將魚體壓於微量離心管底部並旋轉至魚體破碎為止。加入 0.1 ml 氯仿大力搖晃混合至液體呈現乳白色，靜置室溫下 3 分鐘後，於 4°C 下以 12,000 xg 離心 15 分鐘，取出上清液倒至新的微量離心管中，再加入等體積的氯仿並大力搖晃混合均勻，再於 4°C 下以 12,000 xg 離心 15 分鐘，重複此步驟直到水層與有機層界面的雜質消失為止。取出上清液倒至新的微量離心管，加入等體積的異丙醇並且緩慢的混合均勻再將微量離心管冰存於 -80°C 2 小時，於 4°C 下以 12,000 xg 離心 15 分鐘後，加入 1 ml 事先使用 DEPC-treated water 稀釋成 75% 的酒精，緩慢將沉澱於微量離心管底部之 RNA 沖洗至懸浮，再以 12,000 xg 於 4°C 離心 5 分鐘，將上清液去除乾淨後，倒置微量離心管風乾 3 分鐘，以 0.1 ml DEPC-treated water 回溶 RNA，以核酸微量定量儀 (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific) 測定濃度與純度。cDNA 合成使用 SMART™ MMLV Reverse Transcriptase (Clontech)，取 1 µg total RNA 與 1 µl Oligo(dT)12-18 Primer (18418-012, Life Technologies) 混合後，加入 DEPC-treated water 至總體積 11.5 µl 並混合均勻，置於 70°C 加熱 3 分鐘後立刻放置於冰上並依序加入 4 µl 5X First-Strand Buffer、2 µl dNTP Mix、2 µl 100 mM DTT 及 0.5 µl SMART MMLV RT enzyme，於 42°C 作用 75 分鐘以合成第一股 cDNA，反應完成後，將微量離心管放置於 70°C 15 分鐘終止反應。

2.2.2 斑馬魚脂肪酸去飽和酶、延長酶及細胞色素 b5 還原酶 (CYB5R) 等基因選殖、序列分析與質體構築



進行基因選殖時，以斑馬魚 cDNA 為模板，使用 *amfiFusion* High Fidelity PCR Master Mix (GenDEPOT) 以專一性引子對(表一) PCR 方式將斑馬魚的 *fad*, *elovl* 及 *cyb5r* 基因片段增幅出，將序列以分子演化遺傳分析軟體 (Molecular evolutionary genetics analysis, MEGA, ver 5.0) 分析序列相似性，以保守區域資料庫 (Conserved Domains Database, CDD, National Center for Biotechnology Information) 分析蛋白功能區域，以 TMHMM 分析蛋白質序列穿膜區域。分別選擇各個基因所設計相對應的限制酶進行切割，再將基因片段分別接入 pEGFP-N1、pEGFP-C1、pDsRed-monomer-C1 及 pcDNA3CF 等質體，分別命名為 pEGFP-N1-Z-FADS、pEGFP-C1-Z-FADS、pCDNA3CF-Z-FADS、pDsRed-monomer-C1-ELOVL2、pCDNA3CF-ELOVL2、pDsRed-monomer-C1-ELOVL4、pCDNA3CF-ELOVL4、pDsRed-monomer-C1-ELOVL5、pCDNA3CF-ELOVL5、pDsRed-monomer-C1-ELOVL7、pCDNA3CF-ELOVL7、pDsRed-monomer-C1-CYB5R1、pDsRed-monomer-C1-CYB5R2 及 pDsRed-monomer-C1-CYB5R3 等共計 14 種重組真核生物表現質體，並將重組質體送定序確認核苷酸序列正確性。14 種重組真核表現質體共區分為三大類，分別為：(1) 表現綠色螢光的 pEGFP-N1-Z-FADS 及 pEGFP-C1-Z-FADS 質體，可分別表現出帶有綠色螢光的 Z-FADS-EGFP 及 EGFP-Z-FADS 兩種融合蛋白；(2) 表現紅色螢光的 pDsRed-monomer-C1-ELOVL2、pDsRed-monomer-C1-ELOVL4、pDsRed-monomer-C1-ELOVL5、pDsRed-monomer-C1-ELOVL7、pDsRed-monomer-C1-CYB5R1、pDsRed-monomer-C1-CYB5R2 及 pDsRed-monomer-C1-CYB5R3 等質體，可分別表現出在標的蛋白 N 端接上紅螢光蛋白的 DsRed-ELOVL2、DsRed-ELOVL4、DsRed-ELOVL5、DsRed-ELOVL7、DsRed-CYB5R1、DsRed-CYB5R2 及 DsRed-CYB5R3 等融合蛋白；(3) 表現 FLAG (DYKDDDDK) 胜肽片段的 pCDNA3CF-Z-FADS、pCDNA3CF-ELOVL2、pCDNA3CF-ELOVL4、pCDNA3CF-ELOVL5 及 pCDNA3CF-ELOVL7 等質體，可分別表現出在標的蛋白 C 端具有 FLAG 的融合蛋白：Z-FADS-FLAG、ELOVL2-FLAG、ELOVL4-FLAG、ELOVL5-FLAG 及 ELOVL7-FLAG。

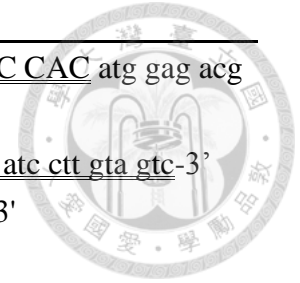


此外，分別設計出針對 *elovl* 基因的引子對，並在正向引子前端加上 5'- ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC-3' 序列，使其在蛋白表現時會於 N 端接上 MHHHHHH 胜肽片段，而反向引子則設計為四種 *elovl* 基因共用之引子(帶有 Not I 切位與 stop codon)(表一)：5'-ATAAGAAT GCGGCCGC cta ttt gtc atc gtc atc ctt gta gtc-3'，可產生出在標的蛋白 C 端接上 DYKDDDDK 胜肽片段。分別以 pcDNA3CF-ELOVL2、pcDNA3CF-ELOVL4、pcDNA3CF-ELOVL5 及 pcDNA3CF-ELOVL7 為模板，將 PCR 增幅出之片段以相對應之限制酶作用(*elovl4*、5 及 7 為 *EcoR* I 與 *Not* I；*elovl2* 為 *Hind*III 與 *Not* I)。將 pEGFP-N1 分別以 *EcoR* I 與 *Not* I 及 *Hind*III 與 *Not* I 作用完後，可將 EGFP 基因自質體上去除，並將 *elovl2*、4、5 及 7 接回去，完成的表現質體命名為 pHis-ELOVL2-FLAG、pHis-ELOVL4-FLAG、pHis-ELOVL5-FLAG 及 pHis-ELOVL-FLAG，共計四種改造的表現質體。將這些質體送入細胞中進行後續實驗分析。



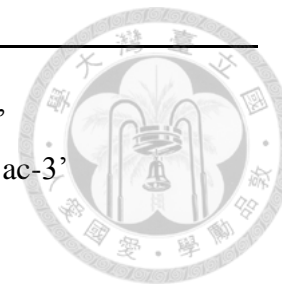
表一、斑馬魚 *fads*、*elovl* 及 *cyb5r* 基因之 PCR 引子對與 PCR 片段之相對應質體，英文字母下方線條代表限制酶切位，雙重下方線條表示為額外增加之序列。

Transcript (Accession No.)	Construct	Primer name	Primer sequence
Z-FADS (NM_131645.2)	pEGFP-N1-FADS,	Z-FADS-F-EcoRI	5'-CCGGAATT <u>CG</u> atg ggt ggc gga gga cag ca-3'
	pEGFP-C1-FADS	Z-FADS-R-KpnI	5'-CGGGGTACCAA ttt gtt gag ata cgc atc cag cca gag-3'
	pcDNA3CF-FADS	Z-FADS-F-EcoRI	5'-CCGGAATT <u>CG</u> atg ggt ggc gga gga cag ca-3'
		Z-FADS-R-XhoI	5'-CCGCTC <u>GAG</u> ttt gtt gag ata cgc atc cag cca gag-3'
ELOVL 2 (NM_001040362.1)	pDsRed monomer C1-ELOVL2	Z-ELOVL2-F-HindIII	5'-CCCAAGCTT <u>CG</u> atg gaa tca tat gaa aaa att gat aag c-3'
	pcDNA3CF-ELOVL2	Z-ELOVL2-R-BamHI	5'-CGGGAT <u>CC</u> ctg tag ctt ctg ttt gga gtt gg-3'
		Z-ELOVL2-F-BamHI	5'-CGGGAT <u>CC</u> atg gaa tca tat gaa aaa att gat aag c-3'
		Z-ELOVL2-R-XhoI	5'-CCGCTC <u>GAG</u> ctg tag ctt ctg ttt gga gtt gg-3'
	pHis-ELOVL2-FLAG	ELOVL2-F-His- HindIII	5'-CCCAAGCTT <u>ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC</u> atg gaa tca tat gaa aaa att gat aag-3'
		FLAG-Stop NotI	5'-ATAAGAATGCGGCCGC <u>cta ttt gtc atc gtc atc ctt gta gtc</u> -3'
ELOVL 4 (BC060897.1)	pDsRed monomer C1- ELOVL4	Z-ELOVL4-F-EcoRI	5'-GGAATT <u>CG</u> atg gag acg gtc gtt cac-3'
	pcDNA3CF-ELOVL4	Z-ELOVL4-R-BamHI	5'-CGGGAT <u>CC</u> atc gtg ctt tcc ttt tcc ttt c-3'
		Z-ELOVL4-F-EcoRI	5'-GGAATT <u>CG</u> atg gag acg gtc gtt cac-3'
		Z-ELOVL4-R-XhoI	5'-CCGCTC <u>GAG</u> atc gtg ctt tcc ttt tcc ttt c-3'



ELOVL 5 (NM_200453.1)	pHis-ELOVL4-FLAG	Z-ELOVL4-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTC</u> <u>ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC</u> atg gag acg gtc gtt cac-3'
		FLAG-Stop NotI	5'-ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> <u>cta ttt gtc atc gtc atc ctt gta gtc</u> -3'
	pDsRed monomer C1- ELOVL5	Z-ELOVL5-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTCG</u> atg gag acg ttt agt cac aga gtc-3'
	pcDNA3CF-ELOVL5	Z-ELOVL5-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTCG</u> atg gag acg ttt agt cac aga gtc-3'
		Z-ELOVL5-R-XhoI	5'- <u>CCGCTCGAG</u> atc tgc tgc tgc ttt tct gtg-3'
	pHis-ELOVL5-FLAG	Z-ELOVL5-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTC</u> <u>ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC</u> atg gag acg ttt agt cac-3'
ELOVL 7 (BC155281.1)		FLAG-Stop NotI	5'-ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> <u>cta ttt gtc atc gtc atc ctt gta gtc</u> -3'
	pDsRed monomer C1- ELOVL7	Z-ELOVL7-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTCG</u> atg gct ttc caa gag ttt aca tc-3'
		Z-ELOVL7-R-BamHI	5'- <u>CGGGATCC</u> ctc ttt ctt atg gtg tat gtc att g-3'
	pcDNA3CF-ELOVL7	Z-ELOVL7-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTCG</u> atg gct ttc caa gag ttt aca tc-3'
		Z-ELOVL7-R-XhoI	5'- <u>CCGCTCGAG</u> ctc ttt ctt atg gtg tat gtc att g-3'
	pHis-ELOVL7-FLAG	Z-ELOVL7-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTC</u> <u>ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC</u> atg gct ttc caa gag ttt ac-3'
CYB5R1 (NM_200189.2)		FLAG-Stop NotI	5'-ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> <u>cta ttt gtc atc gtc atc ctt gta gtc</u> -3'
	pDsRed monomer C1- CYB5R1	Z-CYB5R1-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTCG</u> atg agc tac gcg atg tcc-3'
CYB5R2		Z-CYB5R1-R-BamHI	5'- <u>CGGGATCC</u> ata ggc gaa gcg ctg gc-3'
	pDsRed monomer C1-	Z-CYB5R2-F-EcoRI	5'- <u>GGAATTCG</u> atg gac att cta aca gca cct g-3'

(NM_001045360.1)	CYB5R2		
		Z-CYB5R2-R-BamHI	5'- <u>CGGGATCC</u> gta tgc gaa aat gtt ttc ttt ttt g-3'
CYB5R3	pDsRed monomer C1-	Z-CYB5R3-F-EcoRI	5'-GCGG <u>AATTCG</u> atg tet ttc atc ttt aac ctc atc ac-3'
(NM_212685.1)	CYB5R3		
		Z-CYB5R3-R-KpnI	5'-CGGG <u>TACC</u> gaa cat gaa gcg cct gtc-3'





2.2.3 細胞轉染 (Transfection) 與免疫螢光染色分析 (Immunofluorescence cytochemistry, IFC)

將帶有 CYB5R、ELOVL 及 Z-FADS 基因的質體以 Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) 將質體送入 HeLa 細胞中。將實驗組區分為兩組，分別為 pEGFP-N1-Z-FADS 與 pEGFP-C1-Z-FADS，每組均與 pDsRed-monomer-C1-ELOVL2、pDsRed-monomer-C1-ELOVL4、pDsRed-monomer-C1-ELOVL5、pDsRed-monomer-C1-ELOVL7、pDsRed-monomer-C1-CYB5R1、pDsRed-monomer-C1-CYB5R2、pDsRed-monomer-C1-CYB5R3、pcDNA3CF-Z-FADS、pcDNA3CF-ELOVL2、pcDNA3CF-ELOVL4、pcDNA3CF-ELOVL5 及 pcDNA3CF-ELOVL7 等質體以兩兩為一個實驗組進行 co-transfection。兩個質體分別取 0.4 µg plasmid DNA 與 50 µl 不含胎牛血清 (FBS) 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)，而 Lipofectamine® 2000 取 2 µl 稀釋至 50 µl 不含 FBS 之 DMEM，於室溫下靜置 20 分鐘後，再混合均勻置於室溫 5 分鐘後，加入事先已培養 HeLa 細胞之 4-well 玻片 (Millipore, 每孔面積為 2cm²)，於 18 小時後將 DMEM 吸乾，每個 well 加入 0.5 ml PBS 沖洗乾淨，並重複此步驟 3 次將 DMEM 完全清洗乾淨，準備進行 IFC 及封片。在每個 well 加入 0.5 ml 帶有 4% paraformaldehyde 的 PBS 固定 30 分鐘後，以 PBS 沖洗乾淨，再將 pEGFP-N1、pEGFP-C1 及 pDsRed-monomer-C1 的實驗組直接以指甲油進行封片；而 pEGFP-N1、pEGFP-C1 及 pcDNA3CF 的實驗組則進行 IFC。在每個 well 加入 0.5 ml 帶有 0.25% Triton X-100 的 PBS 靜置室溫 15 分鐘進行穿透作用後，加入 0.5 ml PBS 靜置 5 分鐘並重複 3 次將 well 洗乾淨。以事先配製好帶有 10% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 PBS，在每個 well 加入 0.5 ml 與 37°C 作用 30 分鐘以進行封阻作用 (blocking)，blocking 完成後以 PBS 清洗乾淨，將 Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody (F3165, Sigma) 以 1:500 比例稀釋於 3% BSA/PBS 溶液中，並在每個 well 加入 0.2 ml 於 37°C 作用 2 小時。以 PBS 清洗乾淨後，加入 0.2 ml 事先配製好以 1:1,000 稀釋倍率 Rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG


antibody (Millipore, AP124R)於 3% BSA/PBS 中，於 37°C 作用 1 小時。以 PBS 清洗乾淨後，加入 0.5 ml 以 PBS 稀釋一萬倍的 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen)，進行細胞核染色。將染色完成的細胞玻片，以指甲油封片。

將 pcDNA3CF-ELOVL2、pcDNA3CF-ELOVL4、pcDNA3CF-ELOVL5 及 pcDNA3CF-ELOVL7 等重組質體以 lipofectamine 2000 分別轉染培養好細胞之 10 cm 培養皿中，轉染後 18 小時將細胞以冰冷的 PBS 沖洗三次，再以細胞刮棒將細胞刮離培養皿。以 2,300 xg 於 4°C 離心 5 分鐘後，再以 1 ml 冰冷的 PBS 重新懸浮細胞，並重複此步驟三次。將細胞以 50 µl sample buffer 重新懸浮，以 4%~20% SDS-PAGE 分析，以 15 mA 電流進行電泳。電泳完成之膠片以 300 mA 兩小時轉漬至 PVDF 膜上，再以抗體 Monoclonal ANTI-FLAG® M2-Alkaline Phosphatase antibody (A9469, Sigma)進行西方墨點分析，確認 ELOVLs 表現情形。

將 pHis-ELOVLs-FLAG 質體以 Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) 轉染至 HeLa 細胞中，於 18 小時後以 PBS 將 DMEM 清洗乾淨後，依序以 4% paraformaldehyde/PBS 固定細胞，以 0.25% Triton-X-100 進行 permeation 處理，再以 10% BSA/PBS 於 37°C 進行 blocking 30 分鐘。分別將 rabbit anti-6xHis Tag (LTK BioLaboratories) 及 Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody (F3165, Sigma)同時以 1:500 比例稀釋於 3% BSA/PBS 溶液中，並在每個 well 加入 0.2 ml 於 37°C 作用 2 小時。以 PBS 清洗乾淨後，在每個 well 中加入 0.2 ml 以 3% BSA/PBS 稀釋 1,000 倍的 goat F(ab')₂ anti-rabbit IgG tetramethyl rhodamine isothiocyanate (Rhodamine TRITC) (Leinco technologies Inc., R124) 及 FITC AffiniPure goat anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-095-003)抗體，於 37°C 作用 1 小時。以 PBS 清洗乾淨後，加入 0.5 ml 以 PBS 稀釋一萬倍的 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen)，進行細胞核染色。將染色完成的細胞玻片，以指甲油封片。

2.2.4 螢光共振能量轉移 (Fluorescence resonance energy transfer,

FRET)及 ELOVLs 穿膜構造分析



將已封片完成的玻片，以螢光顯微鏡觀測螢光表現並拍照紀錄。將玻片轉移至共軛焦螢光顯微鏡 (Confocal Fluorescence Microscope, Leica, TCS-SP5-AOBS)。共軛焦螢光顯微鏡螢光接收器採用兩個獨立式的 HyD3 接受器，分別獨立接收綠色螢光與紅色螢光，避免干擾偵測，而 FRET 偵測採用受體漂白的方式(acceptor bleaching)進行操作。綠色螢光(Donor) 激發(excitation) 波長及接收(emission) 波長分別為 488 nm 及 507 nm (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) ；495 nm 及 519 nm (Fluorescein isothiocyanate, FITC)，紅色螢光激發(excitation) 波長及接收(emission) 波長分別為 547 nm 及 572 nm (Rhodamine TRITC) ；557 nm 及 592 nm (DsRed-monomer 蛋白)。受體漂白方式主要為用 100% 雷射能量將受體螢光基團(acceptor fluorophore)完全破壞後，再去偵測提供者螢光基團(donor fluorophore)在受體漂白後的變化量。

在 EGFP-Z-FADFS、Z-FADS-EGFP 及 DsRed monomer-ELOVLs 或-CYB5Rs 的實驗組中，將欲偵測 FRET 的區域以標線畫出範圍，利用 557 nm 可激發紅色螢光基團的波長，以 100% 雷射能量將範圍內的 DsRed 蛋白完全破壞，使其失去紅色螢光，再以 HyD3 接收器偵測受體漂白後 EGFP emission 的變化量，藉由數值判斷 Z-FADS 的 N 端與 C 端是否有與 ELOVL 及 CYB5R 的 N 端發生能量轉移。在 EGFP-Z-FADFS、Z-FADS-EGFP 及 ELOVLs-Rhodamine 的實驗組中，則以 100% 雷射能量的 547 nm 波長將 Rhodamine 的螢光基團完全破壞，以 HyD3 接收器偵測受體漂白後 EGFP emission 的變化量，藉由數值判斷 Z-FADS 的 N 端與 C 端是否有與 ELOVL 的 C 端發生能量轉移。而在 His-ELOVLs-FLAG 蛋白的實驗組中，以 100% 雷射能量的 547 nm 波長將 Rhodamine 的螢光基團完全破壞，以 HyD3 接收器偵測受體漂白後 FITC emission 的變化量，藉由數值判斷 ELOVL 的 N 端與 C 端是否有彼此發生能量轉移，以此判斷其穿膜構造。

FRET 效率 (efficiency, E) 計算需要先測量受體漂白前的綠色螢光數值

(Donor_{pre})及受體漂白後的綠色螢光數值(Donor_{post}):在標線框出的範圍內,由HyD3接收器所接收到 Donor_{pre} 及 Donor_{post} 數據依照公式可計算出 FRET 的效率,由已知兩個螢光基團配對的 R₀ 數值,再利用公式計算出兩螢光基團的真實距離:

$$E = (\text{Donor}_{\text{post}} - \text{Donor}_{\text{pre}}) / \text{Donor}_{\text{post}}$$

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

E 為 FRET 效率, R₀ 為兩螢光基團發生 50% 能量轉移的距離, r 為兩螢光基團彼此的真實距離。

2.2.5 Z-FADS 在 HeLa 細胞內的表現與定位分析 (Subcellular localization)

將質體 pEGFP-N1-Z-FADS 及 pEGFP-C1-Z-FADS 以 lipofectamine 2000 分別轉染至 HeLa 細胞中,藉此觀察 Z-FADS 在細胞內不同胞器內的分佈與表現。在轉染後 18 小時,選擇可辨認內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 與粒線體 (mitochondria) 的特定抗體,進行 IFC 的步驟。依序以 4% paraformaldehyde/PBS 固定細胞,以 0.25% Triton-X-100 進行 permeation,再以 10% BSA/PBS 於 37°C 進行 blocking 30 分鐘。初級抗體以 3% BSA/PBS 稀釋 (1:500),抗體選擇 rabbit anti-COX IV antibody (GeneTex, GTX37731),辨認細胞內粒線體上的膜蛋白—細胞色素-c 氧化酶複合體 IV,可用於細胞內粒線體定位。而 rabbit anti-ERp57 antibody (GeneTex, GTX113719),因可辨認細胞內質網中的硫基-雙硫氧化還原酶 (thiol-disulfide oxidoreductase),可利用於細胞內質網的定位。二級抗體使用 Goat F(ab')₂ anti-rabbit IgG Rhodamine TRITC (Leinco Technologies Inc., R124) 以 3% BSA/PBS 稀釋 (1:1,000) 進行反應,作用兩小時後以 PBS 清洗乾淨後加入 0.5 ml 以 PBS 稀釋一萬倍的 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen),進行細胞核染色。將作用完成的細胞玻片,以指甲油封片。免疫螢光染色反應後的玻片以倒立式螢光顯微鏡

(Zeiss, Axiovert 200M)觀察並拍照紀錄。

取 24 μ g 的 pcDNA3CF-Z-FADS 質體以 lipofectamine 2000 轉染至 HeLa 細胞，粒線體萃取參考並修改 Hajek 等人及 Wieckowski 等人於 2007 年及 2009 年發表的研究報告(Hajek, Chomyn et al. 2007, Wieckowski, Giorgi et al. 2009)。於轉染後 18 小時，以冰冷的 NKM uffer 清洗三次，將 DMEM 完全清洗乾淨，加入 10 ml 冰冷的 NKM buffer，以細胞刮棒將細胞刮離培養皿並使細胞懸浮於冰冷的 NKM buffer，在 4°C 以 2,300 xg 離心 5 分鐘，去除上清液體後，再以 10 ml 冰冷的 NKM buffer 重新懸浮，重複此步驟兩次。第三次離心去除上清液體後，以 1 ml 冰冷的 homogenization buffer 重新懸浮細胞並轉移至 2 ml 離心管中，將離心管放置於冰上，以 26½ G 針頭重複吸取與排出 20 次將細胞破碎。將離心管以 4°C 600 xg 離心 5 分鐘，收取上清液，將 pellets 去除，重複此步驟兩次。將上清液以 4°C 7,000 xg 離心 10 分鐘，保留 pellets 去除上清液，並以 1 ml homogenization buffer 重新懸浮 pellets，重複此步驟兩次。將懸浮後的液體以 4°C 10,000 xg 離心 10 分鐘，去除上清液，並將 pellets 以 0.05 ml mitochondrial suspension buffer 重新懸浮，保存於 -80°C 備用。

將粒線體萃取液及 HeLa 細胞萃取液分別以 12% SDS-PAGE 進行電泳後，再轉漬於 PVDF 膜上並以 blocking buffer 於 37°C 作用 30 分鐘，再分別將 rabbit anti-COX IV antibody、rabbit anti-Lamin A/C antibody (GeneTex, GTX101127) 及 mouse anti-FLAG M2 antibody 以 1:2,000 比例稀釋於 blocking buffer 中，於 37°C 作用 1 小時，然後以 TBST 清洗 10 分鐘，重複三次將未結合之抗體完全洗淨。mouse anti-FLAG M2 antibody 的實驗組以 goat anti-mouse IgG-conjugated alkaline phosphatase (Dako, D048602) 為二級抗體，以 1:5,000 比例稀釋於 blocking buffer 中，並於 37°C 作用 1 小時。Rabbit anti-COX IV antibody 及 rabbit anti-Lamin A/C antibody 的實驗組以 goat anti-rabbit IgG-conjugated alkaline phosphatase (Sigma, A3687-1ML) 為二級抗體，同樣以 1:5,000 比例稀釋於 blocking buffer 中，並於 37°C 作用 1 小時。將二級抗體作用完成的 PVDF 膜，以 TBST 清洗 10 分鐘並重複三次，將未結合之二級

抗體去除乾淨後，加入 NBT/BCIP (ThermoScientific) 呈色液，顯色後以大量二次水沖洗將反應終止。



2.2.6 DHA 及 EPA 的生物合成與脂肪酸甲酯 (Fatty acid methyl ester)

分析

將 HeLa 細胞培養於直徑 15 公分的培養皿。取 10 μg pcDNA3CF-Z-FADS、10 μg pcDNA3CF-ELOVL2、10 μg pcDNA3CF-ELOVL4 及 10 μg pcDNA3CF-ELOVL5 等質體以 lipofectamine 2000 轉染細胞。細胞脂肪酸的生物合成實驗參考 Williard 等人於 1998 年所發表的報告 (Williard, Kaduce et al. 1998)。將轉染 18 小時後以 PBS 清洗三次將 DMEM 清洗乾淨，將 5 μg α -Linolenic acid 與 25 ml 已回溫的 DMEM 混合後，加入 15 公分培養皿中持續培養 3 小時。在以 α -Linolenic acid 培養 3 小時後，以 PBS 清洗細胞三次將 DMEM 完全清洗乾淨，再以胰蛋白酶 (Trypsin) 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 3 分鐘，將細胞以 10 ml PBS 沖洗並懸浮，再於 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 2,300 $\times\text{g}$ 離心 5 分鐘，將上清液去除乾淨後，以 1 ml 冰冷的 PBS 重新懸浮細胞，重複此步驟三次，最後將細胞重新懸浮於 0.2 ml 冰冷的 PBS 中。

將重新懸浮於 PBS 中的細胞立刻進行脂肪酸分析，細胞內總脂肪酸萃取及脂肪酸甲酯化反應方式採用 Masood 等人於 2005 年所發表的研究報告 (Masood, Stark et al. 2005)。取 1.7 ml 甲醇加入 4 ml 棕色反應瓶中，再加入 0.1 ml 乙醯氯 (Acetyl chloride) 混合均勻後，加入 0.1 ml 重新懸浮於 PBS 的細胞溶液，以震盪器震盪 1 分鐘，將反應瓶置於 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴盆中，以恆溫 100 $^{\circ}\text{C}$ 持續加熱 1 小時。將反應完成的棕色反應瓶靜置待其溫度降至室溫，加入 0.75 ml *n*-hexane 以震盪器震盪 1 分鐘，靜置於室溫下 10 分鐘使其自然分層。取上層液至新的棕色反應瓶中，以氣相層析儀 (gas chromatography, GC) 分析，脂肪酸甲酯化標準品使用 Supelco[®] 37 Component FAME Mix standard (Sigma, 47885-U, 10 mg/mL methylene chloride)，GC 管柱為 HP-5，氣相層析溫度流程為先維持於 120 $^{\circ}\text{C}$ 30 分鐘，再以每分鐘增加 3 $^{\circ}\text{C}$ 至 250 $^{\circ}\text{C}$ 維

持 20 分鐘，再以每分鐘增加 5°C 至 300°C 並維持 20 分鐘。共注射實驗(co-injection) 為將萃取後之樣品與脂肪酸甲酯化標準品以 10:1 的比例混合，再取 3 μ l 以專用針筒注入氣相層析儀中，以相同之氣相層析溫度流程進行分析。





2.3 實驗方法：原核生物

2.3.1 假單孢菌基因體 DNA (Genomic DNA) 萃取

將 1.5 ml 假單孢菌液離心，去除上清液後加入 1× genomic extraction buffer 1 ml，緩慢的混合均勻後立刻放入 55 °C 水浴槽中，每作用 30 分鐘時，以手緩慢混勻，作用一小時。加入等體積的 phenol (pH=8.0)，緩慢的上下混勻至乳糜狀，離心 8,000 xg (KUBOTA 3300T)，10 分鐘。取出水層，加入等體積的 phenol:chloroform (1:1) 混合液體，緩慢的上下混合均勻至乳糜狀，離心 8,000 xg (KUBOTA 3300T)，10 分鐘。再重複以單純 chloroform 萃取的步驟直到有機層與水層之間的雜質消失為止。取水層液，加入兩倍體積之 95% 乙醇，用封口的 Pasteur pipette 於介層攪拌收集染色體 DNA，將抽取的染色體 DNA 置於 70% 乙醇中清洗，風乾後將染色體 DNA 溶於 0.5 ml 二次水中，置於 4 °C 冰箱隔夜使染色體 DNA 溶解完全。取 1 µl 之 DNA 以 0.6% 洋菜膠檢視其純度。

2.3.2 二甲苯單加氧酶(Xylene monooxygenase, XylM)及其電子傳遞蛋白(Xylene monooxygenase electron transfer component, XylA)之基因選殖、基因分析與共同表現質體構築

將假單孢菌的 genomic DNA 以二次水稀釋 100 倍後，以帶有限制酶 (restriction enzyme) 切位的引子對 (primer pairs, 表二)，以 *amfiFusion* High Fidelity PCR Master Mix (GenDEPOT) 以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 將 XylM 基因與 XylA 基因增幅出。將所選殖出的 XylM 與 XylA 基因以 CDD 分析蛋白質序列以了解及推測其基本功能，並且以分子演化遺傳分析軟體 (Molecular evolutionary genetics analysis, MEGA, ver 5.0) (Tamura, Peterson et al. 2011) 分析序列相似性。將 XylA 之 PCR 產物與 pACYC-Duet-1 分別以 *Nde* I 及 *Kpn* I 限制酶進行切割後，以 DNA 萃取試劑組 (PROTECH Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Extraction Kit)

將鹽類去除乾淨，並以二次水重新回溶 DNA，將兩 DNA 片段以 1:3 (molar ratio) 比例混合，再以 T4 DNA ligase (Roche, Schweizerische Eidgenossenschaft) 進行接合反應，將所得到的重組表現質體命名為 pACYC-Duet-1-XylA。將 XylM 之 PCR 產物與 pACYC-Duet-1-XylA 分別以 *Nco* I 及 *Hind*III 限制酶進行切割後，將鹽類去除乾淨後以二次水重新回溶 DNA，並將兩 DNA 片段以 T4 DNA ligase 進行接合反應，將所得到的重組表現質體命名為 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現質體。

表二、pACYC-Duet1-XylM-XylA 表現質體構築之引子對

Primer name	Sequence
XylM-F <i>Nco</i> I	CATGCC ATG GAC ACG CTT CGT TAT TAC
XylM-R <i>Hind</i> III	CCCAAGCTT AAT GCT AGC CAC CCG A
XylA-F <i>Nde</i> I	GGGAATTCCAT ATG AAT GAG TTT TTT AAG AAA ATC TC
XylA-R <i>Kpn</i> I	CGGGGTACC GCA AGG AGG TCT ATT ATA AAA ACG

PCR 反應條件

95°C	95°C	52°C	72°C	72°C
5 分鐘	30 秒	30 秒	1 分鐘	5 分鐘
30 cycles				

2.3.3 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現質體基因表現分析

將確認序列的 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現質體重新轉形至 *E. coli* BL-21(DE3) 及 BL-21(DE3) pLysS *E. coli* 表現宿主細胞中，挑取單一菌落於 3 ml LB broth 含 chloramphenicol 中培養至 OD₆₀₀=0.4 時，加入 0.4 mM (終濃度) 的異丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)，降溫至 20°C 以低溫誘導 XylM 與 XylA 蛋白質表現，於誘導 2、4、6 及 8 小時收集菌液 1.5 ml

並離心，將菌體以 0.5 ml SDS sample buffer 打散，以 100°C 加熱 5 分鐘，立即於冰上冷卻後，以 12% SDS-PAGE 檢視蛋白表現。



2.3.4 二甲苯單加氧酶複合體蛋白(xylene monooxygenase complex)活

性分析

挑取帶有 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現質體之 BL-21(DE3) 單一菌落至帶有 chloramphenicol 的 3 ml LB broth 中隔夜培養，取 0.25 ml 至 250ml 錐形瓶中放大培養至 $OD_{600}=0.4$ 後加入終濃度為 0.4 mM 的 IPTG，並將溫度調整為 20°C 以低溫誘導 XylM 與 XylA 蛋白質表現。誘導 8 小時後將菌液以 6,000 xg 離心收集，再以新鮮 LB 重新回溶至 $OD_{600}=15$ ，吸取 1 ml 菌液至小型玻璃反應瓶中，並加入反應物(substrate) (表三)。液體反應物為加入 1 μl 液體混合均勻後以橡皮墊完全密封瓶口；氣體反應物為密封反應瓶瓶口後，以 5 ml 針筒吸出等針筒體積之空氣後，再注入等針筒體積的反應氣體。將反應瓶於 30°C 培養箱中，以 200 rpm 轉速持續反應 3 小時，將反應瓶開啟後立刻添加 1 ml 已添加內標準品之二氯甲烷(dichloromethane, DCM)，添加的內標準品為 *p*-xylene (比例為 20 ml:1 μl ，反應物為 octane 時使用)或 *n*-octane (比例為 20 ml:1 μl ，反應物為非 octane 使用)。Propene 實驗組則使用乙醚萃取。快速劇烈混合後離心，吸取上層有機層溶液，以 GC-MS 分析產物 (Agilent HP6800, HP-5 column, HP5973 mass detector)。

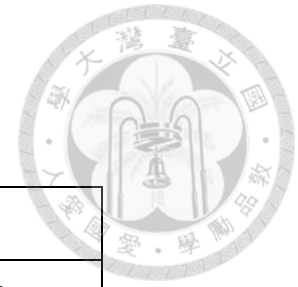


表三、Xylene monooxygenase 複合體活性分析之反應物總表

Benzyl compounds	Saturate compounds	Un-saturate compounds	Fluoro-compound
Toluene	Propane	Propene	Trifluoro-butane
Styrene	Butane	<i>cis</i> -2-Butene	
4-Ethyl-Toluene	Pentane	<i>trans</i> -2-Butene	
<i>p</i> -xylene	Hexane	<i>cis</i> -2-pentene	
	Heptane	<i>trans</i> -2-pentene	
	Octane	<i>cis</i> -2-hexene	
	Nonane	<i>trans</i> -2-hexene	
	Decane		

2.3.5 定點突變 (Site-directed mutagenesis, SDM)

以 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 作為定點突變分析的 DNA 模板，以 PCR 進行定點突變實驗。經序列分析比對及活性反應預測，設計出目標色胺酸(Tryptophan, Trp)突變引子對，突變引子對橫跨突變點的前後各三個胺基酸共計 21 個鹼基，參考 Ke 與 Madison 於 1997 年所發表以 mega-primer 為定點突變的 PCR 操作方法進行實驗(Ke and Madison 1997)。先利用突變引子對的正向引子(forward primer, 表四)與 XylM 引子對的反向引子(reverse primer)進行第一次 PCR，合成出第一階段 DNA 片段，再將此片段作為 mega-primer 與 XylM 引子對的正向引子(forward primer)進行第二次 PCR 反應。將 PCR 增幅出的點突變片段以限制酶 *Dpn* I 作用 3 小時，將 pACYC-Duet-1-xylA-xylM 去除後，再與 pACYC-Duet-1-xylA 分別以 *Nco* I 及 *Hind* III 限制酶進行切割後，將鹽類去除乾淨後以二次水重新回溶 DNA，並將兩 DNA 片段以 T4 DNA ligase 進行接合反應，即可得到帶有定點突變的 pACYC-Duet-1-xylA-xylM 共同表現質體，最後以定序確認突變結果，以 Toluene 分析蛋白質活性。



帶突變點的 mega-primer 合成 (1st SDM PCR)

95°C	95°C	52°C	72°C	72°C
5 分鐘	30 秒	30 秒	30 秒	5 分鐘
	30 cycles			

突變之 XylM 序列增幅 (2nd SDM PCR)

95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
5 分鐘	30 秒	1 分鐘	30 秒	5 分鐘
	30 cycles			

表四、XylM 定點突變之引子

Primer name	Sequence
W321A-Forward	5'-CCG CCT CTT <u>GCG</u> TTC GCT CTC-3'
W333A-Forward	5'-TTG AGA GAC <u>GCG</u> GAC CAG CGG-3'
W355A-Forward	5'-AAA GCG GGA <u>GCG</u> CCA CTG TGG-3'

Underline 為突變點

2.3.6 XylM 及 XylA 蛋白之西方墨點分析 (Western blotting)與免疫共

沉澱試驗(Co-Immunoprecipitation assay)

分別在 XylM 與 XylA 後端加上 His-tag 與 Flag-tag 並接回 pACYC-Duet-1 表現質體，並重新命名為 pACYC-Duet-1-XylM-H-XylA-F 共同表現質體，以供後續交互作用及免疫染色分析。將 pACYC-Duet-1-XylM-H-XylA-F 質體轉形至 BL-21(DE3)宿主細胞中，依前述方法同時誘導 XylM 與 XylA 蛋白質表現。

表現出來的蛋白質再以 Monoclonal Anti-polyHistidine-Alkaline Phosphatase

antibody (A5588, Sigma) 及 Monoclonal ANTI-FLAG® M2-Alkaline Phosphatase antibody (A9469, Sigma) 依前述方法進行西方墨點分析。

將 pACYC-Duet-1-XylM-H-XylA-F 質體轉形至 BL-21(DE3) 宿主細胞中，分別挑取兩個單一菌落小量培養隔夜後，再取 2.5 ml 培養隔夜之菌液分別加至兩瓶 250 ml LB broth 中培養至 $OD_{600}=0.4$ ，以 20°C 低溫誘導 8 小時，將菌液完全離心並收集。分別以 25 ml B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagents (Thermo scientific) 與 25 ml cell lysis buffer 重新回溶菌體，置於室溫作用 20 分鐘後，分別以超音波細胞破碎機以 20% 強度，破碎流程為超音波震盪 5 秒鐘停止 25 秒鐘，破碎時間總計 30 分鐘。將破碎完成的樣品以 Bradford G-250 dye (Bio-Rad) 進行蛋白質定量。取 2 mg 破碎完成之蛋白與 5 μ l 的 anti-His tag antibody (LTK BioLaboratories) 在 2 ml 離心管中混合均勻，再置於轉桿式混合器 (YMG-100, Evernew) 於 4°C 作用 12 小時進行免疫共沉澱。將共沉澱完成的蛋白以 cell lysis buffer 稀釋至 5 ml，以 protein A 親和性樹脂，以重力流動方式 (Gravity-Flow method) 重複通過管柱三次，分別以 10 ml 不帶有 DDM 及帶有 0.5% DDM 之 PBS (pH=6.5) 沖洗管柱，再分別以 10 ml 不帶有 DDM 及帶有 0.5% DDM 之 0.1 M sodium acetate solution (pH=6.5) 沖洗管柱，最後各別以 5 ml 0.1 M Glycine 沖洗管柱，將所沖提出的蛋白以分子篩為 10 kDa 的 Amicon Ultra centrifugal filter units (EMD Millipore Corporation) 濃縮至 500 μ l。以 SDS-PAGE 蛋白質電泳檢視免疫共沉澱後之蛋白，以銀染染色分析。

2.3.7 二甲苯單加氧酶複合體免疫金標誌分析 (Immuno-gold labelling)

以 2.3.6 所述同時誘導 XylM 與 XylA 蛋白表現的剩餘菌液離心並完全去除殘餘 LB broth 後，送至中央研究院細胞與個體生物研究所公共儀器中心 (Core Facilities ICOB, Academia Sinica) 進行固定、包埋及切片處理。將切片完成的樣品進行免疫組織化學分析 (immunohistochemistry)，一抗使用 anti-His tag antibody (辨認 XylM-H 蛋白, LTK BioLaboratories) 及 Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody (辨認 XylA-F 蛋白, F3165, Sigma)，二抗則使用已接上金粒子之相對應抗體 (由中央研究

院細胞與特體生物研究所電子顯微鏡室提供)。將完成免疫金標誌之樣品以穿透式電子顯微鏡 (Hitachi H-7000)觀察 XylM-H 與 XylA-F 蛋白表現位置。





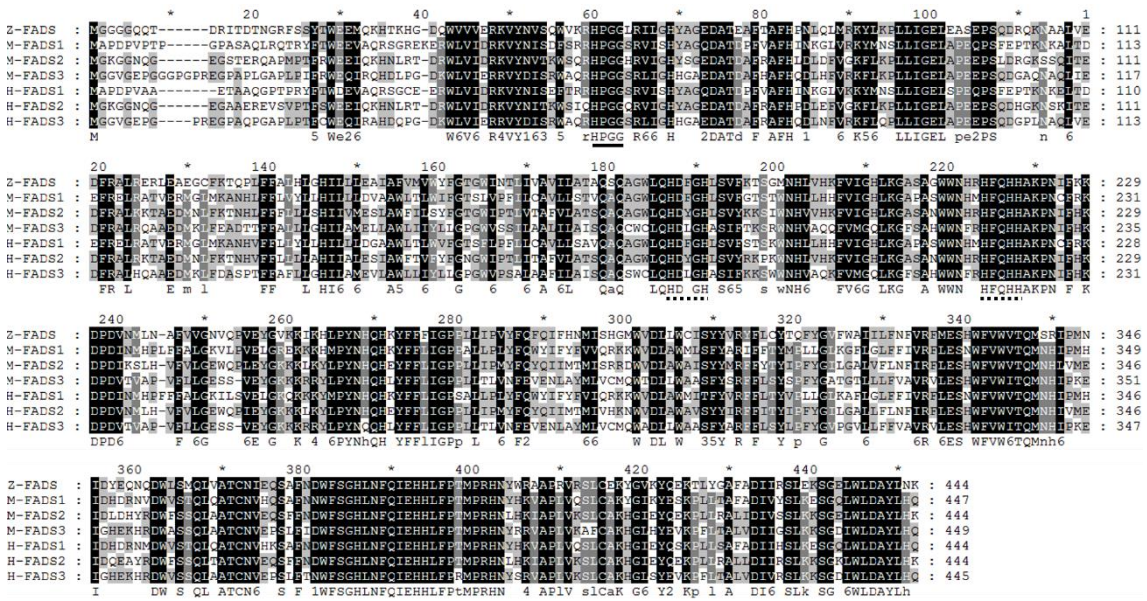
第三章、結果

3.1 真核生物

3.1.1 斑馬魚脂肪酸去飽和酶 (Z-FADS)、延長酶(ELOVLs)及細胞色素

b5 還原酶(CYB5R)之序列分析

將 Z-FADS、CYB5R1、CYB5R2、CYB5R3、ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 蛋白質序列分析比對。在 Z-FADS 序列分析中，Z-FADS 蛋白序列帶有膜結合型脂肪酸去飽和酶所特有的組胺酸盒子(Histidine box)，序列分別為 HDXGH (box1)、HFQHH (box2)及 QIEHH (box3)，同時亦具有細胞色素 b5 區域 (cytochrome b5 motif)，序列為 HPGG。以 MEGA 序列比較軟體分析 (MEGA 5.0)發現 Z-FADS 與小鼠及人類第一型(FADS1)、第二型(FADS2)及第三型(FADS3)去飽和酶，均有高度相似性，其中與小鼠的 FADS1 (NP_666206.1)、FADS2 (NP_062673.1)及 FADS3 (NP_068690.3)分別為 59%、63%及 56%；與人類的 FADS1 (AAH07846.1)、FADS2 (NP_004256.1)及 FADS3 (NP_068373.1)分別為 58%、65%及 54% (圖一)。

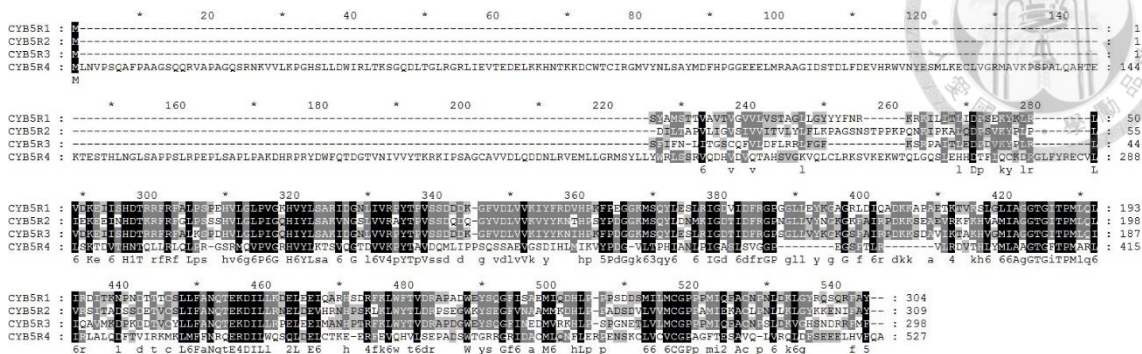


圖一、Z-FADS 與小鼠及人類第一型(FADS1)、第二型(FADS2)及第三型(FADS3)去飽和酶蛋白質序列比分析。以 MEGA 5.0 分析斑馬魚 Z-FADS 與小鼠的 FADS1 (NP_666206.1)、FADS2 (NP_062673.1)及 FADS3 (NP_068690.3)；與人類的 FADS1 (AAH07846.1)、FADS2 (NP_004256.1)及 FADS3 (NP_068373.1)。實線表示細胞色素 b5 區域，虛線表示組胺酸盒子位置。序列比對結果以 GeneDoc 軟體以黑、灰及白三色呈現比對結果，黑色為完全相同之胺基酸殘基，灰色為部分相同之胺基酸殘基，白色為完全不相同之胺基酸殘基。

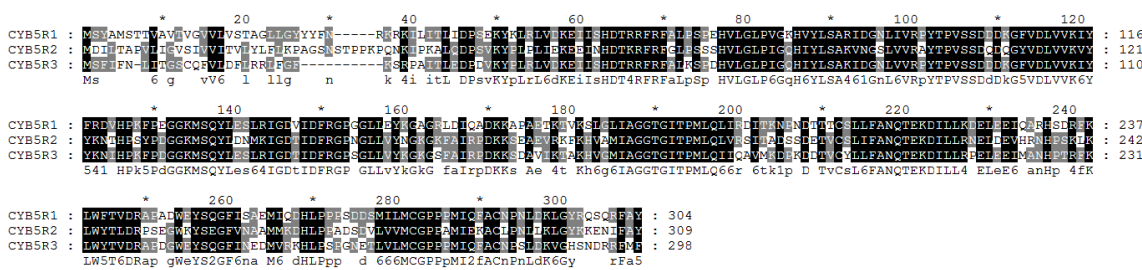
在細胞色素 *b5* 還原酶蛋白質序列分析中，以 TMHMM 軟體分析四種 CYB5R，結果顯示 CYB5R1 及 CYB5R2 在 N 端具有穿膜構造，為膜結合型之細胞色素 *b5* 還原酶，而 CYB5R3 及 CYB5R4 則為可溶型蛋白(附圖一)。在蛋白序列分析中，四種 CYB5R 皆具有黃素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)功能區，顯示具有將輔酶之電子傳遞給標的蛋白之功能(附圖二)。而其中第四型細胞色素 *b5* 還原酶 (CYB5R4)蛋白質序列明顯與其他三型不同(圖二 A)，將相似度較高的三型 CYB5R 蛋白質序列進行分析，可發現三型之相似度較高，且 FAD 結合區域 (FAD binding pocket) 附近之蛋白序列 (胺基酸 85~100、120~140 及 190~200)保守性非常高(圖二 B)。以 CDD 序列保守功能區分析 CYB5R 之蛋白質序列，結果顯示 CYB5R1、CYB5R2 及 CYB5R3 為具有 *b5* 還原酶功能的蛋白，而 CYB5R4 則為單一胜肽序列同時具有類細胞色素 *b5* 血基質/固醇類結合位(Cytochrome *b5*-like Heme/Steroid binding domain)與 *b5* 還原酶功能區(附圖二)。斑馬魚四型 CYB5R 皆為類 NAD(P)H 依賴型鐵氧還原蛋白還原酶超級家族蛋白(ferridoxin reductase-like superfamily, FNR-like superfamily)，顯示斑馬魚 CYB5R 在催化反應過程中需要輔酶 NAD(P)H 提供電子以傳遞至 CYB5R 蛋白內之 FAD 區域。



A



B

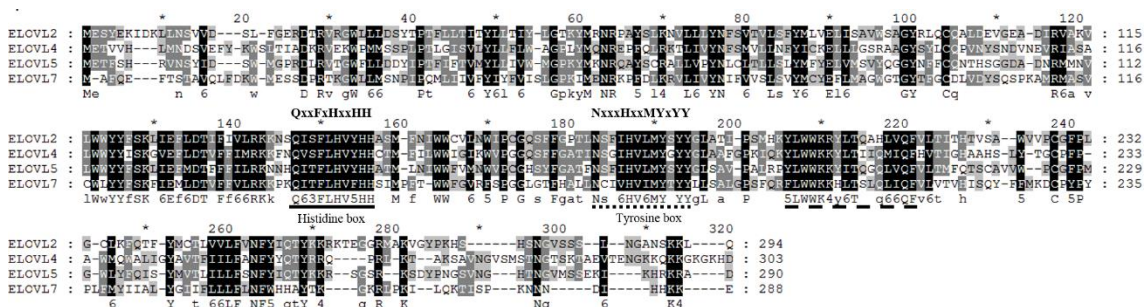


圖二、斑馬魚細胞色素 *b5* 還原酶蛋白質序列相似性分析。(A) 為 CYB5R1、CYB5R2、CYB5R3 及 CYB5R4 四型細胞色素 *b5* 還原酶蛋白序列相似性分析，(B) 為 CYB5R1、CYB5R2 及 CYB5R3 蛋白序列相似性分析。以 MEGA 5.0 分析斑馬魚四型 CYB5R。序列比對結果以 GeneDoc 軟體以黑、灰及白三色呈現比對結果，黑色為完全相同之胺基酸殘基，灰色為部分相同之胺基酸殘基，白色為完全不相同之胺基酸殘基。

根據推測之 DHA、EPA 與 AA 合成途徑，選取斑馬魚 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 之蛋白序列進行比對，可以比對到 ELOVL 基因特有的組胺酸盒子(histidine box) 與酪胺酸盒子(tyrosine box) (Meyer, Kirsch et al. 2004)，蛋白質序列分別為 QxxFLHxYHH 及 NxxxHxxMYxYY。此外，在四種 ELOVL 蛋白質序列中，可比對出一個以苯環類胺基酸與帶電荷胺基酸交錯組成之高保守區域，其蛋白質序列為 Y/F LWWK R/K TxxQxxQF，此高保守性之區域目前未有命名。在蛋白質序列相似性分析中，ELOVL2 與 ELOVL5 相似性為 57% 高於 ELOVL2 與



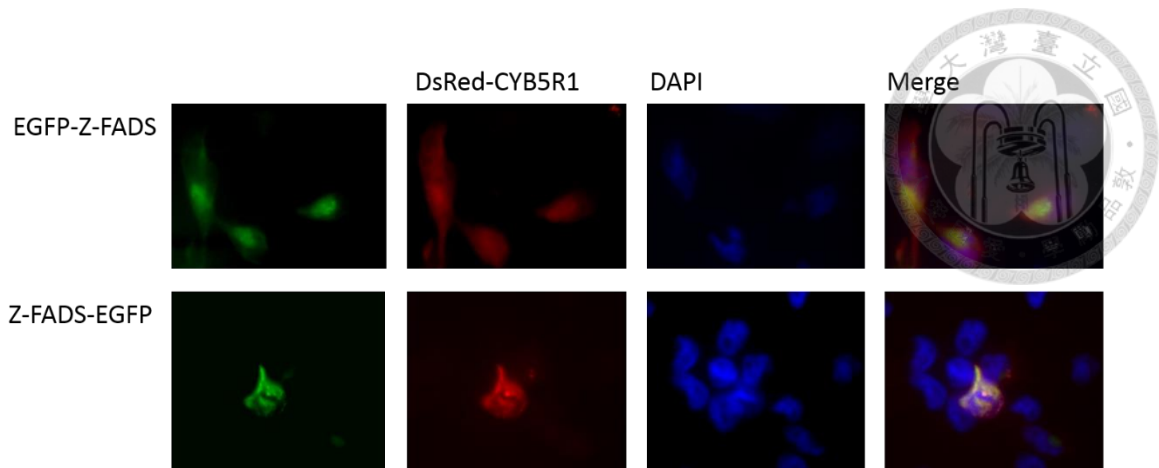
ELOVL4 相比的 45%，及 ELOVL2 與 ELOVL7 相比的 37%。而 ELOVL4 與 ELOVL5 及 ELOVL7 之相似性則分別為 41% 及 43%，並無較大之差異。ELOVL5 與 ELOVL7 之相似性則為 37%，顯示 ELOVL7 之蛋白質序列與其他三者差異較大。



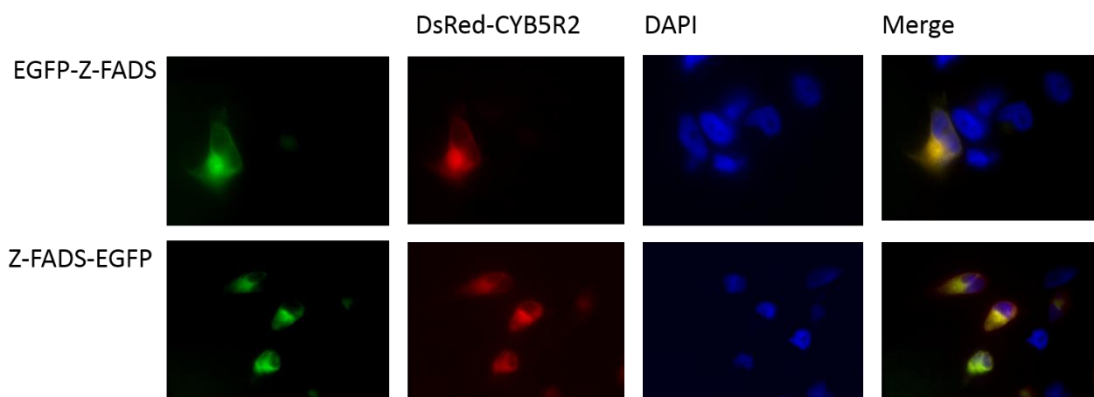
圖三、斑馬魚 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 蛋白質序列相似性分析。以 MEGA5.0 分析斑馬魚這四型 ELOVL 蛋白，兩個 ELOVL 基因所特有的 histidine box (—) 與 tyrosine box (----)。此外，亦有比對出一以苯環類胺基酸與帶電荷胺基酸交錯組成之高保守區域 (- - -)。序列比對結果以 GeneDoc 軟體以黑、灰及白三色呈現比對結果，黑色為完全相同之胺基酸殘基，灰色為部分相同之胺基酸殘基，白色為完全不相同之胺基酸殘基。

3.1.2 Z-FADS、CYB5R 和 ELOVL 在轉染後 HeLa 細胞中的表現觀察

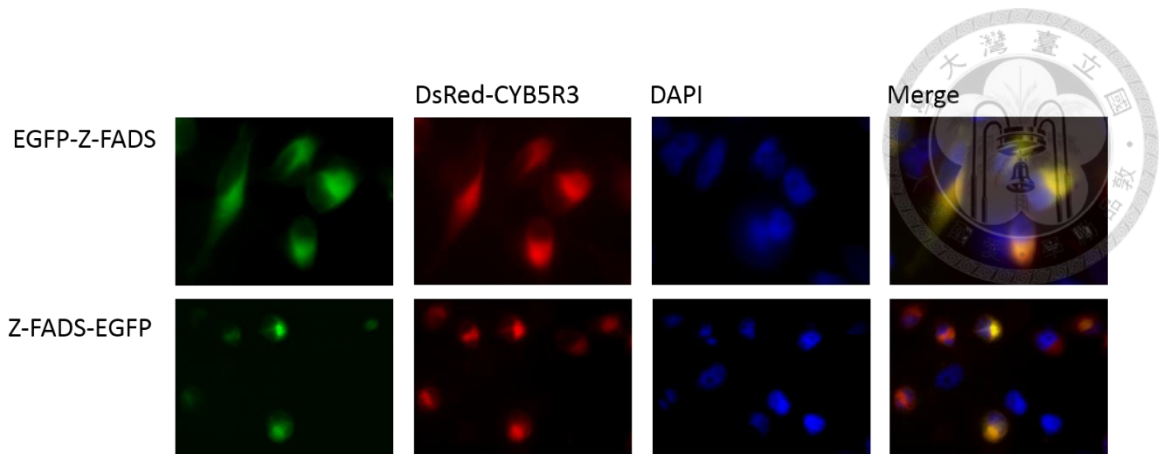
將各目標重組質體送至 HeLa 細胞中，經直接螢光(EGFP)觀察或免疫螢光染色後觀察發現，CYB5R1 與 Z-FADS (EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP)蛋白之重疊性較差(圖四)，其結果顯示 CYB5R1 可能與 Z-FADS 沒有直接的交互作用。而 CYB5R2、CYB5R3、ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 與 Z-FADS 重疊性一致(圖五至圖十)，可看到明顯且大範圍的黃色螢光區域。



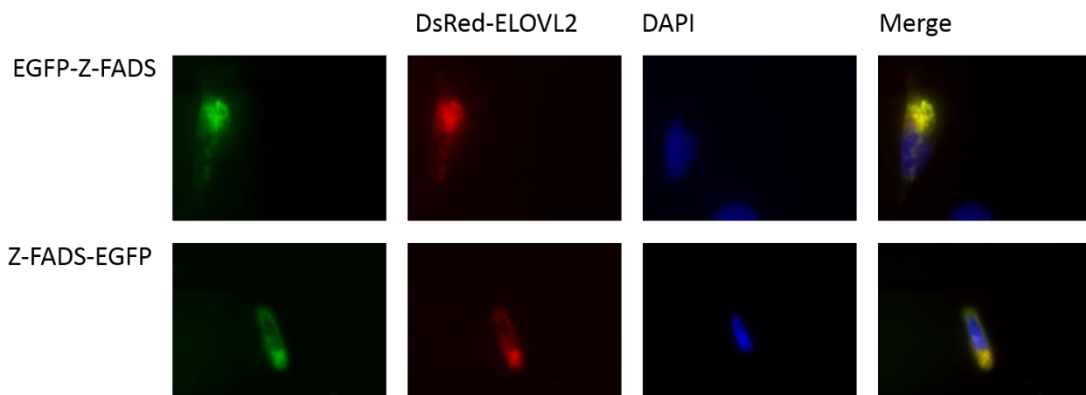
圖四、DsRed-CYB5R1 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析。分別由綠色與紅色螢光質體表現出融合螢光蛋白之 Z-FADS 與 CYB5R1，於固定後透過螢光顯微鏡以 600x 油鏡觀察並照相記錄。綠色螢光為接上 EGFP 之 Z-FADS 蛋白，紅色螢光為接上 DsRed 之 CYB5R1，藍色為 DAPI 染色。



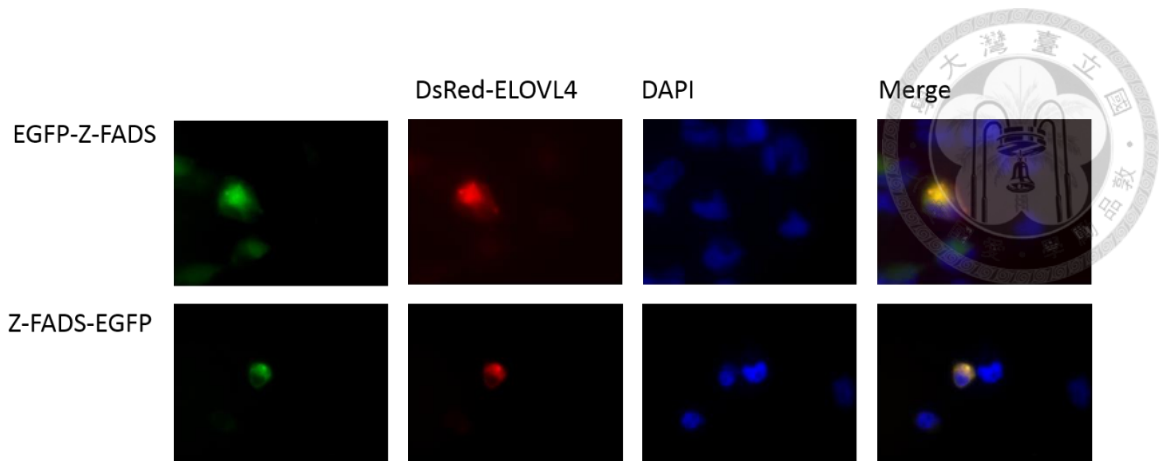
圖五、DsRed-CYB5R2 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析。分別由綠色與紅色螢光質體表現出融合螢光蛋白之 Z-FADS 與 CYB5R2，於固定後透過螢光顯微鏡以 600x 油鏡觀察並照相記錄。綠色螢光為接上 EGFP 之 Z-FADS 蛋白，紅色螢光為接上 DsRed 之 CYB5R2，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為紅、綠兩螢光蛋白互相重疊部分。



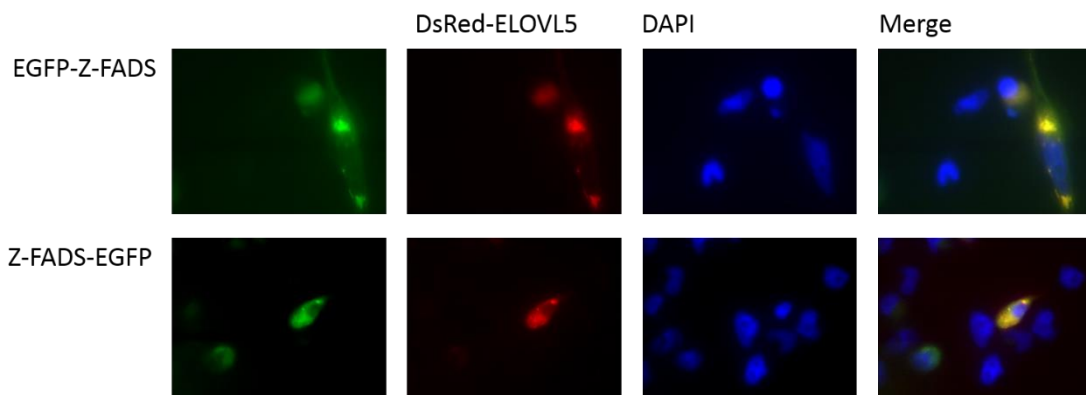
圖六、DsRed-CYB5R3 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析。分別由綠色與紅色螢光質體表現出融合螢光蛋白之 Z-FADS 與 CYB5R3，於固定後透過螢光顯微鏡以 600x 油鏡觀察並照相記錄。綠色螢光為接上 EGFP 之 Z-FADS 蛋白，紅色螢光為接上 DsRed 之 CYB5R3，藍色為 DAPI 染色。



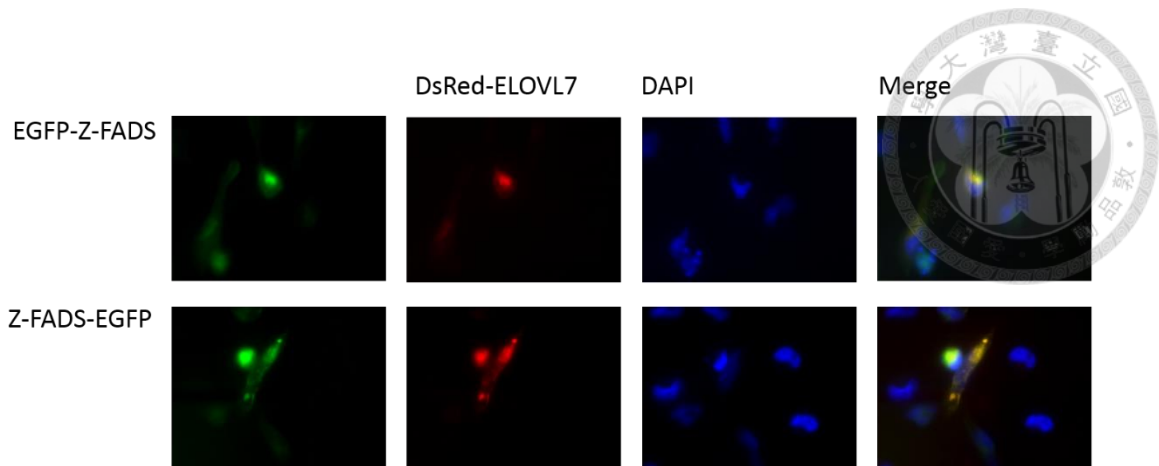
圖七、DsRed-ELOVL2 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析。分別由綠色與紅色螢光質體表現出融合螢光蛋白之 Z-FADS 與 ELOVL2，於固定後透過螢光顯微鏡以 600x 油鏡觀察並照相記錄。綠色螢光為接上 EGFP 之 Z-FADS 蛋白，紅色螢光為接上 DsRed 之 ELOVL2，藍色為 DAPI 染色。



圖八、DsRed-ELOVL4 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析。分別由綠色與紅色螢光質體表現出融合螢光蛋白之 Z-FADS 與 ELOVL4，於固定後透過螢光顯微鏡以 600x 油鏡觀察並照相記錄。綠色螢光為接上 EGFP 之 Z-FADS 蛋白，紅色螢光為接上 DsRed 之 ELOVL4，藍色為 DAPI 染色。



圖九、DsRed-ELOVL5 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析。分別由綠色與紅色螢光質體表現出融合螢光蛋白之 Z-FADS 與 ELOVL5，於固定後透過螢光顯微鏡以 600x 油鏡觀察並照相記錄。綠色螢光為接上 EGFP 之 Z-FADS 蛋白，紅色螢光為接上 DsRed 之 ELOVL5，藍色為 DAPI 染色。

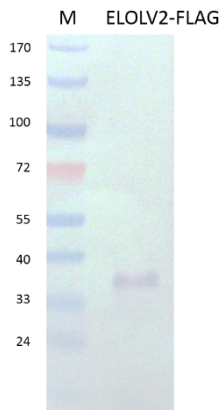


圖十、DsRed-ELOVL7 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 螢光表現分析。分別由綠色與紅色螢光質體表現出融合螢光蛋白之 Z-FADS 與 ELOVL7，於固定後透過螢光顯微鏡以 600x 油鏡觀察並照相記錄。綠色螢光為接上 EGFP 之 Z-FADS 蛋白，紅色螢光為接上 DsRed 之 ELOVL7，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為兩蛋白互相重疊部分。

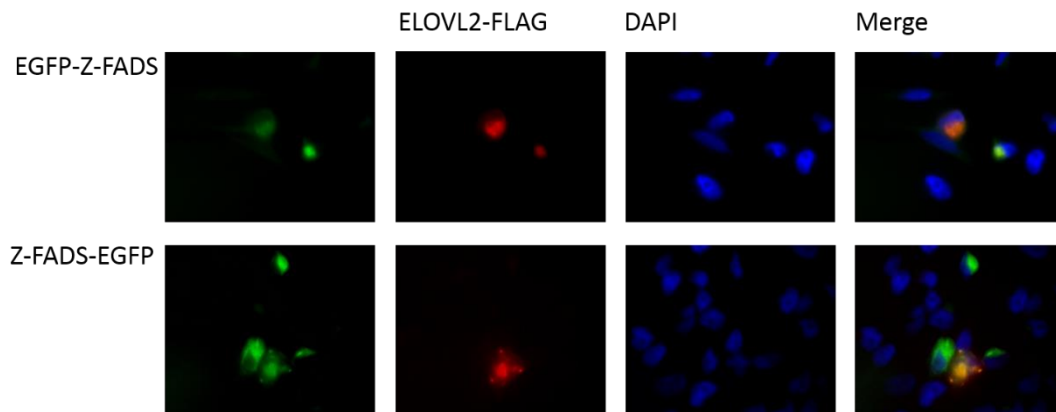
以 Rhodamine(紅色)免疫陽光染色之重組 ELOVL2(圖十一)、ELOVL4(圖十二)、ELOVL5 (圖十三)及 ELOVL7(圖十四)皆可看到與重組帶綠螢光的 Z-FADS-EGFP 或是 EGFP-Z-FADS 有蛋白重疊部分，可以看到紅色螢光與綠色螢光重疊後產生的黃色，從此結果可以推測，ELOVL 與 Z-FADS 可能有交互作用。而在西方墨點分析之結果顯示，ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 在 HeLa 細胞內皆有表現，其分子量約分別為 34 kDa、35 kDa、33 kDa 及 34 kDa，以推估的重組 ELOVLs 正確分子量一致(分別為 34.458 kDa、35.226 kDa、34.679 kDa 及 34.243 kDa)(ExPASy - Compute pI/Mw tool, SIB Bioinformatics Resource Portal, Swiss Institute of Bioinformatics)。



A



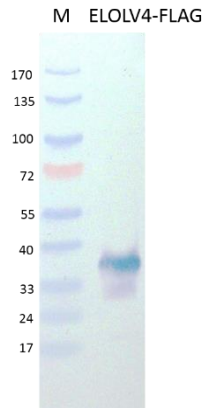
B



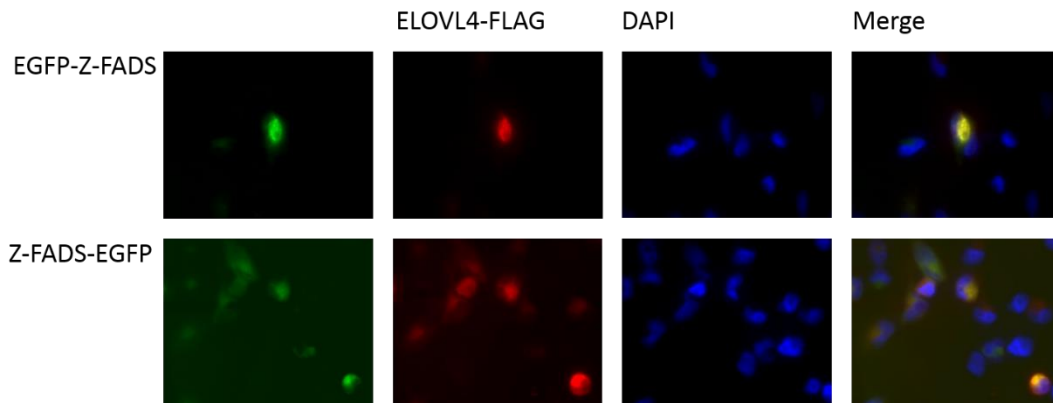
圖十一、ELOVL2 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析。(A)為 pcDNA3CF-ELOVL2 於 HeLa 細胞表現之西方墨點分析，西方墨點結果顯示重組 ELOVL2 分子量與推估之分子量一致，(B)為抗體帶 rhodamine 使 ELOVL2 呈現紅色螢光，與帶有綠色螢光之 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 進行疊圖，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為兩蛋白互相重疊部分。Marker 為 EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.)。



A



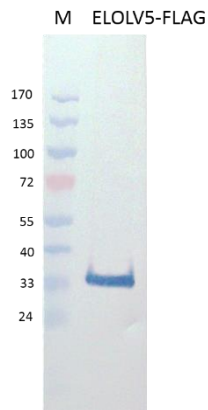
B



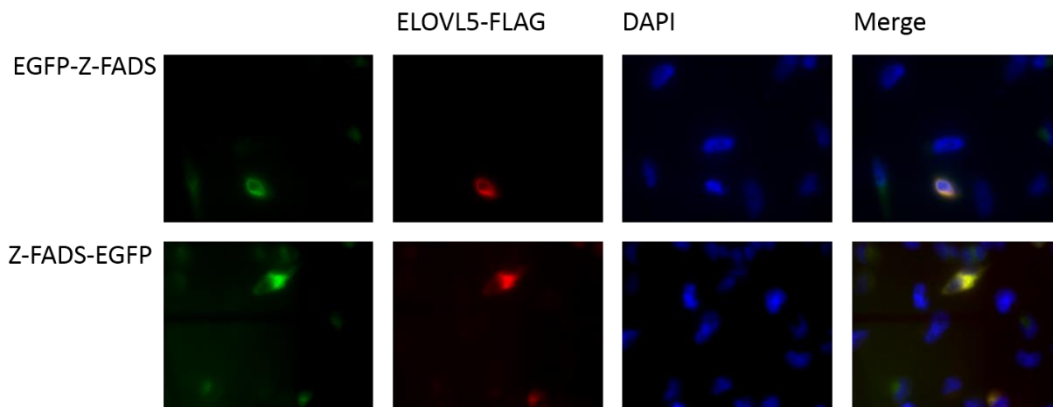
圖十二、ELOVL4 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析。(A)為 pcDNA3CF-ELOVL4 於 HeLa 細胞表現之西方墨點分析，西方墨點結果顯示重組 ELOVL4 分子量與推估之分子量一致，(B)為抗體帶 rhodamine 使 ELOVL4 呈現紅色螢光，與帶有綠色螢光之 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 進行疊圖，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為兩蛋白互相重疊部分。Marker 為 EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.)。



A



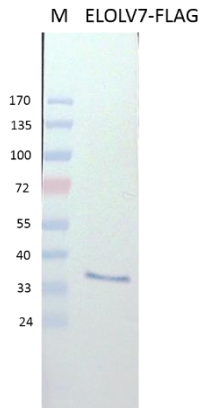
B



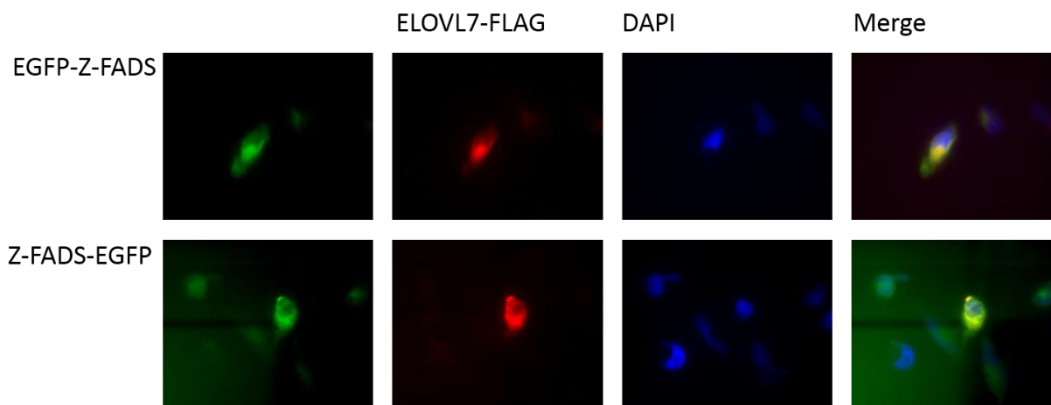
圖十三、ELOVL5 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析。(A)為 pcDNA3CF-ELOVL5 於 HeLa 細胞表現之西方墨點分析，西方墨點結果顯示重組 ELOVL5 分子量與推估之分子量一致，(B)為抗體帶 rhodamine 使 ELOVL5 呈現紅色螢光，與帶有綠色螢光之 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 進行疊圖，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為兩蛋白互相重疊部分。Marker 為 EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.)。



A



B



圖十四、ELOVL7 蛋白表現、免疫螢光染色及分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 之螢光表現分析。(A)為 pcDNA3CF-ELOVL7 於 HeLa 細胞表現之西方墨點分析，西方墨點結果顯示重組 ELOVL7 分子量與推估之分子量一致，(B)為抗體帶 rhodamine 使 ELOVL7 呈現紅色螢光，與帶有綠色螢光之 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 進行疊圖，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為兩蛋白互相重疊部分。Marker 為 EZ-Run™ Prestained Rec Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.)。

3.1.3 螢光共振能量轉移分析

在 HeLa 細胞中同時表現在蛋白質 N 端及 C 端帶有 EGFP 綠色螢光之 Z-FADS 蛋白，及在蛋白質 N 端帶有 DsRed 紅色螢光之 CYB5R1、CYB5R2、CYB5R3、

ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7；或是在蛋白質 C 端帶有 FLAG 之 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7，總計有 22 種質體組合。

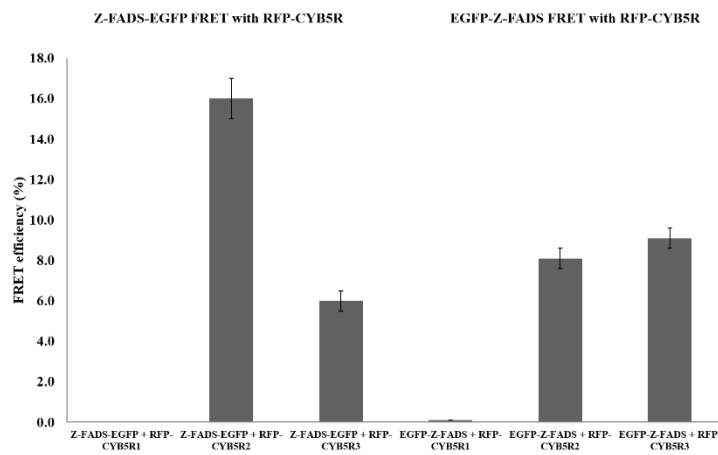
在 Z-FADS 與 CYB5Rs 螢光共振能量轉移實驗，CYB5R1 與 Z-FADS 無法產生螢光共振能量轉移，不論是 EGFP-Z-FADS 或 Z-FADS-EGFP 皆無法偵測到螢光共振能量轉移的現象發生；而 CYB5R2 與 CYB5R3 則可以透過共軛焦螢光顯微鏡偵測到螢光共振能量轉移的現象(圖十五 A)，其中 CYB5R2 與 Z-FADS-EGFP 有較高的螢光共振能量轉移，而在 EGFP-Z-FADS 與 CYB5R2 及 CYB5R3 的螢光共振能量轉移效率較接近(圖十五 A)，透過螢光共振能量轉移效率計算，Z-FADS-EGFP 與 CYB5R2 及 CYB5R3 的距離約為 8.4 及 9.9 nm，而 EGFP-Z-FADS 與 CYB5R2 及 CYB5R3 的距離則分別為 9.5 及 9.3 nm (表五)。由此結果證明 Z-FADS 與 CYB5R2 及 CYB5R3 彼此有發生交互作用，而 Z-FADS 則無法與 CYB5R1 發生交互作用。

在 Z-FADS 與 ELOVL 的實驗組，其中 N 端接上 DsRed 的 ELOVL 與 Z-FADS 會發生螢光共振能量轉移的現象，不論是 EGFP-Z-FADS 或是 Z-FADS-EGFP 兩種蛋白，皆可透過共軛焦螢光顯微鏡偵測到(圖十五 B)。其中 ELOVLs 與 Z-FADS-EGFP 蛋白螢光共振能量轉移的現象較為平均(圖十五 B)，在 ELOVLs 與 EGFP-Z-FADS 蛋白，其螢光共振能量轉移則較不平均(圖十五 B)，其中 ELOVL5 的螢光共振能量轉移效率約為 2.1 ± 0.8 (表五)。透過螢光共振能量轉移效率計算，Z-FADS-EGFP 與 DsRed-ELOVL2、DsRed-ELOVL4、DsRed-ELOVL5 及 DsRed-ELOVL7 距離約為 8.9 到 9.0 nm 之間；而 EGFP-Z-FADS 與 DsRed-ELOVL2、DsRed-ELOVL4、DsRed-ELOVL5 及 DsRed-ELOVL7 距離則分別為 9.2 nm、9.4 nm、12 nm 及 8.8 nm (表五)。

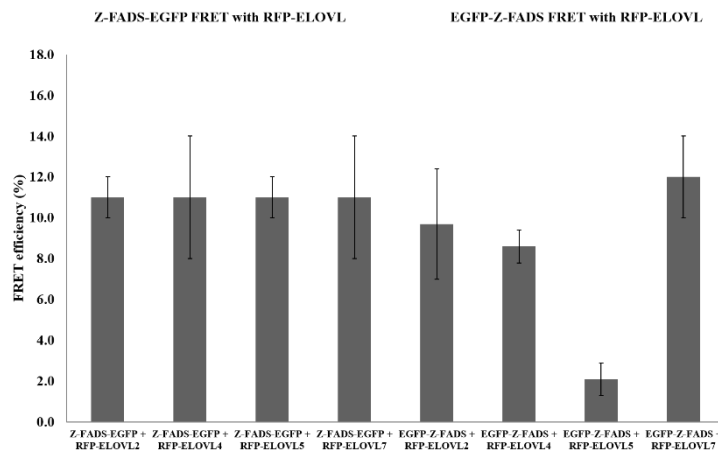
而在 ELOVLs 的 C 端接上 FLAG，並以抗體帶有 rhodamine，作為與 Z-FADS 紅綠螢光配對之螢光共振能量轉移實驗。在 Z-FADS 與 ELOVLs-FLAG 的實驗組中，不論是 EGFP-Z-FADS 或 Z-FADS-EGFP 與 ELOVLs-FLAG 的螢光共振能量轉移效率差異性皆大(圖十五 C)，其中 Z-FADS-EGFP 與 ELOVL5-FLAG 之實驗組其螢光共振能量轉移效率可達到 32 (表五)，高於與 ELOVL2-FLAG 及 ELOVL4-FLAG

之實驗組。在 ELOVL7-FLAG 之實驗組中，不論是 EGFP-Z-FADS 或 Z-FADS-EGFP 皆無法與 ELOVL7-FLAG 發生螢光共振能量轉移的現象(圖十五 C)。透過螢光共振能量轉移效率計算，Z-FADS-EGFP 與 ELOVL2-FLAG、ELOVL4-FLAG 及 ELOVL5-FLAG 距離約為 6.9 到 9.1 nm 之間；而 EGFP-Z-FADS 與 ELOVL2-FLAG、ELOVL4-FLAG 及 ELOVL5-FLAG 距離約為 7.8 到 11 nm 之間(表五)。

A

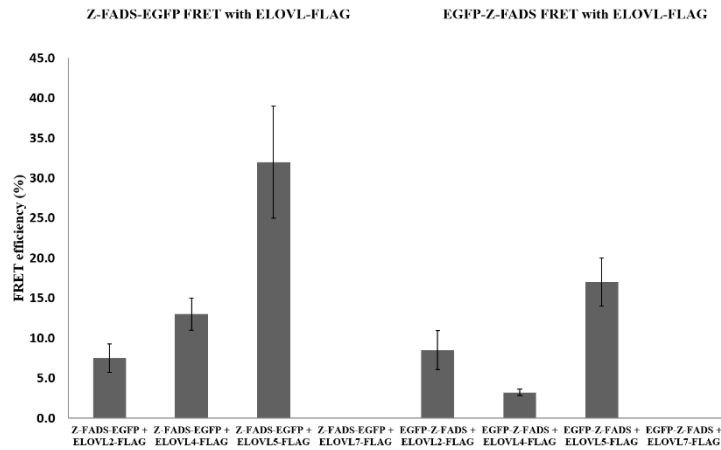


B





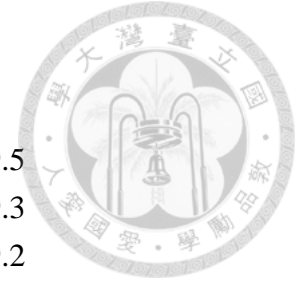
C



圖十五、斑馬魚 Z-FADS 蛋白與 CYB5R 及 ELOVL 蛋白螢光共振能量轉移分析。(A)為 DsRed-CYB5R 分別與 Z-FADS-EGFP 及 EGFP-Z-FADS 蛋白螢光共振能量轉移分析結果，(B)為 DsRed-ELOVL 分別與 Z-FADS-EGFP 及 EGFP-Z-FADS 蛋白螢光共振能量轉移分析結果，(C)為 ELOVL-FLAG 分別與 Z-FADS-EGFP 及 EGFP-Z-FADS 蛋白螢光共振能量轉移分析結果。

表五、斑馬魚 Z-FADS 蛋白與 CYB5R 及 ELOVL 蛋白螢光共振能量轉移及螢光基團距離

Sample	FRET efficiency (%)	R_0 (Å)	Distance (nm)
Z-FADS-EGFP + DsRed-CYB5R1	N/A	-	-
Z-FADS-EGFP + DsRed-CYB5R2	16±1	63	~8.4
Z-FADS-EGFP + DsRed-CYB5R3	6.0±0.5	63	~9.9
Z-FADS-EGFP + DsRed-ELOVL 2	11±1	63	~8.9
Z-FADS-EGFP + DsRed-ELOVL 4	11±3	63	~9.0
Z-FADS-EGFP + DsRed-ELOVL 5	11±1	63	~9.0
Z-FADS-EGFP + DsRed-ELOVL 7	11±3	63	~8.9
Z-FADS-EGFP + ELOVL 2-FLAG	7.5±1.8	60	~9.1
Z-FADS-EGFP + ELOVL 4-FLAG	13±2	60	~8.3
Z-FADS-EGFP + ELOVL 5-FLAG	32±7	60	~6.9



Z-FADS-EGFP + ELOVL 7-FLAG	N/A	-	-
EGFP-Z-FADS + DsRed-CYB5R1	0.10±0	63	-
EGFP-Z-FADS + DsRed-CYB5R2	8.1±0.5	63	~9.5
EGFP-Z-FADS + DsRed-CYB5R3	9.1±0.5	63	~9.3
EGFP-Z-FADS + DsRed-ELOVL 2	9.7±2.7	63	~9.2
EGFP-Z-FADS + DsRed-ELOVL 4	8.6±0.8	63	~9.4
EGFP-Z-FADS + DsRed-ELOVL 5	2.1±0.8	63	~12
EGFP-Z-FADS + DsRed-ELOVL 7	12±2	63	~8.8
EGFP-Z-FADS + ELOVL 2-FLAG	8.5±2.4	60	~8.9
EGFP-Z-FADS + ELOVL 4-FLAG	3.2±0.4	60	~11
EGFP-Z-FADS + ELOVL 5-FLAG	17±3	60	~7.8
EGFP-Z-FADS + ELOVL 7-FLAG	N/A	-	-
His-ELOVL 2-FLAG	13±1	60	~8.3
His-ELOVL 4-FLAG	11±0	60	~8.5
His-ELOVL 5-FLAG	7.8±0.6	60	~9.1
His-ELOVL 7-FLAG	N/A	-	-

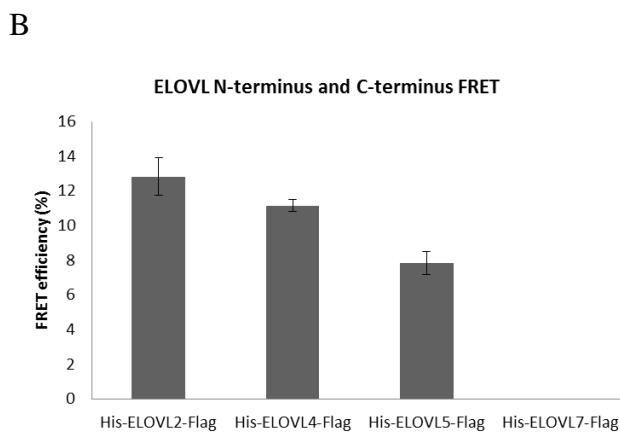
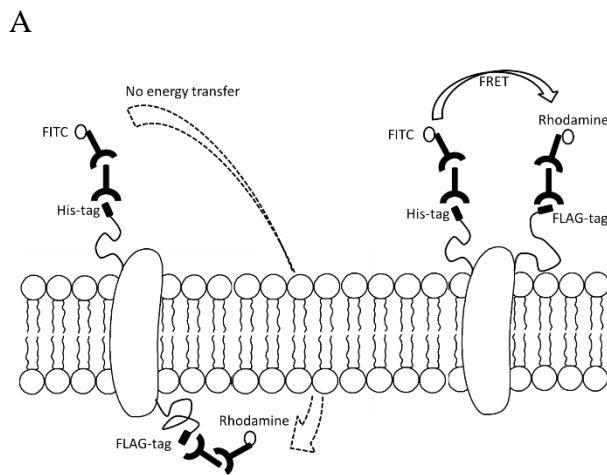
3.1.4 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 膜蛋白之穿膜結構

分析

利用 pEGFP-N1 質體為骨架設計出可使用於研究膜蛋白穿膜結構之專用質體，將 ELOVL 之 N 端接上 His；在 C 端接上 FLAG，將重新產生的片段接回去已剔除 EGFP 基因之 pEGFP-N1 質體，將所重新產生之質體命名為 pHis-ELOVLs-FLAG 質體，可分別表現出 His-ELOVL2-FLAG、His-ELOVL4-FLAG、His-ELOVL5-FLAG 及 His-ELOVL7-FLAG。可透過相對應之抗體辨認兩端之序列，並利用已經上螢光基團之二抗進行辨認，並以共軛焦螢光顯微鏡分析其螢光共振能量轉移（圖十六 A）。結構分析原理為膜蛋白之 N 端與 C 端在細胞膜的同側會發生螢光共振能量轉移；反之若膜蛋白 N 端與 C 端在細胞膜的兩側，則無法發生 (Maurel, Comps-Agrar et al. 2008)。

以 pHis-ELOVLs-FLAG 質體在 HeLa 細胞內所表現出 His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白，透過共軛焦螢光顯微鏡分析其螢光共振能量轉移。其中在 ELOVL2、

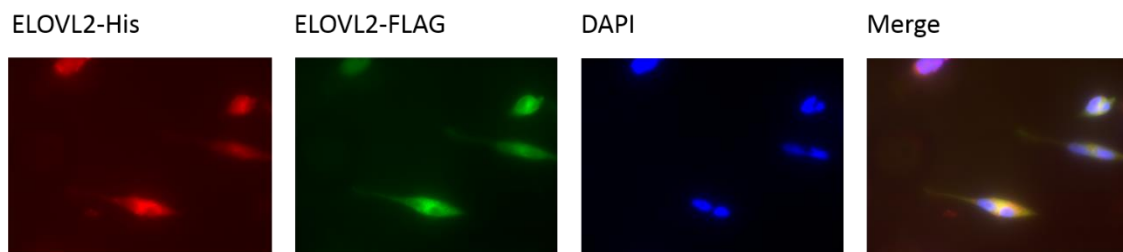
ELOVL4 及 ELOVL5 皆可以偵測到螢光共振能量轉移的現象(圖十六 B)，其能量轉移效率分別為 13 ± 1 、 11 ± 0 及 7.8 ± 0.6 (表五)，可透過有發生螢光共振能量轉移推論，ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 的 N 端與 C 端是在細胞膜的同側。而 ELOVL7 則無法偵測到螢光共振能量轉移，可以推論 ELOVL7 的 N 端與 C 端是在細胞膜的不同側，而導致螢光能量無法轉移之現象。



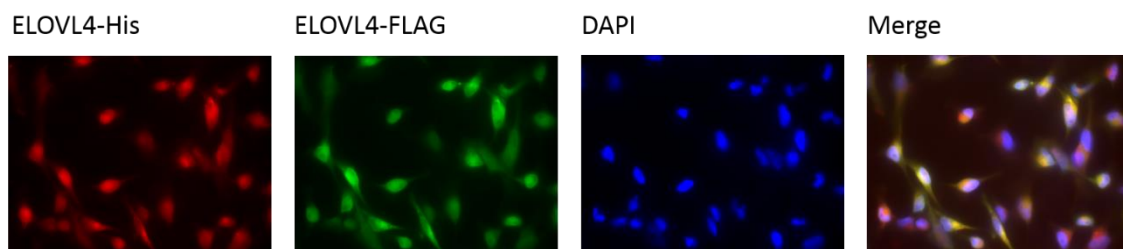
圖十六、His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白穿膜構造分析。(A)為 His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白之設計示意圖，並透過相對應帶有紅色與綠色螢光之二抗進行螢光共振能量轉移分析，(B)為 His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白螢光共振能量轉移分析結果之柱狀圖。

以 pHis-ELOVLs-FLAG 質體所表現出的 His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白，可在 HeLa 細胞內表現，並可以相對應抗體辨認(圖十七)。ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 可以看到紅色與綠色螢光重疊呈現黃色之區域(圖十七)，在 ELOVL5 蛋白表現有明顯的特定胞器表現，可在結果上看到螢光位置為點狀分布(圖十七 C)，而在 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL7 螢光表現則呈現團狀或塊狀的分布，較無明顯的特定胞器表現情形(圖十七 A、B 及 D)。

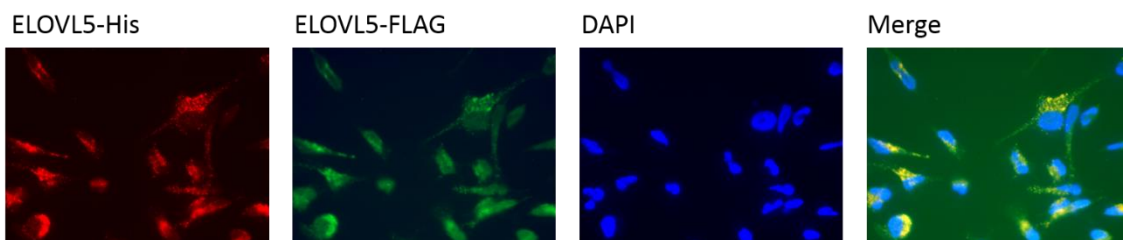
A



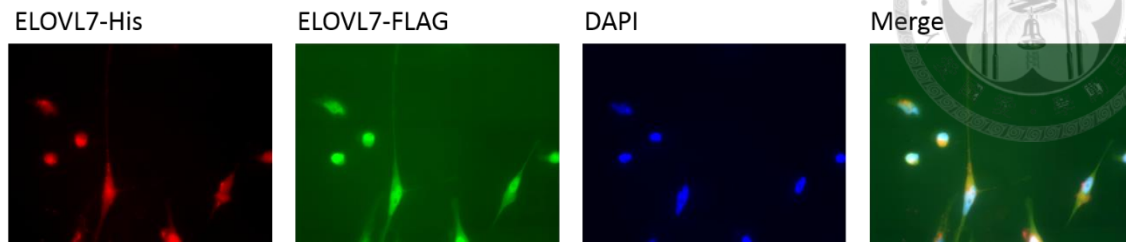
B



C



D



圖十七、His-ELOVLs-FLAG 融合蛋白 HeLa 細胞內的免疫螢光染色分析。分別透過辨認 His 及 FLAG 之一抗，及帶有紅色或綠色螢光之相對應二抗進行免疫螢光染色分析。(A)、(B)、(C)及(D)分別為 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 四種融合蛋白。綠色為 FITC 螢光基團；紅色為 rhodamine 螢光基團，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為兩蛋白互相重疊部分。

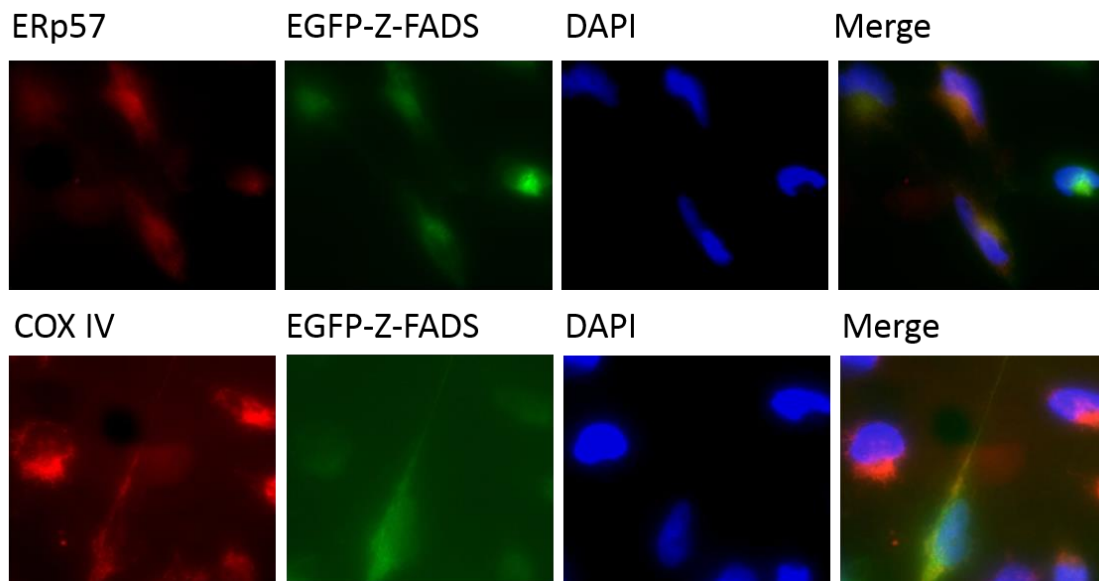
3.1.5 Z-FADS 在細胞內表現與胞器定位分析

在 Z-FADS 於細胞特定胞器定位實驗中，以 ERp57 為細胞內質網之標的蛋白；以 COX IV 為細胞粒線體之標的蛋白。以螢光顯微鏡觀察 Z-FADS 蛋白在細胞胞器定位結果顯示，可以很清楚的看到帶有綠色螢光的 Z-FADS 與帶有紅色螢光之內質網部分有重疊呈現黃色，但並沒有完全百分百吻合，仍然可以看到未重疊部分，不論是 EGFP-Z-FADS (圖十八 A)或是 Z-FADS-EGFP (圖十八 B)皆可以看到同樣結果。而在粒線體定為實驗中，帶有綠色螢光的 Z-FADS 與帶有紅色螢光之粒線體部分，亦有呈現黃色，顯示紅、綠螢光彼此重疊，但仍然可以觀察到單獨出現之綠色螢光或紅色螢光，顯示多數紅色與綠色螢光仍未有重疊，不論是 EGFP-Z-FADS (圖十八 A)或是 Z-FADS-EGFP (圖十八 B)皆可以看到同樣結果。

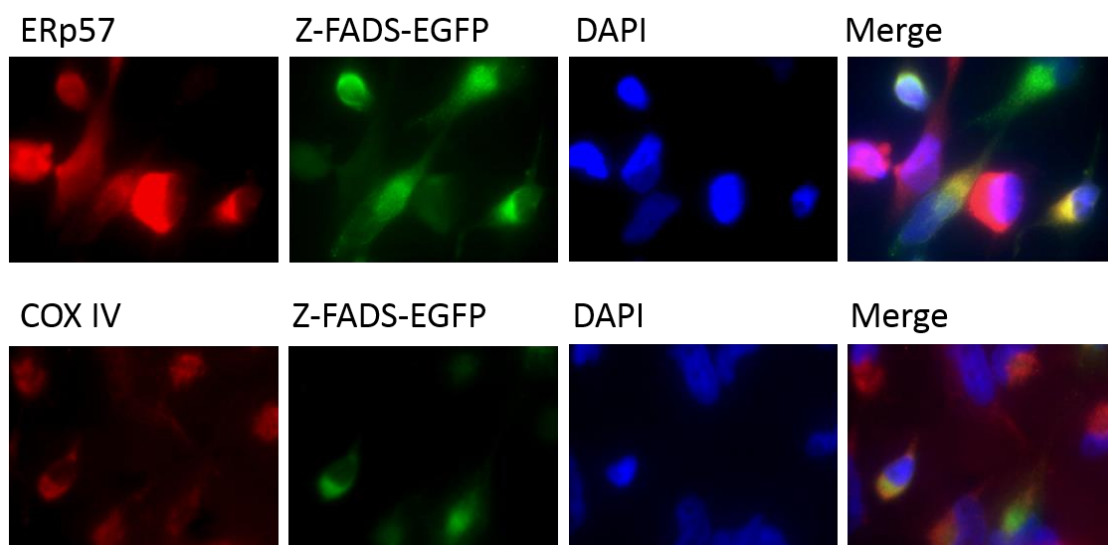
在細胞粒線體萃取實驗中，利用 pcDNA3CF-Z-FADS 質體於 HeLa 細胞內表現出 Z-FADS-FLAG 融合蛋白，再將細胞內的粒線體以及連同胞器內蛋白一起萃取出，以抗體辨認後確認蛋白表現。實驗結果顯示，細胞總蛋白質可以西方墨點法偵測到 Z-FADS-FLAG 融合蛋白，可確認 pcDNA3CF-Z-FADS 質體可於細胞內表現

(圖十八 C, Lane 1)；而在粒線體萃取液也可偵測到 Z-FADS-FLAG 融合蛋白(圖十八 C, Lane 2)。以 anti-COX IV 抗體為粒線體萃取液正控制組(positive control)，確認有萃取到粒線體內之蛋白質。以偵測核膜的 anti-Lamin A/C 抗體為負控制組(negative control)，確認粒線體萃取液中沒有破碎不完全或完整的細胞污染。

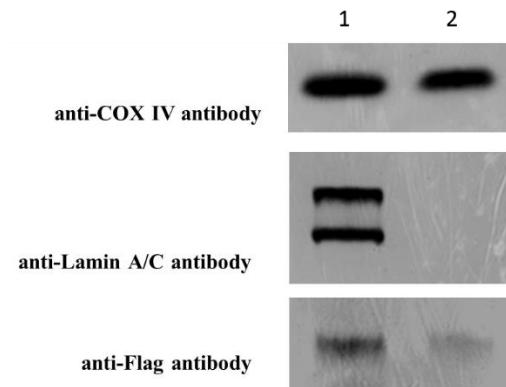
A



B



C



圖十八、斑馬魚 Z-FADS 於 HeLa 細胞內表現與胞器定位分析。以 pEGFP-N1-Z-FADS、pEGFP-C1-Z-FADS 及 pcDNA3CF-Z-FADS 轉殖於 HeLa 細胞內表現後，分別以顯微鏡觀察及粒線體萃取鑑定斑馬魚 Z-FADS 於細胞內表現與胞器定位。(A) 為 EGFP-Z-FADS 與內質網(上圖)及粒線體(下圖)免疫螢光染色分析，(B)為 Z-FADS-EGFP 與內質網(上圖)及粒線體(下圖)免疫螢光染色分析，(C)為 HeLa 細胞總蛋白質 (Lane 1)及粒線體蛋白(Lane 2)之西方墨點分析，anti-COX IV 抗體為正控制組(positive control)，偵測核膜的 anti-Lamin A/C 抗體為負控制組(negative control)。綠色為 EGFP 螢光基團；紅色為 rhodamine 螢光基團，藍色為 DAPI 染色，黃色部分為兩蛋白互相重疊部分。

3.1.6 DHA 及 EPA 生物合成與脂肪酸甲酯分析

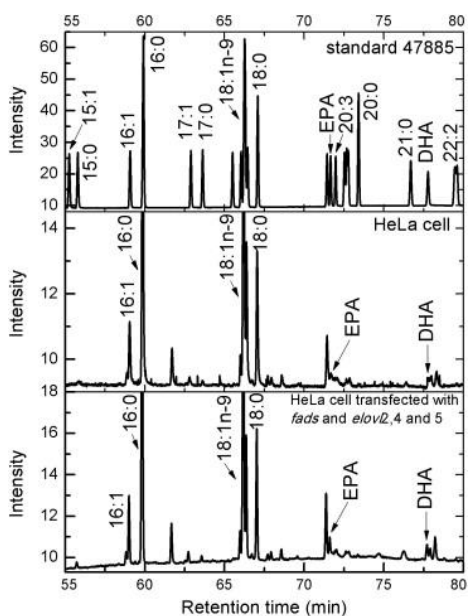
將帶有斑馬魚 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因之表現質體送入 HeLa 細胞中，轉染 18 小時後，添加 ALA 至培養基中，作用 3 小時後以甲醇及乙醯氯混合進行甲酯化反應，再以正己烷萃取脂肪酸。

以氣相層析儀分析脂肪酸甲酯實驗結果顯示，*fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因同時存在時，細胞內的 DHA 及 EPA 產量會提升。以氣相層析儀之圖譜解析，同時比較脂肪酸甲酯標準品(圖十九 A 上)、未轉染基因之 HeLa 細胞(圖十九 A 中)及

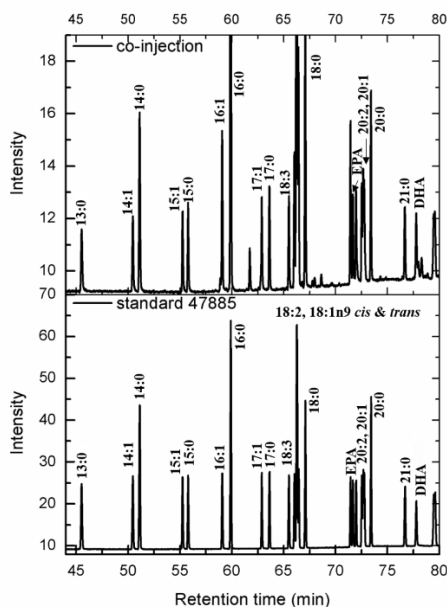
轉染 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因之 HeLa 細胞(圖十九 A 下)，根據相同的滯留時間(retention time)並且與標準品進行比對，確認出 DHA 及 EPA 之相對位置。DHA 與 EPA 相對增加量採用(16:1):(18:0):EPA:DHA 的波峰比值(peak ratio)，可發現 HeLa 細胞在 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因同時存在時，四種脂肪酸甲酯之波峰比值從 1.0:2.1:0.32:0.18 增加為 1.0:1.9:0.44:0.27 (圖十九 A)，根據比例計算 DHA 增加 50%，而 EPA 增加 37.5%。

在脂肪酸甲酯與標準品共注射(co-injection)實驗中，結果顯示標準品之 DHA 與 EPA 在氣相層析圖譜之波峰有顯著增加(圖十九 B)，也透過共注射實驗確認 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因轉染後，HeLa 細胞的脂肪酸甲酯與標準品之 DHA 與 EPA 為同一個波峰，更證實在 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因同時存在時，DHA 與 EPA 的量會提升。

A



B



圖十九、DHA 及 EPA 生物合成與脂肪酸甲酯分析。將帶有斑馬魚 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因之表現質體送入 HeLa 細胞中，以氣相層析儀分析細胞中的脂

肪酸甲酯，並計算 DHA 與 EPA 生成量。(A)為斑馬魚 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因轉染後之 DHA 及 EPA 氣相層析圖譜，上圖為脂肪酸甲酯標準品，中圖為 HeLa 細胞總脂肪酸分析圖，下圖為斑馬魚 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因轉染後 HeLa 細胞總脂肪酸圖譜。(B)圖為斑馬魚 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因轉染後 HeLa 細胞總脂肪酸與脂肪酸甲酯標準品共注射之氣相層析圖譜，上圖為共注射結果，下圖為脂肪酸甲酯標準品。



3.2 原核生物

3.2.1 Xylene monooxygenase complex 序列分析

以 CDD 保守區分析結果可以發現 *Pseudomonas putida* mt-2 XylM 為膜結合型類脂肪酸去飽和酶超級家族，同時在蛋白質序列上具有雙鐵離子結合位 (di-iron binding site) (圖二十 A)，代表 XylM 蛋白可能為具有金屬之膜蛋白。XylA 蛋白則為單一胜肽序列具有多重功能區之蛋白，在功能分析上被歸類於電子傳遞蛋白 (FNR-like superfamily)，具有鐵硫簇結合位，帶有二鐵二硫鐵硫簇中心 (fer2 superfamily, 2Fe-2S iron-sulfur cluster)，負責提供電子進行催化反應之蛋白。序列分析上，XylA 蛋白同時具有黃素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)及菸醯胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)結合位(圖二十 B)，故 XylA 為一個 ferredoxin-NAD⁺ reductase，可將輔酶之電子對透過其轉移給 XylM 以進行催化反應。

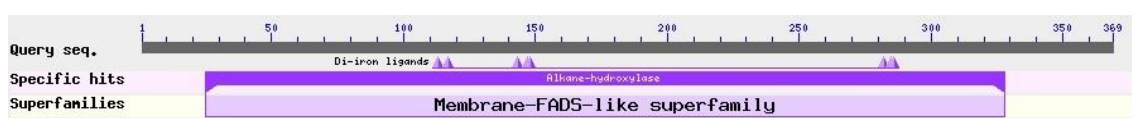
在 XylM 蛋白質序列比對部分，與其他物種之蛋白質序列比對分析也發現與同屬於假單孢菌屬的 *Pseudomonas sp. TW3* 之 4-硝基甲苯單加氧酶(4-nitrotoluene monooxygenase hydroxylase component, NtnMA, AAC38359.1)有 86%的相似性，而與新鞘氨醇菌(*novosphingobium sp. PP1Y*)的脂肪酸去飽和酶在胺基酸序列 (YP_004534277.1)上則有 56%相似性，而與分類學上較遠之鞘脂單胞菌科的 *Sphingobium yanoikuyae* 的二甲苯單加氧酶(ABM79805.1)則有 52%的相似(圖二十 C)。XylM 與其他不同物種之脂肪酸去飽和酶與單加氧酶在蛋白質序列上皆可比對到膜蛋白型脂肪酸去飽和酶所特有之組胺酸盒子(histidine box)，其序列為 HELxH (box 1)、HxxxHH (box 2)及 HxxHH (box 3)。蛋白序列比對結果，亦有發現另外一個高保守區之組胺酸區域，其序列為 HHxWNH，不論是分類學上較近之 *Pseudomonas sp. TW3* 或分類學上較遠之 *Sphingobium yanoikuyae* 皆帶有同樣之組胺酸區域(圖二十 C)。

XylA 蛋白質序列比對對象以圖一 C 中同物種相對應之還原酶(reductase)。

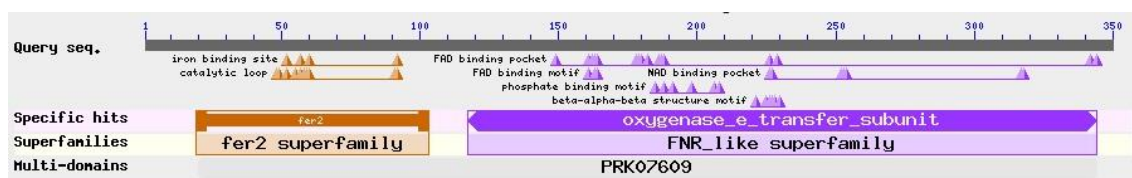


Pseudomonas sp. TW3 之 NtnMA 相對應的還原酶(reductase component of 4-nitrotoluene monooxygenase NtnMA, AAC38360.1)、新鞘氨醇菌脂肪酸去飽和酶相對應的還原酶(oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding subunit, YP_004534276.1)及 *Sphingobium yanoikuyae* 二甲苯單加氧酶的相對應還原酶(oxygenase component of xylene monooxygenase, ABM79805.1),其蛋白質序列相似性分別為 99%、48% 及 47% (圖二十 D)。

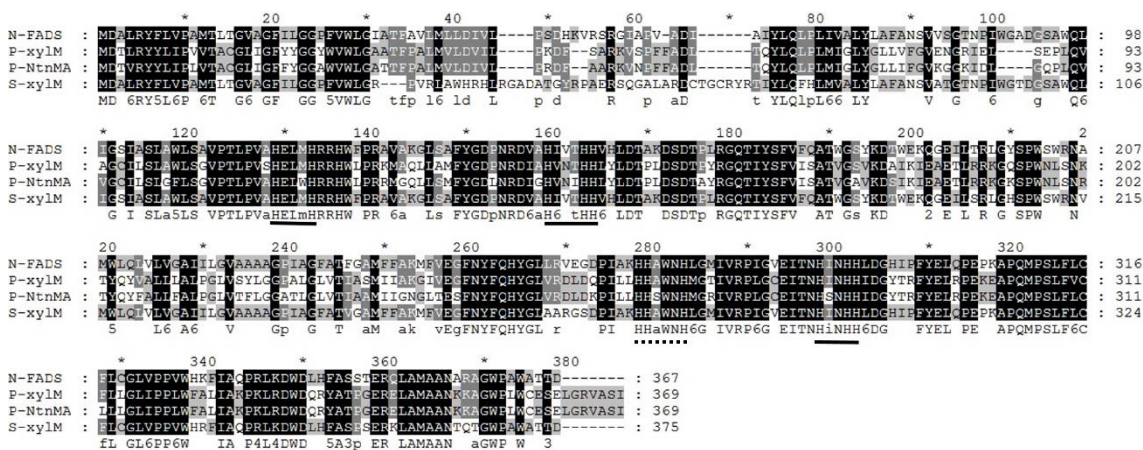
A

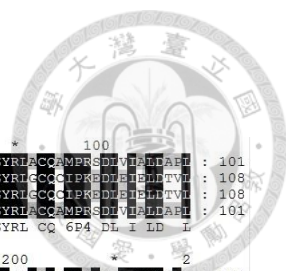


B

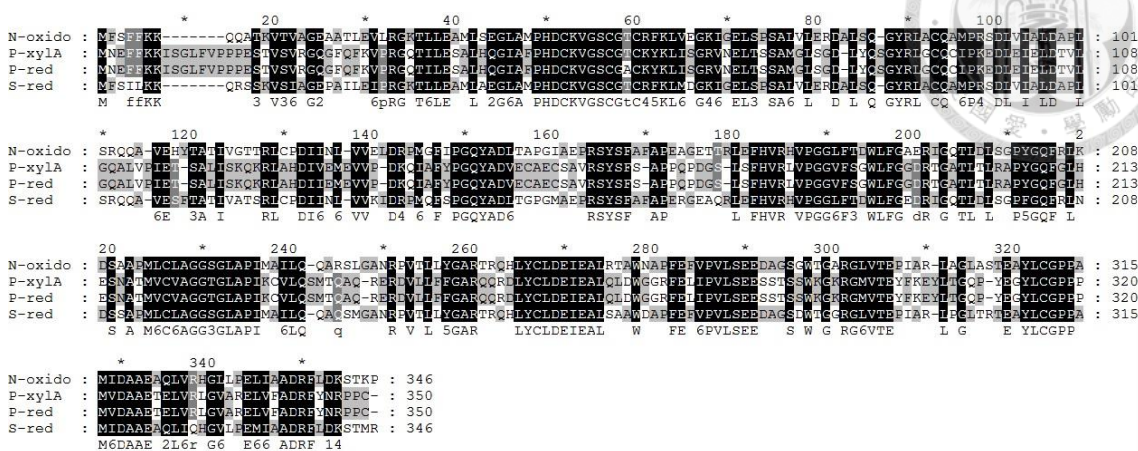


C





D



圖二十、*Pseudomonas putida* mt-2 XylM 與 XylA 蛋白序列保守區資料庫比對 (Conserved Domains Database, CDD)，及以 MEGA5 進行蛋白質序列相似性分析。(A)為 XylM 胺基酸序列分析，可發現 XylM 蛋白在功能上被歸類於膜結合型類脂肪酸去飽和酶超級家族，同時亦具有鐵離子結合位，為一種金屬酵素。(B)為 XylA 胺基酸序列分析，XylA 為單一胜肽序列具有多重功能區之蛋白，同時具有鐵硫簇中心 (2Fe-2S iron-sulfur cluster)，亦具 FAD 與 NAD 之結合位，具有電子傳遞之功能 (ferredoxin-NAD⁺ reductase)，(C)為 *Pseudomonas putida* mt-2 XylM (P-xylA) 與 *Pseudomonas* sp. TW3 之 4-硝基甲苯單加氧酶(4-nitrotoluene monooxygenase hydroxylase component, P-NtnMA, AAC38359.1)、新鞘氨醇菌(*Novosphingobium* sp. PPIY)的脂肪酸去飽和酶(N-FADS, YP_004534277.1)及 *Sphingobium yanoikuyae* 的二甲苯單加氧酶(S-xylM, ABM79805.1)蛋白質序列比對，(D)為 *Pseudomonas putida* mt-2 XylA 與 *Pseudomonas* sp. TW3 之 NtnMA 相對應的還原酶(reductase component of 4-nitrotoluene monooxygenase NtnMA, AAC38360.1)、新鞘氨醇菌脂肪酸去飽和酶相對應的還原酶(oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding subunit, YP_004534276.1)及 *Sphingobium yanoikuyae* 二甲苯單加氧酶的相對應還原酶(oxygenase component of xylene monooxygenase, ABM79805.1)。MEGA5 序列比對

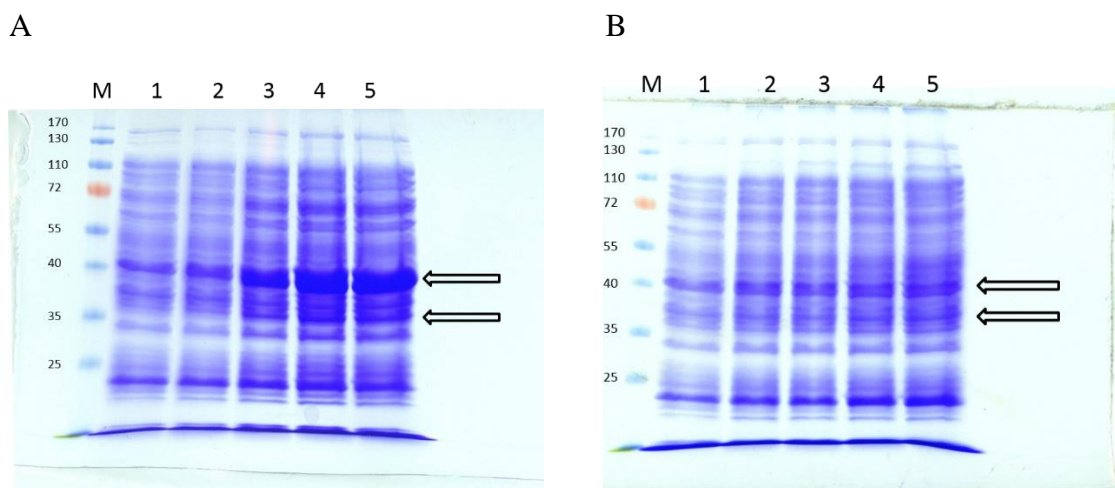
結果以 GeneDoc 軟體以黑、灰及白三色呈現比對結果，黑色為完全相同之胺基酸殘基，灰色為部分相同之胺基酸殘基，白色為完全不相同之胺基酸殘基。



3.2.2 Xylene monooxygenase 蛋白質複合體共同表現質體構築與蛋白質誘導表現分析

質誘導表現分析

以 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 之蛋白表現以 BL-21 (DE3) 及 BL-21 (DE3) pLysS 為宿主細胞，可明顯看出 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現質體在 BL-21 (DE3) 細胞中，在分子量 41 kDa 的位置有明顯的蛋白表現為 XylA 蛋白，在分子量 38 kDa 的位置則有較弱的蛋白表現為 XylM；而在 BL-21 (DE3) pLysS 細胞中，同樣位置也可以看到有蛋白質被誘導而表現，但表現量不及 BL-21 (DE3) 勝任細胞 (圖二十一)。從蛋白誘導表現及電泳分析結果可知，BL-21 (DE3) 較適合用於共同表現 XylM 及 XylA 蛋白，後續實驗也以此菌作表現用。



圖二十一、 pACYC-Duet-1-XylA-XylM 共同表現質體於不同宿主細胞蛋白質表現分析。(A) BL-21 (DE3) 細胞中，以終濃度 0.4 mM IPTG 於 20°C 誘導的蛋白質表現。(B) BL-21 (DE3) pLysS 細胞中，以終濃度 0.4 mM IPTG 於 20°C 誘導的蛋白質表現。Lane1 為未添加 IPTG 誘導、Lane2~5 分別為誘導後 2、4、6 及 8 小時。箭頭表示

質體受誘導後表現出的 XylA 蛋白 (上方箭頭)與 XylM 蛋白(下方箭頭)。



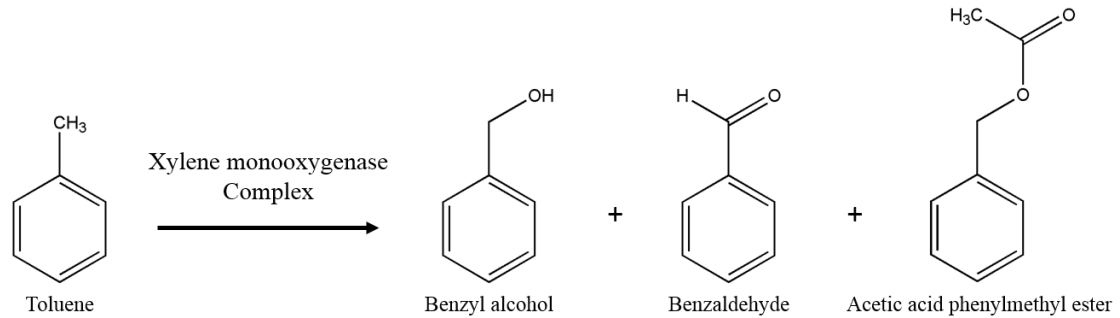
3.2.3 Xylene monooxygenase 蛋白質複合體活性分析

已誘導目標蛋白表現後的菌液會直接對吲哚(indole)起反應,使菌液呈現藍色,以此作為判斷所誘導之目標蛋白質複合體是否具有活性的依據。將菌液離心並以新鮮 LB broth 重新懸浮菌體,並調整至 $OD_{600}=15$ 以進行活性反應分析,活性反應分析的受質為表三所列舉之環化物、飽和烷烴類及不飽和烷烴類等三大類,其中飽和烷烴類完全沒有活性反應,從飽和 3 個碳至飽和 10 個碳的化合物,均無法反應,另同時以 GC-MS 無法偵測到反應物,但將氟取代氫形成飽和烷烴氟化物則可以產生催化反應。

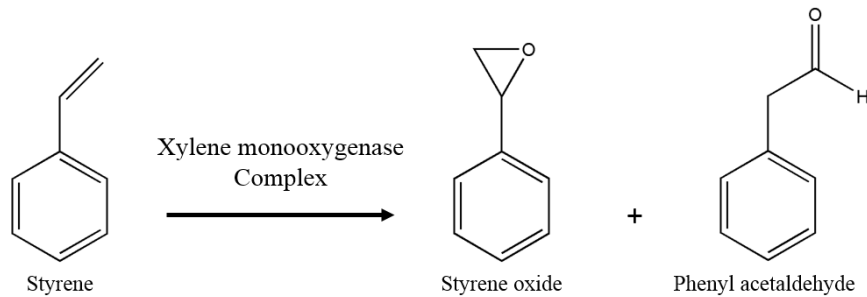
苯環類化合物為 xylene monooxygenase 已知可反應之化合物,實驗中使用甲苯(toluene)、苯乙烯(styrene)、對乙基甲苯(4-ethyl-toluene)及對二甲苯(*p*-xylene),由於 styrene 在 37°C 並沒有被 xylene monooxygenase 所催化,但 toluene、4-ethyl-toluene 及 *p*-xylene 則均可於 37°C 下進行催化反應。而這四種苯環類化合物在 25°C 則均可在 GC-MS 偵測到相對應的產物(圖二十二)。這四種苯環類化合物中,以 4-ethyl-toluene 的催化反應效率最高,可達到 95.4%;其次為 *p*-xylene 91%,而 toluene 的催化反應效率為 87.5%,居四種苯環類化合物第三,styrene 的催化反應效率則最低,約為 45%左右(表六)。Toluene 在經過 xylene monooxygenase 作用後會產生 81.9% 的苯甲醇(benzyl alcohol)、17.8% 的苯甲醛(benzaldehyde)及約 0.3% 於末端接上乙酰基產生酯化反應之特殊代謝延伸物—乙酸苯甲酯(acetic acid phenylmethyl ester)(圖二十二 A 及表六)。Styrene 經過 xylene monooxygenase 作用後會產生 96.2% 氧化苯乙烯(styrene oxide)及少量約 3.8% 的醛類代謝延伸物—苯乙醛(phenyl acetaldehyde)(圖二十二 B 及表六)。4-ethyl-toluene 在經過 xylene monooxygenase 作用後會,則會產生 2.2% 對乙基苯甲醇 (4-ethyl benzene methanol)與 97.8% 對乙基苯甲醛(4-ethyl benzaldehyde) (圖二十二 C 及表六)。而 *p*-xylene 在經過 xylene monooxygenase 作用後,則會產生 96.3% 對甲基苯甲醇 (4-methyl benzene methanol)、

2.9%對甲基苯甲醛(4-methyl benzaldehyde)以及少量約 0.9%會於末端接上乙醯基進而產生酯化反應之特殊代謝延伸物—對甲基苯甲醇乙酸酯(4-methylbenzyl acetate)(圖二十二 D 及表六)。從這些產物分析，xylene monooxygenase 進行羥基化作用的部位為反應物的第一個碳，且在 37°C 反應 3 小時後，以苯環類 4 號碳位置接上官能基之化合物，其催化反應效率優於 4 號碳未接上官能基之化合物，而其中官能基為以帶有 2 個碳之乙基催化反應效率優於帶有 1 個碳之甲基，而於 1 號碳帶有雙鍵之官能基，其催化反應效率遠低於 1 號碳不具有雙鍵之官能基。

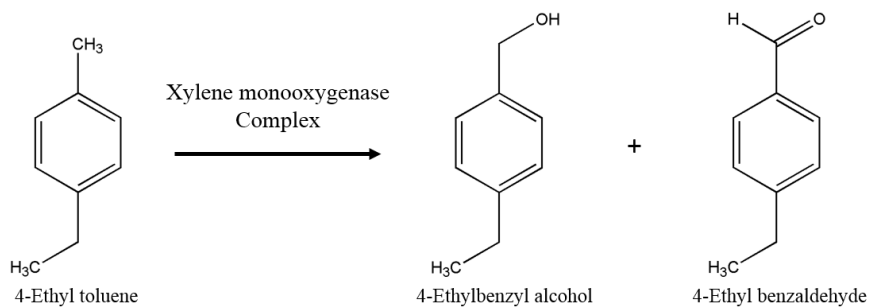
A



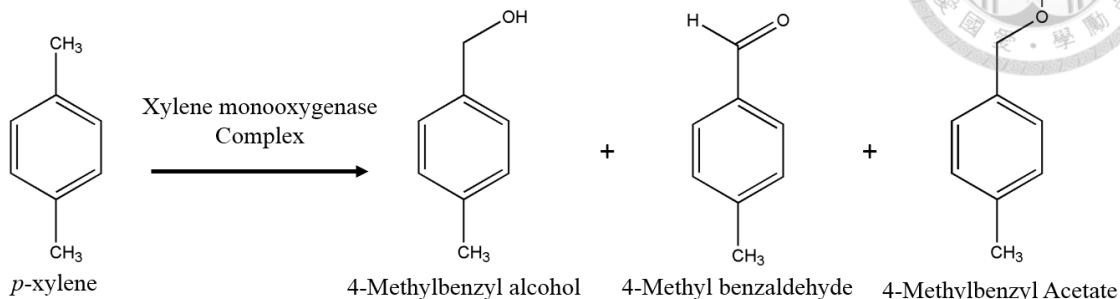
B



C




D



圖二十二、苯環類化合物以 xylene monooxygenase 作用產生相對應之羥基化產物。
 (A) 甲苯經 xylene monooxygenase 作用產生苯甲醇、苯甲醛及乙酸苯甲酯，(B) 苯乙烯經 xylene monooxygenase 作用產生氧化苯乙烯及苯乙醛，(C) 對乙基甲苯經 xylene monooxygenase 作用產生對乙基苯甲醇及對乙基苯甲醛，(D) 對二甲苯經 xylene monooxygenase 作用產生對甲基苯甲醇、對甲基苯甲醛及對甲基苯甲醇乙酸酯。

在使用鏈狀烷烴類化合物作為反應物的實驗組中，以二順式(*cis*-2) 及二反式(*trans*-2)之丁烯(*butene*)、戊烯(*pentene*)、己烯(*hexene*)及以氟取代氫形成飽和烷烴氟化物—三氟丁烷(*trifluoro butane*)為 xylene monooxygenase 反應物，反應後萃取再經 GC-MS 偵測，均可偵測到相對應產物。四種反應物中以 6 個碳的鏈狀烷烴類化合物反應優於碳數較少的鏈狀烷烴類化合物，而其中不飽和型式又以反式化合物之催化反應效率優於同碳數之順式化合物(表六)。而飽和 4 個碳之丁烷無法被 xylene monooxygenase 進行催化，但若以氟取代氫產生之三氟丁烷，可被 xylene monooxygenase 所催化，其催化反應效率約為 18.8% (表六)，高於 *cis*-2-*butene* 之 11.6% (表六)。*cis*-2 及 *trans*-2-*butene* 經過 xylene monooxygenase 作用後的產物為 *cis*-2 及 *trans*-2 丁烯 1 醇(*buten-1-ol*)，其中 *cis*-2-*butene* 之催化反應 100% 產生 *cis*-2-*buten-1-ol*，而 *trans*-2-*butene* 之催化反應則產生 97.9% 的 *trans*-2-*buten-1-ol* 及少量約 2.1% 的醛類化合物— *trans*-2-*butenal*，且其中 *trans*-2-*butene* 的催化反應效率

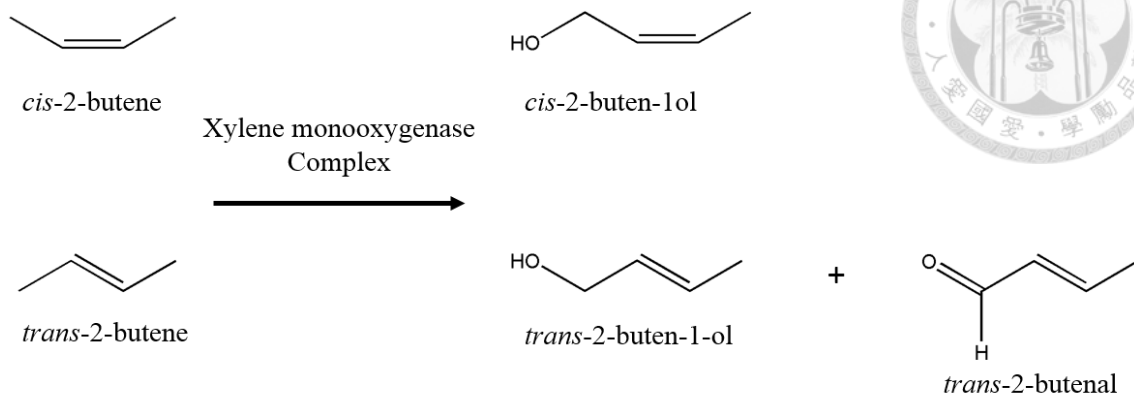


為 26.5%，優於 *cis*-2-butene 之 11.6% 的催化反應效率(圖二十三 A 及表六)。在 5 個碳反應物部分，*cis*-2 及 *trans*-2-pentene 經過 xylene monooxygenase 作用後的產物為 *cis*-2 及 *trans*-2 戊烯 1 醇 (penten-1-ol)，而 *cis*-2-penten-1-ol 及 *trans*-2-penten-1-ol 這兩種產物皆可再受 xylene monooxygenase 催化而產生相對應之醛類產物—*cis*-2-pentenal 及 *trans*-2-pentenal (圖二十三 B)。而 *cis*-2 及 *trans*-2-hexene 經過 xylene monooxygenase 作用後的產物為 *cis*-2 及 *trans*-2 己烯 1 醇 (hexen-1-ol)，其中 *cis*-2-hexene 之催化反應 100% 產生 *cis*-2-hexen-1-ol，而 *trans*-2-hexene 之催化反應則產生 79.1% 的 *trans*-2-hexen-1-ol 及約 20.9% 的醛類化合物—*trans*-2-hexenal，兩者催化反應也同樣以 *trans*-2-hexene 優於 *cis*-2-hexene，其總反應效率分別為 76.6% 與 61% (圖二十三 C 及表六)。不論是 *cis*- 或是 *trans*- 兩種形式不飽和烷烴類化合物，再經過 xylene monooxygenase 作用後的產物均為 1-ol，也就是在第一號碳位置作用而羥基化之產物，綜合此結果顯示 *trans* 化合物之催化反應效率優於同碳數之 *cis* 化合物。

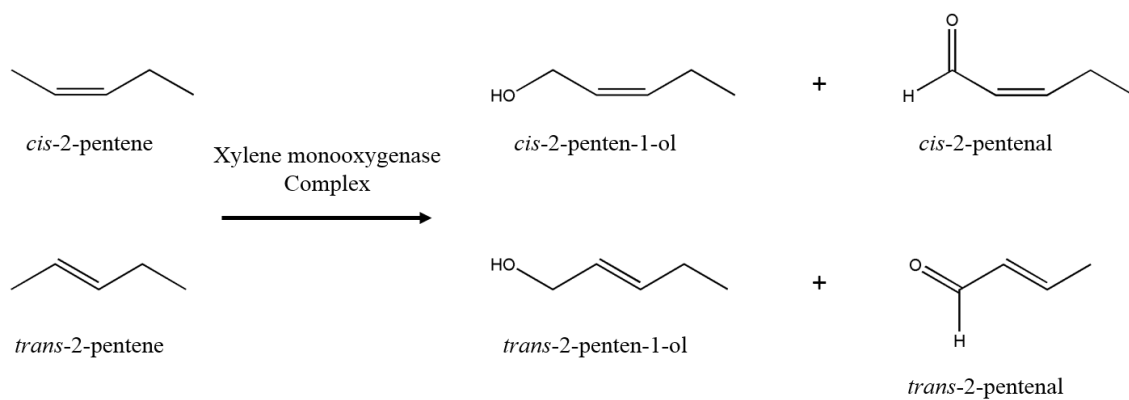
飽和烷烴類化合物無法產生反應，但以氟取代氫形成之飽和烷烴氟化物—trifluoro butane 則可經 xylene monooxygenase 作用而於 trifluoro butane 碳末端接進行羥基化反應，產生 trifluoro butanol (圖二十三 D)，反應產物 100% 為醇類(表六)，沒有產生醛類，顯示氟取代氫之飽和烷烴氟化物有高反應專一性，同時也顯示 C-F 鍵結可改善飽和烷烴類化合物無法被 xylene monooxygenase 催化之困難，而含氟化合物亦使丁烷催化反應效率由完全不反應提高至 18.8% 之催化反應效率(表六)。



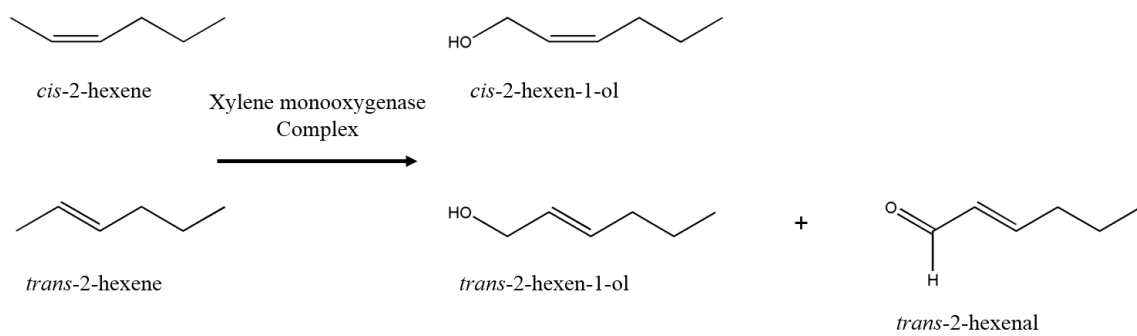
A



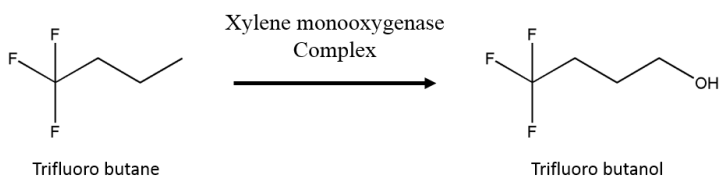
B



C



D



圖二十三、不飽和烷烴類化合物經 xylene monooxygenase 作用產生的相對應之羥基化產物。(A) *cis*-2 及 *trans*-2-butene 經 xylene monooxygenase 作用後的產物為 *cis*-2 及 *trans*-2-buten-1-ol，(B)為 *cis*-2 及 *trans*-2-pentene 經 xylene monooxygenase 作用後的產物 *cis*-2 及 *trans*-2-penten-1-ol，(C)為 *cis*-2 及 *trans*-2-hexene 經過 xylene monooxygenase 作用後的產物 *cis*-2 及 *trans*-2-hexen-1-ol，(D) Trifluoro butane 經 xylene monooxygenase 作用後，於末端羥基化的 Trifluoro butanol。

表六、二甲苯單加氧酶複合體對苯環類化合物、不飽和烷烴類化合物及飽和類氟化物催化反應效率

Sample name	Activity assay	Total conversion rate (%)	Products conversion rate (%)		
			Alcohol / Epoxide	Aldehyde	Metabolism derivative
Toluene	+	87.5	81.9	17.8	0.3
Styrene	+	45.3	96.2	3.8	N.D.
4-Ethyl-Toluene	+	95.4	2.2	97.8	N.D.
<i>p</i> -xylene	+	91.0	96.3	2.9	0.9
<i>cis</i> -2-Butene	+	11.6	100.0	N.D.	N.D.
<i>trans</i> -2-Butene	+	26.5	97.9	2.1	N.D.
<i>cis</i> -2-hexene	+	61.0	100.0	N.D.	N.D.
<i>trans</i> -2-hexene	+	76.6	79.1	20.9	N.D.
Trifluoro-butane	+	18.8	100.0	N.D.	N.D.

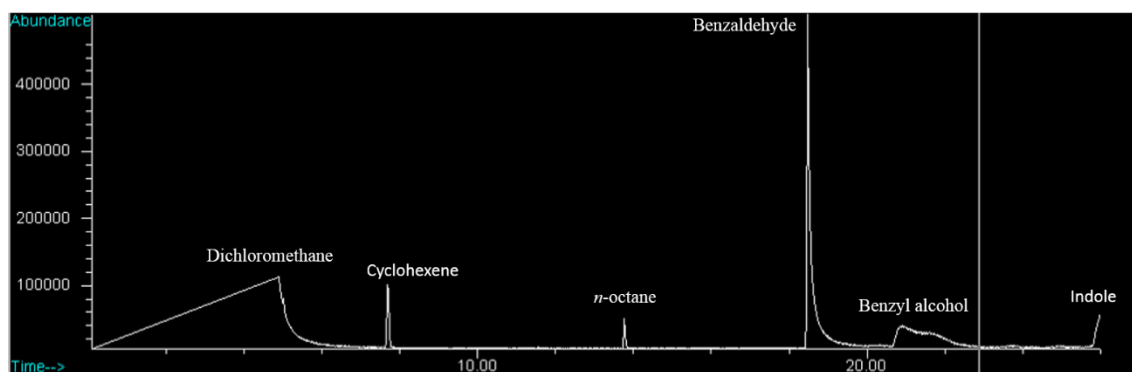
N.D. 表示無法以 GC-MS 偵測到相對應之產物

3.2.4 Xylene monooxygenase 蛋白質複合體定點突變分析

定點突變得到 3 種突變型 xylene monooxygenase，分別為 W321A、W333A 及 W355A 等突變型。只有 W333A 有呈現不明顯的藍色，整體顯色為淡藍黃色，與

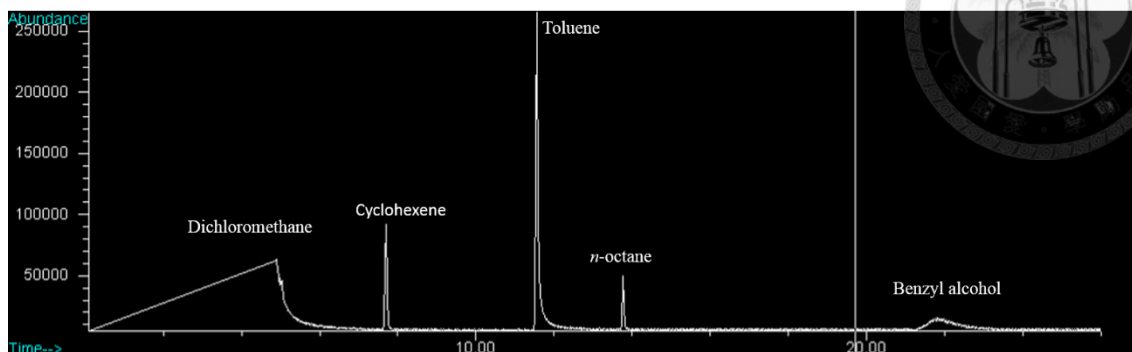
原始型(wild type)分子所造成的藍色明顯不同。W321A 與 W355A 兩種突變型在誘導過程中培養液呈黃色混濁，並沒有藍色出現。將菌液離心並以新鮮 LB broth 重新懸浮菌體，並調整至 $OD_{600}=15$ 並以 toluene 做為反應物測試此三種突變型 xylene monooxygenase 的活性反應。三種突變型對於 toluene 的活性反應皆有下降，其中 W333A 對 toluene 的活性反應是三種突變型中較高的，其催化反應效率為 81.8% (表七)，較原始型(wild type, WT) xylene monooxygenase 的催化反應效率減少 18.2%。而 W321A 則居次，其催化反應效率只剩 26.5% (表七)，減少 73.5%。而 W355A 則完全無法對 toluene 進行催化反應，完全失去活性(表七)。在催化反應 37°C 反應 3 小時後，WT xylene monooxygenase 可將 toluene 完全反應，其催化效率為 100%，產物為 37.3% benzyl alcohol 及 62.7% benzaldehyde (圖二十四 A 及表七)。W321A 則只有 benzyl alcohol 產生，其產物轉換率為 100%，沒有 benzaldehyde 產物被 GC-MS 偵測到(圖二十四 B 及表七)。W333A 突變型催化產生 benzyl alcohol 及 benzaldehyde 兩種產物(圖二十四 C)，其中約有 91.0% 的 toluene 被轉化成 benzyl alcohol，而只有 8.99% benzaldehyde (表七)。W355A 完全失去活性，在 toluene 的活性反應測試中，在 GC-MS 無法偵測到 benzaldehyde 及 benzyl alcohol (圖二十四 D)。

A

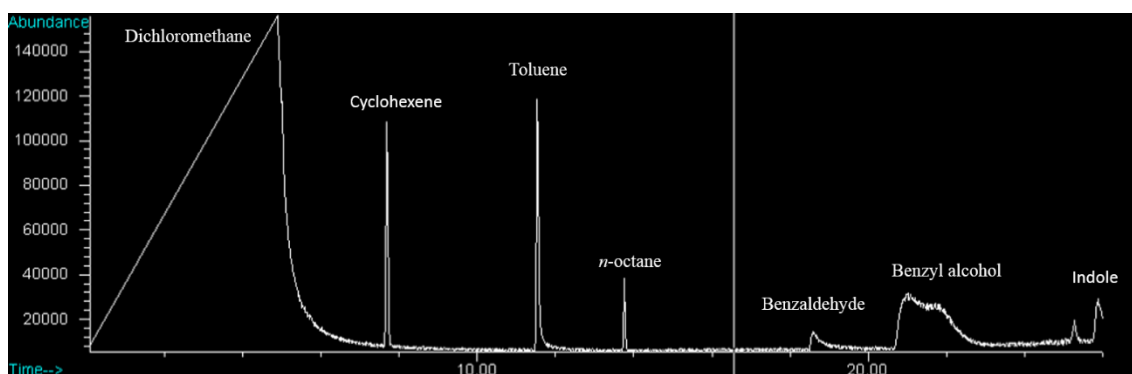




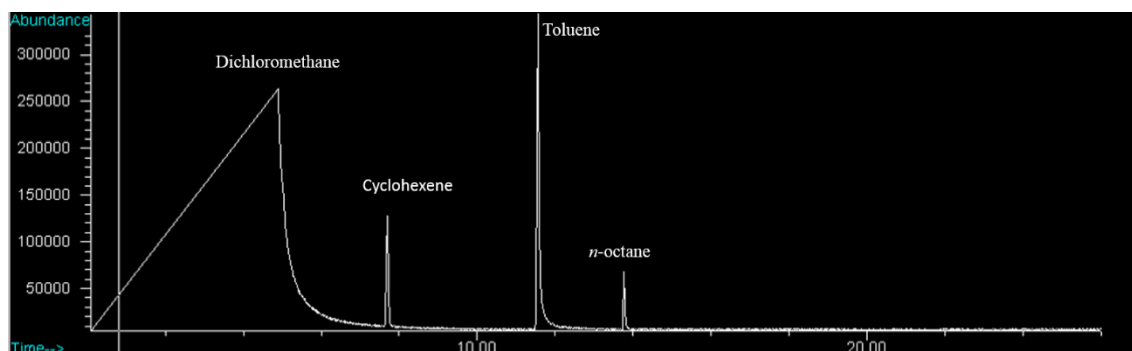
B



C



D



圖二十四、Wild type 與突變型 xylene monooxygenase 與 Toluene 反應之 GC-MS 圖譜。(A) wild type xylene monooxygenase 與 toluene 於 37°C 反應 3 小時後，toluene 完全被反應完之 GC-MS 圖譜，(B) W321A 突變型只有產生 benzyl alcohol，且仍有大量反應物未被作用完。(C) W333A 突變型產生大量 benzyl alcohol 及少量 benzaldehyde。(D) W355A 突變型完全失去活性。

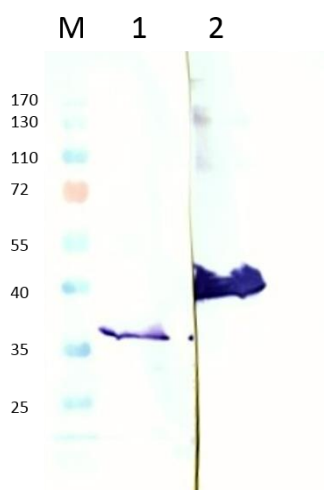
表七、二甲苯單加氧酶 W321A、W333A 及 W355A 定點突變針對甲苯之催化效率分析

Xylene monooxygenase	Activity assay	Total conversion rate (%)	Productas conversion rate (%)	
			Alcohol	Aldehyde
Wild Type	+	100	37.3	62.7
W321A	+	26.5	100	N.D.
W333A	+	81.8	91.0	8.99
W355A	-	0	N.D.	N.D.

N.D. 表示無法以 GC-MS 偵測到相對應之產物

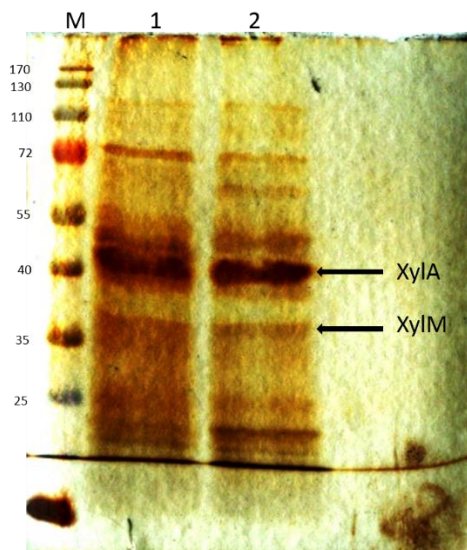
3.2.5 Xylene monooxygenase complex 西方墨點分析與免疫共沉澱試驗

分別在 *XylM* 與 *XylA* 基因序列 3'端接上 His tag 與 FLAG tag，在西方墨點分析中，以抗體進行反應，可以在相對應之分子量清楚辨認到目標蛋白。以 anti-His tag antibody 在分子量 38 kDa 辨認到 *XylM*-His 蛋白；以 anti-FLAG antibody 在分子量 41 kDa 辨認到 *XylA*-FLAG 蛋白（圖二十五）。經過西方墨點分析確認 *XylM*-His 與 *XylA*-FLAG 蛋白，兩種蛋白均在 BL-21(DE3)中表現。



圖二十五、XylM-His 與 XylA-FLAG 蛋白質西方墨點分析。Lane 1 與 Lane2 均為 pACYC-Duet-1-XylM-His-XylA-FLAG 轉形至 BL-21(DE3) 宿主細胞誘導表現後的細菌總蛋白質。轉漬後 Lane 1 以 Monoclonal Anti-polyHistidine-Alkaline Phosphatase antibody (A5588, sigma) 進行分析，Lane 2 以 Monoclonal ANTI-FLAG® M2-Alkaline Phosphatase antibody (A9469, sigma) 進行分析。PVDF 轉漬膜以 NBT/BCIP 呈色 (ThermoScientific)。Marker 為 Bioman #1025 pertained protein marker。

在 XylM-His 及 XylA-FLAG 免疫共沉澱試驗中，以 XylM-His 為沉澱標的蛋白，以含有不同洗滌劑之兩種萃取緩衝液進行細胞裂解及以超音波震盪破碎後，以 anti-His tag antibody 抓取 XylM-His。在市售萃取緩衝液含非離子性洗滌劑 (nonionic detergent) 的實驗組中，可免疫共沉澱同時抓取到 XylM-His 及 XylA-FLAG 蛋白，在 51 kDa 及 24 kDa 有明顯的兩條蛋白帶，與兔子免疫球蛋白之重鏈與輕鏈蛋白分子量一致。以 0.5% DDM 為唯一洗滌劑成分的萃取液實驗組中，同樣也可免疫共沉澱到 XylM-His 及 XylA-FLAG 蛋白，此實驗組共沉澱到其餘蛋白較市售萃取緩衝液多，但仍可以明顯看到 XylM-His 及 XylA-FLAG 蛋白，同樣也可看到兔子免疫球蛋白分子，證明此方法的正確性(圖二十六)。



圖二十六、Xylene monooxygenase complex 以 anti-His tag 抗體進行免疫共沉澱分析。Lane 1 為以市售萃取緩衝液含非離子性洗滌劑 (nonionic detergent) 的實驗組；Lane 2 為以 0.5% DDM 為唯一洗滌劑成分的萃取液實驗組，以銀染蛋白。箭頭指示部位分別為 XylA 與 XylM (由上而下)。Marker 為 Bioman #1025 pretained protein marker。

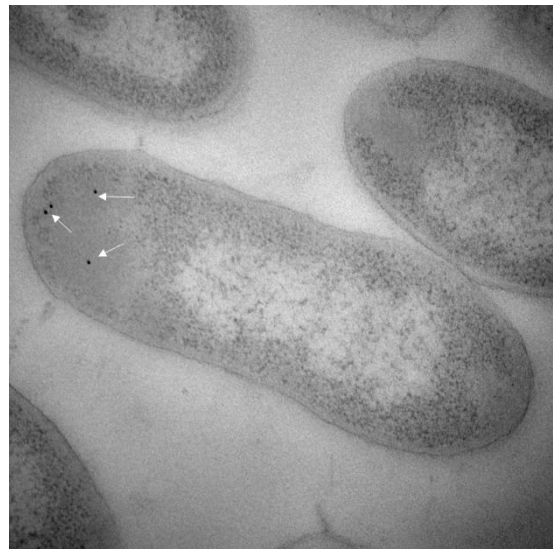
3.2.6 Xylene monooxygenase complex 免疫金標誌分析

以穿透式電子顯微鏡分析 XylA-FLAG 蛋白免疫金標誌分析實驗中，與對照組比較，可清楚看到未轉形質體的 BL-21(DE3) 細胞中無法觀察到免疫金標誌(圖二十七 A)，而 XylA-FLAG 則表現在 BL-21 (DE3) 的細胞質靠近細胞本體的端點附近，且會大量集中(圖二十七 B、C 及 D)，有些 XylA-FLAG 亦會靠近 BL-21 (DE3) 的細胞膜，但是仍然在細胞膜的內側(圖二十七)。

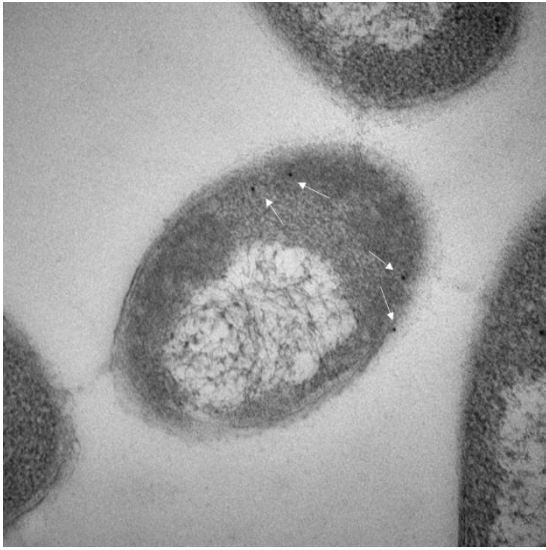
A



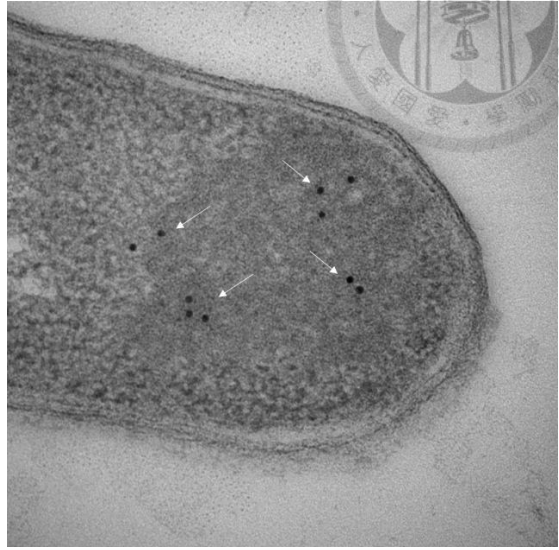
B



C



D



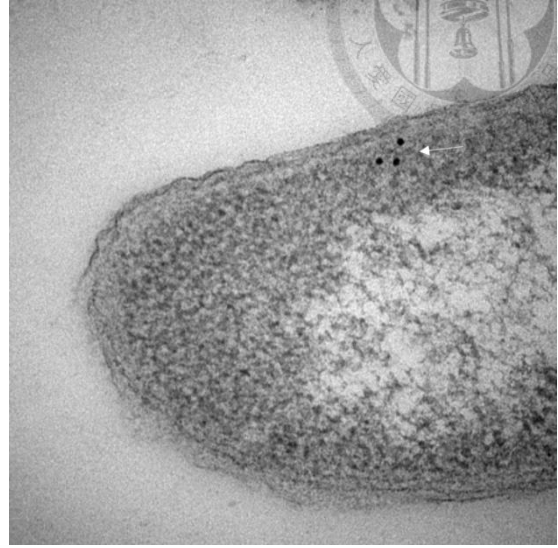
圖二十七、XylA-FLAG 蛋白於 BL-21 (DE3) 表現部位之免疫金標誌分析。(A) 未轉形質體的 BL-21 (DE3) 菌體切片之電顯圖，(B) 60,000 倍放大倍率，BL-21 (DE3) 菌體之 XylA-FLAG 免疫金標誌電顯圖，(C) 80,000 倍放大倍率，BL-21 (DE3) 菌體端點縱剖面電顯圖，(D) 150,000 放大倍率之菌體切片電顯圖。白色箭頭處為經過抗體作用確認出 XylA-FLAG 蛋白表現的位置。

在 XylM-His 蛋白免疫金標誌分析中，以抗體辨認 XylM-His 蛋白發現，XylM-His 蛋白表現量非常低，但以免疫金標誌發現 XylM-His 專一的表現位於 BL-21 (DE3) 的細胞膜上，極少數有集中表現的現象但多數仍然為單獨表現，與 XylA-FLAG 蛋白表現情形不同，而 XylM-His 表現部位也符合蛋白序列分析中表現於細胞膜上 (圖二十八)。

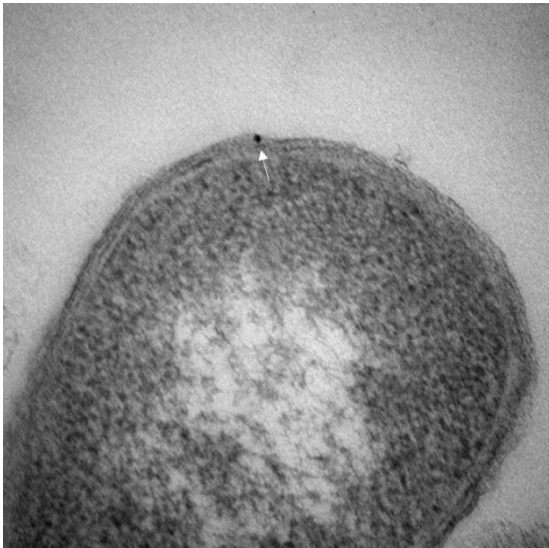
A



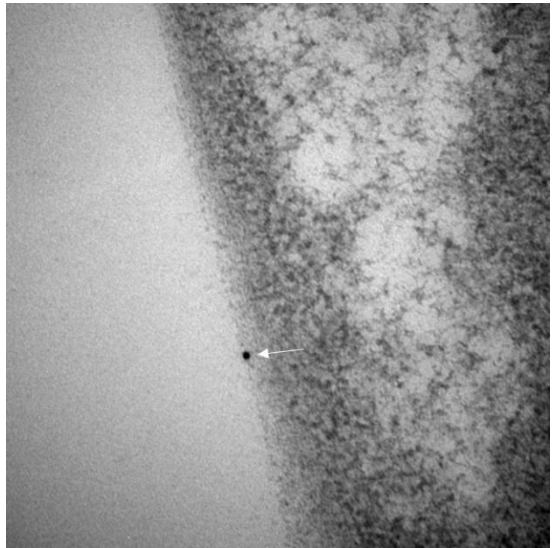
B



C



D



圖二十八、XylM-His 蛋白於 BL-21 (DE3)表現部位之免疫金標誌分析。(A) 未轉形質體的 BL-21 (DE3)菌體切片之電顯圖，(B) 150,000 倍放大倍率，BL-21 (DE3)菌體之 XylM-His 免疫金標誌電顯圖，(C) 150,000 倍放大倍率，BL-21 (DE3)菌體端點縱剖面電顯圖，(D) 150,000 放大倍率之菌體橫切面電顯圖。白色箭頭處為經過抗體作用確認出 XylM-His 蛋白表現的位置。

第四章、討論



4.1 真核生物

斑馬魚 Z-FADS 蛋白質序列與人類與小鼠的 FADS1、FADS2 及 FADS3 在蛋白質序列上與不同物種的不同去飽和酶相似性皆非常高。與小鼠的 FADS1 (NP_666206.1)、FADS2 (NP_062673.1)及 FADS3 (NP_068690.3)分別為 59%、63% 及 56%；與人類的 FADS1 (AAH07846.1)、FADS2 (NP_004256.1)及 FADS3 (NP_068373.1)分別為 58%、65%及 54%。在序列比對分析中，可以直接比對到膜結合型去飽和酶所特有之三個組胺酸盒子，與原核生物較為不同的是，第三個盒子序列為 QIEHH，由 Q 取代 H (圖一) (Castro, Monroig et al. 2012)。

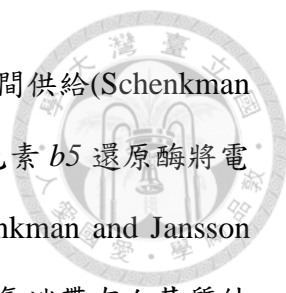
以飽和烷烴類化合物為受質的去飽和酶家族蛋白包括有硬脂醯基輔酶 A 去飽和酶 (Stearoyl-CoA Desaturase, SCD, Δ -9 Desaturase) 及 烷烴 羥 化 酶 (Alkane hydroxylase, AlkB)；而以苯環類或具有單元不飽和之烷烴類化合物之去飽和酶家族蛋白則有 xylene monooxygenase 或硬脂醯基輔酶 A 去飽和酶，其第三個組胺酸盒子的蛋白質序列則為 HxxHH (Shanklin, Whittle et al. 1994)。胺基酸螯合雙鐵形成反應中心，組胺酸扮演重要腳色，但除了組胺酸外，亦有其他胺基酸可以協助穩定雙鐵反應中心的結構例如麩胺酸 (Glutamate, Glu, E) (Broadwater, Haas et al. 1998)。除此之外，在鐵蛋白 (Ferritin) 雙核中心 (Dinuclear center) 的研究中，亦有指出大腸桿菌的非血基質鐵蛋白 (*Escherichia coli* non-haem ferritin, EcFTN) 及人類重鏈鐵蛋白 (Human heavy-chain ferritin, HuHF) 的雙核中心，除了麩胺酸與組胺酸提供共價鍵結外，麩醯胺 (Glutamine, Gln, Q) 會與麩胺酸產生氫鍵作用力以間接穩定雙核中心 (Treffry, Zhao et al. 1997)。而 Z-FADS 第三個組胺酸盒子之麩醯胺亦有可能扮演此角色，但目前文獻仍未有膜結合型脂肪酸去飽和酶的 3D-分子結構圖，因此只能在序列上推測其功能。

斑馬魚 Z-FADS 在蛋白質序列比對分析中，發現具有細胞色素 b5 模組

(cytochrome *b5* motif)其保守序列為 HPGG (圖一)。在 1997 年，Napier 等人先將此類具有細胞色素 *b5* 模組者另外歸類討論，其分類依據為 His-Pro-Pro-Gly-Xaa(8)-Gly-Xaa(6)-Phe-Xaa(3-6)-His，而其中 HPGG 為血基質結合位(heme-binding domain) (Napier, Sayanova et al. 1997)，這個結合位對於去飽和酶催化反應是否能進行扮演了關鍵角色(Napier, Michaelson et al. 2003)。以定點突變的方式將此高保守區域的胺基酸突變，可發現當組胺酸突變成丙胺酸時，去飽和酶完全失去活性(Guillou, D'Andrea et al. 2004)。顯示在去飽和酶中此保守區之重要性。


在斑馬魚去飽和酶作用中，帶有黃素腺嘌呤二核苷酸的細胞色素 *b5* 還原酶為電子傳遞功能蛋白，在氧化還原過程中將電子傳遞給去飽和酶本體。斑馬魚共有四型細胞色素 *b5* 還原酶，分別為：CYB5R1、CYB5R2、CYB5R3 及 CYB5R4。這四型中，CYB5R4 序列與其他三型明顯不同(圖二 A)，其序列較其他三型長，而 CYB5R1-3 各型間相似性較高(圖二 B)。以 Conserve Domain Database 分析其功能區域，發現 CYB5R4 同時帶有細胞色素 *b5* 還原酶及類細胞色素 *b5* 血基質/固醇類結合位(Cytochrome *b5*-like Heme/Steroid binding domain)的功能。而其他三型在蛋白序列不具有細胞色素 *b5* 血基質/固醇類結合位，只有細胞色素 *b5* 還原酶的功能區(附圖二)。四種細胞色素 *b5* 還原酶皆具有黃素腺嘌呤二核苷酸結合位，皆屬於鐵氧還原蛋白還原酶(ferredoxin reductase)。

許多研究有關細胞色素 P450 單一胜肽鏈卻具多個蛋白功能區域，細胞色素 P450 蛋白催化反應過程中亦需要電子，而電子傳遞方式則有數種方式：(1) NADH 直接將電子傳遞給細胞色素 P450 蛋白(Daiber, Shoun et al. 2005)，(2) 有單一胜肽鏈同時具有的細胞色素 P450 蛋白功能區與細胞色素 P450 還原酶(cytochrome P450 reductase, CPR)功能區，在外源電子充足下，即可自行將電子傳遞到催化反應功能區並進行催化反應(Miura and Fulco 1974)，(3) 有細胞色素 P450 蛋白單一胜肽鏈具有鐵硫簇區域(iron-sulfur cluster)，輔酶之電子需由鐵氧還原蛋白還原酶及鐵硫簇區域傳遞給細胞色素 P450 蛋白(Jackson, Lamb et al. 2002)，(4) 由細胞色素 P450 還原酶直接將電子傳遞給細胞色素 P450 蛋白(Serizawa and Matsuoka 1991)，(5) 由細



胞色素 *b5* 介於細胞色素 P450 蛋白與細胞色素 P450 還原酶之間供給(Schenkman and Jansson 2003)，(6) 亦有細胞色素 P450 蛋白直接利用細胞色素 *b5* 還原酶將電子傳遞給細胞色素 *b5*，再傳遞給細胞色素 P450 蛋白本體(Schenkman and Jansson 2003; Henderson, McLaughlin et al. 2013)。而 Z-FADS 蛋白序列氮端帶有血基質結合位作為其電子傳遞之功能區域，因此細胞色素 *b5* 還原酶可直接藉此將電子傳遞給 Z-FADS 本體。而同樣的 CYB5R4 中，同時具有細胞色素 *b5* 還原酶及類細胞色素 *b5* 血基質/固醇類結合位功能，顯示其功能性較可能偏向為特定不具有細胞色素 *b5* 功能區，但是卻需要細胞色素 *b5* 蛋白來輔助其電子傳遞。

依據已解碼完成的斑馬魚基因組序列，斑馬魚不具有 ELOVL6。而在近期的研究中指出， $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 系列長鏈不飽和脂肪酸的延伸，分別是由 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 來完成，而長鏈飽和脂肪酸及 $\omega 9$ 系列長鏈不飽和脂肪酸，則分別是由 ELOVL1、ELOVL3 及 ELOVL6 來完成(Ohno, Suto et al. 2010)。斑馬魚的 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 彼此間的相似性較高，而與 ELOVL7 差異較大(圖三)。其中四種 ELOVL 比對到三個特定保守區(圖三)為組胺酸盒子、酪胺酸盒子及一個以苯環類胺基酸與帶電荷胺基酸交錯組成之高保守區域，其蛋白質序列分別為 QxxFLHxYHH、NxxxHxxMYxYY 及 Y/FLWWKR/KTxxQxxQF(圖三)。而其他物種之研究亦有發現此高保守區，顯示此區域為 ELOVL 蛋白所特有之區域(Oh, Toke et al. 1997; Denic and Weissman 2007; Sarker, Yamamoto et al. 2011)。在對組胺酸盒子進行定點突變證明組胺酸對於 ELOVL 蛋白活性的重要性，在組胺酸被突變後，蛋白即失去活性(Denic and Weissman 2007; Logan, Agbaga et al. 2014)。Denic 與 Weissman 2007 年的研究報告指出，根據免疫共沉澱之結果顯示，組胺酸盒子區域是否會與其他蛋白形成複合體並沒有直接相關性，但是在體內實驗(*in vivo*)結果顯示，此區域對於 ELOVL 能否能進行催化反應有直接相關性。在與輔酶 A 結合凝集酶(CoA-binding condensing enzyme)可發現此相似性保守區，推測可能會與輔酶 A 的磷酸官能基團產生交互作用，由穩定帶有輔酶 A 之反應物(Denic and Weissman 2007)。而酪胺酸盒子與苯環類胺基酸與帶電荷胺基酸交錯組成之高保守



區之功能性，有可能藉由連續且重複出現的苯環類胺基酸，而由胺基酸本身側鏈帶有之苯環與反應物產生 C-H 基團與苯環之間的 C-H/ π 交互作用(C-H/ π interactions)，進而穩定碳氫長鏈的反應物(Tsuzuki 2012)。而在斑馬魚 Z-FADS 亦有發現類似酪胺酸盒子之區域，其蛋白質序列為 NxxxH(11x)YYxxYFxxYxxFY，在連續 13 個胺基酸中，有 7 個側鏈具有苯環之胺基酸，比例佔 50%，與 ELOVL 酪胺酸盒子相比較，顯示此區域有可能為穩定長鏈不飽和脂肪酸之區域。但目前沒有在蛋白結構上的證據支持這些區域所推測的正確功能。

為了解蛋白間的交互作用，同時又必須考慮到膜蛋白的穿膜結構，因此在實驗設計上，須將膜蛋白兩端接上螢光基團或改用抗體攜帶螢光基團的方式以進行實驗。透過共軛焦顯微鏡以螢光共振能量轉移進行實驗，也發現 CYB5R1 沒有與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 發生能量轉移的現象(圖十五)。而 CYB5R2 及 CYB5R3 則可透過螢光共振能量轉移，實驗結果顯示 CYB5R2 及 CYB5R3 可與 Z-FADS 產生交互作用(圖十五)，在螢光顯微鏡觀察中也可觀察到大為黃色螢光區域，顯示兩蛋白彼此重疊(圖五及圖六)。


細胞色素 P450 蛋白是一類以還原態與 CO 結合後在波長 450nm 處有吸收峰的含血紅素的單鏈蛋白質，細胞色素 P450 蛋白在催化反應過程中亦需要電子，而電子傳遞方式則可以歸納出數種方式(Hannemann, Bichet et al. 2007)。其中一類可以透過細胞色素 *b5* 還原酶將電子傳遞給細胞色素 *b5* 蛋白，再將電子傳遞給細胞色素 P450 蛋白，顯示在部分細胞色素 P450 蛋白催化反應過程中，會有細胞色素 *b5* 還原酶參與其中(Schenkman and Jansson 2003)。在肝臟的細胞色素 P450 蛋白系統中，已有部分研究顯示會需要細胞色素 *b5* 還原酶及細胞色素 *b5* 蛋白參與作用，顯示細胞色素 *b5* 還原酶有可能參與去飽和作用之外的電子傳遞工作(Tamburini and Schenkman 1987; Henderson, McLaughlin et al. 2013)。Gray 與 Squires 在 2013 所發表之研究報告，研究約克夏公豬 (Yorkshire boars) 體內類固醇合成作用 (steroidogenesis) 過程中，指出細胞色素 P450 17 型 (CYP17A1, 17 α -hydroxylase) 在進行催化反應時，需要第一型細胞色素 *b5* 還原酶 (CYB5R1) 及 A 型細胞色素 *b5* 蛋白

(CYB5A)提供電子以進行反應(Gray and Squires 2013)。此結果顯示斑馬魚 CYB5R1 很有可能沒有直接參與去飽和作用，而是做為肝臟細胞色素 P450 系統中的電子傳遞之還原酶。

在研究斑馬 Z-FADS 與 ELOVLs 交互作用的實驗組設計中，需要考慮 ELOVL 為膜蛋白，因此在 N 端接上 DsRed 紅色螢光蛋白；在 C 端接上 FLAG tag 藉由抗體攜帶紅色螢光基團。在以螢光顯微鏡觀察的實驗結果顯示，Z-FADS 與 ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 可以透過黃色螢光了解這兩種蛋白表現部位彼此重疊。但以螢光共振能量轉移實驗分析，卻發現在 ELOVL7-FLAG 分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 的實驗組中，無法偵測到能量轉移的現象(圖十五)。但在 DsRed-ELOVL7 與分別與 EGFP-Z-FADS 及 Z-FADS-EGFP 的實驗組中，則可以偵測到螢光共振能量轉移。此研究結果顯示 ELOVL7 蛋白的 C 端可能無法與 Z-FADS 產生交互作用，而由於 ELOVL 與 Z-FADS 皆為膜蛋白，因此可以了解 Z-FADS 的 N 端與 C 端會分別與 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 的 N 端與 C 端是在膜的同一側，而且也同時證明 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 會與 Z-FADS 產生交互作用。

ELOVL 在活性相關研究中發現，ELOVL 並沒有反應物專一性，而是可以同時接受不同碳數之長鏈不飽和脂肪酸或不同飽和程度之長鏈不飽和脂肪酸 (Monroig, Rotllant et al. 2010; Ohno, Suto et al. 2010)。因此在脂肪酸生合成途徑中，ELOVL 與 Z-FADS 會發生交互作用，有可能為反應物由 Z-FADS 選擇，由 Z-FADS 將反應物催化後，將產物轉移給 ELOVL 以進行延伸作用。而在 CYB5R 與 Z-FADS 交互作用的實驗組中，有兩型 CYB5R 會與 Z-FADS 產生交互作用，一型為膜結合型(CYB5R2)與溶解型(CYB5R3)。CYB5R 在去飽和作用的功能為傳遞電子，而 Z-FADS 因已具有細胞色素 *b5* 功能區，因此不需要細胞色素 *b5* 蛋白，因此 CYB5R 會直接與 Z-FADS 產生交互作用。而兩型 CYB5R 有可能為因為 Z-FADS 所分布的胞器不同，進而透過不同之 CYB5R 傳遞電子給位於不同胞器的 Z-FADS。

由於 DsRed-ELOVL7 可以與 Z-FADS-EGFP 及 EGFP-Z-FADS 蛋白發生螢光共



振能量轉移，但 ELOVL7-FLAG 卻無法發生能量轉移之現象(圖十五)，顯示 ELOVL7 的 N 端會與 Z-FADS 產生交互作用，而 C 端則不會。由於 Z-FADS 與 ELOVLs 皆為膜蛋白，穿膜區域與穿膜次數皆會影響螢光共振能量轉移，為了解為甚麼 ELOVL7 的 N 端與 C 端與 Z-FADS 在螢光共振能量轉移實驗結果的歧異，設計了一組實驗，將 ELOVLN 端與 C 端分別接上 His tag 與 FLAG tag，以抗體攜帶螢光基團的方式偵測螢光共振能量轉移(圖十六 A)。在實驗結果顯示，ELOVL7 的 N 端與 C 端無法自行發生螢光共振能量轉移，但 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 則可發生(圖十六 B)，此結果顯示 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 蛋白的 N 端與 C 端是在細胞膜的同一側，但 ELOVL7 的 N 端與 C 端則是在細胞膜的兩側。此結果也同時證明：ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5 及 ELOVL7 皆可與 Z-FADS 發生交互作用，其中 ELOVL7 的 N 端與 C 端與 Z-FADS 在螢光共振能量轉移實驗結果的歧異，是因為其 N 端與 C 端不在細胞膜的同一側，無法發生螢光共振能量轉移(圖十五與圖十六)。圖十五的結果中顯示，Z-FADS 的 N 端與 C 端皆會與 CYB5R3 發生螢光共振能量轉移，而 CYB5R3 為溶解型細胞色素 *b5* 還原酶，分布主要在細胞質，顯示 Z-FADS 的 N 端與 C 端是在同一側，且為向細胞質方向，且亦證明 Z-FADS、ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 具有偶數穿膜次數，而 ELOVL7 穿膜次數則為奇數。圖三結果顯示，ELOVL7 的蛋白質序列較其他三型短，序列比對 ELOVL7 在 C 端部分亦與其他三型有較大差異(圖三)。而蛋白質序列相似性比較分析中，ELOVL7 分別與 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOVL5 為 37% 至 43% ，亦較其他三型的相似性低。

在功能性分析上，ELOVL2、ELOVL4 及 ELOV5 在催化反應的反應物為多元不飽和脂肪酸，包括 $\omega 3$ 及 $\omega 6$ 家族脂肪酸(Monroig, Rotllant et al. 2010; Gregory, Gibson et al. 2011; Castro, Monroig et al. 2012)，ELOVL7 的反應物則為飽和脂肪酸、 $\omega 9$ 家族的單元不飽和脂肪酸或 $\omega 6$ 家族多元不飽和脂肪酸(Tamura, Makino et al. 2009; Ohno, Suto et al. 2010)，ELOVL7 與 ELOVL2、ELOVL4 及 ELOV5 所接受的反應物不同。由序列相似性、長度，以及功能性分析皆顯示 ELOVL7 與其他三

型的差異，故斑馬魚的 ELOVL7 在穿膜構造上也有可能與其他三型有些差異。

在脂肪酸去飽和酶相關研究指出，膜結合型脂肪酸去飽和酶主要分布在細胞的內質網，包括直接使用脂肪酸為反應物與脂肪酸生合成相關的輔酶 A 系統(CoA system) (Brenner 2003; Heinemann and Ozols 2003; Zhang, Liu et al. 2012; Wang, Yu et al. 2014)，或是使用神經醯胺(ceramide)為反應物生合成與神經傳導相關之神經鞘脂質(sphingolipids) (Tidhar and Futerman 2013)。但在一些研究報告中則提出不同研究結果，認為膜結合型脂肪酸去飽和酶並不會只存在於內質網一種胞器，也會存在於粒線體內(Infante and Huszagh 1998; Song, Lu et al. 2010; Park, Kothapalli et al. 2012)。

在本論文中，將斑馬魚 Z-FADS 蛋白與人類及小鼠之膜結合型脂肪酸去飽和酶(FADS1、FADS2 及 FADS3)相比較，發現在蛋白序列 C 端並沒有典型的內質網訊息胜肽片段(ER signal peptide)：KDEL、KKxx、KxKxx、RKxx 及 RxKxx (圖一)。而依照螢光顯微鏡觀察之結果顯示(圖十八 A 及 B)，透過免疫螢光染色，辨認細胞內的粒線體與內質網，再與融合 EGFP 之 Z-FADS 蛋白互相疊圖，可以看到無法完全重疊，不論是 EGFP-Z-FADS (圖十八 A)或是 Z-FADS-EGFP (圖十八 B)之結果皆相同。再透過粒線體萃取的方式，以西方墨點證明在粒線體萃取蛋白中，有 Z-FADS 存在(圖十八 C)。此結果意味著斑馬魚 Z-FADS 有可能為多胞器分布，而並非所預測的只存在於細胞的內質網上。


ELOVLs 在蛋白質序列的 C 端，具有典型內質網訊息胜肽片段：KDEL、KKxx、KxKxx、RKxx 及 RxKxx，但並非會全然只表現在內質網上，有些研究已指出，在真核細胞的粒線體亦有 ELOVLs 的表現。最早在 1963 年，Harlan 與 Wakil 利用同位素碳 14-乙醯輔酶 A ([1-¹⁴C]-Acetyl-CoA)追蹤脂肪酸生合成過程，並同時在微小體及粒線體的萃取物中發現到帶有同位素的長鏈脂肪酸及合成過程之中間物—丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA) (Harlan and Wakil 1963)，而同樣的研究結果，在近期的研究報告亦有相同看法並編寫入教科書中—即在粒線體與微小體有發生脂肪酸延伸作用(Seubert and Podack 1973; Cinti, Cook et al. 1992; Dennis E. Vance 2002; Jump 2009)。綜合上述討論，斑馬魚 Z-FADS 蛋白會存在於內質網及粒線體中，而 ELOVLs

也是如此，並非只存在於內質網，也會存在於粒線體，意味此兩種蛋白會在一起協同作用產生長鏈不飽和脂肪酸。

在斑馬魚長鏈不飽和脂肪酸生合成中，Z-FADS 與 ELOVL 扮演重要角色，在目前現有的研究中，分別已證明 $\omega 3$ 及 $\omega 6$ 系列脂肪酸從 18 碳的 ALA 及亞麻油酸 LA 生合成 20 個碳的 EPA 及 AA 的過程中需要 FADS1、FADS2、ELOVL5 或 ELOVL7 共同參與並協同作用(Hastings, Agaba et al. 2001; Ohno, Suto et al. 2010; Gregory, Gibson et al. 2011)。而在斑馬魚的相關研究中，於酵母菌中表現斑馬魚 ELOVL4 蛋白，並針對此蛋白進行活性測試，發現斑馬魚 ELOVL4 基因主要為生合成長碳鏈不飽和脂肪酸，其反應物為 20 個碳的 EPA 及 AA 以每次增加兩個碳的方式進行延伸，最多可延伸至 36 個碳(Monroig, Rotllant et al. 2010)。DHA 為 22 個碳 6 雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸，其生合成在動物、藻類及細菌有不同的生合成途徑(Okuyama, Orikasa et al. 2007)。以動物而言，在生合成過程中需要先合成 24 個碳 5 雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸(Tetracosapentaenoic acid)後，再進行一次去飽和作用以產生 24 個碳 6 雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸(Tetracosahexaenoic acid, THA)，再以 β -氧化作用(β -oxidation)將 24 個碳 6 雙鍵去除兩個碳而成為 22 個碳 6 雙鍵之 DHA，而此作用發生之位置目前指出有可能位於細胞的粒線體(Infante and Huszagh 1998)或過氧化體(peroxisome) (Ferdinandusse, Denis et al. 2001)。而藻類則為透過具有 $\Delta 4$ 活性之去飽和酶，直接將 22 個碳 5 雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸直接去飽和成 22 個碳 6 雙鍵之 DHA (Qiu, Hong et al. 2001; Guschina and Harwood 2006)。

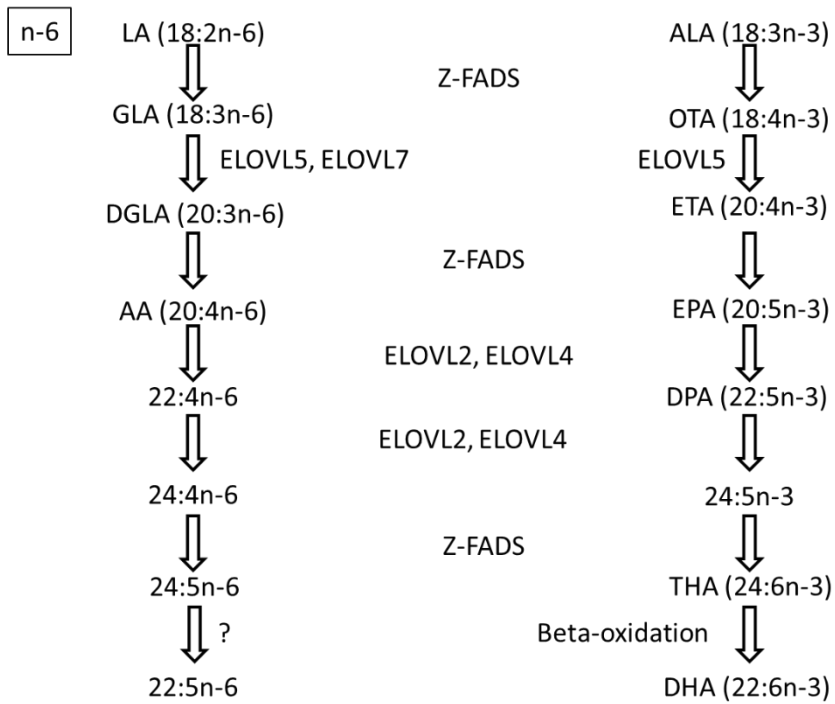
而斑馬魚在基因解碼完成後，所定義出的脂肪酸去飽和酶基因只有一個，而透過活性分析確認斑馬魚脂肪酸去飽和酶同時具有 $\Delta 6$ 及 $\Delta 5$ 去飽和作用的蛋白活性(Hastings, Agaba et al. 2001; Castro, Monroig et al. 2012)，顯示斑馬魚 Z-FADS 為多功能性蛋白。

本實驗將將斑馬魚 *fads*、*elovl2*、*elovl4* 及 *elovl5* 基因轉染至 HeLa 細胞後，以 ALA 作為反應物，以 GC 監測並計算 DHA 及 EPA 生成量。在此實驗中，細胞同時轉染四種基因後，可以明顯看到 DHA 增加 50%，而 EPA 為 DHA 生合成途徑之



中間物，亦有發現增加 37.5% (圖十九 A)。而此結果綜合 Z-FADS 及 ELOVLs 之討論，可以推論斑馬魚 Z-FADS 為多功能性蛋白，同時具有 $\Delta 6$ 及 $\Delta 5$ 去飽和作用，而其中的 $\Delta 6$ 活性，可以有兩種不同的反應物，其中一種為 18 個碳的 ALA，另一種為 24 個碳 5 雙鍵的 Tetracosapentaenoic acid。

而此結果亦證明斑馬魚只需要一個去飽和酶即可直接生合成 DHA 及 EPA，亦證明斑馬魚 DHA 及 EPA 生合成途徑為先由 18 個碳的 ALA 透過 Z-FADS 第一次去飽和作用(第一種反應物之 $\Delta 6$ 酵素活性)產生 18 碳 4 雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸 (octadecatetraenoic acid, OTA)、而 OTA 經過 ELOVL5 延伸後產生 20 個碳 4 雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸(Eicosatetraenoic acid, ETA)，而 ETA 透過 Z-FADS 第二次去飽和作用($\Delta 5$ 酵素活性)及產生 22 個碳 5 雙鍵之 EPA。而斑馬魚會使用 EPA 為 ELOVL4 的反應物生合成 24 個碳 5 雙鍵之 Tetracosapentaenoic acid (Monroig, Rotllant et al. 2010)。而 Tetracosapentaenoic acid 再次經過 Z-FADS 第三次去飽和作用(第二種反應物之 $\Delta 6$ 酵素活性)產生 24 個碳 6 雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸，再透過 β -氧化作用合成 DHA (圖二十九)。



圖二十九、斑馬魚 $\omega 3$ 及 $\omega 6$ 系列脂肪酸生合成途徑圖。

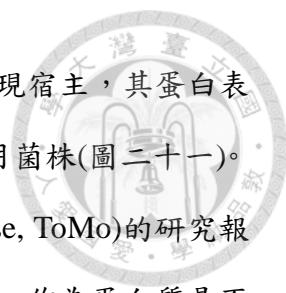


4.2 原核生物

將 *XylM* 及 *XylA* 基因序列轉譯為蛋白質序列，透過 CDD 分析，發現 *XylM* 蛋白質具有特定的胺基酸序列，且功能性被歸類為膜結合型類脂肪酸去飽和酶超級家族 (Membrane-FADS-like super family)(圖二十 A)。在序列分析上可以發現 *XylM* 蛋白質序列與膜結合型脂肪酸去飽和酶相同，均具有三個組胺酸盒子 (Histidine box)，分別為 HxxxH、HxxxHH 及 HxxHH (圖二十 C)，在先前已發表的研究中均指出只有膜結合型的脂肪酸去飽和酶具有三個 Histidine box，而溶解型脂肪酸去飽和酶則不具有這些盒子 (Thiede, Ozols et al. 1986; Stuke, McDonough et al. 1989; Yadav, Wierzbicki et al. 1993)。以定點突變的方式確認這三個 box 的組胺酸與催化反應有直接相關性，在這 8 個組胺酸陸續被突變後，蛋白質立刻失去活性(Shanklin, Whittle et al. 1994)。

Xylene monooxygenase 與其他物種之蛋白質序列分析，發現與新鞘氨醇菌 (*novosphingobium sp.* PP1Y) 的脂肪酸去飽和酶在胺基酸序列 (YP_004534277.1) 上有 56% 相似性，顯示 xylene monooxygenase 可能具有類似功能區域或可能接受同樣反應物(圖二十 C)。與同樣被歸類於脂肪酸去飽和酶超級家族之 alkane hydroxylase 進行相比較，同樣也可比對出在蛋白質序列上具有三個組胺酸盒子的高保守區域，而且在第二與第三盒子中間有另一個高度保守之組胺酸區域，xylene monooxygenase 及新鞘氨醇菌脂肪酸去飽和酶其序列為 HHxWNH，而以飽和烷烴類化合物為反應物之 *Pseudomonas putida GPO1* 則為 HHxWNS (附圖三)，目前仍未有研究以定點突變方式探討此一高保守區域，但此高保守區域亦有可能為雙鐵的鰲合位置或是輔助穩定雙鐵反應中心。

Xylene monooxygenase 在催化反應過程需要電子參與，而 xylene monooxygenase 本身並不含有攜帶電子之區域，因此需要具有 FAD 及 NAD 結合位的 *XylA* 將輔酶之電子(NADH)轉移給 xylene monooxygenase 本體(Buhler, Schmid et al. 2000)，當 *XylM* 與 *XylA* 蛋白結合在一起形成複合體，此時蛋白才具有活性反



應。在蛋白表現中，發現具有 T7 溶菌酶(T7 lysozyme)活性的表現宿主，其蛋白表現量較低，因此實驗上選擇以表現量較多的 BL-21 (DE3)為實驗用菌株(圖二十一)。在溶解型 xylene monooxygenase (Toluene-o-xylene monooxygenase, ToMo)的研究報告已有指出，透過是否與吲哚發生反應，且產生藍色的顯色與否，作為蛋白質是否有活性的初步鑑定與篩選(Rui, Reardon et al. 2005; Vardar, Ryu et al. 2005)。在 xylene monooxygenase 複合體以 IPTG 誘導表現過程中，發現菌液呈現藍色顯色反應，以 GC-MS 分析確認與吲哚發生反應。將細菌離心後可以發現菌塊為深藍色，顯示反應物在經過 xylene monooxygenase 複合體反應後，其產物並不會離開菌體，而會留存於細菌體中。

在活性分析部分，分別以苯環類、飽和烷烴類及不飽和烷烴類等化合物作為反應起始物，其中苯環類化合物可被 xylene monooxygenase 複合體催化，且會在 1 號碳位置發生反應(圖二十二)，但是若改以碳氫長鏈作為反應物，則出現飽和烷烴類化合物完全不反應，而 2 號碳不飽和烷烴類化合物則會發生催化反應。以重組的 xylene monooxygenase 蛋白複合體催化苯環類化合物，在許多研究報告皆已證實(Buhler, Schmid et al. 2000; Buhler, Witholt et al. 2002)。Buhler 等人在 2000 年，以限制酶切割方式將假單孢菌之 TOL 質體中之 operon 啟動子(promoter)、XylM、XylA、苯甲醇去氫酶(benzyl alcohol dehydrogenase, XylB)、苯甲醛去氫酶(benlaldehyde dehydrogenase, XylC)及兩種尚未知悉功能之基因(XylN 及 XylW)接至基因選質載體並於 *E. coli* JM101 中進行表現，並於活性分析中發現，以偏三甲苯(pseudocumene)為反應物，可偵測到 3,4-雙甲基苯甲醇(3,4-dimethylbenzyl alcohol)、3,4-雙甲基苯甲醛(3,4-dimethylbenzaldehyde)及 3,4-雙甲基苯甲酸(3,4-Dimethylbenzoic acid)，而推論 XylB 及 XylC 之功能(Buhler, Schmid et al. 2000)。

但在本研究中，BL-21 (DE3)表現的 xylene monooxygenase 蛋白複合體(XylM 與 XylA)即可在活性分析的實驗中以 GC-MS 偵測到醛類產生，而同時比較以苯環類或不飽和烷烴類化合物皆可以 GC-MS 偵測到醇類與醛類產生，顯示醛類產生並不完全需要 XylB 作用，XylMA 複合體即可催化醛類產生(表六)，此結果顯示 XylB

可能有其他功能，而並非早期研究所指出其具有苯甲醇去氫酶之功能。

此外，在以 toluene 與 *p*-xylene 為反應物之實驗組中，以 GC-MS 偵測到醛類有發生更進一步催化反應，toluene 會產生 acetic acid phenylmethyl ester；而 *p*-xylene 則會產生 4-methylbenzyl acetate，顯示在反應過程發生乙醯化反應，接上一個乙醯官能基形成酯化反應之產物。在 2014 年，Rodriguez 等人發表以 *Escherichia coli* 為模式探討酯化反應相關報告，在 *Escherichia coli* 中產生酯化反應統稱為醋酸酯合成途徑(acetate ester synthesis pathway)，但目前仍未有指出何種酵素參與其中。*Escherichia coli* 的酯化反應是由醇類直接形成酯類，其反應物目前已知只有七種鏈狀化合物及一種環狀化合物—苯乙醇(2-phenyl ethanol)，酯化反應之來源物則為乙醯輔酶 A(acetyl CoA)、異丁醯輔酶 A(isobutyryl coA)及丁醯輔酶 A(butyryl CoA)，而苯乙醇透過乙醯輔酶 A 進行酯化反應後即會產生乙酸苯乙酯(Phenethyl acetate)供細菌使用(Rodriguez, Tashiro et al. 2014)。此結果顯示 *Escherichia coli* 的確有將帶苯環之醇類進行催化反應分解之能力，而本實驗所呈現之結果顯示 toluene 與 *p*-xylene 經過 xylene monooxygenase 催化產生之 benzyl alcohol 及 4-methylbenzyl alcohol 可以被催化為 acetic acid phenylmethyl ester 及 4-methylbenzyl acetate (圖二十二 A 及 D)。

苯環類化合物催化反應效率以 4-ethyl-toluene 的催化反應效率最高，可達到 95.4%；其次為 *p*-xylene，其催化反應效率為 91%，而 toluene 的催化反應效率為 87.5%，居四種苯環類化合物第三，styrene 的催化反應效率則最低，約為 45%左右(表六)。在結構上可以區分為兩大類，一類為 1 號碳與 4 號碳位置均有接上官能基(4-ethyl-toluene 及 *p*-xylene)，而另一類則是只有 1 號碳位置接上官能基(toluene 及 styrene)。在進行催化反應後之結果顯示，1 號碳與 4 號碳位置均有接上官能基之化合物催化反應效率高於只有 1 號碳接上官能基之化合物(表六)，而 4 號碳位置接上官能基以乙基的 95.4% 催化反應效率高於接上甲基的 91% 催化反應效率(表六)。此結果顯示在 xylene monooxygenase 的反應口袋(pocket)，只會針對苯環進行抓取及穩定之動作，而苯環 4 號碳位置所攜帶之官能基大小並沒有直接顯著影響到催


化反應活性，顯示其反應口袋可能為圓筒狀，因此可容納在 4 號碳接上官能基之苯環化合物。

在本研究中，使用烷烴類化合物分析其反應口袋，在研究中發現，除了原本的苯環類化合物之外，xylene monooxygenase 複合體亦可催化不飽和烷烴類化合物，但不能催化飽和烷烴類化合物。此結果顯示，xylene monooxygenase 的反應口袋中，其胺基酸序列只能抓住帶有雙鍵之化合物，而反應口袋的原始構型為卡住苯環類化合物的雙鍵部位。也因此 2 號碳不飽和烷烴類化合物可以從外部進入反應口袋並且被反應口袋抓取並穩定住，而使反應中心針對 1 號碳進行催化反應。但是飽和烷烴類化合物則因為不具有雙鍵結構，使得反應物無法被反應口袋抓取與穩定，因此無法反應。嘗試使用丙烯(propene)作為反應物，但仍無法發生催化反應，證明 xylene monooxygenase 複合體在進行催化作用時，反應物一定需要一個雙鍵，且位置必須要在 2 號碳，才可以被反應口袋抓取與穩定。

在實驗結果中同時也使用反式(*trans*-form)不飽和烷烴類化合物，結果顯示除了順式(*cis*-form)之外，xylene monooxygenase 複合體也會對 *trans*-form 不飽和烷烴類化合物進行催化反應，但催化效果以 *trans*-form 優於 *cis*-form 不飽和烷烴類化合物。

在化學中， π 效應(π -effects)或稱為 π 交互作用(π -interaction)是一種非共價性交互作用(non-covalent interaction)。 π 系統(π -system)中，包括苯環與苯環間形成之苯環堆疊(π - π stacking)或稱為 π - π 交互作用(π - π interaction)(Hunter and Sanders 1990; McGaughey, Gagne et al. 1998)、C-H 基團與苯環之間的 C-H/ π 交互作用(C-H/ π interactions) (Tsuzuki 2012)及 C-F 基團與苯環之間的 C-F/ π 交互作用(C-F/ π interactions) (Kawahara, Tsuzuki et al. 2004)。在 xylene monooxygenase 催化反應中，Sazinsky 等人以溶解型 Toluene-o-xylene monooxygenase 為模式，透過蛋白結晶與 X-光繞射分析，以蛋白質立體結構探討 Toluene-o-xylene monooxygenase 與受質交互作用為透過 π - π stacking 交互作用的方式(Sazinsky, Bard et al. 2004)。

為了了解 xylene monooxygenase 反應口袋與反應物之交互作用，以有機合成



方式將氟取代氫合成出飽和 4 個碳之氟化物— trifluoro butane，再以苯環類化合物、飽和類化合物與不飽和類化合物之結果為模式，推論 xylene monooxygenase 催化反應可能為 π 交互作用，反應物需要具有苯環或是雙鍵之構造才可與反應口袋產生交互作用，但以合成出之 trifluoro butane 卻可以被 xylene monooxygenase 催化成 trifluoro butanol (圖二十三 D)，顯示此化合物可被 xylene monooxygenase 反應口袋抓取並穩定住，此結果證明 C-F 鍵結在反應口袋內確實可以取代苯環或是雙鍵結構，與側鏈具有苯環之胺基酸進行 C-F/ π 交互作用，此結果證明膜結合型 xylene monooxygenase 催化反應需要透過反應口袋內的胺基酸與反應物進行 π 交互作用。以氟化物為反應物進行催化反應的相關實驗顯示，氟化物可以提高催化反應之專一性(Ramu, Chang et al. 2011; Chiang, Ramu et al. 2013; Chen, Luo et al. 2014)。而於本實驗亦可看到相同結果，同樣為飽和 4 碳化合物，butane 無法進行催化反應，而 trifluoro butane 則出現 18.8%的催化反應效率(表六)，且在催化反應後只有單獨產生 trifluoro butanol，並沒有產生相對應之醛類，證明 trifluoro butane 可提高 xylene monooxygenase 的催化反應效率，亦可提高催化專一性。

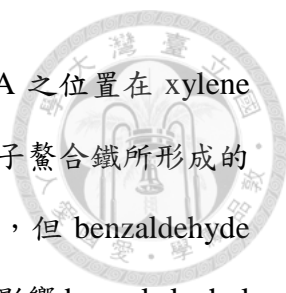
而同屬於膜結合型脂肪酸去飽和酶家族之烷烴羥化酶也是屬於 ω -羥化反應(ω -hydroXylAion) (Ramu, Chang et al. 2011)。但烷烴羥化酶是接受飽和烷烴類化合物，在結構上並沒有如同 xylene monooxygenase 可以抓住雙鍵的反應口袋，而是具有抓取飽和烷烴類化合物的反應口袋，並在飽和烷烴類化合物末端碳進行羥基化反應(Fish, Harbron et al. 1983; Belhaj, Desnoues et al. 2002; Shanklin and Whittle 2003)。

膜結合型脂肪酸去飽和酶的反應口袋可以抓取並穩定飽和、單一不飽和或多重不飽和之烷烴類化合物。其中硬脂醯基輔酶 A 去飽和酶(Stearoyl-CoA Desaturase, SCD, Δ -9 Desaturase)可以 16 個碳(棕櫚酸, 16:0)或是 18 個碳(硬脂酸, 18:0)飽和烷烴類化合物為反應物，於 9 號碳位置形成雙鍵。但目前已有研究報告指出，在生成共軛亞麻油酸(conjugated linoleic acids, CLA)的過程，是以反式-11 號碳或-12 號碳之 18 碳單元不飽和脂肪酸(C18-*trans*-11 或 C18-*trans*-12 fatty acids)作為反應物(Kraft, Hanske et al. 2006; Shanklin, Guy et al. 2009)，與早期研究認為 SCD 是以 16

個碳或是 18 個碳飽和烷烴類化合物為反應物不同(Ntambi 1999; Attie, Krauss et al. 2002)。

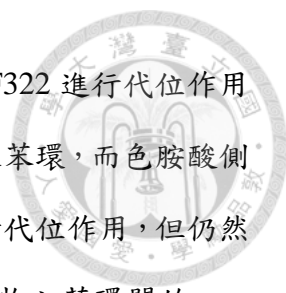
這些推論顯示去飽和酶的反應口袋並不單只能接受反式脂肪酸，只要能進入反應口袋，並且被抓取且穩定的反應物皆可被催化，但會因立體構形上的阻礙，造成抓取效率差異。由硬脂醯基輔酶 A 去飽和酶的例子可以了解，xylene monooxygenase 在進行催化反應時，反式不飽和烷烴類化合物可以被催化，而順式不飽和烷烴類化合物則因為構型上不同，造成反應效率的差異。顯示脂肪酸去飽和酶、烷烴羧化酶與 xylene monooxygenase 雖同為膜結合型去飽和酶超級家族，但各蛋白之反應口袋明顯不同，其分類依據為具有特定組胺酸盒子及組胺酸螯合鐵後形成的活性反應中心，而一起被歸類於第三類雙鐵酵素。

為了更深入分析 xylene monooxygenase 反應口袋如何與反應物之交互作用，本實驗採定點突變將胺基酸置換。在定點突變選擇上，以側鏈具有苯環之酪胺酸 (Tyrosine, Tyr, Y)、苯丙胺酸(Phenylalanine, Phe, F)及色胺酸(Tryptophan, Trp, W)為標的，透過圖二十 C 之四種蛋白與烷烴羧化酶比對蛋白序列(附圖三)，挑選具有可能影響蛋白活性之色胺酸進行突變，以破壞 xylene monooxygenas 與受質之間的 π - π stacking 交互作用。在 W333A 突變型活性測試中，其催化反應在突變後仍然維持在 81.8%，與 WT xylene monooxygenas 相比較只有降低 18.2% (表七)，是三型突變型中催化反應效率最佳者。W333A 突變型能將部分 toluene 轉化為 benzyl alcohol，少部分可以轉化為 benzaldehyde (圖二十四 C)，顯示其蛋白與受質之間的交互作用雖然受影響，但影響幅度較小，其反應口袋仍然可以抓取到 toluene，但是產物專一性之催化反應效率與 WT xylene monooxygenas 相比較卻明顯提升許多。W333A 突變型 xylene monooxygenas 針對 toluene 轉化為 benzyl alcohol 與 WT xylene monooxygenas 相比較，其效率由 37.3% 提升至 91.0%，而 benaldehyde 則由原先之 62.7% 下降至 8.99%，此突變點結果證明 xylene monooxygenas 有產物催化專一性。在圖二十二與表六之結果證明，xylene monooxygenas 可將 toluene 催化而依序產生 benzyl alcohol 及 benzaldehyde，顯示 xylene monooxygenas 的反應口袋除了能抓取



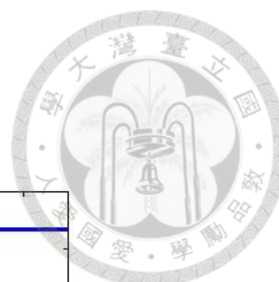
並穩定 toluene，同時還會抓取及穩定 benzyl alcohol。而 W333A 之位置在 xylene monooxygenas 穿膜構造區外(圖三十 A)，但與推測由組胺酸盒子螯合鐵所形成的雙鐵反應中心接近(圖三十 B)，而整體催化反應只有降低 18.1%，但 benzaldehyde 產量卻只剩下 8.99%，顯示 W333A 其作用有兩種可能：一為直接影響 benzyl alcohol 在反應口袋的穩定度，而 benzyl alcohol 無法被反應口袋穩定，因此在 benzyl alcohol 生成後便離開反應口袋而造成 benzaldehyde 催化反應效率較 WT xylene monooxygenas 下降 87.5%。另一可能為 W333A 為醛類催化反應中心附近關鍵胺基酸，由於色胺酸被突變為丙胺酸(Alanine, A)而造成胺基酸性質劇烈改變進而影響結構穩定性，造成醛類催化反應效率大量降低。

在 W321A 突變型 xylene monooxygenas 的活性測試中，對 toluene 的催化反應效率只剩下 26.5%，顯示 W321 之色胺酸與 xylene monooxygenas 催化反應活性明顯有直接相關性，在催化反應之產物則發現能將極少部分 toluene 轉化為 benzyl alcohol，完全沒有 benzaldehyde 的產生(圖二十四 B)。而 W321 的位置在 xylene monooxygenas 第四個穿膜序列(胺基酸 304 到 326, 圖三十 A)中，其二級結構構型為 α -螺旋(α -helix)，座落位置靠近推測由組胺酸盒子螯合鐵形成之雙鐵反應中心。由此結果可證明 W321 為 xylene monooxygenas 催化反應過程中，W321 側鏈上的苯環結構在反應口袋內與 toluene 的苯環產生 π - π 交互作用(圖三十 B)，進而達到穩定 toluene 使催化反應能進行而產生 benzyl alcohol。Xylene monooxygenas 的 4 個穿膜構造在結構與功能上可能類似於烷烴羧化酶 6 個穿膜區域形成之疏水性口袋(hydrophobic pocket)可以抓取並穩定反應物(Rojo 2005; Chen 2013)。而在穿膜區域內，且為具有 π - π stacking 交互作用的 W321，作用相類似於烷烴羧化酶之 W55，極可能提供重要的非共價性 π 交互作用，調整反應物之位向，以達成高專一性的催化效能。而在 W321 突變為 A321 後，催化反應效率為 26.5%，顯示蛋白仍可有一部分催化反應在進行，推測可能在 W321A 突變後，反應口袋內仍有胺基酸協助穩定反應物。在 xylene monooxygenas 第 4 段穿膜構造中，W321 附近有 F309、F312 及 F322 三個側鏈具有苯環構造之胺基酸(圖二十 C)，因此在 W321 被突變後，xylene

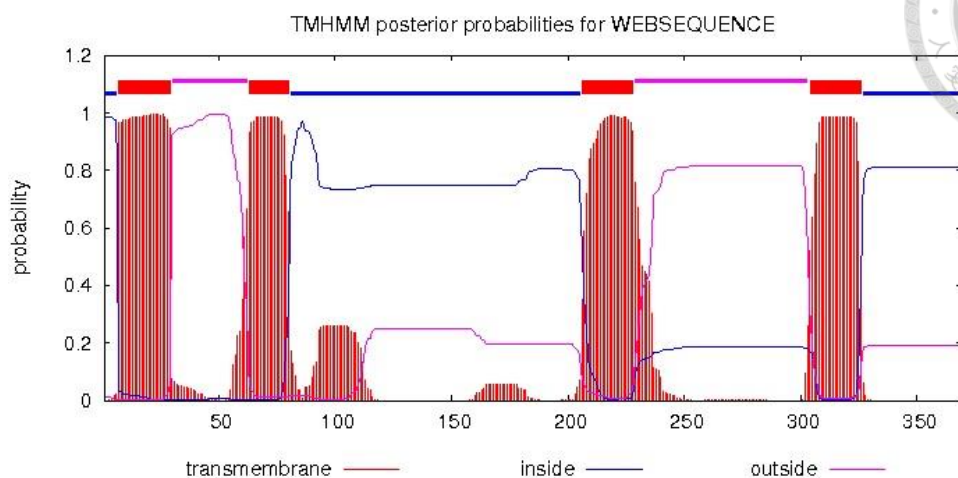


monooxygenas 催化反應仍可進行，可能是透過 F309、F312 及 F322 進行代位作用而取代 W321 的作用，但由於苯丙胺酸之側鏈為單一環狀結構之苯環，而色胺酸側鏈則為具有兩個環狀結構之吲哚環(indole ring)，因此可能雖進行代位作用，但仍然因為側鏈之苯環與反應物之距離較遠，使胺基酸之苯環與反應物之苯環間的 π - π stacking 交互作用力較弱，而造成催化反應效率下降之結果。

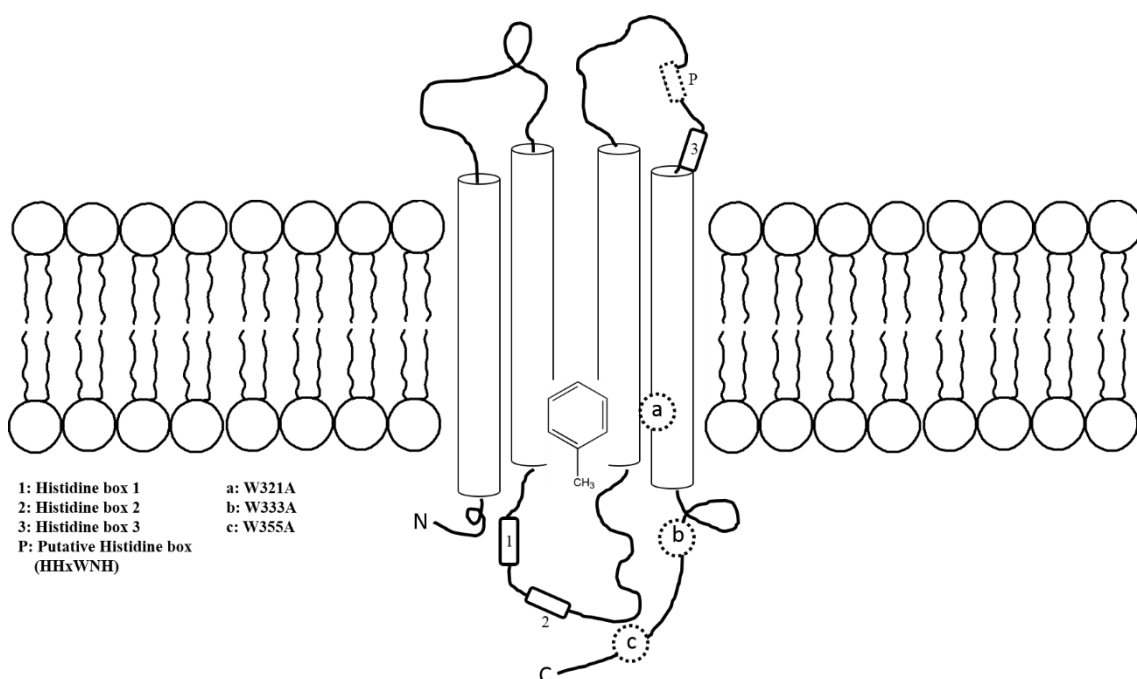
在 W355A 突變型 xylene monooxygenas 的活性測試中，發現此突變型完全失去催化活性，無法將 toluene 轉化為 benzyl alcohol 或 benzaldehyde (圖二十四 D 及表七)。在圖三十 A 中，可以看到在 W355 位置在靠近蛋白序列 C 端，並不在穿膜構造區，顯示 W355 並不在反應口袋內。而在圖二十 C 中 XylIM 與其他三種蛋白比對分析顯示，C 端為四種蛋白中差異較大區域，但在 W355 及 W358 的位置序列均一致，顯示這兩個點為高保守位置，但若同時再與烷烴烴化酶(alkB)之蛋白序列相比較，則可更確認 W355 為高保守位置。而在比較與探討真核生物脂肪酸去飽和酶序列(圖一)，亦有發現在蛋白質序列 C 端有一高保守區域，帶有兩個側鏈具有苯環之胺基酸：一為苯丙胺酸，另一位酪胺酸。顯示膜結合型脂肪酸去飽和酶在蛋白序列 C 端為高保守區，且具有兩個側鏈為苯環結構之胺基酸，但由於蛋白質 C 端與穿膜構造所形成之反應口袋相距甚遠，反而較為接近由組胺酸盒子所形成之雙鐵反應中心，因此推測鍵結型脂肪酸去飽和酶 C 端中，兩個側鏈為苯環結構之胺基酸可能直接影響蛋白活性。



A



B



圖三十、XylM 蛋白穿膜構造拓譜(topology)預測與定點突變相對位置圖。(A)為以 TMHMM 分析軟體(TMHMM Server v. 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析 XylM 蛋白序列穿膜區域預測圖，(B)為依照 XylM 蛋白序列一級構造之資訊所推測之穿膜構造拓譜圖，數字 1-3 為膜結合型脂肪酸去飽和酶家族所具有之典型組胺酸盒子，P 為組胺酸組成之高保守區域，推測亦為特有之組胺酸盒子，a




至 c 分別為 W321、W333 及 W355 之相對位置。

Xylene monooxygenas 複合體在進行催化作用時，需要 XylM 及 XylA 兩個蛋白同時偕同作用。為了證明此論述，在引子對增加特定序列並使其在蛋白表現時，可以產生相對應之特定序列可供抗體辨認或純化使用。以西方墨點分析，可以發現 XylA 蛋白與 XylM 皆可以在 BL-21 (DE3) 中表現，且分子量一致(圖二十七)，根據序列分析，XylM 及 XylA 並沒有轉譯後修飾區域，亦不具有訊息胜肽鏈(signal peptide)。

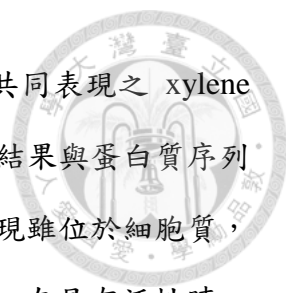
以 anti-His tag antibody 作為擷取抗體，針對 XylM 上之 His tag 進行免疫共沉澱。在圖九的實驗結果顯示，不論是以商品化之 B-PER 蛋白萃取液或是以自行配製帶有 0.5% DDM 之蛋白萃取液，皆可純化到 xylene monooxygenas 複合體，顯示 xylene monooxygenas 複合體在純化過程中，需要清潔劑參與在細菌破碎後，保護膜蛋白，使膜蛋白維持穩定。但不同的部分是，以商品化之 B-PER 蛋白萃取液處理之實驗組，有較少之其他蛋白同時被共沉澱，而自行配置之蛋白萃取液則反之(圖二十五)，其原因可能為 DDM 為傷害性較弱之不帶電荷非離子性清潔劑。在萃取過程中，膜蛋白的穩定性需要依靠清潔劑形成微胞(micelle)包覆蛋白的疏水性區域(Seddon, Curnow et al. 2004)，而傷害性較弱之非離子性清潔劑對於蛋白萃取，可保留較大之完整性，也不易在萃取過程中造成蛋白質構型瓦解，使免疫共沉澱無抓取其他蛋白(Hare and Holocher 1994)。

Xylene monooxygenas 複合體為 XylM 及 XylA 所組成，但在共沉澱結果中，XylM 與 XylA 透過銀染顯示，其比例並不一致。XylA 蛋白量明顯多於 XylM 蛋白量(圖二十六)，不論是以 B-PER 蛋白萃取液或是 0.5% DDM 蛋白萃取液皆為相同結果。此結果意味 xylene monooxygenas 複合體在進行作用時，XylM 及 XylA 比例並不為 1:1 (圖二十六)。在早期研究指出細胞色素 P450 1A2 (CYP1A2) 與其相對應之還原酶(NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR)在催化反應過程其比例為 1:1 (Miwa, West et al. 1979)。但在近期之相關研究則指出，兩者之比例並非如此，Staijen



等人於 2000 年所發表的研究報告中指出，在 *Pseudomonas oleovorans* 的烷烴羧化酶催化系統中，AlkB、AlkG (rebreodoxin) 及 AlkT (rebreodoxin reductase) 比例為 1:3:8，顯示 rebreodoxin 及 rebreodoxin reductase 兩種蛋白在進行電子傳遞過程時需要比進行催化的酵素本體來的多，而將相關蛋白以 pGEc47 表現質體在 *E. coli* HB101 表現之結果也顯示相似結果(Staijen, Van Beilen et al. 2000)。而本實驗室以純化方式將三種蛋白純化後，更發現在催化反應時期比例為 1:3:20，顯示其電子傳遞最為關鍵之部分為具有鐵硫簇的 rebreodoxin。而 xylene monooxygenase 催化系統在 Butler 與 Mason 的分類上為第一類，其還原酶同時具有 FAD 與 ferredoxin 兩個氧化還原中心，而又根據烷烴羧化酶催化系統結果可證明，在 xylene monooxygenase 免疫共沉澱結果中，具有 FAD 及 ferredoxin 的還原酶— XylA 比例要高於 XylM。

透過免疫金及穿透式電子顯微鏡分析 XylM 及 XylA 在細菌內分布位置，在圖十中，XylA 主要分布在細菌端點靠近細胞膜之區域。XylA 蛋白表現量則較 XylM 多，在免疫金標誌分析(圖二十七及圖二十八)及蛋白質電泳分析(圖二十一)均可以看到同樣結果。XylA 在蛋白分析上為溶解型，不具有任何穿膜構造，故其透過免疫金標定後，在穿透式電子顯微鏡下，其分布位於細胞質靠近細胞膜之區域。與 XylA 不同的是，XylM 座落位置則在細胞膜上(圖二十八)，在蛋白質序列分析上為膜蛋白，具有四個穿膜構造(圖三十)。而當共同表現這兩個蛋白時，因為會直接對於 indole 進行催化反應，所以在 BL-21 (DE3) 中受 IPTG 誘導而表現之 xylene monooxygenase 複合體是具有功能性。當 XylM 蛋白表現於細胞膜時，而 XylA 蛋白則會在細胞質靠近細胞膜的區域，傳遞電子使 XylM 蛋白可以對 indole 進行催化反應，與溶解型 xylene monooxygenase 反應相同 (Rui, Reardon et al. 2005)。但 XylA 於 BL-21 (DE3) 細胞中表現明顯高於 XylM (圖二十一)，因此在透過電子顯微鏡觀察 XylA 蛋白表現時，可以發現集中在細菌特定端點上，該端點整個呈現暗色，顯示有大量蛋白集中於該區域，與細菌本體中間區域白色帶有黑色絲狀之核酸在電子顯微鏡下所呈現之結果不同(圖二十七及圖二十八)。而 XylM 蛋白則可以清楚的看到表現在 BL-21 (DE3) 的細胞膜上，而其表現位置也在細菌端點周圍的細胞膜上。



由於實驗中需要使用兩種抗體作免疫金標誌分析，因此需要將共同表現之 xylene monooxygenas 複合體，分別進行切片及抗體辨認。然而將兩個結果與蛋白質序列分析結果相比較，可以證實，XylM 表現於細胞膜，而 XylA 表現雖位於細胞質，但卻會在細胞質靠近細胞膜的地方，顯示 xylene monooxygenas 在具有活性時，XylM 及 XylA 會彼此靠近，但是否會形成複合體則需要更多實驗進行驗證。

第五章、結論



本論文探討金屬膜酵素蛋白特別是膜結合型脂肪酸去飽和酶在催化反應過程中交互作用之機制，同時以真核和原核生物同類型蛋白輔助討論膜結合型脂肪酸去飽和酶的催化反應機制，包括：膜結合型脂肪酸去飽和酶與催化反應相關蛋白間的交互作用、活性中心的立體反應機構及反應物的立體選擇性。

在真核生物膜結合型脂肪酸去飽和酶實驗中，以免疫螢光染色分析與螢光共振能量轉移實驗證明，斑馬魚在脂肪酸生合成過程中，Z-FADS 蛋白會分別與 CYB5R 及 ELOVL 形成複合體，以催化反應。Z-FADS 在接受到長鏈不飽和脂肪酸而進行催化過程時需要電子參與，而又因 Z-FADS 在蛋白本體即具有細胞色素 *b5* 功能區(Heme-binding domain)，因此 CYB5R 可以將電子由 NADH 直接傳遞給 Z-FADS。Z-FADS 在完成長鏈不飽和脂肪酸之去飽和作用後，需要立刻將長鏈不飽和脂肪酸傳送給 ELOVL 以在長鏈不飽和脂肪酸羧酸端延長 2 個碳，而在 Ohno 於 2010 年發表之研究報告已證實，ELOVL 可以同時接受不同碳數之長鏈不飽和脂肪酸或不同飽和程度之長鏈不飽和脂肪酸，而不具有反應物選擇性(Ohno, Suto et al. 2010)，因此在脂肪酸生合成途徑中，必須要仰賴 Z-FADS 將作用完之長鏈不飽和脂肪酸轉移給特定之 ELOVL，以進行延長作用。

以共同表現假單孢菌 XylM 與 XylA 於 *E. coli* 的方式，透過免疫共沉澱方式，可以直接證明膜結合型脂肪酸去飽和酶在催化反應過程中會與相對應之還原酶交互作用，在免疫共沉澱結果以抗體辨認 XylM 可以同時沉澱下與 XylM 產生交互作用之 XylA 蛋白。而 XylA 蛋白為 XylM 之還原酶，可以將電子由 NADH 傳遞給 XylM 以進行催化反應。

透過螢光共振能量轉移實驗與免疫共沉澱分析，直接證明膜結合型脂肪酸去飽和酶在催化過程反應中，去飽和酶會直接與還原酶形成複合體，而還原酶將電子由 NADH 傳遞至去飽和酶本體。而螢光共振能量轉移實驗同時亦證明 Z-FADS 在



長鏈不飽和脂肪酸生合成過程中會與 ELOVL 形成複合體。

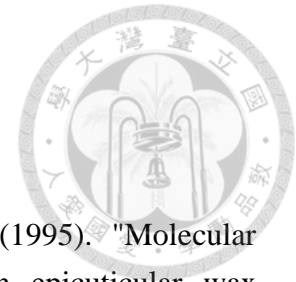
以免疫金染色分析更證明，膜結合型脂肪酸去飽和酶與還原酶在催化過程中會彼此結合，而溶解型還原酶在表現後移至細胞膜內側靠近細胞膜的部位，而該部位為膜結合型脂肪酸去飽和酶表現區域。而此結果支持免疫共沉澱之結果。

本論文證明斑馬魚 Z-FADS 的催化反應部位為多功能型，同時具有 $\Delta 6$ 及 $\Delta 5$ 去飽和作用之活性，其反應口袋可以同時接受 18 個碳到 24 個碳不等的長鏈不飽和脂肪酸。而以共同表現假單孢菌 XylM 與 XylA 的方式驗證，發現 XylM 在接受電子後可以直接催化具有苯環之化合物，同時亦會催化具有單一雙鍵之不飽和化合物(從 4 個碳到 6 個碳)，但並不會催化飽和類化合物。此結果證明膜結合型脂肪酸去飽和酶反應口袋並非只接受單一反應物，而是反應口袋可容納的反應物即可接受，受限於反應口袋大小，催化效率與反應物碳氫鏈長度成反比。

本論文同時亦證明，不飽和碳氫化合物在催化反應中需要被穩定抓取後才能進行催化反應。以定點突變方式，將 XylM 不同位置之色胺酸突變成丙胺酸後，蛋白出現催化不完全或完全失去活性的情況，而色胺酸正是提供 C-H/ π 交互作用或是 π/π 交互作用重要的胺基酸，此結果證明膜結合型脂肪酸去飽和酶在催化反應過程中需要透過色胺酸將反應物穩定才能進行催化。而在斑馬魚不論是 Z-FADS 或 ELOVL 皆在靠近 C 端位置有一個以側鏈帶苯環之胺基酸組成之區域。

生活於不同地域之生物其長鏈不飽和脂肪酸生合成途徑亦會不同，植物與動物即有明顯不同。本論文同時以螢光共振能量轉移以及基因轉染方式，證明斑馬魚長鏈不飽和脂肪酸，特別為 $\omega 3$ 系列脂肪酸生合成過程中，依序需要 Z-FADS、ELOVL5、ELOVL2 及 ELOVL4 才能生合成長鏈不飽和脂肪酸。同時亦證明斑馬魚只需要 Z-FADS 蛋白即可同時催化 $\Delta 6$ 及 $\Delta 5$ 去飽和作用，而其中 $\Delta 6$ 位置更會因為所接受的反應物不同而有不同的產物。同時也可推論斑馬魚 Z-FADS 的反應口袋可以同時接受 18 個碳到 24 個碳的長鏈不飽和脂肪酸，並且進行催化反應。而透過原核生物之膜結合型脂肪酸去飽和酶的模式，推論其反應物依賴 C-H/ π 交互作用而達成。

第六章、參考文獻



Aarts, M. G., C. J. Keijzer, W. J. Stiekema and A. Pereira (1995). "Molecular characterization of the CER1 gene of arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility." Plant Cell **7**(12): 2115-2127.

Armengaud, J., G. Sainz, Y. Jouanneau and L. C. Sieker (2001). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a [2Fe-2S] ferredoxin (FdVI) from *Rhodobacter capsulatus*." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **57**: 301-303.

Attie, A. D., R. M. Krauss, M. P. Gray-Keller, A. Brownlie, M. Miyazaki, J. J. Kastelein, A. J. Lusis, A. F. H. Stalenhoef, J. P. Stoehr, M. R. Hayden and J. M. Ntambi (2002). "Relationship between stearyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia." Journal of Lipid Research **43**(11): 1899-1907.

Austin, R. N., K. Buzzi, E. Kim, G. J. Zylstra and J. T. Groves (2003). "Xylene monooxygenase, a membrane-spanning non-heme diiron enzyme that hydroxylates hydrocarbons via a substrate radical intermediate." Journal of Biological Inorganic Chemistry **8**(7): 733-740.

Bard, M., D. A. Bruner, C. A. Pierson, N. D. Lees, B. Biermann, L. Frye, C. Koegel and R. Barbuch (1996). "Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 186-190.

Bau, R., D. C. Rees, D. M. Kurtz, R. A. Scott, H. S. Huang, M. W. W. Adams and M. K. Eidsness (1998). "Crystal structure of rubredoxin from *Pyrococcus furiosus* at 0.95 angstrom resolution, and the structures of N-terminal methionine and formylmethionine variants of Pf Rd. Contributions of N-terminal interactions to thermostability." Journal of Biological Inorganic Chemistry **3**(5): 484-493.

Behan, R. K. and S. J. Lippard (2010). "The Aging-Associated Enzyme CLK-1 Is a Member of the Carboxylate-Bridged Diiron Family of Proteins." Biochemistry **49**(45): 9679-9681.

Belhaj, A., N. Desnoves and C. Elmerich (2002). "Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a polluted zone: identification of alkB and alkB-related genes." Research in Microbiology **153**(6): 339-344.

Bradbury, J. (2011). "Docosahexaenoic Acid (DHA): An Ancient Nutrient for the Modern Human Brain." Nutrients **3**(5): 529-554.

Brenner, R. R. (2003). "Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **68**(2): 151-162.

Broadwater, J. A., J. A. Haas and B. G. Fox (1998). "The fundamental, versatile role of diiron enzymes in lipid metabolism." Fett-Lipid **100**(4-5): 103-113.

Bugg, T. D. H. and S. Ramaswamy (2008). "Non-heme iron-dependent dioxygenases: unravelling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations." Current Opinion in Chemical Biology **12**(2): 134-140.

Buhler, B., A. Schmid, B. Hauer and B. Witholt (2000). "Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in Escherichia coli JM101." J Biol Chem **275**(14): 10085-10092.

Buhler, B., A. Schmid, B. Hauer and B. Witholt (2000). "Xylene monooxygenase catalyzes the multistep oxygenation of toluene and pseudocumene to corresponding alcohols, aldehydes, and acids in Escherichia coli JM101." Journal of Biological Chemistry **275**(14): 10085-10092.

Buhler, B., B. Witholt, B. Hauer and A. Schmid (2002). "Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis." Applied and Environmental Microbiology **68**(2): 560-568.

Butler, C. S. and J. R. Mason (1997). "Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases." Advances in Microbial Physiology, Vol 38 **38**: 47-84.

Castro, L. F. C., O. Monroig, M. J. Leaver, J. Wilson, I. Cunha and D. R. Tocher (2012). "Functional Desaturase Fads1 (Delta 5) and Fads2 (Delta 6) Orthologues Evolved before the Origin of Jawed Vertebrates." Plos One **7**(2).

Chen, Y. S., W. I. Luo, T. L. Lee, S. S. F. Yu and C. Y. Chang (2013). "Identification of the proteins required for fatty acid desaturation in zebrafish (Danio rerio)." Biochemical and Biophysical Research Communications **440**(4): 671-676.

Chen, Y. S., W. I. Luo, C. L. Yang, Y. J. Tu, C. W. Chang, C. H. Chiang, C. Y. Chang, S. I. Chan and S. S. F. Yu (2014). "Controlled oxidation of aliphatic C-H bonds in metallo-monoxygenases: Mechanistic insights derived from studies on deuterated and fluorinated hydrocarbons." Journal of Inorganic Biochemistry **134**: 118-133.

Chen, Y. S. C., C. W.; C. L. Yang; L. L. Wu; C. H. Chiang; Ravirala Ramu; W. I Luo; S. I. Chan and S. S. F. Yu (2013). "Tuning the metalloenzymes for regio and

stereoselective activation of aliphatics." CHEMISTRY (The Chinese Chemical Society, Taipei) **71**(1): 67-81.

Chiang, C. H., R. Ramu, Y. J. Tu, C. L. Yang, K. Y. Ng, W. I. Luo, C. H. Chen, Y. Y. Lu, C. L. Liu and S. S. Yu (2013). "Regioselective hydroxylation of C(12)-C(15) fatty acids with fluorinated substituents by cytochrome P450 BM3." Chemistry **19**(41): 13680-13691.

Cinti, D. L., L. Cook, M. N. Nagi and S. K. Suneja (1992). "The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum." Prog Lipid Res **31**(1): 1-51.

Colby, J. and H. Dalton (1978). "Resolution of the methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) into three components. Purification and properties of component C, a flavoprotein." Biochem J **171**(2): 461-468.

D'Arrigo, A., E. Manera, R. Longhi and N. Borgese (1993). "The specific subcellular localization of two isoforms of cytochrome b5 suggests novel targeting pathways." J Biol Chem **268**(4): 2802-2808.

Daiber, A., H. Shoun and V. Ullrich (2005). "Nitric oxide reductase (P450nor) from *Fusarium oxysporum*." J Inorg Biochem **99**(1): 185-193.

Denic, V. and J. S. Weissman (2007). "A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length." Cell **130**(4): 663-677.

Dennis E. Vance, J. E. V. (2002). "Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes." pp.181-204.

Elahian, F., Z. Sepehrizadeh, B. Moghimi and S. A. Mirzaei (2012). "Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications." Crit Rev Biotechnol.

Ferdinandusse, S., S. Denis, P. A. Mooijer, Z. Zhang, J. K. Reddy, A. A. Spector and R. J. Wanders (2001). "Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid." J Lipid Res **42**(12): 1987-1995.

Fetzner, S., R. Muller and F. Lingens (1992). "Purification and Some Properties of 2-Halobenzoate 1,2-Dioxygenase, a 2-Component Enzyme-System from *Pseudomonas Cepacia* 2cbs." Journal of Bacteriology **174**(1): 279-290.

Fish, N. M., S. Harbron, D. J. Allenby and M. D. Lilly (1983). "Oxidation of normal-alkanes - isolation of alkane hydroxylase from *pseudomonas putida*." European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology **17**(1): 57-63.

Fukuyama, K., H. Matsubara, T. Tsukihara and Y. Katsube (1989). "Structure of [4Fe-4S]

ferredoxin from *Bacillus Thermoproteolyticus* refined at 2.3-Å resolution - structural comparisons of bacterial ferredoxins." Journal of Molecular Biology **210**(2): 383-398.

Gerdemann, C., C. Eicken and B. Krebs (2002). "The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins." Acc Chem Res **35**(3): 183-191.

Gray, M. A. and E. J. Squires (2013). "Effects of nuclear receptor transactivation on steroid hormone synthesis and gene expression in porcine Leydig cells." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **133**: 93-100.

Gregory, M. K., R. A. Gibson, R. J. Cook-Johnson, L. G. Cleland and M. J. James (2011). "Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis." Plos One **6**(12).

Gueguen, V., D. Macherel, M. Jaquinod, R. Douce and J. Bourguignon (2000). "Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria." Journal of Biological Chemistry **275**(7): 5016-5025.

Guillou, H., S. D'Andrea, V. Rioux, R. Barnouin, S. Dalaine, F. Pedrono, S. Jan and P. Legrand (2004). "Distinct roles of endoplasmic reticulum cytochrome b5 and fused cytochrome b5-like domain for rat Delta 6-desaturase activity." Journal of Lipid Research **45**(1): 32-40.

Guschina, I. A. and J. L. Harwood (2006). "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae." Prog Lipid Res **45**(2): 160-186.

Hajek, P., A. Chomyn and G. Attardi (2007). "Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2." J Biol Chem **282**(8): 5670-5681.

Hannemann, F., A. Bichet, K. M. Ewen and R. Bernhardt (2007). "Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains." Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects **1770**(3): 330-344.

Harayama, S., M. Kok and E. L. Neidle (1992). "Functional and Evolutionary Relationships among Diverse Oxygenases." Annual Review of Microbiology **46**: 565-601.

Harayama, S. and M. Reikik (1989). "Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families." J Biol Chem **264**(26): 15328-15333.

Hare, J. F. and A. Holocher (1994). "Solubility in non-ionic detergents distinguishes between slowly and rapidly degraded plasma membrane proteins." J Biol Chem **269**(8): 5981-5988.

Harlan, W. R. and S. J. Wakil (1963). "Synthesis of Fatty Acids in Animal Tissues .1. Incorporation of C¹⁴-Acetyl Coenzyme a into a Variety of Long Chain Fatty Acids by Subcellular Particles." Journal of Biological Chemistry **238**(10): 3216-&.

Hastings, N., M. Agaba, D. R. Tocher, M. J. Leaver, J. R. Dick, J. R. Sargent and A. J. Teale (2001). "A vertebrate fatty acid desaturase with Delta 5 and Delta 6 activities." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(25): 14304-14309.

Heinemann, F. S. and J. Ozols (2003). "Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **68**(2): 123-133.

Henderson, C. J., L. A. McLaughlin and C. R. Wolf (2013). "Evidence That Cytochrome b(5) and Cytochrome b(5) Reductase Can Act as Sole Electron Donors to the Hepatic Cytochrome P450 Systems." Molecular Pharmacology **83**(6): 1209-1217.

Hsieh, S. L., Y. N. Chen and C. M. Kuo (2003). "Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation." Aquaculture **220**(1-4): 903-918.

Hunter, C. A. and J. K. M. Sanders (1990). "The Nature of Pi-Pi Interactions." Journal of the American Chemical Society **112**(14): 5525-5534.

Infante, J. P. and V. A. Huszagh (1998). "Analysis of the putative role of 24-carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids." FEBS Lett **431**(1): 1-6.

Iyanagi, T. (1977). "Redox properties of microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5." Biochemistry **16**(12): 2725-2730.

Jackson, C. J., D. C. Lamb, T. H. Marezylo, A. G. S. Warrilow, N. J. Manning, D. J. Lowe, D. E. Kelly and S. L. Kelly (2002). "A novel sterol 14 alpha-demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily." Journal of Biological Chemistry **277**(49): 46959-46965.

Jump, D. B. (2009). "Mammalian fatty acid elongases." Methods Mol Biol **579**: 375-389.

Kawahara, S., S. Tsuzuki and T. Uchimaru (2004). "Theoretical study of the C-F/pi interaction: Attractive interaction between fluorinated alkane and an electron-deficient pi-system." Journal of Physical Chemistry A **108**(32): 6744-6749.

Ke, S. H. and E. L. Madison (1997). "Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method." Nucleic Acids Research **25**(16): 3371-3372.

Kok, M., R. Oldenhuis, M. P. van der Linden, P. Raatjes, J. Kingma, P. H. van Lelyveld and B. Witholt (1989). "The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression." J Biol Chem **264**(10): 5435-5441.

Kovaleva, E. G., M. B. Neibergall, S. Chakrabarty and J. D. Lipscomb (2007). "Finding intermediates in the O₂ activation pathways of non-heme iron oxygenases." Acc Chem Res **40**(7): 475-483.

Kraft, J., L. Hanske, P. Mockel, S. Zimmermann, A. Hartl, J. K. G. Kramer and G. Jahreis (2006). "The Conversion efficiency of trans-11 and trans-12 18 : 1 by Delta 9-desaturation differs in rats." Journal of Nutrition **136**(5): 1209-1214.

Kurusu, G., M. Kusunoki, E. Katoh, T. Yamazaki, K. Teshima, Y. Onda, Y. Kimata-Arigo and T. Hase (2001). "Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase." Nature Structural Biology **8**(2): 117-121.

Lange, S. J. and L. Que, Jr. (1998). "Oxygen activating nonheme iron enzymes." Curr Opin Chem Biol **2**(2): 159-172.

Lee, K., R. Friemann, J. V. Parales, D. T. Gibson and S. Ramaswamy (2005). "Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the three components of the toluene 2,3-dioxygenase enzyme system." Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications **61**: 669-672.

Leonard, A. E., S. L. Pereira, H. Sprecher and Y. S. Huang (2004). "Elongation of long-chain fatty acids." Prog Lipid Res **43**(1): 36-54.

Logan, S., M. P. Agbaga, M. D. Chan, R. S. Brush and R. E. Anderson (2014). "Endoplasmic reticulum microenvironment and conserved histidines govern ELOVL4 fatty acid elongase activity." J Lipid Res **55**(4): 698-708.

M.A. Smith, A. K. S., P.R. Shewry, J.A. Napier (1998). "Cytochrome b5 and polyunsaturated fatty acid biosynthesis." Engineering Crop Plants for Industrial End Uses, Portland Press, London: 181-188.

Maji, S., J. C. M. Lee, Y. J. Lu, C. L. Chen, M. C. Hung, P. P. Y. Chen, S. S. F. Yu and S. I. Chan (2012). "Dioxygen Activation of a Trinuclear CuICuICuI Cluster Capable of Mediating Facile Oxidation of Organic Substrates: Competition between O-Atom Transfer and Abortive Intercomplex Reduction." Chemistry-a European Journal **18**(13): 3955-3968.

Malik, Z. A., C. C. R. Allen, L. Gakhar, D. A. Lipscomb, M. J. Larkin and S. Ramaswamy (2002). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp strain NCIMB 12038." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **58**: 2173-2174.

Man, W. C., M. Miyazaki, K. Chu and J. Ntambi (2006). "Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis." Journal of Lipid Research **47**(9): 1928-1939.

Martin, C. E., C. S. Oh and Y. Jiang (2007). "Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast." Biochim Biophys Acta **1771**(3): 271-285.

Mashaghi, S., T. Jadidi, G. Koenderink and A. Mashaghi (2013). "Lipid Nanotechnology." International Journal of Molecular Sciences **14**(2): 4242-4282.

Masood, A., K. D. Stark and N. Salem, Jr. (2005). "A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies." J Lipid Res **46**(10): 2299-2305.

Maurel, D., L. Comps-Agrar, C. Brock, M. L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prezeau, E. Trinquet and J. P. Pin (2008). "Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization." Nat Methods **5**(6): 561-567.

McGaughey, G. B., M. Gagne and A. K. Rappe (1998). "pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins." J Biol Chem **273**(25): 15458-15463.

Meyer, A., H. Kirsch, F. Domergue, A. Abbadi, P. Sperling, J. Bauer, P. Cirpus, T. K. Zank, H. Moreau, T. J. Roscoe, U. Zahringer and E. Heinz (2004). "Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis." Journal of Lipid Research **45**(10): 1899-1909.

Miura, Y. and A. J. Fulco (1974). "(Omega -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*." J Biol Chem **249**(6): 1880-1888.

Miwa, G. T., S. B. West, M. T. Huang and A. Y. H. Lu (1979). "Studies on the Association of Cytochrome-P-450 and NADPH-Cytochrome-C Reductase during Catalysis in a Reconstituted Hydroxylating System." Journal of Biological Chemistry **254**(13): 5695-5700.

Monroig, O., J. Rotllant, J. M. Cerda-Reverter, J. R. Dick, A. Figueras and D. R. Tocher (2010). "Expression and role of Elovl4 elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development." Biochimica Et

Biochimica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids **1801**(10): 1145-1154.

Napier, J. A., L. V. Michaelson and O. Sayanova (2003). "The role of cytochrome b5 fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **68**(2): 135-143.

Napier, J. A., O. Sayanova, A. K. Stobart and P. R. Shewry (1997). "A new class of cytochrome b5 fusion proteins." Biochem J **328** (Pt 2): 717-718.

Nielsen, M. S., P. Harris, B. L. Ooi and H. E. Christensen (2004). "The 1.5 Å resolution crystal structure of [Fe3S4]-ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." Biochemistry **43**(18): 5188-5194.

Nolan, L. C. and K. E. O'Connor (2008). "Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products." Biotechnology Letters **30**(11): 1879-1891.

Norbert, G. S.-C. (1995). Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of synthetic organic chemicals. G. Y. a. C. E. Cerniglia, Wiley-Liss, D. C.: 27-74.

Ntambi, J. M. (1999). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol." J Lipid Res **40**(9): 1549-1558.

Oger, E., S. Ghignone, E. Campagnac, J. Fontaine, A. Grandmougin-Ferjani and L. Lanfranco (2009). "Functional characterization of a C-4 sterol methyl oxidase from the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*." Fungal Genet Biol **46**(6-7): 486-495.

Oh, C. S., D. A. Toke, S. Mandala and C. E. Martin (1997). "ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation." Journal of Biological Chemistry **272**(28): 17376-17384.

Ohno, Y., S. Suto, M. Yamanaka, Y. Mizutani, S. Mitsutake, Y. Igarashi, T. Sassa and A. Kihara (2010). "ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(43): 18439-18444.

Okuyama, H., Y. Orikasa, T. Nishida, K. Watanabe and N. Morita (2007). "Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression." Applied and Environmental Microbiology **73**(3): 665-670.

Ozols, J. (1989). "Structure of cytochrome b5 and its topology in the microsomal membrane." Biochim Biophys Acta **997**(1-2): 121-130.

Park, W. J., K. S. Kothapalli, H. T. Reardon, P. Lawrence, S. B. Qian and J. T. Brenna (2012). "A novel FADS1 isoform potentiates FADS2-mediated production of eicosanoid precursor fatty acids." J Lipid Res **53**(8): 1502-1512.

Passon, P. G. and Hultquis, De (1972). "Soluble Cytochrome-B5 Reductase from Human Erythrocytes." Biochimica Et Biophysica Acta **275**(1): 62-&.

Prenafeta-Boldu, F. X., A. Kuhn, D. M. A. M. Luykx, H. Anke, J. W. van Groenestijn and J. A. M. de Bont (2001). "Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source." Mycological Research **105**: 477-484.

Qiu, X. (2003). "Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22 : 6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **68**(2): 181-186.

Qiu, X., H. P. Hong and S. L. MacKenzie (2001). "Identification of a Delta 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*." Journal of Biological Chemistry **276**(34): 31561-31566.

Ramu, R., C. W. Chang, H. H. Chou, L. L. Wu, C. H. Chiang and S. S. F. Yu (2011). "Regio-selective hydroxylation of gem-difluorinated octanes by alkane hydroxylase (AlkB)." Tetrahedron Letters **52**(23): 2950-2953.

Rodriguez-Bies, E., P. Navas and G. Lopez-Lluch (2014). "Age-Dependent Effect of Every-Other-Day Feeding and Aerobic Exercise in Ubiquinone Levels and Related Antioxidant Activities in Mice Muscle." J Gerontol A Biol Sci Med Sci.

Rodriguez, G. M., Y. Tashiro and S. Atsumi (2014). "Expanding ester biosynthesis in *Escherichia coli*." Nat Chem Biol **10**(4): 259-265.

Rojo, F. (2005). "Specificity at the end of the tunnel: Understanding substrate length discrimination by the AlkB alkane hydroxylase." Journal of Bacteriology **187**(1): 19-22.

Rui, L. Y., K. F. Reardon and T. K. Wood (2005). "Protein engineering of toluene ortho-monooxygenase of *Burkholderia cepacia* G4 for regiospecific hydroxylation of indole to form various indigoid compounds." Applied Microbiology and Biotechnology **66**(4): 422-429.

Sakurai, T. and K. Kataoka (2007). "Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase." Chem Rec **7**(4): 220-229.

Sarker, M. A. A., Y. Yamamoto, Y. Haga, M. S. A. Sarker, M. Miwa, G. Yoshizaki and S.

Satoh (2011). "Influences of low salinity and dietary fatty acids on fatty acid composition and fatty acid desaturase and elongase expression in red sea bream *Pagrus major*." Fisheries Science **77**(3): 385-396.

Sazinsky, M. H., J. Bard, A. Di Donato and S. J. Lippard (2004). "Crystal structure of the toluene/o-xylene monooxygenase hydroxylase from *Pseudomonas stutzeri* OX1 - Insight into the substrate specificity, substrate channeling, and active site tuning of multicomponent monooxygenases." Journal of Biological Chemistry **279**(29): 30600-30610.

Schenkman, J. B. and I. Jansson (2003). "The many roles of cytochrome b5." Pharmacol Ther **97**(2): 139-152.

Seddon, A. M., P. Curnow and P. J. Booth (2004). "Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 105-117.

Serizawa, N. and T. Matsuoka (1991). "A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase." Biochim Biophys Acta **1084**(1): 35-40.

Seubert, W. and E. R. Podack (1973). "Mechanisms and physiological roles of fatty acid chain elongation in microsomes and mitochondria." Mol Cell Biochem **1**(1): 29-40.

Shanklin, J., J. E. Guy, G. Mishra and Y. Lindqvist (2009). "Desaturases: Emerging Models for Understanding Functional Diversification of Diiron-containing Enzymes." Journal of Biological Chemistry **284**(28): 18559-18563.

Shanklin, J. and E. Whittle (2003). "Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane omega-hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family." Febs Letters **545**(2-3): 188-192.

Shanklin, J., E. Whittle and B. G. Fox (1994). "Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase." Biochemistry **33**(43): 12787-12794.

Shaw, J. P. and S. Harayama (1992). "Purification and Characterization of the NADH - Acceptor Reductase Component of Xylene Monooxygenase Encoded by the Tol Plasmid Pww0 of *Pseudomonas-putida* Mt-2." European Journal of Biochemistry **209**(1): 51-61.

Shi, T. L., A. Q. Yu, M. Li, X. Y. Ou, L. J. Xing and M. C. Li (2012). "Identification of a novel C22-Delta 4-producing docosahexaenoic acid (DHA) specific polyunsaturated fatty

acid desaturase gene from *Isochrysis galbana* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Biotechnology Letters **34**(12): 2265-2274.

Shintani, D. K. and J. B. Ohlrogge (1994). "The Characterization of a Mitochondrial Acyl Carrier Protein Isoform Isolated from *Arabidopsis-Thaliana*." Plant Physiology **104**(4): 1221-1229.

Song, L. Y., W. X. Lu, J. Hu, Y. Zhang, W. B. Yin, Y. H. Chen, S. T. Hao, B. L. Wang, R. R. Wang and Z. M. Hu (2010). "Identification and functional analysis of the genes encoding Delta6-desaturase from *Ribes nigrum*." J Exp Bot **61**(6): 1827-1838.

Spatz, L. and P. Strittmatter (1973). "A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b 5 reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment." J Biol Chem **248**(3): 793-799.

Staijen, I. E., J. B. Van Beilen and B. Witholt (2000). "Expression, stability and performance of the three-component alkane mono-oxygenase of *Pseudomonas oleovorans* in *Escherichia coli*." Eur J Biochem **267**(7): 1957-1965.

Stephens, J. L., S. H. Lee, K. S. Paul and P. T. Englund (2007). "Mitochondrial fatty acid synthesis in *Trypanosoma brucei*." Journal of Biological Chemistry **282**(7): 4427-4436.

Strittmatter, P., L. Spatz, D. Corcoran, M. J. Rogers, B. Setlow and R. Redline (1974). "Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(11): 4565-4569.

Stukey, J. E., V. M. McDonough and C. E. Martin (1989). "Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **264**(28): 16537-16544.

Suen, W. C. and D. T. Gibson (1993). "Isolation and preliminary characterization of the subunits of the terminal component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4." J Bacteriol **175**(18): 5877-5881.

Suzuki, M., T. Hayakawa, J. P. Shaw, M. Reikik and S. Harayama (1991). "Primary structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system." J Bacteriol **173**(5): 1690-1695.

Szafer-Glusman, E., M. G. Giansanti, R. Nishihama, B. Bolival, J. Pringle, M. Gatti and M. T. Fuller (2008). "A role for very-long-chain fatty acids in furrow ingression during cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes." Current Biology **18**(18): 1426-1431.

Tamburini, P. P. and J. B. Schenkman (1987). "Purification to homogeneity and enzymological characterization of a functional covalent complex composed of

cytochromes P-450 isozyme 2 and b5 from rabbit liver." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(1): 11-15.

Tamura, K., A. Makino, F. Hullin-Matsuda, T. Kobayashi, M. Furihata, S. Chung, S. Ashida, T. Miki, T. Fujioka, T. Shuin, Y. Nakamura and H. Nakagawa (2009). "Novel Lipogenic Enzyme ELOVL7 Is Involved in Prostate Cancer Growth through Saturated Long-Chain Fatty Acid Metabolism." Cancer Research **69**(20): 8133-8140.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011). "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." Molecular Biology and Evolution **28**(10): 2731-2739.

Tanomman, S., M. Ketudat-Cairns, A. Jangprai and S. Boonanuntanasarn (2013). "Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **166**(2): 148-156.

Thiede, M. A., J. Ozols and P. Strittmatter (1986). "Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase." J Biol Chem **261**(28): 13230-13235.

Tidhar, R. and A. H. Futerman (2013). "The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research **1833**(11): 2511-2518.

Tonon, T., D. Harvey, T. R. Larson and I. A. Graham (2003). "Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid Delta 4-desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*." Febs Letters **553**(3): 440-444.

Treffry, A., Z. W. Zhao, M. A. Quail, J. R. Guest and P. M. Harrison (1997). "Dinuclear center of ferritin: Studies of iron binding and oxidation show differences in the two iron sites." Biochemistry **36**(2): 432-441.

Tshuva, E. Y., D. Lee, W. M. Bu and S. J. Lippard (2002). "Catalytic oxidation by a carboxylate-bridged non-heme diiron complex." Journal of the American Chemical Society **124**(11): 2416-2417.

Tsuzuki, S. (2012). "CH/ π interactions." Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry) **108**: 69-95.

Uauy, R. and A. D. Dangour (2006). "Nutrition in brain development and aging: Role of essential fatty acids." Nutrition Reviews **64**(5): S24-S33.

Uauy, R., D. R. Hoffman, P. Peirano, D. G. Birch and E. E. Birch (2001). "Essential fatty

acids in visual and brain development." Lipids **36**(9): 885-895.

van Beilen, J. B., Z. Li, W. A. Duetz, T. H. M. Smits and B. Witholt (2003). "Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment." Oil & Gas Science and Technology-
Revue D Ifp Energies Nouvelles **58**(4): 427-440.

Vandeloo, F. J., P. Broun, S. Turner and C. Somerville (1995). "An Oleate 12-Hydroxylase from Ricinus-Communis L Is a Fatty Acyl Desaturase Homolog." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(15): 6743-6747.

Vardar, G., K. Ryu and T. K. Wood (2005). "Protein engineering of toluene-o-xylene monooxygenase from Pseudomonas stutzeri OX1 for oxidizing nitrobenzene to 3-nitrocatechol, 4-nitrocatechol, and nitrohydroquinone." Journal of Biotechnology **115**(2): 145-156.

Waldron, K. J., J. C. Rutherford, D. Ford and N. J. Robinson (2009). "Metalloproteins and metal sensing." Nature **460**(7257): 823-830.

Wang, H. S., C. Yu, X. F. Tang, Z. J. Zhu, N. N. Ma and Q. W. Meng (2014). "A tomato endoplasmic reticulum (ER)-type omega-3 fatty acid desaturase (LeFAD3) functions in early seedling tolerance to salinity stress." Plant Cell Reports **33**(1): 131-142.

Wentzel, A., T. E. Ellingsen, H. K. Kotlar, S. B. Zotchev and M. Throne-Holst (2007). "Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes." Applied Microbiology and Biotechnology **76**(6): 1209-1221.

Wieckowski, M. R., C. Giorgi, M. Lebiezinska, J. Duszynski and P. Pinton (2009). "Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells." Nat Protoc **4**(11): 1582-1590.

Williard, D. E., T. L. Kaduce, S. D. Harmon and A. A. Spector (1998). "Conversion of eicosapentaenoic acid to chain-shortened omega-3 fatty acid metabolites by peroxisomal oxidation." J Lipid Res **39**(5): 978-986.

Yadav, N. S., A. Wierzbicki, M. Aegerter, C. S. Caster, L. Perez-Grau, A. J. Kinney, W. D. Hitz, J. R. Booth, Jr., B. Schweiger, K. L. Stecca and et al. (1993). "Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases." Plant Physiol **103**(2): 467-476.

Yen, C. L. E., S. J. Stone, S. Koliwad, C. Harris and R. V. Farese (2008). "DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis." Journal of Lipid Research **49**(11): 2283-2301.

Yen, K. M. and I. C. Gunsalus (1985). "Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7." J Bacteriol **162**(3): 1008-1013.

Zhang, J. T., H. Liu, J. Sun, B. Li, Q. Zhu, S. L. Chen and H. X. Zhang (2012). "Arabidopsis Fatty Acid Desaturase FAD2 Is Required for Salt Tolerance during Seed Germination and Early Seedling Growth." [Plos One](#) 7(1): e30355.

Zylstra, G. J. (1994). [Molecular analysis of aromatic hydrocarbon degradation.](#)

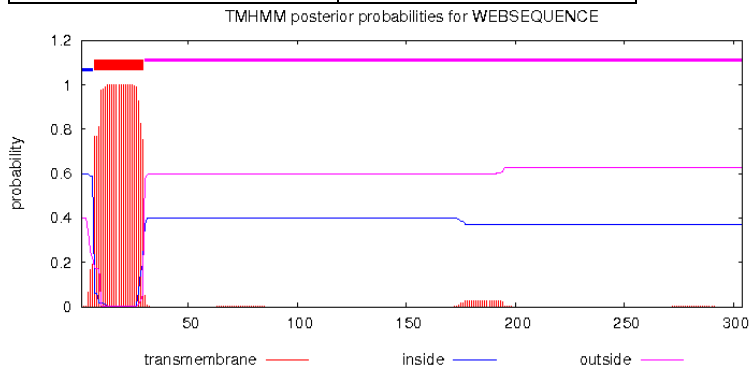


附圖



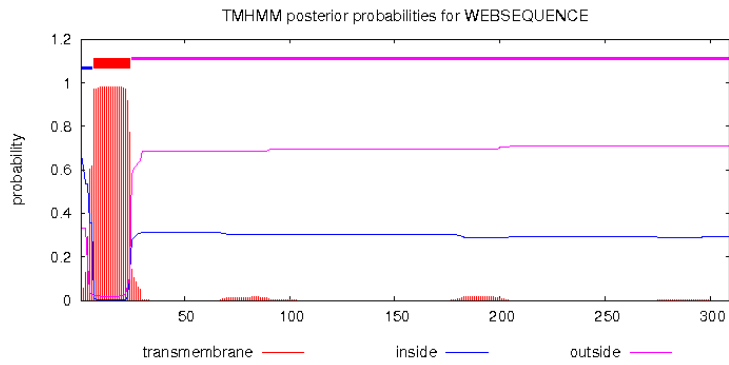
A

Location	Amino acid residues
Inside	1-6
Trans-membrane helix	7-29
Outside	30-304



B

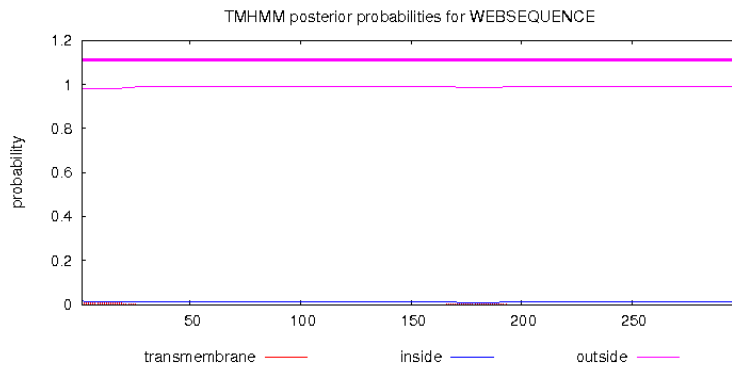
Location	Amino acid residues
Inside	1-6
Trans-membrane helix	7-24
Outside	25-309





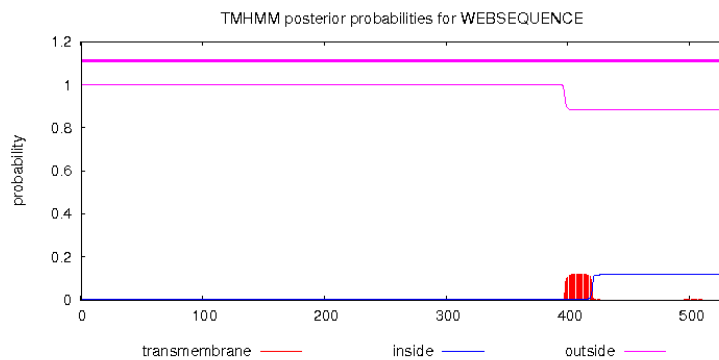
C

Location	Amino acid residue
Outside	1-298



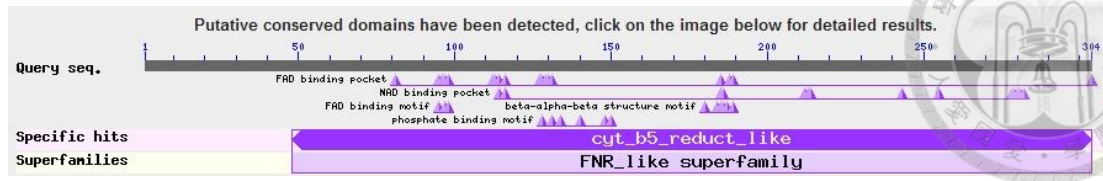
D

Location	Amino acid residue
Outside	1-526

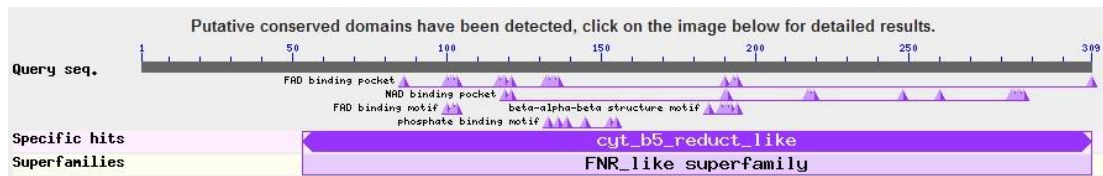


附圖一、斑馬魚四型細胞色素 b5 還原酶(cytochrome b5 reductase, CYB5R)蛋白質穿膜序列預測與穿膜構造拓譜學分析。(A)為 CYB5R1 蛋白序列分析，具有一段 23 個胺基酸組成之穿膜構造區，位於第 7 個胺基酸至 29 個胺基酸殘基，(B)為 CYB5R2 蛋白序列分析，具有一段 18 個胺基酸組成之穿膜構造區，位於第 7 個胺基酸至 24 個胺基酸殘基，(C)與(D)為溶解型，不具有穿膜構造。蛋白質穿膜序列分析軟體為 TMHMM (v2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。

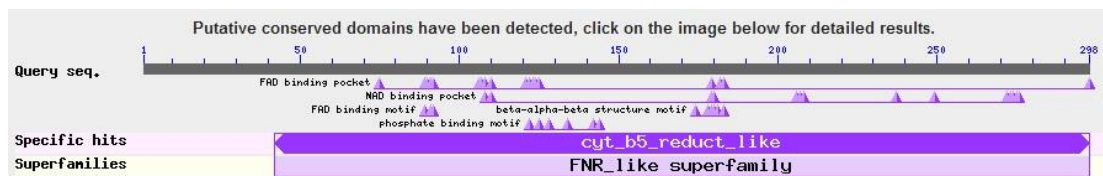
A



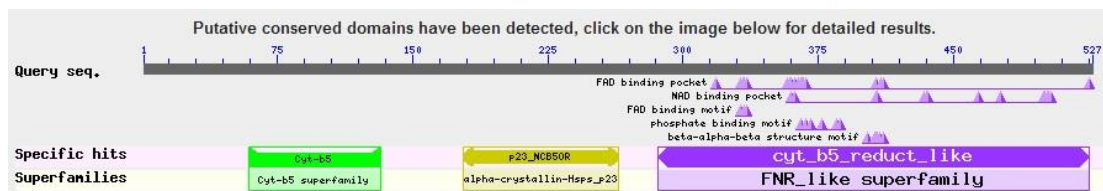
B



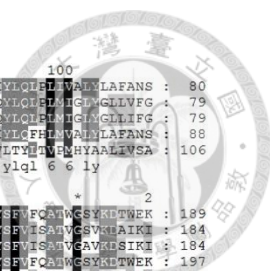
C



D



附圖二、斑馬魚四型 CYB5R 保守功能區域分析。以保守區域資料庫(Conserved Domains Database, CDD, National Center for Biotechnology Information)比對四型 CYB5R 蛋白質序列，四型 CYB5R 中的第一型(A)、第二型(B)及第三型為只具有細胞色素 b5 還原酶區域，屬於類 NAD(P)H 依賴型鐵氧還原蛋白還原酶超級家族蛋白(ferradoxin reductase-like superfamily, FNR-like superfamily)。而第四型(D)同時具有細胞色素 b5 還原酶與細胞色素 b5 蛋白功能區。



```

N-FADS : * 20 * 40 * 60 * 80 * 100
N-FADS : M-----LADRYVLEAVMLTGVAGHILC-----GQVWVLE-IATPAVMLLDLVLES-HKVRSRGIAPVVD-----IATYLOEFLVAVLAFANS : 80
P-xylM : M-----LADRYVLEAVMLTGVAGHILC-----GQVWVLE-AATPAVMLLDLVLES-HKVRSRGIAPVVD-----LTCYLOEFLVAVLAFANS : 79
P-NtnMA : M-----LADRYVLEAVMLTGVAGHILC-----GQVWVLE-ATTPAVMLLDLVLES-HKVRSRGIAPVVD-----LTCYLOEFLVAVLAFANS : 79
S-xylM : M-----LADRYVLEAVMLTGVAGHILC-----GQVWVLE-ATTPAVMLLDLVLES-HKVRSRGIAPVVD-----LTCYLOEFLVAVLAFANS : 88
P-AlkB : MLEKHKRVLDSAPEYVDRKKKYLWSTLWPAHIGIWLANTGVGIVYGVLLVWVGAIFLITAVFGEDNNPPPEVVPKLEKE---RYYRVLTYITWPHYAAALVSA : 106
M d r5 L p t g6 Gf g G 5vWlg 1 Ld d a y1q1 6 6 ly

* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 2
N-FADS : VSGTNEFWGADGSAWQLIGSASIAVLAIAVPLVVAHEIN-HRRHVFRAVVRGISAAGDNRDVAHIVVHHVHLTAARDSDTLGQTIYSEFCATWCSYKRWTEK : 189
P-xylM : VENGRIEIS---EPLQVACILSIAVLAIAVPLVVAHEIN-HRRHVLRRKQQLAMVGDNRDVAHIVVHHVHLTAARDSDTLGQTIYSEFCATWCSYKRWTEK : 184
P-NtnMA : VKGKILIDG---QPLQVACILSIAVLAIAVPLVVAHEIN-HRRHVLRRKQQLAMVGDNRDVAHIVVHHVHLTAARDSDTLGQTIYSEFCATWCSYKRWTEK : 184
S-xylM : VATGNEFWGADGSAWQLIGSASIAVLAIAVPLVVAHEIN-HRRHVFRAVVRGISAAGDNRDVAHIVVHHVHLTAARDSDTLGQTIYSEFCATWCSYKRWTEK : 197
P-AlkB : WWVGTGNS---WLEIGALSLSLGVNGLLNTCHHEIHKRETFEAWKILVAVVGYGHFFHFNKCHERIVVAPMIPASRMGSEIVRHSSTREIFCAEIRAWGL : 209
v G 6 q G 6 sl 6s vptLpv HEL H44hw pR 6a 6 fyGd nrd6 H HH 6dT DsdT rG23IyFv at G kd

20 * 240 * 260 * 280 * 300 * 320
N-FADS : GGEHLRRRCYSWWRNAAVLCVILGIIILGAAAGIACFAVGAMFFARMFVCGFNYSCHYGLLEVEGD-----LARBHWNHLMIVRFLCVINNHNHHD : 293
P-xylM : EAEHRRRCGSPWNLSKRTIYVATLILPGLVSYLGGALCLVITASNIIARGIVEGCFNYSCHYGLVLDLDC-----LARBHWNHLMIVRFLCVINNHNHHD : 288
P-NtnMA : EAEHRRRCGSPWNLSKRTIYVATLILPGLVSYLGGALCLVITASNIIARGIVEGCFNYSCHYGLVLDLDC-----LARBHWNHLMIVRFLCVINNHNHHD : 288
S-xylM : GGEHLRRRCYSWWRNAAVLCVILGIIILGAAAGIACFAVGAMFFARMFVCGFNYSCHYGLAARGSD-----LARBHWNHLMIVRFLCVINNHNHHD : 301
P-AlkB : EAEHRRRCGSPWSEDLKELQPIITVITVYAVLALFGKMLVFLPIQAEFGWVCHTSANYSCHYGLLEQRMEDGRYEHQKPHHSWNSNHLMIVRFLCVINNHHD : 318
2 2 L R G SpW N 6 a6 6 Gp g t M e fNyf2HYGL r p i HH Wnh g 6vpr6g e6tnH 1HH d

* 340 * 360 * 380 * 400 *
N-FADS : GHIFVVELCPPEKAPQMPSEFFVCLDGLIIPVWVHRRFLICPRILKDWLHFASSSEKRLAMAANKRAGWFAVATD----- : 367
P-xylM : CYTRFVELRPERKAPQMPSEFFVCLDGLIIPVWVHRRFLICPRILKDWLQVATGCERELAMAANKRAGWFAVATD-----VASI-- : 369
P-NtnMA : CYTRFVELRPERKAPQMPSEFFVCLDGLIIPVWVHRRFLICPRILKDWLQVATGCERELAMAANKRAGWFAVATD-----VASI-- : 369
S-xylM : GHIFVVELCPPEKAPQMPSEFFVCLDGLIIPVWVHRRFLICPRILKDWLHFASSSEKRLAMAANKRAGWFAVATD----- : 375
P-AlkB : PTRSAGSRDFEGLIPLPGIPGAFIMPAHICWERSLMPKVVWAGGLNKKIIDDSSRETYLKRSGTSSAGHSSTSAVAS--- : 401
g 5yeL pe aFq6P315 c 1 g16pP W 6a P46 Dwd a 2r laMaan g5p w

```

附圖三、原核生物膜結合型脂肪酸去飽和酶超級家族蛋白一級結構序列分析。以 MEGA5 分析 *Pseudomonas putida* mt-2 XylM 與 *Pseudomonas* sp. TW3 之 4-硝基甲苯單加氧酶 (4-nitrotoluene monooxygenase hydroxylase component, NtnMA, AAC38359.1)、新鞘氨醇菌 (*novosphingobium* sp. PP1Y) 的脂肪酸去飽和酶 (YP_004534277.1)、*Sphingobium yanoikuyae* 的二甲苯單加氧酶 (ABM79805.1) 及 *Pseudomonas putida* GPo1 的烷烴烴化酶 (alkane hydroxylase, AlkB, CAB54050.1) 之蛋白質序列比對分析。黑色實心底線為膜結合型脂肪酸去飽和酶三個組胺酸盒子 (histidine box)。黑色虛線為推測之組胺酸盒子，xylene monooxygenase 及新鞘氨醇菌脂肪酸去飽和酶其序列為 HHxWNH，而以飽和烷烴類化合物為反應物之 *Pseudomonas putida* GPo1 則為 HHxWNS。