

國立台灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文



Institute of Biochemistry and Molecular Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

DnaQ 核酸水解外切酶家族之可能的抑制劑之鑑定

Identification of the potential inhibitors for the

DnaQ-like exonucleases

黃冠偉

Kuan-Wei Huang

指導教授：袁小玲 博士

Advisor : Hanna S. Yuan Ph.D.

中華民國 一百零二 年 七 月

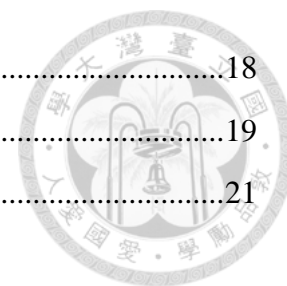
July 2013



# 目錄

中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	2
壹、序論	
一、DnaQ 核酸水解外切酶家族 .....	3
二、DnaQ 核酸水解外切酶家族在細胞內所扮演的功能 .....	4
三、部分病毒利用不同 DnaQ 核酸水解外切酶家族協助感染宿主 .....	6
四、研究目的 .....	7
貳、實驗材料方法	
一、質體及其建構 .....	8
二、蛋白質表現及純化 .....	8
1. 細菌菌株 .....	8
2. 線蟲 CRN-4 蛋白質小量表現測試 .....	8
3. 線蟲 CRN-4 蛋白質大量表現及純化 .....	9
4. 大腸桿菌 RNase T 蛋白質大量表現及純化 .....	11
三、Thrombin 活性測試 .....	12
四、蛋白質膠體電泳法 .....	12
五、西方點墨法 .....	12
六、5 端 $\gamma$ - <sup>32</sup> P 放射性同位素標定 .....	13
七、去氧核糖核酸水解酶活性分析 .....	13
八、蛋白質結晶與 X 光繞射數據收集 .....	14
參、實驗結果	
一、線蟲 CRN-4 蛋白質小量表現測試 .....	16
二、線蟲 CRN-4 蛋白質大量表現及純化 .....	16
三、大腸桿菌 RNase T 蛋白質大量表現及純化 .....	17
四、核酸水解酶活性分析 .....	17
1. CRN-4 核酸水解酶活性分析 .....	18

2. RNase T 核酸水解酶活性分析 .....	18
五、MES-CRN-4 複合物之結晶與其結構 .....	19
肆、 討論 .....	21
伍、 圖表	
表一、DnaQ 核酸水解外切酶家族成員 .....	23
表二、十一種已用於研究之核酸抑制劑 .....	24
表三、抑制 CRN-4 核酸水解外切酶所需之抑制劑濃度 .....	25
表四、抑制 RNase T 核酸水解外切酶所需之抑制劑濃度 .....	26
表五、MES-CRN-4 複合物晶體繞射點資料及模型建立參數 .....	27
圖一、DnaQ 核酸水解外切酶家族區域結構比對圖 .....	28
圖二、DnaQ 核酸水解外切酶家族的催化機制 .....	29
圖三、DNA-RNase T 複合物活性位結構重疊比對圖 .....	30
圖四、HIV 病毒利用人類 TREX1 躲避宿主免疫系統之機制 .....	31
圖五、不同種冠狀病毒具一高度保留核酸水解外切酶區域 .....	32
圖六、LASV 病毒之 NP 蛋白質結構 .....	33
圖七、CRN-4 蛋白質小量表現測試 .....	34
圖八、Thrombin 切除 CRN-4 重組蛋白上 His-tag 的活性測試 .....	35
圖九、CRN-4 大量純化結果 .....	36
圖十、RNase T 大量純化結果 .....	37
圖十一、CRN-4 核酸水解外切酶活性測試 .....	38
圖十二、RNase T 核酸水解外切酶活性測試 .....	39
圖十三、MES-CRN-4 複合物蛋白質結構 .....	41
圖十四、MES-CRN-4 複合物活性位之電子密度圖 .....	42
圖十五、MES-CRN-4 複合物的構形變化 .....	43
圖十六、MES-CRN-4 與 DNA-RNase T 複合物結構重疊比對圖 .....	44
陸、 參考文獻 .....	45



# 摘要



DnaQ核酸水解外切酶家族由超過萬種蛋白質成員組成，廣泛分布於原核與真核生物中。此家族成員具有一高度保留性3端至5端核酸水解外切酶結構區域，含有5個高度保留性胺基酸。此類核酸水解蛋白質在細胞中主要參與DNA或RNA的代謝，例如DNA的複製，DNA的修復、DNA的降解，或RNA成熟修飾過程。近來研究發現，部分病毒會利用DnaQ核酸水解外切酶家族成員，來幫助自身感染宿主細胞。故篩選抑制劑來抑制DnaQ核酸水解酶的活性，可能有助於抗病毒感染藥物的研發。

本論文使用DnaQ核酸水解外切酶家族成員之一的CRN-4與RNase T做為模型，用以篩選11種可能的核酸水解酶抑制劑。CRN-4核酸水解外切酶的活性實驗結果顯示，相對於其他9種可能的抑制劑而言，4-(4,6-dichloro-[1,3,5]-triazin-2-ylamino)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzocacid 與 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) 具有相對較好的抑制效果。而在 RNase T 核酸水解外切酶活性實驗中，則是 p-chloromercuriphenyl sulfonate 與 Aurintricarboxylic acid 具有相對較好的抑制效果。此外根據 CRN-4 和 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid 的複合物之晶體結構，顯示出此化合物結合在 CRN-4 的活性中心位置，造成 CRN-4 活性中心發生構形變化，而導致 CRN-4 的核酸水解外切酶活性受到抑制。我們的研究結果顯示篩選的部分化合物，的確可以抑制 DnaQ 核酸水解外切酶家族成員的活性，然而這些化合物的抑制效果與專一性需要再加改善。

# Abstract



The family of the DnaQ-like exonucleases contains more than ten thousand members widely distributed in prokaryotes and eukaryotes. These exonucleases all contain a highly conserved DEDDh domain with four acidic residues for metal ion binding and one general base residue in the active site. Members in this family play key roles in DNA or RNA metabolism, such as proofreading in DNA replication, DNA processing in DNA repair, DNA degradation in apoptosis and RNA processing in RNA maturation. Recent studies show that several exonucleases in this superfamily are important for viral infections. It is thus important to identify inhibitors for this family of nucleases that may be helpful for the development of anti-viral agents.

Here using CRN-4 and RNase T, members of DnaQ-like exonuclease, as the model system, we screened 11 inhibitor candidates. We found that two compounds, 4-(4,6-dichloro-[1,3,5]-triazin-2-ylamino)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzoic acid and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate), could weakly inhibit the exonuclease activity of CRN-4, whereas two compounds, p-chloromercuriphenyl sulfonate and aurintricarboxylic acid, could strongly inhibit the exonuclease activity of RNase T. Moreover, we co-crystallized CRN-4 with one of the weak inhibitors, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES). The crystal structure of CRN-4 in complex with MES shows that MES was bound in the active site and the general base His<sup>179</sup> was flipped out of the active site. In summary, we identified potential inhibitors for the DnaQ-like exonucleases; however, the inhibition activity and specificity of these compounds need to be further improved.

# 壹、序論



## 一、DnaQ 核酸水解外切酶家族

生物體中，核酸的修飾與代謝是極為重要的生化反應，例如部分基因複製出現的錯誤，需要利用核酸水解酶來幫忙修正；基因轉錄出的 RNA 需要經過修飾才能成為 mRNA，進而提供訊息轉譯成蛋白質。在這些作用中核酸水解酶則扮演了相當重要的角色。目前核酸水解酶主要可分為兩大類，分別為外切酶與內切酶，其中核酸水解外切酶是一個相當大的蛋白質家族，依催化方向又可分為 3 端至 5 端核酸水解外切酶家族 (3' to 5' exoribonuclease superfamily) 或 5 端至 3 端核酸水解外切酶家族 (5' to 3' exoribonuclease superfamily)。此類核酸水解酶主要的催化反應為從核酸的 3 端或 5 端水解磷酸雙酯鍵，將核苷酸一次一個從核酸鏈上移除。而 DnaQ 核酸水解外切酶家族則屬於 3 端至 5 端核酸水解外切酶家族的成員之一 (Yang, 2011; Zuo and Deutscher, 2001)。

DnaQ 核酸水解外切酶家族在各文獻與資料庫中有不同名稱，如 DEDD 核酸水解外切酶家族 (DEDD exonucleases family) 或 RNase T 超級家族 (RNase T superfamily)，藉由序列比對將其歸屬於 3 端至 5 端核酸水解外切酶家族。就區域結構 (Domain structure) 而言，DnaQ 核酸水解外切酶家族主要具有一個 3 端至 5 端核酸水解外切酶的功能區域 (3' to 5' exonuclease domain)。此區域可再細分為 Exo I、Exo II 與 Exo III 三個小區段，而其中含有 5 個高度保留的胺基酸，負責主要核酸水解的活性，分別為：三個 Aspartic acid、一個 Glutamic acid 與一個 Histidine 或是 Tyrosine 的鹼基 (general base) [圖一] (Moser et al., 1997; Yang, 2011; Zuo and Deutscher, 2001)。此類核酸酶的催化機制是利用兩個金屬離子，其中多以鎂離子，穩定受質與核酸水解酶活性中心的交互作用，並由鹼基奪取水分子上的氫原子，並生成一個 OH<sup>-</sup> nucleophile 進而誘導一系列

電子轉移，使磷酸雙酯鍵 (Phosphodiester bond) 斷裂造成核酸分子的水解，由於此類蛋白質的活性位結構排列極為相似，故認為其成員的催化水解機制大致相同[圖二] (Hamdan et al., 2002)。

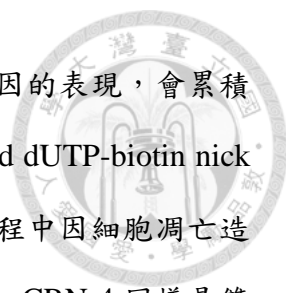


## 二、DnaQ 核酸水解外切酶家族在細胞內所扮演的功能

DnaQ 核酸水解外切酶家族成員組成超過萬種。自然界中從低等細菌、病毒乃至高等哺乳類動物皆具有該類蛋白質，例如大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 的 RNase T、是秀丽桿狀線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 的 CRN-4 (Cell death-related nuclease 4) 與人類 (*Homo sapiens*) 的 TREX1 (Three prime repair exonuclease 1) 等 [表一]。據研究，這些核酸水解外切酶參與在不同生化路徑中，主要可分為兩類，RNA 和 DNA 的修飾及降解作用，而這些功能對於細胞的生存大多是不可或缺的 (Yang, 2011)。

RNase T 於大腸桿菌中負責 tRNA 和 rRNA 的成熟修飾作用 (Deutscher et al., 1984; Hsiao et al., 2011; Zuo and Deutscher, 2002; Zuo et al., 2007)。實驗顯示若將 RNase T 剔除 (Knockout)，會導致大腸桿菌生長緩慢；且當處於代謝壓力 (Metabolic stress) 下，其回復的能力亦會減緩。根據目前已測定出的晶體結構，RNase T 是雙聚體 (Dimer) 的核酸水解酶，而兩個活性位則位於不同的面向。此外，RNase T 具有受質特異性，雙股核酸會被阻擋在活性中心外無法催化反應；而當 3 端為 Cytosine 核苷酸的單股核酸或 3 端突出的雙股核酸，會因 C 效應 (C-effect) 而無法進行催化作用 (Hsiao et al., 2012; Hsiao et al., 2011)，其原因可從 RNase T 和 DNA 的複合物晶體結構觀察得知，比較不同 DNA-RNase T 複合物結構圖，可發現，相對於能被 RNase T 作用的受質而言，當受質為 3 端 Cytosine 時，會造成活性中心構形改變，導致活性位的胺基酸位向偏轉，無法正常作用 [圖三]。

CRN-4 被發現參與在線蟲的細胞凋亡 (apoptosis)，作用於降解 DNA 的



路徑中。研究顯示，以 RNAi 抑制 (Knockdown) CRN-4 基因的表現，會累積大量具 TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 訊號的細胞核，並會延後出線線蟲胚胎發育過程中因細胞凋亡造成的細胞殘骸 (Parrish and Xue, 2003)。從晶體結構上看，CRN-4 同樣是雙聚體，而不同於其他 DnaQ 核酸水解外切酶家族成員，CRN-4 的 C 端具有一段鋅結合區域 (Zn-binding domain)，研究認為此區段與受質的結合有關 (Hsiao et al., 2009)。

人類 TREX1 被認為參與 Granzyme A 所調控的細胞死亡作用中降解 DNA，研究發現，TREX1 會與其他蛋白質有交互作用形成與內質網關聯的 SET 複合體 (Endoplasmic reticulum-associated SET complex)，當 Granzyme A 進入細胞並作用在 SET 複合體的目標蛋白後，SET 複合體會進入細胞核中進一步水解 DNA，導致細胞死亡 (Chowdhury et al., 2006)。此外研究指出，TREX1 會水解由 DNA 複製出錯產生的中間產物，以避免因這些不正常 DNA 啟動活化先天免疫機制 (Bailey et al., 2012)。TREX1 的蛋白質結構亦是雙聚體，有研究發現 TREX1 活性中心具有類似前述 RNase T 的構形變化 (Bailey et al., 2012)。

此外尚有其他蛋白質亦屬於 DnaQ 核酸水解外切酶家族，如 DnaQ 蛋白質亦即 DNA 聚合酶 III 的  $\epsilon$  次單元 (DNA polymerase III  $\epsilon$  subunit)，負責在 DNA 複製中移除錯誤核苷酸的步驟 (proofreading) (Hamdan et al., 2002)。PARN 則是 poly-A 特異性核酸水解外切酶參與 mRNA 降解的過程 (Wu et al., 2005)。ISG20 則是由干擾素 (interferon) 所誘導合成，作為抵抗病毒的核酸水解酶 (Horio et al., 2004)。

儘管截至目前已有許多相關的研究結果，但對於此類蛋白質的細節所知甚少，例如 CRN-4 參與在細胞凋亡作用中降解 DNA，而實驗結果卻發現相對於 DNA，CRN-4 作用在 RNA 的活性反而較高，由此可見該蛋白質或許在細胞中具有其他的生物功能。






### 三、部分病毒利用不同 DnaQ 核酸水解外切酶家族協助感染宿主

近年研究發現，部分病毒在感染宿主的過程中，會利用宿主本身或是病毒自身所攜帶的 DnaQ 核酸水解外切酶家族成員，來幫助病毒感染宿主細胞。例如：造成人類後天免疫缺乏症候群 (Acquired immune deficiency syndrome) 的 Human immunodeficiency virus (HIV)。當 HIV 病毒進入人類宿主細胞後，會利用宿主的 TREX1 來降解由病毒反轉錄酶所轉錄的病毒 DNA 片段，減少細胞內病毒 DNA 的含量，以降低被宿主細胞內的 DNA 感應蛋白質 (DNA sensor) 捕捉的機率，使宿主細胞不會啟動先天免疫反應 (Innate immune response) 而合成干擾素對抗病毒入侵 [圖四]。研究顯示，若抑制 TREX1 的活性可降低 HIV 的感染，因此推測抑制 TREX1 的核酸水解外切酶活性，可做為一抗病毒感染的方法。(Barber, 2011; Geijtenbeek, 2010; Manel and Littman, 2011; Stetson, 2012; Yan et al., 2009; Yan and Lieberman, 2011; Yan et al., 2010)。

不同種類的冠狀病毒 (Coronavirus) 自身攜帶的基因內，存在一段高度保留的核酸水解外切酶活性的區域 (Putative exoribonuclease, ExoN) [圖五] (Eckerle et al., 2010; Minskaia et al., 2006)。而其中造成台灣 2003 年爆發的嚴重急性呼吸道症候群 (Severe acute respiratory syndrome) 的 SARS 冠狀病毒，其核酸水解酶位在非結構蛋白質 14 (Nonstructural protein 14, nsp14) 的 N 端位置。研究顯示在感染冠狀病毒的細胞內 RNA 圖譜結構，會隨著 nsp14 活性位的突變而有所變化；另有研究指出，若 nsp14 失去核酸水解外切酶活性，會造成 SARS 冠狀病毒在複製自身基因組時的準確度降低。

近年在西非等國家所新興的疾病拉沙熱 (Lassa hemorrhagic fever) 是由 Lassa fever virus (LASV) 所引起的症狀。LASV 自身基因組編碼帶有一種具核酸外切水解酶活性的核蛋白 NP (Nucleoprotein NP)。此 NP 蛋白質的序列與該類病毒以外的生物無任何相似性，然而其 C 端所構成的蛋白質 3D 結構與 DnaQ



核酸水解外切酶家族的結構極為相似，其中 NP 蛋白質的 Asp<sup>389</sup>、Glu<sup>391</sup>、Asp<sup>466</sup>、Asp<sup>533</sup> 和 His<sup>528</sup> 的空間排列，對應於 DnaQ 核酸水解外切酶家族的活性位內高度保留的胺基酸 [圖六] (Hastie et al., 2011a; Hastie et al., 2011b)。研究顯示 LASV 的 NP 蛋白質可透過類似前述 TREX1 蛋白質的功能，降解多餘的病毒 DNA 片段，使得細胞不會啟動先天性免疫機制，藉此幫助病毒入侵宿主細胞。

#### 四、研究動機

迄今，市售之抗病毒藥品主要針對以下幾個病毒入侵宿主的路徑進行抑制，分別為：1. 病毒進入宿主細胞的過程 2. 病毒反轉錄自身基因組 3. 病毒 DNA 利用整合酶 (Integrase) 嵌入宿主基因組 4. 病毒合成自身所需之蛋白，除此之外，並無任何核酸水解酶相關藥物之研發 (Flexner, 2007)。

而前述提及到目前研究顯示，部分病毒入侵宿主的過程中，會利用到 DnaQ 核酸水解外切酶家族，若是抑制這類核酸水解酶的活性，則會導致病毒入侵過程受到影響，使得病毒須面對宿主的免疫反應機制，甚至是病毒自身的基因遺傳準確度呈現大幅落差。

故本文主要探究是否存在某化合物，對 DnaQ 核酸水解外切酶家族的活性有抑制效果。本論文以 CRN-4 和 RNaseT 兩個核酸水解外切酶做為模型，分析哪些化合物可對其造成抑制效果。再利用蛋白質結晶學方法，從分子層次揭露出該化合物如何達到抑制核酸水解酶之成效。此外，相對於蛋白酶抑制劑而言，迄今對於核酸水解酶抑制劑的相關研究較為瑣碎、凌亂，故本文亦期望建立一完整且具系統性之研究。希冀透過本研究，可以提供學術及疾病醫療之研究。

## 貳、實驗材料與方法



### 一、質體及其建構

藉由聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction) 以 5'-CCCAAGCTTCTAGTAGTAACCGGCAATTTT-3' 和 5'-GGAATTCCATATG GCTTACCAACACTGTCC-3' 作為引子大量合成線蟲 CRN-4 基因。將上述 PCR 產物以及表現載體 pET28a (Novagen) 分別以限制酶 NdeI 和 HindIII (NEB) 進行反應。並利用接合酶將 CRN-4 基因與 pET28a 載體黏合成 pET28a-CRN-4 表現質體，此質體具有 Kanamycin 抗藥基因且可合成帶有 N 端 His-tag 的 CRN-4 重組蛋白質。

### 二、蛋白質表現及純化

#### 1. 細菌菌株

利用轉型作用 (Transformation) 將 pET28a-CRN-4 質體分別送入不同種的大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 進行蛋白表現，菌種分別為 B834(DE3)、BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 和 BL21(DE3)pLysS。此外帶有 pET28a-RNaseT 質體的 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 菌株則由杜莉雲學姐提供。

#### 2. 線蟲 CRN-4 蛋白質小量表現測試

將含有 pET28a-CRN-4 質體的 B834(DE3)、BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 和 BL21(DE3)pLysS 菌株接種至含 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin 的 Luria-Bertani (LB)，於 37°C 隔夜培養後，以 1:100 的比例重新接種至含 Kanamycin 的 5 ml LB 培養液中，各菌種皆培養 3 管相同菌液。待 37°C 培養到 O.D.600 約 0.5 ~ 0.6 時，將一管留做為控制組，另兩管加入 1 mM

的 IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 並分別在 37°C 中誘導蛋白質合成 2 小時，以及 18°C 中誘導蛋白質合成 20 小時。

誘導表現結束後，以 4,000 rpm 離心 10 分鐘使 LB 與菌體分離，並用 200  $\mu$ l Cobalt 緩衝溶液 A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0) 回溶菌體。接著用超音波破菌儀 (Misonix) 將回溶之菌液破菌後，以 13,000 rpm 離心 20 分鐘分離上清液 (Supernatant) 與破菌後的殘餘菌體 (Pellet)。用 100  $\mu$ l Cobalt 緩衝溶液 A 回溶殘餘菌體，取 1:2 比例體積之上清液和殘餘菌體並加入 SDS 染劑使兩者體積相等後，以 SDS-PAGE 和西方墨點法確認各菌株在不同溫度下誘導 CRN-4 蛋白表現之結果。


### 3. 線蟲 CRN-4 蛋白質大量表現及純化

#### (1) 細菌培養、蛋白質誘導表現及粗蛋白萃取

將建好已含重組質體 pET28a-CRN-4 的 BL21(DE3)pLysS 之菌株接種至含有 50  $\mu$ g/ml Kanamycin 的 LB 培養液中，於 37°C 隔夜培養後，以 1:100 的比例重新接種至含 Kanamycin 的 1 L LB 培養液中，並在 37°C 培養到 O.D.600 約 0.5 ~ 0.6 時，加入 1 mM 的 IPTG，降溫至 18°C 進行誘導蛋白質合成表現，；約 20 小時後，於 4°C 下用 4,000 rpm 離心 30 分鐘，倒去上清液並用 cobalt 緩衝溶液 A 重新懸浮收集菌體，並用破菌機 (Microfluidizer) 破菌後，於 4°C 下 13,000 rpm 離心 30 分鐘，取出的上清液，即為粗蛋白質粗萃取液。

#### (2) Cobalt-charged HiTrap chelating 親和性管柱層析

純化前先以 100% Cobalt 緩衝溶液 B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 8.0) 沖洗 Cobalt 親合性管柱 (Qiagen) 中前次純化所殘留的蛋白質；再以 100% Cobalt 緩衝溶液 A 置換，



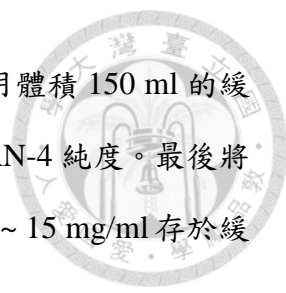
避免 Imidazole 影響蛋白質與管柱內膠體 (Resin) 的結合。接著通入前述之粗蛋白萃取液，以 Cobalt 緩衝溶液 A 將未與膠體結合的雜蛋白沖洗出管柱，直到 AKTA prime FPLC (Pharmacia) 的 O.D.280 吸光度讀值達到平衡。接著將混有 15  $\mu$ l Thrombin (Novagene) 的 20 ml Cobalt 緩衝溶液 A 通入管柱內，並把管柱移至室溫中使 Thrombin 進行反應，切掉 CRN-4 重組蛋白質上的 His-tag，反應時間約為 20 小時。之後用 Cobalt 緩衝溶液 A 將切下下的 CRN-4 沖提出管柱收集於試管中，並以 SDS-PAGE 確認各試管中 CRN-4 純度。

(3) HiTrap heparin 管柱層析

純化前，避免前次純化蛋白殘留和過高濃度的 NaCl 影響蛋白與膠體的結合，先以 100% Heparin 緩衝溶液 B (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8.0) 沖洗 Heparin 親合性管柱 (GE Healthcare)，再以 100% Heparin 緩衝溶液 A (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8.0) 置換。將前述之 Cobalt 親合性管柱純化的蛋白萃取液以 1:4 的比例用 Heparin 緩衝溶液 A 稀釋後通入管柱內，再以 Heparin 緩衝溶液 A 將雜蛋白沖洗出管柱。最後把 Heparin 緩衝溶液 A 和 B 混合成 150 ml 含 0 ~ 1 M NaCl 線性梯度的緩衝溶液，將與膠體結合之蛋白質沖提出來收集，並以 SDS-PAGE 確認 CRN-4 純度。

(4) Gel filtration chromatography column 膠體過濾管柱層析

純化前，先用緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.0) 沖洗管柱 Superdex 200 (GE Healthcare) 直到 AKTA prime FPLC 的 O.D.280 吸光度讀值達到平衡，同時將前述 Heparin 管柱層析純化過之蛋白萃取液，借由離心管 Centriprep YM-30 (Millipore) 濃縮至體積



2 ml 以下；接著將其注入已清洗平衡的管柱中，用體積 150 ml 的緩衝溶液沖提出重組蛋白，並以 SDS-PAGE 確認 CRN-4 純度。最後將各試管中純化的線蟲 CRN-4 蛋白濃縮至濃度約 10 ~ 15 mg/ml 存於緩衝溶液中，並保存在零下 20°C。

#### 4. 大腸桿菌 RNase T 蛋白質大量表現及純化

此小節之材料方法類似前述純化 CRN-4 蛋白過程。在細菌培養、蛋白質誘導表現及粗蛋白萃取液取得部分，改由杜莉雲學姐提供之含 pET28-RNase T 質體的 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 菌株進行實驗。

RNase T 純化過程，首先以 Cobalt 緩衝溶液 A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8) 和 Cobalt 緩衝溶液 B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 8.0) 將通入 Cobalt 親和性管柱的 RNase T 粗蛋白萃取液，用 120 ml 含 0 ~ 500 mM Imidazole 線性梯度將 RNase T 重組蛋白沖提出管柱，並用 SDS-PAGE 確認蛋白質純度。

接著用 Heparin 緩衝溶液 A (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8.0) 和 Heparin 緩衝溶液 B (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 8.0) 將通入 Heparin 管柱的前述 Cobalt 親和性管柱純化過之蛋白萃取液，用 150 ml 含 0 ~ 1 M NaCl 線性梯度的緩衝溶液將重組蛋白沖提出管柱，並以 SDS-PAGE 確認重組蛋白 RNase T 純度。

最後將前述 Heparin 管柱層析純化過之蛋白萃取液，濃縮至體積 2 ml 以下並注入管柱；用體積 150 ml 的緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.0) 沖提出 RNase T 重組蛋白，並以 SDS-PAGE 確認 RNase T 純度。最後將純化的 RNase T 蛋白濃縮至濃度約 20 ~ 30 mg/ml 存於緩衝溶液中，保存於零下 20°C。



### 三、Thrombin 活性測試

將市售套組內的 Thrombin (Novagen) 分別用套組的緩衝溶液以 25、100 和 200 倍稀釋備用。本實驗中分兩部分，一為用套組內的反應緩衝溶液，一為以 Cobalt 緩衝溶液 A 做為反應時的緩衝溶液條件。各反應條件含 10  $\mu\text{g}$  CRN-4 蛋白質和 1  $\mu\text{l}$  三種稀釋濃度之 Thrombin，並以去離子水補至體積 50  $\mu\text{l}$ ，反應於 4°C、37°C 和室溫中進行，作用時間分別為 4、8 和 16 小時。反應完畢後，再以 SDS-PAGE 和西方墨點法進行結果分析。


### 四、蛋白質膠體電泳法

本實驗中使用 12 % SDS-PAGE 為主，配置方法如下。先以 0.3 ml 10 % SDS、6 ml 40 % 丙烯醯胺 (acrylamide)、2.5 ml 緩衝溶液 (Running buffer : 3 M Tris-HCl, pH 8.9)、7.94 ml 去離子水、3.16 ml 的 2.5 M 蔗糖 (Sucrose)、16.6  $\mu\text{l}$  TEMED 和 83  $\mu\text{l}$  10 % 過硫酸銨 (Ammonium persulfate) 配置分離膠體 (Running gel)。

再以 0.1 ml 10 % SDS、0.75 ml 40 % 丙烯醯胺、1.25 ml 緩衝溶液 (Stacking buffer : 0.5 M Tris-HCl, pH 6.7)、7.8 ml 去離子水、16.6  $\mu\text{l}$  TEMED 和 83  $\mu\text{l}$  10 % 過硫酸銨配置上層焦集膠體 (Stacking gel)。鑄膠過程中，須注意避免空氣充填於膠體中。

將上述之膠體架設在電泳槽上，置入 1 倍 SDS 電泳緩衝溶液，並取適量之欲分析之樣品，以 5 倍 SDS 染劑處理，通以 100 伏特進行電泳。電泳完畢後，將 SDS-PAGE 浸於 Coomassie Brilliant Blue R250 染色約 1 小時，接著浸泡在去染色溶液(醋酸、甲醇、水以 1 : 3 : 6 的比例混合)中褪染至背景透明為止。

### 五、西方點墨法



將含有欲分析樣品之 SDS-PAGE、PVDF 膜紙和濾紙浸泡於緩衝溶液 (Transfer buffer: 4.54 g Tris-HCl, 21.6 g Glycine, 300 ml 甲醇和 5.625 ml 10 % SDS, 加水配置成 1,500 ml) 中, 依序以濾紙、SDS-PAGE、PVDF 膜紙和濾紙堆疊, 並用玻棒將其間的空氣移除。接著用 Semi-Dry blotting system 以 75 mA 作用 1 小時, 使 SDS-PAGE 上的蛋白質轉移到 PVDF 膜紙上; 完成後在室溫下浸泡 TBST 緩衝溶液 (2.42 g Tris-HCl, 8 g NaCl, 0.5 ml Tween20, 加水溶解至 1000 ml, pH 7.6) 配置的 5 % 脫脂奶粉中約 1 小時; 倒入新 5 % 脫脂奶粉/TBST 緩衝溶液, 稀釋適量的一級抗體, 並在室溫中反應約 1 小時, 接著以 TBST 緩衝溶液洗去一級抗體, 重新加 5 % 脫脂奶粉/TBST 緩衝溶液稀釋之二級抗體 Alkaline Phosphatase Conjugate, 同樣於室溫反應 1 小時, 最後用 TBST 緩衝溶液洗淨並加入呈色劑 (BCIP-NBT substrate solution) 反應呈色。

#### 六、5 端 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ 放射性同位素標定

取 1  $\mu\text{l}$  的 10  $\mu\text{M}$  10-mer 單股 DNA (5'-AGTTATGAAA-3') 加入 1  $\mu\text{l}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP、1  $\mu\text{l}$  T4 Polynucleotide kinase (5U/ $\mu\text{l}$ )、2  $\mu\text{l}$  T4 Polynucleotide kinase 10 倍緩衝溶液和 15  $\mu\text{l}$  去離子水。於 37°C 反應 30 分鐘後升溫至 65°C 作用 20 分鐘終止標定反應。取 Microspin G-25 管柱 (GE Healthcare) 以 3,000 rpm 離心 1 分鐘移除管柱中保存液, 將前述標定完的樣品加入 G-25 管柱, 以 3,000 rpm 離心 2 分鐘, 收取純化且完成標定之單股 DNA, 最後加入去離子水補至體積 100  $\mu\text{l}$ , 配成濃度約為 100 nM。

#### 七、去氧核糖核酸水解酶活性分析

將本論文中, 不同化合物依溶解性不同, 分別以去離子水或二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide) 溶解, 並連續稀釋配置成不同實驗濃度。每次反應先使




CRN-4 或 RNase T 蛋白質與各化合物在反應緩衝溶液中均勻混合，靜置室溫中約 10 ~ 20 分鐘後再加入受質進行催化。

CRN-4 反應條件為總體積 10  $\mu$ l；反應緩衝溶液濃度為 20 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub> 和 pH 7.0；受質為約 50 ng 由 PCR 合成之雙股 DNA (約 1,000 個鹼基對) 於室溫反應 1 小時後；加入蛋白酶 K (Protease K) 置於 37°C 20 分鐘終止反應。之後用 2 % 洋菜膠體 (Agarose gel) 進行電泳，以 Ethidium bromide 染色照相後，用 AlphaEaseFC 軟體進行實驗數據分析。

RNase T 反應條件為總體積 10  $\mu$ l，其中受質為同位素標定之 10 個核苷酸單股 DNA 濃度為 10 nM；反應緩衝溶液濃度為 50 mM Tris-HCl、120 mM NaCl、2 mM MgCl<sub>2</sub> 和 pH 7.0；置於室溫反應 30 分鐘後，加入 2 倍反應體積之樣品染劑 (TBE-urea sample buffer) 終止反應。接著將樣品以 20 % TBE-Urea 膠體進行電泳，完畢後用 PhosphorImage (Fujifilm) 進行自動放射顯影，最後以 FLA-5000 或 FLA-9000 (Fujifilm) 偵測反應結果，並用 Image Gauge 軟體進行數據分析。

#### 八、蛋白質結晶與 X 光繞射數據收集

蛋白質與化合物複合晶體形成採用蒸氣擴散法 (Hanging drop vapor diffusion) 並於 4 °C 中進行結晶。首先化合物分別以 10 mM、5 mM 和 1 mM 不同濃度混合於蛋白質樣品中靜置約 10 分鐘後，用 1,3000 rpm 離心分離沉澱物。接著將前述之混合物與池液 (reservoir，本論文使用之池液為 Hampton 結晶篩選組) 以 1：1 體積混合，因蛋白質混合液與池液的氣壓不同，使水分子緩緩由混合液擴散到池液，最終達成平衡。由於混合液的水分子慢慢減少，造成蛋白質逐漸增加，最後造成蛋白質沉澱或是結晶。本論文中 MES-CRN-4 複合物晶體結構由蕭育源博士所解得，形成之池液條件為 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate、0.05 M MES monohydrate pH 6.0、15% v/v 2-Propanol。



MES-CRN-4 複合物晶體於台灣同步輻射中心進行繞射實驗，實驗所得之繞射點用軟體 HKL2000 進行處理，在用 Molecular Replacement (CCP4 : Auto-MR) 解決位相問題。蛋白質模板則用先前以解出的線蟲 CRN-4 蛋白結構(PDB : 3CG7)，再利用 Winoot 進行 Model Building，最後以 CCP4 : Refmac 5 進行微調 (Refinement)。

# 參、實驗結果



## 一、線蟲 CRN-4 蛋白質小量表現測試

本論文利用大腸桿菌表現系統來表現重組蛋白質，以提供大量重組蛋白質，進行生化特性及其結構之研究。

為取得適當之表現條件，首先測試 CRN-4 蛋白質小量表現。將全長 CRN-4 接上 pET28a 表現質體並送入 B834(DE3)、BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 和 BL21(DE3)pLysS 三種不同大腸桿菌勝任細胞進行蛋白質表現測試。各菌株在不同生長條件下，誘導蛋白質合成後，將菌液經由破菌和離心分離上清液和殘餘菌體，接著用 SDS-PAGE 分析 CRN-4 蛋白質表現結果，並用西方墨點法進行確認 [圖七]。

SDS-PAGE 的結果顯示，37°C 的條件下，CRN-4 大多無法溶在上清液中；18°C 條件下，則有大量的 CRN-4 存在於上清液中。其中 B834 (DE3) 和 BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL 兩株菌種在控制組有些微的蛋白質表現，因此為有效控制重組蛋白質的合成表現，本論文選定以 18°C、1 mM IPTG、BL21(DE3)pLysS 細菌株和誘導蛋白質表現約 21 小時做為生長條件。

## 二、線蟲 CRN-4 蛋白質大量表現及純化

確認生長條件並大量純化 CRN-4 蛋白質後，首先測試先前研究已確認之 CRN-4 長晶條件，結果發現並無晶體生成，推測原因，可能是 N 端的 His-tag 影響晶格堆疊。因此做前測試以利瞭解 Thrombin 切 CRN-4 上 His-tag 的所需濃度 [圖八]，並評估單次 CRN-4 純化所得總量，藉此計算出每次純化 CRN-4 蛋白質值約需 15  $\mu$ l 的 Thrombin，接著重新純化切除 His-tag 的 CRN-4 蛋白質。

將菌液經破菌離心分離出上粗蛋白質萃取液後，通入 Cobalt 親和性管柱中，接著加入 Thrombin 靜置於室溫約 20 小時。由於切除 His-tag 的 CRN-4

蛋白質不再與管柱結合，因此可用 Cobalt 緩衝溶液 A 將 CRN-4 沖提出管柱收集並以 SDS-PAGE 確認其純度 [圖九(A)]。

取前述的蛋白質萃取液用 Heparin 緩衝溶液 A 稀釋並通入 HiTrap heparin 管柱進行二次純化，降低前次純化的緩衝溶液中的鹽濃度，避免 CRN-4 無法與 Heparin 管柱內的膠體結合。接著用約 10 % ~ 30 % Heparin 緩衝溶液 B，將 CRN-4 沖提出管柱收集，以 SDS-PAGE 確認純度 [圖九(B)]。

將前述之蛋白質萃取液濃縮，通入 Gel filtration 管柱，進行最後純化。CRN-4 蛋白質沖提出 Gel filtration 管柱的體積約在 80 ml，透過 SDS-PAGE 結果顯示 [圖九(B)]，經由三次純化後，可得到質量相當純的 CRN-4 蛋白質。

### 三、大腸桿菌 RNase T 蛋白質大量表現及純化

含 pET28a-RNaseT 質體的 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 菌株由杜莉雲學姐提供。將菌液破菌離心分離出粗蛋白萃取液，通入 Cobalt 親和性管柱，用 10 % ~ 70 % Cobalt 緩衝溶液 B 沖提，並收集 RNase T 蛋白質，接著通入 Heparin 管柱並用 60 % ~ 80 % Heparin 緩衝溶液 B 沖提收集 RNase T，最後將二次純化之 RNase T 蛋白萃取液通入 Gel filtration 管柱，而 RNase T 會在約 80 ml 沖提出管柱。各次純化所取得之蛋白萃取液，皆用 SDS-PAGE 確認其蛋白質純度 [圖九]，而其結果顯示，經由三次純化後可以得到質量相當純的 RNase T。

### 四、核酸水解酶活性分析

為尋找可抑制 DnaQ 核酸水解外切酶家族活性的潛在性抑制劑 (Potential inhibitor)，本論文搜尋相關文獻整理出 11 種已用於研究的核酸水解酶的化合物 [表二]，並用 CRN-4 和 RNase T 做為模型，進行潛在性抑制劑的篩選。實驗過程選用二種不同的蛋白質濃度進行測試，避免因蛋白質濃度過高，使得抑制活性的效果不明顯，造成無活性抑制的誤判。



## 1. CRN-4 核酸水解酶活性分析

CRN-4 核酸水解酶以約 1,000 個鹼基對的 PCR 產物的線性雙股 DNA 做為受質，測試 CRN-4 的核酸外切酶活性，其結果顯示 11 種化合物對 CRN-4 的外切酶活性有效率不等的抑制效果，在此依 10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  與 1,000  $\mu\text{M}$  為界限分為三群 [圖十一]。以 5  $\mu\text{M}$  CRN-4 為基準，利用軟體分析實驗結果，計算各反應之受質殘存量做為蛋白質活性之指標，並以加入 CRN-4 而未加潛在性抑制劑之反應的受質殘存量，做為標準化 (Normalization) 的基礎，最後以內插法估算，求得各潛在性抑制劑降低 50 % 蛋白質活性所需之濃度。

實驗結果顯示，DR396 與 DTNB 僅需約 100  $\mu\text{M}$  以下之濃度，便可以使 5  $\mu\text{M}$  CRN-4 活性降低一半左右。而 NCA、Citrate、PCMPS、pdTp 和 ATA 則需約 300 ~ 800  $\mu\text{M}$  不等的濃度才能抑制一半 CRN-4 的核酸外切酶活性。其他化合物如 FDCO、PV6R 和 MES 則需約 4 mM 或 10 mM 以上的濃度才能達到同樣抑制結果。而 Emodin 因溶解度原因無法確認在更高濃度時能否抑制 CRN-4 內切酶活性 [表三]。

## 2. RNase T 核酸水解酶活性分析

RNAes T 核酸水解外切酶活性則使用含有 10 個核苷酸的同位素標定之單股 DNA 做為受質，以 80 nM RNase T 為基準，將實驗結果以 10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  與 1,000  $\mu\text{M}$  為界限分為四群 [圖十二]，並用軟體依據前述分析 CRN-4 活性之計算方式，計算各潛在性抑制劑降低 50 % 蛋白質活性所需之濃度。

實驗結果顯示，PCMPS 約需 70 nM，而 ATA 約需 630 nM 即可抑制 RNase T 一半活性。而 DR396 與 PV6R 約需 10 ~ 100  $\mu\text{M}$ ；NCA、FDCO 與 DTNB 則約需 100 ~ 500  $\mu\text{M}$  不等之濃度，可抑制 RNase T 一半活性。其餘化合物，如 Citrate 與 MES 則需超過 1 mM 之濃度，方能有相同的抑

制效率。此外 pdTp 因訂製濃度的原因最高只能測到 5 mM，而 80 nM 的 RNase T 雖然無明顯的活性抑制結果，但對於 40 nM 的 RNase T 時，卻可觀察到有些微抑制活性的結果，推測高濃度的 pdTp 應會抑制 RNase T 活性；而 Emodin 則因溶解度的因素而無法測更高的濃度，故無法判定是否有無抑制效果 [表四]。

## 五、MES-CRN-4 複合物之結晶與其結構

MES-CRN-4 複合物晶體結構由蕭育源博士所結晶並測定出晶體結構。此晶體在台灣新竹縣國家同步輻射中心利用 X 光繞射法，收集繞射點資料，並使用 HKL2000 軟體分析所得之繞射點資料。結果顯示，MES-CRN-4 複合物晶體的空間群 (space group) 屬於 Orthorhombic 空間群  $P2_12_12_1$ ，晶格大小為： $a = 66.26 \text{ \AA}$ 、 $b = 67.62 \text{ \AA}$ 、 $c = 178.00 \text{ \AA}$ ，解析度可達  $2.1 \text{ \AA}$ 。以 Molecular Replacement (CCP4: Auto-MR) 解決位相問題，並以已解出結構的線蟲 CRN-4 (PDB: 3CG7) 作為蛋白質模板，利用 Coot 進行結構模型建立，最後以 CCP4: Refmac 5 進行結構微調(refinement)，經過調整後，R-factor 為 17.7%，R-free 為 22.6%，此晶體的繞射及模型建立之詳細參數如 [表五] 所示。

從結構中可見 [圖十三]，MES-CRN-4 複合物結構為同源雙聚體 (Homodimer)，其兩個活性位中，各存在一個 MES 分子與一個鎂離子 (配位三個水分子)。活性位中可清楚觀測到 MES 之電子密度圖 ( $2Fo-Fc, 1\sigma$ ) [圖十四]。計算各原子間距離，顯示 MES 於活性位中與 Thr<sup>161</sup>、Asp<sup>180</sup>、Asp<sup>184</sup> 以及鎂離子的配位水可能有氫鍵的交互作用。將 CRN4 蛋白質結構 (PDB: 3CG7) 與 MES-CRN-4 複合物蛋白質做結構重疊 (Superimpose) 比對，其 RMSD 值約  $0.785 \text{ \AA}$  (560 個  $C_\alpha$  原子)，表示整體結構相似。然而仔細觀察可發現在兩結構間的活性中心有構型改變，特別是 His<sup>179</sup> 所在的 Loop，更有顯著的變動，造成 His<sup>179</sup> 的側鏈 (Side chain) 位置從原本處於活性位中往外轉移約  $10 \text{ \AA}$  [圖十

五]。表示 MES 不但結合於活性中心，阻止了 DNA/RNA 的結合，並導致重要的活性中心氨基酸的位移，而使 CNR-4 的活性減低。



## 肆、討論

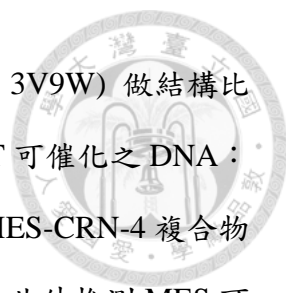


近來研究發現，部分病毒在感染宿主細胞時，會利用 DnaQ 核酸水解外切酶家族，然而在目前核准的抗反轉錄病的藥物中，卻無抑制此類蛋白質的藥物，因此本論文試圖找尋可能的潛在性抑制劑。在搜尋文獻後，整理出 11 種已用於研究的化合物 [表二]，並以 CRN-4 和 RNase T 做為模型，測試此 11 種化合物各抑制核酸外切水解活性的效率；此外，本論文亦嘗試藉由此實驗，建立一完整且具系統性的核酸水解酶抑制劑的研究。

將 CRN-4 與 RNase T 的核酸水解外切酶活性抑制結果整理為 [表三、四]。結果顯示 MES 和 Emodin 對於兩種蛋白質活性的抑制效果都相對較差。在 CRN-4 活性抑制方面，最佳的為 DR396 和 DTNB；而對於 RNase T 活性抑制最佳的則為 PCMPS 和 ATA。若將 11 種化合物依抑制效率做排序，可發現除了 MES 和 Emodin 外，其餘化合物對於兩種蛋白質的活性抑制效率皆有不同的差異。本論文在測試 11 種化合物對 CRN-4 和 RNase T 的活性抑制實驗後，發現對於不同蛋白質的活性，如 CRN-4 和 RNase T 的核酸外切酶活性，其活性抑制的效率差異較為不同，推測可能是因為各類化合物對於不同蛋白質的親和性有所差異，導致抑制效率的不同。

在 MES-CRN-4 複合物的結構中，計算 MES 與附近胺基酸距離，推測 MES 會與 Thr<sup>161</sup>、Asp<sup>180</sup>、Asp<sup>184</sup> 以及鎂離子的配位水有氫鍵的交互作用，使得 MES 可以與活性位結合 [圖十四]。在比較 MES-CRN-4 複合物與純 CRN-4 蛋白質結構後，可發現活性位發生構型改變，特別是 His<sup>179</sup> 所在的 Loop 有明顯的構型變化，導致 His<sup>179</sup> 的側鏈往外翻轉出活性位 [圖十五]。此構形變化與序論中提到，RNase T 遇到 3 端為 CC 序列的單股 DNA 所造成的構型變化相似 [圖三]，然而不同的是，MES-CRN-4 複合物上 His<sup>179</sup> 側鏈偏移的距離約 10 Å，相對大於 DNA-RNase T 複合物 His<sup>181</sup> 側鏈之偏移約 3~4 Å。





將 MES-CRN-4 複合物與 DNA-RNase T 複合物 (PDB: 3V9W) 做結構比對 [圖十六]，在 DNA-RNase T 複合物中，受質為 RNase T 可催化之 DNA: 5'-TTA-3'，可觀察到存在兩鎂離子穩定活性位的結構；而 MES-CRN-4 複合物因構形改變，使一鎂離子脫離活性位，僅剩另一個鎂離子。此外推測 MES 可能利用亞硫酸根模擬 DNA 上的磷酸根，並配合其他交互作用從而結合在活性位中。但是不同於 DNA 上含氮鹼基的位置，MES 的環狀結構會佔據原本 CRN-4 上 His<sup>179</sup> 的位置，使得 His<sup>179</sup> 所在的 Loop 發生構型改變，His<sup>179</sup> 側鏈會往活性位外大幅度翻轉，導致 CRN-4 的核酸水解活性喪失。

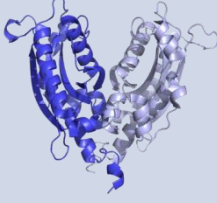
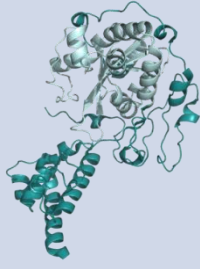

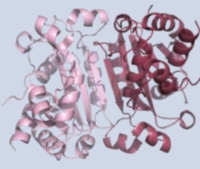
綜合先前研究及上述實驗，推論 MES 可以藉由與受質競爭活性位，並使活性位發生構形改變，進而導致蛋白質喪失活性。但可能因不同化合物與蛋白質的親和力不同，會造成抑制效率有所不同，例如 MES 與蛋白質的親和力不高，故需要及高濃度的 MES 才能達到顯著的活性抑制結果。此外，由於 DnaQ 核酸水解外切酶家族活性位中，保留性胺基酸排列極為相似，推測此類家族成員能藉由特定化合物與活性位結合，致使活性位發生相似的構形改變，並造成核酸水解活性降低。

本文為辨識找尋能抑制 DnaQ 核酸水解外切酶家族的抑制劑，搜尋文獻選定十一種不同的可能之抑制劑。儘管，其原本的目標蛋白與 DnaQ 核酸水解外切酶家族分屬為不同類蛋白質，甚至部分原目標蛋白為核酸水解內切酶。然而，實驗結果顯示，這十一種化合物的確有部分可以抑制 DnaQ 核酸水解外切酶活性，但其抑制的效率卻不甚理想。故之後應以這幾個可能的抑制劑當模板，以化學或其他方式做不同的修飾並進行研究，使其提高抑制的專一性以及抑制效率，進而達成抗病毒感染的藥物開發的目的。

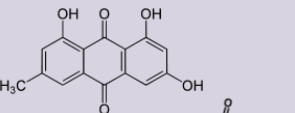
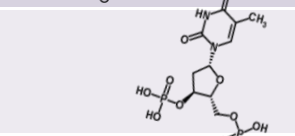
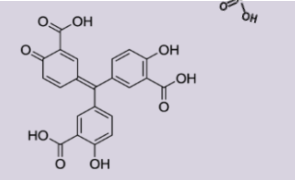
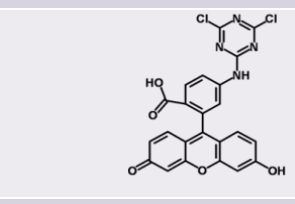
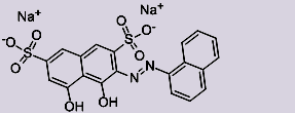
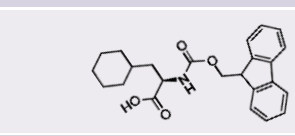
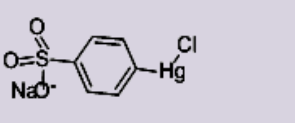
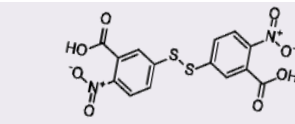
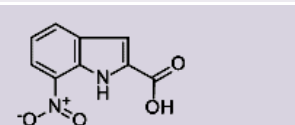
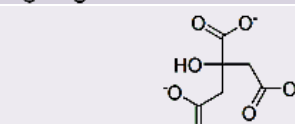
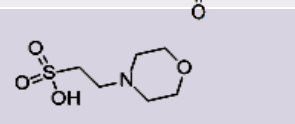
## 伍、 圖表



表一、 DnaQ 核酸水解外切酶家族成員廣泛分布於自然界中，並參與至不同的重要生化路徑中。

	大腸桿菌	酵母菌	線蟲	人
<b>DnaQ核酸水解外切酶家族</b>	<b>RNase T</b>	<b>Rrp6</b>	<b>CRN-4</b>	<b>TREX1</b>
<b>細胞功能</b>	<b>rRNA及 mRNA 的修飾成熟</b>	<b>RNA的降解</b>	<b>細胞凋亡作用 (Apoptosis) 中降解DNA</b>	<b>Granzyme-A所調控的細胞死亡作用中降解DNA</b>
<b>蛋白質結構 (PDB)</b>				
	<b>(3V9X)</b>	<b>(2HBJ)</b>	<b>(3CG7)</b>	<b>(3MXJ)</b>

表二、 11 種已用於研究之核酸抑制劑。下表依序列出各抑制劑的分子結構、名稱及縮寫和其作用的核酸水解酶。

Structure	Inhibitor (Short term)	Target (Ref.)
	Emodin	Herpes Simplex Virus Type 1 Alkaline Nuclease (Hsiang and Ho, 2008)
	Deoxythymidine 3',5'-bisphosphate (pdTp)	Staphylococcal nuclease (Wang et al., 2011)
	Aurintricarboxylic acid (ATA)	DNase I, RNase A, SI nuclease, exonuclease III, Restriction endonucleases (Sal I, Bam HI, Pst I, Sma I) (Hallick et al., 1977)
	4-(4,6-dichloro-[1,3,5]-triazin-2-ylamino)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzoic acid (DR396)	DNase $\gamma$ (Sunaga et al., 2004; Yamada et al., 2011)
	Pontacyl Violet 6R (PV6R)	
	Fmoc-D-Cha-OH (FDCO)	
	p-chloromercuriphenyl sulfonate (PCMPS)	DNase I, micrococcal nuclease (Li et al., 1996; Prentice et al., 1985)
	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) (DTNB)	
	7-nitroindole-2-carboxylic acid (NCA)	AP endonuclease APE1 (Lee et al., 2010)
	Citrate	PNPase (Nurmohamed et al., 2011)
	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)	(Raines, 2013)

表三、以受質殘存量做為活性指標，並以 5  $\mu\text{M}$  CRN-4 為基準，計算各化合物抑制 CRN-4 核酸水解外切酶一半之活性所需濃度整理為下表。



Inhibitor	Conc. ( $\mu\text{M}$ )
<b>DR396</b>	<b>64</b>
<b>DTNB</b>	<b>100</b>
<b>NCA</b>	<b>281</b>
<b>Citrate</b>	<b>467</b>
<b>PCMPS</b>	<b>715</b>
<b>pdTp</b>	<b>765</b>
<b>ATA</b>	<b>805</b>
<b>FDCO</b>	<b>4,200</b>
<b>PV6R</b>	<b>11,636</b>
<b>MES</b>	<b>28,077</b>
<b>Emodin</b>	<b>&gt; 4,000</b>

表四、以受質殘存量做為活性指標，並以 80 nM RNase T 為基準，計算各化合物抑制 RNase T 核酸水解外切酶一半之活性所需濃度整理為下表。

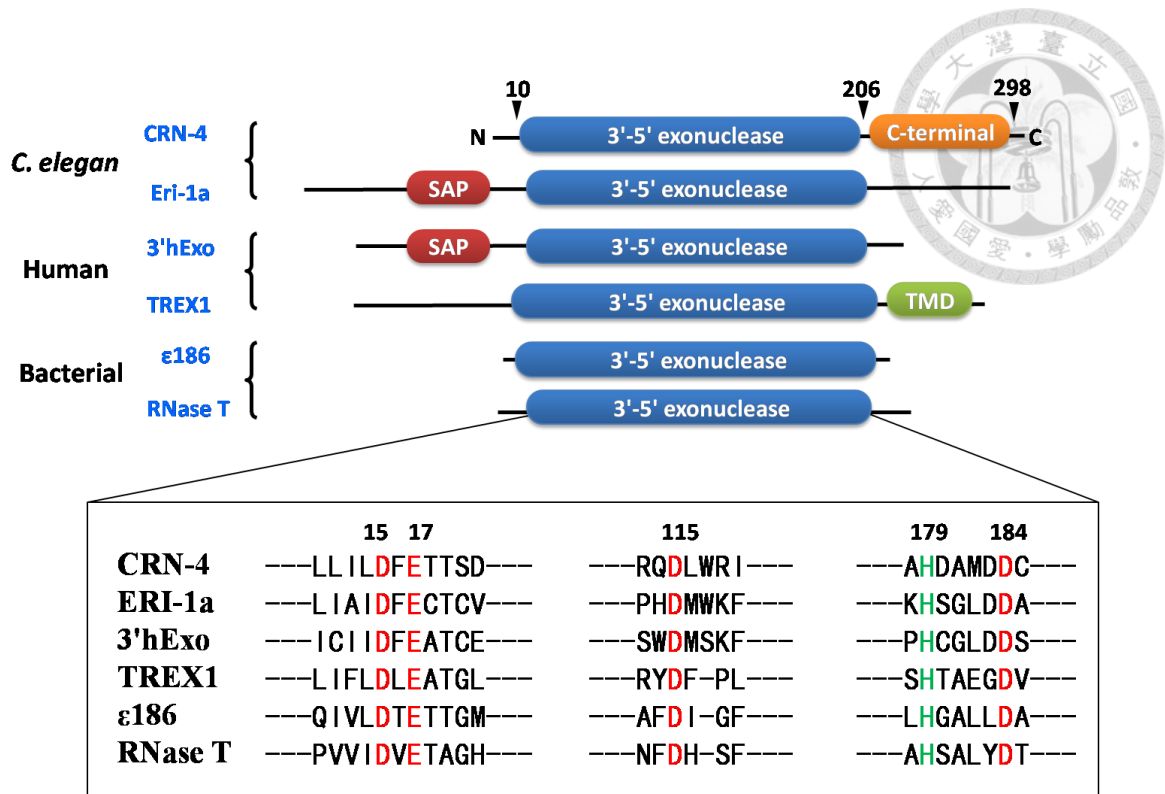


Inhibitor	Conc. ( $\mu\text{M}$ )
<b>PCMPS</b>	<b>0.07</b>
<b>ATA</b>	<b>0.63</b>
<b>DR396</b>	<b>12</b>
<b>PV6R</b>	<b>67</b>
<b>NCA</b>	<b>131</b>
<b>FDCO</b>	<b>460</b>
<b>DTNB</b>	<b>539</b>
<b>Citrate</b>	<b>1,120</b>
<b>MES</b>	<b>3,041</b>
<b>pdTp</b>	<b>&gt; 5,000</b>
<b>Emodin</b>	<b>&gt; 1,000</b>

表五、MES-CRN-4 複合物晶體結構之相關數據表



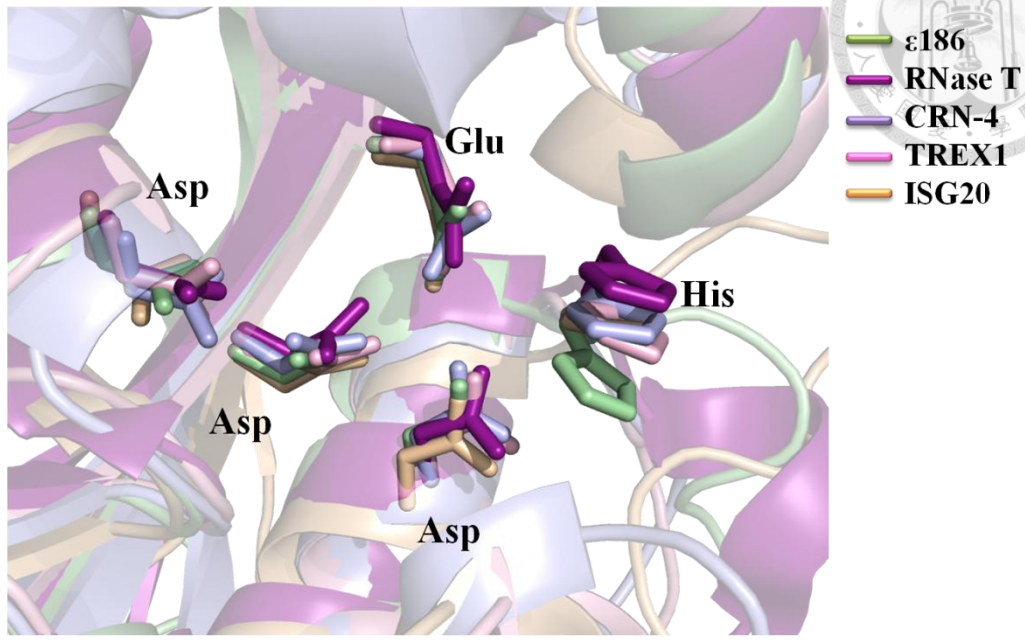
<b>CRN4-inhibitor complex</b>	
Inhibitor	MES
Metal ions in active site	1 Mg <sup>2+</sup>
<b>Data collection</b>	
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	66.26 67.62 178.00
<i>a, b, c</i>	90.0, 90.0, 90.0
Resolution	30.0-2.1 (2.18-2.10)
<i>R</i> <sub>sym</sub> or <i>R</i> <sub>merge</sub>	0.101 (0.494)
<i>I</i> / <i>σI</i>	13.33 (2.1)
Completeness	99.1 (99.0)
Redundancy	4.8 (4.0)
<b>Refinement</b>	
Resolution	30.0-2.1
No. reflections	47139/3662
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	17.7/22.6
R.m.s. deviations	
Bond lengths	0.009
Bond angles (°)	1.213
Ramachandran blot statistics (%)	
Favored region	96.4
Allowed region	3.6
Outlier region	0



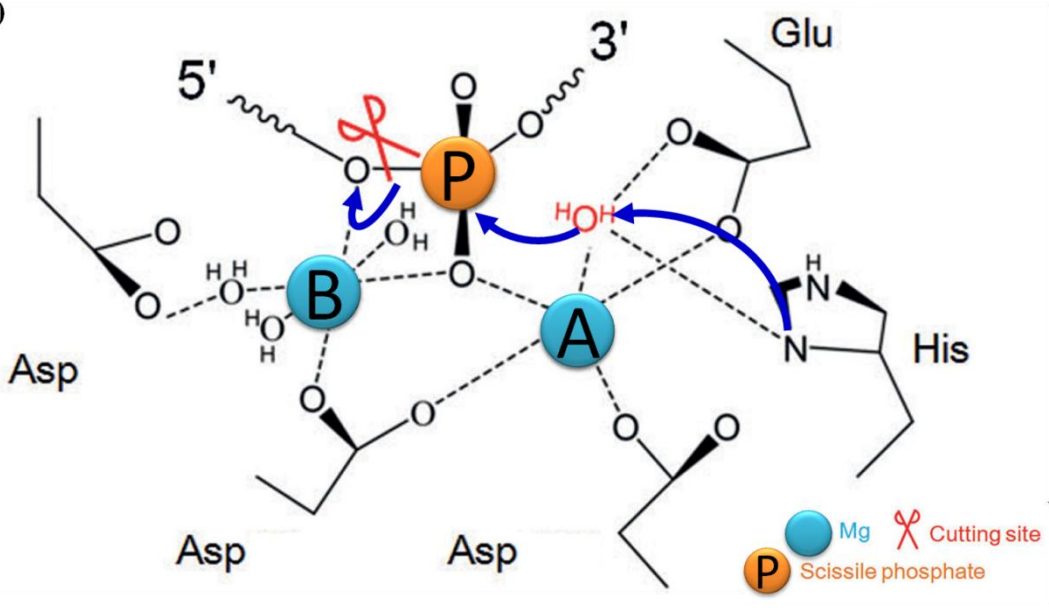
圖一、DnaQ 核酸水解外切酶家族成員具有一個 3 端至 5 端核酸水解外切酶區域。胺基酸序列比對 (Alignment) 的結果顯示，該 3 端至 5 端核酸水解外切酶區域內有五個高度保留的胺基酸，分別為三個 Aspartic acid、一個 Glutamic acid 與一個 Histidine。部分成員除了具有 3 端至 5 端核酸水解外切酶區域，另外亦有其他功能區域，如 CRN-4 的 C 端區域是與受質結合的位置。(Hsiao et al., 2009)



(A)

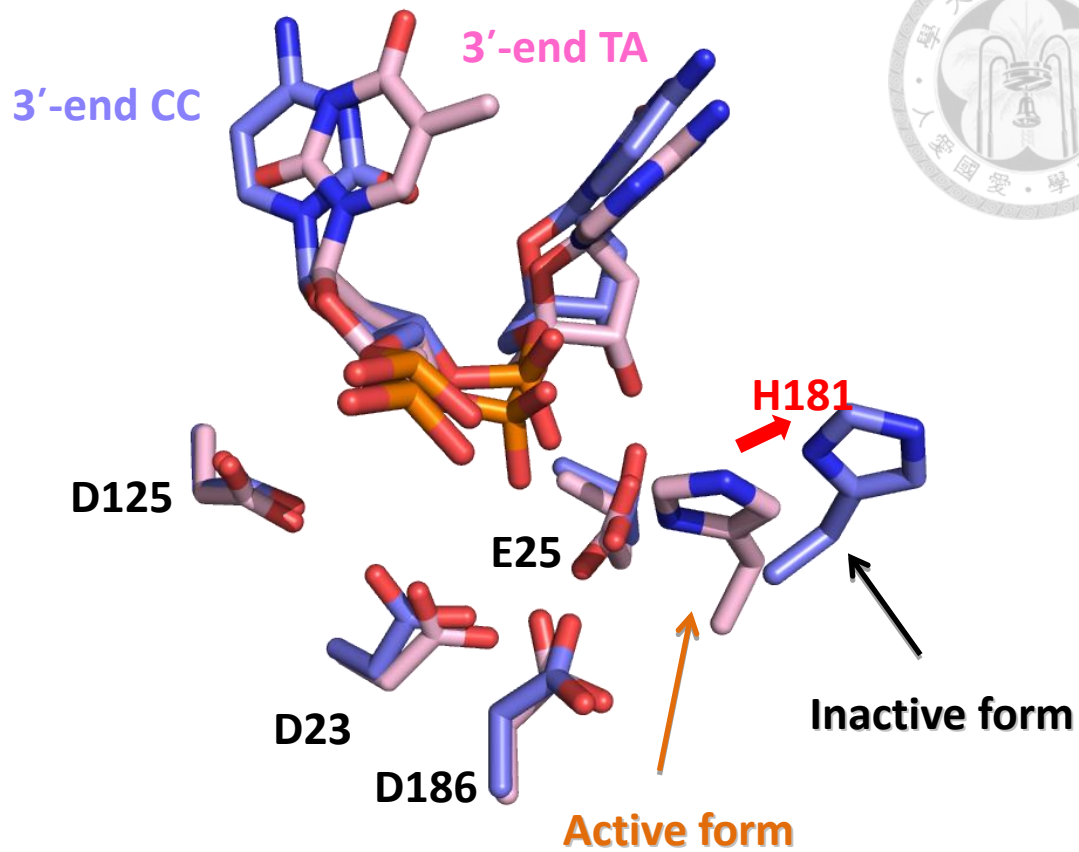


(B)

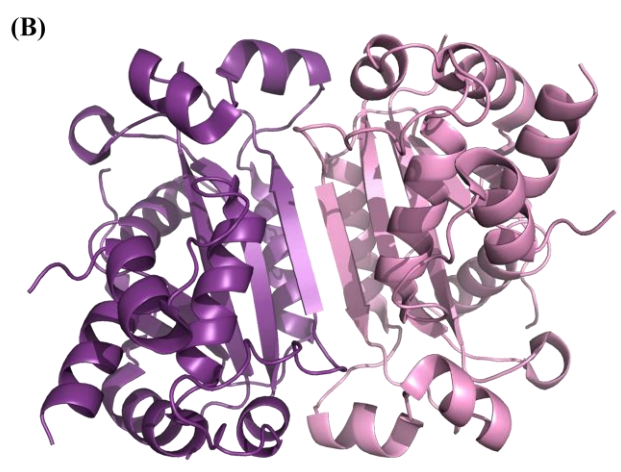
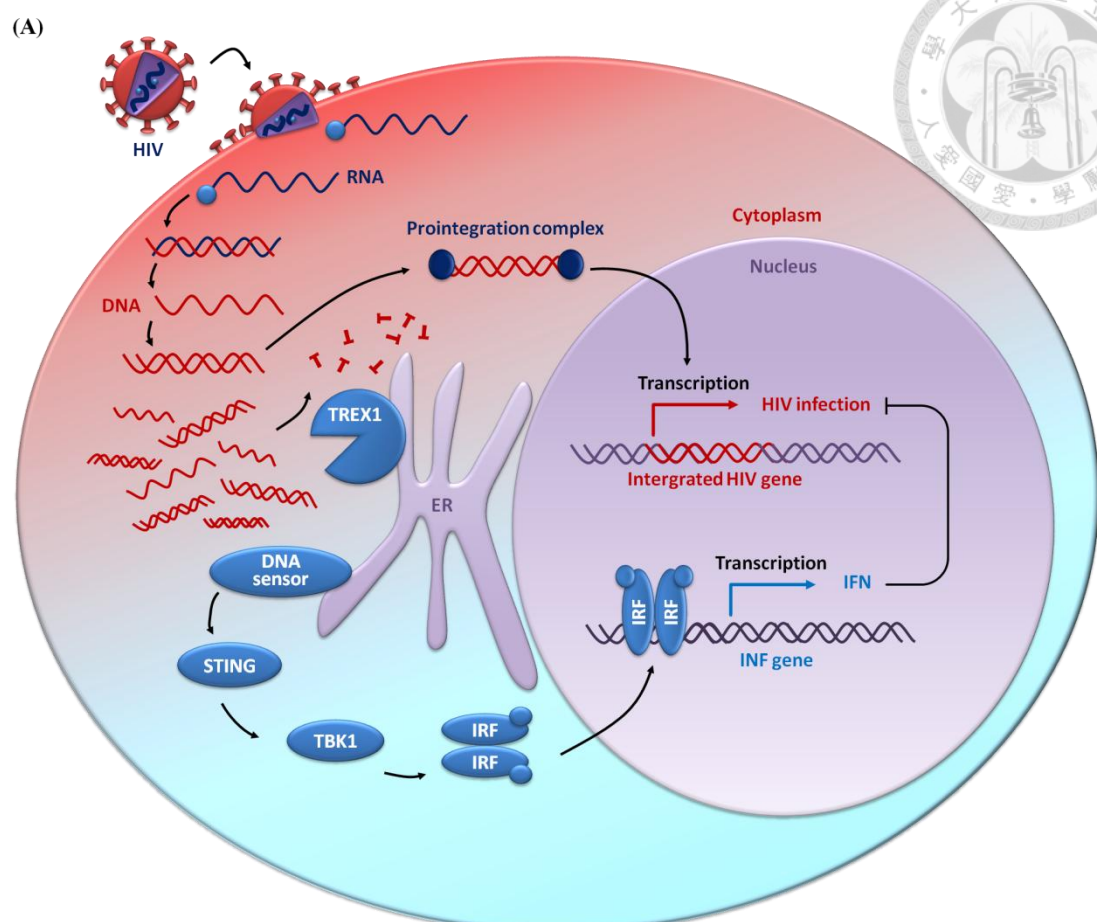


圖二、(A) DnaQ 核酸水解外切酶家族的高度保留性胺基酸，在活性位中排列位置極為相似，顯示此類核酸水解酶具有相似催化機制。(B) DnaQ 核酸水解外切酶家族的催化機制。此類核酸水解酶利用兩個金屬離子，其中多以鎂離子，來穩定受質受質與核酸水解酶活性中心的交互作用，接著由鹼基，此圖以 Histidine 為例，搶走水分子上的氫離子，進而導致一系列電子轉移，最後使磷酸雙酯鍵斷裂造成核酸分子的水解。(Hsiao et al., 2012)

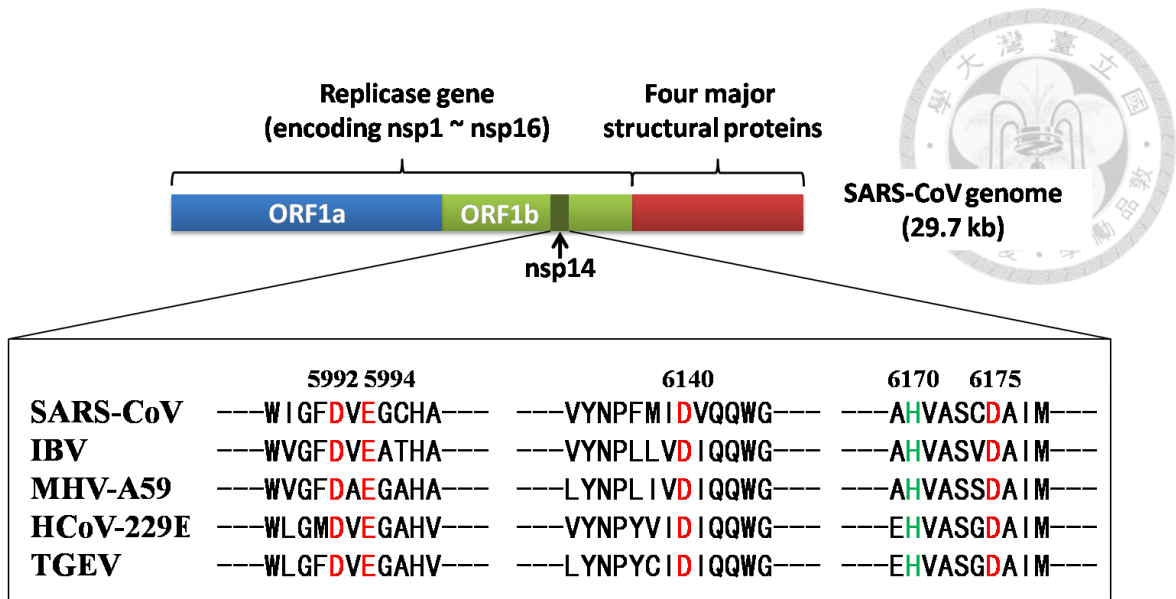




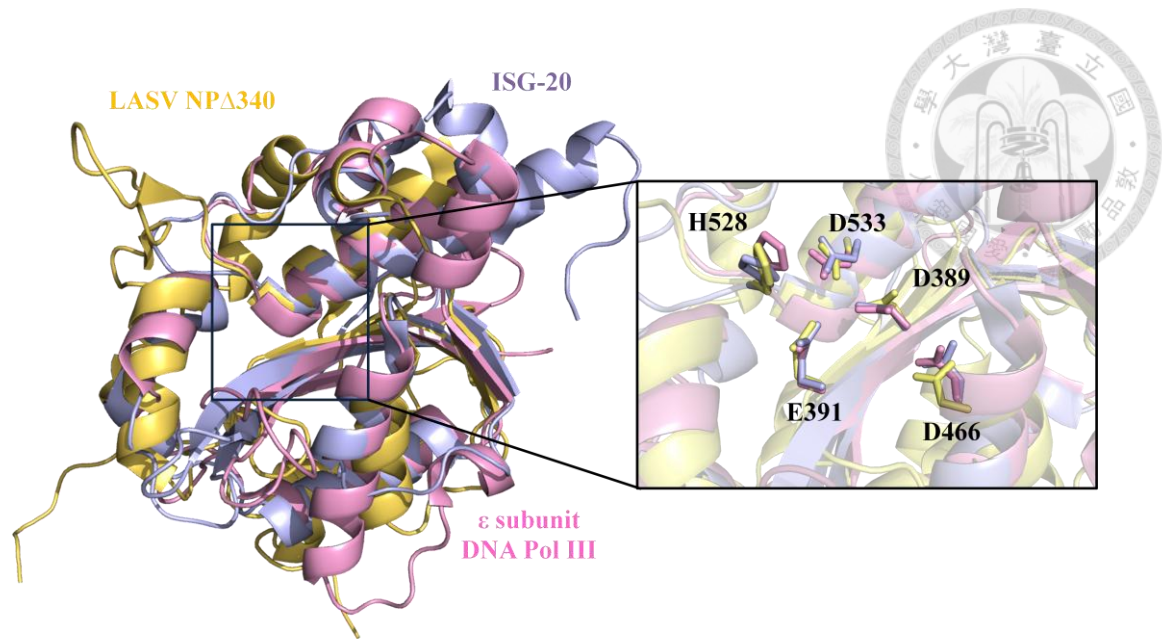
圖三、DNA-RNase T 複合物活性位結構圖。將兩不同受質與 RNase T 活性位結合的結構做重疊比對，分別為 3 端 CC (PDB: 3V9Z) 和 3 端 TA 的單股 DNA (PDB: 3V9W)，顯示出 His<sup>181</sup> 的側鏈在 3 端 CC 的結構中發生構型改變，其側鏈大約位移 3 ~ 4 Å，此變化被認為是造成 RNase T 無法對 3 端為 Cytosine 的核苷酸受質進行催化的原因。



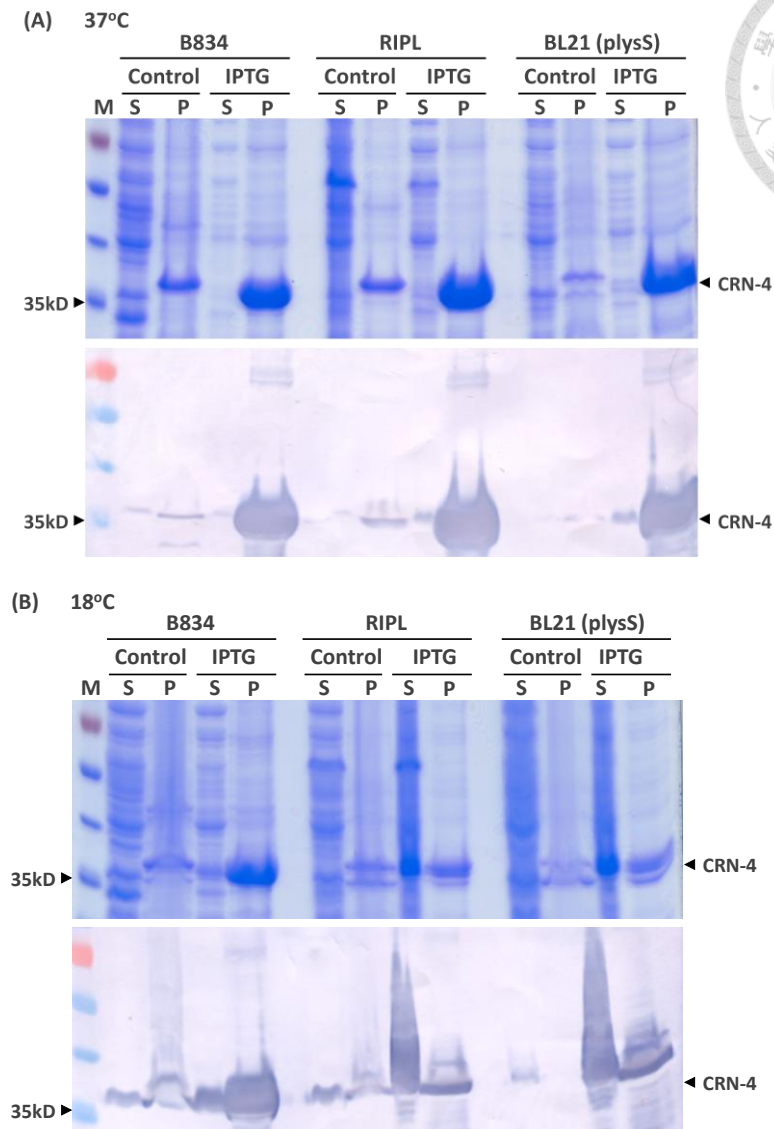
圖四、HIV 病毒利用人類宿主細胞的 TREX1 來幫助其自身躲避宿主的免疫機制。(A) 當宿主細胞內存在 TREX1 時，可將病毒反轉錄出病毒 DNA 片斷降解，避免被細胞內的 DNA 感應蛋白所捕捉，進而抑制 IRF3 活化，使宿主的先天性免疫反應難以啟動，進而無法合成干擾素對抗病毒入侵。(B) TREX1 的蛋白質結構 (PDB: 3MXJ)。



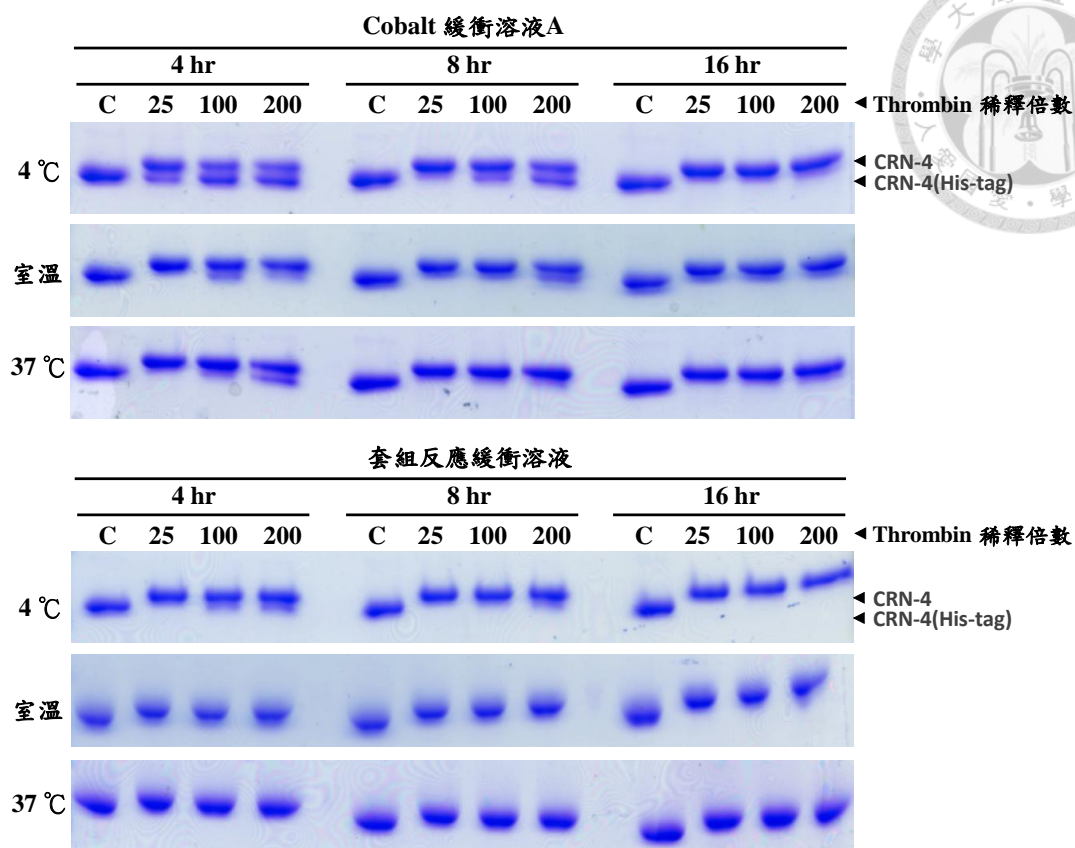
圖五、不同種冠狀病毒，具有一高度保留的核酸外切水解酶之區域。據序列比對結果，冠狀病毒自身的基因組內，編碼存在一 DnaQ 核酸水解外切酶家族成員，其中 SARS-CoV 的核酸水解酶則位於 nsp14 蛋白質上。(Minskaia et al., 2006)



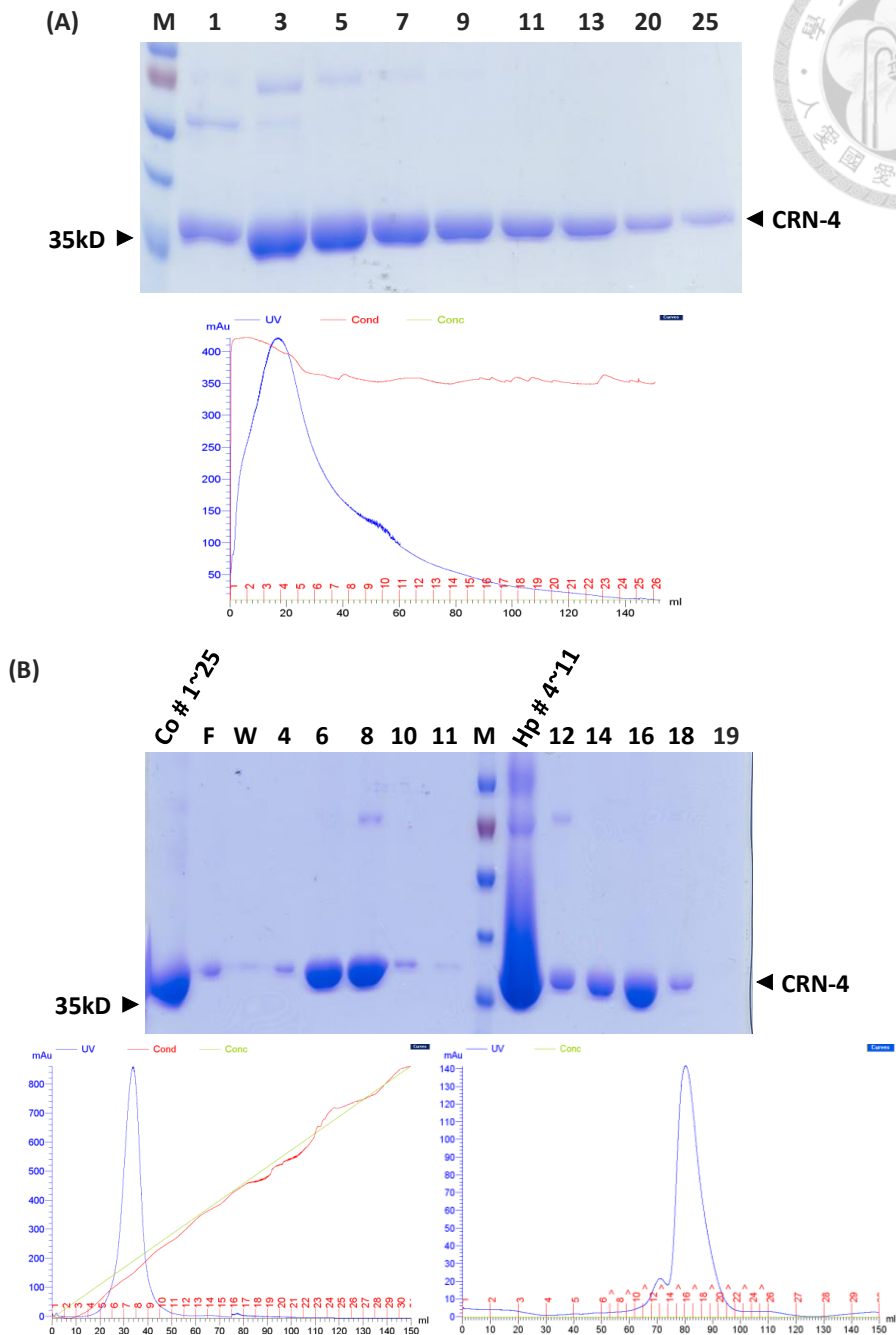
圖六、LASV 病毒的 NP 蛋白質具有與 DnaQ 核酸水解外切酶家族相似的結構。在胺基酸序列的比對結果顯示，LASV 病毒的 NP 蛋白質與該類病毒以外的物種無任何相似性，但 NP 蛋白質卻能構築成一個與類 DnaQ 核酸水解外切酶高度相似的結構，活性位的五個保留性胺基酸排列極為吻合，顯示 NP 蛋白質亦具有類 DnaQ 核酸水解外切酶的活性。(Hastie et al., 2011b)



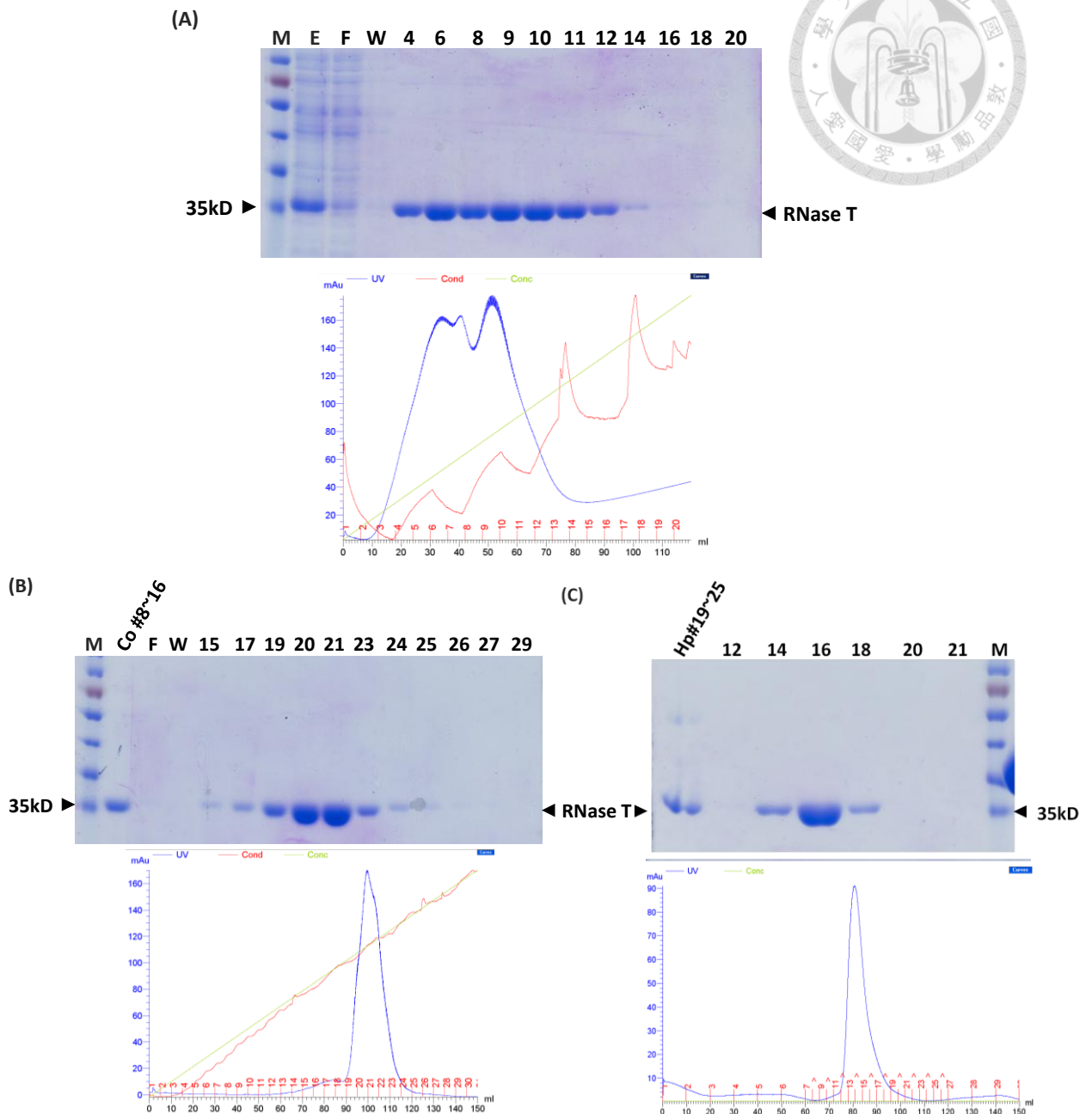
圖七、CRN-4 蛋白質小量表現測試。實驗分別取兩種溫度 (A) 37°C 及 (B) 18°C，並用三種不同勝任細胞進行測試，以 SDS-PAGE (上半圖) 和西方墨點法 (下半圖) 進行分析。結果顯示，在 37°C 下幾乎所有 CRN-4 蛋白都不溶於上清液中，而 18°C 下的 CRN-4 則有大量表現存在於上清液中。由於 B834 及 RIPL 的菌株中，在控制組的結果可觀察到，有部分小量 CRN-4 的表現，故選擇以 18°C 和 BL21 (plysS) 菌株做為蛋白質大量純化的條件。M：Marker，S：Supernatant，P：Pellet，Control：不加 IPTG。



圖八、Thrombin 切除 CRN-4 重組蛋白上 His-tag 的活性測試。實驗分別以兩種反應緩衝溶液(上圖:Cobalt 緩衝溶液,下圖:套組反應緩衝溶液)、三種反應時間(4、8 和 16 小時)、三種 Thrombin 稀釋倍數(25、100 和 200 倍稀釋)和三種反應溫度。結果顯示套組反應緩衝溶液幾乎可以在任何條件下將 CRN-4 上的 His-tag 切除乾淨;而 Cobalt 緩衝溶液 A 則須切至少 16 小時才能達到相同效率。為了方便實驗操作,故選擇用 Cobalt 緩衝溶液 A 於室溫作用約 16 小時,做為切除 His-tag 的反應條件。

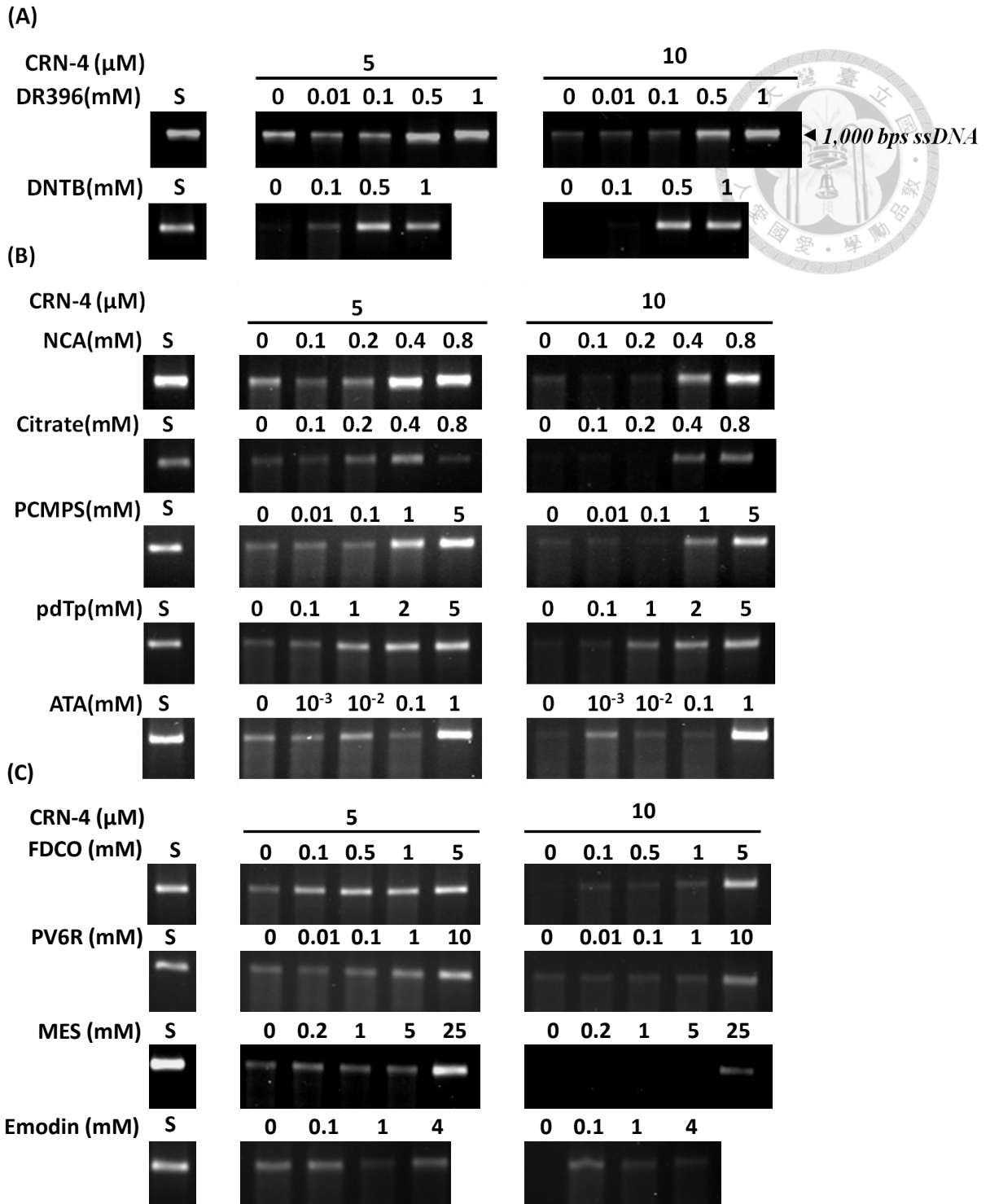


圖九、CRN-4 大量純化結果。上半部為各分餾 (Fraction) 的 SDS-PAGE 結果；下半部為各分餾其蛋白質濃度，縱軸為 280 nm 的吸光值，代表蛋白質濃度，橫軸為沖提之體積。(A) Cobalt 親和性管柱層析結果，以 Thrombin 切除 His-tag 後，用 Cobalt 緩衝溶液 A 將 CRN-4 沖提出管柱收集。(B) 左半部為 Heparin 管柱層析結果，右半部為 Gel filtration 管柱層析結果。各 SDS-PAGE 的結果顯示 CRN-4 都有相當高的純度。M：Marker，F：Flow through，W：Wash，Co#1 ~ 25：Cobalt 親和性管柱純化後所得之 1 至 25 管分餾的濃縮樣品，Hp#4 ~ 11：Heparin 管柱層析純化後所得之 4 至 11 管分餾的濃縮樣品。

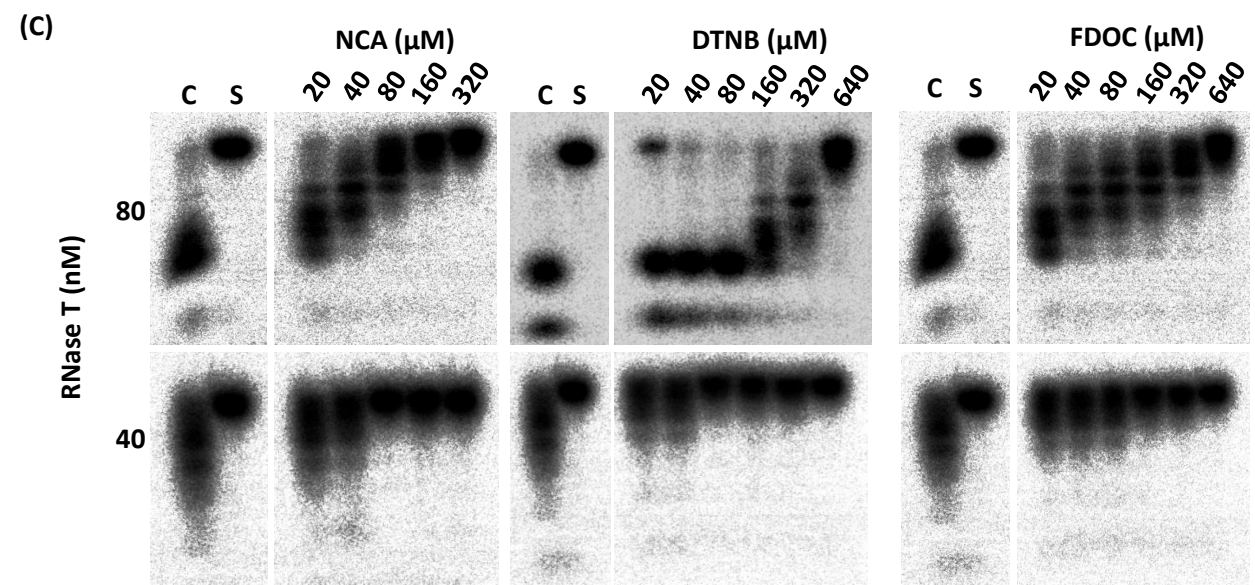
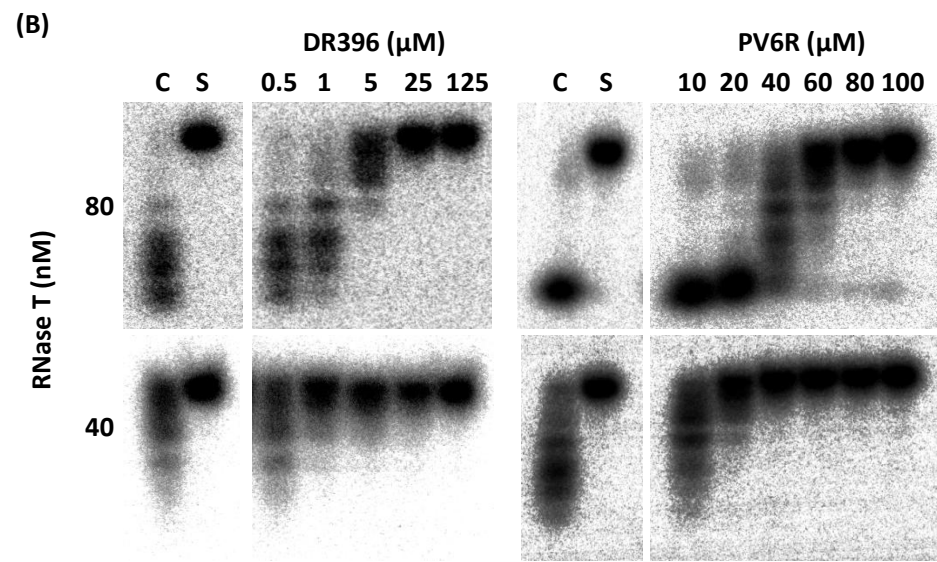
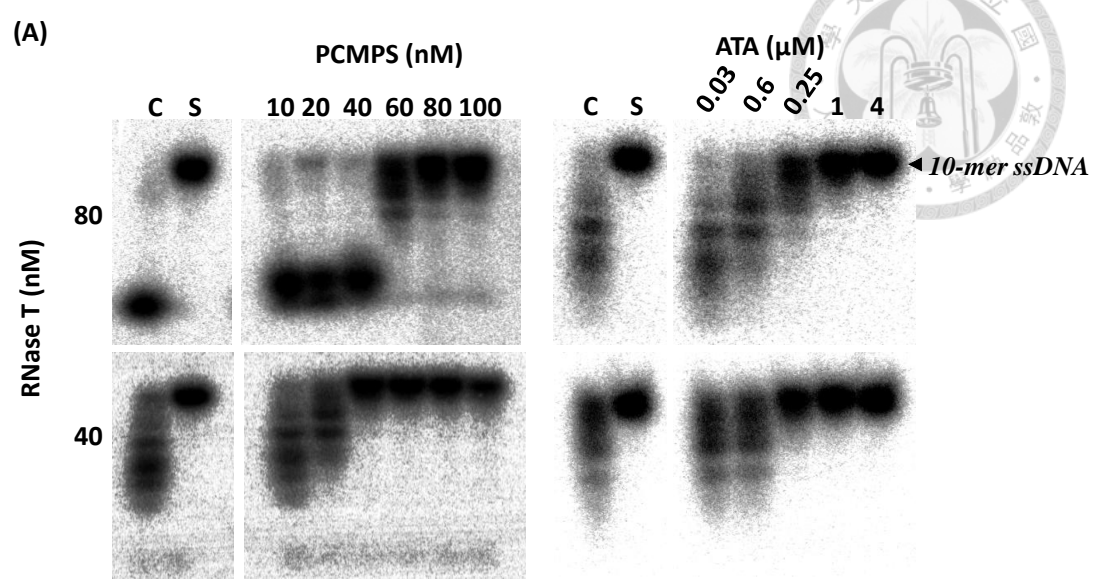


圖十、RNase T 大量純化結果。上半部為各分餾的 SDS-PAGE 結果；下半部為各分餾其蛋白質濃度，縱軸為蛋白質在 280 nm 吸光值，橫軸為沖提之體積。(A) Cobalt 親和性管柱層析結果。(B) Heparin 管柱層析結果。(C) Gel filtration 管柱層析結果。各 SDS-PAGE 結果顯示 RNase T 具有相當高的純度。M: Marker, E: Cell extract, F: Flow through, W: Wash, Co#8 ~ 16: Cobalt 親和性管柱純化後所得之 8 至 16 管分餾的集合樣品, Hp#19 ~ 25: Heparin 管柱層析純化後所得之 19 至 25 管分餾的濃縮樣品。

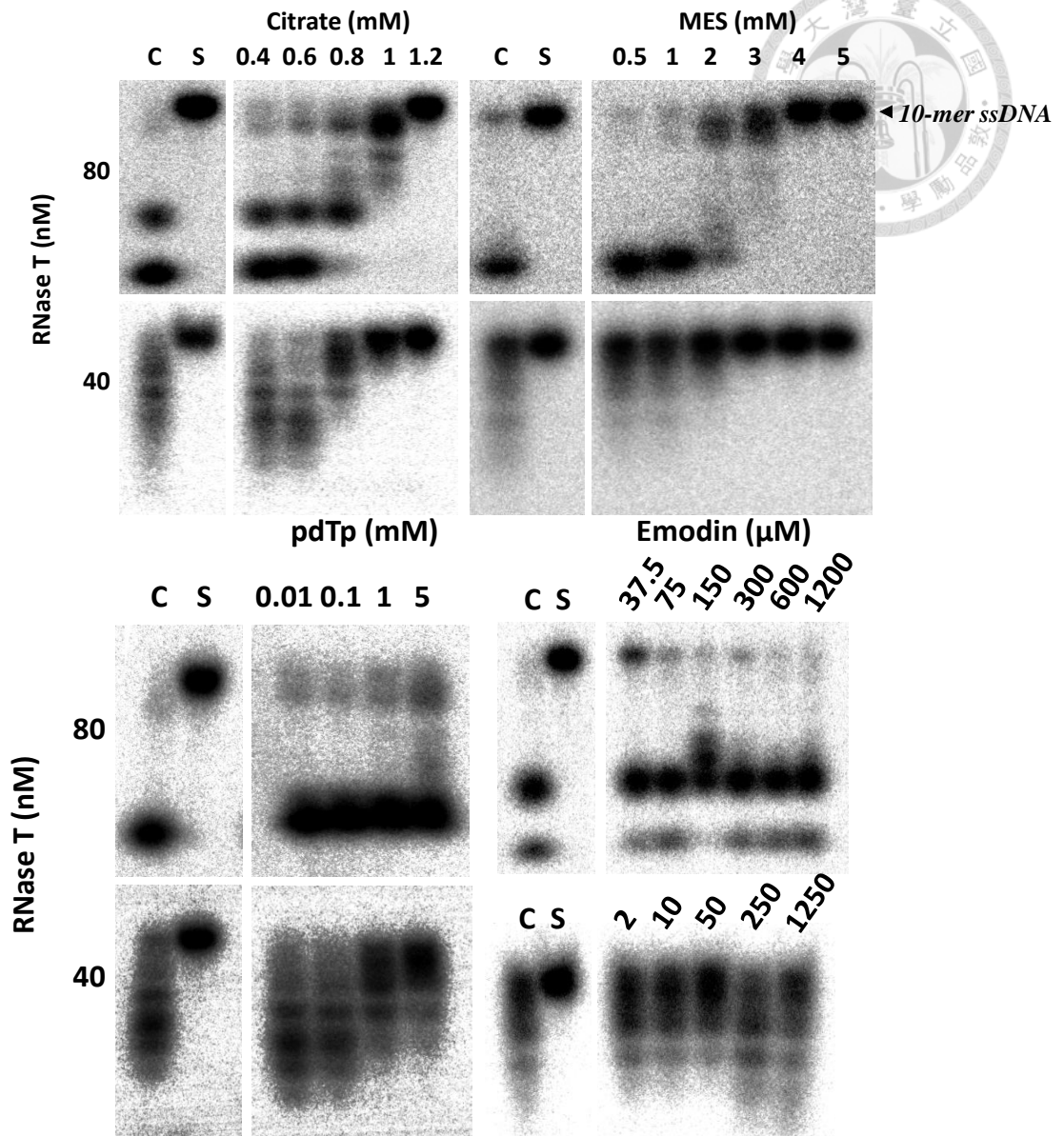




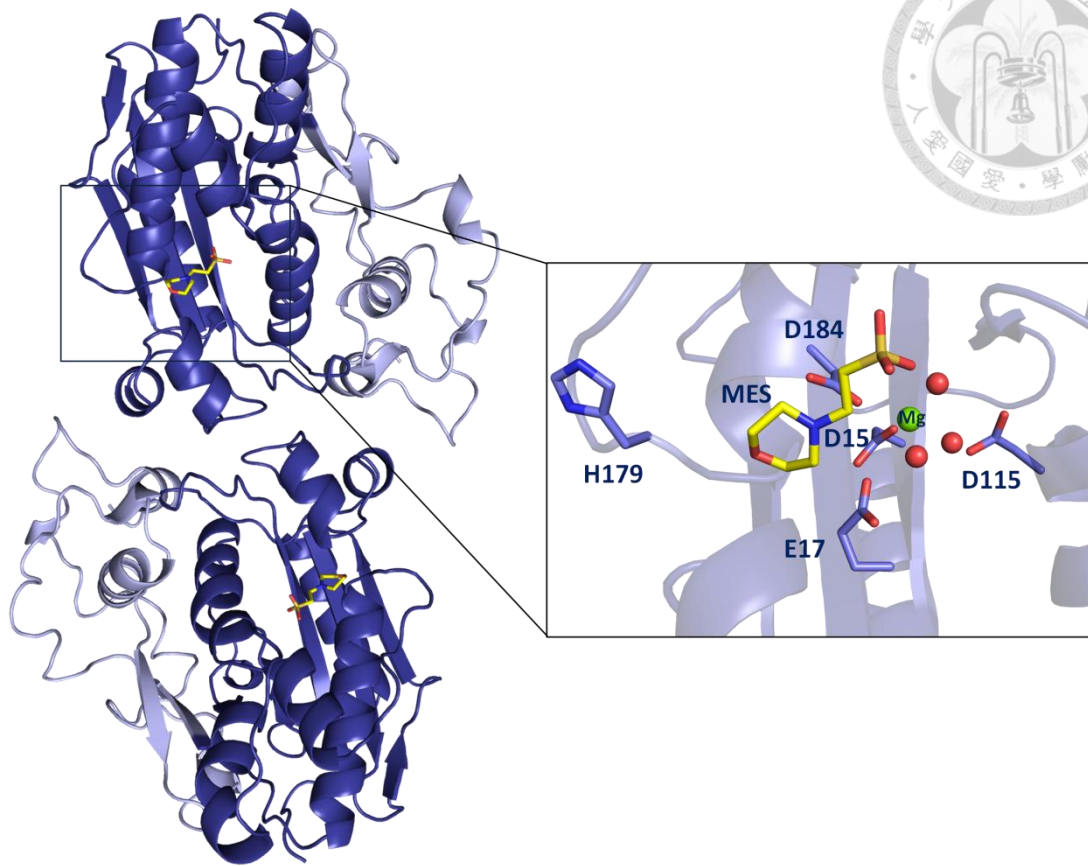
圖十一、CRN-4 核酸水解外切酶活性測試。以 PCR 產物約 1,000 bps 的線性雙股 DNA 做為受質，測試各抑制劑對於 CRN-4 核酸水解外切酶活性的抑制程度。S：只含線性雙股 DNA 受質，不加 CRN-4 和任何抑制劑。以 5  $\mu\text{M}$  CRN-4 為基準，實驗結果顯示，(A) DR396 和 DTNB 有較高的抑制效率，需約 0.1 mM 以下的濃度可抑制一半 CRN-4 活性。(B) NCA、Citrate、PCMPS、pdTp 和 ATA 則需約 0.3 ~ 0.8 mM 方能抑制一半 CRN-4 活性。(C) FDCO、PV6R 和 MES 則需超過 1 mM 才能達到相同抑制效果。Emodin 在實驗結果中雖無抑制活性的現象，但因其溶解度的因素，故無法確定是否在更高的濃度有抑制效果。



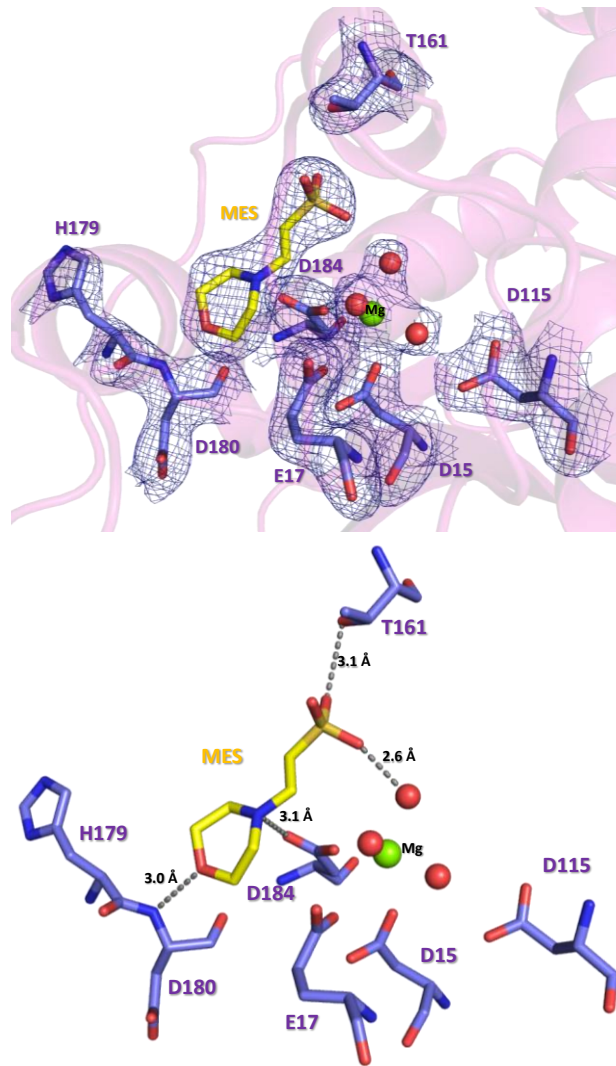
(D)



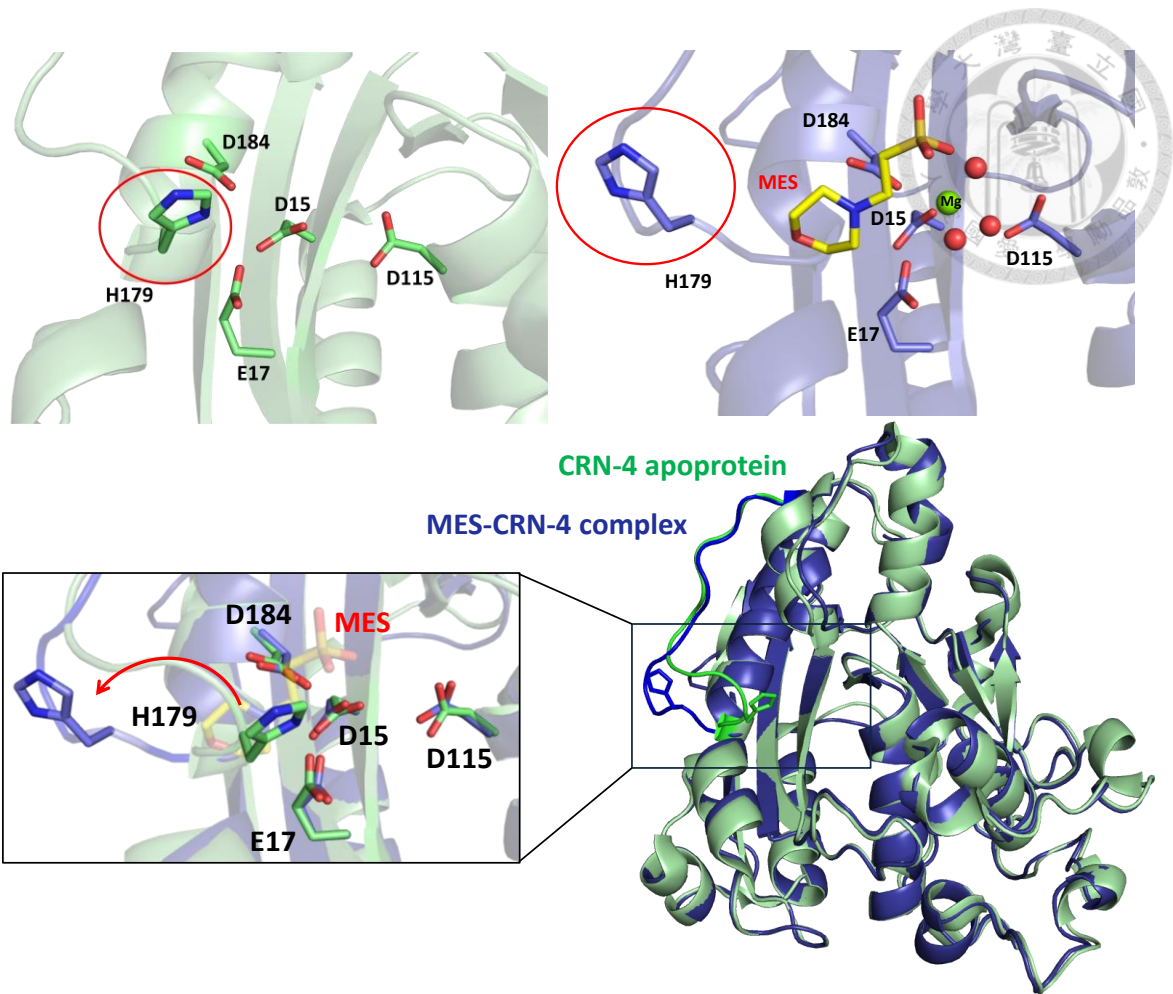
圖十二、RNase T 核酸水解外切酶活性測試。以 10 個核苷酸的單股 DNA (5'-AGTTATGAAA-3') 做為受質，測試各抑制劑對於 RNase T 核酸水解外切酶活性的抑制程度。C：含線性雙股 DNA 受質，並加入 CRN-4，但不加任何抑制劑。S：只含線性單股 DNA 受質，不加 CRN-4 和任何抑制劑。以 80  $\mu$ M RNase T 為基準，實驗結果顯示，(A) PCMPS 和 ATA 有較高的抑制效率，需約 10  $\mu$ M 以下的濃度可抑制一半 RNase T 活性。(B) DR396 與 PV6R 則需約 10 ~ 100  $\mu$ M 才會抑制一半 RNase T 活性。(C) NCA、DTNB 和 FDCO 則需約 100 ~ 1,000  $\mu$ M 才能抑制一半 RNase T 活性。(D) Citrate 和 MES 則需超過 1 mM 才能達到相同抑制效果；而 pdTp 在高濃度 RNase T 中無顯著抑制結果，但在低濃度 RNase T 有些微抑制的現象，故推測高劑量的 pdTp 應會抑制 RNase T 活性。Emodin 在實驗結果中雖無抑制活性的現象，但因其溶解度的原因，故無法確定是否在更高的濃度有抑制效果。



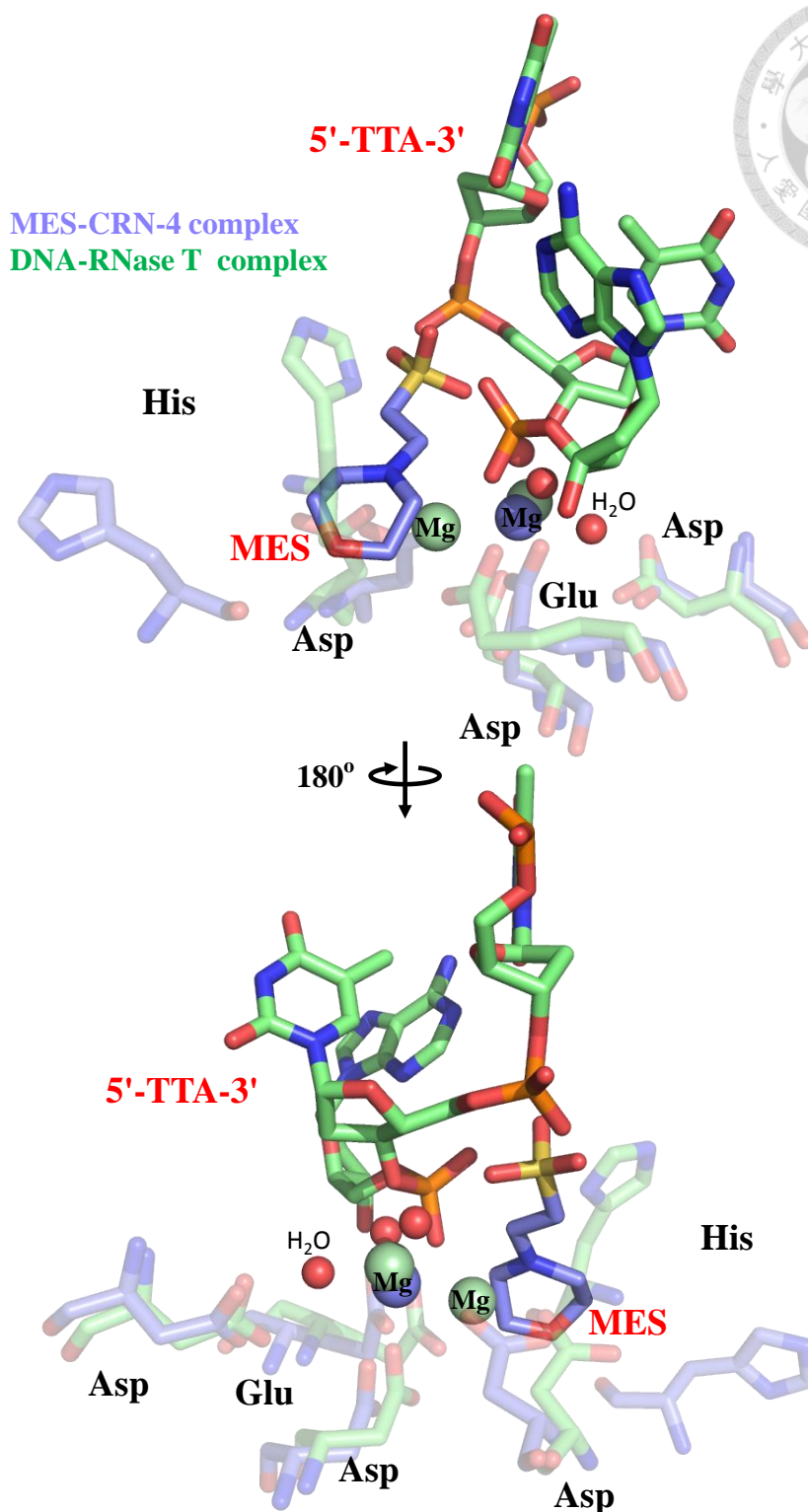
圖十三、MES-CRN-4 複合物蛋白質結構。在此結構中的 CRN-4 活性位，存在一個 MES 分子與一個鎂離子及其三個配位水，放大圖為 CRN-4 活性位中的五個高度保留性胺基酸與 MES 的結合情形。



圖十四、MES-CRN-4 複合物之活性位結構。上圖為活性位中 MES、鎂離子及其鄰近胺基酸的  $2Fo-Fc$  電子密度圖，Sigma 值為 1；下圖為 MES 與其鄰近胺基酸的氫鍵交互作用圖，分別與 Asp<sup>180</sup>、Asp<sup>184</sup>、Thr<sup>161</sup> 及鎂離子的配位水形成氫鍵。



圖十五、MES-CRN-4 複合物的結構於活性位有構形上的改變。左上圖為純 CRN-4 蛋白質活性位結構之放大圖，右上圖為 MES-CRN-4 複合物的活性位結構之放大圖，下圖則為兩者做結構重疊比對之結果。顯示 His<sup>179</sup> 所在的 Loop 有顯著的構形改變，造成 His<sup>179</sup> 的側鏈往外翻轉出活性位，其側鏈約位移 10 Å。



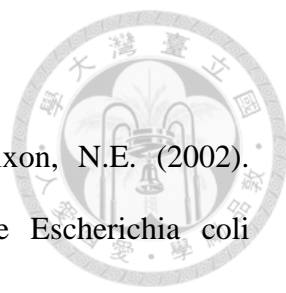
圖十六、MES-CRN-4 複合物與 DNA-RNase T 複合物 (PDB:3V9W) 活性位結構重疊比對圖。DNA-RNase T 複合物活性位中有兩個鎂離子 (綠球)，而 MES-CRN-4 複合物中只含一個鎂離子 (紫球，紅球為其配位水)。推測 MES 可能利用亞硫酸根模擬 DNA 上的磷酸根與 CRN-4 活性位進行結合。


## 陸、 參考文獻





1. Bailey, S.L., Harvey, S., Perrino, F.W., and Hollis, T. (2012). Defects in DNA degradation revealed in crystal structures of TREX1 exonuclease mutations linked to autoimmune disease. *DNA repair* 11, 65-73.
2. Barber, G.N. (2011). Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Current opinion in immunology* 23, 10-20.
3. Chowdhury, D., Beresford, P.J., Zhu, P.C., Zhang, D., Sung, J.S., Demple, B., Perrino, F.W., and Lieberman, J. (2006). The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Molecular cell* 23, 133-142.
4. Deutscher, M.P., Marlor, C.W., and Zaniewski, R. (1984). Ribonuclease T: new exoribonuclease possibly involved in end-turnover of tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4290-4293.
5. Eckerle, L.D., Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B., *et al.* (2010). Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *Plos Pathog* 6, e1000896.
6. Flexner, C. (2007). HIV drug development: the next 25 years. *Nature reviews Drug discovery* 6, 959-966.
7. Geijtenbeek, T.B. (2010). Host DNase TREX1 hides HIV from DNA sensors. *Nature immunology* 11, 979-980.
8. Hallick, R.B., Chelm, B.K., Gray, P.W., and Orozco, E.M. (1977). Use of Aurintricarboxylic Acid as an Inhibitor of Nucleases during Nucleic-Acid Isolation.



- 
- Nucleic Acids Res 4, 3055-3064.
9. Hamdan, S., Carr, P.D., Brown, S.E., Ollis, D.L., and Dixon, N.E. (2002). Structural basis for proofreading during replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Structure* 10, 535-546.
  10. Hastie, K.M., Kimberlin, C.R., Zandonatti, M.A., MacRae, I.J., and Saphire, E.O. (2011a). Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2396-2401.
  11. Hastie, K.M., Liu, T., Li, S., King, L.B., Ngo, N., Zandonatti, M.A., Woods, V.L., Jr., de la Torre, J.C., and Saphire, E.O. (2011b). Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19365-19370.
  12. Horio, T., Murai, M., Inoue, T., Hamasaki, T., Tanaka, T., and Ohgi, T. (2004). Crystal structure of human ISG20, an interferon-induced antiviral ribonuclease. *FEBS letters* 577, 111-116.
  13. Hsiang, C.Y., and Ho, T.Y. (2008). Emodin is a novel alkaline nuclease inhibitor that suppresses herpes simplex virus type 1 yields in cell cultures. *British journal of pharmacology* 155, 227-235.
  14. Hsiao, Y.Y., Duh, Y., Chen, Y.P., Wang, Y.T., and Yuan, H.S. (2012). How an exonuclease decides where to stop in trimming of nucleic acids: crystal structures of RNase T-product complexes. *Nucleic Acids Res* 40, 8144-8154.
  15. Hsiao, Y.Y., Nakagawa, A., Shi, Z., Mitani, S., Xue, D., and Yuan, H.S. (2009). Crystal structure of CRN-4: implications for domain function in apoptotic DNA degradation. *Mol Cell Biol* 29, 448-457.
  16. Hsiao, Y.Y., Yang, C.C., Lin, C.L., Lin, J.L., Duh, Y., and Yuan, H.S. (2011).

- 
- Structural basis for RNA trimming by RNase T in stable RNA 3'-end maturation. *Nature chemical biology* 7, 236-243.
17. Lee, W., Lee, Y.I., Lee, J., Davis, L.M., Deininger, P., and Soper, S.A. (2010). Cross-Talk-Free Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for the Study of Enzyme Activity. *Anal Chem* 82, 1401-1410.
  18. Li, Z., Zhan, L., and Deutscher, M.P. (1996). The role of individual cysteine residues in the activity of Escherichia coli RNase T. *The Journal of biological chemistry* 271, 1127-1132.
  19. Manel, N., and Littman, D.R. (2011). Hiding in plain sight: how HIV evades innate immune responses. *Cell* 147, 271-274.
  20. Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., and Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5108-5113.
  21. Moser, M.J., Holley, W.R., Chatterjee, A., and Mian, I.S. (1997). The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res* 25, 5110-5118.
  22. Nurmohamed, S., Vincent, H.A., Titman, C.M., Chandran, V., Pears, M.R., Du, D., Griffin, J.L., Callaghan, A.J., and Luisi, B.F. (2011). Polynucleotide phosphorylase activity may be modulated by metabolites in Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* 286, 14315-14323.
  23. Parrish, J.Z., and Xue, D. (2003). Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in C. elegans. *Molecular cell* 11, 987-996.
  24. Prentice, D.A., Kitos, P.A., and Gurley, L.R. (1985). Effects of Phosphatase Inhibitors on Nuclease Activity. *Cell Biol Int Rep* 9, 1027-1034.

- 
25. Raines, R.T., Smith, B.D., Soellner, M.B., Lynn, D.M. (2005). Nuclease inhibitors and methods for their use. United States patent application publication US 2005/0214839A1
26. Stetson, D.B. (2012). Endogenous retroelements and autoimmune disease. *Current opinion in immunology* 24, 692-697.
27. Sunaga, S., Kobayashi, T., Yoshimori, A., Shiokawa, D., and Tanuma, S. (2004). A novel inhibitor that protects apoptotic DNA fragmentation catalyzed by DNase gamma. *Biochemical and biophysical research communications* 325, 1292-1297.
28. Wang, C.C., Tsong, T.Y., Hsu, Y.H., and Marszalek, P.E. (2011). Inhibitor binding increases the mechanical stability of staphylococcal nuclease. *Biophysical journal* 100, 1094-1099.
29. Wu, M.S., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y.Y., Wahle, E., and Song, H.W. (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *Embo Journal* 24, 4082-4093.
30. Yamada, Y., Fujii, T., Ishijima, R., Tachibana, H., Yokoue, N., Takasawa, R., and Tanuma, S. (2011). DR396, an apoptotic DNase gamma inhibitor, attenuates high mobility group box 1 release from apoptotic cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* 19, 168-171.
31. Yan, N., Cherepanov, P., Daigle, J.E., Engelman, A., and Lieberman, J. (2009). The SET complex acts as a barrier to autointegration of HIV-1. *Plos Pathog* 5, e1000327.
32. Yan, N., and Lieberman, J. (2011). Gaining a foothold: how HIV avoids innate immune recognition. *Current opinion in immunology* 23, 21-28.
33. Yan, N., Regalado-Magdos, A.D., Stiggelbout, B., Lee-Kirsch, M.A., and Lieberman, J. (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate

- 
- immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nature immunology* *11*, 1005-1013.
34. Yang, W. (2011). Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Quarterly reviews of biophysics* *44*, 1-93.
35. Zuo, Y., and Deutscher, M.P. (2002). The physiological role of RNase T can be explained by its unusual substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* *277*, 29654-29661.
36. Zuo, Y., Zheng, H., Wang, Y., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Skarina, T., Savchenko, A., Malhotra, A., and Minor, W. (2007). Crystal structure of RNase T, an exoribonuclease involved in tRNA maturation and end turnover. *Structure* *15*, 417-428.
37. Zuo, Y.H., and Deutscher, M.P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* *29*, 1017-1026.