

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文



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

大腸桿菌ClpY 蛋白形成六元環關鍵胺基酸之研究

**The study of the key amino acid on ClpY hexamer
formation**

張祿高

Lu-Kao Chang

學號：R00623024

指導教授：吳蕙芬 博士

Advisor：Whei-Fen Wu, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

大腸桿菌 ClpY 蛋白形成六元環關鍵胺基酸之研究
The study of the key amino acid on ClpY hexamer
formation

本論文係張祿高君（學號 R00623024）在國立臺灣大學
農業化學系完成之碩士學位論文，於民國一百零二年七月十
二日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

<u>陳昭瑩</u>	國立臺灣大學植物病理 與微生物學系(所)教授
陳昭瑩 博士	
<u>徐駿森</u>	國立臺灣大學農業化學 系(所)副教授
徐駿森 博士	
<u>陳建德</u>	國立中興大學農藝學系 (所)助理教授
陳建德 博士	
<u>林晉玄</u>	國立臺灣大學生化科技 學系(所)助理教授
林晉玄 博士	
<u>吳蕙芬</u>	國立臺灣大學農業化學 系(所)副教授(本論文指 導教授)
吳蕙芬 博士	

謝誌

感謝台大的多元樣貌，豐富我的視野。感謝農業化學系，讓我從大學一路富足地學習到碩士。感謝蕙芬老師三年多來的指導，帶領我學習新技術，開放討論後務實的實踐，還有在生活上的支持，老師總是與我們一起共度難關，非常感謝老師。

感謝 陳昭瑩教授、陳建德教授、徐駿森教授以及林晉玄教授撥冗細心審閱本論文初稿，參與口試給予我寶貴的建議，使我的思考更加全面完善，從而完成此論文。

感謝汎擎大學長，傳授我這麼多好用的寶貝技術，感謝鈞暘哥，給力的靠山總是令人心安，感謝齡誼姊，燃燒自身之餘還用盡全力照亮我們，感謝智瑄，大事小事一手包辦，感謝嘉葳姊，如此的直率總讓人精神為之一振，感謝惠婷姊，到位且貼心的你是我永遠的模範，謝謝玉鳳、郁君和宣合，讓我初次認識這可愛的實驗室，謝謝柏儒從容的分析與鼓勵，謝謝慈芳和謝馨，用開朗的歡笑和可口的零食豐富我們，感謝天寧，你的參與激盪出土壤微生物的絢爛火花，感謝君翰，讓熱情充滿了實驗室。感謝羅凱尹老師帶領我完成首次的助教生涯。

感謝六年來共同學習成長的 B96 夥伴們，感謝泰祥無私的分享與陪伴，感謝述鈞，不論在什麼時候總是能產生正面能量，感謝得翔與宜叡在實驗上精闢的見解，感謝鈺卿總是捎來第一手消息，感謝克韓總是有令人發笑的故事，感謝昱霆、鎮賢、沛育、永杰，能與你們體驗人生真是一大樂事。感謝系排的夥伴們，儘管用生鏽的關節與你們打球一樣很開心。感謝浩銘、瑞堂、二中、宜慧、立婷及日出團的夥伴們，豐富了我的生活拓展了我的視野。謝謝慈玲、妍好和文修，很高興在碩班生涯認識你們。

謝謝張珊齊兩年來的鼓勵與陪伴，每每見到你可愛的笑容，總是讓疲累一掃而空充滿活力，感謝你的關心與包容。最後謝謝我們家人們，你們總是最強力的支持，謝謝你們的信任、關懷和愛。謝謝你們。

將此篇論文獻給你們

摘要

蛋白質是重要的生物分子，細菌中具有蛋白質品質管系統(protein quality control network)，以維持各類蛋白質之生理活性。其中包含有伴隨蛋白(chaperone)及蛋白酶(protease)，伴隨蛋白協助蛋白質對抗構型變化並修正構型已變之蛋白質，蛋白酶則是分解存在時機不適當之蛋白質，或是已經徹底毀損構型而無法挽救之蛋白質。細菌體內的蛋白質降解任務，主要由一系列不同之 ATP 依賴型蛋白酶(ATP-dependent protease) 所執行。

ATP 依賴型蛋白酶具兩種功能區塊解構酶(unfoldase) 及胜肽酶(peptidase)，前者具有水解 ATP 活性將基質解構並傳送胜肽鏈給後者分解，故屬於 AAA+ (ATPase associated with various cellular activities) 家族的一員。革蘭氏陰性菌大腸桿菌中，包含 ClpAP、ClpXP、ClpYQ、LonA 及 FtsH 等五種 ATP 依賴型蛋白酶，因為具備形成多元環之特性，ATP 依賴型蛋白酶在生理狀態下皆呈現桶狀結構。

本研究以 ClpYQ 作為探討形成多元環的關鍵因素。前人研究顯示，第 408 個胺基酸 tyrosine 對於 ClpY 六元環的形成有關鍵影響，突變蛋白 ClpY Y408A 不論在有無 ATP 或是 ClpQ 的存在下，ClpY 形成六元環的能力都較野生型蛋白為差。檢視 ClpY 結晶結構 1E94，推測 Y408 胺基酸其較大的側基，可與鄰近胺基酸產生較多的凡得瓦爾力，因此我們選擇一系列不帶電的胺基酸，建構了側基由小到大的 Y408 點突變蛋白。在胞外以聯結試驗觀察 ClpY 蛋白在 ATP γ S 存在下形成六元環的狀況；另利用 ClpYQ 之基質 Sula，其作為抑制細胞分裂的特性，透過細菌存活程度，檢定胞內 ClpYQ 蛋白酶之活性。結果顯示，胞外與胞內的結果趨勢均隨 ClpY Y408 側基大小而改變。側基愈小的 ClpY 蛋白在胞外形成六元環的能力愈弱；而 ClpY Y408 的側基愈小，對細菌生長的限制愈大。以上顯示 ClpY Y408 是 ClpY 形成六元環的關鍵胺基酸。

Abstract

Proteins play important roles in the cell. Protein quality control network maintain the physiology function of proteins in bacteria. There are chaperons and proteases in the network. Chaperons help to against the denature and refold the unnature proteins, proteases degrade the damaged proteins or no suitable ones. Degradation relies on ATP-dependent proteases, like ClpAP, ClpXP, ClpYQ, Lon and FtsH in model organism *Escherichia coli*. Under physiology condition, all of them form homomultimer and then stack to form the barrel shape.

This study exams the key amino acid in ClpY forming the hexamer. Before, we knew ClpY Y408A mutant strictly effect the hexamer formation. In the crystal structure 1E94, Y408 is very close to the adjacent amino acid R25; therefore we speculate that the van der Waals' force between ClpY R25 and Y408 might help ClpY hexamer formation. Here, I present some evidence both *in vitro* and *in vivo*. I constructed gradient size point mutant on Y408, according to their side chain size of the amino acid. *In vitro*, the purified mutant proteins corsslink by glutaraldehyde, running the sodium dodecyl sulfat agarose gel electrophoresis (SDS-AGE) to see the 300 kDa hexamer cylinder or not. ClpY Y408W forms more hexamer than Wt, Y408L, Y408C and R25A/Y408A. *In vivo*, ClpY Y408 mutants constructed on pBAD24, co-transformed with ClpQ and tagged-SulA, which is a substrate of Lon and ClpYQ and can inhibit cell divide, to AC3112 *lon⁻ clpYQ⁻*. The wild type ClpYQ can degrade SulA, then cell grow, otherwise the cell would become lethal. Cell viability reveals the Y408W growth equal to wild type, and order as follow: Y408M, Y408L and Y408V/C/A, which growth equal to vector control. Briefly, I show that the side chain of the amino acid of ClpY Y408 mutants affect the function gradually, once the side chain bigger, the hexamer forms more and the cell can grow better.

目錄



論文審定書.....	i
謝誌.....	ii
摘要.....	iii
Abstract.....	iv
目錄.....	v
表目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
附圖目錄.....	ix
壹、 前言.....	1
一、 ATP 依賴型蛋白酶.....	1
二、 大腸桿菌中 ATP 依賴型蛋白酶.....	2
三、 ClpYQ 之基質.....	4
四、 ClpYQ 之結構.....	7
五、 研究動機.....	9
貳、 材料與方法.....	10
一、 實驗材料.....	10
(一) 菌株與質體.....	10
(二) 藥品與試劑.....	11



(三) 器材設備	12
(四) 分析軟體	12
二、 方法	13
(一) 目標基因選殖	13
(二) 蛋白質純化	17
(三) SDS 蛋白質膠體電泳	20
(四) 蛋白質聯結測試 (cross-linking analysis)	22
(五) 細菌生理活性分析	23
(六) 細菌液態培養密度測定	24
參、 結果	25
一、 以軟體預測影響六元環形成之成因	25
二、 確認 ClpY 及其突變株之六元環形成能力	26
三、 胞內 ClpYQ 蛋白酶生理活性測試	27
四、 ClpYQ 蛋白酶與基質對細菌生長之影響	28
五、 ClpYQ 蛋白酶對液態培養的細菌密度之影響	29
肆、 討論	30
伍、 結論	33
陸、 參考文獻	34

表目錄

表一、本論文所使用的菌株	38
表二、本論文所使用的質體	39
表三、本論文所使用的引子對	40



圖目錄



圖一、ClpYQ 結晶結構卡通圖	42
圖二、ClpY 單體之結晶結構卡通圖及其區塊標示	43
圖三、ClpY 單體於六元環之相對位置卡通圖	44
圖四、ClpY Y408 及其附近胺基酸之結晶結構卡通圖	45
圖五、ClpY 蛋白單體表面構造	46
圖六、ClpY Y408 突變模擬圖	47
圖七、純化 ClpY 突變蛋白	48
圖八、定量 ClpY 突變蛋白	49
圖九、ClpY、ClpY Y408C 及 ClpY Y408W 形成六元環之能力	50
圖十、ClpY、ClpY Y408L 及 ClpY R25A/Y408A 形成六元環之能力	51
圖十一、HA-SulA 於 AC3112 生理活性分析	52
圖十二、透過不具活性的 ClpYQ 基質觀察 ClpYQ 六元環對細菌生長之影響	54
圖十三、大腸桿菌 AC3112 大量誘導 ClpYQ 於 24 小時停滯期之菌量	56

附圖目錄

附圖一、ATP 依賴型蛋白酶之分類及保守性序列之分佈.....	57
附圖二、ClpY Y408 於真核生物間的保守性.....	58
附圖三、ClpY Y408 於原核生物間的保守性.....	59



壹、前言



一、ATP 依賴型蛋白酶

細菌體內充滿了各種巨分子如蛋白質、DNA 及 RNA 等，面對不同環境皆需要維持菌體內部之生理恆定，負責各類生理活性的蛋白質尤其重要。細菌具備蛋白質品質管系統 (protein quality control network, PQC)，以維持各類蛋白質之生理活性。其中包含有伴隨蛋白 (chaperone) 及蛋白酶 (protease)，伴隨蛋白協助蛋白質對抗構型變化並修正構型已變之蛋白質，蛋白酶則是分解存在時機不適當之蛋白質，或是已經徹底毀損構型而無法挽救之蛋白質。

細菌體內的蛋白質降解任務，主要由一系列不同之 ATP 依賴型蛋白酶 (ATP-dependent protease) 所執行。蛋白酶中功能區塊主要分為解構酶 (unfoldase) 及胜肽酶 (peptidase)，前者將基質解構並傳送胜肽鏈給後者分解。此系列蛋白酶中的解構酶具有水解 ATP 活性，如一般核酸水解酶一樣，具有與核酸結合的 walker A 超二級結構 (motif) 及負責核酸水解相關的 walker B 超二級結構 (Hanson & Whiteheart, 2005)，屬於 AAA+ (ATPase associated with various cellular activities) 家族的一員。AAA+ 家族成員參與細菌體內多種功能，如 DNA 複製或重組、微管的運輸、鞭毛泳動及此處之蛋白質降解等 (Neuwald *et al.*, 1999)，故此系列蛋白酶又稱為 AAA+ 蛋白酶。

若解構酶與胜肽酶為同一個基因所承載，如：LonA、LonB 以及 FtsH，歸於單元體蛋白酶 (one-component protease)。若解構酶與胜肽酶為兩個基因分別承載，如：ClpAP、ClpCP、ClpEP、ClpXP 及 ClpYQ，則歸於雙元體蛋白酶 (two-component protease) (如附圖一)。革蘭氏陰性菌中帶有 ClpAP、ClpXP、ClpYQ、LonA 及 FtsH 等五種 ATP 依賴型蛋白酶；革蘭氏陽性菌則具有 ClpCP、ClpEP、ClpXP、ClpYQ、LonA、LonB 及 FtsH 等七種 ATP 依賴型蛋白酶 (Gur *et al.*,

2013)。



二、大腸桿菌中 ATP 依賴型蛋白酶

Lon

大腸桿菌中 LonA (或稱為 Lon) 為主要的蛋白酶，早在 1960 年代，研究突變株表面大量多醣生成之細胞外圍黏稠 (mucooid) 現象，此突變株較不容易抵抗紫外光，且細胞呈現長條狀 (long)，因此命名為 Lon (Howard-Flanders *et al.*, 1964)。日後了解到 mucooid 現象是因為 Lon 之基質 RcsA 殘存，持續誘發莢膜多醣基因表現所造成 (Torres-Cabassa *et al.*, 1987)；而另一基質 Sula 的累積，由紫外光所誘發，抑制細胞分裂而產生長條之形狀 (Gottesman *et al.*, 1981)。因為分解蛋白質是趨向失序而能提高熵，當 Lon 被發現是需要 ATP 的蛋白酶時，打破科學家所認為降解蛋白質是不需耗能之下坡反應 (downhill reaction) 的概念 (Murakami *et al.*, 1979)。Lon 也能和 DNA 結合，是所有蛋白酶中唯一有此特性者，但其生理意義尚未明朗 (Gur, 2013)。

FtsH

具有穿膜區域的 FtsH 蛋白酶，鑲嵌在細菌內層胞膜上，可以分解在細胞質中以及細胞膜上的蛋白質，除了分解失活的蛋白質 (Okuno & Ogura, 2013)，亦調控細菌之逆境反應、脂質生合成 (Ogura *et al.*, 1999) 及生物膜之合成 (Bove *et al.*, 2012)，甚至參與了大腸桿菌間蛋白質抗生素 (colicin) 的成熟過程 (Chauleau *et al.*, 2011)。

ClpAP

雙元體的 ClpAP，除了可以分解自身之外，更著名的是它與接合蛋白 (adaptor) ClpS 合作，參與細菌中 N 端法則 (N-end rule) 的運作 (Erbse *et al.*, 2006)，N 端法則於酵母菌中首度發現 (Varshavsky, 1996)，後來證實在細菌、植

物及動物中都有相似的現象，也就是蛋白質的第二或第三個胺基酸決定了此蛋白質的半衰期 (Varshavsky, 2011)。在大腸桿菌中，ClpS 會辨認 N 端胺基酸為白胺酸 (Leucine, L)、苯丙胺酸 (Phenylalanine, F)、色胺酸 (Tryptophan, W) 以及酪胺酸 (Tyrosine, Y) 之蛋白質，然後將此基質交給 ClpAP 蛋白酶降解。其中解構酶 ClpA 從水解 ATP 獲得能量而將基質解構，並傳送胜肽鏈給胜肽酶 ClpP 分解 (Dougan *et al.*, 2012)。

ClpXP

ClpXP 蛋白酶同為雙元體，ClpX 為解構酶，ClpP 為胜肽酶，與 ClpAP 中的 ClpP 一模一樣，基因 *clpP* 位於第 9.83 分鐘，順向下一個基因即為第 9.84 分鐘的 *clpX*。ClpXP 也能藉由接合蛋白如 SspB 及 RssB 的協助來降解蛋白質，但最特別的是 ClpXP 能直接辨識 SsrA-tag 蛋白而將其水解 (Gottesman *et al.*, 1998)。當細菌核糖體 (ribosome) 在轉譯蛋白質時，若遇到 mRNA 不完全而缺乏停止密碼 (stop codon)，則核糖體會卡在 mRNA 上無法脫離，*ssrA* (small stable RNA gene A) 所轉錄出之 tmRNA (transfer-messenger RNA) 則能夠充當 tRNA 讓核糖體繼續轉譯，並帶有一段 mRNA 及停止密碼，此段 mRNA 能轉譯出 11 個胺基酸大小的片段，即所謂之 SsrA-tag，此片段能夠被 ClpXP 所辨識並降解此蛋白質，細菌藉此可分解因 mRNA 不完全而不完整生合成之蛋白質，並釋放困在 mRNA 上的核糖體 (Keiler *et al.*, 1996)。

ClpYQ

clpQY/hslVU 基因序列於 1993 年時由 Chuang 等人，首次在大腸桿菌中發現。*clpQY* 位於大腸桿菌基因圖譜的 88.9 分鐘處，可同時被轉錄成 mRNA，故為一組操作子。由於 *clpQY* 操作子之 mRNA 經由熱誘導後為未熱誘導之 1.5 倍，且其上游啟動子 (promoter) 序列與可被熱休克轉錄因子 (heat shock transcription factor, σ^{32} , σ^H) 辨識的啟動子保守序列相似，亦與 *groE* 及 *dnaK* 等熱休克基因 (heat-shock gene) 之啟動子保守序列相符 (Chuang *et al.*, 1993)，因此推論 *clpQY*

操作子為熱休克基因，故初始名稱由「heat shock locus」的意義而命名為 *hslVU*。此外，Rohrwild 等人於 1996 年時，將 σ^{32} 選殖於具有 *lac* 啟動子的質體上，而後以 IPTG 誘導 σ^{32} 大量表現，發現 HslVU 蛋白的表現量增加約 10 倍，更確定 HslVU 為熱休克蛋白 (Rohrwild *et al.*, 1996)。若以蛋白質之作用來分類，由於其蛋白層次具下列兩點特徵，因此將之分屬於 Clp 家族 (caseinolytic protease family)：(1)從胺基酸序列比對的結果發現，HslV 與真核生物 20S proteasome 中的 β -type 單體具相似度，應具胜肽酶的功能，於 Clp family 中可扮演胜肽酶的角色；(2)HslU 具有 ATP 結合區，且與 ClpX 的胺基酸序列有 50% 的相同度，故 HslU 應屬於 Clp family 中負責基質辨識及 ATPase 的角色。由於此組操作子於胺基酸比對上類似於 Clp 家族，因此，又被命名為 ClpQY (Schirmer *et al.*, 1996)。經由基因序列轉譯成胺基酸序列後計算得知 ClpQ 之分子量為 19095 Da；ClpY 之分子量為 49598 Da。目前所知 ClpYQ 除了可以分解異蛋白 (abnormal protein) 外，其基質有四種：SulA、RcsA、RpoH 及 TraJ。其中 SulA 與 RcsA 為 Lon 之基質 (Mizusawa & Gottesman, 1983)。RpoH 為 FtsH 之基質 (Yura *et al.*, 1993)。

三、 ClpYQ 之基質

異蛋白

利用添加胺基酸類似物或是嘌呤黴素 (puromycin) 而生成不正常蛋白，或異蛋白及外來蛋白的大量累積，皆會誘導熱休克蛋白的生成，致使菌體內產生類似熱休克反應之現象。Missiaka 等人於 1996 年時發現，過量表現的 *clpQY* 操作子可抵抗造成大腸桿菌累積有害蛋白質的毒素如嘌呤黴素及伴刀豆蛋白 A (concanavalin A)。以上結果顯示，ClpYQ 在大腸桿菌細胞中係扮演著分解異蛋白的角色 (Missiakas *et al.*, 1996)。

RpoH

面對溫度上升所造成之快速而半致死性的環境變化，細菌會啟動熱休克反應 (heat shock response, HSR)。此現象最早源於研究黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 之唾腺細胞，當溫度提高於正常生長溫度攝氏五度時，會使細胞快速地大量產生特定蛋白質，統稱為熱休克蛋白 (heat shock protein, HSP) (De Maio *et al.*, 1999)，後來確定此反應為生物體所共有。除了在溫度上升的逆境外，細菌面對環境之重金屬、氧化壓力及酸鹼性改變等逆境下也會產生熱休克反應。熱休克蛋白中有伴隨蛋白及 ATP 依賴型蛋白酶，皆有助於維持細菌體內蛋白質的種類及品質，前者協助維持蛋白質結構完好，而後者降解不合適及無法回復之錯誤摺疊蛋白。

大腸桿菌中由熱休克轉錄因子 (σ^{32}) 單獨調控熱休克反應，其基因名為 *rpoH*。非逆境狀態下，因為 *rpoH* 之 mRNA 二級結構中鹼基配對位置占據了核糖體結合位，蛋白質轉譯量低；又 RpoH 蛋白會在 DnaK 及 DnaJ 的協助下，快速地被 FtsH 降解 (半衰期約一分鐘)，故此時細菌體內 RpoH 之數量很少 (Guisbert, *et al.*, 2004)，細菌體中之基因表現由主要轉錄因子 σ^{70} 所控制。當溫度上升，*rpoH* 之 mRNA 結構釋放了核糖體結合位，RpoH 轉譯量增加；而短時間內，伴隨蛋白系統及蛋白酶 FtsH 著手處理因環境變化而構型改變的蛋白質，兩種因素皆使 RpoH 較為穩定 (Straus *et al.*, 1987)，從而繼續誘發熱休克反應。伴隨蛋白 DnaK 及 DnaJ 和 ATP 依賴型蛋白酶 ClpYQ 亦屬於於熱休克蛋白的一員，熱休克反應中更多量之 DnaK/J 造成 RpoH 被 FtsH 降解，而 ClpYQ 蛋白酶被 RpoH 提高表現量，也會回頭降解 RpoH，多重因素讓 RpoH 數量減少，由此調控熱休克反應。

RcsA

莢膜生合成調控蛋白 RcsA 會與 RcsB 共同形成異雙體 (heterodimer)，調控莢膜生合成基因的表現。RcsA 亦為另一依賴 ATP 蛋白酶 Lon 之基質。由 1999 年 Wu 等人首度提出 RcsA 即為 ClpYQ 蛋白酶基質之證據，除觀察到大量表現

ClpYQ 蛋白酶可抑制菌體之 mucoid 表現型外，更進一步利用可受 RcsA 調控之 *cpsB::lacZ* 報告基因，藉由 *cpsB::lacZ* 表現 β -galactosidase 的活性，來觀察 ClpYQ 蛋白酶對 RcsA 之影響。實驗結果顯示由多倍數質體大量表現的 ClpYQ 蛋白酶會使得 *cpsB::lacZ* 表現下降為對照組的 20 倍 (Wu *et al.*, 1999)。2012 年，Hu 等人也藉由 *in vivo* 之半衰期及 *in vitro* 的水解試驗證明 ClpYQ 蛋白酶可分解 RcsA (胡, 2012)。

TraJ

TraJ 為 F 質體進行接合作用 (conjugation) 過程中的活化蛋白，大腸桿菌內膜上的 CpxAR 訊息傳導系統 (two-component regulatory system) 可感應外在逆境，提高部分伴隨蛋白、熱休克蛋白及 ClpYQ 之表現量，並對 TraJ 進行後轉譯修飾 (post-transcriptional inactivation) 減少細菌之接合作用。透過胞內及胞外降解試驗，發現 TraJ 能被 ClpYQ 蛋白酶水解。ClpYQ 與 CpxAR 共同調控 TraJ 在菌體內的含量 (Lau-Wong *et al.*, 2008)。

SulA

當 UV 光或是其他氧化物質使得大腸桿菌中的 DNA 受損時，細菌會啟動 SOS 反應，停止細胞分裂，直到 DNA 修補完成。當遺傳物質受損時，RecA 與單股 DNA 結合，促使 LexA 開始自我水解，LexA 釋放原先抑制的 SOS 基因上游結合位，使得 SOS 基因開始表現。其中 SOS 基因 *sfiA* 表現後轉譯成 SulA 為細胞分裂抑制蛋白，其胺基酸序列在腸道細菌中有高度保守性，分子量約 18 kDa。SulA 與 FtsZ 蛋白質結合，使後者無法聚合形成細胞分裂必須的 Z 環 (Z-ring)，達到停止細胞分裂的效果 (Bi & Lutkenhaus, 1990)。當 DNA 修復後，SulA 停止表現，並藉由 ClpYQ 及 Lon 蛋白酶將細胞內的 SulA 清除 (Mizusawa & Gottesman, 1983)。

根據實驗，Khattar 等人篩選到一質體可在 *lon*⁻ 突變株中可抑制 SOS 反應，進一步分析該質體中所帶的基因序列，確認能抑制 SOS 反應是由於 *clpQY* 操作

子大量表現所致。細胞型態結果亦顯示，*lon*⁻ 突變株中若帶有能表現 ClpYQ 蛋白之載體，細胞可正常分裂，促使原本因細胞不分裂而成絲狀的大腸桿菌細胞成為正常分裂的細胞，但若不帶有該載體，細胞則因無法細胞分裂而呈現絲狀，此絲狀細胞乃由於大量累積的 SulA 和 FtsZ 結合，抑制細胞分裂所致。以上結果說明在 Lon 蛋白酶不存在時，ClpYQ 蛋白酶可以分解 SulA (Khattar, 1997)。

四、 ClpYQ 之結構

ClpQ

ClpQ 由 176 個胺基酸構成，分子量約為 19 kDa。ClpQ 會聚合形成六元環單體，再由兩個六元環單體聚合形成十二元體。ClpQ 具有胜肽酶的功能，主要負責水解經由 ClpY 解開並運送進入的胜肽鏈。ClpQ 與真核生物的 20S proteasome 之 β -type subunit 具有 18% 之相似度，且在蛋白酶的分類上與 20S proteasome 同樣屬於 threonine protease，與 ClpP (屬於 serine protease) 不同 (Missiakas *et al.*, 1996, Bochtler *et al.*, 1997)。

ClpQ 在其單獨存在時活性不高，可緩慢的水解一些斥水性的胜肽 (Rohrwild *et al.*, 1996)，ClpQ 自身會形成六元環 (ClpQ₆)，再以兩個六元環聚合成啞鈴狀的十二元體 (ClpQ₁₂)，而其活性中心位於十二元體內部 (Bochtler *et al.*, 1997)，基質必須進入活性中心才能被分解。ClpQ 的活性胺基酸在蛋白質 N 端第二號胺基酸，因此需將 6xHis-tag 融合於 ClpQ C 端，才能純化出有活性的 ClpQ 蛋白。組成 ClpQ 的十二元體每個單體皆具有單一活性部位，所以 ClpQ 的十二元體具有十二個活性部位。在 2009 年的研究報告顯示，當 ClpQ 十二元體中具有正常 ClpQ 次單元的個數達六個以上時，可以維持與野生型 ClpQ 蛋白酶相同的降解活性，若個數不達六個時，其活性有逐漸下降的趨勢 (Lee *et al.*, 2009)。

ClpY

ClpY 蛋白質具有一個保守性的 AAA-2 module，為 ATPase，主要負責辨識基質，水解 ATP 協助 ClpQ 打開六元環的窄小孔洞，從原先的 10 Å 擴張至 19.3 Å (Wang *et al.*, 2001)，並將基質蛋白之結構打開後，透過孔洞傳送至 ClpQ 活性中心，分子量約 49 kDa。

ClpY 單體具有三個區塊 (domain) 分別為 N、C 及 I domain：N domain 有 197 個胺基酸 (2-109 及 244-332 a.a.)，此區域具有為 ATP 結合位及運送基質的 pore site，負責結合 ATP 並水解之，並透過 ClpY₆ 中心孔洞周圍之 G⁹⁰Y⁹¹V⁹²G⁹³ pore site 將基質送入中心孔洞；C domain 為 111 個胺基酸組成 (333-443 a.a.)，在結合 ATP 後產生形變而伸出 C 末端十個胺基酸與 ClpQ 產生交互作用，促使中央孔洞放大；而 I domain 介於 N、C domain 之間 (110-243 a.a.)，其結構鬆散而突出於 N、C domain 之外，在具有 AAA-2 同源序列的 ATP 依賴型蛋白酶中，此段序列是專屬於 ClpY 獨有的結構(附圖一) (Bochtler *et al.*, 2000; Gur *et al.*, 2013)，I domain 上的環狀結構 loop 1 & loop 2 被認為與基質之辨識結合有關(謝, 2012)。

ClpY₆Q₁₂ 複合體

ClpY 於 ATP 存在下能夠形成六元環 (ClpY₆)，ClpQ 在有無 ATP 下皆能形成六元環 (ClpQ₆) 並再堆疊成十二元環 (ClpQ₆Q₆)，生理狀態下最終以 ClpY₆Q₁₂ 的桶狀形式存在。前述之大腸桿菌 ATP 依賴型蛋白酶，如 Lon、FtsH、ClpAP 及 ClpXP 亦先形成環狀構造，再堆疊成桶狀構造，顯示此構型是 ATP 依賴型蛋白酶一大特徵。在電子顯微鏡下 ClpY 與 ClpQ 形成 ClpY₆Q₁₂ 的桶狀構造 (Rohrwild *et al.*, 1996)。結晶結構 (PDB：1G3I) 同樣展示 ClpYQ 蛋白酶以 ClpY₆Q₁₂Y₆ 的形式存在(如圖一) (Sousa *et al.*, 2000)，複合体外圍的 ClpY₆ 以藍色及綠色標示，其中夾著以紅色及黃色的 ClpQ₆Q₆。以上可知，在 ATP 存在下形成六元環的能力，對於 ClpYQ 蛋白酶複合體之組成及其功能是相當重要的。

五、 研究動機

針對 ClpY 形成六元環之原因，前人研究顯示，ClpY 第 408 個胺基酸酪胺酸 (Y) 對於 ClpY 六元環的形成有顯著影響，突變蛋白 ClpY Y408A 不論在有無 ATP 或是 ClpQ 的存在下，ClpY 幾乎無法形成六元環 (Hsieh *et al.*, 2011)。而序列比對指出，Y408 無論在原核或真核生物中均具有高度的保守性(附圖二、三，箭頭所指) (Couvreur *et al.*, 2002; Ruiz-Gonzalez & Marín, 2006)。本研究探討此胺基酸 Y408 對於 ClpY 形成六元環之影響。觀察 ClpY 結晶結構後，假設 Y408 胺基酸之側基大小是影響的關鍵因子。以此出發，建構一系列的側基由小到大的點突變蛋白，純化後觀察 ClpY 形成六元環的能力，另外在胞內實驗中，加入 ClpYQ 基質 SulA 測試 ClpYQ 蛋白酶是否因 ClpY 不易形成六元環而使蛋白酶活性降低，以確認大腸桿菌 ATP 依賴型蛋白 ClpY 形成六元環之關鍵胺基酸及其影響因子。

貳、材料與方法



一、實驗材料

(一) 菌株與質體

本研究使用之菌株與質體如表一、表二所示

選殖基因表現系統

以大腸桿菌菌株AC3112 (*lon⁻ clpY⁻ clpQ⁻*) 作為選殖基因表現的宿主細胞，而選殖基因表現之載體為pBAD24、pBAD33 及pTH18kr。其中pBAD24和pBAD33具有 *ara operon* 的啟動子P_{BAD} 及調控基因 *araC*，故可利用阿拉伯糖 (L-arabinose) 誘導目標基因的表現 (Guzman *et al.*, 1995)。而pTH18kr 質體在一細菌中的數量約3-5個，帶有啟動子P_{lac}，以IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) 誘導下游基因表現 (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 2000)。

蛋白質純化系統

大腸桿菌菌株 BL21 (DE3) 為 BL21 品系內帶有 DE3 lysogen 之突變株。DE3 lysogen 內含有受 P_{lac} 調控之 T7 RNA polymerase 基因。當以 IPTG 誘導 T7 RNA polymerase 的表現後，T7 RNA polymerase 會選擇性地轉錄受強力啟動子 T7 promoter 調控之基因。進一步將 BL21 (DE3) 染色體上之 *clpY* 及 *clpQ* 基因進行剔除後，作為純化 ClpY 及 ClpQ 蛋白質之宿主細胞，而 *clpY* 及 *clpQ* 基因表現之載體為 pET21a。於 *clpY* 5' 融合 6x His-tag 以方便純化，限制酶切位為 5' NdeI 及 3' HindIII 將帶有 6x His tag 的目標基因片段送入 pET21a 後，利用其帶有之 T7 promoter，得以被宿主誘導表現之 T7 RNA polymerase 辨識，進一步於細胞內累積帶有 ClpY 及其突變株之目標蛋白，以用於後續之蛋白質胞外實驗。



(二) 藥品與試劑

1. 培養基

LB (Luria-Bertani) 購自 BD Biosciences (U.S.A.)，用於一般大腸桿菌培養，並加入適量抗生素以篩選轉形株。抗生素濃度分別為 Ampicillin (100 mg/ml)、Kanamycin (25 mg/ml)、Chloramphenicol (34 mg/ml)；使用時以 1：1000 倍率稀釋使用。本論文中，一般大腸桿菌培養於 37°C，菌株 AC3112 則培養於 30°C。

2. 藥品、酵素及相關套組

藥品購自 Sigma (St. Louis, U.S.A.)、J.T. Baker (Phillipsburg, U.S.A.) 及生工公司(台北，台灣)。

限制酶、接合酶購自 TaKaRa (Kusarsu, Japan)

Plasmid DNA 純化套組

Mini-MTM Plasmid DNA Extraction kit (Viogene，富聯生物科技公司)

Gel-MTM Gel Extraction kit (Viogene，富聯生物科技公司)

Gel/PCR DNA Isolation kit (Viogene，富聯生物科技公司)

蛋白質純化套組

Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, U.S.A.)

Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Amicon, U.S.A.)

3. 核酸引子

ClpY 引子在 pBAD24 之 5' 帶有 EcoRI 切位而在 3 端帶有 HindIII 切位；在 pET21a 之 5' 帶有 NdeI 切位與加入 6xHis-tag 以便於純化，而在 3' 為

HindIII 切位。核酸引子由基龍米克斯合成，詳見表三。



(三) 器材設備

微量離心機 (Kubota KM-15200, 雙鷹公司, 台北, 台灣)。

冷凍超高速離心機 (CF 15D2, Hitachi, Japan)。

DNA 電泳槽 (major science, U.S.A.)。

蛋白質電泳槽 (Amersham, CA, U.S.A.)。

分光光度計 (Ultraspec 2000, Pharmacia, H.K.)。

全波長掃描式微盤分析儀 (SpectraMax 340PC³⁸⁴, CA, U.S.A.)。

超音波破碎機 (Vibra-CellTM, U.S.A.)。

膠體照相系統 G:BOX (Syngene, U.S.A.)。

蛋白質電泳槽 (Major Science, U.S.A.)

(四) 分析軟體

GeneSnap v. 6.08 (Syngene, U.S.A.)。

BioEdit Sequence Alignment Editor (BioEdit) v. 7.0.9.0。

Image J v.1.60 from NIH (National Institute of Health, U.S.A.)。

The PyMOL Molecular Graphics System V 1.3 (Schrodinger LLC.)。



二、 方法

(一) 目標基因選殖

1. 質體製備

Mini-preparation of plasmid DNA from bacteria (小量製備)

相關 Kits 購買自 Viogene，詳細實驗步驟參考套組之使用手冊。

2. 勝任細胞製備 (氯化鈣法)

1. 於 37°C 培養箱中培養隔夜菌體 (12-16 小時)。
2. 取 1 ml 菌液繼代於 100 ml LB 培養液，於 37°C 下重新震盪培養菌體至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.4-0.8。
3. 將菌液平均分裝至兩支離心管，冰浴 10 分鐘。自此步驟起均保持低溫操作。
4. 以 6000 rpm 在 4°C 下，離心 10 分鐘，移除上清液。
5. 每管以 1-2 ml 冰 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，再加入 3-5 ml 冰 0.1 M CaCl₂ 混勻，冰浴 30 分鐘。
6. 以 4000 rpm 在 4°C 下，離心 10 分鐘，移除上清液。
7. 重複步驟 5-6。
8. 每管加入 1 ml 冰 0.1 M CaCl₂/ 15% glycerol 懸浮菌體。
9. 每 100 μl 菌液分裝至菌種保存管中，儲存於 -80°C 冰箱。

3. 轉形作用

***E. coli* Heat shock transformation**

1. 取 50 μl 勝任細胞與 20 μl 質體接合反應 (ligation) 之產物，或 5 μl

少量製備的質體混合後，冰浴一小時。

2. 於 42°C 下，進行熱休克反應兩分鐘後，迅速置於冰上兩分鐘。
3. 加入 1 ml LB 液態培養基，於 37°C 培養箱中震盪培養一小時。
4. 以 6000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液，留下約 50 μ l 懸浮菌體。
5. 塗於含適當抗生素的培養基上，置於 37°C 培養箱培養隔夜。

TSS -Transformation

1. 取 30 μ l 隔夜培養菌液，繼代於 3 ml LB 液態培養基中，震盪培養菌體至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.6-0.8。
2. 將菌液以 3000 rpm，離心十分鐘，移除上清液。
3. 加入 0.3 ml 2X TSS 溶液將菌體懸浮，加入 5 μ l 少量製備的質體混合後，冰浴一小時。
4. 以 37°C 下，進行熱休克反應兩分鐘後，迅速置於冰上兩分鐘。
5. 加入 0.5 ml LB 液態培養基，於 30°C 培養箱中震盪培養一小時。
6. 以 6000 rpm 離心五分鐘，移除上清液，留下約 50 μ l 懸浮菌體。
7. 塗於含適當抗生素的培養基上，置於 30°C 培養箱培養隔夜。

2XTSS (Transformation and storage solution)	4°C 保存
PEG 8000 (Polyethylene glycol 8000)	20.0 g
1 M MgSO ₄	4.0 ml
加 LB 至總體積 190 ml，滅菌後再加入	190.0 ml
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	10.0 ml

4. 建構點突變蛋白

以 pET21a ClpY 作為模板，利用突變引子對 fw 及 rv 分別與 *clpY* 3' 及 5' 引子做第一次 PCR (polymerase chain reaction) 增幅(表三)。所得之產物以套組回收後，混合兩種片段作為新模板，以 *clpY* 3' 及 5' 引子做第二次 PCR，

所得二次產物同樣以套組回收後，利用限制酶截切，和以相同限制酵素截切製備之載體進行接合反應，再轉形至 *E. coli* XL1Blue 中進行初步篩選，最後萃取出質體經定序確認正確。



PCR 增幅反應

Template	1.0 μ l
10X Prime buffer	5.0 μ l
dNTP (10 mM)	1.0 μ l
Forward primer (5 μ M)	0.5 μ l
Reversed primer (5 μ M)	0.5 μ l
Prime DNA polymerase	0.5 μ l
ddH ₂ O	40.5 μ l
Total	50.0 μ l

PCR 反應條件

Denaturation	94°C : 10 min	
Denaturation	94°C : 1 min 30s	← 30 cycles
Annealing	48°C~55°C : 1 min	
Extension	72°C : 1 min 30s	
Extension	72°C : 10 min	
Stop	4°C : stop	

*Annealing 溫度依照引子的不同而有所差異，為 T_m 值減 5 度。

PCR 產物純化

將 PCR 產物以 Viogene Gel/PCR DNA isolation kit 回收。

限制酶截切反應 (Digestion)

取適量質體或 PCR 回收產物，加入選用之限制酶及其配合之緩衝液混

合均勻，於 37°C 水浴槽內反應，時間約 60 分鐘。反應完成後加入適量的追蹤染劑，進行 DNA 瓊脂電泳。



DNA 瓊脂膠體 (Agarose gel) 電泳

以 1X TAE 緩衝液配製 1.0% 的瓊脂膠體，以 100 伏特之電壓進行電泳。反應 35 分鐘後，利用 Ethidium Bromide (EtBr) 進行外染，經退染後再以紫外光觀察 DNA 產物。

回收電泳膠體之 DNA

進行 DNA 瓊脂膠體電泳，並經 EtBr 染色及退染後，使用長波長之紫外光源 (365 nm)，觀察 DNA 產物片段大小，並挖取欲回收之片段位置，使用 Viogene Gel - M Gel Extraction kit 回收 DNA。

50X TAE buffer

Tris base	242 g
Glacial acetic acid	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml

加水至總體積為 1 L，保存於室溫，使用前稀釋至 1X。

接合反應

透過接合酶將以相同限制酶截切製備而得之基因片段及載體接合，於 16°C 下反應 14~16 個小時，反應後保存於 4°C。

接合反應 (Ligation)

Vector DNA	3.0 µl
Insert DNA	13.0 µl
10X ligation buffer	2.0 µl

10mM ATP

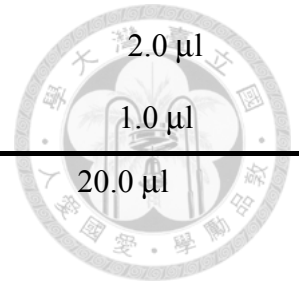
T4DNA Ligase (TaKaRa)

Total

2.0 μ l

1.0 μ l

20.0 μ l




選殖質體篩選及確認

將接合反應的反應物以前述轉形作用的方式轉形至 *E. coli*. XL1Blue 中，並塗抹於含適當抗生素之培養基上，以篩選具有質體的菌落。重新於菌體中純化出質體，並以適當的限制酵素截切，經瓊脂膠體電泳分析，初步確認 DNA 片段分子量大小，最後將萃出之質體委由基龍米克斯進行定序。

(二) 蛋白質純化

His-tag 蛋白質純化

1. 將 N 端帶有 6xHis-tag 之 *clpY* 及其於突變株送入 pET21a 中，並於大腸桿菌菌株 BL21 (DE3) *clpYQ*⁻ 中表現並加以純化。
2. 於 30°C 培養箱中隔夜培養菌體。
3. 將隔夜培養菌液以 1:100 繼代於含適當抗生素之 200 ml LB 液態培養基中，盪培養菌體約 2 小時，至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.4。
4. 加入終濃度 1 mM 之 IPTG，以誘導目標蛋白質表現，再繼續震盪培養 4 小時。
5. 於 4°C 以 4000 rpm 離心 15 分鐘，移除上清液。
6. 以 8 ml 冰的 wash buffer 懸浮菌體。視菌量多寡調整 buffer 量。
7. 在冰上以超音波震盪器(震盪 1 秒後暫停 1 秒，持續 2 分鐘後，於冰上靜置 1 分鐘) 將細胞打破。
8. 於 4°C 以 10,000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液備用。
9. 取 1 ml Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare) 到乾淨之管柱中，以 10 ml wash buffer 流洗平衡 resin。

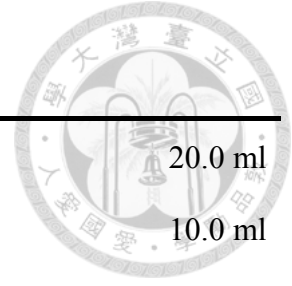
- 
10. 將上清液通過平衡完畢之管柱。
 11. 以 10 ml wash buffer 流洗 resin，去除非專一性結合之雜質。
 12. 以 5 ml elution buffer 流洗 resin，使結合於 resin 上之目標蛋白溶出，並收集通過管柱滴下之液體。
 13. 以 5 ml dH₂O 流洗 resin，使 resin 與 elution buffer 中之咪唑 (imidazole) 間結合力下降，以去除 elution buffer。
 14. 以 10 ml wash buffer 流洗 resin，重新平衡鹽離子濃度，再把清洗完畢之 resin 保存於 4°C。
 15. 於步驟 11 收集而得之產物，取 20 μl 與同體積之 2X SDS sample buffer 混合，於 100°C 加熱 10 分鐘，待其冷卻後以 SDS-PAGE 觀察結果。

5X Wash buffer

NaH ₂ PO ₄	3.0 g
NaCl	8.7 g
H ₂ O	150 ml
先溶解後，再加水至總體積為 200 ml，保存於 4°C	200 ml
需要時先稀釋至 1X，並調整其 pH 至 7.0，置於冰上備用。	

Elution buffer (pH 7.0)

NaH ₂ PO ₄	0.6 g
NaCl	1.74 g
Imidazole	2.72 g
H ₂ O	150 ml
溶解後，pH 調至 7.0，再加水至總體積為 200 ml，保存於 4°C	200 ml



2X SDS sample buffer

10% SDS	20.0 ml
Glycerol	10.0 ml
β -mercaptoethanol	5.0 ml
1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	6.25 ml
Bromophenol blue	1.25 mg
<hr/>	
加水至總體積為 50 ml，保存於室溫	50 ml

蛋白質濃縮

選定適合分子大小 (50 kDa) 的蛋白質濃縮過濾器 (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, Milipore)，以低溫離心的方式進行蛋白質濃縮，濃縮後以大量 storage buffer 置換原本的 elution buffer，體積比為 1：30，此步驟重複兩次以確保緩衝液置換完全。最後以微量吸管將蛋白溶液自濃縮過濾器中取出。

蛋白質定量

使用 Bradford 法，將蛋白質標準品牛血清蛋白 (BSA) 依所需要之濃度稀釋，在 96 孔盤中加入 Bradford 試劑 200 μ l 混合均勻，在室溫下放置 10 分鐘，以分光光度計測吸光值 A_{595} 繪製標準曲線，再將待測樣品值代入公式計算濃度。

蛋白質保存

蛋白質所存在之緩衝液置換成利於蛋白質保存之 storage buffer，使用濃縮管來進行緩衝液置換。

Storage buffer

0.5M HEPES	5.0 ml
1.0M MgCl ₂	1.0 ml
1.0M DTT (Dithiothreitol)	25.0 μl
65% Glycerol	7.7 ml
NaCl	0.88 g
H ₂ O	25 ml

先溶解後，調整 pH 至 7.4，再加水至總體積為 50 ml

(三) SDS 蛋白質膠體電泳

SDS-PAGE

含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液於 12.5% 的 SDS-PAGE 膠片中進行蛋白質電泳，視蛋白質分子量大小選擇適當的膠體濃度。用來檢查蛋白質純化程度，蛋白質定量精準度。

1. 鑄膠，適當隔絕空氣，避免膠體乾裂。
2. 100 伏特電泳十分鐘。
3. 再 120 伏特下電泳約兩小時，視蛋白質泳動速率決定電泳時間。
4. 電泳後將膠片以清水泡洗，去除 SDS。
5. 染色並脫色後，以 G:BOX 膠體照相系統建檔保存。

SDS-PAGE 電泳膠片 (12.5%)	Running gel	Stacking gel
H ₂ O	3.3 ml	3.4 ml
30% Acrylamide	4.0 ml	0.83 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	0 ml
1.0M Tris (pH 6.8)	0 ml	0.63 ml
10% SDS	0.1 ml	0.05 ml

10% APS	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml

此份量約可配製 0.75 mm 厚 10 X 7 cm 的膠片兩片。



30% 丙烯醯胺液 (Acrylamide)

40% Acrylamide / Bisacrylamide	75 ml
H ₂ O	25 ml

加蒸餾水至 100 mL，保存於 4°C。

5X 電泳槽緩衝液 (Chamber buffer)

Tris base	15.0 g
Glycine	72.0 g
SDS	5.0 g

先以 800 ml 蒸餾水溶解並調整 pH 至 8.3，加水至 1000 ml，保存於室溫。

使用時稀釋至 1X。

APS 溶液 (Ammonium persulfate)

APS	50.0 mg
-----	---------

加滅菌水 0.5 ml 溶解。每次使用前新鮮配置。

SDS-AGE

用來檢視聯結蛋白之分子量大小。含聯結蛋白的樣品溶液於 3% 的 SDS-AGE 膠片中進行蛋白質電泳，160 伏特電泳 90 分鐘。以 agarose 取代 Acrylamide/ Bisacrylamide，具備多種好處：可使用較少量之樣品，得到較清晰的色帶，且電泳時間較短，所需電壓也較小。採取水平電泳，膠體的厚度決定可以乘載的樣品體積，以 150 ml 為例，可乘載 25 μ l 的樣品。

1. 當溶解洋菜顆粒以微波爐加熱時應避免溶液溢出，加熱後靜置一段時間，待氣泡消滅再倒入鑄膠槽中。採用 14*15 cm² 的鑄膠槽。

2. 160 伏特電泳 90 分鐘，視蛋白質泳動速率決定電泳時間。
3. 電泳後將膠片以清水泡洗，去除 SDS。
4. 染色並脫色後，以 G:BOX 膠體照相系統建檔保存。



SDS-AGE 電泳膠片(3%)	Running gel
TAE beffer	150 ml
Agarose	4.5 g
10% SDS	0.1 ml

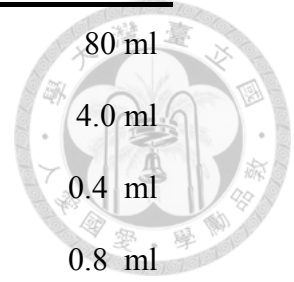
(四) 蛋白質聯結測試 (cross-linking analysis)

為了解 ClpY 蛋白的生理狀態，以緩衝液模擬生理環境，並加入 ATP γ S 模仿 ATP 分子，藉由戊二醛 (glutaraldehyde) 兩端之醛基，將兩個氨基以共價鍵聯結起來，如此便可以將 ClpY 蛋白質在此模擬環境中的生理狀態固定。在此，以蛋白質膠體電泳將大小不同的蛋白質分開來，以分子量判定 ClpY 蛋白質形成六元環或其他多元體的狀況。

1. 將 ClpY (6 μ M)、ClpQ (6 μ M) 與 1 mM ATP γ S 加入 degradation buffer 中，總體積為 40 μ l。ATP γ S 應統一最晚加入。
2. 於 37°C 水浴槽中培養五分鐘。
3. 加入戊二醛，使反應液戊二醛終濃度為 0.4%。加入時需強力震盪均勻。
4. 於 37°C 水浴槽中再培養 20 分鐘進行聯結反應。
5. 加入 10 μ l 2XE SDS-PAGE sample buffer。
6. 進行蛋白質膠體電泳 (SDS-AGE)。

4X Degradation buffer

0.5 M HEPES	80 ml
1.0 M MgCl ₂	4.0 ml
1.0 M DTT (Dithiothreitol)	0.4 ml
0.5 M EDTA	0.8 ml
H ₂ O	50 ml
先溶解後，再加水至總體積為 100 ml，保存於 4 °C	100 ml



(五) 細菌生理活性分析

本實驗中以 5' EcoRI 及 3' HindIII 將 *clpY* 及其突變株建構於 pBAD24，並共轉形入 pBAD33 ClpQ 及 pTH18kr HA-SulA 或 pTH18kr 3xFLAG-SulA，細菌生長時以阿拉伯糖大量誘導 ClpYQ 蛋白質，以 IPTG 誘導 tag-SulA，觀察生長於盤上之表現型。

1. 於大腸桿菌 AC3112 中共轉形 pBAD33 ClpQ、pBAD24 ClpY 或其突變株及 pTH18kr HA-SulA 或 pTH18kr 3xFLAG-SulA。以 pBAD33 ClpQ、pBAD24 及 pTH18kr HA-SulA 或 pTH18kr 3xFLAG-SulA 作為質體控制組。
2. 隔夜培養於含有 1/2 Amp、1/2 Cm、1/2 Kan 的 LB 培養基中。
3. 當日，測定 OD₆₀₀，取同樣濃度之菌液繼代培養。
4. 繼代培養於含有 1/2 Amp、1/2 Cm、1/2 Kan 的 LB 培養基中，並額外加入終濃度 0.5% 之阿拉伯糖。
5. 30 °C 培養至 OD₆₀₀ 為 0.2，加入終濃度 1mM IPTG 誘導 HA-SulA 表現。
6. 加入 IPTG 後 2 小時，取 10 µl 菌液於 96 孔盤中，利用八爪為量分注器，以 M9 minimal medium 序列稀釋菌液至 10⁻⁸，滴於 1/2 ACK 盤

上培養於 30 °C。

7. 培養一天後掃描存檔。



(六) 細菌液態培養密度測定

本實驗中以 5' EcoRI 及 3' HindIII 將 *clpY* 及其突變株建構於 pBAD24，並共轉形入 pBAD33 ClpQ，細菌生長時以阿拉伯糖大量誘導 ClpYQ 蛋白質，觀察 ClpYQ 蛋白質對細菌密度之影響。

1. 共轉形 pBAD33 ClpQ、pBAD24 ClpY 或其突變株於大腸桿菌 AC3112 中。
2. 隔夜培養於含有 1/2 Amp、1/2 Cm 的 LB 培養基中。
3. 當日，測定 OD₆₀₀，取同樣濃度之菌液繼代培養。
4. 繼代培養於含有 1/2 Amp、1/2 Cm 的 LB 培養基中，並額外加入終濃度 0.5% 之阿拉伯糖。
5. 30°C 培養 24 小時
6. 測量 OD₆₀₀ 讀值。

參、結果



一、以軟體預測影響六元環形成之成因

本研究欲了解 ClpY 蛋白形成六元環之因素。由於前人研究顯示，ClpY 第 408 個胺基酸酪胺酸 (Y408) 對於 ClpY 六元環的形成有顯著影響，野生型蛋白於 ATP 存在下能夠形成六元環；但是突變蛋白 ClpY Y408A 不論在有無 ATP 或是 ClpQ 的存在下，形成六元環的能力都較野生型蛋白為差 (Hsieh *et al.*, 2011)。而 ClpY 胺基酸序列比對中，Y408 的位置不論在原核或真核生物中皆為高度保守性 (Couvreur *et al.*, 2002; Ruiz-Gonzalez & Marín, 2006)。因此先以電腦軟體檢視 ClpY 蛋白的結晶結構，並聚焦於 Y408 胺基酸。

圖一為 PyMol V. 1.3 版本檢視蛋白質結晶結構 1G3I 的卡通圖 (Sousa *et al.*, 2000)，ClpY₆Q₆Q₆Y₆ 中兩組 ClpY₆ 分別為藍色及綠色在啞鈴形桶狀構造之蛋白酶外圍，而 ClpQ₆Q₆ 則是內部之淡黃色及紅色六元環。大腸桿菌 ClpY 蛋白結晶結構為 1E94 (圖二) (Song *et al.*, 2000)，將 ClpY 單體 N domain 標示成綠色，C domain 標示成橘色，I domain 標示成淺藍色。由於 I domain 上的 loop 2 經研究顯示為基質結合區 (謝, 2012)，其結構較為鬆散而無法在結晶結構下觀察到構型，因此以 Adobe Photoshop CS3 加上淡紫色虛線示意線(圖二)。附以仰視角度觀察 ClpY₆ 示意圖(如圖三，綠色為 N domain，橘色為 C domain)，則可以發現相鄰之 ClpY 蛋白是以 ClpY_{#1} C domain 與 ClpY_{#2} 之 N domain 相鄰。聚焦於 ClpY_{#1} Y408 及其附近之胺基酸(圖四 A)，可發現相鄰之 ClpY_{#2} R7 及 ClpY_{#2} R25 (淡藍色) (R, arginine, 精胺酸) 將 Y408 (綠色) 包夾於其中，經 PyMol 測量 R25 與 Y408 兩個胺基酸相當靠近，其側基上任意碳原子核最近為 3.7 Å 最遠為 5.0 Å，且 R25 與 Y408 不論在 ATP (圖四 A)或 ADP (圖四 B) 狀態下都相當接近，又 Y408 胺基酸側基為非極性的苯環，且 R25 胺基酸側基之碳鏈亦較其他胺基酸

為長，因此推測 R25 與 Y408 間有非極性之凡得瓦爾力，協助 ClpY 形成六元環。以側視角度觀察 ClpY 蛋白單體表面構造(圖五)，相較於附近其他的胺基酸，R7、R25 及 Y408 凸出於 ClpY 單體外，R7 與 R25 甚至形成小孔構造，此構造可能用來嵌合 Y408。

綜合以上，推測因為 Y408 之胺基酸側基較大，能與 R25 產生足夠的凡得瓦爾力鍵結，為 ClpY 形成六元環穩定力量之一。故以二次 PCR 的方式，選殖 ClpY 點突變株，測試 Y408 之胺基酸側基對 ClpY 六元環之形成及 ClpYQ 蛋白酶活性之影響。本次研究挑選非極性胺基酸，側基由小到大共選殖 Y408V、Y408L、Y408M 與 Y408W 之單突變蛋白及 R25A/Y408A 雙突變蛋白，另建構 Y40C，此胺基酸側基為小的極性胺基酸，加上前人建構之 Y408A，將作為本次實驗的主要材料。利用 PyMol 中 Mutagenesis 功能預測上述點突變胺基酸在 ClpY 結晶結構中與鄰近胺基酸 R25 的相對位置，如圖六所示。

二、 確認 ClpY 及其突變株之六元環形成能力

利用親和性膠體純化 ClpY 及其突變蛋白(如圖七)，更換緩衝液並濃縮後，以 Bradford 法測定蛋白質濃度，最後取定量 6 μ M 的 ClpY 蛋白質，以 SDS-PAGE 檢驗定量取量是否正確(如圖八)。確認步驟完成後，同樣取定量 6 μ M 的 ClpY 蛋白質，並培養於 degradation buffer 中，加入 ATP 類似物 ATP γ S，ATPase 無法水解 ATP γ S，使得 ClpY 的生理狀態維持在 ATP 存在時的構型，以戊二醛 (glutaraldehyde) 將此生理狀態之構型固定，並進行 SDS-PAGE 膠體電泳，以分子量大小確認 ClpY 及其突變蛋白形成六元環之能力。

如圖八及圖九所示，將蛋白質聯結後，可以看到 ClpY Y408C (圖九 lane 5-8) 及 ClpY Y408L (圖十 lane 5-8) 不論在有無 ATP γ S 或是 ClpQ 的狀況下，形成六元體的能力皆較野生型蛋白為差 (圖九 lane 1-4、圖十 lane 1-4)，且多以單體及雙體 (ClpY₂) 的形式存在；而 ClpY Y408W (圖九 lane 9-12) 則在有 ATP γ S 的狀

態下有較野生型好的結合能力，符合色胺酸 (W) 側基比酪胺酸 (Y) 側基大的趨勢。另外建構之雙突變蛋白 ClpY R25A/Y408A，是將靠近 Y408 的 R25 之側基也縮小，試著了解是否對六元環的形成有影響，結果顯示(圖十 lane 9-12)，ClpY R25A/Y408A 在有 ATP γ S 以及 ClpQ 的狀態下都無法形成六元體，幾乎所有蛋白都在雙體 (ClpY₂) 形態出現。

使用 Image J v.1.60 測量突變蛋白六元環之量。若野生型蛋白為 100%，則突變蛋白 Y408C、Y408L、Y408W、R25A/Y408A 依序為 45.0%、67.9%、153%、32.1%，符合先前預測趨勢，即當胺基酸側基愈小，則 ClpY 形成六元環的能力便愈弱。推測可能成因是，側基愈小與鄰近胺基酸產生之凡得瓦爾力愈弱，因此愈難形成六元環。

三、胞內 ClpYQ 蛋白酶生理活性測試

桶狀構造對於 ClpYQ 蛋白酶分解基質是必須的，利用前人建構之 pTH18kr HA-SulA，並依序將 pBAD33 ClpQ 及 pBAD24 ClpY 共同轉形至 AC3112 (*lon⁻ clpYQ⁻*) 中，因為 SulA 同樣是 Lon 之基質，需要將 *lon* 移除才能確認細菌之表現型，是否為 ClpYQ 蛋白酶活性所造成的影響。在 HA-SulA 大量誘導下，大腸桿菌無法分裂，從而抑制細胞生長。若 ClpYQ 蛋白正常作用，在大量表現下能夠使得細菌正常生長，然而 *in vitro* 的實驗中，某些 ClpY 突變株形成六元環的能力較差，此處實驗將測試形成 ClpY 六元環的能力是否影響 ClpYQ 蛋白酶的活性，從而顯現於生長與否的表現型。

把 pBAD33 ClpQ、pTH18kr HA-SulA 及 pBAD24 ClpY 與其突變型，依序共轉形至大腸桿菌 AC3112 中。培養於適當培養基中，並加入終濃度 0.5% 之阿拉伯糖，培養至 OD₆₀₀ 為 0.2 時，加入終濃度 1mM IPTG 誘導 HA-SulA 表現，此 SulA 具有生理活性，若沒有被 ClpYQ 分解，則會抑制細胞分裂。加入 IPTG 後 2 小時，序列稀釋菌液至 10⁻⁸，滴於 1/2 ACK 盤上，培養於 30°C。

如圖十一所示，由上到下之 ClpY 基因型分別為野生型(Wt)、質體控制組 1(S)、質體控制組 2 (QS)、R25A/Y408A (AA)、Y408A (A)、Y408C (C)、Y408V (V)、Y408L (L)、Y408M (M) 及 Y408W (W)。質體控制組 1 (S) 中的基因型為 pBAD33、pBAD24 及 pTH18kr HA-SulA，質體控制組 2 (QS) 的基因型為 pBAD33 ClpQ、pBAD24 及 pTH18kr HA-SulA。圖十一左是培養兩小時尚未添加 IPTG 誘導 HA-SulA 表現之控制組，圖十一右為添加 IPTG 誘導 HA-SulA 表現兩小時之實驗組。

圖十一左可以觀察到尚未以 IPTG 誘導 HA-SulA 時，細菌的生長並不會受到大量誘導 ClpYQ 的影響，ClpY 野生型蛋白及突變株都能夠生長至 10^8 。圖三右全體之生長狀態依序為 Wt : 10^8 、S : 10^6 、QS : 10^6 、AA : 10^5 、A : 10^6 、C : 10^6 、V : 10^6 、L : 10^6 、M : 10^7 及 W : 10^8 ，其趨勢如同側基大小，若側基愈大，則細菌生長狀態愈好，代表 ClpYQ 蛋白酶之活性愈好。綜合以上結果顯示，ClpY 第 408 個胺基酸的側基大小，漸進的影響了 ClpY 六元環的形成及其活性。然而，AA 雙點突變株的生長甚至較質體控制組 1、2 為差，暗示著有另外的機制在影響細菌之生長。

四、 ClpYQ 蛋白酶與基質對細菌生長之影響

利用前人建構之 pTH18kr 3xFLAG-SulA 作為 ClpYQ 蛋白酶之基質，前人利用 3xFLAG-SulA 作為基質以西方氏點墨法研究 ClpYQ 與基質的關係(陳, 2010)。然而此基質在大腸桿菌 AC3112 中並沒有如 HA-SulA 顯著之生理活性，如圖十二 A 所示，質體控制組 (QS) 所帶的基因型為 pBAD33 ClpQ、pBAD24 及 pTH18kr 3xFLAG-SulA，在 IPTG 誘導下，細菌生長並沒有受到影響。故以此作為 ClpYQ 蛋白酶之基質，研究 ClpY 六元環之形成能力並與基質共存時，是否影響細菌的生長情形。

結果如圖十二 B 所示，由上至下分別為野生型 (Wt)、Y408A (A)、Y408C (C)、

Y408V (V)、Y408L (L)、Y408M (M) 、Y408W (W) 及 R25A/Y408A (AA)。圖十二 B 左顯示若大腸桿菌 AC3112 中不帶有 pTH18kr 3xFLAG-SulA，只以阿拉伯糖大量誘導 ClpQ 及 ClpY 或突變株，對於細菌之生長並不會受到影響。然而當以阿拉伯糖大量誘導 ClpQ 及 ClpY 或突變株，並以 IPTG 誘導帶有 pTH18kr 3xFLAG-SulA 之大腸桿菌時，AC3112 的生長表現型隨著 ClpY 蛋白形成六元環的能力成正相關，換句話說，ClpY 形成六元環的能力愈差者，細菌的生長能力愈差。生長狀態依序為 Wt: 10^8 、A: 10^6 、C: 10^6 、V: 10^6 、L: 10^6 、M: 10^7 、W: 10^8 及 AA: 10^4 。顯示 ClpYQ 蛋白酶與基質共同存在時，ClpY 六元環形成的能力，與細菌生長狀態成正相關。

五、 ClpYQ 蛋白酶對液態培養的細菌密度之影響

若以液態培養基培養 AC3112 pBAD33-ClpQ pBAD24-ClpY 及其突變株而不含有 pTH18kr 3xFLAG-SulA，以阿拉伯糖大量誘導 ClpYQ，並記錄其 24 小時停滯期 (stationary phase) 的 OD₆₀₀ 讀值。此時菌體內仍有少量 ClpYQ 之基質，如 RpoH 等已知或未知的基質。結果如圖十三所示，若誘導 ClpY 野生型蛋白 (Wt) 與 ClpQ，其 OD₆₀₀ 讀值為 4.08，其於突變株依序為 R25A/Y408A (1.84)、Y408A (2.06)、Y408V (2.28)、Y408L (2.49) 及 Y408M (2.94)。此觀察顯示 ClpY 六元環的形成能力，會略為影響大腸桿菌 AC3112 在液態培養基中的細菌密度，而 ClpY 形成六元環的能力愈強，則液態培養中的細菌密度愈高。

肆、討論



本研究以純化蛋白質操作之胞外聯結反應，以由小到大之胺基酸點突變證明 Y408 之側基大小是 ClpY 蛋白質在 ATP 存在下形成六元環之關鍵。相較於其他胺基酸，酪胺酸及精胺酸的側基是較大的，推測較大的胺基酸側基能夠形成較足夠的凡德瓦爾力，與鄰近的單體產生交互作用；亦可能是 Y408 苯環中的極性區域吸引了鄰近帶正電之 R7 及 R25，從而造成小孔洞的產生(如圖五)，接著嵌合住 Y408，以牢固 ClpY 之六元環。

由上述延伸，希望了解 ClpY 六元環形成與否，以胞內試驗觀察其對細菌之生理活性之影響。利用具抑制細菌生長之 HA-SulA 蛋白，測試 ClpYQ 蛋白酶之活性，能夠觀察到與胞外聯結試驗相同的趨勢，當 ClpY 側基愈小，細菌生長的能力愈差，推論是因為 ClpY 無法形成六元環，導致細菌中的 HA-SulA 蛋白沒有辦法被 ClpYQ 蛋白酶分解，因此抑制細菌生長。但是雙點突變株 (ClpY R25A/Y408A)之生長狀況比質體控制組略差，暗示除了因 SulA 本身抑制細菌生長外，無法形成六元環的 ClpY 與基質會造成其他機制影響細菌之生長。

因為 3xFLAG-SulA 不具抑制細菌生長的活性，故以此作為 ClpYQ 蛋白酶基質時，可觀察 ClpYQ 蛋白酶與基質共同存在時對細菌生長之影響。結果細菌之生長趨勢亦如 ClpY 之側基大小成正相關，即是與 ClpY 形成六元環的能力成正相關，由於 3xFLAG-SulA 不具抑制細菌生長的活性，推論當 ClpY 之側基愈大，則 ClpY 愈能形成六元環，也愈能將 3xFLAG-SulA 水解。由於 ClpY 不易形成六元環時，ClpY 與基質之結合能力是較佳的(尚未發表)。因此推測，ClpY 可能與基質結合但未分解時，會造成未知的機制使細菌生長受抑制。

若不大量誘導 ClpYQ 蛋白酶基質，紀錄液態培養時細菌密度的差異，可觀察到和 ClpY 側基大小相同之趨勢，如圖十三所示，ClpY 之側基愈大細菌在停滯期的密度愈高。而此現象無法在序列稀釋滴盤實驗中顯現(如圖十二左)，原因

應為過程中的序列稀釋，將微量的細菌密度差異減少而無從顯現。

綜合以上，ClpYQ 蛋白酶與其基質共同存在於細菌體時，會造成細菌生長受到影響，而趨勢恰與 ClpY 側基大小，即形成六元環的能力成正相關。不論是誘導 ClpY、ClpQ 及 3xFLAG-SulA 在滴盤實驗中所見相差 1000 倍的生長狀況，亦或是只大量誘導 ClpY 及 ClpQ 時，細菌在液態培養基中細菌密度的些微差異，皆暗示 ClpYQ 蛋白酶與其基質共同存在於細菌體時，會造成細菌生長受到影響，其趨勢為 ClpY 較無法形成六元環時，細菌生長受較大的抑制。此新現象推測是 ClpYQ 蛋白參與未知的調控有關。然而此未知的調控機制尚需更進一步深入之研究。

本實驗建構之一系列突變株，可用以互相印證以探索 ClpY 蛋白在細菌中未知的角色。由於 ClpY 蛋白形成六元環需要 ATP 的參與，若沒有 ATP 存在，ClpY 將以單體及雙體 (ClpY₂) 的型式存在於細菌體內，如圖九 (lane 1)。再者，ClpY 蛋白需要水解 ATP 後把基質打開，傳送單一多肽鏈進入中央孔洞，運送基質給 ClpQ 蛋白水解，在 2005 年的報告中，Martin 等人將六個 ClpX 單體建構在同一條多肽上，在此，ATP 單純被水解而用來解構基質，不需幫助 ClpX 形成六元環，因為六元環已經由人工生成，並依序利用突變減少其中一個、兩個至五個單體上 ATPase 的能力，確認不論 ClpX 六元環上的具完好 ATPase 之單體有幾個，ClpXP 分解基質所使用的總 ATP 含量是固定的，而分解效率和 ClpX 六元環上的完好 ATPase 之單體數量成正比 (Martin *et al.*, 2005)。綜合以上，ATP 對 ATP 依賴型蛋白酶的角色有二：協助六元環的形成及幫助水解基質。

前人以 CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) 阻斷 ATP 的合成以研究 ATP 對 ClpXP 分解 RpoS 造成的影響 (Peterson *et al.*, 2012)，因為添加 CCCP 後，細菌無法合成 ATP 可能造成許多生理功能失效，影響層面廣泛，只能短時間內聚焦於 ATP 對 ClpXP 之影響，長時間觀察便難以確認是 ATP 對 ClpXP 的影響或是 ATP 造成其他影響而改變觀察結果。

完全抑制 ATP 生合成(如加入 CCCP) 對細菌而言是很大的生長限制，若欲

研究本實驗中發現的新現象，則需要把受 ATP 缺乏直接造成的生長限制，與 ATP 缺乏使 ClpY 無法形成六元環且與基質共存時，所間接造成的生長限制區分開來。則可利用雙突變株 ClpY R25A/Y408A，因為在 ATP γ S 存在下，主要都形成 ClpY₂ 的形式，其型態相同於缺乏 ATP 之野生型 ClpY 蛋白之生理狀態。故可以在 ATP 充足不影響細菌生長下，模擬細菌缺乏 ATP 的狀態，探討 ClpY 蛋白質形成雙體並與基質共存時，對細菌生長造成之影響，配合一系列側基大小不同之突變株交互印證，更能確認 ClpY 蛋白質形成六元環與否對細菌生長之差異。

伍、 結論



本實驗針對 ClpY Y408 建構一系列由小到大之點突變，研究此胺基酸對 ClpY 蛋白形成六元環之影響，發現若此胺基酸之側基愈小 ClpY 愈不易形成六元環。進一步此現象對 ClpYQ 生理活性之影響，以會抑制細菌生長的 HA-SulA 作為基質，觀察到細菌生長能力與 ClpY 形成六元環的能力成正相關，但在 ClpY R25A/Y408A 這個無法形成六元環的雙突變蛋白菌株中，甚至觀察到比控制組為差的生長狀況。故以不具抑制細菌生長效果的 3xFLAG-SulA 作為基質，同樣觀察到細菌生長能力與 ClpY 形成六元環的能力成正相關，對比控制組可知當有不易形成六元環之 ClpY 及其基質共同存在於細菌體內時，會造成細菌生長受抑制。液態培養下停滯期的細菌密度亦有相同的趨勢。由以上顯示，ClpY Y408 胺基酸之側基大小將影響 ClpY 六元環之形成，並影響 ClpYQ 蛋白酶之功能。

陸、參考文獻



- 陳郁君 (2010) 大腸桿菌熱休克蛋白酶 ClpYQ 分解基質之研究 (國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 黃齡誼 (2011) 大腸桿菌 ClpYQ 蛋白酶透過 ClpY 對其基質 SulA 進行辨識、解構及轉送至蛋白酶活性區之研究 (國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 胡惠婷 (2012) 大腸桿菌莢膜生合成調節蛋白 RcsA 為 ClpYQ 蛋白酶的基質之研究 (國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 謝汎擎 (2012) 大腸桿菌 ClpYQ 蛋白酶之 ClpY I domain 區域雙環構造與孔洞區所扮演角色 (國立臺灣大學農業化學研究所博士論文)
- Bi, E. R. F. E. I., & Lutkenhaus, J. (1990). Analysis of *ftsZ* mutations that confer resistance to the cell division inhibitor SulA (SfiA). *Journal of bacteriology*, 172(10), 5602-5609.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., & Huber, R. (1997). Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proceedings of the national academy of sciences*, 94(12), 6070-6074.
- Bochtler, M., C. Hartmann, H. K. Song, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik & R. Huber, (2000) The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. *Nature*, 403, 800-805.
- Bove, P., Capozzi, V., Garofalo, C., Rieu, A., Spano, G., & Fiocco, D. (2012). Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiological research*, 167(4), 187-193.
- Chauleau, M., Mora, L., Serba, J., & de Zamaroczy, M. (2011). FtsH-dependent processing of RNase colicins D and E3 means that only the cytotoxic domains are imported into the cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 29397-29407.
- Chuang, S. E., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Daniels, D. L. & Blattner, F. R. (1993). Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene*, 134(1), 1-6.
- Couvreur, B., Wattiez, R., Bollen, A., Falmagne, P., Le Ray, D., & Dujardin, J. C. (2002). Eubacterial HslV and HslU subunits homologs in primordial eukaryotes. *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2110-2117.
- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11(1), 1-12.

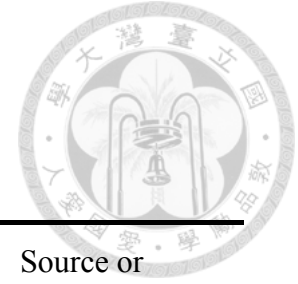
- Dougan, D. A., Micevski, D., & Truscott, K. N. (2012). The N-end rule pathway: From recognition by N-recognins, to destruction by AAA⁺ proteases. *Biochimica et biophysica acta (BBA)- Molecular cell research*, 1823(1), 83-91.
- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R., Dougan, D. A., & Bukau, B. (2006). ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature*, 439(7077), 753-756.
- Gottesman, S., Halpern, E., & Trisler, P. (1981). Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 148(1), 265-273.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., & Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes & development*, 12(9), 1338-1347.
- Guisbert, E., Herman, C., Lu, C. Z., & Gross, C. A. (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes & development*, 18(22), 2812-2821.
- Gur, E. (2013). The Lon AAA⁺ protease. *In regulated proteolysis in microorganisms* (pp. 35-51). Springer Netherlands.
- Gur, E., Ottofueiling, R., & Dougan, D. A. (2013). Machines of destruction: AAA⁺ proteases and the adaptors that control them. *In regulated proteolysis in microorganisms* (pp. 3-33). Springer Netherlands.
- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*, 177, 4121-4130.
- Hanson, P. I., & Whiteheart, S. W. (2005). AAA⁺ proteins: have engine, will work. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(7), 519-529.
- Hashimoto-Gotoh, T., Yamaguchi, M., Yasojima, K., Tsujimura, A., Wakabayashi, Y. & Watanabe, Y. (2000). A set of temperature sensitive-replication/-segregation and temperature resistant plasmid vectors with different copy numbers and in an isogenic background (chloramphenicol, kanamycin, lacZ, repA, par, polA). *Gene*, 241(1), 185-191.
- Howard-Flanders, P., Simson, E., & Theriot, L. (1964). A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, 49(2), 237.
- Hsieh, F. C., Chen, C. T., Weng, Y. T., Peng, S. S., Chen, Y. C., Huang, L. Y., & Wu, W. F. (2011). Stepwise Activity of ClpY (HslU) Mutants in the Processive Degradation of *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) Protease Substrates. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5465-5476.

- Keiler K. C., Waller P. R., & Sauer R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, 271(5251), 990–993
- Kuo, M. S., Chen, K. P. & Wu, W. F. (2004). Regulation of RcsA by the ClpYQ (HslUV) protease in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150(Pt 2), 437-446.
- Khattar, M. M. (1997). Overexpression of the hslVU operon suppresses SOS-mediated inhibition of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS letters*, 414(2), 402-404.
- Lau-Wong, I. C., Locke, T., Ellison, M. J., Raivio, T. L., & Frost, L. S. (2008). Activation of the Cpx regulon destabilizes the F plasmid transfer activator, TraJ, via the HslVU protease in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 67(3), 516-527.
- Lee, J. W., Park, E., Jeong, M. S., Jeon, Y. J., Eom, S. H., Seol, J. H., & Chung, C. H. (2009). HslVU ATP-dependent protease utilizes maximally six among twelve threonine active sites during proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), 33475-33484.
- Peterson, C. N., Levchenko, I., Rabinowitz, J. D., Baker, T. A., & Silhavy, T. J. (2012). RpoS proteolysis is controlled directly by ATP levels in *Escherichia coli*. *Genes & development*, 26(6), 548-553.
- Martin A., Baker T. A., & Sauer R. T. (2005). Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature*, 437(7062), 1115–1120
- Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J. M., Georgopoulos, C., & Raina, S. (1996). Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 15(24), 6899.
- Mizusawa, S. & Gottesman, S. (1983). Protein degradation in *Escherichia coli*: the lon gene controls the stability of sulA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2), 358-362.
- Murakami, K., Voellmy, R., & Goldberg, A. L. (1979). Protein degradation is stimulated by ATP in extracts of *Escherichia coli*. *Journal of biological chemistry*, 254(17), 8194-8200.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., & Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome research*, 9(1), 27-43.
- Okuno, T., & Ogura, T. (2013). FtsH protease-mediated regulation of various cellular functions. *In regulated proteolysis in microorganisms* (pp. 53-69). Springer Netherlands.
- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzaki, T., Karata, K., Young, K., Su, L. H., Fierke,

- C. A., Jackman, J. E., Raetz, C. R. H., Coleman, J., Tomoyasu, T., & Matsuzawa, H. (1999). Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 31(3), 833-844.
- Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H. C., Moerschell, R. P., Yoo, S. J., Seol, J. H., & Goldberg, A. L. (1996). HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proceedings of the national academy of sciences*, 93(12), 5808-5813.
- Ruiz-Gonzalez, M. X., & Marín, I. (2006). Proteasome-related HslU and HslV genes typical of eubacteria are widespread in eukaryotes. *Journal of molecular evolution*, 63(4), 504-512.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A., & Lindquist, S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in biochemical sciences*, 21(8), 289-296.
- Song, H. K., Hartmann, C., Ramachandran, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L., & Huber, R. (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14103-14108.
- Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S., & McKay, D. B. (2000). Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell*, 103(4), 633-643.
- Straus D. B., Walter W. A., & Gross C. A. (1987). The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature*, 329(6137), 348-351
- Torres-Cabassa, A. S., & Gottesman, S. (1987). Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *Journal of bacteriology*, 169(3), 981-989.
- Wang, J., J. J. Song, I. S. Seong, M. C. Franklin, S. Kamtekar, S. H. Eom & C. H. Chung, (2001) Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HslU. *Structure*, 9, 1107-1116.
- Wu, W. F., Zhou, Y. N. & Gottesman, S. (1999). Redundant in vivo proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) Protease. *Journal of bacteriology*, 181, 3681-3687.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the national academy of sciences*, 93(22), 12142-12149.
- Varshavsky, A. (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein science*, 20(8), 1298-1345.
- Yura, T., Nagai, H., & Mori, H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annual reviews in microbiology*, 47(1), 321-350.

表一、本論文所使用的菌株

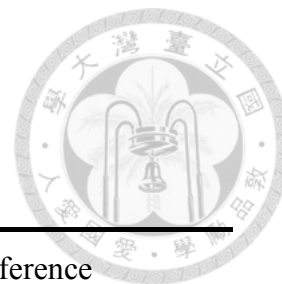
Table 1. Strains used in this study.



Strains	Description	Source or Reference
<i>Escherichia coli</i> strains		
XL1Blue	<i>recA1 endA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15</i> Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
BL21 (DE3) <i>clpQY</i>	<i>ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm, clpY, clpQ</i>	黃 (2010)
AC3112	MC4100 <i>lon⁻ clpQ⁻ clpY tet^r cpsB-lacZ</i> <i>Δara mal::lacI^Q</i>	Kuo <i>et al.</i> (2004)

表二、本論文所使用的質體

Table 2. Plasmids used in this study.



Plasmids	Description	Source and Reference
Protein purification system		
pET21(a)	<i>ori</i> (pBR322) T7 promoter amp ^r	Novagen
<i>Escherichia coli</i> expression system		
pBAD24	<i>ori</i> (pBR322) <i>araC</i> P _{BAD} amp ^r	Guzmen <i>et al.</i> (1995)
pBAD33	<i>ori</i> (pACYC184) <i>araC</i> P _{BAD} cm ^r	Guzmen <i>et al.</i> (1995)
pTH18kr	<i>ori</i> (pSC101) P _{lac} kan ^r	Hashimoto-Gotoh <i>et al.</i> (2000)

表三、本論文所使用的引子對

Table 3. Primers used in this study.

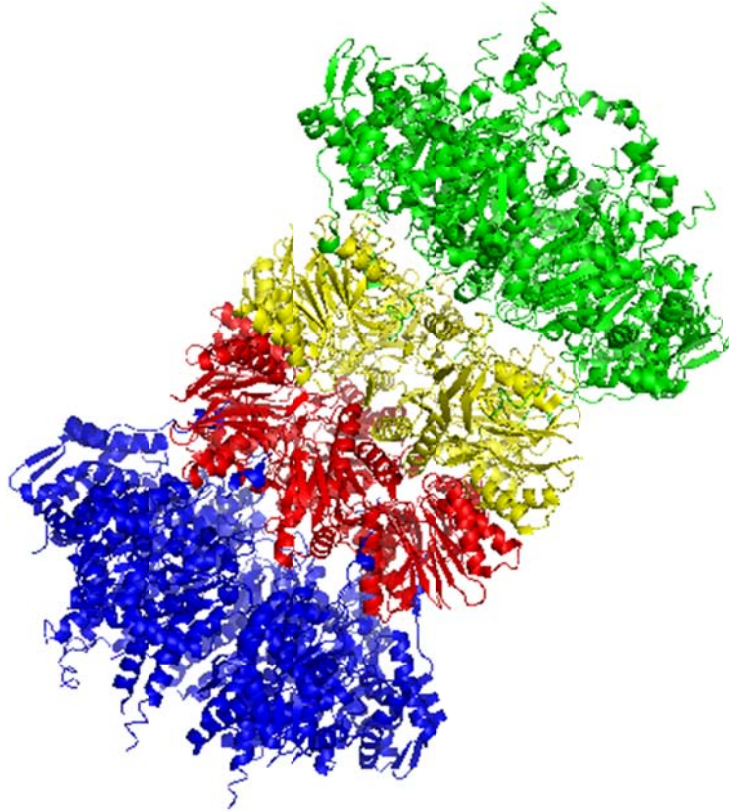


Primers	DNA sequence(5'→3')
ClpY R25A fw ^a	GCCAAGGCCTCTGTGGCGATTGCT
ClpY R25A rv ^a	AGCAATCGCCACAGAGGCCTTGGC
ClpY Y408C/W fw ^{a, d}	GAGATTCCTGSGACGCCAGC
ClpY Y408C/W rv ^{a, d}	GCTGGCGTCSCAGGAAATCTC
ClpY Y408L/M/V fw ^{a, d}	GAGATTCCTVTGGACGCCAGC
ClpY Y408L/M/V rv ^{a, d}	GCTGGCGTCCABGGAAATCTC
T7P fw ^b	TAATACGACTCACTATAGG
T7T rv ^b	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
pTH18kr fw ^b	GCGGATAACAATTCACACA
pTH18kr rv ^b	CGTTGTAAAACGACGGCCAG
pBAD24F ^b	ATGCCATAGCATT TTTATCC
pBAD24R ^b	GATTTAATCTGTATCAGG
ClpY EcoRI 5' fw ^{a, c}	<u>GGAATTC</u> CATGTCTGAAATGACCCCA
6xHis <i>clpY</i> NdeI fw ^{a, c}	GGAATTC <u>CATATG</u> CACCACCACCACCACCTC TGAAATGACCCCA
<i>clpY</i> HindIII rv ^{a, c}	CCCAAGCTTGGGTTATAGGATAAAACGGCCT
<i>clpQ</i> NdeI fw ^{a, c}	GGAATTC <u>CATATG</u> ACA ACTATAGTAAGCGTAC
6xHis <i>clpQ</i> HindIII rv ^{a, c}	CCCAAGCTTGGGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGT GCGCTTTGTAGCTTAATTC

a. Primers used for cloning.

- b. Primers used for sequencing.
- c. The restriction sites were underlined. 6xHis tags were in boldface.
- d. Mixed bases use the code letters for S(G, C), V(A, C, G) and B(C, G, T).



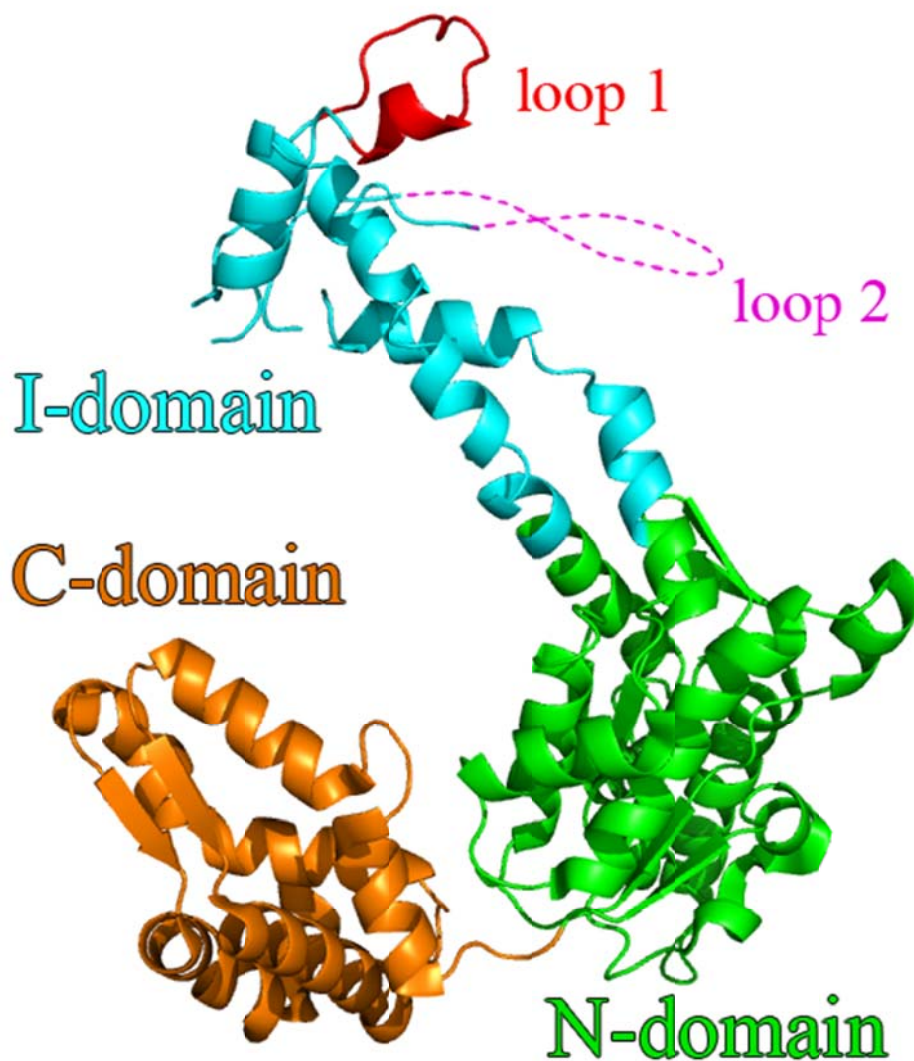


圖一、ClpYQ 結晶結構卡通圖 (修改自 PDB: 1G3I) (Sousa *et al.*, 2000)

以 PyMol V. 1.3 版本檢視 ClpY₆Q₆Q₆Y₆ 的卡通圖，兩組 ClpY₆ 分別為藍色及綠色在啞鈴形桶狀構造之蛋白酶外圍，而 ClpQ₆Q₆ 則是內部之淡黃色及紅色六元環。

Figure 1 ClpYQ crystal structure carton (modified from PDB: 1G3I)

Use PyMol V. 1.3 to view the ClpY₆Q₆Q₆Y₆ structure. The ClpY₆ lies outside the whole protease, colored by green and blue. Double ClpQ₆ stack inside from the protease, and colored by yellow and red.

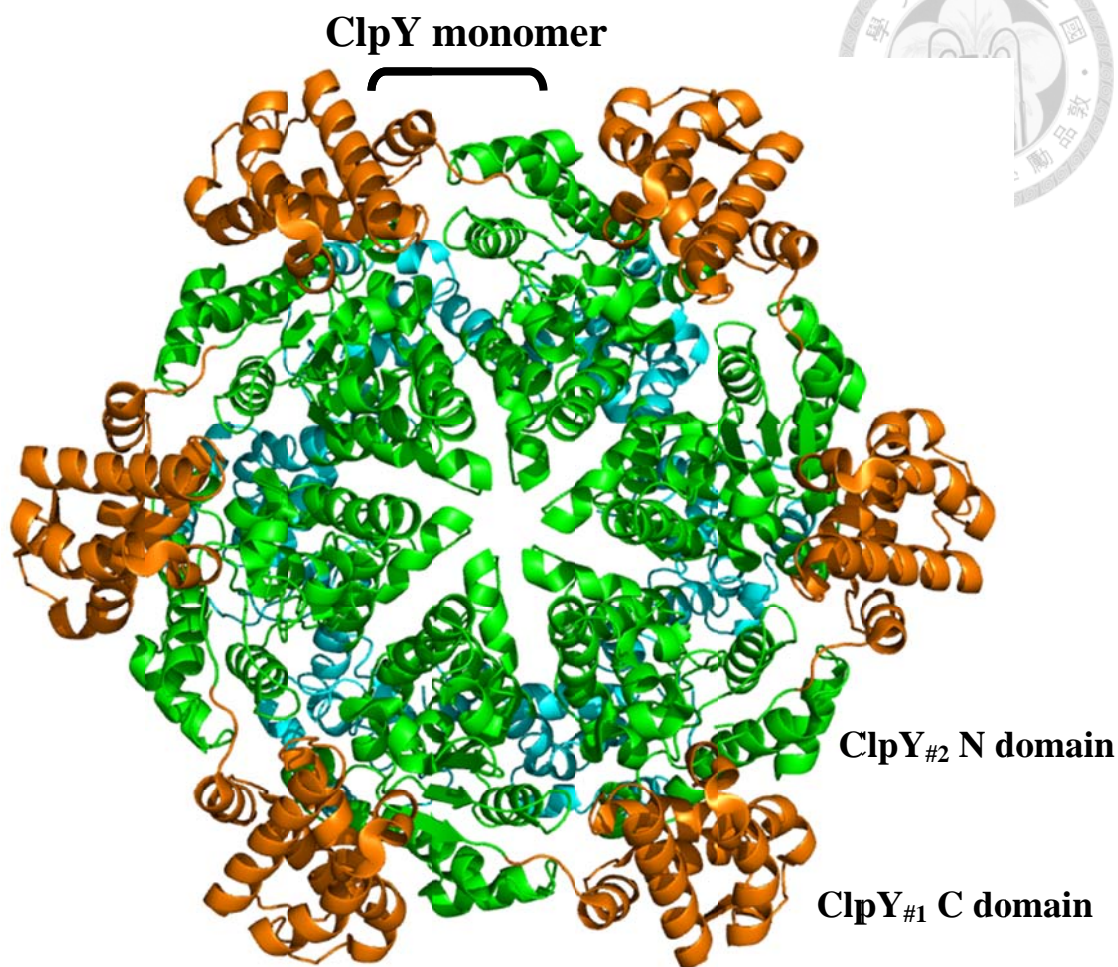


圖二、ClpY 單體之結晶結構卡通圖及其區塊標示 (修改自 PDB: 1E94) (Song *et al.*, 2000)

以 PyMol V. 1.3 版本檢視蛋白質結晶結構 1E94 之卡通圖，將 ClpY 單體 N domain 標示成綠色，C domain 標示成橘色，I domain 標示成淺藍色。由於 I domain 上的 loop 2 其結構較為鬆散而無法在結晶結構下觀察到構型，因此以 Adobe Photoshop CS3 加上淡紫色虛線示意線。

Figure 2 ClpY monomer carton (modified from PDB: 1E94)

Use PyMol V. 1.3 to exam the ClpY monomer. Color the N domain as green, C domain as orange and I domain as cyan. Loop 2 is too flexible to see in the crystal structure, therefore I added the purple dash stands for loop 2 by Adobe Photoshop CS3.



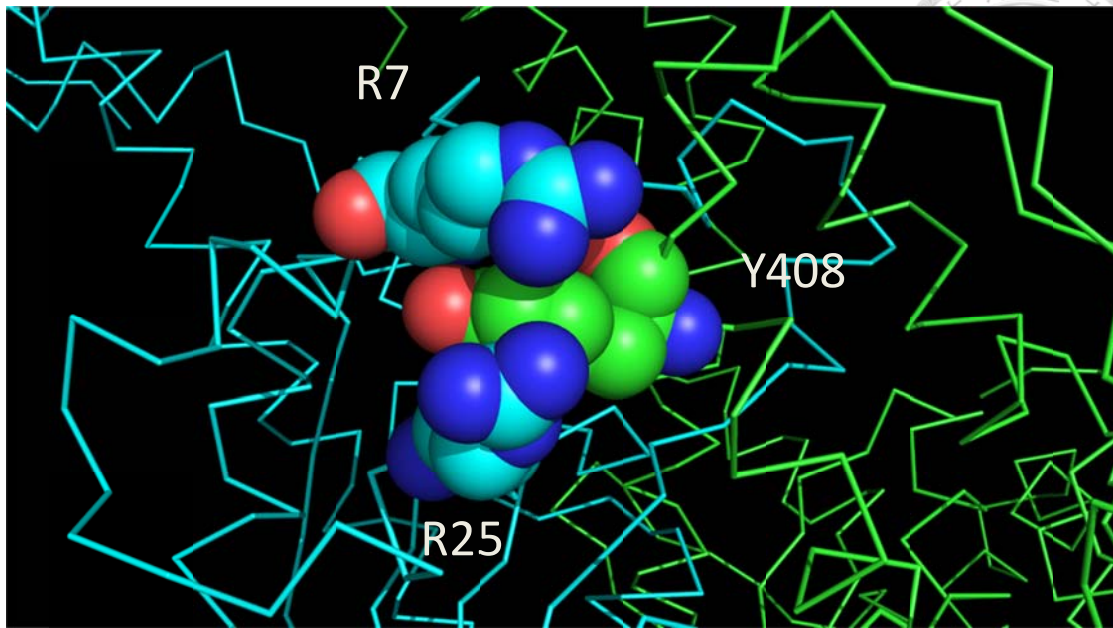
圖三、ClpY 單體於六元環之相對位置卡通圖 (修改自 PDB: 1E94)

以仰視角度觀察 ClpY₆，綠色為 N domain，橘色為 C domain。相鄰之 ClpY 蛋白是以 ClpY_{#1} 之 C domain 與 ClpY_{#2} 之 N domain 相鄰。

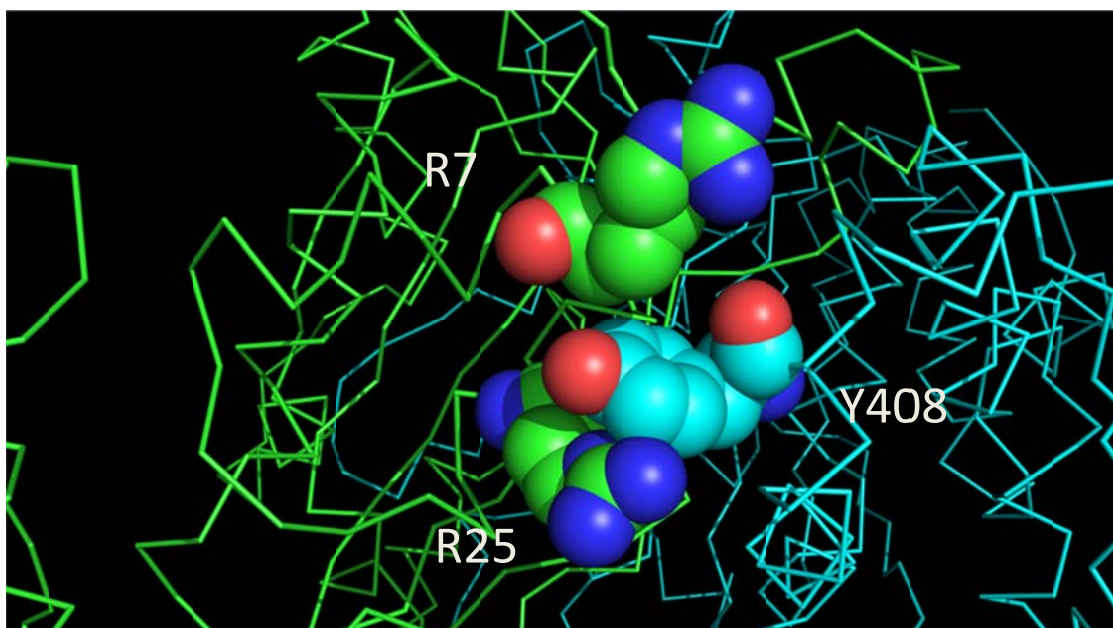
Figure 3 ClpY hexamer carton from bottom (modified from PDB: 1E94)

To see the ClpY hexamer from bottom and confirm the relative position about N domain and C domain. C domain of ClpY_{#1} is colored by orange, and N domain of ClpY_{#2} is colored by green.

A



B



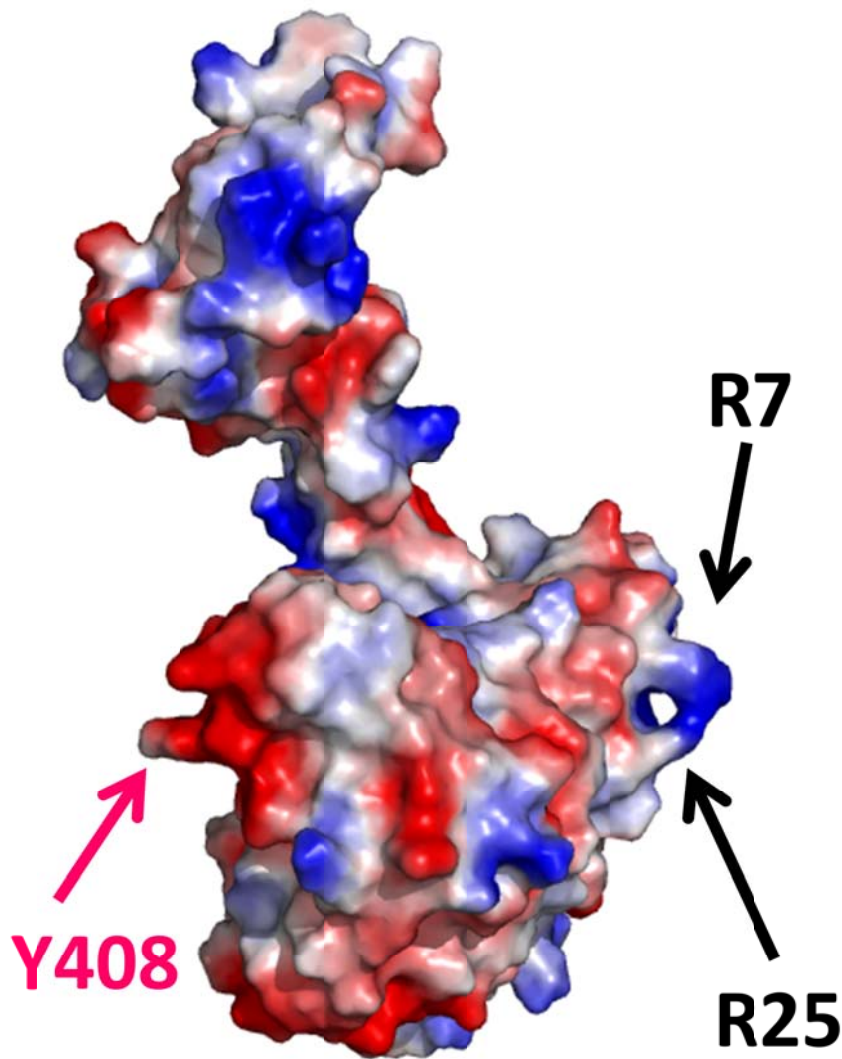
圖四、ClpY Y408 及其附近胺基酸之結晶結構卡通圖 (修改自 PDB: 1E94)

A ClpY 與 ATP 結合時，ClpY₁ Y408 (綠色) 及其附近之胺基酸，相鄰之 ClpY₂ R7 及 ClpY₂ R25 (淡藍色) 將 Y408 包夾其中。

B ClpY 與 ADP 結合時，ClpY₁ Y408 (淡藍色) 及其附近之胺基酸，相鄰之 ClpY₂ R7 及 ClpY₂ R25 (綠色) 將 Y408 包夾其中。

Figure 4 Focus on ClpY Y408 and the adjacent amino acid (modified from PDB: 1E94)

Focus on ClpY Y408 (A green, B cyan) and the adjacent amino acid, I find that there are two amino acids near the Y408. No matter ClpY bind to ATP (A) or ADP (B), R25 and Y408 are close to each other.

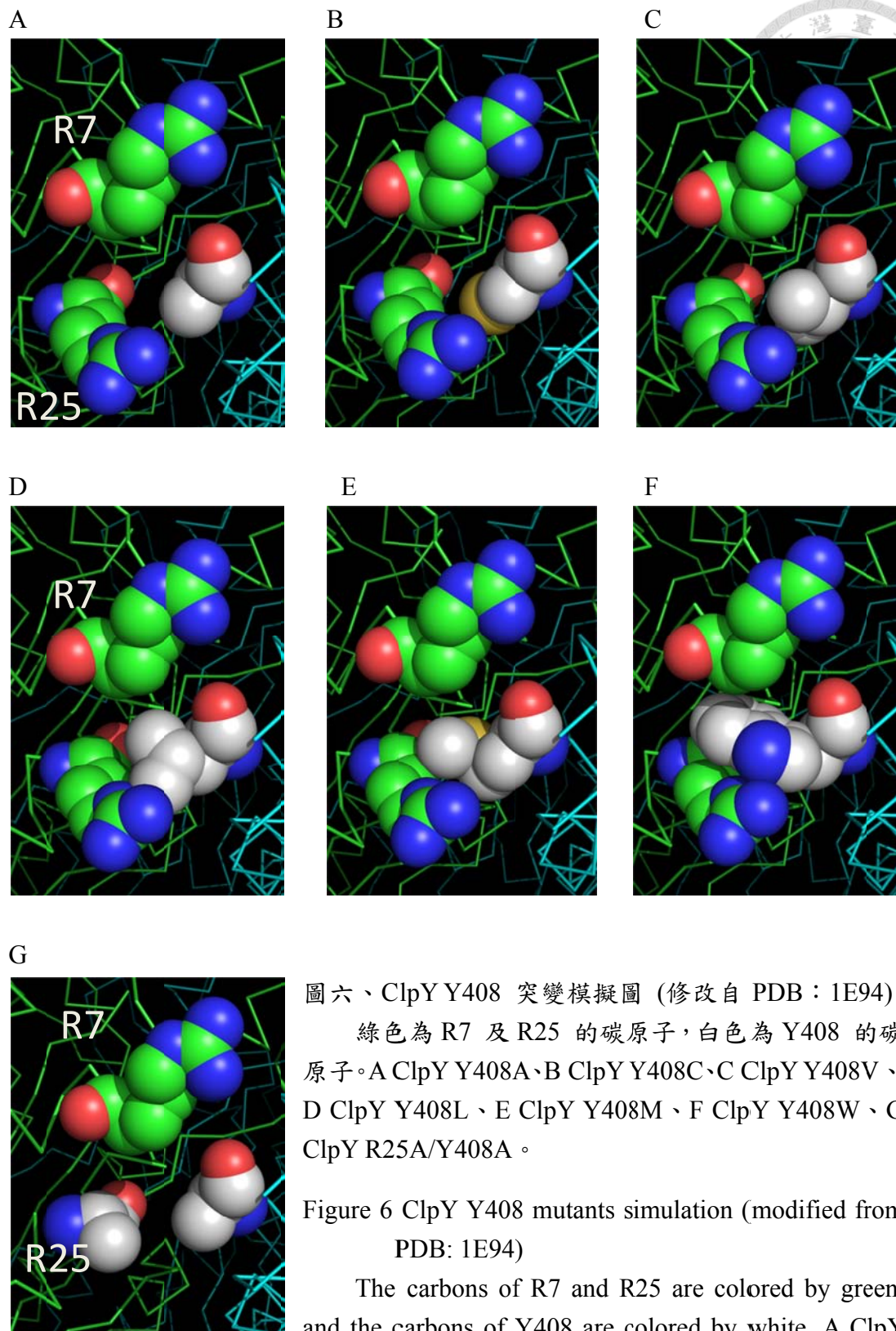


圖五、ClpY 蛋白單體表面構造 (修改自 PDB: 1E94)

以側視角度觀察 ClpY 蛋白單體表面構造，藍色代表蛋白質表面電荷帶正電，紅色則是蛋白質表面電荷帶負電。相較於附近其他的胺基酸，R7、R25 及 Y408 凸出於 ClpY 單體外，R7 與 R25 甚至形成小孔構造，此構造可能用來嵌合 Y408。

Figure 5 ClpY monomer surface structure (modified from PDB: 1E94)

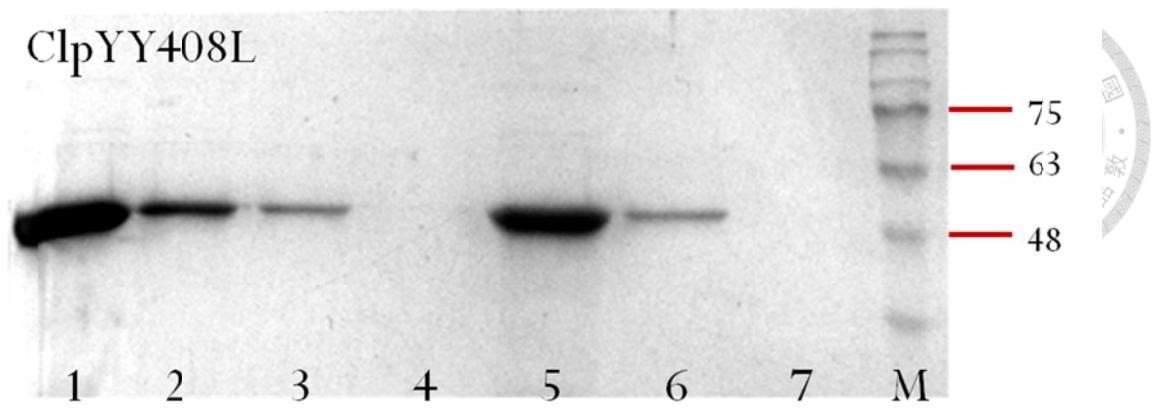
Side view of ClpY monomer surface structure Blue color means the protein surface tend to positive charge, red tend to negative. The ClpY R7 and R25 stick out of the monomer surface and form a tiny hole, which might be the structure holding the Y408. The ClpY Y408 on the left side also stick out of the monomer surface.



圖六、ClpY Y408 突變模擬圖 (修改自 PDB : 1E94)
 綠色為 R7 及 R25 的碳原子，白色為 Y408 的碳原子。A ClpY Y408A、B ClpY Y408C、C ClpY Y408V、D ClpY Y408L、E ClpY Y408M、F ClpY Y408W、G ClpY R25A/Y408A。

Figure 6 ClpY Y408 mutants simulation (modified from PDB: 1E94)

The carbons of R7 and R25 are colored by green, and the carbons of Y408 are colored by white. A ClpY Y408A, B ClpY Y408C, C ClpY Y408V, D ClpY Y408L, E ClpY Y408M, F ClpY Y408W and G ClpY R25A/Y408A.

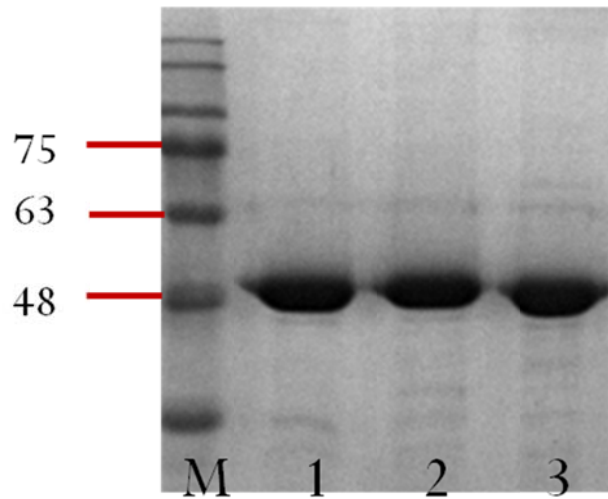


圖七、純化 ClpY 突變蛋白

利用親和性膠體純化 ClpY 及其突變蛋白，以 ClpY Y408L 為例。

Figure 7 Purified ClpY proteins

Using Ni-NTA resin to purify the ClpY proteins, ClpY Y408L is an example.

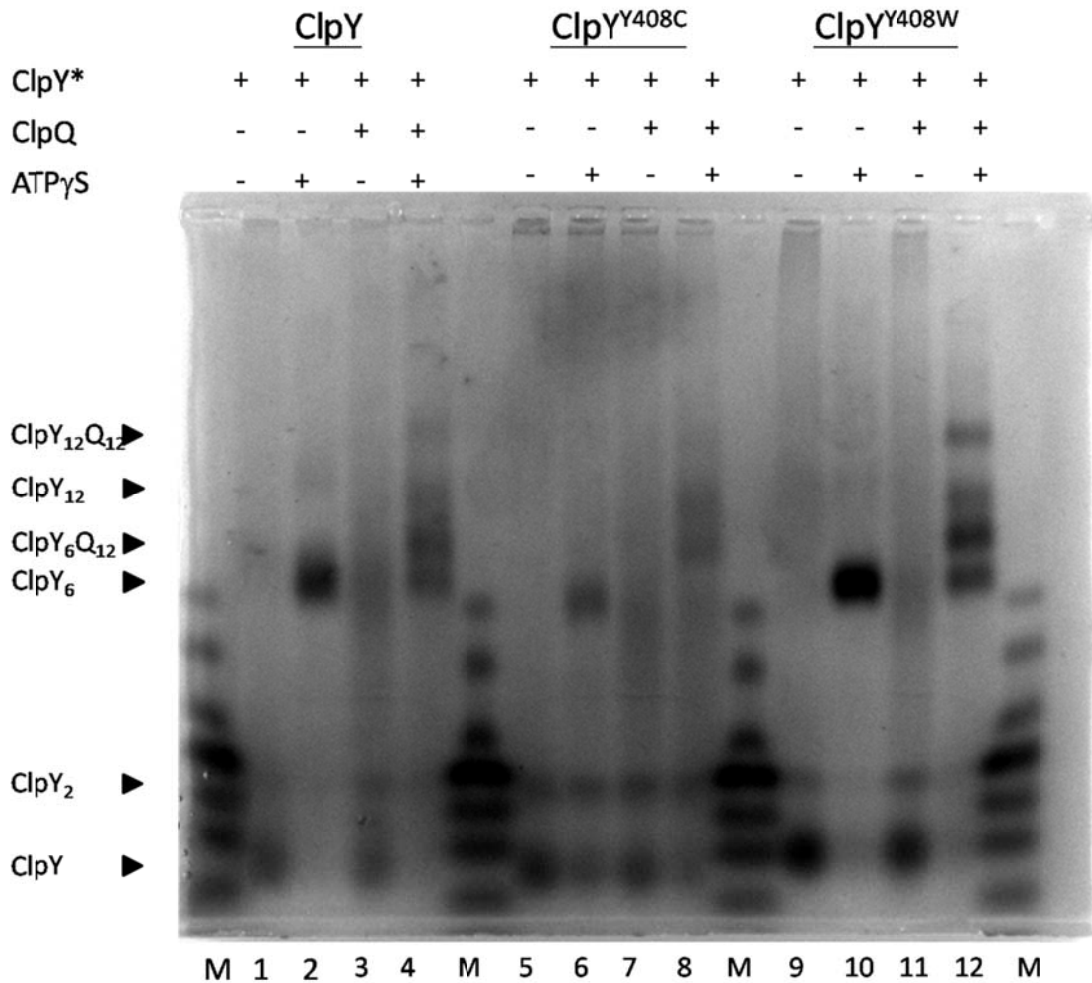


圖八、定量 ClpY 突變蛋白

在 Bradford 法測定完蛋白濃度後，取 6 μ M 蛋白以 SDS-PAGE 檢視定量是否正確。Lane 1, 2 是 wild type 1, 2，lane 3 是 ClpY Y408C。

Figure 8 Quantification of ClpY proteins

After quantifying by Bradford method, exam 6 μ M proteins by SDS-PAGE. Lane 1, 2 is wild type protein 1, 2, and lane 3 is ClpY Y408C protein were measured.

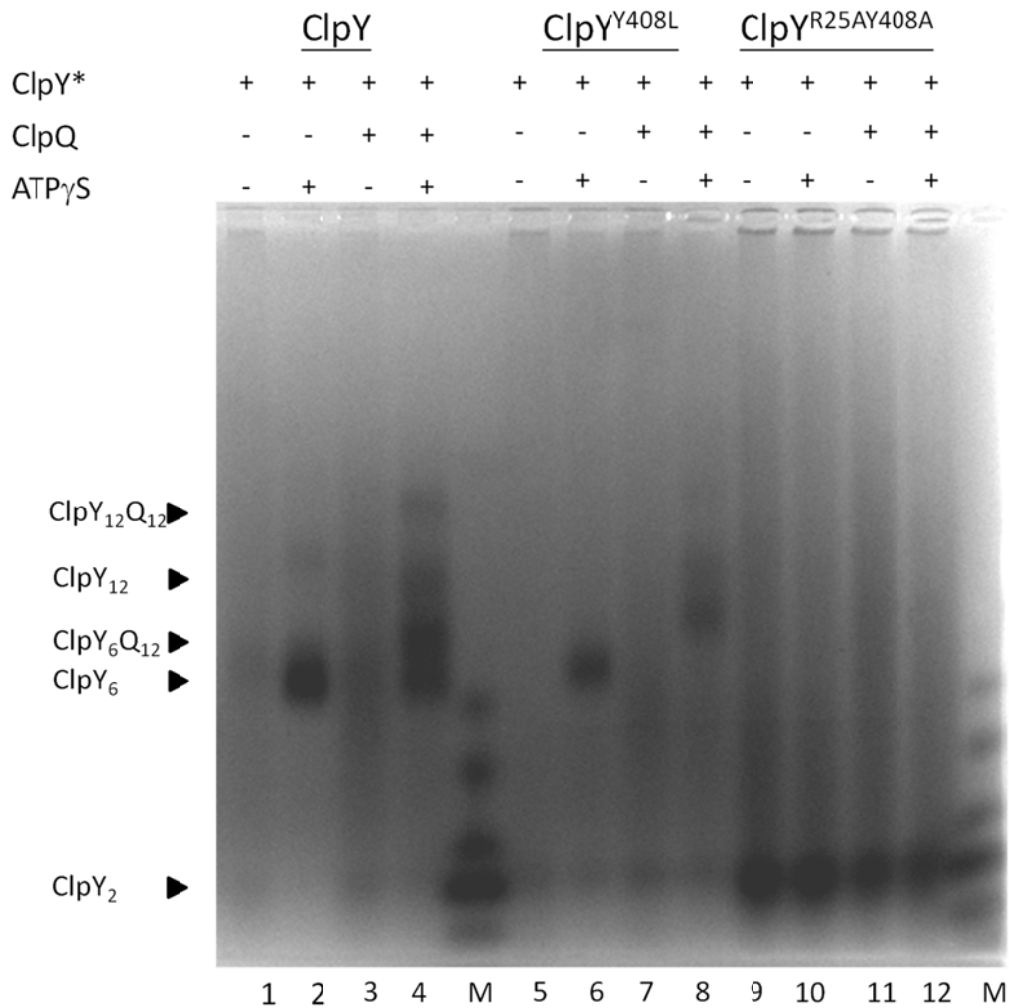


圖九、ClpY、ClpY Y408C 及 ClpY Y408W 形成六元環之能力

聯結反應後以蛋白質膠體電泳分析，在有無 ATP γ S 下，以及 ClpQ 存在與否，對於 ClpY 形成六元環的能力之影響。Lane 1-4 為野生型蛋白，Lane 5-8 為 ClpY Y408C，Lane 9-12 為 ClpY Y408W。Lane 1, 5, 9 顯示在不含 ATP γ S 下，ClpY 多以單體或雙體(ClpY₂) 的形式存在。Lane 2, 6, 10 為加入 ATP γ S 後 ClpY 形成之六元環。

Figure 9 Hexamer formation of ClpY Wt, ClpY Y408C and ClpY Y408W

After crosslinked by glutaraldehyde, purified ClpY forms hexamer when added ATP γ S (lane 2, 6, 10). When there is no ATP γ S existed in lane 1, 5, 9, ClpY is monomer and dimer. Lane 1-4 are wild type proteins, lane 5-8 are Y408C mutants, and lane 9-12 are Y408W mutants.



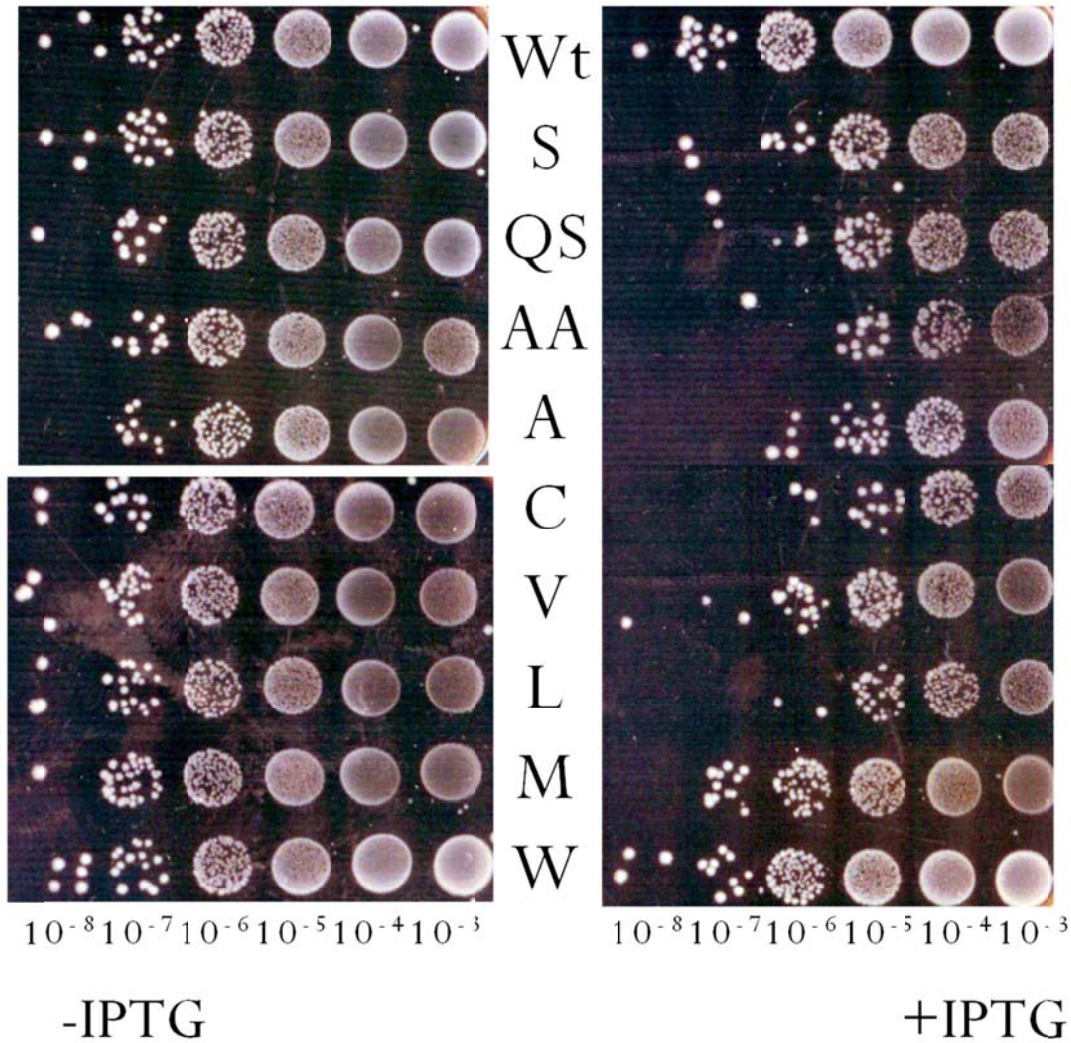
圖十、ClpY、ClpY Y408L 及 ClpY R25A/Y408A 形成六元環之能力

聯結反應後以蛋白質膠體電泳分析，在有無 ATPγS 下，以及 ClpQ 存在與否，對於 ClpY 形成六元環的能力之影響。Lane 1-4 為野生型蛋白，Lane 5-8 為 ClpY Y408L，Lane 9-12 為 ClpY R25A/Y408A。Lane 1, 5, 9 顯示在不含 ATPγS 下，ClpY 多以單體或雙體(ClpY₂) 的形式存在。Lane 2, 6 為加入 ATPγS 後 ClpY 形成之六元環。

Figure 10 Hexamer formation of ClpY Wt, ClpY Y408L and ClpY R25A/Y408A

After crosslinked by glutaraldehyde, purified ClpY forms hexamer when added ATPγS (lane 2, 6, 10). When there is no ATPγS existed in lane 1, 5, 9, ClpY is monomer and dimer. Lane 1-4 are wild type proteins, lane 5-8 are Y408L mutants, and lane 9-12 are R25A/Y408A double mutants.

ClpY Y408



圖十一、HA-SulA 於 AC3112 生理活性分析

於大腸桿菌 AC3112 誘導 ClpYQ 以及 HA-SulA 表現。圖左為尚未添加 IPTG 的控制組。圖右為加入 IPTG 兩小時後之實驗組。控制組及實驗組從右至左為序列稀釋成 10^3 至 10^8 倍。

由上至下標示分別為 Wt: ClpY 野生型、S: 只帶有 HA-SulA 基因的質體控制組 1、QS: 帶有 HA-SulA 及 ClpQ 基因的質體控制組、AA: ClpY R25A/Y408A、A: ClpY Y408A、C: ClpY Y408C、V: ClpY Y408V、L: ClpY Y408L、M: ClpY Y408M 及 W: ClpY Y408W。

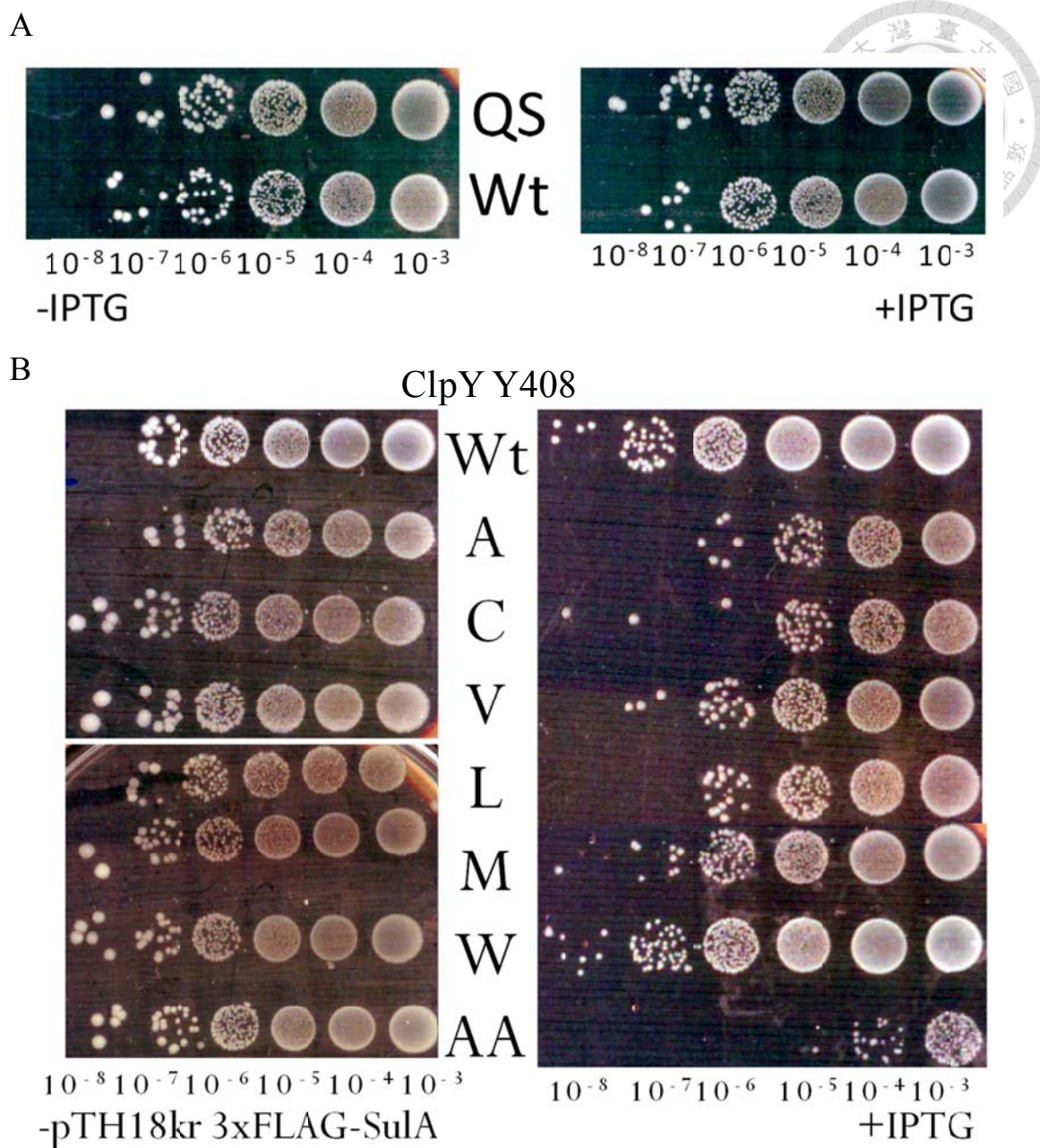
Figure 11 Cell viability when induced HA-SulA and ClpYQ

Using the to induce HA-SulA in AC3112 with ClpYQ. Left panel is the control group, and right panel is the treatment group. On the panel, from right to left is serial dilution from 10^3 to 10^8 folds.

Point mutations of ClpY Y408 are expressed by one letter in the middle, for example, A stands for ClpY Y408A, and so on. Wt means wild type. Vector control S stands for pBAD33, pBAD24 and pTH18kr HA-SulA cotransformed to AC3112,

and QS stands for pBAD33-*clpQ*, pBAD24 and pTH18kr HA-SulA. The word AA stands for ClpY R25A/Y408A double mutant.





圖十二、透過不具活性的 ClpYQ 基質觀察 ClpYQ 六元環對細菌生長之影響於大腸桿菌 AC3112 誘導 ClpYQ 以及 3xFLAG-SulA 表現。圖左為尚未添加 IPTG 的控制組。圖右為加入 IPTG 兩小時後之實驗組。控制組及實驗組從右至左為序列稀釋成 10^3 至 10^8 倍。

A 圖為質體控制組(QS) ，其內含質體為 pBAD33 ClpQ、pBAD24 及 pTH18kr 3xFLAG-SulA，在實驗組細菌生長並沒有受到影響。

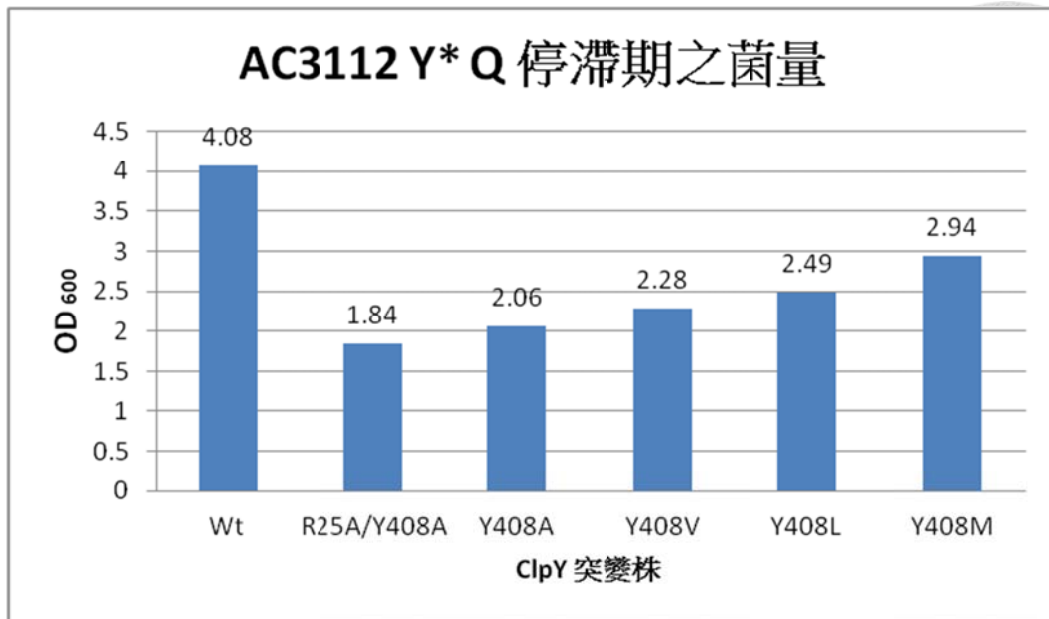
B 圖由上至下分別為 ClpY 野生型(Wt)、Y408A(A)、Y408C(C)、Y408V(V)、Y408L(L)、Y408M(M) 、Y408W(W) 及 R25A/Y408A(AA)。

Figure 12 Cell viability when induce ClpYQ and nonfunctional 3xFLAG-SulA

Induce 3xFLAG -SulA in AC3112 with ClpYQ. Left panel is the control group, and right panel is the treatment group. On the panel, from right to left is serial dilution from 10^3 to 10^8 folds.

4A Vector control QS stands for pBAD33-ClpQ, pBAD24 and pTH18kr 3xFLAG-SulA cotransformed to AC3112. When IPTG induce 3xFLAG-SulA, this tagged SulA does not affect cell viability.

4B Point mutations of ClpY Y408 are expressed by one letter in the middle, for example, A stands for ClpY Y408A, and so on. The word Wt stands for wild type, and AA stands for ClpY R25A/Y408A double mutant.

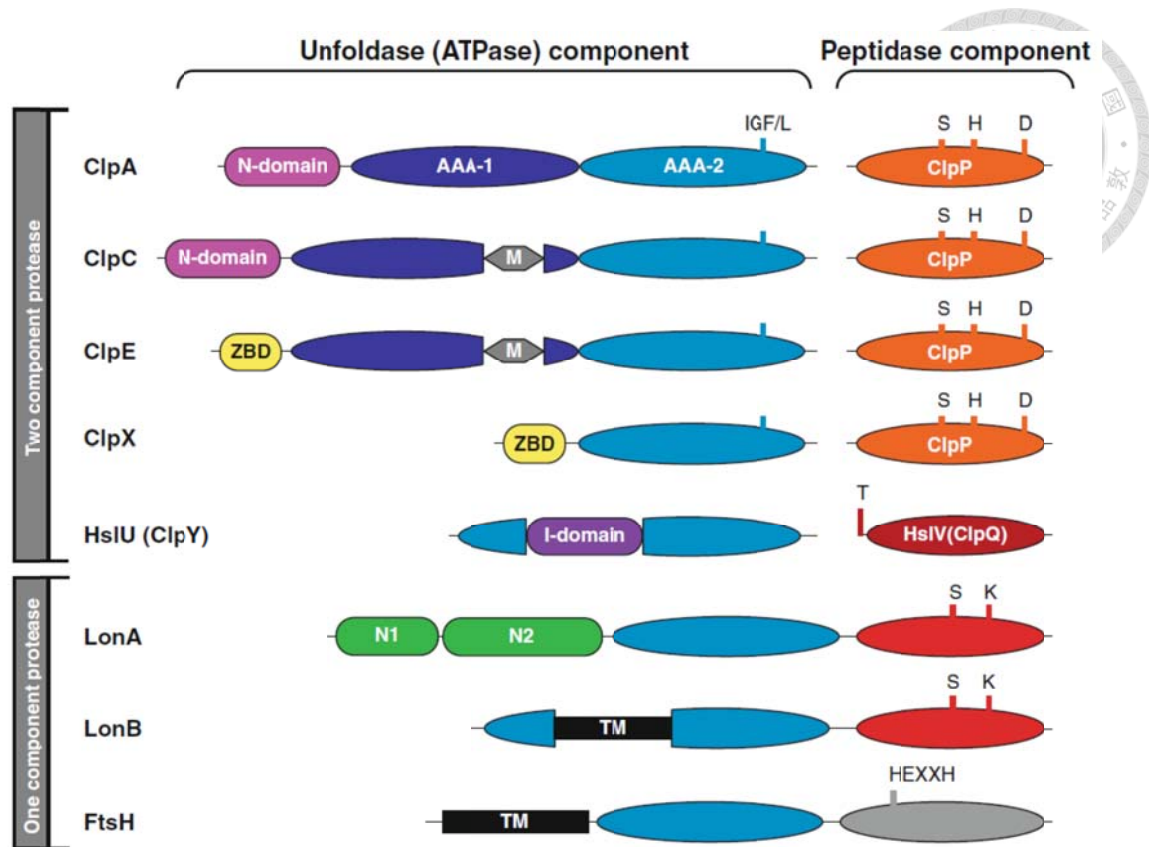


圖十三、大腸桿菌 AC3112 大量誘導 ClpYQ 於 24 小時停滯期之菌量

液態培之 AC3112 ClpYQ，橫軸由左至右為野生型蛋白 (Wt)、雙突變蛋白 (R25A/Y408A) 及點突變蛋白 (Y408A、Y408V、Y408L、Y408M)。縱軸為 OD₆₀₀ 讀值。

Figure 13 Cell density at stationary phase when induced ClpYQ after 24 h

Using arabinose to induce ClpYQ and incubate 24hr in LB broth to stationary phase, measure the OD₆₀₀. Vertical axis is the OD₆₀₀ value, and the horizontal axis is the ClpY point mutants. From left to right is ClpY wild type, R25A/Y408A, Y408A, Y408V, Y408L and Y408M.



附圖一、ATP 依賴型蛋白酶之分類及保守性序列之分佈

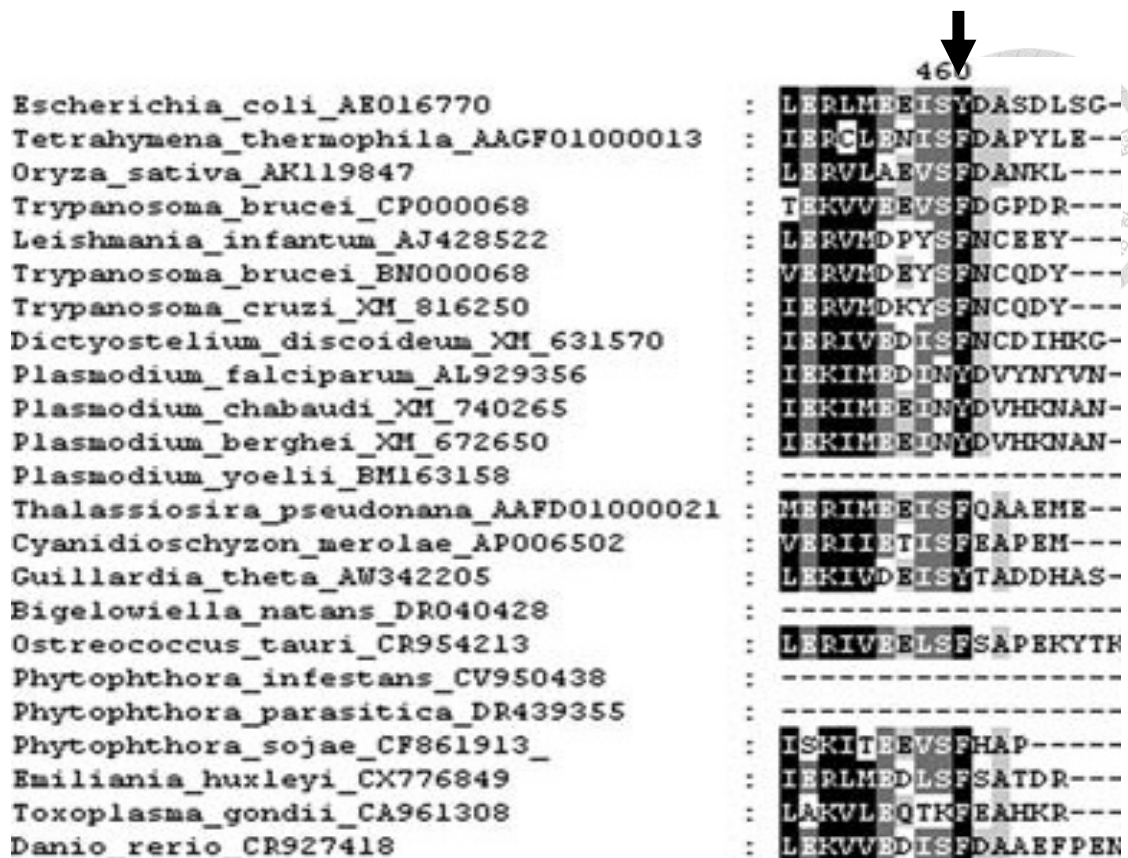
細菌的 ATP 依賴型蛋白酶有兩個功能區塊，一是解構酶(unfoldase)，二是胜肽酶(peptidase)，若兩者在同一條多肽鏈上則為單元體蛋白酶，如圖下列三者 LonA、LonB 及 FtsH；若兩者分屬兩條多肽鏈，則為圖上列五種蛋白酶 ClpAP、ClpCP、ClpEP、ClpXP 及 ClpYQ (Gur *et al.*, 2013)。

ClpY 具有 AAA-2 同源序列，即為圖中淡藍色區塊，而其中插入 I domain 為 ClpY ATPase 所特有之結構。另外 ClpQ 之活性胺基酸為蘇胺酸(threonine, T)，相異於其他胜肽酶以絲胺酸(serine, S) 作為活性胺基酸。

Appendix Figure 1 ATP-dependent protease and the conserved domain

There are two functional compartments, the unfoldase and the peptidase, in the protease. If the two compartment lies in one polypeptide, they belong to one component protease, like LonA, LonB and FtsH. Otherwise, they are two polypeptides to form one protease, which belonging to two component protease, like ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP and ClpYQ.

ClpY is an ATPase, its' AAA-2 conserved part is inserted by the unique sequence named I domain. The partner ClpQ, belongs to threonine protease, distinguish from other serine peptidases.



附圖二、ClpY Y408 於真核生物間的保守性 (Ruiz-Gonzalez & Marín, 2006)

箭頭所指為胺基酸 Y408

Appendix Figure 2 Conservation of ClpY Y408 within eukaryotes

The arrow points ClpY Y408 of *E. coli*.

<i>E. coli</i>	:	V L E R L M E E I S Y
<i>R. prowazekii</i>	:	I L E N L L E D I S F
<i>A. aeolicus</i>	:	V M E K L L E D I S F
<i>T. maritima</i>	:	V A E K V L E E I S F
<i>B. subtilis</i>	:	I L E R L L E D L S F
<i>B. burgdorferi</i>	:	V M E I V L A D L F F
<i>H. pylori</i>	:	T I E K V L E D I S F
<i>L. major</i>	:	I L E R V M D P Y S C
<i>L. infantum</i>	:	I L E R V M D P Y S F
<i>T. brucei</i>	:	V V E R V M D E Y S F

附圖三、ClpY Y408 於原核生物間的保守性 (Couvreur *et al.*, 2002)

箭頭所指為胺基酸 Y408

Appendix Figure 2 Conservation of ClpY Y408 within prokaryotes

The arrow points ClpY Y408 of *E. coli*.