



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 Bio-Resources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

Puf6 與 Loc1 對 Rpl43 蛋白穩定性及轉錄後調控之研究

The study of Puf6 and Loc1 in protein stability and post-transcriptional regulation of Rpl43

越樂昀

Le-Yun Yueh

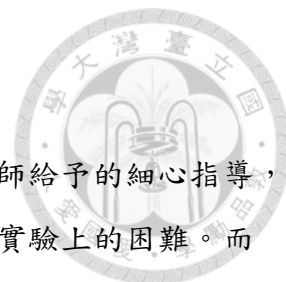
指導教授：羅凱尹 博士

Advisor: Kai-Yin Lo, Ph.D.

中華民國 108 年 8 月

August 2019

誌謝



在碩班這短短的兩年的生涯，首先最感謝的是羅凱尹老師給予的細心指導，在我還在最菜鳥、最懵懂無知的時候，耐心地領導我思考各種實驗上的困難。而自己資質驚鈍，常常會忘東忘西的，也不夠細心能夠注意到許多小細節。老師不僅常常在實驗上在很多失誤及不該錯的小事上包容我，給我再次改進的機會，也很感謝老師在我撰寫論文的過程中反覆地教導我，為我解釋適當的科學性寫法，讓雖然不是相關科系大學畢業的我，也漸漸獲得了分生方面實驗的邏輯思考，十分感謝老師的指導！

接著，也很感謝實驗室的各位學長姐、學弟妹！當我還是碩一時，謝謝筠庭學姊常常提醒我許多實驗上的細節，時常傳給我貓咪的照片療癒心靈；也謝謝已畢業的奕廷學姊，當時在不熟悉的環境中，經常主動關心我在實驗上的進度，陪我一起討論做實驗上遇到的問題，很懷念當時傍晚在運動場運動的時光；謝謝育徵，在我最難受困苦的時候聽我訴苦，我們常常一起早起、一起在假日時做實驗，一起偷偷休息、一起苦惱跟一起踩飛輪運動，希望之後你的實驗也能順順利利。謝謝甯翔，常常包容我偷偷佔用你的實驗桌，卻又很大方的讓我使用你桌上的任何東西，很感謝聰明的你所提供的實驗上的意見。謝謝陪伴我碩二時光的丁亞涵學姊，在最後的兩個月內幫助我完成許多實驗，除了教導我更多我平常不會注意的細節，也常常陪我談心，開導我許多心中的困境，常常買零食請我們吃，讓實驗室的生活更加的歡樂。還有謝謝其他的學弟妹：晴昱、節昕、奇典、瑞笙、芷儀，不僅在口試前不斷的鼓勵我，給我上台的自信，在許多心情低落的夜晚，陪伴我做實驗、談心、訴苦，深深地覺得在碩二的時光有你們真好！接著，跟我一起渡過碩士時光的其他實驗室朋友們，謝謝在碩一時常常約我吃飯，雖然實驗室只有自己是碩二的，但只要在閒暇之時相約聊天時，都會讓我感到不孤單，知道自己是有同伴，能夠有相同的目標一起努力！

最後感謝父母，讓我有讀碩士的機會，時常包容我早出晚歸，以及在應該休息的週末跑去實驗室，最終能順利完成學業也多虧有這一個永遠的避風港，支持我在低潮時繼續努力！

目錄



摘要	4
Abstract	5
表目錄	7
第一章 前言	8
一、核醣體生合成	8
二、rRNA 的生成與加工：	8
三、核醣體之組裝：	9
3.1. 40S 小次單元的組裝	10
3.2. 60S 大次單元的組裝	11
四、核醣體蛋白與其伴護蛋白(Chaperones).....	12
4.1. 伴護蛋白 (Chaperones)	13
五、RNA 結合蛋白對 RNA 的調控與其命運	15
5.1. RNA binding proteins	15
5.2. RBPs 結合對 RNA 的調控.....	16
5.2.1. 穩定性 (Stability).....	16
5.2.2. 細胞位置分布 (Localization).....	17
5.2.3. 表現抑制或活化 (Repression and Activation)	17
六、與本研究相關之因子	18
6.1. Puf6 和 Loc1 和 Ash1 mRNP complex 的關係	18
6.2. Puf6 和 Loc1 和 60S 核醣體生合成的關係	20
第二章、研究動機	21
第三章、材料與方法	22
1. 菌株與質體	22
2. 突變株建構	22

2.1	膠體電泳 (Gel electrophoresis)與 DNA 電泳膠體純化 (Gel recovery)	22
2.2	限制酶切割 (Enzyme digestion)與接合作用(Ligation)	22
2.3	Inverse PCR 突變株建構 (Inverse PCR).....	22
3.	生長測試 (Growth test).....	23
4.	啤酒酵母菌轉型作用 (Yeast transformation).....	23
5.	蛋白質相關實驗	23
5.1	蛋白萃取液的製備 (NaOH 破菌法).....	23
5.2	西方墨點法 (Western blotting)	23
5.3	免疫沈澱法 (Immunoprecipitation)	24
5.4	蛋白質穩定度 (Protein stability)分析	24
6.	啤酒酵母菌 RNA 表現量之測定	25
6.1	酵母菌 RNA 的萃取 (RNA extraction).....	25
6.2	DNase 處理 (TURBO™ DNase Treatment).....	25
6.3	反轉錄作用 (Reverse Transcription).....	25
6.4	即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction)	26
6.5	RNA 免疫沈澱法 (RNA-Immunoprecipitation)	26
7.	核糖體圖譜分析 (polysome profile).....	27
7.1	RNA 於 polysome 分離樣品之純化	27
7.2	蛋白質於 polysome 分佈的分析.....	27
第四章、實驗結果		28
一、Puf6 與 Loc1 維持 Rpl43 核糖體蛋白的穩定性		28
二、Rpl43 的表現及含量受啟動子與其他因素影響		29
三、 <i>RPL43</i> 上的內含子和 3'UTR 會影響 mRNA 的表現.....		30
四、Puf6 與 Loc1 會影響 <i>RPL43</i> 上內含子和 3'UTR 的調控		32
五、大量表現 Puf6、Loc1、Rpl43 對 <i>RPL43</i> 內含子和 3'UTR 的調控的影響		34
六、Puf6 與 Loc1 改變 <i>RPL43</i> mRNA 的轉譯作用		36
第五章、討論		37
5.1. 核糖體蛋白的生成調控		37

5.2. 和其他已知核糖體蛋白的 Intron、3'UTR 調控情形比較	39
5.3. Puf6、Loc1 調控 Rpl43 表現量的機制、及可能重要意義	41
第六章、結論	43
第七章、參考文獻	45



摘要

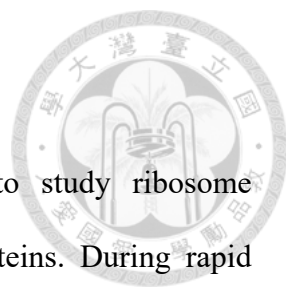


啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是個適合研究核糖體生合成的真核模式生物。核糖體是由 rRNA 與核糖體蛋白所構成，在快速分裂生長期間，為了維持正常核糖體的生理機能，核糖體蛋白會高度表現，同時這些核糖體蛋白表現後需要在細胞中受到調控及保護。本實驗所研究的目標核糖體蛋白，Rpl43，在核糖體的位置上位於約 E-site 附近。在先前的研究中，我們發現 Puf6、Loc1 及 Rpl43 之間在酵母菌中會有蛋白質的交互作用，形成三元複合體。當細胞缺乏 Puf6、Loc1 的時候，Rpl43 核糖蛋白的含量會下降，而在實驗結果顯示出 Puf6 與 Loc1 可能會參與並維持 Rpl43 的穩定性與核糖體的組裝。

為了了解 Puf6、Loc1 會如何影響 Rpl43，我們先去分析新生成的 Rpl43 在細胞中的穩定性，分析的結果顯示在 *puf6Δ* 及 *loc1Δ* 細胞內，Rpl43 的穩定性會顯著地降低。且 *RPL43* mRNA 的量在 *puf6Δ* 及 *loc1Δ* 皆不會有改變的情形，顯示在 RNA 層次上，會有其他機制來調控 *RPL43* 生成。以帶有不同 *RPL43* 片段的報導基因分析不同片段對表現蛋白質與 RNA 的影響，實驗結果發現，*RPL43B* 的 3'UTR 會抑制蛋白質與 RNA 的生成，而帶有 *RPL43B* 內含子能夠抵銷 3'UTR 的抑制；*RPL43A* 的 3'UTR 會增加蛋白質與 RNA 的生成，而帶有 *RPL43A* 內含子能夠抵銷 3'UTR 的活化。Puf6 的存在與否會影響內含子的調控；Loc1 和 Rpl43 會影響 3'UTR 的調控。接著，我們以核糖體圖譜分析 *RPL43* mRNA 的轉譯作用，發現 *puf6Δ* 及 *loc1Δ* 造成 Rpl43 蛋白質生成上的影響。這些結果顯示，Puf6 與 Loc1 會結合 *RPL43* mRNA 調控其 RNA 並增加其轉譯，並和 Rpl43 結合，形成複合體保護其穩定性。

關鍵字：核糖體生合成、RNA 結合蛋白、輔助因子、轉錄後調控、轉譯調控

Abstract



Saccharomyces cerevisiae is a good model organism to study ribosome biogenesis. Ribosome is composed of rRNAs and ribosomal proteins. During rapid growth, ribosomal proteins are highly expressed. In order to build up a functional ribosome, the qualities of ribosomal proteins need to be rigorously controlled. Ribosomal protein large subunit 43 (Rpl43) is located nearby the E-site of ribosome. In our previous study, we found Puf6, Loc1, and Rpl43 formed a trimeric complex in *Saccharomyces cerevisiae*. In the absence of *PUF6* or *LOC1*, Rpl43 protein level was under-accumulated. The data suggests that the functions of Puf6 and Loc1 may correlate with the stability and assembly of Rpl43.

In this study, we further dissected the connections among these three proteins. The stability of free Rpl43 protein decreased significantly both in *puf6Δ* and *loc1Δ*. While the level of mature *RPL43* mRNA did not change in *puf6Δ* and *loc1Δ*, there might be other mechanisms to regulate its mRNA. Different *RPL43* reporter genes were constructed to detect the expression of proteins and RNA. We found 3'UTR of *RPL43B* could repress the expression of RNA and protein, and intron could counteract the repression of 3'UTR in the reporter assay. The 3'UTR of *RPL43A* could enhance the expression of protein, and intron could remove the enhancement of 3'UTR in the reporter assay. The presence of Puf6 could interfere the regulation of intron. Loc1 and Rpl43 could regulate the 3'UTR. In addition, the translation of *RPL43* mRNA decreased in *puf6Δ* and *loc1Δ* mutants. The results in this study suggest that Puf6 and Loc1 bound *RPL43* mRNA to regulate its transcription and translation. In addition, they formed a complex with free Rpl43 protein to protect its stability.

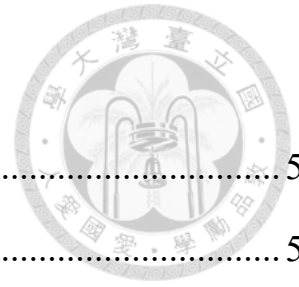
Key words: ribosome biogenesis, RNA binding proteins, transacting factors, post-transcriptional regulation, translational control

圖目錄

圖一、Puf6 與 Loc1 維持 Rpl43 核糖體蛋白的穩定性.....	53
圖二、Rpl43 的表現及含量受啟動子與其他因素影響	54
圖三、 <i>RPL43</i> 上的內含子和 3'UTR 會影響 mRNA 的表現	56
圖四、Puf6 與 Loc1 會影響 <i>RPL43</i> 上內含子和 3'UTR 的調控	59
圖五、Puf6 或 Loc1 及 Rpl43 調控 Rpl43 的生成	60
圖六、Puf6 與 Loc1 改變 <i>RPL43</i> mRNA 的轉譯作用	62

表目錄

表一、本研究所使用之酵母菌株.....	50
表二、本研究所使用之 qPCR Primers	50
表三、本研究所使用之質體.....	51



第一章 前言




一、核糖體生合成

核糖體是活細胞內重要的蛋白質生合成工具，負責將細胞內的訊息 RNA 轉譯為蛋白質。而核糖體也是一個組成複雜的核糖蛋白複合分子(ribonucleoprotein complexes)，以真核細胞為例，組裝完整的核糖體是由 60S 大次單元及 40S 小次單元組成。而目前研究最透澈的啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*，是最簡單的真核細胞，因此本研究也會以啤酒酵母為模式生物來進行機制的探討。

40S 小次單元在酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 內由一條 18S rRNA 及 33 個不同的核糖體蛋白所組成，而 60S 大次單元則是由三條不同長度的 rRNA：5S、5.8S、25S 以及 46 個核糖體蛋白組成 (Woolford and Baserga, 2013)。核糖體對於生長於分裂期的細胞來說非常必須，在酵母菌體內，快速生長期間會耗費大量的能量在核糖體生合成上，每分鐘約可生成兩千個核糖體，在細胞內必須要更嚴謹地去調控核糖體的生成，因此核糖體的生合成會跟細胞的生長息息相關 (de la Cruz et al., 2015; Kressler et al., 2010)。生合成的過程發生任何突變都會影響核糖體的組裝，當組裝的調控發生錯誤時，會進一步影響了參與組裝的核糖體蛋白或組裝因子，嚴重的缺陷會直接地使細胞死亡。Diamond-Blackfan anemia (DBA) 便是一種因核糖體蛋白基因上突變所造成的紅血球疾病。目前發現有許多核糖體蛋白基因會與此疾病相關，包括 *RPL5*、*RPL11*、*RPS24*，或 *RPS26* 基因等，只要其中一個核糖體蛋白突變，就會導致此疾病的發生(Boria et al., 2010)。

二、rRNA 的生成與加工：

RNA polymerase (RNA 聚合酶) 是細胞內合成 rRNA 的主要酵素，其中包括了三種類型的 RNA 聚合酶: RNA polymerases I, II 及 III。其中 RNA polymerases I 及 III 負責進行 rDNA (ribosomal DNA) 的轉錄、RNA polymerases II 則負責訊息 RNA (messenger RNA) 的生合成，來產生核糖體蛋白或組裝因子。新合成的 rRNA 接著送到細胞核質及細胞質中進行裁切，形成完整的 rRNA，並組裝成功能正常的核糖體後，才會辨識 mRNA 上的基因密碼，進行後續之轉譯作用 (Woolford and Baserga, 2013)。



rRNA 於細胞核內的核仁中生成，由 rDNA 轉錄而來。rDNA 位於第十二條染色體上面，形成約 150~200 個重複序列。RNA 聚合酶 I 會合成 35S rRNA，其中 5.8S、18S 及 25S 的序列皆位於 35S rRNA 上，RNA 聚合酶 III 會依 rDNA 的反向進行轉錄來合成 5S rRNA。35S rRNA 序列內穿插了兩段非轉錄區（internal transcribed spacer），分別為 ITS1、ITS2，外圍則被 5' 及 3' 兩段非轉錄區包圍（external transcribed spacer）。首先，RNase III 內切酶 Rnt1 會分別於 35S rRNA 的 5'ETS 的 A₀ 及 A₁ 進行裁切，生成 32S pre-rRNA，之後將位於 ITS1 內的 A₂ 裁切後形成 20S pre-rRNA 及 27S-A₂ 兩個片段(Kufel et al., 1999)。20S pre rRNA 會進一步送至細胞質中經由 Nob1 蛋白裁切為 18S rRNA，進一步包裝成 43S 前驅物形成 40S 小次單元 (Fatica et al., 2003)。27S-A₂ 會有兩種途徑來修飾成 5.8S 及 25S rRNA，有約 85% 的 27S-A₂ 會被 MRP RNase 內切酶於 ITS1 上的 A₃ 位點切一刀，形成 27S-A₃ (Lygerou et al., 1996)，接著經由 Rat1p/Rrp17p/Xrn1 5'-3' 外切酶酵素將 ITS1 內的 spacer sequence 切除，生成 27SB_S pre-rRNA (Johnson, 1997; Oeffinger et al., 2009)；其餘約 15% 的 27S-A₂ 則是於 B1_L 位點上進行裁切，形成 27SB_L pre-rRNA (Geerlings et al., 2000)。接下來會以相同的處理，辨認及剪下 ITS2 內的 C2 位點，分別生成 7S 及 25.5S pre-rRNA。當核孔複合體通道到細胞質中，隨著其他生成因子如 Rex2/Rex3/Ngl2 或 Exosome，最終形成 5.8S 及 25S。

三、核糖體之組裝：

真核生物核糖體的組裝機制，是一段複雜且漫長的過程，目前以酵母菌的機制了解的最透澈。從 rRNA 的生合成到成熟的核糖體釋出到細胞質中之前，會有 79 個核糖體蛋白及至少兩百個短暫結合的組裝因子去進行修飾，參與核糖體組裝之途徑。早期研究核糖體組裝的方式有利用親和力純化實驗 (tandem affinity purification method) 去結合沈澱不同階段的 pre-rRNA 上面所結合的核糖體蛋白與組裝因子，另外也透過低溫電子顯微鏡 (Cryogenic electron microscopy) 技術的發展，藉由解析所純化出的蛋白質晶體的結構與結合域，更進一步了解核糖體蛋白及組裝因子是藉由哪些結合位來與 rRNA 結合 (Klinge et al., 2011; Klinge et al., 2012)。而目前的研究成果顯示 RNA 會位於大小次單元的中心，大部分核糖體蛋

白會鑲嵌在核糖體表面，但也有些會深入到核心之中，與 rRNA 結合(Woolford and Baserga, 2013)。

rRNA 的組裝過程中，除了核糖體蛋白會受組裝因子的協助入核，一些 rRNA 的修飾作用也是對於核糖體組裝功能性的完整度來說是不可或缺的。酵母菌內至少約有 40%~80%的初生 rRNA，在轉錄作用的同時，進行加工作用等修飾 (co-transcriptional cleavage and co-transcriptional modification)，除了內切酶與外切酶加工作用，snoRNPs 所引導的修飾對於核糖體組裝及功能性是非常重要的部分，錯誤的修飾，會影響最終核糖體組裝完成的功能正確性與轉譯效率。snoRNP 是由具引導 RNA 性質的 snoRNA 及具有酵素功能蛋白質所構成的複合體，目前酵母菌內的 snoRNPs 主要分為兩大類：The box H/ACA snoRNPs 及 the box C/D snoRNPs。The box H/ACA snoRNPs 負責催化 rRNA 上總共 44 個位點的假尿嘧啶化作用(pseudouridylation)；the box C/D snoRNPs 負責催化 rRNA 上 66 個位點的 2 號氧的甲基化作用(Decatur and Fournier, 2002; Watkins and Bohnsack, 2012)。

核糖體生合成不僅需要有核糖體蛋白及組裝因子的參與，還需要有那些負責修飾 rRNA 的蛋白質才能構成完整的核糖體，但目前對於組裝順序以及各個蛋白質所參與的功能還有不明瞭的部分。以下則簡單介紹 40S 及 60S 組裝之過程。

3.1. 40S 小次單元的組裝

Pre-40S 小次單元的組裝所參與的生合成因子相對大次單元較少一些。組裝的過程中，會有三個小複合體 UTP-A、UTP-B 及 UTP-C 來參與 35S rRNA 的裁切。當 35S rRNA 於核仁中裁切出 20S rRNA，會通過細胞核上的核孔進入細胞質中於核糖體組裝晚期完成後續的修飾。當 20S pre-rRNA 小次單元前體送出細胞質後，Dim1 會將 18S rRNA 的 3 端上的腺嘌呤進行雙甲基化反應修飾，防止 20S 返回細胞核中 (Lafontaine et al., 1994)。除了組裝因子的參與，近期研究也發現轉譯起始因子 eIF5B/Fun12 會促使 pre-40S 與 60S 大次單元的組裝，促使 80S 核糖體的形成 (Lebaron et al., 2012)。eIF5B/Fun12 具有 GTPase 水解酶活性 (Lebaron et al., 2012)，會活化內切酶 Nob1 的酵素活性，Nob1 蛋白具有 PIN domain，在 20S pre-rRNA 出核前結合，於 20 rRNA 上的 site D 上進行水解作用，完成小次單元的 3 端修飾 (Fatica et al., 2003; Fatica et al., 2004; Lamanna and Karbstein, 2009)。



3.2. 60S 大次單元的組裝

60S 組裝上比 40S 更加複雜，從核仁中裁切成 27S pre-rRNA 開始，直到送到細胞質中之前，皆有許多不同的組裝因子結合。而在實驗上，藉由 TAP tag 親和力純化方法來了解不同時期的 pre-60S 所結合的組裝因子或核糖蛋白。最早的 pre-60S 中間產物是由 Ssf1 純化而來，產物包含了 27SA、27SB pre-rRNA，核糖體蛋白及三十種組裝因子如 Noc1、Rrp5 (Fatica et al., 2002)。然而，從最早分離出來的 pre-60S 前體中並未看到有 snoRNPs 的參與 (Kressler et al., 2010)，表示有更早的蛋白質參與組裝，而其中一個為 Npa1，不僅無法從此蛋白分離出 Ssf1 (Fatica et al., 2002)，且所純化的 pre-60S 中間產物裡面主要由 27SA₂ pre-rRNA 所組成，可以從裡面獲得非組裝因子的蛋白如 RNA helicase 及 snoRNP，且一些 90S 相關的組裝因子也會被 Npa1 純化分離 (Dez et al., 2004)。

接著，第二個分離的 pre-60S 中間產物為也位於核仁的組裝蛋白 Nsa1，實驗結果發現 Nsa1 主要會與 5S rRNA 及 27SB pre-rRNA 有結合，並進一步指出會於此時期參與 Noc1–Noc2 複合蛋白轉換為 Noc2–Noc3，這組複合蛋白與核糖體於核質中運輸有關 (Milkereit et al., 2001)。而 Nsa1 結合的 27SB pre-rRNA 在此時期會完成修飾，離開 pre-60S 後生成 25S 及 7S rRNA，其中有許多組裝因子參與此過程的裁切。例如於後期結合的複合蛋白 Ytm1–Erb1–Nop7，參與外切酶 Rat1 及 Xrn1 進行的 27SA₃ pre-rRNA 五端的裁切作用 (Tang et al., 2008)。或是 27SA₂ pre-rRNA 會透過另一個未知的內切酶，於 B_L 位上作用形成 27SB_L pre-rRNA，發現其中共有約 12 個組裝因子：Ytm1、Erb1、Nop7、Rlp7、Cic1、Nop15、Has1、Drs1、Rpf1、Pwp1、Nop12、和 Rrp1 與 11 個核糖蛋白會有 27SA₃ pre-rRNA 累積的現象 (Konikkat and Woolford, 2017)，且如果任一個核糖蛋白突變的時候，會加速外切酶 Rat1 分解 pre-60S rRNA (Sahasranaman et al., 2011)，顯示這幾個組裝因子不只參與了 pre-60S rRNA 的剪切作用，他們也會幫助核糖體的折疊，對其穩定性來說很重要。27SB pre-rRNA 生成後，接著便會從核仁中離開。AAA type-ATPase Rix7 及 Rea1 負責將 Nsa1 從 pre-60S 中水解釋出 (Kressler et al., 2008)，並由 Rix1 蛋白幫助核糖體由核仁運輸至核質中 (Ulbrich et al., 2009)。

接下來，核質中的內切酶 Las1 會參與 27SB pre-rRNA 的裁切作用，將 ITS2 序列的移除 (Castle et al., 2013; Gasse et al., 2015)。約 14 個組裝因子會於 ITS2 內的 C2 位點。有 5 個 RNA 結合蛋白(Nip7、Rpf2、Nsa2、Rlp24、Tif6)、4 個 RNA helicases (Spb4、Drs1、Has1、Dbp10)、2 個 GTP 水解酶(Nog1、Nog2)，至少 1 個 scaffolding protein (Mak11)與 1 個推測為甲基轉移酶活性的 Nop2，一起協助 27SB 的修飾(Woolford and Baserga, 2013)。其中，Nog2 會參與 C2 加工與 7S pre-rRNA 的生成 (Saveanu et al., 2001)。接著，當 Rat1 去修除 25.5S 的 5 端序列，會有其他 exosome 酵素負責去進行 7S rRNA 的修除，生成 6S pre-rRNA (Fernandez-Pevida et al., 2015)。

到了組裝晚期，準備進入細胞質的階段，可由 Arx1 分離出參與組裝晚期的蛋白，如 Nmd3 及 Mex67-Mtr2 heterodimer (Yao et al., 2007)。Arx1 參與核糖體運輸至細胞質，可於細胞核質及細胞質的核孔複合體(nuclear pore complex; NPC)發現。當 pre-60S rRNA 到達細胞質時，AAA ATPase Drg1 結合 Arx1 並促使核糖體上 Nog1 及 Rpl24 的釋出 (Pertschy et al., 2007)。而 Nmd3 會去幫助 Crm1 調控 pre-60S 的出核 (Ho et al., 2000)，它會受到具 ATPase 的 Rea1 跟具 GTPase 的 Nug2 所影響。只有當 Rea1 被 Nug2 內的 GTPase 水解 GTP 活化 ATPase，導致 Rea1 的構型改變時，才會促使 Nmd3 能結合到 pre-60S rRNA 上 (Johnson, 2014)，將 pre-60S rRNA 送出核，進入細胞質組裝的階段，當 pre-60S rRNA 抵達細胞質後，結合在核糖體上的生合成因子會經由其釋放因子來離開 pre-60S，並促使剩下的核糖體蛋白結合到核糖體上，最終完成了 60S 大次單元的生合成，與 40S 連結來形成 80S，在細胞質中進行轉譯作用。

四、核糖體蛋白與其伴護蛋白(chaperones)

核糖體蛋白參與了核糖體前體(pre-rRNA)組裝、折疊以及核糖體運輸，它們具有大量的鹼性胺基酸的 extension 區，生成後須立即去與帶負電的 rRNA 做結合，當核糖體蛋白無法正確的組裝在核糖體中時，便會容易團聚在一起結團沈澱 (aggregation) (Ben-Shem et al., 2011; Jakel et al., 2002)。在成熟的核糖體內，核糖體蛋白會跟至少一個 rRNA 有直接性地結合，有些核糖體蛋白因構型的因素，會深入到核糖體的核心區，有些具有很多的 extension 區的，只會鑲嵌在核糖體的表

面 (Armache et al., 2010; Ben-Shem et al., 2011)，而這些暴露在核糖體表面的核糖蛋白，同時也能夠作為一些組裝因子或轉譯作用的起始因子直接結合的位置，參與核糖體的組裝(Woolford and Baserga, 2013)。

酵母菌內的核糖體蛋白總共有 79 個，其中的 64 個是必須基因，對於酵母菌內核糖體的折疊或功能性來說是必須的，缺乏任何一個會使細胞死亡 (Simoff et al., 2009)；其餘的核糖體蛋白雖然非細胞生長必須的，但他們在核糖體的組裝上是重要的一群。而在基因的層次上，有 59 個核糖體蛋白會由兩個同源基因 (paralog) 一起生成蛋白質。研究顯示，約有 38 個由兩個同源基因所生成的核糖體蛋白之間有 1~5 個胺基酸的差異，這也顯示出兩個同源基因所表現出的核糖體蛋白在其胺基酸序列上也會有差異，可能導致核糖體蛋白會擁有不同的功能 (Woolford and Baserga, 2013)。更有文獻提出了核糖體密碼 (ribosome code)，指出核糖體可能會針對不同的目標 mRNA，來調控轉譯作用，這也顯示出除了幫助核糖體折疊的功能上，核糖體蛋白會調控其他不同 mRNA，影響目標 mRNA 轉譯蛋白質 (Komili et al., 2007)。

4.1. 伴護蛋白 (Chaperones)

有一群稱為伴護蛋白的分子，會協助細胞內不同生理中的蛋白質折疊與恆定。初生蛋白質在細胞質生合成時，因部分胺基酸殘基所具有的疏水性質，使得它們容易彼此吸引在一起，而形成一段無法正常折疊的胜肽鏈，在細胞中傾向聚集成團，這些聚集成團的蛋白質在有些情況下會造成病變 (Saibil, 2013)。因此，結伴護蛋白促進胜肽鏈內部的胺基酸能夠正常進行分子之間的交互作用，可避免因疏水性質而造成的不正常折疊。

對核糖體而言，細胞質內新生成的核糖體蛋白因為其帶有鹼性且正電胺基酸的特性，在細胞中特別需要受到伴護蛋白的幫助來維持構型，目前將伴護蛋白幫助核糖蛋白折疊系統稱為 Ribosome-associated Chaperone Systems。在酵母菌中，伴護蛋白系統會由兩個分子構成 Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC)，去負責保護即將從核糖體 E 位釋出的初生蛋白 (Wang et al., 1995)，這兩個分子為 Hsp70、Hsp40 及 Ssb 所辨認共同去形成一個複合體蛋白，協助初生的胜肽鏈摺疊

成適當狀態。也發展出一連串的機制去負責護送核糖體蛋白於核糖體中組裝 (Preissler and Deuerling, 2012)。

伴護蛋白除了協助核糖體蛋白的折疊，有些伴護蛋白也可以作為或協助運輸蛋白(importin)，護送核糖體蛋白入核並正確進入核糖體的結合位 (Bange et al., 2013)。真核細胞中因為具有雙膜構造的細胞核，此胞器將細胞內部區分為細胞核與細胞質兩個部分，也因此所有轉錄、轉譯產物，都需要經過細胞核孔。當核糖體蛋白在細胞質中被新合成出來時，運輸蛋白來作為通過細胞核上的核孔通道的辨認受體 nuclear pore complexes (NPCs)，當位於核孔通道 RanGTP 與運輸蛋白結合後，水解造成其構型的改變，讓運輸蛋白結合的核糖蛋白能通過核孔通道。

目前發現在酵母菌細胞中，已發現有至少六個核糖體蛋白有其特定的伴護蛋白來協助其運輸，每種伴護蛋白有特定之運輸機制來參與核糖體蛋白的運輸：

Yar1 及 Tsr2，分別是小次單元 Rps3 及 Rps26 的伴護蛋白，但這兩個蛋白結合的時機與護送機制上卻略有差異。Yar1 在細胞質中直接結合新生合成的 Rps3，主要會結合在 Rps3 的 N 端第十四到十九個胺基酸上(Pausch et al., 2015)，保護 Rps3 維持穩定性來防止它結團沈澱。當 Rps3 進入細胞核中與 40S pre-ribosomal 組裝後，Yar1 便會從 Rps3 上離開，回到細胞質中進行下一輪的護送 (Koch et al., 2012)，並促使它進一步送入細胞質中形成成熟的 40S (Mitterer et al., 2016)；Tsr2 主要會協助 Rps25 入核。Rps26 透過運輸蛋白進入細胞核後，Tsr2 會經由 Ran-GTP 水解酶作用將 Rps26 從運輸蛋白上脫離，並維持 Rps26 的構型防止受到降解，同時也協助 Rps26 組裝於 pre-90S 中(Schutz et al., 2014)。

Sqt1、Rrb1、Acl4 及 Syo1，是大次單元 Rpl10、Rpl3、Rpl4 及 Rpl5 與 Rpl11 的伴護蛋白。當 pre-60S 送出細胞質準備迎接組裝晚期的階段，Sqt1 會於此結合 Rpl10，協助它組裝到 60S 上，促使成熟 60S 的完成 (Pausch et al., 2015)。Rrb1 在細胞質中便以 co-translational 的方式結合 Rpl3 上，伴隨 Rpl3 進入細胞核組裝於 pre-60S 上(Iouk et al., 2001)。Acl4 與 Rrb1 類似，在 Rpl4 生成時就會結合，直到 Rpl4 進入細胞核中與 pre-60S 結合後才會從 Rpl4 上離開 (Pillet et al., 2015)。Syo1 可同時結合兩種核糖體蛋白 Rpl5 及 Rpl11，在細胞質中 Syo1 以 co-translational 方式結合 Rpl5、Rpl11。接著，Syo1 同時結合運輸蛋白 Kap104 與

Rpl5、Rpl11 來協助兩蛋白的運輸入核，在核內，Syo1-Rpl5-Rpl11 複合體會結合到裁切好的 5S RNP 上，幫助 5S 組裝到 pre-60S 上，完成後 Syo1 才會從兩蛋白上脫離(Kressler et al., 2012)。



五、RNA 結合蛋白對 RNA 的調控與其命運

5.1. RNA binding proteins

RNA 從生成到代謝的過程會有相關蛋白質參與每一步的調控，RNA 的表現量主要可以由轉錄 (transcription) 與後轉錄修飾 (post-transcriptional modification) 的層次來調控。在原核生物內，轉錄與轉譯作用幾乎是會伴隨彼此同時進行，而真核生物內，因細胞核形成的屏障，RNA 與蛋白質的生成便會被分開來進行，轉錄作用便會於細胞核內部發生，使得真核生物內有更完善的轉錄修飾系統調控 RNA 的表現。早在 pre-rRNA 生成的時候，就會發生如剪切等作用來修飾 RNA，而當成熟的 mRNA 出核，準備進行轉譯作用時，又會有其他蛋白質去調控 mRNA 的轉譯活性。其中 RNA 結合蛋白 (RBPs: RNA-binding proteins)，結合 RNA 後造成結構上的改變，或是經由磷酸化、甲基化等方式來達到讓特定 RNA 表現或靜默，也有些會藉由結合 mRNA 的 3' 端或 5' 端非轉譯區域 (3' or 5' UTR) 來調控 mRNA 的表現活性。

RBPs 的結構上，通常具有一個或多個作為 RNA 結合的 functional domains，而這樣的性質也讓 RBPs 在結合 RNA 的功能上有多樣性影響。現今發現的 RBPs 中，結構的解析及胺基酸特性辨識較為明瞭的結合域有以下幾種：K-homology (KH) domain、RGG (Arg-Gly-Gly) box、Sm domain、DEAD/DEAH box、zinc finger (ZnF, mostly C-x8-X-x5-X-x3-H)、double stranded RNA-binding domain、cold-shock domain、Pumilio/FBF (PUF or Pum-HD) domain、Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ) domain (Glisovic et al., 2008)。當一蛋白擁有多種重複序列的 RNA binding domain，也代表著他們擁有更複雜且具有專一性的 RNA 結合能力。另一方面，利用 motifs 的基因資訊分析顯示酵母菌中存在的 RBPs 佔全基因的 5%~8% (Keene, 2001)，mRNA 轉錄後修飾如選擇性剪切作用，使得同一段基因上可表現多種不同 RBPs，除此之外，有三種主要的轉譯後修飾作用會發生在 RBPs 上：磷酸化、甲基化、SUMO 修飾，更進一步提升 RBPs 的功能複雜性。這些 RBPs 的轉譯後修

飾作用會使得 RBPs 在細胞中有多元的作用，不僅改變 RBPs 對 RNA 的結合專一性，有時也會改變 RNA 在細胞中的位置。



5.2. RBPs 結合對 RNA 的調控

mRNA 的調控是影響基因表現裡重要的調控位點，一條 mRNA 上的五端及三端的非轉譯序列可作為調控活化、抑制、降解與位移的重要依據，所形成的二級結構便可被 RBPs 所辨識，RBPs 藉由 mRNA 的正調控或負調控影響細胞的生理與功能。而 RBPs 可以影響的層面可分為後轉錄修飾與轉譯作用。在後轉錄修飾上，RBPs 可以從加工作用上調控 RNA，加工好的 RNA 也會被 RBPs 改變細胞內的位置，或是增加轉譯作用，連帶影響蛋白質的生合成，多種 RBPs 也能夠藉由與 mRNA 的五端或三端非轉譯區結合等方式，進一步活化或抑制基因的表現，如位於五端的起始因子可以藉由磷酸化的方式進行調控。從終止密碼子到多聚腺苷酸之間三端非轉譯區，則有其他的 RBPs 結合來影響 RNA 的穩定性或改變 mRNA 的位置。以下針對幾種 RNA binding protein，簡單介紹它們在真核細胞內有哪些的作用與機轉。

5.2.1. 穩定性 (Stability)

mRNA turnover 取決於 mRNA 的生成與降解，當細胞受到某些刺激影響，可能會引發 mRNA 的降解，造成 mRNA 穩定性下降的情形。RBPs 調控 mRNA 降解的方式主要可以藉由移除 3 端 UTR 上的多聚腺苷酸結構，而多聚腺苷酸結構是由初生 mRNA 加工而來 (Glisovic et al., 2008)。因 3 端具高度保守的 AAUAAA 序列及富含 U/GC 序列，被 CF I、CF II 辨識後會於 AAUAAA 序列下游的 cleavage site 做剪切，接著由 Poly(A) 聚合酶 Pap1p 的作用下，為 mRNA 的 3 端尾巴加上了多個腺嘌呤。多聚腺苷酸在細胞中的重要性在於促進轉譯作用或維持 mRNA 在細胞質中的穩定性，而大部分會被一種與多聚腺苷酸高親和力的 RBPs：PABP (poly(A)-binding protein) 給結合，保護 mRNA 免於 ribonuclease 所降解。

當細胞內 poly(A) ribonuclease (PARN) 將多聚腺苷酸縮短時，Dcp1-Dcp2 decapping 複合體會快速地將 mRNA 的 5 端 cap 移除掉，接著一些外切酶如 Xrn1 exonuclease 會迅速經由 5'-3' 或 3'-5' 降解 RNA。在 *Saccharomyces cerevisiae* 中的

Ccr4-Not 複合體(Carbon catabolite repression 4)，為一種 deadenylase，可將 mRNA 的多聚腺苷酸縮短。其中，*LRG1* mRNA 會受到 Ccr4 作用縮短多聚腺苷酸，降低 *LRG1* mRNA 的生成量，進而影響由 *LRG1* mRNA 所生成的 GTPase activating protein (GAP)，接著降低 GTPase Rho1 的活性，影響細胞壁的維持 (Duy et al., 2017)。

5.2.2. 細胞位置分布 (Localization)

mRNA localization 是一個會讓 mRNA 於特定位置上表現的作用，能讓細胞在生長的過程於特定的胞器表現基因。酵母菌內的 *ASH1* mRNA 是一個相關研究較多的例子，當酵母菌處於分裂的時期，*ASH1* mRNA 會被 Myo4 蛋白與 She2、She3 蛋白作用，促使運送到出芽的子細胞中 (Gonsalvez et al., 2004; Long et al., 2000)。其中 She2 與 Puf6 會一起結合 mRNA，抑制蛋白質生成，當 CK2 磷酸化 Puf6 時，使兩蛋白與 RNA 之間作用降低時，才會使 *ASH1* mRNA 於子細胞中活化轉譯作用 (Du et al., 2008)。

5.2.3. 表現抑制或活化 (Repression and Activation)

五端或三端非轉譯區塊也是 RBPs 可以結合調控的位置，造成 mRNA 的表現量上升或下降，同時，結合兩端區塊也會影響轉譯作用，藉由轉譯因子的活化或抑制來促進表現的正負調控。有些蛋白具有抑制 mRNA 表現的功能，如具有 Pumilio/FBF domain 的 PUF 蛋白，研究顯示出會傾向結合在三端非轉譯區塊的序列。酵母菌細胞中的 Puf4、Puf5 能夠結合 *HO* mRNA 的 3'UTR 序列，抑制轉譯作用 (Goldstrohm et al., 2006; Hook et al., 2007)。*HO* mRNA 是一個參與酵母菌細胞性別轉換的一個重要的基因，只有母細胞才具有性別轉換的能力，子代細胞並不具有，Puf5 會去抑制子代細胞中 *HO* mRNA 的活性來降低子代細胞性別轉換的能力 (Tadauchi et al., 2001)。而 Puf5 是藉由辨識位在 *HO* mRNA 3 端上一組 "AUU" 的密碼子，推測 Puf5 會跟相關的抑制蛋白去結合 AUU 並進一步影響轉譯相關的延長因子作用，且 Puf5 去抑制 mRNA 的能力可能也會受到 3'UTR 與 AUU 密碼子之間的長度所影響 (Chritton and Wickens, 2010)。在其他生物內也會有類似的抑制作用發生，*Drosophila* 的胚胎中，Puf 蛋白會抑制 *Hunchback* mRNA 的活性，除了去多聚腺苷酸的作用，也會結合一些轉譯起始的抑制蛋白 d4EHP 去減少

mRNA 的表現(Cho et al., 2006; Wreden et al., 1997)。五端非轉譯區塊的 RNA 結構也會影響轉譯作用的效率。其中 eIF4F 複合體包含了三種蛋白：eIF4E，作為 mRNA 五端帽結構上結合的蛋白；eIF4A，具有 RNA 解旋酶活性，會促進 RNA 二級結構的拆解，使 40S 能夠結合，且會受到 eIF4E 活化；eIF4G，會與三端的 poly(A)-binding protein 有交互作用，使 mRNA 形成環狀。這三個蛋白會聚集在五端 cap 結構上，來開啟 mRNA 的起始作用，會與五端帽結構上的蛋白產生交互作用的因子便會影響到轉譯活性。真核細胞中的 mTORC1 具有活化兩種 S6K kinases 的功能，並且會專一性地磷酸化 eIF4E 的結合蛋白來降低對 eIF4E 的抑制作用，促使轉譯起始的進行，進而增加轉譯作用，與蛋白質的生合成 (Pelletier et al., 2015)。總結以上幾種對於五端及三端調控的例子，我們可以更加了解 RBPs 調控基因表現對生理的重要性及多元性，而這些 RBPs 與蛋白質生成之間是息息相關的，我們可以藉由 RBPs 於生理功能上扮演的角色來了解細胞生長中蛋白質所影響的不同層次。

六、與本研究相關之因子

6.1. Puf6 和 Loc1 和 Ash1 mRNP complex 的關係

ASH1 mRNA，在酵母菌細胞可以專一性地抑制 HO 內切酶活性，來藉此調控從酵母菌交配產生的子世代的性別型態(Chartrand et al., 2001; Darzacq et al., 2003)。在最早的研究中顯示，*ASH1* mRNA 會與 RNA 結合蛋白 Shelp/Myo4p 共同組成 translocation complex，負責 *ASH1* mRNA 運輸於細胞質與細胞核之間(Bohl et al., 2000)。而為了能讓 Ash1 能在特定細胞的特定位置中表現，在運輸過程中維持基因靜默的狀態，還需要有其他蛋白質參與，如 Kdn1、Loc1 及 Puf6 蛋白被發現會參與 *ASH1* mRNA 轉譯作用的抑制(Gu et al., 2004; Irie et al., 2002)。

Puf6 在 Ash1 mRNP complex 中的功能為抑制 *ASH1* mRNA 在運送過程中的轉譯作用。Puf 蛋白是在真核生物中具有調控 RNA 作用的 RNA 結合蛋白，序列上共同具有一段保守性的序列，而具有此段序列的蛋白被歸類在 Puf 蛋白質家族中。目前研究顯示，*Saccharomyces cerevisiae* 具有六種 Puf 蛋白：Puf1~Puf6。所有 Puf 蛋白上都有高度保守性的 Pumilio homology domain (Pum-HD)，又稱為此段序列為 Puf repeat domain，主要位於 Puf 蛋白的三端上，會由八組重複的 36 個胺

基酸排列而成，每一個重複序列會由三個 Helix 構成(H1、H2、H3)，會維持 Puf 蛋白折疊成拱形，並促使 Puf 蛋白調控目標 RNA。因為位於拱形內側的 H3 上帶有正電胺基酸離胺酸(lysine) 及精胺酸(arginine)，因此推測拱形的凹槽部為結合 RNA 的主要位置 (Edwards et al., 2001; Miller and Olivas, 2011)。

Puf 蛋白可以藉由結合特定 RNA 來調控不同的途徑，在真核細胞內作用十分廣泛，包括細胞的分化生長、神經細胞的發育，也有文獻顯示他們也會參與粒線體的生合成過程。Puf 蛋白主要的機制為轉錄後修飾作用，藉由辨識 RNA 3'UTR 序列來進行調控，而他們會作為 RNA 的抑制蛋白，會促進特定結合的 mRNA 降解或是直接地抑制 mRNA 的轉譯作用 (Wharton and Aggarwal, 2006; Wickens et al., 2002)。如在酵母菌內的 Puf5 蛋白會降低 mRNA 穩定性，它會專一性地跟 mRNA deadenylase 複合體 Ccr4-Pop2-NOT 上的次單元 Pop2 結合，活化核酸外切酶活性去縮短 mRNA 三端的 poly(A)tail (Goldstrohm et al., 2006)；Puf6，酵母菌的另一個 Puf 蛋白，則是與轉譯起始因子 eIF5B/Fun12 結合，降低 *ASH1* mRNA 的轉譯，它們之間的結合會受到蛋白質激酶 CK2 (casein kinase II) 所影響，當 Puf6 的 N 端區的胺基酸絲胺酸(Serine)被磷酸化時，會減少 *ASH1* mRNA 的轉譯的抑制，使得到達子細胞的 bud tip 的 Ash1 mRNA 因為 CK2 磷酸化影響而繼續進行 mRNA 的表現 (Deng et al., 2008)。

Loc1 也是另一個結合 *ASH1* mRNA 的 RNA 結合蛋白，參與 RNA 運輸。在 *ASH1* mRNA 的序列中，位於密碼子序列的 E1 localization element 與 3'UTR 上的 E3 localization element，對於 *ASH1* mRNA 的 localization 來說是重要的，並預測了 RNA 這兩段會形成 stem-loop 二級結構，破壞此結構會影響到 *ASH1* mRNA 的功能(Chartrand et al., 1999; Gonzalez et al., 1999)。Loc1 參與 *ASH1* mRNA 所引導的 mRNA localization (Long et al., 2001)，並揭露出與全長的 *ASH1* mRNA 在細胞核中有交互作用。因此在缺失 *loc1* 細胞中，*ASH1* mRNA 的不對稱分佈會受到改變，導致在母細胞與子細胞皆會有 *ASH1* mRNA 的分佈。之後進一步探討與其他 *ASH1* mRNP 相關因子的結合研究裡，顯示 Loc1 也會跟 *ASH1* mRNP 中重要的組成蛋白 She2 有直接地交互作用，並且 Loc1 會促進 She2 與 *ASH1* mRNA 的結合，顯示出 Loc1 參與 *ASH1* mRNA 機制上的重要性 (Niedner et al., 2013)。



6.2. Puf6 和 Loc1 和 60S 核糖體生合成的關係

Puf6 及 Loc1 不只會結合 *ASH1* mRNA 抑制轉譯並參與 mRNA 的 localization，本實驗室研究中也發現 Puf6 與 Loc1 會參與核糖體生合成(Yang et al., 2016)。 *puf6*Δ 在低溫下會影響酵母菌生長，並透過核糖體圖譜分析(Polysome profile) 的實驗，發現 *puf6*Δ 在低溫 20 度時，比起野生株的結果，突變株中 60S 的波峰降低。並由 high-copy suppressor 的基因篩選中，找出 *puf6*Δ 造成的生長缺陷能藉由大量表現 *RPL43* 來恢復，顯示 Puf6 與 60S 生合成的相關性。接著，在其它文獻中，也指出 Loc1 會參與 60S 的裁切與生合成，並會促進 60S 生合成的效率 (Harnpicharnchai et al., 2001 ; Urbinati et al., 2006 ; Nissan et al., 2002)。顯示 Loc1 可能與 Puf6 類似，不只會影響 *ASH1* mRNA，也會一起參與 60S 的生合成。因此，也同樣測定 *loc1*Δ 造成的生理缺陷，卻看到更嚴重的生長缺陷。核糖體圖譜測定中，其 60S 的波峰高度更加地降低。若進一步以顯微螢光實驗，可以觀察到缺乏 Puf6 與 Loc1 會使得核糖體的訊號無法正常出核，此為更直接的證據顯示 Puf6 與 Loc1 會影響核糖體的成熟。但有趣的是，*RPL43* 並不是 *loc1*Δ 的 high-copy suppressor，大量表現 *RPL43* 並不會恢復 *loc1*Δ 造成的生長缺陷。

Puf6 與 Loc1 與 60S 生合成的關聯，使我們更進一步從 60S 的組裝及 rRNA 的裁切作用上，分別探討兩蛋白所扮演的角色。在 60S 的組裝上，首先發現 Puf6 與 Loc1 與 Rpl43 核糖體蛋白具有蛋白質之間的交互作用，顯示出 Puf6 及 Loc1 可能也會參與 Rpl43 的生合成。接著，利用不同時期的組裝因子作為 bait，去沈澱純化核糖蛋白，並分析核糖蛋白與組裝因子的結合量。結果顯示，缺少 Puf6 與 Loc1 會導致 Rpl43 核糖體蛋白於 pre-60S 大次單元的結合量增加，更進一步確認了 Puf6 與 Loc1 對 Rpl43 核糖體蛋白組裝的重要性，需要兩蛋白協助 Rpl43 於 60S 前體的組裝(Yang et al., 2016)。在 rRNA 的裁切方面，Rpl43 會參與 7S pre rRNA 的加工作用，核糖體的位置上，結構緊鄰著 Rpl2，會參與 27S pre-rRNA 中 ITS2 位點上的裁切，並具有穩定裁切產物 7S pre-rRNA 及 25.5S rRNA 的功能。缺少 Puf6 與 Loc1 皆會產生與缺失 *RPL43* 時類似的 pre-rRNA 累積情形，顯示出兩蛋白與 Rpl43 一起參與 rRNA 的裁切作用 (梁凱任., 2017)。

第二章、研究動機

在酵母菌中，核糖體蛋白對於核糖體組裝的完整是重要的，而細胞為了獲得足量的核糖體蛋白進行組裝，部分具有兩對同源基因，負責共同生成核糖蛋白。而細胞內核糖體蛋白的含量也需要獲得平衡，過多或過少的核糖體蛋白都會對酵母菌的生長產生壓力，因此，核糖體蛋白生成的調控對於整個細胞生長是有影響的。

先前研究結果發現，Puf6 與 Loc1 會協助 Rpl43 組裝，且缺失兩蛋白不僅會導致 60S 生成有缺陷，也會改變核糖體在細胞核中的分佈。在蛋白質結合方面，Puf6 會藉由其 *PUF* domain 去與 Rpl43 結合，Loc1 會藉其 N 端 50 到 100 的序列之間與 Rpl43 結合 (梁凱任., 2017)。在本篇，延續先前的研究，繼續探討 Puf6 與 Loc1 在 *RPL43* 生成上的調控。我們先以蛋白質層次，以西方墨點法的方式，偵測缺失 Puf6 與 Loc1 對於細胞內 Rpl43 的含量影響，發現 Puf6 缺失時會些微減少 Rpl43 的含量，以及 Loc1 缺失時會大量地減少細胞內的 Rpl43，顯示出 Puf6 與 Loc1 雖然會參與 Rpl43 與 60S 的生合成。但是個別是如何參與 Rpl43 的生合成，以及對於核糖體生合成的重要性還是尚未明瞭的部分。另外，在酵母菌細胞內，*RPL43* 為酵母菌細胞中的必須基因，具有兩段同源性基因 *RPL43A* 與 *RPL43B*。在 DNA 序列上，*RPL43A* 與 *RPL43B* 相似度為 90%，但兩對同源基因所生成的蛋白質在胺基酸序列上完全相同。兩同源基因在蛋白質的生成量上有明顯的不同，顯示 *RPL43A* 與 *RPL43B* 序列差異影響蛋白質的生合成，並且 Puf6 與 Loc1 也曾報導為 RNA 結合蛋白，*RPL43A* 與 *RPL43B* 是否會因為 Puf6 與 Loc1 的結合影響其調控亦是本研究想探討的主題。我們將會在蛋白質、轉錄後與轉譯作用等層次中來分析兩個蛋白會如何調控與參與 Rpl43 生合成途徑，進一步確定兩個蛋白對於核糖體生合成的重要性。

第三章、材料與方法



1. 菌株與質體

本研究所使用之酵母菌株請見表一。本研究所使用之質體請見表二。

2. 突變株建構

2.1 膠體電泳 (Gel electrophoresis)與 DNA 電泳膠體純化 (Gel recovery)

DNA 樣品以 1%的 Agarose 膠體於 100V 下跑膠 20 分鐘，接著使用 Ethidium Bromide 外染 15~20 分鐘，最後以 UV 照射觀察 DNA 於膠體中分離之情形。切下含有 DNA 片段的膠體，使用 DNA gel recovery kit 將 DNA 從膠體中分離，即可獲得純化的目標 DNA 片段。

2.2 限制酶切割 (Enzyme digestion)與接合作用(Ligation)

使用特定之限制酶切割目標質體，製造出相合的切位，以利於接合反應的進行。混合緩衝溶液及目標酵素的質體於 37°C下反應一個小時，再以 1% Agarose 膠體電泳分離所切割的片段，經由 UV 照射以及 DNA 電泳膠體純化的方法獲得所需的 DNA 片段。經過切割的質體純化後以適當之比例並使用 Ligation High (TOYOBO)進行接合作用，於 16°C的環境下反應兩小時到隔夜。

2.3 Inverse PCR 突變株建構 (Inverse PCR)

使用 KOD-Plus-Mutagenesis kit (TOYOBO)進行點突變以及片段缺失之基因質體的建構。將新鮮抽取的質體以設計過的引子利用 iPCR DNA 聚合酶進行全質體的聚合反應，反應結束後加入 *DpnI* 於 37°C反應一小時，專一性降解非藉由 iPCR 聚合酶所合成的質體。接著以 ligation high 以及 T4 polynucleotide kinase 反應一小時進行接合作用，通過大腸桿菌轉型的方式送入 DH5α competent cells。取 50 μl 的 DH5α competent cells 加入 10 μl 的接合作用產物，置於冰上 30 分鐘後，置於乾浴槽 42°C 90 秒，再放到冰上 120 秒，增加轉型作用的效率，加入 500 μl 的 LB 於 37°C下培養 60 分鐘恢復大腸桿菌活性，最後離心菌體去除多餘 LB 後，塗至含有抗生素的培養基上，藉以選殖出成功轉型的菌落，再抽取特定菌落的質體，以限制酶切割後，用膠體電泳的方式確認是否為正確之質體。



3. 生長測試 (Growth test)

將於適當之培養基隔夜培養的菌液稀釋至相同的 OD_{600} ，進行十倍的序列稀釋，接著依序取 5 μ l 的稀釋液點在培養基上，分別在不同的溫度下培養三天，觀察菌落的生長情形。

4. 啤酒酵母菌轉型作用 (Yeast transformation)

將酵母菌的隔夜培養液以 8000 rpm 離心留下菌體，以 1 mL 的 1X Li/TE (100mM LiOAc, 100mM TE buffer) 清洗菌體，加入約 100~200 μ l 的 1X Li/TE 懸浮菌體，取 15 μ l 的菌液於每一個反應管中，並加入 5 μ l 的 ssDNA 及 2 μ l 的目標質體，加入 300 μ l 的 Li/TE/PEG (40%PEG, 100mM LiOAc, 10mM Tris pH8, 1 mM EDTA) 混合均勻後於 30 $^{\circ}$ C 培養 30 分鐘、42 $^{\circ}$ C 培養 15 分鐘，最後於管中加入 1 ml 的無菌水混合並離心，將多餘的液體倒出後，取菌體塗於適當的選擇性培養基上於 30 $^{\circ}$ C 培養 3~5 天，可獲得含有特定質體之啤酒酵母。

5. 蛋白質相關實驗

5.1 蛋白萃取液的製備 (NaOH 破菌法)

將隔夜培養的酵母菌菌液，稀釋於 5~6 mL 的培養液中，經過至少兩次的分裂生長到對數生長期，其菌液 OD_{600} 介於 0.4~0.8，便可於 4 $^{\circ}$ C 8000rpm 收下菌體。接著使用 100 μ l 的無菌水懸浮菌體之後，加入 100 μ l 的 0.2M NaOH，混合後於室溫下靜置五分鐘，接著離心菌體，將上清液盡量吸乾之後，加入 50 μ l 的 sample buffer (0.06M Tris-HCl, pH 6.8, 5% glycerol, 2% SDS, 4% β -mercaptoethanol, 0.0025% bromophenol blue) 懸浮菌體，以 99 $^{\circ}$ C 煮沸 3 分鐘變性蛋白質再進行西方墨點法分析。

5.2 西方墨點法 (Western blotting)

當 SDS-PAGE 上、下膠凝固好後，以 1X running buffer 注入跑膠臺中，將煮沸好的蛋白質樣品依照所需量填到 SDS-PAGE 膠體的孔內，於 180V 的電壓下跑 45 分鐘。預先將 polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜以 100% 甲醇浸濕後，泡在 Anode buffer 中至少 30 分鐘。之後以半乾式轉印機器 Trans-Blot® 進行蛋白質的轉漬，於 100V 轉漬 30 分鐘。將轉漬完成的

PVDF 膜浸泡在溶於 1X TBS buffer 的脫脂牛奶溶液中進行 blocking，接著加入稀釋後的一抗於 4 °C 隔夜培養或室溫兩個小時。以 1X TBST 清洗 PVDF 膜三次，加入二抗反應 30~60 分鐘，接著繼續以 1X TBST 清洗三次。加入 ECL Blotting Substrates 反應放出冷光，於暗室中偵測發光量。

5.3 免疫沈澱法 (Immunoprecipitation)

將隔夜培養的酵母菌液，稀釋接至 250 mL 的培養基中，以各自的培養條培養至 OD₆₀₀ 的吸光值為 0.6-0.8，將菌體以 5000 rpm 離心收下。以 Lysis buffer (20 mM Tris HCl pH7.4, 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM leupeptin) 懸浮菌體後，加入小玻璃珠破菌六次，每震盪 30 秒後，冰上靜置 1 分鐘。於 4 °C 以 13300 rpm 離心兩次純化蛋白質萃取液。將上清液於 OD₂₈₀ 的吸光值測定蛋白質濃度並標準化。先加入 20 µl 的 protein A Agarose beads 進行 blocking 30 分鐘，取出蛋白質液後，再加入 2 µl anti-myc 抗體於 4 °C 搖晃混合 2 小時，接著加入 protein A beads 反應一小時，最後以 3000 rpm 低速離心，將上清液清除後，以 1 mL lysis buffer 洗三次，最後將液體抽乾留下 beads 的部分，加入 30 µl 的 sample buffer 將 beads 懸浮，煮沸五分鐘後再進行西方墨點法的分析。

5.4 蛋白質穩定度 (Protein stability) 分析

隔夜菌液稀釋後培養至 OD₆₀₀ 的吸光值為 0.4-0.6，加入 200 µg/mL 的 cycloheximide，培養於適當條件並在特定時間下收取菌體。於 4°C 下 5000 rpm 離心菌體後，倒出上清液將菌體凍在 -80°C 中。破菌時將菌體懸浮於冰的 lysis buffer (20 mM Tris HCl pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM leupeptin)。震盪 30 秒後靜置在冰上一分鐘，共重複六次震盪。於 4°C 下 13300 離心十分鐘，取上清液至於新的離心管中，共重複兩次，以 OD₂₈₀ 測定蛋白質濃度並進行標準化，將標準化的蛋白質溶液加到離心管中，於 4°C 下 80000 rpm 離心一小時，而沈澱在底部的部分為核糖體，上清部分則為自由型態、尚未結合至核糖體的蛋白。取出含有自由型態核糖體蛋白的上清液，加入 TCA 沈澱一小時，4°C 下 13300 離心後抽乾上清液，以適當體積之 Sample buffer (+Tris) 回溶蛋白質沈澱物，99°C 煮沸五分鐘再進行西方墨點法的分析。



6. 啤酒酵母菌 RNA 表現量之測定

6.1 酵母菌 RNA 的萃取 (RNA extraction)

將 5~10 mL 的酵母菌培養至 OD₆₀₀ 吸光值約 0.4~0.6，以 8000 rpm 離心收下菌體，以 400 µl 的 AE buffer (50mM NaOAc pH5.2, 10 mM EDTA) 懸浮菌體，並加入 34.5 µl 的 20% SDS、400 µl 的酸性酚 (pH4.5~5.5) 混合均勻。於 65°C 乾浴槽進行破菌，每 15 分鐘震盪一次總共 1 小時。之後將破菌液置於 4°C 下降溫十分鐘，再於 4°C 13,300 rpm 高速離心十分鐘，將上方水層取出來進行萃取。分別以 200 µl 的酸性酚萃取兩次，萃取液取至新的離心管後，以 400 µl 的氯仿 (chloroform) 萃取兩次。最後萃取完的上清液取出，加入萃取液 1/10 倍體積的 3M NaOAc (pH5.2)，以及 2.5 倍體積的分生級酒精於冰上進行 RNA 沈澱 30 分鐘或於 -20°C 沈澱隔夜。沈澱過後的 RNA 以 4°C 13000 rpm 高速離心 10 分鐘，倒出上清液後以 70% 的分生級酒精清洗。放置於室溫乾燥，最後回溶於 20~50 µl 的 DEPC 超純水中，保存於 -80°C 的環境。

6.2 DNase 處理 (TURBO™ DNase Treatment)

將 6.1 萃取出 RNA 樣品稀釋十倍後進行 OD₂₆₀ 的吸光值測定，接著定量 RNA 濃度到 10 µg，並補水到體積總共 44 µl，以 TURBO DNA-free™ kit (Ambion®)，將 RNA 中的 genomic DNA 去除。首先於定量好的樣品中加入 5 µl 的 10X TURBO DNase Buffer 以及 1 µl 的 TURBO DNase，於 37 °C 反應 30 分鐘，接著加入 DNase Inactivation Reagent，靜置室溫 5 分鐘並偶爾震盪，抑制 DNase 的酵素活性。4 °C 離心 1.5 分鐘後，取出約 50 µl 上清液至新的 1.5 ml tube 內。

6.3 反轉錄作用 (Reverse Transcription)

將 6.2 的 TURBO 處理完的產物配成 1 µg / 10 µl，分別加入 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher): 2 µl RT buffer、0.8 µl dNTP mix、2 µl Random Primer、1 µl Reverse transcriptase 及 4.2 µl Nuclease-free water。混勻後與下表反應條件進行反轉錄作用。



Step	Temp (°C)	min
1	25	10
2	37	120
3	85	5

6.4 即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction)

將反轉錄產物 cDNA 樣品稀釋 20 倍，所需的兩組 primer 也稀釋 20 倍為 5mM 的濃度，每一個反應需含有 1.6 μ l 稀釋過後的 cDNA、1.2 μ l 的 Forward 及 Reverse Primer 以及 6 μ l 的 dH₂O，最後於避光的環境下加入 10 μ l 的 SYBR™ Green Master Mix SYBR green (ThermoFisher)，進行 qPCR 的定量分析。統計方式為使用 SPSS 統計軟體作變異數分析(ANOVA)，並以費雪 LSD 法進行差異性檢定。

Step	Temp (°C)	Time (sec)
Holding	95	600
Cycling (40 cycles)	95	15
	60	60
Melting temperature	95	15
	60	60
	95	15

6.5 RNA 免疫沈澱法 (RNA-Immunoprecipitation)

將目標酵母菌株隔夜培養後，稀釋接至 500 ml 的培養基中，於 30 °C 培養 OD₆₀₀ 吸光值為 0.7~0.8，將菌體以 5,000 rpm 離心收下。以 Lysis buffer (20 mM Tris Hcl pH7.4, 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM leupeptin, 250 Units of RNasin® Ribonuclease Inhibitors)懸浮菌體，加入 1 ml 小玻璃珠破菌，震盪 30 秒並重複十次。4°C 13000 rpm 離心兩次，取上清液進行 OD₂₈₀ 標準化。先使用 25 μ l Protein A Agarose beads (GE Healthcare) 於 4 °C 進行 blocking 30 分鐘。離心五分鐘後取出上清液，加入 100 μ l 的 IgG-

sepharose beads 於 4 °C 搖晃反應 2 小時，之後以 lysis buffer 清洗三次，之後加入 1 mM DTT 於 lysis buffer 中清洗兩次，抽乾上清液後，加入 75 μ l ChIP elution buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS) 萃取 RNA 重複兩次，接著加入 300 μ l 的 5:1 acid phenol : chloroform pH 4.7，離心後取上方水層至新管，最後加入 30 μ l 3M NaOAc (pH5.2) 及 900 μ l ice-cold absolute ethanol 沈澱 RNA 1~2 小時，離心晾乾後以 DEPC 水回溶 RNA 沈澱物。

7. 核糖體圖譜分析 (polysome profile)

使用蔗糖梯度來進行核糖體圖譜分析。收集 OD₆₀₀ 吸光值介於 0.3~0.4 的菌液，加入 50 μ g/ml cycloheximide 後繼續培養約十分鐘使核糖體固定在 mRNA 上，接著在收菌同時加入 1/3 倍體積的冰塊以冰鎮菌體，離心去除上清液後，將菌體凍在 -80°C。破菌時，加入 200 μ l 將菌體懸浮在冰的 polysome buffer (20 mM Tris HCl pH7.5, 8 mM MgCl₂, 12 mM mercaptoethanol, 100 mM KCl, 50 μ g/mL cycloheximide, 1 mM PMSF, 1 mM leupeptin) 中，加入約 300 μ l 的小玻璃珠，每震盪 30 秒後就靜置冰上 1 分鐘，共重複四次。將破菌液放到 1.5 mL 的離心管，在 4°C 下以 13300 rpm 離心 10 分鐘，吸出上清液後轉移到新的離心管再離心一次。最後取 9 或 10.8 OD₂₆₀ unit 的蛋白質液放在 7-47% 的連續蔗糖液上，在 4°C 下以 40,000 rpm 離心兩個半小時，以梯度分析儀分析 OD₂₅₄。

7.1 RNA 於 polysome 分離樣品之純化

RNA 純化的部分則是先加入 500 μ l 的 Trizol reagent 及 200 μ l 的 chloroform，於 4 °C 13300 rpm 離心 15 分鐘，將 DNA, 蛋白質及 RNA 分離開來，吸取 500 μ l 位於水層中的 RNA 置另一新管，加入 1 mL isopropanol 異丙醇沈澱 RNA，於 -20 °C 下靜置隔夜。離心 15 分鐘以獲得沈澱的 RNA pellet，並以 70% 酒精清洗 pellet 之後，室溫放至全乾後加入 10 μ l 的 DEPC 水回溶。加入 10 μ l 的 cDNA kit 進行反轉錄作用，產物保存於 -20°C 下，並進行後續之 qPCR 分析。

7.2 蛋白質於 polysome 分佈的分析

另外亦取其中的 500 μ l 進行 TCA 沈澱蛋白質，以進行西方墨點法的分析，觀察大小次單元的分佈情形。

第四章、實驗結果



一、Puf6 與 Loc1 維持 Rpl43 核糖體蛋白的穩定性

Rpl43 在細胞中的總量會受到 *puf6* Δ 及 *loc1* Δ 所影響，酵母菌具有兩個 *RPL43* 的同源基因：*RPL43A*、*RPL43B*，兩者皆會受到影響：其中 *puf6* Δ 時，Rpl43 會些微的減少，而在 *loc1* Δ 的細胞內，Rpl43 的含量會嚴重地下降（圖一 A），表示這兩個蛋白對於 Rpl43 核糖體蛋白總量的維持很重要。部分的核糖體蛋白在新生成後需要有專一性結合特性的伴護蛋白來負責維持核糖體蛋白的結構完整性。由先前結果可知，這三個蛋白之間是有結合上的交互作用 (Yang et al., 2016)。因此，我們想進一步知道 Puf6 與 Loc1 是否為保護核糖體蛋白 Rpl43 的伴護蛋白：缺少這兩個蛋白時，會影響 Rpl43 的穩定度。因此，細胞以放線菌酮 (Cycloheximide) 處理，抑制核糖體的轉譯作用，停止蛋白質的生合成。因為成熟的核糖體穩定度很高，且較高的核糖體蛋白比例存在於核糖體中，因此，破菌後會以超高速離心的方式將蛋白質液中的游離態(新生態)Rpl43 核糖體蛋白和核糖體分離開來，以西方墨點法分析經過十分鐘與二十分鐘後，新生態 Rpl43 蛋白質降解後的剩餘量。而結果顯示，缺少 Puf6 與 Loc1 都會造成新生成的 Rpl43 核糖體蛋白穩定度降低，尤其是在缺少 Loc1 時，Rpl43 受到的影響更為嚴重（圖一 B、圖一 C）。以 Image J 去積分並計算每個時間點的剩餘量中，可以發現缺失 Loc1 保護的 Rpl43，在十分鐘內會降解到只剩下原本的百分之十。這樣的結果顯示出 Puf6 與 Loc1 皆會維持新生成的核糖體蛋白 Rpl43，並且 Loc1 比起 Puf6，對於維持核糖體蛋白是較為重要的。



二、Rpl43 的表現及含量受啟動子與其他因素影響

我們進一步在 *puf6Δ* 與 *loc1Δ* 中大量表現 Rpl43，在低溫下以生長測試的實驗測定突變株是否能夠由回補細胞中降解的 Rpl43 而恢復生長，因為低溫時核醣體生合成的速度會減緩，因此可以去凸顯 *puf6Δ* 在正常溫度下較不明顯的生長缺陷。而結果顯示，只有大量表現 Rpl43B 時，會恢復 *puf6Δ* 低溫下生長的缺陷，但 Rpl43A 卻不行。在 *loc1Δ* 中即使大量表現了 Rpl43A、Rpl43B 也不會恢復基因剔除所造成的缺陷（圖二 A）。在細胞中，Rpl43A 的表現量比 Rpl43B 高（圖一 A），但只有 *puf6Δ* 造成 Rpl43 穩定性下降的現象可以藉由回補更多的 Rpl43B 來恢復，在 *loc1Δ*，Rpl43A、Rpl43B 卻無法恢復生長缺陷，因此，我們認為 Puf6、Loc1 可能會以其他的方式影響 Rpl43 的生成。

蛋白質生成量減少的原因，亦可能是由於抑制 mRNA 的轉錄或是促進 mRNA 的降解，而造成 mRNA 量的降低，且 Puf6 與 Loc1 在先前研究的報導中為一種 RNA 結合蛋白，因此我們首先以 qPCR 的方式測定細胞內 *RPL43* mRNA 有無受到 Puf6 與 Loc1 的影響。我們以特定引子偵測成熟型態 *RPL43A* 及 *RPL43B* 的 mRNA，結果顯示，細胞若缺少 Puf6 並不會顯著地改變 *RPL43A* 或 *RPL43B* mRNA，但是，當 Loc1 缺失時，mRNA 反而有增加的情形（圖二 B）。

我們進一步分析 mRNA 生成量上的結果是否會受到啟動子影響。因此我們建構由 *RPL43A* 與 *RPL43B* 的五端啟動子來表現綠色螢光蛋白(GFP)的建構質體（圖二 C），轉型到 *puf6Δ* 及 *loc1Δ* 中，分別以西方墨點法及 qPCR 的方式來分析當 Puf6 或 Loc1 缺失時對於 *RPL43* 啟動子的影響。其中 *RPL43A* 的啟動子強度較 *RPL43B* 強（圖二 C），表示酵母菌株中 *RPL43A* 是表現 Rpl43 蛋白質的主要基因，此和蛋白質的量相關（圖一 A）。缺失 Puf6 會些微減少 GFP 的表現量，而缺失 Loc1 時則會發現有 GFP 表現量增加的情形（圖二 C），RNA 的總量分析中也可以看到一樣的趨勢（圖二 D）。這些結果顯示出 *RPL43* 的啟動子驅動會被 Puf6 與 Loc1 調控，但這並非造成 Rpl43 蛋白含量下降的原因。

三、*RPL43* 上的內含子和 3'UTR 會影響 mRNA 的表現

從圖二 C 中的 promoter assay 及 qPCR 分析中，顯示出 *RPL43* mRNA 的啟動子會受到 Puf6 與 Loc1 所影響，缺失 Puf6 會些微減弱啟動子的強度、但缺失 Loc1 卻會提高啟動子表現的能力。Puf6 與 Loc1 曾經報導為 RNA 結合蛋白，Puf6 所屬的 PUF 蛋白多發現會結合在 RNA 的三端非轉譯序列（後以 3'UTR 簡稱）(Miller and Olivas, 2011)，Loc1 則是會結合在 RNA 上的 localization element，表示出兩蛋白具有調控 RNA 的能力 (Long et al., 2001)。但目前兩蛋白會如何調控 *RPL43* mRNA 的生成，是目前還未知的。

RPL43A 或 *RPL43B* 的外顯子 1 (exon 1) 只有 AT，需將內含子移除後才會形成 ATG 的 Start Condon。首先，我們建構帶有 *RPL43B* 不同片段：啟動子、內含子(Intron)、3'UTR 來表現 GFP 的質體，來探討不同序列對於 *RPL43B* 表現的影響，圖示如（圖三 A 左）。在野生酵母菌株內，當報導基因只具有啟動子序列，多帶有一段內含子序列並不會影響到 GFP 的含量，顯示內含子並不會影響 *RPL43B* 啟動子表現 GFP 的能力（圖三 B Lane 3 and 4）。但是當報導質體帶有 3'UTR 的序列時，其表現 GFP 的能力會顯著地下降（圖三 B Lane 2 and 4），若以 *SSF1* 為啟動子來表現時，具有 *RPL43B* 的 3'UTR 亦會顯著地降低 GFP（圖三 B Lane 5 and 6），以上的結果顯示，*RPL43B* 的 3'UTR 會降低 mRNA 的表現。但當報導質體同樣帶有 3'UTR 序列，多帶有內含子的質體卻會產生較多的 GFP（圖三 B Lane 1 and 2）。此結果顯示，內含子單獨存在的情況並不會影響到報導質體生成蛋白質的能力，卻能夠在去影響 3'UTR 抑制的作用。而這個結果，當我們利用 qPCR 方式去測定 mRNA 的含量時，也有類似的結果，顯示出，這些生成的 GFP 在轉錄或是轉錄後調控上會受到 *RPL43* element 調控（圖三 D 左）。

另一方面，我們也建構了帶有 *RPL43A* 的 5'UTR、內含子 及 3'UTR 的報導基因，圖示如（圖三 A 右），與 *RPL43B* 內出現的現象做比較，觀察是否有差異。而結果顯示出的趨勢與 *RPL43B* 並不類似。對於 *RPL43A* 來說，它的啟動子強度較 *RPL43B* 的強（圖二 B Lane 1 and Lane 4）。相同的，若是啟動子加上內含子，並不改變表現量（圖三 C Lane 3 and Lane 4）。但當有 *RPL43A* 的 3'UTR 卻不會有造成 GFP 表現下降的情形，反而增加表現（圖三 C Lane 2 and Lane 4）。

若有表現內含子，反而會下降 GFP 蛋白質表現（圖三 C Lane 1 and Lane 2）。當我們同樣利用 qPCR 方式去測定野生株中，GFP 的 mRNA 含量時，跟 *RPL43B* 的結果不同的是，不管帶有哪一段序列的報導質體，其生成的 RNA 含量卻是等量的，顯示 *RPL43A* 所生成的 GFP，應是在轉譯的調控上會受到 *RPL43* element 所影響（圖三 D）。而這些結果皆顯示出，同源基因 *RPL43A* 與 *RPL43B* 所調控及生成 *RPL43* mRNA 及 Rpl43 可能是不一樣的。

四、Puf6 與 Loc1 會影響 *RPL43* 上內含子和 3' UTR 的調控

為了測試 Puf6、Loc1 是否參與後轉錄調控，我們同樣在 *puf6Δ*、*loc1Δ* 中轉型同樣的質體，觀察缺乏 Puf6 與 Loc1 時如何影響 GFP 的表現。當細胞中缺失 Puf6 與 Loc1 時，表現 GFP 的情形也會跟野生株一樣：Reporter 具有 *RPL43B* 5' 和 3' UTR 時，比起不表現內含子的，表現有內含子的報導基因會增強 GFP 表現（圖四 A Lane 1 and Lane 2）；以及比起不具有 3'UTR，具有 3'UTR 會減弱 GFP 的表現（圖四 A Lane 2 and Lane 4）。

我們也同時比較 *puf6Δ*、*loc1Δ* 中，以帶有 *RPL43A* 的基因來驅動 GFP 表現，發現 *puf6Δ* 也跟野生株一樣，*RPL43A* 3'UTR 會對表現有提升的作用（圖四 B 左：Lane 2 and lane 4），但內含子的時候會抑制此提升的效應（圖四 B 左：Lane 1 and lane 2）。但在 *loc1Δ* 裡卻不一樣（圖四 B 右），*RPL43A* 3'UTR 會對表現有抑制的作用（圖四 B 右：Lane 2 and lane 4），但具有內含子的時候會去除此抑制的效應（圖四 B 右：Lane 1 and lane 2）。此結果顯示出 Puf6 與 Loc1 對於 *RPL43A* 的內含子和 3'UTR 亦有調控。

在 *puf6Δ* 中，我們發現 *RPL43B* 中，內含子提升表現的程度比野生株少（圖四 A 左 Lane 1 and Lane 2）。我們進一步分析 Puf6 及 Loc1 是否對調控內含子上具有影響，所以比較同樣帶有五端啟動子及三端的情況下，有無內含子（PKL680 及 PKL752，PKL818 及 PKL819）對蛋白質及 RNA 表現的影響，並以無內含子的報導質體所分析的表現量定量為 1，將 PKL818、PKL680 中獲得之 Ct 值與 PKL819、PKL752 做對除比較（圖四 上：蛋白質定量，下：以 qPCR 對 RNA 定量）。首先，在野生株組內，蛋白質的定量結果顯示具有 *L43B* 內含子是能夠明顯提升表現，但缺失 Puf6 會使內含子提升的效果減弱，同時若偵測 GFP RNA 的含量時，缺失 Puf6 會明顯降低內含子的調控（圖四 C 右）；在 *L43A* 中，蛋白質定量的結果裡，有無 Puf6 對於內含子的調控並沒有顯著影響，且同樣地偵測 RNA 的含量，Puf6 有無並不會對 *RPL43A* 有明顯影響的趨勢（圖四 C 左），顯示 Puf6 可能對 *RPL43B* 的調控是有專一性的影響。

而在 *loc1Δ* 中，在蛋白質的分析上，*L43A* 的基因內具有五端啟動子及三端的情況下，內含子會提升蛋白質的含量；而在 *L43B* 的結果裡，比起野生株，蛋白質含量是會些微減少的（圖四 C，上圖：蛋白質定量）。但是若同樣分析細胞內

GFP 的 RNA 含量，無論是 *RPL43A* 還是在 *RPL43B* 的報導質體裡，Loc1 的缺失皆會顯著提升 RNA 的生成（圖四 C，下圖：RNA 定量）。此結果顯示 *loc1Δ* 可能會促進 *RPL43A* 的轉錄，但對 *RPL43B* 而言，雖然 RNA 的生成量增加，但是蛋白質的生成量比起野生株來說是較少的，顯示 *loc1Δ* 可能在 *RPL43B* 的轉譯作用上會有較明顯的抑制。針對以上的結果，我們認為 Puf6 可能是影響 *RPL43B* 內含子的剪切作用相關的因子，還需要一些測定剪切作用效率的實驗來證實 Puf6 所調控的結果。而 Loc1 可能會特異性改變 *RPL43A*，缺少 Loc1 將會使 *RPL43* 3'UTR 原本具有活化表現的能力變得抑制。

接著，從先前結果中，我們發現具有 *RPL43B* 的內含子會去除 3'UTR 的抑制，增加表現量，但是在不具有 *RPL43B* 3'UTR 的時候，內含子就不會有明顯的提升效果，表示內含子與 3'UTR 的序列之間應該是有關聯的。為了測試內含子去除 3'UTR 的抑制的影響，是否需位於同一條 mRNA 上，或是可以以外加表現的方式來驅動，因此我們以質體的方式大量表現了 *RPL43B* 的內含子於野生株、*puf6Δ* 與 *loc1Δ* 中，並同時轉型了具有 (PKL675)、及不具有 *RPL43* 3'UTR (PKL752) 的 GFP 報導質體，觀察大量表現的內含子是否能夠抵銷 3'UTR 的抑制作用。而結果顯示，無論是野生株還是 *puf6Δ* 中，大量表現 *RPL43* 的內含子並不會去除 *RPL43B* 3'UTR 的抑制情形。但在 *loc1Δ* 中，大量表現的內含子可以去除 3'UTR 的抑制，表示 Loc1 可能去結合內含子 RNA，去除 3'UTR 抑制的能力（圖四 D）。

五、大量表現 Puf6、Loc1、Rpl43 對 *RPL43* 內含子和 3' UTR 的調控的影響

圖三結果可知 Loc1、Puf6 會影響到報導基因的表現，因此，我們接著想要探討他們對 Rpl43 生成過程所扮演的角色是什麼。我們在野生株內大量表現 Puf6、Loc1，並同時放入帶有不同 *RPL43B* 及 *RPL43A* 序列片段的報導基因，其中 *PUF6* 是以 2 μ 來大量表現，*LOC1* 則是以 *GAL* 啟動子來大量表現。我們發現在不管是 *RPL43A* 還是 *RPL43B*，當具有 5'UTR、3'UTR 但缺少內含子 (PKL752、PKL819) 的情況下，大量表現 Loc1 會明顯改變 GFP 的生成 (圖五 A Lane 3 and Lane 4)：下降 A-GFP、上升 B-GFP 的量。但在具有完整 5'UTR-內含子-3'UTR (PKL818、PKL680)、缺乏 3'UTR 但有 Intron (PKL814、PKL815)或只具有 5'UTR (PKL762、PKL675)的時候，蛋白質生成量上並不會顯著影響。顯示出，不具有 intron 的報導質體，Loc1 會去影響 *RPL43* 的 3'UTR，抑制 3'UTR 調控 *RPL43* 的能力。

接著在大量表現 Puf6 的細胞內，在 *RPL43B* 的報導質體內會些微提升具有內含子的報導基因(圖五 B 右：Lane 1 and Lane 2、Lane 5 and Lane 6)，並且在其他組報導基因中並不會改變 GFP 表現。而在 *RPL43A* 的報導質體裡，皆不會有顯著的影響(圖五 B 左)。因此我們推測，Puf6 可能對於 *RPL43B* 的剪切會有提升的作用，因此在具有內含子的 *RPL43* 中，表現 GFP 的能力有些微提升的情形，此外，Puf6 可能不會影響 *RPL43A*，所以大量表現 Puf6 並不會改變 *RPL43A* 報導質體的表現。

除此之外，部分核糖體蛋白過量表現時，可以結合到自己的 RNA 來調控表現(Badis et al., 2004; Vilardell and Warner, 1997)。因此，我們大量表現 *RPL43* 觀察 Rpl43 是否有調控自身基因的情形，並分析對於兩段同源基因來說，產物 Rpl43 是否對於 mRNA 的轉錄後修飾上有差異。因此，在細胞內表現報導質體的同時，轉型可大量表現 *RPL43A* 及 *RPL43B* 的質體，且 *RPL43* 是以 *GAL* 啟動子來大量表現。在大量表現 *RPL43* 的組別裡，我們發現大量表現對 *RPL43B* 表現會有抑制的現象 (圖五 C 右：Lane 1、2)，同時在具有內含子缺乏 3'UTR 的組別內也有些為抑制的作用 (圖五 C 右：Lane 5、6)，推測大量表現的 Rpl43 可能會藉由抑制參與 Intron Splicing 的機制，來平衡細胞內過多的 Rpl43。但是，大量表現 Rpl43 可以促進缺乏內含子但具有 3'UTR 的報導基因表現 (圖五 C Lane 3、4 右)，

去除了 3'UTR 對表現的抑制。因此，Rpl43 可去除 3'UTR 對 *RPL43B* promoter 的抑制效果。

相反地，在 *RPL43A* 的報導質體裡，大量表現 Rpl43 並不會顯著地影響內含子的調控(圖五 D 左)，顯示 Rpl43 對自我調控的機制上，可能較會對 *RPL43B* 的 RNA 有較高的結合，透過這樣的方式去影響 Rpl43 的生成。

六、Puf6 與 Loc1 改變 *RPL43* mRNA 的轉譯作用

在 mRNA 調控中，雖然缺失 *Loc1* 最終會提高 *RPL43* 的 mRNA，但在蛋白質生成量是顯著降低的，因此，我們接著分析 Puf6 與 *Loc1* 是否也改變 *RPL43* mRNA 的轉譯。利用核糖體圖譜 (polysome profile)，分析轉譯作用過程中 mRNA 的分佈情形，藉此了解蛋白質生成上受到的影響(圖六)。

圖六 A 為野生株、*puf6* Δ 及 *loc1* Δ 核糖體圖譜分布及各個次單元所分佈的位置。我們以 *Actin* 的基因為控制組(圖六 B)，在 *Actin* 的分佈結果中，野生株、*puf6* Δ 及 *loc1* Δ 的最高峰皆位在 fraction 10 及 fraction 11 (polysome 的位置)。接著，在 *RPL43A*、*RPL43B* 分佈結果，*puf6* Δ 的分佈圖譜與野生株的趨勢類似，最高峰皆位於 fraction 8 (polysome 的位置)，但其分佈的最高峰有下降的趨勢。而在 *loc1* Δ 中，分佈圖譜比起野生株有往左移至 fraction 7 (為 80S 的位置)的情形。我們推測，*puf6* Δ 可能不會明顯地改變 *RPL43* 的轉譯作用，但是因為 *puf6* Δ 會影響 60S 的生合成，所以成熟的核糖體數量下降導致 mRNA 轉譯作用的改變；而在 *loc1* Δ 中，mRNA 主要分佈在 80S 的部分，我們推測在 *loc1* Δ 時，不僅會影響 60S 生合成，也讓 80S 成熟的核糖體不進行 mRNA 的轉譯作用，導致大部分的 mRNA 累積在 80S 的階段。因此，即使缺失 *loc1* 會使 *RPL43* mRNA 的生成量增加，但卻會停止核糖體的轉譯作用，導致蛋白質的生成受到影響，因此，大量表現 Rpl43 也無法拯救因 *loc1* Δ 造成的轉譯抑制情形。

第五章、討論




5.1. 核糖體蛋白的生成調控

核糖體蛋白在生成後可以藉由轉錄後或轉譯後修飾來調控蛋白質的生成。在本篇所研究的 Rpl43，除了在蛋白質生成後，需要 Puf6 與 Loc1 來維持穩定性，我們亦探討兩蛋白質會影響哪些其他層面。在 RNA 總量的測定上，Puf6 與 Loc1 都不會造成 mRNA 含量的下降，並且同時我們也可以看到 Loc1 缺失時，RNA 的含量是有上升的。並且大量表現 *RPL43* 時，在其細胞內 mRNA 含量雖然有觀察到上升的情形，但生長上無法藉由大量表現 *RPL43* 來回補 *loc1Δ* 的缺陷。因此，我們推論 *RPL43* 生成的調控上，Loc1 與 Puf6 影響的層次亦有所不同，對於細胞來說，Puf6 與 Loc1 影響 *RPL43* 的表現，這個現象連帶影響到細胞的生理。而在別的研究中，亦提出核糖體生成量上是需要維持平衡的，也因此 Puf6 與 Loc1 在調控 mRNA 是有其生理意義的。

在其他研究結果中，核糖體蛋白上五端、內含子及三端序列能夠影響核糖體蛋白轉錄後調控作用。轉錄後調控有時是增加剪切作用，促進細胞中總量的提升。有時是改變 mRNA 的位置，例如促進 RNA 運輸到細胞質中的過程，能夠增加轉譯作用的進行。有時是影響 RNA 的穩定性，造成表現上的下降 (Barrett et al., 2012; Matoulkova et al., 2012)。當我們去探討 Rpl43 蛋白質對 *RPL43B* 不同序列的影響，我們可以看到當報導基因具有內含子的時候，會造成表現的下降，但大量表現 Rpl43 蛋白會促進因缺少內含子造成的表現量低落情形。而這個過程我們推測可能與自我調控作用 (Autoregulation) 有關，細胞為了平衡過量表現的 Rpl43，調控自己的基因轉錄或修飾來抑制表現。

在其他相關地研究中，酵母菌的 Rps28 也有自我調控作用的情形，蛋白質會專一性地對 *RPS28B* 調控。作用機制推測是過量的 Rps28 結合在 mRNA 3'UTR 上的 Stem-loop 結構，並同時結合一種強化子，促進 mRNA 五端帽複合體的去除，進一步將過量的 Rps28 以 mRNA 降解的形式抑制轉錄量 (Badis et al., 2004)。在其他與自我調控作用的機制上，有部分也指出與剪切作用相關。*RPS9B* 所生成的 Rps9 會專一性地去抑制 *RPS9A* 的剪切作用，並指出這可能是由於 *RPS9A* 的內含



子的序列所形成的二級結構造成的，導致 *RPS9A* 啟動子強度較 *RPS9B* 強，但所生成的蛋白質產物為 Rps9B 較多(Petibon et al., 2016)。此外，兩同源基因之間也會互相調控彼此的表現，*RPS14A* 所轉錄的量比 *RPS14B* 多，當 *RPS14A* 基因剔除時，會正調控 *RPS14B* 轉錄的量至少約 10 倍。但過量的 Rps14 只會針對 *RPS14B* 做抑制，推測作用的機制為 *RPS14B* mRNA 五端外顯子與內含子所形成的二級結構，蛋白質產物與此結構較高的結合，藉此進入 RNA 降解途徑 (Li et al., 1995; Paulovich et al., 1993)。因此，推測細胞內，*RPL43B* 也有類似的情形，為了平衡過量表現的核糖體蛋白，可能會抑制未成熟型態 mRNA 的剪切作用，接著核糖體蛋白的生成因剪切作用的改變而下降。但是當內含子消失時，大量表現的 Rpl43 能夠顯著恢復可能因剪切作用造成轉錄上的抑制。並且這個效應並不是單一針對啟動子的作用，因為在缺乏三端或五端時就不會提升。

5.2. 和其他已知核糖體蛋白的 Intron、3'UTR 調控情形比較

我們發現，*RPL43A* 的 3'UTR 能夠提升表現，但其內含子會去除 3'UTR 對表現上的提升；而 *RPL43B* 的 3'UTR 會抑制表現，其內含子則是能夠去除 3'UTR 的抑制。而在其它文獻亦提出類似的現象。細胞內未成熟型態 mRNA 中，約有三分之一的基因是具有內含子的，並顯示大部分的內含子多是源自於核糖體蛋白的基因。並發現在細胞內大部分轉譯活性高的蛋白質中，其 mRNA 多具有內含子的序列(Parenteau et al., 2011)。總共約有 104 個核糖體蛋白具有內含子，需要經過剪切作用來切除。而在這過程中的調控，可能是為了獲得更高表現的核糖體蛋白，因此在演化上，至少有 90% 的內含子會經由剪切作用的調控來正向調控 mRNA 生成的效率，但也指出核糖體蛋白內含子也能夠負向調控基因表現(Parenteau et al., 2011)。並且若核糖蛋白具有兩對同源基因，以內含子來調控的情形可能是非對等的，可能會受到蛋白質產物的亞型 (isoform)，抑或是不同序列的內含子，發展出同源基因間不對稱調控的情形(Parenteau et al., 2011)。

先前有文獻發現，內含子正向調控轉錄作用的機制，可能是經由剪切作用來調控其啟動子與內含子五端、終止子與內含子三端互有交互作用，之中形成的環狀 (looping) 結構，可以增加轉錄的效率(Moabbi et al., 2012)；也有文獻提出內含子負向調控的機制是由於低效率的剪切作用，這可能是因為內含子所形成的二級結構導致有特定的蛋白質結合導致的 (Juneau et al., 2007)。並從轉錄到修飾作用過程、及 RNA 穩定性維持上，內含子亦有可能影響這些層次上的調控 (Moabbi et al., 2012)。*RPL43A* 與 *RPL43B* 的內含子會影響其 3'UTR 產生的效應，並由此推測可能也會藉由與 3'UTR 形成 looping 來影響轉錄作用，這之中也許有其他的蛋白質辨識不同的序列，導致 *RPL43A* 的內含子發生與 *RPL43B* 截然不同的情形。

在其他研究中，*RPL22* 的兩同源基因也具有利用其內含子進行調控的情形。當 *RPL22A* 或 *RPL22B* 的內含子剔除後，分別會影響到原生的 mRNA 含量，並在大量表現 Rpl22 時會進行剪切作用上的抑制，導致 Rpl22 進行自我調控作用的情形。*RPS9* 中的 Rps9B 則也會不對稱地進行自身剪切作用上的調控(Petibon et al., 2016)。*RPL43A* 與 *RPL43B* 的內含子也會調控自身的 RNA，這顯示出 *RPL43B* 可

能會經由剪切作用的方式去增加細胞中的核糖體蛋白。未來可設計出與剪切作用相關的實驗來證實細胞內的剪切效率改變情形。

另外，在本篇研究中，3'UTR 會促進 *RPL43A* 的表現，卻會抑制 *RPL43B* 的表現。除了在 3'UTR 上具有的 AREs (AUUUA motifs)，藉由 ARE-mediated mRNA decay 途徑，可同時抑制 mRNA 轉譯及降低 mRNA 的穩定性。3'UTR 本身也是多個 RNA 結合蛋白辨識的位置，當這些蛋白質結合後，也會維持並促進 RNA 的穩定性與轉錄作用(Matoulkova et al., 2012)。除此之外，3'UTR 的長度也會影響轉錄的表現量，在 *RPS9A* 中，其 3'UTR 的長度較長，在結構上 3'UTR 與內含子之間產生螺旋結構，造成剪切作用上的抑制，若以 *RPL9B* 的 3'UTR 去取代 *RPL9A* 的，則會顯著地提高表現量(Petibon et al., 2016)。

另外，若 *RPL43B* 內含子的存在可以去除 3'UTR 對報導基因的抑制情形，為了解內含子對 3'UTR 的影響，我們試著大量表現只具有內含子的部分，測試這個現象是否可以藉由在不同條 RNA 來恢復 3'UTR 的抑制。結果發現並無法顯著提升 GFP 的表現，並且在三端去除的報導基因中也不會看到有提升的效果，內含子提升表現的反應在野生株中只能從同一條 mRNA 上驅動，若以外加的方式表現內含子並無法正向調控的核糖體蛋白。而在這些實驗裡，只有 *Loc1* 缺失時才能去除 3'UTR 的干擾，這使我們推測 *Loc1* 與 *RPL43B* 內含子之間是否有結構上的專一性所致，但從 RNA 免疫沈澱的實驗裡得知 *Loc1* 對 3'UTR 具有較高的結合，*Loc1* 與單獨具有內含子或啟動子序列之間沒有結合，因此，我們推測 *Loc1* 可能主要是結合在 3'UTR 上，同時與內含子之間形成了交互作用關係，進而干擾了內含子去除 3'UTR 的抑制。

5.3. Puf6、Loc1 調控 Rpl43 表現量的機制、及可能重要意義

目前推測 *RPL43* 的組成元素，內含子可能藉由剪切作用、或是與 3'UTR 之間形成的二級結構來去除 3'UTR 的抑制，其中 3'UTR 的存在可能會影響 mRNA 的穩定性與轉譯作用。接著我們從比較啟動子的強度中，比較了 Puf6 與 Loc1 對五端啟動子強度影響，Puf6 缺失會些微下降其表現，但缺失 Loc1 卻會提升。因此我們推測，對於五端序列的調控上，Puf6 可能作為強化子的功能，但 Loc1 卻具有類似抑制子作用。

但是這兩個蛋白對於 *RPL43* 的不同組成序列亦有不同影響。在 *puf6Δ* 中，出現與野生株類似的現象：具有 *RPL43B* 3'UTR 的報導基因會降低表現，並且在具有 3'UTR 的同時，內含子會去除對 3'UTR 的抑制；而在 *RPL43A* 方面，具有 *RPL43A* 3'UTR 會提升表現量，而具有 3'UTR 的同時，內含子的存在也會有去除 3'UTR 提升表現的情形。但比起野生株，*puf6Δ* 會減弱內含子去除的效應，因此，我們推測 Puf6 可能去影響內含子與 3'UTR 之間的作用，導致內含子對 3'UTR 的作用有減弱的情形。

而在 *loc1Δ* 中，發生與野生株有不同的現象：*loc1Δ* 時，*RPL43B* 3'UTR 與野生株出現的情形相似，3'UTR 皆會抑制報導基因的表現。但比起野生株，*loc1Δ* 會讓 *RPL43A* 的 3'UTR 原本的增強功能改變，變得不能活化。我們推測，Loc1 可能會結合 3'UTR 來增強表現，所以當 Loc1 缺失時，就會使得它無法活化。顯示 Loc1 可能較喜歡去結合在 *RPL43A* 的 3'UTR 上，對於 *RPL43A* 的 3'UTR 有較高的結合偏好。

分別大量表現 Puf6 對不同 *RPL43* 報導基因的影響，發現大量表現 Puf6 可能會提升 *RPL43B* 剪切作用，在具有內含子的報導基因中都有表現提升的現象，並且在缺失 Puf6 時，具有內含子並無法顯著提升表現，便可能是因為剪切作用的能力減弱所致。但缺失 Puf6 並不會顯著改變 mRNA 的表現量。後續可進一步測試大量表現 Puf6 是否會提升剪切效率來確認 Puf6 對 *RPL43B* 剪切作用的影響。可將 RNA 抽出，進行 RT-PCR 來確定是否有未成熟態的 mRNA 生成。那麼，若大量表現 Loc1 於 *RPL43* 時，會去除帶有 *RPL43B* 3'UTR 及 *RPL43A* 3'UTR 時所造成的影響。我們推測，Loc1 偏好結合在 *RPL43A* 上，當 Rpl43 表現量增加後，增加的 Rpl43 也會去除 3'UTR 的抑制而來。另一種推測可能是，Loc1 確實是藉由

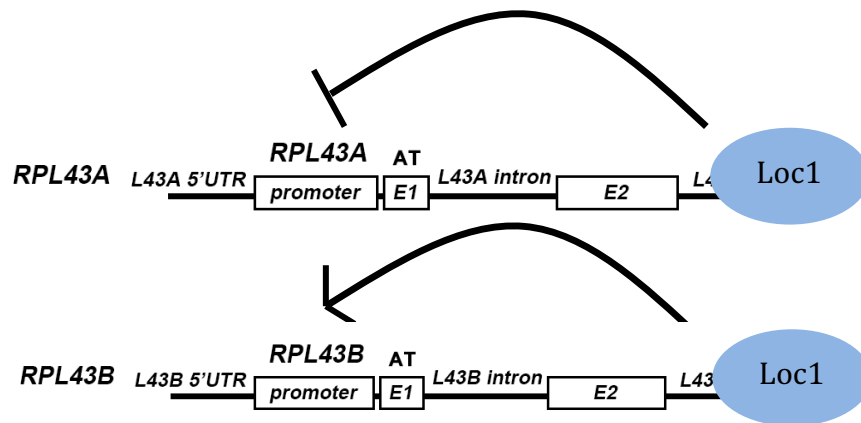
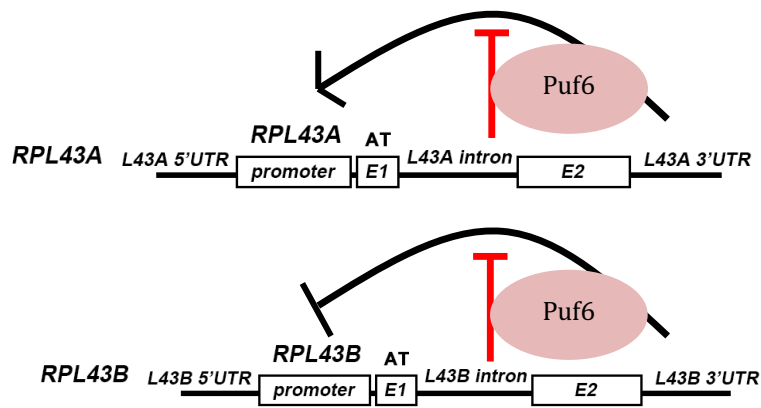
結合 3'UTR 來活化，只是正常情況下 Loc1 對於 *RPL43A* 有較高的結合，所以當大量的 Loc1 影響 *RPL43B* 時，也會去除 3'UTR 的抑制且活化。

綜合以上的結果，我們認為 Puf6 會影響 *RPL43B* 的剪切作用，並在之前研究結果中知道，Puf6 缺失將會使 *RPL43B* 內含子去除 3'UTR 抑制的效應減弱，顯示 Puf6 的存在對於此去除抑制的效應很重要，而這個除去的過程可能會與 Intron 剪切作用相關。Loc1 會影響 3'UTR 的調控，推測 Loc1 結合 3'UTR 後，會去促進 *RPL43* 的表現，必且 Loc1 可能對 *RPL43A* 有較高的結合能力。之後需要進一步針對 Loc1 與 *RPL43* RNA 之間的結合做測試，進一步提供 Loc1 對 *RPL43* 生成上的直接證據。

第六章、結論

RPL43A 比起 *RPL43B*，會生成較多的 Rpl43，因此他是生成 Rpl43 的主要基因。這顯示出 *RPL43A* 與 *RPL43B* 之間序列差異，產生的不同調控影響到蛋白質的生成量。其中，*RPL43A* 的 3'UTR 的存在提高生成量，而內含子的存在會去除此增強的作用；*RPL43B* 的 3'UTR 會抑制轉錄量與蛋白質的生成，內含子也會去除此抑制的作用，增加表現量。Puf6 與 Loc1 是本篇亦研究的兩個參與 Rpl43 生成的蛋白質。兩個蛋白質不僅會維持 Rpl43 的穩定性，也會參與 *RPL43* 後轉錄調控與轉譯作用。

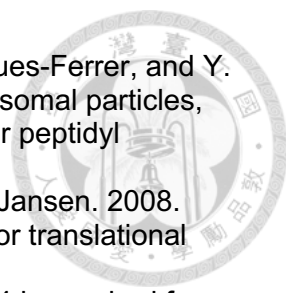
對於 *RPL43* 啟動子、內含子及 3'UTR 的表現上，*puf6Δ* 會降低啟動子的表現、*loc1Δ* 則是會提高啟動子表現。Puf6 只會影響 *RPL43B* 內含子對 3'UTR 的作用，並可能參與 *RPL43B* 的剪切作用，因此當細胞大量表現 Puf6 時，會提高含有內含子的 reporters 的表現；而 Loc1 缺失時對 *RPL43B* 並不會有明顯地改變，卻會改變 *RPL43A* 報導基因的表現。在野生株中，*RPL43A* 的 3'UTR 會去提升表現，但 *loc1Δ* 會使 3'UTR 的作用受到抑制，結果中亦顯示出大量表現 Loc1 會去除 3'UTR 的調控，因此，Loc1 可能透過 3'UTR 來影響 *RPL43A* 與 *RPL43B* 的生成。

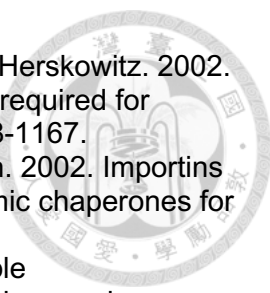


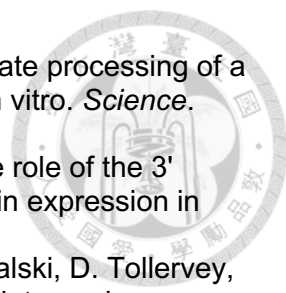
第七章、參考文獻



- Armache, J.P., A. Jarasch, A.M. Anger, E. Villa, T. Becker, S. Bhushan, F. Jossinet, M. Habeck, G. Dindar, S. Franckenberg, V. Marquez, T. Mielke, M. Thomm, O. Berninghausen, B. Beatrix, J. Soding, E. Westhof, D.N. Wilson, and R. Beckmann. 2010. Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:19748-19753.
- Badis, G., C. Saveanu, M. Fromont-Racine, and A. Jacquier. 2004. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell*. 15:5-15.
- Bange, G., G. Murat, I. Sinning, E. Hurt, and D. Kressler. 2013. New twist to nuclear import: When two travel together. *Commun Integr Biol*. 6:e24792.
- Barrett, L.W., S. Fletcher, and S.D. Wilton. 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci*. 69:3613-3634.
- Ben-Shem, A., N. Garreau de Loubresse, S. Melnikov, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov. 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*. 334:1524-1529.
- Bohl, F., C. Kruse, A. Frank, D. Ferring, and R.P. Jansen. 2000. She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J*. 19:5514-5524.
- Boria, I., E. Garelli, H.T. Gazda, A. Aspesi, P. Quarello, E. Pavesi, D. Ferrante, J.J. Meerpohl, M. Kartal, L. Da Costa, A. Proust, T. Leblanc, M. Simansour, N. Dahl, A.S. Frojmark, D. Pospisilova, R. Cmejla, A.H. Beggs, M.R. Sheen, M. Landowski, C.M. Buros, C.M. Clinton, L.J. Dobson, A. Vlachos, E. Atsidaftos, J.M. Lipton, S.R. Ellis, U. Ramenghi, and I. Dianzani. 2010. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Hum Mutat*. 31:1269-1279.
- Castle, C.D., R. Sardana, V. Dandekar, V. Borgianini, A.W. Johnson, and C. Denicourt. 2013. Las1 interacts with Grc3 polynucleotide kinase and is required for ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 41:1135-1150.
- Chartrand, P., X.H. Meng, R.H. Singer, and R.M. Long. 1999. Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol*. 9:333-336.
- Chartrand, P., R.H. Singer, and R.M. Long. 2001. RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17:297-310.
- Cho, P.F., C. Gamberi, Y.A. Cho-Park, I.B. Cho-Park, P. Lasko, and N. Sonenberg. 2006. Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*. 16:2035-2041.
- Chritton, J.J., and M. Wickens. 2010. Translational repression by PUF proteins in vitro. *RNA*. 16:1217-1225.
- Darzacq, X., E. Poirie, W. Gu, R.H. Singer, and D. Zenklusen. 2003. RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Curr Opin Microbiol*. 6:614-620.
- de la Cruz, J., K. Karbstein, and J.L. Woolford, Jr. 2015. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem*. 84:93-129.
- Decatur, W.A., and M.J. Fournier. 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci*. 27:344-351.
- Deng, Y., R.H. Singer, and W. Gu. 2008. Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes Dev*. 22:1037-1050.

- 
- Dez, C., C. Froment, J. Noaillac-Depeyre, B. Monsarrat, M. Caizergues-Ferrer, and Y. Henry. 2004. Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol Cell Biol.* 24:6324-6337.
- Du, T.G., S. Jellbauer, M. Muller, M. Schmid, D. Niessing, and R.P. Jansen. 2008. Nuclear transit of the RNA-binding protein She2 is required for translational control of localized ASH1 mRNA. *EMBO Rep.* 9:781-787.
- Duy, D.L., Y. Suda, and K. Irie. 2017. Cytoplasmic deadenylase Ccr4 is required for translational repression of LRG1 mRNA in the stationary phase. *PLoS One.* 12:e0172476.
- Edwards, T.A., S.E. Pyle, R.P. Wharton, and A.K. Aggarwal. 2001. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell.* 105:281-289.
- Fatica, A., A.D. Cronshaw, M. Dlakic, and D. Tollervey. 2002. Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell.* 9:341-351.
- Fatica, A., M. Oeffinger, M. Dlakic, and D. Tollervey. 2003. Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol.* 23:1798-1807.
- Fatica, A., D. Tollervey, and M. Dlakic. 2004. PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *RNA.* 10:1698-1701.
- Fernandez-Pevida, A., D. Kressler, and J. de la Cruz. 2015. Processing of preribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 6:191-209.
- Gasse, L., D. Flemming, and E. Hurt. 2015. Coordinated Ribosomal ITS2 RNA Processing by the Las1 Complex Integrating Endonuclease, Polynucleotide Kinase, and Exonuclease Activities. *Mol Cell.* 60:808-815.
- Geerlings, T.H., J.C. Vos, and H.A. Raue. 2000. The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA.* 6:1698-1703.
- Glisovic, T., J.L. Bachorik, J. Yong, and G. Dreyfuss. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582:1977-1986.
- Goldstrohm, A.C., B.A. Hook, D.J. Seay, and M. Wickens. 2006. PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 13:533-539.
- Gonsalvez, G.B., J.L. Little, and R.M. Long. 2004. ASH1 mRNA anchoring requires reorganization of the Myo4p-She3p-She2p transport complex. *J Biol Chem.* 279:46286-46294.
- Gonzalez, I., S.B. Buonomo, K. Nasmyth, and U. von Ahsen. 1999. ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol.* 9:337-340.
- Gu, W., Y. Deng, D. Zenklusen, and R.H. Singer. 2004. A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev.* 18:1452-1465.
- Harnpicharnchai, P., J. Jakovljevic, E. Horsey, T. Miles, J. Roman, M. Rout, D. Meagher, B. Imai, Y. Guo, C.J. Brame, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and J.L. Woolford, Jr. 2001. Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell.* 8:505-515.
- Ho, J.H., G. Kallstrom, and A.W. Johnson. 2000. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol.* 151:1057-1066.
- Hook, B.A., A.C. Goldstrohm, D.J. Seay, and M. Wickens. 2007. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J Biol Chem.* 282:15430-15438.
- Iouk, T.L., J.D. Aitchison, S. Maguire, and R.W. Wozniak. 2001. Rrb1p, a yeast nuclear WD-repeat protein involved in the regulation of ribosome biosynthesis. *Mol Cell Biol.* 21:1260-1271.

- 
- Irie, K., T. Tadauchi, P.A. Takizawa, R.D. Vale, K. Matsumoto, and I. Herskowitz. 2002. The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J.* 21:1158-1167.
- Jakel, S., J.M. Mingot, P. Schwarzmaier, E. Hartmann, and D. Gorlich. 2002. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J.* 21:377-386.
- Johnson, A.W. 1997. Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol Cell Biol.* 17:6122-6130.
- Johnson, A.W. 2014. Ribosomes: lifting the nuclear export ban. *Curr Biol.* 24:R127-129.
- Keene, J.D. 2001. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7018-7024.
- Klinge, S., F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus, and N. Ban. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science.* 334:941-948.
- Klinge, S., F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, and N. Ban. 2012. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci.* 37:189-198.
- Koch, B., V. Mitterer, J. Niederhauser, T. Stanborough, G. Murat, G. Rechberger, H. Bergler, D. Kressler, and B. Pertschy. 2012. Yar1 protects the ribosomal protein Rps3 from aggregation. *J Biol Chem.* 287:21806-21815.
- Komili, S., N.G. Farny, F.P. Roth, and P.A. Silver. 2007. Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell.* 131:557-571.
- Konikkat, S., and J.L. Woolford, Jr. 2017. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem J.* 474:195-214.
- Kressler, D., G. Bange, Y. Ogawa, G. Stjepanovic, B. Bradatsch, D. Pratte, S. Amlacher, D. Strauss, Y. Yoneda, J. Katahira, I. Sinning, and E. Hurt. 2012. Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science.* 338:666-671.
- Kressler, D., E. Hurt, and J. Bassler. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta.* 1803:673-683.
- Kressler, D., D. Roser, B. Pertschy, and E. Hurt. 2008. The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *J Cell Biol.* 181:935-944.
- Kufel, J., B. Dichtl, and D. Tollervey. 1999. Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA.* 5:909-917.
- Lafontaine, D., J. Delcour, A.L. Glasser, J. Desgres, and J. Vandenhaute. 1994. The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2)Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18 S rRNA is essential in yeast. *J Mol Biol.* 241:492-497.
- Lamanna, A.C., and K. Karbstein. 2009. Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:14259-14264.
- Lebaron, S., C. Schneider, R.W. van Nues, A. Swiatkowska, D. Walsh, B. Bottcher, S. Granneman, N.J. Watkins, and D. Tollervey. 2012. Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol.* 19:744-753.
- Li, Z., A.G. Paulovich, and J.L. Woolford, Jr. 1995. Feedback inhibition of the yeast ribosomal protein gene CRY2 is mediated by the nucleotide sequence and secondary structure of CRY2 pre-mRNA. *Mol Cell Biol.* 15:6454-6464.
- Long, R.M., W. Gu, E. Lorimer, R.H. Singer, and P. Chartrand. 2000. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J.* 19:6592-6601.
- Long, R.M., W. Gu, X. Meng, G. Gonsalvez, R.H. Singer, and P. Chartrand. 2001. An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J Cell Biol.* 153:307-318.

- 
- Lygerou, Z., C. Allmang, D. Tollervey, and B. Seraphin. 1996. Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science*. 272:268-270.
- Matoulkova, E., E. Michalova, B. Vojtesek, and R. Hrstka. 2012. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*. 9:563-576.
- Milkereit, P., O. Gadal, A. Podtelejnikov, S. Trumtel, N. Gas, E. Petfalski, D. Tollervey, M. Mann, E. Hurt, and H. Tschochner. 2001. Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell*. 105:499-509.
- Miller, M.A., and W.M. Olivas. 2011. Roles of Puf proteins in mRNA degradation and translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2:471-492.
- Mitterer, V., G. Murat, S. Rety, M. Blaud, L. Delbos, T. Stanborough, H. Bergler, N. Leulliot, D. Kressler, and B. Pertschy. 2016. Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation. *Nat Commun*. 7:10336.
- Moabbi, A.M., N. Agarwal, B. El Kaderi, and A. Ansari. 2012. Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:8505-8510.
- Niedner, A., M. Muller, B.T. Moorthy, R.P. Jansen, and D. Niessing. 2013. Role of Loc1p in assembly and reorganization of nuclear ASH1 messenger ribonucleoprotein particles in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:E5049-5058.
- Nissan, T.A., J. Bassler, E. Petfalski, D. Tollervey, and E. Hurt. 2002. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J*. 21:5539-5547.
- Oeffinger, M., D. Zenklusen, A. Ferguson, K.E. Wei, A. El Hage, D. Tollervey, B.T. Chait, R.H. Singer, and M.P. Rout. 2009. Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. *Mol Cell*. 36:768-781.
- Parenteau, J., M. Durand, G. Morin, J. Gagnon, J.F. Lucier, R.J. Wellinger, B. Chabot, and S.A. Elela. 2011. Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes. *Cell*. 147:320-331.
- Paulovich, A.G., J.R. Thompson, J.C. Larkin, Z. Li, and J.L. Woolford, Jr. 1993. Molecular genetics of cryptopleurine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of a ribosomal protein gene family. *Genetics*. 135:719-730.
- Pausch, P., U. Singh, Y.L. Ahmed, B. Pillet, G. Murat, F. Altegoer, G. Stier, M. Thoms, E. Hurt, I. Sinning, G. Bange, and D. Kressler. 2015. Co-translational capturing of nascent ribosomal proteins by their dedicated chaperones. *Nat Commun*. 6:7494.
- Pelletier, J., J. Graff, D. Ruggero, and N. Sonenberg. 2015. Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development. *Cancer Res*. 75:250-263.
- Pertschy, B., C. Saveanu, G. Zisser, A. Lebreton, M. Tengg, A. Jacquier, E. Liebming, B. Nobis, L. Kappel, I. van der Klei, G. Hogenauer, M. Fromont-Racine, and H. Bergler. 2007. Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol Cell Biol*. 27:6581-6592.
- Petibon, C., J. Parenteau, M. Catala, and S.A. Elela. 2016. Introns regulate the production of ribosomal proteins by modulating splicing of duplicated ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res*. 44:3878-3891.
- Pillet, B., J.J. Garcia-Gomez, P. Pausch, L. Falquet, G. Bange, J. de la Cruz, and D. Kressler. 2015. The Dedicated Chaperone Acl4 Escorts Ribosomal Protein Rpl4 to Its Nuclear Pre-60S Assembly Site. *PLoS Genet*. 11:e1005565.
- Preissler, S., and E. Deuerling. 2012. Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends Biochem Sci*. 37:274-283.
- Sahasranaman, A., J. Dembowski, J. Strahler, P. Andrews, J. Maddock, and J.L. Woolford, Jr. 2011. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing. *EMBO J*. 30:4020-4032.

- Saibil, H. 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14:630-642.
- Saveanu, C., D. Bienvenu, A. Namane, P.E. Gleizes, N. Gas, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine. 2001. Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J.* 20:6475-6484.
- Schutz, S., U. Fischer, M. Altvater, P. Nerurkar, C. Pena, M. Gerber, Y. Chang, S. Caesar, O.T. Schubert, G. Schlenstedt, and V.G. Panse. 2014. A RanGTP-independent mechanism allows ribosomal protein nuclear import for ribosome assembly. *Elife.* 3:e03473.
- Simoff, I., H. Moradi, and O. Nygard. 2009. Functional characterization of ribosomal protein L15 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 55:111-125.
- Tadauchi, T., K. Matsumoto, I. Herskowitz, and K. Irie. 2001. Post-transcriptional regulation through the HO 3'-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF. *EMBO J.* 20:552-561.
- Tang, L., A. Sahasranaman, J. Jakovljevic, E. Schleifman, and J.L. Woolford, Jr. 2008. Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 required for assembly of the Nop7-subcomplex in yeast preribosomes. *Mol Biol Cell.* 19:2844-2856.
- Ulbrich, C., M. Diepholz, J. Bassler, D. Kressler, B. Pertschy, K. Galani, B. Bottcher, and E. Hurt. 2009. Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell.* 138:911-922.
- Urbinati, C.R., G.B. Gonsalvez, J.P. Aris, and R.M. Long. 2006. Loc1p is required for efficient assembly and nuclear export of the 60S ribosomal subunit. *Mol Genet Genomics.* 276:369-377.
- Vilardell, J., and J.R. Warner. 1997. Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* influences both the splicing of its own transcript and the processing of rRNA. *Mol Cell Biol.* 17:1959-1965.
- Wang, S., H. Sakai, and M. Wiedmann. 1995. NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J Cell Biol.* 130:519-528.
- Watkins, N.J., and M.T. Bohnsack. 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 3:397-414.
- Wharton, R.P., and A.K. Aggarwal. 2006. mRNA regulation by Puf domain proteins. *Sci STKE.* 2006:pe37.
- Wickens, M., D.S. Bernstein, J. Kimble, and R. Parker. 2002. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet.* 18:150-157.
- Woolford, J.L., Jr., and S.J. Baserga. 2013. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 195:643-681.
- Wreden, C., A.C. Verrotti, J.A. Schisa, M.E. Lieberfarb, and S. Strickland. 1997. Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development.* 124:3015-3023.
- Yang, Y.T., Y.H. Ting, K.J. Liang, and K.Y. Lo. 2016. The Roles of Puf6 and Loc1 in 60S Biogenesis Are Interdependent, and Both Are Required for Efficient Accommodation of Rpl43. *J Biol Chem.* 291:19312-19323.
- Yao, W., D. Roser, A. Kohler, B. Bradatsch, J. Bassler, and E. Hurt. 2007. Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell.* 26:51-62.
- 梁凱任 (2017)。核糖體蛋白 Rpl43 的功能探討及和 Puf6、Loc1 的結合位分析。國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文，台北市。取自 <https://hdl.handle.net/11296/62sm4y>

表一、本研究所使用之酵母菌株

Strain	Gene	Genotype	Source
KLY2	wildtype (BY4741)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY67	<i>puf6Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>puf6Δ::KanMX</i>	Open biosystem
KLY218	<i>loc1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>loc1Δ::KanMX</i>	Open biosystem
KLY134	<i>PUF6-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUF6-</i> <i>TAP::HIS3MX</i>	(Yang et al., 2016)
KLY475	<i>LOC1-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 LOC1-</i> <i>TAP::HIS3MX</i>	(Yang et al., 2016)
KLY842	<i>puf6Δ LOC1-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>puf6Δ::KanMX LOC1-TAP::HIS3MX</i>	This study
KLY415	<i>loc1Δ PUF6-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>loc1Δ::KanMX PUF6-TAP::HIS3MX</i>	This study

表二、本研究所使用之 qPCR Primers

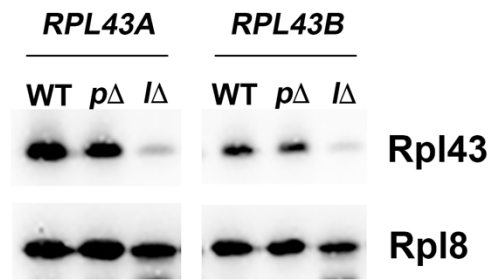
Gene	Primer Sequence (F: forward, R: reverse 5'→3')			Source
RPL43A	KLO542	F	ACTGAGACAAAAATGGCTAAAAGAAGT	This study
	KLO544	R	ACAATCGTATCTAGCGTGTTGTTGG	This study
RPL43B	KLO545	F	CAAACAAAAAATGGCTAAGAGAACAAAG	This study
	KLO462	R	GTCATATCTGGCATGTTGTTGAATTTCAA	This study
Actin	KLO552	F	AGAGTTGCCCCAGAAGAACA	This study
	KLO553	R	GGCTTGGATGGAAACGTAGA	This study
GFP	KLO598	F	GTGAAGGTGATGCAACATACG	This study
	KLO599	R	GTAGTGACAAGTGTGGCCATG	This study
RPL5	KLO323	F	TAGCTGCTGCCTACTCCCACGA	This study
	KLO324	R	GCAGCAGCCCAGTTGGTCAAA	This study

表三、本研究所使用之質體

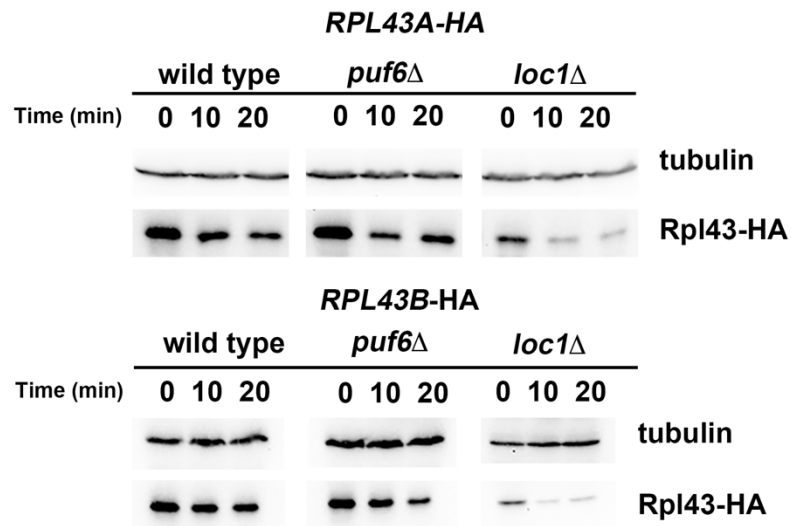


Plasmid	Gene	Relevant Markers	Source
PKL 4	<i>PRS426</i>	2μ <i>URA3</i>	A.W. Johnson
PKL 5	<i>PRS413</i>	<i>CEN HIS3</i>	A.W. Johnson
PKL 302	<i>RPL43A</i>	2μ <i>URA3</i>	This study
PKL 308	<i>RPL43B</i>	2μ <i>URA3</i>	(Yang et al., 2016)
PKL 333	<i>PUF6</i>	2μ <i>URA3</i>	This study
PKL 349	<i>RPL43A-HA</i>	<i>CEN URA3</i>	This study
PKL350	<i>RPL43B-HA</i>	<i>CEN URA3</i>	(Yang et al., 2016)
PKL 381	<i>GAL::RPL43B-HA</i>	<i>CEN HIS3</i>	(Yang et al., 2016)
PKL 555	<i>GAL::LOC1</i>	<i>CEN URA3</i>	This study
PKL 563	<i>RPL43B-HA</i>	<i>CEN HIS3</i>	This study
PKL 675	<i>L43Bp-GFP-3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 680	<i>L43Bp-Intron-GFP-L43 3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 697	<i>SSF1p-GFP-SSF1 3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 752	<i>L43Bp-GFP-L43 3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 753	<i>SSF1p-GFP-L43 3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 762	<i>L43Ap-GFP-3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 814	<i>L43Ap-Intron-GFP-3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 815	<i>L43Bp-Intron-GFP-3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 818	<i>L43Ap-Intron-GFP-L43A 3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study
PKL 819	<i>L43A-GFP-L43A 3'UTR</i>	<i>CEN LEU2</i>	This study

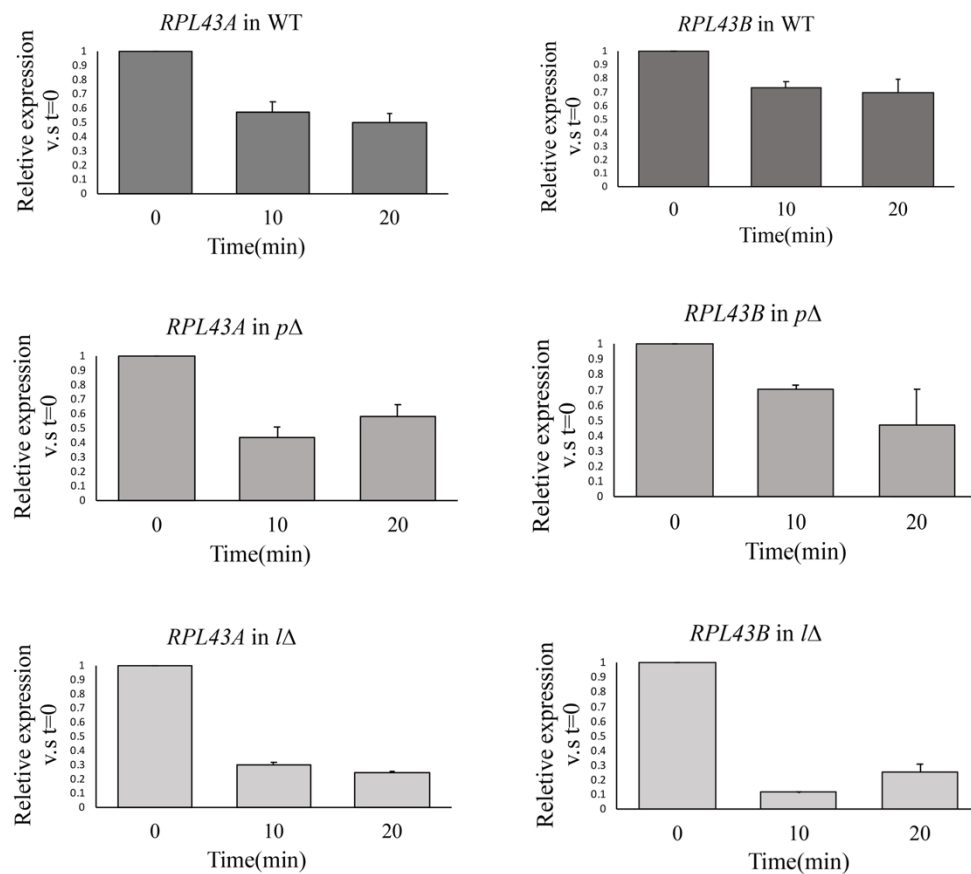
A



B

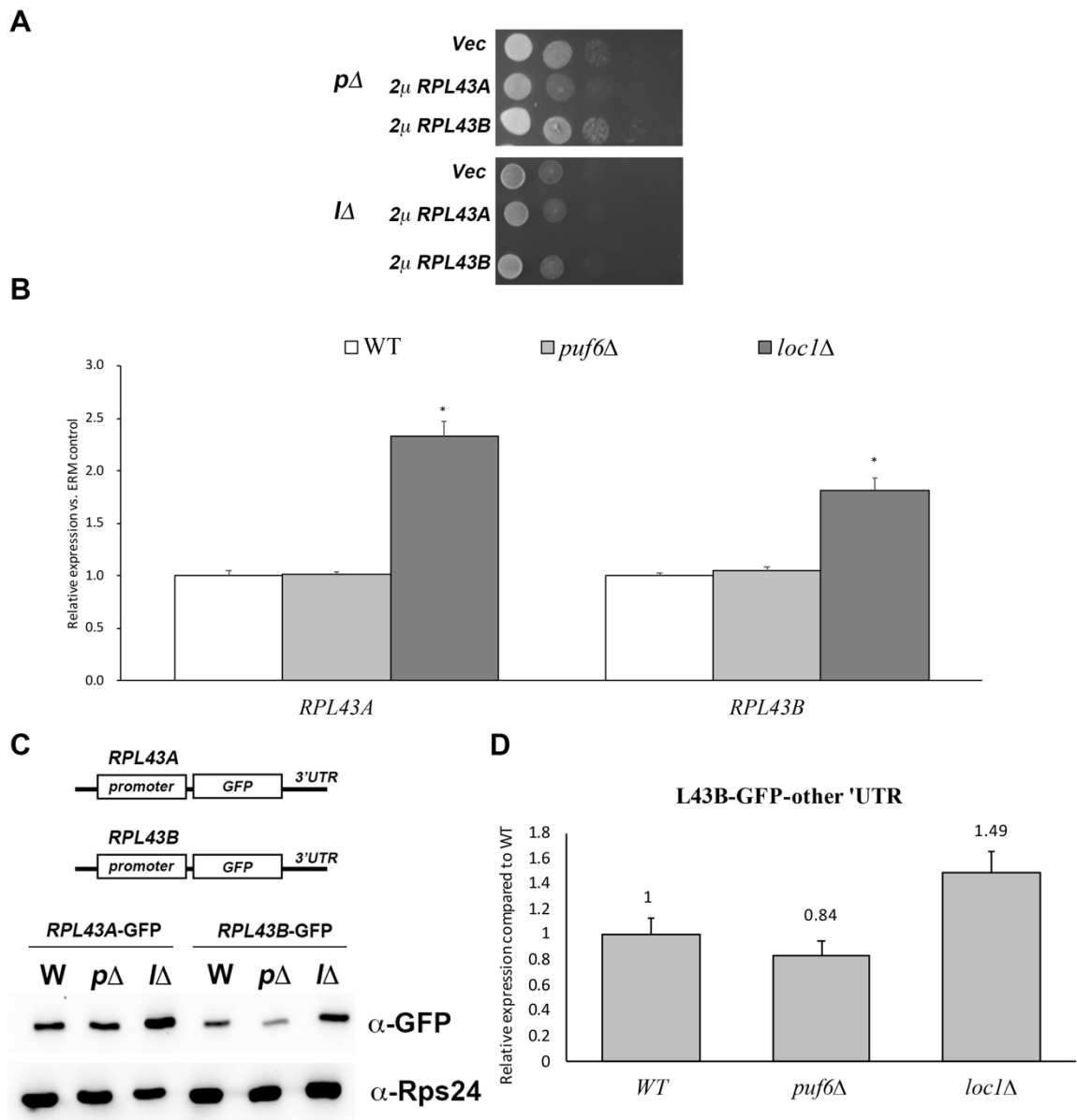


C



圖一、Puf6 與 Loc1 維持 Rpl43 核糖體蛋白的穩定性

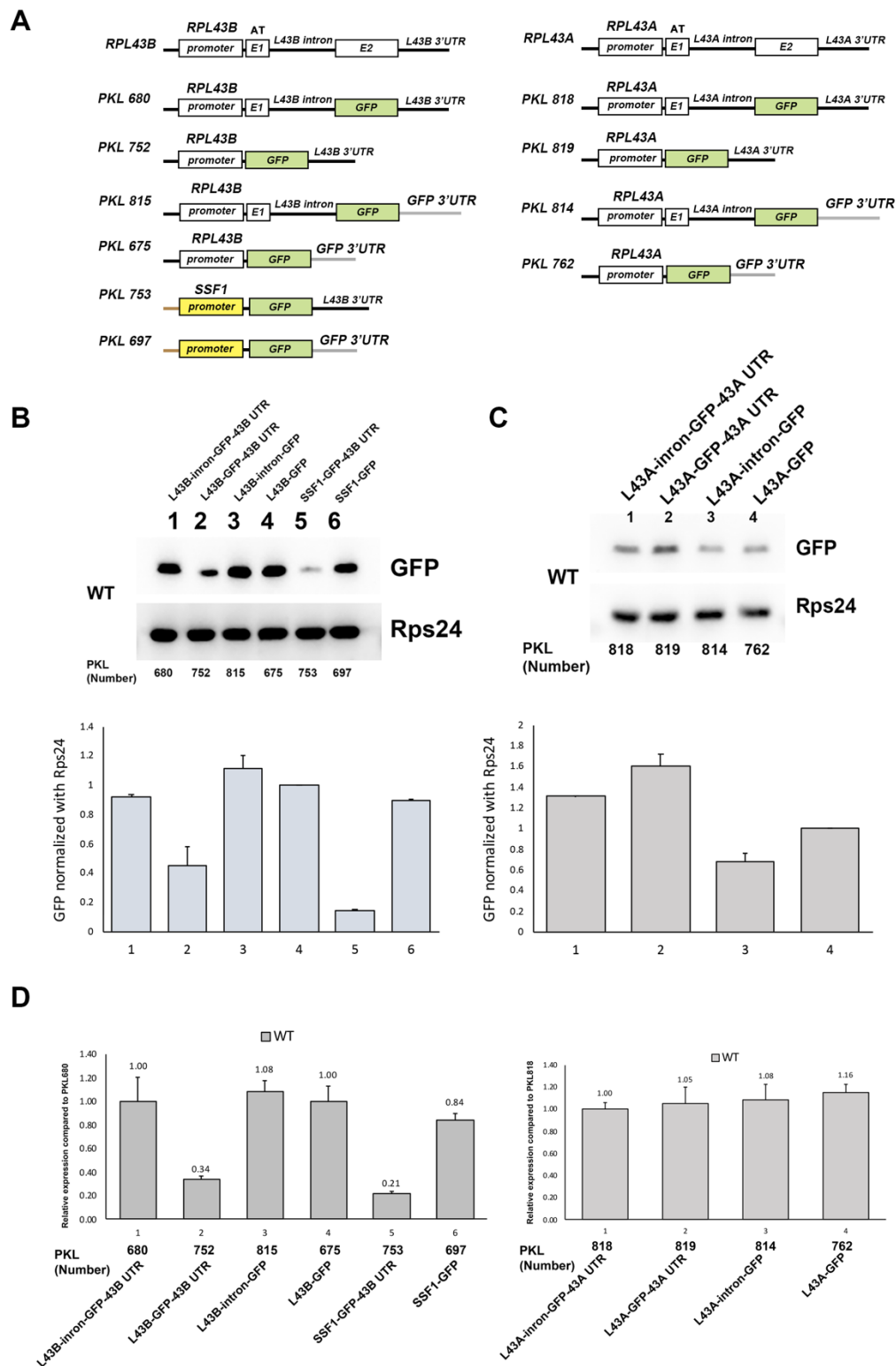
(A) 在野生株 (KLY2)、*puf6* Δ (KLY67)及 *loc1* Δ (KLY218)內，分別轉型 *RPL43A-HA* (PKL349)、*RPL43B-HA* (PKL350)，以西方墨點法分析細胞內 Rpl43 的總量，其中是用 α -HA 的抗體來偵測 Rpl43 的含量。(B) 轉型 *RPL43A-HA* (PKL349)、*RPL43B-HA* (PKL350) 的野生株 (KLY2)、*puf6* Δ (KLY67)及 *loc1* Δ (KLY218)，菌體生長至 OD 約為 0.4~0.6 後，加入放線菌酮，在第 0 分鐘、10 分鐘及第 20 分鐘收下菌體。破菌後以西方墨點法，用 α -HA 的抗體來偵測 Rpl43 的殘留量。(C) 收取兩組菌體，以軟體 Image J 去測定不同時間點之 Rpl43 的訊號，並將 Rpl43 訊號對除 Tubulin，以第 0 的時間點為 1，計算出蛋白質降解率 (n=2)。



圖二、Rpl43 的表現及含量受啟動子與其他因素影響


(A)轉型 *Vector* (PKL 4)、 2μ RPL43A (PKL302)、 2μ RPL43B (PKL308)於野生株、 $puf6\Delta$ (KLY67)及 $loc1\Delta$ (KLY218)，於低溫 20 度生長 3 到 4 天的生長情形。(B) 收取野生株、 $puf6\Delta$ (KLY67)及 $loc1\Delta$ (KLY218)生長至快速生長期(OD= 0.4~0.8)的菌體，以熱酚法萃取 RNA。各菌株的 total RNA 以 DNase 處理，反轉錄作用後，以 qPCR 方式比較 RPL43A 及 RPL43B 的 RNA 總量。*字符號代表與野生株相比有顯著差異(<0.01)；是使用 SPSS 統計軟體作變異數分析(ANOVA)，並以費雪 LSD 法進行差異性檢定。(C) 轉殖 RPL43A (promoter)-GFP (PKL762)及 RPL43B (promoter)-GFP (PKL675) 的野生株、 $puf6\Delta$ (KLY67)及 $loc1\Delta$ (KLY218)，以氫氧

化鈉破菌法萃取蛋白質，以 α -GFP 偵測兩同源基因 *RPL43A* 及 *RPL43B* 啟動子下的 GFP 表現量。(D) 轉型 *RPL43B* (*promoter*)-GFP (PKL675) 於野生株、*puf6* Δ (KLY67)及 *loc1* Δ (KLY218)，以熱酚法萃取 RNA。各菌株的 total RNA 以 DNase 處理，反轉錄作用後，以 qPCR 方式比較在 *RPL43B* 的啟動子調控下，*puf6* Δ 及 *loc1* Δ 對 GFP mRNA 的生成影響。



圖三、*RPL43* 上的內含子和 3'UTR 會影響 mRNA 的表現

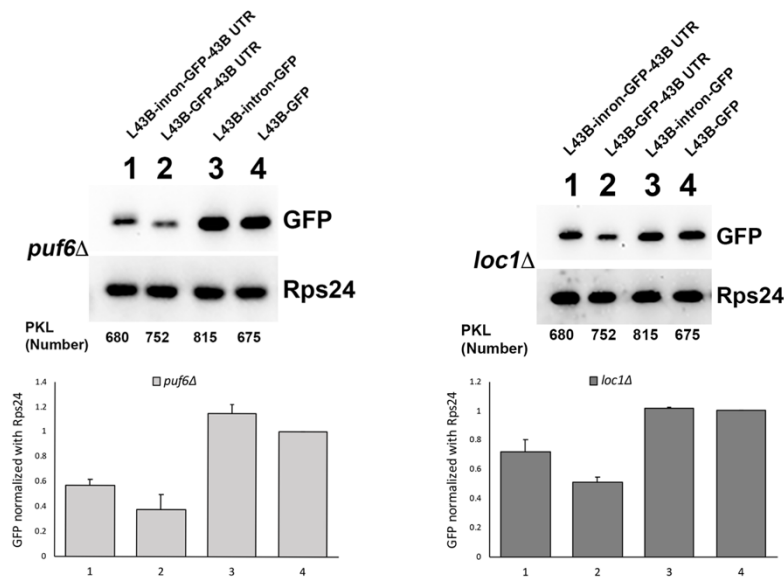
(A) 建構以帶有不同 *RPL43* 5'UTR、Intron、3'UTR 的質體，以綠色螢光蛋白為其報導基因。最上方為 *RPL43* 的全長基因示意圖，報導基因 GFP 將替代 exon2 而成，



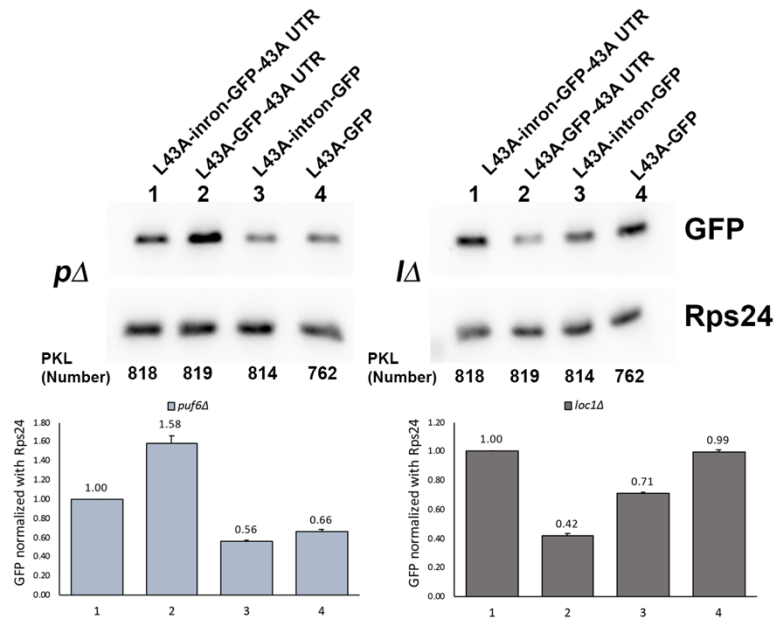
左圖為以 *RPL43B* 為建構的示意圖及編號，右圖為以 *RPL43A* 為建構的示意圖及編號。由上到下分別為：5'UTR、3'UTR 及內含子皆保留 (PKL680、PKL818)、只保留 5'UTR 及 3'UTR 的 (PKL752、PKL819)、保留 5'UTR (PKL675、PKL814)、保留 5'UTR 及內含子的 (PKL815、PKL762)、帶有 *SSF1* 的 5'UTR 及 *RPL43* 的 3'UTR (PKL753)、帶有 *SSFI* 5'UTR (PKL697)。(B) 轉型圖(A)所示之建構 *RPL43B* 質體於野生株 (KLY2)內，收取快速生長期的菌體共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋白質中的 GFP 含量，圖的下方是以 Image J 積分定量面積，比較各組之間強度的結果 (n=2)。(C) 轉型圖(A)所示之建構 *RPL43A* 質體於野生株 (KLY2)內，收取快速生長期的菌體共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋白質中的 GFP 含量，圖的下方是以 Image J 積分定量面積，比較各組之間強度的結果(n=2)。(D) 轉型圖(A)所示之建構 *RPL43A*、*RPL43B* 質體於野生株 (KLY2)內，收取 2 組菌體於快速生長期 OD=0.4~0.6，以熱酚法萃取 RNA。各菌株的 total RNA 以 DNase 處理，反轉錄作用後，以 qPCR 方式比較 GFP RNA 總量。



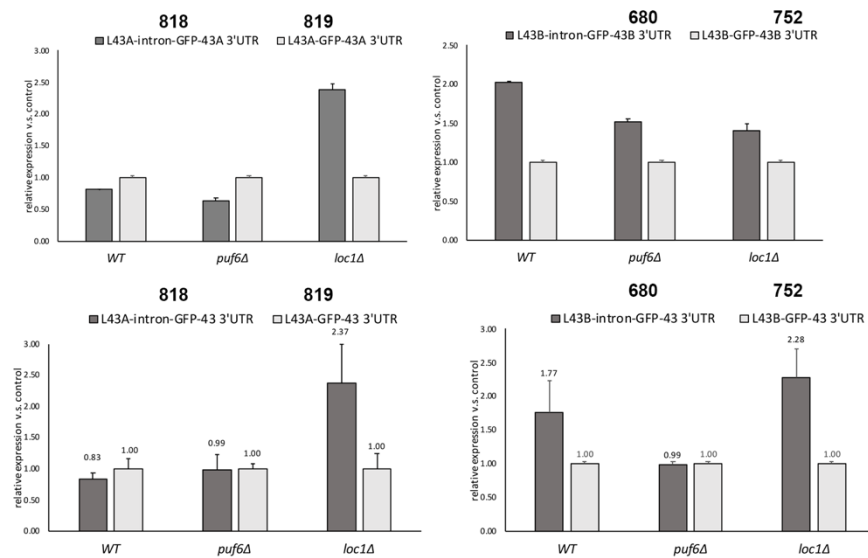
A



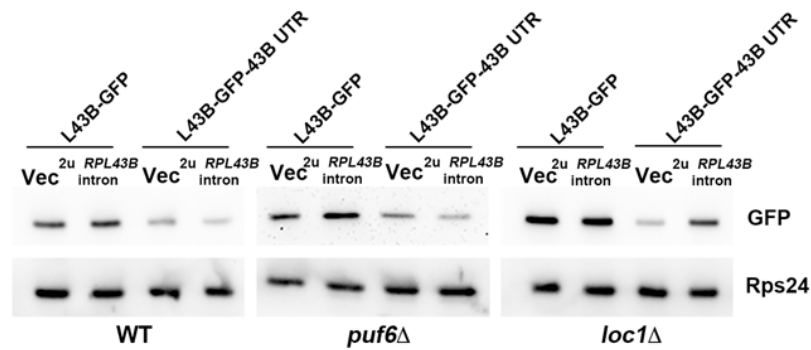
B



C



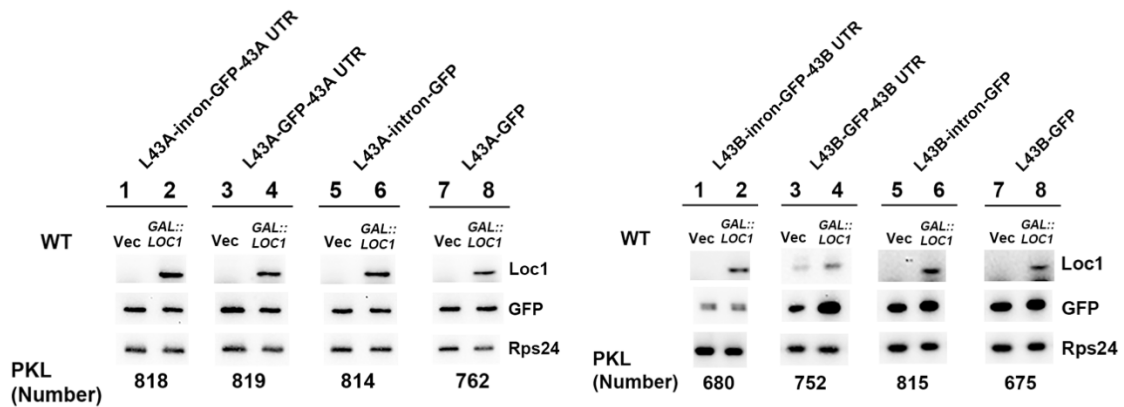
D



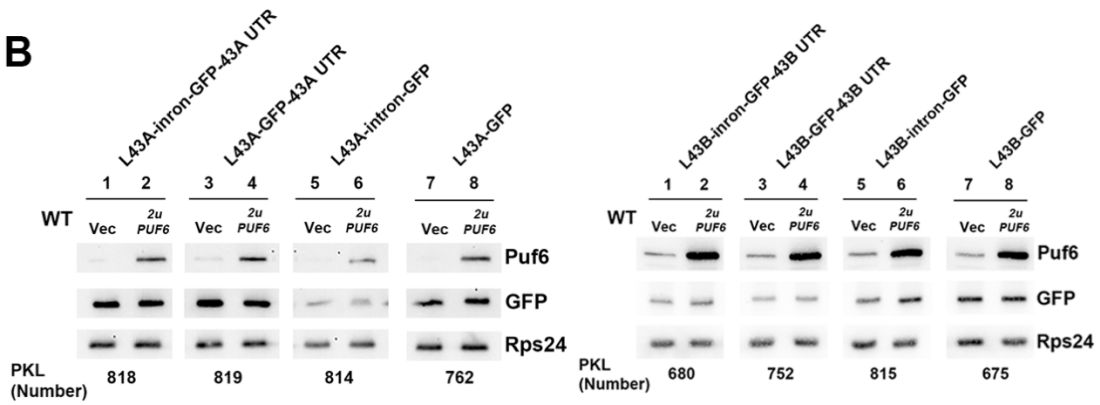
圖四、Puf6 與 Loc1 會影響 *RPL43* 內含子和 3' UTR 的調控

(A) 轉型圖三 (A) 所示之建構 *RPL43B* 報導質體於 *puf6Δ* (KLY67) 及 *loc1Δ* (KLY218)，收取菌體總共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋白質中的 GFP 含量。圖的下方是以 Image J 積分定量面積，比較各組之間強度的結果(n=2)。(B) 轉型圖三(A) 所示建構之 *RPL43A* 報導質體於 *puf6Δ* (KLY67) 及 *loc1Δ* (KLY218)內，收取快速生長期的菌體共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋白質中的 GFP 含量，並以 Image J 做蛋白質含量的定量，皆以第一組報導質體 L43-intron-GFP-L43 3'UTR(PKL680、PKL818)為 1 做比較 (n=2)。(C) 收取轉型 *RPL43A(promoter)-GFP-RPL43A 3'UTR* (PK819) 及 *RPL43A(promoter)-intron-RPL43A 3'UTR* (PKL818)、*RPL43B(promoter)-GFP-RPL43B 3'UTR* (PKL752)及 *RPL43B(promoter)-intron-GFP-RPL43B 3'UTR* (PKL680) 的野生株 (KLY2)、*puf6Δ* (KLY67)及 *loc1Δ* (KLY218)菌，生長於快速生長期間 OD=0.4~0.6。收取 1 O.D 的菌體，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，分別以 image J 做蛋白質的定量，皆以 L43-GFP-L43 3'UTR(PKL752、PKL819)為 1，於各突變株之間比較。另以熱酚法萃取 RNA。各菌株的 total RNA 以 DNase 處理，反轉錄作用後，以 qPCR 方式比較 GFP RNA 總量，以 L43-GFP-L43 3'UTR(PKL752、PKL819)為 1，於各突變株組內比較。(D) 轉型 *Vector* (PKL4)、*2μ RPL43B intron* (PKL764)所示之建構質體於野生株(KLY2)、*puf6Δ* (KLY67)及 *loc1Δ* (KLY218)，並同時轉型報導質體 *RPL43(promoter)-GFP* (PKL675)、*RPL43(promoter)-GFP-RPL43 3'UTR* (PKL752)。收取菌體總共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋白質中的 GFP 含量。

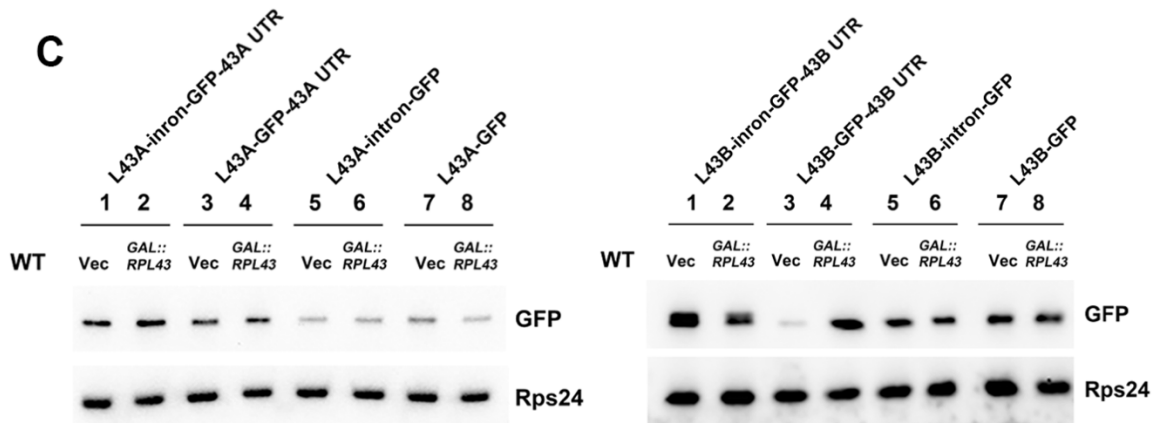
A



B



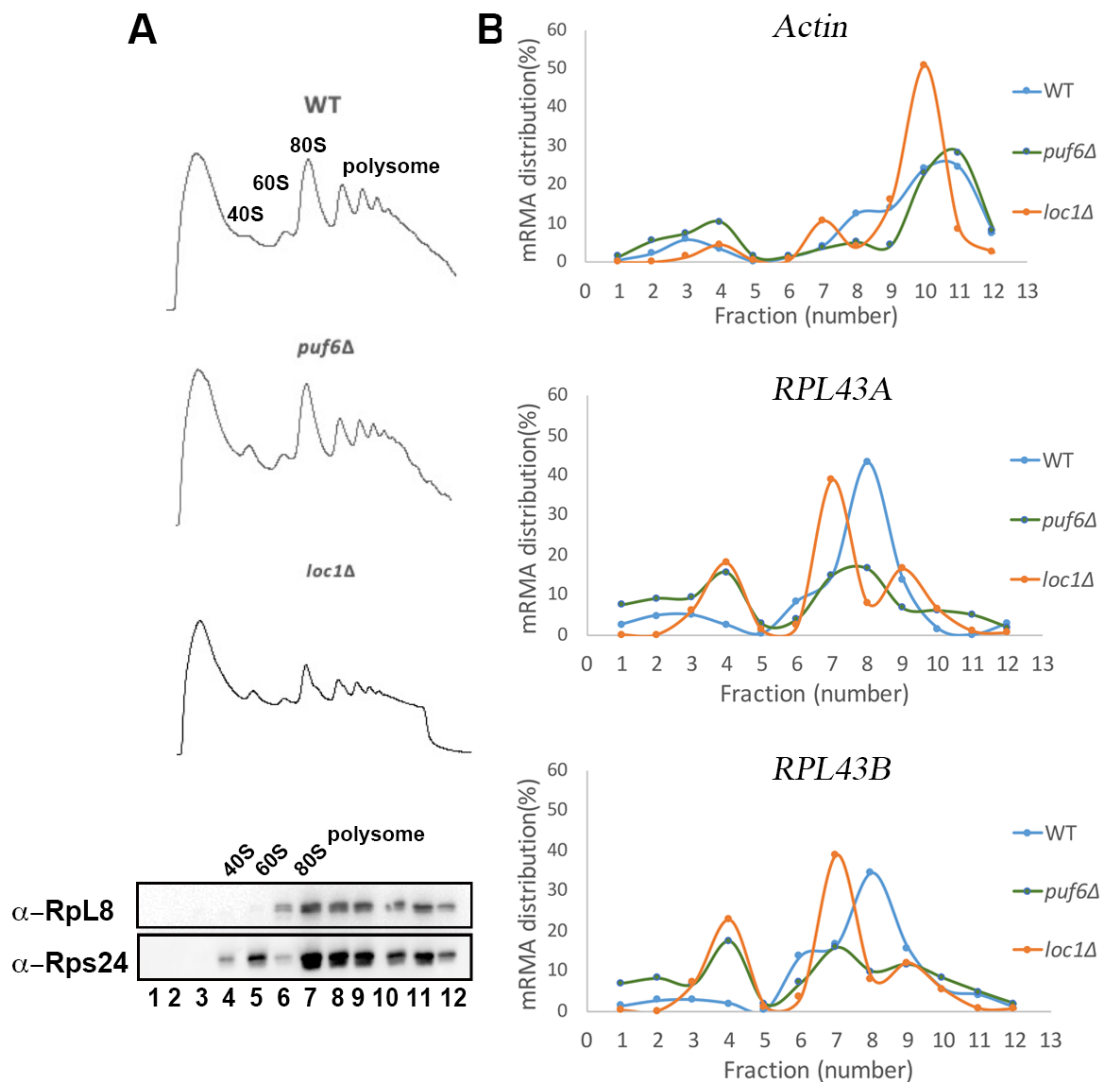
C



圖五、 Puf6 或 Loc1 及 Rpl43 調控 Rpl43 的生成

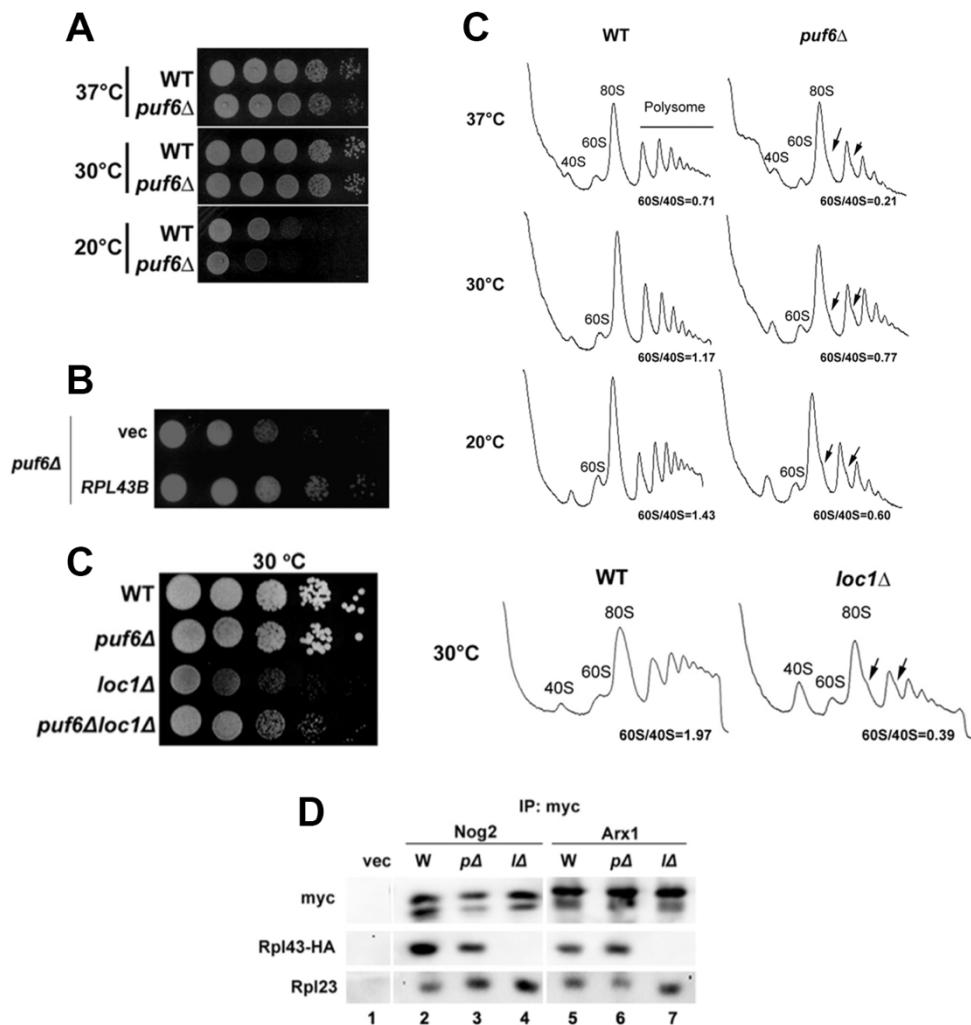
(A)轉型於 *Vector* (PKL4)、*GAL::LOC1* (PKL555) 及圖三 A 所示之報導基因於野生株中。隔夜培養於含 2% 葡萄糖溶液的 *URA-LEU* 後，稀釋培養到含 2% 棉子糖 (Raffinose)，至 OD=0.4~0.5 快速生長期後，加入 2% 半乳糖溶液誘導 *LOC1* 表現 3 小時。收取菌體總共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋

白質中的 GFP 含量。並偵測 Loc1 蛋白質，確認菌株確實有誘導 *LOC1* 表現。(B) 分別轉型於 *Vector* (PKL4)、 2μ *PUF6* (PKL333) 及圖三 A 所示之報導基因於野生株(KLY2)中。隔夜培養於含 2% 葡萄糖溶液的 *URA⁻LEU⁻*，稀釋培養於含 2% 葡萄糖溶液的 *URA⁻LEU⁻*，生長至 OD 為 0.4~0.6，收取菌體總共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋白質中的 GFP 含量。並偵測 Puf6 蛋白質，確認菌株確實有轉型大量表現 *PUF6* 的質體。(C)分別轉型於 *Vector* (PKL4)、*GAL::RPL43B-HA* (PKL381) 及圖三 A 所示之報導基因於野生株(KLY2)中。隔夜培養於含 2% 葡萄糖溶液的 *URA⁻LEU⁻* 後，稀釋培養到含 2% 棉子糖(Raffinose)，至 OD=0.4~0.5 快速生長期後，加入 2%半乳糖溶液誘導 *RPL43B-HA* 表現 3 小時。收取菌體總共 1 O.D，以 NaOH 破菌法抽取蛋白質，以西方墨點法偵測蛋白質中的 GFP 含量。



圖六、Puf6 與 Loc1 改變 *RPL43* mRNA 的轉譯作用

(A) 野生株 (KLY2)、*puf6Δ* (KLY67) 及 *loc1Δ* (KLY218) 生長於 30 度直到 OD=0.2~0.3，加入放線菌酮(Cycloheximide)抑制核糖體生合成十分鐘後收下菌體。藉由蔗糖濃度梯度依據不同沈降係數將細胞內的核糖體次單元做分離。上圖分別為三隻菌株的核糖體圖譜，下圖為將收下的 12 管以西方墨點法來分辨自由態蛋白質、40S、60S、80S 及多核糖體的分佈。(B) 將收下的 12 管做 RNA 的純化與沈澱，回溶於 DEPC 水中後，經過反轉錄處理，並以 qPCR 的方式定量每管所含的 *RPL43A* 與 *RPL43B* 的 mRNA。將 12 管所得到的數值進行加總，計算每一管所站總量的比例，依此計算 *RPL43A* 與 *RPL43B* 的分佈情形。



(Yang et al., 2016)

附錄一、Puf6、Loc1 與 Rpl43 的相關性

(A) *puf6Δ*在低溫 20 度下會有生長缺陷。

(B) 大量表現 *RPL43B* 能夠恢復 *puf6Δ*的生長。

(C) *loc1Δ* 嚴重地影響 60S 的生合成，其生長缺陷更嚴重。

(D) Rpl43 需要 Puf6 與 Loc1 協助其 Pre-60S 的組裝。