

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系



碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

A型流感病毒PB1-F2蛋白質於人類細胞株之穩定性與
蛋白酶體降解效率之研究

Investigation of the Stability and Proteasome Degradation
Efficiency of Influenza A Virus PB1-F2 Proteins from
Different Viral Strains in Human Cell Lines

邱宇恩

Yu-En Chiu

指導教授：張世宗 博士

Advisor: Shih-Chung Chang, Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July 2018

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書



中文題目：A 型流感病毒 PB1-F2 蛋白質於人類細胞株之穩定性與蛋白酶體降解效率之研究

英文題目：Investigation of the Stability and Proteasome Degradation Efficiency of Influenza A Virus PB1-F2 Proteins from Different Viral Strains in Human Cell Lines

本論文係 邱宇恩 君（學號 R05B22035）在國立臺灣大學生化科技學系完成之碩士學位論文，於民國 107 年 7 月 9 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：

張世子

（簽名）

（指導教授）

林翰佳

張麗冠

陳慧文

系主任、所長

王貴山

（簽名）

目錄



目錄.....	I
摘要.....	1
ABSTRACT	2
縮寫表	3
第一章 緒論.....	4
1.1 A 型流感病毒	4
1.1.1 H1N1 病毒.....	4
1.1.2 H3N2 病毒.....	4
1.1.3 H5H1 病毒.....	5
1.1.4 H7N9 病毒.....	5
1.2 Polymerase basic protein 1-frame 2 (PB1-F2).....	5
1.2.1 PB1-F2 的發現.....	5
1.2.2 PB1-F2 的蛋白質結構.....	6
1.2.3 PB1-F2 參與細胞凋亡機制	6
1.2.4 PB1-F2 與 PB1 結合調控 RdRP 聚合酶活性	7
1.2.5 PB1-F2 調控細胞先天性免疫功能	7
1.2.6 PB1-F2 提升宿主二次性細菌感染的機率.....	8
1.2.7 PB1-F2 的穩定度	8



1.2.8 PB1-F2 依賴蛋白酶體的降解機制	8
1.2.9 PB1-F2 的磷酸化與泛素化	9
1.3 蛋白酶體降解機制	10
1.3.1 泛素依賴型降解路徑	10
1.3.2 泛素不依賴型降解路徑	10
1.3.3 蛋白酶體活化調節因子 PA28.....	10
1.4 研究動機.....	11
第二章 材料與方法	13
2.1 PB1-F2 與 PA28 基因來源	13
2.2 大腸桿菌菌株.....	13
2.2.1 大腸桿菌 DH5 α	13
2.2.2 大腸桿菌 BL21 (DE3)	13
2.2.3 大腸桿菌 Rosetta (DE3)	14
2.3 人類細胞株.....	14
2.4 PB1-F2 重組蛋白質表現質體建構	14
2.4.1 PB1-F2 位點互換突變株建構	15
2.4.2 PB1-F2 泛素化位點突變株建構.....	15
2.5 重組蛋白質表現	16
2.5.1 PB1-F2 重組蛋白質表現	16



2.5.2 20S 突變蛋白酶體表現	16
2.6 重組蛋白質純化	16
2.6.1 PB1-F2 重組蛋白質純化	16
2.6.2 20S DM 蛋白酶體純化	17
2.6.3 蛋白質脫鹽與濃縮	17
2.6.4 蛋白質定量	18
2.7 細胞培養	18
2.8 細胞轉染	18
2.9 細胞樣本製備	19
2.10 免疫染色分析	19
2.11 胞外 20S 蛋白酶體降解試驗	19
2.12 免疫螢光染色與雷射共軛焦掃描顯微鏡	20
第三章 結果	21
3.1 PB1-F2 與 20S 蛋白酶體之胞外試驗	21
3.2 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的表現量、穩定性以及降解機制	21
3.2.1 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的表現量	21
3.2.2 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的穩定性	21
3.2.3 PB1-F2 突變株在 HEK293 細胞中的表現量和穩定性	22
3.2.4 PB1-F2 之泛素化位點突變增加其在 HEK293 細胞中的穩定性	23



3.2.5 PA28 參與 PB1-F2 的降解.....	23
3.2.6 PB1-F2 於細胞中的分佈位置.....	24
第四章 討論.....	26
4.1 PB1-F2 與 20S 蛋白酶體之胞外試驗.....	26
4.2 PB1-F2 重組蛋白質在細胞內的表現量和穩定性.....	26
4.3 PB1-F2 重組蛋白質之胺基酸序列影響其在細胞內的表現量和穩定性.....	27
4.4 PB1-F2 重組蛋白質在細胞內的降解機制.....	27
4.5 胺基酸序列影響 PB1-F2 在細胞中的分佈位置.....	29
4.6 A 型流感病毒株之致病力與 PB1-F2 之穩定度.....	29
第五章 總結.....	31
參考文獻.....	33
圖與表.....	37
附錄.....	51

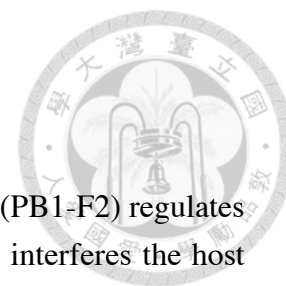
摘要



已知 A 型流感病毒的 PB1-F2 蛋白質會調控病毒 PB1 聚合酶活性，亦會進入宿主細胞粒線體內外膜之間，促使膜電位下降，引發單核球細胞凋亡、調控細胞先天性免疫反應。此外 PB1-F2 也會抑制干擾素的生成，並增加二次細菌性肺炎感染的風險。然而，來自不同病毒株的 PB1-F2 在不同宿主細胞中的定位、表現量和功能都有不少差異，因此研究 PB1-F2 的穩定性、功能及調控機制，也許可以進一步了解不同流感病毒株致病力有所差異的原因。本研究將四株不同亞型的病毒株 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)、A/Udorn/307/1972 (H3N2)、A/Hong Kong/156/1997 (H5N1)、A/Taiwan/01/2013 (H7N9) 的 PB1-F2 基因於 HEK293 細胞中表現時，發現其表現量有極大的差異，且皆會因加入蛋白酶體抑制劑 MG132 而有不同程度的上升，表示 PB1-F2 會受到蛋白酶體降解系統的調控。將四株不同亞型病毒株的 PB1-F2 進行部分胺基酸序列互換時，發現 2、10、11、14 和 68-71 會影響 H1N1、H3N2 和 H7N9 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的穩定性，然而對於 H5N1 則沒有顯著影響。此外，細胞影像的結果顯示 PB1-F2 68-71 的胺基酸序列會影響 PB1-F2 在細胞中的分佈位置，其中 ILVF 有粒線體標的功能，會使 PB1-F2 位於粒線體。為了探究 PB1-F2 的穩定性是否受到泛素化的調控，將四株病毒株之 PB1-F2 上的所有離胺酸突變為精胺酸後，發現 H1N1、H3N2、H7N9 之 PB1-F2 皆因泛素化位點的突變而提升的在細胞中的穩定性，而 H5N1 PB1-F2 的穩定性則沒有因突變而有顯著提升，因此可知 PB1-F2 可經由泛素依賴型 (dependent) 或不依賴型 (independent) 路徑而被蛋白酶體降解。此外，分別將 PA28 α 、PA28 β 或 PA28 γ 與 PB1-F2 共轉染至 HEK293 細胞中，四株病毒株的 PB1-F2 的表現量皆有非常明顯的下降，顯示 PA28 可以促進 PB1-F2 的降解。

關鍵字：流感病毒、PB1-F2、蛋白酶體、PA28

Abstract



Influenza A virus (IAV) protein Polymerase basic 1-frame 2 (PB1-F2) regulates viral polymerase activity, induces apoptosis in host immune cells, interferes the host innate immune response and enhances the pathogenesis of secondary bacterial pneumonia. Moreover, PB1-F2 derived from different virus strains may perform different functions, expression levels and cellular localization, leading to their various strain-specific virulence in host cells. Therefore, studying the principles which determine the stability, functions and regulation mechanisms of PB1-F2 might help us know further about the pathogenesis of various influenza A virus strains. In this study, HEK293 cells expressed PB1-F2 from four IAV strains (A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), A/Udorn/307/1972 (H3N2), A/Hong Kong/156/1997 (H5N1), A/Taiwan/01/2013 (H7N9)) in extremely various expression levels. Moreover, the expression levels of PB1-F2 were increased upon MG132 treatment and showed different sensitivity to MG132, indicating that PB1-F2 may undergo proteasome-mediated degradation. Swapping of equivalent amino acid residues 2, 10, 11, 14, and 68-71 of PB1-F2 among these four IAV strains may alter their protein stability. Moreover, the cell images showed that amino acid residues 68-71 might modulate the localization of PB1-F2. In addition, PB1-F2 residues I68, L69, V70, and F71 are mitochondrial targeting sequence. In order to clarify whether PB1-F2 stability is ubiquitination-mediated, all of the lysine residues of PB1-F2 were mutated to arginine residues to inhibit the possible ubiquitination of PB1-F2. It is found that the expression levels of H1N1, H3N2 and H7N9 PB1-F2 were greatly increased, but H5N1 PB1-F2 did not increase significantly, indicating that the ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent degradation pathway are all involved in regulation of PB1-F2 stability. Furthermore, the expression levels of PB1-F2 were markedly decreased while the proteasome activator PA28 α /PSEM1, PA28 β /PSME2, or PA28 γ /PSME3 was co-transfected with PB1-F2, suggested that PA28 can promote degradation of PB1-F2.

Keywords: Influenza, PB1-F2, Proteasome, PA28/PSME

縮寫表



縮寫	全名
ANT3	Adenine nucleotide translocator 3
CBR	Coomassie Brilliant Blue R-250
DM	Deletion mutant
FBS	Fetal bovine serum
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HA	Hemagglutinin
IDP	Intrinsic disorder protein
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Lysogeny broth
M	Matrix protein
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling
MBP	Maltose binding protein
MTS	Mitochondria targeting sequence
NA	Neuraminidase
NP	Nucleoprotein
NS	Nonstructural protein
PA	Polymerase acidic protein
PA28	Proteasome activator 28
PB	Polymerase basic protein
PB1-F2	Polymerase basic 1-frame 2
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1
WT	Wild Type



第一章 緒論

1.1 A 型流感病毒

A 型流行性感冒病毒屬於正黏液病毒科 (*Orthomyxoviride*)，為單股負股 RNA 病毒，有八段 RNA 所組成之基因組，這八段 RNA 總共會作出 11 個病毒蛋白質，分別是 NA、HA、M1、M2、PB1、PB1-F2、PB2、PA、NP、NS1 以及 NS2。A 型流行性感冒病毒可感染人類、禽鳥、豬隻、狗、馬及海洋哺乳類生物。每年都會引發人類季節性、地域性流行性感冒，造成呼吸道感染 (1)。根據世界衛生組織統計，全球平均每年約有 1 億個流感病例，其中有嚴重症狀的約有 3 百萬至 5 百萬例，約有 30-50 萬個死亡案例 (2)。

A 型流感病毒是依照兩個外套膜上的醣蛋白血球凝集素 (HA) 和神經胺酸酶 (NA) 分類亞型。目前血球凝集素有 18 種，神經胺酸酶則有 11 種 (3)。世界衛生組織在 1980 年通過流感病毒毒株命名法修正案，正式訂定流感毒株命名的 6 個要素：型別/宿主/分離地區/毒株序號/分離年份 (HnNn)，若為人類流感病毒，則省略宿主資訊 (4)。

1.1.1 H1N1 病毒

H1N1 病毒可在人類之間傳播，是人類最常感染的流感病毒之一，一般的病情輕微，但是曾有兩次大規模的疫情；1918 年爆發的流感，造成全球約五億人感染，而西班牙疫情最為嚴重 (5)，此外，2009 年於墨西哥爆發的 H1N1 流感，超過千人感染，疫情甚至傳播到全世界 (6)，另有一些 H1N1 病毒可以在人類和豬隻之間傳播 (7)。

1.1.2 H3N2 病毒



H3N2 是常見的季節性流感病毒，豬隻和人類為主要宿主，也會感染鳥類，且突變成許多不同的變毒株。H3N2 在人類之間引起的流感，最著名的是在 1968 年爆發的香港流感，之後傳至美國導致約 3 萬 4 千人死亡 (8)。

1.1.3 H5H1 病毒

H5N1 病毒是一個高致病性的亞型，主要感染鳥類並引起禽流感，而後經基因交換轉移到人類，在 1997 年首次出現人類感染病例，18 人確診，其中 6 人因此死亡 (9)。在 2003 年至 2015 年之間，全世界向世界衛生組織通報 630 例人類確診病例，其中 375 例死亡，死亡率高達約 60% (10)。

1.1.4 H7N9 病毒

H7N9 是一種禽流感病毒，在禽鳥類的死亡率低，而 2013 年 H7N9 在中國大陸跨物種傳染至人類，造成呼吸道感染和嚴重肺炎，而當年的致死率高達 36% (11)。H7N9 其病發期短、重症率與死亡率都比 SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) 高。

1.2 Polymerase basic protein 1-frame 2 (PB1-F2)

PB1-F2 為 A 型流感病毒中核糖核酸聚合酶 polymerase basic protein 1 (PB1) 基因上的第二個開放閱讀框所轉譯出一段大小約為 87-101 個胺基酸的蛋白質，但並不是所有 A 型流感病毒都會表現 PB1-F2，而其胺基酸序列和長度在不同病毒株和亞型之間也有所差異 (12)。

1.2.1 PB1-F2 的發現

PB1-F2 是在研究毒殺型 T 細胞 (CD8⁺ T lymphocyte) 辨識的所有抗原決定位時所發現的第十一個流感病毒蛋白質，此研究在 2001 年由 Chen 等人發表於 Nature Medicine 上



(13)。PB1-F2 是當核糖體在讀取 PB1 基因的轉譯起始點時發生缺漏，而跳過前面三個轉譯起始點辨識到 PB1 基因上的第四個轉譯起始點所產生的蛋白質。

1.2.2 PB1-F2 的蛋白質結構

在 2001 年被發現時，由 NNPRELECT 演算法預測 H1N1 PR8 病毒株 PB1-F2 的二級結構，發現上第 69 號白胺酸到第 83 號苯丙胺酸這段序列有形成雙極性螺旋結構的傾向

(13)。在 2006 年德國的學者 K. Bruns 等人使用核磁共振光譜儀 (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) 分析 PB1-F2 結構，發現在 N 端有兩個、C 端有一個二級螺旋結構，且會因 C 端的螺旋結構互相形成寡聚合物 (oligomers) (14)。此外，PB1-F2 也具有內生性結構無序 (Intrinsic disorder) 的特性，且在不同的細胞環境之下結構會隨機轉變為 α -helix 或 β -sheet (15)。也有研究指出在被 H1N1 感染的細胞中 PB1-F2 蛋白呈現 β -類澱粉蛋白聚集的結構 (16)。而法國的研究團隊利用大腸桿菌表現並純化 PB1-F2 重組蛋白質，發現 PB1-F2 聚合所形成的類澱粉蛋白纖維會破壞細胞膜，造成細胞死亡 (17)。

1.2.3 PB1-F2 參與細胞凋亡機制

PB1-F2 的胺基酸序列有定位在粒線體上的功能 (Mitochondria targeting sequence, MTS)，PB1-F2 會穿過粒線體外膜進入粒線體雙層膜之間的空間，造成粒線體膜電位喪失，進而引發細胞凋亡 (13, 18)。關於 PB1-F2 定位於粒線體，在 2003 年有研究指出 PB1-F2 的 65 號到第 87 號胺基酸為一段粒線體靶向序列 (Mitochondria Targeting Sequence, MTS)，會在 C 端形成雙極性螺旋結構，與粒線體運輸蛋白作用，使 PB1-F2 進入粒線體的內外膜之間 (19)。另一個研究團隊則認為 PB1-F2 的第 46 號到第 75 號胺基酸為粒線

體靶向序列 (20)。此外，研究證實有別於進入粒線體需要 TOM20/22 運輸蛋白幫助的常見路徑，PB1-F2 是藉由 TOM40 通道蛋白通過粒線體外膜，進入粒線體雙層膜之間 (21)。

PB1-F2 導致粒線體膜電位喪失的機制可能為 PB1-F2 直接或間接影響粒線體雙層膜，有研究指出合成的片段 PB1-F2 會提高單價陽離子和氯離子在雙層磷脂膜上的通透性，在電場中則發現 PB1-F2 會降低膜的穩定度使膜電位喪失 (22)。也有研究發現 PB1-F2 的 C 端有助於多聚體化，形成一個不具選擇性的離子通道，破壞粒線體的網狀、管狀構型 (23)。PB1-F2 也可能間接影響膜電位，研究發現 PB1-F2 會與內膜上的 ANT3 (adenine nucleotide translocator 3) 以及外膜上的 VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1) 結合，形成 PTPCs (Permeability Transition Pore Complexes)，提升外膜通透性，而釋出細胞色素 c (cytochrome c) 造成膜電位喪失，最後導致細胞凋亡 (24)。

1.2.4 PB1-F2 與 PB1 結合調控 RdRP 聚合酶活性

大部分的 PB1-F2 具有提升聚合酶活性的能力，病毒株的 PB1-F2 不僅可以進入粒線體外膜，有些也會分佈在細胞核和細胞質中，如 H1N1、H5N1 和 H7N7 (12)。2008 年 Mazur 等人將突變後無法完整表現 PB1-F2 的 PR8 病毒株和野生株進行實驗，發現突變株於 MDCK 細胞中所形成的群落小於野生株，進一步研究指出 PB1-F2 在細胞質中會直接與 PB1 交互作用，提高聚合酶的活性 (25)。

1.2.5 PB1-F2 調控細胞先天性免疫功能

研究證實 PB1-F2 會影響 IFN β 的表現，使宿主的免疫反應降低，進而增強流感病毒之致病力 (21)。也有研究指出 PB1-F2 會使人類呼吸道上皮細胞的 IFN β 表現量明顯增加



(26)。此外，Peter Palese 的研究團隊發現 PB1-F2 會經由 MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) 輔助蛋白誘導路徑抑制第一型干擾素的生成，因而影響宿主免疫功能 (27, 28)。

1.2.6 PB1-F2 提升宿主二次性細菌感染的機率

因著 PB1-F2 會影響宿主細胞對抗流感病毒感染的免疫反應，進而增加流感病毒的致病力和二次性細菌感染的機率，並引發重症 (28-33)。Zmarin 等人將 PR8 野生型病毒株和剔除 PB1-F2 基因的突變株分別感染小鼠，結果發現未剔除 PB1-F2 基因之突變株感染的小鼠體重較輕、死亡率較高，另外以 HK156 病毒株進行相同的實驗，結果也有同樣的趨勢 (34)。另有團隊進一步研究指出 PR8 病毒株的 PB1-F2 胺基酸 I68、L69 和 V70 有細胞毒性，使病毒有致病力並導致二次性細菌感染 (35)。

1.2.7 PB1-F2 的穩定度

各種 A 型流感病毒株感染細胞後所表現出來的 PB1-F2 蛋白質之半生期差異大。在 PB1-F2 最早的研究中可見，H1N1 WSN 感染 MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) 細胞經過一小時之後 PB1-F2 開始被分解 (13)。此外，有研究團隊發現 H1N1 PR8 感染 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 一小時後 (25) 或感染 A549 (Human lung adenocarcinoma epithelial cell) 八小時後 (26)，以及 H1N1 WSN 感染 A549 細胞十小時後，PB1-F2 就會被分解掉 (34)。然而整體而言 PB1-F2 蛋白質的半生期短，有些病毒株甚至更短而難以觀察。

1.2.8 PB1-F2 依賴蛋白酶體的降解機制



有研究指出細胞在被 H1N1 WSN 感染後，加入蛋白酶體抑制劑 lactacystin，可以提升 PB1-F2 蛋白質在細胞內的穩定度 (13)。不同病毒株的 PB1-F2 在細胞內的穩定性也不一樣，H1N1 PR8、H1N1 TW/3355、H5N1 HK156 和 H7N7 Neth219 的表現量較高，H1N1 TW/1184、H3N2 TW/3351 和 H3N2 TW/1748 的表現量非常低甚至不表現，其中 H1N1/PR8 和 H5N1/HK156 的穩定度在經過蛋白酶體抑制劑 MG132 的處理後有不同程度的提升，其它病毒株則沒有提升其穩定度 (12)。2017 年的文獻也指出 H1N1 PR8 與 H5N1 HK156 在細胞中的穩定度有懸殊的差異，並且在胺基酸序列互換的實驗中證實序列 68-71 會影響 PB1-F2 的穩定度及調控干擾素 β 生成的功能 (36)。

1.2.9 PB1-F2 的磷酸化與泛素化

關於 PB1-F2 的轉譯後修飾，有研究指出合成的 PB1-F2 在胞外試驗中，會被蛋白質激酶 C (Protein Kinase C) 及細胞萃取物磷酸化。此外，在酵母菌雙雜和試驗中也發現 PB1-F2 會跟持續活化的 α 型蛋白質激酶 C (Protein Kinase alpha, PKC $_{\alpha}$) 有交互作用，其磷酸化位點 Thr 27 和 Ser35 影響了病毒的複製並促進人類單核球凋亡 (37)。另一項研究發現，H1N1 PR8 病毒株的 PB1-F2 靠近 C 端的第 73、78、85 號離胺酸以及在 H5N1 HK156 的第 73、78、81、85 號離胺酸會被泛素化，進而被 26S 蛋白酶體所辨認並降解，然而，將這些離胺酸突變成精胺酸，便可提升 PB1-F2 在細胞中的表現量，同時提升了病毒的 RNA 聚合酶的活性、提高細胞中干擾素 β 生成的拮抗作用，並加強細胞產生 PB1-F2 抗體的免疫反應 (38)。然而另一個團隊的研究剛好與上述的結果相反，H1N1 PR8 和 H5N1 HK156 突變株在細胞中的 PB1-F2 表現量並沒有因此而上升 (36)。



1.3 蛋白酶體降解機制

蛋白酶體存在於真核生物和古生菌中，位於細胞核及細胞質中 (39)，是一個筒狀的蛋白質複合物，主要的功能為降解細胞受到損傷或不需要的蛋白質，是細胞中調控蛋白質濃度及除去錯誤蛋白質的機制 (40)。最常見的蛋白酶體形式為 26S 蛋白酶體，由一個 20S 核心顆粒與兩個 19S 核心顆粒所組成 (41)。

1.3.1 泛素依賴型降解路徑

一開始泛素被泛素活化酶 (E1) 活化，接著被移轉到泛素交聯酶 (E2) 上，最後在泛素連接酶 (E3) 的催化之下，泛素被轉移到目標蛋白上，並接續加上多個泛素分子，形成多泛素鍊，藉著此接上泛素鍊的目標蛋白就會被 19S 辨識並被 20S 降解成 7-8 個胺基酸的胜肽片段 (41)。

1.3.2 泛素不依賴型降解路徑

泛素不依賴型降解路徑為蛋白質不需經過泛素化而直接被 20S 蛋白酶體降解 (42)。此降解路徑分為兩個機制，蛋白質藉由一些蛋白質的幫助與 20S 結合，或是藉由蛋白酶體活化因子調控 20S 的降解功能 (43)。

1.3.3 蛋白酶體活化調節因子 PA28

11S 調節因子為 20S 蛋白酶體的活化調節因子，又被稱作 PA28，為一個七聚體，能幫助打開 20S 的門，使蛋白質可以進入 20S 蛋白酶體，進而被降解 (44)。PA28 有三種亞基分別為 PA28 α /PSEMI、PA28 β /PSME2 與 PA28 γ /PSME3，其中 PA28 α 和 PA28 β 為異二聚體。



1.4 研究動機

本實驗室先前的研究發現 H7N9 之 PB1-F2 蛋白質在細胞當中非常的不穩定 (45)，並且其它研究團隊也發現大多數的 A 型流感病毒株之 PB1-F2 半生期短且穩定度低 (13, 25, 26, 34)。有研究指出 H1N1 PR8 和 H5N1 HK156 的 PB1-F2 蛋白質在經過蛋白酶體抑制劑 MG132 的處理後提升了穩定度 (12)。本實驗室亦發現，當轉染 H7N9 PB1-F2 至 HEK293 細胞並且加入蛋白酶體抑制劑 MG132 於培養基中，H7N9 PB1-F2 的表現量會明顯增加，表示 PB1-F2 的穩定度會受到蛋白酶體的調控。為了同時比較不同病毒株之 PB1-F2 的蛋白質穩定性高低是否與其特殊之胺基酸序列有關，因此本研究擴大針對 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)、A/Udorn/307/1972 (H3N2)、A/Hong Kong/156/1997 (H5N1)、A/Taiwan/01/2013 (H7N9) 等四株病毒的 PB1-F2 來進行相同的實驗，並且確認 PB1-F2 的穩定度會受到蛋白酶體的調控是否為一普遍的現象。

此外也有研究發現 H3N2 NT60 病毒株 PB1-F2 的 C 端胺基酸 L62、R75、R79、L82 會增加老鼠的發炎反應以及肺炎鏈球菌的感染 (33)。而 H1N1 PR8 病毒株的 PB1-F2 胺基酸 I68、L69 和 V70 被證實與造成細胞毒性有關，使病毒有致病力並導致二次性細菌感染 (35)。此外，Alymova 等人的研究團隊將 H3N2 的 L62、R75、R79、L82 視為「發炎序列」或「致病性相關序列」，H1N1 PR8 的 I68、L69 和 V70 則為「細胞毒性序列」(46)。已知 PB1-F2 在 N 端有兩個、C 端有一個螺旋結構，且這些疏水性序列為高度保守 (14)，我們也從中觀察到 H1N1 PR8 之 PB1-F2 靠近 N 端的 2、10、11、14 以及 C 端的 68-71 為疏水性胺基酸，因此假設這

些位點可能會影響 PB1-F2 的螺旋結構和穩定性，所以本研究將不同之 PB1-F2 的胺基酸進行了位點互換的實驗，藉此觀察特定區域之胺基酸序列對於 PB1-F2 蛋白質穩定性的影響。

關於 PB1-F2 的降解途徑，有研究指出 H1N1 PR8 病毒株的 PB1-F2 會經由泛素化而被 26S 蛋白酶體所辨認並降解 (38)，然而另一個團隊則有相反的研究結果 (36)，因此本研究針對四株不同病毒株之 PB1-F2 進行離胺酸突變成精胺酸的實驗，藉此觀察 PB1-F2 的降解是否為泛素化依賴型。

基於本實驗室先前對 H7N9 PB1-F2 的研究，本研究繼續擴大分析四株 A 型流行性感冒病毒之 PB1-F2 的蛋白質穩定性，希望藉由此研究可以了解不同 A 型流感病毒株 PB1-F2 的降解機制，並且了解 PB1-F2 穩定度與病毒致病力之關聯性。



第二章 材料與方法

2.1 PB1-F2 與 PA28 基因來源

PB1-F2 基因分別來自 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), A/Udorn/307/1972 (H3N2), A/Hong Kong/156/1997 (H5N1), A/Taiwan/01/2013 (H7N9) 病毒株，cDNA 長度為 264-273 個鹼基對，其轉譯之蛋白質含有 87-90 個胺基酸。詳細基因序列見附錄圖 S1。Human PA28 α (PSME1)、PA28 β (PSME2)與 PA28 γ (PSME3) 之 cDNA 購自 Sino Biological Inc.，編號分別為 HG14654-NY、HG14640-NF 和 HG14682-NM。

2.2 大腸桿菌菌株

2.2.1 大腸桿菌 DH5 α

DH5 α 是一種可攝入外源 DNA 的大腸桿菌菌株，常用來大量複製質體，可將質體穩定儲存於其細胞質中，DH5 α 的基因型為 F^- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17($r\kappa^-m\kappa^+$), λ^- ，其中 *endA* 基因突變降低大腸桿菌本身非專一性的內切酶的活性，提高質體製備的品質 (47)。*

2.2.2 大腸桿菌 BL21 (DE3)

大腸桿菌 BL21 (DE3)常用於表現重組蛋白質，在生長期間藉由異丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 的誘導可以大量表現外轉基因之重組蛋白質。BL21 (DE3) 為 BL21 菌株植入 λ DE3 溶解因子，其帶有的 T7 RNA 聚合酶，可以被 lacUV5 啟動子所調控。BL21 (DE3)



的基因型為 *E. coli* str. B F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)。*

2.2.3 大腸桿菌 Rosetta (DE3)

大腸桿菌 Rosetta (DE3) 為大腸桿菌 BL21 (DE3) 改造而來，用來提升真核生物之重組蛋白質表現量，由於真核細胞密碼子：AUA、AGG、AGA、CUC、CUC、CCC 和 GGA 等，大腸桿菌所含攜帶這些密碼子的 tRNA 數量較少，影響其蛋白質表現量，因此轉入含有這些密碼子基因的質體 pRARE，可以有效提升真核生物蛋白質表現量 (48)。

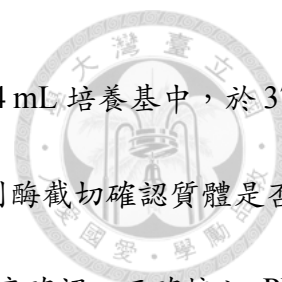
2.3 人類細胞株

人類胚胎腎臟細胞株 (HEK293) (ATCC® CCL-2™)，由正常的人類胚胎腎臟細胞插入經過剪切的 5 型腺病毒 DNA 進行轉化，其轉染效率高且易於培養。

人類子宮頸癌細胞株 (HeLa) (ATCC® CRL 1573™)，經過人類乳突病毒第 18 型 (Human papillomavirus 18) 的轉化，不同於正常子宮頸細胞。

2.4 PB1-F2 重組蛋白質表現質體建構

在 PB1-F2 基因的 5' 端加上 *HindIII* 及 *BamHI* 限制酶切位，於 3' 端加上 *XhoI* 和 *Sall* 限制酶切位，並由力鈞生物科技公司合成於 pUC57-Amp 質體中，進一步以限制酶作用 (New England BioLabs, USA) (表 S4) 截切出線狀質體 pET28a-MBP-His、pEGFP-C1 (Clontech, USA) 與 PB1-F2 基因片段，接著使用 1% 瓊脂膠體電泳分離，再以 GenepHlow Gel/PCR Kit (GeneAids, Taiwan) 萃取 DNA 片段，將質體和基因片段以 1:3 的莫爾數比例共約 200 ng，以 T4 DNA 連接酶 (New England BioLabs, USA) 在室溫下作用 1 小時或 4°C 作用隔夜後轉殖進入大腸桿菌



DH5 α 中，並以含抗生素瓊脂膠培養基篩選菌落。將單一菌落挑起至 4 mL 培養基中，於 37°C 培養隔夜後以 Mini Plasmid Kit 抽取質體 (GeneAids, Taiwan)，以限制酶截切確認質體是否接入預測大小的片段，如有，則將此 DNA 樣本送至基龍米克斯公司定序確認。正確接入 PB1-F2 片段的質體分別命名為 pET28a-MBP-F2-His 和 pEGFP-F2。

pET28a-MBP-F2-His 質體於大腸桿菌中表現的麥芽糖結合蛋白質融合 PB1-F2 蛋白質的重組蛋白將用來進行胞外試驗，此外，pEGFP-F2 質體將於人類細胞株中表現綠色螢光蛋白質融合 PB1-F2 蛋白質的重組蛋白以進行胞內試驗。

2.4.1 PB1-F2 位點互換突變株建構

將四株不同病毒株的 PB1-F2 基因上之特定區域 (2, 10, 11, 14 以及 68-71) 依照親疏水特性進行互換 (圖 S1)，這些突變株命名如表。位點互換突變株由多段引子含有互相交疊的基因片段經過幾次 PCR 完成。主要原理是每一次 PCR 以前一次反應的產物作為模板與新的引子黏合並且經由聚合酶延長，將突變的位點設計在引子上，即可完成 PB1-F2 突變的基因。最後將完整的 PCR 反應產物以限制酶反應後選殖進入 pEGFP-C1 質體中，並由基龍米克斯公司定序確認序列。PCR 所用引子請見表 S1，聚合酶鏈鎖反應條件、限制酶反應條件如表 S3、表 S4。

2.4.2 PB1-F2 泛素化位點突變株建構

將 PB1-F2 基因所有的離胺酸泛素化位點突變成精胺酸，去除泛素化的可能，分別將這些突變株命名為 pEGFP-F2(H1N1)-8KR、pEGFP-F2(H3N2)-10KR、pEGFP-F2(H5N1)-



10KR、pEGFP-F2(H7N9)-9KR (圖 S1A)。這些突變株由力鈞生物科技公司合成於 pUC57-Amp 質體中，接著接入 pEGFP-C1 (Clontech, USA) 質體中。

2.5 重組蛋白質表現

2.5.1 PB1-F2 重組蛋白質表現

將重組蛋白質表現質體轉型進入 BL21(DE3)，挑起單一菌落後培養在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那黴素 (kanamycin) 或氨苄青黴素 (ampicillin) 的 50 mL LB (Luria-Bertani) 培養基中，做為種菌以 37°C 及 150 rpm 的條件培養過夜。隔天，將種菌以 1:50 的比例接種至 800 mL 的 LB 培養基中，在 37°C 及 150 rpm 的條件培養至 O.D.₆₀₀ 0.6~0.8，之後加入 IPTG 誘導蛋白質表現 (最終濃度為 1mM)。經過 4 小時誘導表現後，以 4°C 及 6000 rpm 的條件離心十分鐘收集已表現蛋白質的大腸桿菌。

2.5.2 20S 突變蛋白酶體表現

源自嗜酸熱原體 *Thermoplasma acidophilum* 的重組 20S 蛋白酶體突變株質體 (由 Dr. Alfred L. Goldberg, Harvard Medical School 提供) pRSET- $\Delta\alpha(2-12)20S$ (20S DM) 轉殖進入 BL21(DE3)，挑起單一菌落培養於含有 1% 葡萄糖的 LB 培養基，在 37°C 和 150 rpm 培養隔夜，將此培養液以 1:50 的比例接菌至含有 1% 葡萄糖之 4 公升 LB 培養基中，在 37°C 和 150 rpm 的條件下培養至 O.D.₆₀₀ 1.6~1.8 再加入 IPTG (最終濃度為 1mM) 誘導蛋白質表現 3 個小時，最後以 4°C 及 8,000 rpm 的條件離心十分鐘收集大腸桿菌。

2.6 重組蛋白質純化

2.6.1 PB1-F2 重組蛋白質純化



將離心下來的大腸桿菌 BL21 (DE3) 菌塊以結合緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 懸浮後，用均質破碎機以 25 KPSI 將菌破碎 (Constant system LTD, UK)，並在 20,000 rpm 和 4°C 的條件下離心 15 分鐘，此步驟重複一次，最後收取上清液通過 0.45 μm 濾膜以取得粗萃液。接著使用 ÄKTAprime plus (GE Healthcare, USA) FPLC 系統和 1 mL HisTrap™ HP (GE Healthcare, USA) 進行 MBP-F2 的純化。

2.6.2 20S DM 蛋白酶體純化

將離心下來的大腸桿菌 Rosetta (DE3) 菌塊以結合緩衝液 (20 mM Na_2HPO_4 , 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.3) 懸浮後，使用均質破碎機以 25 KPSI 將菌破碎 (Constant system LTD, UK)，並在 20,000 rpm 和 4°C 的條件下離心 15 分鐘，由於目標蛋白質 20S DM 源自嗜酸熱原體，因此收取上清液於 80°C 水浴槽反應 10 分鐘使部分非目標蛋白質變性，再於 20,000 rpm 和 4°C 的條件下離心 15 分鐘，最後收取上清液通過 0.45 μm 濾膜以取得粗萃液。接著使用 ÄKTAprime plus (GE Healthcare, USA) FPLC 系統和 1 mL HisTrap™ HP (GE Healthcare, USA) 純化出含有 His 標籤的 20S DM 蛋白酶體，最後以緩衝液 (20 mM Na_2HPO_4 , 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.3) 將 20S DM 蛋白酶體分離出來。

2.6.3 蛋白質脫鹽與濃縮

使用 HiLoad® 16/60 Superdex® 75 pg (GE Healthcare, USA) 膠體過濾管柱去除鹽類，接著以超微膜過濾法 (Centrifugal filter unit, Millipore) 進行濃縮，最後將經過純化之蛋白質樣品保存於 -20°C。



2.6.4 蛋白質定量

以 Bradford method 測定蛋白質濃度，將樣本 5 μL 與 Coomassie Brilliant Blue G-250 染劑 200 μL 於 ELISA 96 孔盤混合，並以牛血清蛋白質序列稀釋的樣本取得檢量線，再用 ELISA reader 偵測 595 nm 的吸光值。接著以 Tris-glycine SDS-PAGE 確認蛋白質純度，將完成電泳後的膠體以 Coomassie Brilliant Blue R-250 染劑染色 10 分鐘，以脫色液脫除多餘染劑後觀察其純度，最後以免疫染色法分析蛋白質。

2.7 細胞培養

人類細胞株使用培養基為 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fischer Scientific, USA)，外加 10% 胎牛血清 (FBS) (Hyclone, USA) 及 1% Pen/Strep Amphotericin B (Lonza, Switzerland) 抗生素，培養於 37°C 與 5% CO_2 培養箱。

2.8 細胞轉染

將 HEK293 細胞以細胞計數器 Cellometer Auto T4 (Nexcelom, USA) 計數，將細胞分殖於細胞培養盤中 (3×10^5 個/孔 (12 孔盤)、 5×10^5 個/孔 (6 孔盤))。以 6 孔盤的細胞轉染為例，取質體與 Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer Scientific, USA) 以 1:1.5 的比例混合於 500 μL DMEM，20 分鐘之後，將混合試劑均勻滴入細胞培養盤中，在 37°C 和 5% CO_2 的條件下培養。在特定實驗中，進行轉染 24 小時後將培養液換成含有濃度為 20 μM MG132 (Selleckchem, USA) 或 10 μM Lactacystin 的培養液進行抑制蛋白酶體之實驗。



2.9 細胞樣本製備

在轉染後第 48 小時，將細胞以 300 g 離心 5 分鐘收集，以 PBS 沖洗細胞兩次，再以 cell lysis buffer 回溶。使用超音波破碎機 (Misonix S-3000, USA) 以 0.5 持續十秒將細胞破碎後，於 4°C 以 12,000 rpm 離心 20 分鐘後保留上清液，並使用 BCA method 進行總蛋白質定量 Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, USA)。取定量樣本與 4X Laemmli sample buffer 混合，於 95°C 反應 10 分鐘，接著進行免疫染色分析。

2.10 免疫染色分析

蛋白質樣本以 10% 的丙烯醯胺膠體進行 Tris-glycine SDS 電泳後，將膠體在 4°C 以 110 V 和 1 小時的條件轉印至 0.45 μm PVDF 膜上，接著以含有 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 及 5% 外加的脫脂奶粉將 PVDF 膜進行填塞，再使用 PBST 清洗 PVDF 膜 5 分鐘 3 次將多餘的脫脂牛奶洗去。接下來將 PVDF 膜置於含有一次抗體之明膠-NET 緩衝液中在 4°C 下搖晃反應隔夜，使用的抗體包括 anti-GFP (B-2, Santa Cruz)、anti-Ub (P4D1, Santa Cruz)、anti-α-Tubulin (Genetex)、anti-His (Bio-rad)、anti-HA (Genetex)、anti-Flag (Sigma)、anti-Myc (Genetex)。隔天，以 PBST 洗淨 PVDF 膜，再將其置於含有二次抗體的明膠-NET 緩衝液中於室溫搖晃反應 1 小時，最後將膜以 PBST 洗淨，加入酵素冷光試劑 (Advansta) 進行呈色，以 BioSpectrum Imaging System (UVP, USA) 進行影像拍攝。

2.11 胞外 20S 蛋白酶體降解試驗

在試驗中的每個時間點以 0.5 μg MBP-F2 作為基質，並加入 5 μg 20S 蛋白酶體於 20S 試驗緩衝液 (20 mM Tris pH 7.2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) 中，以 37°C 在微量離心管中進行反



應，反應時間為 6 小時、12 小時，反應結束時以 4X Laemmli sample buffer 終止反應，之後進行膠體電泳與免疫染色分析法。胞外 20S 蛋白酶體降解試驗材料請見表 S5。

2.12 免疫螢光染色與雷射共軛焦掃描顯微鏡

將 HeLa 細胞以 3×10^5 個/孔的細胞數分殖於含有 20 mm 玻片的 12 孔盤細胞培養盤中。取質體與 Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer Scientific, USA) 以 1:1.5 的比例混合於 250 μ L DMEM，20 分鐘之後，將混合試劑均勻滴入細胞培養盤中，在 37°C 和 5% CO₂ 的條件下培養。在特定實驗中，進行轉染 24 小時後以 PBS 將含有 FBS 的培養液洗去，以配置於 DMEM 的 400 nM reduced rosamine MitoTracker Orange (M7511, Invitrogen)，在 37°C 和 5% CO₂ 的條件下染粒線體。接著以 PBS 清洗三次，以 4% paraformaldehyde (Sigma) 於 4°C 固定細胞 10 分鐘，再以 PBS 清洗三次，使用 0.3% Triton X-100 (USB) 在室溫下將細胞打洞 10 分鐘，以 PBS 清洗三次。於保濕暗盒中以含有 10% FBS (GE Healthcare, USA) 和 1% Donkey Serum (Jackson ImmunoResearch) 的 diluent (50 mM TBS, pH 7.4) 作為 blocking reagent 對細胞進行填塞，再以 1nM Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, USA) 於室溫避光靜置 5-10 分鐘染細胞核，以 PBS 清洗三次，最後將玻片以 10 μ L Prolong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, USA) 進行封片，於室溫風乾隔夜，以透明指甲油固定玻片周圍之後保存於 4°C。細胞影像使用顯微鏡 Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope，以及 Type F Immersion liquid (Leica)，在 PL-APO 63X/1.20 Oil 鏡頭下，細胞內的 EGFP 綠色螢光強度以 499 nm 的激發波長和 552 nm 的放射波長下偵測，細胞內的 MitoTracker 紅色螢光強度以 577 nm 的激發波長



和 636 nm 的放射波長下偵測，細胞內的 Hoechst 藍色螢光強度以 411 nm 的激發波長和 462 nm 的放射波長下偵測。

第三章 結果

3.1 PB1-F2 與 20S 蛋白酶體之胞外試驗

在 2010 年 Chevalier 等人發現將 PB1-F2 重組蛋白質單獨於大腸桿菌中表現時會形成不可溶的 inclusion body (15)。本實驗室先前在表現並純化 PB1-F2 重組蛋白質的時後也發現同樣的情況 (45)。而有研究指出 MBP 可提升融合蛋白的可溶性 (49)，因此將 MBP 與 PB1-F2 製備成融合蛋白時，有助於增加 PB1-F2 的可溶性。將純化所得的 MBP-F2 與 20S DM 在 37°C 下反應 6 小時、12 小時。CBR 染色 (圖一 A) 以及免疫染色 (圖一 B) 實驗結果顯示，四株 A 型流感病毒的 PB1-F2 在胞外試驗中皆會被 20S DM 降解，且降解的程度隨著反應時間增加而更加顯著。

3.2 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的表現量、穩定性以及降解機制

3.2.1 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的表現量

將 pEGFP-PB1-F2 質體轉染進入 HEK293 細胞中表現，48 小時之後收取細胞進行免疫染色分析，由實驗結果可知不同流感病毒株之 PB1-F2 於 HEK293 細胞中的表現量有顯著的差異，EGFP-F2(H1N1) 的表現量最高，EGFP-F2(H5N1) 和 EGFP-F2(H7N9) 次之，EGFP-F2(H3N2) 則有極低的表現量 (圖二 A)。

3.2.2 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的穩定性



將 pEGFP-PB1-F2 質體轉染進入 HEK293 細胞中表現，24 小時之後加入蛋白酶體抑制劑 MG132，經過 24 小時的反應後收取細胞進行免疫染色分析，從結果 (圖二 B) 可見 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的含量有提升的趨勢，最顯著的是 EGFP-F2(H3N2)，在 MG132 的作用下與對照組相比有 10 倍的提升，EGFP-F2(H7N9) 有 4.3 倍的提升，EGFP-F2(H5N1) 的 MG132 實驗組則比對照組增加了 3.1 倍，而 EGFP-F2(H1N1) 在 MG132 對蛋白酶體的抑制下表現量的提升不是非常顯著，顯示 EGFP-F2(H1N1) 在 HEK293 細胞中有最高的穩定性，相較之下 EGFP-F2(H3N2) 的穩定性最差。此外，由於 PB1-F2 的表現量會因著 MG132 的處理而提升，因此可以推論 PB1-F2 在 HEK293 細胞中會由蛋白酶體所降解。

3.2.3 PB1-F2 突變株在 HEK293 細胞中的表現量和穩定性

由於不同病毒株的 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的穩定性有非常顯著的差異，值得注意的是相較於其它三個病毒株，H1N1 的 PB1-F2 擁有最高的穩定性，且經由胺基酸序列比對之後發現有一些特定的區域，H1N1 PB1-F2 的胺基酸序列有較高的疏水性，其他三個病毒株的胺基酸則疏水性較低，因此將四株不同病毒株的 PB1-F2 基因上之特定區域 (2、10、11、14 以及 68-71) 依照親疏水特性進行互換 (圖 S1)，並建構成 PB1-F2 位點互換之突變株。將這些突變株轉染進入 HEK293 細胞中觀察其表現量和穩定性 (圖三 A)，結果顯示 H1N1-TQGS 突變株的表現量及穩定性降低，H1N1-ETQE 則沒有明顯影響，H3N2-GILG 突變株有些微上升，H3N2-ILVF 沒有增加其穩定性，而這些位點的突變對於 H5N1 並沒有顯著的影響，相對的 H7N9-GILG、H7N9-ILVF 以及雙突變 H7N9-GILG+ILVF

皆降低了 PB1-F2 的表現量和穩定性，且兩個區域的位點同時突變有協同作用 (圖三 B)。整體而言，胺基酸位點 2、10、11、14 會影響 H3N2 和 H7N9 的 PB1-F2 穩定性，而 68-71 的區域則對 H1N1 和 H7N9 的 PB1-F2 蛋白質穩定性有極為顯著的影響。

3.2.4 PB1-F2 之泛素化位點突變增加其在 HEK293 細胞中的穩定性

先前實驗證實 PB1-F2 在 HEK293 細胞中會經由蛋白酶體降解，因此 PB1-F2 於細胞內的穩定性是由蛋白酶體所調控 (45)。蛋白酶體的降解機制有兩條路徑，一條是藉由蛋白質被泛素化，經蛋白酶體辨認長串的泛素鏈而進行降解，另外一條則是蛋白質因其內生性結構無序的特性，不須經過泛素化即可直接進入蛋白酶體的活性區域被降解 (19)。為了進一步研究 PB1-F2 重組蛋白質的降解機制，將 PB1-F2 所有可能的離胺酸泛素化位點突變成精胺酸，以抑制 PB1-F2 被泛素化的可能性，突變株分別為 pEGFP-F2(H1N1)-8KR、pEGFP-F2(H3N2)-10KR、pEGFP-F2(H5N1)-10KR、pEGFP-F2(H7N9)-9KR。將突變株轉染進入 HEK293 細胞中觀察 PB1-F2 的穩定性是否提升，結果顯示 (圖四)，H1N1、H3N2、H7N9 三個病毒株的 PB1-F2 蛋白質皆因泛素化位點的突變而提升在細胞中的穩定性，而 H5N1 的穩定性並沒有因突變而有顯著提升 (圖四 B)。從此結果可知 H1N1、H3N2 與 H7N9 之 PB1-F2 會經由泛素化且被蛋白酶體辨認進而降解，而 H5N1 之 PB1-F2 則可能不須經過泛素化即可被蛋白酶體所降解。

3.2.5 PA28 參與 PB1-F2 的降解

本論文已經證實 PB1-F2 在細胞中可經由蛋白酶體系統進行降解，為了進一步探究其降解機制是否亦受 PA28 (11S) 調節而被 20S proteasome 降解，因此將 PA28 α 、PA28 β



或 PA28 γ 與 PB1-F2 共轉染至 HEK293 細胞中，並觀察 PB1-F2 的表現量。實驗結果顯示，在 PA28 過度表現的情況之下，四株病毒株的 PB1-F2 的表現量皆有非常明顯的下降 (圖五)，但是 H1N1 的結果在三重複中並不一致。

此外，由於 PA28 α 和 PA28 β 為異二聚體 (heterodimer)，因此將 PA28 α 、PA28 β 和 PB1-F2 同時共轉染進入 HEK293 細胞中，綜合幾次實驗結果可見，在 PA28 α/β 過度表現的情況之下，H3N2、H5N1、H7N9 三株病毒株的 PB1-F2 表現量皆下降，然而 H1N1 的 PB1-F2 表現量則呈現有時些微上升、有時下降的趨勢 (圖六)。整體而言 PB1-F2 應會受到 PA28 的調控而被 20S 降解。

3.2.6 PB1-F2 於細胞中的分佈位置

將帶有 EGFP-PB1-F2 野生株與位點互換突變株的質體分別轉染進入 HeLa 細胞，並於雷射共軛焦顯微鏡底下觀察 EGFP-PB1-F2 在細胞中的分佈 (圖七)。如細胞影像所示，H1N1 野生株在細胞中座落於和粒線體 (紅色螢光) 相同的位置，而 H3N2、H5N1 和 H7N9 野生株則主要分佈於細胞核 (藍色螢光)，少部分位於細胞質中。而針對 2, 10, 11, 14 的位點互換，其中的三個互換株 H1N1-ETQE、H3N2-GILG、H5N1-GILG 並沒有因為序列的互換而改變 PB1-F2 在細胞中的位置 (圖七 A、B、C)，然而，H7N9-GILG 突變株的 PB1-F2 卻改變至粒線體的位置 (圖七 D)。此外，68-71 位點的序列則會影響 H1N1、H3N2、H5N1 之 PB1-F2 在細胞中的位置，H1N1-TQGS 突變株的 PB1-F2 位於細胞核 (圖七 A)，而 H3N2-ILVF 和 H5N1-ILVF 的 PB1-F2 則與粒線體共同分佈 (圖七 B、C)。不同的是，H7N9-ILVF 突變株的 PB1-F2 主要仍位於細胞核 (圖七 D)。此外，雙位點互換突變株

H1N1-ETQE+ILVF、H5N1-GILG+ILVF 的 PB1-F2 大多數分佈於細胞核 (圖七 A、C)，H3N2-GILG+ILVF 則與粒線體位於相同位置 (圖七 B)，而 H7N9-GILG+ILVF 的分佈有些位於細胞核，有些則與粒線體共同分佈 (圖七 D)。





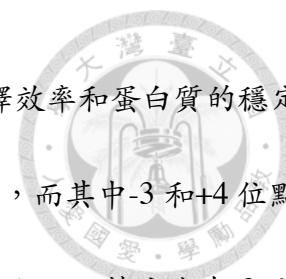
第四章 討論

4.1 PB1-F2 與 20S 蛋白酶體之胞外試驗

胞外試驗使用源自嗜酸熱原體 *Thermoplasma acidophilum* 的重組 20S 蛋白酶體突變株 (20S DM)，此突變株為去除 20S α 亞體的第 2 個到第 12 個胺基酸，使 20S 的孔洞維持敞開的結構，而促進蛋白質的進入 (50)。有研究指出甘藷澱粉磷解酶 (plastidial starch phosphorylase, SP) 可與 20S DM 直接結合，並且受其降解，進而調控其酵素活性 (51)，因此本研究亦將 PB1-F2 與 20S DM 混合進行降解反應，結果顯示四株 A 型流感病毒的 PB1-F2 皆會被 20S DM 降解，其被降解的程度也隨著反應時間的延長而更加顯著 (圖一)。然而目前在胞外試驗中所使用的 20S 是源自嗜酸熱原體而非真核生物之 20S 蛋白酶體，PB1-F2 的降解是否會因 20S 來源物種的不同而有所差異，則有待進一步的研究。

4.2 PB1-F2 重組蛋白質在細胞內的表現量和穩定性

先前研究指出 PB1-F2 在細胞內的半生期短，由於 PB1-F2 基因轉譯後的蛋白質會很迅速的被降解，因此使得其在細胞內的表現量非常少、穩定性低 (52)。本研究將 PB1-F2 蛋白接上 GFP 融合蛋白之後，在細胞當中的表現量得以免疫染色分析測得，且不同的流感病毒株之 PB1-F2 蛋白於 HEK293 細胞中的表現量有顯著的差異，其中 EGFP-F2(H1N1) 的表現量最高，EGFP-F2(H5N1) 和 EGFP-F2(H7N9) 次之，而 EGFP-F2(H3N2) 的表現量極低 (圖二 A)。PB1-F2 蛋白質表現量因不同病毒株而異的現象與 Chen 等人在 2010 年發表於 *Journal of Virology*



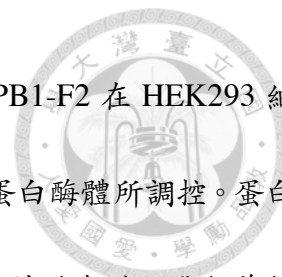
的研究相符 (12)。影響蛋白質在細胞中表現量的因子為其基因的轉譯效率和蛋白質的穩定性，由分子生物學的角度來看，Kozak 序列在轉譯起始中扮演重要的角色，而其中-3 和+4 位點則決定轉譯效率，因此針對 PB1-F2 基因的 Kozak 序列進行比對，結果顯示四株病毒在-3 和+4 位點的序列相同，可推測其轉譯效率並無太大差別，所以 PB1-F2 表現量的差異極有可能是由於蛋白質的穩定性所造成。蛋白質的穩定性和其胺基酸序列相關，將四株病毒株的胺基酸序列進行比對，結果顯示在一些特定的區域有親水性和疏水性的差別 (圖 S1)，這可能是影響蛋白質穩定性的關鍵。

4.3 PB1-F2 重組蛋白質之胺基酸序列影響其在細胞內的表現量和穩定性

Cheng 等人在 2017 年發表於 *Frontiers in Microbiology* 的研究指出，A 型流感病毒蛋白質 PB1-F2 第 68 到 71 胺基酸序列影響蛋白質的穩定度及功能 (36)。本研究在經由胺基酸序列比對之後也發現 H1N1 病毒株在這些特定的區域，有較高的疏水性，其他三個病毒株的胺基酸序列則疏水性較低 (圖 S1)。先前研究也指出，相較於其它三個病毒株，H1N1 的 PB1-F2 擁有最高的穩定性，因此，將四株不同病毒株的位點 2、10、11、14 以及 68-71 依照親疏水性進行互換之後可見，這些位點的互換並沒有對四株病毒株造成非常有規則、有系統性的影響，但整體而言，胺基酸位點 2、10、11 和 14 會影響 H3N2 和 H7N9 的 PB1-F2 穩定性，而 68-71 的區域則對 H1N1 和 H7N9 的 PB1-F2 蛋白質穩定性有極為顯著的影響 (圖三)。

4.4 PB1-F2 重組蛋白質在細胞內的降解機制

雖然 PB1-F2 在細胞中的表現量因病毒株而異，但在加入蛋白酶體抑制劑 MG132 後，四株病毒株的 PB1-F2 表現量皆有上升的趨勢，其中以 H3N2 最為明顯，而 H1N1 的上升則沒有



非常顯著 (圖二 B)。PB1-F2 在加入 MG132 後導致表現量提升顯示 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的降解與蛋白酶體相關，也可以說 PB1-F2 於細胞內的穩定性是由蛋白酶體所調控。蛋白酶體的降解機制其中一個是藉由蛋白質被泛素化，經蛋白酶體辨認長串的泛素鏈而進行降解，另一個則是蛋白質因其內生性結構無序的特性，不須經過泛素化即可直接進入蛋白酶體的活性區域被降解 (43)。PB1-F2 曾經被報導會被泛素化 (38)，也被發現具有內生性結構無序 (Intrinsic disorder) 的特性，它會依所處的環境隨機無序的轉換成 α -helix 結構或 β -sheet 結構 (15)，為了進一步驗證 PB1-F2 的降解機制和泛素化是否相關，將 PB1-F2 所有可能的離胺酸泛素化位點突變成精胺酸，抑制蛋白質被泛素化的可能性，結果顯示 H1N1、H3N2、H7N9 三個病毒株的 PB1-F2 蛋白質皆因泛素化位點的突變而提升在細胞中的穩定性，而 H5N1 的穩定性沒有因突變而有顯著提升，另一面，在加入 MG132 之後，所有突變株的表現量皆持續增加 (圖四 C)。因此 PB1-F2 會經由泛素化進而被蛋白酶體辨認之後降解，也可由不須經過泛素化即直接進入蛋白酶體的活性區域被降解。接著為了更深究其降解機制是否亦受 PA28 (11S) 調節而被 20S proteasome 降解，在 PA28 和 PB1-F2 共轉染的實驗中，觀察到在 PA28 過度表現的情況之下，H3N2、H5N1、H7N9 三株病毒株的 PB1-F2 的表現量皆明顯的下降，表示這三株病毒株的 PB1-F2 會經由 PA28 的調控而受到 20S 降解，而 H1N1 的 PB1-F2 表現量則時而上升、時而下降，可能為同時受 PA28 和 19S 調節而被蛋白酶體降解。整體而言，H1N1 在所有實驗結果中和另外三株病毒株有較多差異之趨勢，穩定性也明顯較高，其降解機制可能有所不同。



4.5 胺基酸序列影響 PB1-F2 在細胞中的分佈位置

在 2003 年 Gibbs 等人研究發現 PB1-F2 的 65 號到第 87 號胺基酸為粒線體靶向序列 (Mitochondria Targeting Sequence, MTS)，會在 C 端形成雙極性螺旋結構，座落於粒線體內膜上，使粒線體喪失膜電位 (19)。而另一個研究團隊則認為粒線體靶向序列是 PB1-F2 的第 46 號到第 75 號胺基酸 (20)。此外，2010 年 Chen 等人將 H5N1 PB1-F2 進行 Q69L 和 H75L 的位點突變，結果發現有 40.7% 的 PB1-F2 由細胞質與細胞核的位置改變至粒線體上 (12)。在 2017 年 Cheng 等人的研究團隊也證實 PB1-F2 68-71 胺基酸序列會影響其在細胞中的分佈 (36)。而在本研究中 H1N1、H3N2、H5N1 病毒株的 68-71 胺基酸序列會決定 PB1-F2 在細胞中的定位，其中 ILVF 會使 PB1-F2 分佈於粒線體 (圖七 A、B、C)，此結果與 2017 年 Cheng 等人的研究結果相符，I68、L69、V70、F71 可能為粒線體標的序列 (36)。然而 68-71 胺基酸序列突變為 ILVF 對於 H7N9 PB1-F2 卻沒有定位於粒線體的功能，反而是 2，10，11，14 的胺基酸序列突變為 GILG 使 H7N9 PB1-F2 分佈於粒線體 (圖七 D)，此結果與其他三個病毒株不同。有可能是因為 GILG 有助於 H7N9 PB1-F2 的胺基酸序列形成雙極性 α -螺旋結構，而此結構會與粒線體運輸蛋白作用，使 H7N9 PB1-F2 分佈於粒線體。

4.6 A 型流感病毒株之致病力與 PB1-F2 之穩定度

在本研究的四株流感病毒當中，H1N1 PB8 和 H3N2 UD307 為低致病性流感病毒，H5N1 HK156 和 H7N9 TW01 則有非常高的致病力，而 H1N1 PR8 穩定度高、H5N1 和 H7N9 次之，H3N2 則最低 (表 S6)，其中，H1N1 致病力低，其 PB1-F2 卻為高度穩定，可

能的因素如下，第一，PB1-F2 會引發免疫細胞凋亡，降低宿主免疫反應而增強致病力，然而 PB1-F2 同時也會引發表皮細胞凋亡 (13)，抑制病毒在宿主細胞內的複製，而降低致病力；第二，PB1-F2 會調控 PB1 聚合酶活性 (12)，增強病毒在宿主細胞內的複製，然而過高的病毒量會使宿主細胞死亡而使病毒無法繼續複製、生長，進而降低其致病力，因此，PB1-F2 的高穩定度可能為導致 H1N1 低致病力的原因之一。






第五章 總結

本研究一開始觀察到 PB1-F2 在細胞中的表現量會因不同的病毒株而有所差異，其中以 H1N1 最高而 H3N2 最低。推測 PB1-F2 的表現量及穩定度會受到胺基酸序列影響，由胺基酸序列互換的實驗中可見胺基酸序列確實會影響 PB1-F2 的穩定度，但無法從四株病毒株的結果看出系統性的影響。在降解機制的研究中首先發現在蛋白酶體抑制劑的作用之下，四株流感病毒 PB1-F2 蛋白質的穩定性皆有提升，其穩定性提升的程度也依不同的病毒株而異，H3N2 有最高幅度的提升，H1N1 則最低，顯示 PB1-F2 在細胞內的穩定性是由蛋白酶體所調控。接著在泛素化位點突變連同蛋白酶體抑制劑作用的實驗中，顯示 PB1-F2 會通過泛素依賴型與泛素不依賴型兩個降解路徑。最後在 PB28 與 PB1-F2 共表現的條件之下，證實 PA28 可以促進 PB1-F2 的降解。

在上述每一項實驗結果中，皆可觀察到因不同病毒株而造成的差異，可見胺基酸序列確實影響 PB1-F2 的穩定性。而近年來有越來越多的團隊針對 PB1-F2 的胺基酸序列有所探討並進行研究，如 2011 年的研究，證實 H1N1 PR8 病毒株的 PB1-F2 胺基酸 I68、L69 和 V70 與造成細胞毒性有關，使病毒有致病力並導致二次性細菌感染 (33)。在同一年 Conenello 等人的研究指出 N66S 的胺基酸位點突變，增加了 H5N1 Hong Kong/1997 和 H1N1 Brevig Mission/1918 兩個病毒株的致病力 (30)。2014 年則發現 H3N2 NT60 病毒株 PB1-F2 的 L62、R75、R79、L82 會增加老鼠的發炎反應以及肺炎鏈球菌的感染 (35)。2017 年的研究指出胺基酸序列 68-71 會影響 PB1-F2 蛋白質的穩定性與功能 (36)。此外，由禽鳥和豬隻跨物種感染人



類的病毒株相較於人類季節性流感病毒有更多的致病性序列，可能會因此增加嚴重程度 (46)。

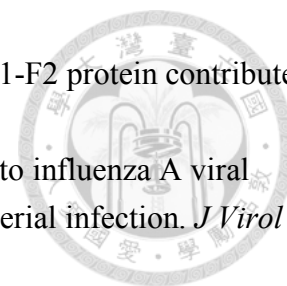
本研究中的四株流感病毒中，H1N1 PB8 和 H3N2 UD307 為低致病性流感病毒，H5N1 HK156 和 H7N9 TW01 為跨物種傳染人類的禽流感病毒，有非常高的致病力，也容易引起重症。然而影響 A 型流感病毒致病力的因子非常多 (53, 54)，無法單獨從某個因子直接看出對致病力的影響，但仍然能從 PB1-F2 胺基酸序列的角度提供一些觀點，有助於 A 型流行性感冒病毒之傳染力及致病力的預測和相關疾病之預防。



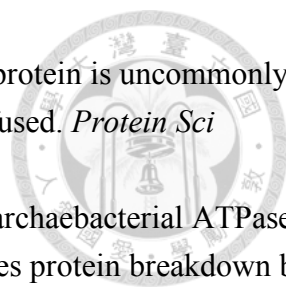
參考文獻

1. Taubenberger JK & Morens DM (2008) The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3:499-522.
2. Krammer F, *et al.* (2018) Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4(1):3.
3. Tong S, *et al.* (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9(10):e1003657.
4. WHO (1980) INFLUENZA NOMENCLATURE. *Weekly Epidemiological Record* 55 (38):294 - 295.
5. Taubenberger JK (2006) The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proc Am Philos Soc* 150(1):86-112.
6. Zepeda-Lopez HM, *et al.* (2010) Inside the outbreak of the 2009 influenza A (H1N1)v virus in Mexico. *PLoS One* 5(10):e13256.
7. Song MS, *et al.* (2010) Evidence of human-to-swine transmission of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in South Korea. *J Clin Microbiol* 48(9):3204-3211.
8. Viboud C, *et al.* (2005) Multinational impact of the 1968 Hong Kong influenza pandemic: evidence for a smoldering pandemic. *J Infect Dis* 192(2):233-248.
9. Chan PK (2002) Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 34 Suppl 2:S58-64.
10. WHO (2015) Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2015.
11. WHO (2017) Human infection with avian influenza A(H7N9) virus – China.
12. Chen CJ, *et al.* (2010) Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *J Virol* 84(19):10051-10062.
13. Chen W, *et al.* (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* 7(12):1306-1312.
14. Bruns K, *et al.* (2007) Structural characterization and oligomerization of PB1-F2, a proapoptotic influenza A virus protein. *J Biol Chem* 282(1):353-363.
15. Chevalier C, *et al.* (2010) PB1-F2 influenza A virus protein adopts a beta-sheet conformation and forms amyloid fibers in membrane environments. *J Biol Chem* 285(17):13233-13243.
16. Chevalier C, *et al.* (2016) Synchrotron Infrared and Deep UV Fluorescent Microspectroscopy Study of PB1-F2 beta-Aggregated Structures in Influenza A Virus-infected Cells. *J Biol Chem* 291(17):9060-9072.
17. Vidic J, *et al.* (2016) Amyloid Assemblies of Influenza A Virus PB1-F2 Protein Damage Membrane and Induce Cytotoxicity. *J Biol Chem* 291(2):739-751.

18. Lowy RJ (2003) Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. *Int Rev Immunol* 22(5-6):425-449.
19. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, & Yewdell JW (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* 77(13):7214-7224.
20. Yamada H, Chounan R, Higashi Y, Kurihara N, & Kido H (2004) Mitochondrial targeting sequence of the influenza A virus PB1-F2 protein and its function in mitochondria. *FEBS Lett* 578(3):331-336.
21. Yoshizumi T, *et al.* (2014) Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun* 5:4713.
22. Chanturiya AN, *et al.* (2004) PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. *J Virol* 78(12):6304-6312.
23. Henkel M, *et al.* (2010) The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 forms a nonselective ion channel. *PLoS One* 5(6):e11112.
24. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, & Palese P (2005) Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 1(1):e4.
25. Mazur I, *et al.* (2008) The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* 10(5):1140-1152.
26. Le Goffic R, *et al.* (2010) Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 185(8):4812-4823.
27. Varga ZT, Grant A, Manicassamy B, & Palese P (2012) Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential. *J Virol* 86(16):8359-8366.
28. Pinar A, *et al.* (2017) PB1-F2 Peptide Derived from Avian Influenza A Virus H7N9 Induces Inflammation via Activation of the NLRP3 Inflammasome. *J Biol Chem* 292(3):826-836.
29. Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, & Palese P (2007) A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog* 3(10):1414-1421.
30. Conenello GM, *et al.* (2011) A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J Virol* 85(2):652-662.
31. McAuley JL, *et al.* (2007) Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2(4):240-249.
32. McAuley JL, *et al.* (2010) PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog* 6(7):e1001014.
33. Alymova IV, *et al.* (2011) Immunopathogenic and antibacterial effects of H3N2 influenza A virus PB1-F2 map to amino acid residues 62, 75, 79, and 82. *J Virol* 85(23):12324-12333.



34. Zamarin D, Ortigoza MB, & Palese P (2006) Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* 80(16):7976-7983.
35. Alymova IV, *et al.* (2014) A novel cytotoxic sequence contributes to influenza A viral protein PB1-F2 pathogenicity and predisposition to secondary bacterial infection. *J Virol* 88(1):503-515.
36. Cheng YY, Yang SR, Wang YT, Lin YH, & Chen CJ (2017) Amino Acid Residues 68-71 Contribute to Influenza A Virus PB1-F2 Protein Stability and Functions. *Front Microbiol* 8:692.
37. Mitzner D, *et al.* (2009) Phosphorylation of the influenza A virus protein PB1-F2 by PKC is crucial for apoptosis promoting functions in monocytes. *Cell Microbiol* 11(10):1502-1516.
38. Kosik I, *et al.* (2015) The ubiquitination of the influenza A virus PB1-F2 protein is crucial for its biological function. *PLoS One* 10(4):e0118477.
39. Peters JM, Franke WW, & Kleinschmidt JA (1994) Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 269(10):7709-7718.
40. Adams J (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 29 Suppl 1:3-9.
41. Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, & Roelofs J (2010) Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol* 20(7):391-401.
42. Hwang J, Winkler L, & Kalejta RF (2011) Ubiquitin-independent proteasomal degradation during oncogenic viral infections. *Biochim Biophys Acta* 1816(2):147-157.
43. Jariel-Encontre I, Bossis G, & Piechaczyk M (2008) Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta* 1786(2):153-177.
44. Forster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, & Hill CP (2005) The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell* 18(5):589-599.
45. Hung KC (2017) Study of the Relationship between the Novel Avian Influenza A(H7N9) Virus PB1-F2 Protein and Proteasome. *Department of Biochemical Science and Technology College of Life Science National Taiwan University Master Thesis*.
46. Alymova IV, *et al.* (2018) Virulent PB1-F2 residues: effects on fitness of H1N1 influenza A virus in mice and changes during evolution of human influenza A viruses. *Sci Rep* 8(1):7474.
47. Schoenfeld T, Mendez, J., and Storts, D.R. (1995) Effects of Bacterial Strains Carrying the endA1 Genotype on DNA Quality Isolated with Wizard(TM) Plasmid Purification Systems. *Promega Notes Magazine* 53:12-15.
48. Loyevsky M, *et al.* (2003) Expression of a recombinant IRP-like Plasmodium falciparum protein that specifically binds putative plasmodial IREs. *Mol Biochem Parasitol* 126(2):231-238.

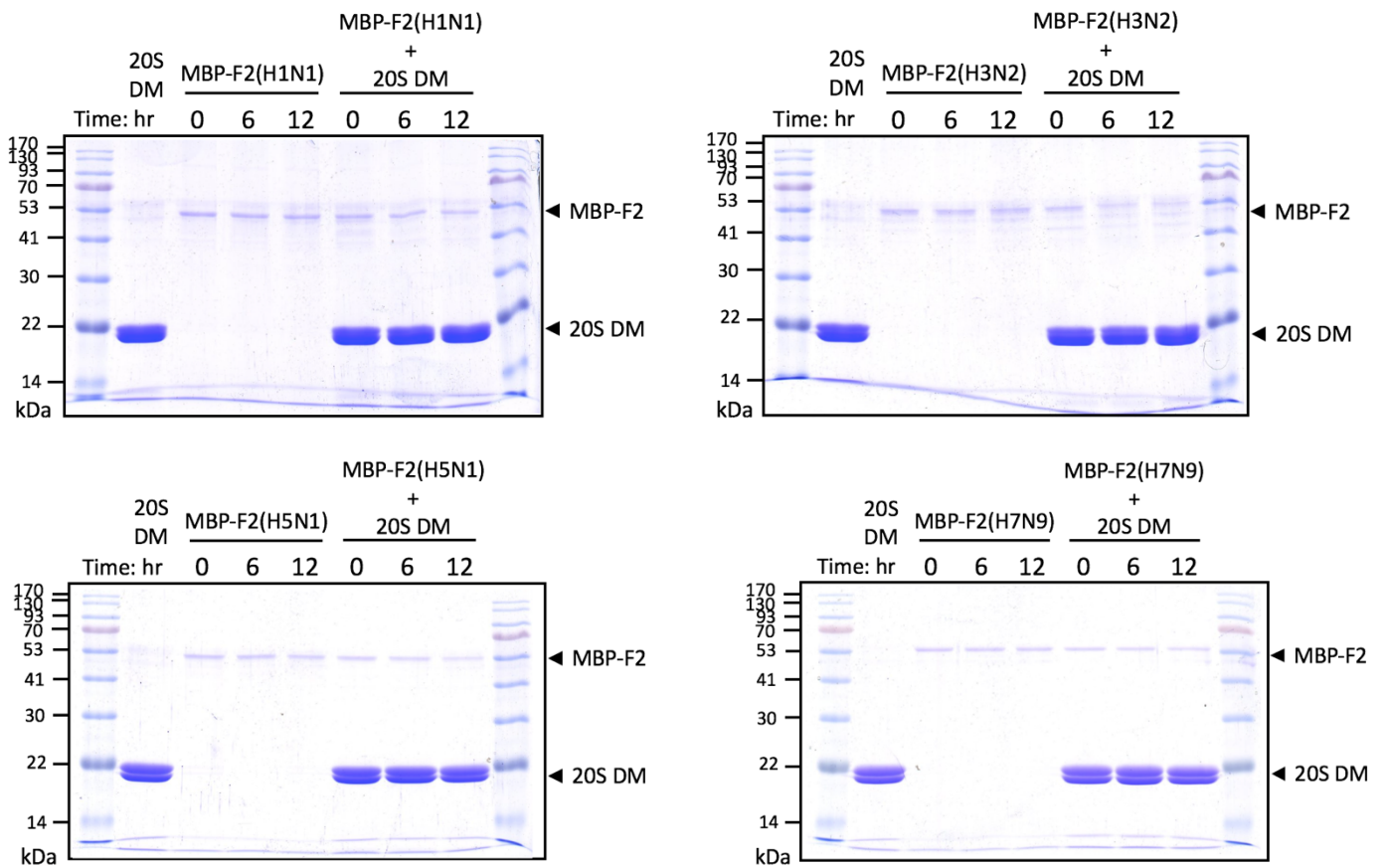
- 
49. Kapust RB & Waugh DS (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8(8):1668-1674.
 50. Zwickl P, Ng D, Woo KM, Klenk HP, & Goldberg AL (1999) An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. *J Biol Chem* 274(37):26008-26014.
 51. Lin YC, *et al.* (2012) Plastidial starch phosphorylase in sweet potato roots is proteolytically modified by protein-protein interaction with the 20S proteasome. *PLoS One* 7(4):e35336.
 52. Buehler J, *et al.* (2013) Influenza A virus PB1-F2 protein expression is regulated in a strain-specific manner by sequences located downstream of the PB1-F2 initiation codon. *J Virol* 87(19):10687-10699.
 53. Fukuyama S & Kawaoka Y (2011) The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol* 23(4):481-486.
 54. Tscherne DM & Garcia-Sastre A (2011) Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *J Clin Invest* 121(1):6-13.



圖與表



(A)

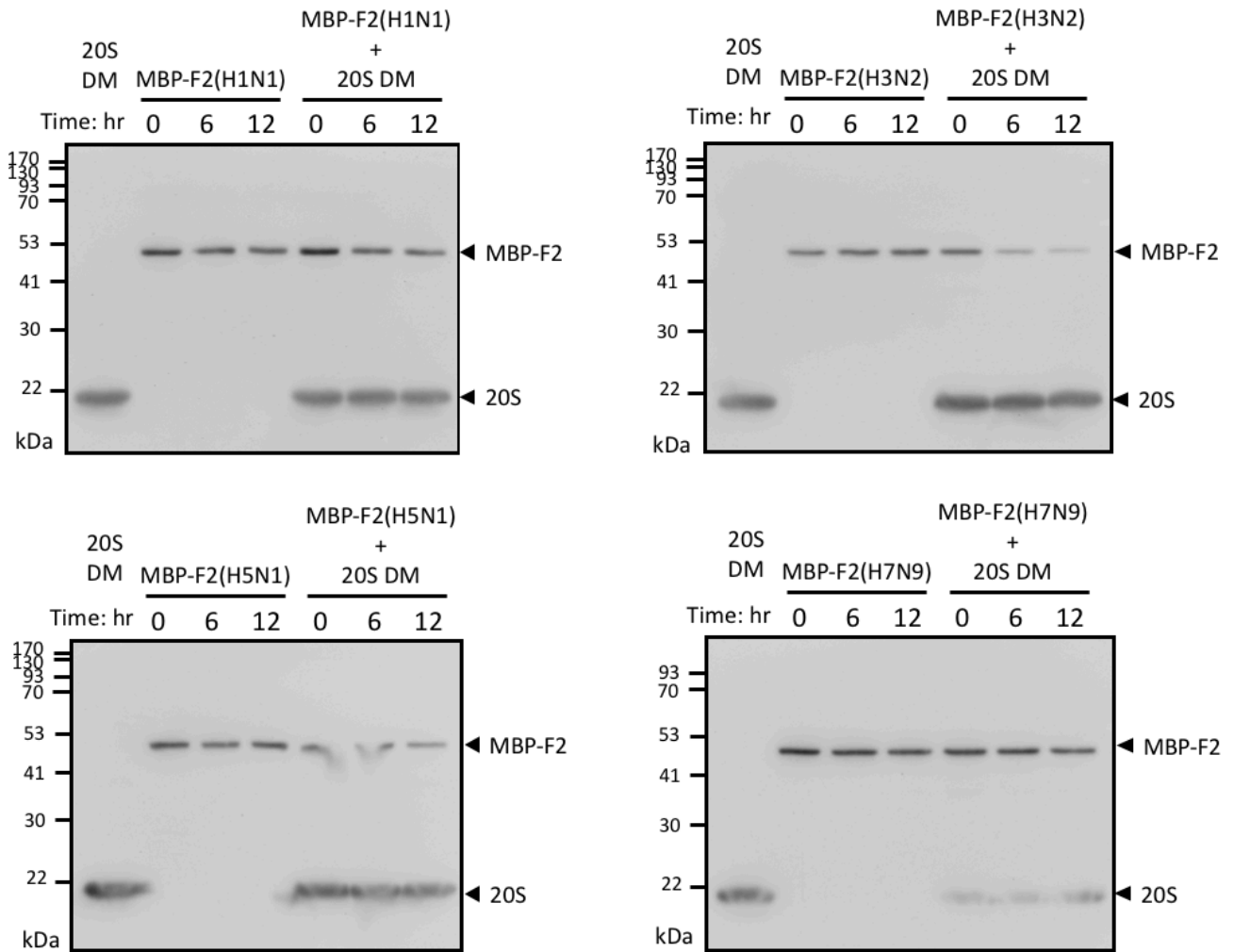


圖一 MBP-F2 被 20S DM 降解之胞外試驗

(A) 5 μ g 20S DM 與 0.5 μ g MBP-F2 於微量離心管中在 37°C 反應 6 小時、12 小時後終止反應，以 12% 膠體電泳分析，並以 CBR 染劑呈色，箭頭分別標示為 20S DM 與 MBP-F2。

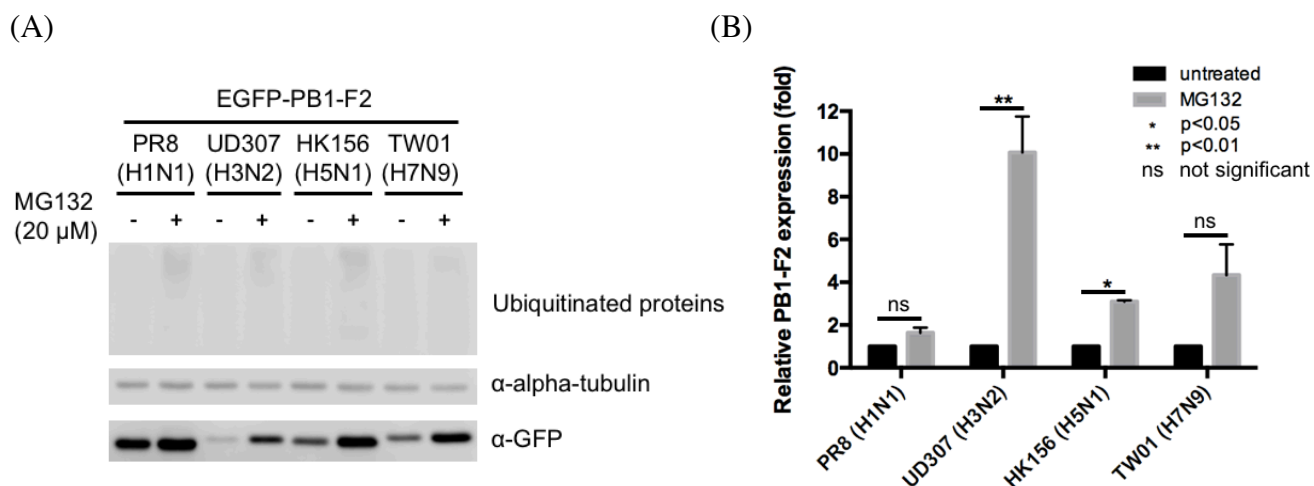


(B)



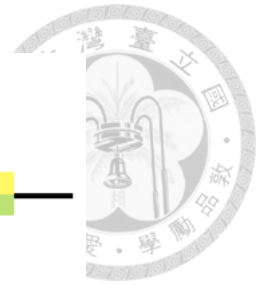
圖一 MBP-F2 被 20S DM 降解之胞外試驗

(B) 5 μ g 20S DM 與 0.5 μ g MBP-F2 於微量離心管中在 37°C 反應 6 小時、12 小時後終止反應，以 12% 膠體電泳分析，並進行免疫染色，箭頭分別標示為 20S DM 與 MBP-F2。

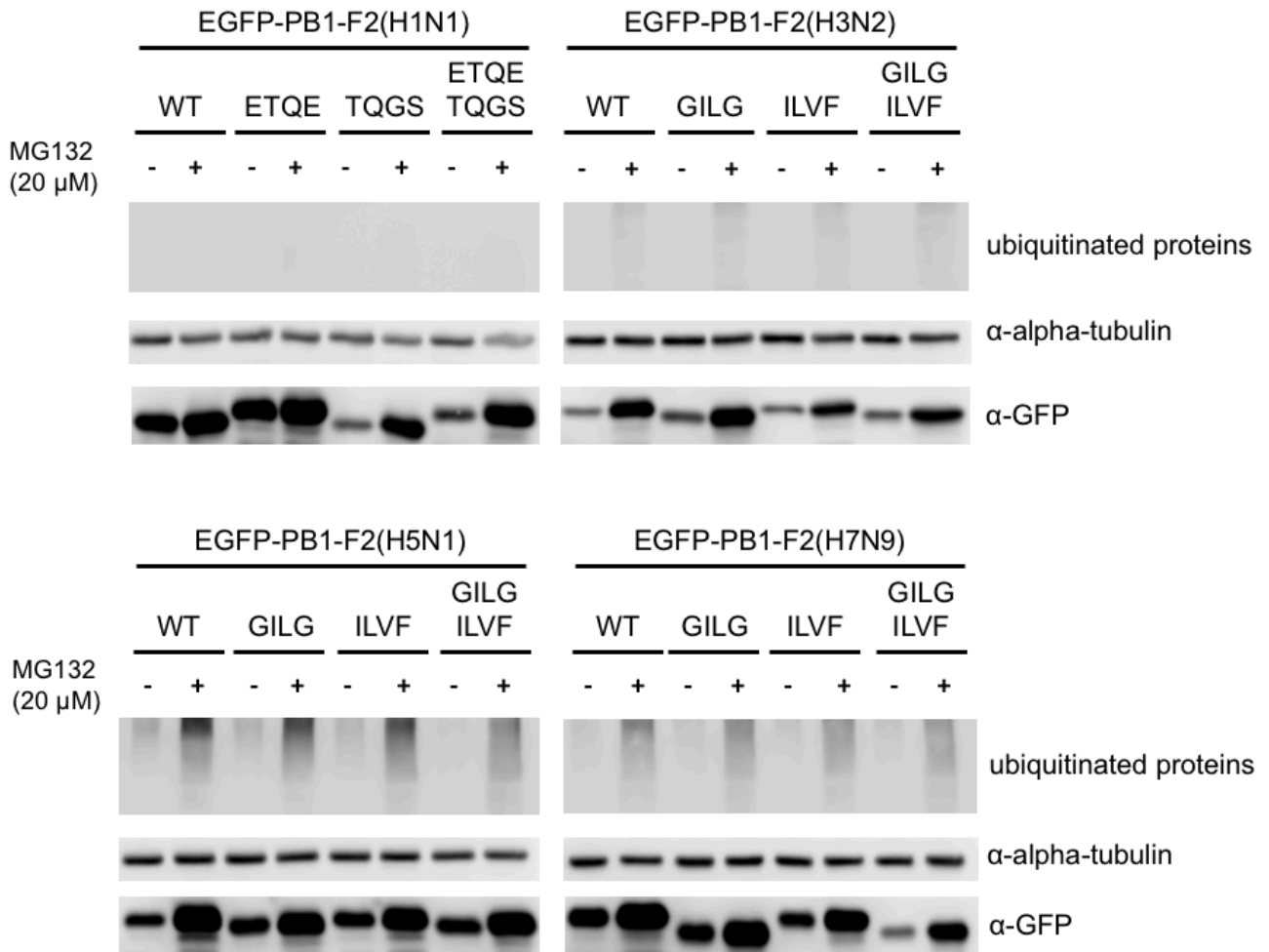
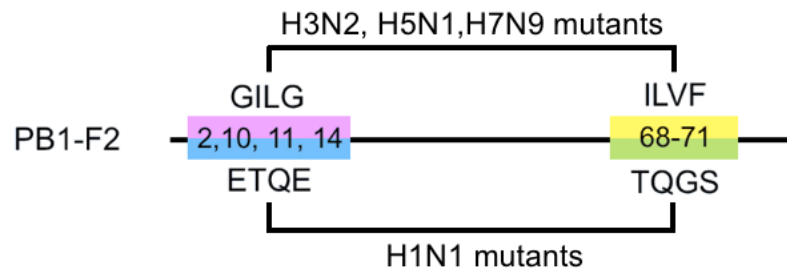


圖二 GFP-PB1-F2 蛋白質在細胞中的穩定性是由蛋白酶體所調控

- (A) 四株流感病毒的 GFP-F2 在 HEK293 細胞中之蛋白質表現，此外於實驗組加入蛋白酶體抑制劑 MG132，使泛素化之蛋白質無法被蛋白酶體降解而累積於高分子量區域，並以 Anti-Ub 抗體進行確認，並以 alpha-tubulin 抗體作為內控制組，確認蛋白質總量相當，以進行定量。
- (B) 使用 Image J 軟體定量免疫染色分析之結果，並以 Prism 軟體進行統計分析及作圖。數據為三次獨立實驗之平均值 \pm SEM。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.05$ ，ns: not significant (Student's t-test)



(A)



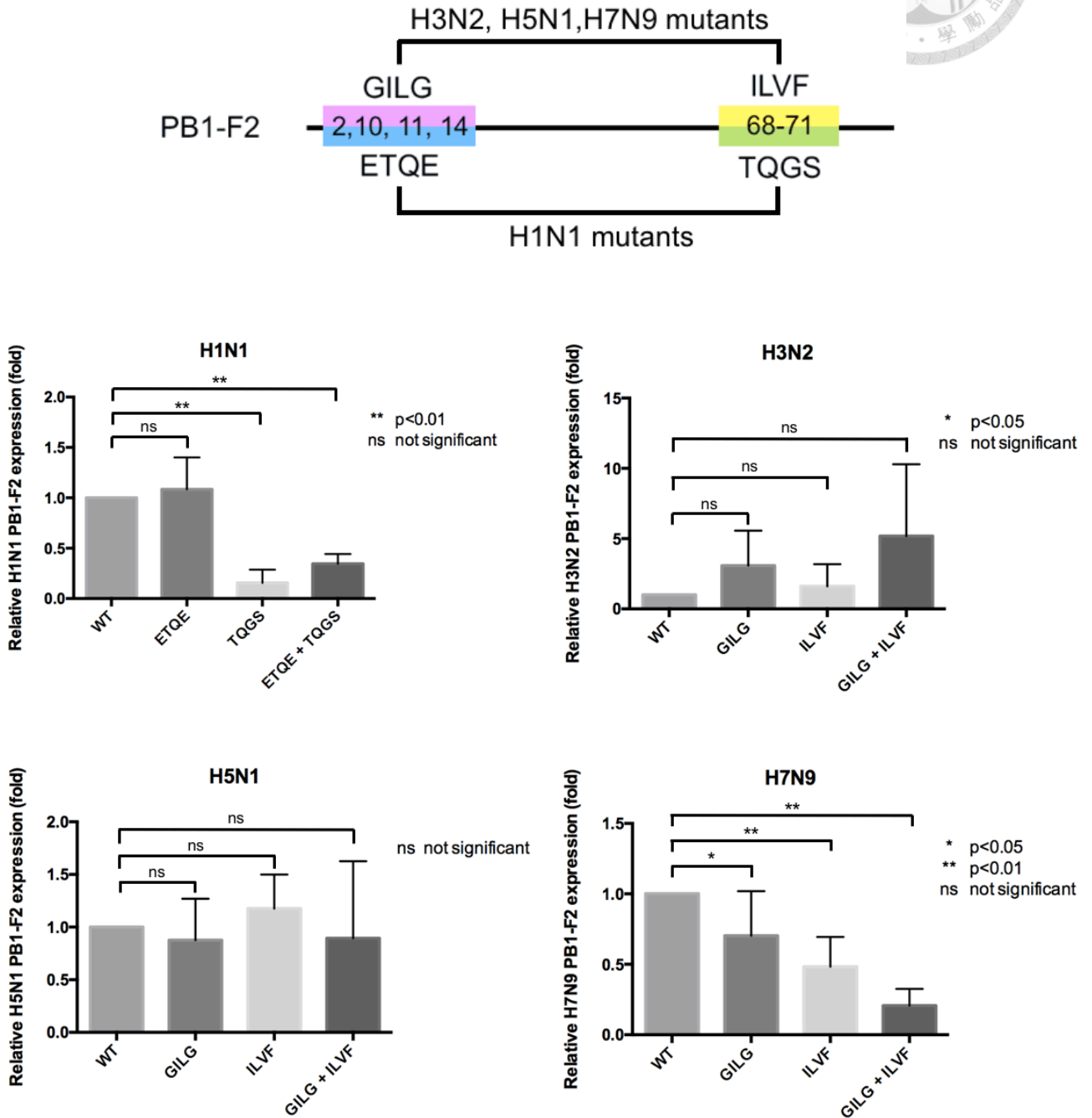
圖三 PB1-F2 位點互換突變株在 HEK293 細胞中的表現量與穩定性

(A) PB1-F2 位點互換突變株在 HEK293 細胞中的蛋白質表現，並加入蛋白酶體抑制劑 MG132

抑制蛋白酶體活性。



(B)



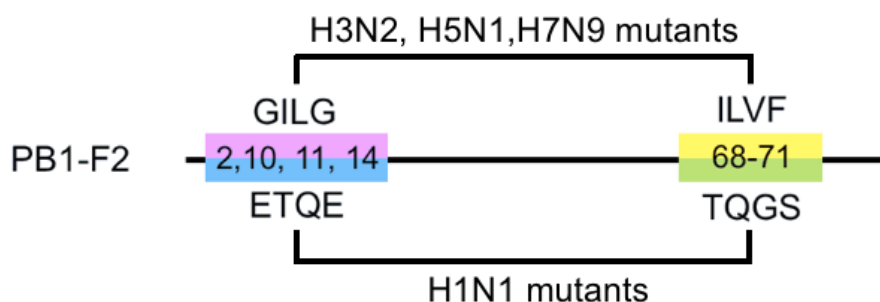
圖三 PB1-F2 位點互換突變株在 HEK293 細胞中的表現量與穩定性

(B) 使用 Image J 軟體定量免疫染色分析之結果，並以 Prism 軟體進行統計分析及作圖。數

據為三次獨立實驗平均值 ± SEM。* p<0.05，**p<0.05，ns: not significant (Student's t-test)



(C)



H1N1	ETQE	TQGS	ETQE+ TQGS
Stability	ns	-6.25x	-2.85x
H3N2	GILG	ILVF	GILG+ILVF
Stability	+3.08x	+1.61x	+5.18x
H5N1	GILG	ILVF	GILG+ILVF
Stability	ns	ns	ns
H7N9	GILG	ILVF	GILG+ILVF
Stability	-1.41x	-2.08x	-2.29

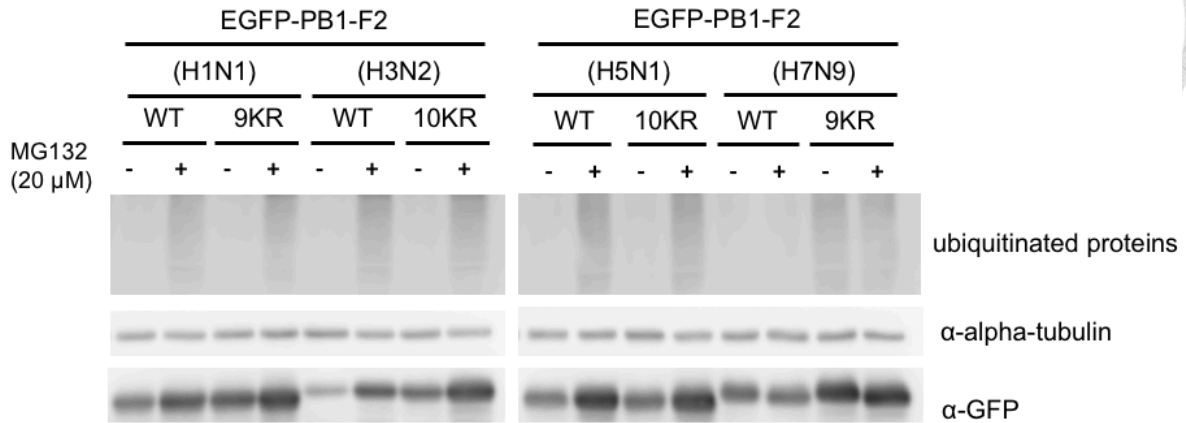
ns : 無顯著改變

圖三 PB1-F2 位點互換突變株在 HEK293 細胞中的表現量與穩定性

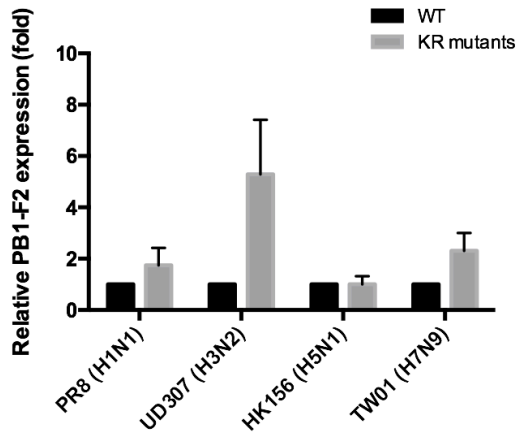
(C) 位點互換突變株之穩定性的改變



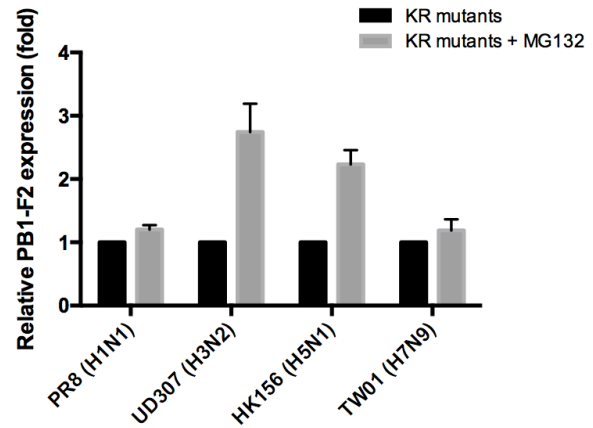
(A)



(B)



(C)

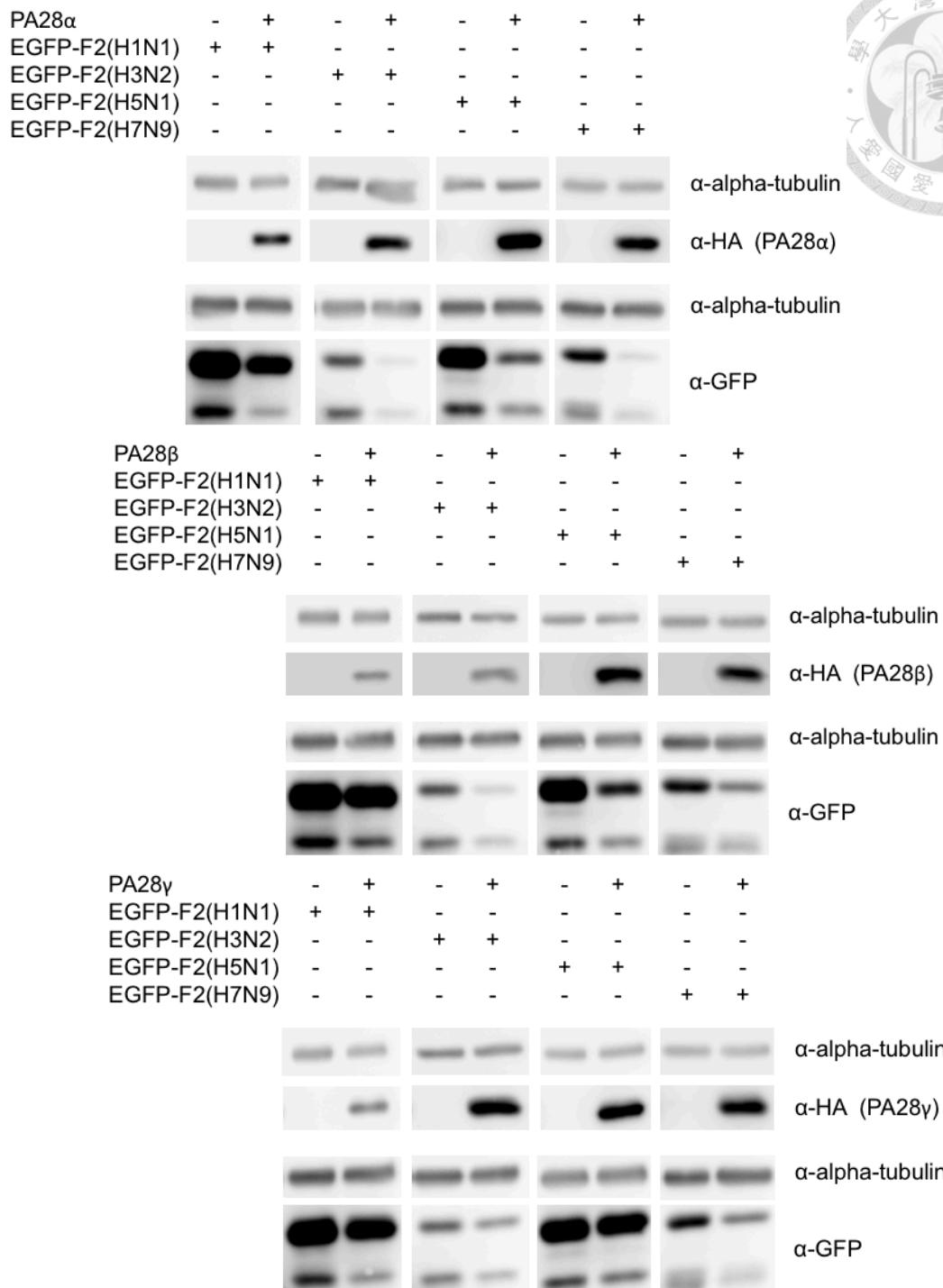


圖四 PB1-F2 泛素化位點突變株於 HEK283 細胞中的表現量與穩定性

(A) H1N1、H3N2、H5N1 和 H7N9 的 PB1-F2 野生株與泛素化位點突變株於 HEK283 細胞中表現。

(B)使用 Image J 軟體定量野生株與突變株之免疫染色分析結果，並以 Prism 軟體進行統計分析及作圖，三次獨立實驗平均值 \pm SEM。ns: not significant (Student's t test)

(C)使用 Image J 軟體定量突變株以及 MG132 處理之免疫染色分析結果，並以 Prism 軟體進行統計分析及作圖。數據為三次獨立實驗平均值 \pm SEM。ns: not significant (Student's t-test)

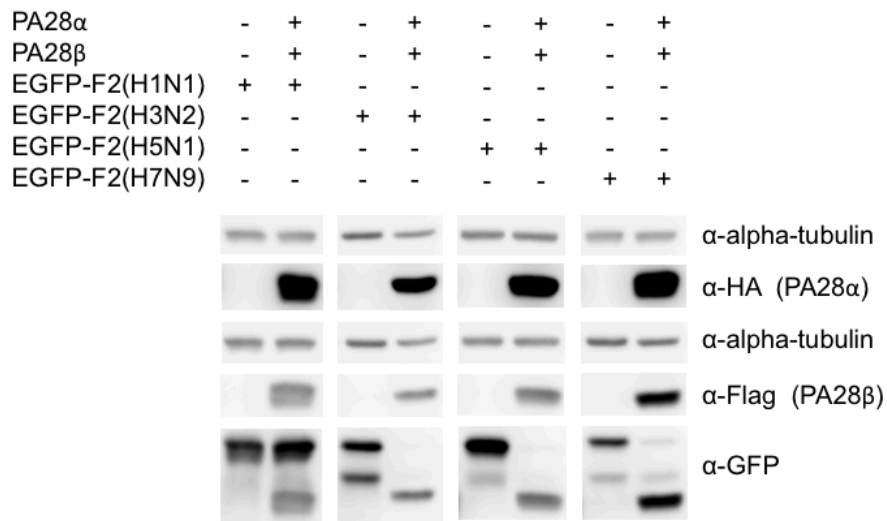


圖五 PB1-F2 的降解分別受到 PA28 α 、PA28 β 、PA28 γ 調控

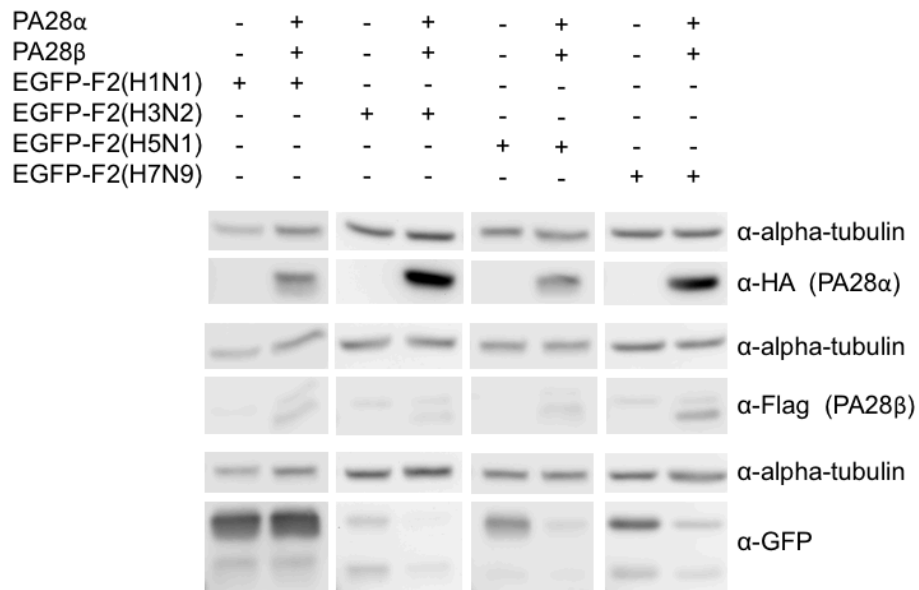
在 PB1-F2 分別和 PA28 α 、PA28 β 或 PA28 γ 共表現的條件之下，四株病毒株的 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的表現量。



(A)



(B)

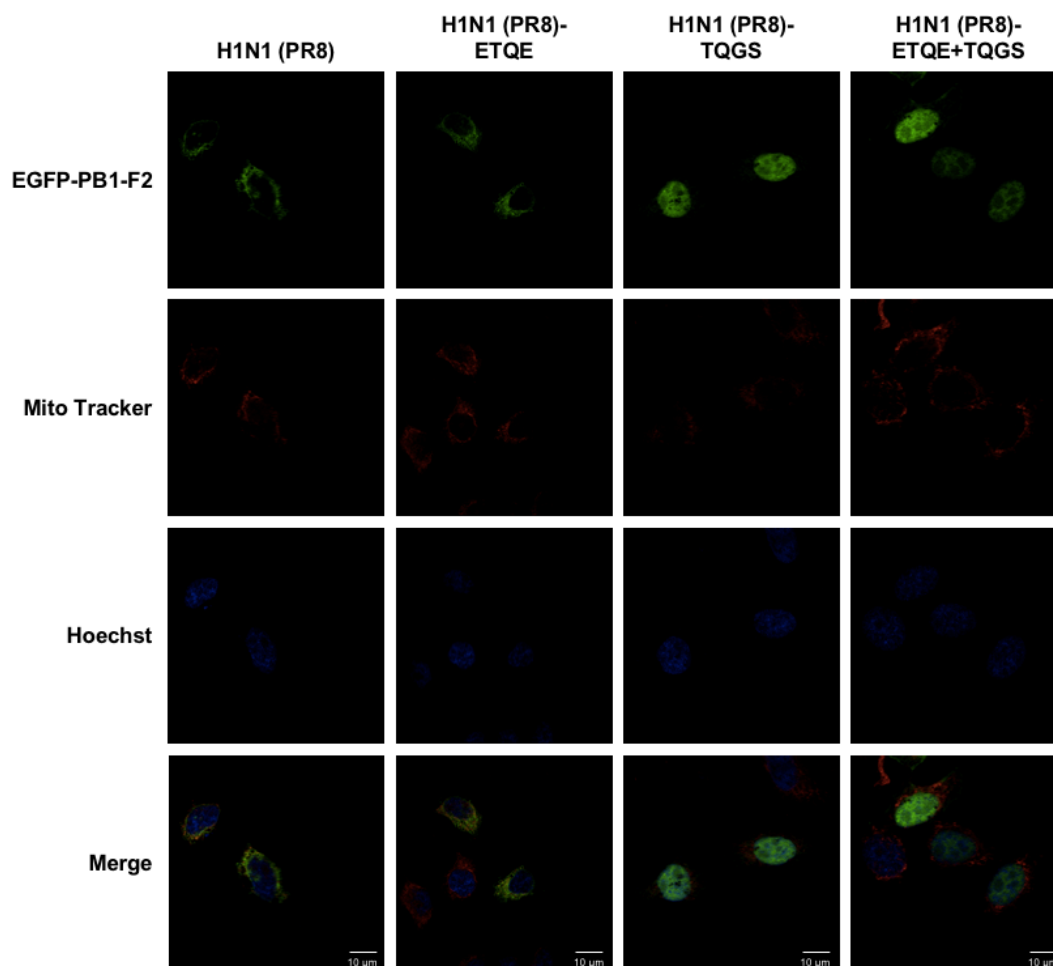


圖六 PB1-F2 的降解受 PA28 α 和 PA28 β 調控

PA28 α 與 PA28 β 之異二聚體 (heterodimer) 和 PB1-F2 在 HEK293 細胞中共表現的條件之下，四株病毒株的 PB1-F2 在 HEK293 細胞中的表現量。



(A)

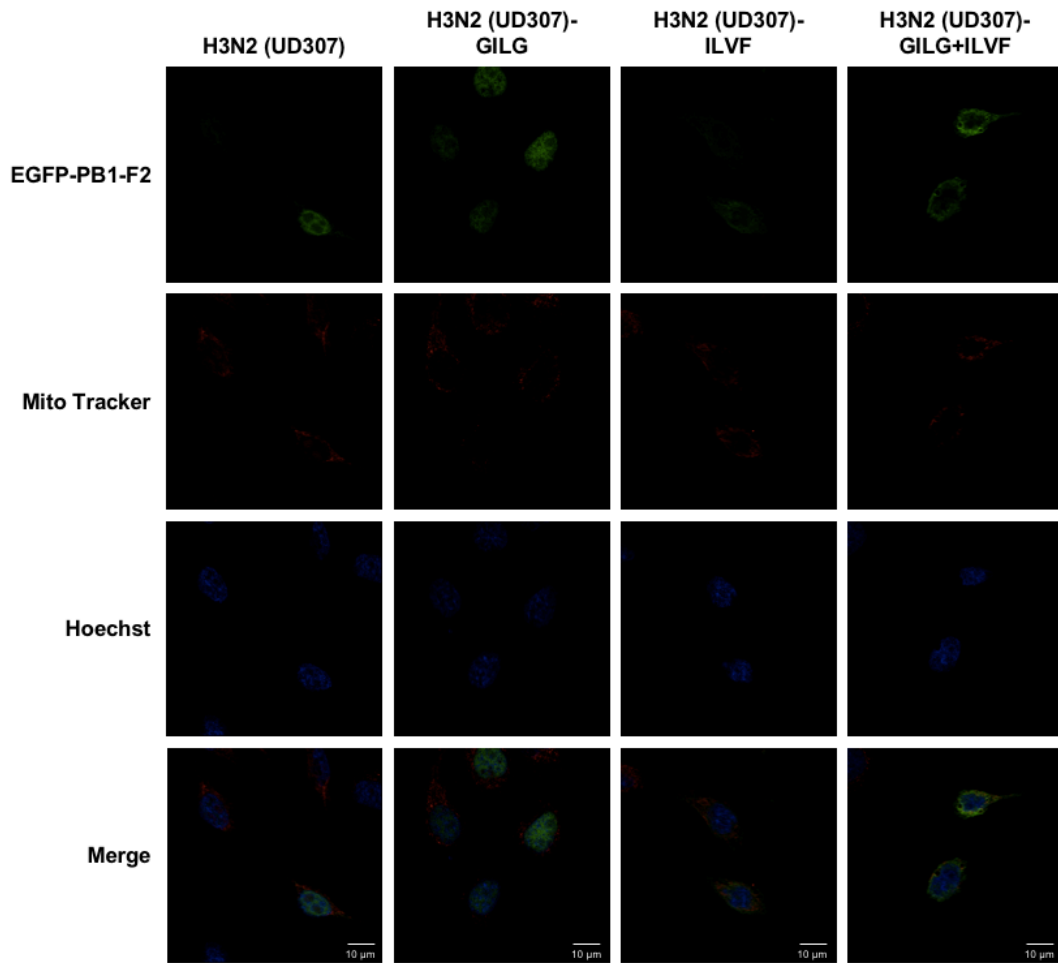


圖七 PB1-F2 野生株及位點互換突變株於細胞中的分佈位置

(A) H1N1 PR8 PB1-F2 野生株及位點互換突變株於細胞中的分佈位置



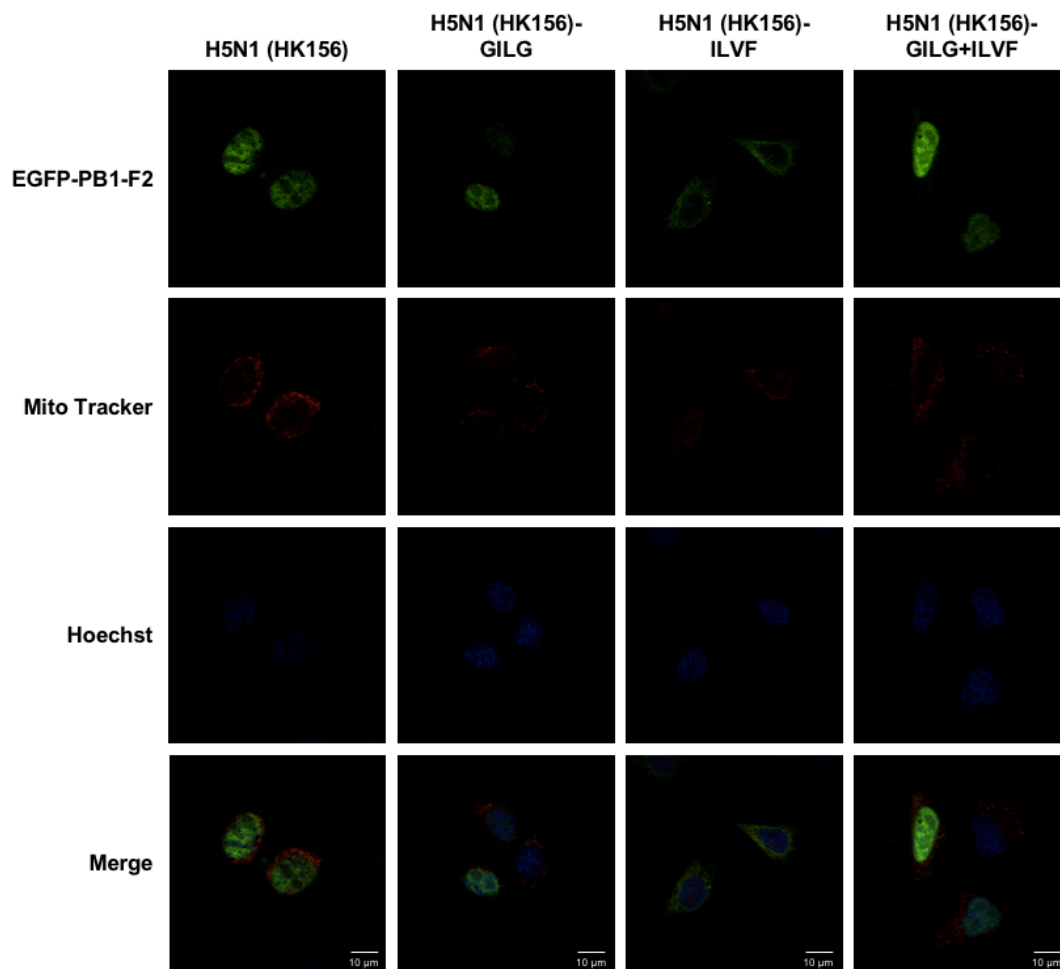
(B)



(B) H3N2 UD307 PB1-F2 野生株及位點互換突變株於細胞中的分佈位置



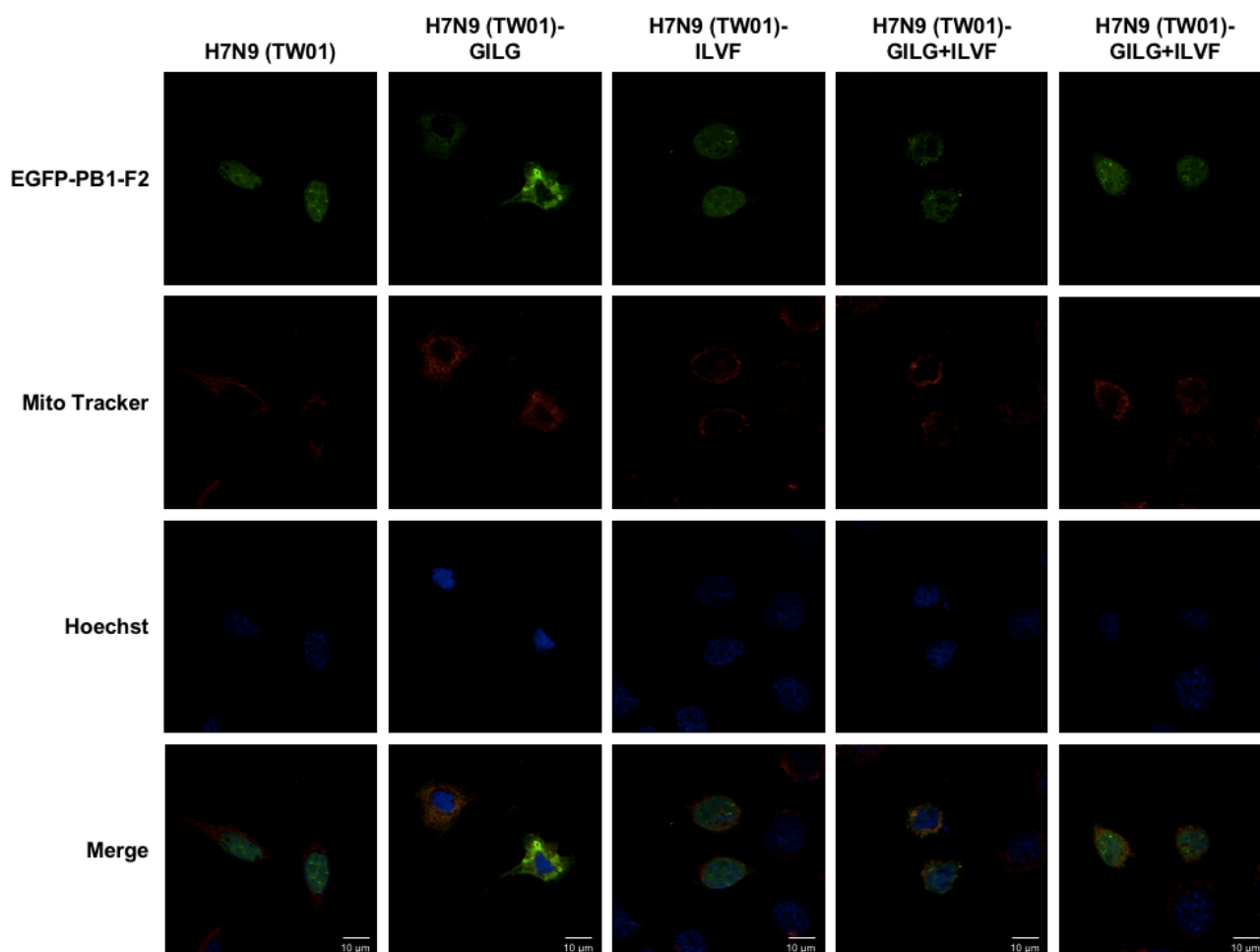
(C)



(C) H5N1 HK156 PB1-F2 野生株及位點互換突變株於細胞中的分佈位置



(D)



(E) H7N9 TW01 PB1-F2 野生株及位點互換突變株於細胞中的分佈位置



附錄



(A)

PR8 (H1N1)

ATGGGACAGGAACAGGATACACCATGGATACTGTCAACAGGACACATCAGTACTCAGAAAAGGGAA
GATGGACAACAAACACCGAAACTGGAGCACCGCAACTCAACCCGATTGATGGGCCACTGCCAGAAG
ACAATGAACCAAGTGGTTATGCCCAAACAGATTGTGTATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAGGAAT
CCCATCCTGGTATTTTTGAAAACCTCGTGTATTGAAACGATGGAGGTTGTTTCAGCAAACACGAGTAG

UD307 (H3N2)

ATGGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACATCAATATTCAGAAAAGGGA
AGTGGACAACAAACACAGAACTGGGGCGCCCAACTTAACCCAATTGATGGACCACTACCTGAGG
ATAATGAGCCAAGTGGATATGCACAAACAGACTGTGTCTTGGAAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAAT
CCCACCCAGGGATCTTTGAAAACCTCGTGCCTTGAACGATGGAAGTCGTTCAACAAACAAGGGTGG
ACAGACTGA

HK156 (H5N1)

ATGGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACATCAATATTCAGAAAAGGGA
GGTGGACAACAAACACAGAGACCGGAGCACCCCAACTCAACCCCTATTGATGGACCATTACCTGAAG
ATAACGAGCCGAGCGGGTATGCACAAACAGATTGTGTATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAAT
CCCACCCAGGACTCTTTGAAAACCTCGTGTCTTGAACGATGGAAGTTGTCCAGCAAACGAGAATGG
ATAAGCTGA

TW01 (H7N9)

ATGGAACAGGAACAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACATAAATACTCAGAAAAGGAA
AGTGGACAACGAACACAGAGACTGGAGCACCCCAACTCAATCCAATTGATGGACCATTACCTGAGG
ACAACGAGCCGAGTGGGTATGCACAAACGGATTGTGTATTGGAAGCAATGGCTTTCCTTGAAGAAT
CTCACCCAGGGATCTTTGAAAACCTCGTGTCTCGAAACGATGGAAATTGTTTCAGCAAACAAGAGTGG
ATAAACTGA

(B)

PB1-F2 (H1N1) MGQEQDTPWI LSTGHISTQK REDGQOTPKL EHRNSTRLMG HCQKTMNQVV 50

PB1-F2 (H3N2) MEQEQDTPWT QSTEHINIQK KGSGQOTQKL GRPNLTQLMD HYLKIMSQVD 50

PB1-F2 (H5N1) MEQEQDTPWT QSTEHINIQK KGGGQOTQRP EHPNSTLLMD HYLKITSRAG 50

PB1-F2 (H7N9) MEQEQDTPWT QSTEHINTQK KESGQRTQRL EHPNSIQLMD HYLRTTSRVG 50

* ***** ** ** . *** : .**:* : * : * ** . * : .:. .

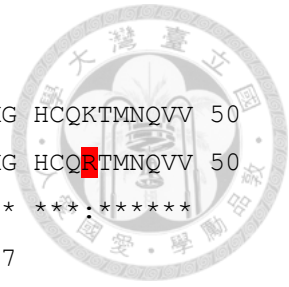
PB1-F2 (H1N1) MPKQIVYWKQ WLSLRNPILV FLKTRVLKRW RLFSKHE--- 87

PB1-F2 (H3N2) MHKQTVSWKQ WLSLKNPTQG SLKTRALKRW KSFNKQGWTD 90

PB1-F2 (H5N1) MHKQIVYWKQ WLSLKNPTQD SLKTRVLKRW KLSSKREWIS 90

PB1-F2 (H7N9) MHKRIVYWKQ WLSLKNLTQG SLKTRVSKRW KLFSKQEWIN 90

* *: * *****:* ***. *** : . *:



(C)

```

PB1-F2 (H1N1) -WT   MGQEQDTPWI LSTGHISTQK REDGQQTPKL EHRNSTRLMG HCQKTMNQVV 50
PB1-F2 (H1N1) -8KR MGQEQDTPWI LSTGHISTQR REDGQQTPL EHRNSTRLMG HCQRITMNQVV 50
*****          *****          *****: * *****          ***:*****
PB1-F2 (H1N1) -WT   MPKQIVYWQK WLSLRNPILV FLKTRVLKRW RLFSKHE 87
PB1-F2 (H1N1) -8KR MPKQIVYWRQ WLSLRNPILV FLRTRVLRW RLFSRHE 87
**:*:*:*:*:* * *****          **:*:*:*:*:* * *:*:*:*
PB1-F2 (H3N2) -WT   MEQEQDTPWT QSTEHINIQK KGSGQQTQKL GRPNLTQLMD HYLRIMSQVD 50
PB1-F2 (H3N2) -10KR MEQEQDTPWT QSTEHINIQR KGSGQQTQRL GRPNLTQLMD HYLRIMSQVD 50
*****          *****          :*****:* *****          *****
PB1-F2 (H3N2) -WT   MHKQTVSWKQ WLSLKNPTQG SLKTRALKRW KSFNKQGWTD 90
PB1-F2 (H3N2) -10KR MHKQTVSWRQ WLSLRNPTQG SLRTRALRW RSNRQGWTD 90
**:*:*:*:*:* * *:*:*:*:* * **:*:*:*:* * :*:*:*:*
PB1-F2 (H5N1) -WT   MEQEQDTPWT QSTEHINIQK KGGGQQTQRP EHPNSTLLMD HYLKITSRAG 50
PB1-F2 (H5N1) -10KR MEQEQDTPWT QSTEHINIQR KGGGQQTQRP EHPNSTLLMD HYLRTITSRAG 50
*****          *****          :*****          *****          ***:*****
PB1-F2 (H5N1) -WT   MHKQIVYWQK WLSLKNPTQD SLKTRVLKRW KLSSKREWIS 90
PB1-F2 (H5N1) -10KR MHKQIVYWRQ WLSLRNPTQD SLRTRVLRW RLSSRREWIS 90
**:*:*:*:*:* * *:*:*:*:* * **:*:*:*:* * :*:*:*:*
PB1-F2 (H7N9) -WT   MEQEQDTPWT QSTEHINTQK KESGQRTQRL EHPNSIQLMD HYLRTTSRVG 50
PB1-F2 (H7N9) -9KR MEQEQDTPWT QSTEHINTQR RESGQRTQRL EHPNSIQLMD HYLRTTSRVG 50
*****          *****          :*****          *****          *****
PB1-F2 (H7N9) -WT   MHKRIVYWQK WLSLKNLTQG SLKTRVSKRW KLFSKQEWIN 90
PB1-F2 (H7N9) -9KR MHKRIVYWRQ WLSLRNLTQG SLRTRVSRW RLFSRQEWIN 90
**:*:*:*:*:* * *:*:*:*:* * **:*:*:*:* * :*:*:*:*
    
```

圖 S1 PB1-F2 野生株與突變株之序列比對

(A) 四株 PB1-F2 野生株序列

(B) PB1-F2 對換位點序列比對

(C) 將 PB1-F2 野生株與突變株之胺基酸進行序列比對分析，紅色標示為突變株離胺酸突變成精胺酸的位點。

表 S1 PB1-F2 表現突變株建構所使用之引子

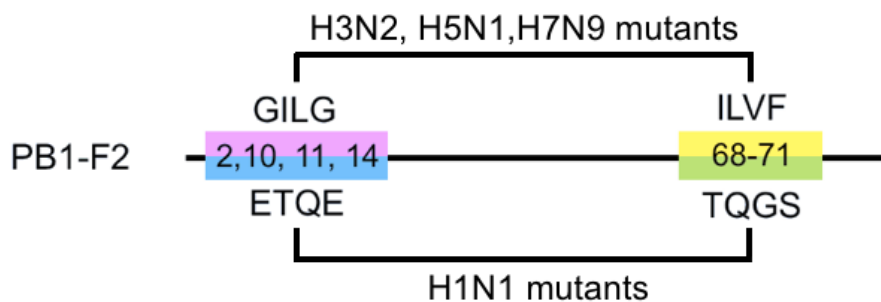


Primer	Sequence (5'→3')
H1N1-F1	GCCAAGCTTCCGGATCCATGGGACAGGAACAGGATAC
H1N1-F1'	GCCAAGCTTCCGGATCCATGGAACAGGAACAGGATACACCATGG
H1N1-F1''	CAGGATACACCATGGACACAGTCAACAGAACACATCAGTACTCAG
H1N1-R1	GGGATTCTCAAGGAAAGCCATTGCTTCCAGGACACAGTCTGTTTG GGCATAACCAC
H1N1-R2	CCATCGTTTCAATACACGAGTTTTCAAATAACCAGGATGGGATTC CTCAAGGAAAGCC
H1N1-R2'	CCATCGTTTCAATACACGAGTTTTCAAAGATCCCTGGGTGGGATTC CTCAAGGAAAGCC
H1N1-R3	GGCGTCGACTTACTCGAGCTCGTGTTTGCTGAACAACCTCCATCGT TTCAATACACGAG
H3N2-F2	GCCAAGCTTCCGGATCCATGGAACAGGAACAGGATAC
H3N2-R4	GGGATTCTTCAAGGAAAGCCATTGCTTCCAATACACAATCTGTTTG TGCATATCCAC
H3N2-R5	CCATCGTTTCAAGGCACGAGTTTTCAAAGATCCCTGGGTGGGATTC TTCAAGGAAAGCC
H3N2-R5'	CCATCGTTTCAAGGCACGAGTTTTCAAATAACCAGGATGGGATTC TTCAAGGAAAGCC
H3N2-R6	GGCGTCGACTTACTCGAGGTCTGTCCACCCTTGTTTGTGTAACGACT TCCATCGTTTCA



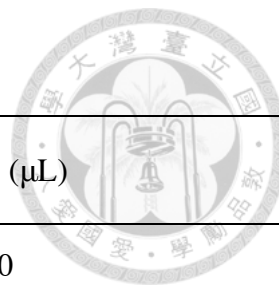
Primer	Sequence (5'→3')
H3N2-F2'	GAACAGGATACACCATGGATACTGTCAACAGGACACATCAATATT CAGAAA
H5N1-R7'	CCATCGTTTCAAGACACGAGTTTTCAAAAATACCAGGATGGGATTC TTCAAGGAAAGCC
H5N1-R8	GGCGTCGACTTACTCGAGGCTTATCCATTCTCGTTTGCTGGACA TCCATCGTTTCA
H7N9-F4''	CAGGATACACCATGGATACTGTCAACAGGACACATAAATACTCAG
H7N9-R9'	CCATCGTTTCGAGACACGAGTTTTCAAAAATACCAGGATGAGATTC TTCAAGGAAAGCC
H7N9-R10	GGCGTCGACTTACTCGAGGTTTATCCACTCTTGTTTGCTGAACAATT TCCATCGTTTCG

表 S2 PB1-F2 位點互換突變株



Regions of amino acids	Mutants of PB1-F2
2, 10, 11, 14	pEGFP-F2(H1N1)-ETQE pEGFP-F2(H3N2)-GILG pEGFP-F2(H5N1)-GILG pEGFP-F2(H7N9)-GILG
68-71	pEGFP-F2(H1N1)-TQGS pEGFP-F2(H3N2)-ILVF pEGFP-F2(H5N1)-ILVF pEGFP-F2(H7N9)-ILVF
2, 10, 11, 14 and 68-71	pEGFP-F2(H1N1)-ETQE+TQGS pEGFP-F2(H3N2)-GILG+ILVF pEGFP-F2(H5N1)-GILG+ILVF pEGFP-F2(H7N9)-GILG+ILVF

S3 聚合酶鏈鎖反應



試劑	體積 (μL)	
5X Phusion HF Buffer	10	
10 Mm dNTPs	1	
Forward primer (10 μM)	0.5	
Reverse primer (10 μM)	0.5	
Template DNA (100 ng)	X	
Phusion DNA polymerase	0.5	
Distilled water	37.5	
Total volume	50	
反應條件		
Cycle step	Temperature (°C)	Time
Initial Denaturation	98	2 min
Denaturation	98	30 sec
Annealing	55	30 sec
Extension	72	30 sec
Final extension	72	10 min
	4	hold

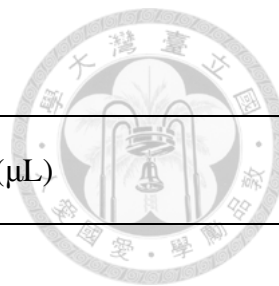


表 S4 限制酶反應

試劑	體積 (μL)
DNA (up to 2 μg)	X
10x Reaction buffer	5
Enzyme 1 (20 U/μL)	1.5
Enzyme 2 (20 U/μL)	1.5
Distilled water	42-X
Total	50

表 S5 胞外 20S 蛋白酶體降解試驗

試劑	體積 (μL)
10x 20S proteasome reaction buffer (200 mM Tris, 10mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7.2)	1.5
20S proteasome (5 μg)	E
Substrate (0.2 or 1 μg)	S
10X protease inhibitor	1.5
Distilled water	12-E-S
Total	15



表 S6 A 型流感病毒株之致病力及 PB1-F2 之穩定性

Virus	PB1-F2 Stability	Pathogenicity
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	High	Low
A/Udorn/307/1972 (H3N2)	Low	Low
A/Hong Kong/156/1997 (H5N1)	Moderate	High
A/Taiwan/01/2013 (H7N9)	Moderate	High