

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

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



Bcp1 與 Rpl23 間交互作用之探討

Functional characterization of the interaction between
Bcp1 and Rpl23

呂庭郡

Ting-Jyun Lu

指導教授：羅凱尹 博士

Advisor: Kai-Yin Lo, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月

July, 2015

致謝



首先感謝這三年多的研究生活中羅凱尹老師對我的指導，以及家人對我的支持。並且有各個實驗室學長姐給與實驗上的協助，我才能夠順利地完成我的論文，感謝徐駿森老師實驗室的張裕勇學長、卓昭岑學長、陳芳芳學姐以及李明穎對於蛋白質表現與純化的協助；感謝張典顯老師實驗室的羅得彰學長指導分離酵母菌細胞核的實驗；感謝陳美瑜老師實驗室的廖顯慶學長、陳愷堉學長與陳葆光指導酵母菌細胞骨架的染色實驗，與討論實驗；感謝黃偉邦老師實驗室提供質體與抗體；最後感謝在培養箱不足或是臨時缺少耗材時農化系各個實驗室給予相互的協助，以及同屆同學平時的互相打氣。

還有當然不能忘記的朝夕相處的實驗室同仁！感謝陳柏儒學長、丁亞涵學姐、李寧學姐指導實驗；感謝在日復一日的實驗室生活中共患難的楊貽婷與吳上穎同學、還有可愛的學弟妹。並且感謝我的室友梁榆、李典如、劉伊容、方琪雯對我的照顧與體諒。還有這幾年來聽我吐苦水的好朋友張慈安，與各方面支持著我的朱昀，沒有你們我可能無法完成這本論文。

要感謝的人很多很多，雖然我沒辦法做到完美，但是有著這些支持我的人，我才能夠竭盡所能達成我的目標！

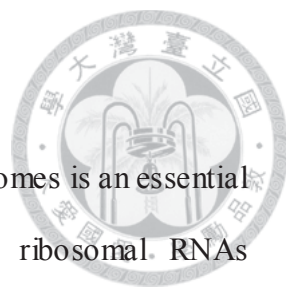
中文摘要



核糖體的功能為製造蛋白質，因此核糖體的缺失會對細胞的生理活性造成很大的影響。核糖體由核糖蛋白以及rRNA組成，而組裝的步驟需要兩百多個因子參與其中，這些因子的功能包含協助組裝、修飾以及運輸。核糖體的生合成機制在各物種間具有高度的保守性，本篇研究使用最簡單的真核生物—酵母菌來探討核糖體的生合成機制。目前已知Bcp1參與60S核糖體的生合成：缺少Bcp1的時候會造成帶有綠色螢光標記的60S核糖體蛋白在細胞核累積，並且多核糖體圖譜中的60S核糖體的量有明顯的下降以及80S核糖體與多核糖體的部分有Halfmer產生。此外，本實驗室前人研究發現RPL23為*bcp1ts*的高通量抑制子。本研究證實Bcp1會與Rpl23直接結合並且穩定自由態的Rpl23，證明Bcp1為Rpl23的伴護子 (chaperone)。並且Bcp1也會與Rpl23的甲基轉移酶—Rkm1有結合，目前在大腸桿菌系統中證實Bcp1、Rpl23與Rkm1兩兩有結合關係，並且三者能夠形成一個蛋白質複合體 (ternary complex)：Bcp1以N端和Rkm1結合，以C端和Rpl23結合。然而在酵母菌中去除任一個皆會對另外兩者之間的結合造成影響，因此，三聚體應是較穩定的結合態。

關鍵字：Bcp1、Rpl23、伴護子、Rkm1、Mss4、核糖體生合成

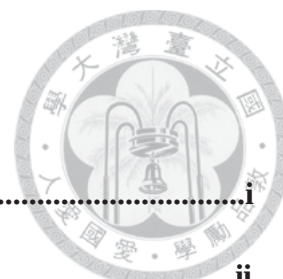
Abstract



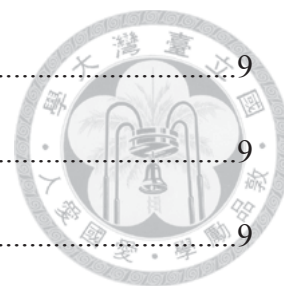
Ribosomes are responsible for protein synthesis. Biogenesis of ribosomes is an essential cellular process. Ribosome consists of ribosomal proteins and ribosomal RNAs (rRNAs). More than 200 non-ribosomal factors are involved in the assembly, modification of ribosomal proteins and rRNAs, and transportation of ribosome. The mechanism of ribosome biogenesis is conserved among eukaryotes. Therefore, *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast) is a model organism for ribosome biogenesis study. It has been known that *BCP1* is essential for 60S ribosome biogenesis. After depletion of *BCP1*, GFP-tagged ribosomal proteins of large subunit are accumulated in nucleus. Also, the polysome profile of *BCP1* depletion strain shows decreased ratio of 60S to 40S and appears halfmers in 80S and polysome. Besides, previous study showed that *RPL23* (Ribosomal protein of large subunit) is a high copy suppressor of *bcp1ts*. In this study, we find that Bcp1 has direct interaction with Rpl23 and can stabilize free-form Rpl23. This evidence suggests that Bcp1 is a chaperon of Rpl23. On the other hand, Bcp1 also has direct interaction with Rkm1, the methyltransferase of Rpl23. According to the evidences from *in vitro* interaction assays, Bcp1, Rpl23 and Rkm1 can interact with each other. They can also form a ternary complex. Bcp1 interacts with Rkm1 via its N terminus, and interacts with Rpl23 via its C terminus. After depletion of any of them in budding yeast, the interaction between the other two is affected. Therefore, the hetero-trimeric complex of Bcp1, Rpl23 and Rkm1 would be a more stable conformation.

Keywords: Bcp1, Rpl23, chaperone, Rkm1, Mss4, ribosome biogenesis

目錄



致謝	i
中文摘要	ii
Abstract	iii
目錄	iv
表目錄	vii
圖目錄	viii
附圖目錄	ix
壹、前言	1
一、核糖體生合成 (Ribosome biogenesis)	1
二、核糖體出核運輸	4
三、Bcp1 簡介	5
四、研究動機	6
貳、材料與方法	7
一、菌株與質體	7
二、轉型作用 (transformation)	7
(一) 大腸桿菌轉型作用 (<i>E. coli</i> heat shock transformation) :	7
(二) 快速酵母菌轉型作用 (Quick yeast transformation) :	7
(三) 高效酵母菌轉型作用 (High-efficiency yeast transformation) :	7
三、生長測試 (Spot assay)	8
四、酵母菌雙雜合系統 (Yeast two-hybrid system)	8
五、多核糖體圖譜分析 (Polysome analysis)	8



六、	螢光顯微鏡觀察	9
七、	免疫沉澱 (Immunoprecipitation)	9
八、	<i>In vitro</i> interaction assay	9
九、	蛋白質染色 (Coomassie blue)	10
十、	<i>bcp1</i> 突變基因的建構.....	10
參、結果		11
一、	<i>BCP1</i> 參與 60S 核糖體生合成.....	11
二、	Bcp1 會與 Rpl23 結合	13
三、	Bcp1 為 Rpl23 的伴護子 (Chaperone)	14
四、	Bcp1 具有全長以及剪切掉 N 端的兩種蛋白質型式	15
五、	Bcp1 會與 Rkm1 結合	17
六、	<i>bcp1</i> 突變株的建構.....	18
七、	Bcp1 透過 N 端與 Rkm1 結合	20
八、	Bcp1、Rkm1 的結合位不位於 Rpl23 的 C 端.....	22
九、	在酵母菌中探討 Bcp1、Rpl23 與 Rkm1 對彼此之間結合的影響	23
十、	探討 Mss4 對於 Bcp1 參與 60S 核糖體生合成的影響	24
肆、結論		26
伍、討論		27
一、	Bcp1、Rpl23 以及 Rkm1 之間的結合	27
二、	Bcp1 的兩種蛋白質形式	28
三、	探討 Rkm1 對於 Bcp1 與 Rpl23 結合的影響	29
四、	探討 Bcp1 與 Mss4 的結合區塊 (Domain).....	30

五、 探討 Mss4 對於 Bcp1 參與 60S 核糖體生合成的影響	31
六、 Bcp1 可能在兩條路徑之間扮演調控的角色	32
陸、參考文獻	33



表目錄

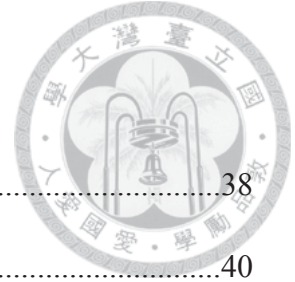


表 一、本實驗所使用之酵母菌菌株	38
表 二、本實驗所使用之質體	40
表 三、各 <i>bcp1</i> 突變株的生長表現及螢光分布	42
表 四、 <i>bcp1</i> 突變株定序結果	45

圖目錄

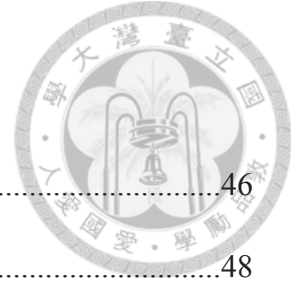
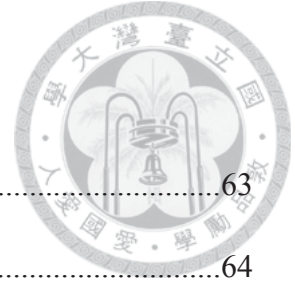


圖 一、BCP1 參與 60S 核糖體生合成	46
圖 二、Bcp1 會與 Rpl23 結合	48
圖 三、Bcp1 為 Rpl23 的伴護子	50
圖 四、Bcp1 具有全長以及剪切掉 N 端的兩種蛋白質型式	52
圖 五、Bcp1 會與 Rkm1 結合	54
圖 六、Bcp1 藉由 N 端與 Rkm1 結合	56
圖 七、在酵母菌中探討 Bcp1、Rpl23 與 Rkm1 對彼此之間結合的影響	59
圖 八、探討 Mss4 對於 Bcp1 參與 60S 核糖體生合成的影響	61

附圖目錄



附錄 一、rRNA 剪切過程.....	63
附錄 二、輔助因子參與 60S 核糖體生合成的時期.....	64
附錄 三、RPL23 為 <i>bcp1ts</i> 的高通量抑制子	65
附錄 四、Rpl23 與 eIF6 (Tif6 in yeast) 結構圖.....	66

壹、前言

一、核糖體生合成 (Ribosome biogenesis)

核糖體的功能是製造蛋白質，若核糖體的生合成出現缺失便會導致蛋白質的合成無法正常地進行，進而使得細胞生長受阻，嚴重時甚至會造成細胞死亡。並且在人類的疾病中，有些也與核糖體的生合成途徑發生異常相關。在真核生物中，一個完整的 80S 核糖體由 40S 以及 60S 兩個次單元體所組成。核糖體的生合成機制雖然複雜，但是在各個物種間具高度保守性。本篇論文利用啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 進行研究，啤酒酵母是常用的模式生物之一，為最簡單的真核生物，其特性為體積小直徑約 5–10 μm ，並且生長快速因此便於操作，其基因組的定序已於 1996 年完成 (Goffeau et al., 1996)，據估計酵母菌約有 31% 的基因與人類基因同源 (Botstein et al., 1997)，因此往往在研究人類未知功能的基因時，常會搜索酵母菌中是否含有同源且已知功能的基因，如此便能加速對該未知基因的研究。

核糖體是一個巨大的蛋白質與 rRNAs (Ribosomal RNA) 複合體。在啤酒酵母中，40S 核糖體由 33 個核糖體蛋白 (Ribosomal protein) 以及 18S rRNA 組成，60S 核糖體則由 46 個核糖體蛋白與 25S、5.8S、5S rRNA 所組成 (Melnikov et al., 2012)。核糖體從細胞核仁開始進行組裝，在細胞核組裝到特定步驟之後，必須經過細胞核孔被運輸到細胞質完成成熟的步驟，然後與 mRNA 結合形成完整的 80S 核糖體進行轉譯作用 (Lindstrom, 2009; Rodnina and Wintermeyer, 2009)。核糖體的組裝步驟需要兩百多個因子參與其中，這些因子的功能包含協助組裝、修飾以及運輸 (Dinman, 2009)。

rRNA 經由 rDNA 轉錄 (Transcription) 而來。其中，18S、5.8S 與 25S rRNA 的前驅物 35S rRNA 是透過 RNA 聚合酶 I (RNA polymerase I) 在細胞核仁所轉錄 (Cmarko et al., 2008; Fatica and Tollervey, 2002; Grandi et al., 2002; Henras et al., 2008; Zemp and Kutay, 2007)。另外，5S rRNA 則是經由 RNA 聚合酶 III 轉錄出 7S pre-rRNA，經過裁切之後，在 Rpl5 與 Rpl11 (**R**ibosomal **p**rotein of **l**arge subnit) 以及 Rpl2 與 Rrs1 兩個輔助因子 (trans-acting factors) 的幫助下，將 5S rRNA 送入細

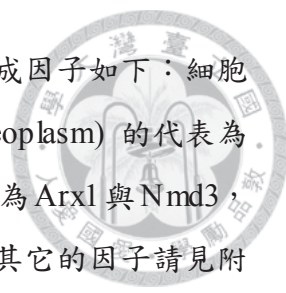


胞核仁 (Zhang et al., 2007)。至於核糖體蛋白 (Ribosomal protein) 則是由 RNA 聚合酶 II 先將 mRNA 轉錄 (Transcription) 出來，在細胞質被轉譯 (Translation) 成蛋白質 (Ciganda and Williams, 2011)，接著經過細胞核孔被送入細胞核或核仁與 rRNA 進行組裝 (Venema and Tollervey, 1999; Zhang et al., 2007)。

當 35S rRNA 在細胞核仁被轉錄出來之後，會與 U3 snoRNP 形成 small subunit (SSU) processome (Dragon et al., 2002)，然後與一些 40S 核糖體生合成的輔助因子一起協助 35S rRNA 的修飾：methylation、pseudouridylation，並且在這時候 35S rRNA 的 A₀ 與 A₁ 切位會被裁切 (附錄一)，變成 32S rRNA (Wehner et al., 2002)。然後一些 40S 核糖體蛋白以及 40S 核糖體生合成的輔助因子結合上去，形成 90S pre-ribosome。將 90S pre-ribosome 中的 32S rRNA 在 A₂ 切位進行裁切，變成 20S rRNA 與 27S rRNA 兩段 rRNA，它們分別組成 43S pre-40S ribosome 以及 66S pre-60S ribosome，兩者會各自進行後續的生合成步驟，離開細胞核在細胞質完成成熟之後，才會組裝成完整的 80S 核糖體 (Venema and Tollervey, 1999)。

經由 Crml 透過 RanGTP/RanGDP 梯度，以及其它因子 (例如：Prp12) 的協助下 pre-40S ribosome 才能夠通過核孔複合體到達細胞質 (Moy and Silver, 1999, 2002; Oeffinger et al., 2004)。在細胞質進行最後的成熟階段，40S 核糖體中的 Rps3 (Ribosomal protein of Small subnit) 在 Hrr25 以及 Rio2 兩個激酶 (Kinase) 的協助下改變其構型 (Schafer et al., 2006)。20S rRNA 的裁切必須要有 Rio1 與 Rio2 兩個 Kinase 的參與，最後將 D 切位切除形成成熟的 40S 核糖體 (Zemp and Kutay, 2007)。

相較於 pre-40S ribosome，pre-60S ribosome 的生合成過程更為複雜，有更多的因子參與。因此透過 Tandem affinity-purification (TAP) 能夠將各個生合成階段的 pre-ribosome 純化出來 (Rigaut et al., 1999)，藉由分析各個中間產物的組成差異，有助於推斷核糖體生合成的步驟 (Bassler et al., 2001; Fatica et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Nissan et al., 2002; Saveanu et al., 2001)。早期的 pre-60S ribosome 可以經由 Ssfl-TAP 純化出來，Ssfl 只在細胞核仁與 pre-60S ribosome 結合，此時的複合體包含 27SA、27SB pre-rRNA、一些核糖體蛋白以及大約 30 個非核糖體蛋白的因子，但是此階段沒有 snoRNPs 存在，因此推測可能有更早期的階



段 (Fatica et al., 2002)。常用來代表各個階段的 60S 核糖體生合成因子如下：細胞核仁的代表為 Ssf1、Nsa1 與 Nop7，細胞核仁與細胞核質 (Nucleoplasm) 的代表為 Nug1，細胞核質的代表為 Rix1 與 Real，細胞核質與細胞質的代表為 Arx1 與 Nmd3，細胞質的代表為 Drg1、Lsg1 與 Kre35 (Nissan et al., 2002)，更多其它的因子請見附錄二。5S rRNA 在細胞核仁與包含 27S rRNA 的 66S pre-60S ribosome 結合，接著 27S rRNA 的 C₂ 切位會被裁切，形成 7S 與 25S rRNA，然後在離開細胞核之前 7S rRNA 會再被修飾成 5.8S rRNA (Dunbar et al., 2000; Gadai et al., 2002)。有關 60S 核糖體的出核運輸在下一段介紹。60S 核糖體在細胞質最後的成熟步驟如下：藉由 Lsg1 (GTPase) 提供能量與 Rpl10 及其伴護子—Sqt1 將 Nmd3 置換下來，並協助 Rpl10 結合到原本 Nmd3 所佔據的位置 (Hedges et al., 2005; West et al., 2005)。最後一步被移除的是位於交界面的 Tif6，Tif6 的功能是避免未成熟的 60S 核糖體與 40S 核糖體結合 (Gartmann et al., 2010)，透過輔助因子 Efl1 與 Sdo1 的共同作用將 Tif6 移除之後，核糖體完成成熟過程可開始進行蛋白質轉譯作用 (Senger et al., 2001)。

二、核糖體出核運輸

真核生物的細胞核被核膜所包覆，當物質要進出細胞核時必須通過核膜上的核孔複合體 (Nuclear pore complex, 簡稱 NPC)，嵌在核膜中的核孔複合體做為連通細胞質與細胞核的通道，許多組成核孔複合體的核孔蛋白 (Nucleoporins, 簡稱 Nups) 具有 FG repeats (Phenylalanine-glycine repeats), FG repeats 會在核孔中間的通道形成疏水性的網狀結構，使物質無法自由進出細胞核 (Chadrin et al., 2010; Hoelz et al., 2011)。

核糖體的兩個次單元體—40S 核糖體與 60S 核糖體在細胞核內初步組裝之後必須離開細胞核，離開的這個步驟稱為出核運輸 (Nuclear export) (Ribbeck and Gorlich, 2002)。其中，60S 核糖體的出核運輸需要幾個因子協助：Nmd3、Mex67-Mtr2 以及 Arx1。Nmd3 帶有 NES (Nuclear export signal) 序列，Nmd3 結合到 60S 核糖體之後會露出 NES 序列而被 Crm1/Xpo1 辨認，Crm1/Xpo1 是核轉運蛋白 (Karyopherin) 家族的一員，透過 RanGTP/RanGDP 梯度協助 60S 核糖體離開細胞核 (Nissan et al., 2002)。Mex67-Mtr2 蛋白質複合體的結構與 NTF2 (Ran-independent transport receptors) 相似，會與核孔蛋白有交互作用，Mex67-Mtr2 藉由 NTF2-like loop 與 60S 核糖體中的 5S rRNA 結合，然後與核孔蛋白作用以協助 60S 核糖體出核 (Bassler et al., 2001; Strasser et al., 2000; Yao et al., 2007)。Arx1 則是會與 Alb1 (Arx1 little brother) 形成蛋白質複合體與 60S 核糖體結合，並將 60S 核糖體表面比較極性的位置屏蔽掉，再與核孔蛋白作用以協助 60S 核糖體出核 (Bradatsch et al., 2007; Hung and Johnson, 2006)。雖然三者各有不同的功能，但是 60S 核糖體的出核運輸卻是缺一不可的，在三者共同作用下，60S 核糖體才能順利地離開細胞核。

三、 Bcp1 簡介



在核糖體生合成路徑的研究中，由於協助生合成但是不屬於成熟核糖體的輔助因子，只會在生合成路徑的特定階段與核糖體接觸，藉由選用適當的輔助因子做為 bait，便能夠透過 Tandem affinity-purification (TAP) 將處於不同生合成階段的核糖體純化出來 (Rigaut et al, 1999)，並搭配質譜儀分析，能夠找到許多與核糖體生合成相關的因子。在 2009 年由 Zhihua Li 等人發表在 PLOS Biology 的一篇研究中，將其他人透過酵母菌雙雜合系統、質譜儀等大量快速篩選的方式，分析蛋白質交互作用以及基因交互作用的結果交叉比對，發現 212 個可能參與核糖體生合成的相關基因。在他們的研究中，利用這 212 個基因的酵母菌突變株做進一步的確認，分別測試不同條件下的生長情形、多核糖體圖譜、核糖體次單元體的出核等，指出其中至少十五個未知功能的基因確實與核糖體生合成有關，本篇論文所探討的 *BCP1* 是其中一個，在缺少 Bcp1 的時候會造成 60S 核糖體的生合成缺失。

另外，在 2003 年 Audhya 及 Emr 發表的研究中，已知 Bcp1 會協助酸肌醇磷酸激酶蛋白 Mss4 (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) 離開細胞核。PI4,5P₂ 是細胞中重要的信息傳遞因子 PIP₃ 的前驅物，當 PI4,5P₂ 的量過多或不足時，會影響細胞骨架中肌動蛋白 (Actin) 的組成、物質運輸以及細胞生長 (Fruman et al, 1998; Martin, 1998; Takenawa and Itoh, 2001)，因此維持細胞中 PI4,5P₂ 的適當含量非常重要。Mss4 會經由 Kap123 送入核中，再經由結合 Bcp1 離開細胞核，將細胞膜上的 PI4P 磷酸化成 PI4,5P₂，所以細胞藉由調控 Mss4 於細胞核與細胞質之間的分布，調控適量 PI4,5P₂ 的產生。

四、研究動機

綜合兩篇研究，Bcp1 在細胞核中協助 60S 核糖體的生合成，並且協助細胞核中的 Mss4 運輸到細胞質，因此 Bcp1 可能做為溝通兩個路徑的橋梁，有其重要性。在實驗室前人的研究中已知 *RPL23* 為 *bcp1ts* 的高通量抑制子 (High-copy suppressor)，在 *bcp1ts* 高溫敏感突變株中大量表現 *RPL23*，能夠改善 *bcp1ts* 的生長缺失 (附錄一)。亦有研究指出 Bcp1 與 Rpl23 (ribosomal protein of large subunit) 之間有交互作用 (Collins et al., 2007; Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002; Krogan et al., 2006)。Rpl23 是構成 60S 核糖體的其中一個核糖蛋白。因此，本篇透過研究 Bcp1 與 Rpl23 之間的交互作用，來探討 Bcp1 在 60S 核糖體生合成途徑中扮演的角色。並且對於 Bcp1 在兩個途徑之間的轉移進行初步的探討。



貳、材料與方法

一、 菌株與質體

請參照表一及表二。

二、 轉型作用 (transformation)

(一) 大腸桿菌轉型作用 (*E. coli* heat shock transformation)：

將 1-10 μL 的質體加入 100 μL 的勝任細胞中，放在冰中靜置 30 分鐘，接著置於 42°C 90 秒，再放回冰中兩分鐘，然後加入 100 μL 的 LB 之後至於 37°C 回復 30 分鐘，最後將菌液塗布於選擇性培養基中置於 37°C 培養一天。

(二) 快速酵母菌轉型作用 (Quick yeast transformation)：

將隔夜培養的 2 毫升酵母菌液離心下來並去除上清液，再用 1 毫升的 Li/TE (0.1 M 的 LiOAc 與 10 mM Tris + 1 mM EDTA 等比例混合) 洗過，取 15 μL 的酵母菌加入 5 μL 的 10 mg/mL ssDNA、1-2 μL 的質體與 300 μL 的 PEG/Li/TE (1 mL 的 1 M LiOAc 加 1 mL 的 100 mM Tris + 10 mM EDTA 以及 8 mL 的 50% PEG)，充分混合後置於 30°C 30 分鐘，再移到 42°C 15 分鐘，接著加入 1 毫升的無菌水混合後離心並去除多餘的液體，然後利用剩餘的液體將菌體回溶，最後將菌液塗布於選擇性培養基中置於 30°C 培養兩天。

(三) 高效酵母菌轉型作用 (High-efficiency yeast transformation)：

先測量隔夜培養的 5 毫升酵母菌液之 OD_{600} ，然後繼代培養至 50 毫升相同的培養液中 (終濃度為 $\text{OD}_{600}=0.15-0.20$)，置於 30°C 培養至 $\text{OD}_{600}=0.7$ (約 5-6 小時)，離心並去除上清液，再以 25 毫升的無菌水洗過菌體，然後回溶於 1 毫升 100 mM 的 LiOAc 並將菌液轉移至 1.5 毫升的試管中，再次離心並去除上清液，接著用 100 mM 的 LiOAc 將菌體回溶至終體積為 500 μL ，並且分裝 50 μL /管 (共十管) 再離心去除上清液，接著依序加入：240 μL 50% PEG w/v、36 μL 1 M LiOAc、10 μL 10 mg/mL

ssDNA、0.1-1 μg 的質體 (體積為 $X \mu\text{L}$) 以及 $(74-X) \mu\text{L}$ 的無菌水，震盪混勻後置於 30°C 30 分鐘，再移到 42°C 15 分鐘，然後離心去除上清液，再以 1 毫升的無菌水將菌體回溶，最後將菌液塗布於選擇性培養基中 (每 200 μL 塗一盤)，置於 30°C 培養兩天 (Gietz and Woods, 2002)。

三、生長測試 (Spot assay)

先測量隔夜培養的菌液之 OD_{600} ，接著將所有的菌液稀釋至 1 OD_{600} ，再於 96 孔盤中做序列稀釋 (1 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 以及 10^{-4})，最後各取 5 μL 點在培養基上，置於適當溫度培養 2-4 天。

四、酵母菌雙雜合系統 (Yeast two-hybrid system)

酵母菌雙雜合系統 (Fields and Song, 1989) 是利用酵母菌轉錄因子 GAL4 所建立起的偵測蛋白質間有無交互作用的一套方法。GAL4 具有獨立的可分開作用的兩個區域，分別為結合區域 (Binding domain, BD) 以及活化區域 (Activation domain, AD)。其中，BD 會辨識基因上游的活化序列 (Upstream activation sequence) 並與之結合，至於 AD 的功能則是與其它轉錄因子共同作用進而啟動下游基因的表現，將預測試的兩個蛋白質分別結合於 BD 或 AD 上，當兩個蛋白質有交互作用時，AD 便能活化 BD 啟動下游報導基因 (Reporter genes: *ADE2*、*HIS3* 及 *LacZ*) 的表現，使得菌株能夠在缺乏 Adenine 或 Histidine 的培養基上生長，或是在含 X-Gal 及 IPTG 的培養基上長出藍色的菌落。

五、多核糖體圖譜分析 (Polysome analysis)

將菌液培養至 0.3-0.4 OD_{600} ，加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide 繼續培養 10 分鐘使核糖體固定在 mRNA 上，收集菌體儲存於 -80°C 冰箱備用。加入 lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 8 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide, 1 mM PMSF, 1 μM Leupeptin) 回溶菌體，移到加到裝有玻璃珠的玻璃試管中進行破菌：以每震盪 30 秒放置冰上靜置 1 分鐘的方式進行 4 個循環。以 4°C ，13000 rpm 離心 10 分鐘兩次後，將上清液進行 OD_{260} 測定。取 9 OD_{260} 的樣品加到含蔗糖濃度梯度的離心管 (7%-47%, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 8 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, and 12 mM β -ME)，以 40000 rpm 在 4°C 離心兩個半小時，以梯度分析儀偵測 OD_{254} ，並收集劃分的樣品以 10% TCA 沉澱蛋白質，以西方墨點法 (Western blotting) 分析

目標蛋白與核糖體的結合情形。



六、 螢光顯微鏡觀察

將菌株隔夜培養，取適量菌液至新鮮的培養液中稀釋後，再培養兩個小時，然後根據不同菌株進行轉換溫度、加入 2%葡萄糖抑制基因表現、加入 2%半乳糖促進基因表現、或是加入藥物處理特定時間。以螢光顯微鏡 (AxioScope A1; Zeiss) 觀察 GFP 融合蛋白於細胞中的分布位置。

七、 免疫沉澱 (Immunoprecipitation)

將菌液培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，收集菌體儲存於-80°C 冰箱備用。加入 lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 μM Leupeptin) 回溶菌體，移到加到裝有玻璃珠的玻璃試管中進行破菌：以每震盪 30 秒放置冰上靜置 1 分鐘的方式進行 6 個循環。以 13300 rpm 在 4°C 離心 10 分鐘兩次後，將上清液進行 OD₂₈₀ 測定，以最低的 OD₂₈₀ 值將破菌液進行標準化。加入 CL-4B Protein A Agarose beads (GE Healthcare) 4°C 反應半小時，離心去除非專一性結合的蛋白。取部分上清液做為細胞萃取液 (WCE, whole cell extract)，其餘上清液加入抗體 4°C 反應兩小時，再加入 Protein A beads 4°C 反應一小時，最後洗去多餘的蛋白質，並抽乾，再以 1x SDS loading buffer 將 beads 上的蛋白質溶出，以西方墨點法 (Western blotting) 分析。

八、 *In vitro* interaction assay

以 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) 大量表現目標蛋白質，將菌體以 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7-8, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 μM Leupeptin) 回溶，使用超音波破菌，以 13300 rpm 在 4°C 離心 10 分鐘兩次後，取上清液進行實驗。將帶有標記(tag)的目標蛋白質液與沒有標記的測試蛋白質液混合，至於作為控制組的單一蛋白質液則加入 lysis buffer 補到相同體積。接著加入與標記具有高親和力的 beads，4°C 反應一小時，洗去多餘的蛋白質，並抽乾，再以 1x SDS loading buffer 將 beads 上的蛋白質溶出，以 SDS-PAGE 分離蛋白質，再以 Coomassie blue 進行蛋白質染色或西方墨點法 (Western blotting) 分析。



九、蛋白質染色 (Coomassie blue)

蛋白質樣品先以 10-11% SDS-PAGE 分離，再將膠體以 Coomassie blue buffer 染色 20-30 分鐘，接著使用 Destain buffer 退染至可以看到清楚的蛋白質色帶為止。Coomassie blue buffer 的配方為 0.3% Coomassie Brilliant Blue R 250 (SERVA Electrophoresis GmbH, UK)、10% acetic acid 以及 30% methanol，以水為溶劑。Destain buffer 的配方為 10% acetic acid 以及 30% methanol，同樣以水為溶劑。

十、*bcp1* 突變基因的建構

利用 PKL101 (*BCP1-GFP*) 為模板，以出錯率高的 *Vas Taq* DNA 聚合酶進行 PCR 希望得到 *bcp1* 的突變基因，反應液如下：5 μ L 10X PCR buffer、X μ L 質體 (0.1 μ g)、1 μ L 0.01 mM 引子 F、1 μ L 0.01 mM 引子 R、5 μ L 2 mM dNTPs、0.4 μ L 5 U/ μ L *Vas Taq* polymerase 以及 (37.6 - X) μ L 的水，反應液加好後進行反應：設定 94°C 3 分鐘，以下的反應進行 12 個循環，94°C 1 分鐘、55°C 1 分鐘 (溫度根據引子的 T_m 而定)、72°C 1.5 分鐘。接著純化 PCR 產物即為插入子 (insert)，至於載體則為 PKL101 (利用 *EagI* 及 *PacI* 將 *BCP1* 基因去除)，然後利用高效酵母菌轉型作用將插入子與載體共同送進 KLY106 (*bcp1ts*) 中，在酵母菌中便會將插入子與載體進行重組 (recombination) 形成完整的質體。理論上能在 $Leu^- + Glc$ 中生長的是轉型成功的菌株。但是 KLY106 中原本就含有 *bcp1ts* 的質體，若轉型進去的突變 *bcp1* 質體所表現出來的 *bcp1* 蛋白無活性，便會留下原本的 *bcp1ts* 質體，由於該質體帶有 *URA* 的記號，於是進一步利用 5FOA (5-Fluoroorotic acid) 培養基進行篩選，當菌體自行合成 Uracil 時便會代謝掉嘧啶 (Pyrimidine) 的相似物—5FOA，其產物對菌體有毒 (Ripmaster et al., 1995)，所以帶有此 *bcp1ts* 質體的菌株無法於 5FOA 培養基中生長。本實驗希望得到 *bcp1* 突變基因，並且該突變會造成酵母菌的生長缺陷者，因此篩選的方式如下：在 30°C 的 5FOA 培養基中或在 37°C 的 $Leu^- + Glc$ 培養基中有生長缺失者，篩選出有生長缺陷的菌株後，再利用螢光顯微鏡分析有無螢光及 *bcp1* 的分布情形，然後經由定序分析得到突變的位置。

參、結果



一、BCP1 參與 60S 核糖體生合成

由於 *BCP1* 為必需基因，直接刪除其基因會造成細胞無法存活，因此利用 *bcp1ts* 突變株以及 *GAL::BCP1* 條件式基因刪除菌株來探討 *BCP1* 缺失時對細胞造成的影響。*bcp1ts* (F241S) 為第 241 個胺基酸 Phenylalanine 突變成 Serine 的單一點突變株，一般酵母菌的最佳生長溫度為 30°C，*bcp1ts* 菌株在 30°C 的生長狀況與野生株並沒有明顯的差異，但是在 37°C 時卻會長得比野生株差很多 (附錄三)。至於 *GAL::BCP1* 菌株則是在 *bcp1Δ* 中表現 *GAL::BCP1* 的質體。將 *BCP1* 基因接在半乳糖啟動子 (Galactose promoter) 後面，使用半乳糖為碳源會使細胞大量表現 *BCP1*，加入葡萄糖會使細胞無法表現 *BCP1*。在生長測試時發現 *GAL::BCP1* 在以葡萄糖為碳源的培養基上面仍然能夠生長 (圖一 A)，因此養菌時會先將 *GAL::BCP1* 在 2 mL 以半乳糖碳源的培養液中培養隔夜，然後使用以葡萄糖為碳源的培養液進行繼代培養約 17-22 小時，視實驗所需培養至特定的濃度範圍。

本實驗室前人是利用 *bcp1ts* 突變株，來進行 *BCP1* 功能的探討 (陳柏儒, 2012；丁亞涵, 2014)，在 37°C 培養兩小時之後，菌體中的 *bcp1ts* 蛋白失去正常功能。而本研究所使用的 *GAL::BCP1* 菌株在以葡萄糖為碳源時，菌體中幾乎沒有 Bcp1 蛋白質的存在 (圖一 B)，對細胞所產生的影響可能會與 *bcp1ts* 突變株不同。因此先針對 *GAL::BCP1* 菌株是否同樣具有 60S 核糖體生合成的缺失進行測試。

利用以葡萄糖為碳源的培養基抑制 *GAL::BCP1* 菌株中的 *BCP1* 基因表現之後，由多核糖體圖譜可以看到 60S 核糖體的量明顯下降，並且在 80S 及多核糖體的部分，有 halfmer 出現 (圖一 C)。並且以螢光顯微鏡觀察代表 60S 核糖體的 Rpl11-GFP 在細胞中的分布位置：Rpl11-GFP 在野生株全部都均勻分布在細胞中，而使用半乳糖培養的 *GAL::BCP1*，9% 細胞的 Rpl11-GFP 聚集在細胞核，但是使用葡萄糖培養的 *GAL::BCP1*，48% 細胞的 Rpl11-GFP 聚集在細胞核 (圖一 D)，顯示 *BCP1* 與 60S 核糖體在細胞核的生合成過程有關。由上述兩個實驗得知細胞缺少 Bcp1 時，會造成 60S 核糖體在細胞核的組裝過程無法順利進行，使得 60S 核糖體在細胞核累積，而無法出核在細胞質完成後續的成熟過程，也因為缺乏成熟的 60S 核糖體

與 mRNA 上的 40S 核糖體配對形成完整的 80S 核糖體，所以在多核糖體圖譜中產生 halfmer 的現象。



二、 Bcp1 會與 Rpl23 結合

在本實驗室前人的研究中已知，在細胞中大量表現 *RPL23* 能夠改善 *bcp1ts* 突變株在高溫生長不良的情形 (附錄一)。*Rpl23* 是 60S 核糖體其中之一的核糖體蛋白，它位於 60S 核糖體與 40S 核糖體的結合面上，在核仁中 Tif6 會結合到位於 60S 核糖體的 *Rpl23* 上，成為立體障礙以避免未成熟的 60S 核糖體與 40S 核糖體結合 (Kemmler et al., 2009)，待 60S 核糖體出核後，在細胞質中經由輔助蛋白的協助以及 *Rpl24* 的結合 (Horsey et al., 2004; Wood et al., 1999)，60S 核糖體逐漸成熟，接著再由 Efl1 與 Sdo1 將 Tif6 釋放 (Gietz and Woods, 2002)，40S 核糖體才能與 60S 核糖體結合然後進行轉譯作用。

酵母菌的 *RPL23* 具有 A 和 B 兩種同源基因 (Paralog) (Degenhardt and Bonham-Smith, 2008)，它們的基因序列不同但能轉錄出相同的氨基酸序列，而兩者皆為 *bcp1ts* 的高通量抑制子 (High-copy suppressor)。然而利用以葡萄糖為碳源的培養基使 *GAL::BCP1* 菌株無法表現 *BCP1*，發現其生長不良的情形即使大量表現 *RPL23* 也毫無改善 (圖二 A)。因此，*RPL23* 的確能夠部份修補 *bcp1ts* 所造成的核糖體生合成缺失，但是不能取代 Bcp1 蛋白質的功能。

由於 *Rpl23* 為 60S 核糖體的其中一個核糖蛋白，因此推測 Bcp1 的功能與 *Rpl23* 正確地嵌入 60S 核糖體有關。先測試兩個蛋白質間是否可能有結合：在酵母菌雙雜合系統測試中，發現 *BCP1* 與 *RPL23* 有結合 (圖二 B)。進一步利用大腸桿菌系統測試兩者間的結合，大量表現在 C 端帶有 His-tag 的 Bcp1-C'His 與沒有 tag 的 *Rpl23* 蛋白，分別破菌之後以 Ni-NTA resin 測試兩者是否能結合。*Rpl23* 沒有 His-tag，所以不會被 Ni resin 抓住，因此只表現 *Rpl23* 的破菌液流過管柱，經過破菌緩衝液洗去未結合的蛋白質，再以 1x SDS loading buffer 將 resin 上的蛋白質溶出，elution 中幾乎沒有 *Rpl23* 存在，但是將 Bcp1-C'His 與 *Rpl23* 的破菌液混合之後，elution 的樣品中同時有 Bcp1-C'His 與 *Rpl23* 存在，表示兩個蛋白質能夠直接結合。由於使用的是破菌液，而不是純化過後的蛋白質，所以進一步用 *Rpl23* 抗體來偵測，證明出現在 17 kDa 附近的那個蛋白質的確是 *Rpl23* (圖二 C)。

三、 Bcp1 為 Rpl23 的伴護子 (Chaperone)



接著探討 Bcp1 是與核糖體上的 Rpl23 還是自由態的 Rpl23 結合。由於核糖體是非常巨大的複合體，所以利用超高速離心 (80000 rpm，一小時) 可以將破菌液分成兩部份—上清液 (S, free protein) 以及沉澱 (P, ribosome-bound protein)，然後以 IP buffer 將沉澱回溶，將兩部份分別進行免疫沉澱，便可透過 α -myc 抗體將 Bcp1-myc 以及與 Bcp1 結合的蛋白質用 protein A beads 抓下來，以西方墨點法進行分析。使用兩個 60S 核糖體生合成的輔助因子 (Tif6 與 Nmd3) 做為對照，在實驗結果中 Tif6-myc 與 Nmd3-myc 會在沉澱的部分與 Rpl23 結合，上清液的部分則偵測不到。至於 Bcp1-myc 則會與自由態 (S, free protein) 的 Rpl23 結合，但是無法偵測到與 60S 核糖體中的 Rpl23 有所結合 (圖三 A)。

由於自由態的核糖蛋白 (Free form) 比較不穩定，在超高速離心分離出來的上清液部分核糖蛋白的含量很少，必須以 10% TCA (Trichloroacetic acid) 將蛋白質沉澱下來，然後以少量體積的一倍 SDS sample buffer 回溶達到濃縮的效果，才能以西方墨點法偵測到自由態的核糖體蛋白。因為已知 Bcp1 會與自由態的 Rpl23 結合，所以測試 Bcp1 對於 Rpl23 的蛋白質穩定性有沒有影響。野生株的上清液樣品中能偵測到少量的 Rpl23，在送入 *GAL::RPL23* 質體，利用半乳糖誘導 *GAL::RPL23* 大量表現，能增加自由態的 Rpl23 蛋白質的量。在野生株中送入 *GAL::BCP1-HA* 質體，同樣以半乳糖誘導 Bcp1 大量表現的結果與表現空載體相比，上清液中的 Rpl23 的量亦明顯增加，同步大量表現 Bcp1 及 Rpl23，自由態的 Rpl23 增加最顯著 (圖三 B)。

反之，以葡萄糖抑制 *GAL::BCP1* 表現時 (圖三 C)，或在經由高溫處理的 *bcp1ts* 突變株中 (圖三 D)，則會使上清液的 Rpl23 含量比野生株少很多。以上結果顯示 Bcp1 具有能夠穩定自由態的 Rpl23 之能力，證實 Bcp1 為 Rpl23 的伴護子 (chaperone)。

四、 Bcp1 具有全長以及剪切掉 N 端的兩種蛋白質型式

使用 α -Bcp1 抗體去偵測時，在理論的 Bcp1 大小位置 (32 kDa) 有兩個條色帶出現，並且在抑制 *GAL::BCP1* 基因表現之後兩條色帶都會減少 (圖一 B)。除此之外，以 α -myc 抗體進行免疫沉澱將 Bcp1-myc 抓下來之後，再以 α -myc 抗體進行 western blotting 的顯影，也同樣在理論的 Bcp1-myc (53 kDa) 位置有兩條色帶 (圖三 A)。因此我們認為兩條色帶皆代表 Bcp1 蛋白，於是希望能藉由質譜儀分析 Bcp1 蛋白是經過何種修飾產生兩種大小的蛋白質。

我們使用免疫沉澱製備樣品，因為主要針對 Bcp1 蛋白進行分析，希望不要有其它雜蛋白的影響，並且所需的蛋白質量也要比較多，所以將免疫沉澱的步驟稍微修改，在野生株中送入 *BCP1-myc* 質體，將一公升的菌培養至 0.4 -0.6 OD₆₀₀，收集菌體保存於 -80°C 備用，分成兩管進行免疫沉澱，使用 lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% NP40, 1 mM PMSF, 1 μ M Leupeptin) 回溶菌體，破菌的方式與平常的免疫沉澱步驟相同 (請參照材料與方法六)，使用 40 μ L 的 CL-4B Protein A Agarose beads (GE Healthcare) 4°C 反應半小時，上清液加入 8 μ L α -c-myc (9E10) 抗體 4°C 反應兩小時，再加入 50 μ L Protein A beads 4°C 反應一小時，以 lysis buffer 洗去多餘的蛋白質，洗三次每次於 4°C 反應十分鐘，最後抽乾，再以 30 μ L 不含 BME 的 1x SDS loading buffer 將 beads 上的蛋白質溶出，一共得到約 60 μ L 的樣品。

將樣品以 10% SDS-PAGE 進行蛋白質膠體電泳，使用 Coomassie blue 染色 (圖四 A)，將 Bcp1-myc 的兩條色帶分別切下來，分子量比較大的色帶標示為 Upper，比較小的片段標示為 Lower，置於 1.5 mL 離心管中保存於 -20°C，再把樣品寄給鎂陞科技股份有限公司的 GLP 蛋白質分析實驗室，進行酵素水解與質譜儀分析。

結果如圖四 B 所示，Bcp1 蛋白質序列中以灰字底線標示的為質譜儀偵測到的片段，其中 Trypsin 的切位為 Arginine (R) 與 Lysine (K)，而 Chymotrypsin 的切位則為 Tyrosine (Y) 與 Phenylalanine (F)。由分析結果可知分子量不同的兩個樣品主要的差異在於 N 端，以 Trypsin 處理之後兩個樣品都有偵測到 73QLFGPQESTER，但是分子量較小的樣品沒有偵測到 73 號胺基酸之前的訊號，而分子量較大的樣品

則偵測到 2VQAIKLNDLK、2VQAIKLNDLKNR、7LNDLK 以及 7LNDLKNR。表示分子量較大的片段應該是全長的 Bcp1，而分子量較小的樣品則是轉譯後修飾切除 N 端的 bcp1 Δ n。

由於 14 到 73 號胺基酸之間的序列經由 Trypsin 水解之後的片段不在質譜儀能夠偵測到的荷質比 (e/m) 範圍內，我們另外使用 Chymotrypsin 來水解分子量較小的樣品，經由質譜儀偵測到 56GGNPEVDFH 以及 56GGNPEVDFHALKNLLR 的訊號，可以再縮小 bcp1 Δ n 被切除的範圍在第 56 個胺基酸之前。

五、 Bcp1 會與 Rkm1 結合



在之前一些 High-throughput 的質譜及酵母菌雙雜合系統的分析中，發現 Rkm1 及 Bcp1 有關聯 (Collins et al., 2007; Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006; Krogan et al., 2004; Yu et al., 2008)。因此進一步測試 *BCP1* 與 *RKM1* 之間的關聯。

在細胞中大量表現 *RPL23* 能夠改善因 *bcp1ts* 突變造成的生長缺失，或許 *RKM1* 也有同樣的效果，但是結果顯示大量表現 *RKM1* 並不會改善 *bcp1ts* 生長缺失的情形 (圖五 A)。除此之外，如果 *BCP1* 與 *RKM1* 有基因上的關聯，那麼將 *bcp1ts* 菌株中的 *RKM1* 基因刪除之後，產生的 *bcp1tsrkm1Δ* 雙突變株的生長狀況應該會比 *bcp1ts* 來的差。結果如 (圖五 B) 所示，不論是在 37°C 高溫或是 25°C 低溫下，*bcp1ts rkm1Δ* 的生長狀況都跟 *bcp1ts* 差不多。另外，Bcp1 為 Rpl23 的伴護子 (chaperone)，Bcp1 或許也有可能對 Rkm1 的蛋白質穩定性造成影響，由於沒有 Rkm1 的抗體，因此將表現 *RKM1-myc* 的質體送入 *GAL::BCP1* 菌株中，用 α -myc 偵測破菌液中 Rkm1-myc 的量。結果顯示不論是用半乳糖使 *GAL::BCP1* 大量表現或是用葡萄糖抑制 *GAL::BCP1* 基因表現，對細胞中的 Rkm1 蛋白質含量沒有明顯的影響 (圖五 C)。

接著在大腸桿菌系統中，透過 GST resin 測試 N 端帶有 GST-tag 的 GST-Rkm1 與 Rpl23 之間的結合，是否會受到 Bcp1-C'His 的影響。結果顯示 Rpl23 以及 Bcp1-C'His 自己本身不會被 GST resin 抓住，而 GST-Rkm1 能夠與 Rpl23 結合，使 GST-Rkm1 與 Rpl23 同時存在於 elution 的樣品中，而 GST-Rkm1 也能與 Bcp1-C'His 結合。若將三者的破菌液混合，elution 的樣品中也同時有 GST-Rkm1、Bcp1-C'His 以及 Rpl23 存在，並且使用 Bcp1 與 Rpl23 抗體去偵測，證實該色帶確實為 Bcp1 與 Rpl23 蛋白 (圖五 D)。這個結果證明 GST-Rkm1、Bcp1-C'HIS 以及 Rpl23 三者分別能夠兩兩結合，但是不能確定三者是否能形成一個蛋白質複合體 (ternary complex)。

六、 *bcp1* 突變株的建構



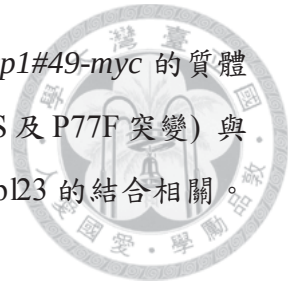
為了進一步研究 Bcp1 的功能區塊，所以利用出錯率高的 DNA 聚合酶以 PCR 的方式產生各種突變的 *bcp1* 基因，將 PCR 產物放入帶有 C 端 GFP 的質體中，然後將接好的質體送入 *bcp1ts* (*URA3*) 菌株。由於 *bcp1ts* 在高溫 37°C 具有生長缺陷，如果 *bcp1-GFP* (*LEU2*) 突變的位置不影響蛋白質的正常功能，那麼菌株在 37°C 的生長情形就會跟野生株相同，而我們要挑選的是會影響 *BCP1* 蛋白質功能的突變株，經由定序分析出突變的位點之後探討該區塊的功能。所以我們要挑選在 37°C 生長較差的菌株，代表該 *bcp1-GFP* 突變無法執行 Bcp1 的正常功能，有兩種可能性：該突變本身為高溫敏感 (*Temperature sensitive*)，或是完全無功能而菌體為了存活所以保留 *bcp1ts* 質體，因而顯現 *bcp1ts* 高溫生長不良的特性。

初步篩選之後再四區劃線進行二次確認，除了檢測菌株在 37°C 的生長情形，也同步測試菌株在 30°C 含 5FOA (5-Fluoroorotic acid) 的培養基之生長。在含 5FOA 的培養基中，當菌體自行合成尿嘧啶 (Uracil) 時便會代謝掉嘧啶 (Pyrimidine) 的相似物—5FOA，產生對酵母菌具有毒性的產物 (Ripmaster et al., 1995)，因此帶有 *bcp1ts* (*URA3*) 質體的菌株無法在 5FOA 培養基中生長。如果帶有 *bcp1-GFP* (*LEU2*) 的突變株如果也無法在此培養基中生長，代表該突變蛋白不具正常功能，也是我們所要的。從 25 盤培養基約一萬顆菌落 (400 cfu/Plate) 中篩選出 184 個可能具有生長缺陷的菌株，然後將這 184 個菌株再畫到 30°C 的 5FOA 培養基以及 37°C 的 LEU⁺ + Glc 培養基中，進行二次確認，於是確定其中 87 個菌株具有生長缺陷，並將各突變菌株的生長情形及螢光分布結果列於表三。

因設計質體時將 *GFP* 接在 *BCP1* 的 C 端，所以若無螢光表現時，表示 *BCP1* 基因中間轉譯出終止密碼子的突變 (truncation)，這是我們在這次分析中要移除的突變型；並且藉由觀察 *GFP* 的訊號，亦可得知此突變是否會改變 Bcp1 的胞內分布。我們從 87 個具有生長缺陷的菌株中，先挑選胞內分布位置與野生株不同的七個質體去定序，定序結果列於表四。

首先利用免液沉澱測試這些突變蛋白與 Rpl23 之間的結合量有無改變，但是進行免液沉澱時，如果利用 α -GFP 抗體將 *bcp1-GFP* 抓下來效果並不好，因此必須

先將 C 端的 GFP-tag 換成本實驗室常用的 13xmyc-tag，但是 *bcp1#49-myc* 的質體沒有做出來，所以先測試其它六個突變蛋白，其中 *bcp1#148* (L67S 及 P77F 突變) 與 Rpl23 的結合量減少了 (圖六 A)，表示這個突變的位置可能與 Rpl23 的結合相關。



七、 Bcp1 透過 N 端與 Rkm1 結合



為了進一步了解 Bcp1 是如何與 Rpl23 以及 Rkm1 結合的，因此透過一些 *bcp1* 突變基因來探討蛋白質之間的結合區域 (Domain)。使用的突變基因除了前述的 *bcp1ts* 以及 *bcp1#148* 之外，還有本實驗室前人所建構出的其它突變基因，包含 NLS (Nuclear localization sequence, *bcp1Δnls*) 與 NES (nuclear export sequence, *bcp1nes*) 的突變，刪除 N 端四十個胺基酸 (*bcp1Δn40*) 與刪除 C 端七十一個胺基酸 (*bcp1Δc*) 以及只保留 C 端 121 個胺基酸 (*bcp1ctr*) 的突變 (圖六 B) (陳柏儒, 2012)。其中建構 *bcp1Δn40* 的想法是源自於台大農化系徐駿森老師實驗室所解出的 Bcp1 結構，其結構中 N 端四十個胺基酸的部分具高度自由性 (Flexible)，通常做為與其它蛋白質結合的位置。

因為沒有 Rkm1 的抗體，所以我們使用 *RKM1-GFP* 菌株，就能以 α -GFP 抗體進行偵測。首先將帶有 13xmyc-tag 的 *bcp1* 突變基因送入 *RKM1-GFP* 菌株中，再進行免液沉澱測試 Bcp1 與 Rpl23 或 Rkm1 結合的區域。實驗結果中偵測不到 *bcp1Δc-myc* 與 Rpl23 的結合，而 *bcp1Δc-myc* 與 Rkm1-GFP 的結合量減少很多，只比空載體多一點點，推測 Bcp1 可能是用 C 端與 Rpl23 結合，並且 Bcp1 的 C 端也可能與 Rkm1 的結合有關。而 *bcp1Δnls* 的突變則不影響與 Rpl23 以及 Rkm1-GFP 的結合。但是 *bcp1nes-myc*、*bcp1ts-myc* 以及 *bcp1ctr-myc* 皆無法與 Rpl23 或是 Rkm1-GFP 結合。特別的是 *bcp1Δn40-myc* 會與 Rpl23 結合，但是幾乎無法與 Rkm1-GFP 結合，推測 Bcp1 可能是用 N 端與 Rkm1 結合。並且 *bcp1#148-myc* 的結果剛好和 *bcp1Δn40-myc* 相反，*bcp1#148-myc* 會與 Rkm1-GFP 結合，但是幾乎無法與 Rpl23 結合 (圖六 C)。

接著利用大腸桿菌系統進行體外測試，先確認 *bcp1Δn40-C'HIS* 與 Rpl23 以及 GST-Rkm1 的結合情形。在 NTA-resin 的結果中，經由 Bcp1-C'HIS 或 *bcp1Δn40-C'HIS* 抓下來的 Rpl23 的量並無差異 (圖六 D)，表示去除 Bcp1 的 N 端四十個胺基酸不會影響與 Rpl23 之間的結合。然而使用 GST-resin 測試，GST-Rkm1 能夠與 Bcp1-C'HIS 結合，但是幾乎不會與 *bcp1Δn40-C'HIS* 結合，證明 Bcp1 是透過 N 端與 Rkm1 結合。但是加入 Rpl23 之後，GST-Rkm1、Rpl23 與 *bcp1Δn40-C'HIS* 會同時存在於 elution 的樣品中 (圖六 E)，顯示 Bcp1、Rpl23 與 Rkm1 除了可以各

別兩兩結合之外 (圖二 C、圖五 D 及圖六 E)，Bcp1 也能夠透過 Rpl23 做為橋梁與 Rkm1 三者形成一個蛋白質複合體。



八、 Bcp1、Rkm1 的結合位不位於 Rpl23 的 C 端

目前已知 Rpl23 的 N 端會嵌入 60S 核糖體中並露出 C 端的部分，以 C 端 15 個胺基酸提供 Tif6 結合的位置 (Gartmann et al., 2010; Klinge et al., 2011)，以避免未成熟的 60S 核糖體與 40S 核糖體結合 (Kemmler et al., 2009)。所以我們想測試 Bcp1 會不會也同樣與 Rpl23 的 C 端 15 個胺基酸結合。以 NTA-resin 測試 Bcp1-C'HIS 與 rpl23 Δ c15 之間的結合，結果發現 rpl23 Δ c15 會比全長的 Rpl23 小一點點，但是仍然能夠與 Bcp1-C'HIS 在 elution 的部分共同存在 (圖六 F)，Bcp1-C'HIS 能與 rpl23 Δ c15 結合，表示 Bcp1 的結合位置並非 Rpl23 的 C 端。

除此之外，我們也想測試 Rpl23 是否亦用此區塊與 Rkm1 結合。將 GST-Rkm1 以及 rpl23 Δ c15 的破菌液混合，加入 GST-resin 進行反應，結果 GST-Rkm1 與 rpl23 Δ c15 會共同存於在 Elution 的部分，表示 Rkm1 並不是結合在 Rpl23 的 C 端 (圖六 G)。

九、在酵母菌中探討 Bcp1、Rpl23 與 Rkm1 對彼此之間結合的影響



在前述實驗中，透過大腸桿菌系統進行體外測試得知 Bcp1、Rpl23 與 Rkm1 兩兩有結合關係，並且三者能夠形成一個蛋白質複合體 (Ternary complex)。因此接著在酵母菌中以免疫沉澱的方式測試當缺少任一個蛋白質時，會不會影響另外兩者之間的結合。

使用葡萄糖抑制 *GAL::RPL23* 基因表現之後，與野生株相比，在缺少 Rpl23 時 Bcp1-myc 與 Rkm1-GFP 的結合量下降了 (圖七 A)。反過來以 Rkm1-myc 做為 bait 進行免疫沉澱，在缺少 Rpl23 時 Rkm1-myc 與 Bcp1 的結合也同樣減少了 (圖七 B)。另外，不論是抑制 *GAL::BCP1* 的基因表現，或是高溫處理 *bcp1ts* 菌株使 bcp1ts 蛋白質失去正常的功能時，都會造成 Rkm1-myc 與 Rpl23 的結合減少 (圖七 C、D)。而在 *rkm1Δ* 菌株中，Bcp1-myc 與 Rpl23 的結合量與野生株相比沒有明顯差異 (圖七 E)。

十、探討 Mss4 對於 Bcp1 參與 60S 核糖體生合成的影響

已知 Bcp1 會協助 Mss4 (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) 離開細胞核，Mss4 的功能是將細胞膜上的 PI4P 磷酸化成 PI4,5P₂，而 PI4,5P₂ 是細胞中重要的信息傳遞因子 PIP₃ 的前驅物。Bcp1 會在細胞核與 Mss4 結合並幫助 Mss4 離開細胞核，使 Mss4 能到達細胞膜執行其功能 (Audhya and Emr, 2003)。另一方面，在本篇研究中得知 Bcp1 作為 Rpl23 的伴護子會參與 60S 核糖體的生合成，其中 Rpl23 是在細胞核仁的部分嵌入 60S 核糖體。綜合以上，Bcp1 與不同途徑的兩個蛋白質都有所結合，但是我們並不清楚 Bcp1 從 60S 核糖體的生合成途徑轉移到另一個途徑的機制為何。

首先，我們利用之前使用過的 *bcp1* 突變基因來探討 Mss4 與 Bcp1 可能的結合位置。但是我們目前沒有 α -Mss4 的抗體，所以使用 Mss4-myc 進行免疫沉澱，除此之外，為了區別突變的 *bcp1* 蛋白與染色體 DNA 製造出來的 Bcp1，我們送入帶有 GFP-tag 的 *bcp1* 突變基因。但是實驗結果中除了正確的 Bcp1-GFP 以及 *bcp1* Δ nls-GFP 之外，其它的 *bcp1* 突變蛋白都沒有明顯與 Mss4 有所結合 (圖八 A)。其中，*bcp1*ts-GFP 與 *bcp1*#148-GFP 皆為點突變蛋白，而 *bcp1*ctr-GFP 刪除的蛋白質片段太長，難以判斷 Bcp1 與 Mss4 的結合方式。但是 *bcp1* Δ c-GFP 與 *bcp1* Δ n40-GFP 是後續可再進行探討的。並且 *bcp1*nes-GFP 是出核訊號的突變，後續可以探討 Bcp1 與 Mss4 的結合方式對於 Bcp1 協助 Mss4 出核的機制中可能的影響。

另一方面，探討 Rpl23 會不會影響 Bcp1 與 Mss4 之間的結合。利用葡萄糖抑制 *GAL::RPL23* 菌株的基因表現然後進行免疫沉澱，發現缺少 Rpl23 對於 Mss4-myc 與 Bcp1 之間的結合影響不大 (圖八 B)。

針對 Mss4 對核糖體生合成的影響進行探討，我們使用 *mss4-1-GFP* 高溫敏感菌株進行多核糖體圖譜的分析。其結果顯示當 *mss4-1-GFP* 失去正常功能之後，會造成 60S 與 40S 核糖體的比例 (60S/40S ratio) 明顯下降，並且有 80S 核糖體累積的現象 (圖八 C)。為了瞭解 60S 與 40S 核糖體的比例下降是否來自於 60S 核糖體的生成量減少，所以進行 40S 與 60S 核糖體的圖譜分析，這個分析方式與多核糖

體圖譜主要的差異在於收菌的時候不加 cycloheximide，並且使用的 buffer 不含鎂離子，因此核糖體沒辦法留在 mRNA 上，同樣使用 OD₂₅₄ 偵測 rRNA 的含量繪出圖譜，能夠針對 40S 與 60S 核糖體的總量進行探討。其結果顯示 *mss4-1-GFP* 突變株中的 60S 與 40S 核糖體的比例跟野生株差不多，但是 40S 與 60S 核糖體的總量皆下降 (圖八 D)。

肆、結論



本研究證明 Bcp1 是 Rpl23 的伴護子，Bcp1 會與自由態的 Rpl23 結合，並中和其電荷使 Rpl23 蛋白質穩定存在。因此，Bcp1 的缺失對於 60S 核糖體生合成的影響，可能與 Rpl23 是否正確地嵌入 60S 核糖體有關。目前推測 Bcp1 可能藉由其 C 端與 Rpl23 結合，但是體外 (*in vitro*) 測試的結果仍未知。另外，實驗證明 Bcp1 能藉由其 N 端與 Rpl23 的甲基轉移酶—Rkm1 結合。然而 Rpl23 是利用哪一個區塊 (Domain) 與 Bcp1 以及 Rkm1 結合仍未知，不過可以確定兩者皆不是結合在 Rpl23 的 C 端。體外 (*in vitro*) 測試證明 Bcp1、Rpl23 以及 Rkm1 能夠兩兩有所結合，三者也可以形成一個蛋白質複合體。但是在酵母菌中三者缺少其一，皆會對另外兩者的結合造成影響，因此形成三聚體可能是較穩定的結合態。除此之外，由於 Bcp1 會協助 Mss4 的出核，因此也針對 Bcp1 與 Mss4 的結合區塊 (Domain) 進行探討，並且測試 Rpl23 對於 Bcp1 與 Mss4 之間結合的影響，結果當缺少 Rpl23 時，Bcp1 與 Mss4 的結合量沒有明顯變化。最後關於 Mss4 對於核糖體生合成的影響，當 Mss4 無法正常作用時，會造成 40S 與 60S 核糖體的量皆下降，但是其機制仍未知。



伍、討論

一、 Bcp1、Rpl23 以及 Rkm1 之間的結合

在對數生長期的酵母菌每分鐘約產生 2000 個核糖體，因此每分鐘至少要合成出 160000 個核糖體蛋白(Warner, 1999)。核糖體蛋白在細胞質被轉譯出來之後必須經過細胞核膜的屏障才能到達細胞核/核仁進行組裝，並且由於大部分的核糖體蛋白會與 rRNA 結合，所以會有極性較高的區域 (Basic domain)。因此核糖體蛋白在快速的轉譯作用中被製造出來的時候可能產生錯誤的摺疊，處於細胞質或細胞核質的核糖體蛋白可能因為其 Basic domain 暴露出來而不穩定，並且核糖體蛋白需要入核因子 (Importin) 的協助才能順利的通過核孔複合體進入細胞核，在組裝過程中核糖體蛋白必須以正確的構型嵌入核糖體，因此核糖體蛋白被轉譯出來到進行核糖體組裝之前，會需要許多的因子的幫助。研究指出 Importin 除了協助核糖體蛋白入核之外，也能幫助遮蔽 Basic domain (Jakes et al., 2002)。與核糖體蛋白結合的因子除了幫助摺疊的伴護子 (folding chaperon) 之外，有些因子不僅幫助核糖體蛋白的摺疊還能協助入核或是協助轉換成正確的構型進行組裝 (Binding partners) (Pausch et al., 2015)。

本篇研究顯示 Bcp1 會與 Rpl23 結合，並幫助自由態 Rpl23 的穩定。但是我們並不確定兩者是在細胞質結合之後一同入核，或是各別入核之後在細胞核才結合。雖然我們曾利用協助 Rpl23 入核的 Importin—Kap123 作為 bait 進行免疫沉澱，Kap123 與 Bcp1 也有結合，但是並不確定是 Kap123 分別與 Bcp1、Rpl23 結合，或是 Bcp1 與 Kap123 共同協助 Rpl23 入核。因此，可能需要在體外 (*in vitro*) 測試 Bcp1 是否會與 KAP123 結合，以及 Bcp1 會不會影響 Kap123 與 Rpl23 之間的結合。

Rpl23 是組成 60S 核糖體的核糖體蛋白之一，Rpl23 嵌入 60S 核糖體之後只會露出 C 端 (附錄四) (Gartmann et al., 2010; Klinge et al., 2011)，但是，由圖六 F、G 知道 Rpl23 去除 C 端 15 個胺基酸並不影響與 Bcp1 或 Rkm1 之間的結合，因此 Rpl23 可能與 Bcp1 及 Rkm1 結合的部位會埋入 60S 核糖體中，推測 Bcp1 和 Rkm1 會在 Rpl23 嵌入 60S 核糖體之後立刻離開；或是離開 Rpl23 後仍會結合於核糖體上其它的位置。

二、 Bcp1 的兩種蛋白質形式

目前知道 Bcp1 以兩種蛋白質形式存在：全長 (Full-length) 以及 bcp1 Δ n (N-terminal truncation)。在徐駿森老師實驗室所解出的 Bcp1 結構中，N 端四十個胺基酸的部分具高度自由性 (Flexible)，搭配質譜儀的結果知道 Bcp1 的 N 端被切除的範圍在第 56 個胺基酸之前。

但是目前並不曉得 Bcp1 的 N 端胺基酸是透過何種機制被去除。目前確定兩種 Bcp1 的蛋白質形式不是來自 mRNA processing 產生不同的 mRNA 片段。原因如下：當我們將來自同一瓶的菌體分成兩管，經由不同的破菌方式得到的 bcp1 Δ n 的量會不一樣。在本篇論文中幾乎都是使用玻璃珠來破菌：將菌體回溶之後移到玻璃試管，加入玻璃珠以震盪 (vortex) 的方式打破細胞，接著將破菌液轉移到 1.5 mL 的試管以 13300 rpm 在 4°C 離心十分鐘，將上清液重複離心的步驟一次，以最低的 OD₂₈₀ 值將破菌液進行標準化，最後以 5x SDS loading buffer 做成 WCE (whole cell extract) 的樣品。另一種方式是將菌體直接加入 0.2 N NaOH 在室溫反應五分鐘，接著以 13300 rpm 離心五到十分鐘，由於強鹼會使蛋白質變性，所以蛋白質會被溶出，取上清液的部分加入 5x SDS loading buffer 做成 WCE 的樣品。

將兩個樣品進行西方墨點法分析，得到的結果在以 NaOH 製成的樣品中，Bcp1 幾乎只有分子量比較大的色帶存在，也就是全長的 Bcp1，如果 Bcp1 有兩種形式的 mRNA，那麼不論是採取何種破菌方式都能偵測到兩種大小的 Bcp1，但是結果不然。我們認為使用玻璃珠破菌時，雖然有加入蛋白酶抑制劑 (PMSF 與 Leupeptin)，但是從一開始破菌到最後加入 SDS loading buffer 之間會花費至少半小時的時間，所以破菌的過程中還是蛋白酶有可能在作用，使 Bcp1 的 N 端被裁切。而使用 NaOH 會使全部的蛋白質變性，包含蛋白酶在內。所以我們推測 Bcp1 的 N 端胺基酸可能是經由蛋白酶作用剪切掉的，但是不排除在破菌過程中 Bcp1 的 N 端產生物理性斷裂。

另外，在圖九 D 可以看到一個現象：與 Rkml-myc 結合的為全長的 Bcp1，呼應了 (*in vitro*) 圖六 E 的結果，GST-Rkml 會與 Bcp1-C'HIS 結合，但是不會與 bcp1 Δ n40-C'HIS 結合。

三、 探討 Rkm1 對於 Bcp1 與 Rpl23 結合的影響

在圖七 C、D 的結果中，當 Bcp1 有缺失會造成 Rkm1 與 Rpl23 的結合量下降，雖然 Rpl23 的總量 (WCE) 並無明顯改變，但是由先前的實驗知道在 *bcp1* 突變株中自由態 Rpl23 的量會下降 (圖三 C、D)，導致 Rkm1 與自由態 Rpl23 結合量下降。

我們曾以不同的階段的核糖體生合成因子純化出 60S 核糖體，並分析其中的組成，但是未偵測到 Bcp1，因此，Bcp1 於核糖體上停留的時間也許很短暫，主要和自由態的 Rpl23 及 Rkm1 結合。但以 Arx1-TAP 作為 Bait 有偵測到 Rkm1-myc。Arx1 會與 60S 核糖體結合，並且與核孔蛋白的 FG repeats 有交互作用，因此能夠協助 60S 核糖體離開細胞核，Arx1 跟著 60S 核糖體一起進入細胞質之後，會被 Reil 以及 Jjj1 共同協助從 60S 核糖體上面被釋放下來 (Hung and Johnson, 2006; Lebreton et al., 2006; Meyer et al., 2010)。因此 Arx1 是在中後期的步驟參與 60S 核糖體生合成。所以 Rkm1 可能會與 60S 核糖體有所結合，但是需要更多實驗結果來佐證，像是偵測 Rkm1-myc 是否會存在於超高速離心之後的沉澱部分，因為核糖體複合體的分子量較大，所以 Rkm1 若與 60S 核糖體有結合，那麼超高速離心之後也會存在於沉澱的部分。或是收集經由多核糖體圖譜分析之後流出來的樣品 (Fraction)，以西方墨點法分析 Rkm1 會不會在與 60S 核糖體相對應的位置出現。也可以偵測以 Rkm1-myc 作為 Bait 進行免疫沉澱的樣品中，是否有 Arx1 以及其它 60S 核糖體生合成的輔助因子存在。確認 Rkm1 是否會與 60S 核糖體有結合，以及在生合成的哪個階段結合，或許能夠幫助了解 Rpl23 是如何嵌入 60S 核糖體。

圖七 C 的結果顯示，在缺少 Bcp1 時 Rkm1-myc 與 Rpl23 的結合量會下降，並且缺少 Rpl23 時 Rkm1-myc 與 Bcp1 的結合量也下降了 (圖七 A、B)，顯示 Bcp1、Rpl23 及 Rkm1 三者共同存在時，應是較穩定的結合態。但是缺少 Rkm1 對於 Bcp1 與 Rpl23 之間的結合量沒有明顯影響 (圖七 E)，可能是因為 *RKM1* 非必需基因，且 *rkm1* Δ 沒有明顯的生長缺失 (圖五 B)，所以結果沒有明顯差異。

此外，Rkm1 為 Rpl23 的甲基轉移酶，但是 Rkm1 對 Rpl23 進行甲基化是否與三者之間的結合有關，目前也仍未知。所以針對 Bcp1 是否會影響 Rkm1 的甲基轉移酶活性進行測試，並探討 Rkm1 的甲基轉移酶活性對三者結合的影響，或許能夠幫助我們對於三者的結合在細胞中的生理意義有更清楚的認識。

四、 探討 Bcp1 與 Mss4 的結合區塊 (Domain)

利用 bcp1 突變蛋白來測試 Bcp1 與 Mss4 的結合區塊時 (圖八 A)，以 Mss4-myc 作為 Bait 會與全長的 Bcp1-GFP 結合，但是無法偵測到 bcp1 Δ c-GFP、bcp1 Δ n40-GFP 以及 bcp1nes-GFP。由圖六 C 的結果推測 Rpl23 可能會結合在 Bcp1 的 C 端，並且在缺少 Mss4 的時候 Rpl23 與 Bcp1 的結合量會下降 (圖八 B)，如果 Mss4 也是與 Bcp1 的 C 端結合，或許 Bcp1 參與在 60S 核糖體生合成以及協助 Mss4 出核這兩個路徑，可能是藉由 Rpl23 與 Mss4 競爭 Bcp1 的 C 端結合位，使 Bcp1 能在兩個路徑中轉換。所以必須進行體外 (*in vitro*) 測試才能確定 Mss4 是否會與 Rpl23 競爭 Bcp1 的 C 端結合位。

目前確定 Bcp1 藉由 N 端與 Rkm1 結合 (圖六 C、E)，如果 Mss4 能與 Bcp1 的 N 端結合，可能會跟 Rkm1 競爭結合位，但是在缺少 Mss4 的時候，對於 Bcp1 與 Rkm1 之間的結合並沒有明顯的影響 (圖八 B)。因此，同樣要進行體外 (*in vitro*) 測試才能確定 Mss4 與 Bcp1 的結合區塊，針對 Bcp1 在兩個路徑間轉換的機制進行探討。

除此之外，bcp1nes-GFP 是出核訊號的突變，出核訊號 (NES, Nuclear export signal) 是富含輸水性胺基酸—Leucine 的一段序列 (LxxxLxxLxL) (la Cour et al, 2004; Wen et al, 1995)，出核運輸蛋白 (Exportin) 會辨識 NES 訊號，並協助帶有 NES 訊號的蛋白質離開細胞核。我們將 Bcp1 的 NES 訊號上的五個 Leucine (L85、L88、L91、L92、L93) 突變成 Alanine (圖六 B) (陳柏儒，2012)，即失去和 Mss4 的結合。可能推測原因有：Bcp1 會協助 Mss4 出核，並且兩者的結合與 Bcp1 帶有正確的 NES 訊號有關，但是我們並不曉得 Bcp1 是直接與 Mss4 結合，然後進行構型改變露出 NES 訊號；或是有其它蛋白質協助 Bcp1 進行構型改變，暴露出 NES 訊號之後再與 Mss4 結合。另一可能是此 NES 突變可能會破壞 Bcp1 的構型，而影響和 Mss4 的結合。

五、 探討 Mss4 對於 Bcp1 參與 60S 核糖體生合成的影響

目前確定 Bcp1 主要是與自由態 Rpl23 結合 (圖三 A)，並且不是與 Rpl23 的 C 端結合 (圖六 F)，所以 Rpl23 用 N 端嵌入 60S 核糖體之後 (Gartmann et al., 2010; Klinge et al., 2011)，與 Bcp1 結合的區塊可能就埋進 60S 核糖體裡面了。Bcp1 在核中和 Mss4 結合運送其出核，因此，以三聚體型式 Bcp1、Rpl23、Rkml 存在的 Bcp1，可能不能與 Mss4 結合，待 Rpl23 嵌入 60S 核糖體隱藏與 Bcp1 結合的區塊之後，Bcp1 才能與 Mss4 結合，進行協助 Mss4 出核的任務。

在 *mss4-1-GFP* 突變株的多核糖體圖譜分析 (圖八 E)，以及 40S 與 60S 核糖體的總量分析結果中 (圖八 F)，顯示 Mss4 無法正常行使功能時，會同時影響 40S 與 60S 核糖體的生合成，造成這個結果的原因仍未知。一是 Mss4 可能主動參與此嵌合的過程，協助 Bcp1 離開 60S 核糖體。另一方面，這個現象也可能來自於 Mss4 無法正常行使功能時，可能影響 PIP₃ 的前驅物 PI4,5P₂ 的合成量，使得 PI3K/AKT/mTOR signaling pathway 無法正常運作，導致核糖體的生合成缺失。

六、 Bcp1 可能在兩條路徑之間扮演調控的角色

已知 Bcp1 會協助 Mss4 (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) 離開細胞核，Mss4 的功能是將細胞膜上的 PI4P 磷酸化成 PI4,5P₂，而 PI4,5P₂ 是細胞中重要的信息傳遞因子 PIP₃ 的前驅物。在本篇研究中得知 Bcp1 作為 Rpl23 的伴護子會參與 60S 核糖體的生合成，其中 Rpl23 是在細胞核仁的部分嵌入 60S 核糖體。另一方面，Bcp1 會幫助 Mss4 離開細胞核，使 Mss4 能到達細胞膜執行其功能(Audhya and Emr, 2003)。綜合以上，Bcp1 與不同途徑的兩個蛋白質都有所結合。但是 Bcp1 是如何離開 Rpl23 然後與 Mss4 結合，其轉換的機制仍需要近一步的實驗才能知道。並且 Bcp1 參與在兩條路徑中，可能扮演著調控兩條路徑角色。

陸、 參考文獻



- 丁亞涵 (2014). Bcp1、Rpl23 及 Sqt1 形成的小複合體於核糖體生合成的功能研究 Functional characterization of the small complex containing Bcp1, Rpl23, and Sqt1 in ribosome biogenesis. 農業化學系. 碩士論文. 國立臺灣大學, 台北.
- 陳柏儒 (2012). Bcp1 蛋白在出芽酵母中核糖體生合成途徑之研究 Bcp1 is a protein involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. 農業化學系. 碩士論文. 國立臺灣大學, 台北.
- Audhya, A., and Emr, S.D. (2003). Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* 22, 4223-4236.
- Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Molecular cell* 8, 517-529.
- Botstein, D., Chervitz, S.A., and Cherry, J.M. (1997). Yeast as a model organism. *Science* 277, 1259-1260.
- Bradatsch, B., Katahira, J., Kowalinski, E., Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgartel, V., Boese, G., Bassler, J., Wild, K., *et al.* (2007). Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Molecular cell* 27, 767-779.
- Chadrin, A., Hess, B., San Roman, M., Gatti, X., Lombard, B., Loew, D., Barral, Y., Palancade, B., and Doye, V. (2010). Pom33, a novel transmembrane nucleoporin required for proper nuclear pore complex distribution. *The Journal of cell biology* 189, 795-811.
- Ciganda, M., and Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2, 523-533.
- Cmarko, D., Smigova, J., Minichova, L., and Popov, A. (2008). Nucleolus: the ribosome factory. *Histology and histopathology* 23, 1291-1298.
- Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.C., Greenblatt, J.F., Spencer, F., Holstege, F.C., Weissman, J.S., and Krogan, N.J. (2007). Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6, 439-450.
- Degenhardt, R.F., and Bonham-Smith, P.C. (2008). Transcript profiling demonstrates absence of dosage compensation in *Arabidopsis* following loss of a single RPL23a paralog. *Planta* 228, 627-640.
- Dinman, J.D. (2009). The eukaryotic ribosome: current status and challenges. *The Journal of biological chemistry* 284, 11761-11765.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.
- Dunbar, D.A., Dragon, F., Lee, S.J., and Baserga, S.J. (2000). A nucleolar protein related to ribosomal protein L7 is required for an early step in large ribosomal subunit biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13027-13032.
- Fatica, A., Cronshaw, A.D., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2002). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Molecular cell* 9, 341-351.
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Current opinion in cell biology*

14, 313-318.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annual review of biochemistry* 67, 481-507.

Gadal, O., Strauss, D., Petfalski, E., Gleizes, P.E., Gas, N., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). Rlp7p is associated with 60S preribosomes, restricted to the granular component of the nucleolus, and required for pre-rRNA processing. *The Journal of cell biology* 157, 941-951.

Gartmann, M., Blau, M., Armache, J.P., Mielke, T., Topf, M., and Beckmann, R. (2010). Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* 285, 14848-14851.

Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.

Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.

Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* 350, 87-96.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.

Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., *et al.* (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Molecular cell* 10, 105-115.

Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., *et al.* (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Molecular cell* 8, 505-515.

Hedges, J., West, M., and Johnson, A.W. (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO journal* 24, 567-579.

Henras, A.K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A., and Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 2334-2359.

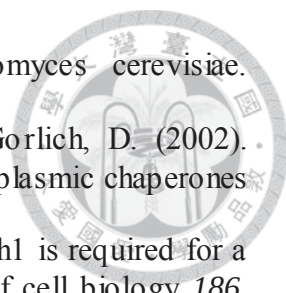
Ho, J.H., Kallstrom, G., and Johnson, A.W. (2000). Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p. *RNA* 6, 1625-1634.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.

Hoelz, A., Debler, E.W., and Blobel, G. (2011). The structure of the nuclear pore complex. *Annual review of biochemistry* 80, 613-643.

Horsey, E.W., Jakovljevic, J., Miles, T.D., Harnpicharnchai, P., and Woolford, J.L., Jr. (2004). Role of the yeast Rpl1 protein in the dynamics of pre-ribosome maturation. *RNA* 10, 813-827.

Hung, N.J., and Johnson, A.W. (2006). Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal



subunit-associated factor Arx1 depends on Reil in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 26, 3718-3727.

Jakel, S., Mingot, J.M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., and Gorlich, D. (2002). Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *The EMBO journal* 21, 377-386.

Kemmler, S., Occhipinti, L., Veisu, M., and Panse, V.G. (2009). Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *The Journal of cell biology* 186, 863-880.

Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* 334, 941-948.

Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.

Krogan, N.J., Peng, W.T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., *et al.* (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Molecular cell* 13, 225-239.

la Cour, T., Kiemer, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 17, 527-536.

Lebreton, A., Saveanu, C., Decourty, L., Rain, J.C., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2006). A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *The Journal of cell biology* 173, 349-360.

Lindstrom, M.S. (2009). Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation. *Biochemical and biophysical research communications* 379, 167-170.

Martin, T.F. (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annual review of cell and developmental biology* 14, 231-264.

Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology* 19, 560-567.

Meyer, A.E., Hoover, L.A., and Craig, E.A. (2010). The cytosolic J-protein, Jjj1, and Reil function in the removal of the pre-60 S subunit factor Arx1. *The Journal of biological chemistry* 285, 961-968.

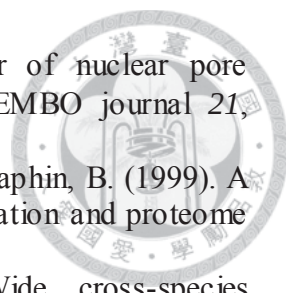
Moy, T.I., and Silver, P.A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes & development* 13, 2118-2133.

Moy, T.I., and Silver, P.A. (2002). Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *Journal of cell science* 115, 2985-2995.

Nissan, T.A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *The EMBO journal* 21, 5539-5547.

Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2004). A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes & development* 18, 196-209.

Pausch, P., Singh, U., Ahmed, Y.L., Pillet, B., Murat, G., Altegoer, F., Stier, G., Thoms, M., Hurt, E., Sinning, I., *et al.* (2015). Co-translational capturing of nascent ribosomal proteins by their dedicated chaperones. *Nat Commun* 6, 7494.

- 
- Ribbeck, K., and Gorlich, D. (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *The EMBO journal* 21, 2664-2671.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17, 1030-1032.
- Ripmaster, T.L., Shiba, K., and Schimmel, P. (1995). Wide cross-species aminoacyl-tRNA synthetase replacement in vivo: yeast cytoplasmic alanine enzyme replaced by human polymyositis serum antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4932-4936.
- Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2009). Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Current opinion in cell biology* 21, 435-443.
- Saveanu, C., Biennu, D., Namane, A., Gleizes, P.E., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *The EMBO journal* 20, 6475-6484.
- Schafer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Bottcher, B., Aebi, U., and Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* 441, 651-655.
- Senger, B., Lafontaine, D.L., Graindorge, J.S., Gadai, O., Camasses, A., Sanni, A., Garnier, J.M., Breitenbach, M., Hurt, E., and Fasiolo, F. (2001). The nucleolar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Molecular cell* 8, 1363-1373.
- Strasser, K., Bassler, J., and Hurt, E. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *The Journal of cell biology* 150, 695-706.
- Takenawa, T., and Itoh, T. (2001). Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1533, 190-206.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* 33, 261-311.
- Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* 24, 437-440.
- Wehner, K.A., Gallagher, J.E., and Baserga, S.J. (2002). Components of an interdependent unit within the SSU processome regulate and mediate its activity. *Molecular and cellular biology* 22, 7258-7267.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., and Taylor, S.S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82, 463-473.
- West, M., Hedges, J.B., Chen, A., and Johnson, A.W. (2005). Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits. *Molecular and cellular biology* 25, 3802-3813.
- Wood, L.C., Ashby, M.N., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (1999). Cloning of murine translation initiation factor 6 and functional analysis of the homologous sequence YPR016c in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 274, 11653-11659.
- Yao, W., Roser, D., Kohler, A., Bradatsch, B., Bassler, J., and Hurt, E. (2007). Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Molecular cell* 26, 51-62.
- Yu, H., Braun, P., Yildirim, M.A., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., Hirozane-Kishikawa, T., Gebreab, F., Li, N., Simonis, N., et al. (2008). High-quality

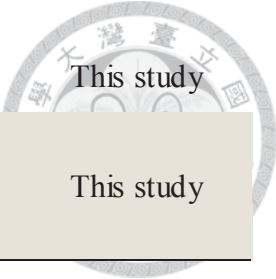
binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* 322, 104-110.

Zemp, I., and Kutay, U. (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS letters* 581, 2783-2793.

Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M.P., Hiley, S.L., Hughes, T., and Woolford, J.L., Jr. (2007). Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes & development* 21, 2580-2592.

表一、本實驗所使用之酵母菌菌株

Strain #	Target	Genotype	Source
KLY2	wildtype	BY4741 MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY6	MSS4-GFP	SEY6210 <i>mss4Δ::HIS3MX6</i> carrying pRS415 MSS4-GFP (URA3 CEN MSS4-GFP)	(Audhya and Emr, 2003)
KLY14	<i>mss4-1-GFP</i>	SEY6210 <i>mss4Δ::HIS3MX6</i> carrying pRS415 <i>mss4-1-GFP</i> (LEU2 CEN <i>mss4-1-GFP</i>)	(Audhya and Emr, 2003)
KLY46	PJ69-4A	MATa <i>trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ Met2::GAL7-lacZ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2</i>	James et al., 1996
KLY106	<i>bcp1ts</i>	BY4741 MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bcp1Δ::KanMX</i> carrying pRS416 <i>bcp1ts</i> (URA3 CEN)	This study
KLY157	<i>bcp1ts</i>	BY4741 MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bcp1Δ::KanMX</i> carrying pRS415 <i>bcp1ts</i> (LEU2 CEN)	This study
KLY180	<i>bcp1ts</i>	BY4741 MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bcp1Δ::KanMX</i> carrying pRS413 <i>bcp1ts</i> (HIS3 CEN)	This study
KLY278	<i>rkm1Δ</i>	BY4741 MATa <i>rkm1Δ::KanMX his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY317	ARX1-TAP	BY4741 MATa ARX1-TAP::HIS3MX <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY471	BRX1-TAP	BY4741 MATa BRX1-TAP::HIS3MX <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY475	LOC1-TAP	BY4741 MATa LOC1-TAP::HIS3MX <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY550	GAL::RPL23	BY4741 MATa <i>rpl23aΔ::KanMX rpl23bΔ::KanMX</i> carrying GAL::RPL23A (HIS3 CEN)	This study
KLY585	NUG1-TAP	BY4741 MATa NUG1-TAP::HIS3MX <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY598	SSF1-TAP	BY4741 MATa SSF1-TAP::HIS3MX <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open biosystem
KLY635	GAL::RPL23 RKM1-GFP	BY4741 MATa RKM1-GFP::HIS3MX <i>rpl23aΔ::KanMX rpl23bΔ::KanMX</i> carrying GAL::RPL23A (URA3 CEN)	This study
KLY743	GAL::BCP1-HA	BY4741 MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bcp1Δ::KanMX</i> carrying pRS413 GAL::BCP1-HA (PKL484 HIS3 CEN)	This study
KLY754	GAL::BCP1	BY4741 MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bcp1Δ::KanMX</i> carrying pRS413 GAL::BCP1 (PKL493 HIS3 CEN)	This study
KLY797	<i>tet:WT</i> RKM1-GFP	MATa RKM1-GFP::HIS3MX URA3:CMV- <i>tTA his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i>	This study



KLY800	<i>tet:mss4</i> <i>RKM1-GFP</i>	<i>MATa RKM1-GFP::HIS3MX tet:Mss4</i> <i>URA3:CMV-tTA his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> <i>BY4741 MATa bcp1Δ::NatMX</i>	This study
KLY826	<i>bcp1ts rkm1Δ</i>	<i>rkm1Δ::KanMX MATa his3Δ1 leu2Δ0</i> <i>met15Δ0 ura3Δ0 carrying pRS415 bcp1ts</i> (<i>URA CEN</i>)	This study

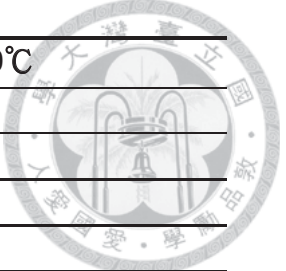
表 二、本實驗所使用之質體

Plasmid #	GENE	Origin	Yeast Marker	E.coli marker	Source
PKL1	<i>pRS423</i>	2 μ	<i>HIS3</i>	Amp	Open biosystem
PKL5	<i>pRS413</i>	<i>CEN</i>	<i>HIS3</i>	Amp	Open biosystem
PKL7	<i>pRS415</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	Open biosystem
PKL8	<i>pRS416</i>	<i>CEN</i>	<i>URA3</i>	Amp	Open biosystem
PKL23	<i>pGAD C1</i>	2 μ	<i>LEU2</i>	Amp	Open biosystem
PKL29	<i>pGBDU C1</i>	2 μ	<i>URA3</i>	Amp	Open biosystem
PKL39	<i>N'HIS-BCP1-C'HIS</i>			Kan	This study (Ho et al., 2000;
PKL62	<i>NMD3-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	Hung and Johnson, 2006)
PKL101	<i>BCP1-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL102	<i>bcp1Δc-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL103	<i>bcp1Δnls-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL104	<i>bcp1nes-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL105	<i>BCP1-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL106	<i>bcp1Δc-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL107	<i>bcp1Δnls-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL108	<i>bcp1nes-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL112	<i>bcp1Δn40-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>URA3</i>	Amp	This study
PKL118	<i>bcp1Δn40-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL120	<i>RPL23A</i>	2 μ	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL121	<i>RPL23B</i>	2 μ	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL160	<i>TIF6-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	(Hung and Johnson, 2006)
PKL183	<i>AD-BCP1</i>	2 μ	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL187	<i>BD-BCP1</i>	2 μ	<i>URA3</i>	Amp	This study
PKL228	<i>RPL11B-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL231	<i>AD-YIP3</i>	2 μ	<i>LEU2</i>	Amp	黃偉邦老師
PKL232	<i>BD-YIP3</i>	2 μ	<i>URA3</i>	Amp	黃偉邦老師
PKL236	<i>N'HIS-RPL23</i>			Kan	This study
PKL253	<i>AD-RPL23A(-intron)</i>	2 μ	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL254	<i>BD-RPL23A(-intron)</i>	2 μ	<i>URA3</i>	Amp	This study
PKL300	<i>GAL::RPL23</i>	<i>CEN</i>	<i>URA3</i>	Amp	This study
PKL303	<i>bcp1ts-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL310	<i>bcp1ts-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL340	<i>bcp1ctr-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL341	<i>bcp1ctr-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL346	<i>Rpl23 (no tag)</i>			Amp	This study
PKL354	<i>bcp1#148-GFP</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study

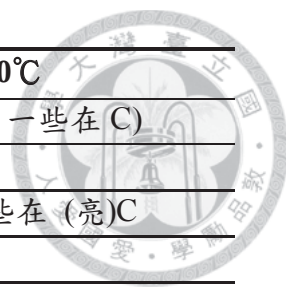
PKL370	<i>bcp1#94-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL371	<i>bcp1#96-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL372	<i>bcp1#148-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL373	<i>bcp1#152-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL374	<i>bcp1#162-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL375	<i>bcp1#171-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL388	<i>pGEX-4T3</i>			Amp	Open biosystem
PKL484	<i>GAL::BCP1-HA</i>	<i>CEN</i>	<i>HIS3</i>	Amp	This study
PKL502	<i>BCP1-C'HIS</i>			Amp	This study
PKL519	<i>GST-RKM1</i>			Amp	This study
PKL522	<i>RKM1</i>	<i>2μ</i>	<i>HIS3</i>	Amp	This study
PKL523	<i>rpl23Δc</i> (no tag)			Amp	This study
PKL531	<i>RKM1-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>LEU2</i>	Amp	This study
PKL538	<i>bcp1Δn40-C'HIS</i>			Amp	This study
PKL539	<i>MSS4-13myc</i>	<i>CEN</i>	<i>URA3</i>	Amp	This study

表 三、各 *bcp1* 突變株的生長表現及螢光分布

編號	5FOA (30°C)	Leu ⁻ (37°C)	GFP 30°C*
PC	-	-	N
4	0	小顆	無
5	X	X	N&C (弱)
8	少	小顆	正常細胞：無； 有顆粒：很亮
9	小顆	有大有小	N
10	X	X	N&C (螢光較弱)
11	X	X	N&C
13	0	小顆	N&C (螢光較弱，細胞有凹凸顆粒)
17	X	X	C
24	少	小顆	N (有些無螢光)
25	少	X	N
29	X	X	C (弱)
30	X	X	N (弱)
31	少	X	N
33	少	小顆	C (弱；有些亮)
39	0	X	C (弱) : N&C (亮) = 2:1
40	0	有大有小	N (亮，但是迅速移動至 C)
41	少	小顆	暗，觀察到 N 移動至 C
42	小顆	X	N (亮)
44	少	X	N (亮)
46	少	X	N (亮)
49	0	X	N 也有 N&C
51	少	小顆	N
52	0	小顆	暗
55	0	X	暗
57	小顆	小顆	暗
59	少	少	N
61	0	小顆	暗
63	小顆	小顆	C (亮)
64	0	小顆	N (亮) 有的無螢光
65	小顆	小顆	暗
68	小顆	小顆	暗 (一些在 N)
69	小顆	小顆	N
70	少	小顆	N
71	0	小顆	暗 (一些在 N)
75	X	小顆	暗



編號	5FOA (30°C)	Leu ⁻ (37°C)	GFP 30°C
76	少	有大有小	N
78	少	有大有小	N
80	小顆	有大有小	暗
86	小顆	0	N
88	0	小顆	無
100	少	X	無
103	0	X	N (弱) 有的無螢光
103	0	X	N (弱) 有的無螢光
89	少	少	無
91	少	小顆	N
92	小顆	小顆	N
93	小顆	小顆	無
94	少	小顆	N
96	小顆	小顆	N
105	小顆&少	小顆	X (一些在 N)
106	小顆	有大有小	X
111	少	X	X (一些在 N)
112	小顆	有大有小	N
113	少	有大有小	X
114	X	小顆	X
117	少	有大有小	N
118	0	有大有小	X
120	0	有大有小	X
121	0	有大有小	X
127	0	有大有小	N
129	X	有大有小	X
131	少	0	暗 (一些在 N 一些在 C)
135	小顆	有大有小	一些在 N 一些在 C
138	少	有大有小	X
140	少	有大有小	X
141	有大有小	有大有小	暗
142	少	少	N
143	X	少	X
146	X	有大有小	暗 (C 少部分在 N)
148	小顆&少	少	N (暗)
149	X	少	暗 (一些在 N 一些在 C)
150	0	有大有小	X
151	少	有大有小	N



編號	5FOA (30°C)	Leu ⁻ (37°C)	GFP 30°C
152	小顆	0	暗 (一些在 N 一些在 C)
154	少	有大有小	N
157	0	有大有小	一些在 N 一些在 (亮)C
160	X	少	X
162	少	有大有小	N
164	X	有大有小	N
165	少	有大有小	X
166	有大有小	有大有小	N
168	0	小顆	N
169	少	少	X
170	0	有大有小	X
171	0	有大有小	一些在 N 一些在 (亮)C
174	0	有大有小	X
175	少	有大有小	一些在 (亮)N 一些在 C
177	0	少且 30°C 少	N

註解：

5FOA 中 X 表示沒有生長，0 表示生長情形良好，而-表示沒有測試。

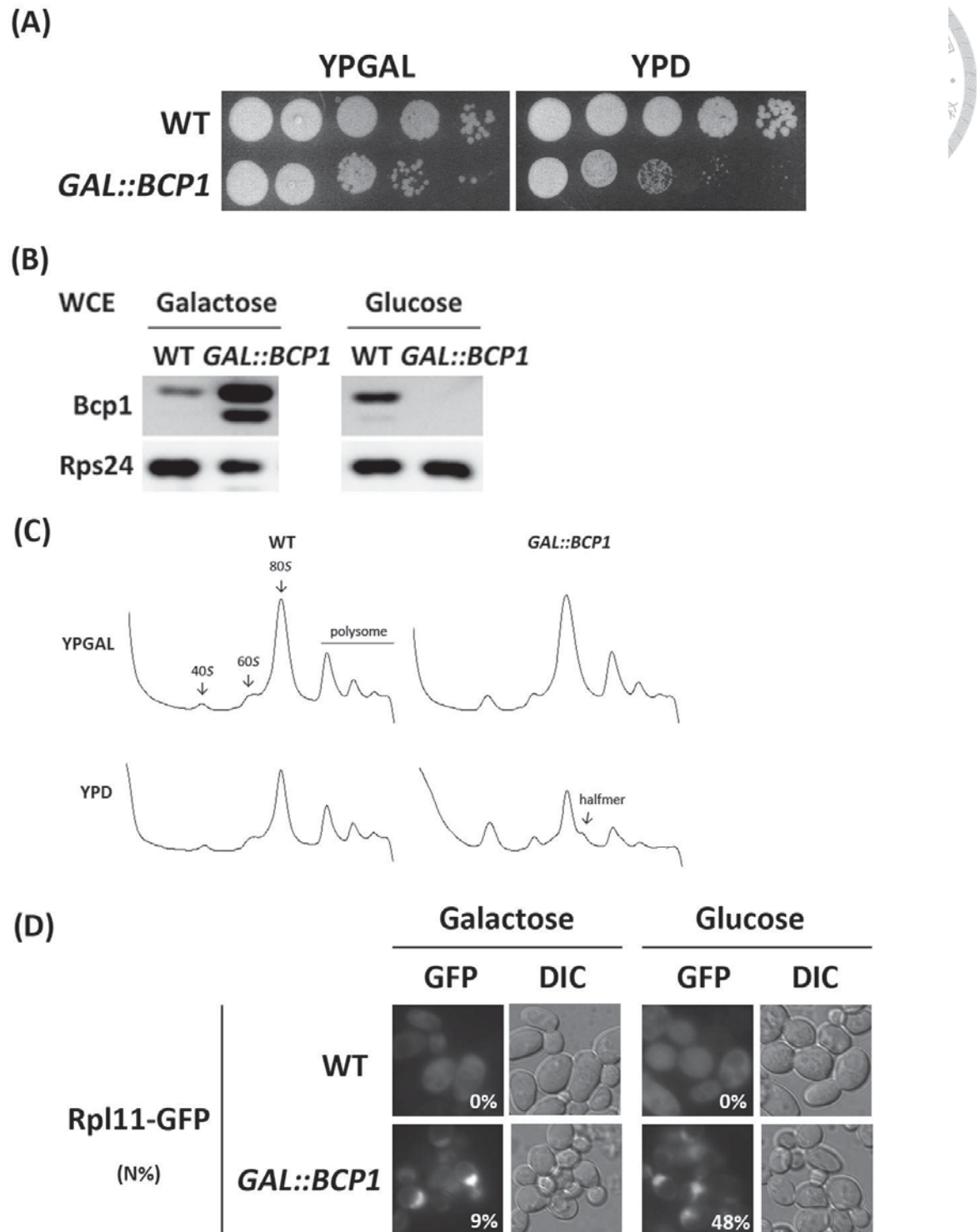
Leu⁻ (37°C) 中 X 表示有生長但是最多長到第二區，0 表示生長情形良好。

GFP 中 N 代表 bcp1 多分布於細胞核，C 表示分布於細胞質。

表 四、*bcp1* 突變株定序結果

Bcp1 mutant number	Mutation sites in amino acid sequence
<i>bcp1</i> #49	216Glu→Lys
<i>bcp1</i> #94	28Glu→Lys 47Glu→Lys
<i>bcp1</i> #96	9Asp→Asn 61Glu→Lys 79Glu→Lys
<i>bcp1</i> #148	67Leu→Ser 77 Pro→Phe
<i>bcp1</i> #152	No mutations. Junction is confused
<i>bcp1</i> #162	No mutations. Junction is confused
<i>bcp1</i> #171	236Glu→Lys





圖一、*BCP1* 參與 60S 核糖體生合成

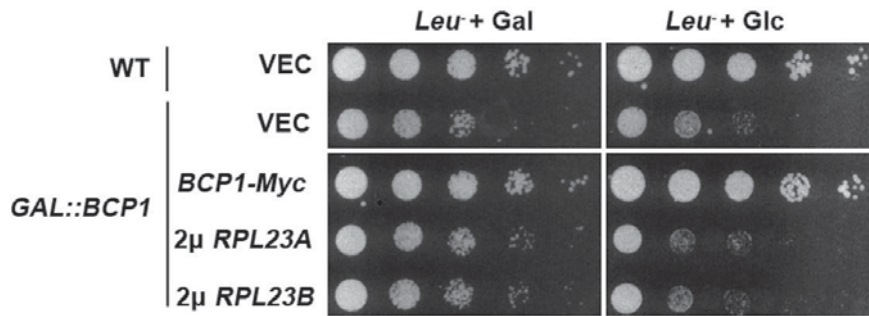
(A) 將 KLY2 (WT)、KLY754 (*GAL::BCP1*) 以 2 mL YPGal 於 30°C 震盪培養隔夜，於 YPGal 以及 YPD 的培養基上，在 30°C 培養一到兩天。(B) 將含有 PKL531 (*RKM1-Myc CEN LEU2*) 質體的 KLY2 (WT)、KLY754 (*GAL::BCP1*) 菌株，以 2 mL

Leu⁻Gal 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 100 mL Leu⁻Gal 或 Leu⁻Glc 稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀ (*GAL::BCP1* 培養 17 小時)，將菌體保存於-80°C 備用。破菌方式與免疫沉澱相同，取上清液 (WCE) 進行西方墨點法分析蛋白質含量。

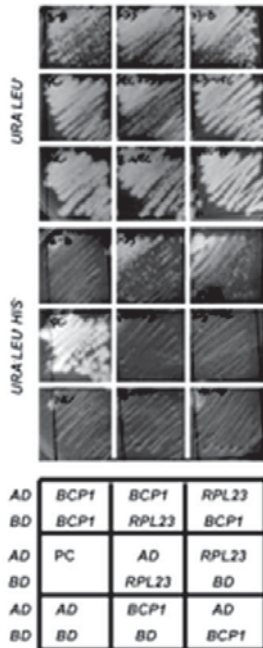
(C) 將 KLY2 (WT)、KLY754 (*GAL::BCP1*) 以 2 mL YPGal 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 150 mL YPD 或 YPGal 稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.3-0.4 OD₆₀₀ (*GAL::BCP1* 於 YPD 培養 25 小時)，加入 50 µg/mL cycloheximide 再培養十分鐘，將菌體置於-80°C 備用，進行多核糖體圖譜分析。

(D) 將 PKL228 (*RPL11B-GFP CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT)、KLY754 (*GAL::BCP1*) 菌株中，以 2 mL Leu⁻Gal 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 2 mL Leu⁻Gal 或 Leu⁻Glc 繼代培養，於 30°C 再次震盪培養隔夜，使用相同的培養液稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養兩小時之後，以螢光顯微鏡觀察 Rpl11-GFP 在細胞中的分布位置。

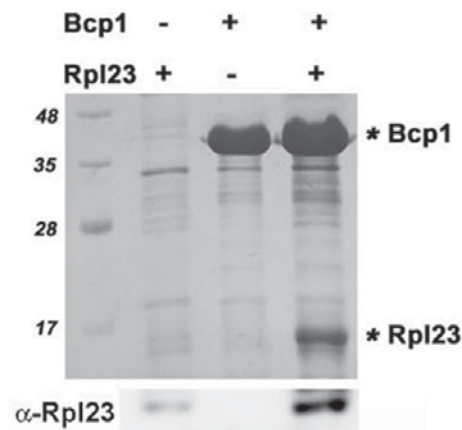
(A)



(B)



(C)

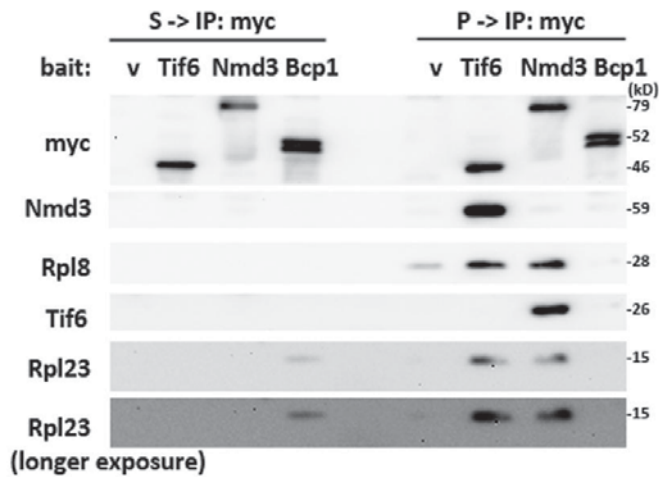


圖二、Bcp1 會與 Rpl23 結合

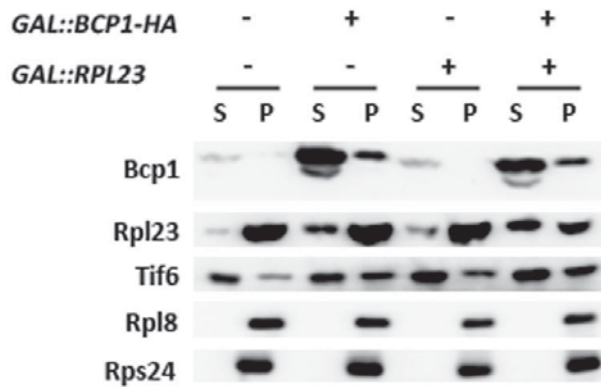
(A) 將 PKL7 (CEN *LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT), 並將 PKL7 (CEN *LEU2*)、PKL105 (*BCP1-Myc* CEN *LEU2*)、PKL120 (*RPL23A* 2μ *LEU2*)、PKL121 (*RPL23B* 2μ *LEU2*) 質體送入 KLY754 (*GAL::BCP1*) 菌株中, 以 2 mL Leu⁻Gal 於 30°C 震盪培養隔夜, 透過生長測試置於 Leu⁻Gal 以及 Leu⁻Glc 的培養基上, 在 30°C 培養二到三天。(B) 利用酵母菌雙雜合系統測試兩個蛋白質有無交互作用。在 KLY46 (*PJ694A*) 菌株中分別送入下列六個質體, 依據 AD 配 BD 兩兩配對, PKL23 (*AD-vector* CEN *LEU2*)、PKL183 (*AD-BCP1* CEN *LEU2*)、PKL253 (*AD-RPL23* CEN *LEU2*)、PKL29 (*BD-vector* CEN *URA3*)、PKL187 (*BD-BCP1* CEN *URA3*)、PKL254 (*BD-RPL23* CEN *URA3*)。培養於 Ura⁻Leu⁻Glc 培養基做為控制組, 並在 Ura⁻Leu⁻His⁻Glc 培養基中觀

察有無報導基因 (Reporter gene) 一組胺酸 (Histine) 的表現。(C) 將 PKL502 (*BCP1-C'HIS* AMP) 以及 PKL346 (*RPL23* AMP) 分別送入 *E. coli* BL21-CodonPlus (*DE3*) 菌株中。使用 LB+Amp 於 37°C 震盪培養隔夜，將 3% 菌液接入相同的培養液中，之後 *BCP1-C'HIS* 於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，加入 0.5 mM IPTG 於 30°C 低速震盪培養四到六小時；而 *RPL23* 則是在 25°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，加入 1 mM IPTG 於 25°C 低速震盪培養 16-24 小時，將菌體保存於 -80°C 備用。使用 50 mL 表現 *BCP1-C'HIS* 的菌體，以及 100 mL 表現 *RPL23* 的菌體進行 *in vitro* interaction assay，加入 20 μ L NTA-resin，最後以 30 μ L 1x SDS loading buffer 將結合在 resin 上的蛋白質溶出。

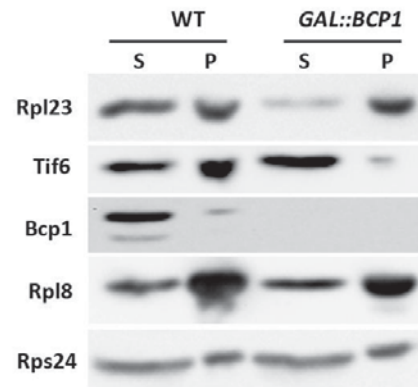
(A)



(B)



(C)



(D)

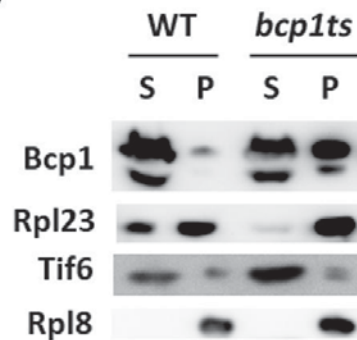


圖 三、Bcp1 為 Rpl23 的伴護子

(A) 將PKL160 (*TIF6-Myc CEN LEU2*)、PKL62 (*NMD3-Myc CEN LEU2*)、PKL105 (*BCP1-Myc CEN LEU2*) 質體送入KLY2 (WT) 菌株中，以2 mL Leu⁻Glc於30°C 震盪培養隔夜，使用250 mL Leu⁻Glc稀釋至適當濃度，在30°C 震盪培養至0.4-0.6 OD₆₀₀，將菌體保存於-80°C 備用。破菌方式與免疫沉澱相同，破菌液離心之後的上清液經由80000 rpm於4°C 離心一小時，將沉澱 (P, ribosome-bound protein) 以IP buffer回

溶，然後與上清液 (S, free protein) 分別進行免疫沉澱，以西方墨點法分析與bait結合的蛋白質有哪些。(B) 在KLY2 (WT) 菌株中同時加入兩個質體PKL5 (CEN *HIS3*) 與PKL8 (CEN *URA3*)、PKL484 (*GAL::BCP1-HA* CEN *HIS3*) 與PKL8、PKL300 (*GAL::RPL23* CEN *URA3*) 與PKL5、或是PKL484 (*GAL::BCP1-HA* CEN *HIS3*) 與PKL300 (*GAL::RPL23* CEN *URA3*)。以2 mL His⁻Ura⁻GAL於30°C 震盪培養隔夜，使用100 mL His⁻Ura⁻Raffinose稀釋至適當濃度，於30°C 震盪培養至0.2-0.3 OD₆₀₀時，加入2%半乳糖再放回30°C 震盪培養五個小時，將菌體保存於-80°C 備用。破菌方式與免疫沉澱相同，破菌液離心之後的上清液經由80000 rpm於4°C 離心一小時，分為兩部份—上清液 (S, free protein) 以及沉澱 (P, ribosome-bound protein)，將上清液以10% TCA沉澱蛋白質再以1x SDS loading buffer回溶，沉澱則直接以1x SDS loading buffer回溶。(C) 將KLY2 (WT) 與KLY754 (*GAL::BCP1*) 菌株，以2 mL YPGAL於30°C 震盪培養隔夜，使用150 mL YPD稀釋至適當濃度，於30°C 震盪培養至0.4-0.6 OD₆₀₀ (*GAL::BCP1*培養21小時)，將菌體置於-80°C 備用。後續步驟與圖三B相同。(D) 將帶有PKL8 (CEN *URA3*) 質體的KLY2 (WT) 與KLY180 (*bcp1ts*) 菌株以2 mL Ura⁻Glc於30°C 震盪培養隔夜，使用150 mL相同的培養液稀釋至適當濃度，於30°C 震盪培養至0.2-0.3 OD₆₀₀時，移到37°C 震盪培養兩個小時，將菌體置於-80°C 備用。後續步驟與圖三B相同。

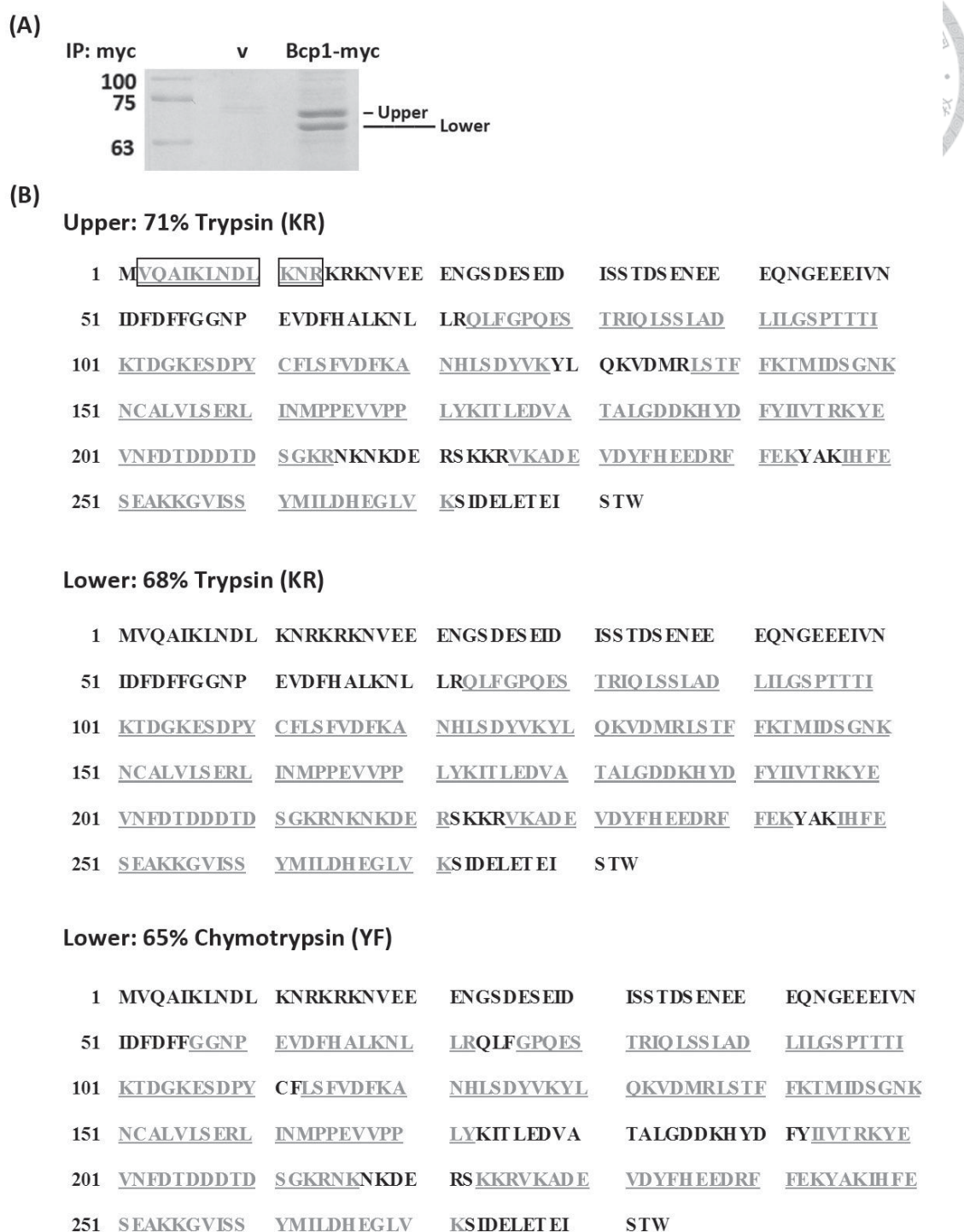


圖 四、Bcp1 具有全長以及剪切掉 N 端的兩種蛋白質型式

(A) 使用帶有 PKL7 (CEN *LEU2*) 或 PKL105 (*BCP1-Myc* CEN *LEU2*) 質體的 KLY2 (WT) 菌株進行免疫沉澱，以不含 BME 的 1x SDS loading buffer 將 CL-4B Protein A Agarose beads (GE Healthcare) 上的蛋白質溶出。將樣品以 10-11% SDS-PAGE 進行蛋白質膠體電泳，使用 Coomassie blue 染色，將 Bcp1-myc 的兩條

色帶分別切下來，分子量比較大的色帶標示為 Upper，比較小的片段標示為 Lower，置於 1.5 mL 離心管中保存於-20℃，再把樣品寄給鎂陞科技股份有限公司的 GLP 蛋白質分析實驗室，進行酵素水解與質譜儀分析。(B) Bcp1 蛋白質序列中以灰字底線標示的為質譜儀偵測到的片段，其中 Trypsin 的切位為 Arginine (R) 與 Lysine (K)，而 Chymotrypsin 的切位則為 Tyrosine (Y) 與 Phenylalanine (F)。

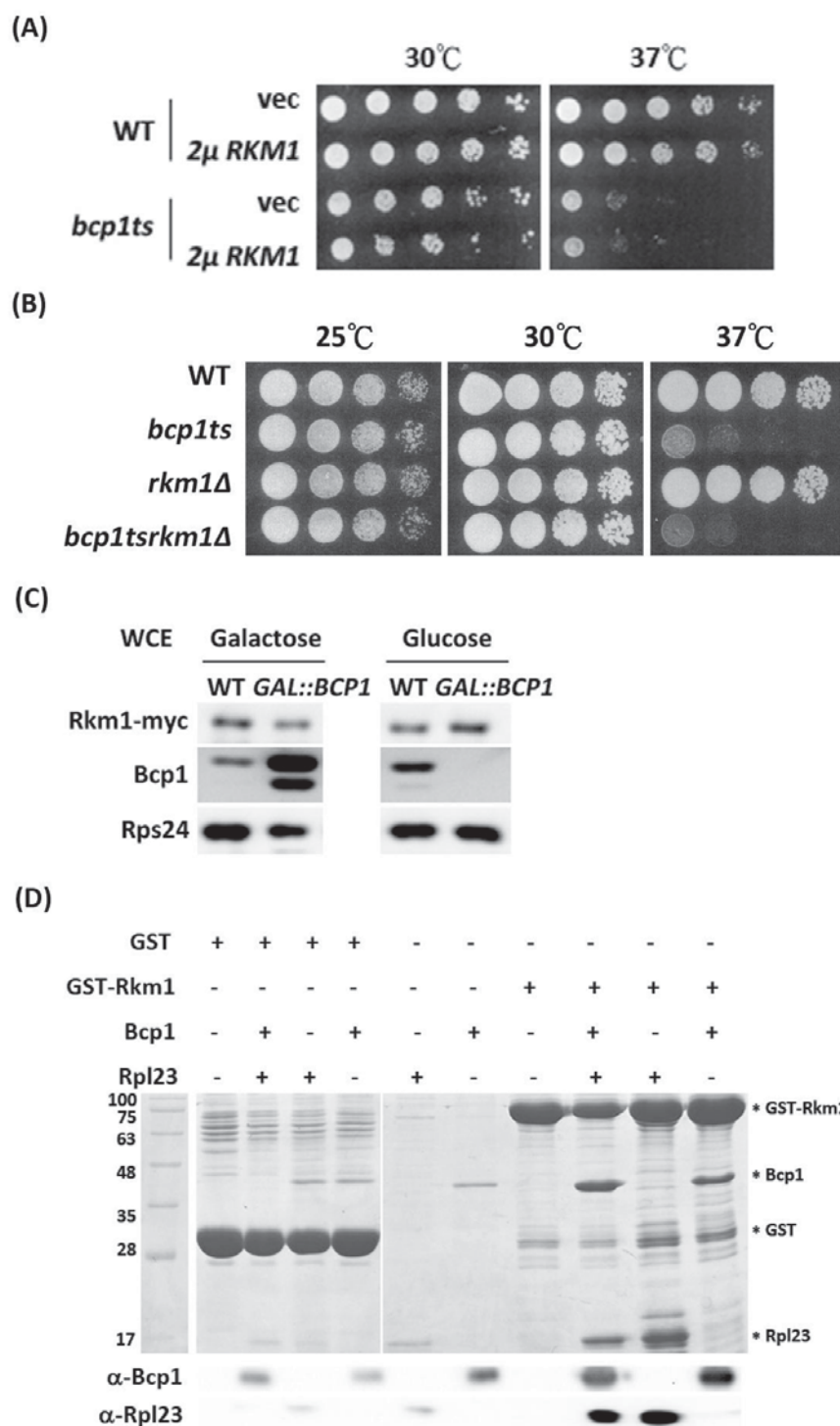
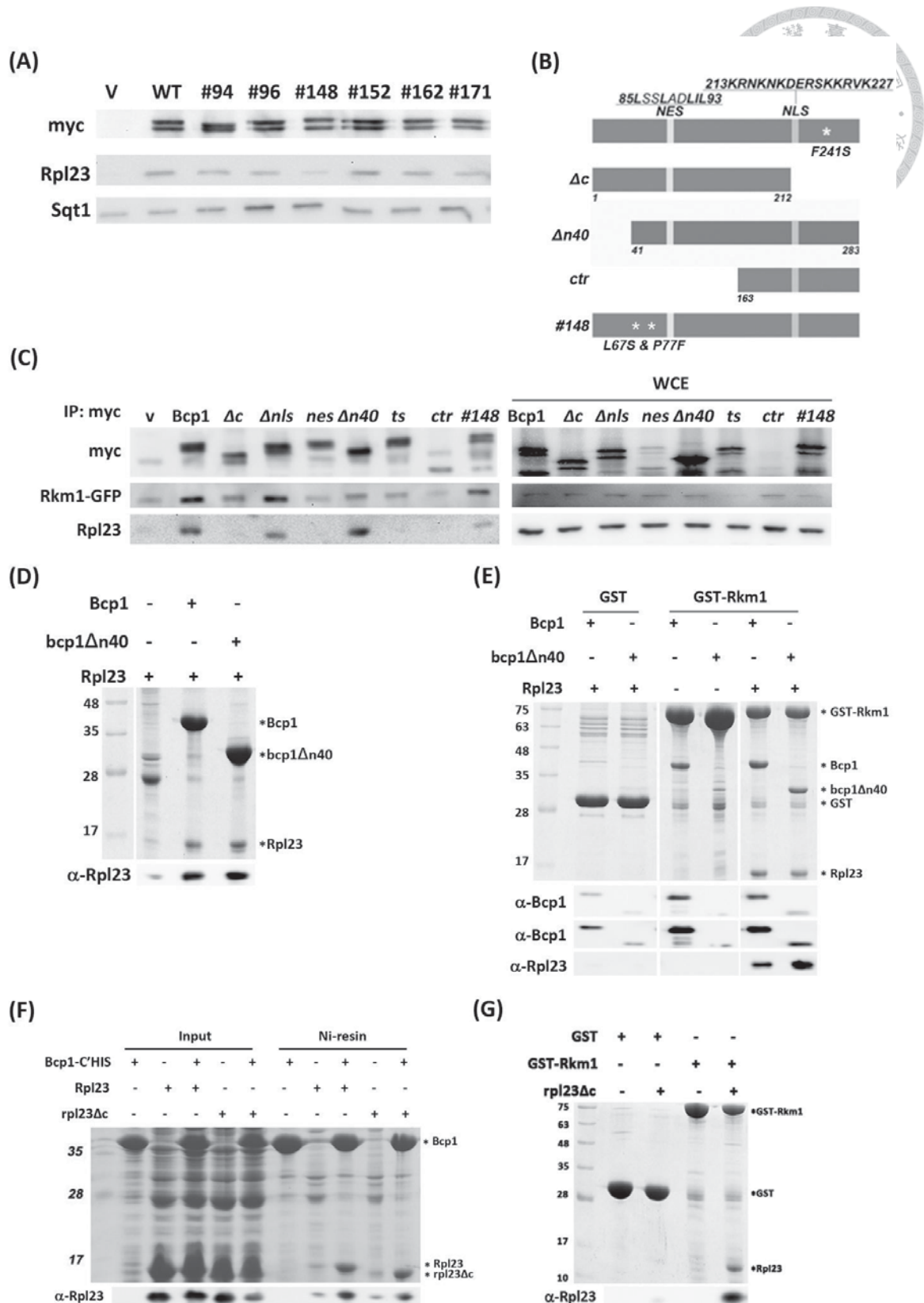


圖 五、Bcp1 會與 Rkm1 結合

(A) 將 PKL1 (2μ *HIS3*) 與 PKL522 (*RKM1* 2μ *HIS3*)質體分別送入 KLY2 (WT)以及 KLY157 (*bcp1ts*)菌株中，以 2 mL His⁻Glc 於 30°C 震盪培養隔夜，透過生長測試置於 His⁻Glc 的培養基上，在 30°C 以及 37°C 培養到二到三天。(B) 將 KLY2 (WT)、KLY181 (*bcp1ts*)、KLY278 (*rkm1Δ*) 以及 KLY 825 (*bcp1tsrkm1Δ*) 以 2 mL YPD 於

30°C 震盪培養隔夜，透過生長測試置於 YPD 的培養基上，在 30°C 以及 37°C 培養一到兩天。(C) 將 PKL531 (*RKM1-Myc CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 以及 KLY754 (*GAL::BCP1*) 菌株中，以 2 mL Leu⁻GAL 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 100 mL Leu⁻Gal 或 Leu⁻Glc 稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀ (*GAL::BCP1* 培養 17 小時)，將菌體保存於 -80°C 備用。破菌方式與免疫沉澱相同，取上清液進行西方墨點法分析蛋白質含量。(D) 將 PKL388 (*pGEX-4T3*)、PKL519 (*GST-RKM1*)、PKL502 (*BCP1-C'HIS*) 以及 PKL346 (*RPL23*) 分別送入 *E. coli* BL21-CodonPlus (*DE3*) 菌株中。PKL388 只會表現 GST-tag，其培養方式與 *BCP1-C'HIS* 相同，*BCP1-C'HIS* 以及 *RPL23* 的表現條件如圖二 C 所示。至於 *GST-RKM1* 同樣使用 LB+Amp 於 37°C 震盪培養隔夜，將 3% 菌液接入相同的培養液中，之後於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，加入 0.1 mM IPTG 於 25°C 低速震盪培養 16-24 小時，將菌體保存於 -80°C 備用。使用 10 mL 表現 *GST* 的菌體、50 mL 表現 *GST-RKM1* 的菌體、50 mL 表現 *BCP1-C'HIS* 的菌體，以及 100 mL 表現 *RPL23* 的菌體進行 *in vitro* interaction assay，加入 20 µL GST-resin，最後以 30 µL 1x SDS loading buffer 將結合在 resin 上的蛋白質溶出。



圖六、Bcp1 藉由 N 端與 Rkm1 結合

(A) 將 PKL7 (*CEN LEU2*)、PKL105 (*BCP1-myc CEN LEU2*)、PKL370 (*bcp1-myc#94 CEN LEU2*)、PKL371 (*bcp1-myc#96 CEN LEU2*)、PKL372 (*bcp1-myc#148 CEN*

LEU2)、PKL373 (*bcp1-myc#152 CEN LEU2*)、PKL374 (*bcp1-myc#162 CEN LEU2*)、PKL375 (*bcp1-myc#171 CEN LEU2*) 質體分別送入 KLY2 (WT) 菌株中，以 2 mL LeuGlc 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 200 mL 相同的培養液稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，將菌體保存於-80°C 備用。進行免液沉澱，以西方墨點法分析突變的 *bcp1* 與 Rpl23 之間的結合。(B) 突變的 *bcp1* 之胺基酸序列 (C) 將 PKL7 (*CEN LEU2*)、PKL105 (*BCP1-Myc CEN LEU2*)、PKL106 (*bcp1Δc-myc CEN LEU2*)、PKL107 (*bcp1Δnls CEN LEU2*)、PKL108 (*bcp1nes-myc CEN LEU2*)、PKL118 (*bcp1Δn40-myc CEN LEU2*)、PKL310 (*bcp1ts-myc CEN LEU2*)、PKL340 (*bcp1ctr-myc CEN LEU2*)、PKL372 (*bcp1#148-myc CEN LEU2*) 質體送入 KLY273 (*RKM1-GFP*) 菌株中，培養方式與實驗步驟與圖六 A 相同 (D) 將 PKL502 (*BCP1-C'HIS AMP*)、PKL538 (*bcp1Δn40-C'HIS AMP*) 以及 PKL346 (*RPL23 AMP*) 分別送入 *E. coli* BL21-CodonPlus (*DE3*) 菌株中。*BCP1-C'HIS* 以及 *RPL23* 的表現條件如圖二 C 所示。至於 *bcp1Δn40-C'HIS* 同樣使用 LB+Amp 於 37°C 震盪培養隔夜，將 3% 菌液接入相同的培養液中，之後於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，加入 0.1 mM IPTG 於 25°C 低速震盪培養 16-24 小時，將菌體保存於-80°C 備用。使用 50 mL 表現 *BCP1-C'HIS* 的菌體、50 mL 表現 *bcp1Δn40-C'HIS* 的菌體，以及 100 mL 表現 *RPL23* 的菌體進行 *in vitro* interaction assay，加入 20 μL NTA-resin，最後以 30 μL 1x SDS loading buffer 將結合在 resin 上的蛋白質溶出 (E) 使用的菌體與圖六 D 相同，另外 *GST* 以及 *GST-RKM1* 的表現方式則與圖五 D 相同，以 20 μL GST-resin 進行 *in vitro* interaction assay，最後以 30 μL 1x SDS loading buffer 將結合在 resin 上的蛋白質溶出 (F) 將 PKL502 (*BCP1-C'HIS*)、PKL346 (*RPL23*) 以及 PKL523 (*rpl23Δc*) 分別送入 *E. coli* BL21-CodonPlus (*DE3*) 菌株中。*BCP1-C'HIS* 以及 *RPL23* 的表現條件與圖二 C 相同，*rpl23Δc* 則與圖六 F 相同。使用 50 mL 表現 *BCP1-C'HIS* 的菌體、100 mL 表現 *RPL23* 的菌體以及 100 mL 表現 *rpl23Δc* 的菌體進行 *in vitro* interaction assay，將菌液混合好之後取一部分做成樣品 (Input)，加入 20 μL NTA-resin，最後以 30 μL 1x SDS loading buffer 將結合在 resin 上的蛋白質溶出 (G) *GST* 以及 *GST-RKM1* 的表現方式與圖五 D 相同，而 *rpl23Δc* 則是使用 LB+Amp 於 37°C 震盪培養隔夜，將 3% 菌液接入相同的培養液中，之後於 25°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，加入 0.1 mM IPTG 於 25°C 低速震盪培養 16-24 小時將菌體保存於-80°C 備用。使用 20 μL

NTA-resin 進行 in vitro interaction assay，最後以 30 μ L 1x SDS loading buffer 將結合在 resin 上的蛋白質溶出。



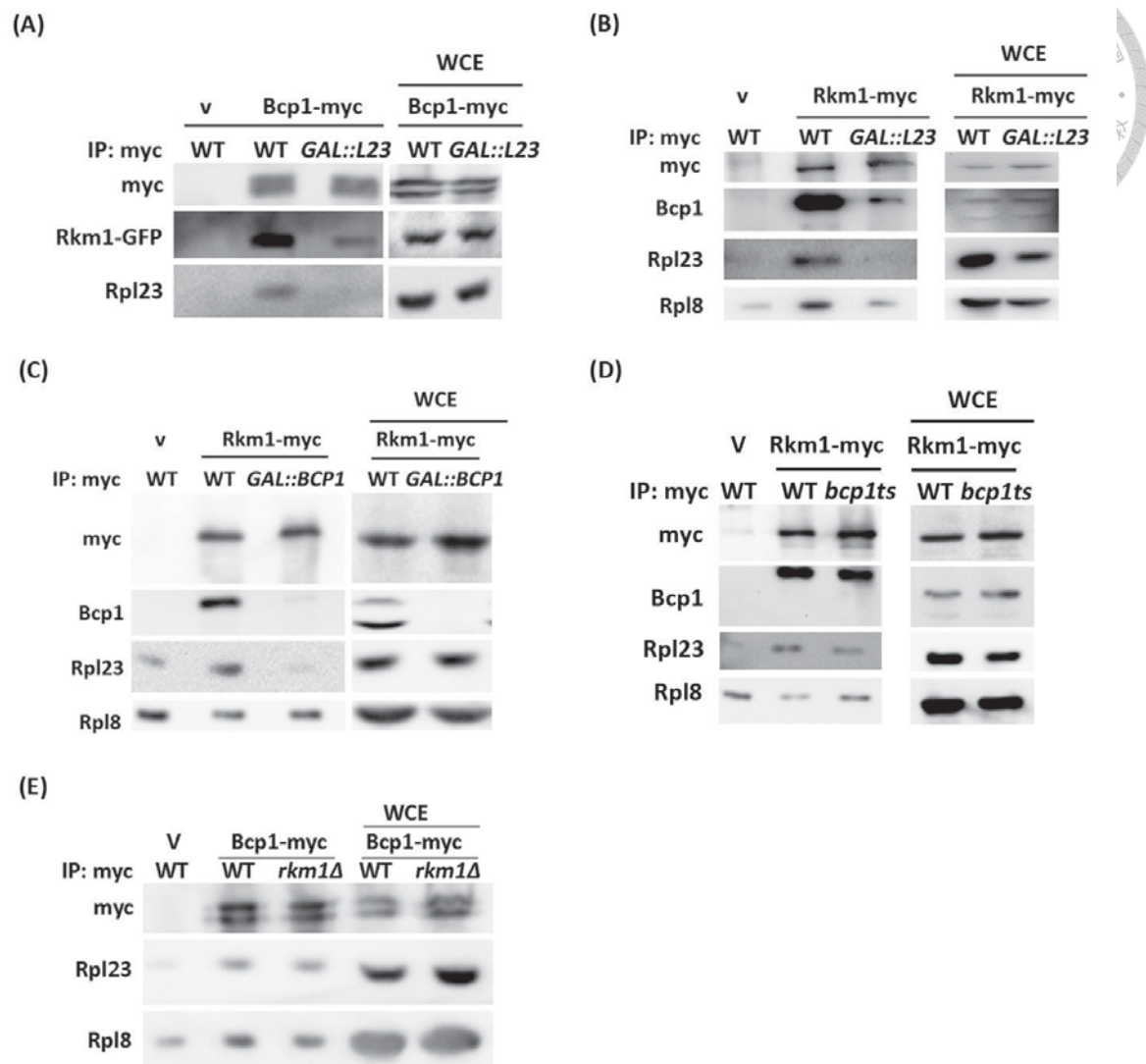


圖 七、在酵母菌中探討 Bcp1、Rpl23 與 Rkm1 對彼此之間結合的影響

(A) 將 PKL7 (*CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 菌株中，另外將 PKL105 (*BCP1-Myc CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 以及 KLY635 (*GAL::RPL23 RKM1-GFP*) 菌株中，以 2 mL Leu⁻GAL 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 200 mL 相同的培養液稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.2-0.3 OD₆₀₀ 時，加入 2% 葡萄糖於 30°C 震盪培養四個小時，將菌體保存於 -80°C 備用。進行免疫沉澱。(B) 將 PKL7 (*CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 菌株中，另外將 PKL531 (*RKM1-Myc CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 以及 KLY550 (*GAL::RPL23*) 菌株中，培養方式與實驗步驟與圖七 A 相同 (C) 將 PKL7 (*CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 菌株中，另外將 PKL531 (*RKM1-Myc CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 以及 KLY754 (*GAL::BCP1*) 菌株中，以 2 mL Leu⁻Gal 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 200 mL 相同的培養液稀釋

至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀ (*GAL::BCP1* 培養 18 小時)，將菌體置於-80°C 備用。進行免液沉澱。(D) 將 PKL7 (*CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 菌株中，另外將 PKL531 (*RKM1-Myc CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 以及 KLY180 (*bcp1ts*) 菌株中，以 2 mL Leu⁻Glc 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 200 mL 相同的培養液稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.2-0.3 OD₆₀₀ 時，移到 37°C 震盪培養兩個小時，將菌體置於-80°C 備用。進行免液沉澱。(E) 將 PKL7 (*CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 菌株中，另外將 PKL531 (*RKM1-Myc CEN LEU2*) 質體送入 KLY2 (WT) 以及 KLY278 (*rkm1Δ*) 菌株中，以 2 mL Leu⁻Glc 於 30°C 震盪培養隔夜，使用 200 mL 相同的培養液稀釋至適當濃度，於 30°C 震盪培養至 0.4-0.6 OD₆₀₀，將菌體置於-80°C 備用。進行免液沉澱。

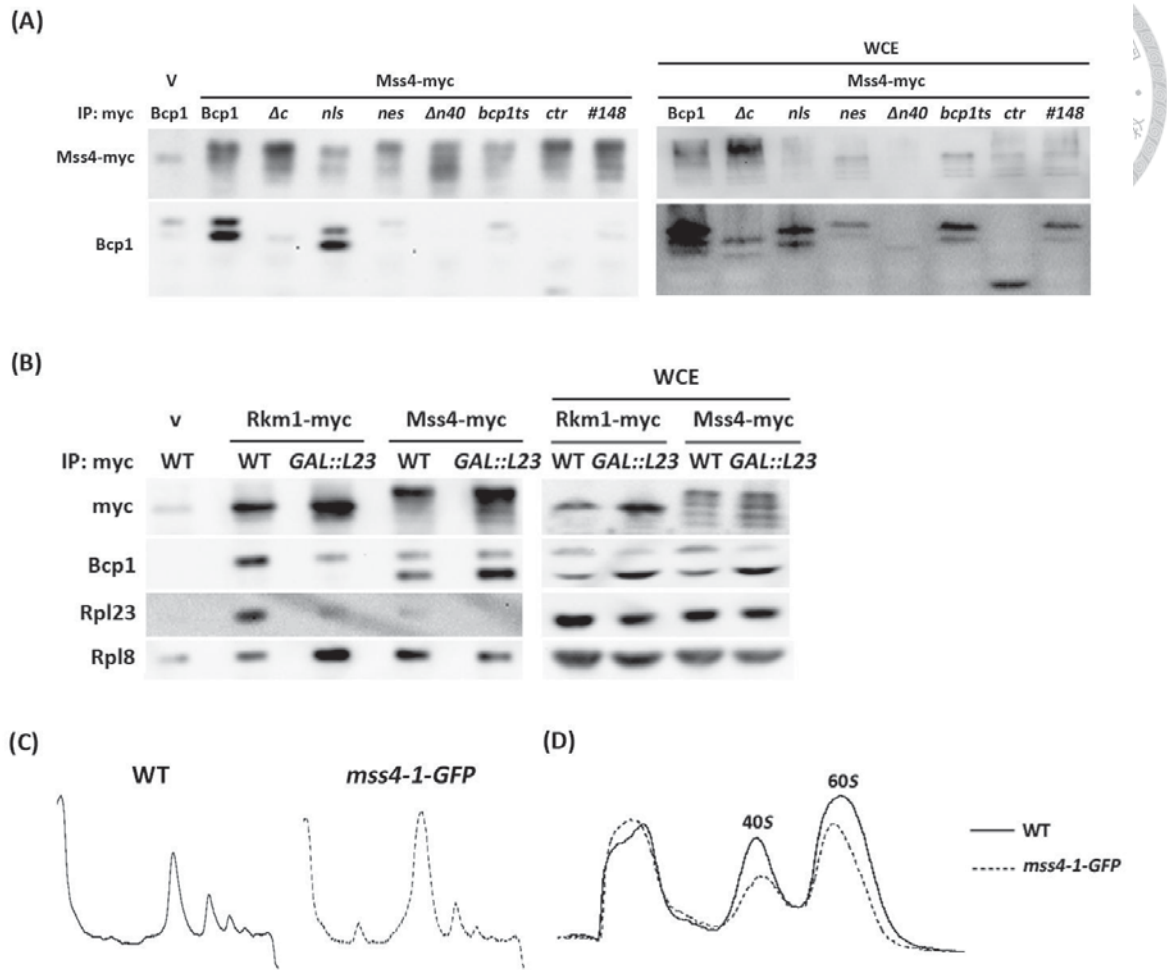
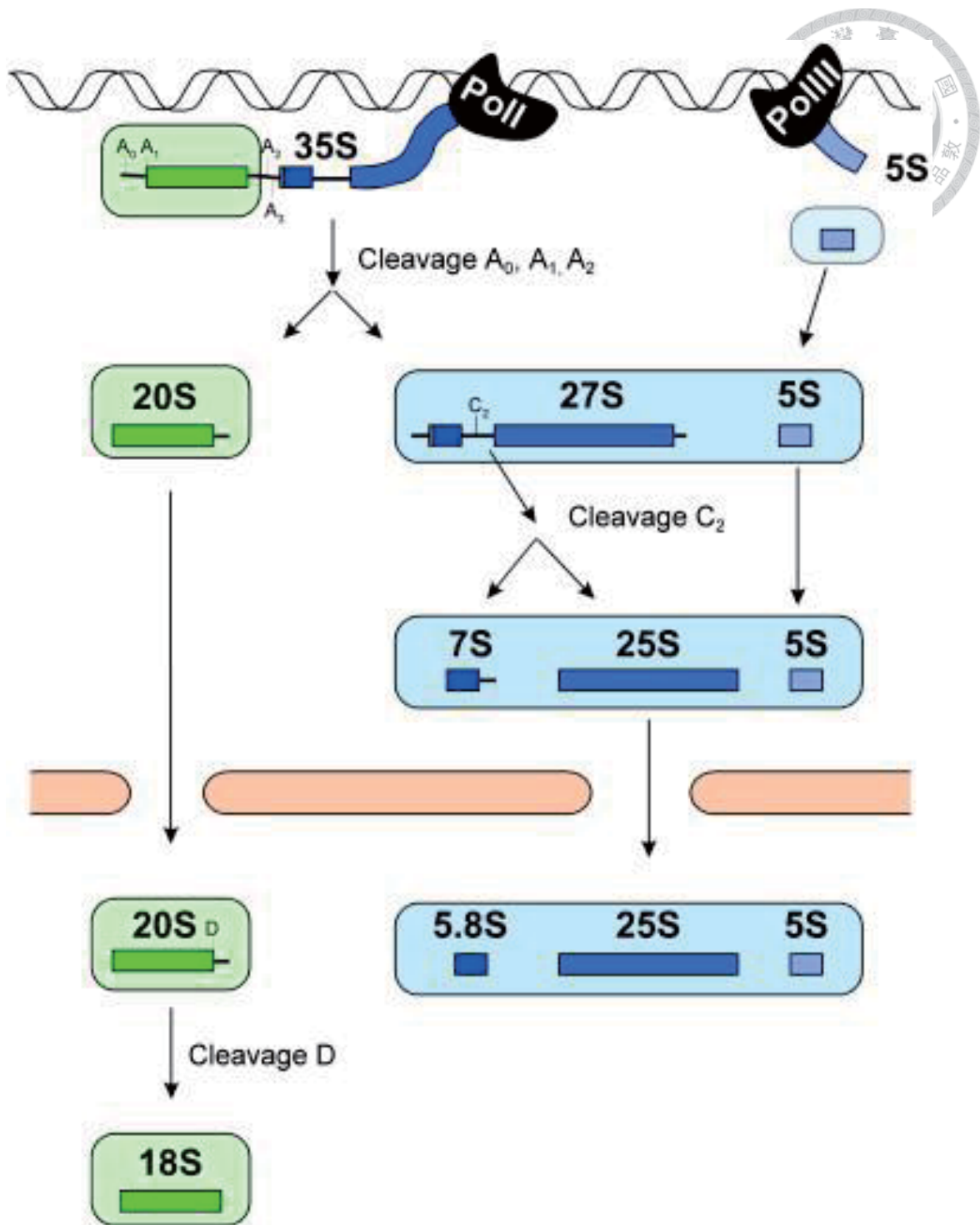


圖 八、探討 Mss4 對於 Bcp1 參與 60S 核糖體生合成的影響

(A) 將PKL7 (CEN *LEU2*) 以及PKL101 (*BCP1-GFP* CEN *LEU2*)質體送入KLY2 (WT) 菌株中，另外將PKL101 (*BCP1-GFP* CEN *LEU2*)、PKL102 (*bcp1 Δc -GFP* CEN *LEU2*)、PKL103 (*bcp1 Δnls -GFP* CEN *LEU2*)、PKL104 (*bcp1nes-GFP* CEN *LEU2*)、PKL83 (*bcp1 $\Delta n40$ -GFP* CEN *LEU2*)、PKL303 (*bcp1ts-GFP* CEN *LEU2*)、PKL341 (*bcp1ctr-GFP* CEN *LEU2*) 以及PKL354 (*bcp1#148-GFP* CEN *LEU2*) 送入含有 PKL539 (*MSS4-Myc* CEN *URA3*) 的KLY2 (WT) 菌株中，使用2 mL Ura⁻Leu⁻Glc於30°C 震盪培養隔夜，以200 mL 相同的培養液稀釋至適當濃度，於30°C 震盪培養至0.4-0.6 OD₆₀₀，將菌體置於-80°C 備用。進行免液沉澱。(B) 將PKL7 (CEN *LEU2*) 質體送入KLY2 (WT) 菌株中，另外將PKL530 (*MSS4-Myc* CEN *LEU2*) 質體送入KLY2 (WT)以及KLY550 (*GAL::RPL23*) 菌株中，培養方式與實驗步驟與圖七A相同。(C) 將KLY6 (WT)、KLY14 (*mss4-1-GFP*) 以2 mL YPD於30°C 震盪培養隔夜，使用150 mL YPD稀釋至適當濃度於30°C 震盪培養，將WT於0.1-0.15 OD₆₀₀時移到37°C 震

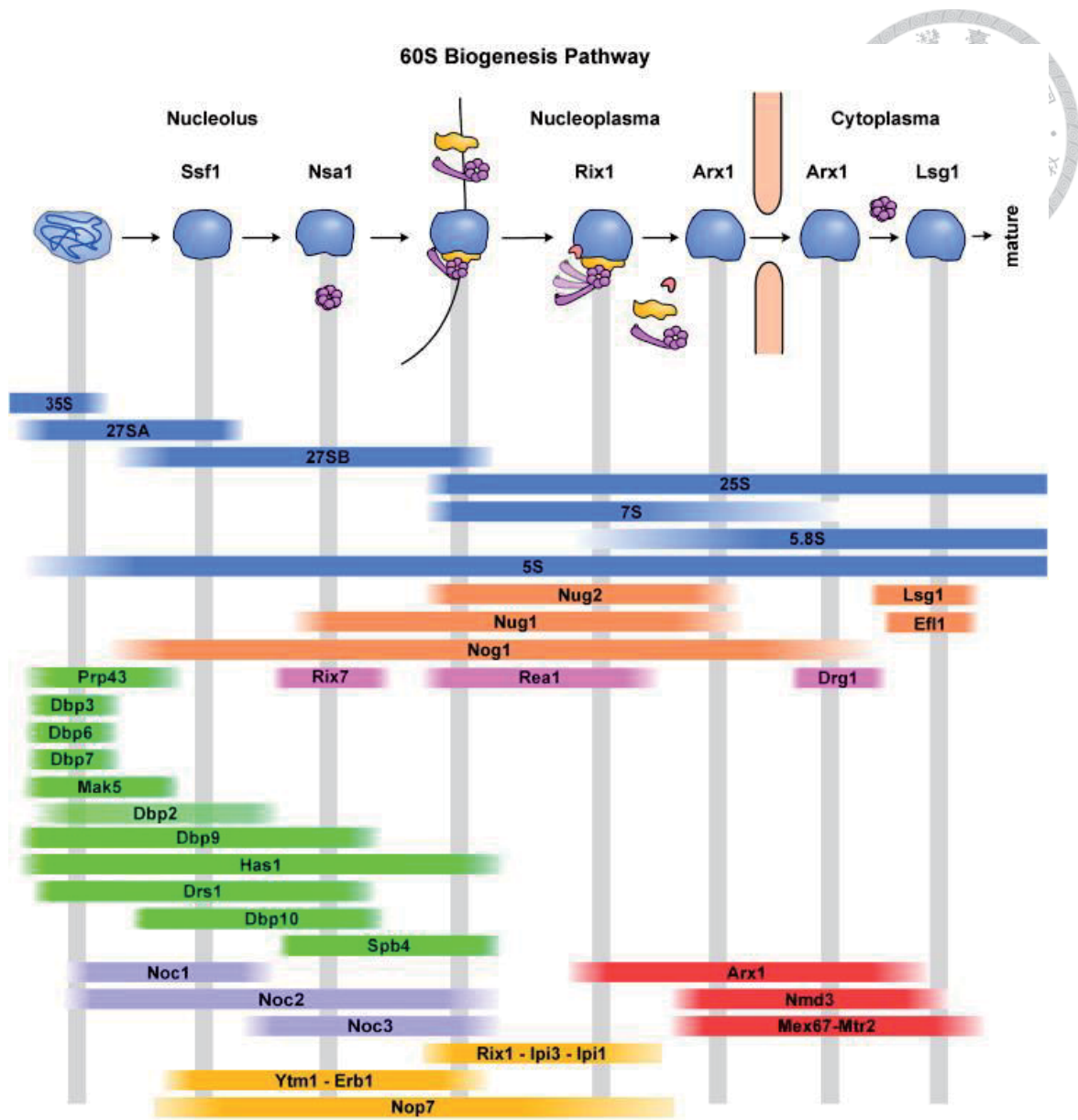
盪培養兩個小時，*mss4-1-GFP*則是在0.2-0.25 OD₆₀₀時移到37°C培養箱培養兩個小時，加入50 µg/mL cycloheximide再培養十分鐘，將菌體置於-80°C備用，進行多核糖體圖譜分析。(D) 培養方式與圖九E相同，但是收菌的時候不加cycloheximide，將菌體置於-80°C備用分析40S與60S核糖體的圖譜。





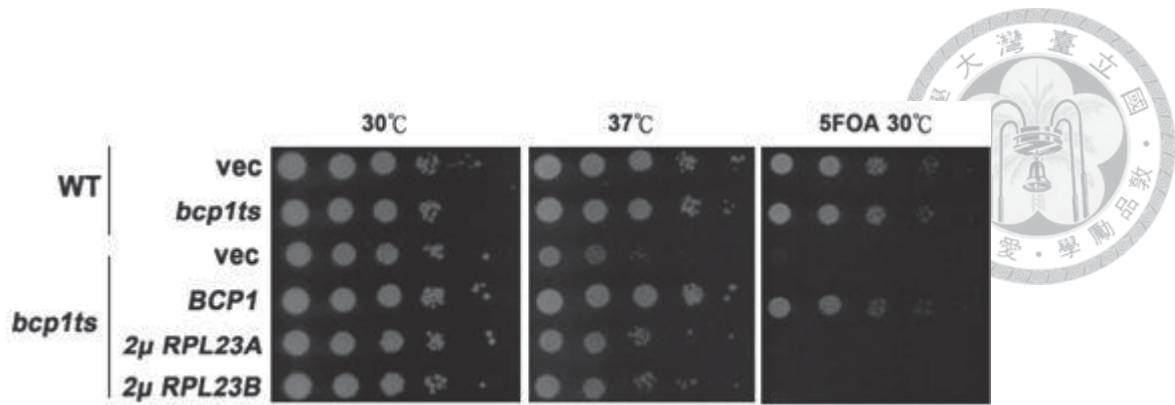
(Kressler et al, 2010)

附錄 一、rRNA 剪切過程



(Kressler et al, 2010)

附錄 二、輔助因子參與 60S 核糖體生合成的時期



附錄 三、*RPL23* 為 *bcp1ts* 的高通量抑制子

將 PKL1 (CEN *HIS3*) 與 PKL483 (*bcp1ts* CEN *HIS3*) 質體送入 KLY2 (WT)，並將 PKL1 (CEN *HIS3*)、PKL478 (*BCP1* CEN *HIS3*)、PKL194 (*RPL23A* 2μ *HIS3*) 以及 PKL195 (*RPL23B* 2μ *HIS3*) 質體送入 KLY106 (*bcp1ts*) 菌株中，以 2 mL Leu⁻Glc 於 30°C 震盪培養隔夜，透過生長測試置於 Leu⁻Glc 與 5FOA 的培養基上，將 Leu⁻Glc 培養基在 30°C 與 37°C 培養二到三天，5FOA 培養基在 30°C 培養三到四天。

