

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 Bioresource and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

探討 Puf6 與 Loc1 於核糖體大單元體 60S

生合成途徑中所扮演之角色

Study the Functional Connection between

Puf6 and Loc1 in 60S Biogenesis

楊貽婷

Yi-Ting Yang

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



國立臺灣大學博/碩士學位論文  
口試委員會審定書

探討 Puf6 與 Loc1 於核醣體大單元體 60S  
生合成途徑中功能之關聯性  
Study the Functional Connection between Puf6 and  
Loc1 in 60S Biogenesis

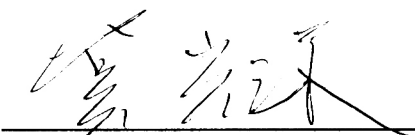
本論文係楊貽婷君 (r02623007) 在國立臺灣大學農業化學學系完成之博/碩士學位論文，於民國 104 年 7 月 22 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

 (指導教授)









## 誌謝



首先感謝指導教授羅凱尹老師，從大三進入實驗室以來，無論是實驗上或是其他方面，總是細心並很有耐心地給予我們許多指導，讓我學習到不只是實驗技術、邏輯思考，更是做人做事的道理，是我在農化系最大的收穫。

也感謝實驗室的學長姐，陳柏儒學長、朱昀學長、李寧學姊，以及丁亞涵學姊。特別感謝丁亞涵學姊，總是在自己忙碌的時候，仍關心學弟妹的實驗，讓我從實驗技能零，到可以獨立操作實驗。也感謝實驗室的同學們，呂庭郡以及吳上穎，總是細心且貼心的幫忙分擔實驗室事務。以及感謝學弟妹，也時常貼心地幫忙分擔實驗室事務，並常熱心地幫學長姐買午餐。當然，也要感謝實驗室的所有成員，讓我在實驗室的三年多時光中，擁有美好的回憶。

最後感謝我的父母，一直到研究所階段，都讓我可以無後顧之憂地完成學業。

## 中文摘要



在真核細胞中，Puf6 與 Loc1 同時參與兩條重要的途徑：mRNA 之不對稱運輸，以及核糖體生合成。此外，Puf6 與 Loc1 在細胞中主要分布位置皆位於核仁。此兩個蛋白結合 *ASH1* mRNA，將 mRNA 運輸至子細胞尖端(bud tip)，而 mRNA 之不對稱分布對於真核細胞之分化相當地重要。另外，Puf6 與 Loc1 也被發現與 60S 生合成有關聯。若將細胞中 *PUF6* 或 *LOC1* 移除，pre-rRNA 之剪切(Processing)，60S 之出核情形，以及 60S 的生成量皆會受到影響。然而，目前對於 Puf6 與 Loc1 之研究大部分是針對 *ASH1* mRNA 運輸之途徑，關於此兩個蛋白如何於 60S 生合成途徑執行其功能，目前仍尚未明瞭。

在此篇研究中，發現 *RPL43* 是 *puf6Δ* 之 High-copy suppressor，以及 Puf6、Rpl43 與 Loc1 三個蛋白質之間具有直接的結合，且於 60S 生合成途徑中的功能有緊密之關聯性。Loc1 為 Rpl43 之伴護子，並和 Puf6 協助 Rpl43 結合 60S。且 Puf6 及 Loc1 需要彼此才能在正確的時間點結合 60S。接著，待 Puf6 與 Loc1 執行完其功能後，離開 60S 則需要 Rpl43。

**關鍵字：**核糖體、核糖體生合成、Puf6、Loc1、Rpl43

## Abstract

Puf6 and Loc1 have two important functional roles in the cells, asymmetric mRNA distribution and ribosome biogenesis. Puf6 and Loc1 are localized predominantly in the nucleolus. They bind *ASH1* mRNA, repress its translation, and facilitate the transport to the daughter cells. Asymmetric mRNA distribution is important for cell differentiation. Besides, Puf6 and Loc1 have been shown to involve in 60S biogenesis. In *puf6Δ* or *loc1Δ* cells, the pre-rRNA processing and 60S export are impaired and 60S subunits are under-accumulated. The functional studies of Puf6 and Loc1 have been focused on *ASH1* mRNA pathway, but the functional roles in 60S biogenesis are still not clear.

In this study, we identified that *RPL43* is the high-copy suppressor of *puf6Δ*. Besides, Puf6, Loc1 and Rpl43 have direct physical interaction, and these proteins are tightly connected in 60S biogenesis. Loc1 is the chaperon of Rpl43. Loc1 and Puf6 facilitate the loading of Rpl43. Furthermore, Puf6 and Loc1 depend on each other for joining 60S biogenesis pathway properly. Finally, the recruitment of Rpl43 is required for release of Puf6 and Loc1.

**Keywords: Ribosome, Ribosome biogenesis, Puf6, Loc1, Rpl43**

# 目錄



一、文獻回顧與探討 .....	1
1.1 核糖體生合成 .....	1
1.1.1 rRNA 之生成與剪切 .....	1
1.1.2 核糖體之組裝 .....	2
1.1.3 40S 之組裝 .....	3
1.1.4 60S 之組裝 .....	4
1.1.5 細胞核內外物質運輸之調控 .....	5
1.1.6 60S 出核之調控 .....	6
1.2 ASH1 mRNA 主動運輸 .....	8
1.3 與本研究相關之因子 .....	10
二、研究動機與問題 .....	12
三、研究材料與方法 .....	14
3.1 質體之建構 .....	14
3.1.1 PCR .....	14
3.1.2 電泳 .....	14
3.1.3 純化 DNA 膠體 .....	14
3.1.4 限制酶切割 .....	14
3.1.5 接合 .....	15
3.1.6 選殖菌體 .....	15
3.2 轉型至啤酒酵母 .....	15
3.3 螢光顯微鏡 .....	15
3.4 生長測試 .....	16
3.5 High-copy suppressor screen .....	16
3.6 核糖體圖譜分析(polysome profile) .....	16
3.7 Sucrose cushion .....	17
3.8 免疫沉澱 .....	17

3.9 <i>In vitro</i> interaction .....	18
<b>四、結果</b> .....	19
4.1 Puf6 和 Loc1 參與 60S 生合成之階段相似 .....	19
4.2 Puf6 與 Loc1 協助彼此於正確之階段執行功能 .....	21
4.3 於 loc1 $\Delta$ 去除 PUF6 基因可以部分修復 loc1 $\Delta$ 突變株之缺失 .....	22
4.4 PUF6 之 High-copy suppressor 為 RPL43B .....	23
4.5 Puf6 與 Loc1 協助 Rpl43 結合 60S .....	24
4.6 Rpl43、Puf6 與 Loc1 三者之間有直接之結合 .....	26
4.7 Loc1 協助 Rpl43 維持其穩定性 .....	27
4.8 Rpl43 幫助 Puf6 與 Loc1 離開 60S .....	28
4.9 分析 Puf6 的功能性區塊 .....	30
4.10 分析 Loc1 的功能性區塊 .....	32
<b>五、結論</b> .....	33
<b>六、討論</b> .....	34
6.1 Rpl43、Loc1 與 Puf6 於 60S 生合成途徑中之關聯 .....	34
6.2 Puf6 與 Loc1 參與 60S 生合成之階段 .....	35
6.3 RPL43B 無法修復 loc1 $\Delta$ 所造成之生長缺失 .....	36
6.4 Puf6 於 loc1 $\Delta$ 之分布由核仁擴散至細胞核 .....	37
<b>七、參考文獻</b> .....	38

## 表目錄

表一、本研究中使用之啤酒酵母菌株.....	46
表二、本研究中使用之質體.....	47





## 圖目錄

Figure 1. Puf6 和 Loc1 參與 60S 生合成之階段相似 .....	49
Figure 2. Puf6 與 Loc1 協助彼此於正確之階段執行功能 .....	51
Figure 3. 去除 <i>PUF6</i> 基因可以部分修復 <i>loc1Δ</i> 突變株之缺失 .....	53
Figure 4. <i>puf6Δ</i> 之 High-copy suppressor 為 <i>RPL43B</i> .....	54
Figure 5. Puf6 與 Loc1 協助 Rpl43 結合 60S .....	55
Figure 6. Rpl43、Puf6 與 Loc1 三者之間有直接之結合 .....	56
Figure 7. Loc1 協助 Rpl43 維持其穩定性 .....	57
Figure 8. Rpl43B 幫助 Puf6 與 Loc1 離開 60S .....	60
Figure 9. 分析 Puf6 的功能性區塊 .....	64
Figure 10. 分析 Loc1 的功能性區塊 .....	66

## 附錄目錄

附錄一、 rRNA 加工示意圖 .....	68
附錄二、 <i>ASH1</i> mRNA 主動運輸示意圖 .....	69
附錄三、 60S 生合成之不同階段示意圖 .....	70
附錄四、 大量表現 <i>RPL43</i> 無法修復 <i>loc1Δ</i> 之生長缺失 .....	71



## 一、文獻回顧與探討

### 1.1 核糖體生合成

核糖體為一重要且複雜的巨大複合體。在細胞中，核糖體將 mRNA 所帶有的基因密碼轉譯成蛋白質，使細胞得以維持正常的生理活性，也因此核糖體的生成對於細胞生長及增生十分地重要。由於其重要性，所以核糖體的組成與生合成之過程在許多真核生物中都具有高度保守性。也由於啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)為最簡單的真核生物，因此本研究以啤酒酵母作為模式生物，以下也以啤酒酵母之機制來介紹。

核糖體由大單元體及小單元體所組成，在真核生物中，分別為 60S 及 40S。而單元體又是由 rRNAs 及核糖蛋白組成，18S rRNA 與 33 個核糖蛋白共同組成 40S；5S、5.8S、25S rRNAs 與 46 個核糖蛋白則組成 60S。rDNA 於細胞核仁由 RNA 合成酶 I (RNA polymerase I) 及 RNA 合成酶 III (RNA polymerase III) 轉錄成 pre-rRNA 之後，必須經過一連串的剪切，最終形成完整的 rRNA；而核糖蛋白與參與核糖體生合成的相關因子之 mRNA 由 RNA 合成酶 II 轉錄，接著於細胞質中被轉譯出來後，部分核糖蛋白與其他相關因子必須進入細胞核仁或細胞核，部分則是在細胞質，參與單元體的組裝，協助其最終在細胞質成熟。整個核糖體的成熟過程高度地複雜，因此需要多個相關因子繁瑣及嚴謹的調控，以確保新生成核糖體之品質。

#### 1.1.1 rRNA 之生成與剪切

核糖體的生合成首先由 pre-rRNA 之合成開始(附錄一)。pre-rRNA 分別由 RNA 合成酶 I 及 RNA 合成酶 III 於細胞核仁轉錄而成，接著再於細胞質或細胞核中進行一系列的剪切，形成完整的 rRNA 片段。35S rRNA 由 RNA 合成酶 I 合成，為 18S rRNA、5.8S rRNA、25S rRNA 三個片段所組成，中間穿插 ITS1 (internal

transcribed region)與 ITS2，兩側則是 5' 及 3'-ETS(external transcribed region)；5S rRNA 則是由 RNA 合成酶III 生成。35S pre-rRNA 先於 A<sub>0</sub> 處截去 5'-ETS，形成 33S pre-rRNA；再於 A<sub>1</sub> 處剪切掉 5'端，形成 32S pre-rRNA；接著再於 18S rRNA 和 5.8S rRNA 中間的 ITS1 之 A<sub>2</sub> 處切成兩端，形成 20S 與 27SA<sub>2</sub> pre-rRNA；而其中的 20S 最後於細胞質截去 D 處之右半部，形成成熟的 18S rRNA。27SA<sub>2</sub> pre-rRNA 則是在細胞核中經由兩種途徑進行剪切，分別為：(a) 約 85% 由 RNase MRP 在 ITS1 的 A<sub>3</sub> 剪切，接著馬上由 Rat1 於 B<sub>1s</sub> 進行 5'到 3'的修剪，形成 27SB<sub>s</sub>。(b) 約 15% 則是直接在 B<sub>1l</sub> 進行剪切，並在 3'端之 B<sub>1</sub> 與 B<sub>2</sub> 處剪切，形成 27SB<sub>L</sub>。此兩種途徑產生的 27SB(27SB<sub>s</sub> 與 27SB<sub>L</sub>)，接下來以相同的處理，截去 C<sub>2</sub> 至 C<sub>1</sub> 段，並以 3'到 5'方向剪切至 E 處。經過上述一系列之剪切，最終形成完整的 18S rRNA、5.8S rRNA、25S rRNA(Venema and Tollervey, 1999)。

### 1.1.2 核糖體之組裝

真核生物中核糖體組裝之機制，以酵母菌的模式了解最為透徹。在生合成的過程中，除了組成核糖體結構之核糖蛋白，還需要至少超過 200 個相關因子參與調控。而這些參與核糖體生合成的蛋白，大部分具有高度保守性，於高等真核生物中有同源蛋白。

79 個核糖蛋白中，有 64 個蛋白對於細胞生長為必須的；其他非必須之蛋白，對於核糖體生合成也可能非常地重要。而有 59 種蛋白擁有兩個同源蛋白(Simoff et al., 2009)，其中的 38 種蛋白其胺基酸序列約有 1-5 個胺基酸的差異。因此，雖是同源蛋白，但被認為擁有不同的功能(Haarer et al., 2007; Komili et al., 2007; Ni and Snyder, 2001)。並有學者提出核糖體密碼(ribosome code)之可能性(Komili et al., 2007)，指出核糖體會針對不同目標 mRNA，來調控轉譯(Xue and Barna, 2012)。也就是由不同種的同源核糖蛋白所組裝的核糖體，可能進行不同的調控。並且，全部的核糖蛋白皆會在成熟的核糖體中直接地以不同程度與 rRNA 結合

(Armache et al., 2010; Ben-Shem et al., 2011)，進而影響 pre-rRNA 構型的改變，並提供其他因子與核糖體結合之位置。

在核糖體生合成的過程中，需要很多輔助因子(非核糖蛋白)的參與，包括協助 pre-rRNA 的修飾、協助核糖體離開細胞核...等。這些因子大部分是以親和力純化實驗(tandem affinity purification method)與質譜儀分析(mass spectrometry)，將不同階段未成熟之核糖體從酵母菌中純化出來而發現(Bassler et al., 2001; Dragon et al., 2002; Fatica et al., 2002; Grandi et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001; Nissan et al., 2002; Saveanu et al., 2001)。而這些相關因子，可能是負責剪切 pre-rRNA 的內切酶或外切酶，也可能是 ATP 水解酶(ATPase)、GTP 水解酶(GTPase)、激酶(kinase)、磷酸酶(phosphatase)、RNA 結合蛋白，或是做為骨架的蛋白，少數蛋白甚至與某些核糖蛋白具有高度相似性。。

然而，對於核糖體生合成過程中，組裝的順序以及各個蛋白質之功能，仍有許多不明瞭的部分。下面簡單介紹 40S 和 60S 組裝之過程。

### 1.1.3 40S 之組裝

相較於 60S 的生合成，40S 的組成及組裝都較為單純。轉錄出 35S rRNA 的同時，pre-40S 的組裝也同步開始進行。組裝的過程中，會有三種小複合體 UTP-A、UTP-B 和 UTP-C 來參與(Krogan et al., 2004)，而這些複合體由將近 20 個輔助蛋白、U3 snoRNP、核糖蛋白，以及 35S rRNA 所組成(Dragon et al., 2002; Grandi et al., 2002)。在 U3 snoRNP 將 35S rRNA 剪切，產生 20S pre-rRNA 之後，大部分輔助蛋白離開複合體，而剩下的少數輔助蛋白，接著協助其他核糖蛋白結合上來(Schafer et al., 2003)。在完成細胞核部分的組裝之後，接著 pre-40S 被運輸至細胞質，此時蛋白激酶 Hrr25 將 Enp1-Ltv1-Rps3 複合物進行磷酸化/去磷酸化反應，以穩定 Rps3 在 40S 上面的結合，使 40S 結構更完整(Schafer et al., 2006)。接著 Nob1、Rio1、Rio2、Tsr1 與 Fap7...等輔助蛋白協助 20S pre-rRNA 剪切成為成熟

之 18S rRNA(Fatica et al., 2003; Gelperin et al., 2001; Granneman et al., 2005; Vanrobays et al., 2003)，完成整個 40S 的組裝。



#### 1.1.4 60S 之組裝

60S 的組裝過程十分地複雜且嚴謹，因此需要許多蛋白質來參與，以維持 60S 生合成之品質。而 pre-60S 生合成之過程，前人藉由代表不同階段之蛋白質，以 TAP(Tandem affinity purification)純化方式，分析各個階段 pre-60S 中間產物之組成。生合成從細胞核仁開始，第一個中間產物是藉由 Ssf1 取得(Fatica et al., 2002; Harnpicharnchai et al., 2001)，由核糖蛋白、約 30 個非核糖因子，以及 27SA<sub>2</sub>、27SB pre-rRNA 組成，且此階段並無 snoRNPs 參與(Kressler et al., 2008)。Ssf1 為 sigma-70 蛋白質家族之成員，與 27SA<sub>2</sub> 和 27SB pre-rRNA 有交互作用，而此複合體所含的另一蛋白 Rpf1，也與 27SB pre-rRNA 有交互作用(Wehner and Baserga, 2002)。第二個中間產物則是藉由 Npa1 純化取得，由核糖蛋白、約 40 個因子、8 個 RNA helicase、27SA<sub>2</sub> pre-rRNA、一些 snoRNPs，以及 90S 相關之因子所組成。而下一個中間產物則是藉由 Nsa1 純化所得，由 5S RNP 複合體(Rpl11、Rpl5、5S rRNA、Rrs1、Rpf2)、外切酶 Rat1 與 Xrn1，和 27SA<sub>3</sub>、27SB pre-rRNA.....等組成。此複合體與 Noc1-Noc2 轉換成 Noc2-Noc3 相關(Kressler et al., 2008; Milkereit et al., 2001)，而另一複合體 Ytm1-Erb1-Nop7 則是與 27SA<sub>3</sub> pre-rRNA 之剪切相關(Holzel et al., 2005; Tang et al., 2008; Ulbrich et al., 2009)。

完成上述組裝步驟之後，pre-60S 接著進入細胞核質中。透過 Rix1 純化取得此階段的複合體，參與的因子有 Rea1、Rix1-Ipi3-Ipi1 複合體、Rsa4、Arx1-Alb1 複合體、Sda1 和 Nog2(Nug2)，而此時 27SB pre-rRNA 大部分已剪切形成 25S 和 7S/5.8S rRNA(Nissan et al., 2002)。此階段的 pre-60S 呈現一個類似蝌蚪形狀(tadpole-like)之結構(Nissan et al., 2004; Ulbrich et al., 2009)，而位於蝌蚪狀尾部的 Rea1，由六個 ATPase 區塊組成，形成一環狀結構並連接至 MIDAS(metal

ion-dependent adhesion site)。Rea1 利用其 AAA-ATPase(ATPase associated with various cellular activities)功能，促使 Rsa4 與 Rix1-Ipi3-Ipi1 複合體釋放(Bassler et al., 2010; Ulbrich et al., 2009)。並且，Rea1 ATPase 和 Nog2 GTPase 之活性，同時也會協助 Nog2 離開 pre-60S(Matsuo et al., 2014)。而這些因子的離開，使 pre-60S 可以準備離開細胞核。在核糖體嚴謹的生合成過程中，必須確認上一步驟正確地完成後，才進行接下來的步驟，隨時都有嚴格的品質控管。而上述之 Nog2 則是其中一個對於品質控管相當重要之調控因子。Nog2 為 GTP 水解酶，是一個負責調控 C2 剪切及 7S pre-rRNA 修飾的非核糖因子(Saveanu et al. 2001)。而為了確保 27SB pre-rRNA 之剪切品質，在確認前面過程的組裝完成並正確，Nog2 才會結合上去，進行 27SB pre-rRNA 不可逆之修飾步驟(Matsuo et al., 2014; Talkish et al., 2012)。接著，在細胞核內所有的組裝步驟正確地完成之後，Nog2 才會離開，讓出核過程中必須的銜接蛋白(adaptor protein)Nmd3 結合上去，使出核蛋白 Crm1 將已足夠成熟的 pre-60S 運送出核(Matsuo et al., 2014)。

### 1.1.5 細胞核內外物質運輸之調控

真核細胞的細胞核外圍具有一層核膜，將細胞核和細胞質分隔成兩個部分。細胞核膜上有許多核孔(nuclear pore)，核孔中又有一複合體，稱為核孔複合體(Nuclear pore complexes, NPCs)，來管制細胞核內外物質之運輸。核孔複合體是細胞中最大的蛋白質複合體，在啤酒酵母中約 60MDa，由於其重要性，因此在各個真核生物中，核孔複合體的構造都相當地保守。核孔複合體為八角型結構，由 30 多個不同的核孔蛋白(Nucleoporins, Nups)所組成(Cronshaw et al., 2002; Rout et al., 2000)。核孔複合體之主體埋在核膜中，分別在細胞質和細胞核兩端皆有一環狀構造，並各有八條中間絲連接(Beck et al., 2004)，而核孔蛋白最常見的結構為 FG repeats(Phenylalanine-Glycine repeats)(Chadrin et al., 2010; Hoelz et al., 2011)，一個核孔蛋白可能含 4 至 48 個 FG repeats，而這些 FG repeats 形成的結構會填滿

整個核孔的中心，使中心呈現篩網狀，如此之結構可使物質的通過具有選擇性。

若物質欲進出細胞核，則運輸方式可大致分為兩類：離子和小分子藉由簡單的擴散作用自由地進入核孔；則大於 40 至 60kDa 的物質必須經由特定運輸蛋白 (Karyopherins) 之協助，才能穿越核孔 (Ma et al., 2012)。運輸蛋白會帶著貨物蛋白，與核孔蛋白之 FG repeats 交互作用，幫助貨物通過核孔複合體之疏水性通道。而運輸蛋白依運送之方向，可分為入核蛋白 (Importin) 和出核蛋白 (Exportin)。當入核蛋白欲將貨物蛋白運送入核時，會先在細胞質中結合，接著通過核孔入核後，入核蛋白會與 Ran-GTP 結合，使原先結合的貨物蛋白被釋放下來，而入核蛋白再經由核孔回到細胞質中，進行下一批的運送；相反地，帶著貨物蛋白的出核蛋白必須在細胞核內與 Ran-GTP 結合，通過核孔出核，再藉由 RanGAP (Ran-GTPase-activating protein) 將 GTP 水解，使其運輸之貨物蛋白釋放下來，而被水解的 Ran-GDP 接著由 NTS2 (Nuclear transport factor 2) 運送回細胞核中，再經由 RCC1 (Ran exchange factor) 轉換回 GTP，進行下一批之運輸。而整個細胞核內外之運輸是藉由 Ran-GTP 與 Ran-GDP 之濃度來調控 (Wente and Rout, 2010)。

#### 1.1.6 60S 出核之調控

核糖體的兩個次單元體 pre-40S 和 pre-60S 皆為巨大的複合體，因此在完成細胞核內的生合成步驟之後，必須在多個出核蛋白之協助下，通過核孔複合體，到達細胞質中，繼續完成細胞質中的成熟步驟，並組裝成完整的 80S，以進行蛋白質的合成。而將 nascent ribosome 通過核孔複合體運送出細胞核的過程，稱為核糖體的出核運輸 (Ribbeck and Gorlich, 2002)。接著，介紹以下三個在 pre-60S 出核過程中重要之蛋白質：

##### a. Nmd3/Crm1

Nmd3 為出核銜接蛋白 (adapter protein)，在 pre-60S 完成細胞核內所有的生合成過程後，Nmd3 會結合上去，使 pre-60S 開始進行出核運輸。其胺基酸序列中



帶有一段出核序列(Nuclear export signal, NES)，而 NES 常見之通式為 LXXXLXXLXL，L 代表 Leucine，X 為任意胺基酸。當 Nmd3 結合到 pre-60S 上面之後，其序列上的 NES 會被出核蛋白 Crm1/Xpo1 辨認，Crm1 藉此與 pre-60S 結合，透過 Ran-GTP/Ran-GDP 濃度梯度之調控，帶著整個複合體通過核孔，運輸至細胞質(Johnson et al., 2001; Thomas and Kutay, 2003; Trotta et al., 2003)。

#### **b. Mex67-Mtr2**

Mex67-Mtr2 heterodimer 是以異源二聚體(heterodimer)的形式來作用，為 mRNA 的出核因子，結構與 NTF2(Ran-independent transport receptors)相似(Fribourg et al., 2001; Fribourg and Conti, 2003; Herold et al., 2000; Santos-Rosa et al., 1998; Segref et al., 1997)，並和 Nup84 複合體之間有交互作用(Lutzmann et al., 2005; Santos-Rosa et al., 1998; Segref et al., 1997)。而 Mex67-Mtr2 主要是以其類似 NTF2 之 loop 結構和 pre-60S 以及 5S rRNA 結合，並幫助 pre-60S 出核(Yao et al., 2007)。

#### **c. Arx1**

Arx1 與 Alb1(Arx1 little brother)形成 heterodimer(Lebreton et al., 2006)，會直接與核孔蛋白上的 FG repeats 有交互作用，幫助整個 pre-60S 通過核孔複合體。抵達細胞質之後，Rei1 和 Jjj1 接著將 Arx1 釋放下來(Hung and Johnson, 2006; Lebreton et al., 2006; Meyer et al., 2010)。Arx1 並會和許多核糖蛋白(Rpl25、Rpl35、Rpl26 及 Rpl19)與 rRNA ES27 結合(Greber et al., 2012; Hung and Johnson, 2006)。

## 1.2 *ASH1* mRNA 主動運輸

在真核細胞中，為了維持細胞之不對稱分布，進而調控細胞發育、細胞移動，和神經突觸之可塑性，調控特定蛋白的表現量，並讓其只出現於該表現之位置，為非常重要之調控(Martin and Ephrussi, 2009)。而調控之方式，相較於轉錄之階段，在轉譯階段進行調控較為快速。且轉譯階段之調控，時常先從調控 mRNA 之不對稱分布開始，進而使 mRNA 只於特定之處轉譯。在細胞中，目前已發現有三種機制來調控特定 mRNA 之分布位置。第一種是藉由細胞質內的自然流動，在於特定區域被蛋白專一地辨認而形成鍵結(Meignin and Davis, 2010)；第二種則是分解 mRNA 來達到細胞的不對稱分布，在特定 mRNA 所應表現的位置之外會被降解掉，使其只在專一位置表現(Holt and Bullock, 2009)；第三種機制，不同 mRNA 會被其專一的 RNA 結合蛋白所結合，並與動力蛋白(motor proteins)形成複合體(Martin and Ephrussi, 2009)，即為 mRNP (messenger ribonucleoprotein particles)。而 mRNP 藉由在微管或肌動蛋白絲上移動，將目標 mRNA 帶至特定之處來進行表現。其中，第三種機制在細胞中為常見且重要之機制，也存在於所有的真核生物中(St Johnston, 2005)。由於其重要性，因此這種調控機制具有高度保守性。而在最簡單之真核生物-啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中，更有 30 種以上的 mRNA 具有不對稱分布之特性，因此做為研究 mRNA 之不對稱分布與主動運輸，啤酒酵母為極佳的模式生物(Chartrand et al., 2001; Darzacq et al., 2003)。

在啤酒酵母中，目前被廣為研究之主角為 *ASH1* mRNA。*ASH1* mRNA 已知在有絲分裂後期(anaphase)，會被運輸至子細胞之尖端，接著於此處轉譯成蛋白 Ash1(Long et al., 1997)。Ash1 會抑制 HO 內切酶之轉錄，使 HO 無法在子細胞讓 *MAT* 基因座重組，進而抑制交配型 a 和  $\alpha$  之間的轉換(Cosma, 2004; Jansen et al., 1996; Sil and Herskowitz, 1996)。*ASH1* mRNA 主動運輸之過程，目前已知的機制如下(附錄二)：於 *ASH1* 在母細胞的細胞核內進行轉錄時，已有 RNA 結合蛋白

She2 開始參與調控(Bohl et al., 2000; Du et al., 2008; Long et al., 2000; Shen et al., 2009)。當 *ASH1* mRNA 與其結合蛋白形成的複合體離開細胞核，到達細胞質時，She2 與 *ASH1* mRNA 接著會和一群以肌動蛋白(myosin)Myo4 為主的小複合體，以及 She3 結合(Bobola et al., 1996; Estrada et al., 2003; Kruse et al., 2002)。She3 除了做為 She2 與 Myo4 之間的銜接蛋白，和 She2 一樣，在 mRNA 主動運輸的過程中，對於所運輸之 mRNA 之專一性辨識，也扮演重要的角色(Muller et al., 2011)。

*ASH1* mRNA 主動運輸的過程中，仍有其他 RNA 結合蛋白參與，以增加反應之效率。如 Puf6 和 Khdl1，從細胞核內開始結合上去，直到運輸至細胞質中，抑制 *ASH1* mRNA 之轉譯，以確保 Ash1 只在子細胞中表現。其中，Puf6 以其 PUF 區塊和 *ASH1* mRNA 之 3' UTR 中的 E3 element 結合(Deng et al., 2008; Gu et al., 2004; Irie et al., 2002; Paquin et al., 2007)。而另一個參與因子 Loc1，也會結合至 *ASH1* mRNA 之 E3 element。而目前對其了解不多，只知 Loc1 分布在細胞核內(Long et al., 2001)，且主要是在細胞核仁的位置(Urbinati et al., 2006)，並無在細胞質發現 Loc1，因此 Loc1 並不會直接參與細胞質運輸的部分。然而，若細胞中缺少 Loc1，則 *ASH1* mRNA 在細胞質中的運輸也會受到影響(Long et al., 2001)。而目前也有研究指出，Loc1 必須先與 *ASH1* mRNA 及 She2 結合，做為 Puf6 與 She2 結合之中間橋樑，Puf6 才能接著結合上去參與運輸(Shahbabian et al., 2014)。

### 1.3 與本研究相關之因子

#### a. Puf6

Puf6 為非必須基因(nonessential gene)，起初於 She2 所組成之 mRNP 中被發現，為 PUF(Pumilio/fem-3 mRNA-binding factor)蛋白家族的一員，具有結合 RNA 之能力。與 She2 相同，Puf6 會參與 *ASH1* mRNA 主動運輸。且藉由其 PUF 區塊，與 *ASH1* mRNA 之 3'UTR 中的 UUGU 保守序列結合，並在運輸的過程中，以 PUF 區塊與轉譯起始因子 eIF5B/Fun12 結合，使 48S 複合體無法與 60S 結合，因此無法形成 80S，*ASH1* mRNA 轉譯因而受到抑制(Deng et al., 2008; Gu et al., 2004)。直到 *ASH1* mRNA 被運送至子細胞尖端，酪蛋白激酶 CK2(casein kinase II)接著將 Puf6 之 N 端磷酸化，停止 Puf6 抑制轉譯之功能(Deng et al., 2008)。倘若細胞中缺少 Puf6，則 *ASH1* mRNA 在運輸的過程中，轉譯無法有效地被抑制，因而嚴重影響 Ash1 蛋白之不對稱分布(Gu et al., 2004)。Puf6 主要分布在細胞核仁，因此被認為在細胞核中即參與 *ASH1* mRNA 運輸。(Du et al., 2008)

除了協助 *ASH1* mRNA 主動運輸，Puf6 亦被發現另一功能—透過純化 pre-60S 中間產物，發現 Puf6 為參與 60S 生合成之其中一員(Nissan et al., 2002)。目前對於 Puf6 於 60S 生合成中所扮演之功能尚未明瞭，僅發現若細胞中缺乏 Puf6，則 27S 及 7S pre-rRNAs 之剪切修飾無法正常地進行，而導致累積(Qiu et al., 2014)。


而目前 Puf6 於人類的同源蛋白 Puf-A 之結構已被解出(Qiu et al., 2014)，並經由 SAXS(small-angle X-ray scattering)比對，確認 Puf6 與 Puf-A 除了序列上有 24%程度相同，結構上也是相似的。Puf-A 具有 11 個 Puf 區塊之重複，整個結構並呈現類似”L”的形狀。不同於一般 Puf 家族之蛋白，Puf-A 和 Puf6 對於 RNA 或 DNA 之結合並無顯著的專一性，而其中 Puf-A 是以其具保守性之鹼性胺基酸進行核酸的結合。Puf6 的 PUF 區塊也擁有具保守性之鹼性胺基酸，並同樣以此區塊結合 RNA，除此之外，Puf6 也是利用此區塊進行 rRNA 修飾及 *ASH1* mRNA 之結合(Qiu et al., 2014)。

## b. Loc1

Loc1 為非必須基因，和 Puf6 相同，也是 RNA 結合蛋白，起初被發現之功能為結合 *ASH1* mRNA 之 3'UTR，協助 *ASH1* mRNA 主動運輸至子細胞尖端。且不同於其他參與 mRNA 運輸之 RNA 結合蛋白，需要往返於細胞質與細胞核之間，Loc1 只分布於細胞核內(Long et al., 2001)。和 Puf6 相似，主要分布位置位於核仁(Urbinati et al., 2006)。目前也發現，Loc1 必須先與 *ASH1* mRNA 及 She2 結合，做為 Puf6 與 She2 結合之中間橋樑，Puf6 才能接著結合上去參與運輸(Shahbadian et al., 2014)。

而 Loc1 除了參與 *ASH1* mRNA 之主動運輸，在前人的研究中，透過 TAP 純化不同階段的核糖體生合成因子，分析其蛋白組成，也發現 Loc1 為協助 60S 生合成的成員之一。若細胞缺乏 Loc1，60S 單元體的數量大幅降低。除此之外，也被發現 60S 無法正常地出核(De Marchis et al., 2005; Harnpicharnchai et al., 2001; Horsey et al., 2004; Saveanu et al., 2003)；在 *loc1*  $\Delta$  的突變株中，也發現 25S rRNA 生成有嚴重的缺失，尤其是在 35S pre-rRNA 的 A0、A1 和 A2 位置上的剪切階段(Urbinati et al., 2006)。而 Loc1 主要分布於細胞核仁(Urbinati et al., 2006)，與其以上協助 60S 生合成的功能相符。

## 二、研究動機與問題



核糖體於細胞中扮演之角色非常重要，在人類細胞中，倘若核糖體生合成有嚴重的缺失，可能會導致疾病或是個體死亡。如 Diamond Blackfan anemia (DBA) 或是 Shwachman-Diamond syndrome (SDS)。其中，DBA 約有 50-60% 之機率起因於核糖蛋白的基因產生突變；SDS 則是因 *SDOI* 突變而導致。Sdo1 為核糖體成熟過程中重要的因子，在細胞質中，協助 60S 上的 Tif6 離開，使得 40S 可以結合上來形成成熟的 80S，開始進行轉譯。而 Sdo1 在人類細胞中的同源蛋白為 SBDS。此兩種疾病皆是會導致骨髓功能異常之罕見疾病，可能會產生嚴重的貧血(Ball, 2011; Burroughs et al., 2009; Ellis and Gleizes, 2011; Horos and von Lindern, 2012)；此外，更發現有較高的罹癌機率(Vlachos et al., 2012)。而在其他脊椎生物中，核糖體蛋白之缺失或突變也可能導致器官發育不全，甚至是癌症的產生(Panic et al., 2006; Uechi et al., 2006)。明白核糖體對於細胞之重要性，但對於核糖體生合成之機制目前仍有許多部分尚未明瞭。因此，本研究以啤酒酵母做為模式生物，以 Puf6 與 Loc1 此兩種蛋白做為主角，來探討核糖體大單元體 60S 在生合成過程中之部分細節機制。

從前人研究中，已得知 Puf6 與 Loc1 皆參與 *ASH1* mRNA 之主動運輸，並被發現和 60S 生合成有關聯。且目前對於此兩種蛋白的研究，於 *ASH1* mRNA 運輸之途徑著墨較多，而在核糖體生合成之途徑中，則仍未明瞭 Puf6 與 Loc1 如何作用。而 Puf6 與 Loc1 除了同時皆參與兩條途徑之外，也有其他共同點，如：在細胞中主要分布位置皆位於核仁，皆為 RNA 結合蛋白，以及兩蛋白間有直接的結合。綜合以上，推測 Puf6 與 Loc1 在參與 60S 生合成的途徑中，所扮演之功能可能具關聯性。因此，在本研究中，希望藉由探討 Puf6 與 Loc1 於 60S 生合成途徑中之關聯性，對於這兩個蛋白於此途徑中所扮演之角色進行研究。且由於 Puf6 與 Loc1 同時亦會參與核糖體生合成與 mRNA 之主動運輸，希望未來能進一步地

探討此二條重要途徑之間的關聯性。





### 三、研究材料與方法

#### 3.1 質體之建構

##### 3.1.1 PCR

以 BY4741 之染色體作為模板，設計特定引子，透過 PCR 得到特定的 DNA 片段。使用的 PCR 酵素為 Phusion (New England BioLabs; Thermo)。以下為 PCR 反應條件：

	反應溫度	反應時間	30 cycles
Denaturation	98°C	30 s	
Denaturation	98°C	10 s	
Annealing	50-60°C	30 s	
Extension	72°C	1 min - 4 min	
Extension	72°C	10 min	
Stop	25°C		

##### 3.1.2 電泳

使用 1% Agarose 膠體，在 100V 通電條件下跑膠 30 分鐘，再使用 EtBr(Ethidium Bromide)染約 20 分鐘，最後以 UV 觀察膠體。

##### 3.1.3 純化 DNA 膠體

將含有特定片段之膠體切下，使用 DNA 膠體純化 Kit 組，純化膠體中的 DNA 片段。

##### 3.1.4 限制酶切割

使用特定限制酶(New England BioLabs)，分別切割純化後的 PCR 產物與質體，以便進行後續的接合反應。加入限制酶反應 1 小時後，再以 Agarose 膠體進



行電泳，接著以 EtBr 外染，再以 UV 照射膠體，將特定的 DNA 片段切下，最後以 DNA 膠體純化 Kit 組將膠體中的 DNA 片段純化出來。



### 3.1.5 接合

將經過切割並純化後的 DNA 片段，使用 T4 Ligase(Thermo)進行接合反應，於 22°C 反應隔夜。

### 3.1.6 選殖菌體

使用 Chemically competent cells 進行轉型作用。將 10  $\mu$ l 的接合產物送入 100  $\mu$ l competent cells，接著置於冰上 30 分鐘，放於水浴槽 42°C 約 90 秒，再放回冰上 2 分鐘，接著加入 100  $\mu$ l LB，於 37°C 培養 30 分鐘後，將菌液塗至含有抗生素的培養基中。培養隔夜後，抽取菌落中的質體，以限制酶切割並跑電泳，挑出正確之質體。

## 3.2 轉型至啤酒酵母

必須先將質體轉型入待測菌株中，才可進行後續實驗來進行探討。將酵母菌隔夜培養，以 8000 rpm 將菌體離心下來，再以 1x Li/TE (100 mM LiOAc, 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA)清洗菌體，接著同樣以 1x Li/TE 懸浮菌體，每管反應使用 15  $\mu$ l 懸浮菌液，並加入 5  $\mu$ l ssDNA (10 mg/ml)、2  $\mu$ l 質體，以及 300  $\mu$ l PEG/Li/TE (40% PEG, 100 mM LiOAc, 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA)，混合均勻，於 30°C 培養 30 分鐘，接著於 42°C 培養 15 分鐘，於管中加入無菌水混合並離心，將菌體塗至適當之選擇性培養基中，於 30°C 培養數天。

## 3.3 螢光顯微鏡

將待測蛋白標記 GFP，藉此追蹤蛋白在細胞中之分布。將菌液培養隔夜，接著再稀釋，放於原培養溫度中培養 2-4 小時(根據不同菌株，培養溫度與時間隨

之調整。有些需加入葡萄糖抑制基因表現。)。接著離心，取菌體之部分，塗在載玻片上以螢光顯微鏡觀察。



### 3.4 生長測試

將待測菌培養於適當培養液中隔夜，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再分別稀釋成 10<sup>1</sup> 倍、10<sup>2</sup> 倍、10<sup>3</sup> 倍與 10<sup>4</sup> 倍，將其一點在適當培養皿上，放置數天培養，觀察菌株之生長情形。

### 3.5 High-copy suppressor screen

將 DNA library 轉型入 *puf6*  $\Delta$  突變株中，於 20°C 下篩選生長情況較佳之菌落，接著再從菌落中抽出質體，送回 *E. coli* 中，以利質體的製備。將質體重新送回 *puf6*  $\Delta$  突變株中，確認此質體的確可使此突變株具有較好的生長，並以限制酶剪切，去除含 *PUF6* 基因的質體。將可能拯救 *puf6*  $\Delta$  生長的質體送去定序，分析其中所含之基因，藉此找尋與 *PUF6* 具有正向基因關聯(Positive genetic)之基因。

### 3.6 核糖體圖譜分析(polysome profile)

利用蔗糖濃度梯度進行超高速離心，將蛋白質依密度分離。此實驗分為三個部分介紹，分別為收菌、製備蔗糖濃度梯度溶液、破菌、進行超高速離心，和分析。首先收菌的部分，為收集 OD<sub>600</sub> 為 0.3-0.4 之間的待測菌液，接著加入 Cycloheximide 培養 10 分鐘，之後將菌液離心，收集沉澱物，將菌體凍於 -80°C；而蔗糖濃度梯度溶液之製備如下，分別配置 7%、27% 與 47% 三種濃度之蔗糖溶液於 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 100 mM KCl, 200  $\mu$ g/ml cycloheximide) 中，並加入蛋白酶抑制劑，如 PMSF 與 Leupeptin，接著分別依序緩慢地填入 4.2 mL 至離心管，再將管口封住，平放於 4°C 中 2-2.5 小時；而破菌的部分，先將菌體回溶於冰的 lysis buffer，並添加蛋白酶抑制劑 PMSF 和 Leupeptin。接著加入小玻璃珠，震盪 30

秒，放在冰上 1 分鐘後再震盪，重複以上步驟四次後，於 4°C 中以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液。最後將 9 OD<sub>260</sub> 之蛋白質液放於蔗糖溶液上，以 40,000 rpm 之條件進行超高速離心 2.5 小時，再以梯度分析儀分析 OD<sub>254</sub>，分析代表核糖體之 rRNA 含量。

### 3.7 Sucrose cushion

待測菌液培養至 0.6-0.8 OD<sub>600</sub>，接著離心菌液，將沉澱菌體凍於-80°C。破菌時將菌體懸浮於冰的 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 μM leupeptin) 中。震盪 30 秒，放在冰上 1 分鐘後再震盪，重複以上步驟六次後，於 4°C 中以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液。而離心管底部先加入 1M 蔗糖溶液，接著將定量 OD<sub>280</sub> 之蛋白質液放於上層，進行超高速離心，而離心條件為 80000 rpm，1 小時。得到之沉澱部分為結合核糖體之蛋白，上清部分為自由型態之蛋白。

### 3.8 免疫沉澱


待測菌液培養至 0.6-0.8 OD<sub>600</sub>，接著離心菌液，將沉澱菌體凍於-80°C。破菌時將菌體懸浮於冰的 IP buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 μM leupeptin) 中。震盪 30 秒，放在冰上 1 分鐘後再震盪，重複以上步驟六次後，於 4°C 中以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液。接著先將定量 OD<sub>280</sub> 之蛋白質液加入 Protein A beads 反應 30 分鐘，去除非專一性結合之蛋白；再加入 anti-myc 抗體反應 2 小時；最後加入 Protein A beads 反應 1 小時，接著離心將 anti-myc 抗體所結合之蛋白質複合體沉澱下來，以 IP buffer 清洗 beads 三次後，加入 30 μl SDS sample buffer 將結合蛋白溶出。

### 3.9 *In vitro* interaction

將目標蛋白與待測蛋白分別於 *E. coli* BL21-Condon Plus 中大量表現，並收集菌體。將菌體懸浮於 TEN100 buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl) 中進行破菌，接著於 4°C 中以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液。將目標蛋白與待測蛋白之破菌液與會 Glutathione beads 一同反應 1 小時，最後以 TEN100 buffer 清洗三次後，加入 30  $\mu$ l SDS sample buffer 將結合蛋白溶出。

## 四、結果

### 4.1 Puf6 和 Loc1 參與 60S 生合成之階段相似



從前人研究中，已知 Puf6 與 Loc1 會參與 60S 生合成，並知道會協助 rRNA 之剪切。因此，先從生長測試中，觀察 Puf6 與 Loc1 對於細胞生長之影響；接著再藉由螢光顯微鏡和 Polysome profile 實驗，進一步地確認在 60S 生合成途徑中，這兩個蛋白質之影響。若將細胞中 *PUF6* 整段基因拿掉，低溫 16-20°C 時會有生長上的缺失(Fig. 1A)。從螢光顯微鏡觀察中，以核糖蛋白 Rpl11-GFP 做為 60S 的 reporter，發現 60S 無法正常地被運送出核(Fig. 3B)，而這代表 60S 在細胞核內的生合成過程有問題，組裝不夠正確且完整，無法形成成熟的 60S 前驅物，因此沒辦法離開細胞核，進行後續的組裝步驟。而在 30、20、37°C 時，無論是常溫、低溫或高溫，從 Polysome profile 中，都可以發現 60S 生成量降低，也出現 Halfmer 的情形(Fig. 1B)。而 Halfmer 的形成是由於品質良好的 60S 數量減少，因此當 40S 結合上 mRNA 後，沒有足夠量的 60S 結合上來形成 80S，而這種情形就導致了 Halfmer；同樣地，若將 *LOC1* 拿掉，在常溫 30°C 時，生長情況即有非常嚴重的缺失(Fig. 1C)。而對於 60S 生合成之影響，無論是從螢光顯微鏡觀察 60S 的出核情況，或是從 Polysome profile 看 60S 之生合成情形，一樣皆有嚴重的影響(Fig. 1D & 3B)。以上實驗結果顯示了 Puf6 與 Loc1 對於 60S 生合成之重要性。

接著，以代表 60S 生合成中不同階段之因子作為 Bait，從核仁至細胞核分別為 Brx1、Tif6、Arx1 及 Rix1 (附錄三)，進行免疫沉澱實驗，觀察在生合成過程中，各個階段參與因子之情形。結果發現，Puf6 與 Loc1 於 Brx1 階段結合 60S 的量最多，接著依 Tif6、Arx1 與 Rix1 之順序，兩者接合量依序減少，這顯示了 Puf6 與 Loc1 結合 60S 之趨勢一致(Fig. 1E)。兩者從核仁便開始參與 60S 生合成，且參與之時間點相似，此點加深了兩者之關聯性。並透過 Sucrose cushion 實驗，將蛋白質液分為上清與沉澱，分別代表游離態蛋白與核糖體複合體，接著取沉澱

蛋白，再進行免疫沉澱。發現在核糖體複合體中，Puf6-myc 與 Loc1-myc 能夠抓下彼此(Fig. 1F)，代表在 Puf6 或 Loc1 參與 60S 生合成的階段中，另一蛋白的參與階段亦有重疊，同樣說明了 Puf6 與 Loc1 參與之時間點相似。



## 4.2 Puf6 與 Loc1 協助彼此於正確之階段執行功能

從上面實驗結果了解 Puf6 與 Loc1 對於 60S 生合成之影響，以及這兩個蛋白於生合成途徑中可能具有關聯性，因此接著探討 Puf6 和 Loc1 對於彼此之影響。首先以螢光顯微鏡觀察 Puf6 與 Loc1 之分布情形。此兩種蛋白於細胞中主要分布位置在核仁，而在 *puf6*  $\Delta$  細胞中，Loc1-GFP 會從核仁部分移動至細胞核；同樣地，若缺乏 *LOC1*，Puf6-GFP 也會從細胞核仁部分擴散至細胞核(Fig. 2A)。以上實驗結果顯示 Puf6 與 Loc1 兩者之間會影響彼此在細胞中的分布。接著進一步分析此差異是否源於 60S 生合成途徑中之影響。以核仁核糖體生合成因子 Nug1、Nog2 及 Tif6 做為 Bait 進行免疫沉澱，在 *puf6*  $\Delta$  突變株中，發現 Loc1 會大量累積於 Nug1 及 Nog2 參與階段之 60S 上，但並沒有累積在 Tif6 上(Fig. 2B)。Nug1、Nog2 主要於核仁至細胞核之階段參與 60S 生合成，而 Tif6 代表之階段為細胞核仁至細胞質，涵蓋的範圍較廣，可能在較下游的階段另有其他因子幫助 Loc1 離開 60S，因此，在 Tif6 做為 Bait 的結果中並沒有看到 Loc1 增加的情況。以上結果顯示若細胞中沒有 Puf6 的存在，則在細胞核仁至細胞核的階段中，Loc1 於 60S 之含量明顯地增加，由此結果推測 Puf6 會協助 Loc1 在正確的時間點離開 60S。

然而，於 *loc1*  $\Delta$  突變株，在 Nug1 及 Nog2 參與階段中，Puf6 於 60S 之含量沒有明顯地增加或減少(Fig. 2C)。但若以更早期之其他核糖體生合成因子 Ssf1 與 Brx1 做為 Bait，在 *puf6*  $\Delta$  中，Loc1 結合於 60S 之含量無明顯差異；然而在 *loc1*  $\Delta$ ，60S 上之 Puf6 含量有增加的情況(Fig. 2D)。統整以上結果，若細胞缺乏 *LOC1*，於較早期的因子 Ssf1 與 Brx1 參與之階段，Puf6 結合於 60S 之含量增加，而在較後期之因子 Nug1 與 Nog2，則無明顯之改變。因此，推測在缺乏 Loc1 的情形下，Puf6 結合於 60S 之時間點往前提早，或和核糖體結合的動態產生改變。所以同樣地，Loc1 亦會協助 Puf6 正確地參與 60S 生合成。

### 4.3 於 *loc1* $\Delta$ 去除 *PUF6* 基因可以部分修復 *loc1* $\Delta$ 突變株之缺失

另外也發現，在 30、25、37°C 情況下，若在 *loc1*  $\Delta$  突變株中去除掉 *PUF6* 整段基因，也就是產生 *puf6*  $\Delta$  *loc1*  $\Delta$ ，其生長情況會比 *loc1*  $\Delta$  好，於 30°C 與 25°C 時差異最明顯。但在低溫 16°C 時，*puf6*  $\Delta$  *loc1*  $\Delta$  反而長的較差(Fig. 3A)，可能在低溫時，缺乏 Puf6 及 Loc1 對於核糖體生合成或是其他重要的細胞生理功能的影響較大。接著進一步探討此修復是否來自於 60S 生合成之影響。從螢光顯微鏡觀察在 30°C 下，Rpl11-GFP 於突變株中之出核情形，也發現 *puf6*  $\Delta$  *loc1*  $\Delta$  可以修復 *loc1*  $\Delta$  所造成之 60S 生合成缺失。*loc1*  $\Delta$  中，約有近 90% 之 60S 無法正常地離開細胞核，但在 *puf6*  $\Delta$  *loc1*  $\Delta$ ，困在細胞核中的比例降低至 45%(Fig. 3B)。而同樣地，在 40S/60S 比例之分析中，*loc1*  $\Delta$  之 40S 與 60S 含量相較於 WT 皆明顯的下降；在 *puf6*  $\Delta$  *loc1*  $\Delta$  中，核糖體單元體之峰值皆有部分回升(Fig. 3C)。



#### 4.4 *PUF6* 之 High-copy suppressor 為 *RPL43B*

為了瞭解 Puf6 於 60S 生合成中如何執行其功能，使用生長最差的  $\Delta PUF$  突變株來進行 High-copy suppressor screen，篩選與 *PUF6* 有基因上關聯之基因，再從這些基因中，找尋可能與 *PUF6* 於 60S 生合成途徑中有關聯之基因，接著進一步地探討他們是如何協助 60S 生合成。將 2 $\mu$  DNA library 送入  $\Delta PUF$ ，從約 30000 菌落中，發現 83 個菌落生長情況較好，再進一步去確認，發現 24 個生長較好，其中 13 個菌落中帶有一樣的質體，質體中之基因分別為 *IME1*、*SFC1*，以及 *RPL43B*。而 *RPL43B* 之 RPL 涵意為 Ribosomal Protein of the Large subunit，代表為 60S 之核糖蛋白中的一員，因此於 60S 生合成途徑中之關聯性較大。為了確認 *RPL43B* 與 *PUF6* 之關聯性，建構 2 $\mu$  *RPL43B*，再次從生長，以及核糖體生合成之層面來觀察。在大量表現 *RPL43B* 的情況下，可以修復 *puf6* 突變株在低溫的生長缺失(Fig. 4A)。除此，從螢光顯微鏡之結果也可看到，在低溫 25°C 時，*puf6*  $\Delta$  中近乎所有 Rpl11-GFP 被困在細胞核中，然而，在大量表現 *RPL43B* 時，Rpl11-GFP 困在細胞核中的情況，從 100% 下降至 57%，顯示在 60S 生合成途徑中，亦有部分被修復(Fig. 4B)。

#### 4.5 Puf6 與 Loc1 協助 Rpl43 結合 60S

從上述實驗結果了解 Rpl43B 與 Puf6 於 60S 生合成之途徑中是具有關聯性的，而 Puf6 又與 Loc1 有關聯，因此，接下來進一步觀察 Puf6、Loc1 及 Rpl43 三者之間是否同樣也具有關聯性。首先，分別以 Puf6 和 Loc1 做為 Bait 進行免疫沉澱，發現 Puf6 與 Loc1 除了可以與彼此結合，也與 Rpl43 結合，而這顯示了 Puf6、Loc1 與 Rpl43 三者參與 60S 生合成之階段有重疊(Fig. 5A)。接著觀察 Puf6 與 Loc1 對於 Rpl43 之影響。若細胞缺乏 *LOC1*，會導致 Rpl43 於細胞中的含量大幅下降；而 Rpl43 在 *puf6*  $\Delta$  與 WT 的量則差異不大(Fig. 5B)。

另外，以免疫沉澱實驗來觀察三個蛋白於 60S 生合成之關聯性。以 Nog2 與 Arx1 做為 Bait，其中 Nog2 主要於核仁至細胞核之階段參與 60S 生合成，Arx1 則是代表 60S 出核前至運送到細胞質之後的階段。在 Nog2 階段，*puf6*  $\Delta$  突變株中 Rpl43-HA 結合 60S 之數量，相較於野生株，有顯著地下降(Fig. 5C)。由此結果推測，Rpl43 結合 60S 可能需要 Puf6 協助。另外，前面結果提到大量表現 Rpl43B 可以修復 *puf6*  $\Delta$  所造成之缺失，可由此結果呼應- 若無 Puf6 存在，Rpl43 結合 60S 之效率下降。然而，當大量表現 RPL43B 時，Rpl43 結合 60S 之數量可部分彌補，因此 *puf6*  $\Delta$  造成之缺失可部分修復；在 Nog2 階段，*loc1*  $\Delta$  中之 Rpl43-HA 結合量更是明顯受到影響(Fig. 5C)，而 Rpl43-HA 於 *loc1*  $\Delta$  之蛋白質數量已大幅減少，因此對於 Rpl43 結合於 60S 之影響更為明顯。此結果顯示 Loc1 對於維持 Rpl43 在細胞中之含量，以及協助 Rpl43 結合上 60S，皆十分地重要。然而在 Arx1 階段，*puf6*  $\Delta$  對於 Rpl43-HA 結合 60S 之影響不大；在 *loc1*  $\Delta$  中，仍無法觀察到 Rpl43 之訊號(Fig. 5C)。另外，從 Nog2 至 Arx1 階段，*puf6*  $\Delta$  對於 Rpl43-HA 結合 60S 之影響從降低至不變，推測可能對於組裝正確，以及有缺失之 pre-60S，Nog2 皆會結合上去作用，因此可以觀察到 Rpl43-HA 減少的情形；然而，Arx1 參與時為 60S 準備出核的階段，而 60S 在出核前，必須先確認組裝之品質，才能運送出核。*RPL43* 為必須基因，若 Rpl43 無法正常地結合 60S，則此 60S 應該

無法順利出核，繼續細胞質之生合成。所以在 Arx1 階段偵測到之 60S，應該為品質良好之 pre-60S。因此，在此階段觀察到之 Rpl43 結合量無明顯差異。



#### 4.6 Rpl43、Puf6 與 Loc1 三者之間有直接之結合

在前人研究中已知，Puf6 與 Loc1 兩者之間有直接的結合(Shahbadian et al., 2014)，但由於 Puf6 及 Loc1 都是 RNA 結合蛋白，為了進一步證明兩蛋白間的結合是直接結合，而不是依靠 RNA，因此在結合反應中加上 RNase 的處理，發現並不影響兩者之間的結合(Fig. 6A)。之前的實驗結果說明了 Puf6、Loc1 與 Rpl43 三者之間與 60S 生合成之關聯性，因此亦測試 Puf6、Loc1 與 Rpl43 三者是否有直接的結合。分別將 Puf6、Loc1 與 Rpl43 在 *E.coli* 中大量表現，接著破菌，將蛋白質液與 Beads 一同反應，觀察在體外是否會有直接之結合。發現 GST-Rpl43 分別會與 HIS-Puf6，以及 HIS-Loc1 有直接的結合(Fig. 6B)。顯示三者之間於 60S 生合成中之影響，可能是透過直接作用而相互影響，加深了三者之間的關聯性。

#### 4.7 Loc1 協助 Rpl43 維持其穩定性

從 Fig. 5B 發現 Rpl43-HA 在 *loc1Δ* 中含量明顯地減少，因此進一步以 *In vitro* 實驗來探討 Loc1 是否能維持 Rpl43 穩定性。首先，分別將 GST-Rpl43 與 HIS-Puf6、GST-Rpl43 與 HIS-Loc1，以及 GST-Rpl43 和未表現蛋白之破菌液一同與 Beads 進行反應之後，加入 0.05、0.1  $\mu\text{g/mL}$  之胰蛋白酶(trypsin)於 37°C 反應，觀察 Rpl43 在與 Puf6 或 Loc1 結合時，降解的情況是否有所改善。胰蛋白酶為 0.1  $\mu\text{g/mL}$  之結果較為明顯，在控制組中，Rpl43 含量明顯減少。然而，Rpl43 與 Loc1 結合時，Rpl43 含量幾乎不受影響。則加入 Puf6 反應之 Rpl43，降解情形亦有稍微改善，但無 Loc1 結合時顯著(Fig. 7A)。此結果說明 Loc1 與 Puf6 皆會和 Rpl43 結合，並保護其遭受酵素降解。為了得到更進一步的證明，將 GST-Rpl43 與 HIS-Puf6，或 HIS-Loc1 在 *E. coli* BL21-Condon Plus 進行共表現，看合成出來的 Rpl43 是否較為穩定，不易形成變性蛋白。分別比較各個組合中，上清之可溶蛋白，以及沉澱部分之變性蛋白，兩個部分的比例，發現在 Rpl43 單獨表現的控制組中，可溶蛋白與變性蛋白之比例大概為 1:1；與 Puf6 共表現之結果也是如此，只是在上清與沉澱兩部分中，GST-Rpl43 降解較少；而 Rpl43 與 Loc1 共表現時，Rpl43 形成變性蛋白之情況大幅減少，可溶與變性蛋白之差異非常地顯著(Fig. 7B)。從以上結果發現，Loc1 與 Rpl43 結合後，會保護 Rpl43，減緩其降解情形。並且，若 Loc1 和新生的 Rpl43 蛋白結合，則 Rpl43 摺疊不正確而形成變性蛋白的情況大幅改善。因此，顯示 Loc1 為 Rpl43 的伴護子(Chaperon)。

#### 4.8 Rpl43 幫助 Puf6 與 Loc1 離開 60S

核糖蛋白多具有兩套基因，*RPL43* 就擁有 *RPL43A* 與 *RPL43B* 兩套基因。他們的 DNA 序列有 90% 相似，轉譯出的胺基酸序列一樣。但內含子(intron)差異大，僅有 46% 相似。*RPL43* 是必須基因(essential gene)，但單獨去除 *RPL43A* 或 *RPL43B* 時，對生長完全不產生影響。因此，我們把 *RPL43B* 接於半乳糖啟動子(promoter)之後，將 *GAL::RPL43B-HA* 質體送入 *rpl43aPL43B-HA* 突變株。若使用半乳糖為碳源，則會大量表現 *RPL43B*；若改用葡萄糖為碳源，則 *RPL43B* 無法表現。首先在生長測試結果中，確認當碳源為葡萄糖時(YPD 培養基)，*GAL::RPL43* 的確因無法表現 *RPL43*，而無法生長(Fig. 8A)。

接著，將 *GAL::RPL43* 先以半乳糖(2%)為碳源培養，接著再加入葡萄糖(2%)，培養 4 小時為條件來養菌，進行後續實驗。從 Polysome profile 分析中發現，若細胞中缺乏組成 60S 之一員-Rpl43，則的確對於 60S 生合成有嚴重的影響：60S 生成量明顯降低，也幾乎看不到多核糖體之訊號(Fig. 8B)。以螢光顯微鏡來觀察抑制 Rpl43 表現是否會影響 Loc1 與 Puf6 在細胞中之分布位置。Puf6 與 Loc1 於細胞中主要分布位置在核仁，在加入葡萄糖 4 小時後，此兩種蛋白之位置皆從細胞核仁改變成部分移動至細胞核(Fig. 8C)。

接著進一步以免疫沉澱實驗，觀察在缺乏 *RPL43* 時，60S 生合成中不同階段之影響情形。分別以核仁、細胞核，與細胞質這三個不同階段參與生合成之因子做為 Bait，分別為 Nog2、Arx1、Nmd3、Drg1 與 Rei1。從實驗結果發現，以 Nog2 做為 Bait，在細胞核仁的階段中，在缺乏 *RPL43* 的情況下，Puf6 與 Loc1 在 60S 之含量皆比 WT 多；接著 Arx1 代表 60S 出核前至運送到細胞質之後的階段，WT 幾乎偵測不到 Puf6 與 Loc1，然而在 *GAL::RPL43* 中同樣也看到兩個蛋白顯著增加的情形；Nmd3 也是在 60S 出核前結合上去，但在細胞質比 Arx1 晚離開 60S，在此階段 Puf6 與 Loc1 也是有增加，但幅度並無前面兩個階段大；Drg1 則是在 60S 離開細胞核，抵達細胞質時結合上去，接著離開 60S 之時間點比 Arx1

早，其在 60S 參與之階段較短，而實驗結果中，Puf6 與 Loc1 之增加幅度非常地明顯；而最後一個階段為 Rei1，Rei1 於細胞質中結合 60S，導致 Arx1 離開 60S，而此時間點 Nmd3 仍結合於 60S。於此階段中，Puf6 與 Loc1 含量也有增加，但幅度與 Nmd3 之階段雷同，並無其他階段來的明顯(Fig. 8D)。而這些階段之 Puf6 與 Loc1 之含量從少變多，推測是由於缺乏 Rpl43 之協助，導致此兩個蛋白無法在正確的時間點離開 60S，而累積於 60S 上，使得偵測到之含量增加。此外，也觀察以 Puf6 與 Loc1 本身當作 Bait，在 Rpl43 停止表現的突變株中，會有什麼影響。從結果發現，在突變株中，Tif6 之含量皆明顯地上升(Fig. 8E)。而在前一結果中，在不同階段皆發現 Puf6 與 Loc1 累積，但另一參與因子 Tif6 並沒有顯著增加的情形，其含量差異不大，或反而是下降。而含有 Puf6 與 Loc1 的核糖體中 Tif6 含量上升，可能是由於此兩個蛋白累積在 60S 上，參與的階段往後延伸，因此與 Tif6 參與之階段重疊部分增加。此現象呼應上述結果- Puf6 與 Loc1 在缺乏 Rpl43 時，會累積於 60S 上。

目前了解 Rpl43 會幫助 Puf6 與 Loc1 離開 60S(Fig. 8D)，而前面實驗中也發現 *puf6*  $\Delta$  也會導致 Loc1 累積於 60S(Fig. 2B)。另外，在 Fig. 4A 與 4B 中發現大量表現 *RPL43* 時，可修復 *puf6* 缺失所造成的生長與 60S 生合成缺失。因此，想進一步探討 *RPL43* 修復之機制，是否與本段發現之結果有關連。同樣以 Nug1 作為 Bait，與 Fig. 2B 結果相同，*puf6*  $\Delta$  在加入空載體的控制組中，Loc1 大量累積於 60S，然而，大量表現 *RPL43* 時，則 Loc1 累積的情形消失(Fig. 8F)。此結果顯示，由於 Rpl43 亦會協助 Loc1 離開 60S，因此，*puf6*  $\Delta$  所造成之 Loc1 累積，在大量表現 Rpl43 時可幫助累積的 Loc1 離開 60S，而此結果可能為 *RPL43* 對於 *puf6*  $\Delta$  之修復機制。

#### 4.9 分析 Puf6 的功能性區塊

為了解 Puf6 如何協助 60S 生合成，以及如何與 Loc1 與 Rpl43 相互作用，建構多個 *puf6* 突變株。從前人研究中，Puf6 已知以其 PUF 區塊進行 rRNA 修飾，以及 *ASH1* mRNA 之結合，因此將 PUF 區塊拿掉，為  $\Delta PUF$ 。而 DE 區塊位於第 49 至第 101 個胺基酸附近，由於 Aspartate 與 Glutamate 為活性區常見的胺基酸，因此推測此區塊可能也有其特殊功能，將 DE 區塊拿掉，為  $\Delta DE$ 。除此之外，也將 *PUF6* 第 466 個胺基酸之後的序列拿掉，為  $\Delta C$ ；將前面第一個至第 101 個胺基酸去掉，為  $\Delta N$ ；也將 NLS 序列作點突變，分別將第 23 個胺基酸由 Lysine 換成 Leucine，第 26 與 27 個胺基酸由 Lysine 換成 Isoleucine；同時也將 PUF 區塊與 C 端去掉，只剩 N 端 132 個胺基酸，為 *N132* (Fig. 9A)。

接下來，分別分析這些突變株之生長與 60S 生合成情形。*puf6*  $\Delta$  在低溫才有生長缺失，因此於 16°C 與 30°C 進行觀察。若將 *PUF6* 之 PUF 區塊或 C 端去掉，或同時去掉，則生長情形變得極差。但  $\Delta DE$ 、 $\Delta N$  與 *NLS* 之生長情形則與 WT 差不多 (Fig. 9B)。在細胞中之分布情形與生長情形雷同，生長狀況幾乎無缺失的  $\Delta DE$  仍與 WT 一樣，分布於核仁與細胞核。然而具有生長缺失之  $\Delta PUF$  與 *N132*，明顯從核仁擴散至細胞核。而缺乏正常 *NLS* 之  $\Delta N$  與 *NLS*，則是因無法入核而分布於細胞質，但  $\Delta N$  會有小亮點聚集的情形，且此亮點並非位於細胞核內 (Fig. 9C)。

接著以螢光顯微鏡觀察 Rpl11-GFP 之出核情況。除了  $\Delta DE$ ，其他突變株之 60S 皆困在細胞核內 (Fig. 9D)。Polysome profile 也有類似的情形，除  $\Delta DE$  以外之突變株，60S 比例下降，也有 Halfmer 出現 (Fig. 9E)。從以上結果，了解在 *PUF6* 中，PUF 區塊、N 端與 C 端皆對於 60S 生合成有影響。接下來，透過 Sucrose cushion，探討這些突變株是否還能與 60S 結合。 $\Delta PUF$  約有一半之比例在上清，而 *N132* 幾乎無法與 60S 結合，情形更為嚴重 (Fig. 9F)，顯示 Puf6 需要倚賴 PUF 區塊與 60S 結合，而接著要能在 60S 生合成途徑中正常地執行功能，還必須透過 C 端來




作用。然而， $\Delta N$  與 *NLS* 失去核聚集的訊號，但生長情形和野生株相似，且能與 60S 結合，代表有可能有其他的 *NLS* 訊號使 Puf6 入核；亦或是 Puf6 可能會與成熟的 60S 有結合。



#### 4.10 分析 Loc1 的功能性區塊

此外，也建構 *loc1* 突變株，分別去掉不同長度之 C 端，剩下 N 端 140、130、120 個胺基酸，為 *N140*、*N130* 與 *N120* (Fig. 10A)，來探討 Loc1 於 60S 生合成途徑中，可能的功能區塊。從生長測試結果來看，*N140* 與 *N130* 皆和 WT 之生長狀況差異不大，*N120* 稍微差了一些(Fig. 10B)。在細胞中的分布情形，正常情況下 Loc1 主要分布在核仁，而 *N140* 與 WT 雷同，*N130* 稍微往細胞核擴散，*N120* 擴散至細胞核的情形更為明顯(Fig. 10C)。接著以免疫沉澱實驗來觀察在 60S 生合成途徑中的影響。*N140* 之生長與分布情況皆無明顯缺失，但在免疫沉澱結果中，與 Puf6 之結合明顯減少許多，和 Rpl43 的結合也有些許下降；*N120* 與 Puf6、Rpl43 和 60S 的結合更是顯著下降，顯示 C 端之重要性(Fig. 10D)。綜合以上結果，造成 *N120* 分布位置差異最為明顯的原因，除了與 Puf6 之結合大幅減少之外，可能是由於和核糖蛋白 Rpl43 及 Rpl8 之結合能力也大幅下降，而這說明 *N120* 無法正常地結合 60S。因此，Loc1 從細胞質進入細胞核後，無法正常地從核仁開始參與 60S 生合成，導致 Loc1 分布位置改變，從核仁擴散至細胞核。

## 五、結論



在本研究中，對於 Puf6 與 Loc1 在 60S 生合成途徑中所扮演之角色，有進一步的了解。發現 *RPL43* 是 *puf6Δ* 之 High-copy suppressor，並進一步探討 Puf6、Loc1 與 Rpl43 於 60S 生合成中之關係。首先，發現 Loc1 對於維持 Rpl43 之穩定性非常重要，為其伴護子。而接著 Rpl43 結合 60S 需要 Puf6 與 Loc1 之協助，且 Puf6 能在正確的時間點結合 60S，也需要 Loc1 協助。並發現，Puf6 藉由其 PUF 區塊與 60S 和 Loc1 作用。接著，Puf6 與 Loc1 離開 60S 則需要 Rpl43。並且，三者之間具有直接的結合，因此，顯示此三個蛋白對於彼此之協助須透過直接的作用，而此點也加深了三者之間的關聯性。

## 六、討論

### 6.1 Rpl43、Loc1 與 Puf6 於 60S 生合成途徑中之關聯

Puf6 與 Loc1 主要分布位置皆位於核仁，因此被認為從細胞核內便參與 60S 生合成，其中，Loc1 還被認為只會分布於細胞核內(Long et al., 2001)。而針對此兩個蛋白參與 rRNA 修飾的部分，目前已知 Puf6 會參與 27S 及 7S pre-rRNAs 修飾階段(Qiu et al., 2014)，大約為核仁至核質的部分；Loc1 則協助 35S pre-rRNA 的 A0、A1 和 A2 位置上之剪切(Urbinati et al., 2006)，此階段為核仁中更早期的階段(附錄一)。Rpl43 與 Puf6 相似，被發現會參與 7S pre-rRNA 之修飾 (Steffen et al., 2012)，此階段大約在核仁至核質之位置。但影響之階段也未必能代表其結合 60S 之時間點，有可能在更早期即結合上去，但作用於其後的步驟。因此，目前仍未明瞭 Rpl43、Loc1 與 Puf6 結合 60S 之先後順序。從 Fig. 5B 中，發現 Rpl43 之蛋白質含量在 *loc1Δ* 大幅下降，Fig. 5C 中也看到 Loc1 對於 Rpl43 結合 60S 之影響。除此之外，從 Fig. 8 中也發現 Loc1 為 Rpl43 之伴護子，因此，Loc1 可能會在 60S 外直接結合 Rpl43，以幫助 Rpl43 穩定。並且 Loc1 可能帶著 Rpl43 結合 60S，而 Rpl43 與 60S 結合後構形較穩定，待 Loc1 執行其功能後，Rpl43 與 Puf6 再協助 Loc1 離開 60S。

此外，Loc1 會協助 Puf6 在正確時間點參與 60S 生合成(Fig. 2D)，避免 Puf6 提早結合上去。而 Puf6 與 Loc1 兩者之間不需依靠 RNA，會有直接的結合(Fig. 7A)；Puf6 與 Rpl43 亦會直接結合(Fig. 7B)。並且，Puf6 也會影響 Rpl43 結合 60S(Fig. 5C)。因此，綜合以上幾點，推測 Rpl43、Loc1 與 Puf6 三個蛋白，可能會先於 60S 外形成小複合體，Loc1 幫助 Rpl43 維持穩定性，接著，Puf6 與 Loc1 協助 Rpl43 結合 60S，同時，Loc1 也確保 Puf6 於正確的時間點結合 60S。此三個蛋白可能在同一時間結合 60S，也可能是前後結合上去，但在核糖體上有倆倆間的結合。但目前能確定的是，此三個蛋白對於彼此結合與離開 60S，皆相當地重要。

## 6.2 Puf6 與 Loc1 參與 60S 生合成之階段

從研究中之結果來分析，Puf6 與 Loc1 從核仁階段(Ssf1 階段)便開始參與生合成(Fig. 2D)，與前人研究之結果可相呼應。而在 Fig. 6E 之結果中，Puf6 在 WT 之情形，在 Nog2 階段有訊號，到了 60S 之出核階段- Arx1，Puf6 於 60S 之含量大幅下降。然而，同樣是位於出核階段之 Nmd3，以及出核後短暫參與之 Drg1，卻又有 Puf6 之訊號。Nmd3 參與之階段與 Arx1 有重疊，但 60S 抵達細胞質後，Nmd3 比 Arx1 晚離開 60S，而 Drg1 參與的階段差不多在 Arx1 離開 60S 之時。因此，推測 Puf6 參與 60S 生合成可能分為兩階段，第一階段從核仁開始，直到 60S 出核時，Puf6 先離開；60S 出核後，在 Arx1 離開之階段，同時也是 Drg1 短暫參與生合成之階段，Puf6 可能又在細胞質與 60S 結合，繼續參與生合成。

另外，Nmd3 也被發現會與成熟之 60S 結合(Ho and Johnson, 1999)，因此，Nmd3 階段之 60S 有 Puf6 的存在，亦可能是 Puf6 會與成熟的 60S 結合。而此點可能與另一條途徑有關聯。目前已知 Puf6 會在協助運輸 *ASH1* mRNA 的同時，抑制成熟的 60S 結合，以避免轉譯的進行。而 Puf6 與成熟之 60S 結合可能與此點有關，Puf6 分別與 48S 和 60S 結合，來協助轉譯的抑制；在成熟的 60S 上，Puf6 也可能另有其他未知功能。

而 Loc1 的部分，從 Fig. 2D 發現 Loc1 的確從較早期之核仁階段(Ssf1 與 Brx1 階段)便開始參與 60S 生合成，但到了 Nug1 與 Nog2 階段(從 Ssf1 與 Brx1 之後的核仁階段至核質階段)，Loc1 的訊號幾乎偵測不到(Fig. 2B)。接下來的 Arx1、Nmd3、Drg1 與 Rei1 階段，也幾乎偵測不到 Loc1 訊號(Fig. 6E)，也與前人研究相呼應，Loc1 僅在細胞核內執行其功能，並且，從以上結果中發現，Loc1 參與之階段可能僅於早期核仁之部分。

### 6.3 RPL43B 無法修復 *loc1Δ* 所造成之生長缺失

大量表現 *RPL43B* 可修復 *puf6Δ* 之缺失，可能是在此情況下，雖然缺少 Puf6 協助 Rpl43B 正常地結合上 60S，但大量表現 Rpl43B 時，使得部分 Rpl43B 仍可結合上去，且結合上的 Rpl43B 能進而協助累積於 60S 之 Loc1 可以正常地離開 60S，進行接下來之生合成步驟；而在 *loc1Δ* 突變株中，Rpl43B 也無法正常地結合 60S，此外，細胞中 Rpl43B 之含量也大幅下降，因此，我們也在 *loc1Δ* 中大量表現 *RPL43B*，然而卻無法修復生長缺失(附錄四)。推測大量表現 *RPL43B* 僅能修復 *puf6Δ* 所造成之 Loc1 累積，但無法修復 *loc1Δ* 所造成之缺失。推測可能原因如下:在 *loc1Δ* 中，除了 Puf6 會累積於 60S，也會導致核糖蛋白 Rpl8 結合 60S 的數量下降(Fig. 2C)，影響的層面更深也更廣。此外，可能 Rpl43B 需 Loc1 維持正常的構型或功能，因此大量表現 Rpl43B 亦無法拯救 *loc1Δ* 的生長缺失。

#### 6.4 Puf6 於 *loc1Δ* 之分布由核仁擴散至細胞核

Loc1 在缺乏 Puf6 時往細胞核擴散，可能是因為在 60S 停留的時間往後延伸；而 Puf6 在缺乏 Loc1 時，會提早結合上 60S。理論上來說，分布位置應該都在核仁內，不會有明顯改變，但卻往細胞核擴散，可能是在另一條途徑上之影響 - *ASH1* mRNA 之主動運輸。由於缺乏 Loc1 會導致 *ASH1* mRNA 之不對稱分布無法正常地執行(Long et al., 2001)，也就是細胞核內的運輸過程出現問題，因此其他的參與因子可能也受到影響；除此之外，Loc1 同時也是橋梁的角色，因此在 *loc1Δ* 突變株中，Puf6 無法結合上 She2，無法在 *ASH1* mRNA 上形成 Puf6-Loc1-She2 複合體並正常地執行功能 (Shahbadian et al., 2014)。所以，以上原因可能造成 Puf6 入核後，無法正常地於核仁執行功能，因而部分擴散至細胞核。

## 七、參考文獻

- Armache, J.P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Becker, T., Bhushan, S., Jossinet, F., Habeck, M., Dindar, G., Franckenberg, S., *et al.* (2010). Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-A resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19748-19753.
- Ball, S. (2011). Diamond Blackfan anemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program 2011*, 487-491.
- Bassler, J., Grandi, P., Gadai, 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.
- Bassler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M., and Hurt, E. (2010). The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. *Molecular cell* 38, 712-721.
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J.M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., and Medalia, O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* 306, 1387-1390.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* 334, 1524-1529.
- Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., and Nasmyth, K. (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84, 699-709.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *The EMBO journal* 19, 5514-5524.
- Burroughs, L., Woolfrey, A., and Shimamura, A. (2009). Shwachman-Diamond syndrome: a review of the clinical presentation, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hematology/oncology clinics of North America* 23, 233-248.
- 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.
- Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2001). RNP localization and transport in yeast. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 297-310.
- Cosma, M.P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO:



Ash1 is the commander. *EMBO reports* 5, 953-957.

Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T., and Matunis, M.J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *The Journal of cell biology* 158, 915-927.

Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R.H., and Zenklusen, D. (2003). RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Current opinion in microbiology* 6, 614-620.

De Marchis, M.L., Giorgi, A., Schinina, M.E., Bozzoni, I., and Fatica, A. (2005). Rrp15p, a novel component of pre-ribosomal particles required for 60S ribosome subunit maturation. *Rna* 11, 495-502.

Deng, Y., Singer, R.H., and Gu, W. (2008). Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes Dev* 22, 1037-1050.

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.

Du, T.G., Jellbauer, S., Muller, M., Schmid, M., Niessing, D., and Jansen, R.P. (2008). Nuclear transit of the RNA-binding protein She2 is required for translational control of localized ASH1 mRNA. *EMBO reports* 9, 781-787.

Ellis, S.R., and Gleizes, P.E. (2011). Diamond Blackfan anemia: ribosomal proteins going rogue. *Seminars in hematology* 48, 89-96.

Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2003). Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 163, 1255-1266.

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., Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Molecular and cellular biology* 23, 1798-1807.

Fribourg, S., Braun, I.C., Izaurralde, E., and Conti, E. (2001). Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Molecular cell* 8, 645-656.

Fribourg, S., and Conti, E. (2003). Structural similarity in the absence of sequence homology of the messenger RNA export factors Mtr2 and p15. *EMBO reports* 4, 699-703.

Gelperin, D., Horton, L., Beckman, J., Hensold, J., and Lemmon, S.K. (2001). Bms1p, a

novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *Rna* 7, 1268-1283.

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.

Granneman, S., Nandineni, M.R., and Baserga, S.J. (2005). The putative NTPase Fap7 mediates cytoplasmic 20S pre-rRNA processing through a direct interaction with Rps14. *Molecular and cellular biology* 25, 10352-10364.

Greber, B.J., Boehringer, D., Montellese, C., and Ban, N. (2012). Cryo-EM structures of Arx1 and maturation factors Rei1 and Jjj1 bound to the 60S ribosomal subunit. *Nature structural & molecular biology* 19, 1228-1233.

Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R.H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* 18, 1452-1465.

Haarer, B., Viggiano, S., Hibbs, M.A., Troyanskaya, O.G., and Amberg, D.C. (2007). Modeling complex genetic interactions in a simple eukaryotic genome: actin displays a rich spectrum of complex haploinsufficiencies. *Genes & development* 21, 148-159.

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.

Herold, A., Suyama, M., Rodrigues, J.P., Braun, I.C., Kutay, U., Carmo-Fonseca, M., Bork, P., and Izaurralde, E. (2000). TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Molecular and cellular biology* 20, 8996-9008.

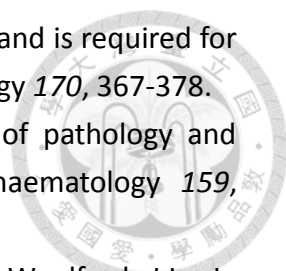
Heym, R.G., and Niessing, D. (2012). Principles of mRNA transport in yeast. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 1843-1853.

Ho, J.H., and Johnson, A.W. (1999). NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 19, 2389-2399.

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

Holt, C.E., and Bullock, S.L. (2009). Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326, 1212-1216.

Holzel, M., Rohmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W., *et al.* (2005).



Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *The Journal of cell biology* **170**, 367-378.

Horos, R., and von Lindern, M. (2012). Molecular mechanisms of pathology and treatment in Diamond Blackfan Anaemia. *British journal of haematology* **159**, 514-527.

Horsey, E.W., Jakovljevic, J., Miles, T.D., Harnpicharnchai, P., and Woolford, J.L., Jr. (2004). Role of the yeast Rrp1 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 Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**, 3718-3727.

Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., and Herskowitz, I. (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *The EMBO journal* **21**, 1158-1167.

Jansen, R.P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* **84**, 687-697.

Johnson, A.W., Ho, J.H., Kallstrom, G., Trotta, C., Lund, E., Kahan, L., Dahlberg, J., and Hedges, J. (2001). Nuclear export of the large ribosomal subunit. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **66**, 599-605.

Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* **131**, 557-571.

Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B., and Hurt, E. (2008). The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *The Journal of cell biology* **181**, 935-944.

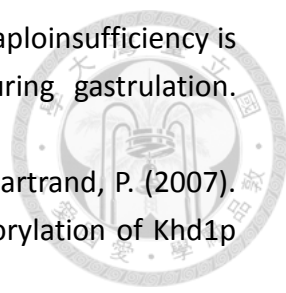
Krogan, N.J., Peng, W.T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., *et al.* (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell* **13**, 225-239.

Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J., and Jansen, R.P. (2002). Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *The Journal of cell biology* **159**, 971-982.

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.

Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *The EMBO journal* **19**, 6592-6601.

- Long, R.M., Gu, W., Meng, X., Gonsalvez, G., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2001). An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *The Journal of cell biology* 153, 307-318.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., and Jansen, R.P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277, 383-387.
- Lutzmann, M., Kunze, R., Stangl, K., Stelter, P., Toth, K.F., Bottcher, B., and Hurt, E. (2005). Reconstitution of Nup157 and Nup145N into the Nup84 complex. *The Journal of biological chemistry* 280, 18442-18451.
- Ma, J., Goryaynov, A., Sarma, A., and Yang, W. (2012). Self-regulated viscous channel in the nuclear pore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 7326-7331.
- Martin, K.C., and Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136, 719-730.
- Matsuo, Y., Granneman, S., Thoms, M., Manikas, R.G., Tollervey, D., and Hurt, E. (2014). Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature* 505, 112-116.
- Meignin, C., and Davis, I. (2010). Transmitting the message: intracellular mRNA localization. *Current opinion in cell biology* 22, 112-119.
- Meyer, A.E., Hoover, L.A., and Craig, E.A. (2010). The cytosolic J-protein, Jjj1, and Rei1 function in the removal of the pre-60 S subunit factor Arx1. *The Journal of biological chemistry* 285, 961-968.
- Milkereit, P., Gadai, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E., and Tschochner, H. (2001). Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 105, 499-509.
- Muller, M., Heym, R.G., Mayer, A., Kramer, K., Schmid, M., Cramer, P., Urlaub, H., Jansen, R.P., and Niessing, D. (2011). A cytoplasmic complex mediates specific mRNA recognition and localization in yeast. *PLoS biology* 9, e1000611.
- Ni, L., and Snyder, M. (2001). A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 12, 2147-2170.
- 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.
- Nissan, T.A., Galani, K., Maco, B., Tollervey, D., Aebi, U., and Hurt, E. (2004). A pre-ribosome with a tadpole-like structure functions in ATP-dependent maturation of 60S subunits. *Molecular cell* 15, 295-301.
- Panic, L., Tamarut, S., Sticker-Jantscheff, M., Barkic, M., Solter, D., Uzelac, M.,



Grabusic, K., and Volarevic, S. (2006). Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation. *Molecular and cellular biology* 26, 8880-8891.

Paquin, N., Menade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E., and Chartrand, P. (2007). Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol Cell* 26, 795-809.

Qiu, C., McCann, K.L., Wine, R.N., Baserga, S.J., and Hall, T.M. (2014). A divergent Pumilio repeat protein family for pre-rRNA processing and mRNA localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 18554-18559.

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.

Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B.T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *The Journal of cell biology* 148, 635-651.

Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Pante, N., and Hurt, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Molecular and cellular biology* 18, 6826-6838.

Saveanu, C., Bienvenu, 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.

Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P.E., Lebreton, A., Rousselle, J.C., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2003). Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Molecular and cellular biology* 23, 4449-4460.

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.

Schafer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *The EMBO journal* 22, 1370-1380.

Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R., and Hurt, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. *The EMBO journal* 16, 3256-3271.

Shahbadian, K., Jeronimo, C., Forget, A., Robert, F., and Chartrand, P. (2014). Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples translational repression to

mRNA localization. *Nucleic acids research* 42, 8692-8704.

Shen, Z., Paquin, N., Forget, A., and Chartrand, P. (2009). Nuclear shuttling of She2p couples ASH1 mRNA localization to its translational repression by recruiting Loc1p and Puf6p. *Mol Biol Cell* 20, 2265-2275.

Sil, A., and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 84, 711-722.

Simoff, I., Moradi, H., and Nygard, O. (2009). Functional characterization of ribosomal protein L15 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 55, 111-125.

St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 363-375.

Steffen, K.K., McCormick, M.A., Pham, K.M., MacKay, V.L., Delaney, J.R., Murakami, C.J., Kaeberlein, M., and Kennedy, B.K. (2012). Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 107-118.

Talkish, J., Zhang, J., Jakovljevic, J., Horsey, E.W., and Woolford, J.L., Jr. (2012). Hierarchical recruitment into nascent ribosomes of assembly factors required for 27SB pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 40, 8646-8661.

Tang, L., Sahasranaman, A., Jakovljevic, J., Schleifman, E., and Woolford, J.L., Jr. (2008). Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 required for assembly of the Nop7-subcomplex in yeast preribosomes. *Molecular biology of the cell* 19, 2844-2856.

Thomas, F., and Kutay, U. (2003). Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J Cell Sci* 116, 2409-2419.

Trotta, C.R., Lund, E., Kahan, L., Johnson, A.W., and Dahlberg, J.E. (2003). Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *The EMBO journal* 22, 2841-2851.

Uechi, T., Nakajima, Y., Nakao, A., Torihara, H., Chakraborty, A., Inoue, K., and Kenmochi, N. (2006). Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in zebrafish. *PloS one* 1, e37.

Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Bottcher, B., and Hurt, E. (2009). Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell* 138, 911-922.

Urbinati, C.R., Gonsalvez, G.B., Aris, J.P., and Long, R.M. (2006). Loc1p is required for efficient assembly and nuclear export of the 60S ribosomal subunit. *Molecular genetics and genomics* : MGG 276, 369-377.

- Vanrobays, E., Gelugne, J.P., Gleizes, P.E., and Caizergues-Ferrer, M. (2003). Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 23, 2083-2095.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* 33, 261-311.
- Vlachos, A., Rosenberg, P.S., Atsidaftos, E., Alter, B.P., and Lipton, J.M. (2012). Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* 119, 3815-3819.
- Wehner, K.A., and Baserga, S.J. (2002). The sigma(70)-like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. *Molecular cell* 9, 329-339.
- Wente, S.R., and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000562.
- Woolford, J.L., Jr., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 643-681.
- Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 355-369.
- 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. *Mol Cell* 26, 51-62.

表一、本研究中使用之啤酒酵母菌株

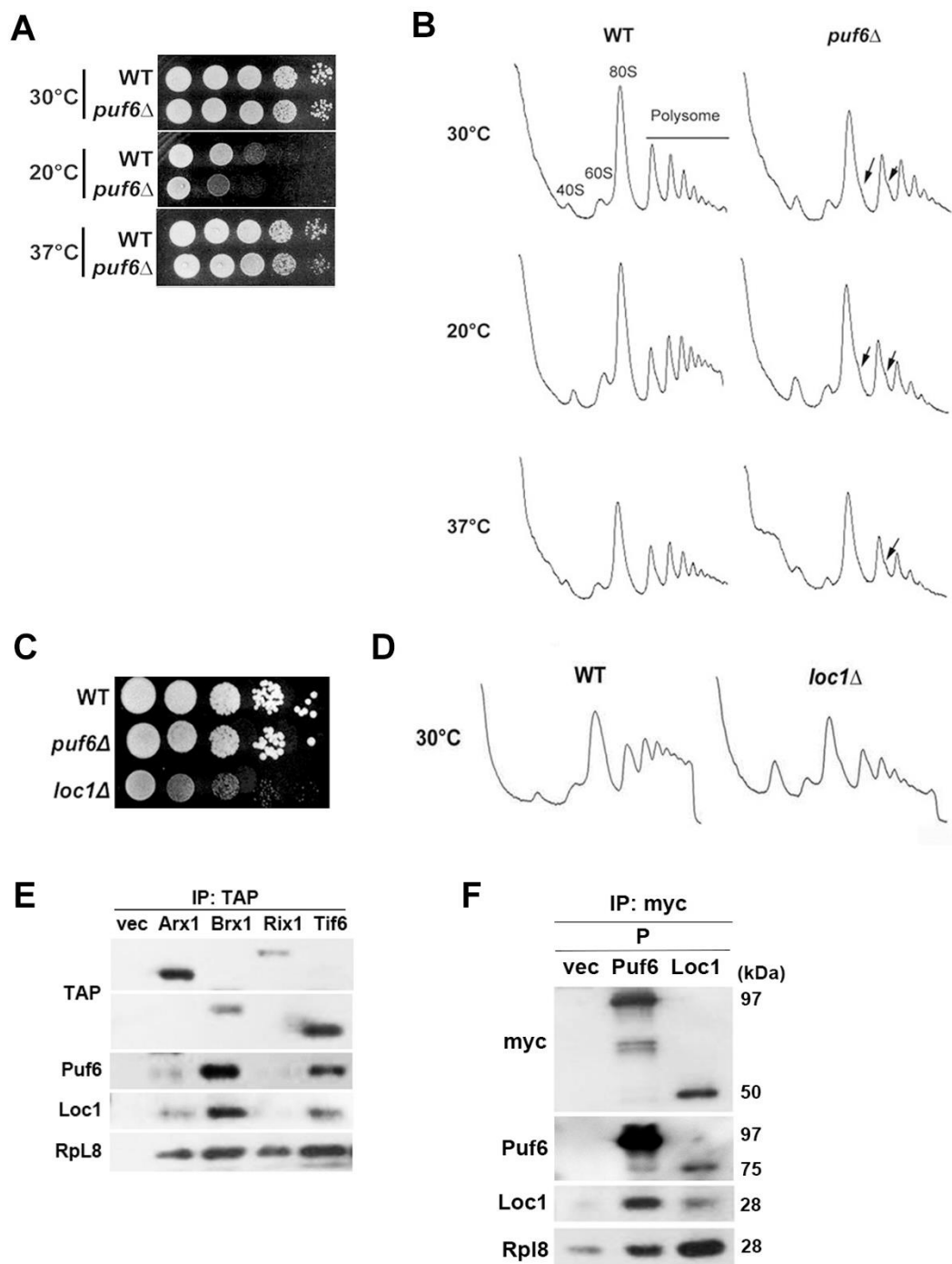
Strain	Genotype	Source
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystem
AJY1873	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TIF6-TAP::HIS3MX</i>	(Winzeler et al., 1999)
KLY67	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 puf6Δ::KanMX</i>	this study
KLY135	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUF6-GFP::HIS3MX</i>	this study
KLY218	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 loc1Δ::KanMX</i>	this study
KLY219	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl43aΔ::KanMX</i>	this study
KLY312	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 puf6Δ::KanMX loc1Δ::KanMX</i>	this study
KLY317	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ARX1-TAP::HIS3MX</i>	this study
KLY471	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 BRX1-TAP::HIS3MX</i>	this study
KLY558	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 BRX1-TAP::HIS3MX loc1Δ::KanMX</i>	this study
KLY561	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl43bΔ::CloNAT</i>	this study
KLY596	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RIX1-TAP::HIS3MX</i>	this study
KLY598	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SSF1-TAP::HIS3MX</i>	this study
KLY624	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TIF6-TAP::HIS3MX puf6Δ::KanMX</i>	this study
KLY628	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpl43aΔ::KanMX rpl43bΔ::CloNAT+ PKL381</i>	This study
KLY674	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 BRX1-TAP::HIS3MX puf6Δ::KanMX</i>	this study
KLY818	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SSF1-TAP::HIS3MX puf6Δ::KanMX</i>	this study
KLY820	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SSF1-TAP::HIS3MX loc1Δ::KanMX</i>	this study
KLY829	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PUF6-GFP::HIS3MX rpl43aΔ::KanMX rpl43bΔ::CloNAT+ PKL381</i>	this study



表二、本研究中使用之質體

Plasmid	Gene	Relevant Marker	Source
pRS415		<i>CEN LEU2</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pRS426		<i>2<math>\mu</math> URA3</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pGEX-4T3		Amp	Open Biosystem
PAJ538	<i>NMD3-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	(Ho et al., 2000)
PAJ903	<i>LSG1-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	(Kallstrom et al., 2003)
PAJ1010	<i>TIF6-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	(Hung and Johnson, 2006)
PAJ1013	<i>NUG1-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	Arlen W. Johnson
PAJ1014	<i>NOG2-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	(Hung and Johnson, 2006)
PAJ1026	<i>ARX1-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	(Hung and Johnson, 2006)
PAJ1028	<i>REI1-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	(Lo et al., 2010)
PAJ2075	<i>DRG1-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	(Lo et al., 2010)
PKL32	<i>SIK1-mRFP</i>	<i>CEN URA3</i>	this study
PKL52	<i>PUF6-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL53	<i>PUF6-<math>\Delta</math>DE-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL54	<i>PUF6-N132-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL55	<i>PUF6-<math>\Delta</math>PUF-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL56	pET28a- <i>PUF6</i>	Kan	this study
PKL85	<i>PUF6-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL86	<i>PUF6-<math>\Delta</math>DE-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL87	<i>PUF6-<math>\Delta</math>PUF-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL88	<i>PUF6-N132-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL188	<i>PUF6-<math>\Delta</math>N-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL189	<i>PUF6-<math>\Delta</math>N-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL198	<i>PUF6-NLS-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL199	<i>PUF6-NLS-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL228	<i>RPL11B-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	(丁亞涵, 2014)
PKL288	pET28a- <i>LOC1</i>	Kan	this study
PKL302	<i>RPL43A</i>	<i>2<math>\mu</math> URA3</i>	this study
PKL304	<i>PUF6-<math>\Delta</math>C-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL306	<i>PUF6-<math>\Delta</math>C-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL308	<i>RPL43B</i>	<i>2<math>\mu</math> URA3</i>	this study
PKL334	<i>LOC1-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL337	<i>LOC1-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL350	<i>RPL43B-HA</i>	<i>CEN URA3</i>	this study

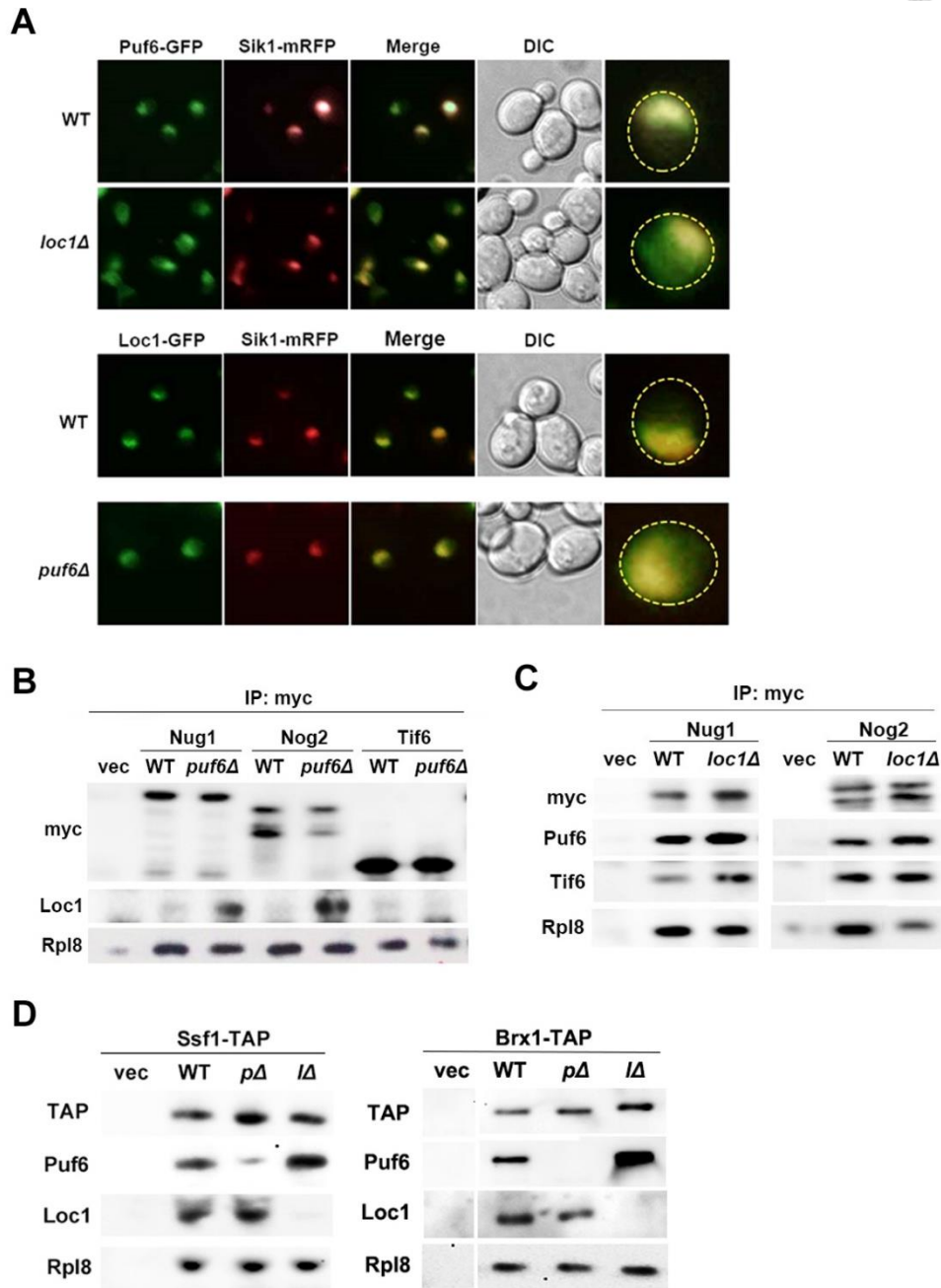
PKL381	<i>GAL::RPL43B-HA</i>	<i>CEN HIS3</i>	this study
PKL400	<i>GST-LOC1</i>	Amp	this study
PKL449	<i>LOC1-N120-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL450	<i>LOC1-N130-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL451	<i>LOC1-N140-GFP</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL474	<i>GST-RPL43B</i>	Amp	this study
PKL514	pET21a- <i>PUF6-ΔN100</i>	Amp	this study
PKL515	<i>LOC1-N120-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL516	<i>LOC1-N130-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study
PKL517	<i>LOC1-N140-myc</i>	<i>CEN LEU2</i>	this study



**Figure 1. Puf6 和 Loc1 參與 60S 生合成之階段相似**

(A)(C) 分別於 30、20、37°C 比較 WT(BY4741)與 *puf6Δ*(KLY67)，以及比較 WT(BY4741)與 *loc1Δ*(KLY218)之生長差異。將待測菌隔液培養於 YPD 液態培養基，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再做序列稀釋，將菌液點於 YPD 培養基，

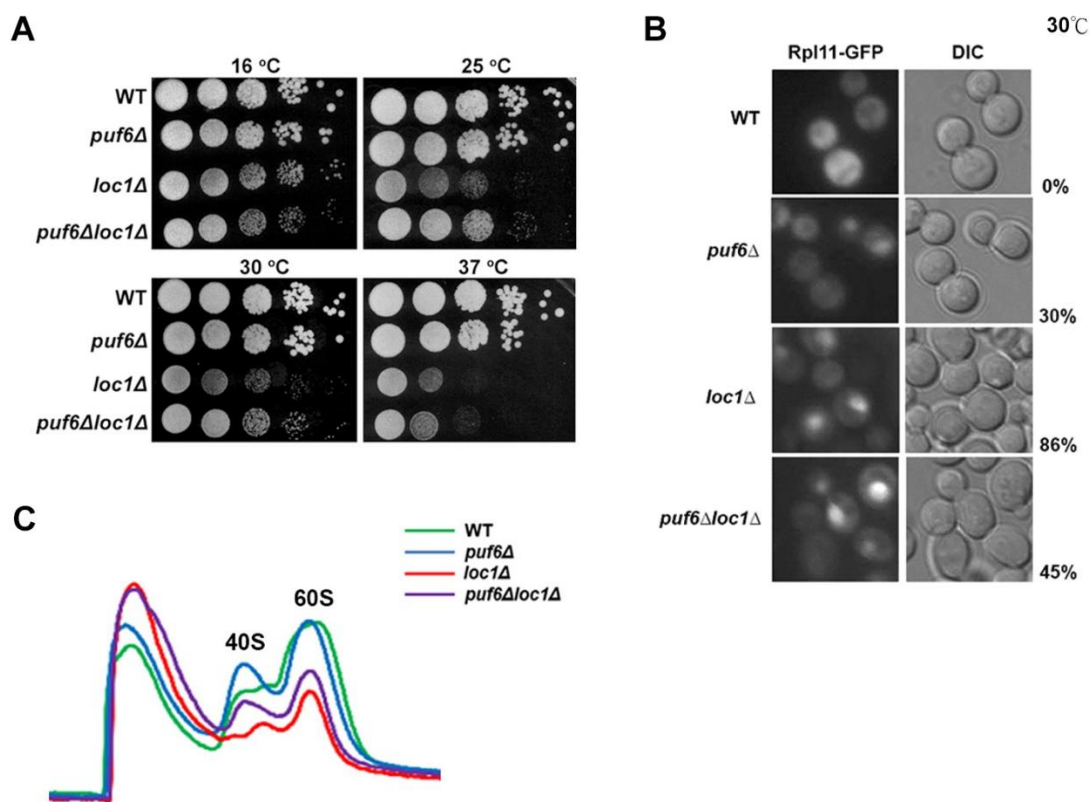
分別在 37、30、20°C，放置數天培養。(B)(D) 分別於 30、20、37°C 比較 WT(BY4741) 與 *puf6Δ*(KLY67)，以及比較 WT(BY4741) 與 *loc1Δ*(KLY218) 之核糖體生合成情形。將待測菌液培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.3-0.4，接著加入 Cycloheximide 培養 10 分鐘後，將菌體收集並凍於 -80°C，接著進行後續之 Polysome profile 分析。(E) 分別將 WT(BY4741)、Brx1-TAP(KLY471)、Tif6-TAP(KLY583)、Arx1-TAP(KLY317) 與 Rix1-TAP(KLY596) 培養於 YPD 液態培養基至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於 -80°C。接著以 IgG beads 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。(F) 將 *PUF6-myc*(PKL315)、*LOC1-myc* (PKL334) 與空載體(pRS415) 轉型入 WT(BY4741)，於 30°C 在 Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於 -80°C。先進行 Sucrose cushion，將沉澱蛋白回溶，接著以 α-myc 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。



**Figure 2. Puf6 與 Loc1 協助彼此於正確之階段執行功能**

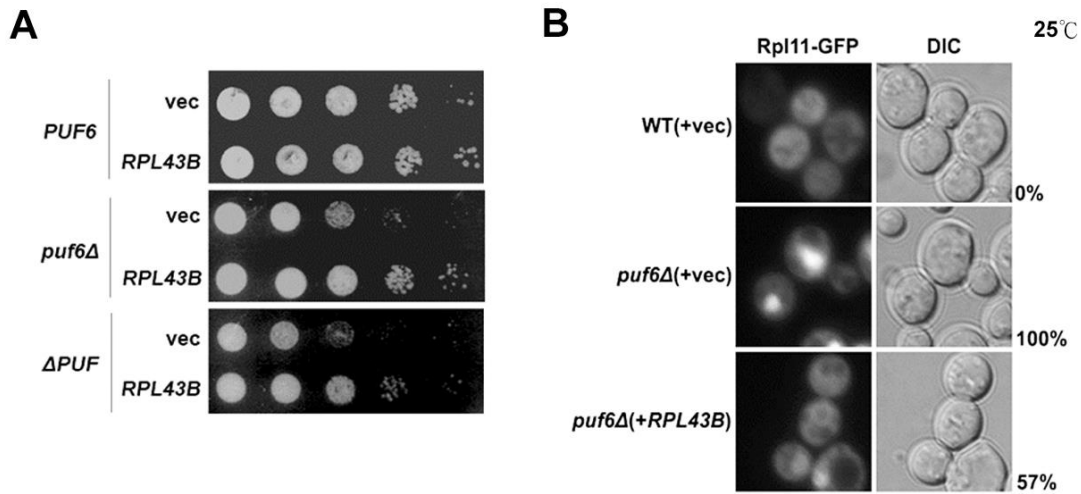
(A)比較 Puf6 分布位置於野生株(KLY135)及 *loc1Δ*(KLY405)之差異；同樣地，也將 *LOC1-GFP*(PKL337)分別轉型入 WT(BY4741)與 *puf6Δ*(KLY67)，觀察 Loc1 之分布情形。接著，再將 *SIK1-mRFP*(PKL32)轉型至以上菌株中，做為核仁之標記。分別在 Ura<sup>-</sup>和 Ura<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養隔夜，再將菌液稀釋，培養 3-4 小時，

以螢光顯微鏡觀察。(B)(C) 分別將 *NUG1-myc* (PAJ1013)與 *NOG2-myc* (PKL299) 轉型入 WT(BY4741)、*puf6Δ*(KLY67)與 *loc1Δ*(KLY218)，於 30°C 在 Leu 液態培養基中培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於-80°C。以 α-myc 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。(D) 分別將 WT (BY4741)、*SSF1-TAP* (KLY598)、*SSF1-TAP puf6Δ* (KLY818)、*SSF1-TAP loc1Δ* (KLY820)與 *BRX1-TAP* (KLY471)、*BRX1-TAP puf6Δ*(KLY674)、*BRX1-TAP loc1Δ* (KLY558)培養於 YPD 液態培養基至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於-80°C。接著以 IgG beads 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。



**Figure 3. 去除 *PUF6* 基因可以部分修復 *loc1Δ* 突變株之缺失**

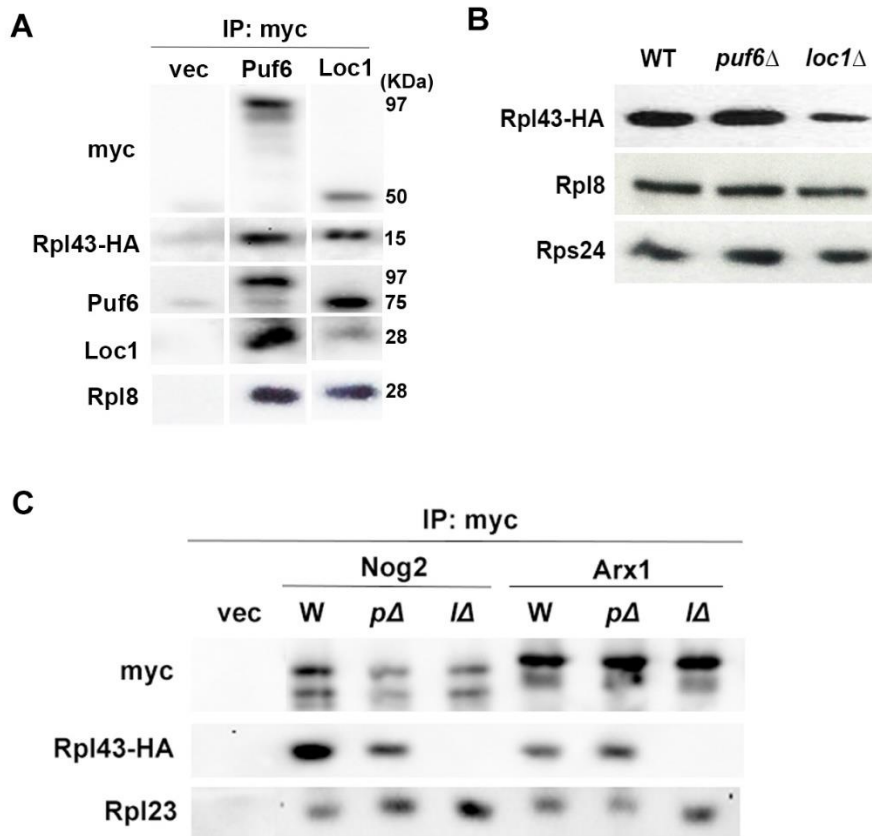
(A) 分別於 16、25、30 與 37°C 比較 WT (BY4741)、*puf6Δ* (KLY67)、*loc1Δ* (KLY218) 與 *puf6Δloc1Δ* (KLY312) 之生長差異。將待測菌隔液培養於 YPD 液態培養基，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再做序列稀釋，將菌液點於 YPD 培養基，分別在 16、25、30 與 37°C 放置數天培養。(B) 比較 60S 於 WT (BY4741)、*puf6Δ* (KLY67)、*loc1Δ* (KLY218) 與 *puf6Δloc1Δ* (KLY312) 之出核情形。將 *RPL11-GFP* (PKL228) 轉型至待測菌株，於 30°C 在 Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養隔夜，再將菌液稀釋，培養 3-4 小時，以螢光顯微鏡觀察。(C) 比較 WT (BY4741)、*puf6Δ* (KLY67)、*loc1Δ* (KLY218) 與 *puf6Δloc1Δ* (KLY312) 之 40S/60S 比例。將待測菌液培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.3-0.4，接著將菌體收集並凍於 -80°C，後續流程如 Polysome profile 分析，但 buffer 條件改為 50 mM Tris-HCl pH7.4，50 mM NaCl，1mM DTT。



**Figure 4. *puf6Δ* 之 High-copy suppressor 為 *RPL43B***

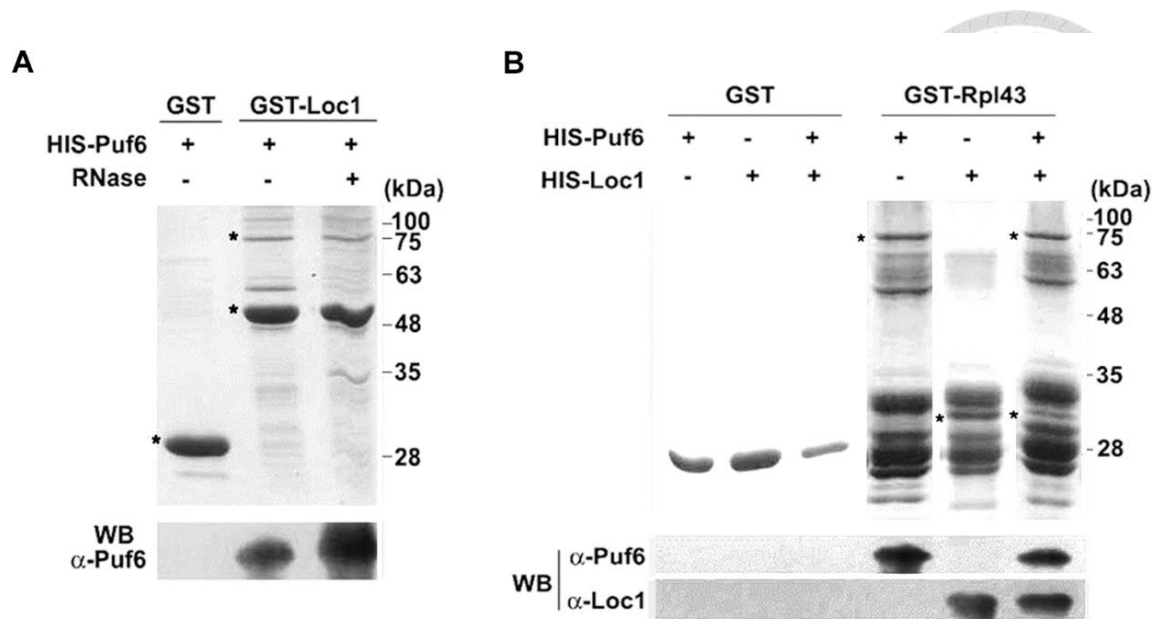
(A) 分別將  $\Delta PUF$ -GFP(PKL55) 與空載體 (pRS415) 轉型入 WT(BY4741) 與 *puf6Δ*(KLY67)，同時分別再送入  $2\mu$  *RPL43B*(PKL308) 與空載體 (pRS426)，於 Ura<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養隔液，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再做序列稀釋，將菌液點於 Ura<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>培養基，於 16°C 放置數天培養。(B) 分別將  $2\mu$  *RPL43B* (PKL308) 與空載體 (pRS426) 轉型入 WT(BY4741) 與 *puf6Δ*(KLY67)，再送入 *RPL11*-GFP(PKL228)，於 25°C 培養隔夜，再將菌液稀釋，培養於 25°C 約 4 小時，以螢光顯微鏡觀察。





**Figure 5. Puf6 與 Loc1 協助 Rpl43 結合 60S**

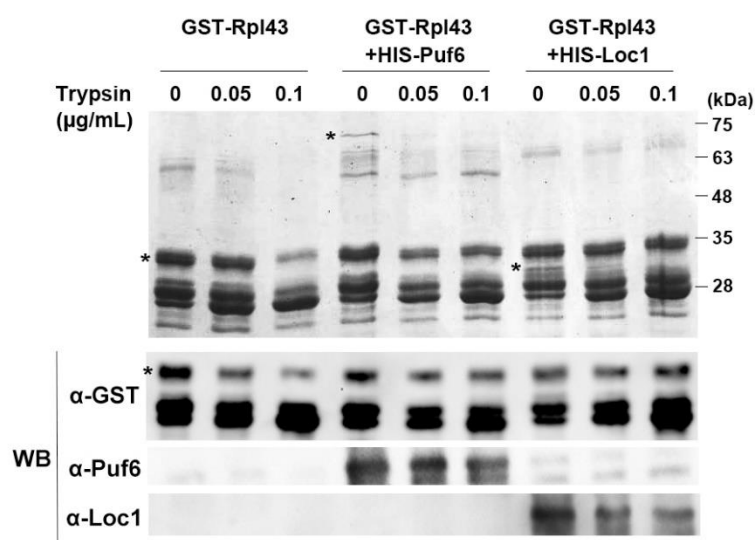
(A) 分別將 *PUF6-myc*(PKL85)與 *LOC1-myc* (PKL334)轉型入 WT(BY4741)，再另外送入 *RPL43-HA*(PKL350)。待測菌於 30°C 在 Ura<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於 -80°C。以 α-myc 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。(B)(C) 分別將 *NOG2-myc* (PKL299)與 *ARX1-myc* (PAJ1026)轉型入 WT(BY4741)、*puf6*Δ(KLY67)與 *loc1*Δ(KLY218)，再另外送入 *RPL43-HA*(PKL350)。待測菌於 30°C 在 Ura<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於 -80°C。以 α-myc 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。



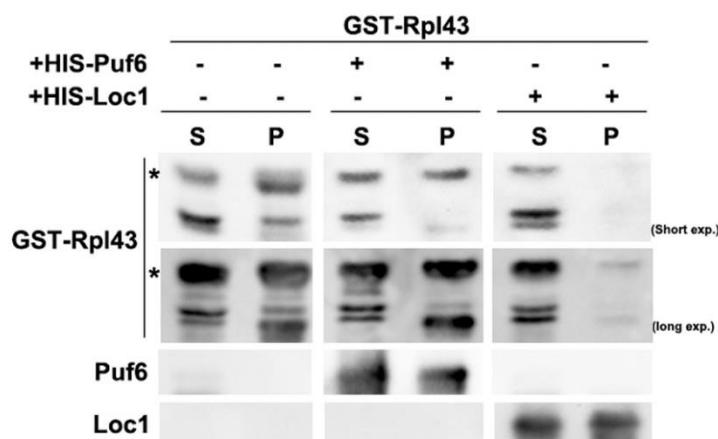
**Figure 6. Rpl43、Puf6 與 Loc1 三者之間有直接之結合**

(A)(B) 分別將 pGEX-4T3(PAJ893)、*GST-LOC1*(PKL400)、*GST-RPL43* (PKL474)、pET28a-*PUF6*(PKL56)與 pET28a-*LOC1*(PKL288)於 *E. coli* BL21-Condon Plus 中大量表現，並收集菌體。接著破菌，將目標蛋白與待測蛋白與 Glutathione beads 反應，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。

**A**



**B**

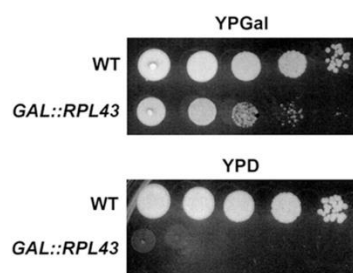
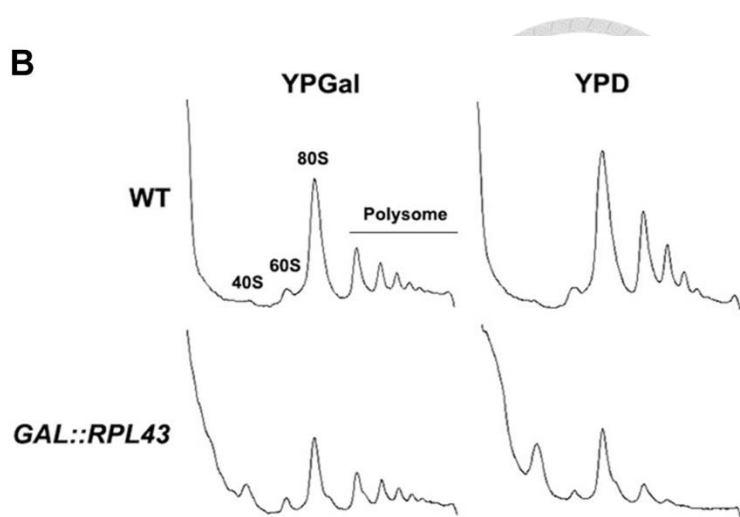
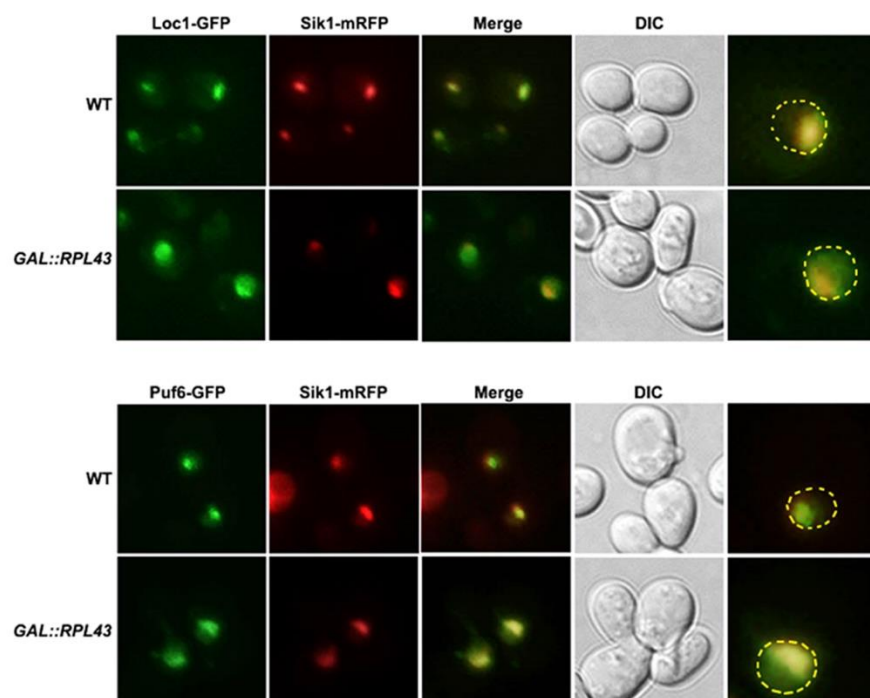


**Figure 7. Loc1 協助 Rpl43 維持其穩定性**

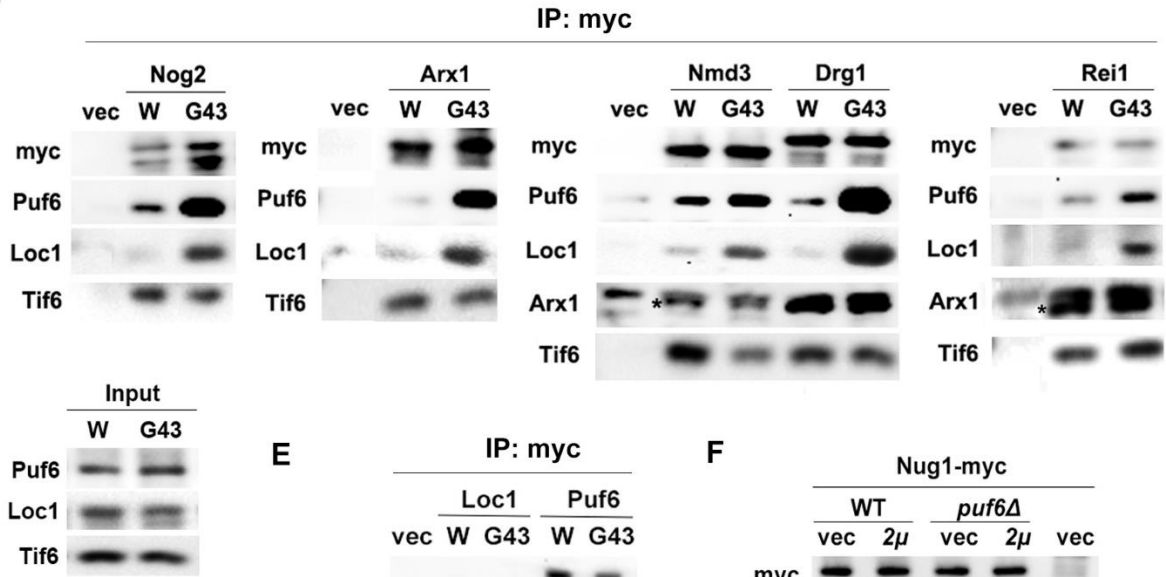
(A) 分別將 *GST-RPL43* (PKL474) 、 *pET28a-PUF6*(PKL56) 與 *pET28a-LOC1*(PKL288)於 *E. coli* BL21-Condon Plus 中大量表現，並收集菌體。接著破菌，將目標蛋白與待測蛋白與 Glutathione beads 反應 1 hr，以 buffer 洗，加入不同濃度之胰蛋白酶(trypsin)，於 37°C 反應 30 分鐘。最後以 SDS-PAGE 分析。(B) 將 *GST-RPL43* (PKL474)與 *pET28a-PUF6*(PKL56)、*GST-RPL43* (PKL474) 與 *pET28a-LOC1*(PKL288)分別同時送入 *E. coli* BL21-Condon Plus 共表現，並收集菌體。接著破菌，先以 5,000 rpm 去除剩餘菌體，再以 13,000 rpm 離心 15 分

鐘，分離可溶蛋白與變性蛋白。最後以 western 分析。

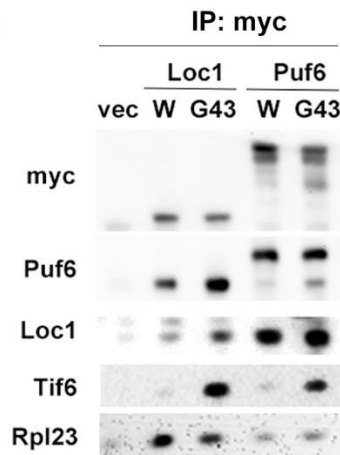


**A****B****C**

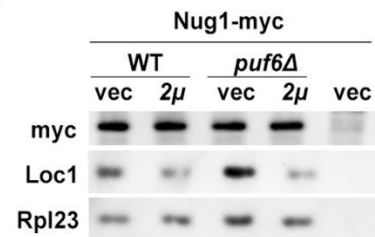
D



E



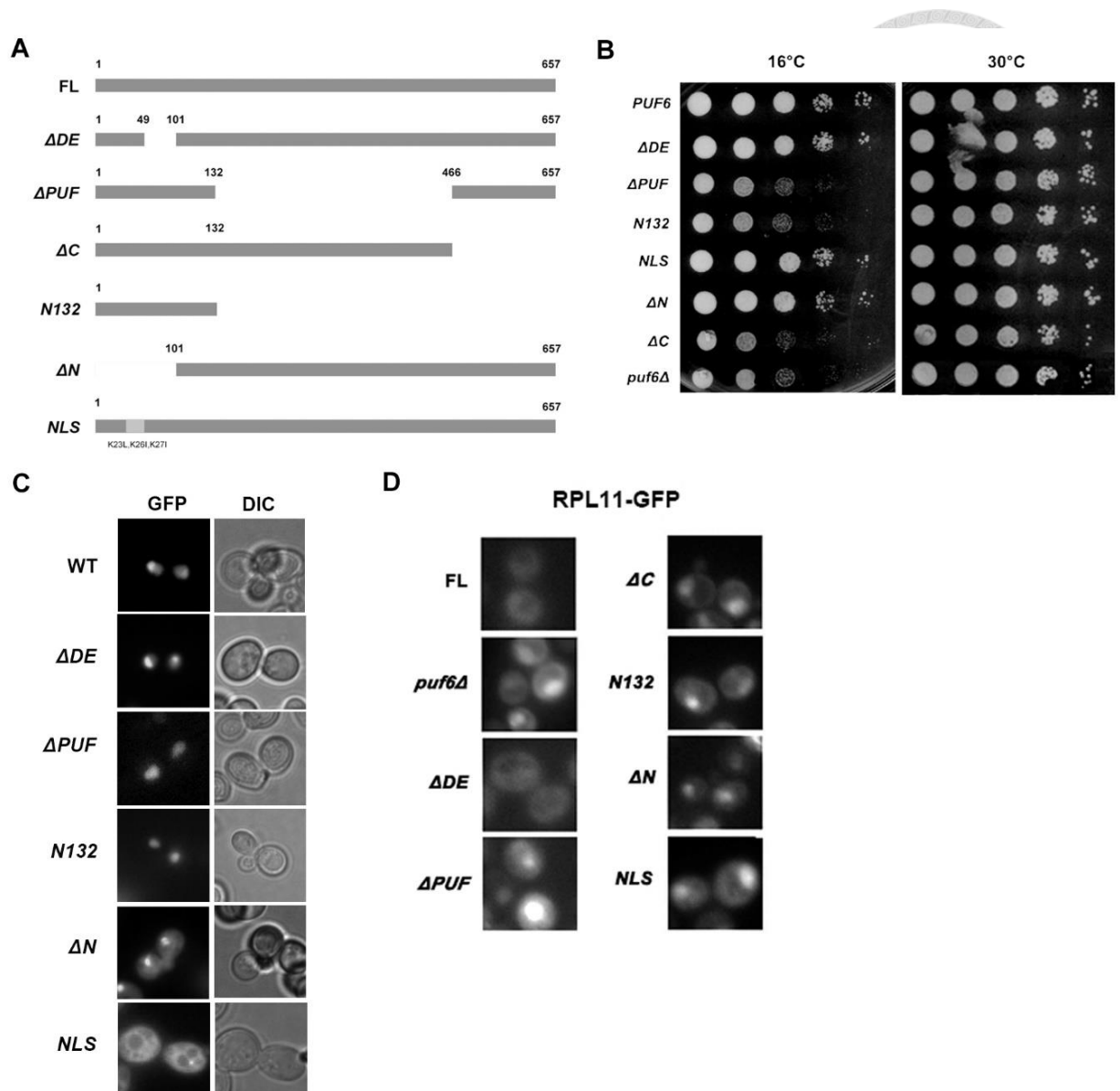
F



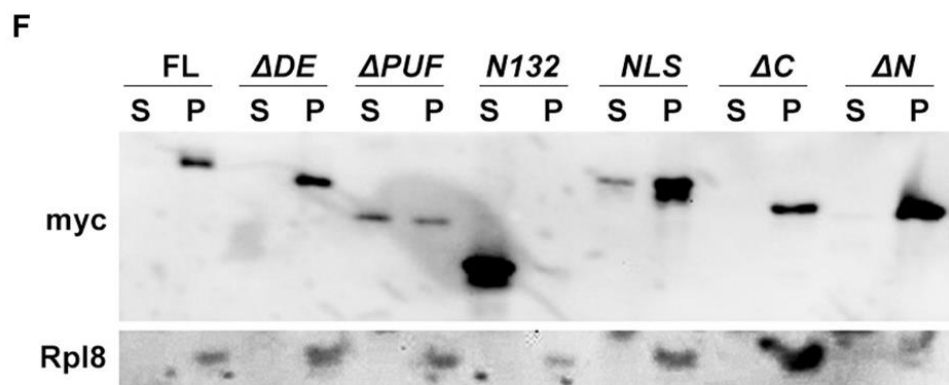
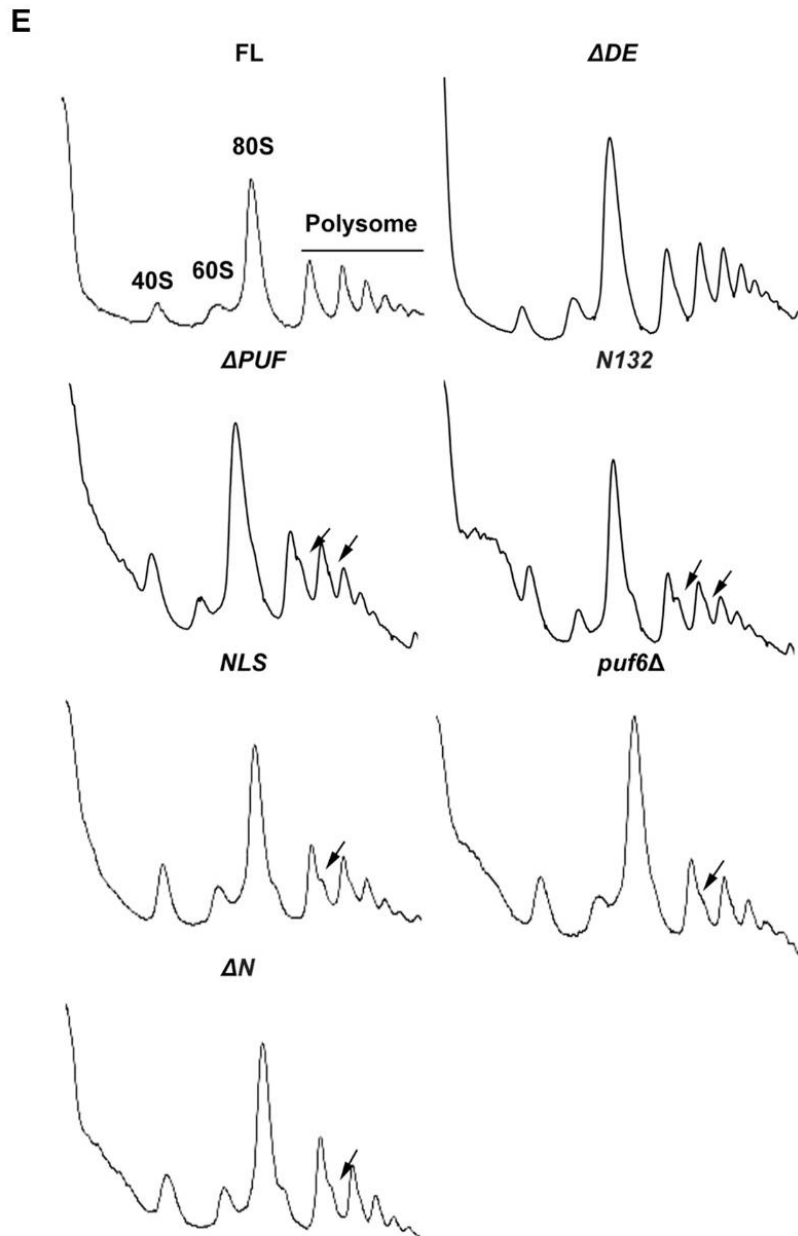
**Figure 8. Rpl43 幫助 Puf6 與 Loc1 離開 60S**

(A) 比較 WT (BY4741) 與 *GAL::RPL43* (KLY628) 之生長差異。將待測菌隔液培養於 YPGal 液態培養基，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再做序列稀釋，將菌液分別點於 YPGal 及 YPD 培養基，於 30°C 放置數天培養。(B) 將 WT (BY4741) 與 *GAL::RPL43* (KLY628) 於 YPGal 或於 YPGal 加入 2% Glucose 培養 4 小時，OD<sub>600</sub> 約為 0.3-0.4，接著加入 Cycloheximide 培養 10 分鐘後，將菌體收集並凍於 -80°C，接著進行後續之多核糖體圖譜分析。(C) 觀察 Puf6-GFP 於野生株 (KLY135) 及 *GAL::RPL43* (KLY829) 分布位置之差異；同樣地，也將 *LOC1-GFP* (PKL337) 分別轉型入 WT (BY4741) 與 *GAL::RPL43* (KLY628)，觀察 Loc1 之分布情形。接著，再將 *SIK1-mRFP* (PKL32) 轉型至以上菌株中，做為核仁之標記。分別在 Ura<sup>-</sup> Gal

和 Ura<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Gal 液態培養基中培養隔夜，再將菌液稀釋培養 2 小時，接著加入葡萄糖溶液(最終濃度 2%)繼續培養 4 小時，最後以螢光顯微鏡觀察。(D)(E) 分別將 *NOG2-myc*(PKL299) 、 *ARX1-myc*(PAJ1026) 、 *NMD3-myc*(PAJ538) 、 *DRG1-myc*(PAJ2075) 、 *REI1-myc* (PAJ1028) ，以及 *LOC1-myc*(PKL334) 、 *PUF6-myc*(PKL85) ，與空載體(pRS415)轉型入 WT(BY4741)與 *GAL::RPL43*(KLY628) ，於 30°C 在 Leu<sup>-</sup> Gal 液態培養基中培養，接著再加入葡萄糖溶液(最終濃度 2%)繼續培養 4 小時，培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於-80°C。以  $\alpha$ -myc 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 western 進行分析。(F) 將 *NUG1-myc* (PAJ1013)轉型入 WT(BY4741)與 *puf6 $\Delta$* (KLY67)，再分別送入 *2 $\mu$  RPL43B*(PKL308) 與空載體(pRS426)，並於 30°C 在 Ura<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於-80°C。以  $\alpha$ -myc 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 western 進行分析。



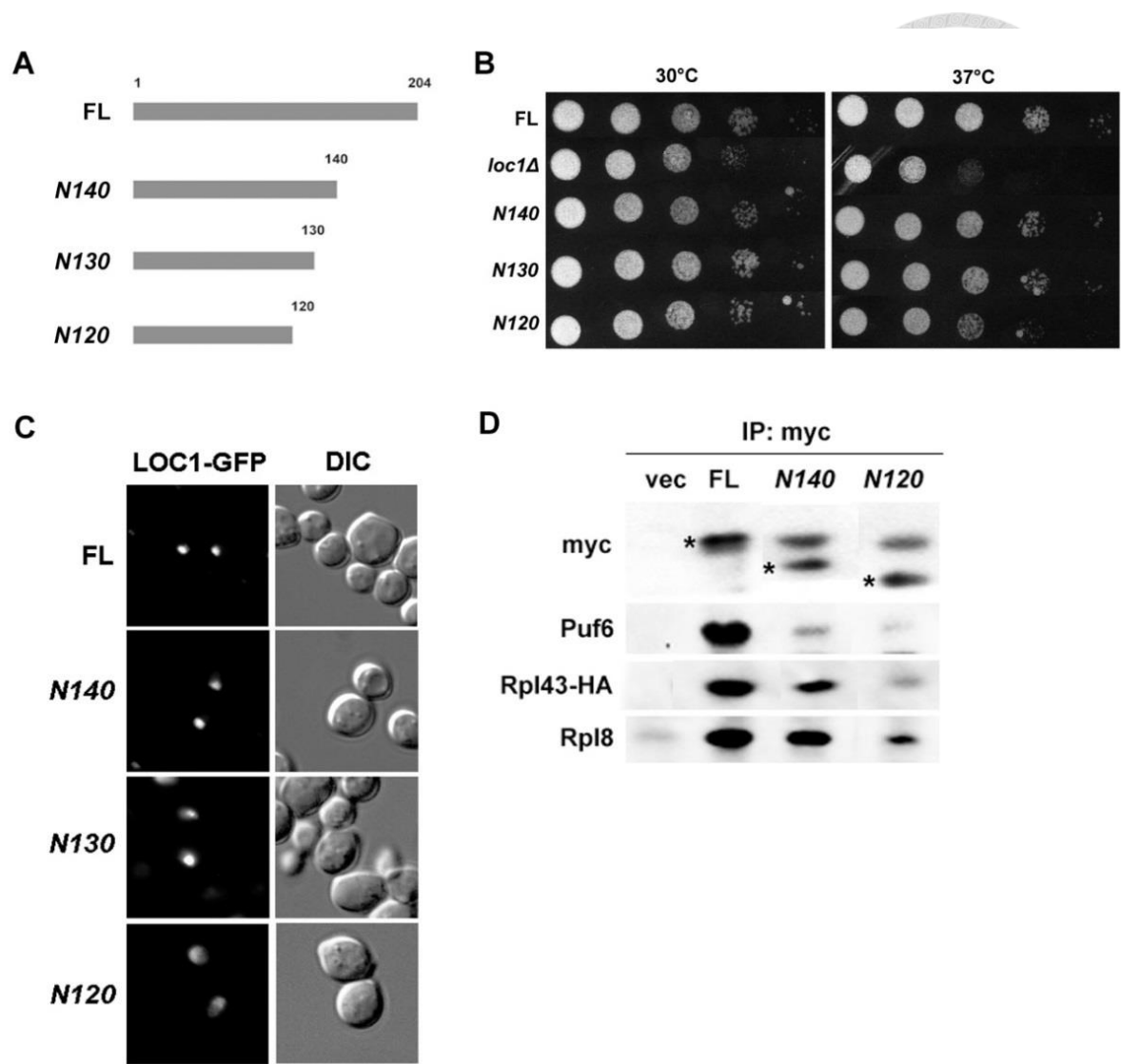




**Figure 9. 分析 Puf6 的功能性區塊**

(A) *puf6* 突變株示意圖。 (B) 將 pRS415、*PUF6-GFP*(PKL52)、*PUF6-ΔDE-GFP*(PKL53)、*PUF6-N132-GFP*(PKL54)、*PUF6-ΔPUF-GFP*(PKL55)、*PUF6-ΔN-GFP*(PKL188)、*PUF6-NLS-GFP*(PKL199)、*PUF6-ΔC-GFP*(PKL304)轉型入 *puf6Δ*(KLY67)，於 Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養隔夜，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再做序列稀釋，將菌液點於 Leu<sup>-</sup>培養基，於 16、30℃ 放置數天培養。 (C) 將 *PUF6-GFP*(PKL52)、*PUF6-ΔDE-GFP*(PKL53)、*PUF6-N132-GFP*(PKL54)、*PUF6-ΔPUF-GFP*(PKL55)、*PUF6-ΔN-GFP*(PKL188)、*PUF6-NLS-GFP*(PKL199)轉型入 *puf6Δ*(KLY67)，於 Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養隔夜，再將菌液稀釋，培養於 16℃ 約 4 小時，以螢光顯微鏡觀察。 (D) 將 pRS415、*PUF6-myc*(PKL85)、*PUF6-ΔDE-myc*(PKL86)、*PUF6-N132-myc*(PKL88)、*PUF6-ΔPUF-myc*(PKL87)、*PUF6-ΔN-myc*(PKL189)、*PUF6-NLS-myc*(PKL198)、*PUF6-ΔC-myc*(PKL306)轉型入 *puf6Δ*(KLY67)，再送入 *RPL11-GFP*(PKL228)，於 16℃ 培養隔夜，再將菌液稀釋，培養於 16℃ 約 4 小時，以螢光顯微鏡觀察。 (E) 將 *PUF6-GFP*(PKL52)、*PUF6-ΔDE-GFP*(PKL53)、*PUF6-N132-GFP*(PKL54)、*PUF6-ΔPUF-GFP*(PKL55)、*PUF6-ΔN-GFP*(PKL188)、*PUF6-NLS-GFP*(PKL199)轉型入 *puf6Δ*(KLY67)。待測菌液培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.3-0.4，接著加入 Cycloheximide 培養 10 分鐘後，將菌體收集並凍於 -80℃，接著進行後續之 Polysome profile 分析。 (F) 分別將 *PUF6-myc*(PKL85)、*PUF6-ΔDE-myc*(PKL86)、*PUF6-N132-myc*(PKL88)、*PUF6-ΔPUF-myc*(PKL87)、*PUF6-ΔN-myc*(PKL189)、*PUF6-NLS-myc*(PKL198)、*PUF6-ΔC-myc*(PKL306)轉型入 *puf6Δ*(KLY67)，待測菌液培養至 0.6-0.8 OD<sub>600</sub>，將菌體收集並凍於 -80℃。接著進行 Sucrose cushion，以 80000 rpm 離心 1 小時。得到之沉澱部分為結合核糖體之蛋白，上清部分為自由型態之蛋白，最後以 SDS-PAGE 與 Western 進行分析。 (G) 將 pRS415、*PUF6-myc*(PKL85)、*PUF6-ΔDE-myc*(PKL86)、*PUF6-ΔPUF-myc*(PKL87)、*PUF6-ΔN-myc*(PKL189)轉型入 WT(BY4741)，再分別

送入 *RPL43-HA*(PKL350)，並於 30°C 在 Ura<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於-80°C。以  $\alpha$ -myc 進行免疫沉澱實驗，最後以 SDS-PAGE 與 western 進行分析。(H) 將 pRS415、*PUF6-myc*(PKL85)、*PUF6- $\Delta$ DE-myc*(PKL86)、*PUF6- $\Delta$ PUF-myc*(PKL87)、*PUF6- $\Delta$ N-myc*(PKL189)轉型入 TIF6-TAP *puf6 $\Delta$* (KLY624)，以 IgG beads 進行免疫沉澱實驗。(I) 分別將 pGEX-4T3(PAJ893)、*GST-LOC1*(PKL400)、*GST-RPL43* (PKL474)、pET28a-*PUF6*(PKL56) 與 pET21a-*PUF6- $\Delta$ N100* (PKL514)於 *E. coli* BL21-Condon Plus 中大量表現，並收集菌體。接著破菌，將目標蛋白與待測蛋白與 Glutathione beads 反應。



**Figure 10. 分析 Loc1 的功能性區塊**

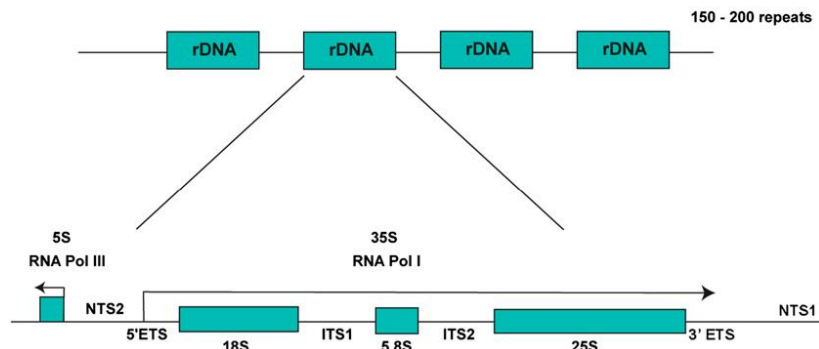
(A) *loc1* 突變株示意圖。(B) 分別將 *LOC1-GFP*(PKL55)、空載體(pRS415)、*LOC1-N140-GFP*(PKL451)、*LOC1-N130-GFP*(PKL450) 與 *LOC1-N120-GFP*(PKL449)轉型入 *loc1Δ* (KLY218)，於 Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養隔液，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再做序列稀釋，將菌液點於 Leu<sup>-</sup>培養基，於 30、37°C 放置數天培養。(C)將 *LOC1-GFP* (PKL55)、*LOC1-N140-GFP* (PKL451)、*LOC1-N130-GFP* (PKL450)與 *LOC1-N120-GFP* (PKL449)轉型入 *loc1Δ* (KLY218)，於 Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養隔液，再將菌液稀釋，培養於 30°C 約 4 小時，以螢光顯微鏡觀察。(D)

將 pRS415、*LOC1-GFP* (PKL55)、*LOC1-N140-GFP* (PKL451)與 *LOC1-N120-GFP* (PKL449)轉型入 WT(BY4741)，於 30°C 在 Leu<sup>-</sup>液態培養基中培養至 OD<sub>600</sub> 約為 0.6-0.8，將菌體收集並凍於-80°C。以  $\alpha$ -myc 進行免疫沉澱。

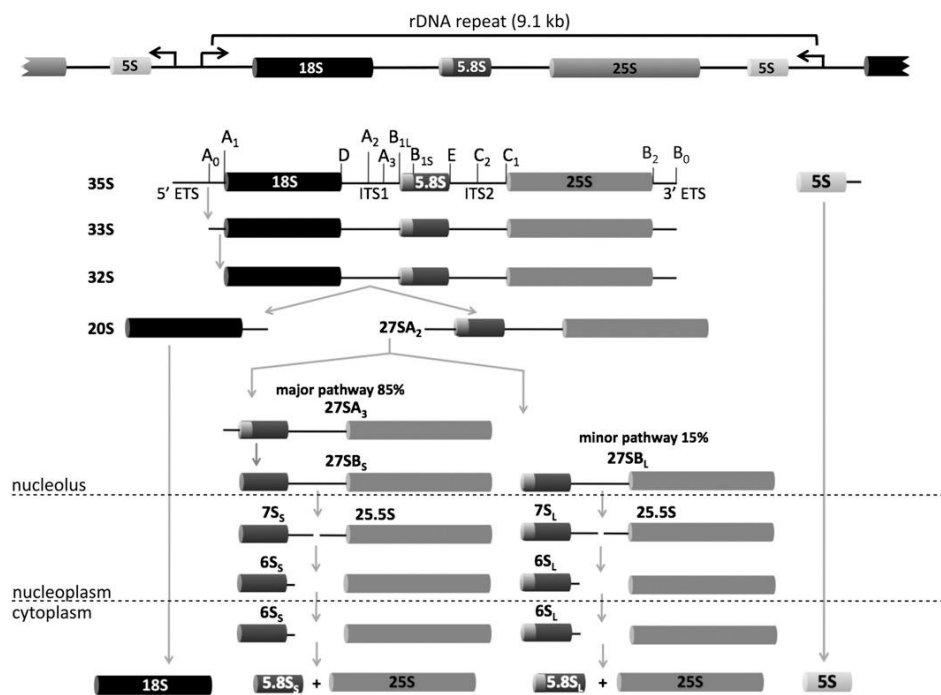


A

*S. cerevisiae* Chromosome XII



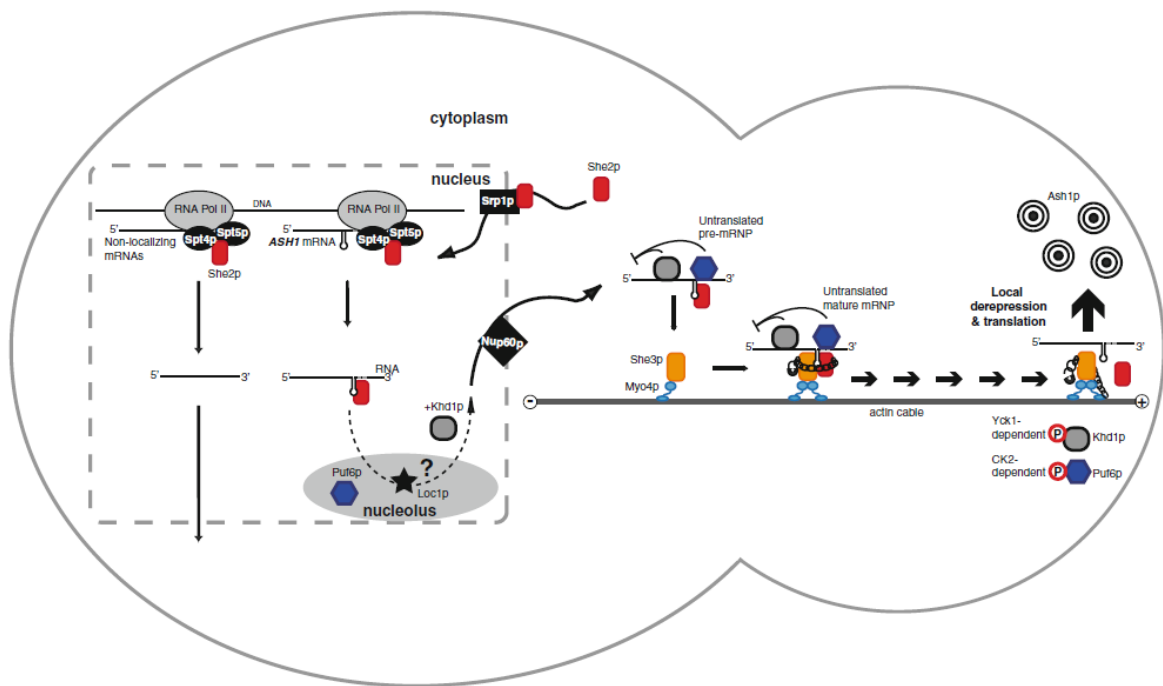
B



(Woolford and Baserga, 2013)

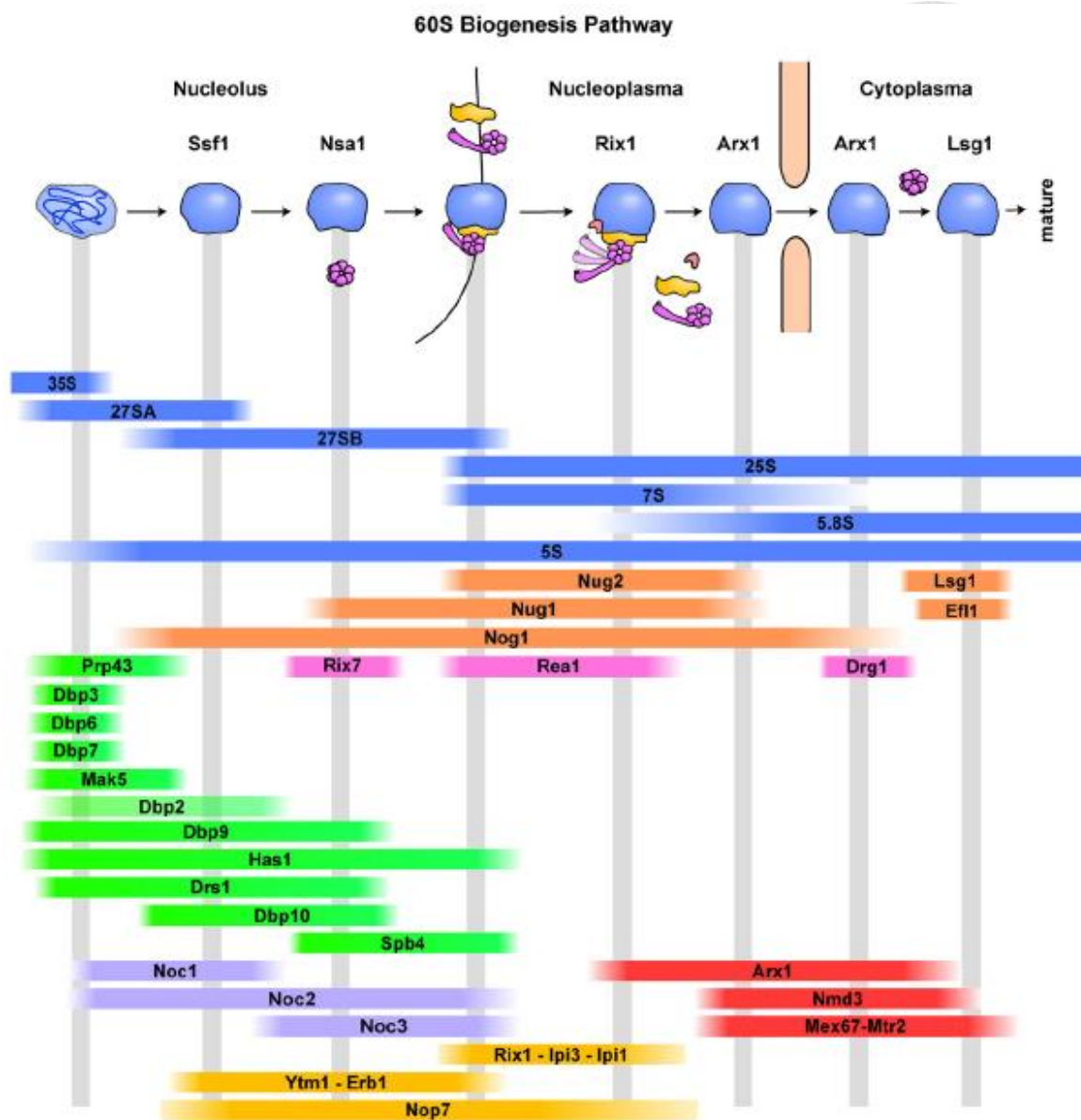
附錄一、 rRNA 加工示意圖

(A) 5S 與 35S pre-rRNA 示意圖，35S 含有 18S、5.8S 及 25S rRNA (B) rRNA 剪切之簡易流程圖



(Heym and Niessing, 2012)

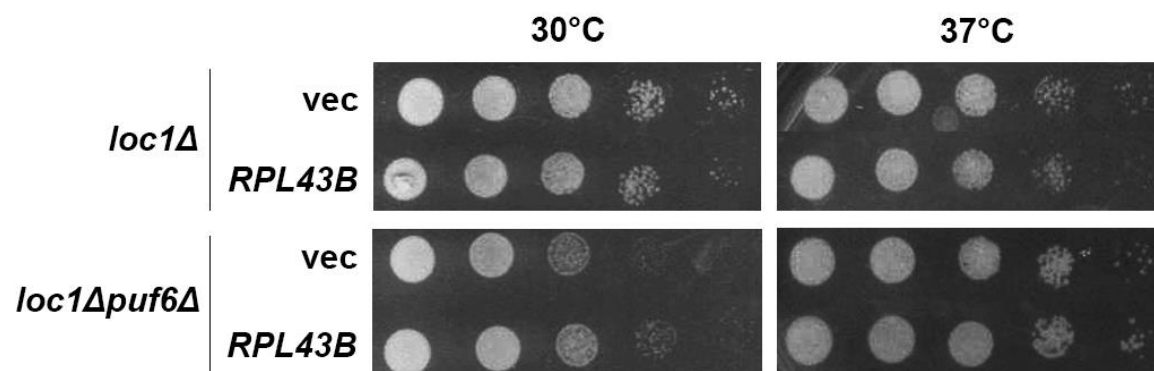
附錄二、 *ASH1* mRNA 主動運輸示意圖



(Kressler et al, 2010, BBA)

附錄三、 60S 生合成之不同階段示意圖





#### 附錄四、大量表現 *RPL43* 無法修復 *loc1Δ* 之生長缺失

分別將 2 $\mu$  *RPL43B*(PKL308) 與空載體 (pRS426) 轉型入 *loc1Δ*(KLY218) 與 *puf6Δloc1Δ*(KLY312)，於 Ura<sup>-</sup>液態培養基中培養隔液，接著將菌液調整至相同 OD<sub>600</sub>，再做序列稀釋，將菌液點於 Ura<sup>-</sup>培養基，於 30 與 37°C 放置數天培養。