

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Agricultural Chemistry

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

大腸桿菌熱休克蛋白酶 ClpYQ 之基質 SulA

被辨識區域特性之研究

The recognition region in SulA by ClpYQ protease
from *Escherichia coli*

翁于婷

Yu-Ting Weng

指導教授：吳蕙芬 博士

Advisor: Whei-Fen Wu, Ph.D.

中華民國九十八年六月

June, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

大腸桿菌熱休克蛋白酶 ClpYQ 之基質 Sula
被辨識區域特性之研究
The recognition region in Sula by ClpYQ protease
from *Escherichia coli*

本論文係翁于婷君 (R96623024) 在國立臺灣大學農化學系 (所) 完成之碩士學位論文，於民國九十八年六月二十三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：

吳蕙芬

(簽名)

(指導教授)

楊啟伸

蘇南維

蔡孟勳

徐駿森

李連源

系主任、所長

(簽名)

誌謝

來到這個實驗室，前後斷斷續續地過了四個年頭，從剛開始的迷惘生疏，到今天能夠順利完成論文，真的要感謝許許多多師長及朋友們的幫助與陪伴，使我在這段時間裡，可以不畏艱難充滿勇氣的向前邁進。

首先要感謝帶領我進入研究領域的指導老師 吳蕙芬教授，老師對我的悉心指導及訓練，使我學習到身為一個研究者應具有的基本能力及素養，而老師於研究上專注嚴謹的實驗態度與邏輯思考，更是我學習效法的對象，衷心的謝謝老師這段時間來的指導與照顧。

感謝 楊啟伸教授、蔡孟勳教授、蘇南維教授、徐駿森教授擔任我的口試委員，撥空審閱我的論文初稿，細心的逐字簽正，並提出許多精闢的見解及寶貴的意見，提醒我用不同的思考角度看待結果，使論文內容可以更趨完善，也謝謝老師們對我的鼓勵，讓我有信心面對更多的挑戰。

此外，感謝實驗室裡與我共度這段時光的夥伴們，親愛的大美女湘芸學姐、美食達人汎擎學長、細心可靠的鈞暘學長、常讓我搭便車的 Asonn、帥氣又搞笑的宣哈、總有獨道見解的岳隆、活潑充滿朝氣的郁君、可愛貼心的玉鳳，已經畢業的學長姐們及各自向外發展的學弟們；還有對面常讓我去串門子的朋友們及樓上的小祕書，因為有你們使實驗室的生活增加更多的樂趣與歡笑。

最後要感謝親愛的爸媽，因為你們的支持，並給我無限的自由和絕對的信任，讓我能走自己的路。還有最愛的慶，謝謝你陪我走過每一個歡樂與傷心的時刻，有你的陪伴，讓我不再感到寂寞。

摘要

大腸桿菌中 ClpYQ 蛋白酶為一種 ATP 依賴蛋白酶，由具有 ATPase 及 unfoldase 活性的 ClpY，與具有 peptidase 活性的 ClpQ 所構成的雙單元體。這類蛋白酶在細胞中，可降解構形錯誤或是具危害性的蛋白質，以維持細胞正常生理作用，避免細胞受到危害。在 ClpYQ 蛋白酶中，ClpY 會負責辨識基質，並水解 ATP 作為能量來源，將基質結構打開並傳送至 ClpQ 的活性區，以進行降解作用。然而，關於 ClpYQ 蛋白酶是如何選擇辨識基質，及後續降解作用的詳細機制，目前仍不清楚。SulA 是一個細胞分裂的抑制物，當細胞暴露在逆境下時會產生 SOS 反應，誘導大量 SulA 蛋白表現，以避免受損的 DNA 傳到子代細胞。目前已知可分解 SulA 的蛋白酶為 Lon 及 ClpYQ，其中又以 Lon 為主要負責分解的蛋白酶。之前有研究指出，Lon 可以藉由辨認 SulA 之 C-末端 8 個胺基酸，與之結合並將其降解，但是 ClpYQ 卻不能。對於 ATP 依賴蛋白酶來說，為避免不必要的降解，如何選擇辨認需要降解的基質是非常重要的。本實驗中，為確認 ClpYQ 蛋白酶辨認 SulA 蛋白的區域，建構 SulA 之 C-端不同大小片段缺失的突變蛋白，以酵母菌雙雜交系統測試，各個 SulA 突變蛋白與 ClpY 之間交互作用的情形，發現 ClpY 辨識的區域可能位於 C-端的高疏水性片段，C-端第 20 - 30 個胺基酸。於此區域內再建構點突變蛋白，分析不同性質的胺基酸對於 ClpY 交互作用的影響，結果顯示當點突變取代為親水性胺基酸時，會降低 SulA 蛋白與 ClpY 之間的交互作用。之後測試各個 SulA 突變蛋白的活性表現，及被 ClpYQ 蛋白酶降解之情形，結果顯示 SulA 之 C-端第 20 - 45 個胺基酸的區域，對於其抑制細胞分裂的活性表現是重要的，且對於 ClpYQ 蛋白酶的降解作用也會造成影響，因此 ClpYQ 蛋白酶應可藉由 SulA 蛋白之活性表現與否，來辨別其是否需要降解。

關鍵詞：ATP 依賴蛋白酶、ClpYQ、Lon、SulA、蛋白質辨識

Abstract

ClpYQ is an ATP-dependent protease from *Escherichia coli* and a two component complex composed of ClpY, which is an ATPase and unfoldase, and ClpQ peptidase. Degradation of denatured or damaged proteins by this proteases helps protect the normal cell growth from the harmful effects of these proteins. The ClpY is thought to recognize protein substrates, denature them, and translocate the unfolded polypeptide into the catalytic cavity of the ClpQ for degradation. However, little information is available on the recognition of substrates for ClpYQ and on the mechanism by which they were selected, unfolded, and translocated by ClpY to the interior of the ClpQ. SulA, induced in the SOS response, is a cell division inhibitor and prevents the distribution of damaged DNA into daughter cells during DNA repair processes. SulA can be degraded by ATP-dependent proteases such as Lon and ClpYQ, and the degradation *in vivo* seems to be predominantly by Lon, while ClpYQ appears to act as a backup for Lon. It was reported previously that the region of C-terminal eight amino acid residues of SulA was essential for interaction with Lon but not with ClpYQ. To avoid unnecessary degradation of cellular proteins, substrate selection by ATP-dependent proteases is tightly regulated; therefore, it is interesting to investigate the recognition region of SulA by ClpYQ. In this study, the deletion mutants of SulA with regard to C-terminus were constructed and the interaction with ClpY was analyzed in yeast two-hybrid system. The

results showed that ClpY recognized the hydrophobic region of SulA, C20 - 30 aa, and the recognition was also likely to rely on hydrophobic interaction following the observation that the binding activity decreased if the substituted residue was polar. The C-terminal region of SulA, C20 - 45 aa, seemed to be important for its activity with an inhibition of cell division, and the region is necessary for the degradation by ClpYQ. Therefore, ClpYQ protease would be able to distinguish whether SulA is to be degraded by the activity of inhibition.

Keywords: ATP-dependent protease, ClpYQ, Lon, SulA, Protein recognition



目錄

口試委員會審定書	i
誌謝	ii
摘要	iii
Abstract	iv
目錄	vi
表目錄	viii
圖目錄	ix
附圖目錄	x
壹、前言	1
一、ATP 依賴蛋白酶	1
二、ClpYQ 蛋白酶	2
三、ClpYQ 複合體結構	4
四、ClpYQ 蛋白酶之基質	5
五、細胞分裂抑制物 Sula	7
六、蛋白酶對基質 Sula 辨認之相關研究	9
七、研究動機與目的	12
貳、材料與方法	13
一、實驗材料	13
(一) 菌株與質體	13
(二) 藥品與試劑	14
(三) 器材設備	15
(四) 分析軟體	15
二、實驗方法	16
(一) 一般實驗方法	16
(二) 菌體的建構	20
(三) 突變基因建構	25
(四) 酵母菌雙雜交系統分析	28
(五) 大腸桿菌選殖基因表現系統	33
(六) 西方墨點分析 (Western Blotting)	35

參、實驗結果	41
一、確認 Sula 蛋白被 ClpY 辨識之區域.....	41
(一) 建構 Sula 蛋白 C-端不同大小片段缺失之突變.....	41
(二) 以酵母菌雙雜交系統測試各個 Sula 突變蛋白與 ClpY 之交互作用...	41
二、Sula 蛋白被辨識區域之特性.....	43
(一) Sula 蛋白 C-端序列特性分析.....	43
(二) 於 Sula 蛋白被辨識區域中建構不同胺基酸性質之點突變.....	43
(三) 利用酵母菌雙雜交系統測試 Sula 點突變蛋白與 ClpY 之交互作用...	44
三、不同蛋白酶對於 Sula 蛋白辨識區域之差異.....	45
(一) Lon 蛋白酶與 Sula 缺失突變蛋白間之交互作用.....	45
(二) ClpY I domain 上兩個 loop 對於 Sula 蛋白辨識之影響.....	46
四、Sula 突變蛋白之活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之現象.....	47
(一) C-末端 20 個胺基酸缺失之 Sula 突變蛋白.....	48
(二) C-端二級結構部份缺失之 Sula 突變蛋白.....	50
(三) Sula 不同性質胺基酸之點突變蛋白.....	51
肆、討論	53
一、Sula 蛋白被 ClpY 辨識之區域及其特性.....	53
二、不同蛋白酶對於辨認相同基質之差異.....	54
三、Sula 突變蛋白之活性表現與 FtsZ 的相關性.....	55
四、ClpYQ 蛋白酶對於 Sula 突變蛋白之降解情形.....	57
五、質體 Sula 的表現會誘導染色體之 Sula 表現.....	58
伍、結論	60
陸、參考文獻	61

表目錄

表一、本論文所使用的菌株與噬菌體	67
表二、本論文所使用的質體	68
表三、本論文所使用的引子對	69
表四、在酵母菌雙雜交系統中 SulA 突變蛋白與 ClpY 之交互作用情形	71
表五、SulA 突變蛋白之活性測試及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形	72



圖目錄

圖一、大腸桿菌之 SulA 結構圖	73
圖二、以酵母菌雙雜交系統分析 SulA Δ C10 及 SulA Δ C20 突變蛋白與 ClpY 交互作用情形	74
圖三、以酵母菌雙雜交系統測試二級結構缺失之 SulA 突變蛋白與 ClpY 交互作用情形	75
圖四、大腸桿菌 SulA 之 C 末端序列分析	76
圖五、大腸桿菌與四種腸道菌微生物之 SulA 相似序列的比對	77
圖六、以酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 點突變蛋白與 ClpY 交互作用情形	78
圖七、以酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 突變蛋白與 Lon 交互作用情形	79
圖八、以酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 突變蛋白與 ClpY 之 loop 缺失突變蛋白交互作用情形	80
圖九、AC3112 菌株及 <i>sulA</i> ⁻ 菌株 YT10010 之 MMS 生長測試	81
圖十、SulA Δ C10 和 SulA Δ C20 突變蛋白活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形 ..	82
圖十一、二級結構缺失之 SulA 突變蛋白活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形 ...	83
圖十二、SulA 點突變蛋白之活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形	84

附圖目錄

附圖一、大腸桿菌 ClpYQ 結構圖.....	85
附圖二、SOS 反應.....	86
附圖三、大腸桿菌及綠膿桿菌之 Sula 胺基酸序列比對.....	87
附圖四、綠膿桿菌之 Sula 結構圖.....	88
附圖五、酵母菌雙雜交系統之報導基因表現示意圖.....	89



壹、前言

一、ATP 依賴蛋白酶

蛋白質品質控制系統 (Protein quality-control systems)

生物體正常的生長代謝過程中，均需要藉由蛋白質來進行各種生理作用，因此產生正確且具有功能的蛋白質，是維持生命現象所必需的。因此在細胞中具有一蛋白質品質控制系統 (Protein quality-control systems)，負責維持蛋白質的正常活性及功能，以避免細胞受到危害。此系統包含幾個重要的角色：ATP 依賴蛋白酶 (ATP-dependent proteases)、伴隨蛋白質 (chaperones)、熱休克蛋白質 (heat shock proteins)，及一些調控分子等；這些系統網絡可幫助新生成蛋白質折疊成正確構形、拆解 (disaggregation) 錯誤折疊蛋白質之聚合物 (aggregate)，並幫助其重新折疊恢復正確構形，或是降解 (degradation) 不能修復而具有危害性的蛋白質，以維持細胞正常的生長活動 (Sauer *et al.*, 2004, Bukau *et al.*, 2006)。

ATP 依賴蛋白酶 (ATP-dependent proteases)

ATP 依賴蛋白酶 (ATP-dependent proteases) 為一調控蛋白質品質的系統，這類蛋白酶廣泛存在於真核細胞、細菌及古細菌中。當細菌的生長受到環境壓力時，如：溫度驟變，易導致菌體內不正常蛋白質的生成累積而造成危害，此時 ATP 依賴蛋白酶可藉由水解 ATP 作為能量來源，將不必要的或具有危害性的蛋白質降解，幫助細菌因應外在環境的變化，於不利生長的环境中存活 (Wickner *et al.*, 1999, Zwickl *et al.*, 2000)。

在原核生物中主要的 ATP 依賴蛋白酶有 Lon、ClpAP、ClpXP、ClpYQ (HslUV) 及 FtsH。Lon 和 FtsH 均是 single-chain proteases (Gottesman, 2003)，Lon 位於細胞質內，為最主要的蛋白酶，FtsH 附著於細胞膜上，主要負責膜蛋白質的降解；而其他 ClpAP、ClpXP 及 ClpYQ 則是位於細胞質內，由兩種蛋白質組成的雙單元體

(two component system) 蛋白酶 (Katayama-Fujimura *et al.*, 1987, Gottesman *et al.*, 1998, Chuang *et al.*, 1993)。

此類蛋白酶通常會形成桶狀的聚合體，其中央具有一狹窄孔洞，由 X-ray 結晶結構的分析發現，孔洞直徑大小約略為 10 Å 左右，這樣的寬度不足以讓正常構形的蛋白質進入 (Bochtler *et al.*, 2000, Guo *et al.*, 2002)；然而，蛋白酶的活性區卻是位於桶狀結構之中，因此必須設法將基質傳遞至中央，才能進行蛋白質的水解作用 (Bochtler *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 1997)。直至目前為止眾多的研究顯示，認為這類蛋白酶會先辨認基質蛋白，並將其結構打開，才能穿越中央孔洞傳送至活性區進行降解 (Sauer *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2002, Matouschek, 2003)。

二、ClpYQ 蛋白酶

熱休克蛋白 (Heat shock proteins)

ClpYQ 蛋白酶屬於熱休克蛋白的一種，最早於 1993 年被提出，在大腸桿菌中以熱休克選殖的方法發現，位於大腸桿菌基因組 (genome) 之 88.9 分鐘處，約 2 kb 左右的操縱組 (operon)，*clpQ* 在前而 *clpY* 在後，組成 *clpQY* operon；其會受到熱逆境而誘導表現，*clpQY* mRNA 表現量相較於未誘導時增加約 1.5 倍 (Chuang *et al.*, 1993)。在 *clpQY* operon 的上游序列中，具有一高度保守性的啟動子 (promoter) 序列，此序列與 *dnaK* 和 *groE* 等可被 σ^{32} 辨認的啟動子序列非常相似，而在大量誘導 σ^{32} 表現的實驗中，ClpYQ 蛋白酶的表現量亦會隨之增加約十倍，因此認為 *clpQY* 為一熱休克基因 (heat shock gene)，又稱為 *hslVU* (heat shock locus) (Rohrwild *et al.*, 1996)。

clpQY operon 可轉譯出兩個蛋白質，分別為 19.1 kDa 的 ClpQ 與 49.6 kDa 的 ClpY。經由胺基酸序列的比對發現，ClpQ 的序列與真核生物 20S proteasome 的 β -type 單體具有 18% 的相似性，實驗結果也顯示 ClpQ 與 20S proteasome 同樣屬於

threonine protease (Yoo *et al.*, 1996, Missiakas *et al.*, 1996); 而 ClpY 在靠近 N 端部份有一個 ATP/GTP-binding motif 的保守性序列 (GXXGXGKT), 若在此序列造成突變, 則 ClpY 會喪失水解 ATP 之能力, 並且無法與 ClpQ 協同降解短鏈胜肽 (Shin *et al.*, 1996)。實驗中若以 ADP、AMP 或其他 ATP 之類似物取代 ATP 時, ClpYQ 便無法分解疏水性基質 Z-Gly-Gly-Leu-AMC, 因此認為 ClpYQ 為 ATP 依賴蛋白酶的一種, 可水解 ATP 並降解蛋白質 (Rohrwild *et al.*, 1996)。

Clp ATPase Family

在胺基酸序列比對分析的結果中顯示, ClpY 與另一 ATP 依賴蛋白酶 ClpXP 複合體中的 ClpX, 具有 50% 的胺基酸相同度 (identity); 且 ClpY 之 ATP/GTP-binding motif 保守性序列, 亦與 ClpAP 蛋白酶中的 ClpA 序列相同, 因此將 ClpY 歸為 Clp ATPase family 的一員; 這類蛋白酶在 *in vitro* 下, 能促使協同的 peptidase 蛋白酶分解酪蛋白 (casein), 故以此能力 caseinolytic protease (Clp) 來命名 (Schirmer *et al.*, 1996)。

Clp ATPase family 是屬於 AAA⁺ (ATPases associated with diverse cellular activities) superfamily 中的一群, 均具有保守性的 ATP binding domain, 約 200 - 250 個胺基酸左右, 負責 ATP 的結合與水解 (Neuwald *et al.*, 1999, Lupas & Martin, 2002)。而依據保守性區域的個數可將 Clp ATPase family 的蛋白酶分為兩類, 第一類如: ClpA、ClpB 和 ClpC, 為具有兩個保守性 domain 的蛋白酶, AAA-1 (D1) 和 AAA-2 (D2) 之間會由一段序列隔開, 在不同菌種中相隔的距離不同; 第二類如: ClpX 和 ClpY, 為僅具有一個保守性 domain 的蛋白酶, 且其序列上是與 AAA-2 (D2) 較具同源相似性 (Schirmer *et al.*, 1996)。

雙單元體 (Two component system)

ClpYQ 蛋白酶為雙單元體 (two component system) 的蛋白酶, 如同 Clp family 中的 ClpAP 和 ClpXP, 包含兩個不同功能的單元體 peptidase 及 ATPase

(Katayama-Fujimura *et al.*, 1987, Gottesman *et al.*, 1993)；其中 ClpP 為具有 peptidase 功能的單元體，而 ClpA 與 ClpX 相似，同樣是具有 ATPase 功能之單元體。此外 ClpA 及 ClpX 本身亦具有 chaperone 功能，且 ClpA 與 Clp family 中另一成員 ClpB 具有 80% 的相似度，ClpB 同樣有 chaperone 的功能 (Gottesman, 1996)。

在 ClpYQ 雙單元體蛋白酶中，ClpQ 扮演著 peptidase 的角色，具有降解基質的活性。ClpQ 是由 176 個胺基酸構成，在蛋白酶性質的分類上，ClpQ 的活性中心為 threonine residue，與真核生物 20S proteasome 同樣屬於 threonine protease，但與 ClpP 的所屬的 serine protease 不同 (Missiakas *et al.*, 1996)。

ClpY 則與 ClpA、ClpX 相似，帶有一個保守性的 ATP binding domain，在 ClpYQ 雙單元體蛋白酶中，主要扮演 ATPase 及 unfoldase 的角色，具水解 ATP 的活性，其本身也有 chaperone 的功能。ClpY 是由 443 個胺基酸構成，主要功能是以水解 ATP 作為能量來源，負責基質的辨認、結合，並將基質結構打開，再經由孔洞傳送入 ClpQ 的活性中心進行降解 (Sauer *et al.*, 2004)。

三、ClpYQ 複合體結構

最早以生化方法純化 ClpYQ 時，發現其分子量約為 650 - 700 kDa，遠大於單體的 ClpY 或 ClpQ，顯示 ClpYQ 均是以聚合蛋白的形式存在，並相互結合成一複合體 (Rohrwild *et al.*, 1996)。從分子量的倍數差異推測，ClpQ 聚合蛋白約是由 12 - 14 個單體組成，ClpY 聚合蛋白約是由 6 - 7 個單體所組成的 (Kessel *et al.*, 1996)。之後透過電子顯微鏡的觀察 (Rohrwild *et al.*, 1997) 及 X-ray 結晶繞射的分析 (Bochtler *et al.*, 1997, Bochtler *et al.*, 2000)，確認 ClpQ 及 ClpY 均是以六個單體排列成環狀的形式存在，其中 ClpQ 的直徑約 10 - 11 nm，ClpY 則稍微大些，直徑約 13 nm。整個 ClpYQ 複合體是由四個平行排列的圓環形成一桶狀結構，其中兩個是 ClpQ 的六元環，位於中央作為蛋白酶的催化中心，另兩個則是 ClpY 的六元環，

以相反的方向分別接在兩個 ClpQ 的外側，組成 YQQY 形式的複合體（附圖一）。

在結晶結構的分析中，Bochtler 等人將 ClpY 蛋白質分為三個區域（附圖一），分別是 N domain：N-terminal domain (S2-K109；I244-L332)，I domain：Intermediate domain (M110-A243)，以及 C domain：C-terminal domain (Q333-L443) (Bochtler *et al.*, 2000)。其中 N domain 帶有 ATP 可結合的區域 (ATP binding site)，I domain 位於遠離 ClpQ 的一側，負責基質的辨識與結合作用 (Wang *et al.*, 2001a, Ramachandran *et al.*, 2002)；C domain 則在靠近 ClpQ 的一側，負責 ClpY 與 ClpQ 分子間的聚合作用，且其尾端 8 - 10 左右的胺基酸對於活化 ClpQ 具有重要性 (Seong *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2003)。

ClpYQ 蛋白酶與其他 ATP 依賴蛋白酶相似，複合體由四個相互堆疊的圓環構成桶狀的聚合體，將水解蛋白質的活性區包埋於中央的空腔內，兩邊的出入口則是狹窄的孔洞，孔徑約 10Å 左右，以確保構形正確的蛋白質 (folded proteins) 無法進入水解中心；因此兩側的 ClpY 必須先將辨認的目標基質打開構形 (unfolding)，以單一條或二條肽鏈的形式，才能通過孔洞送入 ClpQ 的活性區進行降解作用 (Zolkiewski, 2006)。此外，也有研究認為當 ClpY 之 I domain 尚未與基質辨識結合時，其孔洞是呈現關閉的，為親水性；而當 I domain 辨認基質後，孔洞才會打開並轉為親脂性，以便將基質送入 (Wang *et al.*, 2001b)。

四、ClpYQ 蛋白酶之基質

變異蛋白質 (Abnormal proteins)

ClpYQ 蛋白酶在生物體中可降解的基質主要有兩大類，一類是變異的蛋白質 (abnormal protein)，包括構形錯誤 (misfolded) 的蛋白質，或是在逆境下不正常累積的蛋白質。在實驗中過量表現 ClpYQ 蛋白酶，可以抵抗細胞中累積的有害蛋白質毒素如嘌呤黴素 (puromycin) 及伴刀豆蛋白 A (concanavalin A) (Missiakas *et al.*,

1996)。這類基質的降解作用是為維持細胞內蛋白質的平衡穩定及正常的活性功能，以避免細胞受到危害，也就是先前提到的蛋白質品質控制系統 (Protein quality-control systems)。

另一類的基質則是些生理上的物質 (physiological substrates)，如 SulA、RcsA、RpoH 及 TraJ 等，這類物質通常為短暫存在的調控蛋白，當其作用完後就必須快速被降解，以維持細胞的正常生長。其中 SulA 及 RcsA 亦是 Lon 蛋白酶的基質 (Mizusawa & Gottesman, 1983, Gottesman & Maurizi, 1992)，RpoH 亦為 FtsH 蛋白酶的基質 (Yura *et al.*, 1993)。

SulA (Suppressor of ultraviolet sensitivity A)

SulA 是基因 *sulA* (*sfiA*) 轉譯出之蛋白質，在 SOS 反應中會被大量誘導表現，為一細胞分裂的抑制物，可與細胞分裂蛋白 FtsZ 結合形成複合物，達到抑制分裂的效果，導致細胞死亡 (Bi & Lutkenhaus, 1990)。最早，發現 SulA 可以被 Lon 蛋白酶所分解，為 Lon 的基質之一 (Mizusawa & Gottesman, 1983)；於 1997 年時在 *lon⁻* 突變株中發現，大量表現 ClpYQ 蛋白酶可以彌補 Lon 蛋白酶分解 SulA 的功能，使原本因缺乏 Lon 蛋白酶無法分裂的絲狀細胞，恢復成正常分裂的細胞，因此推測 SulA 亦為 ClpYQ 蛋白酶的基質 (Khattar, 1997, Kanemori *et al.*, 1999a)。

RcsA (Regulator of capsule synthesis A)

RcsA 為一胞外莢膜生成基因 *cps* (capsule synthesis) 的調控蛋白，是一種轉錄活化物 (transcriptional activator)，能夠正向調控基因表現量的增加，促使莢膜生成，而莢膜一般被認為與細菌的致病力及於宿主外存活能力有關 (Torres-Cabassa & Gottesman, 1987, Stout *et al.*, 1991)。最早於 1985 年時，Gottesman 等人提出 Lon 蛋白酶可間接調控莢膜生成，後續的研究也證實可調控莢膜生成的 RcsA 為 Lon 蛋白酶的基質之一 (Gottesman *et al.*, 1985, Gottesman & Maurizi, 1992)。之後陸續研究發現在 *lon⁻* 突變株中，RcsA 仍會被降解，而 *clpQY* operon 缺失的突變株則會

呈現輕微的類黏蛋白現象 (mucoid) (Missiakas *et al.*, 1996)；於 1999 年 Wu 等人藉由 *cpsB::lacZ* 融合報導基因，在 *lon*⁻ 突變株中大量表現 ClpYQ 蛋白酶，可使得 *cpsB::lacZ* 表現量大幅降低，顯示 ClpYQ 蛋白酶同樣具有分解 RcsA 的能力，可能是扮演 Lon 蛋白酶的輔助角色。因此 RcsA 同樣是 ClpYQ 與 Lon 蛋白酶的基質 (Wu *et al.*, 1999, Kuo *et al.*, 2004)。

RpoH (Sigma factor, σ^{32})

RpoH 為一 sigma factor (σ^{32})，可啟動熱休克基因的表現，為一熱休克基因轉錄因子。在正常溫度下，RpoH 非常不穩定半衰期約 1 分鐘，然而於高溫或逆境下時，RpoH 因穩定度提高而大幅增加，可進一步啟動熱休克基因表現。在一些蛋白酶的突變株中(*lon*⁻、*clpP*⁻、*ftsH*⁻)，若將 *clpQY* 基因去除，會使得 RpoH 的穩定度大幅提高，而增加熱休克蛋白的合成，並對高溫敏感；然而，當大量表現 ClpYQ 蛋白酶後，RpoH 的量明顯減少並有抑制熱休克反應的現象，因此推測其為 ClpYQ 蛋白酶之基質 (Kanemori *et al.*, 1997, Kanemori *et al.*, 1999b)。

TraJ (F regulatory protein)

TraJ 為 F plasmid conjugation 過程中的一個活化物，對於細菌間的接合作用具有正向調控 (Frost *et al.*, 1994)。最近的研究顯示，在實驗中大量誘導外膜脂蛋白 (outer membrane lipoprotein, nlpE) 生成，會導致 Cpx (conjugative plasmid expression) 壓力反應 (Cpx stress response)，而促使 ClpYQ 蛋白酶降解 TraJ (Lau-Wong *et al.*, 2008)。

五、細胞分裂抑制物 Sula

SOS 反應誘導 Sula 表現

當大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 細胞受到環境壓力，例加熱或冷的溫度驟變、pH 值改變、氧化自由基壓力、化學藥劑或是 UV 輻射等，會導致菌體內蛋白質不

正常的生成累積，或是干擾 DNA 複製造成 DNA 損傷，此時細胞會啟動一連串自我保護的機制，以維持細胞的存活，如熱休克反應 (Heat shock response) 或 SOS 反應 (SOS response)。

SOS 反應 (附圖二) 會透過 LexA 的自我水解機制 (Fernandez De Henestrosa *et al.*, 2000)，誘導將近 30 個基因的表現，大部份是與 DNA 修復相關的蛋白質或酵素 (Walker, 1996)。其中一個受 SOS 反應調控的基因 *sulA* (*sfiA*)，為細胞分裂的抑制物，其在 SOS 反應中會大量的生成累積，可促使細胞停止分裂，避免在 DNA 修復過程中，將受損的 DNA 傳到子代細胞中 (Huisman & D'Ari, 1981, Gottesman *et al.*, 1981)。

SulA 抑制細胞分裂

蛋白質 SulA 是由 169 個胺基酸組成，分子量為 18 kDa，其在各種腸道菌中具有高度的保守性 (Freudl *et al.*, 1987)；當 DNA 受到損傷時，SulA 會被誘導大量生成，直接和細胞分裂的必需蛋白質 FtsZ 結合 (Schoemaker *et al.*, 1984, Higashitani *et al.*, 1995)。原核細胞進行細胞分裂的過程中，FtsZ 會受到 GTP 水解的調控，於細胞中央逐漸聚合成環狀構造 FtsZ-ring，形成細胞隔板，以達成細胞分裂 (Bi & Lutkenhaus, 1991)；然而，當 SulA 和 FtsZ 結合成複合物，則會抑制 FtsZ 的聚合，無法形成環狀構造，導致細胞分裂停止 (Mukherjee *et al.*, 1998)。

直到 DNA 修復完成，SOS 反應結束後，細胞才會再次進行細胞分裂。此時有兩個系統分別調控細胞分裂的重新啟動：其一是藉由 SOS 反應的終止，停止 SulA 生成，屬於轉錄層次上的調控 (Gottesman *et al.*, 1981, Mizusawa & Gottesman, 1983)；另一則是轉譯後調控，透過 ATP 依賴蛋白酶，如：Lon 及 ClpYQ (HslUV)，盡快將剩餘的 SulA 分解，以恢復細胞正常的生長活動 (Seong *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 1999)。

SulA 之結晶結構

SulA 於 2003 年在綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中被解出結晶結構，主要是由五個平行排列的 β -strands 與四個環繞在兩側的 α -helices 所組成 (圖一)，在序列上 α -helices 和 β -strands 是相互交錯排列的 S1-H1-S2-H2-S3-H3-S4-H4-S5 (Cordell *et al.*, 2003)。然而，其中 SulA 的 N 端約 40 個胺基酸，在結晶結構中無法看到明確的電子密度圖 (附圖三)，可能是因為此區域較具彈性而不易解出結構，且其在序列比對上亦較不具保守性 (圖五) (Freudl *et al.*, 1987)；在酵母菌雙雜交系統中，即使去除 SulA 之 N 端 30 個胺基酸，仍不影響其與 FtsZ 的結合作用 (Huang *et al.*, 1996)。

此外，結晶結構也顯示 SulA 是以二聚體 (dimer) 的形式存在 (附圖四)，由單體的第一個 α -helices (H1) 和 β -strands (S1) 部份，與另一單體的相對位置結合，其中 SulA 的 β -strands 相互平行排列，形成一橫越二聚體的 β -sheet 平板。同時作者也發現，SulA 均是以此二聚體的形式，由外側兩端的 S3 和 H3 部份，分別與 FtsZ 的 T7 loop 結合，形成 Z:A:A:Z 的長形複合物，以阻斷 FtsZ 的聚合作用，達到抑制細胞分裂 (Cordell *et al.*, 2003)。

六、蛋白酶對基質 SulA 辨認之相關研究

一般蛋白酶對於基質的辨認

在蛋白質品質調控系統中，為避免不必要的蛋白質降解，對於被降解基質的選擇都有嚴密的調控，如 ATP 依賴蛋白酶便擁有複雜的桶狀結構，將蛋白水解的活性區包埋於中央，利用立體空間的阻隔減少不慎地與蛋白質結合，唯有先被辨認過蛋白質，才能穿越狹窄通道被傳送到達水解活性區。在 ATP 依賴蛋白酶中，是由 ATPase 的部份負責基質辨認的工作，並利用水解 ATP 作為能量來源，將蛋白質結構打開，再傳送基質至 peptidase 蛋白水解的活性區。

因此，蛋白酶如何選擇辨認基質的機制便顯得非常重要，目前眾多研究指出，ATP 依賴蛋白酶可能是藉由辨認目標基質的 N-端或 C-端之特定序列進行結合，而這個結合作用是將基質降解的重要起始步驟。不同的蛋白酶之間也有著不同的辨識特徵，如 ClpAP 和 ClpXP 蛋白酶可以辨認 C-端帶有 *ssrA* tag 的蛋白質，而進行降解作用，但 ClpYQ 與 Lon 卻不能 (Gottesman *et al.*, 1998)。FtsH 蛋白酶可降解 C-端帶有非極性胺基酸序列的蛋白質 (Herman *et al.*, 1998)；最近的研究則指出，Lon 蛋白酶可以辨認一段 $\beta 20$ 的序列，其序列中含有較多的芳香族胺基酸 (Gur & Sauer, 2008)。

ClpYQ 與 Lon 對於 SulA 的辨認

SulA 是 ClpYQ 蛋白酶可降解基質第二類 (physiological substrates) 中最重要的一個。在環境壓力下，SulA 蛋白質的表現會抑制細胞分裂，避免將受損的 DNA 傳遞到子代細胞，當 DNA 修復完成後，就必須將其快速降解以恢復細胞的正常分裂，因此蛋白酶對於 SulA 的辨認是非常重要的。目前已知 SulA 為 Lon 及 ClpYQ 蛋白酶的基質，其中又以 Lon 為主要負責的蛋白酶，可快速降解 SulA 蛋白，當有 Lon 蛋白酶時，SulA 的半衰期僅 1.2 分鐘，而在 *lon*⁻ 突變株中，SulA 的半衰期可達 19 分鐘之久 (Mizusawa & Gottesman, 1983)。而 ClpYQ 蛋白酶似乎扮演著輔助的角色，因為實驗顯示，在大腸桿菌 *lon*⁻ 突變株中，誘導 SOS 反應會有明顯 SulA 蛋白的累積，造成細胞分裂被抑制；當大量誘導 ClpYQ 蛋白酶表現後，則可降低 SulA 蛋白的累積，恢復細胞分裂 (Goldberg, 1992)。

目前有研究指出，當 SulA 去除 C-端末 8 個胺基酸 (SA8) 後，在 *in vivo* 下相較於正常的 SulA 蛋白，累積量變多且較穩定，而在 *in vitro* 下，其與 MBP 之融合蛋白無法被 Lon 蛋白酶所降解，推測可能是因為去除 C-端 8 個胺基酸後的 SulA (SulAC161)，無法與 Lon 進行結合而影響降解作用。若將此 8 個胺基酸 (SA8) 與 Lon 蛋白酶反應，發現其能夠直接與 SA8 結合，並抑制 Lon 蛋白酶對於正常 SulA

的降解，因此認為 Lon 蛋白酶可以藉由辨認 SulA 之 C-末端 8 個胺基酸，來進行結合以及後續的降解作用 (Ishii *et al.*, 2000)。

之後的研究進一步指出，SulA 之 C-末端 8 個胺基酸 KIHSNLYH 中，又以 Histidine 佔有較重要的角色，如果只將最後一個胺基酸置換成 Alanine，則 SulA 蛋白會大量累積並提高穩定度，與 SulA 去除末 8 個胺基酸 (SulAC161) 的結果相似；然而，若將 SulAC161 末端再加上一個 Histidine 胺基酸 (SulAC161+H)，會使 SulA 變得不穩定且快速被 Lon 蛋白酶降解 (Ishii & Amano, 2001)。

然而，有研究利用 SulA 之末端 11 個胺基酸 (CT11) 接於 GFP 的 C-端，作為 ClpYQ 蛋白酶辨識的 tag，但卻無法使 GFP 被降解 (Kwon *et al.*, 2004)。而在 2003 年，Lee 等人的研究指出，ClpY 與 SulA*M89I 之間有很強的結合力，故以 SulA*M89I 作測試，當 SulA 去除 N 端 43 個胺基酸後，仍可與 ClpY 有交互作用；但 SulA 去除 C-端 40 個胺基酸後，則與 ClpY 沒有交互作用的情形，因此認為 ClpYQ 蛋白酶可能是藉由 C-端序列來辨識 SulA 蛋白質 (Lee *et al.*, 2003)。

在 ClpY 的 I domain 上具有兩個 loop，分別是 loop1：137 - 150 a.a. 和 loop2：175 - 209 a.a.，有研究認為 ClpY 是藉由這兩個 loop 來進行基質的辨識與結合，以酵母菌雙雜交系統測試的實驗結果中，若將兩個 loop 都去除，則 ClpY 無法與基質 SulA 結合，但若只去除 loop1 或只去除 loop2 時，ClpY 仍然可與基質 SulA 結合，顯示 ClpY 之 I domain 上的兩個 loop 均具有基質辨識與結合的功能。其中又以 loop2 較為重要，因為去除 loop2 之後的 ClpY 便無法降解基質，而只去除 loop1 的 ClpY 仍可正常降解，顯示 loop2 可能還參與後續基質結構打開及傳送的過程 (Lien *et al.*, 2009)。

七、研究動機與目的

對 ATP 依賴蛋白酶來說，如何選擇辨認需要降解的基質，是非常重要的，可能是藉由某段本來包埋於結構中的短鏈胜肽，或是某些特定的胺基酸序列，來進行辨識結合的作用；然而，關於蛋白酶是如何辨認的詳細機制目前仍不明楚。但大部份的 ATP 依賴蛋白酶應該會使用相似的辨識機制，因此瞭解蛋白質基質最初是如何被蛋白酶辨認並結合，應有助於瞭解後續蛋白酶將基質結構打開及降解的作用。相關的蛋白酶如 ClpXP、ClpAP，對於基質的辨認結合已有廣泛的研究，然而對於 ClpYQ 蛋白酶是如何選擇特定的基質，及其詳細的降解機制，相關的資訊卻較少。

因此為找出 ClpYQ 蛋白酶是如何辨認基質的機制，我們以 Sula 作為基質，建構 C-端不同大小片段缺失的突變，利用酵母菌雙雜交系統，測試各種 Sula 的突變蛋白與 ClpYQ 蛋白酶結合之情形，縮小可能辨識的範圍，再建構單一胺基酸的點突變，分析不同性質的胺基酸對於 ClpYQ 蛋白酶結合的影響，並測試各種突變的 Sula 蛋白活性表現，以及被 ClpYQ 蛋白酶降解之情形。希望藉此找出 ClpYQ 蛋白酶是如何選擇它的基質 Sula，包括其辨認的區域特性，以及對於後續降解作用的影響。

貳、材料與方法

一、實驗材料

(一) 菌株與質體

本研究使用到的菌株與質體如表一、表二所示。

1. 選殖基因表現系統

選殖基因表現的宿主細胞為 *lon⁻ clpY⁻ clpQ⁻* 之大腸桿菌菌株 AC3112，並以 pBAD24、pBAD33 及 pTH18kr 作為選殖基因表現的載體。其中 pBAD24 和 pBAD33 具有 *ara* operon 的啟動子 P_{BAD} 及調控基因 *araC*，故可利用阿拉伯糖 (L-arabinose) 誘導或以葡萄糖 (D-glucose) 抑制目標基因的表現 (Guzman *et al.*, 1995)。而 pTH18kr 為 low copy 數的質體，帶有啟動子 P_{lac}，可以 IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) 誘導下游基因表現 (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 2000)。

2. 酵母菌雙雜交系統

本實驗是使用 LexA Two-hybrid System，此系統的宿主細胞為帶有報導質體 p8op-*lacZ* 的酵母菌 EGY48，其染色體的 *LEU2* 基因上游接有六個 LexA 操縱子 (operator) 序列，可作為報導基因，於 leucine 缺乏的培養基上進行生長測試；報導質體則是在 *lacZ* 前方接上八個 LexA 操縱子序列，利用轉譯出的 β -galactosidase 直接進行活性分析，或是以含有 X-gal 的培養基測試報導基因的表現。此系統中的兩個重要載體 pB42AD 及 pGilda 質體，可分別表現出帶有 AD (activation domain) 或 BD (DNA binding domain) 與選殖基因產物之融合蛋白，當兩蛋白質間有交互作用時，即會啟動上述報導基因表現 (附圖五)。

pB42AD (Clontech，原名 pJG4-5) (Gyuris *et al.*, 1993)，大小 6.45 kb，為一 shuttle vector 可適用於大腸桿菌與酵母菌系統中。pB42AD 之 MCS 上游可轉譯出

一段聚胜肽 B42 及 HA (hemagglutinin) epitope tag，其中 B42 具有酵母菌轉錄活化 (transcription activator) 的功能，可作為 activation domain (Ma & Ptashne, 1987)。其調節性啟動子 P_{GAL} 可受到半乳糖 (galactose) 及植物蜜糖 (raffinose) 的誘導，或是葡萄糖的抑制，以調控融合蛋白的基因表現。pB42AD 可藉由 Amp^r 在大腸桿菌或 *TRP1* 在酵母菌中進行篩選。

pGilda (Clontech) (Gimeno *et al.*, 1995)，大小 6.57 kb，亦為大腸桿菌與酵母菌系統中的 shuttle vector。pGilda 之 MCS 上游為大腸桿菌的 *lexA*，LexA 為 *E. coli* 中 SOS 反應的抑制物，可辨認結合 LexA 操縱子序列，在酵母菌雙雜交系統中作為 DNA binding domain。其同樣以調節性啟動子 P_{GAL} 來調控融合蛋白的基因表現，可藉由 Amp^r 在大腸桿菌或 *HIS3* 在酵母菌中進行篩選 (Ebina *et al.*, 1983)。

(二) 藥品與試劑

1. 一般藥品及相關酵素

一般藥品購自 Sigma (St. Louis, U.S.A.)、J.T. Baker (Phillipsburg, U.S.A.)、和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan) 及生工公司 (台北，台灣)。

一般限制酶、接合酶購自 TaKaRa (Kusarsu, Japan)。

PCR 反應套組購自生工、萬造公司 (台北，台灣)。

DNA 純化套組購自 Viogene (台北，台灣)。

2. 培養基

(1) LB (Luria-Bertani) Broth

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

(2) SD (synthetic dropout) medium

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid (Difco, BD)

Minimal SD Base Gal/Raf (Clontech)

一種以 glucose 作為碳素源的營養限制培養基 (minimum medium)，藉由調配缺乏某些特定胺基酸的 SD medium，作為選擇性培養基 (selective medium)，可用以篩選轉形株。在 LexA 系統中，一般培養是使用 glucose 作為碳素源，當需要誘導質體表現所建構的 LexA 及 B42 融合蛋白時，則以 galactose 和 raffinose 作為碳素源，以進行報導基因測試。本論文中酵母菌均培養於 30°C。

3. 實驗相關核酸引子

參照表三。PCR 引子由基龍米克斯、富聯公司 (台北，台灣) 所合成。



(三) 器材設備

微量離心機 (Kubota KM-15200, 雙鷹公司, 台北, 台灣)

冷凍超高速離心機 (CF 15D2, Hitachi, Japan)

PCR 反應槽 (T3 Thermocycler, Biometra, Germany)

DNA 電泳槽 (伯昂公司, 台北, 台灣)

蛋白質電泳槽 (Amersham, CA, U.S.A.)

蛋白質轉印槽 (Bio-Rad, CA, U.S.A.)

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

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

(四) 分析軟體

BioEdit Sequence Alignment Editor (BioEdit) v7.0.9.0

Hydrophobicity calculations: 於 <http://www.expasy.org/tools/protscale.html> 上輸入序列，選擇“average area buried”，以預測軟體計算蛋白質之 Surface-burial score。

二、實驗方法

(一) 一般實驗方法

1. 相關套組使用

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

此套組用以小量萃取細菌中質體，詳細實驗步驟參考使用手冊。

質體 pTH18kr 以三倍量體積的液態培養基培養。

(2) QIAGEN^R Plasmid Midi kit (Qiagene, 購自台灣諾貝爾生物公司)

此套組用以大量萃取細菌中質體，詳細實驗步驟參考使用手冊。

(3) Gel-M™ Gel Extraction kit (Viogene, 富聯生物科技公司)

此套組用以回收電泳膠體中之 DNA，詳細實驗步驟參考使用手冊。

(4) Montage^R PCR Centrifugal Filter Devices (Montage, 購自伯森生物科技公司)

此套組用以純化 PCR 產物，詳細實驗步驟參考使用手冊。

2. 勝任細胞製備

(1) 氯化鈣法 (一般情況使用)

1. 於 37°C 培養箱中隔夜培養菌體 (12 - 16 小時)。
2. 取 1 ml 菌液接種於 100 ml LB 培養液，重新震盪培養菌體至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.2 - 0.8。
3. 將菌液平均分裝至兩支離心管，冰浴 10 分鐘。自此步驟起均保持低溫操作。
4. 以 6000 rpm 在 4°C 下，離心 10 分鐘，移除上清液。
5. 每管以 1 - 2 ml 冰的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，再加入 3 - 5 ml 冰 0.1 M CaCl₂ 混勻，冰浴 30 分鐘。
6. 以 4000 rpm 在 4°C 下，離心 10 分鐘，移除上清液。
7. 重複步驟 5 和 6 一次。

8. 每管加入 1 ml 冰 0.1 M CaCl₂ / 15% glycerol，懸浮菌體。
9. 每 100 μl 菌液分裝至菌種保存管中，儲存於 -70°C。

(2) 電穿孔法 (用於電穿孔實驗)

1. 於 37°C 培養箱中隔夜培養菌體 (12 - 16 小時)。
2. 取 1 ml 菌液接種於 100 ml LB 培養液，重新震盪培養菌體至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.4 - 0.6。
3. 將菌液平均分裝至兩支離心管。自此步驟起均保持低溫操作。
4. 以 4000 rpm 在 4°C 下，離心 15 分鐘，移除上清液。
5. 加入 100 ml 滅菌的 10% glycerol 清洗菌體，以 4000 rpm 在 4°C 下，離心 15 分鐘，移除上清液。
6. 加入 50 ml 滅菌的 10% glycerol 清洗菌體，以 4000 rpm 在 4°C 下，離心 15 分鐘，移除上清液。
7. 加入 2 ml 滅菌的 10% glycerol 清洗菌體，以 4000 rpm 在 4°C 下，離心 15 分鐘，移除上清液。
8. 加入 200 μl 滅菌的 10% glycerol 混勻，即製成勝任細胞，每 50 μl 分裝成一管。(冷凍過的勝任細胞轉形效率較低。)

3. 轉形作用

(1) *E. coli* Heat shock transformation (Sambrook, 1989)

1. 取 50 μl 勝任細胞與 20 μl 質體接合反應 (ligation) 的產物，或 5 μl 小量製備的質體混合，冰浴 50 分鐘。
2. 置於 42°C 下，進行熱休克反應 (heat shock) 90 秒後，迅速放入冰中。
3. 加入 1 ml LB 液態培養基，在 37°C 培養箱中震盪培養 1 小時。
4. 以 6000 - 8000 rpm 離心四分鐘，移除上清液，留下約 50 μl 懸浮菌體。
5. 塗於含適當抗生素的培養基上，置於 37°C 培養箱培養隔夜。

(2) *E. coli* Electropotation transformation

1. 取 2 μg 的質體 (約 0.5 μl 小量製備的質體) 加入事先準備的 50 μl 電穿孔勝任細胞中混勻。
2. 將混勻的勝任細胞放入 P/N 620 cuvette 中，以 2500 V 電壓進行電擊穿孔反應。
3. 電擊結束後，迅速加入 1 ml SOC 培養液，在 37°C 培養箱中震盪培養 1 小時。
4. 以 6000 - 8000 rpm 離心四分鐘，移除上清液，留下約 50 μl 懸浮菌體。
5. 塗於含適當抗生素的培養基上，置於 37°C 培養箱培養隔夜。

SOC medium	4°C 保存
Tryptone	20.0 g
Yeast extract	5.0 g
NaCl	0.5 g
1M KCl	2.5 ml
調整 pH 至 7.0，加水至總體積為 1 升，滅菌後再加入	
1M Glucose	20.0 ml
2M MgCl ₂	5.0 ml

(3) TSS-Transformation

1. 取 30 μl 隔夜培養菌液，加入 3 ml LB 培養液中，震盪培養菌體至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.6 - 0.8。
2. 將菌液以 3000 rpm，離心 10 分鐘，移除上清液。
3. 以 0.3 ml 2X TSS 溶液將菌體懸浮，加入 5 μl 質體混勻後，冰浴 50 分鐘。
4. 置於 37°C 下，進行熱休克反應 (heat shock) 2 分鐘後，迅速放入冰中。
5. 加入 0.5 ml LB 液態培養基，在 30°C 培養箱中震盪培養 1 小時。
6. 以 6000 - 8000 rpm 離心四分鐘，移除上清液，留下約 50 μl 懸浮菌體。
7. 塗於含適當抗生素的培養基上，置於 30°C 培養箱培養隔夜。

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

(4) Yeast transformation

1. 挑選單一酵母菌菌落接種至 5 ml 選擇性培養液中 (SD medium)，於 30°C 培養箱隔夜培養約 12 - 16 小時，OD₆₀₀ = 0.4 - 0.8，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液，收集菌體。
2. 用 2.5 ml 無菌水清洗菌體，再以 3000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液
3. 加入 100 µl 的 100 mM LiOAc 懸浮菌體，混勻後移至微量離心管。以 14000 rpm 離心 5 秒，移除上清液。
4. 再加入 40 µl 的 100 mM LiOAc 懸浮菌體，以 14000 rpm 離心 5 秒，移除上清液。酵母菌勝任細胞製備完成。
5. 先以 240 µl 的 50% (w/v) PEG 4000 將酵母菌勝任細胞懸浮，再加入 36 µl 的 1 M LiOAc、25 µl 的 salmon sperm carrier DNA 及 50 µl 欲送入的質體 (以 5 µl 小量製備的質體稀釋 10 倍)，劇烈震盪 1 分鐘混合均勻。
* 其中 salmon sperm carrier DNA 需先以 99°C 處理 10 分鐘打開雙股，再迅速置於冰上待用。
6. 於 30°C 培養箱中震盪培養 30 分鐘，再移至 42°C 水浴槽進行熱休克反應 (heat shock) 20 分鐘。
7. 以 14000 rpm 離心 15 秒，移除上清液。以 100 µl 無菌水懸浮菌體，塗抹於適當篩選的 SD 培養基，於 30°C 培養箱培養 2 天。

4. 瓊脂膠體電泳分析

(1) 限制酶截切反應 (Digestion)

取適量質體，加入選用的限制酶及其配合之緩衝液，反應溫度視限制酶

種類決定，反應時間約 60 - 70 分鐘。反應後將溶液加入適量的追蹤染劑，進行 DNA 瓊脂膠體電泳。

(2) DNA 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳

用 1× TAE 緩衝液配製 0.8 - 1.0% 的瓊脂膠體，以 100 伏特之電壓進行電泳，反應時間 25 - 35 分鐘後；利用 Ethidium Bromide (EtBr) 進行外染，經退染後再以紫外光觀察 DNA 產物。

(3) 回收電泳膠體之 DNA

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

(二) 菌體的建構

1. 噬菌體實驗方法

(1) 製備噬菌體 (Preparation of phage plate lysate)

1. 取隔夜培養菌液 0.2 ml，加入 2 - 3 個 plaques，於 37°C 靜置培養 15 分鐘。
2. 將 3 ml 的 R-Top Agar 隔水加熱溶解，待其降溫後將步驟 1 之菌液加入。
3. 混合均勻後倒在 LA 平板培養基上，搖晃使其攤平，待乾。
4. 於 37°C 培養箱中倒置培養 5 - 8 小時，待培養基上長出許多 plaques 後，即可收集噬菌體 lysate。
5. 加 5 ml TM buffer 於培養基內，靜置於 4°C 數小時或隔夜後，將培養基內的溶液吸取到試管內。
6. 加入 0.4 ml 的氯仿 (chloroform)，於 4°C 下靜置 30 分鐘後，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，轉移上清液至乾淨試管。此步驟重複二次。
7. 取得之噬菌體 lysate 保存於 4°C。

R-Top Agar

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	1 g
Difco agar	8 g
NaCl	8 g
加水至總體積為 1000 ml，滅菌後再加入	
1 M CaCl ₂	2 ml
20% Glucose	5 ml

Tris-magnesium (TM) buffer

1M Tris-HCl (pH 7.5)	20 ml
MgSO ₄	0.4 g
加水至總體積為 400 ml，滅菌後 4°C 保存	

(2) P1 lysate 的製備

以 P1 噬菌體感染染色體上帶有某特定基因之細菌細胞，再收集噬菌體之 lysate，用以進行後續的 P1 轉導作用 (P1 transduction)。

1. 將 *E. coli* donor strain 接種至 5 ml LB 培養液中，震盪培養於生長溫度 (依菌株特性決定生長溫度 37°C 或 30°C)。
2. 將隔夜培養菌液以 1:100 接種於 5 ml LB 培養液中，其內含有 50 µl 的 20% Glucose (終濃度 0.2%)，及 25 µl 的 1M CaCl₂ (終濃度 5 mM)，於適合之溫度震盪培養 30 - 45 分鐘。(鈣離子為病毒吸附所必須。)
3. 加入 100 µl 新製備的 P1 vir stock (10^9 - 10^{10} pfu/ml)，繼續震盪培養約 3 小時，直到菌體細胞呈現溶解 (lysis)。
4. 加入 200 µl 氯仿，連續搖動數分鐘使其充分混合，以確保培養液中無殘留細菌，置於冰上 20 分鐘。
5. 以 3500 rpm 離心 10 分鐘後，轉移上清液至新試管，再重複步驟 4 一次。
6. 將上清液轉移至新試管後，標記 lysate 種類 (如：P1vir/sulA^r)，置於 4°C 保存。(此 lysate 可於 4°C 下保存數年，但氯仿可能會減低病毒存活率。)

(3) P1 轉導作用 (P1 transduction)

以帶有特定基因之 P1 lysate 感染欲接受的菌體細胞，將此特定基因轉移至目標菌體中。

1. 將 *E. coli* recipient strain 接種至 5 ml LB 培養液中，震盪培養於生長溫度。
2. 取隔夜培養菌液 1.6 ml 於微量離心管中，以 14000 rpm 離心 2 分鐘，移除上清液。
3. 加入 0.8 ml 的 P1 salts solution 打散細胞，每 400 μ l 分裝至新微量離心管。
4. 混入 100 μ l 欲轉導的 lysate，於生長溫度中靜置 30 分鐘，使噬菌體吸附於細胞。
5. 添加 1 ml LB 及 200 μ l 的 1M sodium citrate，於生長溫度中繼續震盪培養 1 小時。(sodium citrate 可將鈣離子嵌合，避免剩餘病毒再次感染。)
6. 以 14000 rpm 離心 2 分鐘，移除上清液，加入 100 μ l LB 混合，塗抹於含適當抗生素的培養基上，培養於生長溫度中 1 - 2 天。
7. 所得的菌落以劃線法純化出單一菌落二次，避免殘存的 P1 噬菌體感染。
8. 依據菌體的基因型及表現型確認轉導到正確的基因。可利用 colony PCR 方法確認轉導基因是否於正確位置上。

P1 salts solution

CaCl ₂ (終濃度 10 mM)	0.44 g
MgSO ₄ (終濃度 5 mM)	0.24 g
加水至總體積為 400 ml，滅菌後常溫保存	400 ml

2. 建構 *sulA*⁻ 突變株

從日本 National BioResource Project *E. coli* strain 取得的大腸桿菌 *sulA*⁻ 菌株 (Keio Collection JW0941)，其染色體上 *sulA* 基因已被去除，並帶有 kanamycin 抗藥性基因。以 AC3112 為原始菌株，利用 P1 轉導作用的方式，建構 AC3112 菌株之 *sulA*⁻ 突變株。再利用 FLP 重組酶 (recombinase)，去除 kanamycin 抗藥性片段。

1. 先以 P1 噬菌體感染 JW0941，收集 lysate，再利用 P1 轉導作用將此片段轉導至 AC3112 菌株，以含有 Kan 的培養基進行篩選，並利用 colony PCR 方式確認抗藥性基因片段是否於正確位置上。
2. 將質體 pCP20 以 TSS transformation 方式轉形至此菌株中，以含有 Amp 的培養基進行篩選，於 30°C 培養箱中培養隔夜。
 - * 質體 pCP20 為一 FLP-recombination plasmid，可辨認 FRT 位置進行重組反應 (FLP-mediated site-specific recombination)，其對溫度敏感並帶有 ampicillin 抗性 (Cherepanov & Wackernagel, 1995)。
3. 將所得菌落接種於 3 ml LB 培養液中，於 30°C 培養箱中繼代培養 2 - 3 次，去除 kanamycin 抗藥性片段。
4. 塗於 LA 培養基上，於 37°C 培養箱中培養隔夜，去除質體 pCP20。
5. 挑選單一菌落，以含有 Amp 及 Kan 的培養基於 37°C 培養箱中培養隔夜，測試質體 pCP20 及 kanamycin 抗藥性片段是否均掉落。

3. 建構 genomic *sulA* + 3xFLAG tag 之菌株

以 PCR 增幅反應產生兩側具有與目標基因末端同質性 (homologous) 的 3xFLAG tag 及抗藥性基因片段，將此片段以電穿孔方法送入細胞中，再誘導可表現重組酶 (recombinase) 的質體，利用同質性交換 (homologous recombination) 進行重組反應，將此片段插入目標基因後方；利用溫度、抗性篩選 genomic *sulA* + 3xFLAG tag 之菌株 (Uzzau *et al.*, 2001)。

- * 質體 pKD46：帶有 λ 噬菌體之 Red 重組酶且對熱敏感 (thermal-sensitive) 的質體，可受誘導表現進行同質性交換 (Datsenko & Wanner, 2000)。
- * 質體 pSUB11：具有 3xFLAG 及 kanamycin 抗藥性基因。
- * PCR 引子設計：見表三。

Preparation of linear DNA

Template : pSUB11	2.0 μ l
10X Ex Taq buffer	5.0 μ l
dNTP (2.5 mM)	4.0 μ l
Forward primer (5 μ M) (sulA-3xFLAG_Fw)	1.0 μ l
Reversed primer (5 μ M) (sulA-3xFLAG_Rv)	1.0 μ l
TaKaRa Ex Taq	0.5 μ l
ddH ₂ O	36.5 μ l
<hr/>	
Total	50.0 μ l

PCR 反應條件

1. Denaturation	94°C : 3 min	
2. Denaturation	94°C : 30 s	← 30 cycles
3. Annealing	50°C : 30 s	
4. Extension	72°C : 2 min	
5. Extension	72°C : 2 min	
6. Stop	4°C : stop	

1. 以設計的引子經由 PCR 增幅反應產生帶有 3xFLAG 及抗藥性基因之片段，再利用 DNA 瓊脂膠體電泳進行分析，回收目標大小分子量（約 1.6 kb）的 DNA 片段。

2. 定量 DNA 濃度達 50 - 400 ng。

* 基因片段準備完成。

3. 於含有 0.02% arabinose 及 Amp 之 LB 培養液中，在 30°C 培養箱隔夜培養帶有質體 pKD46 之菌株 BW25113。

4. 取 0.4 ml 菌液接種於含有 0.02% arabinose 及 Amp 之 20 ml LB 培養液，重新震盪培養至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.4 - 0.6。

5. 將菌液平均分裝至兩支離心管。自此步驟起均保持低溫操作。

6. 以 5500 rpm 在 4°C 下，離心 8 分鐘，移除上清液。

7. 加入 2 ml 冰無菌水懸浮菌體，分裝至兩支微量離心管中。

8. 以 12000 rpm 在 4°C 下，離心 20 秒，移除上清液。再加入 1 ml 冰無菌水。

重複此步驟三次。

* 電穿孔勝任細胞製備完成。

9. 將步驟 2 之 DNA 約 7 μ l (50 - 400 ng) 加入 50 μ l 製備好的電穿孔勝任細胞中。
10. 混勻後的勝任細胞移置 P/N 620 cuvette 中，以 2500 V 之電壓進行電擊穿孔反應。
11. 電擊結束後，迅速加入 1 ml SOC 培養液，在 37°C 培養箱中震盪培 1 - 2 小時。
12. 以 6000 - 8000 rpm 離心四分鐘，移除上清液，留下約 50 μ l 懸浮菌體。
13. 塗於含有 Kan 的培養基上進行篩選，置於 37°C 培養箱培養隔夜。
14. 挑選單一菌落，利用 colony PCR 確認 3xFLAG 及 kanamycin 抗藥性基因片段插入目標基因後方。

(三) 突變基因建構

利用 PCR based site-directed mutagenesis 的方法，建構目標基因的 deletion mutants 或是 point mutants。將此選殖的基因片段接合至質體 pGilda 上，先轉形至 *E. coli* XL1-Blue 中進行初步篩選，再萃取出質體經定序確認建構的突變序列正確。之後利用限制酶的切位將選殖的基因插入適當的質體中。

1. 選殖基因片段製備

以質體 pB42AD-*sulA* 作為模板，分別設計帶有限制酶切位以及突變序列的引子 (見表三)，利用 PCR 增幅反應產生突變點的前後兩片段，以此做為模板再進行第二次的 PCR 增幅反應，建構出帶有突變的基因片段。

1. 第一次 PCR 增幅反應

Template : pB42AD- <i>sulA</i>	2.0 μ l
10X Taq buffer	5.0 μ l
dNTP (10 mM)	1.0 μ l

Forward primer (5 μ M) (5')	0.5 μ l
Reversed primer (5 μ M) (3')	0.5 μ l
Taq DNA polymerase	0.5 μ l
ddH ₂ O	40.5 μ l
<hr/>	
Total	50.0 μ l

PCR 反應條件

1. Denaturation 95°C : 10 min
 2. Denaturation 95°C : 1 min 30 s
 3. Annealing 48~65°C : 1 min
 4. Extension 72°C : 1 min 30 s
 5. Extension 72°C : 10 min
 6. Stop 4°C : stop
- 30 cycles
-

* Annealing 溫度依照引子的不同而稍作改變，為 Tm 值減 5 度。

2. 將 PCR 產物經瓊脂膠體電泳分析，切下正確大小分子量的片段，利用 Viogene Gel-M Gel Extraction kit 回收純化，作為第二次 PCR 反應的模板。

3. 第二次 PCR 增幅反應

Template 1	1.0 μ l
Template 2	1.0 μ l
10X Pfu buffer	5.0 μ l
dNTP (10 mM)	1.0 μ l
Forward primer (5 μ M) (5' <i>sulA</i> <i>Eco</i> RI)	0.5 μ l
Reversed primer (5 μ M) (3' <i>sulA</i> <i>Bam</i> HI)	0.5 μ l
Pfu DNA polymerase	0.5 μ l
ddH ₂ O	40.5 μ l
<hr/>	
Total	50.0 μ l

PCR 反應條件

1. Denaturation 95°C : 10 min
 2. Denaturation 95°C : 1 min 30 s
 3. Annealing 48~65°C : 1 min
 4. Extension 72°C : 1 min 30 s
 5. Extension 72°C : 10 min
 6. Stop 4°C : stop
- 30 cycles
-

* Annealing 溫度依照引子的不同而稍作改變，為 Tm 值減 5 度。

4. 將 PCR 產物經瓊脂膠體電泳分析，切下正確分子量大小的片段，利用 Viogene Gel-M Gel Extraction kit 回收純化，再進行後續的處理。

2. 載體製備

以質體 pGilda 為載體，將選殖的基因片段插入 *EcoRI* 及 *BamHI* 限制酶的切位之間。

1. 將質體 pGilda 先轉形至 *E. coli* XL1-Blue 中大量複製，再以 QIAGEN Plasmid Midi Kit 萃取質體 DNA。
2. 取部分萃取所得質體以限制酶 *EcoRI* 及 *BamHI* 於 37°C 下載切反應 1 小時後，再於 65°C 下反應 20 分鐘，破壞限制酶 *EcoRI* 及 *BamHI* 的活性。
3. 將反應過後之 DNA 進行酒精沉澱。

* 酒精沉澱

4. 加入相當於 2.5 倍體積的 95% 酒精以及 0.1 倍體積的 2.8 M NaOAc (pH 5.2)，放置於 -80°C 下 30 分鐘或隔夜，使 DNA 沉澱。
5. 以 11000 rpm 在 4°C 下，離心 30 分鐘，移除上清液，取得 DNA 沉澱。
6. 將沉澱 DNA 以 70% EtOH 清洗後，真空乾燥，再以 20 μ l 的無菌二次水溶解，保存於 4°C 或 -20°C。

3. 接合反應

在 PCR 增幅反應中使用的專一性引子，其 5'端及 3'端分別加上限制酶 *EcoRI* 及 *BamHI* 可截切的序列，因此可將此選殖基因片段透過接合酶，接合於具有 *EcoRI* 及 *BamHI* 截切點的載體中。

1. 將選殖的基因片段以限制酶 *EcoRI* 及 *BamHI* 於 37°C 下載切反應 1 小時後，再於 65°C 下反應 20 分鐘，破壞限制酶 *EcoRI* 及 *BamHI* 的活性。
2. 將處理過的選殖基因片段及載體 DNA 加入接合酶 (ligase)，於 16°C 下進行接合反應 (ligation) 14-16 個小時，反應後保存於 4°C。

* 接合反應反應物

Vector DNA	3.0 μ l
Insert DNA	13.0 μ l
10X ligation buffer	2.0 μ l
10 mM ATP	1.0 μ l
T4 DNA Ligase (TaKaRa)	1.0 μ l
<hr/>	
Total	20.0 μ l

4. 選殖質體篩選及確認

將接合反應的反應物先轉形至 *E. coli* XL1-Blue 中，大量複製質體，再進行篩選與確認的動作。

1. 以 Heat shock transformation 方式，將接合反應的產物轉形至 *E. coli* XL1-Blue 中，於 37°C 培養箱培養隔夜。
2. 利用含 Amp 抗生素的培養基篩選具有質體的菌落。
3. 挑選出單一菌落並萃取菌株中質體。
4. 以適當的限制酶於 37°C 下截切反應 1 小時後，經瓊脂膠體電泳分析，初步確認 DNA 片段分子量大小無誤。
5. 再將所萃取的質體送往台大醫學院醫學研究部進行定序，確認建構的突變序列正確。

(四) 酵母菌雙雜交系統分析

利用酵母菌 EGY48 [p8op-*lacZ*] 系統，分別將帶有目標基因的兩個質體 pGilda 及 pB42AD 轉形至酵母菌體內，成為雙質體轉形株 (cotransformants)。以半乳糖 (galactose) 及植物蜜糖 (raffinose) 誘導融合蛋白表現，再利用報導基因測試，分析兩蛋白質間交互作用情形 (Fields & Song, 1989)。

SD medium

1. ddH ₂ O	90 ml
2. Agar	2.0 g

3. Yeast Nitrogen Base w/o Amino acid	0.67 g
或 Mini SD base Gal/Raf	3.7 g
4. DO supplements	依包裝標示
5. Glucose	2.0 g
減菌後待降溫，再加入	
6. 10X BU salts (only for X-gal)	10.0 ml
7. X-gal (20 mg/ml DMF 避光保存於 -20°C)	0.4 ml
Total	100 ml

* 使用固態培養基時加入 agar，液態培養基時則不加入 agar。

* 一般培養時使用 Yeast Nitrogen Base w/o Amino acid，並加入 Glucose；
需誘導質體表現時使用 Mini SD base Gal/Raf，且不加入 Glucose。

* DO supplements 依營養缺陷培養基的需求，使用 -Ura/-His/-Trp，或是
-Ura/-His/-Trp/-Leu。

* X-gal 測試的培養基，減菌後待降溫，再加入 10X BU salts 及 X-gal，避
光保存。

10X BU salts

Na ₂ HPO ₄	37.08 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	39.00 g
調整 pH 至 7.0，加水至總體積 1000 ml，減菌常溫保存	1000 ml

1. *LEU2* expression：生長測試

當兩蛋白質有交互作用時，報導基因 *LEU2* 的表現，可使菌株生長於缺乏 leucine 的選擇性培養基上。

1. 挑選 EGY48 [p8op-*lacZ*] 雙質體轉形株 (cotransformants) 之單一菌落，接種至 1 ml 的 SD /-Ura/-His/-Trp 培養液，於 30°C 培養箱中隔夜培養菌體約 12 - 16 小時。
2. 以 3000 rpm 離心 5 分鐘，收集菌體，以 1 ml 無菌水清洗菌體，再次離心，移除上清液，重複此步驟二次。
3. 以 1 ml 的 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp 培養液懸浮菌體，取 0.2 ml 菌液接種至 2

ml 的 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp 培養液，於 30°C 培養箱震盪培養 5 - 6 小時，至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.5 - 0.7。

4. 取 1 ml 培養至對數期的菌液，以 1 ml 無菌水清洗菌體，離心後移除上清液，重複二次。
5. 以無菌水將清洗過的菌體稀釋 2 倍。
6. 取稀釋後的菌液 5 μ l 滴於 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp/-Leu 的平板培養基上，於 30°C 培養箱中連續培養數天，觀察生長情形。

2. *LacZ* expression : X-gal 測試

當兩蛋白質有交互作用時，報導基因 *LacZ* 表現，會產生 β -galactosidase，可將 X-gal 分解產生藍色物質，於含 X-gal 的選擇性培養基上呈現藍色菌落。

1. 挑選 EGY48 [p8op-*lacZ*] 雙質體轉形株 (cotransformants) 之單一菌落，接種至 SD/-Ura/-His/-Trp 平板培養基上，於 30°C 培養箱中隔夜培養 1 - 2 天，活化菌體。
2. 沾取菌落劃於含 80 mg/l 之 X-gal 的 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp 平板培養基上，於 30°C 培養箱中連續培養數天，觀察生長情形。

3. *LacZ* expression : β -galactosidase 活性分析

當報導基因 *LacZ* 表現，產生 β -galactosidase，可分解 ONPG (O-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside)，藉由分解的活性測試，分析兩蛋白質交互作用情形。

1. 挑選 EGY48 [p8op-*lacZ*] 雙質體轉形株 (cotransformants) 之單一菌落，接種至 1 ml 的 SD/-Ura/-His/-Trp 培養液，於 30°C 培養箱中隔夜培養菌體約 12 - 16 小時。
2. 以 3000 rpm 離心 5 分鐘，收集菌體，以 1 ml 無菌水清洗菌體，再次離心，移除上清液，重複此步驟二次。
3. 以 1 ml 的 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp 培養液懸浮菌體，取 0.5 ml 菌液接種至 5

ml 的 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp 培養液，於 30°C 培養箱震盪培養 5 - 6 小時，至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.5 - 0.7，紀錄各樣品的 OD₆₀₀ 值。

4. 取 1 ml 菌液 (每個樣品均做三重複)，以 14000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，收集菌體。
5. 以 1 ml 的 Z buffer 懸浮菌體，加入 40 μl 0.1% SDS 及 60 μl chloroform，劇烈震盪 20 秒進行破菌。置於 28°C 水浴槽中預反應 5 分鐘。
6. 加入 200 μl ONPG 至每個反應試管及空白組中 (以 1 ml Z buffer 加入 40 μl 0.1% SDS 及 60 μl chloroform 作為空白組)，開始計時。待顏色轉變為黃色 (OD₄₂₀ 吸光值約在 0.4 - 0.6) 後，加入 0.5 ml 的 stop solution (1 M Na₂CO₃) 終止反應，並記錄總反應時間。
7. 離心使細胞碎片沉降後，取上清液測量 OD₄₂₀ 吸光值。
8. 活性的計算公式為：

$$\text{Units of } \beta\text{-galactosidase} = (1000 \times \text{OD}_{420}) / (T \times V \times \text{OD}_{600})$$

T : ONPG 加入至中止液加入所反應之時間 (分)

V : 參與反應菌液之體積 (ml)

Unit 定義：每分鐘每個菌體所產生之 O-Nitrophenol (Miller 1972)

Z buffer

Na ₂ HPO ₄	8.53 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	6.22 g
MgSO ₄	0.12 g
β-mercaptoethanol	2.7 ml
KCl	0.75 g
調整 pH 至 7.0，加水至總體積為 1000 ml，保存於 4°C	1000 ml

ONPG (O-Nitrophenyl β-D-Galactopyranoside)

ONPG	40.0 mg
ddH ₂ O	10.0 ml

需新鮮配製，避光，置於 4°C 保存

4. 酵母菌蛋白質萃取

在酵母菌雙質體轉形株中，以半乳糖 (galactose) 及植物蜜糖 (raffinose) 誘導融合蛋白表現後，破菌粗萃取其蛋白質，再以西方墨點法偵測兩蛋白質的表現情形。

1. 挑選 EGY48 [p8op-*lacZ*] 雙質體轉形株 (cotransformants) 之單一菌落，接種至 1 ml 的 SD /-Ura/-His/-Trp 培養液，於 30°C 培養箱中隔夜培養菌體約 12 - 16 小時。
2. 以 3000 rpm 離心 5 分鐘，收集菌體，以 1 ml 無菌水清洗菌體，再次離心，移除上清液，重複此步驟二次。
3. 以 1 ml 的 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp 培養液懸浮菌體，取 0.5 ml 菌液接種至 5 ml 的 Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp 培養液，於 30°C 培養箱震盪培養 5 - 6 小時，至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.5 - 0.7，紀錄各樣品的 OD₆₀₀ 值。
4. 以 OD₆₀₀ 吸光值換算取等量菌數 (約 3 ml 菌液)，以 14000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，收集菌體。
5. 以 1 ml 的 0.25 M NaOH / 1% β-mercaptoethanol 懸浮菌體，冰浴 10 分鐘。
6. 加入 160 μl 的 50% Trichloroacetic acid，置於冰上冰浴 10 分鐘。
7. 以 14000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液，收集菌體。
8. 以 1 ml 的冰丙酮懸浮菌體，再以 14000 rpm 離心 10 分鐘，收集菌體。
9. 待丙酮揮發後，以 50 - 100 μl 的 2X SDS sample buffer 懸浮菌體，製成含粗萃蛋白質的樣本溶液。

0.25 M NaOH / 1% β-mercaptoethanol

NaOH	0.5 g
β-mercaptoethanol	0.5 ml
加水至總體積為 50 ml，室溫保存	50.0 ml

(五) 大腸桿菌選殖基因表現系統

將選殖的基因片段，及建構好的突變基因片段，分別接合至質體 pBAD24、pBAD33 或 pTH18kr 中，轉形至大腸桿菌 AC3112 菌株或 *sulA*⁻ 菌株 (YT10010) 中，再利用誘導系統使蛋白質表現，進行分析試驗。

1. 基因表現質體建構

(1) pBAD24-*clpY*

以限制酶 *EcoRI* 及 *HindIII* 截切 *clpY* 基因片段，接合至以相同限制酶製備的載體 pBAD24 上，再轉形至大腸桿菌中，利用含 Amp 抗生素的培養基進行篩選。

(2) pBAD33-*clpQ*

以限制酶 *KpnI* 及 *HindIII* 截切 *clpQ* 基因片段，接合至以相同限制酶製備的載體 pBAD33 上，再轉形至大腸桿菌中，利用含 Cm 抗生素的培養基進行篩選。

(3) pTH18kr HA-*sulA*

以限制酶 *EcoRI* 及 *BamHI* 截切建構的各個 *sulA* 突變基因片段，接合至以相同限制酶製備的載體 pTH18kr 上，其質體上帶有 HA tag 位於 *sulA* 的 N-端，再轉形至大腸桿菌中，利用含 Kan 抗生素的培養基進行篩選。

2. 蛋白質誘導表現

轉形成功的大腸桿菌 AC3112 菌株或 *sulA*⁻ 菌株 (YT10010) 會帶有三個質體，並具有三種抗生素之抗性 Ampicillin、Kanamycin 及 Chloramphenicol。藉由可受誘導的質體，分別誘導三種蛋白質表現。

1. 於 30°C 培養箱中隔夜培養菌體。
2. 將隔夜培養菌液以 1:100 接種於含適當抗生素之 LB 培養液中，並加入 arabinose 終濃度 0.5% (w/v)，以誘導 ClpYQ 蛋白質表現，重新震盪培養

菌體約三小時，至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.5。

3. 接著加入 IPTG 終濃度 1 mM，以誘導 SulA 蛋白質表現，再繼續震盪培養二小時。
4. 收取菌液即可進行序列稀釋之生長測試，或將菌液以 3000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液，收集菌體製備蛋白質樣本，進行西方墨點分析。

3. 序列稀釋生長測試

本實驗先只以 IPTG 誘導 SulA 蛋白質表現，經序列稀釋後觀察菌體存活情形，測試 SulA 蛋白質是否具有抑制細胞分裂活性，造成細胞死亡。再分別以 arabinose 誘導 ClpYQ 蛋白質表現，以及 IPTG 誘導 SulA 蛋白質表現，經序列稀釋後觀察菌體存活情形，測試 ClpYQ 蛋白酶是否可分解 SulA，恢復細胞生長。

1. 於 30°C 培養箱中隔夜培養菌體。
2. 將隔夜培養菌液以 1:100 接種於含適當抗生素之 LB 培養液中，並加入 arabinose 終濃度 0.5% (w/v)，以誘導 ClpYQ 蛋白質表現，重新震盪培養菌體約三小時，至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.5。
3. 接著加入 IPTG 終濃度 1 mM，以誘導 SulA 蛋白質表現，再繼續震盪培養二小時。
4. 收取菌液，以 LB 培養液作連續序列稀釋，分別為 10⁻¹ - 10⁻⁶ 稀釋度。
5. 取稀釋後的菌液 5 μl 滴於含 0.5% arabinose、1 mM IPTG 及適當抗生素之培養基上，於 30°C 培養箱中培養隔夜觀察。

4. Methyl methanesulfonate (MMS) 抗性分析

Methyl methanesulfonate (MMS) 為 DNA 致突變劑，會造成 DNA 損傷引發 SOS 反應，進而誘導 genome 上 SulA 的表現，抑制細胞分裂造成死亡。本實驗藉由 arabinose 誘導 ClpYQ 蛋白酶表現，經序列稀釋後觀察菌體對 MMS 是否具有抗性，若可正常生長表示受誘導表現的 ClpYQ 蛋白酶可分解 SulA (Wu *et al.*,

1999)。

1. 於 30°C 培養箱中隔夜培養菌體。
2. 將隔夜培養菌液以 1:100 接種於含適當抗生素之 LB 培養液中，並加入 arabinose 終濃度 0.5% (w/v)，以誘導 ClpYQ 蛋白質表現，重新震盪培養菌體約三小時，至 OD₆₀₀ 吸光值為 0.5。
3. 收取菌液，以 LB 培養液作連續序列稀釋，分別為 10⁻¹ - 10⁻⁶ 稀釋度。
4. 取稀釋後的菌液 5 μl 滴於含 0.5% arabinose、0.025% MMS 及適當抗生素之培養基上，於 30°C 培養箱中培養隔夜觀察。

(六) 西方墨點分析 (Western Blotting)

1. SDS 蛋白質膠體電泳 (SDS-PAGE)

1. 測量菌液 OD₆₀₀ 吸光值。
2. 取 3 ml 菌液，以 3000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液。
3. 以 1 ml 無菌水清洗菌體，再次離心，移除上清液，收集菌體。
4. 加入 70 μl 的 2X SDS sample buffer 懸浮菌體，於 100°C 下反應 10 分鐘，得到含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液。
5. 取約含等量菌數（由 OD₆₀₀ 吸光值換算）之含粗萃蛋白樣品溶液，於 12.5% 的 SDS-PAGE 膠片中進行蛋白質電泳。
6. 先以 100 伏特電泳 30 分鐘，再以 120 伏特電泳約 60 分鐘。

SDS-PAGE 電泳膠片 (12.5%)	Running gel	Stacking gel
H ₂ O	3.3 ml	3.4 ml
30% Acrylamide	4.0 ml	0.83 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	-- ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	-- ml	0.63 ml
10% SDS	0.1 ml	0.05 ml
10% APS	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml

此份量約可配 0.75 mm 厚 10 x 7 cm 的膠片兩片

30% 丙烯醯胺液 (Acrylamide)

40% Acrylamide / Bis solution	75.0 ml
ddH ₂ O	25.0 ml
避光，置於 4°C 保存	100 ml

1.5 M Tris (pH 8.8)

Tris base	36.34 g
ddH ₂ O	150 ml
先溶解後，調整 pH 至 8.8，再加水至總體積為 200 ml	200 ml

1.0 M Tris (pH 6.8)

Tris base	24.22 g
ddH ₂ O	150 ml
先溶解後，調整 pH 至 6.8，再加水至總體積為 200 ml	200 ml

10% APS 溶液 (Ammonium persulfate)

APS	50.0 mg
ddH ₂ O	0.5 ml
每次使用前新鮮配製	

2X SDS sample buffer

10% SDS	20.0 ml
Glycerol	10.0 ml
β-mercaptoethanol	5.0 ml
1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	6.25 ml
Bromophenol blue	1.25 mg
加水至總體積為 50 ml，保存於室溫	50.0 ml

5X Gel running buffer

Tris base	15.0 g
Glycine	72.0 g
SDS	5.0 g
加水至總體積為 1000 ml，室溫保存，使用時稀釋至 1X	1000 ml

2. 轉印 (Transfer)

本實驗利用 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) 將蛋白質由 SDS-PAGE 膠片轉印至 PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) 上固定。轉印方法參考 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell 及 PVDF membrane 所提供之使用說明書。

1. 裁減與 SDS-PAGE 膠片大小相似之 PVDF membrane，先於 100% methanol 中潤濕，再於滅菌過二次水浸潤 2 分鐘，接著放入 transfer buffer 中平衡約 10 分鐘。
2. 裁減與 SDS-PAGE 膠片大小相似之 3 mm 濾紙六張，與二片海綿一同浸泡於 transfer buffer 中平衡約 10 分鐘。
3. 取出轉印用夾板，先將一片海綿置於黑色夾板上，再放上三張濾紙；接著將剛跑完電泳之膠片小心取下，於 transfer buffer 中潤濕後，放置於濾紙上並以玻棒小心趕出氣泡。
4. 將 PVDF membrane 完全覆蓋於膠片上，趕出氣泡後，再依次放上三張濾紙及另一片海綿；最後，闔上夾板卡緊，將夾板放入轉印槽中。以上步驟均戴手套操作。
5. 以 400 mA 之電流轉漬約 1.5 小時，轉漬時蛋白質由負極向正極的 PVDF membrane 移動。每 20 分鐘更換融化之冰塊，避免轉漬溫度過高而產生氣泡。

Transfer buffer

Tris base	3.03 g
Glycine	14.4 g
Methanol	200.0 ml
10% SDS	5.0 ml
<hr/>	
加水至總體積為 1000 ml，保存於室溫	1000 ml

3. 免疫雜交 (Hybridization)

本實驗採用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 操作手冊所提供方法進行免疫雜交。

1. 將轉印後的轉漬膜 PVDF membrane 以 PBS 浸潤後，置入 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時。
2. 將轉漬膜於室溫下以 PBST 搖洗三次，第一次 15 分鐘，第二、三次 5 分鐘。
3. 將轉漬膜置於含一次抗體的 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時，或置於 4°C 反應隔夜，進行雜交。
4. 將轉漬膜於室溫下以 PBST 搖洗三次，第一次 15 分鐘，第二、三次 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。
5. 將轉漬膜置於含二次抗體的 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時，或置於 4°C 反應隔夜，使二次抗體與一次抗體產生雜交反應。
6. 將轉漬膜於室溫下以 PBST 搖洗三次，第一次 15 分鐘，第二、三次 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。

PBS

Na ₂ HPO ₄	11.45 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	2.96 g
NaCl	5.84 g
加水至總體積為 1000 ml，保存於室溫	1000 ml

PBST (PBS-Tween)

於 PBS 中加入 0.1% 的 Tween-20，保存於室溫。

Blocking reagent

PBST	100 ml
Skim milk	7.0 g

使用前配製，需充分溶解。

一次抗體	(適用於本實驗)
Monoclonal mouse anti-HA IgG	1 : 3000 稀釋
Monoclonal mouse anti-FLAG	1 : 4000 稀釋
Polyclonal rabbit anti-LexA IgG	1 : 5000 稀釋
二次抗體	(適用於本實驗)
Goat anti-mouse IgG-HRP	1 : 6000 稀釋
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1 : 6000 稀釋

4. 免疫呈色反應 (Detection)

本實驗使用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 套組進行雜交訊號的偵測。訊號產生的原理，是利用標示於二次抗體上的 peroxidase 與套組中的 detection solution 反應而發出螢光，然後再以 autoradiography film (Classic Blue, MIDSCI) 於暗室中顯影，以偵測雜交訊號。

Immobilon™ Western (Millipore) 套組中含有 Solution I: HRP Substrate Peroxide Solution 及 Solution II : HRP Substrate Luminol Reagent。

1. 取相同體積之 Solution I 及 Solution II 分別置於試管中 (每片轉漬膜各需約 0.5 ml 的 Solution I 及 Solution II)，將 Solution I 及 Solution II 混合成 detection reagent，靜置反應五分鐘。
2. 取透明投影片置於壓片盒內，將轉漬膜上的 PBST 滴乾，平鋪於投影片上；接著將 detection reagent 均勻滴灑於轉漬膜上，再覆蓋另一張投影片，保持投影片表面乾燥。
3. 以下步驟於暗房中操作。將 autoradiography film 置於轉漬膜上壓片。(壓片時間視訊號強弱決定，10 秒至 30 分鐘均可)。
4. 將壓片後的底片 (autoradiography film)，放入顯影劑中顯影，顯影時間視訊號強弱而定，約 30 秒至 5 分鐘。
5. 以清水潤洗除去底片上的顯影劑，將水滴乾；再將底片放入定影劑中定影，以清水潤洗除去底片上的定影劑，最後將底片晾乾保存。

5. Stripping

如欲以同一張轉漬膜再次進行免疫雜交反應，可使用 Stripping buffer 洗去轉漬膜上抗體，以進行第二次的免疫雜交。以 Stripping buffer 處理過的轉漬膜可能會導致蛋白質訊號稍微減弱。

1. 偵測過訊號之轉漬膜，以蒸餾水潤洗 5 分鐘。
2. 將轉漬膜置於 stripping buffer 中，於室溫下搖洗反應 30 分鐘。
3. 將轉漬膜於室溫下以蒸餾水搖洗三次，每次 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。
4. 轉漬膜以 PBS 潤洗後，即可進行第二次的免疫雜交。

Stripping buffer

Glycine	3.0 g
Tween-20	0.1 ml
以 HCl 調整 pH 至 2.5，加水至總體積為 200 ml	200 ml



參、實驗結果

一、確認 SulA 蛋白被 ClpY 辨識之區域

(一) 建構 SulA 蛋白 C-端不同大小片段缺失之突變

由前人的研究顯示，Lon 蛋白酶是藉由辨認 SulA 蛋白的 C-末端 8 個胺基酸，而與之結合進行降解反應 (Ishii *et al.*, 2000)，因此我們從 SulA 蛋白之 C-端著手，並參考於綠膿桿菌中解出的 SulA 蛋白結晶結構，與大腸桿菌之 SulA 胺基酸序列相比對 (Cordell *et al.*, 2003)，可看到大腸桿菌 SulA 蛋白缺乏其末端 20 個胺基酸之結構，而 SulA C-端第 20 - 30 個胺基酸的部份為一 β -strand 結構，C-端第 30 - 45 個胺基酸的部份為一 α -helix 結構 (附圖三)。於是建構 SulA C-端不同大小片段缺失之突變蛋白，分別有 SulA Δ C10、SulA Δ C20、SulA Δ C30、SulA Δ C45、SulA Δ C20-30、SulA Δ C30-45 及 SulA Δ C20-45，其中 SulA Δ C20-30 為僅去除其 β -strand 之結構，SulA Δ C30-45 是僅去除其 α -helix 之結構，而 SulA Δ C20-45 則是將此二者結構均去除 (圖一 A)。藉由建構的缺失突變蛋白，利用酵母菌雙雜交系統，進行與 ClpY 交互作用之測試，探討 SulA 基質與 ClpY 之間，SulA 是如何被辨識及其當中可能負責結合的位置。

(二) 以酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 突變蛋白與 ClpY 之交互作用

利用酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 突變蛋白與 ClpY 之間交互作用情形，將建構好之 *sulA* 突變基因轉殖到質體 pB42AD (activation domain vector) 上，將 *clpY* 基因轉殖到質體 pGilda (binding domain vector) 上，並轉形至酵母菌 EGY48 [p8op-*lacZ*] 中進行試驗分析。

實驗中，先測試 pB42AD-*sulA* 與 pGilda-*clpY* 之交互作用，以及 pGilda-*sulA* 與 pB42AD-*clpY* 的交互作用情形，結果以 pB42AD-*sulA* 與 pGilda-*clpY* 之方式進行

測試，正負控制組的表現結果符合預期，即單獨的 AD 或 BD 與 SulA 或 ClpY 間無交互作用，而 SulA 與 ClpY 間確實有交互作用的情形，因此，後續實驗均以此方式進行，即 *sulA* 基因轉殖到質體 pB42AD，*clpY* 基因轉殖到質體 pGilda。而 ClpY*M187I 為 ClpY 的第 187 個胺基酸位置具有單點突變，以 Ile 取代 Met，經前人研究指出其和 SulA 間有很強的結合作用（施如珊，2004），因此，實驗中亦將 ClpY*M187I 與 SulA 的突變蛋白一起進行交互作用測試。

於酵母菌雙雜交系統中誘導融合蛋白表現後，在 β -galactosidase 活性測試中可看到，相較於負控制組完全沒有活性表現，野生型的 SulA 與 ClpY 確實有交互作用的情形，在 X-gal 培養基上呈現藍色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中可正常生長（表四、圖二）。同時，在分別去除 C-端 10 個或 20 個胺基酸的 SulA Δ C10 或 SulA Δ C20 缺失突變蛋白，與 ClpY 蛋白共同存在之酵母菌株，亦有明顯的活性表現，於 β -galactosidase 活性測試中，在具有 SulA Δ C10 之酵母菌株活性增加近一倍，SulA Δ C20 的酵母菌株活性更提高至六倍；在 X-gal 培養基上兩者均呈現藍色菌落，且 SulA Δ C20 的顏色又較野生型 SulA 為深暗；在缺乏 leucine 的培養基中，兩者均可正常生長，而 SulA Δ C20 之生長是較為快速；而在西方墨點法的偵測中，此兩種 SulA 突變蛋白的表現量與野生型的 SulA 是相一致的（表四、圖二）。

在 SulA C-端片段二級結構 β -strand 和 α -helix 缺失的部份，SulA Δ C30、SulA Δ C45、SulA Δ C20-30、SulA Δ C30-45 及 SulA Δ C20-45，與 ClpY 間皆不具交互作用，與負控制組的結果相一致，在 β -galactosidase 活性測試中完全沒有活性表現，在 X-gal 培養基上均呈現白色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中則無法正常生長；而在西方墨點法的偵測中，各種 SulA 突變蛋白的表現量與野生型的 SulA 是相一致的（表四、圖三）。因此，此二級結構的區域，對於 ClpY 辨識基質 SulA 是必需的，且對於基質的被辨識，並不需要 SulA C-端末 20 個胺基酸，但此序列會影響 SulA 基質與 ClpY 結合之效能。

二、SulA 蛋白被辨識區域之特性

(一) SulA 蛋白 C-端序列特性分析

由先前的實驗結果可知，當 SulA 蛋白去除 C-末端 20 個胺基酸後，SulA Δ C20 與 ClpY 之間的結合力大幅增加，但去除上述二級結構後，不論末端 20 個胺基酸是否存在，其與 ClpY 的結合力均無法恢復；因此，想探究是何種因素造成 SulA Δ C20 與 ClpY 的結合力提高將近六倍之多。而之前，亦有研究指出，這類蛋白質控制系統中的蛋白酶，可藉由與疏水性序列的結合來辨識折疊錯誤的蛋白質，因為這些疏水性序列在蛋白質折疊的過程中通常會被包埋於結構中 (Gur & Sauer, 2008)。而分析 SulA 蛋白 C-端的胺基酸序列，可觀察到其 C-末端 20 個胺基酸中，僅有 7 個是疏水性的胺基酸，比例為 35%，但在 C-端第 21 到 40 個胺基酸中，就包含了 13 個疏水性的胺基酸，比例為 65% (圖四 A)，顯示此區域具有較高疏水性。

接著參考 Gur 等人於 2008 年論文中所使用的預測軟體，計算胺基酸序列被包埋於正常蛋白質中的機率，於網站 [<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>] 上選擇 “average area buried”，並使用 11-residue window 進行分析。結果顯示 SulA 之 C-端第 20 - 30 個胺基酸序列相較於周圍有較高的 Surface-burial score，這個值愈高表示其愈有可能被包埋於結構之中，具有較高之疏水性質 (圖四 B)。因此，推測 SulA Δ C20 可能是因為暴露出 C-端第 20 - 30 個胺基酸，這段高疏水性質的區域，使得 ClpY 對 SulA 蛋白的結合力大幅增加，也暗示著 ClpY 可能是藉由疏水性的結合來辨識其基質。

(二) 於 SulA 蛋白被辨識區域中建構不同胺基酸性質之點突變

經過前面的分析，將範圍鎖定在 SulA 蛋白之 C-端第 20 - 30 個胺基酸序列片段，再參考不同腸道菌中 SulA 序列的保守性 (Freudl *et al.*, 1987) (圖五)，在 SulA 蛋白 169 個胺基酸中，其 C-端附近第 142 個到第 147 個胺基酸均完全相同，為

GFIMRP；因此從中挑選出胺基酸來做單一位置的點突變，而改變的原則是在胺基酸側基影響最小的情況下，將疏水性的胺基酸改為親水性的胺基酸，親水性的胺基酸變為疏水性的胺基酸，依此建構五種 SulA 突變蛋白，分別為 F143Y、F143A、I144N、M145I、R146L，再將這些突變蛋白與 ClpY 進行交互作用測試。此外，在 SulA 蛋白之 C-端第 20 - 30 個胺基酸序列片段的兩側，另建構 R156L 以及 N136LN139L 兩種 SulA 突變蛋白，一起進行試驗 (圖一 B)。

(三) 利用酵母菌雙雜交系統測試 SulA 點突變蛋白與 ClpY 之交互作用

在酵母菌雙雜交系統中，同樣地將 SulA 之各個點突變蛋白與 AD domain 融合，ClpY 蛋白與 BD domain 融合，分析不同性質胺基酸的差異，對於 ClpY 辨識基質 SulA 的影響。

經誘導融合蛋白表現後，實驗結果可看到，若將胺基酸由原本的疏水性改為親水性的胺基酸，例如 F143Y 和 I144N，其在 β -galactosidase 活性測試中，反應活性明顯降低，與負控制組相近，而在 X-gal 培養基上均呈現白色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中則無法正常生長 (表四、圖六)。反之，若將胺基酸由原本的親水性改為疏水性的胺基酸，或是疏水性較強的胺基酸，例如 F143A、M145I、R146L、R156L，在 β -galactosidase 活性測試中，F143A 和 R146L 的活性表現與野生型 SulA 的結果相近，而 M145I 和 R156L 的活性表現則大幅提高三至四倍；在 X-gal 培養基上四者均呈現藍色菌落，其中 SulA*M145I 的顏色為深藍色，較野生型 SulA 為深暗；在缺乏 leucine 的培養基中四者亦均可正常生長，其中 SulA*M145I 的生長是較為快速的 (表四、圖六)。而在西方墨點法的偵測中，上述各種 SulA 突變蛋白的表現量與野生型的 SulA 均是相一致的。顯示這個區域內胺基酸的親水、疏水性質，確實會影響 ClpY 與其基質 SulA 之間的交互作用，當胺基酸取代為疏水性時，會提高 ClpY 對於 SulA 蛋白的結合力，這也印證前述 ClpY 可能是藉由疏水性的結合來辨識其基質。

然而，同樣是將胺基酸由原本的親水性取代為疏水性的 Sula**N136L,N139L* 突變蛋白，其與 ClpY 之間卻沒有交互作用的情形，與負控制組的結果相一致，在 β -galactosidase 活性測試中完全沒有活性表現，在 X-gal 培養基上呈現白色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中無法正常生長(表四、圖六)。但在西方墨點法的偵測中，此 Sula 突變蛋白的表現量與野生型的 Sula 是相一致的，顯示 Sula**N136L,N139L* 突變蛋白可正常表現且與 ClpY 無交互作用。此點突變的位置於 Sula 蛋白 C-端第 20 - 30 個胺基酸序列片段之外側，可能此處的胺基酸對於 ClpY 的辨識結合有更重要的影響。

三、不同蛋白酶對於 Sula 蛋白辨識區域之差異

(一) Lon 蛋白酶與 Sula 缺失突變蛋白間之交互作用

目前已知 Sula 蛋白為 Lon 及 ClpYQ 蛋白酶之基質，其中又以 Lon 為主要負責的蛋白酶，可快速地降解 Sula 蛋白，而 ClpYQ 蛋白酶似乎扮演著輔助的角色；之前有研究指出 Lon 蛋白酶是辨認 Sula 之 C-端末 8 個胺基酸，來進行結合及後續降解作用 (Ishii *et al.*, 2000)。因此我們想藉由所建構的 C-端不同大小片段缺失之 Sula 突變蛋白，與 Lon 蛋白酶進行交互作用試驗，分析 Lon 與 ClpYQ 兩種蛋白酶對於相同基質 Sula 蛋白的辨識差異。

利用酵母菌雙雜交系統，將 *lon* 基因轉殖到質體 pB42AD 上，*sula* 各突變基因轉殖到質體 pGilda 上，再轉形至酵母菌 EGY48 [p8op-*lacZ*] 中。經誘導融合蛋白表現後，在 β -galactosidase 活性測試中可看到，相較於負控制組沒有活性表現，野生型的 Sula 與 Lon 蛋白酶之間確實有交互作用的情形，在 X-gal 培養基上呈現藍色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中可正常生長 (圖七)。然而，在 Sula 之 C-端片段缺失的各個突變蛋白中，僅 Sula Δ C20-30 和 Sula Δ C20-45 與 Lon 蛋白酶有較強的交互作用，在 β -galactosidase 活性測試中，活性值與野生型的 Sula 相近或高出

0.5 倍；在 X-gal 培養基上均呈現深藍色菌落，相較於野生型的 SulA 明顯深暗得多；在缺乏 leucine 的培養基中生長也較野生型的 SulA 來得快速（圖七）。

而其他的 SulA 突變蛋白，如：SulA Δ C10、SulA Δ C20、SulA Δ C30 及 SulA Δ C45，與 Lon 蛋白酶間的交互作用則降低許多，在 β -galactosidase 活性測試中，其活性值與負控制組相近，在 X-gal 培養基上呈現淡淡的藍色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中則是生長緩慢甚至是不易生長（圖七）。此結果與先前 ClpY 和各種 SulA 突變蛋白的交互作用情形差異甚大，ClpY 是對於 SulA Δ C20 有最強的結合能力，而 Lon 則是對於具有末 20 個胺基酸的突變蛋白 SulA Δ C20-30 和 SulA Δ C20-45 有較好的結合能力，顯示兩種不同的蛋白酶是分別辨識基質 SulA 的不同區域。

(二) ClpY I domain 上兩個 loop 對於 SulA 蛋白辨識之影響

由前人研究指出，ClpY 之 I domain 上兩個 loop 可分別與其基質 SulA 結合，可能具有負責辨識基質的功能，其中又以 loop2 的角色較為重要，因 loop2 缺失的 ClpY 便無法降解基質 (Lien *et al.*, 2009)。因此，接著將探討 ClpY 的兩個 loop，對於 SulA 蛋白辨識之影響，分別以 loop1 缺失 (ClpY Δ L1) 或 loop2 缺失 (ClpY Δ L2) 的 ClpY 突變蛋白，與 C-端不同大小片段缺失之 SulA 突變蛋白進行交互作用測試。

在酵母菌雙雜交系統中，同樣地將 ClpY 突變蛋白與 BD domain 融合，SulA 突變蛋白與 AD domain 融合，經誘導融合蛋白表現後測試結果，可看到 ClpY Δ L1& Δ L2 無法與任何一種 SulA 突變蛋白有交互作用，在缺乏 leucine 的培養基上均無法生長（圖八）。ClpY Δ L2 的情形和野生型 ClpY 的結果相近，其與 SulA、SulA Δ C20 及 SulA Δ C30 之間仍有交互作用的情形，在缺乏 leucine 的培養基上均可生長，其中 ClpY Δ L2 與帶有 SulA Δ C20 的酵母菌株，生長又較野生型 ClpY 來得快；而 ClpY Δ L2 與 SulA Δ C45、SulA Δ C20-30 及 SulA Δ C20-45 之間的交互作用則非常地微弱，在缺乏 leucine 的培養基上幾乎無法生長（圖八）。

然而 ClpY Δ L1 與各種 SulA 突變蛋白之間均有交互作用的情形，在缺乏 leucine 的培養基上均可生長，其中以野生型 SulA 和 SulA Δ C20 的酵母菌株生長速度較快，其次為 SulA Δ C30、SulA Δ C45、SulA Δ C20-30，生長較慢的為 SulA Δ C20-45 的酵母菌株 (圖八)。相較於野生型的 ClpY 蛋白，當 ClpY 去除 loop1 只保留 loop2 時，對於各種 SulA 突變蛋白的結合力似乎有加強或恢復的情形，此結果顯示 ClpY 的 loop2 對於基質的辨識與結合，是具有較重要之角色與功能。

四、SulA 突變蛋白之活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之現象

至此可初步推論，ClpY 是藉由辨認 SulA 蛋白 C-端疏水性區域來與之結合。而由於先前有研究指出，SulA 的 C-末端 20 個胺基酸為 Lon 蛋白酶辨識所必需，但卻不足以使 Lon 蛋白酶將其降解 (Higashitani *et al.*, 1997)；因此，接著我們想要再進一步探討，SulA 蛋白的 C-端序列片段，對於 ClpYQ 蛋白酶的降解作用是否會造成影響。這裡利用選殖基因表現系統的大腸桿菌 AC3112 菌株來進行試驗，先將各個 *sulA* 突變基因轉殖至質體 pTH18kr 上，與帶有 *clpY*、*clpQ* 基因的質體 pBAD24-*clpY* 及 pBAD33-*clpQ*，分別轉形至大腸桿菌 AC3112 菌株中；當只誘導質體 pTH18kr 表現 SulA 蛋白時，可測試 SulA 蛋白之活性表現；而同時誘導質體 pBAD24 及 pBAD33 表現 ClpYQ 蛋白酶，則可測試 ClpYQ 蛋白酶對於基質 SulA 的降解作用。

然而，為避免 AC3112 菌株之染色體上 *sulA* 基因的影響，另建構一株染色體上 *sulA*⁻ 的菌株 YT10010，並以 MMS 抗性分析，其在 MMS 誘導的情況下仍可正常生長，確認其染色體上不具有 *sulA* 基因 (圖九)。本實驗便以 AC3112 菌株及 YT10010 菌株一起進行試驗，分析各種 SulA 突變蛋白是否還具有活性，以及其能否被 ClpYQ 蛋白酶所降解，同時以西方墨點法偵測 SulA 蛋白累積的情形。

實驗中，先測試含有不同濃度 1、2、5、10 mM IPTG 的培養基，在 SulA 蛋

白活性試驗的部份，不論在何種濃度的培養基上其結果均一致，具有活性的 SulA 蛋白會導致菌體無法生長，而不具活性的 SulA 蛋白則可正常生長至 10^{-6} 稀釋度。在 ClpYQ 蛋白酶降解作用測試的部份，當 ClpYQ 蛋白酶被誘導表現，可恢復菌體的生長，然而隨著培養基中 IPTG 濃度的提高，恢復的程度也會隨之下降，大約相差一個稀釋度（約十倍）左右，但整體而言表現情形的差異度不大，因此後續實驗均以含 1 mM IPTG 的培養基進行試驗。

在以西方墨點法偵測 SulA 蛋白累積情形的實驗中，先分別測試不同的 IPTG 誘導濃度（1、2、3、5 mM）以及不同的誘導時間（2、3、5 小時）下，野生型 SulA 蛋白被 ClpYQ 蛋白酶所降解之情形。當只誘導 SulA 蛋白表現時，在 1 mM IPTG 誘導 2 小時的條件下，即可看見明顯的 SulA 蛋白表現量，而隨著 IPTG 濃度的提高或是誘導時間的延長，SulA 蛋白表現量會隨之增加；當 ClpYQ 蛋白酶被誘導表現後，在 1 mM IPTG 誘導 2 小時的條件下，可看到 SulA 蛋白被完全降解，但隨著 SulA 蛋白表現量的增加，可能會有些許的 SulA 殘留出現。本實驗中為以野生型 SulA 作為對照組，比較其他 SulA 突變蛋白之降解情形，故以 1 mM IPTG 誘導 2 小時的條件，進行後續的實驗。

(一) C-末端 20 個胺基酸缺失之 SulA 突變蛋白

1. SulA 突變蛋白之活性表現

首先在 SulA Δ C10 和 SulA Δ C20 突變蛋白的部份，當只誘導 SulA 蛋白表現時，活性測試的結果可看到，在 *sulA⁻* 的菌株 YT10010 中，SulA Δ C10 的突變蛋白與野生型的 SulA 蛋白相似，菌體均無法生長，而 SulA Δ C20 則與控制組相似，可正常生長至 10^{-6} 稀釋度（表五、圖十 A）；顯示 SulA Δ C10 的突變蛋白仍具有正常活性，會導致細胞死亡，而 SulA Δ C20 的突變蛋白則不具活性，無法導致細胞死亡。然而，在 AC3112 菌株中，SulA Δ C10 和 SulA Δ C20 的突變蛋白均與野生型的 SulA 蛋白相似，會導致菌體無法生長。同樣的 SulA Δ C20 突變蛋白在不同菌株中卻呈

現不同的結果，相較之下，此二菌株的差異僅在於染色體上 *sulA* 基因的有無，這可能意味著染色體上 SulA 蛋白受誘導表現，因而導致菌體無法生長。

2. 受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形

當同時誘導 ClpYQ 蛋白酶表現時，於含 IPTG 的培養基上可看到，不論是野生型 SulA 或是 SulA Δ C10、SulA Δ C20 的突變蛋白，其菌體均可恢復生長，其中以 SulA Δ C20 的突變蛋白恢復程度最佳，可生長至 10^{-6} 稀釋度，SulA Δ C10 的突變蛋白恢復程度次之，可生長至 10^{-5} - 10^{-6} 稀釋度左右，而野生型的 SulA 則可恢復生長至 10^{-4} - 10^{-5} 稀釋度；且在不同的菌株 AC3112 及 YT10010 中結果是相一致的（圖十 A）。顯示當 ClpYQ 蛋白酶表現後，SulA Δ C10 與 SulA Δ C20 突變蛋白均可被分解，SulA 蛋白 C-末端 20 個胺基酸的有無，並不會影響 ClpYQ 蛋白酶的降解作用。

3. SulA 蛋白之累積表現量

經由前面 IPTG 的誘導試驗後，再進一步利用西方墨點法，以專一性抗體偵測 SulA 蛋白的表現量，希望能更直接的觀察 SulA 蛋白被 ClpYQ 蛋白酶所降解之現象。當只誘導 SulA 蛋白表現時，可清楚看到野生型 SulA 蛋白及 SulA Δ C10、SulA Δ C20 突變蛋白的表現量，而當 ClpYQ 蛋白酶被誘導表現後，三種 SulA 蛋白的累積量均有明顯的下降（表五、圖十 B），顯示 ClpYQ 蛋白酶確實可分解 SulA Δ C10 與 SulA Δ C20 的突變蛋白。

為進一步探討，染色體上 SulA 蛋白是否會受到質體之 SulA 表現的影響而被誘發表現，另建構一株於染色體 *sulA* 基因後方接上 3xFLAG tag 之菌株 YT10009，以利於西方墨點法偵測染色體上 SulA 蛋白表現情形。由試驗結果可看到，相較於控制組完全沒有 SulA 蛋白的表現，在野生型 SulA 及 SulA Δ C20 的部份均有明顯的 SulA 蛋白表現量，在 SulA Δ C10 的部份則是有些微的表現情形；而當 ClpYQ 蛋白酶被誘導表現後，SulA 蛋白的累積量會明顯下降（圖十 B）。顯示染色體上 SulA 蛋白確實會被誘發表現，且同時也會被 ClpYQ 蛋白酶所分解，此結果亦支持先前

SulA 蛋白活性測試中，所觀察到染色體上 SulA 蛋白受誘發表現之情形。

(二) C-端二級結構部份缺失之 SulA 突變蛋白

1. SulA 突變蛋白之活性表現

在 SulA 蛋白 C-端二級結構部份缺失的突變蛋白，包含 SulA Δ C30、SulA Δ C45、SulA Δ C20-30、SulA Δ C30-45、SulA Δ C20-45，同樣在兩種菌株中誘導 SulA 蛋白表現進行活性測試，從結果可看到相較於野生型的 SulA，此五種 SulA 突變蛋白均呈現沒有活性的情形，無法導致細胞死亡，且不論是在 AC3112 菌株或是在 *sulA*⁻ 的菌株 YT10010 中，其菌體均可正常生長至 10^{-6} 稀釋度 (表五、圖十一 A)。顯示 SulA 蛋白 C 末端的二級結構部份，可能會影響其抑制細胞分裂之活性表現，而 C 末端最後 20 個胺基酸的有無，對於活性的恢復則沒有影響；且這結果不論在何種菌株中 (AC3112 或 YT10010) 都相一致，意味著這些 SulA 突變蛋白的表現，可能不會誘發染色體上 SulA 蛋白的表現。

2. 受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形

接著，在 ClpYQ 蛋白酶降解試驗的部份，在不同菌株 AC3112 及 YT10010 中結果是相一致的，當同時誘導 ClpYQ 蛋白酶表現時，於含 IPTG 的培養基上可看到，不論是野生型 SulA 或是上述各種 SulA 突變蛋白，其菌體均可恢復生長，其中野生型的 SulA 可恢復生長至 10^{-4} - 10^{-5} 稀釋度，而各種 SulA 突變蛋白因不具有活性，本就可生長至 10^{-6} 稀釋度，故在此處無法判斷 ClpYQ 蛋白酶對於 SulA 蛋白降解之情形 (圖十一 A)。

3. SulA 蛋白之累積表現量

在此利用西方墨點法的偵測，可直接地看到 SulA 蛋白的累積情形。當只誘導 SulA 蛋白表現時，可看到野生型的 SulA 蛋白及 SulA Δ C45、SulA Δ C30-45 和 SulA Δ C20-45 的突變蛋白均有明顯的累積表現，而 SulA Δ C30 和 SulA Δ C20-30 的突變

蛋白則似乎不易偵測到累積的情形。當 ClpYQ 蛋白酶被誘導表現後，除 SulA Δ C20-45 的突變蛋白完全沒有減少的跡象，其他的 SulA 蛋白均有累積量下降的情形，其中野生型 SulA 蛋白與 SulA Δ C30-45 的突變蛋白幾乎可被完全降解，而 SulA Δ C30、SulA Δ C45 及 SulA Δ C20-30 的突變蛋白則仍有些許的殘留（表五、圖十一 B）。此結果顯示只有 SulA Δ C20-45 的突變蛋白，無法被 ClpYQ 蛋白酶所分解，而其他的突變蛋白對於降解作用的影響，相對來說可能較小。

而在染色體上 SulA 蛋白表現量的部份，以西方墨點法偵測的結果，此五種突變蛋白 SulA Δ C30、SulA Δ C45、SulA Δ C20-30、SulA Δ C30-45 及 SulA Δ C20-45 均與控制組相似，沒有測到染色體之 SulA 蛋白的累積情形（圖十一 B）。此結果與先前在 AC3112 菌株中，SulA 突變蛋白活性表現的情形相一致。

(三) SulA 不同性質胺基酸之點突變蛋白

1. SulA 突變蛋白之活性表現

在 SulA 不同性質胺基酸之點突變蛋白的部份，當只誘導 SulA 蛋白表現時，活性測試的結果可看到，在 *sulA*⁻ 的菌株 YT10010 中，SulA*M145I 及 SulA*R156L 的突變蛋白與野生型 SulA 蛋白相似，菌體無法生長，表示其仍具有活性；其他四個突變蛋白 SulA*F143Y、SulA*F143A、SulA*I144N 及 SulA*R146L 則與控制組相似，菌體可正常生長至 10⁻⁶ 稀釋度，表示其不具有活性，無法導致細胞死亡。而最後一個 SulA*N136L,N139L 的突變蛋白，其雖然可生長至 10⁻⁵ 稀釋度，但程度上相較於控制組來看，可能具有微弱活性的現象（表五、圖十二 A）。

然而，在 AC3112 菌株中，除了 SulA*M145I 及 SulA*R156L 的突變蛋白具有活性，菌體無法生長之外，其他 SulA*I144N、SulA*R146L 及 SulA*N136L,N139L 的突變蛋白也與野生型 SulA 蛋白相似，會導致菌體無法生長；只有 SulA*F143Y 及 SulA*F143A 的突變蛋白與控制組相似，菌體可正常生長至 10⁻⁶ 稀釋度（表五、

圖十二 A)。此結果與先前 *SulA* Δ C20 突變蛋白的情形相似，可能是因為染色體上 *SulA* 蛋白的誘發表現造成菌體無法生長。

2. 受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形

在 ClpYQ 蛋白酶降解試驗的部份，當同時誘導 ClpYQ 蛋白酶表現時，於含 IPTG 的培養基上可看到，在 *sulA*⁻ 的菌株 YT10010 中，菌體恢復生長的情形較 AC3112 菌株稍微好些，約相差一個稀釋度左右（圖十二 A）。其中原本不具活性的 *SulA* 蛋白，如 *SulA**F143A、*SulA**I144N、*SulA**R146L 及 *SulA**N136L,N139L 等，均可恢復生長至 10^{-5} - 10^{-6} 稀釋度；原本具活性的 *SulA* 蛋白，如 *SulA**M145I 及 *SulA**R156L 突變蛋白，只恢復生長至 10^{-3} - 10^{-4} 稀釋度左右。然而 *SulA**F143Y 的突變蛋白原本不具有活性，原先在 AC3112 或 YT10010 菌株中，均可生長至 10^{-6} 稀釋度，但在誘導 ClpYQ 蛋白酶表現後，其只能生長至 10^{-3} - 10^{-4} 稀釋度。

3. *SulA* 蛋白之累積表現量

以西方墨點法偵測 *SulA* 蛋白累積表現量的部份，當只誘導 *SulA* 蛋白表現時，不論是何種 *SulA* 突變蛋白均有明顯的累積表現，可看到清楚的訊號；而當 ClpYQ 蛋白酶被誘導表現後，除 *SulA**F143A 突變蛋白仍有累積的情形，但訊號有稍微減弱的現象，其他的 *SulA* 突變蛋白累積量均顯著的下降（表五、圖十二 B）。顯示 ClpYQ 蛋白酶均可分解這些點突變的 *SulA* 蛋白，只有 *SulA**F143A 的突變蛋白，其第 143 個胺基酸由 Phe 改為 Ala 時，可能會影響 ClpYQ 蛋白酶的降解作用。

而在染色體上 *SulA* 蛋白表現量的部份，以西方墨點法偵測的結果，僅 *SulA**I144N 與野生型 *SulA* 相似，可偵測到染色體上 *SulA* 蛋白的表現，其他的突變蛋白如 *SulA**F143Y、*SulA**F143A、*SulA**M145I、*SulA**R146L、*SulA**R156L 及 *SulA**N136L,N139L 均與控制組相似，沒有測到染色體之 *SulA* 蛋白的累積情形（圖十二 B）。

肆、討論

一、SulA 蛋白被 ClpY 辨識之區域及其特性

由本實驗結果可得到，ClpY 可藉由 SulA 蛋白 C-端的片段序列，辨識其基質 SulA；因 SulA 去除 C 末端 20 個胺基酸後，與 ClpY 交互作用之親和力會大幅地增加，且在 SulA Δ C20-30 和 SulA Δ C20-45 的突變蛋白中將末 20 個胺基酸接上，其與 ClpY 之間仍是沒有交互作用的，顯示 SulA 蛋白 C-端最後 20 個胺基酸，對於 ClpY 與基質之結合是不具作用的。

於 2003 年時 Lee 等人的研究中也指出，SulA 蛋白第 125 - 148 個胺基酸之間，可能是與 ClpY 結合所必需的 (Lee *et al.*, 2003)，其所指出的範圍與我們的實驗結果是相一致的；突變蛋白 SulA Δ C20 可能即是因為暴露出這段可被辨識的區域，而使得與 ClpY 交互作用之親合力大幅增加。之前，亦有研究提出，在分析 ClpYQ 蛋白酶降解 SulA 產生的降解產物中，發現在 SulA 第 117 - 150 個胺基酸的區域，產生的降解片段相較於其他區域，片段的大小較大且數量較少，因而認為此區域可能與 ClpY 的結合相關 (Nishii & Takahashi, 2003)。

經過進一步分析，將範圍鎖定在 C-端第 20 - 30 個胺基酸的片段，此區域有較高的疏水性，而之前也有研究指出，這類蛋白酶可能會藉由與疏水性片段的結合來辨識其基質，例如：FtsH 可降解 C-端帶有非極性胺基酸序列的蛋白質 (Herman *et al.*, 1998)。本實驗結果顯示，若將此片段中的胺基酸取代為親水性的，則 SulA 突變蛋白與 ClpY 之交互作用會降低，如 F143Y 和 I144N；反之，則會增加交互作用，如 F143A、M145I、R146L、R156L，其中 M145I 是將胺基酸改為疏水性質較高的 Isoleucine，會提高與 ClpY 的交互作用約四倍；因此，推測 ClpY 可能是藉由疏水性的結合以辨識基質 SulA。

對於大部份的蛋白酶來說，為辨識構形折疊錯誤的蛋白質，與基質間疏水性的結合是很重要的，因為在正常情況下，蛋白質的疏水性區域通常是包埋於結構之中，只有構形錯誤或不正常的蛋白質，才可能會暴露出疏水性之區域。而 SulA 蛋白 C-端的高疏水性片段，在結構中是位於二聚體的中央，在正常情況下，ClpYQ 蛋白酶應無法辨認到此區域，只有當 SulA 蛋白不正常或不為二聚體形式時，暴露出此高疏水性區域，才能夠被 ClpYQ 蛋白酶辨識到。SulA Δ C20 的突變蛋白則因最末端 20 個胺基酸的缺少，更直接暴露出此區域而大幅提高與 ClpY 的親合力。

點突變蛋白中，SulA*N136L,N139L 的突變點是位於二級結構 β -strand 和 α -helix 的交界處 (圖一 B)，不像其他的突變蛋白是位在 β -strand 的結構上，其與 ClpY 的交互作用也沒有因為疏水性的胺基酸而提高，顯示這個位置的胺基酸可能是重要的，會影響到 ClpY 辨認 SulA 蛋白之疏水性區域的交互作用。

二、不同蛋白酶對於辨認相同基質之差異

先前的研究指出，ClpY 可藉由 I domain 上的兩個 loop 與基質結合，其中以 loop2 的角色較為重要，因為 loop2 缺失的 ClpY 蛋白酶便無法降解基質 (Lien *et al.*, 2009)。在本實驗結果中可看到，當兩個 loop 同時缺失之 ClpY (ClpY Δ L1& Δ L2)，無法與任何 SulA 蛋白有交互作用，顯示此兩個 loop 對於基質的結合確實是重要的；而在 loop1 或 loop2 分別缺失之 ClpY，與 SulA 突變蛋白的結合情形並不太一樣，保留 loop1 之 ClpY (ClpY Δ L2) 的結果與野生型 ClpY 呈現較類似的現象，但保留 loop2 之 ClpY (ClpY Δ L1)，其與各種 SulA 突變蛋白之交互作用，相較於野生型 ClpY 均有增加的跡象，其中與 SulA Δ C45、SulA Δ C20-30 及 SulA Δ C20-45 的突變蛋白，是呈現較弱之作用力。

從結構上來看，ClpY 之 loop1 是伸出結構位於較外側的位置，loop2 則是在內側接近中央孔洞的附近，可能因外側的 loop1 會遮蔽到內側 loop2 與基質的結合作

用，因此當 loop1 缺失時，ClpY 與 Sula 突變蛋白之交互作用會稍微增加。而保留 loop1 之 ClpY 與野生型 ClpY 具有較類似的結果，有可能 ClpY 之 I domain 上的 loop1 才是與基質辨識相關的；但在 Lien 等人的研究中指出，loop2 上的點突變 I186N、E193LE194L 及 L199Q，也會因胺基酸性質的改變而影響 ClpY 與 Sula 蛋白間的交互作用 (Lien *et al.*, 2009)。因此 ClpY 之 I domain 上的兩個 loop，在基質的辨認與結合過程中，可能分別有其不同的角色功能，需要再更進一步的研究探討。

由本實驗結果可看到，兩種不同蛋白酶對於相同的基質 Sula，是分別辨識不同的區域，ClpYQ 蛋白酶對於暴露出高疏水性片段的突變蛋白 (Sula Δ C20) 有較好的交互作用，而 Lon 蛋白酶則對於保有最後 20 個胺基酸的突變蛋白 (Sula Δ C20-30 及 Sula Δ C20-45) 有較好的交互作用，此結果與先前研究指出，Lon 蛋白酶可以藉由辨認 Sula 的 C-末端 8 個胺基酸，來進行結合辨識是相符合的 (Ishii *et al.*, 2000)。相較之下，Lon 蛋白酶比起 ClpYQ 蛋白酶似乎可以更容易、快速的辨認 Sula 蛋白，只要最末端暴露於外的序列即可。

亦有研究指出，在 ATP 存在的情況下，加入等量的 Sula 蛋白，Lon 蛋白酶約 15 分鐘即可分解一半量的 Sula，約二小時可完全降解，而 ClpYQ 蛋白酶則需要約五個小時才能完全降解 (Nishii *et al.*, 2002, Nishii & Takahashi, 2003)。兩種蛋白酶對於相同基質 Sula 蛋白之辨識區域及降解速度的差異或許可以解釋，為什麼在細胞中 Lon 為主要負責降解 Sula 的蛋白酶，因其可快速容易的辨識 Sula，並在最短的時間內將其降解，以避免細胞的死亡。

三、Sula 突變蛋白之活性表現與 FtsZ 的相關性

在 Sula 蛋白活性測試的實驗中可看到，僅 Sula Δ C10 的突變蛋白是具有活性的，其他 C-端片段缺失的突變蛋白均不具活性表現；然而，之前有研究指出，Sula 蛋白的 N 端第 3 - 27 個胺基酸及 C-端最後 21 個胺基酸，對於抑制生長的活性是不

需要的 (Higashitani *et al.*, 1997), 但其所使用的菌株染色體上是具有 *sulA* 基因的。本實驗結果顯示, 當質體上 SulA 蛋白表現時會誘發染色體上 *sulA* 基因的表現, 而 SulA Δ C20 的突變蛋白在 *sulA*⁻ 的菌株 YT10010 中, 仍可正常生長並不會導致菌體死亡, 顯示 SulA 蛋白 C-端第 10 - 20 個胺基酸, 對於抑制細胞生長的活性仍是必需的。

SulA 蛋白的活性表現, 是藉由與 FtsZ 的結合抑制細胞分裂, 因而導致細胞死亡。早期的研究利用 SulA 突變蛋白進行生長測試, 指出 SulA 蛋白抑制生長的活性區是位於中間第 62 - 87 個胺基酸, 及 C-端第 21 - 34 個胺基酸左右的位置 (Huang *et al.*, 1996, Higashitani *et al.*, 1997); 而最近在 SulA 結晶結構的研究中顯示, SulA 蛋白是以二聚體 (dimer) 的形式存在, 由其外側兩端 S3 與 H3 的部份, 分別與 FtsZ 結合以阻斷 FtsZ 的聚合作用 (附圖四) (Cordell *et al.*, 2003)。

綜合來看, SulA 蛋白中央第 62 - 87 個胺基酸的區域, 是在 SulA 結構上第三個 β -strands 與第三個 α -helices 的位置, 正好為 SulA 二聚體外側與 FtsZ 結合的範圍, 故此區域對於 SulA 蛋白抑制細胞分裂的活性是必需的。而 C-端第 21 - 34 個胺基酸的位置, 是在 SulA 結構上的最後一個 β -strands, 位於二聚體的中央構成一 β -sheet 平板, 因此這區域的缺失突變可能會影響其二聚體的形成, 導致 SulA 蛋白失去抑制細胞分裂之活性, 如同本實驗結果看到, C-端之二級結構部份缺失的突變蛋白 (如: SulA Δ C20-30、SulA Δ C30-45 及 SulA Δ C20-45) 即不具有活性表現; 此外, 於此區域內之單一胺基酸點突變蛋白亦會影響其活性表現。

SulA 蛋白是在細胞之 SOS 反應中被誘導大量生成, 其目的為避免受損 DNA 傳到子代細胞中, 而與 FtsZ 結合以抑制細胞分裂, 當 DNA 修復完成後即必須降解之。因此, ClpYQ 蛋白酶應可藉由 SulA 蛋白之活性表現, 來辨別其是否需要降解, 由本實驗結果顯示, SulA 蛋白 C-端第 20 - 45 個胺基酸的區域, 對於其抑制細胞分裂之活性表現是重要的, 而 ClpY 辨識基質 SulA 的疏水性區域亦於此。當 SulA

蛋白以二聚體形式與 FtsZ 結合時，便將 ClpY 辨識之區域包埋於中央，可避免蛋白酶之降解；而當 SulA 蛋白不再與 FtsZ 結合時，不呈現二聚體形式則會暴露出此片段，ClpYQ 蛋白酶也才能夠辨識其基質。

四、ClpYQ 蛋白酶對於 SulA 突變蛋白之降解情形

在 ClpYQ 蛋白酶降解試驗中，大部份的 SulA 突變蛋白均可以被分解，即使是在酵母菌雙雜交系統中，與 ClpY 交互作用能力下降的突變蛋白。原因之一，可能在於利用酵母菌雙雜交系統測試兩蛋白質間交互作用之能力，會有其限制或是低估的情況，ClpY 可能與 SulA 突變蛋白間仍有微弱的作用力；此外，也可能因為 ClpYQ 蛋白酶對於基質之辨識與後續的降解作用有更複雜的機制，如先前有研究指出，SulA 之 C-末端 20 個胺基酸為 Lon 蛋白酶辨識所必需，但卻不足以使 Lon 蛋白酶將其降解 (Higashitani *et al.*, 1997)。

在實驗結果中，SulA Δ C20-45 的突變蛋白無法被 ClpYQ 蛋白酶所降解，顯示這段區域對於 ClpYQ 蛋白酶的降解作用是必需的，然而單獨缺少一個二級結構的突變蛋白 SulA Δ C20-30 或 SulA Δ C30-45 仍然可以被降解；有可能 ClpYQ 蛋白酶也會辨識 SulA 整體的結構，SulA Δ C20-45 的突變蛋白因去除兩個二級結構，對整體構形的變化影響較大，或是因末端 20 個胺基酸的遞補，增加 SulA 蛋白整體的穩定度，使得 ClpYQ 蛋白酶不易將其降解。

SulA*F143A 的突變蛋白，將胺基酸由 Phenylalanine 取代為 Alanine，可能因苯環結構的消失，而影響 ClpYQ 蛋白酶的降解效率，使得 SulA 蛋白仍有明顯的殘留；但在 SulA*F143A 與 ClpY 交互作用的試驗中，其結果與野生型 SulA 相似，與 ClpY 之間具有交互作用，不受胺基酸改變的影響，顯示此位置的 Phenylalanine 對於 ClpY 與 SulA 蛋白的辨識結合影響不大，但在降解作用中是具有重要性的。

在西方墨點法中，SulA Δ C30 及 SulA Δ C20-30 突變蛋白不易偵測到累積的情形，而疏水性分析之結果，此區域片段是具有較高的疏水性，可能會被包埋於蛋白質內側；從 SulA 結構圖中可看到，此胺基酸片段為 β -strand 的二級結構，與兩側平行排列的 β -strands 形成一個 β -sheet 平板，組成整個 SulA 結構的中心。因此 SulA 之 C-端第 20 - 30 個胺基酸的片段，對於維持整體結構的穩定度，可能是非常重要的，所以在此片段缺失的兩個突變蛋白均呈現不穩定的情形。

五、質體 SulA 的表現會誘導染色體之 SulA 表現

在 SulA 蛋白活性測試的實驗中發現，相同的 SulA 突變蛋白於兩種不同的菌株中呈現不同的生長情形，此二菌株的差異僅在於染色體上 *sulA* 基因的有無，顯示染色體之 SulA 蛋白，可能因質體 SulA 蛋白的表現而被誘導產生，且在西方墨點法中，也確實看到染色體上 SulA 蛋白的累積。而早在 1989 年的一篇研究中，也有觀察到類似的現象，其是以北方墨點法分析 *sulA* 之 mRNA 表現量，僅在菌體中放入含 *sulA* 基因之高複製數的質體，其 *sulA* 之 mRNA 表現量與單獨誘導 SOS 反應時相同，而同時放入質體並誘導 SOS 反應，則 *sulA* 之 mRNA 的表現量會大幅增加約 50 倍，然而作者並沒有對此多加解釋 (Cole & Honore, 1989)。

從 SOS 反應誘導 SulA 蛋白生成的機制來看 (附圖二)，在實驗中當誘導質體表現 SulA 蛋白時，可能是在某一步驟中啟動了 SOS 反應，造成染色體之 SulA 蛋白的產生；在細胞中當 DNA 受損時，LexA 蛋白的自我水解機制，是啟動 SOS 基因表現的關鍵，然而以西方墨點法偵測 LexA 蛋白的表現量，不論是否誘導質體之 SulA 蛋白表現，LexA 的表現情形均沒有明顯差異。究竟，在細胞內質體之 SulA 蛋白如何誘發染色體上 *sulA* 基因的大量表現，需要再進一步的研究探討。

在實驗結果中，某些 SulA 突變蛋白可以偵測得明顯的染色體之 SulA 蛋白表現，如：SulA Δ C20 與 SulA*I144N，某些突變蛋白則無法測得，如 C-端二級結構

部份缺失之 SulA 突變蛋白，及其他的 SulA 點突變蛋白。各種 SulA 突變蛋白對於誘導染色體之 SulA 蛋白產生的差異，應與其誘導產生的機制相關，然而目前對於此機制並不瞭解，只能推測 SulA 之缺失突變蛋白可能是因結構上的差異，而無法誘發染色體上 *sulA* 基因的表現，且這些缺失突變蛋白在 AC3112 的菌株中，菌體仍可正常生長，顯示染色體之 SulA 蛋白並沒有被誘導表現。

在 SulA 點突變蛋白的部份，於 AC3112 菌株中，原本不具活性的 SulA*I144N、SulA*R146L 及 SulA*N136L,N139L 突變蛋白，亦會使得菌體無法生長，但在西方墨點法中，僅 SulA*I144N 可測得染色體之 SulA 蛋白產生。顯示這些點突變蛋白應是可誘發染色體上 *sulA* 基因的表現，但可能因西方墨點法的偵測極限，或 SulA 蛋白誘導時間之差異等因素導致無法偵測到；在活性測試中，添加於培養基內的 IPTG 會不斷地誘導 SulA 蛋白表現，而在西方墨點法中，僅以 IPTG 誘導二小時後即收取菌體蛋白質樣本。這也顯示 SulA*I144N 突變蛋白相較於其他突變蛋白，可能會較快速地誘發染色體上 *sulA* 基因的表現。

在 SulA 結晶結構的研究中可知，SulA 蛋白是以二聚體 (dimer) 的形式與 FtsZ 結合，來抑制細胞分裂 (Cordell *et al.*, 2003)。在 AC3112 菌株中，原本不具活性的 SulA 點突變蛋白，有些呈現活性的表現，如 SulA*I144N、SulA*R146L 及 SulA*N136L,N139L 突變蛋白；有些則無，如 SulA*F143Y 及 SulA*F143A 突變蛋白。而假設 SulA 點突變蛋白均可誘導染色體之野生型 SulA 蛋白的產生，那麼當點突變的 SulA 蛋白與野生型的 SulA 蛋白形成二聚體時，SulA 抑制生長之活性表現會是如何？影響 SulA 蛋白抑制細胞分裂活性的因素，與 SulA 和 FtsZ 結合之能力及其形成二聚體的情形相關；而這些點突變蛋白有可能影響到二聚體的形成，但關於 SulA 蛋白形成二聚體的研究仍很少，其對於整體活性的影響仍不清楚。

伍、結論

ClpYQ 蛋白酶要分解一個基質，從一開始的辨識、結合、解開構形、傳送到降解作用，每個步驟都有不同的機制調控，以確保其能夠正確地降解對細胞有危害的蛋白質，維持細胞的正常生理活動。而在整個過程中，最初的辨識作用是最為重要的，是決定一個蛋白質是否應該被降解的重要步驟。

由本篇研究可知，ClpY 可能是藉由疏水性之結合，來辨識基質 SulA 蛋白的疏水性區域，為 C-端第 20 - 30 個胺基酸片段，於此區域中進行胺基酸的點突變試驗，也顯示若取代為疏水性胺基酸時，則會增加其交互作用；且此區域亦為 SulA 蛋白抑制細胞分裂之活性表現的重要範圍，ClpYQ 蛋白酶應可藉由 SulA 蛋白之活性表現與否，來辨別其是否需要降解。

ClpYQ 蛋白酶對於啟動基質的降解作用，可能不僅僅是與基質辨識區域的結合，在 ClpY 之 I domain 上兩個像觸手般的 loop，於整個辨識、結合到降解的過程中，可能分別有著不同的功能；相較之下，Lon 蛋白酶可直接快速地與 SulA 蛋白 C 末端序列結合，突顯兩蛋白酶在細胞中不同的角色地位。在 SulA 蛋白 C-端第 20 - 45 個胺基酸區域，對於 ClpYQ 蛋白酶的降解可能是重要的，而 C-端第 20 - 30 個胺基酸片段，則對於 SulA 整體結構的穩定度有一定的影響性。

陸、參考文獻

- Bi, E. & J. Lutkenhaus, (1990) Analysis of *ftsZ* mutations that confer resistance to the cell division inhibitor SulA (*sfIA*). *J. Bacteriol.* **172**: 5602-5609.
- Bi, E. F. & J. Lutkenhaus, (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164.
- Bochtler, M., L. Ditzel, M. Groll & R. Huber, (1997) Crystal structure of heat shock locus V (HslIV) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6070-6074.
- Bochtler, M., C. Hartmann, H. K. Song, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik & R. Huber, (2000) The structures of HslIU and the ATP-dependent protease HslIU-HslIV. *Nature* **403**: 800-805.
- Bukau, B., J. Weissman & A. Horwich, (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**: 443-451.
- Cherepanov, P. P. & W. Wackernagel, (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**: 9-14.
- Chuang, S. E., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, D. L. Daniels & F. R. Blattner, (1993) Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslITS/ibpAB* and *hslVU* operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**: 1-6.
- Cole, S. T. & N. Honore, (1989) Transcription of the *sulA-ompA* region of *Escherichia coli* during the SOS response and the role of an antisense RNA molecule. *Mol. Microbiol.* **3**: 715-722.
- Cordell, S. C., E. J. Robinson & J. Lowe, (2003) Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 7889-7894.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6640-6645.
- Ebina, Y., Y. Takahara, F. Kishi, A. Nakazawa & R. Brent, (1983) LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 13258-13261.
- Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori & R. Woodgate, (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**: 1560-1572.
- Fields, S. & O. Song, (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Freudl, R., G. Braun, N. Honore & S. T. Cole, (1987) Evolution of the enterobacterial

- sulA* gene: a component of the SOS system encoding an inhibitor of cell division. *Gene* **52**: 31-40.
- Frost, L. S., K. Ippen-Ihler & R. A. Skurray, (1994) Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* **58**: 162-210.
- Gimeno, R. E., P. Espenshade & C. A. Kaiser, (1995) *SED4* encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J. Cell Biol.* **131**: 325-338.
- Goldberg, A. L., (1992) The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* **203**: 9-23.
- Gottesman, S., (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 465-506.
- Gottesman, S., (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 565-587.
- Gottesman, S., W. P. Clark, V. d. Crecy-Lagard & M. R. Maurizi, (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 22618-22626.
- Gottesman, S., E. Halpern & P. Trisler, (1981) Role of *sulA* and *sulB* in Filamentation by Lon Mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **148**: 265-273.
- Gottesman, S. & M. R. Maurizi, (1992) Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* **56**: 592-621.
- Gottesman, S., E. Roche, Y. N. Zhou & R. T. Sauer, (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**: 1338-1347.
- Gottesman, S., P. Trisler & A. S. Torres-Cabassa, (1985) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J. Bacteriol.* **162**: 1111-1119.
- Guo, F., M. R. Maurizi, L. Esser & D. Xia, (2002) Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J. Biol. Chem.* **277**: 46743-46752.
- Gur, E. & R. T. Sauer, (2008) Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes Dev.* **22**: 2267-2277.
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson & J. Beckwith, (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov & R. Brent, (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803.
- Hashimoto-Gotoh, T., M. Yamaguchi, K. Yasojima, A. Tsujimura, Y. Wakabayashi & Y. Watanabe, (2000) A set of temperature sensitive-replication/-segregation and temperature resistant plasmid vectors with different copy numbers and in an

- isogenic background (chloramphenicol, kanamycin, *lacZ*, *repA*, *par*, *polA*). *Gene* **241**: 185-191.
- Herman, C., D. Thevenet, P. Bouloc, G. C. Walker & R. D'Ari, (1998) Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev.* **12**: 1348-1355.
- Higashitani, A., N. Higashitani & K. Horiuchi, (1995) A cell division inhibitor SulA of *Escherichia coli* directly interacts with FtsZ through GTP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 198-204.
- Higashitani, A., Y. Ishii, Y. Kato & K. Horiuchi, (1997) Functional dissection of a cell-division inhibitor, SulA, of *Escherichia coli* and its negative regulation by Lon. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 351-357.
- Huang, J., C. Cao & J. Lutkenhaus, (1996) Interaction between FtsZ and inhibitors of cell division. *J. Bacteriol.* **178**: 5080-5085.
- Huisman, O. & R. D'Ari, (1981) An inducible DNA replication-cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature* **290**: 797-799.
- Ishii, Y. & F. Amano, (2001) Regulation of SulA cleavage by Lon protease by the C-terminal amino acid of SulA, histidine. *Biochem. J.* **358**: 473-480.
- Ishii, Y., S. Sonezaki, Y. Iwasaki, Y. Miyata, K. Akita, Y. Kato & F. Amano, (2000) Regulatory role of C-terminal residues of SulA in its degradation by Lon protease in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **127**: 837-844.
- Kanemori, M., K. Nishihara, H. Yanagi & T. Yura, (1997) Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of σ^{32} and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 7219-7225.
- Kanemori, M., H. Yanagi & T. Yura, (1999a) The ATP-dependent HslVU/ClpQY protease participates in turnover of cell division inhibitor SulA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3674-3680.
- Kanemori, M., H. Yanagi & T. Yura, (1999b) Marked instability of the σ^{32} heat shock transcription factor at high temperature. *J. Biol. Chem.* **274**: 22002-22007.
- Katayama-Fujimura, Y., S. Gottesman & M. R. Maurizi, (1987) A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**: 4477-4485.
- Kessel, M., W. F. Wu, S. Gottesman, E. Kocsis, A. C. Steven & M. R. Maurizi, (1996) Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. *FEBS Lett.* **398**: 274-278.
- Khattar, M. M., (1997) Overexpression of the *hslVU* operon suppresses SOS-mediated inhibition of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **414**: 402-404.
- Kuo, M. S., K. P. Chen & W. F. Wu, (2004) Regulation of RcsA by the ClpYQ (HslUV) protease in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**: 437-446.
- Kwon, A. R., C. B. Trame & D. B. McKay, (2004) Kinetics of protein substrate

- degradation by HslUV. *J. Struct. Biol.* **146**: 141-147.
- Lau-Wong, I. C., T. Locke, M. J. Ellison, T. L. Raivio & L. S. Frost, (2008) Activation of the Cpx regulon destabilizes the F plasmid transfer activator, TraJ, via the HslVU protease in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **67**: 516-527.
- Lee, Y. Y., C. F. Chang, C. L. Kuo, M. C. Chen, C. H. Yu, P. I. Lin & W. F. Wu, (2003) Subunit oligomerization and substrate recognition of the *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease implicated by in vivo protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *J. Bacteriol.* **185**: 2393-2401.
- Lien, H. Y., R. S. Shy, S. S. Peng, Y. L. Wu, Y. T. Weng, H. H. Chen, P. C. Su, W. F. Ng, Y. C. Chen, P. I. Chang & W. F. Wu, (2009) Characterization of the *Escherichia coli* ClpY (HslU) substrate recognition site in ClpYQ (HslUV) protease by the yeast two-hybrid system. *J. Bacteriol.* **191**: 4218-4231.
- Lupas, A. N. & J. Martin, (2002) AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 746-753.
- Ma, J. & M. Ptashne, (1987) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**: 113-119.
- Matouschek, A., (2003) Protein unfolding--an important process in vivo? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 98-109.
- Missiakas, D., F. Schwager, J. M. Betton, C. Georgopoulos & S. Raina, (1996) Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**: 6899-6909.
- Mizusawa, S. & S. Gottesman, (1983) Protein degradation in *Escherichia coli*: the lon gene control the stability of the Sula protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 358-362.
- Mukherjee, A., C. Cao & J. Lutkenhaus, (1998) Inhibition of FtsZ polymerization by Sula, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2885-2890.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge & E. V. Koonin, (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**: 27-43.
- Nishii, W., T. Maruyama, R. Matsuoka, T. Muramatsu & K. Takahashi, (2002) The unique sites in Sula protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 451-457.
- Nishii, W. & K. Takahashi, (2003) Determination of the cleavage sites in Sula, a cell division inhibitor, by the ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **553**: 351-354.
- Ramachandran, R., C. Hartmann, H. K. Song, R. Huber & M. Bochtler, (2002) Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY). *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7396-7401.
- Rohrwild, M., O. Coux, H. C. Huang, R. P. Moerschell, S. J. Yoo, J. H. Seol, C. H. Chung & A. L. Goldberg, (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5808-5813.
- Rohrwild, M., G. Pfeifer, U. Santarius, S. A. Muller, H. C. Huang, A. Engel, W. Baumeister & A. L. Goldberg, (1997) The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 133-139.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, (1989) Preparation and transformation of competent *E. coli*. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., pp. 1.74-71.84.
- Sauer, R. T., D. N. Bolon, B. M. Burton, R. E. Burton, J. M. Flynn, R. A. Grant, G. L. Hersch, S. A. Joshi, J. A. Kenniston, I. Levchenko, S. B. Neher, E. S. Oakes, S. M. Siddiqui, D. A. Wah & T. A. Baker, (2004) Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**: 9-18.
- Schirmer, E. C., J. R. Glover, M. A. Singer & S. Lindquist, (1996) HSP100/Clp proteins: A common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 289-296.
- Schoemaker, J. M., R. C. Gayda & A. Markovitz, (1984) Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the Sula protein, a key to lon-associated filamentation and death. *J. Bacteriol.* **158**: 551-561.
- Seong, I. S., M. S. Kang, M. K. Choi, J. W. Lee, O. J. Koh, J. Wang, S. H. Eom & C. H. Chung, (2002) The C-terminal tails of HslU ATPase act as a molecular switch for activation of HslV peptidase. *J. Biol. Chem.* **277**: 25976-25982.
- Seong, I. S., J. Y. Oh, S. J. Yoo, J. H. Seol & C. H. Chung, (1999) ATP-dependent degradation of Sula, a cell division inhibitor, by the HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **456**: 211-214.
- Shin, D. H., S. J. Yoo, Y. K. Shim, J. H. Seol, M. S. Kang & C. H. Chung, (1996) Mutational analysis of the ATP-binding site in HslU, the ATPase component of HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **398**: 151-154.
- Stout, V., A. Torres-Cabassa, M. R. Maurizi, D. Gutnick & S. Gottesman, (1991) RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J. Bacteriol.* **173**: 1738-1747.
- Torres-Cabassa, A. & S. Gottesman, (1987) Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *J. Bacteriol.* **169**: 981-989.
- Uzzau, S., N. Figueroa-Bossi, S. Rubino & L. Bossi, (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 15264-15269.

- Walker, G. C., (1996) The SOS response of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 1400-1416.
- Wang, J., J. A. Hartling & J. M. Flanagan, (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**: 447-456.
- Wang, J., J. J. Song, M. C. Franklin, S. Kamtekar, Y. J. Im, S. H. Rho, I. S. Seong, C. S. Lee, C. H. Chung & S. H. Eom, (2001a) Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure* **9**: 177-184.
- Wang, J., J. J. Song, I. S. Seong, M. C. Franklin, S. Kamtekar, S. H. Eom & C. H. Chung, (2001b) Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HslIU. *Structure* **9**: 1107-1116.
- Wickner, S., M. R. Maurizi & S. Gottesman, (1999) Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**: 1888-1893.
- Wu, W. F., Y. N. Zhou & S. Gottesman, (1999) Redundant in vivo proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) Protease. *J. Bacteriol.* **181**: 3681-3687.
- Yoo, S. J., J. H. Seol, M. S. Kang & C. H. Chung, (1996) Poly-L-lysine activates both peptide and ATP hydrolysis by the ATP-dependent HslVU protease in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 531-535.
- Yura, T., H. Nagai & H. Mori, (1993) Regulation of the heat shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 321-350.
- Zhang, X., F. Beuron & P. S. Freemont, (2002) Machinery of protein folding and unfolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 231-238.
- Zolkiewski, M., (2006) A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol. Microbiol.* **61**: 1094-1100.
- Zwickl, P., W. Baumeister & A. Steven, (2000) Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 242-250.
- 施如珊, (2004) 大腸桿菌熱休克蛋白 ClpY I domain 之突變蛋白及其專一性基質辨識之研究. 台灣大學農業化學研究所碩士論文.

表一、本論文所使用的菌株與噬菌體

Table 1. Strains and bacteriophage used in this study.

Strains / Bacteriophage	Description	Source or Reference
<i>Escherichia coli</i> strains		
AC3112	<i>lon⁻ clpQ⁻ clpY⁻ tet^r cpsB-lacZ Δara mal::lacIQ</i>	Kuo <i>et al.</i> (2004)
YT10009	AC3112 <i>sulA-3xFLAG</i>	This study
YT10010	AC3112 <i>sulA⁻</i>	This study
BW25113	<i>lacI^d rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1</i>	Barry L. Wanner
Keio Collection JW0941	BW25113 <i>sulA⁻</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains		
EGY48	<i>MATα his3 trp1 ura2 lexA_{op(x6)}-leu2</i>	Clontech
Bacteriophage		
λRS45	<i>imm21 ind⁺ bla'-lacZ_{sc}</i>	Simons <i>et al.</i> (1987)



表二、本論文所使用的質體

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmids	Description	Source or Reference
<i>E. coli.</i> expression system		
pBAD24	ori (pBR322) <i>araC</i> P _{BAD} <i>amp</i> ^r	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD33	ori (pACYC184) <i>araC</i> P _{BAD} <i>cm</i> ^r	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pTH18kr	ori (pSC101) P _{lac} <i>kan</i> ^r	Hashimoto-Gotoh <i>et al.</i> (2000)
Yeast two-hybrid system		
p8op- <i>lacZ</i>	<i>lexA</i> _{op(x8)} - <i>lacZ</i> <i>URA3</i> <i>amp</i> ^r	Clontech
pGilda	P _{GAL1} <i>HIS3</i> <i>amp</i> ^r ; expresses LexA DNA binding domain (BD)	Clontech
pB42AD	P _{GAL1} <i>TRP1</i> <i>amp</i> ^r ; expresses B42 polypeptide activation domain (AD), HA epitope tag	Clontech
Others		
pCP20	<i>FLP</i> ⁺ λ cI857 ⁺ λ P _R Rep ^{ts} <i>amp</i> ^r <i>cm</i> ^r	Cherepanov <i>et al.</i> (1995)
pKD46	<i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i> P _{araB} repA101 ^{ts} oriR101 <i>amp</i> ^r	Datsenko <i>et al.</i> (2000)
pSUB11	Epitope tagging plasmid carrying 3x FLAG tag and kanamycin resistance cassette	Uzzau <i>et al.</i> (2001)

表三、本論文所使用的引子對

Table 3. Primers used in this study.

Primers	DNA sequences (5' → 3')	Notes
sulA-3xFLAG_Fw	ACAAC TTTCCGGGCTAAAAATTC ACTCTAATTTGTATCATGACTACAAAGACCATGACGG	a.
sulA-3xFLAG_Rv	CAAAAAAAGTTCCAGGATTAATCCTAAATTTACTTAATGACATATGAATATCCTCCTTAG	a.
sulA(Fw)	CCAACGTTGCCAGGTATTCT	Colony PCR
sulA(Rv)	ATCCTTACC GGGGGATCT	Colony PCR
5' sulA <i>Eco</i> RI	CGGAATTCGAATTCATGTACTTCAGGCTATGCACATC	b.
3' sulA <i>Bam</i> HI	GGGGGATCCGGATCCTTAATGATACAAATTAGAGTG	b.
3' sulA delete10	GGGGGATCCGGATCCTTAGGAAAGTTGTCTCGTGGC	b.
3' sulA delete20	GGGGGATCCGGATCCTTAGCTTACCGGACGCATAAT	b.
3' sulA delete30	GGGGGATCCGGATCCTTAGTTACCTTCATTTGCCGC	b.
3' sulA delete45	GGGGGATCCGGATCCTTAAGTCAAATCATCTGCCAA	b.
3' sulA delete20-45	AGAGGATGCAGTCAAATCATCTGCCAACCAACCGAT	
5' sulA delete20-45	GGTTGGTTGGCAGATGATTTGACTGCATCCTCTCACGCCACGAGACA ACTTTCC	
3' sulA delete20-30	AGAGGATGCGTTACCTTCATTTGCCGCATCAACAAG	
5' sulA delete20-30	GTTGATGCGGCAAATGAAGGTAACGCATCCTCTCACGCCACGAGACA ACTTTCC	
5' sulA delete30-45	GTTGGCAGATGATTTGACTGCTATGGGGTTTATTATGCGTCCGGTAAGC	
3' sulA delete30-45	ATAATAAACCCCATAGCAGTCAAATCATCTGCCAACCAACCGATCAC	

Continued on following page

表三、本論文所使用的引子對 (接續上頁)

Table 3. Primers used in this study. (Continued)

Primers	DNA sequences (5' → 3')	Notes
sulA F143Y fw	TATGGGGTATATTATGCGTCCGGTAAGCGCATC	c.
sulA F143Y rv	GGACGCATAATATACCCCATAGCGTTACCTTCATT	
sulA F143A fw	TATGGGGG CT ATTATGCGTCCGGTAAGCG	c.
sulA F143A rv	GACGCATAATAGCCCCCATAGCGTTACCTTCATT	
sulA I144N fw	TATGGGGTTT AA TATGCGTCCGGTAAGCGCAT	c.
sulA I144N rv	CGGACGCATATTA AA ACCCCATAGCGTTACCTTCAT	
sulA M145I fw	GGTTTATT ATT CGTCCGGTAAGCGCATCCTCTCAC	c.
sulA M145I rv	CTTACCGGACGAATAATA AA ACCCCATAGCGTTACC	
sulA R146L fw	GGTTTATTATG CTT CCGGTAAGCGCATCCTCTCAC	c.
sulA R146L rv	CTTACCGGAAGCATAATA AA ACCCCATAGCGTTACC	
sulA R156L fw	CCACG CT ACA ACT TTCCGGGCTAAA A ATTCA	c.
sulA R156L rv	AAAGTTGTAGCGTG GC GTGAGAGGATGCGCTTA	
sulA N136LN139L fw	TGCGGC ACTT GAAAGGT CT CGCTATGGGGTTTATTATGCG	c.
sulA N136LN139L rv	CCATAGCGAGACCTTCAAGTGCCGCATCAACAAGTTCA	

- a. Primers were designed to anneal to the beginning of the 3xFLAG-coding sequence (fw) and on the opposite side from the Kn^R cassette (rv) of template plasmid pSUB11 (in italics), and carry extensions homologous to the last 43 nts of the *sulA* gene coding sequence (fw) and to a region downstream from it (rv). fw, forward; rv, reverse.
- b. Specific restriction sites are underlined.
- c. The positions of mutations are shown in bold.

表四、在酵母菌雙雜交系統中 SulA 突變蛋白與 ClpY 之交互作用情形

Table 4. Interaction between SulA mutants and ClpY in yeast two-hybrid system.

pB42AD ^a - SulA mutants	pGilda ^b -clpY*M187I		
	β -galactosidase units ^d (U)	X-gal test ^e	LEU2 ^f
Control			
None ^c	2.24 \pm 0.21	White	-
SulA	35.06 \pm 4.45	Blue	+
SulA deletion mutants			
Δ C10	72.26 \pm 4.63	Blue	++
Δ C20	204.44 \pm 17.14	Dark Blue	+++
Δ C30	1.85 \pm 0.10	White	-
Δ C45	1.90 \pm 0.26	White	-
Δ C20-30	2.15 \pm 0.30	White	-
Δ C30-45	3.18 \pm 0.83	White	-
Δ C20-45	1.41 \pm 0.25	White	-
SulA point mutants			
F143Y	5.14 \pm 1.28	White	-
F143A	27.82 \pm 4.02	Blue	++
I144N	4.63 \pm 0.45	White	-
M145I	123.13 \pm 8.34	Dark Blue	+++
R146L	31.34 \pm 1.42	Blue	+
R156L	93.51 \pm 9.26	Blue	++
N136LN139L	4.60 \pm 1.27	White	-

- pB42AD was the AD vector.
- pGilda was the BD vector.
- It was just AD domain as the negative control.
- β -galactosidase activity presented as Miller units (Miller, 1972).
- LacZ* expression with colony color was evaluated on Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp plates containing X-gal over 4 days.
- LEU2* expression was evaluated on Gal/Raf/-Ura/-His/-Trp/-Leu plates over 4 days. +, the degree of growth compared to positive control. -, no growth.

表五、SulA 突變蛋白之活性測試及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形

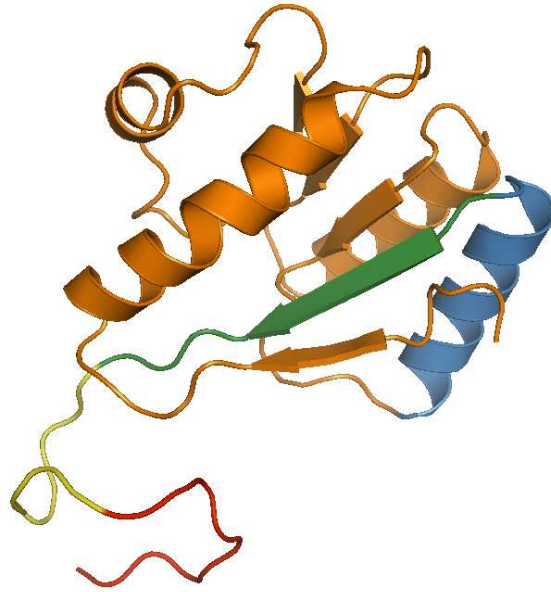
Table 5. The activation assay of the SulA mutants and the degradation by ClpYQ.

pTh18kr ^a - SulA mutants	Activation assay ^e		Degradation by ClpYQ ^f
	AC3112 strain ^c	YT10010 strain ^d	
Control			
None ^b	-	-	--
SulA	+	+	+
SulA deletion mutants			
ΔC10	+	+	+
ΔC20	+	-	+
ΔC30	-	-	+
ΔC45	-	-	±
ΔC20-30	-	-	+
ΔC30-45	-	-	+
ΔC20-45	-	-	-
SulA point mutants			
F143Y	-	-	+
F143A	-	-	-
I144N	+	-	+
M145I	+	+	+
R146L	+	-	+
R156L	+	+	+
N136LN139L	+	±	+

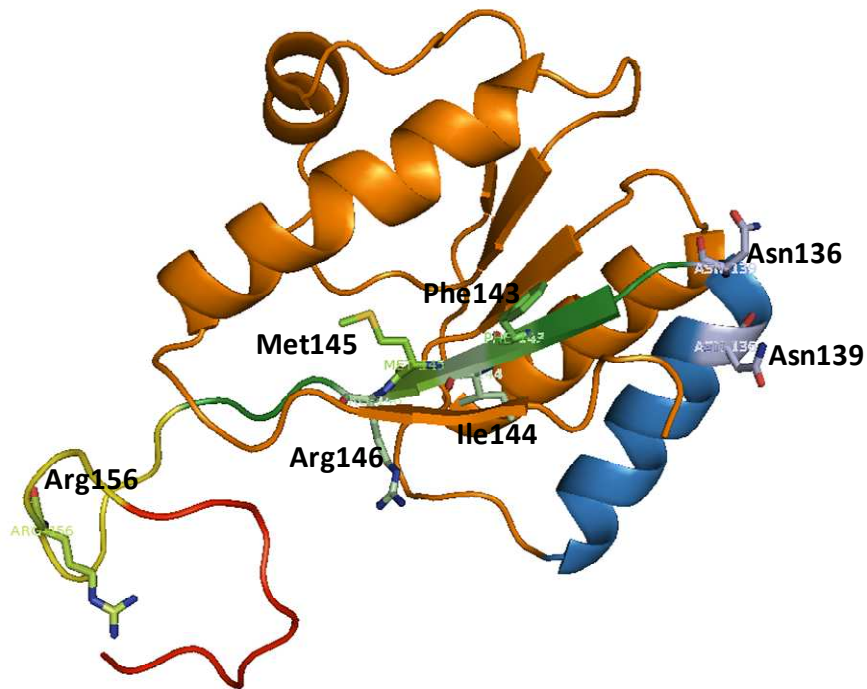


- Plasmid pTH18kr that carried *sulA* mutant gene was transformed into AC3112 or YT10010 strain.
- There was no *sulA* gene in plasmid pTH18kr as the negative control.
- AC3112 strain had the *sulA* gene in the chromosome.
- YT10010 strain had no the *sulA* gene in the chromosome.
- Activation assay was evaluated on LB plates plus 1 mM IPTG and appropriate kanamycin. Serial dilutions of the bacterial cultures were spotted on the plates. +, activity and no cell growth. -, no activity and cell growth. ±, incomplete inactivity and cell growth incomplete.
- Degradation was experimented by Western blotting. +, can be degraded. -, cannot be degraded. ±, cannot be degraded completely.

A



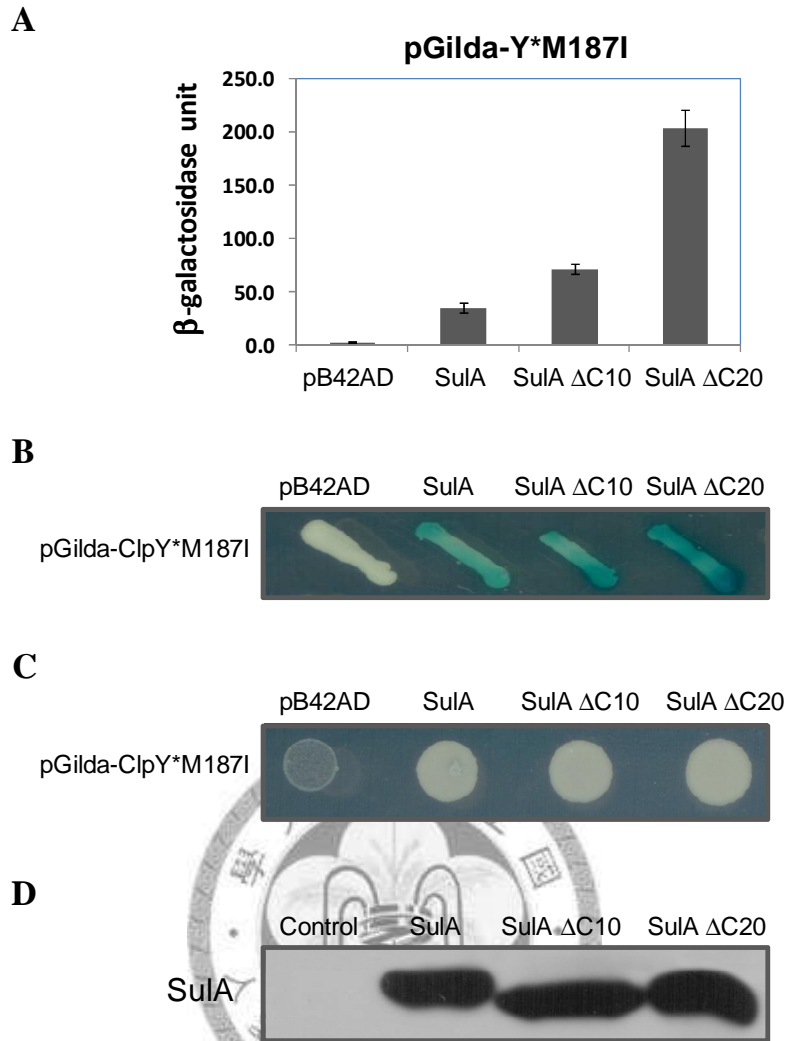
B



圖一、大腸桿菌之 SulA 結構圖

Figure 1. The structure of SulA from *Escherichia coli*.

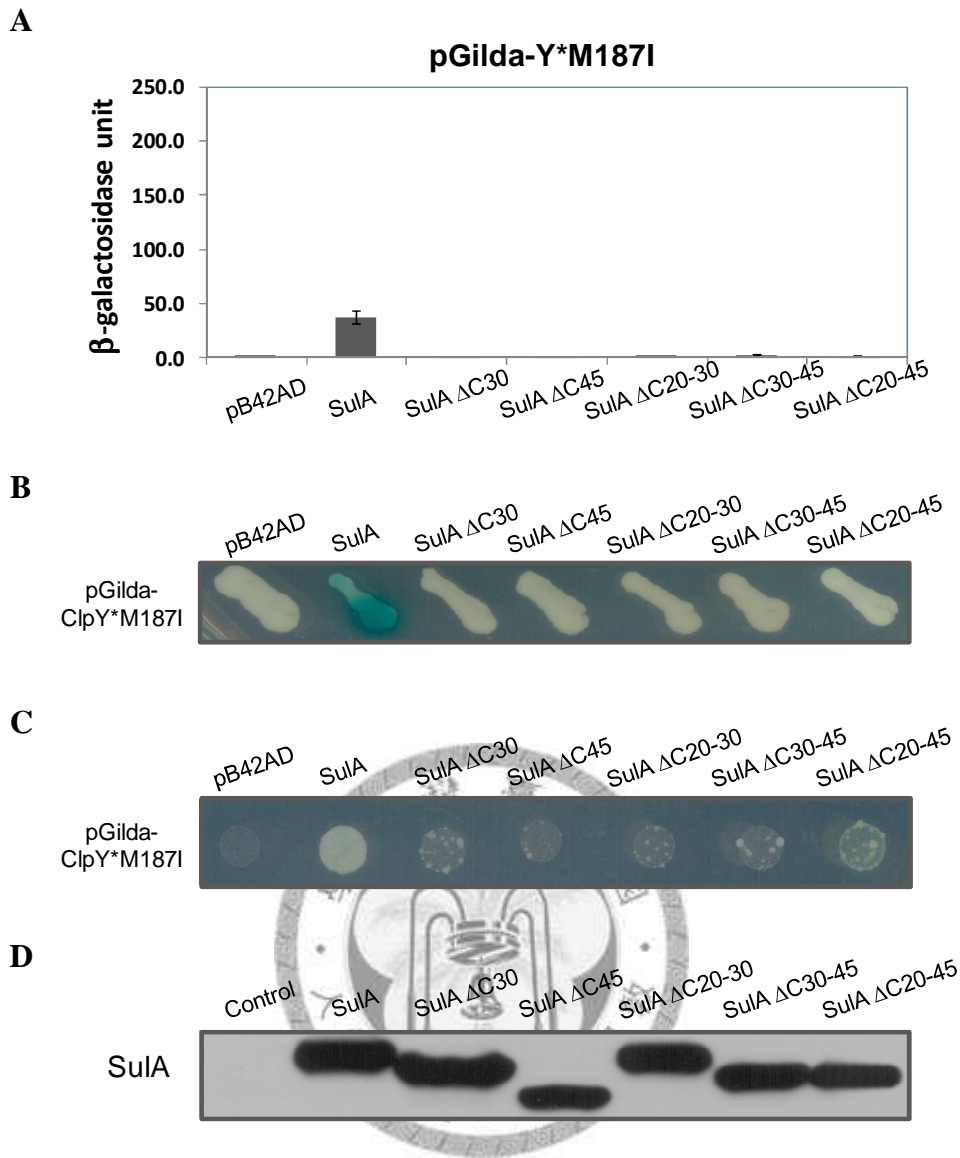
以 PyMol 軟體繪製大腸桿菌之 SulA 結構。A. 紅色為 C-末端 10 個胺基酸，黃色為 C-端 10 - 20 個胺基酸，綠色 β -strand 結構為 C-端 20 - 30 個胺基酸，藍色 α -helix 結構為 C-端 30 - 45 個胺基酸。B. SulA 點突變蛋白於結構上之相關位置。



圖二、以酵母菌雙雜交系統分析 SulA Δ C10 及 SulA Δ C20 突變蛋白與 ClpY 交互作用情形

Figure 2. Interaction between SulA Δ C10 / SulA Δ C20 mutants and ClpY in yeast two-hybrid system.

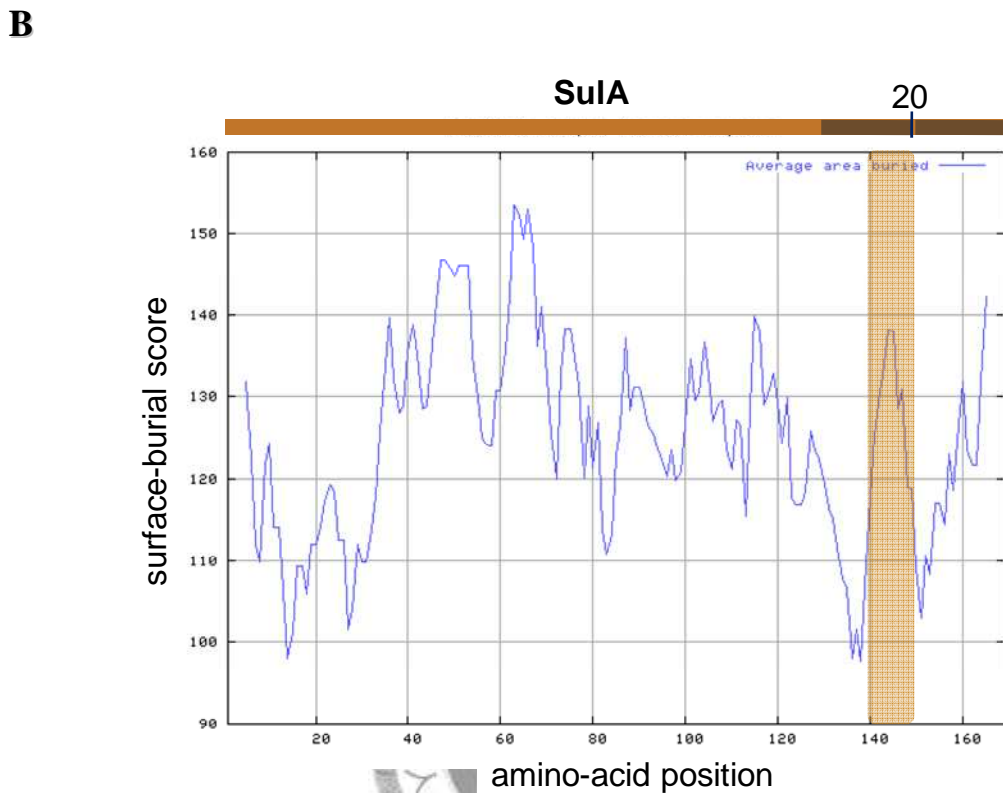
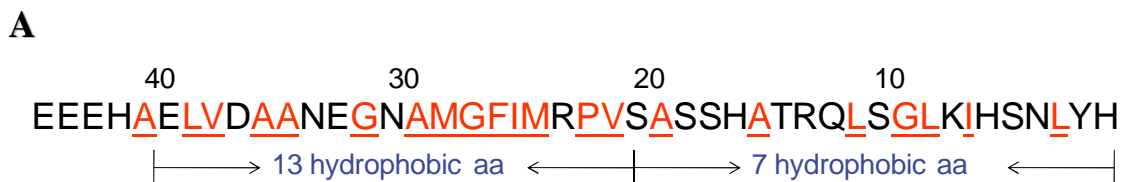
pGilda 帶有 BD domain 與 ClpY 形成融合蛋白，pB42AD 帶有 AD domain 與 SulA 及其各種缺失突變形成融合蛋白，於酵母菌 EGY48 [p8op-*lacZ*] 中進行分析。**A.** *LacZ* expression: β -galactosidase 活性分析。**B.** *LacZ* expression: X-gal 測試。**C.** *LEU2* expression: 生長測試。SulA Δ C10 和 SulA Δ C20 與 ClpY 均有明顯的交互作用，在 β -galactosidase 活性測試中，SulA Δ C10 的活性增加近一倍，SulA Δ C20 的活性則提高至六倍；在 X-gal 培養基上均呈現藍色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中均可正常生長。**D.** 在西方墨點法中以 anti-HA 抗體，偵測酵母菌中 AD domain 與 SulA 形成之融合蛋白表現情形，各種 SulA 缺失突變蛋白表現量均相一致。



圖三、以酵母菌雙雜交系統測試二級結構缺失之 SulA 突變蛋白與 ClpY 交互作用情形

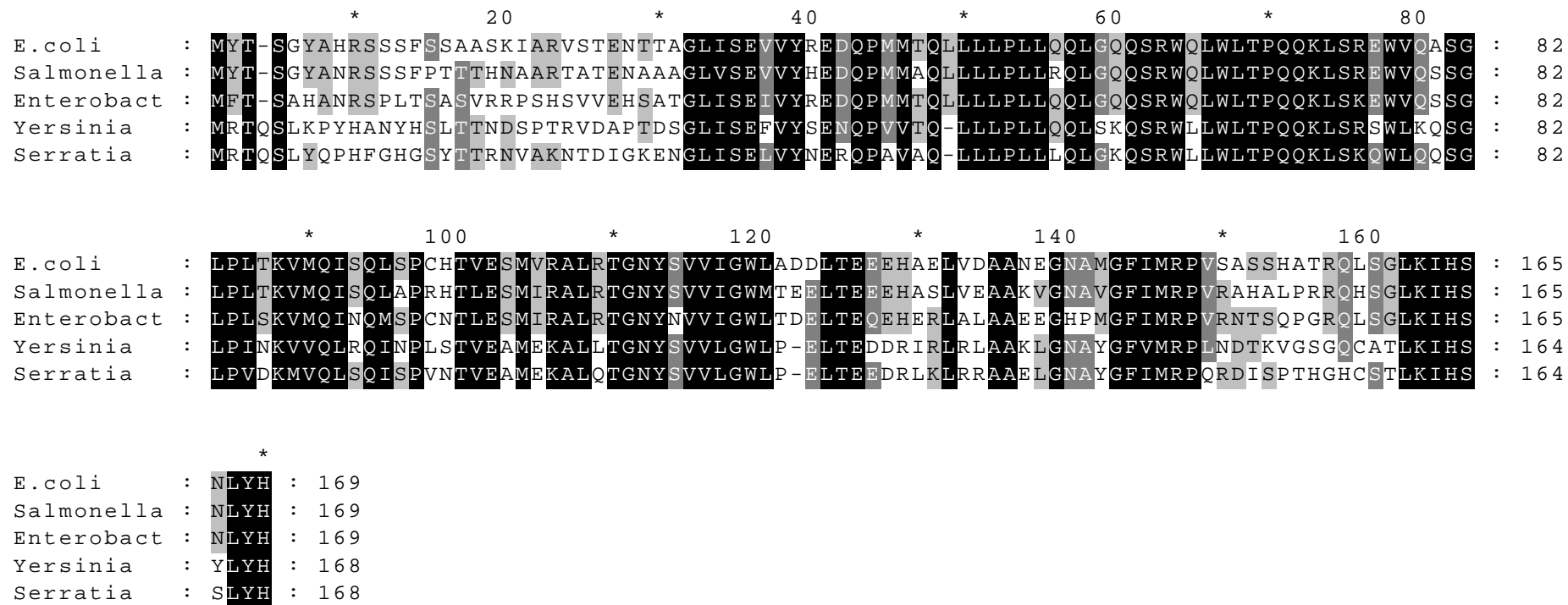
Figure 3. Interaction between SulA deletion mutants and ClpY in yeast two-hybrid system.

pGilda 帶有 BD domain 與 ClpY 形成融合蛋白，pB42AD 帶有 AD domain 與 SulA 及其各種缺失突變形成融合蛋白，於酵母菌 EGY48 [p8op-lacZ] 中進行分析。**A.** *LacZ* expression: β -galactosidase 活性分析。**B.** *LacZ* expression: X-gal 測試。**C.** *LEU2* expression: 生長測試。不論何種 SulA 突變蛋白與 ClpY 之間皆不具交互作用，在 β -galactosidase 活性測試中沒有活性表現，在 X-gal 培養基上均呈現白色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中無法正常生長。**D.** 在西方墨點法中以 anti-HA 抗體，偵測酵母菌中 AD domain 與 SulA 形成之融合蛋白表現情形，各種 SulA 缺失突變蛋白表現量均相一致。



圖四、大腸桿菌 SulA 之 C 末端序列分析
Figure 4. Analysis of the sequence of SulA C-terminal region from *E. coli*.

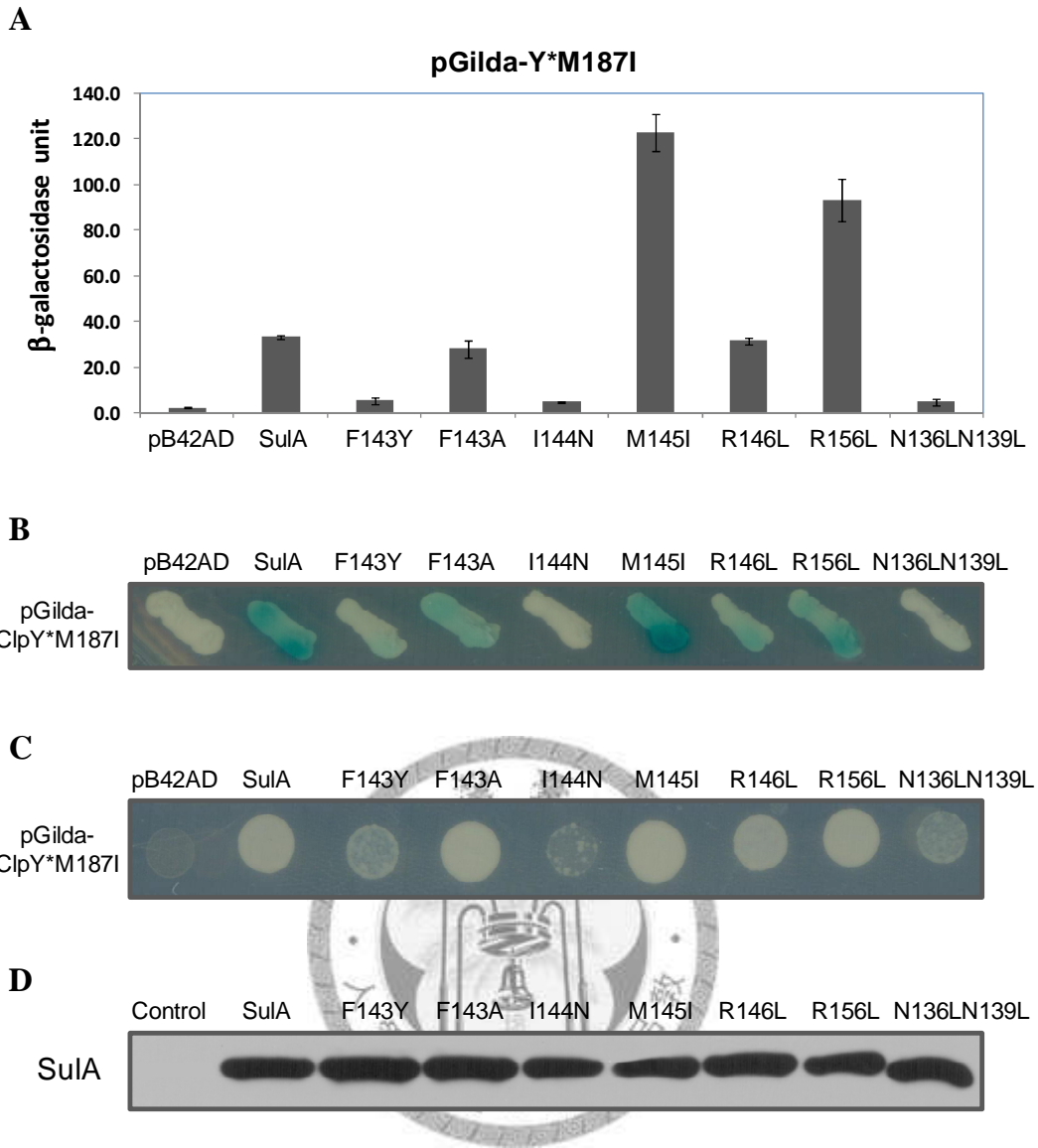
- A. SulA 之 C 末端 45 個胺基酸序列，底線表示為非極性胺基酸。
B. 以軟體計算 SulA 之 surface-burial scores，值愈高表示具有較高的疏水性質。陰影區域為 C-端第 20 - 30 個胺基酸序列。



圖五、大腸桿菌與四種腸道菌微生物之 Sula 相似序列的比對

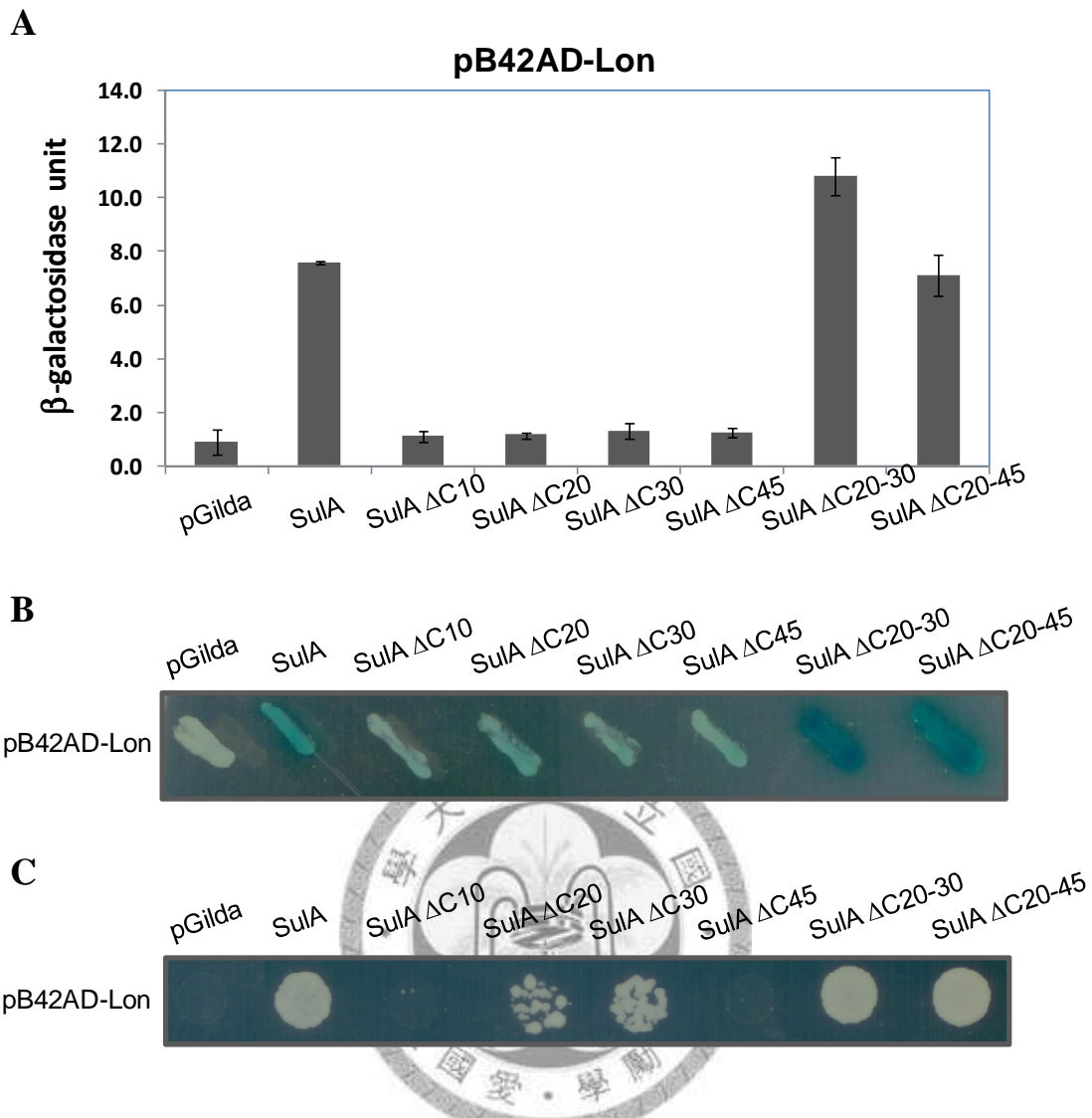
Figure 5. Alignment of *E.coli* Sula with similar Sula sequences in other enterobacterial species.

參照 Freudl *et al.*, 1987 繪製，四種腸道菌分別為 *Salmonella typhimurium*、*Enterobacter aerogenes*、*Yersinia pestis*、*Serratia marcescens*。



圖六、以酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 點突變蛋白與 ClpY 交互作用情形
Figure 6. Interaction between SulA point mutants and ClpY in yeast two-hybrid system.

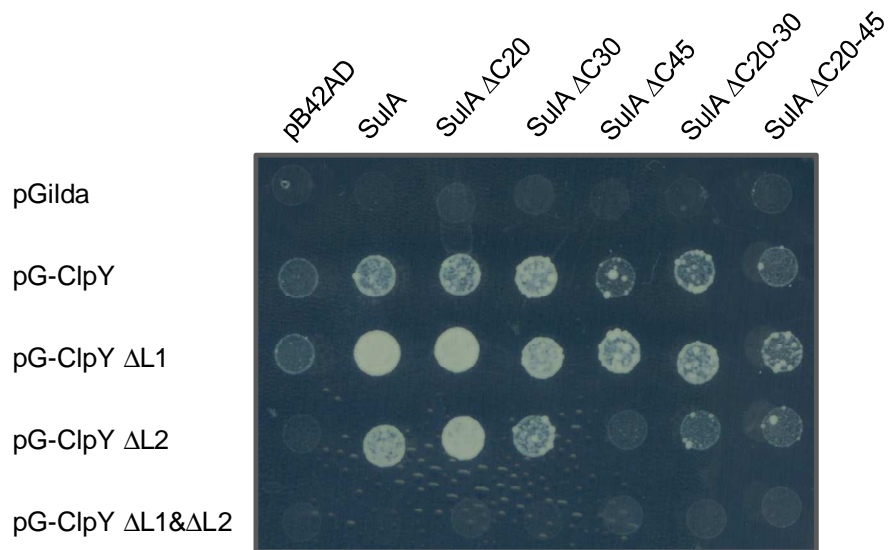
pGilda 帶有 BD domain 與 ClpY 形成融合蛋白，pB42AD 帶有 AD domain 與 SulA 及其各種點突變形成融合蛋白，於酵母菌 EGY48 [p8op-lacZ] 中進行分析。**A.** LacZ expression: β -galactosidase 活性分析。**B.** LacZ expression: X-gal 測試。**C.** LEU2 expression: 生長測試。F143A、M145I、R146L、R156L 的 SulA 突變蛋白與 ClpY 有較好的交互作用，在 β -galactosidase 活性測試中具有活性表現；在 X-gal 培養基上呈現藍色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中可正常生長。而 F143Y、I144N、N136LN139L 的 SulA 突變蛋白與 ClpY 則沒有交互作用。**D.** 在西方墨點法中以 anti-HA 抗體，偵測酵母菌中 AD domain 與 SulA 形成之融合蛋白表現情形，各種 SulA 點突變蛋白表現量均相一致。



圖七、以酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 突變蛋白與 Lon 交互作用情形

Figure 7. Interaction between SulA deletion mutants and Lon in yeast two-hybrid system.

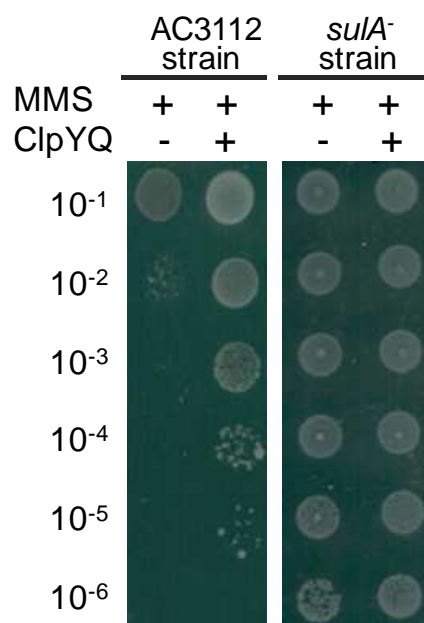
pB42AD 帶有 AD domain 與 Lon 形成融合蛋白，pGilda 帶有 BD domain 與 SulA 及其各種缺失突變形成融合蛋白，於酵母菌 EGY48 [p8op-lacZ] 中進行分析。**A.** *LacZ* expression: β -galactosidase 活性分析。**B.** *LacZ* expression: X-gal 測試。**C.** *LEU2* expression: 生長測試。SulA Δ C20-30 和 SulA Δ C20-45 與 Lon 有較強的交互作用，在 β -galactosidase 活性測試中，有較高的活性表現；在 X-gal 培養基上呈現深藍色菌落，在缺乏 leucine 的培養基中生長較野生型的 SulA 快速。



圖八、以酵母菌雙雜交系統測試各個 SulA 突變蛋白與 ClpY 之 loop 缺失突變蛋白交互作用情形

Figure 8. Interaction between SulA deletion mutants and loop deletion mutants of ClpY in yeast two-hybrid system.

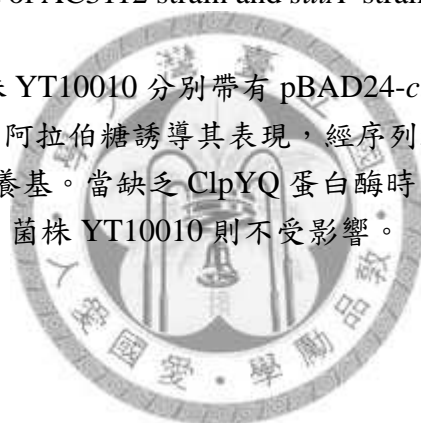
pGilda 帶有 BD domain 與 ClpY 及其突變蛋白形成融合蛋白，pB42AD 帶有 AD domain 與 SulA 及其各種缺失突變形成融合蛋白，於酵母菌 EGY48 [p8op-lacZ] 中，分析 *LEU2* 表現之生長測試。ClpY ΔL2 的結果和野生型的 ClpY 相近，與 SulA ΔC45、SulA ΔC20-30 及 SulA ΔC20-45 之間交互作用較弱；而 ClpY ΔL1 則與各種 SulA 突變蛋白之間均有交互作用的情形，在缺乏 leucine 的培養基上均可生長。

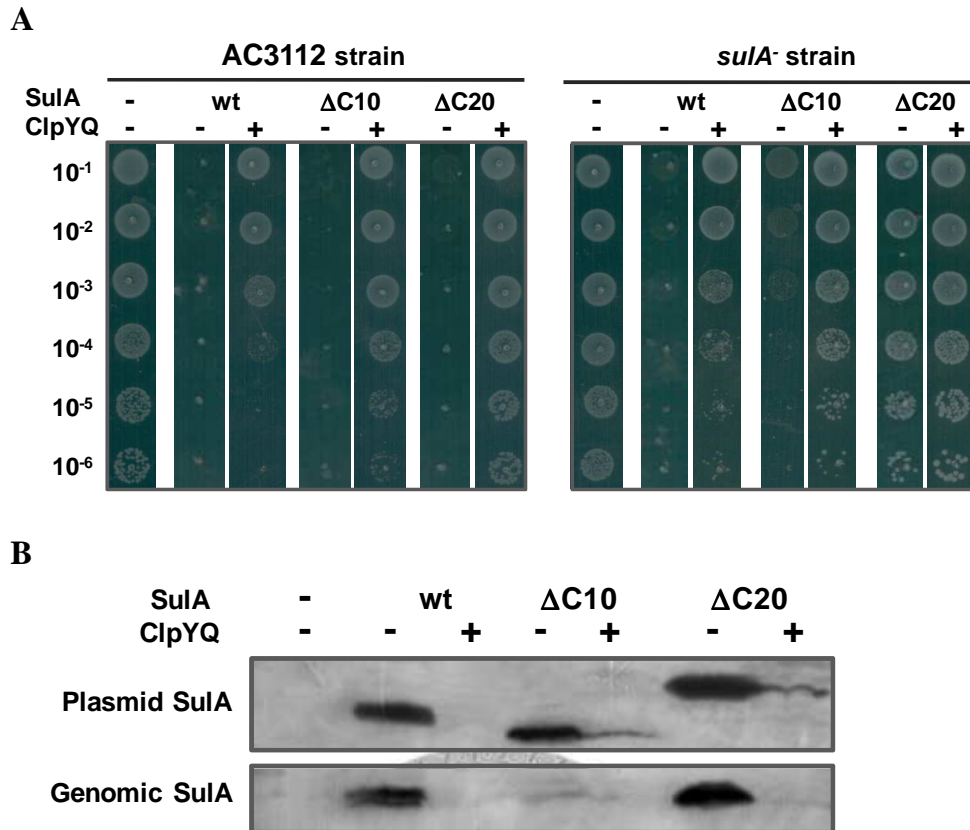


圖九、AC3112 菌株及 *sulA*⁻ 菌株 YT10010 之 MMS 生長測試

Figure 9. MMS growth test of AC3112 strain and *sulA*⁻ strain YT10010.

AC3112 菌株及 *sulA*⁻ 菌株 YT10010 分別帶有 pBAD24-*clpY* 及 pBAD33-*clpQ* 質體，以葡萄糖抑制其表現或以阿拉伯糖誘導其表現，經序列稀釋後，滴於含有 0.025% MMS 及適當抗生素之培養基。當缺乏 ClpYQ 蛋白酶時，AC3112 菌株無法生長於含 MMS 之培養基，*sulA*⁻ 菌株 YT10010 則不受影響。



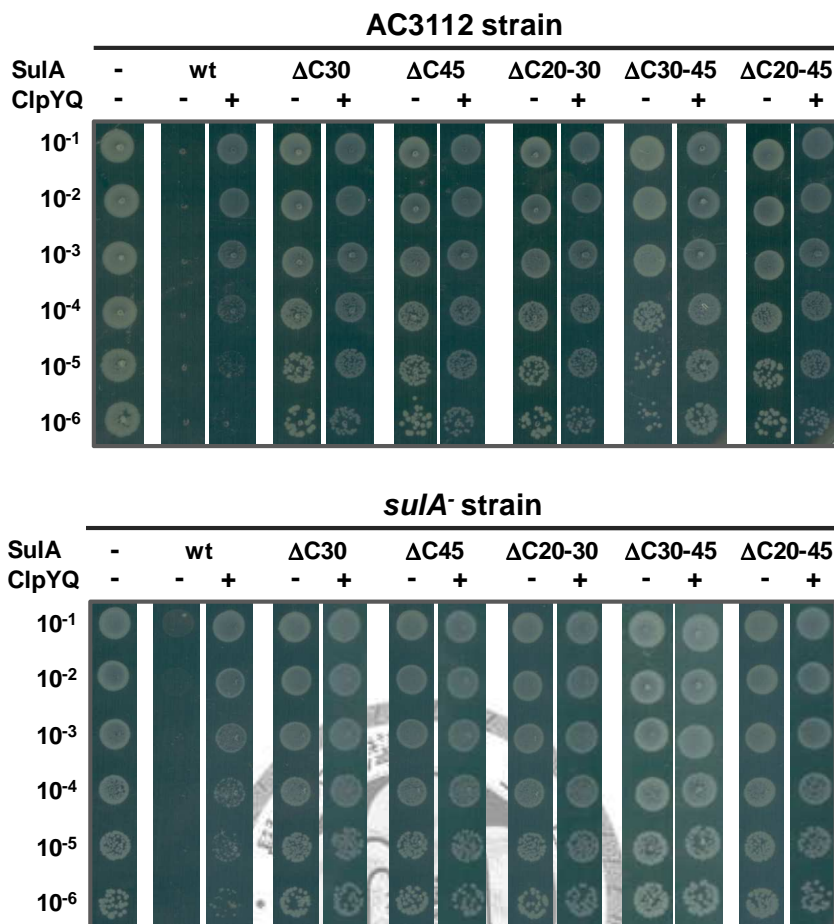


圖十、SulA ΔC10 和 SulA ΔC20 突變蛋白活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形
Figure 10. The activity of SulA ΔC10 / SulA ΔC20 and the degradation by ClpYQ.

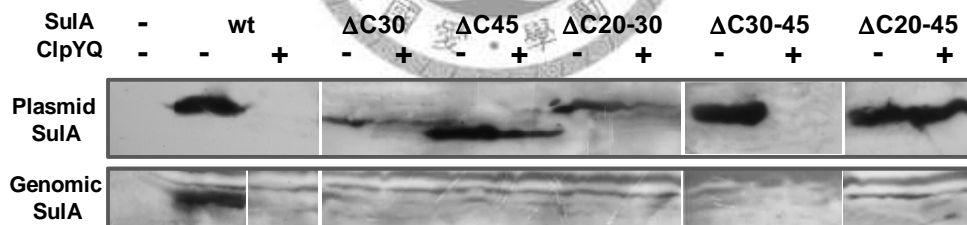
A. 在 AC3112 菌株 (左) 或 *sulA*⁻ 菌株 YT10010 (右) 中, 分別誘導 (+) 或抑制 (-) ClpYQ 蛋白酶表現, 經序列稀釋後滴在含有 1 mM IPTG 之培養基。

B. 以西方墨點法偵測 SulA 蛋白累積情形, 分別誘導 (+) 或抑制 (-) ClpYQ 蛋白酶表現後, 以 anti-HA 抗體偵測質體上 SulA 蛋白的表現, 以 anti-FLAG 抗體偵測染色體上 SulA 蛋白的表現。

A



B

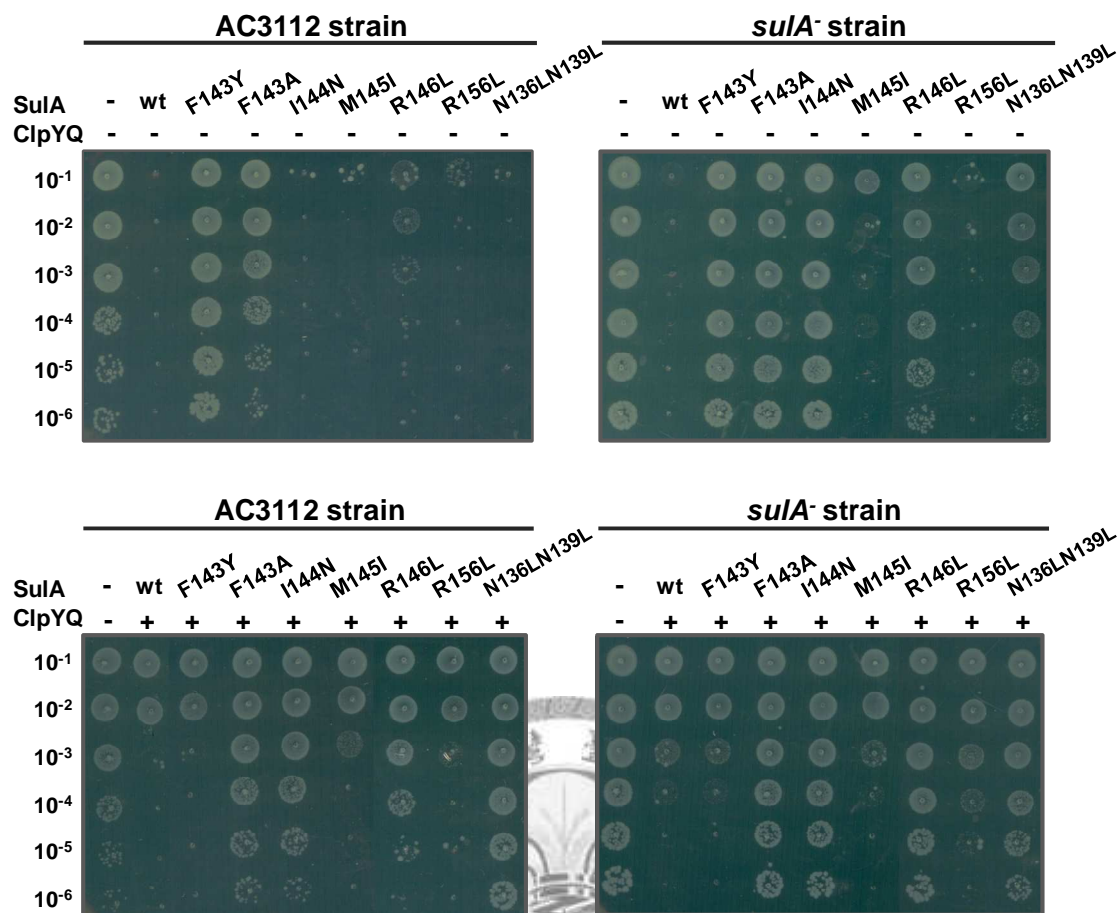


圖十一、二級結構缺失之 SulA 突變蛋白活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形
Figure 11. The activity of SulA deletion mutants and the degradation by ClpYQ.

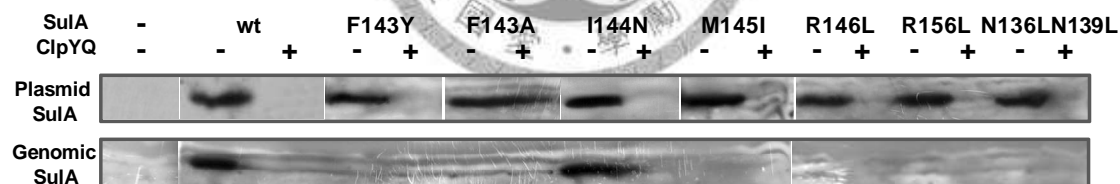
A. 在 AC3112 菌株 (上) 或 *sulA*⁻ 菌株 YT10010 (下) 中, 分別誘導 (+) 或抑制 (-) ClpYQ 蛋白酶表現, 經序列稀釋後滴在含有 1 mM IPTG 之培養基。

B. 以西方墨點法偵測 SulA 蛋白累積情形, 分別誘導 (+) 或抑制 (-) ClpYQ 蛋白酶表現後, 以 anti-HA 抗體偵測質體上 SulA 蛋白的表現, 以 anti-FLAG 抗體偵測染色體上 SulA 蛋白的表現。

A



B

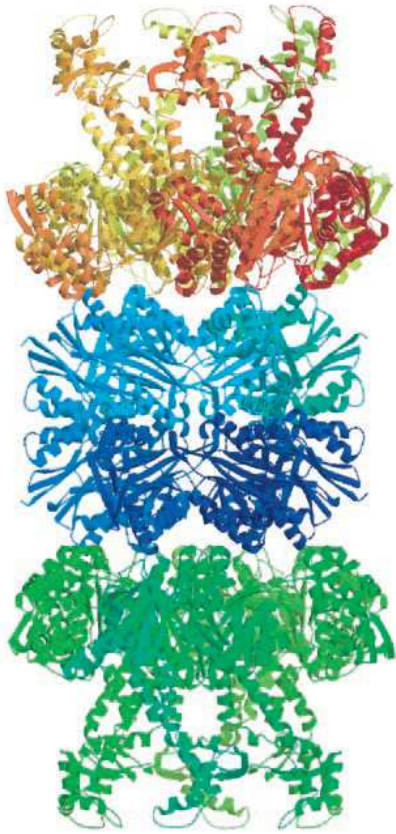
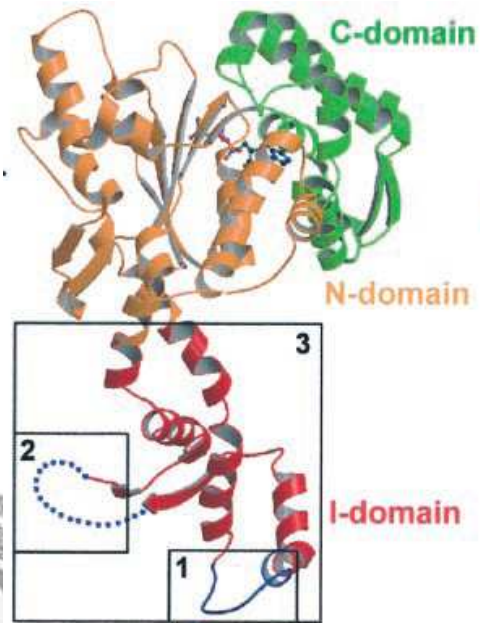


圖十二、SulA 點突變蛋白之活性表現及受 ClpYQ 蛋白酶降解之情形

Figure 12. The activity of SulA point mutants and the degradation by ClpYQ.

A. 在 AC3112 菌株 (左) 或 *sulA*⁻ 菌株 YT10010 (右) 中，分別抑制 (上) (-) 或誘導 (下)(+) ClpYQ 蛋白酶表現，經序列稀釋後滴在含有 1 mM IPTG 之培養基。

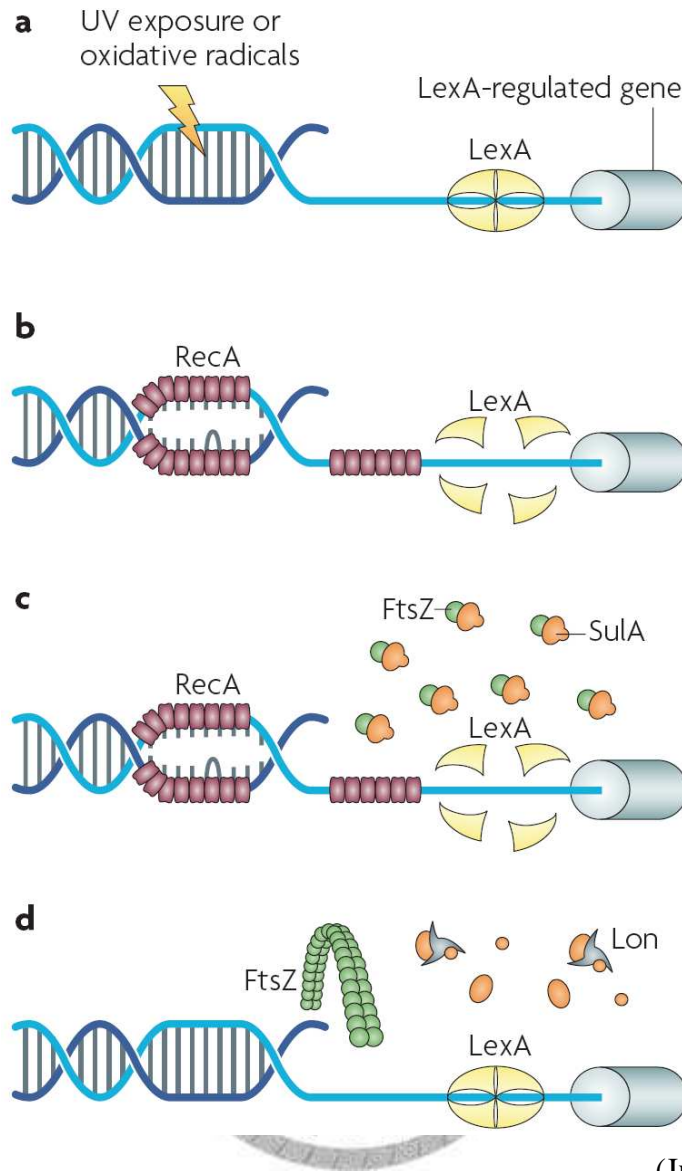
B. 以西方墨點法偵測 SulA 蛋白累積情形，分別誘導 (+) 或抑制 (-) ClpYQ 蛋白酶表現後，以 anti-HA 抗體偵測質體上 SulA 蛋白的表現，以 anti-FLAG 抗體偵測染色體上 SulA 蛋白的表現。

A**B**(Song *et al.*, 2000)

附圖一、大腸桿菌 ClpYQ 結構圖

Appendix figure 1. The structure of ClpYQ complex from *E. coli*.

A. 大腸桿菌 ClpYQ 複合體之結構，是由四個平行排列的圓環所組成，中間部份為兩個 ClpQ 之六元環構成活性中心，上下則是兩個 ClpY 的六元環，以相反方向接合形成 YQQY 之複合體。**B.** 大腸桿菌 ClpY 之結構，由三個 domain 組成，分別是 N-domain、C-domain 及 I-domain，其中 I-domain 上具有兩個 loop 的結構。

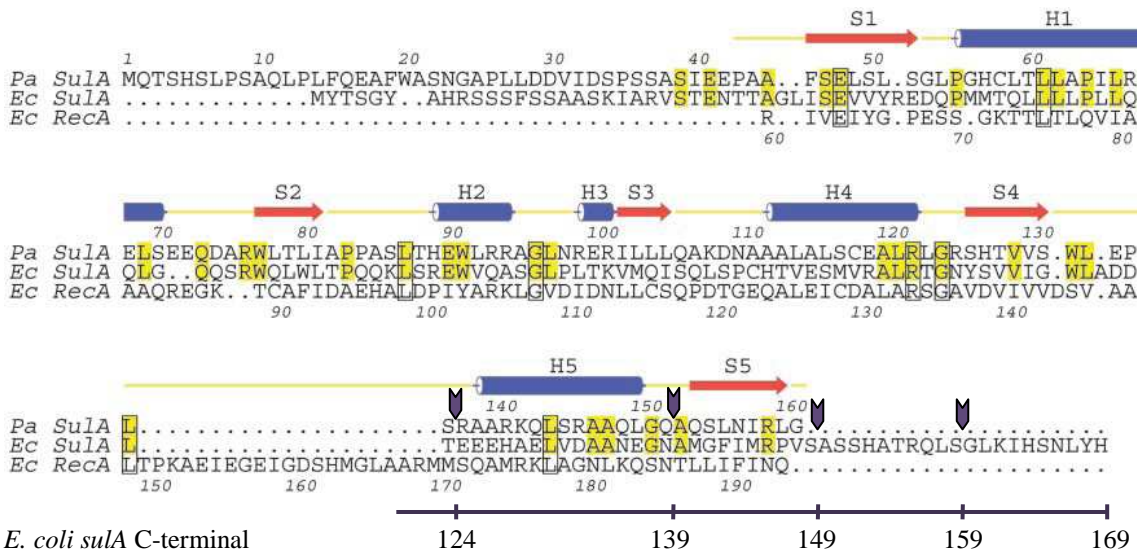


(Justice *et al.*, 2008)

附圖二、SOS 反應

Appendix figure 2. The SOS response.

a. 當受到 UV 輻射或自由基氧化壓力，而造成染色體 DNA 損傷時，會誘發 SOS 反應，在轉錄上誘導將近 30 個基因表現，促進受損 DNA 的修復，避免傳到子代細胞中。**b.** 因受損造成的單股 DNA 會與細胞中的 recombinase (RecA) 結合，而聚集的 RecA 促使 SOS 轉錄抑制物 LexA 的自我水解，啟動 SOS 反應。**c.** LexA regulon 中細胞分裂抑制物 Sula 的表現，與細胞分裂蛋白 FtsZ 結合，抑制 FtsZ 的聚合導致細胞分裂停止。**d.** 直到 DNA 修復完成，LexA 重新抑制 SOS 基因表現，細胞中蛋白酶將剩餘 Sula 降解，恢復細胞分裂。



(Suzanne *et al.*, 2003)

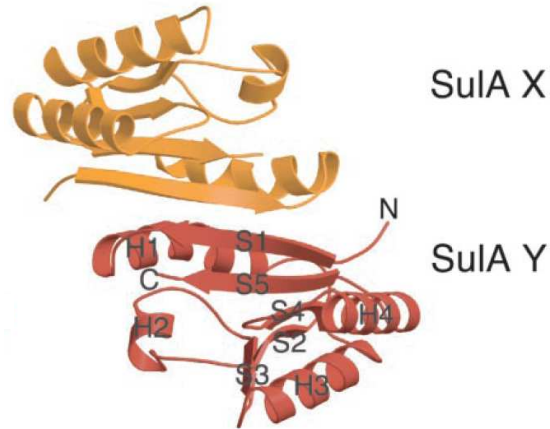
附圖三、大腸桿菌及綠膿桿菌之 SulA 胺基酸序列比對

Appendix figure 3. Structure-based sequence alignment.

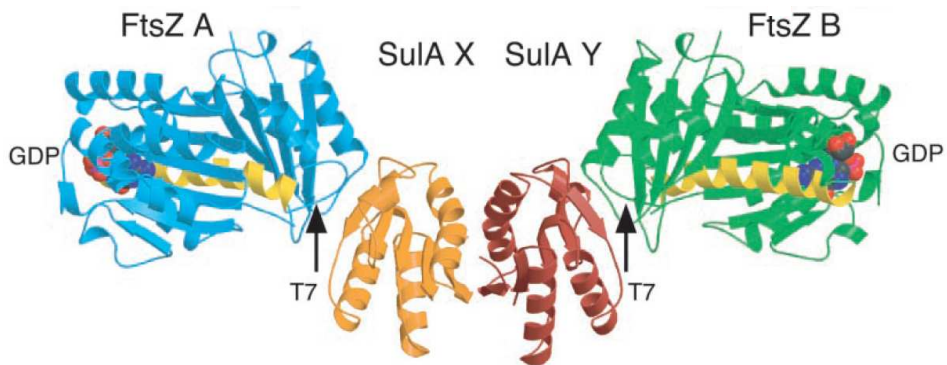
大腸桿菌與綠膿桿菌之 SulA 結構序列比對圖，Pa SulA 為綠膿桿菌之 SulA 序列，Ec SulA 為大腸桿菌之 SulA 序列，兩者相同度為 32%。圖示 ▾ 為 SulA 之缺失突變蛋白切位，最下方數字為大腸桿菌之 SulA 胺基酸序列。



A



B

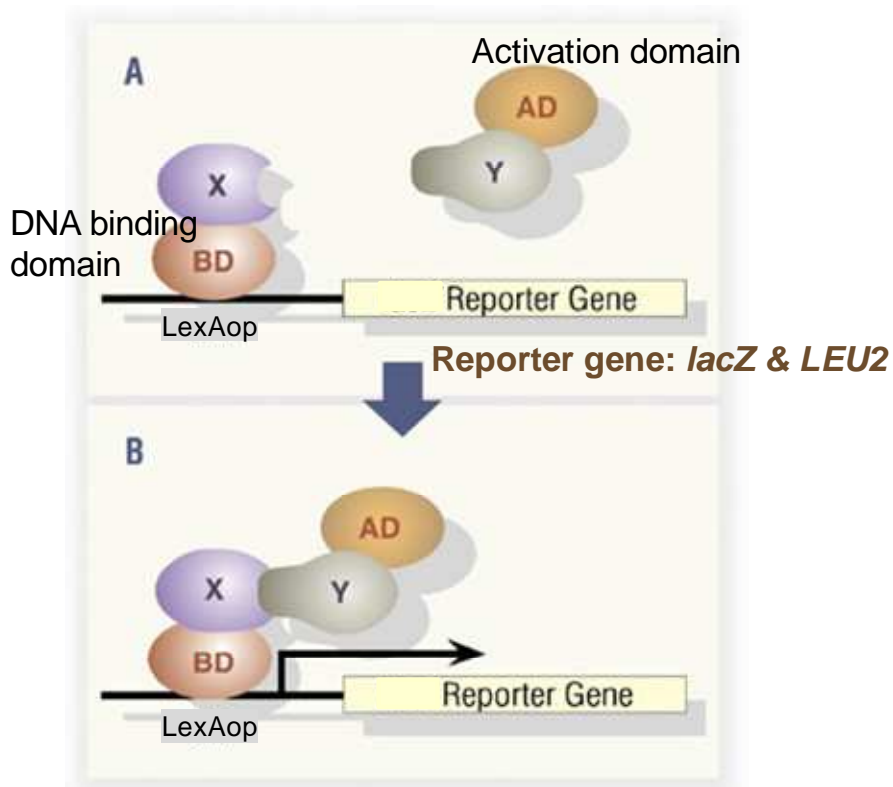


(Suzanne *et al.*, 2003)

附圖四、綠膿桿菌之 SulA 結構圖

Appendix figure 4. The crystal structure of SulA dimer and SulA:FtsZ complex.

A. SulA 之二聚體 (dimer) 形式，由單體的 S1 和 H1 與另一單體的相對位置結合，其中 β -strands 相互平行排列，形成一橫越二聚體的 β -sheet 平板。**B.** SulA 二聚體的外側兩端 S3 和 H3 部份，分別與 FtsZ 結合以阻斷 FtsZ 的聚合作用，達到抑制細胞分裂。



附圖五、酵母菌雙雜交系統之報導基因表現示意圖

Appendix figure 5. Expression of the reporter gene in yeast two-hybrid system.

AD (activation domain) 具轉錄活化的功能，BD (DNA binding domain) 可與 LexA 操縱子序列結合，當 X 與 Y 蛋白之間有交互作用時，會使得 AD 與 BD 靠近，因而啟動下游報導基因 *lacZ* 及 *LEU2* 的表現。