

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學所

博士論文

Graduate Institute of Agricultural Chemistry

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

大腸桿菌 $clpQ^+clpY^+$ 及 $gspS^+$ 基因之研究：

基因之調控及其基質辨識

Investigation of $clpQ^+clpY^+$ and $gspS^+$ in *Escherichia coli*:
gene regulation and substrate recognition

連湘芸

Hsiang-Yun Lien

指導教授：吳蕙芬 博士

Advisor : Whi-Fin Wu, Ph. D.

中華民國九十八年六月

June, 2009

誌謝

從大學、研究所到博士班，在公館學園待了整整十四年，終於要畢業了！論文能順利完成，要感謝的人真的很多。首先，感謝 吳蕙芬教授對我的悉心指導，使我這個駑鈍的學生總是感受到老師無限的耐心，以及循循善誘的苦心；而老師專注嚴謹的實驗態度更是我學習的典範。

口試期間，承蒙 楊盛行教授、陳昭瑩教授、杜宜殷教授、張傳雄教授及張世宗教授，細心審閱逐字簽正、並提供許多寶貴的意見，使論文內容更趨完備，學生在此致上最誠摯的謝意。也感謝李佳音教授、賈景山教授、林俊宏教授及林乃君教授在資格考及預審時，對研究方向及內容給予精闢的見解，使本論文架構更清楚明白。也謝謝劉瑞芬教授與李佳音教授於實驗期間不吝提供實驗室及儀器，使論文能順利完成。

此外，感謝所有曾在實驗室一起工作的伙伴們，因為你們使一成不變的生活變得活潑有趣。也感謝電子大樂隊暨粉絲團的狐群狗黨，你們是讓我心情愉快的最佳特效藥！

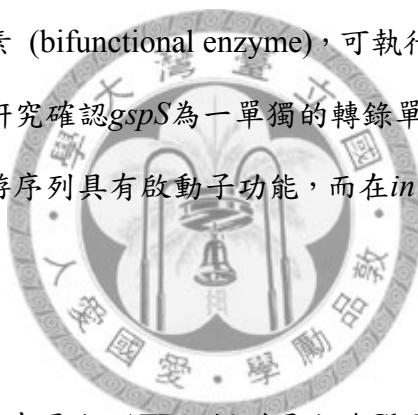
還有我最最親愛的家人，感謝爹娘在精神及金錢上的陪伴與支持，以及弟弟風雨無阻的接送，讓我能無後顧之憂地完成論文。

最後，謹向這幾年被我殺死以及弄殘的*Escherichia coli*大軍致敬！

摘要

熱休克蛋白普遍存在於生物體內，作用為幫助生物抵抗環境衝擊。本文針對大腸桿菌熱休克蛋白ClpYQ (HslUV)的基因調控及基質辨識深入研究。遇到環境衝擊時，大腸桿菌會發生熱休克反應，此時折疊錯誤的蛋白促使細胞內熱休克基因表現，這些表現常由調控蛋白sigma factor，如RpoH (或稱 σ^{32}) 所調控。本文使用大腸桿菌熱休克基因 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子與報導基因 $lacZ$ 建構轉錄融合基因 $clpQ^+::lacZ$ (op)及轉譯融合基因 $clpQ^+::lacZ$ (pr)，利用噬菌體 λ RS45將融合基因 $clpQ^+::lacZ$ 帶入野生株及 $rpoS^-$ ， $rpoH^-$ ， $rpoH^-rpoS^-$ 突變株後，偵測 β -galactosidase活性以瞭解 $clpQ^+::lacZ$ 的表現。當溫度由30°C升至42°C時，野生株及 $rpoS^-$ 突變株的 β -galactosidase活性上升，但 $rpoH^-$ 及 $rpoH^-rpoS^-$ 突變株則未見此現象。由 β -galactosidase 活性分析與北方點墨法分析結果，可知 $clpQ^+::lacZ$ 轉錄的mRNA訊號強度與 β -galactosidase活性成正比，且 $clpQ^+::lacZ$ 與 $clpQ^+clpY^+$ 的表現相似。針對 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子上 σ^{32} ($rpoH$) 可辨識的保守序列做C→T點突變，此突變使融合基因 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 無法被 σ^{32} 活化， β -galactosidase活性下降。經由遺傳分析結果證實，大腸桿菌 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子可被 σ^{32} 辨識。此外， $clpQ^+clpY^+$ operon的五端未轉譯區域 (5'-UTR)，亦即轉錄起始處 (transcription start site) 與起始密碼 (start codon) 之間，長度為71 bp，此五端未轉譯區域帶有一段inverted repeat sequence (IR序列) 5' CC CCGTAC TTTTGTACGGGG 3'，此IR序列普遍存在於腸道菌的 $clpQ^+clpY^+$ 五端未轉譯區域中。藉由刪除此段IR序列，並與 $lacZ$ 融合，分析融合基因 $clpQ^{m2}\Delta 40bp::lacZ$ 的 β -galactosidase 活性，以及此段序列缺失對ClpQ與ClpY間交互作用的影響，顯示IR所形成的stem-loop二級結構在 $clpQ^+clpY^+$ 表現時，具有穩定mRNA的效果，本研究為ATP依賴型蛋白酶 (ATP-dependent protease)中，首次發現5' stem-loop結構具有穩定下游mRNA的功能。在基質辨識的研究部分，ClpYQ以六元環方式組合，其中ClpY負責基質辨識，打開基質結構，並傳送至ClpQ進行分解。ClpY可分為三個作用區(domain)，

N-terminal domain，I-intermediated domain及C-terminal domain，N domain具有ATPase的功能，C domain則與self-oligomerization及ClpQ的蛋白酶活性相關。本文使用酵母菌雙雜交系統，得知ClpY的I domain負責基質辨識，C domain則可與ClpQ作用，而I domain中的loop L2(175-209 aa)除了與基質結合外，並與後續的基質傳遞及分解相關。另外，本文亦研究大腸桿菌的酵素glutathionylspermidine synthetase之基因*gspS*，由於病原蟲*Trypanosomatida*會造成人類昏睡，發炎及死亡，而酵素TryS為此種病原蟲所特有，在人類細胞中不存在，所以TryS的研究對治療*Trypanosomatida*所造成的疾病極為重要，本文針對大腸桿菌中與TryS構造及功能皆相似的酵素GspS，其基因表現之調控做一初步的探討。大腸桿菌的*gspS* 長1860 bp，產物為glutathionylspermidine synthetase (GspS)，共有619個胺基酸，是一種具有雙重功能的酵素 (bifunctional enzyme)，可執行GSH和spermidine之間醯胺鍵的合成與分解。本研究確認*gspS*為一單獨的轉錄單位而非以操縱子形式存在，且GspS起始密碼上游序列具有啟動子功能，而在*in vivo*情況下，H₂O₂與BaeR都可誘導*gspS*之表現。



關鍵詞：大腸桿菌；熱休克蛋白；ATP依賴型蛋白酶ClpYQ(HslUV)；啟動子活性；基因調控；RNA二級結構；mRNA穩定性；基質辨識；麩氨基硫—精胺質合成酶。

Abstract

(1) Heat shock responses are typically observed in *E. coli*. Upon heat shock, protein misfolding leads to a cascade of intracellular protein synthesis, usually dependent on a sigma factor, i.e., σ^{32} , for their gene expression. In this study, the transcriptional (op) or translational (pr) *clpQ*⁺::*lacZ* fusion gene was constructed, with the *clpQ*⁺*clpY*⁺ promoter fused to a *lacZ* reporter gene. The *clpQ*⁺::*lacZ* (op or pr) fusion gene was each crossed into lambda phage. The λ *clpQ*⁺::*lac* (op), a transcriptional fusion gene, was used to form lysogens in the wild-type, *rpoH*⁻ or/and *rpoS*⁻ mutants. Upon shifting the temperature up from 30 °C to 42 °C, the wild-type λ *clpQ*⁺::*lacZ*(op) demonstrates an increased β -galactosidase activity. However, the β -galactosidase activity of *clpQ*⁺::*lacZ*(op) was decreased in the *rpoH*⁻ and *rpoH*⁻*rpoS*⁻ mutants but not in the *rpoS*⁻ mutant. The levels of *clpQ*⁺::*lacZ* mRNA transcripts correlated well to their β -galactosidase activity. Similarly, the expression of the *clpQ*⁺::*lacZ* gene fusion was nearly identical to the *clpQ*⁺*clpY*⁺ transcript under the *in vivo* condition. The *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ*, containing a C to T point mutation in the -10 promoter region for RpoH binding, showed decreased β -galactosidase activity, independent of activation by RpoH. Thus, through a genetic analysis, the *clpQ*⁺*clpY*⁺ promoter is *in vivo* recognized by σ^{32} . The transcriptional start point of the *clpQ*⁺*clpY*⁺ gene lies 71 bases upstream from the *clpQ*⁺ start codon. An untranslated region (UTR) upstream of this mRNA contains a 20 bp inverted repeat (IR) sequence 5'CCCCGTACTTTTGTAC GGGG3', which is unique for the *clpQ*⁺*clpY*⁺ operon. In addition, from the wild bacterial genome, the 5'UTR of *clpQ*⁺*clpY*⁺ also exists in other bacterial species. The *clpQ*⁺*clpY*⁺ message carries a conserved 71 bp at the 5' untranslated region (5'UTR) that is predicted to form the stem-loop structure by analysis of its RNA secondary structure. The *clpQ*^{m2} Δ 40bp::*lacZ*, with a 40 bp

deletion in the 5'UTR, showed a decreased β -galactosidase activity. In addition, from our results, it is suggested that this stem-loop structure is necessary for the stability of the *clpQ*⁺*clpY*⁺ message. It is noteworthy that this is the first example in the ATP dependent protease to demonstrate that the 5' stem-loop structure itself participates in the stability of its downstream mRNA. (2) Regarding ClpY substrate recognition study, in the presence of ATP, the ClpYQ complex forms an active protease with an Y⁶Q⁶Q⁶Y⁶ configuration. ClpY binds, unfolds, and transfers the substrates outside the cylinder into a catalytic core where ClpQ degrades the substrates. The ClpY molecule is divided into three domains: the N-terminal domain, I-intermediate domain and C-terminal domain. The N domain has an ATPase activity, and the C domain is responsible for self-oligomerization of ClpY. Using the yeast two-hybrid system, we show that domain I of ClpY is responsible for recognition of its natural substrates while domain C is necessary for association with ClpQ. The loop 175-209 aa plays a role in substrate tethering. (3) In addition to *clpQ*⁺*clpY*⁺, *gspS*⁺ in *Escherichia coli* is included in this study. Parasitic *Trypanosoma* species cause serious tropical diseases such as kala-azar, African sleeping sickness, and Chagas diseases. Trypanothione synthetase (TryS) is a protein unique to *Trypanosoma*. However, *Escherichia coli* produce only the metabolic intermediate GspdSH by enzyme GspS, but not trypanothione. Evolutionary, TryS and GspS share the similarly functional domains. The *gspS* of *E. coli*, encoding a bifunctional enzyme GspS of 619 amino acids, is a gene with 1860 bp. GspS is responsible for the activities of amidase and synthetase between GSH and spermidine. In this study, we showed that *gspS* in *E. coli* is a unique transcriptional unit, and the singular promoter was present in the upstream region of the GspS structural gene. In addition, the *gspS* promoter is *in vivo* induced by H₂O₂ and Baer.

Key Words: *Escherichia coli*; heat shock; ATP dependent protease ClpYQ(HslUV); promoter activity; gene regulation; mRNA stability; substrate recognition; glutathionylspermidine synthetase (GspS).



目錄

誌謝	i
摘要	ii
Abstract.....	iv
目錄	vii
表目錄	x
圖目錄	xi
已發表文章	xii
第一章 前言	1
1.1 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 研究源起	1
1.2 熱休克蛋白 (heat shock proteins) 與 ATP 依賴型蛋白酶 (ATP-dependent protease) 簡介.....	1
1.3 ClpYQ 蛋白酶之簡介	2
1.3.1 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 操縱子 (operon) 的發現及命名	2
1.3.2 ClpYQ 為熱休克蛋白的證據	3
1.4 ClpYQ 為 ATP 依賴型蛋白酶之研究	3
1.4.1 ClpY 為 ATPase 之研究	3
1.4.2 ClpY 具 chaperone 功能之研究	4
1.4.3 ClpYQ 蛋白酶為 Threonine 蛋白酶	5
1.4.4 ClpYQ 蛋白酶為 ATP 依賴型蛋白酶	6
1.5 ClpYQ 蛋白複合體的結構	7
1.5.1 ClpQ 及 ClpY 可形成複合體	7
1.5.2 由蛋白分子量推測 ClpYQ 蛋白複合體結構	7
1.5.3 由電顯影像分析 ClpYQ 蛋白複合體結構	8
1.6 ClpYQ 蛋白酶基質辨識區域之相關研究	9
1.7 ClpYQ 蛋白酶基質之研究	10
1.7.1 ClpYQ 蛋白酶可分解異常蛋白 (abnormal proteins)	10
1.7.2 ClpYQ 蛋白酶可分解 Sula	10
1.7.3 ClpYQ 蛋白酶可分解 RcsA	12
1.8 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 實驗目的	12
1.9 <i>gspS</i> ⁺ 研究源起	13
1.10 GspdSH 簡介	14
1.10.1 GspdSH 組成物質: GSH 及 spermidine	14
1.10.2 大腸桿菌中 GspdSH 及其合成酵素 GspS 相關之研究	15
1.11 雙成份控制系統 BaeSR 之研究	17
1.12 <i>gspS</i> ⁺ 實驗目的	19
第二章 調控蛋白 sigma factors 對 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 表現的影響	21

2.1 摘要	21
2.2 材料與方法	21
2.2.1 建立 $clpQ^+clpY^+$ 上游啟動子區域 (promoter region) 表現系統	21
2.2.2 β -galactosidase 活性分析	24
2.2.3 北方點墨法 (Northern blotting)	25
2.2.4 引子延伸實驗 (primer extension)	26
2.3 結果	28
2.3.1 $clpQ^+::lacZ$ 轉錄及轉譯融合基因的表現	28
2.3.2 RpoH 對 $clpQ^+::lacZ$ 基因表現的影響	28
2.3.3 $clpQ^{m1}::lacZ$ 啟動子上的點突變對 $clpQ^{m1}::lacZ$ 基因表現的影響	31
2.3.4 $clpQ^{m(c\rightarrow)}::lacZ$ 及 $clpQ^{m1}::lacZ$ 啟動子上的點突變不影響轉錄起始點	32
2.3.5 $clpQ^+clpY^+$ 操縱子 (operon) 的 mRNA 表現與 $clpQ^+::lacZ$ 的 β -galactosidase 活性	32
2.3.6 不同蛋白酶缺失對 $clpQ^+::lacZ$ 的影響	33
2.4 討論	34
第三章 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子五端未轉譯區域 (5'-UTR) 對 ClpQ 表現的影響	36
3.1 摘要	36
3.2 材料與方法	36
3.2.1 建立 AC3112($cpsB::lacZ$)/pBAD33- $clpQ$ /pBAD24- $clpY$ 表現系統	36
3.2.2 AC3112/pBAD33- $clpQ$ /pBAD24- $clpY$ 中, ClpYQ 對兩種基質 ResA 及 Sula 的分解能力測試	38
3.2.3 β -galactosidase 活性分析	39
3.2.4 北方點墨法 (Northern blotting)	39
3.2.5 mRNA 穩定性測試	41
3.2.6 西方點墨法 (Western blotting)	41
3.2.7 預測 RNA 二級結構所使用的網站	43
3.3 結果	43
3.3.1 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子的五端未轉譯區域 (5'-UTR) 對 $clpQ^+::lacZ$ 表現的影響	43
3.3.2 五端未轉譯區域 (5'-UTR) 中的 IR 序列對 $clpQ^+clpY^+$ 表現的影響	44
3.3.3 IR 序列所形成的 stem-loop 結構對 $clpQ^+clpY^+$ 表現的影響	46
3.4 討論	47
第四章 ClpY 基質辨識位置之探討	49
4.1 摘要	49
4.2 材料與方法	49

4.2.1 酵母菌雙雜交系統的菌株、載體及培養基	49
4.2.2 <i>leu2</i> expression : 生長測試	50
4.2.3 <i>lacZ</i> expression : X-gal 測試	50
4.2.4 <i>lacZ</i> expression : β -galactosidase 活性分析	51
4.2.5 ClpY 及其突變分解基質之偵測	52
4.3 結果	52
4.3.1 ClpY 基質辨識 : ClpY $^{\Delta I+7Gly}$ 及 ClpY $^{\Delta L1, \Delta L2}$ 與 SulA 之間沒有交互作用	52
4.3.2 ClpY 基質辨識 : loopL2 上的點突變 ClpY L199Q 造成 ClpY L199Q /ClpQ 無法分解基質	53
4.3.3 ClpY 基質辨識 : ClpY 的基質辨識與 loopL2 上的疏水性胺基酸密切相關	53
4.3.4 ClpY 與 ClpQ 之交互作用 : ClpY $^{\Delta L1}$, ClpY $^{\Delta L2}$, ClpY $^{\Delta L1, \Delta L2}$ 及 ClpY $^{\Delta I+7Gly}$ 能與 ClpQ E61C 結合, ClpY $^{\Delta c}$, ClpYX 則否	54
4.4 討論	55
第五章 大腸桿菌 <i>gspS</i> 基因表現之調控	56
5.1 摘要	56
5.2 材料與方法	56
5.2.1 建立 <i>gspS</i> 上游啟動子區域表現系統	56
5.2.2 β -galactosidase 活性分析	58
5.2.3 預測啟動子、密碼子及操縱子所使用的網站	58
5.3 結果	59
5.3.1 <i>gspS</i> 上游序列之探討	59
5.3.2 影響 <i>gspS</i> 表現的因素	64
5.4 討論	67
參考文獻	69

表目錄

表一、使用於 <i>clpQ⁺clpY⁺</i> 之研究的菌株	76
表二、使用於 <i>clpQ⁺clpY⁺</i> 之研究的載體與噬菌體	77
表三、使用於 <i>clpQ⁺clpY⁺</i> 之研究的引子	78
表四、使用於 <i>gspS</i> 之研究的菌株.....	79
表五、使用於 <i>gspS</i> 之研究的載體與噬菌體.....	80
表六、使用於 <i>gspS</i> 之研究的引子.....	81
表七、操縱子預測結果	82
表八、SG20250/pRS415- <i>gspS-lacZ</i> (op)與 SG20250/ λ RS45- <i>gspS-lacZ</i> 的 β -galactosidase 活性分析.....	83
表九、BaeR 對 <i>gspS-lacZ</i> 表現之影響.....	84
表十、BaeR 與 H ₂ O ₂ 對 <i>gspS-lacZ</i> 表現的影響	85



圖目錄

圖一、 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 操縱子的啟動子區域之序列圖示	86
圖二、不同長度的轉錄及轉譯融合基因 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> 之活性	87
圖三、 <i>wt</i> , <i>rpoS</i> ⁻ , <i>rpoH</i> ⁻ , <i>rpoS</i> ⁻ <i>rpoH</i> ⁻ 四種菌株內，42 °C 對 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> 的熱誘導	88
圖四、42 °C 對 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> 熱誘導受啟動子點突變(C→T)的影響	89
圖五、啟動子點突變 (A→C) 對 <i>clpQ</i> ^{m1} :: <i>lacZ</i> 表現的影響	90
圖六、 <i>clpQ</i> ⁺ 啟動子點突變對轉錄起始點(+1)沒有影響	91
圖七、 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> 與 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 在 30°C 時的 mRNA 表現	92
圖八、蛋白酶缺失對 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> 表現的影響	93
圖九、去除 5'-UTR 對 <i>clpQ</i> ^{m2} Δ40bp:: <i>lacZ</i> 表現的影響	94
圖十、五端未轉譯區域 (5'-UTR) 中的 IR 序列對 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 表現的影響	95
圖十一、IR 序列對 ClpQ/ClpY 交互作用之影響	96
圖十二、IR 序列所形成的 stem-loop 結構對 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 表現的影響	97
圖十三、不同菌種間 <i>clpQ</i> ⁺ <i>clpY</i> ⁺ 五端未轉譯區域(5'-UTR)保守性序列之比對	98
圖十四、ClpY 三個主要作用區示意圖	99
圖十五、ClpY 的 loop L1 與 loop L2 與 SulA 間交互作用之結果。 .100	
圖十六、四組 ClpY 點突變 M187I, A188S, L199Q, N205K 與基質結合及分解基質能力	101
圖十七、三組 ClpY 突變 I186N, E193L, E194L, Q198L, Q200L 與基質結合及分解基質能力	102
圖十八、帶有 ClpQ ^{E61C} /ClpY 融合蛋白的 EGY48/p8op- <i>lacZ</i> , 其 Leu2 的表現	103
圖十九、 <i>gspS</i> 上游區域之啟動子預測	104
圖二十、 <i>gspS</i> 上游區域的編碼區預測	105
圖二十一、啟動子與編碼區預測結果比較	106
圖二十二、編碼區與操縱子預測結果比較	107
圖二十三、 <i>gspS-lacZ</i> 融合基因之建構	108
圖二十四、H ₂ O ₂ 對 <i>gspS-lacZ</i> 表現的影響	109
圖二十五、BaeR 與 H ₂ O ₂ 對 HY1002(<i>gspS-lacZ</i>) 的生長狀況之影響	110
圖二十六、H ₂ O ₂ 對 HY1002(<i>gspS-lacZ</i>) 的生長狀況之影響	111
附圖一、大腸桿菌 ClpYQ 結構圖	112

已發表文章

Lien HY, Yu CH, Liou CM, Wu WF. (2009) Regulation of *clpQY* (*hslVU*) Gene Expression in *Escherichia coli*. *Open Microbiol J.* **3**, 29-39.

Lien HY, Shy RS, Peng SS, Wu YL, Weng YT, Chen HH, Su PC, Ng WF, Chen YC, Chang PY, Wu WF. (2009) Characterization of the *Escherichia coli* ClpY (HslU) substrate recognition site in the ClpYQ (HslUV) protease using the yeast two-hybrid system. *J Bacteriol.* **191(13)**, 4218-31.



第一章 前言

1.1 *clpQ*⁺*clpY*⁺研究源起

本文針對大腸桿菌熱休克蛋白 ClpYQ (HslUV)之基因調控及基質辨識做深入探討。熱休克蛋白一詞源於果蠅唾腺細胞受熱之研究，將溫度提高於正常生長溫度，會使細胞快速產生的蛋白質，統稱為熱休克蛋白 (heat shock protein)，而這種現象稱為熱休克反應(heat shock response)。

熱休克蛋白普遍存在於真核與原核細胞內，主要功能為幫助生物抵抗環境衝擊，細胞在遭遇高溫、重金屬、氧化、缺氧、發炎等環境壓力時，會產熱休克蛋白，此為細胞因應環境變化以求得生存的反應方式，所以這類蛋白質也稱為壓力蛋白質(stress protein)。

由於全球溫度逐漸升高，研究熱休克蛋白的基因調控，對於動植物適應高溫及其他逆境有極高之應用價值，且熱休克蛋白辨識其他蛋白質的功能，目前也已逐漸應用於癌症治療。本文針對原核生物大腸桿菌熱休克蛋白 ClpYQ (HslUV)之基因調控及基質辨識深入研究，以期增進對熱休克蛋白之瞭解，並有助於未來在科學及醫學上之應用。

1.2 熱休克蛋白 (heat shock proteins) 與 ATP 依賴型蛋白酶

(ATP-dependent protease) 簡介

當 *Esherichia coli* 受到熱休克衝擊時，細菌會產生一些熱休克蛋白 (heat-shock proteins) 來分解變質的蛋白 (denatured proteins) 或者幫助新合成的蛋白摺疊成正確的結構。因此，許多熱休克蛋白本身即為 chaperones 或蛋白酶。至今，熱休克的反應受到多種尚未完全了解的機制所調控，其所牽涉之調控基因包括 *rpoH* (Bukau,

1993; Yura *et al.*, 1993)、*htrC* (Missiakas *et al.*, 1996)等，這些基因轉譯之蛋白所調控的範圍包含一些 ATP 依賴型蛋白酶 (ATP-dependent protease) 如 Lon 及 Clp family 等熱休克蛋白的表現。Clp family 至少被分為 5 個 subfamilies，包括 ClpA、ClpB、ClpC、ClpX 及 ClpY。其中 ClpA/B/C 擁有兩段具保守性的 ATP binding-sites；ClpX 和 ClpY 僅具有一段具保守性的 ATP binding-site。

在 *E. coli* 中，已有許多 ATP 依賴型蛋白酶被發現，這些 ATP 依賴型蛋白酶，有些存在細胞質中，如 Lon 及 Clp 蛋白酶；有些則為膜蛋白，如 FtsH。Lon 蛋白酶可形成同單元聚合體；FtsH 可形成異單元聚合體，而 Clp 蛋白酶是由兩次單元所組成，分子量較小的次單元 (約 19k Da) 為 peptidase，ClpP 及 ClpQ (又名 HslV)；分子量較大的次單元為 ATPase，計有 ClpA (84 kDa)、ClpX (46 kDa) 及 ClpY (又名 HslU) (49 kDa)。其中，ClpA 或 ClpX 可和 ClpP 結合形成 ATP 依賴型蛋白酶 ClpAP 或 ClpXP；而 ClpY 則和 ClpQ 結合形成另一 ATP 依賴型蛋白酶 ClpYQ。



1.3 ClpYQ 蛋白酶之簡介

1.3.1 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 操縱子 (operon) 的發現及命名

clpQY/hslVU 基因序列由 Chuang 等人在 *E. coli* 中以基因選殖的方法發現 (Chuang *et al.*, 1993)。*clpQ*⁺*clpY*⁺ 位於 *E. coli* 基因圖譜的 88.9 分鐘處，可同時被轉錄成 mRNA，故為一組操縱子 (operon)。由於 *clpQ*⁺*clpY*⁺ operon 之 mRNA 活性經由熱誘導後為未熱誘導之 1.5 倍，且其上游啟動子 (promoter) 序列與可被 σ^{32} 辨識的啟動子保守序列相似，亦與 *groE* 及 *dnaK* 等熱休克基因 (heat-shock gene) 之啟動子保守序列相符 (Cowing *et al.*, 1985)，因此推論 *clpQ*⁺*clpY*⁺ operon 為熱休克基因，故由 “heat shock locus” 的意義而命名為 *hslV* 及 *hslU*。若以蛋白來分類，由於其蛋白層次具下列兩點特徵，因此將之分屬於 Clp family：(1) 從

胺基酸序列比對的結果發現，ClpQ 與真核生物 20S proteasome 中的 β -type 單體具相似度，應具蛋白酶的功能，於 Clp family 中可扮演蛋白酶的角色；(2) ClpY 在距蛋白 N 端 60 個胺基酸有一段可能為 ATP/GTP-binding motif 的序列 “GPTGVGKT”，係與之前被較深入研究的一種 ATP 依賴型蛋白酶 ClpA/ClpX-ClpP complex 中之 ATPase ClpA 相同，此外，ClpY 亦與 ClpX 的胺基酸序列有 50% 的相似度，故 ClpY 應屬於 Clp family 中負責基質辨識及 ATPase 的角色。由於此組操縱子於胺基酸比對上類似於 Clp family，因此，又被命名為 ClpYQ (Gottesman *et al.*, 1993)。

1.3.2 ClpYQ 為熱休克蛋白的證據

σ^{32} 為一些熱休克蛋白於轉錄階段時之調控蛋白，而 *clpQ⁺clpY⁺* operon 上游具有一段由 σ^{32} 辨識的啟動子序列。Chuang 等人經由 primer extension 確認此段序列為 *clpQ⁺clpY⁺* operon 之啟動子 (Chuang *et al.*, 1993)。Rohrwild 等人將 σ^{32} 選殖於具有 *lac* promoter fusion 的質體上，而後以 IPTG 誘導 σ^{32} 大量表現，發現 ClpYQ 蛋白的表現量增加約 10 倍，且於 ATP 存在時，水解 peptide Z-Gly-Gly-Leu-AMC 之能力亦提高約 10 倍 (Rohrwild *et al.*, 1996)。以上之證據均暗示 *clpQ⁺Y⁺* 受 σ^{32} 之調控，而 ClpYQ 可能為熱休克蛋白。

1.4 ClpYQ 為 ATP 依賴型蛋白酶之研究

1.4.1 ClpY 為 ATPase 之研究

Missiakas 等人針對 ClpY 中假設性的 ATP-binding site 作研究。實驗係將假設性的 ATP-binding site 中之 Gly59 置換成 Ala；或將 Gly61 置換成 Ala。結果發現：(1) 免疫沈澱的結果顯示，經置換過的 ClpY 蛋白無法如野生種的 ClpY 蛋白一般，可與 ClpQ 蛋白形成複合體而共同沈澱出來；(2) 帶有 *clpQ⁺clpY59*

的多倍數質體，並不能如帶 *clpQ⁺ clpY⁺* 的多倍數質體一般可使熱休克反應下降；
(3) 經純化所得的 ClpY59 及 ClpY61 失去胞外水解 ATP 的能力。由結果推論，存在於 *E. coli* 中之 ClpY 的 ATP-binding site “GPTGVGKT” 應與 ClpY 水解 ATP 的活性，及與 ClpY 和 ClpQ 蛋白形成複合體有關 (Missiakas *et al.*, 1996)。

Shin 等人亦針對 ClpY 的 ATP-binding site 作研究。利用定點突變的方式，將 ATP-binding site 中之 Lys63 置換成 Thr，而重組出 HslU/K63T 蛋白，並針對 HslU/K63T 與 HslU 蛋白作 ATP 水解能力及特性上的比較 (Shin *et al.*, 1996)。研究結果發現：(1) HslU/K63T 失去了水解 ATP 的功能；(2) HslU/K63T 無法在 ATP 存在下協同 ClpQ 分解基質 Z-Gly-Gly-Leu-AMC；(3) HslU/K63T 在純化過程中，無論 ATP 存在與否，均以單體 (50 kDa) 存在，而 HslU 蛋白於 ATP 不存在時以雙體之形式出現 (100 kDa)，於 ATP 存在時，則為分子量介於 350 至 450 kDa 之複合體；(4) HslU/K63T 較 HslU (ClpY) 蛋白不穩定，容易在純化過程中被分解成許多小片段蛋白。HslU/K63T 無論 ATP 或 ADP 是否存在，都極易被 Trypsin 分解，但是 HslU (ClpY) 於 ATP 或 ADP 存在時，可受其保護，因而不易被 Trypsin 分解。由以上的結果推論，位於 ATP-binding site 的 Lys63 對 ClpY 蛋白扮演著十分重要的角色，而 ATP-binding site 至少具有三個重要性：

(1) 水解 ATP；(2) 形成 ClpY 複合體的結構；(3) ClpY 與 ATP 結合，可增加 ClpY 的穩定性。

1.4.2 ClpY 具 chaperone 功能之研究

Seong 等人將純化所得的 ClpY (HslU) 和 MBP-SulA 及 FXa 一起置於 Tris-HCl 緩衝液中，測其混濁度，發現無論 ATP 存在與否，ClpY (HslU) 蛋白的存在可降低混濁度，即 ClpY (HslU) 可以阻止 SulA 的聚集 (Seong *et al.*, 2000)。此外，實驗結果亦發現 *E. coli. hsl* 突變菌株的生長較野生型好，此乃由於在 *hsl* 突變菌株中缺少 ClpY (HslU) 蛋白，故有部分 SulA 蛋白聚集失去活性，因此細胞生長較有 ClpY (HslU) 存在而能降低 SulA 蛋白聚集的野生型細胞好。以上的

實驗結果顯示無論於胞內或胞外，ClpY (HslU) 皆具有 molecular chaperone 的功能，能降低細胞分裂抑制物 SulA 之聚集。Seong 等人亦證實 ClpY 的 oligomerization，而非 ATP 水解，為 ClpY 具有 molecular chaperone 功能所必須 (Seong *et al.*, 2000)。

1.4.3 ClpYQ 蛋白酶為 Threonine 蛋白酶

Rohrwild 等人利用各種蛋白酶的抑制物，進行 ClpYQ 蛋白酶活性抑制實驗，以分析 ClpYQ 蛋白酶之特性。實驗結果發現，ClpYQ 蛋白酶分解 peptide Z-Gly-Gly-Leu-AMC 之能力會受到多種可抑制哺乳類 proteasome 的抑制物之抑制 (Rohrwild *et al.*, 1996)。這些抑制物包括 MG132 及 calpain inhibitor I、3, 4-dichloroisocoumarin 及 lactacystin，其中 3,4-dichloroisocoumarin 及 lactacystin 會修飾哺乳類及古細菌 (archaeobacteria) 之 proteasome 中 N 端的 Threonine。Rohrwild 等人將純化所得之 ClpQ 蛋白進行 N 端定序，發現 N 端有兩個 Thr 之殘基，推論此兩個 Thr 應與其蛋白酶活性有關。

由於 ClpQ 蛋白與真核生物中 20S proteasome 的 β -type subunit 蛋白具有同源性，且 N 端均有兩個連續的 Thr 殘基。Seemuller 等人對 *Thermoplasma acidophilum* 中 20S proteasome 之 β -type subunit 的研究報告，推測 ClpYQ 蛋白酶屬於 Threonine 蛋白酶，且 ClpQ 蛋白中的 Thr1 及 Thr2 與蛋白酶活性有關 (Seemuller *et al.*, 1995)。因此，Missiakas 等人針對 Thr1 及 Thr2 對 ClpQ 的活性影響作研究，分別將 ClpQ 的 Thr1 及 Thr2 置換成 Ala，而得到 HslV1 及 HslV2 兩重組蛋白，結果顯示 HslV2 完全失去其蛋白酶活性，並且於 *clpQY* 基因缺失的突變種中大量表現 *hslV2 hslU* 基因時，將無法像大量表現正常 *hslV hslU* 基因時，可抑制 puromycin，*hslV2 hslU:: Ω* 亦無法像 *hslV hslU:: Ω* 突變株可形成較小的菌落，這顯示 Thr2 與 ClpQ 的活性及 ClpYQ 蛋白酶的功能有關，ClpYQ 應屬於 Threonine 蛋白酶 (Missiakas *et al.*, 1996)。

1.4.4 ClpYQ 蛋白酶為 ATP 依賴型蛋白酶

Rohrwild 等人發現 ClpQ 抗體可降低 ClpYQ 蛋白酶的活性，且活性降低程度和 ClpQ 抗體濃度成正比關係，然而，利用 ClpY、ClpP、Lon 等抗體或是 preimmune serum 不影響 ClpYQ 蛋白酶的活性，由此推論 ClpQ 為 ClpYQ 蛋白酶水解活性所必須。此外，亦發現純化之 ClpYQ 蛋白僅於 ATP 存在時可分解 peptide Z-Gly-Gly-Leu-AMC，而 CTP、GTP、UTP、ADP、AMP 以及 ATP 的類似物 (analogue) AMP-PNP 皆無法取代 ATP 使 ClpYQ 蛋白酶分解 peptide，且當 ATP 存在時，水解 Z-Gly-Gly-Leu-AMC 的活性提高 150 倍，因而推論 ATP 水解為 ClpYQ 蛋白酶活性所必須 (Rohrwild *et al.*, 1996)。1996 年，Missiakas 等人亦發現在 ClpY 及 ATP 存在下，會大大增加 ClpQ peptidase 的水解活性 (Missiakas *et al.*, 1996; Rohrwild *et al.*, 1996)。

1996 年 Yoo 等人亦得到相同的實驗結果 (Yoo *et al.*, 1996)。Yoo 等人以多倍數質體大量表現 ClpYQ 以純化其蛋白，並對 ClpYQ 蛋白酶作特性分析。實驗結果發現：(1)利用膠體過濾法 (gel filtration) 無論 ATP 是否存在的情況下，均可純化得到 250 kDa 的 ClpQ 複合體，推測由 12~14 個 ClpQ 單體組成；(2)在 ATP 存在的情況下可得到 450 kDa 的 ClpY 複合體 (8~10 個單體)，但 ATP 不存在時則僅可得到 100 kDa 的 ClpY 複合體 (2 個單體)，這顯示 ATP 的存在與 ClpY 形成複合體有關；(3)ClpQ 單獨存在時其水解活性相當低；當 ATP 及 ClpY 同時存在時，ClpQ 水解 peptide Z-Gly-Gly-Leu-AMC 之能力劇烈提高，這顯示細胞中 ClpY 和 ClpQ 需在 ATP 的存在下協同作用；(4)ClpY 可水解 ATP，是一種 ATPase，而 ClpQ 存在時會刺激 ATPase 的活性達兩到四倍；(5)在 ATP 存在下，ClpQ 可水解 peptide Z-Gly-Gly-Leu-AMC，於 dATP、CTP、 α 、 β -methylene ATP 存在時，僅有 15~40% 的 peptide 被分解，此因其水解速度為 ATP 水解速度的 15~35%，由於 GTP 及 UTP 不被水解，故無法刺激 ClpQ 水解 peptide，而 ADP 及 AMP 並非 ClpY 之基質，因而無法刺激 ClpQ 水解 peptide。無法被水解的 ATP

之類似物 β,γ -methylene ATP 亦無法取代 ATP，促使 ClpYQ 蛋白酶分解 peptide，此結果顯示 ATP 水解為 ClpQY 蛋白酶活性所必須。綜合上述結果可知，細胞中 ClpY 和 ClpQ 需在 ATP 存在下協同作用，故 ClpYQ 蛋白酶為一 ATP 依賴型蛋白酶。

1.5 ClpYQ 蛋白複合體的結構

1.5.1 ClpQ 及 ClpY 可形成複合體

Rohrwild 等人在缺乏 Lon 及 ClpP 兩個 ATP 依賴型蛋白酶之菌株中，將 σ^{32} 選殖於具有 *lac* promoter fusion 的質體上，而後以 IPTG 誘導而大量表現 σ^{32} ，進而誘導 ClpYQ 蛋白的表現 (Rohrwild *et al.*, 1996)。於純化 ClpYQ 蛋白的過程中可得到分子量約 650~700 kDa 的部分，此結果顯示 ClpQ 及 ClpY 蛋白可能自己單獨或彼此相互結合形成複合物；亦可能有其他蛋白共同參與形成複合物。此外，在同時大量存在 ClpQ 及 ClpY 蛋白的情形下，可偵測出絕大部分水解 Z-Gly-Gly-Leu-AMC peptide 的活性。Rohrwild 等人更進一步利用 ClpQ 抗體，將 ClpQ 及 ClpY 蛋白共同沈澱出來，直接證明 ClpQ 及 ClpY 蛋白能形成具有水解活性之蛋白酶複合體。

1.5.2 由蛋白分子量推測 ClpYQ 蛋白複合體結構

Rohrwild 等人於 ATP 存在時，純化藉由誘導 σ^{32} 而增加 ClpYQ 表現之菌體中的 ClpYQ 蛋白，可流洗出一分子量介於 650 kDa 至 750 kDa 的蛋白，因 SDS-PAGE 偵測出這些具有活性的部分，至少含有 15 至 20 種其他的蛋白，Rohrwild 等人推測 ClpYQ 蛋白酶可能由 ClpQ 或 ClpY 蛋白彼此相互結合而形成，亦可能有其他蛋白參與複合體之形成，但於該菌體中無法純化出更純且帶有水解活性的 ClpYQ 複合體。於是，Rohrwild 等人進一步純化於多倍數質體上大

量表現的 ClpYQ 蛋白，結果發現 ClpYQ 可同時複合出現在分子量約 650-700 kDa 的部分，SDS-PAGE 僅偵測出兩個主要的蛋白，經西方雜交法確認為 ClpQ 及 ClpY 兩蛋白，其中大部分的 ClpQ 蛋白出現於 280~320 kDa 的部分，由於 ClpQ 的單體為 19k Da，故推測此複合體約含 14-16 個 ClpQ 單體；ClpY 大部分出現於 480~520 kDa 的部分，因 ClpY 單體的分子量為 50 kDa，故推測複合體至少含 10 個 ClpY 單體。

Yoo 等人則不論在 ATP 存在與否，皆可純化出分子量約 250 kDa 之 ClpQ 複合體，約含 12~14 個 ClpQ 單體 (Yoo *et al.*, 1996)。於 ATP 不存在時，純化得到分子量為 100 kDa 之 ClpY，應為 ClpY 之雙體；但在 ATP 存在時，可得到分子量為 450 kDa 之複合體，即包含 8~10 個 ClpY 單體。據此，Yoo 等人推測 ATP 在 ClpY 形成複合體之過程中扮演重要的角色。

Kessel 等人純化由帶有 *clpQ⁺clpY⁺* 基因之多倍數質體所大量表現的 ClpQ 和 ClpY 蛋白時，亦與 Rohrwild 等人的研究有相似的結果 (Kessel *et al.*, 1996)。Kessel 等人在 ATP 存在的條件下，經由 Superose 膠體過濾純化之過程，分離出分子量約 220 kDa 的 ClpQ 複合體 (約由 12 個單體組成) 及分子量約 350 kDa 的 ClpY 複合體 (約由 7 個單體組成)，以及分子量大於 600 kDa 的 ClpQ 和 ClpY 所組成的 ClpYQ 複合體 (推論含有 12 個 ClpQ 單體以及至少一組至兩組的 ClpY 六元體)。

1.5.3 由電顯影像分析 ClpYQ 蛋白複合體結構

Kessel 等人將純化之蛋白經負染處理後，以電子顯微鏡觀察，發現 ClpQ 的複合體是由六個次單體形成的環狀結構，直徑約 10~11 nm；ClpY 的複合體於 MgATP 存在時，在電子顯微鏡下呈現圓形，亦由六個次單體形成環狀的結構，較 ClpQ 略大，直徑約 13 nm。

Rohrwild 等人利用 TEM (transmission electron microscopy) 、STEM (scanning

transmission electron microscopy) 以及負染影像處理 (image processing of negatively staining) 的方法，對純化出的 ClpQ、ClpY 及 ClpYQ 蛋白複合體進行結構分析 (Rohrwild *et al.*, 1997)。結果發現，ClpQ 複合體為兩個環狀結構所組成，每個環狀結構由六個 ClpQ 單體組成。在 ATP、ADP 及無水解能力之 ATP 類似物 AMP-PNP 或是 ATP- γ -S 等核苷酸存在時，ClpY 可形成環狀複合物，直徑約 14 nm；但無上述核苷酸存在時，則無法看見該環狀複合物。因此，Rohrwild 等人推測 ATP 之結合而非 ATP 水解為 ClpY 形成複合體所必須。分析負染處理較佳之 ClpY 複合體，發現 ClpY 複合體之歧異度較 ClpQ 複合體為大，經對稱及數位分析，發現有 24% 之 ClpY 複合體呈現六元對稱，36% 呈現七元對稱，但有 40% 之 ClpY 複合體無法歸入上述兩對稱形式中。進一步分析 ClpY 複合體之結構，不論是利用 STEM 測量質量之分析，或利用 BS³ (bis(sulfosuccinimidyl) suberate) 進行 crosslinker 之實驗，皆可確認 ClpY 可由六或七個單體形成環狀複合結構。在 AMP-PNP 存在時，電子顯微鏡下可觀察到穩定存在之 ClpYQ 之複合體，該複合體由四個平行排列的環狀構造形成一圓柱體，其中由 ClpQ 複合體的兩個環狀結構組成蛋白酶的催化中心，ClpY 複合體的環狀結構則平貼於 ClpQ 兩個環狀複合體之外側，形成一 YQQY 平行環狀圓柱狀構造。

1.6 ClpYQ 蛋白酶基質辨識區域之相關研究

於 1997 及 1999 年時分別由 Levchenko 和 Smith 等人提出 Clp family 蛋白酶的蛋白 C 端具有同源性的基質辨識區域。Levchenko 將此蛋白 C 端的基質辨識區域命名為 PDZ-like domains，初始研究 PDZ domains 與許多真核生物中的 signaling proteins 有關，其利用 C 端區域與其他協同的蛋白產生蛋白間聯結的作用。Levchenko 推論於 Clp family 中此段 PDZ-like domains 可能與基質辨識的機制有關 (Levchenko *et al.*, 1997)。Smith 等人提出同為 ATP-dependent protease 的 Lon

以及 Clp family protease 及 chaperones 於蛋白 C 端具有同源性的基質辨識區域，並將之命名為 SSD (sensor- or substrate-discrimination) domains (Smith *et al.*, 1999)，研究結果推論 Lon 以及 Clp family protease 使用相同的基質辨識機制，推測這些 ATP 依賴型蛋白酶於細菌中係利用此段專一性之區域去辨識基質的某段區域，然而詳細的辨識機制或基質被辨識之區域的資料則尚無研究報告。

1.7 ClpYQ 蛋白酶基質之研究

1.7.1 ClpYQ 蛋白酶可分解異蛋白 (abnormal proteins)

當 *E. coli* 暴露於高溫時會誘導熱休克蛋白 (heat shock proteins) 大量生成，這是由於不穩定的 σ^{32} 漸趨穩定，而指揮 RNA 聚合酶轉錄熱休克基因所致。利用添加胺基酸類似物或是嘌呤黴素 (puromycin) 而生成異蛋白或外來蛋白的大量累積，皆會誘導熱休克蛋白的生成，致使菌體內產生類似熱休克反應之現象。Missiaka 等人發現，過量表現的 $clpQ^+clpY^+$ operon 可抵抗造成 *E. coli* 累積有害蛋白質的毒素如 puromycin。以上結果顯示，ClpYQ 在 *E. coli* 中扮演分解異蛋白的角色 (Missiakas *et al.*, 1996)。

Kanemori 等人測量 σ^{32} 的半衰期 (Kanemori *et al.*, 1997)，結果顯示在 lon^- $clpP^-X^-hslV^-U^-$ 突變株中， σ^{32} 半衰期增長，而在 Lon 與 ClpXP 蛋白酶缺乏的菌體中，利用質體大量表現 ClpQY 蛋白酶，會降低 σ^{32} 的表現，此結果說明，這些 ATP 依賴型蛋白酶之間，彼此偕同作用，藉由分解 σ^{32} 及異蛋白來調控細胞內熱休克反應。

1.7.2 ClpYQ 蛋白酶可分解 Sula

Misuzawa 及 Gottesman 等人於 1983 及 1991 年發表，在 lon^- 突變株中，施以 MMS (methyl methanesulfonate) 或 UV，因缺乏 Lon protease 使細胞分裂抑制物

SulA 無法被分解，導致細菌死亡，證實 SulA 可被 *E. coli* 蛋白酶 Lon 所分解，故 SulA 為 Lon 的基質之一(Gottesman & Stout, 1991; Mizusawa & Gottesman, 1983)。

SulA 是由 *sfiA* 所轉譯出的蛋白質，可於 UV 照射後或以 Nitrofurantion 處理而被誘導表現，SulA 於細胞中會和 FtsZ 形成複合物，而使 FtsZ 失去蛋白活性因而抑制細胞分裂，故 SulA 為細胞分裂抑制物。ClpYQ 蛋白酶可分解 SulA 始於 Khattar 等人發表的報告 (Khattar, 1997)，Khattar 等人篩選到一質體可在 *lon*⁻ 突變株中抑制 SOS 反應 (SOS response)，進一步分析該質體所帶的基因序列，確認能抑制 SOS 反應是由於 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ operon 大量表現所致。

Kanemori 等人利用免疫印漬法 (immunoblotting) 發現在 Δ (*clpPX-lon*) 菌株中增加 *clpQY* 基因突變，可偵測到原本無法偵測的 SulA 蛋白 (Kanemori *et al.*, 1999)，而在缺乏 Lon 及 Clp 蛋白酶活性時，誘導 SulA 表現，發現在 Δ *clpQY* 突變株中，SulA 的累積遠比 *clpQ*⁺ 菌株快，此外，SulA 的半衰期在 Δ *clpQY* 突變株中較長，在野生株 *clpQ*⁺ 中較短。胞外實驗亦證實，ATPase 存在時，ClpQ 及 ClpY 蛋白需同時存在才能分解 SulA。根據以上結果，Kanemori 等人認為，ClpYQ 與 Lon 具有相同功能，可參與細胞中 SulA 的分解，且當細胞中 Lon 及 Clp 蛋白酶活性低於某一程度時，ClpYQ 為生長所必須。

同年，Wu 等人藉由在 *lon*⁻ 突變株中，大量表現 ClpYQ，使細菌在 MMS 當中亦能生存，不致受 SulA 累積的影響而死亡 (Wu *et al.*, 1999)；且在 *lon*⁻ 突變株中，大量表現 ClpYQ，SulA 也可以被分解；另外，與 *lon*⁻ 突變株相比，SulA 在 *lon*⁻ *clpQ*⁻，*lon*⁻ *clpY*⁻ 突變株中都比較穩定，半生期變長，此結果再度證明 SulA 為 ClpYQ 的基質。

由於 ClpY 為一 ATPase，在 ClpYQ chaperone 中，負責基質辨識的角色，Lee 等人以 yeast two-hybrid system 方式證實，ClpY 與 SulA 之間有蛋白質交互作用

(protein-protein interaction)，除說明 SulA 為 ClpYQ 的基質之外，更進一步證明 ClpY 與 SulA 在 *in vivo* 中可互相作用 (Lee *et al.*, 2003b)。

1.7.3 ClpYQ 蛋白酶可分解 RcsA

RcsA 為 capsule synthesis 的基因 *cpsB* 之活化物，Gottesman 等人確認 RcsA 為蛋白酶 Lon 的基質，*lon*⁻突變使細菌產生 mucoid 的表現型 (Gottesman & Stout, 1991)。

Wu 等人首度提出 RcsA 為 ClpYQ 蛋白酶基質之初步觀察 (Wu *et al.*, 1999)，利用可受 RcsA 調控之 *cpsB::lacZ* 報告基因 (reporter gene)，藉由 *cpsB::lacZ* 表現 β -galactosidase 的活性，來觀察 ClpYQ 蛋白酶對 RcsA 之影響。實驗結果顯示由多倍數質體大量表現的 ClpYQ 蛋白酶會使得 *cpsB::lacZ* 表現下降為對照組的 20 倍。據此，推論 ClpYQ 蛋白酶可分解 RcsA。

Kuo 等人亦針對 RcsA 為 ClpYQ 的基質做更進一步的研究 (Kuo *et al.*, 2004)，利用在 *lon*⁻突變株中，大量表現 ClpYQ，可抑制因 *lon*⁻而產生的 mucoid 表現型，以及在 *lon*⁻*clpQ*⁻*clpY*⁻突變株中，*cpsB::lacZ* 之 β -galactosidase 活性比 *lon*⁻*clpQ*⁺*clpY*⁺高，證實 ClpYQ 可藉由分解 RcsA，調控 *cpsB::lacZ* 的表現。

1.8 *clpQ*⁺*clpY*⁺實驗目的

本論文針對 *clpQ*⁺*clpY*⁺ operon 在菌體內 (*in vivo*) 的調控及 ClpY 的基質辨識功能做探討。利用 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 啟動子與報導基因 *lacZ* 所建構之融合基因 *clpQ::lacZ*，證明 σ^{32} 可直接調控 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 啟動子。

在 *clpQ*⁺*clpY*⁺ operon 的五端未轉譯區域 (5'-UTR)，亦即轉錄起始處 (transcription start site) 與轉譯起始處 (translation start site) 之間，有一段 inverted

repeat sequence (IR), 藉由觀察此段序列缺失對 ClpQ 與 ClpY 間交互作用的影響, 可知 IR 所形成的 stem-loop 二級結構為 $clpQ^+clpY^+$ operon 表現時所必須。

前人研究可知 ClpYQ 以六元環方式組合(Kessel *et al.*, 1996; Missiakas *et al.*, 1996; Rohrwild *et al.*, 1996), 其中 ClpY 負責基質辨識, 打開基質結構, 並傳送至 ClpQ 進行分解(Gottesman, 2003), 已知的 ClpYQ 基質有 SulA 及 RcsA 等, SulA 為細胞分裂抑制物, 若在菌內累積則細菌無法生長, RcsA 為活化物, 可活化形成 capsule 的基因 *cpsB*。

ClpY 可分為三個作用區(domain), N-terminal domain, I-intermediated domain 及 C-terminal domain, N domain 具有 ATPase 的功能, C domain 則與 self-oligomerization 及 ClpQ 的蛋白酶活性相關。由 X-ray 結構分析, 認為 I domain 能與 ClpQ 結合, 並負責與基質互相作用(Bochtler *et al.*, 2000)。

ClpY 的 I domain 中, 有兩個 loop 結構, 分別為 loop L1(137-150 aa)與 loop L2(175-209 aa), 已知將 loop L2 移除後, $ClpY^{\Delta(175-209\text{ aa})}$ 在 ClpQ 存在時仍然無法分解 SulA (*in vitro*), 但其分子機制未明(Song *et al.*, 2000)。利用酵母菌雙雜交系統(yeast two-hybrid system)分析, 可知 ClpY 與 SulA 之間有蛋白質交互作用(Lee *et al.*, 2003a), 本文亦藉由酵母菌雙雜交系統, 進一步得知 ClpY 的 I domain 負責基質辨識, C domain 則可與 ClpQ 作用, 而 I domain 中的 loop L2(175-209 aa)除了與基質結合外, 並與後續的基質傳遞及分解相關。

1.9 $gspS^+$ 研究源起

Trypanosomatida 包含 *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Crithidia* 等, 此類致病性原蟲, 可藉由蚊蟲叮咬, 進入血液, 中樞神經及淋巴, 在非洲及南美, 此類原蟲會引起昏睡, 發炎等病症, 使許多人死亡。目前已從 *Trypanosoma* 分離出 TSH [trypanothione, N^1, N^8 -bis(glutathionyl)spermidine] (Fairlamb *et al.*, 1985; Fairlamb *et al.*, 1986)。在 *Trypanosoma*, TSH 取代 glutathione (GSH) 在一般物種 (如人類

及 *E. coli*) 中維持細胞氧化還原平衡的角色，在人類或 *E. coli*，藉由還原態的 GSH 使 Glutaredoxin (Gxn) 還原，進而調整其他物質的氧還，但在 *Trypanosoma*，則用 TSH/ Tryparedoxin 取代 GSH/ Gxn 的作用。例如，Peroxynitrite (ONOO⁻) 是巨噬細胞用來對抗致病菌的重要物質，在培養 *Trypanosoma* 時，加入 peroxynitrite，會耗損病原蟲的 TSH；不但如此，在 *Trypanosoma* 中，GSH 只和含硫的蛋白質有作用，大部分氧化物的代謝，都是透過 TSH (Thomson *et al.*, 2003)。因此與 TSH 相關的酵素，近年來吸引許多人的探討，希望對藥物發展有所幫助。TSH 的合成，是由 GSH 與 spermidine 間的醯胺鍵結 (amide bond)，先合成 GspdSH (glutathionylspermidine)，再由 GspdSH 與 GSH 間醯胺鍵生成，產生 TSH。*Trypanosoma* 用酵素 TryS (Trypanothione synthetase) 來進行 GSH 與 GspdSH 間醯胺鍵結生成，產生 TSH，此病原蟲缺乏 GspS (glutathionylspermidine synthetase) 的基因，GSH 與 spermidine 間醯胺鍵生成，產生 GspdSH 也是靠 TryS。另一致病原蟲 *Leishmania*，GspdSH 與 TSH 的合成，和 *Trypanosoma* 相同，都是靠 TryS 作用，但 *Leishmania* 有一退化的 GspS 基因 (*gspS* pseudogene)。此外，在 *Crithidia*，GspdSH 的合成可用 GspS 或 TryS，TSH 的合成則靠 TryS，但至目前為止，只知 *E. coli* 以 GspS 合成 GspdSH，尚未在 *E. coli* 測得 TSH 存在。TryS 與 GspS 的性質類似，都有合成酶 (synthetase) 和醯胺酶 (amidase) 活性，兩者的胺基酸序列亦相似 (Ariyanayagam *et al.*, 2005)，另外，根據親源分析 (phylogenetic analysis) 結果，*E. coli* 的 GspS 與 *Crithidia* 的 GspS 及 *Leishmania* 的 GspS 非常相似，位於樹狀圖中相鄰的位置，GspS 與 TryS 相似度也很高，兩者在樹狀圖中的位置也很相近 (Comini *et al.*, 2005)。藉由研究 *E. coli* 基因 *gspS*，可增進對 *tryS* 的瞭解也有益於 *Trypanosoma* 的研究。

1.10 GspdSH 簡介

1.10.1 GspdSH 組成物質: GSH 及 spermidine

GSH 是一種 tripeptide，由 L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine 組成，在好氧物種 (aerobic species) 中是最主要的低分子量硫醇 (low molecular weight thiol)，細胞內濃度約為 0.1 至 10 mM。細胞內大部分 GSH 維持在還原態 (reduced, thiol form)，亦即 GSH，其他則以 GS-S-protein、GSSG、thioester 形式存在 (Pai *et al.*, 2006)。藉由將大多數 GSH 維持在還原態，GSH 可維持細胞內氧化還原狀態的平衡，還原態 GSH 可將 H₂O₂ 或其他過氧化物還原，本身則變成氧化態的 glutathione disulphide (GSSG)，GSSG 再經由 glutathione reductase 及 NADPH 的作用，還原成 GSH。

Spermidine [C₉H₁₇N₃, N-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine] 是細菌細胞中主要的多胺 (polyamine)。Spermidine 在細菌細胞中作用廣泛，可和磷脂質結合，達到穩定細胞膜或其他膜結構的效果，或調節膜通透性。另外，多胺類物質亦與細胞生長及抗氧化有關，其方式為多胺可刺激調控蛋白的生成 (Raj *et al.*, 2001; Tkachenko & Nesterova, 2003)，進而影響許多與生長或抗氧化相關基因的表現，如多胺可刺激 RpoS、OxyR、FecI、Fis 等調控蛋白的生成，OxyR 可誘導抗氧化相關基因的表現，RpoS 則與生長遲滯期 (stationary phase) 的許多基因表現有關 (Jung & Kim, 2003)。

1.10.2 大腸桿菌中 GspdSH 及其合成酵素 GspS 相關之研究

GSH 的 glycine carboxylate 與 spermidine 之間，可用醯胺鍵結，形成 GspdSH。在一般培養條件下，*E. coli* 生長至指數生長期 (log phase) 或遲滯期 (stationary phase)，菌體內都無法測得 GspdSH。但若將 *E. coli* 以 M9 minimal medium 搖動通氣培養 (shaker) 到遲滯期時停止搖動，可在菌體中偵測到 GspdSH 的存在 (Tabor & Tabor, 1975)，Tabor 等人偵測此條件下 (厭氧/生長遲滯期)，二十分鐘內細胞中 GspdSH 和 spermidine 濃度不變，但 GspdSH 卻一直進行生成和分解，並且發現，在指數生長期時，spermidine 沒有顯著代謝，但進入遲滯期後，大部分的 spermidine 改以 GspdSH 形式存在。若將遲滯期的 *E. coli* 培養液用新鮮培養基稀釋，會使 GspdSH 快速分解成 GSH 及 spermidine，據此推測使 GspdSH 在生

長遲滯期累積的原因可能有二，一是 GspdSH 可能在所有生長期皆可生成，但在指數生長期時，GspdSH 的分解速度快，另一可能性是遲滯期細胞內的酸鹼值或氧化還原狀態改變，造成某種酵素活性的改變，使 GspdSH 累積（此時期尚未發現合成 GspdSH 的酵素 GspS）。De Craecker 等人觀察 *E. coli* 所有生長期中 GSH 與 GspdSH 含量變化 (De Craecker *et al.*, 1997)，在 aerobic/ M9 minimal medium 狀態下，整個生長期中的 GSH 含量穩定，指數生長期中期 (mid-log phase) 會生成微量 GspdSH，約佔 GSH 總量的 3%，到了遲滯期，GspdSH 生成量增加，佔 GSH 總量的 11%。在 aerobic/M9 minimal medium 狀態下培養 *E. coli* 至指數期，再換到厭氧狀態 (anaerobic) 培養 6 小時，測得 GspdSH 逐漸增加，最後 80% 以上的 GSH 轉變成 GspdSH；但在全程中都沒有測到 N¹, N⁸-bis (glutathionyl) spermidine，即 TSH 的存在，此外，在 glutathione reductase 中加入不同的基質 (substrate)，發現 glutathione reductase 除了可還原 GSH，也可以還原 GspdSH 與 GSH 間的雙硫鍵 (GspdS-SG)，所以 De Craecker 等人推測，GspdSH 的作用可能是調節 GSH 或 spermidine 含量，或者 GspdSH 就像 TSH 在 *Trypanosoma*，是一種比 GSH 更好的抗氧化物，由於 GspdSH 在遲滯期會累積，GspdSH 也可能和壓力反應 (stress response) 有關。

GSH 和 spermidine 結合，形成 GspdSH，此作用在 *E. coli* 中由酵素 GspS 進行。*E. coli* 的 *gspS* 在 1995 年首次由 Bollinger 等人發現，並定出基因及胺基酸序列 (Bollinger *et al.*, 1995)，此基因位於 *E. coli* 染色體 67.5 分鐘處，全長 1860 bp，其產物 GspS 由 619 amino acids 組成，約 70 kDa。是一種具有雙重功能的酵素 (bifunctional enzyme)，有合成酶 (synthetase) 活性，在 ATP 及 Mg²⁺ 存在下，可催化 glutathione 與 spermidine 間醯胺鍵的形成，產生 GspdSH。除了合成酶之外，GspS 也具有醯胺酶 (amidase) 活性，可使 GspdSH 的醯胺鍵水解成 GSH 及 spermidine。之後，更進一步發現，GspS 的 N 端 1 至 195 胺基酸有醯胺酶 (amidase) 功能 (Pai *et al.*, 2006)，C 端 206 至 619 胺基酸是合成酶，linker region 為 196 至 205 胺基酸。

1.11 雙成份控制系統 BaeSR 之研究

許多細菌已發展出各種雙成份控制系統 (two component regulatory system)，並利用這些系統適應環境的改變，典型的雙成分控制系統包含兩種蛋白，一為 kinase sensor，位於細胞膜，另一為同源性 response regulator，存於細胞質中。雙成分控制系統控制許多基因表現，與細菌的營養狀態，致病性，抗藥性等息息相關。在 *E. coli* 中，已知的雙成分控制系統大約有 30 種，但許多雙成分控制系統的功能未明

藉由抑制 response regulators EnvZ、PhoR 及 CreC，Nagasawa 等人在 1993 年時發現一新的雙成分控制系統 BaeSR (Nagasawa *et al.*, 1993)。之後，Raffa 與 Raivio 等人探討 envelope stress 與 BaeSR 的關係時，發現 BaeSR 可以誘導 *spy* (spheroplast protein Y，是一種 periplasmic protein，與 envelope 的形成有關) 的表現 (Raffa & Raivio, 2002)，他們觀察在 spheroplast formation，indole 等 envelope stress 情況下，BaeSR 和另一組與 envelope stress 相關的雙成分控制系統 CpxAR 都可以誘導 *spy*，在 spheroplast formation 誘導 *spy* 表現時，CpxAR 和 BaeSR 扮演同樣重要的角色，無論是 *cpxR* 或是 *baeR*，都會使 spheroplast formation 對 *spy* 的誘導減低 10 倍，但在 indole 造成的 envelope stress response 中，BaeSR 比 CpxAR 重要，因為在 *cpxR* 時，*spy* 表現降低至三分之二，*baeR* 時，*spy* 表現降低至五分之一。據此，他們認為 BaeSR 可調控一組與 envelope stress 相關的基因表現，此組基因與 CpxAR 調控的基因不同，而 BaeSR 和 CpsAR 可能會被相同的訊號 (signal) 誘導，亦即某種 envelope stress (如 spheroplast formation 或 indole) 造成 envelope proteins 的錯誤折疊，而不同種類的蛋白質折疊錯誤會分別促使 BaeSR 以及 CpxAR 生成，此兩組蛋白質再進一步調控兩組與 envelope stress 相關的基因表現。他們認為有一 BaeSR regulon 存在，其組成基因除了與 envelope stress 相關的蛋白質以外，可能也包含與 envelope stress 相關性未明的 cytoplasmic

proteins。

此外，根據 Garbe 等人在 2000 年的研究結果顯示，indole 可誘導 superoxide dismutase 及 alkylhydroperoxide 生成，此兩者和氧化毒性 (oxidant toxicity) 相關 (Garbe *et al.*, 2000)，因此認為 indole 會破壞細胞膜，造成氧化損害 (oxidative damage)，使細胞的氧還狀態 (redox potential) 發生改變，產生過氧化物，誘發 superoxide dismutase 及 alkylhydroperoxide 生成。基於以上理由，Raffa 與 Raivio 等人推論，BaeSR 可能對細胞膜的改變或 envelope 氧還狀態的破壞有反應，進而引發下游基因表現。

接著，Baranova 等人亦發現，BaeR 大量表現時，*E. coli* 的抗藥性增加 (Baranova & Nikaido, 2002)，並經由實驗證實 *baeSR* 位於 multidrug transporter gene cluster *mdtABCD* 下游，且 BaeR 可直接與 *mdtA* 的 promoter 結合，至此，BaeSR 已被證實與 envelope stress 及 multidrug transport 相關。

一般認為不同組雙成分控制系統之間，可能有交互作用 (cross talk)，但 Verhamme 等人觀察四組雙成分控制系統 Uhp (與 phosphorylated sugar 相關)，Pho (與 phosphate 相關)，Ntr (與 nitrogen 相關)，Arc (與 oxygen 相關) (Verhamme *et al.*, 2002)，認為非同源性 (noncognate)，且雙成分控制系統之間的交互作用並非主要的調控方式，此結果使 Raffa 等人解釋 BaeSR 與 CpxAR 皆可誘導 *spy* 時 (Raffa & Raivio, 2002)，傾向於 BaeSR 與 CpxAR 以不同的方式調控 envelope 相關基因，且兩組基因之間可能有重疊，而非 BaeSR 會與 CpxAR 發生交互作用。

Hirakawa 等人發現，大量表現 response regulators BaeR、EvgA、CpxR、OmpR、RcsB 會誘發許多有助排除藥物的基因 (drug exporter genes) 表現 (Hirakawa *et al.*, 2003a; Hirakawa *et al.*, 2003b)。2005 年時，他們探討 indole 如何誘導 multidrug exporter genes (Hirakawa *et al.*, 2005)，除了證明兩種基因 *acrD* 和 *mdtA* 的表現受 BaeSR 與 CpxAR 控制，並且發現 BaeSR 所產生的誘導不需 CpxAR 的幫助，但 CpxAR 所產生的誘導需要 BaeSR。並且找出兩種 response regulator (BaeR 和 CpxR) 與 *acrD* 及 *mdtA* promoter 結合的位置。因此，Hirakawa 等人認

為，indole 可刺激 kinase sensor BaeS 和 CpxA，兩者分別與 BaeR 及 CpxR 作用之後，BaeR 直接誘導 *acrD* 及 *mdtA*，CpxR 則可增強 BaeR 的影響。

2005 年，Nishino 等人欲對 BaeSR 做一全面性的瞭解，他們利用生物晶片分析，發現將 response regulator BaeR 過量表現，可誘發 59 個基因表現 (Nishino *et al.*, 2005)，他們將這些基因分為五大類，分別是 two component system、chemotactic response、flagellar biosynthesis、maltose transport 以及 multidrug transport，其中 *gspS* 的表現增強為原來的 13 倍，但未明確歸類。他們比較野生株 (wild type) 和 *baeSR* 兩種情況下的基因表現，發現 *gspS* 在兩種菌株中的比值 (wt/*baeSR*) 為 1.7，沒有顯著不同。他們也在培養時加入 indole，發現在野生株中，加 indole 和不加 indole 兩者的 *gspS* 表現量比值為 1.2 (indole/no indole=1.2)，在 *baeSR* 情況下，比值為 0.8，兩者差異不大，因此認為 indole 經由 BaeSR 對 *gspS* 的誘導並非直接作用，此外，在 *phoBR* 情況下，*gspS* 被 BaeR 過量表現誘導的倍數為 14 倍 (有些基因誘導倍數會下降至 0)，因此推論 *gspS* 受 BaeR 的調控與 PhoBR 與 BaeSR 間的交互作用無關。不僅如此，他們更利用三種條件：(1) 會被 BaeR 過量表現誘導，(2) 野生株和 *baeSR* 兩種情況下的基因表現比值大於 2，(3) 在野生株中，加 indole 和不加 indole 兩狀況的表現量比值大於 2，篩選出直接受 BaeSR 調節的 BaeSR regulon，但 *gspS* 並未包含在此 regulon 當中，最後，他們比對 BaeSR regulon 基因的啟動子區域，歸納出一 BaeR 與啟動子的結合區，但此區的位置，與前述 Hirakawa 等人在 2005 年經實驗所得之 BaeR 與啟動子結合區稍有不同 (Hirakawa *et al.*, 2005)。

1.12 *gspS*⁺實驗目的

E. coli 的 *gspS* 長 1860 bp，為一反向基因，起始密碼子 (start codon) 位在 *E. coli* 基因組(genome)全序列 3136544 處，產物為 glutathionylspermidine

synthetase (GspS)，共有 619 個胺基酸，是一種具有雙重功能的酵素 (bifunctional enzyme)，可執行 GSH 和 spermidine 之間醯胺鍵的合成與分解，至目前為止，尚未有任何與 *gspS* 轉錄調控 (transcription regulation) 相關之研究。本文對大腸桿菌 *gspS* 基因轉錄做一初步探討，已確認 *gspS* 為一單獨的轉錄單位而非以操縱子形式存在，且 GspS 起始密碼上游序列具有啟動子功能，而在 *in vivo* 情況下， H_2O_2 與 BaeR 都可誘導 *gspS* 之表現。



第二章 調控蛋白 sigma factors 對 $clpQ^+clpY^+$ 表現的影響

2.1 摘要

大腸桿菌的 ClpYQ 蛋白酶屬於熱休克蛋白的一種，而 σ factor 是一些熱休克蛋白的調控蛋白(regulator)， $clpQ^+clpY^+$ operon 啟動子(promoter)中的一段序列 CCCCCCAT CTATAATT，具有 σ^{32} ($rpoH$) 可辨識的保守序列 (consensus binding sequence) CXCCCCAT.T (圖一)，且熱休克可增加 $clpQ^+clpY^+$ 的表現 (Chuang *et al.*, 1993)，但熱休克誘導 $clpQ^+clpY^+$ 的表現是否由 σ^{32} ($rpoH$) 直接造成則尚未證實。本研究利用 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子與報導基因 $lacZ$ 所建構之融合基因 $clpQ^+::lacZ$ ，在菌株的培養過程中，提高溫度造成熱休克反應的條件，使 σ^{32} 誘導 $clpQ^+::lacZ$ 大量表現，但在 $rpoH^-$ 突變株中則無此誘導現象；並利用 β -galactosidase 活性分析與北方轉印法，證實 $clpQ^+clpY^+$ operon 的 mRNA 及蛋白質表現，在 $rpoH^-$ 突變株中均會降低。另外，針對 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子上 σ^{32} ($rpoH$) 可辨識的保守序列做 C→T 點突變，造成 σ^{32} 對 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 的熱誘導降低，本文首次證明 σ^{32} 可直接調控 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子。

2.2 材料與方法

2.2.1 建立 $clpQ^+clpY^+$ 上游啟動子區域 (promoter region) 表現系統

(a) 菌株，載體，培養基和培養條件

本研究選殖基因的載體為 pRS415 與 pRS414 (Simons *et al.*, 1987)，兩載體皆以 $lacZ$ 為 reporter gene，pRS415 用以建構不同長度 $clpQ^+clpY^+$ promoter region 與 $lacZ$ 之轉錄融合基因(operon fusion or transcriptional fusion)，包含 $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)， $clpQ^+::lacZ$ (op-478bp)， $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ (op-141bp)， $clpQ^{m1}::lacZ$ (op-141bp) 及 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op)，pRS414 用於建構轉譯融合基因(protein

fusion or translational fusion), 包含 $clpQ^+::lacZ$ (pr-141bp), $clpQ^+::lacZ$ (pr-478bp), $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ (pr-141bp), $clpQ^{m1}::lacZ$ (pr-141bp) 等, 點突變 C→T, A→C 及 $\Delta 40$ bp 位置如圖一所示。

選殖基因表現的宿主細胞為 *E. coli* MC4100 (Casadaban, 1976), RH90 (Lange & Hengge-Aronis, 1991), KY1429 (Yano *et al.*, 1987), SM25 (Marques *et al.*, 1999)。用於製備含有 single copy $clpQ::lacZ$ 溶原菌 (lysogen) 的噬菌體為 λ RS45, 本文所使用的菌株列於表一, 載體及噬菌體列於表二。

使用的培養基為 Luria Bertani Broth (Difco), 並視情況加入 100 μ g/ml 的 ampicillin, 以 30 °C, 200 rpm 培養。進行熱誘導實驗時, 則將 *E. coli* 培養於 30 °C, 待生長至對數期, 取樣後再移至 42 °C 培養 30 分鐘, 再次取樣。

(b) $clpQ^+clpY^+$ 啟動子區域序列建構及選殖

(1) PCR 增幅 $clpQ^+clpY^+$ promoter region 條件

為大量增幅選殖的基因片段, 利用 *E. coli* 野生株 MG1655 chromosome 作為 DNA 模板, 5'primers 及 3'primers 列於表 3, 進行 PCR 反應。條件為 95 °C denature 7 min, 95 °C denature 1.5 min, 60 °C annealing 2 min, 72 °C extension 1.5 min, 進行 35 個循環, 再以 72 °C extension 10 min 後, 反應停止於 4 °C。

(2) 酵素截切及黏合作用

PCR 產物 $clpQ^+141$, $clpQ^+478$, $clpQ^{m(c\rightarrow t)}141$, $clpQ^{m1}::lacZ141$, $clpQ^{m2}\Delta 40bp$ 經純化後, 以限制酶 EcoRI 及 BamHI 在 37 °C 水浴截切一小時, pRS415 及 pRS414 也以相同酵素做相同處理。再將截切後的載體和 PCR 產物溶液混合, 加入 2.5 倍 95 % 酒精及 1/10 倍 2.8 M NaOAc (pH5.2), 置於 -80 °C 共同沈澱至少四小時後, 以 4 °C, 11000 rpm 離心 30 min, 吸除上清液後, 再加入 75 % 酒精, 之後以 4 °C, 11000 rpm 離心 30 min, 用 16 μ l ddH₂O 溶解 DNA, 加入 2 μ l ligation buffer, 1 μ l ATP, 1 μ l T4 DNA ligase, 在 16 °C 進行 16 hr 接合反應。

(3) $clpQ::lacZ$ 基因選殖

E. coli XL1 blue 培養至 OD600 約 0.4-0.5, 離心後以冰浴之 2X TSS buffer

[10% PEG 8000/ 5% (v/v) DMSO/ 20 mM MgSO₄ (pH6.5) in LB] 0.15 ml 懸浮菌體，再加入接合反應後的反應物冰浴 45 分鐘，置於 37 °C heat shock 2 分鐘，在 37 °C 培養兩小時，將菌液塗抹於含 100 µg/ml ampicillin 的 LA 培養基，37 °C 隔夜培養 (Chung *et al.*, 1989)。

待長出許多菌落後，挑出單一菌落，於 100 µg/ml ampicillin 的 LB 培養基隔夜培養，再以 Viogene mini prep kit 抽取載體，並定序以確認是否含有欲選殖之基因序列。

(4) lysogens (溶原菌) 建構

菌液於 37 °C，0.2% maltose，震盪培養隔夜，視需要加入抗生素 (此菌內的載體含有欲建構的 target DNA 序列)，取 0.2 ml 菌液，加入 λRS45 plaques，在 37 °C 靜置 15 分鐘。加入 R-Top Agar (10 g Bacto tryptone/ 1 g bacto yeast extract/ 8 g agar/ 8 g NaCl/ 2 ml 1M CaCl₂/ 5 ml 20 % glc/ 1 L dH₂O) 3 ml，混勻後倒在 LA 上，在 37 °C 倒置培養 5-8 小時，待長出許多透明 plaques 後，加 5 ml TM buffer [0.05 M Tris-HCl (pH7.5)/ 8 mM MgSO₄] 於培養皿內，靜置於 4 °C 隔夜培養。再將培養皿內的溶液吸到乾淨試管內，加 200 µl chloroform，震盪混合均勻，靜置 4 °C 30 min，離心取上清液即為溶胞液 (lysate)，保存於 4 °C。

將 lysate 以 TM buffer 稀釋，並與 R-Top agar 混合後倒在 X-gal/LA 上，37 °C 隔夜培養後，取藍色 plaques (藍色 plaques 代表 λRS45 已帶有 target gene，可使 X-gal 變藍色)，再用前述方法製備溶胞液。

將 MC4100 置於 LB/0.2 % maltose 隔夜培養，取菌液 0.2 ml 與 R-top agar 混合後倒入 LA plate，待凝固後，滴入 0.1 ml 溶胞液，於 37 °C 隔夜培養，取溶胞液區(透明)與菌液區(混濁)間的細菌，以 X-gal/LA 藍白篩選並分離純化得溶原菌。

(5) *clpQ*⁺::*lacZ* 轉錄及轉譯融合基因的建構

將 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 的啟動子 (promoter) 序列與報導基因 (reporter gene) *lacZ* 接合，建構兩組不同長度的 *clpQ*⁺::*lacZ* 融合基因，分別為第一組 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) (operon fusion gene or transcriptional fusion gene，轉錄融合基因)，

clpQ⁺::*lacZ* (pr-141bp) (protein fusion gene or translational fusion gene, 轉譯融合基因), 及第二組 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-478bp), *clpQ*⁺::*lacZ* (pr-478bp)。

建構方式以 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) 為例, 將 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 的上游序列至 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 的第十三個胺基酸序列 (包含啟動子的-35 及-10 box, 五端未轉譯區 (5'UTR) 71 bp 與 *clpQ*⁺ 第一至第十三個胺基酸的序列), 總共 141 bp, 與載體 pRS415 上的 reporter gene *lacZ* 接合, 轉殖入 *E. coli*, 使其帶有 pRS415-*clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)。因 *lacZ* 的產物 β -galactosidase 可分解 X-gal 而呈現藍色, 以噬菌體 λ RS45 感染帶有載體 pRS415-*clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) 的菌株, 再以 X-gal/LA 培養基進行藍白篩選, 製備溶胞液 (lysate), 此時溶胞液中的 λ RS45, 含有 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp), 最後, 以 λ RS45 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) 感染 *E. coli* MC4100 (其染色體上的 *lacZ* 已無作用), 繼之以藍白篩選, 純化出溶原菌 (lysogen) MC4100 λ RS45 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp), 即 HY20001。

另外, 同組溶原菌中, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) 與 *clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp) 的不同處, 在於 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) 用載體 pRS415 所建構, 稱之為 operon fusion gene 或轉錄融合基因 (transcriptional fusion gene), *clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp) 用載體 pRS414 建構, 稱之為 protein fusion gene 或轉譯融合基因 (translational fusion gene)。第一組 (141 bp) 與第二組 (478 bp) 融合基因不同之處, 在於第二組融合基因包含的 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 上游片段較長, 由 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 的啟動子區域往前延伸 337 bp, 下游則同樣至 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 的第十三個胺基酸為止, 總長度為 478 bp。

2.2.2 β -galactosidase 活性分析

菌液於適當溫度培養至 OD₆₀₀ = 0.3-0.7。取 0.3 ml 菌液加入 0.7 ml Z buffer (Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ · 2H₂O/ MgSO₄/ β -mercaptoethanol/ KCl), 以 0.1% SDS 30 μ l 及 40 μ l 氯仿破菌後, 於 28 °C 水浴槽中預反應 5 分鐘。加入 0.2 ml ONPG (4 mg/ml) 開始計時, 至反應呈黃色 (OD₄₂₀=0.6-0.9) 後, 加入 0.5 ml 1 M Na₂CO₃ 終止反應, 記錄反應時間。測定反應液之 OD₄₂₀ 及 OD₅₅₀ 值。

活性的計算公式為:

$$1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / (T \times V \times \text{OD}_{600}) = \text{Units of } \beta\text{-galactosidase}$$

T：反應時間（分）

V：反應體積（ml）

單位定義：每分鐘每個菌體所產生之 *O*-Nitrophenol (Miller, 1972)。

2.2.3 北方點墨法 (Northern blotting)

(a) total RNA 萃取

將 *E. coli* 於 37 °C 震盪培養至 $\text{OD}_{600} = 0.3\sim 0.5$ ，4 °C 離心收集菌液 5 ml，以 Qiagen RNeasy Mini Kits 抽取 total RNA，再用 DEPC-ddH₂O 溶解 RNA 後，測 OD_{260} ，取 3 µg 用於變性膠體電泳。

(b) 變性膠體電泳

(1) 配製 formaldehyde agarose gel

agarose 1.5 g 加入 DEPC-ddH₂O 111 ml 中，加熱使其溶解，降溫後加 10X formaldehyde running buffer (80 mM NaOAc/ 0.2 mM MOPS/ 10 mM EDTA pH 8.0/ DEPC-ddH₂O to 1000 ml) 15 ml/ 37% formaldehyde 26.82 ml，待冷卻定型。

(2) RNA 樣品處理

RNA 樣品 [RNA + 4.5 µl DEPC-ddH₂O/ 2 µl 10X formaldehyde running buffer/ 3.5 µl formaldehyde/ 10 µl formamide/ 0.5 µl EtBr/ loading buffer (50 % glycerol/ 0.5 M EDTA pH 8.0/ 0.25 % bromophenol blue/ 0.25 % xylene cyanol)] 以 65 °C 加熱十分鐘後，放冰上急速冷卻 5 分鐘。

(3) 變性膠體電泳

formaldehyde agarose gel 放入電泳槽，先以 1X formaldehyde running buffer，60V 預跑 30 min 後，加入 RNA sample，以 60V 100 min 進行電泳。

(c) 北方轉印實驗 (blotting)

電泳膠片以 DEPC-ddH₂O 漂洗，再以 20X SSC 浸泡 5 min。將轉印膜 (nylon membrane) 置於膠片上，再依次取三張濾紙於 20X SSC 中潤濕，依序置於其上；並折疊吸水紙累積至 8 公分，覆蓋在最上層，最後以重物壓住整個裝置。靜置

隔夜，利用毛細現象將膠片上的 RNA 轉印到轉印膜。

(d) 雜交反應 (hybridization)

取下轉印裝置上的重物及濾紙。轉印膜以 RNA 面朝上，浸泡 6X SSC 5 min 再風乾。以 Stratalinker 1800 進行 UV 連結反應。將 hybridization solution 10 ml (formamide/ 20X SSC/ 10% blocking reagent/ 1% N-lauroylsarcosine/ 10 % SDS) 注入雜交袋，轉印膜移至袋內並封口，在 42 °C 進行雜合前置反應 2 小時。取 probe (以 Roche PCR DIG Probe Synthesis Kit 製備) 20 µl 以 65 °C 加熱 10 min 後，冰浴 5min，倒出塑膠袋內雜合前置反應的液體，加入新的 hybridization solution 10 ml 以及上述 probe 20 µl，在 42 °C 進行雜合反應過夜。以 2 X SSC，0.1 % SDS 室溫下清洗轉印膜兩次，各 5 min。再以 0.1 X SSC，0.1 % SDS，55 °C 下清洗轉印膜兩次，各 20 min。

(e) 雜交訊號偵測 (detection)

轉印膜用 Buffer I (1 M maleic acid/ 0.15 M NaCl/ adjust to pH7.5 with NaOH) 漂洗，再用 Buffer II (1 % blocking reagent in Buffer I) 浸洗 30 分鐘，並以 50 rpm 低速搖動。取 2 µl anti-DIG-AP conjugate，以 10 ml 之 Buffer II 稀釋後浸洗轉印膜 30 分鐘，並以 50 rpm 低速搖動。再用 Buffer I 浸洗並以 50 rpm 低速搖動。用 CDP-Star 5 ml 室溫下靜置反應 15 分鐘。取出轉印膜，風乾後，將底片壓在轉印膜上，顯影 15 秒 (顯影時間視訊號強弱決定)。將顯影後的底片先以顯影劑顯影再置於定影劑定影。以水潤洗除去藥劑，將底片晾乾保存。

2.2.4 引子延伸實驗 (primer extension)

(a) 磷酸化標定引子

將 H₂O 2 µl/ 10X T4 polynucleotide kinase buffer 1 µl/ 0.1 M DTT 1 µl/ 1 mM spermidine 1 µl/ 10 µM oligonucleotide primer 1 µl/ 10 µCi/µl [γ ³²P]ATP 3 µl/ 10U/µl T4 polynucleotide kinase (NEB) 1 µl 混合後，37 °C 反應 1 hr。加入 0.5 M EDTA 2 µl 和 TE buffer (pH 7.5) 2 µl，65 °C 加熱 5min 以終止反應。以 DEPC-ddH₂O 定量至 100 µl，取適量 RNA 與標定的 primer，以 1/10 倍 3M NaOAc 及 2.5 倍 95% EtOH

放-20 °C 隔夜以純化並沈澱樣品。

(b) 引子延伸 (primer extension)

前述樣品離心 (最高速, 10min) 去除上清液, 再以 75% EtOH 清洗並離心去除上清液, 加入 10X hybridization buffer 1.5 μ l (1.5 M KCl/ 0.1 M Tris-HCl pH 8.0/ 10 mM EDTA) 及 DEPC-ddH₂O 13.5 μ l 溶解後, 85°C 反應 30 min 以打開雙股結構。再換 42 °C 反應 30 min 使 primer 與 RNA 結合。加入 primer extension mix 30 μ l (1 M Tris-HCl pH 8.0 0.9 μ l/ 0.5 M MgCl₂ 0.9 μ l/ 0.1 M DTT 2.5 μ l/ 10 mM dNTP 0.7 μ l/ DEPC-ddH₂O 24 μ l/ 40U/ μ l RNAsin 0.5 μ l/ 10U/ μ l AMV RTase 0.5 μ l), 42 °C 進行 primer extension 1 hr。加入 TE buffer 67.5 ml 及 5 M NaOH 8.1 μ l, 65 °C 反應 1 hr 以去除 RNA。加 10 N HCl 4.05 μ l 以中和 NaOH。加 10 M NH₄OAc 27 μ l/ 95% EtOH 350 μ l, -20 °C 靜置隔夜。

配製 acrylamide 電泳膠片 (ddH₂O 10.42 ml/ 5X TBE 6 ml/ 40% acrylamide 6 ml/ urea 12.6 g), 於 55 °C 加熱溶解, 加入 16% AP 99 μ l 及 TEMED 15 μ l, 混合後將溶液注入兩片玻璃板間(需避免氣泡), 最後在玻璃板間插入尺梳(即電泳時樣品注入處)待乾。

用於 sequencing 的 DNA (本實驗中使用 pRS415-*clpQ*⁺::*lacZ*) 取 2 μ l, 加入 primer 3 μ l (4.4 ng/ μ l) 及 1 M NaOH 1 μ l, 置 68 °C 乾浴 10 min (denature), 再加入 TDMN 4 μ l, 置室溫 10 min (anneal), 再加入 labeling mix 1.5 μ M, [α ³²P]dCTP 及 T7 polymerase 2 μ l, 置室溫 5 min (elongation), 將四種 termination mix 各 2.5 μ l 於 37 °C 預熱, 在四種 termination mix 中各加入 4 μ l 已用 [α ³²P]dCTP 標定的溶液, 於 37 °C 水浴 5 min, 最後加入 stop solution, 即可用於 sequencing 或於-20 °C 保存。

75 % EtOH 清洗並離心去除上清液, 90 °C, 1 min 以烘乾酒精。加 loading buffer 5 μ l (47.5% formamide/ 10 mM EDTA/ 0.025% bromophenolblue/ 0.025% xylene cyanol FF) 溶解樣品。95 °C 加熱 10 min 後, 以 10 % 變性定序電泳膠, 1700 V, 50 W 電泳分離 2 hr。將電泳膠固定於濾紙上真空抽乾後於暗室中壓入底片, 置於-70 °C。七天後用顯影劑及定影劑漂洗底片並檢視訊號。

2.3 結果

2.3.1 *clpQ*⁺::*lacZ* 轉錄及轉譯融合基因的表現

為瞭解大腸桿菌熱休克基因 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 之調控，建構兩組不同長度的 *clpQ*⁺::*lacZ* 融合基因，分別為第一組 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) (operon fusion gene or transcriptional fusion gene，轉錄融合基因)，*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp) (protein fusion gene or translational fusion gene，轉譯融合基因)，及第二組 *clpQ*⁺::*lacZ* (op-478bp)，*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-478bp)。

第一組 (141 bp) 與第二組 (478 bp) 融合基因不同之處，在於第二組融合基因包含的 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 上游片段較長，本組融合基因之建構，是為了確認在 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 啟動子的上游，是否有影響 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 基因表現的因素存在。

依此方式，建構出溶原菌 (lysogens) HY20001 [MC4100λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]，HY20002 [MC4100λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp)]，HY20003 [MC4100λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (op-478bp)]，HY20004 [MC4100λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-478bp)]。

將以上四株菌培養於 30 °C，待生長至 log phase，測 β-galactosidase 活性，結果如圖二，比較 HY20001 [*clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 與 HY20002 [*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp)]，相同的啟動子區域序列(141 bp)與不同長度的 *lacZ* 基因融合，轉錄融合與轉譯融合之間，活性差異約為三倍。比較 HY20003 [*clpQ*⁺::*lacZ* (op-478bp)] 與 HY20004 [*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-478bp)] 亦得到相似結果。

而 HY20001 [*clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 與 HY20003 [*clpQ*⁺::*lacZ* (op-478bp)] 活性相似，HY20002 [*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp)] 與 HY20004 [*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-478bp)] 活性相似，表示 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 啟動子區域 141 bp 的上游，不具有影響 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 表現的因子。因此本論文之溶原菌 (lysogen) 皆以 λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp) 或 λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp) 建構。

2.3.2 RpoH 對 *clpQ*⁺::*lacZ* 基因表現的影響

(a) RpoH 參與 $clpQ^+::lacZ$ 在一般狀況及熱誘導時的表現

sigma factor σ^{32} (RpoH) 可辨識的保守序列(consensus binding site)為 CCCCATXT (X=A, C, G, T), σ^{38} (RpoS) 可辨識的保守序列為 CTATACT, $clpQ^+clpY^+$ 啟動子區域中的序列 CCCCATCTATAAT, 有可能受 σ^{32} 或 σ^{38} 所調控, 為瞭解 σ^{32} 及 σ^{38} 是否參與 $clpQ^+::lacZ$ 的表現, 將 λ RS45 $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp) 以藍白篩選的方式, 帶入 MC4100 (wt), RH90 ($rpoS^-$), KY1429 ($rpoH^-$), SM25 ($rpoS^-, rpoH^-$), 得到四株溶原菌 HY20001 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)], HY20005 [$rpoS^-, clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)], HY20006 [$rpoH^-, clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)], HY20007 [$rpoS^-, rpoH^-, clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]。

將此四菌於熱誘導處理前後分別取樣, 分析熱誘導前後的 β -galactosidase 活性, 結果如圖三。在 30 °C 對數期時, HY20001 (wt) 和 HY20005 ($rpoS^-$) 的活性比 HY20006 ($rpoH^-$) 和 HY20007 ($rpoS^-, rpoH^-$) 高。此結果顯示, 在一般生長狀況下, $clpQ^+::lacZ$ 的表現受 σ^{32} 影響。

移至 42 °C 熱誘導後, HY20001 (wt) 及 HY20005 ($rpoS^-$) 的 β -galactosidase 活性均大幅增加, HY20006 ($rpoH^-$) 和 HY20007 ($rpoS^-, rpoH^-$) 的活性則沒有顯著改變。此結果顯示, 42 °C 熱休克對 $clpQ^+::lacZ$ 的誘導, 受 sigma factor σ^{32} (RpoH) 的控制, 若菌株的 $rpoH$ 基因缺失, 則 42 °C 熱休克無法誘導 $clpQ^+::lacZ$ 表現。

(b) RpoH (σ^{32}) 可直接調控 $clpQ^+clpY^+$ 的表現

前述實驗證實 42 °C 熱誘導對 $clpQ^+::lacZ$ 的影響受 σ^{32} 控制, 而在 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子區域中, 具有可以被 σ^{32} 辨識的序列 CCCCATXT, 為瞭解 σ^{32} 是否直接調控 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子序列, 在 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子的此段保守序列中做點突變 CC(C \rightarrow T)CATCT, 並觀察點突變對 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 表現的影響。

在 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子的 σ^{32} 保守序列做點突變 CC(C \rightarrow T)CATCT, 以 PCR 大量產生選殖基因片段後, 分別與 pRS415 及 pRS414 上的 $lacZ$ 接合, 同前述方式用 λ RS45 以藍白篩選的方式, 得到兩種溶胞液(lysate) λ RS45 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ (op-141bp) 及 λ RS45 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ (pr-141bp), 接著以此兩種溶胞液分別感染

MC4100 (wt) 及 KY1429 (*rpoH*⁻) 兩株菌，以藍白篩選方式取得溶原菌 HY20020 [wt, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)]，HY20022 [wt, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (pr-141bp)]，HY20021 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)]，HY20023 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (pr-141bp)]。

將菌株 HY20001 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]，HY20006 [*rpoH*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]，HY20020 [wt, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)]，HY20021 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)] 培養在 30 °C，待生長至對數期，取樣分析 β -galactosidase 活性，並將菌株移至 42 °C 培養，30 分鐘後再次取樣分析 β -galactosidase 活性，結果如圖四(A)。

在 30 °C 對數生長期的部分，具有正確啟動子序列的兩株菌， β -galactosidase 活性分別是 HY20001 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 為 151 units，HY20006 [*rpoH*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 為 87 units，而啟動子有 C→T 點突變的兩株菌，活性分別是 HY20020 [wt, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)] 為 84 units，HY20021 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)] 為 73 units，其中，HY20020 (具有正常的 σ^{32} ，但啟動子上的 σ^{32} 保守序列已有突變 C→T) 的活性與 HY20006 (*rpoH* 基因有缺失，但啟動子序列正確) 相似，表示點突變 C→T 造成 σ^{32} 無法啟動 *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* 之表現，使其活性降低。

以 42 °C 熱休克誘導後的 β -galactosidase 活性，HY20001 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 為 286 units，HY20006 [*rpoH*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 為 84 units，HY20020 [wt, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)] 為 105 units，HY20021 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (op-141bp)] 為 79 units，比較野生株 HY20001 與啟動子點突變的 HY20020，可知點突變後，*clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* 受 42 °C 熱休克誘導的程度顯著降低，且 *rpoH* 缺失的 HY20006 亦無法被 42 °C 熱休克誘導，此結果顯示點突變 C→T 造成 *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* 無法被 42 °C 熱誘導。以上結果亦說明 σ^{32} 可直接影響 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 啟動子，並調控 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 表現。

將轉譯融合的菌株 HY20002 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp)]，HY20017 [*rpoH*⁻,

clpQ⁺::*lacZ* (pr-141bp)]，HY20022 [wt, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (pr-141bp)]，HY20023 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (pr-141bp)] 培養在 30 °C，待生長至對數期，取樣分析 β-galactosidase 活性，並將菌株移至 42 °C 培養，30 分鐘後再次取樣分析 β-galactosidase 活性，結果與 operon fusion 的菌株 HY20001, HY20006, HY20020, HY20021 相似，點突變後 *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* 受 42 °C 熱休克誘導的程度顯著降低，且 *rpoH* 缺失的 HY20017 亦無法被 42 °C 熱休克誘導，如圖四(B)。

2.3.3 *clpQ*^{m1}::*lacZ* 啟動子上的點突變對 *clpQ*^{m1}::*lacZ* 基因表現的影響

σ^{38} (*rpoS*) 可辨識的保守序列是 CTATACT，而 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 啟動子上的序列為 CTATAAT，為瞭解 σ^{38} (*rpoS*) 可否調控 *clpQ*⁺::*lacZ* 的基因表現，實驗之初，嘗試將 HY20001, HY20005, HY20006 及 HY20007 四菌施以高溫、5%酒精、5%NaOH 等各種逆境處理，也嘗試將菌株培養至 stationary phase，並於培養過程中取樣測 β-galactosidase 活性，皆未看到 σ^{38} 可誘導 *clpQ*⁺::*lacZ* 的現象。但基於 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 啟動子序列與 σ^{38} 可辨識的保守序列相似度極高，只相差一個鹼基，為更進一步探討 σ^{38} 可否調控 *clpQ*⁺::*lacZ* 的基因表現，在 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 的啟動子序列上做一 A→C 的點突變，使 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 啟動子上的序列改成 CTATA(A→C)T，將此突變後的啟動子區域與 pRS415 和 pRS414 上的 *lacZ* 融合，接著利用 λRS45，以藍白篩選方式得到溶胞液 (lysate) λRS45*clpQ*^{m1}::*lacZ* (op) 及 λRS45*clpQ*^{m1}::*lacZ* (pr)，此二溶胞液感染 MC4100 (wt) 和 KY1429 (*rpoH*⁻) 後，得溶原菌 HY20013 [MC4100λRS45*clpQ*^{m1}::*lacZ* (op)] 及 HY20015 [MC4100 λRS45*clpQ*^{m1}::*lacZ* (pr)]，HY20016 [KY1429λRS45*clpQ*^{m1}::*lacZ* (op)] 及 HY20018 [KY1429λRS45*clpQ*^{m1}::*lacZ*(pr)]，再以 λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (pr) 製備 KY1429 的溶原菌 HY20017 [KY1429λRS45*clpQ*⁺::*lacZ* (pr)]，將 HY20001 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (op)]，HY20013 [wt, *clpQ*^{m1}::*lacZ* (op)]，HY20002 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (pr)]，HY20015 [wt, *clpQ*^{m1}::*lacZ* (pr)]，HY20006 [*rpoH*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op)]，HY20016 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m1}::*lacZ* (op)]，HY20017 [*rpoH*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (pr)]，HY20018 [*rpoH*⁻, *clpQ*^{m1}::*lacZ* (pr)] 培養於 30 °C，待生長至對數期，取樣分析以上菌株的

β -galactosidase 活性，結果如圖五，HY20001 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (op)]，HY20013 [wt, $clpQ^{m1}::lacZ$ (op)] 的活性相近，HY20002 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (pr)]，HY20015 [wt, $clpQ^{m1}::lacZ$ (pr)] 的活性相近。HY20006 [$rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op)]，HY20016 [$rpoH^-$, $clpQ^{m1}::lacZ$ (op)] 的活性相近，HY20017 [$rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (pr)]，HY20018 [$rpoH^-$, $clpQ^{m1}::lacZ$ (pr)]活性相近。由此分析結果可知，融合基因 $clpQ^{m1}::lacZ$ 的活性與 $clpQ^+::lacZ$ 相似，A→C 點突變對 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子活性不具影響。

2.3.4 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 及 $clpQ^{m1}::lacZ$ 啟動子上的點突變不影響轉錄起始點

在 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子上做點突變 C→T，改變 σ^{32} 可辨識的保守序列，所建構的融合基因為 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ ，以 $clpQ^+clpY^+$ 轉錄起始點為五端引子 (5' primer) 的起始，以 $clpQ^+::lacZ$ 及 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 為模版進行 RT-PCR，兩組 PCR 皆有訊號產生，如圖六(A) lane 3 及 lane 5，若以 $clpQ^+clpY^+$ 轉錄起始點的上游序列為五端引子，以 $clpQ^+::lacZ$ 及 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 為模版進行 RT-PCR，兩組 PCR 皆沒有訊號產生，如圖六(A) lane 2 及 lane 4，此結果間接顯示，C→T 點突變不會改變 $clpQ^+clpY^+$ 的轉錄起始點。

在 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子上做點突變 A→C，使啟動子序列與 σ^{38} 可辨識的保守序列完全相同時，為確認此突變是否會改變 $clpQ^{m1}::lacZ$ 的轉錄起始點，抽取 HY20002[$clpQ^+::lacZ$ (pr)]及 HY20015[$clpQ^{m1}::lacZ$ (pr)] 的 total mRNA 做 primer extension，結果如圖六(B)，兩者的轉錄起始點相同，A→C 點突變不會改變 $clpQ^+clpY^+$ 的轉錄起始點。

2.3.5 $clpQ^+clpY^+$ 操縱子 (operon) 的 mRNA 表現與 $clpQ^+::lacZ$ 的 β -galactosidase 活性

使用北方點墨法 (Northern blotting) 及 β -galactosidase 活性分析兩種方法，觀察 $clpQ^+clpY^+$ 操縱子 (operon) 及 $clpQ^+::lacZ$ 的 mRNA 表現與 $clpQ^+::lacZ$ 的 β -galactosidase 活性間的關係。

首先觀察 $clpQ^+::lacZ$ 的 mRNA 表現，將 HY20001 (wt)，HY20005 ($rpoS^-$)，

HY20006 (*rpoH*⁻), HY20007 (*rpoS*⁻, *rpoH*⁻) 於 30 °C 培養至對數生長期, 抽取 total RNA 後, 以 *lacZ* 的序列為探針 (probe), 進行北方點墨分析, 得結果如圖七(A), HY20001 (wt), HY20005 (*rpoS*⁻) 的訊號極強, HY20006 (*rpoH*⁻), HY20007 (*rpoS*⁻, *rpoH*⁻) 的訊號較弱。另將上述四株菌於相同培養條件下抽取 total mRNA, 以 *clpQ* 的序列為探針, 進行北方轉印, 結果和使用 *lacZ* 為探針相似, HY20001 (wt) 及 HY20005 (*rpoS*⁻) 的訊號較強, HY20006 (*rpoH*⁻) 及 HY20007 (*rpoS*⁻, *rpoH*⁻) 的訊號較弱, 如圖七(B)。對照 HY20001 (wt), HY20005 (*rpoS*⁻), HY20006 (*rpoH*⁻), HY20007 (*rpoS*⁻, *rpoH*⁻) 於 30 °C 培養至對數生長期, 取樣分析 β -galactosidase 活性的結果(圖三), HY20001 (wt) 及 HY20005 (*rpoS*⁻) 的活性較高, HY20006 (*rpoH*⁻) 及 HY20007 (*rpoS*⁻, *rpoH*⁻) 的活性較低。由以上實驗結果可知, *clpQ*⁺::*lacZ* 融合基因與 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 操縱子(operon)的 mRNA 表現與 *clpQ*⁺::*lacZ* 的 β -galactosidase 活性呈現正相關。

2.3.6 不同蛋白酶缺失對 *clpQ*⁺::*lacZ* 的影響

ATP-dependent protease 如 Lon, ClpXP, FtsH 皆為熱休克蛋白, 且受 σ^{32} 調控(Gottesman, 2003), 為瞭解不同的蛋白酶缺失 (protease deficient) 對 *clpQ*⁺::*lacZ* 的影響, 將 *clpA*⁻, *clpX*⁻, *clpB*⁻, *lon*⁻, *lon*⁻*clpX*⁻*clpP*⁻ 送入 HY20001 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], 得到 HY20008 [*clpA*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], HY20009 [*clpX*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], HY20010 [*clpB*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], HY20011 [*lon*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], HY20012 [*lon*⁻*clpX*⁻*clpP*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]。將這些菌株培養於 30 °C, 待其生長至對數期, 取樣分析 β -galactosidase 活性, 結果如圖八(A), HY20001 [wt, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 的活性為 131 units, 單一蛋白酶缺失的菌株 HY20008 [*clpA*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], HY20009 [*clpX*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], HY20010 [*clpB*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], HY20011 [*lon*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], β -galactosidase 活性均比 HY20001 (wt) 稍高, 三種蛋白酶缺失的菌株 HY20012 [*lon*⁻*clpX*⁻*clpP*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)], β -galactosidase 活性增加很多, 約是 HY20001 的三倍。

2.4 討論

本文所建構的轉錄融合 $clpQ^+::lacZ$ (op-141 bp) 與轉譯融合 $clpQ^+::lacZ$ (pr-141 bp)，其相異處在於 $clpQ^+::lacZ$ (op-141 bp) 有完整的報導基因 (reporter gene) $lacZ$ ，包含 $lacZ$ 五端未轉譯區域 (5' untranslated region)，具備 $lacZ$ 本身的 Shine-Dalgarno sequence (SD)，其轉錄由 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子調控，LacZ 的轉譯由 $lacZ$ 的 start codon 開始，至於 $clpQ^+::lacZ$ 中 $clpQ$ 的前十三個胺基酸則因 out of frame，雖然有 $clpQ^+clpY^+$ 的 SD 序列，但無法轉譯出完整的蛋白質。另由於原核生物可在同時分別進行相鄰基因的轉譯作用，因此轉錄融合 (operon fusion) 的基因轉譯時，前端由 $clpQ^+clpY^+$ 的 SD 所進行的轉譯不影響後端相鄰的 $lacZ$ 所進行的轉譯。

$clpQ^+::lacZ$ (pr-141 bp) 的轉錄由 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子調控，ClpQ-LacZ 的轉譯亦由融合基因上的 (亦即 $clpQ^+clpY^+$ 的) start codon 開始，產生 ClpQ 前十三個胺基酸與 LacZ 形成的融合蛋白， $clpQ^+::lacZ$ (op-141 bp) 的活性約為 $clpQ^+::lacZ$ (pr-141 bp) 的三倍，是由於 LacZ 的 SD region 較強所致。

而第一組 (141 bp) 與第二組 (478 bp) 融合基因不同之處，在於第二組融合基因包含的 $clpQ^+clpY^+$ 上游片段較長，由 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子區域往前延伸 337 bp，下游則同樣至 $clpQ^+clpY^+$ 的第十三個胺基酸為止，總長度為 478 bp，兩組不同長度的融合基因所測得之 β -galactosidase 活性相似，此結果顯示，位於 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子區域前的 337 bp，對 $clpQ^+::lacZ$ 的活性沒有影響。

當溫度由 30 °C 提高至 42 °C 時， $clpQ^+clpY^+$ 產生熱休克反應， $clpQ^+::lacZ$ 的活性增加。與野生株比較，在 $rpoH^-$ 突變株中， $clpQ^+clpY^+$ 及 $clpQ^+::lacZ$ 的 mRNA 表現都顯著減少；且當細菌具備正常的 σ^{32} ($rpoH$)，但在融合基因中， σ^{32} 可辨識的保守序列上做一 C→T 點突變，則融合基因 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 在 30 °C 時活性降低，顯示 σ^{32} 對 $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$ 沒有作用，當溫度提升至 42 °C 時， $clpQ^{m(c\rightarrow t)}::lacZ$

表現幾乎不會增加，沒有熱誘導現象產生。

一般狀況下 σ^{32} 會被 DnaK、DnaJ 及 GrpE chaperone system 結合並分解，當細菌內多種蛋白酶缺失的情況下，折疊錯誤或不正常的蛋白質增加並與 DnaK、DnaJ 及 GrpE chaperone system 結合後，啟動 dynamic auto-regulatory mechanism， σ^{32} 不再被 DnaK 等蛋白結合並趨於穩定 (Gamer *et al.*, 1992; Gamer *et al.*, 1996)，進而活化 $clpQ^+clpY^+$ 的表現，如圖八(B)。



第三章 *clpQ⁺clpY⁺* 啟動子五端未轉譯區域 (5'-UTR) 對 ClpQ 表現的影響

3.1 摘要

在 *clpQ⁺clpY⁺* operon 的五端未轉譯區域 (5'-UTR)，亦即轉錄起始處 (transcription start site) 與轉譯起始處 (translation start site) 之間，有一段 inverted repeat sequence (IR 序列) 5' CC CCGTAC TTTTGTACGGGG 3' (圖一)。藉由刪除 IR 序列(deletion)，並與 *lacZ* 融合，觀察 fusion gene 的表現，可知 IR 序列的缺失，會使 fusion gene 表現降低。另外，利用 Sula 及 RcsA 為 ClpYQ 基質的原理，建立 AC3112/pBAD33-*clpQ*/pBAD24-*clpY* 表現系統，觀察 IR 序列改變後的 ClpQ 對 ClpQ 與 ClpY 間交互作用的影響，並偵測其是否能分解 Sula 及 RcsA，得知 IR 序列缺失時，ClpYQ 無法正常分解基質，將 IR 序列以其他序列取代時，ClpYQ 亦無法正常分解基質，但若以反向的 IR 序列 5'GGGGCATGTTTTTCATGCCCC3' 取代原始的 IR 序列，使其序列改變但二級結構不變，則 ClpYQ 分解基質的能力不受影響。顯示 IR 所形成的 stem-loop 二級結構為 *clpQ⁺clpY⁺* operon 表現時所必須。

3.2 材料與方法

3.2.1 建立 AC3112(*cpsB::lacZ*)/pBAD33-*clpQ*/pBAD24-*clpY* 表現系統

(a) 菌株，載體，培養基和培養條件

本系統用於表現 *cpsB::lacZ* 的宿主細胞為 AC3112 (*lon⁻, clpQ⁻clpY⁻, cps::lacZ*) (Kuo *et al.*, 2004)，載體為 pBAD33 及 pBAD24，pBAD33 用於建構 5'-UTR 長度不同的 *clpQ⁺*，包含 pBAD33-*clpQ⁺*，pBAD33- Δ IR-*clpQ⁺* 與 pBAD33- Δ L-*clpQ⁺*，pBAD33-(R-IR)-*clpQ⁺* 及 pBAD33-(S-IR)-*clpQ⁺*。 Δ IR-*clpQ⁺*

不含 IR 序列， ΔL - $clpQ^+$ 則去除整段 5'-UTR。 $(R-IR)$ - $clpQ^+$ ，長度與 $clpQ^+$ 相同，但 IR 序列由 CCCC GTAC TTTT GTAC GGGG 改成 GGGG CATG TTTT CATG CCCC。 $(S-IR)$ - $clpQ^+$ ，長度與 $(R-IR)$ - $clpQ^+$ 同，但 IR 序列改成 CCCC GTAC TTTT TTTT TTTT。pBAD24 用於建構 pBAD24- $clpY^+$ 。

將 5'-UTR 及 $clpQ$ 序列以 PCR 放大後，與載體 pBAD33 (Guzman *et al.*, 1995) 接合，得到載體 pBAD33- $clpQ^+$ ，另以 PCR 放大 $clpY^+$ ，並與載體 pBAD24 (Guzman *et al.*, 1995) 接合，得 pBAD24- $clpY^+$ ，將此二載體送入帶有融合基因 $cpsB::lacZ$ 的菌株 AC3112 (lon^- , $clpQ^-clpY^-$, $cpsB::lacZ$)。因 pBAD33 及 pBAD24 兩載體會受阿拉伯糖 (arabinose) 誘導，受葡萄糖 (glucose) 抑制，實驗進行中若需促使載體上的 $clpQ^+$ 與 $clpY^+$ 大量表現時，則於培養過程中全程加入 0.5% (w/v) 阿拉伯糖，需抑制載體上的 $clpQ^+$ 與 $clpY^+$ 表現時，則於培養過程中全程加入 2% (w/v) 葡萄糖。使用的培養基為 Luria Bertani Broth (Difco)，並視情況加入 100 μ g/ml ampicillin(用於篩選 pBAD24)或 25 μ g/ml chloramphenicol(用於篩選 pBAD33)，以 30 $^{\circ}$ C 200 rpm 培養。

(b) pBAD33- $clpQ$ /pBAD24- $clpY$ 建構及選殖

(1) PCR 增幅條件

為大量增幅選殖的基因片段，利用 pWPC80 (Wu *et al.*, 1999) 作為 DNA 模板，5'primers 及 3'primers 列於表三，進行 PCR 反應。條件為 95 $^{\circ}$ C denature 7 min，95 $^{\circ}$ C denature 1.5 min，60 $^{\circ}$ C annealing 2 min，72 $^{\circ}$ C extension 1.5 min，進行 35 個循環，再以 72 $^{\circ}$ C extension 10 min 後，反應停止於 4 $^{\circ}$ C。

(2) 酵素截切及黏合作用

PCR products $clpQ^+$ ， ΔIR - $clpQ^+$ 與 ΔL - $clpQ^+$ ， $(R-IR)$ - $clpQ^+$ 及 $(S-IR)$ - $clpQ^+$ 經純化後，以限制酶 KpnI 及 HindIII 在 37 $^{\circ}$ C 水浴截切一小時，pBAD33 也以相同酵素做相同處理。再將截切後的質體和 PCR products 溶液混合，加入 2.5 倍 95% 酒精及 1/10 倍 2.8 M NaOAc (pH 5.2)，置於 -80 $^{\circ}$ C 共同沈澱至少四小時後，以 4 $^{\circ}$ C，11000 rpm 離心 30 min，吸除上清液後，再加入 75% 酒精，之後以 4 $^{\circ}$ C，

11000 rpm 離心 30 min，用 16 μ l ddH₂O 溶解 DNA，加入 2 μ l ligation buffer，1 μ l γ ATP，1 μ l T4 DNA ligase，在 16 °C 進行 16 hr 接合反應。

(3) pBAD33-*clpQ* 基因選殖

E. coli XL1 blue 培養至 OD600 約 0.4-0.5，離心後以冰浴之 2X TSS buffer [10%PEG 8000/ 5% (v/v) DMSO/ 20 mM MgSO₄ (pH 6.5) in LB] 0.15 ml 懸浮菌體，再加入接合反應後的反應物冰浴 45 分鐘，置於 37 °C heat shock 2 分鐘，在 37 °C 培養兩小時，將菌液塗抹於含 25 μ g/ml chloramphenicol 的 LA 培養基，37 °C 隔夜培養。

待長出許多菌落後，挑出單一菌落，於 25 μ g/ml chloramphenicol 的 LB 培養基隔夜培養，再以 Viogene mini prep kit 抽取載體，並定序以確認是否含有欲選殖之基因序列，若序列正確，則將質體以 2X TSS 轉殖法送入宿主 AC3112。

3.2.2 AC3112/pBAD33-*clpQ*/pBAD24-*clpY* 中，ClpYQ 對兩種基質 RcsA 及 Sula 的分解能力測試

因 RcsA 可活化 *cpsB* 的基因表現，若 AC3112 系統中所生成的 ClpYQ 可分解 RcsA activator，會造成報導基因 *cpsB::lacZ* 的 β -galactosidase 活性降低 (Kuo *et al.*, 2004; Munavar *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1999)。據此，用 LB/100 μ g/ml ampicilin/25 μ g/ml chloramphenicol/ 0.5% arabinose 培養基，使阿拉伯糖誘導兩載體 pBAD33 與 pBAD24，產生大量的 ClpYQ，培養至對數期取樣測 β -galactosidase 活性。若 ClpYQ 可分解 RcsA，則 *cpsB::lacZ* 的 β -galactosidase 活性降低，若無法分解 RcsA，則 *cpsB::lacZ* 的 β -galactosidase 活性升高。

另由於 Sula 為 ClpYQ 的基質之一，且 MMS (Methyl-methansulfonate) 會造成 DNA damage，引發 SOS response，誘導產生 Sula。而 Sula 為細胞分裂抑制物，過量的 Sula 使 *E. coli* 細胞因無法分裂而死亡。若 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 可表現，則 ClpYQ 可分解 Sula，使細胞分裂正常而可在含有 MMS 的培養基中生長。依此，將 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺，AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 及 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ L- *clpQ*⁺ 三菌分別培養

於 LB/100 µg/ml ampicilin/25 µg/ml chloramphenicol/ 2% glucose 及 LB/100 µg/ml ampicilin/25 µg/ml chloramphenicol/ 0.5% arabinose，待生長至 OD₆₀₀ 約 0.7，以 LB 將菌液稀釋，再分別滴在四種培養基 LA/ 2% glucose，LA/ 0.5% arabinose，LA/ 2% glucose/ 0.05% MMS，LA/ 0.5% arabinose/ 0.05% MMS，30°C 隔夜培養，接著觀察細菌生長狀況，若可生長表示 ClpYQ 可分解 SulA，不生長表示 ClpYQ 無法分解 SulA。

3.2.3 β-galactosidase 活性分析

菌液於適當溫度培養至 OD₆₀₀ = 0.3-0.7。取 0.3 ml 菌液加入 0.7 ml Z buffer (Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ · 2H₂O/ MgSO₄/ β-mercaptoethanol/ KCl)，以 0.1% SDS 30 µl 及 40 µl 氯仿破菌後，於 28 °C 水浴槽中預反應 5 分鐘。加入 0.2 ml ONPG (4 mg/ml) 開始計時，至反應呈黃色 (OD₄₂₀=0.6-0.9)後，加入 0.5 ml 1 M Na₂CO₃ 終止反應，記錄反應時間。測定反應液之 OD₄₂₀ 及 OD₅₅₀ 值。

活性的計算公式為：

$$1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / (T \times V \times \text{OD}_{600}) = \text{Units of } \beta\text{-galactosidase}$$

T：反應時間（分）

V：反應體積（ml）

單位定義：每分鐘每個菌體所產生之 *O*-Nitrophenol (Miller, 1972)。

3.2.4 北方點墨法 (Northern blotting)

(a) total RNA 萃取

將 *E. coli* 於 37 °C 震盪培養至 OD₆₀₀ = 0.3~0.5，4 °C 離心收集菌液 5 ml，以 Qiagene RNeasy Mini Kits 抽取 total RNA，再用 DEPC-ddH₂O 溶解 RNA 後，測 OD₂₆₀，取 3 µg 用於變性膠體電泳。

(b) 變性膠體電泳

(1) 配製 formaldehyde agarose gel

agarose 1.5 g 加入 DEPC-ddH₂O 111 ml 中，加熱使其溶解，降溫後加 10X formaldehyde running buffer (80 mM NaOAc/ 0.2 mM MOPS/ 10 mM EDTA pH 8.0/

DEPC-ddH₂O to 1000 ml) 15 ml/ 37% formaldehyde 26.82 ml，待冷卻定型。

(2) RNA sample 處理

RNA sample [RNA + 4.5 μ l DEPC-ddH₂O/ 2 μ l 10X formaldehyde running buffer/ 3.5 μ l formaldehyde/ 10 μ l formamide/ 0.5 μ l EtBr/ loading buffer (50 % glycerol/ 0.5 M EDTA pH 8.0/ 0.25 % bromophenol blue/ 0.25 % xylene cyanol)] 以 65 °C 加熱十分鐘後，放冰上急速冷卻 5 分鐘。

(3) 變性膠體電泳

formaldehyde agarose gel 放入電泳槽，先以 1X formaldehyde running buffer，60V 預跑 30 min 後，加入 RNA sample，以 60V 100 min 進行電泳。

(c) 北方轉印實驗 (blotting)

電泳膠片以 DEPC-ddH₂O 漂洗，再以 20X SSC 浸泡 5 min。將轉印膜 (nylon membrane) 置於膠片上，再依次取三張濾紙於 20X SSC 中潤濕，依序置於其上；並折疊吸水紙累積至 8 公分，覆蓋在最上層，最後以重物壓住整個裝置。靜置隔夜，利用毛細現象將膠片上的 RNA 轉印到轉印膜。

(d) 雜交反應 (hybridization)

取下轉印裝置上的重物及濾紙。轉印膜以 RNA 面朝上，浸泡 6X SSC 5 min 再風乾。以 Stratalinker 1800 進行 UV 連結反應。將 hybridization solution 10 ml (formamide/ 20X SSC/ 10% blocking reagent/ 1% N-lauroylsarcosine/ 10 % SDS) 注入雜交袋，轉印膜移至袋內並封口，在 42 °C 進行雜合前置反應 2 小時。取 probe (以 Roche PCR DIG Probe Synthesis Kit 製備) 20 μ l 以 65 °C 加熱 10 min 後，冰浴 5min，倒出塑膠袋內雜合前置反應的液體，加入新的 hybridization solution 10 ml 以及上述 probe 20 μ l，在 42 °C 進行雜合反應過夜。以 2 X SSC，0.1 % SDS 室溫下清洗轉印膜兩次，各 5 min。再以 0.1 X SSC，0.1 % SDS，55 °C 下清洗轉印膜兩次，各 20 min。

(e) 雜交訊號偵測 (detection)

轉印膜用 Buffer I (1 M maleic acid/ 0.15 M NaCl/ adjust to pH7.5 with NaOH)

漂洗，再用 Buffer II (1 % blocking reagent in Buffer I) 浸洗 30 分鐘，並以 50 rpm 低速搖動。取 2 μ l anti-DIG-AP conjugate，以 10 ml 之 Buffer II 稀釋後浸洗轉印膜 30 分鐘，並以 50 rpm 低速搖動。再用 Buffer I 浸洗並以 50 rpm 低速搖動。用 CDP-Star 5 ml 室溫下靜置反應 15 分鐘。取出轉印膜，風乾後，將底片壓在轉印膜上，顯影 15 秒 (顯影時間視訊號強弱決定)。將顯影後的底片先以顯影劑顯影再置於定影劑定影。以水潤洗除去藥劑，將底片晾乾保存。

3.2.5 mRNA 穩定性測試

取 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺，AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33-*AIR*- *clpQ*⁺，培養於 30 °C 的 LB/100 μ g/ml ampicilin/25 μ g/ml chloramphenicol 並以 0.5% 阿拉伯糖誘導，待生長至對數期，加入 rifampin 200 μ g/ml 抑制轉錄作用，在 0，2，4，6，10，20 分鐘取樣，抽出 total RNA 後，以北方點墨法偵測 *clpQ*⁺ mRNA 的表現。

3.2.6 西方點墨法 (Western blotting)

(a) SDS 蛋白質膠體電泳

細菌培養至對數期，測量菌液 OD₆₀₀ 吸光值後，取 3.0 ml 菌液，以 3000rpm 離心 10 分鐘，移除上清液。接著以 1 ml 無菌水清洗菌體並再次離心，移除上清液收集菌體。加入 70 μ l 的 2X SDS sample buffer 懸浮菌體，於 100 °C 反應分鐘，得到含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液。由菌液 OD₆₀₀ 吸光值換算出等量菌數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。先以 100V 電泳 30 分鐘再以 120V 電泳 60 分鐘。

(b) 蛋白質轉印 (transfer)

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 所提供的使用說明書。

裁減大小與 SDS-PAGE 膠片相似之 PVDF membrane，先於 100% methanol

中潤濕，再於滅菌二次水中浸潤 2 分鐘，接著放進 transfer buffer 中平衡約 10 分鐘。裁剪與 SDS-PAGE 膠片大小相似的 3mm 濾紙六張，與兩片海綿一同浸泡於 transfer buffer 中平衡十分鐘。

取出轉印用夾板，將充分以 transfer buffer (Trisbase 3.03 g/ Glycine 14.4 g/ methanol 200 ml/ 10% SDS 5 ml/加水至總體積 1000 ml) 潤濕之海綿置於黑色夾板上，取三張 3 mm 濾紙於 transfer buffer 中沾濕，依次置於海綿上，再將剛跑完電泳之膠片小心取下，於 transfer buffer 中潤濕一下放於 3 mm 濾紙上並以玻棒趕出氣泡。

將 PVDF membrane 置於膠片上，再依次取三張 3 mm 濾紙於 transfer buffer 中潤濕，依序置於其上；之後將另一片海綿充分以 transfer buffer 潤濕後置於濾紙上；最後，將夾板夾住。以上步驟需戴手套，並免各夾層間產生氣泡。

將夾板至入 transfer cell 中，轉印時蛋白質由負極向正極的 PVDF membrane 移動。以 400 mA 之電流轉印約 1.5 小時，並不時將融化之冰塊取出置換，以免轉印溫度過高而產生氣泡。

(b) 雜交反應 (hybridization)

採用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 操作手冊所提供之方法進行免疫雜交。將轉印後的轉印膜以 PBS (Na_2HPO_4 11.45 g/ NaH_2PO_4 2.96 g/ NaCl 5.84 g/ dH_2O 1 L) 潤濕後，置入 blocking reagent (PBST 100 ml/ skin milk 7.0 g) 中，於室溫下搖洗反應一小時或者置於 4°C 冰箱中反應隔夜。將轉印膜於室溫下以 PBST (於 PBS 中加入 Tween-20，至濃度為 0.1%) 洗三次，第一次 15 分鐘；第二、三次洗 5 分鐘。

將轉印膜置於含一次抗體 [ClpQ Polyclonal Antibody (Clontech)，1:1000 稀釋] 的 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時，進行雜交。將轉印膜以 PBST 於室溫下洗三次，第一次 15 分鐘；第二、三次洗 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。將轉印膜置於含二次抗體 [Anti-rabbit Ig, peroxidase-linked specific whole antibody (Amersham): 1:500 稀釋] 的 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時。將轉印膜以 PBST 於室溫下洗三次，第一次 15 分鐘；第二、三次洗 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。

(c) 雜交訊號偵測 (detection)

使用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 套組進行雜交訊號的偵測。訊號產生的原理為：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。

取相同體積之 Solution I (HRP Substrate Peroxide Solution) 及 Solution II (HRP Substrate Luminol Reagent) 分別置於試管中 (每片轉印膜約各需 0.5 ml 的 Solution I 及 Solution II)，將兩者混合成 detection reagent 靜置反應 5 分鐘。取透明投影片置於壓片盒上，將轉印膜上的 PBST 滴乾，平鋪於保鮮膜上，然後將 detection reagent 以滴管均勻滴灑於轉印膜上再覆以另一張透明投影片。以下步驟於暗房中操作。將 autoradiography film 置於轉印膜上，顯影 15 秒 (顯影時間視訊號強弱決定)。將顯影後的底片 (autoradiography film)，置於顯影劑中顯影，顯影時間視訊號強弱而定。以水潤洗除去底片上的顯影劑，水滴乾後，再將底片置於定影劑中定影。以水潤洗除去定影劑，將底片晾乾保存。

3.2.7 預測 RNA 二級結構所使用的網站

Mfold RNA folding <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>

(Zuker, 2003)

3.3 結果

3.3.1 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子的五端未轉譯區域 (5'-UTR) 對 $clpQ^+::lacZ$ 表現的影響

在 $clpQ^+clpY^+$ 的起始密碼 (start codon) 之前，有 71bp 的五端未轉譯區 (5'-untranslated region, 5'-UTR)，在 5'-UTR 中，有 IR 序列 CCCC GTAC TTTT GTAC GGGG 存在。

為探討 5'-UTR 對 $clpQ^+clpY^+$ 基因表現的影響，將 $clpQ^+clpY^+$ 的啟動子區域及其下游序列，去除 IR 序列及其下游共 40 bp (如圖一所示)，以 PCR 方式大量產生選殖基因片段，將此片段 $clpQ^{m2} \Delta 40bp$ 與載體 pRS415 上的 $lacZ$ 接合，利用噬菌體 λ RS45 及藍白篩選法製備溶胞液 (lysate) λ RS45 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$

(op)。以溶胞液 λ RS45 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op) 感染 MC4100，純化出溶原菌 (lysogen) HY20019 [MC4100 λ RS45 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op)]。

取 HY20001 [MC4100 λ RS45 $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)] 及 HY20019 [MC4100 λ RS45 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op)]，在 30 °C 下培養至對數期，取樣分析 β -galactosidase 活性，結果如圖九(A)。HY20001 [$clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)] 的活性為 159 units，因缺乏 IR 序列及下游 40 bp，使 HY20019 [$clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op)] 的 β -galactosidase 活性顯著降低至 67 units。另外，HY20001 [$clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)] 及 HY20019 [$clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op)] 在 30°C 培養至對數期，抽取 total RNA，以 $lacZ$ 的序列為探針，做北方點墨分析，結果如圖九(B)，HY20019 [$clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op)] 的訊號比 HY20001 [$clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)] 微弱許多，由以上結果，可知缺乏 5'-UTR 使 $clpQ^+clpY^+$ 無法正常表現。

3.3.2 五端未轉譯區域 (5'-UTR) 中的 IR 序列對 $clpQ^+clpY^+$ 表現的影響

由前述實驗可知，缺乏 5'-UTR，使 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op) 的 mRNA 表現減少及 β -galactosidase 的活性降低，為瞭解這些影響是否與 5'-UTR 中的 IR 序列相關，首先用 M-fold 分析軟體，預測 5'-UTR 的 RNA 結構。將 $clpQ^+clpY^+$ 啟動子的 -10 box 及 5'-UTR 序列輸入 M-fold，預測 RNA 結構如圖十(A)(a)，在 IR 序列的地方，會形成 stem-loop 結構， $\Delta G = -24.6$ kcal/mol，若去除 IR 序列後，再以 M-fold 預測 RNA 結構，結果如圖十(A)(b)，stem-loop 消失， $\Delta G = -3.3$ kcal/mol，若刪除整段 5'-UTR，所預測的 RNA 結構如圖十(A)(c)， $\Delta G = -1.3$ kcal/mol。

將四種載體 pBAD33，pBAD33- $clpQ^+$ ，pBAD33- $\Delta IR-clpQ^+$ 與 pBAD33- $\Delta L-clpQ^+$ 分別送入 AC3112/pBAD24- $clpY^+$ ，得四株菌：AC3112/pBAD24- $clpY^+$ /pBAD33，AC3112/pBAD24- $clpY^+$ /pBAD33- $clpQ^+$ ，AC3112/pBAD24- $clpY^+$ /pBAD33- $\Delta IR-clpQ^+$ ，AC3112/pBAD24- $clpY^+$ /pBAD33- $\Delta L-clpQ^+$ ，將此四菌培養於 30 °C，並於培養基中加入 0.5% 阿拉伯糖，誘導 ClpYQ 大量表現，待生長至對數期，分析 $cpsB::lacZ$ 的 β -galactosidase 活性，結果如圖十(B)，AC3112/pBAD24- $clpY^+$ /pBAD33- $clpQ^+$ 的活性為 31 units，遠低於缺乏 $clpQ^+$ 的

控制組 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33 (活性 157 units), 表示 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺ 可產生正常的 ClpYQ, 具有分解 RcsA activator 的作用。AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 的活性為 125 units, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ L- *clpQ*⁺ 的活性為 129 units, 兩者皆與缺乏 *clpQ*⁺ 的控制組活性相近, 表示 Δ IR- *clpQ*⁺ 與 Δ L- *clpQ*⁺ 因缺乏 IR 序列, 使 *clpQ*⁺ 無法正常表現。

為瞭解 IR 序列對 *clpQ*⁺ 蛋白質及 mRNA 表現的影響, 將此四菌培養於 30 °C, 並於培養基中加入 0.5% 阿拉伯糖, 待生長至對數期, 以西方點墨法偵測蛋白質表現量, 結果如圖十(C), 5'-UTR 完整的 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺, 蛋白質訊號較強, 缺乏 IR 序列的兩菌 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 與 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ L- *clpQ*⁺, 蛋白質的訊號非常微弱。另以北方點墨法分析 *clpQ* mRNA 表現量, 結果如圖十(D), pBAD33- *clpQ*⁺ 所產生的訊號很強, pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 及 pBAD33- Δ L- *clpQ*⁺ 的訊號都很微弱。由以上結果可知, 缺乏 IR 序列使 *clpQ*⁺ mRNA 表現量變少, 進而降低蛋白質表現。

為瞭解 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 中, *clpQ*⁺ mRNA 表現量變少是否因缺乏 IR 序列使 *clpQ*⁺ mRNA 不穩定, 半生期 (half life) 變短, 以 rifampin 抑制兩株菌 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 的轉錄作用後, 以北方點墨法偵測 *clpQ*⁺ mRNA 的表現, 結果如圖十(E), pBAD33- *clpQ*⁺ 的 mRNA 訊號較強, pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 較弱, 且在加入 rifampin 後, mRNA 分解速度較慢, 以上結果顯示缺乏 5'-UTR 使 Δ IR- *clpQ*⁺ 的 mRNA 不穩定。

以 MMS 及三菌株 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ IR- *clpQ*⁺ 及 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ L- *clpQ*⁺ 測試 IR 序列對 *clpQ*⁺ 蛋白質表現的影響。將三菌分別以 2% glucose 抑制 pBAD33 及 pBAD24, 或以 0.5% arabinose 誘導 pBAD33 及 pBAD24

後，再分別滴在四種培養基 LA/ 2% glucose, LA/ 0.5% arabinose, LA/ 2% glucose/ 0.05% MMS, LA/ 0.5% arabinose/ 0.05% MMS, 30°C 隔夜培養，結果如圖十一。

三株菌在 LA/2% glucose 中，生長狀況皆正常，稀釋倍數 10^{-1} 至 10^{-5} 時細菌都可生長，在 LA/0.5% arabinose 中的生長情況與在 LA/2% glucose 類似。

有加 0.05% MMS 的情況，在 LA/ 2% glucose/ 0.05% MMS 培養時，AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33-*ΔIR-clpQ*⁺ 及 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33-*ΔL-clpQ*⁺ 皆無法生長，表示此培養條件時，*clpY*⁺ 存在，但 *clpQ*⁺ 表現不足，無法分解由 MMS 誘導產生的 Sula，使 *E. coli* 無法正常分裂及生長。在 LA/0.5% arabinose/0.05% MMS 培養時，AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺ 稀釋倍數 10^{-1} 至 10^{-4} 時細菌可生長，AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33-*ΔIR-clpQ*⁺ 及 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33-*ΔL-clpQ*⁺ 則無法生長，表示培養條件中含有 MMS，產生大量 Sula 時，只有 pBAD33- *clpQ*⁺ 可與 *clpY*⁺ 正常作用並分解 Sula，pBAD33-*ΔIR-clpQ*⁺ 及 pBAD33-*ΔL-clpQ*⁺ 都無法正常表現。以上結果亦顯示五端未轉譯區域 (5'-UTR) 中的 inverted repeat sequence 對 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 表現非常重要。

3.3.3 IR 序列所形成的 stem-loop 結構對 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 表現的影響

由前述實驗中已知，IR 序列 CCCC GTAC TTTT GTAC GGGG 對 *clpQ*⁺ mRNA 表現非常重要，為瞭解此重要性來自於序列本身或序列所形成的 stem-loop 結構，建構兩種新的載體，並送入 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺，一為 pBAD33-(*R-IR*)-*clpQ*⁺，長度與 pBAD33-*clpQ*⁺ 相同，但 IR 序列由 CCCC GTAC TTTT GTAC GGGG 改成 GGGG CATG TTTT CATG CCCC，經 M-fold 預測其 mRNA 結構，結果如圖十二(A)(a)，結構及 ΔG (= -24.6 kcal/mol) 都與 pBAD33-*clpQ*⁺ 相同，另一載體為 pBAD33-(*S-IR*)-*clpQ*⁺，長度與 pBAD33-(*R-IR*)-*clpQ*⁺ 同，但 IR 序列的序列改成 CCCC GTAC TTTT TTTT TTTT，經 M-fold 預測其 mRNA 結構，結果如圖十二(A)(b)，結構改變且 ΔG = -10.6 kcal/mol。將五株菌 AC3112/pBAD24- *clpY*⁺

/pBAD33, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- *clpQ*⁺, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33-(*R-IR*)- *clpQ*⁺, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33-(*S-IR*)- *clpQ*⁺, AC3112/pBAD24- *clpY*⁺ /pBAD33- Δ *IR*- *clpQ*⁺ 培養於 30 °C, 待生長至對數期後, 取樣分析 β -galactosidase 活性, 結果如圖十二(B), 序列改變但結構不變的 pBAD33-(*R-IR*)- *clpQ*⁺, 活性為 28 units, 與 pBAD33-*clpQ*⁺ 的活性 35 units 相近, 序列與結構皆改變的 pBAD33-(*S-IR*)- *clpQ*⁺, 活性為 81 units, 遠高於 pBAD33-*clpQ*⁺。以北方點墨法分析此五菌的 *clpQ*⁺ mRNA 訊號強度, 結果與 β -galactosidase 活性相似, 序列改變但結構不變的 pBAD33-(*R-IR*)- *clpQ*⁺, 訊號強度與 pBAD33-*clpQ*⁺ 相近, 序列與結構皆改變的 pBAD33-(*S-IR*)- *clpQ*⁺, 訊號強度遠低於 pBAD33-*clpQ*⁺, 如圖十二(C)。由以上結果可知, *clpQ*⁺*clpY*⁺ 操縱子的 5'-UTR, 對 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 表現的重要性來自 5'-UTR 中的 IR 序列所產生的 stem-loop 結構, 具有穩定 *clpQ*⁺ mRNA 的效果。

3.4 討論

在 *clpQ*⁺*clpY*⁺ operon 5'-UTR 的研究中, 無論是 *clpQ*^{m2} Δ 40bp::*lacZ*, Δ *IR-clpQ*⁺ 或 Δ *L-clpQ*⁺, 只要缺乏 stem-loop 結構, mRNA 表現量就會減少, 且與 *clpQ*⁺ 比較, Δ *IR-clpQ*⁺ 因沒有 stem-loop 結構, 使 mRNA 分解速度加快。另外, (*R-IR*)-*clpQ*⁺ 以 GGGG CATG TTTT CATG CCCC 取代 *clpQ*⁺*clpY*⁺ operon 5'-UTR 上的 IR 序列 CCCC GTAC TTTT GTAC GGGG, 使 stem-loop 的結構不變但序列改變, 結果顯示 (*R-IR*)-*clpQ*⁺ 與 *clpQ*⁺ 的 mRNA 一樣穩定, 且同樣可使 *cpsB*::*lacZ* 的活性顯著降低。由此可知, *clpQ*⁺*clpY*⁺ 5'-UTR 中, IR 序列形成的 stem-loop 結構, 具有穩定下游 mRNA 的作用。在前人研究中, 亦曾提出 5' stem-loop 結構可使 *papA* (pyelonephritis-associated pili) (Bricker & Belasco, 1999) 基因及 *ompA* (outer membrane protein) (Emory & Belasco, 1990; Emory *et al.*, 1992) 基因的 mRNA 穩定, 本研究為 ATP-dependent protease 中, 首次發現 5' stem-loop 結構具有穩定下

游 mRNA 的功能。

近幾年，small RNA 對基因的調節受到各方注目(Gottesman *et al.*, 2006)，可與 RNA 結合的蛋白 Hfq (a host factor for RNA phage QB phage replication) 具有穩定 small RNA 並幫助 small RNA 與 mRNA 結合的作用(Franze de Fernandez *et al.*, 1972)，但這種調控方式在 *clpQ*⁺::*lacZ* 的表現中尚未發現。

在搜尋比對腸道菌 (*Enterobacteriaceae*) 的基因後得知，大部分腸道菌的 *clpQ* 基因，其 5'UTR 中，都具有可能形成 stem-loop 結構的 IR 序列，且位置與大腸桿菌中 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 5'UTR 的 IR 序列相似 (圖十三)，IR 序列所形成的 stem-loop 結構在細菌的生理調節中扮演何種角色，是未來值得研究的課題。



第四章 ClpY 基質辨識位置之探討

4.1 摘要

經研究已知 ClpYQ 以六元環方式組合，其中 ClpY 負責基質辨識，利用水解 ATP 作為能量來源，打開基質結構，並傳送到 ClpQ 進行分解。至於 ClpY 如何辨識並選擇基質，以及後續傳送降解基質的細節，目前尚屬未知。本文針對 ClpY 基質辨識區域做一研究與討論。ClpY 可分為三個作用區(domain)，如圖十四，N-terminal domain，I-intermediated domain 及 C-terminal domain，N domain 具有 ATPase 的功能，C domain 則與 self-oligomerization 及 ClpQ 的蛋白酶活性相關。由 X-ray 結構分析，認為 I domain 能與 ClpQ 結合，並負責與基質互相作用。ClpY 的 I domain 中，有兩個 loop 結構，分別為 loop L1(137-150 aa)與 loop L2(175-209 aa)，已知將 loop L2 移除後，ClpY Δ (175-209 aa) 在 ClpQ 存在時仍然無法分解 Sula (*in vitro*)，但其分子機制未明。利用酵母菌雙雜交系統(yeast two-hybrid system)分析，可知 ClpY 與 Sula 之間有蛋白質交互作用，本文亦使用酵母菌雙雜交系統，進一步得知 ClpY 的 I domain 負責基質辨識，C domain 則可與 ClpQ 作用，而 I domain 中的 loop L2(175-209 aa)除了與基質結合外，並與後續的基質傳遞及分解相關。

4.2 材料與方法

4.2.1 酵母菌雙雜交系統的菌株、載體及培養基

本文使用酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 (*his3, trp1, ura2, lexA_{op(x6)}-leu2*)，其內帶有載體 p8op-*lacZ*，報導基因為 *lacZ* 與 *leu2*，另使用兩載體 pGilda (a LexA DNA binding domain)及 pB42AD (a B42 popypeptide activation domain)。將欲探討的基因片段(如 *clpY* 或 *sula*)分別帶入載體 pGilda 及 pB42AD，

以植物蜜糖 raffinose 及半乳糖 galactose 誘導兩載體產生 ClpY 及 Sula, 若兩者 (ClpY 與 Sula) 結合, 則可啟動報導基因 *lacZ* 或 *leu2* 表現, *lacZ* 表現時, 菌落在 LA/X-gal 培養基上呈現藍色, β -galactosidase 活性升高, *leu2* 表現時, 菌落可以在缺乏 Leucine 的培養基中生長。

用於培養酵母菌的培養基為 SD medium (ddH₂O 90 ml/ agar 2.0 g/ yeast nitrogen base w/o amino acid 0.67 g 或 mini SD base Gal/Raf 3.7 g/ DO supplements 依包裝標示加入/ glucose 2.0 g/ 10X BU salts(only for X-gal) 10.0 ml/ X-gal (20 mg/mlDMF 避光保存於-20 °C)/加水至 100 ml。使用液態培養基時不需加入 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, 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。10X BU salts 及 X-gal 需先滅菌降溫之後再加入。

4.2.2 *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。首先挑選 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。再以 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。接著用 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。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, 重複兩次。以無菌水將清洗過的菌體稀釋 2 倍。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。

4.2.3 *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。首先挑選 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。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。

4.2.4 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。首先挑選 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。再以 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。接著以 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。

取 1 ml 菌液 (每個樣品均做三重複)，以 14000 rpm 離心移除上清液，收集菌體。再以 1 ml 的 Z buffer 懸浮菌體，加入 40 μ l 0.1% SDS 及 60 μ l chloroform，劇烈震盪 10 秒進行破菌。置於 28°C 水浴槽中預反應 5 分鐘。接著加入 200 μ l ONPG 至每個反應試管及空白組中 (以 1 ml Z buffer 加入 40 μ l 0.1% SDS 及 60 μ l chloroform 作為空白組)，開始計時。待顏色轉變黃色 (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。最後離心使細胞碎片沉降後，取上清液測量 OD₄₂₀ 吸光值。

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)。

4.2.5 ClpY 及其突變分解基質之偵測

偵測 ClpY 及其突變是否可以順利分解基質時，使用 *E. coli* AC3112 (*lon*⁻, *clpQ*⁻*clpY*⁻, *cpsB::lacZ*)，將 *clpY* 及其衍生的突變基因與 pBAD24 接合，送入 AC3112/ pBAD33-*clpQ*，以阿拉伯糖誘導兩載體表現，產生之 ClpQ 與 ClpY(或突變的 ClpY)如能正常作用，則 ClpYQ 可分解基質 SulA 或 RcsA。當培養基中加入 MMS 使細菌產生大量的 SulA，而 SulA 被 ClpYQ 分解，此時菌株可正常生長，另外，當 ClpYQ 分解 RcsA 時，報導基因 *cpsB::lacZ* 缺乏活化物，活性下降。

4.3 結果

4.3.1 ClpY 基質辨識：ClpY^{ΔI+7Gly} 及 ClpY^{ΔL1, ΔL2} 與 SulA 之間沒有交互作用

前人研究已知，ClpY 的 I domain 中有兩個環狀結構(loop)，分別為 loop L1(137- 150 aa)及 loop L2(175-209 aa)，若將 loop L2 去除，ClpY 無法分解 SulA。為瞭解 I domain 與基質辨識及分解的相關性，建構以下各組載體：pGilda-*clpY*，pGilda-*clpY*^{ΔL1}，pGilda-*clpY*^{ΔL2}，pGilda-*clpY*^{ΔL1, ΔL2}，pGilda-*clpY*^{ΔI+7Gly}，ClpY^{ΔL1} 係將 I domain 中的 loop L1 移除，ClpY^{ΔL2} 將 I domain 中的 loop L2 移除，ClpY^{ΔL1, ΔL2} 則移除 loop L1 及 L2 都去除，ClpY^{ΔI+7Gly} 以七個 Glicine 取代 I domain，經由 X-ray 分析已知其構形與 ClpY 相似。

將各載體分別送入 EGY48/pB42AD-*sulA*⁺，觀察這些菌株在缺乏 Leucine 的選擇性培養基中的生長狀況，結果如圖十五(A)，BD-ClpY/AD-SulA，BD-ClpY^{ΔL1}/AD-SulA，BD-ClpY^{ΔL2}/AD-SulA 可生長，BD-ClpY^{ΔL1, ΔL2}/AD-SulA，BD-ClpY^{ΔI+7Gly}/AD-SulA 無法生長，此結果顯示 loop L1 與 loopL2 皆可與 SulA 作用。

為瞭解上述不同的 ClpY 與 ClpQ 作用後，是否具備分解基質的能力，將 *clpY* 及其衍生基因分別與載體 pBAD24 接合，得到載體 pBAD24，pBAD24-*clpY*，pBAD24-*clpY*^{ΔL1}，pBAD24-*clpY*^{ΔL2}，pBAD24-*clpY*^{ΔL1, ΔL2}，pBAD24-*clpY*^{ΔI+7Gly}，

將上述各載體送入 AC3112/pBAD33-*clpQ*⁺，觀察報導基因 *cpsB::lacZ* 的表現，結果如圖十五(B)，只有 ClpY 與 ClpY^{ΔL1} 兩者與 ClpQ 作用後，可正常分解 RcsA activator，使 *cpsB::lacZ* 的活性降低，ClpY^{ΔL2}，ClpY^{ΔL1, ΔL2} 與 ClpY^{ΔI+7Gly} 三者則否，另外，以 MMS test 觀察 ClpYQ 是否可分解 SulA，使細菌正常生長，結果如圖十五(C)，ClpY 與 ClpY^{ΔL1} 兩者與 ClpQ 作用後，可分解 SulA，細菌生長正常，ClpY^{ΔL2}，ClpY^{ΔL1, ΔL2} 與 ClpY^{ΔI+7Gly} 三者則無法分解 SulA，細菌無法正常生長，此結果顯示，在 ClpY 與基質結合後，loop L2(175-209 aa)與基質的進一步傳送及分解相關。

4.3.2 ClpY 基質辨識：loopL2 上的點突變 ClpY^{L199Q} 造成 ClpY^{L199Q}/ClpQ 無法分解基質

為瞭解 I domain 中，哪些胺基酸與 SulA 的結合相關，在 *clpY* 的 I domain 序列做 error prone PCR，取得 *clpY* 隨機突變片段，與載體 pB42AD 接合後，送入 yeast EGY48/pB42AD-*sulA*⁺/p8op-*lacZ*，以藍白篩選方式挑出與野生株 EGY48/pB42AD-*clpY*/pGilda-*sulA*⁺/p8op-*lacZ* 顏色相異者（深藍色或白色），經定序知突變處為 M187I，A188S，L199Q，N205K，皆集中於 loop L2。

此四突變株與野生株 AD-ClpY/BD-SulA 的 SulA binding 活性測試結果如圖十六(A)，AD-ClpY^{M187I}/BD-SulA 在 X-gal 培養基中生長時為深藍色，且 β-galactosidase 活性較高，顯示其與 SulA binding 較強，ClpY^{L199Q} 在 X-gal 培養基中生長時為白色，且 β-galactosidase 活性極低，顯示其與 SulA binding 很弱，ClpY^{A188S}ClpY^{N205K} 在 X-gal 培養基中生長時為淡藍色，且 β-galactosidase 活性稍低，顯示其與 SulA binding 較弱。

另欲知上述四處突變對 ClpYQ 分解基質的影響，建構四組載體 pBAD24-*clpY*^{M187I}，pBAD24-*clpY*^{A188S}，pBAD24-*clpY*^{L199Q}，pBAD24-*clpY*^{N205K}，分別送入 AC3112/pBAD33-*clpQ*，測 *cpsB::lacZ* 活性，結果如圖十六(B)，除 ClpY^{L199Q} 活性升高，無法正常分解基質外，其餘三者皆可分解基質。

4.3.3 ClpY 基質辨識：ClpY 的基質辨識與 loopL2 上的疏水性胺基酸密切相關

為確認 I domain 中的疏水性胺基酸與基質結合的相關性，在前述四組隨機突變處附近做點突變，建構三組新載體 pB42AD-*clpY*^{I186N}，pB42AD-*clpY*^{E193L,E194L}，pB42AD-*clpY*^{Q198L,Q200L}，送入 yeast EGY48/pGilda-*sulA*⁺/p8op-*lacZ*，經缺乏 Leucine 的培養基培養後，結果如圖十七(A)，ClpY^{E193L,E194L}，ClpY^{Q198L,Q200L} 可生長，表示此兩組突變可與 SulA 結合，ClpY^{I186N} 則無法與 SulA 結合，此結果顯示 ClpY 需要 loop L2 的疏水性胺基酸才能與基質 SulA 結合。

將此三突變與載體 pBAD24 接合，分別送入 AC3112/pBAD33-*clpQ*，測 *cpsB::lacZ* 活性，結果如圖十七(B)，ClpY^{I186N}，ClpY^{E193L,E194L}，ClpY^{Q198L,Q200L} 三者的活性都升高，無法分解基質。顯示 ClpY^{I186N} 無法順利與基質結合，ClpY^{E193L,E194L}，ClpY^{Q198L,Q200L} 雖能與基質結合，但無法正常的將基質傳送至 ClpQ 並加以分解。

4.3.4 ClpY 與 ClpQ 之交互作用: ClpY^{ΔL1}，ClpY^{ΔL2}，ClpY^{ΔL1, ΔL2} 及 ClpY^{ΔI+7Gly} 能與 ClpQ^{E61C} 結合，ClpY^{Δc}，ClpYX 則否

前人以 X-ray 結晶結構分析得知，ClpQ 的第 61 個胺基酸 E61 與 ClpY 的第 440 個胺基酸 R440 相連接(Rohrwild *et al.*, 1997)，且 X-ray 結晶結構亦得出 ClpY 以 I domain 與 ClpQ 作用之結論((Bochtler *et al.*, 2000))。由本實驗室先前研究則顯示，與野生型的 ClpQ 相比，ClpQ^{E61C} 與 ClpY 的親和力較佳，並具有正常的蛋白酶功能。為探討 ClpY 以哪一部份與 ClpQ 相連結，將 *clpY* 的 C domain 去除後，建構新載體 pGilda-*clpY*^{ΔC}，另外，將 *clpY* 的 C domain 置換為 *clpX* 的 C domain (已知 ClpX 的 C domain 與 ClpQ 無作用(Kim & Kim, 2003))，建構新載體 pGilda-*clpYX*。

將載體 pGilda，pGilda-*clpY*，pGilda-*clpY*^{ΔL1}，pGilda-*clpY*^{ΔL2}，pGilda-*clpY*^{ΔL1, ΔL2}，pGilda-*clpY*^{ΔI+7Gly} 及 pGilda-*clpY*^{ΔC} 與 pGilda-*clpYX* 分別送入 EGY48/pB42AD-*clpQ*^{E61C}，觀察各菌株在缺 Leucine 培養基的生長狀況，結果如圖十八，BD-ClpY/AD-ClpQ^{E61C}，BD-ClpY^{ΔL1}/AD-ClpQ^{E61C}，BD-ClpY^{ΔL2}/AD-ClpQ^{E61C}，BD-ClpY^{ΔL1, ΔL2}/AD-ClpQ^{E61C}，BD-ClpY^{ΔI+7Gly}/AD-ClpQ^{E61C} 中，ClpY 與 ClpQ 交

互作用正常，菌株可生長，BD-ClpY^{Δc}/AD-ClpQ^{E61C}，BD-ClpYX/AD-ClpQ^{E61C} 中，ClpY 與 ClpQ 無法正常作用，使菌株無法在缺 Leucine 的培養基中生長，以上結果顯示，ClpY 的 C domain 可以與 ClpQ 相結合。

4.4 討論

在 ClpY 基質辨識的研究中，以酵母菌雙雜交系統證實，缺乏 I domain 但 N 與 C domain 之間仍有七個 Gly 相連的突變 ClpY^{ΔI+7Gly}，無法與 SulA 結合，而 ClpYQ 複合體之結構，中間部分為兩個 ClpQ 六元體，上下則是兩個 ClpY 六元體，且 I domain 位於複合體最外層（附圖一 A），顯示 ClpY 是以突出的 I domain 來進行基質辨識。

前人研究已知，在 *in vitro* 狀態下，ClpY 分解 MBP-SulA 需要 loopL2 (Song *et al.*, 2000)，且在 X-ray 結構中，*H. influenza* 的 ClpY，其 loopL2 呈現 α loop 結構 (Sousa *et al.*, 2000)。本文研究則顯示，單獨缺乏 loopL1 或 loopL2 時，ClpY 仍可辨識基質，但兩者皆缺乏時，ClpY 失去與基質結合的能力，此結果與結晶結構中，ClpY 的 I domain 上，loopL1 與 loopL2 位於複合體中 I domain 的外側相呼應(附圖一 B)。另外，ClpY^{ΔL2} 無法與 ClpQ 共同作用並分解 SulA，表示 loopL2 在 *in vivo* 狀態下，與基質結合之後的基質傳送有關，此亦與結晶結構中，loopL2 為一具有彈性的 loop 結構之結果相對應。

第五章 大腸桿菌 *gspS* 基因表現之調控

5.1 摘要

致病性原蟲 *Trypanosoma* 會造成人類昏睡及死亡等病症，*Trypanosoma* 中，形成 trypanothione 的酵素 TryS 為 *Trypanosoma* 所獨有，在人類細胞中不存在，因此針對 TryS 的研究，有助於治療 *Trypanosoma* 所造成的疾病。大腸桿菌沒有 TryS，但形成 glutathionylspermidine 的酵素 GspS，和 *Trypanosoma* 的 TryS 在序列分析或親源分析都極為相似。至目前為止，尚未有任何與大腸桿菌 *gspS* 轉錄調控 (transcription regulation) 相關之研究，本文對 *E. coli* 基因 *gspS* 做探討，目的是了解 *gspS* 的調控方式，並找出 *gspS* 調控蛋白。*E. coli* 的 *gspS* 長 1860 bp，產物為 glutathionylspermidine synthetase (GspS)，共有 619 個胺基酸，是一種具有雙重功能的酵素 (bifunctional enzyme)，可執行 GSH 和 spermidine 之間醯胺鍵的合成與分解。本研究初步確認 *gspS* 為一單獨的轉錄單位而非以操縱子形式存在，且 GspS 起始密碼上游序列具有啟動子功能，而在 *in vivo* 情況下， H_2O_2 與 BaeR 都可誘導 *gspS* 之表現。

5.2 材料與方法

5.2.1 建立 *gspS* 上游啟動子區域表現系統

(a) 菌株，載體，培養基和培養條件

本研究選殖基因的載體為 pRS415 及 pRS414，兩載體皆以 *lacZ* 為 reporter gene，pRS415 用以建構不同長度 *gspS* promoter region 與 *lacZ* 之 operon fusion *gspS472-lacZ* (op)，*gspS687-lacZ* (op)，*gspS895-lacZ* (op)，*gspBaeR1-lacZ* (op)，*gspBaeR2-lacZ* (op) 等，pRS414 用於建構 protein fusion *gspS472-lacZ* (pr)，*gspS687-lacZ* (pr)，*gspS895-lacZ* (pr)，*gspBaeR1-lacZ* (pr)，*gspBaeR2-lacZ* (pr) 等。

選殖基因表現的宿主細胞為帶有不同長度之 *gspS* 啟動子區域與 *lacZ* 接合基

因之 *E. coli* SG20250。用於製備含有 single copy *gspS-lacZ* 菌株的噬菌體為 λ RS45。本文所使用的菌株列於表四，載體及噬菌體列於表五。

使用的培養基為 Luria Bertani Broth (Difco)，並視情況加入 100 μ g/ml 的 ampicillin，以 37°C，200 rpm 培養。

(b) *gspS* 啟動子區域序列建構及選殖

(1) PCR 增幅 *gspS* promoter region 條件

為大量增幅選殖的基因片段，利用 *E. coli* MG1655 chromosome 作為 DNA 模板，5'primers 及 3'primers 列於表 3，進行 PCR 反應。條件為 95°C denature 7 min，95°C denature 1.5 min，60°C annealing 2 min，72°C extension 1.5 min，進行 40 個循環，再以 72°C extension 10 min 後，反應停止於 4°C。

(2) 酵素截切及黏合作用

PCR products *gsp472*，*gsp687* 及 *gsp895* 經純化後，以限制酶 EcoRI 及 BamHI 在 37°C 下載切一小時，pRS415 及 pRS414 也做相同處理。再將截切後的各組載體和 PCR products 溶液以酒精共同沈澱後，用 T4 DNA ligase 在 16°C 進行 16 hr 接合反應。

(3) *gspS-lacZ* 基因選殖

E. coli XL1 blue 培養至 OD₆₀₀ 約 0.4-0.5，離心後以冰浴之 2X TSS buffer [10%PEG 8000/ 5% (v/v) DMSO/ 20 mM MgSO₄(pH6.5) in LB) 0.2 ml 懸浮菌體，再加入接合反應後的反應物冰浴 45 分鐘，置於 37°C heat shock 2 分鐘，在 37°C 培養一小時，將菌液塗抹於含 100 μ g/ml ampicillin 的 LA plate，37°C 隔夜培養。挑出單一菌落，抽取載體並定序以確認是否含有欲選殖之基因序列。

(4) lysogens (溶原菌) 建構

overnight culture 於 37°C，0.2% maltose，震盪培養，視需要加入抗生素(此菌內的載體含有欲建構的 target DNA 序列)，取 0.2 ml 菌液，加入 λ RS45 plaques，在 37°C 靜置 15 分鐘。加入 R-Top Agar 3 ml，混勻後倒在 LA 上，在 37°C 倒置培養 5-8 小時後，加 5 ml TM buffer [Tris-HCl (pH7.5) 0.05 M / MgSO₄ 8 mM)，靜置

於 4°C 隔夜培養。再將培養皿內的溶液吸到試管內，加 400 μ l chloroform，在 4°C 下靜置 30 min，離心取上清液得 lysate 保存於 4°C。

將 lysate 以 TM buffer 稀釋，並與 R-Top agar 混合後倒在 X-gal/ LA 上，37°C 隔夜培養後，取藍色 plaques 再用前述方法製備 lysate。並感染 *E. coli* SG20250 得 lysogen。

5.2.2 β -galactosidase 活性分析

菌液於適當溫度培養至 $OD_{600} = 0.3-0.7$ 。取 0.3 ml 菌液加入 0.7 ml Z buffer ($Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O/ MgSO_4/ \beta$ -mercaptoethanol/ KCl)，以 30 μ l 0.1% SDS 及 40 μ l 氯仿破菌後，於 28°C 水浴槽中預反應 5 分鐘。加入 0.2 ml ONPG (4mg/ml) 開始計時，至反應呈黃色 ($OD_{420}=0.6-0.9$) 後，加入 0.5 ml 1 M Na_2CO_3 終止反應，記錄反應時間。測定反應液之 OD_{420} 及 OD_{550} 值。

活性的計算公式為：

$$1000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / (T \times V \times OD_{600}) = \text{Units of } \beta\text{-galactosidase}$$

T：反應時間（分）

V：反應體積（ml）

單位定義：每分鐘每個菌體所產生之 *O*-Nitrophenol (Miller 1972)。

5.2.3 預測啟動子、密碼子及操縱子所使用的網站

(a) 預測啟動子使用的網站

Berkeley Drosophila Genome Project : Neural Network Promoter Prediction

http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html

SoftBerry-bprom

<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfi>
[ndb](#)

(b) 預測密碼子使用的網站

GeneMark.hmm for prokaryotes

http://exon.gatech.edu/GeneMark/gmhmm2_prok.cgi

Generation Microbial Gene Prediction System

<http://compbio.ornl.gov/generation/>

(c) 預測操縱子使用的網站

SoftBerry FgenesB: Finding operons and genes in microbial genomes

<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=programs&subgroup=gfindb>

(d) 預測 RNA 二級結構使用的網站

Mfold RNA folding

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>

5.3 結果

5.3.1 *gspS* 上游序列之探討

(a) 以啟動子預測軟體推測 *gspS* 上游啟動子區域 (promoter region) 位置

一般基因在其上游均有負責調控的啟動子區域 (promoter region)，在本研究之初，將 *gspS* 上游序列約 1000 bp，亦即從基因組 (genome) 上第 3137615 bp 至第 3136521 bp (*GspS* 8th amino acid)，以兩種啟動子預測軟體 (promoter prediction)，對此段序列含有啟動子的可能性及其位置做一初步探討。

以 Berkeley Drosophila Genome Project : Neural Network Promoter Prediction，選擇 prokaryote 選項，預測出 *gspS* 上游含有三處可能的啟動子區域 (promoter regions) 及轉錄起始點 [transcription start sites (TSS)] (圖十九)，分別在 3137125 (距 *GspS* 起始密碼 3136544 處 581bp)、3137003 (距 *GspS* 起始密碼 459bp)、3136880 (距 *GspS* 起始密碼 336bp)。以 SoftBerry-bprom 亦預測出三處 TSS，分別在 3137510 (距 *GspS* 起始密碼 3136544 處 966bp)、3137124 (距 *GspS* 起始密碼 580bp)、3136739 (距 *GspS* 起始密碼 195bp)。兩軟體所得結果有一重複，即 TSS 位於 3137124 處之預測。由以上結果初步認定 *gspS* 上游序列含有啟動子，

且位置距離 GspS 起始密碼 1000 bp 以內。

(b)以啟動子 (promoter prediction)、編碼區 (coding region prediction) 及操縱子 (operon prediction) 預測軟體推測, *gspS* 是一單獨的轉錄單位 (transcription unit)

為瞭解 *gspS* 是否為一單獨的轉錄單位 (transcription unit), 或是屬於一操縱子 (operon), 上游可能還有其他基因, 針對此點, 將搜尋序列往更上游延伸, 使用相關軟體, 預測 3139000 (GspS start codon 上游 2456 bp) 至 3136521 (GspS 8th amino acid) 序列中, 啟動子及編碼區的位置, 並以操縱子預測 (operon prediction) 軟體, 預測 3163000 (GspS 起始密碼上游 26456 bp) 至 3133000 (GspS 起始密碼下游 3544 bp) 序列中, 轉錄單位 (transcription unit) 與操縱子 (operon) 存在的狀況。

(1)以啟動子預測軟體, 預測 *gspS* 上游 3139000 至 3136521 啟動子區域 (promoter region) 位置

GspS start codon 位於 *E. coli* genome 的 3136544 處, 首先將其上游序列約 2500 bp (3139000 至 3136521) 以兩種啟動子預測軟體 BDGP-Neural Network Promoter Prediction 及 SoftBerry-bprom 預測啟動子及轉錄起始處 (TSS)。

除前述所預測的三個 TSS 外, BDGP-Neural Network Promoter Prediction 預測出更上游有四處 TSS (圖十九), 距離起始密碼子 (start codon) 由近至遠分別是 3137728, 與起始密碼子距 1184bp; 3137979, 與起始密碼子距 1435bp; 3138297, 與起始密碼子距 1753 bp; 3138690, 與起始密碼子距 2146 bp。

SoftBerry-bprom 預測出與 BDGP 三個重複的 TSS, 距離 GspS 起始密碼子由近至遠分別為 3137979, 與起始密碼子距 1435 bp; 3138297, 與起始密碼子距 1753 bp; 3138690, 與起始密碼子距 2146 bp。其中, TSS 3137979 有一轉錄因子 (transcription factor) RpoD 的 binding site。

(2)以編碼區預測軟體, 預測 *gspS* 上游區域 3139000 至 3136521 編碼區 (coding region) 位置

將 GspS 起始密碼子上游序列約 2500 bp (3139000 至 3136521)以兩種編碼區預測軟體 GeneMark.hmm for prokaryotes 及 Generation Microbial Gene Prediction System，預測 GspS 上游是否存有編碼區(圖二十)。

GeneMark.hmm for prokaryotes 預測所得編碼區，與 GspS 起始密碼子距離由近至遠分別是在 3137986 至 3137738 的基因長度為 249 bp，由 83 個胺基酸組成，暫名之 coding region 1(cod. 1);3138340 至 3137999 的基因長度為 342 bp，由 114 個胺基酸組成(cod.2); 3138821 至 3138333 有一基因，長度為 489 bp，由 163 個胺基酸組成(cod.3);另外此軟體亦預測在反向序列(在 genome 上為正向)3136749 至 3137615 有一長 867 bp 的基因，由 289 個胺基酸組成(cod. 4)。

以 Generation Microbial Gene Prediction System 預測，結果與 GeneMark 有兩完全重複之結果，分別是 3137986 至 3137738 (83 個胺基酸、cod. 1)、3138821 至 3138333 (163 個胺基酸、cod. 3)，另外在 3136701 至 3137615 處，有一反向基因，長度為 915bp，由 305 個胺基酸組成(cod. 4)，此反向基因預測的起始碼 (start codon) 與 GeneMark 的結果稍有出入，但終止碼 (stop codon) 則相同。

(3)以操縱子預測軟體，預測 *gspS* 上游至下游間 (3163000 至 3133000) 轉錄單位 (transcription unit) 與操縱子 (operon) 存在的狀況

為瞭解 *gspS* 是單獨存在的基因或屬於某操縱子的一部份，以 SoftBerry FgenesB: Finding operons and genes in microbial genomes，預測 3163000 (GspS 起始碼前 26456 bp)至 3133000 (GspS 起始碼後 3544 bp) 的序列轉錄單位 (transcription unit) 與操縱子 (operon) 存在的狀況，得知此區域可能含有 20 個轉錄單位，其中 17 個基因是單一轉錄單位，另外三段轉錄單位則構成三組操縱子，總基因數為 31 個。此預測結果和目前已知的基因位置幾乎完全吻合，列出距離 GspS 起始碼較近的 17 個基因於表七。

(4)啟動子 (promoter)、編碼區 (coding region) 與操縱子 (operon) 預測結果分析

(4-1)啟動子與編碼區預測之比較

預測所得 TSS 位置分別是 3137728 (以 TSS 1 表示) (圖二十一)、3137979 (TSS 2)、3138297 (TSS 3)、3138690 (TSS 4)，編碼區分別是 3137986 (以 cod 1 表示)、3138340 (cod 2)、3138821 (cod 3)，cod 1 與 TSS 1 距離 258bp，cod 1 與 TSS 2 距離 7 bp，TSS 3 與 cod1 距離 311 bp，cod 2 與 TSS 3 距離 43 bp，TSS 4 與 cod 2 距離 350 bp，cod 3 與 TSS 4 距離 131 bp。其中 TSS 3 與 cod1 距離、TSS 4 與 cod 2 距離皆大於 300 bp，彼此為相互基因所屬的 promoter 與 coding region 可能性較低。

(4-2)編碼區與操縱子預測之比較

預測所得編碼區分別是 3137986 (以 cod 1 表示) (圖二十二)、3138340 (cod 2)、3138821 (cod 3) 以及一反向編碼區 3136701 (cod 4)，cod 4 與操縱子預測結果的第 15 個基因 (也是反向) 位置吻合 (對照表七)，亦即目前已知的 *yghU*；cod 1 與操縱子預測結果的第 14 個基因位置吻合，亦即目前已知的 *hybG*；cod 2 與操縱子預測結果的第 13 個基因位置吻合，亦即目前已知的 *hypA*；cod 3 與操縱子預測結果的第 12 個基因位置吻合，亦即目前已知的 *hybE*。

根據操縱子預測結果，*gspS* 上游為一緊鄰的反向基因 *yghU*，更上游處是一操縱子，由九個基因組成，此結果與目前研究所知 (*gspS* 上游為 *yghU*，更上游處是一操縱子，由八個基因組成) 相去不遠。此外 GspS 起始碼 (3136544) 與其上游距離最近的同向基因 *hybG* 終止碼 (3137738) 距離很遠，是 1194 bp，屬於同一操縱子的可能性很低。

以上結果顯示 *gspS* 是一單獨的轉錄單位，且其啟動子位置在上游 1000 bp 以內。

(c) 建構 *gspS* 啟動子區域 (promoter region) 與 *lacZ* 的融合基因 (fusion gene)，並分析 β -galactosidase 活性，以偵測啟動子的強度。

將 *gspS* 上游不同長度片段至 GspS 13th amino acid 的序列以 PCR 方式放大，並在 5' primer 加上 EcoRI 之切點，3' primer 加上 BamHI 切點。這些片段長度及位置分別為 (圖二十三)：(1) 472 bp，包含預測結果中最靠近 GspS 起始碼的兩

個 TSS，分別是用 BDGP 程式預測的 TSS 3136880（距離 GspS 起始碼 336 bp）及用 Softberry 軟體預測的 TSS 3136739（距離 GspS 起始碼 195 bp），(2) 687 bp，包含預測結果中最靠近 GspS 起始碼的四個 TSS，分別距離 GspS 起始碼 195 bp (from SoftBerry)、336 bp (from BDGP)、459 bp (from BDGP)、580 bp (from BDGP and SoftBerry)，其中 580 bp 片段 (TSS 3137124) 是兩軟體都有預測到的重複結果，(3) 895 bp，此片段所包含之 TSS 與前述 687 bp 片段相同，含三個 BDGP 預測的 TSS 和兩個 Softberry 預測的 TSS，本長度的建構是考慮啟動子上游可能有未知的調控因子 (regulatory element) 存在。

上述片段以 PCR 大量複製後，與質體 pRS415 上 *lacZ* 基因前的 EcoRI 及 BamHI site 接合，得 pRS415-*gspS472-lacZ* (op)、pRS415-*gspS687-lacZ* (op)、pRS415-*gspS895-lacZ* (op)。將此三質體分別轉殖入 *E. coli* XL1 blue，抽出質體後，以酵素 EcoRI 及 BamHI 截切並定序，確認片段長度及序列無誤後，送入宿主 SG20250。

將 SG20250/pRS415-*gspS472-lacZ* (op)、SG20250/pRS415-*gspS687-lacZ* (op)、SG20250/pRS415-*gspS895-lacZ* (op) 及 SG20250/pRS415 四株菌，在 37°C 下培養至對數生長期，取樣分析 β -galactosidase 活性 (表八)。前三株載體上帶有 *gsp-lacZ* 轉錄融合基因 (transcriptional fusion, operon fusion; op) 的菌株，其活性皆大於對照組 SG20250/pRS415，且活性約為 2000 至 2299 units。

因 *lacZ* 的產物 β -galactosidase 可分解 X-gal 而呈現藍色，本實驗以 λ RS45 感染帶有 *gspS-lacZ* 質體 [pRS415-*gspS-lacZ*(op)] 的菌株，再以 X-gal/LA 培養基進行藍白篩選，製備溶胞液 (lysate)，此時溶胞液中的 λ RS45，皆含有不同長度的 *gspS-lacZ*。接著再用這些溶胞液分別感染宿主 *E. coli* SG20250，繼之以藍白篩選，純化出呈現藍色的菌落。

在建構轉錄融合基因 (operon fusion) 的過程中，順利的得到三株溶原菌 (lysogen): HY1001, genotype 為 SG20250/*gspS472-lacZ* (op); HY1002, genotype 為 SG20250/*gspS687-lacZ* (op); HY1003, genotype 為 SG20250/*gspS895-lacZ* (op)。

將三株菌 HY1001、HY1002、HY1003 於 37°C 培養至對數生長期，取樣並分析 β -galactosidase 活性 (表八)，HY1001 [*gspS472-lacZ*(op)] 的活性是 60 units；HY1002 [*gspS687-lacZ*(op)] 的活性是 48 units；HY1003 [*gspS895-lacZ*(op)] 的活性是 36 units。

由上述啟動子預測軟體，得知在 *gspS* 上游可能有 *gspS* 啟動子存在，加上活性分析結果，三組質體上的 *gspS-lacZ* 轉錄融合基因，活性都很高，在 2000 units 左右，染色體上的 *gspS-lacZ* 啟動子融合基因，活性也有 50 units 左右。以上結果顯示 *gspS* 的啟動子位於起始密碼上游 433 bp 之內。

pRS415 與 pRS414 為一組相對應的 plasmids，在 pRS415 中，有一完整報導基因 (reporter gene) *lacZ*，包含 *lacZ* 5 端未轉譯區域 (5' untranslated region)，所以 pRS415 用於建構標的基因與 *lacZ* 的轉錄融合基因 (transcriptional fusion or operon fusion；op)。pRS414 的報導基因 *lacZ* 則不含有 5 端未轉譯區域，因此用於建構標的基因與 *lacZ* 的轉譯融合 (translational fusion or protein fusion；pr)。在製備 pRS415-*gspS-lacZ* 轉錄融合基因的同時，也建構一組相對應之 pRS414-*gspS-lacZ* 轉譯融合基因，分別是 pRS414-*gspS472-lacZ* (pr)、pRS414-*gspS687-lacZ* (pr)、pRS414-*gspS895-lacZ* (pr)，並同前述方式，將其轉殖入宿主 SG20250，得三株菌 SG20250/pRS414-*gspS472-lacZ* (pr)、SG20250/pRS414-*gspS687-lacZ* (pr)、SG20250/pRS414-*gspS895-lacZ* (pr)。

同前述 SG20250/*gspS-lacZ* (op) 溶原菌方式，欲建構相對應的 SG20250/*gspS-lacZ* (pr) 溶原菌，以 λ RS45 感染 SG20250/pRS414-*gspS895-lacZ* (pr)、SG20250/pRS414-*gspS687-lacZ* (pr) 及 SG20250/pRS414-*gspS472-lacZ* (pr)，結果三組皆無法用藍白篩選獲得藍色溶菌斑。

5.3.2 影響 *gspS* 表現的因素

(a) H_2O_2 對 *gspS* 的影響

已知以生物晶片分析時，BaeR 過量表現可誘發 *gspS* 的表現增強為原來的 13 倍 (Nishino *et al.*, 2005)，且 BaeR 可能對 envelope 氧還狀態的破壞有反應，進

而引發下游基因表現。

據此，將 HY1002 培養於 37°C，待生長至對數生長期後，分別加入 H₂O₂ 0 mM、1.0 mM、3.0 mM，在 30 分鐘、一小時及兩小時，分別取樣測 β-galactosidase 活性及菌液濃度 OD₆₀₀。未加入 H₂O₂ 前活性為 70 units，加入 H₂O₂ 1.0 mM 兩小時後活性上升至 268 units，表示 *gspS-lacZ* 可受 H₂O₂ 誘導。加入 H₂O₂ 3.0 mM 之後，OD₆₀₀ 由 30 分鐘的 0.292 下降至兩小時的 0.198，表示 3 mM H₂O₂ 已超過細菌的耐受範圍，造成細菌死亡。

為了更瞭解 H₂O₂ 濃度與 *gspS-lacZ* 表現之間的關係，將 HY1002 培養於 37°C，待生長至對數生長期後，分別加入 0、0.1、0.3、0.5、1.0 mM H₂O₂，在 1 hr、2 hr 及 3 hr 後取樣分析 β-galactosidase 活性，結果如圖二十四。在 0 至 1.0 mM H₂O₂ 的濃度範圍內，三小時後活性都會上升，且 H₂O₂ 濃度越高培養時間越長，對 *gspS-lacZ* 的誘導效果愈好。

(b) BaeR 對 *gspS* 的影響

生物晶片分析時，BaeR 過量表現可誘發 *gspS* 的表現增強，其為 *in vitro* 之實驗數據，為瞭解在 *E. coli* 中，BaeR 是否可誘導 *gspS* 表現，將 *baeR* 以 PCR 大量複製，再與 pBAD24 接合，得新載體 pBAD24-*baeR*，將 pBAD24-*baeR* 分別送入 HY1001，HY1002 及 HY1003，將 HY1001/pBAD24-*baeR*，HY1002/pBAD24-*baeR* 及 HY1003/pBAD24-*baeR* 分別培養於 LB 及 LB/1% arabinose，待生長至對數期後，取樣分析 β-galactosidase 活性 (表九)，HY1001/pBAD24-*baeR*，HY1002/pBAD24-*baeR* 及 HY1003/pBAD24-*baeR*，以 arabinose 誘導使 BaeR 大量表現後，*gspS-lacZ* 的 β-galactosidase 活性均顯著升高，由以上結果顯示，在 *E. coli* 菌體內，大量的 BaeR 可以誘導 *gspS* 的表現，且活性皆增加十倍以上。

另外，將可受 IPTG 誘導的載體 pJP24-*baeR* (from *E. coli* Strain National BioResource Project) 送入 HY1002，得 HY1002/pJP24-*baeR*，將此菌培養於 37°C 至對數生長期後，加入 1mM IPTG 誘導 pJP24-*baeR*，兩小時後取樣分析

β -galactosidase 活性，未以 IPTG 誘導者活性為 44 units，以 IPTG 誘導後活性升至 569 units，此結果亦符合前述，大量的 BaeR 可以誘導 *gspS* 的表現，且活性皆增加十倍以上。

(c) BaeR 與 H₂O₂ 對 *gspS* 的影響

為瞭解 BaeR 是否參與 H₂O₂ 對 *gspS* 的誘導，將 HY1002 及 HY1002/pJP24-baeR 兩菌培養至對數生長期後，分別加入 1 mM IPTG、1 mM H₂O₂ 或 1mM IPTG/ 1 mM H₂O₂，兩小時後取樣分析 β -galactosidase 活性 (表十)，以 1 mM IPTG 培養前後，HY1002 的活性無顯著變化，HY1002/ pJP24-baeR 的活性則由 54 units 升至 522 units，此結果與前述(大量的 BaeR 可以誘導 *gspS* 的表現)相符。以 1 mM H₂O₂ 培養，HY1002 的活性由 94 units 上升至 348 units，亦符合前述 H₂O₂ 可誘導 *gspS-lacZ* 的結果，但在 HY1002/pJP24-baeR，以 1 mM H₂O₂ 培養後的活性由 54 units 微升至 66 units，表示 HY1002 帶有 pJP24-baeR 時，以 H₂O₂ 培養兩小時無法誘導 *gspS-lacZ*。

與加入 1 mM IPTG 比較，加入 1 mM IPTG/ 1 mM H₂O₂ 培養時，HY1002 的活性由 74 units 升為 222 units，OD₆₀₀ 由 1.110 降至 0.366，HY1002/pJP24-baeR 的活性由 522 units 升為 586 units，OD₆₀₀ 由 0.524 降至 0.393，以上結果可知，已有 IPTG 使 pJP-baeR 大量表現而誘導 *gspS-lacZ* 時，再加上 H₂O₂，*gspS-lacZ* 活性增加的幅度小，OD₆₀₀ 降低的幅度也較小，顯示大量的 BaeR 可能會減低 H₂O₂ 對 *gspS-lacZ* 的影響，且對細菌具有保護的效果。

為更進一步瞭解 BaeR、H₂O₂ 與 *gspS-lacZ* 表現及細菌生長之間的關係，將 HY1002 與 HY1002/pJP24-baeR 兩菌培養於 37°C，待生長至對數生長期後，分別加入 1 mM IPTG 或 1 mM IPTG/ 1.5 mM H₂O₂，在培養期間每隔一小時取樣分析菌液濃度，結果如圖二十五(A)(B)。

在觀察細菌生長後發現，HY1002 只加入 IPTG 後一小時，OD₆₀₀ 由 0.571 上升至 1.020，並且在實驗過程中持續上升正常生長，在加入 IPTG 與 H₂O₂ 後一小時，OD₆₀₀ 由 0.556 增為 0.611，細菌生長極緩並且漸漸死亡。HY1002/pJP24-baeR

只加入 IPTG 時，生長狀況亦正常，在加入 IPTG 與 H₂O₂ 的組別中，一小時後 OD₆₀₀ 由 0.446 增至 0.554，此組別生長雖較緩，但仍持續生長，細菌不會死亡，由圖二十五(A)(B)可看出兩者顯著的差異。以上結果可確切證實，當 BaeR 被大量表現時，具有保護作用。

為更加確認以上結果，將 HY1002 及 HY1002/pJP24-baeR 兩菌培養於 37°C，待生長至對數生長期後，分別加入 1.5 mM H₂O₂，在培養期間每隔一小時取樣偵測菌液濃度 OD₆₀₀，結果如圖二十六(A)(B)。HY1002 受 H₂O₂ 影響，兩小時後 OD₆₀₀ 由 0.957 下降至 0.578，細菌大量死亡，其結果與前述實驗相符，在 HY1002/pJP24-baeR，因有 BaeR 之存在，使細菌濃度大致持平無顯著死亡，在 H₂O₂ 加入後兩小時，*gspS-lacZ* 表現開始明顯上升，使細菌較不受 H₂O₂ 影響而死亡，其結果亦與前述實驗相符。

由以上實驗可知，*gspS* 可受過氧化物 H₂O₂ 誘導而大量表現，細菌內若有 BaeR，亦可使 *gspS* 表現大幅增加，且 BaeR 誘導 *gspS* 表現具有保護細菌不受 H₂O₂ 影響導致死亡的效果。



5.4 討論

細菌藉由將 GSH 維持在還原態，以還原其他過氧化物來維持體內氧化還原的平衡，多胺類如 spermidine 等，可刺激調控蛋白生成，進而影響許多與生長或抗氧化相關基因的表現，而 GspdSH 的作用可能是調節 GSH 或 spermidine 含量。*gspS* 可轉譯的蛋白為 glutathionylspermidine synthetase 及 amidase，其基因表現應與細胞內 GSH，spermidine 及 GspdSH 的平衡相關。BaeR 可能受細胞膜的改變或 envelope 氧還狀態的破壞影響，進而引發下游基因表現，本研究中，大量的 BaeR 可誘導 *gspS* 表現增加十倍至十三倍。

Nishino 等人在 2005 年利用生物晶片分析 BaeR 可調控的基因時，經序列比對的方式，分析出具有高度保守性的序列 (highly conserved sequence) TTTTT

CTCCA TDATT GGC，稱之為 BaeR binding motif，並將 BaeR 可調控的基因中，其上游具有 BaeR binding motif 的基因稱之為 BaeR regulon (Nishino *et al.*, 2005)，這些 BaeR regulon 基因的上游區域中，與此 BaeR binding motif 相似度最低為 50%，但 Nishino 等人並未將 *gspS* 列入 BaeR regulon。另外，Hirakawa 等人經實驗所得之 BaeR 與啟動子結合區與 Nishino 等人以比對方式所得的 BaeR binding motif 序列稍有不同(Hirakawa *et al.*, 2005)。

若以 *gspS* start codon 的上游 300 bp 與 BaeR binding motif，以軟體 Bioedit 比對，在 *gspS* start codon 上游 198 至 210 bp 處預測出 BaeR binding site 存在，與 Nishino 等人發表之 BaeR binding motif 相似度達 50%。以 *gspS* start codon 的上游 300 bp 與 Hirakawa 等人經實驗所得之 BaeR 與啟動子結合區比對，亦可得兩處可能與 BaeR 結合的區域，因此，*gspS* 上游區域中，可能有 BaeR binding site 存在。



參考文獻

- Ariyanayagam, M. R., Oza, S. L., Guther, M. L. & Fairlamb, A. H. (2005)** Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *Biochem J* **391**, 425-432.
- Baranova, N. & Nikaido, H. (2002)** The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* **184**, 4168-4176.
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D. & Huber, R. (2000)** The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* **403**, 800-805.
- Bollinger, J. M., Jr., Kwon, D. S., Huisman, G. W., Kolter, R. & Walsh, C. T. (1995)** Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. Purification, cloning, overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. *J Biol Chem* **270**, 14031-14041.
- Bricker, A. L. & Belasco, J. G. (1999)** Importance of a 5' stem-loop for longevity of papA mRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3587-3590.
- Bukau, B. (1993)** Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol Microbiol* **9**, 671-680.
- Casadaban, M. (1976)** Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541-555.
- Chuang, S. E., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Daniels, D. L. & Blattner, F. R. (1993)** Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**, 1-6.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & H., M. R. (1989)** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci, USA* **86**, 2172-2175.

Comini, M., Menge, U., Wissing, J. & Flohe, L. (2005) Trypanothione synthesis in *crithidia revisited*. *J Biol Chem* **280**, 6850-6860.

Cowing, D. W., Bardwell, J. C., Craig, E. A., Woolford, C., Hendrix, R. W. & Gross, C. A. (1985) Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 2679-2683.

De Craecker, S., Verbruggen, C., Rajan, P. K., Smith, K., Haemers, A. & Fairlamb, A. H. (1997) Characterization of the peptide substrate specificity of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* **84**, 25-32.

Emory, S. A. & Belasco, J. G. (1990) The ompA 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J Bacteriol* **172**, 4472-4481.

Emory, S. A., Bouvet, P. & Belasco, J. G. (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**, 135-148.

Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T. & Cerami, A. (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in *trypanosomatids*. *Science* **227**, 1485-1487.

Fairlamb, A. H., Henderson, G. B. & Cerami, A. (1986) The biosynthesis of trypanothione and N1-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* **21**, 247-257.

Franze de Fernandez, M. T., Hayward, W. S. & August, J. T. (1972) Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* **247**, 824-831.

Gamer, J., Bujard, H. & Bukau, B. (1992) Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor sigma 32. *Cell* **69**, 833-842.

Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., McCarty, J. S., Rudiger, S., Schonfeld, H. J., Schirra, C., Bujard, H. & Bukau, B. (1996) A cycle of binding and release of the

DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *Embo J* **15**, 607-617.

Garbe, T. R., Kobayashi, M. & Yukawa, H. (2000) Indole-inducible proteins in bacteria suggest membrane and oxidant toxicity. *Arch Microbiol* **173**, 78-82.

Gottesman, S. & Stout, V. (1991) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **5**, 1599-1606.

Gottesman, S., Clark, W. P., Crecy-Lagard, V. d. & Maurizi, M. R. (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**, 22618-22626.

Gottesman, S. (2003) Proteolysis in Bacterial Regulatory Circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 565-587.

Gottesman, S., McCullen, C. A., Guillier, M., Vanderpool, C. K., Majdalani, N., Benhammou, J., Thompson, K. M., FitzGerald, P. C., Sowa, N. A. & FitzGerald, D. J. (2006) Small RNA regulators and the bacterial response to stress. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 1-11.

Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121-4130.

Hirakawa, H., Nishino, K., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2003a) Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 1851-1856.

Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2003b) Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **52**, 576-582.

Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T. & Yamaguchi, A. (2005) Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **55**, 1113-1126.

Jung, I. L. & Kim, I. G. (2003) Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 915-922.

Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H. & Yura, T. (1997) Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma³² and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 7219-7225.

Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T. (1999) Marked instability of the sigma⁽³²⁾ heat shock transcription factor at high temperature. Implications for heat shock regulation. *J Biol Chem* **274**, 22002-22007.

Kessel, M., Wu, W. F., Gottesman, S., Kocsis, E., Steven, A. C. & Maurizi, M. R. (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.

Kim, D. Y. & Kim, K. K. (2003) Crystal structure of ClpX molecular chaperone from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **278**, 50664-50670.

Kuo, M.-S., Chen, K.-P. & Wu, W. F. (2004) Regulation of RcsA by the ClpYQ (HslUV) protease in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**, 437-446.

Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 49-59.

Lee, Y.-Y., Chang, C.-F., Kuo, C.-L., Chen, M.-C., Yu, C. H., Lin, P.-I. & Wu, W. F. (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.

Levchenko, I., Smith, C. K., Walsh, N. P., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (1997) PDZ-like domains mediate binding specificity in the Clp/Hsp100 family of chaperones and protease regulatory subunits. *Cell* **91**, 939-947.

Marques, S., Manzanera, M., Gonzalez-Perez, M. M., Gallegos, M.-T. & Ramos, J. L. (1999) The XylS-dependent Pm promoter is transcribed *in vivo* by RNA polymerase with σ^{32} or σ^{38} depending on the growth phase. *Mol Microbiol* **31**, 1105-1113.

Miller, J. H. (1972) In Experiments in bacterial genetics
Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Missiakas, D., Schwager, F., Betton, J. M., Georgopoulos, C. & Raina, S. (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. & Gottesman, S. (1983) Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene control the stability of the SulaA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 358-362.

Munavar, H., Zhou, Y. & Gottesman, S. (2005) Analysis of the *Escherichia coli* Alp phenotype: heat shock induction in *ssrA* mutants. *J Bacteriol* **187**, 4739-4751.

Nagasawa, S., Ishige, K. & Mizuno, T. (1993) Novel members of the two-component signal transduction genes in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **114**, 350-357.

Nishino, K., Honda, T. & Yamaguchi, A. (2005) Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J Bacteriol* **187**, 1763-1772.

Pai, C. H., Chiang, B. Y., Ko, T. P., Chou, C. C., Chong, C. M., Yen, F. J., Chen, S., Coward, J. K., Wang, A. H. & Lin, C. H. (2006) Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *Embo J* **25**, 5970-5982.

Raffa, R. G. & Raivio, T. L. (2002) A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**, 1599-1611.

Raj, V. S., Tomitori, H., Yoshida, M., Apirakaramwong, A., Kashiwagi, K., Takio, K., Ishihama, A. & Igarashi, K. (2001) Properties of a revertant of *Escherichia coli* viable in the presence of spermidine accumulation: increase in L-glycerol 3-phosphate.

J Bacteriol **183**, 4493-4498.

Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H. C., Moerschell, R. P., Yoo, S. J., Seol, J. H., Chung, C. H. & Goldberg, A. L. (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5808-5813.

Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Muller, S. A., Huang, H. C., Engel, A., Baumeister, W. & Goldberg, A. L. (1997) The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Biol* **4**, 133-139.

Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. & Baumeister, W. (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-582.

Seong, I. S., Oh, J. Y., Lee, J. W., Tanaka, K. & Chung, C. H. (2000) The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulaA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **477**, 224-229.

Shin, D. H., Yoo, S. J., Shim, Y. K., Seol, J. H., Kang, M. S. & Chung, C. H. (1996) Mutational analysis of the ATP-binding site in HslU, the ATPase component of HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **398**, 151-154.

Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.

Smith, C. K., Baker, T. A. & Sauer, R. T. (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 6678-6682.

Song, H. K., Hartmann, C., Ramachandran, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L. & Huber, R. (2000) Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14103-14108.

Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S. & McKay, D. B. (2000) Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell* **103**, 633-643.

- Tabor, H. & Tabor, C. W. (1975)** Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **250**, 2648-2654.
- Thomson, L., Denicola, A. & Radi, R. (2003)** The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys* **412**, 55-64.
- Tkachenko, A. G. & Nesterova, L. Y. (2003)** Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* **68**, 850-856.
- Verhamme, D. T., Arents, J. C., Postma, P. W., Crielaard, W. & Hellingwerf, K. J. (2002)** Investigation of *in vivo* cross-talk between key two-component systems of *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**, 69-78.
- Wu, W.-F., Zhou, Y. N. & Gottesman, S. (1999)** Redundant *in vivo* proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) Protease. *J Bacteriol* **181**, 3681-3687.
- Yano, R., Imai, M. & Yura, T. (1987)** The use of operon fusions in studies of the heat shock response: effects of altered sigma32 on heat-shock promoter function in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **207**, 24-28.
- Yoo, S. J., Seol, J. H., Shin, D. H., Rohrwild, M., Kang, M. S., Tanaka, K., Goldberg, A. L. & Chung, C. H. (1996)** Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**, 14035-14040.
- Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993)** Regulation of the heat shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **47**, 321-350.
- Zuker, M. (2003)** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.

表一、使用於 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 之研究的菌株

Table 1. Strains used in *clpQ*⁺*clpY*⁺ study

<i>E. coli</i> Strains	Description	Reference or source
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ(<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 fibB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	<i>Casadaban</i> 1976
KY2266	MC4100 <i>lon, clpX, clpP::chl</i>	<i>Kanemori et al.</i> 1997
SG20252	<i>lon::tet</i>	<i>S. Gottesman</i> 1991
AC3117	<i>clpA::kan</i>	<i>Kuo et al.</i> 2004
SG22154	<i>clpB::kan</i>	<i>S. Gottesman</i> 1991
AC3118	<i>clpX::kan</i>	<i>Kuo et al.</i> 2004
RH90	MC4100 <i>rpoS-359::Tn10</i>	<i>Lange et al.</i> 1991
KY1429	MC4100 <i>rpoH(Am)zhf-50::Tn10</i>	<i>Yano et al.</i> 1987
SM25	MC4100 <i>rpoHrpoS</i>	<i>Marques et al.</i> 1999
HY20001	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20002	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study
HY20003	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-478bp)	This study
HY20004	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study
HY20005	<i>rpoS</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20006	<i>rpoH</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20007	<i>rpoS, rpoH</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20008	<i>clpA</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20009	<i>clpX</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20010	<i>clpB</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20011	<i>lon</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20012	<i>lon, clpX, clpP</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20013	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ^{ml} :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20015	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ^{ml} :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study
HY20016	<i>rpoH</i> λRS45 <i>clpQ</i> ^{ml} :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20017	<i>rpoH</i> λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study
HY20018	<i>rpoH</i> λRS45 <i>clpQ</i> ^{ml} :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study
HY20019	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ^{m2} Δ40bp:: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20020	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ^{m(c→t)} :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20021	<i>rpoH</i> λRS45 <i>clpQ</i> ^{m(c→t)} :: <i>lacZ</i> (op-141bp)	This study
HY20022	MC4100λRS45 <i>clpQ</i> ^{m(c→t)} :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study
HY20023	<i>rpoH</i> λRS45 <i>clpQ</i> ^{m(c→t)} :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study
AC3112	<i>lon, clpQclpY, cps</i> :: <i>lacZ</i>	<i>Kuo et al.</i> 2004
SW10059	NM6001λRS45 <i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (pr-141bp)	This study

表二、使用於 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 之研究的載體與噬菌體

Table 2. Plasmids and bacteriophage used in *clpQ*⁺*clpY*⁺ study

Plasmids or bacteriophage	Description	Reference or source
Plasmids		
pRS415	<i>bla</i> -T1 ₄ <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I- <i>Bam</i> HI <i>lacZ</i>	<i>Casadaban</i> 1976
pRS414	<i>bla</i> -T1 ₄ <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I- <i>Bam</i> HI <i>lacZ</i>	<i>Casadaban</i> 1976
pBAD24	<i>ori</i> (pBR322) <i>araC</i> P _{BAD} <i>amp</i> ^r	<i>Guzman et al.</i> 1995
pBAD33	<i>ori</i> (pACYC184) <i>araC</i> P _{BAD} <i>cm</i> ^r	<i>Guzman et al.</i> 1995
Bacteriophage		
λRS45	<i>imm21</i> <i>ind</i> ⁺ <i>bla</i> '- <i>lacZ</i> _{sc}	<i>Casadaban</i> 1976



表三、使用於 *clpQ*⁺*clpY*⁺ 之研究的引子

Table 3. primers used in *clpQ*⁺*clpY*⁺ study

Constructions	Names of primers	DNA sequences
<i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (141bp)	Fen I(F1)	5'-CGGAATTCCC GGGGTTGAAA-3'
	Lian1102(R1)	5'-GCGGGATCCACATGGCCGTTACGGC-3'
<i>clpQ</i> ⁺ :: <i>lacZ</i> (478bp)	<i>clpQ</i> -5'-upstream- <i>Ec</i> oRI(F2)	5'-CCGGAATTCAGCCGTACCAGGATCTGCTGCA AACTCCTG-3'
	Lian1102(R1)	5'-GCGGGATCCACATGGCCGTTACGGC-3'
<i>clpQ</i> ^{m(c→t)} :: <i>lacZ</i>	5'EcoRI- <i>clpQ</i> m3(F3)	5'-CGGAATTCCC GGGGTTGAAACCTCAAAA TCCCCCTCATCTATAATTG-3'
	Lian1102(R1)	5'-GCGGGATCCACATGGCCGTTACGGC-3'
<i>clpQ</i> ^{m2} Δ40bp:: <i>lacZ</i>	<i>clpQ</i> -5'-upstream- <i>Ec</i> oRI(F2)	5'-CCGGAATTCAGCCGTACCAGGATCTGCTGCA AACTCCTG-3'
	translate-rsb-up(R2)	5'-CATAATGCAATTATAGATGG-3'
	translate-rsb-down(F 4)	5'-CCATCTATAATTGCATTATGCCAAGGGGTCA GCT-3'
	new <i>clpQ</i> -3'-downstre am- <i>Bam</i> HI(R3)	5'-CGCGGATCCGCATCCGCAGTACCGCCCGCA AAG-3'
<i>clpQ</i> ^{m1(a→c)} :: <i>lacZ</i>	FenI- <i>clpQ</i> - <i>rpoS</i> -mut	5'-CCGAATTC CCGGG GGTTG AAACC CTCAA AATCC CCCCC ATCTA TACTT GCATT ATGCC CCGTA-3'
	Lian1102(R1)	5'-GCGGGATCCACATGGCCGTTACGGC-3'
<i>clpQ</i> ⁺	5' <i>kpn</i> I-59Q(F5)	5'-GGGGTACCCATCTATAATTGCATTATGCC-3'
	3' <i>Hind</i> III-Q(R4)	5'-CCCAAGCTTTTACGCTTTGTAGCTTAATT-3'
<i>ΔIR</i> - <i>clpQ</i> ⁺	5' <i>kpn</i> I-98Q(F6)	5'-GGGGTACCTTTGACTCTGTATTCGTAAC-3'
	3' <i>Hind</i> III-Q(R4)	5'-CCCAAGCTTTTACGCTTTGTAGCTTAATT-3'
<i>ΔL</i> - <i>clpQ</i> ⁺	5' <i>kpn</i> I-RSBQ(F7)	5'-GGGGTACCCCAAGGGGTCAGCTCGTGACAA -3'
	3' <i>Hind</i> III-Q(R4)	5'-CCCAAGCTTTTACGCTTTGTAGCTTAATT-3'
<i>(S-IR)</i> - <i>clpQ</i> ⁺	5' <i>kpn</i> I-59Qaft8t	5'-GGGGTACCCATCTATAATTGCATTATGCCCCG TACTTTTTTTTTTTTTTTGTACTCTGTATTCGTA CCAAGGGGTCAG-3'
	3' <i>Hind</i> III-Q(R4)	5'-CCCAAGCTTTTACGCTTTGTAGCTTAATT-3'
<i>(R-IR)</i> - <i>clpQ</i> ⁺	5' <i>kpn</i> I-59Qreinv	5'-GGGGTACCCATCTATAATTGCATTATGGGGGC ATGTTTCATGCCCTTTGTACTCTGTATTCGTA ACCAAGGGGTCAG-3'
	3' <i>Hind</i> III-Q(R4)	5'-CCCAAGCTTTTACGCTTTGTAGCTTAATT-3'
<i>lacZ</i> -probe	5'- <i>lacZ</i> -probe	5'-CCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTAC-3
	3'- <i>lacZ</i> -probe	5'-GGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCT-3
<i>clpQ</i> -probe	5'- <i>clpQ</i> -probe	5'-GGCAATACCGTAATGAAAGG-3
	3'- <i>clpQ</i> -probe	5'-CCTGCAATATCCAACGCCTT-3
pBAD24- <i>rpoD</i>	RpoD-5'- <i>Kpn</i> I	5'-GGGGTACCATGGAGCAAAACCCGCAGTC-3'
	RpoD-3'- <i>Hind</i> III	5'-CCCAAGCTTTTAAATCGTCCAGGAAGCTAC-3'
pBAD24- <i>rpoH</i>	RpoH-5'- <i>Kpn</i> I	5'-GGGGTACCTTACGCTTCAATGGCAGCAC-3'
	RpoH-3'- <i>Hind</i> III	5'-CCCAAGCTTATGACTGACAAAATGCAAAG-3
pBAD24- <i>rpoS</i>	<i>rpoS</i> -5'- <i>Eco</i> RI	5'-CGGAATTCTTACTCGCGGAACAGCGCTT-3'
	<i>rpoS</i> -3'- <i>Hind</i> III	5'-CCCAAGCTTATGAGTCAGAATACGCTGAA-3'

表四、使用於 *gspS* 之研究的菌株

Table 4. Strains used in *gspS* study

<i>E. coli</i> Strains	Description	Reference:
SG20250	MC4100 <i>lon</i> ⁺ <i>cps</i> ⁺	<i>S. Gottesman</i> 1991
NM6001	F ⁻ <i>araD139 lamda</i> ⁻ <i>lac</i> ⁻ <i>leu</i> ⁺	<i>Marques et al.</i> 1999
HY1001	SG20250λRS45 <i>gspS</i> 472- <i>lacZ</i> (op)	This study
HY1002	SG20250λRS45 <i>gspS</i> 687- <i>lacZ</i> (op)	This study
HY1003	SG20250λRS45 <i>gspS</i> 895- <i>lacZ</i> (op)	This study
HY1005	NM6001λRS45 <i>gspS</i> 687- <i>lacZ</i> (op)	This study
HY1010	NM6001λRS45 <i>gspBaeR1</i> - <i>lacZ</i> (op)	This study
HY1011	NM6001λRS45 <i>gspBaeR2</i> - <i>lacZ</i> (op)	This study



表五、使用於 *gspS* 之研究的載體與噬菌體

Table 5. Plasmids and bacteriophage used in *gspS* study

Plasmids or bacteriophage	Description	Reference or source
Plasmids		
pRS415	<i>bla</i> -T ₁₄ <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I- <i>Bam</i> HI <i>lac</i> Z	<i>Casadaban</i> 1976
pRS414	<i>bla</i> -T ₁₄ <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I- <i>Bam</i> HI <i>lac</i> Z	<i>Casadaban</i> 1976
pBAD24	<i>ori</i> (pBR322) <i>ara</i> C P _{BAD} <i>amp</i> ^r	<i>Guzman et al.</i> 1995
pJP24- <i>baeR</i>	<i>baeR</i> ⁺ <i>cm</i> ^r	National BioResource Project (NBRP) <i>E. coli</i> Strain
Bacteriophage		
λ RS45	<i>imm</i> 21 <i>ind</i> ⁺ <i>bla</i> '- <i>lac</i> Z _{sc}	<i>Casadaban</i> 1976



表六、使用於 *gspS* 之研究的引子

Table 6. Primers used in *gspS* study

Primers	DNA sequences	Notes
<i>gspS</i> -5'-EcoRI-472	5'-CGGAATTCGTCGTACT CTGCACCAGTAACGC-3'	forward primer for construct <i>gspS472-lacZ</i>
<i>gspS</i> -5'-EcoRI-687	5'-CCGGAATTCAGAACA GCCAGTTCATC-3'	forward primer for construct <i>gspS687-lacZ</i>
<i>gspS</i> -5'-EcoRI-895	5'-CCGGAATTCGTTGCCA AACCACGGCCAAATC-3'	forward primer for construct <i>gspS895-lacZ</i>
<i>gspS</i> -3'-BamHI	5'-CGGGATCCCCGAACGG GGCATCCTGGCTG-3'	reversed primer for construct <i>gspS472-lacZ</i> reversed primer for construct <i>gspS687-lacZ</i> reversed primer for construct <i>gspS895-lacZ</i> reversed primer for construct <i>gspBaeR1-lacZ</i> reversed primer for construct <i>gspBaeR2-lacZ</i>
<i>gspBaeR1</i> -5'EcoRI	5'-CGGAATTCGGCGATTGA TATTGGCGAACGCGCCGC CAG-3'	forward primer for construct <i>gspBaeR1-lacZ</i>
<i>gspBaeR2</i> -5'EcoRI	5'-CGGAATTCCTGCG ATGAGGTGTATGATTAGTC TGA-3'	forward primer for construct <i>gspBaeR2-lacZ</i>

表七、操縱子預測結果

Table 7. Results of operon prediction

N	Tu/Op	Strand	Predicted start site	Predicted end site	Real start site	Real end site	Gene
1	Tu 1	—	3146959	3145919			<i>yghZ</i>
2	Op 1	+	3145762	3145619	—	—	
3	Op 2	+	3145641	3145288	3145713		<i>b3000</i>
4	Op 3	+	3145288	3144878			<i>b2999</i>
5	Tu 1	+	3144759	3144472			<i>yghW</i>
6	Op 1	+	3144371	3144270	—	—	
7	Op 2	+	3144229	3143165	3144283		<i>hybO</i>
8	Op 3	+	3143162	3142176			<i>hybA</i>
9	Op 4	+	3142186	3141008			<i>hybB</i>
10	Op 5	+	3141011	3139308			<i>hybC</i>
11	Op 6	+	3139275	3138814	3139308		<i>hybD</i>
12	Op 7	+	3138821	3138333			<i>hybE</i>
13	Op 8	+	3138340	3137999			<i>hypA</i>
14	Op 9	+	3137986	3137738			<i>hybG</i>
15	Tu 1	—	3137615	3136748		3136701	<i>yghU</i>
16	Tu 2	+	3136544	3134685			<i>gspS</i>
17	Tu 3	—	3134175	3133888	—	—	

Tu/Op：轉錄單位或操縱子(transcriptional unit or operon)

Strand：+與 *gspS* 同向，genome 上為反向；—與 *gspS* 反向，genome 上為正向 (*gspS* 是一反向基因)

Predicted start site and predicted end site：預測軟體所得的基因起始點與終點，數字表示在 genome 上的位置

Real start site and real end site：目前已知的基因位置與預測結果不同處，—表示目前沒有任何相關研究文獻

Gene：基因名

表八、SG20250/pRS415-*gspS-lacZ*(op)與 SG20250/ λ RS45-*gspS-lacZ* 的 β -galactosidase 活性分析

Table 8. β -galactosidase activities of SG20250/pRS415-*gspS-lacZ*(op) and SG20250/ λ RS45-*gspS-lacZ*

strain	Plasmids or genotype	β -galactosidase units
SG20250	pRS415	27.6 \pm 0.8
SG20250	pRS415- <i>gsp472-lacZ</i> (op)	2222.9 \pm 41.6
HY1001	SG20250/ λ RS45- <i>gsp472-lacZ</i> (op)	60.5 \pm 0.3
SG20250	pRS415- <i>gsp687-lacZ</i> (op)	2111.5 \pm 10.9
HY1002	SG20250/ λ RS45- <i>gsp687-lacZ</i> (op)	48.7 \pm 0.7
SG20250	pRS415- <i>gsp895-lacZ</i> (op)	2299.1 \pm 4.2
HY1003	SG20250/ λ RS45- <i>gsp895-lacZ</i> (op)	36.8 \pm 0.6



表九、BaeR 對 *gspS-lacZ* 表現之影響

Table 9. Effect of BaeR on *gspS-lacZ* expression

strain	β -galactosidase units	
	1 % arabinose	
	+	-
HY1001 pBAD24-baeR	1186.0 \pm 51.8	101.6 \pm 3.2
HY1002 pBAD24-baeR	1247.6 \pm 30.5	101.4 \pm 5.5
HY1003 pBAD24-baeR	1459.5 \pm 10.4	109.6 \pm 1.4

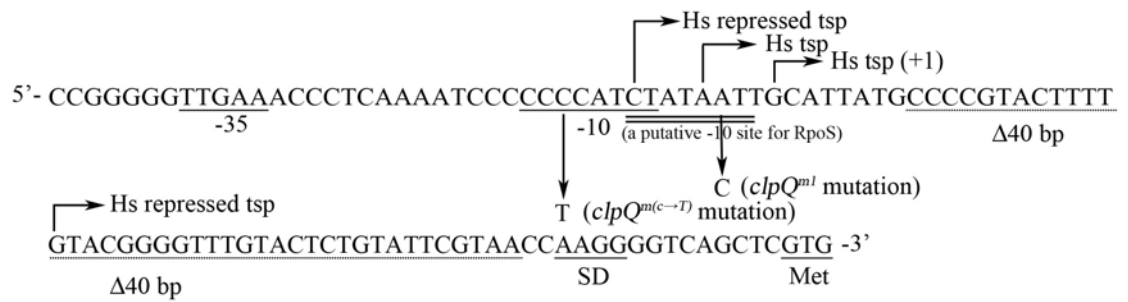


表十、BaeR 與 H₂O₂ 對 *gspS-lacZ* 表現的影響

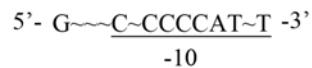
Table 11. Effect of BaeR and H₂O₂ on *gspS-lacZ* expression

		control	IPTG	H ₂ O ₂	IPTG/H ₂ O ₂
HY1002	β-galactosidase units	94.9±5.6	74.1±6.7	348.3±3.5	222.4±5.8
	OD ₆₀₀	1.040	1.110	0.337	0.366
HY1002/ pJP24-baeR	β-galactosidase units	54.4±1.5	522.3±3.5	66.0±3.7	586.9±2.4
	OD ₆₀₀	0.687	0.524	0.575	0.393





Consensus sequences of σ^{32} (*rpoH*)

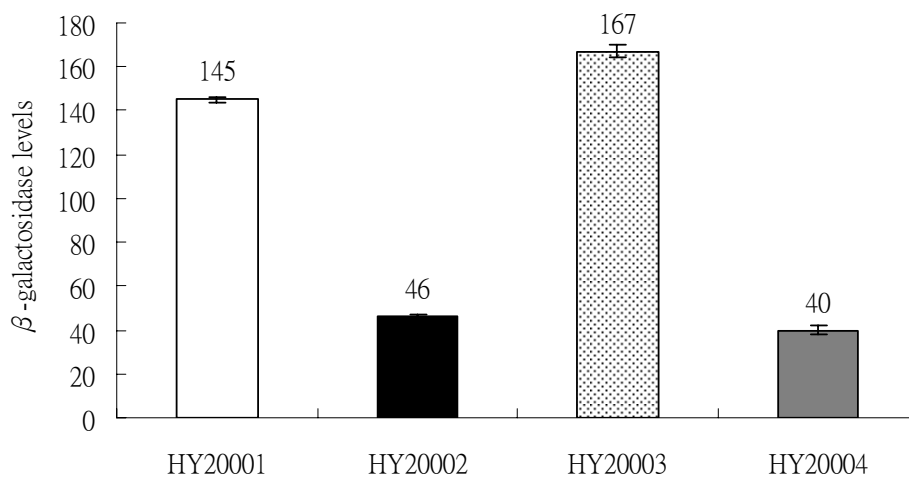


圖一、*clpQ*⁺ *clpY*⁺ 操縱子的啟動子區域之序列圖示

Fig. 1. Nucleotide sequences of the promoter region of the *clpQ*⁺ *clpY*⁺ operon.

tsp 表示轉錄起始處 transcriptional start site。-35 與 -10 box, Shine-Dalgarno sequence (SD) 及起始密碼 GTG (起始胺基酸為 Met) 以底線標示。融合基因 *clpQ*^{*m(c→t)*}::*lacZ* 的 C→T 點突變以 *clpQ*^{*m(c→t)*} mutation 標示。融合基因 *clpQ*^{*m1*}::*lacZ* 的 A→C 點突變以 *clpQ*^{*m1*} mutation 標示。*clpQ*^{*m2*}Δ40bp::*lacZ* 所移除的 40 bp 以虛線標示。

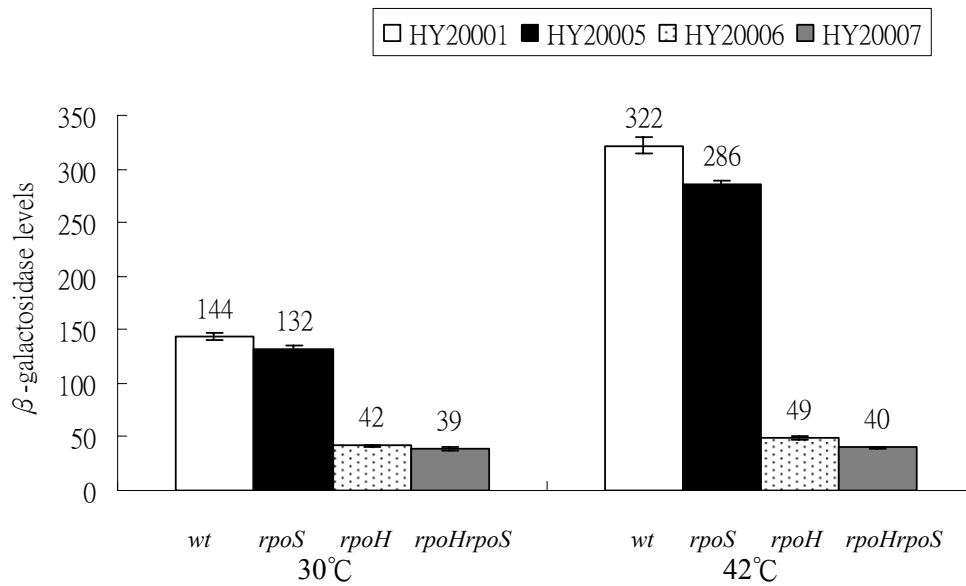




圖二、不同長度的轉錄及轉譯融合基因 $clpQ^+clpY^+::lacZ$ 之活性

Fig. 2. Expression of two sets of $clpQ^+clpY^+::lacZ$ gene fusion, in a transcriptional or a translational fusion type, with two different lengths of the $clpQ^+$ promoter.

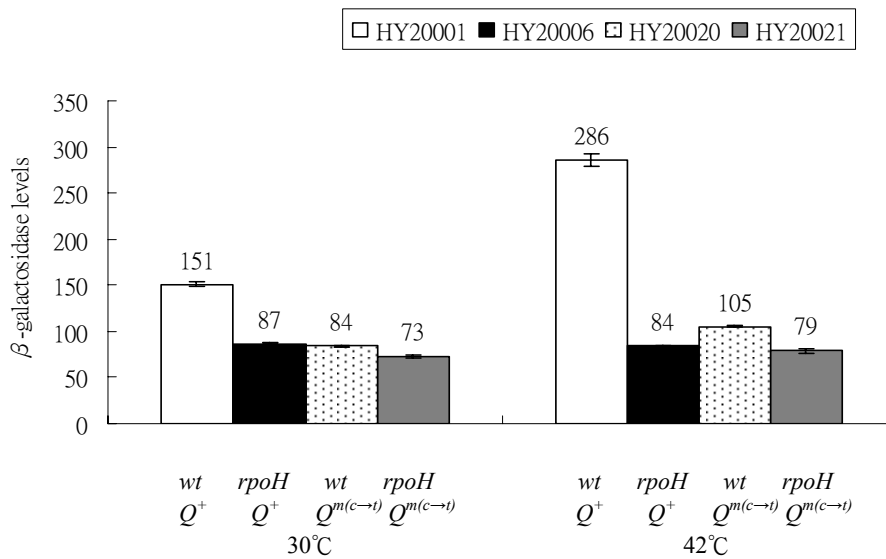
菌株培養於 30 °C LB, 生長至對數期取樣測活性。HY20001 之融合基因包含 $clpQ^+$ 前 13 個胺基酸及其上游共 141 bp, operon fusion [$clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)], HY20002 之融合基因包含 $clpQ^+$ 前 13 個胺基酸及其上游共 141 bp, protein fusion [$clpQ^+::lacZ$ (pr-141bp)], HY20003 之融合基因包含 $clpQ^+$ 前 13 個胺基酸及其上游共 478 bp, operon fusion [$clpQ^+::lacZ$ (op-478bp)], HY20004 之融合基因包含 $clpQ^+$ 前 13 個胺基酸及其上游共 478 bp, protein fusion [$clpQ^+::lacZ$ (pr-478bp)]。



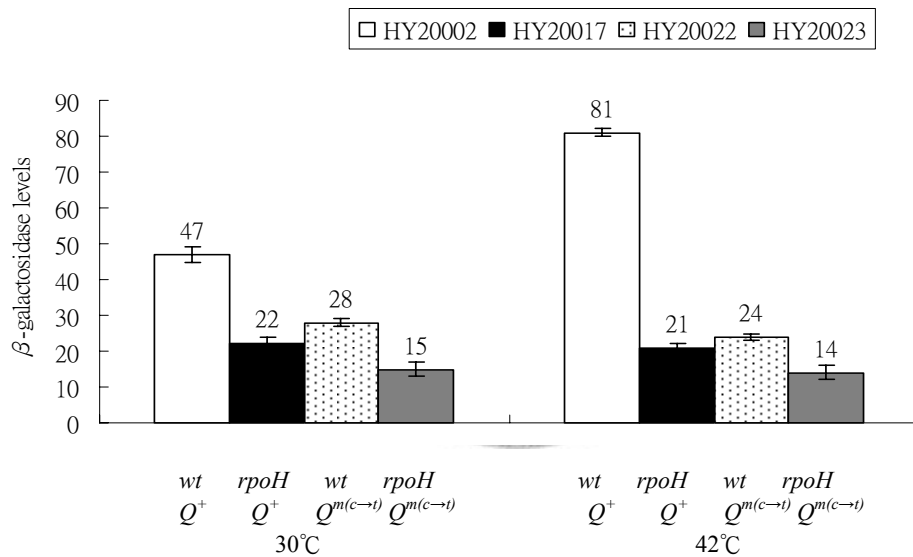
圖三、*wt*, *rpoS*⁻, *rpoH*⁻, *rpoS*⁻*rpoH*⁻ 四種菌株內，42 °C 對 *clpQ*⁺::*lacZ* 的熱誘導
Fig. 3. Expression of *clpQ*⁺::*lacZ* in the *wt*, *rpoS*⁻, *rpoH*⁻, *rpoS*⁻*rpoH*⁻ strains on heat shock induction.

菌株先培養於 30 °C 至對數生長期，取樣測 β -galactosidase 活性，再移至 42 °C 培養 30 分鐘取樣測 β -galactosidase 活性。HY20001 [*wt*, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]，HY20005 [*rpoS*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]，HY20006 [*rpoH*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]，HY20007 [*rpoS*⁻*rpoH*⁻, *clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)]。圖上標示之 *rpoH* 表示 *rpoH*⁻ 突變株，其他菌株表示法亦同。

(A)



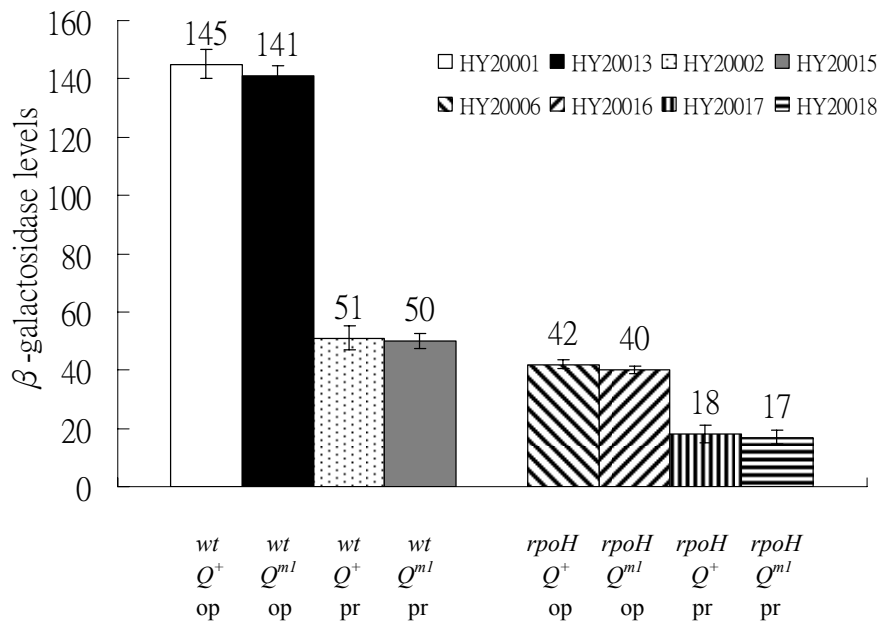
(B)



圖四、42 °C 對 $clpQ^+::lacZ$ 熱誘導受啟動子點突變(C→T)的影響

Fig. 4. Expression of the $clpQ^+::lacZ$ (op or pr fusion) and the $clpQ^{m(c \rightarrow t)}::lacZ$ (op or pr fusion) in the wt , or $rpoH^-$ at 30°C or 42°C.

菌株先培養於 30 °C 至對數生長期，取樣測 β -galactosidase 活性，再移至 42 °C 培養 30 分鐘取樣測 β -galactosidase 活性。(A) $clpQ^+::lacZ$ 轉錄融合基因受 42 °C 熱誘導的 β -galactosidase 活性。HY20001 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20006 [$rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20020 [wt, $clpQ^{m(c \rightarrow t)}::lacZ$ (op-141bp)]，HY20021 [$rpoH^-$, $clpQ^{m(c \rightarrow t)}::lacZ$ (op-141bp)]。(B) $clpQ^+::lacZ$ 轉譯融合基因受 42 °C 熱誘導的 β -galactosidase 活性。HY20002 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (pr-141bp)]，HY20017 [$rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (pr-141bp)]，HY20022 [wt, $clpQ^{m(c \rightarrow t)}::lacZ$ (pr-141bp)]，HY20023 [$rpoH^-$, $clpQ^{m(c \rightarrow t)}::lacZ$ (pr-141bp)]。

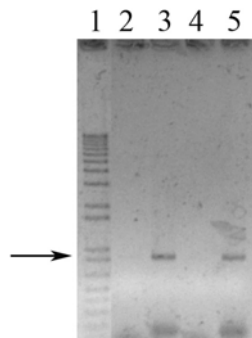


圖五、啟動子點突變 (A→C) 對 $clpQ^{ml}::lacZ$ 表現的影響

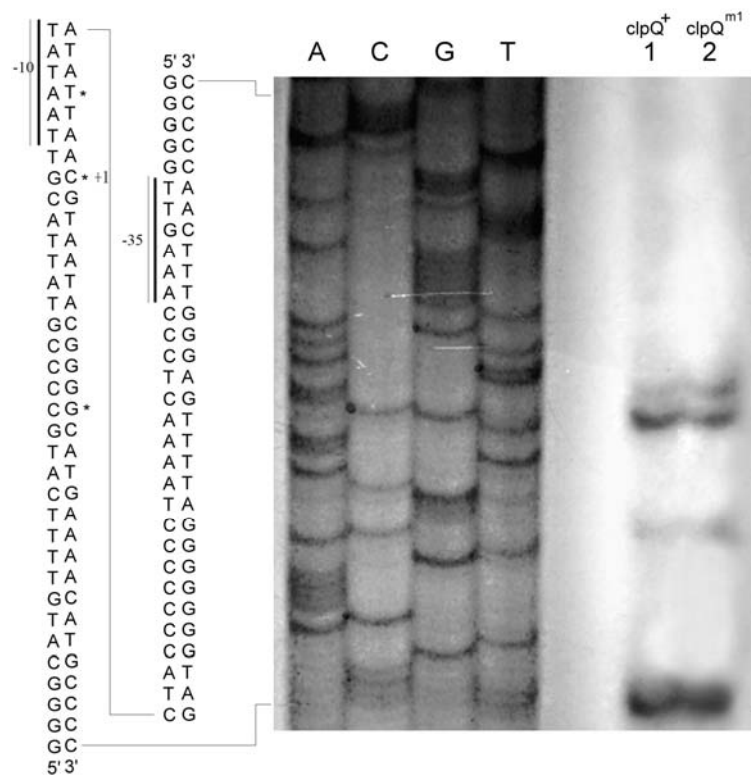
Fig. 5. Effect of promoter mutation (A→C) on $clpQ^{ml}::lacZ$ expression.

菌株先培養於 30°C 至對數生長期，取樣測 β -galactosidase 活性。HY20001 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20013 [wt, $clpQ^{ml}::lacZ$ (op-141bp)]，HY20002 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (pr-141bp)]，HY20015 [wt, $clpQ^{ml}::lacZ$ (pr-141bp)]。HY20006 [$rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20016 [$rpoH^-$, $clpQ^{ml}::lacZ$ (op-141bp)]，HY20017 [$rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (pr-141bp)]，HY20018 [$rpoH^-$, $clpQ^{ml}::lacZ$ (pr-141bp)]。圖上標示之 $rpoH^-$ 表示 $rpoH^-$ 突變株，其他菌株表示法亦同。

(A)



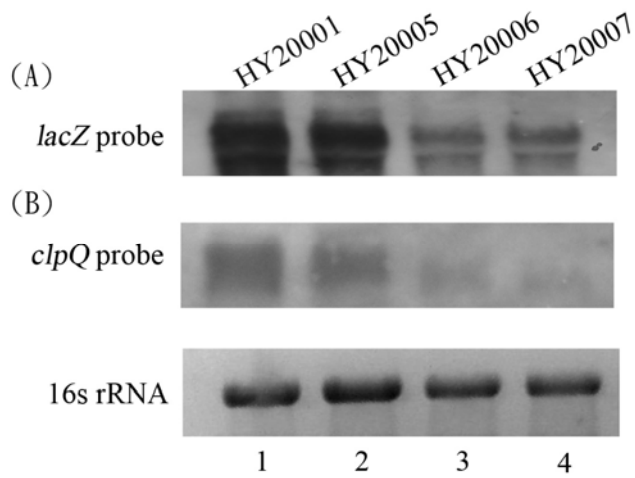
(B)



圖六、*clpQ*⁺啟動子點突變對轉錄起始點(+1)沒有影響

Fig. 6. Point mutation of *clpQ*⁺ promoter has no effect on transcription start site.

(A) 抽取 HY20001 [*clpQ*⁺::*lacZ* (op-141bp)] 及 HY20020 [*clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* (pr-141bp)] 的 mRNA 進行 RT-PCR 之結果。lane 1: marker, lane 2: 以 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 轉錄起始點的上游序列為五端引子，以 *clpQ*::*lacZ* 之 mRNA 為模版，lane 3: 以 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 轉錄起始點為五端引子 (5' primer) 的起始，以 *clpQ*::*lacZ* 之 mRNA 為模版，lane 4: 以 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 轉錄起始點的上游序列為五端引子，以 *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* 之 mRNA 為模版，lane 5: 以 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 轉錄起始點為五端引子 (5' primer) 的起始，以 *clpQ*^{m(c→t)}::*lacZ* 之 mRNA 為模版。(B) 以 HY20002 [*clpQ*⁺::*lacZ* (pr-141bp)] 及 HY20015 [*clpQ*^{m1}::*lacZ* (pr-141bp)] 所得之 primer extension, 結果顯示 A→C 點突變後 *clpQ*::*lacZ* 的轉錄起始點沒有改變，+1 表示實驗所得之轉錄起始點。



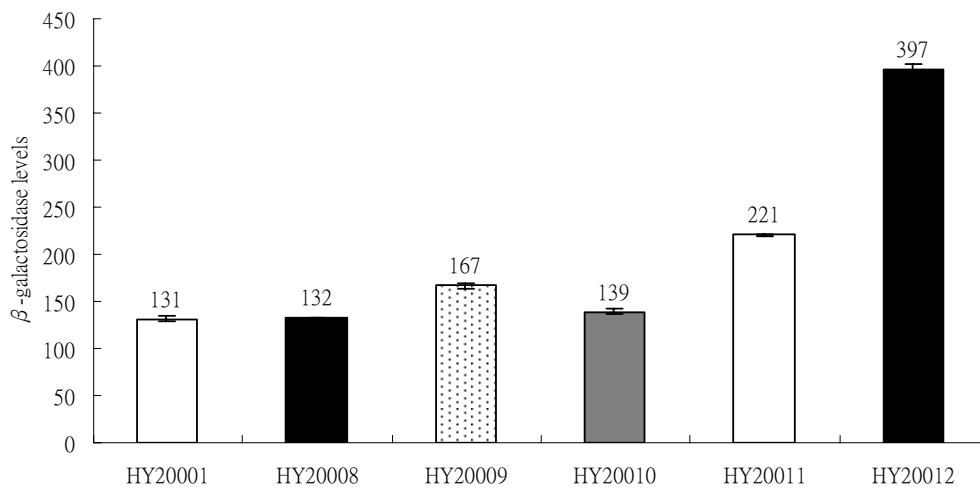
圖七、 $clpQ^+::lacZ$ 與 $clpQ^+clpY^+$ 在 30°C 時的 mRNA 表現

Fig. 7. mRNA expression of $clpQ^+::lacZ$ and $clpQ^+clpY^+$ at 30°C.

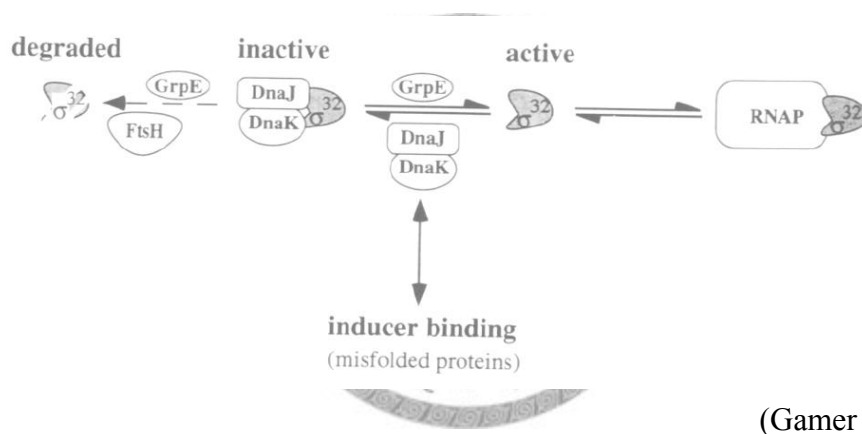
(A)以 *lacZ* 為探針所測得的 mRNA 表現。(B)以 *clpQ* 為探針所測得的 mRNA 表現。HY20001 [wt, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)], HY20005 [$rpoS^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)], HY20006 [$rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)], HY20007 [$rpoS^-rpoH^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]。



(A)



(B)



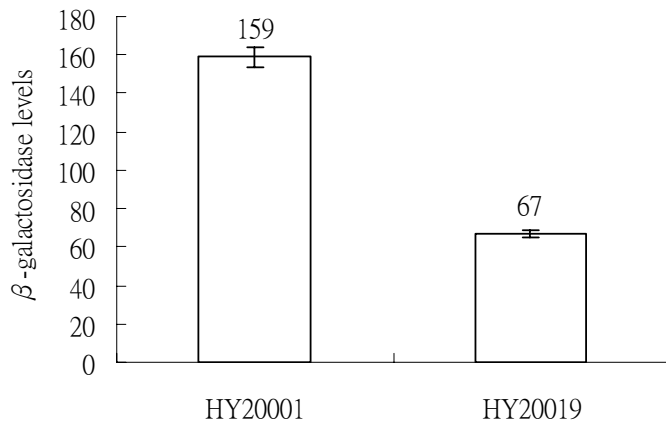
(Gamer 1996)

圖八、蛋白酶缺失對 $clpQ^+::lacZ$ 表現的影響

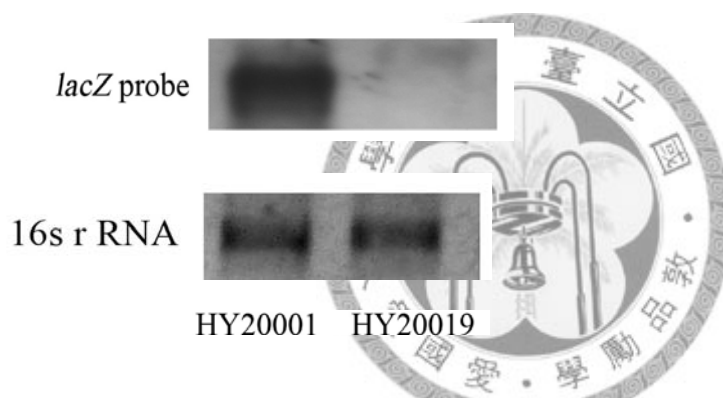
Fig. 8. Effect of protease deficient on $clpQ^+::lacZ$ expression.

(A)蛋白酶缺失時 $clpQ^+::lacZ$ 的 β -galactosidase 活性。HY20001 [*wt*, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20008 [$clpA^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20009 [$clpX^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20010 [$clpB^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20011 [lon^- , $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20012 [$lon^- clpX^- clpP^-$, $clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]。 (B)Model of chaperone-mediated homeostatic control of a σ^{32} activity and stability。

(A)



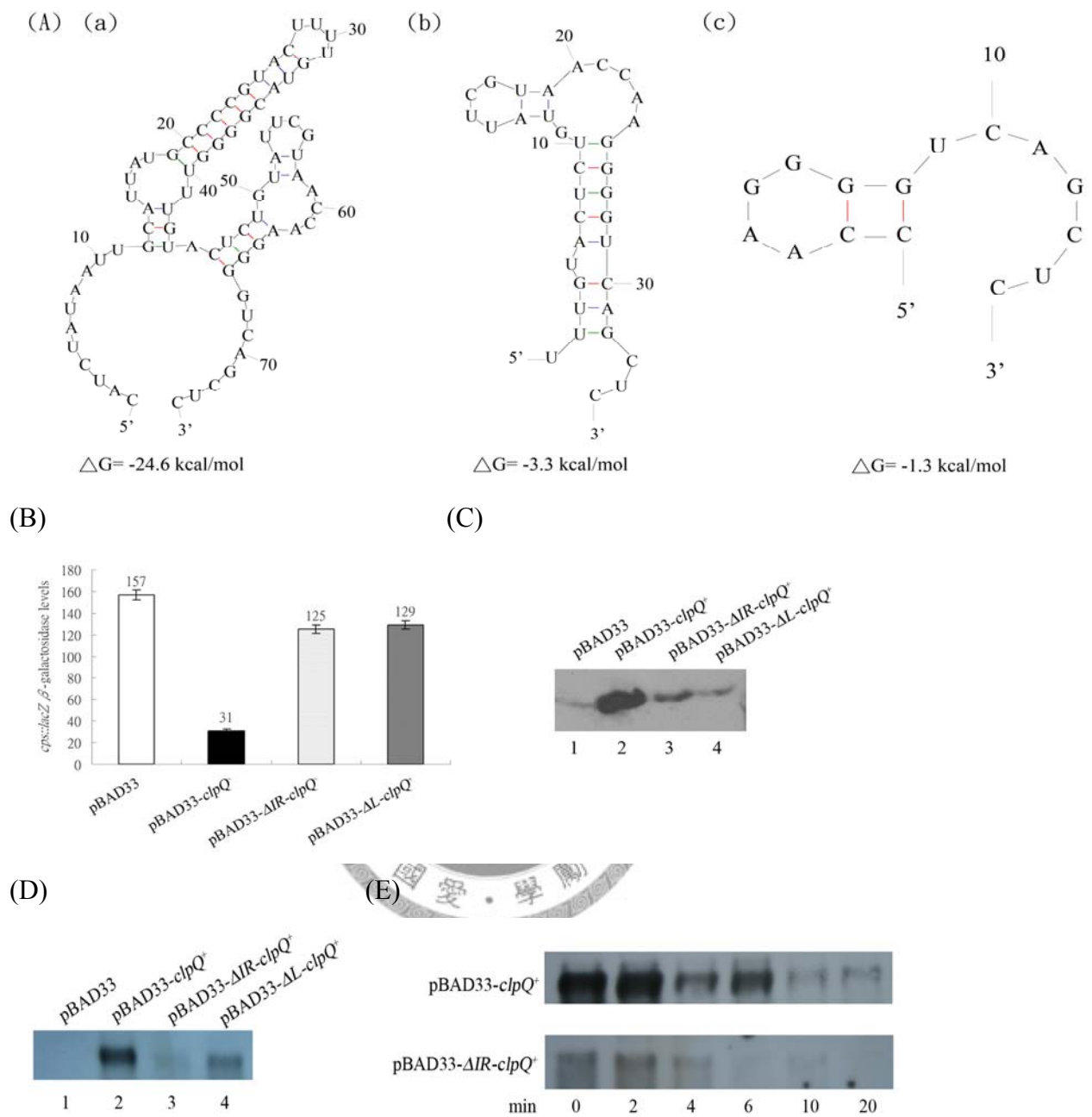
(B)



圖九、去除 5'-UTR 對 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ 表現的影響

Fig. 9. Effect of 5'-UTR deletion on the $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ expression.

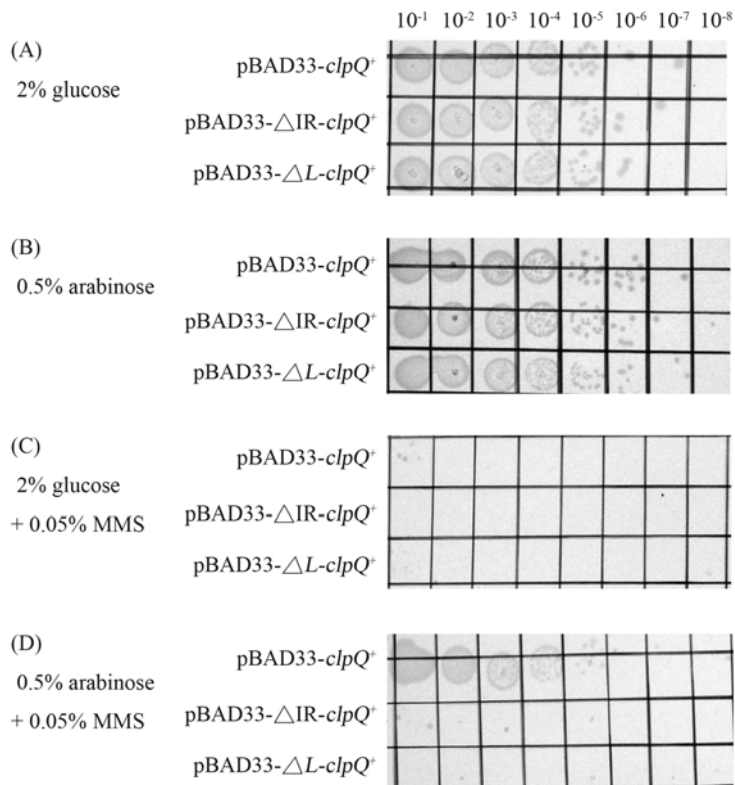
(A) β -galactosidase 活性。(B)以 *lacZ* 為探針所測得的 $clpQ^+::lacZ$ 及 $clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ 表現。HY20001 [$clpQ^+::lacZ$ (op-141bp)]，HY20019 [$clpQ^{m2} \Delta 40bp::lacZ$ (op-141bp)]。



圖十、五端未轉譯區域 (5'-UTR) 中的 IR 序列對 $clpQ^+ clpY^+$ 表現的影響

Fig. 10. Effect of IR sequence in the 5'-UTR on the $clpQ^+ clpY^+$ expression.

(A)以 Mfold 所預測之 RNA 二級結構 (a) $clpQ^+$, $\Delta G = -24.6$ kcal/mol (b) $\Delta IR-clpQ^+$, $\Delta G = -3.3$ kcal/mol (c) $\Delta L-clpQ^+$, $\Delta G = -1.3$ kcal/mol。(B) $clpQ^+$, $\Delta IR-clpQ^+$, $\Delta L-clpQ^+$ 三種情況下所測得之 $cpsB::lacZ$ 活性。(C) $clpQ^+$, $\Delta IR-clpQ^+$, $\Delta L-clpQ^+$ 三種情況下所測得之 ClpQ 表現。(D) $clpQ^+$, $\Delta IR-clpQ^+$, $\Delta L-clpQ^+$ 三種情況下所測得之 $clpQ$ mRNA 表現。(E) $clpQ^+$, $\Delta IR-clpQ^+$ 兩者以 rifampin 200 μ g/ml 抑制轉錄後之 $clpQ$ mRNA 表現。



圖十一、IR 序列對 ClpQ/ClpY 交互作用之影響

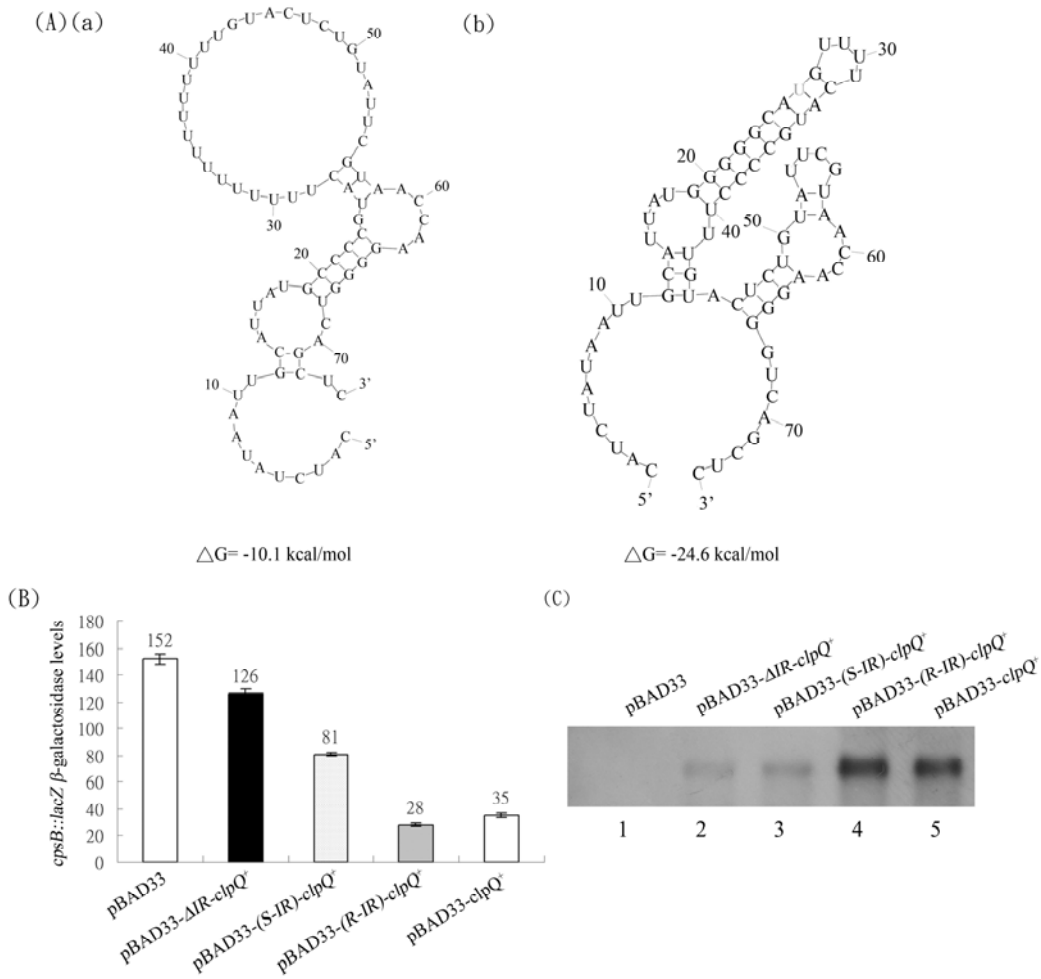
Fig. 11. Effect of IR sequence on ClpQ/ClpY interaction.

glucose : 葡萄糖，可抑制載體 pBAD33 及 pBAD24 表現

arabinose : 阿拉伯糖，可誘導載體 pBAD33 及 pBAD24 表現

MMS : methyl methanesulfonate 為細胞分裂抑制物

10^{-1} 至 10^{-8} : 菌液稀釋為 10^{-1} 倍至 10^{-8} 倍



圖十二、IR 序列所形成的 stem-loop 結構對 $clpQ^+ clpY^+$ 表現的影響

Fig. 12. Effect of stem-loop structure on $clpQ^+ clpY^+$ expression.

(A)以 Mfold 所預測之 RNA 二級結構(a) $(S-IR)-clpQ^+$, $\Delta G= -10.6$ kcal/mol (b) $(R-IR)-clpQ^+$, $\Delta G= -24.6$ kcal/mol (B) $(S-IR)-clpQ^+$, $(R-IR)-clpQ^+$ 兩種情況下所測得之 $cpsB::lacZ$ 活性 (C) $(S-IR)-clpQ^+$, $(R-IR)-clpQ^+$ 兩種情況下所測得之 $clpQ$ mRNA 表現。

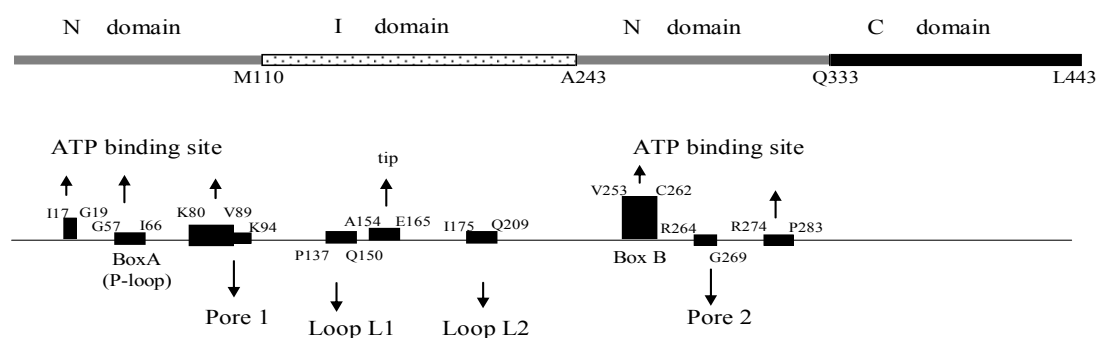
<i>E. coli</i>	5' ----- <u>CCCCGTACTTTTGTACGGGG</u> TTTGTACTCTGTATTCGTAACC <u>AAGG</u> GGTCAGCTCGTG-3'
<i>S. flexneri</i>	5' ----- <u>CCCCGTACTTTTGTACGGGG</u> TTTGTACTCTGTATTCGTAACC <u>AAGG</u> GGTCAGCTCGTG-3'
<i>S. enterica</i>	5' -- <u>GCCCCGTACGCCGTACGGGGC</u> CGCAATTCAGCATTAGTAACC <u>AAGG</u> GGTCTGCTCGTG-3'
<i>K. pneumonia</i>	5' <u>GGCCCCGCGGACAGCGCGGGGC</u> CCTGTTCCGCTTTTGCAACC <u>AAGG</u> GGTCTGCTCGTG-3'
<i>Enterobacter sp.</i>	5' ---- <u>GCCCTGAGTATCAGCTCAGGGC</u> ATCTCTTTCGAATTTGTAACC <u>AAGG</u> GGTCTGCTCGTG-3'
<i>Serratia sp.</i>	5'- <u>CCTCGTAGTGTCTGCGCAAGCAGATACTGCGAGG</u> GCTTCTTCCGCTTCAA <u>CGAG</u> GGTCTGCTCGTG-3'
<i>Y. pestis</i>	5' -- <u>CTCCGTACTGTTTTTAACAGGCAGTACGGG</u> ACTCATTAGTCTGCAA <u>CGAG</u> GGTCTGCTCGTG-3'
<i>Erwinia sp.</i>	5' --- <u>GCCCCACACTGACGTGTGGGGC</u> CGT-----CTTTTGTACTGTAAC <u>AAGG</u> GGTCTGCCCGTG-3'
<i>Citrobacter sp.</i>	5' ---- <u>GCCCCGTACCGCGTGC</u> GGGGCCTGT---ATTCTGCATTGTAACC <u>AAGG</u> GGTCTGCTCGTG-3'

圖十三、不同菌種間 *clpQ*⁺ *clpY*⁺ 五端未轉譯區域(5'-UTR)保守性序列之比對
Fig. 13. The conserved region of sequences from the 5'-UTR of the *clpQ*⁺ *clpY*⁺ genes were aligned among the different bacterial species.

各菌分別為 *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica subsp. Enteritidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter sp.*, *Serratia proteamaculans*, *Yersinia pestis*, *Erwinia tasmaniensis* and *Citrobacter koseri*. 可形成 stem-loop 的序列以黑色底線標示，IR 序列以底色灰色標示，Shine-Darlarno sequence 以黑色方框標示，起始密碼 GTG 以粗體字標示。



(A)



(B)

The selective ClpY loop mutants or those made by the site-directed mutagenesis

a L2 loop, 175-209 aa						
^a I186N	M187I	A188S	L199Q	N205K	^a E193L, E194L	^a Q198L, Q200L
^b ATT	^b ATG	^b GCT	^b CTG	^b AAC	^b GAA, GAG	^b CAG, CAG
^c AAT	^c ATT	^c TCT	^c CAG	^c AAA	^c CTA, CTG	^c CTG, CTG

a. the ClpY mutants constructed by the site-directed mutagenesis

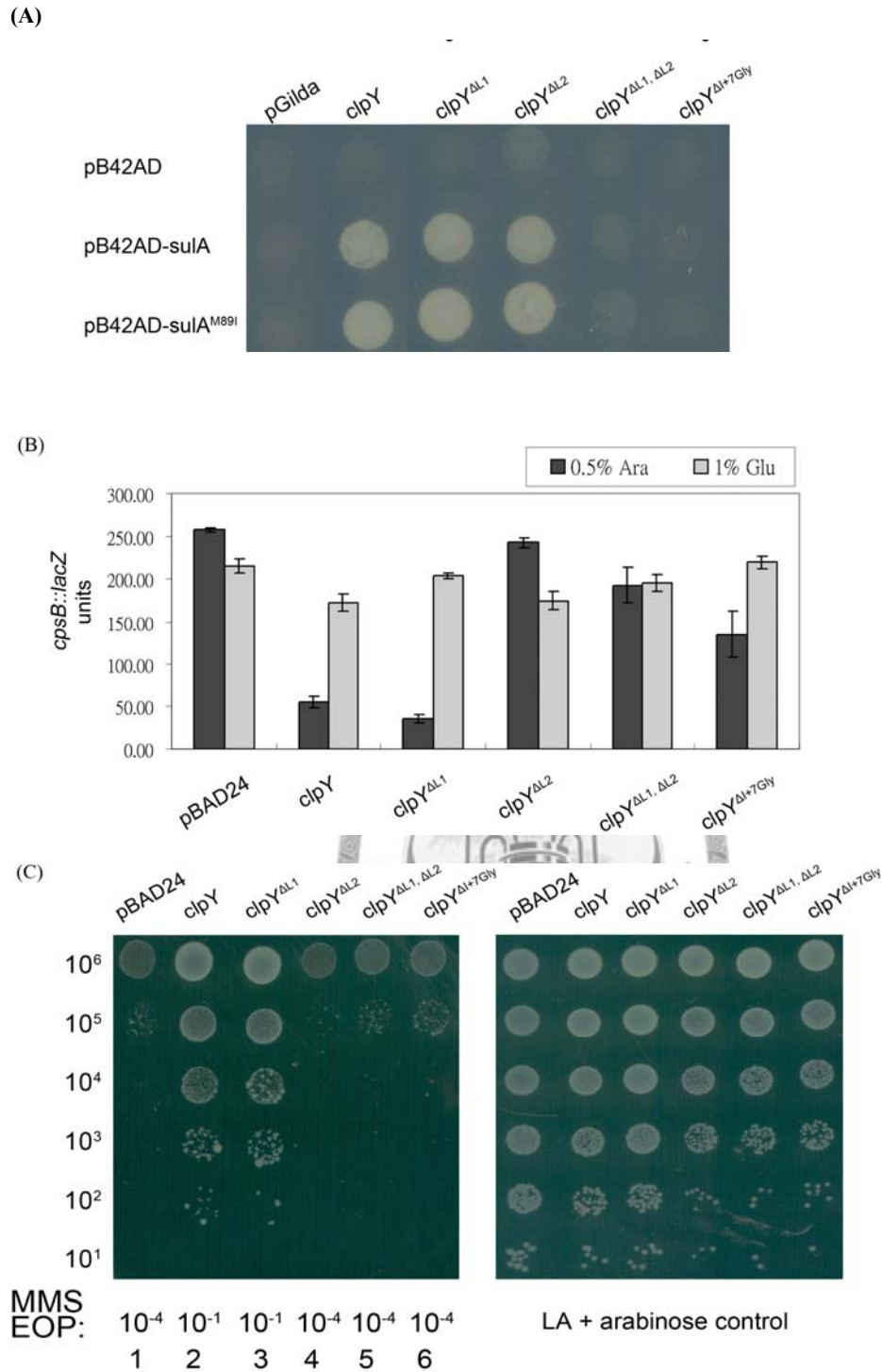
b. the original sequence of the amino acid

c. the substituted sequence of the mutants

圖十四、ClpY 三個主要作用區示意圖

Fig. 14. Domains of ClpY and its functional motifs.

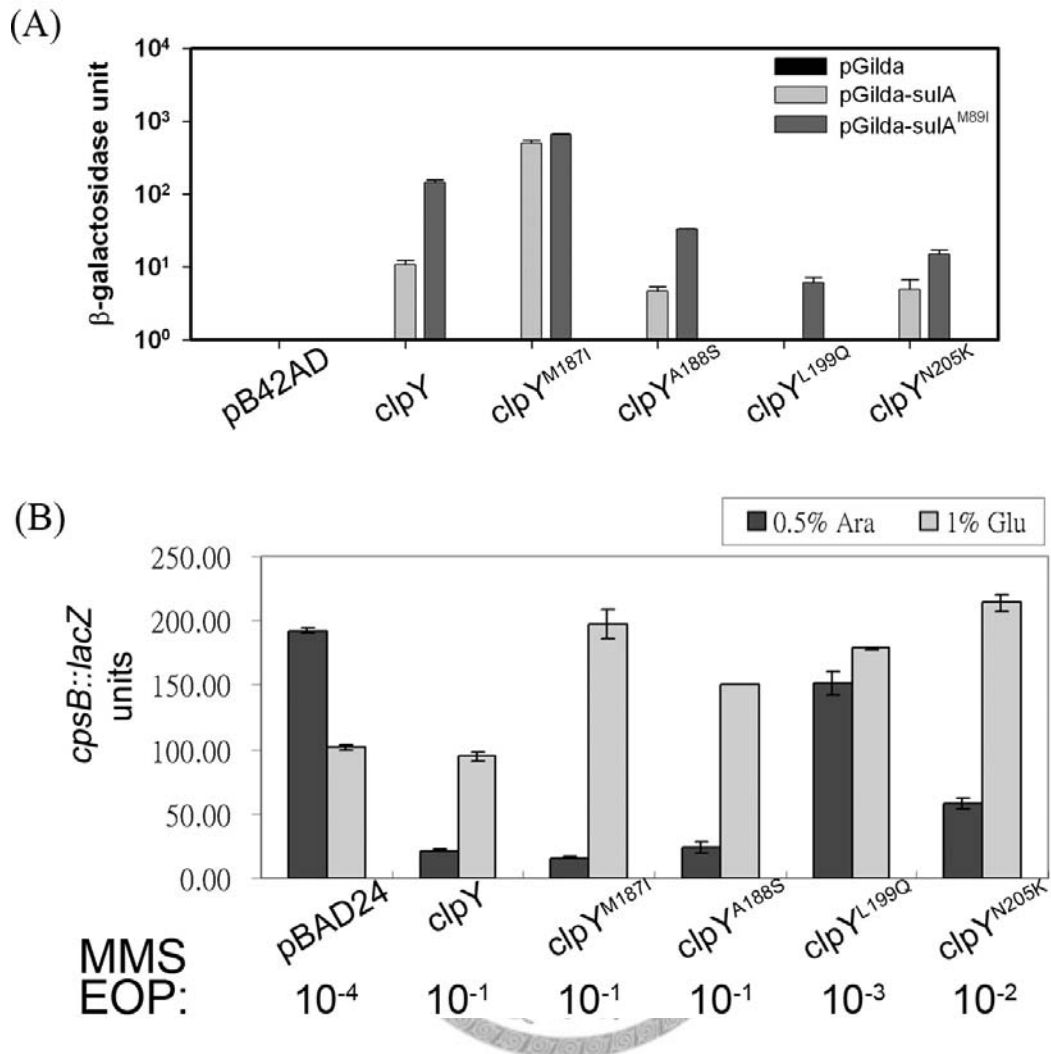
(A) N-terminal domain (N; residues 2-109/244-332), I-intermediated domain (I; residues 110-243)及 C-terminal domain (C; residues 333-443)。(B)本文所使用 ClpY 突變列表。



圖十五、ClpY 的 loop L1 與 loop L2 與 Sula 間交互作用之結果。

Fig. 15 Interaction between Sula and ClpY mutants.

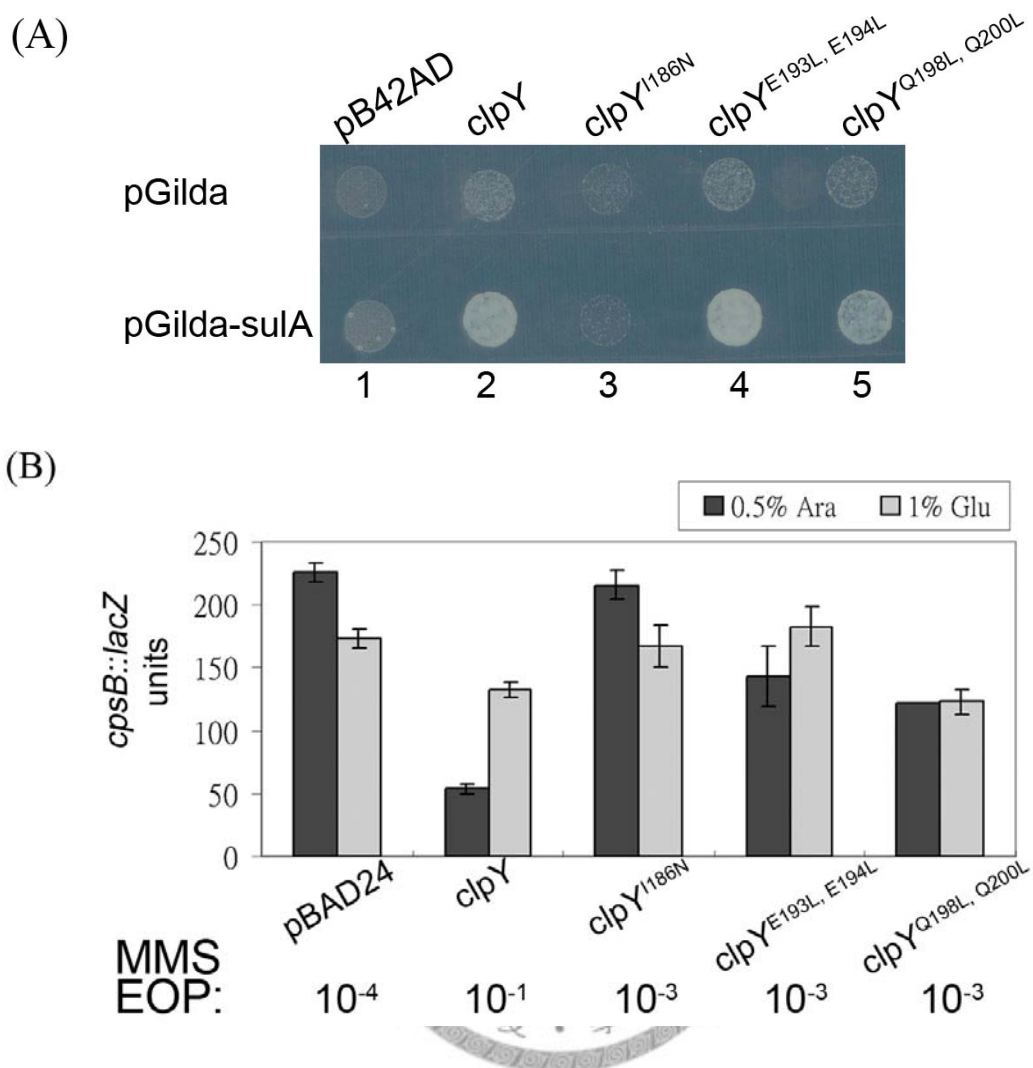
(A)以 EGY48/p8op-*lacZ* 表現各組 pB42AD-*sulA*⁺/pGilda-*clpY* 融合蛋白後，在 Leu⁻ 培養基中培養四天之結果。(B)不同的 ClpY 融合蛋白與 ClpQ 作用後，所測得之 *cpsB*::*lacZ* 活性。(C)以 MMS test 測試不同的 ClpY 融合蛋白對 ClpQ/ClpY interaction 之影響。EOP: efficiency of plating。Ara: 阿拉伯糖，Glu: 葡萄糖。



圖十六、四組 ClpY 點突變 M187I，A188S，L199Q，N205K 與基質結合及分解基質能力

Fig. 16. Substrate binding and degradation of ClpY mutants M187I, A188S, L199Q and N205K.

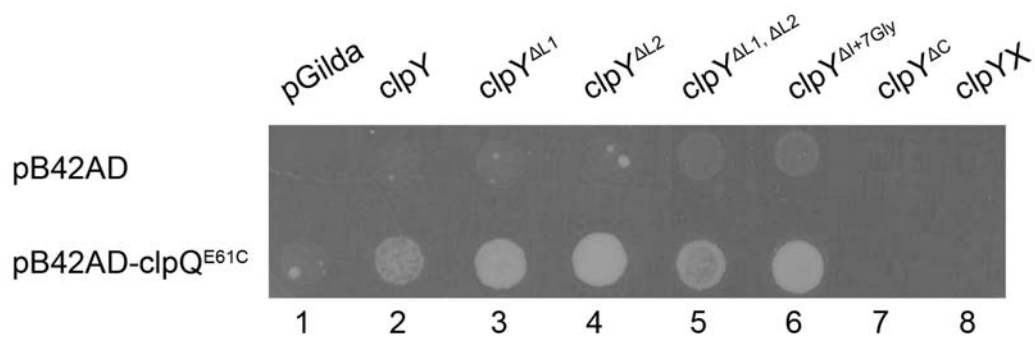
(A)四突變株和野生株 AD-ClpY 分別與 BD-SulA 和 BD-SulA^{M89I} 的 SulA binding 活性測試結果。(B)四組突變和野生 ClpY 與 ClpQ 作用後，所測得之 *cpsB::lacZ* 活性。Ara：阿拉伯糖，Glu：葡萄糖。



圖十七、三組 ClpY 突變 I186N, E193L,E194L, Q198L,Q200L 與基質結合及分解基質能力

Fig. 17. Substrate binding and degradation of ClpY mutants I186N, E193L,E194L and Q198L,Q200L.

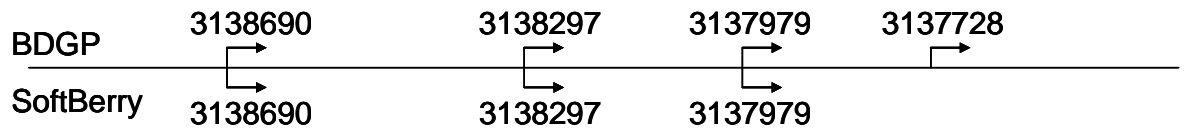
(A)以 EGY48/p8op-*lacZ* 表現各組 pGilda-*sulA*⁺/pB42AD-*clpY* 融合蛋白後，在 Leu⁻ 培養基中培養結果。(B)不同的 ClpY 與 ClpQ 作用後，所測得 *cpsB::lacZ* 活性。Ara：阿拉伯糖，Glu：葡萄糖。



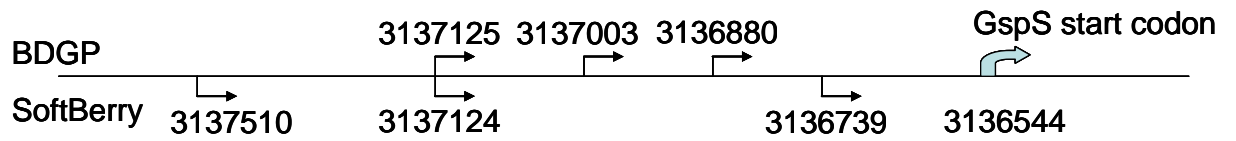
圖十八、帶有 ClpQ^{E61C}/ClpY 融合蛋白的 EGY48/p8op-*lacZ*，其 Leu2 的表現
 Fig. 18. Expression of Leu2 in EGY48/p8op-*lacZ* cells carrying ClpY and its derivative mutants with ClpQ^{E61C}.



3139000 - 3137600



3137615- 3136521



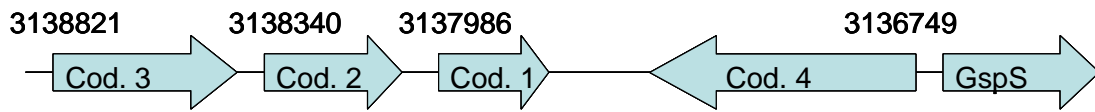
圖十九、*gspS* 上游區域之啟動子預測

Fig. 19. Promoter prediction of *gspS* upstream region.

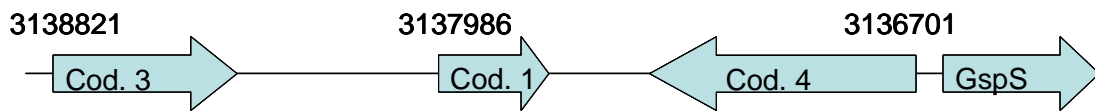
數字代表在基因組(genome)上的位置，如 3139000 代表大腸桿菌基因組上第 3139000 對鹼基對



GeneMark



Generation Microbial

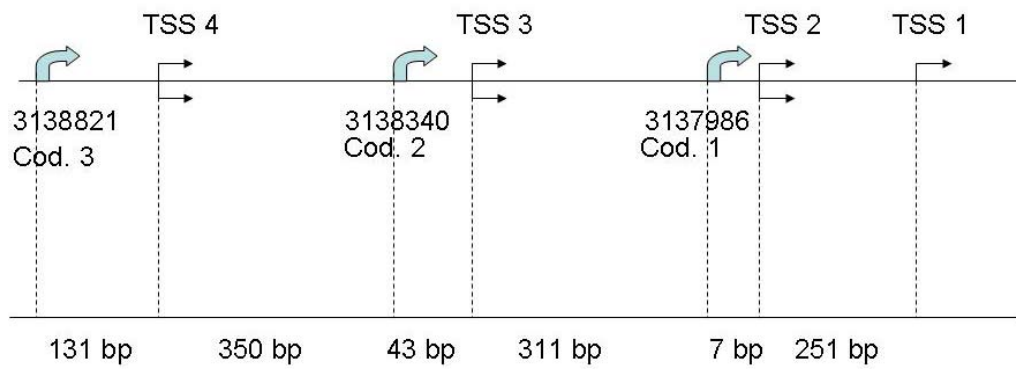


圖二十、*gspS* 上游區域的編碼區預測

Fig. 20. Coding region prediction of *gspS* upstream region.

Cod. : coding region , 編碼區





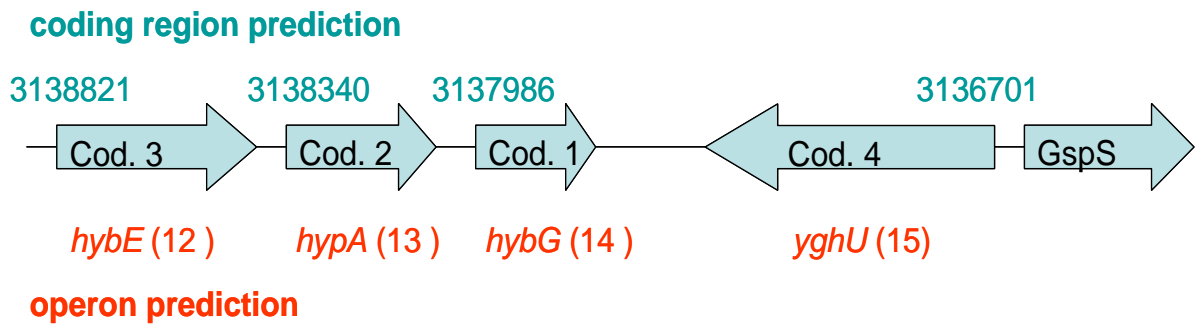
圖二十一、啟動子與編碼區預測結果比較

Fig. 21. Comparison with promoter prediction and coding region prediction.

TSS : predicted transcription start site

Cod. : predicted coding region





圖二十二、編碼區與操縱子預測結果比較

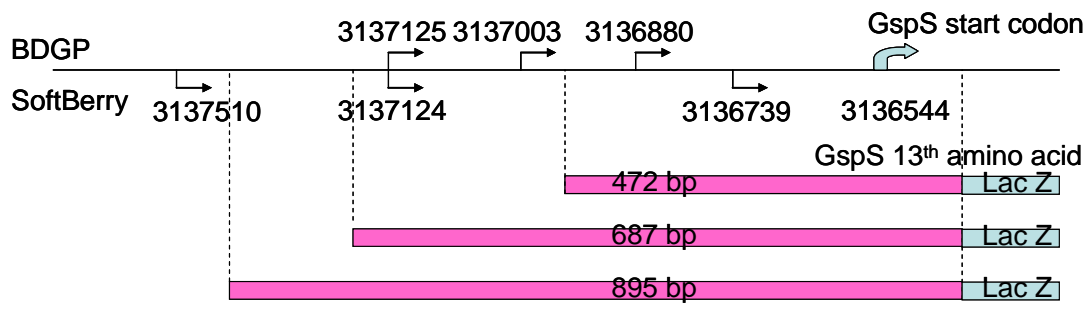
Fig. 22. Comparison with coding region prediction and operon prediction.

TSS : predicted transcription start site

Cod. : predicted coding region

基因名稱後，括弧內數字為與表七第一欄之對照



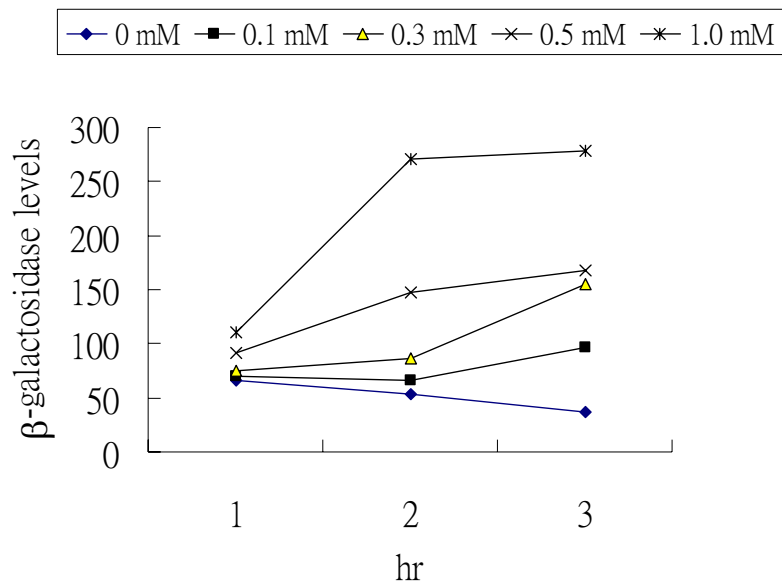


圖二十三、*gspS-lacZ* 融合基因之建構

Fig. 23. Construction of *gspS-lacZ* fusion gene.

BDGP, SoftBerry :以軟體 BDGP 及 SoftBerry 所預測的轉錄起始點以箭號表示，數字為該處在基因組上的位置





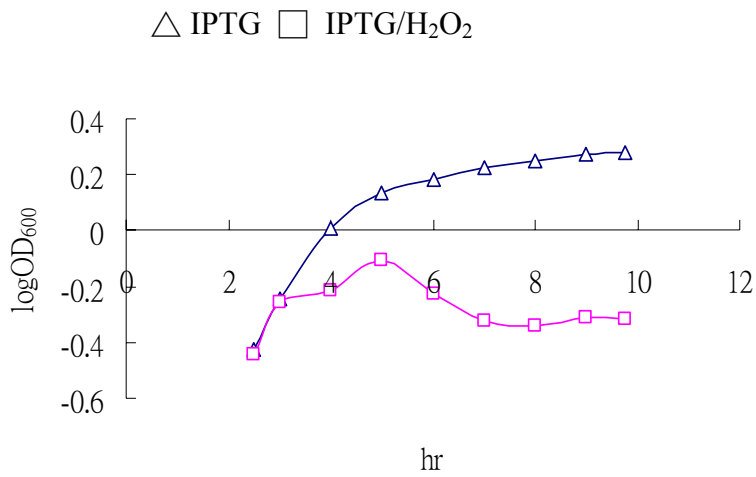
圖二十四、 H_2O_2 對 *gspS-lacZ* 表現的影響

Fig. 24. Effect of H_2O_2 on *gspS-lacZ* expression.

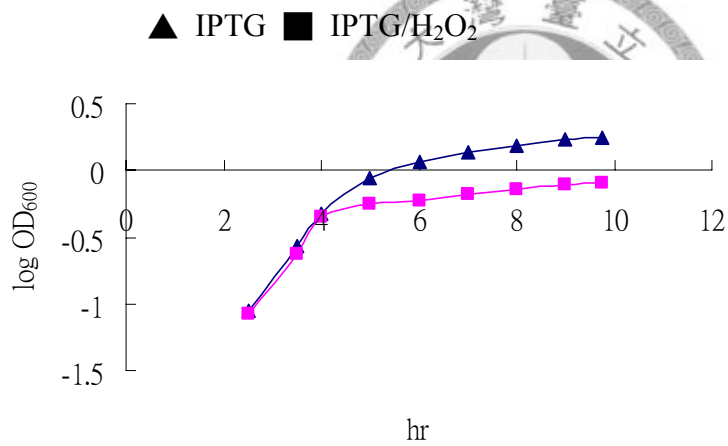
本實驗使用菌株 HY1002，在 0 小時加入 H_2O_2 ，在 1, 2 及 3 小時取樣測量 β -galactosidase 活性



(A) HY1002(*gspS-lacZ*)的生長狀況

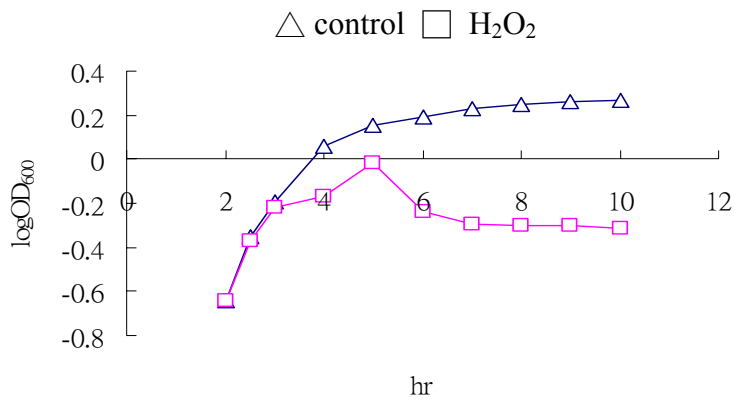


(B) HY1002(*gspS-lacZ*)/pJP24-baeR 的生長狀況

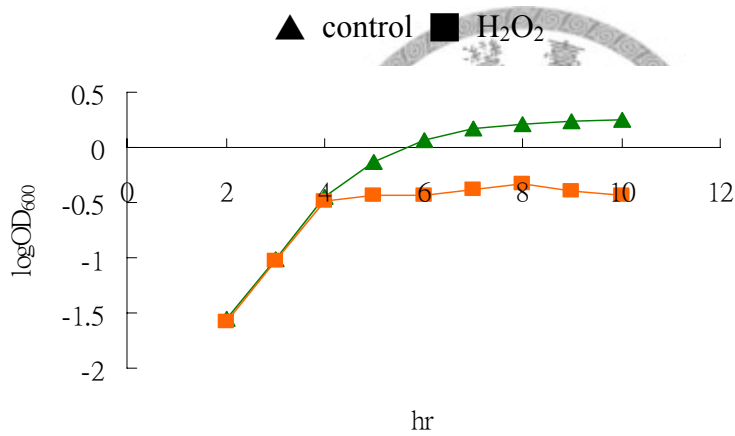


圖二十五、BaeR 與 H₂O₂ 對 HY1002(*gspS-lacZ*) 的生長狀況之影響
Fig. 25. Effect of BaeR and H₂O₂ on HY1002(*gspS-lacZ*) growth.

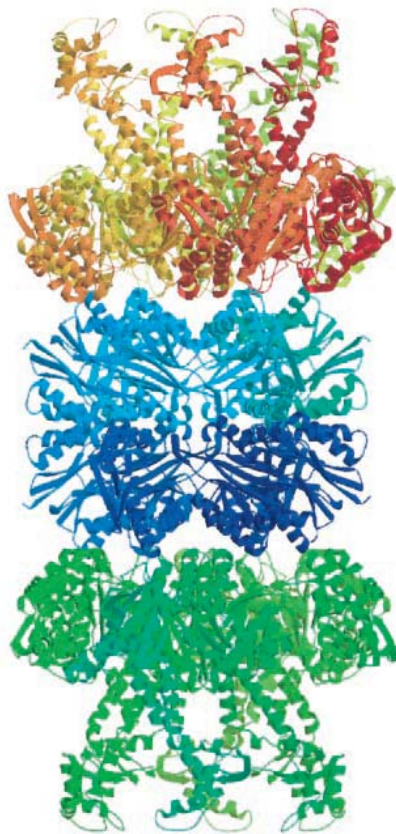
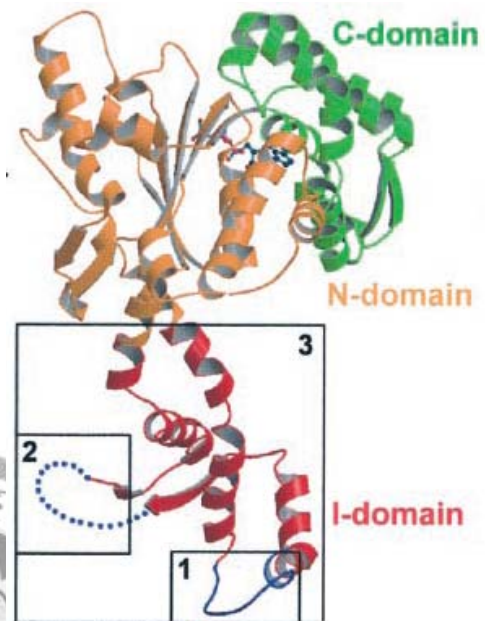
(A) HY1002(*gspS-lacZ*)的生長狀況



(B) HY1002(*gspS-lacZ*)/pJP24-baeR 的生長狀況



圖二十六、H₂O₂ 對 HY1002(*gspS-lacZ*) 的生長狀況之影響
Fig. 26. Effect of H₂O₂ on HY1002(*gspS-lacZ*) growth.

A**B***(Song et al., 2000)***附圖一、大腸桿菌 ClpYQ 結構圖****Appendix figure1. The structure of ClpYQ complex from *E. coli*.**

(A) 大腸桿菌 ClpYQ 複合體之結構，中間部份是兩個 ClpQ 的六元體，上下則是兩個 ClpY 的六元體，以相反方向接合形成。(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，而 I-domain 上具有兩個 loop 的結構。1 號框為 loop L1，2 號框為 loop L2，3 號框為 I domain。