

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所

碩士論文

Institute of Plant Biology College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

未知功能 DUF28 protein 及色胺酸調控途徑在酵母菌

氧化逆境反應之功能分析

Functional study of DUF28 protein and
tryptophan-related metabolism in *Saccharomyces*
cerevisiae response to oxidative stress



陳巧燕

Chiao-Yen Chen

指導教授：鄭秋萍 博士

Advisor : Dr. Chiu-Ping Cheng

中華民國九十八年一月

January, 2009

口試委員會審定書



致 謝



中文摘要

生物在正常生長代謝過程中，會產生活性氧化物質(reactive oxygen species, ROS)，做為訊息傳導分子，幫助生物抵抗逆境，順利進行生長發育。適量的 ROS 可以保護生物，但過量的 ROS 反而會破壞蛋白質、脂質及 DNA，造成細胞損壞，導致細胞死亡。本論文針對酵母菌 *S. cerevisia* 兩個基因，利用遺傳、分子及 DNA 微陣列等研究策略，分析它們在氧化逆境的功能進行研究。首先，*YGR021w* 產物係隸屬具跨物種保守性但功能未知的新穎 DUF28 蛋白家族；本論文的研究結果發現，此基因在不同氧化逆境下其表現會被抑制，而其剔除株對於氧化逆境的抗性增加，且提早或大量誘導具代表性之已知抗氧化逆境相關基因的表現，而過量表現株的特質則反之；故首次發現 DUF28 蛋白在酵母菌抗氧化逆境機制中具負面調控。另外，微陣列結果進一步顯示，在 *YGR021w* 剔除株中抗逆境相關基因較提早且大量表現，醣類及能量相關基因也大量表現，可能在醣類及能量上能更有效之利用，且其細胞內之氧化還原之平衡，也較 WT 更具穩定性，顯示 *YGR021w* 剔除菌株之耐受性，可能是多種有利因素而得到之結果。其次，本論文也以色胺酸合成酶 *YGL026c (TRP5)* 為研究對象，結果發現，此基因在不同氧化逆境下其表現會被誘導，*TRP5* 剔除株對過氧化氫及膜相關逆境之敏感度增加，且在氧化逆境下 *TRP5* 剔除株中與抗氧化逆境相關之基因的誘導表現比在 WT 中較為延遲及減弱。另外，微陣列結果顯示，在正常條件下，*TRP5* 缺失即會造成酵母菌本身與膜構造及抗逆境相關基因之表現下降；而在氧化逆境下，其抗氧化、抗其他逆境及蛋白質降解相關基因之表現也是下降，可能在 *TRP5* 剔除株中大量之 ROS 造成之損壞物質無法藉由蛋白質降解過程移除，且缺乏了移除危機之能力，這些皆可能為造成 *TRP5* 剔除菌株對氧化逆境敏感的原因。這些結果顯示，酵母菌在遭受逆境時，需有具正負調控能力的不同的蛋白共同參與並協調，以達到最佳的最後逆境反應結果，以維持其生存。

關鍵詞：酵母菌、氧化逆境、DUF28 蛋白、色胺酸

Abstract

Cells growing aerobically are exposed to reactive oxygen species (ROS) generated during metabolism. These ROS can seriously damage the cell by reacting with cellular components, causing oxidative stress and cell death. The aim of this study is to investigate roles of two *S. cerevisiae* genes, *YGR021w* and *YGL026c* (tryptophan synthase, *TRP5*), in oxidative stress response by taking genetic, molecular and microarray approaches. Firstly, *YGR021w* is predicted to encode a protein belonging to a conserved novel protein family, namely DUF28. The results showed: (1) *YGR021w* expression was repressed by oxidative stress factors; (2) Deletion of *YGR021w* led to enhanced tolerance to H₂O₂ and heat shock stress, and *YGR021w* over-expression had opposite effects; (3) Stress-induced expression of oxidative response-related genes in *YGR021w*-deleted strain was faster and stronger compared to the wild-type strain (WT) ; (4) Microarray-based transcriptome analysis revealed enhanced induction of genes involved in oxidative response, carbohydrate metabolism in *YGR021w*-deleted strain compared to the WT. As the first report, these results together indicated that *YGR021w* plays a negative role in yeast response to oxidative stress. Secondly, role of *TRP5* in oxidative stress has not been elucidated until this study. The results showed: (1) *TRP5* expression was induced by oxidative stress factors; (2) Deletion of the *TRP5* led to remarkably increased sensitivity to various oxidative stresses and hydrophobic toxic compounds, while complementation rescued some of these defects; (3) Stress-induced expression of oxidative response-related genes in *TRP5*-deleted strain was much reduced compared to the WT; (4) Exogenous supplement of plant hormone IAA, enhanced tolerance to oxidative stress in the WT and the *TRP5*-deleted strain; (5) Microarray analysis revealed decreased expression of genes involved in stress tolerance and protein degradation in the deleted strain compared to the WT. Therefore, in addition to possible loss of cell structure integrity, the accumulation of abnormal proteins under stress condition in *TRP5*-deleted strain, which is not capable of degrading and removing such proteins, may account for the increased sensitivity of *TRP5*-deleted strain to oxidative stress. These results pointed out that *TRP5* plays an important role in yeast stress response. Taken together, the results suggest that both negative and positive elements are required to involve and coordinate to achieve proper and efficient response in yeast to oxidative stress.

Keywords: *S. cerevisiae*, oxidative stress, DUF28, tryptophan

常用名詞之縮寫與全名對照表

縮寫	全名
BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pair
CAT	Catalase
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	Ethylenediamine-tetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
ETC	Electron transport chain
LB medium	Luria-Bertani medium
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
MOPS	3- (N-morpholino) propanesulfonic acid
¹ O ₂	Singlet oxygen
O ₂ ⁻	Superoxide anion
OD	Optical density
OH ·	Hydroxyl Radical
PCR	Polymerase chain reacciton
PEG 4000	Polyethylene glycol 4000
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotation per minutes
Rs	<i>Ralstonia solanacearum</i>
RT-PCR	Reverse transcription- PCR
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

目次

口試委員會審定書.....	i
致謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
常用名詞之縮寫與全名對照表.....	v
目次.....	vi
表目次.....	ix
圖目次.....	x
附錄目次.....	xi
第一章 前言.....	1
1.1 氧化逆境.....	1
1.1.1 ROS 之生合成.....	1
1.2.1 ROS 之來源.....	2
1.3.1 氧化逆境對酵母菌生理發育的影響.....	3
1.2 抗氧化防禦系統 (antioxidant defense system).....	4
1.2.1 抗氧化酵素.....	4
1.2.1.1 超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD).....	4
1.2.1.2 過氧化酶 (catalase, CAT).....	4
1.2.1.3 過氧化物酶 (peroxidase).....	4
1.2.2 非酵素型抗氧化物.....	5
1.3 <i>YGR021w</i> (DUF28)功能相關研究.....	7
1.4 <i>YGL026c</i> (<i>TRP5</i>)功能相關研究.....	8
1.5 研究目標.....	9
第二章 材料與方法.....	10
2.1 <i>YGR021w</i> 及 <i>TRP5</i> 基因選殖.....	10
2.1.1 酵母菌 genomic DNA 萃取.....	10
2.1.2 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR).....	10
2.1.3 限制酶的消化水解.....	11
2.1.4 載體與基因之接合.....	11
2.1.5 製備大腸桿菌勝任細胞的製備與轉型作用.....	12
2.1.5.1 大腸桿菌勝任細胞的製備.....	12
2.1.5.2 大腸桿菌勝任細胞的轉型作用.....	12

2.1.6 酵母菌勝任細胞的製備與轉型作用	12
2.1.6.1 酵母菌勝任細胞的製備	12
2.1.6.2 酵母菌勝任細胞的轉型作用	13
2.2 逆境處理對酵母菌的菌落形成和生長曲線之測試	13
2.2.1 氧化及不同逆境處理下菌落形成之測試	13
2.2.2 H ₂ O ₂ 氧化逆境處理下液態培基中生長曲線之測試	13
2.3 RNA expression	14
2.3.1 RNA 製備	14
2.3.2 北方點墨法 (Northern Blotting)	14
2.3.2.1 1% 甲醛電泳膠體製備 (1% formaldehyde gel)	14
2.3.2.2 總核糖核酸轉印 (Total RNA transfer)	14
2.3.2.3 製作 DIG 標記探針 (probe)	15
2.3.2.4 雜合反應 (Hybridization)	15
2.3.2.5 免疫探知作用 (Immunological detection)	16
2.4 外加胺基酸實驗	16
2.5 微陣列 (Microarray)	17
第三章 結果	18
3.1 氧化逆境下酵母菌未知功能基因 <i>YGR021w</i> (DUF28 family) 之功能分析	18
3.1.1 生物資訊 (bioinformatics) 功能性研究	18
3.1.1.1 DUF28 蛋白在不同物種之分類範圍 (taxonomic coverage) 及 homologues 演化樹 (phylogenetic trees) 分析	18
3.1.2 不同氧化劑處理之氧化逆境下 <i>YGR021w</i> RNA 之表現	18
3.1.3 檢測實驗所需之酵母菌菌株中 <i>YGR021w</i> 基因之表現	19
3.1.4 多種逆境處理對酵母菌菌落形成及生長之影響	19
3.1.5 酵母菌粒線體活性之測試	20
3.1.6 不同氧化劑處理對酵母菌生長之影響	20
3.1.7 抗氧化相關基因在 WT 及 <i>YGR021w</i> Δ 在氧化逆境下之表現	20
3.1.8 DNA 微陣列 (Microarray) 分析	21
3.1.9 DNA 微陣列實驗所得基因之驗證	23
3.2 氧化逆境下酵母菌 <i>YGL026c</i> (Tryptophan systemase, <i>TRP5</i>) 之功能分析	26
3.2.1 不同氧化劑處理之氧化逆境下 <i>TRP5</i> RNA 之表現	26
3.2.2 檢測實驗所需之酵母菌菌株中 <i>TRP5</i> 基因之表現	26
3.2.3 多種逆境處理對酵母菌菌落形成及生長率之影響	26
3.2.4 抗氧化相關基因在 WT 及 <i>trp5</i> Δ 遭遇氧化逆境之表現	27
3.2.5 外加不同胺基酸抵抗氧化逆境之效果	28

3.2.6 缺氮飢餓 (nitrogen starvation) 試驗	29
3.2.7 DNA 微陣列 Microarray 分析	29
3.2.8 DNA 微陣列篩選之目標基因之驗證	31
第四章 討論	33
4.1 氧化逆境下酵母菌未知功能基因 <i>YGR021w</i> 功能機制之探討	33
4.1.1 <i>YGR021w</i> 基因在不同氧化劑 (oxidants) 處理下之表現與探討	34
4.1.2 <i>YGR021w</i> 基因缺失在不同逆境及不同碳源下之存活能力之探討	35
4.1.3 DNA 微陣列實驗中可能受 <i>YGR021w</i> 影響的基因之可能功能探討	35
4.1.3.1 DNA 微陣列實驗之探討	35
4.1.3.2 <i>YGR021w</i> Δ 在酵母菌遭遇氧化逆境時影響之基因群表現分析	40
4.1.3.3 DNA 微陣列實驗之驗證	40
4.2 氧化逆境下酵母菌 <i>YGL026c (TRP5)</i> 功能機制之探討	43
4.2.1 DNA 微陣列實驗中可能受 <i>TRP5</i> 影響的基因之可能功能探討	43
4.2.3.1 <i>trp5</i> Δ 在酵母菌正常生長條件下所影響之基因群表現	43
4.2.3.2 <i>trp5</i> Δ 在酵母菌遭遇氧化逆境時所影響之基因群表現	45
第五章 未來展望	48
參考文獻	49



表目次

表一、使用酵母菌菌株及質體 (Yeast strains and plasmid used in this work)	56
表二、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 <i>YGR021w</i> 影響之基因	57
表三、酵母菌抗氧化微陣列中在正常生長條件下可能受 <i>TRP5</i> 影響之基因	62
表四、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 <i>TRP5</i> 影響之基因	66



圖目次

圖一、 <i>YGR021w</i> 在氧化逆境下之表現	72
圖二、分析本論文使用之各式酵母菌菌株中 <i>YGR021w</i> 之表現	73
圖三、WT 和 <i>YGR021w</i> △於營養培養基上處理不同逆境及碳源的生長情形	74
圖四、WT 和 <i>YGR021w</i> △於貧瘠培養基上處理不同逆境及碳源的生長情形	75
圖五、WT ^c 與 <i>YGR021w</i> overexpression strain 於處理 H ₂ O ₂ 下之生長情形	76
圖六、WT 和 <i>YGR021w</i> △處理 H ₂ O ₂ ，培養 16 小時後之生長情形	77
圖七、以半定量 RT-RCR 分析 WT 和 <i>YGR021w</i> △之氧化逆境相關基因	78
圖八、酵母菌在氧化逆境下可能被 <i>YGR021w</i> 影響的基因群之功能分配圖	79
圖九、以即時定量 RT-RCR 分析已知與逆境反應相關之基因的表現	80
圖十、以即時定量 RT-RCR 分析與逆境反應相關之新穎基因的表現	81
圖十一、 <i>YGL026c (TRP5)</i> 在氧化逆境下之表現	82
圖十二、分析本論文使用之各式酵母菌菌株中 <i>TRP5</i> 之表現	83
圖十三、WT 和 <i>trp5</i> △於營養培養基上處理不同逆境的生長情形比較	84
圖十四、WT 和 <i>trp5</i> △於貧瘠培養基上處理不同逆境的生長情形比較	85
圖十五、WT ^c 與 <i>TRP5</i> overexpression strain 於處理不同逆境之生長情形	86
圖十六、WT 和 <i>trp5</i> △處理 H ₂ O ₂ ，培養 16 小時後之生長情形比較	87
圖十七、以半定量 RT-RCR 分析 WT 和 <i>trp5</i> △之氧化逆境相關基因	88
圖十八、外加 tryptophan、IAA、methionine 試驗	89
圖十九、缺氮飢餓試驗 (nitrogen starvation test)	90
圖二十、酵母菌在正常生長下可能被 <i>TRP5</i> 影響的基因群之功能分配圖	91
圖二十一、酵母菌在氧化逆境下可能被 <i>TRP5</i> 影響的基因群之功能分配圖	92
圖二十二、以即時定量 RT-RCR 分析微陣列篩選之基因的表現	93

附錄目次

附錄一、本研究使用之引子序列.....	94
附錄二、利用生物資訊軟體 InterPro 分析 DUF28 蛋白	95
附錄三、DUF28 homologues 演化樹 (phylogenetic trees)分析	96
附錄四、酵母菌色胺菌之合成路徑.....	97
附錄五、 <i>YGR021w</i> 在氧化逆境下可能參與之相關機制模式圖	98
附錄六、 <i>TPR5</i> 在氧化逆境下可能參與之相關機制模式圖	99
附錄七、常用培養基配方.....	100



第一章 前言

在逆境中求生存，是生物不變的因應策略。環境因子影響所有生物體的存活，環境變異 (environmental changes) 造成逆境及有害刺激產生，生物為了生存，會以各種方式來適應持續變化的環境，並抵抗伴隨而來的逆境 (Scandalios, 2005)。生活在有氧環境 (aerobic environment) 的生物，在正常生長代謝過程中，會產生活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS)，包含超氧陰離子 (superoxide anion, O_2^-)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、氫氧根離子 (hydroxyl Radical, $OH\cdot$)，這些具強烈反應活性的 ROS，可做為訊息傳導分子，扮演協助生長發育的角色。適量的 ROS 可以保護生物，但過量的 ROS 反而會破壞蛋白質、脂質及 DNA，造成細胞損壞，導致細胞死亡，使細胞無法在惡劣環境下存活。當生物防禦機制無法有效的對抗 ROS，氧化逆境 (oxidative stress) 便因而產生。

1.1 氧化逆境

1.1.1 ROS 之生合成

新陳代謝過程中會產生自由基 (free radicals)，自由基為帶有一個或一個以上不成對電子的分子、原子或離子，這樣具奇數不成對電子之特性，十分不穩定且具有強烈的氧化能力，並產生具有高度反應性的 ROS，ROS 極易與細胞內的細胞膜、脂質、蛋白質、DNA 及 RNA 等發生作用，並破壞這些分子的結構與正常的生化功能，造成生物體生理功能異常，例如對 DNA 的破壞造成之基因突變，而導致如癌症之類的疾病的發生 (Toledano et al., 2003)。

ROS 可以分成單重態氧 (singlet oxygen, 1O_2)、超氧陰離子 (O_2^-)、過氧化氫 (H_2O_2)、氫氧根離子 ($OH\cdot$) 四類， 1O_2 具較高的活潑狀態，為強效氧化劑，當 1O_2 吸收足夠的能量，可使未配對電子轉移至更高的電子軌域，形成較穩定的中間產物，為超氧陰離子 (O_2^-)， O_2^- 為大部分 ROS 的先驅物並能調節氧化鏈反應 (oxidative chain reactions)， O_2^- 經由超氧歧化酶 (superoxide dismutases) 催化形成過氧化氫 (H_2O_2)，為非自由基的物質，能在生物組織內擴散， H_2O_2 再經由不同種類的過氧化酶 (peroxidases) 降解成水及氧分子， H_2O_2 亦會與過渡金屬離子反應形成氫氧根離子 ($OH\cdot$)，例如著名的 Fenton Reaction，利用 Fe^{2+} 作為催化劑，將 H_2O_2 分解成 $OH\cdot$ 及 OH 兩種自由基 (Herrero et al., 2008)。

1.2.1 ROS 之來源

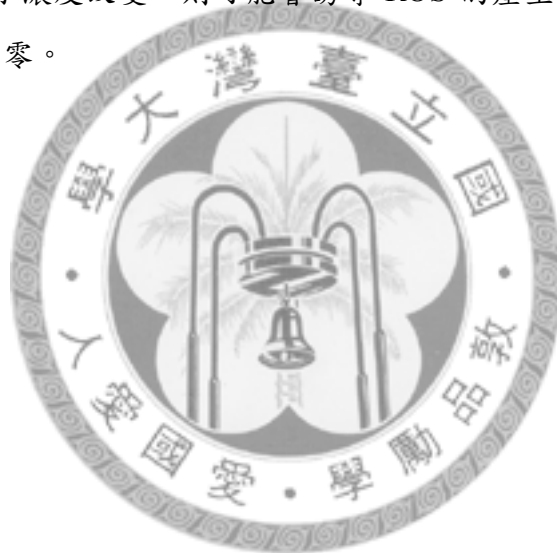
自由基的來源可分為內在外在兩方面，內在來源包括，粒線體電子傳遞鏈和氧化反應等；另外生物體亦可經由環境汙染、離子輻射與毒物之入侵產生活性氧化物質，但對於產生活性氧化物質之路徑機制，仍未完全明瞭。粒線體電子傳遞鏈 (electron transport chain, ETC)過程中，會有部份電子從路徑中流失，造成電子滲漏的結果 (尤其發生於 ubiquinone)，並直接把氧分子還原成活性氧化物質 ROS，此為最主要的內在自由基來源 (Turrens, 2003)。

真核細胞中的電子傳遞鏈多發生於粒線體內膜，並將電子提供者 NADH 送入不同的複合體 (complexes) 進行一連串電子傳遞。酵母菌 *Saccharomyces cerevisia* 的 NADH 經由粒線體內膜上之 internal NADH dehydrogenase (NDI1)，又稱泛醌氧化還原酶 (ubiquinone oxidoreductase, complex I)、external NADH dehydrogenases (NDE1 及 NDE2) 及細胞質上的 NADH-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD1/2)、ubiquinone oxidoreductase (GUT2) 進行氧化作用，而琥珀酸鹽 (succinate) 則經由 dehydrogenase (SDH, complex II) 作為電子傳遞媒介，轉換成蘋果酸 (malate)，電子經由這些不同的酵素及複合體送達至粒線體內膜上的泛醌 (ubiquinone, coenzyme Q)，最後透過細胞色素複合物 bc1 (cytochrome bc1 complex, complex III) 及 cytochrome c oxidase 催化，最終將電子傳達到氧分子 (Herrero et al., 2008)。目前認為在酵母菌中的粒線體電子傳遞鏈中之細胞色素複合物 bc1 (complex III)，為最主要之 ROS-superoxide 來源，而造成大部分 ROS 的產生 (Raha and Robinson, 2000; Thannickal and Fanburg, 2000)。

除了粒線體電子傳遞鏈所生成之 ROS 之外，過氧化物生合成 (peroxisome biogenesis) 過程中，也會產生 ROS，主要為 H₂O₂ (Purdue and Lazarow, 2001)，在酵母菌中過氧化物 (peroxisome) 會代謝生長發育之基質 (substrates)，包括脂肪酸 (fatty acid)、胺基酸 (amino acid) 及甲醇 (methanol)，這些基質在進行生理功能過程中，其參與之相關過氧化物酵素 (peroxisomal enzymes) 往往會產生 H₂O₂，例如參與脂肪酸代謝降解之 acyl-CoA oxidases、胺基酸代謝過程之 D-amino acid oxidases、甲醇代謝過程 (methanol metabolism) 之 alcohol oxidase (Herrero et al., 2008)。

1.3.1 氧化逆境對酵母菌生理發育的影響

由於自由基活潑的化學特性，會與細胞組織產生化學反應，使細胞組織功能異常，造成氧化逆境，而氧化逆境與癌症、心血管疾病及老化等多種疾病有著非常緊密的相關性。酵母菌生長在好氧的環境下，使其在代謝的過程中，容易遭受到 ROS 所造成的逆境。但若細胞因為消耗太多能量，以致於抗氧化能力降低，或者因為 ROS 不斷的增加，使得細胞受到傷害情況下，而導致 ROS 的量超出細胞抗氧化能力時，細胞便會啟動可能的防護機制以中和 ROS (第一道防護)和修復受傷害的細胞分子或將氧化的分子降解 (第二道防護) (Costa and Moradas-Ferreira, 2001)。在正常生理狀況下，酵母菌體內存有如鉀鎂銅鈣鐵鋅鎳等必需的金屬離子，這些金屬離子能夠提供和接受電子，使特定酵素能催化氧化還原反應，但若離子濃度改變，則可能會誘導 ROS 的產生，造成 DNA 損傷、DNA 突變或細胞凋零。



1.2 抗氧化防禦系統 (antioxidant defense system)

生物體具有抗氧化之防禦系統，這個系統由兩大部分組成，即抗氧化酵素及非酵素性之抗氧化物質以交互協同之作用來清除活性氧化物質與自由基，保護生物體免於氧化性傷害。

1.2.1 抗氧化酵素

1.2.1.1 超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

SOD 依其核心金屬離子來分類，酵素因內含的金屬離子不同而有不同的表現。目前已知的 SOD 主要分為三類，即 Fe-SOD、Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD。其中 Fe-SOD 主要存在於原核生物，Cu/Zn-SOD 主要存在於高等真核生物中，而 Mn-SOD 則在高等生物的粒線體及細菌中均有發現。而酵母菌具有二種 SOD：存在於細胞質的 Cu/Zn-depending SOD1，主要清除外來及新陳代謝過程中產生的 O_2^- ，另一種為存在於粒線體基質的 Mn-depending SOD2，則對於清除粒線體呼吸鏈過程中的 O_2^- 較為重要 (Costa et al., 1997; Culotta et al., 2006)。

1.2.1.2 過氧化酶 (catalase, CAT)

CAT 為一複合蛋白，廣泛存在於動植物中，利用鐵或錳等金屬離子作為反應中心，藉由氧化還原作用將 H_2O_2 催化成水和氧。過氧化酶 catalase 大多出現在過氧化物裡，來幫助 H_2O_2 的代謝。酵母菌具有二種 catalase：分別為存在於過氧化物 peroxisome 的 *CTA1* 及散佈於細胞質中的 *CTT1*。目前認為 *CTA1* 參與脂肪酸 β -氧化作用 (fatty acid beta-oxidation)，並會受到脂肪酸的誘導 (Hiltunen et al., 2003)，*CTT1* 則會受到氧化、滲透壓、溫度逆境及缺乏碳源之環境誘導，對於 *CTT1* 在細胞質的機制作用仍未十分明瞭，但兩種過氧化酶具某種程度的協力作用，共用抵抗外來的 H_2O_2 (Izawa et al., 1996)。

1.2.1.3 過氧化物酶 (peroxidase)

有別於上述之兩種利用金屬離子作為氧化還原反應之抗氧化酵素 (SOD 及 CAT)，過氧化物酶 (peroxidase) 作用機制為利用蛋白上之硫醇 (thiols) 作為反應位置，將 peroxisome 還原成酒精 (alcohols)。peroxidase 依其不同還原劑種類又可分為穀胱甘肽過氧化物酶 (glutathione peroxidases, GPXs) 與硫氧還原過氧化物酶

(thioredoxin peroxidases, TRXs, 又稱抗氧化蛋白 peroxiredoxins, PRXs)。

GPXs 的還原劑為 glutathione，酵母菌具有三個 GPXs：GPX1, GPX2 及 GPX3，屬於 phospholipid hydroperoxide GPXs (PHGPXs)；PHGPX 可直接還原被過氧化的脂肪酸成為無毒害產物，並為修復膜脂過氧化作用 (membrane lipid peroxidation) 的重要酵素，而細胞膜過氧化是常發生的氧化現象 (Inoue et al., 1999)。GPX1、GPX2 及 GPX3 皆可增加對於金屬毒害之抵抗能力，但 Gpx3 在 *in vitro* activity 試驗中具較高活性其突變株對於氧化逆境亦有明顯之表現型，且在對於過氧化物及金屬毒害之抗氧化機制扮演比 GPX1 及 GPX2 重要的角色。此外，GPX3 除了具 peroxidase 之活性外，在目前已知之 Yap1 transcription factor 與 oxidative signaling transduction 中，GPX3 扮演接收者 (transducer) 的角色，進而調控 oxidative stress response (Delaunay et al., 2002)。GPX2 則經由 Yap1- 及 Skn7-dependent 訊息傳遞及鈣離子訊息傳遞之 Crz1 transcription factor 來調控氧化逆境，但目前對於鈣離子訊息傳遞與氧化逆境之關係仍不清楚 (Tsuzi et al., 2004)。除了 GPXs，在酵母菌中其他具 GPX 活性之酵素，如穀胱甘肽轉移酶 (glutathione transferase, GTT1) 會與 GRX1 與 GRX2 一同對抗氧化逆境。

TRXs 會還原 peroxides 及 peroxinitrites，在酵母菌中具五個 TRXs，分別存在於不同部位：細胞質中的 Tsa1 (cTPxI)、Tsa2 (cTPxII) 及 Ahp1 (cTPxIII)，粒線體中的 Prx1 (mTPx) 及細胞核中的 Dot5 (nTPx)。這五種 TRXs 皆具有 thioredoxin reductase 活性，目前已知 Tsa1 與 Tsa2 會共同抵抗 oxidative 及 nitrosative stresses，而其他的三個 TRX 可能具有互補或加成的調控效果 (Munhoz and Netto, 2004)。

1.2.2 非酵素型抗氧化物

有別於酵素型之抗氧化酵素，另有小分子之物質亦具抵抗 ROS 之能力，稱之為抗氧化劑 (antioxidants)，其包括穀胱甘肽 (GSH)、維生素 C (ascorbate, vitamin C)、維生素 E (tocopherol, vitamin E) 及微量元素。GSH 為生物體內主要之抗氧化劑，會協同 glutathione peroxidase 還原體內脂質過氧化物及 H_2O_2 ，間接抑制自由基之連鎖反應，使細胞免受到自由基之傷害，扮演維持細胞氧化還原平衡的重要因子 (Herrero et al., 2008)。維生素 E 為廣泛、重要的脂溶性抗氧化劑，對抗脂肪過氧化自由基的生理效果最強，在所有的真核生物皆具有清除自由基之功

能，並可提高抗氧化酵素之活性 (Hancock et al., 2000)。微量元素，例如錳、銅、鋅及硒，這些金屬離子能夠提供和接受電子，使特定酵素能催化氧化還原反應，具清除自由基之功能 (Evans and Halliwell, 2001)。



1.3 *YGR021w* (DUF28)功能相關研究

本實驗室前人利用跳躍子 (Tn5)策略篩選致病力降低的青枯病菌突變株，其中一株突變株在番茄的致病力不變，但在阿拉伯芥上的致病力卻大大降低，而在其基因體中因 Tn5 插入而被影響的基因，便可能是參與青枯病菌適應不同宿主環境力之關鍵基因。經序列比對分析發現，被 Tn5 插入者為未知功能之基因 RSc2190，其基因被分類於 DUF28 基因家族 (Pfam family DUF28)中，在演化上具高度保守性，許多細菌、真菌、甚至於動物與植物中，皆有預期可製造出與 RSc2190 產物蛋白序列極相似的基因存在。而在酵母菌 (*YGR021W*)及阿拉伯芥 (*At2g25830*)中的 DUF28 基因，被認為為粒線體蛋白 (Marcotte et al., 1999; Ghaemmaghami et al., 2003)，目前已知粒線體與氧化逆境具重要關連性，為主要自由基之來源 (Turrens, 2003)，但其 DUF28 基因與氧化逆境之關係，以及其確切功能與作用機制目前仍不清楚。由於這類基因存在於許多物種中，且現有之研究報導十分有限，僅在細菌病原菌 *Pseudomonas aeruginosa* 上有一篇相關研究報導 (Liang et al., 2008)，在 *P. aeruginosa* 的病程發展中，其 quinolone signal system (PQS)為重要之病原性 (pathogenicity)訊號傳遞系統，控制其病原性及病原族群大小，目前最新發現認為 *P. aeruginosa* 之 DUF28 protein YebC family PA0964 gene 扮演 PQS system 中之負調控角色，對於 YebC family proteins 有更深入的研究，但此基因在其他物種 (包括酵母菌)中的功能尚未明瞭，為了進一步了解 DUF28 protein 之功能，本實驗室於不同物種進行其基因體學及功能性研究 (comparative genomic and functional study)，包括原核生物之大腸桿菌 (*Escherichia coli*)及青枯病菌 (*R. solanacearum*)、真核生物之酵母菌 (*S. cerevisia*)及阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*)，期於在不同物種中探討 DUF28 protein 在環境及生長發育過程中扮演之角色，所以本論文以酵母菌 (*S. cerevisia*)做為研究對象，分析酵母菌 *YGR021w* (DUF28) 於氧化逆境下之防禦機制，特別是粒線體蛋白與氧化逆境之關連性，是十分重要且具高度新穎性的，亦是本篇論文最重要的主題。

1.4 YGL026c (TRP5)功能相關研究

色胺酸 tryptophan 為一種必需胺基酸，被廣泛地使用在醫藥、工業和食品添加物中。動物無法自行合成色胺酸，植物、酵母菌及細菌皆能自行合成。色胺酸化學結構上帶有苯環，與 phenylalanine (Phe)與 tyrosine (Tyr)同屬於芳香族氨基酸 (aromatic amino acid)。酵母菌的 tryptophan 主要由 tryptophan biosynthesis genes，包括 *TRP2*、*TRP3* 及 *TRP5* 合成酵素主導 (Zalkin and Yanofsky, 1982)。

目前許多研究指出胺基酸生合成 (amino acid biosynthesis)與逆境抵抗能力有關 (Takagi et al., 1997; Takagi et al., 2000)。例如：酵母菌 *S. cerevisiae* 缺乏離胺酸 lysine 及組胺酸 histidine 會使細胞內胺基酸含量失衡，而引發強烈氧化逆境及細胞死亡 (apoptosis)，必需胺基酸的損耗會影響細胞代謝，造成不正常的蛋白質合成及細胞逆境 (Eisler et al., 2004)。又例如：離胺酸生合成途徑 (lysine biosynthetic pathway)會影響粒線體正常功能運作，離胺酸營養缺陷型變異株 (lysine auxotrophy)會引起粒線體 DNA 異常，機能受損之粒線體可能藉由 mitochondrial retrograde signaling 影響細胞核內的基因表現造成氧化逆境及細胞死亡結果 (Jensen et al., 2004)，但離胺酸誘導氧化逆境之詳盡機制仍尚未清楚。胺基酸生合成與逆境抵抗能力之相關性在輔胺酸 proline 的代謝調控研究較為詳細，輔胺酸已被認定為逆境保護劑 (stress protectant)，可保護酵母菌對抗滲透壓 osmotic stress (包括冰凍 freezing 及脫水 desiccation)、酒精 (ethanol stress)、及氧化 (oxidative stress)等多種逆境，藉由增加蛋白質及膜構造的穩定性及清除 ROS，來抵抗環境變異 (Takagi, 2008)。

針對色胺酸與逆境反應之相關性的研究報導卻不多，目前僅知已知酵母菌 *S. cerevisiae* 色胺酸營養缺陷型變異株 (aromatic amino acids auxotrophy)對於弱有機酸逆境 (weak organic acids stress)、酒精逆境 (ethanol stress)及低溫逆境 (cold stress)具高度敏感，若大量表現 tryptophan biosynthesis genes 或於培養基外加 tryptophan 及大量表現 tryptophan permease gene *TAT2*，可增加色胺酸之獲取，皆可回復或減緩色胺酸營養缺陷型變異株對逆境之敏感性 (Bauer et al., 2003; Hirasawa et al., 2007; Rodriguez-Vargas et al., 2007)。目前僅知推測色胺酸營養缺陷型變異株，可能是因為膜構造損壞而造成對於 weak organic acids 逆境敏感，但對於色胺酸在酵母菌生理上的功能及代謝上的調控角色仍未清楚，色胺酸是否扮演逆境保護劑 (stress protectant)，特別是氧化逆境為本篇論文最重要的主題。

1.5 研究目標

本研究目的為解析未知功能基因 *YGR021w* 及色胺酸生合成與氧化逆境之關係，分別探討 *YGR021w* 基因及 tryptophan synthase (*TRP5*) 是否參與酵母菌在氧化逆境反應相關之防禦機制。本研究利用分子遺傳研究策略，以 *YGR021w* 基因及 *TRP5* 基因大量表現菌株和 *YGR021w* 剔除菌株 (*YGR021w*Δ) 及 *TRP5* 剔除菌株 (*trp5*Δ) 作為研究材料，來觀察酵母菌在正常環境及不同逆境下的反應，並進一步以生物晶片全面性地分析其可能分子機制。



第二章 材料與方法

2.1 *YGR021w* 及 *TRP5* 基因選殖

2.1.1 酵母菌 genomic DNA 萃取

取單一酵母菌菌落至 YPD 液態培養基，於 28°C 震盪培養箱中黑暗培養 12-16 小時，隔天將菌液以最大轉速離心 30 秒，去除培養基，再以無菌水清洗振盪，再次以最大轉速離心 30 秒，去除無菌水，接著加入 0.2 mL 的 solution A (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM Na₂EDTA) 及 0.2 mL phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)，再加入 0.3 g acid-wash glass beads，振盪 2 分鐘，加入 0.2 mL TE buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA)，離心 5 分鐘後，取出水層的溶液至另一個微小離心管，並加入 100% 酒精，混合均勻，離心 2 分鐘，去除上清液，自然乾燥後，加入 0.2 mL TE buffer 溶解離心物，再加入 0.3 mg/mL RNase A，置於 37°C/5 分鐘，加入 10 μ L 4M ammonium acetate 和 1 mL 100%酒精，放入 -80°C 進行沈澱，再離心 2 分鐘，去除上清液，自然乾燥，溶於 50 μ L TE buffer。

2.1.2 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

本步驟使用的試藥組為購於 Promega kit。利用總核糖核酸中的 mRNA 後面帶有 poly A tail，而用 Oligo (dT)₁₅ 當作引子 (primer) 合成 cDNA。製備方式如下，取 0.5~1 μ g 的總核糖核酸，加入 2 μ L 的 dNTP mix (10 mM)、1 μ L 的 Oligo (dT)₁₅ (0.5 μ g/ μ L)、2 μ L 的 10x reverse transcription buffer、4 μ L 的 MgCl₂ (25 mM)、0.6 μ L 的 AMV reverse transcriptase (15U/1 μ L) 及 0.4 μ L recombinant RNasin ribonuclease inhibitor，最後補水至總體積 20 μ L 後，置於 42°C/1.5 小時，再將整個反應 95°C，加熱 5 分鐘，之後置於冰上 5 分鐘，停止反應，補 TE buffer 至總體積 100 μ L。再利用特定引子經聚合酶連鎖反應 (PCR) 將 *YGR021w* 及 *TRP5* 基因擴增 (amplify)。進行 PCR 擴增基因時，將下列成分混合：11.88 μ L 的去離子滅菌水、1.96 μ L 的 10x reverse transcription buffer、0.36 μ L 的 dNTP (10 mM)、1 μ L 的 forward primer (10 μ M)、1 μ L 的 reversed primer (10 μ M)、1.5 μ L 的 MgCl₂ (25 mM)、2 μ L 的 first strand cDNA 以及 0.3 μ L 的 DNA 聚合酶 (DNA polymerase, 5U/ μ L)。PCR 反應溫度與時間如下：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	94°C/5 分鐘		
30	94°C/30 秒	55°C/1 分鐘	72°C/1.5 分鐘
1			72°C/5 分鐘

經 PCR 擴增之產物，取 5 μ L 進行 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100V/30 分鐘)，以確定基因之長度。之後再利用 GeneClean III system (Q Biogene, U.S.A) 進行 DNA 之瓊脂糖凝膠回收 (gel extraction)，回收產物再經 NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer) 換算出回收之 DNA 之總量，將 DNA 定量。

2.1.3 限制酶的消化水解

將 pANDS 載體與 *TRP5* 及 *YGR021w* 基因的 DNA 利用 *NotI* 限制酶來消化水解。其做法如下：取 5 μ L 的 DNA，加入 0.5 μ L 的 *NotI* (20 U/ μ L)、2 μ L 10x NEBuffer (100 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT pH7.9)、0.2 μ L BSA (10 mg/mL) 與去離子滅菌水，加至最後體積 20 μ L，混合均勻後加入管內，於 37°C/3 小時，再加入 1 μ L CIP，處理 37°C/1 小時，進行消化水解之 DNA，再取 15 μ L 進行 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100V/30 分鐘)，以確定基因之長度。之後再利用 GeneClean III system (Q Biogene, U.S.A) 進行 DNA 之瓊脂糖凝膠回收，回收產物再經 NanoDrop 換算出回收之 DNA 之總量，將 DNA 定量。

2.1.4 載體與基因之接合

將 pANDS 載體與 *TRP5* 及 *YGR021w* 基因的 DNA 利用接合酶 (T4 DNA ligase) (Promega, U.S.A.) 接合。做法為取 30 ng 的 DNA，加入 5 μ L 的 2x Rapid ligation buffer (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP)，100 ng pANDS 載體，1 μ L 的 T4 DNA ligase (3 U/ μ L)，最後以去離子滅菌水補至最終體積 10 μ L，均勻混合後於 16°C 下進行接合反應 12 小時。

2.1.5 製備大腸桿菌勝任細胞的製備與轉型作用

2.1.5.1 大腸桿菌勝任細胞的製備

挑一大腸桿菌 DH5 α 單一菌落，於 4 mL LB broth 37°C 下隔夜培養。取 1 mL 隔夜培養的菌液置於 50 mL LB broth 中，在 37°C 下繼續培養，直到菌液的 600 nm 吸光值 (OD₆₀₀) 於 0.3~0.5 (約 3~4 小時)。將菌液倒入離心管中，冰浴 30 分鐘後，以 5000 rpm，4°C 離心 15 分鐘，離心後小心倒去上清液，以 10 mL 去離子滅菌水小心沖散細胞沉澱物，再以 5000 rpm，4°C 離心 15 分鐘，吸去上清液，以 5 mL 滅菌的冰 10% glycerol 沖散細胞沉澱物，以 5000 rpm，4°C 離心 15 分鐘，去上清液，以 2.5 mL 滅菌的冰 10% glycerol 沖散細胞沉澱物，分裝 60~80 μ L 至已滅菌之微小離心管，並快速置於液態氮中，可置於 -80°C 冷凍儲存。整個製備過程皆需於 4°C 及冰上操作，且過程宜快速輕柔。

2.1.5.2 大腸桿菌勝任細胞的轉型作用

取 1 μ L 接合作用後之質體 DNA 與 60 μ L 大腸桿菌勝任細胞混合，置於細胞電穿孔小管中，通以 2.5 KV 的電流。以 1 mL SOC medium 混合吸出菌液，注入微量離心管中，於 37°C 下震盪培養 1 小時。以低速離心 1 分鐘，吸去 900 μ L 的上清液，混合剩餘的液體與細胞沉澱。將混合好的菌液塗佈於含有 ampicillin 的 LB 固體培養基，於 37°C 下隔夜培養 16 個小時。

2.1.6 酵母菌勝任細胞的製備與轉型作用

2.1.6.1 酵母菌勝任細胞的製備

挑酵母菌單一菌株培養於 2~4 mL YPD broth 28°C 下 250 rpm 震盪隔夜培養。取 1 mL 隔夜培養的菌液置於 50 mL YPD broth 中，在 28°C 下繼續 250 rpm 震盪培養 4 小時。將菌液倒入離心管中，以 1500 rpm，4°C 離心 5 分鐘。倒去上清液，以 50 mL 冰的去離子滅菌水沖散細胞沉澱。以 1500 rpm，4°C 離心 5 分鐘。以 25 mL 冰的去離子滅菌水沖散細胞沉澱。以 2000 rpm，4°C 離心 5 分鐘。吸去上清液，以 2 mL 冰的 1M sorbitol 沖散細胞沉澱。以 2000 rpm，4°C 離心 5 分鐘。吸去上清液，加入 1~2 mL 1M 冰的 1M sorbitol 沖散細胞沉澱，分裝 60~80 μ L (依樣品數增減其體積) 至滅菌之微小離心管，並快速置於液態氮中，接著進行轉型作用。整個製備過程皆需於 4°C 及冰上操作，且過程宜快速輕柔。

2.1.6.2 酵母菌勝任細胞的轉型作用

取 2 μL 質體 DNA 和 80 μL 酵母菌勝任細胞置於 1.5 mL 微量離心管中，混合後置於冰上 5 分鐘，再吸出置於細胞電穿孔小管中，通以 2.5 KV 的電流。以 1 mL 1M sorbitol 混合吸出菌液，注入微量離心管中。以低速離心 1 分鐘，吸去 900 μL 的上清液，混合剩餘的液體與細胞沉澱。將混合好的菌液塗佈於 SD-Leu 篩選固體培養基，於 28°C 下隔夜培養 2~3 天。

2.2 逆境處理對酵母菌的菌落形成和生長曲線之測試

2.2.1 氧化及不同逆境處理下菌落形成之測試

挑酵母菌單一菌株培養於 5 mL YPD broth 28°C 下 250 rpm 震盪隔夜培養。取 1 mL 隔夜培養的菌液置於 10 mL YPD broth 中，在 28°C 下繼續 250 rpm 震盪培養 2~3 小時，將菌液養至 OD₆₀₀ 為 0.1，當作 1x 菌液，再依次稀釋 10x、100x，分別取 5 μL ，大約是 2×10^4 ， 2×10^5 ， 2×10^6 細胞數，點在含有不同濃度之逆境處理之固體培養基上，於 28°C 下黑暗培養 1~3 天。實驗處理之氧化劑分別為：過氧化氫 (H₂O₂)、二醯胺 (diamide) 及維他命 K (menadione, MD)；H₂O₂ 是目前研究氧化逆境常用之氧化劑，ROS 生合成過程中 O₂⁻ 會由 superoxide dismutases 催化形成 H₂O₂，其能於生物組織內擴散，造成細胞遭受氧化逆境之傷害；diamide 為硫醇氧化劑 (thiol oxidant)，會將小分子的硫醇進行氧化反應，造成細胞內的穀胱甘肽 (glutathione) 的含量快速的減少 (Kosower and Kosower, 1995)，使細胞內氧化還原反應失衡；menadione 目前用於治療癌症及甲狀腺的疾病，其具有細胞毒性作用 (cytotoxic mechanism)，為產生 superoxide radicals 之氧化劑，也是用於氧化造成細胞損傷的研究 (Castro et al., 2008)。本論文主要以 H₂O₂ 做為實驗之氧化逆境處理。

2.2.2 H₂O₂ 氧化逆境處理下液態培基中生長曲線之測試

挑酵母菌單一菌株培養於 5 mL YPD broth 28°C 下 250 rpm 震盪隔夜培養。取 1 mL 隔夜培養的菌液置於 10 mL YPD broth 中，在 28°C 下繼續 250 rpm 震盪培養 2~3 小時，將菌液養至 OD₆₀₀ 為 0.3，再處理不同濃度 H₂O₂：0.25~3 mM，經 16 小時 28°C 震盪培養後，測量其 OD₆₀₀。以未處理逆境的 OD₆₀₀ 值當作 100%，與處理組的 OD₆₀₀ 值相比之百分比值呈現。

2.3 RNA expression

2.3.1 RNA 製備

挑酵母菌單一菌株培養於 10 mL YPD broth 28°C 下 250 rpm 震盪隔夜培養，酵母菌細胞養至為 $OD_{600}=1$ ，把菌液吸移至 50 mL 離心管，以 6000~7000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，將沉澱物懸浮在冰水中洗去培養基，再次以 6000~7000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 1 mL 冰的去離子滅菌水，吸出移至微小離心管，以高速離心 1 分鐘後，去除上清液，加入 400 μ L 的 TBS buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% SDS)，將之懸浮後再加入 400 μ L 的 acid phenol，用力搖晃，置於 65°C 水浴 30~60 分鐘，期間需多次搖晃，靜置於冰上 5~15 分鐘後，以最高速 4°C 離心 15~30 分鐘，取出上清液後，加入 400 μ L 的 acid phenol，混合均勻後置冰上 30 分鐘，以最高速 4°C 離心 5~15 分鐘，將上清液取出後，加入 400 μ L 的氯仿 (chloroform)，混合均勻，以最高速 4°C 離心 30 分鐘，取出上清液，加入總體積 10x 的 3M sodium acetate (pH 5.3) 及總體積 2x 的 100% 冰的酒精，置於 -80°C 進行沉澱。再以最高速 4°C 離心 30 分鐘，再用 75~80% 冰的酒精清洗 RNA，快速離心得到 RNA，去除酒精後，回溶在 30~50 μ L RNase free DEPC 水，再以分光光度計或 NanoDrop 測量 total RNA 濃度及 A_{260}/A_{280} 的比值。

2.3.2 北方點墨法(Northern Blotting)

參考 Boehringer Mannheim 的 the DIG system。

2.3.2.1 1% 甲醛電泳膠體製備 (1% formaldehyde gel)

取 1 g 的 agarose 加入 37 mL 去離子滅菌水，微波加熱使之完全溶解後，待冷卻至 70-80°C，加入 5 mL 的 10x MOPS 及 8 mL 的 37% 甲醛混合均勻後倒入模具中，插入齒梳後待冷卻凝固備用。取 5~10 μ g 總核糖核酸 (total RNA), 2 μ L 10x MOPS, 3 μ L 的 37% 甲醛, 10 μ L 的 formamide 及 1 μ L 的 EtBr (10 mg/mL)，混合後於 75°C 加熱 10 分鐘，在冰上急速冷卻 10 分鐘後，以微量吸管將 total RNA 樣品注入膠體中，以電壓 70-80 伏特進行電泳跑膠。

2.3.2.2 總核糖核酸轉印 (Total RNA transfer)

依據膠體大小剪裁適當的尼龍膜，以 20x SSC (3M NaCl, 0.3 M sodium citrate pH 7.0) 潤溼。架設轉印架橋，以 20x SSC 做為緩衝液，利用向上虹吸轉印，依序

由下往上放置膠體、尼龍膜、濾紙緊密重疊，四邊再以保鮮膜封住後，疊上吸水紙，最後以適當大小的玻璃板及 300~500 g 左右的重物，平衡靜壓至隔天。轉印完成後，利用紫外線交聯器中，以儀器自動設定時間的功能，照射能量為 120,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ，使 RNA 與尼龍膜產生共價鍵結。

2.3.2.3 製作 DIG 標記探針 (probe)

利用 Boehringer Mannheim 的 PCR DIG labeling mix 的方式，將探針標記上 DIG。將質體 DNA 當作模板取 1 ng，加上 5 μL 的 10x PCR reaction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl, 20 mM MgCl_2)，5 μL 的 PCR DIG labeling mix (dATP、dCTP、dGTP 各 2 mM, 1.9 mM dTTP, 0.1 mM digoxigenin-11-dUTP/DIG-11-dUTP, pH 7.0)，1 μL 的 gene forward primer (10 μM)，1 μL 的 gene reverse primer (10 μM)，0.5 μL 的 DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 的 PCR 反應液中。混合均勻後放入聚合酶連鎖反應器中進行反應。PCR 反應溫度與時間如下所示：

Cycle#	Denaturation	Annealing	Polymerization
1	94°C/5 分鐘		
30	94°C/1 分鐘	55°C/1 分鐘	72°C/1.5 分鐘
1			72°C/5 分鐘

經 PCR 擴增之產物，取 1 μL 進行 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (100V/30 分鐘)，以確定基因之長度。

2.3.2.4 雜合反應 (Hybridization)

將尼龍膜移至離合試管中，加入雜合反應溶液 (5x SSC, 50% formamide, 0.1% sodium-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 10% blocking reagent)，總體積為尼龍膜面積 100 cm^2 ，加入 6 mL 雜合反應溶液，置於 42°C 下進行預雜合反應 (pre-hybridization) 1 小時，當 pre-hybridization 完成後，倒除雜合反應溶液，重新加入雜合反應溶液及加熱變性 (denature) 完成的 DIG 標記 probe (5~25 ng/mL)，總體積為尼龍膜面積 100 cm^2 ，加入 3.5 mL 雜合反應溶液，置於 42°C 下進行雜合反應 16~24 小時。

2.3.2.5 免疫探知作用 (Immunological detection)

取出尼龍膜至塑膠盒中，加入約 10 mL 的 2x wash solution (2x SSC, 0.1% SDS)，在室溫下於平台振盪清洗 15 分鐘，倒掉 2x wash solution，重覆一次；再加入約 10 mL 的 0.5x wash solution (0.5x SSC, 0.1% SDS)，在 68°C 下於平台振盪清洗 15 分鐘，倒掉 0.5x wash solution，重覆一次，去除 0.5x wash solution 後，以少許 wash buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl pH7.5, 0.3% v/v Tween 20)，在室溫下於平台振盪清洗 1 分鐘，倒掉溶液，加入 1% (w/v) blocking reagent (溶於 1x maleic acid buffer, Roche)，在室溫下於平台振盪清洗 30~60 分鐘，倒掉溶液，加入 antibody solution (anti-DIG AP, Roche, 1:15,000 稀釋於 blocking reagent)，在室溫下於平台振盪清洗 30 分鐘，倒掉溶液，加入 wash buffer，在室溫下於平台振盪清洗 15 分鐘，重覆一次，倒掉溶液，加入 detection buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH9.5)，在室溫下於平台振盪清洗 2 分鐘，取出尼龍膜至透明塑膠片上，在膜上均勻加入適量之 CDP-Star (Roche)，將氣泡和多餘 CDP-Star 刮除，於 LAS3000 進行冷光顯影反應。

2.4 外加胺基酸實驗

挑酵母菌單一菌株培養於 5 mL YPD broth 28°C 下 250 rpm 震盪隔夜培養。取 1 mL 隔夜培養的菌液置於 10 mL YPD broth 中，在 28°C 下繼續 250 rpm 震盪培養 2~3 小時，將菌液養至 OD₆₀₀ 為 0.3，分別於菌液中，加入 50 μM 及 100 μM 兩種濃度之色胺酸、蛋胺酸及 IAA，共六組菌液，與未加入物質之菌液，一起放置 28°C 震盪培養 3 小時，測量其 OD₆₀₀ 後，將菌液稀釋成 OD₆₀₀ 為 0.1，當作 1x 菌液，再依次稀釋 10x、100x，分別取 5 μL，大約是 2×10⁴，2×10⁵，2×10⁶ 細胞數，點在含有不同濃度 H₂O₂ 之固體培養基上，於 28°C 下黑暗培養 1~3 天，觀察其菌落生長變化。

2.5 微陣列 (Microarray)

菌株生長狀態取於 log-phase 時期，WT、*YGR021w*Δ 及 *trp5*Δ 分別處理濃度 0.6mM H₂O₂ 0、10、30、60、120 分鐘，抽取各時間點之菌株之 RNA，將處理 H₂O₂ 10、30、60、120 分鐘四個時間點的菌株 RNA，1:1:1:1 混合，為實驗組之材料 (treatment)，對照組 (control) 則為沒有處理 H₂O₂ 之材料，每批實驗具

四組材料：野生種菌株對照組 (WT control, WT-C)、野生種菌株實驗組 (WT treatment, WT-T)、*YGR021w* 剔除菌株對照組 (*YGR021w*△ control, *YGR021w*△-C) 及 *YGR021w* 剔除菌株實驗組 (*YGR021w*△ treatment, *YGR021w*△-T)，整批實驗共重覆二次，共八組材料：batch1- WT-C、batch1- WT-T、batch1- *YGR021w*△-C、batch1- *YGR021w*△-T、batch1- *trp5*△control、batch1- *trp5*△ treatment 及 Batch2- WT-C、batch2- WT-T、batch2- *YGR021w*△-C、batch2- *YGR021w*△-T、batch2- *trp5*△ control、batch2- *trp5*△ treatment。



第三章 結果

3.1 氧化逆境下酵母菌未知功能基因 *YGR021w* (DUF28 family)之功能分析

3.1.1 生物資訊 (bioinformatics)功能性研究

3.1.1.1 DUF28 蛋白在不同物種之分類範圍 (taxonomic coverage)及 homologues 演化樹 (phylogenetic trees)分析

為了瞭解 DUF28 蛋白在不同物種之分類範圍，利用 EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) InterPro 資料庫分析高度保守之 DUF28 蛋白群，從附錄二、(A)可看到 DUF28 蛋白分類範圍廣泛，除了病毒及古細菌物種中目前沒有找到 DUF28 蛋白相關基因，從原核生物的細菌到真核生物的酵母菌、植物及動物皆有 DUF28 蛋白存在，而在酵母菌 *S. cerevisiae* 之 DUF28，即為本論文研究之基因 *YGR021W*。在附錄二、(B)蛋白質 domain 部分，DUF28 蛋白群除具有長度約 230 個胺基酸的 DUF28 domain 之外，在 N-terminal 段具有類似 zinc-binding domain Integrase，而出現在哺乳類動物的人類及老鼠之 DUF28 蛋白，具有 coiled-coil domain 之蛋白。亦利用此網站將 DUF28 蛋白群，依其序列相似度進行分類，從附錄三之演化樹顯示，酵母菌 *S. cerevisiae* DUF28 蛋白 (*YGR021W*) 與老鼠的 DUF28 蛋白 (Q8K0Z7, CCP44 蛋白)最為相似，其次與原核生物細菌較為相似。

3.1.2 不同氧化劑處理之氧化逆境下 *YGR021w* RNA 之表現

為了得知 *YGR021w* 在氧化逆境下之表現情形，分別以 0.5 mM H₂O₂、1.5 mM diamide 及 100 μM menadione 處理 WT 30 分鐘，收取其菌株後，進行北方點墨法，由實驗(圖一、A)得知，*YGR021w* RNA 在沒有處理氧化劑之對照組下，可表現其 RNA，但處理 H₂O₂、diamide 及 menadione 後，*YGR021w* RNA 的表現量與對照組相比，具明顯的差異，*YGR021w* RNA 表現會於氧化逆境下呈現減弱或沒有表現之結果。再以本篇論文主要使用之氧化劑 H₂O₂ 來處理 WT，處理時間為 10、30、60、120 分鐘，進行 RT-PCR 來測定 *YGR021w* RNA 之表現變化，由圖一、B 之結果得知，*YGR021w* 基因會隨著處理 H₂O₂ 的時間增加，而有顯著的減少趨勢。

3.1.3 檢測實驗所需之酵母菌菌株中 *YGR021w* 基因之表現

為確保實驗結果正確，於進行實驗前，利用北方點墨法測定 WT、*YGR021w*Δ、WT strain containing vector (WT^c)、*YGR021w* overexpression strain (WT^{*YGR021w*})、*YGR021w*-deleted strain containing vector (*YGR021w*Δ^c)、*YGR021w* complementation strain (*YGR021w*Δ^{*YGR021w*})之 *YGR021w* 基因表現。由本實驗 (圖二)結果得知 *YGR021w*Δ及 *YGR021w*Δ^c皆無法產生出 *YGR021w* RNA，而 WT、WT^c、WT^{*YGR021w*} 及 *YGR021w*Δ^{*YGR021w*} 則有表現 *YGR021w* RNA，而 WT^{*YGR021w*} 及 *YGR021w*Δ^{*YGR021w*} 之 *YGR021w* RNA 表現量都較 WT^c 多。此結果可確認本實驗所使用之剔除菌株為 null mutant，WT^{*YGR021w*} 及 *YGR021w*Δ^{*YGR021w*} 確實會大量表現 *YGR021w* 基因。以下實驗所使用之菌株皆以縮寫名稱示之，縮寫名稱整統於表一。

3.1.4 多種逆境處理對酵母菌菌落形成及生長之影響

為了瞭解不同種類的環境逆境是否會造成 WT 和 *YGR021w*Δ兩株的生長情形改變，分別於營養的 YPD 固態培養基及營養貧乏的 SD 培養基中加入氧化劑分別為：1~4 mM H₂O₂、0.5~1.5 mM diamide 及 10~100 μM menadione，重金屬分別為：2.5~40 mM 硫酸銅 (CuSO₄)、8~16 mM 硫酸鋅 (ZnSO₄)及 20 ~160 μM 氯化鎘 (CdCl₂)，膜逆境藥劑分別為：10⁻⁴%~0.05% SDS 以及熱處理 55°C/5 分鐘。初步研究結果發現，*YGR021w*Δ在 YPD 或 SD 培養基對照組 (control)下仍可生長正常，在對照組 WT 和 *YGR021w*Δ菌落生長起始一致，比較 YPD 或 SD 培養基處理不同逆境之實驗組與對照組，可發現不管是 WT 或 *YGR021w*Δ的菌落生長皆有不同程度的抑制效果，但 WT 和 *YGR021w*Δ在 YPD 培養處理不同逆境之實驗組，其兩菌株之菌落生長差異不大 (圖三)。然而在 SD 培養基處理 3mM H₂O₂ 及熱處理 55°C/5 分鐘之逆境下，WT 生長較 *YGR021w*Δ差 (圖四、B 及 I)。利用 WT^c、WT^{*YGR021w*}、*YGR021w*Δ^c 及 *YGR021w*Δ^{*YGR021w*} 進行 complementation 試驗，由圖五可知，在 SD-Lue 篩選培養基處理 1mM H₂O₂ 下，*YGR021w*Δ^c 與其他菌株比較，菌落生長狀況最佳，其次為 WT^c，這與圖四之點盤結果相符，而大量表現菌株 WT^{*YGR021w*} 及 *YGR021w*Δ^{*YGR021w*} 則可發現，在處理 H₂O₂ 下其菌落生長會受到明顯抑制，證實在 H₂O₂ 逆境下，*YGR021w* 基因缺失確實具較高的逆境耐受性 (tolerance)的表現型。之後實驗將針對 H₂O₂ 做為逆境處理。由 YPD 或 SD 液態

培養基中生長曲線之實驗結果發現，隨著 H_2O_2 處理的濃度增加，WT 或 *YGR021w*Δ 的生長受抑制愈加厲害，且在 H_2O_2 逆境下 WT 的之生長率較 *YGR021w*Δ 差，與 *YGR021w*Δ 相差約 20~30% 之生長率 (圖六)，與先前實驗 (圖四、B) 相符。由此可知，在 H_2O_2 氧化逆境情況下，*YGR021w* 基因的表現會對酵母菌造成不良的影響，若大量表現 *YGR021w* 會造成酵母菌無法抵抗 H_2O_2 氧化逆境，最終死亡。

3.1.5 酵母菌粒線體活性之測試

從上述生物資訊多方面分析、整合結果，得知酵母菌的 *YGR021w* 蛋白預測分布於粒線體，為了瞭解 *YGR021w* 是否參與調控粒線體正常功能，於 YPG (yeast extract-peptone-glycerol) 及 SG (synthetic-glycerol) 固態培養基上進行粒線體的活性測試。從結果得知 (圖三及圖四)，在 YPD 或 SD 培養基對照組中，其兩菌株之菌落生長起始一致，在 YPG 及 SG 培養基上 (圖三、J 及圖四、J)，WT 和 *YGR021w*Δ 皆能正常生長，顯示 *YGR021w* 缺失並不影響粒線體正常活性運作。

3.1.6 不同氧化劑處理對酵母菌生長之影響

前結果得知，*YGR021w*Δ 較 WT 具較高的 H_2O_2 逆境耐受性。為了釐清不同種類的氧化劑是否也會造成 WT 和 *YGR021w*Δ 生長情形改變，分別於 YPD 固態培養基及 SD 培養基中處理兩種不同種類的氧化劑分別為：0.5~1.5 mM diamide 及 10~100 μ M menadione。由點盤測試結果 (圖三及圖四)，在 YPD 或 SD 培養基對照組的菌落生長起始一致，比較 YPD 或 SD 培養基處理氧化劑之實驗組與對照組，可發現 WT 和 *YGR021w*Δ 在處理 diamide 及 menadione YPD 及 SD 培養基上生長被抑制之程度沒有明顯差異 (圖三、C、D 及圖四、C、D)。

3.1.7 抗氧化相關基因在 WT 及 *YGR021w*Δ 在氧化逆境下之表現

為了瞭解在 H_2O_2 逆境下，*YGR021w*Δ 與 WT 中抗氧化逆境相關基因之變化，以半定量 Real-Time PCR (RT-PCR) 進行分析，所選之抗氧化逆境相關基因為：*CTT1* (cytosolic catalase T)、*GSH1* (glutamylcysteine synthetase)、*SOD1* (cytosolic superoxide dismutase) 及 *SOD2* (mitochondrial superoxide dismutase)。RT-PCR 跑膠結果，再以軟體進行定量分析，所得數值 (藍色數字) 皆與 loading control gene *ACT1*

均一化 (normalize)後，各以未處理之對照組作為 1，實驗組再與其相比得到相對之倍數，再製成曲線圖呈現；實驗得知 (圖七)，不管是 WT 及 *YGR021w*Δ，皆可看到抗氧化逆境相關基因會被 H₂O₂ 誘導，但在 *YGR021w*Δ 中，*CTT1* 在正常條件下的表現量就比 WT 略高，且於 H₂O₂ 處理 10 分鐘時，其表現也較 WT 高，*GSH1*、*SOD1* 及 *SOD2* 則在 H₂O₂ 處理 60 分鐘時，各基因的表現明顯較野生種菌株 WT 高。結果顯示，在酵母菌遭遇氧化逆境時，*YGR021w*Δ 與 WT 相比，*YGR021w*Δ 之抗氧化相關基因具提前或增量的表現 (圖七)，而提高 *YGR021w*Δ 對於氧化逆境之耐受力。

3.1.8 DNA 微陣列 (Microarray)分析

為進一步大量分析在氧化逆境下可能受 *YGR021w* 影響之基因，以整體性地了解為何 *YGR021w* 缺失造成較高之氧化逆境耐受性，本論文利用 DNA 微陣列分析，全面分析在 *YGR021w*Δ 中，在氧化逆境下受 *YGR021w* 影響之基因，期能釐清得知 *YGR021w* 在酵母菌氧化逆境下所扮演的角色。DNA 微陣列實驗材料為 WT 及 *YGR021w*Δ，收取兩批不同次 (batch) 之材料 (independent biological repeat)，以實驗材料之名稱分為：batch 1-WT control、batch 1-WT treatment、batch 1-*YGR021w*Δ control、batch 1-*YGR021w*Δ treatment 及 batch 2-WT control、batch 2-WT treatment、batch 2-*YGR021w*Δ control、batch 2- *YGR021w*Δ treatment，共八片晶片，其詳細實驗材料內容請參照材料與方法。

為確認本次 DNA 微陣列實驗之可信度，另行準備新材料 (independent biological repeat)，進行第三批之檢測，在檢測實驗部分，與微陣列兩批材料僅不同於將實驗組 (處理 0.6 mM H₂O₂) 之各時間點 (10、30、60、120 分鐘) 分開進行 qRT-PCR，選用氧化逆境之標示基因 (marker gene) *CTT1* 來檢測，發現在 qRT-PCR 之結果 (圖九、A)，在處理 H₂O₂ 各時間之 *CTT1* 的表現量，在 *YGR021w*Δ 皆明顯高於 WT，與微陣列兩批實驗結果相比 (表一)，在第一批材料實驗結果，WT treatment /WT control 之相對倍率為 3.9，*YGR021w*Δ treatment /*YGR021w*Δ control 之相對倍率為 7.2，在第二批材料實驗結果，WT treatment/WT control 之相對倍率為 9.3，*YGR021w*Δ treatment/*YGR021w*Δ control 之相對倍率為 10.1，雖 *CTT1* 在第三批實驗之趨勢一致，但在表現量上具很大的落差，顯示微陣列實驗之倍率明顯低估，因此在 WT 及 *YGR021w*Δ 晶片之篩選基因標準，採用較寬鬆

之對應標準，以兩批 *YGR021w*△ treatment /*YGR021w*△ control 之相對倍率皆高於 1.5 倍以上，經 Gene Spring 7.3 微陣列分析軟體，維恩圖交集結果 (圖八、A)，得到 355 個基因。在之後分析上亦發現，微陣列二批實驗的訊號也具差異性，在第二批結果之訊號表現普遍高於第一批結果，為了顧及不同批晶片訊號差異，篩選基因標準，除了兩批 *YGR021w*△ treatment /*YGR021w*△ control (*YGR021w*△-T/*YGR021w*△-C) 之相對倍率皆高於 1.5 倍以上，並且倍率皆需高於相同批之 WT treatment /WT control 之相對倍率，利用軟體分析整合，得到 78 基因符合篩選標準，將其 78 基因利用 Gene Spring 軟體、NCBI、SGD (*Saccharomyces* Genome Database) 及 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 線上資料庫進行基因功能性分類 (Gene Ontology 或簡稱 GO)，其所得基因分群為其下：

- (1) 環境相關訊息過程基因 (environmental information processing): 共 17 個基因，包括與逆境相關具 8 個基因、與氧化逆境相關具 4 個基因、為細胞運輸相關具 5 個基因。
- (2) 代謝相關基因 (metabolism): 共 11 個基因，包括碳水化合物代謝相關具 2 個基因，與胺基酸代謝相關具 7 個基因，DNA 代謝相關具 2 個基因。
- (3) 細胞生長相關基因 (cellular processes): 共 10 個基因，包括與細胞生長相關具 8 個基因，為子囊孢子形成、細胞壁組成、與菌絲生長、肌動蛋白絲構成等細胞生長過程，以及與細胞自噬相關具 2 個基因。
- (4) 其他相關基因 (others processing): 共 9 個基因，包括與蛋白質泛素化過程相關具 5 個基因，與 MAP kinase 訊息傳導相關具 1 個基因，與 RNA 加工過程相關具 1 個基因，與 kinase 活性相關具 2 個基因。
- (5) 未知功能基因群 (Unknown): 共 32 個基因。

經整合統計，在酵母菌遭遇氧化逆境時會被 *YGR021w* 所影響之基因群 (78 個基因)，在已知功能之基因中，以氧化等多種逆境相關基因，其次為胺基酸代謝相關基因及蛋白質泛素化過程相關基因，此外在細胞生長相關基因，包括細胞自噬、菌絲生長、細胞壁及肌動蛋白絲構成、子囊孢子形成，亦佔多數比例，在其篩選條件下，也有許多未知功能之基因，佔之比例極高 (圖八、表一)

3.1.9 DNA 微陣列實驗所得基因之驗證

為了確認微陣列實驗結果，針對部分基因進行 qRT-PCR 分析，所用實驗材料與微陣列使用之材料相似，但另行準備新材料(independent biological repeat)將 WT 及 *YGR021w*△，於 log-phase 生長狀態時期，分別處理濃度 0.6 mM H₂O₂，0、10、30、60、120 分鐘，抽取各時間點之菌株 RNA，利用 qRT-PCR，於每個時間點檢測目標基因之 RNA 表現趨勢；qRT-PCR 呈現之結果，皆以 WT control 作為 1，處理 H₂O₂ 10、30、60、120 分鐘之四組 WT-treatment、*YGR021w*△-control 及處理 H₂O₂ 10、30、60、120 分鐘之四組 *YGR021w*△-treatment，分別再於 WT control 相除，得到其相對之表現量。因目前實驗結果皆顯示 *YGR021w* 應參與氧化逆境反應，且於微陣列實驗，也得到與氧化等多種逆境相關之基因群，再於其中選出 4 個基因來驗證，除此之外，亦對於參與細胞生長之細胞自噬相關基因及 MAP kinase 訊息傳導相關基因，具感興趣，另於未知功能基因群也挑出與 WT 差異倍率較大之基因來進行 qRT-PCR 驗證。

所選測試基因包括：

(1) *YGR088w/CTT1*

為細胞質中的過氧化酶 (cytosolic catalase T)，會將對細胞具毒害之 H₂O₂ 轉換成水，保護細胞不受氧化逆境之傷害，在 qRT-PCR 實驗中 (圖九、A)，可看到 *YGR021w*△ 在處理 H₂O₂ 10 分鐘後，即大量表現，而同時間點之 WT 並未偵測到 *CTT1* 的表現，需在處理 H₂O₂ 30 分鐘後才具表現量，在 *YGR021w*△ 中 *CTT1* 的表現在處理 H₂O₂ 30 分鐘時達到最高峰，之後 *CTT1* 在 *YGR021w*△ 之表現便下降，而在 WT 中 *CTT1* 在處理 H₂O₂ 60 分鐘時才達到最高峰的表現，之後 *CTT1* 表現開始下降，結果明顯顯示，在每個處理處理 H₂O₂ 的時間點，*YGR021w*△ 中 *CTT1* 表現皆比 WT 中 *CTT1* 表現明顯增高。

(2) *YDR256c/CTA1*

為存在於 peroxisomal matrix 之過氧化酶，在 qRT-PCR 實驗中 (圖九、B)，可看到 *CTA1* 在 *YGR021w*△ 中處理處理 H₂O₂ 30 分鐘後開始表現，且呈現持續表現之趨勢，而在 WT 中 *CTA1* 的表現，在處理 H₂O₂ 後不具誘導表現，且在處理處理 H₂O₂ 10 分鐘及 30 分鐘時，*CTA1* 表現量反而具下降的趨勢，在 *YGR021w*△ 中之 *CTA1* 表現，於每個處理處理 H₂O₂ 的時間點皆高於 WT 中 *CTA1* 表現。

(3) *YMR250w/GAD1*

為 glutamate decarboxylase，會將穀氨酸鹽 glutamate 降解成 gamma-aminobutyric acid (GABA)，為抗氧化物質 GSH 之前趨物，已知參與氧化逆境中，在 qRT-PCR 實驗中 (圖九、C)，可看到 *GAD1* 一開始在 *YGR021w*△ 的表現就略高於 WT，且在處理 H₂O₂ 後表現量繼續增加，並於處理 H₂O₂ 30 分鐘後達到高峰，在 WT 中的 *GAD1* 表現，在處理 H₂O₂ 10 分鐘時有略為下降，但於 30 分鐘時間點後，便開始增加 *GAD1* 表現量，但相較於 *YGR021w*△，WT 的 *GAD1* 表現量明顯較為減少。

(4) *YJL101c/ GSH1* (gamma glutamylcysteine synthetase)

雖未列於微陣列實驗篩選出之基因群中，但因 glutamate 為 glutathione (GSH) 之前趨物，亦檢測 GSH biosynthesis 之主要合成酵素 *GSH1*，在本論文之處理條件下之表現變化，在 qRT-PCR 實驗中 (圖九、D)，可看到在 *YGR021w*△ 中 *GSH1* 在處理 H₂O₂ 30 分鐘後開始持續增加表現量，而在 WT 中的 *GSH1* 表現雖於處理 H₂O₂ 30 分鐘後開始增加，但其增加幅度較 *YGR021w*△ 明顯趨緩，*YGR021w*△ 開始表現 *GSH1* 後，其表現量都顯著高於 WT 之 *GSH1* 表現量。

(5) *YMR169c/ALD3*

為存在於細胞質中的乙醛去氫酶 (cytoplasmic aldehyde dehydrogenase)，目前已知參與多種逆境，在 qRT-PCR 實驗中 (圖九、E)，可看到在 *YGR021w*△ 處理 H₂O₂ 10 分鐘後，*ALD3* 表現量略為下降，但在處理 H₂O₂ 30 分鐘後，則看到其表現量恢復至未處理 H₂O₂ 之狀態，之後呈現持續表現之趨勢，反之在 WT 中，處理 H₂O₂ 10 分鐘後，*ALD3* 表現量下降，但隨著 H₂O₂ 處理時間的增長並無提高變化，並無像在 *YGR021w*△ 中之 *ALD3* 表現具恢復及持續表現趨勢，明顯看到在處理 H₂O₂ 下，*ALD3* 在 *YGR021w*△ 及 WT 之差異。

(6) *YCR068W/ATG15*

為細胞自噬作用中的脂肪酶，參與自噬作用最後的步驟，會將液泡構造進行分解，目前已知會被營養貧瘠之環境所誘導，但在氧化逆境之功能未知，在 qRT-PCR 實驗中 (圖十、A)，WT 中 *ATG15* 不因 H₂O₂ 所誘導，但在 *YGR021w*△

中，雖在處理 H₂O₂ 10 分鐘時，*ATG15* 的表現有被抑制，但在處理 H₂O₂ 30 分鐘後，卻發現 *ATG15* 呈現持續上升表現之趨勢，此表現變化與 WT 之 *ATG15* 表現十分不同。

(7)*YGR040W/KSS1*

參與 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling transduction pathway，調控 filamentous growth 及 pheromone response，在 qRT-PCR 實驗中 (圖十、B)，可看到在處理 H₂O₂ 下，雖 WT 及 *YGR021w*Δ 之 *KSS1* 表現趨勢十分相似，都呈現在處理 H₂O₂ 10 分鐘時表現下降，但之後之時間點則為持續表現曲線，但在 *YGR021w*Δ 中可發現，在未處理及處理 H₂O₂ 下，其 *KSS1* 之表現量皆明顯高於 WT *KSS1* 之表現量。

(8)*YLR164w*

為未知功能基因，目前僅知蛋白位置可能位於粒線體，在序列比對下與 Tim18p 及 Sdh4p 具高度相似，在 qRT-PCR 實驗中 (圖十、C)，可看到在 *YGR021w*Δ 之 *YLR164w* 表現與 *CTT1* 表現趨勢相似，皆於處理 H₂O₂ 10 分鐘後 *YLR164w* 即開始表現，並於 30 分鐘時達到表現高峰，之後便趨於下降，在 WT 中之 *YLR164w* 表現量，並不因 H₂O₂ 處理時間增長而有所明顯表現，且在處理 10 分鐘時，還呈現些略下降的趨勢，結果明顯顯示，在每個處理 H₂O₂ 的時間點，*YGR021w*Δ 中 *YLR164w* 表現皆比 WT 中 *YLR164W* 表現明顯增高。

3.2 氧化逆境下酵母菌 *YGL026c* (Tryptophan systemase, *TRP5*)之功能分析

3.2.1 不同氧化劑處理之氧化逆境下 *TRP5* RNA 之表現

為了得知 *TRP5* 在氧化逆境下之表現情形，分別以 0.5 mM H_2O_2 、1.5 mM diamide 及 100 μM menadione 處理 WT 30 分鐘，收取其菌株後，進行北方點墨法。由實驗 (圖十一)得知，*TRP5* RNA 在沒有處理氧化劑之對照組下，可表現其 RNA，但處理 H_2O_2 、diamide 及 menadione 後，*TRP5* 之 RNA 較對照組為高，結果證實 *TRP5* 之 RNA 表現會被 H_2O_2 、diamide 及 menadione，不同種類之氧化劑處理之氧化逆境所誘導，*TRP5* 可能與氧化逆境反應有關。

3.2.2 檢測實驗所需之酵母菌菌株中 *TRP5* 基因之表現

為確保實驗結果正確，於進行實驗前，利用北方點墨法測定 WT、*trp5* Δ 、WT strain containing vector (WT^c)、*TRP5* overexpression strain (WT^{TRP5})、*TRP5*-deleted strain containing vector (*trp5* Δ ^c)、*TRP5* complemetation strain (*trp5* Δ ^{TRP5})之 *TRP5* 基因之表現。由本實驗 (圖十二)結果得知 *trp5* Δ 及 *trp5* Δ ^c 皆無法產生出 *TRP5* RNA，而 WT、WT^c、WT^{TRP5} 及 *trp5* Δ ^{TRP5} 則有表現 *TRP5*，而 WT^{TRP5} 及 *trp5* Δ ^{TRP5} 之 *TRP5* RNA 表現量都較 WT^c 多。此結果可確認本實驗所使用剔除菌株為 null mutant，WT^{TRP5} 及 *trp5* Δ ^{TRP5} 確實會大量表現 *TRP5* 基因。以下實驗所使用之菌株皆以縮寫名稱示之，縮寫名稱整統於表一。

3.2.3 多種逆境處理對酵母菌菌落形成及生長率之影響

為了瞭解不同種類的环境逆境是否會造成 WT 和 *trp5* Δ 兩株的生長情形改變，分別於營養的 YPD 固態培養基及營養貧乏的 SD 培養基中處理逆境，觀察 WT 和 *trp5* Δ 其生長情形；營養的 YPD 固態培養基部分，選定三種逆境測試 (1) 與細胞表面 (細胞壁、細胞膜)相關逆境 (cell-surface related stress)、(2)氧化逆境 (oxidative stress)、(3)重金屬逆境 (heavy metal stress)，細胞表面逆境相關逆境分別為：0.005 % SDS、0.1% congo red、0.5% polymycin B，氧化劑分別為：1~4 mM H_2O_2 、0.5~1.5 mM diamide 及 10~100 μM menadione，重金屬分別為：2.5~40 mM 硫酸銅、8~16 mM 硫酸鋅及 20 ~ 160 μM 氯化鎘。初步研究結果發現，WT 和 *trp5* Δ ，在 YPD 對照組的菌落生長起始一致 (圖十三、A)，在處理不同逆境之實驗組與對照組相較下，WT 或 *trp5* Δ 的菌落生長皆有不同程度的抑制效果，顯示

處理逆境藥劑為有效濃度，但在細胞表面逆境相關逆境，0.005% SDS、0.1% congo red、0.5% polymycin B 及氧化劑，1 mM H₂O₂、1.5mM diamide、50μM menadione 之處理下，*trp5*Δ 明顯較 WT 生長為差 (圖十三、B~G)，生長之菌落數相差 10~100 倍之多，在重金屬逆境方面，在處理 8 mM ZnSO₄，*trp5*Δ 較 WT 生長為差，*trp5*Δ 生長之菌落數較 WT 生長之菌落數減少約 10 倍之多 (圖十三、I)。營養貧乏的 SD 培養基部分，處理氧化劑分別為：1~4 mM H₂O₂、0.5~1.5 mM diamide 及 10~100 μM menadione，重金屬分別為：2.5~40 mM 硫酸銅、8~16 mM 硫酸鋅及 20~160 μM 氯化鎘。氧化劑處理之結果與在 YPD 培養基處理之結果一致，*trp5*Δ 在 H₂O₂、diamide 及 menadione 處理下明顯較 WT 生長為差 (圖十四、B~D)，在處理重金屬部分，WT 及 *trp5*Δ 兩者之生長情形並無明顯差異性，原本在 YPD 培養基處理硫酸鋅，*trp5*Δ 生長較 WT 差，但在 SD 培養基處理條件下則無看到其差異 (圖十四、E~G)。進行 complementation 試驗其外表型表現時，在 0.005%SDS 逆境下，在 *trp5*Δ 中大量表現 *TRP5* 基因，可恢復對於細胞膜逆境之敏感性 (圖十五、B)，但在 2 mM H₂O₂ 逆境下，*trp5*Δ 中大量表現 *TRP5* 基因，對於 H₂O₂ 仍具敏感性 (圖十五、C)，其原因推測可能為，雖在 *trp5*Δ 中大量表現 *TRP5* RNA，但並未轉譯出正常功能 *TRP5* 蛋白，或雖於 *trp5*Δ 中大量表現 *TRP5* RNA，但其菌株之 tryptophan 相關基因已造成異常，而無法回復對於 H₂O₂ 逆境之敏感性，於未來將檢測其推測原因。從以上結果證實 *trp5*Δ 基因缺失會影響酵母菌在氧化逆境及細胞表面相關逆境下之抵抗能力，而 *TRP5* 基因的存在對於細胞膜逆境之耐受性十分重要。在生長曲線實驗部分，分別於 YPD 及 SD 液態培養基中加入不同濃度之 H₂O₂，培養 16 小時後，測定其 OD₆₀₀，比較 WT 及 *trp5*Δ 生長狀況，實驗結果發現，隨著 H₂O₂ 處理的濃度增加，WT 或 *trp5*Δ 的生長受抑制愈加厲害，且 *trp5*Δ 的生長明顯較 WT 為差，相差約 10~30% (圖十六、A 及 B)，與先前固態培養基之結果相符 (圖十三、E 及圖十四、B)。由此可知，在氧化逆境情況下，缺乏 *TRP5* 基因的表現會對酵母菌造成不良的影響，無法抵抗氧化逆境而死亡。

3.2.4 抗氧化相關基因在 WT 及 *trp5*Δ 遭遇氧化逆境之表現。

為了瞭解在 H₂O₂ 逆境下，*trp5*Δ 與 WT 中抗氧化逆境相關基因之變化，以半定量 Real-Time PCR 進行分析，所選之抗氧化逆境相關基因為：*CTT1* (cytosolic

catalase T)、*GSH1* (glutamylcysteine synthetase)、*SOD1* (cytosolic superoxide dismutase)及 *SOD2* (mitochondrial superoxide dismutase)。實驗得知 (圖十七、A)，在營養的 YPD 培養基培養之 WT 及 *trp5*Δ 菌株，在其 *CTT1*、*GSH1*、*SOD1* 及 *SOD2* 之 RNA 表現上，皆可發現抗氧化逆境相關基因會被 H₂O₂ 誘導，但在 WT 中，*CTT1* 於處理 H₂O₂ 10 分鐘時，就具誘導表現，較 *trp5*Δ 提早表現，在 *GSH1*、*SOD1* 及 *SOD2* 表現量中，則在處理 H₂O₂ 60 分鐘時，在 WT 中各基因的表現量明顯較 *trp5*Δ 高，在酵母菌遭遇氧化逆境時，*trp5*Δ 與 WT 相比，*trp5*Δ 之抗氧化相關基因具延緩或減少的表現。在營養貧乏的 SD 培養基培養之 WT 及 *trp5*Δ 菌株(圖十七、B)，在其 *CTT1* 之 RNA 表現上，在其 WT 及 *trp5*Δ 相比下，更具明顯差異，在 WT 處理 H₂O₂ 10~30 分鐘時，*CTT1* 之 RNA 表現呈現持續增加，但在 *trp5*Δ 中 *CTT1* 表現則幾乎消失，僅能檢測到些微訊。結果顯示，在酵母菌遭遇氧化逆境時，*trp5*Δ 與 WT 相比，*trp5*Δ 之抗氧化相關基因具延遲或減弱的表現 (圖十七)，而造成 *trp5*Δ 無法有效抵抗氧化逆境。

3.2.5 外加不同胺基酸抵抗氧化逆境之效果

為了瞭解色胺酸是否能增加酵母菌抗氧化逆境之能力，進行外加色胺酸實驗，在之前報導已知外加色胺酸可提高對於有機酸、酒精及低溫逆境之耐受性 (Bauer et al., 2003; Hirasawa et al., 2007; Rodriguez-Vargas et al., 2007)，參考修改 Hirasawa 等人之文獻進行外加實驗。本次實驗之外加物質除色胺酸外，另選定其他胺基酸，蛋胺酸 (methionine) 做為實驗對照，並外加植物賀爾蒙 IAA，因色胺酸合成途徑中 TRP5 會先合成 indole，再合成色胺酸 (附錄四)，IAA 為 indole-3-acetic acid，可能具相似功能。從實驗結果得知 (圖十八)，在 YPD 對照組中，不管外加色胺酸、蛋胺酸或 IAA 皆不會造成生長狀況差異或變化，且在生長起始點一致之基準下，比較處理 H₂O₂ 後之菌落生長變化，從圖十八中可發現在處理 H₂O₂ 處理具抑制生長效果，但在外加 50 μM 及 100 μM 之 IAA，相較於沒有外加之 WT 或外加色胺酸、蛋胺酸之 WT，其對於 H₂O₂ 之抵抗具明顯較高之耐受性，結果顯示外加 IAA 可提高 H₂O₂ 氧化逆境之耐受性。

3.2.6 缺氮飢餓 (nitrogen starvation) 試驗

因先前文獻指出，酵母菌若缺乏離胺酸會使細胞內胺基酸含量失衡，造成無法在缺氮環境下存活，並引發強烈氧化逆境及細胞死亡 (Eisler et al., 2004)，因此為了瞭解缺乏色胺酸是否也會影響酵母菌在缺氮飢餓之存活率，實驗結果 (圖十九) 得知，在缺氮之貧瘠營養環境下，*trp5*Δ 在第五天即全數死亡，但 WT 仍有 100% 以上之存活率，*trp5*Δ 對於飢餓之耐受力明顯較 WT 低，結果顯示缺乏色胺酸會使酵母菌在缺氮環境下，無法正常存活，造成提早死亡現象。

3.2.7 DNA 微陣列 (Microarray) 分析

為進一步大量分析在氧化逆境下其他可能受 *TRP5* 基因或在氧化逆境下受 *TRP5* 影響之基因，以整體性地了解為何 *TRP5* 缺失造成氧化逆境之敏感性增高，本論文利用 DNA 微陣列技術，全面分析 *trp5*Δ 中，可能受 *TRP5* 或在氧化逆境下受 *TRP5* 影響之基因，期能深入了解 *TRP5* 及 tryptophan 所影響之生長發育及其在氧化逆境下所扮演的角色。DNA 微陣列實驗材料為 WT 及 *trp5*Δ，收取兩批不同次(batch)之材料(independent biological repeat)，以實驗材料之名稱分為：batch 1-WT control、batch 1-WT treatment、batch 1-*trp5*Δ control、batch 1-*trp5*Δ treatment 及 batch 2-WT control、batch 2- WT treatment、batch 2-*trp5*Δ control、batch 2-*trp5*Δ treatment，共八片晶片。

DNA 微陣列結果，分成二大部分來分析：1) 分析 *trp5*Δ 在酵母菌正常生長條件下所影響之基因群表現，其目的為挑選出與酵母菌生長發育、且與 *TRP5* 相關之基因，其挑選原則為，在 *TRP5* 缺失時，與 WT 相比其表現倍率具明顯差異之基因，挑選表現倍率 (ratio) 為 WT control / *trp5*Δ control (WT-C/ *trp5*Δ -C)，大於 1.5 倍以上。2) 分析 *trp5*Δ 在酵母菌遭遇氧化逆境時所影響之基因群表現，其目的為挑選出受 *TRP5* 影響且與氧化逆境相關之基因群，其挑選原則為，在處理 H₂O₂ 下，WT 中提高 2 倍以上表現，但在 *trp5*Δ 無提高 2 倍以上表現之基因，由此篩選出之基因應為具正面調控氧化逆境之功能。

1) 分析 *trp5*Δ 在酵母菌正常生長條件下所影響之基因群表現

在二次 batch，WT control 皆高於 *trp5*Δ control 1.5 以上，以表示此次實驗之可信度。利用 Gene Spring 7.3 微陣列分析軟體，經維恩圖交集比對分析，篩選出 54

個基因 (圖二十、A)，將其 54 個基因利用 Gene Spring 軟體及 NCBI 線上資料庫、SGD 線上資料庫進行基因功能性分類，將所得基因分群為以下幾類：

- (1)環境相關訊息過程基因 (environmental information processing)：15 個，包括
逆境相關具 5 個基因、氧化逆境相關具 6 個基因、細胞運輸相關具 4 個基因。
- (2)代謝相關基因 (metabolism)：11 個，包括碳水化合物代謝相關具 5 個基因，
與脂質代謝相關具 1 個基因，與調節酵素活性相關具 2 個基因，與胺基酸代
謝相關具 1 個基因，與酵素活性相關具 1 個基因。
- (3)細胞生長相關基因 (cellular processes)：5 個，皆為細胞壁組成相關之基因。
- (4)未知功能基因群 (unknown)：23 個。

經整合統計，在酵母菌正常生長條件下會受 *TRP5* 所影響之基因群，在已知功能之基因中，以氧化逆境相關基因佔比例最高，其次為逆境相關基因、碳水化合物代謝相關基因、細胞壁組成相關相關基因及細胞運輸相關基因，在其篩選條件下，未知功能之基因佔極高之比例 (圖二十、B 及表三)。

2) 分析 *trp5*△在酵母菌遭遇氧化逆境時所影響之基因群表現

二次 batch 皆為， H_2O_2 處理下在 WT 中提高 2 倍以上表現，但在 *trp5*△無提高 2 倍以上表現之基因群，以表示此次實驗之可信度。利用 Gene Spring 7.3 微陣列分析軟體，經維恩圖交集比對分析篩選出 83 基因 (圖二十一、A)，再將其 83 基因利用 Gene Spring 軟體及 NCBI 線上資料庫、SGD 線上資料庫進行基因功能性分類，將所得基因分群為以下幾類：

- (1)環境相關訊息過程基因 (environmental information processing)：24 個，包括
逆境相關 9 個基因、氧化逆境相關具 5 個基因、細胞運輸相關具 10 個基因。
- (2)代謝相關基因 (metabolism)：9 個，包括碳水化合物代謝相關具 3 個基因，
，胺基酸代謝相關具 1 個基因，酵素活性相關具 2 基因，NAD 代謝相關具
1 個基因，酒精代謝相關 1 個，DNA 代謝相關具 1 個基因。
- (3)細胞生長相關基因 (cellular processes)：5 個，包括生長相關具 2 個基因，
細胞自噬相關具 2 個基因，賀爾蒙調節相關具 1 個基因。
- (4)其他相關訊息基因 (others processing)：7 個，包括 DNA 修復及複製相關具 1
個基因，未折疊蛋白相關具 2 個基因，蛋白質降解相關具 2 基因，訊息傳導
相關具 1 個基因。

(5)未知功能基因群 (unknown)：40 個。

經整合統計，在酵母菌遭遇氧化逆境時具正面調控之基因群 (83 個基因)，在已知功能之基因中，以環境相關訊息過程基因佔比例最高，包括氧化等多種逆境相關基因及細胞運輸相關基因，在其篩選條件下，有許多未知功能之基因佔極高數比例 (圖二十一、B 及表三)。

3.2.8 DNA 微陣列篩選之目標基因之驗證

為了確認微陣列實驗結果，針對基因進行 qRT-PCR 分析，所用實驗材料與微陣列使用之材料相似，但另行準備新材料 (independent biological repeat) 將 WT 及 *trp5*Δ，於 log-phase 生長狀態時期，分別處理濃度 0.6mM H₂O₂ 0、10、30、60、120 分鐘，抽取各時間點之菌株 RNA，利用 qRT-PCR，於每個時間點檢測目標基因之 RNA 表現趨勢；qRT-PCR 呈現之結果，皆以 WT control 作為 1，處理 H₂O₂ 10、30、60、120 分鐘之四組 WT-treatment、*trp5*Δ-control 及處理 H₂O₂ 10、30、60、120 分鐘之四組 *trp5*Δ-treatment，分別再於 WT control 相除，得到其相對之表現量。

所選基因包括：

(1) *YJL101c*/ *GSH1*

為 GSH biosynthesis 之主要合成酵素 gamma glutamylcysteine synthetase，，在本論文之處理條件下之表現變化，在 qRT-PCR 實驗中 (圖二十二、A)，可看到在 *trp5*Δ 中 *GSH1* 在處理 H₂O₂ 下，全面呈現下降之趨勢，在 WT 中的 *GSH1* 雖在一開始處理 H₂O₂ 10~30 分鐘時，亦呈現下降現象，但在處理 H₂O₂ 60 分鐘後，開始持續增加表現量，與 *trp5*Δ 中 *GSH1* 相較下，明顯具程度上之差異性。

(2) *YMR250w*/*GAD1*

為 glutamate decarboxylase，會將 glutamate 降解成 gamma-aminobutyric acid (GABA)，為 GSH 之前趨物，已知參與氧化逆境中，在 qRT-PCR 實驗中 (圖二十二、B)，可看到在 *trp5*Δ 中 *GAD1* 在處理 H₂O₂ 下，呈現下降之線條，而在 WT 中的 *GAD1* 在處理 H₂O₂ 30 分鐘後，呈現高幅度的持續上升趨勢，與 *trp5*Δ 中 *GSH1* 相較下，明顯具程度上之差異性。

(3)YGR088w/*CTT1*

為細胞質中的 cytosolic catalase，在微陣列篩選下，歸類於處理 H₂O₂ 下，在 WT 及 *trp5*△皆提高 2 倍以上表現之基因；在 qRT-RCR 實驗中 (圖二十二、C)，可看到 WT 在處理 H₂O₂ 30 分鐘後即大量表現，但在同時時間點之 *trp5*△並未偵測到 *CTT1* 的表現，需在處理 H₂O₂ 60 分鐘後才具表現量，在 WT 中 *CTT1* 的表現在處理 H₂O₂ 60 分鐘時達到最高峰，之後 *CTT1* 在 WT 之表現便下降，而在 *trp5*△中的 *CTT1* 在處理 H₂O₂ 後，先呈現下降趨勢，在處理 30 分鐘及 60 分鐘才表現量開始具上升的現象，但其表現量仍比 WT 之 *CTT1* 表現低很多，雖在處理 H₂O₂ 120 分鐘時，*CTT1* 在 *trp5*△及 WT 中表現量相近，但在其他時間點之 *CTT1* 表現量，在 *trp5*△中明顯表現較 WT 低。

(4)YDR256c/*CTA1*

為存在於過氧化物 (peroxisomal matrix) 之 catalase，與 *CTT1* 相似之功能，在微陣列篩選下，歸類於處理 H₂O₂ 下，在 WT 及 *trp5*△無 2 倍以上表現之基因；在 qRT-RCR 實驗中(二十二、D)，可看到 *CTA1* 不管在 WT 或 *trp5*△中，在處理 H₂O₂ 後其 *CTA1* 的表現量皆不高或下降，在 WT 中 *CTA1* 的表現，呈現先下降後上升，最後緩和持平的表現量，在 *trp5*△中則看到 *CTA1* 的表現量皆為下降的趨勢，雖其下降程度在處理 H₂O₂ 60 分鐘時有些為回升的現象，其 *CTA1* 在 WT 及 *trp5*△中之表現量，不因處理 H₂O₂ 之時間長短，而有明顯之誘導表現之現象。

(5)YGR040w/*KSS1*

為 mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase，參與調控 filamentous growth 及 pheromone response 之 signal transduction pathway，微陣列篩選下，歸類於處理 H₂O₂ 下，在 WT 及 *trp5*△無 2 倍以上表現之基因；在 qRT-RCR 實驗中 (圖二十二、E)，在處理 H₂O₂ 後，WT 或 *trp5*△中其 *KSS1* 的表現量無明顯表現，不因處理 H₂O₂ 之時間長短，而有明顯之誘導表現之現象。

第四章 討論

4.1 氧化逆境下酵母菌未知功能基因 *YGR021w* 功能機制之探討

高度保守性的基因 DUF28 廣泛存在於許多細菌、真菌、動物與植物中，在演化上其基因之角色應具有重要意義，但目前對其功能了解仍尚未明瞭。所以本論文以酵母菌 (*S. cerevisia*) 做為研究對象，分析酵母菌 *YGR021w* (DUF28) 是否參與氧化逆境反應及氧化防禦機制，將實驗結果分述以下幾點進行討論。

4.1.1 *YGR021w* 基因在不同氧化劑 (oxidants) 處理下之表現與探討

從本論文實驗結果得知，*YGR021w* 基因在正常生長條件下即有表現，處理不同氧化劑： H_2O_2 、diamide 及 menadione 後表現量反而減少 (圖一)，推測可能在酵母菌遭遇氧化逆境時，*YGR021w* 扮演負調控的角色。不同的氧化劑會誘導特定之氧化逆境反應基因 (oxidative-stress response genes)，生物體會因應不同的氧化逆境，啟動不同的機制來對抗保護 (Thorpe et al., 2004)，但氧化防禦機制之共同點為，細胞會藉由 Yap1p 及 Msn2p/Msn4p transcription factors 來感測氧化逆境，並啟動 glutathione 及 thioredoxin detoxification systems，利用 catalase 及 superoxide dismutase 來清除自由基，在達到成功的抗氧化機制，必需經過一連串的 cell processes 來協助，而這一連串的細胞變化則會因不同的氧化劑而有不同； H_2O_2 所誘發之氧化逆境 (H_2O_2 -induced stress)，會改變細胞中粒線體的電子傳遞鏈，具完整的呼吸鏈 (respiratory chain) 功能對於 H_2O_2 -induced stress 之抗性十分重要。diamide 之耐受性則需要液胞蛋白 vacuolar protein-sorting (VPS) 及 ergosterol metabolism 的功能，來抵抗 thiol-oxidizing 的環境。menadione 所造成氧化逆境，五碳糖磷酸途徑 (pentose phosphate pathway, PPP) 扮演抵抗其氧化逆境之重要因素，顯示 NADPH 對於清除 superoxide ion 十分重要 (Thorpe et al., 2004)。實驗中發現在 H_2O_2 、diamide 及 menadione，不同種類的氧化劑處理後，*YGR021w* 基因表現量會減少，顯示 *YGR021w* 基因可能參與不同種類的氧化逆境，扮演廣泛調控氧化逆境的角色。但在氧化劑逆境處理對酵母菌菌落形成實驗結果 (圖三、B、C 及 D)，僅在 H_2O_2 逆境下看到 *YGR021w*Δ 具較高之耐受性，而在 diamide 及 menadione 逆境下，卻沒有看到 WT 及 *YGR021w*Δ 在菌落存活上具明顯的差異，推測可能在酵母菌中具有和 *YGR021w* 功能互補之基因群，雖將 *YGR021w* 基因剔除，其他具相似功能之基因仍能代替 *YGR021w* 之功能，以致於在 diamide 及

menadione 逆境下，*YGR021w*△沒有呈現對於其兩種氧化劑具較高之耐受性，也可推論預測位於粒線體之 *YGR021w*，可能與維持正常完整之粒線體電子傳遞鏈有關，使 *YGR021w*△在 H₂O₂ 誘導之氧化逆境下呈現較高之抗性。

4.1.2 *YGR021w* 基因缺失在不同逆境及不同碳源下之存活能力之探討

本論文實驗結果顯示，*YGR021w*△相較於 WT 具較高之 H₂O₂ 氧化逆境及高溫逆境的耐受性 (圖四、B 及 G)，酵母菌喜好生長在於 20°C~30°C 之間，環境溫度的變化會影響酵母菌細胞生長及生理週期進行，溫度高於 40°C 之環境會造成酵母菌生長緩慢及死亡，若溫度在可容許範圍內變化 (如 25–30°C to 37–42°C)，反而可以刺激細胞生長 (Gonzalez-Parraga et al., 2008)；本實驗利用高嚴苛致死高溫條件來處理酵母菌，因細胞在熱或高溫的狀況亦會造成氧化性傷害 (oxidative damage)，已知熱誘導的細胞死亡與氧化逆境具有關聯性 (Davidson et al., 1996)，藉此來探討 *YGR021w* 基因與高溫逆境及氧化逆境之關係。許多文獻指出，生物在長期演化過程下，會留下具高度保守的生理機制，來有效對抗不同的環境逆境，稱之為核心逆境反應機制 (core stress response, CSR) 機制，在酵母菌 *S. cerevisiae* 的 CSR，由多樣的 stress-activated protein kinases pathways (SAPKs) 來進行特定的調節功能，以交互保護各種環境傷害 (Smith et al., 2004)，在氧化及高溫等多種逆境下，細胞會誘導 Hog1-訊息傳導途徑 (Hog1-SAPKs)，活化 stress tolerance response element (STRE) 相關基因，例如 catalase (*CTT1*、*CAT1*)、heat shock protein (*HSP104*、*HSP26*)、multistress response protein (*DDR2*) 等，用以調節逆境所造成之傷害。*YGR021w*△在氧化逆境及高溫逆境下仍能生長存活，推測可能 *YGR021w* 基因缺失後，反而使 STRE 相關基因活化，在本論文微陣列實驗中，亦可看到在氧化逆境下，相較於 WT，*YGR021w*△中之 STRE 相關基因：*CTT1*、*CAT1*、*HSP26*、*DDR2* 等，會呈現較高的表現量，顯示在氧化逆境下，*YGR021w*△之 STRE 相關基因具較高效率，來進行抗氧化機制。

在酵母菌粒線體活性實驗中，將碳源由葡萄糖 (glucose) 換置為甘油 (glycerol)，配製以 glycerol 做為唯一碳源之 YPG 及 SG 培養基，因酵母菌要代謝利用 glycerol 只能進行有氧呼吸，而進行有氧呼吸時粒線體的功能必須是正常的，若粒線體功能缺乏或異常，則無法在 YPG 及 SG 培養基上生長 (Wallis and Wilkie, 1979)，用改變碳源來以測試酵母菌粒線體活性，以及 *YGR021w* 與粒線體

之關係；從結果得知 (圖三、H 及圖四、H)，WT 和 *YGR021w*△皆能在 YPG 及 SG 培養基上正常生長，顯示 *YGR021w* 失去功能並不影響粒線體正常活性，*YGR021w* 應不參與粒線體構型組成之功能。

4.1.3 DNA 微陣列實驗中可能受 *YGR021w* 影響的基因之可能功能探討

4.1.3.1 DNA 微陣列實驗之探討

本論文利用 DNA 微陣列實驗，快速大量檢測，全面性地分析 *YGR021w* 在氧化逆境下可能參與之機制。初步分析微陣列實驗結果，發現 WT 及 *YGR021w*△在未處理 H₂O₂ 時之微陣列晶片上，其基因表現趨勢十分相似，且經分析軟體將訊號同步化後比較，二者在表現倍數上並無具明顯差異之基因，推測 *YGR021w* 可能與細胞生長發育相關較無重要關係，酵母菌缺少 *YGR021w* 並不會造成生長異常，在本微陣列實驗之菌株材料係取自於對數期 (exponential phase) 生長狀態時期，而菌株的生長狀態亦影響實驗結果，故本實驗無法排除 *YGR021w* 可能在酵母菌的遲滯期 (lag phase) 或恆定期 (stationary phase)，參與細胞生長發育。

4.1.3.2 *YGR021w*△在酵母菌遭遇氧化逆境時所影響之基因群表現分析

本論文利用分析微陣列實驗，挑選到一群在氧化逆境下受 *YGR021w* 影響的基因，並依據其已知功能加以分類 (表二)，以利探討這些基因與 *YGR021w* 在氧化逆境下之關係，進而釐清 *YGR021w* 在酵母菌中可能扮演的角色。

(1) 環境相關訊息過程基因 (environmental information processing)：

包括逆境相關、氧化逆境相關、細胞運輸相關之基因。以微陣列分析在 *YGR021w*△處理 H₂O₂ 後，與氧化及其他逆境相關的基因表現程度有增加，例如 *YBR072w/HSP26*、*YCR021c/HSP26*、*YER103w/SSA4* 為 heat-shock proteins，目前已知這些蛋白質會受到逆境的誘導而大量表現，且會保護細胞去對抗氧化傷害 (Papp et al., 2003)；*YGR088w/CTT1* 及 *YDR256c/CTA1* 為 catalase，扮演解毒之角色，在氧化逆境中具清除 ROS 之功能 (Izawa et al., 1996)；*YMR250w/GAD1* 為 glutamate decarboxylase，參與 glutamate degradation，其過程對於氧化逆境之耐受性十分重要 (Coleman et al., 2001)，其結果已於 qRT-PCR 驗證 (圖九、A~C)，*CTT1*、*CTA1* 及 *GAD1*，在處理 H₂O₂ 後，在 *YGR021w*△中表現量皆明顯高於 WT 中之表現，證實在 *YGR021w*△中具有較強之抗氧化解毒機制。由微陣列及

qRT-PCR 驗證顯示酵母菌在逆境下即會引發一連串機制來抵抗氧化逆境，但在 *YGR021w* 缺失時，其抗氧化機制，包括 *CTT1*、*CTA1* 及 *GAD1*，反而呈現更強之保護力，去抵抗遭遇的逆境。

在細胞運輸相關之基因中，*YGR138c/TPO2*、*YHR048w/YHK8* 皆屬於 Drug:H⁺Antiporter-1 (DHA1 family)，為多藥物運輸者 (multidrug transporters)，會將特定物質傳送至細胞外，例如胺基酸、金屬離子等，*YGR138c/TPO2* 為 polyamines transporters (Albertsen et al., 2003)，polyamines 是存在於原核生物及真核生物之必需多聚胺，參與多種生理功能，目前認為會調控氧化逆境，但大量的 polyamines 對細胞具有毒性，需藉由 polyamines transporters 來調節，將多餘之 polyamines 傳送至細胞外或轉換成另一形式之物質存在 (Bower and Mulvey, 2006)；*YHR048w/YHK8* 亦為 multidrug transporters，但功能仍未清楚。推測在氧化逆境產生時，造成細胞內氧化還原失衡，使具有毒性之物質增加，而 *YGR021w* 缺失反而促使相關之運輸系統 (transport systems) 活化，進而將多餘之有害物質，例如 polyamines 送出細胞外，回復原本之細胞平衡 (Tomitori et al., 2001)。

(2) 代謝相關基因 (metabolism):

包括碳水化合物代謝相關、胺基酸代謝相關基因、DNA 合成相關。*YGR256w/GND2* 及 *YEL011w/GLC3* 參與醣類代謝過程，*YGR256w/GND2* 為 6-phosphogluconate dehydrogenase，參與五碳醣磷酸化途徑，將 NADPH 進行氧化反應，目前已知可保護酵母菌抵抗氧化逆境 (Izawa et al., 1998)，因 NADPH 為目前已知之抗氧化系統：glutathione 抗氧化系統及 thioredoxin 的輔助因子 (cofactor)，會將被氧化之 glutathione 及 thioredoxin 回復成有效的還原形態；*YEL011w/GLC3* 為 glycogen branching enzyme，會造成 glycogen 累積，而當環境缺乏 glucose 時，glycogen 便開始累積 (Parrou et al., 1999)，glycogen 可做為暫時性的貯存醣類，且多貯存於細胞壁中。在氧化逆境的產成時，會造成醣類的組成及醣類生合成途徑改變，影響 NADPH 生成，進而影響抗氧化系統。

在胺基酸代謝相關基因中之 *YLL060c/GTT2*、*YMR251w/GTO3* 參與 glutathione metabolic process，皆為 glutathione transferase (Choi et al., 1998)；*YGL184c/STR3* 參與 methionine biosynthetic process，為 cystathionine beta-lyase，會將 methionine 之 cystathionine 轉換成 homocysteine，目前已知 methionine biosynthesis 缺失 (或

表現不完全)會抑制五碳醣磷酸化途徑，進而影響 NADPH 的含量，造成 NADPH pool 的損耗，使得由五碳醣磷酸化過程，合成之脂肪酸等物質受到阻礙(Slekar et al., 1996)，從醣類代謝及胺基酸代謝相關基因，推測 *YGR021w*△在 H₂O₂ 之耐受力，可能是藉由五碳醣磷酸化途徑，提高並維持 glutathione 及 thioredoxin 的氧化還原能力，最後得到較高抗氧化能力。

與 DNA 合成相關之基因有 *YLR245c/CDD1* 及 *YIL066c/RNR3*；*CDD1* 為 cytidine deaminase，參與 DNA 嘧啶回收途徑 (pyrimidine salvage pathway)，在細胞分解過程中，壞損、老舊之 DNA 會藉由胺基酸重新合成及回收途徑，來進行利用 (Kurtz et al., 1999)；*RNR3* 為 ribonucleotide-diphosphate reductase，目前已知為 dNTP synthesis 之速率決定步驟酵素，調控 DNA 複製 (replication)及 DNA damage checkpoint pathways (Elledge and Davis, 1990)，氧化逆境中之 ROS，會對於細胞中之脂質、蛋白質、DNA 及 RNA 進行攻擊，特別是 DNA，造成 DNA 斷裂，無法由細胞修復，造成細胞極大的傷害 (M.B. Toledano et al., 2003)，推測在 *YGR021w* 缺失時，反而提高 DNA 自我修復之能力，增加 DNA 複製效力，在氧化逆境之傷害後，具較高之恢復能力，在逆境下顯得更具優勢。

(3)細胞生長相關基因 (cellular processes)：

包括細胞自噬相關、細胞壁組成相關、菌絲生長相關。細胞自噬作用 (autophagy) 為真核生物高度保守之系統，會經由 cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway，將蛋白質從細胞質運送至溶酶體 (lysosome) 中進行蛋白質降解作用，會受營養貧瘠之環境條件誘導，包括碳源、氮源及其他胺基酸等缺乏；autophagy 過程會在細胞質中形成雙膜的液泡構造 (double-membrane vesicle)，稱之為 autophagosome，此雙膜液泡構造會把細胞內特定的蛋白或物質，送至溶酶體分解。目前在酵母菌中參與 autophagy 過程之基因約有 30 個，稱之為 autophagy-related (ATG) proteins，而微陣列篩選到之 ATG protein 有二個，分別為 *YPL149w/ATG5* 及 *YCR068w/ATG15*；*ATG5* 參與 autophagy 中的傳輸過程 (Cvt pathway)，*ATG15* 為細胞自噬作用中的脂肪酶，參與自噬作用最後的步驟，會將液泡構造進行分解 (Tsukada and Ohsumi, 1993)。目前已知在酵母菌中之 ATG proteins，對粒線體之正常功能構造十分重要，若缺失 *ATG1 (atg1)*、*ATG6 (atg6)*、*ATG8 (atg8)*、*ATG12 (atg12)*，會使粒線體電子傳遞鏈活性下降，並累積大量

ROS，造成粒線體功能異常(Zhang et al., 2007)，在動物研究也指出，ATG proteins 會將因 ROS 造成之不正常粒線體，經由 autophagy 過程，於損壞之粒線體部分進行分解作用，來避免再次受到氧化傷害(Jin, 2006)。經 qRT-PCR (圖十、A)，已證實在處理 H₂O₂ 後，*ATG15* 之表現量在 *YGR021w*△中皆高於在 WT 中之表現量，其 autophagy 與 *YGR021w* 在氧化逆境之關連性，推測可能在 *YGR021w* 缺失時，可能引發 autophagy 作用，移除不正常之粒線體並維持正常完整之粒線體電子傳遞鏈，而呈現抵抗 H₂O₂ 誘導之氧化逆境。

(4)其他相關訊息基因 (others processing):

包括蛋白質泛素化過程相關、MAP kinase 訊息傳導相關、RNA 加工過程相關。與蛋白質泛素化過程相關之基因，為 *YDR265w/PEX10*，為過氧化體上之膜蛋白 (peroxisomal membrane protein)，具 E3 ubiquitin 活性，在過氧化物生合成 (peroxisome biogenesis) 中扮演 peroxisomal protein import 之功能，藉由 ubiquitin 標定辨示，將過氧化物基質相關蛋白運送至過氧化物中，對於過氧化物之生合成十分重要，研究指出酵母菌若缺乏 *PEX10*，不會使菌株死亡，但會嚴重影響過氧化物蛋白之運送，造成運送位置錯誤傳送至細胞質中 (Eckert and Johnson, 2003)，環境變化會引起過氧化物降解 (peroxisome degradation)，為一種具特定的細胞自噬作用 (autophagy)，在酵母菌中過氧化物降解需經由 cytoplasm-to-vacuole targeting (Cvt) pathway 運輸，將特定蛋白送達至過氧化物或液泡進行分解作用，推測可能在氧化逆境下，造成過氧化物蛋白之運送錯誤，使過氧化物生合成受到阻礙，造成異常，而無法進行過氧化物細胞自噬作用，將氧化逆境產生之有害物質或多餘物質進行分解，反而 *YGR021w* 缺失之狀況下，仍能正常完成過氧化物生合成，並經由 Cvt pathway 運輸，將具威脅之物質清除，解除氧化逆境之危機 (Gey et al., 2008)。

與 MAP kinase 訊息傳導相關之基因為 *YGR040w/KSSI*，為 mitogen-activated protein kinase (MAPK)，調控 filamentous growth 及 pheromone response 之 signal transduction pathways。目前已知酵母菌之菌絲型態生成 (filamentous growth)，會因氮源缺乏，使單倍體酵母菌形成侵入型生長型 (invasive growth)，雙倍體中形成假菌絲生長 (pseudohyphal growth)，*KSSI* 會磷酸化下游基因，活化啟動 filamentous growth signal transduction pathway (Cook et al., 1997)，另外 *KSSI* 也會

調控 pheromone response，使單倍體時期進入雙倍體時期 (Sabbagh et al., 2001; Oyedotun and Lemire, 2004)，目前對於 filamentous growth 及 pheromone response 之 signal transduction pathways 與氧化逆境之相關性之文獻報導不多，有報導指出 filamentous growth 與氧化逆境相關，在具 filamentous growth 之形態下，對於氧化逆境具較高之耐受性；已於 qRT-PCR 實驗驗證 (圖十、B)，在處理 H₂O₂ 後，*YGR021w*△中之 *KSS1* 的表現量高於 WT，推測可能在 *YGR021w*△中會誘發 filamentous growth 及 pheromone response MAPK signal transduction pathway，啟動下游相關基因來對抗氧化逆境，但 *YGR021w*△對於氧化逆境之耐受性，是否也與 filamentous growth 相關，仍需進一步檢驗。

Kinase activity 相關基因有 *YGL059w/PKP2* 及 *YJL141c/YAK1*；*PKP2* 為 mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase，目前已知會負調控 pyruvate dehydrogenase complex (PDC)，PDC 會將 pyruvate 轉換成 acetyl-CoA，進行調控呼吸作用，其細胞能量來源之一，但若細胞體內 NADH 量大於 NAD⁺量時，PDC 則經 mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase (*YGL059w*)使之不具活性，受到抑制 (Gey et al., 2008)；*YAK1* 為 serine-threonine protein kinase，參與葡萄糖訊息傳導 (glucose signal transduction)，提供酵母菌生長過程中所需之葡萄糖 (Moriya et al., 2001)。葡萄糖會經由糖解作用，將 pyruvate 轉換成 lactate，其中之 pyruvate 會參與 acetyl-CoA 及 tricarboxylic acid (TCA) cycle，進而影響粒線體電子傳遞鏈之過程 (Semenza, 2007)。推測 *YGR021w*△在氧化逆境及高溫逆境下具較高之耐受性，可能是因為其對於葡萄糖訊息傳導具有較精密之調節，在氧化逆境下，粒線體電子傳遞鏈中電子滲漏結果，會產生大量 ROS，造成 NADH 量失衡，造成 PDC 受到 *PKP2* 抑制，使原本應經由 PDC 將 pyruvate 轉換成 acetyl-CoA 之過程亦受到影響，進而調控 TCA cycle 提供之 NADH 含量，達到回復細胞平衡之狀態。

(5)未知功能基因群 (unknown)：

未來仍對於表現具差異之未知功能基因做深入研究。

4.1.3.3 DNA 微陣列實驗之驗證

本論文在 DNA 微陣列實驗初步驗證，先以環境相關訊息過程基因，與氧化及其他逆境相關之基因進行 qRT-PCR 驗證，在實驗結果 (圖九)，可看到參與氧化逆境之相關基因：*YGR088w/CTT1*、*YDR256c/CTA1*、*YMR250w/GAD1* 及 *YJL101c/GSH1*，在處理 H_2O_2 後，在 *YGR021w*△中表現量皆明顯高於 WT 中之表現，顯示在 *YGR021w*△中具有較強抗氧化解毒機制；在參與多種逆境之相關基因：*YMR169c/ALD3*，在處理 H_2O_2 後，*ALD3* 在 WT 中幾乎無表現，但在 *YGR021w*△中卻有增加表現量之趨勢，表示 *ALD3* 所調控相關之生理，亦會對氧化逆境具些微之影響。但在對抗氧化逆境之過程中，依其不同基因表現趨勢，又可分成早期表現及持續增加表現兩種不同形式之抗氧化基因，其應具不同程度的抗氧化效果及意義。

早期表現的基因為：*YGR088w/CTT1* 及未知功能基因 *YLR164w*。

YGR088w/CTT1，其表現趨勢為山峰之曲線，在遭遇氧化逆境之初期，會快速、大量表現，並且與其他較晚表現之基因協同作用，共同保護細胞，但其基因在完全作用後，會開始邁向減弱的趨勢，因快速大量表現對於生物體為一種強烈耗能之行為，細胞為了節省能量，會減少或縮短其行為之時間，以利生物體能量之再利用，且早期表現的基因除了具抗氧化功能之外，其亦可能調控整個細胞對抗氧化逆境之效能，達到及時的抗氧化機制。目前認為存在於細胞質之 *CTT1* 會與存在於過氧化物的 *CTA1*，協同抵抗外來的 H_2O_2 (Izawa et al., 1996)。在 *YGR021w*△中，處理 H_2O_2 10 分鐘後，其 *CTT1* 即大量表現，於處理 H_2O_2 30 分鐘時達到最高峰後，表現量便下降，*CTT1* 在 *YGR021w*△中之表現明顯比 WT 提前表現，這在半定量 RT-PCR 實驗 (圖七)之結果一致，*YGR021w*△對於氧化逆境具有之較高的耐受性，應是 *CTT1* 具提前或增量的表現之結果，增加對 H_2O_2 水解之功能。

YLR164w 為未知功能基因，在 qRT-PCR 實驗中 (圖十、C)，可看到 *YGR021w*△在處理 H_2O_2 後 *YLR164w* 呈現為山峰之曲線趨勢，與 *CTT1* 表現趨勢相似，推測可能為氧化逆境中早期表現的基因，且表現量明顯高於 WT 之 *YLR164w* 表現量。目前僅知 *YLR164w* 蛋白位置可能為粒線體，蛋白質序列比對，與 Tim18p 及 Sdh4p 具高度相似性，Tim18p 為 mitochondrial Tim54p-Tim22p 複合體，參與酵母菌粒線體輸入過程，影響粒線體功能，目前認為可能參與氧化逆

境 (Kerscher et al., 2000), Sdh4p 為琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase), 會經由氧化之琥珀酸, 將電子送至電子傳遞鍊之 ubiquinone (Oyedotun and Lemire, 2004)。推測 *YLR164w* 可能與 Tim18p 及 Sdh4p 具類似或協同之功能, 參與粒線體功能完整性及電子傳遞鏈, 而使得 *YGR021w*△具高度對抗氧化逆境之能力, 但其推測仍需進一步證實。

持續增加表現的基因為: *YDR256c/CTA1*、*YMR250w/GAD1* 及 *YJL101c/GSH1*、*YMR169c/ALD3*、*YCR068w/ATG15*、*YGR040w/KSS1*。

CTA1、*GAD1* 及 *GSH1*、*ALD3*, 其表現趨勢為往上曲線, 在酵母菌遭遇氧化逆境下, 其保護作用為較長效漸進的, 與早期表現之基因具加成互補之意義, 例如 *CTA1* 與 *CTT1* 具協同作用; *GAD1* 會將 glutamate 降解成 glutamate gamma-aminobutyric acid, 為 glutathione (GSH) 之前趨物, 在 qRT-PCR 實驗中 (圖九、C), 可看到處理 H₂O₂ 30 分鐘, *GAD1* 在 *YGR021w*△中會大量表現, 且持續增加, 因此推斷在處理 H₂O₂ 下, *YGR021w*△中 GSH 表現量應也較 WT 中之表現量高, 結果證實 (圖九、D) 生成 GSH 之 *GSH1* (Gamma glutamylcysteine synthetase) 之表現量, 在 *YGR021w*△中會於處理 H₂O₂ 30 分鐘後開始表現高於 WT, 且呈現繼續增加趨勢, 顯示具較高氧化逆境抵抗性之 *YGR021w*△, 其 GSH 抗氧化機制, 與 WT 比較下更具有效能, 趨勢幅度及表現時間, 在 *YGR021w*△中, *GAD1* 於處理 H₂O₂ 30 分鐘時大量表現, 進而提高同時間點之 *GSH1* 表現量, *GSH1* 之表現幅度雖不及 *GAD1*, 但其影響之效能不因其表現量幅度較小, 而減少其抗氧化之效能 (Coleman et al., 2001; Dormer et al., 2002)。另一個持續增加表現的基因 *YMR169c/ALD3*, 為存在於細胞質中的乙醛去氫酶 (cytoplasmic aldehyde dehydrogenase), 目前已知參與多種逆境, 在 qRT-PCR 實驗中 (圖九、E), 可看到在 WT 中 *ALD3* 幾乎無表現, 但在 *YGR021w*△中卻有表現幅度較小之增加趨勢, 在處理 H₂O₂ 120 分鐘後, 則看到其表現量與 WT 具明顯差異, 目前認為 *ALD3* 會調控 pantothenic acid (vitamin B₅) pathway 其中的 β-alanine biosynthesis, 而 pantothenic acid 為 coenzyme A (CoA) biosynthesis 之中間產物, CoA 又與逆境等多種生理功能有關, *ALD3* 會將 polyamine 降解成 β-alanine, 促使進行 pantothenic acid 合成, 進而對抗酒精及滲透壓之逆境 (White et al., 2003); 許多文獻指出, 為了抵抗環境逆境, 生物在長期演化過程下, 會留下具高度保守的防禦機制, 這些防禦機制往往具有重疊交互作用 (Smith et al., 2004), *ALD3* 參

與在 *YGR021w*△對抗氧化逆境之意義，可能是為了要全面性的保護細胞。

其他非逆境相關基因包括，細胞自噬相關基因 *YCR068w/ATG15*、MAP kinase 訊息傳導相關基因 *YGR040w/KSS1*，經 qRT-PCR 驗證 (圖十)，在處理 H_2O_2 後，這些基因之表現量在 *YGR021w*△中皆高於在 WT 中之表現量，其所代表之生理意義分別於下文細敘。*ATG15* 為細胞自噬作用中的脂肪酶，會將液泡構造進行分解，目前已知會被營養貧瘠之環境所誘導，但在氧化逆境之功能未知，在 qRT-PCR 實驗中 (圖十、A)，在 *YGR021w*△中呈現持續增加表現之曲線，表現量及表現趨勢明顯與 WT 不同，反之 WT 處理 H_2O_2 後 *ATG15* 並不會被誘導表現，顯示 *ATG15* 對於 *YGR021w*△抵抗氧化逆境能力，應且有正面之意義，推測可能在 *YGR021w*△中，可更早偵測到粒線體中不正常增加的 ROS 量，進而誘發 autophagy 基因表現，進行異常粒線體之分解作用，以回復粒線體及電子傳遞鏈之功能，解除 ROS 氧化逆境之危機。

YGR040w/KSS1 為參與 filamentous growth 及 pheromone response MAPK signal transduction pathway，調控 filamentous growth 及 pheromone response，從 qRT-PCR 實驗中 (圖十、B)，*KSS1* 其表現為持續增加趨勢，雖在 WT 與 *YGR021w*△中之 *KSS1* 的表現趨勢十分相似，但在表現量上則具有程度上的差異，明顯看到在處理 H_2O_2 後，*YGR021w*△中之 *KSS1* 的表現量高於 WT，推測可能在 *YGR021w*△中會誘發 filamentous growth 及 pheromone response MAPK signal transduction pathway，啟動下游相關基因來對抗氧化逆境。

從微陣列之結果顯示，酵母菌在遭遇氧化逆境時，*YGR021w* 缺乏時，抗逆境相關基因較提早且大量表現，其結果亦部分由 qRT-PCR 證實確認，且醣類及能量相關基因也大量表現，可能在醣類及能量上能更有效之利用，進而有效調節細胞內之氧化還原平衡，推測較 WT 更具氧化還原穩定性，顯示 *YGR021w*△之耐受性，可能是多種有利因素而得到之結果，但其推論仍需進一步加以驗證 (附錄五)；未來將針對微陣列具差異之新穎基因進行深入研究及遺傳分子之驗證，並利用微陣列其能找出 *YGR021w* 在酵母菌其他生理功能之意義。

4.2 氧化逆境下酵母菌 *YGL026c (TRP5)* 功能機制之探討

本論文以酵母菌 (*S. cerevisia*) 做為研究對象，分析酵母菌 *TRP5* 與氧化逆境之關係，將實驗結果分述以下幾點進行討論。

4.2.1 DNA 微陣列實驗中可能受 *TRP5* 影響的基因之可能功能探討

本論文利用分析微陣列實驗，挑選到一群可能會受 *TRP5* 影響的基因群，特別是在氧化逆境下，並依據其已知功能加以分類 (表三及表四)，以利探討這些基因與 *TRP5* 在正常生長條件下及氧化逆境下之關係，全面了解 *TRP5* 及 tryptophan 對於酵母菌生長發育之影響，以及氧化逆境之關係。依目的不同，分成二大部分來討論：

4.2.3.1 *trp5* 在酵母菌正常生長條件下所影響之基因群表現

(1) 環境相關訊息過程基因 (environmental information processing)：

包括氧化及其他逆境相關、細胞運輸相關之基因。與氧化逆境相關基因有 *YGR088w/CTT1* 為存在於細胞質的 catalase T、*YDR453c/ TSA2* 為 thioredoxin peroxidase (TSA)，都具清除 ROS 之功能 (Traczyk et al., 1985; Park et al., 2000)，*YFL014w/HSP12* 為 heat shock protein，受 HOG pathways 調控影響 (Hirayama et al., 1995)，*YMR250w/GAD1* 為 glutamate decarboxylase，參與 glutamate degradation (Coleman et al., 2001)，*YKL150w/MCRI* 為粒線體 NADH-cytochrome b5 reductase，參與麥角固醇生合成 (ergosterol biosynthesis) (Hahne et al., 1994)，皆已知對氧化逆境之耐受性十分重要。

與逆境相關之基因有 small heat shock protein (sHSP)-*YBR072w/HSP26*，與 *YDR171w/HSP42* 同屬 small heat shock protein (sHSP) family，具 chaperone 活性 (Bentley et al., 1992)；heat shock protein HSP70 family 包括 *YER103w/SSA4* 及 *YBR169c/SSE2*，主要為移除及防止 misfolded proteins 等不正常蛋白之產生 (Werner-Washburne et al., 1987)。其他與逆境相關基因，例如：*YOL052c-A/DDR2* 為 multistress response protein，會被 xenobiotic 藥劑、環境及生理逆境活化 (Kobayashi et al., 1996)。當 *TRP5* 缺失時，會造成氧化及其他逆境相關之基因之 RNA 表現量下降，*trp5*△在正常條件下即較 WT 缺乏抵抗相關逆境之能力，推測可能為 *trp5*△對於氧化及膜構造逆境敏感之原因之一；氧化及相關基因能力下降

之原因，可能因缺乏 *TRP5*、色胺酸含量減低，使色胺酸相關或衍生之生合成過程改變，影響其他物質，例如胺基酸、蛋白質、酵素及醣類之生合成，進而影響氧化及其他逆境相關基因。

與細胞運輸相關之基因為：*YDR342c/HXT7*、*YDR343c/HXT6*、*YHR096c/HXT5* 皆為 glucose transporter (Ozcan and Johnston, 1999; Diderich et al., 2001)，會依環境營養所需，傳送不同形式之醣類。*YGR138c/TPO2* 為 polyamines transporters，(Albertsen et al., 2003)，將多餘之毒性 polyamines 傳送至細胞外或轉換成另一形式之物質存在 (Bower and Mulvey, 2006)。當 *TRP5* 缺失時，推測可能造成酵母菌處於營養貧瘠狀態，在能量缺乏時，醣類及多聚胺類運輸者能力也下降。

(2) 代謝相關基因 (metabolism)：

包括碳水化合物代謝相關、與肝醣生合成及代謝相關及與調節酵素活性相關。碳水化合物代謝相關之基因有 *YFR053c/HXK1* 及 *YGR248w/SOL4*；*HXK1* 為 hexokinase isoenzyme 1，參與葡萄糖代謝過程，具磷酸化葡萄糖之活性，與 glucose uptake 相關 (Lobo and Maitra, 1977)；*SOL4* 為 6-phosphogluconolactonase，參與五碳醣磷酸化途徑 (PPP) (Stanford et al., 2004)。

與肝醣生合成及代謝相關有 *YEL011w/GLC3*、*YIL099w/SGA1* 及 *YPR160w/GPH1*，*GLC3* 為 glycogen branching enzyme，會使肝醣累積，*SGA1* 為 sporulation-specific glucoamylase，*GPH1* 為 glycogen phosphorylase，皆參與肝醣代謝過程 (Yamashita and Fukui, 1985; Hwang et al., 1989; Thon et al., 1992)，環境中葡萄糖缺乏時，會開始轉換累積肝醣，做為貯存性之醣類。當 *TRP5* 缺失，可能造成醣類代謝能力下降，推測 *trp5* 在利用醣類之效力減低，導致無法累積能量。

與調節酵素活性相關之基因為 *YGR008c/STF2* 及 *YDL181w/INH1* 參與調控粒線體 F1F0-ATP 合成酶 (ATP synthase)，*INH1* 會抑制 ATP 水解作用，*STF2* 為 stabilizing factors，可提高 *INH1* 之抑制效果 (Dienhart et al., 2002)。

(3) 細胞生長相關基因 (cellular processes)，為細胞壁組成相關之基因，包括 *YDL222c/FMP45*、*YGL027c/CWH41*、*YER150w/SPI1*、*YNL160w/YGPI*。*FMP45* 為 integral membrane protein 1，參與酵母菌維持 sphingolipid 含量及產孢過程

(Jiang et al., 1996), *CWH41* 為位於內質網之 glucosidase I (Jiang et al., 1996), *SPII* 為 glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell wall protein (CWP) family (Simoes et al., 2006), *YGPI* 為 Cell wall-related secretory glycoprotein (Destruelle et al., 1994), 目前已知皆與細胞壁合成有關。研究指出酵母菌細胞壁之構型與對抗環境逆境相關, 例如: *SPII* 參與親脂性微酸除草劑 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 之耐受性, 其對 2,4-D 之適應性, 是因 *SPII* 參與改變細胞壁的構型, 重塑細胞壁, 使之多孔性 (porosity) 減少, 讓膜傷害降低來抵抗除草劑逆境 (Lagorce et al., 2003)。當 *TRP5* 缺失時, 推測可能造成內質網分泌系統及細胞壁組成相關的蛋白質異常, 而影響細胞壁構成之完整性, *trp5*Δ 的膜構造可能鬆散或不完整, 而無法有效抵擋 H₂O₂ 之氧化及其他逆境。

(4) 未知功能基因群 (unknown):

在酵母菌正常生長條件下, *TRP5* 缺乏所影響之基因, 有許多為未知功能基因, 其中有些基因, *trp5*Δ 與 WT 相比其表現倍率相差 3 倍以上之多, 例如: *YDR070c*、*YKL071w*、*YML128c*, 未來亦對於倍率具明顯差異之基因進一步探討。

4.3.2.2 *trp5* 在酵母菌遭遇氧化逆境時所影響之基因群表現

(1) 環境相關訊息過程基因 (environmental information processing):

包括與氧化及其他逆境相關、與細胞運輸相關之基因。與逆境相關包括, 轉錄因子: *YDR423c/CAD1* 及 *YOR162c/YRRI*, *CAD1* 為 AP-1-like basic leucine zipper (bZIP) transcriptional activator, 參與逆境反應 iron metabolism drug and metal resistance (Wu et al., 1993); *YRRI* 為 Zn²⁺-Cys₆ zinc-finger transcription factor, 參與 multidrug 抗性 (Cui et al., 1998)。*YPL240c/HSP90* 為 heat shock protein Hsp90, 具 chaperone 活性 (Gross et al., 1990), *YDR258c/HSP78* 為 mitochondrial heat shock protein, 具 thermotolerance, 可防止 misfolded matrix proteins 產生 (Leonhardt et al., 1993), *YOL151w/GRE2* 為 3-methylbutanal reductase 及 NADPH-dependent methylglyoxal reductase, 會被多種逆境引導包括 osmotic、oxidative、heat shock 及 heavy metals, *YLR205c/HMX1* 為 heme-binding peroxidase, 調控粒線體離子平衡 (Protchenko and Philpott, 2003)。推測 *trp5*Δ 對氧化逆境之敏感性, 是其內之逆境相關基因, 包括相關轉錄因子及 heat shock protein 表現量低, 造成逆境傷

害或連帶之影響，而無法有效抵擋氧化逆境。

與氧化逆境相關包括，*YKL026c/GPX1* 為 phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase，會受 glucose starvation 誘導 (Avery and Avery, 2001)，*YKR066c/CCP1* 為 mitochondrial cytochrome-c peroxidase，會清除粒線體中的 ROS，參與氧化逆境 (Charizanis et al., 1999)，*YJL101c/GSH1* 為 gamma glutamylcysteine synthetase 參與合成 GSH (Kistler et al., 1990)，*YNR074c/AIF1* mitochondrial cell death effector，會 translocates 至細胞核，並反應抵抗 apoptotic stimuli (Wissing et al., 2004)，*YBL064c/PRX1* 為 mitochondrial peroxiredoxin (1-Cys Prx)，具 thioredoxin peroxidase 活性，與細胞氧化還原平衡相關 (Pedrajas et al., 2000)。

與細胞運輸相關之基因有：vesicle-mediated transport 有 *YDR003w/RCR2* 及 *YER143w/DDI1*，*RCR2* 參與 endosomal-vacuolar trafficking pathway，決定細胞膜蛋白降解或形成細胞膜，影響 plasma membrane transporter activity (Kota et al., 2007)；*DDI1* 為 DNA damage-inducible v-SNARE binding protein (Liu et al., 1997)，*YPR201w/ARR3* 為 arsenite transporter，影響 arsenic compounds 之抗性 (Wysocki et al., 1997)。

(2) 代謝相關基因 (metabolism)：

包括碳水化合物代謝相關、與胺基酸代謝相關、與酵素活性相關、與 NAD 代謝相關及與酒精代謝相關之基因。碳水化合物代謝相關之 *YBR117c/TKL2*，為 transketolase，會將酮醣轉變成醛醣，參與 pentose phosphate pathway。與胺基酸代謝相關之 *YFL030w/AGX1*，為 alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)，會合成 glycine (Schlosser T, et al. 2004)，與酵素活性相關 (energy metabolism) 之 *YER175c/TMT1*，為 trans-aconitate methyltransferase，參與 leucine biosynthetic pathway (Cai H, et al., 2001)，與 NAD 代謝相關 (NAD metabolic process) 之 *YGR010w/NMA2*，為 nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase，而 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 為維持細胞間氧化還原之必需的 cofactor 及能量之來源，參與多種重要之生理過程，與酒精代謝相關之 *YLR251w/SYMI*，會被 heat shock 誘導 (Trott A and Morano KA, 2004)。

(3)細胞生長相關基因 (cellular processes) :

包括與孢子形成成熟相關及與細胞自噬相關。*YHR139c/SPS100*，與孢子形成成熟相關。*YPL166w/ATG29* 及 *YBL078c/ATG8* 與細胞自噬相關 (autophagy)，*ATG29* 為 autophagy-specific protein，與 pre-autophagosomal structure 相關；*ATG8* 為 autophagy 運輸過程相關，影響 autophagosomes 之組成大小 (Kirisako et al., 1999)。

(4)其他相關訊息基因 (others processing) 中與蛋白質降解相關，包括 *YLL039w/UBI4*，為 ubiquitin，將蛋白經由 ubiquitin-26S proteasome system 降解，與 cellular stress response 相關 (Finley D, et al., 1987)，*YBR280c/SAF1* 為 F-Box protein，參與 proteasome-dependent degradation (Escusa S, et al., 2006)

(5)未知功能基因群 (unknown)。

未來仍對於表現具差異之未知功能基因做深入研究。

從微陣列之結果顯示，在正常條件下，缺乏 *TRP5* 即造成 *trp5*△ 本身在膜構造及抗逆境相關基因之表現下降，而在氧化逆境下，其抗氧化及其他逆境之基因也是呈現表現低落，亦以 qRT-PCR 驗證部分抗氧化相關基因，其結果與微陣列結果一致，推測可能 *trp5*△ 其抗氧化機制受到阻礙或影響，造成對氧化逆境敏感之原因；除此之外，亦從微陣列之結果看到，與氧化還原相關基因 (碳水化合物代謝相關及 NAD 代謝相關)、蛋白質降解相關基因、細胞自噬相關基因及細胞運輸相關基因，也在 *trp5* 中表現量呈現下降，推測可能 *trp5*△ 自身調控氧化還原之能力較弱，在遭遇氧化逆境，*trp5*△ 無法藉由蛋白質降解、細胞自噬及細胞運輸過程，來移除大量之 ROS 造成之損壞物質，亦缺乏了移除危機之能力，但其推論仍需進一步加以驗證 (附錄六)，來將對於具表現量差異之基因，進行遺傳分子之檢驗，並更深入了色胺酸對酵母菌氧化逆境之角色。

第五章 未來展望

針對 *YGR021w* (DUF28 family) 之功能分析，(1) 首先要確定其蛋白質座落位置 (protein localization)，利用螢光物質或抗體標定方式，來確認是否為粒線體蛋白，從其蛋白存在位置進而檢測 *YGR021w* 可能之功能，包括與氧化逆境之關係；(2) 在 H_2O_2 逆境下，*YGR021w*△ 具較高之耐受性，應另選用其他更穩定之氧化劑，來處理誘發氧化逆境，以得到最接近細胞遭受氧化逆境之真實情況，再利用生物化學方式，來檢測 *YGR021w*△ 細胞內 ROS、抗氧化酵素及抗氧化物之含量，並使用顯微鏡來觀察 *YGR021w*△ 細胞外觀型態 (例如孢子大小等) 及內部構造 (例如細胞核及粒線體之完整性)，來支持經遺傳分子及微陣列實驗得到之結果；(3) 在微陣列實驗中，應進一步利用 qRT-PCR 及突變菌株，來驗證所篩選出之有興趣基因，是否參與氧化逆境，進而釐清 *YGR021w* 在已知 biological process 途徑中可能扮演之角色，且微陣列結果應再與現有之氧化逆境相關之微陣列資料庫，進行相同異之基因群比較，期能於相異處找到其他具新穎之基因；(4) 已驗證細胞自噬作用之 *ATG15*、調控 filamentous growth 及 pheromone response 之 *KSS1* 及未知功能基因 *YLR164w*，應於 *YGR021w*△ 分別探討其相關性，以及與抗氧化逆境之關係；(5) 多方面探討 *YGR021w* 之功能，例如 cell cycle 之調控亦與抵抗逆境相關，可檢測 *YGR021w*△ 是否造成有絲分裂及減數分裂過程異常等。

針對色胺酸 (tryptophan) 生合成與氧化逆境之功能分析，與 *YGR021w* (DUF28 family) 之未來功能分析具相同部分；(1) 選擇其他更穩定之氧化劑，並利用生物化學方式，檢測 *trp5*△ 或其他參與色胺酸生合成酵素之突變株，其細胞內 ROS、抗氧化酵素及抗氧化物之含量，以及細胞外觀型態 (例如膜構造改變等) 及內部構造 (例如細胞核及粒線體之完整性)，來支持經遺傳分子及微陣列實驗得到之結果；(2) 應進一步利用 qRT-PCR 及突變菌株，來驗證微陣列實驗所篩選出之有興趣基因，進而釐清色胺酸在氧化逆境所扮演之角色，且微陣列結果應再與現有之氧化逆境相關之微陣列資料庫，進行相同異之基因群比較，期能於相異處找到其他具新穎之基因；(3) 於 *trp5*△ 大量表現色胺酸 permease，來檢測細胞吸收利用色胺酸能力增加，是否會回復 *trp5*△ 在氧化逆境下之敏感性。

參考文獻

- Albertsen, M., Bellahn, I., Kramer, R., and Waffenschmidt, S.** (2003). Localization and function of the yeast multidrug transporter Tpo1p. *J Biol Chem* **278**, 12820-12825.
- Avery, A.M., and Avery, S.V.** (2001). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **276**, 33730-33735.
- Bauer, B.E., Rossington, D., Mollapour, M., Mamnun, Y., Kuchler, K., and Piper, P.W.** (2003). Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *Eur J Biochem* **270**, 3189-3195.
- Bentley, N.J., Fitch, I.T., and Tuite, M.F.** (1992). The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast* **8**, 95-106.
- Bower, J.M., and Mulvey, M.A.** (2006). Polyamine-mediated resistance of uropathogenic *Escherichia coli* to nitrosative stress. *J Bacteriol* **188**, 928-933.
- Castro, F.A., Mariani, D., Panek, A.D., Eleutherio, E.C., and Pereira, M.D.** (2008). Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **3**, e3999.
- Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B., and Entian, K.D.** (1999). The mitochondrial cytochrome c peroxidase *Ccp1* of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in conveying an oxidative stress signal to the transcription factor *Pos9* (*Skn7*). *Mol Gen Genet* **262**, 437-447.
- Choi, J.H., Lou, W., and Vancura, A.** (1998). A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 29915-29922.
- Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J., and Moye-Rowley, W.S.** (2001). Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 244-250.
- Cook, J.G., Bardwell, L., and Thorner, J.** (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**, 85-88.
- Costa, V., and Moradas-Ferreira, P.** (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* **22**, 217-246.
- Costa, V., Amorim, M.A., Reis, E., Quintanilha, A., and Moradas-Ferreira, P.** (1997). Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143** (Pt 5), 1649-1656.
- Cui, Z., Shiraki, T., Hirata, D., and Miyakawa, T.** (1998). Yeast gene *YRRI*, which is required for resistance to 4-nitroquinoline N-oxide, mediates transcriptional activation of the multidrug resistance transporter gene *SNQ2*. *Mol Microbiol* **29**, 1307-1315.
- Culotta, V.C., Yang, M., and O'Halloran, T.V.** (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 747-758.

- Davidson, J.F., Whyte, B., Bissinger, P.H., and Schiestl, R.H.** (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A **93**, 5116-5121.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B.** (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. Cell **111**, 471-481.
- Destruelle, M., Holzer, H., and Klionsky, D.J.** (1994). Identification and characterization of a novel yeast gene: the *YGP1* gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation. Mol Cell Biol **14**, 2740-2754.
- Diderich, J.A., Schuurmans, J.M., Van Gaalen, M.C., Kruckeberg, A.L., and Van Dam, K.** (2001). Functional analysis of the hexose transporter homologue *HXT5* in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast **18**, 1515-1524.
- Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H., and Stuart, R.A.** (2002). Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. J Biol Chem **277**, 39289-39295.
- Dormer, U.H., Westwater, J., Stephen, D.W., and Jamieson, D.J.** (2002). Oxidant regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *GSH1* gene. Biochim Biophys Acta **1576**, 23-29.
- Eckert, J.H., and Johnsson, N.** (2003). Pex10p links the ubiquitin conjugating enzyme Pex4p to the protein import machinery of the peroxisome. J Cell Sci **116**, 3623-3634.
- Eisler, H., Frohlich, K.U., and Heidenreich, E.** (2004). Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. Exp Cell Res **300**, 345-353.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W.** (1990). Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. Genes Dev **4**, 740-751.
- Evans, P., and Halliwell, B.** (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. Br J Nutr **85 Suppl 2**, S67-74.
- Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Rodel, G., and Krause-Buchholz, U.** (2008). Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. J Biol Chem **283**, 9759-9767.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S.** (2003). Global analysis of protein expression in yeast. Nature **425**, 737-741.
- Gonzalez-Parraga, P., Sanchez-Fresneda, R., Martinez-Esparza, M., and Arguelles, J.C.** (2008). Stress responses in yeasts: what rules apply? Arch Microbiol **189**, 293-296.
- Gross, D.S., Adams, C.C., English, K.E., Collins, K.W., and Lee, S.** (1990). Promoter function and in situ protein/DNA interactions upstream of the yeast *HSP90* heat shock genes. Antonie Van Leeuwenhoek **58**, 175-186.
- Hahne, K., Haucke, V., Ramage, L., and Schatz, G.** (1994). Incomplete arrest in the outer membrane sorts NADH-cytochrome b5 reductase to two different submitochondrial compartments. Cell **79**, 829-839.
- Hancock, R.D., Galpin, J.R., and Viola, R.** (2000). Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett **186**, 245-250.

- Herrero, E., Ros, J., Belli, G., and Cabicol, E.** (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1217-1235.
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., and Gurvitz, A.** (2003). The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 35-64.
- Hirasawa, T., Yoshikawa, K., Nakakura, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H., and Shioya, S.** (2007). Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *J Biotechnol* **131**, 34-44.
- Hirayama, T., Maeda, T., Saito, H., and Shinozaki, K.** (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (*HOR*) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **249**, 127-138.
- Hwang, P.K., Tugendreich, S., and Fletterick, R.J.** (1989). Molecular analysis of *GPH1*, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **9**, 1659-1666.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., and Kimura, A.** (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**, 27002-27009.
- Izawa, S., Inoue, Y., and Kimura, A.** (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **320 (Pt 1)**, 61-67.
- Izawa, S., Maeda, K., Miki, T., Mano, J., Inoue, Y., and Kimura, A.** (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **330 (Pt 2)**, 811-817.
- Jensen, L.T., Sanchez, R.J., Srinivasan, C., Valentine, J.S., and Culotta, V.C.** (2004). Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* iron-sulfur cluster assembly genes and oxidative stress relevant to Cu,Zn superoxide dismutase. *J Biol Chem* **279**, 29938-29943.
- Jiang, B., Sheraton, J., Ram, A.F., Dijkgraaf, G.J., Klis, F.M., and Bussey, H.** (1996). *CWH41* encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in beta 1,6-glucan assembly. *J Bacteriol* **178**, 1162-1171.
- Jin, S.** (2006). Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy* **2**, 80-84.
- Kerscher, O., Sepuri, N.B., and Jensen, R.E.** (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* **11**, 103-116.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* **147**, 435-446.
- Kistler, M., Maier, K., and Eckardt-Schupp, F.** (1990). Genetic and biochemical analysis of glutathione-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis* **5**, 39-44.
- Kobayashi, N., McClanahan, T.K., Simon, J.R., Treger, J.M., and McEntee, K.** (1996). Structure and functional analysis of the multistress response gene *DDR2* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 540-547.
- Kosower, N.S., and Kosower, E.M.** (1995). Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol* **251**, 123-133.

- Kota, J., Melin-Larsson, M., Ljungdahl, P.O., and Forsberg, H.** (2007). Ssh4, *Rcr2* and *Rcr1* affect plasma membrane transporter activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**, 1681-1694.
- Kurtz, J.E., Exinger, F., Erbs, P., and Jund, R.** (1999). New insights into the pyrimidine salvage pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of six genes for cytidine metabolism. *Curr Genet* **36**, 130-136.
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D., and Francois, J.** (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 20345-20357.
- Leonhardt, S.A., Fearson, K., Danese, P.N., and Mason, T.L.** (1993). HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol Cell Biol* **13**, 6304-6313.
- Liang, H., Li, L., Dong, Z., Surette, M.G., and Duan, K.** (2008). The YebC family protein *PA0964* negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *J Bacteriol* **190**, 6217-6227.
- Liu, Y., Dai, H., and Xiao, W.** (1997). UAS(MAG1), a yeast cis-acting element that regulates the expression of *MAG1*, is located within the protein coding region of *DDII*. *Mol Gen Genet* **255**, 533-542.
- Lobo, Z., and Maitra, P.K.** (1977). Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **182**, 639-645.
- Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Thompson, M.J., Yeates, T.O., and Eisenberg, D.** (1999). A combined algorithm for genome-wide prediction of protein function. *Nature* **402**, 83-86.
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M., and Sakai, A.** (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev* **15**, 1217-1228.
- Muhlenhoff, U., Stadler, J.A., Richhardt, N., Seubert, A., Eickhorst, T., Schweyen, R.J., Lill, R., and Wiesenberger, G.** (2003). A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J Biol Chem* **278**, 40612-40620.
- Munhoz, D.C., and Netto, L.E.** (2004). Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. *J Biol Chem* **279**, 35219-35227.
- Oyedotun, K.S., and Lemire, B.D.** (2004). The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *J Biol Chem* **279**, 9424-9431.
- Ozcan, S., and Johnston, M.** (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 554-569.
- Papp, E., Nardai, G., Soti, C., and Csermely, P.** (2003). Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors* **17**, 249-257.
- Park, S.G., Cha, M.K., Jeong, W., and Kim, I.H.** (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 5723-5732.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B., and Francois, J.** (1999). Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 191-203.

- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizueté, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.A., and Spyrou, G.** (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* **275**, 16296-16301.
- Protchenko, O., and Philpott, C.C.** (2003). Regulation of intracellular heme levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 36582-36587.
- Purdue, P.E., and Lazarow, P.B.** (2001). Peroxisome biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 701-752.
- Raha, S., and Robinson, B.H.** (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* **25**, 502-508.
- Rodriguez-Vargas, S., Sanchez-Garcia, A., Martinez-Rivas, J.M., Prieto, J.A., and Rande-Gil, F.** (2007). Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl Environ Microbiol* **73**, 110-116.
- Sabbagh, W., Jr., Flatauer, L.J., Bardwell, A.J., and Bardwell, L.** (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8**, 683-691.
- Scandalios, J.G.** (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* **38**, 995-1014.
- Semenza, G.L.** (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* **405**, 1-9.
- Simoés, T., Mira, N.P., Fernandes, A.R., and Sa-Correia, I.** (2006). The *SPII* gene, encoding a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein, plays a prominent role in the development of yeast resistance to lipophilic weak-acid food preservatives. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7168-7175.
- Slekar, K.H., Kosman, D.J., and Culotta, V.C.** (1996). The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J Biol Chem* **271**, 28831-28836.
- Smith, D.A., Nicholls, S., Morgan, B.A., Brown, A.J., and Quinn, J.** (2004). A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**, 4179-4190.
- Stanford, D.R., Whitney, M.L., Hurto, R.L., Eisaman, D.M., Shen, W.C., and Hopper, A.K.** (2004). Division of labor among the yeast Sol proteins implicated in tRNA nuclear export and carbohydrate metabolism. *Genetics* **168**, 117-127.
- Takagi, H.** (2008). Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 211-223.
- Takagi, H., Iwamoto, F., and Nakamori, S.** (1997). Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**, 405-411.
- Takagi, H., Sakai, K., Morida, K., and Nakamori, S.** (2000). Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **184**, 103-108.

- Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L.** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1005-1028.
- Thon, V.J., Vigneron-Lesens, C., Marianne-Pepin, T., Montreuil, J., Decq, A., Rachez, C., Ball, S.G., and Cannon, J.F.** (1992). Coordinate regulation of glycogen metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of glycogen branching enzyme. *J Biol Chem* **267**, 15224-15228.
- Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., and Dawes, I.W.** (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6564-6569.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Asakawa, T., Kakinuma, Y., Michael, A.J., and Igarashi, K.** (2001). Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. *Biochem J* **353**, 681-688.
- Traczyk, A., Bilinski, T., Litwinska, J., Skoneczny, M., and Rytka, J.** (1985). Catalase T deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Pol* **34**, 231-241.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y.** (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-174.
- Tsuzi, D., Maeta, K., Takatsume, Y., Izawa, S., and Inoue, Y.** (2004). Distinct regulatory mechanism of yeast *GPX2* encoding phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase by oxidative stress and a calcineurin/Crz1-mediated Ca^{2+} signaling pathway. *FEBS Lett* **569**, 301-306.
- Turrens, J.F.** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335-344.
- Wallis, C., and Wilkie, D.** (1979). Mitochondrial activity of 2,6-diaminopurine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **173**, 307-313.
- Werner-Washburne, M., Stone, D.E., and Craig, E.A.** (1987). Complex interactions among members of an essential subfamily of *hsp70* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 2568-2577.
- White, W.H., Skatrud, P.L., Xue, Z., and Toyn, J.H.** (2003). Specialization of function among aldehyde dehydrogenases: the *ALD2* and *ALD3* genes are required for beta-alanine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**, 69-77.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S.J., Kroemer, G., and Madeo, F.** (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **166**, 969-974.
- Wu, A., Wemmie, J.A., Edgington, N.P., Goebel, M., Guevara, J.L., and Moye-Rowley, W.S.** (1993). Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* **268**, 18850-18858.
- Wysocki, R., Bobrowicz, P., and Ulaszewski, S.** (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* *ACR3* gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* **272**, 30061-30066.
- Yamashita, I., and Fukui, S.** (1985). Transcriptional control of the sporulation-specific glucoamylase gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**, 3069-3073.
- Zalkin, H., and Yanofsky, C.** (1982). Yeast gene *TRP5*: structure, function, regulation. *J Biol Chem* **257**, 1491-1500.

Zhang, Y., Qi, H., Taylor, R., Xu, W., Liu, L.F., and Jin, S. (2007). The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Autophagy* **3**, 337-346.



表一、使用酵母菌菌株及質體 (Yeast strains and plasmid used in this work)

Strains/plasmid	Genotype/Annotation	Source
plasmid		
pADNS	<i>S.cerevisiae-E.coli</i> multicopy shuttle plasmid marked with <i>LEU2</i>	Colicelli et al.,1989
Strains		
Wild-type BY4741 (WT)	MATa, his3 ⁻ 1, leu ⁻ 0, met15 ⁻ 0, ura ⁻ 0	Open Biosystems, U.S.A.
BY4741:: <i>YGR021w</i> (<i>YGR021w</i> ⁺)	BY4741, MATa, his3 ⁻ 1, leu ⁻ 0, met15 ⁻ 0, ura ⁻ 0 <i>YGR021w</i> ::KanMX	Open Biosystems, U.S.A.
BY4741:: <i>YGL026c/trp5</i> (<i>trp5</i> ⁻)	BY4741, MATa, his3 ⁻ 1, leu ⁻ 0, met15 ⁻ 0, ura ⁻ 0 <i>YGL026c</i> ::KanMX	Open Biosystems, U.S.A.
WT strain containing vector (WT ^c)	轉入 pADNS 質體至 Wild-type, 細節參照材料與方法	This study
<i>YGR021w</i> overexpression strain (WT ^{<i>YGR021w</i>})	轉入 pADNS- <i>YGR021w</i> 質體至 Wild-type, 細節參照材料與方法	This study
<i>YGR021w</i> -deleted strain containing vector (<i>YGR021w</i> ⁻)	轉入 pADNS 質體至 <i>YGR021w</i> ⁻ , 細節參照材料與方法	This study
<i>YGR021w</i> complemetation strain (<i>YGR021w</i> ⁻ <i>YGR021w</i> ⁺)	轉入 pADNS- <i>YGR021w</i> 質體至 <i>YGR021w</i> ⁻ , 細節參照材料與方法	This study
<i>TRP5</i> overexpression strain (WT ^{<i>TRP5</i>})	轉入 pADNS- <i>TRP5</i> 質體至 Wild-type, 細節參照材料與方法	This study
<i>TRP5</i> -deleted strain containing vector (<i>TRP5</i> ⁻)	轉入 pADNS 質體至 <i>trp5</i> ⁻ , 細節參照材料與方法	This study
<i>TRP5</i> complemetation strain (<i>trp5</i> ⁻ <i>TRP5</i> ⁺)	轉入 pADNS- <i>TRP5</i> 質體至 <i>trp5</i> ⁻ , 細節參照材料與方法	This study

表二、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *YGR021w* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>YGR021w</i> -T/ <i>YGR021w</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Environmental information processing					
Response to stress					
<i>YBR072W</i>	Small heat shock protein (sHSP) 26 with chaperone activity	4.3	4.9	5.2	5.3
<i>YCR021C</i>	Heat shock protein 30	3.1	48.9	14.9	51.4
<i>YER103W</i>	Heat shock protein that is highly induced upon stress	4.0	7.0	6.8	7.3
<i>YFL053W</i>	Dihydroxyacetone kinase	3.9	5.0	4.7	7.4
<i>YGR197C</i>	Protein involved in nitrosoguanidine (MNNG) resistance	1.5	1.9	2.2	2.4
<i>YMR169C</i>	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase	4.1	7.7	6.6	13.0
<i>YNL234W</i>	Similar to globins and has a functional heme-binding domain	1.2	1.3	1.7	1.6
<i>YPL223C</i>	Hydrophilin of unknown function; stress induced	1.3	2.0	1.5	2.4
Response to oxidative stress					
<i>YDR256C</i>	Catalase A	3.9	9.3	7.2	10.1
<i>YGR088W</i>	Cytosolic catalase T	3.5	6.2	5.1	7.9
<i>YKL086W</i>	Sulfiredoxin	4.8	59.9	17.2	69.9
<i>YMR250W</i>	Glutamate decarboxylase	1.7	2.0	1.8	2.3
Transporters					
<i>YHR048W</i>	Presumed antiporter of the DHA1 family of multidrug resistance transporters	3.5	14.3	10.1	18.2
<i>YGR138C</i>	Polyamine transport protein specific for spermine	1.2	2.5	2.1	2.7
<i>YKL188C</i>	Subunit of a heterodimeric peroxisomal ATP-binding cassette transporter complex (Pxa1p-Pxa2p)	1.4	1.3	1.5	1.9
<i>YNR034W</i>	Protein with a possible role in tRNA export	1.4	1.6	1.9	1.7
<i>YOL119C</i>	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases	1.8	2.8	2.3	3.0

表二、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *YGR021w* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>YGR021w</i> -T/ <i>YGR021w</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Metabolism					
Carbohydrate metabolism					
<i>YEL011W</i>	Glycogen branching enzyme, involved in glycogen accumulation	1.5	1.5	1.7	2.0
<i>YGR256W</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating),	1.9	3.6	2.9	4.6
Amino acid metabolism					
<i>YLL060C</i>	Glutathione S-transferase capable of homodimerization	6.4	19.7	13.9	22.4
<i>YMR251W</i>	Omega class glutathione transferase	1.4	1.9	2.0	2.4
<i>YGL184C</i>	Cystathionine beta-lyase	1.1	1.5	1.7	1.9
<i>YKL218C</i>	3-hydroxyaspartate dehydratase	1.5	1.5	1.5	1.8
<i>YHR137W</i>	Aromatic aminotransferase	1.4	2.5	1.5	2.8
<i>YBR183W</i>	Alkaline ceramidase	1.5	1.3	1.7	1.7
<i>YFL030W</i>	Alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)	2.7	5.9	5.1	9.1
DNA metabolism					
<i>YLR245C</i>	Cytidine deaminase	1.2	1.7	1.7	1.8
<i>YIL066C</i>	Ribonucleotide-diphosphate reductase	1.2	1.6	1.8	2.0
Cellular processes					
Cell growth					
Ascospore formation					
<i>YDR403W</i>	Sporulation-specific enzyme required for spore wall maturation	2.2	1.5	2.0	1.8
<i>YNL194C</i>	Integral membrane protein required for sporulation and plasma membrane sphingolipid content	3.2	8.3	6.3	10.5

表二、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *YGR021w* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>YGR021w</i> -T/ <i>YGR021w</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Cellular processes					
Filamentous growth					
<i>YPL203W</i>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit	2.0	2.9	2.3	3.0
<i>YGR249W</i>	Protein similar to heat shock transcription factor	2.4	1.3	3.0	1.7
Actin filament organization					
<i>YDL161W</i>	Epsin-like protein involved in endocytosis and actin patch assembly	1.5	1.5	1.5	1.7
<i>YHR016C</i>	Protein involved in the organization of the actin cytoskeleton	1.4	2.0	1.6	2.2
Cell wall synthesis					
<i>YOR134W</i>	Rho GTPase activating protein (RhoGAP)	1.1	1.3	1.9	1.9
Autophagy					
<i>YCR068W</i>	Lipase required for intravacuolar lysis of autophagic bodies and Cvt bodies	1.0	1.7	1.5	2.3
<i>YPL149W</i>	Conserved protein involved in autophagy and the Cvt pathway	1.7	1.4	1.9	1.5
Others processing					
Protein ubiquitination					
<i>YDR255C</i>	Conserved protein that has an E3-like ubiquitin ligase	1.7	1.9	2.0	2.3
<i>YDR265W</i>	Peroxisomal membrane E3 ubiquitin ligase	1.3	1.4	1.6	1.5
<i>YGL227W</i>	Protein involved in proteasome-dependent catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase	1.5	1.9	1.7	2.6
<i>YLR102C</i>	Subunit of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C)	1.4	1.7	1.5	1.8
<i>YOR018W</i>	Membrane protein that binds the ubiquitin ligase Rsp5p via its 2 PY motifs	1.3	1.9	1.6	2.1

表二、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *YGR021w* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>YGR021w</i> -T/ <i>YGR021w</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
RNA process					
<i>YDL087C</i>	Essential protein associated with the U1 snRNP complex	1.3	1.2	1.5	2.0
MAP kinase activity					
<i>YGR040W</i>	Mitogen-activated protein kinase involved in signal transduction pathways that control filamentous growth and pheromone response	1.2	1.6	1.5	1.8
Kinase activity					
<i>YJL141C</i>	Serine-threonine protein kinase that is part of a glucose-sensing system involved in growth control in response to glucose availability	1.4	2.0	1.6	2.2
<i>YGL059W</i>	Mitochondrial protein kinase that negatively regulates activity of the pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylating the ser-133 residue of the Pda1p subunit	1.8	2.0	2.1	2.4
Unknown					
<i>YAR023C</i>	Putative integral membrane protein, member of DUP240 gene family	1.4	1.7	1.9	2.1
<i>YBR047W</i>	Putative protein of unknown function	3.6	5.8	5.3	6.4
<i>YDL180W</i>	Putative protein of unknown function	1.1	1.6	1.5	2.0
<i>YDR042C</i>	Putative protein of unknown function	1.5	2.5	1.6	2.9
<i>YDR070C</i>	Putative protein of unknown function	3.3	4.1	4.6	5.2
<i>YDR222W</i>	Protein of unknown function	2.1	7.9	4.3	8.6
<i>YER037W</i>	Protein of unknown function	2.7	3.8	3.6	4.3
<i>YIR039C</i>	Putative GPI-anchored aspartic protease	1.7	2.5	2.5	3.2
<i>YGL004C</i>	Putative non-ATPase subunit of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome	1.5	1.9	1.5	2.0
<i>YER067W</i>	Putative protein of unknown function	4.2	2.7	6.2	3.5
<i>YBL043W</i>	Non-essential protein of unknown function	2.7	1.2	3.2	2.5
<i>YPL250C</i>	Protein of unknown function	2.3	2.9	3.4	3.1

表二、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *YGR021w* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>YGR021w</i> -T/ <i>YGR021w</i> -C		
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2	
Unknown	<i>YPL250C</i>	Protein of unknown function	2.3	2.9	3.4	3.1
	<i>YGL117W</i>	Putative protein of unknown function	1.3	1.3	1.7	1.9
	<i>YPL230W</i>	Putative transcription factor containing a C ₂ H ₂ zinc finger	1.7	1.9	2.2	2.2
	<i>YJL057C</i>	Putative serine/threonine kinase	2.3	3.8	3.0	4.2
	<i>YKL023W</i>	Putative protein of unknown function	1.5	1.6	1.7	1.7
	<i>YLR154W-E</i>	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein	1.5	1.3	1.7	1.5
	<i>YJL165C</i>	Putative protein kinase	1.5	2.2	1.8	2.4
	<i>YLR164W</i>	Mitochondrial inner membrane of unknown function	1.2	1.8	2.0	2.8
	<i>YMR135C</i>	Protein of unknown function	1.6	1.5	1.7	1.6
	<i>YDR222W</i>	Protein of unknown function	1.9	1.8	2.3	2.0
	<i>YMR090W</i>	Protein of unknown function	3.7	5.9	6.0	6.4
	<i>YGR043C</i>	Transaldolase of unknown function	3.9	4.4	5.1	5.0
	<i>YMR140W</i>	Protein of unknown function	1.3	1.8	1.9	2.0
	<i>YMR196W</i>	Putative protein of unknown function	1.5	1.6	1.6	2.0
	<i>YOL084W</i>	Protein of unknown function	1.3	1.3	1.5	2.3
	<i>YOR220W</i>	Protein of unknown function	1.9	1.9	2.2	2.2
	<i>YOR223W</i>	Protein of unknown function	1.0	1.6	1.7	2.2
	<i>YOR289W</i>	Putative protein of unknown function	1.3	1.8	1.6	2.1
	<i>YFL054C</i>	Putative channel-like protein	1.7	1.9	2.1	2.9
	<i>YNR002C</i>	Putative transmembrane protein involved in export of amm	1.4	1.6	1.6	1.7
	<i>YKL064W</i>	Putative magnesium transp	1.4	1.7	1.6	1.8

表三、酵母菌抗氧化微陣列中在正常生長條件下可能受 *TRP5* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT- <i>C/trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2
Environmental information processing			
Response to oxidative stress			
<i>YDR453C</i>	Stress inducible cytoplasmic thioredoxin peroxidase	10.5	2.2
<i>YFL014W</i>	Heat shock protein that protects membranes from desiccation	5.0	10.8
<i>YGR088W</i>	Cytosolic catalase T	1.5	1.5
<i>YKL150W</i>	Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase, involved in ergosterol biosynthesis	1.5	1.5
<i>YMR250W</i>	Glutamate decarboxylase	1.8	3.2
Response to stress			
<i>YBR072W</i>	Small heat shock protein (sHSP) with chaperone activity	1.9	2.9
<i>YER103W</i>	Heat shock protein that is highly induced upon stress	2.7	1.5
<i>YKR076W</i>	Omega class glutathione transferase	2.5	1.5
<i>YEL039C</i>	Cytochrome c isoform 2	2.0	3.0
<i>YBR169C</i>	Member of the heat shock protein 70 (HSP70) family	1.7	1.7
<i>YOL052C-A</i>	Multistress response protein	6.6	7.1
Transporters			
<i>YGR138C</i>	Polyamine transport protein specific for spermine	3.0	1.8
<i>YDR342C</i>	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily	1.8	1.7
<i>YHR096C</i>	Hexose transporter	2.0	3.5
<i>YDR343C</i>	High-affinity glucose transporter of the major facilitator superfamily,	1.8	1.7

表三、酵母菌抗氧化微陣列中在正常生長條件下可能受 *TRP5* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT- <i>C/trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2
Metabolism			
Carbohydrate metabolism			
<i>YFR053C</i>	Hexokinase isoenzyme 1	1.6	4.7
<i>YGR248W</i>	6-phosphogluconolactonase	3.3	3.7
<i>YEL011W</i>	Glycogen branching enzyme, involved in glycogen accumulation	1.9	2.7
<i>YIL099W</i>	Intracellular sporulation-specific glucoamylase involved in glycogen degradation	1.5	1.5
<i>YPR160W</i>	Non-essential glycogen phosphorylase required for the mobilization of glycogen	1.9	6.3
Lipid metabolism			
<i>YER062C</i>	One of two redundant DL-glycerol-3-phosphatases (RHR2/GPP1 encodes the other)	1.5	1.7
Amino acid metabolism			
<i>YFL030W</i>	Alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)	1.8	1.5
Regulation of enzyme activity			
<i>YDL181W</i>	Protein that inhibits ATP hydrolysis by the F1F0-ATP synthase	1.8	2.2
<i>YGR008C</i>	Protein involved in regulation of the mitochondrial F1F0-ATP synthase	1.7	2.0
Enzyme activity			
<i>YOR173W</i>	Non-essential, stress induced regulatory protein containing a HIT (histidine triad) motif	2.3	2.9
Cellular processes			
Cell wall synthesis			
<i>YDL222C</i>	Integral membrane protein localized to mitochondria (untagged protein)	1.8	1.8
<i>YGL027C</i>	Processing alpha glucosidase I	1.8	1.5
<i>YJL116C</i>	Protein that functions with Nca2p to regulate mitochondrial expression of subunits 6 (Atp6p) and 8 (Atp8p) of the Fo-F1 ATP synthase	2.1	3.4

表三、酵母菌抗氧化微陣列中在正常生長條件下可能受 *TRP5* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT- <i>C/trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2
Cellular processes			
Cell wall synthesis			
<i>YER150W</i>	GPI-anchored cell wall protein involved in weak acid resistance	4.6	3.1
<i>YNL160W</i>	Cell wall-related secretory glycoprotein	1.6	2.2
Unkown			
<i>YBR056W</i>	Putative protein of unknown function	1.5	1.6
<i>YDL204W</i>	Putative protein of unknown function	2.7	2.8
<i>YDR034W-B</i>	Putative protein of unknown function	2.6	2.7
<i>YPL017C</i>	Protein of unknown function, required for accurate meiotic chromosome segregation	1.6	2.3
<i>YDR070C</i>	Putative protein of unknown function	4.4	3.8
<i>YER037W</i>	Putative protein of unknown function	2.2	2.3
<i>YIL136W</i>	Putative protein of unknown function	1.6	1.8
<i>YKL071W</i>	Putative protein of unknown function	4.7	1.7
<i>YOR120W</i>	Putative NADP(+) coupled glycerol dehydrogenase	1.5	1.6
<i>YPL230W</i>	Putative transcription factor containing a C ₂ H ₂ zinc finger	1.5	1.5
<i>YLR149C</i>	Putative protein of unknown function	1.5	2.4
<i>YLR297W</i>	Putative protein of unknown function	2.1	1.8
<i>YGR043C</i>	Transaldolase of unknown function	2.1	1.7
<i>YLR327C</i>	Putative protein of unknown function	1.7	2.5
<i>YML128C</i>	Putative protein of unknown function	2.4	3.8
<i>YMR090W</i>	Putative protein of unknown function	2.5	2.2

表三、酵母菌抗氧化微陣列中在正常生長條件下可能受 *TRP5* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT- <i>C/trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2
Unkown			
<i>YMR196W</i>	Putative protein of unknown function	1.6	2.2
<i>YNR034W-A</i>	Putative protein of unknown function	3.7	2.2
<i>YMR181C</i>	Putative protein of unknown function	1.5	1.6
<i>YOL084W</i>	Putative protein of unknown function	1.7	2.1
<i>YOR161C</i>	Putative protein of unknown function	1.5	1.6
<i>YOR289W</i>	Putative protein of unknown function	1.5	1.7
<i>YOR338W</i>	Putative protein of unknown function	1.8	2.3



表四、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *TRP5* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>trp5</i> -T/ <i>trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Environmental information processing					
Response to stress					
<i>YDR043C</i>	Transcriptional repressor that recruits the Cyc8p-Tup1p complex to promoters	4.1	3.7	1.5	1.1
<i>YPR093C</i>	Ubiquitin ligase that modifies and regulates RNA Pol II	2.8	3.5	1.4	1.9
<i>YPL240C</i>	Hsp90 chaperone required for pheromone signaling and negative regulation of Hsf1p; docks with Tom70p for mitochondrial preprotein delivery	2.7	2.6	0.9	1.4
<i>YDR423C</i>	AP-1-like basic leucine zipper (bZIP) transcriptional activator involved in stress responses	2.3	3.3	1.4	1.3
<i>YOL151W</i>	3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase	2.1	3.6	1.1	1.8
<i>YJR048W</i>	Cytochrome c	2.2	2.6	1.5	1.6
<i>YLR205C</i>	ER localized, heme-binding peroxidase involved in the degradation of heme	2.4	2.1	0.9	0.8
<i>YOR162C</i>	Zn2-Cys6 zinc-finger transcription factor that activates genes involved in multidrug resistance	2.6	3.2	1.6	1.4
<i>YDR258C</i>	Oligomeric mitochondrial matrix chaperone	3.9	4.4	0.7	2.0
Response to oxidative stress					
<i>YKL026C</i>	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	2.1	2.6	0.9	1.2
<i>YKR066C</i>	Mitochondrial cytochrome-c peroxidase	2.1	2.8	1.0	1.4
<i>YJL101C</i>	Gamma glutamylcysteine synthetase catalyzes the first step in glutathione (GSH) biosynthesis	2.2	2.9	0.9	1.2
<i>YNR074C</i>	Mitochondrial cell death effector that translocates to the nucleus in response to apoptotic stimuli	2.2	3.4	1.2	1.1
<i>YBL064C</i>	Mitochondrial peroxiredoxin (1-Cys Prx) with thioredoxin peroxidase activity	2.2	3.2	1.0	1.4

表四、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *TRP5* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>trp5</i> -T/ <i>trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Environmental information processing					
Transporters					
<i>YPR201W</i>	Arsenite transporter of the plasma membrane	2.1	3.8	1.2	1.9
<i>YDR003W</i>	Vacuolar protein that presumably functions within the endosomal-vacuolar trafficking pathway	2.7	3.7	1.2	2.0
<i>YLR214W</i>	Ferric reductase and cupric reductase	2.2	2.9	0.8	0.7
<i>YKR052C</i>	Mitochondrial iron transporter of the mitochondrial carrier family (MCF),	2.1	2.9	0.7	1.5
<i>YLL055W</i>	High-affinity cysteine-specific transporter with similarity to the Dal5p family of transporters	2.4	4.8	0.9	1.7
<i>YDR533C</i>	Possible chaperone and cysteine protease with similarity to E. coli Hsp31	2.4	4.5	1.1	1.6
<i>YER143W</i>	DNA damage-inducible v-SNARE binding protein	2.5	2.6	1.2	1.3
<i>YDR003W</i>	Vacuolar protein that presumably functions within the endosomal-vacuolar trafficking pathway	2.7	3.7	1.2	2.0
<i>YHR048W</i>	Presumed antiporter of the DHA1 family of multidrug resistance transporters	3.5	14.3	1.4	1.9
<i>YER053C</i>	Mitochondrial phosphate carrier	2.8	2.7	0.6	1.1
Metabolism					
Carbohydrate metabolism					
<i>YBR117C</i>	Transketolase	2.3	2.9	1.4	0.9
Amino acid metabolism					
<i>YFL030W</i>	Alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)	2.7	5.9	1.2	1.6
Enzyme activity					
<i>YER175C</i>	Trans-aconitate methyltransferase	2.5	2.3	0.8	0.9
<i>YIL164C</i>	Nitrilase, member of the nitrilase branch of the nitrilase superfamily	2.7	3.3	0.9	1.0

表四、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *TRP5* 影響之基因

Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>trp5</i> -T/ <i>trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
NAD metabolic process					
<i>YGR010W</i>	Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase	2.0	2.4	1.3	1.3
Ethanol metabolic process					
<i>YLR251W</i>	Protein required for ethanol metabolism	2.5	3.1	0.8	1.3
Ergosterol metabolic process					
<i>YNR019W</i>	Acyl-CoA:sterol acyltransferase	2.3	2.3	1.3	1.3
Regulation of glycolysis					
<i>YLR345W</i>	Similar to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase enzymes	2.1	2.1	0.9	1.0
Phospholipid biosynthetic process					
<i>YKR067W</i>	Glycerol-3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate-specific sn-1 acyltransferase	2.1	2.5	1.0	1.2
DNA metabolism					
<i>YKR091W</i>	Cytoplasmic protein that, when overexpressed, suppresses the lethality of a rad53 null mutation	2.2	2.2	1.0	0.9
Cellular processes					
Cell growth and develople					
<i>YPL123C</i>	RNAse; member of the T(2) family of endoribonucleases	2.2	2.4	0.9	1.2
<i>YHR139C</i>	Protein required for spore wall maturation	2.3	3.4	1.0	0.9
Autophgy					
<i>YPL166W</i>	Autophagy-specific protein	2.7	2.3	0.6	1.3
<i>YBL078C</i>	Component of autophagosomes and Cvt vesicles	4.5	4.1	0.8	1.8

表四、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *TRP5* 影響之基因

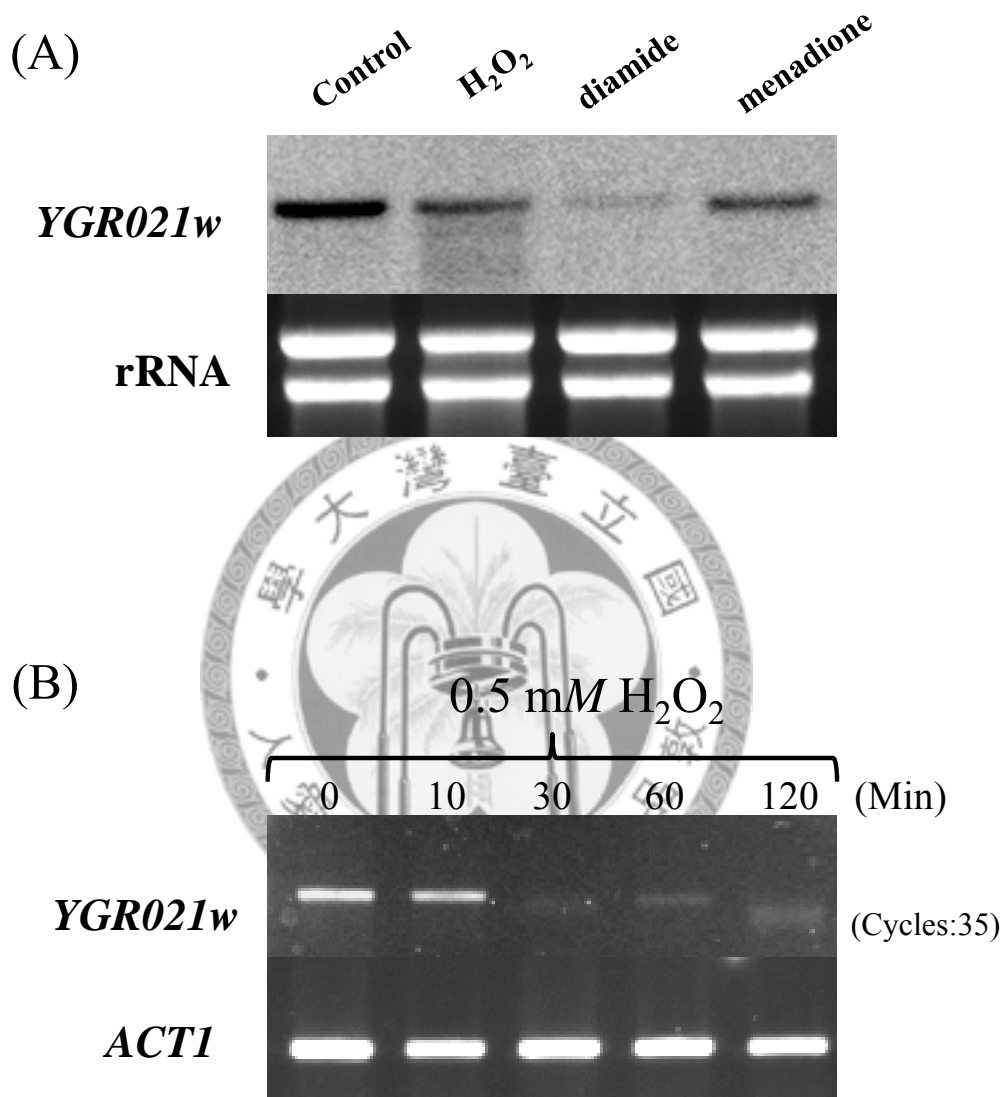
Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>trp5</i> -T/ <i>trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Response to pheromone					
<i>YGL053W</i>	Pheromone-regulated protein	2.2	2.2	0.8	1.2
Others processing					
DNA repair and replication					
<i>YOR386W</i>	DNA photolyase involved in photoreactivation	2.3	3.1	1.0	1.6
Response to unfolded protein					
<i>YMR174C</i>	Cytoplasmic proteinase A (Pep4p) inhibitor	2.9	2.5	0.9	1.6
Protein degradation					
<i>YBR280C</i>	F-Box protein involved in proteasome-dependent degradation of Aah1p	2.0	2.2	1.0	1.1
<i>YLL039C</i>	Ubiquitin, becomes conjugated to proteins	2.7	2.4	0.7	1.7
Signal transduction					
<i>YGL121C</i>	Proposed gamma subunit of the heterotrimeric G protein that interacts with the receptor Gpr1p	2.3	2.6	1.0	1.6
Unfolded protein binding		1			
<i>YBR214W</i>	One of two <i>S. cerevisiae</i> homologs (Sds23p and Sds24p) of the <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Sds23 protein	2.6	2.3	0.6	1.1
Unknown					
<i>YJR005C-A</i>	Putative protein of unknown function	8.8	8.3	0.7	1.4
<i>YER067W</i>	Putative protein of unknown function	4.2	2.7	0.4	1.0
<i>YGR043C</i>	Transaldolase of unknown function	3.9	4.4	1.2	1.9

表四、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *TRP5* 影響之基因

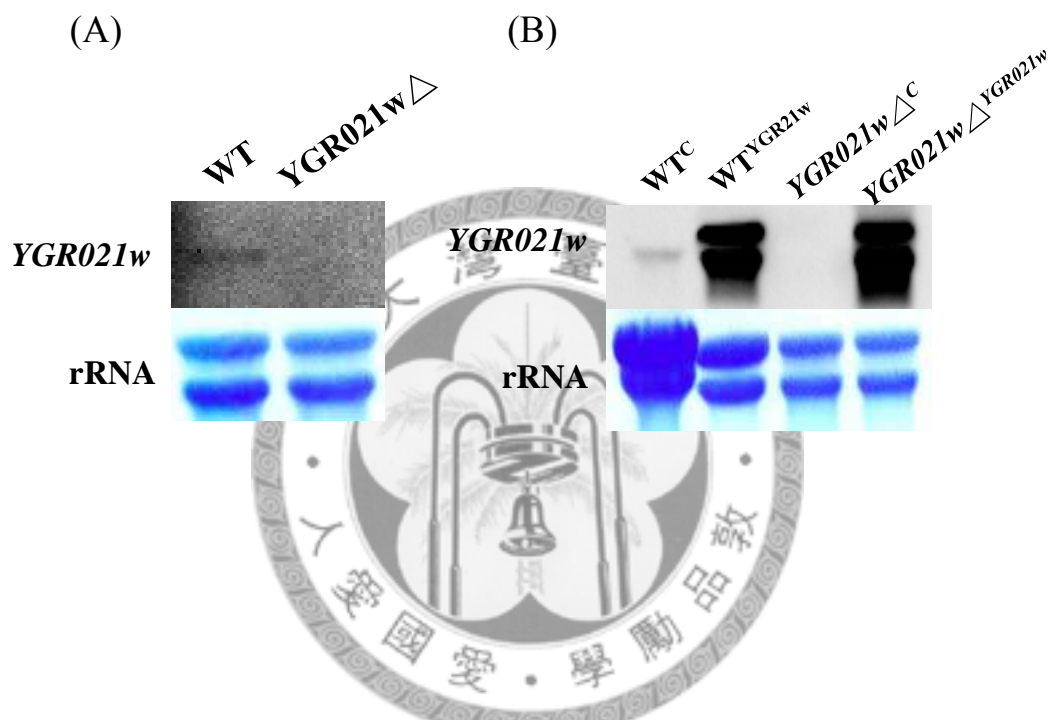
Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>trp5</i> -T/ <i>trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Unknown					
<i>YHR209W</i>	Putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	2.5	2.2	1.5	1.5
<i>YNR068C</i>	Putative protein of unknown function	3.6	4.2	0.8	1.3
<i>YDL204W</i>	Protein of unknown function	3.4	3.8	0.8	2.0
<i>YOR120W</i>	Putative NADP(+) coupled glycerol dehydrogenase	3.1	3.4	0.7	1.2
<i>YBL049W</i>	Protein of unknown function	3.2	4.3	1.0	1.5
<i>YIL165C</i>	Putative protein of unknown function	2.7	3.3	0.9	1.0
<i>YJR096W</i>	Putative xylose and arabinose reductase	3.8	3.7	1.3	2.0
<i>YKL070W</i>	Putative protein of unknown function	3.2	11.8	1.1	1.2
<i>YNL195C</i>	Putative protein of unknown function	3.0	4.0	1.9	1.1
<i>YIL097W</i>	Protein of unknown function	3.0	3.6	1.3	1.9
<i>YGR250C</i>	Putative RNA binding protein	3.0	3.5	1.1	1.8
<i>YKR071C</i>	Protein of unknown function	2.4	3.4	1.3	1.9
<i>YHR007C-A</i>	Putative protein of unknown function	2.9	2.6	1.2	1.0
<i>YHL021C</i>	Putative protein of unknown function	2.9	3.4	0.6	1.7
<i>YER079W</i>	Putative protein of unknown function	2.8	2.4	0.9	1.6
<i>YPR127W</i>	Protein of unknown function	2.4	3.3	1.3	1.6
<i>YLR149C</i>	Protein of unknown function	2.4	2.4	0.4	1.0
<i>YOL029C</i>	Putative protein of unknown function	2.0	2.8	1.6	1.4
<i>YBR047W</i>	Putative protein of unknown function	3.6	5.8	1.1	1.4
<i>YLR149C</i>	Protein of unknown function	2.4	2.4	0.4	1.0

表四、酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *TRP5* 影響之基因

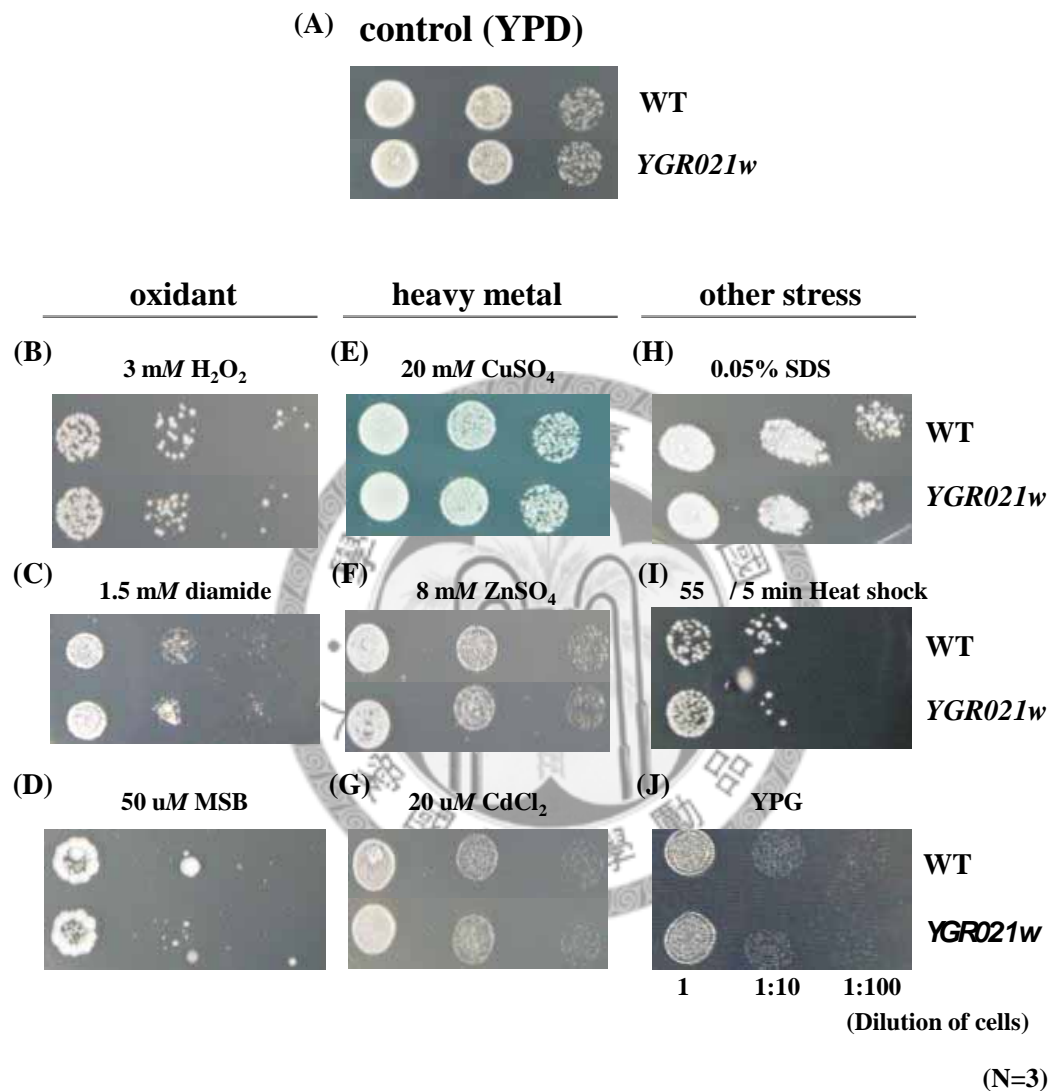
Process/Gene (ORF)	Description	WT-T/WT-C		<i>trp5</i> -T/ <i>trp5</i> -C	
		batch 1	batch 2	batch 1	batch 2
Unknown					
<i>YNR069C</i>	Protein of unknown function	2.4	2.8	0.7	1.0
<i>YML128C</i>	Putative protein of unknown function	2.4	2.2	0.5	1.1
<i>YBR085C-A</i>	Putative protein of unknown function	2.4	2.3	0.7	1.2
<i>YPL250C</i>	Putative protein of unknown function	2.3	2.9	0.9	1.4
<i>YDL025C</i>	Putative protein kinase	2.3	3.2	0.8	1.6
<i>YJL057C</i>	Putative serine/threonine kinase	2.3	3.8	1.0	1.5
<i>YER130C</i>	Protein of unknown function	2.2	2.3	1.0	1.3
<i>YDR061W</i>	Protein with similarity to ATP-binding cassette (ABC) transporter family members	2.3	2.3	0.9	1.0
<i>YPL014W</i>	Protein of unknown function	2.2	2.3	0.6	1.3
<i>YLR108C</i>	Protein of unknown function	2.2	4.5	0.8	1.6
<i>YMR085W</i>	Putative protein of unknown function	2.2	3.8	0.7	1.5
<i>YMR265C</i>	Protein of unknown function	2.1	2.2	1.1	1.2
<i>YBL086C</i>	Protein of unknown function	2.1	2.7	1.0	1.3
<i>YDL091C</i>	UBX (ubiquitin regulatory X) domain-containing protein that interacts with Cdc48p	2.1	2.4	1.2	1.4
<i>YDL021W</i>	Homolog of Gpm1p phosphoglycerate mutase	2.1	2.4	0.9	1.4
<i>YKR011C</i>	Putative protein of unknown function	2.1	2.6	0.9	1.2
<i>YHR199C</i>	Putative protein of unknown function	2.1	2.8	1.0	1.1
<i>YNL305C</i>	Putative protein of unknown function	2.0	2.0	1.0	1.0
<i>YKR046C</i>	Putative protein of unknown function	2.0	2.1	0.9	1.2
<i>YOR059C</i>	Putative protein of unknown function	2.0	2.7	1.5	1.3



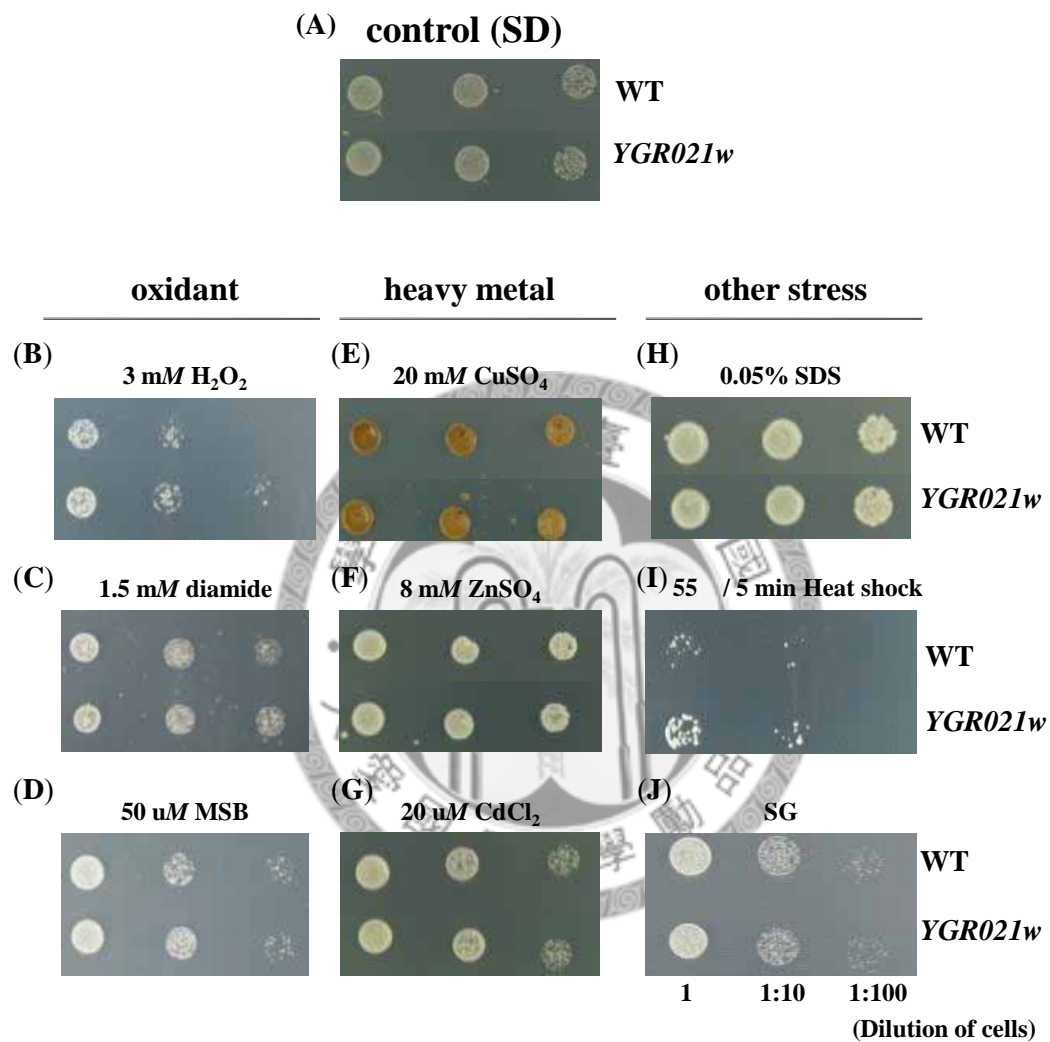
圖一、*YGR021w* 在氧化逆境下之表現。(A)以北方點墨法分析在不同氧化劑處理下 *YGR021w* 之表現。各項處理包括：以 0.5 mM H₂O₂ 處理 30 分鐘；以 1.5 mM diamide 處理 30 分鐘；以 100 μM menadione 處理 30 分鐘；(B)以半定量 RT-RPCR 分析處理 0.5 mM H₂O₂ 後各個時間點（10、30、60、120 分鐘）其 *YGR021w* 之表現變化。



圖二、以北方點墨法分析本論文使用之各式酵母菌菌株中 *YGR021w* 之表現。WT, Wild-type; *YGR021w* Δ, *YGR021w*-deleted strain; WT^c, WT strain containing vector; WT^{*YGR021w*}, *YGR021w* overexpression strain; *YGR021w* Δ^c, *YGR021w*-deleted strain containing vector; *YGR021w* Δ^{*YGR021w*}, *YGR021w* complementation strain。

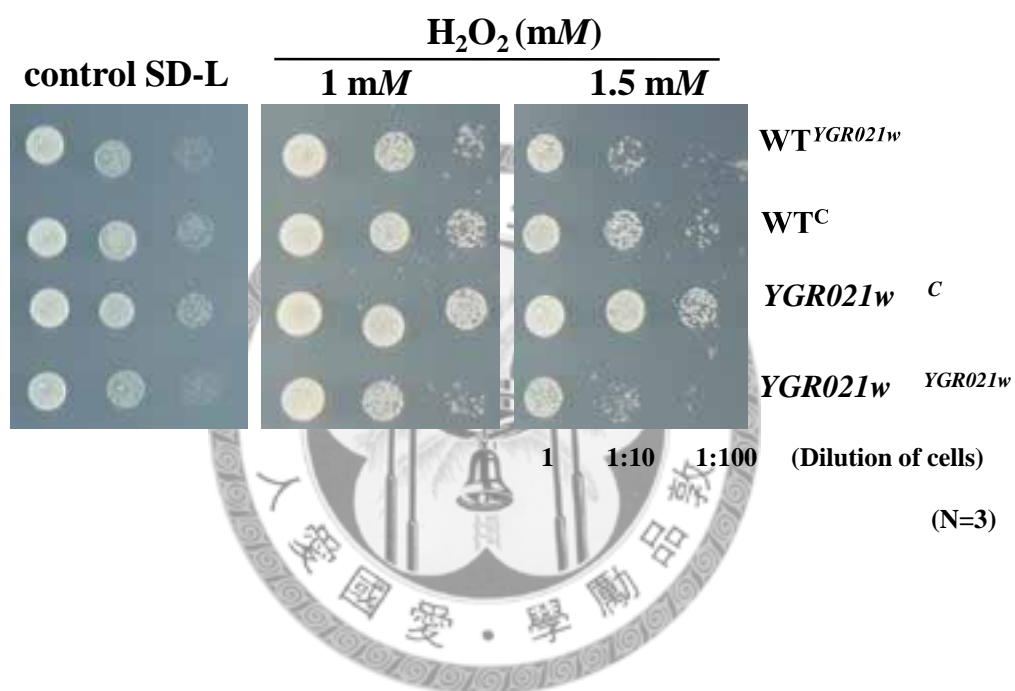


圖三、WT 和 *YGR021w* 於營養培養基上處理不同逆境及碳源的生長情形。所使用 1 倍濃度菌液中之細胞數目大約為 20,000。整組實驗重覆做三次。(A)YPD control; (B)處理 3 mM H₂O₂; (C)處理 1.5 mM diamine; (D)處理 50 μM menadione; (E)處理 20 mM CuSO₄; (F)處理 8 mM ZnSO₄; (G)處理 20 μM CdCl₂; (H)處理 0.05% SDS; (I) 55 °C 處理 5 分鐘; (J) YPG 培養基。



(N=3)

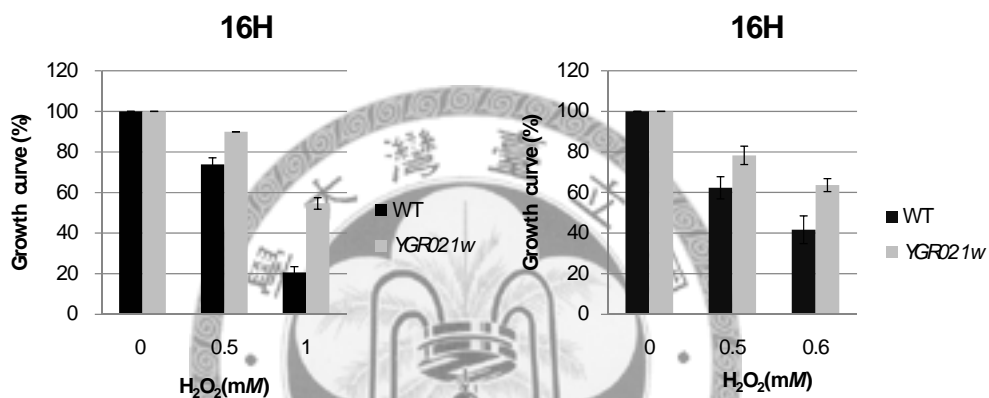
圖四、WT 和 *YGR021w* 於貧瘠培養基上處理不同逆境及碳源的生長情形。所使用 1 倍濃度菌液中之細胞數目大約為 20,000，整組實驗重覆做三次。(A)SD control; (B)處理 3 mM H₂O₂; (C)處理 1.5 mM diamine; (D)處理 50 μM menadione; (E)處理 20 mM CuSO₄; (F)處理 8 mM ZnSO₄; (G)處理 20 μM CdCl₂; (H)處理 0.05% SDS; (I)55 °C 處理 5 分鐘; (J) SG 培養基。



圖五、WT^C 與 YGR021w overexpression strain 於處理 H₂O₂ 下之生長情形。所使用 1 倍濃度菌液中之細胞數目大約為 20,000，培養於 SD-L 篩選培養基上，整組實驗重覆做三次。WT, Wild-type; YGR021w^C, YGR021w-deleted strain; WT^C, WT strain containing vector; WT^{YGR021w}, YGR021w overexpression strain; YGR021w^C, YGR021w-deleted strain containing vector; YGR021w^{YGR021w}, YGR021w complementation strain。

(A) Rich (YPD) medium

(B) Minimal (SD) medium

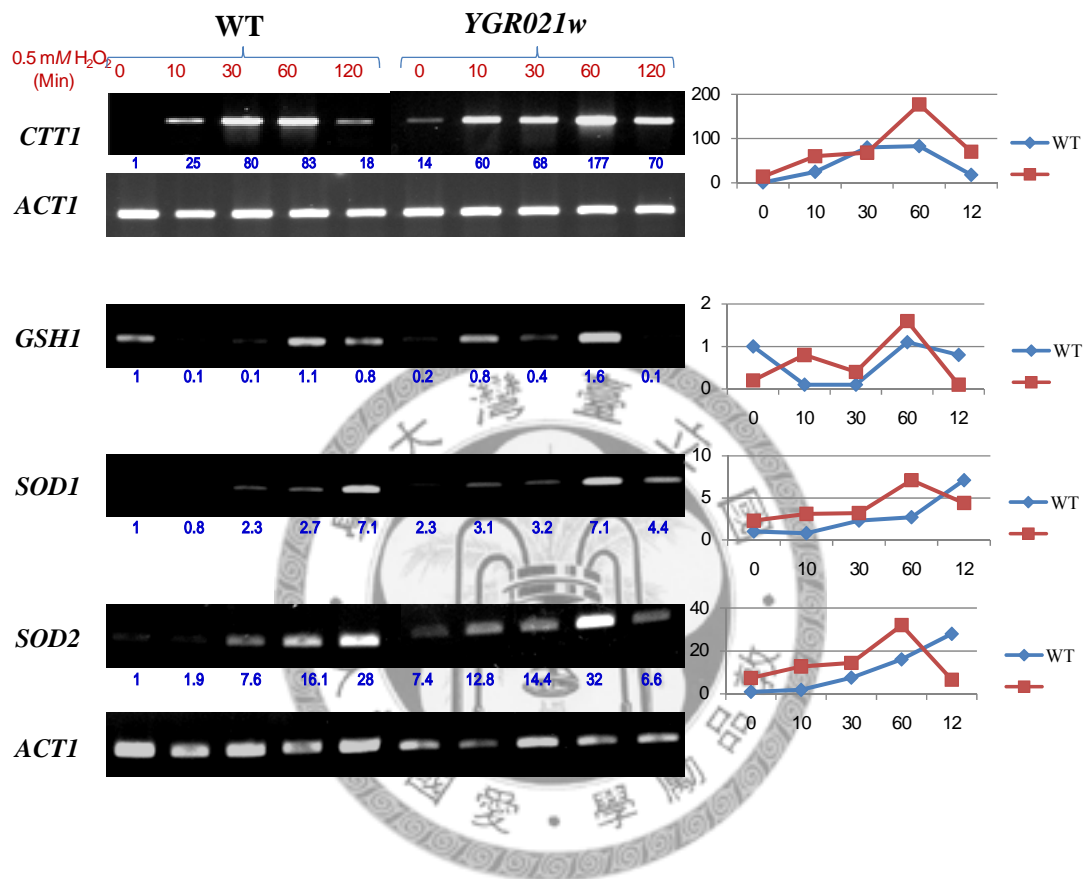


(N=3)

圖六、WT 和 *YGR021w* 處理 H₂O₂，培養 16 小時後之生長情形。各菌株分別以未處理 H₂O₂ 之對照組做為基準(100%)，與處理 H₂O₂ 之實驗組比較，得到之生長率(%)。整組實驗重覆做三次。(A)YPD (rich medium); (B) SD (minimal medium)。

(A)

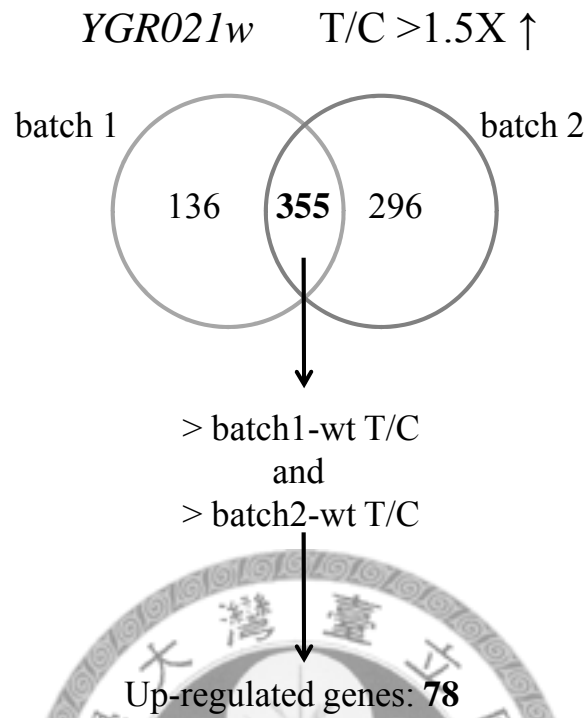
(B)



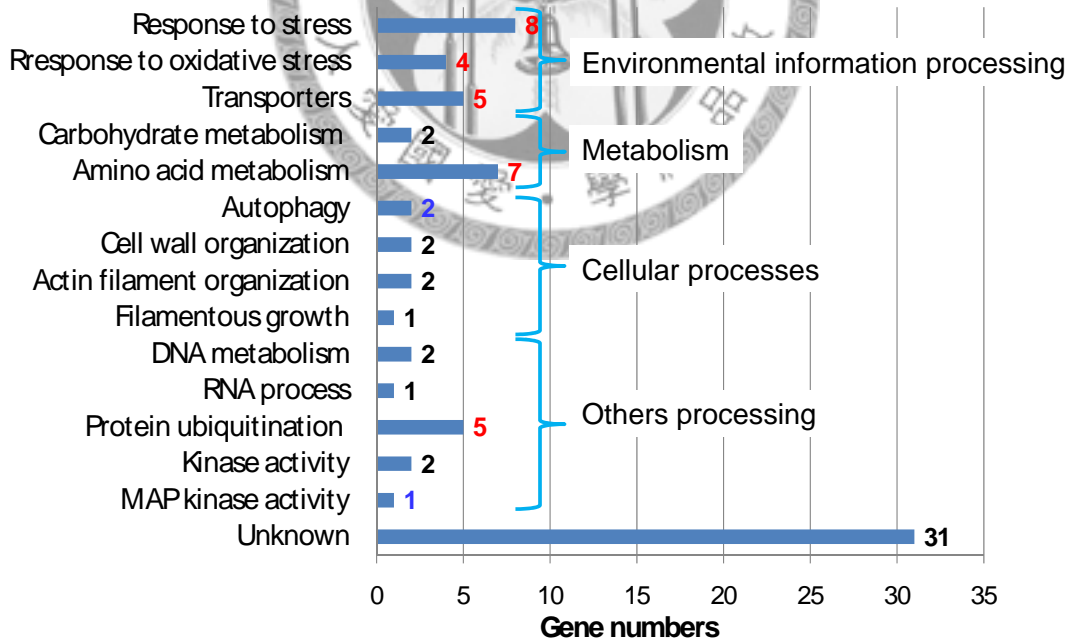
圖七、以半定量 RT-PCR 分析 WT 和 *YGR021w* 之氧化逆境相關基因。

WT 和 *YGR021w* 培養於 YPD (rich medium) 後，處理不同時間(0、10、30、60、120 分鐘)之 0.5 mM H₂O₂，其氧化逆境相關之標記基因包括：*CTT1*(cytosolic catalase T)、*GSH1*(glutamylcysteine synthetase)、*SOD1*(cytosolic superoxide dismutase)及 *SOD2*(mitochondrial superoxide dismutase)之 RNA 表現。(A)瓊脂糖凝膠電泳結果，藍色數值表 RNA 量之相對倍數；(B)軟體定量 RNA 表現量之曲線圖，WT, Wild-type; *YGR021w*, *YGR021w*-deleted strain; X 軸表處理 H₂O₂ 之時間(分鐘)，Y 軸表 RNA 量之相對倍數。

(A)

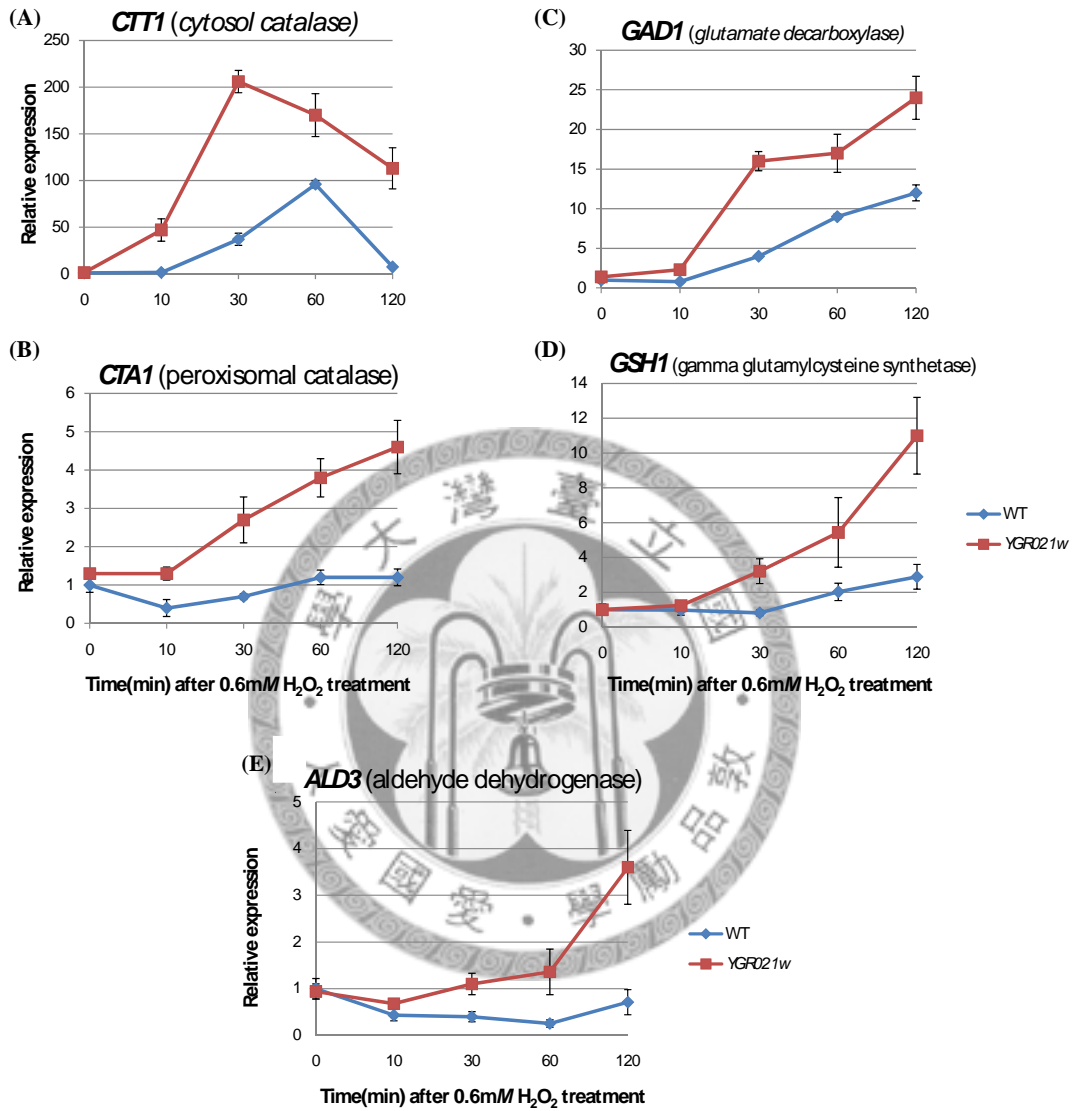


(B)



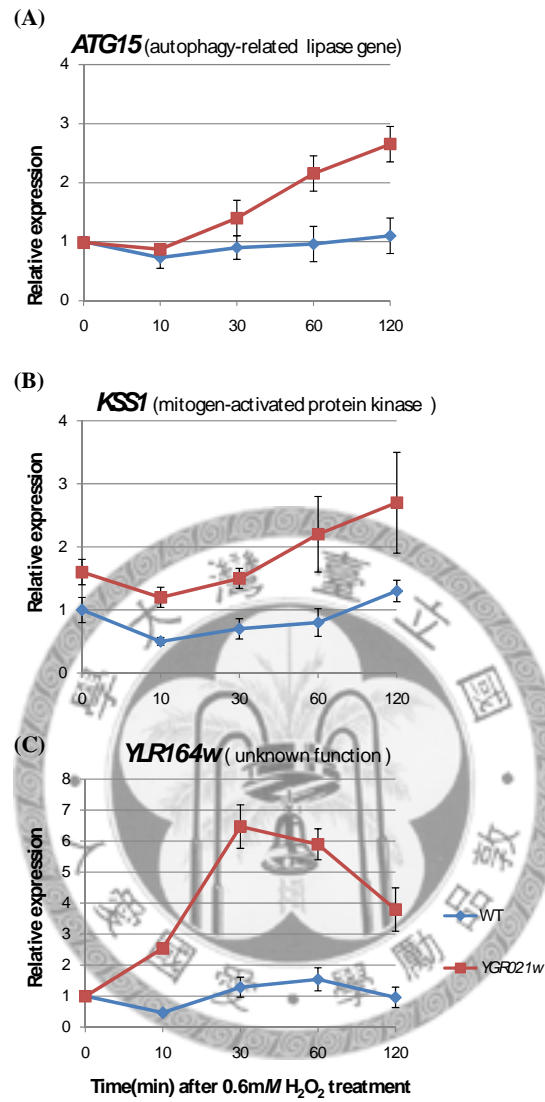
圖八、酵母菌在氧化逆境下可能被 *YGR021w* 所影響的基因群之功能分配。

(A)維恩交集圖(venn diagram); (B)酵母菌抗氧化微陣列中在氧化逆境下可能受 *YGR021w* 影響之基因功能性分群。



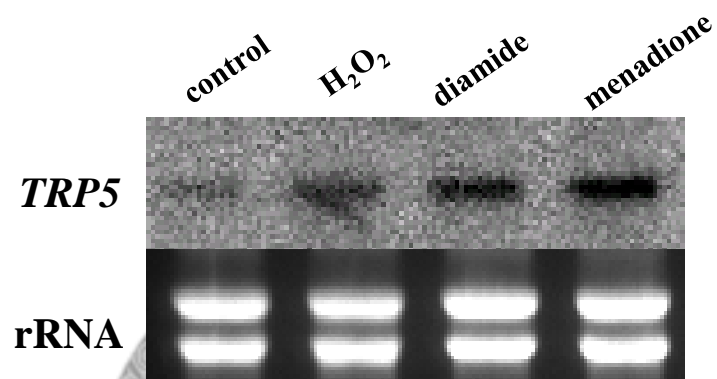
圖九、以即時定量 RT-RCR 分析已知與逆境反應相關之基因的表現。WT 和 YGR021w 以 0.6 mM H₂O₂ 處理不同時間後之各基因表現變化。

(A) YGR088w/CTT1; (B) YDR256c/CTA1; (C) YMR250w/GAD1; (D) YJL101c/GSH1; (E) YMR169c/ALD3。



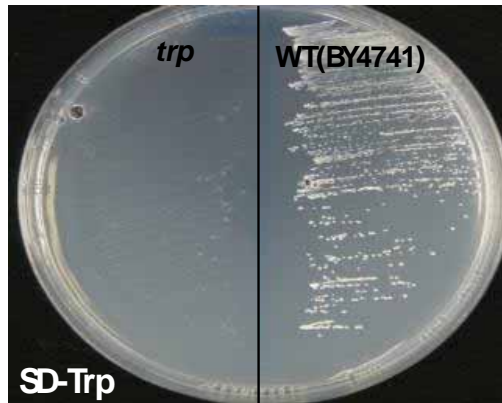
圖十、以即時定量 RT-RPCR 分析與逆境反應相關之新穎基因的表現。WT 和 *YGR021w* 以 0.6 mM H₂O₂ 處理不同時間後之各基因表現變化。

(A) *YCR068w/ATG15*; (B) *YGR040w/KSS1*; (C) *YLR164w*。

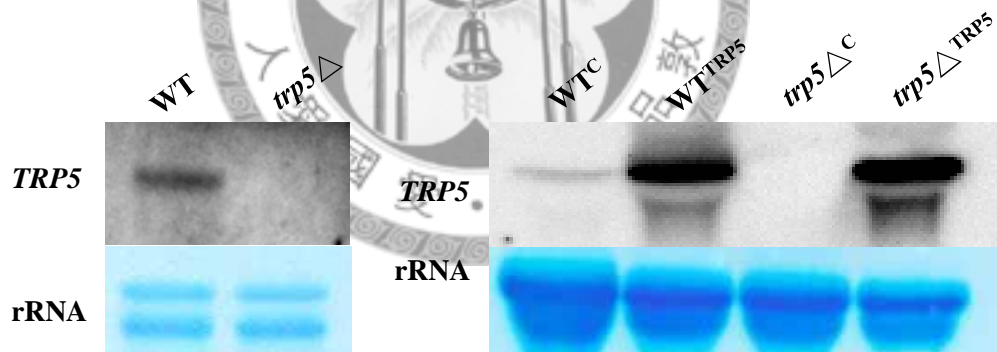


圖十一、*YGL026c* (*TRP5*)在氧化逆境下之表現。以北方點墨法分析在不同氧化劑處理下 *TRP5* 之表現。各項處理包括：以 0.5 mM H₂O₂ 處理 30 分鐘；以 1.5 mM diamide 處理 30 分鐘；以 100 μM menadione 處理 30 分鐘。

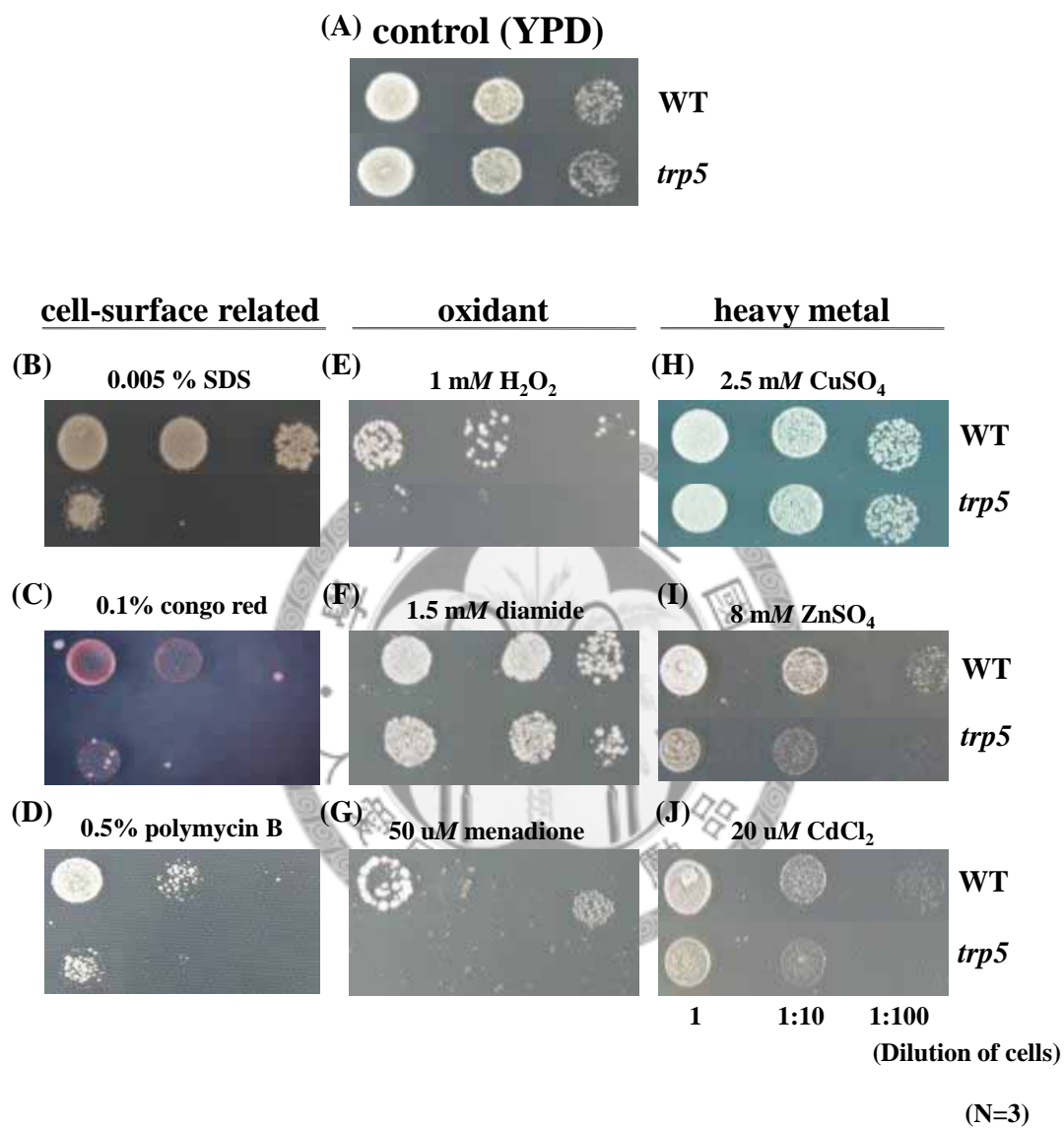
(A)



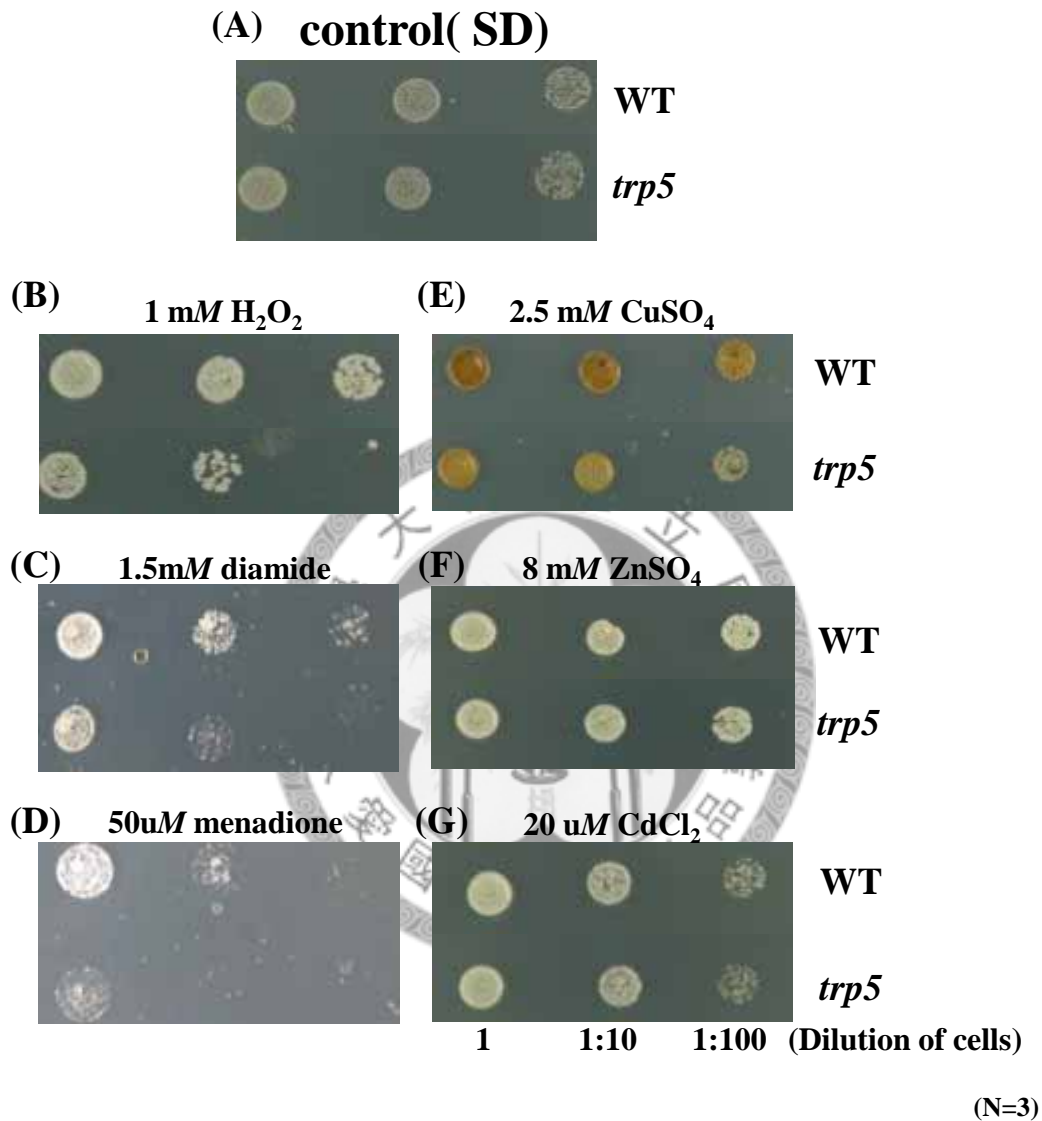
(B)



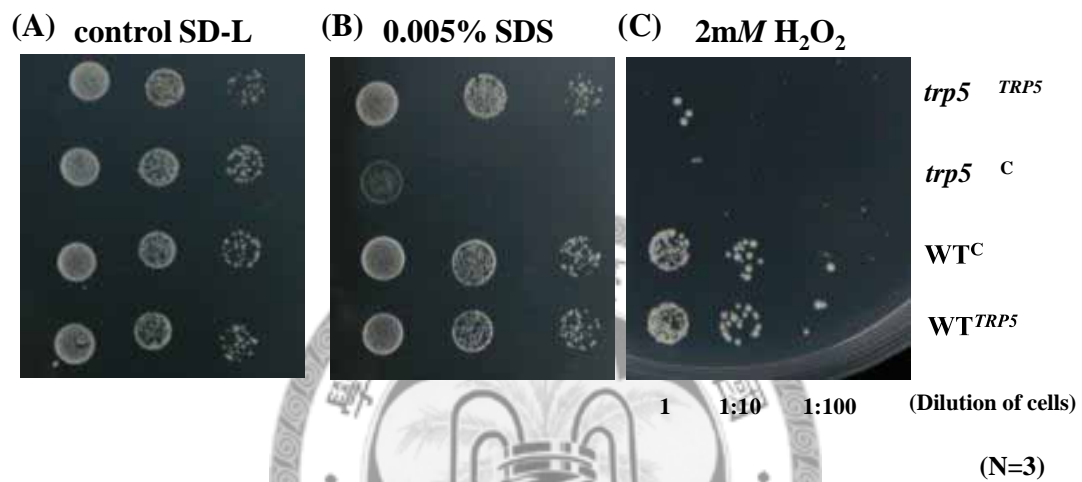
圖十二、分析本論文使用之各式酵母菌菌株中 *TRP5* 之表現。(A)以缺乏 tryptophan 之 SD 合成培養基 (SD-*Trp*)，檢測 WT 與 *trp5* 之生長情形；(B)以北方點墨法分析 *TRP5* 之表現。WT, Wild-type; *trp5* Δ , *trp5* -deleted strain; WT^c, WT strain containing vector; WT^{trp5}, *trp5* overexpression strain; *trp5* Δ ^c, *trp5* -deleted strain containing vector; *trp5* Δ TRP5, *trp5* complementation strain。



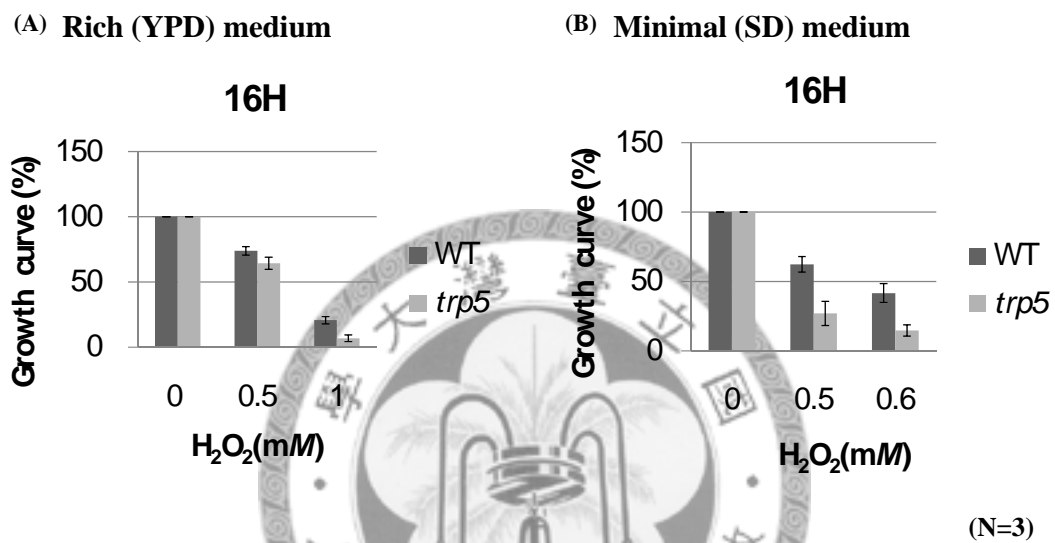
圖十三、WT 和 *trp5* 於營養培養基上處理不同逆境的生長情形比較。所使用 1 倍濃度菌液中之細胞數目大約為 20,000，整組實驗重覆做三次。(A)YPD control; (B)處理 0.05% SDS; (C)處理 0.1% congo red; (D)處理 0.1% polymycin B; (E)處理 3 mM H₂O₂; (F)處理 1.5 mM diamine; (G)處理 50μM menadione; (H)處理 2.5 mM CuSO₄; (I)處理 8 mM ZnSO₄; (J)處理 20μM CdCl₂。



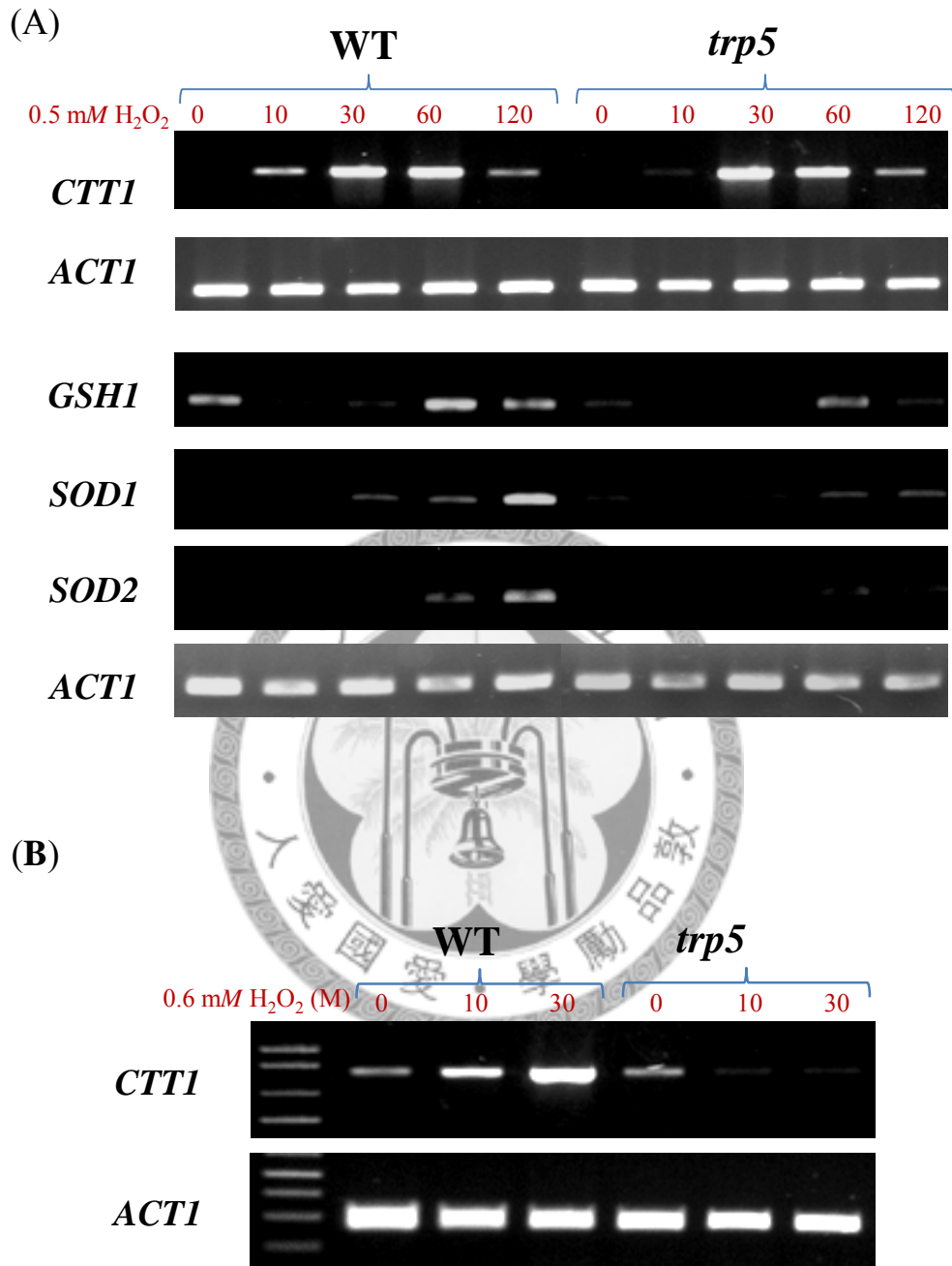
圖十四、WT 和 *trp5* 於貧瘠培養基上處理不同逆境的生長情形比較。所使用 1 倍濃度菌液中之細胞數目大約為 20,000，整組實驗重覆做三次。(A)SD control; (B) 處理 3 mM H₂O₂; (C)處理 1.5 mM diamine; (D)處理 50 μM menadione; (E)處理 20 mM CuSO₄; (F)處理 8 mM ZnSO₄; (G)處理 20 μM CdCl₂。



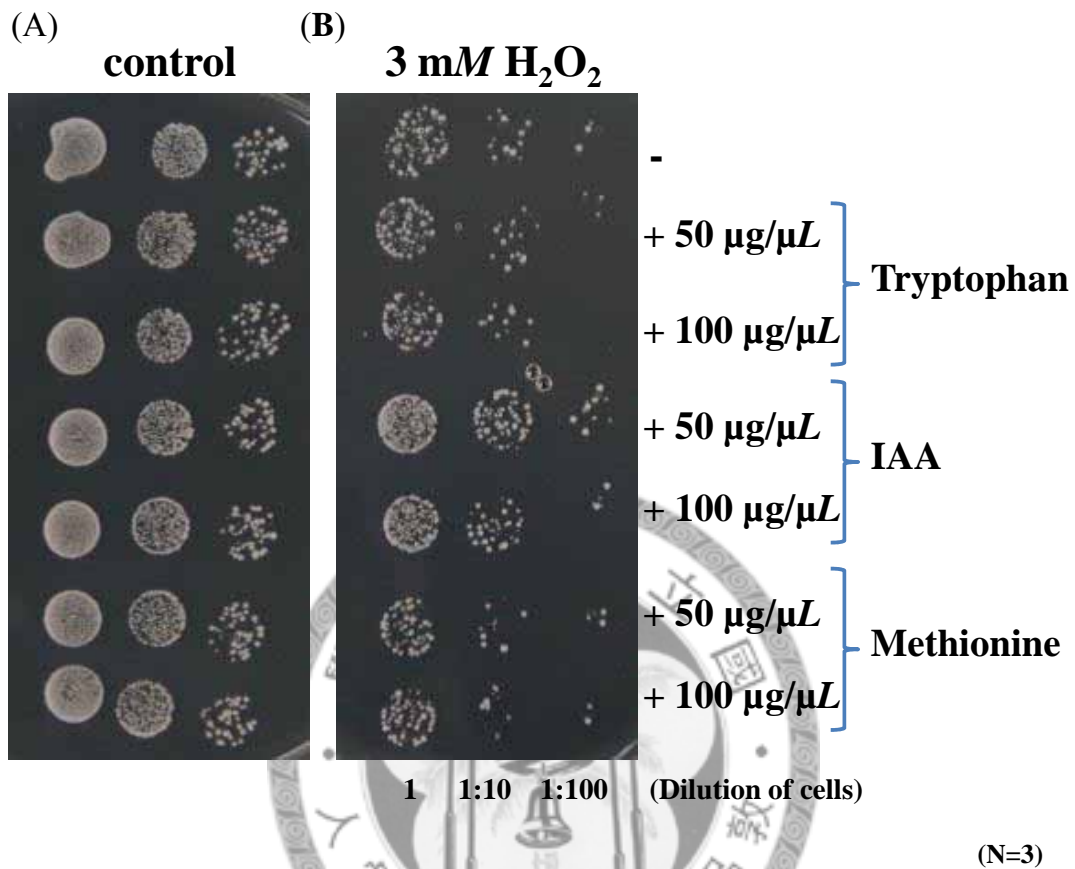
圖十五、WT^c與 *TRP5* overexpression strain 處理不同逆境之生長情形。所使用 1 倍濃度菌液中之細胞數目大約為 20,000，培養於 SD-L 篩選培養基上，整組實驗重覆做三次。(A)SD-L control; (B)處理 0.005% SDS; (C)處理 3 mM H₂O₂。WT, Wild-type; *trp5*⁻, *trp5*-deleted strain; WT^c, WT strain containing vector; WT^{*trp5*}, *trp5* overexpression strain; *trp5*^c, *trp5*-deleted strain containing vector; *trp5*^{*trp5*}, *trp5* complementation strain。



圖十六、WT 和 *trp5* 於培養基上處理 H₂O₂，培養 16 小時後之生長情形。各菌株分別以未處理 H₂O₂ 之對照組做為基準(100%)，與處理 H₂O₂ 之實驗組比較，得到之生長率(%)。整組實驗重覆做三次。(A)YPD (rich medium); (B)SD (minimal medium)。

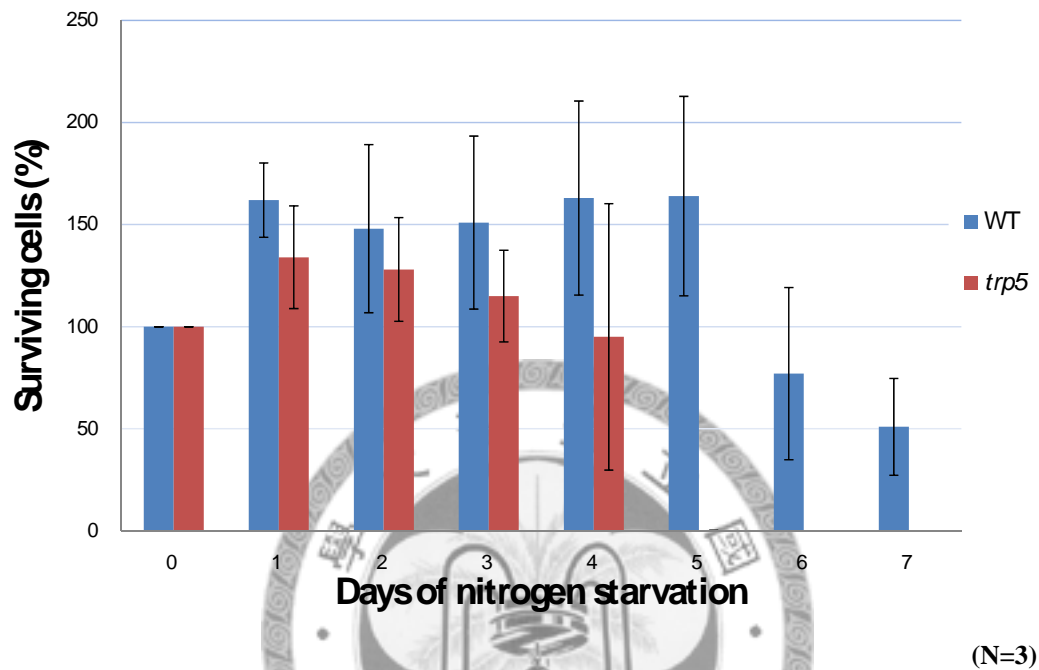


圖十七、以半定量 RT-RPCR 分析 WT 和 *trp5* 之氧化逆境相關基因。WT 和 *trp5* 培養於(A)YPD (rich medium); (B)SD (minimal medium)後，處理不同時間之 0.5 mM H₂O₂，氧化逆境相關之標記基因包括：*CTT1*(cytosolic catalase T)、*GSH1*(glutamylcysteine synthetase)、*SOD1*(cytosolic superoxide dismutase)及 *SOD2*(mitochondrial superoxide dismutase)之 RNA 表現。



圖十八、外加 tryptophan、IAA、methionine 試驗。

WT 外加不同濃度之 tryptophan、IAA、methionine 後，於 YPD 培養基處理 H₂O₂ 下之菌落生長情形比較。所使用 1 倍濃度菌液中之細胞數目大約為 20,000，整組實驗重覆做三次。(A)YPD control; (B)處理濃度 3 mM 之 H₂O₂。

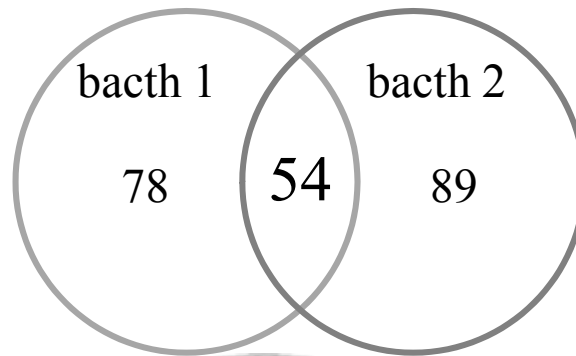


圖十九、缺氮飢餓試驗 (nitrogen starvation test)。

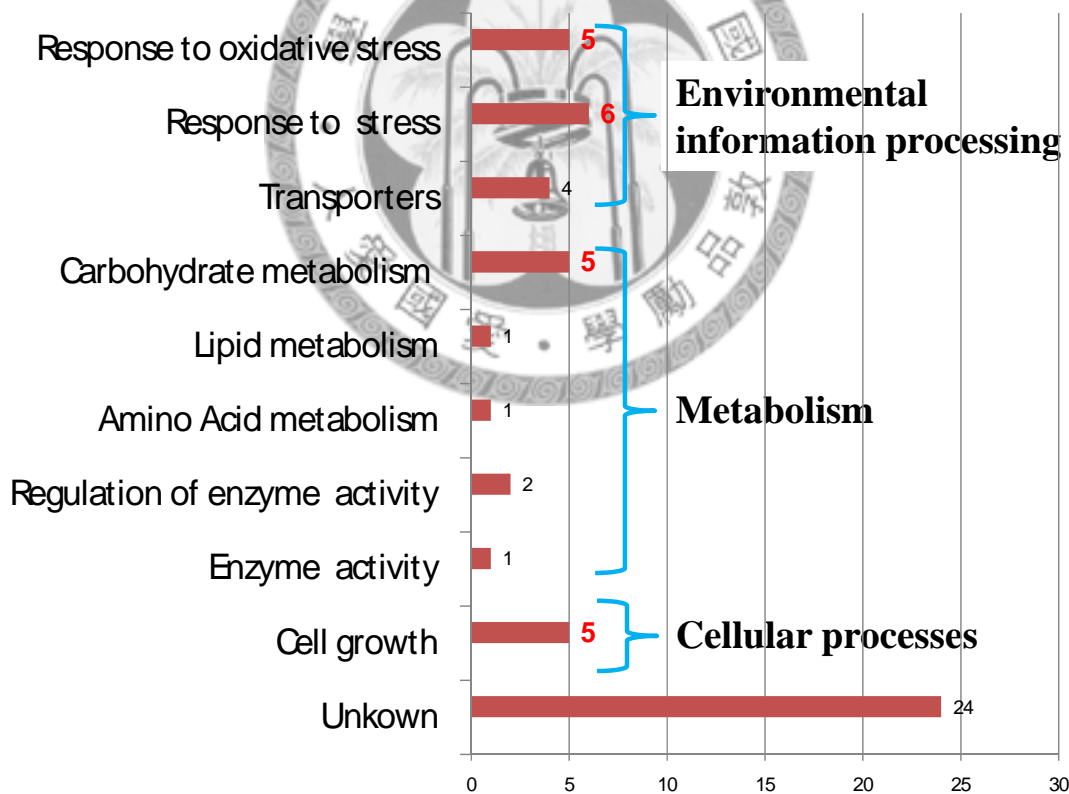
WT 和 *trp5* 在缺氮培養基培養不同天數後之菌落生長存活率。各菌株分別以自己的起始天(第 0 天)於 YPD 上存活之菌落數當作 100%，各與飢餓培養處理後之存活菌落數相比之相對存活比率。

(A)

WT-C / *trp5*⁻ C :1.5X ↑



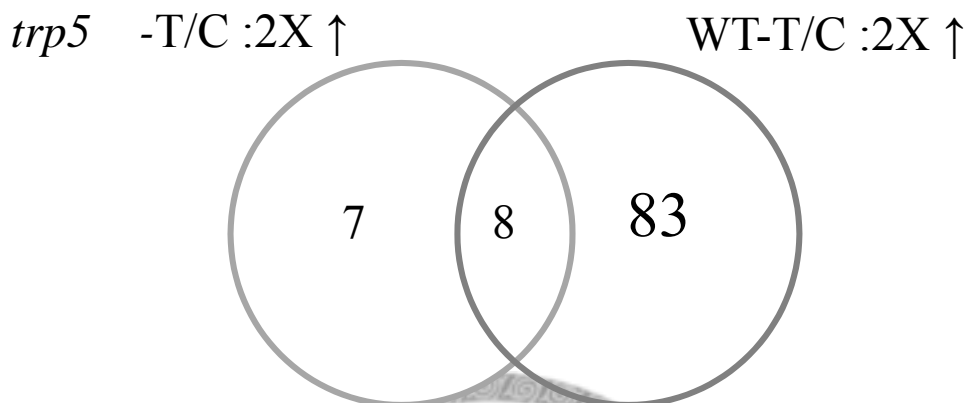
(B)



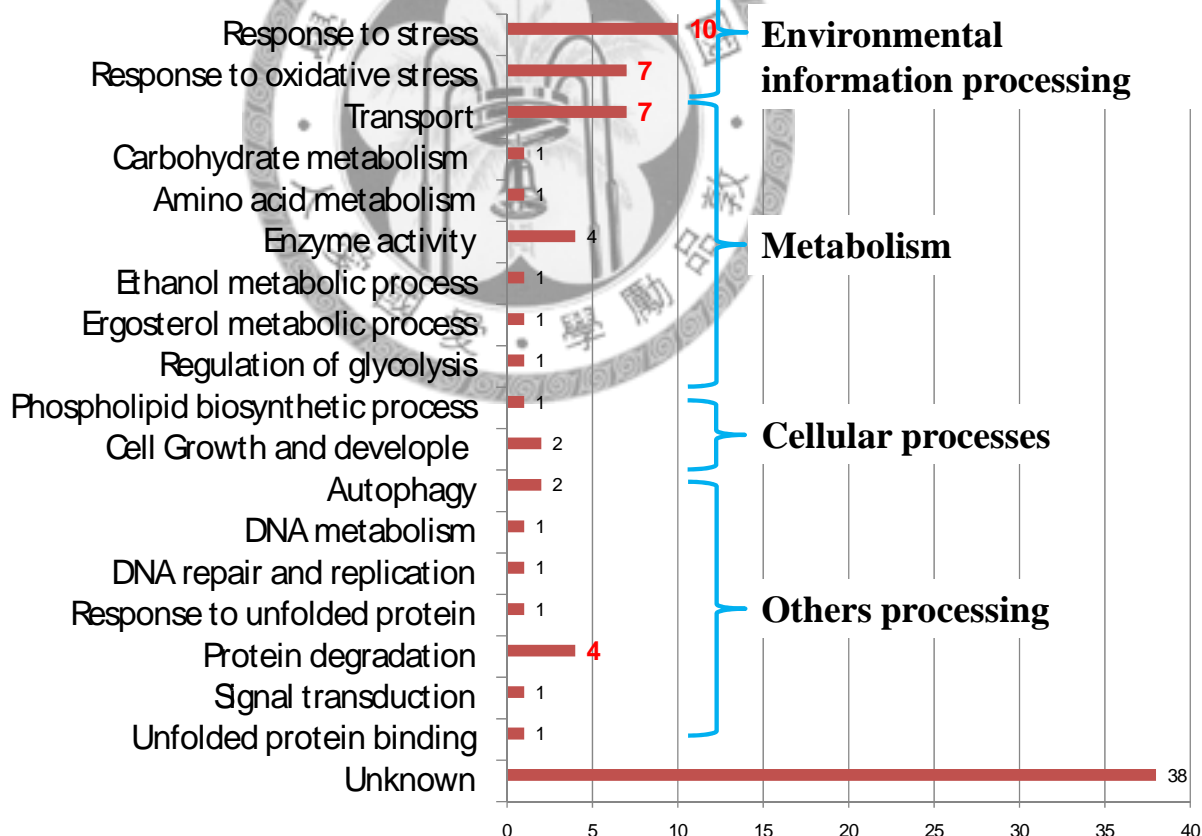
圖二十、酵母菌在正常生長下可能被 *TRP5* 所影響的基因群之功能分配圖。

(A)維恩交集圖(venn diagram); (B)酵母菌正常生長條件下可能受 *TRP5* 影響之基因功能性分群。

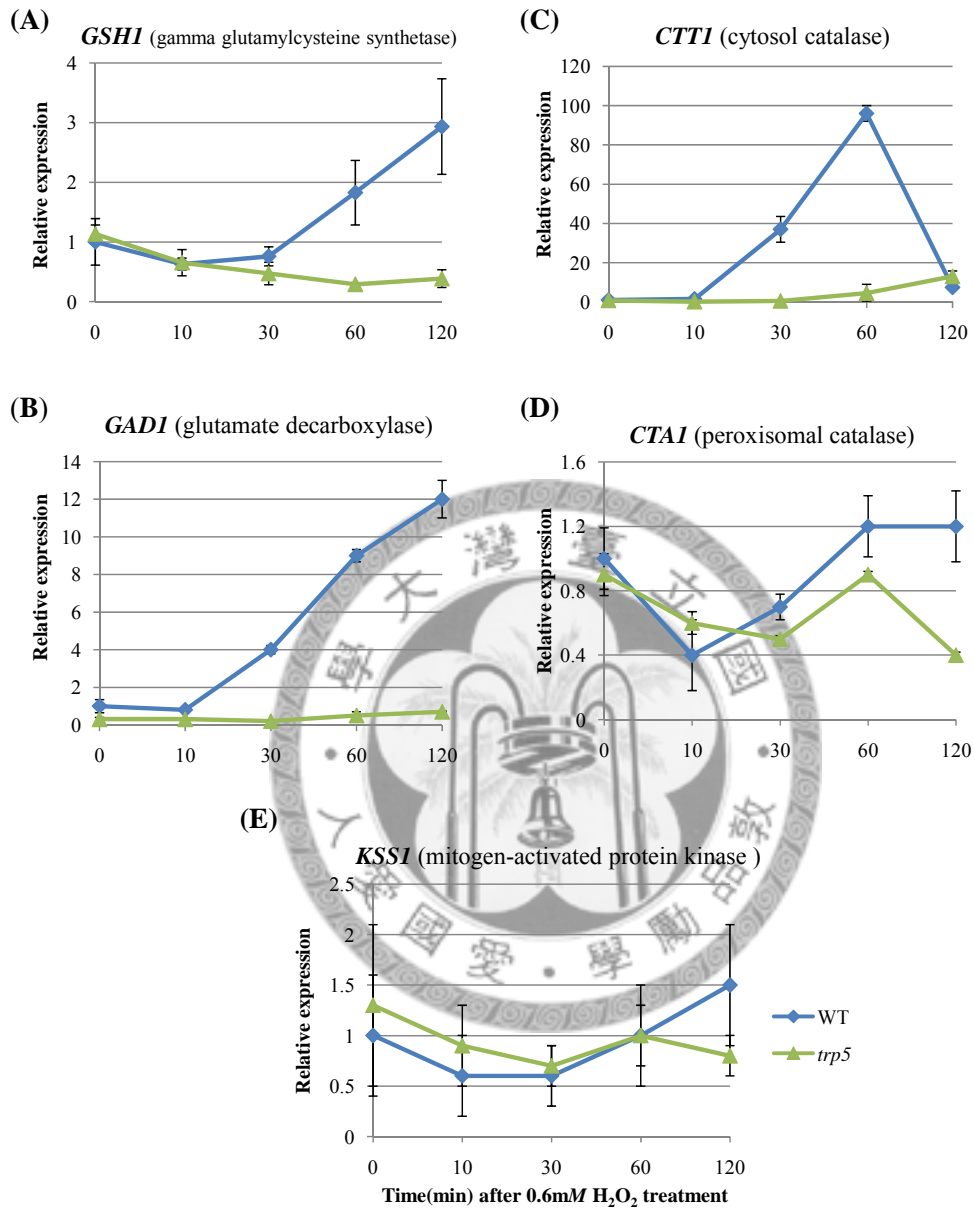
(A)



(B)



圖二十一、酵母菌在遭遇氧化逆境後可能被 *TRP5* 所影響的基因群之功能分配圖。(A)維恩圖(venn diagram); (B)酵母菌在氧化逆境下可能受 *TRP5* 影響之基因功能性分群。



圖二十二、以即時定量 RT-RCR 分析微陣列篩選之基因的表現。 WT 和 *trp5* 以 0.6 mM H₂O₂ 處理不同時間後之各基因表現變化。

(A) *YJL101c/GSH1*; (B) *YMR250w/GAD1*; (C) *YGR088w/CTT1*; (D) *YDR256c/CTA1*; (E) *YGR040w/KSS1*。

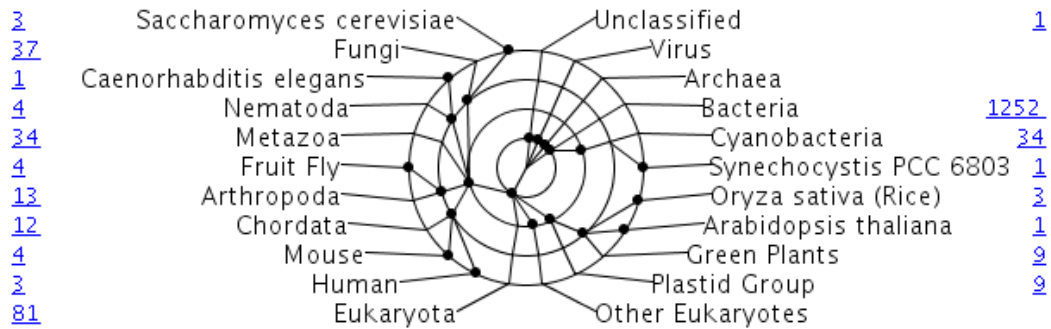
附錄一、本研究使用之引子序列

Gene	Primer sequences	Full length (bp) ^a
<i>YGR021w</i> (DUF28)	F:5'- <u>AGATCTGCGGCCGC</u> ATGTTGGTAAGAAATAGGTATCTGG-3' R:5'- <u>ACTAGTGC</u> GGCCGCTTAAGCGTTGCTAGCGTTAGTGTAC-3'	873
<i>TRP5/YGL026C</i>	F:5'-ATGTCAGAACAACCTCAGACA-3' R:5'-TTAGGCAGATGGGTCTTCTT-3'	2124
Gene	Primer sequences	Fragment length (bp) ^b
<i>SOD1/YJR104C</i>	F:5'-ATGGTTCAAGCAGTCGCAG-3' R:5'-CTTGCCGGCGTGGATAA-3'	373
<i>SOD2/YHR008C</i>	F:5'-ATGTTTCGCGAAAACAGCAG-3' R:5'-CAAGCACCATCAAACCTTATG-3'	543
<i>GSH1/YJL101C</i>	F:5'-ATGGGACTCTTAGCTTTGG-3' R:5'-GGTTTGGGAAGCCAGTTTC-3'	746
<i>CTT1/YGR088W</i>	F:5'-ATGAACGTGTTCCGGTAAAAAAG-3' R:5'-CCATTTTGCAATTGAGTGAAC-3'	791
<i>ALD3/YMR169C</i>	F:5'-CGAATAGCGTAGATTTAACTG-3' R:5'-GTAGCTGGGTTACAGTTTC-3'	292
<i>YLR164W</i>	F:5'-GAAACCACTCTGCAGAATAAG-3' R:5'-GCAAGACTGAAATCCGATATG-3'	304
<i>ACT1/YFL039C</i>	F:5'-GGTCAAGTCATCACTATTGG-3' R:5'-GAACCACCAATCCAGACGG-3'	299
<i>KSS1/YGR040W</i>	F:5'-ATGGCTAGAACCATAACTTTTG-3' R:5'-GGTTTCCATCAACTCTTCGAC-3'	297
<i>CTA1/YDR256C</i>	F:5'-GGATAGAGTTGTGACAAACTC-3' R:5'-GTGTCGGCACTACCTTTATC-3'	306
<i>ATG15/YCR068W</i>	F:5'-CCCTTCAAGAAAGAGATTTGC-3' R:5'-CGAATATGCCACCACTAACC-3'	344
<i>GAD1/YMR250W</i>	F:5'-CACAGGCACGGTTCTAAGC-3' R:5'-CAGTGGTAAAAGTGTTACAG-3'	292

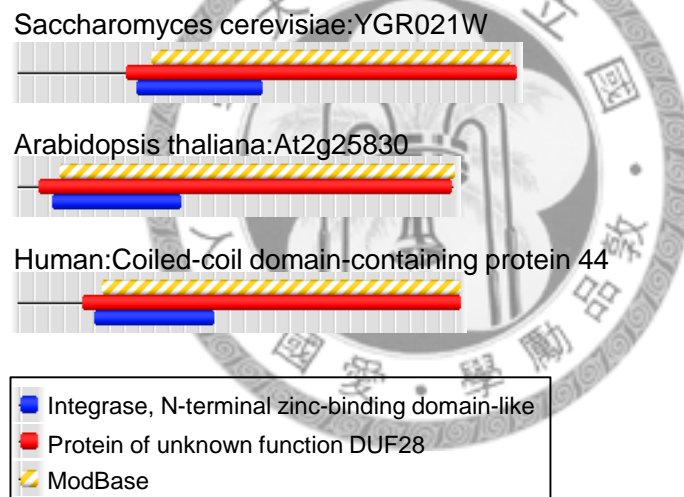
a Full length (bp)用於基因選殖

b Fragment length (bp)用於 RT-PCR 及 qRT-PCR

(A)

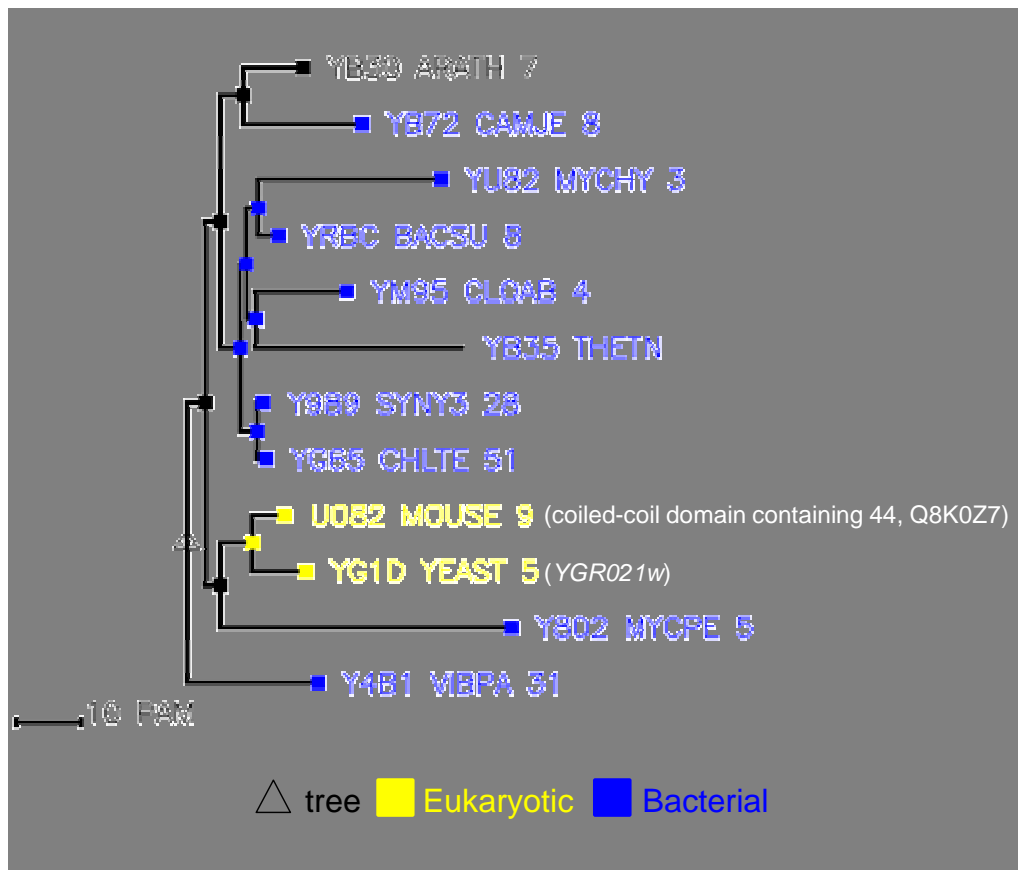


(B)



附錄二、利用生物資訊軟體 InterPro 分析 DUF28 蛋白。

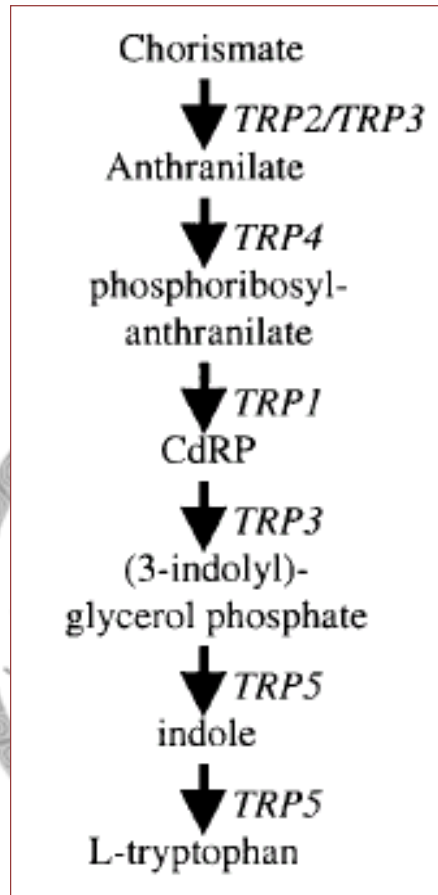
(A)DUF28 蛋白在不同物種之分類範圍 (taxonomic coverage)，數字表物種中已知之 DUF28 蛋白數量；(B) DUF28 蛋白特有 domains。 <http://www.ebi.ac.uk/>



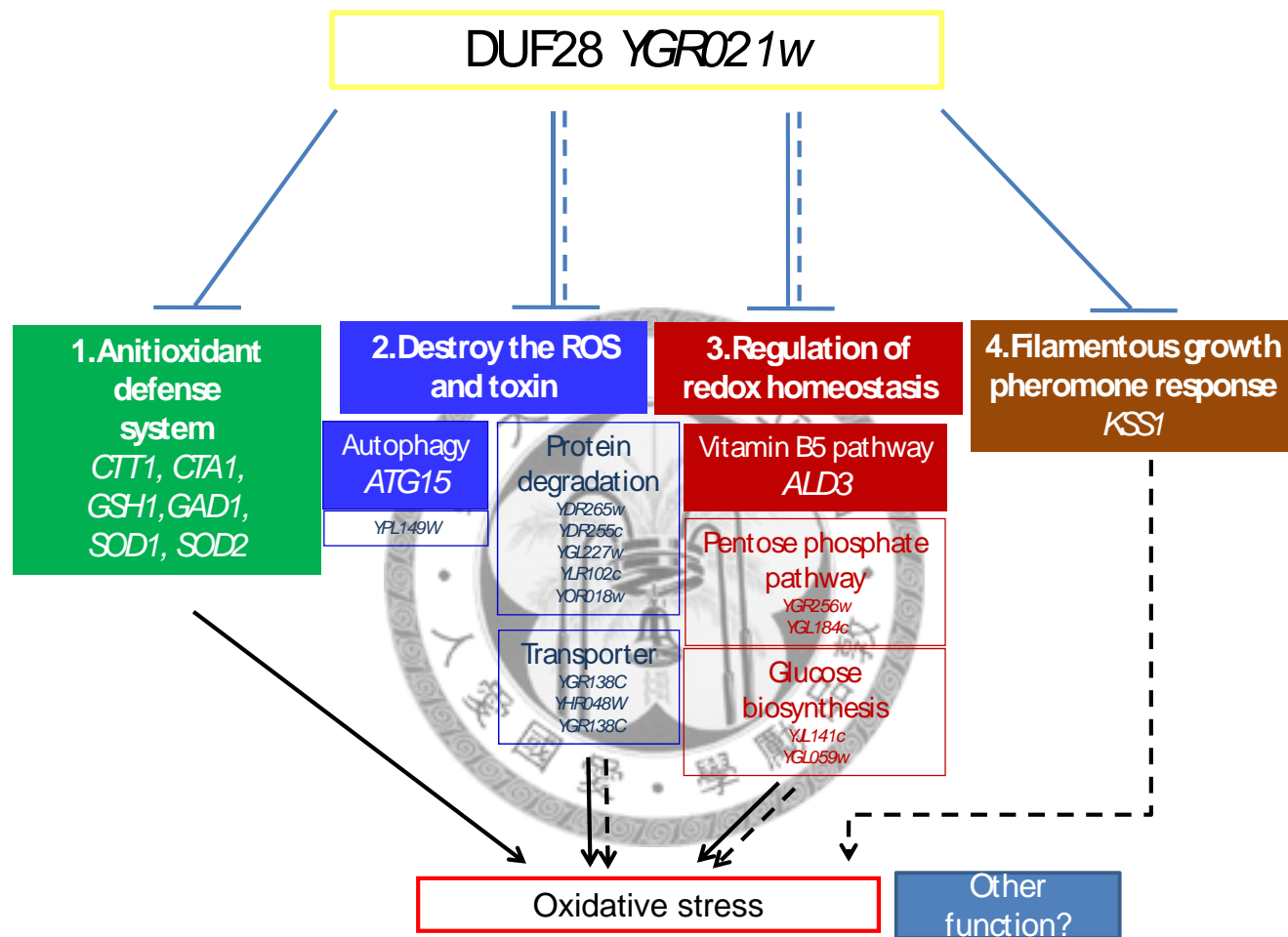
附錄三、DUF28 homologues 演化樹(phylogenetic trees)分析。

黃色字體表真核生物(eukaryotic); 藍色字體表細菌(bacterial)。

<http://www.ebi.ac.uk/>

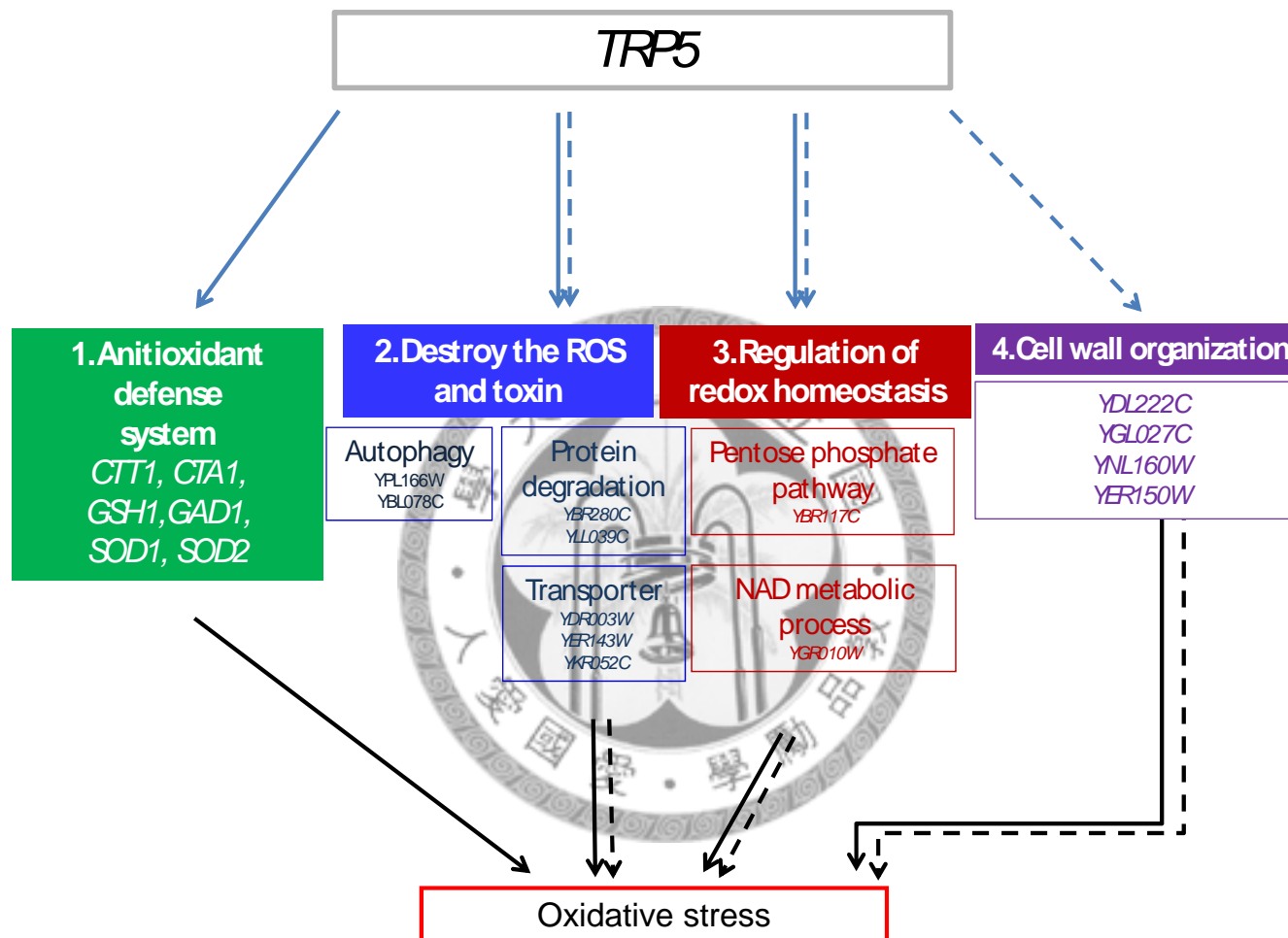


附錄四、酵母菌色胺酸的合成路徑 (Yeast 2000; 16: 553-560)



附錄五、*YGR021w* 在氧化逆境下可能參與之相關機制模式圖。

塗滿方格表已驗證之基因；實線表經本論文實驗或相關文獻證實會參與途徑；虛線表可能參與途徑。



附錄六、*TPR5* 在氧化逆境下可能參與之相關機制模式圖。

塗滿方格表已驗證之基因；實線表經本論文實驗或相關文獻證實會參與途徑；虛線表可能參與途徑。

附錄七、常用培養基配方

LB medium

Component	per Liter
Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Adjust pH to 7.0	
Additional 15 g agar for afar medium	

YPD medium

Component	per Liter
Peptone	20 g
Yeast extract	10 g
Dextrose (glucose)	20 g
Adjust pH to 5.8	
Additional 20 g agar for afar medium	

SD medium

Component	per Liter
Yeast nitrogen base	6.7 g
Amino acid dropout	0.67 g
Dextrose (glucose)	20 g
Adjust pH to 5.8	
Additional 20 g agar for afar medium	

SOC medium

Component	per Liter
Tryptone	20 g
Yeast extract	5 g
NaCl	0.5 g
250 mM KCl	10 mL
Adjust pH to 7.0	
Autoclave	
1M MgCl ₂	10 mL
1M Glucose	20 mL