

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

博士論文

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

大腸桿菌ClpYQ蛋白酶之ClpY I domain區域双環構

造與孔洞區所扮演角色

The role of ClpY I domain double loops structure and  
pore site in *Escherichia coli* ClpYQ protease

謝汎擎

Fan-Ching Hsieh

學號：D95623002

指導教授：吳蕙芬 博士

Advisor：Whei-Fen Wu, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

國立臺灣大學博士學位論文  
口試委員會審定書

大腸桿菌 ClpYQ 蛋白酶之 ClpY I domain 區域雙環構造與孔洞區所扮演  
角色

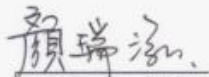
The role of ClpY I domain double loops structure and pore site in  
*Escherichia coli* ClpYQ protease

本論文係謝汎學君 (D95623002) 在國立臺灣大學農業化學所完成  
之博士學位論文，於民國一百零一年七月二十七日承下列考試委員審  
查通過及口試及格，特此證明

論文審查委員：



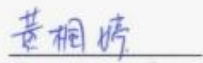
陳昭瑩 博士 國立臺灣大學植物病理與微生物學系(所)教授



顏瑞泓 博士 國立臺灣大學農業化學系(所)教授



陳建德 博士 國立臺灣大學農業化學系(所)助理教授



黃楓婷 博士 國立臺灣大學生化科技學系(所)助理教授



吳蕙芬 博士 國立臺灣大學農業化學系(所)副教授  
(本論文指導教授)

## 謝誌

感謝吳蕙芬老師悉心指導與各位口試委員給予的寶貴建議，才能將論文順利的完成。也謝謝家人在攻讀博士學位期間對我的包容與支持。求學過程中師長與好朋友們所給予的提點與建議使我受益良多。還有謝謝這六年來一起在實驗室打拼互相扶持的夥伴們，以及中研院林宇慶博士、江秉諭博士及林聖偉博士在實驗上給予的幫助與建議。對大家的幫忙，盡在不言中，只有感謝、感謝再感謝



謝汎擎 101.7.27

## 摘要

ATP依賴型蛋白酶對於控制關鍵調控蛋白表現量及降解異常蛋白質以維持微生物體內正常生理活動扮演著重要的角色。ClpYQ蛋白酶為ATP依賴型蛋白酶其中的一種由ClpY與ClpQ二種次單元體所組成。ClpY具有ATPase與chaperone的功能而ClpQ為一胜肽酶。ClpY可以自身形成的六元環而與ClpQ十二元體上下相接形成啞鈴狀的聚合分子。ClpY主要負責辨識、解構與運送基質SulA至ClpQ十二元體的活性中心進行分解。ClpY單元體由N、I與C三個domain組成各有其獨特的活性而I domain區域突出於N與C domain之外，其主要的功能尚未有清楚的界定。本研究發現ClpYQ蛋白酶對基質MBP-SulA的辨識結合主要是由loop2結構來進行。而I domain loop1(aa.137-150) 結構則是可能在ClpY在與MBP-SulA辨識結合後，ClpYQ蛋白酶進行降解作用時，阻擋多餘的MBP-SulA與ClpY六元環結合的功能。在pore I/loop2雙缺失突變蛋白 $\Delta$ P1L2(aa 90-93; aa 175-209)在*in vitro* pull down實驗中有與MBP-SulA最低的相對活性，顯示基質的辨識結合由pore I與loop2共同負責。另外ClpY可以在沒有ATP存在下與SulA進行辨識結合，而且當ClpY形成六元環後只能與少量的MBP-SulA結合。綜合以上結果可推論出ClpY與SulA進行辨識結合的步驟：即ClpY在沒有ATP存在下與SulA進行辨識結合後，SulA-ClpY在ATP存在下與其他未結合的ClpY形成SulA-ClpY<sub>6</sub>或SulA-ClpY<sub>12</sub>的聚合，再與ClpQ十二元體形成SulA-ClpY<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>聚合體，再進行解構、傳送及降解的步驟。而ClpYY408A突變蛋白無法形成穩定的六元環及ClpYQ聚合體，但仍保有部分的ATPase活性及部分的降解活性，顯示了ClpYQ聚合的穩定度對酵素的活性是重要的。

關鍵字： ClpYQ、MBP-SulA、pore I site、I domain、pull down、基質辨識

## Abstract

ATP dependent proteases play important roles in controlling the levels of key regulatory protein and in the elimination of abnormal proteins to maintain normal physiological functions of microorganisms. ClpYQ protease, one of ATP dependent proteases includes two subunits ClpY and ClpQ. ClpY acts as an ATPase and chaperone and ClpQ is a peptidase. ClpY is capable of forming a hexamer ring docked with ClpQ dodecamer to constitute a dumbbell-shaped complex. ClpY is responsible to recognize, unfold and translocate substrates into the proteolytic site of ClpQ for degradation. Besides, ClpY is divided into three domains N, I and C domain. Each domain has its own distinct activity. I domain, a unique protruding domain of ClpY, is unclear for its function. In this study, our results demonstrated that ClpY I domain loop2 is responsible for the initial gripping of Sula and loop1 acts as a lid that is likely to prevent an excess of substrates binding for ClpY when ATP is present.  $\Delta$ P1L2(aa 90-93 ; aa 175-209) showed the lowest binding activity with MBP-Sula at *in vitro* pull-down assay and these results indicated that pore I and loop2 are most responsible for substrates binding. In addition, ClpY was capable of recognizing MBP-Sula without ATP to form Sula-ClpY complex and the ClpY hexamer can only bind a MBP-Sula molecule when ATP is present. These results also indicated that ClpY was capable to recognize Sula without ATP and formed Sula-ClpY complex for increasing its local surrounding substrate's concentration and likely subsequently formed Sula-ClpY<sub>6</sub> or Sula-ClpY<sub>12</sub> complex docked with ClpQ for degradation when ATP is present. Y408A is not capable to form stable hexamer and ClpYQ oligomer maintains partial ATPase activity and degradation activity indicating that ClpYQ oligomerization is important for the enzyme activity.

keyword: ClpYQ·MBP-Sula·pore I site·I domain·pull down·substrate recognition

# 目錄

論文審定書	i
謝誌	ii
摘要	iii
Abstract	iv
目錄	v
表目錄	vii
圖目錄	viii
附圖目錄	x
<b>壹、前言</b>	<b>1</b>
一、能量依賴蛋白酶	1
二、ClpYQ 蛋白酶	2
三、ClpQ 結構及功能	3
四、ClpY 結構及功能	4
五、ClpYQ 蛋白酶與 ATP 之間的交互作用	6
六、ClpY 與 ClpQ 的交互作用	7
七、ClpYQ 蛋白酶之基質	9
八、ClpYQ 蛋白酶對於 Sula 之辨識	10
九、研究動機與目的	11
<b>貳、材料與方法</b>	<b>12</b>
一、實驗材料	12
(一) 菌株與質體	12
(二) 藥品與試劑	12
二、方法	14
(一) 目標基因選殖	14
(二) 蛋白質純化	17
(三) SDS 蛋白質膠體電泳	20
(四) 西方墨點分析	22
(五) 蛋白質活性測試	26
(六) ATPase 活性測定	27
(七) 等溫滴定量熱法	28
(八) 蛋白質聯結測試	28

(九) Pull down assay.....	29
(十)表面電漿共振生物分子感測法.....	30
<b>參、結果.....</b>	<b>31</b>
一、ClpY與ClpQ及其突變蛋白純化.....	31
二、ClpY及其突變蛋白對於ClpYQ分解MBP-SulA活性的影響.....	31
三、以 <i>in vitro</i> pulldown探討ClpY對於MBP-SulA辨識結合的區域.....	34
四、以蛋白質聯結測試觀察ClpY及ClpY與ClpQ的聚合.....	38
五、ClpY T87I ATPase突變蛋白的定性分析.....	40
六、C domain突變蛋白ClpY Y408A的定性分析.....	41
七、以表面電漿共振生物分子感測法進行即時偵測MBP-SulA與ClpY、pore I 缺失突變蛋白與雙缺失突變蛋白的親和力.....	43
<b>肆、討論.....</b>	<b>44</b>
<b>伍、結論.....</b>	<b>49</b>
<b>陸、參考文獻.....</b>	<b>50</b>

## 表目錄

表一、本論文所使用的菌株.....	55
表二、本論文所使用的質體.....	56
表三、本論文所使用的引子.....	57
表四、ClpY及其缺失突變蛋白於胞外降解MBP-SulA的相對活性.....	58
表五、在不同核苷酸存在下ClpY與MBP-SulA在 <i>in vitro</i> pulldown試驗中相對活性.....	59
表六、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測MBP-SulA與ClpY及其缺失突變蛋白之間的親和力.....	60
表七、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測於有 ATP 下 MBP-SulA 與 ClpY 及其缺失突變蛋白之間的親和力.....	61



## 圖目錄

圖一、突變蛋白及其突變區域位置	62
圖二、帶有 His tag ClpY 與 ClpQ 的蛋白質純化	63
圖三、帶有 MBP tag SulA 蛋白質的純化	64
圖四、純化帶有 N 端 His tag 的 ClpY $\Delta$ I domain 缺失突變蛋白質	65
圖五、純化帶有 N 端 His tag 的 ClpY $\Delta$ D-loop 缺失突變蛋白質	66
圖六、ClpYQ 蛋白酶於胞外對 MBP-SulA 降解實驗	67
圖七、ClpYQ 與 ClpY-ClpQE61C 對 MBP-SulA 的降解實驗	68
圖八、ClpY I domain 缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解實驗	69
圖九、ClpY $\Delta$ D-loop 缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解實驗及其蛋白質穩度	70
圖十、ClpY I domain loop2 點突變蛋白對 MBP-SulA 的降解實驗	71
圖十一、以不同核苷酸進行 ClpY 與 MBP-SulA 的 <i>in vitro</i> pulldown 實驗	72
圖十二、以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 ClpQ 對 ClpY 與 MBP-SulA 的辨識結合的影響	73
圖十三、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 ClpY $\Delta$ I+7Gly 缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合	74
圖十四、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 ClpY $\Delta$ L1 缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合	75
圖十五、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合	76
圖十六、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 ClpY $\Delta$ D-loop 缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合	77
圖十七、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 I domain loop2 點突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合	78
圖十八、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 pore I 缺失突變蛋白 $\Delta$ P1 與 MBP-SulA 辨識結合	79
圖十九、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析雙缺失突變蛋白 $\Delta$ P1L1 與 MBP-SulA 辨識結合	80
圖二十、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析雙缺失突變蛋白 $\Delta$ P1L2 與 MBP-SulA 辨識結合	81
圖二十一、ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白與雙缺失突變蛋白 ClpY $\Delta$ P1L2 <i>in vitro</i> pulldown 之結果	82
圖二十二、ClpY pore I 缺失突變蛋白及 pore I/I domain 雙缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解實驗	83
圖二十三、以蛋白質聯結測試觀察 ClpY 自身聚合及 ClpY 與 ClpQ 的聚合	84
圖二十四、以蛋白質聯結測試觀察 ClpY 與 MBP-SulA 的結合	85
圖二十五、以蛋白質聯結測試觀察 ClpY $\Delta$ L1 缺失突變蛋白自身聚合及 ClpY $\Delta$ L1	

缺失突變蛋白與 ClpQ 的聚合·····	86
圖二十六、以蛋白質聯結測試觀察 ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白自身聚合及 ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白與 ClpQ 的聚合·····	87
圖二十七、ClpY T87I ATPase 突變蛋白對 MBP-SulA 的降解實驗·····	88
圖二十八、ClpY T87I ATPase 突變蛋白 ATPase 的相對活性·····	89
圖二十九、以等溫滴定量熱法(Isothermal Titration Calorimetry, ITC) 進行 ClpY、ClpYT87I 與 ATP $\gamma$ S 結合測定·····	90
圖三十、以蛋白質聯結測試觀察 ClpY T87I ATPase 突變蛋白自身聚合及 ClpY T87I ATPase 突變蛋白與 ClpQ 的聚合·····	91
圖三十一、ADP 存在下以蛋白質聯結測試觀察 ClpY T87I ATPase 突變蛋白自身聚合及 ClpY T87I ATPase 突變蛋白與 ClpQ 的聚合·····	92
圖三十二、ClpY Y408A 突變蛋白對 MBP-SulA 的降解實驗·····	93
圖三十三、ClpY Y408A 突變蛋白 ATPase 的相對活性·····	94
圖三十四、以蛋白質聯結測試觀察 ClpY Y408A 突變蛋白自身聚合及 ClpY Y408A 突變蛋白與 ClpQ 的聚合·····	95
圖三十五、在有或無 ATP 下以 <i>in vitro</i> pulldown 分析 ClpY Y408A 突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合·····	96
圖三十六、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY 之間的親和力·····	97
圖三十七、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ P1 之間的親和力·····	98
圖三十八、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ P1L1 之間的親和力·····	99
圖三十九、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ P1L2 之間的親和力·····	100
圖四十、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY 之間的親和力·····	101
圖四十一、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ P1 之間的親和力·····	102
圖四十二、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ P1L1 之間的親和力·····	103
圖四十三、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ P1L2 之間的親和力·····	104
圖四十四、ClpY 與 MBP-SulA 辨識結合流程·····	105

## 附圖目錄

附圖一、大腸桿菌 ClpYQ 結構圖.....	106
附圖二、大腸桿菌 ClpY 六元環與單元體結構圖.....	107
附圖三、大腸桿菌 ClpY 與 ClpQ 在無 ATP 下以凝膠過濾法純化其分子大小之分布.....	108
附圖四、大腸桿菌 ClpY pore I site 之結構.....	109
附圖五、基質促進 ClpYQ 聚合與降解流程.....	110



# 壹、前言

## 一、能量依賴蛋白酶(energy-dependent protease)

在細胞內為了維持正常的生理功能及新陳代謝活動，細胞內各種調節蛋白濃度高低及蛋白質品質均須調控與平衡才能達成。而能量依賴蛋白酶(energy-dependent protease)能夠藉由分解蛋白質來維持細胞中蛋白質濃度的恒定及分解錯誤摺疊的蛋白質以維持蛋白質的品質，確保功能正常。在真核細胞中 26S proteasome 可辨識被加上 ubiquitin tag 的基質予以分解。然而在細菌中有數種標記系統及能量依賴蛋白酶；這些能量依賴蛋白酶(energy-dependent protease)在正常的生長狀況下細胞內有一定的表現量。當受到環境的壓力刺激下細菌會增加此類蛋白質的合成，調節細胞生理功能抵抗環境壓力維持正常生理功能。而蛋白質的分解作用，不管在動物細胞或細菌中均涉及在貧乏狀態下回收蛋白質，藉以產生游離胺基酸進行回收再利用與能量生成的機制 (Wickner *et al.*, 1999)。所以這些能量依賴蛋白酶(energy-dependent protease)在調節細胞生理功能上扮演了重要的角色。

在大腸桿菌中也具有此類能調節細胞生理功能的 energy-dependent protease，如 Lon、HslUV(ClpYQ)、ClpAP、ClpXP、FtsH 等。以上這些蛋白酶均可藉由水解 ATP 將蛋白質水解成小片段，當細菌生長環境受到改變如：溫度上升或下降、營養缺乏、添加抗生素或其他化學藥劑、滲透壓改變、UV 照射等，都會引發菌體內不正常蛋白質生成累積，此時細菌會因所受到不同的壓力產生一些反應，如：熱休克反應(Heat-shock response)或 SOS 反應，在這些反應中會引起以 ATP 作為能量來源的蛋白酶提高生產，用以幫助細菌度過不利於生長的環境。

## ATP 依賴蛋白酶 (ATP-dependent protease)

ATP 依賴蛋白酶為廣泛存在於真核細胞、細菌及古細菌中。顧名思義 ATP 依賴蛋白酶能夠水解 ATP 作為能量來源，將基質結構打開並降解。ATP 依賴蛋

白酶通常為桶狀的複合體，而蛋白酶的活性部位則被包埋於桶狀複合體中。基質必須穿越桶狀的複合體中央的孔洞才能抵達蛋白酶活性中心(Bochtler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997)。孔洞直徑大小約為 10Å，而蛋白質進入需經解構之後才能進入蛋白酶活中心進行降解 (Bochtler *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2002)。而真核生物中的 26S proteasome 也是依賴蛋白酶的成員之一。由具有 ATPase 功能的 19S proteasome 及具有蛋白酶功能的 20S proteasome 所組成，19S proteasome 會辨識基質並將基質解構送入 20S proteasome 中進行降解 (Voges *et al.*, 1999)。

在大腸桿菌中 ATP-dependent protease，其中可依組成分為雙組合系統(two component system)，如 ClpYQ、ClpAP、ClpXP 等；單一胜肽鏈蛋白酶(single-chain protease)，如 Lon 及 FtsH。雙組合系統是由兩各單元體組成，分別為 ATPase 與 peptidase；單一胜肽鏈蛋白酶則是具有 ATP 水解酶(ATPase) 與胜肽分解酶(peptidase)活性的單元體。ATP-dependent proteases 在分類上根據 AAA (ATPase associated with a variety of cellular activities)保守序列的個數，將 ATP-dependent protease 分為兩種類型的蛋白質：(1) Class I: 如 ClpA、ClpB、ClpC 及 ClpE，其均具有兩個具保守性的 AAA domain 或 Nucleotide binding domain (NBD) AAA-1(D1)，分別為 AAA-1(D1)及 AAA-2(D2)，兩者之間由一段序列(linker sequence)隔開，此序列於各個菌種長度接不同；(2) Class II：如 ClpX 與 ClpY，其具有一個保守性的 AAA module，為 AAA-2(與 D2 具有同源性) (Schirmer *et al.*, 1996)。

## 二、ClpYQ 蛋白酶

### *ClpQY* operon

*ClpQY* operon 是以 *clpQ* 在前 *clpY* 在後的順序存在於基因組上 (Chuang *et al.*, 1993)，而 *ClpQY* operon 能經由熱休克誘導生成及其上游啟動子(promoter)基因序列與  $\sigma^{32}$  (熱休克基因啟動子)能辨識之保守序列相似，且其序列與 *groE* 及

dnaK等熱休克基因啟動子相符，因而 $clpQ^+Y^+$  operon被推論為熱休克基因。所以 $ClpQY$ 也被稱為 $HslVU$ (Heat Shock Locus)。

在1996年，Rohrwild等人 (Rohrwild *et al.*, 1996)，利用帶有 $lac$  promoter 及  $ropH$  基因( encode $\sigma^{32}$ )之質體，大量表現 $\sigma^{32}$  時， $ClpYQ$ 的表現量增加約 10 倍，且當有 ATP 存在時， $ClpYQ$ 水解短肽鏈 Z-Gly-Gly-Leu-AMC 之能力亦提高約10倍，此研究確認了 $ClpYQ$ 屬於熱休克蛋白酶，並提及此 operon 受到 $\sigma^{32}$  調控。

$clpY$  基因的突變會造成dnaA46突變株在較高溫環境生長時抑制DNA的複製，Lon突變株的絲狀性狀及照射UV所造成的死亡可藉由 $clpQ^+Y^+$  的大量表現獲得抑制 (Khattar, 1997)。 $ClpYQ$ 同時也能分解 $\sigma^{32}$  在44°C下分解活性為35°C的15倍 (Kanemori *et al.*, 1997)。在研究報告中 (Lien *et al.*, 2009)利用在染色體上 $clpQ^+Y^+$  啟動子序列與報告基因( $lacZ$ )融合，並在野生型及 $rpoH$  缺失株中進行熱休克的誘導，在研究報告中融合基因在野生型菌株經熱休克誘導會表現增加而在 $rpoH$ 缺失株表現量減少且在啟動子與RpoH結合的-10區域帶有C→T點突變，融合基因表現量會減少證明了RpoH是單獨調控 $clpQ^+Y^+$  operon的表現。作者更進一步的發現 $clpQ^+Y^+$  operon的五端上游帶有一段約71bp未轉譯序列(5'untranslated region; 5'UTR)會形成stem-loop的結構針對此一結構經由缺失突變分析結構的破壞會造成融合基因表現量的下降由此一結果得出5'UTR形成stem-loop的結構與否會影響 $clpQ^+Y^+$  operon表現，推論stem-loop的結構可增加mRNA的穩定性 (Lien *et al.*, 2009)。

### 三、ClpQ結構及功能

ClpQ單元體由176個胺基酸構成，基因片段長531個鹼基，分子量為19kDa。ClpQ會聚合形成六元環單體，再由兩個六元環單體聚合形成十二元體。ClpQ具有

胜肽酶的功能，主要負責水解經由ClpY解開並運送來的胜肽鏈 ClpQ與真核生物的 20S proteasome之 $\beta$ -type subunit 具有 18%之相似度且在蛋白酶的分類上與 20S proteasome同樣屬於threonine protease，與ClpP（屬於 serine protease）不同 (Missiakas *et al.*, 1996, Bochtler *et al.*, 1997)。

ClpQ在其單獨存在時，是一個活性不高的胜肽酶(peptidase)可緩慢的水解一些斥水性的胜肽 (Rohrwild *et al.*, 1996)，ClpQ 自身會形成六元環在兩個六元環聚合成啞鈴狀的十二元體，而其活性中心位於十二元體內部 (Bochtler *et al.*, 1997)。基質必須進入活性中心才能被分解。因此十二元體的聚合對於ClpQ的活性有很大的影響。組成ClpQ的12元體每個單體皆具有單一活性部位，所以ClpQ的12元體具有12個活性部位。在2009年的研究報告顯示，當ClpQ 12元體中具有正常ClpQ次單元的個數達6個以上時，可以維持與野生型ClpQ 蛋白酶相同的peptidase活性，若個數不達6個時，其peptidase活性有逐漸下降的趨勢 (Lee *et al.*, 2009)。

#### 四、ClpY結構及功能

ClpY由443個胺基酸構成，基因片段長1332個鹼基，分子量為49kDa，會聚合形成六元環 (附圖一)。ClpY具有ATP水解酶與chaperone的功能 ClpY六元環能與ClpQ聚合成的十二元體結合後進行蛋白質的水解。ClpY具有ATP水解酶與chaperone的功能之外也負責基質的辨認與結合，並藉著水解 ATP消耗能量，打開基質及將基質經由中心孔洞送往ClpQ中水解。ClpY單體具有三個區域分別為N、C及 I domain；N domain約有197各胺基酸 (N, residues 2-109及244-332) 此區域為nucleotide binding site；C domain為111各胺基酸組成,(333-443aa)形成一 $\alpha$ -helix構造；而I domain介於N、C domain之間 (110-243 aa)而突出於N、C domain之外，其結構具有高度的彈性 (附圖二 B) (Bochtler *et al.*, 2000)。

## ClpY N domain

ClpY具有二個N domain(aa 2-109及aa 224-332)中間以I domain相連之後接C domain(N-I-N-C)，在N domain中有核苷酸結合區域 nucleotide binding pocket(aa17-19, aa57-66, aa80-89)、central pore(pore I aa89-94,poreII aa265-269)。

前人研究中(Wang *et al.*, 2001)指出在不同菌種間ATPase的同源性比較，在pore I的GYVG motif的胺基酸序列保守性相當高，藉由ClpY結晶結構指出位於pore I GYVG motif中Y91位置會隨著ClpY open state到close state的變化而遠離或靠近ClpQ，因此認為水解ATP提供了將基質打開並轉送至蛋白酶活性區的能量，Y91則可能扮演將基質解構及轉送至活性區的角色(Wang *et al.*, 2001)。在Park等人報告中更進一步推論位於ClpY中心孔洞周圍的G<sup>90</sup>Y<sup>91</sup>V<sup>92</sup>G<sup>93</sup> pore-motif(附圖四)扮演打開及運送基質的角色 (Park *et al* 2005)。Y91G、V92G、G93A、△88-92突變蛋白無法分解MBP-SulA，但仍具有分解casein的能力。突變蛋白Y91F、V92I、V92A、V92S具有分解MBP-SulA及casein能力，而其他突變蛋白Y91I、Y91C、Y91A、Y91S、V92F、V92C無法分解MBP-SulA但仍具有分解casein的能力。結果顯示在第91位置為芳香環系胺基酸對於分解SulA是無可取代的(Park *et al.*, 2005)。且在2011年的研究，以酵母菌雙雜交系統與*in-vitro* pull down assay針對位於ClpY中心孔洞(central pore)中的兩個pore site(pore I 90-93aa.; poreII 265-269aa.)與基質MBP-SulA結合的關係研究中指出pore I突變蛋白Y91F、Y91S、V92F在ClpQ存在下，不管是否具有分解基質MBP-SulA的能力(Y91F有；Y91S、V92F則無)均可與基質MBP-SulA結合，證明了pore I參與基質的結合與負責運送；而poreII不若pore I重要 (Hsieh *et al.*, 2011)。

## ClpY C domain

ClpY C domain( aa333-443)，C domain與N domain會形成ATPase活性區，當



ATP與ClpY結合時ATP會同時與C domain與N domain接觸形成緊密的結合；反之，C domain與N domain結構較鬆散。C domain也會與鄰近ClpY單元體的N domain以逆時針的方向緊密的結合幫助ClpY形成六元環 (Bochtler *et al.*, 2000)。的在前人研究中，ClpY當與ATP結合時C domain末端會自結構內部伸出並插入ClpQ聚合體活化ClpQ活性 (Wang *et al.*, 2001)。ClpY C domain具有幫助ClpY形成六元環、幫助ClpY與ClpQ結合與維持ATPase活性的功能。

### ClpY I domain

在前人研究中ClpYQ的聚合是由ClpY的C domain與ClpQ相接而ClpY的I domain位於ClpYQ聚合體的最外側(Ishikawa *et al.*, 2000)。ClpY與其他ATPase經由序列比對座同源性比較，在I domain的部分的比對不僅長度大小不一，連胺基酸的序列也有明顯的不同 (Wang *et al.*, 2001)。Wang等人藉由ClpY結晶結構提出了ClpY運送親脂性基質的模型：基質先與ClpYQ外側的I domain辨識結合，當I domain改變位置將基質往中心孔洞運送時，孔洞打開露出Y91與基質結合後，由Y91將基質帶往ClpQ，孔洞關閉 (Wang *et al.*, 2001)。研究指出ClpY的I domain包含的兩個loop結構：loop1 (P137-Q150) 及loop2 (I175-Q209)，ClpY可能藉由這兩個loop來進行基質的辨識與結合 (Song *et al.*, 2000)。近期研究中 (Lien *et al.* 2009)在酵母菌雙雜交系統中ClpY $\Delta$ L1,L2(loop1 137-150aa；loop2 175-209aa)缺失突變株無法與SulA有親和力，然而ClpY $\Delta$ I+7Gly在MMS test與西方氏雜交 (western blot)的結果顯示除了野生型ClpY及ClpY $\Delta$ L1(loop1；137-150aa)外其餘突變株均無法生長在western blot的結果也測到了SulA的存在。以上結果顯示ClpY I domain可能參與降解作用之前期對基質辨識有關。

## 五、ClpYQ蛋白酶與ATP之間的交互作用

ClpYQ為ATP依賴蛋白酶 (ATP-dependent protease)，ATP存在與否與ClpYQ蛋

白酶的活性有密切的關聯。與ClpYQ蛋白酶需要藉由ClpY本身的ATPase水解ATP將基質解構並傳送基質至ClpQ進行基質降解。在沒有ATP存在下經gel filtration所得到的聚合蛋白分子量則分布於50 kDa、100kDa、282 kDa及346 kDa，約為ClpY單體的1倍、2倍、6倍及7倍，而在ATP存在下經gel filtration則大部分聚集在單體的6倍及7倍(Kessel *et al.*, 1996; Rohrwild *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 1996)。經X-ray結晶繞射分析，確認ClpY是以六元環的形式存在(Rohrwild *et al.*, 1997)顯示ATP的存在會促進ClpY六元環的形成。而在2008年研究報告中發現，雖然ClpY六元環具有6各ATP結合區，但其與ATP結合的狀態在3至4個結合狀態即達到飽和並不會6個ATP結合區全數佔滿。而是當1個ATP與ClpY結合時會使得ClpY與ClpQ結合隨著ATP與ClpY結合的量增加促使ClpY辨識基質，然後活化ATP的水解作用進而提供能量使得基質被解構並運送至ClpQ進行降解。由此，完成酵素聚合、基質辨識、基質打開折疊與運送及基質降解的循環，因此正在作用的ClpYQ不會分離且維持其分解效率 (Yakamavich *et al.*, 2008)。

## 六、ClpY與ClpQ的交互作用

Ishikawa 等人 (Ishikawa *et al.*, 2000)於 Nature 發表以 cryo-EM 觀察大腸桿菌 ClpYQ 蛋白質的結構，發現 ClpY 的 I domain 是遠離 ClpQ 並非與 ClpQ 相接；此外在 2001 年 Wang 等人 (Wang *et al.*, 2001)及 2002 年 Ramachandran 等(Ramachandran *et al.*, 2002)亦有相同的結果，指出 ClpY 的 I domain 是遠離 ClpQ 且 ClpYQ 的聚合是由 ClpY 的 C domain 與 ClpQ 相接。ClpYQ 蛋白酶是由  $Y_6Q_6Q_6Y_6$  環狀結構所形成的啞鈴狀聚合體，ClpYQ 聚合體中央通道是相通的而降解蛋白質的活性區域包埋於 ClpQ 內(附圖一)。由於進入 ClpQ 十二元體入口僅  $10\text{\AA}$ ，基質無法直接進入酵素活性中心進行分解。所以基質需要先經由 ClpYQ 蛋白酶外側的 ClpY 解開摺疊，再將胜肽鏈送入 ClpQ 進行基質的降解 (Zolkiewski, 2006)。

Wang等人藉由重新分析已知的幾種ClpY結晶結構，得到  $SO_4$ 、ATP、ADP 及

不外加的四種情況下ClpY之結晶結構分析觀察到不同核苷酸對於ClpY之 $\alpha$ -helical domain旋轉角度之影響，並認為不同核苷酸對於ClpY的 $\alpha$ -helical domain旋轉角度之即為ClpY由打開狀態（open state）至關閉狀態（close state）的構型變化。且ClpY在與ATP結合時，其C端會從其結構內部向外伸出與ClpQ十二元體進行結合。當ClpYQ聚合之後，ClpQ十二元體的中央孔洞由10Å擴張至19.3Å。相較於沒有ClpY或是ClpY存在但無ATP時ClpQ十二元體的中央孔洞大小明顯增加近一倍 (Wang *et al.*, 2001)。

2002年Ramachandran等人亦有合成ClpY C端最後8個胺基酸EDLSRFIL (octapeptides)，發現僅此 octapeptides 便能將 ClpQ 的功能活化，進行分解一些短胜肽鏈，此結果較野生型的ClpYQ功能效率相比為其之50%，而此實驗之結果顯示，在加入octapeptides之後，ClpQ仍無法分解已摺疊之較大基質，但是卻明顯比僅ClpQ存在時在分解短胜肽的能力上有明顯的提升，同樣在decapeptides (ADEDLSRFIL)及dodecapeptides (LVADEDLSRFIL)的實驗中也看到相同的情形，甚至在使用12個胺基酸的胜肽鏈時，效率可以達到100%。從以上證據可知ClpY C端最後10個胺基酸在活化ClpQ的功能上扮演重要的角色 (Ramachandran *et al.*, 2002)。在2004年的研究報告更進一步顯示ClpY C端之R440及L443胺基酸為連結並活化ClpQ的重要位置 (張2004)。在ClpQ與ClpY C端的結合部位，經結晶結構預測ClpQ E61及K28為ClpY R440及L443對應之位置 (黃2006)以酵母菌雙雜交系統分析ClpQ蛋白分子在E61位置突變，除了E61D以外其餘其他胺基酸均可以在E61位置上與ClpY產生數十至數百倍的交互作用力且可以恢復ClpY R440突變株的酵素活性而K28位置則是不可替換的重要位置。

在研究報告中 (Azim *et al.*, 2006)以SPR(surface plasmon resonance)技術測定蛋白質的交互作用力，發現在基質(MBP-SulA)存在的情形下ClpYQ的親和力為ClpYQ單獨存在下的5倍且ClpY對於MBP-SulA有極強的親和力；另外，也提供了證據當ClpY與ClpQ的交互作用時，基質可參與其中。反之，ClpQ則無此作用。

## 七、ClpYQ 蛋白酶之基質

大腸桿菌ClpYQ蛋白酶之基質，目前所知ClpYQ基質有四種：SulA、RcsA、RpoH及TraJ。其中SulA與RcsA為Lon之基質 (Gottesman *et al.*, 1993)。RpoH為FtsH之基質 (Herman *et al.*, 1995)。ClpYQ 專屬之專一性基質直至目前仍未發現。

SulA為突變株中篩選到的可幫助細菌抗拒紫外線傷害的蛋白質 (Gottesman *et al.*, 1985)是 *sfiA* 所轉譯出之產物 (Jones & Holland, 1985)，為SOS反應發生時會大量表現的蛋白質之一。目前已知：SulA為細胞分裂的抑制物，能與FtsZ(能促進細胞分裂)形成複合物，以達到抑制細胞分裂的效果。當細胞DNA受到嚴重損傷時，細胞會啟動SOS反應，此時SulA會大量表現使細胞停止生長，直至細胞度過惡劣的環境。

RcsA為一胞外莢膜(capsule)生成的正調控蛋白質，RcsA能夠使莢膜生成基因*cpsB*的表現量增加，是一種轉錄活化物，其於1985年時首度由Gottesman等人 (Gottesman *et al.*, 1985)提出，被認為可調控莢膜生成，於*lon*突變株更為明顯，而細菌的莢膜被認為與致病力及細菌於宿主外存活有關。

RpoH為一種 $\sigma$  factor ( $\sigma^{32}$ ，其可開啟熱休克基因的表現，是一個與熱休克基因轉錄有關之因子)。RpoH在平常溫度時，結構較不穩定易被分解，但當其存在於高溫時結構較穩定，則可進一步啟動熱休克基因表現。在一些蛋白酶(Lon、ClpXP)的突變株中，會看到 $\sigma^{32}$ 的表現量增加，而當放入*clpYQ*轉殖於拷貝(copy)數高之質體時， $\sigma^{32}$ 的表現量並無增加，發現有抑制熱休克反應的現象發生 (Kanemori *et al.*, 1997)，推測其為ClpYQ之基質。

TraJ為F-plasmid的transfer activator，對於細菌間的接合具正向調控，促使細菌間基因的交換，在最近研究顯示，在細菌正常生長時TraJ對於ClpYQ具有抗性而當有外在壓力的時候，ClpYQ可將TraJ分解 (Lau-Wong *et al.*, 2008)。

## 八、ClpYQ蛋白酶對於SulA之辨識

SulA為ClpYQ天然的基質ClpYQ能將SulA分解成58條不同片段大小的碎片(3-31residues)，ClpYQ對於SulA切割位置較偏好其蛋白質分子中央及C端區域(Breyer & Matthews, 2001)而此區域正是SulA與FtsH進行交互作用必要的區域(Higashitani *et al.*, 1997)。在酵母菌雙雜交系統針對ClpYQ對於基質的辨識的研究中發現在分子中央區段的SulA/M87I與SulA/L57F突變蛋白對於ClpY的親和力有顯著的不同(SulA/M87I有高於野生型的親和力而SulA/L57F幾乎沒有)，且SulA/ $\Delta$  C40幾乎沒有ClpY的親和力 (Lee *et al.*, 2003)。此結果與Lon辨識SulA分子C端區域不同 (Ishii & Amano, 2001)。為確認ClpYQ蛋白酶辨認SulA的區域，進行酵母菌雙雜交測試各突變蛋白與ClpY之間交互作用的情形，發現ClpY辨識的區域可能落在SulA C端末20-30個胺基酸片段中。將C端末20-30個胺基酸序列進行軟體分析，具有較高的疏水性。推測，ClpY可能是利用疏水性作用力對基質SulA進行結合及辨識 (翁, 2009)。透過*in vitro* pull down及降解實驗分析，確認SulA C端末20-30個胺基酸片段中GFIMRP序列對ClpY的辨識、傳送及SulA本身的生理活性扮演重要的角色。同時也發現ClpY GYVG motif中Y91相對作用位置會影響在GFIMRP序列的SulA F143上 (黃, 2011)。

在以Bacteriophage P22 Arc repressor蛋白當作ClpYQ基質的研究中Arc在ATP存在下能夠被ClpYQ辨識然後分解，其辨識區域為Arc的N端序列。其N端序列片段(1-12residues)在有ATP $\gamma$ S及鎂離子的存在下與ClpY有很強的結合力，此結果顯示了ClpYQ對於基質的辨識是需要ATP的存在且辨識區域隨著基質的不同而有所不同 (Kwon *et al.*, 2004)。

## 九、研究動機與目的

ClpYQ蛋白酶的組成分別由ClpY與ClpQ組成，ClpYQ對於其基質的降解需要兩者與ATP的共同參與才能完成。ClpYQ對於基質的降解則是牽涉到一連串的辨識、結合、解構、運送及降解等步驟。ClpY與ClpQ聚合成ClpYQ蛋白酶；才具有降解基質的能力，而ClpY與ClpQ結合力的大小對於ClpYQ蛋白酶降解效率有何影響？是否ClpYQ之間聚合力越強降解效率越高？因此，以ClpQ與ClpY結合力增強功能蛋白探討ClpYQ之間聚合力與蛋白酶活性的關係。

ClpYQ蛋白酶對於其基質SulA的辨識在SulA C末端20-30個胺基酸片段 (翁, 2009)，但是ClpY本身的辨識功能區段尚未有明確的界定。而ClpY I domain (110-243aa)介於N、C domain之間而突出於N、C domain之外，其結構具有高度的彈性 (Bochtler *et al.*, 2000)，而且ClpY的I domain位於ClpYQ聚合體的最外側 (Ishikawa *et al.*, 2000)。在Park等人報告中指出基質的打開及運送位於ClpY中心孔洞的pore site (Park *et al.*, 2005)，有此可知在基質進入ClpY中心的pore site之前應有另一區域先與基質做辨識結合；因此，位於ClpY最外側之 I domain可能與基質辨識有關，並以ClpY的I domain缺失突變蛋白來探討I domain對於基質辨識及分解的影響。

利用酵母菌雙雜交系統中測定ClpY與基質SulA的親和力並輔以MMS test與細胞內降解測試(*in vivo* degradation)的西方氏雜交(Western blot)，進行ClpY及其突變蛋白的分析研究；發現ClpY pore I及I domain上的double loops會影響基質辨識、解構、運送，並且於ClpY與ClpQ結合及ClpQ的活化，使基質降解流程，亦具有初步生化測試之結果。本篇研究，延續及拓展先前所參與之研究，藉由選殖並純化出ClpY及具有影響ClpYQ蛋白酶降解流程的突變蛋白，進行一連串的生生化測試及分析；針對ClpY自身的聚合、ClpY的基質辨識區位、ClpYQ與ATP的關係、ClpY各區域與ClpQ之間的交互作用、及ClpY不同區域(N、I 及C domain)的突變在對基質降解過程所扮演的功能及重要性，提供直接有力的證據。

## 貳、材料與方法

### 一、實驗材料

#### (一) 菌株與質體

##### 1. 菌株

(1) *Escherichia coli* BL21 DE3

(2) *Escherichia coli* XL1 Blue

菌株描述詳見表一

突變蛋白及突變區域詳見圖一

##### 2. 質體

(1) pET21a (novagen)

為表現載體通常用於大量表現所選殖在pET21a MCS(multiple cloning site)上的基因產物其宿主為*E. coli* BL21 DE3，帶有T7 promotor當以IPTG進行誘導時宿主產生T7 polymerase會使選殖在T7 promotor目標基因大量表現而大量產生目標蛋白。帶有Amp抗性。

(2) pMAL(NEB)

為一表現載體，主要是能大量表現目標基因與MBP(maltose binding protein)融合蛋白藉由MBP與amylose resin的親和力提供一簡單方便的方式純化蛋白質。

質體詳見表二

#### (二) 藥品與試劑

##### 1. 培養基

Luria-Bertani (LB) Broth 液態培養基 BD Biosciences (U.S.A.)

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

---

每 25 g 溶於 1 L 蒸餾水中

LB Agar 固態培養基，每 1 L 液態培養基加入 15 g agar

Agar 購於 BD Biosciences (U.S.A.)

Luria-Bertani (LB) Broth+glucose+ampicillin

抗生素使用濃度為 Ampicillin (100 $\mu$ g/ml)

## 2. 藥品、酵素及相關套組

(1)藥品購自 Sigma (St. Louis, U.S.A.)

J.T. Baker (Phillipsburg, U.S.A.)

和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)

及生工公司 (台北，台灣)。

(2)限制酶、接合酶等酵素購自 TaKaRa (Kusarsu, Japan)

(3)Plasmid DNA 純化套組

Mini-M<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction kit (Viogene，富聯生物科技公司)

Gel-M<sup>TM</sup> Gel Extraction kit (Viogene，富聯生物科技公司)

Gel/PCR DNA isolation kit (Viogene，富聯生物科技公司)

QIAGEN<sup>R</sup> Plasmid Midi kit (Qiagene)

(4)蛋白質純化套組

TALON Metal Affinity Resin (Clontech)

pMAL<sup>TM</sup> Protein Fusion and Purification System (NEB)

(5)親和力測試



### 3.核酸引子

ClpY 引子在 5 端帶有 NdeI 切位與加入 6 個 His 胺基酸以便於純化，而在 3 端帶有 HindIII 切位。ClpQ 引子在 5 端帶有 NdeI 切位，而在 3 端帶有 HindIII 切位與加入 6 個 His 胺基酸以便於純化。

核酸引子由基隆米克斯合成

詳見表三

## 二、方法

### (一) 目標基因選殖

#### 1.質體製備

Mini-preparation of plasmid DNA from bacteria(小量製備)

相關 Kits 購買自 Viogene 以及 Qiagene，詳細實驗步驟參考套組之使用手冊。

#### 2.勝任細胞 (competent cell) 製備

氯化鈣法於 37°C 恆溫培養箱隔夜培養菌體 (12 - 16 小時)。以 1 mL 菌體接種於 100 mL LB 培養基，重新震盪培養至 OD<sub>600</sub> 吸光值為 0.6 - 0.8。將菌液平分至兩管，4000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液。此後步驟均保持低溫操作。以每管 1 - 2 mL 冰的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 懸浮菌體，再加入 3 - 5 mL 冰 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 混勻，冰浴 30 分鐘。以 4000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，後倒掉上清液。重複 3 及 4 步驟一次。每個離心管加入 2 mL 冰 0.1 M CaCl<sub>2</sub> / 15% glycerol，懸浮菌體。每 0.2 mL 菌液分裝至菌種保存管中，儲存於 -80°C。

### 3.轉形作用

#### (1) *E. coli* Heat shock transformation

取 50 μL competent cell 與 20 μL 質體接合產物 或 5 μL 小量製備的質體

混合，冰浴 40 分鐘。於 42°C 水浴，進行熱休克轉形作用 100 秒。加入 0.5 mL LB，在 37°C (AC3112 於 30°C) 培養箱中震盪培養 1 小時。以 4000 rpm 離心五分鐘，去除上清液，留下約 50  $\mu$ L 懸浮菌體，塗於具適當抗生素固態培養基上，置於 37°C (AC3112 於 30°C) 培養箱培養隔夜。以 4000 rpm 離心五分鐘，去除上清液，留下約 50  $\mu$ L 懸浮菌體，塗於具適當抗生素固態培養基上，置於 37°C (AC3112 於 30°C) 培養箱培養隔夜。

## (2) TSS-Transformation

取 30  $\mu$ L 隔夜培養菌液加入 3 mL LB 培養液中，培養至 OD<sub>600</sub> 0.6~0.8。將菌液以 3000 rpm，離心 5 分鐘，移除上清液。以 300  $\mu$ L 2X TSS 溶液將菌體懸浮，冰浴 10 分鐘。加入 5  $\mu$ L 質體，混勻後，再置於冰上 30 分鐘。於 42°C 下，進行熱休克反應 (Heat shock) 120 秒。加入 0.5 mL LB 液態培養基，在 30°C 培養箱中震盪培養 1 小時。以 4000 rpm 離心五分鐘，去除上清液，留下約 50  $\mu$ L 懸浮菌體，塗於適當抗生素之 LA plate，置於 30°C 培養箱培養隔夜。

### 2X TSS (Transformation and storage solution)

PEG 8000 (Polyethylene glycol 8000)	20.0 g
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	10.0 ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	4.0 ml

加入 LB 至 200 mL，以 0.22  $\mu$ m 孔徑濾膜過濾達滅菌效果，保存於 4°C。

## 4. 基因選殖

### (1) 基因表現質體建構

#### pET21a 6x His *clpY* 與 pET21a 6x His *clpQ* 及其他突變蛋白

設計帶有 6x His tag 及 *NdeI* 切位之 5' 端引子 (*NdeI*-His-*ClpY*-5' primer) 及帶有 *HindIII* 切位之 3' 端引子 (*ClpY*-*HindIII*-3' primer) 以 pBAD24-*clpY* 及其突變基因作為模板，透過 PCR 放大 *clpY* 及其突變基因片段後，將此片段及 pET21a 以 *NdeI* 及 *HindIII* 截切後並進行接合反應，最後轉形至大腸桿菌中，利用含 Ampicillin

抗生素的培養基進行篩選。而 *clpQ* 則使用帶有 *NdeI* 切位之 5 端引子 ( *NdeI*-*ClpQ*-5'primer ) 及帶有 6xHis-tag 及 *HindIII* 切位之 3 端引子 ( *ClpQ*-His-*HindIII*-3'primer ) 以 pBAD33-*clpQ* 作為模板，以相同的方式進行建構。

## (2) 聚合酵素鏈鎖反應(PCR)

PCR 反應條件

Template	2.0	μl
10X PCR buffer (with Mg <sup>2+</sup> )	5.0	μl
dNTP (10 mM)	1.0	μl
Forward primer 5 mM (5')	1.0	μl
Reversed primer 5 mM (3')	1.0	μl
Taq DNA polymerase	1.0	μl
ddH <sub>2</sub> O	39.0	μl
<b>Total</b>	<b>50.0</b>	<b>μl</b>

95°C : 10 分鐘，雙股 DNA 打開成單股 DNA。95°C : 90 秒。55°C : 60 秒，使引子 annealing 於模版。72°C : 90 秒，進行 DNA extension。重複步驟 2、3、4 共 30 個循環。72°C，2 分鐘。4°C，中止反應。產物保存於 4°C。

## (3) 限制酶 (restriction enzyme) 反應

選用適當之限制酶與質體和 DNA 片段分別反應，反應溫度視限制酶種類而定，一般來說反應溫度為 37°C，反應時間 60 – 70 分鐘。將反應溶液加入適當之追蹤染劑，進行 DNA 瓊脂膠體電泳。

## (4) DNA 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳

以 1× TAE 緩衝液配製 0.8~1.0% 之瓊脂膠體，以 100 伏特之電壓進行電泳，反應 25~35 分鐘。以 EtBr (ethidium bromide) 進行外染，退染後再以紫外

光觀察 DNA 產物。

### (5) DNA 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳回收 DNA

進行 DNA 瓊脂膠體電泳後，經 EtBr 染色，退染後，使用長波長之紫外光源 (365 nm)，觀察並截取欲回收之 DNA 位置。使用 Gel Extraction Kit (購買自 Viogene，詳細實驗步驟參考套組之使用手冊。) 回收 DNA。

### (6) 接合反應 (DNA ligation)

經限制酶反應回收後之 DNA，依載體與欲插入之 DNA 片段濃度比約 3 : 1 的比例加入：

質體(vector)	4.0 $\mu$ l
DNA 片段(insert)	12.0 $\mu$ l
T4 Ligase	1.0 $\mu$ l
10X ligation buffer	2.0 $\mu$ l
10 mM rATP	1.0 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20.0 $\mu$ l

以 16°C 冰浴反應 16 - 20 小時。

## (二) 蛋白質純化

### 1. His tag 蛋白之純化 metal affinity resin (Talon resin ; Takara)

將轉殖帶目標蛋白 pET21a 質體的菌株 (*E.coli* BL21) 培養於 Luria-Bertani (LB) Broth+ampicillin 培養隔夜。將隔夜菌液以 100 比 1 的體積至培養基中震盪培養至 OD600 吸光值 0.5，加入 IPTG 至濃度 0.3mM 振盪培養於 37°C 4 小時離心 4000xg/15 分鐘/4°C 去上清液收集菌體。以預冷之 native buffer 懸浮菌體 (25ml 菌液對應 2ml)。在冰上以 sonicator 將細胞壁打破 (功率 10 瓦、震盪 1 秒停 1 秒、

總時間 2 分鐘) 。離心 10000-12000xg/15 分鐘/4°C 取上清液。將上清液倒入裝置好的 metal affinity resin 管柱(事先已用 5-10 倍體積之 wash buffer 洗過)，讓上清液完全通過管柱收集滴下的上清液。以 5-10 倍體積 wash buffer 洗 metal affinity resin 管柱收集滴下的液體。以 3-5 倍體積 elution buffer 將帶有 His tag 之目標蛋白溶出收集滴下的液體。

#### **Native buffer pH 7.5**

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	58 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
NaCl	68 mM

#### **Wash buffer pH 7**

---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM

#### **Elution buffer pH 7**

---

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazo	150 mM



## **2. MBP 融合蛋白之純化 Amylose resin (NEB)**

將轉殖帶有 pMAL-sulA 菌株培養於 Luria-Bertani(LB) broth+glucose +ampicillin 培養隔夜。將隔夜菌液以 100 比 1 的體積至培養基中震盪培養至 OD 600 吸光值 0.5 加入 IPTG 至濃度 0.3mM 振盪培養於 37°C 2 小時。離心 4000xg /20 分鐘去上清液收集菌體加入預冷之 column buffer 懸浮菌體(1g 菌體重加 10ml column buffer)。在冰上以 sonicator 將細胞壁打破(功率 10 瓦、震盪 1 秒停 1 秒、

總時間 2 分鐘)。將菌液離心 9000xg/30 分鐘取上清液，加入 column buffer 以 1:5 的體積稀釋上清液。將上清液倒入裝置好的 amylose resin 管柱(事先已用 8 倍體積之 column buffer 洗過)，讓上清液完全通過管柱收及滴下的上清液。以 12 倍體積之 column buffer 沖洗管柱。以 column buffer+10 mM maltose 進行溶出回收 MBP 融合蛋白。

#### **Column buffer, pH = 7.4**

---

Tris-HC	120 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM

#### **Elution buffer add 10 mM maltose in column buffer**

### **3. 蛋白質濃縮**

選定適合分子大小的蛋白質濃縮過濾器使用蛋白質濃縮過濾器 10k 及 30k (Millipore)以離心的方式進行蛋白質濃縮及緩衝液的取代。

### **4. 蛋白質定量**

使用 Bradford 法蛋白質定量套組(BIONOVAS Co., Ltd)，將蛋白質標準液依所需要之濃度稀釋(體積 20 ul)在 96 孔盤中加入 Bradford 試劑 200 ul 混合均勻在室溫下放置 5 分鐘以分光光度計測吸光值 A595 繪製檢量線在將待測樣品值代入公式計算濃度。

### **5. 蛋白質保存**

蛋白質所存在之緩衝液置換成利於蛋白質保存之 storage buffer 濃縮管 (Milipore)，來進行緩衝液置換。

### Storage buffer

0.5M HEPES	5.0 ml
1.0M MgCl <sub>2</sub>	1.0 ml
1.0M DTT (Dithiothreitol)	25.0 µl
65% Glycerol	7.7 ml
NaCl	0.88 g
H <sub>2</sub> O	25 ml
先溶解後，調整 pH 至 7.4，再加水至總體積為 50 ml	50 ml

### (三) SDS 蛋白質膠體電泳

測量菌液的 OD<sub>600</sub> 吸光值。取 2.0 mL 菌液於 6000 rpm 離心十分鐘，去除上清液。以滅菌水清洗兩次，加入 50 µL 的 2X SDS-PAGE 樣品溶液，於 95-100°C 下反應 10 分鐘，得到含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液。取約含等量菌數 (由 OD<sub>600</sub> 吸光值換算) 之含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液於 12.5% 的 SDS-PAGE 膠片中進行蛋白質電泳。先於 60 伏特電泳 40 分鐘，再於 100 伏特下電泳約 100 分鐘。

SDS-PAGE 電泳膠片 (12.5%)	Running gel	Stacking gel
H <sub>2</sub> O	3.3 ml	3.4 ml
30% Acrylamide	4.0 ml	0.83 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	0 ml
1.0M Tris (pH 6.8)	0 ml	0.63 ml
10% SDS	0.1 ml	0.05 ml
10% APS	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml

此份量約可配製 0.75mm 厚 10X7cm 的膠片兩片。

### 30% 丙烯醯胺液 (Acrylamide)

40% Acrylamide/ Bisacrylamide	75 ml
H <sub>2</sub> O	25 ml

---

加蒸餾水至 100 mL，保存於 4°C。

### 分離膠體緩衝液 (Running buffer)

Tris base	36.3 g
TEMED	0.72 ml

---

以 150 ml 蒸餾水溶解並調整 pH 至 8.8，加水至總體積為 200 ml，保存 4°C。

### 焦集膠體緩衝液 (Stacking buffer)

Tris base	6.0 g
TEMED	0.4 mL

---

調整 pH 至 6.8，加水至總體積為 100 mL，保存於 4°C。

### 5X 電泳槽緩衝液 (Chamber buffer)

Tris base	15.0 g
Glycine	72.0 g
SDS	5.0 g

---

先以 800 ml 蒸餾水溶解並調整 pH 至 8.3，加水至 1000 ml，保存於室溫。

使用時稀釋至 1X。

### 追蹤染劑 (Tracking dye)

Bromophenol blue	1.0 mg
H <sub>2</sub> O	5.0 ml
87% Glycerol	5.0 ml

---



Bromophenol blue 先溶於蒸餾水後，再加入 glycerol，保存於室溫。

### 2X SDS-PAGE 樣品溶液

H <sub>2</sub> O	0.8 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	4.0 ml
10% SDS	6.4 ml
β-mercaptoethanol	1.6 ml
Tracking dye	3.2 ml

---

總體積 16.0 ml，保存於室溫。

### APS 溶液 (Ammonium persulfate)

APS	50.0 mg
-----	---------

---

加滅菌水0.5 ml溶解。每次使用前新鮮配置。

## (四) 西方墨點分析 (Western Blotting)

### 1. 蛋白質粗萃樣品製備

- (1) 測量菌液之 OD<sub>600</sub> 吸光值。
- (2) 將 3ml 菌液以 3000 rpm，離心 10 分鐘，移除上清液。
- (3) 以 1ml 無菌水清洗菌體，再次離心，移除上清液，收集菌體。
- (4) 加入 200 μl 的 2X SDS sample buffer 懸浮菌體，於 100°C 下反應 10 分鐘，得到含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液。
- (5) 取約含等量菌數(由 OD<sub>600</sub> 吸光值換算)之粗萃蛋白樣品溶液，於 12.5% 的 SDS-PAGE 膠片中進行蛋白質電泳。

### 2. 轉印 (Transfer)

本實驗使用 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) 將蛋白

質由 SDS-PAGE 膠片轉印至 nitrocellulose membrane (Millipore) 上固定。轉印方法參考 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell 所提供之使用說明書。

- (1) 裁剪與 SDS-PAGE 膠片大小相似之 nitrocellulose membrane，使用前先於 100% methanol 中潤濕，再於無菌之二次水浸潤 2 分鐘，最後放入 transfer buffer 中平衡約 10 分鐘。
- (2) 裁剪與 SDS-PAGE 膠片大小相似之 3 mm 濾紙六張，與二片海綿一同浸泡於 transfer buffer 中平衡約 10 分鐘。
- (3) 取出轉印用夾板，先將一片海綿置於黑色夾板上，再放上三張濾紙；接著將電泳完畢之膠片小心取下，於 transfer buffer 中潤濕後，放置於濾紙上並以玻棒小心趕出氣泡。
- (4) 將 nitrocellulose membrane 完全覆蓋於膠片上，趕出氣泡後，再依次放上三張濾紙及另一片海綿；最後闔上夾板卡緊，並將夾板放入轉印槽中。以上步驟均戴手套操作。
- (5) 以 400 mA 之電流轉印約 90 分鐘，轉印時蛋白質由負極向正極的 nitrocellulose membrane 移動。每 20 分鐘更換融化之冰塊，避免轉印溫度過高而產生氣泡。

#### **Transfer buffer**

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

### **3. 雜合反應 (Hybridization)**

本實驗採用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)

操作手冊所提供之方法進行免疫雜交。

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

### **PBS**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	11.45 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.96 g
NaCl	5.84 g
加水至總體積為 1000 ml，保存於室溫	1000 ml

### **PBST (PBS-Tween)**

於 PBS 中加入 0.1% 的 Tween-20，保存於室溫。

### **Blocking reagent**

PBST	100 ml
Skim milk	7.0 g

使用前配製，需充分溶解。

#### 一次抗體 (適用於本實驗)

Polyclonal rabbit anti-MBP (NEB)	1:5000 稀釋
Polyclonal rabbit anti-ClpY	1:5000 稀釋

#### 二次抗體 (適用於本實驗)

Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:5000 稀釋
--------------------------	-----------

#### 4. 訊號偵測 (signal detection)

本實驗採用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) 套組進行雜交訊號的偵測。訊號產生的原理，是利用標示於二次抗體上的 peroxide 與套組中的 detection solution 反應而發出螢光，然後再以 autoradiography film (Classic Blue, MIDSCI) 於暗房中顯影，以偵測雜交訊號。此套組中含有 Solution I : HRP Substrate Peroxide Solution 及 Solution II : HRP Substrate Luminol Reagent。

- (1) 取相同體積之 Solution I 及 Solution II 置於試管中 (每片轉漬膜各需約 0.5 ml 的 Solution I 及 Solution II )，將 Solution I 及 Solution II 混合成 detection reagent，靜置反應 5 分鐘。
- (2) 取透明投影片置於壓片盒內，將轉漬膜上的 PBST 滴乾，平鋪於投影片上；接著將 detection reagent 均勻滴灑於轉漬膜上，再覆蓋另一張投影片，保持投影片表面乾燥。
- (3) 以下步驟均於暗房中操作。將 autoradiography film 置於轉漬膜上壓片。  
(壓片時間視訊號強弱而定，10 秒至 30 分鐘均可)。

- (4) 將壓後的底片 (autoradiography film)，放入顯影劑中顯影，顯影時間視訊號強弱而定，約 30 秒至 5 分鐘。
- (5) 以清水潤洗去除底片上的顯影劑，將水滴乾；再將底片放入定影劑中定影，以清水潤洗去除底片上的定影劑，最後將底片晾乾保存。

## 5. Stripping

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

- (1) 將偵測過訊號之轉漬膜以蒸餾水潤洗五分鐘。
- (2) 將轉漬膜置於 stripping buffer 中，於室溫下搖洗反應 30 分鐘。
- (3) 將轉漬膜於室溫下以蒸餾水搖洗三次，每次 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。
- (4) 轉漬膜以 PBS 潤洗後，即可進行第二次的免疫雜交反應。

### Stripping buffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	11.45 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.96 g
以 HCl 調整 pH 至 2.5，加水至總體積為 200 ml	200 ml

## (五) 蛋白酶活性測試 (Degradation assay)

本實驗利用純化完成之 ClpY、ClpQ 及 MBP-SulA，於 *in vitro* 下測試 ClpYQ protease 的活性。將 ClpY(4.05 $\mu\text{M}$ )、ClpQ(6.6 $\mu\text{M}$ )、MBP-SulA(1.6 $\mu\text{M}$ )及 ATP(5mM)總體積 60 $\mu\text{l}$  混合後於 37 $^\circ\text{C}$  進行反應，於不同時間點取樣，並使用 SDS-PAGE 的方式觀察分析結果。

- (1) 於 degradation buffer 中加入 ClpY、ClpQ、MBP-SulA 及 5 mM ATP，

置於 37°C 下進行反應。

- (2) 於反應開始 0 小時，取 20  $\mu$ l 之反應物加入 20  $\mu$ l 2X SDS sample buffer 終止反應，並於 100°C 下反應 10 分鐘，得到 SDS-PAGE 樣品溶液。
- (3) 於反應開始 2 小時及 4 小時，重複步驟 2，進行不同時間點取樣。
- (4) 進行 SDS-PAGE 觀察結果。
- (5) 利用 Image J 影像分析軟體將 SDS-PAGE 之結果進行定量分析。

#### Degradation buffer

HEPES	0.1M
MgCl <sub>2</sub>	10mM
DTT (Dithiothreitol)	1mM
EDTA	1mM

#### 4X Degradation buffer

0.5M HEPES	80.0 ml
1.0M MgCl <sub>2</sub>	4.0 ml
1.0M DTT (Dithiothreitol)	0.4 ml
0.5M EDTA	0.8 ml
H <sub>2</sub> O	50 ml

先溶解後，再加水至總體積為 100 ml，保存於 4°C

100 ml

### (六) ATPase 活性測定

將待測蛋白質 ClpY(6-mer ; 8 $\mu$ M)、ClpQ(12-mer ; 8 $\mu$ M)與MBP-SulA(4.9 $\mu$ M) 加入ATP mix反應溶液中，反應總體積200 $\mu$ l。以螢光分光光譜儀(激發340 nm ; 發散460 nm)，在37°C下連續偵測NADH減少的量，NADH減少的量即為ATP消

耗的量。以野生型ClpYQ的ATP消耗量為100%得出突變株ATPase相對活性。

#### ATP mix反應溶液

---

degradation buffer中含有

ATP	2.5mM
NADH	0.375mM
Phosphoenopyruvate	1.0mM
Pyruvate kinase	5 U/ml
Lactate dehydrogenase	5 U/ml

#### (七) 等溫滴定量熱法(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

將待測蛋白質ClpY(Cl pY6-mer 25 $\mu$ M ; 200 $\mu$ l)置於isothermal calorimetric cell中以750mM之ATP $\gamma$ S (以degradation buffer配製)在25 $^{\circ}$ C下對蛋白質ClpY進行滴定，每間隔150秒注入1.9 $\mu$ l ATP $\gamma$ S，攪拌速率為1000rpm。以蛋白質ClpY注入只有degradation buffer的isothermal calorimetric cell當作控制組。所用的機型為iTC 200 (MicroCal)。所得到的資料以Origin version 7.0 data analysis software (MicroCal)進行分析。

#### (八) 蛋白質聯結測試(cross-linking analysis)

將ClpY (Cl pY6-mer 4 $\mu$ M)、ClpQ (Cl pQ12-mer 4 $\mu$ M)與1mMATP $\gamma$ S加入degradation buffer中，總體積為50 $\mu$ l於37 $^{\circ}$ C中培養5分鐘進行結合後，加入glutaraldehyde使反應液中glutaraldehyde濃度為0.4%於37 $^{\circ}$ C中培養20分鐘進行連結反應，加入30 $\mu$ l含有7.5% SDS及10% 2-mercaptoethanol之Tris.HCl (pH6.8)，進行蛋白質電泳(4-12% gradient gel)。(Seong 2002)

## (九) Pull-down assay

本實驗利用 MBP-SulA 融合蛋白與 amylose resin 之間具有親合性結合之特性，於 *in vitro* 下研究 MBP-SulA 對 ClpY 及其突變蛋白親合性分析。

- (1) 於 degradation buffer 中加入 ClpY (ClpY6-mer 1.3 $\mu$ M)及 MBP-SulA (7.8 $\mu$ M)或其衍生物蛋白質及 5 mM ATP，總體積為 50 $\mu$ l，置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘。
- (2) 取 40  $\mu$ l 之 amylose resin 至乾淨離心管中，於 4 $^{\circ}$ C 下以 4000 rpm 離心 30 秒，移除上清液。
- (3) 加入 200  $\mu$ l 之 1X wash buffer 懸浮 amylose resin，於 4 $^{\circ}$ C 下以 4000 rpm 離心 30 秒，移除上清液。
- (4) 加入反應完成之反應液以懸浮 amylose resin，於 4 $^{\circ}$ C 下搖洗 6 小時以上。
- (5) 將搖洗完畢之反應物，於 4 $^{\circ}$ C 下以 4000 rpm 離心 30 秒，移除上清液。
- (6) 加入 200  $\mu$ l 之 1X wash buffer，激烈震盪 5 秒，於 4 $^{\circ}$ C 下以 4000 rpm 離心 30 秒，移除上清液。
- (7) 重複步驟 6，10 次。
- (8) 加入 20  $\mu$ l 之 2X SDS sample buffer，於 100 $^{\circ}$ C 下反應 10 分鐘，得到 SDS-PAGE 樣品溶液。
- (9) 以 SDS-PAGE 或 Western blotting 的方式進行結果分析。

<b>5X wash buffer</b>	4 $^{\circ}$ C 保存
0.5M HEPES	100.0 ml
3.0M NaCl	17.6 g
Glycerol	50.0 ml
Triton X-100	0.4 ml
1.0 M MgCl <sub>2</sub>	5.0 ml



(十) 表面電漿共振生物分子感測法 (Surface plasmon resonance assays)

親和力測試採用表面電漿共振生物分子感測法 (Surface plasmon resonance assays)，所使用儀器為 BIAcore T200 instrumentation (GE Healthcare Life Sciences)，採用 CM5 晶片 (GE Healthcare Life Sciences)，所有實驗步驟均照原廠操作手冊。將 MBP-SulA 固定於 CM5 晶片上達 9818 RU (resonance units)，親和力測試以 degradation buffer (100 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT and 1mM EDTA) 進行，在添加 ATP 的實驗中則在 degradation buffer 中添加 5 mM ATP，系統流速為 30  $\mu$ l/min。待分析蛋白質 ClpY 及其突變蛋白以不同濃度 (0.1–6  $\mu$ M) 進行測定。結合測試 (Binding assays) 進行 2 min 後，將分析物置換成 degradation buffer 進行 10 min 的分離測試 (Dissociation)。結合測試後所得數據以 Biacore T200 Evaluation Software version 1.0. 軟體進行分析。

## 參、結果

### 一、ClpY 與 ClpQ 及其突變蛋白純化

將pET21a-6xHis-clpY及pET21a-6xHis-clpQ送入大腸桿菌菌株BL21clpYclpQ中大量表現並經Metal affinity resin (Talon resin ; Takara)加以純化。而ClpQ則是利用設計好的引子將6xHis tag加在蛋白質的C端以免影響其酵素活性。以Metal affinity resin純化帶有His tag的ClpY (圖二A)與ClpQ (圖二B)及其突變蛋白，以獲得純度較高的目標蛋白。而ClpYQ的基質MBP-SulA以Amylose resin進行親和性純化，由於宿主沒有將MBP基因剔除故有少量的MBP蛋白 (圖三)。ClpY I domain 缺失突變蛋白與ClpY $\Delta$ I+7Gly ClpY $\Delta$ L1,L2 (loop1 137-150; loop2 175-209)以下以ClpY  $\Delta$ D-loop ( $\Delta$ double loops)稱之，無法得到純化蛋白，但是在破菌上清液中無明顯出現目標蛋白，因此推測誘導出來的目標蛋白在包涵體 (inclusion body)中。加入以含有5% sarklsoyl緩衝液進行破菌，離心取上清液然後加入binding buffer (2%triton X-100及20mM CHAPS) 稀釋破菌上清液。將破菌上清液中5% sarklsoyl稀釋至1%以免妨礙後續純化。結果顯示，ClpY $\Delta$ I+7Gly (圖四)與ClpY  $\Delta$ D-loop (圖五)雖能純化但產量效率偏低，以純化大量製備並濃縮至所適當的濃度與體積。

### 二、ClpY及其突變蛋白對於ClpYQ分解MBP-SulA活性的影響

將經純化的 ClpY、ClpQ 與 MBP-SulA 在含有 ATP 的緩衝液在 37°C 下進行 *in vitro* degradation 經測試過後選用 0 hr、2 hr、4 hr 時間點進行取點後，進行 SDS-PAGE 觀察結果 (表四；圖六)。利用 Image J 軟體將 SDS-PAGE 之結果進行定量分析。以 ClpYQ 的實驗組所降解 MBP-SulA 的量為 100%，以計算出 ClpY 突變蛋白相對於 ClpYQ 降解 MBP-SulA 的相對

### (一) ClpQ 蛋白 E61 位置突變對 ClpYQ 聚合的影響及其酵素活性之探討

前人研究中 (Wang *et al.*, 2001)提出當ATP與ClpY結合時，ClpY C端會自其結構內部向外伸出並使得ClpQ中央通道直徑增加。而Ramachandran等人發現ClpY C端扮演連結並活化ClpQ的角色，ClpY C端10各胺基酸能夠活化ClpQ使酵素活性提高 (Ramachandran *et al.*, 2002)。ClpQ E61C為一個與ClpY聚合能力強的功能增強蛋白，將純化之ClpYQ E61C進行降解實驗與ClpYQ作比較，以釐清ClpYQ之間聚合力的強弱對酵素活性的影響。結果顯示，ClpQ E61C與ClpY然雖然具有較佳的聚合力，但ClpQ E61C-ClpY分解MBP-sulA的相對活性為 $89\% \pm 7.1\%$ 與ClpQ-ClpY分解MBP-sulA的能力相去不遠 (表四；圖七)；可知於*in vitro*分解實驗中，ClpY與ClpQ聚合力之大小並不能影響分解能力。

### (二) ClpY I domain 缺失突變蛋白 ClpY $\Delta$ I+7Gly 對於 ClpYQ 酵素活性的影響

ClpY I domain (aa.110-aa.243)，ClpY I domain 缺失突變蛋白為了維持構型完整在N domain之間加了7個Glycin當作連接。在酵母菌雙雜交系統中ClpY $\Delta$ I+7Gly與基質MBP-SulA並無明顯的親和力，且ClpY $\Delta$ I+7Gly在MMS test與*in vivo* degradation的western blot的結果顯示突變株均無法生長；在western blot的結果也測到了SulA的存在 (Lien *et al.*, 2009)，顯示I domain 缺失會影響ClpYQ酵素活性。所以利用純化ClpY $\Delta$ I+7Gly缺失突變蛋白在*in vitro*下對MBP-SulA進行降解實驗，與ClpY相比，ClpY $\Delta$ I+7Gly缺失突變蛋白酵素活性僅為ClpY的 $59\% \pm 6.5\%$ 活性下降了將近40%左右 (表四；圖八 A)，顯示ClpY I domain對於ClpY所負責的基質辨識、解構或運送具有一定程度的影響。

### (三) ClpY I domain loop 構造對於酵素活性的影響

在對ClpY結晶結構分析研究中 (Wang *et al.*, 2001)，ClpY I domain (aa.110-aa. 243)中有二個loop構造分別位於aa.137- aa.150 (loop1)與aa.175- aa.209 (loop2)的位置。分別對於此二個loop構造分別進行缺失突變於*in vivo*下以MMS test與*in*

*vivo* degradation western blot 進行分析，ClpY $\Delta$ L2 (loop2 ; 175-209)、ClpY $\Delta$ L1,L2 (loop1 137-150 ; loop2 175-209)失去活性無法分解SulA (Lien *et al.*2009)。以ClpY I domain 缺失突變蛋白ClpY $\Delta$ L1(loop1 ; 137-150)進行對MBP-SulA降解實驗，ClpY $\Delta$ L1 酵素活性為ClpY的1.38倍 (表四 ; 圖八 B)。而ClpY $\Delta$ L2 (loop2 ; 175-209)對 MBP- SulA的降解，相對活性為49% $\pm$ 12% (表四 ; 圖八 C)。由以上結果顯示ClpY I domain loop構造對於酵素活性有一定的影響，缺少loop2的ClpY $\Delta$ L2缺失突變蛋白相對活性大幅下降一半，ClpY I domain 缺失與I domain loop2缺失均會導致對基質的辨識結合能力下降造成酵素活性降低 (表四 ; 圖八 D)。ClpY $\Delta$ L1 缺失突變蛋白，因為缺少loop1使得loop2更容易與基質的辨識結合導致相對活性高於ClpY，則需要更一步的實驗證明。

以ClpY  $\Delta$ D-loop ( $\Delta$ double loops)，進行降解實驗，發現ClpY  $\Delta$ D-loop 缺失突變造成蛋白質本身不穩定，在降解實驗中第2小時起開始自行降解 (圖九 A)。因此，無法測得其酵素的相對活性。對於ClpY $\Delta$ D-loop 蛋白進行穩定性實驗以0分鐘開始取點，每30分鐘取一點連續取點至120分鐘進行SDS-PAGE觀察，結果顯示在37°C下ClpY  $\Delta$ D-loop 蛋白於60分鐘開始有明顯自身降解(圖九 B)。

#### (四) ClpY I domain loop2點突變對於酵素活性的影響

ClpY I domain loop2 (175-209)的缺失會使相對活性大幅下降一半，ClpY I domain loop2可能對於基質的辨識結合扮演重要的角色。在ClpY aa.175- aa.209 區域中是否有某些胺基酸位置對酵素活性具有的影響，因此利用loop2點突變來進行對MBP-SulA的降解，藉此縮小或確定ClpY對基質辨識結合的點位。在 *in vivo* 實驗中 (Lien *et al.*,2009)，M187I為親和力增強突變蛋白與SulA的親和力同時保有酵素活性，在*in vitro*下降解活性為ClpY的87 $\pm$ 5% (表四 ; 圖十 A)與ClpY 相去不大，並未由於與SulA的親和力大而使活性增加；ClpY loop2點突變ClpY L199Q功能缺失株均為非極性突變成極性造成在酵母菌雙雜交系統中與SulA幾乎無親合力，同樣的在MMS test無法生長，為一個活性與親和力完全喪失的點突

變。但ClpY L199Q在*in vitro*下降解MBP-SulA的活性為ClpY的 $74\pm 3.1\%$ ，活性下降近30% (表四；圖十 B)。E193L/E194L與Q198L/Q200L在細胞中的 $\beta$ -galactosidase及MMS活性測試中較不具活性；但是在*in vitro*下降解MBP-SulA E193L/E194L與Q198L/Q200L的相對活性分別 $84\pm 2.5\%$  (表四；圖十 C)及 $83\pm 4.3\%$  (表四；圖十 D)僅微幅下降其分解能力；由上述結果推論loop2點突變蛋白微幅但負向影響酵素活性。

### 三、以 *in vitro* pulldown 探討 ClpY 對於 MBP-SulA 辨識結合的區域

#### (一) ATP 存在下 ClpY 對於 MBP-SulA 辨識結合的影響

利用MBP-SulA 融合蛋白與amylose resin之間具有親和性結合之特性來分析ClpY是否可以與MBP-SulA進行結合，若是ClpY無法與MBP-SulA進行結合，ClpY會在10次的沖洗步驟被洗去最後只留下與amylose resin有親和性結合的MBP-SulA，以此分析ClpY及其突變蛋白是否可以與MBP-SulA產生專一性結合。以ClpY與MBP-SulA進行混合後進行前培養 (pre-incubate)後將混合液加入已準備好amylose resin中在 $4^{\circ}\text{C}$ 下搖晃培養6小時進行結合反應經沖洗步驟後，加入2X SDS sample buffer，於 $100^{\circ}\text{C}$ 下反應10分鐘後得到SDS-PAGE樣品溶液以SDS-PAGE的方式進行結果分析。在以MBP-SulA對ClpY進行*in vitro* pulldown實驗中分別進行二組實驗：在蛋白質混合液中一組含有含有5 mM的ATP另一組則無。以SDS-PAGE的方式進行分析。結果顯示ClpY與MBP-SulA結合體可以被amylose resin pulldown下來，以*in vitro* pulldown方式可以用來分析ClpY與MBP-SulA的結合。而且，在有加ATP的實驗條件下*in vitro* pulldown下來ClpY的量明顯比沒加ATP的實驗組少，約為沒加ATP實驗組的1/5 (表五；圖十一)。以沒加ATP的實驗組所pulldown下來ClpY的量為100%以計算出相對活性來代表ClpY與MBP-SulA親和力。

## (二) 不同核苷酸ClpY對於MBP-SulA辨識結合的影響

ClpY為ATP-dependent chaperone能與ATP結合消耗ATP獲得能量以解構及運送基質至ClpQ進行降解。研究報告中藉由分析ClpY在不添加任何核酸及分別添加SO<sub>4</sub>、ATP、ADP的情形下所得到的結晶構，得知不同核酸的添加會影響ClpY之 $\alpha$ -helical domain的旋轉角度而與影響ClpQ的聚合 (Wang *et al.*, 2001)。所以在不同核苷酸存在的情況下是否會影響ClpY與MBP-SulA的辨識結合。因此，分別在蛋白質混合液中加入ADP、ATP、ATP $\gamma$ S來進行*in vitro* pulldown實驗；以分析不同核苷酸對ClpY與MBP-SulA辨識結合的影響。結果顯示與控制組(不加任何核苷酸)相比，ATP、ADP、ATP $\gamma$ S所pulldown下來ClpY蛋白質質量分別為控制組的23% $\pm$ 1.2%、20% $\pm$ 1.5%、15% $\pm$ 0.7% (表五；圖十一)。顯示在ATP、ADP、ATP $\gamma$ S存在pulldown下來ClpY的量與約為沒有ATP情形的1/5與前述實驗相同。顯示ClpY聚合成六元環與否，會影響ClpY與MBP-SulA辨識結合的蛋白質質量，但是在沒有核苷酸讓ClpY聚合成六元環情形下ClpY可以與較多的MBP-SulA結合。

## (三) 以 *in vitro* pulldown分析ClpQ對ClpY與MBP-SulA的辨識結合的影響

在研究報告中 (Azim *et al.*, 2006)，發現在MBP-SulA存在的情形下ClpY與ClpQ的親和力為ClpYQ單獨存在下的5倍。MBP-SulA能增強ClpY與ClpQ的親和力，以 *in vitro* pulldown分析ClpQ存在下對ClpY與MBP-SulA的辨識結合是否有影響。先將ClpYQ進行前培養 (pre-incubate)後，將MBP-SulA加入混合液進行二次培養再以amylose resin進行*in vitro* pulldown，所有實驗均分別在有無添加ATP狀態下進行。以無添加ATP組當作100%計算相對活性實驗，結果顯示添加ATP為無添加ATP的16% $\pm$ 3.9% (圖十二)；與前述無添加ClpQ的實驗相去不遠。ClpQ對於ClpY與MBP-SulA的辨識結合並無明顯影響。

## (四) 以 *in vitro* pulldown分析ClpY I domain缺失突變蛋白與MBP-SulA辨識結合的影響

在酵母菌雙雜交系統中ClpY $\Delta$ I+7Gly與基質SulA並無明顯有親和力 (Lien *et al.*2009)，且在前述降解實驗中ClpY $\Delta$ I+7Gly缺失突變蛋白活性下降了將近4成左右。因此以*in vitro* pulldown實驗來探討ClpY I domain缺失影響ClpY與MBP-SulA辨識結合。以ClpY $\Delta$ I+7Gly缺失突變蛋白當作實驗組而ClpY為控制組，實驗組與控制組都分別為加入或不加5mM ATP二組實驗，以探討ATP的影響。以不加ATP的狀態下ClpY被pulldown下來的量當作100%計算相對活性。不加ATP的狀態下ClpY $\Delta$ I+7Gly相對活性為56% $\pm$ 11.5%；加ATP的狀態下ClpY $\Delta$ I+7Gly相對活性為43% $\pm$ 0.2%而ClpY相對活性為23% $\pm$ 6.6% (圖十三)。ClpY的I domain缺失會使得與MBP-SulA親和性下降近一半。

(五) 以 *in vitro* pulldown分析ClpY I domain loop構造對於MBP-SulA辨識結合的影響

在前述降解實驗中不同loop構造的缺失影響酵素活性，ClpY $\Delta$ L1酵素活性為ClpY的1.38倍。而ClpY $\Delta$ L2對MBP-SulA的降解，相對活性為49% $\pm$ 12%。顯示ClpY I domain loop構造對於酵素活性有很大的影響。因此利用*in vitro* pulldown分析ClpY I domain loop構造缺失突變蛋白ClpY $\Delta$ L1與ClpY $\Delta$ L2對於MBP-SulA辨識結合的影響。*in vitro* pulldown實驗以ClpY為控制組，ClpY $\Delta$ L1與ClpY $\Delta$ L2為實驗組同時控制組與實驗組均在有無添加ATP狀態下進行，以不加ATP的狀態下ClpY被pulldown下來的量當作100%計算相對活性。I domain loop1在不添加ATP狀態下ClpY $\Delta$ L1相對活性為70% $\pm$ 1.1%而；添加ATP狀態下ClpY $\Delta$ L1相對活性為105% $\pm$ 0.1% (圖十四)而添加ATP狀態下ClpY相對活性為28% $\pm$ 1.2%。在添加ATP狀態下ClpY $\Delta$ L1對MBP-SulA相對活性比ClpY為高。此結果與ClpY $\Delta$ L1的降解實驗中酵素活性比ClpY高結果相符。I domain loop2在不添加ATP狀態ClpY $\Delta$ L2相對活性僅剩35% $\pm$ 0.8%，結果顯示，ClpY $\Delta$ L2對MBP-SulA親和性下降60%以上，在添加ATP狀態下ClpY $\Delta$ L2相對活性42% $\pm$ 1.5% (圖十五)。可知I domain loop2缺失影響了對於MBP-SulA辨識結合。雖然於前述降解實驗ClpY  $\Delta$ D-loop缺失突變蛋

白在37°C下ClpY  $\Delta$ D-loop蛋白於60分鐘開始有明顯自身降解以致於無法測得其酵素活性，但是*in vitro* pulldown僅在37°C下前培養 (pre-incubate)30分鐘後，後續實驗便移至4°C下進行後續步驟。因此仍然可以以ClpY  $\Delta$ D-loop進行*in vitro* pulldown實驗，結果顯示在不添加ATP狀態ClpY  $\Delta$ D-loop相對活性為36% $\pm$ 1.2%；在添加ATP狀態ClpY  $\Delta$ D-loop相對活性為46% $\pm$ 1.5% (圖十六)，ClpY  $\Delta$ D-loop與ClpY $\Delta$ L2對MBP-SulA有相似的親和力。

(六)以 *in vitro* pulldown分析ClpY I domain loop2點突變對於MBP-SulA辨識結合的影響

雖然在前述降解實驗中I domain loop2點突變M187I、E193L/E194L與Q198L/Q200L對於降解活性的影響不若loop2構造缺失來的大。以*in vitro* pulldown實驗來探討loop2點突變對MBP-SulA的親和力的影響。在沒有添加ATP條件下M187I的相對活性為115% $\pm$ 6.2%、E193L/E194L為92% $\pm$ 8.2%，Q198L/Q200L為68% $\pm$ 3.9%；有添加ATP條件下M187I的相對活性為58% $\pm$ 1.5%、E193L/E194L為51% $\pm$ 2.0%，Q198L/Q200L為39% $\pm$ 5.6% (圖十七)。loop2點突變與MBP-SulA的親和力與酵母菌雙雜交系統所表現的趨勢相同。

(七) pore I缺失突變蛋白對於MBP-SulA辨識結合與酵素活性的的影響

ClpY六元體中心孔洞 (central pore)中有兩個pore site (pore I 90-93aa.；poreII 265-269aa.)。在研究中指出pore I GYVG motif為ClpY主要的活性中心，具有將基質解構(unfold)及傳送已解構基質的功能(Park *et al.*, 2005)。而在研究中指出pore I點突變蛋白在ClpQ存在下，不管是否具有分解基質MBP-SulA的能力均可與基質MBP-SulA結合證明了pore I參與基質的運送而針對poreII點突變所進行的在 $\beta$ -galactosidase及MMS活性測試，均與ClpY一樣均有正常的酵素活性，在基質降解過程中poreII不若pore I來的重要 (Hsieh *et al.*, 2011)。而在前述*in vitro* pulldown實驗中ClpY $\Delta$ I+7Gly仍與MBP-SulA有親和性，是否為ClpY $\Delta$ I+7Gly上帶



有的pore I的GYVG motif所賦予的？ClpY pore I的GYVG motif的缺失是否也影響對於MBP-SulA辨識結合？因此建構pore I缺失突變蛋白 $\Delta P1$  (aa 90-93)、pore I/loop1雙缺失突變蛋白 $\Delta P1L1$  (aa 90-93；aa 137-150)、pore I/loop2雙缺失突變蛋白 $\Delta P1L2$  (aa 90-93；aa 175-209)，對上述缺失突變蛋白進行*in vitro* pulldown實驗。

pore I缺失突變蛋白 $\Delta P1$ 在不添加ATP狀態pulldown相對活性為 $61\% \pm 1.3\%$  (圖十八)； $\Delta P1L1$  相對活性為 $93\% \pm 1.2\%$  (圖十九)而 $\Delta P1L2$ 相對活性為 $28\% \pm 3.1\%$  (圖二十)。而在添加ATP狀態下pulldown  $\Delta P1$ 相對活性為 $26\% \pm 0.8\%$  (圖十八)； $\Delta P1L1$  相對活性為 $126\% \pm 3.6\%$  (圖十九)； $\Delta P1L2$ 相對活性為 $23\% \pm 2.1\%$  (圖二十)。pore I缺失突變蛋白 $\Delta P1$ 不添加ATP狀態下與ClpY相比與MBP-SulA的親和性下降近4成，顯示pore I區域會與MBP-SulA結合。而雙缺失突變蛋白 $\Delta P1L1$ 、 $\Delta P1L2$ 對於MBP-SulA親和性與ClpY $\Delta L1$ 、ClpY $\Delta L2$ 的趨勢相近但是雙缺失突變蛋白 $\Delta P1L1$ 、 $\Delta P1L2$ 比ClpY $\Delta L1$ 、ClpY $\Delta L2$ 親和性更弱。

若將ClpY、ClpY $\Delta L2$ 、ClpY $\Delta P1L2$  *in vitro* pulldown實驗一起比較，可看到對於MBP-SulA親和性由強至弱的趨勢，ClpY最強、ClpY $\Delta L2$ 次之而ClpY $\Delta P1L2$ 幾乎沒有親和力 (圖二十一)，顯示MBP-SulA可能與loop2及pore I為主要的接合位置。

以pore I缺失突變蛋白 $\Delta P1$ 、雙缺失突變蛋白 $\Delta P1L1$ 及 $\Delta P1L2$ 對MBP-SulA進行*in vitro* degradation結果顯示 $\Delta P1$ 缺失突變蛋白相對活性僅剩 $4\% \pm 1.4\%$  (圖二十二 A)； $\Delta P1L1$ 雙缺失突變蛋白相對活性為 $11\% \pm 3\%$  (圖二十二 B)而 $\Delta P1L2$ 雙缺失突變蛋白相對活性為 $9\% \pm 1.8\%$  (圖二十二 C)。綜合以上結果 (圖二十二 D)可確認pore I為ClpY主要影響基質運送的區域。

#### 四、以蛋白質聯結測試觀察ClpY及ClpY與ClpQ的聚合

##### (一) ClpY六元環聚合及ClpY與ClpQ的聚合

影響ClpY活性也包括ClpY六元環與ClpQ的聚合。因此，對ClpY及其突變蛋白進行蛋白質聯結測試 (cross-linking analysis) 觀察ClpY及其突變蛋白自身的聚合與ClpY及其突變蛋白與ClpQ的聚合。結果顯示當ClpY單獨存在下加入ATP $\gamma$ S的ClpY六元體的聚合比沒有ATP $\gamma$ S的ClpY來的明顯，顯示ATP $\gamma$ S能幫助較多的ClpY形成六元環，且可以看到在ClpY六元環上方出現十二元環的聚合但數量較六元環少。當以ClpY與ClpQ進行蛋白質聯結測試，在沒有ATP $\gamma$ S下ClpY與ClpQ沒有明顯的形成Y<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>的聚合；在加入ATP $\gamma$ S的實驗條件下在ClpY六元環與十二元環之間明顯的形成Y<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>的聚合且在ClpY十二元體上方有Y<sub>12</sub>Q<sub>12</sub>的聚合。顯示ATP $\gamma$ S的存在會促成ClpY自身聚合及ClpY與ClpQ的聚合 (圖二十三)。

## (二) 以蛋白質聯結測試觀察ClpY與MBP-SulA結合

在前述 *in vitro* pulldown 實驗中在有ATP存在下ClpY被MBP-SulA所pulldown 下來ClpY的量約為無ATP存在下的1/5，此結果可能顯示在有ATP存在下，一個ClpY六元環分子可能只與一或二個MBP-SulA分子結合。藉由蛋白質聯結測試觀察ClpY與MBP-SulA結合所形成聚合體分子量來探討ClpY與MBP-SulA結合比例。以ClpY與ClpY+ATP $\gamma$ S當作控制組，ClpY+MBP-SulA+ATP $\gamma$ S為實驗組進行蛋白質聯結測試來比較ClpY+MBP-SulA+ATP $\gamma$ S與ClpY+ATP $\gamma$ S所形成的聚合體分子量差異。結果顯示ClpY+MBP-SulA+ATP $\gamma$ S所形成的聚合體(Y<sub>6</sub>-MBP-SulA; 360kDa)分子量略大於ClpY+ATP $\gamma$ S所形成的聚合體(Y<sub>6</sub>; 300kDa) (圖二十四)。

## (三) 以蛋白質聯結測試觀察ClpY I domain loop構造缺失突變蛋白ClpY $\Delta$ L1與ClpY $\Delta$ L2聚合的影響

ClpY $\Delta$ L1在前述降解實驗及*in vitro* pulldown實驗中均呈現比ClpY相對活性高的結果，藉由蛋白質聯結測試觀察ClpY $\Delta$ L1缺失突變蛋白對自身的聚合與ClpQ結合有何影響。結果顯示在有或無ATP $\gamma$ S條件下ClpY $\Delta$ L1聚集中集中在十二元

環區域。ClpY的L1缺失突變使得ClpY $\Delta$ L1易於聚合形成十二元環 (圖二十五)。ClpY $\Delta$ L2在前述降解實驗相對活性大幅下降一半而在*in vitro* pulldown實驗也呈現對MBP-SulA相對親和性下降60%的結果。ClpY $\Delta$ L2缺失突變蛋白自身的聚合，在無ATP $\gamma$ S條件下ClpY $\Delta$ L2都無明顯形成六元環，但是在有ATP $\gamma$ S下能形成六元環。ClpY $\Delta$ L2缺失突變蛋白在有ATP $\gamma$ S條件下能夠與ClpQ結合，但比ClpY與ClpQ結合訊號弱 (圖二十六)，顯示ClpY $\Delta$ L2缺失突變蛋白能夠與ClpQ結合但不穩定。

## 五、ClpY T87I ATPase突變蛋白的定性分析

### (一) ClpY T87I ATPase突變蛋白對於ClpYQ酵素活性的影響

當ClpY在與ATP結合時，其C端會從其結構內部向外伸出並插入ClpQ 12元體之中使ClpYQ結合並活化ClpQ胜肽酶的活性(Wang *et al.*, 2001)。所以ATP的存在對於ClpY與基質SulA結合及酵素的活性有相當的影響。為了探討ATPase區域突變對ClpYQ的影響藉由測定ClpYT87I ATPase突變蛋白分解基質MBP-SulA以了解是否ATPase突變影響ClpY與基質MBP-sulA ClpYQ蛋白酶活性。將經過純化的ClpY、ClpYT87I突變蛋白分別與基質MBP-SulA進行降解實驗以SDS-PAGE觀察結果，以Image J圖像軟體，計算在相同時間內基質MBP-SulA降解的量。以ClpY降解的量當作100%計算出ClpYT87I突變蛋白的相對活性為13% $\pm$ 2.3% (圖二十七)。由以上結果可看出ClpY在nucleotide binding site突變影響ClpYQ蛋白酶活性。

### (二) ClpY T87I ATPase突變對於ATPase活性的影響

為了要針對ClpYT87I突變蛋白分解活性降低與ATPase活性的相關性做更進一步探討。對ClpY與ClpYT87I ATPase突變蛋白進行ATPase活性測定，以ClpY所消耗的ATP量當作ATPase活性100%，測得ClpYT87I ATPase的相對活性為ClpY

的 $33\pm 0.7\%$  (圖二十八)。由於ClpYT87I突變區域位於nucleotide binding site，是否此突變影響了ClpYT87I與ATP結合導致ATPase活性降低。透過中央研究院生化核心實驗室(林宇慶博士協助)，以等溫滴定微量熱法(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)以ATP $\gamma$ S分別與ClpY、ClpYT87I進行結合測定，ClpY六元環可與 $3.5\pm 0.1$ 個ATP $\gamma$ S結合；ClpYT87I六元環可與 $3.2\pm 0.2$ 個ATP $\gamma$ S結合 (圖二十九)。由結果可知ClpYT87I與ClpY一樣可與ATP $\gamma$ S結合，ClpYT87I對ATP $\gamma$ S親和性較低。

### (三) 以蛋白質聯結測試觀察ClpY T87I ATPase突變對於聚合的影響

影響ClpY活性也包括ClpY六元環與ClpQ的聚合。因此，對ClpYT87I突變蛋白進行蛋白質聯結測試(cross-linking analysis)觀察ClpYT87I與ClpQ的聚合。蛋白質聯結測試以ClpY分別以ClpY與ClpYQ在有或無ATP $\gamma$ S的實驗條件下前培養(pre-incubation)5分鐘後加入glutaraldehyde當作控制組，ClpYT87I在蛋白質聯結測試中顯示ClpYT87I $\pm$ ATP $\gamma$ S均可形成六元環，但ClpT87IQ $\pm$ ATP $\gamma$ S無法與ClpQ聚合。而ClpY可以與ClpQ形成Y<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>聚合 (圖三十)。由於ClpT87I無法與ClpQ聚合為了要探討ClpT87I處於何種狀態而無法與ClpQ聚合，利用ADP取代ATP $\gamma$ S進行蛋白質聯結測試 (圖三十一)。結果顯示以ADP取代ATP $\gamma$ S進行蛋白質聯結測試，ClpY與ClpYT87I均無法與ClpQ聚合，顯示ClpYT87I可能無法進行結構改變讓C端與ClpQ聚合。

## 六、 C domain突變蛋白ClpY Y408A的定性分析

### (一) ClpY C domain突變蛋白ClpY Y408A對於酵素活性的影響

ClpY C domain具有幫助ClpY形成六元環、幫助ClpY與ClpQ結合與維持ATPase活性的功能而且ClpY C domain末端最後8個胺基酸能活化ClpQ (Bochtler *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2001)。ClpY Y408其與ClpX相對位置為Y385，在ClpX

Y385A突變蛋白與基質能夠結合但失去了解構 (unfold)基質的活性 (Joshi *et al.*, 2003)。因此為了探討ClpY C domain對於ClpYQ蛋白酶的影響利用C domain突變蛋白ClpY Y408A來進行研究。在酵母菌雙雜交系統上ClpY C domain突變株Y408A與基質sulA有親和力，但是在 $\beta$ -galactosidase及MMS活性測試中卻是ClpYQ失去活性的狀況 (Hsieh *et al.*, 2011)。將經His-tag純化的ClpY Y408A與MBP-sulA在*in vitro*狀況下進分解測試。實驗結果發現，ClpY Y408A分解MBP-sulA的相對活性為ClpY的52%±6.1% (圖三十二)，C domain Y408點位突變造成酵素活性下降近一半。

#### (二) ClpY Y408A C domain突變對於ATPase活性的影響

為了要針對ClpY Y408A突變蛋白分解活性降低與ATPase活性的相關性做更進一步探討。對ClpY與ClpY Y408A C domain突變蛋白進行ATPase活性測定，結果顯示測得ClpY Y408A的ATPase的相對活性為50%±1.8% (圖三十三)，顯示ClpY Y408A突變造成ATPase活性部分喪失。

#### (三) 以ClpY Y408A進行蛋白質聯結測試觀察ClpY Y408A突變對聚合的影響

以ClpY Y408A進行蛋白質聯結測試觀察ClpY Y408A是否形成六元環、ClpY Y408A是否能與ClpQ結合，結果顯示當ClpY Y408A單獨存在下並無形成六元環的現象，在ClpY Y408A加入ATP $\gamma$ S的實驗可看到形成ClpY Y408A六元環但比ClpY形成六元環的量少顯示ClpY Y408A的突變造成自身的聚合力部分缺失要藉由ATP $\gamma$ S形成較穩定的六元環。而在ClpY Y408A與ClpQ進行蛋白質聯結測試的實驗中ATP $\gamma$ S存在下ClpY Y408A與ClpQ能夠形成Y<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>的聚合但比ClpY與ClpQ形成聚合的的量少顯示ClpY Y408A自身不穩定也影響了與ClpQ的聚合 (圖三十四)。

#### (四) ClpY Y408A對基質MBP-SulA相對親和性的影響

ClpY Y408A在*in vitro* pulldown實驗中有加ATP的相對活性為79%±2.2%與沒加ATP相對活性為104%±1.1% (圖三十五), ClpY Y408A加ATP的實驗條件下pulldown下來的量比ClpY多3-4倍。結果顯示聚合力弱的ClpY Y408A反而能夠與MBP-SulA有較好的親和性。

## 七、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測MBP-SulA與ClpY、pore I缺失突變蛋白與雙缺失突變蛋白的親和力

以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測MBP-SulA與ClpY、 $\Delta P1$ 、 $\Delta P1L1$ 及 $\Delta P1L2$ 之間的親和力結果顯示在無ATP狀態下所測得的親和力KD值ClpY為 $6.69 \times 10^{-7}$  (表六; 圖三十六)均比 $\Delta P1$ 為 $1.36 \times 10^{-6}$ (表六; 圖三十七)、 $\Delta P1L1$ 為 $2.95 \times 10^{-6}$ (表六; 圖三十八)及 $\Delta P1L2$ 為 $1.92 \times 10^{-6}$ (表六; 圖三十九)。有ATP狀態下ClpY為 $8.13 \times 10^{-7}$ (表七; 圖四十)、 $\Delta P1$ 為 $1.19 \times 10^{-6}$ (表七; 圖四十一)、 $\Delta P1L1$ 為 $4.33 \times 10^{-6}$ (表七; 圖四十二)及 $\Delta P1L2$ 則為 $2.72 \times 10^{-6}$ (表七; 圖四十三)。顯示在無論ATP存在與否; ClpY與 $\Delta P1$ 、 $\Delta P1L1$ 及 $\Delta P1L2$ 之間的親和力差異, ClpY比缺失突變蛋白高出數倍至數十倍。

## 肆、討論

ClpY在前人研究中在沒有ATP存在下經gel filtration所得到的聚合蛋白分子量則分布於50 kDa、100kDa、282 kDa及346 kDa，約為ClpY單體的1倍、2倍、6倍及7倍，而在ATP存在下經gel filtration則大部分聚集在單體的6倍及7倍(Kessel *et al.*, 1996; Rohrwild *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 1996)，所以ATP能促進ClpY六元環的形成。ATP也能促進ClpY六元環與ClpQ十二元體結合同時藉由消耗ATP獲得能量讓ClpY對基質進行解構運送至ClpQ進行降解。顯示在ClpYQ在聚合的情形下始具有酵素活性，為了探討基質MBP-SulA與ClpY辨識結合在*in vitro* pulldown實驗中分別在有無ATP存在下以MBP-SulA對ClpY進行pulldown實驗。在ATP存在下pulldown下來的ClpY約為沒有ATP存在下的1/5-1/6(表五；圖十一)，顯示ClpY六元環僅能與一個MBP-SulA結合。再者以蛋白質聯結測試觀察ClpY與MBP-SulA結合所形成聚合體顯示ClpY+MBP-SulA+ATP $\gamma$ S所形成的聚合體(Y<sub>6</sub>-MBP-SulA)僅略大於ClpY+ATP $\gamma$ S所形成的聚合體(Y<sub>6</sub>) (圖二十四)，ClpY+MBP-SulA+ATP $\gamma$ S所形成的聚合體分子量並未大幅上升，此一證據也支持ClpY六元環在進行降解作用時僅能對一個MBP-SulA進行解構及傳送的動作，此一結果與前人的研究報告中ClpQ十二元體入口僅能容許一條胜肽鏈通過，基質需經解構後才能進入酵素活性中心進行分解相互呼應 (Zolkiewski, 2006)。

ClpY在沒有ATP存在下聚合個數呈現廣泛且不固定比例的分布(Kessel *et al.*, 1996; Rohrwild *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 1996)，這些不完全聚合的ClpY單元體均可與MBP-SulA結合，所以在沒有ATP存在下ClpY被pulldown下來的量較多。在pulldown實驗裡以ADP與ATP $\gamma$ S代替ATP進行pulldown實驗也呈現與ATP相似的結果(表五；圖十一)，顯示ClpY在六元環狀態下只能與一個MBP-SulA結合。在研究報告中(Azim *et al.*, 2006)提出了基質促進ClpYQ聚合的理論，MBP-SulA與ClpY六元環辨識結合後引發ClpY6元體結構改變與ClpQ十二元體親合性增加形

成穩定的MBP-SulA-ClpY<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>聚合體再進降解作用(附圖五)。在本篇研究中發現在沒有ATP存在下MBP-SulA即可以與ClpY進行辨識結合，所以不需要先形成ClpY六元環後才能與MBP-SulA進行辨識結合。由於SulA為細胞分裂的抑制物，當細胞DNA受到嚴重損傷時，細胞會啟動 SOS 反應，此時 SulA 會大量表現使細胞停止生長，直至細胞度過惡劣的環境。所以，ClpYQ蛋白酶對SulA降解作用，起始於細菌體內SulA會大量表現，使細胞停止生長。ClpY於此狀態下，由於缺乏ATP，先行與局部的SulA進行辨識結合，形成SulA-ClpY，再與其他未結合基質的ClpY，於ATP存在下，形成SulA-(ClpY)<sub>6</sub>或(SulA)<sub>2</sub>-ClpY<sub>12</sub>的聚合(圖四十四)，之後與ClpQ十二元體形成[SulA-ClpY<sub>6</sub>]ClpQ<sub>12</sub>聚合體，進行降解作用，然後恢復細菌正常的生理活動。所以，ClpYQ蛋白酶作用流程可以ATP與ClpY結合作為分界點，結合之前屬於ClpY對基質辨識的階段，結合之後屬於酵素作用時期展開一連串的降解相關步驟。

ClpY I domain突出於N、C domain之外於當ClpYQ聚合體形成之後I domain位於聚合體外側，且ClpY與其他ATPase經由序列比對I domain的部分不僅長度大小不一，連胺基酸的序列也有明顯的不同 (Wang *et al.*, 2001)。在以酵母菌雙雜交系統中初步觀察到ClpY $\Delta$ I+7Gly與ClpY  $\Delta$ D-loop無法與SulA測得親和力顯示I domain可能具有對基質辨識的功能 (Lien *et al.*2009)。ClpY $\Delta$ I+7Gly缺失突變蛋白在*in vitro*降解實驗中酵素活性下降了將近4成左右 (表四；圖八 A)，並未完全失去活性而且在*in vitro* pulldown實驗ClpY $\Delta$ I+7Gly缺失突變蛋白仍然保有與MBP-SulA近五成的親和力 (圖十三)，此一結果顯示ClpY能與MBP-SulA結合區域不止一處。再者由ClpY $\Delta$ L2缺失突變蛋白對MBP-SulA的降解活性下降 (表四；圖八 C)與*in vitro* pulldown實驗中不添加ATP狀態ClpY $\Delta$ L2與MBP-SulA親和力變低 (圖十五)。顯示I domain loop2缺失所帶來的酵素活性與對基質親和力的影響較為重要。而ClpY  $\Delta$ D-loop缺失突變蛋白(loop1 137-150aa；loop2 175-209aa)在37°C下C不穩定產生自我降解 (圖九 A；圖九 B)，顯示loop構造能穩定ClpY



的結構，ClpY  $\Delta$ D-loop缺失突變蛋白在*in vitro* pulldown中所測得的相對活性與ClpY $\Delta$ L2缺失突變蛋白相近。顯示ClpY I domain中loop2 (175-209aa)是主要與MBP-SulA在分解作用前期主要進行辨識結合區域。

ClpY I domain loop2對於整個降解作用對基質的辨識結合與傳送扮演重要的角色，但是在ClpY I domain loop2的點突變如L199Q、M187I、193L/E194L與Q198L/Q200L不若domain loop2缺失影響大，顯示ClpY對基質的辨識結合是由整個loop2結構來進行，loop2點突變影響較小

在ClpY $\Delta$ L1在ATP存在下pulldown比ClpY高4到5倍（圖十四），顯示在ClpY $\Delta$ L1聚合後並不影響ClpY $\Delta$ L1單元體與MBP-SulA結合，ClpY loop1結構可能在ClpY聚合成六元環後阻止多餘的基質與loop2結合，所以缺少loop1結構的ClpY $\Delta$ L1聚合後各單元體仍可與基質結合。而在E61C與M187I降解實驗中可知ClpYQ聚合力強或是與基質親和力強並不影響ClpYQ的酵素活性。所以ClpY $\Delta$ L1的降解活性增加不是因為少了loop1結構讓loop2容易與基質結合增加ClpYQ的酵素活性。而ClpY $\Delta$ L1具有對MBP-SulA較好的降解能力亦可能導因於ClpY $\Delta$ L1容易形成(ClpY $\Delta$ L1)<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>(ClpY $\Delta$ L1)<sub>6</sub>聚合體，降解的速度比ClpY<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>聚合體快。ClpY在I domain中 loop1、loop2的缺失在蛋白質聯結測試中ClpY $\Delta$ L1會形成十二元環（圖二十五）而ClpY $\Delta$ L2在ATP $\gamma$ S存在下才能形成六元環（圖二十六）此結果也顯示了ClpY I domain的也可能與ClpY聚合有關。

在*in vitro* pulldown實驗ClpY $\Delta$ I+7Gly缺失突變蛋白保有與MBP-SulA近五成的親和力。因此，酵素活性中心pore I區域為另一可能的結合點。缺失突變蛋白 $\Delta$ P1(aa 90-93)、pore I/loop1雙缺失突變蛋白 $\Delta$ P1L1(aa 90-93；aa 137-150)、pore I/loop2雙缺失突變蛋白 $\Delta$ P1L2(aa 90-93；aa 175-209)，以上突變蛋白由於活性中心pore I缺失在降解實驗中均無法降解MBP-SulA（圖二十二 D）。而在對上述缺

失突變蛋白進行*in vitro* pulldown實驗可發現 $\Delta P1$ 、 $\Delta P1L1$ 、 $\Delta P1L2$ 比ClpY、 $\Delta L1$ 、 $\Delta L2$ 親和力都更低，尤其以 $\Delta P1L2$ 為最低（圖二十一）。此結果顯示ClpY對於MBP-SulA的辨識結合可能由在loop2與pore I構造負責。

ClpYQ蛋白酶對於基質的降解，需由ClpY與ClpQ形成ClpYQ聚合體以ATP的水解提供能量讓ClpY進行解構與傳送基質的動作；同時ATP也扮演促成ClpY與ClpQ形成ClpYQ聚合的角色。因此ClpY的ATPase活性區是ClpYQ蛋白酶降解作用的核心。T87I ATPase突變蛋白ATPase相對活性約為ClpY的1/4（圖二十八）。在蛋白質聯結測試中，無論在有或沒有ATP $\gamma$ S存在的條件下都可以形成六元環而且在ATP $\gamma$ S存在下T87I突變蛋白無法與ClpQ形成ClpYQ聚合體（圖三十）。這也解釋了為何在基質降解實驗中T87I突變蛋白無法降解基質。同時在蛋白質聯結測試中以ADP來代替ATP $\gamma$ S進行ClpY與ClpYQ聚合，結果顯示ClpY在ADP存在下與T87I突變蛋白一樣無法與ClpQ形成ClpYQ聚合體（圖三十一），可知T87I突變蛋白構型處於與ADP結合的狀態其C端結構無法向外伸出與ClpQ十二元體進行結合。再者T87I突變蛋白雖然自身不需ATP $\gamma$ S即可形成六元體，但是在ITC實驗中T87I與ClpY一樣仍然可以與ATP $\gamma$ S進行結合只是親和力低於ClpY（圖二十九）。綜合以上結果雖然T87I突變蛋白具有低度的ATPase活性，但無法與ClpQ形成ClpYQ聚合體，顯示ClpY T87I的突變造成此突變蛋白缺乏結構改變的能力。

在ClpY Y408A以ClpY Y408A進行蛋白質聯結測試觀察，ClpY Y408A單獨存在下並無形成六元環的現象，但是在ClpY Y408A加入ATP $\gamma$ S的實驗可看到形成少量的ClpY Y408A六元環（圖三十四），顯示Y408A聚合力低，導因於在胺基酸第408位置的突變由Tyrosin變成Alanine缺少了支鏈提供與鄰近單元體穩定的結合，影響了六元環的穩定。而在ClpY Y408A與ATP $\gamma$ S及ClpQ進行蛋白質聯結測試，ClpY Y408A可以與ClpQ形成少量的(Cl pY Y408A)<sub>6</sub>-Q<sub>12</sub>聚合體（圖三十四）。顯示ATP $\gamma$ S與ClpQ均可直接或間接提供聚合的穩定度。在ClpY Y408A分解

MBP-SulA的相對活性為ClpY的 $52\% \pm 0.6\%$  (圖三十二)也顯示ClpY Y408A可與ClpQ形成少量或不穩定結合而帶有部分酵素活性。ClpY Y408A 所保有的ATPase活性 $51\% \pm 1.75\%$  (圖三十三)也與分解MBP-SulA的活性相近。綜合以上結果顯示ClpYQ聚合與ATPase活性及分解MBP-SulA的活性是環環相扣的。ClpY Y408A因不易聚合成六元環在*in vitro* pulldown實驗中在有ATP條件下由於聚合力弱所形成六元環較少被pulldown下來的量比ClpY多三到四倍 (圖三十五)，此一結果也支持前述討論ClpY在六元環狀態下只能與一個MBP-SulA結合的結論。



## 伍、結論

ClpYQ蛋白酶對於基質的降解作用流程需要經過辨識，結合、解構、傳送到ClpQ進行基質的降解。而整個降解作用需要ATP的大部分步驟都由ClpY進行，ClpY也具有與ClpQ聚合及活化ClpQ的能力。ClpY為ClpYQ蛋白酶對基質的降解作用扮演決定步驟的角色。

在本篇研究中對於ClpYQ蛋白酶對於基質的降解作用流程有了更進一步的發現。在前人研究中認為ATP存在下使得ClpY六元環形成然後與SulA進行辨識結合。在本篇研究中發現ClpY在沒有ATP存在下能與SulA進行辨識結合，而ATP扮演辨識結合與降解作用的分界點，ATP存在下降解作用開始SulA-ClpY與其他沒有與SulA結合的ClpY形成SulA-ClpY<sub>6</sub>的聚合後，再與ClpQ十二元體形成SulA-ClpY<sub>6</sub>Q<sub>12</sub>聚合體再進行解構、傳送及降解的步驟。

而ClpY I domain負責降解作用前期對基質的辨識結合，其中尤以loop2 (aa.175-209)為ClpY主要對基質的辨識結合的區域。loop2的點突變對於酵素活性與基質親和力影響不大，由此可知基質的辨識結合主要是由loop2結構來進行。而I domain loop1(aa.137-150) 結構則是可能在ClpY在與基質辨識結合後，ClpYQ蛋白酶進行降解作用時，阻擋多餘的基質與ClpY六元環結合的功能。而且當loop1缺失ClpY $\Delta$ L1會形成十二元環、loop2缺失ClpY $\Delta$ L2在ATP $\gamma$ S存在下才能形成六元環，顯示loop2缺失可能影響ClpY自身的穩定性或是直接或間接影響六元環的形成，這也意味著I domain可能間接影響ClpY六元環的聚合作用。

在本篇研究中利用與ClpY交互作用力強的ClpQ E61C及與MBP-SulA親和力強的ClpY M187I進行降解實驗，與ClpYQ相比並無增加降解的效率，可知ClpY與ClpQ交互作用力強弱及ClpY與基質的親和力高低並不是ClpYQ降解作用主要的決定性因素。ClpY Y408A突變蛋白因自身聚合能力穩定度低使得其具有部分的降解能力與ATPase活性。由以上可知ClpY六元環的穩定、ClpYQ蛋白酶聚合的穩定與ATPase活性對基質的降解作用快慢有重大的影響。

## 陸、參考文獻

- 余建泓.2004大腸桿菌ClpQ蛋白的C端為負責其單元體間交互作用的區段(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 林佩宜.2006大腸桿菌ClpQ蛋白分子之間的聚合和其C端的功能(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 施如珊.2004大腸桿菌熱休克蛋白ClpY I domain之突變蛋白及其專一性基質辨識之研究(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 翁于婷.2009大腸桿菌熱休克蛋白酶ClpYQ之基質SulA被辨識區域特性之研究(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 張道遠.2004分析大腸桿菌ClpYQ蛋白酶之ClpY功能性羧基端(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 連湘芸.2009大腸桿菌 $clpQ^+lpY^+$ 及 $gspS^+$ 基因之研究：基因之調控及其基質辨識(國立臺灣大學農業化學研究所博士論文)
- 彭聲翔.2008大腸桿菌對基質SulA專一辨識位之研究(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 黃吉心.2006大腸桿菌ClpQ與ClpY之交互作用與其蛋白酶之活化(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)
- 黃齡誼.2011大腸桿菌ClpYQ蛋白酶透過ClpY對其基質SulA進行辨識、解構及轉送至蛋白酶活性區之研究(國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文)

- Azim, M. K., W. Goehring, H. K. Song, R. Ramachandran, M. Bochtler & P. Goettig, (2006) Characterization of the HslU chaperone affinity for HslV protease. *Protein Sci.* **14**: 1357-1362.
- Bochtler, M., L. Ditzel, M. Groll & R. Huber, (1997) Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 6070-6074.
- Bochtler, M., C. Hartmann, H. K. Song, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik & R. Huber, (2000) The structures of HsIU and the ATP-dependent protease HsIU-HsIV. *Nature* **403**: 800-805.
- Breyer, W. A. & B. W. Matthews, (2001) A structural basis for processivity. *Protein Sci.* **10**: 1699-1711.
- Chuang, S. E., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, D. L. Daniels & F. R. Blattner, (1993) Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslTS/ibpAB* and *hslVU* operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**: 1-6.
- Gottesman, S., (2003) Proteolysis in Bacterial Regulatory Circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 565-587.
- Gottesman, S., W. P. Clark, V. d. Crecy-Lagard & M. R. Maurizi, (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 22618-22626.
- Gottesman, S., P. Trisler & A. S. Torres-Cabassa, (1985) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J. Bacteriol.* **162**: 1111-1119.
- Guo, F., Maurizi, M. R., Esser, L. & Xia, D. (2002). Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J. Biol. Chem.* **277**: 46743-46752.
- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121–4130.
- Hanson, P. I. & S. W. Whiteheart, (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:519-529.
- Herman, C., D. Thevenet, R. D'Ari & P. Bouloc, (1995) Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 3516-3520.
- Higashitani, A., Y. Ishii, Y. Kato & K. Horiuchi, (1997) Functional dissection of a cell-division inhibitor, SulA, of *Escherichia coli* and its negative regulation by Lon. *Mol. Gen. Genet.* **254**:351-357.
- Hsieh, F. C., Chen, C. T., Weng, Y. T, Peng, S. S., Chen, Y. C., Huang, L. Y., Hu, H. T.,

- Wu, Y. L., Lin, N. C., Wu, W. F., (2011) Stepwise activity of ClpY (HslU) mutants in the processive degradation of *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease substrates. *J. Bacteriol.* **193**:5465-76.
- Huang, H. & A. L. Goldberg, (1997) Proteolytic activity of the ATP-dependent protease HslVU can be uncoupled from ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **272**: 21364-21372.
- Ishii, Y. & F. Amano, (2001) Regulation of Sula cleavage by Lon protease by the C-terminal amino acid of Sula, histidine. *Biochem. J.* **358**: 473-480.
- Ishikawa T, Maurizi M.R., Belnap D & Steven A.C., (2000) Docking of components in a bacterial complex. *Nature* **408**: 667-668.
- Jones, C. & I. B. Holland, (1985) Role of the SulB (FtsZ) Protein in division inhibition during the SOS response in *Escherichia coli* : FtsZ stabilizes the inhibitor Sula in maxicells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6045-6049.
- Joshi S. A., Baker T. A & Sauer R. T.. 2003. C-terminal domain mutations in ClpX uncouple substrate binding from an engagement step required for unfolding. *Mol. Microbiol.* **48**:67–76.
- Kanemori, M., K. Nishihara, H. Yanagi & T. Yura, (1997) Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma32 and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 7219-7225.
- Kessel M, Wu W, Gottesman S, Kocsis E, Steven AC, Maurizi MR. (1996) Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. *FEBS Lett.* **398**:274–278.
- Khattar, M. M., (1997) Overexpression of the *hslVU* operon suppresses SOS-mediated inhibition of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS. Lett.* **414**: 402-404.
- Kwon, A. R., C. B. Trame & D. B. McKay, (2004) Kinetics of protein substrate degradation by HslUV. *J. Struct. Biol.* **146**: 141-147.
- Lau-Wong, I. C., T. Locke, M. J. Ellison, T. L. Raivio & L. S. Frost, (2008) Activation of the Cpx regulon destabilizes the F plasmid transfer activator, TraJ, via the HslVU protease in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **67**: 516-527.
- Lee, J. W., Park, E., Jeong, M. S., Jeon, Y. J., Eom, S. H., Seol, J. H. & Chung, C. H. (2009). HslVU ATP-dependent protease utilizes maximally six among twelve threonine active sites during proteolysis. *J. Biol. Chem.* **284**: 33475-33484.
- Lee, Y.-Y., C.-F. Chang, C.-L. Kuo, M.-C. Chen, C. H. Yu, P.-I. Lin & W. F. Wu, (2003) Subunit oligomerization and substrate recognition of the *Escherichia coli* ClpYQ (HslUV) protease implicated by in vivo protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *J. Bacteriol.* **185**: 2393-2401.

- Lien, H. Y., Shy, R. S., Peng, S. S., Wu, Y. L., Weng, Y. T., Chen, H. H., Su, P. C., Ng, W. F., Chen, Y. C., Chang, P. Y. & Wu, W. F. (2009). Characterization of the *Escherichia coli* ClpY (HslU) substrate recognition site in the ClpYQ (HslUV) protease using the yeast two-hybrid system. *J. Bacteriol.* **191**: 4218-4231.
- Missiakas, D., F. Schwager, J. M. Betton, C. Georgopoulos & S. Raina, (1996) Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. *EMBO. J.* **15**: 6899-6909.
- Park, E., Y. M. Rho, O. J. Koh, S. W. Ahn, I. S. Seong, J. J. Song, O. Bang, J. H. Seol, J. Wang, S. H. Eom & C. H. Chung, (2005) Role of the GYVG pore motif of HslU ATPase in protein unfolding and translocation for degradation by HslV peptidase. *J. Biol. Chem.* **280**: 22892-22898.
- Ramachandran, R., C. Hartmann, H. K. Song, R. Huber & M. Bochtler, (2002) Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 7396-7401.
- Rohrwild, M., O. Coux, H. C. Huang, R. P. Moerschell, S. J. Yoo, J. H. Seol, C. H. Chung & A. L. Goldberg, (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**: 5808-5813.
- Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Muller, S. A., Huang, H. C., Engel, A., Baumeister, W. & Goldberg, A. L. (1997). The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 133-139
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. & Lindquist, S. (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* **21**: 289-296.
- Seong, I. S., M. S. Kang, M. K. Choi, J. W. Lee, O. J. Koh, J. Wang, S. H. Eom & C. H. Chung, (2002) The C-terminal tails of HslU ATPase act as a molecular switch for activation of HslV peptidase. *J. Biol. Chem.* **277**: 25976-25982.
- Song, H. K., Hartmann, C., Ramachandran, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L. & Huber, R. (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 14103-14108.
- Voges, D., Zwickl, P. & Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 1015-1068.
- Wang, J., (2001) A corrected quaternary arrangement of the peptidase HslV and atpase HslU in a cocrystal structure. *J. Struct. Biol.* **134**: 15-24.
- Wang, J., J. J. Song, I. S. Seong, M. C. Franklin, S. Kamtekar, S. H. Eom & C. H.



- Chung, (2001) Nucleotide-dependent conformational changes in a protease-associated ATPase HslU. *Structure* **9**: 1107-1116.
- Wang, X., Huang, J., Mukherjee, A., Cao, C. & Lutkenhaus, J. (1997). Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. *J. Bacteriol.* **179**: 5551-5559.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**: 1888-1893.
- Yakamavich JA, B. T. & Sauer RT., (2008) Asymmetric nucleotide transactions of the HslUV protease. *J. Mol. Biol.* **380**: 946-957.
- Yoo, S. J., Seol, J. H., Shin, D. H., Rohrwild, M., Kang, M. S., Tanaka, K., Goldberg, A. L. proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *Esche & Chung, C. H. (1996). Purification and characterization of the heat shock richia coli. J. Biol. Chem.* **271**:14035-14040.
- Zolkiewski, M. (2006). A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol. Microbiol.* **61**: 1094-1100.



表一、本論文所使用的菌株

Table 1 . *Escherichia coli*. strain used in this stuay

Strain	Description	Source or Reference
<i>Escherichia coli</i> .strain		
BL21 DE3	<i>omT hsdSB(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) gal dcm, clpY<sup>-</sup>, clpQ<sup>-</sup></i>	This stuay
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene

表二、本論文所使用的質體

Table 2 . Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Source or Reference
pET21a	<i>ori</i> (pBR3322) T7 promoter amp <sup>r</sup>	Novagen
pMAL-c2X	<i>ori</i> (pBR3322) P <sub>tac</sub> amp <sup>r</sup>	NEB
pBAD24	<i>ori</i> (pBR3322) <i>araC</i> P <sub>BAD</sub> amp <sup>r</sup>	Guzmen et al.(1995)
pBAD33	<i>ori</i> (pACYC184) <i>araC</i> P <sub>BAD</sub> cm <sup>r</sup>	Guzmen et al.(1995)



表四、ClpY 及其缺失突變蛋白於胞外降解 MBP-SulA 的相對活性

Table 4 . *In vitro* degradation of MBP-SulA degraded by ClpY and its variants.

ClpY	ClpQ	relative proteolytic activity(%) *
ClpY	ClpQ	100
ClpY	ClpQ E61C	89±7.1
ClpYΔI+7Gly	ClpQ	59±6.5
ClpYΔL1	ClpQ	138±10.9
ClpYΔL2	ClpQ	49±12
ClpY M187I	ClpQ	87±5
ClpY L199Q	ClpQ	74±7.1
ClpY E193L/E194L	ClpQ	84±2.5
ClpY Q198L/Q200L	ClpQ	83±4.3
ClpY ΔP1	ClpQ	4±1.4
ClpY ΔP1L1	ClpQ	11±3
ClpY ΔP1L2	ClpQ	9±1.8



\*: The relative levels of MBP-SulA degraded by ClpYQ define as 100% and calculate the relative activities of mutants.

表五、在不同核苷酸存在下 ClpY 與 MBP-SulA 在 *in vitro* pulldown 試驗中相對活性

Table 5 . The relative activity of MBP-SulA between ClpY and its variants when different nucleotide was present by *in vitro* pulldown test.

ClpY	MBP-SulA	nucleotide	relative activity(%) *
ClpY	MBP-SulA	non	100
ClpY	MBP-SulA	ATP	23±1.2
ClpY	MBP-SulA	ADP	20±1.5
ClpY	MBP-SulA	ATP $\gamma$ S	15±0.7

\* : The relative level of ClpY pulldown by MBP-SulA without any nucleotide was define as 100%

表六、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測MBP-SulA與ClpY及其缺失突變蛋白之間的親和力

Table 4 . Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpY and it's variants

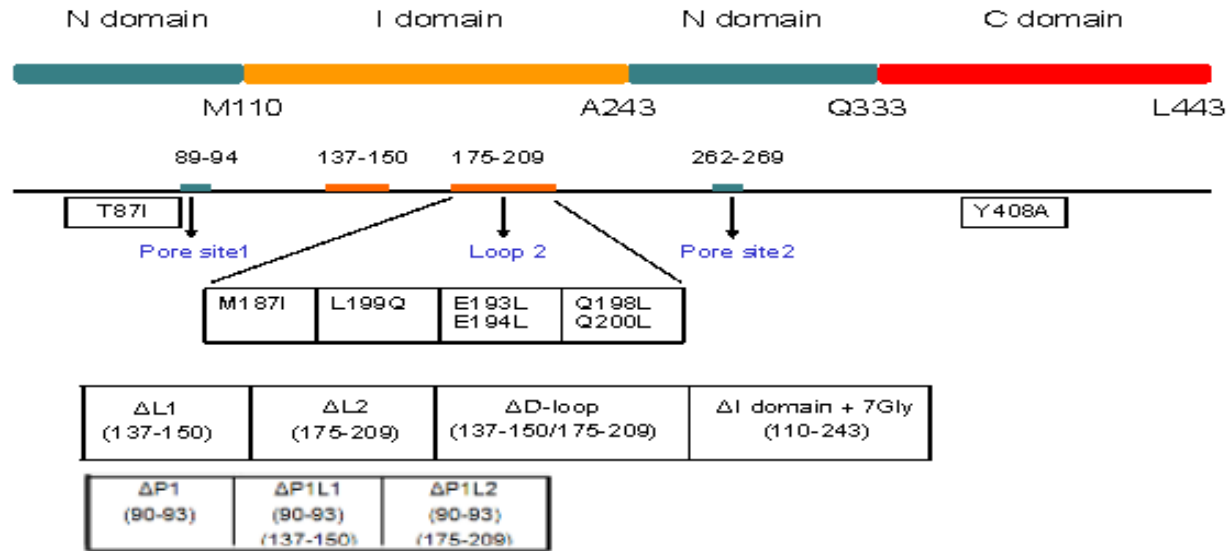
Immobilized protein	Soluble protein	KD(M)
MBP-SulA	ClpY	$6.69 \times 10^{-7}$
MBP-SulA	ClpY $\Delta$ P1	$1.36 \times 10^{-6}$
MBP-SulA	ClpY $\Delta$ P1L1	$2.95 \times 10^{-6}$
MBP-SulA	ClpY $\Delta$ P1L2	$1.92 \times 10^{-6}$

表七、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測於有ATP下MBP-SulA與ClpY及其缺失突變蛋白之間的親和力

Table5. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpY and its variants with ATP

Immobilized protein	Soluble protein	KD(M)
MBP-SulA	ClpY	$8.13 \times 10^{-7}$
MBP-SulA	ClpY $\Delta$ P1	$1.19 \times 10^{-6}$
MBP-SulA	ClpY $\Delta$ P1L1	$4.33 \times 10^{-6}$
MBP-SulA	ClpY $\Delta$ P1L2	$2.72 \times 10^{-6}$

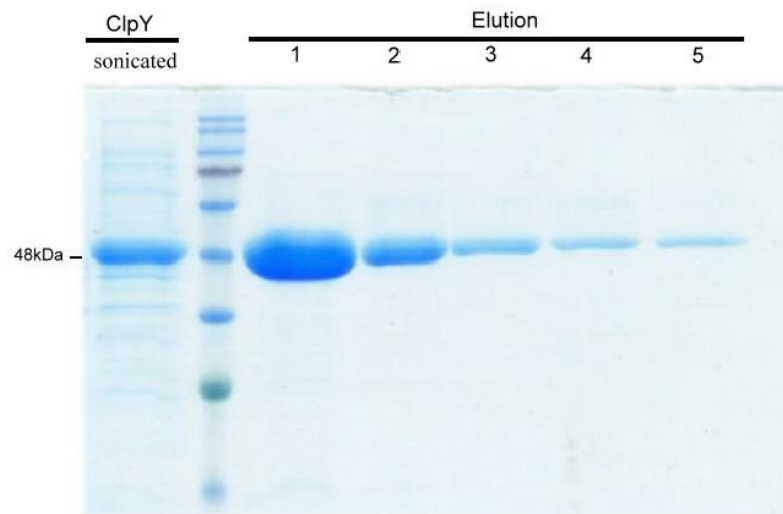




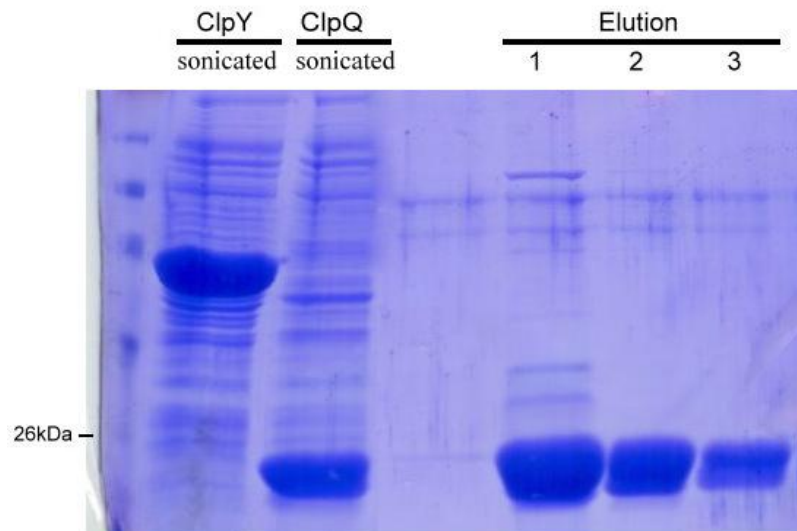
圖一、ClpY突變蛋白及其突變區域位置：ATPase點突變T87I；I domain loop2點突變M187I、L199Q；I domain loop2雙點突變E193L/E194L、Q198L/Q200L；孔洞區缺失突變 $\Delta$ P1 (90-93 aa)；I domain缺失突變 $\Delta$ I+7Gly (110-243 aa)、 $\Delta$ I $\Delta$ L1 (137-150 aa)、 $\Delta$ L2 (175-209 aa)及 $\Delta$ D-loop (137-150 aa；175-209 aa)；孔洞區與I domain雙缺失突變 $\Delta$ P1L1 (90-93 aa；137-150 aa)及 $\Delta$ P1L2 (90-93 aa；175-209 aa)；C domain點突變Y408A。

Fig 1. ClpY mutants and mutation positions: ATPase point mutant T87I；I domain loop2 point mutants M187I and L199Q；I domain loop2 double point mutants E193L/E194L and Q198L/Q200L；poreI deletion mutant  $\Delta$ P1 (90-93 aa)；I domain deletion mutants  $\Delta$ I+7Gly (110-243 aa)、 $\Delta$ I $\Delta$ L1 (137-150 aa)、 $\Delta$ L2 (175-209 aa) and  $\Delta$ D-loop (137-150 aa；175-209 aa)；poreI /I domain double deletion mutants  $\Delta$ P1L1 (90-93 aa；137-150 aa) and  $\Delta$ P1L2 (90-93 aa；175-209 aa)；C domain point mutant Y408A.

A



B

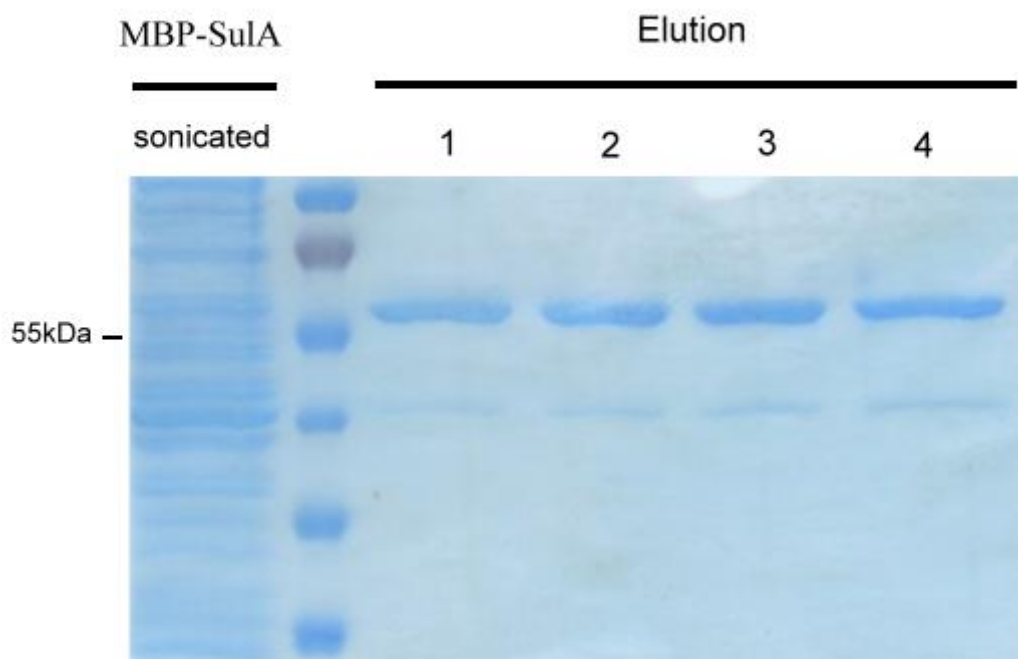


圖二、帶有 His tag ClpY 與 ClpQ 的蛋白質純化；以 IPTG 大量誘導表現帶有 His tag 的 ClpY 與 ClpQ 基因的 pET21a 質體的大腸桿菌 BL21 以 Metal affinity resin 進行親和性純化。

(A) ClpY 以 Metal affinity resin 進行親和性純化的結果 ClpY 分子量為 49kDa。

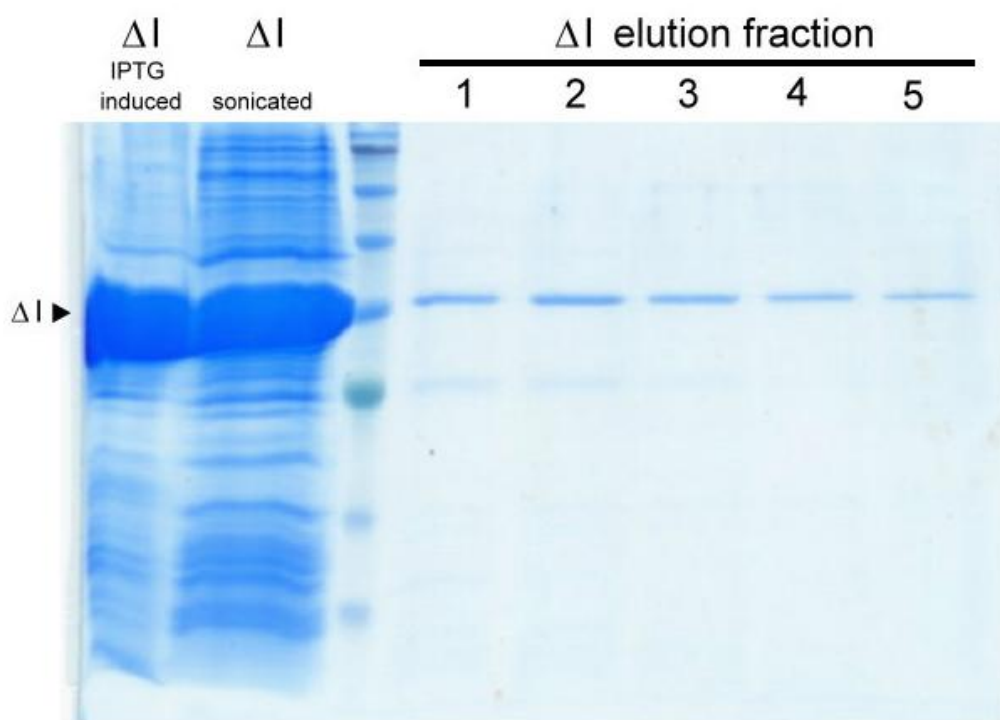
(B) ClpQ 以 Metal affinity resin 進行親和性純化的結果 ClpY 分子量為 19kDa。

Fig 2. Purification of His tagged ClpY and ClpQ protein ; His tagged ClpY and ClpQ gene were separately cloned into pET21a plasmid and transformed into *E. coli*. BL21. Overexpress with IPTG and purified by Metal affinity resin. (A) Purified ClpY protein molecular weight is 49kDa. (B) Purified ClpQ protein molecular weight is 19kDa.



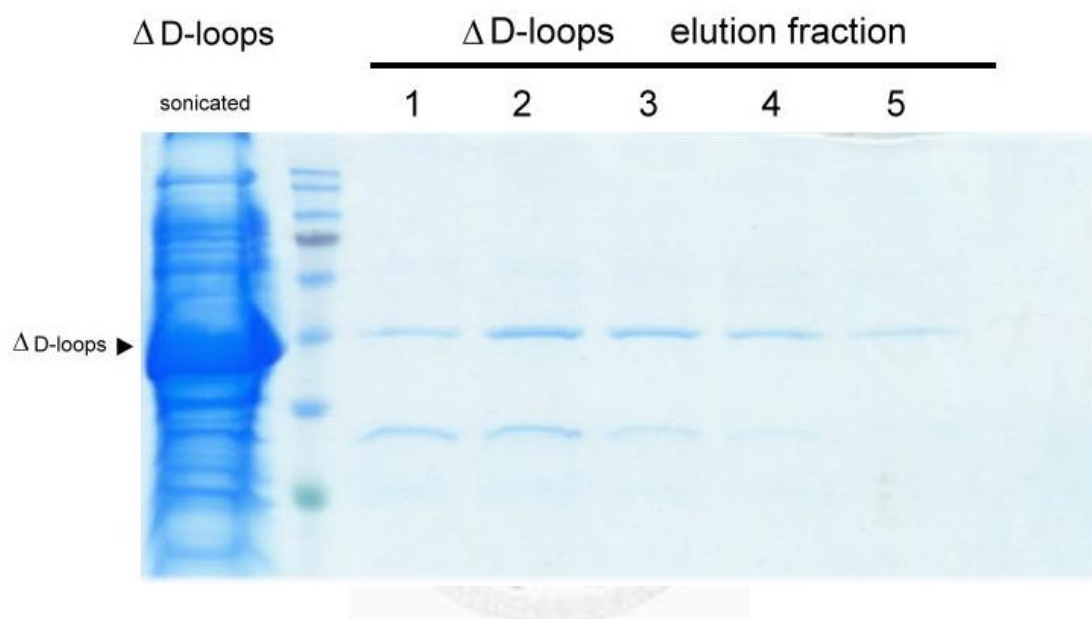
圖三、帶有 MBP tag SulA 蛋白質的純化；以 IPTG 大量誘導表現帶有的 pMAL-p-SulA 質體的大腸桿菌 BL21 以 Amylose resin 進行親和性純化。

Fig 3. Purification of MBP-tagged SulA protein ; pMAL-p-SulA plasmid was transformed into *E. coli*. BL21. An overexpression of MBP-SulA with an IPTG induction, it was purification by Amylose resin.



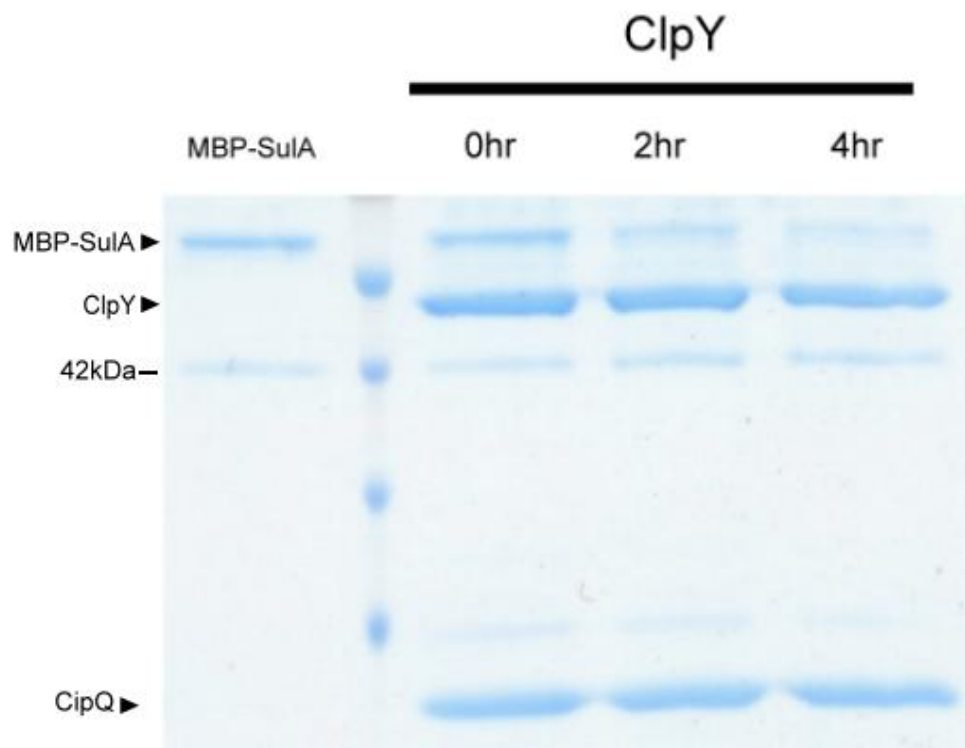
圖四、純化帶有 N 端 His tag 的 ClpY $\Delta$ I domain 缺失突變蛋白質；以 IPTG 大量誘導表現帶有 His tag 的 ClpY $\Delta$ I 基因的 pET21a 質體的大腸桿菌 BL21，以含有 sarklsoyl 緩衝液進行破菌以 Metal affinity resin 進行親和性純化。

Fig 4. Purification of N-terminal His tagged ClpY  $\Delta$ I domain deletion mutant protein ; His tagged ClpY  $\Delta$ I gene was clone into pET21a plasmid and transformed into *E. coli*. BL21. Overexpression with an IPTG induction and sonication with sarklsoyl lysis buffer, then purified by Metal affinity resin.



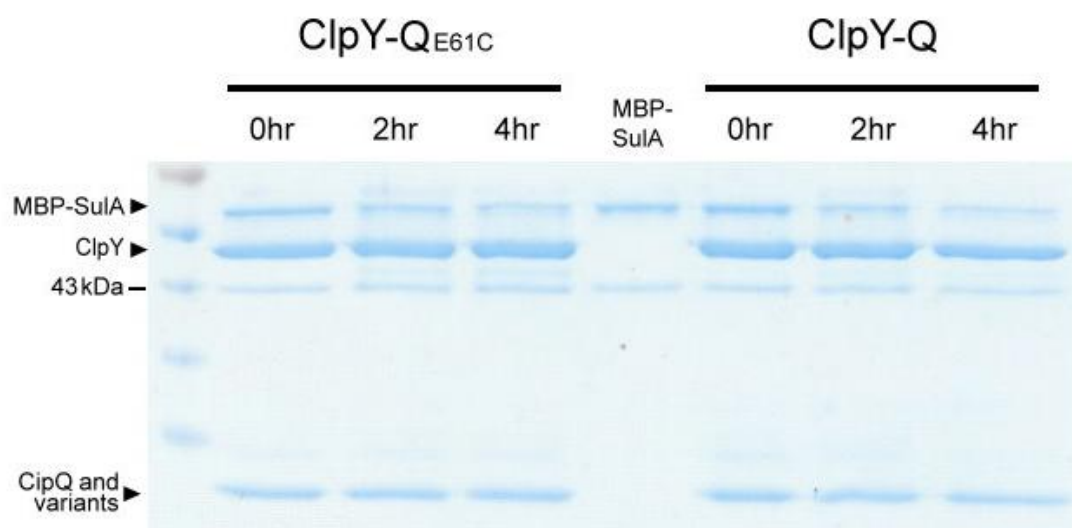
圖五、純化帶有 N 端 His tag 的 ClpY  $\Delta$ D-loop 缺失突變蛋白質；以 IPTG 大量誘導表現帶有 His tag 的 ClpY  $\Delta$ D-loop 基因質體的大腸桿菌 BL21，以含有 sarklsoyl 緩衝液進行破菌以 Metal affinity resin 進行親和性純化。

Fig 5. Purification of N-terminal His tagged ClpY  $\Delta$ D-loop deletion mutant protein; His tagged clpY  $\Delta$ D-loop gene was clone into pET21a plasmid and transformed into *E. coli*. BL21. An overexpression with an IPTG induction and sonication with sarklsoyl lysis buffer then purified by Metal affinity resin.



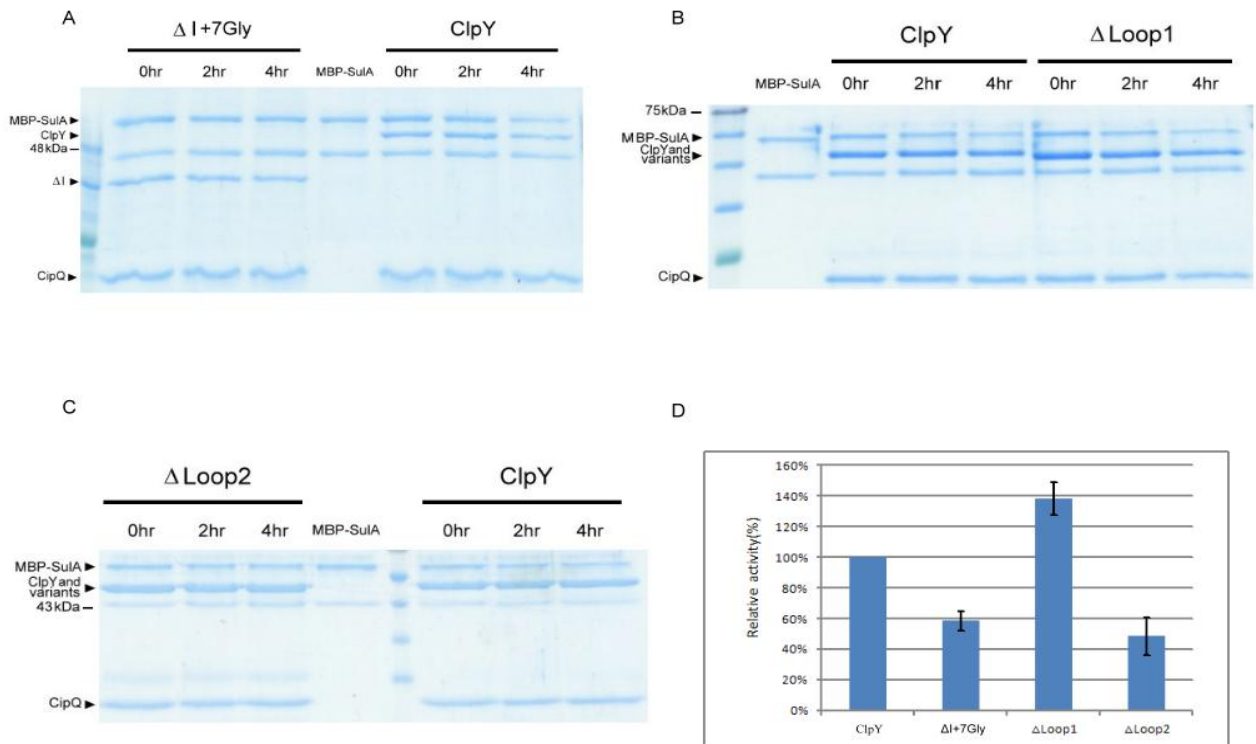
圖六、ClpYQ 蛋白酶於胞外對 MBP-SulA 降解試驗；降解反應開始 0，2 及 4 小時進行時間點取樣後以 12%SDS-PAGE 進行蛋白質電泳。

Fig 6. *In vitro* degradation of MBP-SulA by ClpYQ protease. Degradation mixture were sampled at 0, 2 and 4hr time points, then analyzed by 12%SDS-PAGE.



圖七、ClpYQ 與 ClpY-ClpQE61C 對 MBP-SulA 的胞外降解試驗；降解反應開始 0、2 及 4 小時進行時間點取樣後以 12%SDS-PAGE 進行蛋白質電泳。

Fig 7. *In vitro* degradation of MBP-SulA by ClpYQ and ClpY-ClpQE61C. Degradation mixture were sampled at 0, 2 and 4hr time points then analyzed by 12%SDS-PAGE.



圖八、ClpY I domain 缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的胞外降解試驗。

(A) ClpY  $\Delta I+7Gly$  缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解。

(B) ClpY  $\Delta L1$  缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解。

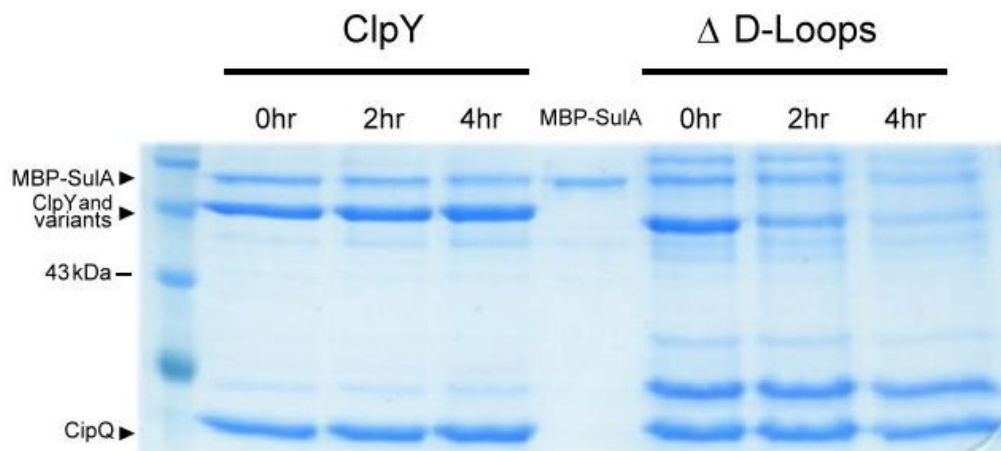
(C) ClpY  $\Delta L2$  缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解。

(D) ClpY I domain 缺失突變蛋白對 MBP-SulA 降解的相對活性。

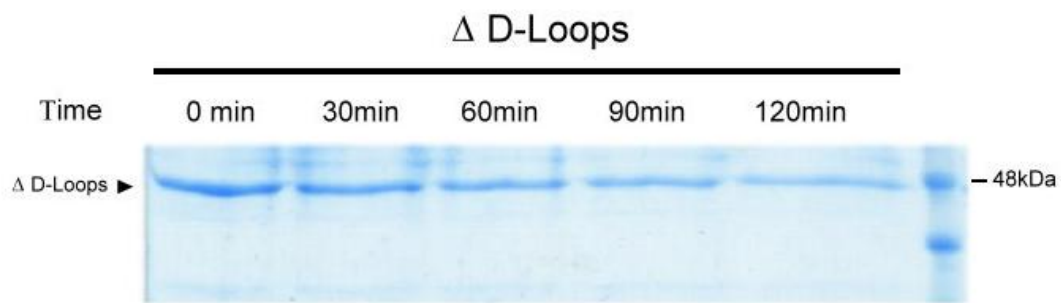
Fig 8. *In vitro* degradation of MBP-SulA degraded by ClpY I domain deletion mutants. (A) MBP-SulA degraded by ClpY  $\Delta I+7Gly$  (B) MBP-SulA degraded by ClpY  $\Delta L1$  (C) MBP-SulA degraded by ClpY  $\Delta L2$  (D) The relative activities of ClpY I domain deletion mutants degraded MBP-SulA .



A



B

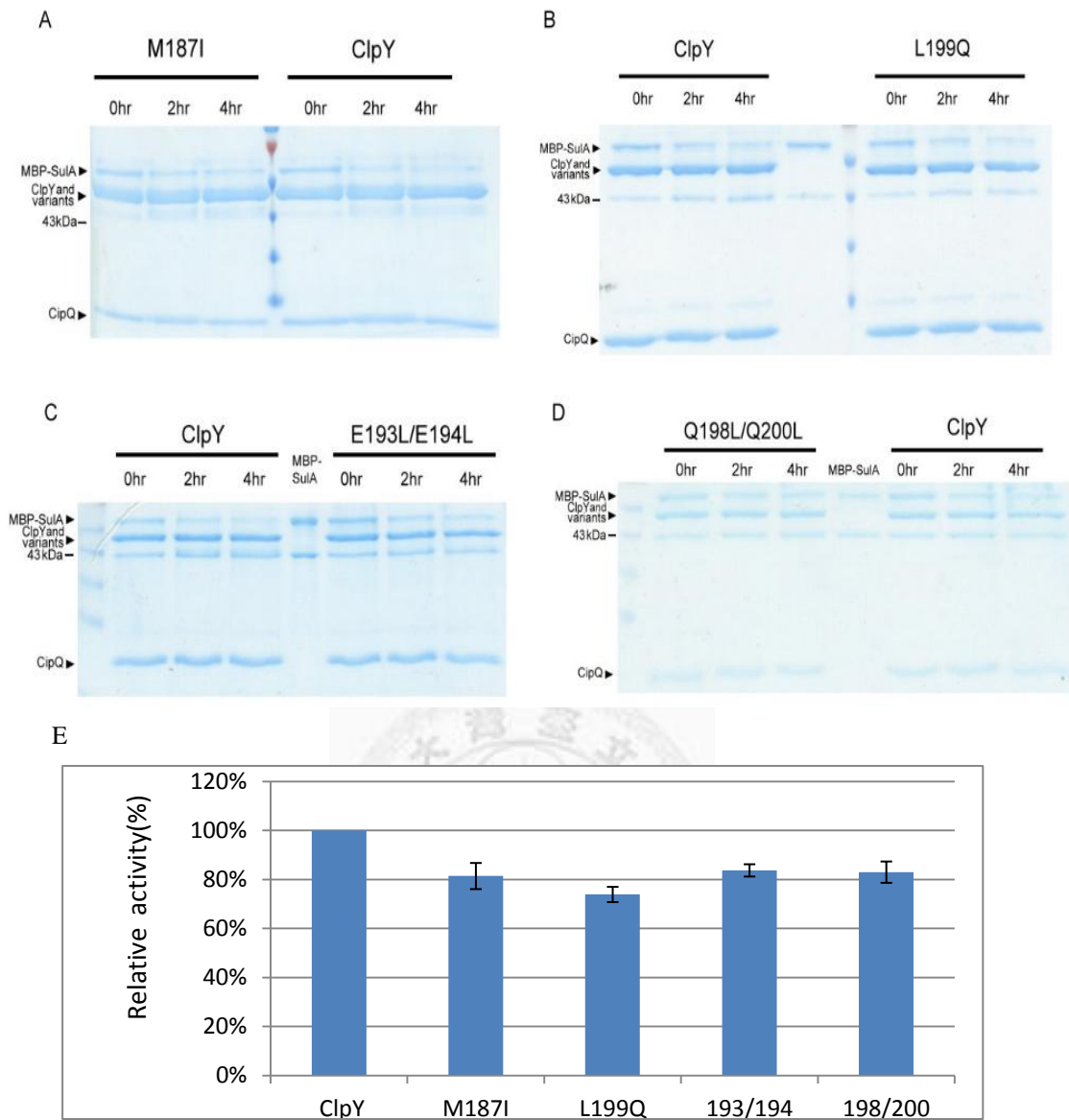


圖九、ClpY  $\Delta$ D-loop 缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解試驗及其蛋白質之穩定度。

(A) ClpY  $\Delta$ D-loop 缺失突變蛋白對 MBP-SulA 的降解。

(B) ClpY  $\Delta$ D-loop 缺失突變蛋白之穩定性。

Fig 9. *In vitro* degradation of MBP-SulA degraded by ClpY  $\Delta$ D-loop deletion mutant and it's own stability. (A) MBP-SulA degraded by ClpY  $\Delta$ D-loop deletion mutant. (B) The stability test of ClpY  $\Delta$ D-loop deletion mutant..



圖十、ClpY I domain loop2 點突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

(A) ClpY M187I 突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

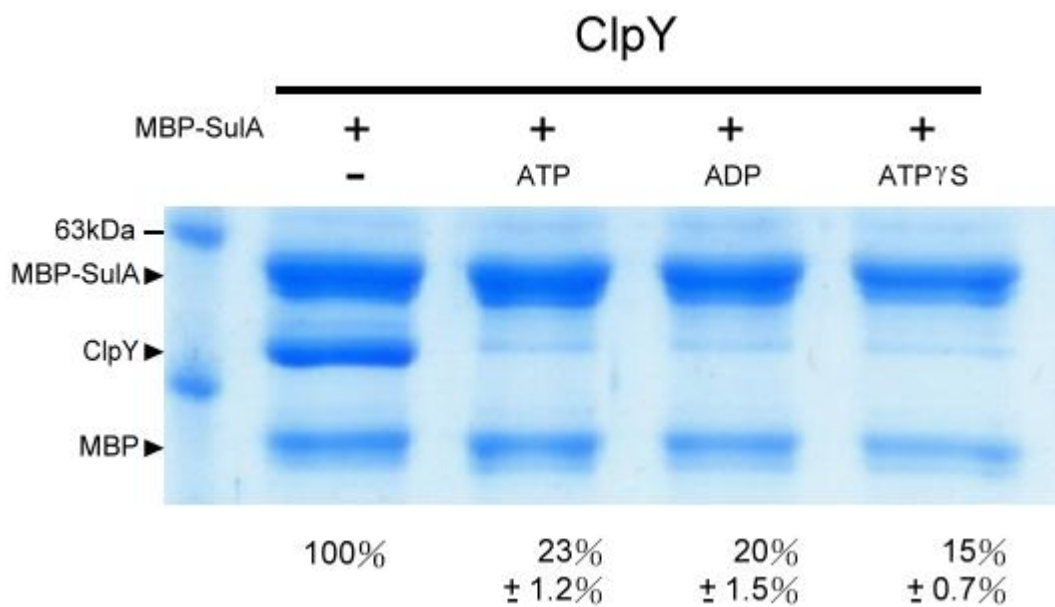
(B) ClpY L199Q 突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

(C) ClpY E193L/E194L 突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

(D) ClpY Q198L/Q200L 突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

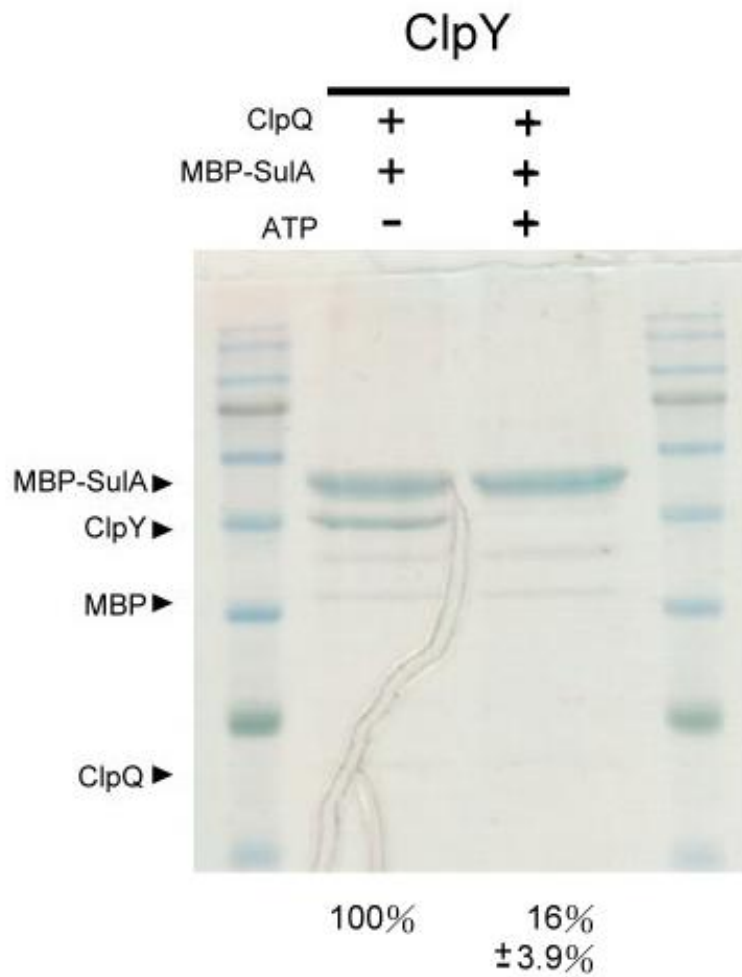
(E) ClpY I domain loop2 點突變蛋白對 MBP-SulA 降解之相對活性。

Fig 10. *In vitro* degradation of MBP-SulA degraded by ClpY I domain loop2 point mutants. (A) MBP-SulA degraded by ClpY M187I ; (B) MBP-SulA degraded by ClpY L199Q ; (C) MBP-SulA degraded by ClpY E193L/E194L ; (D) MBP-SulA degraded by ClpY Q198L/Q200L (E) The relative activities of ClpY I domain loop2 point mutants degraded MBP-SulA .



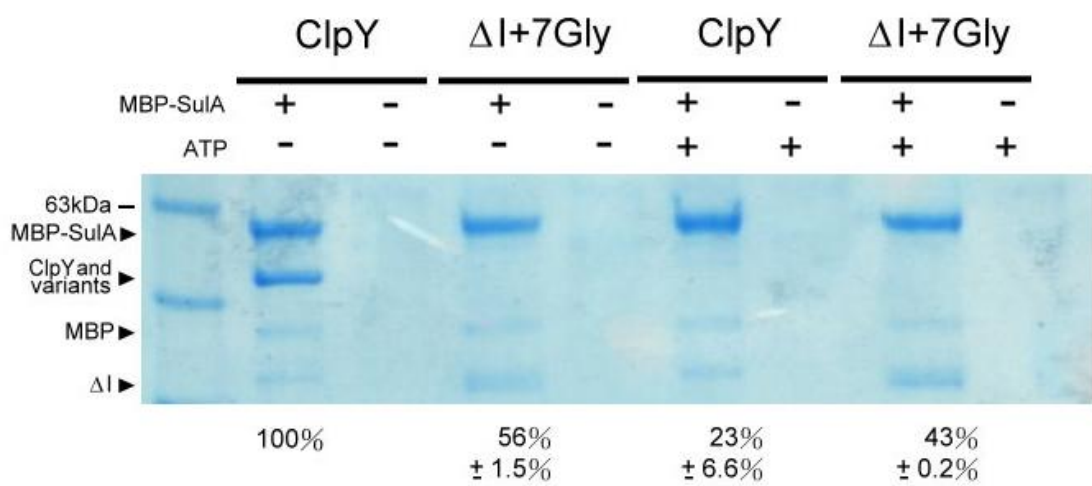
圖十一、以不同核苷酸進行 ClpY 與 MBP-SulA *in vitro* pulldown 之實驗。

Fig 11. *In vitro* pulldown experiments between ClpY and MBP-SulA without or with different nucleotides.



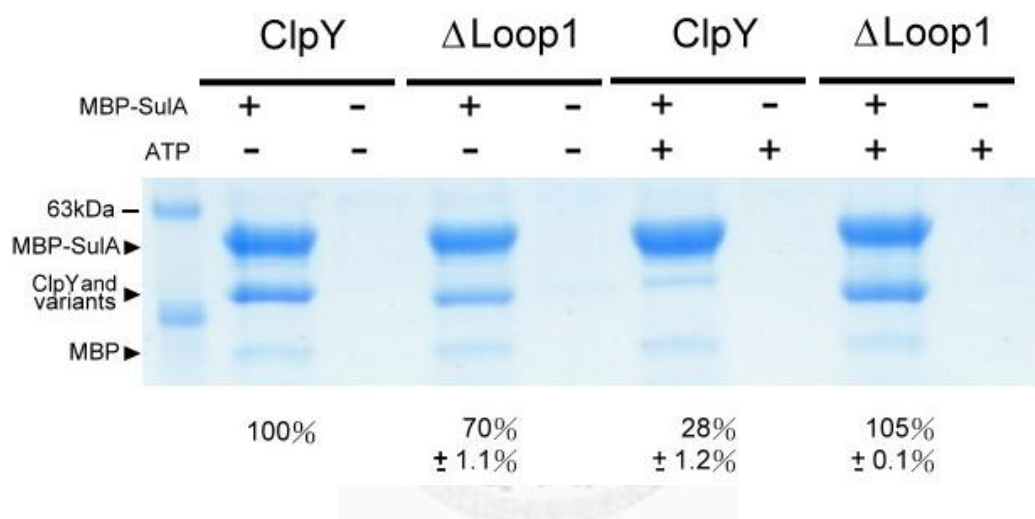
圖十二、以 *in vitro* pulldown 分析 ClpQ 對 ClpY 與 MBP-SulA 的辨識結合的影響。

Fig 12. *In vitro* pulldown experiments analyze the recognition between ClpY and MBP-SulA with ClpQ.



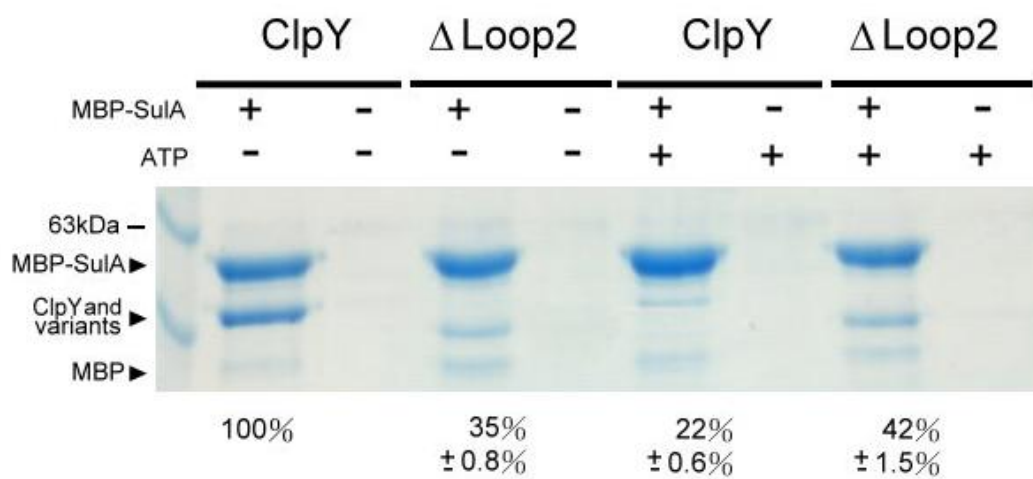
圖十三、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析 ClpY $\Delta I+7Gly$  缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合。

Fig 13. *In vitro* pulldown experiments analyze the recognition between ClpY  $\Delta I+7Gly$  and MBP-SulA with or without ATP.



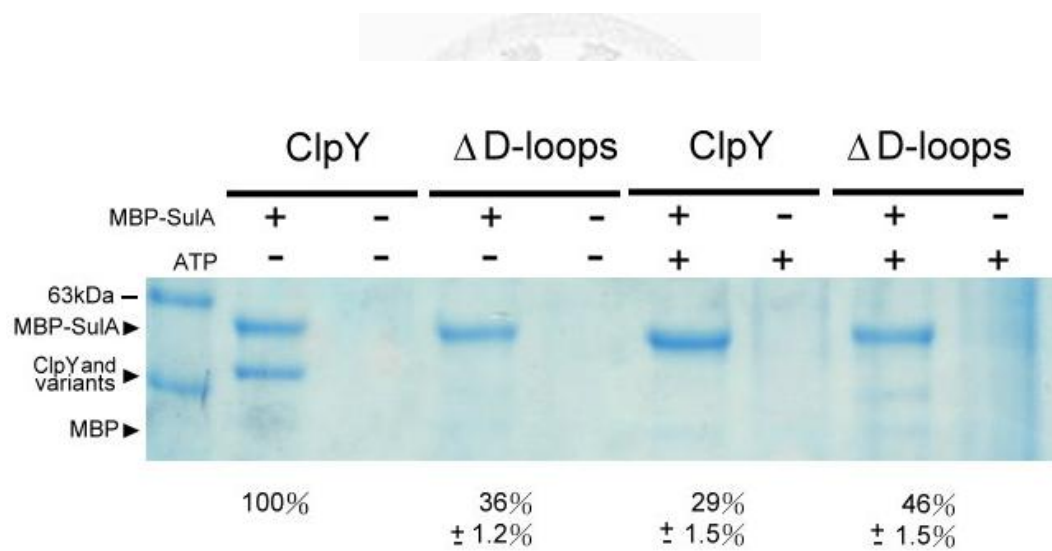
圖十四、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析 ClpY $\Delta$ L1 缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合。

Fig 14. *In vitro* pulldown experiments analyze the recognition between ClpY $\Delta$ L1 and MBP-SulA with or without ATP.



圖十五、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析 ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合。

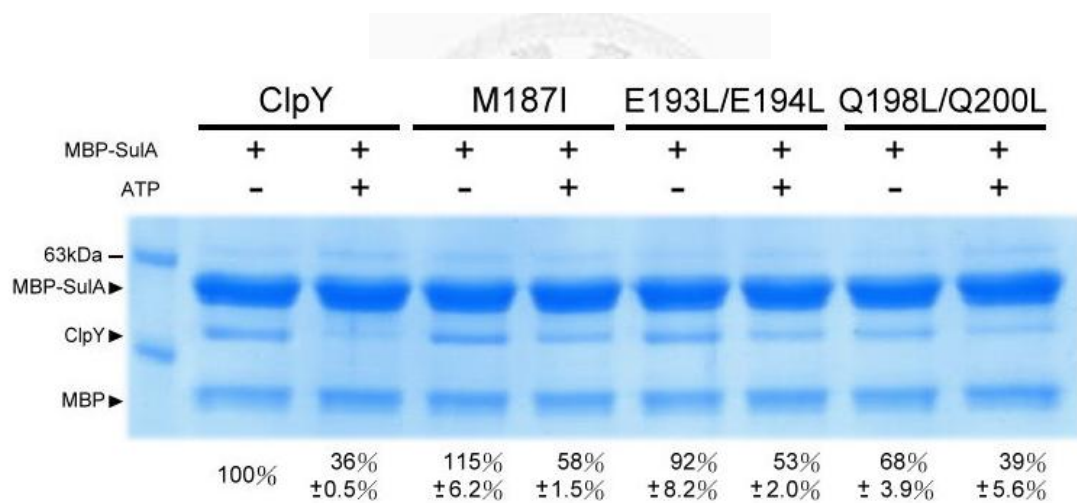
Fig 15. *In vitro* pulldown experiments analyze the recognition between ClpY $\Delta$ L2 and MBP-SulA with or without ATP.



圖十六、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析 ClpY ΔD-loop 缺失突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合。

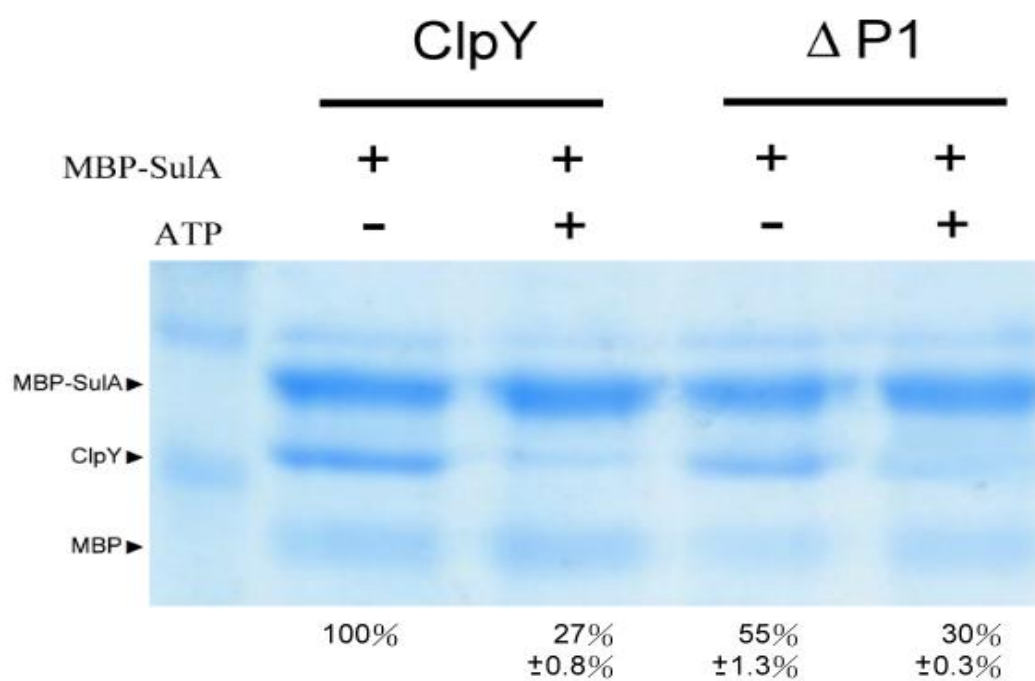
Fig 16. *In vitro* pulldown experiments analyze the recognition between ClpY ΔD-loop and MBP-SulA with or without ATP.





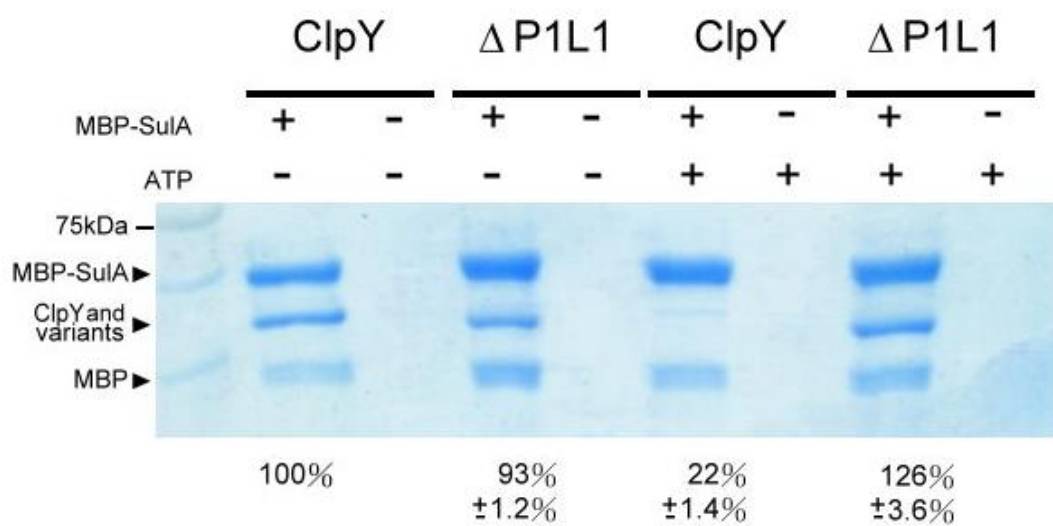
圖十七、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析 I domain loop2 點突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合。

Fig 17. *In vitro* pulldown experiments analyze the ClpY recognition between I domain loop2 point mutants and MBP-SulA with or without ATP.



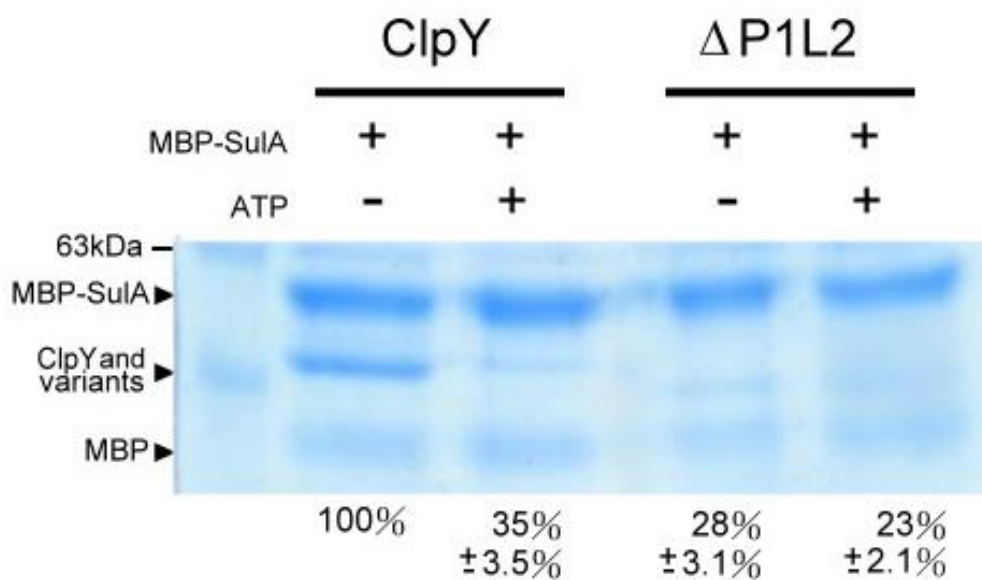
圖十八、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析 pore I 缺失突變蛋白  $\Delta P1$  與 MBP-SulA 辨識結合。

Fig 18. *In vitro* pulldown experiments analyze the ClpY recognition between pore I deletion mutant  $\Delta P1$  and MBP-SulA with or without ATP.



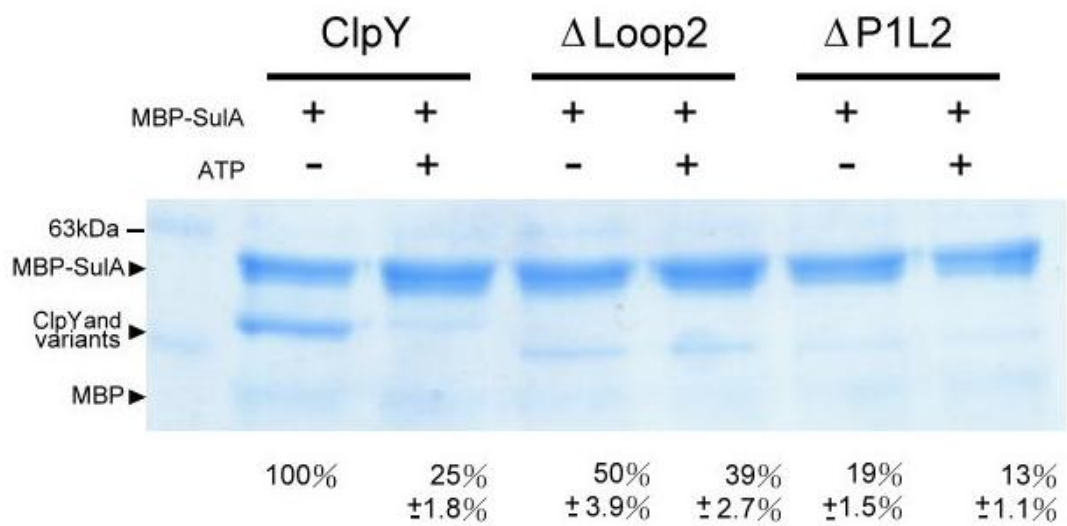
圖十九、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析雙缺失突變蛋白  $\Delta P1L1$  與 MBP-SulA 辨識結合。

Fig 19. *In vitro* pulldown experiments analyze the ClpY recognition between double deletion mutant  $\Delta P1L1$  and MBP-SulA with or without ATP.



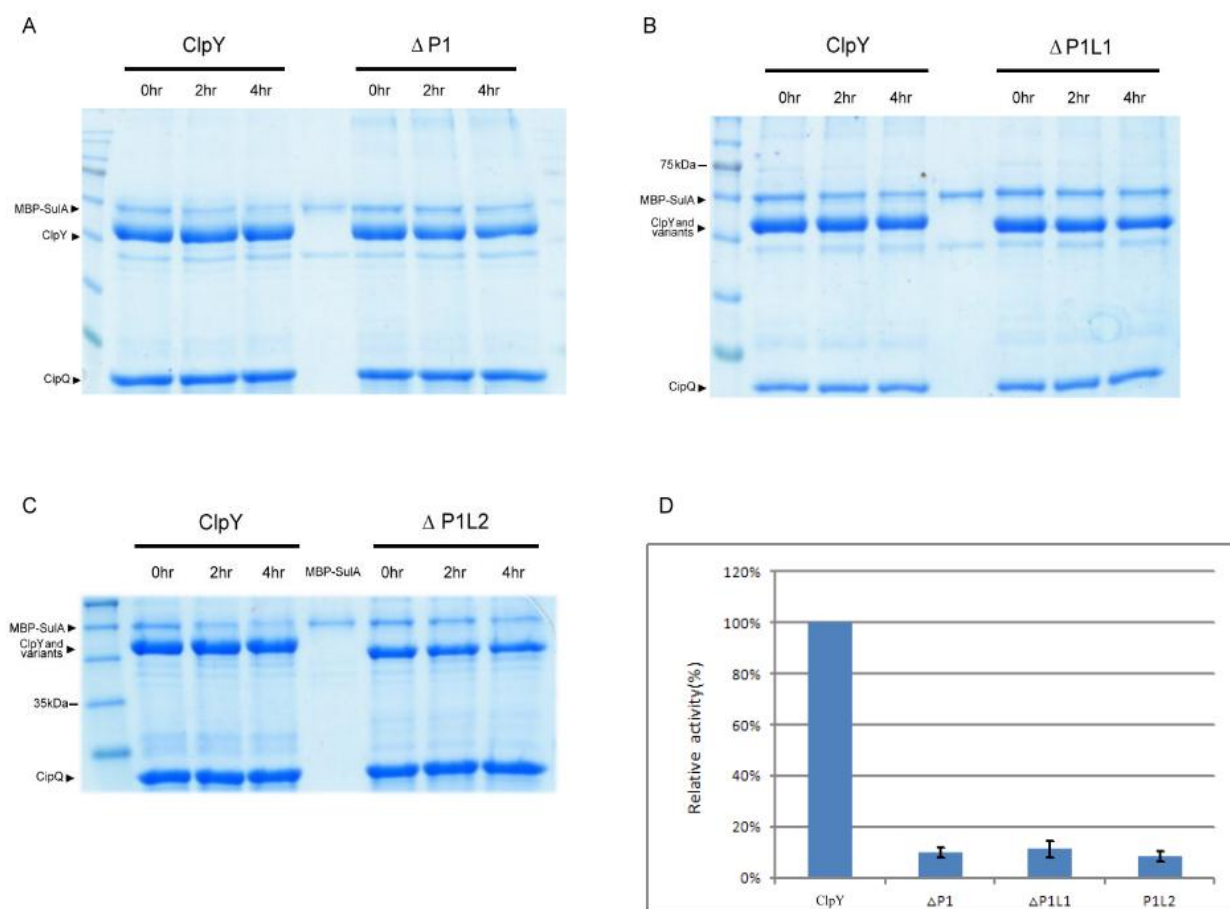
圖二十、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析雙缺失突變蛋白  $\Delta P1L2$  與 MBP-SulA 辨識結合。

Fig 20. *In vitro* pulldown experiments analyze the ClpY recognition between double deletion mutant  $\Delta P1L2$  and MBP-SulA with or without ATP.



- 圖二十一、ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白與雙缺失突變蛋白 ClpY $\Delta$ P1L2 *in vitro* pulldown 之結果。

Fig 21. *In vitro* pulldown experiments of loop2 deletion mutant ClpY $\Delta$ L2 and double deletion mutant ClpY  $\Delta$ P1L2.



圖二十二、ClpY pore I 缺失突變蛋白及 pore I/I domain 雙缺失突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

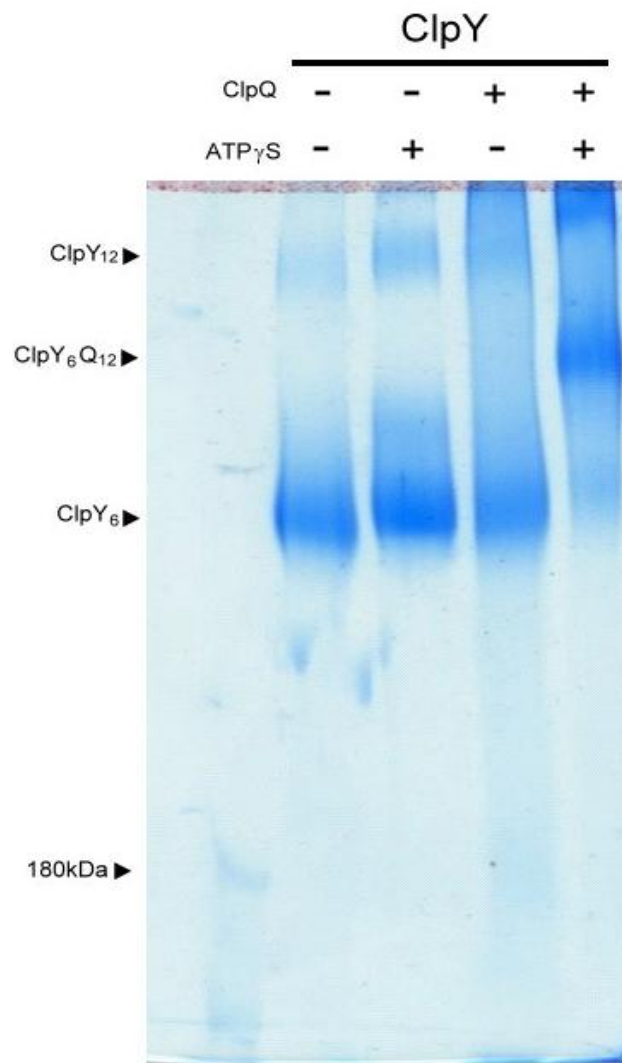
(A) ClpY $\Delta P1$  缺失突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

(B) ClpY $\Delta P1L1$  雙缺失突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

(C) ClpY $\Delta P1L2$  雙缺失突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

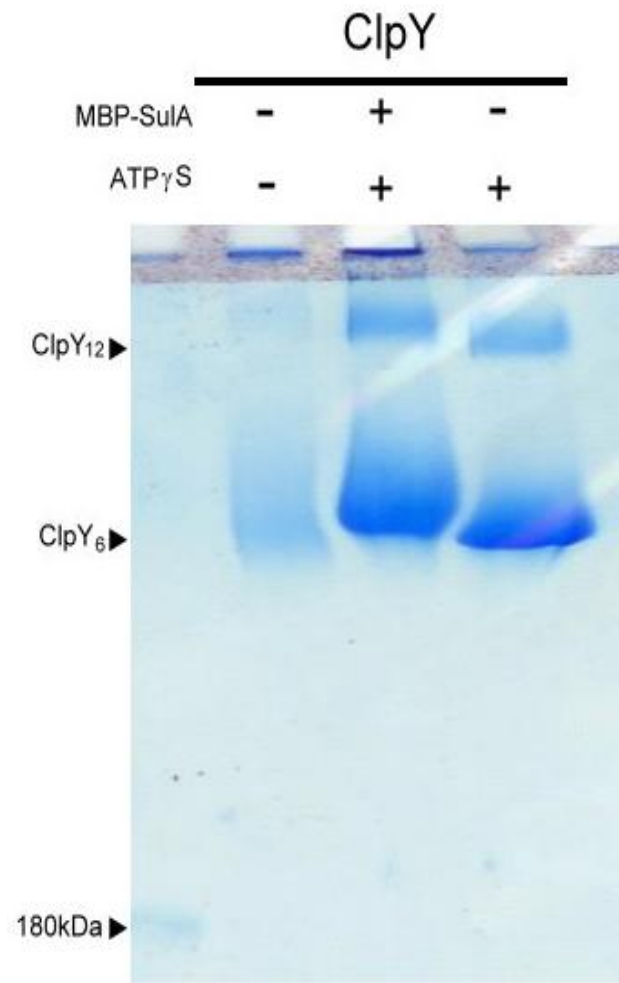
(D) ClpY pore I 缺失突變蛋白及 pore I/I domain 雙缺失突變蛋白對 MBP-SulA 降解的相對活性。

Fig 22. *In vitro* degradation of MBP-SulA degraded by pore I and pore I/I domain double deletion mutants. (A) MBP-SulA degraded by ClpY $\Delta P1$  (B) MBP-SulA degraded by ClpY $\Delta P1L1$  (C) MBP-SulA degraded by ClpY  $\Delta P1L2$  (D) The relative activities of ClpY pore I deletion mutants and pore I/I domain double deletion mutants degraded MBP-SulA .



圖二十三、以蛋白質聯結試驗觀察 ClpY 自身聚合及 ClpY 與 ClpQ 的聚合。

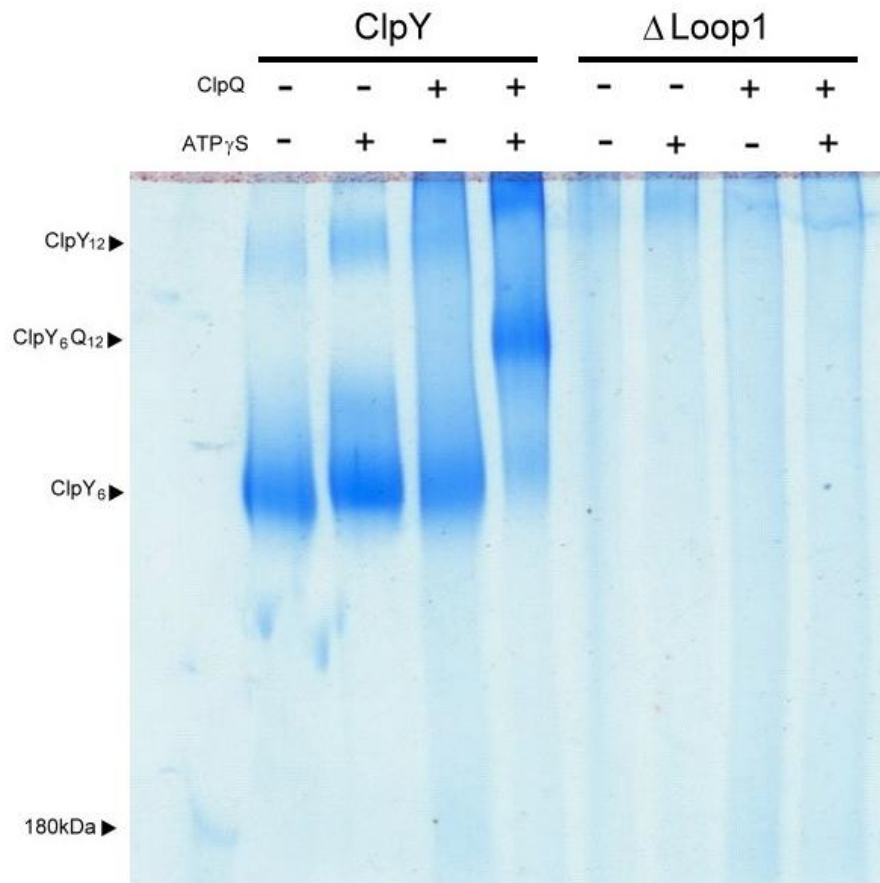
Fig 23. Cross-linking analysis of ClpY and ClpYQ.



圖二十四、以蛋白質聯結試驗觀察 ClpY 與 MBP-SulA 的結合

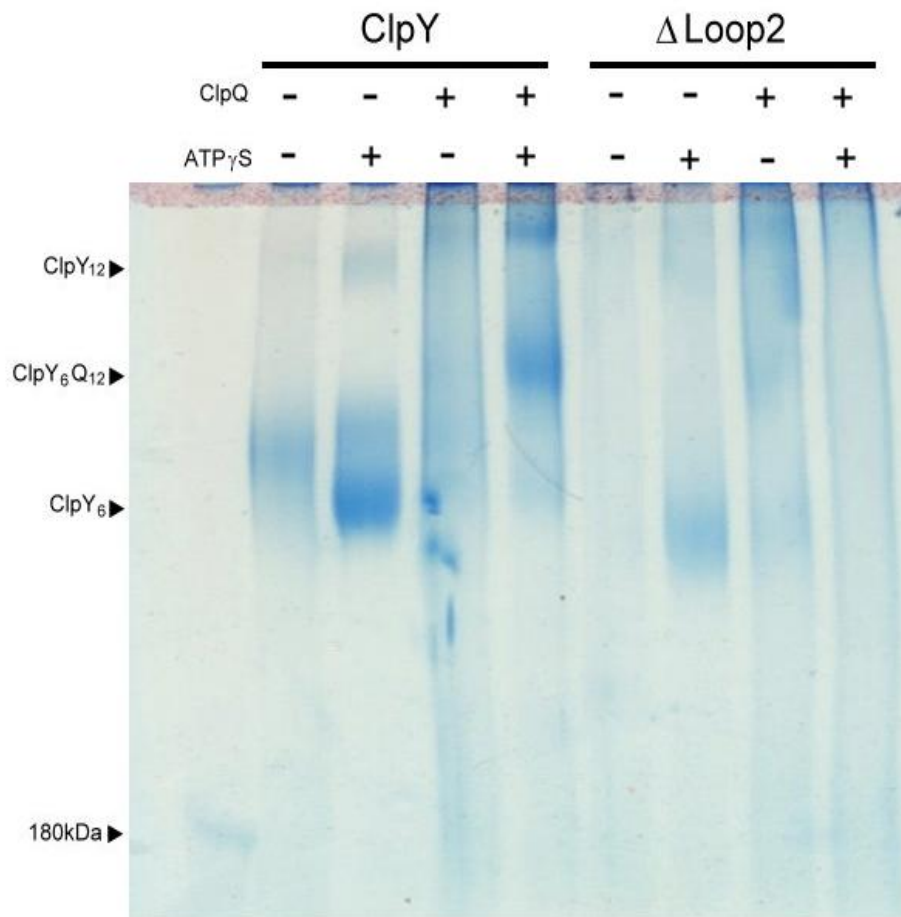
Fig 24. Cross-linking analysis of ClpY and MBP-SulA





圖二十五、以蛋白質聯結試驗觀察 ClpY $\Delta$ L1 缺失突變蛋白自身聚合及 ClpY $\Delta$ L1 缺失突變蛋白與 ClpQ 的聚合

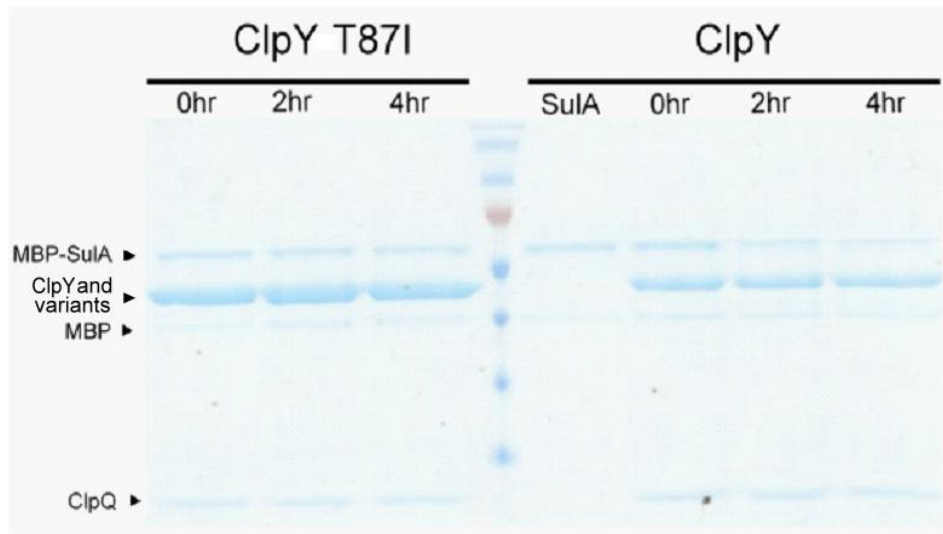
Fig 25. Cross-linking analysis of ClpY $\Delta$ L1 and ClpY $\Delta$ L1-Q



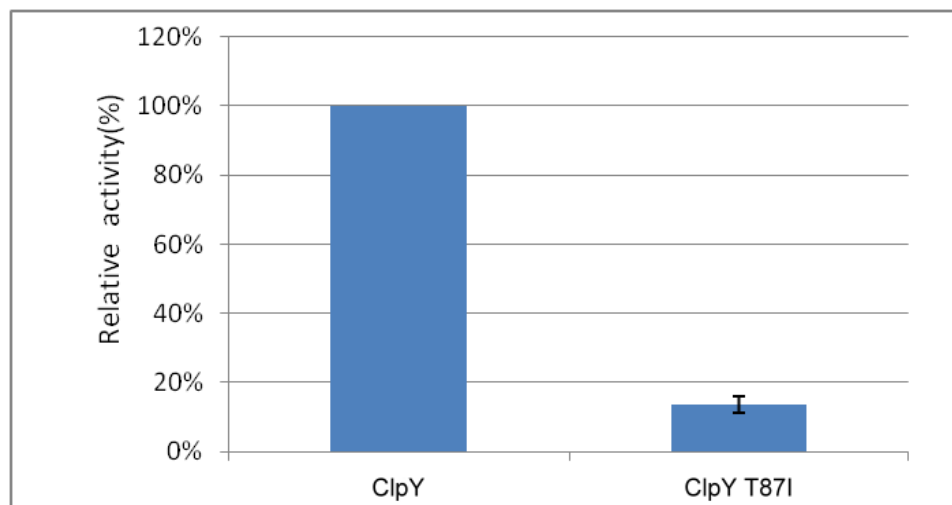
圖二十六、以蛋白質聯結試驗觀察 ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白自身聚合及 ClpY $\Delta$ L2 缺失突變蛋白與 ClpQ 的聚合

Fig 26. Cross-linking analysis of ClpY $\Delta$ L2 and ClpY $\Delta$ L2-Q

A



B

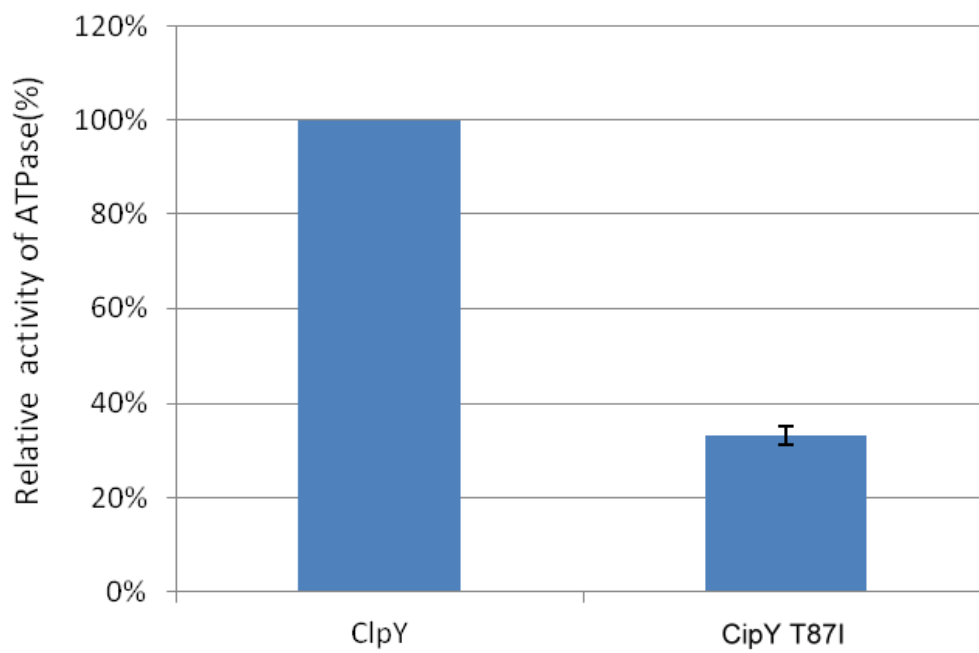


圖二十七、ClpY T87I ATPase 突變蛋白對 MBP-SulA 的降解試驗

(A) ClpY T87I ATPase 突變蛋白對 MBP-SulA 的降解

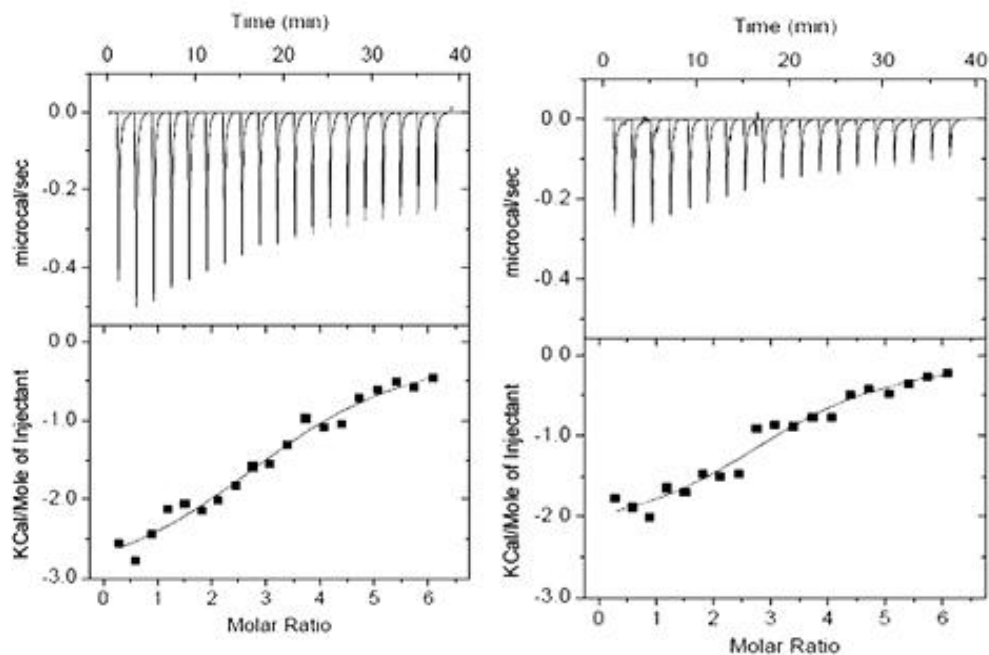
(B) ClpY T87I ATPase 突變蛋白對 MBP-SulA 的相對活性

Fig 27. *In vitro* degradation of MBP-SulA degraded by ClpY T87I ATPase mutant.(A) MBP-SulA degraded by ClpY T87I ATPase mutant and (B) The relative activities of ClpY T87I ATPase mutant degraded MBP-SulA.



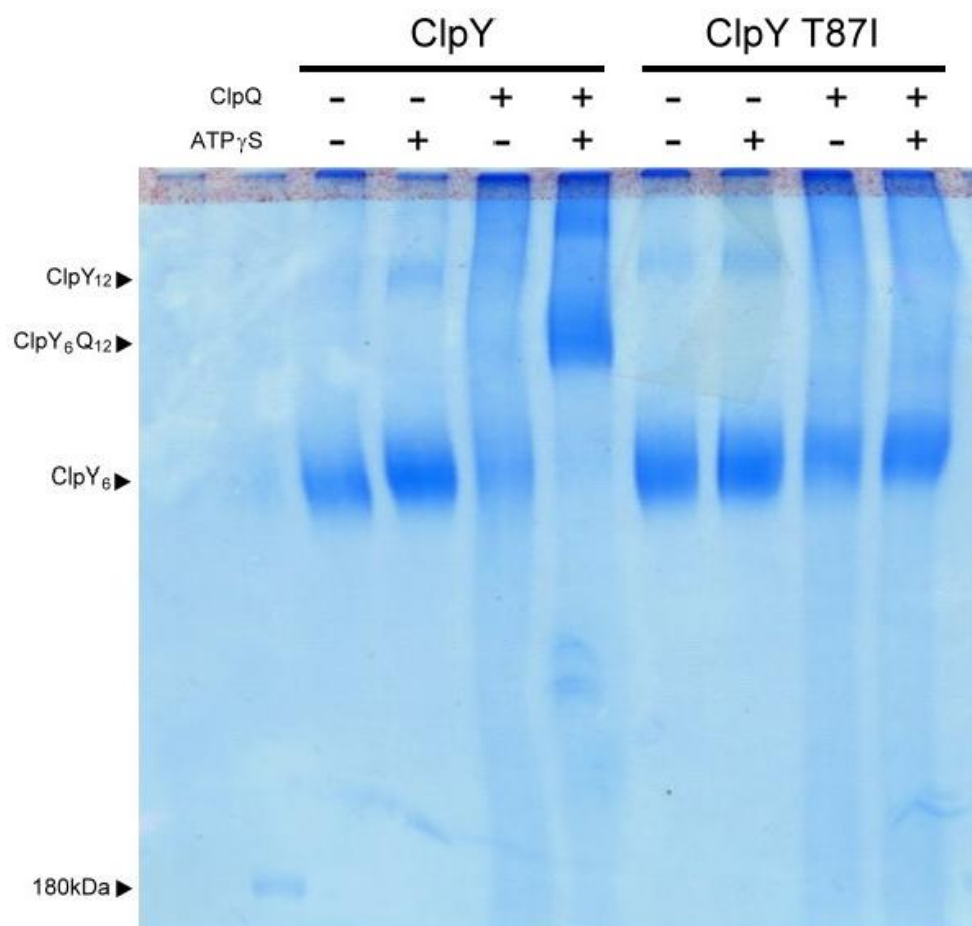
圖二十八、ClpY T87I ATPase 突變蛋白 ATPase 的相對活性

Fig 28. Relative ATPase activity of ClpY T87I ATPase mutant



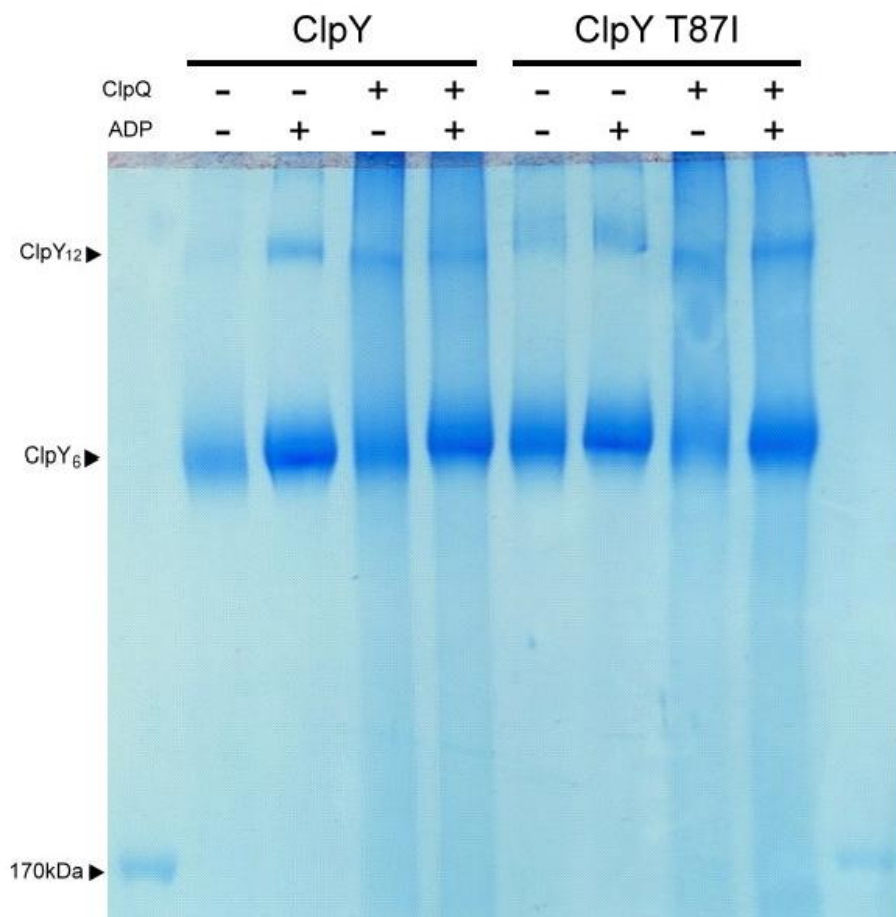
圖二十九、以等溫滴定微量熱法(Isothermal Titration Calorimetry, ITC) 進行 ClpY、ClpYT87I 與 ATP $\gamma$ S 結合測定。ATP- $\gamma$ S 與 ClpY 結合比例( $N$ ) =  $3.5 \pm 0.1$ , 反應熱( $\Delta H$ ) =  $-3.2 \pm 0.2$  kcal/mol, and 自由能( $\Delta G$ ) =  $-8.2$  kcal/mol(圖左) ; ATP- $\gamma$ S 與 ClpYT87I 結合比例( $N$ ) =  $3.2 \pm 0.2$ , 反應熱( $\Delta H$ ) =  $-2.3 \pm 0.2$  kcal/mol, and 自由能( $\Delta G$ ) =  $-8.7$  kcal/mol (圖右)

Fig 29. Isothermal Titration Calorimetry of ClpY and ClpYT87I titrated by ATP $\gamma$ S ; The binding of ATP- $\gamma$ S to the ClpY or ClpY(T87I) in buffer was exothermic. For ClpY(left), the binding ratio (ATP- $\gamma$ S to ClpY) ( $N$ ) =  $3.5 \pm 0.1$ ,  $\Delta H = -3.2 \pm 0.2$  kcal/mol, and  $\Delta G = -8.2$  kcal/mol (left); for ClpY T87I (right),  $N = 3.2 \pm 0.2$ ,  $\Delta H = -2.3 \pm 0.2$  kcal/mol, and  $\Delta G = -8.7$  kcal/mol (right).



圖三十、以蛋白質聯結試驗觀察 ClpY T87I ATPase 突變蛋白自身聚合及 ClpY T87I ATPase 突變蛋白與 ClpQ 的聚合。

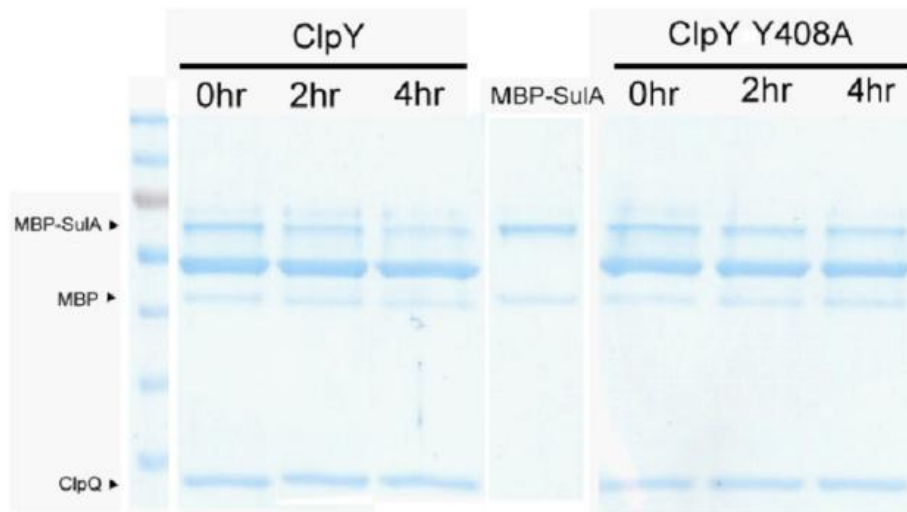
Fig 30. Cross-linking analysis of ClpY T87I ATPase mutant and ClpY T87I-Q.



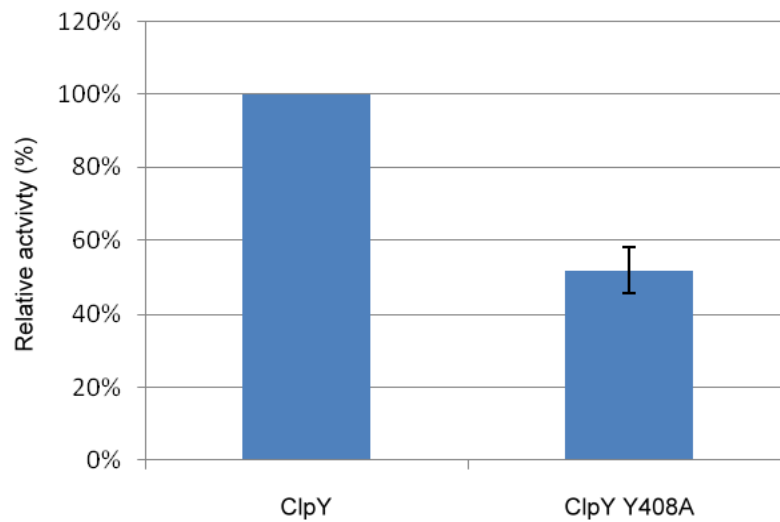
圖三十一、ADP 存在下以蛋白質聯結試驗觀察 ClpY T87I ATPase 突變蛋白自身聚合及 ClpY T87I ATPase 突變蛋白與 ClpQ 的聚合。

Fig 31. Cross-linking analysis of ClpY T87I ATPase mutant and ClpY T87I-Q with ADP.

A



B



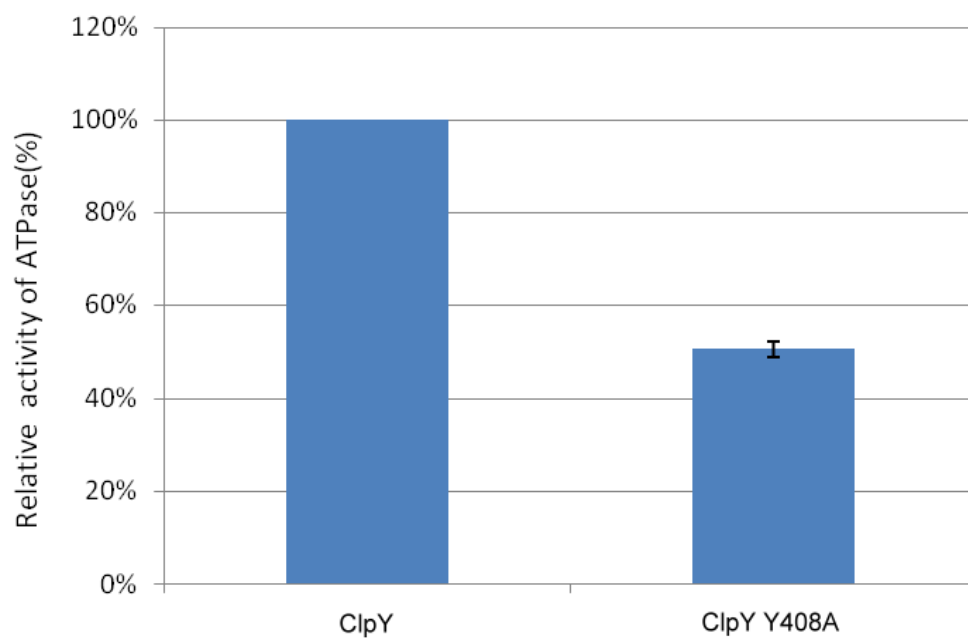
圖三十二、ClpY Y408A 突變蛋白對 MBP-SulA 之降解。

(A) ClpY Y408A 突變蛋白對 MBP-SulA 的降解。

(B) ClpY Y408A 突變蛋白對 MBP-SulA 的相對活性。

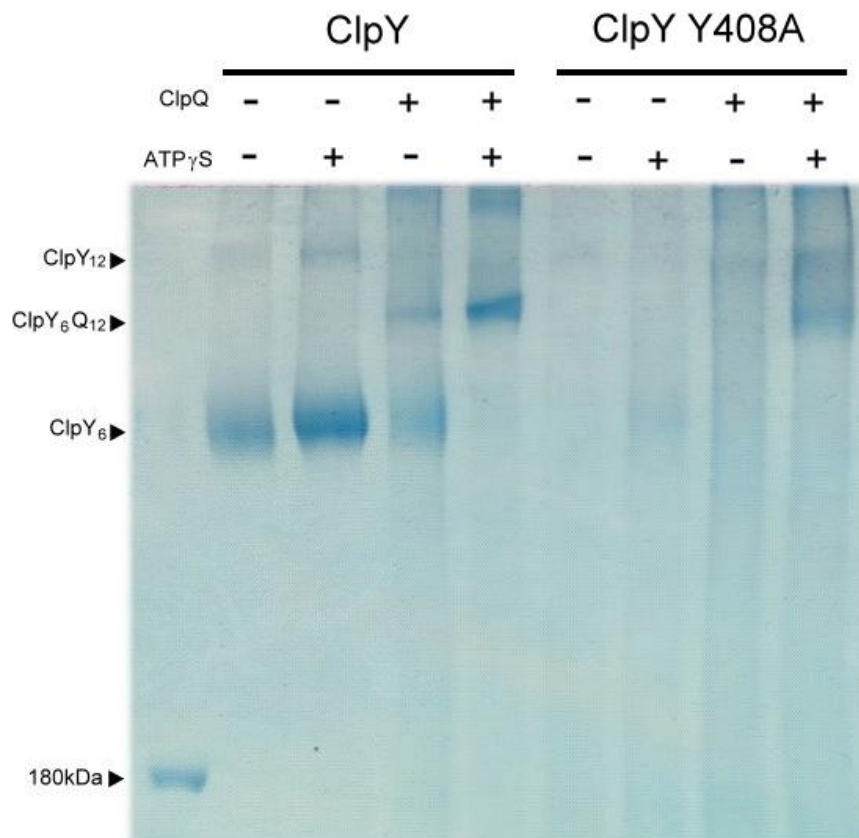
Fig 32. *In vitro* degradation of MBP-SulA degraded by ClpY Y408A mutant. (A) MBP-SulA degraded by ClpY Y408A and (B) The relative activities of ClpY Y408A degraded MBP-SulA.





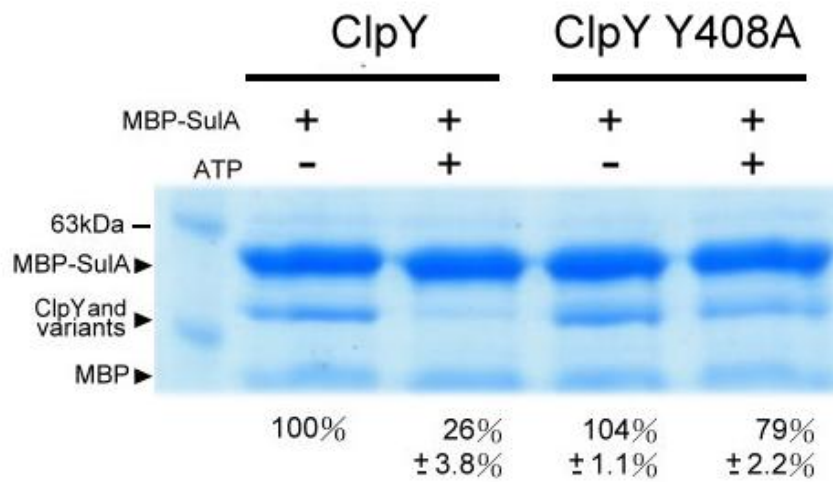
圖三十三、ClpY Y408A 突變蛋白 ATPase 的相對活性。

Fig 33. Relative ATPase activity of ClpY Y408A mutant.



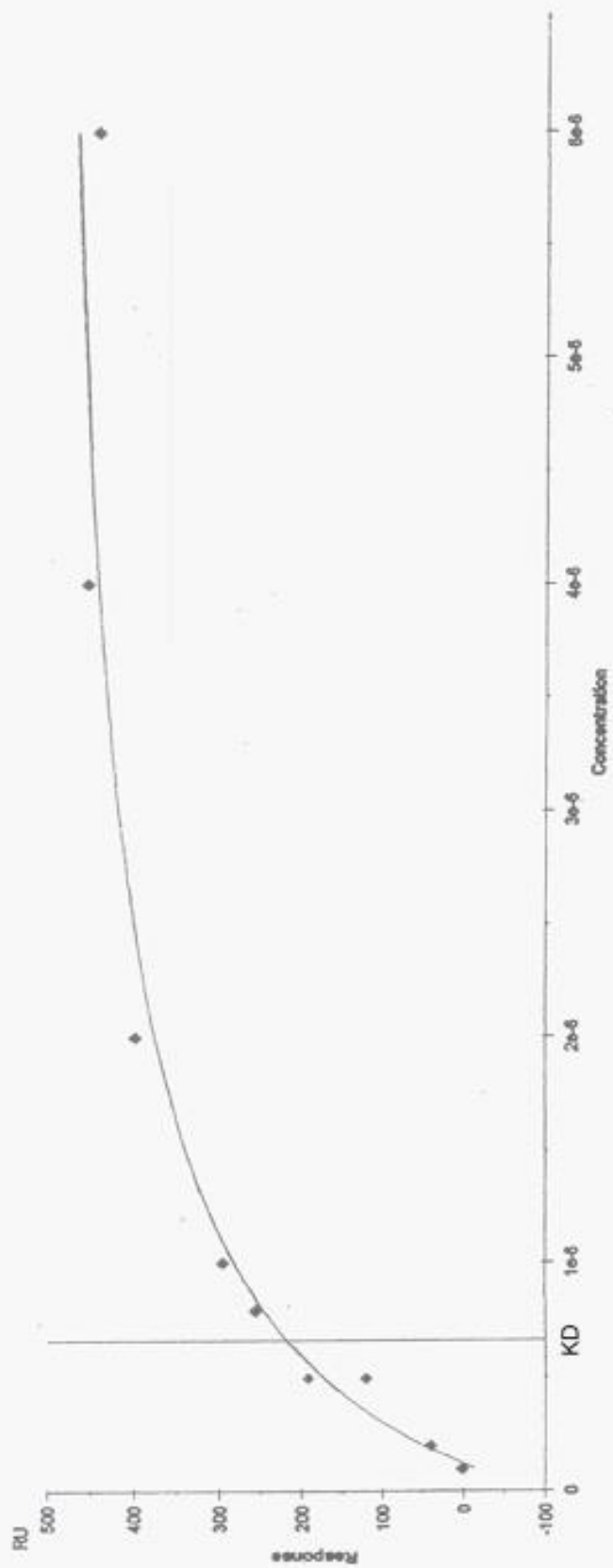
圖三十四、以蛋白質聯結試驗觀察 ClpY Y408A 突變蛋白自身聚合及 ClpY Y408A 突變蛋白與 ClpQ 的聚合。

Fig 34. Cross-linking analysis of ClpY Y408A mutant and ClpY Y408A -Q.



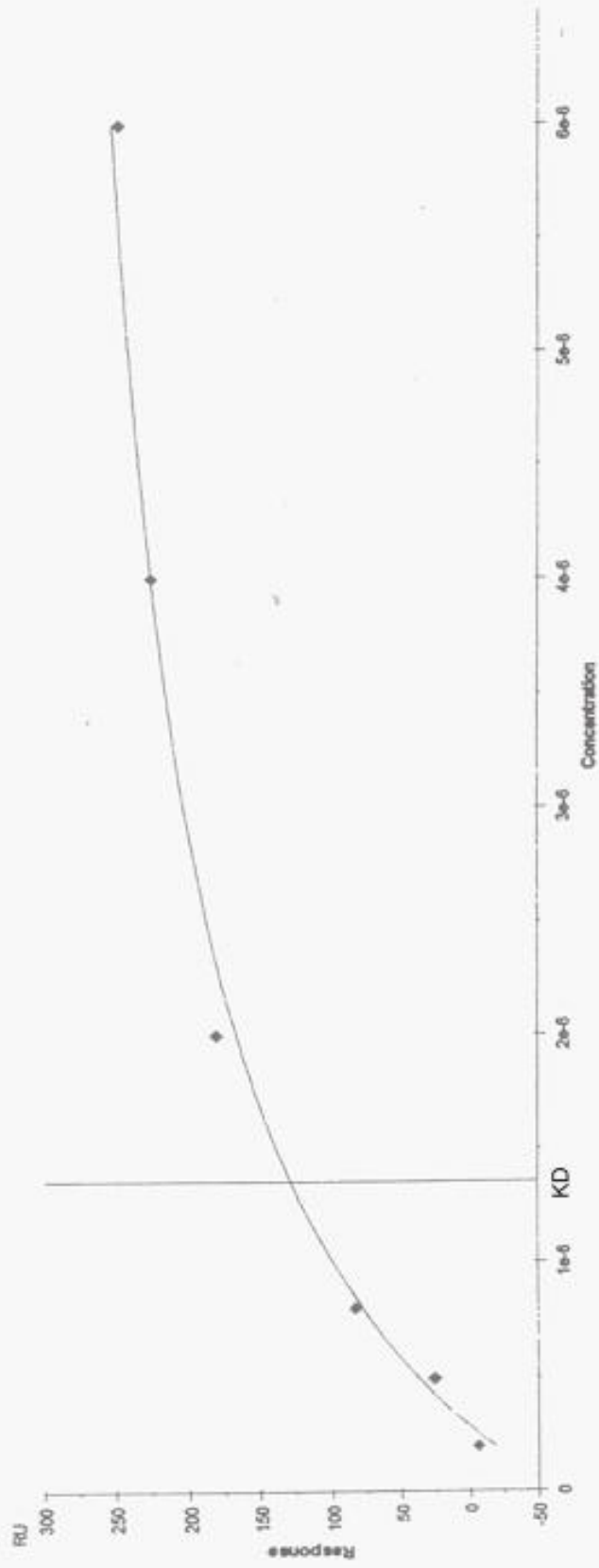
圖三十五、在有或無 ATP 下以 *in vitro* pulldown 分析 ClpY Y408A 突變蛋白與 MBP-SulA 辨識結合。

Fig 35. *In vitro* pulldown experiments analyze the recognition between ClpY Y408A and MBP-SulA with or without ATP.



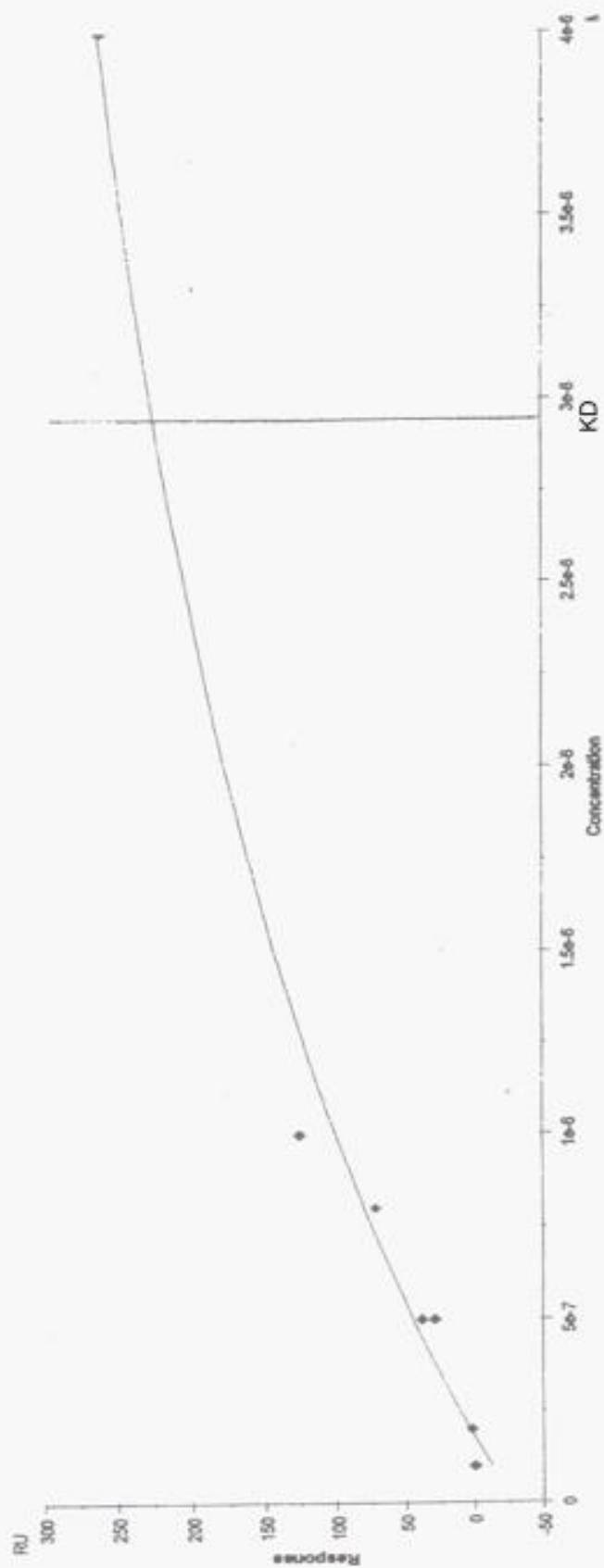
圖三十六、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY 之間的親和力

Fig36. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpY



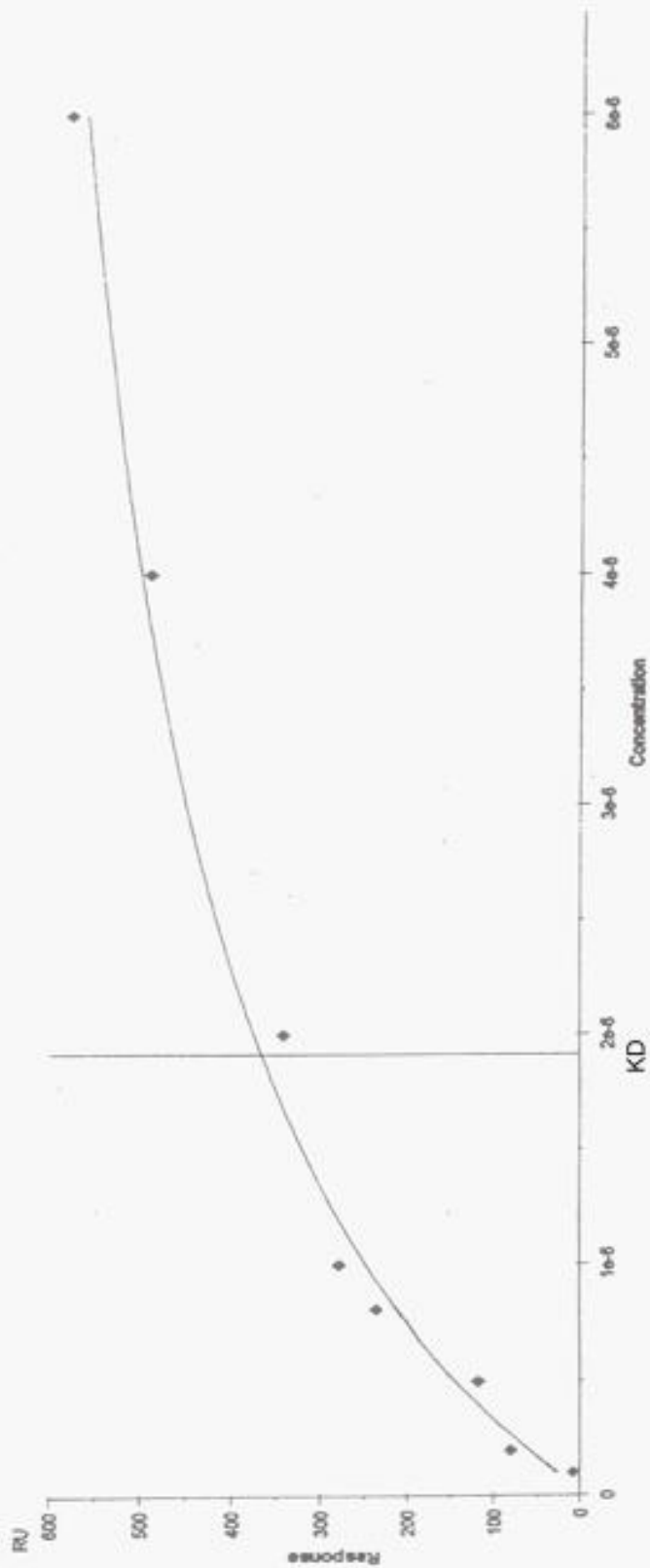
圖三十七、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ P1 之間的親和力

Fig37. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpY  $\Delta$ P1



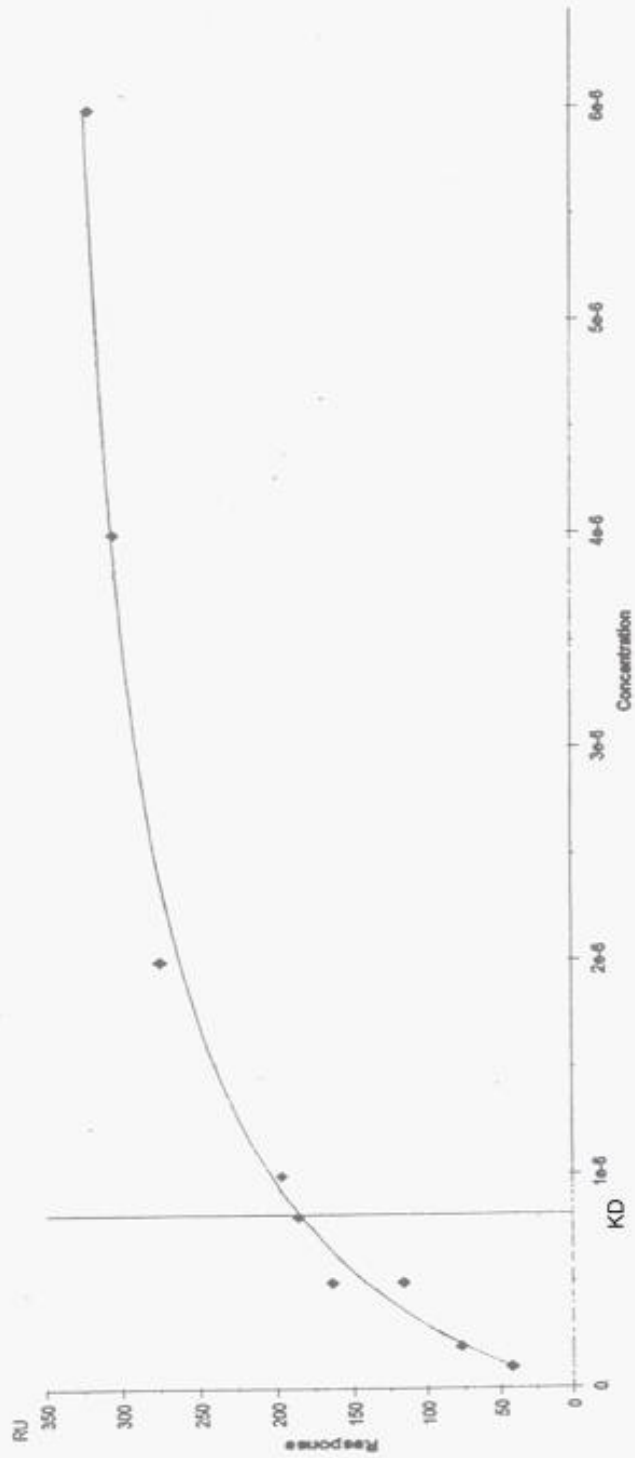
圖三十八、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpYΔPIL1 之間的親和力

Fig38. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpYΔPIL1



圖三十九、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpYΔPIL2 之間的親和力

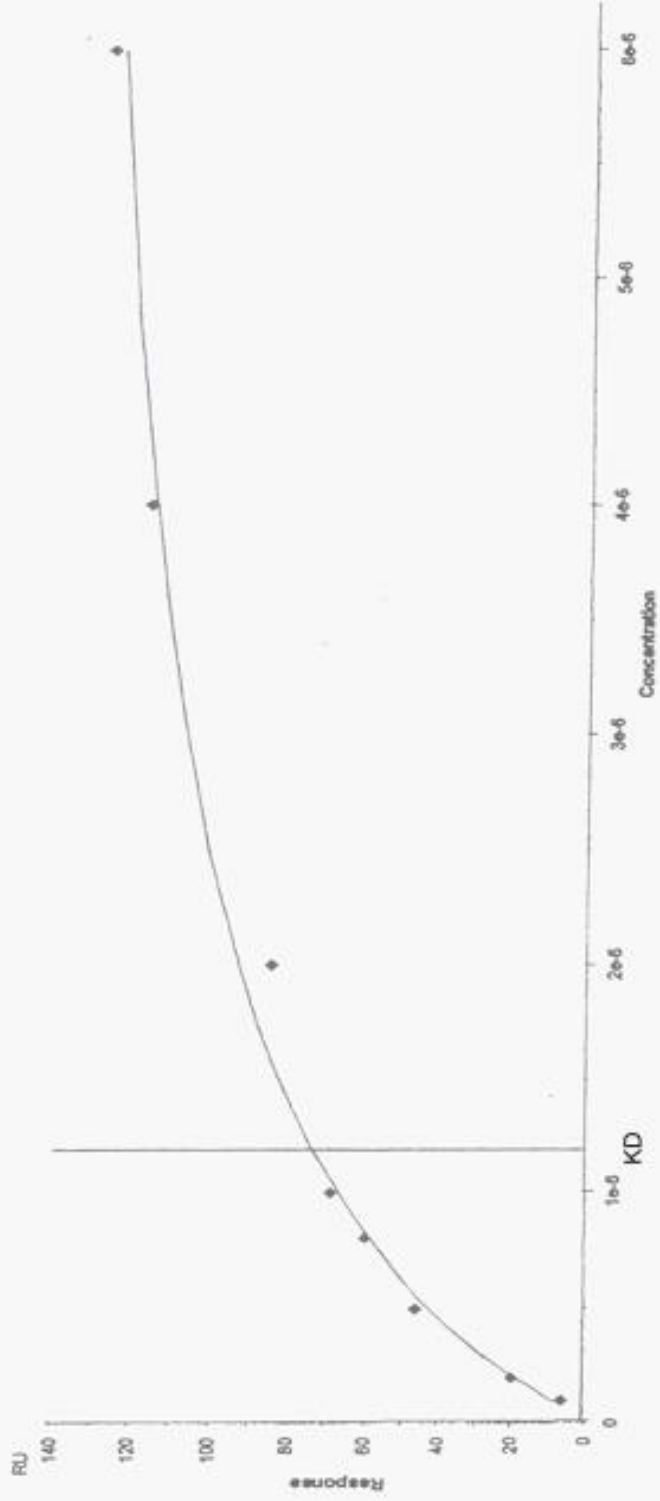
Fig39. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpYΔPIL2



圖四十、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY 之間的親和力

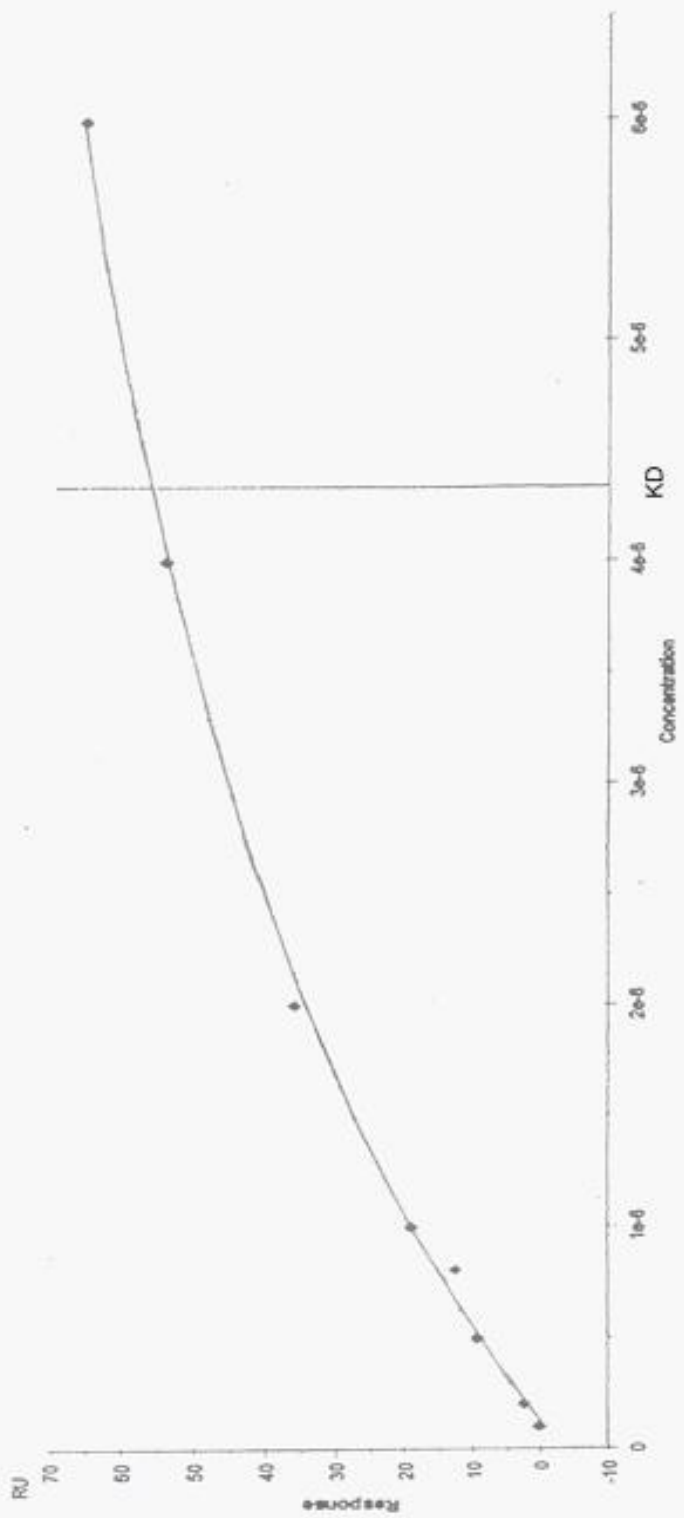
Fig40. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpY with ATP





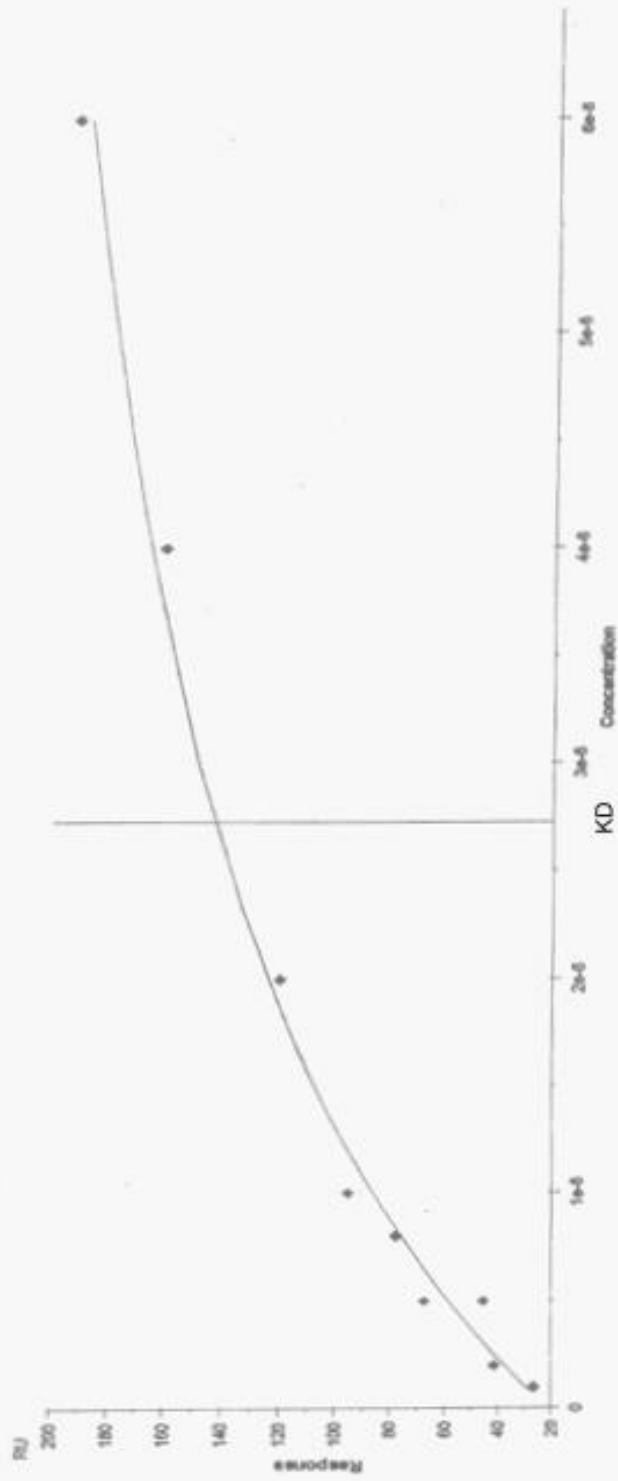
圖四十一、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpY $\Delta$ PI 之間的親和力

Fig41. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpY  $\Delta$ PI with ATP



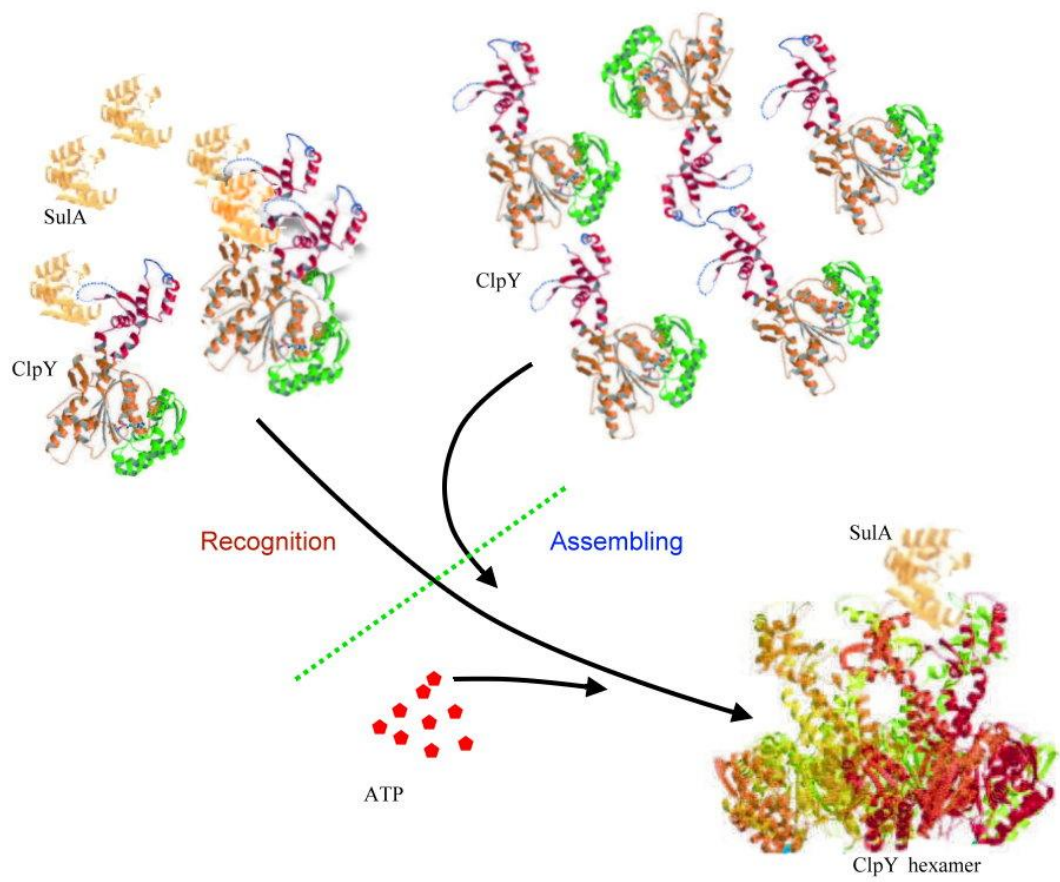
圖四十二、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpYΔPIL1 之間的親和力

Fig38. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpYΔPIL1 with ATP



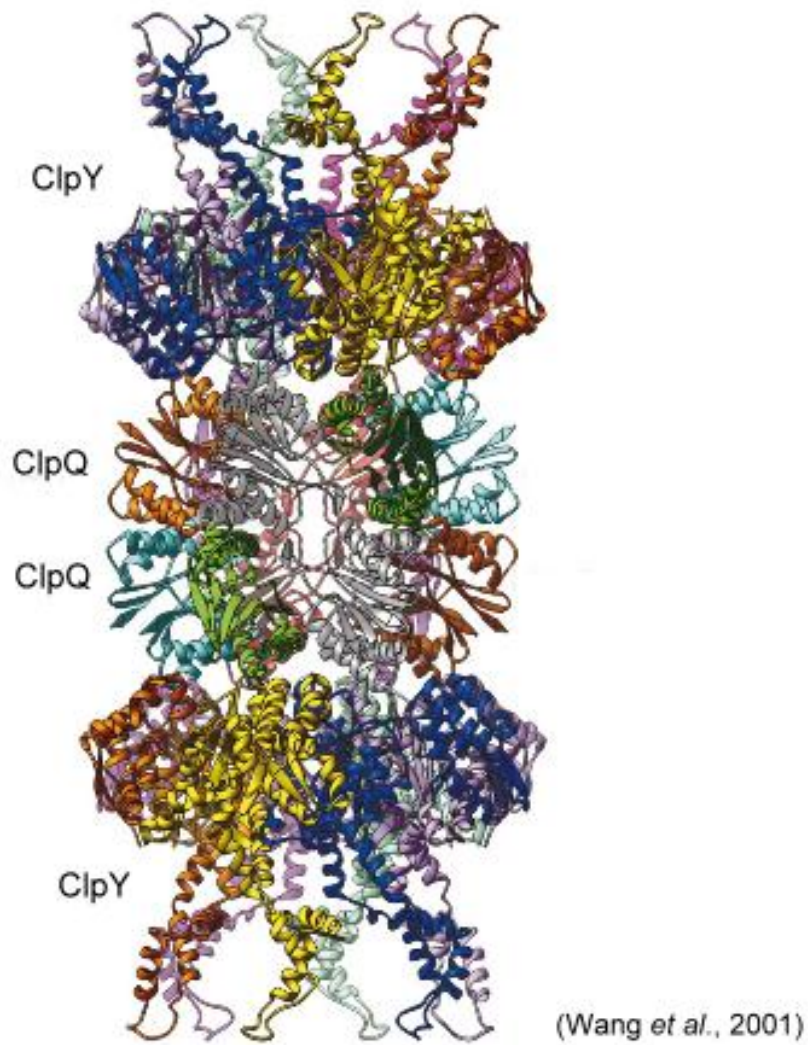
圖四十三、以表面電漿共振生物分子感測法(Surface plasmon resonance assays)在 ATP 存在下進行即時偵測 MBP-SulA 與 ClpYΔPIL2 之間的親和力

Fig43. Surface plasmon resonance assays of affinity between MBP-SulA and ClpYΔPIL2 with ATP



圖四十四、ClpY 與 MBP-SulA 辨識結合流程。

Fig44. The recognition process of ClpY for its targeting MBP-SulA.

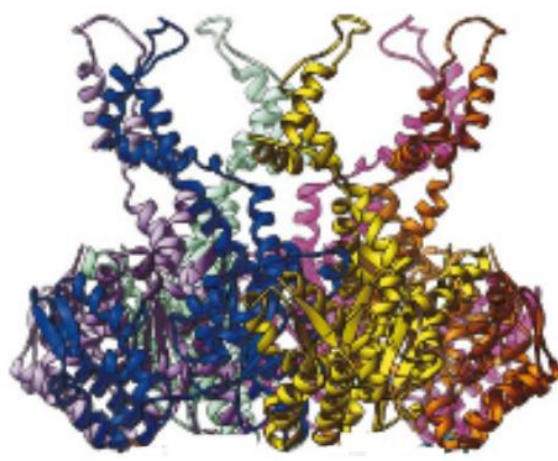


附圖一、大腸桿菌 ClpYQ 結構圖。

ClpYQ 的聚合是由 ClpY 六元環的 C domain 與二個 ClpQ 六元環形成的十二元體相接，ClpY 可以由 ClpQ 十二元體上方或下方與之相接而形成  $Y_6Q_6Q_6Y_6$  環狀結構所形成的啞鈴狀聚合體。

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

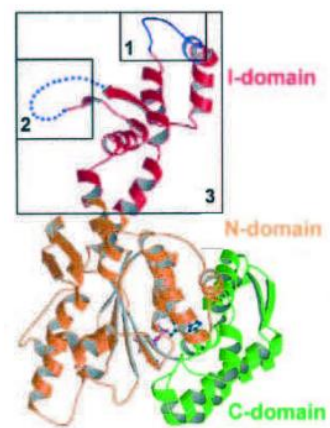
A



ClpY hexamer

(Wang et al.,2001)

B



ClpY

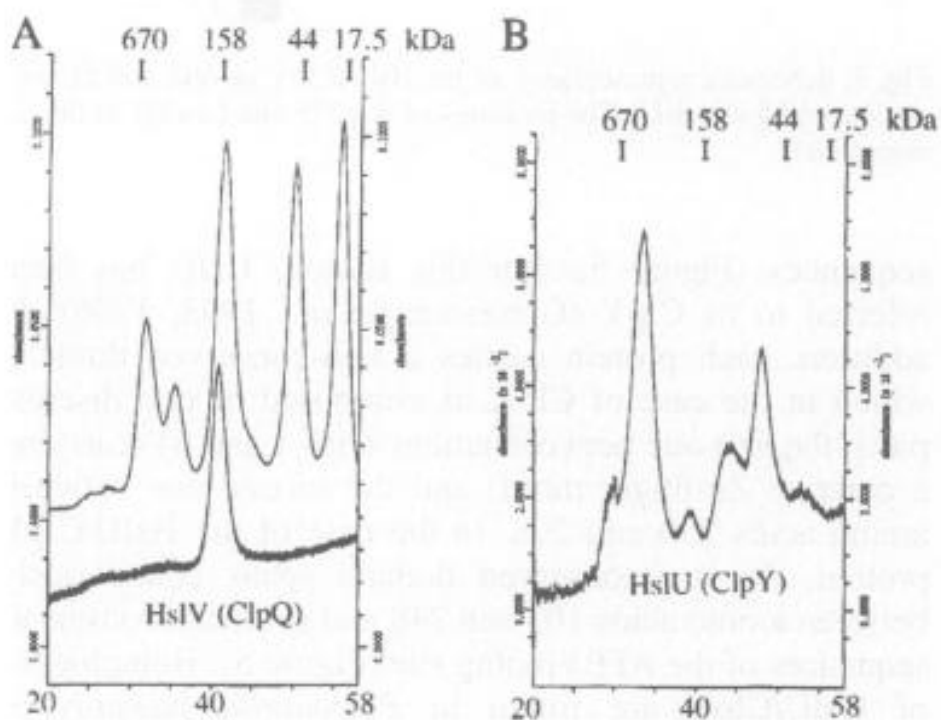
(Song et al.,2000)

附圖二、大腸桿菌 ClpY 六元環與單元體結構圖。

(A) ClpY 六元環是由六個單元體所組成之環狀構造。

(B) ClpY 單元體是由三個區域所組成，分別為 C-、N-及 I domain，其中 I domain 突出於 C 與 N domain 之外，包含了二個環狀結構。

Appendix figure 2. The structure of ClpY hexamer and monomer from *E. coli* ClpYQ protease.



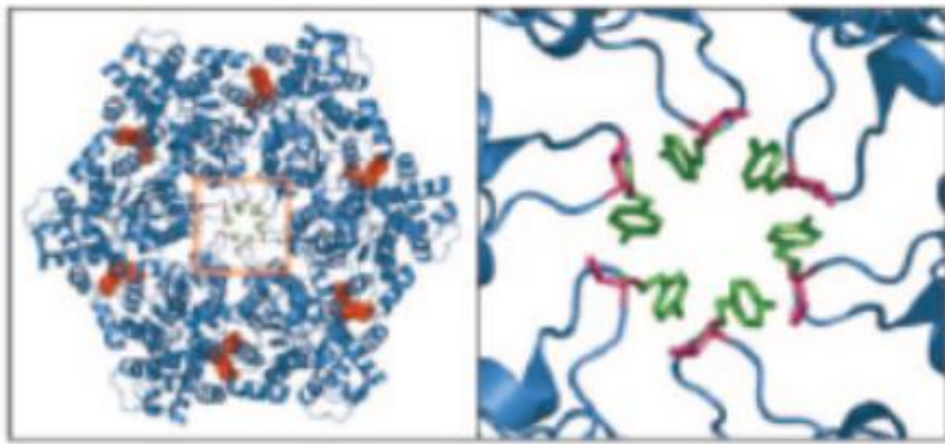
(Missiakas *et al.*, 1996)

附圖三、大腸桿菌 ClpY 與 ClpQ 在無 ATP 下以凝膠過濾法(gel filtration)純化，其分子大小之分布。

(A) ClpQ 的聚合蛋白分子量約為 220 kDa。

(B) ClpY 的聚合蛋白分子量則分布於 100kDa 至 450 kDa 之間。

Appendix figure 3. Purification of ClpY and ClpQ protein by gel filtration.



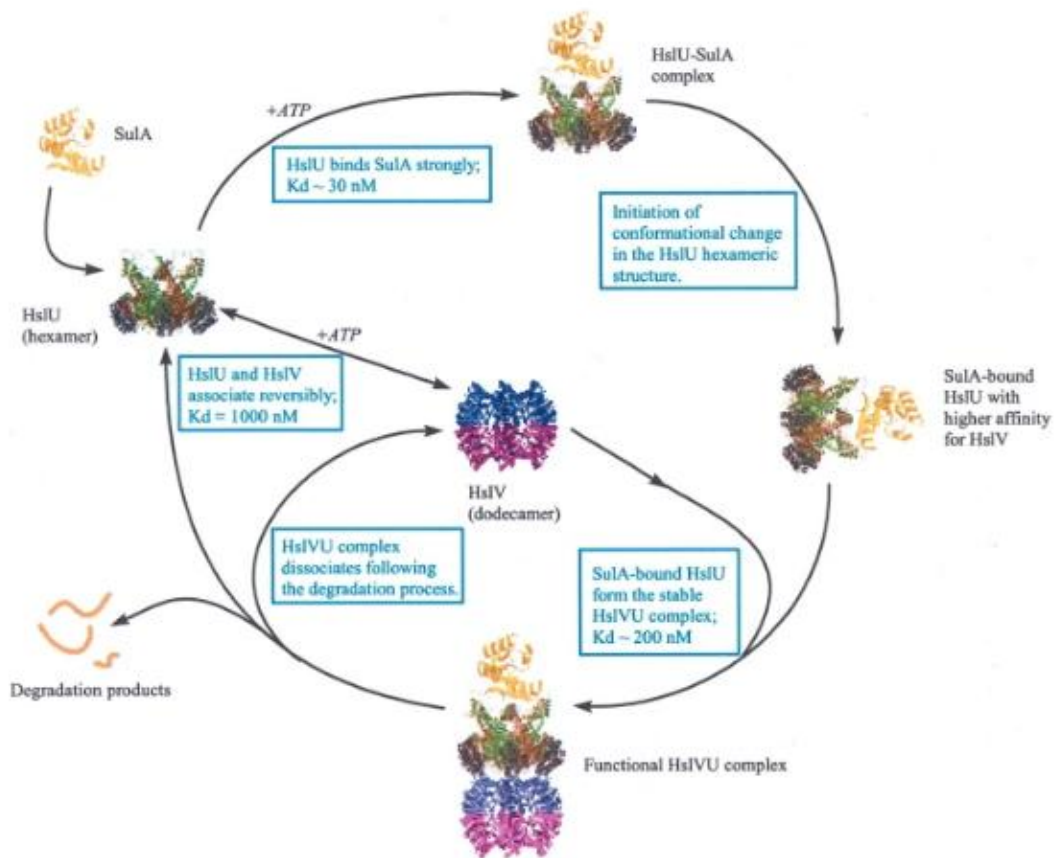
(Park *et al.*, 2005)

附圖四、大腸桿菌 ClpY pore I site 之結構。

Pore I site GYVG 保守序列位於 ClpY 六元環中央(左);GYVG 保守序列放大圖(右)，綠色與粉紅色分別代表胺基酸 Y91 位置與 V92 位置。

Appendix figure 4. The structure of ClpY pore I site from *E. coli*.





(Azim *et al.*, 2005)

附圖五、基質促進 ClpYQ 聚合與降解流程。

Appendix figure 5. Schematic illustration of “substrate-induced” HslVU assemblage.