

國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



La 蛋白酶 N 端功能區對於受質辨識所扮演的角色

Unraveling the roles of the N domain of protease La in

substrate recognition

曾音筑

Yin-Chu Tseng

指導教授：曾秀如 博士

Advisor: Shiou-Ru Tzeng, Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July 2018



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

La蛋白酶N端功能區對於受質辨識所扮演的角色

Unraveling the roles of the N domain of protease La in
substrate recognition

本論文係曾音筑君(R05442002)在國立臺灣大學生物化
學暨分子生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國 107 年
07 月 26 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

曾秀如

(簽名)

(指導教授)

3103813

徐曉萍

系主任、所長

林致玲

(簽名)

(是否須簽章依各院系所規定)

致謝



因入學面試需要報 paper 被嚇到驚魂未定彷彿昨日之事，一回神才發現原來兩年已經結束，時光飛逝，從原來對結構生物學完全一竅不通，看到就會馬上舉白旗投降的我，在不知不覺中也和他和平共處且逐漸了解其中的奧妙，這都要感謝曾秀如老師，老師是幽暗深谷中的一抹曙光，不管是實驗上遇到的困難，或是生活中的大小事，老師永遠都願意傾聽和我討論並且幫助我，甚至是和我一起完成，將困擾一一排除，使我可以完成各種原本以為做不到的事，除此之外，因為老師，我們實驗室才能充滿歡樂又和諧的氣氛，這些都讓從原本抱著隨時都可能休學心情的我足以蛻變及成長。

當然，除了指導教授以外也要感謝生化分生所所有老師的教導，不論是課堂中所傳授的知識，又或是 seminar 各種建議及問題，都提醒了我自己的不足，也特別感謝林敬哲老師及詹迺立老師在碩二上進度報告時提供的想法，讓我知道了自己遺漏的地方。在整個所中要感謝的也少不了所辦的助教們，常常都要麻煩助教許多事情，也因為有你們，很多事物才能完成。謝謝共研的小詹老師，在做 SPR 時時常麻煩老師，老師都很耐心的回答所有問題，並願意花時間和我討論實驗上的困難，盡力幫助我解決疑惑。感謝張崇毅老師及徐俊森老師願意擔任口試委員，並給予許多寶貴的建議以及討論。

初進實驗室時，最依賴的就是郭郭學姐及游甄甄學姐，當初若不是妳們耐心的一步一步帶我做實驗，今天我也無法順利完成所有實驗，感謝學姐們願意無私地分享實驗上以及生活中的經驗，才讓我可以解決各種事情，順利融入這個原本陌生的環境。謝謝信德負責實驗室大大小小的事情，常常麻煩學長做很多的瑣事，才讓我可以心無旁騖的專心進行實驗。小馬和羊羊是實驗室好夥伴，不論是實驗藥品的借取還是各種問題的討論都給予我許多的幫助，也非常慶幸你們都是好相處好脾氣的人，使我的碩士生涯充滿歡樂，大家一同完成許多事情，一同經歷許多快樂及困難的時刻。小美、紳紳和翔翔，自從你們進來後實驗室的氛圍變得更



加歡騰，使我以為原本枯燥的碩士生活充滿了各種不同的感受，也感謝你們在實驗中的幫忙，讓我可以同時完成多事情。謝謝大源，不論快樂生氣難過身旁永遠都有你的陪伴，一同分享生活中所有的大小事。

最後，最感謝的是我的家人，謝謝爸媽讓我衣食無虞，使我可以專注的完成碩士學位，也謝謝妹妹為我的生活帶來許多的歡樂，還有阿公、阿嬤、姑姑、叔叔以及表哥，感謝你們一路以來的支持以及鼓勵，都是我前進的動力。

在宇宙天地中渺小的自己，要感謝的人很多，無法一一表達，但真心感謝所有曾經給予我支持、鼓勵以及幫助的人，因為有你們我才能在這條路上不斷的前進。

音筑

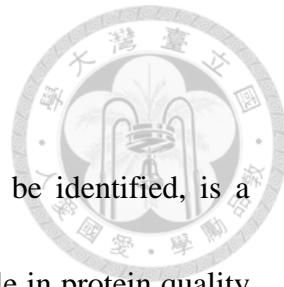
2018.08.03



中文摘要

Protease Ia 又稱為 Lon AAA+蛋白酶 (LonA) 是第一個被發現的 ATP 依賴型蛋白酶，屬於多功能性的蛋白，在進行生物功能時會由單一種單體聚合成多聚體，在古細菌、原核生物及真核生物的胞器中都具有 LonA。LonA 蛋白酶在生物體中主要藉由分解不正常或是損壞的蛋白進行蛋白質的品質管理，避免廢物在細胞中累積，除此之外，LonA 也參與多種生物功能的調控。先前在台灣本土嗜熱菌 *Meiothermus taiwanensis* LonA 蛋白酶 (MtaLonA) 的研究中發現，N 端功能區與因為溫度影響而造成結構部分展開的受質 (Ig2) 之降解相關，然而對於 LonA N 端功能區到底如何辨識受質並與受質結合詳細的機制仍不清楚，因此本研究想利用核磁共振實驗以結構生物學的角度探討 LonA N 端功能區與受質間的交互作用關係，藉此了解 N 端功能區所扮演的角色。在全長的 MtaLonA 異核核磁共振實驗中，我們得到一個有約兩百個清楚交叉峰的光譜，而這些訊號大致上與 MtaLonA N 端截短區塊 (NN206) 的交叉峰重疊，顯示 MtaLonA 的 N 端功能區以一個較為動態的接鏈和 ATPase 功能區及蛋白酶功能區連接，使得 N 端功能區能夠獨立的在環境中擺動，因此我們也得以利用核磁共振實驗觀察 N 端功能區的化學位移擾動，除此之外，利用多維異核核磁共振實驗，我們完成了 NN206 約 95% 的骨架循序判定。將受質加入 NN206 中並加熱使受質結構逐漸展開後，從核磁共振光譜中可以觀察到 NN206 的化學位移發生劇烈的改變，而根據 NN206 的結構及循序判定的結果也發現受到影響的殘基主要位於 N 端子功能區，我們也進一步對 NN206 進行點突變，並且發現 NN206 N 端子功能區暴露於外界環境中的疏水性殘基對於與未折疊的受質結合是必須的。綜合上述結果，本篇實驗發現 MtaLonA 藉由 N 端功能區中 N 端子功能區的疏水性殘基辨識未折疊或聚集的蛋白。

關鍵字：*Meiothermus taiwanensis*、Lon 蛋白酶、N 端功能區、Ig2、核磁共振



Abstract

Lon AAA+ protease (LonA), the first ATP-dependent protease to be identified, is a multi-functional, homo-oligomeric enzyme. LonA plays a crucial role in protein quality control and regulation of diverse biological processes in prokaryotes and eukaryotic organelles. Previous studies suggest that N-terminal domain (NTD) of *Meiothermus taiwanensis* LonA (MtaLonA) is required for a thermally unfolded tandem immunoglobulin substrate from *Dictyostelium discoideum* (Ig2) binding. However, the structural basis for the substrate recognition mediated by the NTD domain has not been characterized. Here we seek to understand how the NTD of LonA recognizes and traps protein substrates by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Heteronuclear NMR analyses show 200 well-resolved ^{15}N - ^1H correlations of full-length hexameric MtaLonA at an apparent molecular weight of 0.5 MDa. Importantly, most of these correlations are superimposable to those observed in the N-terminal truncated form (NN206) spectrum. The results reveal that the NTD is loosely linked to the hexameric core via a flexible linker rendering it possible for detailed chemical shift perturbation mapping of substrate binding in the context of full-length MtaLonA. We also apply multidimensional heteronuclear NMR experiments to assign 95% of the non-proline backbone ^1H and ^{15}N resonances of NN206. Moreover, the chemical shifts of NN206 are significantly perturbed by the addition of damaged substrate and structural mapping of



the chemical shift perturbations shows that the affected residues are mainly located in the N subdomain. We further show exposed hydrophobic residues are required for interaction with unfolding conformation by mutagenesis. Together, our findings demonstrate that MtaLonA recognizes unfolded or aggregated substrate via exposed hydrophobic residues located in the N subdomain of its NTD.

Key words: *Meiothermus taiwanensis*, LonA, N subdomain, Ig2, NMR



目錄

論文口試委員審定書	I
致謝	II
中文摘要	IV
Abstract	V
目錄	VII
圖目錄	X
表目錄	XI
縮寫表	XII
一、 前言	1
1. Lon AAA+蛋白酶 (Lon AAA+ protease, LonA).....	1
2. LonA 的結構	2
3. LonA 的功能	4
4. LonA 的受質	5
5. LonA 受質的辨識	6
6. MtaLonA (Meiothermus taiwanensis LonA)	7
7. 研究動機	8
二、 實驗材料與方法	9
2.1 實驗材料	9
2.2 實驗方法	9
2.2.1 基因的選殖	9
2.2.2 勝任細胞的製備	9
2.2.3 細胞轉型 (transformation)	10
2.2.4 點突變及選殖 (site directed mutagenesis and cloning).....	10
2.2.4.1 引子的設計 (primer design)	10
2.2.4.2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)	10
2.2.4.3 DNA 定序 (DNA sequencing)	12
2.2.5 重組蛋白的表現及純化	12
2.2.5.1 重組蛋白於 LB 培養基的表現	12
2.2.5.2 重組蛋白於 M9 培養基的表現	12
2.2.5.3 重組蛋白的純化—固定化金屬離子親合層析法 (immobilized-metal affinity chromatography, IMAC)	13
2.2.5.4 蛋白質濃縮	13



2.2.5.5 膠體過濾層析 (gel-filtration chromatography)	14
2.2.5.6 蛋白質濃度的測定	15
2.2.6 热轉變分析 (thermal shift assay)	15
2.2.7 蛋白質核磁共振 (protein NMR)	15
2.2.7.1 特定的氨基酸標定策略 (specific amino acid labeled strategy)	16
2.2.7.1.1 ^{15}N 、 ^{13}C 同位素標定的 NN206 (^{15}N , ^{13}C dual-labeled NN206) ...	16
2.2.7.1.2 ^{15}N -lysine 標定的 NN206 (^{15}N -lysine selectively labeled NN206) 16	16
2.2.7.1.3 ^{14}N -arginine 反標定的 NN206 (^{14}N -arginine selectively reverse labeled NN206)	16
2.2.7.2 核磁共振樣品製備	16
2.2.7.3 NN206 骨架 (backbone) 的循序判定 (Sequence specific assignment)	17
2.2.7.4 核磁共振滴定實驗 (NMR titration).....	17
2.2.7.5 核磁共振樣品之分析	18
2.2.7.6 用核磁共振計算結構正確之 Ig2D5	18
三、 實驗結果	19
3.1 重組蛋白的表現及純化	19
3.1.1 LonA 的表現及純化.....	19
3.1.2 NN206 的表現及純化	20
3.1.3 Ig2 的表現及純化.....	21
3.2 蛋白質折疊轉變溫度中點的測定	22
3.3 LonA 的 N 端功能區與 Ig2 之交互作用	22
3.3.1 WT LonA 與 NN206 之二維 TROSY-HSQC 光譜比較	22
3.3.2 NN206 骨架的循序判定 (Sequence specific assignment)	23
3.3.3 NN206 與受損的受質 (damaged substrate) 之交互作用	24
3.4 LonA 的 N 端與 Ig2D5 之交互作用	27
3.4.1 Ig2D5 的表現及純化.....	27
3.4.2 Ig2 與 Ig2D5 之比較.....	27
3.4.3 NN206 與 Ig2D5 之交互作用	28
3.4.4 LonA N 端功能區對於 Ig2D5 再折疊 (refolding) 的影響	28
3.5 NN206 的疏水性胺基酸對於損壞的受質結合之重要性	29
3.5.1 NN206 的點突變 (site directed mutagenesis)	29
3.5.2 NN206 ^{P22AM85A} 、NN206 ^{P22A} 及 NN206 ^{M85} 的表現及純化	30
3.5.3 NN206 ^{P22AM85A} 與 NN206 之核磁共振光譜比較	30
3.5.4 NN206 ^{P22AM85A} 與 Ig2 之交互作用	31
3.5.5 NN206 ^{P22AM85A} 對於 Ig2D5 再折疊的影響	32
四、 討論	33

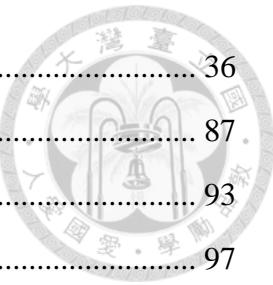


圖	36
表	87
參考文獻	93
附錄	97



圖 目 錄

圖 1-1 LonA 與 LonB 的功能區組成	36
圖 1-2 台灣本土嗜熱菌 <i>Meiothermus taiwanensis</i> LonA.....	37
圖 1-3 N 端功能區對受質降解之重要性	38
圖 1-4 LonA N 端功能區之結構.....	39
圖 2-1 核磁共振骨架的循序判定 (NMR backbone assignment).....	40
圖 3-1 WT LonA 的固定化金屬離子親合層析法純化	41
圖 3-2 WT LonA 之陰離子交換層析法	42
圖 3-3 WT LonA 之分子篩層析純化	43
圖 3-4 NN206 的固定化金屬離子親合層析法純化	44
圖 3-5 NN206 之分子篩層析純化	46
圖 3-6 Ig2 的固定化金屬離子親合層析法純化	47
圖 3-7 Ig2 之分子篩層析純化	49
圖 3-8 蛋白質熱轉變分析 (thermal shift assay)	50
圖 3-9 WT LonA 與 NN206 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較	51
圖 3-10 NN206 之部分 (partial) 循序判定光譜 (residue 42-51).....	52
圖 3-11 NN206 的骨架循序判定 (Sequence specific assignment).....	53
圖 3-12 NN206 的骨架循序判定結果	54
圖 3-13 特殊標定的 NN206 核磁共振光譜	55
圖 3-14 Ig2 滴定 NN206 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜	56
圖 3-15 Ig2 滴定 NN206 的核磁共振樣品分析	57
圖 3-16 WT LonA、Ig2 滴定 WT LonA 與 NN206 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較	59
圖 3-17 NN206 加入 Ig2 之化學位移變化.....	60
圖 3-18 Ig2 之結構	61
圖 3-19 Ig2D5 的固定化金屬離子親合層析法純化.....	62
圖 3-20 Ig2D5 之分子篩層析純化.....	64
圖 3-21 Ig2 與 Ig2D5 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較.....	65

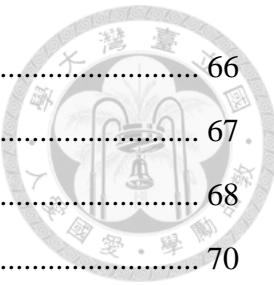


圖 3-22 蛋白質熱轉變分析	66
圖 3-23 NN206 加入 Ig2D5 之化學位移變化	67
圖 3-24 WT LonA 之 N 端功能區對於 Ig2D5 結合的影響	68
圖 3-25 NN206 的點突變	70
圖 3-26 NN206 ^{P22AM85A} 的固定化金屬離子親合層析法純化	71
圖 3-27 NN206 ^{P22AM85A} 之分子篩層析純化	73
圖 3-28 NN206 ^{P22A} 的固定化金屬離子親合層析法純化	74
圖 3-29 NN206 ^{P22A} 之分子篩層析純化	76
圖 3-30 NN206 ^{M85A} 的固定化金屬離子親合層析法純化	77
圖 3-31 NN206 ^{M85A} 之分子篩層析純化	79
圖 3-32 NN206 與 NN206 ^{P22AM85} 的比較	80
圖 3-33 Ig2 滴定 NN206 ^{P22AM85A} 之二維 ¹ H- ¹⁵ N TROSY-HSQC 光譜	81
圖 3-34 NN206 ^{P22AM85A} 加入 Ig2 之化學位移變化	82
圖 3-35 WT LonA 之 N 端功能區對於 Ig2D5 結合的影響	83
圖 3-36 WT LonA 之 N 端功能區點突變對於 Ig2D5 結合的影響	84
圖 4-1 N 端功能區對 α -casein 降解之重要性	85
圖 4-2 MtaLonA 與 EcLon 之 N 端功能區比較	86

表目錄

表 2-1 本實驗使用之菌種	87
表 2-2 本實驗使用之質體	88
表 2-3 本實驗使用之培養基、培養液	89
表 2-4 本實驗使用之緩衝溶液	90
表 2-5 本實驗使用之引子	91
表 3-1 NN206 的胺基酸組成	92



縮寫表

AAA+	ATPase associated with various cellular activities
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BsLon	<i>Bacillus subtilis</i> Lon protease
β-ME	2-mercaptoethanol
bp	base pair
CARA	computer aided resonance assignment
D ₂ O	deuterium oxide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcLon</i>	<i>Escherichia coli</i> Lon protease
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HCl	hydrochloride
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IMAC	immobilized-metal affinity chromatography
IPTG	isopropyl β-D-thiogalactoside
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani broth
NaPi	sodium phosphate group
NMR	nuclear magnetic resonance
OD ₆₀₀	optical density at 600 nm
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
rpm	revolutions per minute
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEV	Tobacco Etch Virus
Tm	melting temperature
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV	ultra violet
WT	wild type



一、前言

1. Lon AAA+蛋白酶 (Lon AAA+ protease, LonA)

Lon 蛋白酶又稱為 La 蛋白酶 (protease La) 或 CapR，最早於大腸桿菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 中被發現¹，是第一個被發現的 ATP 依賴型 (ATP-dependent) 蛋白酶²，此蛋白廣泛存在於古細菌、原核生物 (prokaryote) 及真核生物 (eukaryote) 的胞器中，其蛋白序列在物種間有高度的保留性。Lon 蛋白酶在細胞當中主要的角色是進行蛋白品質管理 (protein quality control)，La 蛋白酶會將損壞或是不正常的蛋白質降解 (degrade)，使得這些廢物不會在細胞中累積產生有毒的聚集體 (toxic aggregate)，除此之外，Lon 也參與了一些生物作用中蛋白的調控，例如：Sul-A 細胞分裂調控蛋白 (cell-division inhibitor)³。Lon 和其他 ATP 依賴型蛋白酶 (例如：ClpXP、ClpAP、ClpC、FtsH 和 26S proteasome 等) 一樣屬於 AAA+蛋白家族 (ATPases associated with diverse cellular activities superfamily) 的成員，此家族的特色是有約 250 個胺基酸左右的 ATP 結合功能區 (ATP-binding domain)，即 AAA 功能區，當受質 (substrate) 沒有結構的部分 (unstructured region) 暴露在環境中，AAA+環 (AAA+ ring) 的軸向孔洞 (axial pore) 會和其結合，在受質結合後，AAA+環會不斷重複結合及水解 ATP 的動作，誘使蛋白構型 (conformation) 發生改變，因而能將變性的 (denatured) 受質移動 (translocate)，使受質被拉往被蛋白包覆在內的 (sequestered) 蛋白酶催化中心 (degradation chamber)^{4,5}。先前研究發現，當受質結合後，La 蛋白酶的 ATPase 及 peptidase 活性會被刺激，因此認為 Lon 蛋白酶會受到受質的異位 (allosteric) 調控^{6,7}，接著也陸續發現 Lon 蛋白酶和受質結合後會釋放原本結合的 ADP 而結合 ATP⁷、利用降解決定因子 (degron) 的結合^{8,9} 以及蛋白質的結晶結構¹⁰，種種結果都說明了異位調控的發生。

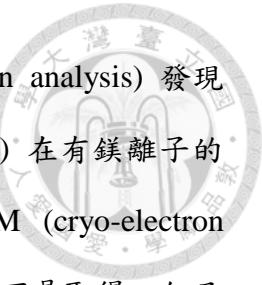
根據序列的同源性以及蛋白質的結構，Lon 蛋白酶主要可以再分為 LonA 及 LonB 兩個次家族 (subfamily) (圖 1-1)，LonA 主要存在於細菌及真核生物中，其中



最經典的代表即是大腸桿菌的 Lon 蛋白酶 (*EcLon*)，而 LonB 目前只在古細菌 (archaeabacterial) 中被發現，LonA 和 LonB 最為顯著的差異在於 AAA+ 模組 (module) 以及蛋白質 N 端功能區 (N-terminal domain) 的不同。AAA+ 模組在 N 端有一個較大的核苷酸結合功能區，又稱為 α/β 功能區 (α/β domain)，而在 C 端的部分有一個較小的螺旋區 (helical domain)，又稱為 α 功能區。在 α/β 功能區中有一些序列保守的 (conserved) 模體 (motif)，包含 Walker A、Walker B 及 sensor-1 模體，這些區域和核苷酸的結合以及水解相關，除此之外，在 α/β 功能區還有和核苷酸水解相關的 arginine 手指 (arginine finger)。 α 功能區通常由 4-5 個 α 螺旋 (helices) 組成，其中也包含一些保守的模體，例如：sensor-2 模體，其含有一個和 ATP 水解相關的 arginine 或 lysine， α 功能區是區分 AAA+ 蛋白家族的重要區域。LonA 由三個獨立 (independently) 且有結構的功能區組成，分別是 N 端功能區、ATPase 功能區 (也就是 AAA+) 以及蛋白水解功能區 (proteolytic domain)，而 LonB 只有 ATPase 功能區及蛋白水解功能區並沒有 N 端功能區，除此之外，在 LonB 的 AAA+ 模組中，在 Walker A 模體及 Walker B 模體中有一大段穿膜功能區 (transmembrane domain)，使得蛋白可以分布於胞膜上^{4,11}。

2. LonA 的結構

LonA 蛋白酶包含 N 端功能區、ATPase 功能區以及蛋白酶功能區 (protease domain) 三個區域，和 FtsH 一樣，LonA 的這些區域位於同一條多肽鏈 (single polypeptide chain) 中¹²，並非像 Clp 家族的蛋白，不同功能區由不同的多肽鏈所編碼 (encond)，最後才聚合成一個有功能的蛋白。La 蛋白酶會形成環形的同元多聚體 (homo-oligomer) 執行其蛋白功能，一開始依據分子篩層析法 (size-exclusion chromatography) 的分析，認為 LonA 的多聚體可能是由 4-5 個相同的單體聚合而成¹³，也有人利用 cryo-EM 發現釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 粒線體中的 Lon 蛋白酶形成七聚體 (heptameric oligomerization)¹⁴，然而後來也有許多研究證明



LonA是以六聚體的形式進行作用，最早已沉降分析 (sedimentation analysis) 發現
恆垢分枝桿菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 的Lon蛋白酶 (*MsLon*) 在有鎂離子的
狀況下可以形成六聚體¹⁵，此結果也在EcLonA中以cryo-EM (cryo-electron
microscopy)¹⁶及X-ray結構的方式被證實，然而全長的LonA結晶並不易取得，但已
有許多研究成功解出了各功能區的結構，藉此便可以構築出LonA的結構藍圖以及
其形成多聚體實的樣貌，目前得到最完整的LonA X-ray結晶結構是枯草桿菌
(*Bacillus subtilis*) LonA (*BsLon*) 的兩個子結構 (sub-structure)，分別是其N端功能區
(PDB ID : 3M65) 以及其ATPase和蛋白酶功能區 (PDB ID : 3M6A)，而近年也有研
究利用cryo-EM的方式一探人類粒線體LonA (human mitochondrial Lon protease,
hLon) 的全長樣貌，其結果顯示*hLon*亦是形成六聚體¹⁷。

ATPase功能區負責將目標蛋白展開 (unfold) 以及移動到蛋白酶室 (protease
chamber)，LonA的AAA+模組是同源性非常高的區域，在La蛋白酶進行作用的過程
中ATPase功能區將ATP水解，藉此獲得化學能量，因此而能使得蛋白的構型產生改
變，進而可以運送受質，而位於LonA蛋白酶的C端蛋白酶功能區則負責將多肽鏈
水解成小片段，約有150-200氨基酸的長度，其物種間的同源性也很高。LonA的蛋
白酶功能區一度被認為是serine蛋白酶 (serine protease)^{13,18}，然而其序列和一般所
知的serine蛋白酶並沒有同源性，LonA的蛋白酶功能區沒有典型的催化三聯體
(catalytic triad)：Ser-His-Asp，在催化區LonA的蛋白酶功能區缺少了His以及Asp，
然而根據氨基酸序列的一級結構 (primary structures) 的分析、點突變 (site-directed
mutagenesis) 的實驗以及EcLon蛋白酶功能區的結晶結構^{19,20}，發現LonA的蛋白酶
功能區的活性區域 (active site) 是以Ser-Lys催化二聯體的形式存在。

相對於序列上十分保守的ATPase功能區及蛋白酶功能區，LonA的N端功能區
不論是胺基酸長度 (220-510個胺基酸) 或是氨基酸序列都被認為是最變
(variable) 的部分，目前發現其和受質的辨識 (recognition) 以及受質的結合相關
^{21,22}。N端功能區又可再細分為兩個或多個子功能區 (subdomain)，並且可能包含



一個延展的捲曲螺旋 (coiled coil)，目前 *EcLon* 以及 *BsLon* 的 N 端功能區結構已被解出²³⁻²⁵，*EcLon* N 端功能區的 N 端子功能區主要由 β 摺疊 (β -sheet) 構成，包含了 6 個 β 摺疊以及 2 個 α 融合 (α-helix)，而其 C 端子功能區則由 5 個 α 融合組成，兩個子功能區之間由一段短接鏈 (linker) 連接，*BsLon* N 端功能區的 N 端子功能區和 *EcLon* 的 N 端子功能區非常相似，都是一個主要由 β 摺疊形成的球狀區域 (globular domain)，然而其 C 端子功能區雖然亦由 α 融合所構成，但兩個 N 端功能區之間會藉由 C 端子功能區形成區域交換的二聚體 (domain-swapped dimer)，而這些 N 端功能區以一段有形成捲曲螺旋傾向的 α 融合和 ATPase/蛋白酶水解功能區連接。

3. LonA 的功能

LonA 在細胞中最重要的功能是進行蛋白品質管理，*La* 蛋白酶會結合帶有降解決定因子的受質，這些區域通常是蛋白質損壞或是構型不正常而裸露至環境中的疏水性胺基酸，*LonA* 結合後會將其降解，除此之外，*LonA* 也參與某些生理反應的調控，例如：群聚感應 (quorum sensing)、細胞分裂、莢膜 (capsule) 的生成、質體 (plasmid) 的穩定、對抗輻射線和嗜菌體 (phage) 的複製等。在大腸桿菌中，如果 *Lon* 蛋白酶表現發生異常或是突變，會使得大腸桿菌的外型較為黏稠 (mucoid) 且較長，也會使得大腸桿菌在有壓力的環境下 (例如：UV 光) 被誘發 SOS 反應後無法正常生長²⁶。除了蛋白酶的活性外，*LonA* 也被發現可以做為伴護蛋白 (chaperone) 的能力，而這個活性和蛋白的品質管理通常也有所關連^{27,28}。先前 *EcLon* 被認為有和單股以及雙股 DNA 非專一性結合的能力²⁹，而在後續實驗中則發現 *EcLon* 會和一段富 T 和 G 序列 (TG-rich) 的 DNA 結合³⁰。

在粒線體當中，*LonA* 除了進行蛋白品質管理以外，也和粒線體的維持及呼吸作用相關，而 *LonA* 也會和粒線體 DNA (mtDNA) 結合，其主要和富 T、G 序列的單股 DNA 以及 G 四聯體 (G-quadruplex) DNA 結合。粒線體中 *LonA* 的表現量下降會影響粒線體其他蛋白的含量，例如：能量代謝相關的蛋白、維持粒線體結



構的蛋白及 mtDNA 代謝相關的蛋白等，也會使得粒線體在有氧化壓力的環境下無法正常作用，造成粒線體的損傷甚至減少。許多研究也發現粒線體 LonA 和癌症息息相關³¹，由於癌細胞會快速分裂增殖，使的腫瘤組織內部細胞處於缺氧且有氧化壓力的情況，而 LonA 蛋白會因環境壓力而被誘導生成，使得粒線體 LonA 表現量上升藉此抵抗外界的環境壓力，然而癌細胞也因此得以存活不會凋亡，造成病情更進一步的加劇。

4. LonA 的受質

在細菌和真核生物的粒線體當中 LonA 負責進行蛋白質的品質管理，因此 LonA 對於受質的選擇性以及專一性十分重要，要能夠辨別構型正確以及不常的蛋白，否則會使一般正常運作或必要的蛋白被降解。當受質要進入蛋白酶水解室前會經過一個狹窄的通道，然而正常的蛋白 (native protein) 並無法通過，藉此便可排除大部分構型正常的蛋白。除了藉由結構上的阻礙來辨別，LonA 也傾向和有疏水性胺基酸的序列結合³，在一般的狀況下，這些疏水的區域通常被包覆在蛋白的中心，然而，當蛋白被展開或是構型不正確時，這些疏水性的區域會裸露在環境中，LonA 便能與其結合。除了摺疊錯誤 (misfold) 的蛋白，LonA 也能辨識正常蛋白，而這些蛋白在氨基或羧基末端通常帶有降解決定因子 (dagron)，這是一段可以被辨識的特定胺基酸序列，又可稱為降解標籤 (tag)。大腸桿菌的 SulA 由 Lon 進行調控，因此也是最常用來進行研究的蛋白，當環境中存在會損壞細胞 DNA 的物質時，大腸桿菌會活化 SOS 反應的發生，誘使 SOS 反應相關的蛋白質進行表現，其中也包含了細胞分裂抑制劑 SulA，SulA 會和細胞中的 FtsZ 結合，使得細胞無法進行分裂，在將受損的 DNA 修補完後，SulA 會被 EcLon 降解，細胞也因而得以進行分裂³²，而 SulA C 端的最後 20 個胺基酸是 Lon 的降解決定因子，這個標籤含有中等疏水性的胺基酸序列，最末端兩個胺基酸為 Tyrosine 和 Histidine，在點突變的實驗中發現這兩個位點對於與 Lon 的結合十分重要^{8,33}，許多研究中會將



蛋白接上 Sul20 標籤，藉此探討 LonA 和受質之間的作用，除了 Sul20 標籤外， β 20 標籤也是會被 LonA 辨識且降解的胺基酸序列，這是一段原本被包覆在 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 中的胺基酸序列，和 Sul20 一樣常用來探討 LonA 和受質間的交互作用關係。然而，並非所有能被 LonA 降解的蛋白都有已知的降解決定因子，大腸桿菌轉錄因子 (transcription factor) RcsA 的降解標籤目前仍尚未被發現，RcsA 會活化大腸桿菌的莢膜多醣基因 (capsular polysaccharide genes, *cps*)，在一般的細胞當中，RcsA 會被 *EcLon* 降解，使得 *cps* 表現量低，然而當 *EcLon* 發生突變或異常時，細胞中 RcsA 的含量便不受控制，造成 *cps* 大量表現，使得大腸菌細胞變的黏稠 (mucoid)³⁴。

5. LonA 受質的辨識

受質的辨認以及結合對於整個蛋白的功能而言是十分重要的，然而究竟 LonA 是以怎麼樣的方式去辨識受質目前仍有許多討論空間。

先前的研究發現，原本就存在於大腸桿菌中 Lon 蛋白酶的 E240 突變 (*EcLon*^{E240K}) 會使 Lon 蛋白酶以十二聚體 (dodecamer) 的形式存在，並且造成 *EcLon*^{E240K} 無法降解 RcsA，然而卻依然可以降解 SulA³⁵，除此之外，*EcLon*^{E240K} 對於不同的受質降解會產生不同的影響³⁶，這個產生突變的位點主要位於 N 端功能區的 C 端子功能區有形成捲曲螺旋傾向的 α 螺旋區域，由於此區的氨基酸主要是酸性胺基酸，因此被認為是可能會產生蛋白—蛋白交互作用的區域之一，而在 *BsLon*²³ 以及 *MsLon*²¹ 中也發現他們序列相對應的 glutamate 對於受質的辨識似乎亦有重要的地位。除了原核生物外，在屬於真菌界的鵝柄孢殼菌 (*Podospora anserine*) 中發現，其粒線體中 Lon 蛋白酶 (*PaLon1*) 的 N 端功能區和受質的結合有所關連³⁷，在鵝柄孢殼菌的基因當中，如同先前在大腸桿菌的研究，也發現鵝柄孢殼菌中的三種突變，而突變的位點都位於 *PaLon1* N 端功能區的 C 端子功能區，利用 *in vitro* 的降解實驗及 *in vivo* 的實驗，作者發現 *PaLon1* N 端功能區的 C 端子功能區參與了受質的結



合，而上述的glutamate位於*PaLon1*的第490個胺基酸，雖然在*PaLon1*中此區域並沒有形成捲曲螺旋的傾向，但其二級結構也是 α 螺旋，而且經過胺基酸序列的比較後，發現此區域在鵝炳孢殼菌及其他細菌當中是十分有保守性的，因此此區域不論是在真核生物或是原核生物都被認為是一個可能的受質結合區。

除了N端功能區的C端子功能區外，也有研究發現N端子功能區對於受質辨識的重要性似乎也佔有一席之地，利用cross-linking的方式發現在*EcLon*的N端功能區第14-15以及33-38個胺基酸的區域對於sul-20受質的結合扮演了重要的角色⁹，而由於在結構中這些胺基酸位於非常相近的區域，也因此此位於N端子功能區的區塊被認為可能是負責辨識受質的區域之一，將第33-35個胺基酸進行突變後，嚴重影響了*EcLon*對於帶有sul-20標籤 (tag) 的受質降解，除此之外，在 *in vivo*的實驗中，此區的突變也無法抑制SulA，使得大腸桿菌DNA受到UV光的破壞後無法繼續生長，因此LonA N端功能區的N端子功能區亦可能和受質的辨認及結合相關，然而LonA N端功能區對於受質的辨識目前沒有明確的結構證據可以說明。

6. MtaLonA (*Meiothermus taiwanensis* LonA)

台灣本土嗜熱菌 *Meiothermus taiwanensis* 是從台灣北部烏來溫泉區發現的中度嗜熱性溫泉菌³⁸，這是一種有氧 (aerobic) 且嗜熱的 (thermophilic) 菌株，*Meiothermus taiwanensis* 最適合的生長溫度為 55-60°C，生活史中不會有孢子的生成，在培養基上由不同長度的細胞形成絲毛狀體，而且會產生紅色的菌落。

在先前的研究當中，已從 *Meiothermus taiwanensis* 中選殖出熱穩定的 (thermal stable) LonA (MtaLonA)，利用 X-ray 結晶結構及 cryo-EM 的方式^{10,39}，發現 MtaLonA 在有鎂離子的環境中會形成六聚體，加入 ATP 的狀況下，其結構 (PDB: 4YPL) 呈現緊密的環形 (close ring) 排列，每個原聚體 (protomer) 以類似橙瓣 (orange's carpel) 的方式相互堆疊，並且沒有和 ADP 結合與有和 ADP 結合的原聚體交錯排列 (圖 1-2)。若將有 ADP 結合的原聚體以沒有 ADP 結合的原聚體取代，可以得到



一個沒有核苷酸結合的 MtaLonA 六聚體結構，而這個結構可以和 cryo-EM 的結果互相吻合，在沒有核苷酸的環境下，MtaLonA 會形成一個 open chamber 的形態，這是 diffusion-based proteases 的一大特徵。除此之外，在降解實驗中，MtaLonA 可以在沒有 ATP 的條件下降解無穩定構型蛋白質 (intrinsically disordered protein) (例如： α -casein) 或是短的肽鏈 (例如：suc-FLF-MNA)，也就是 LonA 在有鎂離子的環境中，可以不使用 ATP 就進行受質的降解。MtaLonA 也可以降解 Ig2，Ig2 是盤基網柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 中凝膠因子 (gelation factor) ABP-120 的第 5 個和第 6 個功能區，Ig2 是由 β 摺疊所構成的蛋白，不論是結構摺疊完整的 Ig2 還是因為熱而逐漸展開的 (unfold) Ig2，MtaLonA 在有鎂離子以及鎂離子加上 ATP 的情況下都能將 Ig2 降解，而在 55°C 時，MtaLonA 對 Ig2 的降解有最好的活性。

7. 研究動機

在張崇毅老師實驗室先前的研究中發現，若將 MtaLonA 的 N 端功能區去除 (AAAP)，對於 Ig2 的降解不論在有無 ATP 的狀況下會明顯受到影響 (圖 1-3，未發表)，使得 AAAP 在 55°C 的環境下降解 Ig2 的效率變差，而在 55°C 的狀況下，Ig2 的結構會呈現部分未折疊的狀態，顯示 N 端功能區對於未折疊蛋白的降解十分重要。雖然先前的研究利用 cross-linking 的方式，發現 EcLon 的 N 端功能區對於 sul20 標籤的結合扮演了重要的角色⁹，而一些 LonA 的 N 端功能區結晶結構也已經知曉，張崇毅老師實驗室也已經得到 MtaLonA N 端功能區的 X-ray 結晶結構 (圖 1-4，未發表)，其結構和 EcLonA N 端功能區相似，可以分為兩個子功能區，N 端子功能區主要由 β 摺疊構成，而其 C 端子功能區 α 螺旋組成，兩個子功能區之間由一段 18 個胺基酸的接鏈連接，但是對於 N 端功能區如何去辨識且結合受質的作用機制及方式仍然不清楚，因此本實驗想以生物物理的方式探討 LonA N 端功能區對於 Ig2 辨識以及結合的重要性，藉此了解 LonA 對於受質的辨認。



二、 實驗材料與方法

2.1 實驗材料

- 2.1.1 菌株 (表 2-1) 及質體 (表 2-2)
- 2.1.2 培養基、培養液 (表 2-3) 及緩衝溶液 (表 2-4)
- 2.1.3 引子 (primer) (表 2-5)

2.2 實驗方法

2.2.1 基因的選殖

LonA、NN206 及 Ig2 的質體是由中研院張崇毅老師實驗室建構並提供。利用 *NdeI* 及 *HindIII* 限制酶切位將台灣本土嗜熱菌 *Meiothermus taiwanensis* 全長 LonA (1-793 residues) 基因克隆入 C 端帶有 6xHis-tag 的 pET21a(+) 質體中，生成 pET21a(+)MtaLonA。NN206 (1-206 residues) 質體是以 *NdeI* 及 *EcoRI* 限制酶切位將帶有 N 端 6xHis-tag 的 pET28a(+)tev 與其基因接合，生成 pET28a(+)tev-NN206 質體。pET28a(+)tev-Ig2 則是將由 Genscript (Piscataway, USA) 的 Ig2 (domains 5 and 6 of the gelation factor ABP-120 of *Dictyostelium discoideum*) DNA 以 *NdeI* 及 *XhoI* 限制酶切位和 pET28a(+)tev 接合而生成。

2.2.2 勝任細胞的製備

(所有用品皆須事先滅菌)

將勝任細胞 (competent cell) 培養在 LB 固態培養基 12-16 小時，挑選單一菌落至 100ml LB 培養液中，並置於 37°C 震盪培養至 OD₆₀₀ 讀值約 0.4-0.45，將菌液置入事先冰鎮的離心管中，於 4°C 以 3000 xg 離心 10 分鐘，去除上清液後以 0.1M 事先冰鎮過的 CaCl₂ 回溶沉澱物，再於 4°C 以 3000 xg 離心 10 分鐘，去除上清液，再加入 0.1M 事先冰鎮過的 CaCl₂ 並輕輕的將沉澱物回溶，置於冰上 20 分鐘，再於 4°C 以 3000 xg 離心 7 分鐘，去除上清液，加入 4ml 事先冰鎮的 buffer (0.1M CaCl₂,



15% w/glycerol 及 5% DMSO) 中回溶沉澱物，最後以每管 50 μ l 的體積分裝至微量離心管 (Eppendorf) 中，並置於-80°C保存。

2.2.3 細胞轉型 (transformation)

將 30-70 ng 的質體加入 50 μ l 的勝任細胞中，混合均勻後置於冰上 10 分鐘，每 5 分鐘將其震盪及離心，42°C水浴 45 秒，迅速置於冰上並放置 5 分鐘，加入 600 μ l LB 培養液 (1% Tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.5)，放入 37°C培養箱震盪 30 分鐘。將菌液塗於含有適當抗生素的 LB 培養基上，置於 37°C培養 12-16 小時。

2.2.4 點突變及選殖 (site directed mutagenesis and cloning)

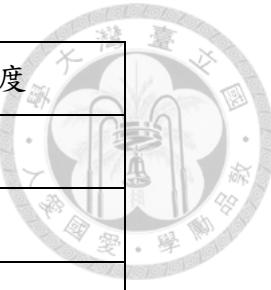
2.2.4.1 引子的設計 (primer design)

利 用 Agilent 的 QuikChange Primer Design 網 站 (<https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) 進行設計，將基因序列貼上，並選擇要進行突變的位點，網站便會計算出建議的引子序列，確認 T_m 適當後進行合成。

2.2.4.2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

取 100 ng 原始質體作為模板，並加入 12.5 μ l PfuUltra II Hotstart 2X master mix、0.5 μ l 10 μ M forward primer、0.5 μ l 10 μ M reverse primer、0.5 μ l DMSO 及 ddH₂O，使反應總體積為 25 μ l。

進行反應所需混合物：



成分	體積或最終濃度
PfuUltra II Hotstart 2X master mix	12.5 μ l
10 μ M forward primer	0.5 μ l
10 μ M reverse primer	0.5 μ l
template	100 ng
DMSO	0.5 μ l
ddH ₂ O	補至總體積 25 μ l
總體積	25 μ l

PCR 反應條件：

反應之溫度如下：(1) 95°C反應 2 分鐘；(2) Denaturing 溫度 95°C反應 20 秒；(3) Annealing 溫度依引子 Tm 而定，反應 20 秒；(4) Elongation 溫度 72°C，反應 90 秒；(5) 重複步驟 (2) 到 (4) 29 次；(6) Final extension 溫度 72°C，反應 3 分鐘。

溫度	時間
95°C	2 分鐘
95°C	20 秒
primer Tm - 5°C	20 秒
72°C	90 秒
72°C	3 分鐘

完成 PCR 之產物加入 1 μ l DpnI，並於 37°C反應至隔天 (overnight)，最後以 80°C加熱 20 分鐘。



2.2.4.3 DNA 定序 (DNA sequencing)

挑選 LB 培養基上的一顆菌落至 5 ml LB 培養液中，將入適當抗生素，於 37°C 震盪培養 12-16 小時。按照 QIAGEN miniprep kit 說明指示抽取質體，利用 nanodrop 進行定量，取 300-500 ng 質體送至台大醫學院第一共研 DNA 定序中心定序。

2.2.5 重組蛋白的表現及純化

2.2.5.1 重組蛋白於 LB 培養基的表現

運用 2.2.3 節之方法將質體轉型至 BL21 (DE3) 中，並塗抹於含有適當抗生素的 LB 培養基中，置於 37°C 培養 12-16 小時。選取數個菌落接種 (inoculate) 至 100 ml LB 培養液中，於 37°C 以 280-300 rpm 震盪培養約 3-4 小時，將菌液平均分配至 6 瓶 1000 ml LB 培養液中，並加入適當抗生素，於 37°C 以 240-280 rpm 震盪培養至 OD₆₀₀ 讀值為 0.5 時降溫，待溫度降至 25°C 加入 0.2 mM 異丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 進行誘導，並於 25°C 以 220 rpm 震盪培養 14-18 小時。利用 JLA-9.1 轉子 (rotor) 以 5000 xg 轉速將菌液離心，去除上清液，並以 binding buffer (500 mM NaCl, 25 mM NaPi, 5 mM β-Me, 5% glycerol, pH 8.0) 將菌塊回溶，最後置於 -20°C 保存。

2.2.5.2 重組蛋白於 M9 培養基的表現

運用 2.2.3 節之方法將質體轉型至 BL21 (DE3) 中，並塗抹於含有適當抗生素的 LB 培養基中，置於 37°C 培養 12-16 小時。選取數個菌落接種 (inoculate) 至 100 ml LB 培養液中，於 37°C 以 280-300 rpm 震盪培養約 3-4 小時，取 15ml 菌液以 3000 g 離心 5 分鐘，去除上清液，將菌塊溶於 300 ml M9 培養液 (6g/L Na₂HPO₄, 3g/L KH₂PO₄, 5g/L NaCl, pH 7.4) 中，加入 4 g/L 葡萄糖 (glucose)、1 g/L NH₄Cl、1 mM MgSO₄ 及 100 μM CaCl₂，並加入適當抗生素，於 37°C 以 240-280 rpm 震盪培養 14-18 小時。將適當菌液加入 1.5 L M9 培養液中，使起始 OD₆₀₀ 讀值約為 0.1-0.15，加入



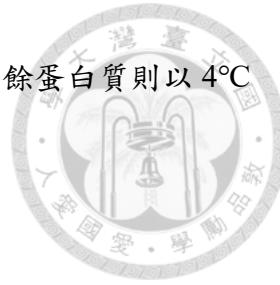
4 g/L 葡萄糖 (glucose)、1 g/L NH₄Cl、1 mM MgSO₄、100 μM CaCl₂ 及適當抗生素，於 37°C 以 240-280 rpm 震盪培養至 OD₆₀₀ 讀值為 0.5 時降溫，待溫度降至 25°C 加入 0.2 mM IPTG 進行誘導，並於 25°C 以 220 rpm 震盪培養 14-18 小時。利用 JLA-9.1 轉子 (rotor) 以 5000 xg 轉速將菌液離心，去除上清液，並以 binding buffer (500 mM NaCl, 25 mM NaPi, 5 mM β-Me, 5% glycerol, pH 8.0) 將菌塊回溶，最後置於-20°C 保存。

2.2.5.3 重組蛋白的純化—固定化金屬離子親合層析法 (immobilized-metal affinity chromatography, IMAC)

將菌塊以 binding buffer (500 mM NaCl, 25 mM NaPi, 5 mM β-Me, 5% glycerol, pH 8.0) 回溶，利用均質機 EmulsiFlex-C3 (Avestin) 以 1000-1500 bar 之壓力將細菌打破，重複約 8 次循環至濃稠的菌液變成較為液態，於 4°C 以 50000 xg 離心 50 分鐘，收集上清液，利用事先以 binding buffer 平衡的鎳螯合親和樹脂 His60 Ni Superflow Resin (Clontech) 以 0.5ml/min 流速進行結合，待上清液結合完畢，以含有不同濃度 imidazole (0、10、20 及 30 mM) 之沖洗緩衝液 (wash buffer) 去除非特異性結合的蛋白，最後利用洗脫緩衝液 (elution buffer) (400 mM imidazole, 500 mM NaCl, 25 mM NaPi, 5 mM β-Me, 5% glycerol, pH 8.0) 沖提目標蛋白。在 Ig2、NN206 或 Ig2D5 中加入 Tobacco Etch Virus (TEV) 蛋白酶 (protease) 去除 6xHis-tag，靜置於 4°C 至隔天，將目標蛋白中的 elution buffer 置換成 binding buffer，去除 imidazole，再重複上述步驟，以鎳螯合親和樹脂將目標蛋白與 TEV 蛋白酶進行分離。在 LonA、Ig2 及 Ig2D5 中加入 DNase，靜置於 4°C 至隔天。

2.2.5.4 蛋白質濃縮

將純化後所收取之蛋白液進行濃縮，以利體積的減少或是濃度的增加，LonA 及 Ig2 以 10 MWCO 孔徑之濃縮管 (Vivaspin® Turbo 15, Sartorius) 濃縮，NN206 及



Ig2D5 則以 5 MWCO 孔徑之濃縮管濃縮, NN206 於 25°C 離心, 其餘蛋白質則以 4°C 於 3400 xg 離心至適當體積或濃度。

2.2.5.5 膠體過濾層析 (gel-filtration chromatography)

利用膠體過濾層析 (gel-filtration chromatography) 將純化出來的蛋白進行更進一步的純化, 以去除雜蛋白或構型不正確的蛋白。將 LonA 的 buffer 置換成 buffer A (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2mM β-Me, pH 8.0), 利用事先以 buffer A 平衡的 Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare) 陰離子交換樹脂進一步分析, 以逐漸注入不同比例 buffer B (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM β-Me, pH 8.0) 的方式產生鹽度梯度, 將蛋白進行分離。

以分子篩層析法 (size exclusion chromatography) 進行進一步純化, LonA、NN206 及 Ig2 以事先用 buffer (50 mM NaPi, 2 mM β-Me, pH 6.5) 平衡好的 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) 管柱進行分析, 跑膠確認並收取適當的部分。Ig2D5 以事先用 buffer (50 mM NaPi, 2 mM β-Me, pH 6.5) 平衡好的 HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare) 管柱進行分析, 跑膠確認並收取適當的部分。

分子篩層析法分子量之測定以標準分子量蛋白質進行, 將標準品分別以 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 以及 HiLoad 16/600 Superdex 75 pg 分析之結果製作分子量標準曲線, 再以樣品的沖脫體積 (elution column) 推算樣品之分子量。HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 之標準品為 Gel Filtration Standard (Bio-rad #151-1901) : bovine thyroglobulin (670 kDa)、bovine γ-globulin (158 kDa)、chicken ovalbumin (44 kDa)、horse myoglobin (17 kDa) 及 vitamin B₁₂ (1.35 kDa)。HiLoad 16/600 Superdex 75 pg 之標準品為 Gel Filtration Cal Kit Low Molecular Weight (GE healthcare, 28-4038-41) : chicken conalbumin (75 kDa)、hen ovalbumin (43 kDa)、bovine carbonic anhydrase (29 kDa)、bovine ribonuclease (13.7 kDa)、bovine aprotinin



(6.5 kDa)。分析後所獲得之減量線見附錄一。

2.2.5.6 蛋白質濃度的測定

利用分光光度計 (DU 730, Beckman Coulter, Inc.) 的 UV 光偵測蛋白質含量。先以 buffer (50 mM NaPi, 2 mM β-Me, pH 6.5) 在 240-340 nm 的波長範圍進行 blank，接著將蛋白進行 10-50 倍稀釋，使所測得之 280 nm 吸收值不超過 1.000，最後將所測得之數值扣除背景值後乘以稀釋倍數再除以消光係數 (extinction coefficient)，即可得知蛋白濃度。消光係數以 ExPasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 進行預測。

2.2.6 热轉變分析 (thermal shift assay)

利用 SYBRO orange dye (Life Technologies) 測定蛋白的折疊轉變溫度中點 (the midpoint temperature of transition, Tm)。將 5000x 的 SYPRO orange stock 以 buffer (50mM NaPi, 2mM β-Me, pH 6.5) 做 150-200x 的稀釋，再將稀釋過的 SYPRO orange 加入蛋白液中，其 SYBRO orange dye 終稀釋倍率為 1500-2000x，而蛋白之最終濃度 (final concentration) 為 5 μM，加入 45 μl 混合液至 PCR tube 中，每組進行三重複。

以 CFX connect Real-Time PCR System (Bio-Rad) 進行偵測，選擇 “FRET” 模式進行，將樣品從 25°C 加熱至 95°C，每 0.5°C 偵測一次。將數據進行分析後，螢光訊號圖 (fluorescence signal plots) 中曲線的反曲點 (inflection point) 或導數圖 (derivative plot) 中曲線的最低點即為該蛋白質之 Tm。

2.2.7 蛋白質核磁共振 (protein NMR)

本篇研究所有核磁共振實驗皆於台大貴重儀器中心 Bruker 800-MHz 核磁共振儀 (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany) 以 305K、328K 及 333K 進行，核磁共振



實驗之所有相關參數皆列於附錄二。所有實驗光譜以 NMRPipe 進行傅立葉轉換 (Fourier transform) 以及相位 (phase) 的調整，並以 NMRView 分析及處理。

2.2.7.1 特定的氨基酸標定策略 (specific amino acid labeled strategy)

2.2.7.1.1 ^{15}N 、 ^{13}C 同位素標定的 NN206 ($^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ dual-labeled NN206)

以 2.2.5.2 節之方式利用 M9 培養液進行蛋白質的大量表現，由於一般的 ^{12}C 及 ^{14}N 沒有核磁共振訊號，因此在養菌時以 $[^{15}\text{N}]\text{-NH}_4\text{Cl}$ 及 $[^{13}\text{C}]\text{-glucose}$ 作為營養來源，使所產生之蛋白質帶有 ^{13}C 及 ^{15}N 標定，因而能夠被核磁共振儀偵測其訊號。

2.2.7.1.2 ^{15}N -lysine 標定的 NN206 (^{15}N -lysine selectively labeled NN206)

以 2.2.5.2 節之方式利用 M9 培養液進行蛋白質的大量表現，於一開始養菌時加入一般 NH_4Cl ，而在 OD_{600} 讀值約 0.4 時加入 ^{15}N L-Lysine 至培養液中，於 OD_{600} 讀值約 0.5 時進行誘導。

2.2.7.1.3 ^{14}N -arginine 反標定的 NN206 (^{14}N -arginine selectively reverse labeled NN206)

以 2.2.5.2 節之方式利用 M9 培養液進行蛋白質的大量表現，於一開始養菌時加入 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 使得所產生之蛋白有 ^{15}N 的標定，而在 OD_{600} 讀值約 0.4 時加入一般的 Arg 至培養液中，於 OD_{600} 讀值約 0.5 時進行誘導。

2.2.7.2 核磁共振樣品製備

樣品皆使用 NMR buffer (50mM NaPi, 2mM β -Me, pH 6.5) 配製，加入適當濃度之蛋白，並加入 5-7% (v/v) 的重水 (D_2O)，並離心將沉澱去除後裝入 4 mm NMR 試管 (Norell) 中，樣品置於室溫待實驗進行。



2.2.7.3 NN206 骨架 (backbone) 的循序判定 (Sequence specific assignment)

利用 ^{15}N 、 ^{13}C 同位素標定的 NN206 蛋白樣品在 305K 及 328K 下進行實驗，藉由二維的 ^1H - ^{15}N TROSY-heteronuclear single quantum correlation (HSQC) 光譜以及三維的 HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、HN(CO)CACB、HN(CA)CO 和 HNCO 光譜（圖 2-1a）在 CARA 中進行蛋白質骨架的循序判定。首先，先以二維的 TROSY-HSQC 光譜標定出蛋白質骨架醯胺鍵上 ^1H 及 ^{15}N 的化學位移，接著利用三維的光譜取得更多訊息，依照光譜不同的脈衝程序 (pulse sequence)，我們可以從中得到不同的訊息，從 HNCA 及 HN(CO)CA 可以得知 $\text{C}_{\alpha(i)}$ 及 $\text{C}_{\alpha(i-1)}$ 的化學位移，由 HNCACB 及 HN(CO)CACB 可以得到 $\text{C}_{\alpha(i)}$ 、 $\text{C}_{\alpha(i-1)}$ 、 $\text{C}_{\beta(i)}$ 及 $\text{C}_{\beta(i-1)}$ 的化學位移，而從 HN(CA)CO 及 HNCO 則能夠得到 $\text{CO}_{(i)}$ 及 $\text{CO}_{(i-1)}$ 的化學位移，以手動方式挑選訊號峰 (peak) 最後由軟體進行 autolink，將所有資訊進行交叉比對，再經過手動方式重複進行確認，最後便可獲的正確的胺基酸前後關係。以 HNCA 光譜為例（圖 2-1b），可以從此光譜得知 $\text{C}_{\alpha(i)}$ 及 $\text{C}_{\alpha(i-1)}$ 的化學位移，而 $\text{N}^{\text{H}}_{(i)}$ 的 $\text{C}_{\alpha(i)}$ 為下一顆胺基酸的 $\text{C}_{\alpha(i+1)-1}$ ，藉此互相交叉比對後便可排列出正確的胺基酸序列，除此之外，也會利用有特殊化學位移的胺基酸來幫助循序判定的進行，Glycine 由於沒有側鏈，因此不會有 $\text{C}_{\beta(i)}$ 的化學位移，而 Alanine 的 $\text{C}_{\beta(i)}$ 化學位移較小，大約只有 19 ppm 左右，Serine 以及 Threonine 的 $\text{C}_{\beta(i)}$ 化學位移則偏大，大約是 60-70 ppm 左右。

2.2.7.4 核磁共振滴定實驗 (NMR titration)

將所有蛋白樣品事先置換至 NMR buffer (50mM NaPi, 2mM β -Me, pH 6.5)，並將樣品依照實驗所需濃度混合，以 2.2.7.2 之方式進行製備，將未標定的受質加入已標定的蛋白酶中，或將未標定的蛋白酶加入已標定的受質中，將實驗溫度由 305K 加熱至 328K 或 333K，再將溫度降回 305K，觀察核磁共振光譜的化學位移改變，藉此探討彼此間的交互作用。



2.2.7.5 核磁共振樣品之分析

將做完核磁共振實驗之樣品由 NMR 試管中吸出，將樣品體積補至 500 μl 並離心，以事先用 buffer (50 mM NaPi, 2 mM β -Me, pH 6.5) 平衡好的 Superdex 200 10 300 GL (GE Healthcare) 管柱分析，最後以 12% SDS-PAGE 進行跑膠確認。

2.2.7.6 用核磁共振計算結構正確之 Ig2D5

將加熱前後的 305K $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY-HSQC 光譜進行比較，以訊號峰之強度 (intensity) 計算加熱前後結構摺疊依然正確之 Ig2D5。以加熱前之 305K 光譜為參考光譜 (reference spectra)，挑選所有交叉峰，和加熱後之 305K 光譜重疊後，扣除會和因加熱而聚集於 7.5-8.5 ppm 所產生之訊後峰重疊的訊號 (附錄三)，計算所選定之訊號峰加熱前後光譜訊號的強度，以加熱前之 305K 光譜訊號強度為分母，加熱後之 305K 光譜訊號強度為分子，藉此計算加熱後仍折疊完好 (fold well) 之 Ig2D5 的比例。



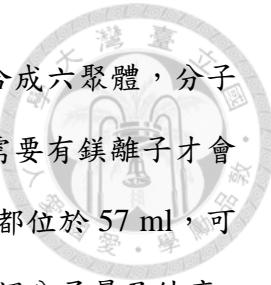
三、 實驗結果

3.1 重組蛋白的表現及純化

3.1.1 LonA 的表現及純化

pET21a(+)-MtaLonA 質體由中研院張崇毅老師實驗室建構並提供，將台灣本土嗜熱菌 *Meiothermus taiwanensis* 之 LonA 基因克隆入 C 端帶有 6xHis-tag 的 pET21a(+) 質體中，再將質體轉型 (transform) 至大腸桿菌菌株 BL21 (DE3) 中，並進行大量表現，產生帶有 793 個胺基酸的 LonA 蛋白，分子量約為 89 kDa，此蛋白的結構包含 N 端功能區、ATPase 功能區 (domain) 以及蛋白酶功能區 (protease domain) (圖 3-1a)。以均質機將細胞打碎後，所得到的粗萃取液以固定化金屬離子親合層析法 (immobilized-metal affinity chromatography, IMAC) 進行純化，由於蛋白質的 C 端帶有 6xHis-tag，因此能與鎳離子親合管柱結合，經過 10 mM 及 20 mM 的 imidazole 沖提下可將大部分非專一性結合蛋白質去除 (圖 3-1b, c)，目標蛋白 LonA 則主要在 400 mM 的 imidazole 被沖提出來。由於 LonA 會和 DNA 結合，因此接著在純化後的樣品中加入 DNase，並放置於 4°C 至隔天 (overnight)，將和蛋白結合的 DNA 切斷，以利於蛋白質的取得。

為了提高樣品純度與取得構型 (conformation) 正確之蛋白，使用離子交換層析法 (ion exchange chromatography) 進行進一步純化將 DNA 與 LonA 分離，利用陰離子交換樹脂 Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare) 分析，陰離子交換樹脂會和帶有負電的物質結合，藉由將氯化鈉 (NaCl) 濃度提高的方式逐漸將帶負電的分子沖提出管柱，由於 DNA 帶有較多的負電，因此會在最後被沖提出來，而 LonA 會在較低的氯化鈉濃度被沖提出管柱，藉此將兩者進行分離，在氯化鈉濃度約 0.2-0.4 M 時有較明顯的 UV280 吸收波峰 (圖 3-2)，也就是 LonA 主要被沖提出來的部分，以 12% SDS-PAGE 確認目標蛋白的分布，接著收取 43-50 ml 的部分 (fraction)，並濃縮蛋白液之體積至約 5 ml 左右，以分子篩層析法 (size exclusion chromatography) 進行純化，經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) 分析後，於 57 ml



處有主要的 UV280 之吸收波峰（圖 3-3），雖然 LonA 會彼此聚合成六聚體，分子量大約為 540 kDa，和此出現位子相符，然而根據先前研究發現需要有鎂離子才會形成六聚體，而不管有無加入鎂離子 LonA 被沖提出的位子大約都位於 57 ml，可能因為 LonA 也會形成其他多聚體的構型，再以 12% SDS 跑膠確認分子量及純度，收取 52-67 ml 進行後續實驗。

3.1.2 NN206 的表現及純化

pET28a(+)tev-NN206 質體亦是由中研院張崇毅老師實驗室建構並提供，將 NN206 基因克隆入 N 端帶有 6xHis-tag 的 pET28a(+)tev 質體中，NN206 是只保留 LonA N 端功能區的重組蛋白（圖 3-4a），只有 WT LonA 的第 1-206 個胺基酸，分子量約為 24 kDa，以均質機將細胞打碎後，所得到的粗萃取液以固定化金屬離子親合層析法進行純化，經過 10 mM 的 imidazole 沖提，可將大部分非專一性結合蛋白質去除（圖 3-4b, c），在 20 及 30 mM imidazole 有少許的 NN206 沖提出來，而 NN206 主要會在 400 mM 的 imidazole 中被沖提出來。在純化出來的蛋白液中加入 Tobacco Etch Virus (TEV) 蛋白酶 (protease)，並放置於 4°C 至隔天，由於所生成之重組蛋白帶有 TEV 蛋白酶辨識位 (recognition site): Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly (圖 3-4a)，TEV 蛋白酶會在 Gln 和 Gly 之間進行剪接，使得 6xHis-tag 被去除，接著再同樣以親和性管柱進行純化，將沒有 6xHis-tag 的 NN206 和 TEV protease 及 6xHis-tag 未被切除的蛋白質分離，沒有 6xHis-tag 的 NN206 因為不會和管柱中的鎳離子結合因此會直接流出（圖 3-4d, e），以 binding buffer 及 10 mM imidazole 沖提也會使沒有 6xHis-tag 的 NN206 被洗下來，而從 SDS-PAGE 上可以清楚看到沒有 6xHis-tag 的 NN206 組別確實分子量比有 6xHis-tag 的 NN206 小，表示 6xHis-tag 確實有被切斷。

以分子篩層析法進行進一步純化，經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 分析後，於 92 ml 處有主要的 UV280 之吸收波峰（圖 3-5），和標準品進行比較後，發



現出現在此部分的蛋白分子量介於 17-44 kDa，而經過 12% SDS-PAGE 確認分子量大約為 24 kDa，因此 NN206 主要以單體 (monomer) 的形式存在環境中，收取 85-102 ml 進行後續實驗。

3.1.3 Ig2 的表現及純化

pET28a(+)tev-Ig2 質體亦是由中研院張崇毅老師實驗室建構並提供，將其基因克隆入 N 端帶有 6xHis-tag 的 pET28a(+)tev 中，Ig2 是盤基網柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 中凝膠因子 (gelation factor) ABP-120 的第 5 個和第 6 個功能區，含有 ABP-120 的第 644-857 個胺基酸 (圖 3-6a)，分子量約為 30 kDa，以均質機將細胞打碎後，所得到的粗萃取液以固定化金屬離子親合層析法進行純化，經過 10 mM imidazole 沖提，可將大部分非專一性結合蛋白質去除 (圖 3-6b, c)，在 20 及 30 mM imidazole 有少許的 Ig2 被沖提出來，但 Ig2 主要在 400 mM 的 imidazole 中被沖提出來。在純化出來的蛋白液中加入 TEV 蛋白酶，並放置於 4°C 至隔天去除 6xHis-tag，接著再同樣以親和性管柱進行純化，將沒有 6xHis-tag 的 Ig2 和 TEV protease 及 6xHis-tag 未被切除的蛋白質分離，沒有 6xHis-tag 的 Ig2 因為不會和管柱中的鎳離子結合因此會直接流出 (圖 3-6d, e)；沒有 6xHis-tag 的 Ig2 也會被 10 mM imidazole 沖提下來，而從 SDS-PAGE 上可以清楚看到沒有 6xHis-tag 的 Ig2 組別確實分子量比有 6xHis-tag 的 Ig2 小，表示 6xHis-tag 確實有被切斷。

以分子篩層析法進行進一步純化，經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 分析後，於 77 ml 處有主要的 UV280 之吸收波峰 (圖 3-7)，和標準品進行比較後，出現在此部分的蛋白質分子量介於 44-158 kDa，由於 ABP-120 會形成二聚體 (dimer)⁴⁰，因此主要波峰位於 76 ml 處可以推測 Ig2 確實會形成二聚體，再以 12% SDS 跑膠確認分子量及純度，收取 72-84 ml 進行實驗。



3.2 蛋白質折疊轉變溫度中點的測定

由於 LonA 在 55°C 將 Ig2 降解的效果較好¹⁰，因此後續實驗需要在 55°C 的溫度下進行，所以必須先測定蛋白質在高溫環境下的穩定程度。以 SYBRO orange dye 進行蛋白質折疊轉變溫度中點 (the midpoint temperature of transition, Tm) 的測定，隨著溫度上升，蛋白質的結構逐漸變得不穩定，使得原本被包覆在蛋白質內部的疏水性 (hydrophobic) 區域曝露到環境中，而 dye 會和這些疏水性區域結合，隨著溫度越來越高，蛋白展開 (unfold) 的區域增加，螢光訊號便會逐漸增強，藉此來測定蛋白質的 Tm，而到達最大值後，螢光的訊號會因為變性的 (denatured) 蛋白質染料複合體形成聚合 (aggregation) 而下降。

經過測定後，LonA 的 Tm 為 68°C，由於此蛋白是 *Meiothermus taiwanensis* 的蛋白，所以有較高的 Tm 十分合理，而 NN206 的 Tm 則為 85.5°C (圖 3-8a)，因此加熱到 55°C 的溫度時，LonA 及 NN206 都還可以維持結構和功能。而受質 Ig2 的 Tm 為 46°C (圖 3-8b)，因此當溫度升溫至 55°C 以上 Ig2 會呈現部分展開 (partially unfolded) 的狀態，原本被包覆在蛋白內部的疏水區域便可以裸露至環境中，因此在實驗中能以加熱的方式將 Ig2 的結構展開，藉此探討 LonA 的 N 端對於受質的辨識。

3.3 LonA 的 N 端功能區與 Ig2 之交互作用

3.3.1 WT LonA 與 NN206 之二維 TROSY-HSQC 光譜比較

二維 ^1H - ^{15}N TROSY-heteronuclear single quantum correlation (HSQC) 光譜中的每個交叉峰 (cross peak) 為蛋白質骨架上殘基 (residue) 的 ^1H - ^{15}N 化學位移，由於每個殘基所處的化學環境並不相同，因此會有不同的化學位移，藉由觀察光譜中化學位移的狀況可以知道蛋白質是否有好的構型 (well-structure)。

WT LonA 共有 793 個胺基酸，然而於 328K 的 ^{15}N - ^1H TROSY-HSQC 光譜中 (圖 3-9)，WT LonA (藍色) 只有約兩百多個較清楚的交叉峰訊號，並沒有 793 個交叉



峰，在光譜上出現的訊號峰是 WT LonA 結構中比較動態的 (flexible) 區域，而這些訊號峰和 NN206 的訊號峰（桃紅色）有許多重疊 (overlap)，和 WT LonA 交叉峰相比，NN206 的交叉峰並沒有太多明顯的化學位移改變，表示單獨純化出來的 LonA N 端功能區是保有和原本相似的結構，並不會因為沒有 ATPase 功能區和蛋白酶功能區而產生太大的變化，因此 N 端功能區對於整個 LonA 的結構而言是屬於較獨立 (independently) 且較動態的區域。除此之外，NN206 光譜的交叉峰分布均勻且清楚 (well disperse)，表示在這樣的緩衝溶液條件下 NN206 有好的構型，而 WT LonA 的交叉峰在氫 (^1H) 的化學位移 7.5-8.5 ppm 的部分有許多交叉峰重疊，是 WT LonA ATPase 功能區及蛋白酶功能區聚合的多聚體中沒有結構且較為動態區域所產生的訊號，這些重疊會造成後續實驗的探討上有所困難，因此本實驗主要以 NN206 來探討 WT LonA 的 N 端功能區對於受質結合所扮演的重要性。

3.3.2 NN206 骨架的循序判定 (Sequence specific assignment)

為了要能夠清楚的判定 NN206 中會和受質作用的胺基酸，必須要知道光譜中每一個交叉峰所表示的胺基酸才能得知足夠的資訊，因此首先要完成循序判定。循序判定主要是想取得蛋白質各胺基酸的化學位移，並且標明出核磁共振光譜中每個交叉峰所表示之胺基酸，利用二維的 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC，以及三維的 HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、HN(CO)CACB、HN(CA)CO 以及 HNCO 光譜進行骨架 (backbone) 的序列循序判定。

藉由不同實驗取得的資訊並借助軟體的幫助，將所記錄的化學位移進行連結，例如：由 HNCA 光譜得知 $\text{C}_{\alpha(i)}$ 及 $\text{C}_{\alpha(i-1)}$ 的化學位移 (圖 3-10a)，而從 HNCACB 光譜得知 $\text{C}_{\alpha(i)}$ 、 $\text{C}_{\alpha(i-1)}$ 、 $\text{C}_{\beta(i)}$ 及 $\text{C}_{\beta(i-1)}$ 的化學位移 (圖 3-10b)。NN206 的胺基酸組成列於表 3-2，共有 206 個胺基酸，序列循序判定的結果如圖 3-11，大部分的交叉峰已判定其所屬胺基酸，其中 NN206 有 12 個 proline (Pro, P)，此胺基酸由於骨架上沒有氫原子，所以在 TROSY-HSQC 光譜中不會有其交叉峰的存在，不包含 Pro 在



內，我們完成了約 95%的胺基酸序列循序判定，有 7 個胺基酸：R11、G26、R27、A28、K29、R146 及 S156 沒有在光譜中成功被找到或是辨認（圖 3-12）。除了上述光譜，我們也以 ^{15}N -lysine 標定的 NN206 (^{15}N -lysine selectively labeled NN206)（圖 3-13a）及 ^{14}N -arginine 反標定的 NN206 (^{14}N -arginine selectively reverse labeled NN206)（圖 3-13b）幫助序列循序判定的進行及提高結果的可信度。 ^{15}N -lysine 標定的 NN206 只將樣品的 Lysine (Lys) 進行標定，NN206 共有 10 個 Lys，而於光譜中可以看到 9 個明顯的訊號峰（紅色）（圖 3-13a），這些交叉峰分別為：K31、K72、K129、K134、K140、K153、K176、K190 及 K191，剩餘第 10 個 K 可能和其他 K 的訊號重疊，需要更進一步地確認，因此於光譜中僅能看見 9 個訊號。 ^{14}N -arginine 反標定的 NN206 則是在養菌過程中除了 ^{15}N 以外也加入一般的 ^{14}N -arginine (Arg)，藉此產生 Arg 沒有被標定的蛋白，而由於 Arg 沒有被標定，所以無法被核磁共振儀偵測到其訊號，因而不會在核磁共振光譜中出現 Arg 殘基的化學位移，NN206 共有 17 個 Arg，目前僅能判斷出 12 個 Arg：R2、R32、R42、R76、R89、R91、R104、R106、R122、R143、R188 及 R198，然而此結果還需再繼續進行。

3.3.3 NN206 與受損的受質 (damaged substrate) 之交互作用

先前的研究已知 LonA 和 Ig2 之間存在交互作用的關係¹⁰，而本實驗想藉由核磁共振實驗進一步探討 LonA 之 N 端功能區和 Ig2 間的交互作用。Ig2 是盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 的第 5 個和第 6 個功能區，有和免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 相似的構型主要由 β 折疊組成，先前的研究已發現 Ig2 是能被 MtaLonA 降解的受質之一¹⁰。為了探討 NN206 和 Ig2 之間的交互作用，利用未標定同位素的 Ig2 加入 ^{15}N 標定的 NN206 當中，觀察二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜上的交叉峰，此光譜除了告訴我們蛋白質在各環境條件下的結構基本資訊外，也能提供蛋白質與受質間交互作用的訊息，若兩者之間有交互作用，會造成 NN206 的結構有所變化，進而改變殘基的化學環境，使得殘基的化學位移有所擾動 (perturbation)，或



是造成交叉峰的訊號強度減弱或消失 (line broadening effect)，因此藉由比較加入受質前後 NN206 的化學位移來進行觀察彼此間的作用。

將 $600 \mu\text{M}$ Ig2 加入 $300 \mu\text{M}^{15}\text{N}$ 標定的 NN206 中，我們首先紀錄 (record) 305K 時的光譜，接著將溫度提高至 328K 並記錄，最後再將溫度降回 305K，在加熱的過程中，Ig2 的結構會因為溫度的變化逐漸展開 (unfold)，將原本被包覆在內的氨基酸裸露至環境中，而 NN206 則不會受到影響，因此可以觀察到加入 Ig2 後 NN206 發生的變化。在最一開始 305K 時 (圖 3-14a)，加入了 Ig2 的組別 (橘色) 和只有 ^{15}N NN206 的組別 (黑色) 兩者交叉峰的訊號只有微弱的化學位移改變，其中有 4 個胺基酸 (R11、V23、G26 及 L77) 有化學位移的變化，也就是 NN206 的結構在這樣的狀況下並沒有太大的改變，然而將溫度提高至 328K 時 (圖 3-14b)，加入了 Ig2 的組別 (紅色) 和只有 ^{15}N NN206 的組別 (灰色) 相比產生了很大的化學位移變化，有許多的訊號消失是因為中間過度的交換狀態 (intermediate exchange)，也就表示在這個時候 NN206 和因為溫度升高而結構展開的 Ig2 之間有顯著的交互作用，因而使得 NN206 的化學位移有所改變，最後再將溫度降回 305K (圖 3-14c)，加入了 Ig2 的組別 (桃紅色) 和只有 ^{15}N NN206 的組別 (綠色) 相比化學位移有明顯的改變，甚至有許多交叉峰的訊號消失在光譜中，這可能是因為 NN206 和 Ig2 之間有交互作用而結合在一起，形成分子量很大的複合體，而分子量較大的蛋白在溶液中翻滾 (tumbling) 較慢，使得弛滯速度 (relaxation rate) 增加，造成訊號的展寬 (peak broadening)，因此無法在光譜中看見交叉峰，而 NN206 本身在加熱前後並沒有明顯的化學位移擾動 (圖 3-14d)，因此加入了 Ig2 的光譜中所造成 NN206 的化學位移改變確實是因為 Ig2 所引起，而非 NN206 本身因為加熱所產生結構上的變化。

接著利用分子篩層析法，以 superdex 200 10 300 GL 的管柱將做完核磁共振實驗之樣品取出進行更進一步的分析，可以在結果中 (圖 3-15a) 看到於 9.2、13.4 及 15.83 ml 處有明顯的三個 UV280 吸收波峰 (分別以波峰 1、波峰 2 及波峰 3 代表)，



而和單純只有 NN206 或 Ig2 的結果 (圖 3-15b, c) 相比，可以推測位於 15.83 ml 處的波峰 3 屬於 NN206，而 13.4 ml 的波峰 2 則為 Ig2，將三個結果疊合 (圖 3-15d) 也可以發現 Ig2 (橘色) 和 13.4 ml 的藍色波峰完美重合，而 NN206 (綠色) 則和藍色波峰 15.83 ml 重疊，經過 12% SDS-PAGE 分析後 (圖 3-15f)，也確定圖 3-15a 中波峰 2 為 Ig2，而波峰 3 是 NN206，從 SDS-PAGE 中也可以明顯看到波峰 1 的分子量和 Ig2 相同，因此推測其為結構展開或聚集的 (aggregate) Ig2，然而位於 9.5 ml 處被洗脫 (elute) 下來的分子分子量十分巨大，約為 500-600 kDa，將波峰 1 的蛋白收集再以 Superdex 200 10 300 GL 的管柱分析一次，其依舊會在 9.5 ml 處被洗脫出來 (圖 3-15e)，因此可以推測在加熱完之後 Ig2 結構可能會展開或是聚合成較大的分子，而這些聚合的 Ig2 和 NN206 在核磁共振實驗中 (圖 3-14) 結合在一起，使的整體分子量變大，因此造成訊號的展寬，所以光譜上的交叉峰便消失不見。而在 WT LonA 中加入 Ig2 也可以發現相似的結果 (圖 3-16)，在加入 Ig2 後，LonA 的核磁共振光譜中許多交叉峰也消失不見，也就是 Ig2 和 LonA 之間也有交互作用，使的整體分子量變大，因此訊號展寬，造成光譜上的交叉峰消失不見。

利用循序判定的結果在核磁共振光譜中標定出加入 Ig2 後有化學位移的殘基 (圖 3-17a, b)，由於將溫度由 328K 降回 305K 後許多交叉峰會消失，因此無法判斷哪些殘基會和 Ig2 之間的結合相關，因此以 328K 的光譜進行分析。在 328K 的環境下，加入了 Ig2 以後，NN206 的 L5、V7、I8、L10、N12、T13、I15、L16、H18、T19、V23、D24、V25、S30、K31、R32、A33、I44、F45、L46、A48、Q49、E53、V54、D55、A58、G66、V67、Q68、A69、V71、K72、Q73、T81、L82、Q83、V84、M85、V86、E87、R89、R91、L103、T172、K176、I179、L189 及 D199 所代表的訊號峰都有明顯的化學位移或訊號的消失，也就是 NN206 在加入 Ig2 後，會和 Ig2 之間形成交互作用，因此造成結構上有所變化，而且大部分有化學位移的殘基位於 NN206 的 N 端子功能區 (subdomain) (圖 3-17c)，也就是 NN206 主要以 N 端子功能區和 Ig2 產生交互作用。



3.4 LonA 的 N 端與 Ig2D5 之交互作用

由於 NN206 於核磁共振光譜的許多交叉峰在加入了 Ig2 以後會展寬而消失 (圖 3-14)，使得有交互作用的位點被遮蔽而無法進一步的探討到底是以哪些殘基和 Ig2 之間進行交互作用，為了解決這個問題，我們嘗試以其他方式進行實驗。盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 會形成二聚體 (dimer)⁴⁰，而其中第 6 個功能區是彼此間形成二聚體的交界面 (interface) (圖 3-18)，相對於這個區域，第 5 個區域較為簡單，因此嘗試以盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 的第 5 個功能區 (Ig2D5) 來進行實驗，探討 NN206 與受質的交互作用。

3.4.1 Ig2D5 的表現及純化

pET28a(+)tev-Ig2D5 是盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 的第 5 個功能區，含有 ABP-120 的第 644-750 個胺基酸 (圖 3-19a)，分子量約為 13 kDa，其純化結果如圖 3-19。

以分子篩層析法進行進一步純化，經過 HiLoad 16/600 Superdex 75 pg 分析後，於 72 ml 處有主要的 UV280 之吸收波峰 (圖 3-20)，和標準品進行比較後，出現在此部分的蛋白質分子量介於 13.7-29 kDa，雖然 ABP-120 主要在第 6 個功能區的部分形成二聚體⁴⁰，然而第 5 個功能區對於二聚體的形成也有所貢獻，因此主要波峰位於 72 ml 處可以推測 Ig2D5 可能也會形成二聚體，再以 15% SDS 跑膠確認分子量及純度，收取 66-82 ml 進行實驗。

3.4.2 Ig2 與 Ig2D5 之比較

首先，從 Ig2 及 Ig2D5 的核磁共振光譜來看 (圖 3-21)，只有 107 個胺基酸的 Ig2D5 (紅色) 和有 214 個胺基酸的 Ig2 (灰色) 相比，Ig2D5 的化學位移相對較簡單，且交叉峰也較為清楚，在 7.5-8.5 ppm 的部分也不會出現沒有結構且較為動態區域所產生的訊號，因此相對而言，Ig2D5 較為簡單且利於實驗後續觀察。由於核



磁共振實驗會於 55°C 以上的溫度進行，因此也測定了 Ig2D5 的 Tm (圖 3-22)，Ig2D5 的 Tm 值為 46.5°C，和 Ig2 並無太大差異，因此當溫度升溫至 55°C 以上時，Ig2D5 也會呈現部分展開 (partially unfolded) 的狀態，原本包覆在蛋白內部的疏水性區域會隨著溫度升高而暴露至環境中。

3.4.3 NN206 與 Ig2D5 之交互作用

將所得到的 Ig2D5 加入有 ^{15}N 標定的 NN206 中，觀察 Ig2D5 對於 NN206 的影響是否和 Ig2 有不同的現象，將 600 μM Ig2D5 加入 300 μM ^{15}N NN206 中，實驗溫度同樣由 305K 加熱到 328K 再降回 305K，加熱過後的 305K 核磁共振光譜中 (圖 3-23)，NN206 的光譜並不會像加入 Ig2 的光譜 (圖 3-14) 有許多交叉峰消失，因此便可以觀察 NN206 的哪些殘基可能和 Ig2D5 之間有交互作用的產生，使 NN206 的結構發生改變而造成化學位移的發生。在有 Ig2D5 的狀況下，NN206 的 I8、N12、T13、V14、L16、H18、T19、V23、D24、V25、G26、K29、S30、K31、A33、I44、L46、V47、E53、D55、K72、Q73、A74、L82、Q83、V84、M85、V86、E87、L103 及 F114 有較明顯的化學位移改變或是訊號減弱的現象，A48、Q68、V71 及 T164 有些微的化學位移變化，而從 NN206 的結構上來看 (圖 3-23c)，這些發生化學位移變化的胺基酸大多也都是位於 N 端子功能區，也就是 NN206 和 Ig2D5 產生交互作用之處主要也是其 N 端子功能區。

3.4.4 LonA N 端功能區對於 Ig2D5 再折疊 (refolding) 的影響

為了要探討 LonA 的 N 端功能區對於受質的影響，因此反過來將受質標定，並加入未標定同位素的 WT LonA 或 NN206，觀察受質的核磁共振光譜變化，將 50 μM WT LonA 及 NN206 滴定到 50 μM ^{15}N 標定的 Ig2D5 中，並將溫度由 305K 加熱到 333K 進行紀錄，在 333K 時 Ig2D5 有 90% 以上為展開的構型，再將溫度降回 305K，觀察 Ig2D5 核磁共振光譜的化學位移變化 (圖 3-24)。在只有 Ig2D5 的狀



況下（圖 3-24a-d），將溫度由 305K 提高到 333K 後，Ig2D5 的訊號（綠色）主要集中在 7.5-8.5 p.p.m.的區域，而在此區塊之外的訊號強度明顯減弱，說明了在 333K 的環境下 Ig2D5 會變性或是原本的結構被展開，使的整體結構變成沒有結構且較為動態的區域，然而將溫度降回 305K 時，雖然中間仍有一些重疊的訊號，但可以發現許多交叉峰恢復了，也就是說在降溫後，Ig2D5 可以再折疊（refold）回原來的構型，將加熱前後之 305K 光譜訊號強度以 2.2.7.6 節所述之方式計算後（圖 3-24m），有八成以上的 Ig2D5 經過加熱後依舊是有折疊的。加入了 WT LonA（藍色）或是 NN206（紅色）後（圖 3-26 e-l），將溫度由 333K 降溫回 305K 之後，Ig2D5 光譜中大部分在 7.5-8.5 p.p.m.區塊之外的交叉峰都不見了，無法恢復，也就是說由於 Ig2D5 和 WT LonA 及 NN206 之間有交互作用，使的 Ig2D5 被 WT LonA 或 NN206 結合，因此而無法再恢復原本的構型，造成光譜中的交叉峰訊號能顯消失，分別只有約 6% 及 13% 的 Ig2D5 經過加熱後依舊是折疊的，僅有 N 端功能區的 NN206 和 WT LonA 的組別有相似的結果，也就表示只要 N 端功能區就可以和 Ig2D5 結合，使得 Ig2D5 因為和 NN206 有交互作用而無法再折疊。

3.5 NN206 的疏水性胺基酸對於損壞的受質結合之重要性

3.5.1 NN206 的點突變（site directed mutagenesis）

根據 3.3.3 及 3.3.4 之實驗結果，由 NN206 加入受質後產生化學位移改變可知，NN206 與受質間確實有交互作用，而有化學位移改變的交叉峰則表示在和受質結合後，該殘基有結構上的變化因此造成這樣的移動，或是因為結合而造成交叉峰的消失，因此根據有化學位移變化之殘基，我們挑選了認為可能是結合位（binding site）之胺基酸進行突變，以核磁共振實驗探討是否突變後會對交互作用造成影響。由於 LonA 會辨認受質變性後所裸露出的疏水性區域，所以在策略上需要挑選較為疏水的胺基酸，且其胺基酸側鏈（side chain）需要暴露於外界環境中才能和受質之間進行交互作用，因此我們選擇位於 N 端功能區 β2 的 P22 及位於 β5 的 M85



進行突變 (圖 3-25)，這兩個位點是在有化學位移變動的區域中疏水性的胺基酸，而且側鏈是朝向外界環境而非蛋白內側，我們分別將 NN206^{P22AM85A}、NN206^{P22A} 及 NN206^{M85} 表現及純化，並進行核磁共振實驗探討對交互作用的影響。

3.5.2 NN206^{P22AM85A}、NN206^{P22A} 及 NN206^{M85} 的表現及純化

pET28a(+)tev-NN206^{P22AM85A} 質體是將 pET28a(+)tev-NN206 的第 22 個及第 85 個胺基酸由 proline 及 methionine 突變成 alanine 而成，而 pET28a(+)tev-NN206^{P22A} 及 pET28a(+)tev-NN206^{M85A} 質體則分別是將 pET28a(+)tev-NN206 的第 22 及 85 個胺基酸進行突變。將質體轉型至大腸桿菌菌株 BL21 中，並進行大量表現，純化結果如圖 3-26, 3-28 及 3-30，所得到的重組蛋白分子量和 NN206 並無太大差異。

以分子篩層析法進行進一步純化，經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 分析後，NN206^{P22AM85A} 於 93 ml 處有主要的 UV280 之吸收波峰 (圖 3-27)，和標準品進行比較後，得知出現在此部分的蛋白分子量介於 17-44 kDa，和 NN206 之分子篩層析法結果進行疊合後可以發現 NN206^{P22AM85A} (藍色) 和 NN206 (紅色) 的主要吸收波峰十分相近，兩者相差 1 ml 的偏移，也就是兩者在分子量大小或是構型上並無太大的變化，而經過 12% SDS-PAGE 確認分子量大約為 24 kDa，因此 NN206^{P22AM85A} 主要也是以單體的形式存在環境中，而 NN206^{P22A} 與 NN206^{M85A} 則於 92 ml 處有主要的 UV280 之吸收波峰 (圖 3-29, 3-31)，和 NN206 (紅色) 的主要吸收波峰十分相符，也就是兩者在分子量大小或是構型上並無太大的變化，而經過 12% SDS-PAGE 確認分子量大約為 24 kDa，因此 NN206^{P22A} 與 NN206^{M85A} 主要也是以單體的形式存在環境中，收取 85-102 ml 進行後續實驗。

3.5.3 NN206^{P22AM85A} 與 NN206 之核磁共振光譜比較

突變過後的 NN206^{P22AM85A} 在核磁共振實驗光譜的化學位移和 NN206 相比有些微的不同 (圖 3-32a)，I15、L16、H18、T21、V23、D24、V25、G26、S30、E35、



I44、L46、V67、V71、K72、Q73、R76、L77、L82、Q83、V84、V86、E87、A88

及 S141 這些殘基有較明顯的化學位移變化，從 NN206 的結構看來這些殘基主要集中在進行突變的位點附近（圖 3-32c），大致的結構並無太大變化。

3.5.4 NN206^{P22AM85A} 與 Ig2 之交互作用

利用未標定同位素的 Ig2 加入 ¹⁵N 標定的 NN206^{P22AM85A} 當中，觀察二維 ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC 光譜上交叉峰的改變，探討是否對 NN206 進行突變後會影響兩者間的交互作用。

將 600 μM Ig2 加入 300 μM ¹⁵N 標定的 NN206^{P22AM85A} 中，接著由 305K 開始進行實驗，再將溫度加熱至 328K，最後將溫度降回 305K。在最一開始 305K 時（圖 3-33），加入了 Ig2 的組別（橘色）和只有 ¹⁵N NN206^{P22AM85A} 的組別（黑色）兩者交叉峰的訊號並沒有什麼太大的化學位移改變，也就是 NN206^{P22AM85A} 的結構在這樣的狀況下並沒有什麼改變，然而將溫度提高至 328K 時，加入了 Ig2 的組別（紅色）和只有 ¹⁵N NN206^{P22AM85A} 的組別（灰色）相比有一些交叉峰發生了化學位移的改變，然而卻不會像加入了 Ig2 的 ¹⁵N NN206 光譜有很多交叉峰消失的中間過度交換狀態（圖 3-14），最後再將溫度降回 305K 時，加入了 Ig2 組別（桃紅色）的 ¹⁵N NN206^{P22AM85A} 光譜中有一些交叉峰也發生了化學位移的變化，但大多數的訊號都還在或只是訊號減弱，並沒有直接在光譜中消失，此為快速的交換狀態（fast exchange），顯示蛋白的交互作用因兩個點突變而減弱，而 NN206^{P22AM85A} 本身在加熱前後並沒有明顯的化學位移改變（圖 3-33d），因此加入了 Ig2 的光譜中所造成 NN206^{P22AM85A} 的化學位移改變仍是因為 Ig2 所引起，而非 NN206^{P22AM85A} 本身因為加熱所產生結構上的變化。

接著分析加入了 Ig2 後，將溫度由 328K 降回 305K 的狀況下，NN206^{P22AM85A} 到底有哪些殘基受到了影響（圖 3-34），E4、L5、T13、H18、D24、R27、S30、E53、K72、V84、V86 及 S197 有較明顯的化學位移變化，I15、T19、V25、K29、A33、



I44、Q49、V67 及 Q83 有些微的化學位移改變，而 L16、A48、Q68 及 R89 的訊號強度減弱，這些變動的殘基主要還是集中在 NN206 的 N 端子功能區中。

3.5.5 NN206^{P22AM85A} 對於 Ig2D5 再折疊的影響

將受質進行標定，加入未標定的 NN206^{P22AM85A}，觀察 NN206 進行突變後對 Ig2D5 的再折疊 (refold) 是否會產生影響。將 50uM NN206^{P22AM85A} 加入 50 μM ^{15}N Ig2D5 中，實驗溫度由 305K 加熱到 333K 在降溫回 305K，從光譜中清楚發現 Ig2D5 可以再折疊 (圖 3-35)，在加熱後的光譜中仍有許多交叉峰恢復，和加入 NN206 的組別 (紅色) 有明顯差異，而分別將 50、100、200、400 及 780 μM NN206^{P22AM85A} 加入 50 μM ^{15}N Ig2D5 中，觀察不同濃度的 NN206^{P22AM85A} 對於 Ig2D5 再折疊的影響，加入 50、100 及 200 μM 的 NN206^{P22AM85A} 後，Ig2D5 依舊有約八成是正常折疊的 (圖 3-36 a)，將 NN206^{P22AM85A} 濃度提高至 400 μM 約有 65% 的 Ig2D5 是有折疊的，將濃度再提高到 780 μM 也還是有 45% 的 Ig2D5 有正常構型，和 NN206 相比 (圖 3-24)，加入 50 μM 的 NN206 後因為兩者間有交互作用因此會造成 Ig2D5 許多的交叉峰消失，能再折疊的 Ig2D5 比例明顯較低，而 NN206^{P22AM85A} 可能因為和 Ig2D5 之間的交互作用減弱，使的 Ig2D5 可以再折疊，因此說明了 P22 及 M85 兩個位點在 NN206 和 Ig2D5 的結合中扮演了重要的角色。

為了再更進一步探討哪一個位點對於 NN206 與 Ig2D5 之間的結合較為重要，因此分別進行了 P22 及 M85 的點突變，將 100 或 400 μM 的 NN206^{P22A} 或 NN206^{M85A} 滴定到 50 μM ^{15}N Ig2D5 中，並且一樣以核磁共振光譜進行觀察 Ig2D5 的再折疊。分別加入 100 及 400 μM 的 NN206^{P22A} 後 (圖 3-36b)，由 305K 加熱至 333K 再降溫回 305K，約有 70% 及 50% 的 Ig2D5 是有折疊的，而加入 100 及 400 μM 的 NN206^{M85A} 後 (圖 3-36c)，約有 70% 及 60% 的 Ig2D5 是有折疊的，和 NN206^{P22AM85A} 的結果相比，僅突變單一位點造成 Ig2D5 再折疊的比例較少，然而卻還是比 NN206 的組別多出許多，表示 P22 和 M85 對於 Ig2D5 的結合都十分重要。



四、討論

在先前的研究中發現，LonA N 端功能區對於 Ig2 的降解扮演著重要角色（圖 1-2），也就是 N 端功能區對於因為變性或是損壞而造成原本被包覆在內的疏水性胺基酸暴露的受質有特殊的作用，然而對於無穩定構型蛋白質 (intrinsically disordered protein) α -casein，N 端功能區的有無似乎對於這種主要由帶電性或極性 (polar) 胺基酸所構成的受質降解影響較少（圖 4-1），而先前的研究也發現 LonA 傾向和有疏水性胺基酸的受質結合³，因此本實驗主要以核磁共振實驗探討 N 端功能區與 Ig2 的交互作用，並且以點突變的方式尋找可能的結合位，藉此了解 LonA 對於受質的辨識方式。

從核磁共振實驗中可以發現 MtaLonA N 端功能區的結構相對於整個 LonA 蛋白酶而言是較為獨立且在溶液中翻滾較快的區域（圖 3-9），而且 NN206 核磁共振光譜中的交叉峰和全長 MtaLonA 的十分相符，表示單獨純化 NN206 後其結構不會有太大的變化，即使沒有 ATPase 及蛋白酶功能區也能保有原本的結構，在先前張崇毅老師實驗室以 X-ray 結晶結構的方式得到 MtaLonA N 端功能區的結構，其結構與 EcLon N 端功能區結構相似（圖 4-2），然而 EcLon N 端功能區的 C 端子功能區有約 40 個胺基酸左右的 α 螺旋延伸²⁴，MtaLon 則是在 N 端功能區和 ATPase 及蛋白酶功能區間以 40 個胺基酸左右的接鏈 (linker) 連接，如此便說明了因為 N 端功能區和 ATPase 及蛋白酶功能區之間以一個約 40 個胺基酸左右的接鏈結合，使得 N 端功能區屬於結構中較獨立的部分，可以在環境中擺動，也因此在核磁共振實驗中有較好的訊號，可以獲得解析度較好的光譜進行序列的骨架循序判定，由多種光譜互相交叉比對後，我們完成了 NN206 約 95% 的判定，而尚未辨別的殘基仍須再進一步的確認及尋找。

在滴定實驗中可以明顯看到因為熱而部分未折疊的 Ig2 和 NN206 之間確實有中間過度交換狀態 (intermediate exchange) 的交互作用（圖 3-14），造成 NN206 的核磁共振光譜中許多交叉峰訊號消失，而且主要作用的殘基位於 NN206 的 N 端子



功能區，然而由於 Ig2 在加熱後結構會展開且會聚合成大分子，和 NN206 結合後形成十分巨大的聚體，使得核磁共振光譜中許多訊號消失，造成釐清兩者間交互作用位點的困難，因此我們嘗試以盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 的第 5 個功能區 (Ig2D5) 進行滴定實驗 (圖 3-23)，加入 Ig2D5 並加熱後，NN206 的交叉峰並沒有發生和加入 Ig2 的組別一樣有許多消失，可以清楚分辨有化學位移的位點，而有化學位移改變表示兩者之間有交互作用的產生，使得 NN206 發生結構上的變化，因而造成交叉峰的移動或消失，加入 Ig2D5 後，這些有化學位移改變的殘基主要也位於 NN206 的 N 端子功能區。除此之外，我們也反過來觀察 Ig2D5 的構型是否會受到 N 端功能區的影響 (圖 3-24)，在實驗中發現 Ig2D5 雖然在加熱後會變性，造成光譜的交叉峰主要聚集在 7.5-8.5 ppm 的區域，然而將溫度降回 305K 後，80% 的 Ig2D5 可以再折疊成原來的構型，而在加入 LonA 或 NN206 後，許多 Ig2D5 的交叉峰都無法恢復，只有約 13% Ig2D5 的構型有摺疊，這是因為 LonA 或 NN206 會和加熱後的 Ig2D5 產生交互作用，使得 Ig2D5 因為和 LonA 或 NN206 結合而無法再折疊，而只有 N 端功能區的 NN206 可以造成和 LonA 相似的現象，顯示 N 端功能區對於受質的結合十分重要。

根據核磁共振實驗的結果，我們從 NN206 發生化學位移改變的殘基中挑選可能的結合位 P22 及 M85 進行點突變，觀察是否突變過後 NN206 和受質間的交互作用會受到影響。不論是在 Ig2 或 Ig2D5 的滴定實驗中，都發現 $NN206^{P22AM85A}$ 產生化學位移變化的交叉峰變少了，而且在加入 Ig2 的組別中可以明顯看到許多交叉峰的訊號都還在為快速交換 (fast exchange) (圖 3-34)，說明了兩者間的交互作用由於點突變有減弱的現象，表示 P22 及 M85 兩個位點對於 Ig2 的結合仍扮演重要的角色。反過來觀察 Ig2D5 的再折疊，不論是 $NN206^{P22AM85A}$ 還是單一位點突變的 $NN206^{P22A}$ 及 $NN206^{M85A}$ ，都發現 Ig2D5 可以再折疊，即使將濃度提高至約 1:15，仍有四成以上的 Ig2D5 是有折疊的，而且加入 1:1、1:2 及 1:4 的 $NN206^{P22AM85A}$ 組別中，Ig2D5 折疊的比例和沒有加入 $NN206^{P22AM85A}$ 十分相近，都仍有約 80% 有



摺疊，表示 $NN206^{P22AM85A}$ 和 Ig2D5 之間的交互作用明顯減弱，因此根據 $NN206^{P22AM85A}$ 的化學位移變化以及 Ig2D5 的反滴定實驗，都說明了 $NN206$ 的 P22A 及 M85A 是參與 Ig2D5 結合的重要位點，而在加入只有單一突變 $NN206^{P22A}$ 或 $NN206^{M85A}$ 的組別中，Ig2D5 也能夠再折疊，表示這兩個位點對於 Ig2D5 的結合都扮演了重要的角色。

根據核磁共振實驗、點突變及先前的蛋白質結晶結構，MtaLonA 的 N 端功能區是由一段較動態的接鏈 (flexible linker) 與 ATPase 及蛋白酶功能區相連，N 端功能區可以獨立的在環境中擺動，並且可以和因為加熱而變性的 Ig2 及 Ig2D5 結合，而 N 端功能區中 N 端子功能區的 P22 及 M85 殘基對於受質的辨識及結合佔有重要的一席之地。而先前的研究發現 EcLon 的第 33-35 個殘基對於受質的辨識有所貢獻，對應到 MtaLonA 中是第 27-29 個殘基，是否在 MtaLonA 中這些胺基酸亦會對受質的結合產生影響仍需進一步的實驗釐清。

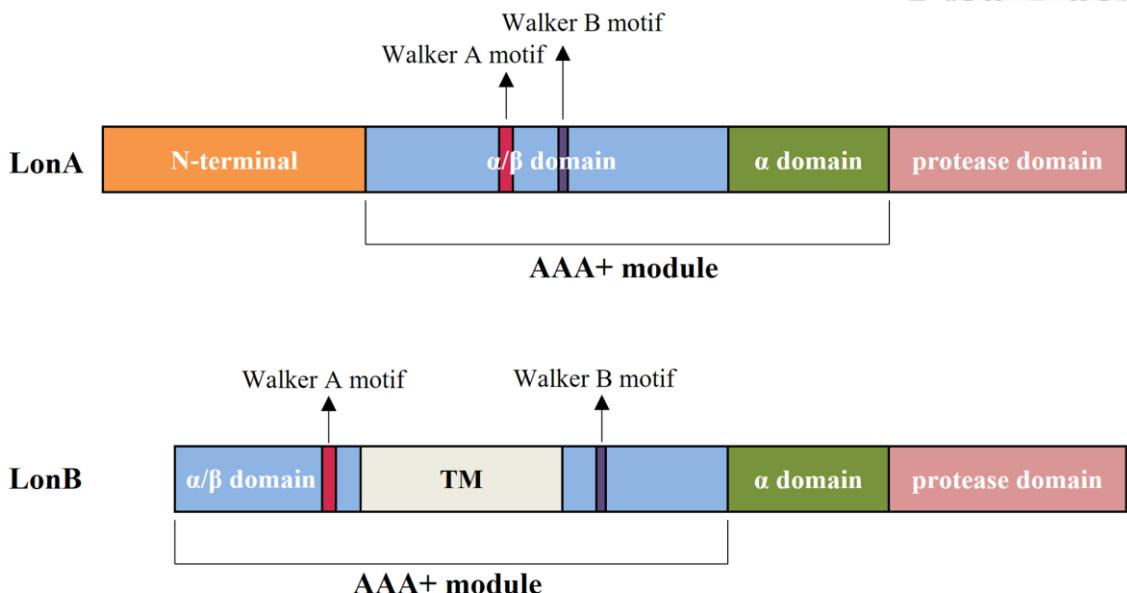
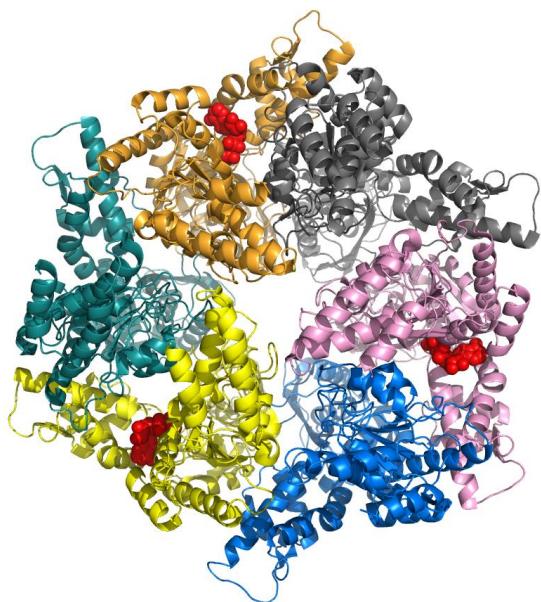


圖 1-1 LonA 與 LonB 的功能區組成

LonA 與 LonB 的功能區組成，LonA 包含 N 端功能區、ATPase 功能區（即 AAA+ 模組）及蛋白酶功能區，LonB 則只有 ATPase 功能區及蛋白酶功能區。



(a)



(b)

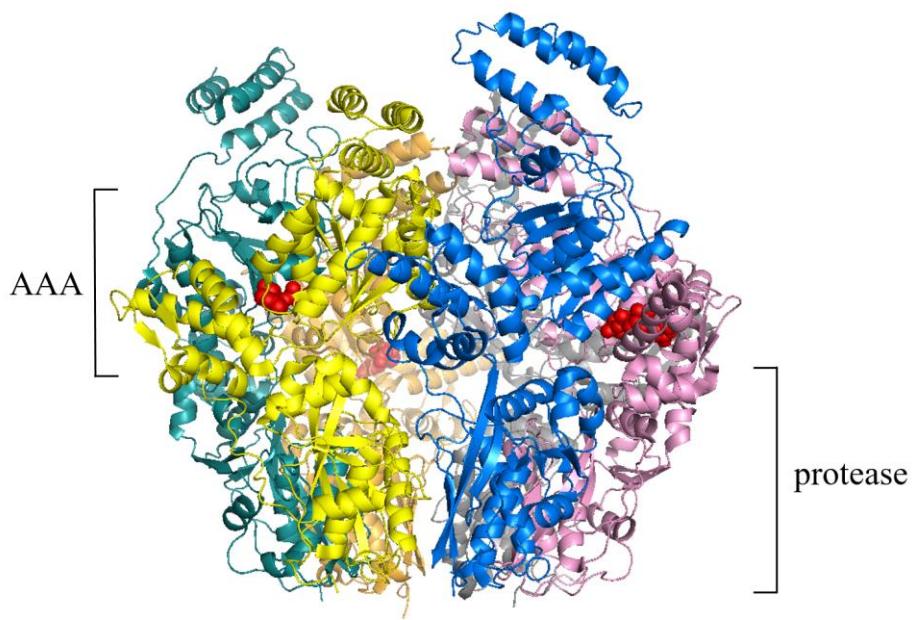


圖 1-2 台灣本土嗜熱菌 *Meiothermus taiwanensis* LonA

台灣本土嗜熱菌 *Meiothermus taiwanensis* 之 ATPase 功能區及蛋白酶功能區之結構 (PDB : 4YPL)³⁹。ADP：紅色球面區域。(a) 俯視圖 (top view)；(b) 側面圖 (side view)。

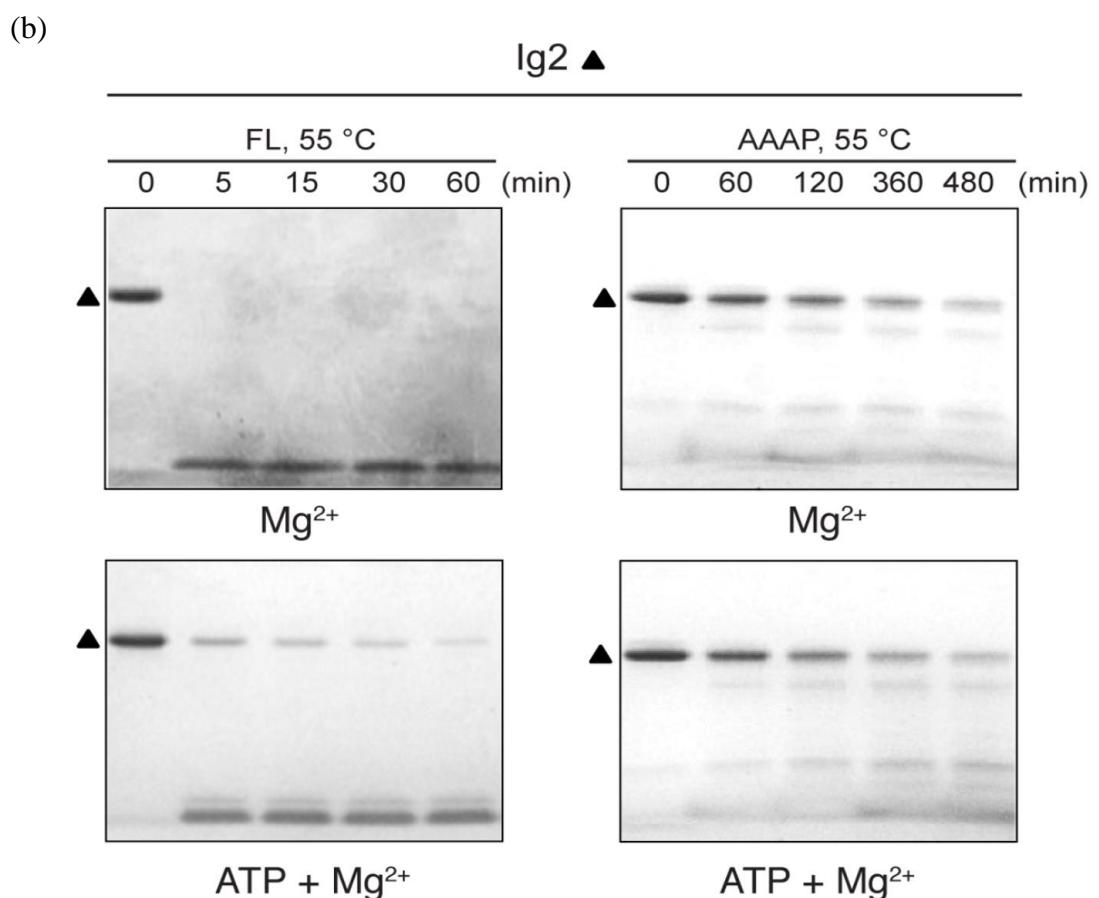
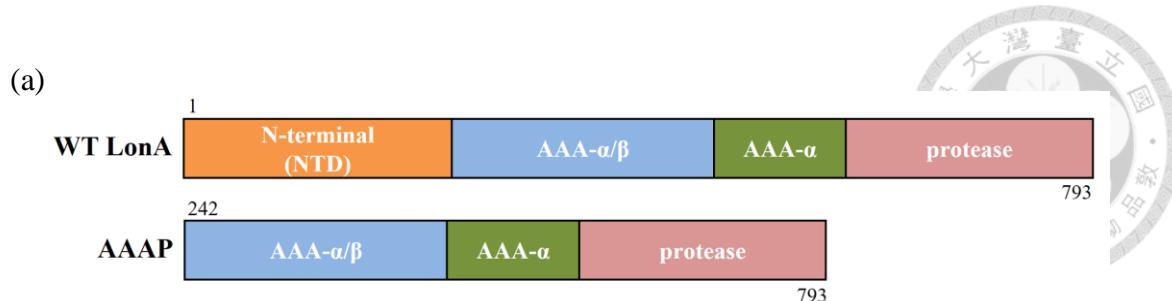


圖 1-3 N 端功能區對受質降解之重要性

(a) LonA 與 AAAP 的功能區組成。LonA 包含 N 端功能區、ATPase 功能區及蛋白酶功能區，AAAP 是將 LonA 之 N 端功能區去除所生成之蛋白。(b) LonA 與 AAAP 對 Ig2 之降解實驗 (degradation assay) (張崇毅老師實驗室，未發表)。FL：全長 LonA。

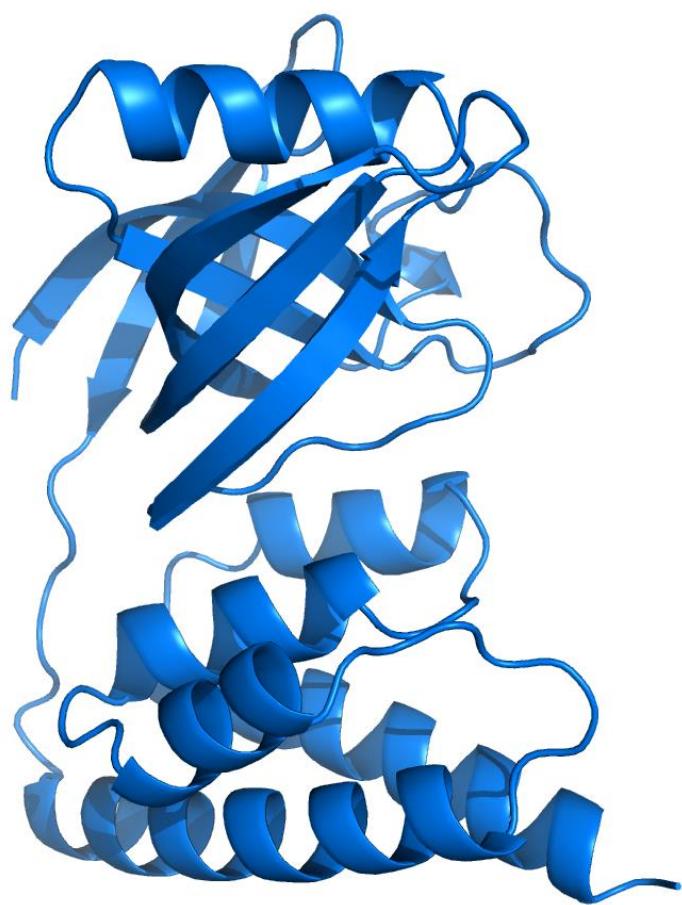


圖 1-4 LonA N 端功能區之結構

LonA N 端功能區 (NN206) 之結構 (張崇毅老師實驗室，未發表)。

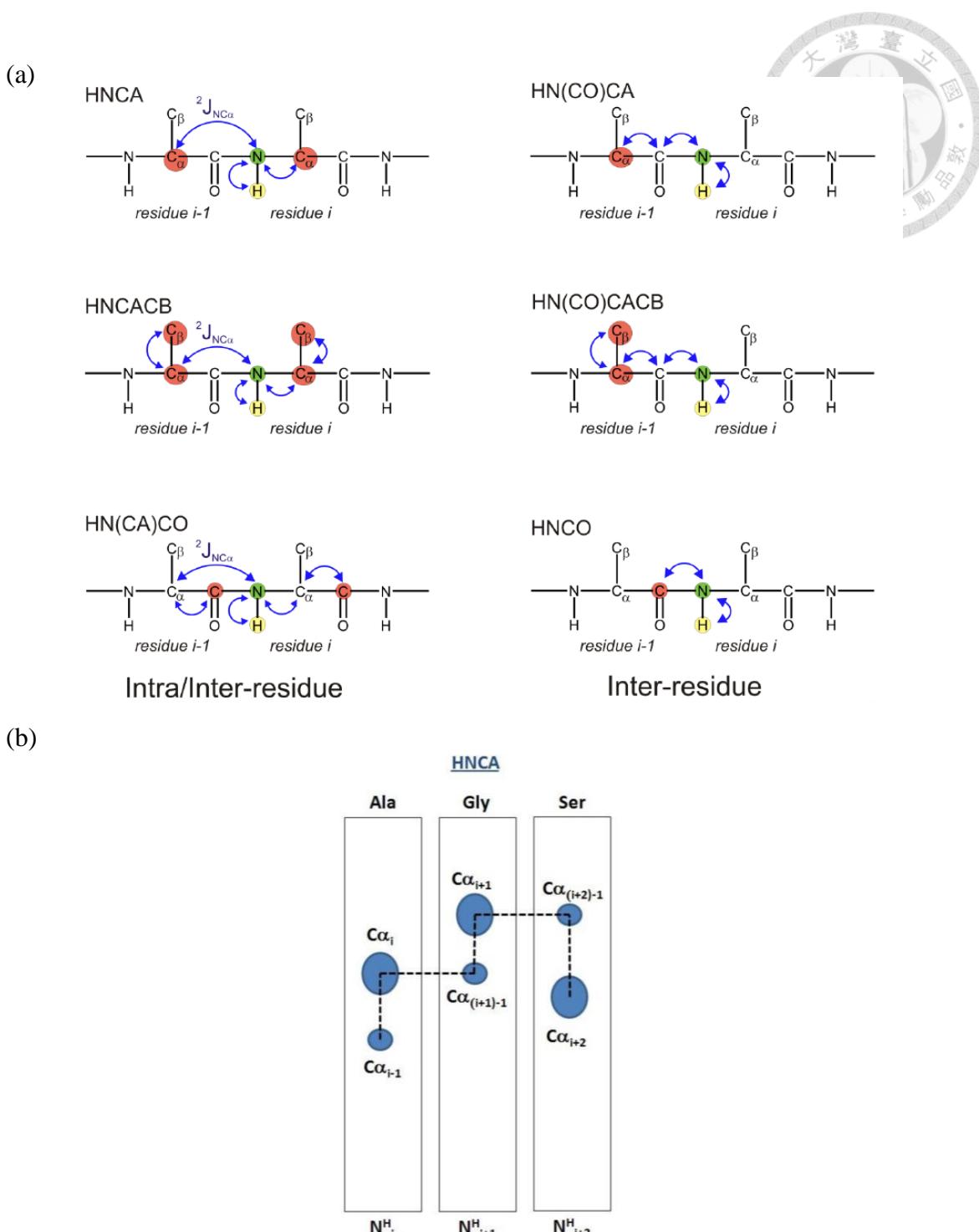


圖 2-1 核磁共振骨架的循序判定 (NMR backbone assignments)

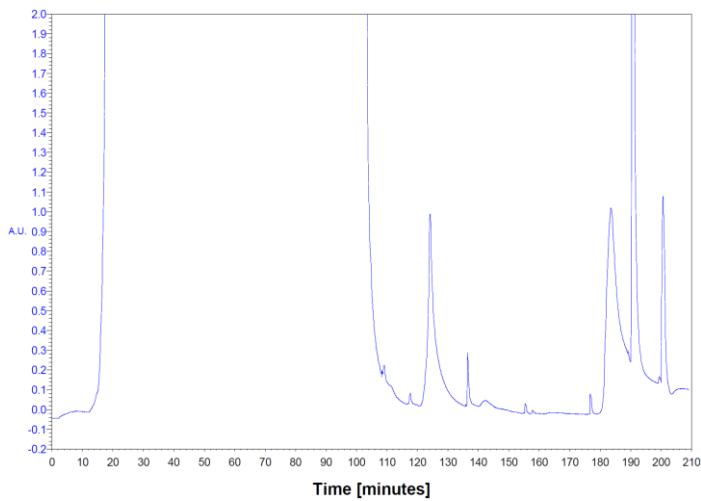
(a) 3D 的 HNCA、HN(CO)CA、HNCACB、HN(CO)CACB、HN(CA)CO 以及 HNCO 實驗之磁矩傳遞路徑示意圖⁴¹。藍色箭頭表示磁矩之傳遞。(b) HNCA 光譜示意圖⁴²。



(a)



(b)



(c)

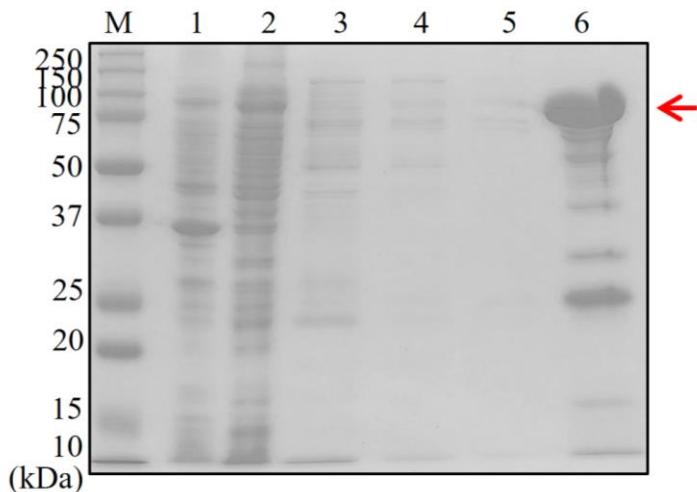
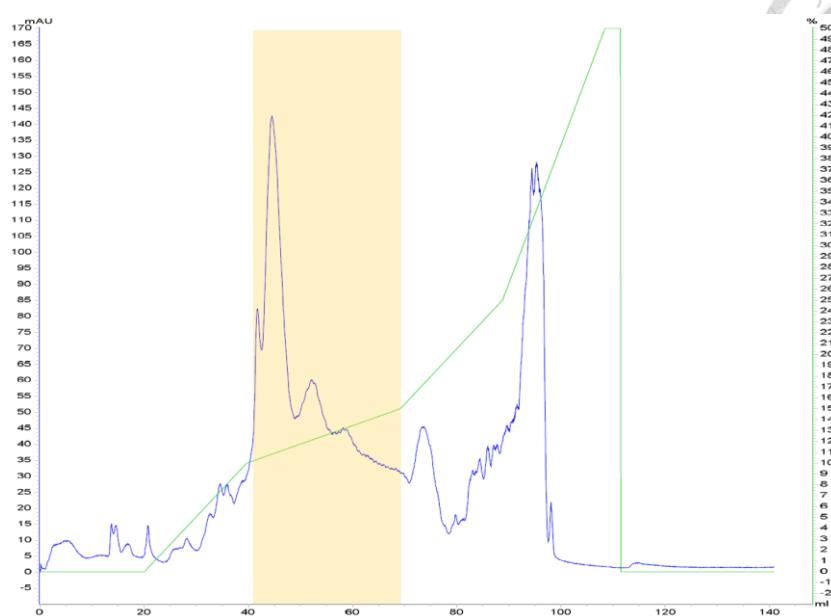


圖 3-1 WT LonA 的固定化金屬離子親合層析法純化

(a) WT LonA 之示意圖，此蛋白包含 N 端功能區、ATPase 功能區 (domain) 及蛋白酶功能區 (protease domain)，而 6xHis 接於蛋白之 C 端。(b) 純化之層析圖，橫軸表示時間，縱軸為 UV280 之吸光值。(c) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，WT LonA 分子量大小為 89 kDa (紅色箭頭)。M： marker；1：離心後之菌塊 (pellet)；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液 (flow through)；3：10 mM imidazole 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 之洗脫液 (elution buffer)。



(a)



(b)

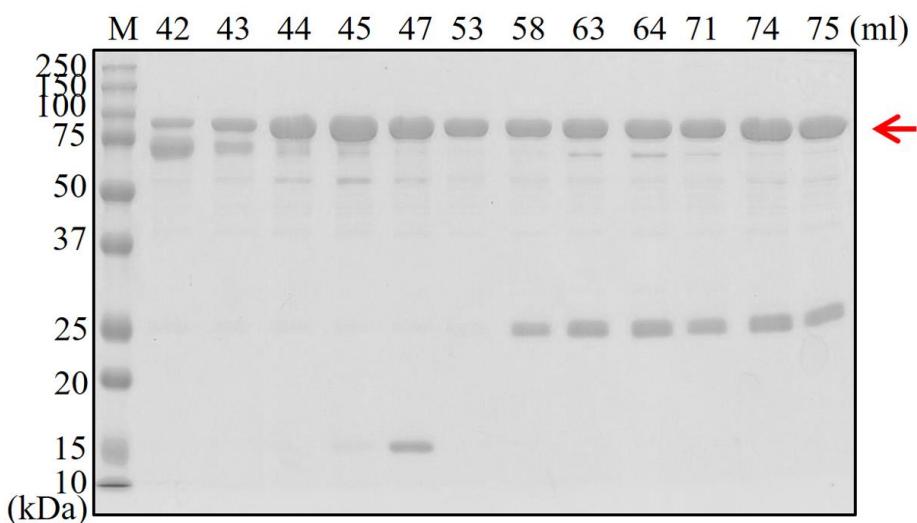
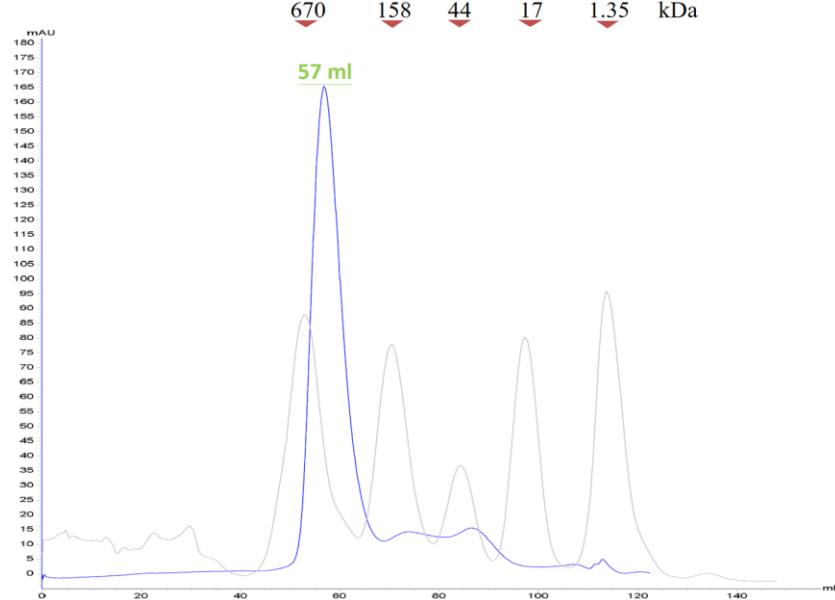


圖 3-2 WT LonA 之陰離子交換層析法

(a) WT LonA 經過陰離子樹脂交換管柱之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數 (mL) 表示，橘黃色方框處為 LonA 之沖提體積 (elution column)，左側縱軸為 UV280 之吸光值，右側縱軸為沖提液中 buffer B (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM β -Me, pH 8.0) 所佔的百分比。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，WT LonA 分子量大小為 89 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。



(a)



(b)

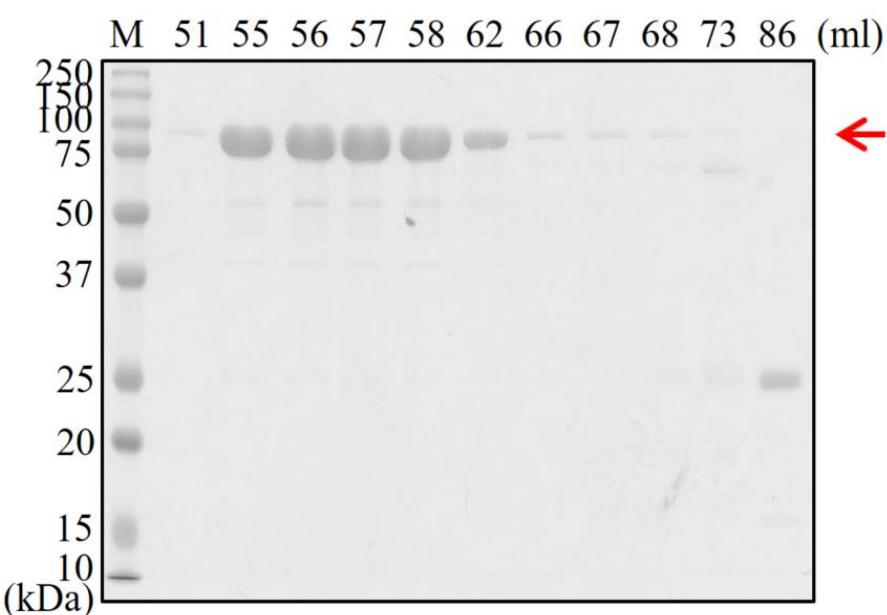


圖 3-3 WT LonA 之分子篩層析純化

(a) WT LonA 經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值，藍色曲線為 WT LonA 之吸光值，灰色則為標準品之吸光值。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，WT LonA 分子量大小為 89 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。

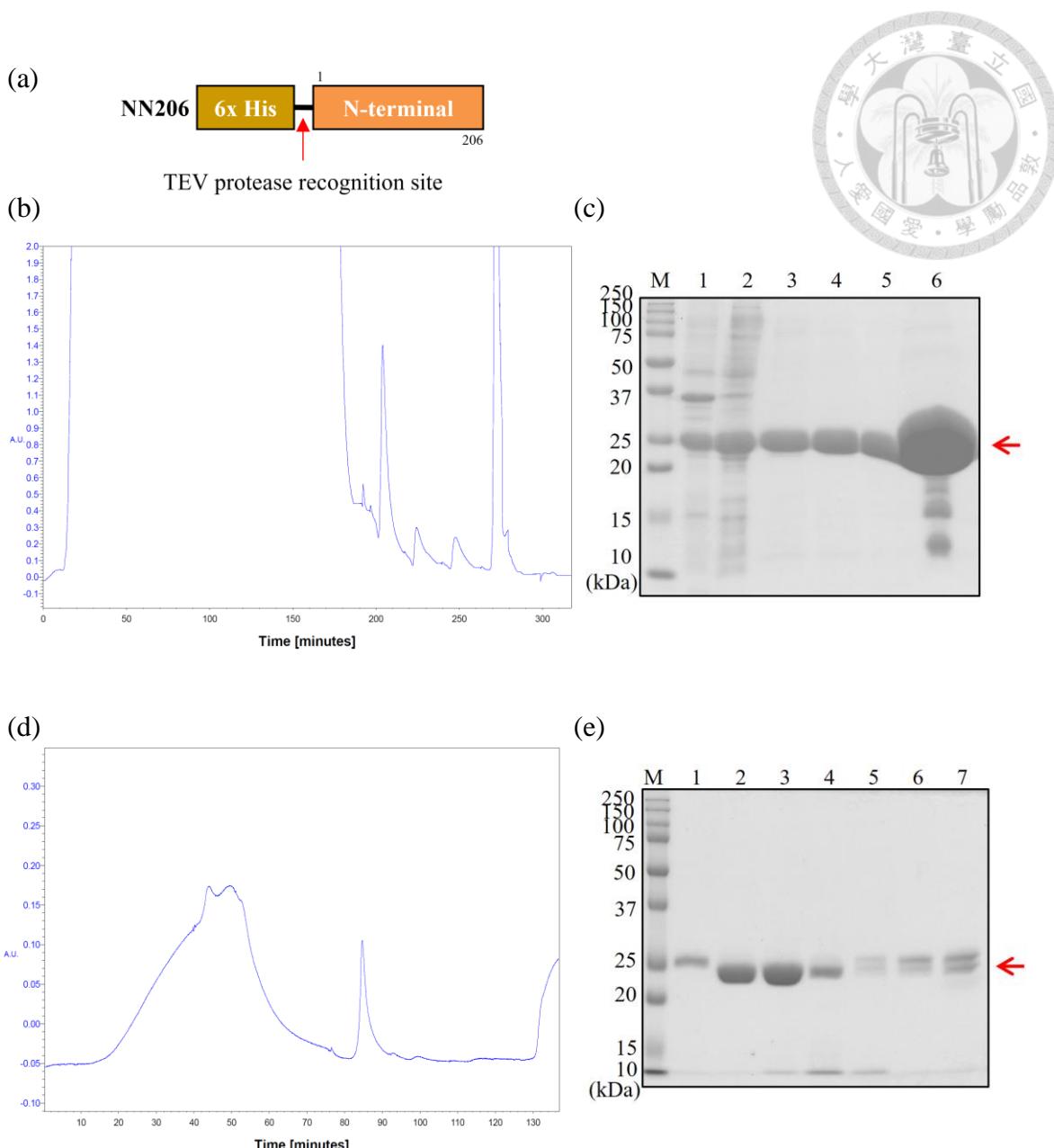


圖 3-4 NN206 的固定化金屬離子親合層析法純化

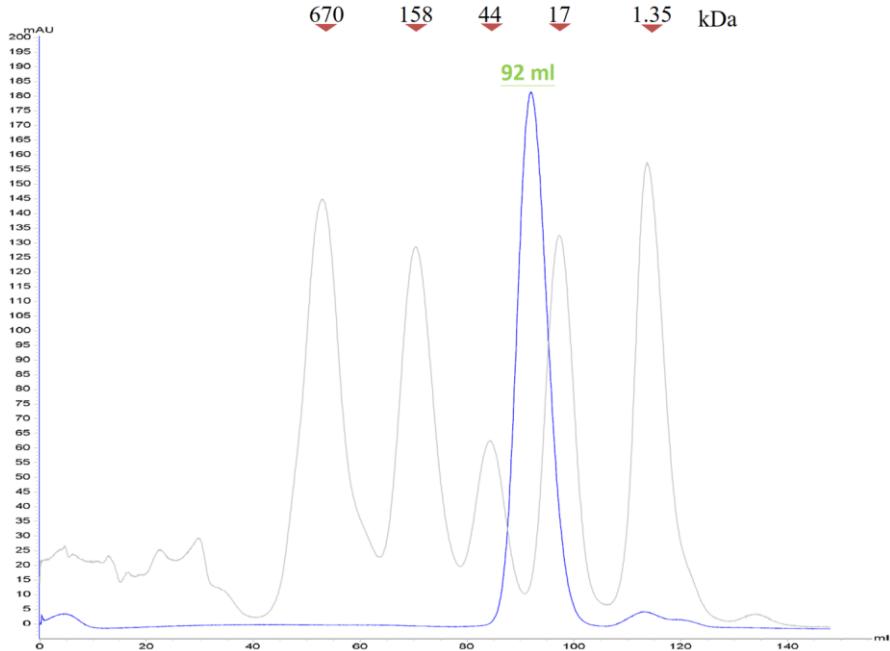
(a) NN206 之示意圖，此蛋白僅含有 LonA 的 N 端，6xHis 接於此蛋白之 N 端。(b) 純化之層析圖，橫軸表示時間，縱軸為 UV280 之吸光值。(c)NN206 純化之結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：離心後之菌塊；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：10 mM imidazole 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 之洗脫液。(d) NN206 以 Tobacco Etch Virus (TEV) 蛋白酶 (protease) 切除 6xHis 後之純化層析圖。(e) NN206 加入 TEV 蛋白



酶處理後之純化結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：未經 TEV 蛋白酶處理之 NN206；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：不含 imidazole 之沖洗液；4：10 mM 之沖洗液；5：20 mM imidazole 之沖洗液；6：30 mM imidazole 之沖洗液；7：400 mM imidazole 之洗脫液。



(a)



(b)

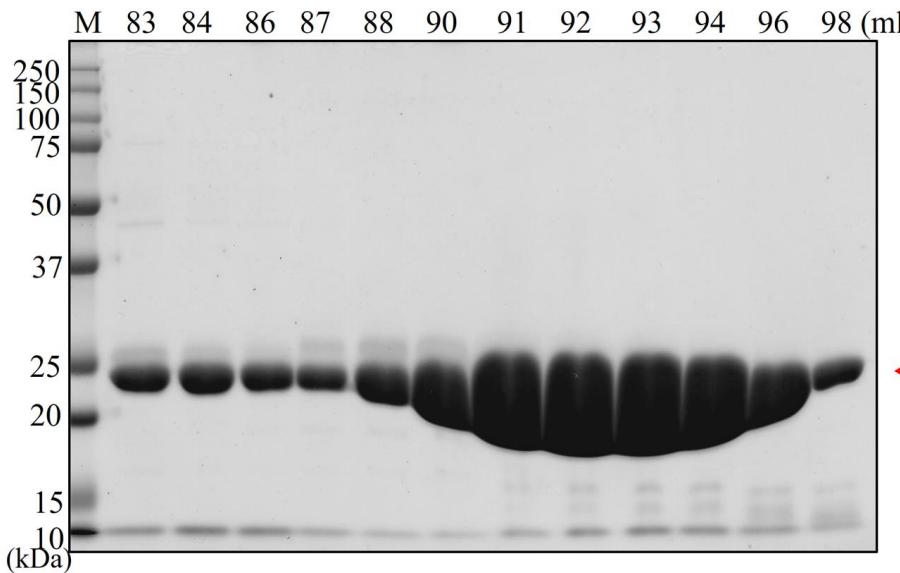


圖 3-5 NN206 之分子篩層析純化

(a) NN206 經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值，藍色曲線為 NN206 之吸光值，灰色則為標準品之吸光值。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。

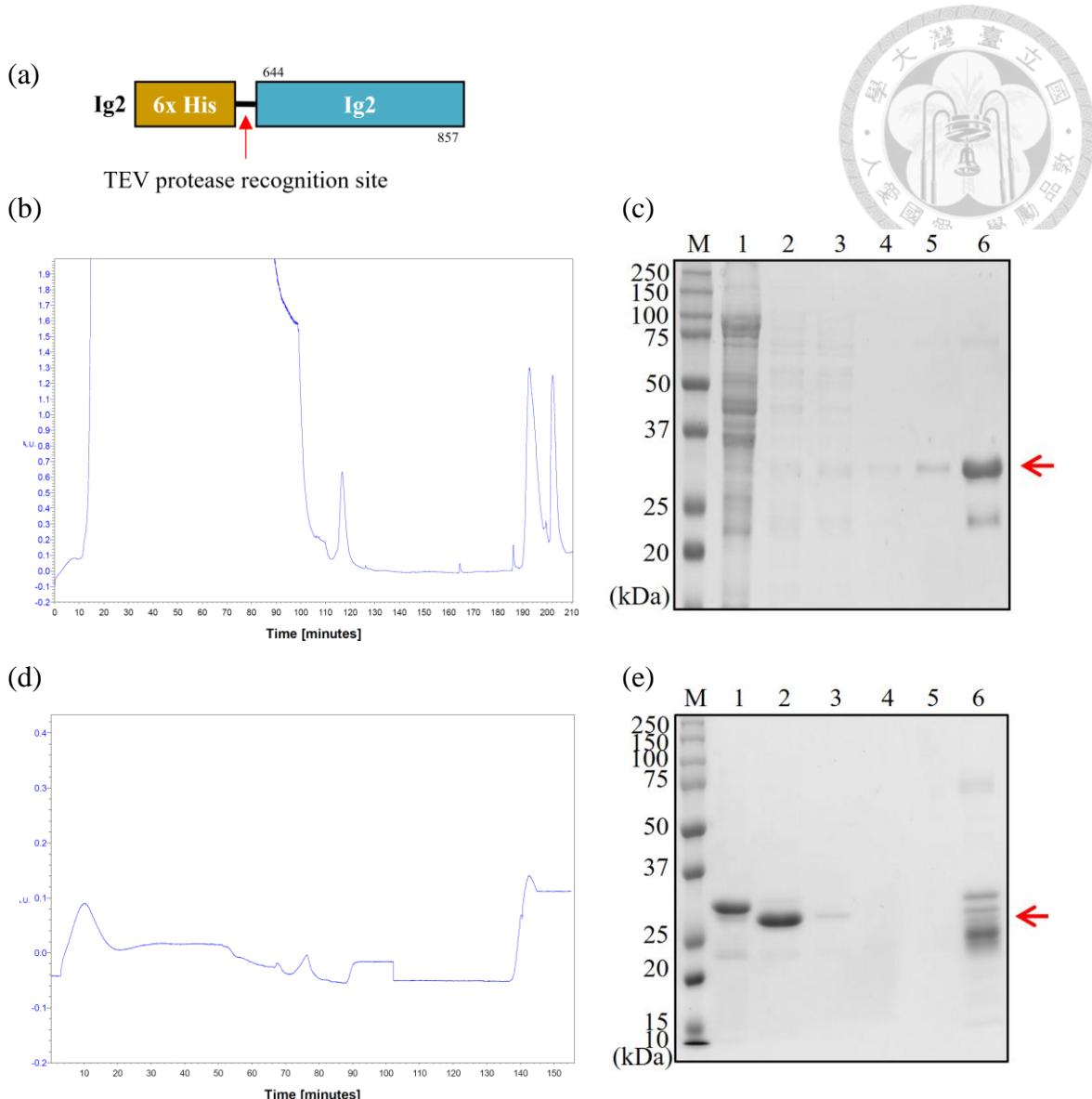


圖 3-6 Ig2 的固定化金屬離子親合層析法純化

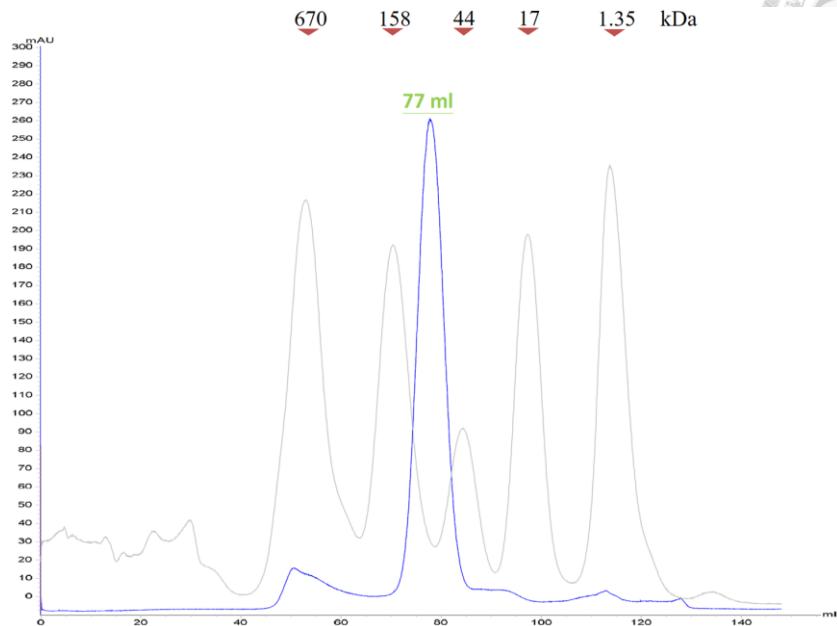
(a) Ig2 之示意圖，此蛋白是盤基網柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 中凝膠因子 (gelation factor) ABP-120 的第 5 個和第 6 個功能區，6xHis 接於此蛋白之 N 端。(b) 純化之層析圖，橫軸表示時間，縱軸為 UV280 之吸光值。(c) Ig2 純化之結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，Ig2 分子量大小為 30 kDa (紅色箭頭)。M : marker；1：離心後之菌塊；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：10 mM imidazole 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 洗脫液。(d) Ig2 以 TEV 蛋白酶 protease 切除 6xHis 後之純化層析圖。(e) Ig2 加入 TEV 蛋白酶處理後之純化結果。經過 Cooassie Blue



染色的 12% SDS-PAGE， Ig2 分子量大小為 30 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：未經 TEV 蛋白酶處理之 Ig2；2：不含 imidazole 之沖洗液；3：10 mM 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 洗脫液。



(a)



(b)

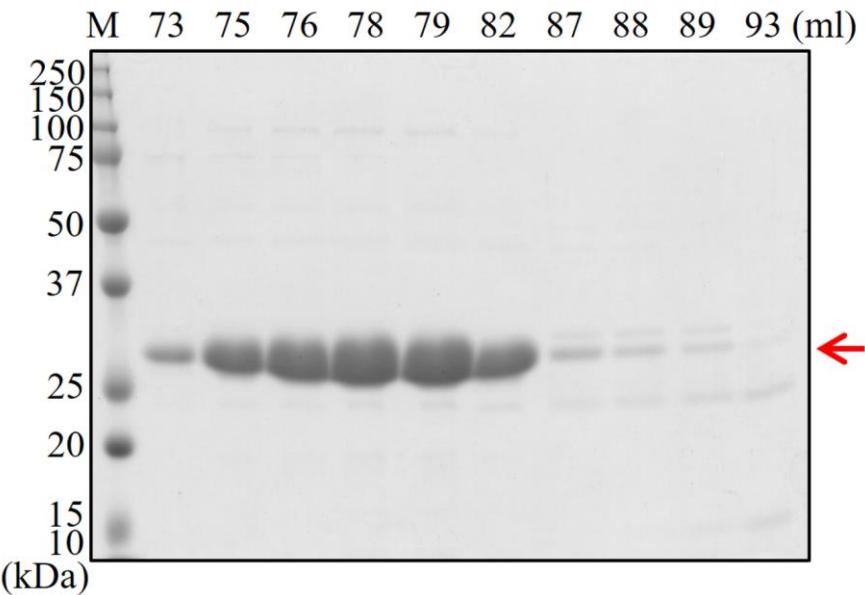
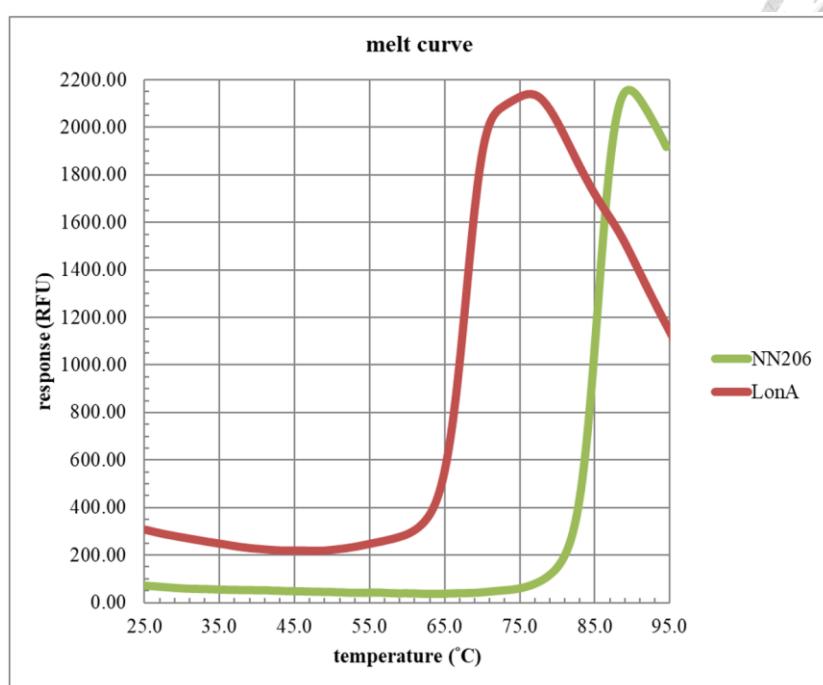


圖 3-7 Ig2 之分子篩層析純化

(a) Ig2 經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值，藍色曲線為 Ig2 之吸光值，灰色則為標準品之吸光值。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，Ig2 分子量大小為 30 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。



(a)



(b)

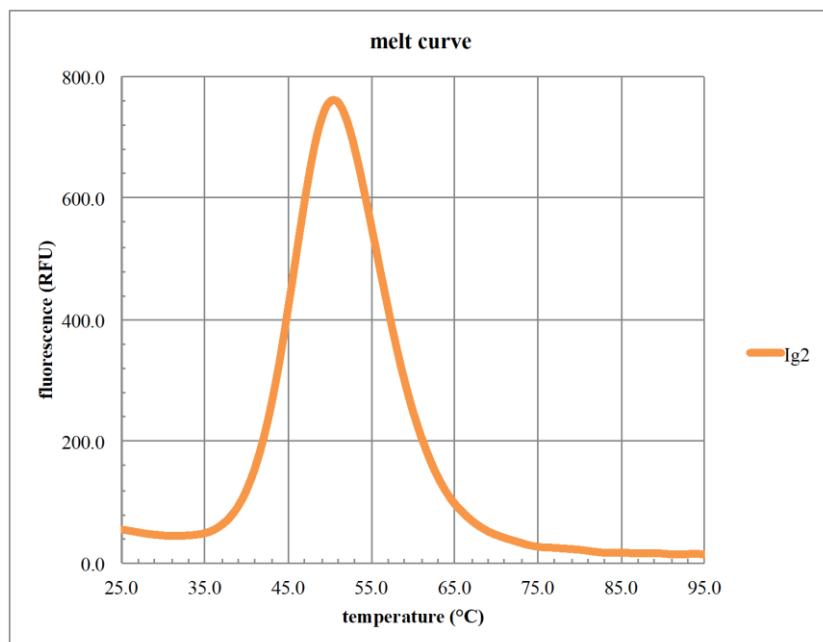


圖 3-8 蛋白質熱轉變分析 (thermal shift assay)

(a) WT LonA (紅色) 及 NN206 (綠色) 之 Tm 測定，此兩個蛋白的 Tm 分別為 68 及 85.5°C。 (b) Ig2 (橘色) 的 Tm 為 46°C。

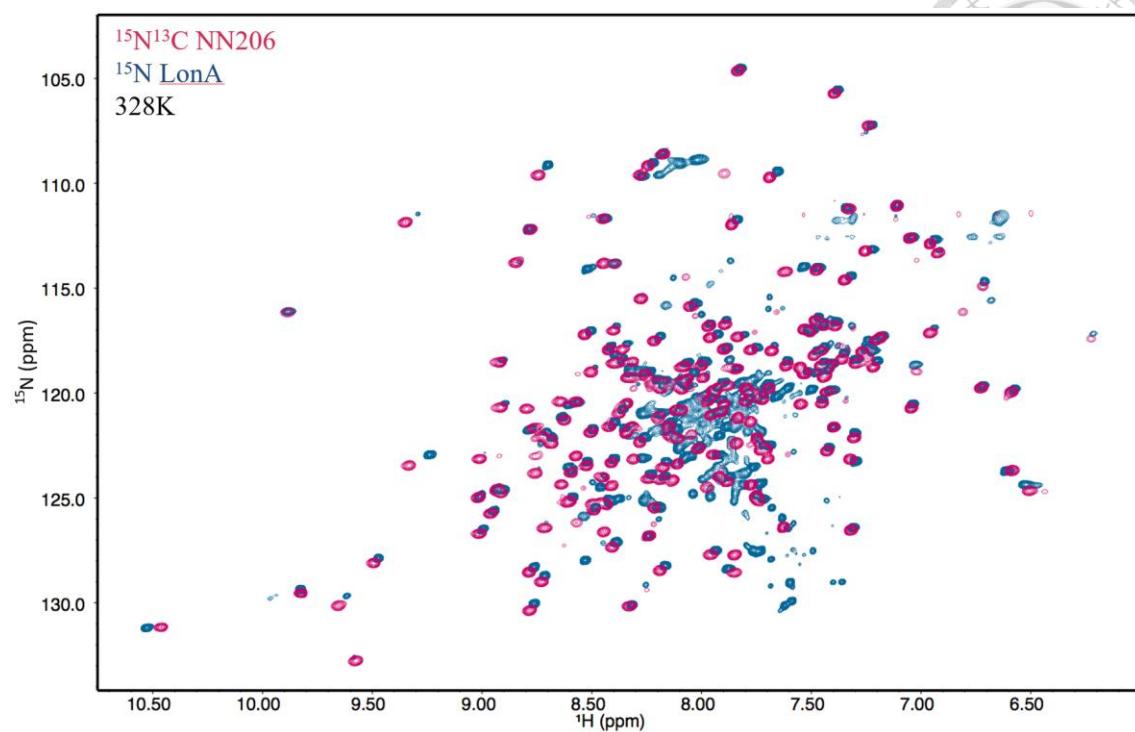
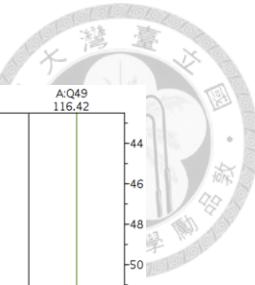
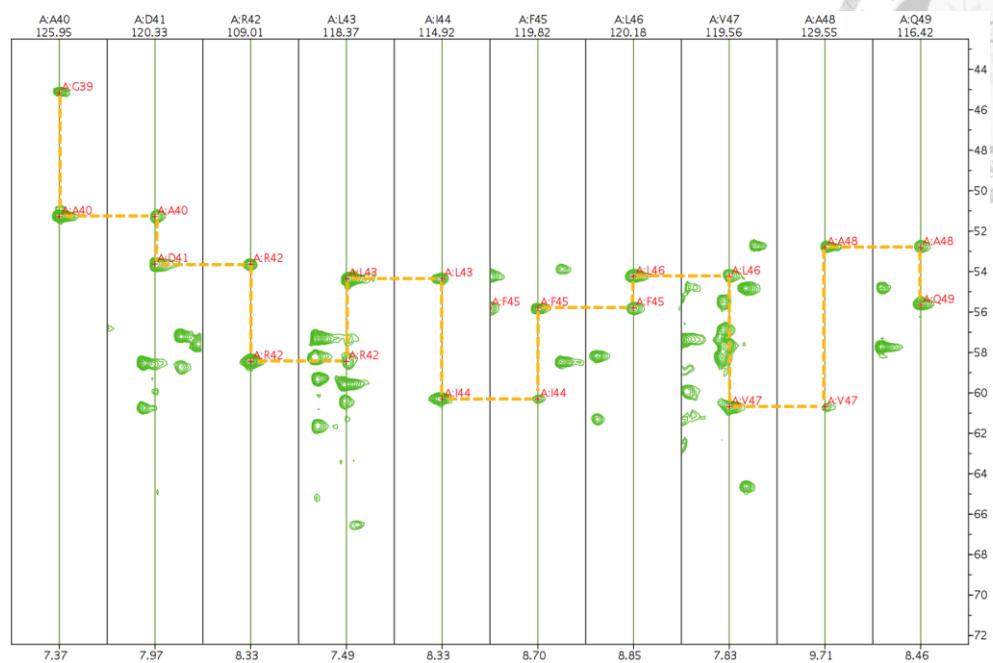


圖 3-9 WT LonA 與 NN206 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較

WT LonA (藍色) 與 NN206 (桃紅色) 於 328K 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較。



(a)



(b)

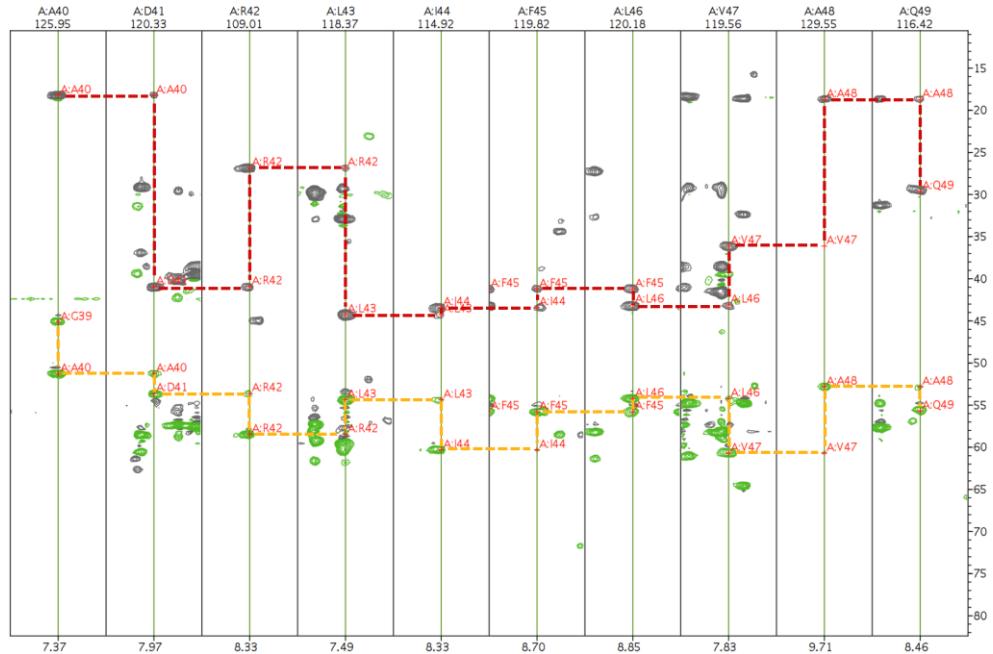
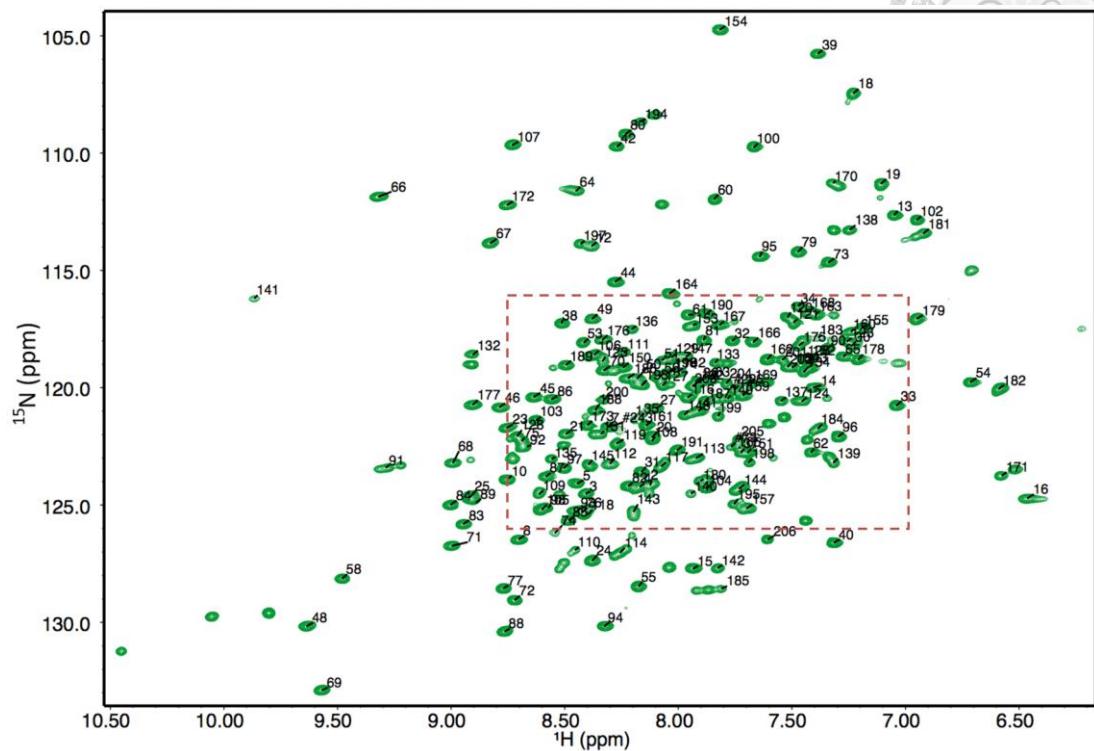


圖 3-10 NN206 之部分 (partial) 循序判定光譜 (residue 42-51)

(a) NN206 第 40-49 個胺基酸的 HNCA 光譜，橘色線表示殘基之間 $C_{\alpha(i)}$ 及 $C_{\alpha(i-1)}$ 化學位移的前後關係。(b) NN206 第 40-49 個胺基酸的 HNCACB 光譜，橘色線表示殘基之間 $C_{\alpha(i)}$ 、 $C_{\alpha(i-1)}$ 化學位移的前後關係，紅色線表示殘基之間 $C_{\beta(i)}$ 及 $C_{\beta(i-1)}$ 化學位移的前後關係。



(a)



(b)

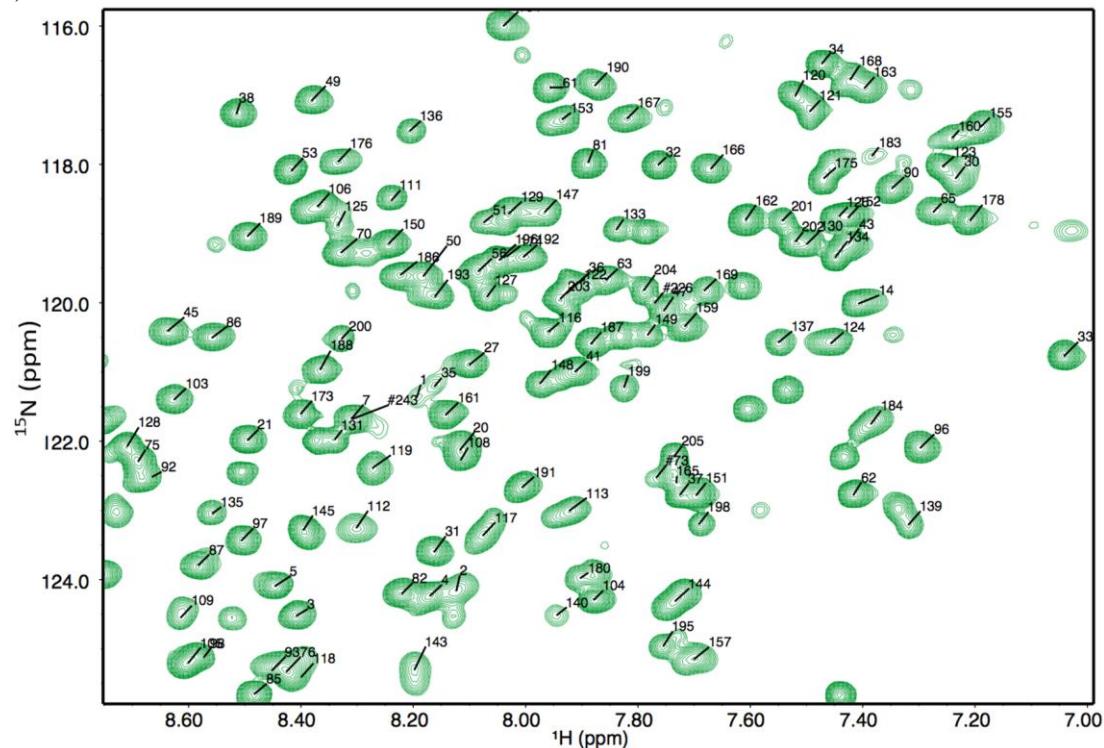


圖 3-11 NN206 的骨架循序判定 (Sequence specific assignments)

(a) NN206 於 328K 下的循序判定結果，圖上的數字即表示該交叉峰所代表的殘基。

(b) 圖 (a) 中紅色方框處的放大圖。



1 MRLELPVIPL RNTVILPHTT TPVDV**GRAKS** KRAVEEAMGA DRLIFLVAQR
51 DPEVDDPAPD DLYTWGVQAV VKQAMRLPDG TLQVMVEARA RAQVTDYIPG
101 PYLRARGEVF SEIFPIDEAV VRVLVEELKE AFEKYVANHK SLRLD**RYQLE**
151 AVKGT**SDPAM** LADTIAYHAT WTVAEKQEIL ELTDLEARLK KVLGLLSRDL
201 ERFELD

圖 3-12 NN206 的骨架循序判定結果

NN206 的序列，黃色為 proline，紅色為未找到之殘基。

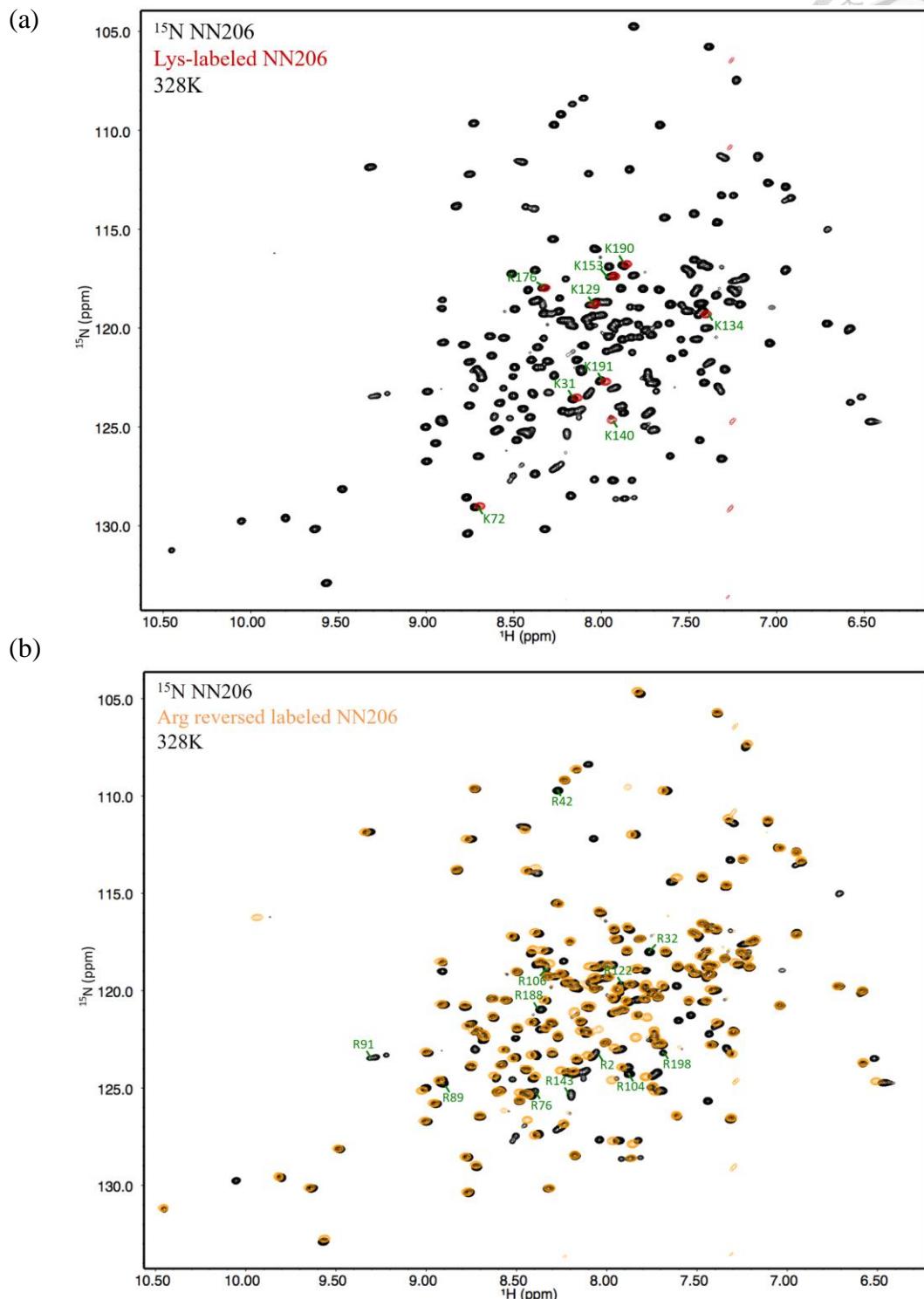


圖 3-13 特殊標定的 NN206 核磁共振光譜

(a) ^{15}N Lys 標定之 NN206 (紅色) 與 ^{15}N 標定之 NN206 (黑色) 於 328K 下的二維 ^{1}H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。(b) Arg 反標定之 NN206 (橘色) 與 ^{15}N 標定之 NN206 (黑色) 於 328K 下的二維 ^{1}H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。

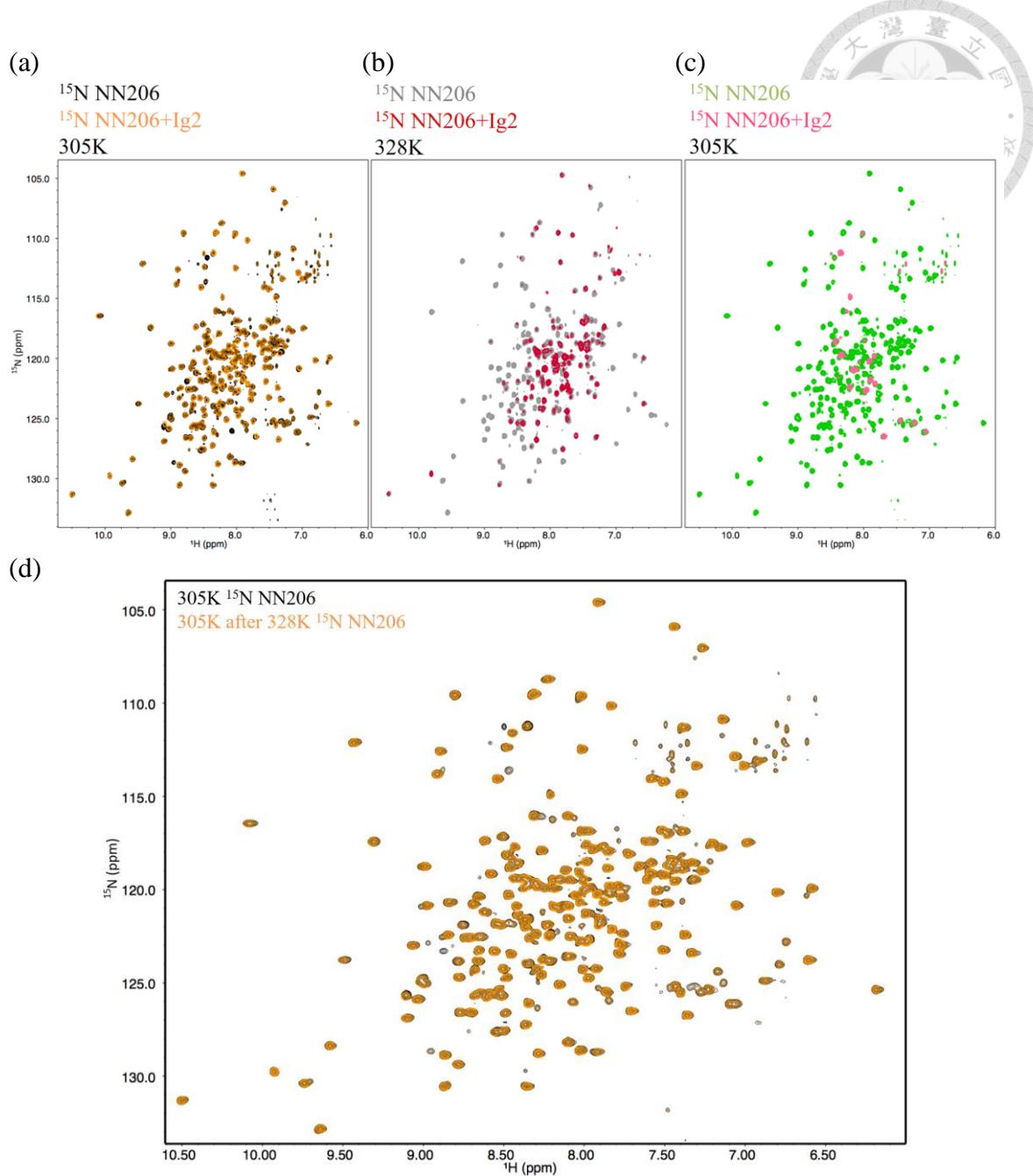


圖 3-14 Ig2 滴定 NN206 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜

(a) 於 305K 下，NN206（黑色）與 Ig2 滴定 NN206（橘色）之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。(b) 於 328K 下，NN206(灰色) 與 Ig2 滴定 NN206(紅色) 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。(c) 將溫度由 328K 降回 305K 下，NN206 (綠色) 與 Ig2 滴定 NN206 (粉色) 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。(d) NN206 (黑色) 之 305K 與 NN206 (橘色) 由 328K 降回 305K 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較。

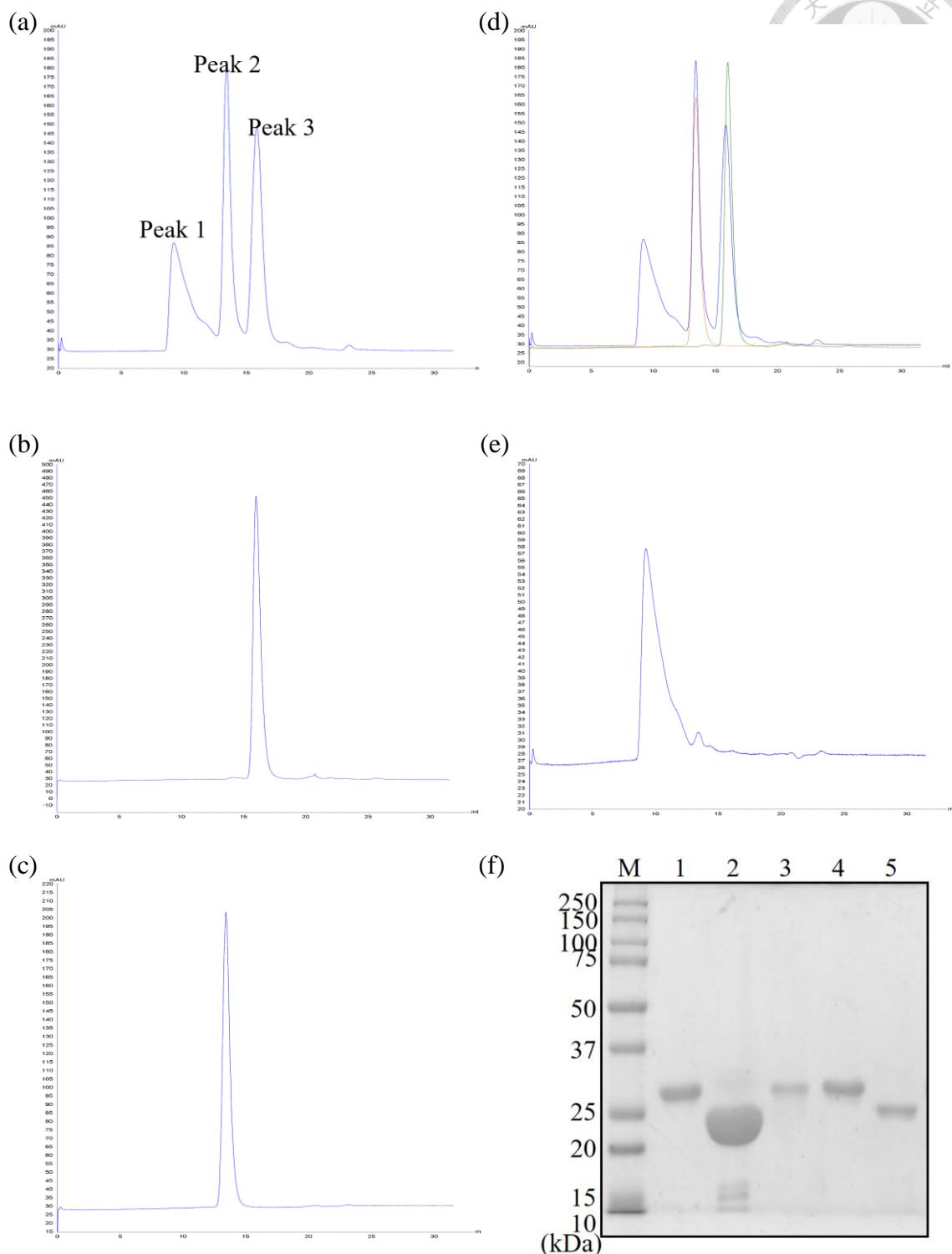


圖 3-15 Ig2 滴定 NN206 的核磁共振樣品分析

(a) Ig2 滴定 NN206 的核磁共振樣品經過 superdex 200 10 300 GL 管柱之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值。(b) NN206 經過 superdex 200 10 300 GL 管柱之層析圖。(c) NN206 經過 superdex 200 10 300 GL 管



柱之層析圖。(d) Ig2 滴定 NN206 的核磁共振樣品（藍色）與 Ig2（橘色）及 NN206（綠色）之層析圖比較。(e) 圖 (a) 之 peak 1 經過 superdex 200 10 300 GL 管柱之層析圖。(f) Ig2 滴定 NN206 的核磁共振樣品經過 superdex 200 10 300 GL 管柱分析之樣品經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE。M : marker ; 1 : Ig2 ; 2 : NN206 ; 3 : peak 1 ; 4 : peak 2 ; 5 : peak 3 。

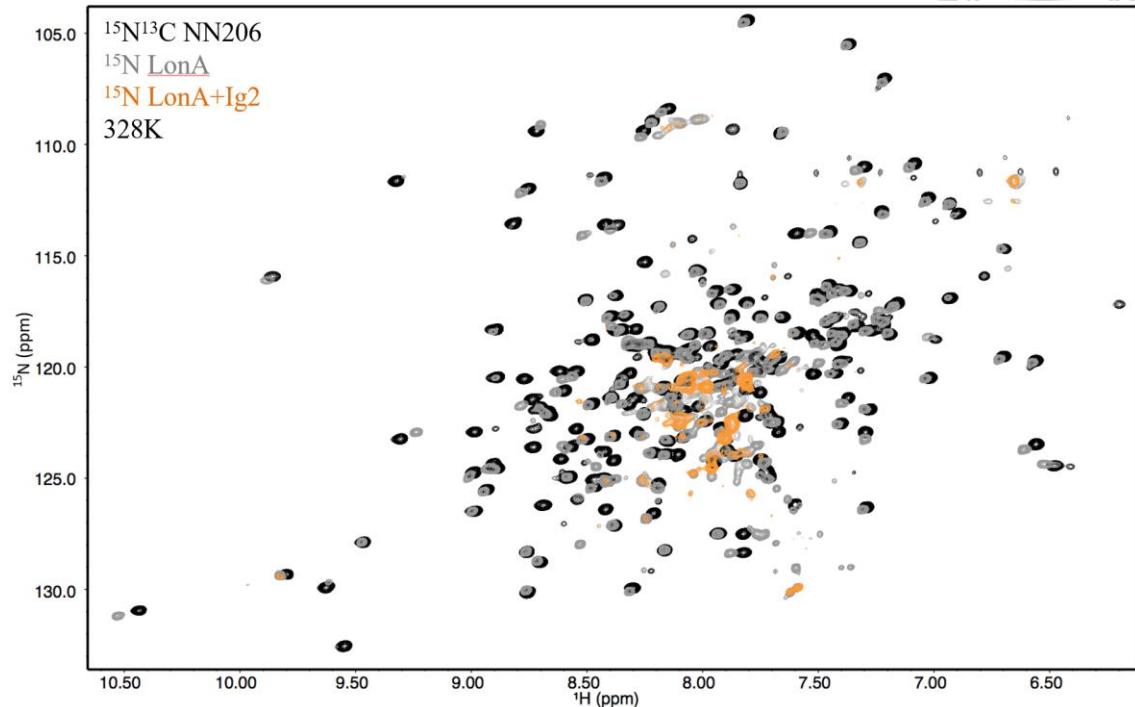


圖 3-16 WT LonA、Ig2 滴定 WT LonA 與 NN206 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較

WT LonA (灰色)、Ig2 滴定 WT LonA (橘色) 與 NN206 (黑色) 於 328K 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較。

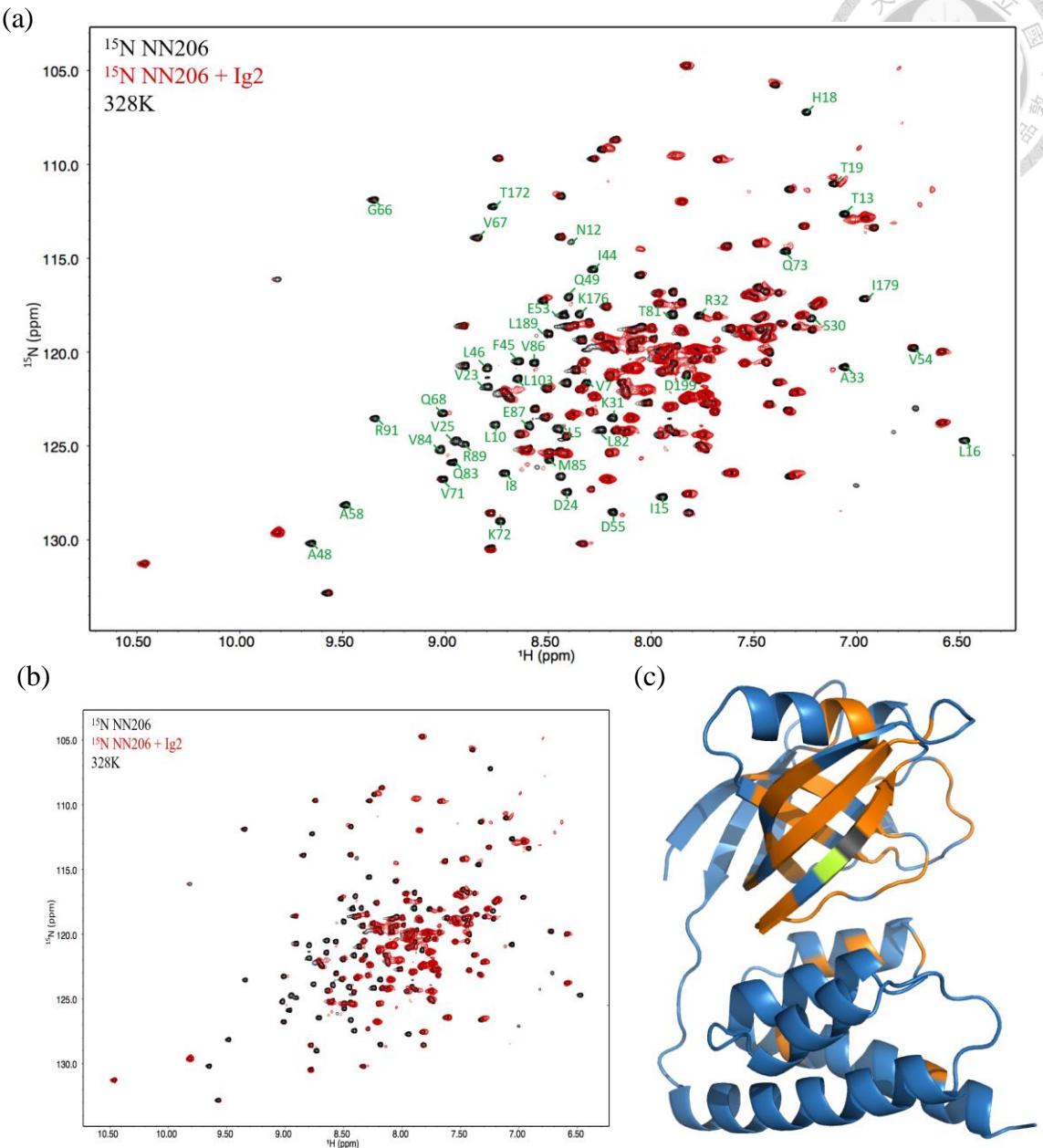
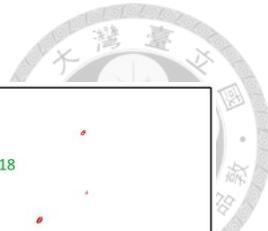


圖 3-17 NN206 加入 Ig2 之化學位移變化

(a) NN206 (黑色) 與 NN206 加入 Ig2 (紅色) 於 328K 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較，綠色的標定表示有化學位移改變的殘基 (residue)。(b) NN206 (黑色) 與 NN206 加入 Ig2 (紅色) 於 328K 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較，未標定交叉峰所代表的殘基。(c) 於 NN206 的結構上標定有化學位移改變的殘基，橘色區塊即為有化學位移變動的殘基，綠色區域為和其他訊號重合而無法判別之殘基，灰色為 P22。

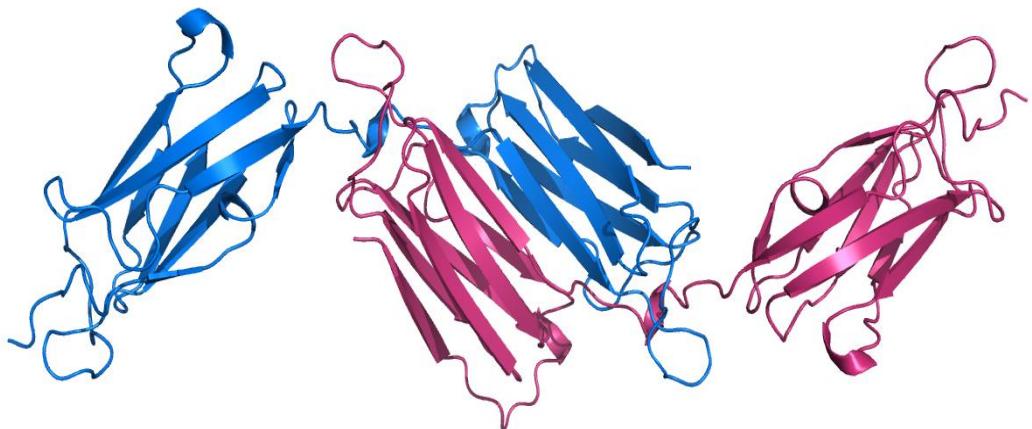


圖 3-18 Ig2 之結構

Ig2 的結構 (PDB : 1QFH)。Ig2 在第 6 個功能區會形成二聚體 (dimer) 的交介面 (interface)。

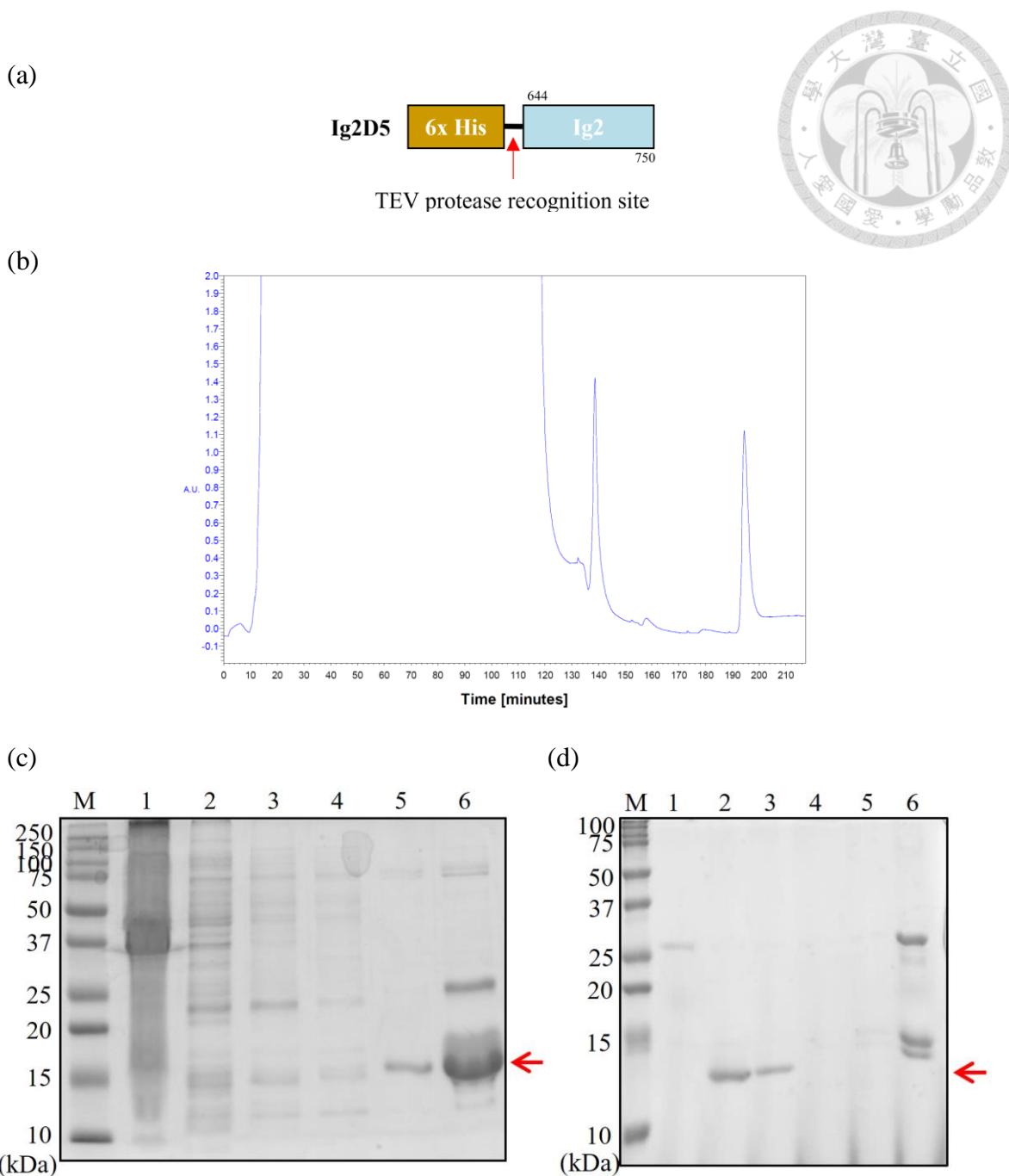


圖 3-19 Ig2D5 的固定化金屬離子親合層析法純化

(a) Ig2D5 之示意圖，此蛋白是盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 的第 5 個功能區，6xHis 接於此蛋白之 N 端。(b) 純化之層析圖，橫軸表示時間，縱軸為 UV280 之吸光值。

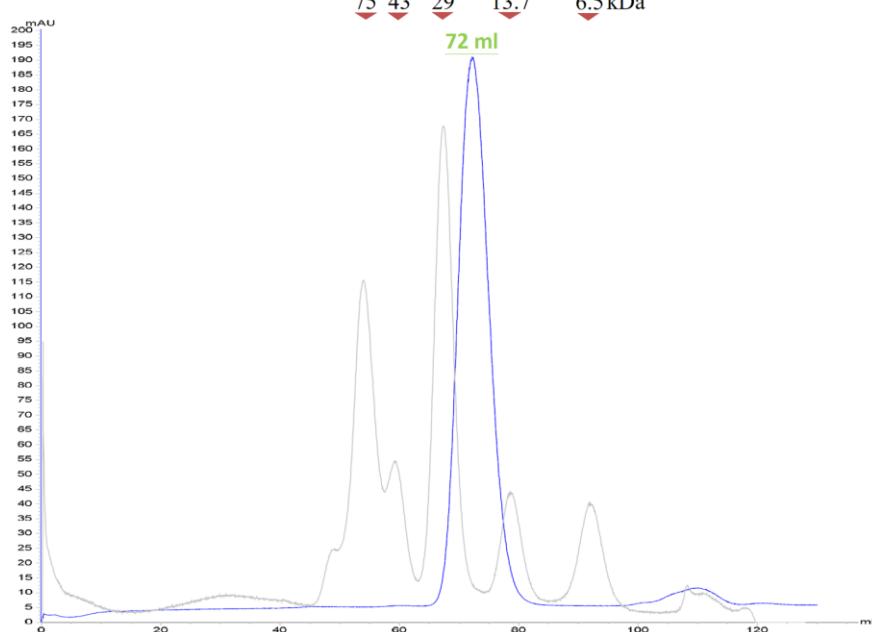
(c) Ig2D5 純化之結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，Ig2D5 分子量大小為 13 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：離心後之菌塊；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：10 mM imidazole 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之



沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 洗脫液。(d) Ig2D5 加入 TEV 蛋白酶處理後之純化結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，Ig2D5 分子量大小為 13 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：未經 TEV 蛋白酶處理之 Ig2D5；2：不含 imidazole 之沖洗液；3：10 mM 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 洗脫液。



(a)



(b)

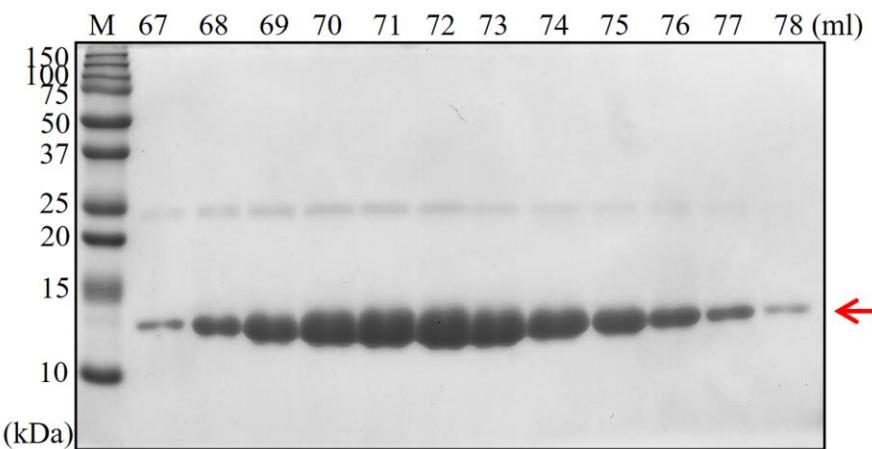


圖 3-20 Ig2D5 之分子篩層析純化

(a) Ig2D5 經過 HiLoad 16/600 Superdex 75 pg 之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值，藍色曲線為 Ig2D5 之吸光值，灰色則為標準品之吸光值。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，Ig2D5 分子量大小為 13 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。

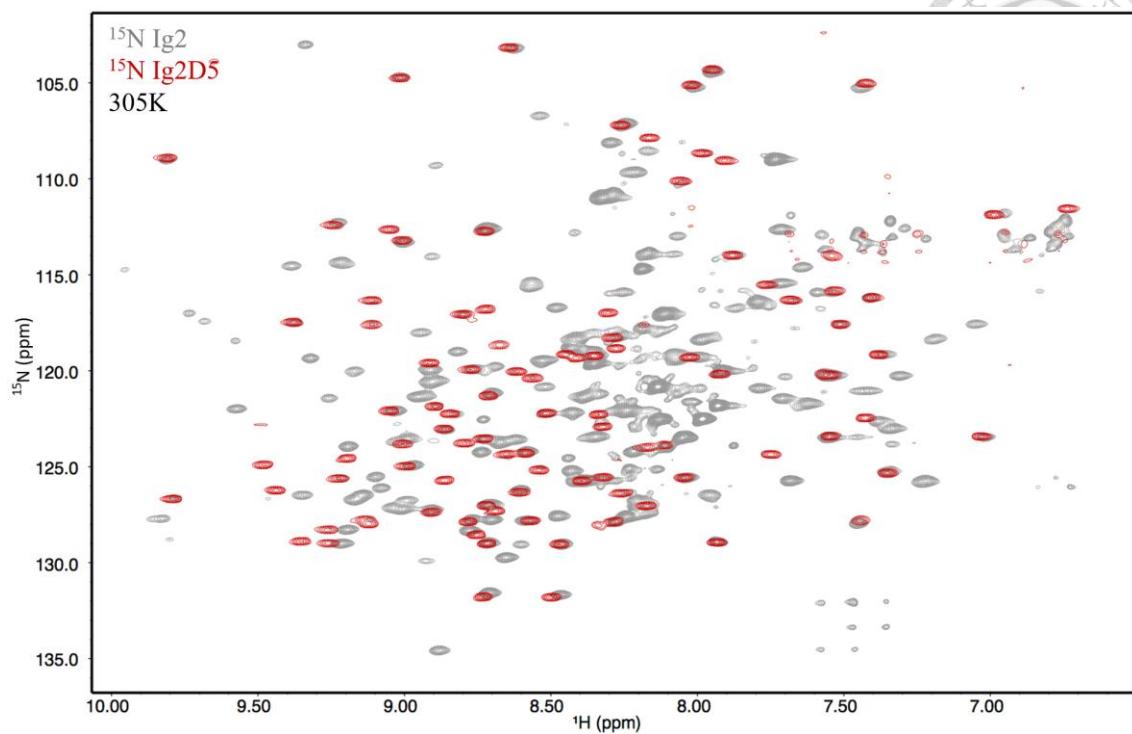


圖 3-21 Ig2 與 Ig2D5 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較

Ig2 (灰色) 與 Ig2D5 (紅色) 於 305K 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較。

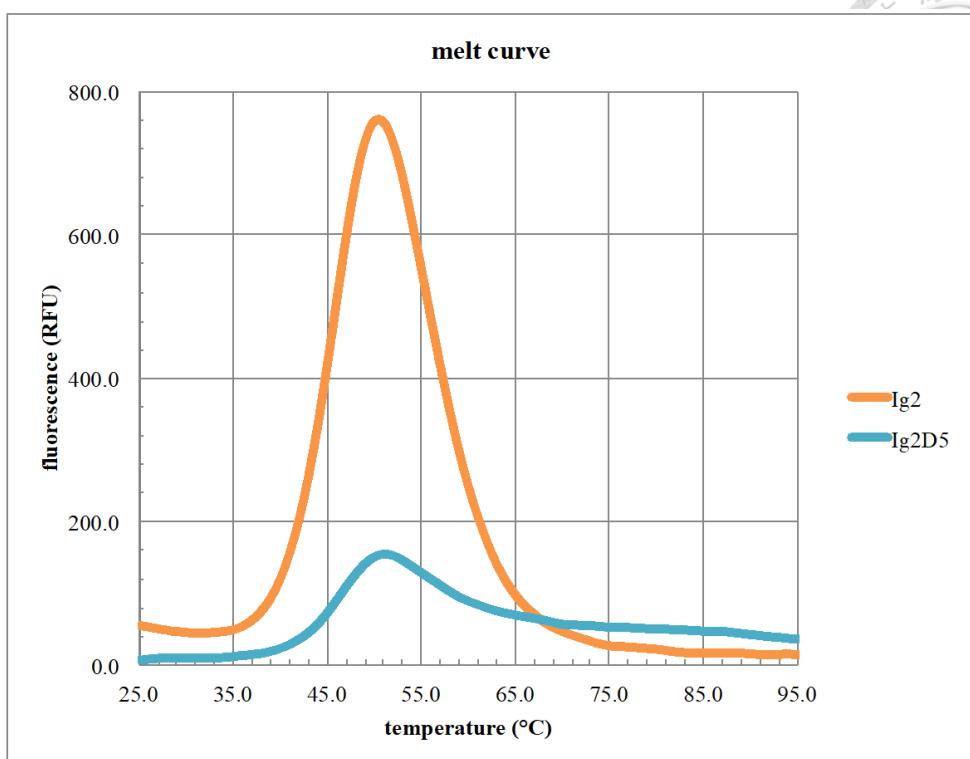


圖 3-22 蛋白質熱轉變分析

Ig2 (橘色) 及 Ig2D5 (藍色) 之 Tm 測定，其 Tm 分別為 46 及 46.5°C。

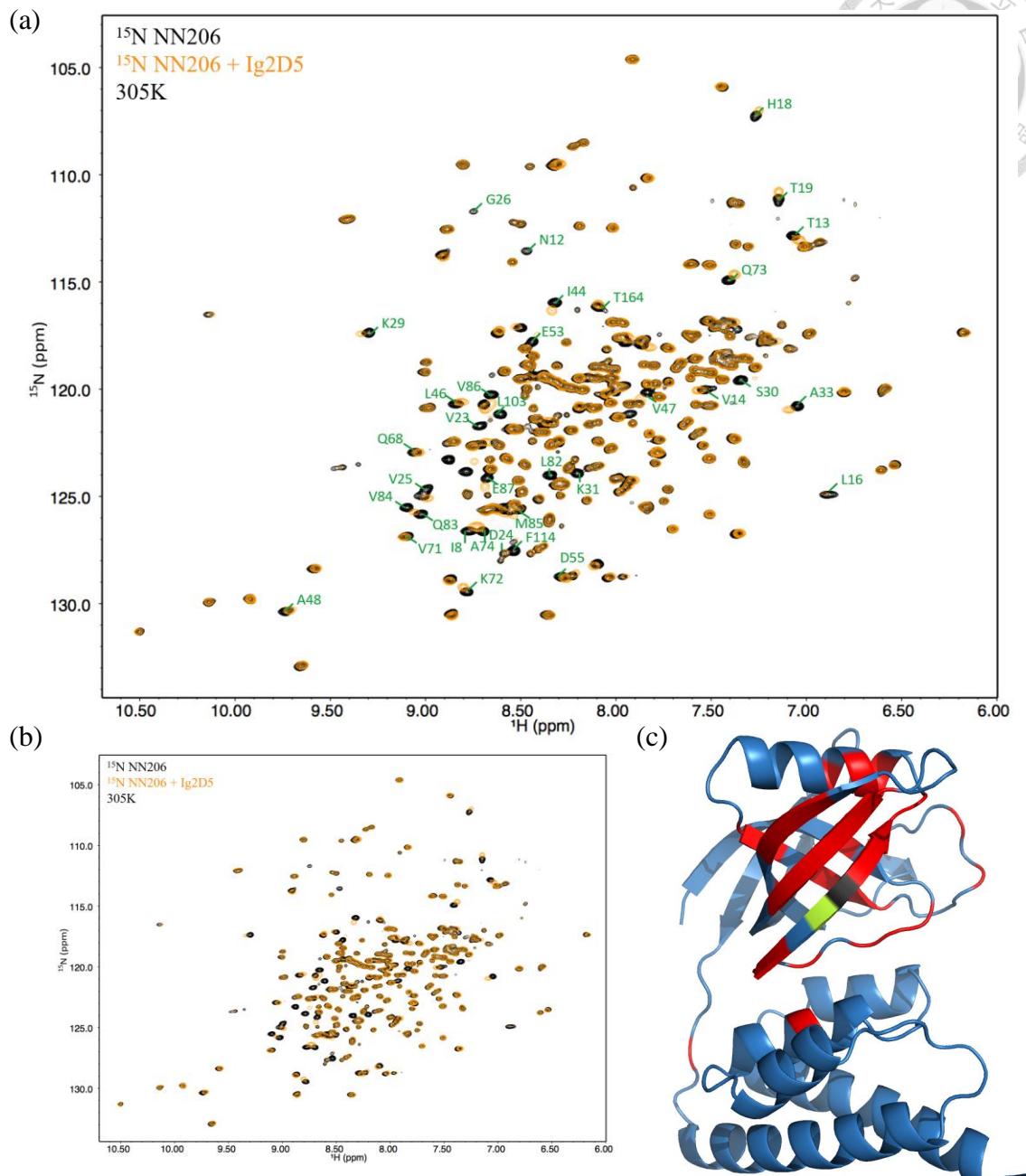


圖 3-23 NN206 加入 Ig2D5 之化學位移變化

(a) NN206 (黑色) 與 NN206 加入 Ig2D5 (橘色) 於 305K 之二維 ^{1}H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較，綠色標定表示有化學位移改變的殘基。(b) NN206 (黑色) 與 NN206 加入 Ig2D5 (橘色) 於 305K 之二維 ^{1}H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較，未標定交叉峰所代表的殘基。(c) 於 NN206 的結構上標定有化學位移改變的殘基，紅色區塊即為有化學位移變動的殘基，綠色區域為和其他訊號重合而無法判別之殘基，灰色為 P22。

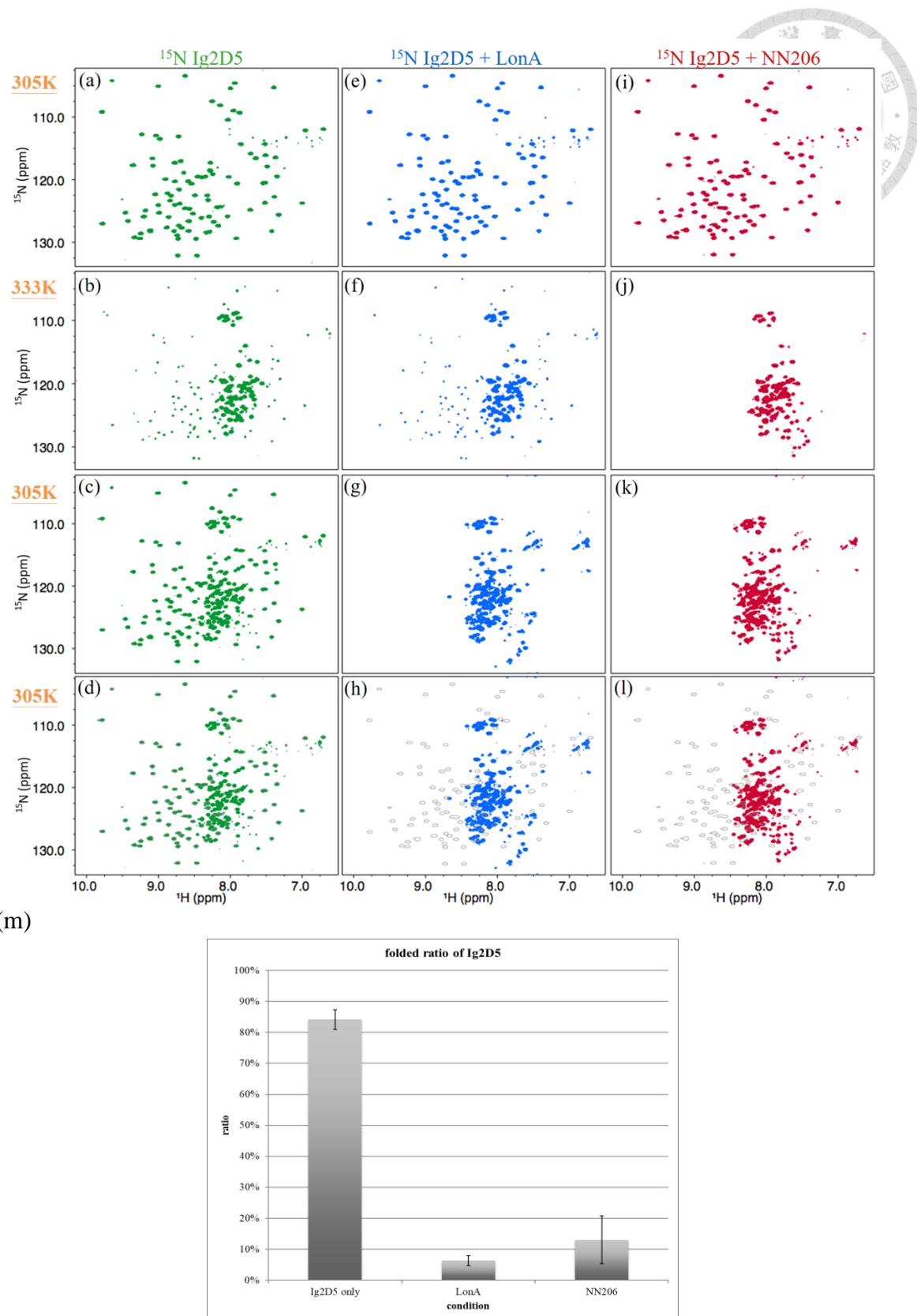


圖 3-24 WT LonA 之 N 端功能區對於 Ig2D5 結合的影響

(a-l) Ig2D5 (綠色)、 Ig2D5 加入 WT LonA (藍色)及 Ig2D5 加入 NN206 (紅色) 之二



維 ^{1}H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜。(a)、(e) 和 (i) 為 305K 下紀錄的光譜，(b)、(f) 和 (j) 為 333K 下紀錄的光譜，(c)、(g) 和 (k) 則為由 333K 降溫回 305K 紀錄的光譜。(d)、(h) 和 (l) 為加熱前後之 305K 光譜疊圖，灰色為加熱前之 305K 光譜。(m) 折疊的 (folded) Ig2D5 統計圖，計算圖 (a-l) 加熱後的 Ig2D5 折疊比例。

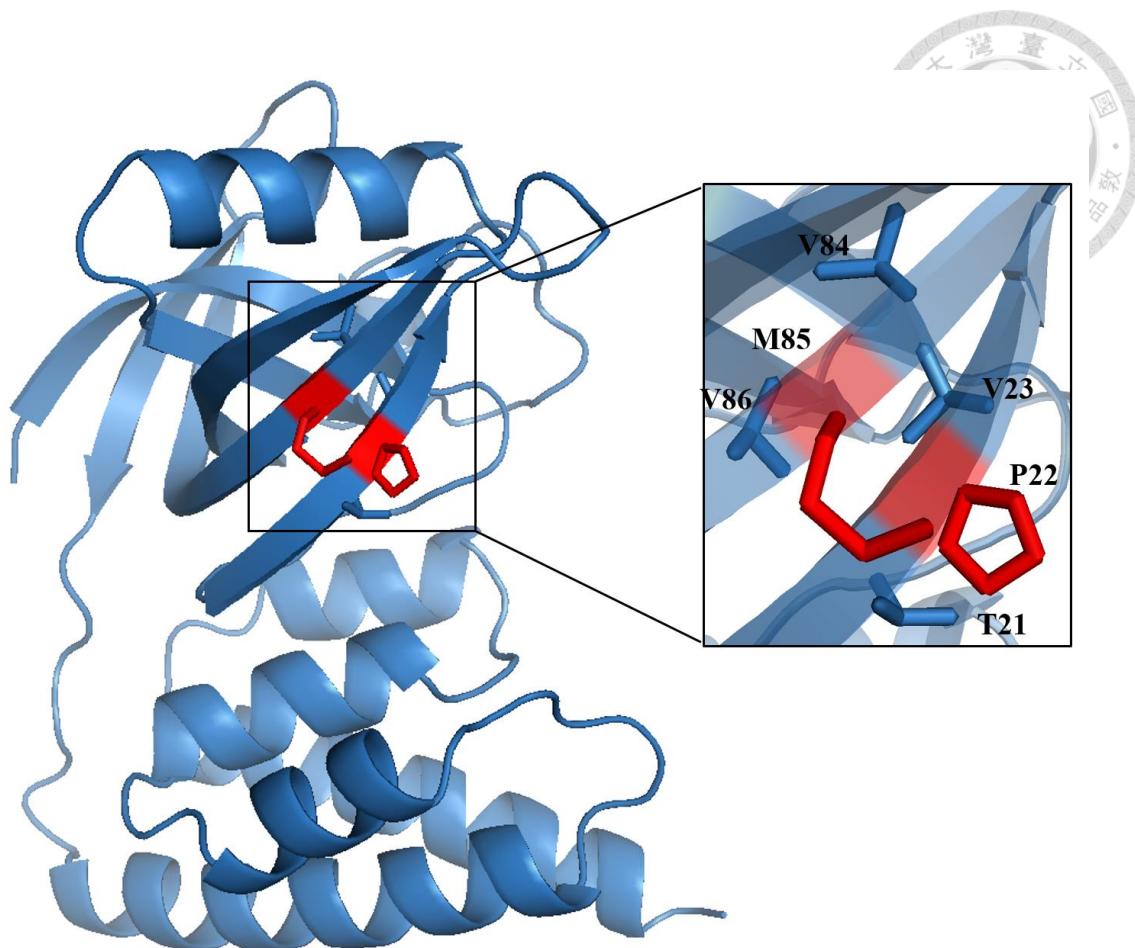


圖 3-25 NN206 的點突變

NN206 的結構，P22 及 M85 為突變位點（紅色）。

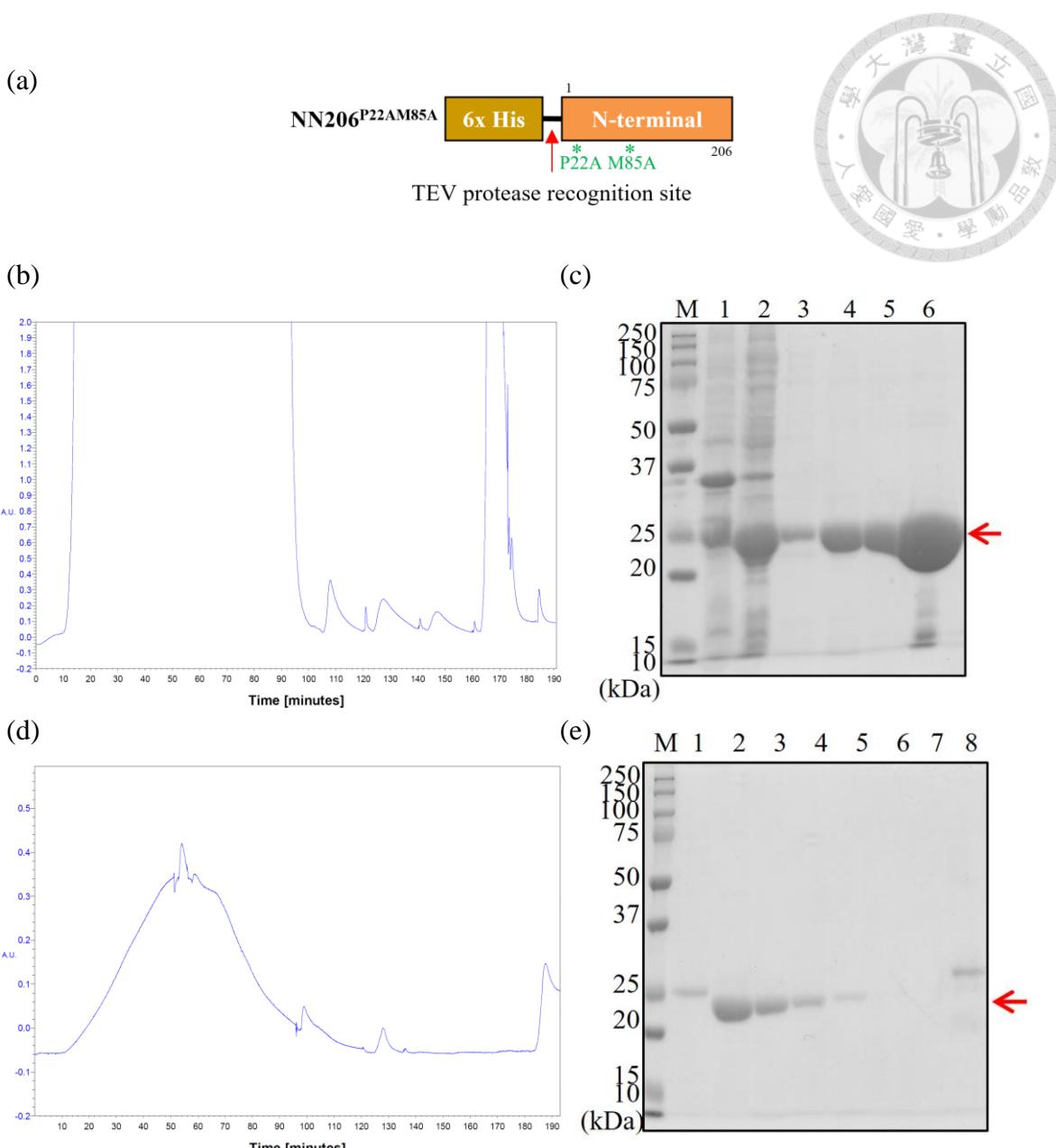


圖 3-26 NN206^{P22AM85A} 的固定化金屬離子親合層析法純化

(a) NN206^{P22AM85A} 之示意圖，此蛋白僅含有 LonA 的 N 端，此蛋白的 P22 及 M85 被突變成 alanine，6xHis 接於此蛋白之 N 端。(b) 純化之層析圖，橫軸表示時間，縱軸為 UV280 之吸光值。(c) NN206^{P22AM85A} 純化之結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{P22AM85A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M : marker；1：離心後之菌塊；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：10 mM imidazole 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 之洗脫液。(d) NN206^{P22AM85A} 以 TEV 蛋白酶 protease 切除 6xHis

後之純化層析圖。(e) NN206^{P22AM85A} 加入 TEV 蛋白酶處理後之純化結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{P22AM85A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：未經 TEV 蛋白酶處理之 NN206^{P22AM85A}；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：不含 imidazole 之沖洗液；4：5 mM 之沖洗液；5：10 mM imidazole 之沖洗液；6：20 mM imidazole 之沖洗液；7：30 mM imidazole 之沖洗液；8：400 mM imidazole 洗脫液。

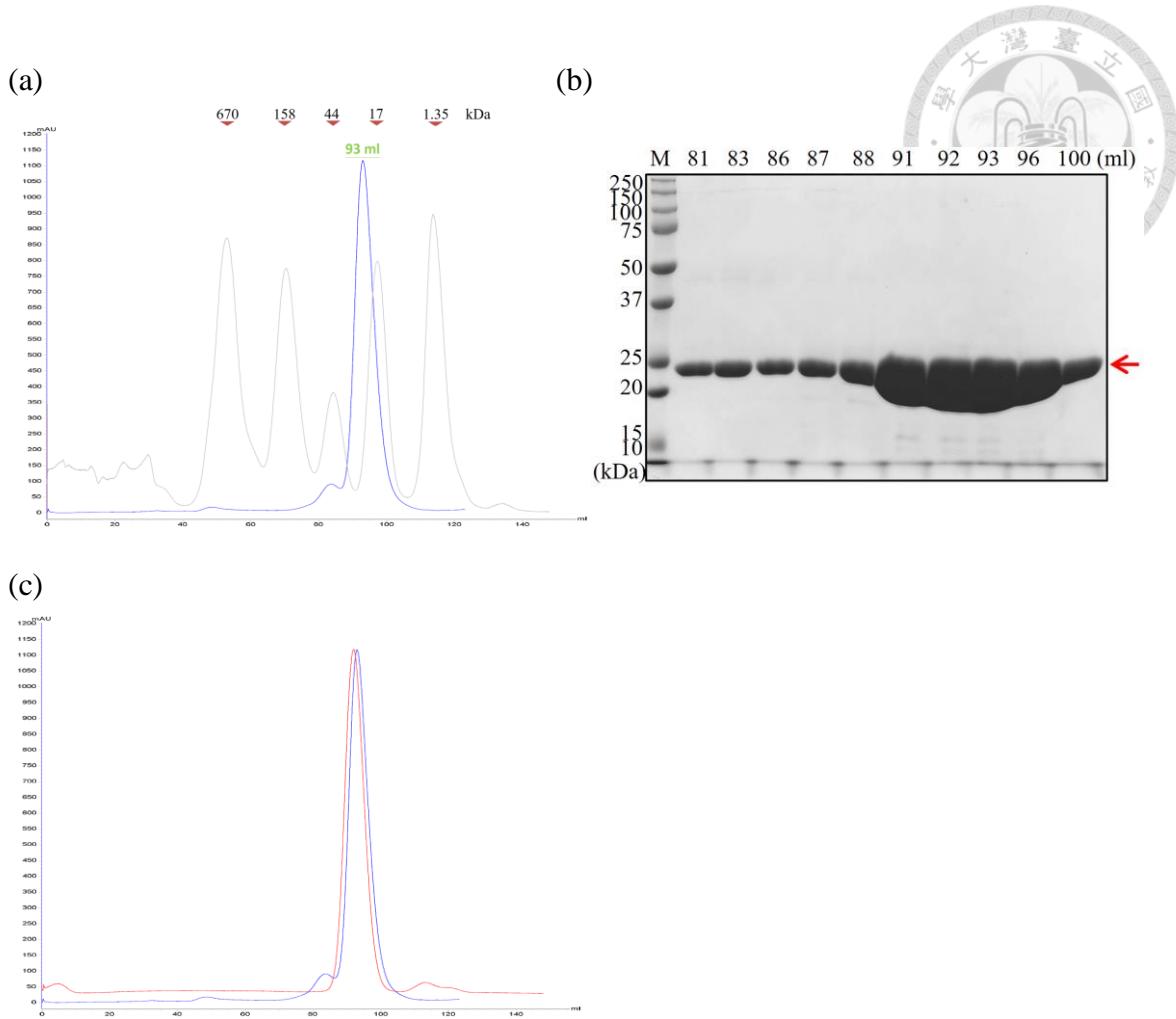
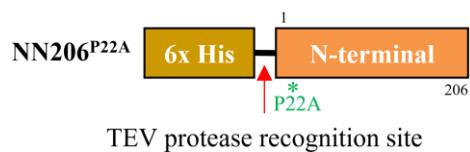


圖 3-27 NN206^{P22AM85A} 之分子篩層析純化

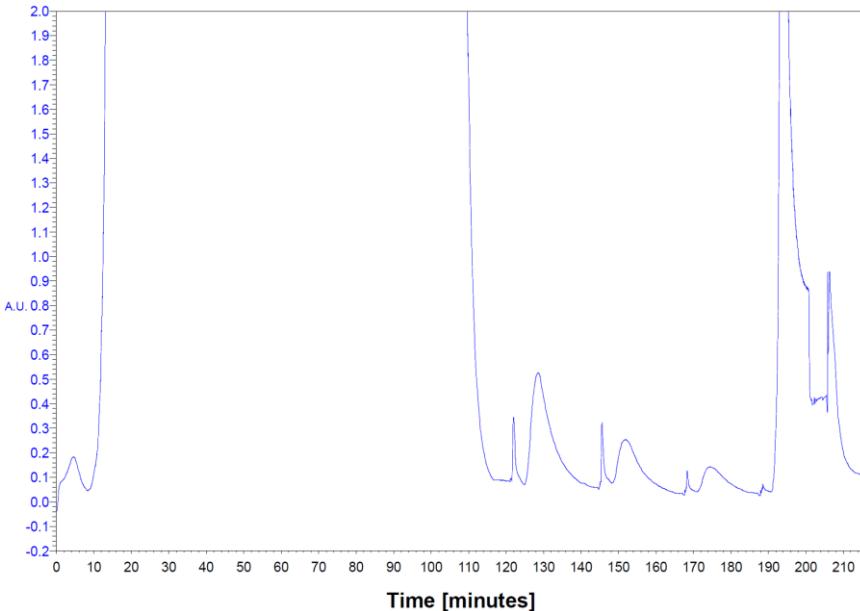
(a) NN206^{P22AM85A} 經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值，藍色曲線為 NN206^{P22AM85A} 之吸光值，灰色則為標準品之吸光值。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{P22AM85A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。(c) 將 NN206 之分子篩層析法結果 (紅色) 與 NN206^{P22AM85A} 之結果 (藍色) 疊合。



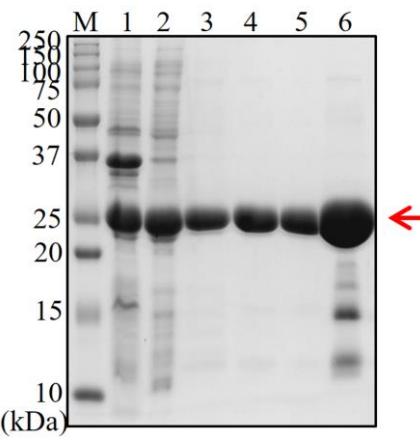
(a)



(b)



(c)



(d)

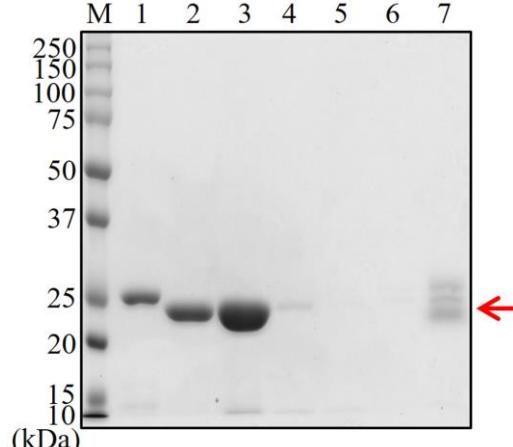


圖 3-28 NN206^{P22A} 的固定化金屬離子親合層析法純化

(a) NN206^{P22A} 之示意圖，此蛋白僅含有 LonA 的 N 端，而其 P22 被突變成 alanine，6xHis 接於此蛋白之 N 端。(b) 純化之層析圖，橫軸表示時間，縱軸為 UV280 之吸光值。(c) 純化之結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{P22A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：離心後之菌塊；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：10 mM imidazole 之沖洗液；4：20 mM imidazole



之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 之洗脫液。(d) NN206^{P22A} 加入 TEV 處理後之純化結果。經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{P22A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：未經 TEV 蛋白酶處理之 NN206^{P22A}；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：不含 imidazole 之沖洗液；4：10 mM 之沖洗液；5：20 mM imidazole 之沖洗液；6：30 mM imidazole 之沖洗液；7：400 mM imidazole 之洗脫液。

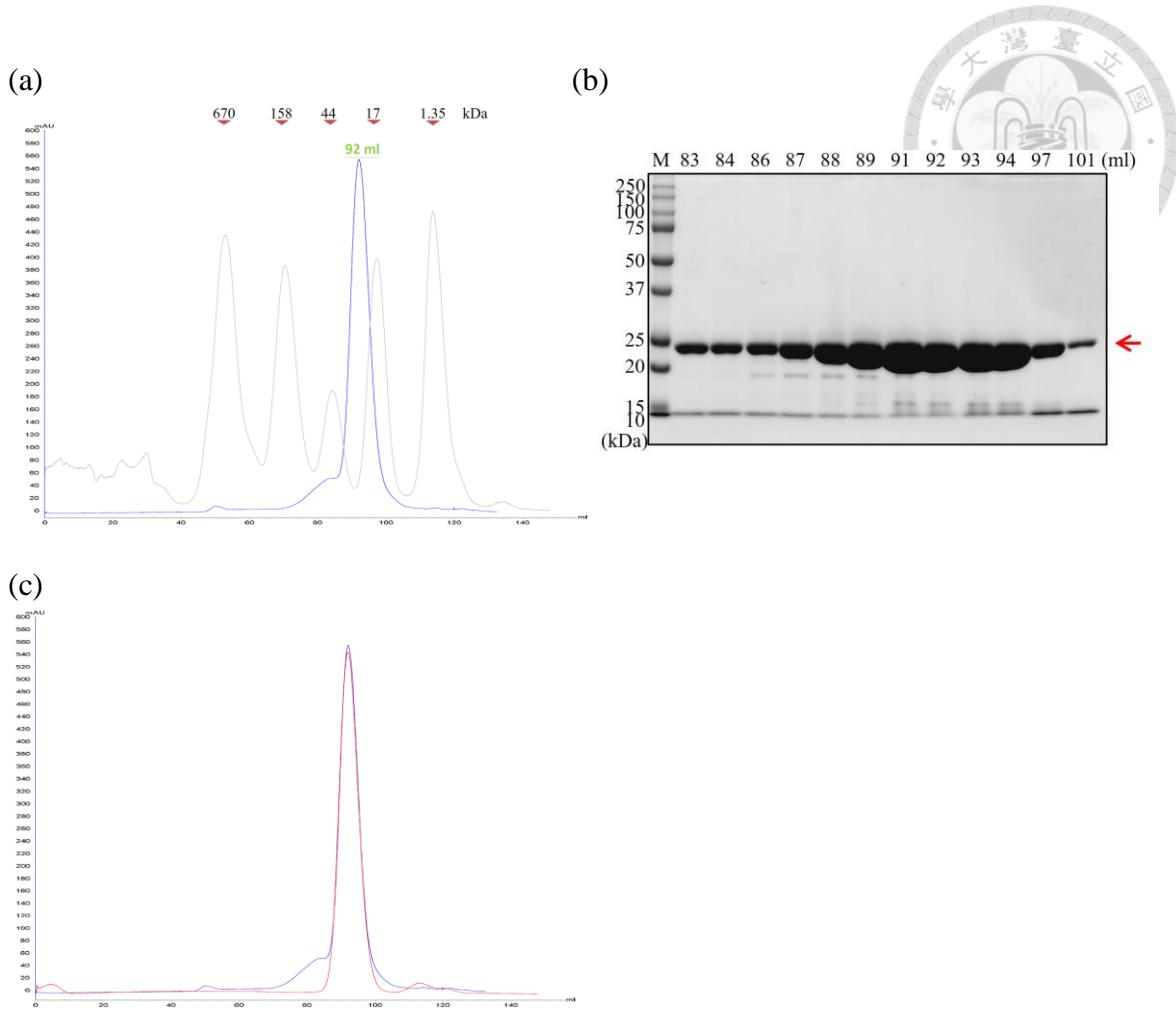


圖 3-29 NN206^{P22A} 之分子篩層析純化

(a) NN206^{P22A} 經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值，藍色曲線為 NN206^{P22A} 之吸光值，灰色則為標準品之吸光值。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{P22A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。(c) 將 NN206 之分子篩層析法結果 (紅色) 與 NN206^{P22A} 之結果 (藍色) 疊合。

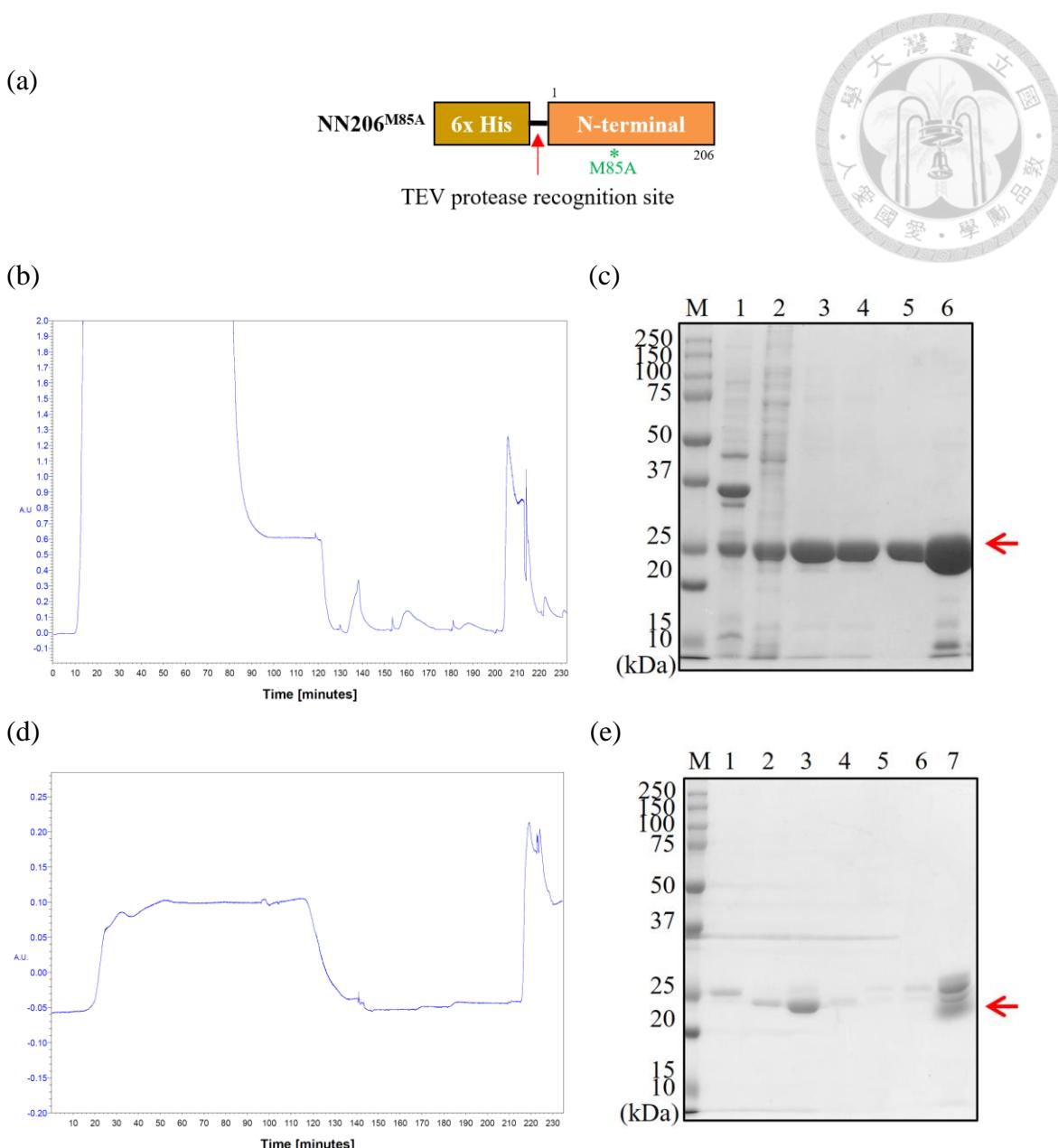


圖 3-30 NN206^{M85A} 的固定化金屬離子親合層析法純化

(a) NN206^{M85A} 之示意圖，此蛋白僅含有 LonA 的 N 端，此蛋白的 M85 被突變成 alanine, 6xHis 接於此蛋白之 N 端。(b) 純化之層析圖，橫軸表示時間，縱軸為 UV280 之吸光值。(c) NN206^{M85A} 純化之結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{M85A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M : marker；1：離心後之菌塊；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：10 mM imidazole 之沖洗液；4：20 mM imidazole 之沖洗液；5：30 mM imidazole 之沖洗液；6：400 mM imidazole 之洗脫液。(d) NN206^{M85A} 以 TEV 蛋白酶 protease 切除 6xHis 後之純化層析圖。(e)



NN206^{M85A} 加入 TEV 蛋白酶處理後之純化結果。經過 Cooassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{M85A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；1：未經 TEV 蛋白酶處理之 NN206^{M85A}；2：未被固定化金屬離子親合管柱結合之上清液；3：不含 imidazole 之沖洗液；4：10 mM 之沖洗液；5：20 mM imidazole 之沖洗液；6：30 mM imidazole 之沖洗液；7：400 mM imidazole 洗脫液。

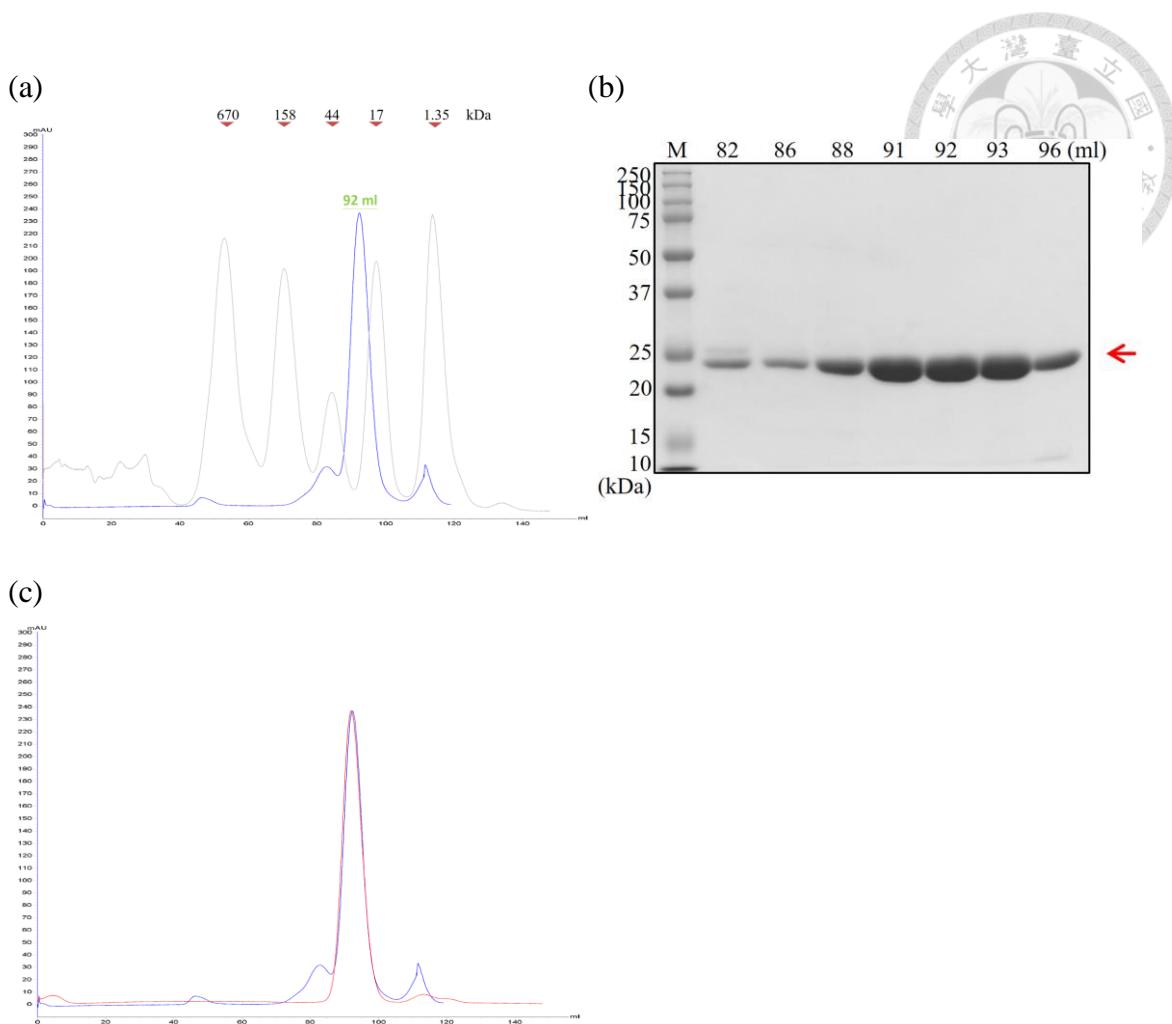
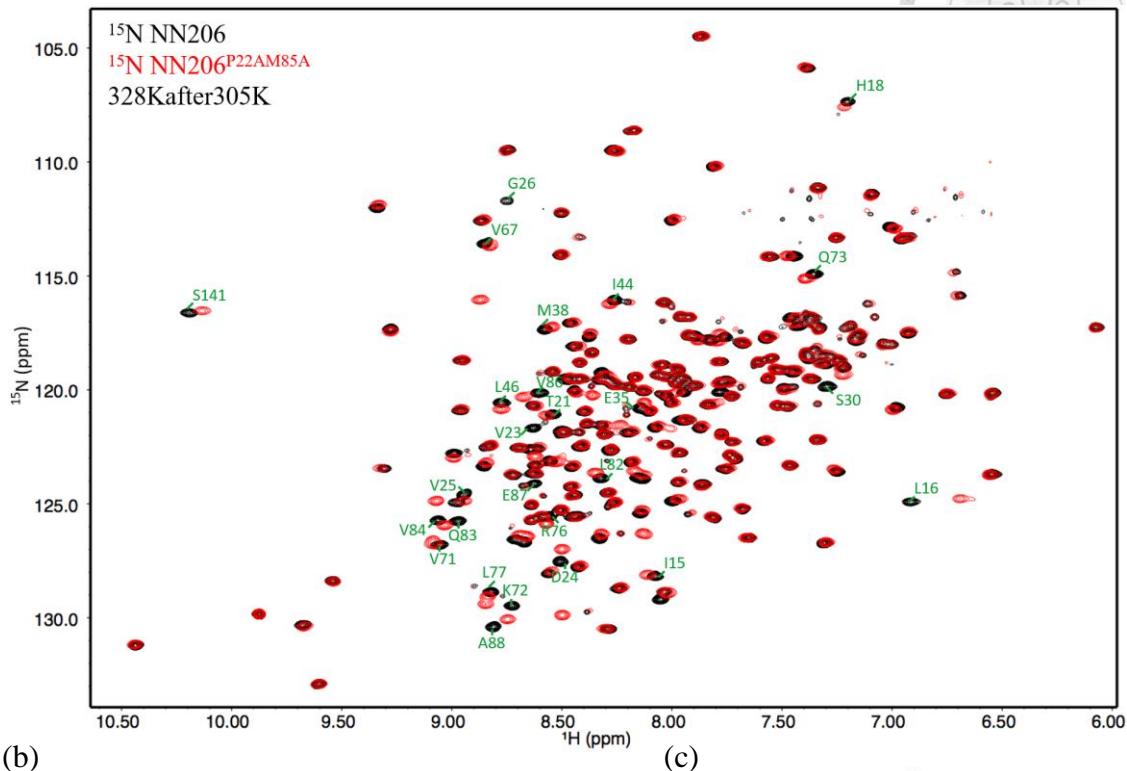


圖 3-31 NN206^{M85A} 之分子篩層析純化

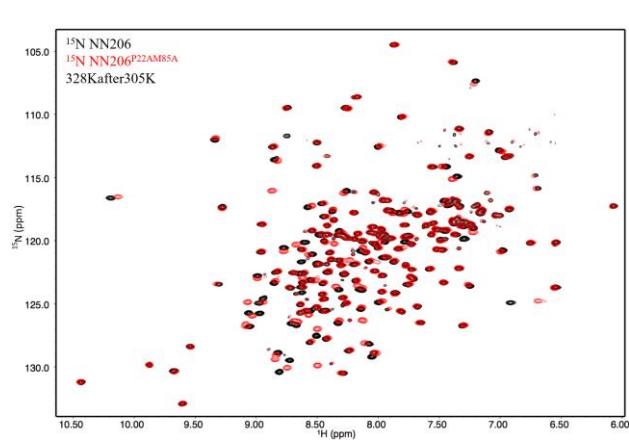
(a) NN206^{M85A} 經過 HiLoad 16/600 Superdex 200 pg 之層析圖，橫軸為析出液之體積以毫升數表示，左側縱軸為 UV280 之吸光值，藍色曲線為 NN206^{M85A} 之吸光值，灰色則為標準品之吸光值。(b) 經過 Coomassie Blue 染色的 12% SDS-PAGE，NN206^{M85A} 分子量大小為 24 kDa (紅色箭頭)。M：marker；橫軸數值表示收集的樣本所對應之沖脫體積。(c) 將 NN206 之分子篩層析法結果 (紅色) 與 NN206^{M85A} 之結果 (藍色) 疊合。



(a)



(b)



(c)

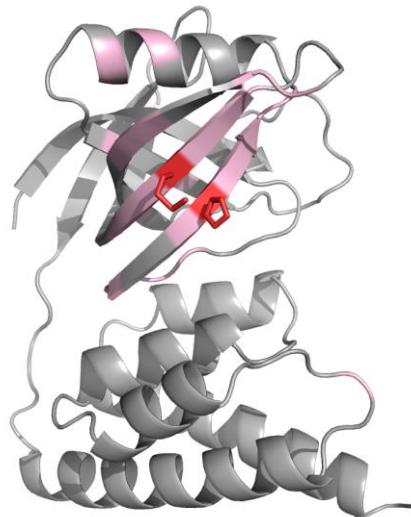


圖 3-32 NN206 與 NN206^{P22AM85A} 的比較

(a) NN206 (黑色) 與 NN206^{P22AM85A} (紅色) 於 305K 之二維 ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC 光譜比較，綠色的標定表示有化學位移改變的殘基。(b) NN206 (黑色) 與 NN206^{P22AM85A} (紅色) 於 305K 之二維 ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC 光譜比較，未標定交叉峰所代表的殘基。(c) 於 NN206 的結構上標定有化學位移改變的殘基，紅色的部分為點突變之位點，粉色區塊為有化學位移變動的殘基。

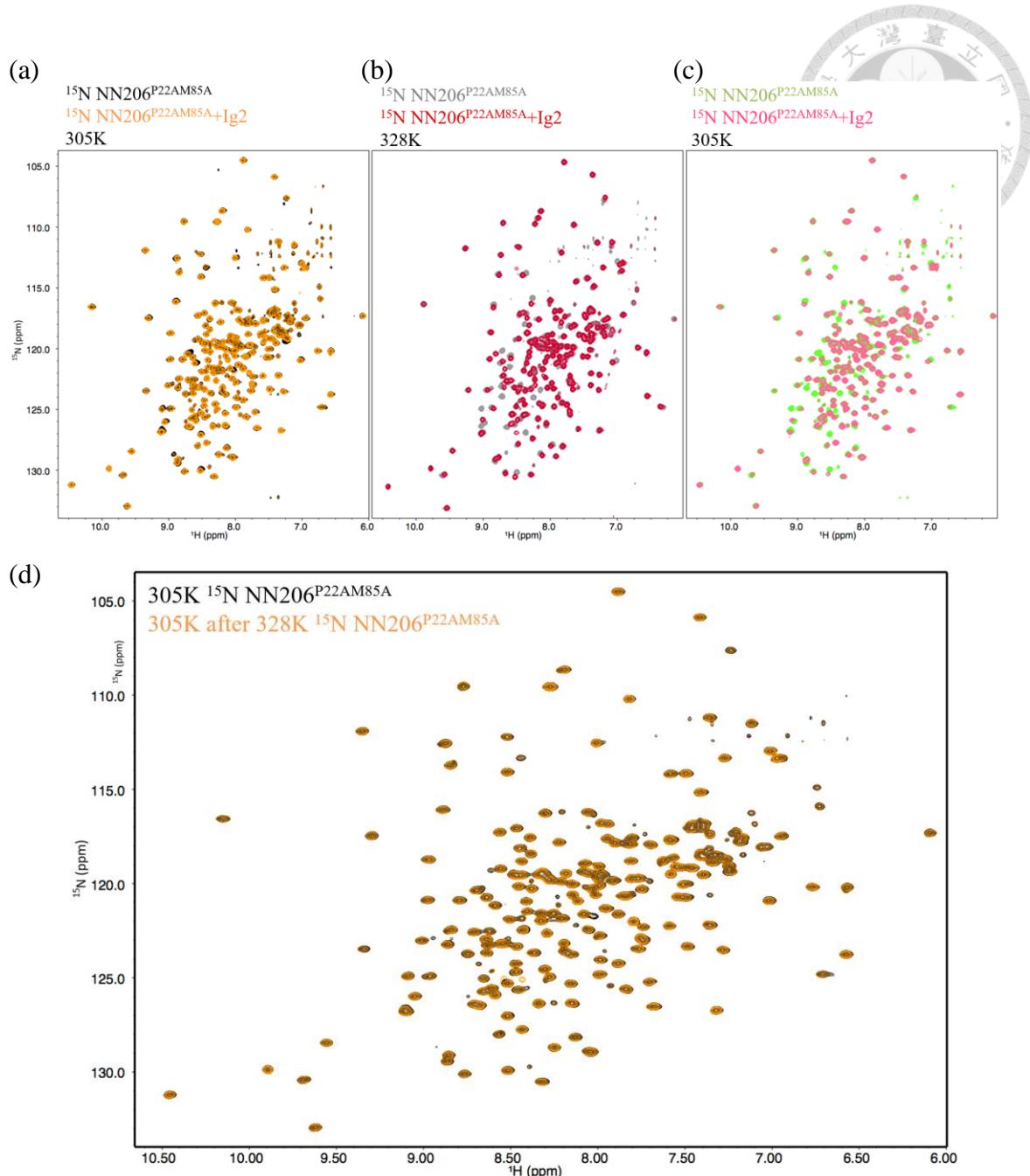


圖 3-33 Ig2 滴定 NN206 $^{\text{P}22\text{AM}85\text{A}}$ 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜

(a) 於 305K 下，NN206 $^{\text{P}22\text{AM}85\text{A}}$ (黑色) 與 Ig2 滴定 NN206 (橘色) 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。(b) 於 328K 下，NN206 $^{\text{P}22\text{AM}85\text{A}}$ (灰色) 與 Ig2 滴定 NN206 (紅色) 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。(c) 將溫度由 328K 降回 305K 下，NN206 $^{\text{P}22\text{AM}85\text{A}}$ (綠色) 與 Ig2 滴定 NN206 (粉色) 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜疊合。(d) NN206 $^{\text{P}22\text{AM}85\text{A}}$ (黑色) 之 305K 與 NN206 $^{\text{P}22\text{AM}85\text{A}}$ (橘色) 由 328K 降回 305K 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜比較。

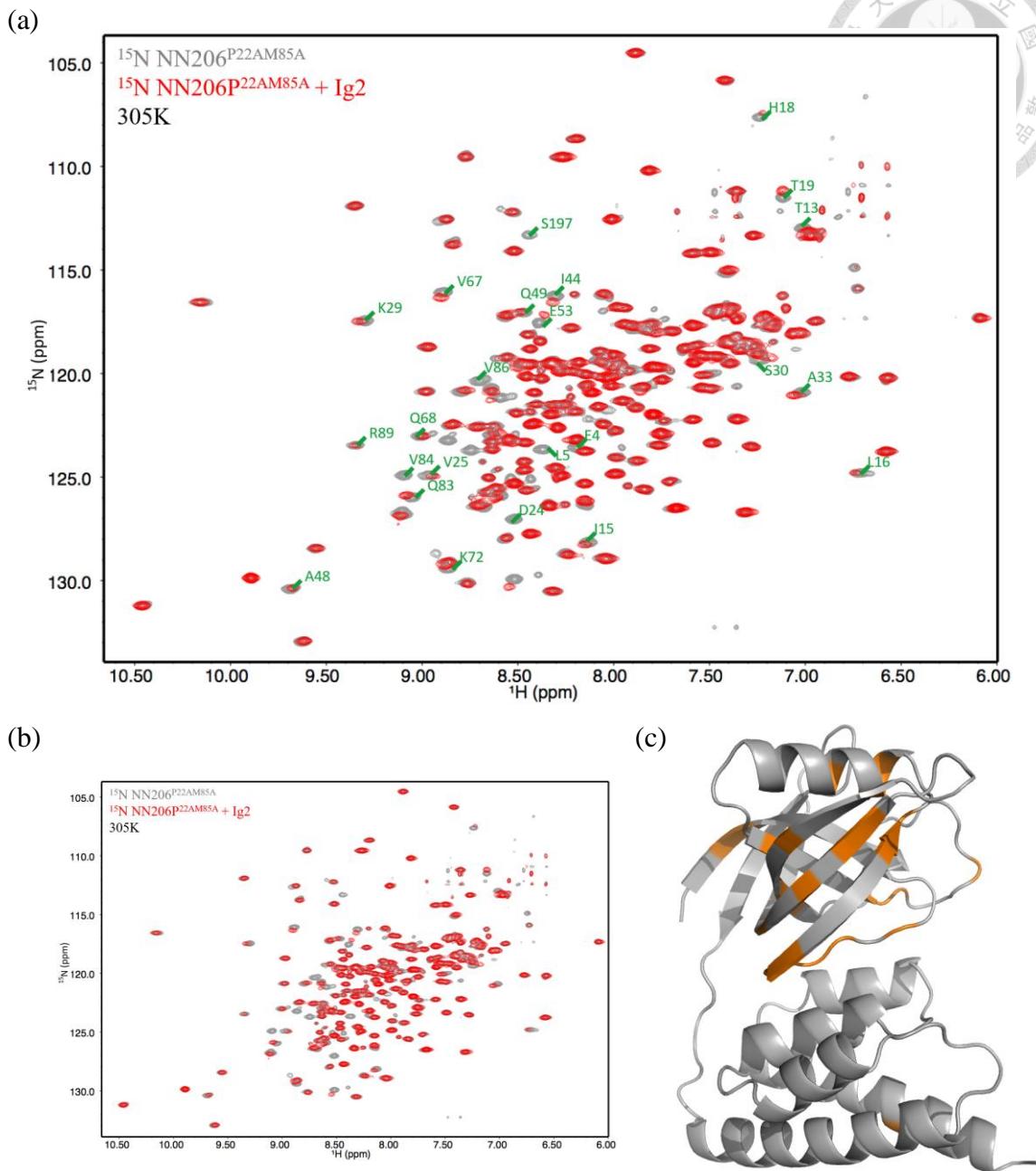


圖 3-34 NN206^{P22AM85A} 加入 Ig2 之化學位移變化

(a) NN206^{P22AM85A} (灰色) 與 NN206^{P22AM85A} 加入 Ig2 (紅色) 於 328K 之二維 ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC 光譜比較，綠色的標定表示有化學位移改變的殘基 (residue)。(b) NN206^{P22AM85A} (灰色) 與 NN206^{P22AM85A} 加入 Ig2 (紅色) 於 328K 之二維 ¹H-¹⁵N TROSY-HSQC 光譜比較，未標定交叉峰所代表的殘基。(c) 於 NN206 的結構上標定有化學位移改變的殘基，橘色區塊即為有化學位移變動的殘基。

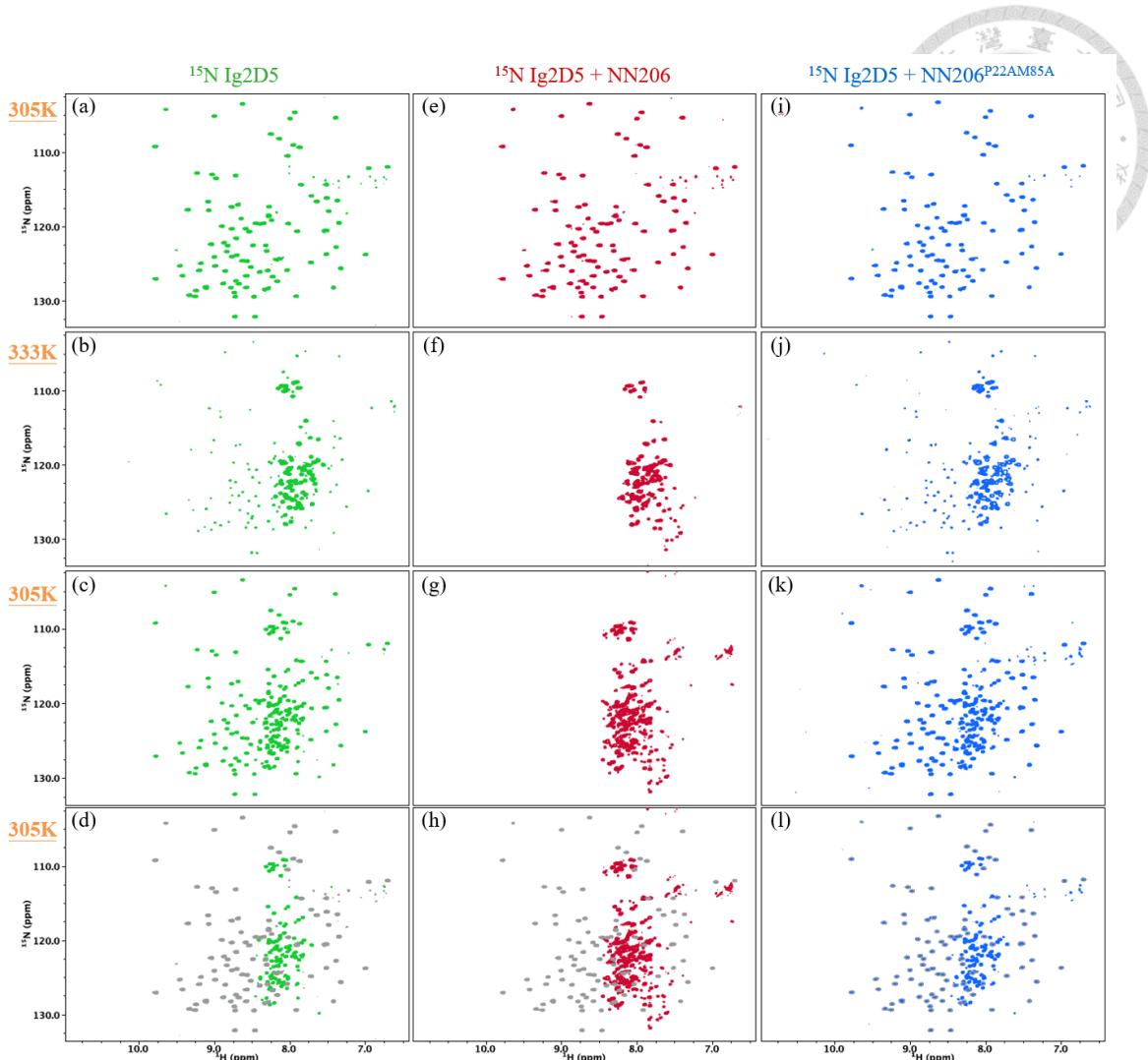


圖 3-35 WT LonA 之 N 端功能區對於 Ig2D5 結合的影響

(a-l) Ig2D5 (綠色)、Ig2D5 加入 NN206 (紅色) 及 Ig2D5 加入 NN206P22AM85A (藍色) 之二維 ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC 光譜。(a)、(e) 和 (i) 為 305K 下紀錄的光譜，(b)、(f) 和 (j) 333K 下紀錄的光譜，(c)、(g) 和 (k) 為由 333K 降溫回 305K 紀錄的光譜。(d)、(h) 和 (l) 為加熱前後之 305K 光譜疊圖，灰色為加熱前之 305K 光譜。

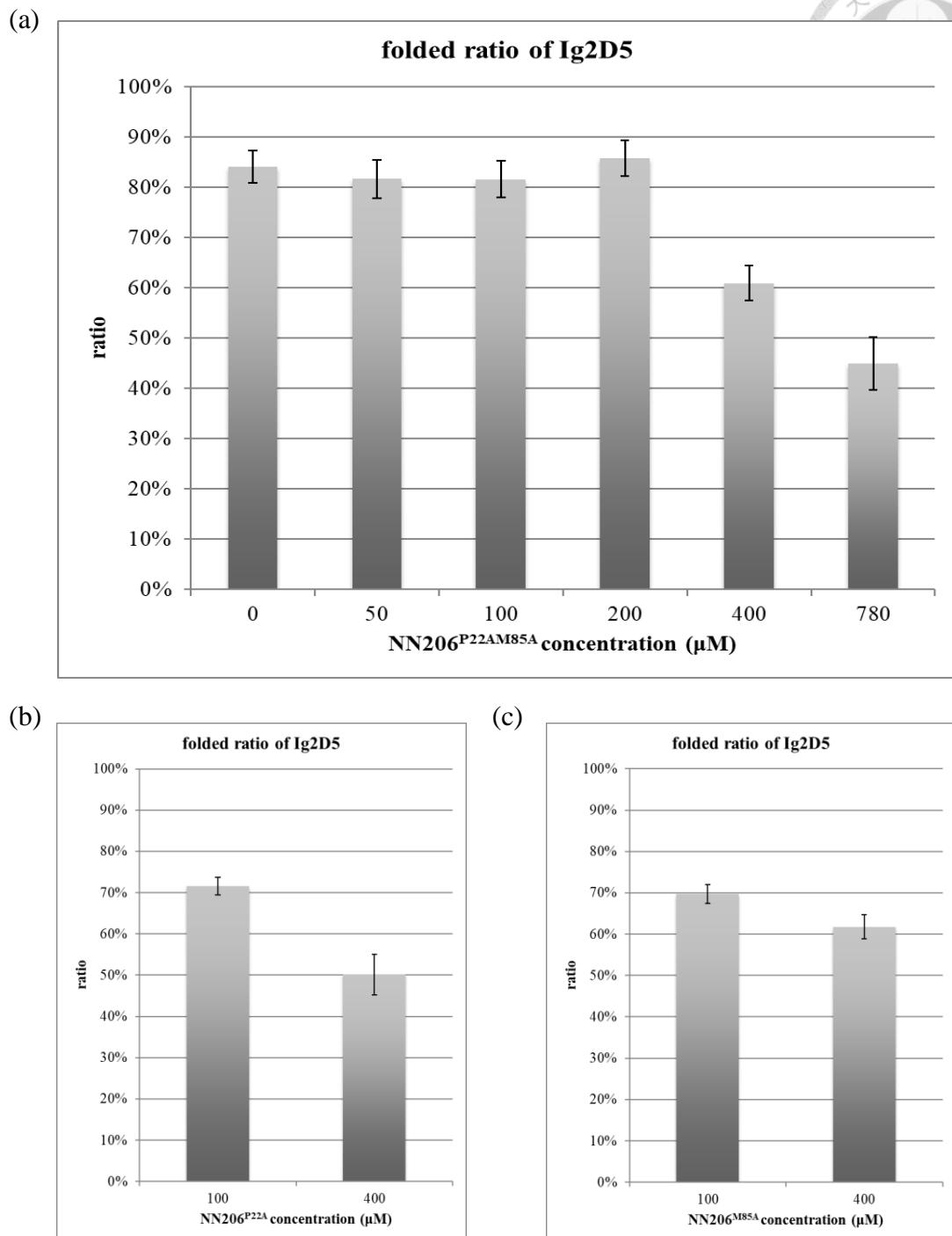
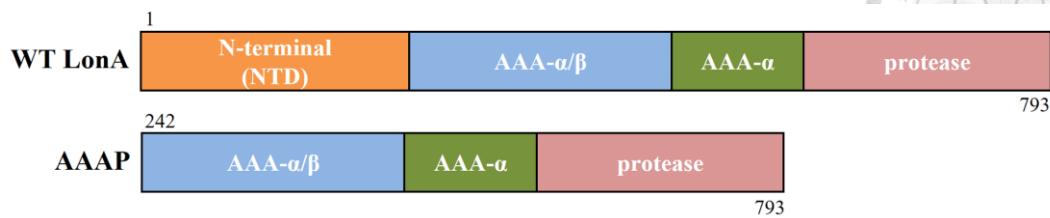


圖 3-36 WT LonA 之 N 端功能區點突變對於 Ig2D5 結合的影響

(a) 加入 NN206^{P22AM85A} 後 Ig2D5 折疊之比例。(b)加入 NN206^{P22A} 後 Ig2D5 折疊之比例。(c) 加入 NN206^{M85A} 後 Ig2D5 折疊之比例。



(a)



(b)

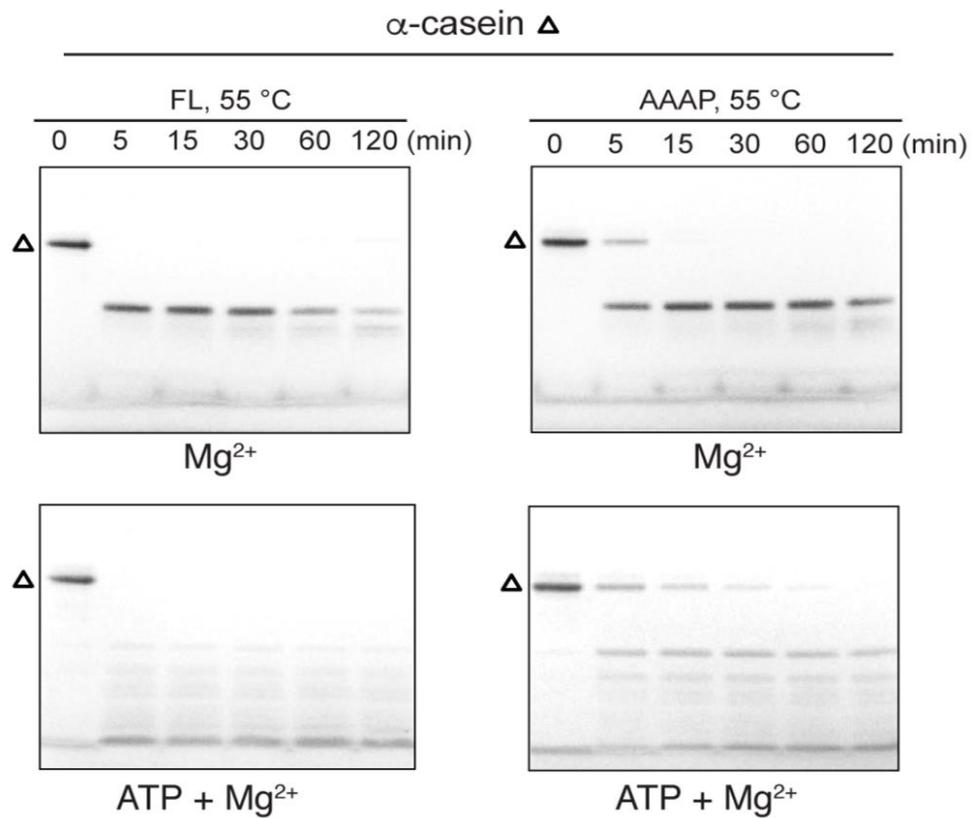


圖 4-1 N 端功能區對 α -casein 降解之重要性

(a) LonA 與 AAAP 的功能區組成。LonA 包含 N 端功能區、ATPase 功能區及蛋白酶功能區，AAAP 是將 LonA 之 N 端功能區去除所生成之蛋白。(b) LonA 與 AAAP 對 α -casein 之降解實驗 (degradation assay) (張崇毅老師實驗室，未發表)。FL：全長 LonA。

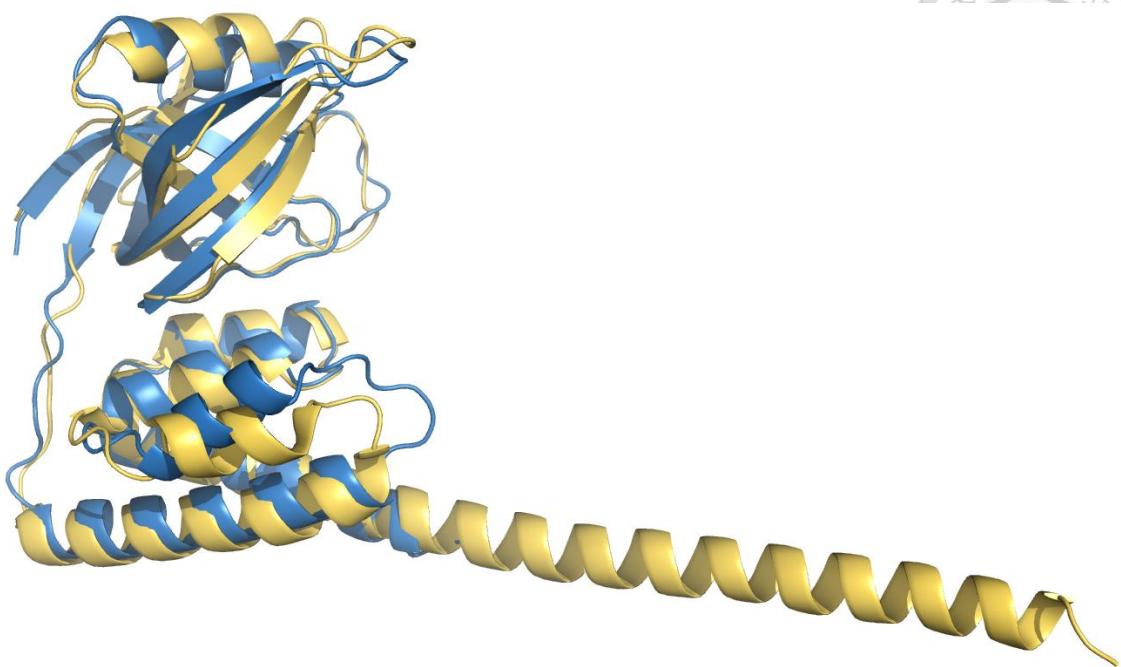


圖 4-2 MtaLonA 與 EcLon 之 N 端功能區比較

MtaLonA (藍色) 與 EcLon (黃色) 的 N 端功能區疊圖。



表

表 2-1 本實驗使用之菌種

<i>E. coli</i> strain	Genotype
DH5 α	F $^{-}$ ϕ 80/ <i>acZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rK$^{-}$, mK$^{+}$) phoA supE44 λ$^{-}$ thi-1 gyrA96 relA1</i>
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS.</i> λ DE3 = λ s <i>BamHI</i> o Δ <i>EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>



表 2-2 本實驗使用之質體

質體名稱	相關特徵	來源
pET21a(+)MtaLonA	全長 LonA	10
pET28a(+)tev-NN206	LonA 之 N 端	張崇毅老師實驗室
pET28a(+)tev-NN206 ^{P22AM85A}	LonA 之 N 端，並且將 P22 及 M85 兩個胺基酸突變成 alanine	本研究
pET28a(+)tev-NN206 ^{P22A}	LonA 之 N 端，並且將 P22 突變成 alanine	本研究
pET28a(+)tev-NN206 ^{M85A}	LonA 之 N 端，並且將 M85 突變成 alanine	本研究
pET28a(+)tev-Ig2	盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 的第 5 個和第 6 個功能區 (domain)	10
pET28a(+)tev-Ig2D5	盤基網柄菌凝膠因子 ABP-120 的第 5 個功能區	本研究



表 2-3 本實驗使用之培養基、培養液

名稱	成分	備註
LB 培養液	25g/L LB Broth	以滅菌釜滅菌
LB 培養基	40g/L LB agar	以 autoclave 滅菌，冷卻至 55°C後加入抗生素
10x M9 培養液	Na ₂ HPO ₄ (anhydrous) 48 g KH ₂ PO ₄ 24 g NaCl 40 g 加水至 800 ml pH 7.4	以滅菌釜滅菌
kanamycin	50 g/L kanamycin	以 0.22 μm 針筒過濾器過濾
ampicillin	100 g/L ampicillin	以 0.22 μm 針筒過濾器過濾



表 2-4 本實驗使用之緩衝溶液

名稱	配方	備註
binding buffer	500 mM NaCl 25 mM NaPi 5 mM β-Me 5% glycerol pH 8.0	固定化金屬離子親合層析法
NMR buffer	50 mM NaPi 2 mM β-Me pH 6.5	分子篩層析法、蛋白質核磁共振實驗
buffer A	50 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 2mM β-Me pH 8.0	離子交換層析法
buffer B	1 M NaCl 20 mM Tris-HCl 2mM β-Me pH 8.0	離子交換層析法
10x SDS running buffer	30.2 g Tris-HCl 144 g glycine 補 ddH ₂ O 至 1000 ml	SDS-PAGE

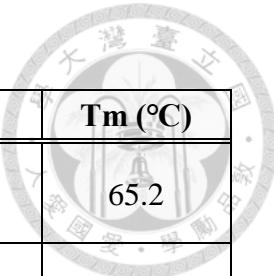


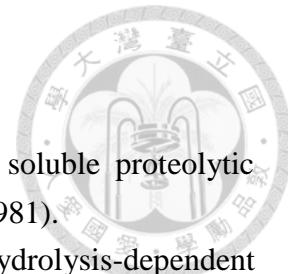
表 2-5 本實驗使用之引子

名稱	序列 (5'→3')	Tm (°C)
Ig2D5_1	caaaagagctatctcaccattctaggcattcaatcgcttaacgtcg	65.2
Ig2D5_2	cgcgtttaaaggcgattgaaggctagaatggtaagatagcttttg	65.2
NN206 P22A_1	ccacgtccaccgcggtggtgttg	69.6
NN206 P22A_2	cacaccaccaccgcggtgacgtgg	69.6
NN206 M85A_1	ccgggttccaccgcgacctgcagggtg	73.0
NN206 M85A_2	caccctgcaggtcgcggtgaaagccccgg	73.0



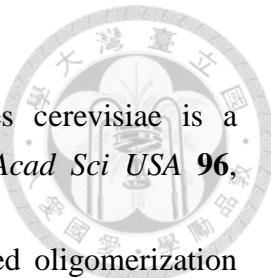
表 3-1 NN206 的胺基酸組成

胺基酸	數目	百分比 (%)
Ala (A)	22	10.7
Arg (R)	17	8.3
Asn (N)	2	1.0
Asp (D)	16	7.8
Cys (C)	0	0.0
Gln (Q)	7	3.4
Glu (E)	19	9.2
Gly (G)	8	3.9
His (H)	3	1.5
Ile (I)	8	3.9
Leu (L)	25	12.1
Lys (K)	10	4.9
Met (M)	5	2.4
Phe (F)	5	2.4
Pro (P)	12	5.8
Ser (S)	5	2.4
Thr (T)	12	5.8
Trp (W)	2	1.0
Tyr (Y)	6	2.9
Val (V)	22	10.7



參考文獻

- 1 Swamy, K. H. & Goldberg, A. L. E. coli contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent. *Nature* **292**, 652-654 (1981).
- 2 Charette, M. F., Henderson, G. W. & Markovitz, A. ATP hydrolysis-dependent protease activity of the lon (capR) protein of Escherichia coli K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4728-4732 (1981).
- 3 Gur, E. & Sauer, R. T. Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes Dev* **22**, 2267-2277, doi:10.1101/gad.1670908 (2008).
- 4 Sauer, R. T. & Baker, T. A. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu Rev Biochem* **80**, 587-612, doi:10.1146/annurev-biochem-060408-172623 (2011).
- 5 Patterson-Ward, J., Huang, J. & Lee, I. Detection and characterization of two ATP-dependent conformational changes in proteolytically inactive Escherichia coli Lon mutants by stopped flow kinetic techniques. *Biochemistry* **46**, 13593-13605, doi:10.1021/bi701649b (2007).
- 6 Waxman, L. & Goldberg, A. L. Selectivity of intracellular proteolysis: protein substrates activate the ATP-dependent protease (La). *Science* **232**, 500-503 (1986).
- 7 Menon, A. S. & Goldberg, A. L. Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP. *The Journal of biological chemistry* **262**, 14929-14934 (1987).
- 8 Gur, E. & Sauer, R. T. Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA+ Lon proteolytic machine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18503-18508, doi:10.1073/pnas.0910392106 (2009).
- 9 Wohlever, M. L., Baker, T. A. & Sauer, R. T. Roles of the N domain of the AAA+ Lon protease in substrate recognition, allosteric regulation and chaperone activity. *Mol Microbiol* **91**, 66-78, doi:10.1111/mmi.12444 (2014).
- 10 Su, S. C. et al. Structural Basis for the Magnesium-Dependent Activation and Hexamerization of the Lon AAA+ Protease. *Structure* **24**, 676-686, doi:10.1016/j.str.2016.03.003 (2016).
- 11 Hanson, P. I. & Whiteheart, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 519-529, doi:10.1038/nrm1684 (2005).
- 12 Rotanova, T. V. et al. Slicing a protease: structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. *Protein Sci* **15**, 1815-1828, doi:10.1110/ps.052069306 (2006).
- 13 Chung, C. H. & Goldberg, A. L. The product of the lon (capR) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc Natl Acad Sci*



- USA **78**, 4931-4935 (1981).
- 14 Stahlberg, H. *et al.* Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *P Natl Acad Sci USA* **96**, 6787-6790, doi:DOI 10.1073/pnas.96.12.6787 (1999).
- 15 Rudyak, S. G., Brenowitz, M. & Shrader, T. E. Mg²⁺-linked oligomerization modulates the catalytic activity of the Lon (La) protease from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry* **40**, 9317-9323 (2001).
- 16 Park, S. C. *et al.* Oligomeric structure of the ATP-dependent protease La (Lon) of *Escherichia coli*. *Mol Cells* **21**, 129-134 (2006).
- 17 Kereiche, S. *et al.* The N-terminal domain plays a crucial role in the structure of a full-length human mitochondrial Lon protease. *Sci Rep* **6**, 33631, doi:10.1038/srep33631 (2016).
- 18 Waxman, L. & Goldberg, A. L. Protease La from Escherichia-Coli Hydrolyzes Atp and Proteins in a Linked Fashion. *P Natl Acad Sci-Biol* **79**, 4883-4887, doi:DOI 10.1073/pnas.79.16.4883 (1982).
- 19 Botos, I. *et al.* The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 8140-8148, doi:10.1074/jbc.M312243200 (2004).
- 20 Rotanova, T. V. *et al.* Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur J Biochem* **271**, 4865-4871, doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04452.x (2004).
- 21 Roudiak, S. G. & Shrader, T. E. Functional role of the N-terminal region of the Lon protease from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry* **37**, 11255-11263, doi:10.1021/bi980945h (1998).
- 22 Cheng, I. *et al.* Identification of a Region in the N-Terminus of *Escherichia coli* Lon That Affects ATPase, Substrate Translocation and Proteolytic Activity. *Journal of Molecular Biology* **418**, 208-225, doi:10.1016/j.jmb.2012.02.039 (2012).
- 23 Duman, R. E. & Lowe, J. Crystal structures of *Bacillus subtilis* Lon protease. *J Mol Biol* **401**, 653-670, doi:10.1016/j.jmb.2010.06.030 (2010).
- 24 Li, M. *et al.* Structure of the N-terminal fragment of *Escherichia coli* Lon protease. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 865-873, doi:10.1107/S0907444910019554 (2010).
- 25 Li, M. *et al.* Crystal structure of the N-terminal domain of *E. coli* Lon protease. *Protein Sci* **14**, 2895-2900, doi:10.1110/ps.051736805 (2005).
- 26 Gur, E. The Lon AAA+ protease. *Subcell Biochem* **66**, 35-51, doi:10.1007/978-94-007-5940-4_2 (2013).
- 27 Suzuki, C. K. *et al.* ATP-dependent proteases that also chaperone protein



- biogenesis. *Trends in biochemical sciences* **22**, 118-123 (1997).
- 28 Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893 (1999).
- 29 Zehnbauer, B. A., Foley, E. C., Henderson, G. W. & Markovitz, A. Identification and purification of the Lon⁺ (capR⁺) gene product, a DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2043-2047 (1981).
- 30 Fu, G. K., Smith, M. J. & Markovitz, D. M. Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **272**, 534-538 (1997).
- 31 Pinti, M. et al. Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **72**, 4807-4824, doi:10.1007/s00018-015-2039-3 (2015).
- 32 Justice, S. S., Hunstad, D. A., Cegelski, L. & Hultgren, S. J. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 162-168, doi:10.1038/nrmicro1820 (2008).
- 33 Ishii, Y. & Amano, F. Regulation of SulA cleavage by Lon protease by the C-terminal amino acid of SulA, histidine. *Biochem J* **358**, 473-480 (2001).
- 34 Torres-Cabassa, A. S. & Gottesman, S. Capsule synthesis in Escherichia coli K-12 is regulated by proteolysis. *J Bacteriol* **169**, 981-989 (1987).
- 35 Ebel, W., Skinner, M. M., Dierksen, K. P., Scott, J. M. & Trempy, J. E. A conserved domain in Escherichia coli Lon protease is involved in substrate discriminator activity. *J Bacteriol* **181**, 2236-2243 (1999).
- 36 Wohlever, M. L., Baker, T. A. & Sauer, R. T. A mutation in the N domain of Escherichia coli Lon stabilizes dodecamers and selectively alters degradation of model substrates. *J Bacteriol* **195**, 5622-5628, doi:10.1128/JB.00886-13 (2013).
- 37 Adam, C. et al. Biological roles of the *Podospora anserina* mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain. *PLoS One* **7**, e38138, doi:10.1371/journal.pone.0038138 (2012).
- 38 Chen, M. Y., Lin, G. H., Lin, Y. T. & Tsay, S. S. *Meiothermus taiwanensis* sp. nov., a novel filamentous, thermophilic species isolated in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1647-1654, doi:10.1099/00207713-52-5-1647 (2002).
- 39 Lin, C. C. et al. Structural Insights into the Allosteric Operation of the Lon AAA+ Protease. *Structure* **24**, 667-675, doi:10.1016/j.str.2016.03.001 (2016).
- 40 McCoy, A. J., Fucini, P., Noegel, A. A. & Stewart, M. Structural basis for dimerization of the Dictyostelium gelation factor (ABP120) rod. *Nat Struct Biol* **6**, 836-841, doi:10.1038/12296 (1999).
- 41 Rutgers, D. o. C. a. C. B. o. High field NMR, <<http://chem.rutgers.edu/facilities/biomolecular-nmr/biomolecular-nmr-experiment>

42

[ents/573-triple-resonance-experiments-for-backbone-assignments>](https://sites.google.com/site/nmrgenerator/home)

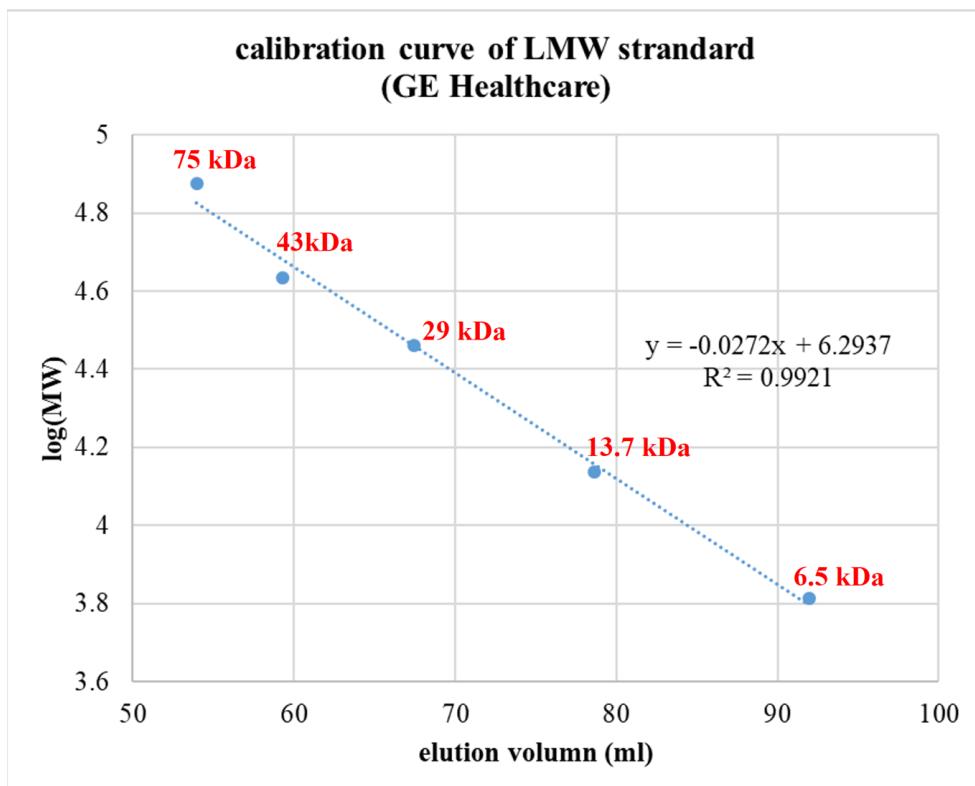
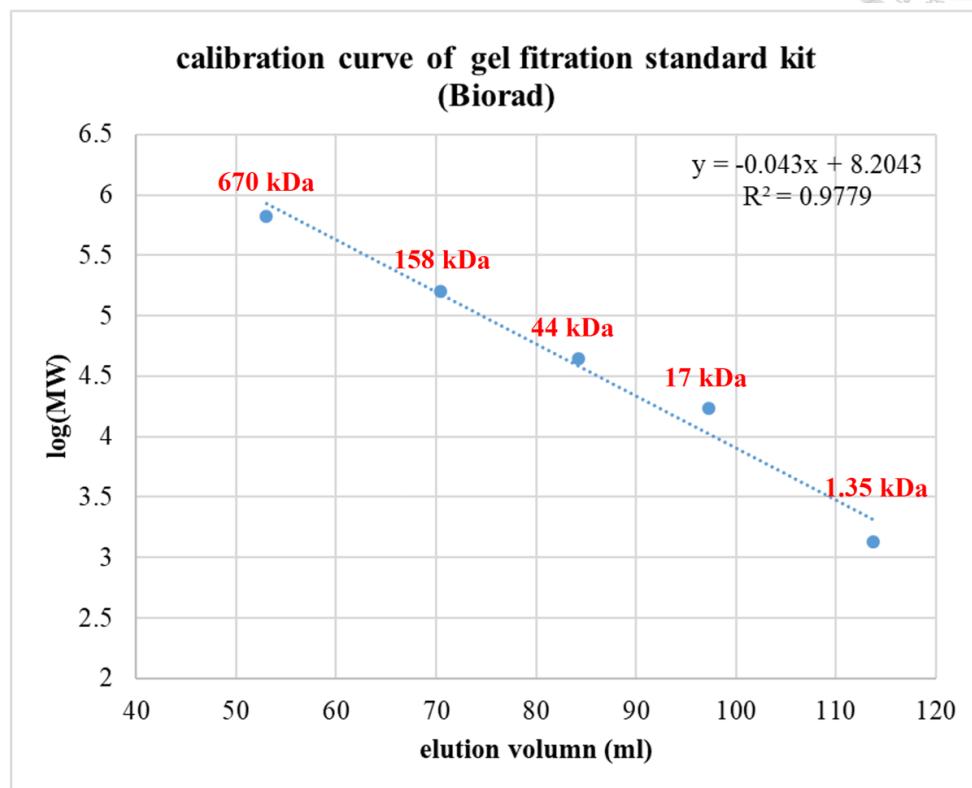
Phillips, M. *Triple Resonance Backbone Assignment: HNCA*,
[<https://sites.google.com/site/nmrgenerator/home>](https://sites.google.com/site/nmrgenerator/home)

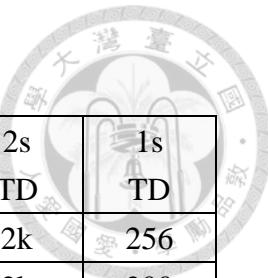




附錄

附錄一 分子篩層析法標準品之減量線





附錄二 核磁共振實驗之參數

Sample	Temp. (K)	experiment	ns	3s TD	2s TD	1s TD
LonA	328	TROSY-HSQC	200	/	2k	256
NN206	305	TROSY-HSQC	56	/	2k	200
	328	TROSY-HSQC	56	/	2k	200
	328	HNCA	8	2k	58	88
	328	HN(CO)CA	8	2k	58	92
	328	HNCACB	8	2k	60	120
	328	HN(CO)CACB	8	2k	56	112
	328	HN(CA)CO	8	2k	54	64
	328	HNCO	8	2k	60	64
Ig2	305	TROSY-HSQC	72	/	2k	200
Ig2D5	305	TROSY-HSQC	56	/	2k	200
	328	TROSY-HSQC	56	/	2k	200

附錄三 摺疊正確 Ig2D5 強度計算之訊號峰

