

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

酵母菌過氧化體 ABC 運輸蛋白 PXA1 及 PXA2 複合體之結構 及功能探討(第 3 年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2311-B-040-002-MY3
執行期間：99 年 08 月 01 日至 100 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學生化暨生物科技研究所

計畫主持人：蔡榮宗

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：趙俊欽
碩士班研究生-兼任助理人員：許家齊
碩士班研究生-兼任助理人員：王建程
碩士班研究生-兼任助理人員：林育緯
碩士班研究生-兼任助理人員：陳詩銘
碩士班研究生-兼任助理人員：陳孟賢
碩士班研究生-兼任助理人員：白駿里
博士班研究生-兼任助理人員：莊政益

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中華民國 100 年 10 月 31 日

中文摘要： 過氧化體是真核細胞中脂肪酸進行 α 氧化作用的重要胞器。目前已知人類過氧化體膜上有四個 ABC 運輸蛋白(ATP-binding cassette transporter)，其中的 ALDP 參與極長鏈脂肪酸之 α 氧化作用，當此蛋白基因發生變異時，會導致腎上腺腦白質退化症(簡稱為 ALD)。目前的證據指出，ALDP 與其他兩個過氧化體 ABC 蛋白(ALDRP 及 PMP70)會形成同源及異源二聚體。酵母菌中也有 ALDP 及 PMP70 的同源性蛋白，分別為 Pxa1p 及 Pxa2p。生化及遺傳的證據指出，Pxa1p 及 Pxa2p 是以異源二聚體參與長鏈脂肪酸的 α 氧化作用。然而，到目前為止，尚未有人針對 Pxa1p 及 Pxa2p 是否可能形成同源複合體進行研究，此外，兩者之間相互作用的區域也未有人進行深入探討。

本研究計畫一開始先構築 pxa1/pxa2 雙基因刪除酵母菌株，再將表現全長 Pxa1p-HA/Pxa1p-V5 的質體或 Pxa2p-HA/Pxa2p-V5 的質體送入 pxa1/pxa2 雙基因刪除株中表現蛋白，然後以免疫共沉澱方法證實同源複合體的存在。接著我們使用膠體過濾層析法分析蛋白複合體的分子大小，分析結果指出，蛋白在清潔劑萃取的情況下都會形成分子量大於 2000 KDa 的不正常聚集(aggregate)，因此無法經由膠體過濾層析法鑑定出複合體的分子量。由於 Pxa1p 及 Pxa2p 都是 ABC 運輸蛋白，我們也嘗試將蛋白的 ATPase 的區域以重組蛋白的型態進行表現及純化，並進行 ATPase 活性的鑑定，然而因為非專一性蛋白干擾的存在，而無法鑑定其 ATPase 的特性。為了進一步以遺傳的方法證實同源複合體及異源複合體的存在的可能性，我們開始發展酵母菌雙雜交方法，來探討蛋白之間的相互作用，實驗過程中發現 Pxa1p 及 Pxa2p 的穿膜區會干擾雙雜交的分析方法，因此後來只選取蛋白穿膜區之後的 C 端進行分析。實驗結果顯示相互作用確實存在於 Pxa1p-Pxa1p、Pxa2p-Pxa2p 及 Pxa1p-Pxa2p 的組別中，顯示確實存在同源複合體及異源複合體。另外，我們進一步探討 Pxa1p-Pxa2p 相互作用的區域，發現 Pxa2p 的 C 端的 CT2 區域對於 Pxa1p-Pxa2p 蛋白之間的相互作用是必要的，此區域高度保留的氨基酸若發生點突變，也會影響到相互作用的能力，此結果更加說明 CT2 區域對於相互作用的重要性。另外我們也發現 Pxa2p 蛋白的 CT3 區域具有調節相互作用的能力，當 CT3 刪除時，Pxa1p-Pxa2p 的相互作用增強為兩倍，顯示 CT3 具有負向調節相互作用的能力。最後，經由 Pxa1-NBF 一系列刪除突變株的分析發現，Pxa1-NBF 的 C 端包含 ATP 結合及分解的區域對於相互作用是必須的，也就使說 Pxa1p 可能是使用本區域直接與 Pxa2p 蛋白的 CT2 區域進行相互作用。

在本研究中，我們發現 Pxa1p-Pxa1p 及 Pxa2p-Pxa2p 同源的相互作用，目前已知的以異源二聚體運作的 ABC 運輸蛋白

中，這種同源相互作用是第一個被發現的，其生理功能是否與調節運輸能力有關還有待深入探討。

英文摘要：

目錄

前言及文獻探討	2
研究目的	6
研究方法	8
實驗結果	11
討論	26
參考文獻	27
附錄	29
計畫成果自評	31

一、前言及文獻探討

ABC 運輸蛋白(ATP-binding cassette transporter)是屬於一個很大的蛋白家族，此蛋白家族成員通常為膜蛋白，一般的功能在於協助離子、小分子或蛋白質等物質穿越膜的運輸過程(1)。ABC 運輸蛋白通常是藉由其上的 ATP 結合區的序列及構造而被鑑定出來。此區域又稱為核苷酸結合區(nucleotide-binding fold; NBF)，包含三個高度保留序列，最外圍的兩個稱之為 Walker A 及 B，相隔約 90~120 個氨基酸。第三個稱為 C 特徵性序列(C motif)，位於 Walker B 序列的上游約 20 個氨基酸的位置(參考圖一)(2)。

圖一：摘自 Ref. 2

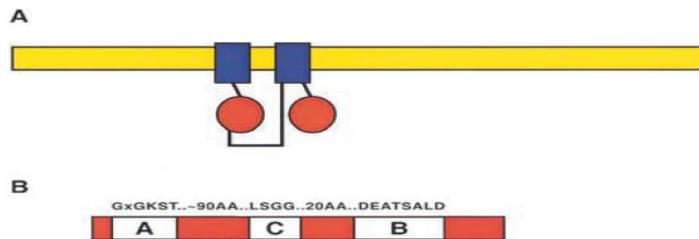


Figure 1 Diagram of a typical ABC transporter protein. (A) A diagram of the structure of a representative ABC protein is shown with a lipid bilayer in yellow, the transmembrane domains in blue, and the nucleotide binding fold in red. Although the most common arrangement is a full-transporter with motifs arranged N-TM-NBF-TM-NBF-C, as shown, NBF-TM-NBF-TM, TM-NBF, and NBF-TM arrangements are also found. (B) The NBF of an ABC gene contains the Walker A and B motifs found in all ATP-binding proteins. In addition, a signature or C motif is also present. The most common amino acids found in these motifs are shown above the diagram; subfamilies often contain characteristic residues in these and other regions.

就構造上來說，ABC 運輸蛋白可能以完整的運輸蛋白(full-ABC transporter)型態存在，或是以半個運輸蛋白(half-ABC transporter)的型態來呈現。大部份真核生物的 ABC 運輸蛋白，是以完整蛋白的型態存在，且由兩個相似的半邊所構成，每半邊皆具有一個厭水性穿膜區(trans-membrane domain; TMD; 由數個 α 螺旋構成)及一個朝向細胞質的親水性核苷酸結合區，其排列方式可能為 TMD-NBF-TMD-NBF 或是 NBF-TMD-NBF-TMD，在單體(monomer)的型態下即具有完整的功能。若是屬半個運輸蛋白的話，則具有一個厭水性穿膜區及一個親水性核苷酸結合區，其排列方式可能為 TMD-NBF 或是 NBF-TMD，一般來說，此類蛋白只有在組成同源二聚體(homo-dimer)或異源二聚體(hetero-dimer)時，才具有功能(參考圖二)(3)。

圖二：摘自 Ref. 3

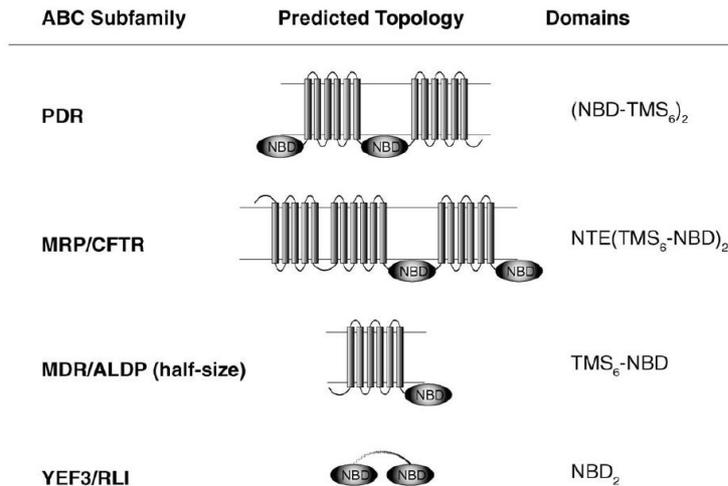


Fig. 1. Predicted topology and domain organization of ABC protein subfamilies. The cartoon depicts the predicted membrane topology and domain organization of all subfamilies encoding yeast ABC proteins (see text for details). NBD, nucleotide-binding domain; NTE, N-terminal extension; TMS, transmembrane segment.

在 2001 年，Dean 等人根據已經解碼的基因組中所包含的 ABC 蛋白序列，比對其核苷酸結合區之親緣性的差異，將其進一步分類成七個亞型(ABCA~ABCG)，同一亞型的成員其核苷酸結合區的結構相似。目前已知的過氧化體的 ABC 蛋白，大多屬於 ABC 蛋白之 D 亞型，而且其結構都是 TMD-NBF (2)。人類的過氧化體具有的四個 ABCD 的成員，分別為 ALDP、ALDRP、PMP70、PMP69。而酵母菌則具有的兩個 ABCD 的成員，包含 Pxa1p 及 Pxa2p。其中 ALDP、PMP70、Pxa1p 及 Pxa2p 已經被證實有參與脂肪酸的 β 氧化作用(4, 5)。人類的 ALDP 若發生突變會導致嚴重的遺傳疾病，稱為腎上腺腦白質退化症 (Adrenoleukodystrophy; 簡稱為 ALD)，是屬於 X 染色體性聯(X-linked)隱性遺傳疾病，故又稱為 X-ALD，是常見的過氧化體功能異常相關的先天性腦神經及腎上腺退化疾病(6)，女性得此病的機率較低，因為需兩條染色體皆異常才會發病。此病有許多臨床症狀，最特別的是病人的腦白質、腎上腺及血漿中累積了大量的飽和極長鏈脂肪酸(C \geq 22:0)，最後導致腦神經髓鞘的喪失及腎上腺萎縮(7)。

過去的研究指出 ALDP 本身可形成同源二聚體，也可分別與 ALDRP 及 PMP70 形成異源二聚體(8, 9)。儘管有許多形成異源二聚體的證據，但 ALD 的病症卻只與 ALDP 的突變有相關性，而與其他三個蛋白無關。假如 ALDP 形成二聚體(同源或異源)對其功能是很重要的，理論上來說，應該有些 ALD 病因是由於其他的 ABC 運輸蛋白發生突變所引起的，因為它們會與 ALDP 組成功能缺陷的異源二聚體。再者，雖然異源二聚體可在 in vitro 情況下形成，但在判斷不同 ABC 運輸蛋白之間的相互作用時，組織中蛋白表現量的相對比例是一個重要的考慮因素，也就是說，功能上相互依存並形成複合體的蛋白，在組織中的比例應該是相似的。1999 年，Berger 的研究指出，ALDP、ALDRP 及 PMP70 在不同組織的表

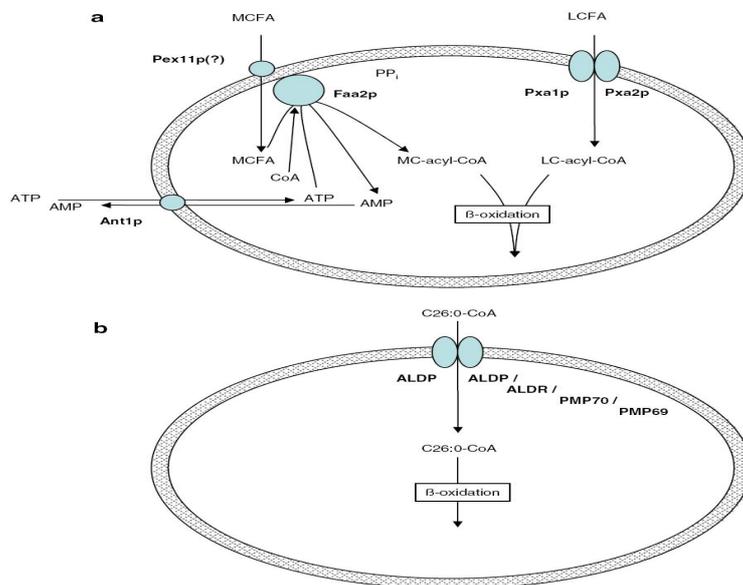
現型態不同，表示它們的功能可能不是相互依存的(10)。此外，如果形成異源二聚體對功能是有必要的，則只大量表現其中一個蛋白的話，對整體功能的提升應該是助益不大。反之，若是同源二聚體對功能是有必要的，則會呈現相反結果。Imanaka 在其研究中，於 CHO 細胞中單獨大量表現 PMP70，結果有效的促進了 LCFA 的 β 氧化作用，顯示 PMP70 可能主要是以同源二聚體來執行功能(4)。同一研究中也發現，VLCFA 的 β 氧化作用效率降低大約 30-40%，此現象顯示，細胞內大量的 PMP70 促使較多的 ALDP 與 PMP70 形成異源二聚體，而干擾 ALDP 的正常功能。此結果同樣指出，同源二聚體可能是有功能的型態。2008 年，van Roermund 等人在其研究中(11)，將 ALDP 蛋白在雙基因刪除 Δ pxa1/pxa2 的酵母菌中大量表現，結果發現可以互補代謝長鏈脂肪酸的能力，但若同時表現 ALDP 及 Pxa1p，反而會干擾 ALDP 的互補能力，再加上酵母菌中並沒有 PMP70 及 ALDRP 的存在，因此，他們的研究結果指出，ALDP 是以同源二聚體來執行功能。

酵母菌具有兩個類似 ALDP 及 PMP70 的同源性蛋白：一、Pxa1p (peroxisomal ABC-transporter 1)，相似於 ALDP(12)。二、Pxa2p (peroxisomal ABC-transporter 2)，相似於 PMP70(13)。細胞內的定位分析及免疫螢光分析都指出，Pxa1p 及 Pxa2p 都是過氧化體上的穿膜蛋白(12, 14)。PXA1 或 PXA2 的基因刪除株無法生長於以油酸當作唯一碳源的環境中(12, 13)，且其氧化 LCFA 能力也大為降低(15)，顯示 LCFA 的 β 氧化作用需要 Pxa1p 及 Pxa2p 的參與。然而，它們對於過氧化體的生成是非必須的(12)，且對於酵母菌生長於中鏈脂肪酸(medium chain fatty acid; 簡稱 MCFA)-例如 laureate(C12:0)及 myristate(14:0)-的環境中也是非必須的(15)，顯示這些蛋白的功能是專一的參與 LCFA 的 β 氧化作用。此外，由於 Pxa1p 及 Pxa2p 的單獨突變及雙重突變的性狀是相似的，因此，推論它們是以異源二聚體的型態組成一個有功能的運輸蛋白(15)。這種推論也因免疫共沈澱的實驗及 Pxa1p 的蛋白穩定性受 Pxa2p 的影響而得到更進一步的支持(13)。此外，Verleur 將酵母菌製成細胞膜可通透的原生質體(permeabilised protoplast)，以測試不同碳數的脂肪酸運送到過氧化體的能力，結果發現，Pxa2p 對於 C18:1-CoA(LCFA-CoA)的運送是有必要的，且過程中需要 ATP 的水解，顯示 LCFA 是在先在細胞質進行活化作用(形成 LCFA-CoA)，再經由 Pxa1p、Pxa2p 所形成的異源二聚體送入過氧化體中。相對來說，中、短鏈脂肪酸(C12:0、C8:0)的 β 氧化作用，則是需要位於過氧化體中的醯基輔酶 A 合成酶(Faa2p)將其活化，顯示，中、短鏈脂肪酸可能是先以未修飾的脂肪酸型態進入過氧化體。以上結果都指出，酵母菌之過氧化體至少具有兩種脂肪酸的運輸機制，一種是在細胞質中先活化脂肪酸，再將其送入過氧化體，另一種則是以未修飾的脂肪酸型態通過過氧化體膜，再進行活化作用(16)。這兩種機制也在 Hetteima 的研究中得到有力的支持，他使用一株酵母菌的突變株，其突變的位置是在 Faa2p 蛋白上，這個突變蛋白因異常的運輸作用而出現在細胞質中，此舉將使得細胞中的脂肪酸都可在細

胞質中被活化。整體來看，此突變株與野生株在氧化各種脂肪酸的能力上並無不同。但如果這個變異再加上 *PXA1* 或 *PXA2* 的基因突變，就會使得酵母菌無法生長在以 MCFA 或 LCFA 為碳源的培養基中。LCFA 的氧化受影響是不足為奇的，因為 Pxa1p 及 Pxa2p 本來就有參與 LCFA 的運送。有趣的是，MCFA 的氧化本來是不需要 Pxa1p 及 Pxa2p 參與的，但因細胞質中存在突變的 Faa2p，使得 MCFA 提早在細胞質中被活化成 MCFA-CoA，最後變成需要 Pxa1p 及 Pxa2p 幫助其運送。此結果顯示，活化的位置的確影響了脂肪酸的運輸機制，也更加說明 Pxa1p 及 Pxa2p 的主要功能是負責運送已接上輔酶 A 的脂肪酸到過氧化體中(15)。(請參考圖三.a)

圖三：摘自 Ref. 17

Fig. 3 Models depicting a the oxidation of MCFA and LCFA in peroxisomes in *S. cerevisiae* and the role of Faa2p and Pxa1p/Pxa2p therein and b the oxidation of VLCFAs in peroxisomes in human cells and the role of ALDP therein either as homodimer or heterodimer with ALDR, PMP70, and PMP69 as potential partners



二、研究目的

到目前為止，有關 Pxa1p 及 Pxa2p 的研究皆指出它們會形成異源二聚體，然而這些研究中所使用的方法無法清楚釐清酵母菌中是否只有異源二聚體存在，還是異源及同源二聚體同時存在(正如在人類細胞的情況一樣)，其理由如下：第一、免疫共沈澱的實驗只能說明兩者之間有相互作用的能力，並無法排除同源二聚體存在的可能性。第二、遺傳學上的分析發現，單獨 *PXA1* 或 *PXA2* 的突變與雙重的突變之表現型類似，這個結果指出，它們參與同一生理功能，有可能會形成異源二聚體，但也可以解釋成此生理功能包含兩步驟，Pxa1p 及 Pxa2p 分別負責其中一步，而非以複合體的方式執行功能，此種情況也會導致相同的結果。第三、Pxa1p 的穩定性受 Pxa2p 蛋白的影響，只能說明 Pxa1p 穩定存在過氧化體需要 Pxa2p 的協助，雖然可用形成異源二聚體來解釋，但也可以解釋成 Pxa2p 的功能只是幫助 Pxa1p 進入過氧化體，而並非以異源二聚體來執行功能。因此，酵母菌中 Pxa1p 及 Pxa2p 是否會形成同源二聚體，仍是個未解之謎題，有功能的型態是異源或是同源二聚體也是未知的。

在上一個計畫中(NSC 96-3111-B-040-001-)，我們選定與人類 ALDP 的 C 端相似的 Pxa1p 的 C 端區域(包含 C 端 169 個氨基酸，稱為 Pxa1pC-HA)進行特性分析。經一系列的純化方法製備出重組蛋白 Pxa1pC-HA，以膠體過濾層析法分析其分子量，發現可形成由 2-4 個單體構成的同源複合體。共同表現的重組蛋白 Pxa1pC-HA 及 Pxa1pC-V5 以免疫沈澱法進行分析，也確認了同源複合體的相互作用。然而，這些特性是使用 C 端蛋白所鑑定出來的，全長的蛋白在酵母菌中是否具有同樣的性質仍是未知的，此外，與 Pxa1p 密切相關的 Pxa2p 蛋白是否具有同樣的性質也是未知的。

本研究計畫針對上述已知結果進一步探討 Pxa1p 及 Pxa2p 蛋白的特性。先構築 *pxa1/pxa2* 雙基因刪除酵母菌株，再將表現全長 Pxa1p-HA/Pxa1p-V5 的質體或 Pxa2p-HA/Pxa2p-V5 的質體送入 *pxa1/pxa2* 雙基因刪除株中表現蛋白，將膜蛋白進行萃取，然後以免疫共沈澱方法證實同源複合體的存在。接著我們使用不同條件萃取膜蛋白，希望藉由膠體過濾層析法分析蛋白複合體的分子大小，分析結果指出，蛋白在清潔劑萃取的情況下都會形成不正常的聚集(aggregate)，其分子量大於 2000 KDa，此現象可能與其厭水性穿膜區有關，因此我們無法經由膠體過濾層析法鑑定出複合體的分子量。由於 Pxa1p 及 Pxa2p 都是 ABC 運輸蛋白，因此我們將蛋白 C 端(包含 NBF 區域)的 DNA 片段接入大腸桿菌表現載體 pGEX-5X-3 中，進行重組蛋白的表現及純化，再進行 ATPase 活性的鑑定，結果指出，GST-Pxa1p-C 重組蛋白活性與 ATP 活性區突變的蛋白活性沒有明顯的差異，顯示有非專一性蛋白的干擾，因此無法鑑定其分解 ATP 的特性。為了進一步以遺傳的方法證實同源複合體及異源複合體的存在的可能性，我們開始發展酵母菌雙雜交方法，來探討蛋白

之間的相互作用，實驗過程中發現 Pxa1p 及 Pxa2p 的穿膜區會干擾雙雜交的分析方法，因此後來只選取蛋白穿膜區之後的 C 端進行分析。實驗結果顯示相互作用確實存在於 Pxa1p-Pxa1p、Pxa2p-Pxa2p 及 Pxa1p-Pxa2p 的組別中，顯示確實存在同源複合體及異源複合體。另外，我們進一步探討 Pxa1p-Pxa2p 相互作用的區域，發現 Pxa2p 的 C 端的 CT2 區域對於 Pxa1p-Pxa2p 蛋白之間的相互作用是必要的，此區域高度保留的氨基酸若發生點突變，也會影響到相互作用的能力，此結果更加說明 CT2 區域對於相互作用的重要性。最後，經由 Pxa1-NBF 一系列刪除突變株的分析發現，Pxa1-NBF 的 C 端包含 ATP 結合及分解的區域對於相互作用是必須的，有可能是使用本區域直接與 Pxa2p 蛋白的 CT2 區域進行相互作用的。

三、研究方法

(1) 以同源重組技術構築 Δ PXA1/PXA2 酵母菌雙基因刪除突變株

將製備好只帶有 PXA1 基因上下游的質體 pRS406 Δ AK-PXA1-us-ds(已切過 XbaI)，經由酵母菌轉化(yeast transformation)技術送入酵母菌株 Δ pxa2，在切割位附近引發染色體與質體間進行第一次同源重組交換，利用 SC-Ura/Glucose 培養皿進行篩選，若質體插入染色體，因質體上帶有 Ura 3 的基因可做出 ODCase (orotidine 5-phosphate decarboxylase) 可以幫助 Ura 的合成，使酵母菌可以在缺乏 Ura 的 SC-Ura/Glucose 培養皿上生長。將已插入質體的 Δ pxa2，在營養培養基 YPD 中培養 24 小時，可能會在切割位附近引發第二次的染色體與質體間的同源重組交換，稱為 loop-out，再透過 SD-5' FOA 培養皿進行篩選 loop-out 的菌株，若染色體 loop-out 後會把部分的質體連同 Ura 3 的基因移出染色體，此時可在 SD-5' FOA 培養皿上生長；若染色體沒有 loop-out，此時染色體上還存在 Ura 3 的基因，其蛋白產物會使 SD-5' FOA 培養皿上的 5-fluoro-orotic acid 轉變成 5-fluorouracil 而使酵母菌無法生長。同源重組交換後會有兩種結果，一種是回復成原本的 Δ pxa2，另一種則是成功將 PXA1 基因刪除，這是我們要的菌株，稱為 Δ pxa1/pxa2。接著，利用 PCR 挑選 loop-out 成 Δ pxa1/pxa2 的菌株。最後以 PXA1 專一的 Primer 23 及 42 進行 PCR 確認，若為 Δ pxa2 則會有 3.1 kb 產物(PXA1 基因還在)，若為 Δ pxa1/pxa2 則會產生 500bp 的產物。

(2) 胞膜的製備

以 YPDG (含 1% glucose 及 1% galactose) 培養的菌液總體積 200 ml，取出 2 ml，測 O.D.600，將剩下菌液在 4°C 下用 8000 rpm 離心 10 分鐘，pellet 用 10 ml TBS 清洗一次，以 8000 rpm 離心 10 分鐘，pellet 以 TBS 回溶 (每組 pellet 分成四管 eppendroff 裝，以 1ml TBS 回溶) 加入 1 g 玻璃珠在冷房劇烈震盪 20 分鐘破碎菌體，於 4 °C 下使用 12000 rpm 離心 5 分鐘，取上清移置新的 eppendroff，再離心一次，取上清液移置超高速離心專用的離心管，補 TBS 到離心管的一半以上，於 4°C 下以 50000 rpm 離心 1 小時，pellet 用 600 μ l TBS 回溶，每 200 μ l 分裝一管，保存於 -20 °C。

(3) 膜蛋白萃取

取 100 μ l 的檢體加 40 μ l 10% Triton X-100(最終濃度 2%) 補 TBS 至 200 μ l，於 4°C 旋轉器上放置 1 小時，使用 13000 rpm 4 °C 20 分鐘取上清液，即為膜萃取液。

(4) 免疫沉澱法

經由蛋白濃度測定後，取相同蛋白量的檢體，加入 30 μ l 的抗體 (anti-HA 抗體)，補 TBS

至 200 μ l，於 4°C 下，在旋轉器上作用 2 小時，接著加入 5 mg PAS (Protein A sepharose ，已經先用 Buffer A100 處理過)，於 4°C 旋轉器上放置 1 小時，用 Buffer A100 (50 mM pH : 8.0 Tris , 150 mM NaCl , 1% Triton X-100) 清洗 4 次，加 50 μ l 3X Sample buffer，於 100 °C 煮 10 分鐘，使用 13000 rpm 5 分鐘取出上清液，以 Western blot 進行分析。

(5) 酵母菌雙雜交法

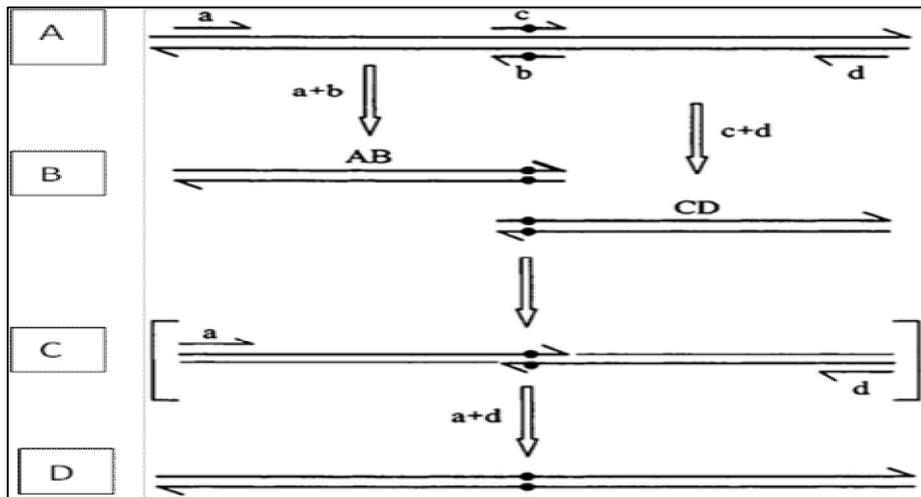
首先將 EGY48(pSH18-34) 酵母菌株養在胺基酸培養液於 30 °C 培養箱震盪培養 12~16 小時，使其起始 OD600 < 4，接著將要分析相互作用的兩個蛋白的 DNA 片段分別構築在含有 DNA 結合區(DNA binding domain, DBD) 與轉錄活化區(transcription activation domain, TAD) 的兩個載體上，分別是 pEG202 及 pACT2，然後將分好組的質體以酵母菌轉形技術送入 EGY48(pSH18-34)，30°C 培養箱培養 3~5 天，利用 SC-Ura-His-Leu/Glucose 培養皿進行篩選，等菌落生長出來後，每組各挑選 5 顆畫備份菌，再將備份菌用竹棒畫至 SC-Ura-Leu-His/Glucose/X-Gal 培養皿，放置 30 °C 培養箱培養 1 天左右觀察其顏色變化。

(6) 膠體過濾層析法

將 Superdex 200 HR (size 25 ml，可分 10-600 kDa，Pharmacia) 膠質層析管柱安裝於 FPLC 分析儀，先用過濾後的二次水，以管柱二倍以上的體積清洗，再以二倍體積的緩衝液(150 mM NaCl，20 mM Tris-HCl，0.5% deoxycholate (DOC)) 平衡，流速為 0.5 ml/min，直到管柱中的離子濃度穩定後，先將待測檢體以 50000 rpm 於 4 °C 離心 30 分鐘後，取上清液，以微量針筒取 1ml 注射到 FPLC 分析儀內儀器設定吸取 200 μ l，收集 retention time 15-40 分鐘，每管 0.5 ml。以 Acetone 沉澱之，每管取等量體積進行 Western blot 分析。

(7) 使用 SOE(splicing by overlapping extension) 進行胺基酸定點突變

定位突變主要設計四個引子，以下圖為例：



有 a、b、c、d 四個引子，其中 a 與 b 引子為一組的 PCR 產物是欲製造的 DNA 片段全長，b 與 c 引子則設計成帶有突變的 DNA 序列。定位突變分成兩個部分，第一部分是使用 a 與 b 引子為一組及 c 與 d 引子為一組各自做 PCR 反應，得到 2 段不同長度的 DNA 片段，此兩段有一段重疊區域，該區域有突變後的 DNA 序列，第二部分是利用第一部分所得到的 DNA 序列為模板(須先稀釋成 10 ng/ μ l)，並利用 a 與 d 引子進行第二次的 PCR 反應，最後則可以得到帶有突變的全長 DNA 片段，在第二次 PCR 時，此兩段的帶有突變的 DNA 片段會因有重複區域的存在，先進行自行黏合形成全長帶有突變的 DNA 序列，再以此為模板進行 PCR 反應。

(8) Beta-galactosidase 活性分析方法(PIERCE Co.)

- A. 分別將 Yeast Two Hybrid 所用的 Clone 養於 10 ml Sc-Ura-Leu-His medium 中培養過夜。
- B. 將 2X beta-galactosidase Assay Buffer 放於冰上回溶。
- C. 把 Assay buffer 與 YPER Reagent 以等比例混合成"working solution"，根據實驗所需配置適當份量的 working solution。
- D. 使用 96 孔盤(96 well plate)，將菌液分別加入 96 孔盤中(200ul/well)，另外有一組 control 組為 growth medium only，測定吸光值 OD660 並記錄。
- E. 將多餘的菌液取出，最後每個 well 的菌液體積為 70 ml。
- F. 準備一個計時器。每個 well 加入 70ul 的 WS，並開始計時。
- G. 當反應溶液變成黃色時，每個 well 加入 56ul 的 beta-Galactosidase Assay Stop Solution 並 mix 15 秒，接著停止計時，並記錄時間。
- H. 用 contain medium 歸零機器，接著測定 420 nm 波長，並記錄
- I. 利用公式算出 beta-galactosidase activity。

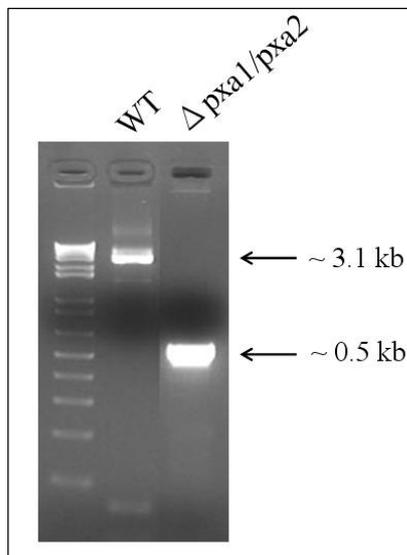
(9) 鎳離子親和性管柱層析法

取 1 ml Ni-NTA agarose(Invitrogen)先以 10 倍體積 Balance buffer(10 mM pH: 8.0 Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02 % Tween-20)平衡後，將此 1 ml Ni-NTA resin(Invitrogen)與蛋白液混合，於 4 °C 旋轉器上放置 2 小時，再將混合液填入 column(Bio-Rad)，收集流下來的液體即為 Flow through，然後以 10 倍體積的 Wash buffer(10 mM pH: 8.0 Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02 % Tween-20, 10 mM Imidazole)清洗，收集第一管(W1)和最後一管(Wf)。最後加入 Elution buffer(10 mM pH: 8.0 Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02 % Tween-20, 250 mM Imidazole)緩慢地沖提，每 1 ml 收集一管，總共收集 5 管，最後以 SDS-PAGE 分析所分離下來的蛋白。

四、實驗結果

(1) 構築 pxa1 及 pxa2 雙重刪除突變的酵母菌：

為了更加確認同源複合體的存在，我們計畫在 pxa1 及 pxa2 雙基因刪除的酵母菌中，以質體的方式同時表達全長的 Pxa1p-HA 及 Pxa1p-V5，再以免疫沈澱的技術偵測同源複合體的是否存在。在上一個計畫中 (NSC 96-3111-B-040-001-) 我們已經構築了 pxa2 的基因刪除株，以此基因刪除株為基礎，繼續構築 pxa1 及 pxa2 雙基因的刪除株(以下將簡稱為 Δ pxa1/pxa2)。將 PXA1 基因的上游區域 US (Up-stream) 及下游區域 DS(Down-stream) 以 PCR 的技術放大並將其構築在質體 pRS406 Δ A 上，而得到 pRS406 Δ A-PXA1-US-DS。將此質體經轉型作用送入酵母菌中，經由兩步驟的同源重組方法(參考實驗方法 1)挑選 PXA1 基因刪除株，以 PCR 的方法進行挑選，使用基因上游及下游的引子(分別為第 23 號及第 42 號引子，參考附錄一)來確認，若為原本的野生株則可得到 3.1kb 的產物，若是刪除株則可得到約 0.5kb 的產物，結果如下：



結果顯示我們已經成功挑選到 PXA2 的基因刪除株。

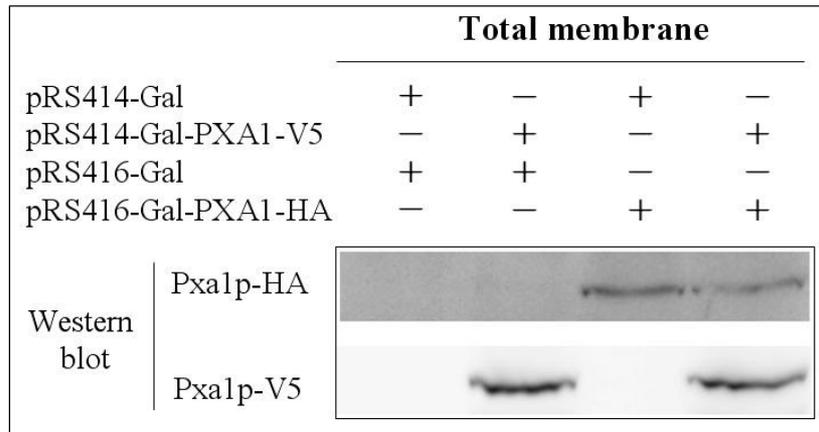
(2) 構築 pRS414-Gal-PXA1-V5 及 pRS416-Gal-PXA1-HA：

我們接著以 PCR 的技術將全長的 PXA1 基因由染色體中選殖出來，將 PXA1-HA 基因接入酵母菌表現載體 pRS416-Gal，得到 pRS416-Gal-PXA1-HA，將 PXA1-V5 基因接入 pRS414-Gal，得到 pRS414-Gal-PXA1-V5，這兩個質體具有 Gal Promoter，可以使用 galactose 來誘導蛋白大量表現，而且這兩個質體可以相容於同一株酵母菌中。選殖出來的基因已經使用 DNA 定序確認其序列的正確性。

(3) 在酵母菌中誘導 Pxa1p-HA 及 Pxa1p-V5 蛋白大量表現：

將以下四組質體送入 Δ pxa1/pxa2 酵母菌中：(一)pRS414-Gal/pRS416-Gal，(二)pRS414-Gal-PXA1-V5/pRS416-Gal，(三)pRS414-Gal/pRS416-Gal-PXA1-HA，(四)pRS414-Gal-PXA1-V5/pRS416-Gal-PXA1-HA。將這些酵母菌個別的培養於 YPDG(1%

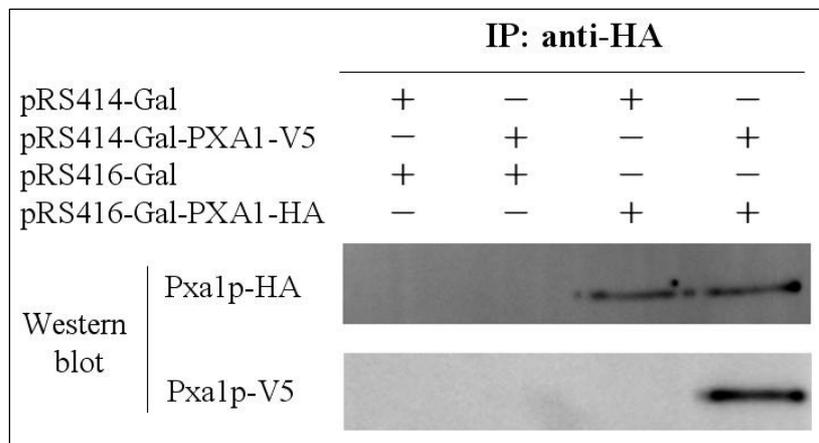
glucose / 1% galactose)中，以離心的方式收取菌體，以玻璃珠將菌體打破，低速離心去除未破細胞，接著以超高速 50000rpm 將總胞膜離心下來，以適當體積的 PBS 將胞膜回溶，取少量胞膜以 Western blot 的方法，確認膜蛋白的表現，結果如下：



上面結果顯示，具有質體 pRS416-Gal-PXA1-HA 的酵母菌胞膜即有 Pxa1p-HA 蛋白的訊號 (lane3, 4)，具有質體 pRS414-Gal-PXA1-V5 的酵母菌胞膜即有 Pxa1p-V5 蛋白的訊號(lane2, 4)，所以，Pxa1p-HA 及 Pxa1-V5 蛋白有成功被誘導出來，並且進入胞膜內。

(4) 以免疫沈澱的方法確認 Pxa1p 同源複合體的存在：

確認蛋白有表現在胞膜上後，接著，將胞膜以 2% Triton X-100 進行萃取，離心去除不可萃取的部分，將 HA 專一性抗體加入膜萃取物中，作用一段時間，再加入 Protein A sepharose，將抗體及抗原複合體沈澱下來，再以 Western blot 進行分析，結果如下：



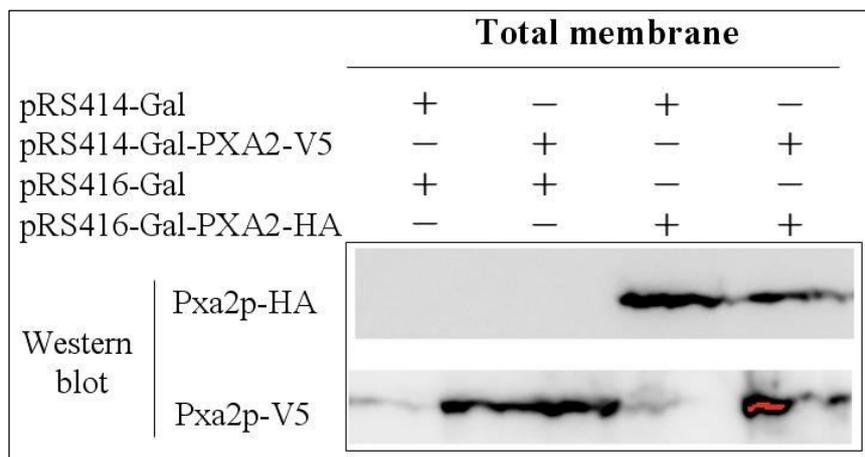
在上面的結果中，由 lane 2 可知 Pxa1p-V5 不會非專一性的被沈澱下來，由 lane 4 可知當 Pxa1p-HA 被抗體沈澱下來時，可以將 Pxa1p-V5 一起沈澱下來，這個結果顯示 Pxa1p-HA 及 Pxa1-V5 在 $\Delta pxa1/pxa2$ 酵母菌體的胞膜上的確可以形成一個複合體，也就是說，Pxa1p 蛋白本身可以形成同源複合體。既然 Pxa1p 蛋白可以形成同源複合體，那麼 Pxa2p 蛋白是否也具有形成同源複合體的能力？所以，我們接著使用相同的免疫沈澱法，證明 Pxa2p 蛋白是否可以形成同源複合體。

(5) 構築 pRS414-Gal-PXA2-V5 及 pRS416-Gal-PXA2-HA :

我們接著以 PCR 的技術將全長的 PXA2 基因由染色體中選殖出來，將 PXA2-HA 基因接入酵母菌表現載體 pRS416-Gal，得到 pRS416-Gal-PXA2-HA，將 PXA2-V5 基因接入 pRS414-Gal，得到 pRS414-Gal-PXA2-V5，這兩個質體具有 Gal Promoter，可以使用 galactose 來誘導蛋白大量表現，而且這兩個質體可以相容於同一株酵母菌中。選殖出來的基因已經使用 DNA 定序確認其序列的正確性。

(6) 在酵母菌中誘導 Pxa2p-HA 及 Pxa2p-V5 蛋白大量表現：

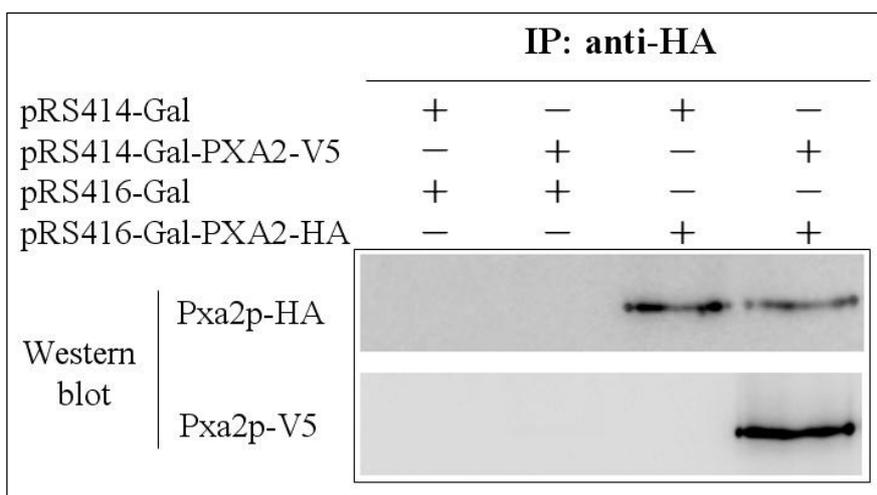
將以下四組質體送入 $\Delta pxa1/pxa2$ 酵母菌中：(1)pRS414-Gal/pRS416-Gal (2)pRS414-Gal-PXA2-V5/pRS416-Gal (3)pRS414-Gal/pRS416-Gal-PXA2-HA (4) pRS414-Gal-PXA2-V5/pRS416-Gal-PXA2-HA。將這些酵母菌個別的培養於 YPDG(1% glucose / 1% galactose)中，以離心的方式收取菌體，以玻璃珠將菌體打破，低速離心去除未破細胞，接著以超高速 50000rpm 將總胞膜離心下來，以適當體積的 PBS 將胞膜回溶，取少量胞膜以 Western blot 的方法，確認膜蛋白的表現，結果如下：



上面結果顯示，具有質體 pRS416-Gal-PXA2-HA 的酵母菌胞膜即有 Pxa2p-HA 蛋白的訊號 (lane3, 4)，具有質體 pRS414-Gal-PXA2-V5 的酵母菌胞膜即有 Pxa2p-V5 蛋白的訊號(lane2, 4)，所以，Pxa2p-HA 及 Pxa2-V5 蛋白有成功被誘導出來，並且進入胞膜內。

(7) 以免疫沈澱的方法確認 Pxa2p 同源複合體的存在：

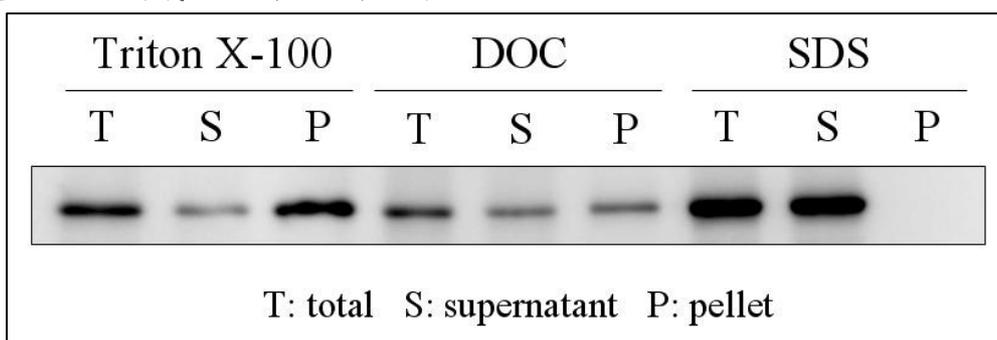
確認蛋白有表現在胞膜上後，接著，將胞膜以 2% Triton X-100 進行萃取，離心去除不可萃取的部分，將 HA 專一性抗體加入膜萃取物中，作用一段時間，再加入 Protein A sepharose，將抗體及抗原複合體沈澱下來，再以 Western blot 進行分析，結果如下：



在上面的結果中，由 lane 2 可知 Pxa2p-V5 不會非專一性的被沈澱下來，由 lane 4 可知當 Pxa2p-HA 被抗體沈澱下來時，可以將 Pxa2p-V5 一起沈澱下來，這個結果顯示，Pxa2p-HA 及 Pxa2-V5 在 $\Delta pxa1/pxa2$ 酵母菌體的胞膜上的確可以形成一個複合體，也就是說，Pxa2p 蛋白本身可以形成同源複合體。

(8) 測試不同清潔劑的萃取效果：

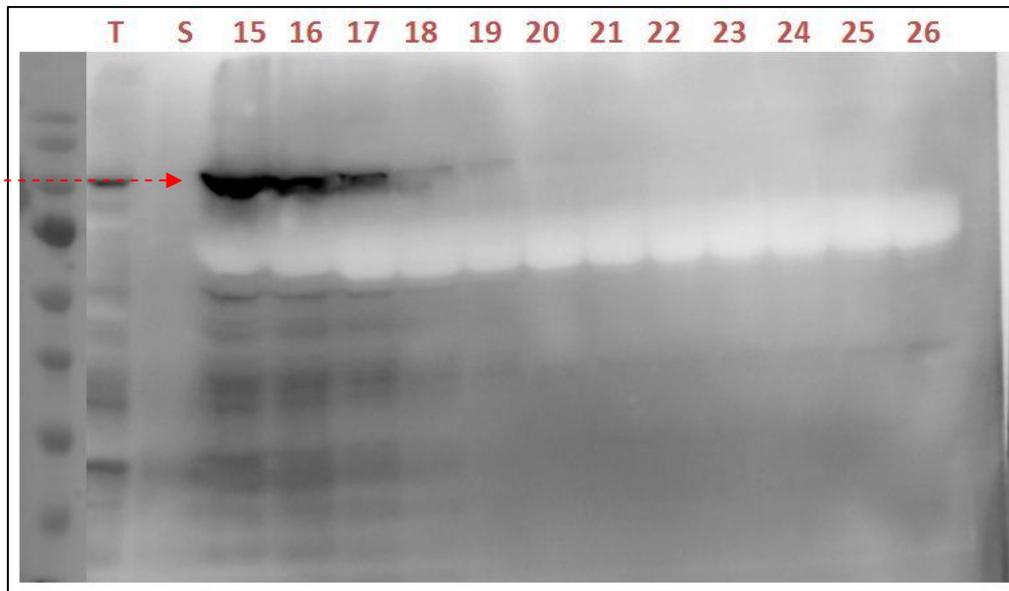
由上述結果可知，Pxa1p 及 Pxa2p 蛋白皆可以形成同源複合體。我們接著要使用膠體過濾層析法進行複合體分子量的鑑定，來推論同源複合體的分子型式，在進行這個實驗之前，我們要先進行膜萃取條件的最佳化。Triton X-100 雖是膜蛋白萃取常用的清潔劑，但它會形成較大的乳化微粒(micelle)(18)，約 63-94 KDa，對於蛋白分子量影響較大，在膠體過濾層析法中無法反應真正的分子量。因此，我們改用 DOC (全稱為 deoxycholate)進行膜蛋白的萃取，DOC 所形成的乳化微粒較小(18)，約 6 KDa，對蛋白分子量影響較小。我們測試以 2% Triton X-100、2% DOC、2% SDS 分別萃取 Pxa2p-V5，比較其相對的萃取比例，以評估大規模使用 DOC 的成效，測試結果如下：



在上面的結果中，就相對比例來說，DOC 萃取時約有 50% 的 Pxa2p-V5 被萃取出來，而使 TritonX-100 時約只有 20% 的 Pxa2p-V5 被萃取出來，此結果顯示 DOC 的萃取效果不比 Triton X-100 差，所以我們以下的實驗中將以 DOC 進行膜蛋白萃取，並使用膠體過濾層析法鑑定複合體分子量。

(9) 使用膠體過濾層析法鑑定 Pxa1p-HA 的分子量：

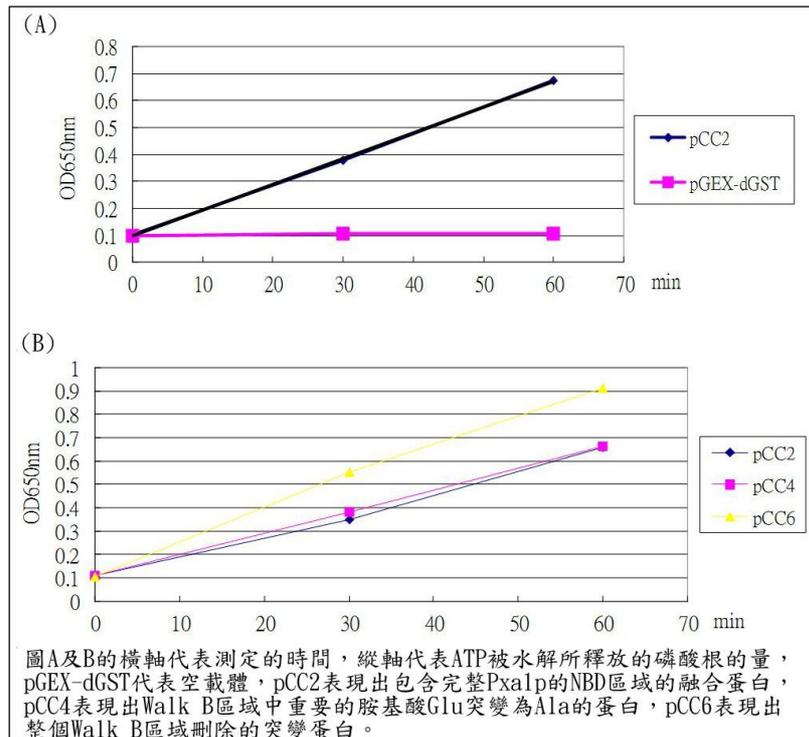
我們將可表達 Pxa1p-HA 蛋白的質體 pRS416-GAL-Pxa1-HA 送入 Δ pxa1 的酵母菌中，使用 galactose 誘導蛋白表現，將菌體以超音波震碎，以超高速收取胞膜，並以 DOC 進行萃取，離心後將上清液過濾去除雜質，再以 gel filtration 管柱(superdex HR-200)進行分離，每分鐘收集一管，以 acetone 進行沉澱，最後以 Western blot 進行分析。實驗結果如下



以上結果指出，使用 DOC 進行萃取，Pxa1p-HA 蛋白都出現在分子量大於 2000 KDa 的位置(第 15-16 分鐘)，這表示 Pxa1p 膜蛋白在此萃取條件下形成了不可溶的聚集(aggregate)，因此，使用膠體過濾層析法進行 Pxa1p 分子量的鑑定並不可行，也就是說，我們無法得知 Pxa1p 所形成的同源複合體的分子量大小。

(10) 鑑定 Pxa1p 水解 ATP 的活性：

由於 Pxa1p 及 Pxa2p 蛋白是屬於 ABC 運輸蛋白，因此我們想要探討其水解 ATP 的能力，先針對 Pxa1p 蛋白之 NBD 區域進行活性鑑定，我們將不包含 N 端穿膜區的 Pxa1p-C 的 DNA 片段接到 pGEX-5X-3 載體上，形成的質體稱為 pCC2，可在大腸桿菌 BL21 中表達 GST-Pxa1p-C 融合蛋白，再將此蛋白以 GSH 管柱進行純化及蛋白定量，接著以 Innova Biosciences 公司的 ATPase assay kit 進行活性測定，控制組為空載體 pGEX-dGST，與實驗組是並行進行純化的，其使用量與實驗組相同，實驗結果如下：(參考下圖 A)

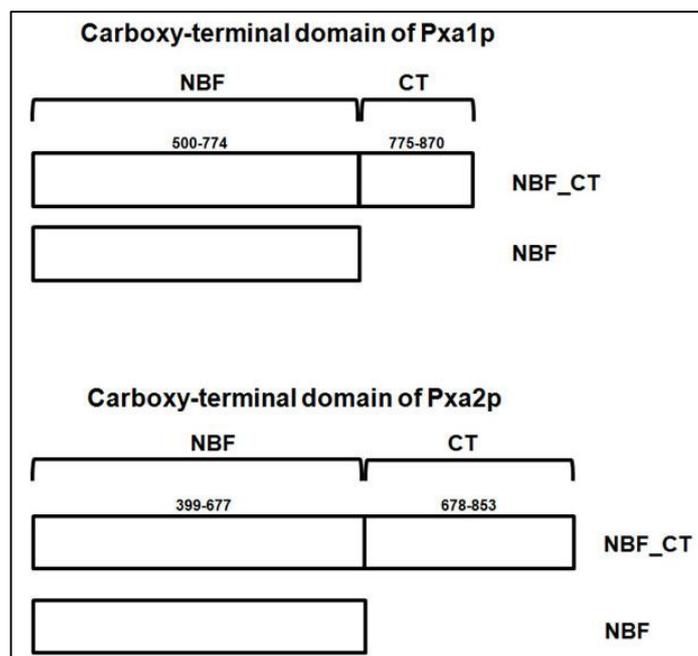


由上圖 A 中可以發現 GST-Pxa1p-C 融合蛋白可以使 ATP 被水解，而控制組則不會，表示蛋白可能有活性。接著，為了排除融合蛋白的活性並非由於其他微量不相關的蛋白污染所造成，於是我們構築了兩個突變蛋白，一個是 Walk B 區域重要胺基酸 Glu 突變成 Ala 的突變蛋白，由 pCC4 所表達，另一個則是整個 Walk B 區域皆刪除的突變蛋白，由 pCC6 所表達，這兩種突變理論上對於活性會造成重大影響。將 pCC2、pCC4、pCC6 所表達的純化蛋白並行測一次活性，結果發現他們皆有活性，且 pCC6 表現的突變蛋白的活性還超過無突變的 pCC2 的蛋白(參考上圖 B)，此結果指出我們的系統有來自大腸桿菌的蛋白干擾，因此無法真正測出 ATPase 的活性。此方法目前無法用來鑑定 Pxa1p 蛋白的 ATP 水解的特性。

(11) 以 yeast two-hybrid 分析法研究 Pxa1p 及 Pxa2p 彼此間相互作用的特性：

去年的研究結果中，發現以 yeast two-hybrid 分析法研究全長 Pxa1p 及 Pxa2p 的相互作用時，發現皆無相互作用，此結果與 Shani 等人的免疫共沈澱實驗結果不一致(13)，且人類的 ALDP、PMP70 等相似性蛋白在去除穿膜區後，以 yeast two-hybrid 進行分析，有發現同源及異源的相互作用(8)，因此，我們推測全長 Pxa1p 及 Pxa2p 之所以無相互作用的現象，是因蛋白有穿膜區，導致蛋白不可溶或不穩定，而影響 yeast two-hybrid 的分析，為了證實這個想法，我們就構築了一系列刪除穿膜區的 Pxa1p 及 Pxa2p 突變蛋白，再以 yeast two-hybrid 進行分析。結果如下：

(A)刪除穿膜區的 Pxa1p 及 Pxa2p 的突變蛋白示意圖：NBF 代表 nucleotide binding fragment; CT 代表 C terminal, CT 的起始點是 Walker B 結束的下一個氨基酸。

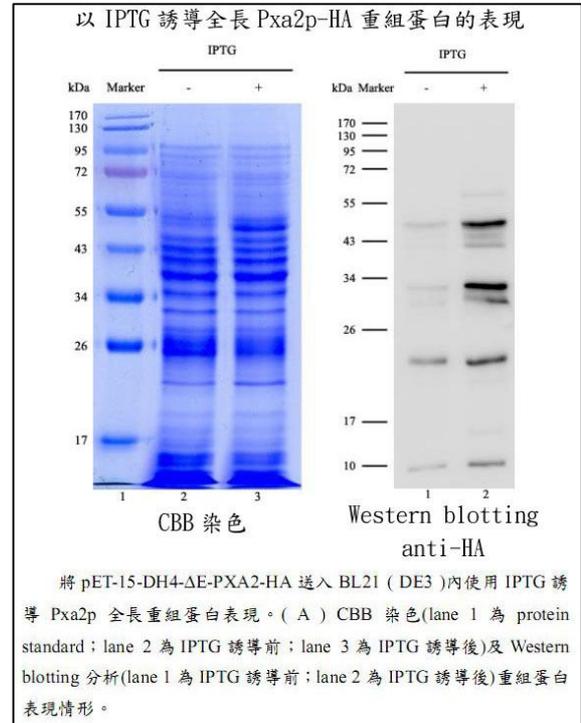
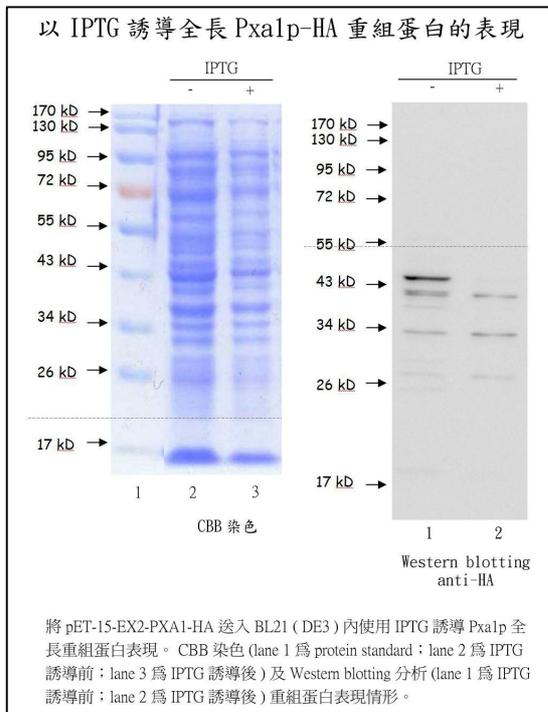


(B) Yeast two-hybrid 分析結果如下：

Binding domain	Activation domain				
	-	Pxa1-NBF-CT	Pxa1-NBF	Pxa2-NBF-CT	Pxa2-NBF
Pxa1-NBF-CT	-	+++ (a)	-	-	-
Pxa1-NBF	-	-	-	-	-
Pxa2-NBF-CT	-	+++ (b)	+++ (d)	-	++ (e)
Pxa2-NBF	-	- (c)	-	-	-

上述結果指出，在刪除蛋白穿膜區後進行分析，有四組出現藍色。其中兩組代表同源的相互作用，分別是 Pxa1-NBF-CT/Pxa1-NBF-CT 及 Pxa2-NBF-CT/Pxa2-NBF(參考 a 及 e)。另外兩組代表異源的相互作用，分別是 Pxa2-NBF-CT/Pxa1-NBF-CT 及 Pxa2-NBF-CT/Pxa1-NBF (參考 b 及 d)。此結果顯示，Pxa1p 及 Pxa2p 蛋白之間具有異源的相互作用，也存在同源的相互作用。將異源性相互作用的兩組進行比較，可得知 Pxa1p 蛋白在 NBF 之後的 C 端區域對於蛋白之間的作用是非必需的，刪除之後並不影響 Pxa1p-Pxa2p 的相互作用(參考 b 及 d)。反之，若是將 Pxa2p 蛋白在 NBF 之後的 C 端區域刪除，則會完全破壞 Pxa1p-Pxa2p 的相互作用(參考 b 及 c)。所以，Pxa2p 在 NBF 之後的 C 端區域對於 Pxa1p-Pxa2p 的異源性相互作用是必要的。所以，我們就以 Pxa2-NBF-CT/Pxa1-NBF 為基礎繼續探討 Pxa1p 及 Pxa2p 之間的相互作用。此外，Pxa1p 或 Pxa2p 同源的相互作用現象也與我們之前免疫共沉澱結果相互一致，更加確認同源二聚體的存在，只是目前尚不清楚此種分子型態的生理功能為何。

我們刪除了蛋白穿膜區之後就可觀察到蛋白之間的相互作用的現象指出，穿膜區非常不利於 yeast-two hybrid 的分析，可能是跟 yeast-two hybrid 的融合蛋白是需要進入細胞核內水溶液環境去驅動報導基因表現有關，而穿膜區會嚴重干擾這個過程。而這個現象正與我們另一個實驗結果是有相關性的，這個實驗描述如下：當我們在大腸桿菌中表達包含穿膜區的全長 Pxa1p-HA 或 Pxa2p-HA 時，皆無法得到大約 95KDa 左右的全長重組蛋白，看到的都是蛋白分解的產物，如下圖所示。因此，Pxa1p-HA 或 Pxa2p-HA 蛋白穿膜區確實會造成重組蛋白的不穩定現象。



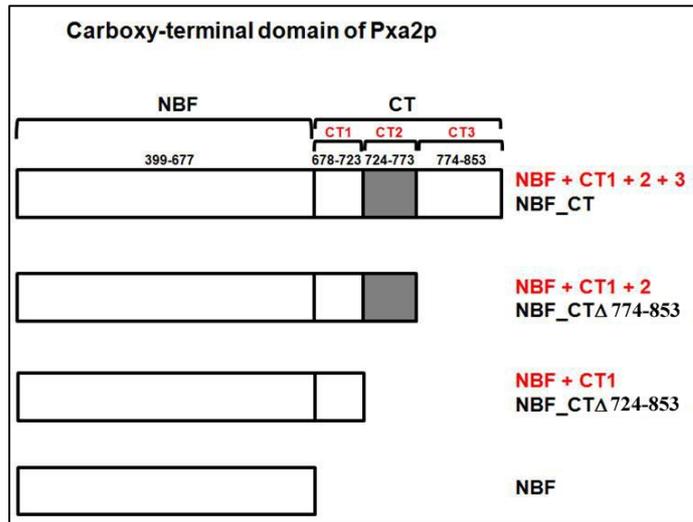
(12) 構築一系列 Pxa2p 蛋白 C 端的刪除突變株並分析突變的影響：

由於我們已經發現 Pxa2p 蛋白 C 端具有與 Pxa1p-NBF 作用的區域，因此，我們使用 PCR 的技術構築 Pxa2p 蛋白 C 端的刪除突變株，構築突變株的理由如下：將 Pxa1p、Pxa2p 及人類 ALDP 進行序列比對，發現 Pxa2p 比 Pxa1p 多出一段 774-853 的氨基酸序列，我們將之命名為 CT3(C-terminal 3)，如下圖所示：

```

PXA2_C      RLC-NEEKLLLELNAILDQQVPLWERKLDLTIAKESNIRKSETNMLNLFEKIEDPKTSKS
ALDP_C      RLS-LTBEKQRLEQQLAG-IPKMQRRLQELCQILGEAVAP-----AHVPAPSPQGP
PXA1_C      AITSIDNEIEELERKLER-VKGWEDERTKLRKLE--II-----
           :  :  .*  *  :  :  .  *  :
PXA2_C      NALFNANKGQRITSPYQETSRLPLFSQPSASSNLLRNNKSLNKKVKTKEEGKER
ALDP_C      GGLQGAST-----
PXA1_C      -----
    
```

另外，NBF 之後距離第 774 個氨基酸大約有 100 個氨基酸，簡單將它區分成兩個區域，分別命名為 CT1 (序列範圍為 678-723) 及 CT2 (序列範圍為 724-773)，所有刪除突變株以底下簡圖表示：



將這些刪除突變株以 yeast two-hybrid 進行分析，結果如下：

LexA BD fused	Gal4 AD fused	+X-gal
1 Pxa2_NBF_CT	Pxa1_NBF	
2 Pxa2_NBF_CTΔ774-853	Pxa1_NBF	
3 Pxa2_NBF_CTΔ724-853	Pxa1_NBF	
4 Pxa2_NBF	Pxa1_NBF	

結果指出，CT2 (724-773) 這個區域對於 Pxa1p-Pxa2p 的相互作用非常重要，只要一刪除，蛋白即失去相互作用的能力。另外，上圖中第二組結果都指出，CT3(774-853)的刪除具有明顯提升相互作用的能力，顯示 CT3 可能具有調節相互作用的能力。

(13) 針對 Pxa2p 的 CT2 區域進行序列比對：

由於 CT2 區域對於 Pxa1p-Pxa2p 的相互作用是必要的，我們開始對於 CT2 區域在蛋白相互作用中所扮演的角色產生興趣，於是針對 CT2 進行序列比對。比對的結果如下：

(A) 針對人類(Hs)、老鼠(Mm)及酵母菌(Sc)的相似性蛋白的 CT2 進行比對：

Mm_member 1	GGWKFEKLD SAARLSLTEEKQRL EQQLAG-IPKM <u>GR</u> LQELRQILGEAAA
Hs_ALDP	GGWKFEKLD SAARLSLTEEKQRL EQQLAG-IPKM RRLLQELCQILGEAVA
Mm_member 2	GGWRFEQLDTAIRLTLSEEKQKLESQLAG-IPKM QRLNELCKILGEDSV
Hs_ALDRP	GGWRFEQLDTAIRLTLSEEKQKLESQLAG-IPKM QRLNELCKILGEDSV
Sc_Pxa2p	GGYQFGPFNPKERLCNEEKLEL LNAILDQQVPLWER KLKDLT-IAKESNI
	**::* ::. ** *:. *:. * :* :.::* * *

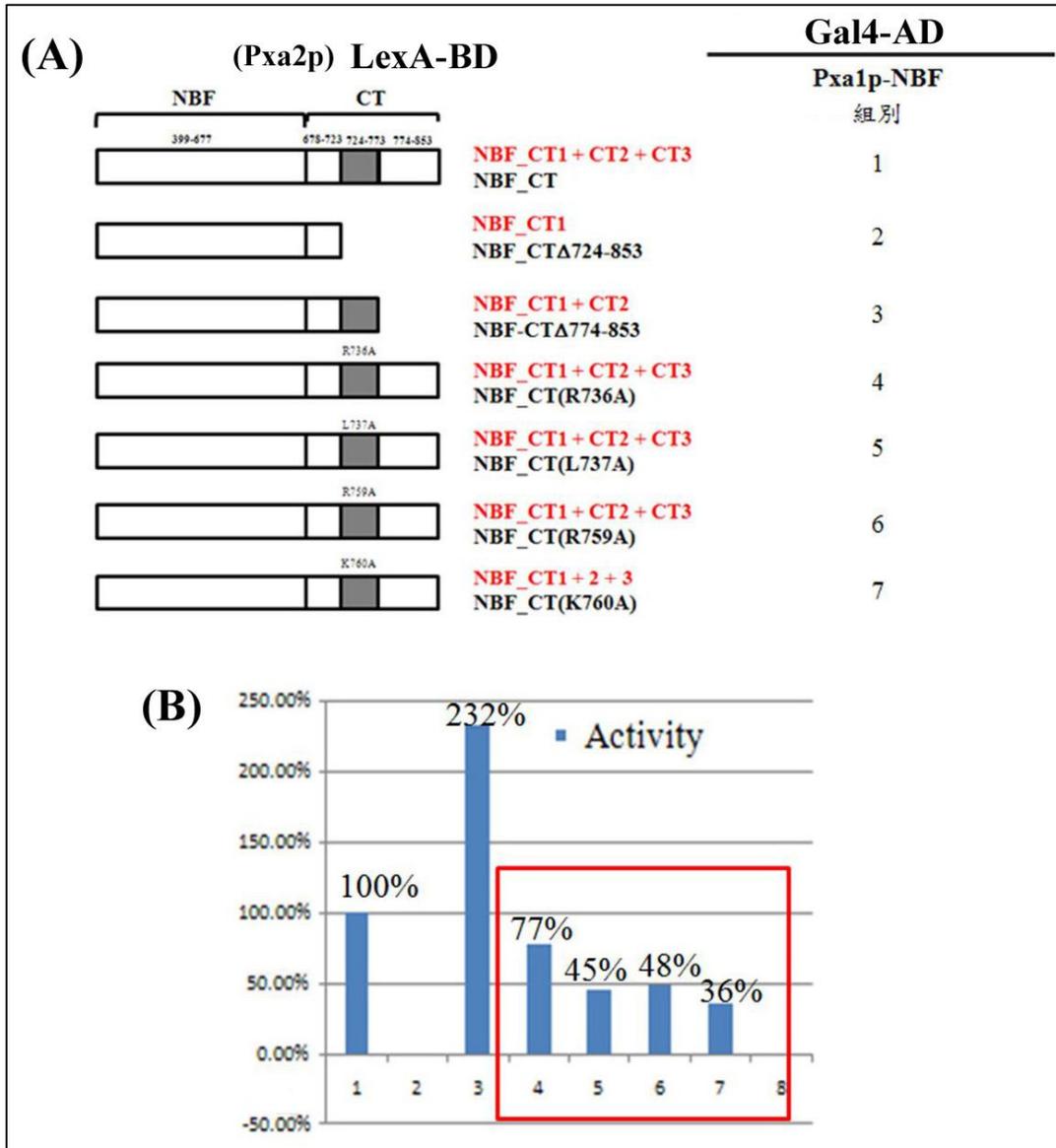
上面的結果指出，來自不同物種的 Pxa2p 之同功同源蛋白在此區域有極高的相似性。

(B) 針對同屬於酵母菌屬的三株真菌-耐鹽性酵母菌 *Zygosaccharomyces rouxii* (簡稱 Zr)、孔酸克魯維酵母 *Kluyveromyces lactis* (簡稱 Kl)、啤酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* (簡稱 Sc)-

圖中的第3到6組即是分析 Pxa2p 之 CT2 區域點突變蛋白與 Pxa1-NBF 的相互作用，可以發現它們的顏色比起第1控制組都有減弱，表示這些點突變確實影響了蛋白之間的相互作用，此結果指出，Pxa2p 的 CT2 區域高度保留的氨基酸對於 Pxa1p-Pxa2p 之間的相互作用都是重要的。

(15) 建立 yeast-two hybrid 活性分析方法並鑑定 Pxa2p 之 CT2 區域點突變的影響：

為了將 yeast two-hybrid 相互作用的現象加以數位化，以便於更精確分析它們之間的差異，我們採用了 Thermo 公司開發的 Yeast beta-Galactosidase Assay Kit (Cat. No. 75768) 來測定 galactosidase 的活性，其結果如下：

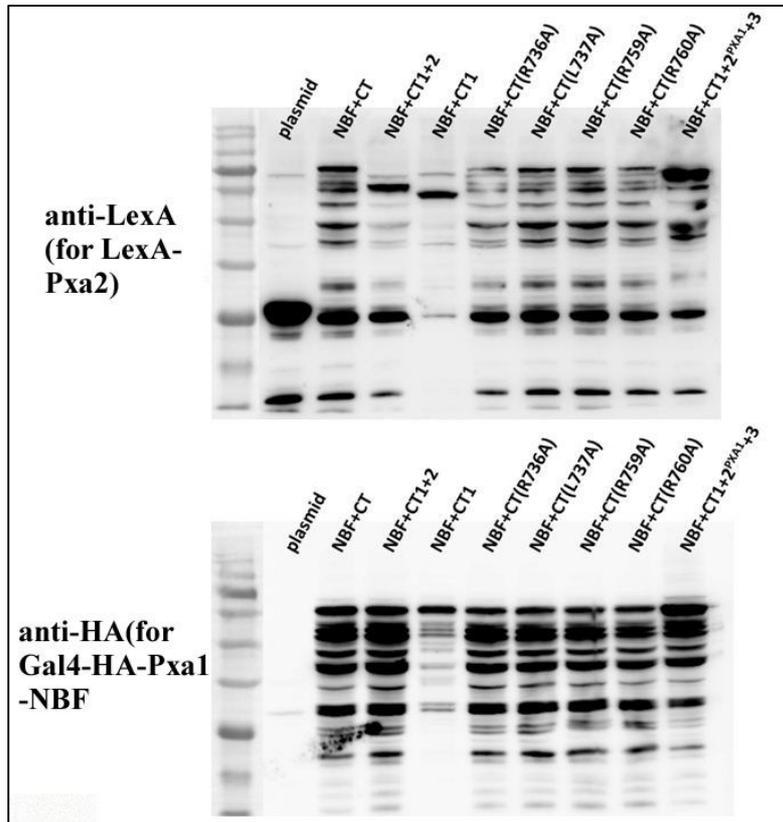


(A)圖表示各組所分析的蛋白配對，(B)圖表示以(A)圖組合進行活性分析的結果，由上圖(B)中可以發現第4~7組比起第1控制組(活性當作100%)減少23~64%，顯示第736、737、759或760氨基酸的突變確實影響了 Pxa1p 與 Pxa2p 的相互作用，這表示 CT2 區域高度保留的氨基酸對相互作用而言是相當重要的。此活性分析結果正與前面 X-gal plate 的結論是相互一致的，所以，beta-Galactosidase 活性分析方法確實可以用來將相互作用的差異數位化，

以便於可以較精確描述突變的效應。

(16) 以 Western blot 分析 yeast-two hybrid 酵母菌中融合蛋白的含量：

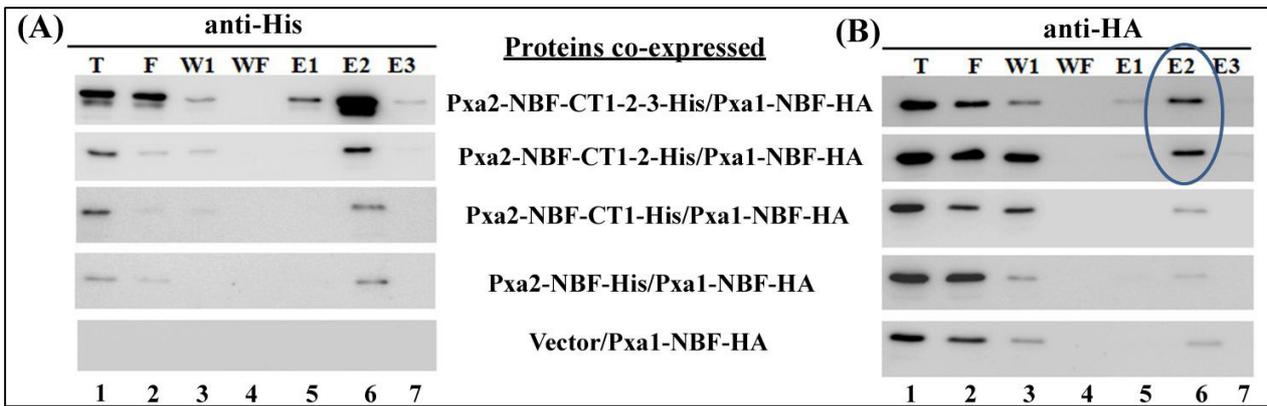
為了確認在 yeast-two-hybrid 的分析方法中融合蛋白都有穩定表現，於是我們將上述組合的酵母菌總蛋白萃取物以西方墨點法分析融合蛋白的含量，各種 Pxa2p 蛋白是以 LexA-Pxa2 的型態存在，因此以 anti-LexA 抗體進行偵測，而 Pxa1-NBF 蛋白則是以 Gal4-HA-Pxa1-NBF 的形態存在，因此以 anti-HA 抗體進行偵測。實驗結果如下：



由上圖的結果可知這些融合蛋白都有穩定表現出來，這更加說明先前分析結果的正確性。

(17) 以生化方法分析 CT2 區域對於 Pxa1p 與 Pxa2p 的相互作用的重要性：

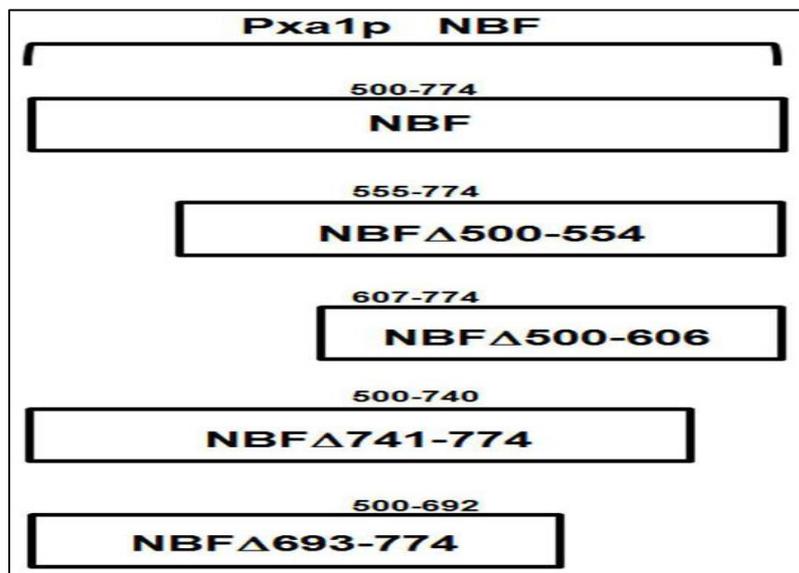
除了使用遺傳方法證明 Pxa1p-Pxa2p 之間的相互作用之外，我們也想從生化的角度來應證它們之間的相互作用。將各種 Pxa2(His-tag) 蛋白的 DNA 片段接入酵母菌表現載體 pRS414-GAL(含有可受 galactose 誘導的 GAL promoter)，將 Pxa1-NBF(HA-tag) 蛋白的 DNA 片段接入 pRS416-GAL，將質體依規畫的組合送入 $\Delta pxa1/pxa2$ 的菌株中進行蛋白誘導，接著使用超音波將菌體震碎，離心收取上清液，以 Ni-NTA resin 進行各種 Pxa2-His 蛋白的純化，若蛋白之間有相互作用，則 Pxa1-NBF-HA 蛋白將會被共同純化下來，反之則不會。實驗結果如下：



圖(A)及(B)是將純化過程各個步驟收取的 sample 以 Western blot 進行分析，分別以 anti-His (圖 A)及 anti-HA(圖 B)抗體進行偵測，圖中的 T 表示 total，F 表示 flow-through，W1 及 Wf 分別表示清洗的第一管及最後一管，E1~3 表示沖提的第一~三管，由上圖可得知蛋白都是在 E2 沖出。觀察上圖共純化的結果可知，在 Pxa2-NBF-CT1-2-3-His/Pxa1-NBF-HA 及 Pxa2-NBF-CT1-2-His/Pxa1-NBF-HA 這兩組蛋白都有共純化的現象，顯示蛋白之間有相互作用，但是當 Pxa2 的 C 端刪除到只剩 CT1 或是連 CT1 都刪除之後，則蛋白之間的相互作用就減弱許多，顯示 CT2 區域對於相互作用確實相當重要。此生化分析結果完全與遺傳分析結果相互一致，更加確認 CT2 區域在 Pxa1p-Pxa2p 的相互作用上扮演重要的角色，是不可或缺的。

(18) 構築 Pxa1p 蛋白 NBF 的一系列刪除突變株並分析其對相互作用的影響：

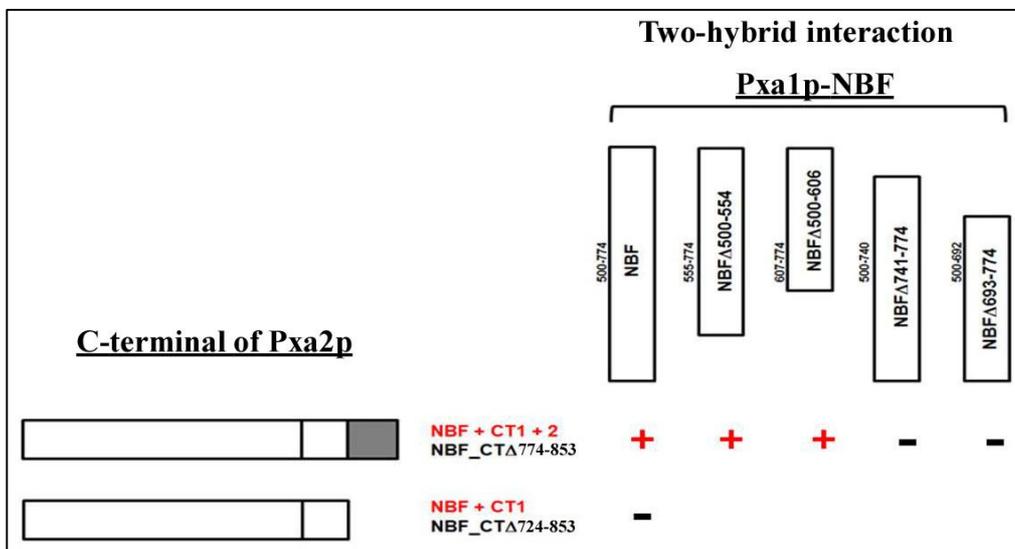
我們已經發現 Pxa2p 蛋白會經由其 CT2 區域與 Pxa1p 蛋白的 NBF 相互作用，接著我們想找出與 CT2 相互作用的部位是在 Pxa1p-NBF 的那個區域上，所以，我們構築了 Pxa1-NBF 的一系列刪除突變株，再進行 yeast two-hybrid 的分析。我們針對其 N 端及 C 端各構築了兩個刪除突變株，圖示如下：



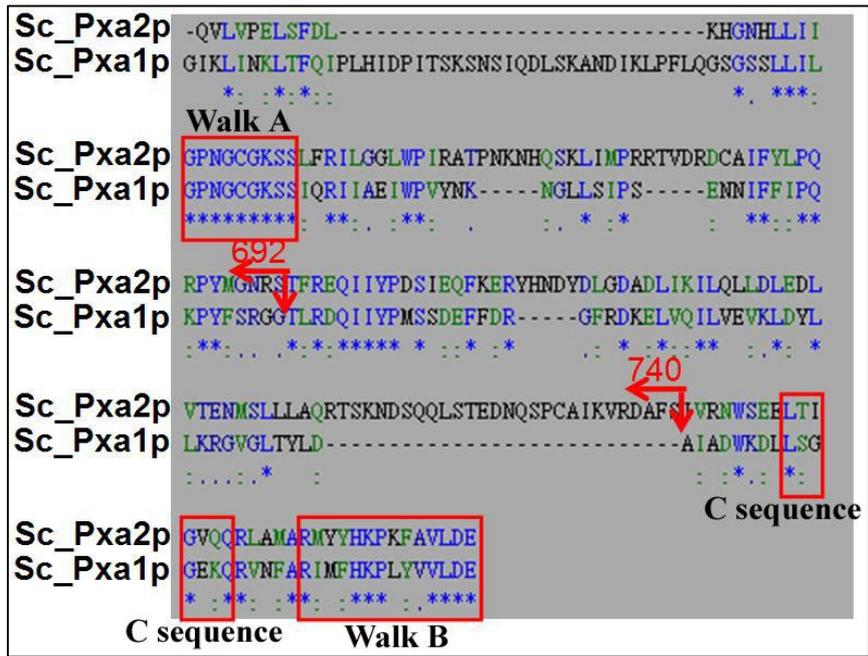
以這些刪除突變株進行 yeast two-hybrid 的分析，結果如下：

	LexA BD fused	Gal4 AD fused	+X-gal
1	Pxa2_NBF_CTΔ774-853	Pxa1_NBF	
2	Pxa2_NBF_CTΔ724-853	Pxa1_NBF	
3	Pxa2_NBF_CTΔ774-853	Pxa1_NBFΔ500-554	
4	Pxa2_NBF_CTΔ774-853	Pxa1_NBFΔ500-606	
5	Pxa2_NBF_CTΔ774-853	Pxa1_NBFΔ741-774	
6	Pxa2_NBF_CTΔ774-853	Pxa1_NBFΔ693-774	

將上述結果簡化圖示如下：



以上的結果指出，Pxa1p 蛋白 NBF 的 N 端大約 100 個氨基酸對於相互作用影響較小，刪除後仍然可以觀察到藍色，但是其 NBF 的 C 端則對相互作用影響很大，刪除 741-774(長度為 34)或 693-774(長度為 82)皆會完全破壞相互作用的能力。Pxa1p-NBF 的 C 端包含了 ATP 結合的 Walk A、Walk B motif 及 C sequence，將其相對位置以下圖表示：



由上圖中可知刪除 741-774(長度為 34)或 693-774(長度為 82)皆無保留 C sequence 及 Walker B 的功能，會破壞 ATPase 的功能，因此，Pxa1p 蛋白中負責與 ATP 結合的區域有可能直接與 Pxa2p 蛋白 CT2 區域發生相互作用，也暗示著 ATP 的結合及水解在相互作用上扮演某種未知的角色。

五、討論

本研究計畫剛開始是從研究 Pxa1p 及 Pxa2p 複合體的分子型著手，先構築 pxa1/pxa2 雙基因刪除酵母菌株，再將表現全長 Pxa1p-HA/Pxa1p-V5 的質體或 Pxa2p-HA/Pxa2p-V5 的質體送入 pxa1/pxa2 雙基因刪除株中表現蛋白，然後以免疫共沉澱方法證實同源複合體的存在。接著我們使用膠體過濾層析法分析蛋白複合體的分子大小，分析結果指出，蛋白在清潔劑萃取的情況下都會形成分子量大於 2000 KDa 的不正常聚集(aggregate)，因此無法經由膠體過濾層析法鑑定出複合體的分子量。由於 Pxa1p 及 Pxa2p 都是 ABC 運輸蛋白，我們也嘗試將蛋白的 ATPase 的區域以重組蛋白的型態進行表現及純化，並進行 ATPase 活性的鑑定，然而因為非專一性蛋白干擾的存在，而無法鑑定其 ATPase 的特性。為了進一步以遺傳的方法證實同源複合體及異源複合體的存在的可能性，我們開始發展酵母菌雙雜交方法，來探討蛋白之間的相互作用，實驗過程中發現 Pxa1p 及 Pxa2p 的穿膜區會干擾雙雜交的分析方法，因此後來只選取蛋白穿膜區之後的 C 端進行分析。實驗結果顯示相互作用確實存在於 Pxa1p-Pxa1p、Pxa2p-Pxa2p 及 Pxa1p-Pxa2p 的組別中，顯示確實存在同源複合體及異源複合體。另外，我們進一步探討 Pxa1p-Pxa2p 相互作用的區域，發現 Pxa2p 的 C 端的 CT2 區域對於 Pxa1p-Pxa2p 蛋白之間的相互作用是必要的，此區域高度保留的氨基酸若發生點突變，也會影響到相互作用的能力，此結果更加說明 CT2 區域對於相互作用的重要性。最後，經由 Pxa1-NBF 一系列刪除突變株的分析發現，Pxa1-NBF 的 C 端包含 ATP 結合及分解的區域對於相互作用是必須的，有可能是使用本區域直接與 Pxa2p 蛋白的 CT2 區域進行相互作用的。

本研究很清楚的描繪出 Pxa1p 及 Pxa2p 相互作用的區域，我們發現 Pxa1p 蛋白會使用其 NBF 區域(ATPase 活性區)與 Pxa2p 的 CT2 區域相互作用，顯示 ATP 的結合及水解與相互作用有關，有可能使用來自 ATP 的能量來控制通道的開關。Pxa2p 的 CT2 區域可促進相互作用而 Pxa1p 的 C 端不會的差異性顯示這兩個蛋白的 C 端作用模式並非對稱性的，也就是說兩個蛋白的 C 端區域在運輸過程扮演不同的角色。我們也發現 Pxa1p-Pxa1p 及 Pxa2p-Pxa2p 同源二聚體的相互作用，目前已知的以異源二聚體運作的 ABC 運輸蛋白中，這種同源相互作用是第一個被發現的，其生理功能是否與調節運輸能力有關還有待深入探討。另外我們也發現 Pxa2p 蛋白的 CT3 區域具有調節相互作用的能力，當 CT3 刪除時，Pxa1p-Pxa2p 的相互作用增強為兩倍，顯示 CT3 具有負向調節相互作用的能力，有可能扮演類似開關的角色。上述的結果是本研究中最重要發現，可增進科學界對於異源性 ABC 運輸蛋白相互作用的了解，相信對於其他異源性 ABC 運輸蛋白作用機制的研究上深具參考價值。

六、参考文献

1. Higgins, F. (1992) ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.
2. Dean, M., Rzhetsky, A. and Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11, 1156-1166.
3. Jungwirth, H. and Kuchler, K. (2006) Yeast ABC transporters—a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* 580, 1131-1138.
4. Imanaka, T., Aihara, K., Takano, T., Yamashita, A., Sato, R., Suzuki, Y., Yokota, S. and Osumi, T. (1999) Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* 274, 11968-11976.
5. Cartier, N., Lopez, J., Moullier, P., Rocchiccioli, F., Rolland, M.O., Jorge, P., Mosser, J., Mandel, J.L., Bougnères, P.F., Danos, O. and Aubourg, P. (1995) Retroviral-mediated gene transfer corrects very-long-chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1674-1678.
6. Moser, H.W., Smith, K.D. and Moser, A.B. (1995) in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R. et al., Eds.), pp. 2325-2349, McGraw-Hill, New York, NY.
7. Bezman, L., Moser, A., Raymond, G., Rinaldo, P., Watkins, P., Smith, K., Kass, N. and Moser, H. (2001) Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann. Neurol.* 49, 512-517.
8. Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R. and Aubourg, P. (1999) Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette halftransporters. *J. Biol. Chem.* 274, 32738-32743.
9. Tanaka, A.R., Tanabe, K., Morita, M., Kurisu, M., Kasiwayama, Y., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Imanaka, T. and Ueda, K. (2002) ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J. Biol. Chem.* 277, 40142-40147.
10. Berger, J., Albet, S., Bentejac, M., Netik, A., Holzinger, A., Roscher, A.A., Bugaut, M. and Forss-Petter, S. (1999) The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *Eur. J. Biochem.* 265, 719-727.
11. van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., van Cruchten, A., Boek, M., Kulik, W., Waterham, H. R. and Wanders, R. J. (2008) The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J.* 22, 4201-4208.
12. Shani, N., Watkins, P. A. and Valle, D. (1995) PXA1, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6012-6016.

13. Shani, N. and Valle, D. (1996) A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11901-11906.
14. Swartzman, E.E., Viswanathan, M.N. and Thorner, J. (1996) The PAL1 gene product is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 132, 549-563.
15. Hetteema, E.H., van Roermund, C.W.T., Distel, B., vandenBerg, M., Vilela, C., RodriguesPousada, C., Wanders, R.J.A. and Tabak, H.F. (1996) The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15, 3813-3822.
16. Verleur, N., Hetteema, E.H., Van Roermund, C.T., Tabak, H.F. and Wanders, R.A. (1997) Transport of activated fatty acids by the peroxisomal ATP-binding-cassette transporter Pxa2 in a semi-intact yeast cell system. *Eur. J. Biochem.* 249, 657-661.
17. Wanders R.J., Visser W.F., van Roermund C.W., Kemp S. and Waterham, H.R. (2007) The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch.* 453, 719-34.
18. Makino, S., Woolford, J. L. Jr., Tanford, C. and Webster, R. E. (1975) Interaction of deoxycholate and of detergents with the coat protein of bacteriophage ϕ 1. *J. Biol. Chem.* 250, 4327-4332.

七、附錄

附錄 1：Primer

Primer	序列(5'→3')	基因	*相對位置	orientation
Primer-23	ggccggatcctggcaagtatacaatgctc	<i>PXA1</i>	493 – 510	forward
Primer-42	aattgcggccgcctctccctttctagggtg	<i>PXA1</i>	3617 – 3634	reverse

*相對位置：以基因上游的 1000 bp 為起始點，所以基因的第一個鹼基的序號為 1001。

附錄 2：菌種

strain	Relevant characteristics
DH5 α	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻
BJ2168	<i>MATa prc1-407 prb1-1122 pep4-3 leu2 trp1 ura3-52 gal2</i>
Δ pxa2	<i>MATa prc1-407 prb1-1122 pep4-3 leu2 trp1 ura3-52 gal2 pxa2</i>
Δ pxa1/pxa2	<i>MATa prc1-407 prb1-1122 pep4-3 leu2 trp1 ura3-52 gal2 pxa1 pxa2</i> ; construed in this study
EGY48	<i>ura3 his3 trp1 LexAop-leu2</i>

附錄 3：質體

plasmid	Relevant characteristics	Source
pRS406 Δ AK-PXA1-us-ds	A 0.5 kb <i>PXA1</i> upstream and downstream fragment was subcloned in pRS406 Δ AK; <i>URA</i> ⁺ ; Ap ^r	This study
pRS416-GAL	A galactose promoter from pRS414-GAL was subcloned in pRS416 at <i>Ngo</i> MIV, <i>Sac</i> I site; <i>URA</i> ⁺ ; Ap ^r	This study
pRS414-GAL	An expression vector with galactose promoter; <i>TRP</i> ⁺ ; Ap ^r	Dr. Soo-Chen Cheng
pRS414-GAL-PXA1-V5	<i>PXA1-V5</i> was subcloned in pRS414-GAL; <i>TRP</i> ⁺ ; Ap ^r	This study
pRS416-GAL-PXA1-HA	<i>PXA1-HA</i> was subcloned in pRS416-GAL; <i>URA</i> ⁺ ; Ap ^r	This study
pRS414-GAL-PXA2-V5	<i>PXA2-V5</i> was subcloned in	This study

	pRS414-GAL; <i>TRP</i> ⁺ ; Ap ^r	
pRS416-GAL-PXA2-HA	<i>PXA2-HA</i> was subcloned in pRS416-GAL; <i>URA</i> ⁺ ; Ap ^r	This study
pCC2	<i>Pxa1-550-870</i> fragment(NBD) was subcloned in pGEX-5X-3; Ap ^r	This study
pCC4	<i>Pxa1-550-870</i> _{E774A} was subcloned in pGEX-5X-3; Ap ^r	This study
pCC6	<i>Pxa1-550-870</i> _{Δ761-774} was subcloned in pGEX-5X-3; Ap ^r	This study
pATC2	LexA activation domain vector for yeast-two hybrid assay; <i>LEU</i> ⁺ ; Ap ^r	Dr. Soo-Chen Cheng
pEG202	Gal4 binding domain vector for yeast-two hybrid assay; <i>HIS</i> ⁺ ; Ap ^r	Dr. Soo-Chen Cheng
pSH18-34	Reporter plasmid with LacZ gene controlled by LexA operator for yeast-two hybrid assay; <i>URA</i> ⁺ ; Ap ^r	Dr. Soo-Chen Cheng

Ap^r 代表 Ampicillin-resistance

Dr. Soo-Chen Cheng 為中央研究院分子生物研究所特聘研究員鄭淑珍博士。

八、計畫成果自評

本研究很清楚的描繪出 Pxa1p 及 Pxa2p 相互作用的區域，我們發現 Pxa1p 蛋白會使用其 NBF 區域(ATPase 活性區)與 Pxa2p 的 CT2 區域相互作用，顯示 ATP 的結合及水解與相互作用有關，有可能使用來自 ATP 的能量來控制通道的開關。Pxa2p 的 CT2 區域可促進相互作用而 Pxa1p 的 C 端不會的差異性顯示這兩個蛋白的 C 端作用模式並非對稱性的，也就是說兩個蛋白的 C 端區域在運輸過程扮演不同的角色。我們也發現 Pxa1p-Pxa1p 及 Pxa2p-Pxa2p 同源二聚體的相互作用，目前已知的以異源二聚體運作的 ABC 運輸蛋白中，這種同源相互作用是第一個被發現的，其生理功能是否與調節運輸能力有關還有待深入探討。另外我們也發現 Pxa2p 蛋白的 CT3 區域具有調節相互作用的能力，當 CT3 刪除時，Pxa1p-Pxa2p 的相互作用增強為兩倍，顯示 CT3 具有負向調節相互作用的能力，有可能扮演類似開關的角色。上述的結果是本研究中最重要發現，可增進科學界對於異源性 ABC 運輸蛋白相互作用的了解，相信對於其他異源性 ABC 運輸蛋白作用機制的研究上深具參考價值。本研究結果目前正在整理投稿中，相信很快就可被接受並刊行。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2011/10/31

國科會補助計畫	計畫名稱: 酵母菌過氧化體ABC運輸蛋白PXA1及PXA2複合體之結構及功能探討
	計畫主持人: 蔡榮宗
	計畫編號: 97-2311-B-040-002-MY3 學門領域: 生物學之生化及分子生物
無研發成果推廣資料	

97 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：蔡榮宗		計畫編號：97-2311-B-040-002-MY3				計畫名稱：酵母菌過氧化體 ABC 運輸蛋白 PXA1 及 PXA2 複合體之結構及功能探討	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

本研究很清楚的描繪出 Pxa1p 及 Pxa2p 相互作用的區域，我們發現 Pxa1p 蛋白會使用其 NBF 區域(ATPase 活性區)與 Pxa2p 的 CT2 區域相互作用，顯示 ATP 的結合及水解與相互作用有關，有可能使用來自 ATP 的能量來控制通道的開關。Pxa2p 的 CT2 區域可促進相互作用而 Pxa1p 的 C 端不會的差異性顯示這兩個蛋白的 C 端作用模式並非對稱性的，也就是說兩個蛋白的 C 端區域在運輸過程扮演不同的角色。我們也發現 Pxa1p-Pxa1p 及 Pxa2p-Pxa2p 同源二聚體的相互作用，目前已知的以異源二聚體運作的 ABC 運輸蛋白中，這種同源相互作用是第一個被發現的，其生理功能是否與調節運輸能力有關還有待深入探討。另外我們也發現 Pxa2p 蛋白的 CT3 區域具有調節相互作用的能力，當 CT3 刪除時，Pxa1p-Pxa2p 的相互作用增強為兩倍，顯示 CT3 具有負向調節相互作用的能力，有可能扮演類似開關的角色。上述的結果是本研究中最重要發現，可增進科學界對於異源性 ABC 運輸蛋白相互作用的了解，相信對於其他異源性 ABC 運輸蛋白作用機制的研究上深具參考價值。本研究結果目前正在整理投稿中，相信很快就可被接受並刊行。