

# 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 的結構與功能 關係研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 96-3111-B-040-001-  
執行期間：96年11月01日至97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  
共同主持人：陳凌雲  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：黃傑懋  
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  
博士班研究生-兼任助理人員：莊政益

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

酵母菌過氧化體ABC運輸蛋白PXA1 及PXA2 的結構與功能關係研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 96-3111-B-040-001-

執行期間：96年11月01日至97年07月31日

計畫主持人：蔡榮宗

共同主持人：陳凌雲

計畫參與人員：黃傑懋、莊政益、許家齊、王建程

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中華民國 97 年 10 月 31 日

## (一) 中文摘要

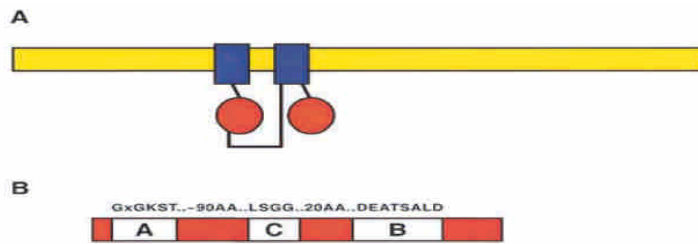
過氧化體是真核細胞中脂肪酸進行 $\beta$ 氧化作用的重要胞器。目前已知人類過氧化體膜上有四個 ABC 運輸蛋白(ATP-binding cassette transporter)，其中的 ALDP 參與極長鏈脂肪酸之 $\beta$ 氧化作用，當此蛋白基因發生變異時，會導致腎上腺腦白質退化症(簡稱為 ALD)。目前的證據指出，ALDP 與其他兩個過氧化體 ABC 蛋白(ALDRP 及 PMP70)會形成同源及異源二聚體。酵母菌中也有 ALDP 及 PMP70 的同源性蛋白，分別為 Pxa1p 及 Pxa2p。生化及遺傳的證據指出，Pxa1p 及 Pxa2p 是以異源二聚體參與長鏈脂肪酸的 $\beta$ 氧化作用。然而，這些二聚體的證據皆來自於免疫共沈澱、遺傳學上的分析及蛋白質穩定的相關性，這些方法無法測定分子量而不能完全證明是否為二聚體，也無法排除同源複合體存在的可能性。因此，本研究的目標就是要探討酵母菌 Pxa1p 及 Pxa2p 蛋白的構造及功能之間的關係，我們先選定與人類 ALDP 最相似的 Pxa1p 進行初步的研究。由於 ALDP 是經由 C 端進行同源及異源的相互作用，因此，我們選定與 ALDP 的 C 端相似的 Pxa1p 的 C 端區域(即 Pxa1pC-HA)進行特性分析。重組蛋白 Pxa1C-HA 在大腸桿菌中大量生產，原本是不可溶的，經 Urea 溶解及透析後變為可溶，以鎳離子管柱層析純化，再以膠體過濾進行分析，依據蛋白出現的時間計算分子量，得知複合體約由 2-4 個單體所構成，顯示 C 端蛋白有形成同源複合體的能力。我們在細菌中同時表現 Pxa1pC-HA 及 Pxa1pC-V5，取可溶性的蛋白以免疫沈澱方法進行分析，結果發現兩種版本的蛋白的確可以相互作用。這些生化結果顯示：Pxa1pC 具有形成同源複合體的能力，也間接指出全長蛋白具有形成同源複合體的能力，然而，這種假說需要更進一步的研究加以證實。

## (二) 報告內容

### 1. 前言、研究目的、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, *Genome Res.*, 11: 1156-1166 (2001)



**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 $\alpha$ 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, *FEBS Letters* 580: 1131-1138 (2006)

ABC Subfamily	Predicted Topology	Domains
PDR		(NBD-TMS <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
MRP/CFTR		NTE(TMS <sub>6</sub> -NBD) <sub>2</sub>
MDR/ALDP (half-size)		TMS <sub>6</sub> -NBD
YEF3/RLI		NBD <sub>2</sub>

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.

由於最近幾年基因解碼的工作突飛猛進，使許多原核及真核的基因組序列相繼被鑑定出

來。於是，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 (Adrenoleuko- dystrophy protein; 又簡稱為 ABCD1)、ALDRP

(Adrenoleukodystrophy- related protein; 又簡稱為 ABCD2)、PMP70 (the 70KDa peroxisomal membrane protein ; 又簡稱為 ABCD3)、PMP69 (the 69KDa peroxisomal membrane protein ; 又簡稱為 ABCD4)。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  $\beta$  氧化作用(4, 5)。

過氧化體內脂肪酸的  $\beta$  氧化作用，可以區分成兩階段。第一階段是  $\beta$  氧化作用前的反應，包含脂肪酸的活化及運送。脂肪酸的活化是經由醯基輔酶 A 合成酶(acyl CoA synthetase) 的轉脂化作用，而使脂肪酸與輔酶 A (coenzyme A) 共價鍵結成脂肪醯基輔酶 A (fatty acyl CoA)，而活化的位置則可能發生於細胞質或過氧化體內，所以醯基輔酶 A 合成酶也有屬於細胞質的以及過氧化體內的。若是活化的位置在細胞質，則雙性的(amphipathic)脂肪醯基輔酶 A，將不易通過厭水性的過氧化體膜，而需要運送蛋白的協助。若是活化的位置是在過氧化體內，則表示脂肪酸是以本身厭水特性通過過氧化體膜，這是較容易發生的過程，也可能不需其他蛋白得幫助(6)。第二階段是過氧化體內的  $\beta$  氧化作用的反應，需要 acyl-CoA oxidase、bifunctional protein 及 3-oxoacyl-CoA thiolase 等酵素的參與，才能將脂肪酸氧化成 acetyl-CoA(7)。然而，來自人類的 ALDP、PMP70 及酵母菌的 Pxa1p、Pxa2p 在  $\beta$  氧化作用中扮演何種角色仍是未知的，不過從前人的研究中已經提供了一些相當有意義的線索。

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，約兩萬個男性中有一例(8)，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(9)。相關研究指出，ALD 是由於 X 染色體上一個稱為 X-ALD 的基因發生突變所導致，其序列與 ABC 運輸蛋白有很高相似性(10, 11)。X-ALD 的蛋白產物被命名為 ALDP (ALD protein)，是一個過氧化體上的膜蛋白，其朝向細胞質的部分具有一個 ATP 結合區(12, 13)。統計結果指出，所有來自 ALD 病人的突變中，約有 50% 是發生 missense 的突變，其分布位置有一些是在穿膜區的 EAA 序列上，其功能與 ABC 蛋白之間相互作用及蛋白本身的運輸有關，其他的則位於 NBF 上，這些數據顯示，EAA 序列及 NBF 對於 ALDP 的蛋白功能都是很重要的，也表示蛋白之間的相互作用及 ATP 的結合與水解，對蛋白的功能具有決定性的影響(11)。約有 70% 的變異最後都

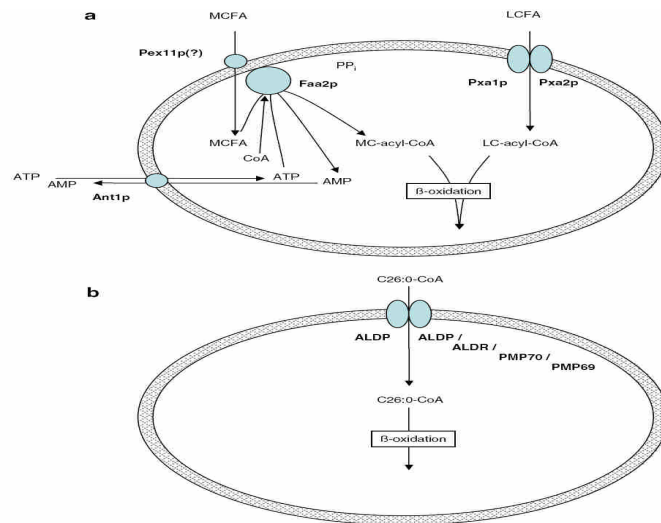
會導致 ALDP 蛋白不穩定，以至於病人的檢體中測不到 ALDP 的存在(14)。當來自 ALD 病人的纖維母細胞中表達外來的 ALDP 時，可恢復極長鏈脂肪酸之  $\beta$  氧化作用的能力，證明 ALDP 的缺乏是導致 ALD 的關鍵性因素(5, 15, 16)。然而，ALDP 並非直接參與  $\beta$  氧化作用的化學反應，其理由如下：第一、ALDP 並無  $\beta$  氧化作用所需要的酵素活性(acyl-CoA oxidase、bifunctional protein 及 3-oxoacyl-CoA thiolase)(7)。第二、McGuinness 於 2003 年的研究指出，ALD 的老鼠的組織中其過氧化體內之 VLCFA 的  $\beta$  氧化作用是正常的，表示 ALDP 主要是參與  $\beta$  氧化作用之前的步驟，可能是脂肪酸的活化或運送過程(17)。第三、Smith 於 2000 年的研究發現，罹患 ALD 人類及老鼠的纖維母細胞之過氧化體中，都可以偵測到負責脂肪酸活化的 VLACS，顯示 VLACS 的運送及穩定性與 ALDP 無關。所以，ALDP 並非參與脂肪酸的活化酵素的運送(18)。第四、Guimaraes 於 2005 年的研究指出，當 ALDP 與被運送物質(LCFA-CoA 及 VLCFA-CoA)一起培養時，被誘導產生構形的改變，表示 ALDP 很可能直接參與 LCFA-CoA 及 VLCFA-CoA 運送通過過氧化體膜的過程(19)。雖然這些研究指出，ALDP 功能很可能是負責運送 VLCFA 或 VLCFA-CoA 通過氧化體膜，然而，還需其他更直接的證據，例如、捕捉 ALDP 與 VLCFA(or VLCFA-CoA)的複合體、解析出此複合體之 X-ray 結晶繞射圖，或是以電子顯微鏡觀察通道的存在...等等。

過去十五年的研究指出人類的 ALDP、PMP70、ALDRP 彼此之間具有相當複雜的關係，甚至有些結果是相互衝突的，以下將簡單回顧這些研究結果。早期所發現的 ABC 運輸蛋白中，有兩個稱為 TAP1 及 TAP2，其功能是負責將抗原性肽由細胞質中送入內質網。1992 年，Kelly 及 Spies 分別在其研究中幾乎同時發現，TAP1 及 TAP2 可形成異源二聚體(20, 21)。因此，當 PMP70 及 ALDP 相繼被發現後，Valle 等人隨即提出一個假設：既然它們與 TAP1 及 TAP2 同屬於 ABC 蛋白家族成員，就有可能具有形成二聚體的特性(22)。然而，更直接的證據是來自於 Liu 的研究，他以重組蛋白之間的免疫共沈澱(immuno-precipitation)及酵母菌雙雜交(yeast two hybrid)實驗，證明 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(23)。另外，在 Tanaka 的研究中發現，ALDP 與 PMP70 皆具有典型 ATPase 的活性(結合及水解 ATP)。同一研究中的免疫共沈澱的實驗結果指出，ALDP 與 PMP70 可形成複合體，且其特定位置的 tyrosine 有被磷酸化的現象，因而推測，運輸蛋白與 ATP 的結合及水解及其磷酸化的現象，對脂肪酸的運送過程扮演調節的角色(24)。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(25)。最近，Guimaraes在其研究中，以特殊的清潔劑溶解條件進行膜蛋白的萃取，接著，進行蛋白純化並分析其比例，結果顯示，ALDP及PMP70在in vivo的情況下，以形成同源二聚體較為普遍(26)。此外，如果形成異源二聚體對功能是必要的，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 $\beta$ 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 $\beta$ 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。然而，真正有功能的是同源二聚體、或是異源二聚體、或是兩者皆有功能只是運輸的物質不同、或是在不同組織有不同的情形...等等，這些論點都要等到在微脂粒(liposome)中重組成有功能的運輸蛋白時，才能完全釐清。(請參考圖三.b)

圖三：摘自 Ref. 27, *Pflugers Arch.* 453 : 719-34 (2007)

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



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(28)。二、Pxa2p (peroxisomal ABC-transporter 2)，相似於PMP70(29)。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(28, 30)。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(28, 29)，且其氧化LCFA能力也大為降低(31)，顯示LCFA的 $\beta$ 氧化作用需要Pxa1p及Pxa2p的參與。然而，它們對於過氧化體的生合成是非必須的(28)，且對於酵母菌生長於中鏈脂肪酸(medium chain fatty acid; 簡稱MCFA)-例如 laurate(C12:0)及 myristate(14:0)-的環境中也是非必須的(31)，顯示這些蛋白的功能是專一的參與LCFA的 $\beta$ 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(31)。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(29)。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 $\beta$ 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(32)。這兩種機制也在 Hetteema 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(31)。(請參考圖三.a)

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。此外，人類及酵母菌的過氧化體 ABC 運輸蛋白可以形成蛋白數目為二的二聚體之證據仍是相當薄弱的，因為免疫共沈澱、酵母菌雙雜交實驗、遺傳學的分析、蛋白質穩定的相關性皆無法得知複合體之分子量。因此，嚴格來說，這些蛋白是形成二聚體還是更大的寡聚體(oligomer)，仍是未知的。

本研究的目標就是要探討酵母菌 Pxa1p 及 Pxa2p 蛋白複合體的構造及功能之間的關係，我們先選定與人類 ALDP 最相似的 Pxa1p 進行初步的研究。由於 ALDP 是經由 C 端進行同源及異源的相互作用(23)，因此，我們選定與 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(參考附錄一)。經本研究中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。

## **2. 研究方法**

### **(1) 酵母菌同源重組技術**

我們所使用的同源重組技術，是以兩步驟的方式來完成，先構築包含 *PXA1* 或 *PXA2* 基因上游及下游但不包含基因本身序列的質體(載體為 pRS406，無法在酵母菌中自行複製，但具有 *Ura3* 營養需求基因)，接著以限制酶在基因上游區切一刀，送入野生株 BJ2168 中，在切割點附近容易引發同源重組反應，使質體完全插入染色體中，產生出來的酵母菌因多出來自質體的 *Ura3* 基因，即可生長在不含 uracil 成分之合成培養基上，再以 PCR 的方式進行確認。第二步則是將此具有質體插入的變異株，培養於營養的 YPD(包含 yeast extract、peptone、glucose)培養基上，由於在此培養基中酵母菌生長快速，在細胞分裂時，同源性 DNA 會發生聯會互換，因而出現第二次的同源重組，若重組發生在上游區，則將恢復成野生株，若重組發生於基因下游區，則將使完整的 *PXA1* 或 *PXA2* 基因被刪除。重組發生後質體上的 *Ura3* 基因也一起刪除，因此可用含 5-FOA(5-fluoro-orotic acid)的合成培養基進行篩選，其篩選的原理是，若無發生第二次同源重組，則 *Ura3* 基因還在，會將 5-fluoro-orotic acid 催化產生 5-fluorouracil，這個物質會嚴重干擾 DNA 及 RNA 的合成，也是一種常用癌症的化療藥物，酵母菌即無法存活，反之，若有發生第二次同源重組，則因 *Ura3* 基因已經刪除，不會產生有毒物質，細胞因而存活下來。經第二次同源重組後，會同時產生野生株及 *PXA1*(或 *PXA2*)基因刪除突變株，這時需再 PCR 的方法並使用基因上游及下游的引子進行確認。

### **(2) 包含 Pxa1p 蛋白 C 端 168 個氨基酸之重組蛋白質體的構築**

首先將 BJ2168(酵母菌的野生株，由中研院分生所鄭淑珍特聘研究員所提供)養在 YPD

液體培養基上，培養條件 30 °C 培養過夜，之後利用 genomic DNA 純化試劑組(GeneMark) 將 BJ2168 的 genomic DNA 純化出來作為模板。Primer-3、4、5、6 以染色體為模板進行聚合酶連鎖反應，由 Primer-3、4 所放大的 PCR 產物包含 Pxa1p 的 C 端 168 個氨基酸及前半段的 HA 標籤(完整 HA 標籤氨基酸序列為 YPYDVPDYA)，由 Primer-5、6 所放大的 PCR 產物則包含後半段的 HA 標籤及 PXA1 的下游約 500 bp 的區域。反應完成的 PCR 產物含有限制酶的辨識位置，使用酒精沉澱的方法將 PCR 產物純化出來，再利用限制酶 BamHI 和 AatII 進行切割，限制酶切割條件為 37 °C 作用 2 小時(digestion)，之後的 DNA 回收皆利用低熔點的膠(low melting gel)進行回收。本實驗使用前人的質體 pRS406 $\Delta$ A-CWC23HA 為初始的質體將 Pxa1p-HA 及其下游區域依序轉殖進入其中而取代 CWC23 的基因，由於稍後的實驗要把質體插入到 BJ2168 的染色體 DNA，這個過程要利用 PXA1 基因中的 KpnI，為避免載體中原本 KpnI 的干擾，所以使用 Klenow fragment 先破壞 pRS406 $\Delta$ A-CWC23HA 上的 KpnI 切割位(附錄 6 A)。接著 pRS406 $\Delta$ AK-CWC23HA 利用限制酶 BamHI 和 AatII 進行切割，先接入 Primer-3、4 PCR 產物(已切過 BamHI 和 AatII) (附錄 6 B)接著進行序列比對胺基酸無誤後，再利用限制酶 AatII 和 XhoI 進行切割，再接入 Primer-5、6 PCR 產物(已切過 AatII 和 XhoI) (附錄 6 C)進行序列比對胺基酸無誤後，在此已得到 pRS406 $\Delta$ AK-PXA1C-HA (包含 Pxa1p 蛋白 C 端 168 個胺基酸及包含 HA 標籤及下游約 500 bp 的區域)。為了使之後接到 pET-15b-DH4(表現重組蛋白用的質體)質體上的 PXA1-HA 的基因是 in-frame，因此利用了 Klenow fragment 的方法破壞原本 pET-15b-DH4 上的 EcoRI 切割位(附錄 7 A)。接著使用 CelII 限制酶進行切割，利用 Klenow fragment 的方法進行 Fill-in 使之變成平端，再用 BamHI 限制酶進行切割後(回收 5.7Kb)，最後把 insert(pRS406 $\Delta$ A-PXA1C-HA 切 BamHI 和 EcoRV，回收 0.7 Kb 的 band)接入後得到 pET-15b-DH4-PXA1C-HA，此質體所表現出來的重組蛋白就稱為 Pxa1pC-HA。

### (3) 重組蛋白液之製備

把含有 pET-15b-DH4-PXA1C-HA 的 BL21(DE3)菌株，培養在含 ampicillin 最終濃度達 100  $\mu$ g/ml 的 3 ml LB broth 中，於 37 °C 培養 12~16 小時，再把菌液轉入含 Ampicillin 最終濃度達 100  $\mu$ g/ml 的 50ml LB broth 中(菌液 OD 為 0.05)，於 37 °C 培養至 OD<sub>600</sub>=0.5~0.7(留 2 ml，之後以 Western blot 分析)，此時加入 50  $\mu$ l 的 1 M IPTG(最終濃度為 1 mM)誘導蛋白表現，於 37 °C 培養 4 小時，以高速離心機 9500 rpm 於 4 °C 各離心 20 分鐘，將離下來的菌體，懸浮於 2 ml 的 TBS buffer(最終濃度為 10 mM pH: 8.0 Tris, 150 mM NaCl)，使用超音波破碎儀(Sonicator)破菌(破菌 5 秒休息 15 秒，破菌時間為 15 分鐘)，此時取出少量細胞萃取物作為總蛋白(Total protein)，再取出相同量以 13000 rpm 於 4 °C 離心 20 分鐘，收集上清液(supernatant)，此為可溶的蛋白。另外將 pellet 懸浮於與 supernatant 同體積的 TBS buffer(此為不可溶的蛋白)中。前述三管加入 Sample buffer 並以 SDS-PAGE 分析之。其餘部

分在離心後分成 pellet 及 supernatant 分開保存。

#### (4) 8M Urea 透析法

用 2 ml 8 M Urea 回溶不可溶的蛋白，把已溶解的 sample 加入透析袋(已泡過 TBS buffer 10 分鐘)內，置入 1000 ml TBS buffer 於 4 °C 透析 12~16 小時，取出二份 sample 一份當作總蛋白，另一份以 13000 rpm 於 4 °C 離心 10 分鐘，收集上清液(supernatant)，此為可溶的蛋白。另將 pellet(為不可溶的蛋白)懸浮於 TBS buffer。前述三管加 Sample buffer 並以 SDS-PAGE 分析之，其餘部分在離心之後分成 pellet 及 supernatant 分開保存之。

#### (5) 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。

#### (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)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 15000 rpm 於 4 °C 離心 5 分鐘後，取上清液，以微量針筒取 200  $\mu$ l 注射到 FPLC 分析儀內，收集 retention time 14-30 分鐘，每管 0.5 ml。以 TCA 沉澱之，每管取等量體積進行 Western blot 分析。

#### (7) pJM2 的構築

將含有 V5 蛋白標籤(氨基酸序列為 GKPIPPLLGLDST)的 DNA 序列設計在基因末端的引子中，以 PCR 放大與 pET-15b-DH4-PXA1C-HA 相同的 PXA1 基因片斷，將此片段以 BamHI 及 NotI 切割位接入 pET28b-EX2 載體中，構築好的質體就稱為 pJM2，所表現出的蛋白命名為 Pxa1pC-V5，此重組蛋白可用 anti-V5 的抗體加以偵測。

#### (8) 酵母菌雙雜交實驗

將要分析相互作用的兩個蛋白的基因其中一個轉殖到 pACT2(含轉錄活化區)上，將另一個基因轉殖到 pEG202(含 DNA 結合區)上，再以一對一的方式一起送入含有 reporter 質體(pSH18-34)的酵母菌株 EGY48 中，進行  $\beta$ -galactosidase 活性分析，若在含 X-gal 培養基上有出現藍色沈澱物，就表示蛋白間有相互作用，若為白色，就表示蛋白間已失去相互作用

力。

### **3. 結果與討論**

#### **(1) 包含 Pxa1p-C 端 168 個胺基酸之重組蛋白的製備**

將重組質體 pET-15b-DH4-PXA1C-HA 送入 BL21(DE3) 中，透過加入誘導物 IPTG 使重組蛋白表現(Fig. 1)。在 Coomassie blue 染色結果中，比較 IPTG 誘導前後的總蛋白量(參考 Fig. 1A)，結果顯示在約 25 kDa 的位置偵測到大量表現的蛋白，其大小與 Pxa1pC-HA 重組蛋白分子量的理論值相近，表示重組蛋白已經成功的大量表現。相同實驗以 Western blot 進行分析(參考 Fig. 1B)，結果顯示除了在 25 kDa 的位置可偵測到 Pxa1pC-HA 重組蛋白的訊號之外，另外在約 2 倍分子量(約 50 kDa)的位置也可以觀察到另外兩條蛋白條紋。由於 anti-HA 的抗體專一性極高，因此這些額外的蛋白訊號有可能代表 Pxa1pC-HA 的二聚體型態，而此種二聚體型態因在 SDS 之下不穩定，所以只剩下極少數。然而，也有可能是其他與 anti-HA 抗體有非專一性結合的蛋白。我們在下面的實驗中會再進一步確認二聚體的可能性。

#### **(2) 透過 Urea 將不可溶的重組蛋白變成可溶的重組蛋白**

進行完重組蛋白 Pxa1pC-HA 的誘導後，利用超音波破碎儀(Sonicator)破碎菌體，檢查重組蛋白的可溶性，結果顯示 Pxa1pC-HA 重組蛋白大部分屬於不可溶的蛋白(參考 Fig.2 lane 1~3)，此特性將不利於的重組蛋白純化。因此，我們利用 8 M Urea 加以處理，再進行透析，使蛋白有機會慢慢摺疊回來變成可溶的蛋白，結果顯示蛋白在經過 Urea 處理及透析後，大多變為可溶的形式(參考 Fig.2 lane 4~6)。可溶性的 Pxa1pC-HA 非常有利於我們下一步的純化及特性分析。

#### **(3) 以鎳離子親合性管柱將重組蛋白做初步純化**

將上面方法所獲得的可溶性重組蛋白 Pxa1pC-HA 以鎳離子親合性管柱進行純化。由於重組蛋白基因是構築在 pET-15b-DH4 的基礎上，使得蛋白 N 端額外多出由六個組胺酸(histidine)所構成的蛋白標籤(His tag)，所以使用鎳離子親合性管柱來做初步純化，純化後再以 SDS-PAGE 及 Western blot 進行分析(參考 Fig.3A 及 3B)。結果顯示 SDS-PAGE 及 Western blot 分析的結果相似，所以，只以 SDS-PAGE (Fig.3A)的分析結果加以說明：Input 為純化前總蛋白量；FT(flow through)是指沒有與管柱結合的部份，幾乎沒有偵測到蛋白，表示大部分的蛋白都與 resin 結合了；清洗的最後一管(Wf)沒有偵測到蛋白，表示沒有與管柱結合的蛋白已經清洗乾淨；沖提(elute)的部分總共收取五管(E1~E5)，E1 蛋白量較少，E2~E5 沖提出較多量的蛋白。這些結果表示，可溶性的 Pxa1pC-HA 可以使用鎳離子親合性管柱進行純化。

#### **(4) 以膠體過濾層析法(gel filtration)對重組蛋白進行特性分析**

由於人類的 ALDP 蛋白 C 端已經證明參與同源及異源二聚體的相互作用，因此我們想知道 Pxa1p 的蛋白 C 端是否也具有形成同源二聚體的能力。將經過鎳離子親合性管柱所純化到的 Pxa1pC-HA 重組蛋白進一步以膠體過濾層析法(gel filtration)進行分析(參考 Fig.4)。實驗結果指出，14~16 分鐘及 26~28 分鐘有出現重組蛋白的訊號。與 Fig.4B 的蛋白標準品分析結果進行比對後並經 standard curve 直線方程式的計算(參考 Fig. 4C)得知，發現 14~16 分鐘的蛋白其分子量約相當於 2000 kDa 左右，26~28 分鐘的蛋白其分子量約相當於 70~110 kDa 左右。2000 kDa 左右的重組蛋白型態可能是來自於蛋白所形成的 aggregate，由於蛋白原本就是由不可溶轉變而來，因此在純化過程可能有些又形成較大的聚合體。而 70~110 kDa 左右的重組蛋白型態其分子量約等於 2~4 倍的單體分子量(~25 KDa)，此結果表示 Pxa1pC-HA 可以形成同源二聚體，此外，也間接指出，全長的 Pxa1p 蛋白有可能也具有形成同源二聚體的能力。

#### (5) 重組蛋白 Pxa1pC-HA 及 Pxa1pC-V5 之間免疫共沈澱結果指出同源蛋白之間的相互作用

由於我們前面的實驗中所使用的重組蛋白是由不可溶的狀態經由 Urea 溶解及透析所獲得可溶性蛋白，此重組蛋白的特性可能無法完全代表一個蛋白天然結構的特性，因此我們想使用可溶性的蛋白直接進行分析，以進一步確認同源複合體的相互作用。我們將表達 Pxa1pC-HA 的 pJM3(原本稱為 pET-15b-DH4-PXA1C-HA，為了簡化而改名)及表達 Pxa1pC-V5 的 pJM2(載體為 pET28b-EX2)一起送入 BL21(DE3)中大量表現，在細菌體內同時表達兩個版本的蛋白，雖然大部分的蛋白是不可溶的，但仍有一部份是可溶的，取可溶的部分進行免疫沈澱的分析，即可知這兩個版本是否可以相互作用。將只表達 Pxa1pC-HA(質體為 pJM3/pET28b-EX2)及同時表達 Pxa1pC-HA、Pxa1pC-V5(質體為 pJM3/pJM2)的兩對質體分別送入細菌中大量表達蛋白，經誘導、破細胞、離心後，取包含可溶性蛋白的上清液以 anti-V5 抗體進行免疫沈澱的實驗，再由 Western blotting 分析實驗結果(參考 Fig. 5)。實驗結果指出，具有 pJM3/pET28b-EX2 的細菌的確只表現 Pxa1pC-HA 的蛋白，而具有 pJM3/pJM2 的細菌則可同時表現 Pxa1pC-HA、Pxa1pC-V5 兩種蛋白(lane1-2)。含有兩種蛋白的上清液以 anti-V5 抗體進行免疫沈澱時，除了將 Pxa1pC-V5 沈澱下來，也可以共沈澱 Pxa1pC-HA(比較 lane6 及 lane7)。只含 Pxa1pC-HA 的上清液以 anti-V5 抗體進行免疫沈澱時進行，則無法沈澱任何的蛋白(比較 lane4 及 lane5)。此結果指出 anti-V5 抗體可以專一性的沈澱 Pxa1pC-V5 蛋白，且 Pxa1pC-HA 只有藉由與 Pxa1pC-V5 共同表達時才會被共沈澱下來，顯示 Pxa1pC-HA 與 Pxa1pC-V5 的確有直接的相互作用。這個結果進一步的確認了前幾個實驗的分析結果，也指出全長蛋白可能具有形成同源複合體的特性。

#### (6) 構築 PXA2 基因的刪除突變株

為了在 in vivo 情況下測試 Pxa1p 是否會行同源二聚體，我們打算在酵母菌中以質體的

形式表現 Pxa1p 蛋白的兩種版本，即 Pxa1p-HA 與 Pxa1p-V5，再進行免疫共沈澱的分析，藉由 anti-HA 抗體沈澱 Pxa1p-HA 時是否可以共沈澱 Pxa1p-V5，即可判斷同源二聚體在 *in vivo* 狀態下是否存在。為了避免染色體上內生性基因的干擾，我們打算逐步刪除 PXA1 及 PXA2 的基因。我們先構築 PXA2 單基因突變株。將 PXA2 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 $\Delta$ A 上，而得到 pRS406 $\Delta$ A-PXA2-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挑選 PXA2 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 20 號及第 15 號引子，參考附錄二)來確認，若為原本的野生株則可得到 3.3kb 的產物，若是刪除株則可得到約 0.65kb 的產物，結果顯示的確有挑選到 PXA2 的基因刪除株(參考 fig. 6 的 lane7)。在下一個計畫中我們會以 PXA2 的基因刪除株為基礎繼續構築雙基因的刪除株。

### (7) 以酵母菌雙雜交實驗分析 Pxa1p 及 Pxa2p 蛋白之間的相互作用

生化上我們已經證實同源複合體的存在，我們接著想以遺傳學的酵母菌雙雜交實驗分析同源複合體是否存在。在本實驗中使用蛋白 C 端刪除變異株(刪除 Walker B 的下游氨基酸序列)當作控制組，PXA1 $\Delta$ C 是刪除 C 端 96 個氨基酸，PXA2 $\Delta$ C 則是刪除 C 端 180 個氨基酸，這樣做的原因是因為，人類的 ALDP 蛋白刪除 Walker B 的下游氨基酸序列(150 個氨基酸)之後，蛋白即喪失同源及異源之間的相互作用能力，因此，與 ALDP 同源的 Pxa1p 及 Pxa2p 可能也具有相似的特性。我們將全長及刪除 C 端的基因分別接在 pACT2(具有 activation domain)及 pEG202(具有 DNA binding domain)中，再以下列表格中的方式進行配對，將配對的質體兩個一組送入已經內含 reporter 質體(pSH18-34)的酵母菌中，此酵母菌株稱為 EGY(pSH18-34)。接著，將菌株塗抹於含 X-gal 的固體培養基中觀察 12-36 小時。

Yeast two hybrid assay

Binding domain	Activating domain				
	-	PXA1	PXA1 $\Delta$ C	PXA2	PXA2 $\Delta$ C
-	?	?	?	?	?
PXA1	?	?	?	?	?
PXA1 $\Delta$ C	?	?	?	?	?
PXA2	?	?	?	?	?
PXA2 $\Delta$ C	?	?	?	?	?

結果發現除了正控制組呈現藍色之外，其它的配對皆為白色(data not show)。這樣的結果是非常奇怪的，因為酵母菌的 Pxa1p 及 Pxa2p 已經證實可以形成異源二聚體，因此，異源相互作用的配對組別(pACT2-Pxa1p/pEG202-Pxa2p 或 pACT2-Pxa2p/pEG202-Pxa1p)理論上應該要呈現藍色才對。對於這個結果的可能解釋之一是：Pxa1p 及 Pxa2p 是膜蛋白，N 端具有許多的穿膜區域，具有極強的厭水性，雙雜交的融合蛋白會被運送到細胞核以活化

reporter 質體上的基因表現，而細胞核內部本來就是一個水溶液的環境，因此，Pxa1p 及 Pxa2p 可能在細胞中形成了不可溶的沈澱物，沈澱物可能無法被運送至細胞核內部或無法活化基因的表現。所以，下一個計畫中，我們會將穿膜區刪除，再進行相似的實驗。

### (三) 參考文獻

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., Bougneres, 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. Hamilton, J. (1998) Fatty acid transport: difficult or easy? *J. Lipid Res.* 39, 467-481.
7. Wanders, R. J. A. and Waterham, H. R. (2006) Peroxisomal disorders: The single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763, 1707-1720.
8. 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.
9. 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.
10. Mosser, J., Douar, A.M., Sarde, C.O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A.M., Mandel, J.L. and Aubourg, P. (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361, 726-730.
11. Smith, K.D., Kemp, S., Braiterman, L.T., Lu, J.F., Wei, H.M., Geraghty, M., Stetten, G., Bergin, J.S., Pevsner, J. and Watkins, P.A. (1999) X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations and phenotypes. *Neurochem. Res.* 24, 521-535.
12. Contreras, M., Mosser, J., Mandel, J.L., Aubourg, P. and Singh, I. (1994) The protein coded by the X-adrenoleukodystrophy gene is a peroxisomal integral membrane protein. *FEBS Lett.* 344, 211-215.
13. Contreras, M., Sengupta, T.K., Sheikh, F., Aubourg, P. and Singh, I. (1996) Topology of ATP-binding domain of adrenoleukodystrophy gene product in peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 369-379.

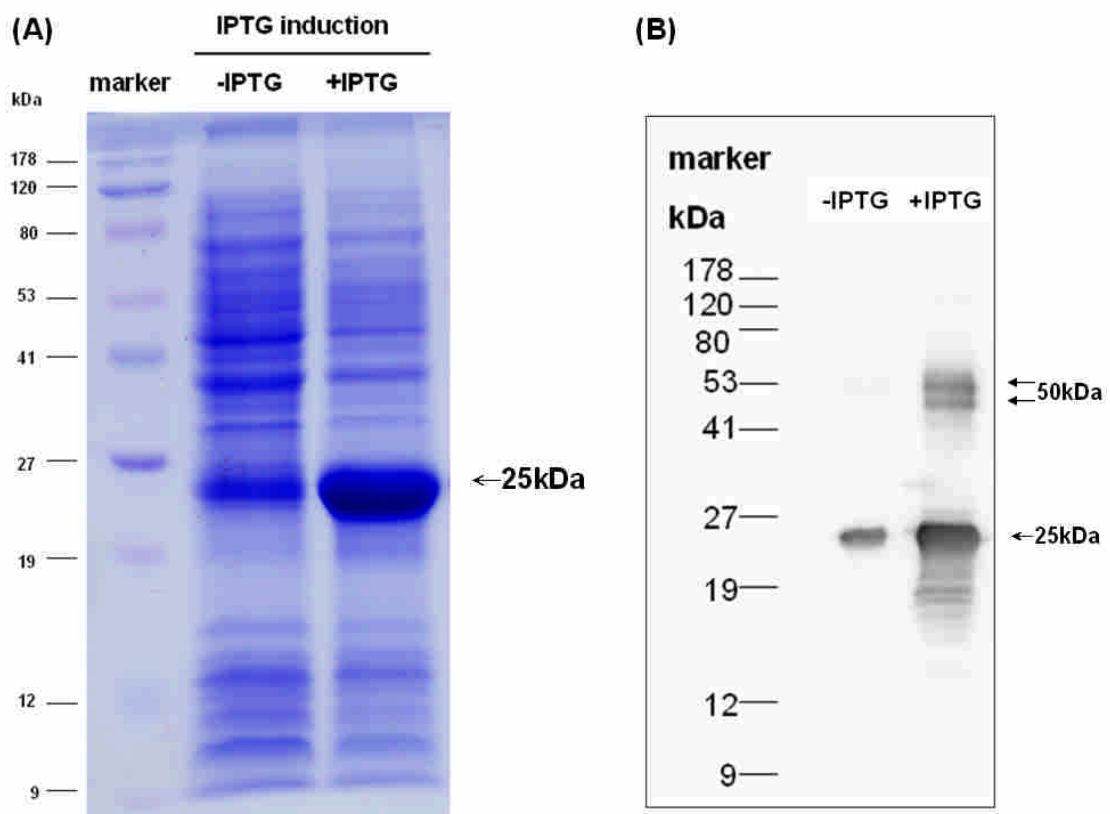
14. Watkins, P.A., Gould, S.J., Smith, M.A., Braiterman, L.T., Wei, H.M., Kok, F., Moser, A.B., Moser, H.W. and Smith, K. (1995) Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 292-301.
15. Braiterman, L.T., Zheng, S., Watkins, P.A., Geraghty, M.T., Johnson, G., McGuinness, M.C., Moser, A.B. and Smith, K.D. (1998) Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins. *Hum. Mol. Genet.* 7, 239-247.
16. Braiterman, L.T., Watkins, P.A., Moser, A.B. and Smith, K.D. (1999) Peroxisomal very long chain fatty acid betaoxidation activity is determined by the level of adrenoleukodystrophy protein (ALDP) expression. *Mol. Genet. Metab.* 66, 91-99.
17. McGuinness, M., Lu, J.-F., Zhang, H.-P., Dong, G.-X., Heinzer, A.K., Watkins, P., Powers, J. and Smith, K. (2003) Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol. Cell. Biol.* 23, 744-753.
18. Smith, B.T., Sengupta, T.K. and Singh, I. (2000) Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy. *Exp. Cell Res.* 254, 309-320.
19. Guimaraes, C.P., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J.E. (2005) Probing substrate-induced conformational alterations in adrenoleukodystrophy protein by proteolysis. *J. Hum. Genet.* 50, 99-105.
20. Kelly, A., Powis, S.H., Kerr, L.A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J. and Townsend, A. (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 355, 641-644.
21. Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A. and DeMars, R. (1992) Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 355, 644-646.
22. Valle, D. and Gartner, J. (1993) Human genetics. Penetrating the peroxisome. *Nature* 361, 682-683.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Guimaraes, C.P., Domingues, P., Aubourg, P., Fouquet, F., Pujol, A., Jimenez-Sanchez, G., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J.E. (2004) Mouse liver PMP70 and ALDP:



homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim. Biophys. Acta. - Mol. Basis Dis.* 1689, 235-243.

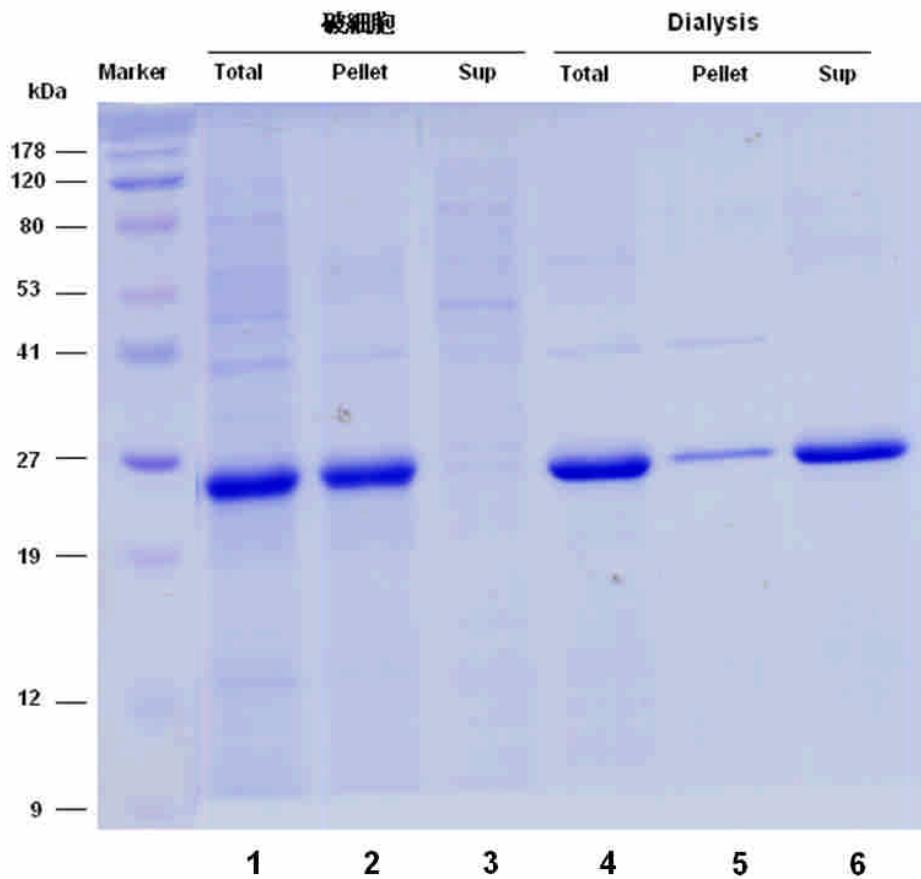
27. Wanders R.J., Visser W.F., van Roermund C.W., Kemp S. and Waterham, H.R. (2007) The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch.* 453, 719-34.
28. Shani, N., Watkins, P.A. and Valle, D. (1995) PXA1, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6012-6016.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

(四) 圖表



**Fig. 1 IPTG 誘導 Pxa1pC-HA 重組蛋白表現**

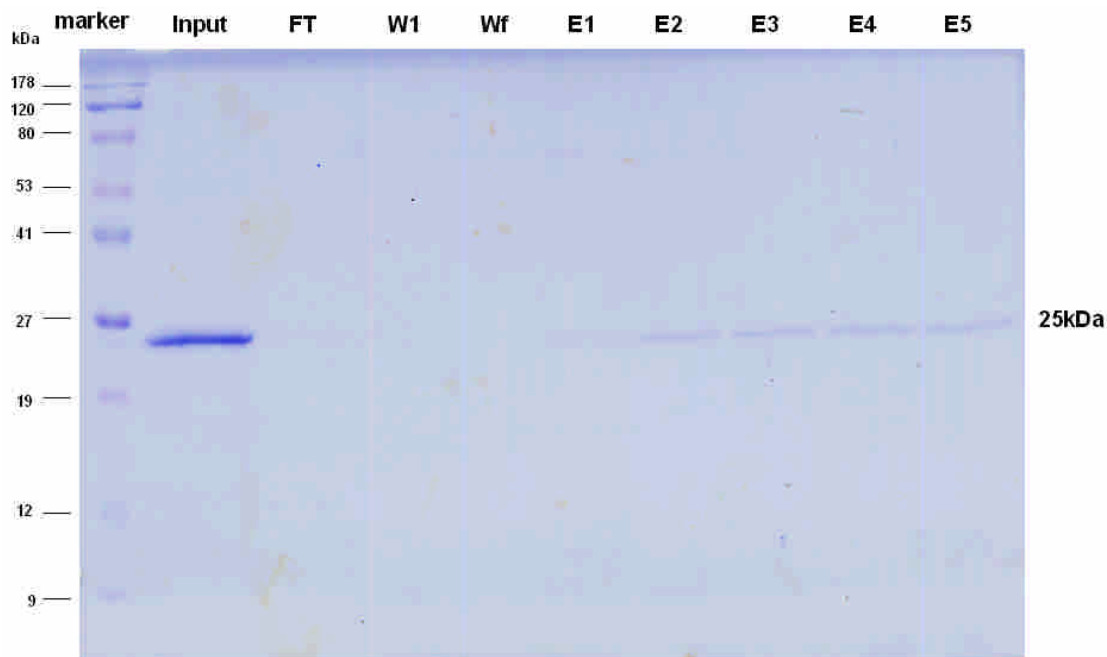
將含有重組質體 pET-15b-DH4-PXA1C-HA 的 BL21(DE3)，分別以加或不加 IPTG 誘導重組蛋白的表現。A 圖表示以 SDS-PAGE 進行分析，再以 CBB 進行染色分析重組蛋白表現的情形。B 圖表示以 SDS-PAGE 分離後，再進行 Western blot，以 anti-HA 抗體進行偵測的結果。



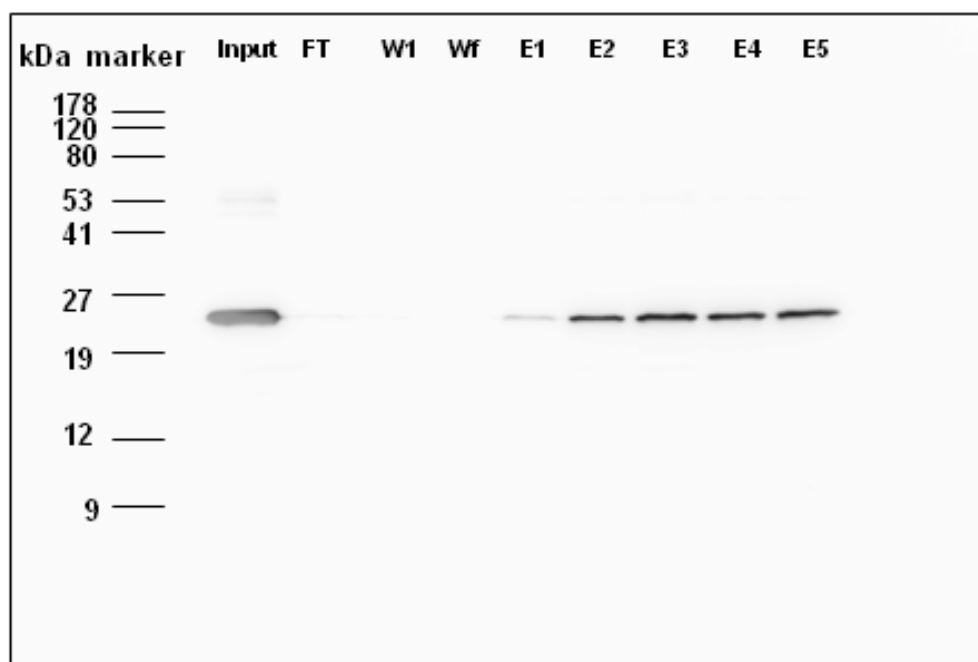
**Fig. 2 透過 8 M Urea 處理 Pxa1pC-HA 重組蛋白**

(1)細胞以 Sonicator 將之破碎，接著離心分為不可溶的 pellet 及可溶的 Sup，將離心前的 total 及離心後的 pellet 及 Sup，以 SDS-PAGE 分析，再以 comassie blue 進行染色(參考 lane 1~3)。(2)用 8 M Urea 處理不可溶的 Pxa1pC-HA 重組蛋白，將之置入透析袋(已泡過 TBS buffer 10 分鐘)內，以 TBS buffer 進行透析，結束後離心分出 pellet(為不可溶的蛋白)及上清液，將 pellet 懸浮於 TBS buffer 中。以 SDS-PAGE 進行分析，再以 comassie blue 進行染色(參考 lane 4~6)。Total：總蛋白，pellet：不可溶的蛋白，supernatant：可溶的蛋白。

(A)



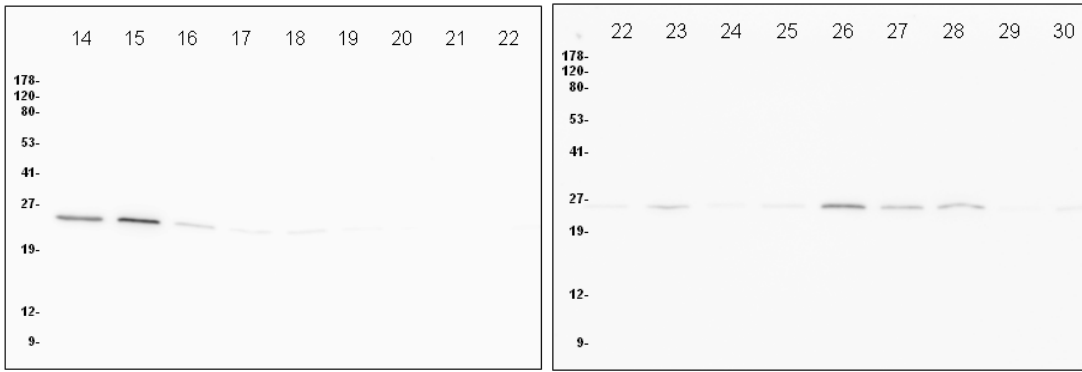
(B)



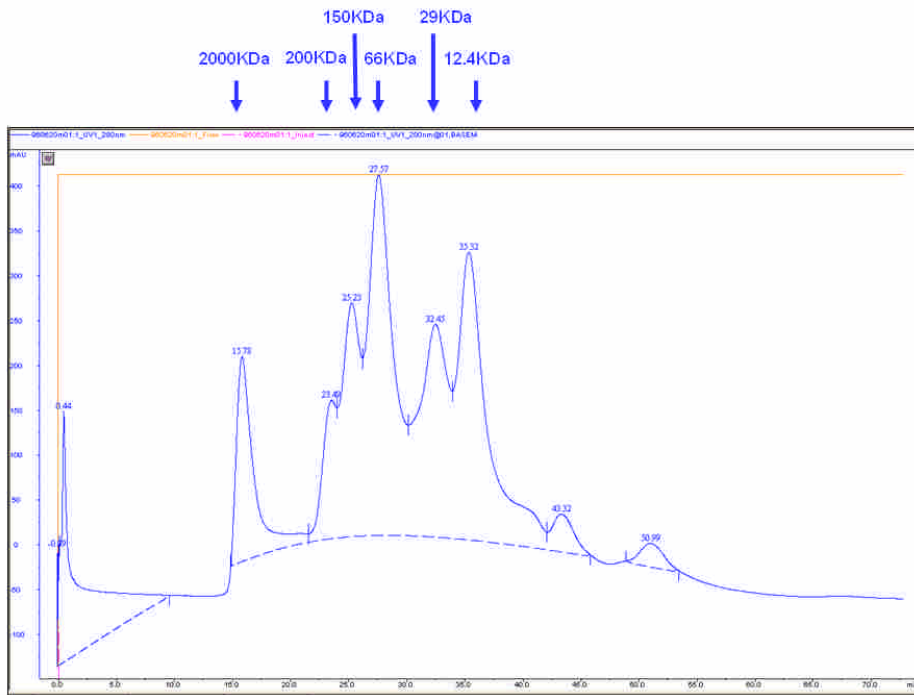
**Fig. 3 以鎳離子親合性管柱純化 Pxa1pC-HA 重組蛋白**

取透析過的可溶性蛋白通過鎳離子親合性管柱，經過結合及清洗的步驟後，最後以 250 mM 的 imidazole 進行沖提。Input：純化前的總蛋白；FT(flow through)：未與管柱結合的蛋白；W1(Wash 1)：清洗的第一管，Wf(Wash final)：清洗的最後一管；E1~E5(Elute 1~5)：使用 250 mM 的 imidazole 沖提 5 管，每管 1 ml。從每管中取出 20  $\mu$ l 與 2X sample buffer 以等量體積混合後，進行 SDS-PAGE 分析，以 comassie blue 進行染色(A 圖)。另外，也利用 anti-HA 抗體做 Western blot 的分析(B 圖)。

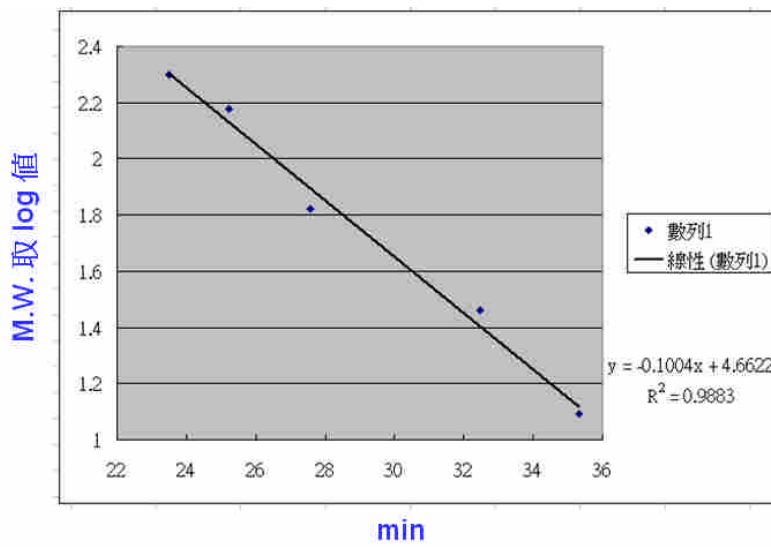
(A)



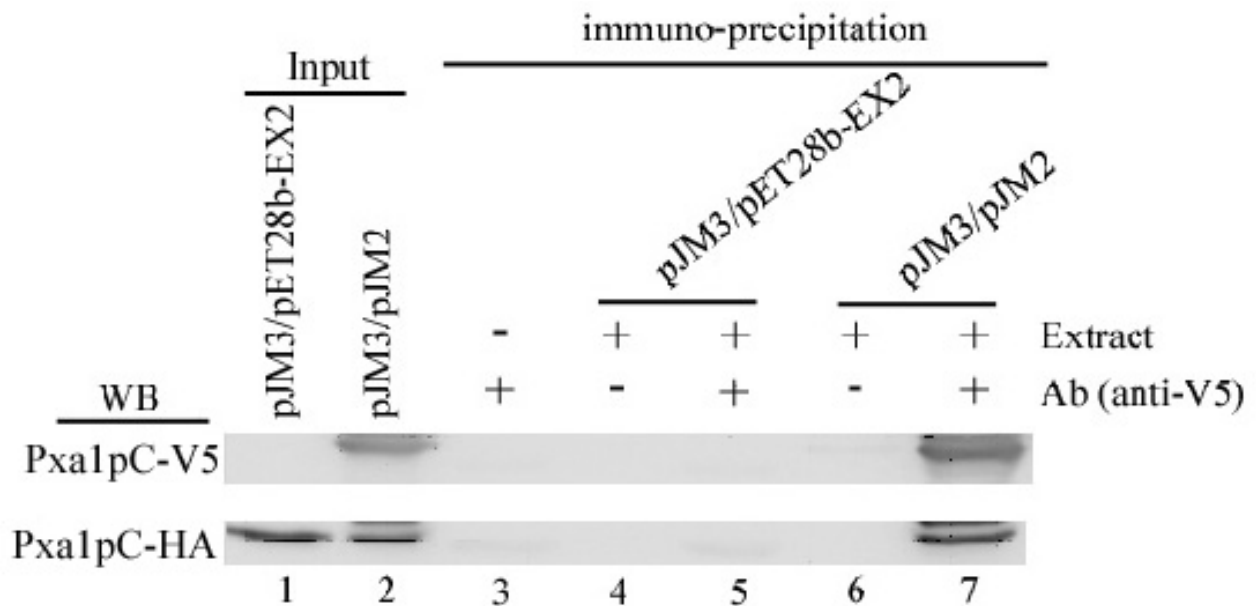
(B)



(C)

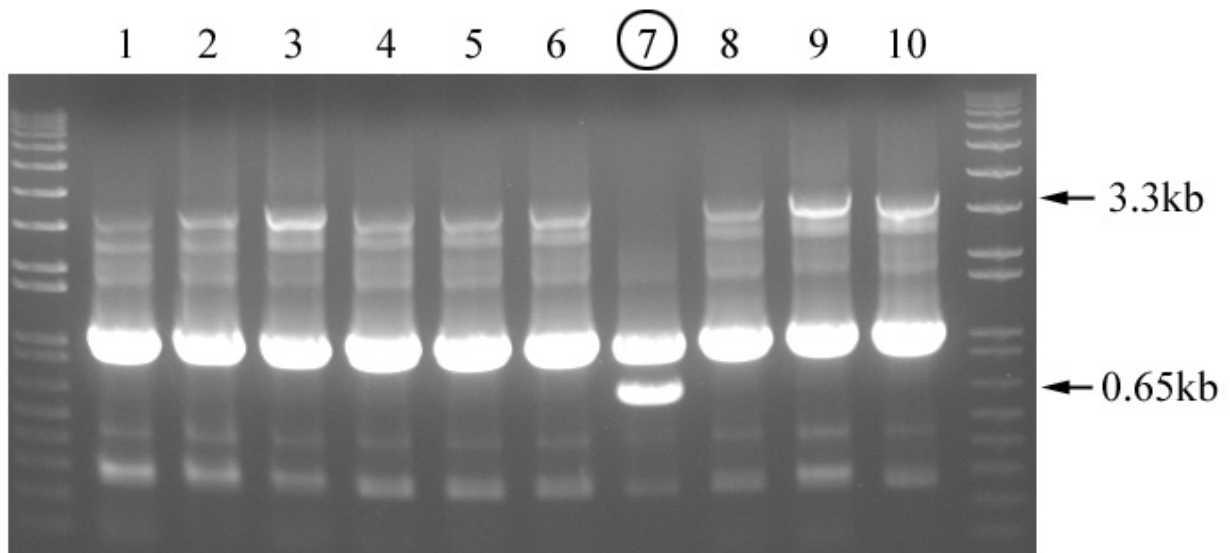


**Fig. 4. 以膠體過濾層析法(Gel filtration)分析 Pxa1pC-HA 重組蛋白是否會形成同源複合體。**(A)取鎳離子親合性管柱沖提的第三管(因為蛋白量較多, Fig. 3A)以膠體層析管柱 Superdex 200HR(Amersham biosciences)進行分析, 流速為 0.5 ml/tube, 使用 fraction collector 每分鐘收集 1 管。接著, 在每管中加入 TCA(最終濃度為 10 %)進行蛋白的沉澱, 最後再利用 anti-HA 抗體做 Western blot 的分析。(B) FPLC 的標準分子量: 成分包含 Cytochrome c From Horse Heart 為 12.4 kDa; Carbonic Anhydrase from Bovine Erythrocytes 為 29 kDa; Albumin, Bovine Serum 為 66 kDa; Alcohol Dehydrogenase from Yeast 為 150 kDa;  $\beta$ -Amylase from Sweet Potato 為 200 kDa; Blue Dextran 為 2000 kDa。(C) FPLC 分析之標準分子量計算曲線: 縱軸為分子量之對數值, 橫軸為滯留時間, 圖中直線是經電腦計算所得之線性迴歸直線, 直線方程式為  $Y=4.6622-0.1004 \times X$ ,  $R^2=0.9883$ 。管柱是 Superdex 200HR(Pharmacia), 液體動相為 20 mM Tris-HCl pH=8.0, 250 mM NaCl, 偵測波長為 280 nm, 流速為每分鐘 0.5 ml。



**Fig. 5. 以免疫沈澱法分析重組蛋白 Pxa1pC-HA 與 Pxa1pC-V5 之間的相互作用**

分別將兩組質體 pJM3/pET28b-EX2(只表現 Pxa1pC-HA)及 pJM3/pJM2(同時表現 Pxa1pC-HA 及 Pxa1pC-V5)送入 BL21(DE3)中進行大量表達，經誘導、破細胞、離心之後，直接取可溶性的部分以 anti-V5 的抗體進行免疫沈澱的實驗，再以 Western blotting(簡稱 WB)進行分析。lane1-2 是免疫沈澱前的細胞萃取物，lane3-7 是進行免疫沈澱的組別。lane3 不加細胞萃取物，lane4-5 則是加入具有 Pxa1pC-HA 的細胞萃取物，lane6-7 則是加入具有 Pxa1pC-HA 及 Pxa1pC-V5 的細胞萃取物。lane3, -5, -7 有加入 anti-V5 的抗體，lane4, -6 則是不加抗體。在 Western blotting 的分析中，分別使用 anti-V5 及 anti-HA 抗體進行偵測。



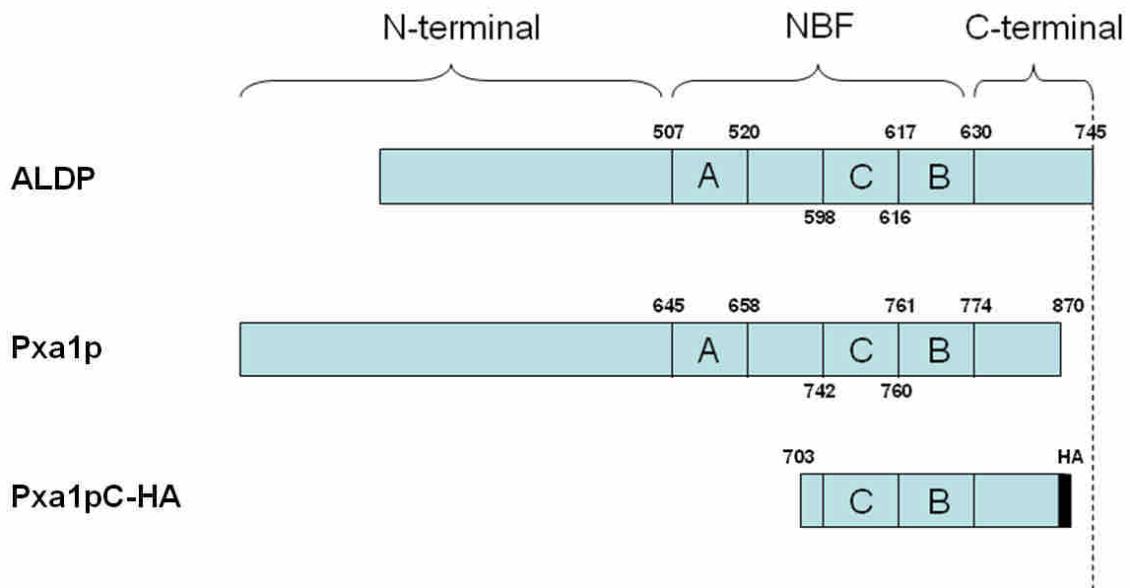
**Fig. 6 以 PCR 的方法挑選 PXA2 基因刪除株**

將切割過的質體 pRS406  $\Delta$  A-PXA2-US-DS 送入野生株 BJ2168 中進行兩次的同源重組，長出的菌株再以 PCR 的技術進行挑選。第二次同源重組有兩種情形，一種是恢復成野生株，另一則是 PXA2 基因刪除株，為了區別這兩種，我們選用基因上游及下游的引子，分別為第 20 號及 15 號引子進行 PCR，若是野生株則可以獲得 3.3kb 的產物，若是 PXA2 基因刪除株則可以獲的 0.65kb 的產物。

(五) 附錄

附錄 1：ALDP、Pxa1p、Pxa1pC-HA 蛋白的圖示

ALDP、Pxa1p 和 Pxa1pC-HA 蛋白的圖示(參考 Shani et al. 1996)。NBF 為 nucleotide-binding fold，A 為 Walker A motif，B 為 Walker B motif，C 為 C sequence，HA 為 HA 蛋白標籤。





## 附錄 2：Primer

Primer	序列(5'→3')	基因	*相對位置	orientation
Primer-3	ggccggatcctgtcctcggatgaattc	<i>PXA1</i>	3105 - 3121	forward
Primer-4	ggccgacgtcgtatgggtaataattca agctttcccgt	<i>PXA1</i>	3589 - 3610	reverse
Primer-5	ggccgacgtcccagactacgcttga caccctagaag	<i>PXA1</i>	3611 - 3628	forward
Primer-6	ccggctcgaggacgaaataactctgtga	<i>PXA1</i>	4108 - 4124	reverse
Primer-15	ttgagcaatcaaccgtaa	<i>PXA2</i>	3654 - 3671	reverse
Primer-20	ggcctctagagtgatgatgatgctg	<i>PXA2</i>	313 - 330	forward

\*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 3：菌種

strain	Relevant characteristics
DH5 $\alpha$	F $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk $^-$ , mk $^+$ ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda^-$
BL21(DE3)	F $ompT$ <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r $B^-$ m $B^-$ ) <i>gal dcm</i>
BJ2168	<i>MATa prc1-407 prb1-1122 pep4-3 leu2 trp1 ura3-52 gal2</i>

### (六) 計畫成果自評

本研究計畫原先預定同時進行 Pxa1p 及 Pxa2p 的蛋白特性分析，但後來發現基因選殖並不容易，所以就將目標縮小，而將焦點放在與人類 ALDP 最相似的 Pxa1p 蛋白的特性分析上，這樣比較容易得到具體的成果。膜蛋白的研究的確有其困難度，因為厭水的特性使蛋白的純化及分析較為複雜，由本研究中 Pxa1pC-HA 的純化及分析就可深刻體驗到，但我們還是用迂迴的方式克服了，並鑑定出同源複合體的存在及其可能的分子形式，免疫共沈澱的結果也確認了同源相互作用的存在。然而，若要更確定同源複合體的存在，還需在酵母菌中同時表達全長的 Pxa1p-HA 及 Pxa1-V5，再以免疫沈澱的實驗加以證實，這將列為下一個研究的優先實驗之一。本研究中也嘗試使用酵母菌雙雜交實驗分析同源及異源的相互作用，花了很多時間製作了 8 個分析用的質體，但是沒有成功，其原因可能也與膜蛋白厭水特性有關，因此，下一個研究中，會先將蛋白 N 端穿膜區刪除，再進行分析，預期應該可以得到具體的結果。