

中國醫藥大學

醫學研究所

碩士學位論文

Endonuclease G 切割核酸機制之研究

Mechanism and cleavage specificity of human
endonuclease G

指導教授：吳世祿 助理教授

共同指導教授：項千芸 副教授

侯庭鏞 副教授

研究生：李佳橙

中華民國九十五年七月

中國醫藥大學 醫學研究所

碩士候選人學位考試

論文題目

中文：Endonuclease G切割核酸機制之研究

英文：Mechanism and cleavage specificity of human endonuclease G

本論文係 李佳橙 於中國醫藥大學醫學研究所完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

考試委員

吳世祥

項干芸

侯龍錫

陳志豪

李龍明

所長：蓋先之

中華民國 九十五年七月六日

誌謝

誠摯感謝指導教授吳世祿老師、共同指導教授項千芸老師及侯庭鏞老師，於大學及碩士研究期間的指導與教誨。另外，也非常感謝李龍湖老師以及陳志豪老師對此論文的細心指導，使我受益良多，得以完成這本碩士論文。

同時感謝生化學科許美鳳老師、李妙蓉老師、張乃文老師、詹淑琴老師、林錦芬老師、高銘欽老師以及所裡諸位師長在課業上的指導。

此外，也感謝在實驗上給予許多協助的學長姊與學弟妹們，以及曾經給我關懷與鼓勵的所有朋友，因為有你們的存在，使我成長了許多。

最後將本論文獻給我最敬愛的父母、大姊、女友以及所有家人，認同我所做的任何選擇，讓我專心的完成碩士學程。



佳橙 謹誌

2006年7月

中文摘要

Endonuclease G (EndoG) 是一種細胞凋亡時所必需的核酸水解酶，在細胞凋亡時會參與細胞核中 DNA 的片斷化切割 (fragmentation)。在本研究中，我們利用 pET 表現系統並且從大腸桿菌大量表現及純化出重組人類 EndoG 蛋白質。重組 EndoG 在執行雙股 DNA 質體的水解時，一開始會先造成其中一股的斷裂，不斷地在同一個質體上累積這種單股斷裂的結果會進而形成雙股斷裂。在這個研究當中，我們以各物種的 EndoG 胺基酸序列做比對，推測 histidine 在 EndoG 蛋白中可能為催化活性的關鍵胺基酸。接著我們以 diethyl pyrocarbonate 做化學修飾及 hydroxylamine 還原的實驗，結果顯示 histidine 可能扮演 EndoG 蛋白質中催化活性之角色。然而在經過比對一系列具有相同 $\beta\beta\alpha$ -Me finger 結構及 H-N-H 區域之核酸水解酶後，值得令人注意的是在 NucA (1ZM8)、*I-PpoI* (1A73)、Colicin E9 (1XBI)、m5C-specific REase *McrA* 及 T4 endonuclease VII (1EN7) 當中可以得到與二級結構上的位置相對應，並且具有高度保留的 H-N-H 區域。接著我們利用定點突變的方式將 EndoG 在 H-N-H 高度保留的胺基酸點突變，然後將這些突變株進行酵素動力學的實驗。從酵素動力學的結果發現，取代成 alanine 胺基酸的 histidine-141 (H141)、asparagine-163 (N163) 及 asparagine-172 (N172) 在催化及水解核酸的效率 (Kcat/Km) 有很嚴重的下降。這個結果暗示 H141、N163 及 N172 這三個胺基酸可能扮演 EndoG 催化的關鍵性角色。EndoG 野生株的活性會在高濃度鎂離子緩衝溶液下被抑制，利用這個實驗我們測試許多 EndoG 突變株也有與野生株有相同的結果。然而，H141A (histidine-141 突變成 alanine) 及 E271A (glutamic acid-271 突變成 alanine) 在比野生株高 60 倍的濃度下可以達到最佳的切割 DNA 活性，這表示 EndoG 可能具有很獨特的兩個鎂離子結合位置。由於 EndoG 先前被指出可能參與疱疹病毒的基因體重組複製時 *a* sequence 的切割，根據這個研究假說及實驗設計，我們更進一步利用疱疹病毒基

因體的 α sequence 分析 H141A、N163A、N172A 及其它的突變株切割的專一性。結果顯示 H141、N163、N172 可能扮演 EndoG 切割受質專一性的重要胺基酸。綜合以上，我們的研究結果推測 H-N-H 這個區域也存在人類 EndoG 蛋白質的 $\beta\alpha$ -Me 結構上，而人類 EndoG 的 H-N-H 功能區塊，可能主要是扮演鎂離子結合及受質切割專一性的功能。



Abstract

Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic nuclease involved in nucleosomal fragmentation of DNA. Here we expressed and purified the human EndoG in *Escherichia coli* with the use of pET expression vector. Recombinant human EndoG initiated single strand breaks in plasmids, and the accumulation of nicks resulted in the double strand breaks of DNA. In this study, histidine residues involved in the catalytic activity of human EndoG have been characterized. Diethyl pyrocarbonate (DEPC) modification and hydroxylamine restoration assay indicated that histidine residues were responsible for the catalysis of human EndoG. A survey of the $\beta\beta\alpha$ -Me finger and H-N-H nuclease, it was noticed that a good structural superposition in the H-N-H region could be achieved for NucA (1ZM8), *I-PpoI* (1A73), Colicin E9 (1XBI), m5C-specific REase *McrA*, and T4 endonuclease VII (1EN7). The site-directed mutants of H-N-H motif of EndoG were further constructed and analyzed by kinetic studies. Kinetic analysis indicated that replacement of histidine-141, asparagine-163, and asparagine-172 with alanine residue, resulted in a drastic reduction on catalytic efficiency (K_{cat}/K_m). These results suggested that H141, N163 and N172 were critical for catalysis. The enzyme activity of wild-type EndoG was inhibited at higher magnesium concentration. EndoG mutants shared similar profiles with wild-type EndoG. However, H141A and E271A achieved the maximal activity at a 60-fold higher magnesium concentration than wild-type EndoG. These findings suggested that magnesium ion might be coordinated by His141 and E271A of human EndoG. Because EndoG has been proved to exhibit the a sequence-specific cleavage activity, we further analyzed the EndoG mutants of H141A, N163A, and N172A in the *a* sequence cleavage. These results indicated that

H141, N163 and N172 were critical for substrate specificity. Taken together, our data suggested that the H-N-H motif is present in human EndoG, the domain H-N-H of human EndoG performed magnesium binding and specificity of cutting function.



目錄

	頁數
中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 文獻探討	1
第二章 Endonuclease G 的選殖、表現與純化	10
第一節 緒言	11
第二節 材料與方法	12
第三節 結果	16
第四節 討論	19
第三章 Endonuclease G 的功能與結構之研究	27
第一節 緒言	28
第二節 材料與方法	30
第三節 結果	34
第四節 討論	38
參考文獻	52
作者簡歷	59

第一章 文獻探討

前言

Endonuclease G (EndoG) 是一種細胞凋亡時所必需的核酸水解酶，在細胞凋亡發生時會參與細胞核中 DNA 的片斷化切割 (fragmentation)。EndoG 已經被證實可能在細胞凋亡的過程當中扮演關鍵角色。EndoG 最早被提出它可能參與粒線體 DNA 合成時 primer 的製造 (Cote et al., 1993) 及維持粒線體 DNA 完整有關聯 (Ohsato et al., 2002)。然而，目前已有許多研究針對 EndoG 參與粒線體 DNA 重組的假說設計實驗去證實，結果並沒有在粒線體內發現這個現象。自從 2002 年以來，有許多針對 EndoG 這個酵素的的研究，學者們已經將它與細胞凋亡的關聯性視為另一條路徑的重要標的蛋白。導因於 Parrish 等 (2001) 從線蟲的實驗模式所提出的論點，存在於粒線體的 EndoG 對於線蟲 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 的細胞凋亡是非常重要的。Li 等 (2001)，藉著將粒線體當中的蛋白質逐層的分離出來及偵測細胞組成的每一個位置，也發現當 EndoG 從粒線體被釋放出來後會造成細胞凋亡的核酸水解酶。在 2003 年 Zhang 等，從 EndoG 基因剔除老鼠的細胞中發現，這些細胞對於人為誘發的細胞凋亡會產生抗性，並且發現 homozygous EndoG 基因剔除的老鼠在胚胎早期時就無法存活下來。根據這個結果，他們提出一個結論，EndoG 是老鼠胚胎早期發育及細胞凋亡時所必需的蛋白質。然而，EndoG 跟細胞凋亡之間的關聯，尤其是具有這樣殺傷力的 EndoG 基因剔除的表現型，並沒有受到後來其它學者的研究所認同。在 2005 年時，Irvine 等，精準而且很專一的剔除老鼠染色體上的 EndoG exon 2，發現這些缺乏 EndoG 老鼠活與正常老鼠一樣存活。更進一步研究，從這些老鼠的細胞中並沒有觀察到 EndoG 缺失會影響細胞凋亡證據。2006 年在 David 等，在他們的實驗模式中也有相同的結果，而且他們的結論也是 EndoG 在胚胎早期發育及細胞凋亡時並不是必需的。以上的研究結果顯示，

EndoG 有許多的生物性功能及在細胞中的影響，然而這些活體的試驗存在著許多的矛盾，而這些功能及影響仍需更進一步的研究才能證實。所以在本論文的研究中將利用 EndoG 的結構及功能，試著重新詮釋 EndoG 在生物體內所扮演的角色。



第一節 Endo G 的簡介

EndoG 是一種屬於 DNA/RNA 非專一性的核酸水解酶，凡是核酸類如雙股 DNA、單股 DNA、單股 RNA、RNA·DNA 的複合物等，都可被其所催化水解 (Gerschenson et al., 1995; Widlak et al., 2001)。類似這樣的蛋白質在許多物種，如細菌、黴菌、無脊椎動物以及脊椎動物等生物體都有發現它的蹤跡。而哺乳類生體內的 EndoG 分子量大約是 33 kDa，在 N 端包含一段 48 個胺基酸序列，會引領 EndoG 到粒線體儲存的引領序列 (Mitochondria leader sequence) (Tiranti et al., 1995)。而經過修飾過去除 N 端 48 個胺基酸序列的成熟型 EndoG 會儲存在粒線體裡，並且始具有水解核酸的活性。

EndoG 的生化功能

1987 年首先由 Ruiz-Carrillo 等，從未成熟的雞紅血球細胞核中分離出一種具內切酶活性，而且會選擇性的切割在 DNA 的 $d(G)_n \times d(C)_n$ 序列上，因此將這個內切酶命名為 Endonuclease G。他們分析出 EndoG 最喜好受質 $d(G)_n \times d(C)_n$ 序列的 n 值大於或等於 9，其切割行為很類似於第二型及第三型限制酶。更進一步，他們分析出 EndoG 在 G-strand 造成裂口(nick)的比率比在 C-strand 高出 4 到 10 倍。由此結果，他們推測 EndoG 在切割雙股 DNA 的時候，會先吸附到喜好的那一股，進而藉著鎂離子或錳離子造成 DNA 斷列並形成 5' 端的磷酸單酯末端 (phosphomonoester ends)，因此他們推論 EndoG 可能參與 DNA 重組的過程。接著，1989 年，同一個研究團隊從牛的胸腺組織細胞核當中，分離出 EndoG 並且很明確的在 SDS-PAGE 上觀察到變性的 EndoG 約 26 kDa 的分子量，然而利用膠體過濾法 (gel filtration) 卻得到 50 kDa 的未變性 (native) EndoG，因此推論 EndoG 是以雙體的形式存在於細胞內的。1993 年時 Cote 等，首先證實了 EndoG 在 N 端具有一段會引領到粒線體儲存的 48 個胺基酸序列

(mitochondria leader sequence)。因此，他們將先前 Ruiz-Carrilloz 提出 EndoG 可能參與 DNA 重組過程的推論及假說，應用在他們從 EndoG 在試管中切割粒線體 DNA 所觀察到的現象上，並提出一個假說，EndoG 可以在粒線體 DNA 複製的時候幫助 primer 的形成。直到 2001 年，Parrish 等，利用 si-RNA (small interfering RNA) 的方式，抑制線蟲身上的 EndoG 表現，發現線蟲在細胞凋亡時不容易產生 DNA 的片段化 (DNA degradation)，此結果顯示 EndoG 可能牽涉到細胞凋亡的進程。

EndoG 基因在體內扮演的功能

人類 EndoG 基因座落染色體 9q34.1 的位置，很奇特的 EndoG 的 exon3 剛好與反向轉錄的 C9orf114 (小鼠 D2Wsu81e) 基因 exon3 重疊，因此在 2003 年 Zhang 等，將 EndoG 基因及一部份 D2Wsu81e 基因剔除後，從老鼠的細胞中發現，這些細胞對於人為誘發的細胞凋亡會產生抗性，並且發現 homozygous EndoG 基因剔除的老鼠在胚胎早期時就無法存活下來。根據這個結果，他們提出一個結論，EndoG 是老鼠胚胎早期發育及細胞凋亡時所必需的蛋白質。然而，這樣的基因剔除的設計並沒有受到後來其它學者的研究所認同。在 2005 年時，Irvine 等，精準而且很專一的剔除老鼠染色體上的 EndoG exon 2，發現這些缺乏 EndoG 的老鼠皆與正常老鼠相同。更進一步，從這些老鼠的細胞中並沒有觀察到會影響細胞凋亡。2006 年 David 等，改進 Irvine 等的 EndoG 剔除法，更進一步的也將少部份的 EndoG exon3 也剔除，而且不影響到 D2Wsu81e 基因的表現，他們的結論與 Irvine 等不謀而合，EndoG 在胚胎早期發育及細胞凋亡時並不是必需的。這些矛盾的結果，使得 EndoG 在生物體內扮演的功能更顯得有趣。

第二節 人類 EndoG 的蛋白質結構

人類 EndoG 全長由 297 個胺基酸所組成，分子量約 33 kDa。先前有以牛 (bovine) EndoG 為研究的報告 (Schafer et al., 2004)，將牛 EndoG 與許多物種 DNA/RNA 非專一核酸水解酶的胺基酸做多重線性比對 (multiple alignment)，及同源性結構模擬 (homology modeling)，他們根據這些生物資訊所得的結果推測，牛 EndoG 是屬於 $\beta\beta\alpha$ -Me-finger 超家族 (superfamily) 的核酸水解酶。而且在這個研究當中，經二級、三級蛋白質結構模擬，以 *Serratia* nuclease 與牛 EndoG 最為相似，在執行功能時，並且存在著雙體結構。牛 EndoG 執行功能的主要胺基酸為 histidine-143，對應到人類 EndoG 為 histidine-141。

$\beta\beta\alpha$ -Me-finger 家族蛋白質

Ghosh 等，將不同功能但是具相似的催化中心的 $\beta\beta\alpha$ -Me-finger 核酸水解酶，區分為五大類 (Ghosh et al., 2005)：

- (1) Sugar non-specific nuclease： *Serratia* nuclease、NucA 以及 EndoG。
- (2) Non-specific DNase： Cole7、Cole9、Vvn nuclease 以及 CAD/DFF40。
- (3) Structure-specific nuclease： T4endoV II。
- (4) TypeII restriction endonuclease： *KpnI* 及 *McrA*。
- (5) Homing endonuclease： *I-PpoI* 及 *I-HmuI*。

屬於這五類的 $\beta\beta\alpha$ -Me-finger 核酸水解酶蛋白質，根據蛋白質結晶的文獻歸納，通常它們會提供一個到兩個的鎂離子配體 (Mg^{2+} ligand)，例如 *Serratia* nuclease 的 Asn119、NucA 的 Asn155、Cole7 的 His544 及 His569、Cole9 的 His102 及 His127、Vvn nuclease 的 Glu79 及 Asn127、CAD/DFF40 的 Asp262 及 His308、T4 endoVII 的 Asp40 及 Asn62、*I-PpoI* 的 Asn119 以及 *I-HmuI* 的 Asp74 及 Asn96。而目前沒有結晶，但是已有以蛋白質結構模擬及生化試驗

的報告指出在 $\beta\alpha$ -Me-finger核酸水解酶上面的 Mg^{2+} ligand，如牛EndoG 的 Asn174 與 *KpnI* 的 Asp148 及 Gln175。

H-N-H 結構之核酸水解酶

H-N-H motif最早從一些噬菌體及細菌裡的intron-encoded homing endonuclease蛋白質胺基酸序列的比對中被發現到的高度保留位置 (Gorbalenya, 1994; Shub et al., 1994)。目前為止，從噬菌體、細菌到人類，約有大於200多個蛋白質被現具有H-N-H motif，並且被歸納為H-N-H家族 (Hsia et al., 2004)。許多的H-N-H蛋白質，像是具有限制酶專一性的group I或group II homing endonuclease，這些蛋白質可以切下染色體上的一小段DNA，並著轉送的其它細胞內蛋白質將這段DNA轉送到對偶基因缺失這段DNA的地方 (Chevalier and Stoddard, 2001; Lambowitz and Belfort, 1993)。目前也發現許多DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶具有H-N-H motif，如ColE7、ColE9 (Hsia et al., 2004)、apoptotic DNase CAD等。H-N-H motif 通常伴隨著 $\beta\alpha$ -metal的結構的存在如 nonspecific *Serratia* nuclease (Miller et al., 1994) 以及 Holliday junction-specific phage T4 endonuclease VII (Raaijmakers et al., 1999)，而且這些伴隨著 $\beta\alpha$ -metal結構的H-N-H motif通常也是它們的催化受質的核心。另外，本研究也在EndoG蛋白質上也有發現類似這樣的一個結構。

第三節 EndoG 的研究及展望

細胞在經過一些如鎘Cd或Galectin-1的物質處理後，EndoG可藉由從粒線體釋放到細胞核使染色體DNA片斷化達到細胞凋亡的效果 (Lemarie et al., 2004; Hahn et al., 2004) 。因此EndoG不但可以成為一個細胞凋亡偵測的標的，也可以成為抗癌藥物的開發標的。然而EndoG蛋白質的結構目前並沒有很直接的被定義出來，僅有從生物資訊學的角度去討論EndoG的結構，以及如何與受質結合並推測其水解核酸的分子模式。在EndoG結構的相關報告，大都以偵測其最專一的DNA切割位置為主的研究，或從其生物性功能下去探討。至2006年為止，目前只有一篇報告以牛EndoG為主來討論EndoG的結構，其結構相似於*Serratia* nuclease (Miller et al., 1994) ，DNA的結合如Vvn (Li et al., 2003) ，鎂離子主要的ligand是N174 (人類 N172) 。然而，並沒有很直接的證據支持這些假說(Schafer et al., 2004) 。所以，如能找尋更直接有力的方法探討人類EndoG如何與受質接合、如何水解受質、如何與輔因子結合等完整的研究，也許能提供EndoG在細胞中諸多功能的紛爭及其所扮演的角色有更好的解釋。

DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶的結晶

由於DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶很難尋找到一段與該酵素結合很專一的核酸序列，所以要很直接的探討DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶是如何與受質交互作用的機制是不容易的。也因此，要在實驗中取得這類酵素的共結晶更是困難。如今已有結晶的DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶有*Staphylococcal* nuclease (Arnone et al., 1971) 、*Serratia* nuclease (Miller et al., 1994) 、Vvn (*Vibrio Vulnificus* nuclease) (Li et al., 2003) 、P1 nuclease (Volbeda et al., 1991) 、Nuclease A (Ghosh et al., 2005) 以及ColE7的核酸水解功能區段 (Cheng et al., 2002) 等。而目前只有Vvn與ColE7及ColE9有與雙股DNA的共結晶被以X-ray繞射解讀出來。

然而這些結晶結果只能在數據上做分析及推論，詳細分子間的交互作用還是需由分生實驗來證實，可見得要解開一個DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶的結構跟功能需要很長期及深入的研究，尤其是在哺乳類生物體內的這類蛋白質。

DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶所扮演的角色

在原核生物體的DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶，例如從細菌中發現的 *Serratia* nuclease、*Staphylococcal* nuclease、P1 nuclease 等，這些核酸水解酶可以幫助細菌本體水解外來的核酸並提供本身所需的養份。除此之外，有些細菌像是霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 更利用這類的蛋白質來幫助它感染到宿主 (Focareta and Manning, 1991)。而在真核生物體的DNA/RNA-nonspecific 核酸水解酶例如在酵母菌中的 Rad52 以及 Nucl等核酸水解酶，可以參與DNA的修補以及DNA的重組 (Alani et al., 1990)。而哺乳類生物粒線體裡的EndoG目前仍然有許多的爭議，雖然如此，但從文獻中不難發現，許多報告都在細胞凋亡的時候偵測到EndoG的參與。

EndoG 在生物體內功能的不確定性

最早提出 EndoG 在生物體內確切的功能是在 2001 年 Li 等，利用 si-RNA (small interfering RNA) 的方式，將 EndoG 從線蟲身上剔除，發現會影響線蟲的細胞凋亡。然而從 2003 年至 2005 年陸續的有三個研究團隊，利用基因組重組的方式剔除老鼠染色體上的 EndoG (Zhang et al., 2003; Irvine et al., 2005; David et al., 2006)。然而卻得到兩種截然不同且矛盾的結果。EndoG 是老鼠胚胎早期發育及細胞凋亡時所必需的蛋白質？或者與兩者功能相關性不大？而另一個問題是當 EndoG 形成後會儲存在粒線體的哪個部位？是儲存在 intermembrane space (Ohsato et al., 2002) 或者是鑲鉗在 innermembrane 上及 matrix 裡(David et

al., 2005) ? 這些疑問都有待更具體的研究來解答。

EndoG 基礎結構研究的缺乏

自從人類EndoG 在2001年首次從HeLa細胞中被純化出來 (Widlak et al., 2001) , 在EndoG的許多研究方面, 大都展開以生物性功能為主, 這對於EndoG在生物體功能提供了不可抹滅的貢獻, 並且也提供了相當大的討論空間。因此本論文的研究設計將重新回到探討EndoG結構, 利用生物資訊學試著將EndoG胺基酸序列完整的分析, 並搭配定點突變的方式, 對EndoG切割DNA、酵素動力學、輔因子的結合做完整的分析, 藉著此基礎研究輔助EndoG在生物體功能的探勘。



第二章 Endonuclease G 的選殖、表現與純化

摘要

EndoG是一種具有很廣泛酵素活性的核酸水解酶，它是屬於DNA/RNA 非專一性的核酸水解酶，凡是核酸類如雙股DNA、單股DNA、單股RNA、RNA·DNA的複合物等，都可被其所催化水解。類似這樣的蛋白質在例如細菌、黴菌、無脊椎動物以及脊椎動物等生物體都有發現它的蹤跡。而哺乳類生體內的EndoG分子量大約是33 kDa，在N端包含一段會引領到粒線體儲存的48個胺基酸序列(Mitochondria leader sequence)。我們利用大腸桿菌表現系統為主，大量表現EndoG。結果證實，從大腸桿菌表現出來的重組EndoG與先前科學家從HeLa萃取出來的EndoG活性條件相符。利用此生化條件，我們設計3株針對粒線體引領序列的缺損株，並且各自在相同條件下水解核酸，結果發現以EndoG(49)有最佳的活性，證實了成熟型的EndoG必需去除前端的引領序列。

第一節 緒言

EndoG 屬於一種 DNA/RNA 非專一性的核酸水解酶，凡是核酸類如雙股 DNA、單股 DNA、單股 RNA 及 RNA · DNA 的複合物等，都可被其所催化水解 (Gerschenson et al., 1995; Widlak et al., 2001)。在體外試驗的 EndoG 最喜好受質 $d(G)_n \times d(C)_n$ 的序列 (Ruiz-Carrillo et al., 1987)，而從 HeLa 細胞存化出來的 EndoG 在體外要達到最佳活性的 pH 為值 7 跟 9，最佳的輔因子為鎂離子 (Mg^{2+}) 或錳離子 (Mn^{2+}) 濃度為 3 mM，但是在含有鉀離子的緩衝溶液下反而會抑制 EndoG 的活性 (Widlak et al., 2001)。

人類 EndoG 全長由 297 個胺基酸所組成，分子量約 33 kDa。在 N 端包含一段會引領到粒線體儲存的 48 個胺基酸序列 (Mitochondria leader sequence) (Tiranti et al., 1995)。經過修飾過去除 N 端 48 個胺基酸序列的成熟型 EndoG 會儲存在粒線體裡，並且始具有水解核酸的活性。目前文獻中，並無針對 EndoG 的引導序列去做研究，EndoG 在細胞內的折疊是否在這段引導序列切除之後才進行；或者是全長 EndoG 在細胞表現時早已折疊好，只是因為這段序列的存在，EndoG 的活性才被抑制住。

為了研究 EndoG 的基本酵素活性，利用人類細胞株的培養，然後純化出 EndoG，來進行生化條件及酵素切割的測試是一個相當好的方法，然而這種方法並無法大量取得蛋白質，以及不方便探討 EndoG 這類前端帶有引導序列的蛋白質。因此，在本章節的研究將利用 pET 表現載體，以大腸桿菌為宿主，進行人類 EndoG 的表現，純化成均質性的產物後，再進行酵素生化特性及切割模式的研究。

第二節 材料與方法

EndoG 與缺損株 cDNA 之選殖及表現載體之架構與製備

將 HeLa 細胞溶裂後，利用酸性 guanidinium-phenol-chloroform 方法 (Chomczynski et al., 1987) 抽取其全部 RNA。接著將全部的 RNA 以反轉錄酶 (SuperScript™ III, invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 及 P2 (5'-CGGGATCCGCCGAGTTGCCCCCTGTGCC-3')、M1 (5'-CGGAATTCTCACTTACTGCCCCGCCGTGATGG-3') 為引子，做 35 個循環後得到的產物為 902 bp 長度的全長 EndoG cDNA。將 902 bp 全長的 EndoG cDNA 經過 *Bam*HI 及 *Eco*RI 處理後，轉架接到帶有 histidine-tagged 的 pet-28c(+) (Novagen, Madison, WI, USA) 表現載體上，完成 pet-EndoG(1) 全長 EndoG 表現載體。接著為了架構成熟型的 EndoG，我們利用已架構好的 pet-EndoG(1) 為模板股，以 P1 (5'-CGGGATCCTGGGCCGGCTGCCGTGC-3') 及 M1、P3 (5'-CGGGATCCGCCGAGTTGCCCCCTGTGCC-3') 及 M1 為引子做聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，分別得到 791 bp 及 755 bp 兩種片段的產物，接著架接到 pet-28a(+) 中的 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切位上，各自形成 pET-EndoG(37) (Δ 1-36) 及 pET-EndoG(49) (Δ 1-48) 兩個缺損株。之後，每一個架構出來的表現載體利用大腸桿菌增殖後，皆需經過核苷酸定序確認。

EndoG 表現的最佳 O.D 值

取已選殖到的 EndoG 表現載體 pET/EndoG 1 μ l 加入 40 μ l 的勝任細胞 (competent cell) 利用電穿孔 (electroporation，電容 25 μ F、電壓 1.25 kV、電阻 480 Ω) 的方式轉形 (transformation) 至勝任細胞，此細胞為大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS，再加入 1 ml 的 SOB Medium，於 37 °C 以 200 rpm 振盪培養一小時，最後將菌液塗在含有 0.03 μ M kanamycin 的培養基中，在 37 °C 培養 16 小時後觀察有無菌落出現。挑取此株大腸桿菌單一菌落，接種到 2 ml

Luria-Bertani (LB) 含 0.03 μM kanamycin 培養液中經 37 $^{\circ}\text{C}$ ，250 rpm 震盪培養隔夜後，以 1 : 50 的比例接種到 5 ml 含 kanamycin 的 LB 培養液中，置於 37 $^{\circ}\text{C}$ ，250 rpm 震盪，在培養後 30 分鐘開始第一次取樣，每隔 10 分鐘取樣一次，直至到第 120 分鐘，樣品在可見波長 600 nm 測其 OD；每次取樣完並加入 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 至最終濃度為 0.5 mM，再振盪培養 3 小時。因此株大腸桿菌內帶有一個嵌在染色體上的 T7 RNA 聚合酵素基因，其表現受到 lac operator 控制，因此可用 IPTC 誘導 T7 RNA 聚合酵素表現，進而轉錄 pET 質體上所帶的基因，大量產生異源蛋白質。最後將細菌離心收集下來，以 10 % SDS-聚丙稀醯膠體電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) 分析。

重組EndoG表現最佳IPTG濃度測試

以測得的最佳表現外源蛋白質 OD 值的時間條件，加入 IPTG 至終濃度分別為 0.1 mM，0.5 mM，1 mM。蛋白質以 10 % SDS-聚丙稀醯膠體電泳分析。

EndoG表現出來之可溶性檢測

將經過 IPTG 誘導的細菌以 14,000 rpm 離心 30 秒後收集，再把細菌混勻於 50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、2 mM EDTA 中，加入 lysozyme 至終濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，再加入 1/10 體積的 1 % Triton X-100，混合均勻後，於 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 分鐘。作用完後將微量試管置於冰上，以針頭抽吸方式破壞細菌所釋放出來的染色體，直至溶液不再黏稠。接著在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 rpm 離心 15 分鐘，收集上清部份即可溶性蛋白質，沉澱部分為不可溶性蛋白質，再以 10 % SDS-PAGE 分析。

EndoG及其缺損株蛋白之表現與純化

將已選殖到的全長 EndoG(1) 及缺損株 EndoG(37)與 EndoG(49)之 cDNA 分

別架接在 pET-28a(+)及 pET-28c(+) 上的 *Bam*HI 與 *Eco*RI 限制酶切位上。接著再將此已構築好之表現載體利用電穿孔的方式轉型 (transform) 到 BL21(DE3)pLysS 大腸桿菌並做篩選。將篩選到含有 pET-EndoG 載體的大腸桿菌，接種至 5 ml 含 0.03 μ M kanamycin 的 LB 培養液中經 37 $^{\circ}$ C，250 rpm 震盪培養隔夜後，以 1 : 50 的比例接種到 100 ml 含 kanamycin 的 LB 培養液中，置於 37 $^{\circ}$ C，250 rpm 震盪，在培養 2 小時後加入 IPTG 使最終濃度到達 0.5 mM，以誘導 T7 RNA 聚合酶表現，促使 pET 載體上的基因表現。再繼續經過 2 小時，37 $^{\circ}$ C，250 rpm 的震盪培養後，將菌液於 4 $^{\circ}$ C、8,000 rpm 離心 5 分鐘，以收集細菌。接著將菌體懸浮在 10 ml 含 20 % (w/v) 蔗糖及 1 mg/ml 溶解酵素 lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0] , 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride) 中，在冰上作用 20 分鐘後，進行一次冷凍解凍 (-70 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C)，再利用超音波震盪處理，接著以 15000 rpm 離心 10 分鐘。去上清液後，將沉澱物懸浮於含 1 % (v/v) Triton X-100 的 lysis buffer 中，置於冰上 15 分鐘，再以 15000 rpm 離心 10 分鐘，把沉澱物懸浮於含 8 M 尿素的 binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0]) 中，於室溫下緩慢混合 2 小時。最後以 15000 rpm 離心 10 分鐘後，收集上清液並利用鎳親合性色層分析法 (nickel-affinity chromatography) 將帶有 6 個組胺酸標記的 EndoG 蛋白質純化出來，再以 10 % SDS-PAGE 檢測蛋白質純度。

重組EndoG蛋白之再折疊

由於人類EndoG蛋白質從大腸桿菌表現出來為不可溶之包涵體 (inclusion bodies)，經純化後的EndoG蛋白是變性的，因此必須以漸進式透析的方法，使變性的蛋白質復原為有功能之結構。純化後的EndoG蛋白在依序在renaturing bufferA (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 0.5 M NaCl , 6 M urea) ， renaturing buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA ,

0.1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 0.5 M NaCl, 4 M urea) , renaturing buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 0.5 M NaCl) , renaturing buffer D (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 15 % (v/v) glycerol) , renaturing buffer E (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 25 % (v/v) glycerol) ,最後在storage buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 20 % (v/v) glycerol , 0.2 % (v/v) NP-40) 。經過兩次storage buffer透析後，將EndoG蛋白分裝保存於-70 °C 。

EndoG核酸水解酶活性的測定

取 1 μ l 先前已完成再折疊的EndoG，以 0.1 μ g 環形超螺旋的pUC18 DNA 為受質，混合在 EndoG buffer (20 mM Tris/HCl [pH 7.5]/0.5 mM MgCl₂/0.5 mM DTT) 並且在 37 °C 的條件下反應 5 分鐘。最後再利用以 1.2 % TAE agarose gel (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA) 進行電泳，電泳結束後將膠片置於EtBr中染色，再以紫外光照像並觀察分析之。



第三節 結果

人類 EndoG 的表現及純化

將人類 EndoG 基因架接在 pET 表現載體內，送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 表現(圖 2-1A)。經過 IPTG 的誘導下，將細菌粗萃取物利用 SDS-PAGE 分析，可以在圖 2-1B 看見經 IPTG 誘導的萃取物中，出現一個 33kDa 的蛋白質產物。然而，這些表現的蛋白質幾乎都是以不可溶的型態，存在於細菌內。為了解決這個問題，以尿素(變性物質)溶解這些表現的蛋白質、以親合性色層分析法純化蛋白質，最後再以漸層式透析回復蛋白質。在依序經過變性、純化的步驟後，為了回復 EndoG 的構形及活性，利用漸層式透析將尿素慢慢的從 EndoG 溶液中去除，而在尿素去除的過程中，EndoG 也慢慢的回復其構形。最後，純化的 EndoG 可以保存在-70 °C 中。

人類 EndoG 的生化特性

對於人類 EndoG 生化特性的分析，首先探討 EndoG 在何種 pH 及不同濃度金屬離子作用下之活性為何。分別利用線形及環形的 pUC18 為受質，圖 2-2A 顯示，人類 EndoG 最佳的作用 pH 值在 7.0，但當 pH 值增加到 10.0 時，則會造成抑制的效應。對不同兩價及單價金屬離子的作用環境，鎂離子是執行 EndoG 活性所絕對必需的，其最佳的作用濃度為 0.5 mM (圖 2-2B)；單價金屬離子，則非 EndoG 活性所必需的，當鉀離子濃度增加時 EndoG 活性也隨著降低 (圖 2-2C)。

人類 EndoG 的切割模式

EndoG 的切割行為在其最佳的生化條件分析出來後，隨即進行其切割 DNA 模式的測定。利用經 *EcoRI* 限制酶處理過的線形 pUC18 以及環形 pUC18 為受質，並分別以時間點 (圖 2-3A) 及 EndoG 濃度 (圖 2-3B) 為各別條件進行反應。結

果顯示，EndoG 在切割受質時會將線形 pUC18 片段化 (fragmentation)，形成不同長短的片段，此結果顯示其內切的活性並非很專一，但並未能解釋其是否具有外切酶活性。當以環形 pUC18 為受質時，從 EndoG 切割 DNA 的模式可以發現，EndoG 會先造成雙股 DNA 的其中一股斷列，形成 open circular 的 DNA 產物，在隨機的切割下剛好累積在同一點的位置即造成線形 (linear) DNA 的產物，接著跟切割線形 DNA 一樣的結果，形成不同長短的片段，最後所有的受質將被切成大小約 200 個鹼基長度的產物。

人類 EndoG 全長、缺損株及野生株的表現與純化

為了研究 EndoG 前端粒線體引導胺基酸序列對其結構及功能的相關性，設計特定引子以聚合酶連鎖反應，得到一系列的 EndoG 基因片段。將這些缺損片段轉接到適合的 pET 表現載體，先以定序分析，確定轉譯密碼無誤後，再進行缺損蛋白質的表現及純化。在本實驗中，共構築了 3 株粒線體引導序列不同長度的 EndoG (圖 2-4A)。這些不同長度的 EndoG 在送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 後，經 IPTG 誘導，取得粗萃取物後，利用親合性色層分析法純化，各自得到三種不同長短的 EndoG 蛋白，分別為 EndoG(1) 40 kDa、EndoG(37) 35 kDa 及 EndoG(49) 33 kDa (圖 2-4B)。

人類 EndoG 前端粒線體引導胺基酸序列對其結構及功能的影響

將先前所得到的三個不同長短 EndoG 蛋白，以固定 0.1 pmole 的蛋白質濃度，組別排列為 EndoG(49)、EndoG(1) 及 EndoG(37)，分別給予經 0.1 μ g *EcoRI* 限制酶處理過的線形 pUC18 以或環形 pUC18 為受質，在適當的緩衝液中 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘(圖 2-5)。結果不管是以線形或環形 pUC18 為受質的反應中，都顯示 EndoG(49) 有最佳的水解核酸的活性。在此實驗中發現，全長的 EndoG(1) 也

具少許的核酸水解酶活性，而且其切割的模式與 EndoG(49)有些微不同之處，EndoG(1)會提早將受質水解成約 200 個鹼基長度的產物。而 EndoG(37)在此蛋白濃度的 5 分鐘反應裡看不出其水解 DNA 的活性，但是將時間延長為 30 分鐘後，即可看到其切割模式與 EndoG(49)相同(資料未展現)。



第四節 討論

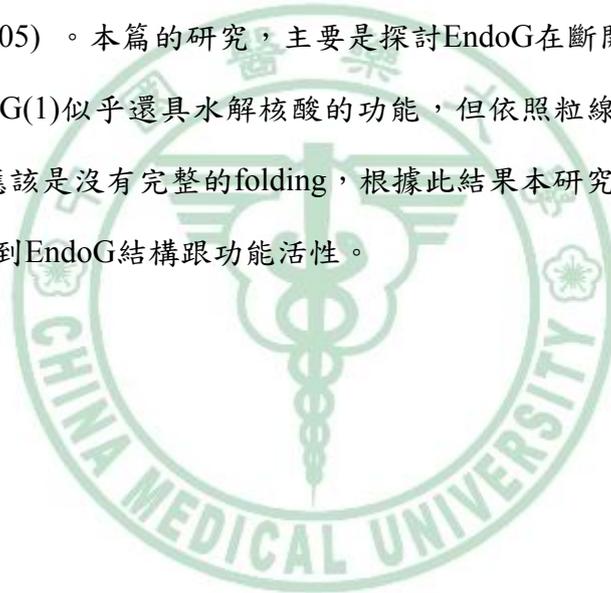
在本章節中證實了人類 EndoG 的基因利用大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 表現系統，所表現出來的蛋白質，經純化及變性到再折疊復性的過程是可行的，並分析到 EndoG 蛋白的生化特性及切割 DNA 的行為。但是以這些來源進行 EndoG 的酵素分析，必須經過繁鎖的純化步驟，而且所回收的大腸桿菌表現可溶蛋白質的比例偏低。為了解決這些問題，我們嘗試利用大腸桿菌表現與六個 histidine 融合的人類 EndoG，再自不可溶的部份，純化 EndoG。將 pET-DNase 表現載體送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 後，因這株細菌含有 T7 溶解酵素基因，因此有利於菌體的擊破。在 IPTG 誘導後，可以看見在不可溶的部份，出現相當大量大小約 33kDa 的蛋白。以大腸桿菌表現系統進行異源性蛋白的表現，雖然可以誘導極高量的蛋白質表現，但大部份的表現蛋白質會聚集成包涵體 (inclusion body)，而使蛋白質的活性喪失。因此，就自含有高量表現蛋白的不可溶包涵體中，利用變性物質溶解不可溶物，再經純化，最後利用適當的方法將變性的蛋白質回復其活性。在純化的策略上，將親合性層析的步驟放在變性及復性的步驟之間，有兩個理由：第一，只有可溶性的樣品才能進入層析分離，因此不可溶的包涵體必須先溶解成可溶態；第二，為了純化方便，將 6 個 histidine 融合在人類 EndoG 的 N 端，但若是復性過程後才進行層析分離，發現層析效率會受到嚴重的干擾，而使回收量下降，因此推測 N 端的 6 個 histidine 在復性的過程中，會摺疊到蛋白質結構的內部。在復性的步驟上，主要的原則是使變性物質自溶液中去或是稀釋，而使蛋白質的結構復原，當變性物質緩慢的自蛋白質溶液中去時，會使人類 EndoG 回復活性。在進行復性的過程中，純化的 EndoG 必須先稀釋到 100 $\mu\text{g/ml}$ ，當以超過 100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的 EndoG 溶液進行透析時，在變性物質去除的過程中，蛋白質又會聚集成不可溶的物質，而無法恢復正確的結構及活性。經過這樣的流程，可以自 100 ml 的培養液中純化出 1.5 mg 具活性的

EndoG。因為這樣純化出來的人類 EndoG 具有與從真核生物體 EndoG 有相似的特性 (如 pH 值及一價或二價離子的偏好、水解 DNA 的能力)。此外,人類 EndoG N 端的 6 個 histidine 會摺疊到蛋白質內部,不會對 EndoG 的功能造成干擾。

取得有功能的人類 EndoG 之後,首先進行其生化特性上的分析,從大腸桿菌表現出來的重組人類 EndoG,在 pH 值等於 7 的時候有最佳的活性,然而在 pH 值等於 9 的時候,活性又比 pH 等於 8 的時候好。然而這個現象在先前的文獻中也顯示相同結果 (Widlak et al., 2001),科學家們的解釋是較高 pH 值有利於 DNA 雙股的打開,又剛好 EndoG 在水解單股 DNA 的活性上又比雙股 DNA 強許多 (Ikeda and Ozaki, 1997),因此 pH 值少許影響到 EndoG 的活性,但受質結構的改變使得 EndoG 水解 DNA 活性在 pH 等於 9 時比 pH 等於 8 的時候好。EndoG 偏好在中性的環境下作用,而且需要鎂離子其最進濃度 0.5 mM,而鈉離子不能取代鎂離子。目前大部份的核酸分解酵素都需要二價金屬離子作為輔因子,以執行酵素的機能。EndoG 是在低濃度的鈉離子及鉀離子時有最佳的催化條件,當鉀離子濃度高於 20 mM 時 EndoG 活性即很明顯的被抑制住。在同樣是扮演細胞凋亡因子 DNA fragmentation factor (DFF),其活性展現在鈉或鉀離子環境中有很大的範圍,從 50 mM 到 150 mM 之間都可以有最佳活性 (Widlak et al., 2001)。然而正常存活的細胞裡的鉀離子濃度可達 140 mM 以及進入細胞凋亡的細胞可以到 50 mM,這些濃度都遠超過 EndoG 最佳的活性條件,因此有學者猜測 EndoG 在細胞中執行功能時可能會藉著與其它的蛋白質交互作用來增加其做用活性及環境的適應力 (Kalinowska et al., 2005)。

EndoG 分子量全長大約是 33 kDa,在 N 端包含一段會引領到粒線體儲存的 48 個胺基酸序列 (Tiranti et al., 1995)。這類帶有 Mitochondria leader sequence (MLS) 的前驅蛋白質,其 N 端通常會由許多帶正電荷的胺基酸所組成,經由在細胞質中最重要的伴隨蛋白 (chaperones) heat-shock protein 70 (cHsp70) 及粒線體轉運

刺激因子將帶有MLS的前驅蛋白質運送到粒線體外膜 (outermembrane) 並由 Tom 複合體 (Tom complex) 做辨識轉運進去intermembrane space, 若是要儲存到粒線體的基質 (matrix) 當中, 則需再經過粒線體內膜 (innermembrane) Tim複合體(Tim complex)的轉運後, 接著經由粒線體蛋白水解酶 (mitochondrial processing peptidase (MPP) 將前驅蛋白質的MLS切除後, 再透過Hsp60及cpn10 (Chaperonin 10) 幫助折疊成具有功能的蛋白質並儲存在該位置 (Hood et al., 2003) 。EndoG 先前被認為會從細胞質轉送到intermembrane space儲存 (Ohsato et al., 2002) , 另一個研究團隊則認為是少部份鑲嵌在innermembrane上及大量存在matrix當中 (David et al., 2005) 。本篇的研究, 主要是探討EndoG在斷開N端的MLS後的功能。全長的EndoG(1)似乎還具水解核酸的功能, 但依照粒線體的轉運蛋白質過程, EndoG(1) 應該是沒有完整的folding, 根據此結果本研究推論N端的MLS 48 個胺基酸會影響到EndoG結構跟功能活性。



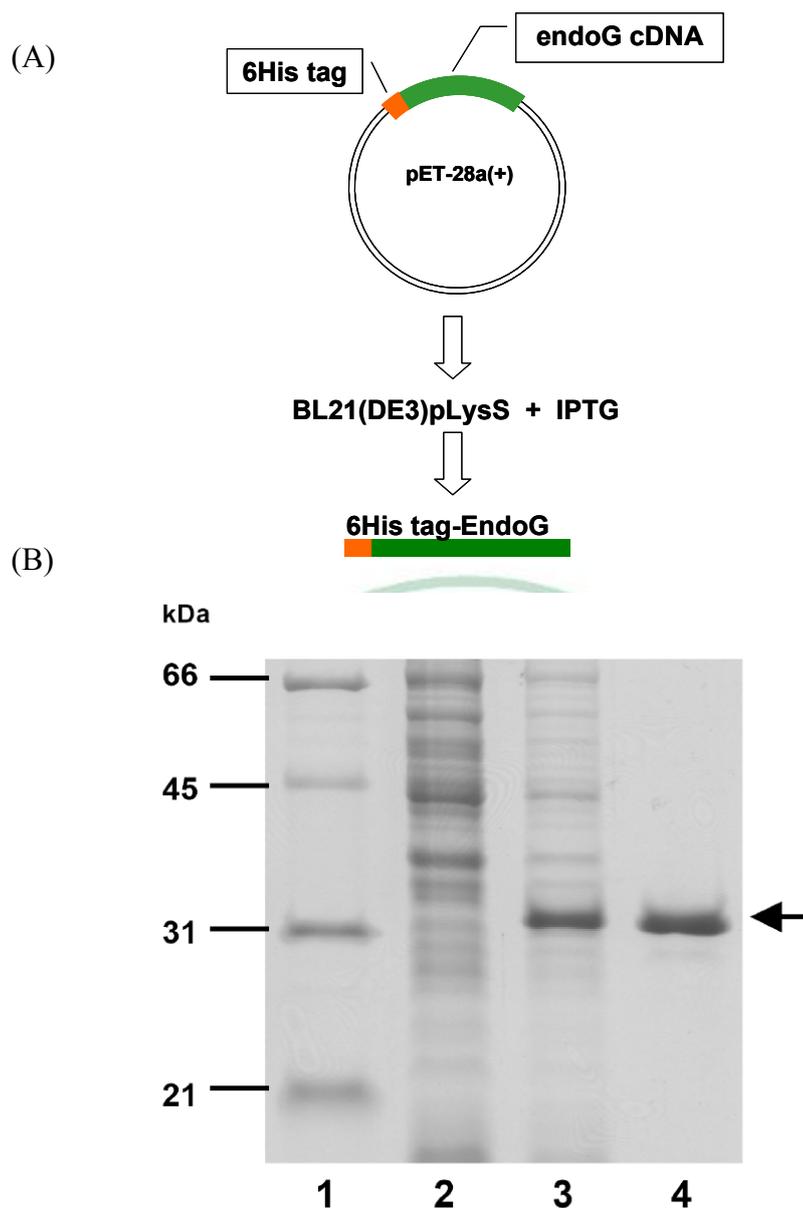


圖 2-1 SDS-PAGE 分析大腸桿菌表現及純化的人類 EndoG。(A) EndoG 表現載體架構及產物示意圖。(B) 將含有 pET-EndoG(49) 野生株的大腸桿菌不經 (Lane 2) 及經 (Lane 3) IPTG 誘導的粗萃取液及純化後 (Lane 4) 的人類 EndoG 野生株，命名為 EndoG(49)，利用 SDS-PAGE 分析後，再以 Coomassie Brilliant Blue 染色。蛋白質標誌 (Lane 1) 的分子量 (單位為 kDa) 標示在左邊，33 kDa 的表現蛋白質以箭頭標示在右邊。

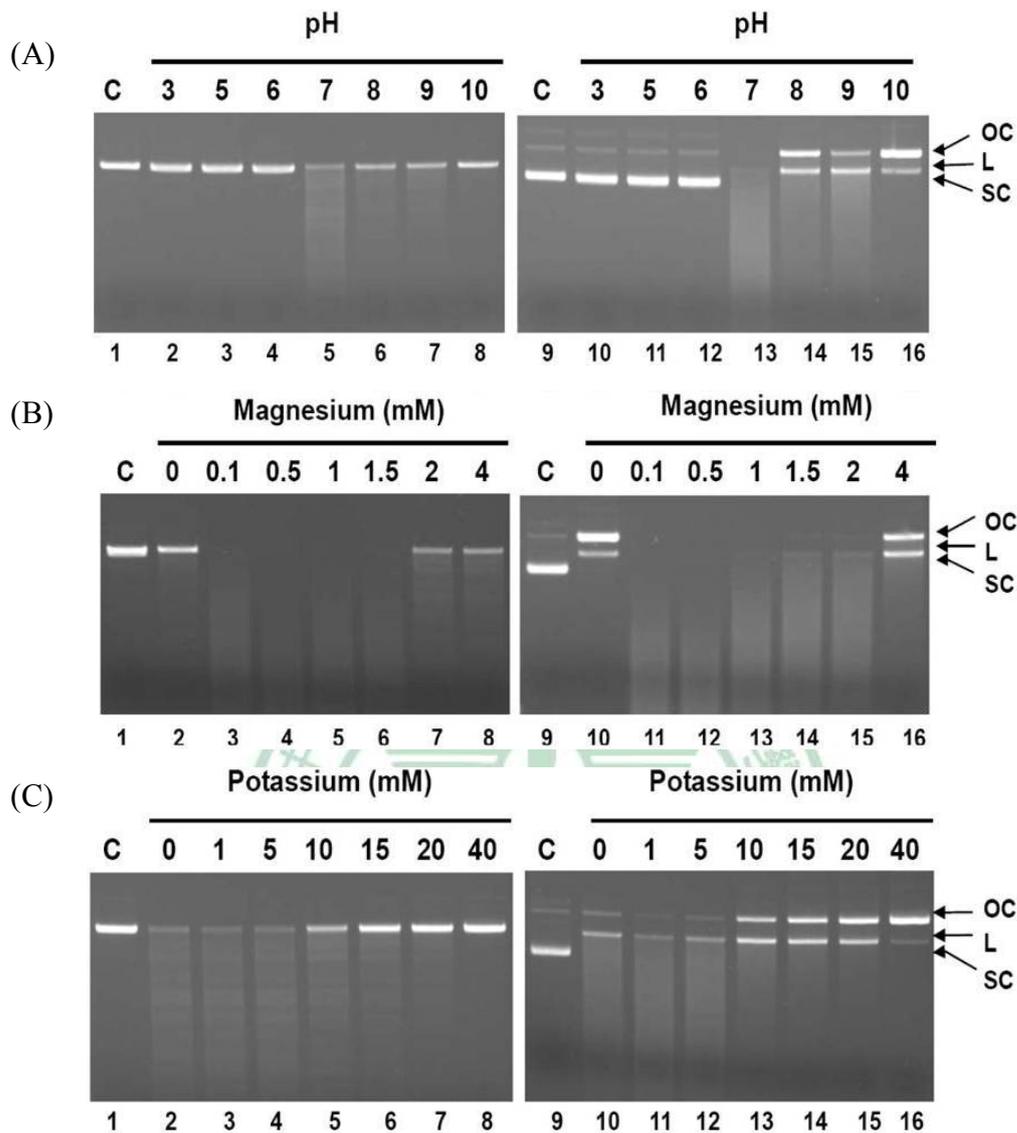


圖 2-2 人類 EndoG 的生化特性。 以上的每個試管反應包含 0.1 pmol EndoG(49) 及 0.1 μg pUC18 雙股 DNA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 2 分鐘 **(A)** pH 值對酵素活性的影響。下列緩衝液被用來維持適當的 pH 值：BES (pH 3.0)、醋酸(acetic acid, pH 5.0)、磷酸 (sodium phosphate, pH 6.0)、Tris (pH 7.0、8.0、9.0) 及 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (pH 10)。 **(B)** 兩價鎂離子對酵素活性的影響。 **(C)** 單價鉀離子對酵素活性的影響。 Lane1~8 受質為經 *EcoRI* 限制酶處理過的線形 pUC18， Lane9~16 受質為環形 pUC18。

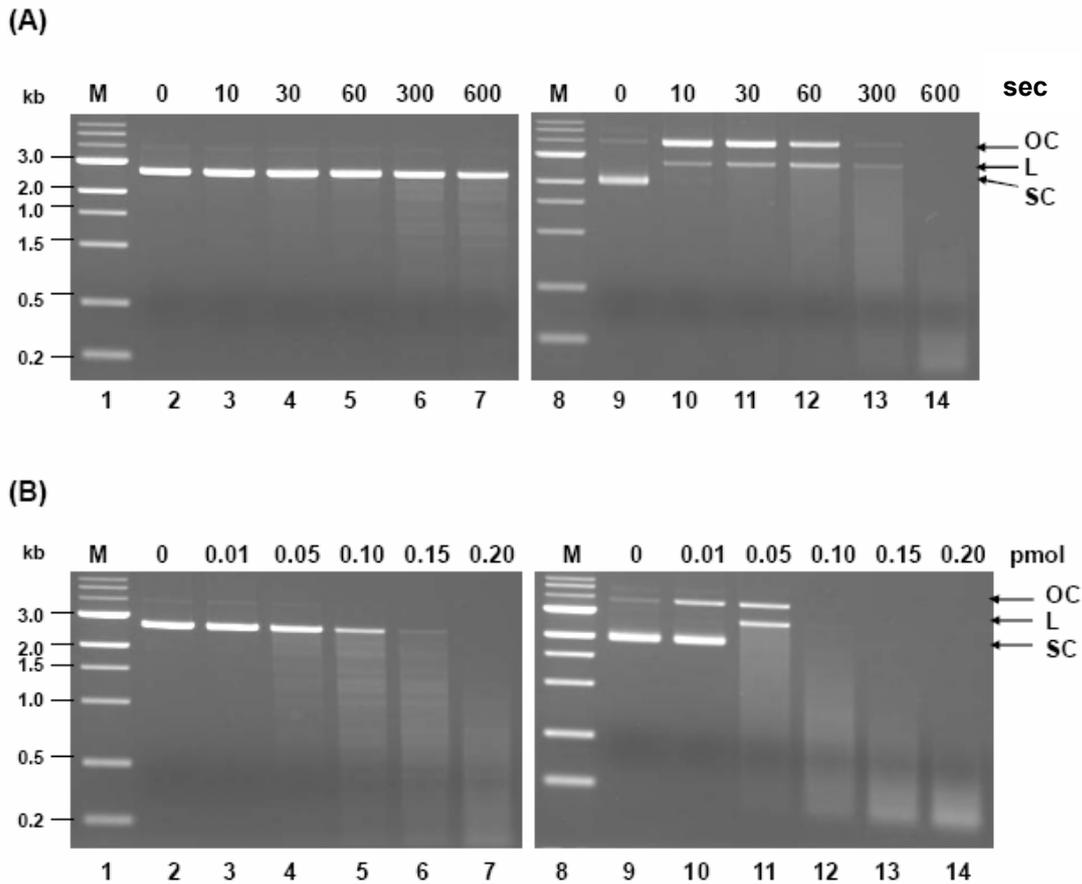
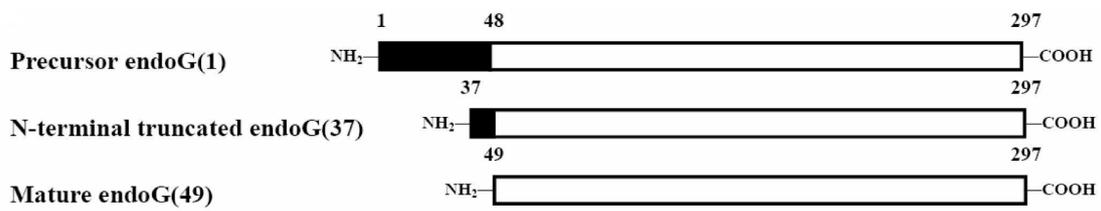


圖 2-3 重組人類 EndoG 的切割模式。 (A) 以不同時間點觀察 EndoG 的切割行為。每個試管包含 0.01 pmol EndoG、0.1 μ g pUC18 雙股 DNA 在最佳的緩衝液中下 37 $^{\circ}$ C 反應，時間分別為 0、10、30、60、300、600 秒。(B) 以不同濃度的 EndoG 觀察其切割行為。每個試管包含 0.1 μ g pUC18 雙股 DNA 在最佳的緩衝液中下 37 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘，濃度分別為 0、0.01、0.05、0.10、0.15、0.20 pmol。Lane 1 及 Lane 8 為 DNA 標誌的左邊為長度單位 kb，Lane 2 ~ Lane 7 的受質為經 *EcoRI* 限制酶處理過的線形 pUC18；Lane 9 ~ Lane 14 為受質為環形 pUC18。右邊 OC 代表 open circular；L 代表 linear；SC 代表 supercoiled。

(A)



(B)

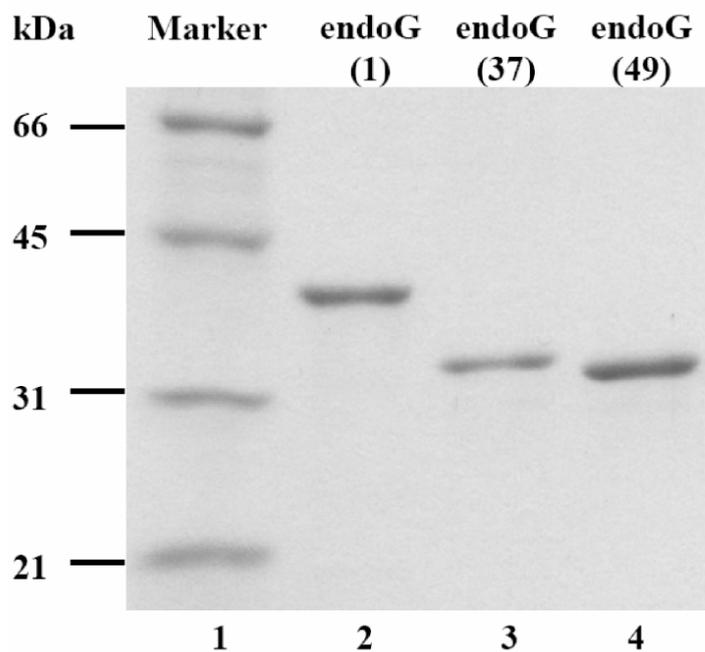


圖 2-4 人類前趨 EndoG、缺損株、成熟株之架構與表現純化。(A) EndoG 缺損株的架構。最上面的 EndoG(1) 表示為全長完整的 EndoG 結構，EndoG(37)則是隨機裁剪 N 端 1~36 個胺基酸的缺損株，EndoG(49) 為裁剪 N 端 1~48 個胺基酸的野生株 EndoG (B) 將各別大腸桿菌的粗萃取液經純化步驟後，利用 SDS-PAGE 分析後，再以 Coomassie Brilliant Blue 染色。蛋白質標誌 (Lane 1) 的分子量 (單位為 kDa)，Lane 2 為純化後全長 EndoG(1)，Lane 3 為缺損株 EndoG(37)，Lane 4 為野生株 EndoG(49)。

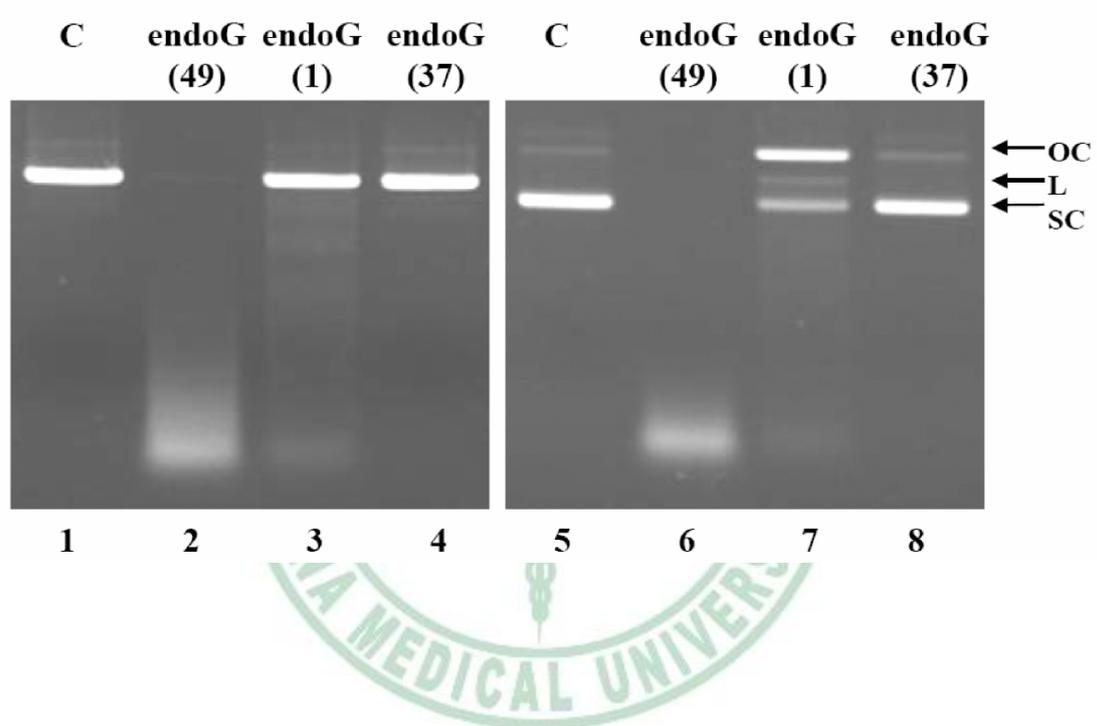


圖 2-5 重組人類前趨 EndoG、缺損株、成熟株的切割活性比較。以固定濃度 0.1 pmol 酵素，以 0.1 μ g pUC18 雙股 DNA 為受質，在適當的緩衝液中反應 37 $^{\circ}$ C 5 分鐘。Lane 1 及 Lane 5 為不含酵素的對照組，Lane 2 ~ Lane 4 的受質為經 *EcoRI* 限制酶處理過的線形 pUC18；Lane 6 ~ Lane 8 的受質為環形 pUC18。右邊 OC 代表 open circular；L 代表 linear；SC 代表 supercoiled。

第三章 Endonuclease G 的功能與結構之研究

摘要

本章主要是進行人類 EndoG 功能區及活化中心的研究。利用化學修飾作用，探討 histidine 是否參與 EndoG 的活性。由 EndoG 水解核酸分析，發現 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 不活化的 EndoG 在水解核酸的活性依 DEPC 的濃度上升而下降，然而藉由 hydroxylamine 的處理 EndoG 的活性又回復。這些結果顯示 DEPC 不活化 EndoG 的作用是因 histidine 被修飾所造成的。因此，histidine 對於 EndoG 活性，顯然具有決定性的影響力。為了證實這一點，進行人類 EndoG 氨基酸序列的比較，利用人類 EndoG 蛋白質胺基酸序列與另外其它六個物種分別是牛、小鼠、大鼠、線蟲、*S. cerevisiae* 酵母菌、*S. pombe* 酵母菌之 EndoG 線性比對的結果，發現 EndoG 在各物種有一 DRGH 高度保留的序列。而這個 DRGH 高保留區的氨基酸 histidine 位在人類 EndoG 的第 141 個胺基酸。因此，利用定點突變，將 histidine 轉換為 alanine，並探討其在 EndoG 中是否為主要的活性胺基酸。接著在取得一系列的 arginine、asparagine、及 histidine 的 EndoG 點突變株後，利用酵素動力學的方式計算得到其 K_m 及 K_{cat} 等參數以探討這些胺基酸對於 EndoG 活性的影響。更進一步，為了探討 EndoG 與鎂離子的關係，利用這些點突變株以不同鎂離子的濃度處理，發現 H141 在高濃度的鎂離子有很好的切割活性，這表示 H141 直接的與鎂離子結合並執行核酸水解的行為。另外，我們選擇具有 H-N-H domain 的各類代表性蛋白質與 EndoG 做線性比對。比對這些蛋白質其都在其 $\beta\alpha$ -Me 結構上發現都具有同樣的 H-N-H (H-N-N) 的區域，除了 H141，對應到 H-N-H 的胺基酸還有 N163 及 N172，利用定點突變、鎂離子需求及 α sequence 切割試驗，結果發現 H141A、N163A、N172A 對於 EndoG 活性有嚴重影響，因此推論 EndoG 可歸類於 H-N-H 核酸水解酶的一種。

第一節 緒言

Human EndoG 的 mRNA、cDNA 及胺基酸在 NCBI 所發表序列 X79444 (Tiranti et al., 1995)，經過比對在已被發表 EndoG 的許多 mRNA 及 cDNA，發現 X79444 這組序列具有核苷酸的點突變，造成 EndoG 第 163 的胺基酸存在 lysine 及 asparagine 兩種胺基酸，更進一步在，我們以定點突變分析這兩種 EndoG 發現活性上 N163 遠大於 K163 的 EndoG。這表示著，如果真實存在這兩種不同的 type EndoG 的細胞，在進行 EndoG apoptosis pathway 路徑時或執行其功能時會受到嚴重影響。所以我們從許多來自 human 不同的 cell line 中抽取 genomic DNA，設計 primer 經 PCR 取得 EndoG exo1 這個片段的 DNA，並利用限制酶來檢驗。

在 2004 年 Schäfer 等，已對牛 EndoG 的功能及結構提出了一些推測及看法 (Schäfer et al., 2004)。基於對牛 EndoG 結構的模擬及 DNA/RNA-non-specific nuclease 的胺基酸線性比對，他們推測牛 EndoG 是屬於 $\beta\alpha$ -Me-Finger 核酸水解酶超家族 (superfamily)。幾乎帶有 H-N-H motif 的 nuclease 都存在著 $\beta\alpha$ -Me-Finger 這個結構。然而這些 EndoG 在 H-N-H 這個 motif 的生化上面的直接證據目前還沒有被研究。人類 EndoG 催化核酸水解的機制以及哪些胺基酸負責催化核酸水解的活性，目前仍然不夠詳盡，因此未來需要進一步的研究。在本章節當中，利用化學修飾、生物資訊學、點突變以及酵素動力學的分析，我們推論 EndoG 存在著 $\beta\alpha$ -Me-Finger 這個結構，並且與 H-N-H-superfamily 的核酸水解酶有相同的生化及序列特性。

在輔因子鎂離子的研究方面，Schäfer 等，認為牛 EndoG 的第 174 個 asparagine 為主要跟鎂離子交互作用的胺基酸，線性比對的結果對應到人類 EndoG 第 172 個胺基酸 asparagine。為了更明確的分析哪些胺基酸參與鎂離子的結合作用，利用 protein data bank 蛋白質結晶資料庫 (<http://www.rcsb.org>)，將 EndoG 與其它具有結晶的 $\beta\alpha$ -Me-Finger 交集 H-N-H motif 的蛋白質做模擬比對，

發現與人類EndoG最為相似的是NucA (1ZM8) (Ghosh et al., 2005) 。在這個結構當中，NucA 第 249 個胺基酸glutamate發現其第二個鎂離子結合位(Ghosh et al., 2005)，另外在人的EndoG以NucA的模擬結構及序列比對當中，發現EndoG 第 271 個胺基酸glutamate與NucA的第 249 個胺基酸glutamate吻合。利用定點突變及鎂離子需求的試驗，證實了人類EndoG 的E271 是第二個鎂離子結合位。



第二節 材料與方法

多重胺基酸序列排序 (Multiple Alignment)

進入國家衛生研究院網頁之GCG (Genetics Computer Group) 資料庫 (<http://bioinfo.nhri.org.tw/gcg/>)，將EndoG之胺基酸序列與另外其它六個物種分別是牛、小鼠、大鼠、線蟲、*S. cerevisiae*酵母菌、*S. pombe*酵母菌之EndoG相似蛋白質胺基酸序列進行線性比對。

利用焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate ; DEPC) 進行人類 EndoG 的化學性修飾及利用 hydroxylamine 進行修飾後氨基酸的回復

在反應液 pH 值為 6.0 時，DEPC 通常會選擇性的修飾 histidine，少部份也有可能對 tyrosine 進行修飾作用，但是只有被修飾的 histidine 可被 hydroxylamine 還原。將含有 0.2 pmole 純化後的 EndoG、50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)及不同 DEPC 濃度的 100 μ l 反應液，在 25 $^{\circ}$ C 作用 5、10、15 及 30 分鐘後，加入 1 μ l 的 0.1 M imidazole (pH 6.0)中止反應。最後，經 DEPC 處理的 EndoG 利用活性測定，判定其被 DEPC 不活化的程度。在 hydroxylamine 回復實驗中，將上述利用 DEPC 處理後的 EndoG，以 imidazole 中止反應後，加入 hydroxylamine 至最終濃度為 20 mM，反應物於 4 $^{\circ}$ C 下作用五小時。最後測定 EndoG 的活性，以判定 EndoG 活性回復的程度。反應中所使用的 DEPC 必須新鮮以絕對酒精配製，而且所加入的 DEPC 體積不得超過總反應液體積的 2.5 %。

含尿嘧啶單股 DNA 的製備

首先將 phagmid pET-EndoG 送入大腸桿菌 CJ236 株中。大腸桿菌 CJ236 的染色體中不含 dut 及 ung 基因 (這兩個基因分別可以表現 dUTPase 及 uracil N-glycosylase)，如此一方面導致細菌內 dUTP 的濃度增加，另一方面導致在 DNA

複製中即使插入尿嘧啶鹽基，也不會被uracil N-glycosylase修補成胸腺嘧啶，因此，在這株細菌中所萃取得的質體DNA，通常含有大量的尿嘧啶。將含pET-EndoG的大腸桿菌CJ236，接種在5 ml含30 µg/ml kanamycin及10 µg/ml chloramphenicol的LB培養液中，於37 °C下振盪培養隔夜。之後，以1：50的比例，將隔夜培養的菌液接種在50ml含kanamycin的LB培養液中，也是以振盪的方式，培養在37 °C。當培養液的OD₆₀₀到達0.3時，加入20 m.o.i的helper phage M13KO7，繼續培養八小時。培養液以17,000 g於4 °C中離心五分鐘後，將含有transducing particles的上清液收集起來，加入10 µg/ml RNaseA、10 U/ml DNaseI及2 mM MgCl₂，於25 °C中作用30分鐘。之後，加入1/4上清液體積的3.5 M ammonium acetate / 20% PEG-6000，於冰上作用30分鐘，再以17,000 g於4 °C中離心十五分鐘，以沉澱transducing particles。將沉澱物懸浮在200 µl的高鹽緩衝液(0.3 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA)，放置在冰上30分鐘，以12,000 g離心兩分鐘去除低分子量的DNA，上清經酚/氯仿萃取兩次、酒精沉澱後，可得到含尿嘧啶的單股DNA。

定點突變

定點突變的方法主要參考自Kunkel等的方法(1985)，這個方法是以含尿嘧啶的單股DNA為模版，將設計好的突變引子與模版黏合後，利用T4 DNA聚合酵素，進行試管內DNA的合成，此時新合成的互補股DNA不含尿嘧啶。之後，將經這樣程序合成的雙股DNA，送入染色體含dut及ung基因的大腸桿菌中，因ung基因產物uracil N-glycosylase可以辨認在DNA上的尿嘧啶，將尿嘧啶去除，如此一來，在DNA複製時，原先充作模版的含尿嘧啶DNA會因尿嘧啶的去除，而被分解成小片段，只有新合成的互補股DNA可以在細菌中順利進行複製。定點突變的步驟如下：將含0.3 pmol含尿嘧啶的單股DNA、6 pmol已

先經 5'端磷酸反應的突變引子、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM MgCl₂ 及 50 mM NaCl 的 10 μl 黏合反應液，加熱到 95 °C 1 分鐘後，以每分鐘降 1 °C 的速度，緩慢降到 25 °C。之後依序加入 4 μl 的 10 倍合成緩衝液 (4 mM dNTPs, 175 mM Tris-HCl [pH 8.0], 37.5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 7.5 mM ATP)、3 U 的 T4 DNA 接合酵素、1 U 的 T4 DNA 聚合酵素及 22 μl 的 DDW，進行第二股 DNA 的合成。第二股 DNA 合成的反應條件為：冰上五分鐘；25 °C 五分鐘；37 °C 90 分鐘。反應結束後的突變雙股 DNA 送入大腸桿菌 NM522 株中，所得的菌落進一步抽取增殖的質體，並以引子上設計的限制酶切位，以特定的限制酶切割質體 DNA，篩選突變株。

EndoG 點突變株蛋白的表現及純化

將構築好的表現質體送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 中進行表現，IPTG 誘導及純化的方法同 EndoG 蛋白的表現及純化的方法。

酵素動力學分析

EndoG切割pUC18 DNA的酵素動力學，在本篇研究是利用固定濃度的EndoG之後給予不同濃度的pUC18 dsDNA當作受質，並在適當的buffer中反應。依野生株及突變株活性的不同，反應時間及酵素濃度也會跟著不同。反應結果利用膠體電泳分析後，經過Gel-Pro[®] Analyzer (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA) 軟體的運算後，將所得的資料代進方程式計算， $v = \{ I_1 / (I_0 + 0.5I_1) t \} \times [\text{substrate}]$ ，t = 反應時間 (秒)、I₁ = 產物、I₀ = 受質原始濃度。最後利用 Michaelis-Menten 方程式將 V_{max} 及 K_m 值，K_{cat} 與 K_{cat}/K_m 隨後便可被計算出來。

GC 喜好性的切割分析

先前已有文獻利用含有 HSV-1 *a* sequence 轉接的序利為受質來分析 EndoG (Huang et al., 2002)。這個質體 DNA 命名為 pKJH20，它包含 HSV-1 *a* sequence，經 *EcoRI* 與 *XbaI* 處理後，形成 2.8 kb 及 1.6 kb 的兩個片斷，而 *a* sequence 則會存在於 1.6 kb 的片段的邊緣。取 0.2 μ g 以 *EcoRI/XbaI* 處理過的 pKJH20 與重組人類 EndoG 在含有 15 mM spermidine 適當的 buffer 中 37 °C 反應，並依照突變株不同活性設定不同反應時間。最後加入終止反應的試劑後以 1.2 % 膠體電泳分析。

蛋白質立體結構模型分析 (3D modeling)

進入 <http://bioinfo.pl/meta/> 網頁中並將 human EndoG 胺基酸序列載入之，進行分析並計算 EndoG 可能的 3D 結構模式。將由上述方法所得之 PDB 檔以 PyMOL (<http://www.pymol.org/funding.html>) 軟體程式將 PDB 蛋白質結構原始的數據檔打開後，即可將此數據檔轉換成 3D 模型，再以該軟體分析並評估其結構，並與其相似，且已有結晶的蛋白質進行比對，並可從差異性當中推論該點胺基酸在 EndoG 當中參與的功能角色。

第三節 結果

人類 EndoG 基因多型性之分析

從NCBI 網站中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，利用其Evidence Viewer程式將人類EndoG在染色體上的每個exon與目前已被發表的EndoG cDNA或mRNA序列作線性比對。結果得到其中有三個核苷酸點不一樣造成轉譯的胺基酸改變，分別是第12個leucine變成serine，第34個proline變成leucine，以及第163個asparagine變成lysine (Ohsato et al. 2002; Strausberg et al. 2001) (圖 3-1A)。EndoG exon1 部分基因及蛋白質序列比對。在第163的胺基酸位置，accession number 為X79444.1的序列的胞嘧啶 (cytosin, C) 點突變為腺嘌呤 (adenine, A) 造成由asparagine (N) 改變成lysine (K)。因此，利用限制酶*Hpy*99I恰好可辨識此突變點 (圖 3-1B)，接著將EndoG exon 1 利用Exon1-P (5'- TGCTGTGCTACGACCCGCGCACCC-3') 及 Exon1-M (5'-CCCGTGGAGGGACT CGCAGCGAAAGGA-3') 為引子，以PCR方法放大EndoG exon 1 的DNA片段 (圖 3-1C)。在此研究選擇以下幾種細胞株 HeLa、Hs68、HL60、Caco-2、Detroit 551、C3A及Change liver，在取得Exon 1 的產物後 (圖 3-2A)，經*Hpy*99I限制酶切割確認後在這些細胞株中沒有發現預期的K163這一型的EndoG (圖 3-2B)。所以我們以endoG N163 的這個因基型為野生株更進一步研究。

重組人類 EndoG 的化學修飾

從圖 3-3 各物種 EndoG 的多重線性比對結果，可以顯示出人類 EndoG 第141個 histidine 以及很多高度保留的胺基酸。為了偵測 histidine 胺基酸對於 EndoG 活性的影響。我們利用 DEPC 來修飾 EndoG 蛋白質上 histidine 胺基酸。將純化的 EndoG (0.2 pmol) 與不同濃度 (0、0.1、0.2、0.4 mM) 的 DEPC 混合後，於 pH 6.0 緩衝液中作用 30 分鐘，再進行酵素活性的測定。圖 3-4 顯示，當作用 DEPC

濃度愈高時，酵素活性被不活化的程度愈大。當 DEPC 濃度為 0.2 mM 時，可以抑制大部份 EndoG 的活性。若是將 DEPC 不活化的 EndoG，進一步以 hydroxylamine 處理，可以回復 EndoG 大部份的活性。此結果顯示 histidine 在 EndoG 當中主要負責催化活性的角色。

EndoG 突變株之酵素動力學

在本研究中，我們將 EndoG 在各個物種高度保留的 histidine、asparagine 以及 arginine 設計引子進行定點突變成 alanine 及 glutamic acid (見圖 3-4、表 3-1)，所得突變株包含：H141A、H228A、H141A/H228A、H141D、H228D、R110A、R139A、R184A、R272A、N163A、N172A、N251A。由於 EndoG 水解 DNA 的起始速率會隨著受質濃度增加，利用此曲線關係利用 Michaelis-Menten 方程式計算可得 Steady-state kinetic 參數 (圖 3-5)。野生株 EndoG 的 K_m 及 K_{cat} 從這個實驗當中得到值分別為 18.72 ± 1.84 nM 與 0.07 ± 0.01 S_{-1} 。表 3-2 為野生株與突變株的酵素動力學參數比較。將 H、N、R 這些胺基酸取代成 alanine 或是 aspartic acid 結果會導致 K_m 輕微的降低。特別的是 H141D、R139A 及 R184A 這三株的 K_m 比野生株下降將近 15 倍。然而在實驗當中所有突變株的 K_m 值都比野生株小，這個結果顯示 EndoG 的 H、N、R 在與 DNA 的交互作用扮演很重要的角色。將 H141、N163 及 N251 各別突變成 alanine 後，導致 EndoG 酵素活性幾乎不活化，從酵素動力學所求得的參數也顯示 K_{cat} 比野生株降低了 25,000 倍以上，此結果暗示 H141、N163 及 N251 可能是扮演 DNA 水解的關鍵角色。將 R139 及 N172 各別突變成 alanine 所得 K_{cat} 比野生株降低了約 2,000 倍，而其它的突變株則是下降 1,000 倍左右。綜合以上結果，H141、N163、N172、N251 這幾個 histidine 及 asparagine 的位置可能參與催化功能的重要角色。

鎂離子濃度對於 EndoG 點突變活性影響

為了探討EndoG哪些為主要與鎂離子交互作用的胺基酸，首先我們如預期的得到EndoG 野生株在鎂離子 0.5 mM時，有最佳的活性。更進一步將EndoG點突變株H141A、H228A、H141A/H228A、R110A、R139A、R184A、N163A、N172A、N251A及E271A，以不同鎂離子濃度測試其活性，並利用膠體電泳分析（圖 3-6A 部分資料）。圖 3-6B是將膠體電泳分析結果以密度掃描程式定量的曲線關係 (Gel-Pro[®] Analyzer, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA)，H141A與E271A達到最佳活性時所需的鎂離子濃度高於野生株 60 倍之多。另外此結果顯示大部份這些點突變株跟野生株一樣只需要較低的鎂離子濃度為輔酶。根據此發現推論，EndoG與鎂離子直接的交互作用可能透過H141 及 E271 這兩個胺基酸。

EndoG 點突變株對於 GC 序列專一性的影響

由於 EndoG 已經被證實有切割 *a* sequence 專一性的活性，以此模式我們利用經過 *EcoRI/XbaI* 處理過的 pKJH20 為受質（圖 3-7A）。由於 pKJH20 質體上帶有 *a* sequence，然而經過 *EcoRI/XbaI* 處理後，形成 2.8 kb 及 1.6 kb 的產物，而 *a* sequence 則會存在於 1.6 kb 的片段的邊緣。因此，若 EndoG 專一的切割 *a* sequence 則會形成 1.3 kb 片段產物。圖 3-7B 顯示針對 EndoG 點突變株給予此受質後的切割結果。野生株可以專一的切割 *a* sequence，然而其活性在經過 15 分鐘反應後出現 smear 的現象。值得注意的是 H141A、N163A、N172A 及 N251A 這幾個突變株在切割 *a* sequence 的活性降低了許多，而這個結果顯示 H141、N163、N172 及 N251 可能是控制 EndoG 切割 DNA 行為的胺基酸。另外 R110A、R139A、R184A 都有增加專一性的現象產生，因此我們推測 R110、R139、R184 與 DNA 的結合與序列的選擇有極大的關係。

EndoG 序列線性比對與同源性結構模擬

$\beta\alpha$ -Me finger的核酸水解酶大致可分成五大類：(a) *Serratia* nuclease, NucA 以及apoptotic nuclease EndoG；(b) nonspecific DNases 例如ColE7、ColE9、Vvn nuclease以及apoptotic nuclease CAD/DFP40；(c) structure-specific nucleases 例如T4endoVII；(d) type II restriction endonucleases 例如*KpnI*及*McrA*；(e) homing endonucleases 例如 *I-PpoI*及 *I-HmuI*。利用此分類我們選擇具有H-N-H domain 的各類代表性蛋白質與EndoG做線性比對。比對發現這些蛋白質其都在其第一個 β sheet結構上的histidine為參與酵素活性主要胺基酸，而且發現都具有同樣的H-N-H (HNN) 的區域 (見圖 3-8A)。圖 3-8B是利用NucA為模版進行同源性結構模擬所得之EndoG結構 (<http://genesilico.pl/meta/>)，與NucA、*I-PpoI*、Colicin E9 及T4 Endonuclease VII的蛋白質結構比較，其催化核心的結構都與H-N-H型核酸水解很類似 (圖 3-6C、D、E、F)，因此推測EndoG為H-N-H型的核酸水解酶。

第四節 討論

藉著比較已發現的人類 EndoG 序列，這些序列包括染色體 DNA、mRNA、cDNA 及 protein。其中有一組 EndoG 序列上很重要的第 163 個胺基酸從 asparagine 突變成 lysine (accession number X79444; Tiranti et al., 1995)，根據這個結果我們原本認為可能是基因的多型性。但是經過許多的細胞株從染色體 DNA 利用 PCR 放大其 EndoG 的 exon1 拼合 PCR-RFLP 及定序並沒有發現有這個基因型的 EndoG。隨後我們利用定點突變來觀察其酵素活性，將 N163 突變成 K163 後，EndoG K163 的活性幾乎完全被抑制住，由於許多文獻都指出 EndoG 在細胞內扮演著細胞凋亡時使 DNA 片段化的重要酵素，若存在著不活化態的 EndoG 在細胞內將造成重大影響，因此我們推測在 EndoG 的 K163 可能是誤判的結果，所以本研究則主要以 N163 這一型 EndoG 為作野生株。

以 GCG 套裝軟體可以預測到 EndoG 蛋白質具有一個 DRGH 的 DNA/RNA non-specific 核酸水解酶的區域，由預測結果，H141 為其活性的中心。因此推測 EndoG 的活性胺基酸是屬於 histidine 型。為了證明此假設，利用化學修飾作用來進行分析。一般而言，許多的 DNA/RNA non-specific 核酸水解酶如 *E. coli* 的 colicin E7 (Hsia et al., 2004)、CAD/DFP40、*I-PpoI* (Flick et al. 1998) 以及部份的限制酶參與酵素催化的關鍵胺基酸通常是 histidine。因此我們選擇一種會針對 histidine 修飾的化學物質-DEPC 進行反應。DEPC 可以與不同的 nucleophiles (例如 amines、alcohol、thiols、imidazoles、及 guanido group 等) 作用，而產生 carbethoxyl 的衍生物 (Hsiang et al., 1998)。在低 pH 值 (pH 6.0) 的狀況下，DEPC 可以選擇性地針對 histidine 進行修飾，但是少部份也會對 lysine 及 tyrosine 的 hydroxy groups 進行修飾。當 EndoG 被 DEPC 修飾後，可利用核酸水解試驗檢測，接著可以利用 hydroxylamine 回復被修飾的 histidine。因此由結果可得知，被 DEPC 不活化的 EndoG 經 hydroxylamine 回復後，活性幾乎完全回復，證實 histidine 確

實在參與 EndoG 的 活性上扮演重要角色。

將 EndoG 與其它各個物種的蛋白質序列比對，高度保留的 histidine、asparagine 以及 arginine 進行定點突變成 alanine 及 glutamic acid。Alanine 通常作為定點突變所改變成的胺基酸，因為其除了比較小外，在蛋白質結構上所造成的影響也比輕微。在 DEPC 修飾及序列比對的結果都可說明 H141 的重要性，而 EndoG 定點突變株 H141A 呈現幾乎喪失酵素活性現象，因此推測 H141 是參與 EndoG 活性的關鍵胺基酸。另外由酵素動力學的數據，也可以了解到 H141、N163、N172、N251 在 EndoG 當中對於受質的催化具有很大的影響力。由酵素動力學的數據我們只能得知其較具意義的吸附受質速率及催化速率比值，來判讀胺基酸與活性關係。更進一步，還需要討探 EndoG 受質的結合、以及輔酶的結合主要是由哪幾個胺基酸所主導。由於 EndoG 是個很廣泛的核酸水解酵素，而且其切割 DNA 的機制並不是很清楚。本研究在探討 EndoG 突變株與受質結合的關係，曾經嘗試利用 EMSA (electrophoretic mobility-shift assay) 及硝基纖維濾紙結合試驗 (nitrocellulose filter binding assay) 來偵測，但並沒有得到很明顯的結果，因此未來可以朝此一主題為方向，更深入研究哪些胺基酸會負責 EndoG 的受質結合。鎂離子及錳離已被證實可以使 EndoG 達到最佳活性，而在細胞當中則以鎂離子為最多，最有可能為 EndoG 的輔酶。鎂離子在細胞的功能通常當作輔酶並參與蛋白質結構的穩定及催化受質的角色 (Hartwig, 2001)，例如在 DNA 複製及修補路徑的許多蛋白質都有鎂離子作為輔酶 (Barzilay et al., 1995)。一般而言，酵素結合鎂離子的結合位通常是利用酸性的胺基酸 (Hough et al., 1989; Beese et al., 1991; Murphy et al. 1993)。然而，有幾個例外的酵素是利用 histidine 當作其鎂離子的結合位，例如 phosphodiesterase-5 利用 His607 及 His643 直接的與鎂離子結合交互化用來執行其催化的功能 (Francis et al. 2000)；colicin E9 利用 His102 及 His127 當作其鎂離子的結合位，並且還兼具催化的關鍵胺基酸

(Maté et al., 2004)。利用 EndoG 對於鎂離子需求量的試驗 (圖 3-6)，發現 H141A 需要 20mM~40mM 的鎂離子濃度才能達到最佳的活性，反觀野生株與其它突變株其最佳的鎂離子條件大約集中在 0.5~1mM。這個發現不同於先前文獻所推測的 N172 為主要的鎂離子結合位，然而，此結果顯示 EndoG 在鎂離子的結合位是 H141，而 H141 也同時是水解 DNA 的關鍵胺基酸。更進一步以 NucA 為模版並進行 EndoG 的胺基酸序列及結構比對，發現 NucA 在 C 端與鎂離子的第二個結合位 E249 與 EndoG 的 E271 對應 (Ghosh et al. 2005)，接著我們更進一步將 E271 進行點突變成 alanine，進行鎂離子需求量的試驗，意外的發現 EndoG 不只利用 H141 為結合鎂離子主要核心，在 C 端 E271 也具有另外的鎂離子結合位 (圖 3-6)。因此我們推測 EndoG 的 C 端具有某些生物性功能存在，在細胞內 EndoG 的 C 端鎂離子結合位可能與蛋白質與蛋白質交互作用以及訊息傳導有相當大的關聯。

EndoG 最喜好的受質是雙股的 DNA 並且需富含連續的鳥嘌呤 (Guanine, (dG)n) 及胞嘧啶 (Cytosine, (dC)n)，或是單股富含連續胞嘧啶的單股 DNA。而來自疱疹病毒基因的 *a* sequence，亦是 GC 含量很高的一個片斷。pKJH20 質體 DNA 經 *EcoRI* 與 *XbaI* 限制酶切割後形成 2.8 kb 及 1.6 kb，而 *a* sequence 則會存在於 1.6 kb 的片段的邊緣。當 *a* sequence 經過 EndoG 切割後，預期得到 1.3 kb 片段產物。然而，EndoG 突變株 H141A、N163A、N172A 及 N251A 卻喪失了 GC 切割的專一性。大部份的 DNA/RNA non-specific 核酸水解酶，如在原核生物如用來防禦的核酸水解酶 Vvn 以及 ColE7、真核生物體與細胞凋亡的相關核酸水解酶 CAD/DFP40 等，這些核酸水解酶在切割 DNA 時，本身都具有 $\beta\beta\alpha$ -Me 的結構，這個結構上的特定胺基酸會吸附在 DNA 特定序列的 minor groove 再進行切割，(Hsia et al., 2005)。所以導致這些突變株無法專一辨認 GC 序列，可能原因，我們推測是 EndoG 結構改變造成的，或是其主要辨識序列的關鍵性胺基酸被破壞。

在 $\beta\alpha$ -Me 的結構交集具有 H-N-H 的 DNA/RNA non-specific 核酸水解酶，將人類 EndoG 與 NucA (Ghosh et al. 2005)、*I-PpoI* (Flick et al. 1998)、ColE9 (Kuhlmann et al. 1998)、*McrA* (Hiom and Sedgwick, 1991) 以及 T4 endonuclease VII (Raaijmakers et al. 1999) 做蛋白質序列的線性及 3D 結構比對。根據本研究的生化結果拼合生物資訊學數據，我們歸納出 EndoG 在 $\beta\alpha$ -Me 結構及 H-N-H motif 的催化行為。EndoG 序列對應在 H-N-H 上的胺基酸分別是 H141、N163 及 N172，而 EndoG 第 141 個 histidine 是主要催化胺基酸也與其它比對的核酸水解酶符合而且高度保留，但比較特別的是 EndoG 的第 141 個 histidine 亦是鎂離子的結合位不同於其它核酸水解酶 (見圖 3-8A)。由於 EndoG 結構尚未被解出來，所以我們利用 homology modeling 的方式，經分析 EndoG 與目前已在 protein data bank 有發表的結構最相似的是 NucA。因此利用 NucA 為模版進行同源性結構模擬再與其它核酸水解酶做比對，圖 3-8A 中黑色結構所代表 $\beta\alpha$ -Me 結構，H-N-H 位置皆形成很相近的空間結構，而且這些核酸水解酶吸附 DNA 及水解 DNA 皆在此 V 字形的凹槽結構內，並由 H-N-H 執行催化的功能。EndoG 從功能與切割行為到二級及三級結構，都與這些 H-N-H 的核酸水解酶相似，因此我們推論 EndoG 也是一個屬於 H-N-H 型的核酸水解酶。

綜合以上研究結論，EndoG 在基因層面觀察，即很特殊的跟其它反向轉錄的基因重疊，而且另一個有趣的議題如蛋白質的轉運、修飾及儲存也是未知的。在蛋白質功能上則很奇特的在 H141 及 C 端 E271 發現兩個鎂離子結合，以及某些胺基酸會影響到酵素專一性等。未來我們將以 EndoG 在 C 端的第二個位 E271 主要是扮演什麼功能；EndoG 以哪些關鍵胺基酸與 DNA 結合及序列的辨識等問題更深入的探討以了解 EndoG 基本的功能結構，進而解釋在體內的功能扮演角色。

表 3-1. 本研究的定點突變所使用之 DNA 引子。

Primers used for mutagenesis	
R110A	5'-GCACTCTCGAGCGTCGCCGTCGCCGCGGAGACG-3'
R139A	5'-CAGGTGGCCGGCGTCGAAGCCACTGCCGCGG-3'
R184A	5'-TCAAGCTTGCGCTATATTTCTCCAGGTTGTTCC-3'
R272A	5'-CAGCCCTGAGGCCGCCTCAATGCTCTCGATGGGCACC-3'
N163A	5'-GGGGCGCTACAGCGCTCAGGTAGAACGTGTCGTCC-3'
N163K	5'-CACCTGGGGCGCGACCTTGCTCAGGTAGAAC-3'
N172A	5'-CATTCTGCGCAAGGTGGGGCACCTGGGGCGCG-3'
N251A	5'-AGGTGCTGCAGGCATCACGTAGGTGCGGAGC-3'
H141A	5'-GCGGGCATTGGCTGCGGCGGCCAGGTGACC-3'
H141D	5'-GGCCAGATCTCCGCGGTCGAAGCCACTGCCGC-3'
H228A	5'-TTGAAGAATGCTGTGGGCACTGCCACGTGG-3'
H228D	5'-GAAGAAGTCTGTAGGCACTGCCACGTGGTTCTTGCC-3'
E271A	5'-CGAAGCCCGAGCAATGCTCTCGATGGGCACCAGG-3'

表 3-2. EndoG 點突變株之 Steady-state kinetic 數據。

EndoG variants	Km (nM)*	Kcat (S ⁻¹)*	Kcat/Km (S·nM ⁻¹)*
Wild type	18.72±1.84	0.07±0.01	3.58x10 ⁻³ ±3.11x10 ⁻⁴
H141A	12.93±2.17	2.48x10 ⁻⁶ ±4.34x10 ⁻⁷	1.96x10 ⁻⁷ ±4.78x10 ⁻⁸
H141D	1.94±0.05	9.68x10 ⁻⁶ ±2.59x10 ⁻¹³	5.03x10 ⁻⁶ ±1.72x10 ⁻⁷
H228A	6.01±1.88	5.34x10 ⁻³ ±2.71x10 ⁻³	8.61x10 ⁻⁴ ±1.81x10 ⁻⁴
H228D	5.70±0.33	4.74x10 ⁻⁴ ±1.78x10 ⁻⁵	8.33x10 ⁻⁵ ±1.75x10 ⁻⁶
R110A	-	-	-
R139A	1.01±0.03	2.77x10 ⁻⁵ ±4.44x10 ⁻⁷	2.75x10 ⁻⁵ ±1.47x10 ⁻⁶
R184A	1.53±0.02	7.68x10 ⁻³ ±3.27x10 ⁻¹⁰	5.03x10 ⁻⁴ ±1.91x10 ⁻⁵
R272A	2.30±0.20	3.67x10 ⁻³ ±9.23x10 ⁻⁵	1.61x10 ⁻³ ±9.96x10 ⁻⁵
N163K	12.10±2.03	2.35x10 ⁻⁶ ±1.85x10 ⁻⁷	1.99x10 ⁻⁷ ±1.61x10 ⁻⁸
N163A	8.51±2.28	7.52x10 ⁻⁶ ±1.41x10 ⁻⁶	9.05x10 ⁻⁷ ±7.67x10 ⁻⁸
N172A	8.75±0.13	3.77x10 ⁻⁵ ±4.26x10 ⁻⁸	4.31x10 ⁻⁶ ±5.95x10 ⁻⁸
N251A	3.13±0.37	3.15x10 ⁻⁶ ±5.68x10 ⁻¹⁴	1.02x10 ⁻⁶ ±6.64x10 ⁻⁸
E271A	-	-	-
H141A/H228A	8.06±1.92	1.18x10 ⁻⁷ ±1.26x10 ⁻⁸	1.48x10 ⁻⁸ ±1.98x10 ⁻⁹

*表示：資料平均值 ± 三次重覆試驗之標準差。

- 表示無法分析。

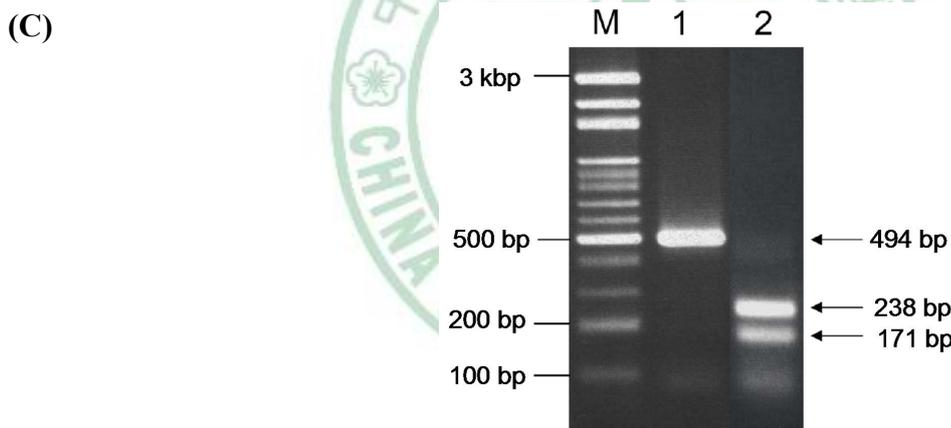
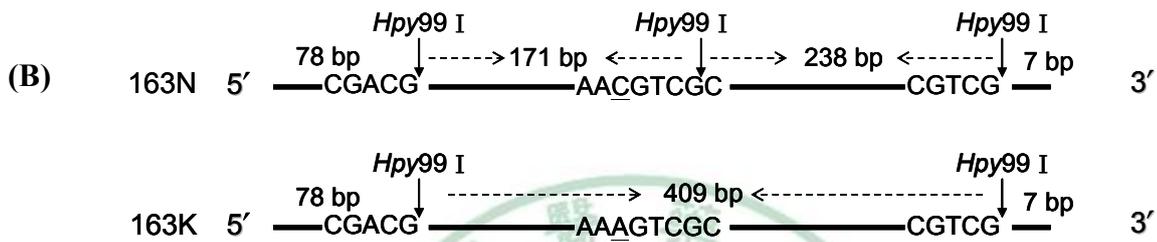
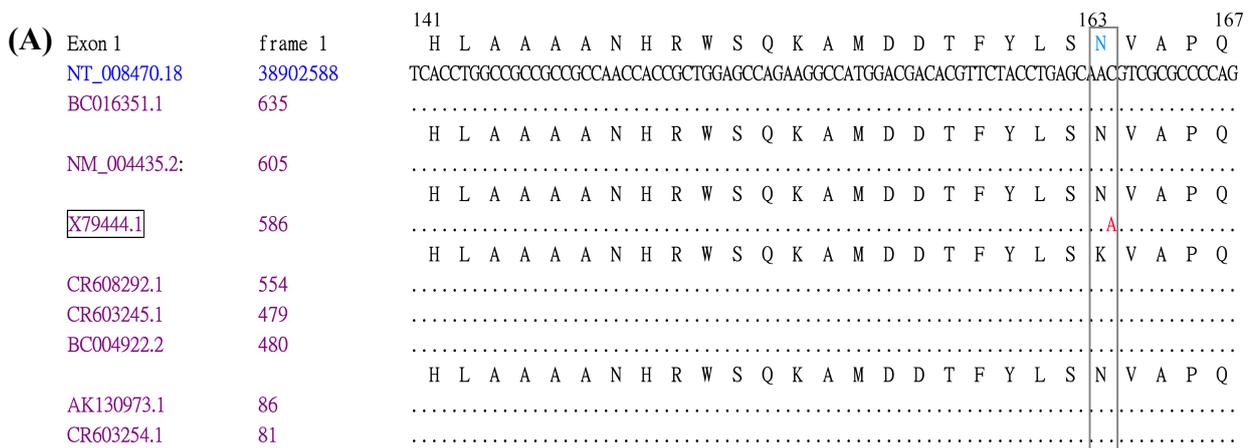
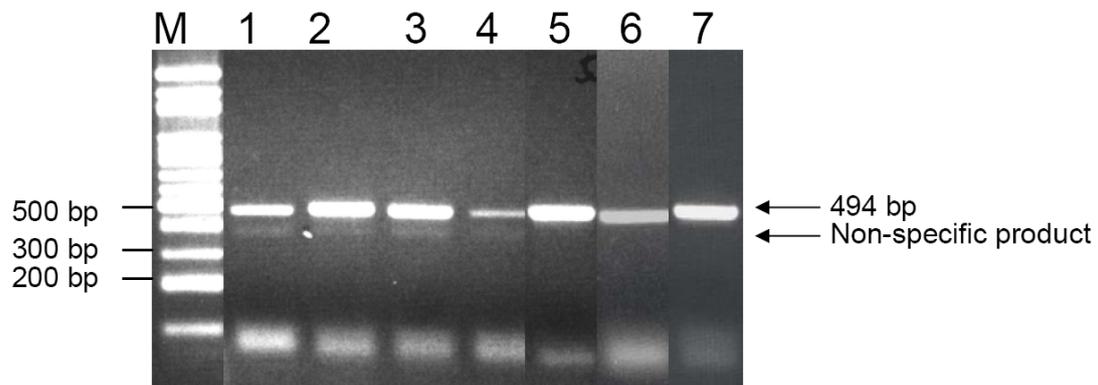


圖 3-1 (A) EndoG exon1 部分基因及蛋白質序列比對。在第 163 的胺基酸位置，accession number X79444 的序列的胞嘧啶 (cytosin, C) 點突變為腺嘌呤 (adenine, A) 造成由 asparagine (N) 改變成 lysine (K)。(B) 利用限制酶 *Hpy99I* 確認 EndoG 的第 163 個胺基酸對應的核苷酸序列。(C) 利用 Exon1-P (5'-TGCTGTGCTACGACCCGCGCACCC-3') 及 Exon1-M (5'-CCCGTGGAGGGA CTCGCAGCGAAAGGA-3') 為引子，Lane1 為 EndoG exon1 的 PCR 產物 494 bp，Lane 2 為經過 *Hpy99I* 限制酶切割確認為 N163 產分別為 238 bp 及 171 bp，M 為 marker。

(A)



(B)

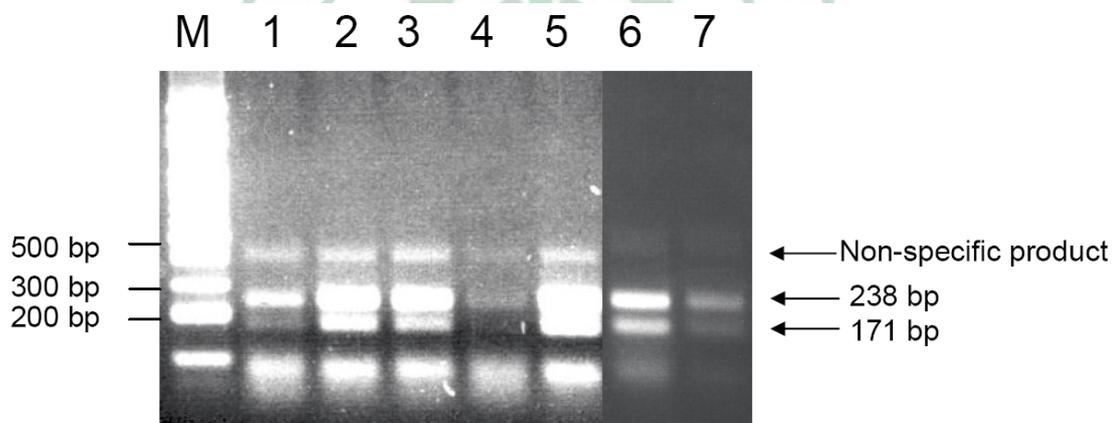
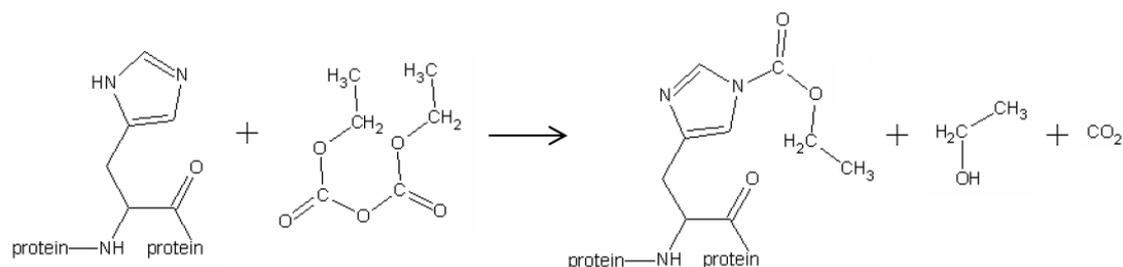


圖 3-2 (A) 各種組織細胞染色體 DNA 上 EndoG exon1 的 PCR 產物 494 bp。 (B) 利用限制酶 *Hpy99I* 確認 EndoG exon 1 上第 163 個胺基酸對應的核苷酸序列。 Lanes 1~7 分別為 HeLa、Hs68、HL60、Caco-2、Detroit 551、C3A 及 Chang liver 細胞株。

Human	~mralragl	tlalgaglga	vvegwrre	daraapglg	rlpvlpva	aelppvpggp	r..gpg...	62
Bovine	~mqllragl	tlalgaglga	aaeswrrra	daratpglls	rlpvlpva	aglpavpgap	agggpg...	64
Mouse	~mralragl	tlalgaglga	aaehwrrreg	ka...pgllg	rvpllpv.va	adlpalpggp	a.ggtg...	59
Rat	~mralragl	tlalgaglga	aaehwrrreg	kg...pgllg	rvpvlpv.va	adlpalpggp	a.gstg...	59
Nematoda	~migkvag.	taai.agisf	lagkysnddl	pifrnvsat	nvpmniqvs	epmtvkpasl	nadamgpsrs	66
<i>S. cerevisiae</i>	mcsrills.g	lvlgagtgl	ty...lllnkh	sptqie.tp	.ypptq.kpn	sniqs.hsf.nvdp	56
<i>S. pombe</i>	mssnliksg	liaigaisgv	tfthfyykgy	qgsdvpdtp	rytkfd.sag	ralesiydf.na..	60
Consensus	-----	-----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Human	.elakyglpg	.laqlksres	yvlcydprtr	galwvveqlr	perlr.gdg.	drrecdfred	dsvhayhrat	128
Bovine	.elakyglpg	.vaqlksras	yvlcydprtr	galwvveqlr	peglr.gdg.	nrscdfhed	dsvhayhrat	130
Mouse	.elakyglpg	.vaqlrsres	yvlcydprtr	galwvleqlr	perlr.gdg.	drsacdfred	dsvhayhrat	125
Rat	.elakyglpg	.vaqlrsres	yvlcydprtr	galwvleqlr	perlr.gdg.	dracdfhed	dsvhayhrat	125
Nematoda	aeimkhgypg	.ftnvrtyed	fvlsydyktr	tahwvcehlt	perlkhaegv	drklcefcpd	itfpqkflsq	135
<i>S. cerevisiae</i>	sgffkygpg	pihdlqnree	fiscynrtq	npywlehit	peslaarna.	drknsffked	evipekfrgk	125
<i>S. pombe</i>	tkffqygipg	pvadqrnhg	ymsvdrtr	npfytaetit	qeslnqrkg.	nrysefvpd	dnipemfqak	129
Consensus	-----G-PG-----	-----T-----	-----E-----	-E-L-----	-R-----F-D-----	-----	-----	
Human	nadyrgsgfd	rglaaaanh	rwsqkamddt	fylskvapqv	ph.lnqnawn	nlekysrslt	rsyqnyvct	197
Bovine	nadyrgsgfd	rglaaaanh	rwsqkamddt	fylnsvapqv	ph.lnqnawn	nlekysrslt	rtyqnyvct	199
Mouse	nadyrgsgfd	rglaaaanh	rwsqkamddt	fylnsvapqv	ph.lnqnawn	nlekysrslt	rtyqnyvct	194
Rat	nadyrgsgfd	rglaaaanh	rwsqkamddt	fylnsvapqv	ph.lnqnawn	nlekysrslt	rtyqnyvct	194
Nematoda	ntdykcsbfd	rglaaaanh	rksqlavdqt	fylnsmcpqv	grgfnrdkwn	dlemhcrva	kkmysyit	205
<i>S. cerevisiae</i>	lrdyfrsgyd	rglqapaada	kfsqqamddt	fylnmcpqv	gegfnrdywa	hleyfcrilt	kkyksvrit	195
<i>S. pombe</i>	lgdyrgsgyd	rglqvpaadc	kfsqeamnet	fylnmcpqv	gdgfnrnywa	yfedwcrilt	skygsvtimt	199
Consensus	--DY--SG-D	RGH--A--	--SQ-A--T	FYLS--PQV	--N--W	--E--R--	-----T	
Human	gplflp.rte	adgksyvkyq	vigk.nhvav	pthffkvlil	eaag.....	..gqielrty	vmpnapvdea	257
Bovine	gplflp.rte	adgksyvkyq	vigk.nhvav	pthffkvlil	eaag.....	..gqielrty	vmpnapvdea	259
Mouse	gplflp.rte	adgksyvkyq	vigk.nhvav	pthffkvlil	eaag.....	..gqielrty	vmpnapvdea	254
Rat	gplflp.rte	adgksyvkyq	vigk.nhvav	pthffkvlil	eaas.....	..gqielrty	vmpnapvdea	254
Nematoda	gplylp.kle	gdgkkyikyq	vigd.nnvav	pthffkvalf	evtp.....	..gkfelesy	ilpnaviedt	265
<i>S. cerevisiae</i>	gplylpkkdp	idnkfrvnye	vignppsiav	pthffkliva	e...aptanp	arediavaaf	vlpnepisne	262
<i>S. pombe</i>	gplylpkkne	.rgqwevqyr	vignppnvav	pthffkviia	eksgeptsspsvaaf	vlpnkpiadn	263
Consensus	GPL-LP----	-----Y-	VIG-----AV	PTHFFK----	E-----	-----	--PN-----	
Human	iplerflvpi	esierasgll	fvpnilarag	slkaita.gs	k~~~~~	~~~~~	~~~~~	297
Bovine	iplehflvpi	esierasgll	fvpnilarag	slkaita.gs	k~~~~~	~~~~~	~~~~~	299
Mouse	iplerflvpi	esierasgll	fvpnilarag	nlkaita.gs	k~~~~~	~~~~~	~~~~~	294
Rat	lplerflvpi	esierasgll	fvpnilarag	nlkaita.gs	k~~~~~	~~~~~	~~~~~	294
Nematoda	veiskfhvpl	daversagl.	...eifarld	pkshivkenga	kkggllw	~~~~~	~~~~~	308
<i>S. cerevisiae</i>	tkltdfevpi	dalerstgle	llqkv..pps	kkkalckevn	cqivvrdf.s	naaikqskdv	kllpppkkrn	329
<i>S. pombe</i>	fplknfavpv	everasgle	ilsnv..pkg	nrkqlcsevv	cqlnvkefve	svkqkqnag	k~~~~~	322
Consensus	-----F-VP-	-----ER--GL-	-----	-----	-----	-----	-----	

圖 3-3 EndoG 與其它物種多重線性比對。EndoG 蛋白質多重線性比對序列分別來自於 bovine、mouse、rat、nematoda (*Caenorhabditis elegans*)、budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 以及 fission yeast (*Schizosacharamyces pombe*) 等物種。Consensus 代表該位置胺基酸完全相同；粗體黑字表示催化關鍵性胺基酸。

(A)



(B)

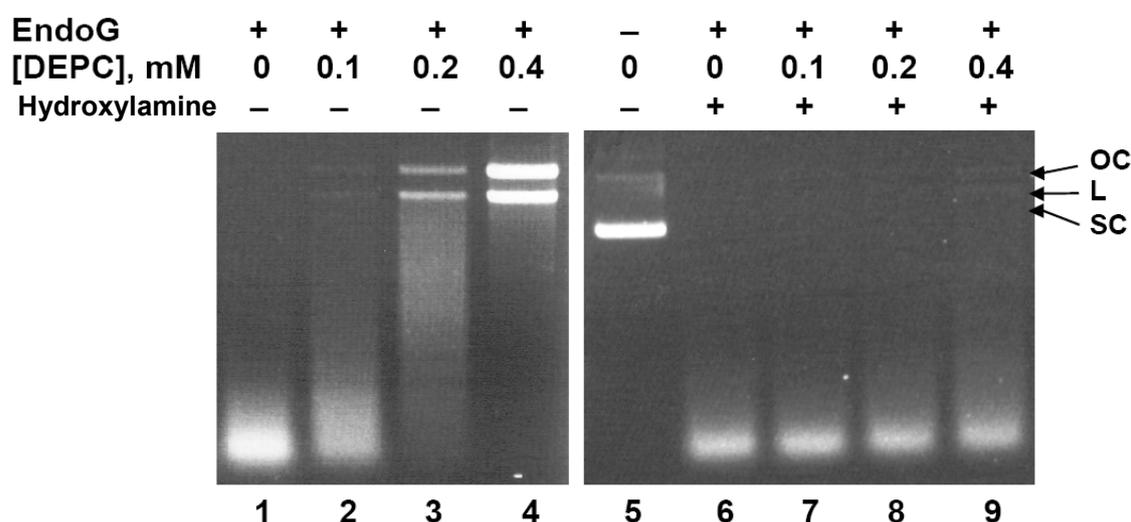
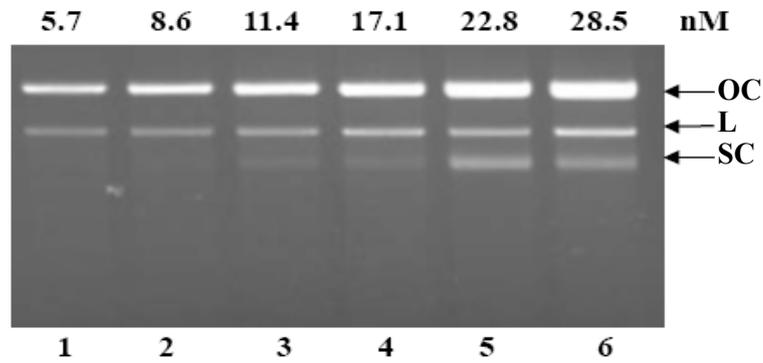


圖 3-4 重組人類 EndoG 的化學修飾。(A) Histidine 經過 DEPC 修飾後的產物。

(B) 將 EndoG (0.2 pmol) 與幾個不同濃度的 DEPC 在 25 °C 下反應 30 分鐘後，利用標準的 EndoG 活性測試分析經過 DEPC 修飾後的 EndoG 活性 (Lanes 1~4)。接著加入 20 mM hydroxylamine 在 4 °C 反應 5 小時還原 DEPC 修飾過的胺基酸，並測還原後 EndoG 的活性 (Lane 6~9)，Lane 5 為控制組不含 EndoG。箭頭所指為不同構形的 pUC18 載體。OC: open circular; L: linear; SC: supercoiled.

(A)



(B)

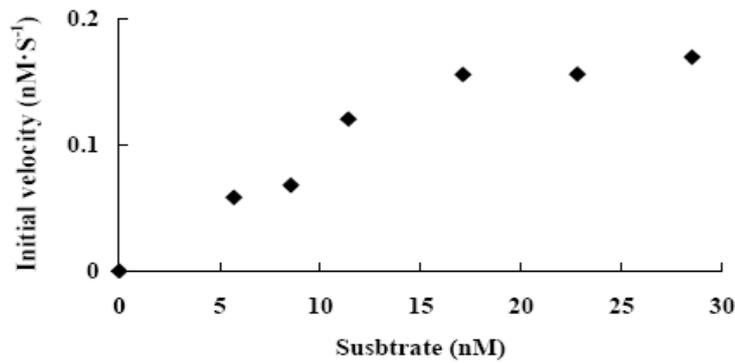


圖 3-5 人類 EndoG 酵素動力學的分析。(A) 將 EndoG (5 nM) 與幾個不同濃度的 supercoiled pUC18 dsDNA 在適當的緩衝液中 37 °C 反應 3 分鐘。所得到的結果以 1.2 % 膠體電泳分析。箭頭所指為不同構形的 pUC18 載體，OC: open circular; L: linear; SC: supercoiled。(B) EndoG 水解 DNA 的起始速率隨著受質濃度增加。利用此曲線關係利用 Michaelis-Menten 方程式計算可得 Steady-state kinetic 參數。

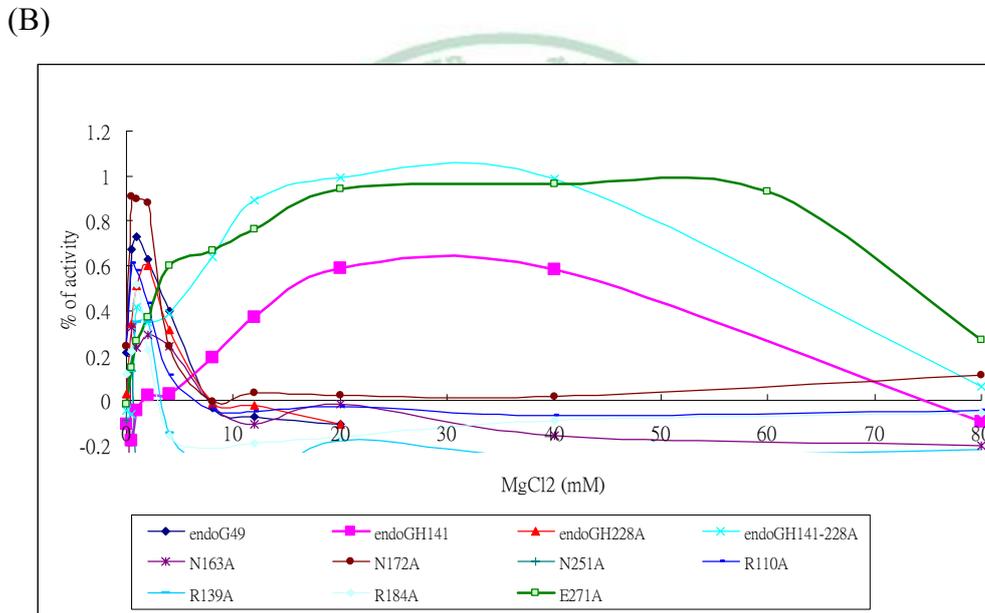
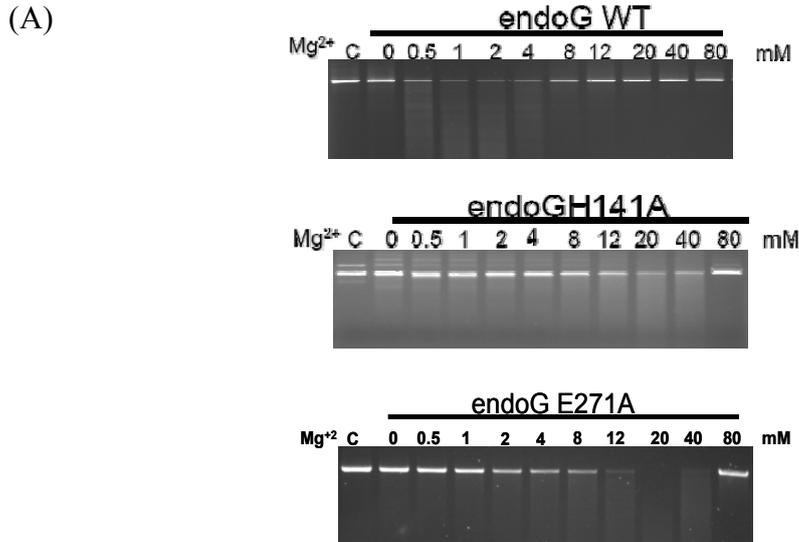


圖 3-6 EndoG 突變株的鎂離子需求量。 (A) 此反應每個試管含 0.1 μg pUC18 dsDNA 及不同的突變株，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中反應。不同突變株加入的蛋白質濃度及反應時間隨著酵素活性而不一樣，如下：wild type 0.05 pmol，10 分鐘；R110A 4.5 pmol，30 分鐘；R139A 4 pmol，2 小時；R184A 4 pmol，10 分鐘；N163A 6.5 pmol，3 小時；N172A 10 pmol，12 小時；N251A 10 pmol，72 小時；H228A 0.2 pmol，10 分鐘；H141A 15 pmol，86 小時；H141A/228A 15 pmol，86 小時；E271A 5 pmol，20 分鐘。最後所得結果再以 1.2 % 膠體電泳分析 (部份資料展現)。(B) 膠體電泳分析之密度掃描定量曲線。

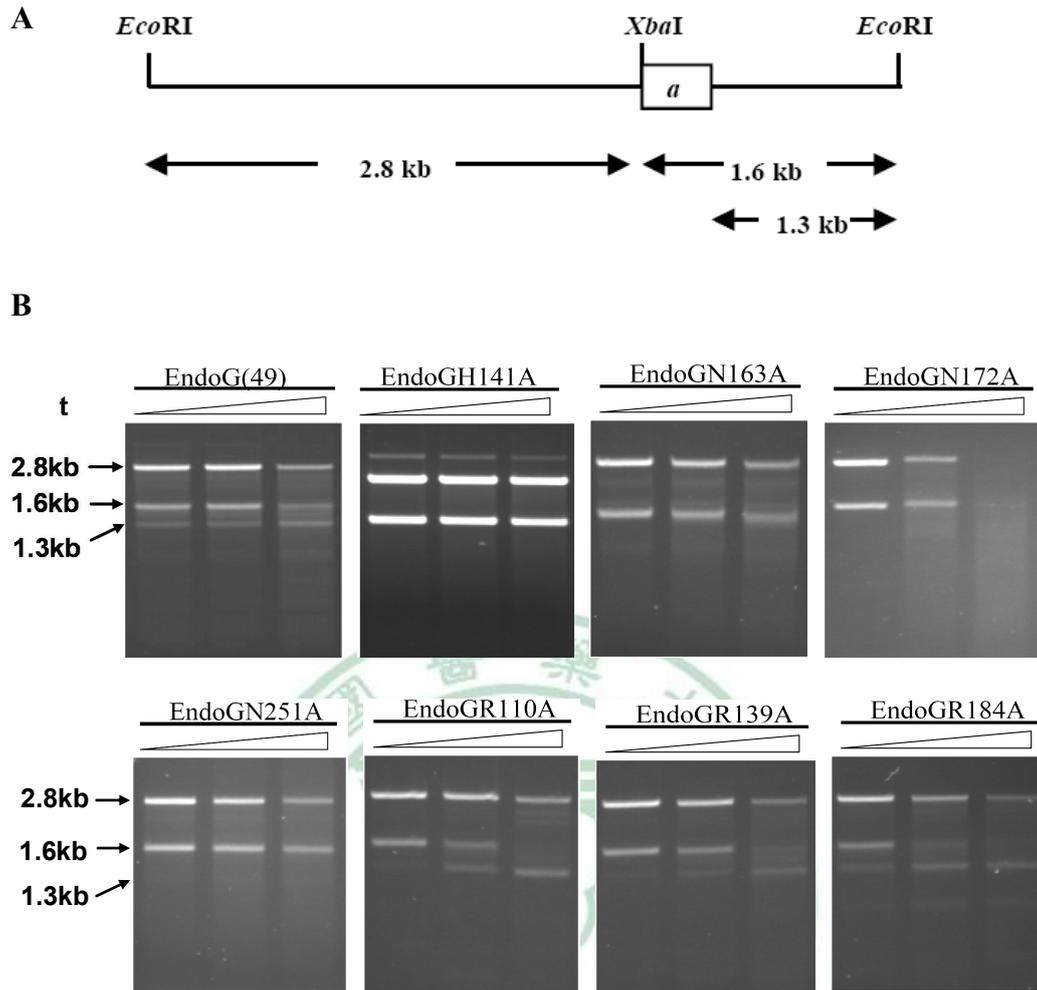


圖 3-7 EndoG 突變株對於 *a* sequence 切割的專一性。 (A) 受質的製備將 pKJH20 質體 DNA 經 *EcoRI* 與 *XbaI* 限制酶切割後形成 2.8 kb 及 1.6 kb，當經過 EndoG 切割 *a* sequence 後，預期得到 1.3 kb 片段產物。 (B) 將經過 *EcoRI/XbaI*-treated pKJH20 受質取 0.2 μ g 與 EndoG 的突變株在 37 $^{\circ}$ C 反應，其條件為：野生株 EndoG (49) 1 pmole 時間為 1、5、10 分鐘；H141A 7 pmole 時間為 4、8、12 小時；N163A 10 pmole 時間為 2、4、8 小時；N172A 15 pmole 時間為 12、24、36 小時；N251A 15 pmole 12、36、48 小時；R110A 4.5 pmole 時間為 5、10、15 分鐘；R139A 10 pmole 時間為 30、60、90 分鐘；R184A 2 pmole 時間為 10、20、30 分鐘。結果以 1.2% 膠體電泳分析。t 代表時間，箭頭所指 2.8 kb 及 1.6 kb 為起始受質，1.3 kb 為產物。

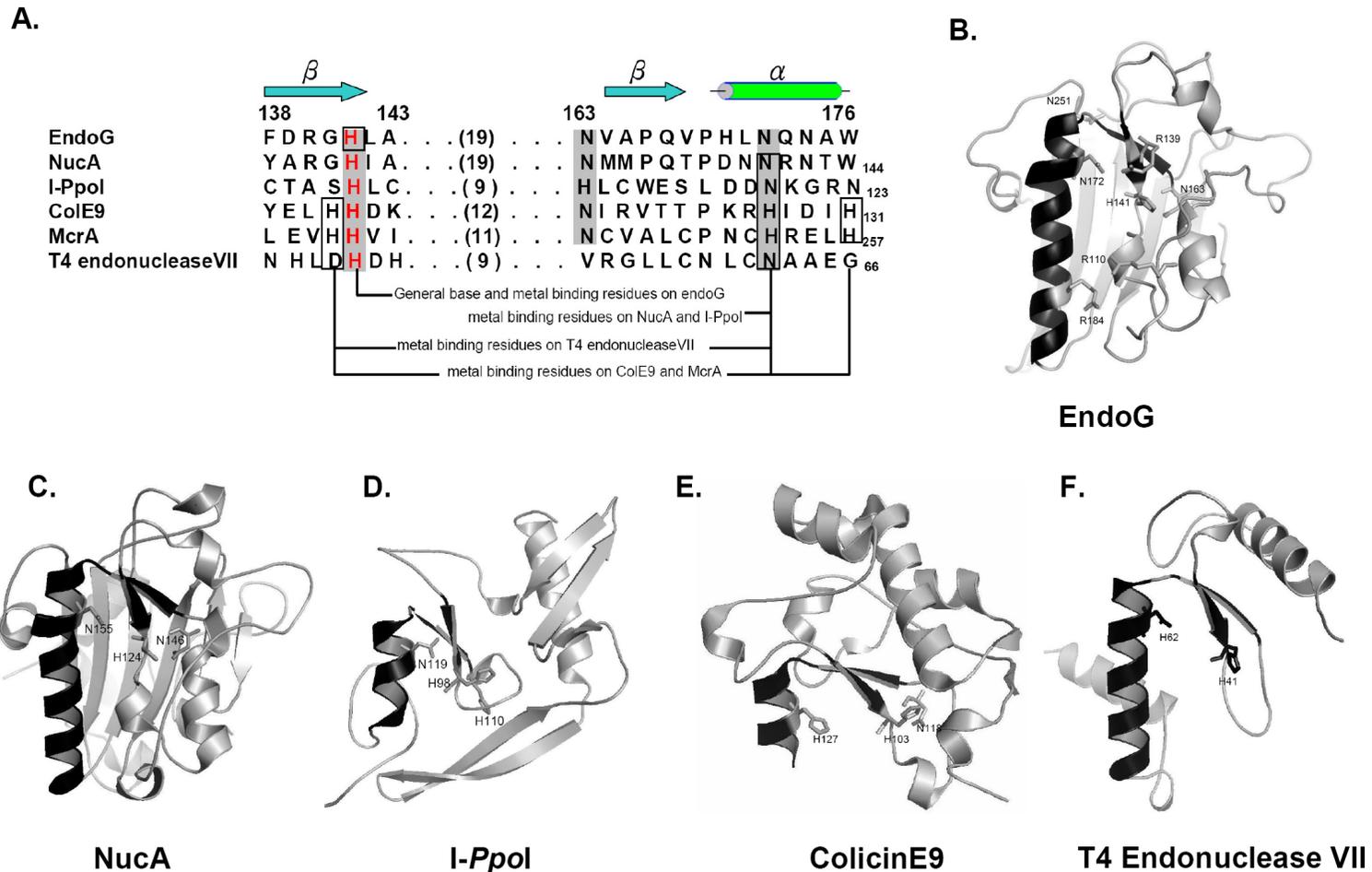


圖 3-8 (A) EndoG與其它H-N-H核酸水解酶蛋白質序列的線性比對，包含non-specific endonuclease NucA (Ghosh et al. 2005)、group I homing endonuclease *I-PpoI* (Flick et al. 1998)、non-specific DNase colicin ColE9 (Kuhlmann et al. 1998)、restriction enzyme *McrA* (Hiom and Sedgwick, 1991)、structure specific nuclease T4 endonucleaseVII (Raaijmakers et al. 1999)。灰色背景表示高度保留胺基酸；方格圈選表示負責鎂離子結合之胺基酸；紅色表示催化核心胺基酸。(B) 利用NucA為模版進行同源性結構模擬所得之EndoG結構。蛋白質結構模擬經由GeneSilico metaserver (<http://genesilico.pl/meta>) 取得。(C) (D) (E) (F) 分別為NucA、*I-PpoI*、ColicinE9、T4 Endonuclease VII的蛋白質結構，黑色結構代表的是 $\beta\alpha$ -Me結構。(資料來源：protein data bank, <http://www.rcsb.org>)

參考文獻

- Alani, E., Padmore, R., Klecker N. (1990) Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell*. 61: 419-436.
- Arnone, A., Bier, C. J., Cotton, F. A., Day, V. W., Hazen, E. E., Richardson, D. C., Yonath, A., Richardson, J. S. (1971) A high resolution structure of an inhibitor complex of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. I. Experimental procedures and chain tracing. *J. Biol. Chem.* 246: 2302-2316.
- Baril, E., Mitchener, J., Lee L., Baril, B. (1977) Action of pancreatic DNase: requirements for activation of DNA as a template-primer for DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 4: 2641-2653.
- Barzilay, G., Mol, C. D., Robson, C. N., Walker, L. J., Cunningham, R. P., Tainer, J.A., Hickson, I. D. (1995) Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nat. Struct. Biol.* 2: 561-568.
- Beese, L. S. and Steitz, T. A. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.* 10: 25-33.
- Cheng, Y. S., Hsia, K. C., Doudeva, L. G., Chak, K. F., Yuan, H. S. (2002) The crystal structure of the nuclease domain of ColE7 suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA by the H-N-H endonucleases. *J. Mol. Biol.* 324: 227-236.
- Chevalier, B. S. and Stoddard, B. L. (2001) Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res.* 29: 3757-3774.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid

- guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Cote, J. and Ruiz-Carrillo, A. (1993) Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science.* 261: 765-769.
- Cote, J. and Ruiz-Carrillo, A. (1993) Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science.* 261: 765-769.
- Dalgaard, J. Z., Moser, M. J., Klar, A. J., Holley, W. R., Chatterjee, A., Mian, I. S. (1997) Statistical modeling and analysis of the LAGLIDADG family of site-specific endonucleases and identification of an intein that encodes a site-specific endonuclease of the HNH family. *Nucleic Acids Res.* 25: 4626-4638.
- David, K. K., Sasaki, M., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L. (2006) EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death Differ.* 13: 1147-1155.
- Flick, K. E., Jurica, M. S., Monnat, R. J. Jr., Stoddard, B. L. (1998) DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-PpoI. *Nature.* 394: 96-101.
- Focareta, T. and Manning, P. A. (1991) Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system. *Mol. Microbiol.* 5: 2547-2555.
- Francis, S. H., Turko, I. V., Grimes, K. A., Corbin, J. D. (2000) Histidine-607 and histidine-643 provide important interactions for metal support of catalysis in phosphodiesterase-5. *Biochemistry.* 39: 9591-9596.
- Gerschenson, M., Houmiel, K. L., Low, R. L. (1995) Endonuclease G from mammalian nuclei is identical to the major endonuclease of mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 23: 88-97.

- Ghosh, M., Meiss, G., Pingoud, A., London, R. E., Pedersen, L. C. (2005) Structural insights into the mechanism of nuclease A, a betabeta alpha metal nuclease from *Anabaena*. *J. Biol. Chem.* 280: 27990-27997.
- Gorbalenya, A. E. (1994) Self-splicing group I and Group II introns encode homologous putative DNA endonucleases of a new family. *Protein Sci.* 3: 1117-1120.
- Hahn, H. P., Pang, M., He, J., Hernandez, J. D., Yang, R. Y., Li, L. Y., Wang, X., Liu, F. T., Baum, L. G. (2004) Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. *Cell Death Differ.* 11: 1277-1286.
- Hartwig, A. (2001) Role of magnesium in genomic stability. *Mutat. Res.* 475: 113-121. Review.
- Ho, T. Y., Wu, S. L., Hsiang, C. H., Chang, T. J., Hsiang, C. Y. (2000) Identification of a DNA-binding domain and an active-site residue of pseudorabies virus DNase. *Biochem. J.* 346: 441-445.
- Hood, D. A., Adhietty, P. J., Colavecchia, M., Gordon, J. W., Irrcher, I., Joseph, A. M., Lowe, S. T., Rungi, A. A. (2003) Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35: 86-94.
- Hsia, K. C., Chak, K. F., Liang, P. H., Cheng, Y. S., Ku, W. Y., Yuan, H. S. (2004) DNA binding and degradation by the HNH protein ColE7. *Structure.* 12: 205-214.
- Hsia, K. C., Li, C. L., Yuan, H. S. (2005) Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 126-134. Review.
- Hsiang, C. Y., Ho, T. Y., Hsiang, C. H., Chang, T. J. (1998) Recombinant pseudorabies

- virus DNase exhibits a RecBCD-like catalytic function. *Biochem. J.* 330: 55-59.
- Huang, K. J., Zemelman, B. V., Lehman, I. R. (2002) Endonuclease G, a candidate human enzyme for the initiation of genomic inversion in herpes simplex virus type 1 virus. *J. Biol. Chem.* 277: 21071-21079.
- Ikeda, K., Inoue, S., Amasaki, C., Teshima, K., Ikezawa, H. (1991) Kinetics of the hydrolysis of monodispersed and micellar phosphatidylcholines catalyzed by a phospholipase C from *Bacillus cereus*. *J. Biochem. (Tokyo)* 110: 88-95.
- Ikeda, S. and Ozaki, K. (1997) Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 291-294.
- Irvine, R. A., Adachi, N., Shibata, D. K., Cassell, G. D., Yu, K., Karanjawala, Z. E., Hsieh, C. L., Lieber, M. R. (2005) Generation and characterization of endonuclease G null mice. *Mol. Cell. Biol.* 25: 294-302.
- Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W. T., Widlak, P. (2005) Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis.* 10: 821-830.
- Kunkel, T. A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 488-492.
- Lemarie, A., Lagadic-Gossmann, D., Morzadec, C., Allain, N., Fardel, O., Vernhet, L. (2004) Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1517-1531.
- Li, C. L., Hor, L. I., Chang, Z. F., Tsai, L. C., Yang, W. Z., Yuan, H. S. (2003) DNA

- binding and cleavage by the periplasmic nuclease Vvn: a novel structure with a known active site. *EMBO J.* 22: 4014-4025.
- Li, L. Y., Luo, X., Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412: 95-99.
- Mate, M. J. and Kleanthous, C. (2004) Structure-based analysis of the metal-dependent mechanism of H-N-H endonucleases. *J. Biol. Chem.* 279: 34763-9.
- Mehta, P., Katta, K., Krishnaswamy, S. (2004) HNH family subclassification leads to identification of commonality in the His-Me endonuclease superfamily. *Protein Sci.* 13: 295-300.
- Miller, M. D., Tanner, J., Alpaugh, M., Benedik, M. J., Krause, K. L. (1994) 2.1 Angstrom structure of Serratia endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Nat. Struct. Biol.* 1: 461-468.
- Murphy, J. E., Xu, X., Kantrowitz, E. R. (1993) Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by a single amino acid substitution in Escherichia coli alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 268: 21497-21500.
- Ohsato, T., Ishihara, N., Muta, T., Umeda, S., Ikeda, S., Mihara, K., Hamasaki, N., Kang, D. (2002) Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur. J. Biochem.* 269: 5765-5770.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature.* 412: 90-94.
- Raaijmakers, H., Vix, O., Toro, I., Golz, S., Kemper, B., Suck, D. (1999) X-ray structure of T4 endonuclease VII: a DNA junction resolvase with a novel fold and unusual domain-swapped dimer architecture. *EMBO J.* 18: 1447-1458.

- Ruiz-Carrillo, A. and Renaud, J. (1987) Endonuclease G: a (dG)_n X (dC)_n-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO J.* 6: 401-407.
- Schäfer, P., Scholz, S. R., Gimadutdinow, O., Cymerman, A., Bujnicki, J. M., Ruiz-Carrillo, A., Pingoud, A., Meiss, G. (2004) Structural and functional characterization of mitochondrial endoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J. Mol. Biol.* 338: 217-228.
- Schäfer, P., Scholz, S. R., Gimadutdinow, O., Cymerman, I. A., Bujnicki, J. M., Ruiz-Carrillo, A., Pingoud, A., Meiss, G. (2004) Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J. Mol. Biol.* 338(2): 217-228.
- Shub, D. A., Goodrich-Blair, H., Eddy, S. R. (1994) Amino acid sequence motif of group I intron endonucleases is conserved in open reading frames of group II introns. *Trends. Biochem. Sci.* 19: 402-404.
- Sirover, M. A. and Loeb, L. A. (1977) On the fidelity of DNA replication. Effect of metal activators during synthesis with avian myeloblastosis virus DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 252: 3605-3610.
- Takahashi, T., Irie, M., Ukita, T. (1967) Effect of divalent cations on bovine pancreatic ribonuclease. *J. Biochem. (Tokyo)* 61: 669-678.
- Tiranti, V., Rossi, E., Ruiz-Carrillo, A., Rossi, G., Rocchi, M., DiDonato, S., Zuffardi, O., Zeviani, M. (1995) Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics.* 25: 559-564.
- Volbeda, A., Lahm, A., Sakiyama, F., Suck, D. (1991) Crystal structure of Penicillium

- citrinum P1 nuclease at 2.8 Angstrom resolution. *EMBO J.* 10:1607-1618.
- Welsh, K. M., Lu, A. L., Clark, S., Modrich, P. (1987) Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutH gene product. *J. Biol. Chem.* 262: 15624-15629.
- Widlak, P. and Garrard, W. T. (2001) Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD. *Mol. Cell. Biochem.* 218: 125-130.
- Widlak, P., Li, L.Y., Wang, X., Garrard, W.T. (2001) Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatic substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J. Biol. Chem.* 276: 48404-48409.
- Wilson, D. M. (2005) Ape1 abasic endonuclease activity is regulated by magnesium and potassium concentrations and is robust on alternative DNA structures. *J. Mol. Biol.* 345: 1003-1014.
- Zhang, J., Dong, M., Li, L., Fan, Y., Pathre, P., Dong, J., Lou, D., Wells, J. M., Olivares-Villagomez, D., Van Kaer, L., Wang, X., Xu, M. (2003) Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 15782-15787.

作者簡歷

姓名：李佳橙

民國 71 年 7 月 22 日生

出生地：彰化縣

學歷：

彰化縣立大同國民小學畢

彰化縣立伸港國民中學畢

雲林縣私立崇先高級中學畢

私立中國醫藥大學醫事技術學系畢

私立中國醫藥大學醫學研究所碩士班畢

