

東海大學生命科學系
博士論文

指導教授:范聖興博士

Advisor: Dr. Seng-Sheen Fan

果蠅king tubby (ktub) 基因參與光線誘導視紫紅質
內胞飲作用和感光細胞退化

Drosophila king tubby (ktub) mediates light- induced
rhodopsin endocytosis and retinal degeneration

研究生:陳淑芬

Shu-Fen Chen

中華民國 102 年 1 月 11 日

中文摘要

Tubby(*tub*)和 *tubby like protein*(*tulp*)基因歸類成一個小家族，此家族基因的功能還不是很清楚。但在許多生物體，包括植物和動物都可以發現此家族蛋白。*Tub* 和 *Tulps* 的 C 端胺基酸序列中含高度保留的區域稱之為 *tubby domain*。過去的研究發現這個家族基因發生突變時會導致疾病特徵，包含視網膜神經退化和晚期肥胖。本篇研究中我們發現果蠅 *king tubby* (*ktub*)參與反應光線刺激的 rhodopsin (*Rh1*) 內胞飲過程中。細胞免疫染色結果顯示，在暗環境時 *Ktub* 表現分佈位於感光細胞桿小體區域(*rhabdomere domain*)，當果蠅受到光線刺激時原先位於桿小體分佈消失，*Ktub* 從桿小體分佈到細胞質和細胞核。進一步研究顯示，野生型果蠅感光細胞短時間光線刺激下細胞質會形成 *Rh1* 內胞飲囊泡(*Rh1-immunopositive large vesicles*; *RLVs*)，然而 *ktub* 突變果蠅感光細胞在光線誘導下感光細胞質 *RLVs* 形成很少，大部分 *Rh1* 都留在桿小體中。為了更進一步證實 *ktub* 作用於 *Rh1* 內胞飲作用，我們將已知突變會導致 *Rh1* 內胞飲作用快速進行的 *norpA* 突變基因，與 *ktub* 突變基因放在同一隻果蠅表現，觀察 *ktub* 突變是否有能力阻斷 *norpA* 變所增加的 *Rh1* 內胞飲作用。結果顯示 *norpA* 突變果蠅 *Rh1* 內胞飲作用大量產生，*ktub* 和 *norpA* 雙突變果蠅 *Rh1* 內胞飲作用被抑制，*Rh1* 主要留在桿小體中。除此之外我們也發現，*ktub*

和 *norpA* 突變也抑制 *norpA* 突變所引起光誘導感光細胞退化現象。
我們利用 *ktub* 基因刪除果蠅實驗證實，Ktub 參與 Rh1 內胞飲作用時
Ktub 之 tubby domain 是必要的。綜合以上結果我們提出 Ktub 在感光
細胞中新的功能是參與 Rh1 內胞飲作用和視網膜的退化。

Abstracts

The *tubby* (*tub*) and *tubby-like protein* (*tulp*) genes belong to a small family of genes which their functions remain unclear. The *tub* and *tulps* genes are found in multicellular organisms including both plants and animals. The C-terminal of Tub and Tulps proteins are highly conserved. Mutation of members of this protein family causes disease phenotypes including retinal degeneration and obesity. In this study, we find that *Drosophila king tubby* (*ktub*) participates in rhodopsin (Rh1) endocytosis in response to light stimulation. Immunocytochemical analysis shows that Ktub expresses at the rhabdomere domain in the dark condition. When flies received light stimulation, the Ktub translocates from rhabdomere to the cytoplasm and the nucleus of the photoreceptor cells. Studies further show that wild type photoreceptor forms Rh1-immunopositive large vesicles (RLVs) shortly after light stimulation. In light-induced *ktub* mutants, the majority of Rh1 remains at the rhabdomere; only few RLVs in the cytoplasm of photoreceptor cells. To further investigate the role of *ktub* in Rh1 endocytosis, we examine its ability to block *norpA* mediated Rh1 endocytosis. Mutation of *norpA* allele causes massive Rh1 endocytosis in light condition. However, majority of Rh1 remains at the rhabdomere in *ktub* and *norpA* double mutant in response to light induction. In addition, we also find that *ktub* and *norpA* double mutant rescues the light-induced *norpA* retinal degeneration. Using deletion constructs, we further demonstrate that Tub domain in the Ktub protein is necessary for Rh1 endocytosis. Together, these results delimitate the novel function of Ktub in Rh1 endocytosis and retinal degeneration.

前言

視網膜退化性疾病

視網膜位於眼球底部內壁，約有十層的細胞，包括內限制膜(inner limiting membrane)、視神經纖維層(nerve fiber layer)、神經節細胞層(ganglion cell layer)、內叢層(inner plexiform layer)、內核層(inner nuclear layer)、外叢層(outer plexiform layer)、外核層(outer nuclear layer)、外限制膜(external limiting membrane)、感光接收器層(photoreceptor layer)、視網膜色素上皮層(retinal pigment epithelium)。

視網膜色素上皮細胞 (retinal epithelium cell) 分佈在最底層，負責清除感光細胞廢物和供應感光細胞氧氣及營養 (Strauss, 2005)。感光接收器層的感光細胞有兩種，分別為視錐細胞 (cone cell) 和視桿細胞 (rod cell)。視錐細胞分佈集中在視覺中央黃斑點，負責中央視覺和辨別顏色。視桿細胞(rod cell)分佈在視網膜周邊，負責微弱光線和周邊的視覺。感光細胞將光線訊號轉換成神經訊號傳到大腦視層分辨影像。當視網膜退化病變時，初期會感受到畏光、夜晚視力變差，俗稱夜盲症(Night Blindness)，以及週邊或中央視力變的模糊，情況嚴重時可能會導致失明。最常見的視網膜病變為視網膜色素病變(Retinitis Pigmentosa；簡稱 RP)，此種病人特徵為視錐細胞、視桿細胞產生退化並且出現不正常色素凝塊。RP 被認為是遺傳性疾病，目

前為止發現至少 55 種基因與 RP 相關(表一)，其中 tubby like protein 1 (tulp1) 基因突變與隱性遺傳 RP14 有關。Tulp1 來自 tubby 蛋白家族。

Tubby 蛋白家族特性和疾病

Tubby 蛋白家族蛋白質的 COOH 端具有高度保留相似序列，大約有 260 個胺基酸，稱為 tubby domain。蛋白序列中相似 tubby domain 蛋白命名為- tubby 相似性蛋白(tubby like protein)。目前 tubby 家族中包含 4 個成員分別為，tubby (tub)、tubby like protein 1(tulp1)、tubby like protein 2 (tulp2) 和 tubby like protein 3 (tulp3)。Tubby 基因發現於 1990 年 Jackson Lab，他們發現飼養的老鼠在晚期出現肥胖且有胰島素結抗(Cokeman and Eicher, 1990)和神經退化的現象。神經退化部位包括漸進式視網膜神經退化和耳蝸神經退化(Ohlemiller et al., 1997; Ohlemiller et al., 1995)。此基因突變老鼠稱之為 tubby mouse。野生型(wild type)老鼠 tubby 基因表現由 12 個 exon 組成，轉錄出正常的訊息核糖核酸(messenger ribonucleic acid ; mRNA)，然而 tubby mouse 染色體中 tubby 基因序列的第 11 exon 剪除辨識點(splice donor site) G 突變成 T，使 mRNA 剪除產生缺失，進而導致 COOH 端轉譯出 24 個新的胺基酸，取代原先正常的 44 個胺基酸 (圖一)(Kleyn et al.,

1996)。後續將 *tubby* 基因刪除的老鼠實驗顯示，在 *tubby* 蛋白無法表現的情況下，老鼠會呈現肥胖與視網膜退化，此現象與 *tubby mouse* 顯示性狀相同。此結果顯示剪除辨識點突變所轉譯後的 C 端異常 *tubby* 蛋白，其在生物體內無法發揮功能，而產生病症 (Stubdal et al., 2000)。

老鼠的染色體中包含 *tubby*、*tulp1*、*tulp2* 和 *tulp3*。免疫化學法染色結果顯示 *Tubby* 蛋白分佈於腦皮層、下視丘和視網膜。*Tulp2* 分佈侷限在睪丸組織，*Tulp3* 則廣泛的分佈在老鼠組織中。*Tubby* 在腦部和下視丘的分佈被認為與胰島素受體 (*insulin receptor*)、體重控制 (*control body weight*)、能量代謝平衡 (*metabolism energy balance*) 有關。實驗顯示 *tubby* 基因突變的老鼠在出生八週後體重開始產生變化，十九週後 *tubby* 基因突變老鼠體重平均 45 公克，是對照組老鼠體重 (25 公克) 的兩倍 (Stubdal et al., 2000)。Wang 等人在實驗中觀察到 *tubby mouse* 在未肥胖前呼吸商 (*Respiratory Quotient*) 比對照組老鼠還低，並且有較高的酮體 (*ketone body*) 和肝醣堆積在肝臟，因此推測 *tubby mouse* 能量來源是由脂肪取代正常醣類代謝 (Wang et al., 2006)。在正常情況下，從食物中攝取的醣類透過胰島素促進細胞對葡萄糖 (*glucose*) 的利用，將葡萄糖轉換成能量或以肝醣、三酸甘油脂形式儲存。當身體需要能量時，肝臟儲存的醣類提供身體所需能量。

Tubby mouse顯示胰島素的結抗，不過研究也發現大量表現tubby蛋白無法提增胰島素促進能量代謝，例如降低體重和食物攝取(Figlewicz et al., 2004)。Tubby和過去已知的肥胖機制是否有相關？研究顯示obese (*ob*)、diabetes (*db*) 和melanocortin 4 receptor基因缺失老鼠中，tubby基因表現顯示正常(Stubdal et al., 2000)。然而在神經細胞發現，分泌失調引起體型改變的甲狀腺素賀爾蒙- (T3)，會增加細胞中tubby mRNA的表現 (Koritschoner et al., 2001)。綜合以上結果顯示，tubby可能透過內分泌機制調控能量代謝，然而是何種機制引起晚期肥胖仍是有趣的議題，期待透過更多有關tubby 的研究來解開這個迷。

tubby 家族蛋白中tubby 和tulp1突變導致感光細胞退化，兩種蛋白在視網膜神經節細胞層(ganglion cell layer)和感光細胞的inner segment (Ikeda et al., 1999)皆可被偵測到。在tubby或tulp1基因突變老鼠的視網膜組織切片結果顯示，老鼠出生後2週感光細胞的outer segment和inner segment長度明顯比正常老鼠短，並且隨著週數增加感光細胞數目越來越少，在出生21週後幾乎完全消失(Ikeda et al., 2000)並且老鼠飼養於持續照光環境下時更加速感光細胞退化情形(Kong et al., 2006)。tulp1基因突變不但使感光細胞發生退化，而且會影響聯外叢層(outer plexiform layer)細胞突觸(synaptic) 的發育(Grossman et

al., 1999 ; 2010) 。Tulp1分佈在老鼠眼睛和腦部，研究顯示tulp1突變會影響視網膜，產生退化情形。腦部雖然也有表現，但是研究皆顯示tulp1突變不會使老鼠產生肥胖現象 (Ikeda et al., 2000) 。Tulp 2蛋白在老鼠睪丸(testis)有明顯的分佈 (North et al., 1997) 。 Tulp 3蛋白則廣泛分佈在老鼠體內，當tulp3基因突變會引起胚胎死亡，在死亡胚胎中發現神經管無法癒合現象 (Ikeda et al., 2001) 。綜合以上顯示Tubby和Tulps缺失會導致神經細胞退化，推測tubby 家族蛋白可能作為神經保護因子在神經細胞形成或維持功能時扮演重要的角色。

從染色體基因庫資料和過去文獻得知tubby或tulps基因序列在不同生物體內皆保留下來，例如：人 (Hagstrom et al., 1998) 、老鼠 (Kleyn et al., 1996; Noben-Trauth et al., 1996; Ohlemiller et al., 1995) 、雞 (Heikenwalder et al., 2001) 、水稻 (Liu 2008)、阿拉伯芥 (Lai et al., 2004)、線蟲 (Ashrafi et al., 2003) 和果蠅 (Ronshaugen et al., 2002)等，顯示tubby或tulps在生物體內的功能是重要的。但如今對於tubby 或tulps蛋白在不同細胞內或組織的功能尚未有全貌了解。過去藉由基因序列和蛋白質的結構研究中發現，tubby家族蛋白相似性較低的N端序列中含有預測的細胞核分佈序列(Nucleus Localization Sequence; NLS)和活化轉錄作用序列(transaction sequence) (Boggon et al.,1999) 。NLS預測序列如K³⁹KKR、P⁵⁶RSRRAR、P¹²³RKEKKG、和

K³⁰²RKK。Santagata 等人利用Neuro-2A(N2A)細胞轉染實驗結果證實 tubby N端蛋白表現後分佈在細胞核，印證tubby N端的NLS序列。另一方面也觀察到tubby C端蛋白表現後會分佈在細胞質膜，表現tubby 全長時則觀察到細胞核和細胞質膜皆有tubby分佈，值得注意的現象是tubby在細胞質膜分佈後細胞核的訊號才增加(Santagata et al., 2001)，顯示細胞核內的訊號是透過細胞質膜訊息活化後才分佈進入細胞核。tubby的N端不僅是帶有進入細胞核訊號，研究顯示tubby N端也具有活化phagocytosis作用的能力，其中KR(X)₁₋₂ KKK domain與 MerTK receptor 的結合是必須的 (Caberoy et al., 2010)。然而相似性較高的tubby C端蛋白具有辨識死亡細胞且結合的能力(Caberoy et al., 2010)、並且可與雙股 DNA (Boggon et al., 1999) 和 PIP2 (phosphorylated phospholipids)結合。當Tubby與PIP2結合時K330和R332是必要的胺基酸(Santagata et al., 2001)。以上顯示tubby的蛋白N端和C端區域雖然特性不同，在細胞內發揮功能時必須透過兩個domain相互配合才能完滿執行任務。

Tubby 在細胞中所扮演的角色

過去研究顯示 Tubby 在細胞中有不同分佈情形，包括細胞核、細胞質、細胞質膜甚至細胞外 (Caberoy and Li, 2009) 皆可發現 Tubby

分佈。細胞核中的 tubby 被認為做為轉錄因子，可以調控轉錄作用 (Boggon et al.,1999)。Lee 等人最近的研究顯示，tubby 突變的老鼠大腦皮層(Cerebral cortex)和下視丘(hypothalamus)組織中發現某些基因表現比正常老鼠低，如：tripartite motif protein 3 (Trim3)、Cholecystinin 2 receptor (Cck2r)、Ceroid-lipofuscinosis neuronal 2 (Cln2)和 p21 (CDKN1A) activated kinase 1(Pak1)基因，其中 Pak1 的表現降低 5 倍(Lee et al., 2009)。Santagata 等人觀察到在細胞核的 tubby 蛋白須透過細胞質膜上的分佈後再到細胞核內。研究顯示 tubby 必須透過 G protein 持續活化的訊號，tubby 才能持續地從細胞質膜進入到細胞核(Santagata et al., 2001)。研究結果推測出 tubby 透過與位在細胞質膜的 PIP2 結，而分佈在細胞質膜，當 G protein 蛋白被活化後，Gαq 活化 Phospholipase C (PLC)，活化後的 PLC 會將 PIP2 分解成為 Inositol triphosphate (IP3)和 diacylglycerol (DAG)，此時 tubby 因 PIP2 被水解而無法留在細胞質膜，即從細胞質膜進入細胞質到細胞核 (Santagata et al., 2001)。然而作者也提出不清楚殘餘 IP3 是否會與離開細胞質膜的 tubby 結合？也不清楚是否有其他生化修飾 tubby 蛋白，以避免 tubby 再度與細胞質膜結合。

Kapeller的發現似乎可以稍微回應上面的問題，他發現tubby會被磷酸化且透過磷酸化參與胰島素信息傳遞 (Kapeller et al., 1999)。

研究中利用CHO-IR細胞加入胰島素後發現tubby會被磷酸化，且磷酸化的位點在tyrosine 胺基酸殘基，老鼠tubby 胺基酸序列中可能被磷酸化的tyrosine有13個，分別是Y12、Y74、Y83、Y280、Y283、Y311、Y327、Y343、Y371、Y438、Y464、Y481和Y483。其中Y283、Y311、Y371和Y438這四個tyrosine胺基酸殘基在tubby 家族蛋白中高度被保留。細胞外 (in vitro) 實驗證明Abl和JAK2蛋白可使tubby磷酸化，磷酸化的tubby 可以和含有SH2 domain的蛋白結合，例如PLC γ 、Lck和Abl (Kapeller et al., 1999)。Tubby mouse 因tubby 蛋白缺陷使細胞內胰島素訊號無法傳遞下去，產生胰島素結抗現象。Tubby 蛋白不僅參與胰島素訊號路徑，在視網膜組織中也發現F-actin和dynamin-1蛋白與tubby或tulp1會結合在一起 (Xi et al., 2005; Xi et al., 2007)，推測這樣的結合可能參予感光細胞內蛋白質的運輸 (Ikeda et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2005)。先前研究觀察到感光細胞中感光分子rhodopsin 1 (Rh1) 在tubby 和tulp1突變老鼠中呈現不正常分佈，原先應分佈在感光細胞的outer segment區域反而堆積在inner segment。此外，線蟲實驗發現刪除tulp1基因時，線蟲腸道的三酸甘油脂(Triglycerides) 儲存會增加 (Ashrafi et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2005)，進一步研究推論的結果認為，tulp1可能透過抑制RBG-3(RabGTPase-activating protein)調控Rab7活性而影響脂肪儲存

(Mukhopadhyay et al., 2007)。

近年來的研究顯示 tubby 可能分泌到胞外(Caberoy and Li, 2009)，細胞外的 tubby 可能扮演配體 (ligand) 的角色，與 tubby 配體結合的接受體為 MerTK receptor (MER/AXL/TYRO3 receptor kinase)。MerTK 接受體含有 2 個纖維連接蛋白、2 個免疫球蛋白相似 C2 domain 和一個酪胺酸激酶 (tyrosin kinase domain)，透過 tubby 與 MerTK receptor 結合後，將促進視網膜色素上皮細胞(retinal pigment epithelium)、巨噬細胞(macrophage) (Caberoy et al., 2010a Caberoy et al., 2010b)和小神經膠質細胞(microglial)進行吞噬作用 (phagocytosis) (Caberoy et al., 2012)。綜合以研究顯示 tubby 或 tulps 蛋白在不同物種或組織中功能似乎有差異，且因分佈的位置不同而執行或傳遞的訊息也不同。

果蠅常被用來探討人類眼睛疾病發生的模式動物，查看過去文獻，果蠅研究只有一篇(Ronshaugen et al., 2002)，其探討果蠅 tubby 在胚胎發育過程的表現和分佈。此外並無其他相關的論文。在本研究論文中我們欲瞭解果蠅 tubby 在感光細胞的發育過程中表現與分佈情形，並且探討感光細胞果蠅 tubby 缺失導致的現象。

果蠅感光細胞光傳遞作用和感光細胞的退化

成蟲果蠅有相當明顯的複眼，利用肉眼或在光學顯微鏡下就可以觀察。果蠅的複眼約由750個小眼規則排列所組成；每個小眼外圍包含6個二級色素細胞、3個三級色素細胞和3個剛毛細胞交錯而成六邊形結構，六邊形結構中間頂層有2個初級色素細胞圍繞四個桿狀細胞 (cone cell)，桿狀細胞下方是8個感光細胞。感光細胞排列形成梯型狀分別為R1-R7，R8位於R7下方(Wolff and Ready 1993)。節肢動物感光細胞中有個特別區域，類似脊椎動物的outer segment 部位，由長1-2 μm ，直徑約60 nm的管狀微絨毛(tubular microvilli)緊密堆疊形成約100 μm 長的結構，稱之為桿小體(rhabdomere)(Hardie and Raghu 2001)。桿小體的基部(base) 的地方稱為系統次微絨毛池(system of submicrovillar cisternae; SMC)，SMC構造看起來像似真珠項鍊圈住微絨毛，此區域被認為具有內質網密集網路，調節細胞內離子濃度和感光細胞膜生成(Baumann and Lautenschlager 1994; Hardie and Raghu 2001)。桿小體上聚集許多光傳遞分子如 rhodopsin、G protein、Phospholipase C、TRP/TRPL...等和光線有關的蛋白質負責將光訊號轉換成為膜電位訊號。這些與光相關蛋白質中最重要且先被活化的是 Rhodopsin1 (Rh1:由 *ninaE* 基因轉譯)。Rh1不僅參與起始光傳遞訊號，對於形成和維持桿小體型態扮演重要角色。果蠅Rh1於成蛹晚期約70 % p.d (pupal development) 開始在內質網(endoplasmic reticulum;

ER)合成，Rh1運送須依賴ninaA (Baker et al., 1994)、Rab1(Satoh et al., 1997)、Rab 6 (Shetty et al., 1998)、Rab 11(Satoh et al., 2005)和MyosinV(Li et al., 2007)等蛋白，以post-Golgi囊泡方式運送至桿小體。當Rh1突變或產生缺失時桿小體型態會變得異常，無法有正常橢圓形結構 (Kumar and Ready, 1995; Ahmad et al., 2006)。Rh1受到光線刺激後會進行一連串分子訊息傳遞；包含光線使Rh1分子內色素分子 11-*cis* retinal 改變成 all-*trans* retinal 稱為 meta-rhodopsin。meta-rhodopsin和G-protein作用促使GDP轉變成GTP活化形式，G α 從 $\beta\gamma$ 釋出且活化phospholipase C (PLC:由*norpA*基因轉譯)，活化的PLC將PIP2分解成為Inositol triphosphate (IP3)和diacylglycerol (DAG)，此結果誘發陽離子通道TRP/TRPL開啟，細胞外和內質網Ca²⁺進入細胞內(Hardie, 2001)。細胞內Ca²⁺調控光線反應包含活化和抑制活化作用。當細胞內Ca²⁺濃度逐漸增加時會活化細胞內鈣離子依賴蛋白例如:Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase和retinal degeneration C等蛋白。在一般情況下Rh1被活化後，具有活性的M-Rh1會被rhodopsin kinase磷酸化，磷酸化的M-Rh1活性部分被抑制，直到arrestin2結合到磷酸化的meta-rhodopsin活性完全被抑制，接著arrestin2招攬AP2、clathrin 和dynamin到細胞質膜，並且以內胞飲方式將Rh1帶往內涵體(endosome)、溶小體(lysosome)分解路徑(Chinchore et al., 2009)。果蠅

Rh1和脊椎動物不同，在脊椎動物中Rh1受到光線刺激後opsin 和 *trans*-11-retinal則馬上分離，果蠅的opsin和all-*trans*-retinal仍以共價鍵緊密結合，所以當感光細胞受到另一光源580nm刺激時*trans*則轉變成為 *cis*-11 retinal，在鈣離子活化蛋白 (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase；CaMK)存在下將Arrestin 2磷酸化使Arrestin2則從M-Rh1釋出，並且透過retinal degeneration C (RDGC; rhodopsin phosphatase)作用下Rh1去除磷酸根，恢復回不活化型式 (Wang and Montell, 2007)(圖二)。目前已知許多蛋白參與感光細胞光線傳遞作用，這些蛋白突變或缺失導致感光細胞在型態上或功能上的改變，其中許多蛋白在光條件下導致視網膜退化(Wang and Montell, 2007)。

目的

先前研究顯示 *tubby* 家族蛋白在不同物種或組織內可能有不同功能，*tubby* 相似基因在果蠅中也存在，但是過去文獻只有一篇報導 (Ronshaugen et al., 2002)。本實驗利用果蠅為模式動物，探討在眼睛發育的表現且成蟲 *tubby* 是否參予果蠅光線傳遞作用，並試著探討 *tubby* 與 h1 運送或循環是否有關，此研究結果將可對 *tubby* 家族蛋白的功能有更進一步的瞭解。

材料方法

果蠅品系

w^{1118} 做為野生型果蠅，GS17325/SM 從 Szeged Drosophila stock center, *Rh1-Gal4*、*Norpa*³³ EMS、GMR-Gal4 誘導的突變從 Bloomington stock center, UAS-ktub, UAS-N-ktub 和 UAS-C-ktub 本實驗中建構。果蠅以玉米洋菜膠 1% BRL agar power, 5.52% glucose, 2.76% red surge, 6.3% yeast extract, 4.78% corn starch) 作為食物來源，培養於 25°C 培養箱中。

果蠅照光條件

此實驗皆於室內操作，在日光燈照下以光度計（LX-101 LUX METER）測量室內光強強度。將果蠅置於透明塑膠管中，室內日光燈光線調整在 500 lux 的光照條件，為使果蠅皆能照到光線，我們將果蠅管橫放置於此光照條件。實驗所需光照時間完成後，將果蠅置於解剖顯微鏡下解剖。執行 6 天光照實驗時，為避免培養基覆蓋管壁遮住光線，在第 3 天時會將果蠅置換於新的塑膠管中，再放回原處照光。

Ktub 抗體製備

利用 PCR 方式以 cDNA 為模板擴增引子 5'- ATGGAG GCCTACATCCGGCAGAAGAG-3',5'- TCACTCGCAGGCTATTTTGC CATCGA-之間的 DNA 序列，將 DNA 片段選殖到 pQE31 表現載體 (Qiagen, Valencia, CA)，定序確認後轉形入 *XLI-Blue* 大腸桿菌中，加入 IPTG 誘導 ktub-S 蛋白表現。大量表現的蛋白純化後當作抗原，以皮下注射方式打入紐西蘭大白兔，誘導抗體產生。第一次施打劑量 1mg 抗原混合，後續追加每次 0.5mg 混合，間隔 2 個月施打一次，施打後一星期抽血，檢測抗體力價。我們將果蠅頭部或全身以利用含蛋白酶抑制剂 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupetin, 300 μ M PMSF, 1mM TAME 的均質液[100 mM Pipes (pH 6.9), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 0.5mM DTT, 10% Glycerol] 將果蠅磨碎，並且 4 $^{\circ}$ C 低溫下 8,000 rpm 離心 20 分鐘。利用 SDS-PAGE 分離蛋白。以 Western blot 方式 (Laemmli, 1970; Towbin et al., 1979) 進行抗原抗體反應分析。Western blot 條件是以 12% SDS-PAGE 進行低溫(4 $^{\circ}$ C)以低福特電壓(40v)電泳 18 小時後，再以 20V 電壓將 SDS-PAGE 上蛋白質轉漬到經 methanol 處理過的 PVDF membrane 上，反應 20 分鐘後，以含 5% 脫脂奶粉的 PBST 浸泡 30 分鐘，加入 ktub 抗體(1:2000) 在 4 $^{\circ}$ C 下反應至隔天。將 PVDF membrane 取出以 PBST 沖洗掉未結

合的抗體後，加入含有 peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10000) 二級抗體室溫下反應 1 小時，以 PBST 沖洗三次後將 PVDF membrane 浸泡於 chemiluminescent reaction (Milipore Corporation, Billerica, MA) 試劑中，並於 CCD camera (Fuji film, Japan) 下擷取冷光訊號。

***E. coli* 質體 DNA 的抽取**

根據 Sambrook *et al.* (1989) 的 alkaline lysis 方法抽取質體 DNA。挑取單一菌落接種至含有抗生素之 10 ml LB 培養基 [每公升含有 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl] 中。置於 37 °C 恆溫培養箱，以 150 rpm 震盪培養 12~14 小時。吸取 1.5 ml 菌液至微量離心管中，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，加入 100 µl 冰冷的 solution I [含 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 及 10 mM EDTA (pH8.0)]，並震盪使菌體完全懸浮。隨後加入 200µl 的 solution II [含 0.2 N NaOH 及 1 % sodium dodecyl sulfate (SDS)]，輕輕搖動微量離心管，使溶液能夠完全混合均勻。置於冰上 10 分鐘後，加入 150 µl 冰冷的 solution III [含 5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, 無菌之二次蒸餾水 28.5 ml]，反覆搖動使溶液能夠混合均勻，置於冰上 10 分鐘後，以 14,000 rpm 離心 5 分鐘。小心

吸取上清液至另一支新的 1.5 ml 微量離心管，加入 RNase (10 mg/ml) 4 μ l，於 65 $^{\circ}$ C 水浴中反應 20 分鐘。加入 phenol 和 chloroform 各 200 μ l，震盪混合均勻後，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，小心吸取上清液至另一支新的微量離心管，重覆此步驟直到界面層 (interface) 乾淨為止。加入 2 倍體積的 100 % 酒精，置於 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 分鐘，使 DNA 沉澱。以 14,000 rpm 置於 4 $^{\circ}$ C 下離心 20 分鐘，倒掉上清液。沉澱物以 70 % 酒精小心沖洗兩次後，以真空乾燥機，乾燥離心 15 分鐘。抽出之質體 DNA，經過乾燥之後，以無菌之二次蒸餾水 20 μ l 溶解，然後取出 1 μ l，以 1 % 洋菜膠體 (agarose gel) 作電泳分析，以確定抽出之質體是否正確。

質體轉形作用

(1) 勝任細胞 (Competent cell) 之製備

取隔夜培養之菌液 100 μ l，加入 Luria-Bertani (LB) 培養基 [每公升含有 tryptone 10 g, yeast extract 5 g 及 NaCl 10 g) 10 ml]，在 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中震盪培養 2.5 小時至菌液的 OD₆₀₀ 值約為 0.4-0.6。將菌液置冰上 10 分鐘，以 3,000 rpm 離心 10 分鐘，將菌體離下，並去除上清液。加入 10 ml 冰冷的 0.1 M CaCl₂，將菌體拍散懸浮，置於冰液中 30 分鐘。再以相同條件離心，倒去上清液後，加入 500 μ l 冰

冷的 0.1 M CaCl_2 ，輕輕使菌體懸浮後即可使用，並可置於 4°C 中保存。

(2) 轉形作用 (Transformation)

在無菌之 1.5 ml 微量離心管，加入勝任細胞 200 μl ，質體 DNA 或 DNA 黏合混合液，混合均勻後置於冰液中 30 分鐘。再將離心管取出置於 42 °C 水浴中反應45 秒進行熱休克 (heat shock)，然後立即置於冰液中。加入800 μl SOC 培養基 [tryptone 20 g，yeast extract 5 g，NaCl 0.5 g 和二次蒸餾水 950 ml，溶解後加入 250 mM KCl 10 ml，並將 pH 值調為 7.0，再以二次蒸餾水將總體積補至 1 公升，滅菌後加入 2 M MgCl_2 5 ml 和 1 M glucose 20 ml]，於 37 °C 恆溫培養箱中震盪培養 1 小時。取出菌液 200 μl ，以無菌玻棒均勻塗佈在含抗生素的 LA 培養基上，隨後置於 37 °C 恆溫培養箱中，培養 12~16 小時。等到菌落長出後再篩選出帶有質體或構築正確之質體的轉形株 (transformant)。

反轉錄-聚合酉每連鎖反應 (RT-PCR)

(1) RNA抽取 (Isolation of total RNA)

取5-10隻果蠅置入1.5 ml 離心管中，置入液態氮迅速冷凍後，加入0.5ml Trizol Reagent，並以塑膠棒磨碎組織，加入0.2ml chloroform

後上下翻轉混合均勻，置於4°C反應5分鐘後，並以8200rpm離心15分鐘，將上清液置於新的離心管中，並加入isopropanol室溫反應，5-10分鐘。以8200rpm 速度4°C離心20分鐘分離RNA，去除上清液，底部RNA以70%酒精沖洗，置於室溫風乾後，以DEPC水回溶RNA。

(2) 反轉錄作用 (reverse transcription; RT)

取約1-5 μ g total RNA，加入1 μ l oligo dT (500 μ g/ml)，1 μ l 10mM dNTP，加水至總體積為12 μ l，65°C反應5分鐘後，迅速置於冰上，加入4 μ l 5X first-stand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3)，375 mM KCl，15 mM MgCl₂]，2 μ l 0.1M DTT，1 μ l RNase out (40U/ μ l)，42°C反應2分鐘後，加入1 μ l superscript II (200U/ μ l，Invitrogen)，42°C反應50分鐘後，以70°C反應15分鐘將酵素去活化，此溶液為cDNA，作為PCR反應之模板DNA (template DNA)。

(3) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR)

取一支 PCR 專用薄壁微量離心管，依序加入 5 μ l 10 ×緩衝液 [含 100 mM Tris-HCl (pH 8.8)，15 mM MgCl₂，500 mM KCl，1 % Triton X-100]、1.5 μ l 10mM dNTP、引子 1 μ l (10 pmole/ μ l) 及適當體積的模板 DNA(濃度約 10pg-1 μ g) (cDNA 溶液約 1 μ l)，隨後補適量二次去離子水至體積為 49.5 μ l，再加入 0.5 μ l super-thermal Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)。將此微量離心管放入 Gene Amp PCR System

9600 (Perkin Elmer Cetus, Connecticut, U.S.A.) 的反應槽內，PCR 的反應條件為：95°C 3 分鐘，使雙股 DNA 打開，接著在 95 °C 30 秒、60 °C 30 秒，使模板和引子鏈合，以及 72 °C 30 秒，使 DNA 延伸，條件下重複進行約 28-35cycles，最後以 72 °C 5 分鐘反應完成。從 PCR 反應液中取 1-3 μ l 進行洋菜膠體分析。

DNA 黏接反應 (Ligation)

將 insert DNA 與 vector DNA 利用酵素剪切並純化後，調整兩種 DNA 莫耳數比為 4:1 混合，以二次蒸餾的無菌水補至總體積為 15 μ l，在 65 °C 水浴中反應 15 分鐘，隨後置於冰，加入 2 μ l 10x reaction buffer [50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol (pH 7.5)]，1 μ l T4 DNA ligase (20U/ μ l, NEB)，漿混和液置於 16 反應 8 小時以上，使 DNA 相互黏合。

Schneider 2 cell 免疫化學染色

將 Schneider 2 cell (S2 cell) 5 x 10⁶ cells/ml 細胞置於含有 10% (FBS) 的 Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen) 培養液於 25°C 培養箱中培養至最終細胞濃度約 2~4 x 10⁶ cells/ml。將 S2 cell 離心後以 1xPBS 置換後取 0.5~1ml 至蓋玻片上靜置約 30 分鐘後，以 4% 固定液 (paraformaldehyde in PBS [137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10mM

Na_2HPO_4 , 1.7mM KH_2PO_4 , (pH7.2)] 取代置換固定20分鐘，固定後以PBST將固定液沖洗去除後，將S2 cell置於含10% FBS溶液中反應30分鐘，將蓋玻片至於含有phalloidin、ELAV和Ktub抗體溶液中，在4°C下反應至隔天，以PBST沖洗掉非專一結合抗體後，於含有FITC、Cy5螢光二級抗體下室溫反應1小時，PBST沖洗掉非專一結合二抗後，將蓋玻片用封片液[0.25% n-propyl gallate, 50% glycerol in PBS (pH 8.2)]保存，蓋玻片四周以指甲油封住避免封片液蒸散。利用Zeiss LSM 510共軛焦顯微鏡觀察，影像以Adobe Photoshop 6.0 處理。

組織免疫染色

收取的果蠅以小剪刀將果蠅口器剪除後，將固定液 4% paraformaldehyde in PBS [137 mM NaCl , 2.68 mM KCl , 10mM Na_2HPO_4 , 1.7mM KH_2PO_4 , pH7.2] 灌流固定 40 分鐘後解剖取出果蠅眼睛，以 PBST 將固定液沖洗去除後，將眼睛置於含 10% FBS 溶液中反應 30 分鐘，加入稀釋適當的抗體 ktub 抗體在 4°C 下反應至隔天，以 PBST 洗掉未結合抗體，再加入含有螢光的二級抗體室溫下反應 1 小時，再以 PBST 沖洗掉未結合的二抗，以封片液[0.25% n-propyl gallate , 50% glycerol in PBS (pH 8.6)]將眼睛固定保存於玻片上。利用 Zeiss LSM 510 共軛焦顯微鏡觀察，影像以 Adobe Photoshop 6.0 處

理。本實驗用到抗體稀釋比例如下 1:200 Ktub (Rabbit) , 1: 100 Rh1-5C4 (mouse) Hybridoma Bank , 1:50 ELAV (mouse) , 1:50 phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich) , phalloidin-FITC(Sigma-Aldrich) , 二抗 Alex 488 (Invitrogen Molecular Probes , Carlsbad, CA) Cy5 (Jackson ImmunoResearch Lab. West Grove , PA) 。

***ktub* 基因突變果蠅選殖**

利用 P-element imprecise excision 方式，選取靠近 *ktub* 基因的 P-element GS17325/SM 果蠅 (Szeged Drosophila stock center) 與帶有轉位子 (transposase) ($\Delta 2-3$) 果蠅交配，子代中挑選帶有 (P/CyO; +/TM3,Sb($\Delta 2-3$)) 基因型與 Pin/CyO 處女果蠅交配設 10 管，其子代中帶有白眼雄果蠅 (Δ P/CyO; +/+) 與 Pin/CyO 處女果蠅交配，設 120 管，將羽化後子代與 *ktub* Df (2R) ED3791 (Bloomington) 交配，觀察交配後子代 homozygous 是否可以存活？並以 PCR 方式篩選引子 5' GGCAATTTCAATCGAATTTACC 和 5' ATCGAAGTAACTCGAAGGACCC 區間基因片段被刪除的果蠅。取 1 隻果蠅，加入 50 μ l Squishing buffer (10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 g/ml Proteinase K) , (Gloora *et al.*, 1993) 磨碎後於 37°C 反應 30 分鐘後，以 95°C 反應 30 分鐘使 Proteinase K 失去活性。取 1 μ l DNA 做為模板加入 10 μ l PCR 反應體積中。

穿透式電子顯微鏡分析

穿透式電子顯微鏡下觀察果蠅眼睛材料製備參考(Fan, 2004)。取在持續光照下 6 天的果蠅，以小剪刀將果蠅口器剪除後，將固定液 [4% paraformaldehyde, 7% glutaraldehyde, 0.1M cacodylate buffer pH7.40]由胸腔注入，解剖分離眼睛，固定 2 小時後，將果蠅眼睛浸入 1% tannic acid 反應 2 小時，以 0.1M cacodylate buffer pH7.4 沖洗後將眼睛置入 2% OsO₄ (0.1M cacodylate buffer pH7.4) 反應 2 小時，以 2% uranyl acetate 反應至隔天，將眼睛取出至於酒精中以不同比例由低濃度至高濃度進行連續脫水後，將眼睛埋入 Quetol-812 (EMS)，以 42-60°C 塑化後切薄片(0.1μm)於 Tecnai spirit G2 (FEI) 含有 photographed Gatan CCD 下觀察。

構築 ktub 刪除片段質體和基因轉殖果蠅

為了在果蠅中大量表現 ktub-L、ktub-C 端和 ktub-N 端蛋白，利用 PCR 方式以 RE38560 cDNA (Berkeley Drosophila Genome Project) 為模板，利用引子配合 PfuTurbo DNA polymerase 分別擴增全長 ktub 5'-ATGTCCGGAATCAACAGTCGTAATCAG -3', 5'-TCACTCGCAG GCTATTTTGC -3'，ktub-C (5'-ATCGACCAGTTCGTGATGCAAC-3', 5'-TCACTCGCAGGCTATTTTGC-3' 和 ktub-N (5'-ATGTCCGGAAT CAACAGTCGTAATCAG-3',5'-ATTGCCGATGACATCTCCCTCGGA

C-3') DNA 片段，經由限制酵素剪切後，個別接入 pUAST-*flag* 載體中分別建構，*pUAST-flag-ktub*、*pUAST-flag-C-ktub* 和 *pUAST-flag-N-ktub* 經由定序確認後，以顯微技術將質體打入果蠅生殖細胞中 (Spradling and Rubin, 1982)，羽化的果蠅分別和野生型果蠅 w^{1118} 進行交配，選殖子代中紅眼的果蠅，每種轉殖果蠅挑選三個獨立品系。

結果

一、King tubby (Ktub) 胺基酸序列特徵

經由 NCBI 網站 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對後顯示 tubby 家族蛋白胺基酸序列與果蠅染色體 king tubby 基因最相似，其胺基酸相似性約 63%。將 tubby 家族蛋白的胺基酸序列與 king tubby 胺基酸序列比對(圖三)。結果顯示 king tubby 和 tubby 家族蛋白相似性較高區域在 C 端，N 端胺基酸序列相似性較低。果蠅染色體序列中只有一個 tubby 相似基因稱之為 *king tubby (ktub)*，位於第二條右臂(2R)染色體 57B-57C2 上。*ktub* 可能利用 2 個不同啟動子(promoter)轉錄出 2 種形式的 mRNA(圖四)，分別為 *ktub-Long form (ktub-L)* 和 *ktub-short form (ktub-S)*，2 種 mRNA 差別在於 5' 端。從 mRNA 轉譯出胺基酸序列比對結果顯示，兩者差別 *ktub-L* 在 5' 前多出 17 個胺基酸，其餘胺基酸序列皆相同(圖五)。這 17 個胜肽序列是否具有意義?我們比對 11 個不同種名的果蠅 *ktub* 胺基酸序列，分別有 *D.melanogaster*、*D.pseudoobscura*、*D.erecta*、*D.sechellia*、*D.yakuba*、*D.ananassae*、*D.persimilis*、*D.willistoni*、*D.mojavensis*、*D.virilis* 和 *D.grimshawi*(圖六)，結果顯示不同品種果蠅中 *Ktub* 前 17 個胺基酸序列無論是數目或胺基酸序列並無一致性。然而我們發現 11 種品種之 N 端卻有一個共同的 RQL domain，RQL 三個胺基酸在 9

種不同品種間具有高度保留性。我們也好奇 Ktub 的 N 端這三個高度保留胺基酸在老鼠 tubby 家族蛋白是否也有一致性?經比對 tubby 蛋白家族 N 端前 30 個胺基酸(圖七)發現 tubby 家族蛋白 tubby、tulp1、tulp2 和 tulp3 中 tulp3 的 N 端也含有 RQL domain。

二、King tubby (ktub) 抗體蛋白專一性測試

為瞭解果蠅 Ktub 的表現和分佈情形，我們製備果蠅 Ktub 抗體用來偵測果蠅內生性 Ktub 蛋白的表達和分佈位置。由於 Ktub-L 和 Ktub-S 差別只在於 Ktub-L 的 N 端多出 17 個胺基酸(圖五)。我們計畫利用胜肽合成差異的 17 個胺基酸序列作為抗原，製備專一性辨識 Ktub-L 的抗體。然而經 Western blot 和免疫測試結果，此抗體無法辨識果蠅內生性與大量表現的 Ktub 蛋白。然而另一方面，我們以兩種蛋白皆具有的胺基酸序列，也就是 Ktub-S 全長胺基酸序列作為基礎，利用 PCR 方式擴增 Ktub-S 全長 DNA 序列，將 DNA 片段選殖到 pQE31 載體中，經定序確認後轉形入大腸桿菌，以 IPTG 誘導 Ktub-S 蛋白表現，將蛋白純化後當成抗原利用兔子皮下注射入誘導產生免疫反應，製備抗體。經 6 次施打後進行 Ktub 抗體專一性測試(圖八)，將果蠅成蟲頭部萃取液以 SDS-PAGE 電泳分離後將蛋白轉漬到 PVDF 膜上，分別與未免疫前血清 (preimmune serum)、免疫血清 (immune

serum)反應和預先與 Ktub 抗原中和的免疫血清(Ag-absorbed serum)進行反應，Ktub-L 和 Ktub-S 預測分子量大小約 50kD 和 48kDa。Western blot 結果顯示，免疫後血清在 50 kDa 左右有明顯訊號產生，此訊號於免疫前和抗原中和抗體後的血清皆消失，表示此抗體專一的辨識果蠅 Ktub 蛋白。為更進一步瞭解此抗體在細胞中是否專一辨識 Ktub，我們利用果蠅早期胚胎血液細胞 S 2 cell 進行細胞染色實驗(圖九)，結果顯示 Ktub 分佈在細胞核中與細胞核標識蛋白有共同分佈位置，為了確認抗體所呈現細胞核分佈訊號是 Ktub 蛋白，我們將 Ktub 抗體預先和大腸桿菌表現的 Ktub 蛋白(抗原)中和後再進行細胞染色，結果顯示原先位於細胞核的訊號消失，表示細胞核中訊號為 Ktub 蛋白。以上結果顯示我們成功製備 ktub 抗體且此抗體專一地辨識果蠅 Ktub 蛋白。此抗體能辨識 Ktub-S 和 Ktub-L 共同序列，因此我們無法區別抗體顯現的訊號是 Ktub-S 蛋白或是 Ktub-L 蛋白，所以此抗體所辨識蛋白以 Ktub 表示。

三、Ktub 蛋白為磷酸化蛋白

過去研究顯示細胞內的 Tubby 透過被磷酸化過程參與 insulin signal 訊號傳遞(Kapeller et al., 1999)。研究中指出 Tubby 蛋白序列中的 tyrosine 胺基酸會被磷酸化。Tubby 胺基酸序列中含有 13 個

tyrosine，分別位於 Y 12、Y 74、Y 83、Y 280、Y 283、Y 311、Y 327、Y 343、Y 371、Y 438、Y 464、Y 481 和 Y 483。推測其中 Y 283、Y 311、Y 371 和 Y 438 胺基酸可能為被磷酸化位點，在 tubby 家族蛋白中，這個四個 tyrosine 胺基酸殘基被高度保留下來。我們將果蠅和老鼠胺基酸序列進行比對分析，結果發現 Ktub 胺基酸序列中包含 14 個 tyrosine，其中 8 個 tyrosin 位點與 Tubby 胺基酸序列中的 Y 74、Y 283、Y 311、Y 371、Y 438、Y 464、Y 481 和 Y 483 位點一致，其中 tubby 家族蛋白高度保留的四個 tyrosin 位點也包含在內 (圖十，A)，因此我們推測果蠅 Ktub 可能也會被磷酸化。為證實 Ktub 在果蠅中被磷酸化，我們利用 λ -phosphatase 酵素，移除蛋白質胺基酸序列中 serine、threonine 和 tyrosine 胺基酸殘基的磷酸根，移除磷酸根後的蛋白分子量變小，以檢視 Ktub 是否具磷酸化。我們將果蠅頭部組織磨碎後，將蛋白萃取液分別加入不同濃度的 λ -phosphatase(400U/ μ l)，置於 30°C 反應 30 分鐘後，利用 Western blot 方式偵測 Ktub 分子量是否有改變。結果顯示(圖十，B)，未加入 λ -phosphatase 前 Ktub 蛋白訊號顯現於 55kDa 以下(箭頭表示)，加入 λ -phosphatase 後 55kDa 下方約 45kDa 左右出現另一個 Ktub 訊號(箭號表示)，隨著 λ -phosphatase 濃度的增加 45kDa 左右訊號也增加。此結果顯示 Ktub 為磷酸化蛋白，並且在果蠅中 Ktub 大部分以磷酸化的形式存在。

四、果蠅成蟲感光細胞 Ktub 分佈受到光線調節

為瞭解成蟲果蠅感光細胞 Ktub 表現和分佈位置是否受到光線的影響，我們將果蠅置於不同光線條件下，利用免疫螢光分析方式偵測果蠅感光細胞 Ktub 的分佈情形(圖十一)。結果顯示置於暗環境中(圖十一，A)的果蠅，Ktub 分佈位於 R1-R6 感光細胞桿小體中，且細胞核無明顯 Ktub 訊號產生。當我們將果蠅從暗環境中移到室內光線(500 lux)下，解剖果蠅眼睛(圖十一，B)結果發現，在黑暗中分佈於桿小體 Ktub 訊號消失，且細胞質產生 Ktub 訊號。當果蠅持續暴露光線(500 lux)12 小時後(圖十一，C)，我們發現感光細胞的細胞核內有明顯的 Ktub 訊號。此結果顯示在成蟲感光細胞 Ktub 會隨著光線而有不同分佈。當果蠅在黑暗中時 Ktub 分佈於桿小體，受到光線刺激後 Ktub 從桿小體分佈消失，Ktub 進入細胞質。隨著暴露光線的時間增加，Ktub 聚集於感光細胞核。Ktub 的分佈受到光線調控，我們好奇在感光細胞中，Ktub 分佈於感光細胞的桿小體和細胞核與曝光時間長短有何關連？在光線刺激下，感光細胞是否透過位於桿小體的 Ktub 蛋白參與活化光線傳遞蛋白？或是在光線不斷刺激下，感光細胞不斷透過 Ktub 蛋白進入感光細胞核中，作為轉錄因子調控與光傳遞蛋白基因表現。為更清楚明白 Ktub 在感光細胞的功能，我們製備 *ktub* 基因突變果蠅。

五、Ktub 突變果蠅的篩選和分析

為更清楚明白 Ktub 在感光細胞的功能和 Ktub 與光線之關係，我們利用 P-element excision 方式製備 *ktub* 突變果蠅。P-element excision 原理，是利用誘導插入靠近基因的 P-element 跳躍，順道帶走插入位點附近的 DNA 序列，造成染色體 DNA 序列受到破壞，而達到突變目的。我們測試分析 *ktub* 基因附近的 P-element，包括 GS14334/SM、NP0138/CyO、d03644、NP6282/Cyo、GS22433/SM1、KG04932、NP3310/SM 和 GS17325/SM，選取跳躍能力較佳的果蠅，也就是眼睛的 mosaic 呈現較分明的果蠅。測試結果顯示 GS17325/SM P-element 跳躍能力較佳，所以我們選取此 P-element 果蠅用以製備 *ktub* 突變之果蠅。GS17325/SM P-element 插入點於 *ktub-L* 第一個 exon，距離 *ktub-L* 起始轉譯 ATG 約 391bp，然而此 P-element 距離 *ktub-S* 起始轉譯 ATG 約有 10Kb。根據以往其他實驗室操作 P-element excision 經驗顯示，染色體 DNA 刪除片段最多為 3kb。因此我們估計此結果最終可能只會得到 *ktub-L* 基因刪除突變果蠅。因過去未曾有 *ktub* 突變果蠅的文獻報導，我們無法預測 *ktub* 突變果蠅形態會如何？果蠅外觀是否有顯著異常或胚胎死亡情形。為了將果蠅中 Ktub 蛋白表現量降到最低方便觀察且篩選 *ktub* 突變果蠅，我們將 *ktub* 基因片段刪除果蠅和 Df (2R) ED3791 果蠅交配。Df (2R) ED3791 果蠅染色體

57B1-57D4 缺失，此缺失的範圍包含 *ktub* 基因(57B-57C2)。我們從子代中觀察具有 *ktub* 基因刪除且 Df (2R) ED3791 基因型的果蠅，其表現與野生型果蠅相比，無顯著異常。為了在外觀正常的果蠅中篩選出 *ktub* 基因刪除果蠅，我們利用 PCR 方式篩選 *ktub-L* 基因被破壞的果蠅。我們將 PCR 所需的引子分別設計座落於 *ktub-L* 基因的轉譯起始點 ATG 上游- 1320 bp 和下游+ 907 bp 的位置(圖十二，A)。當 PCR 產物擴增出 2.2kb 的 DNA 片段時，表示 P-element 跳走後，未帶走附近 DNA 序列。當 PCR 產物擴增出小於 2.2kb DNA 片段時，顯示 *ktub-L* 基因可能被刪除破壞。然而 PCR 未能擴增出 DNA 片段時，表示 DNA 被刪除片段大於引子範圍。我們利用 PCR 方式篩選 2 百多隻果蠅，經由洋菜膠體 DNA 電泳分析結果後，我們找出 6 個獨立的 DNA 片段被刪除的果蠅(圖十二)。定序結果發現其中 3 個 *ktub-L* 基因的 ATG 被刪除，我們將它命名為 *ktub*¹¹⁵⁻⁴、*ktub*³⁵⁻³ 和 *ktub*¹³¹⁻³。利用 RT-PCR 方式檢視 *ktub-L* mRNA 表現(圖十三)，結果顯示在相同 PCR 條件下，野生型果蠅可以擴增出預期的 DNA 片段，然而基因刪除片段果蠅則無法以 *ktub-L* 專一性引子擴增出 *ktub-L* 的 PCR 產物，表示這些基因刪除片段果蠅無法轉錄出 *ktub-L* mRNA。定序分析結果我們發現 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 果蠅 DNA 刪除位點分別座落於染體 16988986~16990657 範圍與 16988988~16990431 (圖十四，A)。利用

Western blot 方式偵測 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 果蠅 Ktub 蛋白的表現(圖十四)，結果中我們觀察到 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 果蠅 Ktub 蛋白表現量比野生型果蠅顯著降低。不過此兩種果蠅內仍有少量的 Ktub 表現，表示 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 果蠅非 *ktub* 基因無效突變 (null mutant) 果蠅。此外，我們也分析在感光細胞中 *ktub* 突變果蠅 Ktub 蛋白表現(圖十五)，與野生型果蠅相比之下，果蠅感光細胞核中 Ktub 訊號在 *ktub* 突變果蠅顯著降低。*ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 果蠅中，Ktub 蛋白表現明顯降低，但我們觀察 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 突變果蠅外觀與野生型相比並無明顯異常。我們將此果蠅置於 12 小時亮(12L) 且 12 小時暗(12D) 的光線中，並且解剖眼睛分析感光細胞內部結構，發現 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 突變果蠅和野生型果蠅感光細胞結構並無太大差異。我們不清楚為何 *ktub* 突變果蠅，Ktub 蛋白表現顯著降低，但是未能觀察出感光細胞的缺失現象？查閱過去老鼠的實驗發現，*tubby* 基因突變老鼠在照光後，會加速感光細胞的退化 (Kong et al., 2006)。我們推測在 12D 和 12L 的環境中，*ktub* 突變果蠅仍可以維持感光細胞型態，然而當感光細胞持續在光線下時，可能需要更多的 Ktub 蛋白以維持感光細胞型態。為驗證我們的推測，我們將 *ktub* 突變果蠅置於持續的光照下，觀察果蠅感光細胞的型態是否異常。

六、*ktub* 突變果蠅光線誘導感光細胞退化

為更進一步了解 *Ktub* 是否與光照有關，我們將果蠅置於光線壓力下持續一段時間後，觀察並比較野生型果蠅和 *ktub* 突變果蠅感光細胞之間形態是否有差異。本實驗中我們將果蠅置於暗處或室溫室內光線約 500 lux，持續給予果蠅光照 6 天後，將果蠅以固定液灌注且解剖眼睛後進行染色分析（圖十六）。結果顯示，將果蠅置於暗處 6 天，無論是野生型果蠅（圖十六，A）或 *ktub* 突變果蠅（圖十六，B），感光細胞仍維持正常型態，從 F-actin 染色結果可見到，桿小體呈現橢圓狀緊密堆疊的結構。然而果蠅照光 6 天後，野生型果蠅感光細胞仍維持正常（圖十六，C）。然而 *ktub* 突變果蠅持續光照 6 天後，感光細胞型態明顯異常（圖十六，D），桿小體型態變的不規則，失去橢圓型態，並且感光細胞 F-actin 染色訊號變弱，感光細胞 R7 正常，其餘 R1-R6 的感光細胞呈現不規則形態。此結果顯示，*ktub* 突變果蠅在持續光照下會誘導感光細胞產生退化情形。為更進一步分析 *ktub* 突變果蠅在持續光照下，感光細胞內部變化情形，我們利用穿透式電子顯微鏡 (TEM) 觀察 6 天後野生型和 *ktub* 突變果蠅感光細胞型態（圖十七）。結果顯示，野生型果蠅感光細胞由 microvilli 緊密堆積形成橢圓桿小體結構（圖十七，A），且具有引導細胞內蛋白運往 rhabdomere 且支撐 apical 結構的桿小體的基部的系統次微絨毛池 (system of

submicrovillar cisternae; SMC) 型態完整且明顯如項鍊般結構(圖十七, B)。然而 *ktub* 突變果蠅, 其桿小體 microvilli 變短且呈現稀疏狀, SMC 型態消失且可見長條狀 microvilli (圖十七, C、D)。推測 *ktub* 突變果蠅中, 桿小體和細胞內蛋白的運輸可能出現缺失, 導致感光細胞產生退化現象。以上結果我們推測果蠅在一般光循環或暗環境中, 感光細胞表現基本量的 Ktub 蛋白即可維持感光細胞生理功能和型態。然而在持續光照下, 需要 Ktub 蛋白以維持感光細胞正常運作, 當 *ktub* 突變果蠅在持續光照下, Ktub 蛋白表現不足時則影響感光細胞生理運作, 例如蛋白運送等過程, 進而導致感光在持續光照下產生退化情形。

七、*ktub* 突變果蠅 Rhodopsin 1 (Rh1) 分佈異常

在上個結果中(圖十七, C、D) 我們發現持續光照下, *ktub* 突變果蠅桿小體 SMC 結構異常, 且 microvilli 呈現與 *dymanin* 突變果蠅相似(Pinal and Pichaud, 2011)。dynamin 為 GTPase 在內胞飲過程中扮演將 vesicle 移除的角色(Van der Bliet, 1999), 因此推測 *ktub* 突變感光細胞中感光蛋白的運送可能受到影響。為了印證 *ktub* 突變果蠅在持續光線下, 可能影響感光蛋白質的運送, 導致感光細胞退化, 我們分析光照 6 天後, 感光細胞重要蛋白質-Rh1 的分佈情形(圖十八)。

結果顯示，野生型果蠅光照 6 天後，感光細胞的 Rh1 以囊泡(vesicles) 方式分佈於感光細胞質。然而在 *ktub* 突變果蠅光照 6 天後，Rh1 分佈顯示異常，Rh1 堆積在桿小體與 F-actin 共同分佈。以上結果顯示 *ktub* 突變果蠅 Rh1 循環可能產生缺失，推測 Rh1 可能無法順利從桿小體內胞飲進入細胞質。為更進一步證實 *ktub* 突變是否影響桿小體 Rh1 的內胞飲作用，我們利用短時間光照下誘導 Rh1 囊泡產生並觀察 *ktub* 突變果蠅 Rh1 內胞飲作用情形 (圖十九)。結果顯示，將果蠅置於 3 小時光線下，野生型果蠅感光細胞之細胞質產生許多 Rh1 大囊泡(圖十九，A)，統計顯示平均一個小眼約有 12 個 Rh1 大囊泡產生(圖十九，C)。相反地，我們發現 *ktub* 突變果蠅感光細胞質中 Rh1 囊泡形成較少，平均一個小眼約 2 個 Rh1 大囊泡，而大部分的 Rh1 皆留在桿小體上(圖十九，B)。由此結果推測 *Ktub* 在感光細胞的功能可能參與光線誘導 Rh1 內胞飲過程。

八、*ktub* 突變果蠅抑制 *norpA* 突變誘導 Rh1 快速 endocytosis

過去文獻顯示 *norpA* 突變果蠅，感光細胞顯示 Rh1-arrestin 形成穩定複合物，因此誘導 Rh1 內胞飲作用快速增加，由於過多的 Rh1-arrestin 累積在細胞質引起果蠅感光細胞退化現象(Orem and Dolph, 2002)。為確認 *ktub* 突變阻止 Rh1 內胞飲作用的進行，我們嘗

試在 *norpA* 突變果蠅中加入 *ktub* 突變，製造 *norpA* 和 *ktub* 雙突變果蠅，並且觀察在短時間照光下 Rh1 內胞飲作用情形（圖二十）。結果顯示，野生型果蠅在照光 24 小時情況下，感光細胞的 Rh1 大部分分佈在桿小體中（圖二十，A）。*norpA* 突變果蠅在照光 24 小時後，感光細胞的 Rh1 大部分消失在桿小體，感光細胞之細胞質中可見到許多 Rh1 囊泡（圖二十，B）。然而 *norpA* 和 *ktub* 雙重基因突變的感光細胞細胞質中有一些 Rh1 囊泡產生，但是大部分的 Rh1 留在桿小體（圖二十，C）。以上結果顯示，*ktub* 突變會抑制 *norpA* 突變誘導 Rh1 內胞飲作用。

九、*ktub* 突變果蠅恢復 *NorpA* 突變引起的感光細胞退化

過去文獻也顯示到 *norpA* 突變引起果蠅光線誘導感光細胞退化現象（Sark and Sapp,1989; Ziinkl et al., 1990）。前一個實驗中我們知道 *ktub* 突變抑制 *norpA* 突變誘導 Rh1 快速內胞飲作用進行。在此我們想知道當 *ktub* 突變抑制 Rh1 內胞飲作用後，是否也會抑制 *norpA* 在光誘導產生感光細胞退化的情形（圖二十一）。結果顯示，持續光照 6 天後，野生型果蠅之感光細胞排列呈現梯形狀，桿小體呈橢圓結構（圖二十一，A）。*norpA* 突變果蠅持續光照 6 天後（圖二十一，B）感光細胞型態明顯異常，呈現嚴重退化現象，感光細胞失去梯型排列，

且桿小體產生嚴重缺失現象(圖二十一, B)。然而在 *norpA* 與 *ktub* 同時突變果蠅中, 可觀察到感光細胞恢復原有梯型排列, 且桿小體型態恢復成橢圓形(圖二十一, C)。以上結果顯示, *ktub* 突變可以抑制 *norpA* 突變導致感光細胞退化情形。

十、tubby domain 參與 Rh1 endocytosis

上述實驗說明 Ktub 參與 Rh1 內胞飲作用。然而我們好奇究竟 Ktub 的哪個部分參與 Rh1 內胞飲作用? 過去研究顯示 tubby domain 在 tubby 家族蛋白功能執行時扮演相當重要角色。我們想了解 Ktub 的 tubby domain 是否參與 Rh1 的內胞飲作用。從序列比對中知道 tubby domain 位於 Ktub C 端。為回答此問題, 我們分別構築表現全長的 Ktub-L (*ktub*)、Ktub-C domain (*dN-ktub*)和 Ktub-N domain (*dC-ktub*)。利用 *rh1-Gal4* 在果蠅蛹期晚期, 誘導表現全長、C domain 和 N domain 的 Ktub 蛋白, 並且在短時間光照下觀察 Rh1 內胞飲作用情形 (圖二十二)。結果顯示, 當暴露在光線下時, 在對照組 *Rh1-Gal4/+* 的果蠅感光細胞中可見到部分 Rh1 囊泡堆積在桿小體, 有一些桿小體幾乎沒有 Rh1 (圖二十二, A)。然而當大量表現全長的 Ktub 蛋白時, 觀察到感光細胞細胞質有大量 Rh1 堆積 (圖二十二, B), 此 Rh1 囊泡堆積的現象也在大量表現 Ktub 的 C domain 果蠅中觀察到 (圖二十

二，C)。然而在大量表現 Ktub 的 N domain 時觀察到 Rh1 表現分佈與對照組 Rh1-Gal4/+相似(圖二十二，D)。以上結果顯示，大量表現 Ktub 果蠅在照光後會促使 Rh1 在細胞質堆積。然而大量表現 Ktub 或 tubby domain 造成 Rh1 在細胞質堆積是因 Rh1 內胞飲作用或是感光細胞合成 Rh1 蛋白後，無法運送至感光細胞桿小體而累積在細胞質所致?為了釐清此問題。我們將大量表現全長、C domain 和 N domain 的 Ktub 蛋白的羽化後果蠅置於黑暗環境，並且以固定液固定後解剖眼睛進行染色(圖二十三)。結果顯示，無論是對照組 Rh1-Gal4/+或大量表現全長 Ktub、Ktub C 端或 Ktub 的 N 端蛋白果蠅，在暗環境中 Rh1 皆可分佈在感光細胞的桿小體中，感光細胞之細胞質並無 Rh1 囊泡。表示大量表現 Ktub 或 Ktub 不同 domain 時，果蠅感光細胞的 Rh1 仍可正常地運送到桿小體。由此結果得知光照下，大量表現全長 Ktub 和 Ktub C 端蛋白的果蠅，會促進 Rh1 堆積在細胞質中，此堆積結果是由於 Rh1 內胞飲作用所致。

討論

果蠅 *Ktub* 蛋白和 *tubby* 家族蛋白之比較

本研究利用果蠅為模式動物探討 *tubby* 家族蛋白在感光細胞內的功能。脊椎動物染色體中 *tubby* 家族蛋白包含 *tubby*, *tulp1*, *tulp2* 和 *tulp3*。此家族蛋白中依蛋白特性和分佈位置而有不同功能。研究顯示 *tubby* 和能量代謝較相關 (Stubdal et al., 2000; Wang et al., 2006)。 *tulp1* 負責感光細胞發育和蛋白質的運送 (Kong et al., 2006; Grossman et al., 2010)。 *tulp2* 表現在老鼠睪丸組織，推測可能與生殖有關 (North et al., 1997)。 *tulp3* 廣泛分佈全身且與神經管形成發育有關 (Ikeda et al., 2001)。然而果蠅染色體中只有一個 *tubby* like protein，家族蛋白 *king tubby* (*ktub*)，不過卻利用不同啟動子調控表現 2 種 mRNA (圖四) (Ronshaugen et al., 2002)，分別轉譯出 *Ktub-L* 和 *Ktub-S* 蛋白差異只有在 N 端 17 個胺基酸 (圖五)。我們也嘗試過利用 N 端 17 個胺基酸合成胜肽製備抗體，但很可惜未能有很好的結果來區分 *Ktub-L* 和 *Ktub-S* 在果蠅中的差異。不過在序列比對中我們發現很特別的現象，*Ktub-L* 的 N 端 17 胺基酸具有特殊 RQL domain，此 domain 在不同品種的果蠅和 *tulp3* 也都被保留下來，顯示此 RQL domain 應有特殊意義，查考過去文獻資料對 RQL domain 並無相關文獻顯示，若能更進一步了解 RQL domain 的功能，將有助於瞭解 *tubby* 蛋白質的特性以

及 Ktub-L 和 Ktub-S 的差異。

過去在 N2A 神經細胞表達 tubby-GFP，偵測 tubby 分佈在細胞核內，並且觀察到透過 G-protein 持續活化的訊號 tubby 會從細胞質膜運送到細胞核(Santagata et al., 2001)。本研究製備果蠅 Ktub 抗體偵測果蠅內生性 Ktub 的表現和分佈結果發現，在沒有光線的環境下 Ktub 聚集分佈在桿小體中，然而當受到光線刺激後桿小體 Ktub 聚集分佈消失，隨著暴露光線增加細胞核的訊號逐漸明顯(圖十一)，顯示感光細胞中 Ktub 分佈受到光線的影響。此結果也呼應 Santagata 等提出 tubby 進入細胞核模式，透過 G-protein 活化訊號促使 PLC 活化分解細胞質膜 PIP2，tubby 從 PIP2 解離後進入細胞質，然而不清楚 tubby 是否會被修飾後而應影響與細胞質膜再度結合。本實驗中發現 Ktub 被磷酸化且幾乎以磷酸化形式存在(圖十)，Ktub 胺基酸序列中也發現含有高度保留的 Tyrosine 胺基酸，雖然實驗中無法證實 Ktub 功能重要的 Tyrosine 胺基酸殘基，但是從序列分析我們提出 Ktub 胺基酸序列中的 Y245、Y273、Y325 和 Y393 可能與 Tyrosine 胺基酸的磷酸化有關與 tubby 家族蛋白高度保留位點相同。

實驗結果中呈現 Ktub 蛋白表現降低時，在一般光線或黑暗環境中不影響感光細胞之型態，然而持續光照下則產生感光細胞退化現象(圖十六、圖十七)，過去發現老鼠 *tulp1* 突變，在光照下會加速視網

膜的退化現象(Kong et al., 2006),推測光照條件下 *tulp1* 運送感光細胞中蛋白之運送以維持感光細胞的正常生理運作(Ikeda et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2005)。我們將 *ktub* 突變果蠅置於黑暗環境或 12h 亮或 12 暗的環境中,果蠅感光細胞型態並無顯著異常。然而將 *ktub* 突變果蠅持續光照 6 天後,感光細胞型態呈現顯著退化現象(圖十六)。果蠅照光後會誘導 Rh1 內胞飲作用進行,野生型果蠅 Ktub 蛋白表現正常,顯示 Rh1 循環可以順利的進行(圖十九, A)。然而 *ktub* 突變果蠅中 Ktub 表現量降低,抑制感光細胞中 Rh1 的內胞飲作用(圖十九, B)。我們提出 *ktub* 突變果蠅可能因光照下, Rh1 內胞飲作用被抑制,使 Rh1 無法循環導致感光細胞退化產生。

Ktub 蛋白不僅在成蟲眼睛有表現,從染色結果得知在眼睛發育過程(圖二十四)甚至果蠅早期胚胎發育之中樞神經系統和週邊神經系統皆可偵測到 Ktub 的表現和分佈(圖二十五)。顯示 *tubby* 家族蛋白在果蠅中仍保留高度組織特異性,分佈在神經組織的 *tubby* 家族蛋白可能維持神經細胞生理功能,同時也具維持神經型態之蛋白。

Ktub 蛋白在 Rh1 內胞飲作用的角色

本實驗結果發現 *ktub* 突變果蠅,其感光細胞在光誘導下會抑制 Rh1 囊泡形成(圖十九),且 *ktub* 突變果蠅也具有抑制 *norpA* 突變導致

Rh1內胞飲作用快速增加現象(圖二十)，並且恢復*norpA* 突變導致感光細胞產生退化的情形(圖二十)。因此我們提出Ktub參與感光細胞Rh1的內胞飲作用。過去在牛的視網膜中發現會與tulp1交互作用蛋白有下列：actin、microtubule associated protein 1B、clathrin heavy chain、interphotoreceptor retinoid binding protein、dynamin-1、rab gerynl gerynltransferase、dynein intermediate chain、pyruvate kinase 和tubulin (Xi et al., 2005)。其中clathrin heavy chain、dynamin-1和actin皆與內胞飲作用有密切關係(Ferreira et al., 2012; Van der Blik , 1999; Durrbach et al.,1996; Song and Schmid , 2003)。然而後續也證實tulp1與dynamin-1 和actin 直接結合在一起(Xi et al., 2005; Xi et al., 2007)。tulp1突變老鼠視網膜中inner segment 出現不正常的Rh1囊泡堆積(Hagsterom et al., 1999; Hagsterom et al., 2001)，因此推測tulp1的功能可能與dynamin-1參與inner segment 經由connecting cilium 到outer segment 蛋白的運送過程有關(Xi et al., 2005)。老鼠視網膜中outer segment相當於果蠅的桿小體位置，在本研究中觀察*ktub*突變果蠅感光細胞的Rh1仍能正常運送到桿小體 (圖二十三)，顯示Rh1從細胞本體往桿小體的路徑是正常的。但是*ktub*突變果蠅中Rh1從桿小體經由內胞飲作用往細胞質路徑反而出現缺失(圖十九)。此感光細胞缺失型態和果蠅dynamin (*shibire*)突變 (Pinal and Pichaud, 2011)造成感光細胞

退化情形類似。研究顯示dynamamin (*shibire*)突變也會抑制*norpA* 突變而導致促進Rh1內胞飲現象(Alloway et al., 2000; Orem and Dolph , 2002)。綜合以上，我們推測Ktub可能透過與dynamamin (*shibire*)共同執行Rh1內胞飲作用。然而過去文獻也指出tubby可能透過抑制與tulp1交互作用蛋白(RabGTPase-activating protein ; RBG-3)的活性調節Rab7蛋白活性影響脂肪儲存(Mukhopadhyay et al., 2007)。Rab7在Rh1分解路徑分佈於晚期內涵體中(late endosomes)，Rab7缺失會導致Rh1堆積在細胞質(Chinchore et al., 2009)。然而本實驗結果顯示，*ktub*突變導致感光細胞之細胞質無法形成Rh1囊泡，Rh1堆積在感光細胞之桿小體中，顯示*ktub*突變果蠅抑制Rh1內胞飲作用可能和Rab7活性較無直接關係，推測Ktub功能與桿小體Rh1囊泡的移除較相關。

Ktub 參與內胞飲作用除了可能透過 dynamamin 蛋白外，還有另一個候選蛋白- Numb。從 Fly base 果蠅資料庫資料顯示，yeast two hybrids 方式偵測到 Ktub 交互作用蛋白其中一個蛋白為 Numb。過去研究顯示 Numb 在果蠅周邊神經和中樞神經發育時，Numb 蛋白藉由抑制 Notch 訊號而決定細胞命運(Uemura et al.,1989; Frise et al.,1996)。近來發現 Numb 也參與內胞飲作用。Numb 主要透過和 Eps15 蛋白的交互作用而參與內胞飲作用。Eps15 蛋白蛋為內胞飲組件其中之一的蛋白質，Eps15 具有三個交互作用蛋白的 domain，

分別為 Eps15 homology (EH) domain，中間的 central coiled coil domain, 和 C 端區域，其中 C 端區域會與 clathrin adaptor complex AP2 之 α -adaptin 結合(Santolini et al., 2000; Berdnik et al., 2002; Hutterer et al., 2005; Nishimura et al., 2003)。過去研究顯示 Numb Ser²⁶⁴ Ser³⁰⁴ 受到 Calmodulin dependent protein kinase (CaMK) 磷酸化後，磷酸化的 Numb 會招攬 14-3-3 (Tokumitsu et al., 2005)，且無法與 AP-2 結合，進而影響內胞飲作用 (Tokumitsu et al., 2006)。本篇研究提出 Ktub 參與內胞飲作用的過程，雖然實驗中未能進一步證實是否透過 dynamin 或 Numb 蛋白質共同執行 Rh1 內胞飲作用，在此提出這兩個可能的交互作用蛋白，提供將來探討 Ktub 功能之參考方向。

參考文獻

1. Ahmad ST, Joyce MV, Boggess B, O'Tousa JE. The role of *Drosophila* ninaG oxidoreductase in visual pigment chromophore biogenesis. *J Biol Chem* 2006; 281(14):9205-9.
2. Alloway PG, Howard L, Dolph PJ. The formation of stable rhodopsin-arrestin complexes induces apoptosis and photoreceptor cell degeneration. *Neuron* 2000; 28(1):129-38.
3. Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 2003; 421(6920):268-72.
4. Baker EK, Colley NJ, Zuker CS. The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *EMBO J* 1994; 13(20):4886-95.
5. Baumann O, Lautenschlager B. The role of actin filaments in the organization of the endoplasmic reticulum in honeybee photoreceptor cells. *Cell Tissue Res* 1994; 278(3):419-32.
6. Berdnik D, Torok T, Gonzalez-Gaitan M, Knoblich JA. The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* 2002; 3(2):221-31.
7. Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC, Shapiro L. Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* 1999; 286(5447):2119-25.
8. Caberoy NB, Alvarado G, Li W. Tubby regulates microglial phagocytosis through MerTK. *J Neuroimmunol* 2012; 252(1-2):40-8.
9. Caberoy NB, Li W. Unconventional secretion of tubby and tubby-like

- protein 1. FEBS Lett 2009; 583(18):3057-62.
10. Caberoy NB, Maiguel D, Kim Y, Li W. Identification of tubby and tubby-like protein 1 as eat-me signals by phage display. *Exp Cell Res* 2010; 316(2):245-57.
 11. Caberoy NB, Zhou Y, Li W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J* 2010; 29(23):3898-910.
 12. Chinchore Y, Mitra A, Dolph PJ. Accumulation of rhodopsin in late endosomes triggers photoreceptor cell degeneration. *PLoS Genet* 2009; 5(2):e1000377.
 13. Coleman DL, Eicher EM. Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered* 1990; 81(6):424-7.
 14. Durrbach A, Louvard D, Coudrier E. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 2):457-65.
 15. Fan SS. Dynactin affects extension and assembly of adherens junctions in *Drosophila* photoreceptor development. *J Biomed Sci* 2004; 11(3):362-9.
 16. Ferreira F, Foley M, Cooke A, Cunningham M, Smith G, Woolley R, Henderson G, Kelly E, Mundell S, Smythe E. Endocytosis of G protein-coupled receptors is regulated by clathrin light chain phosphorylation. *Curr Biol* 2012; 22(15):1361-70.
 17. Figlewicz DP, Zavosh A, Sexton T, Neumaier JF. Catabolic action of insulin in rat arcuate nucleus is not enhanced by exogenous "tub" expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286(6):E1004-10.
 18. Frise E, Knoblich JA, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN. The

- Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(21):11925-32.
19. Grossman GH, Pauer GJ, Narendra U, Hagstrom SA. Tubby-like protein 1 (Tulp1) is required for normal photoreceptor synaptic development. *Adv Exp Med Biol* 2010; 664:89-96.
 20. Grossman GH, Pauer GJ, Narendra U, Peachey NS, Hagstrom SA. Early synaptic defects in *tulp1*^{-/-} mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(7):3074-83.
 21. Hagstrom SA, Adamian M, Scimeca M, Pawlyk BS, Yue G, Li T. A role for the Tubby-like protein 1 in rhodopsin transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(9):1955-62.
 22. Hagstrom SA, Duyao M, North MA, Li T. Retinal degeneration in *tulp1*^{-/-} mice: vesicular accumulation in the interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(12):2795-802.
 23. Hagstrom SA, North MA, Nishina PL, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the gene encoding the tubby-like protein TULP1 in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1998; 18(2):174-6.
 24. Hardie RC, Raghu P. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 2001; 413(6852):186-93.
 25. Heikenwalder MF, Koritschoner NP, Pajer P, Chaboissier MC, Kurz SM, Briegel KJ, Bartunek P, Zenke M. Molecular cloning, expression and regulation of the avian tubby-like protein 1 (*tulp1*) gene. *Gene* 2001; 273(1):131-9.

26. Hutterer A, Knoblich JA. Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep* 2005; 6(9):836-42.
27. Ikeda A, Ikeda S, Gridley T, Nishina PM, Naggert JK. Neural tube defects and neuroepithelial cell death in *Tulp3* knockout mice. *Hum Mol Genet* 2001; 10(12):1325-34.
28. Ikeda A, Naggert JK, Nishina PM. Genetic modification of retinal degeneration in *tubby* mice. *Exp Eye Res* 2002; 74(4):455-61.
29. Ikeda A, Nishina PM, Naggert JK. The *tubby*-like proteins, a family with roles in neuronal development and function. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 1):9-14.
30. Ikeda A, Zheng QY, Rosenstiel P, Maddatu T, Zuberi AR, Roopenian DC, North MA, Naggert JK, Johnson KR, Nishina PM. Genetic modification of hearing in *tubby* mice: evidence for the existence of a major gene (*moth1*) which protects *tubby* mice from hearing loss. *Hum Mol Genet* 1999; 8(9):1761-7.
31. Ikeda A, Zheng QY, Zuberi AR, Johnson KR, Naggert JK, Nishina PM. Microtubule-associated protein 1A is a modifier of *tubby* hearing (*moth1*). *Nat Genet* 2002; 30(4):401-5.
32. Ikeda S, Shiva N, Ikeda A, Smith RS, Nusinowitz S, Yan G, Lin TR, Chu S, Heckenlively JR, North MA, Naggert JK, Nishina PM, Duyao MP. Retinal degeneration but not obesity is observed in null mutants of the *tubby*-like protein 1 gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9(2):155-63.
33. Kapeller R, Moriarty A, Strauss A, Stubdal H, Theriault K, Siebert E,

- Chickering T, Morgenstern JP, Tartaglia LA, Lillie J. Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signaling by insulin. *J Biol Chem* 1999; 274(35):24980-6.
34. Kleyn PW, Fan W, Kovats SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y, Berkemeier LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glucksmann-Kuis MA, Carlson GA, Duyk GM, Moore KJ. Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family. *Cell* 1996; 85(2):281-90.
35. Kong L, Li F, Soleman CE, Li S, Elias RV, Zhou X, Lewis DA, McGinnis JF, Cao W. Bright cyclic light accelerates photoreceptor cell degeneration in *tubby* mice. *Neurobiol Dis* 2006; 21(3):468-77.
36. Koritschoner NP, Alvarez-Dolado M, Kurz SM, Heikenwalder MF, Hacker C, Vogel F, Munoz A, Zenke M. Thyroid hormone regulates the obesity gene *tub*. *EMBO Rep* 2001; 2(6):499-504.
37. Kumar JP, Ready DF. Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* 1995; 121(12):4359-70.
38. Lai CP, Lee CL, Chen PH, Wu SH, Yang CC, Shaw JF. Molecular analyses of the *Arabidopsis* TUBBY-like protein gene family. *Plant Physiol* 2004; 134(4):1586-97.
39. Lee JH, Kim CH, Kim DG, Ahn YS. Microarray analysis of differentially expressed genes in the brains of *tubby* mice. *Korean J*

- Physiol Pharmacol 2009; 13(2):91-7.
40. Li BX, Satoh AK, Ready DF. Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Biol* 2007; 177(4):659-69.
 41. Liu Q. Identification of rice TUBBY-like genes and their evolution. *FEBS J* 2008; 275(1):163-71.
 42. Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJ, Tissenbaum HA. *C. elegans* tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms. *Cell Metab* 2005; 2(1):35-42.
 43. Mukhopadhyay A, Pan X, Lambright DG, Tissenbaum HA. An endocytic pathway as a target of tubby for regulation of fat storage. *EMBO Rep* 2007; 8(10):931-8.
 44. Nishimura T, Fukata Y, Kato K, Yamaguchi T, Matsuura Y, Kamiguchi H, Kaibuchi K. CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol* 2003; 5(9):819-26.
 45. Noben-Trauth K, Naggert JK, North MA, Nishina PM. A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature* 1996; 380(6574):534-8.
 46. North MA, Naggert JK, Yan Y, Noben-Trauth K, Nishina PM. Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(7):3128-33.
 47. Ohlemiller KK, Hughes RM, Lett JM, Ogilvie JM, Speck JD, Wright JS, Faddis BT. Progression of cochlear and retinal degeneration in the tubby (*rd5*) mouse. *Audiol Neurootol* 1997; 2(4):175-85.

48. Ohlemiller KK, Hughes RM, Mosinger-Ogilvie J, Speck JD, Grosfeld DH, Silverman MS. Cochlear and retinal degeneration in the tubby mouse. *Neuroreport* 1995; 6(6):845-9.
49. Orem NR, Dolph PJ. Loss of the phospholipase C gene product induces massive endocytosis of rhodopsin and arrestin in *Drosophila* photoreceptors. *Vision Res* 2002; 42(4):497-505.
50. Orem NR, Dolph PJ. Epitope masking of rhabdomeric rhodopsin during endocytosis-induced retinal degeneration. *Mol Vis* 2002; 8:455-61.
51. Ronshaugen M, McGinnis N, Inglis D, Chou D, Zhao J, McGinnis W. Structure and expression patterns of *Drosophila* TULP and TUSP, members of the tubby-like gene family. *Mech Dev* 2002; 117(1-2):209-15.
52. Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, Gomez CA, Zhao J, Shan WS, Myszka DG, Shapiro L. G-protein signaling through tubby proteins. *Science* 2001; 292(5524):2041-50.
53. Santolini E, Puri C, Salcini AE, Gagliani MC, Pelicci PG, Tacchetti C, Di Fiore PP. Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* 2000; 151(6):1345-52.
54. Satoh A, Tokunaga F, Kawamura S, Ozaki K. In situ inhibition of vesicle transport and protein processing in the dominant negative Rab1 mutant of *Drosophila*. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 23):2943-53.
55. Satoh AK, O'Tousa JE, Ozaki K, Ready DF. Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of *Drosophila* photoreceptors. *Development* 2005;

132(7):1487-97.

56. Shetty KM, Kurada P, O'Tousa JE. Rab6 regulation of rhodopsin transport in *Drosophila*. *J Biol Chem* 1998; 273(32):20425-30.
57. Song BD, Schmid SL. A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* 2003; 42(6):1369-76.
58. Spradling AC, Rubin GM. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 1982; 218(4570):341-7.
59. Stark WS, Sapp R, Carlson SD. Photoreceptor maintenance and degeneration in the *norpA* (no receptor potential-A) mutant of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* 1989; 5(1):49-59.
60. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85(3):845-81.
61. Stubdal H, Lynch CA, Moriarty A, Fang Q, Chickering T, Deeds JD, Fairchild-Huntress V, Charlat O, Dunmore JH, Kleyn P, Huszar D, Kapeller R. Targeted deletion of the *tub* mouse obesity gene reveals that *tubby* is a loss-of-function mutation. *Mol Cell Biol* 2000; 20(3):878-82.
62. Tokumitsu H, Hatano N, Inuzuka H, Sueyoshi Y, Yokokura S, Ichimura T, Nozaki N, Kobayashi R. Phosphorylation of Numb family proteins. Possible involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2005; 280(42):35108-18.
63. Tokumitsu H, Hatano N, Yokokura S, Sueyoshi Y, Nozaki N, Kobayashi R. Phosphorylation of Numb regulates its interaction

- with the clathrin-associated adaptor AP-2. *FEBS Lett* 2006; 580(24):5797-801.
64. Uemura T, Shepherd S, Ackerman L, Jan LY, Jan YN. numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 1989; 58(2):349-60.
65. van der Blik AM. Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* 1999; 9(3):96-102.
66. Wang T, Montell C. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch* 2007; 454(5):821-47.
67. Wang Y, Seburn K, Bechtel L, Lee BY, Szatkiewicz JP, Nishina PM, Naggert JK. Defective carbohydrate metabolism in mice homozygous for the tubby mutation. *Physiol Genomics* 2006; 27(2):131-40.
68. Wolff T, Ready DF.. Pattern formation in the *Drosophila* retina. In: *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1993; 2:1277-325.
69. Xi Q, Pauer GJ, Ball SL, Rayborn M, Hollyfield JG, Peachey NS, Crabb JW, Hagstrom SA. Interaction between the photoreceptor-specific tubby-like protein 1 and the neuronal-specific GTPase dynamin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(6):2837-44.
70. Xi Q, Pauer GJ, Marmorstein AD, Crabb JW, Hagstrom SA. Tubby-like protein 1 (TULP1) interacts with F-actin in photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;

46(12):4754-61.

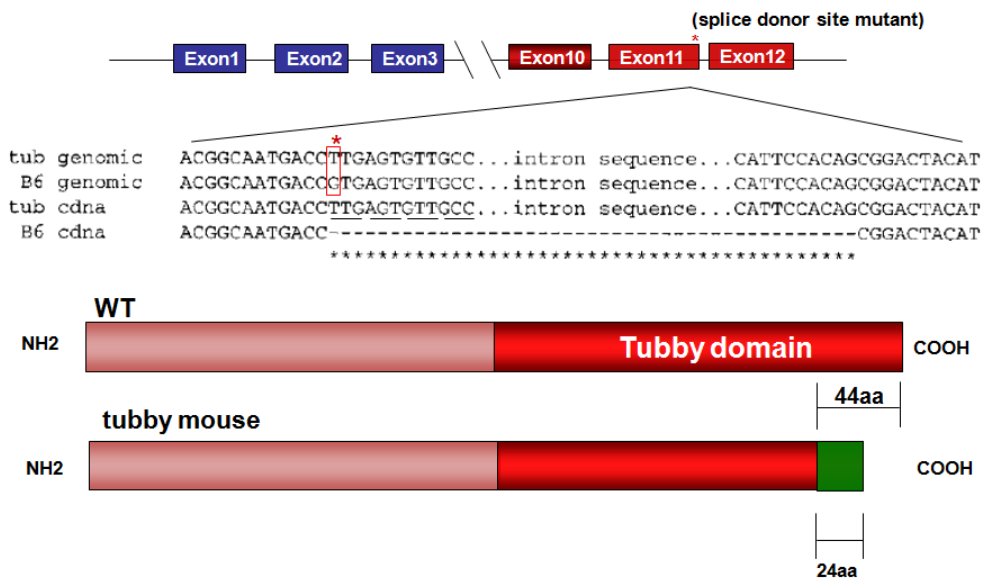
71. Zinkl GM, Maier L, Studer K, Sapp R, Chen DM, Stark WS. Microphotometric, ultrastructural, and electrophysiological analyses of light-dependent processes on visual receptors in white-eyed wild-type and norpA (no receptor potential) mutant *Drosophila*. *Vis Neurosci* 1990; 5(5):429-39.

圖表

表一、視網膜色素病變相關基因

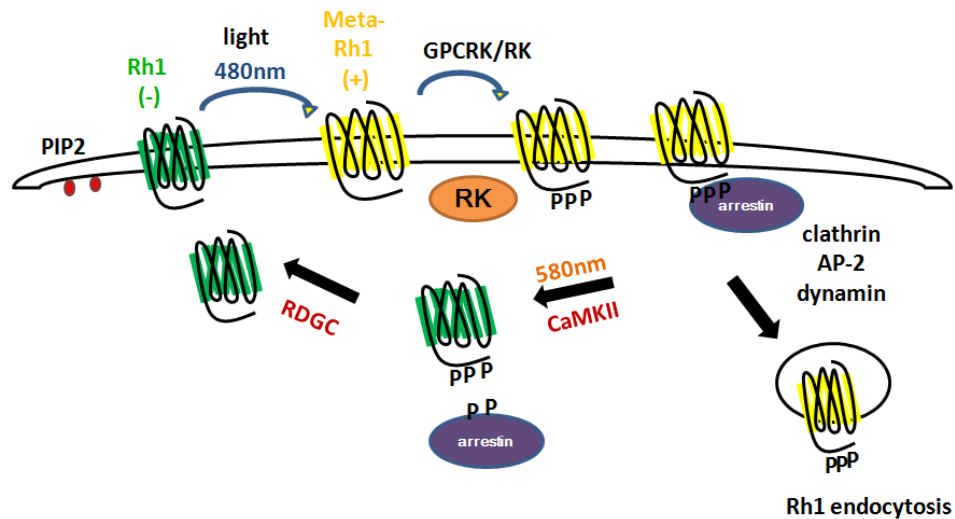
Gene	(RP)	Gene	(RP)	Gene	(RP)
TTC8	(RP51)	NR2E3	(RP37)	ABCA4	(RP19)
PRPF8	(RP13)	CNGB1	(RP45)	RPGR	(RP3)
PRPF31	(RP11)	GUCA1B	(RP48)	CRB1	(RP12)
USH2A	(RP39)	EYS	(RP25)	KLHL7	(RP42)
RP1	(RP1)	SAG	(RP47)	FSCN2	(RP30)
PRCD	(RP36)	CERKL	(RP26)	SNRNP ₂₀₀	(RP33)
CA4	(RP17)	PDE6A	(RP43)	RGR	(RP44)
IMPG2	(RP56)	BEST1	(RP50)	MAK	(RP62)
ZNF513	(RP58)	RHO	(RP4)	TOPORS	(RP31)
C8orf37	(RP64)	CNGA1	(RP49)	PRPF3	(RP18)
CLRN1	(RP61)	NRL	(RP27)	ARL6	(RP55)
MERTK	(RP38)	PRPF6	(RP60)	DHDDS	(RP59)
PRPH2	(RP7)	PDE6B	(RP40)	PDE6G	(RP57)
TULP1	(RP14)	IDH3B	(RP46)	C2orf71	(RP54)
RDH12	(RP53)	FAM161A	(RP28)	IMPDH1	(RP10)
SEMA4A	(RP35)	PROM1	(RP41)	RPE65	(RP20)

附註: RP (retinitis pigmentosa)
參考資料來源 NCBI



圖一、tubby 基因突變老鼠基因突變導致 mRNA 剪除異常

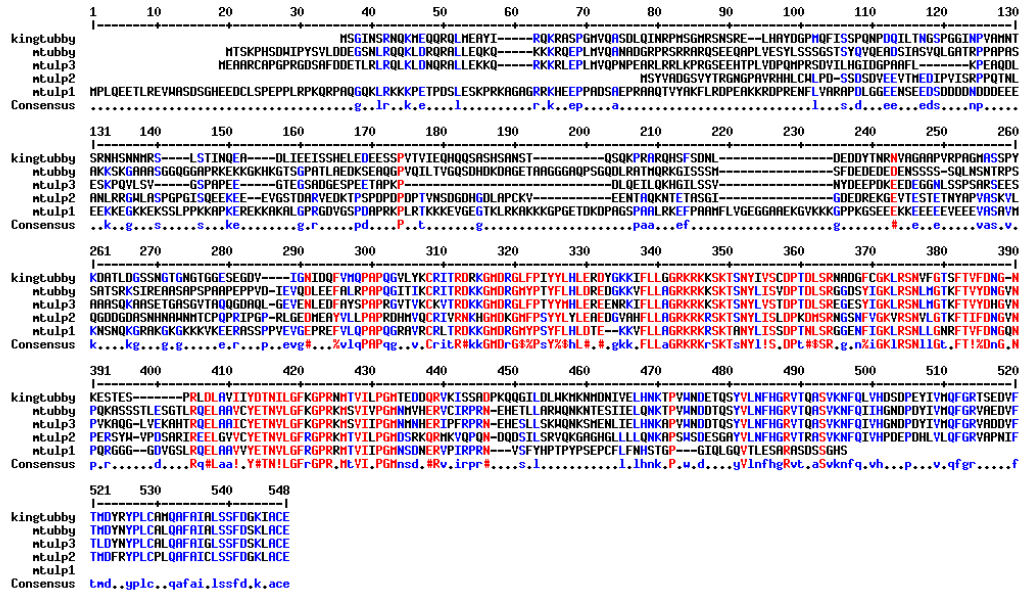
野生型(wild type)老鼠中 tubby 基因表現轉錄出的 mRNA 由 12 exon 所組成，轉譯出 505 胺基酸。然而 tubby mouse 所含的 tubby 基因其第 11 exon 的剪除辨識點(splice donor site) G 突變成 T，導致 mRNA 剪除缺失，進而導致 COOH 端轉譯出新的 24 個胺基酸取代原先 44 個胺基酸。



(modify from Wang and Montell, 2007)

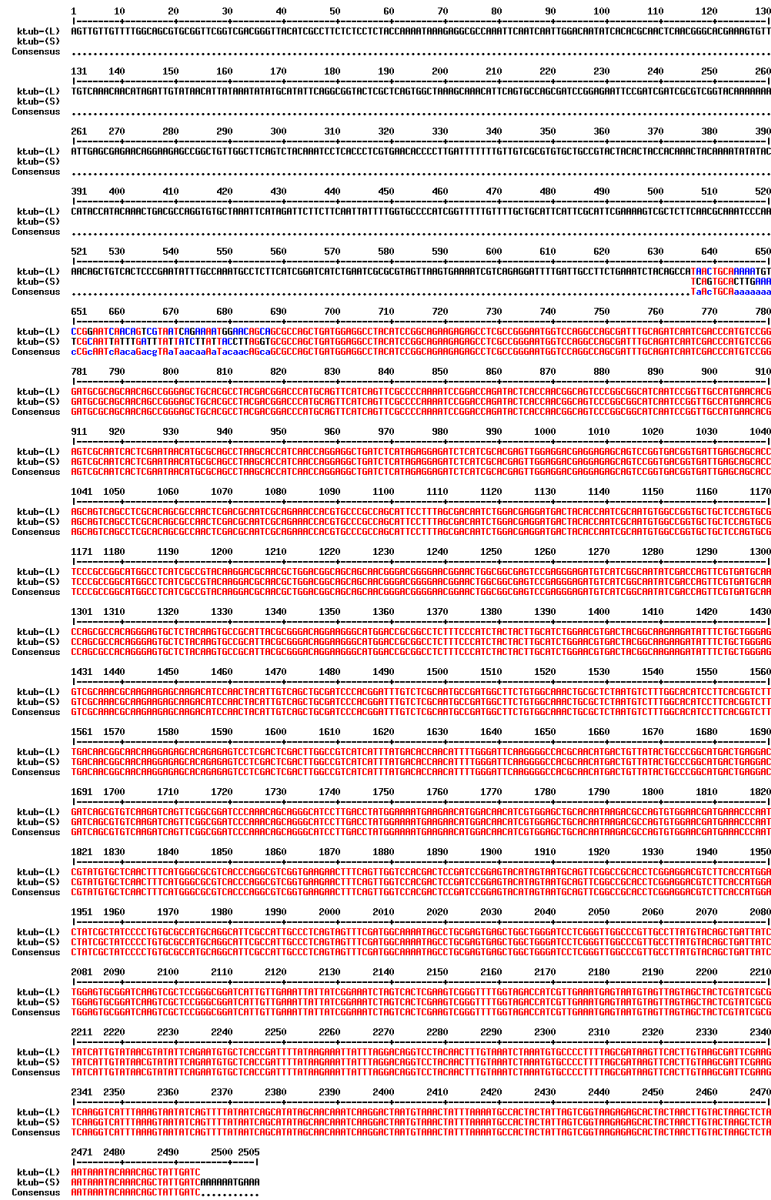
圖二、果蠅感光細胞中 Rh1 循環作用

果蠅 Rh1 受到光線刺激後 Rh1 活化成 meta-rhodopsin (M-Rh1) 活化 G-protein 下游訊號開啟陽離子通道，增加細胞內 Ca^{2+} 濃度。活化 M-Rh1 被 rhodopsin kinase 磷酸化，arrestin 結合到磷酸化的 M-Rh1 且招攬 AP2、clathrin 和 dynamin 進行內胞飲作用。另一方面 M-Rh1 受到 580nm 光源刺激時，*trans* 則轉變成為 *cis*-11 retinal 在活化鈣離子依賴蛋白 (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase ; CaMK) 存在下會將 arrestin 磷酸化。磷酸化 arrestin 則從 rhodopsin 釋出在 retinal degeneration C (RDGC; rhodopsin phosphatase) 作用下 Rh1 磷酸被去除則恢復成不活化型式。



圖三、果蠅 king tubby 與老鼠 tubby 家族蛋白之胺基酸比對

利用 ExPasy 軟體比對果蠅 king tubby 與老鼠 tubby 家族蛋白，分別為 tubby、tulp1、tulp2 和 tulp3 胺基酸序列。結果顯示 king tubby 胺基酸序列和 tubby 家族蛋白相似性較高胺基酸序列集中在 C 端約 254 個胺基酸，N 端的相似性較低。黑色表示：各別胺基酸序列，紅色表示：五種胺基酸殘基完全相同，藍色表示：兩個以上胺基酸殘基相同者。



圖四、比對分析果蠅 king tubby (ktub) 基因轉錄 mRNA short

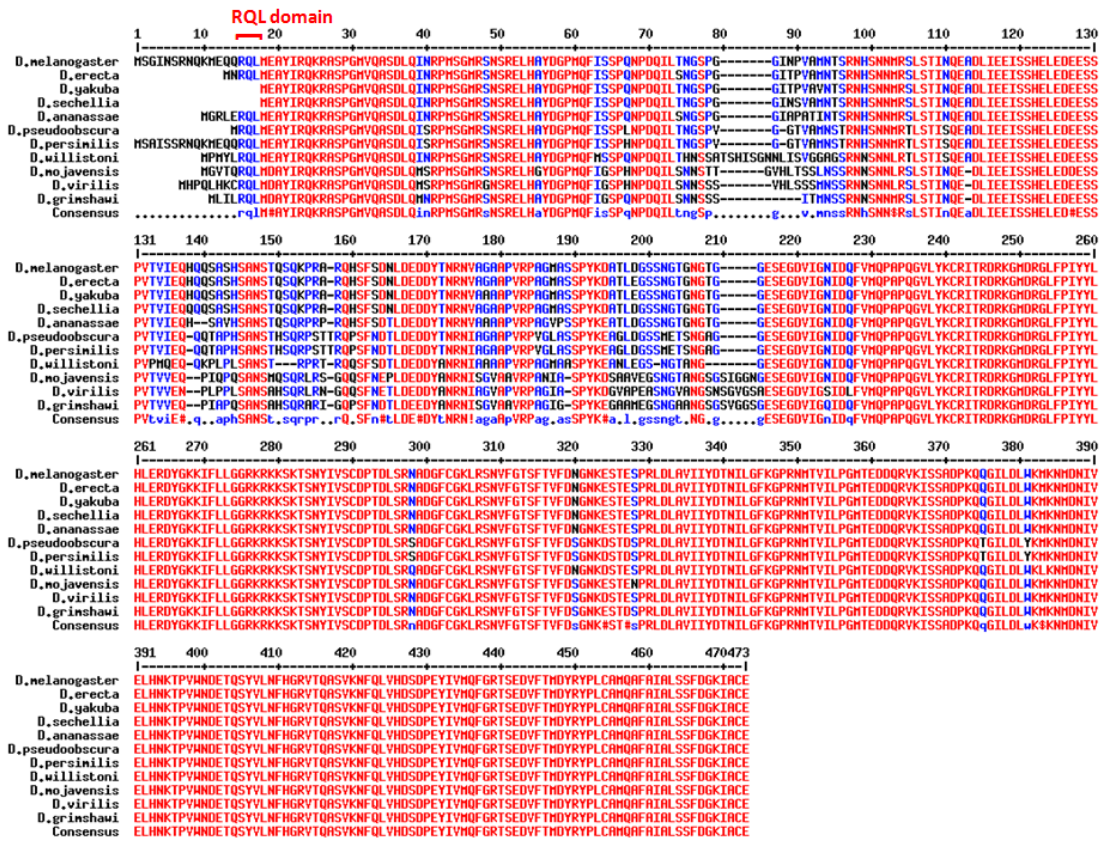
form 和 long for 的 mRNA

king tubby 的 Long form 由 2494bp 所組成，short form 含 1870bp。兩者 mRNA，short form 5'端 52bp，和 3'端 11bp 不同於 long form，其餘皆相同。

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Ktub-(L)	MSGINSRNQKMEQQRQLMEAYIRQKRASPGHYQASDLQINRPHSGHRSNSRELHAYDGP HQF ISSPONPDQIL TNGSPGGINPVAMTSRNHNSNNRSLSTINQEAADLIEEISSHELEDEESSPVTVIEQ													
Ktub-(S)	MEAYIRQKRASPGHYQASDLQINRPHSGHRSNSRELHAYDGP HQF ISSPONPDQIL TNGSPGGINPVAMTSRNHNSNNRSLSTINQEAADLIEEISSHELEDEESSPVTVIEQ													
ConsensusMEAYIRQKRASPGHYQASDLQINRPHSGHRSNSRELHAYDGP HQF ISSPONPDQIL TNGSPGGINPVAMTSRNHNSNNRSLSTINQEAADLIEEISSHELEDEESSPVTVIEQ													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Ktub-(L)	HQQSASHSANSIQSQKPRARQHSFSDNLEDDYTNRNVAGRAPVVRPAGHSSPYKDATLDGSSNGTGNGTGGSEGEVIGNIDQFVHQPAPQGVLYKCRITRDRKGMORGLFPIYYLHLERDYGKKIFLL													
Ktub-(S)	HQQSASHSANSIQSQKPRARQHSFSDNLEDDYTNRNVAGRAPVVRPAGHSSPYKDATLDGSSNGTGNGTGGSEGEVIGNIDQFVHQPAPQGVLYKCRITRDRKGMORGLFPIYYLHLERDYGKKIFLL													
Consensus	HQQSASHSANSIQSQKPRARQHSFSDNLEDDYTNRNVAGRAPVVRPAGHSSPYKDATLDGSSNGTGNGTGGSEGEVIGNIDQFVHQPAPQGVLYKCRITRDRKGMORGLFPIYYLHLERDYGKKIFLL													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Ktub-(L)	GGKRKRSKTSNYIVSCOPTDL SRNADGFCGKLRSNVFGTSFTVFDNGNKESTESPRLDLAVIYDNTILGFKGPRNHTVILPGHTEDDQRYKISSADPKQGGILDLLKMKKNNDNIVELHNKTPVWVNDET													
Ktub-(S)	GGKRKRSKTSNYIVSCOPTDL SRNADGFCGKLRSNVFGTSFTVFDNGNKESTESPRLDLAVIYDNTILGFKGPRNHTVILPGHTEDDQRYKISSADPKQGGILDLLKMKKNNDNIVELHNKTPVWVNDET													
Consensus	GGKRKRSKTSNYIVSCOPTDL SRNADGFCGKLRSNVFGTSFTVFDNGNKESTESPRLDLAVIYDNTILGFKGPRNHTVILPGHTEDDQRYKISSADPKQGGILDLLKMKKNNDNIVELHNKTPVWVNDET													
	391	400	410	420	430	440	450	460						
Ktub-(L)	QSYVLFNHGRVYQASVKNFQLVHDSOPEYIVHGFRTSEDFVTHDYRYPLCRHQAFRIALSSFQDKTACE													
Ktub-(S)	QSYVLFNHGRVYQASVKNFQLVHDSOPEYIVHGFRTSEDFVTHDYRYPLCRHQAFRIALSSFQDKTACE													
Consensus	QSYVLFNHGRVYQASVKNFQLVHDSOPEYIVHGFRTSEDFVTHDYRYPLCRHQAFRIALSSFQDKTACE													

圖五、果蠅 *king tubby* (*ktub*) 基因轉譯出胺基酸序列 Ktub-L 和 short form (Ktub-S) 胺基酸序列

Ktub-L 含有 460 胺基酸 Ktub-S 含有 443 胺基酸，胺基酸數目相差 17 個。將 2 個胺基酸序列比對結果顯示，Ktub-L 和 Ktub-S 差別在於 N 端 17 胺基酸，其餘胺基酸序列皆相同。黑色表示:個別胺基酸序列，紅色表示:相同胺基酸序列，藍色底線表示:tubby domain。



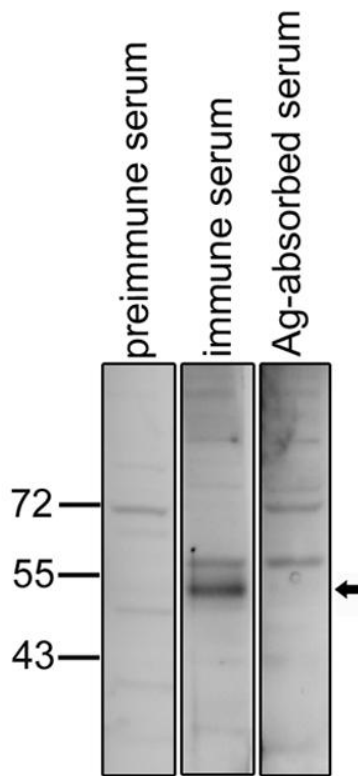
圖六、不同果蠅品系 Ktub 胺基酸序列 N 端含有 RQL domain

比較 11 種不同果蠅品系 N 端 17 個胺基酸，分別為 *Drosophila* . *melanogaster*、*D. pseudoobscura*、*D. erecta*、*D. sechellia*、*D. yakuba*、*D. ananassae*、*D. persimilis*、*D. willistoni*、*D. mojavensis*、*D. virilis* 和 *D. grimshawi*，結果顯示不同品種果蠅中 Ktub 前 17 個胺基酸序列無論是數目或胺基酸序列並無一致性，然而果蠅 11 不同品種 Ktub 之 N 端卻有一個共同的 RQL domain。黑色表示：各別胺基酸序列，紅色表示：五種胺基酸殘基完全相同，藍色表示：兩個以上胺基酸殘基相同者。


```
ktub > MSGINSRNQKMEQQRQLMEAYIRQKRASPG  
mtubby> MTSKPHSDWIPYSVLDDEGSNLRQQKLDNRQ  
mtulp1 > MPLQEETLREWASDSGHEEDCLSPEPLR  
mtulp2 > MSYVADGSVYTRGNGPAVRHHLCWLPDSSD  
mtulp3 > MEAARCAPGPRGDSAFDDETLRLRQLKLDN
```

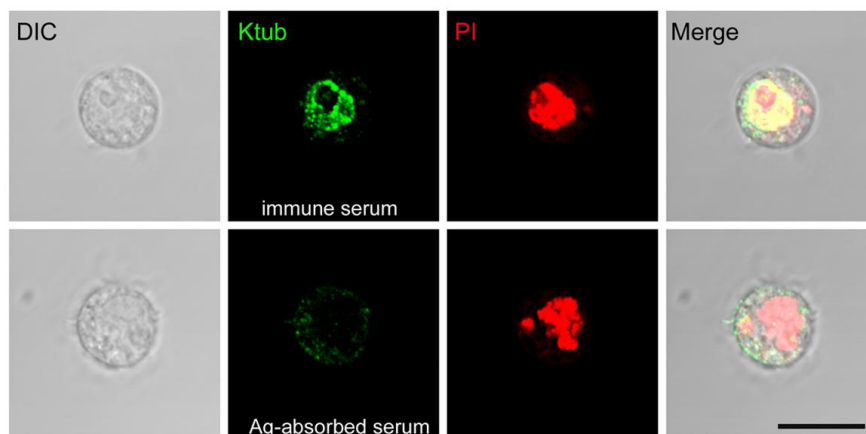
圖七、Tubby 家族蛋白 tulp3 含有 RQL domain

以上序列分別顯示果蠅 ktub、tubby 家族蛋白 tubby、tulp1、tulp2、tulp3 的 N 端前 30 個胺基酸序列，觀察分析是否具有與 ktub 相同 RQL domain，結果顯示 tubby 家族蛋白 tulp3 之 N 端前 30 個胺基酸序列包含 RQL domain，位於 N 端的第 24 個胺基酸位置。



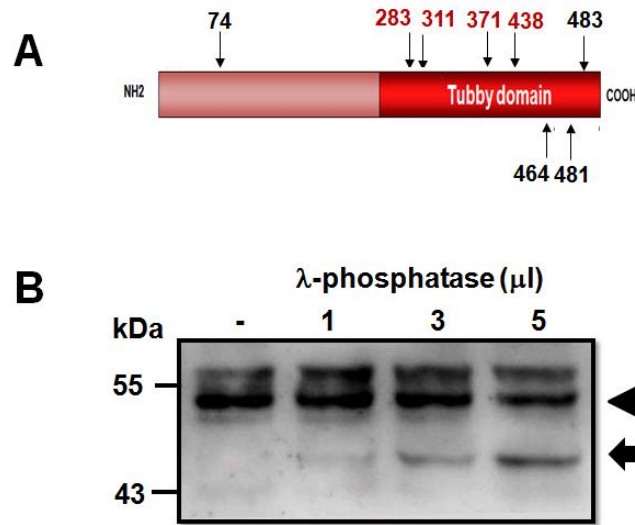
圖八、Ktub 抗體專一辨識果蠅 Ktub 蛋白

果蠅成蟲頭部萃取液，以 SDS-PAGE 電泳分離後將蛋白轉漬到 PVDF 膜上，分別與未免疫前血清（preimmune serum）、免疫血清（immune serum）和預先與 Ktub 抗原反應的免疫血清（Ag-absorbed serum）反應。估計 Ktub 約 50 kDa 左右，免疫前血清此區域無明顯訊號，免疫血清 50 kDa 左右處有明顯訊號產生，在預先和 Ktub 抗原反應的免疫血清則此訊號消失，顯示 Ktub 免疫後血清可以專一的辨識 ktub 蛋白。箭號所指示位置：Ktub 蛋白分子量。



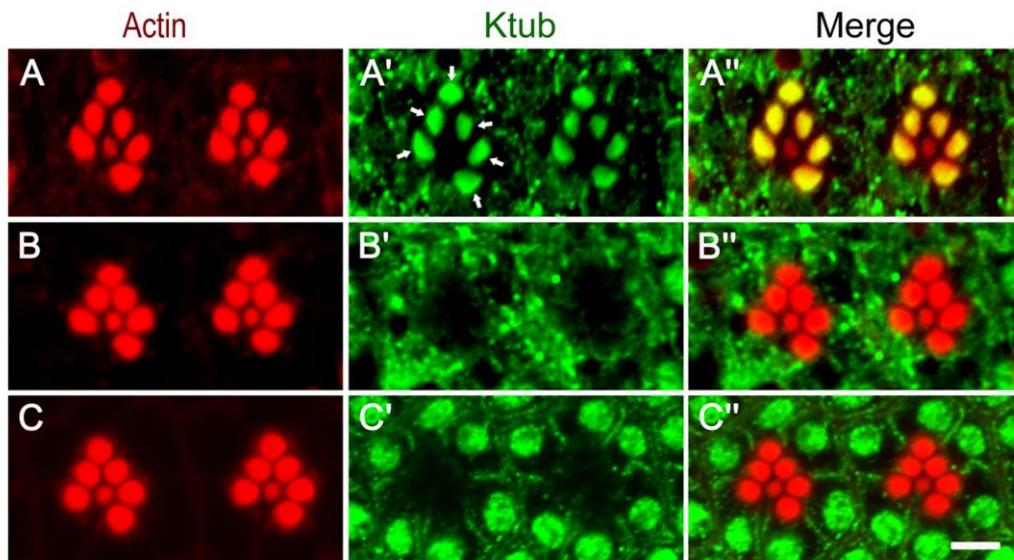
圖九、Ktub 抗體專一辨識 S2 細胞中內生性 Ktub

果蠅 S2 細胞固定後，分別與加入與免疫血清 (immune serum) 和預先與 ktub 抗原反應的免疫血清 (Ag-absorbed serum) 進行反應。洗去非專一性結合抗體後並加入含有螢光的二抗，於共軛焦顯微鏡下觀察。免疫血清 (immune serum) 可發現有明顯訊號，此訊號與標定細胞核 PI (Propidium iodide) 有共同分佈。預先與 ktub 抗原反應的免疫血清 (immune serum) 進行反應後則細胞核的分佈消失，顯示 ktub 抗體專一的辨識 Ktub，且 ktub 分佈於 S2 細胞核。綠色表示 Ktub 蛋白，紅色顯示 PI，黑色尺標顯示 10 μ m。



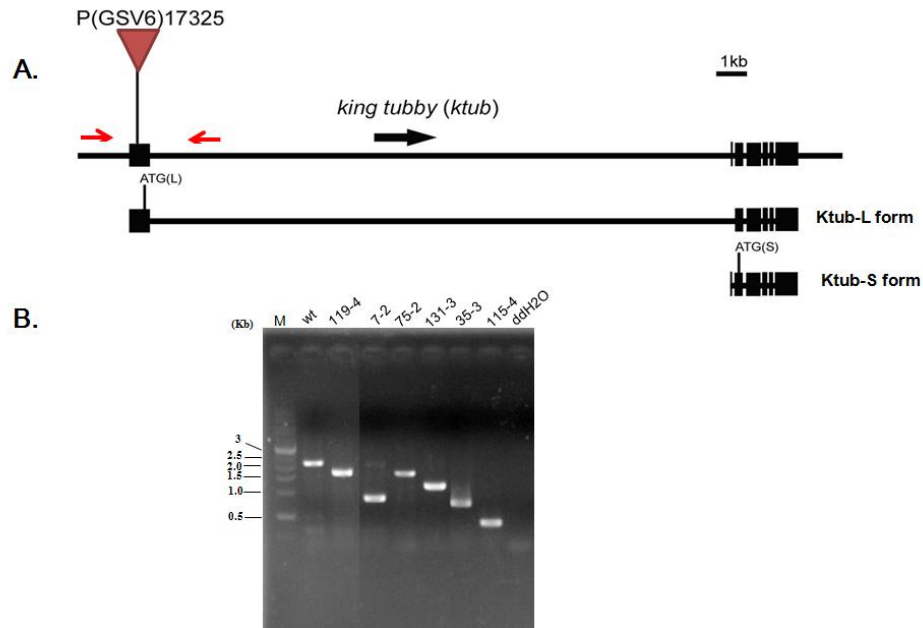
圖十、Ktub 在果蠅中為磷酸化蛋白以磷酸化形式存在

果蠅 Ktub 胺基酸序列中包含 8 個高度保留 tyrosine 胺基酸殘基，分別和 Tubby Y74、Y283、Y311、Y371、Y438、Y646、Y481 和 Y483 位點相同，其中 Y283、Y311、Y371 和 Y438 四個胺基酸殘基為 Tubby 家族蛋白高度保留 tyrosin 胺基酸(紅色表示)(A)。果蠅成蟲頭部萃取液，分別加入不同濃度的 λ -phosphatase 於 30°C 反應 30 分鐘後，Western blot 偵測結果(B)，未加入 λ -phosphatase 前 Ktub 蛋白訊號集中於 55kDa 以下(箭頭表示)，加入 λ -phosphatase 後 45kDa 左右出現 Ktub 訊號(箭號表示)，此訊號隨著 λ -phosphatase 濃度的增加而增加。顯示 Ktub 為磷酸化蛋白且以磷酸化形式存在果蠅中組織中。(箭頭表示: Ktub 磷酸化蛋白位置，箭號表示: Ktub 去磷酸化蛋白位置)。



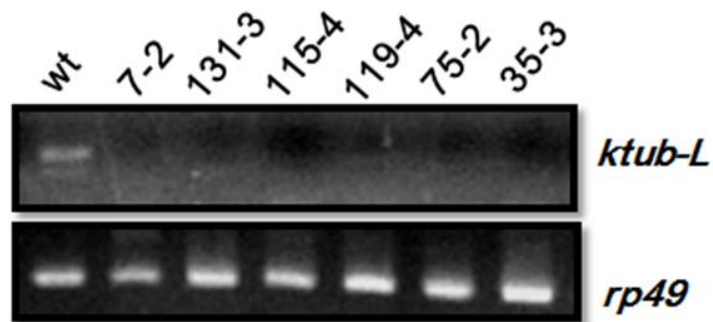
圖十一、成蟲果蠅感光細胞 Ktub 分佈與光線有關

成蟲果蠅於羽化後置於不同環境下，暗環境(A)、暴露於光線下約 1 小時(B)和持續在光的環境下(C)。分別將果蠅固定後進行 Ktub 抗體和 F-actin 染色結果顯示，當果蠅置於暗處時 Ktub 分佈在感光細胞 R1-R6(箭頭所示)桿小體中，細胞核無顯著訊號 (A)。當果蠅接觸到光線後，桿小體分佈的訊號則消失，細胞質有些訊號(B)。在持續光線下 Ktub 明顯分佈於感光細胞 R1-R6 細胞核中(C)。紅色顯示 phalloidin (F-actin)，綠色表示 Ktub 蛋白，白色尺標顯示 10 μ m。



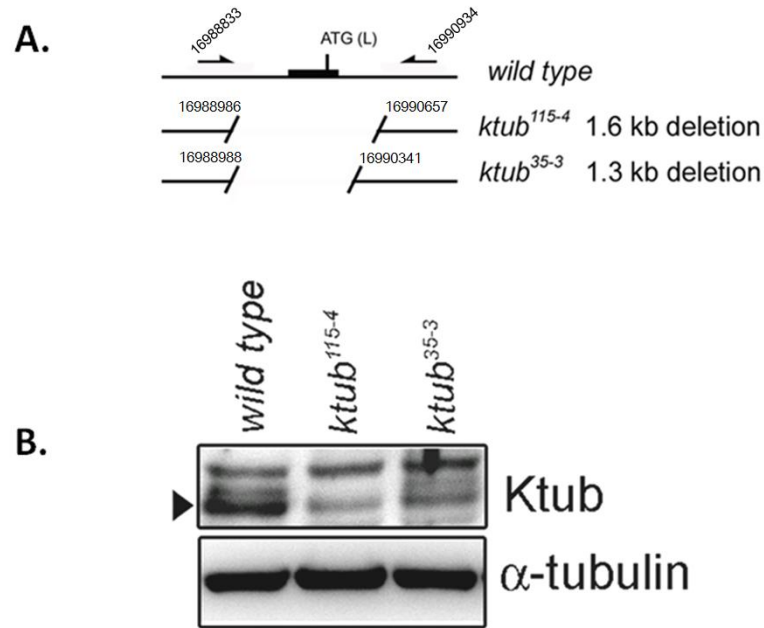
圖十二、*ktub* 基因刪除突變果蠅篩選結果

利用 P-element imprecision excision 製備 *ktub* 基因刪除突變果蠅。預測 *king tubby* (*ktub*) 在不同啟動子作用下可能轉錄兩種形式，long form (*ktub-L*) 和 short form (*ktub-S*) 的 mRNA (A)。P-(GSV6)17325 element 插入位置於 *ktub-long form* (*ktub-L*) 的 exon1，距離 *ktub-L* 轉譯起始點(ATG) 距離大約為 367 bp。在 P-element 兩側 (-883, +1217) 設計 primer (紅色箭頭) 用以篩選誘導 P-element 跳走後 ATG 連帶被刪除的果蠅。PCR 產物經洋菜膠體電泳分析結果(B)，*wild type* (wt) 果蠅 PCR 產物為 2.1kb，來自 imprecision excision 後不同果蠅染色體 DNA，119-4、7-2、75-2、131-3、35-3 和 115-4 擴增引子區域 DNA 片段界於 0.4kb~1.7kb，其中 35-3 和 115-4 刪除片段最大。



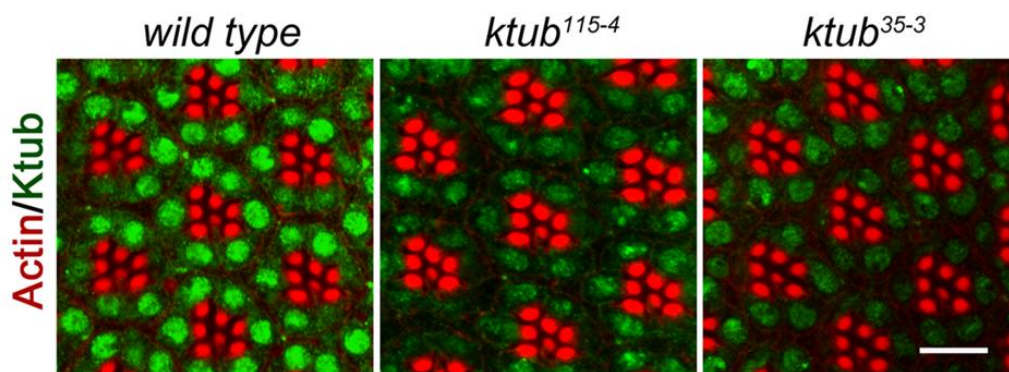
圖十三、*ktub* 基因刪除果蠅 *ktub-L* 無法轉錄表現

洋菜膠體電泳分析 RT-PCR 產物結果。萃取出蟲果蠅頭部之 mRNA 進行反轉錄作用成 cDNA 當作模板。利用 primers 擴增 *ktub-L* exon1 至 exon3 之 cDNA 片段。結果顯示在相同 PCR 條件下，wt (wild type) 可擴增出 DNA 片段，然而其他 *ktub* 基因刪除果蠅則無法擴增出 exon1 至 exon3 的片段，顯示 *ktub* 刪除果蠅無法正常轉錄 *ktub-L* 的 mRNA。rp49 為(ribosomal protein 49)內部對照組。



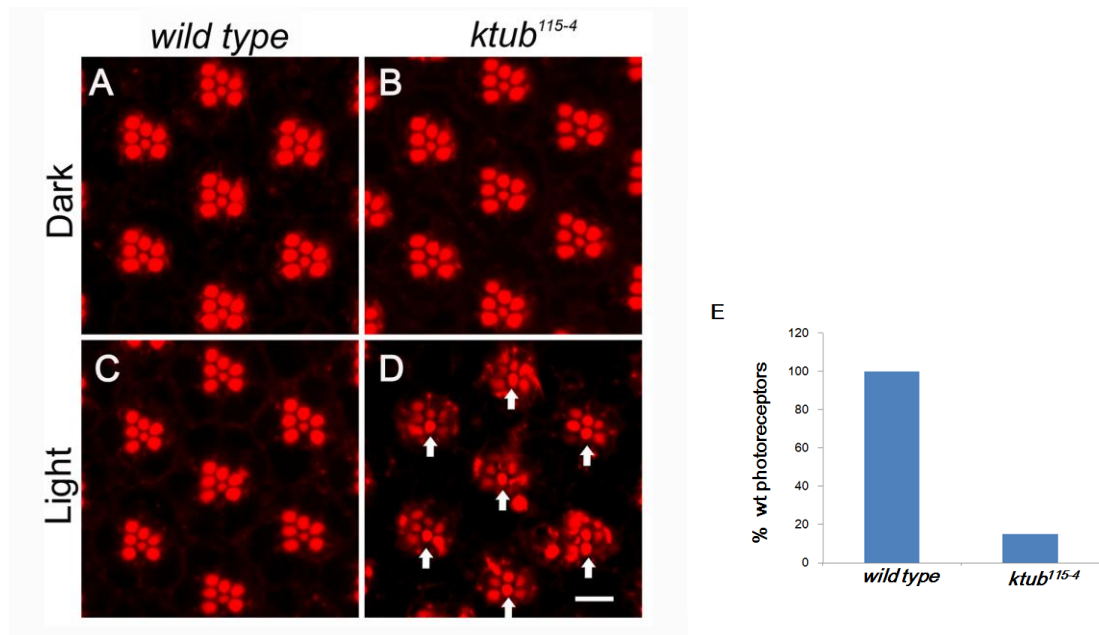
圖十四、*ktub* 基因突變果蠅 Ktub 蛋白表現降低

基因刪除果蠅 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 的定序結果示意圖(A)。利用引子擴增 2R 染色體 16988833 位點至 16990934 位點的 DNA 片段，引子進行 PCR 擴增 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 基因刪除果蠅染色體，利用此 DNA 片斷，且經由定序結果顯示 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 和 *ktub*³⁵⁻³ 果蠅分別刪除 1.6kb 和 1.3kb 的 DNA 片段。比對結果顯示 *ktub*¹¹⁵⁻⁴ 果蠅染色體刪除位點從 16988986~至 16990657。*ktub*³⁵⁻³ 果蠅染色體刪除位點從 16988988~至 16990431。刪除片段序列中包含 *ktub*-L 的轉譯起始點 ATG (16990081)。利用 Western blot 方式偵測蛋白的表現(B)，結果顯示 *ktub* 基因刪除果蠅中 Ktub 蛋白表現 (箭頭所指示位置) 明顯低於 wild type，結果中仍可見到殘留 Ktub 蛋白表現，顯示此刪除突變果蠅非無效突變體(null mutant)。α-tubulin 為內部對照組。



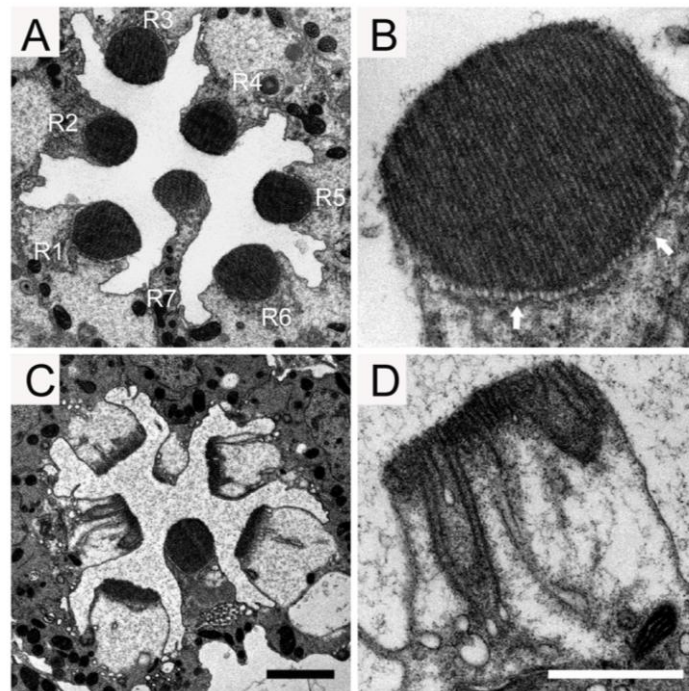
圖十五、*ktub* 突變果蠅感光細胞 Ktub 蛋白表現降低

將果蠅以固定液固定解剖眼睛後，利用 Ktub 抗體進行染色分析感光細胞 Ktub 的表現，結果顯示 wild type 果蠅感光細胞核中明顯偵測到 Ktub 訊號，*ktub* 突變果蠅感光細胞核中 Ktub 訊號明顯變弱，顯示 Ktub 蛋白仍有殘留表現且分佈於感光細胞核中。綠色表示 Ktub 蛋白，紅色表示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



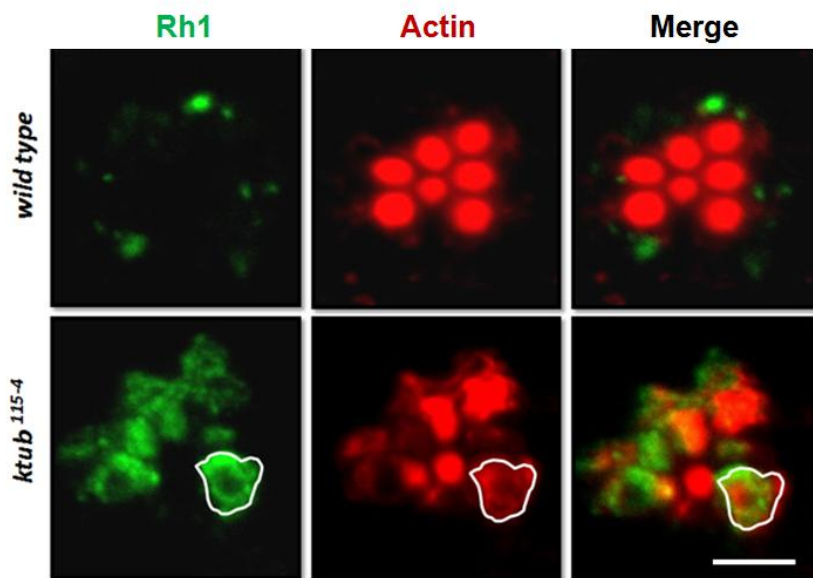
圖十六、*ktub* 突變果蠅光誘導下產生感光細胞退化現象

成蟲果蠅羽化後置於暗處 12h 後分別於暗處避光(A、B)或室內光線持續下 6 維持天(C、D)後以固定液灌流解剖取出視網膜，以 phalloidin 進行免疫螢光染色分析感光細胞型態變化。結果顯示在暗處 6 天的果蠅感光細胞型態 *ktub* 基因刪除果蠅和野生型果蠅並無明顯差異(A,B)。然而室內光線 500Lux 持續暴露 6 天後，野生型感光細胞型態仍維持和暗處相同型態(C)，然而 *ktub* 基因刪除果蠅感光細胞型態則呈現退化(photoreceptor cell degeneration)的現象(D)，R7 型態仍維持正常(箭號所指)。統計圖顯示(E)，野生型果蠅和 *ktub* 基因突變果蠅所含正常感光細胞之比例，*ktub* 基因突變果蠅約有 20% 感光細胞維持正常。感光細胞數目 126 個。感光細胞紅色表示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



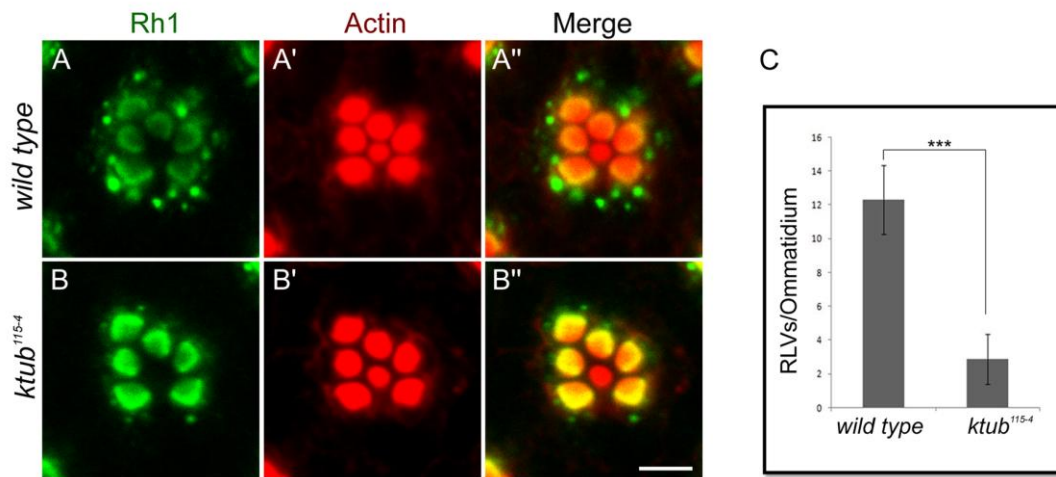
圖十七、*ktub* 突變果蠅在光線誘導下影響桿小體型態

成蟲果蠅羽化後置於暗處 24h 後，在室內光線 500lux 持續曝光 6 天，固定、解剖、脫水、包埋切片後於 Tecnai G2 Spirit TWIN (FEI Company)，下進行觀察。野生型感光細胞 R1-R7 排列呈現梯型狀，感光分子分佈位置-桿小體(rhabdomere)呈現橢圓形式(A)，以放大圖觀察桿小體內部的微絨毛(microvilli)緊密堆疊在一起，提供機械性支撐 apical microvilli 和引導來自高基氏體運往 rhabdomere 的膜 SMC (箭頭所指之處)呈現出似項鍊般結構 (B)，在 *ktub* 刪除果蠅感光細胞桿小體所組成的 microvilli 變短且呈現疏鬆的狀態(C)，且失去項鍊般型態。白色尺標顯示 2 μm ，白色尺標顯示 1 μm 。



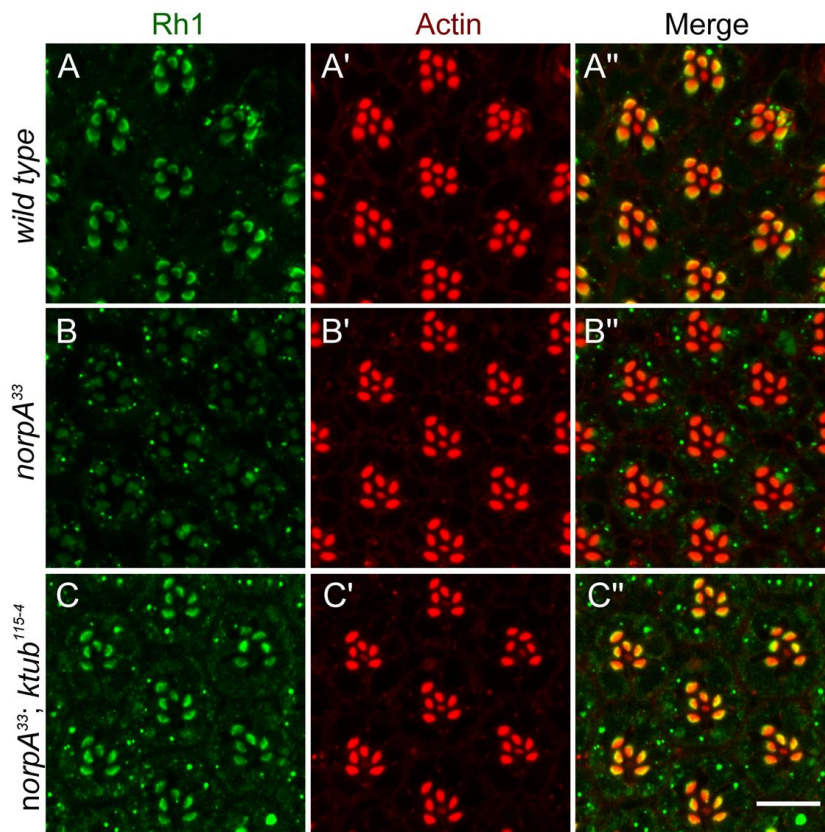
圖十八、*ktub* 突變果蠅光誘導下 Rh1 分佈異常

成蟲果蠅羽化後置於暗處 24h 後，在室內光線 500lux 持續曝光 6 天，經固定液固定後解剖眼睛以抗體進行染色。光照 6 天後 Rh1 在野生型果蠅中以囊泡(vesicles)方式分佈於感光細胞質中。*ktub* 突變果蠅顯示 Rh1 堆積在趕小體中與 F-actin 共同分佈 (白色圈起部分)。綠色表示 Rh1，紅色顯示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



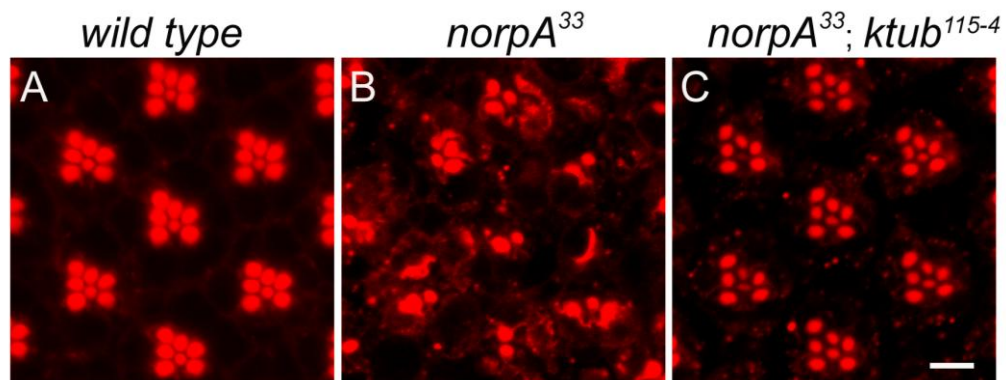
圖十九、*ktub* 突變果蠅抑制光誘導 Rh1 囊泡產生

成蟲果蠅羽化後置於暗處 24h 後，移置室內光線 500lux 曝光 3 小時，經固定液固定解剖眼睛後並以 Rh1 抗體進行染色。在 3 小時光線作用下觀察到野生型果蠅感光細胞質中，有明顯的 Rh1 囊泡 (vesicles) 形成，只有少部分 Rh1 留在桿小體 (A)。*ktub* 突變果蠅則發現細胞質有少部分的 Rh1 vesicles 形成，大部分的 Rh1 則留在桿小體上 (B)，顯示在 *ktub* 突變會影響 Rh1 內胞飲作用。細胞質中 (Rh1-immunopositive large vesicles; RLVs) 統計結果 (C)。綠色表示 Ktub 蛋白，紅色顯示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



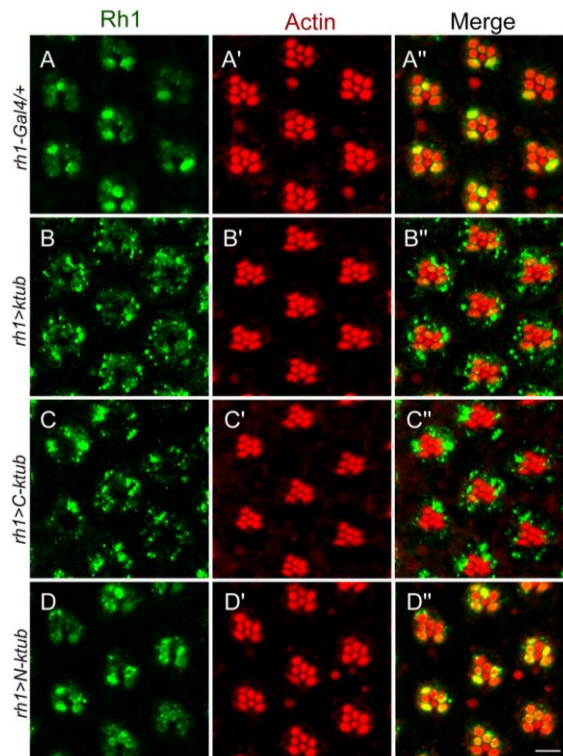
圖二十、*ktub* 突變果蠅阻斷 *norpA* 突變增加誘導 Rh1 內胞飲作用

成蟲果蠅羽化後置於暗處 24h 後，在室內光線 500lux 曝光 24 小時後，經固定液固定解剖眼睛後並以 Rh1 抗體進行染色。在 24 小時光線作用下觀察發現相對於野生型果蠅感光細胞(A)，*norpA* 突變果蠅 Rh1 的分佈幾乎都分佈感光細胞質(B)，*norpA* 與 *ktub* 同時突變果蠅觀察到有一些 Rh1 囊泡分佈在感光細胞質，但是主要 Rh1 訊號則分佈在感光細胞的桿小體(C)。綠色表示 Rh1 蛋白，紅色顯示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



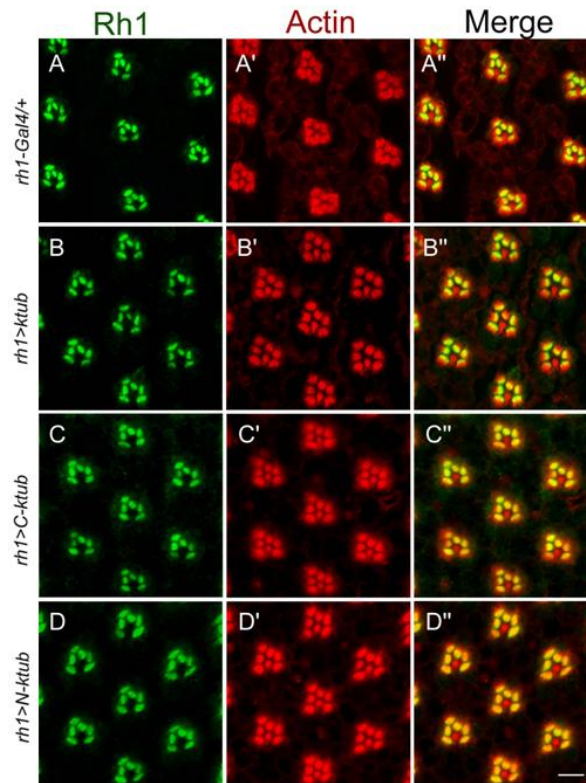
圖二十一、*ktub* 突變果蠅阻斷 *norpA* 誘導感光細胞退化作用

成蟲果蠅羽化後置於暗處 24h 後，在室內光線 500lux 曝光 6 天後，經固定液固定解剖眼睛後並以 F-actin 進行染色，並觀察眼睛型態。在 6 天光線作用下觀察發現 *norpA* 突變果蠅感光細胞退化顯著，感光細胞的桿小體產生嚴重缺失現象(B)，然而在 *norpA* 與 *ktub* 同時突變果蠅中，可觀察到桿小體型態恢復成橢圓形(C)，型態接近野生型感光細胞(A)。以上結果顯示，*ktub* 突變可以抑制 *norpA* 突變導致感光細胞退化情形。紅色顯示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



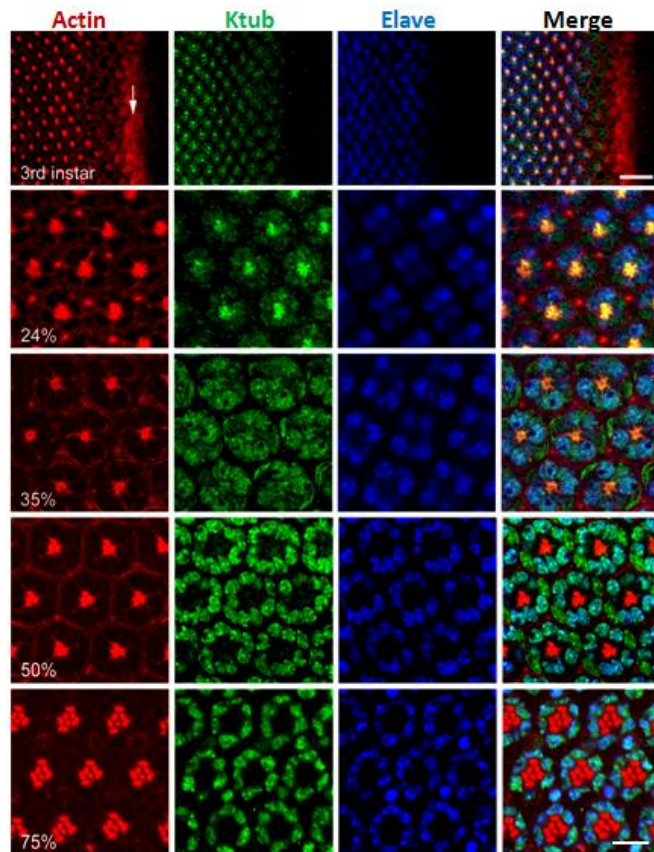
圖二十二、Ktub domain 參與感光細胞誘導 Rh1 作用

Rh1-Gal4 果蠅分與 wild type、*ktub* (*pUAST-flag-ktub*)、C domain (*pUAST-flag-dN-ktub*) 和 N domain (*pUAST-flag-dC-ktub*) 的果蠅交配，促使在 R1-R6 大量表現全長、Ktub C 端和 N 端的 Ktub 蛋白。在 500lux 光誘導下觀察對照組 *Rh1-Gal4/+* 的感光細胞中可見到部分 Rh1 堆積在桿小體，有一些桿小體幾乎沒有 Rh1 訊號(A)，當大量表現全長 Ktub 時，Rh1 堆積在感光細胞質(B)。大量表現 Ktub C 端蛋白仍可觀察到大量 Rh1 堆積在感光細胞質(C)。然而大量表現 Ktub 的 N 端蛋白時，Rh1 分佈和表現與 *Rh1-Gal4/+* 控制組相同(D)。綠色顯示 Rh1，紅色顯示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



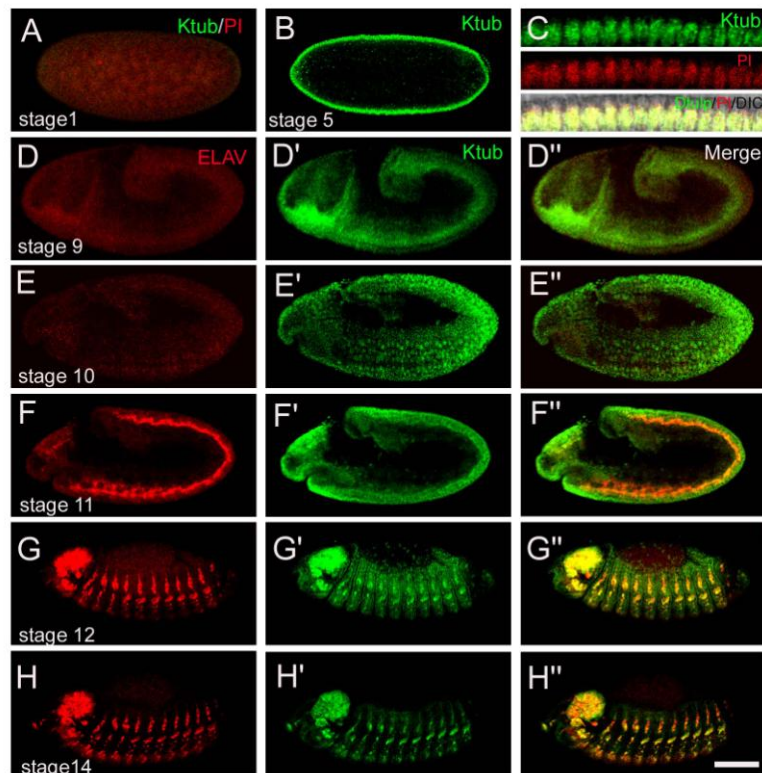
圖二十三、大量表現 Ktub 不會影響 Rh1 運送至桿小體

Rh1-Gal4 果蠅分與 wild type、*ktub* (*pUAST-flag-ktub*)、C domain (*pUAST-flag-dN-ktub*) 和 N domain (*pUAST-flag-dC-ktub*) 的果蠅交配促使在 R1-R6 大量表現全長、Ktub C 端和 N 端的 Ktub 蛋白。將羽化後果蠅置於黑暗環境下觀察 Rh1 分佈情形。結果顯示無論是對照組 *Rh1-Gal4/+* 或大量表現全長 Ktub、Ktub C 端或 Ktub 的 N 端蛋白時，Rh1 皆分佈在桿小體細胞中，細胞質並無 Rh1 訊號。顯示在大量表現 Ktub 或不同 domain 果蠅感光細胞 Rh1 仍可正常地運送到桿小體。綠色顯示 Rh1，紅色顯示 phalloidin，白色尺標顯示 10 μ m。



圖二十四、果蠅眼睛發育過程 Ktub 表現和分佈情形

分別收取果蠅三齡幼蟲、蛹期 24%、35%、50%、75% 不同發育階段之果蠅以固定液固定解剖出眼睛後，利用 Ktub 抗體進行染色分析。結果顯示 Ktub 分佈在三齡幼蟲眼碟的感光細胞 apical tip 的位置，蛹期 24%的感光細胞 Ktub 訊號更加集中，隨著發育時間增加 35%~50%感光細胞核訊號明顯。75% Ktub 分佈在果蠅感光細胞核。綠色表示 Ktub 蛋白，藍色表示 Elav：標示細胞核，紅色表示 phalloidin，白色箭頭指示型態發生溝，白色尺標顯示 10 μ m。



圖二十五、Ktub 分佈在果蠅胚胎中樞神經和週邊神經系統

將果蠅培養於含有葡萄汁培養基中，置於 25°C 溫度下 24 小時後收集培養基上蛋脫去外殼和內膜後進行染色。結果顯示果蠅 Ktub 表現於胚胎發育 stage 5 胚盤細胞化過程和 PI 共同分佈細胞核(B、C)。神經細胞尚未分化時，Ktub 分佈在感覺神經前驅細胞中(D、E)，當神經細胞分化完成時，Ktub 分佈在腦、中樞神經和週邊神經(F~H)。綠色表示 Ktub 蛋白，藍色表示：標示細胞核，紅色表示 PI(Propidium iodide)和 Elav。白色尺標顯示 10 μ m。