

甘藷塊根澱粉磷解酶之蛋白質交互作用

Protein-Protein Interaction of Starch Phosphorylase from Sweet Potato Roots

林怡岑 吳建興 張世宗 莊榮輝

國立臺灣大學 微生物與生化學研究所 生物化學組

摘要

近年來在基因及生化學方面的研究顯示，澱粉的合成可能經由幾個澱粉合成相關酵素互相结合，以蛋白質複合體的形式來進行，Tetlow 等人 (2004) 在小麥造粉體中發現磷酸化之澱粉磷解酶可能與澱粉分支酶互相结合；玉米粒中，Yu 等人 (2001) 也推測澱粉磷解酶可能與澱粉合成相關酵素互相结合。另外，本實驗室發現澱粉磷解酶 (L-SP) 在其氨基酸序列上，具有 PEST region 及 destruction box 等訊號序列，顯示容易遭受降解；而研究也發現 L-SP 的確容易降解，並可能與其活性調節有關 (Chen et al., 2002)。張世宗 (1999) 在純化 L-SP 的過程中，發現一高分子量 L-SP 活性色帶 HX，並推測 HX 可能是 L-SP 和 proteasome 的結合體。陳安娜 (2001) 續以親和層析管的專一性吸附能力，證明 L-SP 與 proteasome 可能互相结合。林怡岑 (2003) 以雙向免疫擴散，證實 HX 的確是 L-SP 與 proteasome 的結合體。周宜旻 (2005) 利用 Blue native PAGE 加上 LC-MS/MS 的身分鑑定，確定 HX 為 L-SP 與 proteasome 的蛋白質複合體。進一步 Young 等人 (2005) 發現磷酸化修飾之 L-SP 會導致分子中央一段胺基酸序列 (L78) 移除。本論文接續上述研究，以免疫共沉澱實驗探討 HX 可能是那些蛋白質所構成的複合體，結果顯示除了 proteasome 可能與 L-SP 互相结合之外，另外發現一個分子量約 65 kDa 的蛋白質也可能與 L-SP 互相结合，經 LC-MS/MS 定序的結果為 D-enzyme；另外，利用 Blue native PAGE 配合 LC-MS/MS 的鑑定，也觀察到 HX 的次單元組成包含了 L-SP、proteasome 與 D-enzyme，於是重新檢視 L-SP 高分子量活性色帶，發現除了有 proteasome 色帶重疊外，亦有 D-enzyme 的高分子量活性色帶，這些結果皆顯示 L-SP 和 proteasome 及 D-enzyme 可能互相结合；進一步以 2DE 分析 HX 的結果顯示 L-SP 可能受到磷酸化修飾，造成等電點及分子量都有 shift 的現象，這些結果使我們推測 L-SP 可能經由不同位置的磷酸化修飾而與不同的蛋白質構成不同形式之蛋白質複合體，以扮演不同的生理角色。

結果

● 以 HX 進行免疫共沉澱實驗結果顯示，除了 proteasome 可能與 L-SP 互相结合之外，另外發現一個分子量約 65 kDa 的蛋白質也可能與 L-SP 互相结合，經 LC-MS/MS 定序的結果確認為 D-enzyme

Fig. 1a-b 將部分純化之 HX 與共價性接合在 protein A agarose 上的 anti-L-SP mAb (H7c) 進行免疫共沉澱實驗，接著將專一性結合之蛋白質流出，進行 12.5% SDS-PAGE 之 CBR 染色 (a)。Lane 1, 8 為 marker, Lane 2 為十分之一的注入樣品, Lane 3-6 為四重複之實驗組, Lane 7 為控制組 (protein A agarose 上並未接合抗體)。在 Lane 3-6 實驗組中主要發現三個不同於 L-SP 的蛋白質色帶，經 LC-MS/MS 定序結果分別為 DPE1 (D-enzyme)、20S proteasome subunit、Proteasome delta subunit (b)。

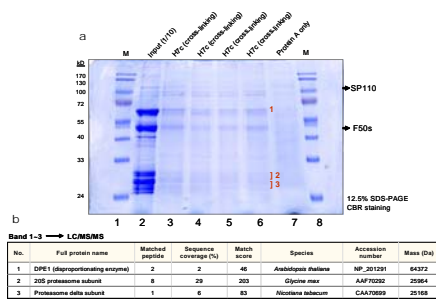


Fig. 1c-e 將部分純化之 HX (80 μg) 與共價性接合在 protein A agarose 上的 anti-L-SP mAb (H7c) 進行免疫共沉澱實驗，接著將專一性結合之蛋白質流出，進行 12.5% SDS-PAGE 之 CBR 染色 (c)，並經電泳轉印，利用 H7c (d) 及 anti-20S proteasome pAb (e) 進行免疫呈色。Lane 1 為 marker, Lane 2 為十分之一的注入樣品, Lane 3 為實驗組, Lane 4 為 mock (protein A agarose 上並未接合抗體) 為 anti-HA mAb, Lane 5 為控制組 (protein A agarose 上並未接合抗體)。利用 H7c 及 anti-20S proteasome pAb 進行免疫呈色的結果顯示 HX 中的 L-SP 及 20S proteasome 互相结合。

Fig. 1c-e HX (50 μg) 先以 2DE (7 cm IPG strip, pH 4-7) 分析，然後進行 CBR 染色 (c) 及電泳轉印，利用 anti-L-SP mAb (H7c) (d) 及 anti-D-enzyme mAb (Y4F-Z6H) (e) 免疫呈色，結果顯示 L-SP 及 D-enzyme 都有等電點改變 (pI shift) 的現象，可能是磷酸化或醃基化所造成的結果。

Fig. 2a-b HX 先進行 6% native-PAGE 後再進行 12.5% SDS-PAGE，利用二維電泳的方式觀察 HX 之次單元組成，並以 CBR 染色 (a)，發現除有 L-SP 和 proteasome 外，還有一條分子量約 65 kDa 的蛋白質色帶，經 LC-MS/MS 定序的結果為 DPE1 (D-enzyme) (b)。

Fig. 2c-d HX 先進行 6% native-PAGE 後再進行 12.5% SDS-PAGE，利用二維電泳的方式觀察 HX 之次單元組成，並進行 CBR 染色 (c) 及電泳轉印，利用 anti-D-enzyme mAb (Y4F-Z6H) 免疫呈色 (d)，結果顯示 HX 中除了含有 L-SP 和 proteasome 外，還有一條分子量約 65 kDa 的蛋白質色帶，免疫呈色結果顯示此蛋白質為 D-enzyme。

Fig. 3a-e 利用膠體過濾法 (Sephacryl S-300) 部分純化 HX，進行 7.5% native-PAGE 之 CBR 染色 (b)、L-SP 活性染色 (c) 及 D-enzyme 活性染色 (d, e)，發現 HX 的電泳位置除了有 L-SP 的高分子量活性色帶及 proteasome 色帶外，也有 D-enzyme shift 到高分子量的活性色帶。

Fig. 3f-g 利用膠體過濾法 (Sephacryl S-300) 部分純化 HX，將各分劃進行 7.5% native-PAGE (包含 0.1% glycogen) 之電泳轉印，利用 anti-D-enzyme mAb (Y4F-Z6H) (f) 及 anti-L-SP mAb (H7c) (g) 進行免疫呈色，發現 HX 的電泳位置除了有 L-SP 的高分子量色帶外，也有 D-enzyme shift 到高分子量的色帶。

● 以 2DE 分析 HX 之結果顯示 L-SP 可能受到磷酸化修飾，造成等電點及分子量都有 shift 的現象

Fig. 4a-b (a) 將 HX 與 Calf Intestine Alkaline Phosphatase (0.67 U/μL) 混合，置於 37°C 下反應 0 至 8 h，進行 6% native-PAGE 之 L-SP 活性染色。Lane 1, 3, 5 為單獨的 HX (控制組)；Lane 2, 4, 6 為 HX 與 CIAP 反應 0, 4, 8 h。(b) 將 HX 與 ATP 混合，置於 35°C 下反應 0 至 2 d，進行 6% native-PAGE 之 L-SP 活性染色。Lane 1 至 Lane 3 為單獨的 HX (控制組)；Lane 4 至 Lane 6 為 HX 與 ATP/Mg²⁺ 反應，ATP/Mg²⁺ 的最終濃度為 4 mM。

Fig. 4c-e HX (50 μg) 先以 2DE (7 cm IPG strip, pH 4-7) 分析，然後進行 CBR 染色 (c) 及電泳轉印，利用 anti-L-SP mAb (H7c) (d) 及 anti-D-enzyme mAb (Y4F-Z6H) (e) 免疫呈色，結果顯示 L-SP 及 D-enzyme 都有等電點改變 (pI shift) 的現象，可能是磷酸化或醃基化所造成的結果。

● 利用 Blue native PAGE 配合 LC-MS/MS 的鑑定及免疫呈色，觀察到 HX 的次單元組成包含了 L-SP、proteasome 與 D-enzyme

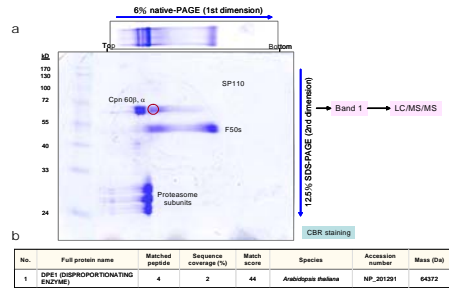
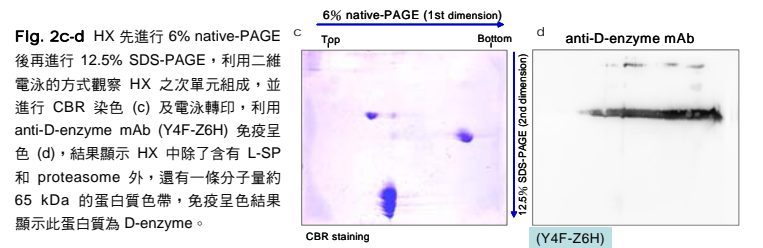
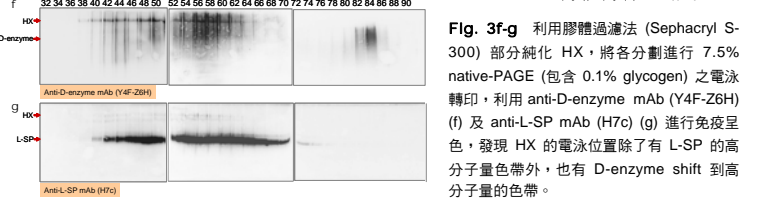
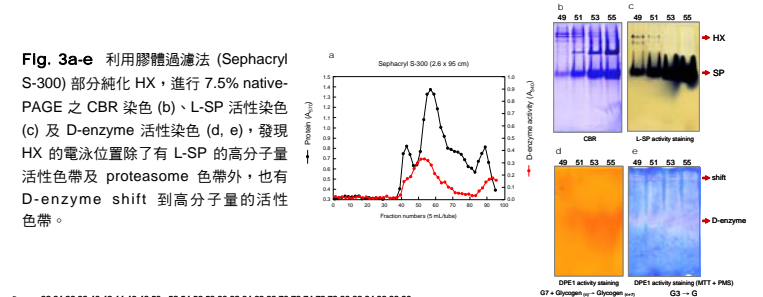


Fig. 2a-b HX 先進行 6% native-PAGE 後再進行 12.5% SDS-PAGE，利用二維電泳的方式觀察 HX 之次單元組成，並以 CBR 染色 (a)，發現除有 L-SP 和 proteasome 外，還有一條分子量約 65 kDa 的蛋白質色帶，經 LC-MS/MS 定序的結果為 DPE1 (D-enzyme) (b)。



● 觀察 L-SP 高分子量活性色帶，發現除了有 proteasome 色帶重疊外，也可觀察到 D-enzyme 的高分子量活性色帶



● 以 2DE 分析 HX 之結果顯示 L-SP 可能受到磷酸化修飾，造成等電點及分子量都有 shift 的現象

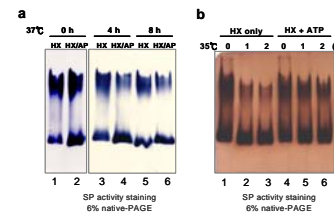


Fig. 4a-b (a) 將 HX 與 Calf Intestine Alkaline Phosphatase (0.67 U/μL) 混合，置於 37°C 下反應 0 至 8 h，進行 6% native-PAGE 之 L-SP 活性染色。Lane 1, 3, 5 為單獨的 HX (控制組)；Lane 2, 4, 6 為 HX 與 CIAP 反應 0, 4, 8 h。(b) 將 HX 與 ATP 混合，置於 35°C 下反應 0 至 2 d，進行 6% native-PAGE 之 L-SP 活性染色。Lane 1 至 Lane 3 為單獨的 HX (控制組)；Lane 4 至 Lane 6 為 HX 與 ATP/Mg²⁺ 反應，ATP/Mg²⁺ 的最終濃度為 4 mM。

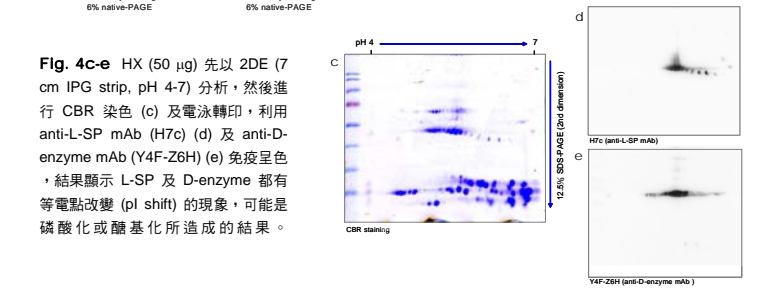


Fig. 4c-e HX (50 μg) 先以 2DE (7 cm IPG strip, pH 4-7) 分析，然後進行 CBR 染色 (c) 及電泳轉印，利用 anti-L-SP mAb (H7c) (d) 及 anti-D-enzyme mAb (Y4F-Z6H) (e) 免疫呈色，結果顯示 L-SP 及 D-enzyme 都有等電點改變 (pI shift) 的現象，可能是磷酸化或醃基化所造成的結果。