

甘藷澱粉磷解酶不需醣引子活性之分子機制探討

Molecular mechanism for the primer-independent activity of L-form starch phosphorylase from sweet potato roots

王宏祥 莊榮輝

國立臺灣大學 微生物與生物化學研究所 生物化學組

摘要

澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP; EC 2.4.1.1) 為植物體內參與澱粉代謝的重要酵素之一，催化 α -1,4-葡聚糖 (α -1,4-glucan) 的可逆磷酸反應，可以從葡聚糖的非還原端加入或移走一個葡萄糖單位，在甘藷塊根中發現有兩種主要澱粉磷解酶之同功酶，根據對於澱粉親和力的不同，分為 H-SP (high affinity) 與 L-SP (low affinity)，而在澱粉代謝當中兩者所扮演的生理角色還有待釐清。

在 *in vitro* 中，L-SP 合成澱粉的活性有兩種，需醣引子之合成直鏈醣的活性 (primer-dependent activity)，與不需醣引子合成直鏈醣的活性 (primer-independent activity, PI activity)，前者一般認為是 L-SP 分子上的 PLP 與 Glc-1-P 結合，而 primer 與 starch binding site 結合，進行澱粉合成反應；而 PI activity，我們提出了不一樣的假設，Glc-1-P 有兩個結合區域，一為 PLP 結合區 (A site)，另一個為 L78 結合區 (B site)；早期的研究中，發現 PI activity 催化速率有三個 phases，本研究利用酵素動力學的方式，解釋其中可能的分子機制。如果當 L-SP 分子中央的 78 個胺基酸 (L78) 被移除，PI activity 會完全消失，但需醣引子活性卻會上升，使其催化行為類似 H-SP。研究中外加表現的 L78 於中央序列被移除的 L-SP，成功 rescue PI activity，證明 L78 對 PI activity 有所貢獻，進一步使用軟體比對，發現 L78 可能與 Glc-1-P 作用的兩個胺基酸 (Glu⁵²⁸, Lys⁵²⁹)，加強了 B site 結合區的可能性。於是利用 Glc 與 Mal 取代 Glc-1-P 在 B site 的結合位置，結果顯示 Mal 的出現，使催化速率剩下兩種 phases，同時減弱了 L78 對 PI activity 的必要性。最後的研究中還發現 proteasome 可以降解 L-SP 中央序列。

綜合上述，推測 L-SP 在澱粉代謝中，可能扮演 primer 合成的角色，而隨著 primer 的長度增加，使其催化效率大幅提升，並且利用 proteasome 的降解方式調節 L-SP 的活性，來配合生理環境的改變。

實驗結果

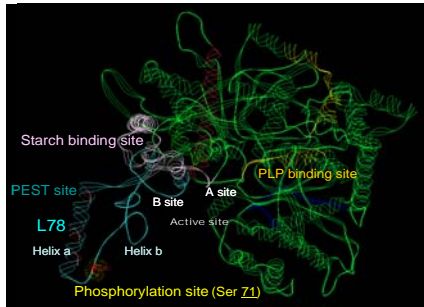
L-SP 之結構與序列顯示其功能性

甘藷 L-SP 套用兔肌 Glycogen Phosphorylase 的三級結構。

PLP binding site (A site) – 利用 pyridoxal phosphate 上的 phosphate 以離子鍵與 Glc-1-P (Pi) 結合。

Starch binding site – 與 glucan 結合，搭配 PLP 上的 Glc-1-P (Pi) 於 active site 進行合成 (磷解) 澱粉反應。

L78 (loop 78) – L-SP 的中央序列，突出於 starch binding site 外部形成一個 loop，此 loop 可能阻礙澱粉與 L-SP 的結合。



L78 序列顯示出許多訊息。

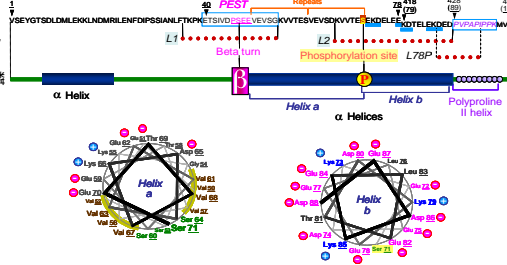
PEST region – 蛋白質被降解的訊號。

Phosphorylation site – L78 上被磷酸化的位置。

L1 – L1 抗體所辨識的 epitope (polyclonal antibody)。

L2 – L2 抗體所辨識的 epitope (polyclonal antibody)。

L78P – L78P 抗體所辨識的 epitope (monoclonal antibody)。

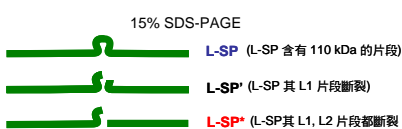
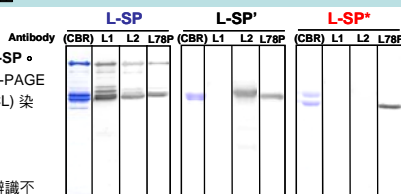


Chen et al., (2002) Physiologia Plantarum 114:506-515

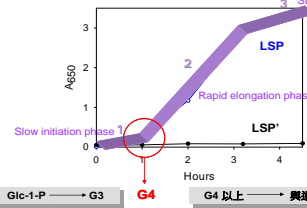
L-SP 以不同的降解形式存在

利用抗體區分出三種不同斷裂程度的 L-SP。每條 lane 注入 2 μ g 的蛋白質，以 15% SDS-PAGE 進行電泳，最後分別以 CBR 與 western (ECL) 染色。

- L-SP – 含有 110 kDa 片段。
- L-SP' – 不含有 110 kDa 片段，且 L1 抗體辨識不到。
- L-SP* – 不含有 110 kDa 片段，且 L2 抗體辨識不到，但是 L78P 抗體有訊號。



L-SP 具有 PI activity 且其催化速率具有三個 phases



	L-SP			L-SP'		
	1/Km	Vmax	Vmax/Km	1/Km	Vmax	Vmax/Km
G2	0.018	1.66	0.031	0.02	1.83	0.03
G3	0.28	0.86	0.24	0.20	1.49	0.29
G4	6.63	3.21	21.27	7.43	3.38	25.09
G5	7.87	3.14	24.68	7.10	3.69	26.21
G6	6.62	3.18	21.05	6.76	3.70	25.03
G7	7.46	3.31	24.70	8.19	3.51	28.74

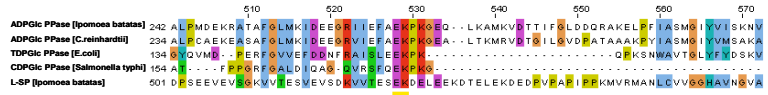
圖四. L-SP 的 PI activity 有三種催化速率：1. slow initiation phase；2. rapid elongation phase；3. steady-state phase。L-SP' 則無此活性。

L-SP (3 μ g) 與 L-SP' (3 μ g) 只外加 Glc-1-P (60 mM)，每小時收一次時間點，活性測定以鉍藍法偵測磷酸的生成。根據表一的結果，G4 可能為一轉折點。

表一. L-SP 與 L-SP' 皆在 G4 之後，活性大幅增加。

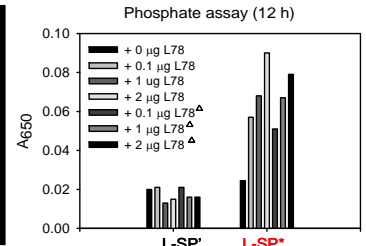
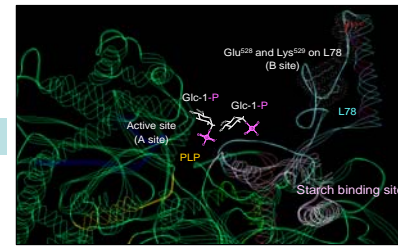
L-SP (3 μ g) 與 L-SP' (3 μ g) 加入 Glc-1-P (60 mM)，再分別加入 G2-G7 進行酵素動力學測試，活性測定以鉍藍法偵測磷酸的生成。(G2: maltose; G3: maltotriose; G4: maltotetrose; G5: maltopentose; G6: maltohexose; G7: maltoheptose)

L-SP 可能利用 L78 上的 Glu⁵²⁸ 和 Lys⁵²⁹ 與 Glc-1-P 產生交互作用



NDPGlc PPase 與 L-SP 的序列比對 (軟體: Clustal_W)。

利用具有 Glc-1-P binding site 的 NDPGlc PPase，與 L-SP 序列比對，發現 NDPGlc PPase 與 Glc-1-P 產生交互作用的兩個胺基酸 (Glu, Lys)，也發現在 L-SP 的 L78 身上 (黃色底線所標示)。



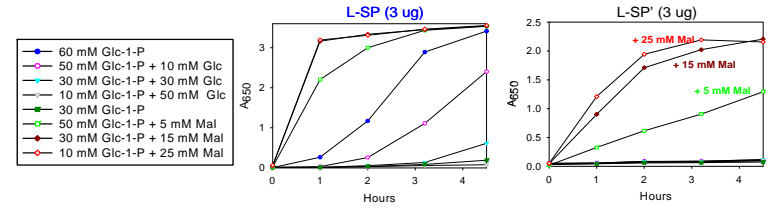
L-SP 之 PI activity 可能的分子機制。

利用具 L78 上的 Glu⁵²⁸, Lys⁵²⁹，與 B site 的 Glc-1-P 結合，A site 則用 PLP 與 Glc-1-P 結合，進行 primer 的合成。

外加表現的 L78 可以 rescue L-SP' 的 PI activity。

加熱 100°C 處理與未加熱處理的 L78，依照 0.1 μ g, 1 μ g, 2 μ g，分別外加到 L-SP' (2 μ g) 與 L-SP* (2 μ g)，37°C 下反應 12 小時，活性測定以鉍藍法偵測磷酸的生成。

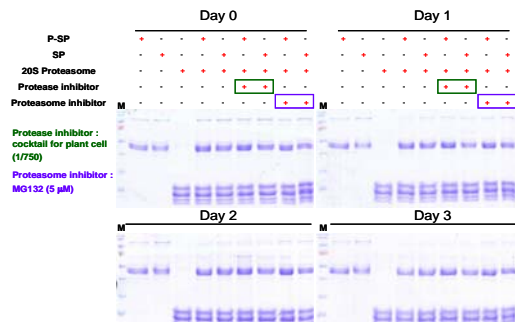
L-SP 對於 Glc 與 Mal 可能有不同的催化機制



以 Glc 與 Mal 取代 Glc-1-P，觀察 PI activity 催化速率的改變。

L-SP (3 μ g) 與 L-SP' (3 μ g) 以不同基質濃度比例，測定活性每小時收一次時間點，活性測定以鉍藍法偵測磷酸的生成。當 Glc 取代 Glc-1-P 越多，活性越弱，反觀 Mal 取代越多，活性越強，且催化速率剩下兩種 phases。Mal 存在下，L-SP 斷裂與否並無顯著影響。(Glc: glucose; Mal: maltose)

L-SP 可能是經由 proteasome 降解的方式調節其活性



Proteasome 可以降解 L-SP 分子。

L-SP (2 μ g) 與 P-SP (2 μ g) 分別加入甘藷塊根中純化出來的 proteasome (2 μ g)，37°C 反應下，每 24 h 收一次時間點，以 15% SDS-PAGE 檢測 L-SP 的斷裂情形，並以 proteasome 與 protease inhibitor 確定降解活性的來源。

- P-SP: 利用甘藷塊根純化出來的 L-SP 的 kinase (LSK)，將 L-SP 磷酸化後，再經由 superose 6 純化得之。
- M: Pre-stained marker。