

B4

相關研究計畫

國科會研究計畫

甘藷澱粉磷解酶激酶之純化與性質檢定

甘藷澱粉磷解酶激酶之純化與性質檢定

中文摘要

澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP) 一般認為是植物分解其貯藏性多醣的重要酵素，其蛋白質是由兩個 110 kD 次體所組成的二元體，原態分子量為 220 kD。與動物的同源酵素 肝糖磷解酶 (glycogen phosphorylase, GP) 比較，SP 分子的中央多出一段由 78 個胺基酸組成的 α 螺旋 (L78)；L78 可能是由 intron 演變而來，剛好插入 SP 與基質結合區的正中位置，阻礙了澱粉與酵素之結合，可能因此而降低活性。在研究 SP 的過程中，發現 SP 分子非常容易斷裂，成為一群分子量約為 50 kD 的片段 (F50)；推測可能是在 L78 上的 PEST site 上斷開。但 SP 分子在斷開後，仍保有其完整的四級構造，且其催化活性與基質的親和力都有增加。已知動物細胞內的 GP 有很複雜的酵素調節作用，如磷酸化、異位酶調節等，但 SP 分子構造上則缺乏這些特徵；我們推測 L78 的存在，及其易受水解的特性，很可能是植物細胞用來調節 SP 活性的一種機制。以電腦程式 PC/GENE 搜尋 L78 上的胺基酸序列，發現有很強的磷酸化位址，經單株抗體檢定確有磷酸化 Ser，而以放射性 ATP 標示，也發現 SP 分子可以被接上放射性磷；另外在 L78 的 C-端側發現有 Pro-rich 序列，可能與 SH3 domain 有專一性結合，而 SH3 是信息傳導的重要聯結分子。我們也發現 SP 可以在沒有引子的存在下，使用 Glc-1-P 合成長達數千葡萄糖單位的直鏈澱粉。因此，我們擬由 SP 的磷酸化，以及 SP 可能參加的信息傳導網路，推知植物細胞中澱粉顆粒生合成的誘導，與其細胞層次的調節控制是如何發生。由於我們已確知 SP 會受到磷酸化，因此甘藷塊根中一定有可以進行磷酸化的激酶存在。因此，本年度計畫將要接著完成下面三項工作：(1) 純化此 SP 激酶並檢定其生物化學的基本性質；(2) SP 的磷酸化是否確實與信息傳導有關；(3) 製備 SP 激酶的抗體以作為檢定的方便工具。

研究計畫之背景及目的

一、本計畫之研究背景：

動物的肝糖磷解酶有極為複雜的調控機制：

以貯藏性多醣類為基質的磷解酶 (phosphorylase)，是生物體內重要的醣類代謝酵素 (Fletterick and Madsen, 1980)。尤其在動物細胞中，肝糖磷解酶 (glycogen phosphorylase, GP) 影響動物體內血醣濃度的高低，有極複雜的酵素調節及控制系統，數十年來被研究得很透澈，有關的重要結論例如：

- a. GP 可經磷酸化，由不具活性的 b 型轉變為活性 a 型；反之則由去磷酸反應，變為不具活性的 b 型。磷酸化的位置在 Ser 14。
- b. GP 有許多 allosteric effectors，如 caffeine 及葡萄糖均為抑制性影響；而 AMP 則為 activator。都可誘導蛋白質分子構形的改變，造成抑制或活化效果。
- c. 肝糖磷解酶對基質有一結合位置，距活性區 30 埃，方便與肝糖結合，GP 的細部分子構造已經由 X 光繞射分析解出 (Acharya et al., 1991; Johnson and Barford., 1990)。

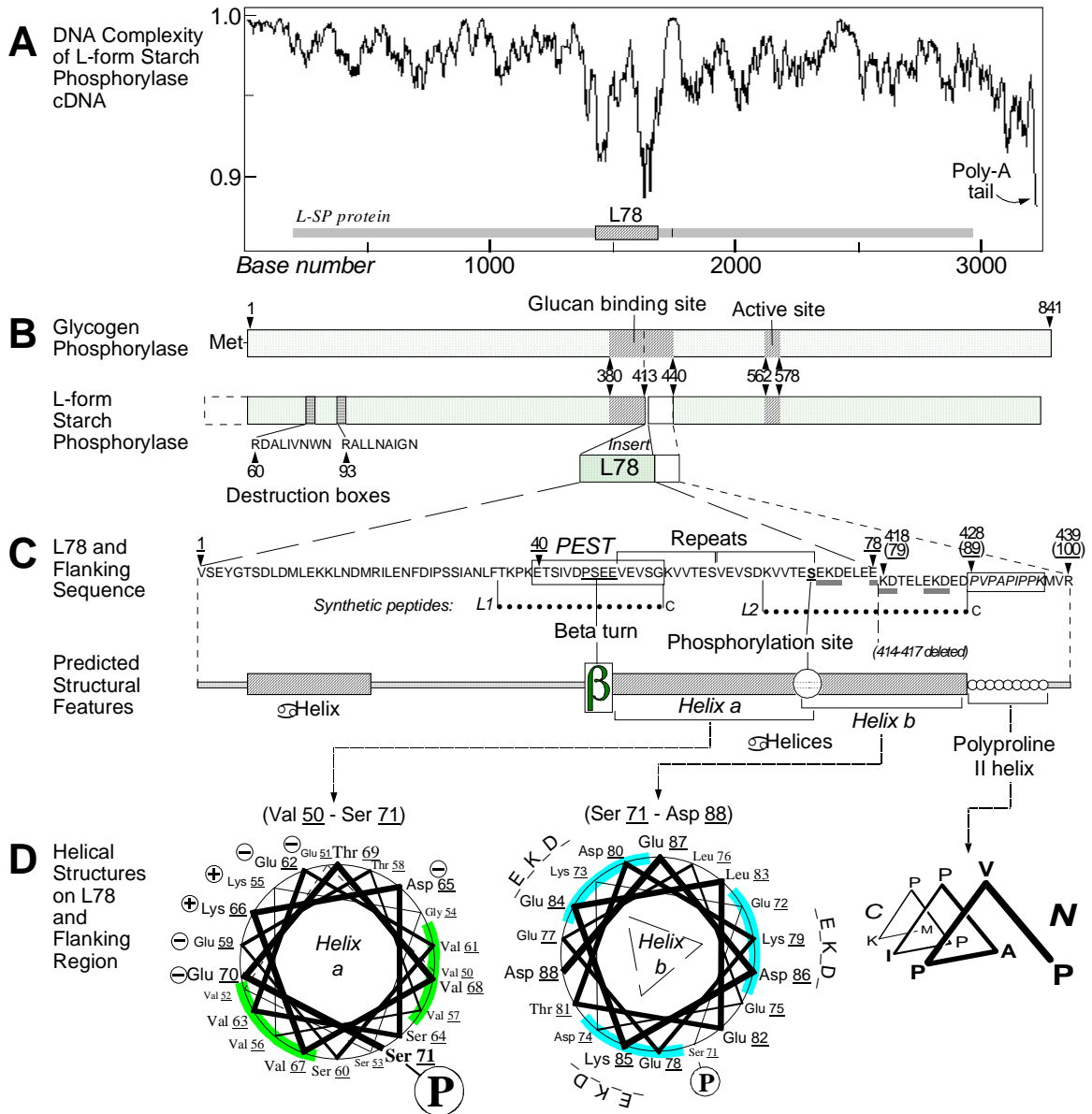
植物的澱粉磷解酶很容易降解但仍保持其原態四級構造：

對等於動物的 GP，澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP) 則被認為是植物分解其貯藏性多醣的重要酵素 (Steup, 1988)，本研究群體已從甘藷塊根中純化此酵素 (Chang et al., 1987)，群殖得到其 cDNA 及 genomic DNA 並且定序完成 (Lin et al., 1991)。一般的生化研究，則檢定 SP 的蛋白質四級構造，是由兩個 110 kD 次體組成的二元體，故原態分子量為 220 kD (Chang et al., 1987)。在研究 SP 的過程，發現 SP 分子非常容易降解，可在 SDS-PAGE 得到一群分子量約 50 kD 的片段 (F50)，推測可能是 SP 在分子的中央裂解所得 (Chiang et al., 1991)；而 SP 分子雖然斷裂，但仍然可維持其三、四級構造，而具有原來的催化活性。我們也對 SP 製備得單株抗體多株，發現不同的單株抗體會與不同的 SP 片段結合，在判定分子的斷裂點及其他研究工作上極為有用 (Chern et al., 1990)。Brisson 等也檢定馬鈴薯 SP 的基因表現，發現其 SP 可能也受到轉譯後之調節 (St-Pierre et al., 1996)。

澱粉磷解酶分子中央多出一段由 78 個胺基酸組成的多肽：

日本大阪大學的福井等人 (Nakano and Fukui, 1986)，群殖馬鈴薯 SP cDNA，並由其胺基酸一級構造預測 SP 分子的三次元結構。與 GP 比較後發現，SP 與 GP 的立體構造相當相似，但在分子的正中央，多出一個 78 胺基酸的 α 螺旋環 (L78)。此環位置剛好切入上述 GP 的多醣結合區，且突出分子表面，造成了 SP 對澱粉結合的障礙。此外 GP 所有的磷酸化、allosteric effect 等作用，在 SP 上均不存在；

因此 SP 不像 GP，沒有明顯的調節機制。以 PC/GENE 分析 SP 的胺基酸序列，我們發現在 L78 分子的正中央，有一很強的 PEST site；表示其半衰期很短，可能肇因於蛋白酶對 L78 的攻擊。以上有關的分子構造關係，整理於圖一。福井也由馬鈴薯中群殖得 SP 的 H 型異構酶 (Mori et al., 1991)，H 型 SP 分子中因無 L78，故對肝糖的和力較高；他們把 L 型中的 L78 片段植入 H 型中，發現修改後的 H 型 SP 對澱粉的親和力因而下降 (Mori et al., 1993)。我們亦發現 β-澱粉酶會抑制 SP 的活性，可能與基質的競爭有關 (Pan et al., 1988)。



圖一 澱粉磷酸酶的分子構造特徵

(A) 澱粉磷酸酶比肝糖磷酸酶多出一段由 78 個胺基酸所組成的片段 (L78)，經比對核酸序列的複雜度，發現 L78 可能是由 intron 所衍生的。(B) L78 附近的 100 個胺基酸序列，有相當的奇特的分子構造 (C)，其中有很強的磷酸化 Ser 位置，連接著兩段連續的 α 螺旋構造 (D)，其後並有一段可與 SH3 結合的 polyproline II helix，暗示著澱粉磷酸酶可能具有與信息傳導相關的功能。

二、本計畫之研究動機：

澱粉磷解酶也有複雜的調控機制？

基於以上背景，我們對 SP 的蛋白質構造與酵素功能間的關係非常有興趣，並提出一個假說。認為 SP 並非完全沒有調節機制，它可能先以類似 酶原 的方式存在，此時酵素分子因為有 L78 的立體障礙，對澱粉的結合力很低；當 L78 被蛋白酶切開之後，活性才提高起來。而斷開後的 SP，仍可維持原來的分子構形，並不散開，且因與基質的結合力大增，造成活性的升高。尤其在與 GP 的胺基酸或核苷酸序列比較後，發現 L78 可能是由早先的 intron 演變而來的 (Camirand et al., 1990)，更給這個機制之存在源由，提供有趣的說明。

上一期三年計畫已獲致相當的結果：

為了證實此一假說，我們在前一期的三年計畫，探討有關的生化學研究，果然發現澱粉磷解酶分子斷裂時，其最高催化速率 V_{max} 漸漸升高，同時與澱粉的親和力 $1/K_m$ 也上升。第二年進一步探討，發現這種降解現象可能因於SP分子的降解，同時也推衍出分子上的規律斷裂點，以及可能的降解順序。另外，當我們檢視L78上的胺基酸序列時發現，除了已知的PEST序列外，還有許多非常獨特的signature序列及二級構造，且有很強的磷酸化Ser，推測可能與細胞內的信息傳導有關（請見圖一）。第三年則進一步檢討這種降解作用的可能生理功能，發現SP可能主導澱粉引子 (primer) 的合成；目前已用放射線標示法追蹤，單獨以放射性Glc-1-P為基質，初步證明SP可合成新的多糖引子，其上標有放射性磷。到此似乎給了SP的生理角色一個極重要定位，此前學界對SP的真正生理作用並無定論。至於L78的存在或其降解，是否與澱粉引子的產生能力有關，則尚待探究。

未來的計畫將探討澱粉磷解酶的信息傳導及其分子生理：

由以上觀察，使我們瞭解到澱粉磷解酶的分子，並非無緣無故多出一段 L78 胜肽，它可能做為調節 SP 的催化或反應方向的 感應點。最近 Huber 等人 (Huber et al., 1996) 的工作成果顯示，植物酵素 (nitrate reductase) 也有很強的磷酸化反應，而此磷酸化反應是一種相當複雜的酵素調節機制 (Verslues et al., 1996)。我們發現 SP 可能有類似的調控機制，而其最終的影響，推測是控制植物澱粉的堆積。

因此我們的研究計畫，將以植物細胞內的信息傳導為主軸，以SP為主要研究對象，看植物如何起動其澱粉的生合成。目前第一個關鍵性的工作，是察看澱粉磷解酶到底有沒有被磷酸化。今年正進行中的計畫，我們以甘藷的抽出物，加以放射性ATP標示SP，發現SP確可接上放射性磷；另外，使用抗磷酸化 -Ser或 -Thr的單株抗體，也可以對甘藷中原來存在的SP產生正反應的染色。這些正面結果，使得我們有極大的信心完成本研究計畫 (Chen et al., 2002)。

三、相關參考文獻：

- Acharya KR, Stuart DI, Varvill KM, Johnson LN (1991) *Glycogen phosphorylase b: Description of the protein structure*. World Scientific, Singapore
- Baeuerle PA (1998) I κ B-NF- κ B structures: At the interface of inflammation control. *Cell* **95**: 729-731
- Camirand A, St-Pierre B, Marineau C, Brisson N (1990) Occurrence of a copia-like transposable element in one of the introns of the potato starch phosphorylase gene. *Mol Gen Gene* **224**: 33-39
- Chang TC, Lee SC, Su JC (1987) Sweet potato starch phosphorylase - Purification and characterization. *Agric Biol Chem* **51**: 187-195
- Chen HM, Chang SC, Wu CC, Cuo TS, Wu JS, Juang RH (2002) The catalytic behavior of L-form starch phosphorylase from sweet potato roots is regulated by proteolysis. *Physiol. Plant.* **114**(4): 506-515.
- Chern MS, Mo YC, Juang RH, Su JC (1990) Probing the protein structure of sweet potato starch phosphorylase with monoclonal antibodies. *J Chinese Biochem Society* **19**: 55-64
- Chiang CL, Lu YL, Juang RH, Lee PD, Su JC (1991) Native and degraded forms of sweet potato starch phosphorylase. *Agric Biol Chem* **55**: 641-646
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT ed. (1997) *Current protocols in protein science*. John Wiley & Sons, Inc.
- Fletterick RJ, Madsen NB (1980) The structures and related functions of phosphorylase. *Annu Rev Biochem* **49**: 31-61
- Hardie DG ed. (1993) Protein phosphorylation. *A Practical Approach Series*. IRL Press.
- Hochstrasser M (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* **84**: 813-815
- Huber CS, Bachmann M, Huber JL (1996) Post-translational regulation of nitrate reductase activity: A role for Ca²⁺ and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci* **1**: 432-438
- Johnson LN, Barford D (1990) Glycogen phosphorylase. *J Biol Chem* **265**: 2409-2412
- Lin CT, Yeh KW, Lee PD, Su JC (1991) Primary structure of sweet potato starch phosphorylase deduced from its cDNA sequence. *Plant Physiol* **95**: 1250-1253
- Mori H, Tanizawa K, Fukui T (1991) Potato tuber type H phosphorylase isoenzyme. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 18446-18453
- Mori H, Tanizawa K, Fukui T (1993) A chimeric alpha-glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes: Functional role of 78-residue insertion in type L isozyme. *J Biol Chem* **268**: 5574-5581
- Nakano K, Fukui T (1986) The complete amino acid sequence of potato alpha-glucan phosphorylase. *J Biol Chem* **261**: 8230-8236
- Pan SM, Chang TC, Juang RH, Su JC (1988) Starch phosphorylase inhibitor is beta-amylase. *Plant Physiol* **88**: 1154-1156
- Smith RD, Walker JC (1996) Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 101-125
- St-Pierre B, Bertrand C, Camirand A, Cappadocia M, Brisson N (1996) The starch phosphorylase gene is subjected to different modes of regulation in starch-containing tissues of potato. *Plant Mol Biol* **30**: 1087-1098
- Steup M (1988) Starch degradation. In: Preiss J (ed) *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. pp. 255-296. Academic Press
- Verslues PE, Braun DM, Garcia MXU, Stone JM (1996) Protein phosphorylation: Examining the plant CPU. *Trends Plant Sci* **1**: 289-291
- Zhang S, Klissig DF (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**: 809-824