

運用酵母菌真核系統：轉殖人類酪胺酸羥基化? 滌穢]以及基因表現和酵素活性分析

林政學、簡宏堅

E-mail: 321981@mail.dyu.edu.tw

摘要

左多巴(L-DOPA)目前為醫學上最廣泛拿來作為治療帕金森氏症(Parkinson's disease)的藥物，故希望能從微生物內尋求tyrosine hydroxylase 類似物para-hydroxybenzoate hydroxylase(HBHD)以期將L-tyrosine轉換成L-DOPA而達到治療帕金森氏症。第一部份為野生型從Pseudomonas aeruginosa PAO1找出hbhd基因序列。將hbhd基因選殖入Escherichia coli 菌體內，可表現HBHD的活性。第二部份為從野生型HBHD基因序列中做Y310F與Y371F定點突變，此Y310F為本實驗對照組，文獻中指出Y371F可使HBHD的活性降低，故此做Y371F為本實驗第二組對照，測得活性與野生型做為比較、探討hbhd基因序列在微生物尋求tyrosine hydroxylase 類似物para-hydroxybenzoate hydroxylase(HBHD)以期將L-tyrosine轉換成L-DOPA而達到治療帕金森氏症。HBHD-mut的open reading frame (ORF)全長為1185 bp，轉譯出HBHD蛋白質分子量45 KDa。將P.aeruginosa PAO1之HBHD-mut (Y310F、Y371F) ORF選殖入pQE30，轉形至E.coli Nova Blue內，再用Ni-NTA管柱回收此酵素。經過高效能液相層析法(High performance liquid chromatography)分析酵素活性後，以tyrosine為受質，分別依次加入輔因子，100 mM pH 7.0磷酸緩衝液、10 mM Ascorbic acid、830 μ M亞鐵硫酸緩衝液、750 mM 1.5 M 2-ME 6MPH4與Catalase在37 $^{\circ}$ C下反應，測無活性。而tyrosine 371這個位置，有前人說過它是非常重要的胺基酸位置，它是對受質tyrosine 親合性決定位，假如我們將tyrosine371這個位置改變成phenylalanine371，它就不再對受質tyrosine 有親和性，所以無法將tyrosine 還原成L-DOPA，所以測無活性。現今醫學對於帕金森氏症(Parkinson's disease)的治療使用化學合成的L-dopa當做治療藥物，在經過一段時間的治療，會產生許多的副作用，而科學界對於帕金森氏症的研究著重於基因療法(Gene Therapy)和幹細胞的研究，希望能夠重建腦內Aromatic amino acid decarboxylase(AADC)酵素的量或是重建腦內黑質區(substantia nigra)的細胞，但是都仍屬於動物實驗的階段，所以在此過渡期，天然合成的L-dopa變為一個可以替代的方向。L-dopa是由phenylalanine被苯丙胺酸羥基化(phenylalanine hydroxylase)轉換成tyrosine，再被酪胺酸羥基化(tyrosine hydroxylase)轉換成L-dopa。本實驗針對來自人類tyrosine hydroxylase作一系列的研究，研究它的最適反應條件以及是否帶有tyrosine hydroxylase的活性，從BC104967 homo sapiens tyrosine hydroxylase研究結果發現此蛋白質的ORF(original reading frame)全長1494 bp，轉譯成蛋白質一共是由498個胺基酸所組成，蛋白質分子量大小約為55 kDa，糖基化後為65 KDa，為一胞外酵素，最適反應pH為7.0，最適反應溫度為37 $^{\circ}$ C。經過酵素動力學參數分析之後，其Lineweaver-Burk plot的計算結果，來自HTH-SC在pH 7.0，37 $^{\circ}$ C下反應20分鐘，以100 μ M水浴30分鐘停止反應的條件下，Km是2200 μ M，Vmax是111.1 μ M/min，Kcat是9.87 $\times 10^{-3}$ s $^{-1}$ ，kcat/km是4.487 $\times 10^{-6}$ μ M/s $^{-1}$

關鍵詞：帕金森氏症、酪胺酸羥基化? B左多巴

目錄

1. 前言	1.1.1 帕金森氏症	1.1.2 酪胺酸羥基化?	2. 研究動機	3. 材料與方法	6.3.1 實驗用品	6.3.1.1 菌種及質體	6.3.1.2 實驗藥品	6.3.1.3 培養液	6.3.1.4 製備DNA電泳膠片	7.3.1.5 製備蛋白質電泳膠片	7.3.1.6 實驗配方	8.3.1.7 實驗試劑組	12.3.1.8 酵素	13.3.1.9 引子	13.3.1.10 重疊式定點突變設計引子	14.3.1.11 分析軟體	15.3.2 實驗方法	16.3.2.1 DNA之回收	16.3.2.2 抽取E.coli 質體DNA傳統法	16.3.2.3 萃取染色體DNA	18.3.2.4 聚合? 嘔礫	19.3.2.5 表現載體pQE30之構築	20.3.2.6 製備大腸桿菌(E. coli) 勝任細胞	20.3.2.7 大腸桿菌的轉形作用	21.3.2.8 HBHD-mut大量表現與蛋白回收	21.3.2.9 transformation(Yarrowia.lipolitica)	22.3.2.10 透析	23.3.2.11 以Ni-NTA column 純化 HTH-SC	24.3.2.12 Yarrowia lipolitica生長曲線	24.3.2.13 Yarrowia lipolitica PO1g和HTH-SC生長曲線	25.3.2.14 BSA標準曲線的製作	25.3.2.15 高效能液相層析儀	26.3.2.16 HTH-SC最適pH催化反應分析	27.3.2.17 HTH-SC最適反應溫度分析	28.3.2.18 HTH-SC之酵素活性分析	28.4. 結果	30.4.1 萃取 para-hydroxybenzoate hydroxylase- mut (HBHD-mut) 的plasmid DNA	30.4.2 萃取 human tyrosine hydroxylase pylsc(HT H-SC) 的plasmid DNA	30.4.2.1 HTH-SC 譯讀區基因分析	31.4.3 HBHD-mut的蛋白質表現與分析	31.4.4 HBHD-mut之酵素活性測定	32.4.5 HTH-SC 之酵素活性測定	32.5. 結論	33.5.1 P. aeruginosa HBHD-mut 的胺基酸序列比對HTH-SC的胺基酸序列比對	33.5.2 HTH-SC之酵素活性分析	33.5.3 HTH-SC最適反應溫度	33.5.4 HTH-SC之酵素活性分析	34.5.5 HBHD-mut 之酵素活性分析	34. 參考文獻	82. 圖目錄	圖1. L-DOPA 作用機制	35. 圖2. L-DOPA 和 3,4-DOHB 作用比較圖, para-hydroxybenzoate【para-hydroxybenzoate (p-OHB); 3,4-dihydroxybenzoate (3,4-DOHB)】	36. 圖3. HBHD-mut 的引子	37. 圖4. HTH-SC 的引子	38. 圖5. HBHD-mut 基因轉殖進入 pQE30 示意圖	39. 圖6. HTH-SC 基因轉殖進入 pYLSC1 示意圖	40. 圖7. HTH用YHTHF1 and YHTHB1 引子進行聚合? 嘔礫 膠體電泳圖	41. 圖8. HTH用YHTHF1 and kpnr 引子進行聚合? 嘔礫 膠體電泳圖	42. 圖9. 限制酵素處理過之電泳圖 (1) pYLSC1 質體DNA 7.2 kb 膠體電泳圖 (2)
-------	-------------	---------------	---------	----------	------------	---------------	--------------	-------------	-------------------	-------------------	--------------	---------------	-------------	-------------	-----------------------	----------------	-------------	-----------------	----------------------------	-------------------	-----------------	-----------------------	-------------------------------	--------------------	----------------------------	--	--------------	------------------------------------	-----------------------------------	---	----------------------	--------------------	----------------------------	--------------------------	-------------------------	----------	---	--	-------------------------	--------------------------	------------------------	-----------------------	----------	--	----------------------	---------------------	----------------------	-------------------------	----------	---------	-----------------	---	----------------------	--------------------	-----------------------------------	----------------------------------	--	--	---

用限制酵素hindIII 處理過之pYLSC1 質體 DNA膠體電泳圖 (3) 用限制酵素hindIII and kpn1處理過之HTH PCR產物
和pYLSC1 質體DNA膠體電泳圖 43 圖10. HTH-SC 基因選殖後由YHTHF1與YHTHB1 進行聚合? 嘔礫狹醜局汎磷q泳圖
44 圖11. 用限制酵素hindIII and kpn1處理, 確認HTH-SC plasmid DNA是否有轉殖進去之膠體電泳圖 45 圖 12. 用 NCBI 和
HTH-SC 送定序之序列比對 46 圖 13. 用 NCBI 和 HTH-SC 胺基酸送定序之序列比對 47 圖 14. 表現載體之切位示意圖 48
圖 15. 用限制酵素 spel 處理 HTH-SC 質體 DNA 之膠體電泳圖 49 圖 16. HTH-SC 基因選殖後由 YHTHF1 與 YHTHB1 進
行聚合? 嘔礫狹醜局T認是否有轉殖進入 po1g 之膠體電泳圖 50 圖 17. 從 clone # 8 之 HTH-SC SDS-PAGE 分析
。 M:protein marker; lane S, sonication homogenate; lane W, washing buffer; E1~E11, elution 1~11. 51 圖 18. po1g 和 HTH-SC
生長曲線 52 圖 19-1. 利用 Bio-Rad assay 製作出 BSA 標準曲線定量蛋白質 53 圖 19-2. 利用L-DOPA標準品製作出左多巴標
準曲線 53 圖 20. 各種酵素活性反應所需藥品的 HPLC 層析圖 54 圖 21. 野生型 HTH-SC 之 Michaelis-Menten plot 方程式酵
素動力學分析 55 圖 22. 野生型 HTH-SC 之 Lineweaver-Burk plot 雙倒數作圖 55 圖 23. HTH 的蛋白構形分析預測 56 圖 24.
phenylalanine hydroxylase 與 BH4 原子間交互作用之情形以及 tyrosine hydroxylase 活性中心胺基酸位點 比對圖 57 圖 25. 從
Pseudomonas aeruginosa 用 HBHD-mut-F1 and HBHD-mut-B1 (Y310F) (1 to 940 bp)進行聚合? 鎖反應之膠體電泳圖 58 圖
26. 從 *Pseudomonas aeruginosa* 用 HBHD-mut-F1 and HBHD-mut-B1 (Y310F) (940 to 1185 bp) 進行聚合? 嘔礫狹醜局汎磷q
泳圖 59 圖 27. 頭端 PCR 產物(940 bp)與尾端 PCR 產物(270 bp)回收後進行重疊式聚合? 嘔礫狹醜局汎磷q泳圖 60 圖 28. 重
疊後產物不回收進行全長聚合? 嘔礫狹醜W幅膠體電泳圖 (total 1185 bp)(Y310F) 61 圖 29. 增幅後回收之產物與載體進行
限制酵素切割 62 圖 30. HBHD-mut (Y310F) 基因選殖後由HBHD-mut-F1與 HBHD-mut-B1與進行聚合? 嘔礫狹醜局汎磷q
泳圖 63 圖 31. 用限制酵素 hindIII and BamH1 處理, 確認 HBHD-mut (Y310F) 質體 DNA 是否有轉殖進去之膠體電泳圖 64
圖 32. 用 NCBI 和 HBHD-mut (Y310F) 送定序之序列比對 65 圖 33. 用 NCBI 和HBHD-mut (Y310F) 胺基酸送定序之序列 比
對 66 圖 34. 從 clone # 7 之 HBHD-mut (Y310F) SDS-PAGE 分析 67 圖 35 從 *Pseudomonas aeruginosa* 用 HBHD-mut-F1 and
HBHD-mut-B1 (Y371F) (1 to 1130 bp) 進行聚合? 鎖反應之膠體電泳圖 68 圖 36. 從 *Pseudomonas aeruginosa*
用HBHD-mut-F1 and HBHD-mut-B1 (Y371F) (1130 to 1185 bp) 進行聚合? 鏈鎖反應之膠體電泳圖 69 圖 37. 頭端 PCR 產
物(1130 bp)與尾端 PCR 產物(55 bp)回收後 進行重疊式聚合? 嘔礫狹醜局汎磷q泳圖 70 圖 38. 重疊後產物不回收進行全長
聚合? 嘔礫狹醜W幅膠體電泳圖(total 1185 bp)(Y371F) 71 圖 39. HBHD-mut (Y371F) 基因選殖後由HBHD-mut-F1與
HBHD-mut-B1與進行聚合? 嘔礫狹醜局汎電泳圖 72 圖 40. 用限制酵素 hindIII and BamH1 處理, 確認 HBHD-mut (Y371F)
質體 DNA 是否有轉殖進去之膠體電泳圖 73 圖 41. 用 NCBI 和 HBHD-mut (Y310F) 送定序之序列比對 74 圖 42. 用 NCBI
和HBHD-mut (Y310F) 胺基酸送定序之序列 比對 75 圖 43. 從 clone # 2 之 HBHD-mut (Y371F) SDS-PAGE 分析 76 圖 44.
HBHD Y310F(A) and Y371F(B) 經由 HPLC 分析則是 測無活性 77 圖 45. para-hydroxybenzoate hydroxylase 酵素構形 78 表目
錄表1. 本實驗所使用的菌種與質體 79 表2. HTH-SC 的酵素動力學參數 80 表3. (1) *Pseudomonas aeruginosa*, (2) *Mus musculus*
(3)、(4) *Rattus norvegicus* (Norway rat) 序列比對 81

參考文獻

- Andreas Kastrop, Hans-J?gen Gdynia, Thomas N?讚ele, Axel ieckerDropped-h -head syndrome due to steroid responsive focal myositis: A case report and review of the literatureJournal of the Neurological Sciences 267 (2008) 162 – 165
- Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernandez C, Galan B, Garcia JL, DiazE, Minambres B. 2004. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 186 (15):5062-5077.
- Brigitte Grima, Annie Lamouroux, Fran;Oisblanot, Nicole Faucon Biguet, and Jacques Mallet Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mrna 17-621, January 1985 Neurobiology
- Chisato Takazawa, Kengo Fujimoto, Daigo Homma, Chiho Sumi-Ichinose, Takahide Nomura, Hiroshi Ichinose, Setsuko Katoh a brain-specific decrease of the tyrosine hydroxylase protein in sepiapterin reductase-null mice—as a mouse model for Parkinson ' s disease Biochemical and Biophysical Research Communications 367 (2008) 787 – 792
- David E. Millhorn, Richard Raymond, Lauraconforti, Wylie Zhu, Dana beitner- Johnson, Theresa Filisko, Mary Beth Genter, Shuichi Kobayashi, and MEt PENG Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia Kidney International, Vol. 51(1997), pp. 527—535
- Daniel P. Gelain, Jose C. F. Moreira, Lia R. M. Bevilaqua, Phillip W. Dickson and Peter R. Dunkley Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells Journal of Neurochemistry, 2007, 103, 2369 – 2379
- Daubner SC, Melendez J, Fitzpatrick PF. 2000. Reversing the substrate specificities of phenylalanine and tyrosine hydroxylase: aspartate 425 of tyrosine hydroxylase is essential for L-DOPA formation. Biochemistry 39(32):9652-61.
- Eppink MH, Schreuder HA, van Berkel WJ. (1998) Lys42 and Ser42 vareiant of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *pseudomonas fluorescens* reveal that Arg42 is essential for NADPH binding . Eur J Biochem.253(1):194-201.
- Fitzpatrick PF. 1991. Steady-state kinetic mechanism of rat tyrosine hydroxylase. Biochemistry 30(15):3658-62.
- Fujii T, Kaneda T. (1985) Purification and properties of NADH/NADPH- dependent P-hydroxybenzoate hydroxylase from *corynebacterium cyclohexanicum*. Eur J Biochen. 147(1):97-104.
- Frederico F. Miranda, Matthias Kolberg, K. Kristoffer Andersson, Carlos F.G.C. Geraldés, Aurora Mart? ' nez The active site residue tyrosine 325 influences iron binding and coupling efficiency in human phenylalanine hydroxylase Journal of Inorganic Biochemistry 99 (2005) 1320 – 1328.
- Heidi Erlandsen, Elisa Bj?麻go, Torgeir Flatmark, and Raymond C. Stevens, Crystal Structure and Site-Specific Mutagenesis of Pterin-Bound Human, Phenylalanine Hydroxylase. Biochemistry 2000, 39, 2208-2217.
- Kazuto

Kobayashi, Norio Kaneda, Hiroshi Ichinose, Fumio Kishi, atsushi Nakazawa, Yoshikazu Kurosawa, Keisuke Fujita, and Toshiharu Nagatsu Structure of the Human Tyrosine Hydroxylase Gene: Alternative Splicing from a Single Gene Accounts for Generation of Four mRNA Types *J. Biochem.* 103, 907-912 (1988). 14. Kenneth E. Goodwill, Christelle Sabatier, and Raymond C. Stevens Crystal Structure of Tyrosine Hydroxylase with Bound Cofactor analogue and Iron at 2.3 Å Resolution: Self-Hydroxylation of Phe300 and the Pterin-Binding Site *Biochemistry*, Vol. 37, No. 39, 1998. 15. Larisa Bobrovskaya, Daniel P. Gelain, Conor Gilligan, Phillip W. Dickson, Peter R. Dunkley PACAP stimulates the sustained phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40 *Cellular Signalling* 19 (2007) 1141 – 1149. 16. Montserrat Royo, S. Colette Daubner Kinetics of regulatory serine variants of tyrosine hydroxylase with cyclic AMP-dependent protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase 2 *Biochimica et Biophysica Acta* 1764 (2006) 786 – 792. 17. Montserrat Royo, S. Colette Daubner, and Paul F. Fitzpatrick Effects of Mutations in Tyrosine Hydroxylase Associated With Progressive Dystonia on the Activity and Stability of the Protein *Proteins*. 2005 January 1; 58(1): 14 – 21. 18. Nicolas Termoz, Suzanne E. Halliday, David A. Winter, James S. Frank, Aftab E. Patla, Francis Prince The control of upright stance in young, elderly and persons with Parkinson's disease *Gait & Posture* 27 (2008) 463 – 470. 19. Paul F. Fitzpatrick, Erik C. Ralph, Holly R. Ellis, Opal J. Willmon, and S. Colette Daubner Characterization of Metal Ligand Mutants of Tyrosine Hydroxylase: Insights into the Plasticity of a 2-Histidine-1-Carboxylate Triad *Biochemistry* 2003, 42, 2081-2088. 20. S. Colette Daubner and Paul F. Fitzpatrick. Mutation to Phenylalanine of Tyrosine 371 in Tyrosine Hydroxylase Increases the Affinity for Phenylalanine. *Biochemistry* 1998, 37, 16440-16444. 21. Seivold B, Matthes M, Eppink MH, Linhens F, Van Berkel WJ, Muller R. (1996) 4-Hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas* sp. CBS3. Purification, characterization, gene cloning.