

葡萄糖六磷酸酵素次單元一的基因選殖、表現與活性位點分析

張容甄、簡宏堅

E-mail: 322098@mail.dyu.edu.tw

摘要

人類第一型肝醣儲積症 (GSD-1a) 俗稱 von Gierke disease, 是一種染色體上葡萄糖-6-磷酸? (G6P) 基因突變的隱性疾病。G6PC 是維持體內葡萄糖濃度恆定的最主要酵素, 是在葡萄糖生成和肝醣代謝途徑的最後一個步驟將葡萄糖-6-磷酸分解成葡萄糖和磷酸根。突變在染色體 17q21 上 G6PC 基因, 由於 G6PC1 病人主要臨床症狀是血糖低下、高血脂、酸血症、肝腫大、腎腫大、生長遲緩, 由於目前沒有藥物可以治療 GSD-1a 疾病, 僅能靠著營養供給來改善減輕症狀。若能深入探討 G6PC1 究其活性位置, 篩選具高活性的 G6PC1 酵素, 大量表現及純化, 可生產高活性酵素, 作為治療第一型肝醣儲積症的蛋白性藥物的開發。G6PC1 的蛋白質。其分子量為 45 kDa, 因為 PQE30 表現載體上含有 6 個 Histidine (His-tag), 所以能夠輕易的被純化下來, 再利用 glucose dehydrogenase-coupling reaction 的方法來分析其酵素活性。野生型的 G6PC1 酵素在 pH 值 6.5 phosphate buffer (100 mM) 以及 37 °C 下, 與 5 mM G6P 催化反應 30 分鐘, 具有最適的反應, L21 (V318A) 突變菌株與野生型 G6PC1 相較之下, k_{cat} / K_m 活性降低 8.2 倍而 L31 (I198F) 則是降低 10.3 倍, 另外發現 H19 (S196G) 及 H2 (N203S) 與野生型 G6PC1 相較之下, k_{cat} / K_m 效率高出 1.2 倍以及 4 倍, 而 H4 (S196N, L305P) 突變株, k_{cat} / K_m 效率由其高出野生型 G6PC1 有 8 倍之多。我們觀察到 G1P 的活性中心與 G6PC1 相似, 依據 G1P 的活性中心模型結構, 我們找到 L305P 相對應位置在桶狀活性位置非常接近 L374 磷酸水解位點, 在這研究上, 我們找到 L305P 是 G6PC1 重要活性位點, 其它 G6PC1 突變點 I198F、V318A、N203S、S196G、N196N 在桶狀活性位置開口的外緣, 改變原來的胺基酸會影響受質結合能力, 因此改變 G6PC1 活性。在未來我們將轉殖入酵母菌經過發酵槽量產酵素開發優酪乳製成做出作為治療第一型肝醣儲積症的健康食品。

關鍵詞: 第一型肝醣儲積症、葡萄糖六磷酸?、比活性、活性位置、活性中心

目錄

目錄封面內頁簽名頁授權書.....	iii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	vi
謝辭.....	viii
目錄.....	ix
圖目.....	xii
表目.....	xiv
1. 前言.....	1
1.1 肝醣儲積症.....	1
1.2 葡萄糖六磷酸酵素次單元一的功能.....	2
1.3 利用酵素的方式生產天然產物的優點及缺點.....	3
2. 研究動機.....	4
3. 材料與方法.....	5
3.1 材料.....	5
3.1.1 菌種及質體.....	5
3.1.2 藥品.....	6
3.1.3 酵素.....	6
3.1.4 培養液.....	6
3.1.4.1 LB 培養基.....	7
3.1.5 其他緩衝液及試劑.....	8
3.1.6 引子設計.....	12
3.2 實驗方法.....	13
3.2.1 製備 G6PC1 質體 DNA.....	13
3.2.2 聚合?連鎖反應.....	15
3.2.2.1 聚合?連鎖反應.....	15
3.2.2.2 隨機突變聚合?連鎖反應.....	16
3.2.3 DNA 洋菜膠體.....	17
3.2.4 DNA 片段的回收及純化.....	19
3.2.5 限制酵素剪切.....	20
3.2.6 DNA 黏接作用.....	20
3.2.7 E. coli 勝任細胞的製備.....	20
3.2.8 E. coli 的轉形作用.....	21
3.2.9 E. coli 質體 DNA 的抽取.....	22
3.2.10 快速質體抽取套組.....	23
3.2.11 隨機突變葡萄糖六磷酸?次單元酵素之小量菌體 活性篩選.....	24
3.2.12 DNA 定序.....	24
3.2.13 葡萄糖六磷酸?次單元蛋白質表現及蛋白回收.....	25
3.2.14 聚丙烯醯胺凝膠電泳分析.....	26
3.2.15 G6PC1 酵素活性分析測定.....	27
3.2.15.1 G6PC1 最適反應時間的測定.....	27
3.2.15.2 G6PC1 酵素最適 pH 值的測定.....	27
3.2.15.3 G6PC1 酵素最適溫度的測	

定.....	28 3.2.15.4 G6PC1基質抑制作用測定.....	28 3.2.15.5 G6PC1產物抑制作用測定.....
定.....	29 3.2.15.6 標準曲線的製作.....	29 4. 結
果.....	31 4.1 製備G6PC1質體DNA與基因分析.....	31 4.2
葡萄糖六磷酸?次單元酵素的蛋白質表現與分析.....	31 4.3 野生型葡萄糖六磷酸次單元一酵素活性分析.....	32 4.3.1 葡
萄糖六磷酸?次單元一酵素最適pH值.....	32 4.3.2 葡萄糖六磷酸?次單元一酵素最適溫度.....	32 4.3.3 葡
萄糖六磷酸?次單元一酵素最佳反應時間.....	32 4.3.4 G6PC1最適受質濃度及抑制作用測定.....	33 4.3.5 G6PC1產物抑制作用測定.....
定.....	33 4.4 隨機定點突變葡萄糖六磷酸?次單元一酵素的活分析.....	
.....	33 4.4.1 Error-prone PCR隨機定點突變.....	33 4.4.2 葡萄糖六
磷酸?次單元一酵素菌株的蛋白質大量 表現及回收.....	34 4.4.3 Wild type以及突變葡萄糖六	
磷酸?的活性分析.....	35 5. 結論.....	37 5.1 G6PC1的酵素活性特
性.....	37 5.2 G6PC1基因之應用.....	37 5.3 模擬G6PC1活性
中心結構之探討的關係.....	38 參考文獻.....	69 圖目錄
圖1.G6PC1酵素之活性測定實驗設計.....	39 圖2. G6PC1基因並轉殖於pQE30表現載體	
中.....	40 圖3. G6PC1基因plasmid DNA的膠體電泳.....	41 圖4. G6PC1酵素聚合?連鎖反
應膠體電泳.....	42 圖5. G6PC1酵素基因核酸序列比對.....	43 圖6. 聚合?連鎖反
應後DNA回收之膠體電泳.....	44 圖7. 野生型G6PC1胺基酸序列.....	45 圖8. 軟
體分析G6PC1酵素之胺基酸百分比.....	46 圖9. 野生型G6PC1基因蛋白回	
收.....	47 圖10.G6PC1酵素最適pH緩衝溶液.....	48 圖11.G6PC1酵素最
適溫度.....	49 圖12.G6PC1酵素最適反應時間.....	50 圖13.
G6PC1酵素活性對受質的抑制作用.....	51 圖14. G6PC1酵素產物抑制作	
用.....	52 圖15. 突變G6PC1基因藉由Error-prone PCR膠體電泳.....	53 圖16. PCR膠體電
泳回收.....	54 圖17. 篩選隨機突變G6PC1.....	55 圖18.
突變G6PC1菌株轉譯成胺基酸之定序結果.....	56 圖19. I198F和V318A兩隻低活性和S196N、L305P和N203S三	
隻高 活性的G6PC1突變菌回收.....	58 圖19-A. 利用SDS-PAGE測定突變I198F G6PC1菌株蛋白	
質回收..	58 圖19-B. 利用SDS-PAGE測定突變V318A G6PC1菌株蛋白質回收	
.....	59 圖19-C. 利用SDS-PAGE測定突變S196N L305P G6PC1菌株蛋白	
質回收.....	60 圖19-D. 利用SDS-PAGE測定突變S196N G6PC1菌株蛋白質回收	
.....	61 圖19-E. 利用SDS-PAGE測定突變N203S G6PC1菌株蛋白	
質回收.....	62 圖20. 利用Bio-Rad assay 製作出BSA標準曲線定	
量蛋白質.....	63 圖21. 野生型G6PC1與突變I198F和V318A、以及S196N、L305P及N203S G6PC1菌株之酵素動力學分	
析.....	64 圖 22.藉由Glucose Dehydrogenase-Coupled Reaction方法製作出此Glucose標準曲	
線.....	66 圖23. E. coli glucose-1-phosphatase 結構.....	67 圖24. 模
擬G6PC1活性中心電腦模擬結構.....	68 表目錄 表1. 菌種與質	
體.....	5 表2. LB液態培養基配方.....	7 表3.
LA固態培養基配方.....	7 表4. 引子設	
計.....	13 表5. SOC液態培養基配方.....	22
表6. 比較野生型與突變G6PC1基因酵素動力學分析.....	36	

參考文獻

- 參考文獻 1.Nagasaka H, Hirano K.i, Ohtake A, et al. Improvements of hypertriglyceridemia and hyperlacticemia in Japanese children with glycogen storage disease type Ia by medium-chain triglyceride milk. *Eur J Pediatr* 2007;166:1009-1016 2.Bio-Rad Laboratories (1994) Bio-Rad Protein Assay, Bulletin No. 600-0005, Bio- Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany. 3. SARA LINDBLOOM*, MICHELLE LECLUYSE*, & THOMAS SCHERMERHORN, et al. Cloning and comparative bioinformatic analysis of feline glucose-6-phosphatase catalytic subunit cDNA. *DNASequences*, June 2008; 19(3):256-263 4. John C. Hutton¹ and Richard M. O' Brien², et al. The Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit Gene Family. *JBC Paper in press* 2009 5. Chen, YT. Glycogen storage diseases. In: Scriver, CR.; Beaudet, AL.; Sly, WS.; Valle D.; Childs, B.; Kinzler, KW.; Vogelstein, B., editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1521-1551. 6. Chen YT, Cornblath M, Sidbury JB. Cornstarch therapy in type I glycogen storage disease. *N Engl J Med*1984;310:171 – 175. 7. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med* 2002;2:121 – 143. 8. Chou JY, Mansfield BC. Molecular genetics of type 1 glycogen storage diseases. *Trend Endocrinol Metab*1999;10:104 – 113. 9. Daublin G, Schwahn B, Wendel U. Type I glycogen storage disease: favorable outcome on a strict management regimen avoiding increased lactate production during childhood and adolescence. *Eur J Pediatr* 2002;161:S40 – S45. 10. Feldman F, Butler LG. Protein-bound phosphoryl histidine: a probable intermediate in the microsomal glucose-6-phosphatase-inorganic pyrophosphatase reaction. *Biochim Biophys Acta* 1972;268:698 – 710. 11. Greene

HL, Slonim AE, O'Neill JA Jr, Burr IM. Continuous nocturnal intragastric feeding for management of type 1 glycogen-storage disease. *N Engl J Med* 1976;294:423 – 425. 12. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Moses SW, Chou JY. Inactivation of the glucose-6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *J Biol Chem* 1999;274:5532 – 5536. 13. Lei KJ, Pan CJ, Shelly LL, Liu JL, Chou JY. Identification of mutations in the gene for glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a. *J Clin Invest* 1994;93:1994 – 1999. 14. Martin CC, Oeser JK, Svitek CA, Hunter SI, Hutton JC, O'Brien RM. Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol* 2002;29:205 – 222. 15. Martens DH, Kuijpers TW, Maiani NA, Rake JP, Smit GP, Visser G. A patient with common glycogen storage disease type 1b mutations without neutropenia or neutrophil dysfunction. *J Inher Metab Dis* 2006;29:224 – 225. 16. Pan CJ, Lei KJ, Annabi B, Hemrika W, Chou JY. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 1998;273:6144 – 6148. 17. Rake JP, ten Berge AM, Verlind E, Visser G, Verlind E, Niezen-Koning KE, Buy CH, Smit GPA, Scheffer H. Glycogen storage disease type 1a: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flowchart. *Eur J Pediatr* 2000;159:322 – 330. 18. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 2002;161:S20 – S34. 19. Stuke J, Carman GM. Identification of a novel phosphatase sequence motif. *Protein Sci* 1997;6:469 – 472. 20. Shieh JJ, Terzioglu M, Hiraiwa H, Marsh J, Pan CJ, Chen LY, Chou JY. The molecular basis of glycogen storage disease type 1a: structure and function analysis of mutations in glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 2002;277:5047 – 5053. 21. Weston BW, Lin JL, Muenzer J, Cameron HS, Arnold RR, Seydewitz HH, Mayatepek E, Van Schaftingen E, Veiga-da-Cunha M, Matern D, Chen YT. Glucose-6-phosphatase mutation G188R confers an atypical glycogen storage disease type 1b phenotype. *Pediatr Res* 2000;48:329 – 334. 22. Weinstein DA, Wolfsdorf JI. Effect of continuous glucose therapy with uncooked cornstarch on the long-term clinical course of type 1a glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* 2002;161:S35 – S39.