

人類葡萄糖六磷酸酵素催化次單元2的基因轉殖及酵素分析

蔡明芬、簡宏堅

E-mail: 322100@mail.dyu.edu.tw

摘要

人類葡萄糖六磷酸酶 (human glucose-6-phosphatase; G6Pase) 為一位於內質膜上之蛋白質，可以將葡萄糖六磷酸 (G6P) 催化生成葡萄糖。人體包含三個構造相似的G6Pase 分別為: G6PC1 (glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1)、G6PC2 (glucose-6-phosphatase catalytic subunit 2) 及G6PC3 (glucose-6-phosphatase catalytic subunit 3)，這三個酵素在人體的不同組織中表現，酵素若產生缺失所引起的症狀也不同。本篇所研究之G6PC2主要於胰島 細胞表現，cDNA片段大小為1,068 bp將其與pQE30表現載體連接，並轉型至大腸桿菌E. coli Nova blue中誘導表現含有G6PC2之蛋白質。其分子量為45 kDa，因為pQE30表現載體上含有6個histidine (His-tag)，可用含Ni-NTA的管柱將其純化下來，再利用glucose dehydrogenase-coupling method 分析酵素活性。依此方法分析野生型的G6PC2酵素，發現在pH值8.0硼酸緩衝液(100 mM)以及37 °C下，與5 mM G6P催化反應30分鐘，具有最適的催化效果；在此條件下再加入各種金屬離子一起參與反應，發現此酵素並不受金屬離子影響其反應活性。我們也將G6PC2的胺基酸序列作隨機突變，共116隻突變菌株，同樣以glucose dehydrogenase-coupling method 初步分析其酵素活性，從中我們篩選得到一隻高活性及三隻低活性的單點突變菌株，其胺基酸突變分別為H78P、Y42H、Y124H及E99K。接著，純化這四株G6PC2突變菌株之酵素，測其活性及計算酵素動力學並與野生型作比較。比較結果得知，Km部分：Y42H、Y124H突變株分別高出2.62倍及1.09倍，E99K及H78P突變株則分別下降了0.61倍及0.65倍；kcat部分：Y42H及H78P突變株高出4.29倍及2.63倍，Y124H及E99K等突變株則分別下降了0.6倍及0.56倍。最後以E. coli alkaline phosphatase (與G6PC2有50%相似度)的蛋白構型作為模型，標定上這些突變點，說明改變活性的可能原因。H78P位於活性中心桶狀底部，proline有較大的轉折，也許連帶撐大了桶狀開口，使受質更容易結合到酵素；Y42H突變後的胺基酸帶正電性提高，擾亂了活性中心D51及S102對受質的吸引力，使受質更靠近能水解磷酸根的R166，提高了酵素活性；E99K與Y124H這二個突變所造成的影響相似，可能都是因為帶正電性增加，當受質經過這二個突變位點時，磷酸根容易被吸引住，而導致被R166水解的機率降低。

關鍵詞：葡萄糖六磷酸酶、葡萄糖六磷酸、葡萄糖、酵素動力學

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書iii 中文摘要iv 英文摘要vi 誌謝vii 目錄ix 圖目錄xiii 表目錄xv 1. 前言1 1.1 葡萄糖六磷酸酶催化次單元的功能1 1.2 G6PC所引發之疾病1 1.2.1 G6PC1缺失導致第1a型導致肝醣儲積症1 1.2.2 G6PC2引發之相關症狀2 1.2.3 G6PC3缺失引發之症狀2 2. 研究動機3 3. 材料與方法4 3.1 材料4 3.1.1 菌種及質體4 3.1.2 藥品4 3.1.3 酵素5 3.1.4 培養液5 3.1.4.1 LB 培養基5 3.1.4.2 SOC培養基6 3.1.5 其他緩衝液及試劑6 3.1.6 引子設計10 3.2 實驗方法10 3.2.1 E. coli質體 DNA 的抽取10 3.2.2 快速質體抽取套組12 3.2.3 聚合酶鏈鎖反應12 3.2.3.1 聚合酶連鎖反應12 3.2.3.2 隨機突變聚合酶連鎖反應14 3.2.4 DNA洋菜膠體15 3.2.5 DNA片段的回收及純化16 3.2.6 限制酵素剪切18 3.2.7 DNA黏接作用18 3.2.8 E. coli 勝任細胞的製備18 3.2.9 E. coli 的轉形作用19 3.2.10 葡萄糖六磷酸酶催化次單元2之活性篩選方法20 3.2.11 隨機突變葡萄糖六磷酸酶催化次單元2之少量菌體活性篩選20 3.2.12 DNA定序21 3.2.13 葡萄糖六磷酸酶催化次單元2蛋白質過量表現及蛋白回收21 3.2.14 聚丙烯醯胺凝膠電泳分析22 3.2.15 G6PC2酵素活性分析測定23 3.2.15.1 G6PC2最適pH值的測定23 3.2.15.2 G6PC2最適反應溫度的測定23 3.2.15.3 G6PC2最適反應時間的測定24 3.2.15.4 G6PC2產物抑制作用測定24 3.2.15.5 G6PC2與金屬離子的影響測定25 3.2.15.6 標準曲線的製作25 4. 結果26 4.1 人類葡萄糖六磷酸酶催化次單元2的基因分析26 4.2 人類葡萄糖六磷酸酶催化次單元2的蛋白質表現與分析26 4.3 野生型人類葡萄糖六磷酸酶催化次單元2活性分析 27 4.3.1 G6PC2最佳反應pH 值27 4.3.2 G6PC2最佳反應溫度27 4.3.3 G6PC2最佳反應時間27 4.3.4 G6PC2最適受質濃度與抑制作用測定28 4.3.5 G6PC2產物抑制作用測定28 4.3.6 G6PC2與金屬離子的影響測定28 4.4 隨機突變人類葡萄糖六磷酸酶催化次單元2的活性分析29 4.4.1 Error-prone PCR 隨機定點突變29 4.4.2 突變人類葡萄糖六磷酸酶催化次單元2菌株的蛋白質大量表現及回收29 4.4.3 野生型以及突變人類葡萄糖六磷酸酶催化次單元2的活性分析30 5. 結論32 5.1 人類葡萄糖六磷酸酶催化次單元2的活性特性32 5.2 隨機突變菌株對G6PC2 酵素的影響32 5.3 模擬人類 G6PC2 活性中心結構之探討33 參考文獻63

參考文獻

1. Arden, S. D., Zahn, T., Steegers, S., Webb, S., Bergman, B., O'Brien, R. M., and Hutton, J. C. (1999) Molecular Cloning of a Pancreatic Islet – Specific Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit – Related Protein Diabetes 48(3), 531-542 2. Bouatia-Naji, N., Rocheleau, G., Van Lommel,

L., Lemaire, K., Schuit, F., Cavalcanti-Proenca, C., Marchand, M., Hartikainen, A. L., Sovio, U., De Graeve, F., Rung, J., Vaxillaire, M., Tichet, J., Marre, M., Balkau, B., Weill, J., Elliott, P., Jarvelin, M. R., Meyre, D., Polychronakos, C., Dina, C., Sladek, R., and Froguel, P. (2008) A Polymorphism Within the G6PC2 Gene Is Associated with Fasting Plasma Glucose Levels. *Science* 320(5879), 1085-1088. 3. Boztug, K., Appaswamy, G., Ashikov, A., Schaffer, A. A., Salzer, U., Diestelhorst, J., Germeshausen, M., Brandes, G., Lee-Gossler, J., Noyan, F., Gatzke, A. K., Minkov, M., Greil, J., Kratz, C., Petropoulou, T., Pellier, I., Bellanne-Chantelot, C., Rezaei, N., Monkemoller, K., Irani-Hakimeh, N., Bakker, H., Gerardy-Schahn, R., Zeidler, C., Grimbacher, B., Welte, K., and Klein, C. (2009) A Syndrome with Congenital Neutropenia and Mutations in G6PC3. *N Engl J Med* 360(1), 32-43 4. Bio-Rad Laboratories (1994) Bio-Rad Protein Assay, Bulletin No. 600-0005, Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany. 5. Cirino P.C., Mayer K.M. and Umeno D. (2003) Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Meth in Mole Bio* 231: 3-9. 6. Han, B., Serra, P., Amrani, A., Yamanouchi, J., Maree, A. F., Edelstein-Keshet, L., and Santamaria, P. (2005) Prevention of diabetes by manipulation of anti-IGRP autoimmunity: high efficiency of a low-affinity peptide. *Nat Med* 11(6), 645-652 7. Hutton, J. C., and O'Brien, R. M. (2009) The Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit Gene Family. *J Biol Chem* 284(43):29241-5. 8. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. 9. Ma, L., and Kantrowitz, E. R. (1996) Kinetic and X-Ray Structural Studies of a Mutant *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase (His-412 f Gln) at One of the Zinc Binding Sites. *Biochemistry* 35, 2394-2402 10. Martin, C. C., Oeser, J. K., Svitek, C. A., Hunter, S. I., Hutton, J. C., and O'Brien, R. M. (2002) Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol* 29, 205-222. 11. Martin, C. C., Bischof, L. J., Bergman, B., Hornbuckle, L. A., Hilliker, C., Frigeri, C., Wahl, D., Svitek, C. A., Wong, R., Goldman, J. K., Oeser, J. K., Lepretre, F., Froguel, P., O'Brien, R. M., and Hutton, J. C. (2001) Cloning and Characterization of the Human and Rat Islet-specific Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit-related Protein (IGRP) Genes. *J Biol Chem* 276(27), 25197-25207 12. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., and Sugino Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acid Res* 18, 61-69. 13. Pritchard L., Corne D., Kella D., Rowland J., Winson M. (2005) A general model of error-prone PCR. *J The Bio* 234: 497-509. 14. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239,487-491 15. Sambrook J. and Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, third edition. Cold spring harbor laboratory press, New York. 16. Shieh, J. J., Pan, C. J., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2003) A Glucose-6-phosphate Hydrolase, Widely Expressed Outside the Liver, Can Explain Age-dependent Resolution of Hypoglycemia in Glycogen Storage Disease Type Ia. *J Biol Chem* 278(47), 47098-47103 17. Wang, Y., Martin, C. C., Oeser, J. K., Sarkar, S., McGuinness, O. P., Hutton, J. C., and O'Brien, R. M. (2007) Deletion of the gene encoding the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein autoantigen results in a mild metabolic phenotype. *Diabetologia* 50, 774-778