

R  
008,8  
0881  
88

中山醫學院營養科學研究所碩士論文

Master Thesis

Institute of Nutrition Science,

Chung Shan Medical and Dental College

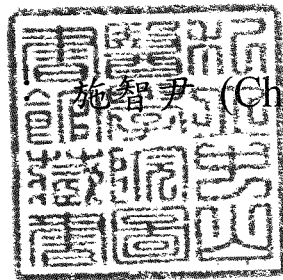
E-192 在人類雙羥擬脂醯胺去氫酶

反應機制中所扮演的角色

The Role of E-192 in the Reaction Mechanism of  
Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase (E<sub>3</sub>)

指導教授：劉德中 博士 (Dr. Te-Chung Liu)

研究生



施智尹 (Chin-Yin Shih)

中華民國八十八年六月

中山醫學院圖書館



C065194

## 授權書 (博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在中山醫學院營養科學研究所  
八十七學年度第二學期取得理學碩士學位之論文。

論文名稱：E-192 在人類雙羥擬脂醯胺去氫酶反應機制中所扮演的角色

同意      不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

同意      不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：劉德中

研究生簽名：\_\_\_\_\_ 學號：R86310  
(親筆正楷)

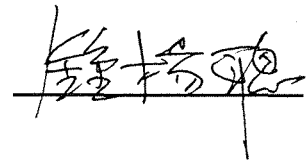
日期：民國八十八年六月十日

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，  
經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合  
格及口試通過。

### 口試委員

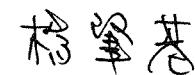
國立中興大學農學院獸醫學系教授

鍾楊聰 博士



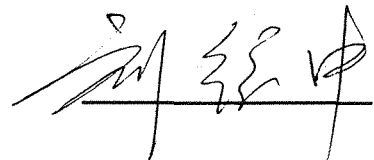
私立中山醫學院口腔醫學研究所助理教授

楊肇基 博士



私立中山醫學院營養科學研究所副教授  
(論文指導教授)

劉德中 博士



中華民國八十八年六月

學生施智尹，論文題目為「E-192 在人類雙羥擬脂醯胺去氫酶反應機制中所扮演的角色」。其論文已經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：劉德中 博士

簽名：

劉德中

中華民國八十八年六月

## E-192 在人類雙羥擬脂醯胺去氫酶反應機制中所扮演的角色

### 摘 要

雙羥擬脂醯胺去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase;  $E_3$ )是屬於嘌呤核苷雙硫氧化還原酶家族之一。此族群主要特徵是具有活性雙硫基(active disulfide)、活性鹼基(active base)和 FAD，其活性中心可在電子接受者( $NAD^+$ 或  $NADP^+$ )與雙硫基受質(dithiol substrate)之間傳遞電子； $E_3$ 也是哺乳類的酮酸去氫酶複合體包括丙酮酸去氫酶複合體(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)、 $\alpha$ -酮戊二酸去氫酶複合體( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex, KGDC)及側鏈酮酸去氫酶複合體(branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex, BCKADC)等三種複合體的共同組成成份，所以當  $E_3$  發生缺乏或有缺陷時，三種酮酸去氫酶複合體的活性均會受到影響，因此  $E_3$  在能量代謝上佔有舉足輕重的地位。所以本實驗研究的目的即是探討  $E_3$  : E192 在  $E_3$  反應機制及電子傳遞路徑上扮演的角色。其研究方法首先利用定點突變方法創造出 E192Q 這個突變蛋白質，隨後利用分子量測定、FAD 含量測定、酵素動力學分析、光譜分析及氧化還原電位測定等方法，來探討酵素結構與功能間的關係。

經由分子量測定發現突變蛋白質與正常蛋白質其分子量大致相同，約為 100kDa；換言之突變並不會影響其同質雙體(homodimer)的結構。酵素相對的 FAD 含量比  $E_3$  : E192Q 為 100 : 95。而在酵素動力學分析中 E192Q 之代謝迴轉速率(Kcat)約只為正常  $E_3$  的 10%。令人驚奇的是 E192Q 突變蛋白正反應的反應機制從正常  $E_3$  的乒乓反應(ping pong mechanism)變成序列機制(sequential mechanism)。進一步在螢光光譜分析中發現 E192Q 突變蛋白從 DHL 傳遞電子至 FAD 形成 FADH，再進一步的將  $NAD^+$  還原產生 NADH 之反應途徑幾乎完全被阻斷，隨後的紫外光/可見光光譜分析則發現 E192Q 突變蛋白在 530nm 雙硫基與 FAD 間的電價轉移階段其電子傳遞緩慢而近乎停滯；而在氧化還原電位中

點分析中，E192Q 突變蛋白的 FAD 還原電位中點和 E<sub>3</sub> 相比則發現有升高的現象產生。

由以上結果推論 E192Q 的代謝迴轉率的大幅下降可能是因為突變致使 FAD 無法被順利還原成 FADH 進而使電子傳遞路徑的受阻所導致。所以推測 E192 參與電子傳遞，可能是 E<sub>3</sub> 活性中心的成員之一，其對於活化中心的穩定和酵素功能的維持具有關建性的影響，在 E<sub>3</sub> 的反應機制中確實扮演一個非常重要的角色。

# The role of E-192 in the Reaction Mechanism of Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase( $E_3$ )

Abstract

by

Chin-Yin Shih

Dihydrolipoamide dehydrogenase( $E_3$ ) belongs to the enzyme family of pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductases and catalyzes the transfer of electrons from dihydrolipoamide to FAD cofactor, then to the  $NAD^+$ .  $E_3$  is also the common component of  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complexes including pyruvate dehydrogenase (PDC), branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complexes and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes. A deficiency in  $E_3$  leads to the deficiency of all these three  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase complexes.  $E_3$  plays an important role in the energy metabolism indeed.

This study is to characterize the functional significance of E-192 in the reaction mechanism and to focus on the role of E-192 in electron transferring pathway.

The approach in this study was using site-directed mutagenesis(SDM) to create the E192Q mutant protein, and the mutant protein was subjected into the following analysis which including molecular sieving analysis, relative FAD content assay, enzyme kinetics assay, spectrophotometer analysis and midpoint reduction potential analysis.

Molecular sieving analysis showed that the E192Q mutant protein was homodimer with the molecular-weight approximately to 102 kDa, as well as wild-type  $E_3$ . The relative FAD content of these enzymes are  $E_3 : E192Q = 100 : 95$ . The  $K_{cat}$  of E192Q is reduced to 5%, while compared to wild-type  $E_3$ . It is interesting that the reaction mechanism of E192Q is sequential mechanism while  $E_3$  is the ping pong mechanism in forward reaction. The fluorescence assay reveals that the FAD can be reduced by DHL with the formation of FADH in  $E_3$ . The FADH can be further

oxidized by  $\text{NAD}^+$  with the NADH formation. E192Q almost loss the ability of electrons transferring between FAD to  $\text{NAD}^+$  when compared to  $\text{E}_3$ . In addition, the UV/VIS spectrophotometer analysis of E192Q indicates that the electron transferring from active disulfide to FAD may be blocked. Further, the midpoint potential of FAD is also increased.

In conclusion, the E192 maybe involve in the active center of  $\text{E}_3$  and specifically corresponding to the reduction of FAD in the  $\text{E}_3$  reaction mechanism.



## 誌 謝

感謝父母、家人、女友及朋友在精神上的鼓勵與支持；感謝所有學長姊、同學、學弟妹於實驗以及課業上的幫助與照顧；感謝所有指導過我的老師。兩年求學生涯，得之於人者太多，出之於己者太少，感謝之情無由表達，一切唯有謝天罷。

施智尹

謹誌於

中山醫學院 營養科學研究所

中 華 民 國 八 十 八 年 六 月

# 目 錄

	頁次
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
誌謝.....	V
目錄.....	VI
圖次.....	VIII
表次.....	IX
附錄文次.....	X
縮寫表.....	XI
章節	
第一章 序論.....	1
一 喋呤核苷雙硫氧化還原酶家族.....	1
二 雙羥擬脂醯胺去氫酶簡介.....	1
三 雙羥擬脂醯胺去氫酶在能量代謝上重要性.....	3
四 雙羥擬脂醯胺去氫酶構造分析.....	5
(一) 黃素腺喋呤雙核苷酸結合位置.....	6
(二) 菸鹼醯胺腺喋呤雙核苷酸結合位置.....	6
(三) 活化中心.....	7
五 雙羥擬脂醯胺去氫酶之物理及生化特性.....	7
(一) 螢光光譜.....	8
(二) 吸收光譜.....	8
(三) 氧化還原電位.....	8
六 缺陷個案報導及突變蛋白之研究.....	8
七 研究目的.....	10

第二章 材料與方法.....	11
一 材料.....	11
(一) 質體及菌種.....	11
(二) 藥品試劑.....	11
(三) 常用儀器.....	13
(四) 容液、緩衝液及培養液之配製.....	14
二 方法.....	18
(一) 突變蛋白質表達質體之建構及核酸序列分析.....	18
(二) 蛋白質大量表達與純化及定量分析.....	20
(三) 蛋白質功能特性分析.....	22
第三章 結果.....	26
一 突變蛋白質表達質體之建構.....	26
二 蛋白質表達與純化及定量.....	26
三 突變蛋白質之功能特性.....	27
(一) 酵素動力學分析.....	27
(二) 螢光光譜分析.....	28
(三) 可見光/紫外光光譜分析.....	30
(四) 氧化還原中點電位測定.....	31
第四章 討論.....	33
第五章 圖表.....	36
第六章 參考文獻.....	65
附錄.....	73

## 圖 次

	頁次
圖 1 實驗設計流程圖 .....	36
圖 2 pQE-9-E <sub>3</sub> -E192Q 突變表達質體之構建.....	37
圖 3 E192Q 胺基酸 DNA 定序圖 I.....	38
圖 4 E192Q 胺基酸 DNA 定序圖 II.....	39
圖 5 E192Q 胺基酸 DNA 定序圖 III.....	40
圖 6 E <sub>3</sub> 與 E192Q 純化蛋白質之 SDS-PAGE.....	42
圖 7 HPLC 分析之標準分子量計算曲線 .....	43
圖 8 E <sub>3</sub> 與 E192Q 蛋白質分子量之 HPLC 分析圖.....	44
圖 9 E <sub>3</sub> 之酵素動力學分析正反應圖.....	47
圖 10 E192Q 之酵素動力學分析正反應圖.....	49
圖 11 E <sub>3</sub> 之酵素動力學分析逆反應圖.....	51
圖 12 E192Q 之酵素動力學分析逆反應圖.....	53
圖 13 酵素在 DHL 單受質反應之螢光光譜圖.....	55
圖 14 酵素在 DHLA 單受質反應之螢光光譜圖.....	56
圖 15 酵素在 DHL 與 NAD <sup>+</sup> 雙受質反應之螢光光譜圖.....	57
圖 16 酵素在 DHLA 加上 NAD <sup>+</sup> 雙受質反應之螢光光 譜圖.....	58
圖 17 酵素在強還原劑 NaBH <sub>4</sub> 反應之螢光光譜圖.....	59
圖 18 酵素在 DHL 單受質反應之紫外光/可見光光譜圖.....	60
圖 19 酵素在 DHL 單受質反應之紫外光/可見光光譜圖 中 530nm 截點比較圖.....	61
圖 20 酵素在 DHL 與 NAD <sup>+</sup> 雙受質反應之紫外光/可見 光光譜圖.....	62
圖 21 酵素在 DHL 與 NAD <sup>+</sup> 雙受質反應之紫外光/可見 光光譜圖中 530nm 與 340nm 截點比較圖.....	63

## 表 次

	頁次
表一 E <sub>3</sub> 與 E192Q 之蛋白質純化分析表.....	41
表二 E <sub>3</sub> 與 E192Q 之蛋白質中 FAD 含量分析表.....	45
表三 E <sub>3</sub> 酵素動力正反應分析表.....	46
表四 E192Q 酵素動力正反應分析表.....	48
表五 E <sub>3</sub> 酵素動力逆反應分析表.....	50
表六 E192Q 酵素動力逆反應分析表.....	52
表七 E <sub>3</sub> 與 E192Q 之蛋白質酵素動力分析比較表.....	54
表八 E <sub>3</sub> 、E192Q 及 K54E 氧化還原電位中點比較表.....	64

## 附錄文次

	頁次
附錄 1 酮酸去氫酶複合體催化反應之總反應式 .....	73
附錄 2 雙羥擬脂醯胺去氫酶催化反應機制 .....	74
附錄 3 嘌呤核苷雙硫氧化還原酶家族的受質與產物歐.....	75
附錄 4 酮酸去氫酶複合體參與之能量代謝路徑.....	76
附錄 5 人類雙羥擬脂醯胺去氫酶 FAD 結合結構區假想 模式圖 .....	77
附錄 6 人類雙羥擬脂醯胺去氫酶 NAD 結合結構區、中 心結構區及介面結構區假想模式圖 .....	78
附錄 7 人類雙羥擬脂醯胺去氫酶與麩胱甘肽還原酶鏈摺 比較圖 .....	79
附錄 8 <i>P. Fluorescens</i> 菌之擬脂醯胺去氫酶同質雙體帶狀圖 ...	80
附錄 9 NAD <sup>+</sup> 結合位置之一般構造.....	81
附錄 10 雙羥擬脂醯胺去氫酶之 FAD 結合位置附近胺基酸.....	82
附錄 11 雙羥擬脂醯胺去氫酶之 NAD <sup>+</sup> 結合位置附近胺基酸.....	83
附錄 12 與 FAD 形成氫鍵之附近胺基酸.....	84
附錄 13 人類雙羥擬脂醯胺去氫酶之活性中心三度空間 假想圖.....	85
附錄 14 pQE-9 質體表達及純化系統.....	86

## 縮寫表

AD	asparagusate dehydrogenase
BCKADC	branched-chain $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex
CoA	coenzyme A
DHL	dihydrolipoamide
DHLA	dihydrolipoic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
E <sub>1</sub>	$\alpha$ -keto acid dehydrogenase
E <sub>2</sub>	dihydrolipoamide acyltransferase
E <sub>3</sub>	dihydrolipoamide dehydrogenase
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	flavin adenine dinucleotide
FPLC	fast protein liquid chromatography
GCS	glycine cleavage system
GR	glutathion reductase
GSR	bis- $\gamma$ -glutamylcystine reductase
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
KGDC	$\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex
LA	lipoamide
MR	mercuric ion reductase
NAD	nicotiamide adenine dinucleotide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PDC	pyruvate dehydrogenase complex
pQE	plasmid of QIAGEN expression system
SDM	site-directed mutagenesis
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N',-tetramethyl ethylene diamine
TR	thioredoxin reductase
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TTR	trypanothione reductase



## 第一章 緒 論

### 一、嘧啶核苷雙硫氧化還原酶家族(pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family)

雙羥擬脂醯胺去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase;  $E_3$ )是嘧啶核苷雙硫氧化還原酶家族的成員之一(參見第 75 頁附錄 3)。除了  $E_3$  外，同屬嘧啶核苷雙硫氧化還原酶家族的酵素包括: mercuric ion reductase(MR)[EC. 1. 16. 1. 1.](Brown, 1985)、trypanothione reductase(TTR)[EC. 1. 6. 4. 8.](Shames et al., 1986)、asparaginate dehydrogenase(AD)(Yanagawa and Egami, 1976)和 bis- $\gamma$ -glutamylcystine reductase(GSR)(Sundquist and Fahey, 1988)

此族群主要特徵是具有活性雙硫基(active disulfide)、活性鹼基(active base)和 FAD，其活性中心可在電子接受者( $NAD^+$  或  $NADP^+$ )與雙硫基受質(dithiol substrate)之間傳遞電子。西元 1967 年，Williams 等人(Williams et al., 1967)提出  $E_3$ 、glutathione reductase(GR)和 thioredoxin reductase(TR)等酵素的催化反應是將受質在活性鹼基的作用下，使其電子經由活性雙硫基，FAD 傳遞到  $NAD^+$  或  $NADP^+$ 。

### 二、雙羥擬脂醯胺去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase; $E_3$ )

#### 簡介

對  $E_3$  的研究可追溯自西元 1939 年，Straub 自豬心純化出一個黃色的蛋白質(Straub, 1939)。此蛋白質含黃素腺嘧啶雙核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)作為其輔基(prosthetic group)，並能氧化菸鹼醯胺腺嘧啶雙核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)形成  $NAD^+$ 。因此將此蛋白質命名為“黃色酵素”(yellow enzyme)。西元 1958 年，Massey(Massey, 1958)發現此酵素氧化 NADH 後，將電子傳遞至擬脂酸(lipoic acid)將其還原成雙羥擬脂酸

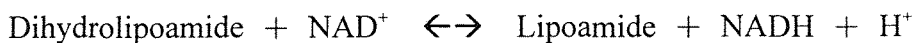


(dihydrolipoic acid)，因而將此酵素重新命名為擬脂酸去氫酶(lipoyl dehydrogenase)(Massey, 1960)。

Massey 進一步發現擬脂酸去氫酶是  $\alpha$ -酮戊二酸去氫酶複合體( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex, KGDC)的組成份子之一(Massey, 1960)。KGDC 之作用是將  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate)氧化脫羧後釋放一分子的二氧化碳( $\text{CO}_2$ )，並將琥珀醯基(succinyl group)轉移至 CoASH 形成琥珀醯輔酶 A(succinyl CoA)，同時還原  $\text{NAD}^+$  形成 NADH。因此在正常生理狀態下，擬脂酸去氫酶的催化作用是將電子由雙羥擬脂醯胺(dihydrolipoamide)轉移至  $\text{NAD}^+$ ，形成擬脂醯胺(lipoamide)及 NADH(參見第 73 頁附錄 1)。故如今將此「黃色酵素」重新正式命名為雙羥擬脂醯胺去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase)或簡稱為  $\text{E}_3$ 。

Massey 等人首次利用從豬心分離出來的  $\text{E}_3$ [EC. 1. 8. 1. 4.]從事 dihydrolipoamide 還原  $\text{NAD}^+$  及其酵素動力學方面的相關研究。

研究結果顯示哺乳類之  $\text{E}_3$  催化以下可逆反應：(參見第 74 頁附錄 2)



依據酵素動力學的研究顯示  $\text{E}_3$  之兩受質在反應時遵循「乒乓」機制('ping pong' mechanism)。在此作用機制下 dihydrolipoamide 先與酵素結合、反應後釋出 lipoamide，接著  $\text{NAD}^+$  再與酵素結合、反應後釋出 NADH，完成整個反應。在上述反應中，輔基 FAD 先被還原成 FADH，接著 FADH 再度被氧化成 FAD。DL-dihydrolipoamide 的  $K_m$  是 0.3 mM， $\text{NAD}^+$  的  $K_m$  是 0.2 mM，而酵素反應的  $K_{cat}$  是  $555 \text{ Sec}^{-1}$ (Massey et al., 1960)。

另外根據 Otulakowski 等人(Otulakowski and Robinson, 1987)及 Pons 等人(Pons et al., 1988)所發表人類  $\text{E}_3$  之 cDNA 核酸序列，顯示 cDNA 之閱讀框架(open reading frame)含有 1527 個鹼基對(base pair; bp)，轉譯(translated)成 509 個胺基酸殘基。在 N 端有一段含 35 個胺基酸殘基是  $\text{E}_3$  進入粒線體的信號序列(leader

sequence)。成熟的 E<sub>3</sub> 具 474 個胺基酸殘基，分子量約為 50 kilodaltons(kDa)。E<sub>3</sub> cDNA 於 3' 未轉譯區(untranslated region)具有兩個聚腺核糖化位點 polyadenylation sites 相距 234 bp。經輪替切割(alternative splicing)和聚腺核糖化(polyadenylation)後，E<sub>3</sub> mRNA 之長度分別為 2.2 kb(kilo base pair)及 2.4 kb。人類之 E<sub>3</sub> 基因為單一拷貝(single copy)且位於第七號染色體上(Otulakowski et al., 1988)。

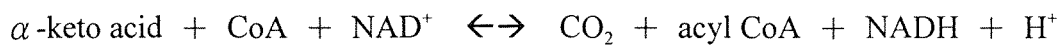
### 三、雙羧擬脂醯胺去氫酶在能量代謝上的重要性

由於從丙酮酸去氫酶複合體(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)及  $\alpha$ -酮戊二酸去氫酶複合體( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex, KGDC)分離出來的 E<sub>3</sub> 可以重組互換，而不影響原酵素複合體之活性(Sakurai et al., 1970)；由豬心分離出來的 E<sub>3</sub> 所引發之抗體可同時辨認 PDC、KGDC 及側鏈酮酸去氫酶複合體(branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex, BCKADC) (Clarkson and Lindsay, 1991)；E<sub>3</sub> 的基因只有單一拷貝(single copy)，其 cDNA clone 亦只有一種(Otulakowski and Robinson, 1987; Otulakowski et al., 1988; Pons et al., 1988)；此外在 E<sub>3</sub> 缺乏的病人中此三種酵素複合體的活性都受到影響。所以 E<sub>3</sub> 為哺乳類的酮酸去氫酶複合體包括丙酮酸去氫酶複合體(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)、 $\alpha$ -酮戊二酸去氫酶複合體( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex, KGDC) 及側鏈酮酸去氫酶複合體(branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex, BCKADC)等三種複合體(Reed, 1974; Yeaman, 1986; Yeaman, 1989)之共同組成部分。

酮酸去氫酶複合體在醣類、脂肪酸及胺基酸的中間代謝上扮演重要的角色。其催化反應的受質及產物參見第 73 頁附錄 1。PDC 將丙酮酸(pyruvate)氧化形成乙醯輔酶 A(acetyl-CoA)後可進一步氧化產生能量(ATP)或是作為生合成的受質。KGDC 是檸檬酸循環(citric acid cycle)中的關鍵酵素之一，除了 acetyl-CoA

之代謝外，亦參與胺基酸中麩胺酸(glutamic acid)及醃胺麩胺酸(glutamine)之異化作用(catabolism)。BCKADC 控制著側鏈胺基酸(branch chain amino acid)代謝的流量生成步驟(flux-generation step)並且扮演調節氮平衡(nitrogen homeostasis)之重要角色。以上三種酮酸去氫酶複合體所參與的代謝路徑參見第 76 頁附錄 4(Patel and Harris, 1995)。

酮酸去氫酶複合體位於粒腺體(mitochondria)內，是由酮酸去氫酶( $\alpha$ -keto acid dehydrogenase; E<sub>1</sub>)、雙羥擬脂醃胺醃基轉移酶(dihydrolipoamide acyltransferase; E<sub>2</sub>)及雙羥擬脂醃胺去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase; E<sub>3</sub>)等三種酵素依特定比例所共同組成的複合體，該複合體可催化以下反應(Guest et al., 1989)：



此催化反應之各個部分反應參見第 73 頁附錄 1。E<sub>1</sub> 所催化的部分反應為不可逆之反應，該反應將酮酸( $\alpha$ -keto acid)氧化脫羧(oxidative decarboxylation)形成 CO<sub>2</sub> 及醃基擬脂醃胺(acyl-lipoamide)。E<sub>2</sub> 將醃基(acyl group)轉移至輔酶 A(CoA)形成醃基輔酶 A(acyl CoA)及雙羥擬脂醃胺(dihydrolipoamide)。E<sub>3</sub> 將 dihydrolipoamide 再度氧化並且經由 FAD 把電子轉移給 NAD<sup>+</sup>。

酮酸去氫酶複合體中 E<sub>1</sub> 和 E<sub>2</sub> 具受質專一性(substrate specificity)，而 E<sub>3</sub> 是此酵素複合體的共同組成部份(Reed, 1974; Yeaman, 1986)。所以 E<sub>3</sub> 功能缺乏時，三種酮酸去氫酶複合體都會受到影響。典型 E<sub>3</sub> 缺陷的症狀包括乳酸血酸症(lactic acidosis)、智障、血清中胺基酸濃度增加及尿液中有機酸濃度升高(Robinson, 1989)。

乳酸血酸症形成的原因是因為丙酮酸(pyruvate)堆積，且細胞質內的還原能力同時增強所導致。細胞質內 NADH/NAD<sup>+</sup> 比例增高後，能將過剩的丙酮酸經乳酸去氫酶(lactate dehydrogenase)還原成乳酸。智障的形成則是因為腦部組織主要的能量來源是葡萄糖，因 E<sub>3</sub> 缺陷連帶造成的 PDC 和 KGDC 缺陷，使得腦部

組織檸檬酸循環(citric acid cycle)運轉受阻因而能量供應不足。所以在腦部代謝最旺盛的區域諸如腦幹(brain stem)和基底神經節(basal ganglia)造成嚴重損害而導致智障。此外因為 PDC、KGDC 和 BCKADC 在胺基酸代謝上扮演重要的角色(參見第 75 頁附錄 3)，所以酮酸去氫酶複合體有缺陷時，會造成血清中胺基酸濃度增加及尿液中有機酸濃度升高的現象(Kuhara et al., 1983)。目前對 E<sub>3</sub> 缺陷的診斷方法是分析此酵素之活性。

#### 四、雙羥擬脂醯胺去氫酶構造分析

經由 *Azotobacter vinelandii*(Mattevi et al., 1991)、*Pseudomonas putida*(Mattevi et al., 1992)及 *Pseudomonas fluorescens*(Mattevi et al., 1993)三株菌株的 E<sub>3</sub>X-射線的結晶構造分析，對於 E<sub>3</sub> 的 FAD 結合位置有進一步的了解。

Rossmann(Rossmann et al., 1975)和 Branden(Branden, 1980)等人在研究菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸去氫酶(NADH dehydrogenase)(s-malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, liver alcohol dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase)的結構時，發現這些去氫酶的菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合位置都很相似。這個結合位置是由六股平行的  $\beta$ -平板( $\beta$ -sheets;  $\beta A$ ,  $\beta B$ ,  $\beta C$ ,  $\beta D$ ,  $\beta E$  and  $\beta F$ )及四個  $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helices;  $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ,  $\alpha E$  and  $\alpha 1F$ ; 參見第 81 頁附錄 9)所組成。這些  $\beta$ -平板和  $\alpha$ -螺旋的胺基酸序列從 N 端到 C 端分別是： $\beta A$ 、 $\alpha B$ 、 $\beta B$ 、 $\alpha C$ 、 $\beta C$ 、twist、 $\beta D$ 、 $\alpha E$ 、 $\beta E$ 、 $\alpha 1F$  及  $\beta F$ 。 $NAD^+$  是結合到  $\beta$ -平板的 C 端胺基酸和  $\alpha$ -螺旋 N 端胺基酸。 $\beta A$ 、 $\beta B$ 、 $\beta C$ 、 $\alpha B$  和  $\alpha C$  是腺嘌呤單磷核苷酸(adenine nucleotide monophosphate, AMP)的結合位置，而  $\beta D$ 、 $\beta E$ 、 $\beta F$ 、 $\alpha E$  和  $\alpha 1F$  則是菸鹼醯胺單核苷(nicotinamide mononucleotide)的結合位置，而存在於  $\beta A$  和  $\beta D$  之間的縫隙則是焦磷酸鹽(pyrophosphate)的結合位置。

此外 E<sub>3</sub> 的 FAD 結合位置也經由麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase)與 E<sub>3</sub>

胺基酸序列的構造做同質性的比較(Jentoft et al., 1992)，進而根據麩胱甘肽還原酶的二度空間構造設計了人類 E<sub>3</sub> 的平面構造模型(Schulz et al., 1983)(參見第 79 頁附錄 7)。E<sub>3</sub> 的平面構造模型分成四個不同的結構區(domain)：黃素腺嘌呤雙核苷酸結合結構區(FAD binding domain)(參見第 77 頁附錄 5)、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合結構區(NAD binding domain)、中心結構區(Center domain)及介面結構區(Interface domain)(參見第 78 頁附錄 6)。這些結構區上分別具有 FAD 結合位置、NAD<sup>+</sup>結合位置及擬脂醯胺(lipoamide)結合位置，E<sub>3</sub> 分子的活化中心(active center)是 E<sub>3</sub> 同質雙體(homodimer)(參見第 79、80 頁附錄 7、8)上各結合位置所共同組成。其中一個單體(monomer)的 FAD 結合結構區及 NAD 結合結構區的部分胺基酸與另一個單體介面結構區的部分胺基酸組成活化中心。一個成熟且完整的 E<sub>3</sub> 同質雙體具有兩個活化中心，每個活化中心都含有 FAD 結合位置、NAD<sup>+</sup>結合位置及擬脂醯胺結合位置以共同進行催化反應。以下對 E<sub>3</sub> 的黃素腺嘌呤雙核苷酸結合結構區(FAD binding domain)、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合結構區(NAD binding domain)、及 E<sub>3</sub> 分子的活化中心(active center)進行更深入的探討：

#### (一)E<sub>3</sub> 之黃素腺嘌呤雙核苷酸結合位置(FAD binding site)

黃素腺嘌呤雙核苷酸結合位置(FAD binding site)是由 FAD 結合結構區、中心結構區和介面結構區所組成(參見第 77 頁附錄 5)。參與 FAD 結合位置的胺基酸參見第 82-84 頁附錄 10、11、12；和 NAD<sup>+</sup>結合位置中 FED-ABC 平板不同的是 FAD 結合位置有一個 D-ABC  $\beta$ -平板的構造(參見第 81 頁附錄 9)。這些平板股的羧基端面向活化位置是 FAD 的接觸位置。在 FAD 結合結構區， $\alpha$ C 螺旋是擴大成  $\alpha$ II 和  $\alpha$ III 螺旋，而活性雙硫基(active disulfide)是在  $\alpha$ II 螺旋之前。胺基酸 G-17、K-37、T-44、I-121 及 G-149 位在  $\beta$ -strain 的羧基上，這些胺基酸與 FAD 主幹位置接觸；而胺基酸 E-36、T-44 及 K-54 與 FAD 側鏈(side chain)接觸。在 E<sub>3</sub> 之 NAD 結合結構區，胺基酸 V-188、E-192 及 R-280 以側鏈和 FAD

接觸。在 E<sub>3</sub> 之介面結構區，胺基酸 H<sup>+</sup>-452 以主鏈(main chain)和 FAD 接觸。

## (二)E<sub>3</sub> 之菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合位置(NAD<sup>+</sup> binding site)

E<sub>3</sub> 的 NAD<sup>+</sup> 結合結構區和 FAD 結合結構區構造相似，都有 D-ABC β-平板形成之羅斯謨曲摺(Rossmann fold)。參與 NAD<sup>+</sup> 結合位置的胺基酸是位在 NAD<sup>+</sup> 結合結構區和介面結構區。

NAD<sup>+</sup> 在 β 股的羧基與 NAD<sup>+</sup> 結合結構區接觸，這些結合結構區是由胺基酸殘基 G-187、V-188、E-208、K-232、V-243、R-280 和 M-327 的胜肽主幹所組成。此外，NAD<sup>+</sup> 亦和介面結構區之胺基酸殘基 Q-373 的胜肽主幹及 NAD<sup>+</sup> 結合結構區之胺基酸 E-208 及 R-280 的側鏈接觸(參見第 82-84 頁附錄 10、11、12)。

## (三)E<sub>3</sub> 之活化中心(active center)

E<sub>3</sub> 之活化中心含活性鹼基(active base)、活性雙硫基(active disulfide)、FAD、NAD<sup>+</sup> 及雙羥擬脂醯胺(dihydrolipoamide, DHL)所組成，包括 FAD 結合結構區、NAD<sup>+</sup> 結合結構區、中心結構區以及介面結構區(參見第 80 頁附錄 8)。活性鹼基是由胺基酸 H-452 和 E-457 形成氫鍵後構成。H-452 之咪唑(imidazole)N<sup>3</sup> 經親核攻擊雙羥擬脂醯胺後引發電子傳遞反應。將 C-45 和 C-50 之間活性雙硫基還原(參見第 85 頁附錄 13)。電荷在 thio-disulfide 之間轉換後，經由胺基酸 C-50 傳送到 FAD，並進一步的將電子從 FAD 傳送至 NAD<sup>+</sup>。由於電子從 FAD 傳送至 NAD<sup>+</sup> 時不會直接形成鍵結，所以可能是經由 K-54 與 E-192 形成之離子對，進行 FAD 和 NAD<sup>+</sup> 之間電子的傳遞。

# 五、雙羥擬脂醯胺去氫酶之物理及生化特性

## (一)E<sub>3</sub> 之螢光光譜

E<sub>3</sub> 於 296 nm 激發後在 300 to 360 nm 產生放射光譜，此放射光能夠激發鄰近的 FAD，受激態的 FAD 於 480 to 550 nm 產生放射光譜。先添加 NAD<sup>+</sup>，接著再加入 dihydrolipoamide 推動 E<sub>3</sub> 酵素反應，可以發現 480 to 550 nm 放射光譜

消失，同時產生 450 nm 之放射光譜。此 450 nm 放射光譜代表 NADH 形成，而 480 to 550 nm 放射光譜消失，代表 FAD 被還原成 FADH。隨著時間的增長 NADH 離開 E<sub>3</sub>，450 nm 放射光譜逐漸消失，而 FADH 因將電子傳遞給 NAD<sup>+</sup>之故再度氧化成 FAD，所以 480 to 550 nm 之放射光譜漸漸恢復。因此螢光光譜不但可以作為觀察 E<sub>3</sub> 酵素反應之進行，同時也可觀察輔酶之氧化還原狀態(Liu et al., 1995)。

## (二)E<sub>3</sub> 之吸收光譜

E<sub>3</sub> 的氧化態(E form)，因所含之 FAD 吸收紫光(380 to 435 nm)及藍光(435 to 480 nm)故呈現黃色。Dihydrolipoamide 或 NADH 能將 E<sub>3</sub> 自 E form 還原成 EH<sub>2</sub> form(reduced form)。在 EH<sub>2</sub> form，FAD 的紫藍光吸光區位移發生新的藍綠吸光(490 to 560 nm)。此 490 至 560 nm 間(或 530 nm)之吸光代表 E<sub>3</sub> 處於 thiol-FAD 間電價轉移的階段。

EH<sub>2</sub> 還原態可經 lipoamide 處理後變回氧化態(E form)，由 EH<sub>2</sub> 至 E form 間之轉換亦可經由添加 acetylpyridine adenine dinucleotide (APyAD<sup>+</sup>，NAD<sup>+</sup>的類似物)或 NAD<sup>+</sup>完成。因此傳統上，E<sub>3</sub> 可見光光譜常被運用作為觀察電子於 dihydrolipoamide 和 NAD<sup>+</sup>間轉移之工具。

## (三)E<sub>3</sub> 之氧化還原中點電位

E<sub>3</sub> 主要由 active disulfide 和 FAD 負責內部電子傳遞的工作，藉由偵測 active disulfide 及 FAD 的氧化還原中點電位(Clark, 1960)，即可瞭解電子在 active disulfide 及 FAD 中傳遞的情形。正常 E<sub>3</sub> 的 active disulfide 和 FAD 氧化還原中點電位分別是 -264 mV 和 -314 mV(Wilkinson and Williams, 1979)

## 六、雙羥擬脂醯胺去氫酶缺陷個案報導及突變蛋白之研究

首件 E<sub>3</sub> 缺陷症的病例報告由 Haworth 等人於西元 1976 年提出(Haworth et al., 1976)。這篇報告中提到三個病人(C. M., G. M. and D. M.)，其中兩位(G. M. 和 D.

M.)之尿液中丙酮酸(pyruvate)和 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate)濃度提高，且血漿及腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)中的麩胺酸(glutamate)、脯胺酸(proline)及丙胺酸(alanine)含量也上昇，由體外(*in vitro*)活性分析發現 D. M.病人的丙酮酸去氫酶及 $\alpha$ -酮戊二酸去氫酶的酵素活性很低。

接著有許多病例相繼發表(Blass et al., 1976. Robinson et al., 1977; Taylor et al., 1978; Kuroda et al., 1979; Robinson et al., 1980; Robinson et al., 1981; Munnich et al., 1982; Matuda et al., 1984; Matalon et al., 1984; Otulakowski et al., 1985; Yoshida et al., 1990)。其中 Blass 等人於報告中提到在病人的纖維母細胞(fibroblasts)中，PDC 及 KGDC 酵素活性同時降低(Blass et al., 1976)；Taylor 等人則首先以測量 E<sub>3</sub> 酵素活性來診斷 E<sub>3</sub> 缺陷症(Taylor et al., 1978)。Otulakowski 等人(Otulakowski et al., 1985)更進一步的利用西方墨點分析法(Western blot analysis)，在病人的纖維母細胞(fibroblasts)分析 E<sub>3</sub>，來診斷 E<sub>3</sub> 缺陷症。

在突變蛋白研究方面，Liu 等人首度於 E<sub>3</sub> 缺陷症病人的 E<sub>3</sub> cDNA 上，發現兩個點突變，其中一個突變是由 A 變成 G，造成蛋白質上第三十七個胺基酸由 Lys(K)變成 Glu(E)(E<sub>3</sub> K-37 to E)。另一個突變點是由 C 變成 T 造成蛋白質上第 453 個胺基酸由 Pro(P)變成 Leu(L)(E<sub>3</sub> P-453 to L) (Liu et al., 1993)。

另外利用定點突變(site-directed mutagenesis, SDM)的方法曾創造出 E<sub>3</sub> H-452 to Q 及 E-457 to Q 的突變蛋白(Liu et al., 1995; Kim and Patel, 1992)，這兩個突變蛋白破壞了酵素的活性鹼基，突變後蛋白其比活性(specific activity)分別降到正常 E<sub>3</sub> 的 0.5%和 6%。此外根據 Liu 等人在 E<sub>3</sub> 缺陷病人基因上所確認兩個突變點(Liu et al., 1993)進行更深入之研究發現，其中一個點突變造成 K-37 to E 的改變，此突變後的蛋白質其雙體化(dimerization)的性質並未改變，酵素仍然是以同質雙體的形式存在，但其 FAD 含量降低 30%，同時比活性也降低 30%(Liu et al., 1995)。因此推測 K-37 可能參與 FAD 和蛋白質間的結合。另一個點突變造成 P-453 to L 的改變，突變後的蛋白質其 FAD 含量降低 70%，而比活性和正常 E<sub>3</sub> 比



和蛋白質間的結合。此外本實驗室最近的研究顯示 E<sub>3</sub> K-54 to E 和 E<sub>3</sub> S-53, K-54 to K-53, S54 的突變蛋白其 FAD 含量雖然只降低 25%(大約是 E<sub>3</sub> 的 75%)，但其比活性卻顯著的降低(小於 E<sub>3</sub> 的 1%)。螢光光譜分析結果進一步顯示 E<sub>3</sub> S-53, K-54 to K-53, S54 的突變蛋白在受質 DHL(dihydrolipoamide)及 NAD<sup>+</sup>之存在下電子傳遞部分受損，但是 E<sub>3</sub> K-54 to E 的突變蛋白電子由 DHL 傳遞到 NAD<sup>+</sup>的過程完全中斷。

Kazuko 等人(Kazuko et al., 1994)亦曾報告，將大腸桿菌(*Escherichia coli*)E<sub>3</sub> 之 K53(與哺乳類之 K54 同源)突變成 R 後，會增加 FAD 之氧化還原電位中點。

## 七、研究目的

經由 NMR 的資料顯示，在 E<sub>3</sub> 活性中心的 FAD 與 NAD<sup>+</sup>之間並無直接的鍵結，故電子並不是直接由 FAD 傳遞給 NAD<sup>+</sup>，可能是透過與 FAD 結合區相鄰的某些胺基酸當中間介質。根據 X-射線的結晶構造分析，位於 NAD 結合區的 E192 與 FAD 結合區的 K54 間形成離子對。因此 E192 可能對 FAD 與 NAD 之間的電子傳遞具有重要的影響。

另外去年度本實驗室所進行有關 K54E 的突變蛋白研究中發現，在電子傳遞反應進行時，E<sub>3</sub> 第 54 個胺基酸(K54)對於 FAD 構造的穩定具有關鍵性的影響。當 lysine 突變成 glutamate 後，可能使 K54E 突變蛋白的 FAD 還原成 FADH 之能力喪失而使電子傳遞反應被阻斷。

因此本實驗採用定點突變方法(SDM)創造出 E192Q 突變蛋白，經由酵素動力學分析比較 E192Q 突變蛋白質和正常 E<sub>3</sub> 蛋白質其酵素動力學性質上的差異；並以螢光光譜分析及可見光/紫外光光譜分析來探討 E192Q 可能的電子傳遞機制；此外利用還原電位中點分析(midpoint reduction potential)印證螢光光譜分析上觀察到的現象。藉以了解 E192 是否參與了活化中心 FAD 結構的穩定，並探討其在 FAD 與 NAD 間之電子傳遞所扮演的角色。

## 第二章 材料與方法

### 一、材料

#### (一)質體(Plasmid)及菌種(Bacteria Strain)

*Escherichia coli* M15 strain、pDM1.1 plasmid、*Escherichia coli* JM109 strain 及 pQE-9-E<sub>3</sub> plasmid(Villarejo and Zabin, 1974; Liu, 1994)，由中山醫學院營養科學研究所劉德中博士提供。

#### (二)實驗藥品試劑

購自美國 Amersham LIFE SCIENCE (USB)

agarose-LE

boric acid (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)

EDTA, disodium dihydrate

ethidium bromide (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br)

potassium hydroxide (KOH)

potassium phosphate monobasic, anhydrous(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

sodium acetate (NaOAc, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na)

sodium chloride (NaCl)

sodium hydroxide (NaOH)

sodium phosphate dibasic, heptahydrate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O)

sodium phosphate monobasic, monohydrate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O)

tris (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>)

購自美國 Bio-Rad Laboratories

Bio-Rad protein assay

Econo-column

n-butanol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>OH)

prestained SDS-PAGE standards, low range

購自美國 New England BioLabs

*Bam* HI restriction endonuclease

*Sal* I restriction endonuclease

*T4* DNA ligase

購自瑞典 Pharmacia Biotech AB

acrylamide

chelating sepharose fast flow

N,N'-methylene-bis-acrylamide

購自美國 Sigma Chemical company

2,6-dihydroxypurine (xanthine)

ammonium persulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)

ampicillin

benzyl viologen, dichloride salt (C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

bovine serum albumin

chloroform (CHCl<sub>3</sub>)

DL-6,8-thioctic acid amide, oxidized form (DL-lipoamide)

flavin adenine dinucleotide (FAD)

imidazole

isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH)

isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)

kanamycin

methanol (CH<sub>3</sub>OH)

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)

nickel sulfate (NiSO<sub>4</sub>)

phenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O)

phenosafranin (C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>Cl)

sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>)

xanthine oxidase

β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD)

β-nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (β-NADH)

購自 Spectrum

Spectra/Por membrane

購自美國 Stratagene Biochemical company

*Pfu* Turbo DNA polymerase

購自日本 TAKARA SHUZO CO., LTD.

recombinant *Taq* DNA polymerase

購自美國 Whatman Inc

DE52 (ion-exchange cellulose)

購自美國 QIAGEN Biochemical company

QIAEX II agarose gel extraction kit

QIAprep spin miniprep kit

QIAquick PCR purification kit

6×Histidine antibody

購自美國 PERKIN-ELMER Applied Biosystems

ABI PRISM™ dye terminator cycle sequencing ready reaction kit

### (三)實驗常用儀器

破細胞機：French® Pressure Cells and Press (SLM Instruments, Inc.)

去氧核糖核酸自動定序儀：ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)

聚合酶連鎖反應器：GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN-ELMER Applied Biosystems)

超高速離心機：CP 85  $\beta$  Ultracentrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd.)

高速離心機：J2-MC Centrifuge (BECKMAN Instruments, Inc.)

高速離心機：CR-21 Centrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd.)

數位化影像分析系統：AlphaImager™ 2000 Documentation & Analysis System (Alpha Innotech Corporation)

螢光光譜分析儀：F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi Koki Co., Ltd.)

可見光/紫外光光譜分析儀：U-3000 Spectrophotometer (Hitachi Koki Co., Ltd.)

HPLC：LC-Organizer (Hitachi Koki Co., Ltd.)

L-4500 Diode Array Detector (Hitachi Koki Co., Ltd.)

L-6200A Intelligent Pump (Hitachi Koki Co., Ltd.)

FPLC：D-6000 Interface (Hitachi Koki Co., Ltd.)

L-4000 UV Detector (Hitachi Koki Co., Ltd.)

L-6220 Intelligent Pump (Hitachi Koki Co., Ltd.)

電化學分析儀：Electrochemical Analyzer BAS100B(Bioanalytical  
Systems Inc.)

4°C 冰箱：Whirlpool

-20°C 冰箱：Norfrost Ice Chef

-70°C 冰箱：SANYO Ultra Low

微量高速離心機：Eppendorf Centrifuge 5415C (Eppendorf)

微量天秤：Mettler Toledo AB204

pH Meter：Mettler Toledo 320 pH Meter

加熱攪拌器：Stirrer/Hotplate (CORNING)

水平式電泳槽：Mupid-2 (COSMO Bio Co., Ltd.)

震盪器：Vortex-2 Genie (Scientific Industries, Inc.)

eppendorf 震盪器：Firstek Scientific

微量吸取器：BOECO Pipette

微量吸取器：GILSON Pipette

震盪水浴槽：Water Bath (YIHDERN)

紫外光箱：TFX-20C UV-BOX (VILBER LOURMAT)

細菌培養箱：Temperaturl Incubator (CHENG SANG)

Column：Superdex™ 200 HR 10/30 (Pharmacia)

一次 RO 純水製造機：Water Purification System (MILLIPORE)

二次 RO 純水製造機：Ultra-Pure Water System (MILLIPORE)

電源供應器：Power/PAC 3000 (BIO-RAD)

蛋白質電泳轉印槽：Mini-PROTEAN® II System (BIO-RAD)

(四)溶液、緩衝液(Buffer)及培養液(Medium)之配製：

(1) Luria-Bertani medium：(per liter)

tryptone            10 g

Yeast Extract       5 g

NaCl                 5 g

(plate：per liter L.B. medium add 15 g Agar)

以一次水攪拌均勻滅菌後備用

- (2) 5X TBE Buffer : (per liter)
- |                     |             |
|---------------------|-------------|
| Tris base           | 54 g        |
| Boric acid          | 27.5 g      |
| EDTA (0.5M, pH=8.0) | 20ml        |
| dH <sub>2</sub> O   | 定量至 1000 ml |
- (3) TE Buffer : (pH=8.0)
- |       |                   |
|-------|-------------------|
| 10 mM | Tris-HCl (pH=8.0) |
| 1 mM  | EDTA (pH=8.0)     |
- (4) 12.5 % SDS-PAGE Resolving Gel : (4 ml)
- |                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| acrylamide-bisacrylamide (30:0.8) | 1.66 ml   |
| 1.5 M Tris-HCl (pH=8.8)           | 1 ml      |
| 10 % SDS                          | 0.04 ml   |
| 1.5 % Ammonium persulfate         | 0.5ml     |
| dH <sub>2</sub> O                 | 0.79 ml   |
| TEMED                             | 2 $\mu$ l |
- (5) SDS-PAGE Stacking Gel : (2 ml)
- |                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| acrylamide-bisacrylamide (30:0.8) | 0.25 ml   |
| 0.5 M Tris-HCl (pH=6.8)           | 0.5 ml    |
| 10 % SDS                          | 0.02 ml   |
| 1.5 % Ammonium persulfate         | 0.1 ml    |
| dH <sub>2</sub> O                 | 1.03 ml   |
| TEMED                             | 2 $\mu$ l |
- (6) SDS-PAGE Electrophoresis Buffer : (per liter)
- |                   |             |
|-------------------|-------------|
| Tris base         | 3 g         |
| Glycine           | 14.4 g      |
| SDS               | 1 g         |
| dH <sub>2</sub> O | 定量至 1000 ml |
- (7) SDS-PAGE Sample Buffer : (10 ml)
- |                         |      |
|-------------------------|------|
| 0.5 M Tris-HCl (pH=6.8) | 1 ml |
|-------------------------|------|

2 % SDS	2 ml
1.25 M DTT	0.5ml (1/20)
10 % Glycerol	1 ml
0.4 % Bromophenol blue	0.5 ml (0.02 %)

dH<sub>2</sub>O 定量至 10 ml

(8) SDS-PAGE Coomassie blue Staining Solution : (per 500 ml)

0.1 % Coomassie blue R250	208 ml
Methanol	208 ml
Glacial acetic acid	84 ml

以濾紙過濾

(9) SDS-PAGE Destain Solution : (per 500 ml)

Acetic acid	50 ml
Methanol	150 ml
dH <sub>2</sub> O	300 ml

(10) TBS Buffer : (per liter)

0.5 M Tris-HCl (pH=7.4)	20 ml
NaCl	9 g

dH<sub>2</sub>O 定量至 1000 ml

(11) Blotting Buffer : (per 3000 ml)

Tris-HCl	9.1 g
Glycine	43.2 g
Methanol	600 ml

dH<sub>2</sub>O 定量至 3000 ml

(12) Substrate Solution :

4-chloro-1-naphthol	30 mg (0.06 % g/ml)
Methanol	10 ml

add TBS Buffer to 50 ml

add 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to 呈色

(13) Enzyme Kinetic Forward Reaction Assay Buffer : (pH=7.4)

50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7.4)

0.25 mM EDTA (pH=8.0)

(14) Enzyme Kinetic Reverse Reaction Assay Buffer : (pH=6.8)

50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6.8)

0.25 mM EDTA (pH=8.0)

(15) Molecular Sieving Buffer : (pH=7.4)

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH=7.4)

200 mM NaCl

(16) Enzyme Extract Buffer(PEN) : (pH=7.4)

0.50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH=7.4)

25 mM EDTA (pH=8.0)

100 mM NaCl

(17) Dialysis Buffer(PE) : (pH=7.4)

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH=7.4)

0.25 mM EDTA (pH=8.0)

store at 4°C

(18) 5X Loading Buffer :

50 % Glycerol

1 mM EDTA

0.25 % Bromophenol blue

0.25 % Xylene cyanol

store at 4°C

(19) Ethidium Bromide (EtBr) :

10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

Dissolve well and keep in a dark or brown bottle at 4°C

(20) DE52 Elution Buffer : (pH=7.4)

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH=7.4)

0.25 mM EDTA (pH=8.0)

150 mM NaCl



(21) Oxidation-Reduction Potential Buffer :

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH=7.4)

0.25 mM EDTA (pH=8.0)

50 mM NaCl

(22) Dihydrolipoamide(DHL) Reagent :

Lipoamide 400 mg

Methanol 8 ml

$\text{NaBH}_4$  400 mg

ddH<sub>2</sub>O 2 ml

將上列反應試劑溶解均勻後，在避光三角瓶中冰浴攪拌六小時。六小時後，溶液將會由原先的黃色轉變為無色，之後加入 10 ml 1N HCl 將未反應的  $\text{NaBH}_4$  作用形成 NaCl。

以 10 ml chloroform 反覆萃取 DHL 三次，DHL 會溶解在 chloroform，最後在抽風櫥中抽乾 chloroform，使 DHL 乾燥後儲存在黑色或棕色的 eppendorf 中，放在 -20°C 冰箱中備用。

## 二、方法

本實驗共分成三個階段進行，首先進行突變蛋白質表達質體之建構及核酸序列分析，接著將建構完成後之突變蛋白質表達質體送進 *Escherichia coli* M15 strain 中進行蛋白質表達及純化，並進行分子量測定，最後進行蛋白質功能分析。(實驗流程參見第 36 頁圖 1) 實驗方法詳述如下：

### (一) 突變蛋白質表達質體之建構及核酸序列分析

#### (1) 定點突變聚合酶連鎖反應(SDM PCR)

以兩段式 polymerase chain reaction(PCR)方法構建突變蛋白質表達質體 pQE-9-E<sub>3</sub>: E192Q。首先利用 pQE-9-E<sub>3</sub> 當模板(template)以一段內含 E192Q 之定點突變引子(sense site-directed mutated primer: 5'-GTA ATA GGT GTA CAA TTG GGT TCA GTT-3')及 antisense LS primer(5'-GCG CGC GTC GAC TCA AAA GTT GAT TGA TTT GCC-3'；內含 *Sal* I restriction site 及 E<sub>3</sub> stop code)以 *Pfu* DNA polymerase 進行聚合酶連鎖反應合成第一段含突變點之 DNA 片段。接著再以此 DNA 片段為 antisense primer 和一個 sense L1 primer(5'-GCG CGC GGA TCC GCA GAT CAG CCG ATT-3'；內含 *Bam* HI restriction site 及 E<sub>3</sub> start code)繼續以 PCR 方法放大全段 E<sub>3</sub> SDM cDNA。

#### (2) 聯結反應(Ligation)

將 PCR 放大之 SDM DNA 片段和 pQE-9 質體，同樣以 *Bam* HI 及 *Sal* I 二個限制內切酶進行消化作用(digestion)，再各別進行純化。將形成黏性端(sticky end)之 SDM DNA 片段當 insert，以經消化作用之 pQE-9 質體當載體(vector)，利用 *T4* DNA ligase 在 16°C 下培養至少 4 小時進行聯結反應，接合成 pQE-9 突變蛋白質表達質體。

#### (3) 轉形作用(transformation)

經聯結作用後突變蛋白質表達質體 pQE-9-E<sub>3</sub>: T148X 接著 CaCl<sub>2</sub> transformation 方法送入 *E. coli* JM109 strain 中。並將經轉形作用之 *E. coli* JM109 塗在含有抗生素 ampicillin(100 µg/ml)的 LB 洋菜膠盤中，在 37 °C 恆溫隔夜培

養以進行微篩選。

#### (4) 微篩選(mini screening)

經隔夜培養的 LB 洋菜膠盤所篩選存活的單一菌落，各別放進 LB medium(內含抗生素 ampicillin)中 37 °C 恆溫隔夜培養。以菌液：phenol：chloroform = 2：1：1 震盪破細胞，以瓊脂糖膠(agarose gel)電泳。以 pQE-9-E<sub>3</sub> 質體當 marker 進行微篩選。以 QIAprep spin miniprep kit 純化聯結成功的突變蛋白質表達質體。進一步以 *Bam* HI 及 *Sa*II 二個限制內切酶進行消化作用(digestion)來確認結果。

#### (5) 去氧核糖核酸序列分析(DNA sequencing)

純化聯結成功之突變蛋白質表達質體，利用 Perkin-Elmer 公司的 ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer 及 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 進行定序分析。主要以 ddNTP 上帶有四種不同顏色的螢光染劑為原料，突變蛋白質表達質體為模板，分別以 Y118X(5'-CAT GTC AAT GGA TAT GGA AAG ATA ACT-3')、E<sub>3</sub>815(5'-TGA AAG TTT TTA GAT ATC TCC-3') 及 PQE9AS(5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3')三段 primer，利用 deoxynucleotide termination 的方式及 PCR 方法在 DNA 模板上 extension 後，以酒精沈澱方法純化後，經 6% polyacrylamide sequencing gel 分析[黑色代表鳥糞嘌呤(guanine; G)，綠色代表腺嘌呤(adenine; A)，紅色代表胸腺嘧啶(thymine; T)，藍色代表胞嘧啶(cytosine; C)]，挑出具正確突變點質體菌株(pQE-9-E<sub>3</sub>: E192Q)。

## (二)蛋白質大量表達與純化及定量分析

### (1) 突變蛋白質質體大量表達及純化

將經 DNA 序列分析後，具有正確的突變 DNA 序列的表達質體 pQE-9-E<sub>3</sub>: E192Q，利用 CaCl<sub>2</sub> transformation 方法送入含有 pDM1.1 質體的 *E. coli* M15 strain 中表達。在 *E. coli* M15 strain 宿主細胞中含有攜帶 *lac*<sup>f</sup> gene 之質體 pDM1.1(具有 kanamycin 抗藥性)會產生 *lac* 抑制子(repressor)，與質體 pQE-9 上之 phage T5

啟動子(promoter)結合，以抑制 pQE-9 質體蛋白質的表達。為啟動 pQE-9 質體表達蛋白質，可加入 isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)與 *lac* repressor 結合，使 *lac* repressor 離開 phage T5 promoter 後，RNA 聚合酶得以順利結合到 phage T5 promoter 上，表現基因得以進行轉錄作用(transcription)合成 mRNA，再經 mRNA 轉譯作用(translation)合成蛋白質外，由於在 pQE-9 載體之 N 端接有六個組織胺酸(histidine)基因，所以表達的蛋白質可以與 Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic-agarose)樹脂結合，再利用與組織胺酸構造相似之咪唑(imidazole)濃度梯度與蛋白質競爭樹脂上的結合部位，將蛋白質溶析出來。

第一步將具有表達質體的單一菌株培養在含有 ampicillin(100  $\mu$ g/ml)及 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)的 2 ml LB 培養液中 37  $^{\circ}$ C 隔夜培養。第二天將隔夜菌液接種到 200 ml 同樣的 LB 培養液中至 OD<sub>600 nm</sub>=0.7 時(約 5 小時)，加入 IPTG(200  $\mu$ g/ml)後在 30  $^{\circ}$ C 下繼續進行隔夜培養(約 15 小時)。第三天將菌液離心(4,000 $\times$ g, 20 min, 4 $^{\circ}$ C)後收集沈澱細胞(cell pellets)，將其懸浮於冰的 PEN 緩衝溶液(Enzyme extract buffer)中，最後終體積 15 ml。接著以 French<sup>®</sup> Pressure Cells and Press 在 4 $^{\circ}$ C 下高壓破碎細胞(20,000 psi)。經超高速離心(50,000 $\times$ g, 15 min)後取上清液通入預先以 PEN buffer 平衡之 Ni-NTA 管柱。再以二倍管柱體積之 PEN buffer 清洗管柱，去除非專一性(non-specific)結合蛋白質。最後以咪唑濃度梯度(5-100 mM 溶於一倍管柱體積之 PEN buffer 中)將結合在 Ni-NTA 上的標的蛋白質溶析下來。收集純化的蛋白質在 4 $^{\circ}$ C 下進行透析(dialysis)，藉以去除大部分的咪唑。經透析後的蛋白質以 DE52 陰離子交換樹脂做進一步純化。利用 ddH<sub>2</sub>O 平衡管柱，以 DE52 elution buffer 將標的蛋白質溶析下來。

## (2) 蛋白質濃度測定

將純化出來的蛋白質用 Bradford 方法測定其蛋白濃度，該方法使用 BSA(bovine serum albumin)作為定量的標準溶液，設定四組標準濃度(standard concentration)BSA，其濃度分別為 0  $\mu$ g/ml、5  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml 及 15  $\mu$ g/ml，以

PEN 緩衝溶液定量體積至 800  $\mu\text{l}$ ，各標準溶液分別再加入 200  $\mu\text{l}$  的 Bradford 緩衝溶液，使最終體積為 1000  $\mu\text{l}$  後，在室溫下進行反應 5 分鐘後置入透光石英比色管中，在可見光/紫外光光譜分析儀(Hitachi U-3000)波長 595 nm 下掃描偵測吸光值，建立標準 BSA 濃度曲線。測試樣品之濃度經範圍內標準濃度曲線內差法計算後即可得之。

### (3) 蛋白質純度測定

將 protein marker、E<sub>3</sub>、E192Q(10  $\mu\text{g}$ )分別和 sample buffer 以 1 比 1 的比例混合均勻後，沸水加熱 5 分鐘，loading 入 12.5 % SDS-PAGE，以 120 V 的電壓電泳 1 小時，以 coomassie blue 染色，退染後觀察其單體分子量是否為 55 kDa，以及蛋白質的純度。

### (4) 蛋白質分子量測定

將經過純化的蛋白質取 100  $\mu\text{g}$  打入 HPLC，以 Superdex HR-200 管柱觀察其分子量。液態流動相為 Molecular sieving buffer 在 UV 280 nm 下偵測蛋白質出現的時間(流速為 0.5 ml/min)。

### (5) FAD 相對含量測定

經過純化的蛋白質分別取 200  $\mu\text{g/ml}$ 、300  $\mu\text{g/ml}$  及 500  $\mu\text{g/ml}$  三種濃度，加熱煮沸 5 分鐘將蛋白質變性，使 FAD 懸浮在溶液中，離心後取上清液，總體積 1 ml。個別放入透光石英比色管中，測其 450 nm 吸光讀值。以正常 E<sub>3</sub> FAD 含量 OD<sub>450 nm</sub> 值當成百分之百，突變蛋白質之 FAD 含量 OD<sub>450 nm</sub> 讀值與其比較後，作三重複平均後，即可得知突變蛋白質 FAD 的相對含量百分比。

## (三) 突變蛋白質功能特性分析

### (1) 酵素動力學分析(Enzyme kinetic assay)

酵素反應之正反應是利用 DHL(dihydrolipoamide)和 NAD<sup>+</sup>為受質，在 340 nm 吸光下監測產物 NADH 的生成速率。逆反應是利用 LA(lipoamide)和 NADH 為受質，在 340 nm 吸光下監測受質 NADH 的消失速率。單位酵素活性的定義是 $\mu$

mole of NADH produced(or disappeared) per min per mg protein。在室溫下進行酵素動力學分析時，正逆反應之受質分別選五種不同之濃度，在不同 pH 值(正反應 pH=7.4，逆反應 pH=6.8)的緩衝溶液下進行，正反應首先固定一個 NAD<sup>+</sup>濃度改變 DHL 濃度做反應，可得一組 5 個反應速率之數據，如以五種 NAD<sup>+</sup>濃度重複上述步驟即可得五組(5×5=25 個)數據。逆反應做法同正反應步驟，但受質改為 LA 及 NADH。[數據以 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit(Version 3.0)軟體進行雙受質酵素分析]。每個反應濃度分別求得酵素反應之初速度後代入公式計算。因為此酵素反應有兩個受質，所以突變蛋白的反應機制有兩種可能性：

乒乓機制(Ping-Pong mechanism)或序列機制(Sequential mechanism)其計算公式如下：

1. 乒乓機制(Ping-Pong mechanism)：

$$V=V_{\max}[A][B]/(K_mB[A]+K_mA[B]+[A][B])$$

2. 序列機制(Sequential mechanism)：

$$V=V_{\max}[A][B]/(K_{ia}K_mB+K_mB[A]+K_mA[B]+[A][B])$$

最後求得  $K_m(\text{DHL})$ 、 $K_m(\text{NAD}^+)$ 、 $K_m(\text{LA})$ 、 $K_m(\text{NADH})$ 及正逆反應之  $K_{\text{cat}}$ 。以上之  $K_m$  代表酵素與其受質之結合能力， $K_{\text{cat}}$  代表酵素反應之代謝迴轉速率。比較  $E_3$  及突變蛋白質之酵素反應的各個  $K_m$  及  $K_{\text{cat}}$  後，即可判斷突變蛋白質比活性較  $E_3$  降低的原因。由此初步確定突變蛋白質在酵素反應中伴演之角色。

(2) 螢光光譜分析

反應混合溶液內含 100  $\mu\text{g/ml}$  純化的酵素，總體積 1 ml 之 PEN 緩衝溶液 (pH=7.4)，以不同受質 DHL、DHDLA(dihydrolipoic acid)、NAD<sup>+</sup>及 NaBH<sub>4</sub> 分成下列五組實驗在室溫下進行分析。1. 25  $\mu\text{M}$  DHL 單受質處理；2. 50  $\mu\text{M}$  DHDLA 單

受質處理；3. 50  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  及 50  $\mu\text{M}$  DHL 雙受質處理；4. 50  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  及 250  $\mu\text{M}$  DHLA 雙受質處理；5. 1  $\text{mM}$   $\text{NaBH}_4$  處理。在添加反應受質後將樣品置入四面透光石英比色管中，以 Hitachi F-4500 螢光光譜分析儀中，以 296 nm 波長激發，在波長 310nm 至 570nm 之間觀察不同時間點酵素放射光螢光光譜的變化，此時 FAD 在波長 480 nm 至 550 nm 之間會有一放射光波峰產生，而 NADH 在波長 450 nm 至 460 nm 之間會有一放射光波峰產生。當加入 DHL 時，FAD 還原成 FADH，此時 FAD 在波長 480 nm 至 550 nm 之間放射光波峰會下降，當 FADH 將電子傳遞給  $\text{NAD}^+$  產生 NADH 時，此時在波長 450 nm 至 460 nm 之間會有一 NADH 放射光波峰產生，藉此可推測電子在 FADH 及  $\text{NAD}^+$  之間的傳遞情形。螢光光譜數據轉換成 ASCII 碼後，以 MicroCal Software, Inc. 公司所設計的 MicroCal Origin(Version 2.62) 軟體進行螢光光譜分析。

### (3) 可見光/紫外光光譜分析

反應混合溶液內含 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  純化的酵素，總體積 0.5 ml 之 PEN 緩衝溶液 ( $\text{pH}=7.4$ )，以不同受質 DHL 及  $\text{NAD}^+$  分成下列二組實驗在室溫下進行分析。1. 50  $\mu\text{M}$  DHL；2. 100  $\mu\text{M}$  DHL + 100  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$ 。在添加反應受質後將樣品置入透光石英比色管中，以 Hitachi U-3000 可見光/紫外光分光光度儀偵測。依不同的時間點觀察  $\text{E}_3$  及突變蛋白質在波長 300 nm 至 600 nm 之吸光曲線的變化。吸收光譜數據轉換成 ASCII 碼後，以 MicroCal Software, Inc. 公司所設計的 MicroCal Origin(Version 2.62) 軟體進行光譜分析。

### (7) 氧化還原中點電位測定

根據 Clark 所提出的方法(Clark, 1960)，將反應混合物包括突變蛋白質(1  $\text{mg}/\text{ml}$ )、20  $\mu\text{M}$  phenosafranine、200  $\mu\text{M}$  Xanthine、2  $\mu\text{M}$  benzylviologen、50  $\text{nM}$  Xanthine oxidase 之 0.1 M phosphate buffer( $\text{pH}=7.4$ )，在室溫下施與 -220、-230、至 360 mV 之電壓，並分別以可見光/紫外光光譜分析儀(Hitachi U-3000)讀取 290 nm 以及 454 nm 之吸光值。扣除 blank(不含突變蛋白質之反應物)之 290 nm( $\epsilon =$

9.92 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)讀值代表 active disulfide 及 FAD 之還原量總合；扣除 blank 之 454 nm( $\epsilon = 8.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )讀值代表 FAD 之還原量。因為測定時酵素之用量及酵素內 FAD 含量為已知量，所以可先算出 FAD 之還原量，並換算成對應之 FAD 還原量，之後換算出 active disulfide 之還原電位中點。以 MicroCal Software, Inc.公司所設計的 MicroCal Origin(Version 2.62)軟體進行分析。以確認突變蛋白質在螢光光譜分析中之變化和 active disulfide 及 FAD 還原電位中點之相互關係。



## 第三章 結 果

### 一、突變蛋白質表達質體之建構

利用 SDM PCR 的方法創造出 E<sub>3</sub>:E192Q(E<sub>3</sub> 蛋白質上第 192 個胺基酸由 glutamate 變成 asparagine)，以 T4 DNA Ligase 將同樣經 Bam HI / Sal I digestion 後之 T148X DNA 片段和 pQE-9 表達質體進行聯結反應(ligation)，再將聯結成功的 plasmid DNA 以 CaCl<sub>2</sub> transformation 方法送入 *Escherichia coli JM109* strain。經由微篩選(miniscreening)及微量 plasmid DNA 製備(miniprep)純化後，進行 DNA 定序，表達質體經 DNA 定序確認除了 E192 位置突變成 Q 外，並無其他額外之突變後(參見第 37-40 頁圖 2-5)，以 CaCl<sub>2</sub> transformation 方法送入 *E. coli M15* strain 中繼續進行突變蛋白質之表達及純化。因為 E<sub>3</sub> 是由 homodimer(同質雙體)所組成，每個 monomer 之分子量為 50919 Da 且含一個非共價鍵結合之 FAD，所以可利用 SDS-PAGE 初步檢查純化後蛋白質之純度，接著再利用 high performance liquid chromatography(HPLC)分析其突變蛋白質分子量，並以 FAD 在 450 nm 有最大吸光特性，分析突變蛋白質其 FAD 的含量。

### 二、蛋白質表達與純化及定量分析

將 DNA 定序完成的 plasmid DNA 以 CaCl<sub>2</sub> transformation 方法送入內含 pDM1.1 質體 *E. coli M15* strain，經由 IPTG 誘發蛋白質大量表達。破碎細胞及超高速離心後，得到的細胞粗萃物上清液，通過 Ni-NTA 管柱，以濃度梯度咪唑(imidazole)溶析，經 SDS-PAGE 確定蛋白質純度後(data not shown)，在 4°C 進行透析(dialysis)，之後以 DE52 管柱進一步純化，以 SDS-PAGE 初步檢查蛋白質純度及分子量(參見第 42 頁圖 6)，以 Bradford 方法測其蛋白質濃度後，儲存蛋白質於 4°C 或冰上備用。經過純化的突變蛋白質以 HPLC 進行分子量測定(Superdex HR-200 column, Molecular sieving buffer, UV 280 nm detected, speed 0.5 ml/min)，結果顯示突變蛋白質 E192Q 和 wild type E<sub>3</sub>，其吸光波峰同樣約在 27.5 分鐘出現(參見第 44 頁圖 8)，經參照標準分子量曲線(參見第 43 頁圖 7)計算出在此時間點的相對分子量約為 102 kDa。因為已知 E<sub>3</sub> 單體分子量為 50919 Da，所以推測純化出來的蛋白質為雙體(dimer)形態。由 HPLC 分析結果顯示，E192Q

蛋白質的突變不會改變 E<sub>3</sub> 自身組成雙體(self-dimerization)之性質，酵素本身依然是以同質雙體(homodimer)的形式存在。在隨後的 FAD 相對含量分析方面，將純化出的突變蛋白質 E192Q 以及 E<sub>3</sub> 測定其 FAD 含量，其中以 E<sub>3</sub> 的 FAD 含量當作 100%，發現 E192Q 突變蛋白的 FAD 相對含量為 95% (參見第 45 頁表二)。顯示突變蛋白質 E192Q 其與 FAD 之間的結合能力受突變影響很小，在 5% 範圍以內。

由以上結果得知突變蛋白質 E192Q 在構造上仍然維持同質雙體之型態，且突變對於 FAD 之結合能力並未發生重大的改變，因此接下來進行突變蛋白質功能分析，藉以瞭解突變是否對酵素正常功能造成影響。首先可利用 E<sub>3</sub> 酵素反應產物 NADH 在 340 nm 有最大吸光的特性，進行酵素動力學分析，測量酵素活性，觀察酵素反應機制、對受質親和力以及代謝迴轉率。

### 三、突變蛋白質之功能特性

#### (一) 酵素動力學分析

將 E192Q 突變蛋白質和 wild type E<sub>3</sub> 以不同濃度的受質進行酵素動力學之正逆反應分析。在正反應分析中，E<sub>3</sub> 所使用受質 DHL 濃度分別為 0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、1 mM、3 mM；NAD<sup>+</sup>濃度則分別為 0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、1 mM、3 mM。而 E192Q 所使用受質 DHL 濃度分別為 0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM；NAD<sup>+</sup>濃度則為 0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM。分別以五種不同濃度的受質 DHL 和 NAD<sup>+</sup>進行反應，首先固定一 DHL 的濃度，改變 NAD<sup>+</sup>濃度作反應，可得五個反應數據，以五種不同濃度的 DHL 重複上述步驟共可獲得二十五個反應數據。在逆反應分析中，以同樣方法也可獲得二十五個反應數據。而 E<sub>3</sub> 所使用受質 LA 濃度為 0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6 mM；NADH 濃度則為 0.01 mM、0.02 mM、0.03 mM、0.05 mM、0.1 mM。E192Q 所使用受質 LA 濃度分別為 0.05 mM、0.1 mM、0.15 mM、0.2 mM、0.25 mM；NADH 濃度則為 0.01 mM、0.015 mM、0.02 mM、0.025 mM、0.03 mM。由所獲得之反應數據分別求得酵素反應之初速度後，再以 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit(Version 3.0)軟體進行雙受質酵素分析。該軟體可直接計算出正反應之 K<sub>m</sub>(DHL)、K<sub>m</sub>(NAD<sup>+</sup>)及 V<sub>max</sub> 與逆反應之 K<sub>m</sub>(LA)、K<sub>m</sub>(NADH)及

$V_{max}$ ， $V_{max}$  除以  $E_3$  之分子量(102 kDa)換算可得到  $K_{cat}$ 。因為雙羥擬脂醯胺去氫酶( $E_3$ )是屬於雙受質酵素，所以突變蛋白質的反應機制有兩種可能性；一為乒乓機制(Ping-Pong mechanism)，可以經由  $V = V_{max}[A][B]/(K_mB[A] + K_mA[B] + [A][B])$  方程式模擬出其反應機制圖形；另一種機制為序列機制(Sequential mechanism)，也可利用其計算方程式為  $V = V_{max}[A][B]/(K_{ia}K_mB + K_mB[A] + K_mA[B] + [A][B])$  模擬出反應機制圖形。以上之  $K_m$  代表酵素與其受質之結合能力， $K_{cat}$  代表酵素反應之代謝迴轉速率。比較  $E_3$  及突變蛋白質之酵素反應的各個  $K_m$  及  $K_{cat}$  後，可初步確定突變蛋白質的酵素反應機制及其  $K_m$  與  $K_{cat}$  之變化程度。其結果參見第 46-53 頁圖 9-12 及表三至六。由結果顯示， $E_3$  其正逆反應機制皆為乒乓機制，且 E192Q 的逆反應催化機制仍然遵循乒乓機制，但其正反應則轉變成序列機制。此外 E192Q 之正反應反應機制中，代謝迴轉率( $K_{cat}$ )大幅降低，僅約為  $E_3$  的 5%， $K_m(DHL)$  僅約為  $E_3$  的 15%， $K_m(NAD)$  則約為  $E_3$  的 80%；而 E192Q 逆反應的反應機制之代謝迴轉率( $K_{cat}$ )僅約為  $E_3$  的 10%，其  $K_m(LA)$  僅約為  $E_3$  的 15%， $K_m(NADH)$  僅約為  $E_3$  的 30% (詳見第 54 頁表七)。從上述結果得知 E192Q 的突變改變了正反應之反應機制，使代謝迴轉率大幅降低，並影響了酵素與受質之間的親和力。由此可知 E192 確實在  $E_3$  的活化中心的催化反應中扮演重要角色。接下來可藉由螢光光譜分析進一步探討突變蛋白質 E192Q 代謝迴轉率大幅降低及反應機制的改變是否肇因於 DHL 與 FAD 及  $NAD^+$  之間的電子傳遞受到影響所致。

## (二) 螢光光譜分析

### (1) 經單受質 DHL(dihydrolipoamide)處理之螢光光譜分析

$E_3$  在加入 DHL 後，因為 FAD 可以被還原成 FADH，所以原先在 510nm 處的 FAD 放射光波峰將會依 FADH 的生成而下降，可藉以觀察 DHL 與 FAD 間的電子傳遞情形。由第 55 頁圖 13A 的結果發現  $E_3$  在 510 nm 處有 FAD 的放射光波峰產生，在加入 DHL 後，FAD 的放射光波峰迅速降至最低點；在 15 分鐘之後，FAD 放射光波峰回復至原來的 90%)；推論在  $NAD^+$  不存在的情況下，電子是由 DHL 傳至 FAD，然後由 FADH 傳至可能存在之中間介質，故在高濃度的 DHL(酵素濃度的 50 倍)正向驅動下，FADH 仍可氧化成 FAD。由第 55 頁圖

13B 的結果得知，E192Q 在 510nm 處的 FAD 放射光波峰些微下降後即停滯不動，其 FAD 幾乎無法還原形成 FADH，推測可能是突變蛋白質 E192Q 在 DHL 傳遞電子給予 FAD 的過程受到阻斷而導致。

#### (2) 經雙受質 DHL 與 NAD<sup>+</sup>處理之螢光光譜分析

E<sub>3</sub> 在 NAD<sup>+</sup>存在的情況下，電子由 DHL 傳至 FAD，然後由 FADH 傳至 NAD<sup>+</sup>形成 NADH，所以加入 DHL 及 NAD<sup>+</sup>後，藉由觀察 FAD 之 510 nm 放射光波及 NADH 之 450 nm 放射光波峰的升降探討由 DHL 經 FAD 至 NAD 間氧化還原態的變化及完整的電子傳遞過程。在第 57 頁圖 15A 可以觀察到 FAD 之 510 nm 放射光波峰迅速下降，同時 NADH 之 450 nm 放射光波峰上升之情形，然後 NADH 之 450 nm 波峰隨著時間增加而下降；FAD 之 510 nm 放射光波峰則反之。在反應進行 15 分鐘後 NADH 之 450 nm 波峰約下降 50%，而 FAD 之 510 nm 放射光波峰則回復至原來高度之 90%，至此停滯不動。從第 57 頁圖 15B 結果顯示突變蛋白質 E192Q 在 510nm 處的 FAD 放射光波峰仍然些微下降後即停滯不動，即 E192Q 無法將 DHL 電子傳遞至 FAD；另外 NADH 之 450 nm 放射光波峰幾乎沒有任何變化，進一步證實電子傳遞至 FAD 處即受阻斷，FAD 幾乎無法還原形成 FADH，所以 FAD 至 NAD<sup>+</sup>之間的電子傳遞不能順利進行，導致 NADH 無法生成。

#### (3) 經單受質 DHLA(dihydrolipoic acid)處理之螢光光譜分析

DHLA 為 DHL 的類似物，以其當作酵素的受質進行反應。由於 DHLA 與酵素間結合能力較差，可用來觀察突變蛋白質與受質間結合能力變化細微之處，更進一步瞭解 DHL 與 FAD 間電子傳遞情形；可當作單受質 DHL 反應之佐證。由第 56 頁圖 14 結果可知其實驗結果與以單受質 DHL 處理的情形相類似，E<sub>3</sub> 加入 DHLA 後 FAD 的放射光波峰迅速降至最低點；在 40 分鐘之後，FAD 放射光波峰回復至原來的 90%；突變蛋白質 E192Q 在 510nm 處的 FAD 放射光波峰仍然些微下降後即停滯不動，E192Q 之 FAD 亦無法被還原成 FADH。足見 DHL 與 FAD 間電子傳遞因為突變而受到嚴重阻斷。

#### (4) 經雙受質 DHLA 與 NAD<sup>+</sup>處理之螢光光譜分析

同理，當以 DHL 類似物 DHLA 當作酵素的受質同樣加入 NAD<sup>+</sup>處理，可進一步瞭解 DHL 與 FAD 及 NAD<sup>+</sup>間完整電子傳遞情形。由第 58 頁圖 16 結果顯示

與 DHL 和  $\text{NAD}^+$  處理之情形相彷彿， $\text{E}_3$  加入 DHLA 及  $\text{NAD}^+$  後 FAD 之 510 nm 放射光波峰迅速下降，同時 NADH 之 450 nm 放射光波峰上升，然後 NADH 之 450 nm 波峰隨著時間增加而下降；FAD 之 510 nm 放射光波峰則緩慢上升。在反應進行 20 分鐘後 NADH 之 450 nm 波峰約下降 50%，而 FAD 之 510 nm 放射光波峰則回復至原來高度之 90%，至此停滯不動；突變蛋白質 E192Q 在 510nm 處的 FAD 放射光波峰仍然些微下降後即停滯不動，而 NADH 之 450 nm 放射光波峰也幾乎沒有任何變化，再次證明 DHL 至 FAD 間電子傳遞被阻斷，所以 NADH 無法生成。

#### (5) 經還原劑 $\text{NaBH}_4$ 處理之螢光光譜分析

$\text{E}_3$  的完整電子傳遞途徑是由 DHL 經活性雙硫基傳至 FAD，使 FAD 還原成 FADH，再由 FADH 傳至  $\text{NAD}^+$ ，使得  $\text{NAD}^+$  還原成 NADH。由上述無論是單受質反應或是雙受質反應的螢光光譜分析之結果均顯示突變蛋白質 E192Q 在 DHL 至 FAD 間電子傳遞被阻斷，可能是 DHL 與活性雙硫基或是活性雙硫基與 FAD 電子傳遞發生問題，以至於酵素催化反應無法順利進行，幾乎無法觀察到 NADH 的產生。所以利用強還原劑  $\text{NaBH}_4$  還原 FAD，嘗試由中央推動反應，避開活性雙硫基，探討 FAD 與  $\text{NAD}^+$  之間的電子傳遞是否因突變而受到破壞。由第 59 頁圖 17 結果發現  $\text{E}_3$  加入  $\text{NaBH}_4$  後在 510nm 處的 FAD 放射光波峰迅速下降至原來波峰的 1/3 高度，然後波峰隨著時間增加而上升，在 45 分鐘時上升至約為原來高度之 2/3 後即停滯不動。而突變蛋白質 E192Q 在 510nm 處的 FAD 放射光波峰仍然些微下降後即停滯不動，顯示 FAD 依然無法被還原，電子由 FADH 傳至  $\text{NAD}^+$  這一方向的反應無法進行，亦即突變蛋白質 E192Q 之 FAD 可能喪失了氧化還原的能力。所以接著進行可見光/紫外光光譜分析，藉由單受質 DHL 處理與雙受質 DHL 與  $\text{NAD}^+$  處理之可見光/紫外光光譜，觀察  $\text{OD}_{530\text{ nm}}$  處活性雙硫基與 FAD 間電價轉移的情形，及 NADH 生成( $\text{OD}_{340\text{ nm}}$ )之情形，可與螢光光譜分析所獲得結果相互印證。

### (三) 可見光/紫外光光譜分析

#### (1) 經單受質 DHL 處理之可見光/紫外光光譜分析

酵素經單受質 DHL 處理後，可由酵素中 FAD 的吸光變化，在 490 到 560nm

(或 OD<sub>530 nm</sub>)處可觀察到活性雙硫基與 FAD 間電子轉移的情形。由第 60、61 頁圖 18、19 結果發現，E<sub>3</sub> 在加入 DHL 後，380nm 至 480nm 間 FAD 的紫藍光吸光區會發生會位移產生新的藍綠吸光(490 到 560nm)，亦即 OD<sub>530 nm</sub> 處吸光波峰會上升，隨著時間增加而下降的現象。所以經由 E<sub>3</sub> 的 OD<sub>530 nm</sub> 活性雙硫基與 FAD 間電價轉移階段截點圖可觀察到加入 DHL 後吸光波峰迅速上升，隨著時間增加而下降的現象，證明 E<sub>3</sub> 活化中心的活性雙硫基與 FAD 可在氧化還原態間自由轉換，其電子傳遞可順利進行。而突變蛋白質 E192Q 在 OD<sub>530 nm</sub> 處吸光波峰則隨著時間增加緩慢上升，與 E<sub>3</sub> 相較非常緩慢，顯示由 DHL 經活性雙硫基傳遞電子到 FAD 的路徑被阻斷，與單受質 DHL 螢光光譜分析獲得之結果相吻合。

#### (2) 經雙受質 DHL 與 NAD<sup>+</sup>處理之可見光/紫外光光譜分析

在加入 NAD<sup>+</sup>處理之後，觀察活性雙硫基與 FAD 間電子轉移及 NADH 生成(OD<sub>340 nm</sub>)之情形。由第 62、63 頁圖 20、21 結果顯示，E<sub>3</sub> 在加入 DHL 及 NAD<sup>+</sup>後，380nm 至 480nm 間 FAD 的紫藍光吸光區會發生會位移產生新的藍綠吸光(490 到 560nm)，亦即 OD<sub>530 nm</sub> 處吸光波峰會迅速上升，並隨著時間增加而下降；另外在 OD<sub>340 nm</sub> 處也發現與 OD<sub>530 nm</sub> 處吸光波峰類似情形，表示 E<sub>3</sub> 的電子傳遞可順利進行。而突變蛋白質 E192Q 在 OD<sub>530 nm</sub> 處吸光波峰依然上升非常緩慢，與其經單受質 DHL 處理之可見光/紫外光光譜分析類似。另外，在 OD<sub>340 nm</sub> 處吸光波峰也呈現緩慢上升的現象，與 E<sub>3</sub> 相較，NADH 生成相當稀少，與雙受質 DHL 與 NAD<sup>+</sup>螢光光譜分析獲得之結果相當。由螢光光譜分析及可見光/紫外光光譜分析結果均顯示突變蛋白質 E192Q 其 DHL 經活性雙硫基傳遞電子到 FAD 的路徑被阻斷

，因此接下來利用氧化還原中點電位分析，經由偵測活性雙硫基的還原電位中點及 FAD 之還原電位中點，對活性雙硫基及 FAD 的氧化還原能力進行探討，進一步驗證突變蛋白質 E192Q 其電子傳遞路徑的阻斷是活性雙硫基抑或是 FAD 發生問題所導致。

#### (四)氧化還原中點電位測定

在氧化還原中點電位分析中，可經由偵測 OD<sub>290 nm</sub> 之吸光變化獲得活性雙硫基(active disulfide)及 FAD 的總還原量，經由偵測 OD<sub>454 nm</sub> 獲得 FAD 之還原量，

以總還原量扣除 FAD 之還原量即可得到活性雙硫基之還原量，進一步換算後可獲得 FAD 之還原電位中點與活性雙硫基之還原中點。由第 64 頁表八結果顯示：

突變蛋白質 E192Q 之 disulfide 還原中點電位 (-262 mV) 與正常 E<sub>3</sub> (-264 mV) 比較相去不遠，但其 FAD 之還原中點電位 (-287 mV) 與正常 E<sub>3</sub> (-314 mV) 比較則有明顯增加的現象，不利於還原反應之進行，亦即 FAD 可能較不容易被還原。顯示突變蛋白質 E192Q 的 DHL 與活性雙硫基間之電子傳遞並未被阻斷，其電子傳遞路徑的受阻可能是因為 FAD 無法被順利還原所導致；突變蛋白質 E192Q 代謝迴轉率大幅降低及反應機制的改變也可能是電子傳遞路徑的受阻導致。

## 第四章 討 論

經由 *Azotobacter vinelandii*(Mattevi et al., 1991) 菌株 E<sub>3</sub> 的 X-射線結晶構造分析發現，FAD 附近的胺基酸殘基 lysine 和 glutamate 形成一個離子對；另外對 *Escherichia coli* 的 E<sub>3</sub> 構造進行同源比對後(Stephens et al., 1983)也發現其離子對是位於 K53 和 E188 間。而人類的 E<sub>3</sub> 經過同源比對後則發現離子對是位於 E192 與 K54 間(Jentoft et al., 1992)。由去年本實驗室所進行有關 K54E 的突變蛋白研究中發現，在電子傳遞反應進行時，E<sub>3</sub> 第 54 個胺基酸(K54)對於雙硫基與 FAD 中間介質的形成具有關鍵性的影響。當 lysine 突變成 glutamate 後，可能使 K54E 突變蛋白無法形成雙硫基與 FAD 之中間介質而喪失大部份的活性(約只為正常 E<sub>3</sub> 的 1%)。所以實驗結果中 E192Q 突變蛋白活性大幅下降(約為 E<sub>3</sub> 的 5%)可能與 E192 與 K54 間無法形成離子對進而無法穩定 FAD 之結構有關。

依據酵素動力學研究顯示 E<sub>3</sub> 之雙受質反應遵循“乒乓”機制(ping pong mechanism)，然而 E192Q 突變蛋白的正反應反應機制卻發生大幅度的變化，轉變成序列機制(sequential mechanism)。推測可能是因為 E192Q 突變蛋白構造改變，致使正反應中 KmDHL(和 KmNAD 相較)大幅變小；換言之即 DHL 和 E192Q 突變蛋白之間親和力變大，導致反應中第一個產物(lipoamide)未形成之前，已與第二個受質 NAD 結合。因為 lipoamide 的延遲產生，造成電子傳遞速度變慢，進而使代謝週轉率(Kcat)降低，甚至導致反應機制的改變。

在螢光光譜分析中可觀察到 E192Q 突變蛋白在電子由 DHL 傳至 FAD，而 FAD 接受電子還原成 FADH，再將電子對傳至 NAD 產生 NADH 的傳遞過程幾乎被完全阻斷。與 wild-type E<sub>3</sub> 的螢光光譜比較後發現，wild-type E<sub>3</sub> 在單受質反應(DHL 及其類似物 DHLA)中，FAD 可被 DHL 還原成 FADH，接著電子可能從 FADH 下傳給酵素的某一部分(可能是 FADH 與 NAD 間的中間介質)，而從還原態(FADH)回復至氧化態(FAD)。但 E192Q 突變蛋白在此反應中幾乎無法觀



察到 FADH 的形成，以及氧化態 FAD 與還原態 FADH 往復傳動的情形。進一步從 E192Q 突變蛋白之雙受質反應(DHL 加  $\text{NAD}^+$  ; DHLA 加  $\text{NAD}^+$ )中發現即使在  $\text{NAD}^+$  存在狀況下也無 NADH 的產生。由以上結果推測可能是 E192Q 突變蛋白在活性雙硫基與 FAD 間或著是 FADH 與  $\text{NAD}^+$  之間電子傳遞被阻斷，導致電子無法繼續下傳。所以接著在強還原劑  $\text{NaBH}_4$  反應中，嘗試避開活性雙硫基，直接將 FAD 還原以推動反應，結果顯示 FAD 仍然無法被還原。因此推論 E192 可能與 FAD 還原成 FADH 的能力有關。

紫外光/可見光光譜分析結果顯示，無論是單受質 DHL 的反應或是 DHL 和  $\text{NAD}^+$  的雙受質反應，均可發現在 530nm 的雙硫基和 FAD 間的電價轉移階段中 E192Q 突變蛋白的電子傳遞非常緩慢，幾乎無法觀察到電子轉移的情形；也就是表示氧化態  $\text{E}_3$  無法順利進入還原態  $\text{E}_3$  而致使電子傳遞過程受到阻礙。可能是因為電子由 DHL 傳至 active disulfide 的過程發生障礙，抑或是 FAD 接受電子的能力發生變化所導致。

由氧化還原電位中點測試的結果可判別在螢光光譜及紫外光/可見光光譜中所觀察到之現象。E192Q 突變蛋白的 disulfide 還原電位中點(-262mv)和 wild-type  $\text{E}_3$  相近(-264mv)，但 E192Q 突變蛋白的 FAD 還原電位中點(-287mv)和 wild-type  $\text{E}_3$  相較(-314mv)則有增加的現象。根據 Macda-Yorita 等人發表之研究結果顯示 *E. coli* 的  $\text{E}_3$  其 K53(與人類 K54 同源)突變成 R 之後會增加 FAD 的還原電位中點，且不利於 FAD 還原成 FADH 之反應進行(Macda-Yorita et al., 1994)。由以上結果進一步證實 E192Q 突變蛋白的電子傳遞可能是因為 FAD 無法被順利還原成 FADH 而被阻斷。

另外從 K54E 突變蛋白的氧化還原電位中點測試的結果發現，其 disulfide 還原電位中點(-256mv)和  $\text{E}_3$ (-263mv)相近，而其 FAD 還原電位中點(-287mv)則發生上升之情形，與 E192Q 突變蛋白的氧化還原電位中點測試的結果相類似，而 K54E 突變蛋白和 E192Q 突變蛋白在螢光光譜上所觀察到之現象也相彷彿。

將上述結果與結晶學構造上 E192 和 K54 之間可形成離子對的觀點相印證，E192 和 K54 二者任一方發生突變，都會使離子對無法形成進而使 FAD 的三度空間構造改變，導致酵素的電子傳遞無法順利進行，造成電子傳遞速度變慢，進而使代謝週轉率(Kcat)降低，甚至導致反應機制的改變。由此可知 E192 的確是 E<sub>3</sub> 活化中心重要的成員之一，對於電子傳遞具有關鍵性影響。

# 第五章 圖 表

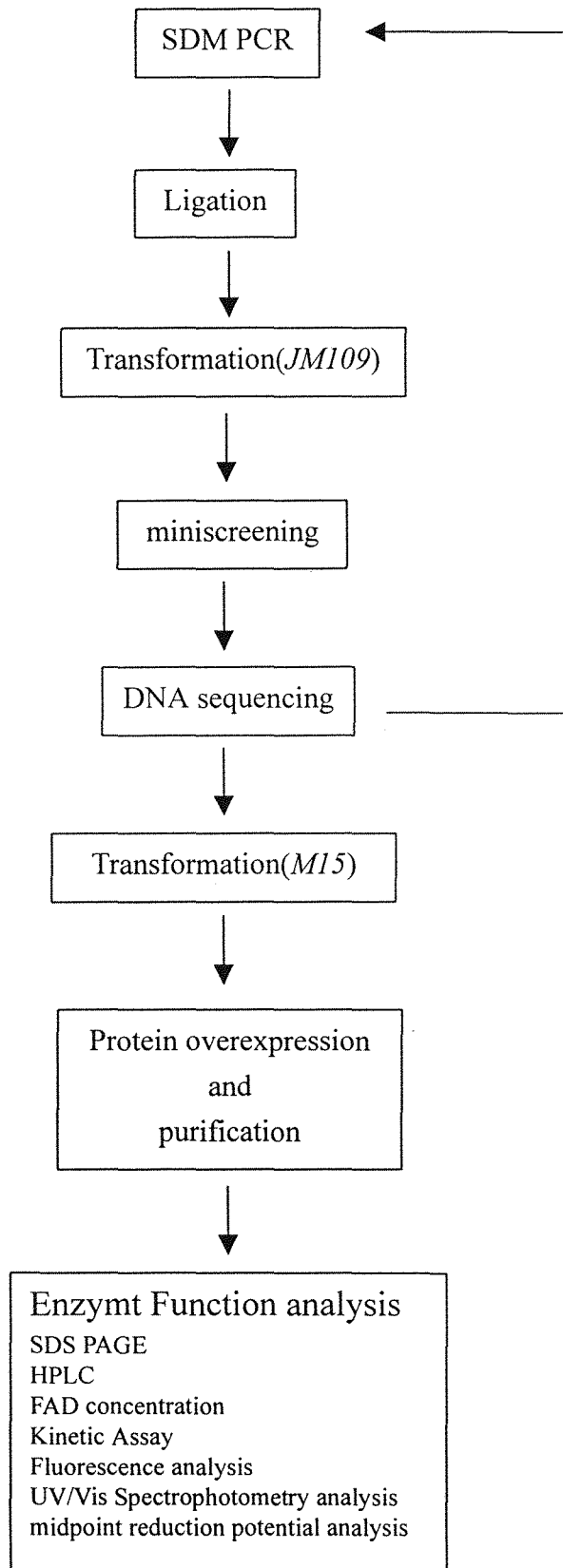


圖 1：實驗設計流程圖。

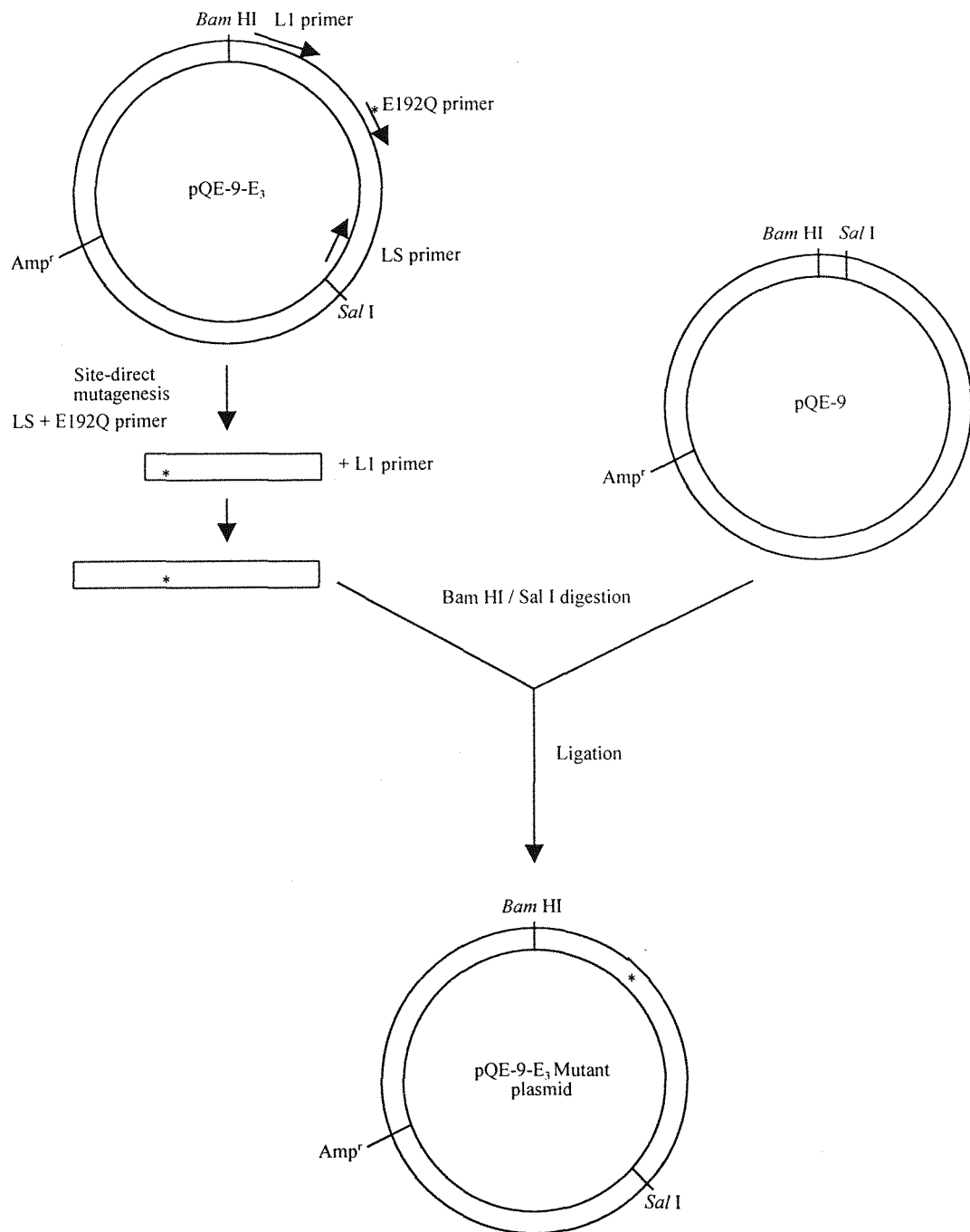


圖 2：pQE-9-E<sub>3</sub> 突變表達質體構建圖。以 pQE-9-E<sub>3</sub> 為模板，引子分別為一段內含 E192Q 之定點突變引子(sense site-directed mutated primer: 5'-GTA ATA GGT GTA CAA TTG GGT TCA GTT-3')及 LS primer(5'-GCG CGC GTC GAC TCA AAA GTT GAT TGA TTT GCC-3'；內含 *Sal* I restriction site 及 E<sub>3</sub> Stop code) L1 primer(5'-GCG CGC GGA TCC GCA GAT CAG CCG ATT-3'；內含 *Bam* HI restriction site 及 E<sub>3</sub> Start code)

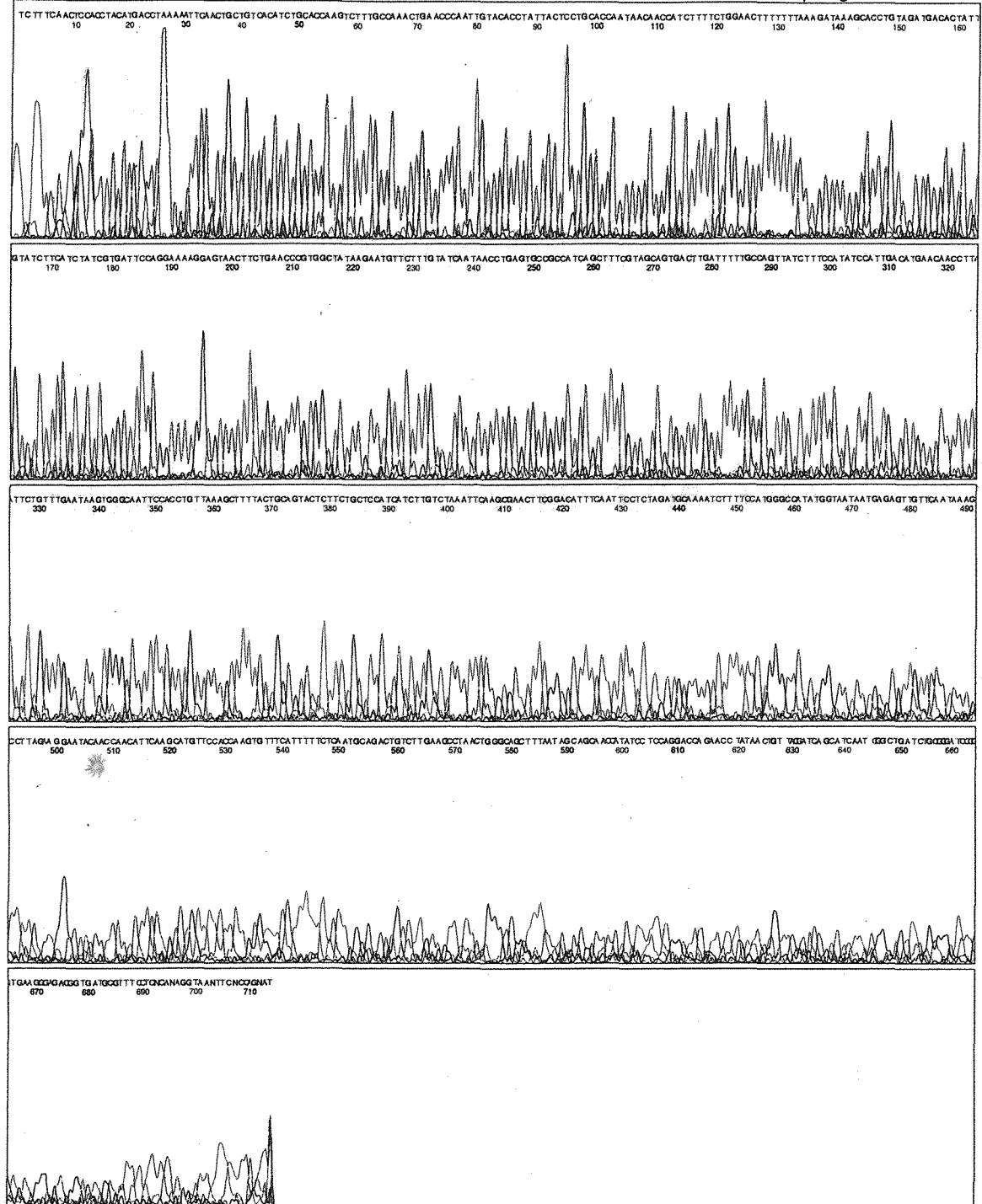


圖 3 : E192Q 定序圖 I。此圖為 E192Q 第 1(圖上第 656 位置)至 217(圖上第 10 位置)個胺基酸 DNA 序列，圖中箭頭所指位置為突變點，E192 由 GAA 變成 CAA(Q)(圖上第 81 位置)。DNA primer 為 E3815，使用 PERKIN-ELMER 公司生產之 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit。

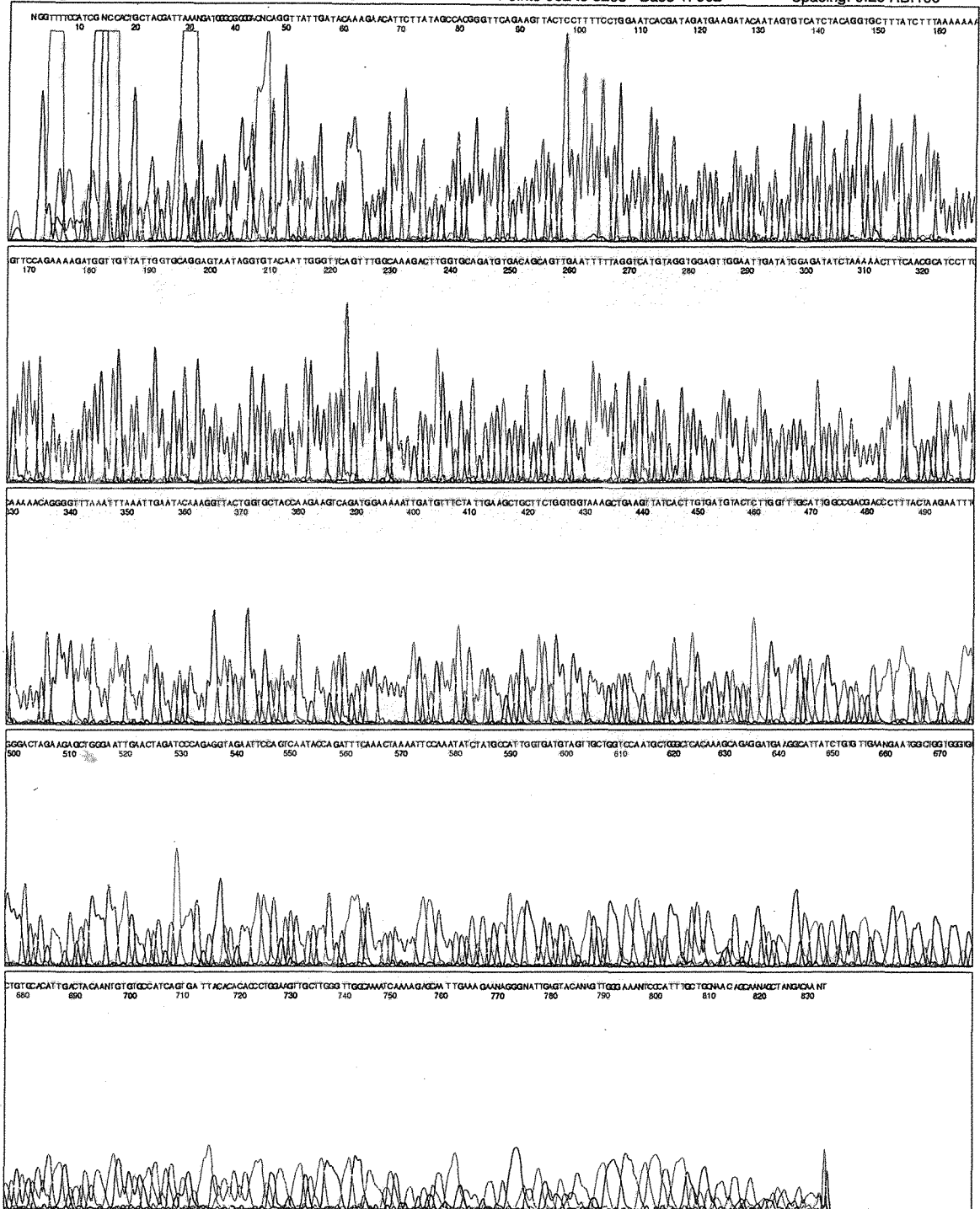


圖 4：E192Q 定序圖 II。E192Q 第 37(圖上第 47 位置)至 325(圖上第 611 位置)個氨基酸 DNA 定序圖。圖中箭頭所指位置為突變點，E192 由 GAA 變成 CAA(Q)(圖上第 212 位置)primer 為 Y118X，使用 PERKIN-ELMER 公司生產之 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit。



表一：Wild-type E<sub>3</sub> 與 E192Q 之蛋白質純化分析表

Fraction	Wild-type E <sub>3</sub>			E192Q		
	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery of activity (%)	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery of activity (%)
supernatant	110	51	100	95	3	100
Ni-NTA column	19	250	84.67	7	30	73.68
DE52 column	9	420	79.58	3	50	71.43

\* 個別蛋白質同樣以 LB medium 200 mL 於 37°C 恆溫培養 16 小時後進行純化；  
而表中 DE52 column 之 Recovery of activity 係以 Ni-NTA column 之 Recovery of activity 當成 100% 計算



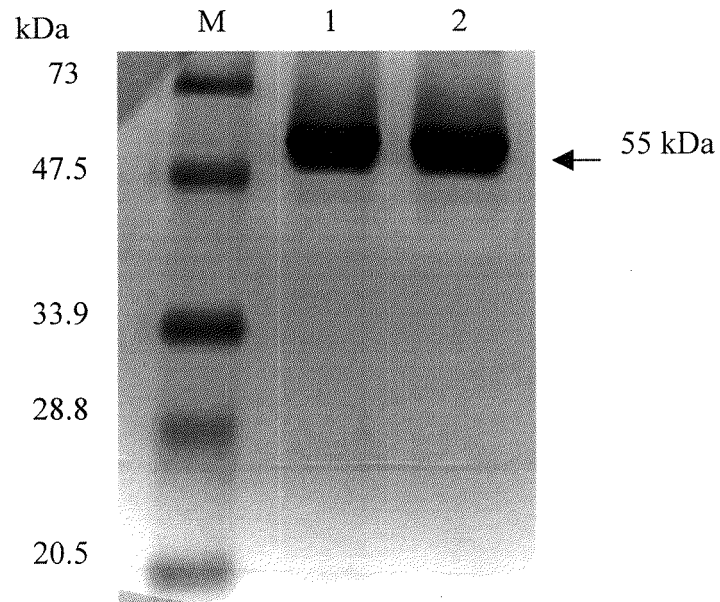


圖 6: E<sub>3</sub> 及 E192Q 純化蛋白質之 SDS-PAGE。Lane M 為 protein marker(Bio-Rad)；Lane 1 為純化透析後之 Wild-type E<sub>3</sub>；Lane 2 為純化透析後之突變蛋白質 E192Q。各個蛋白質取 10  $\mu$ g loading 在 12.5 % SDS-PAGE，以電壓 120 伏特電泳一個小時後，以 coomassie blue 染色。箭頭標示處為標的蛋白質，分子量為 55 kDa。

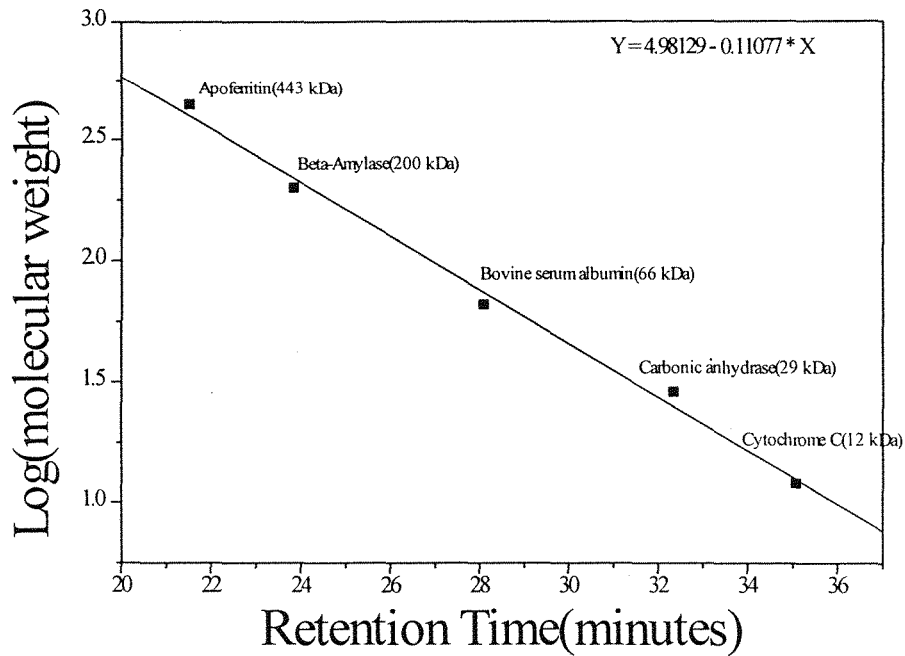


圖 7：HPLC 分析之標準分子量計算曲線。縱軸為分子量之對數值，橫軸為滯留時間，圖中直線是經最小平方法計算得之，直線方程式為  $Y=4.98129 - 0.11077 \times X$ 。管柱是 Superdex™ 200 HR 10/30 (Pharmacia)，液體動相為 50 mM  $\text{NaPO}_4$  (pH=7.4)、200 mM NaCl，偵測波長為 UV 280 nm，流速為每分鐘 0.5 ml。

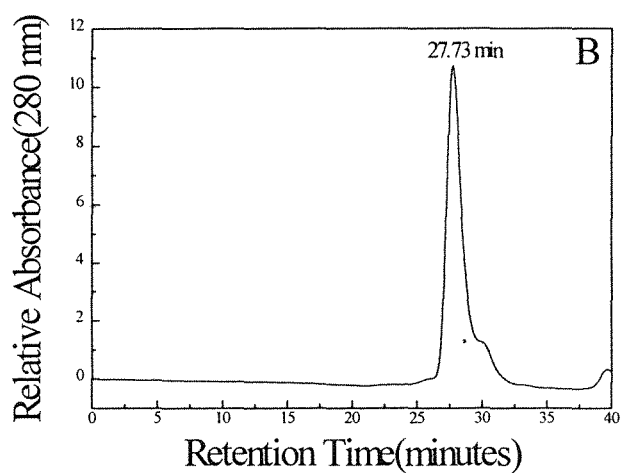
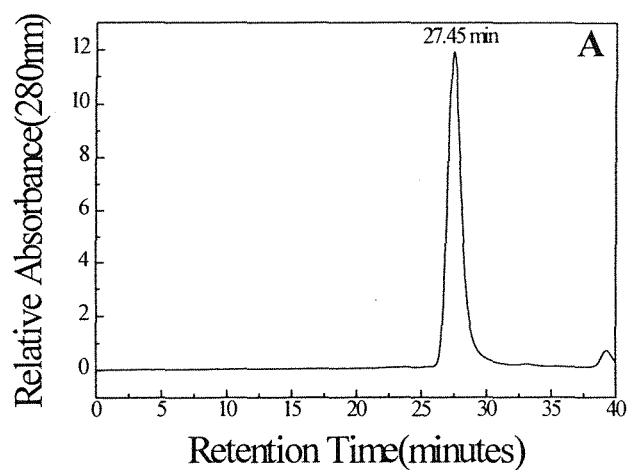


圖 8：E<sub>3</sub> 及 E192Q 蛋白質分子量之 HPLC 分析圖。圖 A：Wild-type E<sub>3</sub>；圖 B：E192Q。各取 100 μg 蛋白質打入 HPLC 分析，對照標準分子量計算曲線計算後分子量皆為 100 kDa，因為 E<sub>3</sub> 單體分子量為 50 kDa，所以得知突變後之蛋白質仍然以同質雙體(homodimer)之形式存在

表二：突變蛋白質之 FAD 含量分析表。

---

	Wild-type E <sub>3</sub>	E192Q
200 $\mu$ g/mL	0.0315	0.0295
300 $\mu$ g/mL	0.0495	0.0474
500 $\mu$ g/mL	0.0807	0.0771
Average FAD ratio	100%	95%

---

表三：E<sub>3</sub>之酵素動力正反應分析表

E<sub>3</sub> forward Reaction

Protein concentration : 100 ng/ml

Assay Volume : 1 ml

pH = 7.4

---

Variable	Value	Std. Err.
Vmax	0.3210	0.0165
Ka (DHL)	0.6580	0.0819
Kb (NAD <sup>+</sup> )	0.2627	0.0366
Kap	0.0626	0.0814

---

Specific Activity = 516 U/mg

Kcat = 860 1/sec

※ 表中數據由 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit(Version 3.0)軟體進行雙受質酵素分析。Specific Activity 是由 Vmax 計算後得之，Kcat 是由 Vmax 與蛋白質分子量計算後得之。

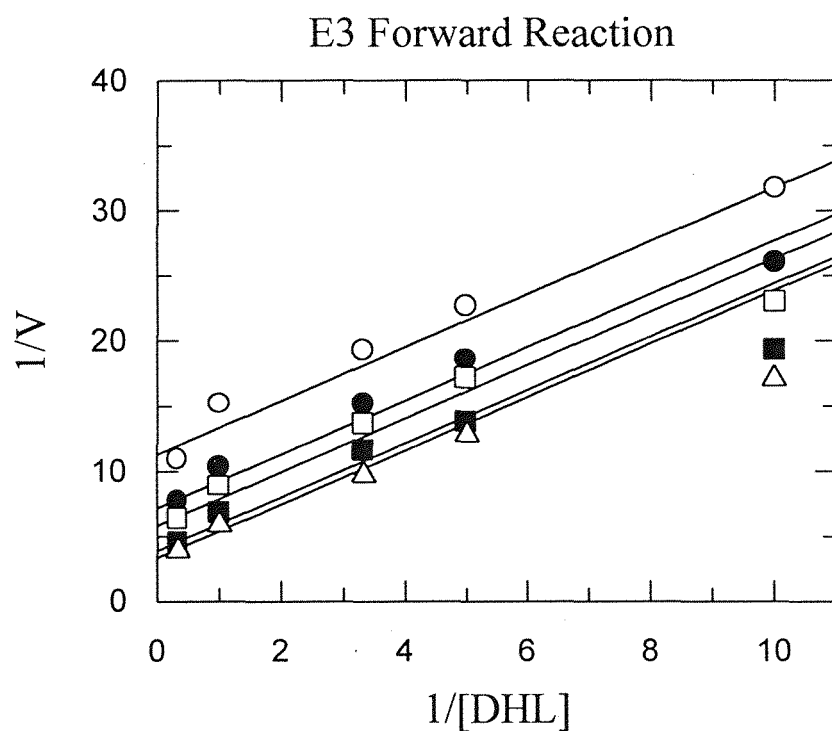


圖 9: E<sub>3</sub> 之酵素動力正反應分析圖。○代表 1/V 0.1 mM NAD<sup>+</sup>; ●代表 1/V 0.2 mM NAD<sup>+</sup>; □代表 1/V 0.3 mM NAD<sup>+</sup>; ■代表 1/V 1 mM NAD<sup>+</sup>; △代表 1/V 3 mM NAD<sup>+</sup>; 與 1/[DHL](DHL 濃度分別為 0.1mM、0.2 mM、0.3 mM、1 mM、3mM) 作圖, 共 25 組反應, 結果經 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit(Version 3.0) 軟體進行雙受質酵素分析為 ping-pong mechanism。

表四：E192Q 之酵素動力正反應分析表

E192Q forward Reaction

Protein concentration : 500 ng/ml

Assay Volume : 1 ml

pH = 7.4

---

Variable	Value	Std. Err.
Vmax	0.0853	0.0085
Ka (DHL)	0.0908	0.0369
Kb (NAD <sup>+</sup> )	0.2066	0.0526
Kap	0.1498	0.0685

---

Specific Activity = 27 U/mg

Kcat = 45 1/sec

※ 表中數據由 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit(Version 3.0)軟體進行雙受質酵素分析。Specific Activity 是由 Vmax 計算後得之，Kcat 是由 Vmax 與蛋白質分子量計算後得之。

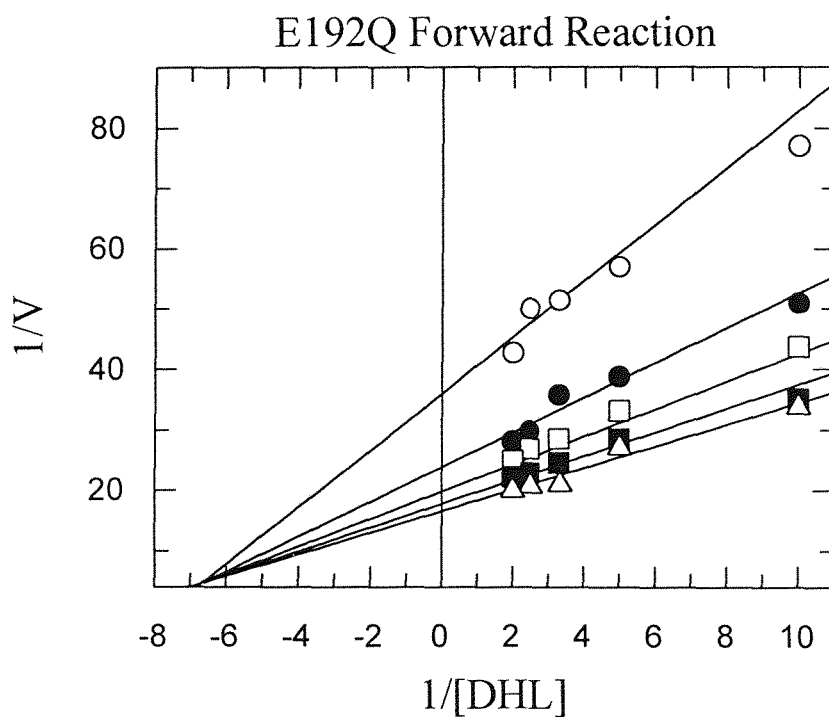


圖 10：E192Q 之酵素動力正反應分析圖。○代表  $1/V$  0.1 mM  $NAD^+$ ；●代表  $1/V$  0.2 mM  $NAD^+$ ；□代表  $1/V$  0.3 mM  $NAD^+$ ；■代表  $1/V$  0.4 mM  $NAD^+$ ；△代表  $1/V$  0.5 mM  $NAD^+$ ；與  $1/[DHL]$  (DHL 濃度分別為 0.1mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM) 作圖，共 25 組反應，結果經 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit (Version 3.0) 軟體進行雙受質酵素分析為 sequential mechanism。



表五：E<sub>3</sub>之酵素動力逆反應分析表。

E<sub>3</sub> Reverse Reaction

Protein concentration : 100 ng/ml

Assay Volume : 1 ml

pH = 6.8

---

Variable	Value	Std. Err.
Vmax	0.1937	0.0274
Ka (NADH)	0.0428	0.0108
Kb (LA)	0.5591	0.1357
Kap	0.0045	0.0498

---

Specific Activity = 311 U/mg

Kcat = 519 1/sec

※ 表中數據由 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit(Version 3.0)軟體進行雙受質酵素分析。Specific Activity 是由 Vmax 計算後得之，Kcat 是由 Vmax 與蛋白質分子量計算後得之。

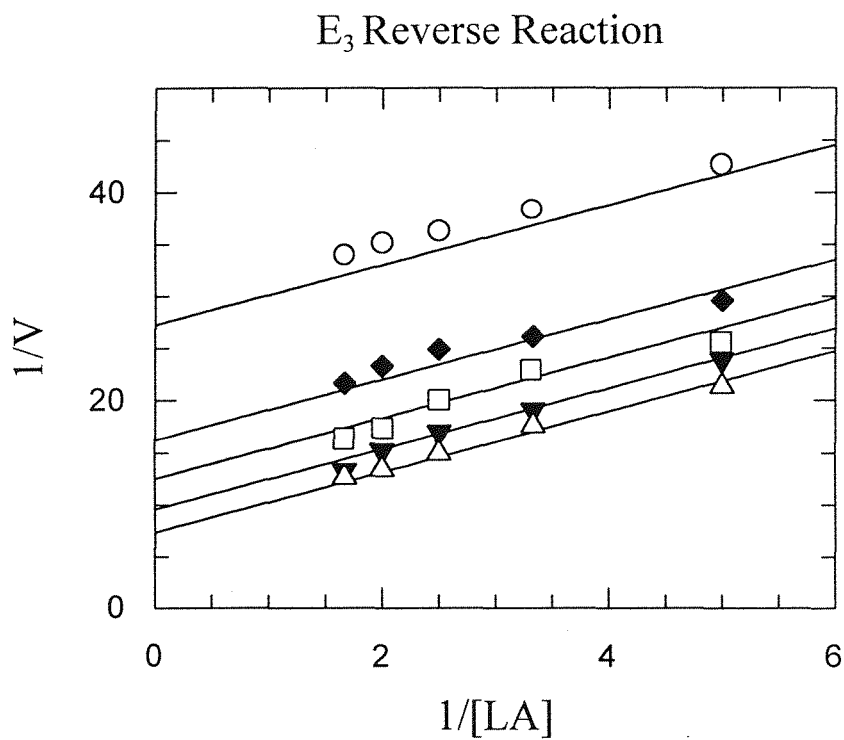


圖 11: E<sub>3</sub> 之酵素動力逆反應分析圖。○代表 1/V 0.01 mM NADH; ●代表 1/V 0.02 mM NADH; □代表 1/V 0.03 mM NADH; ■代表 1/V 0.05 mM NADH; △代表 1/V 0.1 mM NADH; 與 1/LA (LA 濃度分別為 0.2mM、0.3 mM、0.4 mM、0.5 mM、0.6mM) 作圖, 共 25 組反應, 結果經 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit (Version 3.0) 軟體進行雙受質酵素分析為 ping-pong mechanism。

表六：E192Q 之酵素動力逆反應分析表。

E192Q Reverse Reaction

Protein concentration : 300ng/ml

Assay Volume : 1 ml

pH = 6.8

---

Variable	Value	Std. Err.
Vmax	0.0720	0.0075
Ka (NADH)	0.0122	0.0033
Kb (LA)	0.0775	0.0225
Kap	0.0347	0.0296

---

Specific Activity = 39 U/mg

Kcat = 65 1/sec

※ 表中數據由 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit(Version 3.0)軟體進行雙受質酵素分析。Specific Activity 是由 Vmax 計算後得之，Kcat 是由 Vmax 與蛋白質分子量計算後得之。

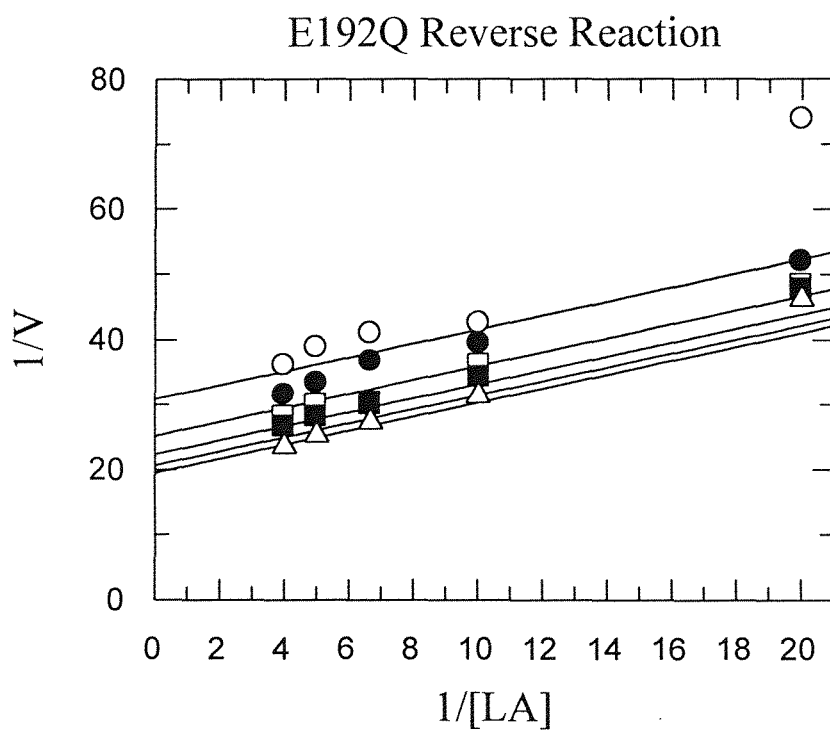


圖 12：E192Q 之酵素動力逆反應分析圖。○代表  $1/V$  0.01 mM NADH；●代表  $1/V$  0.015 mM NADH；□代表  $1/V$  0.02 mM NADH；■代表  $1/V$  0.025 mM NADH；△代表  $1/V$  0.03 mM NADH；與  $1/[LA]$  (LA 濃度分別為 0.05mM、0.1 mM、0.15 mM、0.2 mM、0.25 mM) 作圖，共 25 組反應，結果經 Erithacus Software 公司所設計的 GraFit (Version 3.0) 軟體進行雙受質酵素分析為 ping-pong mechanism。

表七：E<sub>3</sub> 與 E192Q 之酵素動力分析比較表

	Wild-type E <sub>3</sub>	E192Q
Dimerization	+	+
FAD concentration	100 %	95 %
Forward Reaction		
Mechanism	Ping-Pong	Sequential
K <sub>cat</sub>	860 s <sup>-1</sup> (100%)	45 s <sup>-1</sup> (5%)
K <sub>m</sub> (DHL)	0.6580 mM	0.0908 mM
K <sub>m</sub> (NAD <sup>+</sup> )	0.2627 mM	0.2066 mM
Reverse Reaction		
Mechanism	Ping-Pong	Ping-Pong
K <sub>cat</sub>	519 s <sup>-1</sup> (100%)	65 s <sup>-1</sup> (13%)
K <sub>m</sub> (LA)	0.5591 mM	0.0775 mM
K <sub>m</sub> (NADH)	0.0428 mM	0.0122 mM

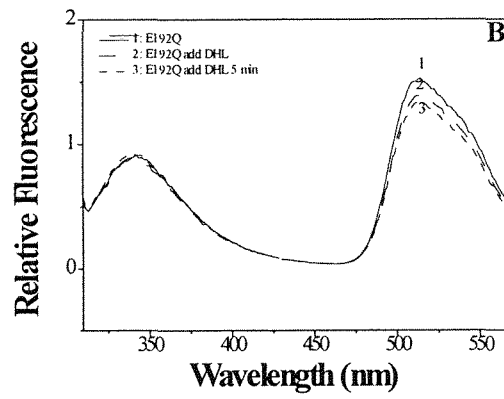
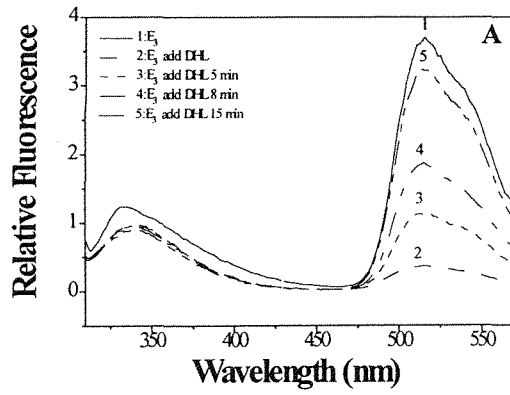


圖 13：酵素在 DHL 單受質反應之螢光光譜圖。每一個反應所使用酵素終濃度為  $100 \mu\text{g/ml}$ ，反應總體積  $1 \text{ ml}$   $\text{pH}=7.4$ ，DHL 終濃度為  $25 \mu\text{M}$ 。圖 A：Wild-type  $E_3$ ；圖 B：E192Q

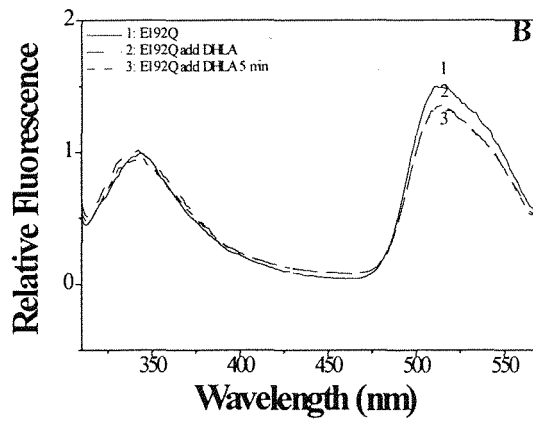
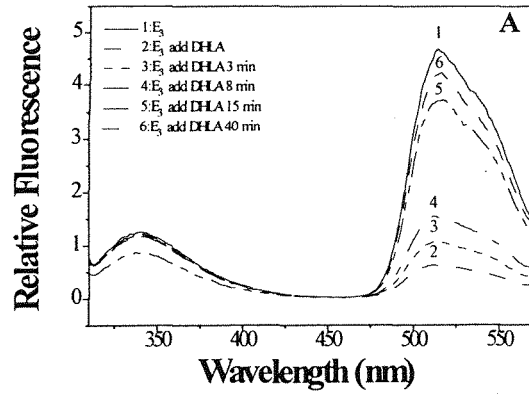


圖 14：酵素在 DHLA 單受質反應之螢光光譜圖。每一個反應所使用酵素終濃度為  $100 \mu\text{g/ml}$ ，反應總體積  $1 \text{ ml}$   $\text{pH}=7.4$ ，DHLA 終濃度為  $25 \mu\text{M}$ 。圖 A：Wild-type  $E_3$ ；圖 B：E192Q

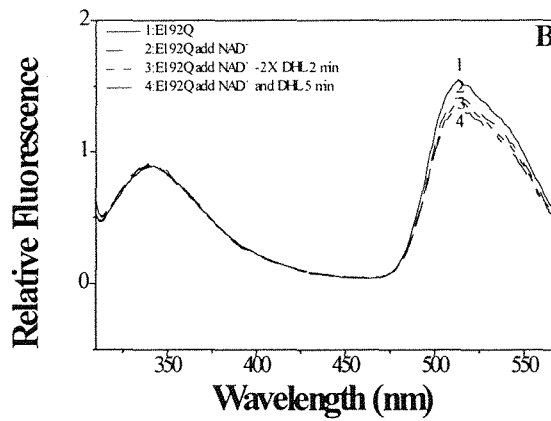
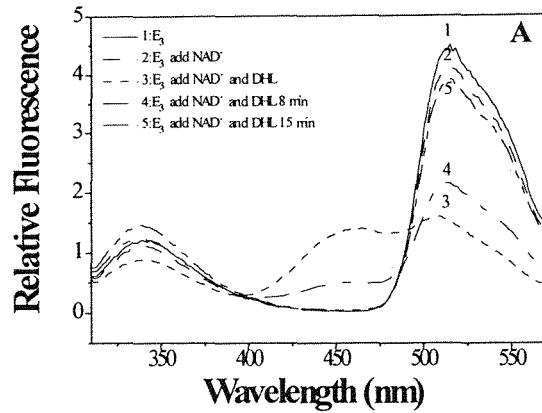


圖 15：酵素在 DHL 與  $\text{NAD}^+$  雙受質反應之螢光光譜圖。每一個反應所使用酵素終濃度  $100 \mu\text{g/ml}$ ，反應總體積  $1 \text{ ml}$   $\text{pH}=7.4$ ，DHL 終濃度為  $50 \mu\text{M}$ ， $\text{NAD}^+$  終濃度為  $50 \mu\text{M}$ 。圖 A：Wild-type  $\text{E}_3$ ；圖 B：E192Q。



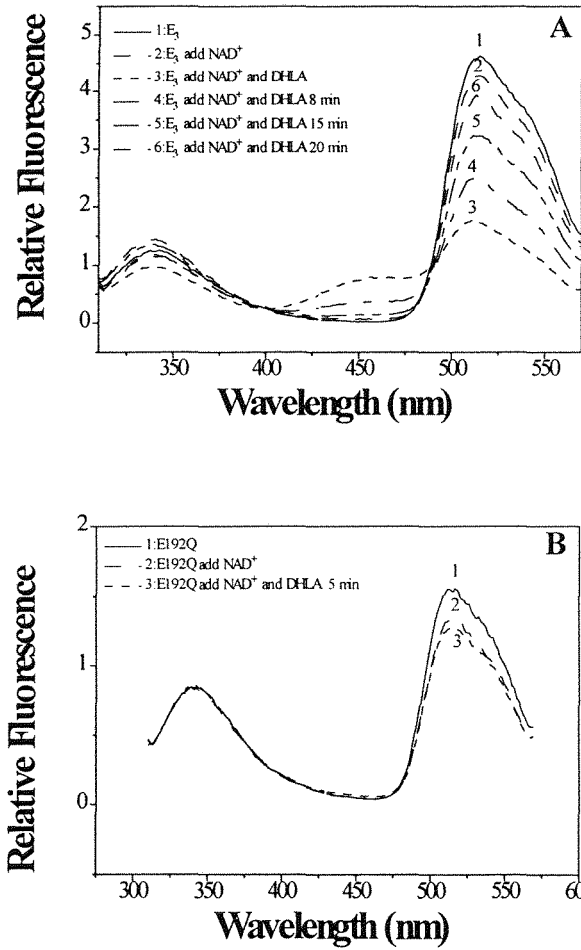


圖 16：酵素在 DHLA 與 NAD<sup>+</sup> 雙受質反應之螢光光譜圖。每一個反應所使用酵素終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$ ，反應總體積 1 ml pH=7.4，DHLA 終濃度為 50  $\mu\text{M}$ ，NAD<sup>+</sup> 終濃度為 50  $\mu\text{M}$ 。圖 A：Wild-type E<sub>3</sub>；圖 B：E192Q。

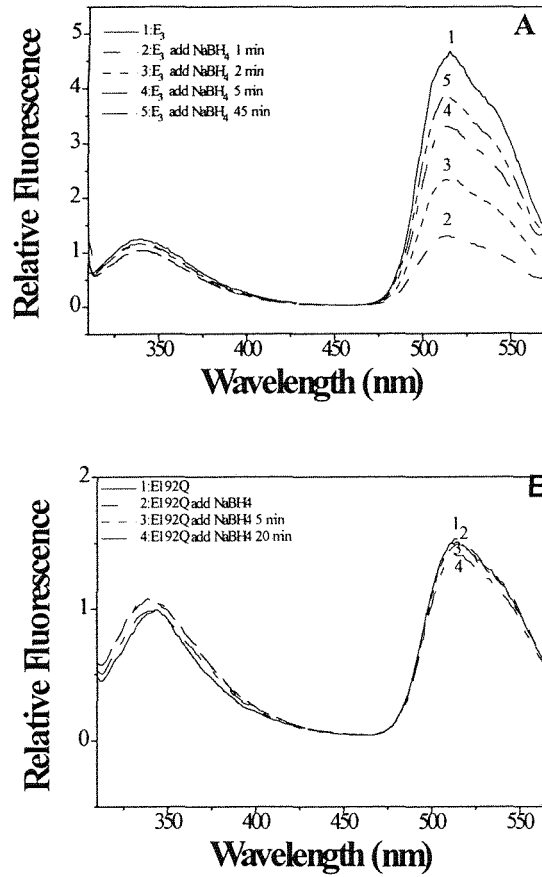


圖 17：酵素在強還原劑 NaBH<sub>4</sub> 處理後之螢光光譜圖。每一個反應所使用酵素終濃度為 100 μg/ml，反應總體積 1 ml pH=7.4，NaBH<sub>4</sub> 終濃度為 1 mM。圖 A：Wild-type E<sub>3</sub>；圖 B：E192Q。

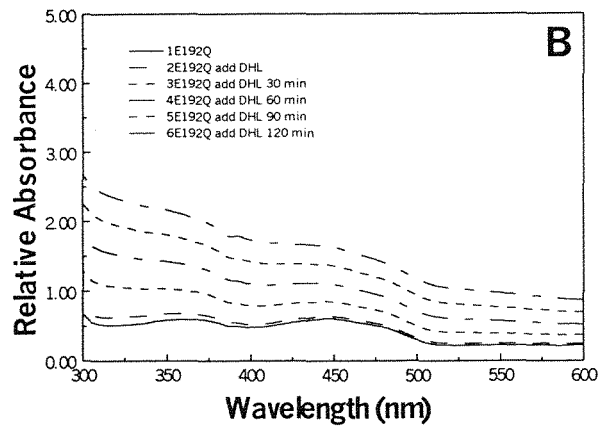
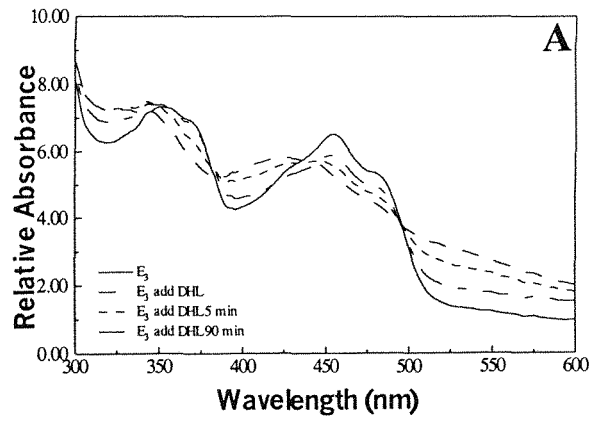


圖 18：酵素在 DHL 單受質反應之可見光/紫外光光譜圖。每一反應使用酵素終濃度  $200 \mu\text{g/ml}$ ，反應總體積  $0.5 \text{ ml}$   $\text{pH}=7.4$ ，DHL 終濃度為  $50 \mu\text{M}$ 。圖 A：Wild-type  $E_3$ ；圖 B：E192Q

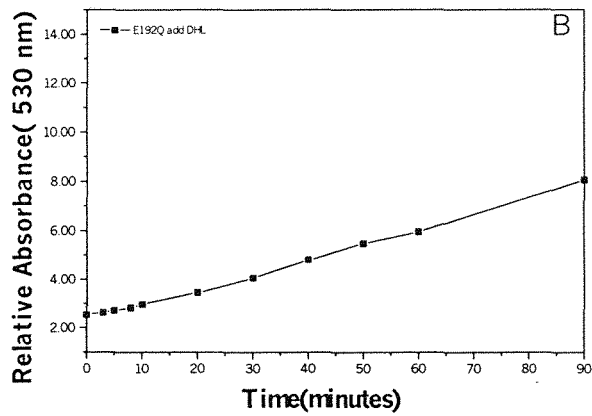
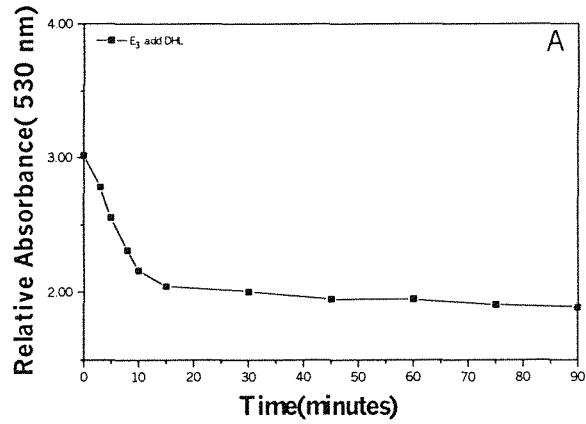


圖 19：酵素在 DHL 單受質反應之可見光/紫外光光譜 530 nm 截點比較圖。將圖 18 中波長 530 nm 處截點對時間作圖，分析 wild-type E<sub>3</sub> 與 E192Q 其 Active Disulfide 與 FAD 間電子轉移的情形。圖 A：wild-type E<sub>3</sub>；圖 B：E192Q。

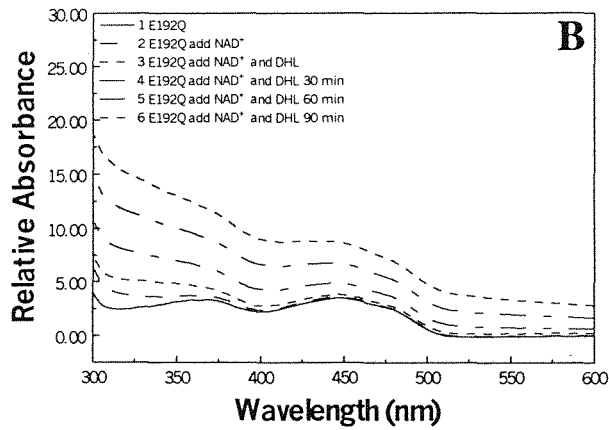
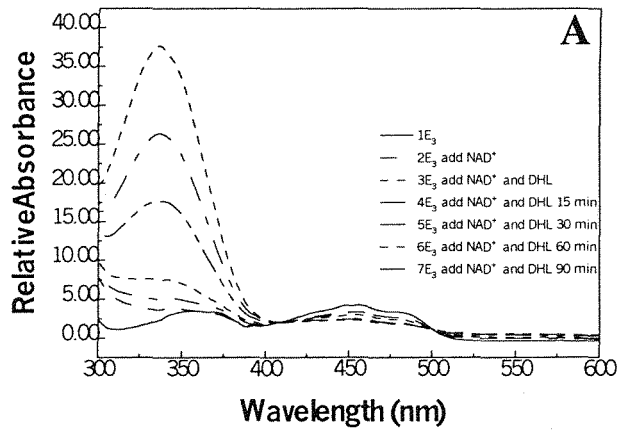


圖 20：酵素在 DHL 與  $\text{NAD}^+$  雙受質反應之可見光/紫外光光譜分析。每一個反應所使用酵素終濃度  $200 \mu\text{g/ml}$ ，反應總體積  $0.5 \text{ ml}$   $\text{pH}=7.4$ ，DHL 終濃度為  $100 \mu\text{M}$ ， $\text{NAD}^+$  終濃度為  $100 \mu\text{M}$ 。圖 A：Wild-type  $\text{E}_3$ ；圖 B：E192Q

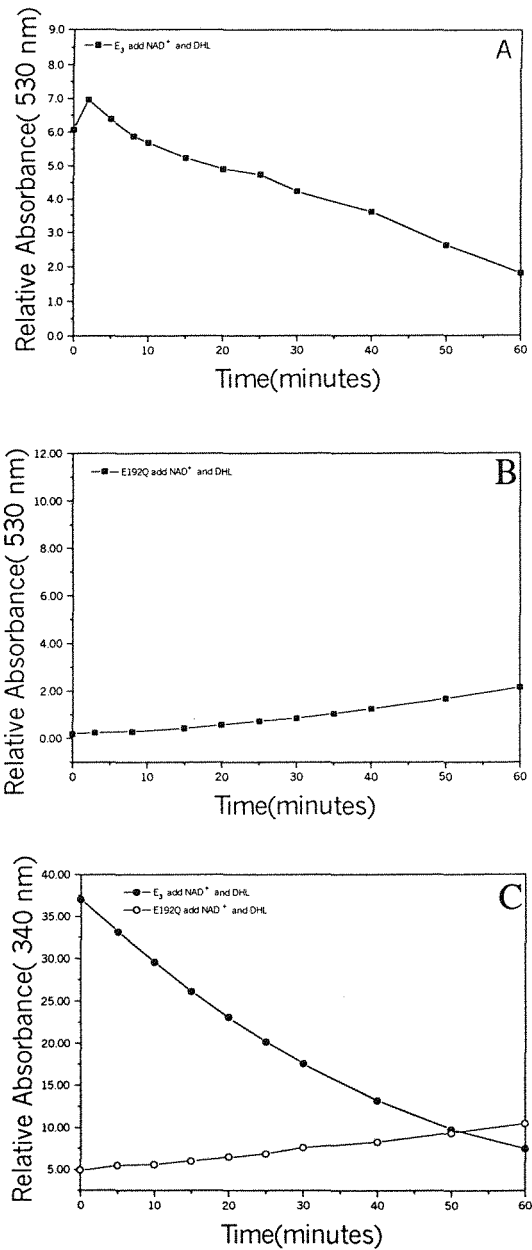


圖 21: 酵素在 DHL 與 NAD<sup>+</sup> 雙受質反應之可見光/紫外光光譜途中 530 nm 及 340 nm 截點比較圖。圖 A: 將圖 20(A) 中波長 530nm 處截點對時間作圖; 圖 B: 將圖 20(B) 中波長 530 nm 處截點對時間作圖, 比較 wild-type E<sub>3</sub> 與 E192Q 之 Active Disulfide 與 FAD 間電子傳遞的情形。圖 C: 將圖 20(A) 及 (B) 中波長 340nm 處截點對時間作圖, 比較 wild-type E<sub>3</sub> 與 E192Q 其 NADH 變化情形。

表八：E<sub>3</sub>、E192Q 及 K54E 之 50% 還原電位中點比較表

	FAD	Disulfide
Wild-type E <sub>3</sub>	-314mV	-264mV
E192Q	-287mV	-262mV
K54E	-262mV	-256mV

## 第六章 參考文獻

1. Blass, J. P., Kark, P. and Menon, N. K. (1976). Low activities of the pyruvate and oxoglutarate dehydrogenase complexes in five patients with friedreich's ataxia. *New England J. Med.* 295: 62-67.
2. Bourguignon, J., Macherel, D., Neuberger, M. and Douce, R. (1992). Isolation, characterization, and sequence analysis of a cDNA clone encoding L-protein, the dihydrolipoamide dehydrogenase component of the glycine cleavage system from pes-leaf mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 204: 865-873.
3. Branden, C-I. (1980). Relation between structure and function of  $\alpha / \beta$ -proteins. *Q. Rev. Biophys.* 13: 317-338.
4. Brown, N. L. (1985). Bacterial resistance to mercury-reductio ad absurdum. *Trends. Biochem. Sci.* 10:400-403.
5. Clark, W. M. (1960). in oxidation-reduction potentials of organic systems, the Williams and Wilkins Co., Baltimore.
6. Clarkson, G. D. and Lindsay, J. G. (1991). Immunology, biosynthesis and *in vivo* assembly of the branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex from bovine kidney. *Eur. J. Biochem.* 196: 95-100.
7. Guest, J. R., Angier, S. J. and Russell, G. C. (1989). Structure, expression and protein engineering of the pyruvate dehydrogenase complexes of *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 573: 76-99.



8. Haworth, J. C., Perry, T. L., Blass, J. P., Hansen, S. and Urquhart, N. (1976). Lactic acidosis in three sibs due to defects in both pyruvate dehydrogenase and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes. *Pediatr.* 58: 564-572.
9. Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and glutaredoxin: small multi-functional redox proteins with active-site disulfide bonds. *Biochem. Soci. Trans.* 16: 95-96.
10. Jentoft, J. E., Shoham, M., Hurst, D. and Patel, M. S. (1992). A structural model for human dihydrolipoamide dehydrogenase. *Protein: Structure, Function, and Genetics* 14: 88-101.
11. Kazuko, Maeda-Yorita, George, C. Russell, John, R. Guest, Vincent, Massey and Charles, H. Williams Jr. (1994). Modulation of the oxidation-reduction potential of the flavin in lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli* by alteration of a nearby charged residue, K53R. *Biochemistry* 33: 6213-6220.
12. Kim, H. and Patel, M. S. (1992). Characterization of two site-specifically mutated human dihydrolipoamide dehydrogenase (His-452 $\rightarrow$  Gln and Glu-457 $\rightarrow$  Gln). *J. Biol. Chem.* 267: 5128-5132.
13. Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24: 946-950.
14. Kuhara, T., Shinka, T., Inoue, Y., Matsumoto, M., Yoshino, M., Sakaguchi, Y. and Matsumoto, I. (1983). Studies of urinary organic acid profiles of a patient with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Clinica. Chemica. Acta.* 133: 133-140.

15. Kuroda, Y., Kline, J. J., Sweetman, L., Nyhan, W. L. and Groshong, T. D. (1979). Abnormal pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes in a patient with lactic acidemia. *Pediatr. Res.* 13: 928-931.
16. Liu, T., Kim, H., Arizmendi, C., Kitano, A. and Patel, M. S. (1993). Identification of two missense mutations in a dihydrolipoamide dehydrogenase-deficient patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5186-5190.
17. Liu, T. C. (1994). Ph. D. thesis.
18. Liu, T.C., Korotchkins, L. G., Hyatt, S. L., Vettakkorumakankav, N. N. and Patel, M. S. (1995). Spectroscopic studies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* 270(26): 15545-15550.
19. Massey, V. (1958). The identity of diaphorase and lipoic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 30: 205-206.
20. Massey, V. (1960). The identity of diaphorase and lipoyl dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 37: 314-322.
21. Massey, V. (1960). On the reaction mechanism of lipoyl dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 40: 184-185.
22. Massey, V. (1960). The composition of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 38: 447-460.

23. Massey, V., Gibson, Q. H. and Veeger, C. (1960). Intermediates in the catalytic action of lipoyl dehydrogenase (diaphorase). *Biochem. J.* 77: 341-351.
24. Matalon, R., Stumpf, D. A., Michals, K., Hart, R. D., Parks, J.K. and Goodman, S. I. (1984). Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J. Ped.* 104: 65-69.
25. Mattevi, A., Obmolova, G., Kalk, K. H. VanBerke, W. J. H. and Hol, W. G. I. (1993). Three-dimensional structure of lipoamide dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 230: 1200-1215.
26. Mattevi, A., Obmolova, G., Schierbeek, J., Betzel, C. and Hol, W. G. I. (1992). The refined crystal structure of *Pseudomonas putida* lipoamide dehydrogenase complexed with NAD<sup>+</sup> at 2.45 Å resolution. *Protein: Structure, Function, and Genetics* 13: 336-351.
27. Mattevi, A., Schierbeek, J. and Hol, W. G. I. (1991). Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 220: 975-994.
28. Matuda, S., Kitano, A., Sakaguchi, Y., Yoshino, M. and Saheki, T. (1984). Pyruvate dehydrogenase subcomplex with lipoamide dehydrogenase deficiency in a patient with lactic acidosis and branched chain ketoaciduria. *Clin. Chim. Acta.* 140: 59-64.
29. Munnich, A., Saudubray, J. M., Taylor, J., Charpentier, C., Marsac, C., Rocchiccioli, F., Amedee-Manesme, O., Coude, F. X., Frezal, J. and Robinson, B. H. (1982). Congenital lactic acidosis,  $\alpha$ -ketoglutaric aciduria and variant from

of maple syrup urine disease due to a single enzyme defect: dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr. Scand.* 71: 167-171.

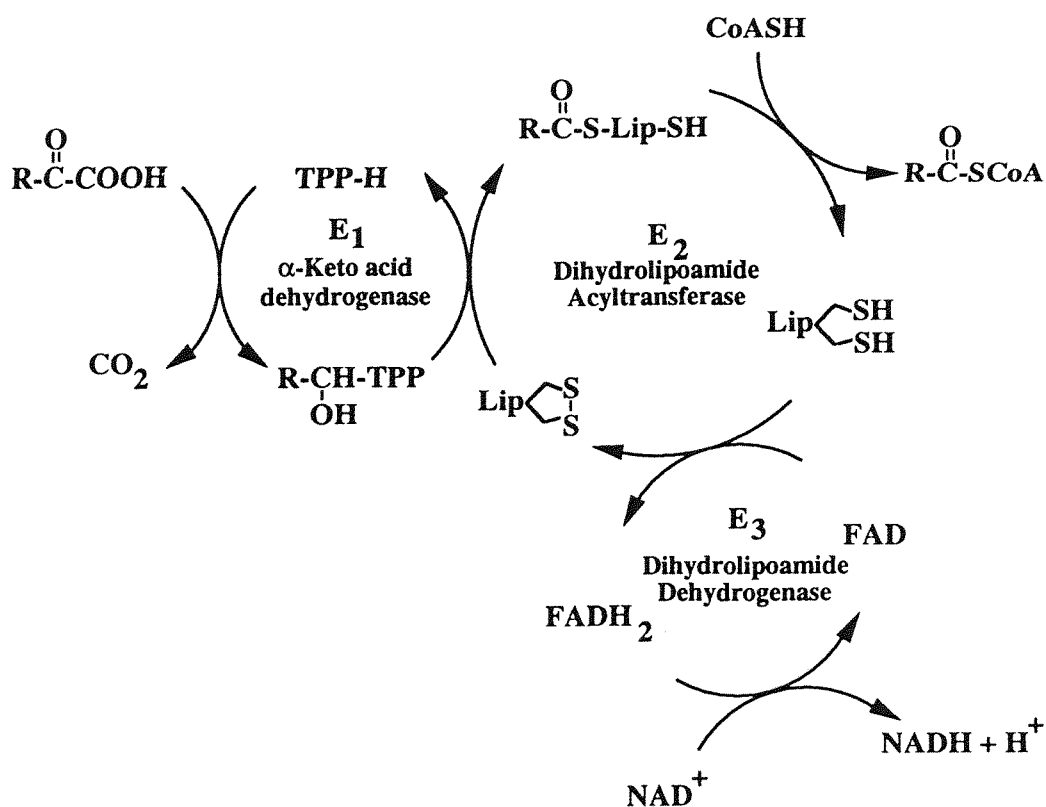
30. Otulakowski, G. and Robinson, B. H. (1987). Isolation and sequence determination of cDNA clone for porcine and human lipoamide dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 262: 17313-17318.
31. Otulakowski, G., Nyhan, W., Sweetman, L. and Robinson, B. H. (1985). Immunoextraction of lipoamide dehydrogenase from cultured skin fibroblasts in patients with combined  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase deficiency. *Clin. Chim. Acta.* 152: 27-36.
32. Otulakowski, G., Robinson, B. H. and Willard, H. F. (1988). Gene for lipoamide dehydrogenase maps to human chromosome 7. *Somatic Cell Mol. Genet.* 14: 411-414.
33. Patel, M. S. and Harris, R. A. (1995). Mammalian  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects. *FASEB.* 9: 1164-1172.
34. Pons, G., Raefsky-Estrin, C., Carothers, D. J., Pepin, R. A., Javed, A. A., Jesse, B. W., Ganapathi, M. K., Samols, D. and Patel, M. S. (1988). Cloning and cDNA sequence of the dihydrolipoamide dehydrogenase component of human  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1422-1426.
35. Reed, L. J. (1974). Multienzyme complexes. *Accts. Chem. Res.* 7: 40-46.
36. Robinson, B. H. (1989). The metabolic basis of inherited disease. Charles, R. Scriver, Authur, L. Beaudet, William, S. Sly, David, V. Valle, Eds. McGraw-Hill Information Services Company, New York. 6th Ed., Part I, pp. 869-888.

37. Robinson, B. H., Taylor, J. & Sherwood, W. G. (1977). Deficiency of dihydrolipoyl dehydrogenase (a component of the pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes): a case of congenital chronic lactic acidosis in infancy. *Pediatr. Res.* 11: 1198-1202.
38. Robinson, B. H., Taylor, J. and Sherwood, W. G. (1980). The genetic heterogeneity of lactic acidosis: occurrence of recognizable inborn errors of metabolism in a pediatric population with lactic acidosis. *Pediatr. Res.* 14: 956-962.
39. Robinson, B. H., Taylor, J., Kahler, S. G. and Kirkman, H. N. (1981). Lactic acidemia, neurologic deterioration and carbohydrate dependence in a girl with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 136: 36-39.
40. Rossmann, M. G., Liljas, A., Branden, C-I. and Banaszak, L. J. (1975). Evolutionary and structure relationship among dehydrogenases. In *The Enzymes*, 3<sup>rd</sup> ed. vol. XI, (ed. Boyer, P.), pp. 61-102. New York: Academic Press.
41. Sakurai, Y., Fukuyoshi, Y., Hamada, M., Hayakawa, T. and Koike, M. (1970). Mammalian  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes. *J. Biol. Chem.* 245: 4453-4462.
42. Schulz, G. E., Schirmer, R. H. and Pai, E. F. (1982). FAD-binding site of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* 160: 287-308.
43. Shames, S. L., Fairlamb, A. H., Crtami, A. and Walsh, C. T. (1986). Purification and characterization of trypanothione reductase from *Criyhidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry* 25: 3519-3526.

44. Stephens, P. E., Lewis, H. M., Darlison, M. G. and Guest, J. R. (1983).  
Nucleotide sequence of the lipoamide dehydrogenase gene of *Escherichia coli*  
k12. *Eur. J. Biochem.* 135: 519-527.
45. Straub, F. B. (1939). Isolation and properties of a flavoprotein from heart muscle  
tissue. *Biochem. J.* 33: 787-792.
46. Sundquist, A. R. and Fahey, R. C. (1988). The novel disulfide reductase bis- $\gamma$ -  
glutamylcystine reductase and dihydrolipoamide dehydrogenase from  
*Halobacterium halobium*: purification by immobilized-metal-ion affinity  
chromatography and properties of the enzymes. *J. Bacteriol.* 170: 3459-3467.
47. Taylor, J., Robinson, B. H. and Sherwood, W. G. (1978). A defect in branched-  
chain amino acid metabolism in a patient with congenital lactic acidosis due to  
dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Ped. Res.* 12: 60-62.
48. Villarejo, M. R. and Zabin, I. (1974). Beta-galactosidase from termination and  
deletion mutant strains. *J. Bacteriol* 120(1): 466-74.
49. Wilkinson, K. D. and Williams, C. H., Jr. (1979). Evidence for multiple electronic  
forms of two-electron-reduced lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J.*  
*Biol. Chem.* 254(3): 852-862.
50. Williams, C. H., Jr. (1976). Flavin-containing dehydrogenase. *In The Enzymes.*  
Boyer, P. D., Ed. pp 89-173, Academic Press, New York.
51. Williams, C. H. Jr., Zanetti, G., Arscott, L. D. and McAllister, J. K. (1967).  
Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase and  
thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 242: 5226-5231.

52. Yanagawa, H. and Egami, F. (1976). Asparaginate dehydrogenase and lipoyl dehydrogenase from asparagus mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251: 3637-3644.
53. Yeaman, S. J. (1986). The mammalian 2-oxoacid dehydrogenases: a complex family. *Trends. Biochem. Sci.* 11: 293-296.
54. Yeaman, S. J. (1989). The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem. J.* 257: 625-632.
55. Yoshida, I., Sweetman, L., Kulovich, S., Nyhan, W. L. and Robinson, B. H. (1990). Effect of lipoic acid in a patient with defective activity of pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase, and branched-chain keto acid dehydrogenase. *Pediatr. Res.* 27: 75-79.

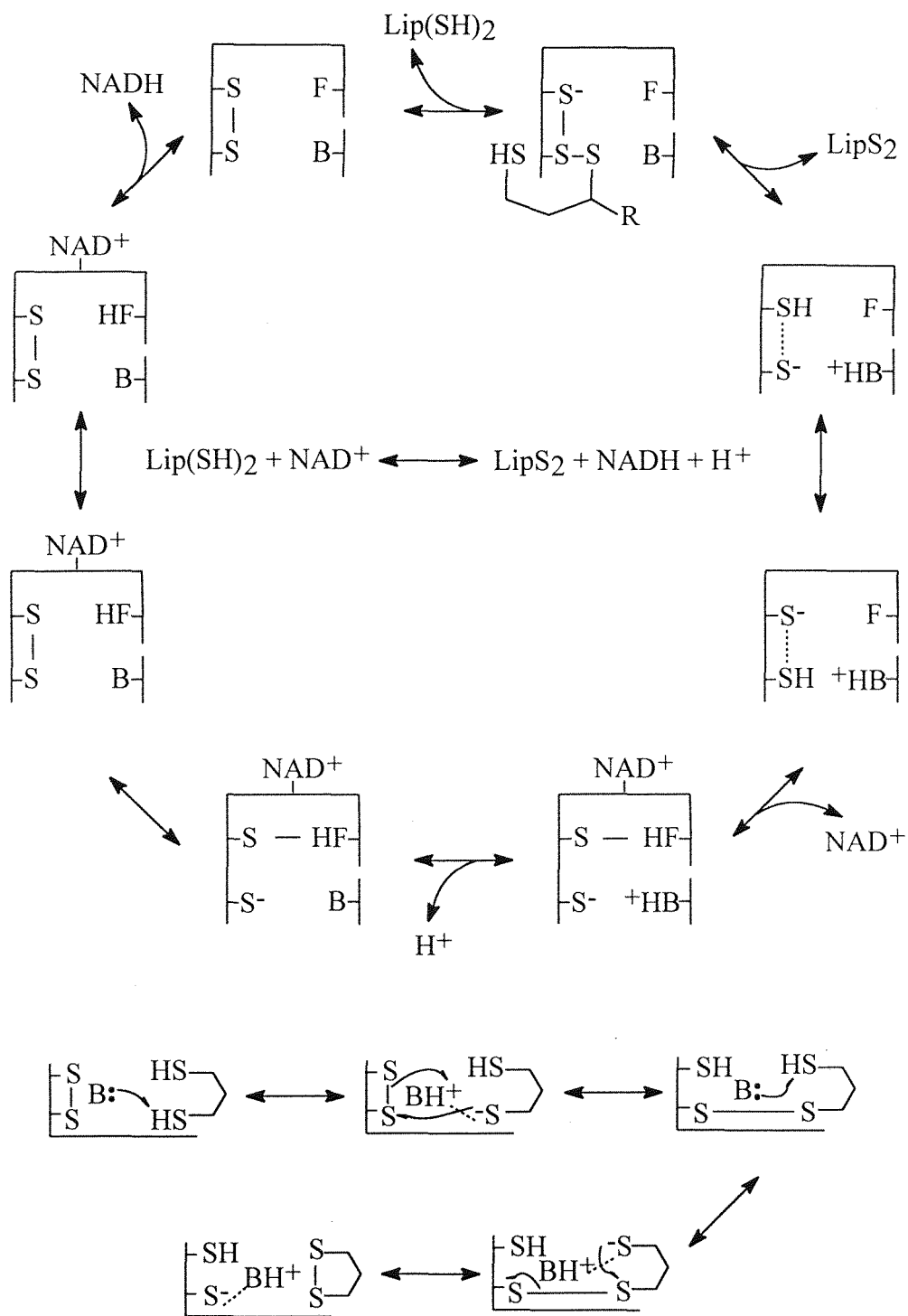
## 附 錄



PDC :	Pyruvate	Acetyl CoA
$\alpha$ KGDC :	$\alpha$ -Ketoglutarate	Succinyl CoA
BCKADC :	$\alpha$ -Ketoisovalerate(Val)	2-Methylpropionyl CoA
	$\alpha$ -Ketoisocaproate(Leu)	3-Methylbutyryl CoA
	$\alpha$ -Keto $\beta$ -Methylvalerate(Ile)	2-Methylbutyryl CoA
	$\alpha$ -Ketobutyrate(Thr)	Propionyl CoA
	$\alpha$ -Keto $\gamma$ -Methylthiobutyrate(Met)	3-Methylthiopropionyl CoA

附錄 1：酮酸去氫酶複合體催化反應之總反應式



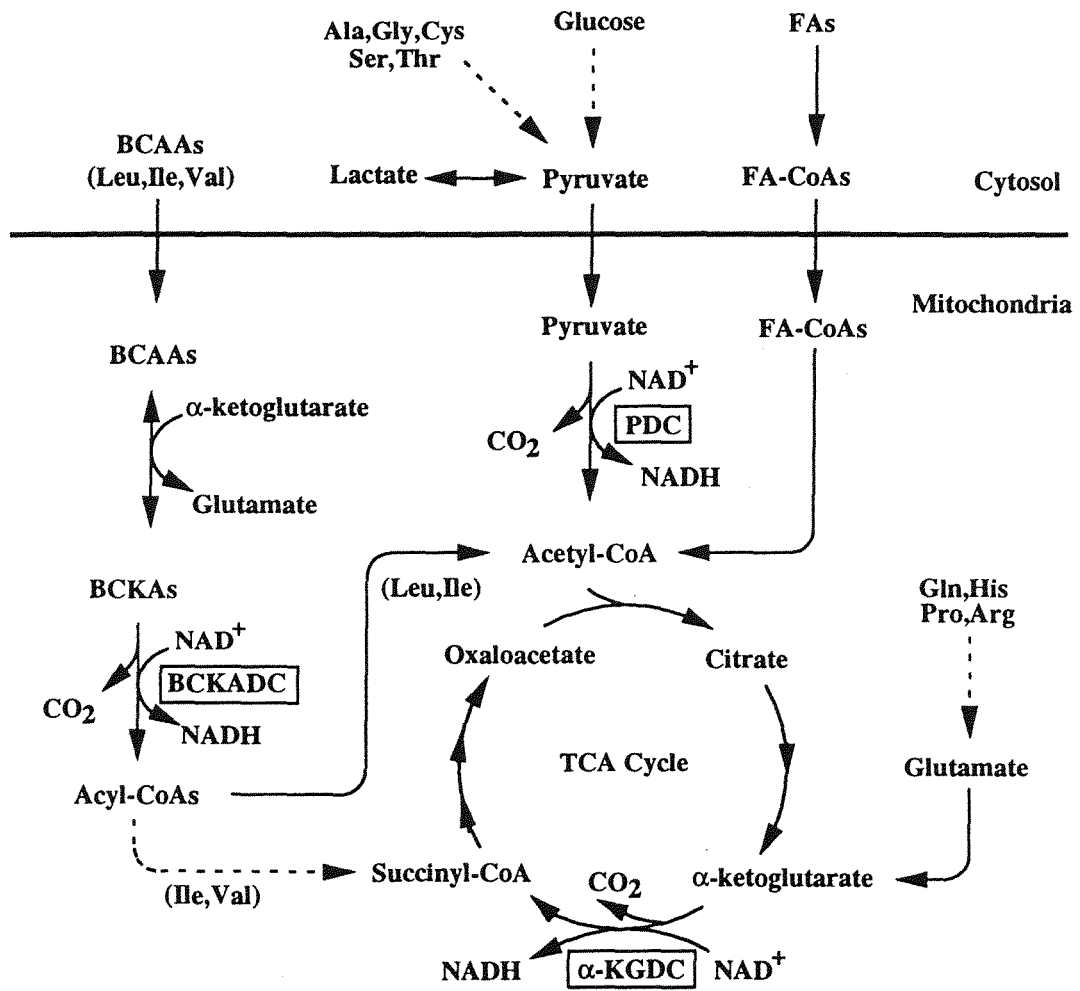


附錄 2：雙羥擬脂醯胺去氫酶催化反應機制。圖中 B 代表活性鹼基，  
S-S 代表活性雙硫基，F 代表 FAD。

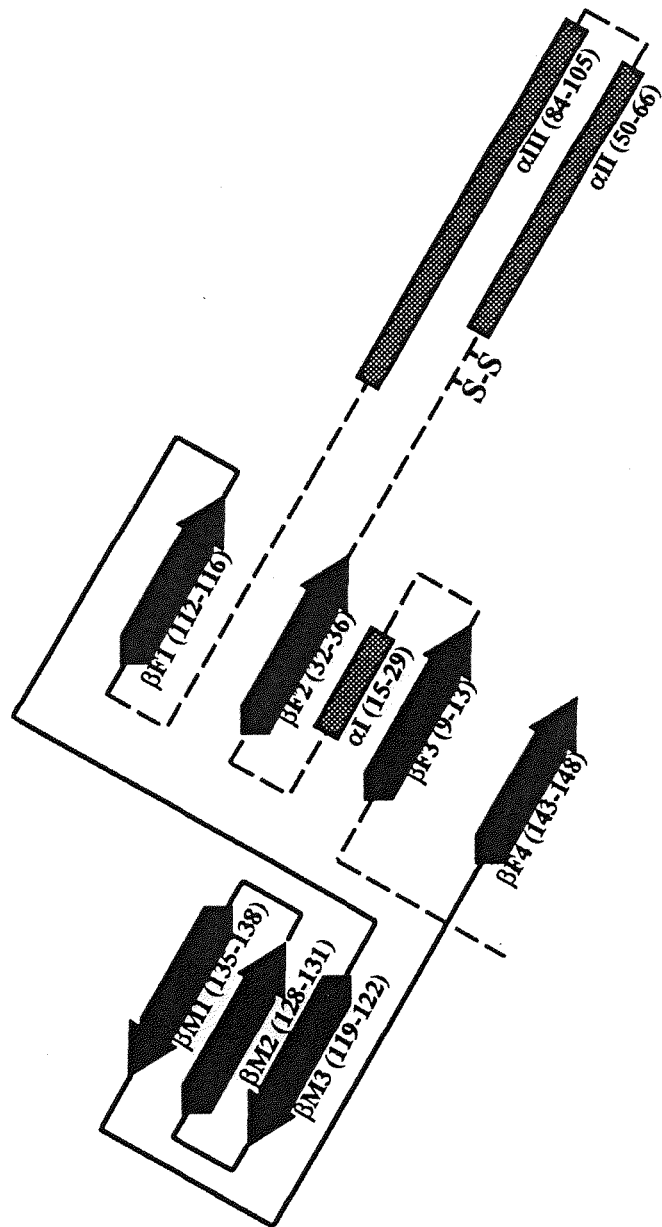
Enzyme	Substrates	Products
E <sub>3</sub>	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{C(=O)NH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{HS} \quad \text{SH}  \end{array}  $ Dihydrolipoamide	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{C(=O)NH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{S} \quad \text{S}  \end{array}  $ Lipoamide
GR	$  \begin{array}{c}  \text{Gly} \quad \text{Gly} \\    \quad   \\  \gamma\text{Glu-Cys-S-S-Cys-Glu}\gamma \\  \text{Oxidized Glutathione}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{Gly} \\    \\  \gamma\text{Glu-Cys-SH} \\  \text{Reduced Glutathione}  \end{array}  $
TR	Oxidized Thioredoxin	Reduced Thioredoxin
MR	Hg(II)	Hg <sup>0</sup>
TTR	$  \begin{array}{c}  (\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4 \\    \quad   \\  \text{NH} \quad \text{NH} \\    \quad   \\  \text{Gly} \quad \text{Gly} \\    \quad   \\  \gamma\text{Glu-Cys-S-S-Cys-Glu}\gamma \\  \text{Oxidized Trypanothione}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  (\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4 \\    \quad   \\  \text{NH} \quad \text{NH} \\    \quad   \\  \text{Gly} \quad \text{Gly} \\    \quad   \\  \gamma\text{Glu-Cys-SH} \quad \text{HS-Cys-Glu}\gamma \\  \text{Reduced Trypanothione}  \end{array}  $
AD	$  \begin{array}{c}  \text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{HS} \quad \text{SH}  \end{array}  $ Dihydroasparagusic acid	$  \begin{array}{c}  \text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{S} \quad \text{S}  \end{array}  $ Asparagusic acid
GSR	$  \begin{array}{c}  \gamma\text{Glu-Cys-S-S-Cys-Glu}\gamma \\  \text{bis-}\gamma\text{-glutamylcystine}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \gamma\text{Glu-Cys-SH} \\  \gamma\text{-glutamylcysteine}  \end{array}  $

(Liu, 1994)

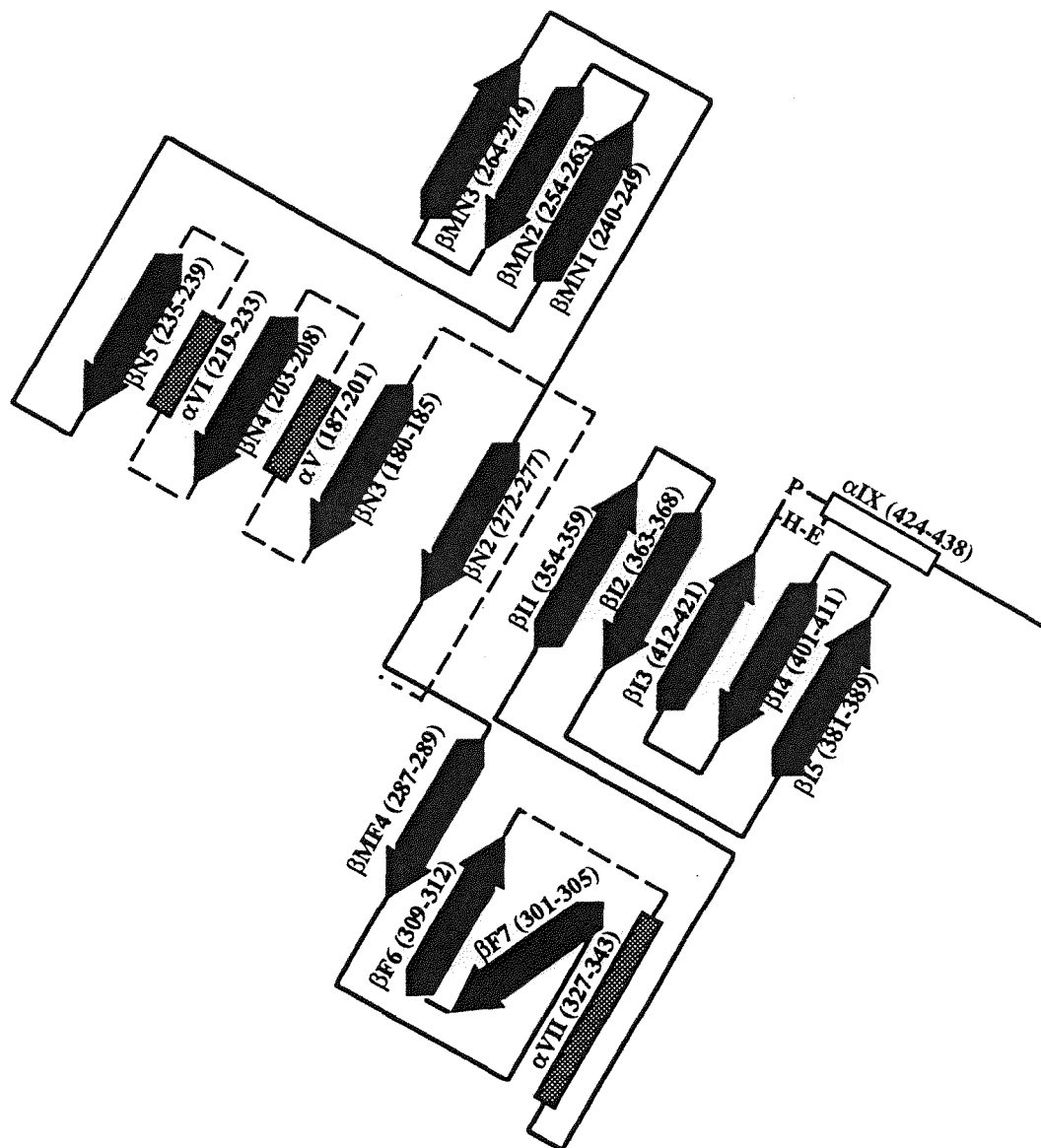
附錄 3：嘧啶核苷雙硫氧化還原酶家族酵素的受質與產物



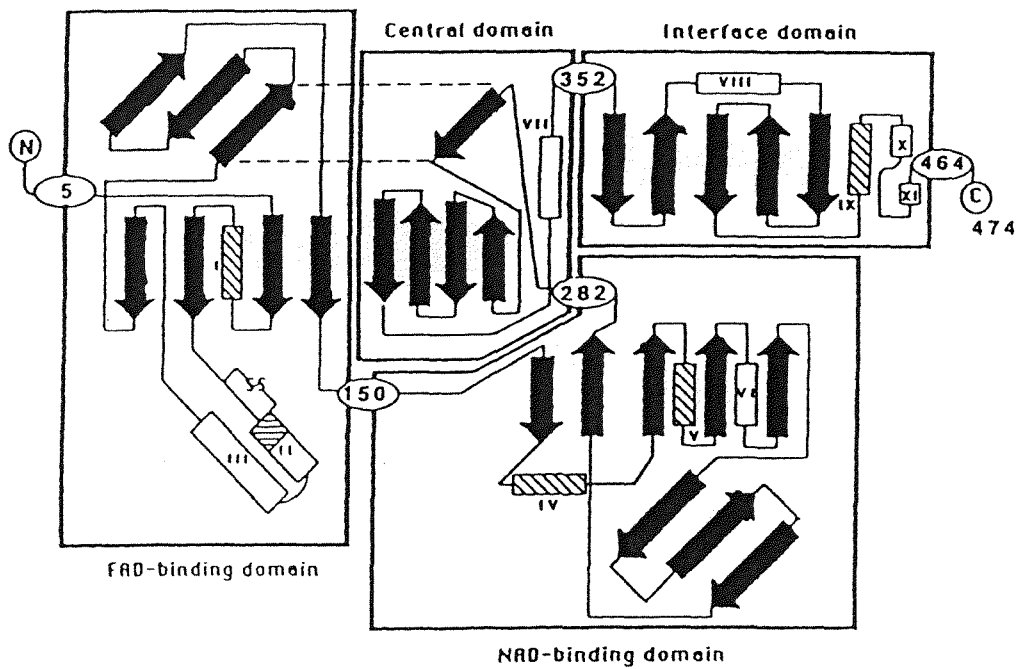
附錄 4：酮酸去氫酶複合體參與之能量代謝路徑



附錄 5：人類雙羥擬脂醯胺去氫酶 FAD 結合結構區假想模圖

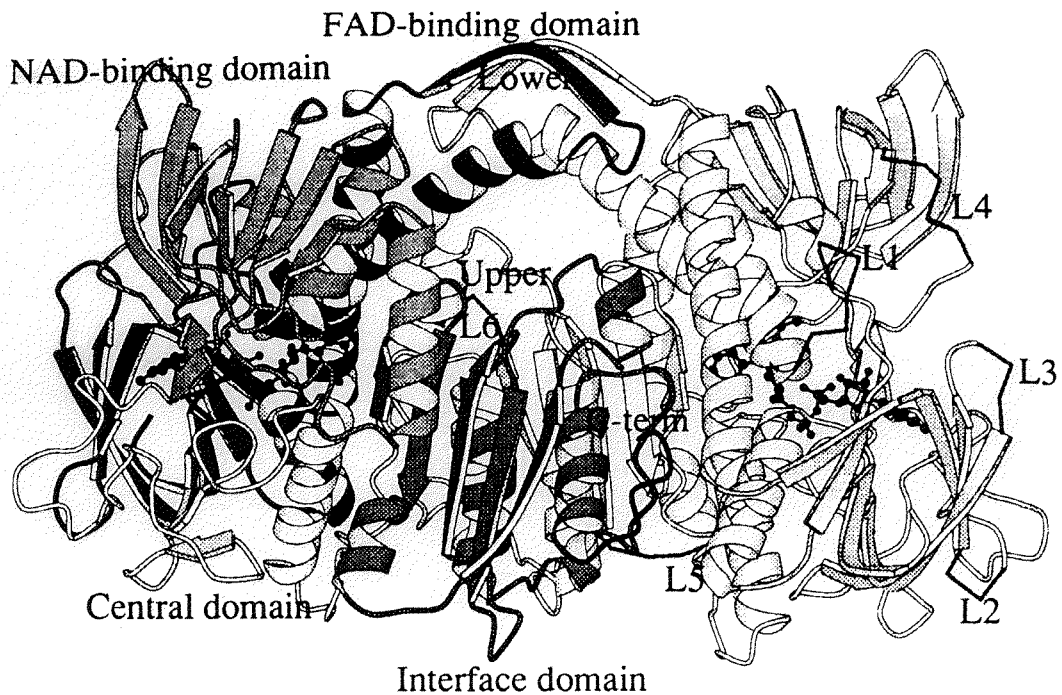


附錄 6：人類雙羥擬脂醯胺去氫酶 NAD 結合結構區、中心結構區及  
介面結構區假想模式圖



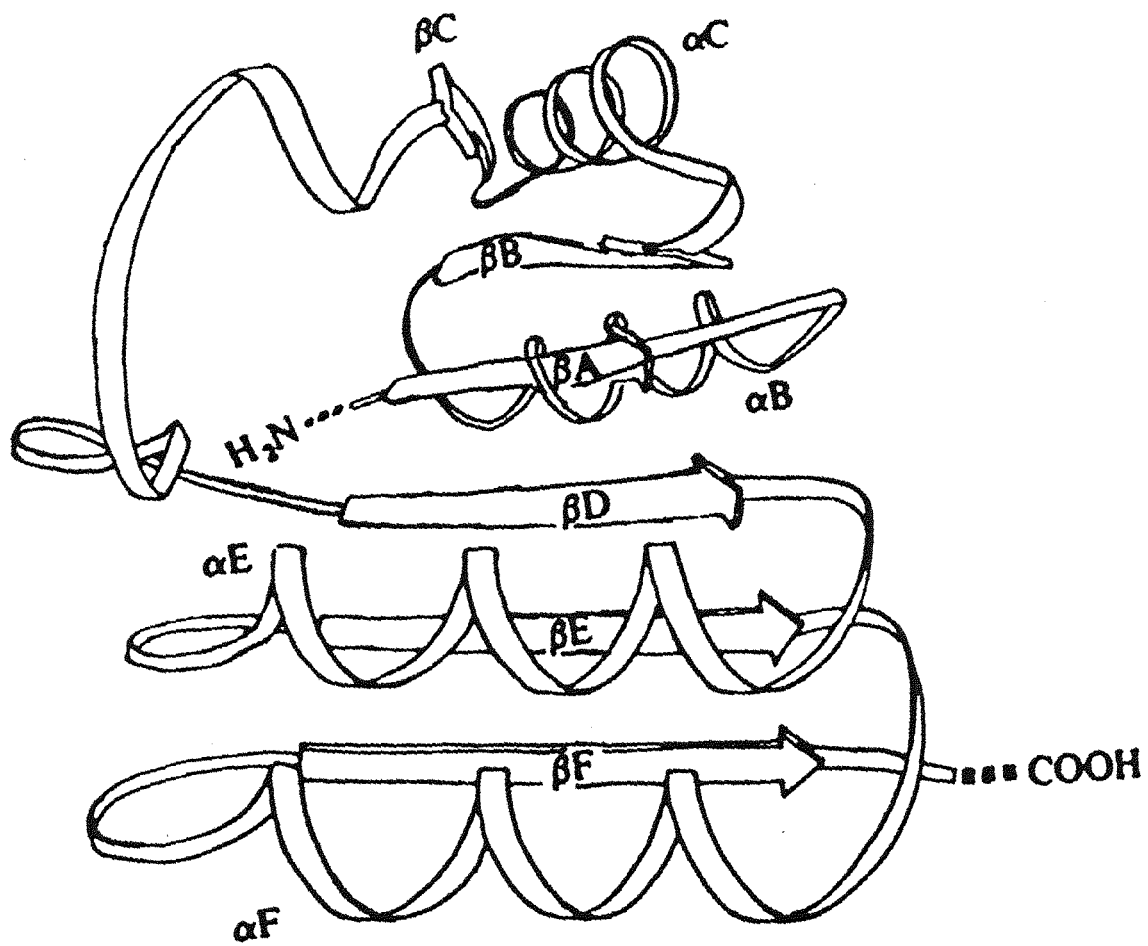
(Mattevi et al., 1992)

附錄 7：人類雙羥擬脂醯胺去氫酶與麩胱甘肽還原酶(GR)鏈摺(chain fold)比較圖。以方框區分成四個結構區(Domain)，由 N 端至 C 端依序為 FAD 結合結構區、NAD 結合結構區、中心結構區及介面結構區。箭頭符號代表  $\beta$ -平板，羅馬數字的長方框代表  $\alpha$ -螺旋。空心長方框是 E<sub>3</sub> 與 GR DNA 序列相同的部分。阿拉伯數字代表人類 E<sub>3</sub> 的胺基酸殘基，S-S 是酵素的活性雙硫基，N 與 C 分別代表酵素的 NH<sub>2</sub> 端與 COOH 端。



(Kraulis, 1991)

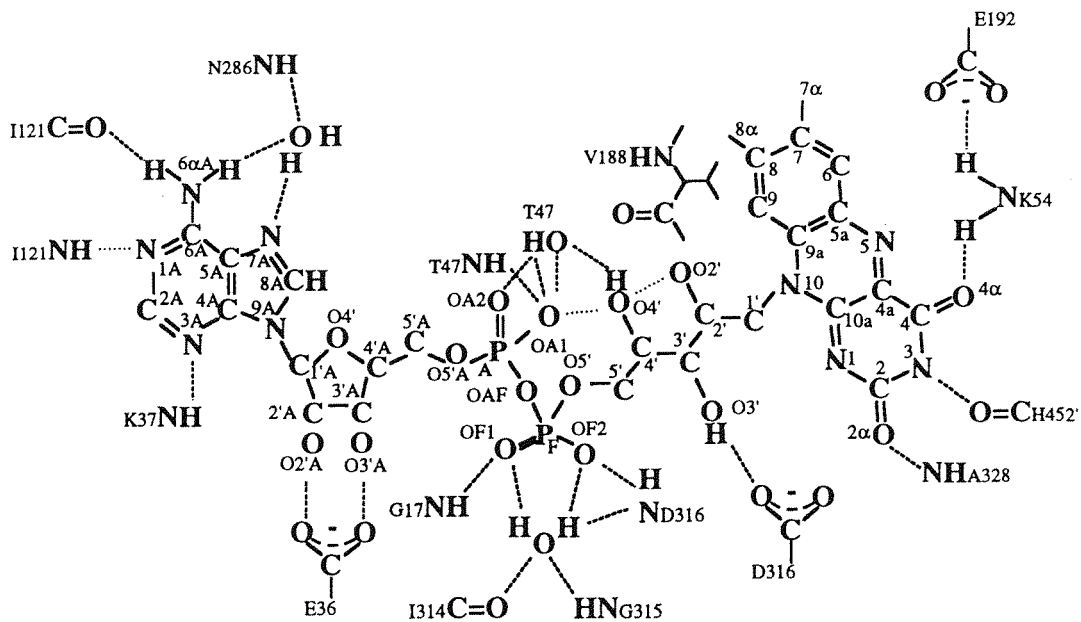
附錄 8： *P. Fluorescens* 菌之擬脂醯胺去氫酶同質雙體帶狀圖。以顏色深淺來區分雙體構造的兩個單體，深灰色部分為一單體，其餘部分為另一單體。黑色顆粒為 FAD 分子。每一單體區分成 FAD 結合結構區(胺基酸殘基 1 至 150)、NAD 結合結構區(胺基酸殘基 151 至 280)、中心結構區(胺基酸殘基 281 至 350)及介面結構區(胺基酸殘基 351 至 472)。酵素的活性中心是由單體的 FAD 結合結構區、NAD 結合結構區與另一單體的介面結構區所組成。



(Bourguignon, 1992)

附錄 9：NAD<sup>+</sup>結合位置之一般構造。





(Liu, 1994)

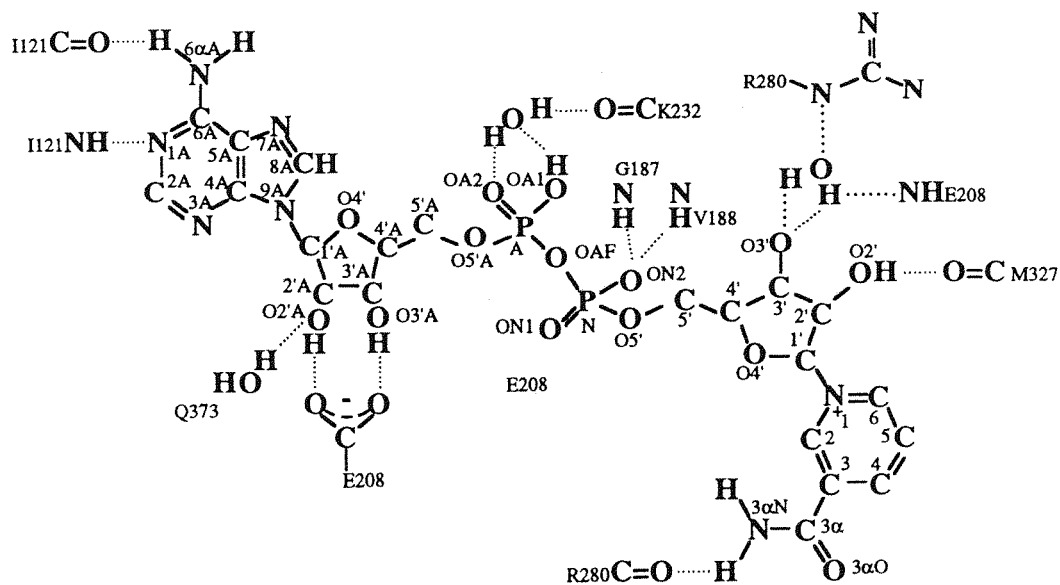
---

### FAD domain

$\alpha$ I(15-29)	G17:	main chain, amide NH, H-bond to pyrophosphate O OF1
$\beta$ F2(32-36)	E36:	side chain, bind to ribose hydroxyls O2'A and O3'A
		main chain, amide NH, H-bond to adenine N A3
$\alpha$ II(50-66)	T44:	main chain, amide NH, H-bond to pyrophosphate O A2
	T44:	side chain, H-bond to phosphate OA1, OA2 and O4'
	K54:	side chain, bind to FAD $4\alpha$ and form ion-pair(salt bridge) with E192 side chain
$\beta$ M3(119-122)	I121:	main chain, carbonyl O, H-bond to adenine $6\alpha$ A
	I121:	main chain, amide NH, H-bond to adenine 1A
$\beta$ F4(143-148)	G149:	main chain, amide NH, H-bond to OF1 and OF2 via HOH

---

附錄 10：雙羧擬脂醯胺去氫酶之 FAD 結合位置附近胺基酸



(Liu, 1994)

---

#### NAD domain

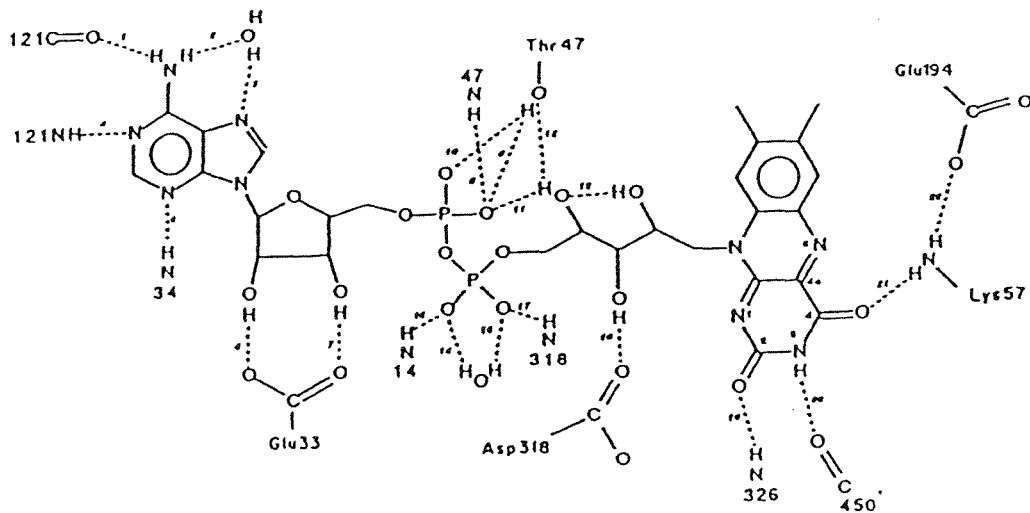
$\alpha$ V(187-210)	G187:	main chain, amide NH, H-bond to ON2
	V188:	main chain, amide NH, H-bond to ON2
$\beta$ N4(203-208)	E208:	main chain, amide NH, H-bond to O3' via HOH side chain, H-bond to O2'A and O3'A
$\alpha$ VI(219-233)	K232:	main chain, carbonyl O, H-bond to OA2 and OA1 via HOH
$\beta$ MN1(240-249)	V243:	main chain, amide NH, H-bond to adenine N1A main chain, carbonyl O, H-bond to adenine N6 $\alpha$ A
	$\beta$ N2(272-277)	R280:
$\alpha$ VII(327-343)	M327:	main chain, carbonyl O, H-bond to O2'

#### Interface domain

$\alpha$ VIII(370-377)	Q373:	main chain, carbonyl O, H-bond to O2'A via HOH
------------------------	-------	--

---

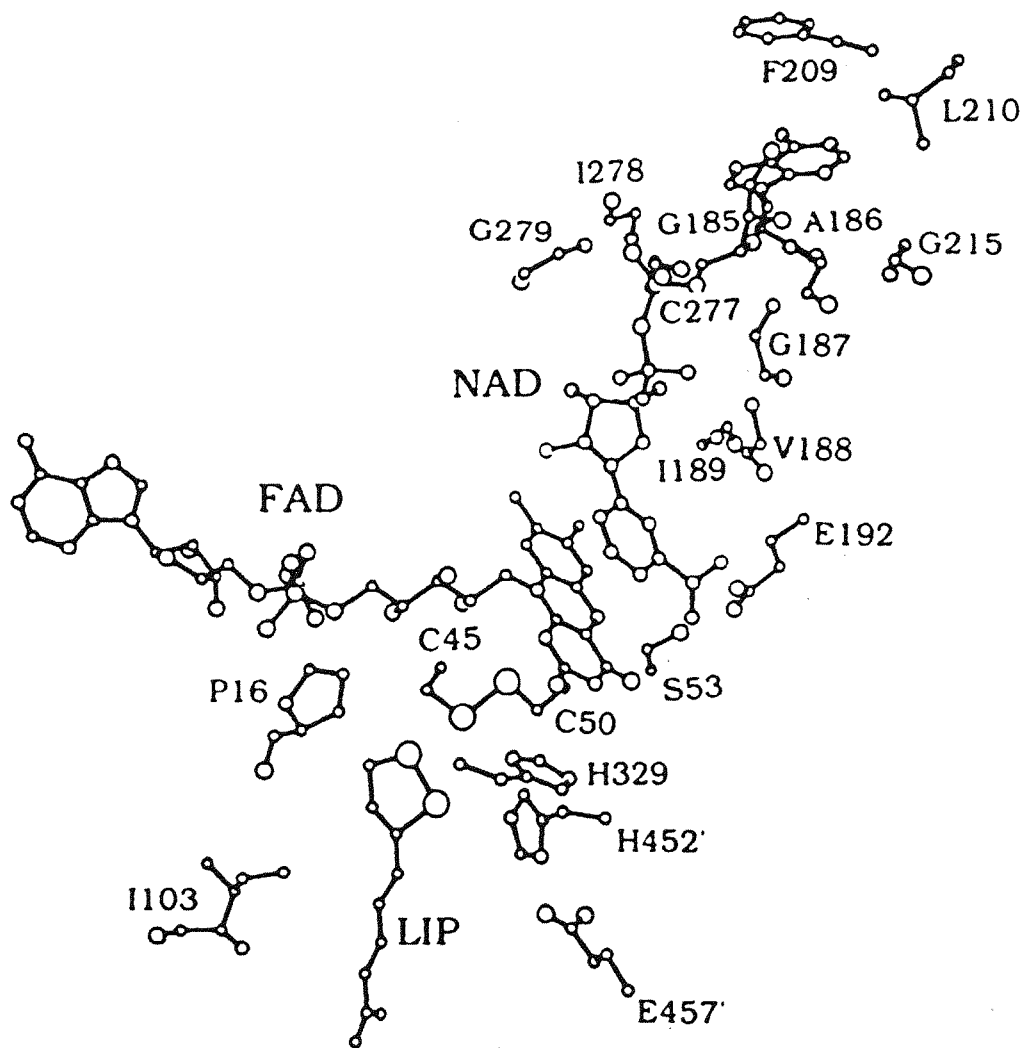
附錄 11：雙羧擬脂醯胺去氫酶之 NAD<sup>+</sup> 結合位置附近胺基酸



Interatomic distances(Å)

	Subunit			Subunit	
	A	B		A	B
1:	3.0	2.8	12:	3.1	3.5
2:	3.4	3.6	13:	2.9	2.7
3:	3.3	3.2	14:	3.2	3.6
4:	3.0	2.9	15:	2.7	2.3
5:	3.5	3.5	16:	3.4	2.8
6:	2.4	2.4	17:	2.8	3.0
7:	2.7	3.3	18:	2.8	2.9
8:	2.9	3.2	19:	2.9	2.8
9:	2.9	3.5	20:	3.2	2.9
10:	3.3	3.9	21:	2.9	3.4
11:	2.6	2.8	22:	2.8	3.0

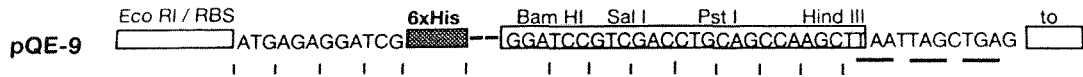
附錄 12：與 FAD 形成氫鍵之附近胺基酸



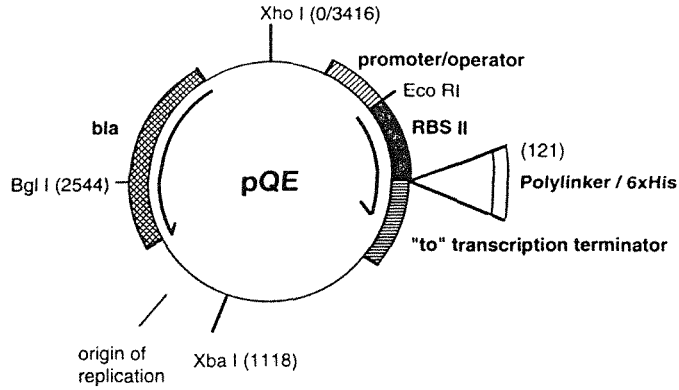
(modified from Jentoft et al., 1992)

附錄 13：人類雙羧擬脂醯胺去氫酶之活性中心三度空間假想圖。此圖是依據人類麩胱甘肽還原酶(GR)推測之  $E_3$  活性中心，包括 Lipoamide、FAD、 $NAD^+$  及可能與受質反應之胺基酸殘基，S-S 是由 Cys-45 與 Cys-50 所構成，活性鹼基是來自另一單體之 His-452 與 Glu-457。

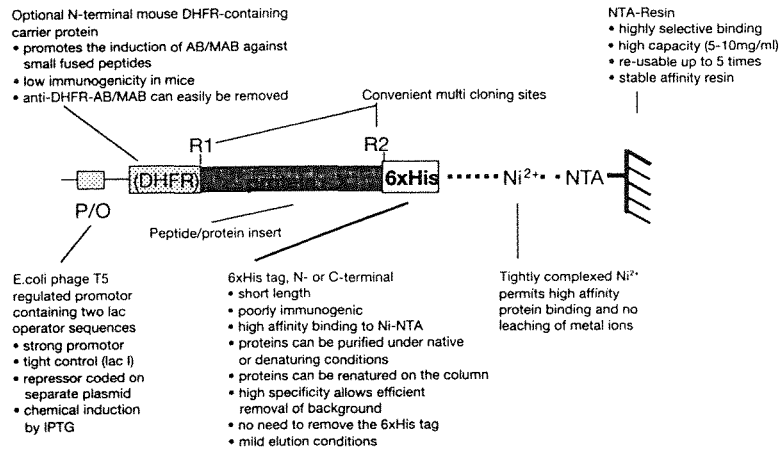
A



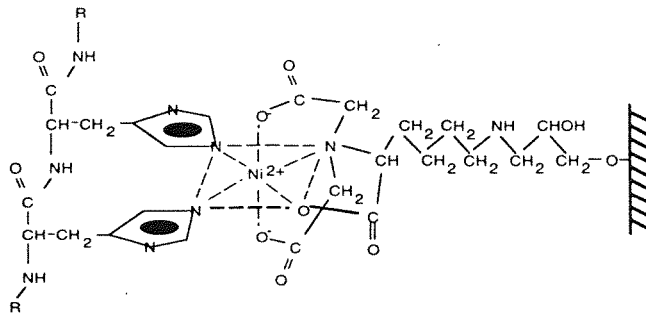
B



C



D



(摘錄自 QIAGEN 公司商品說明書)

附錄 14：pQE-9 質體表達及純化系統