

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

離子通道磷酸化功能的探討 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2321-B-040-009-
執行期間：95年12月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

計畫主持人：劉玉凡

計畫參與人員：研究生：陳佳陽、黃仁裕

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96年10月29日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告 期中進度報告

離子通道磷酸化功能的探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2321-B-040-009-

執行期間：95年12月01日至96年07月31日

計畫主持人：劉玉凡 助理教授

共同主持人：

計畫參與人員：研究生 陳佳陽、黃仁裕

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及
下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學系

中華民國 96 年 10 月 30 日

簡介

在真核細胞蛋白質序列中，約有大於 1/3 的區域是屬於無法摺疊成為緊密固定的立體結構，然而這些不固定蛋白質結構的區域，卻常常扮演蛋白質調控的角色，因為一些蛋白質調控因子容易來辨識這些摺疊不緊密的蛋白質一級序列，例如：磷酸化酵素 (kinase) 所辨識磷酸化未點附近的結構，便是透過蛋白質磷酸化的修飾過程，來改變整個蛋白質功能或是影響摺疊緊密的功能性區域。[1]

在真核及原核細胞中的氯離子 (Cl⁻) 通道分子，在通道結構上是由完成相同的二元體 (homodimer) 所組成[2]，而每個單元體是包含 18 個 α -helices (命名的方式由 A – R helix 依次稱之)，構成折疊成為完整的穿膜結構 (transmembrane)，這個稱為 pore domain 組成的結構，也是構成的離子通道的主體，在這些 α -helices 結構中 D、F、N 及 R helices 的 N-端有幾個關鍵氨基酸，是構成氯離子選擇性通道 (selectivity filter) 的部份[3]。除了這個構成氯離子通道的主體結構外，位於氯離子通道蛋白質的 C-端結構稱為 cytoplasmic domain，這部分結構主要是位於細胞質中變演調控的功能，在脊椎動物的氯離子通道同源基因間，蛋白質的長度有差異很大，可由 160-315 個氨基酸所構成，但是其中有兩個固定由 50 個左右氨基酸所組成 cystathionine β -synthetase (CBS) 蛋白質模組外[4]，其他結構的部份則屬於結構鬆散的聯結結構(linker)，此外連接在 CBS2 蛋白質模組後稱為 C-peptide 的也屬於結構不固定的區域。[5]

本期報告的研究重點，是針對氯離子通道基因磷酸化的調控機制進行研究工作，研究的起因是於在 1987 年 Brinkmeier & Jockusch 利用蛋白質激化酵素 C (PKC) 的抑制劑 phorbol esters 處理老鼠肌肉纖維

後，發現會引起老鼠肌肉纖維重複性肌強直放電 (repetitive myotonic discharges) 現象[6]。這方面的發現到了 1999 年 Rosenbohmd 等人利用重組性的人類 CIC-1 氯離子通道，在 HEK293 的細胞膜電位研究工作中，證明此現象是藉過蛋白質激化酵素 C 磷酸化的作用，改變原有 CIC-1 氯離子通道的功能而產生。但是對於詳細的磷酸化作用機制、以及磷酸化對於 CIC-1 氯離子通道功能上的影響[7]，目前對於磷酸化的位點以及調控的機轉，仍是處於未知的狀態性，因此本研究利用生物資訊的方法配合蛋白質結構的資料、定位點突變以及全細胞電壓量測的實驗方法，來進一步推展這方面的研究工作。

結果

■ Determine 5 hot-spot phosphorylation sites *in silico*

首先針對蛋白質磷酸化位點的預測，本研究所採取的方式是整合網際網路上的工具，利用目前已有公開對於序列磷酸化的分析工具為之，首先利用人類氯離子通道 (hClC-1, GenBank ID - NP_000074) 的蛋白質序列為例。首先我們先針對各個分析工具的分析結果進行比對，發現對於各個生物資訊學分析工具所預測的結果，彼此之間並無關聯性，同時分析的結果也有很大差異性，分析問題的主要原因，在於各個蛋白質磷酸化的預測程式，是採取不相同的預測觀點所致。

因此我們詳細的分析各個工具的分析觀點，其中由 Blom 等人所發展的 NetPhos 以及 NetPhosK 兩項預測工具，對序列是僅考慮受質部分的專一性來決定磷酸化位點，並且在演算法上所使用的方式 - 是採取神經網路 (neural network) 的方法進行預測，根據實際測試的結果，由程式評估的得分在 0.5 分以上，預測的準確率約為 90% 以上[8]。另外由 Iakoucheva 等人所發展的 DISPHOS 預測工具，該方法除了考慮磷酸化序列上的受質專一性外，同時也將序列上氨基酸本身的性質，包括：表面曝露 (surface exposure)、電荷 (charge)、親疏水性 (hydrophilic/hydrophobic) 及易曲性 (flexibility)，因此根據此方法的預測結果，不但可兼顧磷酸化區域的預測，同時也考慮到這些氨基酸的特性，對於氯離子通道本身功能的影響。[9]

上述兩種方法皆是考慮一般性的磷酸化位點附近的序列，然後為了決定由特定激化酵素(Kinase) 所磷酸化的專一序列，而 Huang 等人所發展的 KinasePhos 的工具，所採用的演算法是 Hidden Markovo Model (HMM)，可以直接預測由特定磷酸化酵素的磷酸位點進行預

測，例如：激化酵素 C(PKC) 磷酸化的位置[10]。再配合現有的蛋白質三度空間的結構資訊[1; 5]，以及綜合性的分析方法，不但可以較準確的預測磷酸的位置，同時也考慮到磷酸化後對氯離子通道功能的影響，再配合結構上的資訊來進行磷酸化熱區(Hot-spot region)的預測。

根據此分析流程，對於人類氯離子通道 (hClC-1) 上 Thr/Ser 的被磷酸化位置，我們避開結構功能固定的 pore domain 以及 CBS 蛋白質模組的區域，並且綜合 4 項分析工具的結果，總共預測有 T87、T782、S886、S892 和 S896 等五個位置為磷酸化熱區 [Fig.1]，其中 T87 位於氯離子通道結構的 N-端，和 T782 位於 CBS1 和 CBS2 間 linker 的區域，此兩者為 Threonine 磷酸化的位點，而 S886、S892 和 S896 位於氯離子通道結構的 C-端 C-peptide 區域，為 Serine 磷酸化的位點。

根據前面的討論，我們在選擇磷酸化的熱區時，特別避開與離子通道功能相關的通道蛋白質模組 (pore domain) 以及 C-terminus 上會形成雙體 (dimer) 的 CBS domains 的區域，其中 T782 和 S896 兩個預測磷酸化的位點，是全部 4 個預測程式的結果都超過分析統計的門檻 (threshold)；但是對於 S886 及 S892 兩個位置則是有 3 個預測程式的結果超過統計的門檻，僅有 T78 的磷酸化位點的預測是只有 2 個預測成是超過統計門檻。根據的計劃作流程的分配，在計劃的第一個部份生物資訊核心的先期工作，我們已經利用生物資訊學的工具，完成磷酸化位點的序列分析工作，搭配人類氯離子通道立體結構的資訊，決定了上述數個在氯離子通道的結構上易曲 (flexible) 的區域，作為可能被蛋白質激化酵素 C 磷酸化的熱區，同時該蛋白質序列上的磷酸化位置，作為下一階段定位點突變的目標區。

■ Which phosphorylation site can influence the function of human CIC-1

本計劃的第二個階段是針對磷酸化熱點區定位點突變的工作，實驗的部份是與本系系主任蕭光明教授合作，該實驗室利用分子生物學的方法，產生定位點突變的人類 CIC-1 氯離子通道基因，再利用試管外 (*in vitro*) 基因表現的系統，產生相關正常以及突變的氯離子通道之 cRNA，這個階段的工作除了確定所改變的定位點序列外，並且須產生品質好且足夠量的 cRNA 來進行下一階段的實驗工作，目前已完成包含預測的磷酸化熱點區之 12 個位點突變人類 CIC-1 基因。

第三個階段氯離子通道功能測試的部份，也是與系上林明忠教授合作，將經過定位點突變的人類CIC-1 氯離子通道cRNA，利用顯微注射 (microinjection) 的方式送入非洲爪蟾 (*X. laevis*) 的蛙卵細胞中，並誘導該基因表現蛋白質產物，為了啟動PKC酵素的活性，在有使用PKC的活化劑 (Activator, Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 處理以及未處理的條件下，透過測量蛙卵細胞膜電位的改變，來說明磷酸化的修飾作用影響氯離子通道的功能。經過點突變的方式所測試的氯離子通道基因，因為被磷酸化的位置點已經被改變了，因以並不會PKC活化劑的處理而產生磷酸化的修飾作用，因此也不會像正常的氯離子通道基因一樣，受到磷酸化的作用會改變其電位，藉此實驗方法來進行研究，進一步了解磷酸化的作用對於人類CIC-1 氯離子通道功能的影響以及調節的機制。

由蕭光明教授實驗室分別對於人類的氯離子通道基因的磷酸化位點，利用點突變的方法來挑選並建構產生高品質的 cRNA，目前這部份的工作，已完成 11 個 Ser/Thr 磷酸化位點以及 1 個非磷酸化位點的測

試，其中包含預測熱區 4 個磷酸化的位點 (T782、S886、S892 及 S896)，以及非預測熱點區的 7 個磷酸化的位點 (S682、S720、S740、S798、S902、S903 及 S933)，以及 1 個非磷酸化的位點 (P727)。所產生的 cRNAs 均交由林明忠教授實驗室，進行氯離子通道功能的測試，根據野生型 (wild type) 氯離子通道的測試結果箝制電位 (Voltage clamp) 約為 -42 ± 12 ，而當加入 PKC 的活化劑 (PMA) 後箝制電位減少成為 -14 ± 5 ，說明前人的實驗人類的氯離子通道，會受到磷酸化的作用而改變離子通道的功能。實驗的下一步便針對 12 個點突變的人類氯離子通道進行相同條件的測試，所得的結果如 Table I 所示，除了預測磷酸化位點 S892 之外，其他的點突變的氯離子通道均會受到 PKC 活化劑 PMA 加入後減小其箝制電位，目前實驗的結果也發現僅有 S892 點突變的人類氯離子通道基因，在加入 PMA 活化劑來活化 PKC 蛋白質的處理前後，該細胞的箝制電位並未發生改變，分別量測的值為 -52 ± 17 以及 -51 ± 20 ，說明 S892 的磷酸化位點因為被改變了，因此造成 PKC 磷酸化調控機制的喪失，使得其箝制電位並未受到活化劑的處理而發生改變。[Fig.2]

討論

本計劃進一步利用蛋白質的立體結構，來探討 S892 磷酸化對於氯離子通道功能調控的可能機制，在目前的蛋白質結構資料庫(Protein Data Bank, PDB) 中，已經約有 20 個細菌的同源性氯離子通道基因的立體結構主體 (pore domain) 利用 X-ray 的方式解析出來了[11]，同時還包含石紋電鰻 (*T. marmorata*) CIC-0 細胞質內的調控區域 – CBS1、CBS2、linker 等立體結構也利用 X-ray 的方式被解析出來[5]，因此可利用電腦分子模擬的方式，再利用這些適當的已知結構作為建構模型的模板 (template)，進一步建立人類氯離子通道的立體模型，包含離子通道的主體以及調節的區域，並且希望藉此模型的建立，進一步了解磷酸化的調控機轉。

首先從 S892 所位於的區域開始分析，因為目前雖然僅有石紋電鰻離子通道基因 CIC-0 的結構可用[5]，不過透過將人類的氯離子通道基因 CIC-1 與石紋電鰻的離子通道基因 CIC-0，在位於細胞質內長的 C-端的蛋白質序列做比較[Fig.3A]，發現兩者在該區的 2 個 CBS1 及 CBS2 蛋白質模組的序列部份，分別有高達 64.3%及 84.8%的相似性程度，只有在連結區域 (linker) 及 C-peptide 的區域有很大的差異，同時這兩個低度相似的區域結構是屬於易屈(flexible)，在結構上具有很大的動態性(dynamic) [Fig.3A]，因此石紋電鰻 CIC-0 的氯離子通道結構中這部份的結構也無法解析出來。雖然不到這個磷酸化位點的立體結構，不過在 2007 年 Alioth 等人利用 NMR 的方法[12]，將這部份的動態結構給分析出來，其中在這個動態易屈的結構中，仍有 2 個具有蛋白質二級結構的區域，該區域透過蛋白質序列的同源性比對的分析，與我們實驗所找到 PKC 磷酸化調控的位點 S892 很接近，如 Fig.3A 所示，圖形中黃色框

框的位置，是位於 C-peptide 上利用 NMR 的方式所決定的 β -sheet 二級結構，在石紋電鰻 CIC-0 的序列是 791-ARNGRGRTATSNS-802，根據這個模型的結果顯示 C-peptide 與 CBS2 結構是相較於 CBS1 更接近 pore domain 的區域，然而在人類氯離子通道 CIC-1 上相對於這個區域的結構，也正好是磷酸化位點 S892 的位置，同時這個位置附近的序列，根據 PKC 磷酸化位點附近氨基酸性質的分析[Fig.3B]，在相對於磷酸化位置的 N 端 -4 以及 C 端 +2 的位置，符合傾向於帶正電性質的氨基酸如: Lys 和 Arg，在這個區域的氨基酸序列也正好符合這樣的特性，藉此觀察的結果，可以進一步說明 C-peptide 區域，是透過磷酸化的作用來影響到氯離子通道功能的主要結構。[Fig.3C]

計畫成果自評

完成預定計畫進度，並且在當初所提的 5 個磷酸化位點的熱區，也成功的預測到受 PKC 調控的位置 – S892，橫方面的擴展，因此可以藉由這樣的生物資訊工具的整合，建立 p-PRICES (putative-Phosphorylated Regulated Ion Channel Effect Sequences) 資料庫，分析離子通道基因的序列與結構，預測會受到磷酸化調控的區域，並且提高預測的能力。縱向方面的延伸，可以藉由蛋白質三級結構的模擬，更進一步了解磷酸化位點，如何調節離子通道的功能。

預計將研究的成果與合作的實驗室聯名發表於相關的國際期刊上，生物資訊的部份，可單獨完成 p-PRICES 資料庫的建立，也預計發表於生物資訊與資料庫相關的國際期刊之上，同時下一階段將開始與 2007 年的國科會計劃- NSC 96-2311-B-040-002，探討 MBNL 蛋白質調控選擇性剪接的分子機轉相整合，初步的結果發現 MBNL 基因與人類氯離子通道基因的 N-端的 exon 剪輯(spliced)有關，是否這些不同剪輯的 hCIC-1 的蛋白子產物，氯離子通道功能是否改變？以及與磷酸化的作用是否有關？都需要做進一步的探討，從功能方面決定離子通道上受磷酸化調控的熱區後，下一階段採取分子模擬的方式或結晶學的方法，進一步以結構為基礎的研究方法，來探討離子通道磷酸化調控的機制。

本研究工作的主要價值，生物資訊工具的應用，可輔助實驗上找尋磷酸化熱點的時間，並且整合各個實驗室所長的分析能力，共同解決生物上未知的問題，同時也可藉由立體空間模型的建立，根據模型提出可能磷酸化調控的機制，作為相關實驗結果的合理探討與研究工作的延

續，同時透過與醫院的合作，篩選相關疾病病人的離子通道基因，找尋磷酸化作用與疾病的關係。

參考文獻

- [1] H.J. Dyson, and P.E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 197-208.
- [2] R. Dutzler, E.B. Campbell, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon, X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415 (2002) 287-94.
- [3] R. Dutzler, Structural basis for ion conduction and gating in CIC chloride channels. *FEBS Lett* 564 (2004) 229-33.
- [4] B. Bennetts, G.Y. Rychkov, H.L. Ng, C.J. Morton, D. Stapleton, M.W. Parker, and B.A. Cromer, Cytoplasmic ATP-sensing domains regulate gating of skeletal muscle CIC-1 chloride channels. *J Biol Chem* 280 (2005) 32452-8.
- [5] S. Meyer, and R. Dutzler, Crystal structure of the cytoplasmic domain of the chloride channel CIC-0. *Structure* 14 (2006) 299-307.
- [6] H. Brinkmeier, and H. Jockusch, Activators of protein kinase C induce myotonia by lowering chloride conductance in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 148 (1987) 1383-9.
- [7] A. Rosenbohm, R. Rudel, and C. Fahlke, Regulation of the human skeletal muscle chloride channel hCIC-1 by protein kinase C. *J Physiol* 514 (Pt 3) (1999) 677-85.
- [8] N. Blom, S. Gammeltoft, and S. Brunak, Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294 (1999) 1351-62.
- [9] L.M. Iakoucheva, P. Radivojac, C.J. Brown, T.R. O'Connor, J.G. Sikes, Z. Obradovic, and A.K. Dunker, The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 1037-49.
- [10] H.D. Huang, T.Y. Lee, S.W. Tzeng, and J.T. Horng, KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res* 33 (2005) W226-9.
- [11] R. Estevez, and T.J. Jentsch, CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002) 531-9.
- [12] S. Alioth, S. Meyer, R. Dutzler, and K. Pervushin, The cytoplasmic domain of the chloride channel CIC-0: structural and dynamic characterization of flexible regions. *J Mol Biol* 369 (2007) 1163-9.

FIGURES

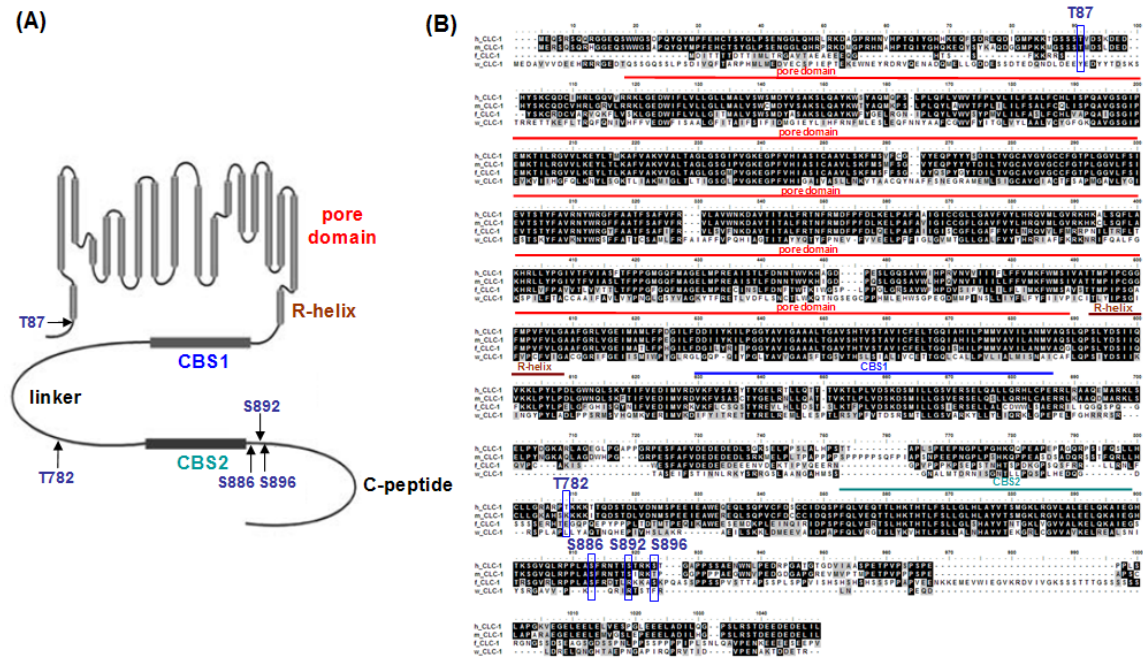


Fig.1 Topology (A) and sequence (B) of hCLC-1 channels. The hot-spot phosphorylation sites and protein domain represented in previous studies. Amino-acid sequences are : h_CLC-1, *H. sapiens* (GenBank number NP_000074), m_CLC-1, *M. musculus* (NP_038519), f_CLC-1, *D. retio* (NP_001076379) and w_CLC01, *C.elegans*(NP_001022373).

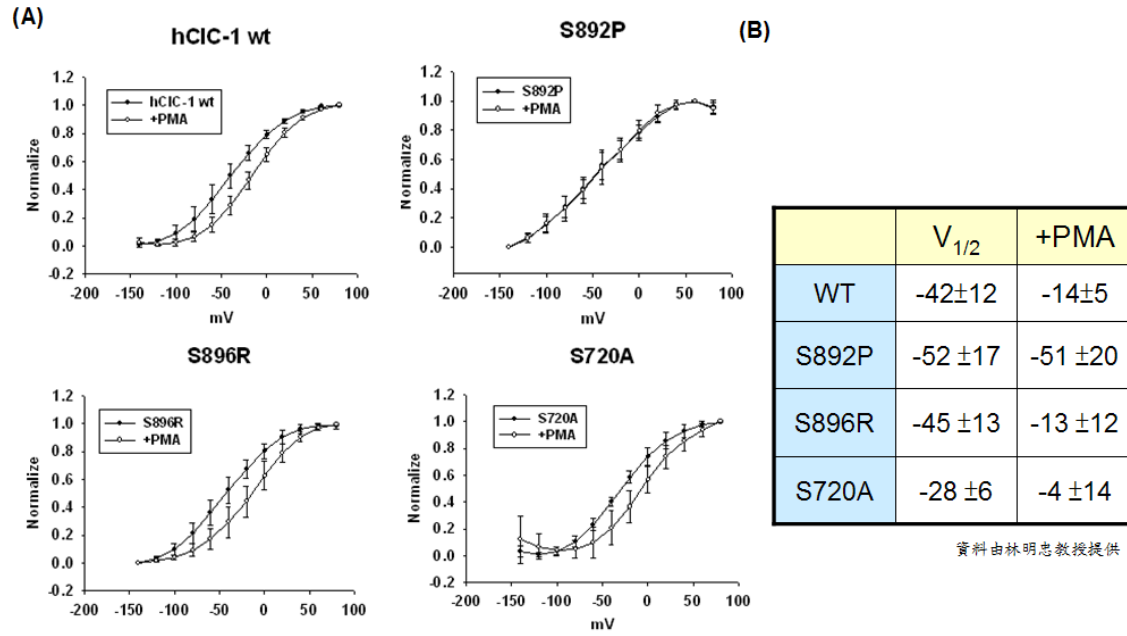


Fig.2 Point-mutation modified the voltage dependence of hCIC-1 channel genes under w/o PKC activator PMA treatment.

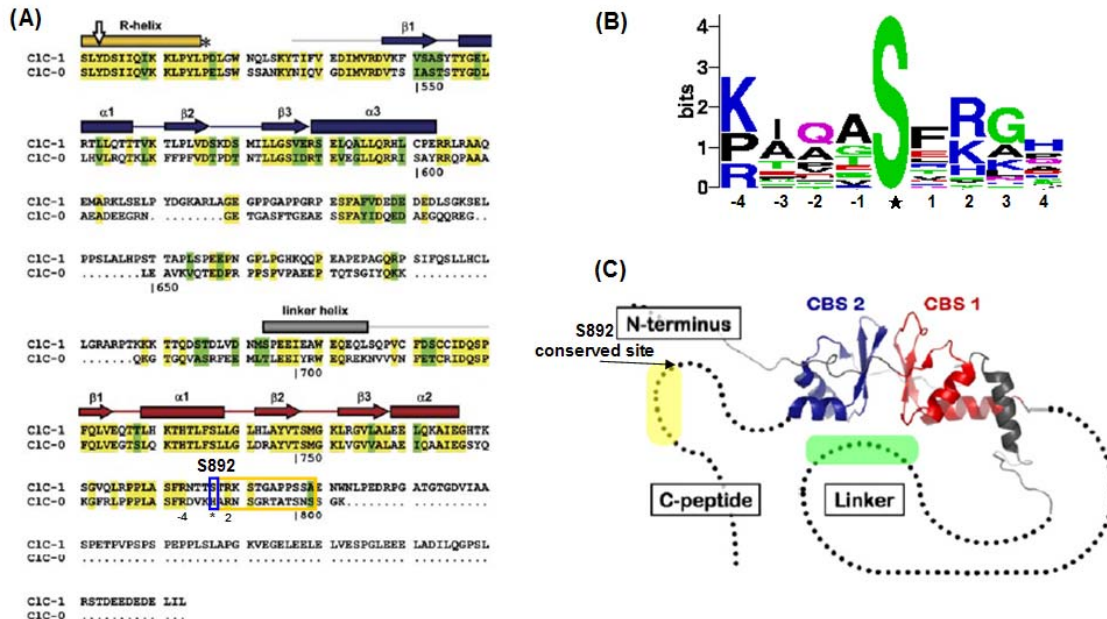


Fig.3, Sequence alignment, the logo of PKC phosphorylation sites and subunit organization. **(A)** Sequence alignment of the cytoplasmic domains of *T. marmorata* (GenBank: X56758) and CIC-1 *H.sapiens* (GeneBank: M97820). **(B)** PSSM logo is a “graph” of the scores in the PKC. Each stack of number represent bits score for residues at a single substrate position. **(C)** Structure organization of hypothesis model. The green box marks the position of α -helix and yellow box indicated the β -sheet structures. The PKC regulated phosphorylation site S892 in C-peptide region.

1 **TABLE 1**

	$V_{1/2}$	+PMA		$V_{1/2}$	+PMA
WT	-42 ±12	-13±5	S720A	-28 ±6	-4 ±14
S886R	-35 ±3	2 ±6	S798A	-30 ±13	-4 ±9
T782A	-37 ±10	-8 ±11	S902A	-50 ±11	-16 ±5
T782R	-63 ±1	-28 ±14	S903A	-57 ±29	-24 ±11
S892P	-52 ±17	-51 ±20	S740A	-55 ±13	-24 ±9
S896R	-45 ±13	-13 ±12	S933A	-52 ±7	-13 ±12
S682A	-35 ±2	-8 ±9	P727L	-48 ±2	-28 ±8

資料由林明忠教授提供

2

3 **Table I** Function assay of WT and point mutation hCIC-1 channels

[Insert Running title of <72 characters]