中華民國第 56 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學學科

第二名

052010

Src 酪胺酸激酶對核纖層蛋白之調控

學校名稱：國立臺中女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 李岱芸	陳玉珊

關鍵詞：核纖層蛋白、Src 激酶、磷酸化

摘要

本研究以 Src 酪胺酸激脢與核纖層蛋白（nuclear lamins）中之 lamin A 亞型為主題，探討 Src 激酶是否調控核纖層蛋白之酪胺酸磷酸化（tyrosine phosphorylation）。本研究中，以細胞內（*in vivo*）與試管內（*in vitro*）實驗，得知 Src 激酶會直接磷酸化 lamin A；以串聯質譜分析實驗，推知 Src 激酶乃磷酸化 lamin A 上之酪胺酸 X 位置；以單點基因突變實驗，發覺 lamin A 不受酪胺酸磷酸化調控時，細胞核型態將出現異常。未來若將此研究之結果應用於過往醫學研究中與核纖層蛋白異常有關之疾病，如早年衰老症、肌肉萎縮症等，或可有更多發現。

壹、研究動機

核纖層蛋白（nuclear lamins）為細胞核中提供結構功能之纖維蛋白。根據序列同源性、表現模式、結構特性與生物化學與動力學特徵，核纖層蛋白可分為 A 型與 B 型。脊椎動物 A 型核纖層蛋白之兩種主要亞型——lamin A 與 lamin C，由 LMNA 基因經剪接作用所製造；而 B 型核纖層蛋白之兩種主要亞型——lamin B1 與 lamin B2，分別由 LMNB1 與 LMNB2 基因所製造。

Lamin A、B1 和 B2 皆為前核纖層蛋白（prelamins），需經轉譯後修飾，以變為成熟核纖層蛋白。由於核纖層蛋白於細胞核中進行轉錄，因此其轉譯後修飾作用較有可能僅發生於核內，而非於內質網膜上。核纖層蛋白之轉譯後修飾主要為法呢醇化與甲醯化，亦會進行磷酸化、SUMO 蛋白化、ADP-核糖基化，甚至糖化亦有可能。根據文獻資料，核纖層蛋白受磷酸化時會造成細胞核核膜崩解，去磷酸化後則使細胞核核膜重建；此項轉譯後修飾作用藉由引起核膜的崩解與重建，進而調控細胞分裂之進行。

Src 酪胺酸激酶（proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src，簡稱 Src 激酶）由 SRC 基因編碼而成，為重要的致癌基因（oncogene）。文獻指出，Src 會對同樣位於核膜內層、並能與核纖層蛋白相結合之 emerin 蛋白進行磷酸化修飾作用。故本研究選定 Src 酪胺酸激酶與核纖層蛋白為主題，探討 Src 激酶是否調控核纖層蛋白之酪胺酸磷酸化（tyrosine phosphorylation，PY）。根據過往研究，核纖層蛋白中除 lamin A 會受酪胺酸（tyrosine，Tyr/Y）磷酸化外，lamin C、lamin B1、lamin B2 均不存在酪胺酸磷酸化現象，因此本研究所分析之酪胺酸磷酸化現象係針對核纖層蛋白 A 型之 lamin A 亞型。

貳、研究目的

一、探討 Src 激酶是否調控核纖層蛋白之磷酸化。

二、分析 Src 激酶磷酸化核纖層蛋白之作用位置。

三、探討核纖層蛋白不受酪胺酸磷酸化調控時，對細胞功能之影響。

參、研究設備及器材

一、實驗設備

	蛋白純化設備	電泳分析設備	發光成像設備
影像			
品名	Chelating sepharose fast flow	Mini-PROTEAN electrophoresis system	ImageQuant LAS 4000 biomolecular imager
廠牌	GE Healthcare	BIO-RAD	GE Healthcare
	胜肽純化分離設備	液相層析設備	串聯質譜儀設備
品名	Phos-trap^{TM} 24 phosphopeptide enrichment kit	Ultimate 3000-RSLC	TripleTOF 6600
廠牌	Perkin Elmer	Thermo Scientific Dionex	AB Sciex
	單點突變設備		
品名	Quikchange site-directed mutagenesis kit		
廠牌	Agilent Technologies		

二、實驗藥品

- 2.5 X SDS sample buffer：25% glycerol、0.2 M tris (pH 6.8)、5% SDS、0.25 M DTT、5 μM EDTA、0.2% bromophenol blue。
- Auto-induction medium：Na_2HPO_4、Na_2HPO_4、KH_2PO_4、tryptone、yeast extract、NaCl、60% v/v glycerol、10% w/v glucose、8% w/v lactose。

- Dialysis buffer：25 mM tris、0.5 M NaCl、0.5 M imidazole (pH 7.4)。
- DMEM cell culture fluid：10% bovine fetal serum、100 unit/mL penicillin、100 mL streptomycin。
- Elution buffer：20 mM Na_2HPO_4、0.5 M NaCl、0.5 M imidazole (pH 7.4)。
- Kinase buffer：50 mM tris (pH 7.4)、10 mM $MgCl_2$、1 mM ATP。
- Mouse anti-GFP（Roche Diagnostics）。
- Protein A sepharose beads（GE Healthcare）。
- Rabbit anti-lamin A/C（H-110）（Santa Cruz Biotechnology）。
- Rabbit anti-mouse IgG（Jackson ImmunoResearch）。
- RIPA buffer：1% Nonidet P-40、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS。
- TBST buffer：50 mM tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05% Tween-20。
- Ureal buffer：8 M urea、25 mM tris、0.5 M NaCl、10 mM imidazole (pH 8.0)。

肆、研究過程與方法

一、探討 Src 激酶是否調控核纖層蛋白之磷酸化

（一）細胞內（*in vivo*）

此項實驗之目的為探討 Src 激酶在細胞內（*in vivo*）環境中，是否調控核纖層蛋白之磷酸化。實驗中，以標靶藥物 Dasatinib 抑制 Src 激酶之活性，觀察核纖層蛋白之磷酸化是否因此減少。

1. 將 SW-480 細胞株培養在含有 DMEM 細胞培養液中，放置於培養箱（37℃，95%大氣、5% CO_2）中培養。
2. 在 SW-480 細胞中加入 100 nM 之 Src 激酶抑制劑 Dasatinib，作用 2 小時。
3. 利用免疫共沉澱（immunoprecipitation，IP），自細胞中純化出核纖層蛋白。
   (1) 取 250 μg lysis buffer 與 2 μg 1：1000 rabbit anti-lamin A/C 放入 1.5 mL 微量離心管，滴加 RIPA buffer 至 300 mL，在 4℃下旋轉反應 90 分鐘。

(2) 加入 30 mL protein A sepharose beads，在 4℃下旋轉反應 90 分鐘。

(3) 以 13000 rpm 離心 1 分鐘，並去除上清液。

(4) 加入 1 mL 冰 RIPA buffer 清洗，在 4℃下以 13000 rpm 離心 1 分鐘，並去除上清液。共重複 3 次。

4. 利用西方墨點法（western blot/immunoblot，IB），檢驗核纖層蛋白之磷酸化。

(1) 前項之蛋白質樣品中，加入 30 mL 2.5 X SDS sample buffer，以 95℃加熱 3 分鐘。

(2) 以 SDS polyacrylamide gel（7.5% running gel、4.0% stacking gel）進行電泳分析。

(3) 將 running gel 置入 Mini-PROTEAN electrophoresis system 電泳分析設備，以 100 Volt 通電 60 分鐘，將膠體上之蛋白轉印至硝化纖維膜（nitrocellulose membrane）上。

(4) 將硝化纖維膜置於含有 5% skim milk 之 TBST buffer 中，在室溫下作用 15 分鐘，以 TBST buffer 漂洗 5 分鐘共 3 次。

(5) 將硝化纖維膜以含抗體（1：1000 rabbit anti-lamin A/C、1：2000 mouse anti-GFP）之 TBST buffer 浸泡覆蓋 60 分鐘，以 TBST buffer 漂洗 3 次。

(6) 將硝化纖維膜以含 1：5000 rabbit anti-mouse IgG 之 TBST buffer 浸泡覆蓋 60 分鐘，以 TBST buffer 漂洗 3 次。

(7) 將硝化纖維膜置於淺盤中，以 enhanced chemiluminescence system kit（ECL）顯影，再以發光成像系統偵測訊號。

（二）試管內（*in vitro*）

此項實驗之目的為探討 Src 激酶在試管內（*in vitro*）環境中，是否調控核纖層蛋白之磷酸化。實驗中，分別以持續活化及無活性之 Src 激酶與核纖層蛋白作用，觀察核纖層蛋白磷酸化現象之有無。

1. 以細菌大量表現 His-lamin A 蛋白，將蛋白純化以作為受質。

(1) 在大腸桿菌（*Escherichia coli*）穩定表現 pET21 b-lamin A 之質體，在 37℃下以 auto-induction medium 培養 2 小時，在 30℃下培養 12 小時，以 13000 rpm 離心。

(2) 加入 1% Triton X-100 之 PBS，進行超音波震盪破菌，以 13000 rpm 離心。

(3) 去除上清液，取沉澱物並加入 ureal buffer，進行第二次超音波震盪後，以 13000 rpm 離心。

(4) 取出沉澱物以 elution buffer 溶解，並放入透析袋，放置在 4℃下的 dialysis buffer 液體中 24 小時進行透析（dialysis）。

2. 由 HEK-293 細胞中純化出 green fluorescent protein-Src Y527F（GFP-Src Y527F）與 GFP-Src Knockdown（GFP-Src KD）蛋白作為激酶。

3. 以 Src 激酶與核纖層蛋白受質進行生物體外激酶活性分析。

(1) 取 50 μg lysis buffer 與 0.5 μg mouse anti-GFP 之 IgG，滴加 RIPA buffer 至 300 mL，在 4℃下旋轉反應 90 分鐘。

(2) 取另一支 1.5 mL 微量離心管，取 0.5 μg rabbit anti-mouse IgG 與 30 mL protein A sepharose beads，在 4℃下旋轉反應 90 分鐘，在 4℃下以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液。

(3) 將含有抗體之 lysis buffer 轉移至含有 protein A sepharose beads 之微量離心管，在 4℃下旋轉反應 90 分鐘，在 4℃下以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液。

(4) 以冰 1% Nonidet P-40 lysis buffer 漂洗，在 4℃下以 13000 rpm 離心 1 分鐘共 3 次。

(5) 以 25 mM Tris (pH 7.4)清洗，加入 40 mL kinase buffer，與受質 5 μg His-lamin A 於室溫下反應 40 分鐘，加入 30 mL 2.5 X SDS sample buffer，以 95℃加熱 5 分鐘。

二、分析 Src 激酶磷酸化核纖層蛋白之作用位置

（一）在 HEK-293 與 HEK-293（Src Y527F）細胞中大量表現 GFP-lamin A。利用免疫共沉澱純化 GFP-lamin A 蛋白，並偵測 Src 激酶對 lamin A/C 的酪胺酸磷酸化程度。確定在 Src 激酶持續活化之細胞中，lamin A 之酪胺酸磷酸化訊號大幅上升。

1. 本實驗流程參照一。

（二）將此樣品進行蛋白質譜鑑定。

此項實驗之目的為分析 Src 激酶磷酸化核纖層蛋白之作用位置。本實驗中，以液相層析-串聯質譜分析進行 HEK-293 細胞株樣品分析，探討 Src 激酶磷酸化 lamin A 之酪胺酸位置。

1. 將欲進行酵素水解之蛋白質以乾淨之刀片由膠片上切下，收集至 1.5 mL 離心管中。

2. 以 25 mM ammonium bicarbonate（ABC）清洗膠體。
3. 加入 50% acetonitrile（ACN）/25 mM ABC 搖晃清洗膠體，至膠體呈現透明，去除 50% acetonitrile/25 mM ABC。
4. 加入 100% ACN 使膠體脫水，並將膠體抽乾。
5. 加入 50 mM 1,4-dithiothretol/25 mM ABC，在 37℃下反應 1 小時，使雙硫鍵還原。
6. 以 100 mM iodoacetamide/25 mM ABC，在 37℃下避光反應 30 分鐘以進行烷化反應，並去除 iodoacetamide/25 mM ABC。
7. 依序以 25 mM ABC 與 50% ACN/25 mM ABC 清洗膠體。
8. 加入 100% ACN 使膠體脫水，並將膠體抽乾。
9. 加入酵素水解溶液（25 mM ABC，40~60 ng trypsin），在 37℃下反應 16 小時，並以 50% ACN/0.1% formic acid（FA）終止反應。
10. 將溶液進行超音波震盪，並移至另一離心管中，將溶液濃縮，以 10 μL o.1% trifluoroacetic acid 回溶，膠內水解流程參照前述。
11. 進行磷酸胜肽之純化分離。
    (1) 將 10 μL 磁珠與 190 μL 去離子水均勻混合於 1.5 mL 離心管，置於磁座上，並移除上清液。
    (2) 加入 binding buffer 清洗數次，平衡磁珠狀態。
    (3) 加入預先與胜肽混合之 binding buffer，置於磁座上 1 分鐘，並吸去上清液（即未被磁珠吸附之物質）。
    (4) 以 200 μL binding buffer 清洗 3 次，去除非專一性結合，並以 washing buffer 清洗 1 次。
    (5) 加入 10 μL elution buffer，以磁座分離出上清液（磷酸胜肽沖提液），並移至另一離心管中。
    (6) 將溶液抽乾，並置於-20℃下之冰箱保存。
12. 將純化後之磷酸胜肽樣品以 0.1% FA 回溶 20 μL。
13. 取磷酸胜肽樣品 1 μL 置於 trap column（100 μm x 2 cm，nano Viper C18，5 μm，100

Å，Thermo），loading pump 以 0.1% FA 流速 10 μL/min 濃縮純化樣品 4.5 分鐘。

14. 以 analytical column（75 μm x 25 cm，nano Viper C18，2 μm，100 Å，Thermo）流速 0.3 μL/min 分析樣品，A buffer 為 0.1% FA/H_2O，B buffer 為 0.1% FA/ACN，以不同 LC 層析梯度對樣品分離狀況與強度進行最佳化測試。
15. 利用超高效能液相層析（ultra performance liquid chromatography，UPLC）搭配三重四極桿時間飛行式串聯質譜儀，以液相層析-串聯式質譜儀（liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry，LC-MS/MS）進行樣品分析與測試。
    (1) 質譜條件：全掃描為範圍 350~1250 m/z，掃描時間 0.25 sec；選擇前 30 強子離子掃描，掃描時間為 0.08 sec，質量範圍為 65~1800 m/z，偵測帶電價數+2~+4 價，並選擇強度大於 20 cps，排除時間（exclude time）為 6 sec，離子源溫度為 150℃。

三、探討核纖層蛋白不受酪胺酸磷酸化調控時，對細胞功能之影響

1. PCR 反應增量 Lamin A 基因所設計之引子

以 pBABE-puro-GFP-wildtype-lamin A 為模板，進行聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction，PCR）。以 *Eco*R I 與 *Bam*H I 限制酶進行裁切，並與 pEGFP-C2 載體結合。Lamin A 進行 PCR 時所使用之引子如下：

a.a.	1~7	*Eco*R I	Forward	5’-CGCGAATTCATGGAGACCCCGTCCCAGCGG-3’
a.a.	597~664	*Bam*H I	Reverse	5’-GGCGGATCCTTACATGATGCTGCAGTTCTG-3’

2. pEGFP-C2-lamin A YX 位置之單點突變所設計之引子

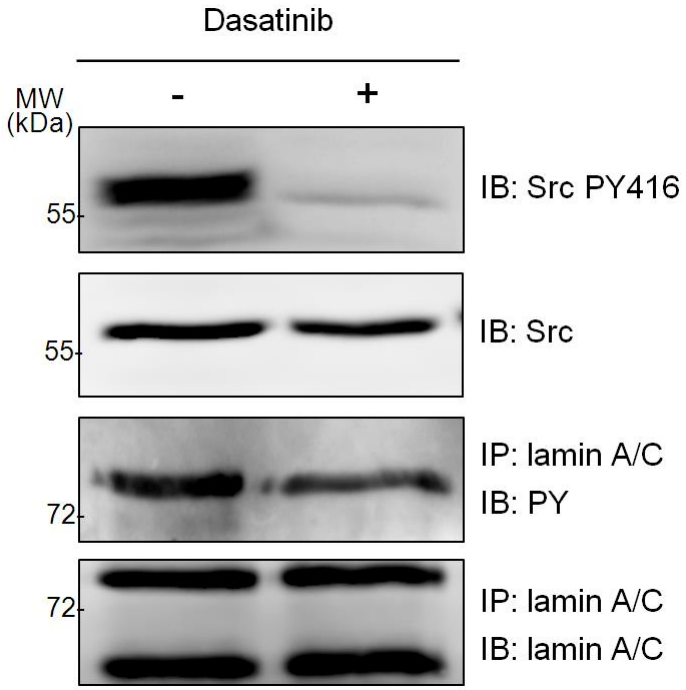
以 pEGFP-C2-lamin A wildtype 為模板，並以核酸定序確認位置突變成功。YXF 單點突變使用之引子如下：

YXF	Forward	5’-CGCTTGGCGGTCTTCATCGACCGTGTG-3’
	Reverse	5’-CACACGGTCGATGAAGACCGCCAAGCG-3’

伍、研究結果

一、探討 Src 激酶是否調控核纖層蛋白之磷酸化

（一）細胞內（*in vivo*）



圖一、以免疫共沉澱與西方墨點法偵測 SW-480 細胞內 Src 激酶與核纖層蛋白磷酸化

在 SW-480 細胞中，加入 Src 激酶抑制劑 Dasatinib 作用 2 小時。利用免疫共沉澱（immunoprecipitation，IP）純化 lamin A/C，並利用西方墨點法（western blot/immunoblot，IB）偵測 Src 激酶對 lamin A/C 的酪胺酸磷酸化程度。

根據文獻，已知 Src 激酶上之酪胺酸 416 位置受磷酸化後（即 Src PY416），Src 激酶便會持續活化，因此設計將 Src PY416 之基因以細胞轉染（transfection）送入細胞中，即可獲得 Src 激酶持續活化之細胞。由於原發性大腸腺癌細胞 SW-480 適宜作為細胞轉染之宿主細胞，故選擇 SW-480 細胞株進行實驗。

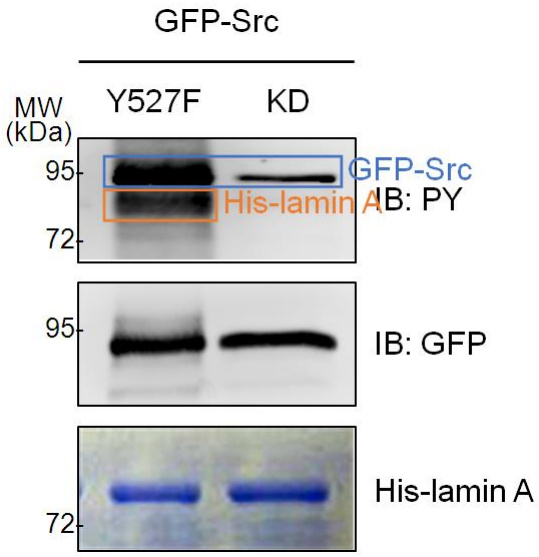
本實驗中，以西方墨點法偵測 Src PY416 訊號，即代表有活性之 Src 激酶含量。而 Src 訊號則為所有持續活化以及無活性之 Src 激酶總量。由圖一結果可見，加入 Dasatinib 之細胞中，Src 訊號並未改變，但 Src PY416 訊號遠少於未添加 Dasatinib 之對照組。換言之，無論

細胞中是否加入 Dasatinib，細胞中 Src 激酶總含量並無改變，但加入 Dasatinib 作用之細胞中，持續活化的 Src 含量遠低於未加入 Dasatinib 作用之細胞。可知 Dasatinib 確有抑制 Src 激酶，使其失去活性之效，因此可將受 Dasatinib 作用之細胞視為 Src 激酶無活性之細胞。

為了解 Src 激酶活性與核纖層蛋白磷酸化之關聯，以免疫共沉澱純化出核纖層蛋白 A 型，並以西方墨點法偵測酪胺酸磷酸化訊號（即 IB：PY）。由於 lamin A 可受酪胺酸磷酸化作用，lamin C 則否，因此實驗結果偵測到之酪胺酸磷酸化必發生於 lamin A 而非 lamin C。分析由 SW-480 細胞純化出之核纖層蛋白，由實驗結果可見，在 Src 激酶無活性（即加入 Dasatinib）之細胞中，酪胺酸磷酸化訊號少於 Src 激酶持續活化（即未加入 Dasatinib）之對照組細胞。單就此結果推論其可能原因有二：其一為加入 Dasatinib 之細胞當中，lamin A 含量少於未加入 Dasatinib 之細胞，造成 lamin A 酪胺酸磷酸化含量連帶亦較少；另一可能原因即為，Src 激酶無活性時會造成 lamin A 酪胺酸磷酸化下降，亦即印證「Src 激酶活性會影響 lamin A 酪胺酸磷酸化」之實驗假設。

為判別真正原因，實驗中以西方墨點法偵測核纖層蛋白 A 型訊號（即 IB：lamin A/C）。由圖一結果可見，無論細胞中是否加入 Dasatinib 作用，核纖層蛋白 A 型訊號均相同，即無論細胞中 Src 激酶活性，lamin A 含量均相同。因此 lamin A 酪胺酸磷酸化含量之下降並非由於 lamin A 總含量之下降，故可排除上述所推論之第一種原因。是故，綜括本實驗各項結果而推論，在 SW-480 細胞中，抑制 Src 激酶活性會降低 lamin A 之酪胺酸磷酸化。

（二）試管內（*in vitro*）



圖二、以西方墨點法偵測試管內 Src 激酶與 lamin A 之磷酸化

在 HEK-293 細胞表現 GFP-Src Y527F 與 GFP-Src KD。利用免疫共沉澱純化蛋白，並以細菌純化出之 His-lamin A 為受質，於試管中進行 Src 激酶活性分析。

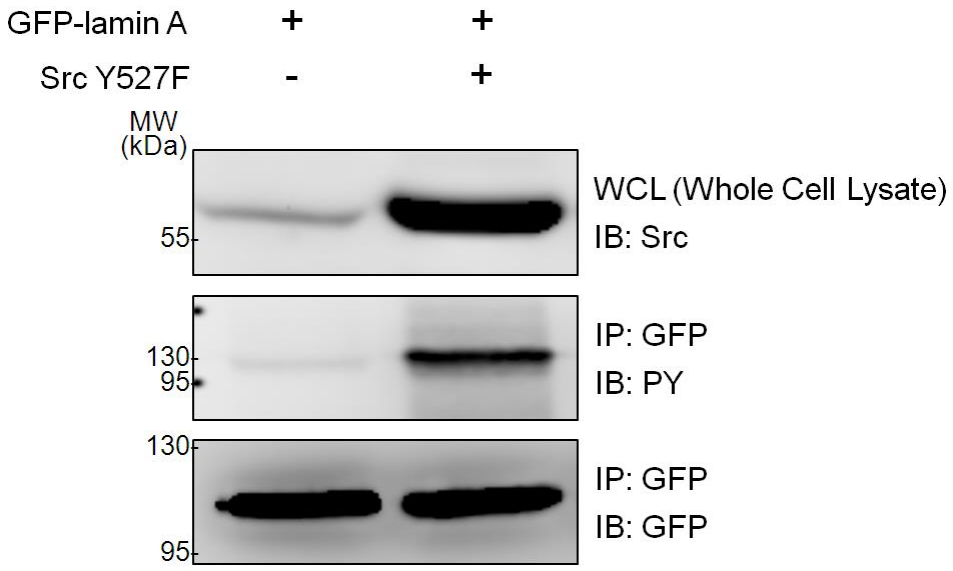
由上述 SW-480 細胞內（*in vivo*）實驗中，已得知抑制 Src 激酶活性會降低 lamin A 之酪胺酸磷酸化。為進一步了解 Src 激酶對 lamin A 之影響，將 Src 激酶與 lamin A 置於試管內（*in vitro*）作用，確認 Src 激酶是否直接磷酸化 lamin A。

由於實驗中以綠色螢光蛋白（green fluorescent protein，GFP）標記 Src 激酶，因此以西方墨點法偵測到之 GFP 訊號（即 IB：GFP）即可視為代表試管中 Src 激酶之總含量。並且，如細胞內實驗結果所述，根據文獻，已知 Src 激酶上之酪胺酸 416 位置受磷酸化後，Src 激酶便會持續活化，因此本實驗中偵測 Src 酪胺酸磷酸化訊號（即 IB：PY 中標示 GFP-Src 方框），即為有活性之 Src 激酶含量。由圖二結果可見，加入 GFP-Src Y527F 與 GFP-Src KD 之試管中，GFP 訊號量相同，但在加入 GFP-Src Y527F 之試管中，酪胺酸磷酸化訊號（PY）遠高於對照組試管 GFP-Src KD 之酪胺酸磷酸化訊號。即言兩試管中 Src 激酶總含量相同，但 Src Y527F 中有活性之 Src 激酶含量遠高於 Src KD 中有活性之 Src 激酶含量，因此可將 Src Y527F 視為持續活化之 Src 激酶，Src KD 則為無活性之 Src 激酶。

為了解 Src 激酶是否直接磷酸化 lamin A，以西方墨點法偵測 His-lamin A 含量與酪胺酸磷酸化含量。由於實驗中以 polyhistidine-tag（His tag）標記 lamin A，因此 His-lamin A 訊號量即為 lamin A 總含量。由實驗結果可見，在加入 GFP-Src Y527F 之試管中，His-lamin A 酪胺酸磷酸化訊號（即 IB：PY 中標示 His-lamin A 方框）遠高於加入 GFP-Src KD 之試管，但兩試管中所偵測到之 His-lamin A 訊號量則相同。亦即兩試管中 lamin A 總含量相同，但 Src 激酶持續活化（即加入 GFP-Src Y527F）之試管中，lamin A 酪胺酸磷酸化含量遠高於 Src 激酶無活性（即加入 GFP-Src KD）之對照組試管。換言之，Src 激酶持續活化之情形下會造成 lamin A 酪胺酸磷酸化，無活性之情形下則否。是故，綜括本實驗各項結果而推論，Src 激酶會直接磷酸化 lamin A。

二、分析 Src 激酶磷酸化核纖層蛋白之作用位置

（一）細胞內（*in vivo*）



圖三、以免疫共沉澱與西方墨點法偵測 HEK-293 細胞內 Src 激酶與核纖層蛋白磷酸化

在 HEK-293 與 HEK-293 (Src Y527F) 細胞中大量表現 GFP-lamin A。利用免疫共沉澱純化 GFP-lamin A 蛋白，並偵測 Src 激酶對 lamin A/C 的酪胺酸磷酸化程度。

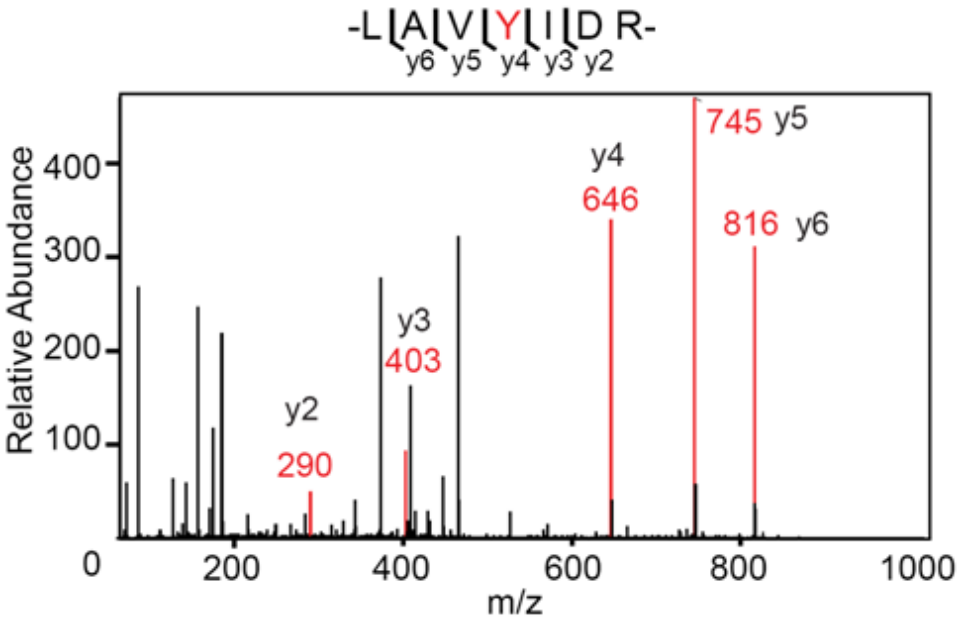
由上述細胞內（*in vivo*）與試管內（*in vitro*）之實驗結果，Src 激酶會直接磷酸化 lamin A。為探討 Src 激酶磷酸化 lamin A 之作用位置，規劃進行蛋白質譜鑑定。首先須確認 Src 激酶在 HEK-293 細胞中亦使 lamin A 磷酸化，始可純化出 HEK-293 細胞中之 lamin A，以作為串聯質譜分析實驗中 lamin A 來源。

根據文獻，已知 Src 激酶上酪胺酸 527 位置點突變而被苯丙胺酸（phenylalanine，Phe/F）取代後（即 Src Y527F），Src 激酶便會持續活化，因此設計將 Src Y527F 之基因以細胞轉染（transfection）送入細胞中，即可獲得 Src 激酶持續活化之細胞。由於腎胚腫瘤細胞 HEK-293 適宜作為細胞轉染之宿主細胞，故選擇 HEK-293 細胞株進行實驗。

將全細胞溶解液（whole cell lysate，WCL）以西方墨點法偵測 Src 激酶訊號（即 IB：Src），根據圖三結果，加入 Src Y527F 之細胞中，Src 激酶訊號遠高於未加入 Src Y527F 之細胞，即該細胞中持續活化之 Src 激酶含量遠高於對照組細胞，因此可將加入 Src Y527F 之細胞視為 Src 激酶有活性之細胞，未加入 Src Y527F 之細胞則視為 Src 無活性之細胞。

為了解 Src 激酶於 HEK-293 細胞中之作用能力，自 HEK-293 細胞中純化出 lamin A 檢驗其磷酸化情形。由於實驗中以綠色螢光蛋白（green fluorescent protein，GFP）標記 lamin A，因此以免疫共沉澱純化出之 GFP 實際上為 GFP-lamin A，即藉此純化出 lamin A 進行檢驗。並且，以西方墨點法偵測到之 GFP 訊號（即 IB：GFP），即代表 GFP-lamin A 總含量，酪胺酸磷酸化訊號（即 IB：PY）則代表 GFP-lamin A 之酪胺酸磷酸化含量。由實驗結果可見，有無加入 Src Y527F 之細胞中，GFP 訊號量均相同，但加入 Src Y527F 之細胞中，酪胺酸磷酸化訊號則遠高於未加入 Src Y527F 之細胞。即言兩細胞樣本中，GFP-lamin A 總含量相同，但 Src 激酶有活性（即加入 Src Y527F）之細胞中，GFP-lamin A 酪胺酸磷酸化含量則遠高於 Src 激酶無活性（即未加入 Src Y527F）之對照組細胞。因此得知，在 HEK-293 細胞中，Src 激酶之活化亦會造成 lamin A 磷酸化，故可以此 HEK-293 細胞株為樣品，純化出 lamin A 進行串聯質譜分析，以分析 Src 磷酸化 lamin A 之作用位置。

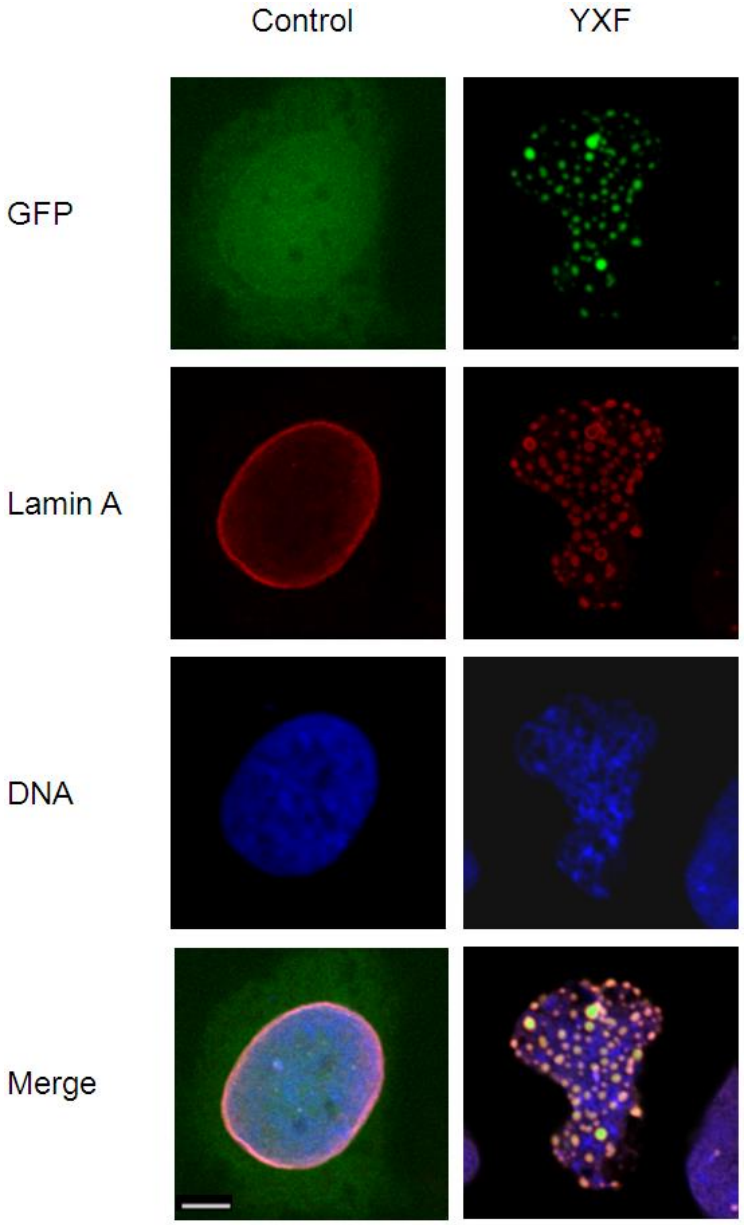
（二）串聯質譜分析



圖四、以質譜鑑定 lamin A 酪胺酸磷酸化

由上述 HEK-293 細胞內（*in vivo*）實驗，得知在 HEK-293 細胞中，Src 激酶之活化會造成 lamin A 磷酸化，因此以其作為樣品，進行串聯質譜分析。根據圖四質譜分析結果，lamin A 胜肽序列上 X 位置（圖五中 y4）之分子量預測應為 566 kDa，偵測結果卻為 646kDa，因此推測 X 位置之酪胺酸帶有分子量 80 kDa 之磷酸根。是故，推論 lamin A 酪胺酸 X 位置（即 lamin A YX）具有磷酸化，為 Src 激酶之作用位置。

三、探討核纖層蛋白不受酪胺酸磷酸化調控時，對細胞功能之影響



圖五、以單點基因突變與蛋白免疫螢光染色觀察 lamin A 不受磷酸化調控時之細胞核外型

以單點基因突變將 lamin A 突變為 lamin A YXF，使其不受磷酸化作用調控，並以蛋白免疫螢光染色與影像分析設備，觀察細胞核之外型。

根據上述串聯質譜分析實驗結果，Src 激酶會磷酸化 lamin A 上之 YX 位置。為了解 lamin A 酪胺酸磷酸化對於核膜形態之影響，以單點基因突變，將 lamin A 之 X 位置由酪胺酸取代為苯丙胺酸（phenylalanine，F）。由於酪胺酸為苯丙胺酸上添加一羥基（-OH）之衍生物，因

此兩者結構極為相似，但酪胺酸可被磷酸化，苯丙胺酸則否，故可以 lamin A YXF 模擬 lamin A 之 X 位置不受磷酸化調控時之情形。

根據圖五結果可見，lamin A YXF 細胞樣品之 lamin A 無法沿細胞核核膜內側正確組裝，而是在細胞核內呈點狀分布，細胞核亦無法維持形狀而向內凹裂。換言之，lamin A YX 不受磷酸化作用調控時，細胞核外型將呈現異常。

陸、討論

一、實驗結果討論

本研究以核纖層蛋白 A 型中之 lamin A 亞型與 Src 酪胺酸激酶為主題，探討 Src 激酶對 lamin A 之磷酸化。首先以以免疫共沉澱與西方墨點法偵測 SW-480 細胞內（*in vivo*）Src 激酶與核纖層蛋白磷酸化，得知在 SW-480 細胞內環境中，抑制 Src 激酶活性會降低 lamin A 之酪胺酸磷酸化。再以西方墨點法偵測試管內（*in vitro*）Src 激酶與 lamin A 之磷酸化，推論知 Src 激酶會直接磷酸化 lamin A。復以免疫供沉澱與西方墨點法偵測 HEK-293 細胞內 Src 激酶與核纖層蛋白磷酸化，確認 Src 激酶於 HEK-293 細胞中亦會磷酸化 lamin A，遂可以此為樣本，以質譜鑑定 lamin A 酪胺酸磷酸化，得知 lamin A 酪胺酸 X 位置（即 lamin A YX）具有磷酸化，為 Src 激酶之作用位置。最後以單點基因突變將 lamin A YX 之酪胺酸置換為無法被磷酸化之苯丙胺酸，並以蛋白免疫螢光染色觀察 lamin A 不受磷酸化調控時之細胞核外型，發覺 lamin A YX 不受磷酸化作用調控時，細胞核外型將呈現異常。

根據 SW-480 細胞與 HEK-293 細胞之實驗結果，均推論 Src 激酶之活化會使核纖層蛋白中 lamin A 亞型之酪胺酸磷酸化上升。因此可得知，lamin A 受 Src 激酶調控並非單一個體之特殊案例，而是人類細胞中普遍情形。

並且，進一步檢視試管內實驗結果可得知，當環境中僅存在 Src 激酶與 lamin A 時，仍能觀察到 Src 激酶對 lamin A 磷酸化之調控，因此推知 Src 激酶係直接磷酸化 lamin A，而非藉由其他機制間接影響 lamin A 磷酸化。

二、文獻探討

過往文獻中曾探討核纖層蛋白受轉譯後修飾作用調控，核纖層蛋白之磷酸化現象亦有研究。但過去研究僅發覺 CDK1 激酶與 PKC 激酶會於細胞進入分裂期時將 lamin A 酪胺酸磷酸化，促使 lamin A 與核纖層瓦解，驅使細胞分裂發生，Src 激酶對於 lamin A 之調控則未曾被探討。本研究中發覺 Src 激酶亦磷酸化 lamin A，而由於核纖層蛋白之磷酸化可調控細胞分裂之始末，推測 Src 激酶對 lamin A 之磷酸化亦可能於細胞分裂時佔有作用，後續或可應用於細胞生命週期之研究中。

此外，過往醫學研究結果顯示，核纖層蛋白之異常將導致數種疾病，諸如早年衰老症候群（Hutchinson-Gilford Progeria syndrome）與肌肉萎縮症（muscular dystrophy）。本研究中，根據蛋白免疫螢光染色與影像分析實驗結果，lamin A YX 位置不受磷酸化作用調控時，lamin A 即無法正確組裝，細胞核核膜亦出現明顯異常之凹裂情形。換言之，Src 激酶所調控之 lamin A YX 位置突變將導致核纖層蛋白與細胞核外型之異常。若將此結果應用於既有醫學研究，或可有更多發現。

三、未來展望

根據 SW-480 細胞中實驗結果，即使 Src 激酶受 Dasatinib 抑制而失去活性，lamin A/C 酪胺酸磷酸化現象仍未完全消失，推測應另有其他激酶亦調控核纖層蛋白之酪胺酸磷酸化，可作為未來研究方向。

柒、結論

一、根據 SW-480 細胞內（*in vivo*）與試管內（*in vitro*）激酶活性分析之實驗結果，Src 激酶能直接磷酸化核纖層蛋白中之 lamin A 亞型。

二、根據 HEK-293 細胞株之串聯質譜分析結果，Src 激酶乃磷酸化 lamin A 上之酪胺酸 X（YX）位置。

三、根據單點基因突變與蛋白免疫螢光染色實驗結果，當 lamin A 上之酪胺酸 X（YX）位置不受磷酸化調控時，細胞核外型會出現異常。

捌、參考資料

Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., and Goldman, R. D. (2010). Nuclear lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(11).

Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K., and Spann, T. P. (2002). Nuclear lamins: Building blocks of nuclear architecture. *Genes & Development*, *16*(5), 533-47.

Tifft, K. E., Bradbury, K. A., and Wilson, K.L. (2009). Tyrosine phosphorylation of nuclear-membrane protein emerin by Src, Abl and other kinases. *Journal of Cell Science*, *122*(20), 3780-90.

【評語】052010

目的：探討 Src Kinase 對 LaminA 是否會磷酸化及其位置，及對細胞功能之影響。若 LaminA 不受磷酸化調控時除了細胞核受影響外，其他功能是不是也受影響，是可以探討之方向，其他在什麼疾病 LaminA 有點突變現象？