

臺灣二〇〇七年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作 品 名 稱：人類粒腺體蘋果酸酶活性中心輔酶 NAD(P)⁺
結合位置之探討

學校 / 作者：國立臺中女子高級中學 趙洛芸

作者簡介及照片

雖然興趣廣泛—彈琴、書法、繪畫、溜冰、桌球，都有一定的造詣，但我最愛的仍是自然、科學。

父親喜歡科學、自然，耳濡目染下，我從小便也喜歡觀察週遭環境生命之成長，更常參加科博館各種生命之旅課程—「微觀世界」、「生命的演化」、「生命環境」、「四季的循環」----等主題。穿上綠制服後，有幸甄選上「高級中學基礎科學資優人才培育計畫」中之一員，乃得有更宏觀的視野。尤其接受大學教授之指導，得以見識大師級的風範。猶記得初見面時，教授便領著我到圖書館借了二十幾本有關科學的書，開啟我探究科學之門，及至接受指導，她治學之嚴謹，做事之認真，思慮之細膩、敏捷，更令人折服。也感謝洪慧芝教授這兩年來傾囊相授之指導「人類粒線體蘋果酸酶活性中心輔酶 NAD(P)^+ 結合位置之探討」，基因突變、蛋白質純化及酵素反應動力學分析方法、科學實驗設計、資料處理、邏輯分析、論文查詢、報告撰寫、今日方能有此參展機會。

生活中，研究是興趣，探索是樂趣。



人類粒線體蘋果酸酶活性中心輔酶 NAD(P)⁺

結合位置之探討

壹、摘要

人類粒線體蘋果酸酶可利用 NAD⁺或 NADP⁺為輔酶，幫助腫瘤細胞獲得能量，但一般生理條件較傾向以 NAD⁺為輔酶。本研究將 K346 修改成偏好 NADP⁺之粒線體蘋果酸酶家族中具有高度保留性的絲胺酸、及不具極性之丙胺酸，探討為何此酵素較偏好以 NAD⁺為輔酶。天然及突變株酵素的催化常數 (k_{cat})、基質 K_m 值、及抑制常數 (K_i) 測定結果顯示 K346 之點突變不會影響基質 K_m 值，但 K346S 之 k_{cat} 明顯上升，繼而改變此酵素對 NADP⁺之選擇性。本研究對於人類粒線體蘋果酸酶催化機制的了解，有助設計具專一性的活性抑制劑，未來可應用於抑制腫瘤細胞能量來源，進而抑制腫瘤細胞生長。

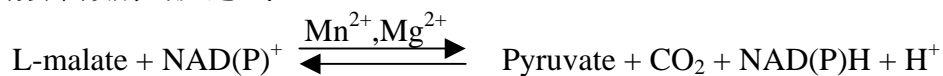
Human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme can help tumor cells gain energy, using either NAD⁺ or NADP⁺ as the cofactor, but prefers NAD⁺ as the coenzyme. By mutating the K346 to Ser, conserved in NADP⁺-dependent ME and to Ala with non-polar, we explore why human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme prefers NAD⁺ as the coenzyme. We measured the proteins k_{cat} , K_m and the K_i values. The experiments showed that mutations don't affect the K_m values, but K346S increased in the k_{cat} value, transferring the coenzyme specificity to NADP⁺. If we develop deeper understanding of the human mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme, we can design a specific drug to inactivate the enzyme activity, and inhibit tumor cell growth.

貳、內文

(一)、前言

蘋果酸酶 (malic enzyme) 為 1947 年於鵝肝萃取液中首次發現，廣佈於細菌、動植物間的酵素，且彼此的胺基酸序列具有高度的保留性。蘋果酸酶以二價金屬離子為輔因子 (Mn^{2+} 、 Mg^{2+}) 催化，進行氧化脫羧反應，使蘋果酸 (malate) 分解成為丙酮酸 (pyruvate) 及二氧化碳，並使輔酶 $NAD(P)^+$ 還原成 $NAD(P)H$ 。

以下為蘋果酸酶的反應式



蘋果酸酶依其對輔酶選擇性之不同可區分為三類：

1. NAD^+ 依賴型 (NAD^+ -dependent) 蘋果酸酶 (E.C.1.1.1.38)
2. $NAD(P)^+$ 依賴型 ($NAD(P)^+$ -dependent) 蘋果酸酶 (E.C.1.1.1.39)，以使用 NAD^+ 為主
3. $NADP^+$ 依賴型 ($NADP^+$ -dependent) 蘋果酸酶 (E.C.1.1.1.40)

在哺乳動物中，蘋果酸酶具有三種異構型：

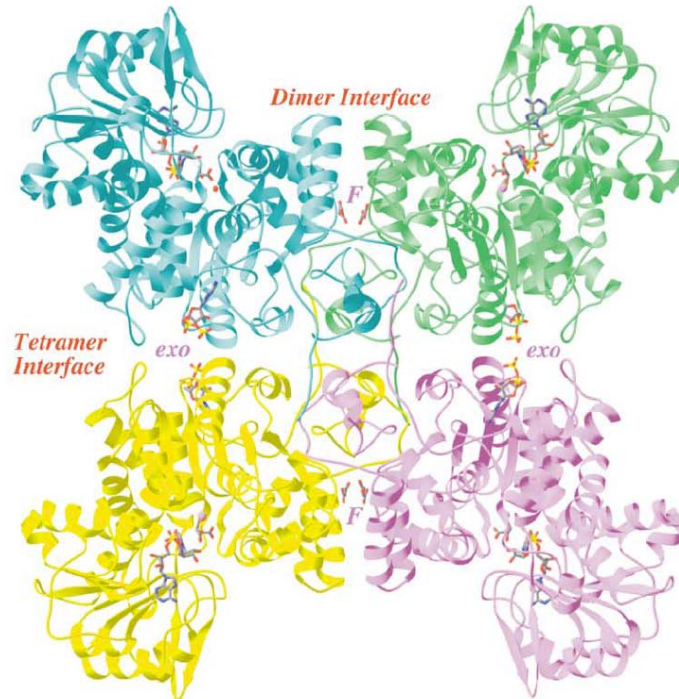
- (1) cytosolic $NADP^+$ -dependent malic enzyme (c- $NADP$ -ME)
- (2) mitochondrial $NADP^+$ -dependent malic enzyme (m- $NADP$ -ME)
- (3) mitochondrial $NAD(P)^+$ -dependent malic enzyme (m- NAD -ME)

其中 m- NAD -ME 可同時以 NAD^+ 或 $NADP^+$ 為輔酶，但在一般生理條件偏好以 NAD^+ 為輔酶。本實驗使用的人類粒線體蘋果酸酶 (human mitochondrial $NAD(P)^+$ -dependent malic enzyme, EC 1.1.1.39) 即屬於此一類型。

生理學研究顯示人類粒線體蘋果酸酶可能作用於快速增生的組織 (如：小腸黏膜細胞、脾臟、胸腺等) 或腫瘤細胞中，在能量代謝方面扮演重要角色。許多腫瘤細胞能利用穀胺酸 (glutamine) 以取代葡萄糖成為主要的能量來源，蘋果酸酶催化作用即與穀胺酸的代謝有關，稱之為「Glutaminolysis」；代謝過程中， α -ketoglutarate 轉化成蘋果酸 (malate) 係由三羧酸循環 (citric acid cycle) 中的酵素催化。正常細胞內的蘋果酸在三羧酸循環中由蘋果酸去氫酶 (malate dehydrogenase) 催化為 oxaloacetate；但在

Glutaminolysis 過程中，蘋果酸則由蘋果酸酶催化形成丙酮酸 (pyruvate)。

人類粒線體蘋果酸酶係由四個完全相同的單元體 (monomer) 組成的四聚體 (homotetramer) (圖一)。每個單元體含 584 個胺基酸，分子量為 62 kDa。



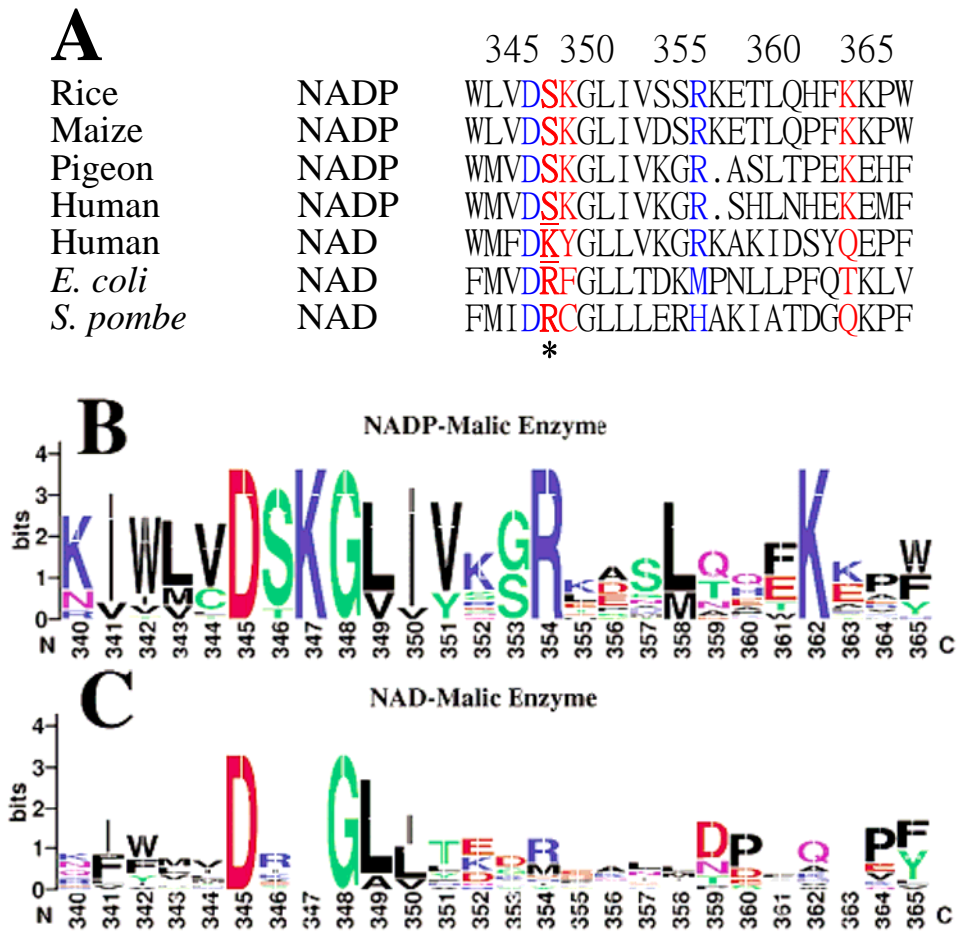
圖一、人類粒線體蘋果酸酶 (m-NAD-ME)四聚體之 X-ray 晶體結構圖 (PDB:1GZ4)

人類粒線體蘋果酸酶之四級結構由四個完全相同之單元體組成的四聚體。

由於人類粒線體蘋果酸酶 (m-NAD-ME) 屬於一種異位調節酶 (allosteric enzyme)，不同於 c-NADP-ME 及 m-NADP-ME，m-NAD-ME 除了具備活性中心以外，還具有異位調節區 (allosteric site)，會受到活化劑 (activator) 反丁烯二酸 (fumarate) 或抑制劑 (inhibitor) 腺苷三磷酸 (ATP) 調控，以競爭型抑制之方式和 NAD^+ 競爭，進而抑制酶活性。

利用生物資訊工具 (ClustalW) 比對 NADP^+ -dependent 的蘋果酸酶和 NAD^+ -dependent 的蘋果酸酶序列 (圖二)，發現前者於 346 位置的胺基酸為具有高度保留性的絲胺酸 (Ser, S)，後者則不具此一特性。絲胺酸 S346 於 NADP^+ 選擇性中扮演一重要角色，在晶體結構中亦可看到其和輔酶間的相對位置 (圖三)，因此本研究將人類粒線體蘋果酸酶之 K346 突變成在 NADP^+ -dependent 蘋果酸酶有高度保留性的 S346，與不具形成氫鍵或離子鍵能力的丙胺酸 (Ala, A)，進而探討人類粒線體蘋果酸酶定點突變對 NAD^+ 和 NADP^+ 的

親和力之影響，希望能更了解m-NAD-ME為何較喜好以NAD⁺作為輔酶。



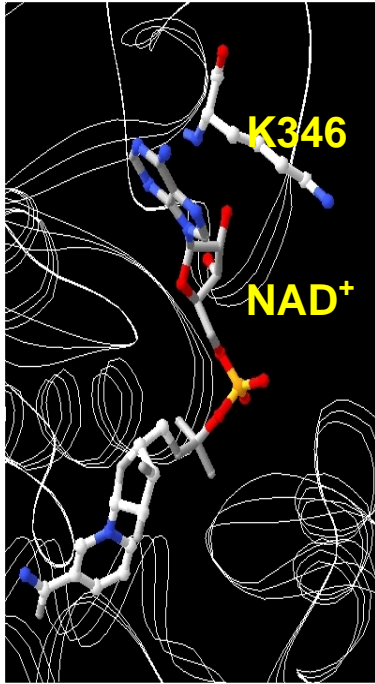
圖二、蘋果酸酶之序列比對圖

(A) NADP⁺-dependent 及 NAD⁺-dependent 的蘋果酸酶 341 至 365 序列比對

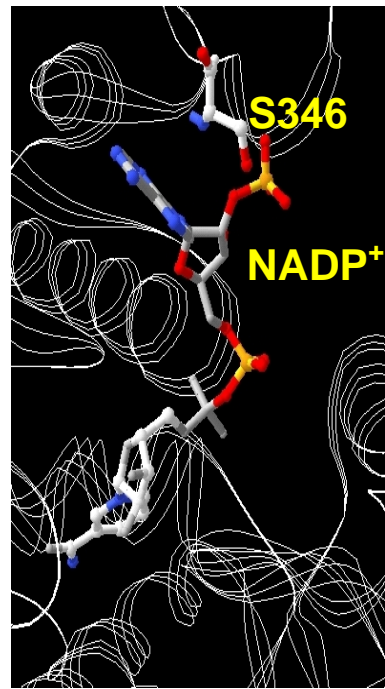
(B)NADP⁺-dependent 的蘋果酸酶於 346 的位置為具有高度保留性的 Ser

(C)NAD⁺-dependent 的蘋果酸酶的相對位置無保留性的 Ser

(A) 人 m-NAD-ME, 1DO8



(B) 鴿 c-NADP-ME, 1GQ2



圖三、人類粒線體蘋果酸酶活性中心之 X-ray 晶體結構圖

(A) 人類粒線體型蘋果酸酶 K346 和 NAD⁺的位置

(B) 鴿肝漿細胞型蘋果酸酶 S346 和 NADP⁺的位置

(二)、實驗材料與方法

實驗材料

一. LB (Luria-Bertaini) 培養液：

秤取 10 g tryptone、5 g Bacto-yeast extract 及 5 g NaCl 溶於去離子水，以 NaOH 調至 pH7.5 後定量至 1 公升，再高壓滅菌。

二. LB plate：

於 LB (Luria-Bertaini) 培養液配方中再加入 15 g Bacto-agar，溶於去離子水以 NaOH 調至 pH 7.5 後定量至 1 公升，再高壓滅菌。等培養液較冷卻尚未凝固前(約為 55 °C)，倒入培養皿 (100 mm Petri-dish) 中，每盤約 25 ml，待其凝固後置於 4 °C 約可保存一個月。

三. LB plate with ampicillin (AP)：

秤取 10 g tryptone、5 g Bacto-yeast extract、5 g NaCl 及 15 g agar 溶於去離子水以 NaOH 調至 pH 7.5 後定量至 1 公升，再高壓滅菌。等降溫至約 55 °C 時，加入 AP (50 µg/ml)，搖勻後分裝入培養皿 (100 mm Petri-dish) 中。注意勿於培養液太燙時加入抗生素，以免抗生素過熱而失效。

四. 蛋白質電泳

1. Sample buffer (4x)：

溶液中含 180 mM Tris-HCl (pH6.8)、40% glycerol、4% SDS、0.04% bromophenol blue 及 200 mM DTT，其餘體積以去離子水補足。

2. Running buffer (1x)：

在 1 公升中含有 3 g Tris base (25 mM)、14.4 g Glycine (192 mM) 及 10% SDS 10 ml (0.1%)，其餘體積以去離子水補足。

3. destain buffer:

在 1 公升中含 500ml methanol (50%)、100 ml acetic acid (10%) 及 400 ml (40%) 的去離子水。

實驗方法

一、突變型人類粒線體蘋果酸酶質體 (pRH281-ME) 建構

1. 質體 (plasmid) 的萃取 (Viogene; Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System)

從 stable agar 或 LB agar plate 挑取單一菌落，放入含 50 µg/ml AP 的 5 ml LB 液，置於 37°C 培養箱中震盪 16 小時。將菌液倒入 1.5 ml eppendorf 微量離心管中，以 1000~3000 xg 離心 2 分鐘，倒掉上清液後重複幾次，直到 5 ml 菌液沈澱物皆集中於 eppendorf 試管底部。加入 250 µl 的 MX-1，快速震盪使其均質化後，緩慢加入 250 µl 的 MX-2，輕輕均勻地搖晃 5 分鐘以上，使上清液呈現透明黏稠狀，再加入 350 µl 的 MX-3，同樣輕輕搖晃，直到看見白色碎蛋花狀的懸浮物出現。以 12000~17000 xg 離心 10 分鐘，將上清液小心取出至 Mini-MTM column 上層管中，以 2400 xg 離心 1 分鐘後，將下層液體倒回上層再重複離心一次。棄置下層液體，沿上層管壁周圍加入 500 µl WF，以 2400 xg 離心 1 分鐘後，再棄置下層液體，同樣沿上層管壁周圍加入 700 µl WS，以 2400 xg 離心 1 分鐘後將下層液體倒掉，繼續以 17000 xg 離心 3 分鐘並去除下層液體。將上層管架在新的 eppendorf 試管上靜置，使酒精完全揮發無味後，在上管膜上加入 40 µl 去離子水，等待約 2 分鐘使質體溶出後，以 17000 xg 離心 3 分鐘，即可在 eppendorf 試管中得到質體，置於 -20 °C 冰箱保存。

2. 定點突變反應 (QuitChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene)

(1) 實驗前準備

總反應體積為 50 µl，其中包含 5 µl 10x reaction buffer、50 ng pRH-281-ME 質體、165 ng forward primer、165 ng reverse primer、1 µl dNTP mix (10 mM)、2 µl DMSO (終濃度為 4%) 及最後加入的 1 µl *Pfu* DNA polymerase (2.5 U/µl)，其餘體積以滅菌過的去離子水補足。

Primer 序列如下 (由左至右為 5' 端到 3' 端)：

K346A forward	5'-GAAAATCTGGATGTTTGACGCTTATGGTTTATTAGTTAAGGGAC-3'
K346S forward	5'-GAAAATCTGGATGTTTGACTCCTATGGTTTATTAGTTAAGGGAC-3'

(2) 循環次數及溫度時間設定

Stage 1 95 °C 反應 30 秒

Stage 2 95 °C 反應 30 秒、55 °C 反應 1 分鐘、68 °C 反應 11 分鐘，反覆循環 16 次

Stage 3 設定為 4 °C

(3) 在產物中加入限制酶 *DpnI* 1 μ l (10 U/ μ l)，置於 37 °C 水浴反應 3 小時，以去除雙股 DNA 模板，進行轉形作用到新鮮的 *E.coli* XL-1 通透細胞。

3. 轉形作用 (Transformation)

在 100 μ l 新鮮的通透細胞 (XL-1) 中，加入 1 μ l 重組野生型或經定點突變後的突變型質體。冰浴 30 分鐘，放入 42°C 水浴 45 秒後，立刻置於冰浴 5 分鐘，加入 NZY⁺ 培養液 100 μ l，置於 37 °C 培養箱中震盪 1 小時。將培養液吸起，排入含 50 μ g/ml AP 的 LB agar plate，以 L 型玻棒塗佈均勻後，放入 37 °C 培養箱中靜置 16 小時以上。

二、重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶 (m-NAD-ME) 的純化

1. 菌體培養

將野生型及突變種質體分別轉形於 BL-21 菌株，37 °C 隔夜培養於含 50 μ g/ml AP 的 3 ml LB 培養液 16 小時，以 1 : 100 的比例取出菌液，加到 250 ml 含 50 μ g/ml AP 的 LB 培養液於 37 °C 培養箱中震盪，直至 OD₆₀₀ 達 0.6 ~ 0.8 時 (約 2.5 小時)，加入 50 μ g/ml IAA 後放入 25 °C 培養箱中震盪培養 20 小時。再以 4 °C，以 15600 xg 離心 15 分鐘，使菌體沈積於離心管底部，倒掉上清液，將離心管冰存於 -20 °C 冰箱。

2. 管柱的充填與平衡 (本實驗使用管柱為親和性 5'-ATP 管柱 (Sigma))

(1) 管柱充填：秤取 5'-ATP agarose 粉末，加入去離子水溶解後，於 4 °C 環境中倒入管柱，使膠體高度約為 3 公分。

(2) 緩衝液的配製 AP：本實驗使用之緩衝液為緩衝液 B。每公升緩衝液 B 中含有 30 mM Tris-HCl、2 mM 2-mercaptoethanol、3 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、1 mM

MnCl₂。調整酸鹼值至 pH7.4 後其餘以去離子水補足。

- (3) 管柱平衡：親和性 5'-ATP 管柱第一次使用時，5' ATP agarose column 以管柱體積為基準，先後以 8 倍管柱體積的去離子水及緩衝液 B 流洗；當通過蛋白質溶液進行純化後，則先後以 8 倍管柱體積的 2.5 M NaCl、去離子水及緩衝液 B 洗滌管柱。

3.蛋白質的純化

首先取出存放於-20 °C 冰箱的菌體，加入 25 ml 的緩衝液 B 使均質化後，以超音波 (sonicator) 以振 2 秒停 5 秒的方式，共振盪 7 分鐘破碎菌體。接著於 4 °C 以 15600 xg 離心 20 分鐘，取出 100 µl 上清液進行蛋白質濃度測定、活性測定及 SDS-PAGE 鑑定。將其餘上清液倒入親和性 5'-ATP 管柱，以 6 倍管柱體積的緩衝液 B 流洗後，接著以含 4 mM NAD⁺的緩衝液 B 流洗 10 次，每次收集 3 ml，即可獲得本研究所需的人類粒線體蘋果酸酶蛋白質溶液。

4.蛋白質的濃度測定

本實驗以 Bio-Rad protein assay 的方式測定蛋白質濃度，此法係由 Bradford method 改良而來，其步驟如下：

(1)建立 Bovine serum albumin (BSA) 標準線

設計 BSA 濃度，分別取濃度 1.25~25 µg/ml 的 BSA，將每個樣本皆加去離子水定量至 800 µl，再加入 200 µl 酸性染劑 Coomassie Brilliant Blue G-250。將上述溶液加入 1 ml 比色管，混合均勻後靜置 15 分鐘，測定波長 595 nm 之吸光值，以吸光值相對於所含之 BSA 濃度訂出標準線。

(2)蛋白質濃度測定

將未知濃度的蛋白質溶液加入去離子水定量至 800 µl，再加入 200 µl 酸性劑 Coomassie Brilliant Blue G-250。將上述溶液加入 1 ml 比色管，混合均勻後靜置 15

分鐘，測定波長 595 nm 之吸光值，即可對照 BSA 濃度標準線推算出此樣品之蛋白質濃度。

5. 蛋白質的透析及濃縮

使用 Centricon 30000 (Amicon) 透析管以濃縮蛋白質溶液，並去除過多的 NAD^+ 及置換蛋白質溶液中的緩衝液。先將純化出之蛋白質溶液放入 Centricon 30000 上層管，於 4 °C 以 5000 xg (大管容量 15ml) 離心 15 ~ 20 分鐘，使上層管中溶液體積濃縮，再加入 10 倍體積 30 mM Tris-HCl 至上層管中，以同樣條件反覆離心至少 3 次後，即可獲得去除 NAD^+ 的濃縮蛋白質溶液。

6. 10% SDS-PAGE 分析：目的為鑑定蛋白質的純度含量及分子量

(1) 膠片製備

解析膠層 (Resolving gel)

取 4 ml 的去離子水、3.3 ml 30% acylamide mix、2.5 ml 下膠緩衝液 (pH8.8)、100 μl 10% SDS、100 μl 10% (W/V) ammonium persulfate (APS) 及 4 μl TEMED，混勻後立刻灌入已架好的玻璃，並以少量的水將液面壓平。

聚集膠層 (Stacking gel)

解析膠層凝固後，取 3.4 ml 的去離子水、0.83 ml 30% acylamide mix、0.63 ml 上膠緩衝液 (pH6.8)、50 μl 10% SDS、50 μl 10% (W/V) ammonium persulfate (APS) 及 5 μl TEMED，混勻後立刻灌入解析膠層上方，並插入間隔用齒梳，等待膠體凝固約 0.5~1 小時。

(2) 樣品處理及電泳進行

將樣品與 6x sample buffer 以 5:1 比例混合均勻，於 95 °C 加熱 10 分鐘後注入聚集膠層間隔，當樣品移動至聚集膠層時，以 120 伏特電壓進行電泳分析。

(3) 染色及退染

當指示染劑跑出解析膠層後即停止電泳，以 Brilliant Blue R-250 染色，30 分鐘後，倒掉 Brilliant Blue R-250 染色劑，並加入退染劑 (methanol 40% and glacial acetic acid 10%) 退染。

三、重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶 (m-NAD-ME) 酶動力學分析

1. 催化常數 (k_{cat}) 測定

人類粒線體蘋果酸酶的活性測定方法為參考文獻 (Loeber et al., 1994) 後再經修正而成。1 ml 標準反應液中含有 50 mM Tris-HCl (pH7.4) 、 15 mM malate (pH 7.4) 、 10 mM $MgCl_2$ 、 1 mM NAD^+ 及適量的蘋果酸酶，含反丁烯二酸的組別其濃度為 3 mM，其餘體積以去離子水補足。加入蘋果酸酶後，利用光譜儀測定波長 340 nm 吸光度之變化，並換算為每分鐘 NAD^+ 轉變為 NADH 的量。目前尚未確定當人類粒線體蘋果酸酶單元體單獨存在時是否具有酵素催化活性，因此本實驗以四聚體之分子量計算。

轉換率 (turnover number, k_{cat}) 計算方式：

$$k_{cat} (s^{-1}) = v / 6.22 / mg \text{ protein} \times 256000 / 60 / 1000$$

$$v = \Delta A_{340} / \text{min}$$

6.22 為 NADH 的 millimolar absorption coefficient

256000 為蘋果酸酶之四聚體分子量

60 為每分鐘內之秒數

2. 速率常數與基質的 K_m 值測定

分別在反丁烯二酸 (fumarate) 存在與否的狀況測定蘋果酸、鎂離子、及 NAD^+ 的 K_m 值。進行測定時只改變其中一種反應基質之濃度，控制變化範圍約為 K_m 濃度上下各十倍；其餘的基質濃度則為固定值，本實驗中固定的基質濃度分別為 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、15 mM malate (pH 7.4)、10 mM $MgCl_2$ 及 1 mM NAD^+ 。將測得吸光變化值 ($\Delta A_{340} / \text{min}$) 對應變化的基質濃度，以下列公式計算，求得精確的 K_m 值或 K

值與 h 值。

當速率對基質呈現一飽合曲線，則以軟體 Prism 3.0 處理計算

Michaelis-Menten equation :

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$$

若速率對基質呈現一 sigmoid 曲線，則以軟體 Sigmaplot 8.0 處理計算

Hill equation :

$$v = V_{\max} [\text{malate}]^h / (K_{0.5}^h + [\text{malate}]^h)$$

h 值為 hill coefficient

3. 腺苷三磷酸的活性抑制反應及 K_i 值 (抑制常數) 測定

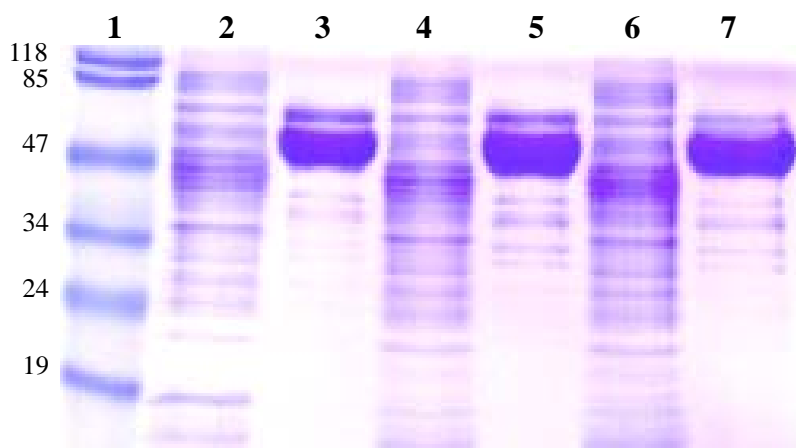
已知腺苷三磷酸為人類粒線體蘋果酸酶的活性抑制劑，故在不同腺苷三磷酸濃度下 (0~1M)，觀察基質濃度對酶反應速度的影響。以軟體 Prism 4.0 處理，分別測定 NAD^+ 、 NADP^+ 的 K_i 值。本實驗中固定的基質濃度分別為 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、15 mM malate (pH 7.4) 及 10 mM MgCl_2 。以 SigmaPlot 8.0 處理，以下列公式計算：

$$v = V_{\max} [S] / ([S] + K_m / (1 + [ATP] / K_{i,ATP}))$$

(三)、結果

一、重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶之純化

重組人類粒線體蘋果酸酶野生型和突變型 (K346A 及 K346S) 菌體均能順利培養及誘導表現標的蛋白質，經 5'-ATP 管柱純化後能獲得純度高且大量的蛋白質，便於進行後續動力學實驗。SDS-PAGE 電泳圖(圖四)顯示純化後野生型及突變型重組酵素之純度皆達 90 % 以上，分子量約為 62 kDa，與預期獲得之人類粒線體蘋果酸酶的分子量吻合。



圖四、大量表現及純化重組野生型及突變型 K346A、K346S 之蛋白質，用 SDS/PAGE 來表示純化和表現的效能。

Lane 1: marker

Lane 2: 重組野生型大腸桿菌粗萃取液

Lane 3: 重組野生型經 5'-ATP 管柱純化之酶溶液

Lane 4: K346A 大腸桿菌粗萃取液

Lane 5: K346A 經 5'-ATP 管柱純化之酶溶液

Lane 6: K346S 大腸桿菌粗萃取液

Lane 7: K346S 經 5'-ATP 管柱純化之酶溶液

二、重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶之基礎動力學分析

1. Apparent K_m 值的分析

利用軟體 Prism 3.0 及 Sigmaplot 8.0 計算，探討重組野生型及突變型人類粒線

體蘋果酸酶之 apparent K_m 結果。 $K_{m, \text{malate(NAD)}}$ 和 $K_{m, \text{malate(NADP)}}$ (表一) 實驗的結果顯示重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶對 malate 的 K_m 值並無明顯差異，且加入 3mM 的反丁烯二酸後， K_m 值亦無明顯變化。在 $K_{m, \text{malate(NAD)}}$ 實驗中，重組野生型、K346A、K346S 分別在無反丁烯二酸的 K_m 值為有反丁烯二酸存在的 K_m 值的 3.94 倍、1.51 倍、及 1.49 倍。在 $K_{m, \text{malate(NADP)}}$ 實驗中，重組野生型、K346A、及 K346S 分別在無反丁烯二酸的 K_m 值為有反丁烯二酸存在的 K_m 值的 3.60 倍、1.54 倍、及 1.58 倍。

比較 $K_{m, \text{NAD}}$ 和 $K_{m, \text{NADP}}$ 之測定值 (表二) 顯示很大的差異性，人類粒線體蘋果酸酶對 NAD^+ 和 NADP^+ 的親和性明顯不同，不論是重組野生型或突變型都偏好利用 NAD^+ 為輔助因子。在 $K_{m, \text{NAD}}$ 中，重組野生型和 K346A 在加入反丁烯二酸後 K_m 的下降分別為 3.56 倍和 1.48 倍，K346S 則不論是否加入反丁烯二酸，兩者間的 K_m 接近，其對 NAD^+ 的親和性比野生型略低，所得到的 K_m 值較大，當加入反丁烯二酸反應， K_m 值則下降 1.52 倍。在 $K_{m, \text{NADP}}$ 方面，重組野生型對於 NADP^+ 的利用較差，K346A 之 K_m 值在未加入反丁烯二酸前為加入反丁烯二酸後的 1.23 倍，而 K346S 之 K_m 值在未加入反丁烯二酸前為加入反丁烯二酸後的 1.93 倍，較接近重組野生型酵素的數據。眾多 apparent K_m 測定結果顯示加入反丁烯二酸後，重組野生型及突變型之 K_m 值下降倍數並無很大的差異。

2. k_{cat} 分析

重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶對於 NAD^+ k_{cat} 值普遍比 NADP^+ k_{cat} 值高 (表二)，無論有無反丁烯二酸，野生型及突變型間的 k_{cat} 值並無明顯差異； NAD^+ k_{cat} 測定實驗發現，突變型 K346A 的數值下降 50%，K346S 則下降 70%，但 NADP^+ k_{cat} 測定實驗中，K346A 僅些微下降，而 K346S 則明顯提升 3 倍。本實驗結果顯示加入反丁烯二酸後，的確增加了野生型及突變型的 k_{cat} 值，其倍數並無很大的差異。

3. Hill 係數 (h 值) 分析

由 $K_{m, \text{NAD}}$ 、 $K_{m, \text{NADP}}$ 實驗結果中發現，重組野生型蘋果酸酶對於蘋果酸 (malate)

利用呈現 Sigmoid 曲線，故後續實驗改變活化劑反丁烯二酸的濃度 (0 mM, 0.2 mM, 3 mM)，以探討 h 值的變化 (表一、圖五)。未加入反丁烯二酸時無論以 NAD^+ 或 NADP^+ 作輔酶，皆得到的正協同作用。在 0 mM 反丁烯二酸濃度，重組野生型的 h 值分別為 1.93 及 1.94，隨著反丁烯二酸的增加，越接近飽和的趨勢，在 3 mM 反丁烯二酸濃度，其 h 值分別為 1.04 及 1.15，突變型也具有相同的趨勢而使正協同作用消失。

三、重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶對腺苷三磷酸之活性抑制分析

1. 腺苷三磷酸對重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶的抑制

利用不同濃度的腺苷三磷酸 (0 ~ 3 mM)，分別探討不同基質的條件是否影響重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶抑制作用。實驗結果發現，無論以 NAD^+ 或 NADP^+ 為反應基質，重組野生型受到抑制的情形均較突變型明顯 (圖六)。

2. 重組野生型及突變型人類粒線體蘋果酸酶的抑制 K_i 值比較

探討在不同基質的情況下，腺苷三磷酸對重組野生型蘋果酸酶的抑制情形，其雙倒數圖均交於 y 軸 (圖七)，故腺苷三磷酸對 NAD^+ 與 NADP^+ 皆為競爭型抑制劑，而在突變型 Q362K 也呈現相同的抑制情形。以不同濃度的腺苷三磷酸 (0、0.4、0.8、1.2mM)，得到分別在輔酶 NAD^+ 與 NADP^+ 的 K_i 值。而在 $K_{i,\text{NAD}}$ ，重組野生型和 K346S 分別為 0.30 和 2.23 (表三)。在 $K_{i,\text{NADP}}$ 則為 0.33 和 2.23 (表三)，顯示無論以 NAD^+ 或 NADP^+ 為基質，K346S 對腺苷三磷酸的親和性較重組野生型較低。

表一、重組野生型及突變型(K346A,K346S)人類粒線體蘋果酸酶對 Malate (NAD/NADP) 之

K_m 、 h

		$K_{0.5, Malate(NAD)}$	$h_{(NAD)}$	$K_{0.5, Malate(NADP)}$	$h_{(NADP)}$
Wild-Type	(-)	12.84±0.48	1.93±0.10	15.50±0.78	1.94±0.14
	(+)	3.26±0.50	1.04±0.12	4.31 ±0.66	1.15±0.13
K346A	(-)	6.78±0.77	1.45±0.19	9.31±0.92	1.54±0.16
	(+)	4.48±0.20	1.00±0.04	6.06±0.97	1.02±0.11
K346S	(-)	13.12±0.87	1.46±0.10	6.70±0.39	1.67±0.13
	(+)	8.82±1.04	1.05±0.09	4.23±0.28	1.16±0.07

(-):0 mM fumarate (+):3mM fumarate

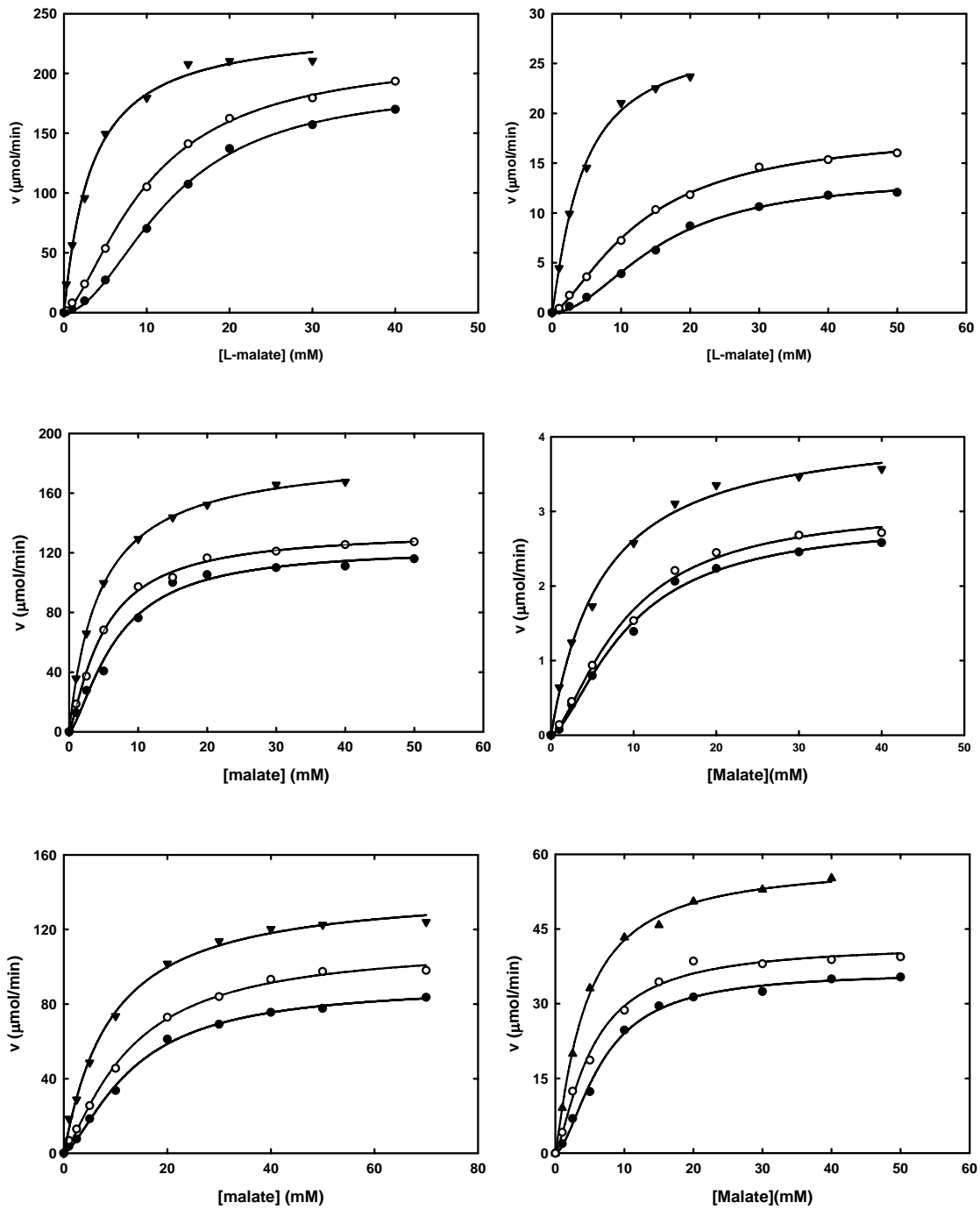
表二、重組野生型及突變型(K346A,K346S)人類粒線體蘋果酸酶對 NAD(P)⁺之 K_m 、 K_{cat}

		$K_{m, NAD}$	k_{cat}	$K_{m, NADP}$	k_{cat}
Wild-Type	(-)	0.57±0.11	119.42	1.57±0.32	6.71
	(+)	0.16±0.04	174.40	1.19±0.14	13.96
K346A	(-)	0.43±0.05	58.58	2.44±0.32	2.63
	(+)	0.29±0.06	80.95	1.99±0.27	3.34
K346S	(-)	1.60±0.20	40.30	1.39±0.33	22.25
	(+)	1.05±0.17	51.26	0.72±0.10	29.29

(-):0 mM fumarate (+):3mM fumarate

表三、重組野生型及突變型(K346A,K346S)人類粒線體蘋果酸酶對 NAD(P)⁺之 K_i

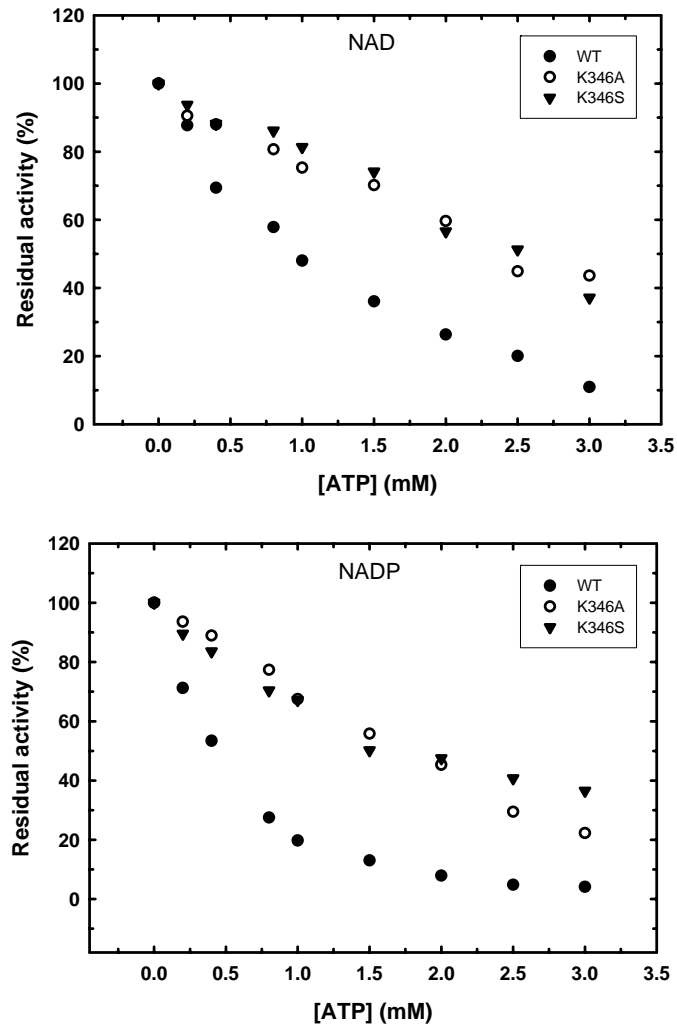
	$K_{i ATP(NAD)}$	$K_{i ATP(NADP)}$
Wild-Type	0.30±0.04	0.33±0.03
K346A	1.74±0.22	1.80±0.15
K346S	2.23±0.12	2.23±0.14



圖五、人類粒線體蘋果酸酶重組野生型和突變型 K346A 和 K346S 分別於 0mM(●)、0.2mM(O)

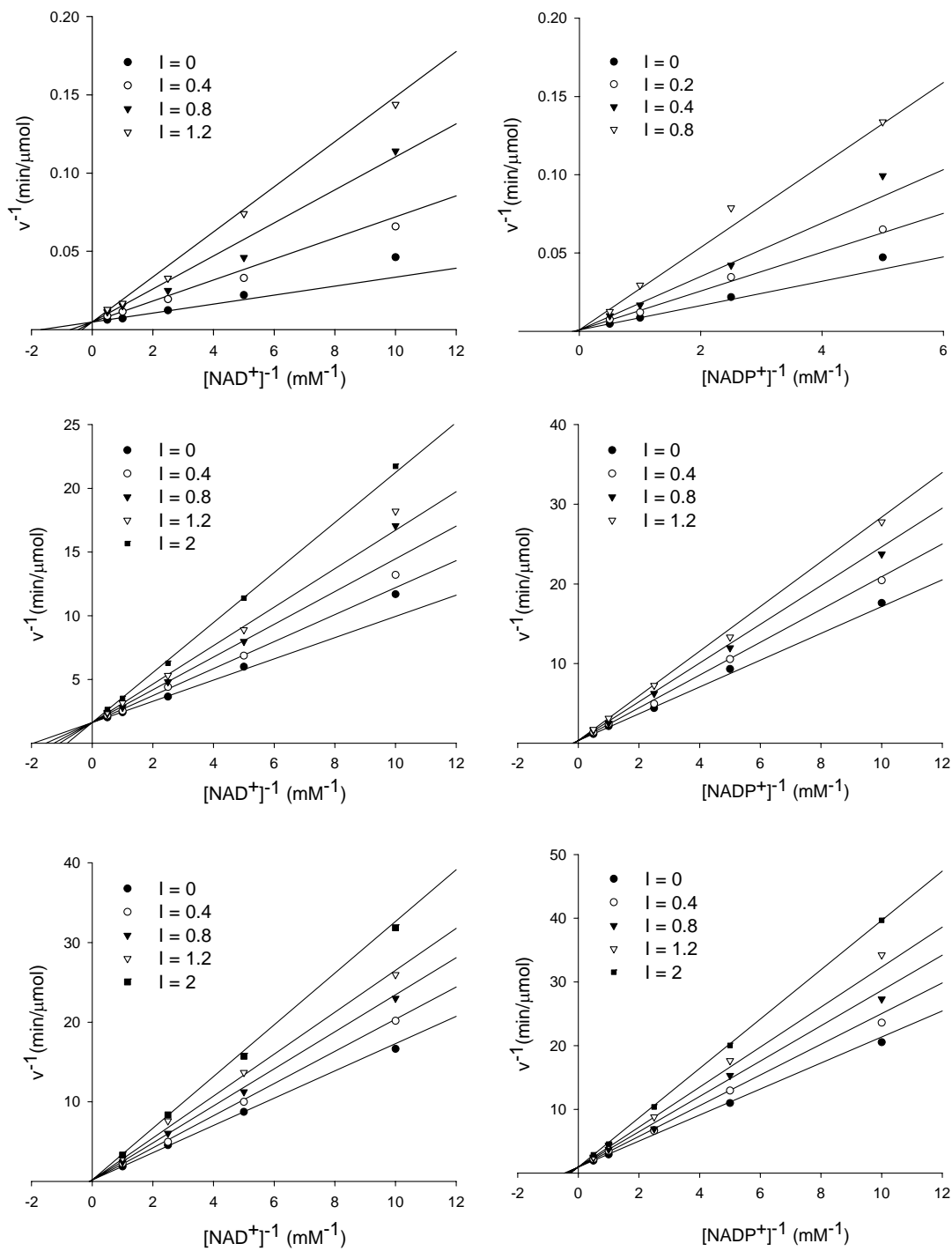
和 3mM(▼) fumarate 測定 $K_{m, malate}$

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| (A) 重組野生型以 NAD^+ 為輔因子測定 | (B) 重組野生型以 $NADP^+$ 為輔因子測定 |
| (C) K346A 以 NAD^+ 為輔因子測定 | (D) K346A 以 $NADP^+$ 為輔因子測定 |
| (E) K346S 以 NAD^+ 為輔因子測定 | (F) K346S 以 $NADP^+$ 為輔因子測定 |



圖六、人類粒線體蘋果酸酶重組野生型和突變型 K346A 和 K346S 受到腺苷三磷酸的抑制百分比圖

(A) 以 NAD^+ 為輔因子測定 (B) 以 NADP^+ 為輔因子測定



圖七、人類粒線體蘋果酸酶重組野生型和突變型 K346A 和 K346S 受到腺苷三磷酸的競爭型抑制百分比圖

(A) 重組野生型以 NAD^+ 為輔因子測定

(B) 重組野生型以 NADP^+ 為輔因子測定

(C) K346A 以 NAD^+ 為輔因子測定

(D) K346A 以 NADP^+ 為輔因子測定

(E) K346S 以 NAD^+ 為輔因子測定

(F) K346S 以 NADP^+ 為輔因子測定

(四)、討論與應用

討論：

一般哺乳動物中蘋果酸酶具有三種異構形型，分別為 c-NADP-ME、m-NADP-ME 和 m-NAD-ME，其中僅 m-NAD-ME 能夠利用 NAD^+ 及 NADP^+ 為輔酶，但以利用 NAD^+ 為主，人類粒線體蘋果酸酶即屬此型 (EC 1.1.1.39)。比較三種異構形型蘋果酸酶與輔酶相關的序列發現，第 346 號胺基酸在 c-NADP-ME 和 m-NADP-ME 中為絲胺酸 (Ser, S)，而在 m-NAD-ME 為離胺酸 (Lys, K)，其中 c-NADP-ME 的研究顯示此一位置對於 NADP^+ 選擇性扮演一重要角色 (Chang et al., 2003)。因此，本研究以人類粒線體蘋果酸酶 (m-NAD-ME) 為標的，將其 K346 之位置突變成在 c-NADP-ME、m-NADP-ME 有高度保留性的絲胺酸 (Ser, S) 及不帶電的丙酮酸 (Ala, A)，以探討突變型人類粒線體蘋果酸酶對 NAD^+ 和 NADP^+ 的親和性造成的影響。

研究結果顯示突變型 K346S 與 K346A 對輔酶 NAD(P)^+ 親和性測得數據並無明顯不同，二者之 $K_{m,\text{Malate}}$ 及 $K_{m,\text{NAD(P)}}$ 測定結果都與重組野生型無明顯差異，表示突變型並不會嚴重影響人類粒線體蘋果酸酶對基質 malate 及 NAD(P)^+ 的親和性。然而，當 K346S 以 NADP^+ 作為輔酶時，則發現提高了反應速率且 k_{cat} 值明顯提升，所以將 K346 改成 NADP^+ -dependent ME 具高度保留性的 Ser，的確能穩定 NADP^+ 於活性中心，因此提高催化反應效率。

加入活化劑反丁烯二酸 (fumarate) 皆降低蘋果酸 (malate)、 NAD^+ 和 NADP^+ 的 K_m ，使輔酶與人類粒線體蘋果酸酶的親和力上升。由 $K_{m,\text{Malate}}$ 測定結果中觀察到人類粒線體蘋果酸酶對 malate 具正協同作用，在反丁烯二酸作用下，則使原本具有正協同作用之蘋果酸酶失去協同作用。突變型 K346S 與 K346A 也發生相同情況，都得到相似的 h 值，表示此 346 之胺基酸的突變不會影響反丁烯二酸活化與正協同作用的機制。

腺苷三磷酸 (ATP) 為人類粒線體蘋果酸酶的活性抑制劑，其雙倒數圖均交於 y 軸，顯示腺苷三磷酸是人類粒線體蘋果酸酶競爭型抑制，無論是重組野生型或突變型，腺苷三磷酸和 NAD^+ 或 NADP^+ 競爭相同的位置。由抑制實驗得知，重組野生型或突變型不論以何種輔酶參與反應，受到腺苷三磷酸的抑制能力相同，表示突變型不會因改變

其對輔酶的選擇性而影響腺苷三磷酸之抑制能力。但比較重組野生型與突變型則可發現突變型較不受到腺苷三磷酸抑制，推測可能是因為野生型原本帶正電的 Lys 具有穩定帶負電之腺苷三磷酸，突變株則否，所以突變型對腺苷三磷酸的親合力降低。

整體而言，改變活性中心內的 K346 對於基質的利用並無明顯差異，但改變原本人類粒線體蘋果酸酶對 NAD^+ 及 NADP^+ 的選擇性。K346 突變成 Ser 對於 NADP^+ 的催化效能明顯提升，同時亦降低腺苷三磷酸對蘋果酸酶的抑制性；突變成不帶電的 Ala 則使酵素活性明顯降低，且不影響酵素對 NAD^+ 及 NADP^+ 的偏好。藉由本實驗，可知此蘋果酸酶的 K346 胺基酸位置對 NAD^+ 及 NADP^+ 的選擇性非常重要，此研究結果係由酵素動力學的角度更了解人類粒線體蘋果酸酶活性中心和輔酶 NAD(P)^+ 間的作用。

應用：

人類粒線體蘋果酸酶可應用於抗癌藥物發展，因為它能幫助腫瘤細胞分解穀胺酸以獲得能量，了解人類粒線體蘋果酸酶之催化反應能協助設計具專一性的新穎活性抑制劑，藉由抑制酵素活性中心以阻斷癌細胞之能量來源，預期可抑制腫瘤細胞生長。

(五)、參考文獻

Gu-Gang Chang and Liang Tong

Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry*. 2003 Nov 11;42(44):12721-33

Yang, Z., Zhang, H., Hung, H. C., Kuo, C. C., Tsai, L. C., Yuan, H. S., Chou, W.

Y., Chang, G. G., and Tong, L.

Structural studies of the pigeon cytosolic NADP^+ -dependent malic enzyme. *Protein Sci*. 2002 ;11, 332-341

Hsieh JY, Liu GY, Chang GG, Hung HC.

Determinants of the dual cofactor specificity and substrate cooperativity of the human mitochondrial NAD(P)^+ -dependent malic enzyme: functional roles of glutamine 362. *J. Biol. Chem*. 2006 Aug 11;281(32):23237-45

Xu, Y., Bhargava, G., Wu, H., Loeber, G., and Tong, L.

Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)^+ -dependent malic enzyme: a new class of

oxidative
decarboxylases. *Structure* 1999 ;7, 877-889

評語

此研究在探討粒腺體蘋果酸酶的 NAD⁺結合位置的 amino acid.作者對 amino acid 的結構瞭解不夠深入，因此很難解釋 amino acid 的改變對 NAD⁺結合變化的分子機制，綜合言之，作者對生物化學的基本知識有待加強。