

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系
博士論文



Department of Biochemical Science and Technology
College of Life Science
National Taiwan University
Doctoral Dissertation

阿拉伯芥植物螯合素合成酶第二基質結合位及轉譯後修飾
之研究

Characterization of the Second Substrate Binding Site and
Post-Translational Modification in Arabidopsis Phytochelatins
Synthase

賈儒珍

Ju-Chen Chia

指導教授：莊榮輝 博士
Advisor: Rong-Huang Juang, Ph.D.

中華民國 103 年 1 月

January, 2014





國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：阿拉伯芥植物螯合素合成酶第二基質結合位及轉譯後修飾之研究

英文題目：Characterization of the second substrate binding site and post-translational modification in Arabidopsis phytochelatin synthase

本論文係 賈儒珍 君（學號 D96b47202）在國立臺灣大學生化科技學系完成之碩（博）士學位論文，於民國 102 年 12 月 26 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：莊榮輝 (簽名)

陳翰民 (指導教授)

張世豪

吳祜如

楊健志

系主任、所長

黃慶璋 (簽名)



致 謝



六年半的博士班生涯即將在完成這本論文之後劃下句點。回顧從助理工作開始，在生化社區這個大家庭生活八年多來的點點滴滴，我懷抱著無限的感謝。

我很幸運，在念博士班的漫漫長路上遇到許多貴人。首先要感謝的就是莊榮輝老師。老師在各方面都是我學習的對象，教我用客觀的角度、更大的格局分析一個現象，試著提出對的問題。老師對於教授課程認真的態度和靈活的教學方法，讓我在當 TA 時受用無窮。我也很感謝老師日常生活中的照顧，讓我待在實驗室也有家的感覺；常常對時事忿忿不平的我，可以對老師暢所欲言，並且在與老師聊完之後得新的觀點。這篇論文能夠完成，我也要感謝楊健志老師的諸多幫助。楊老師總是很有耐心的回答我各種問題，大方出借生長箱讓我的轉殖株有個家，並且在我對未來感到疑惑的時候告訴我人生的意義。此外，我也非常感謝張世宗老師。我一開始的重組 DNA 實驗幾乎都是在張老師實驗室進行的；能夠得到卓越 TA 也都是因為擔任張老師的生化課助教。每次與張老師一起討論實驗或工作，都是寶貴的經驗。吳裕仁老師和陳翰民老師每次見面時一定會為我加油打氣，給我正面的力量；生化社區的王愛玉老師、黃楓婷老師和廖憶純老師帶給我亦師亦友的關懷，這一切都讓我倍感溫暖。

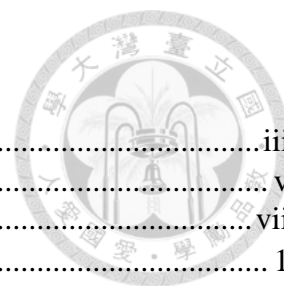
這些日子我認識了非常多朋友。感謝信傑學長帶領我認識 PCS 這個題目；龍哥時常幫忙解決實驗室的各種疑難雜証，堪稱 520 的多啦 A 夢；皮蛋則是我認識最冷靜客觀的人，不但在我最需要幫助的時候陪伴在身邊，也會幫忙分析我的盲點。與宏祥、均全、和成、俐惟、怡君、思翰和驊珊的友誼，讓我枯燥的生活多了許多樂趣。還有與我一起研究 PCS 的歆祐、子瑜和怡靜，謝謝你們時常滿足我無理的要求，幫我釐清許多問題。明孝、又楷、政宏、于嫻、彥宏和依汝，謝謝你們讓實驗室充滿歡樂，以後也請繼續為科學奮鬥喔！此外，我也很感謝 510 的毛毛學長和艾玲學姐，給我許多實驗上的建議。博士班進度報告總是被排在一起的景興、毅霖和玉嬌，能與你們一起為相同的目標奮鬥，讓我覺得念博士班沒有那麼孤單了。515 台柱辛永誠，你是我在生化社區的最佳夥伴。還有好多好多朋友們，我沒有提到你們的名字並不是因為不重要，而是因為你們早已成為我人生的一部分。

念博士班的過程中，我很幸運地能夠擔任教學發展中心的 TA pilot。謝謝紋霞老師帶領我認識 ISW，以及中心夥伴旨彥、依帆、怡葳、妍慧、雅雯和盈君陪伴在我身邊。儘管生活中總是有壓力存在，只要與妳們相處就會覺得世界是美好的。還有一起為 Coursera 課程打拼的葉丙成老師和韶維，謝謝你們帶給我這麼美好而特別的工作經驗。我很開心在博二那年決定報名 TA pilot 並且堅持了下來，才能得到這麼多美好的回憶。

最後，也是最重要的，我要感謝家人無私的愛。父母親從小到大總是給我最好的，包容我的一切，讓我能沒有顧慮的追求夢想。還有從我大學就一直照顧我到現在的大伯大媽，謝謝您們！得到博士學位並不是終點，而是更多挑戰的開端。感謝我所有的親人和朋友，幫助我成為一個更好的人。



目錄



中文摘要.....	iii
Abstract	v
縮寫表.....	vii
第一章 緒論.....	1
1.1 重金屬與環境.....	1
1.1.1 重金屬的定義.....	1
1.1.2 重金屬之毒害.....	1
1.1.3 清除重金屬的方法.....	2
1.1.4 植物金屬螯合素.....	2
1.2 植物螯合素合成酶之特性.....	3
1.2.1 植物螯合素合成酶基因家族.....	3
1.2.2 植物螯合素合成酶之生理功能.....	4
1.2.3 植物螯合素合成酶轉殖株之性狀.....	5
1.2.4 植物螯合素合成酶之表現與調控.....	6
1.3 植物螯合素合成酶之活性催化機制.....	8
1.3.1 植物螯合素合成酶之蛋白質構造.....	8
1.3.2 植物螯合素的合成機制.....	9
1.3.3 植物螯合素合成酶的基質結合區.....	10
1.4 研究動機.....	11
第二章 材料與方法.....	13
2.1 材料.....	13
2.1.1 菌株.....	13
2.1.2 植物材料.....	13
2.2 載體之構築.....	13
2.2.1 點突變技術 (site-direct mutagenesis).....	13
2.2.2 <i>P. pastoris</i> 表現系統之載體構築.....	14
2.2.3 阿拉伯芥轉殖載體之構築.....	14
2.3 重組蛋白質之表現與純化.....	15
2.3.1 <i>E. coli</i> 表現系統.....	15
2.3.2 <i>P. pastoris</i> 表現系統.....	15
2.3.3 表現蛋白質之純化.....	16
2.3.4 表現蛋白質之二維電泳 (2-dimensional electrophoresis).....	16
2.4 PCS 活性分析.....	17
2.4.1 PCS 活性分析及活性單位之計算.....	17
2.4.2 酵素動力學分析.....	18
2.4.3 表現蛋白質去磷酸化處理.....	18
2.5 阿拉伯芥轉殖.....	18
2.5.1 農桿菌轉殖法.....	18
2.5.2 轉殖株篩選.....	19
2.5.3 RNA 之抽取及半定量 RT-PCR.....	19
2.5.4 Western blot.....	20
2.6 阿拉伯芥鎘逆境處理及性狀分析.....	20

2.7 阿拉伯芥內生性 AtPCS1 之純化.....	20
2.8 其他分析方法.....	21
2.8.1 AtPCS1 鎘結合能力之測定.....	21
2.8.2 AtPCS1 分子模型之建立.....	21
2.8.3 蛋白質身分及轉譯後修飾之鑑定.....	22
2.8.4 Pro-Q diamond 染色法.....	22
第三章 結果與討論.....	27
3.1 PCS 序列和結構分析.....	27
3.1.1 植物螯合素合成酶胺基酸序列比對.....	27
3.1.2 AtPCS1 分子模型之建立.....	27
3.2 AtPCS1 第二基質結合位之研究.....	37
3.2.1 第二基質結合區之重要胺基酸.....	37
3.2.2 Tyr55 可能與第二基質上的金屬離子結合.....	42
3.2.3 AtPCS1 第二基質結合區之分子機制.....	51
3.3 AtPCS1 之磷酸化後修飾.....	54
3.3.1 以酵母菌系統表現 AtPCS1.....	54
3.3.2 以 <i>P. pastoris</i> 生產的 AtPCS1 有磷酸化現象.....	57
3.3.3 AtPCS1 的磷酸化修飾位置.....	61
3.3.4 Ser13 和 Ser352 磷酸化修飾位置序列分析.....	67
3.3.5 Ser13 和 Ser352 磷酸化會影響蛋白質活性.....	69
3.3.6 阿拉伯芥 AtPCS1-S13A、S352A 補償性轉殖株之建立.....	72
3.3.7 阿拉伯芥 AtPCS1-S13A、S352A 補償性轉殖株之基因表現.....	80
3.3.8 AtPCS1 磷酸化位置突變會影響阿拉伯芥對鎘之耐受性.....	82
3.4 阿拉伯芥內生性 PCS 之純化.....	87
3.4.1 部分純化阿拉伯芥內生性 PCS.....	87
3.4.2 LC-MS/MS 身份鑑定.....	88
第四章 總結.....	95
參考文獻.....	97
問答錄.....	105

中文摘要



植物螯合素 (phytochelatin, PC, $\gamma(\text{Glu-Cys})_2\text{-Gly}$) 存在於細胞質中，可與外來的鎘離子結合並將其運送至液泡中隔離，是植物抵抗入侵重金屬的重要方法。PC 的合成反應由植物螯合素合成酶 (PC synthase, PCS; EC 2.3.2.15) 所催化，已知此反應利用兩種基質進行 ping-pong mechanism，分別為 glutathione (GSH, $\gamma\text{Glu-Cys-Gly-GSH}$) 和另一種與金屬結合的 glutathione 衍生物 (Cd-GS_2)。目前的研究尚未完全了解 PCS 的構造與基質結合機制，因此本論文利用 cyanobacterium *Nostoc* PCS (NsPCS) 的結晶構造為模板，模擬出阿拉伯芥 AtPCS1 活性區序列 (residues 12-218) 的立體構形。在這個模擬結果上觀察到第一基質結合區附近有另一個口袋，推測可能是第二基質結合區。這個口袋由三個 loops 組成，我們分別將這些 loops 上的保守性胺基酸序列突變，並確認它們對活性的貢獻。其中最特別的是 Arg152 和 Lys185，這兩個胺基酸位於第二基質結合口袋的表面，可能會利用側基上的正電荷與 GSH 上的羧基結合，幫助基質以正確的角度進入活性區。另一方面，Tyr55 的突變會降低 AtPCS1 對第二基質的親和力，而且此胺基酸具有結合金屬的能力；這兩個結果顯示 Tyr55 可能是以芳香基團上的 π 電子與第二基質上的 Cd 進行結合。綜合第二基質結合區的研究結果，本研究推測第二基質可能需要 Tyr55、Arg152 和 Lys185 協同作用才能進入活性區，與 $\gamma\text{Glu-Cys}$ 結合生成 PC。

除了第二基質結合位的探討之外，本論文也針對 AtPCS1 的磷酸化後修飾進行研究。先前的研究已確定 AtPCS1 的磷酸化修飾位於 Thr49，這個保守性胺基酸可能會與鄰近的 Arg183 形成離子鍵，固定活性反應區的立體結構，因而影響了 PCS 的催化活性。另外，本論文以酵母菌 *Pichia pastoris* 表現系統生產帶有轉譯後修飾的 AtPCS1，並且用 LC-MS/MS 鑑定其上的磷酸化位置，找到兩個新的磷酸化修飾位 Ser13 和 Ser352。將這兩個胺基酸突變之後會使得 PCS 的催化活性下降，但其影響力不如 Thr49 來得重要。為了得知這兩個磷酸化修飾位點的生理功能，進一步將 PCS-S13A、S352A 以及 S13A-S352A 雙重突變株表現於阿拉伯芥 *cad1-3* 中，篩選出能穩定表現 AtPCS1 突變蛋白質的轉殖株。相較於能表現 AtPCS1 正確序列的植株，S13A 和 S352A 轉殖株對重金屬的耐受性較低，顯示 Ser13 和 Ser352 確

實是具有生理意義的兩個磷酸化位置。綜合這個部分的結果，本論文已經逐步瞭解 AtPCS1 可能是由轉譯後修飾來調控其活性，而且這些磷酸化修飾在阿拉伯芥的重金屬耐受機制上扮演重要角色。

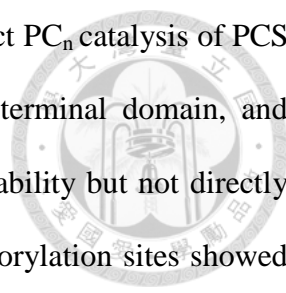
關鍵字：植物螯合素，植物螯合素合成酶，酵素催化機制，阿拉伯芥，轉譯後修飾，重金屬逆境

Abstract



Phytochelatase (PCS) uses the substrates glutathione (GSH, γ Glu-Cys-Gly) and a cadmium (Cd)-bound GSH ($\text{Cd}\cdot\text{GS}_2$) to produce the shortest phytochelatase product (PC_2 , $(\gamma\text{Glu-Cys})_2\text{-Gly}$) through a ping-pong mechanism. The binding of the 2 substrates to the active site, particularly the second substrate binding site, is not well-understood. In this study, we generated a structural model of the catalytic domain of Arabidopsis AtPCS1 (residues 12–218) by using the crystal structure of the γ Glu-Cys acyl-enzyme complex of the PCS of the cyanobacterium *Nostoc* (NsPCS) as a template. The modeled AtPCS1 revealed a cavity in proximity to the first substrate binding site, consisting of 3 loops containing several conserved amino acids including Arg152, Lys185, and Tyr55. Substitutions of these amino acids (R152K, K185R, or double mutation) resulted in the abrogation of enzyme activity, indicating that the arrangement of these 2 positive charges is crucial for the binding of the second substrate. Recombinant AtPCS1s with mutations at Tyr55 showed lower catalytic activities because of reduced affinity (3-fold for Y55W) for the $\text{Cd}\cdot\text{GS}_2$, further suggesting the role of the cation- π interaction in recognition of the second substrate. Our study results indicate the mechanism for second substrate recognition in PCS. The integrated catalytic mechanism of PCS is further discussed.

Besides the effects of metal ions on substrate binding mechanism, the post-translational activation of PCS via phosphorylation was also discussed in this study. Previous studies had revealed that Thr49 is the site for phosphorylation and play an important role in the formation of the active site through the interaction with Arg183. In addition, Ser13 and Ser352 were also identified as phosphorylation sites of AtPCS1 expressed in *Pichia pastoris* expression system. In contrast with the activity of T49A



mutant, mutations on these Ser residues did not significantly affect PC_n catalysis of PCS. Ser352 was located on the heavy metal binding motifs on C-terminal domain, and phosphorylation on this site might involve in the metal-binding ability but not directly influence the catalysis of the enzyme. Besides, these Ser phosphorylation sites showed their identity in Arabidopsis. In the modest cadmium concentration, wild type Arabidopsis and PCS1 complementary lines were more tolerant than S13A and S532A lines, indicating that the phosphorylation sites on AtPCS1 are important for cadmium resistance of Arabidopsis. In summary, our data demonstrated that PCS activity is regulated via post-translational modification, and phosphorylated AtPCS1 may play critical roles in heavy metal stress in Arabidopsis.

Key word: phytochelatin, phytochelatin synthase, enzyme catalysis, Arabidopsis, post-translational modification, heavy metal stress

縮寫表



AtPCS1, *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1

PC, phytochelatin, γ -(Glu-Cys)_n-Gly

GSH, glutathione, γ -Glu-Cys-Gly

DTT, dithiothreitol

β -ME, β -mercaptoethanol

CBR, Coomassie Brilliant Blue R-250

TFA, trifluoroacetic acid

RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction

BSA, bovine serum albumin

CIP, calf intestinal alkaline phosphatase

CK2, casein kinase 2



第一章 緒論



1.1 重金屬與環境

1.1.1 重金屬的定義

日常生活中提到的重金屬有許多種不同的定義，科學上定義密度大於 5 g/cm^3 以上的金屬即為重金屬。而在環境污染層面，重金屬主要是指對生物有明顯毒害作用而且不易被代謝者，例如汞、鎘、鋅、銅、鉛、砷等。由於重金屬密度較大，在地殼表面的含量通常不高，但是經由冶煉等工業技術，地表環境中的重金屬含量逐漸增加，因此造成許多重金屬污染的問題。

1.1.2 重金屬之毒害

重金屬在大氣、水、土壤、生物體中廣泛分布，尤其以土壤的重金屬儲存量最多。植物吸收了土壤中的重金屬之後，生長容易受到抑制。重金屬對植物的毒害主因可能分為三點：(1) 對細胞造成氧化還原壓力，(2) 與特殊官能基結合、抑制其功能 (3) 取代輔助因子與蛋白質結合，抑制酵素作用 (Schützendübel and Polle, 2002; Küpper et al., 2007)。相同的，人體若吸收了重金屬，也會威脅到體內的正常代謝作用。重金屬會和體內的多種蛋白質相互結合，使它們失去活性，也可能聚集在某些器官，造成慢性或急性中毒。例如早年臺灣曾經發生鎘和砷污染，引發當地居民的痛痛病及烏腳病 (翁震圻, 2006)。

另一方面，一些在定義上屬於重金屬的元素，在生物的代謝中扮演相當重要的角色，這一類的金屬被稱之為必需金屬元素 (essential elements)，如銅、錳、鈷、鐵、鋅等 (Mengel and Kirkby, 1987)。它們在酵素中經常扮演輔助因子 (cofactor)，負責調節酵素活性的高低，或是參與氧化還原反應。因此缺乏此類金屬元素時，常常會引起生長發育上的問題，例如植物缺乏鐵離子時，葉片會出現黃化、生長遲緩等現象。這類金屬在極高的濃度之下才會對植物造成傷害。例如高濃度的銅離子使得細胞內氧化還原反應失衡，在短時間內破壞正常的代謝路徑，造成植物快速死亡 (Gaetke and Chow, 2003)。

1.1.3 清除重金屬的方法

由於重金屬進入土壤後容易與有機物質、氧化物或黏土礦物等結合，而使得自身的移動性 (mobility) 或生物有效性 (bioavailability) 大幅降低，因此土壤中的重金屬污染一般來說不容易清除，回復原來的地力。臺灣目前的土壤重金屬污染整治技術主要有四種策略，分別為翻土稀釋法、化學穩定法、土壤酸洗法和植物復育法 (phytoremediation) (Chang et al., 2011; Olaniran et al., 2013)。前三種方法成本較高昂，而且容易對土壤結構造成二次傷害。而植物復育法不但適合用於大面積、中低污染濃度的土地，而且整治費用相對地較低，因此成為目前最常用的一種土壤整治技術。

植物復育法是利用重金屬超富集植物 (hyperaccumulator) 容易吸收重金屬並累積於體內的特性，將其種植於受到污染的土地上，透過收割植物來清除土壤的重金屬污染 (Yang et al., 2005)。理想的重金屬超富集植物必需具備下列特徵：根部能深植土壤、生長快速、收割容易、對於重金屬有高耐受性和累積量。目前已知超過四百種植物具有重金屬超富集的特性，如十字花科植物 *Arabidopsis halleri* 和 *Thlaspi caerulescens* (Meyer et al., 2011)。然而這些植物對特定重金屬的耐受性及累積程度都不同，而且幾乎沒有一種能夠完全符合上述的要求。因此除了篩選各種具有重金屬超富集潛力的野生植物之外，也可利用基因工程的方式，將所需的重金屬超富集植物特性匯集在一種植物內，做為植物復育法的有力工具。

1.1.4 植物金屬螯合素

植物金屬螯合素 (phytochelatin, PC) 是生物體內一種重要的金屬螯合分子，其分子式為 $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$) (Grill et al., 1985)，廣泛存在於高等植物、藻類、真菌和線蟲中 (Grill et al., 1986; Grill et al., 1987; Rea et al., 2004)。當植物細胞遭遇鋅、銅、砷等重金屬逆境時，細胞質中的植物金屬螯合素會以其上的 cysteine 與重金屬結合 (Reese et al., 1992; Speiser et al., 1992)，經由 ABC transporter 轉運至液泡內形成高分子聚合體，將重金屬離子隔離在液泡中，減輕重金屬對細胞傷害 (Loeffler et al., 1989; Vögeli-Lange and Wagner, 1990; Salt and Rauser, 1995; Cobbett, 2000)。植物金屬螯合素雖然是一種短鏈勝肽，但是它並非是由基因轉錄轉譯而成，

而是由一種具有 γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase 活性的植物金屬螯合素合成酶 (phytochelatase, PCS) (EC 2.3.2.15)，利用 glutathione (GSH) 或其他短鏈 PC 為基質進行 PC 的生合成 (Grill et al., 1989)。



1.2 植物螯合素合成酶之特性

1.2.1 植物螯合素合成酶基因家族

自 1999 年開始，許多物種的 PCS 基因序列陸續被發表，包括阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtPCS1* 和 *AtPCS2* (Ha et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999; Cazalé and Clemens, 2001)、小麥 (*Triticum aestivum*) *TaPCS1* (Clemens et al., 1999)、酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*) *SpPCS* (Clemens et al., 1999; Ha et al., 1999)、具有高度重金屬抗性的兩種十字花科 (Brassicaceae) 植物 *Arabidopsis halleri* (*AhPCS1*) 和 *Thlaspi caerulescens* (*TcPCS1*) (Meyer et al., 2011) 以及單胞綠藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) *CrPCS* (Bräutigam et al., 2011)。另一方面，在少數動物中也發現 PCS 同源基因的存在，如線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) *CePCS1* (Vatamaniuk et al., 2001) 和寄生蟲類 *Schistosoma mansoni* *SmPCS* (Ray and Williams, 2011)。

某些豆科植物 (*Fabaceae*) 在重金屬逆境下會利用 homo-glutathione (hGSH) 形成 homo-phytochelatase (hPC)，其分子式為 $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Xaa, Xaa}$ 可能為 $\beta\text{-Ala}$ 、Ser 或 Glu (Zenk, 1996)。利用 *Escherichia coli* 表現的大豆 (*Glycine max*) *GmhPCS1* 和百脈根 (*Lotus japonicas*) *LjPCS1*，可同時利用 GSH 和 hGSH 生合成 hPC (Oven et al., 2002; Loscos et al., 2006)。豆科植物合成 PC 或 hPC 的能力可能取決於重金屬逆境的種類；鎘處理後的百脈根會累積大量的 hPC，而在銅處理下則會累積較多的 PC (Loscos et al., 2006)，顯示 PC 及其衍生物在豆科植物對抗重金屬逆境時各有其重要性。

一個物種的基因組中可能具有數個 PCS 同源基因，如阿拉伯芥有兩個 PCS 基因。雖然這兩個基因轉譯出來的蛋白質都有合成方向活性，但是 *AtPCS1* mRNA 表現量較 *AtPCS2* 高出 20 倍以上 (Cazalé and Clemens, 2001)；利用 *GUS* 報導基因進

行啟動子分析，結果發現 *PCS1* promoter (*P1*) 的強度較 *PCS2* promoter (*P2*) 高出許多 (Lee and Kang, 2005)。PCS 基因互補試驗的結果也顯示，在阿拉伯芥中 *AtPCS2* 基因轉錄出來之後不容易被轉譯成蛋白質，因此無法回復 *AtPCS1* 基因缺失造成的重金屬超敏性 (hypersensitivity)，可見兩個 PCS 同源基因中，*AtPCS1* 擔負著主要的解毒功能 (Lee and Kang, 2005)。除此之外，*Arabidopsis halleri* 和 *Thlaspi caerulescens* 中也都存在兩個 PCS 同源基因，但都只有其中一個基因具有生理功能 (Meyer et al., 2011)。另一方面，百脈根基因組中存在三種有活性的 PCS 同源蛋白質，其中 LjPCS1 的活性可被鉛所誘導，LjPCS3 則容易被鋅、砷、鐵和鋁所活化，顯示 LjPCS 家族可能在各種重金屬逆境中扮演不同角色 (Ramos et al., 2008)。

1.2.2 植物螯合素合成酶之生理功能

植物在重金屬逆境下會開啟一連串 GSH 代謝路徑，抵抗重金屬帶來的氧化還原壓力，PCS 也參與其中 (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Herbette et al., 2006)。利用化學突變法剔除阿拉伯芥基因組中的 *AtPCS1*，所得到的突變株 *cad1-3* 由於無法在體內累積 PC，所以幾乎無法在鎘和鋅逆境中存活 (Howden et al., 1995; Tennstedt et al., 2009)；若將 *AtPCS1* 或 *TaPCS1* 表現於 *cad1-3* 突變株中，則可以回復植株對重金屬的耐受性 (Ha et al., 1999; Gong et al., 2003; Singh et al., 2008)。

除了植物之外，某些動物在重金屬環境的存活率也與 PCS 的存在與否有關。將 *CePCS1* dsRNA 注射於線蟲體內阻斷其 PCS 基因表現，會造成線蟲對鎘的耐受力下降 (Vatamaniuk et al., 2001)。另一方面，經由 whole mount in situ hybridization (WISH) 觀察寄生蟲 *Schistosoma mansoni* *SmPCS* 的表現，確認蟲體內各部位都有 *SmPCS* mRNA 的累積，而且長期生長於含鎘、鋅、鐵、 H_2O_2 或其他毒化物環境中可提高此基因的表現量 (Ray and Williams, 2011; Rigouin et al., 2013)。這說明了寄生蟲中的 PCS 除了與重金屬抗性相關之外，可能還有更廣泛的解毒功能。

雖然 PCS 最主要的功能是合成 PC，但是近年來的研究也發現此類 dipeptidyl transpeptidase 能夠水解與荷爾蒙類毒素 (xenobiotic compounds) 結合的 GSH 衍生物。例如植株以 mono-chlorobimane 處理後，進入體內的毒素會與 GSH 上的硫醇

基結合形成 GSH-bimane，接著被 AtPCS1 轉化為 γ -Glu-Cys-bimane 以降低其毒性 (Beck et al., 2003; Blum et al., 2007)。相對地，阿拉伯芥 *AtPCS1* 缺失突變株則因為喪失 PCS 催化活性，因此進入植株內的 bimane 只能以 GSH-bimane 的形式大量累積在細胞質中，證實 PCS 除了合成重金屬螯合分子之外，也是生物毒素降解路徑的一員 (Blum et al., 2007; Blum et al., 2010)。

1.2.3 植物螯合素合成酶轉殖株之性狀

1.2.3.1 表現阿拉伯芥 *AtPCS1* 之轉殖株

在生物中大量表現 PCS 經常能夠提升植株對重金屬的耐受程度。舉例來說，將 *AtPCS1* 大量表現於與阿拉伯芥同為十字花科的芥菜 (*Brassica juncea*) 可以提升轉殖株對鎘、砷和鋅的耐受度 (Gasic and Korban, 2007, 2007)；在斑馬魚 (*Danio rerio*) 胚胎發育早期表現此基因，也可降低胚胎在 500 μ M 鎘離子濃度中的致死率 (Konishi et al., 2006)。但是 *AtPCS1* 的累積有時也可能造成與預期相反的結果。Lee 等人於 2003 年利用 *AtPCS1* 啟動子及基因全長表現於 *cad1-3* 中，雖然轉殖株的 PC 累積量上升，但對鎘和鋅的抗性卻與缺乏 PCS 活性的母本 *cad1-3* 相去不遠 (Lee et al., 2003; Lee et al., 2003)；進一步分析轉殖株和野生種阿拉伯芥中的 non-protein thiol (NPT) 並無明顯差異，推測轉殖株的重金屬敏感性並不是因為 PCS 消耗了細胞中的主要還原劑 GSH，而是過量的 PCS 會與金屬結合，影響其他與金屬離子相關的代謝路徑所造成的結果 (Kim and Lee, 2007)。

AtPCS1 造成的重金屬敏感性狀可能與金屬處理的種類、用於基因表現的啟動子、培養基添加物、轉殖株的表現部位等因子相關。利用 actin promoter 將 *AtPCS1* 過量表現於阿拉伯芥中，轉殖株對鎘具有高度敏感性狀，但是轉殖株對砷的抗性是上升的 (Li et al., 2004)。相對地，Brunetti 等人於 2011 年的研究結果則和 Lee 等人和 Li 等人兩組團隊不同；他們利用 *CAMV 35S* promoter 表現 *AtPCS1* 於阿拉伯芥中，提升了轉殖株對鎘的耐受程度。原作者認為使用不同的啟動子可能造成植株各部位的 PCS 蛋白質累積差異；另一方面，阿拉伯芥幼苗培養高於 2% 的蔗糖濃度中，生長也比較容易受到重金屬抑制，因此造成性狀上的差別 (Brunetti et al., 2011)。

多組異源表現 *AtPCS1* 的菸草 (*Nicotiana tabacum*) 轉殖株性狀試驗也得到與上述類似的結果。Pomponi 等人發現，在培養基中加入 GSH 可以使 35S::*AtPCS1* 轉殖株呈現出對鎘的耐受性 (Pomponi et al., 2006)；相對的，Wojas 團隊用相同啟動子表現的 *AtPCS1* 轉殖株在一般 MS 培養基中則顯現對鎘高度敏感、對砷耐受性增加的性狀 (Wojas et al., 2008; Wojas et al., 2010; Wojas et al., 2010)，可見改變的培養基條件即可能得到不同的性狀表現。另一方面，若在 *AtPCS1* 蛋白質前端標記上送入葉綠體的胺基酸序列 (Picault et al., 2006)，或是使用 chlorophyll a/b binding protein promoter 將基因表現限定於葉片中 (Peterson and Oliver, 2006)，都可以加強阿拉伯芥轉殖株對鎘的耐受程度，顯示相較於全株表現 PCS，只在葉片中累積此蛋白質是提高植株重金屬耐受性較有效的作法。

1.2.3.2 表現其他物種 PCS 之轉殖株

相對於 *AtPCS1* 過量表現轉殖株可能造成鎘的過敏性，表現其他物種 PCS 基因的植株則呈現穩定的重金屬抗性。例如過量表現線蟲 *CePCS1* 於菸草 (*Nicotiana tabacum*) 中可同時提升轉殖株抗鎘和砷逆境的效果 (Wojas et al., 2008; Wojas et al., 2010; Wojas et al., 2010)；*TcPCS1* 於菸草中表現也可提高轉殖株對鎘的耐受性 (Liu et al., 2011)。另外，過量表現小麥 *TaPCS1* 於阿拉伯芥 *cad1-3* 突變株可以提高轉殖株在砷、鎘和汞等重金屬逆境下的生長狀況。除了使用 *CAMV 35S promoter* 表現 *TaPCS1* 的轉殖株對重金屬的抗性增加，利用 alcohol dehydrogenase (Adh) promoter 將 *TaPCS1* 專一性表現於根部，或用莖部專一性表現的 *CAB2 promoter* 啟動 *TaPCS1* 表現的轉殖株都有此類性狀；除此之外，轉殖株全株都可偵測到 PC 的存在 (Gong et al., 2003; Chen et al., 2006)。這些結果不備顯示小麥的 PCS 可增加植物對重金屬的耐受性，也證實 PC 可以經由維管束轉移至其他部位。

1.2.4 植物螯合素合成酶之表現與調控

1.2.4.1 金屬離子對於轉錄及轉譯層次的調控

目前研究大多顯示 PCS 基因於植物中大多維持著穩定但低量的表現，即使遭遇重金屬逆境時，其基因轉錄量也不會在短時間內顯著增加。例如阿拉伯芥成株以 100 μM 鎘或 100 μM 銅離子處理 24 小時，Northern blot 呈現出的 *AtPCS1* mRNA

表現量與並未增減 (Vatamaniuk et al., 2000)。利用靈敏度較高的 microarray 觀察阿拉伯芥於不同鎘離子濃度下的基因表現，發現 *AtPCS1* 只有於 5 μM 鎘處理 2 小時表現量上升約 1.5 倍，第 6 到 30 小時之間 mRNA 表現量又回復正常 (Herbette et al., 2006)。將 *AtPCS1* promoter 接上 *GUS* 報導基因並轉殖於阿拉伯芥，發現幼苗如果從發芽階段就生長於含 50 μM 鎘離子的培養基中，報導基因的表現量有顯著的增加；但是此現象會隨著植株成熟而逐漸消失，這說明了 *AtPCS1* 轉錄層次的調控與逆境處理時間和植株生長發育情況有密切的關係 (Lee and Korban, 2002)。

十字花科植物的 *PCS* 基因與 *AtPCS1* 在轉錄調控層次有類似的現象。*BjPCS1* 在 50 μM 鎘逆境下，需要處理 6 天以上才能看到蛋白質表現量增加 (Heiss et al., 2003)；而在 *Arabidopsis halleri* 和 *Thlaspi caerulescens* 中，因為物種本身具良好的鎘排除機制，所以低於 100 μM 的鎘離子對植株來說尚未造成逆境，也因此幾乎無法誘導 *AhPCS1* 或 *TcPCS1* 表現 (Meyer et al., 2011)。由以上研究推測，植物 *PCS* 基因的轉錄調控可能與重金屬處理濃度，以及不同物種對重金屬的敏感度有關。的確，若將鎘處理的濃度提高到 200-500 μM 時，可以在 4-8 小時內誘導 *TcPCS1* 的表現 (Liu et al., 2011)。除此之外，甘藍 (*Lactuca sativa*) 在 500 μM 的鎘逆境下，於 1-48 小時之間 *LsPCS1* 的 mRNA 累積量和蛋白質活性都會逐漸上升 (He et al., 2005)。

除了十字花科植物之外，許多植物在高濃度的重金屬處理下，其 *PCS* 基因也會在數小時內被誘導，細胞中的 PC 累積量也同步上升。舉例來說，以 500 μM 的鎘離子處理可大蒜 (*Allium sativum*) 幼苗，不但會促使植株累積 PC，而且在處理 1 小時和 24 小時分別有兩個 *AsPCS1* 表現高峰 (Zhang et al., 2005)；水生植物海茄冬 (*Avcennia germinans*) 在高於前述 100 倍的銅或鎘逆境下，*AvPCS* 基因會於 8-16 小時內表現量超過控制組兩倍以上 (Gonzalez-Mendoza et al., 2007)。另一方面，若使用鉛誘導 *PCS* 基因表現，所需要的濃度可能較鎘來得低。小槐葉蘋 (*Salvinia minima*) 以 40 μM 鉛離子處理 12 小時以上，其 *PCS* 基因表現和蛋白質活性都有顯著提升 (Estrella-Gómez et al., 2009)。這些研究說明植物除了長期處於重金屬環境下時需要累積 *PCS* 之外，在強度較高的重金屬逆境下，*PCS* 也參與立即性的解毒機制。

1.2.4.2 RNA splicing

大多物種的 PCS 並無轉錄後修飾的現象。比較特別的是基因組中有三個 PCS 同源基因的百脈根，其 *LjPCS2* 在轉錄層次還有 alternative splicing，這個基因在根部和根瘤中分別轉譯出有無 PCS 活性及正常的胺基酸序列 (Ramos et al., 2007)。除此之外，寄生蟲 *Schistosoma mansoni* 也會利用 alternative splicing，在粒線體中表現全長的 SmPCS 蛋白質，另外在細胞質中表現兩種較短的 SmPCS (Ray and Williams, 2011)。這些證據顯示某些物種的 PCS 表現調證機制可能相當複雜，而關於 PCS mRNA splicing 的機制與生理意義尚需進一步的釐清。

1.2.4.3 轉譯後修飾

由上述提到的研究可以了解，細胞內金屬離子的濃度雖然可能會影響 PCS 轉錄和轉譯層次的表現，但是其過程可能需要數天之久，尤其模式植物阿拉伯芥的 *AtPCS1* 很少有受到轉錄層次調控的現象。然而，當植物或酵母菌以重金屬處理時，約 30 分鐘之內就可以偵測到細胞內有 PC 生合成 (Grill et al., 1986; Grill et al., 1987)。另一方面，PCS 表現蛋白也需要金屬離子啟動合成方向的活性，例如 Cd^{2+} , As^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ and Au^+ (Zenk, 1996)。比較金屬處理後 PC 在細胞內快速累積的現象和需時較久的轉錄調節，可得知細胞內 PCS 活性提升可能會受到轉譯後修飾的調控 (Cobbett, 2000; Vatamaniuk et al., 2000)。本實驗室以阿拉伯芥 *AtPCS1* 為材料，發現由 *E. coli* 表現出來的 *AtPCS1* 蛋白質在含 30 μM 以上的鎘離子環境中可受到 casein kinase 2 (CK2) 的調節，而且磷酸化修飾之後會提高 *AtPCS1* 的活性；利用點突變技術，也確定了靠近活性區的 Thr49 為 *AtPCS1* N 端的磷酸化修飾位置 (Wang et al., 2009)。以上研究顯示，PCS 於細胞內的活性調控不但與重金屬的存在高度相關，磷酸化修飾也可能參與活化 PCS 的過程。

1.3 植物螯合素合成酶之活性催化機制

1.3.1 植物螯合素合成酶之蛋白質構造

真核生物的 PCS 同源蛋白質大約有 40-50% 的序列保守性，長度約在 400-500 個胺基酸左右，由一個包含活性催化區而且高度保守的 N-terminal domain，和一個序列歧異度較高的 C-terminal domain 所組成 (Cobbett, 2000)。PCS 單元體分子量

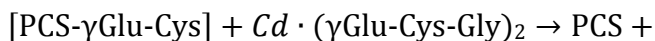
約 50-55 kDa，然而實際測量 AtPCS1 表現蛋白質的原態分子量約為 100 kDa；由此看來，PCS 實際上可能會結合成雙元體進行反應 (王信傑, 2009)。PCS 的活性催化區可能由 papain 的催化鐵三角 Cys-His-Gln 演化而來 (Rea et al., 2004)；以 AtPCS1 為例，位於 N 端的 Cys 56、His 162 和 Asp 180 即為進行 GSH deglycylation 和延長 PC 的反應中心 (Romanyuk et al., 2006)。進一步分析兩個 domain 的功能，發現失去 C-terminal domain 的 AtPCS1 表現蛋白質仍然有合成 PC 的能力，但是這類半長蛋白質在高溫下穩定性較差，原本可以啟動 PC 合成的汞和鋅離子也無法活化 AtPCS1 N 端表現蛋白質；此結果顯示 C-terminal domain 雖然不直接參與催化功能，但是與蛋白質整體的穩定度和對金屬的感受性有關 (Ruotolo et al., 2004)。

PCS 除了產物有螯合重金屬的能力之外，這個蛋白質本身也是一個可與重金屬結合的金屬蛋白 (metalloprotein)，一個 PCS 最多能結合 7 個鎘離子 (Vatamaniuk et al., 2000)。最近的研究顯示，AtPCS1 的主要金屬結合區可能是位於 C 端的幾個 Cys-rich motifs，其主要的功能可能是偵測重金屬的存在，利用 Cys 與金屬結合間接增強蛋白質的催化活性 (Sachiko et al., 2004; Vestergaard et al., 2008; Rea, 2012)。除了 AtPCS1 之外，在酵母菌 SpPCS 和小麥 TaPCS 的 C-terminal domain 也找到數個具有金屬結合能力的 Cys-rich motif，可見這類 motif 在 PCS 蛋白質演化上有特殊的意義 (Maier et al., 2003)。

1.3.2 植物螯合素的合成機制

目前已知 PCS 是以 ping-pong mechanism 進行雙基質合成反應。PCS 進行反應時通常需要 millimolar 濃度的 GSH 和 micromolar 濃度的二價鎘離子，由於 GSH 上的硫醇基與鎘離子的親和力非常高，高於 98% 的鎘離子會與 GSH 結合，以 bis(glutathionato)cadmium (Cd-GS₂) 複合物的形式存在，因此一般活性分析條件下同時有高濃度的 GSH 和另一種低濃度的 Cd-GS₂。酵素動力學的結果證實這兩種形式的 GSH 即為 AtPCS1 進行 ping-pong mechanism 所需要的兩種基質，其中對 GSH 的 K_m 值約在 14-18 mM 左右，對 Cd-GS₂ 的 K_m 值則在 5-9 μ M 之間 (Vatamaniuk et al., 2000; Ogawa et al., 2011)。除此之外，Vatamaniuk 等人進一步提出 AtPCS1 的活性催化步驟如下：首先，第一基質 GSH 結合於活性區上，PCS 切除 GSH 上的 Glycine 之後形成 γ -Glu-Cys acyl-enzyme 過渡態；接著第二基質 Cd-GS₂ 進入活性區附近與

γ -Glu-Cys 結合，形成 PC₂ 後從酵素中放出 (Vatamaniuk et al., 2000; Vatamaniuk et al., 2004)。整個催化過程可簡化為下列兩個反應式：

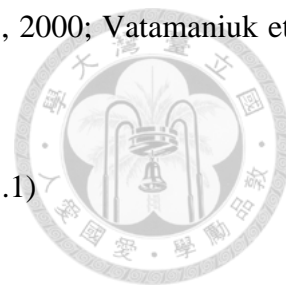


雖然 AtPCS1 本身與鎘離子有一定的親和力 ($K_L=0.54 \pm 0.21 \mu\text{M}$)，但是由於鎘離子在反應溶液中會優先與 GSH 結合的特性，因此 PCS 受到重金屬活化的現象，主要可能還是因為有第二基質形成的緣故 (Vatamaniuk et al., 2000)。AtPCS1 除了可利用 Cd-GS₂ 做為第二基質之外，也可以在沒有鎘離子的反應環境中使用 GSH 衍生物 *S*-alkylglutathione，代表帶 GSH 硫醇基上的修飾基團可能是第二基質的重要特色，也是活化 PCS 的決定因子之一 (Vatamaniuk et al., 2000; Romanyuk et al., 2006; Rea, 2012)。

1.3.3 植物螯合素合成酶的基質結合區

先前的研究已經對 PCS 的催化反應步驟進行深入的探討，然而基質與 PCS 的分子交互作用機制尚未被完全釐清。目前已從藍綠藻 *Nostoc* sp. PCC 7120 的 NsPCS 蛋白質結晶構造獲得一些訊息 (Vivares et al., 2005)。屬於原核生物的 NsPCS 缺乏一般真核 PCS 帶有的 C terminal domain，在活性上也與真核 PCS 有很大的差異。NsPCS 能夠完成催化反應的第一步，將 GSH 轉化成 γ Glu-Cys，但是其反應第二步驟的催化速率非常緩慢，幾乎沒有合成 PC 的能力 (Harada et al., 2004; Tsuji et al., 2004; Tsuji et al., 2005)。也因為這種特性，Vivares 等人於 2005 年利用 x-ray 解出的兩種 NsPCS 蛋白質結晶構形中，其中一種為 γ Glu-Cys-acyl enzyme 的過渡態形式 (圖 1.1)。

過渡態 γ -Glu-Cys-acyl PCS 的結晶構形顯示結合口袋上的數個胺基酸會與第一個基質形成離子鍵，其中包括了 Arg 與 γ Glu-Cys N 端羧基形成的鍵結。更重要的是，第一基質結合區的附近還有另一個凹陷的口袋，被推測可能是進行第二基



質結合的位置 (圖 1.1) (Vivares et al., 2005)。這個可能的第二基質結合區由數個保守性胺基酸組成，包括 Arg173、Asp201、Gln64、Lys206 和 Tyr207；利用序列比對可找出這些胺基酸在 AtPCS1 上的相對位置，即為 Arg152、Asp 180、Gln50、Lys185 和 Tyr186 (Vivares et al., 2005)。由於 NsPCS 與 AtPCS1 的 N-terminal domain 大約有 34% 的相似度，因此這個原核 PCS 蛋白質結晶構造可提供一些結構上的資訊，並做為模擬 AtPCS1 立體結構的模板，以便深入的研究 PCS 如何辨認基質和進行反應。

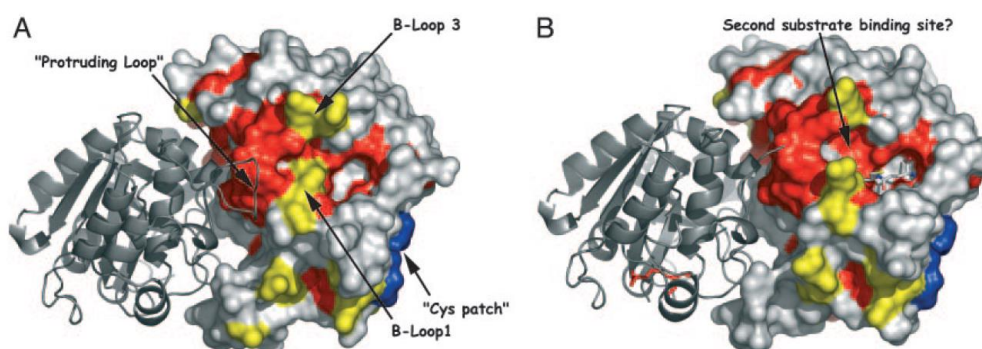


圖 1.1 NsPCS 蛋白質結晶構形 (Vivares et al., 2005)

Figure 1.1 Crystal structures of NsPCS dimer (A) and γ -Glu-Cys acyl enzyme intermediate (B).

1.4 研究動機

藍綠藻的 NsPCS 蛋白質構形顯示了第一基質 GSH 與 PCS 之間的分子交互作用，同時也指出 PCS 第二基質結合區可能的位置。但由於 NsPCS 不是一個具有完整催化能力的酵素，無法完全利用它了解 PCS 如何對基質進行辨認與結合。為此，本論文的目標之一是利用模式植物阿拉伯芥的 AtPCS1 當做研究真核生物 PCS 的模型，以 NsPCS 所提供的結構線索模擬出 AtPCS1 N-terminal domain 的構形，深入了解 AtPCS1 的第二基質結合區。觀察模型上活性區附近的結構，本研究發現數個可能與基質辨認有關的 loops。利用序列比對找出這些 loops 中的保守性胺基酸做為點突變的目標，並以活性和酵素動力學分析，試著找出可能與第二基質結合的區域。經由分析這些功能性胺基酸的重要性，期望能釐清 PCS 辨認基質的分子

作用機制。

另一方面，本實驗室已證實 AtPCS1 的活性受到磷酸化的調控，也找到蛋白質 N 端活性區附近被磷酸化修飾的位置。在此基礎之下，本論文深入探討 AtPCS1 磷酸化調控的生理角色。在真核表現系統中表現帶有 His-tag 的 AtPCS1，經過純化和 LC-MS/MS 鑑定，我們找到另外兩個被磷酸化修飾的胺基酸 Ser13 和 Ser352。除了利用表現蛋白質這個研究工具之外，我們也將突變的 AtPCS1 序列 S13A 和 S352A 表現於阿拉伯芥 *cad1-3* 突變株中，利用阿拉伯芥穩定性轉殖系統研究這兩個磷酸化位置的功能。觀察轉殖株的在重金屬逆境下的性狀表現，一方面可以探討這兩個 Ser 磷酸位置的生理功能，同時也能深入了解 AtPCS1 轉譯後修飾在逆境引發的訊息調控中扮演何種角色。



第二章 材料與方法



2.1 材料

2.1.1 菌株

本論文使用之 *Escherichia coli* strain DH5 α 和 BL21 (DE3) 菌種皆購自於益生生技公司，一般在 37°C 下培養於 Luria-Bertani (LB) 培養基 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 中。*Pichia pastoris* strain X33 由王愛玉教授提供，來源為 Invitrogen，使用 YPD 培養基 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)、30°C 進行培養。農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 由楊健志老師提供，以 LB 培養基、28°C 進行培養。

2.1.2 植物材料

本論文使用兩種阿拉伯芥材料，分別為 Columbia (Col-0) (購於 Arabidopsis Biological Resource Center)、和 *AtPCS1* 缺失植株 *cad1-3* (由 Dr. Christopher S. Cobbett 提供)。阿拉伯芥種子需先以純水處理、於 4°C 中避光反應 3 天，再播種於含有 2% sucrose 的 1/2 Murashige and Skoog (MS) 固態培養基 (pH 5.8) 或土壤中，於溫度 22°C、光照度 5,000~7,000 Lux、相對溼度 65% 和 16 小時光照之條件下進行培養。種植於培養基上之種子需先使用 1% 次氯酸鈉消毒表面之後再進行低溫處理和無菌播種。

2.2 載體之構築

本論文使用之 DNA 技術皆修改自 Molecular cloning (Maniatis et al., 1982)。DNA 片段增殖使用之酵素為 Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerase，連同其他限制酶酵素皆購自於 New England Biolab (NEB)。DNA 定序委託基龍米克斯生技公司完成。

2.2.1 點突變技術 (site-direct mutagenesis)

本論文延續實驗室先前的研究，使用相同的 pET28b-*AtPCS1* 表現載體，可表現出 N 端帶有 His tag 的 *AtPCS1* 表現蛋白質 (Wang et al., 2009)。以此表現載體做

為模板，分別針對欲突變的 Ser10、Ser13、Gln50、Ser51、Glu52、Tyr55、Cys56、Arg152、Lys156、Gln157、Phe184、Lys185、Tyr186、Ser350、Ser352 和 Ser354 胺基酸密碼子設計成對引子，進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 合成帶有突變 AtPCS1 序列的表現載體。將 PCR 產物以 *Dpn* I 進行限制酶切，除去原先加入的模板質體之後，將此產物用熱休克法送入 *E. coli* strain DH5 α 中，並以含有 50 mg/L kanamycin LB 固態培養基篩選轉型成功的菌落。挑選單一菌落純化其中的質體，最後以 DNA 定序確認序列的正確性。表 2.1 詳細列出用於點突變實驗的引子序列。

2.2.2 *P. pastoris* 表現系統之載體構築

本實驗選用帶有 *AOX1* expression cassette 之載體 pPICZ-B (Invitrogen)，利用 *AOX1* promoter 在含甲醇的環境下開啟基因表現。另外，此載體上帶有 Zeocin 抗性基因可供抗生素篩選之用。首先針對 AtPCS1 序列設計專一性引子進行 PCR 增殖，選用 EcoRI 和 NotI 限制酶切位加在引子的 5' 端前，另外在 forward primer 前端加上 *P. pastoris* 表現基因需要之 initial sequence。利用限制酶切位將 *AtPCS1* cDNA 全長送入載體，並利用 DNA 定序確認序列。最後以 EcoRI 和 NotI 限制酶切檢測質體，確認 pPICZ-AtPCS1 表現載體的正確性。表 2.2 列出用於載體構築的引子序列。

2.2.3 阿拉伯芥轉殖載體之構築

本實驗使用之 binary vector pCAMBIA2300 (CAMBIA) 由楊健志老師提供，P1 promoter 序列先前已由阿拉伯芥野生種 Col-0 染色體 DNA 中選殖出來，保存於 yT&A cloning vector (益生生技) (黃迺茵，2010)。首先針對 P1 promoter 序列設計專一性引子進行 PCR 增殖，選用 EcoRI 和 NotI 限制酶切位加在引子的 5' 端前，再以 T-A cloning 方式將 P1 promoter 與 yT&A cloning vector 進行接合，送入 *E. coli* strain DH5 α 中保存，並利用定序確認序列。接著針對 *AtPCS1* cDNA 序列設計專一性引子進行 PCR 增殖，在 reverse primer 上加入 FLAG tag 密碼子序列，同時利用 NotI 與 BamHI 限制酶切位加在引子前端，並用此限制酶切位將 *AtPCS1* cDNA 全長送入載體，並利用定序確認序列，得到 yT&A-P1-AtPCS1 中間載體。

另一方面，針對 nitric oxide synthase (NOS) 3'-UTR 設計引子，並在引子前端加入 SalI 和 HindIII 限制酶切位，利用前述相同策略將 NOS 3'-UTR 送入

pCAMBIA2300 質體中，建立 pCAMBIA2300-NOS 3'UTR。最後使用此 binary vectors 進行轉殖載體之構築。利用有 EcoRI 與 BamHI 將 P1-AtPCS1 送入 pCAMBIA2300-NOS 中，此轉殖質體可表現帶有 NOS 3'-UTR 之 *AtPCS1* mRNA，最終可轉譯出 C 端含有 FLAG tag 之融合蛋白。再以 EcoRI 和 BamHI 限制酶切檢測質體，確認 pCAMBIA2300- P1-AtPCS1 載體的正確性。表 2.2 詳細列出用於載體構築的引子序列。

2.3 重組蛋白質之表現與純化

2.3.1 *E. coli* 表現系統

利用熱休克法將 pET28b-AtPCS1 表現載體送入 *E. coli* BL21 (DE3) 中，並以含有 50 µg/mL kanamycin 的 LB 固態培養基篩選轉形成成功的菌株。挑選單一菌落於 LB 液態培養基中，以 37°、150 rpm 震盪培養過夜，再以 1:100 的比例放大，培養於新鮮 LB 液態培養基中，同條件培養至 OD600 介於 0.4-0.6 之間，加入 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導基因於 30°C 中表現 4.5 小時。最後用 5,400 rpm (Avanti J25, rotor JA10, Beckman Coulter) 收集細胞，保存於 -80°C。每個 AtPCS1 突變株單次放大培養的體積為 150-300 mL。

2.3.2 *P. pastoris* 表現系統

酵母菌 *P. pastoris* 之培養主要參考 Invitrogen 提供的 EasySelect™ *Pichia* Expression Kit 實驗手冊。首先選用 PmeI 限制酶將構築完成的 pPICZ-AtPCS1 載體切成直線雙股 DNA，再利用電穿孔法送入 *P. pastoris* strain X33 中進行基因重組，以含有 100 µg/mL Zeocin 的 YPD 培養基篩選基因重組成功的菌株。挑選單一菌落抽取染色體 DNA，利用辨認 *AOX* promoter 和 terminator 的一對引子進行 PCR，確認 *AOX1* expression cassette 已成功轉型於酵母菌基因組中。

挑選單一菌落接種於 BMGY 培養基中 (1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, 4×10^{-4} g/L Biotin, 1% glycerol, 100 mM potassium phosphate, pH6.0)，以 30°、150 rpm 震盪培養過夜。隔日取 OD600 介於 2-6 的菌液，用 3000 xg (Avanti J25, rotor JA25.5, Beckman Coulter) 離心收取菌塊，用 BMMY 培養基 (1% yeast extract, 2%

peptone, 1.34% YNB, 4×10^{-4} g/L Biotin, 0.5% methanol, 100 mM potassium phosphate, pH6.0) 懸浮，放大稀釋菌液至 OD600=1.0。以 30°、150 rpm 震盪培養 0-72 小時，每 24 小時收集一次樣本並加入最終濃度為 0.5% 的 methanol。最後用 3,000 rpm (Avanti J25, rotor JA10, Beckman Coulter) 收集細胞進行蛋白質表現質量分析。大量表現時的單次培養體積為 1 L，表現時間為 48 小時。

2.3.3 表現蛋白質之純化

整個純化過程皆在 4°C 下進行。表現完成的細胞以 10-20 mL 破菌緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM β -mercaptoethanol (β -ME), protease inhibitor cocktail (Roche)) 重新懸浮之後，使用超音波震盪 (Misonix 3000) 打破細胞，再以 15000 rpm (Avanti J25, rotor JA25.5, Beckman Coulter) 離心 30 分鐘。分離得到的上清液與事先平衡於平衡緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl and 10% glycerol) 的 Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE healthcare) 混合反應 3 小時，再使用含有 20 mM imidazole 的平衡緩衝液洗去非專一性吸附蛋白質，接著使用含有 200 mM imidazole 的平衡緩衝液流洗出 AtPCS1 表現蛋白質。純化出來的蛋白質與 10 mM EGTA 反應 1 小時之後，利用 Amicon Ultra (cutoff size of 10000) (Millipore) 進行濃縮和脫鹽。

表現蛋白質的定量是依照 Bradford method 蛋白質定量原理，以小牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 做為定量標準，使用 Bio-Rad 的蛋白質定量套組進行定量。最後利用 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 和 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 染色來檢查 AtPCS1 的純度和完整性。另外在與磷酸化相關的實驗中，會另外添加 20 mM NaF 與 1 mM Na_3VO_4 於緩衝液中，以抑制表現蛋白質上的磷酸化飾被磷酸酶降解。

2.3.4 表現蛋白質之二維電泳 (2-dimensional electrophoresis)

接續 2.3.3，收集 200 mM imidazole 緩衝液流洗出之表現蛋白質，加入等體積 PCI (phenol: chloroform: isoamylalcohol= 25: 24: 1) 將蛋白質沉澱於有機層中。以 4°C 12,000 rpm (Microfuge[®], Beckman Coulter) 離心 10 min 去除水層，加入與原樣本等體積純水沖洗蛋白質。再次以同條件離心去除上清液，最後以原樣本 1.5 倍體積之 0.1 M $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{MeOH}$ 沉澱蛋白質，置於 -20°C 過夜。隔日以同條件離心去除

上清液，以 80% 丙酮反覆潤洗沉澱物數次。以 SpeedVac (RT100, SAVANT) 抽乾之後，加入 2-D sample buffer (6 M urea, 2 M thiourea, 0.5%(w/v) Triton-X100, 1% (w/v) DTT, 0.5% (v/v) IPG buffer (pH 4-7)) 回溶。最後以 2-D Quant kit (GE healthcare) 定量蛋白質濃度。BSA 蛋白質溶液也以上述方式製備。

取 10 μ g PCS 表現蛋白質及 2.5 μ g BSA 溶液，加入 pH 4-7、7 cm Immobiline Drystrip (GE healthcare) 中，以 EttanTM IPGphorTM Isoelectric Focusing System (GE healthcare) 進行等電點聚焦。電壓設定為 30 V、12 小時，500 V、250 Vhr，1000 V、500 Vhr，2000 V、4000 Vhr，5000 V、20000Vhr。將完成聚焦的 IPG strips 以含有 1% (w/v) DTT 之平衡緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH8.8), 6 M urea, 30% (w/v) glycerol, 2% (v/v) SDS, 0.002% (w/v) bromophenol blue) 平衡 15 分鐘，再以含有 2.5% (w/v) iodoacetamide 之平衡緩衝液平衡 15 分鐘；將平衡完畢的膠條移入直式電泳槽 (Hoefer SE-250)，進行 10% SDS-PAGE。最後以 CBR 進行蛋白質染色，確認蛋白質之完整性。

2.4 PCS 活性分析

2.4.1 PCS 活性分析及活性單位之計算

本論文使用之標準 PCS 活性反應條件為 1 μ g AtPCS1、200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、10 mM GSH 和 50 μ M CdCl₂ 於 100 μ L 反應體積下、於 37°C 反應 10 分鐘。所有反應完成之後加入最終濃度為 5% (v/v) 的 trifluoroacetic acid (TFA) 中止，保存於 -80°C。詳細過程如下：事先以 200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) 配製 100 mM GSH 和 1 mM CdCl₂ stock，PCS 也以相同緩衝液稀釋為 0.1 μ g/ μ L 之濃度備用；接著取 10 μ L 100 mM GSH、5 μ L 1 mM CdCl₂、和 75 μ L 200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) 混合均勻，在 37°C 預熱 10 分鐘後加入 10 μ L 0.1 μ g/ μ L 酵素進行反應，到達預定時間之後以 10 μ L 50% TFA 中止反應。以 *S*-methylglutathione 做為基質的活性反應條件同上，但反應溶液中不含有 CdCl₂。活性較低的 AtPCS1 突變株，包括 Q50A、Q50N、C56A、R152A、Q157N、F184A、K185A 和 Y186A 的反應時間延長為 180 分鐘，以累積足夠 PC 產物供 HPLC 分析。取 50 μ L 反應溶液注入 reverse-phase

column (LiChrospher 100 RP-18e, Merck), 進行 RP-HPLC 之分析。HPLC 在 0.05% TFA 溶液中進行, 使用 0-20% acetonitrile 梯度分離不同長度的 PC, 再與已知濃度的 GSH 高峰比較, 分別計算出 PC₂、PC₃、PC₄ 的莫耳濃度, 最後計算出的 PCS 活性單位為每分鐘、每 mg 酵素生合成出的 PC 產物莫耳數。



2.4.2 酵素動力學分析

為了決定 AtPCS1 初速反應時間, 首先將 1 µg AtPCS1、200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、10 mM GSH 和 100 µM CdCl₂ 配置成 1 mL 反應溶液, 於 37°C 下進行反應, 求得固定時間下 PC₂、PC₃、PC₄ 產物累積量。酵素動力學分析條件為: 將 0.1 µg PCS、200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、固定濃度之 GSH 和 CdCl₂ 配製為 200 µL 反應溶液於 37°C 反應, wild type AtPCS1、S51A 和 Y55W 反應時間為 2 分鐘, E52D 反應時間為 3 分鐘。詳細過程如下: 事先以 200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) 配製 100 mM GSH 和 100 µM CdCl₂ stock, PCS 也以相同緩衝液稀釋為 0.005 µg/µL 之濃度備用; 接著取指定濃度之 GSH 和 CdCl₂, 以 200 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) 定量至 200 µL, 在 37°C 預熱 10 分鐘後加入 20 µL 0.005 µg/µL 酵素進行反應, 到達預定時間之後以 20 µL 50% TFA 中止反應。

2.4.3 表現蛋白質去磷酸化處理

本實驗使用之 calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) 購自 NEB。取 2 µg AtPCS1 與 5U CIP 混合於 1X NEB buffer³ 中配置成 11.5 µL 反應溶液, 在 37°C 反應 1 小時, 處理完成的反應溶液繼續加入基質進行 PCS 活性反應, 或直接加入 2X SDS-sample buffer 加熱 100°C 中止反應, 以 12.5% SDS-PAGE 和 Pro-Q diamond 進行磷酸化蛋白質染色 (詳見 2.7.4)。另外配製 190 µL 基質溶液, 含 0-50 µM CdCl₂、10 mM GSH 和 100 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 預熱至 37°C 之後加入 CIP 處理完成的反應溶液中, 在相同溫度下反應 10 分鐘後加入最終濃度為 5% 的 TFA 中止。

2.5 阿拉伯芥轉殖

2.5.1 農桿菌轉殖法

本論文使用的轉殖法是參考 Steven J. 等人於 1998 年發表的花序感染法 (Floral dip method) (Clough and Bent, 1998)。首先以電穿孔法將構築完成的 binary vector pCAMBIA2300-P1-AtPCS1 送入農桿菌 *A. tumefaciens* strain GV3101 中，利用含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin 抗生素的 LB 固態培養基篩選轉形成功的菌落，再使用 AtPCS1 cDNA 序列專一性引子對菌落進行 PCR，確定質體的存在。選取單一菌落接種於 LB 液態培養基，以 28°C、200 rpm 震盪培養過夜，再取菌液放大培養於 300 mL LB 液態培養基中，用同條件培養至菌液濃度達到 OD₆₀₀ 1.6~1.8。接著以 4°C 5,000 rpm 離心收集菌塊，加入 500 mL 蔗糖溶液 (5% (w/v) sucrose、0.02% (v/v) silwet L-77) 重新懸浮菌體，並將濃度調整至 OD₆₀₀ 0.6~0.8。選取生長狀況良好的阿拉伯芥 *cad1-3* 開花植株，去除開放的花朵和果莢後，以感染製備好的菌液感染花序，感染後的 T₀ 代轉殖株先以暗處理 28 小時，之後送入生長箱內正常培養至收取 T₁ 代種子。

2.5.2 轉殖株篩選

T₁ 代轉殖株種子播種於含有 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin 抗生素的 1/2 MS 固態培養基上，置於生長箱中 11 天後，第一對本葉葉片呈現綠色且有長根的植株視為轉殖株；反之，葉片呈現白色且沒有長根的植株為非轉殖株。取出培養完成的植株計算存活率，並將轉殖株進行土壤培養。對 T₂ 代轉殖株種子重覆篩選過程，至收取 T₃ 子代之種子為止。

2.5.3 RNA 之抽取及半定量 RT-PCR

本論文使用 TRIZOL method (Invitrogen) 萃取阿拉伯芥 21 天大植株葉片中的 total RNA。取 0.5 g 葉片樣本均質後與 500 μL 的 TRI reagent 混合均勻，取水層上清液加入等體積 isopropanol 於 -20°C 靜置沉澱核酸，再以 4°C 12,000 rpm (Microfuge[®], Beckman Coulter) 離心 10 分鐘並去除上清液，並以 75% (v/v) EtOH 沖洗沉澱物，最後同相同條件離心去除酒精，再加入 DEPC 水於 65°C 中回溶 RNA。取 5 μg RNA 加入 iscript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad)，以 Biometra TPersonal Thermal Cycler 進行反轉錄。溶液先於 25°C 中反應 5 分鐘，再於 42°C 反應 30 分鐘，最後以 85°C、5 分鐘中止反應。

設計 AtPCS1 與 actin 8 之專一性引子 (序列詳述於表 2.2)，以上述方法製備的 cDNA 為模板進行 PCR 反應，再以 DNA 瓊脂糖膠體電泳分析產物，利用 Vision Work LS software (UVP) 對電泳結果作定量。以 actin 8 的 PCR 產物濃度做為對照組，利用半定量 RT-PCR 比較轉殖株與野生型阿拉伯芥中，AtPCS1 mRNA 的表現量差異。

2.5.4 Western blot

取 0.05 g 阿拉伯芥 21 天大植株葉片以液態氮研磨，加入 100 μ L protein extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% (w/v) glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM β -ME)，以 4°C 12,000 rpm (Microfuge[®], Beckman Coulter) 離心後取上清液做為 western 樣本。使用 Bradford method 測定樣本蛋白質濃度，取 20 μ g 總蛋白質進行 12.5% SDS-PAGE，並以 anti-AtPCS1 單株抗體 D5b 偵測樣本中的 AtPCS1 蛋白質含量。

2.6 阿拉伯芥鎘逆境處理及性狀分析

種子經過消毒與低溫處理後，以無菌播種的方式 (方法同 2.4.2) 利用鑷子將種子以直線排列在含有重金屬的 1/2 MS 固態培養基 (1% sucrose、0.8% agarose) 上，垂直置放並培養 9 天，生長條件同 2.1.2 所述。本實驗中的重金屬處理濃度分別為 25 及 50 μ M CdCl₂，25 μ M HgCl₂ 和 75 μ M Na₂HAsO₄。將培養後的阿拉伯芥照相存檔，影像以 Image J (National Institutes of Health) 處理並計算出根長。植株鮮重之測量方法為取 10 株幼苗為一組，以微量天秤測量其重量。

2.7 阿拉伯芥內生性 AtPCS1 之純化

整個純化過程於 4°C 中進行。取 70 g 阿拉伯芥成株樣本，加入 100 mL 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM β -ME, protease inhibitor cocktail (Roche)) 以果汁機均質，再以 15000 rpm (Avanti J25, rotor JA25.5, Beckman Coulter) 離心 30 分鐘。取上清液進行定量，緩慢加入硫酸銨至

指定飽和度為止。持續攪拌平衡 30 分鐘之後以上述條件離心，保留沉澱物之後，取上清液以上述過程繼續進行下一個硫酸銨濃度的沉澱。以適量緩衝液回溶所有分割收集到的沉澱物，置於透析袋 (molecular weight cutoff of 14,000, EIDIA) 對 100 倍體積的透析緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 300 mM NaCl, 1 mM β -ME) 透析過夜。隔日進行 12.5% SDS-PAGE，以 CBR 對膠片染色或以 AtPCS1 抗體 (D5b) 進行 western blot。

取 20-40% 硫酸銨分割透析後之樣本 10 mL，以 Sephacryl S-300 (2.6 \times 95 cm) (GEhealthcare) 進行膠體過濾，每 5 mL 收集一管。選擇有蛋白質主要高峰管數進行 12.5% SDS-PAGE，以 CBR 對膠片染色或以 AtPCS1 抗體 (D5b) 進行 western blot。接著收集含有 PCS 的數管樣本，以 PCI 進行蛋白質沉澱，製備可進行蛋白質二維電泳之樣本 (方法同 2.3.4)。

取 400 μ g 蛋白質樣本加入 pH 4-7、11 cm Immobiline Drystrip (GH healthcare) 中，進行等電點聚焦。電壓設定為 30 V、12 小時，500 V、250 Vhr，1000 V、500 Vhr，2000 V、4000 Vhr，8000 V、24000Vhr。其餘二維電泳過程皆以 2.3.4 所述條件進行。

2.8 其他分析方法

2.8.1 AtPCS1 鎘結合能力之測定

本實驗方法修改自 Vatamaniuk et al., (2000) 的平衡透析法。為了讓 AtPCS1 與鎘離子的結合達到飽和，本實驗選擇 10 μ M 做為透析時的鎘離子濃度 Vatamaniuk 2000。將 0.36 μ M 的 AtPCS1 表現蛋白質置於透析袋 (molecular weight cutoff of 14,000, EIDIA) 中，於 4 $^{\circ}$ C、100 倍體積的透析緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 μ M CdCl₂) 中反應過夜。取出透析完成的溶液進行蛋白質定量 (Bradford method)，最後使用火焰式原子吸收光譜儀 (932 plus, GBC)，於 228.8 nm 波長下分別測定蛋白質溶液和透析緩衝液中的鎘離子濃度，即可求得鎘離子與 PCS 結合的比例。

2.8.2 AtPCS1 分子模型之建立

AtPCS1 (residues12-218) 和 AtPCS1-R152K-K185R 突變株之蛋白質立體構造預測是以 NsPCS 的蛋白質結晶構造 (2BU3) 做為模板，使用 Discovery Studio 3.0 (Accelrys) 運算模擬而來。得到初步的模擬結構之後，再使用 Discovery Studio 中的 Protein Health 模組計算結構的能量最低形式。得到蛋白質分子模型之後接著進行第二基質 docking 的運算。選定可能為第二基質結合位的區域、以 γ -glutamylcysteine 為 ligand 之後，利用 Discovery studio 中的 CDOCK 模組計算基質與 AtPCS1 分子模型可能的結合方式。

2.8.3 蛋白質身分及轉譯後修飾之鑑定

P. pastoris 表現系統及蛋白質純化方法同 2.3 所述。取 4 μ g 純化後的 AtPCS1 表現蛋白質進行 12.5% SDS-PAGE 及 CBR 染色，切下目標片段進行 in-gel digestion。首先將膠體以 50 mM DTT, 25 mM NH_4HCO_3 和處理 1 小時後，再浸泡於 100 mM iodoacetamide (IAA), 25 mM NH_4HCO_3 中進行雙硫鍵還原和 alkylation。處理完畢的膠體以 50% acetonitrile 反覆脫色去除 CBR，之後以 SpeedVac (RT100, SAVANT) 抽乾膠體，加入含有 0.25 μ g trypsin (Promega) 或 chymotrypsin (Promega) 的 25 mM NH_4HCO_3 緩衝液中，於 37°C 中反應 16 小時。收集反應溶液以 SpeedVac (RT100, SAVANT) 抽乾，接著進行 phosphopeptide enrichment。

取 50 μ L TiO_2 Mag Sepharose (GE healthcare) 平衡於 binding buffer (1M glycolic acid, 80% acetonitrile, 5% TFA)，再以 binding buffer 回溶樣本、與 TiO_2 Mag Sepharose 於室溫混合 30 分鐘。接著去除反應溶液，先後用 500 μ L binding buffer 和 wash buffer (80% acetonitrile, 1% TFA) 清洗三次。最後使用 50 μ L elution buffer (5% ammonium hydroxide, pH 12) 洗下目標 peptides，收集溶液後以 SpeedVac (RT100, SAVANT) 抽乾。最後以 LC-MS-MS 分析 peptides 序列及轉譯後修飾之種類，此步驟委託鎂陞生技公司完成。

2.8.4 Pro-Q diamond 染色法

取去磷酸化反應完成的 AtPCS1 表現蛋白質 (詳見 2.4.3) 進行 12.5% SDS-PAGE 之後，將膠體浸泡於固定液 (50% methanol, 10% acetic acid) 固定蛋白質，再以 Milli-Q 水洗去固定液，加入 Pro-Q diamond 染色液 (Invitrogen) 於室溫避光反應 1.5 小時。之後以脫色液 (20% acetonitrile, 50 mM NaOAc, pH 4) 反覆洗

去染色液，最後以 Milli-Q 水置換脫色液，完成染色。影像呈色使用 Typhoon 9400 多功能影像系統 (GE healthcare) 進行，以 excitation: 532 nm laser、emission filter: 560 nm long pass 條件掃描膠體。最後用 CBR 染色，確認膠片上的蛋白質含量。分別將 Pro-Q diamond 和 CBR 染色後的影像圖檔以 Vision Work LS software (UVP) 量化 PCS 色帶強度，計算出 Pro-Q diamond signal/ CBR signal 之比例，即可比較不同樣本之間蛋白質磷酸化修飾的程度。

表 2.1 用於點突變實驗之引子序列

Table 2.1 Primers used for site-direct mutagenesis

Primer	Sequences (5'-3') ^{1,2}
S10A	GAGTTTATATCGGCGAGCTCTTCCTTCTCCTCCGGCC
S13A	CGGCGATCTCTTCCTGCTCCTCCGGCCATTGACTTTTC
Q50A	GATTTTCGTATTTTCAGACAG C ATCCGAACCTGCGTATTGTGG
Q50N	GATTTTCGTATTTTCAGACAAA C TCCGAACCTGCGTATTGTGG
S51A	TCGTATTTTCAGACACAAG C CGAACCTGCGTATTGTGG
E52A	GTATTTTCAGACACAATCC G CACCTGCGTATTGTGGTTTG
E52D	GTATTTTCAGACACAATCC G ATCCTGCGTATTGTGGTTTG
Y55A	CACAATCCGAACCTGCG G CGTGTGGTTTGGCTAGTCTC
Y55F	CACAATCCGAACCTGCG T TTTGTGGTTTGGCTAGTCTC
Y33W	CACAATCCGAACCTGCG T GGTGTGGTTTGGCTAGTCTC
Y55H	CACAATCCGAACCTGCG C ACTGTGGTTTGGCTAGTCTC
Y55D	CACAATCCGAACCTGCG G ATTGTGGTTTGGCTAGTCTC
Y55E	GACACAATCCGAACCTGCG G AATGTGGTTTGGCTAGTCTC
C56A	CAATCCGAACCTGCGTAT G CTGGTTTGGCTAGTCTCTC
R152A	CATATGATCTCAACATATCAC G CGGGTGTATTTAAGCAGACTGGG
R152K	CATATGATCTCAACATATCACAA A GGTGTATTTAAGCAGACTGGG
R152H	CATATGATCTCAACATATCAC A TGGTGTATTTAAGCAGACTGGG
Q157A	TATCACCGAGGTGTATTTAAG G CGACTGGGACTGGTCACT
Q157N	TATCACCGAGGTGTATTTAAGA A ACTGGGACTGGTCACT
F184A	CTTGATGTTGCTCGT G CCAAGTATCCCCCTCACTGGG
F184W	CTTGATGTTGCTCGT T GGAAGTATCCCCCTCACTGGG
F184Y	CTTGATGTTGCTCGT T ACAAGTATCCCCCTCACTGGG
K185A	CTTGATGTTGCTCGTT T CGCGTATCCCCCTCACTGGGG
K185R	CTTGATGTTGCTCGTT T CCGCTATCCCCCTCACTGGGTTCC
K185H	CTTGATGTTGCTCGTT T CCATTATCCCCCTCACTGGGTTCC
Y186A	GATGTTGCTCGTTTCAAG G CTCCCCCTCACTGGGTTCC
Y186W	GATGTTGCTCGTTTCAAG T GCCCCCTCACTGGGTTCC
Y186F	GATGTTGCTCGTTTCAAG T TCCCCCTCACTGGGTTCC
S350A	GAGCTGAAATCTTAGCCGGAAGCCCATCAAAGAGTTTTGTTG
S352A	GAGCTGAAATCTTATCCGGAGCCCCATCAAAGAGTTTTGTT
S354A	GAAATCTTATCCGGAAGCCCAGCAAAGAGTTTTGTTGTCGG

¹ 表中只列出 forward primer 序列，互補序列未列出。

² 粗體字為突變位置。



表 2.2 用於載體構築之引子序列

Table 2.1 Primers used for vector construction

Primer ¹	Sequences (5'-3') ^{2,3,4}
pPICZ-PCS-F-EcoRI	ATGAATTCACAATAATGTCTATGGCTATGGCGAG TTTATATCG
pPICZ-PCS-R-NotI	ATGCGGCCGC CATAGGCAGGAGCAGCGAGATC
P1-F-EcoRI	ACCGGATCCGAATTTAAGTACATTTCTCATGGG
P1-R-NotI	CGCGGCCGC CTTTTCACTGCTTGTTTTGGTATC T
PCS-F-NotI	AAGCGGCCGC CATGGCTATGGCGAGTTTATATCG
PCS-R-Flag-BamHI	ATGGATCCCTATTTGTCATCGTCATCTTTATAATC ATAGGCAGGAGCAGCGAGATC
PCS-F-1148	TGCGTGATGGGAATGAACAA
PCS-R-1431	CTCTTCCTTGTTCTCTTGGCATC
Actin2-F	GCTGAGAGATTCCGTTGTCCTG
Actin2-R	CAGTGTCTGGATCGGAGGATC

¹ 在引子名稱中，F 代表 forward primer，R 代表 reverse primer。

² 粗體字為限制酶切位序列。

³ 底線標示為 *P. pastoris* 基因表現需要之 initial sequence。

⁴ 雙底線標示為 FLAG tag 之密碼子序列。



第三章 結果與討論



3.1 PCS 序列和結構分析

3.1.1 植物螯合素合成酶胺基酸序列比對

將 AtPCS1 胺基酸序列送至 NCBI 資料庫比對，取得不同物種的 PCS 蛋白質序列，其來源包括雙子植物 *T. caerulescens*、*L. japonicus*，單子葉植物 *T. aestivum*，酵母菌 *S. pombe*，線蟲 *C. elegans* 和藍綠藻 *Nostoc*。利用 Vector NTI 軟體計算各物質之間的序列相似程度，結果顯示植物的 PCS 蛋白質約有 60-90% 的同源性，與其他生物 PCS 的相似程度約為 30% (表 3.1)。PCS 的保守性序列大多分布在 N-terminal domain，其原因可能是因為 N 端帶有重要的活性區。為了維持其催化 PC 的功能，因此這個 domain 在演化上變異度較小，約有 64% 為保守性區域，以及 14% 絕對保守性胺基酸 (圖 3.1)。相對的，C 端的胺基酸序列變化較大。此區的序列中沒有絕對保守性的胺基酸，而且保守性區域只佔序列的 33% (圖 3.2)。

3.1.2 AtPCS1 分子模型之建立

3.1.2.1 第二基質結合區之構形分析

AtPCS1 尚無實際的蛋白質構形被解出，因此本研究利用序列上有 34% 相似度的 γ -Glu-Cys acyl-NsPCS intermediate 蛋白質結晶構造 (2BU3) 做為模板，模擬出 AtPCS1 的 N-terminal domain 分子模型。先前在 NsPCS1 上被推測可能為第二基質結合區的口袋，也能在 AtPCS1 的分子模型上觀察到 (圖 3.3A)。AtPCS1 活性反應中心 Cys56-His162-Aps180 的附近即為第一和第二基質結合區，主要由 B-Loop 1、B-Loop 3 和 B-Loop 4 組成 (圖 3.3C)。除了 Gln50、Arg152、Lys185 和 Tyr186 已被認為可能是第二基質結合區的重要胺基酸 (Vivares et al., 2005)，也於這個分子模型上觀察到 Glu52、Tyr55、Gln157 和 Phe184 可能支持著第二基質結合區的結構 (圖 3.3D)。此外，分析序列演化程度之後，發現這些位於 B-Loops 上的胺基酸序列保守性很高 (圖 3.1)。這個訊息顯示它們可能在維持蛋白質功能或穩定性上扮演重要的角色，因此在演化過程中被保留下來。

分析分子模型上基質結合區附近的表面帶電性 (ionizability)，發現兩個基質結合區口袋上都帶著部分正電，其中第二基質結合區的正電主要由位於蛋白質表面附近的 Arg152 和 Lys185 所造成 (圖 3.3E)。本論文進一步將 AtPCS1 上的這兩個胺基酸序列修改為 Lys152 和 Arg185，並建立一個新的 AtPCS1-R182K-K185R 突變株分子模型。這個新的分子模型大致結構都與 wild type AtPCS1 類似，只有活性區的兩個基質結合位的構形明顯與正常 PCS 不同 (圖 3.3G)。雖然 Arg 與 Lys 都是帶正電的鹼性胺基酸，但是兩種胺基酸在第 152 號和第 185 號位置互換的結果，卻造成活性區附近的構形明顯改變。可見除了帶正電的性質之外，這兩個胺基酸的鍵長和和側基角度都有可能影響第二基質結合位的結構。

3.1.2.2 AtPCS1 與基質之間可能的交互作用

由於 AtPCS1 分子模型是以 γ -Glu-Cys acyl-NsPCS intermediate 蛋白質結晶構造為模版，因此這個分子模型與第一基質 (γ -Glu-Cys) 之間的交互作用很趨近於實際情況，能夠提供可靠的分子資訊。將分子模型與第一基質的交互作用轉換為平面圖示，可呈現出 AtPCS1 上與第一基質結合有關的胺基酸 (圖 3.4A)。蛋白質與基質之間主要以離子鍵作用力和凡得瓦爾力來穩定中間物的構形，其中 γ Glu-Cys N 端的兩個羧基可能與保守性鹼性胺基酸 Arg211 產生氫鍵，可能是指引基質以正確方向進入活性區的重要胺基酸之一。

另一方面，本論文也利用對 AtPCS1 上的第二基質結合區進行基質 docking。一開始選擇 GSH 當作 ligand，計算結果顯示這個分子無法完全結合在第二基質結合位上。因此初步推測第二基質可能不會完全進入 PCS 活性區，而是只有基質 N 端部分基團與 PCS 結合；或是 PCS 與第二基質作用過程中可能伴隨著另一次構形變化，因此 γ -Glu-Cys acyl-NsPCS intermediate 呈現的構形可能還不是與第二基質作用的最佳狀態。利用 Trp 螢光光譜追蹤 AtPCS1 接受兩個基質過程中的構形變化，也觀察到與第二基質結合之後的 PCS 構形可能有明顯的改變 (陳怡靜，2013)。在改用 γ Glu-Cys 做為 ligand 之後，本研究得到了較為可信的 docking 結果。

圖 3.3B、圖 3.4B 顯示，第二基質與蛋白質之間的分子作用力形式和第一基質十分類似，都是由蛋白質提供正電與基質 N 端的羧基形成氫鍵，AtPCS1 的 Gln50 和 Lys185 可能提供部分正電與第二基質進行交互作用 (圖 4.3B)。由此推測，第二

基質結合口袋附近的表面正電應該相當重要，因此原先在分子模型上觀察到的兩個鹼性胺基酸 Arg152 和 Lys185，便成為研究 PCS 第二基質結合口袋的要首要目標。



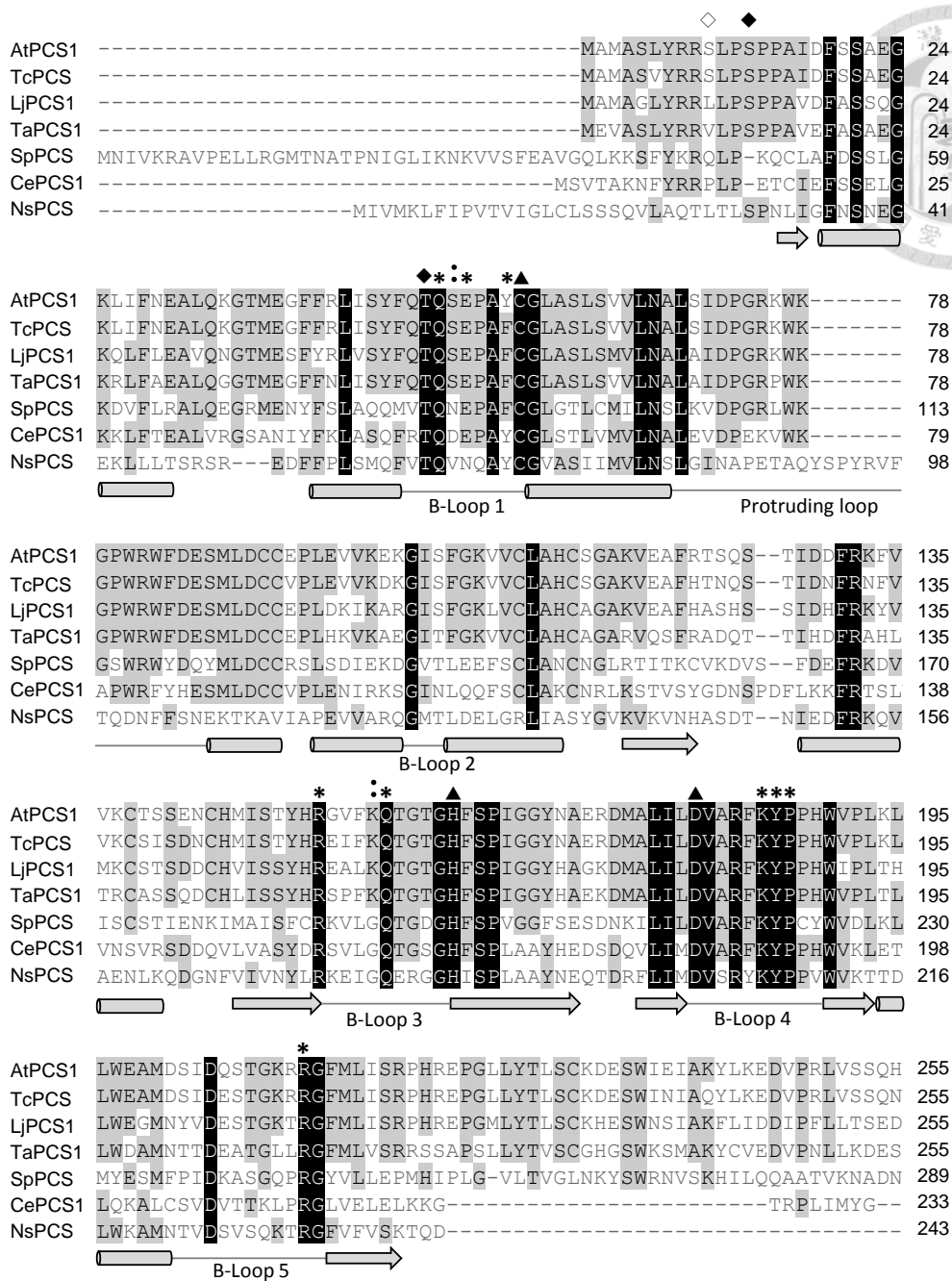




表 3.1 PCS 同源蛋白質胺基酸序列相似度之比較

Table 3.1 Comparison for the similarity of PCS amino acids sequences in plants using the AlignX program of Vector NTI Suite 9 software

Identity (%)	<i>A. thaliana</i>	<i>T. caerulea</i>	<i>T. aestivum</i>	<i>L. japonicus</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Nostoc</i>
<i>A. thaliana</i>	100						
<i>T. caerulea</i>	90	100					
<i>T. aestivum</i>	58	58	100				
<i>L. japonicus</i>	64	64	58	100			
<i>S. pombe</i>	32	31	29	31	100		
<i>C. elegans</i>	32	32	33	30	32	100	
<i>Nostoc</i>	34	32	33	35	24	30	100



3.1 PCS 同源蛋白質 N 端序列比對

Figure 3.1 Sequence alignment of the N-terminal domain of PCS sequences

底色為黑色之胺基酸代表絕對保守性序列，灰色代表高度保守性序列。三角形記號 (▲) 為催化鐵三角 (Cys56-His162-Asp180); 星形 (*) 指出 AtPCS1 的 Gln50, Glu52, Tyr55, Arg152, Gln157, Phe184, Lys185 和 Tyr186 所在位置; 冒號 (:) 代表 Ser51 和 Lys156 之位置; 實心方形 (◆) 為 AtPCS1 兩個位於 N 端的磷酸化位置 Ser13、和 Thr49; 空心方形 (◇) 則是磷酸化位置附近的 Ser10。在序列下方為 NsPCS 結晶構造中的二級結構，圓柱形為 α -helixes、箭頭代表 β -sheets、直線代表 loops。物種縮寫分別代表：At, *Arabidopsis thaliana*; Tc, *Thlaspi caerulescens*; Lj, *Lotus japonicus*; Ta, *Triticum aestivum*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; and Ns, *Nostoc*。

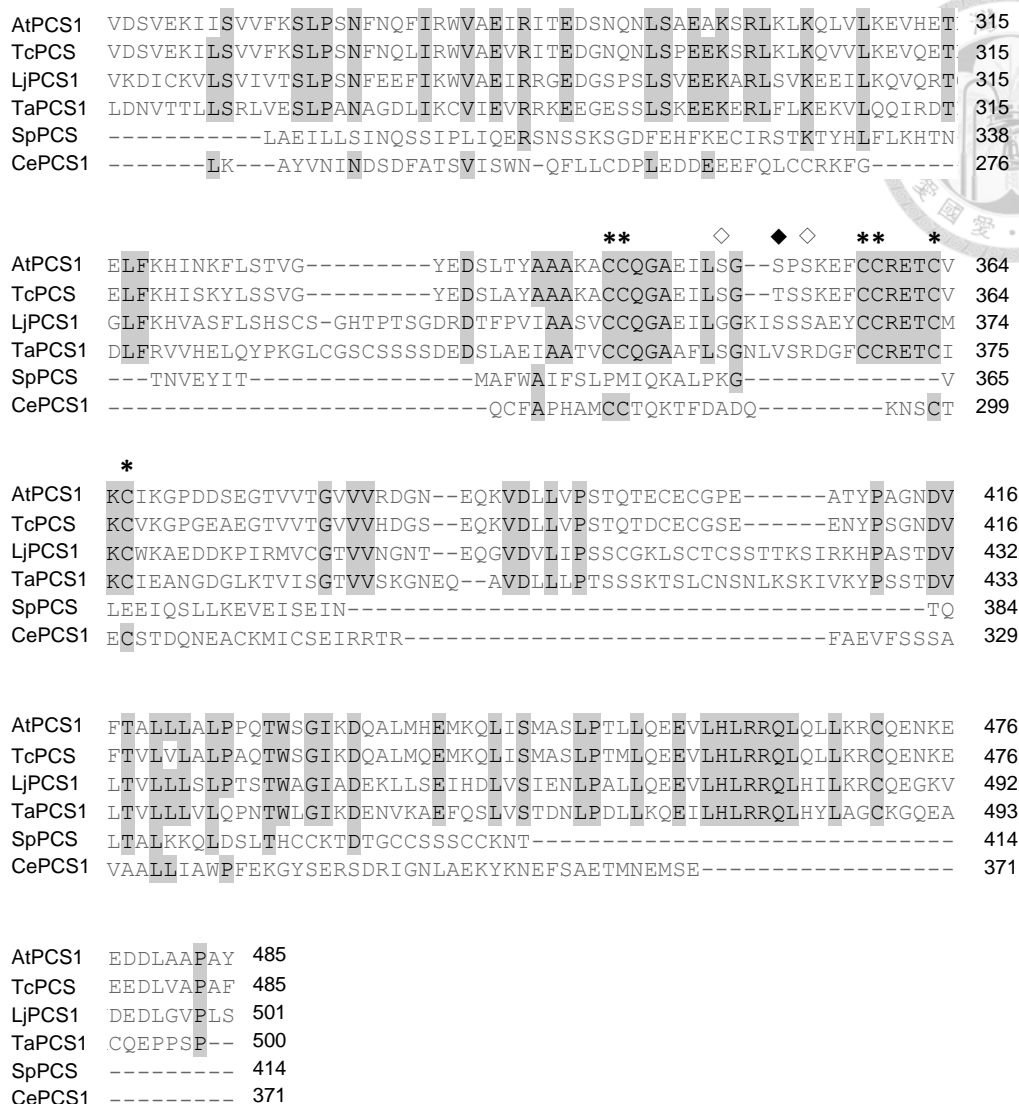


圖 3.2 PCS 同源蛋白質 C 端序列比對

Figure 3.2 Sequence alignment of the C-terminal domain of PCS sequences

底色為黑色之胺基酸代表絕對保守性序列，灰色代表高度保守性序列。星形記號 (*) 指出 AtPCS1 三個位於 C 端的金屬結合位 Cys342-Cys343、Cys358-Cys359、Cys363-X-X-Cys366；實心方形 (◆) 代表 AtPCS1 位於 C 端的磷酸化位置 Ser352；空心方形 (◇) 則是磷酸化位置附近的 Ser350 和 Ser354。At, *Arabidopsis thaliana*; Tc, *Thlaspi caerulescens*; Lj, *Lotus japonicus*; Ta, *Triticum aestivum*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; and Ns, *Nostoc*。

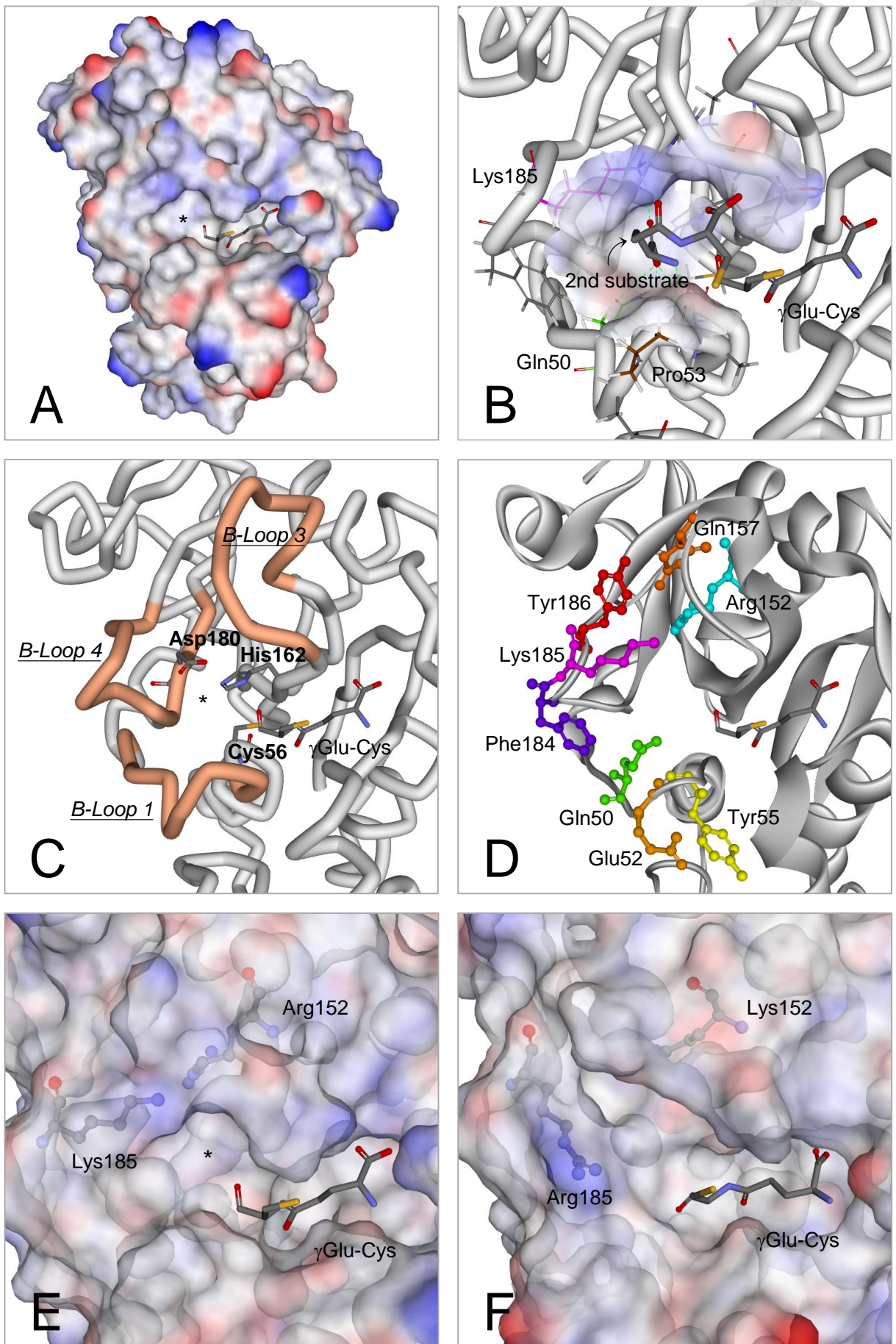




圖 3.3 AtPCS1 活性區立體結構模型

Figure 3.3 The prediction for the active site structure of AtPCS1

AtPCS1 的 N-terminal domain 分子模型顯示活性區附近可能有第二基質結合位的存在 (以星號標示)(A);以 γ Glu-Cys 和第二基質結合位進行 docking 的最佳結果 (B), γ Glu-Cys 與 AtPCS1 之間可能的交互作用以圖 3.4 說明。C 圖顯示 N 端活性區主要由 B-Loop 1、B-Loop 3 和 B-Loop 4 組成, 這三個 loops 和催化鐵三角 (Cys56-His162-Asp180) 的位置密切相關;D 圖則是以相同角度呈現第二基質結合區附近的保守性胺基酸, 包括 Gln50、Glu52、Tyr55、Arg152、Gln157、Phe184、Lys185 和 Tyr186D)。第二基質結合區表面可能有帶有部分正電, 由圖 (E) 可觀察到這個特性可能由 Arg152 和 Lys185 兩個鹼性胺基酸造成;若將兩個位置突變成 R152K-K185R 再進行結構模擬, 發現 N 端活性區的結構有部分改變。圖 (B)、(D) 和 (E) 結構表面的色彩代表 ionizability 的程度, 紅色為帶負電的區域, 藍色為帶正電的區域。

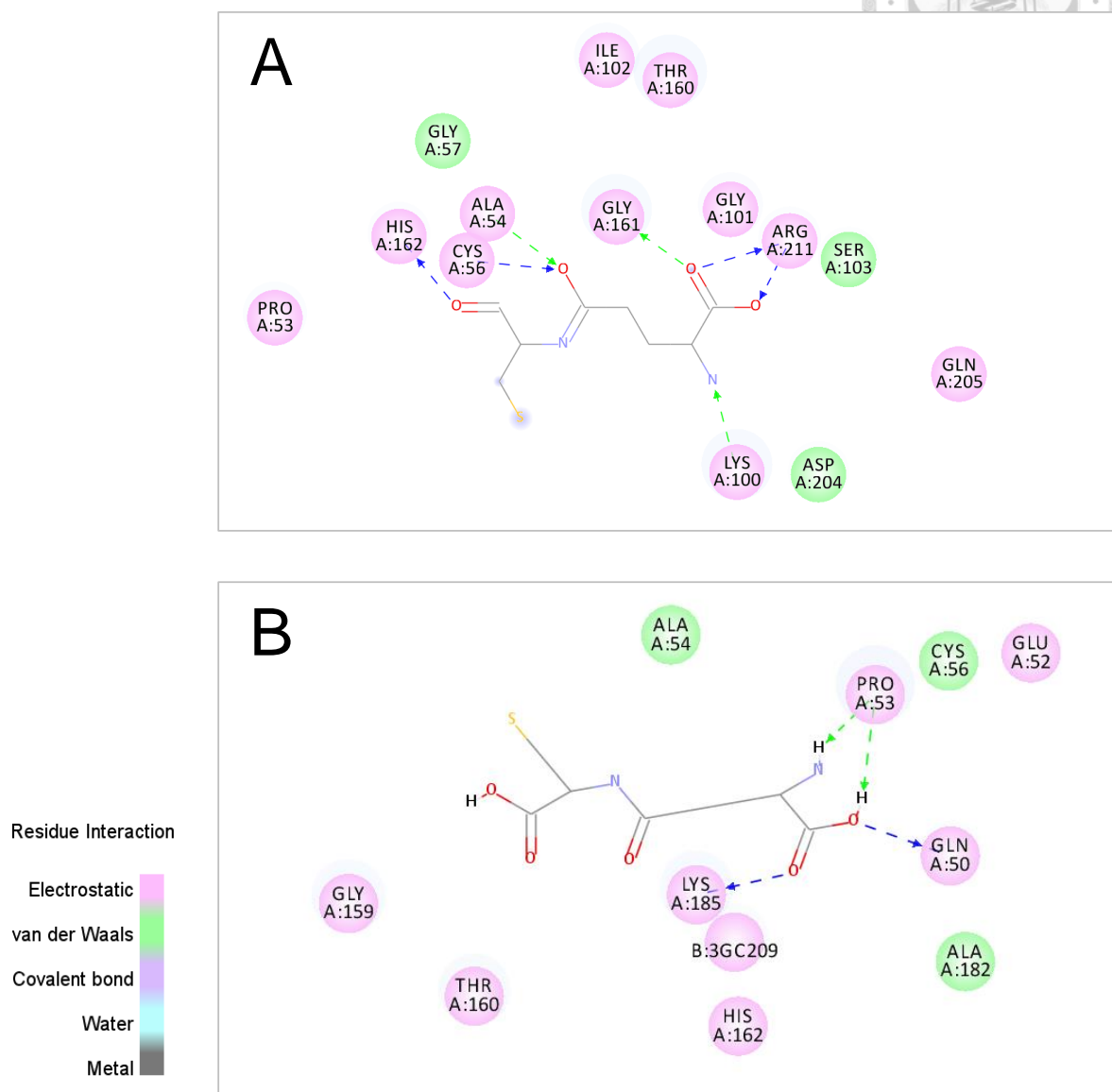


圖 3.4 AtPCS1 與第一和第二基質之間可能的交互作用

Figure 3.4 Docking prediction for the second substrate (γ -Glu-Cys) and its binding cavity

(A) 第一基質 γ Glu-Cys 與 AtPCS1 之間交互作用平面圖，顯示兩者之間利用數個帶電荷的基團和凡得瓦爾力穩定基質的結合；其中 γ Glu-Cys N 端的羧基可能與 Arg211 之間有離子鍵的存在。(B) 第二基質 docking 結果的平面圖顯示出基質 N 端的羧基可能為 Lys185 和 Gln50 的电子提供者, Pro53 則為 N 端的羧基的电子接受者。



3.2 AtPCS1 第二基質結合位之研究

3.2.1 第二基質結合區之重要胺基酸

由序列和結構分析結果鎖定的 B-Loops 上八個保守性胺基酸之中，Arg152 和 Lys185 可能為第二基質結合區表面電性的決定基團。將這兩個胺基酸分別突變成 Ala，會嚴重影響 PCS 的催化活性 (表 3.2)。比較特別的是，Arg 和 Lys 互相取代的點突變株 (R152K 和 K185R) 活性也有顯著的下降；另外用帶有正電的 His 基團取代這兩個位置 (R152H 和 K185H)，突變株仍然無法有效地合成 PC (表 3.2)。不僅如此，同時將 Arg152 和 Lys185 取代成其他基團的雙重突變株 (R152A-K185A、R152K-K185R、R152H-K185H) 完全失活，顯示這兩個胺基酸於 PCS 催化功能有極高的重要性。對照 R152K-K185R 雙重突變株的結構預測結果 (圖 3.3F)，本研究推測 Arg152 和 Lys185 點突變株的活性下降，不僅是因為影響了活性區附近的蛋白質構形，也可能是突變造成基質無法以正確方向進入活性區的緣故。另一方面，因為 Arg152 和 Lys185 突變株活性過低，所以無法進一步以酵素動力學分析這兩個位置對基質親和力的影響。

除了 Arg152 和 Lys185 之外，本論文也對另外六個保守性胺基酸分別進行點突變。位於 B-Loop 1 上的 Gln50、Glu52、Tyr55，B-Loop 3 上的 Gln157，以及 B-Loop 4 上 Phe184 以 Ala 取代時，點突變株的 PC 催化活性都顯著地下降；相對地，對另外兩個不在活性口袋附近的胺基酸 Ser51 和 Lys156 進行點突變則不會影響 PCS 活性 (圖 3.5)。可見相對於其他 B-Loops 上的非保守性序列，這六個保守性胺基酸對 PCS 活性有較高的貢獻。

進一步以其他基團分別取代這六個位置，發現這些胺基酸對 PCS 活性中扮演的角色可能不同。將 Glu52 突變為 Asp，點突變株仍然保有約 75% 的活性；將 Tyr55 突變為 Phe 或 Tyr 也有類似的效果 (圖 3.5)。這個結果顯示 Glu52 上的負電和 Tyr55 的芳香基團可能是維持 PCS 活性的關鍵，只要性質類似的基團存在，突變株就能保有大部分活性。相反的，即使用 Trp 取代 Phe184 或 Tyr186，突變株的活性仍然不到正常 PCS 的 10% (圖 3.5)，可見除了基團性質影響活性之外，第 184 和 186 號胺基酸側基於立體空間上能忍受的變化也比較小。由於 Trp 上的 indole group 立體

結構相對於另外兩種芳香基團大得多，相對的可能會佔去第二基質結合口袋原有的空間，因此阻擋了基質進入活性區的路徑。由 Q157N 的活性結果也可得知，只改變 Gln157 位置的側基長度，就會使得突變株完全失活。綜合以上的實驗結果可知，B-Loops 上的保守性胺基酸側基性質和大小限制性非常大，只要稍稍改變就會造成 PCS 失活，因此可能造成這些胺基酸在序列演化上具有高度保守性。但是由於 B-Loops 與催化反應中心非常接近，因此本研究也不能排除突變株活性的改變可能是因為影響了活性區和第一基質結合位的構形所導致。

除了以上的突變株活性分析之外，Q50N 完全失活的情況也十分值得注意。PCS 的 Gln50 是對應於 NsPCS Gln64、papain Gln19 的同源胺基酸，是酵素催化中心形成 oxyanion hole 的重要基團之一，可以穩定 γ -Glu-Cys 與 PCS 形成的過渡態 (Vivares et al., 2005; Rea, 2012)。推測 Q50N 是因為側基長度改變之後，無法穩定第一基質與酵素形成的過渡態，最終導致突變株失去催化能力。

為了確認這些點突變對蛋白質的立體結構沒有顯著影響，本論文也利用 SDS-PAGE 和 His-tag 專一性抗體檢測表現蛋白質的品質和分子大小。結果顯示於 *E. coli* 中表現之 AtPCS1 帶有約 54kD 之主要色帶 (圖 3.6A 和 3.6B)，接下來以 His tag binding agarose 純化出的表現蛋白質也具有單一的 54kD 色帶 (圖 3.6C)，代表點突變株活性變化與表現蛋白質的品質沒有關係。



表 3.2 Arg152 和 Lys185 點突變株之 PC 合成能力顯著下降

Table 3.2 Mutations at Arg152 and Lys185 resulted in a drastic decline in PCS activity

活性反應條件列於材料與方法 (2.4.1) ; 活性數值皆為三重覆之平均 \pm 標準偏差 ;
N.D. = 無法測量 (not detectable)。

Substitution	AtPCS1 & mutants	Relative activity (%)
	Wild type	100
Alanine	R152A	0.02
	K185A	0.02
	R152A-K185A	N.D.
Lysine or Arginine	R152K	0.01
	K185R	0.56
	R152K-K185R	N.D.
Histidine	R152H	0.25
	K185H	0.01
	R152H-K185H	N.D.

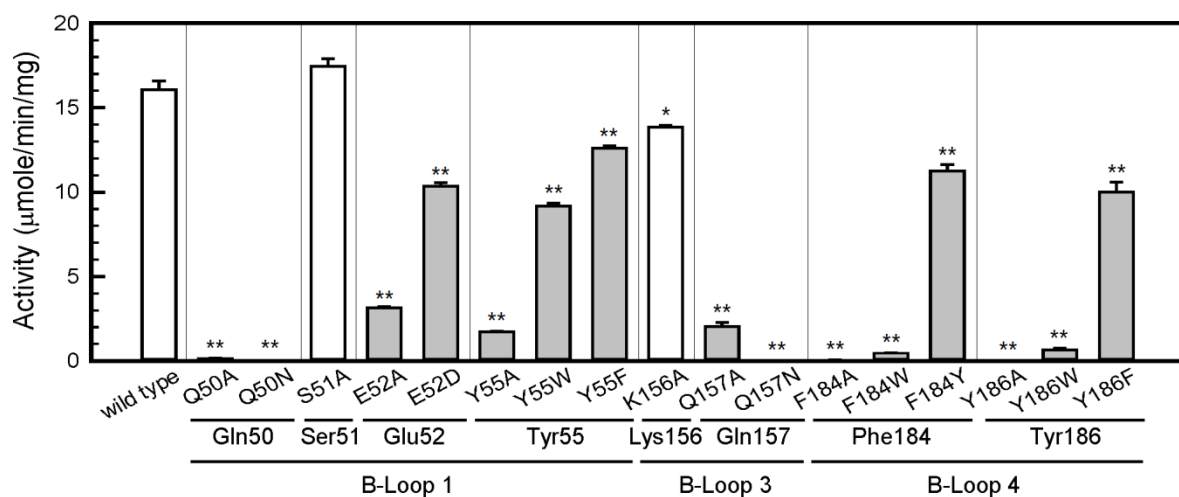


圖 3.5 第二基質結合區附近的保守性胺基酸與 PCS 催化活性有密切關聯

Figure 3.5 The conserved residues on the predicted cavity of AtPCS1 played critical roles in PC synthesis

比較 B-Loop 1、B-Loop 3 和 B-Loop 4 上胺基酸點突變株之活性，發現保守性胺基酸（標為灰色）突變為 Ala 時，會嚴重影響酵素合成 PC 的能力；另外兩個半保守性胺基酸 Ser51 和 Lys156 的突變株（標為白色）活性則與正常 PCS 相似。活性反應條件列於材料與方法 (2.4.1)；活性數值皆為三重覆之平均 ± 標準偏差，星號代表突變株 PCS 與野生型 PCS 的活性相較之下有顯著差異 (*, P value < 0.01, **, P value < 0.001)。

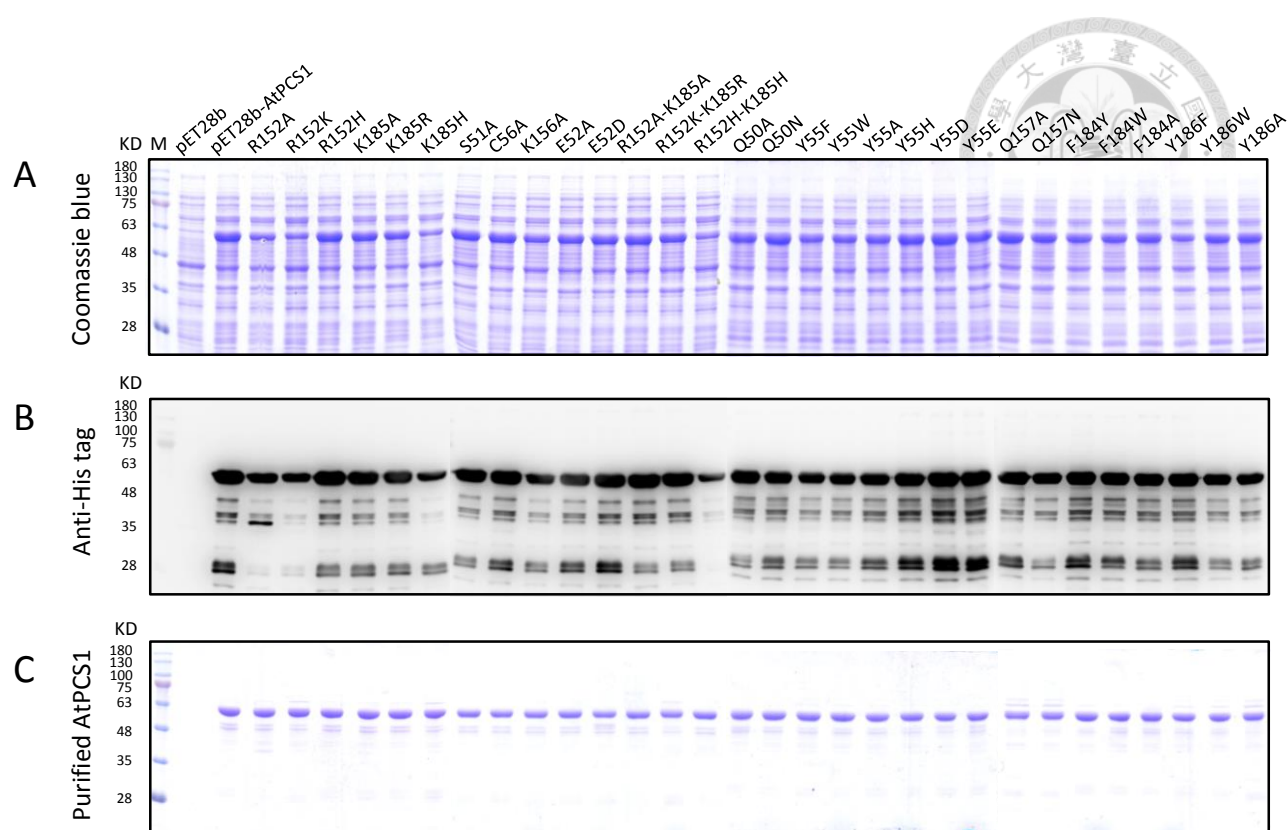


圖 3.6 AtPCS1 和其點突變株蛋白質之表現與純化後之品質

Figure 3.6 Expression and purification of AtPCS1 and its mutants

以 IPTG 誘導 *E. coli* BL21 (DE3) AtPCS1 表現 (詳見材料與方法 2.3.1) 之後, 定量粗萃取液 20 μg 蛋白質進行 12.5% SDS-PAGE (A) 和 western blot (B), 確認表現品質。接著以親和層析法純化出帶有 His-tag 的表現蛋白質, 每個樣本取 2 μg 進行 12.5% SDS-PAGE, 確認蛋白質之分子量和完整性 (C)。



3.2.2 Tyr55 可能與第二基質上的金屬離子結合

由先前的 γ Glu-Cys 與 AtPCS1 第二基質結合位的 docking 結果，本論文推測第二基質的 N-terminal carboxyl group 可能受到 Lys185 的引導，以 N 端進入活性區與第一基質反應 (圖 3.3B、圖 3.4B)。另一方面，由於 PCS 要使用 GSH 和 Cd-GS₂ 兩種不同基質才能進行合成方向反應，因此第二基質結合區不僅要與 GSH 骨架結合，還必需要有能力辨認與第二基質整合的金屬離子。假使第二基質以 N 端進入活性區，那麼第二基質上的金屬離子極有可能與 B-Loop 1 上的分子進行交互作用。已有研究顯示，蛋白質上可能與金屬離子結合的胺基酸主要為 Cys 或 Glu，另外 Tyr、Phe 和 Trp 與金屬離子之間也可能產生 cation- π 交互作用 (Gallivan and Dougherty, 1999; Singh et al., 2009)。讀取 B-Loop 1 的序列，本研究推測 Glu52 上的負電基團和 Tyr55 的 π 電子都很有可能是與第二基質 Cd-GS₂ 進行交互作用的胺基酸。

本研究測試了 B-Loop 1 不同點突變株與鎘結合的能力，以確認與金屬離子結合的胺基酸位置，(圖 3.7)。先前研究指出 Tyr55-Cys56 於 SpPCS 和 TaPCS1 中可能是一個鎘結合位 (Maier et al., 2003)，但是圖 3.7 顯示，以 Ala 取代 Cys56 並不會影響結合於蛋白質上鎘離子數目。在 B-Loop 1 的突變株之中，只有 Y55A 的鎘結合力由 7 下降至 5，其他如 S51A 和 E52A 的鎘結合能力都與正常 PCS 相當。這個結果說明了 Tyr55 可能是一個鎘結合位，而且此位置可能經由異位調控影響其他金屬結合位的作用。除此之外，以 Trp 取代 Tyr55 並不會影響蛋白質的鎘結合力，可見這個位置極有可能是利用 cation- π 交互作用辨認第二基質上的金屬離子。

進一步挑選 B-Loop 1 突變株中保有 60% PCS 活性的 Y55W 和 E52D，以及有 100% PCS 活性的 S51A 進行酵素動力學分析。首先用 Equ. 3.1 和 3.2 (Ogawa et al., 2011) 計算反應中第二基質形成的理論濃度：



$$\text{association constant } (\beta_2') = \frac{[\text{Cd-GSH}_2]}{[\text{Cd}][\text{GSH}]^2} = 4.09 \times 10^8 \text{ M}^{-2} \quad (\text{Equation 3.2})$$

在給予 millimolar 濃度的 GSH 和 micromolar 濃度的 CdCl₂ 條件下，反應溶液中超過 99% 的 CdCl₂ 會形成第二基質 Cd-GS₂，因此本實驗中的 CdCl₂ 濃度可直接視為第二基質濃度。接下來以 10 mM GSH 和 100 μM CdCl₂ 為反應條件，測量 1μg/mL PCS 於固定時間內的產物生成量，確定在此條件之下，wild type PCS、S51A 和 Y55W 在兩分鐘內只會累積 PC₂，而且產物累積量在線性範圍內；E52D 則需要約 3 分鐘才能累積足夠的 PC₂ 供 HPLC 分析 (圖 3.8)。

AtPCS1 酵素動力學是在 2.5-12.5 mM GSH 和 2.5-30 μM CdCl₂ 濃度下進行反應，所有突變株的酵素動力學行為都符合 ping-pong mechanism，以雙倒數作圖可得到固定基質濃度下的一系列平行線 (圖 3.9)。表 3.3 列出各項酵素動力學參數。所有突變株的 V_{max} 都與 wild type PCS 類似，其中 E52D 和 Y55W 對 GSH 的親和力稍微下降，但是變動不超過 wild type 的兩倍。比較所有實驗組的 K_m (Cd-GS₂)，卻只有 Y55W 的數值提高了將近三倍之多，可見以 indole group 取代 Tyr55 會影響 PCS 對第二基質的親和力。由此一來，本實驗進一步驗證了 Tyr55 可能與第二基質結合的假設。

除了以上結果之外，本論文也利用僅有 wild type PCS 10% 活性的 E52A 和 Y55A 進行酵素動力學。以 10 mM GSH 和 100 μM CdCl₂ 為反應條件，測量酵素於固定時間內的產物生成量，確定 E52A 和 Y55A 分別需要 45-90 分鐘才能累積足夠的 PC₂ 供 HPLC 分析 (圖 3.10A、3.10C)。使用前述酵素動力學反應條件進行分析，卻發現不同第一基質濃度下，酵素的反應速率呈現 sigmoidal curves，因此無法順利計算出酵素動力學參數 (圖 3.10B、3.10D)。這樣的圖形結果顯示，以 Ala 取代 Gln52 和 Tyr55 可能會大幅改變活性區附近的結構；尤其是 Y55A 不只第二基質的結合可能受到影響，第一基質也無法順利與酵素結合，進而影響整體催化速率。

為了進一步了解 Tyr55 的功能，便將此胺基酸分別以不同性質的側基 Phe、Trp、His、Ala、Asp 和 Glu 取代。以 GSH 和 Cd-GS₂ 為基質的反應中，突變株隨著第 55 號胺基酸基團性質的改變，活性也逐漸消失 (圖 3.11)。雖然 Glu 和 Asp 也可能帶有電子，但是仍然無法回復 PCS 活性，代表 Tyr55 上的芳香基團才是維持催化活性的關鍵。另一方面，本實驗也使用 S-methylglutathione 做為突變株活性分析的另一種基質。這類基質的 Cys 上帶有甲基化修飾的硫醇基，可以取代一般的第二

基質 Cd-GS₂，因此反應不需要鎘離子即有 *S*-methyl-PC 產物生成 (Vatamaniuk et al., 2000; Romanyuk et al., 2006)。Tyr55 突變株 *S*-methyl-PC 生合成能力的趨勢與一般 PC 合成反應類似，唯一不同的只有 Y55H (圖 3.11)。Y55H 以 GSH 為基質時，仍然保有與正常 PCS 相比 30% 的活性，但是 Y55H 卻幾乎沒有生合成 *S*-methyl-PC 的能力；可見 His 上的 imidazole ring 對鎘離子的結合能力似乎比甲基高出很多。

仔細比較這些 Tyr55 突變株側基性質與活性的變化，可發現 Tyr、Phe 和 Trp 是同時具有親水性與疏水性的兩性分子 (amphipathic group)，因可能與非極性分子之間形成交互作用 (Kyte and Doolittle, 1982; Koide and Sidhu, 2009)。這或許能夠解釋為何 Y55F 和 Y55W 可以使用 GSH 和 *S*-methylglutathione 兩種不同的基質進行反應。雖然 His 也有與金屬結合的能力，但是 imidazole ring 並不是一個良好的疏水性基團 (Kyte and Doolittle, 1982)，也因此造成 Y55H 無法利用 *S*-methylglutathione 進行 *S*-methyl-PC 的合成。

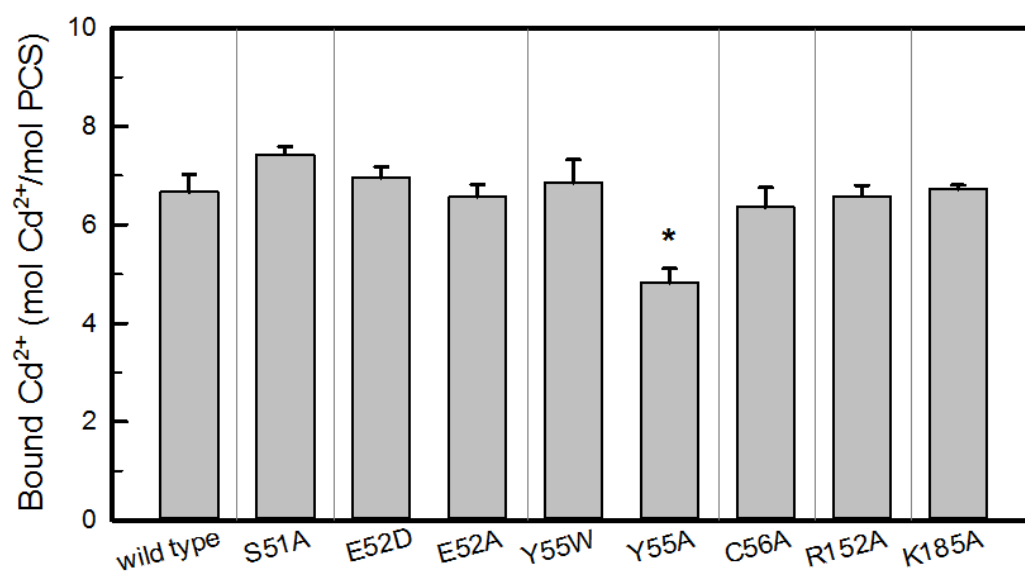


圖 3.7 Tyr55 突變可能影響 AtPCS1 與鎘結合的能力

Figure 3.7 Mutation on Tyr55 might decline the cadmium binding ability of AtPCS1

與正常 AtPCS1 相比較，點突變株 Y55A 的鎘結合力明顯下降。平衡透析法和鎘結合數計算方法列於材料與方法 (2.8.1)。所有數值皆為三重覆之平均 ± 標準偏差，並以 ANOVA 計算正常 PCS 與突變株之鎘結合力是否有顯著差異，星號代表突變株 PCS 與野生型 PCS 的鎘結合力相較之下有顯著差異 (* , P value < 0.01)。

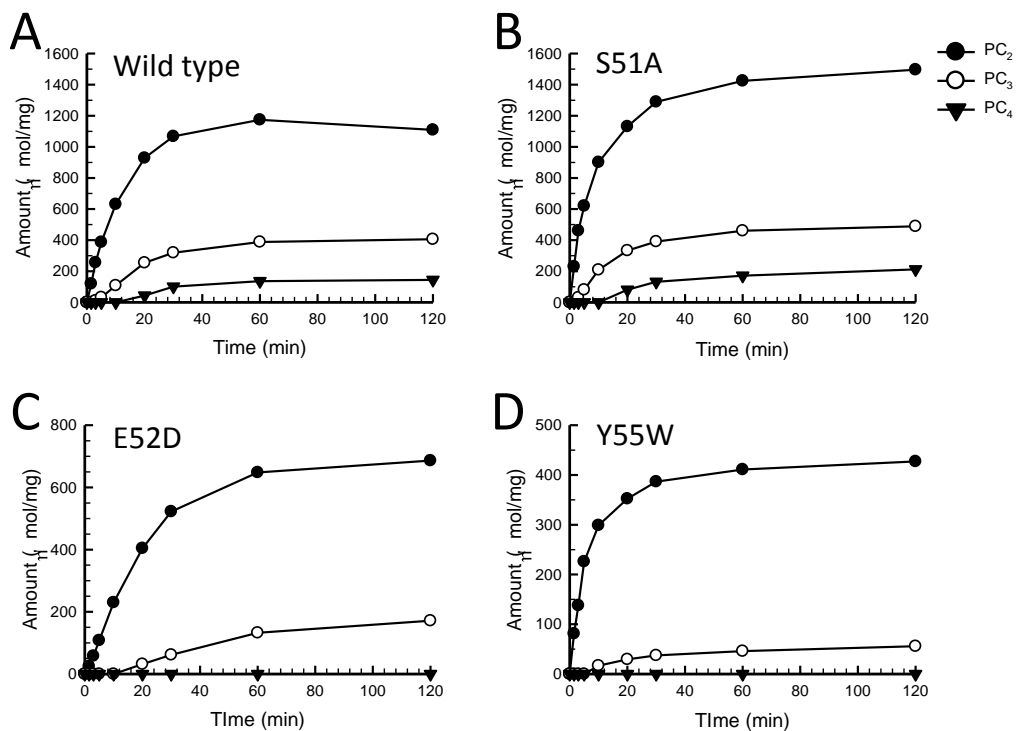


圖 3.8 AtPCS1 突變株於固定時間下的 PC 合成量

Figure 3.8 Time course of *in vitro* PC synthesis by AtPCS1 variants

正常 AtPCS1 (A)、S51A (B)、E52D (C) 和 Y55W (D) 於反應 1.5、3、5、10、20、30、60 和 120 分鐘時的 PC₂-PC₄ 合成量。活性反應條件列於材料與方法 (2.4.2)。

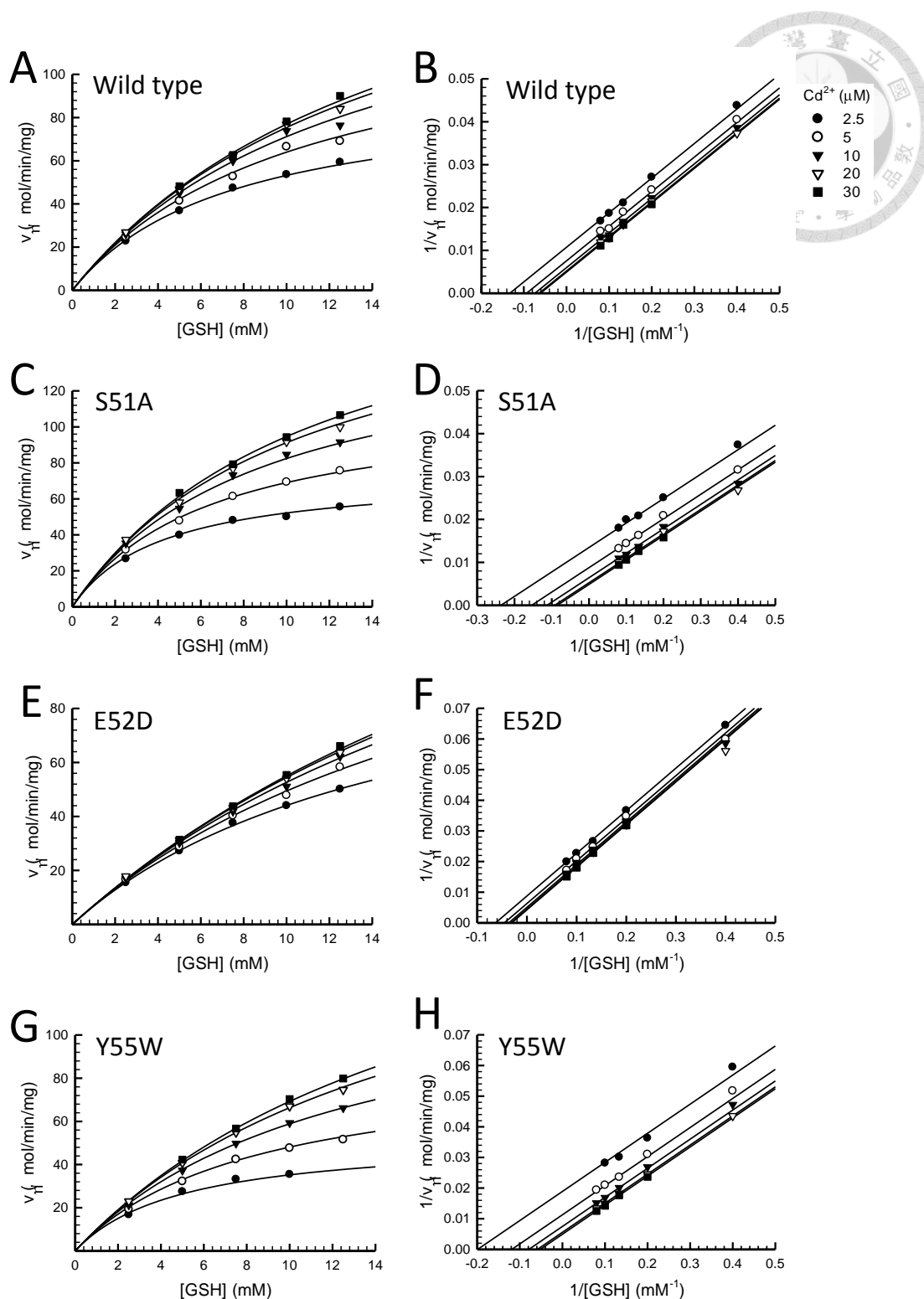


圖 3.9 AtPCS1-wild type、S51A、E52D 和 Y55W 的酵素動力學結果

Figure 3.9 Kinetics analysis of PC_2 synthesis catalyzed by AtPCS1-WT, S51A, E52D and Y55W

圖 (A)、(C)、(E)、(G) 為 Michaelis-Menten plots；圖 (B)、(D)、(F)、(H) 為雙倒數作圖結果。酵素動力學反應條件列於材料與方法 (2.4.2)；所有圖形均為 SigmaPlot 12.3 酵素動力學模組之計算結果。

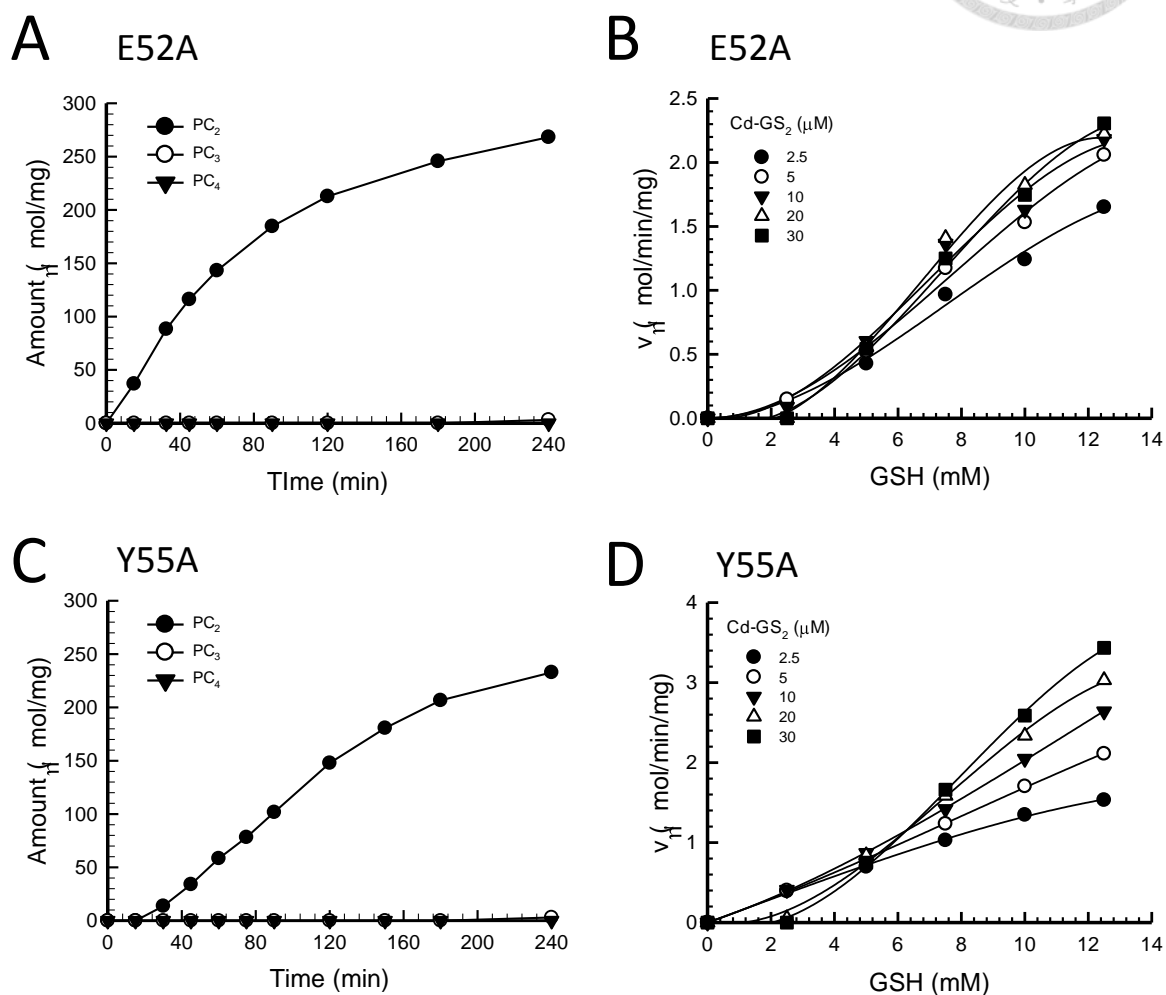


圖 3.10 AtPCS1-E52A 和 Y55A 酵素動力學呈現 sigmoidal curves

Fig. 3.10 Kinetic data of of PC₂ synthesis catalyzed by AtPCS1- E52A and Y55A

(A) & (C) 為 E52A 和 Y55A 於固定時間下的 PC 合成量；(B) & (D) 為 E52A 和 Y55A 的 Michaelis-Menten 圖形。酵素動力學反應條件列於材料與方法 (2.4.2)；圖形為 SigmaPlot 12.3 酵素動力學模組之計算結果。



表 3.3 AtPCS1 點突變株之酵素動力學參數

Table 3.3 Kinetic parameters of synthesis of PC₂ catalyzed by wild type AtPCS1 and mutants

所有數值均為 SigmaPlot 12.3 酵素動力學模組之計算結果。

AtPCS1 & mutants	V_{\max} (mmole/mg/min)	K_m (GSH) (mM)	K_m (Cd-GS ₂) (mM)	V_{\max}/K_m (GSH)	V_{\max}/K_m (Cd-GS ₂)
Wild type	227 ± 13	18.3 ± 1.6	3.58 ± 0.32	12.4	63.4
S51A	245 ± 9	13.9 ± 0.8	5.74 ± 0.28	17.6	42.7
E52D	259 ± 16	36.1 ± 2.8	3.19 ± 0.28	7.19	81.2
Y55W	272 ± 13	25.8 ± 1.7	10.3 ± 0.6	10.5	26.3

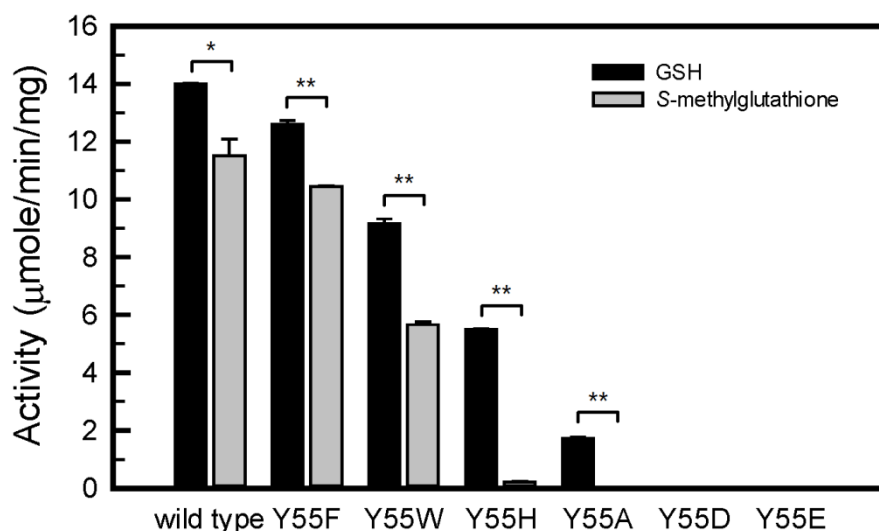


圖 3.11 AtPCS1 第 55 號胺基酸的性質可能影響酵素合成 PC 或 S-methyl-PC 的速率

Figure 3.11 PC_n and S-methyl-PC_n synthesis of AtPCS1 was affected by the side chain on the 55th amino acid.

AtPCS1 以 GSH 以 GSH 和 S-methylglutathione 為基質的合成能力與第 55 號位置是否帶有芳香環有關；當側基失去芳香環性質，會使 PCS 無法合成 S-methyl-PC。活性反應條件列於材料與方法 (2.4.1)；S-methyl-PC 活性測定除了不含鎘離子之外，其他條件與使用 GSH 為基質相同。活性數值為三重覆之平均 ± 標準偏差，星號代表同一突變株之中，使用兩種不同的基質活性相比有顯著差異 (*, P value < 0.01, **, P value < 0.001)。



3.2.3 AtPCS1 第二基質結合區之分子機制

利用立體構形模擬和點突變技術，本論文提出第二基質結合區可能的結構，找出結構上的重要分子並確認它們對活性的貢獻，也以酵素動力學分析確認 Tyr55 即為辨認第二基質的重要胺基酸。另外，在本實驗室先前的研究中指出 AtPCS1 活性區附近的 Thr49 被磷酸化之後 Thr49 可能與立體空間上相近的 Arg183 結合，進而穩定活性區附近的結構 (Wang et al., 2009)。這些研究成果解釋了 AtPCS1 可能的活化機制。

圖 3.12 顯示 B-Loop 1、B-Loop 3 和 B-Loop 4 上重要的保守性胺基酸相對位置。位於 B-Loop 1 的 Thr49 磷酸化之後與 B-Loop 4 外側的 Arg183 結合，可能帶來兩方面的影響。第一是造成構形上的改變，使得第二基質結合區得以接受第二個 GSH 的進入。由 B-Loop 4 上的 Lys185 吸引基質 N 端的羧基，第二基質上的 Tyr55 則以 cation- π 交互作用結合 GSH 上的鎘離子，協同 Ly185 引導 GSH 以正確方向進入催化區。另一方面，由圖 3.1 和 3.12 也可看出催化鐵三角 Cys56-His162-Aps180 剛好位於三個 B-Loops 的末端，因此磷酸化 Thr49 與 Arg183 的結合也可能有助於穩定活性區催化鐵三角的構形，進而使得 PCS 催化效率上升。

雖然 AtPCS1 立體模型的確指引出可能為第二基質結合位之胺基酸，但是由於模擬出此分子模型的原核模版 NsPCS 不具有 C-terminal domain 結構，其 PC 催化活性也遠低於真核 PCS 家族 (Harada et al., 2004; Tsuji et al., 2004; Tsuji et al., 2005)，因此本論文得到的 AtPCS1 模型可能無法完全展現真核 PCS 活性區的樣貌。除了以上提及的保守性胺基酸之外，還可能有其他分子參與第二基質的辨認與結合。若未來有與 AtPCS1 同源性更高的 PCS 模版、或是真核 PCS 的結晶構形能夠參考，將可更深入的了解第二基質結合位。

以上針對第二基質結合區的研究結果，不但描繪出 PCS 整體催化過程的分子機制，也解釋了為何重金屬是啟動 PCS 活性開關的關鍵。在植物遭遇重金屬時，細胞質中的重金屬濃度的確控制了 PC 的累積速度 (Loeffler et al., 1989)。不同種類金屬離子開啟蛋白質活性的效率差異很大，例如 AtPCS1 對二價鎘和汞離子的敏感

度很高，但是相同的濃度的二價銅、鋅、和鉛離子卻無法活化酵素 (Vatamaniuk et al., 2000)。由於 Tyr55 可以結合第二基質上的金屬離子，因此本研究推測這個基團也可能幫助 PCS 選擇不同金屬形成的第二基質 (X^{2+} -GS₂)。



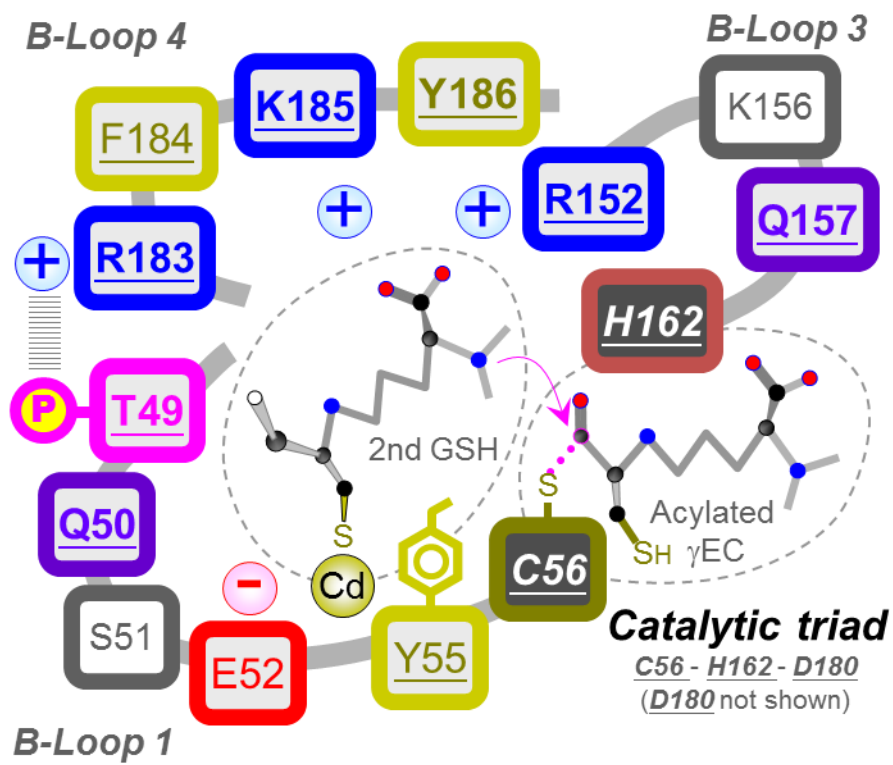


圖 3.12 AtPCS1 活性區重要分子之圖示

Figure 3.12. A schematic representation for the AtPCS1 active site

3.3 AtPCS1 之磷酸化後修飾

3.3.1 以酵母菌系統表現 AtPCS1

本實驗室先前的研究指出，casein kinase 2 可針對 *E.coli* 系統表現的 AtPCS1 上的 Thr49 進行磷酸化後修飾。為了更深入研究 AtPCS1 上的磷酸化位置，以及磷酸化對酵素催化活性的影響，因此本論文使用酵母菌 *P. pastoris* 真核表現系統，生產帶有完整磷酸化修飾的 AtPCS1 重組蛋白質。

本論文使用 invitrogen 公司的 pPICZ-B 為表現載體，其上帶有 *AOX1* promoter 和 *AOX1* terminator，可以在含有甲醇的環境下誘導特定基因表現。將 *AtPCS1* cDNA 構築於 *AOX1* promoter 之後，可以表現出帶有 His tag 和 c-myc tag 的 AtPCS1 表現蛋白質。雖然 His tag 有結合二價金屬離子的能力，但是在本實驗室先前的實驗中，已證實帶有 His tag 對 PCS 表現蛋白質催化能力和對基質的親和力影響極小 (林歆祐，2011)，因此本論文仍然使用 His tag 為主要的表現蛋白質純化策略。所有 pPICZ-AtPCS1 表現載體皆經過限制酶和 DNA 定序確認帶有正確基因 (圖 3.13)，最後將此載體送入 *P. pastoris* strain X33 中進行表現。

AtPCS1 之表現在 30°C、0.5% methanol 條件下進行。挑選三種表現強度的細胞株，分別收集表現時間 0-72 小時的細胞樣本進行蛋白質電泳。再用 anti-AtPCS1 和 anti-His tag 確認細胞中累積的表現蛋白質總量和品質。圖 3.14 顯示 AtPCS1 於細胞培養至 72 小時累積量最多，但是已有部分蛋白質開始降解；培養 48 小時則可以累積最多完整且帶有 His tag 的表現蛋白質。因此後續實驗皆選用此時間點為 AtPCS1 表現條件。



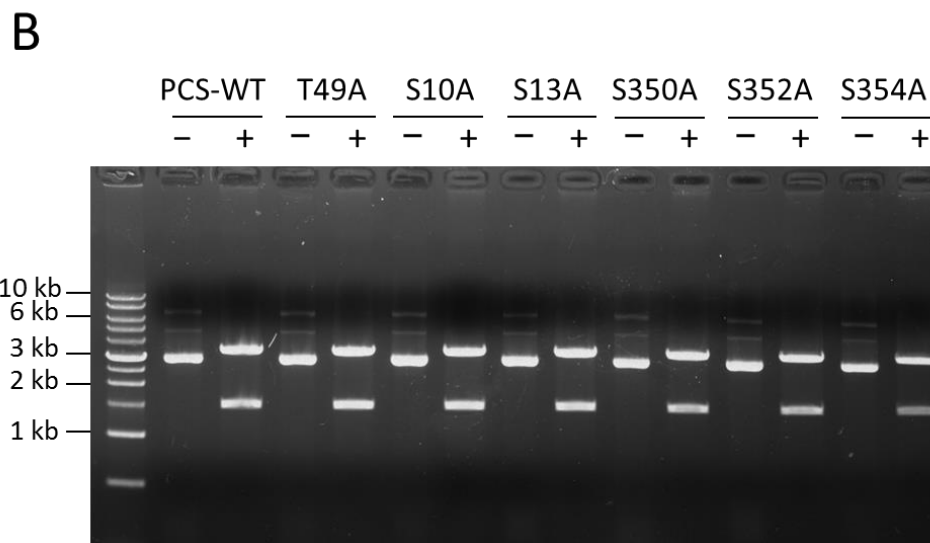
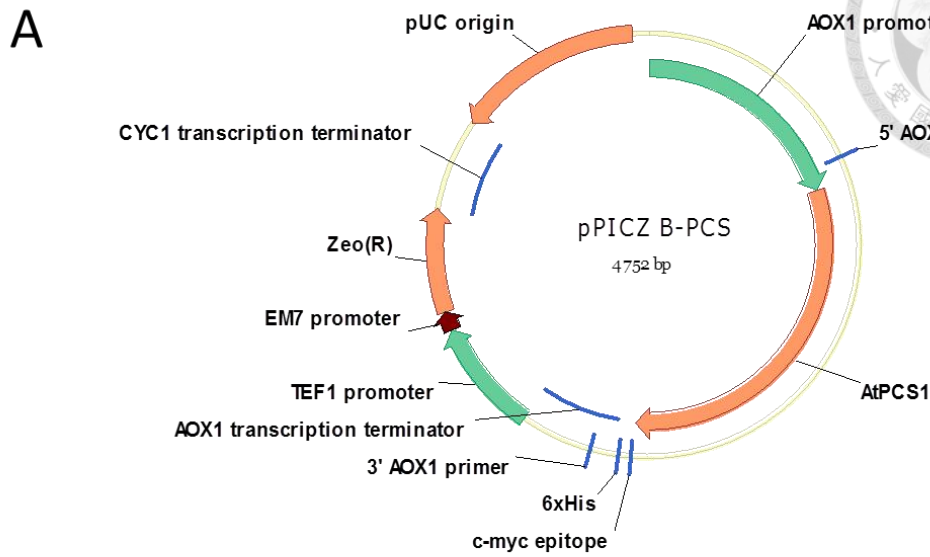
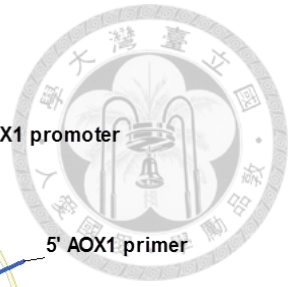


圖 3.13 pPICZ-AtPCS1 載體之確認

Fig 3.13 pPICZ-AtPCS1 construction map

(A) pPICZ-AtPCS1 載體圖譜；(B) 以 *EcoRI*/*NotI* 限制酶確認載體中 *AtPCS1* cDNA 1.5 kb 之片段，- 表示未處理之質體，+ 表示限制酶反應後之質體。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.2.2)。

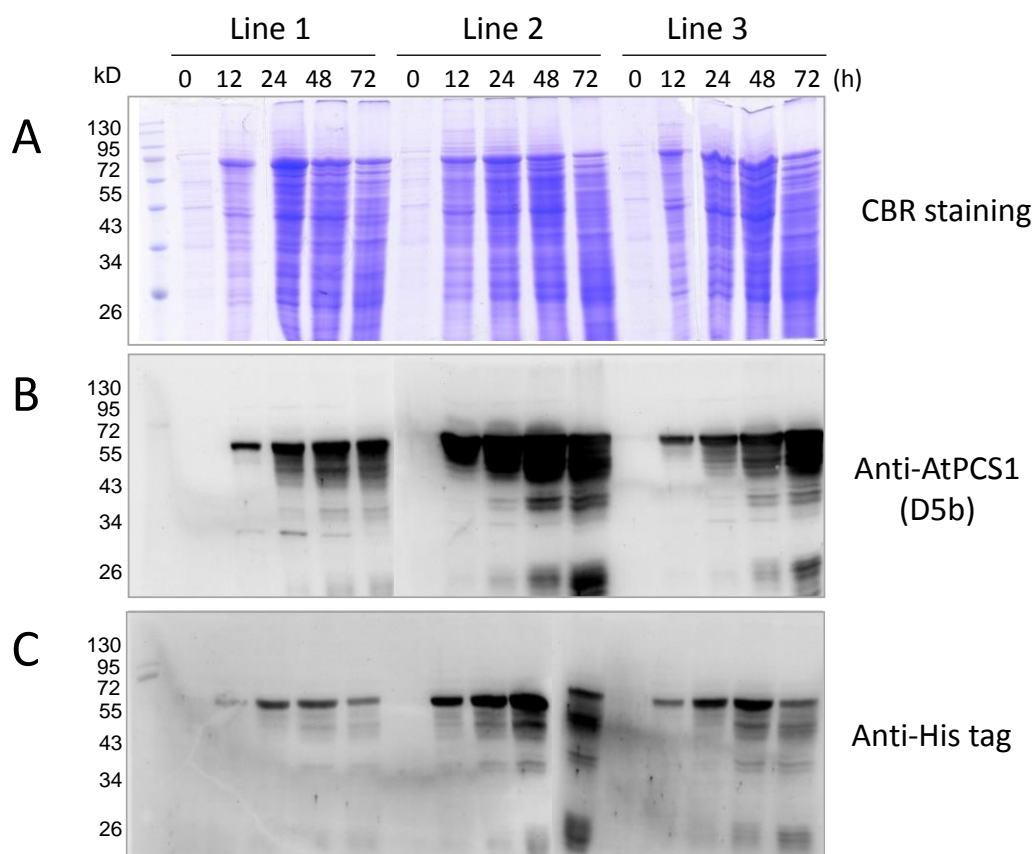


圖 3.14 以 *Pichia* 系統表現 AtPCS1 之最適條件

Fig 3.14 Culture conditions of AtPCS1 in *Pichia* expression system

三種不同表現量的 *P. pastoris* 轉殖株於 0、12、24、36 和 72 小時的 AtPCS1 蛋白質表現量和品質。菌株在培養第 48 小時可累積大量且完整的表現蛋白質，部分表現蛋白質於培養至 72 小時開始降解。(A)：CBR 染色結果；(B)：AtPCS1 單株抗體染色結果；(C)：Anti-His tag 抗體染色結果。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.3.2)。



3.3.2 以 *P. pastoris* 生產的 AtPCS1 有磷酸化現象

利用 AtPCS1 表現蛋白質帶有的 His-tag 進行蛋白質純化，再以二維電泳分析表現蛋白質的圖譜。結果發現從 *P. pastoris* 表現出來的 AtPCS1 與阿拉伯芥內生性 AtPCS1 在二維圖譜上的分布非常類似，分子量都在 55 kD 附近，而且在 pH 6-7 之間有數個不同 *pI* 值的蛋白質點 (圖 3.15)。由此推測 *P. pastoris* 生產的 AtPCS1 可能與內生性的 PCS 具有類似的性質。

由於 AtPCS1 表現蛋白質上可能有磷酸化修飾，所以本論文推測在表現蛋白質純化過程中另外加入磷酸酶抑制劑 NaF 和 Na_3VO_4 ，可能會降低 AtPCS1 被磷酸酶攻擊的可能性。的確，若在純化過程中添加這兩項抑制劑可以使表現蛋白質在二維圖譜中呈現較多不同 *pI* 的位點 (圖 3.16)。另一方面，為了確認二維圖譜上 AtPCS1 位點的移動，另外在二維電泳中加入已知 *pI* 值分布在 5.4-5.7、分子量為 67 kD 的小牛血清蛋白 (BSA) 當做判斷標準。對照 BSA 的 *pI* 分布，可以得知若無磷酸酶抑制劑的保護，AtPCS1 的不同 *pI* 的位點會減少、並且往 pH 值高的方向移動 (圖 3.16)。由此結果可知，二維圖譜中不同 *pI* 分布的 PCS 位點可能是磷酸化修飾所造成的結果。

進一步利用磷酸酶 (CIP) 對純化後的 AtPCS1 進行去磷酸化反應，再以磷酸化蛋白質染劑 Pro-Q dimond 偵測 PCS 的磷酸化訊號。由圖 3.17A 可知，AtPCS1 的確帶有磷酸化後修飾，而且在 CIP 處理 30 分鐘之後，磷酸化的訊號就消失了。比較 CIP 處理前後的 PCS 活性，發現去磷酸化會使得蛋白質活性下降約 40% (圖 3.17B)，此現象與本實驗室先前的研究成果十分類似 (Wang et al., 2009)。對照以上的分析結果，推測由 *P. pastoris* 表現出的 AtPCS1 帶有本研究預期的磷酸化修飾，而且此修飾可以提升 PC 生合成方向的活性。

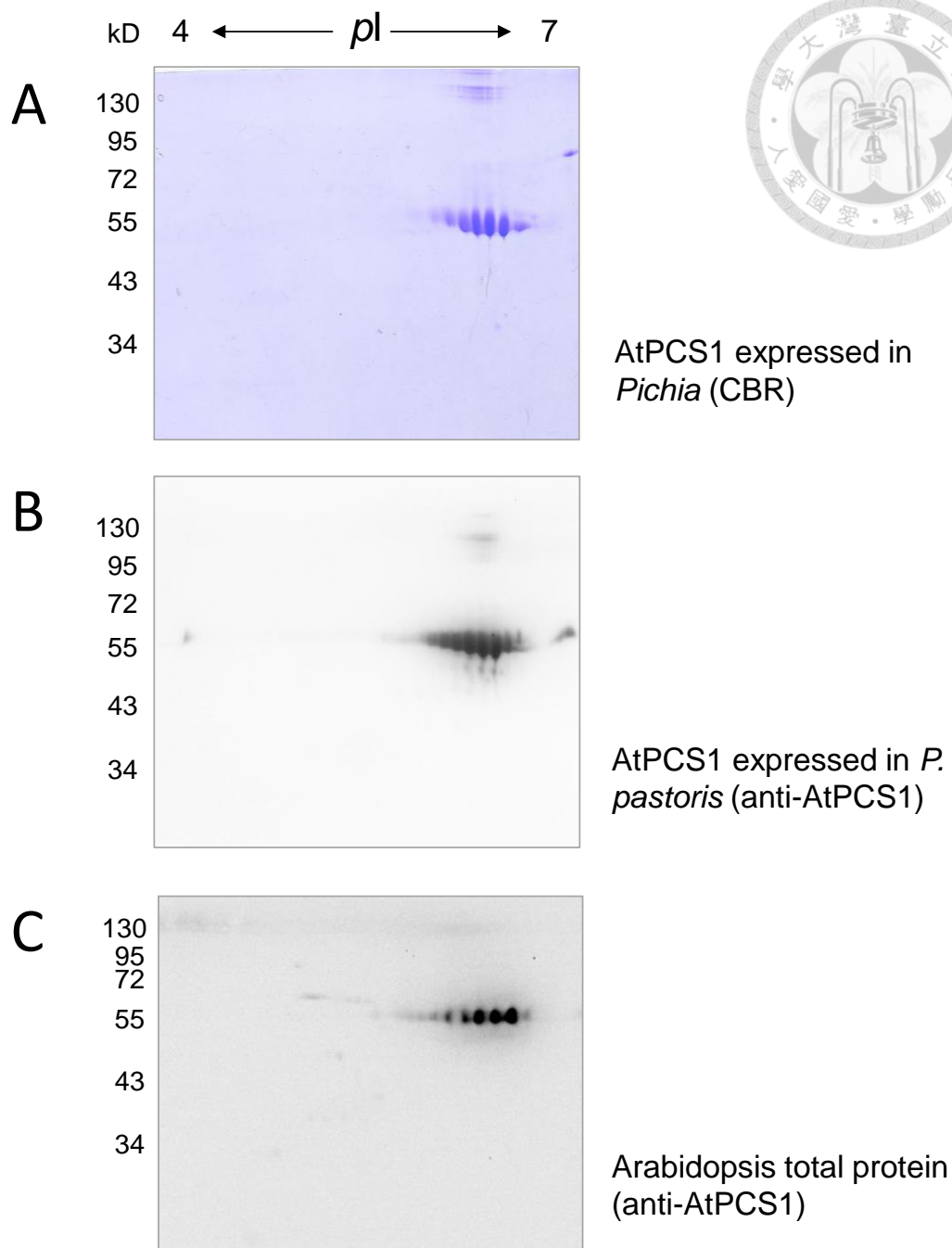


圖 3.15 *P. pastoris* 表現之 AtPCS1 和阿拉伯芥內生性 PCS 有類似的 *pI* 分布

Fig 3.15 The 2-DE pattern of AtPCS1 expressed in *P. pastoris* was similar to that of intact AtPCS1

(A) *P. pastoris* 表現出之 AtPCS1 經過純化後的二維電泳圖譜 CBR 染色結果；(B) *Pichia* 表現出之 AtPCS1 經過純化後的二維電泳圖譜之 PCS 單株抗體染色結果；(C) 阿拉伯芥總蛋白質二維電泳圖譜之 PCS 單株抗體染色結果 (林欽祐, 2011)。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.3.4)。

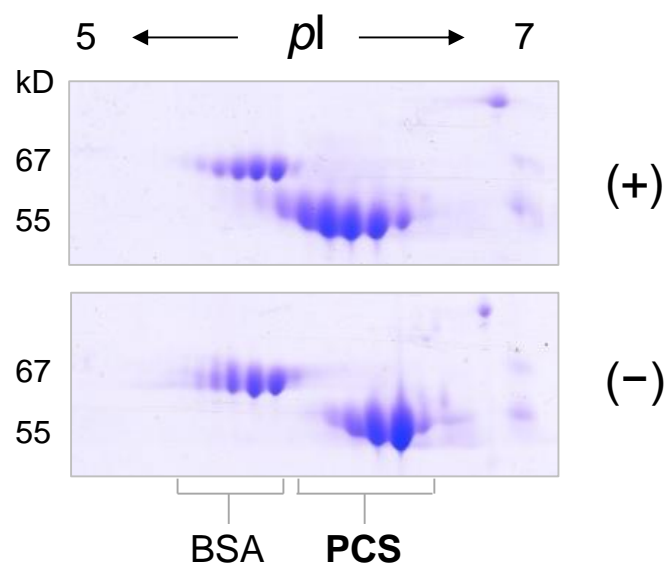


圖 3.16 *P. pastoris* 表現之 AtPCS1 二維圖譜形態可能受到磷酸酶調控

Fig 3.16 The 2-DE pattern of AtPCS1 expressed in *P. pastoris* might regulated by phosphatase

P. pastoris 表現出之 AtPCS1 在純化過程中可能受到磷酸酶作用，使得純化後的蛋白質於二維圖譜上有不同的 *pI* 分布。+ 代表在蛋白質純化過程中加入磷酸酶抑制劑 20 mM NaF 和 1 mM Na₃VO₄；- 代表蛋白質純化過程中未加入任何磷酸酶抑制劑。由二維圖譜中的 BSA (M.W. = 67, *pI*=5.4~5.7) 相對位置可辨認出 PCS (M.W. = 55) 之位移。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.3.4)。

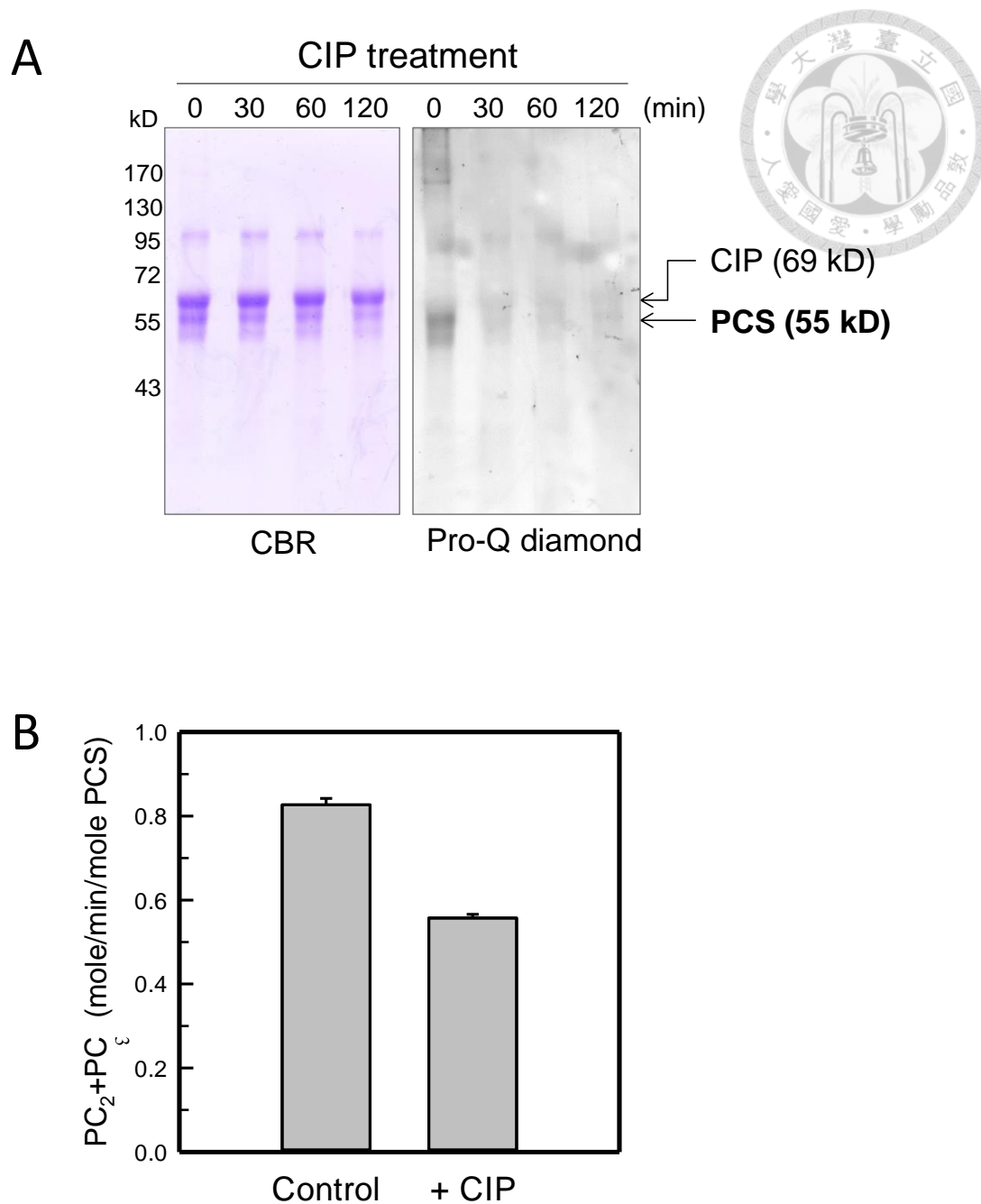


圖 3.17 *P. pastoris* 表現之 AtPCS1 之活性受到磷酸化調控

Fig. 3.17 AtPCS1 expressed in *P. pastoris* was activated by phosphorylation

(A) 以 Pro-Q diamond 偵測帶有磷酸化修飾之蛋白質，顯示 *P. pastoris* 表現出之 AtPCS1 可被 calf intestinal phosphatase (CIP) 去磷酸化；(B) CIP 處理後之 AtPCS1 活性明顯下降。活性反應條件列於材料與方法 (2.8.4 和 2.4.3)；活性數值為三重覆之平均 ± 標準偏差。



3.3.3 AtPCS1 的磷酸化修飾位置

利用表現蛋白質 C 端的 His-tag 將 AtPCS1 從 *P. pastoris* 中純化出來，再以 SDS PAGE 分離出 55 kD 的目標片段進行 in-gel digestion。選用 trypsin 或 chymotrypsin 將 AtPCS1 切成較小的片段，經過 phospho-peptide enrichment 之後以 LC-MS/MS 分析樣本中磷酸化修飾的位置。最後得到兩個高度可信的片段，分別為 chymotrypsin 切解出的兩段序列：⁹RRSLPS_pPPAIDF¹⁸ 和 ³⁴¹ACCQGAEILSGS_pPSKEFCCR³⁶⁰，並且確定磷酸化修飾在 Ser13 和 Ser352 上 (圖 3.18)。除了磷酸化位置之外，LC-MS/MS 結果也顯示樣本中帶有去酰胺修飾 (deamidation) (表 3.4)。由於去酰胺也會改變胺基酸的帶電性，因此除了磷酸化可能會造成蛋白質帶有不同 *pI*，這些去酰胺修飾也可能是 AtPCS1 帶有多個不同 *pI* 位點的原因之一。

另一方面，因為 Thr49 磷酸化實驗是以外加 casein kinase 2 的方式進行放射性 P³² 標定，尚需要其他證據證明此磷酸化修飾存在於真核系統中。為此，本研究試著使用 MASS 確定由 *P. pastoris* 表現的 AtPCS1 帶有 Thr49 磷酸化修飾。同樣使用 trypsin 或 chymotrypsin 處理 AtPCS1，預期能將含有 Thr49 的序列切成 10-30 個胺基酸左右的片段 (⁴⁷FQTQSEPAY⁵⁵、⁴⁷FQTQSEPAYCGL⁵⁸ 或 ⁴³LISYFQTQSEPAYCGLASLSVVLNALSID- PGRKW⁷⁵)。處理完的樣本不經過 phospho-peptide enrichment，直接進行 LC-MS-MS。令人意外的是，五個獨立樣本得到的數百筆 mass 圖譜中，包含 Thr49 的片段只出現四次。本實驗使用的 electrospray ionization (ESI)-MS 是利用酸性環境讓 peptided 的 N 端胺基和序列中的 Arg、Lys 帶有正電，然而包含 Thr49 的序列上 Arg 和 Lys 非常少，可能比較不容易被離子化，因此在進行 ESI-MS 時屬於不容易被分析到的一群片段。相對來說，之前分析到的 ⁹RRSLPS_pPPAIDF¹⁸ 和 ³⁴¹ACCQGAEILSGS_pPSKEFCCR³⁶⁰ 片段上都帶有多個 Arg 或 Lys，也因此非常適合進行 mass 分析。由於技術上的困難，因此目前並未得到磷酸化 Thr49 的可信 mass 圖譜。

本實驗室先前的研究已經顯示 Thr49 是 PCS N 端上被 casein kinase 2 (CK2) 調控磷酸化位置 (Wang et al., 2009)。為了確認另外兩個磷酸化位置的真實性，本論

文利用點突變技術將 Ser13 和 Ser352 突變 Ala，同時也挑選磷酸化位置附近的其他 Ser (Ser10、Ser350 和 Ser354) 做為對照組進行突變，再使用 *P. pastoris* 系統表現這些 Ser 點突變株。利用磷酸化蛋白質染劑 Pro-Q dimond 辨認這些表現蛋白質上的磷酸化修飾之後，再以 CBR 對同一份蛋白質膠片進行染色，計算 Pro-Q dimond 訊號強度和 CBR 訊號的比值，即可得知每個突變株之間磷酸化修飾的相對程度 (圖 3.19)。

將 wild type PCS 的磷酸化強度定為 100% 與 Ser 突變株進行比較，結果只有 S13A 和 S352A 的磷酸化程度明顯下降，其中 Ser352A 下降的程度大約有 20% (圖 3.19)。可見 Ser352 是 *P. pastoris* 表現出的 AtPCS1 中最主要的磷酸化修飾位置，而且由此結果即可排除相鄰的 Ser10、Ser350 和 Ser354 為主要磷酸化修飾位之可能性。Ser13A 與 wild type 之間的磷酸化程度雖然也有統計上的顯著差異，但是實際下降幅度約只有 5.5%，代表 AtPCS1 表現蛋白質中，帶有磷酸化 Ser13 的 AtPCS1 不到所有表現蛋白質的十分之一。除此之外，這兩個磷酸化位置分別突變之後蛋白質上都還有磷酸化訊號的存在，顯示 AtPCS1 是一種帶有多個磷酸化修飾的蛋白質，或是還有其他替代位置在 Ser13 或 Ser352 失去功能時被磷酸化。目前已著手製備 S13A-S352A 雙重突變株和 S13A-T49A-S352A 三點突變株，期望能進一步分析這些位點對 PCS 磷酸化程度的貢獻。

除此之外，本論文也在阿拉伯芥蛋白質磷酸化資料庫 (The Arabidopsis Protein Phosphorylation Site Database, PhosPhAt) (Sugiyama et al., 2008; Nakagami et al., 2010)，找到帶有 phospho-Ser352 的相同片段，顯示這個胺基酸在植物中的確受到磷酸化修飾。這個資料庫是將阿拉伯芥總蛋白質以 Lyc-C 切解之後，利用 LC-MS/MS 定出混合樣本中所有磷酸化片段的身分。這個搜尋結果代表 Ser352 確實是 AtPCS1 在阿拉伯芥植株中被磷酸化修飾的位置。由於這個資料庫中的阿拉伯芥樣本沒有經過逆境處理，因此 phospho-Ser352 可能在逆境下會受到去磷酸化修飾，藉此調節 PCS 的活性。這個位置也可能是一般生理條件下產生的轉譯後修飾，不一定與生理逆境的調控路徑有關。另一方面，Ser13 的相關序列並沒有出現在這次比對結果中，有可能是因為此資料庫並未完全包含阿拉伯芥中所有的磷酸化片段，或是 phospho-Ser13 為酵母菌系統獨有的轉譯後修飾。綜合以上結果，mass 圖譜找出了 AtPCS1 上兩個容易被磷酸化修飾的 Ser，而它們真正的生理意義還需

要深入的探討。



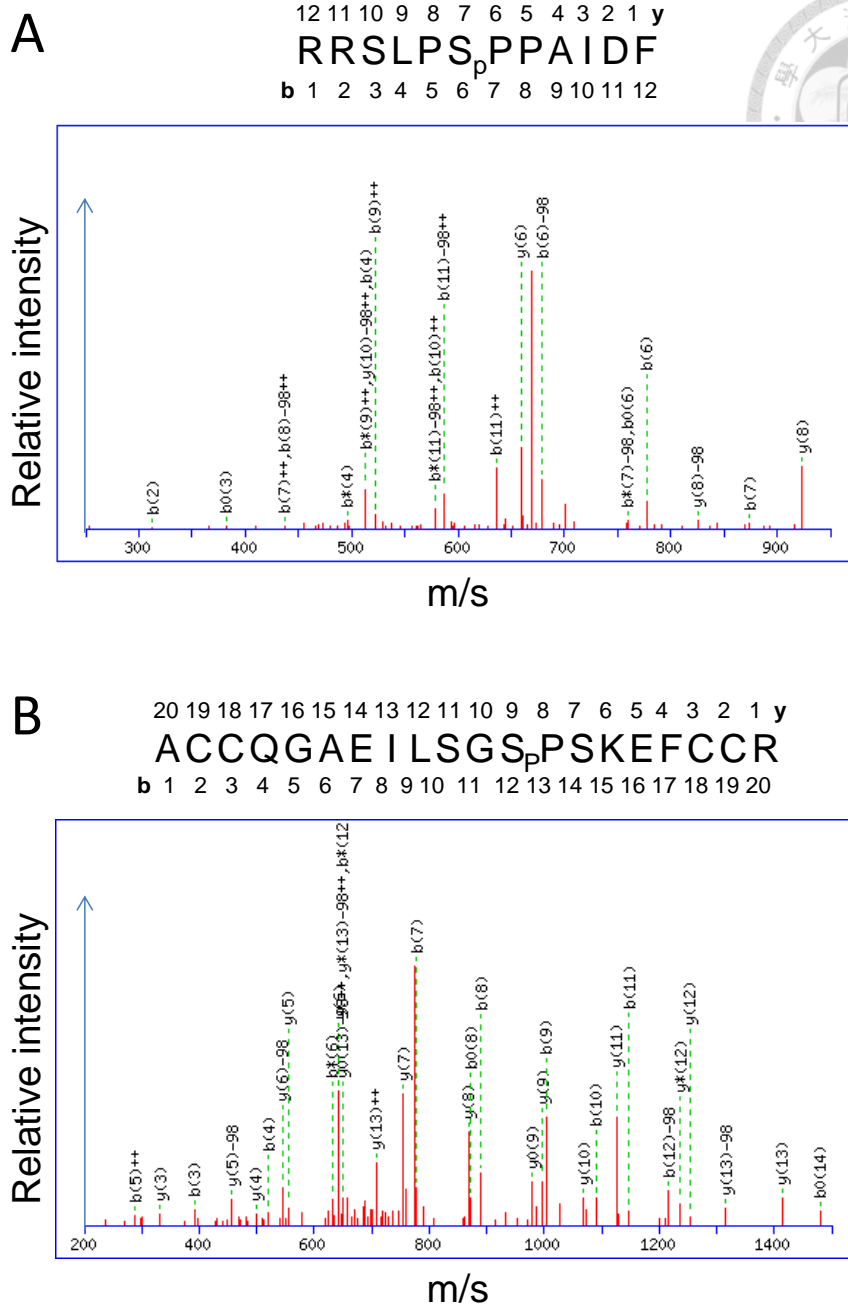


圖 3.18 由 ESI-MS 圖譜結果確認 Ser13 和 Ser532 為磷酸化修飾位置

Figure 3.18 Characterization of the phosphorylation sites corresponding to Ser13 and Ser352 of AtPCS1 by using electrospray ionization (ESI)-MS spectrometry

(A) ⁹RRSLPSPPAIDF¹⁸ ESI-MS 圖譜結果，確認 Ser13 帶有磷酸化修飾；(B) ³⁴¹ACCQGAEL-LSGSPSKEFCCR³⁶⁰ ESI-MS 圖譜結果，確認 Ser352 帶有磷酸化修飾。

表 3.4 以 LC-MS/MS 分析 AtPCS1 表現蛋白質可能的去酰胺修飾位置

Table 3.4 Summary of identified deamidated sites in recombinant AtPCS1 expressed in *P. pastoris* by LC-MS/MS analysis

Fragment	Deamidated peptides ¹	Designation	Ion score	Expect ²
26-34	K.LIF <u>N</u> EALQK.G	Asn29	68	***
43-75	R.LISYFQTQSEPAYCGLASLSV VL <u>N</u> ALSIDPGRK.W	Asn66	42	***
123-133	R.TSQSTIDDFRK.F	Gln125	52	***
138-152	K.CTSS <u>E</u> NCHMISTYHR.G	Asn143	35	**
157-173	K.QTGTGHFSPIGGYNAER.D	Gln157	53	***
157-173	K.QTGTGHFSPIGGY <u>N</u> AER.D	Gln157, Asn170	26	*
250-261	R.LVSSQHVD <u>S</u> VEK.I	Gln254	26	*
269-279	K.SLPSN <u>F</u> NQFIR.W	Gln276	60	***
269-279	K.SLPSN <u>F</u> NQFIR.W	Asn275, Gln276	38	**
269-279	K.SLPSN <u>F</u> NQFIR.W	Asn273, Gln275	33	**
286-329	R.ITEDSN <u>Q</u> NLSAEEK.S	Asn293	25	*
286-329	R.ITEDSN <u>Q</u> NLSAEEK.S	Asn291	31	**
286-329	R.ITEDSN <u>Q</u> NLSAEEK.S	Gln292	31	**
286-329	R.ITEDSN <u>Q</u> NLSAEEK.S	Gln292, Asn293	31	**
320-340	K.H <u>I</u> NKFLSTVGYEDSLTYAAAK .A	Asn322	75	***
341-355	K.ACCQGA <u>E</u> ILSGSPSK.E	Gln344	53	***
434-442	K.DQ <u>A</u> LMHEMK.Q	Gln 435	34	**
443-462	K.QLISMASLPTLLQEEVLHLR.R	Gln 455	37	**
443-462	K.QLISMASLPTLLQEEVLHLR.R	Gln443, Gln455	29	*
471-494	R.CQEN <u>K</u> EEDDLAAPAYAAASF LEQK.L	Asn474	52	***
471-494	R.CQEN <u>K</u> EEDDLAAPAYAAASF LEQK.L	Gln472, Asn474	86	***

¹ 胺基酸序列中的底線代表去酰胺修飾位置。

² 期望值依照 P value 分組，P < 0.01*，P < 0.001**，P < 0.0001=***

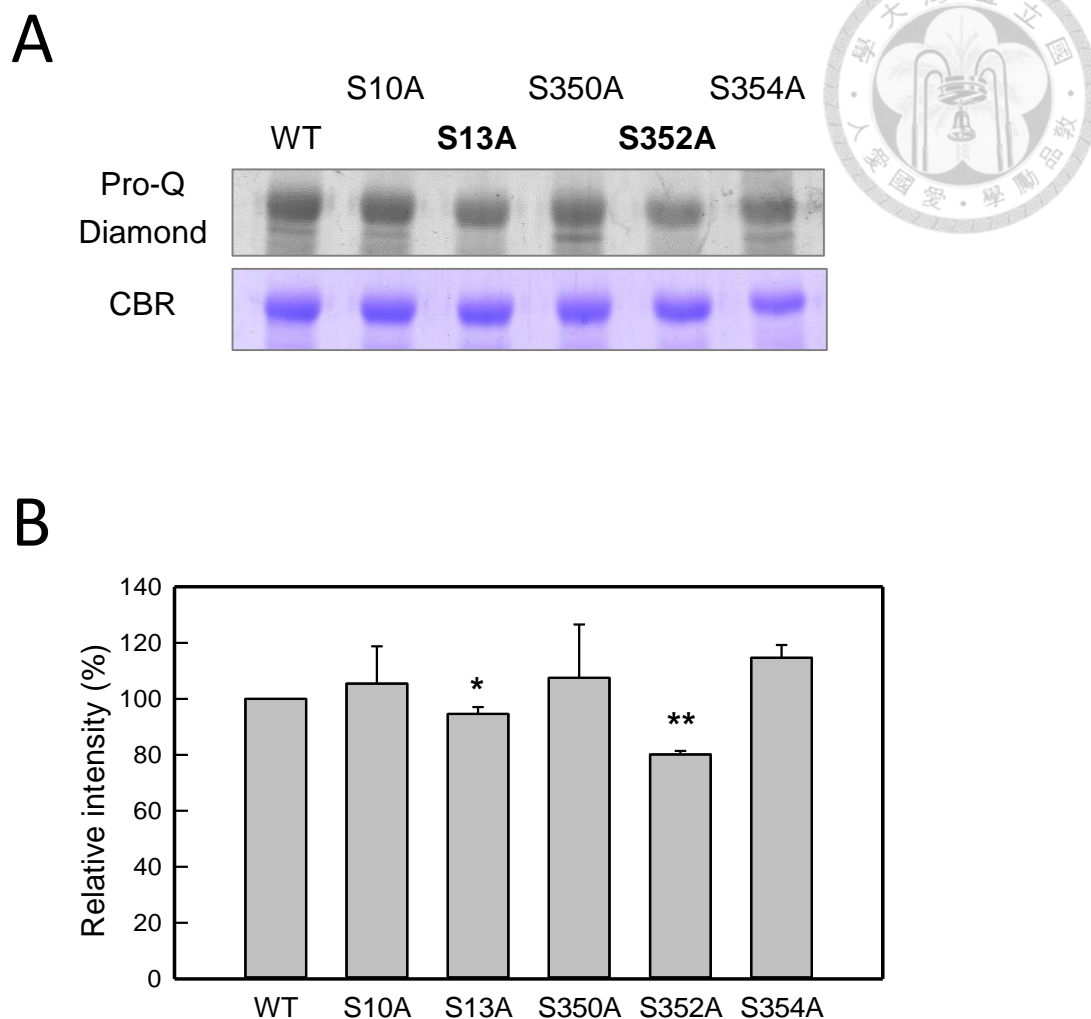


圖 3.19 Ser13 和 Ser352 突變會降低 AtPCS1 的磷酸化程度

Fig. 3.19 Mutation on Ser13 and Ser352 declined phosphorylation intensity of AtPCS1

(A) Ser 突變株表現蛋白質之 Pro-Q diamond 染色結果；(B) Pro-Q diamond 染色影像數據化之後將 wild-type PCS 染色強度視為 100%，計算突變株的相對磷酸化強度。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.8.4)；所有數值皆為三次重覆實驗之平均 ± 標準偏差，並以 ANOVA 計算正常 PCS 與突變株之鎬結合是否有顯著差異，*代表 P value < 0.05，**代表 P value < 0.01。



3.3.4 Ser13 和 Ser352 磷酸化修飾位置序列分析

Ser13 和 Ser352 這兩個磷酸化位置分別位於 N-terminal domain 和 C-terminal domain，而且附近都有連續數個 Ser 出現。從序列比對結果看來，Ser13 是只存在於高等植物 PCS 中的半保守性胺基酸，而其附近的 Ser10 並無序列保守性 (圖 3.1)。位於 C 端的磷酸化位置序列變異度較大，但是高等植物在此區域仍然有保有部分共同序列 SGxx[ST]xSx (圖 3.2)。雖然 C 端磷酸化位置保守性不高，但特別的是它位於 C 端三個保守性的金屬結合位 (Cys342Cys343、Cys358Cys359、Cys363xxCys366) 之間 (圖 3.2)。陳怡靜 (2013) 針對這三個金屬結合位進行酵素動力學實驗，發現 Cys358Cys359 很有可能是一個活化 PCS 催化反應的金屬結合位，因此推測 C 端磷酸化位置很有可能與 PCS 對金屬離子的感受性或選擇性有關。

本研究也使用 Eukaryotic Linear Motif (ELF) 軟體，分析 AtPCS1 三個磷酸化位置附近可能帶有那些與磷酸化調控相關的 motifs，從序列上得到一些蛋白質交互作用的資訊。表 3.5 列出與 Ser13、Thr49 和 Ser352 磷酸化相關的 motifs。Ser13 可能被 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 或 casein kinase 1 (CK1) 辨認，Ser352 則可能被 MAPK、cyclin-dependent kinase (CDK) 或 glycogen synthase kinase 3 (GSK3) 類的激酶進行磷酸化修飾。有趣的是，兩個 Ser site 都有可能和 WW domain 進行交互作用。若將序列保守程度也加入考量，C 端 Ser 磷酸化 motifs 則只侷限於阿拉伯芥，其他物種如 *Thlaspi caerulescens* 和 *Lotus japonicus* 則是帶有數個相連的 Ser 或 Thr；相對的，N 端的 Ser 磷酸化 motif 較為保守，在高等植物演化上的生理意義可能較為重要。雖然本論文還沒有真正找出修飾這些磷酸化位置的激酶，但是 motifs 分析顯示 AtPCS1 可能受到複雜的訊息傳導路徑調控，或是與其他蛋白質之間有交互作用，在生理上參與多種反應。

表 3.5 以 Eukaryotic Linear Motif (ELM) 軟體分析磷酸化位置附近可能帶有的 motifs

Table 3.5 Summary of Eukaryotic Linear Motif (ELM) analysis for the peptides containing phosphor-Ser

Positions	Sequence	Motif ^{1,2}	Pattern
10-16	SLPSPPA	MAPK phosphorylation site	...([ST])P..
10-16	SLPSPPA	CK1 phosphorylation site	S..([ST])...
10-15	SLPSPP	class 4 WW domain interaction motif	...[ST]P.
46-52	YFQTQSE	CK2 phosphorylation site	...([ST])..E
349-355	LSGSPSK	CDK phosphorylation Site	...([ST])P.[KR]
349-355	LSGSPSK	MAPK phosphorylation site	...([ST])P..
347-354	EILSGSPS	GSK3 phosphorylation site	...([ST])...[ST]
349-354	LSGSPS	class 4 WW domain interaction motif	...[ST]P.

1 Abbreviations: MAPK, mitogen-activated protein kinase; CK1, casein kinase 1; CK2, casein kinase 2; CDK, cyclin-dependent kinase; GSK, glycogen synthase kinase 3.

2 WW domain contains WWP repeating sequences that could recognize phosphor-Ser or phosphor-Thr motifs



3.3.5 Ser13 和 Ser352 磷酸化會影響蛋白質活性

選取三個磷酸化位置點突變株 S13A、T49A 和 S352A，連同另外三個非磷酸化位置的 S10A、S350A 和 S354A 突變株進行活性分析。結果發現只有磷酸化位置突變之後會使 PCS 的催化能力下降，其影響幅度為 T49A>S13A>S352A (圖 3.20)。這個趨勢也和胺基酸保守性成正相關，Thr49 為絕對保守序列，而 Ser13 和 Ser352 是半保守序列 (圖 3.1 和圖 3.2)。先前針對第二基質結合區的研究結果已說明 Thr49 的重要性，而 Ser13 雖然也位於 N-terminal domain，但是它位於 AtPCS1 蛋白質結構模型最前端，因此其立體空間的正確性還有待商榷，也難以用分子模型推測 Ser13 的功能。至於位於 C-terminal domain 的 Ser352，由於目前尚無同源蛋白質的結晶構形被解出，因此在結構方面缺乏可供參考的資料。

這組活性分析實驗中比較有趣的是，wild type PCS 與大多數突變株在 10 μ M 與 50 μ M 鎘離子濃度下的活性差異都在 30% 左右，只有 S13A 在兩種鎘離子濃度下的反應速率相當。這個結果顯示 S13A 催化能力有明顯的改變，受到影響的因子可能為最大催化速率、第一或第二基質親和力等。也因為表現蛋白質中 Ser13 的磷酸化程度原本就不高 (圖 3.19)，這個位置突變卻對活性造成明顯的影響，可見這個位置本身在結構上就有一定的重要性，不能輕易被改變。另一方面，S352A 活性下降程度雖然不及 S13A，但是由於這個磷酸化位置坐落在金屬結合區中間，因此推測其可能的影響機制與 PCS 和鎘離子之間的結合有關。未來將著手進行 S13A 和 S352A 點突變株的酵素動力學，進一步了解這兩個磷酸化位置的功能。

另一方面，以 CIP 處理 S13A 和 S352A 會造成 PCS 活性明顯下降 (圖 3.21)。先前以 Pro-Q dimond 偵測蛋白質磷酸化的結果就顯示 AtPCS1 可能帶有多個磷酸化修飾，這個推論也和圖 3.20 的結果相互呼應。這個蛋白質可能有多個磷酸化位點都會對活性調控有貢獻，但是影響程度和方式不一定相同；因此失去一個磷酸化位置的突變株不但保有部分活性，而且可以再度受到 CIP 去磷酸化而使活性下降。圖 3.21 的結果中，又以 S13A 受到 CIP 的影響活性改變最大，S13A 去磷酸化之後活性被抑制 50% 左右。可見最重要的磷酸化位置並不在 Ser13 上，而很有可能是已知功能的 Thr49 或另一個 Ser 磷酸化位置。

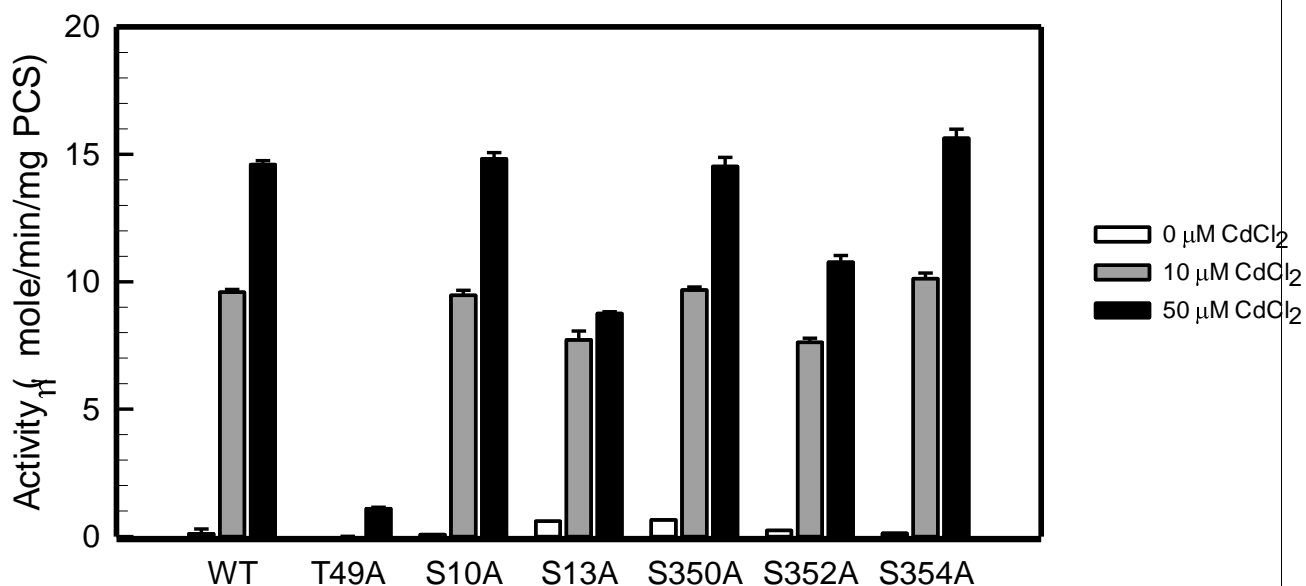


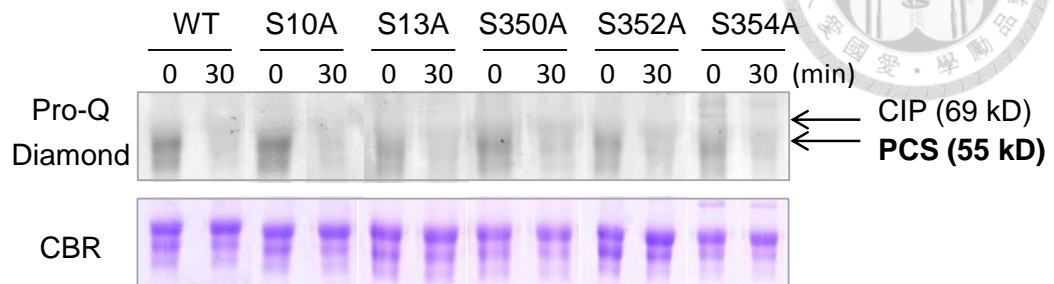
圖 3.20 AtCS1 磷酸化位置突變使得 AtCS1 的催化活性下降

Fig. 3.20 Mutation on the phosphorylation sites on AtPCS1 declined the catalytic activity of the enzyme

AtCS1 磷酸化位置突變株 (T49A, S13A 和 S352A) 與其他 Ser 突變株 (S10A, S350A 和 S354A) 於不同鎘離子濃度條件下的合成方向活性，三個磷酸化位置突變成 Ala 均會對蛋白質活性造成影響。活性反應條件列於材料與方法 (2.4.1) 中；活性數值為三重覆之平均 ± 標準偏差。



A



B

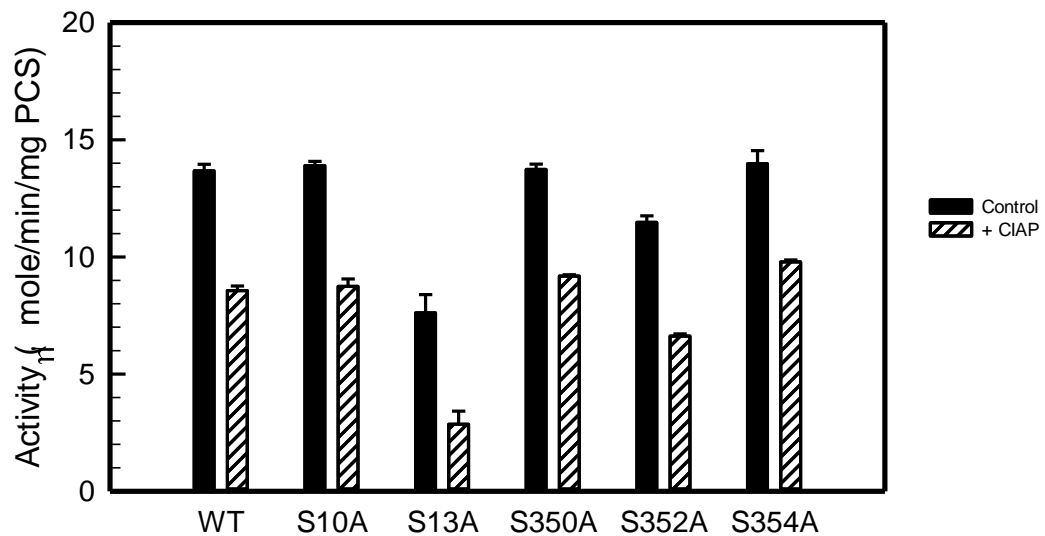


圖 3.21 AtCS1 磷酸化位置突變株仍然受到 CIP 調控

Fig. 3.21 Mutation on the phosphorylation sites on AtPCS1 declined the catalytic activity of the enzyme

(A) 以 Pro-Q diamond 偵測帶有磷酸化修飾之蛋白質，顯示磷酸化位置突變株以 CIP 處理 30 分鐘之後磷酸化訊號下降；(B) AtCS1 磷酸化位置突變株 (S13A 和 S352A) 與其他 Ser 突變株 (S10A、S350A 和 S354A) 以 CIP 去磷酸化之後的 PC 生合成能力，所有樣本去磷酸化後活性即下降，其中以 S13A 處理前後差異最大。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.8.4 和 2.4.3)；活性數值為三重覆之平均 \pm 標準偏差。

3.3.6 阿拉伯芥 AtPCS1-S13A、S352A 補償性轉殖株之建立

為了研究 Ser13 和 S352 這兩個磷酸化位置的生理功能，本論文嘗試將 S13A、S352A、S13A-S352A 及其他突變 PCS 蛋白質表現於 AtPCS1 缺失突變株 *cad1-3* 中。由於 *cad1-3* 無法轉譯出具有正常功能的 AtPCS1，用其做為母本可避免內生性 PCS 干擾後續實驗。本實驗選用帶有 kanamycin 抗性基因的 pCAMBIA 做為轉殖用的 binary vector，構築帶有 PCS1 (P1) promoter-*AtPCS1* cDNA 的載體，並且在序列 3' 端接上 FLAG tag 密碼子，最終目的是在轉殖株全株表現帶有 FLAG tag 的 AtPCS1 表現蛋白質。相較於先前表現重組蛋白質使用的 His tag，FLAG tag 沒有和金屬離子結合能力，用於在植物系統中不會受到細胞質中的二價金屬干擾，未來可以減少轉殖株性狀分析上的問題。所有構築完成的 pCAMBIA-*AtPCS1* 表現載體皆經過限制酶和 DNA 定序確認帶有正確基因 (圖 3.22)，最後將此載體送入農桿菌 *A. tumefaciens* 中進行阿拉伯芥轉殖。

以 kanamycin 篩選帶有目標基因的轉殖株，在整個篩選過程中逐漸淘汰生長不良或有明顯性狀缺陷的植株。收集到 T3 子代種子之後即著手計算轉殖株在抗生素篩選後的存活率，進而推測目標基因可能的插入拷貝數和篩選 100% 存活率的同型合子。若同一組 (開頭序號相同) 轉殖株存活率大約在 75% 左右，代表基因分離率為 3:1，因此可能插入單一基因拷貝。表 3.6 至表 3.11 分別列出每個 Ser 突變株 T3 代種子的篩選結果。在接下來的性狀分析中，會從分離率大致為 3:1 的小組中選出 100% 存活率的同型合子進行實驗。

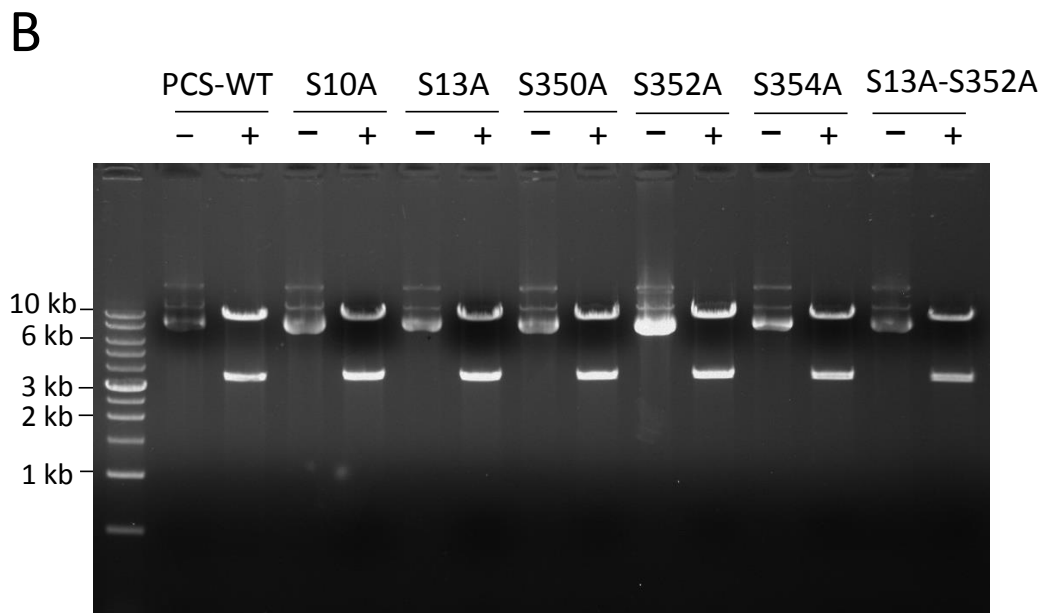
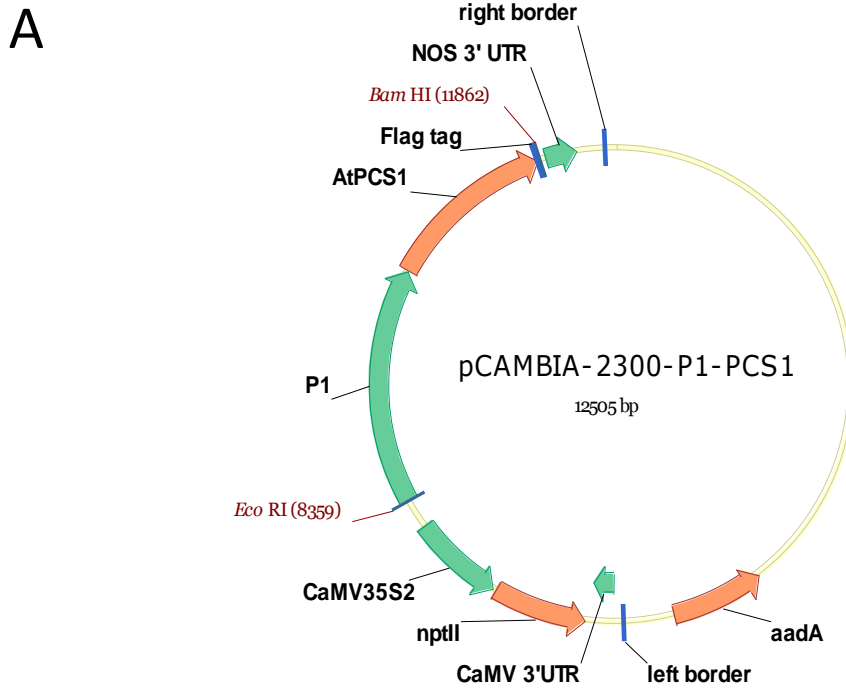


圖 3.22 pCAMBIA2300-P1-AtPCS1 載體之確認

Fig 3.22 pCAMBIA2300-P1-AtPCS1 construction map

(A) pCAMBIA2300-P1-AtPCS1 載體圖譜；(B) 以 EcoRI/ BamHI 限制酶確認載體中 *P1* promoter-*AtPCS1* 3.5 kb 之片段，- 表示未處理之質體，+ 表示限制酶反應後之質體。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.2.3)。



表 3.6 阿拉伯芥 AtPCS1-S10A 補償性轉植株抗生素篩選之存活率

Table 3.6 Survival rates of AtPCS1-S10A transgenic lines by antibiotic selection

詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.2)。

Arabidopsis line	No. of sesistant seeds	No. of sensitive seeds	Survival rate (%)
2-1	38	14	73.1
2-5	201	55	78.5
6-1	311	0	100
6-2	343	96	78.1
6-3	371	115	76.3
6-4	327	93	77.8
6-5	355	0	100
6-6	420	0	100
9-1	207	26	88.8
9-2	184	37	83.3
9-3	174	20	89.7
9-4	243	0	100
9-5	59	20	74.7
9-6	195	0	100
10-1	134	55	70.9
10-2	296	0	100
10-3	145	41	80.0
10-4	189	0	100
10-5	207	63	76.7

表 3.7 阿拉伯芥 PCS-S13A 補償性轉植株抗生素篩選之存活率

Table 3.7 Survival rates of AtPCS1-S13A transgenic lines by antibiotic selection

詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.2)。

Arabidopsis line	No. of resistant seeds	No. of sensitive seeds	Survival rate (%)
1-2	46	20	69.7
1-3	91	27	77.1
1-4	153	0	100
1-5	67	20	77.0
1-6	108	38	74.0
2-4	267	0	100
2-5	299	0	100
2-6	354	0	100
4-1	70	29	70.7
4-2	117	0	100
4-3	67	25	72.8
4-4	99	30	76.7
4-6	75	27	73.5
6-1	155	0	100
6-2	209	0	100
6-3	267	0	100
6-4	104	40	72.2
6-5	171	0	100
10-1	231	0	100
10-2	280	0	100
10-3	249	0	100
10-4	147	11	93.0
10-5	156	0	100



表 3.8 阿拉伯芥 AtPCS1-S350A 補償性轉植株抗生素篩選之存活率

Table 3.8 Survival rates of AtPCS1-S350A transgenic lines by antibiotic selection


詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.2)。

Arabidopsis line	No. of sesistant seeds	No. of sensitive seeds	Survival rate (%)
2-1	214	75	74.0
2-2	70	24	74.5
2-3	278	0	100
6-1	241	0	100
6-3	306	0	100
6-4	209	73	74.1
6-5	124	50	71.3
6-6	362	128	73.9
16-1	329	0	100
16-2	135	14	90.6
16-3	251	97	72.1

表 3.9 阿拉伯芥 AtPCS1-S352A 補償性轉植株抗生素篩選之存活率

Table 3.9 Survival rates of AtPCS1-S352A transgenic lines by antibiotic selection

詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.2)。



Arabidopsis line	No. of sesistant seeds	No. of sensitive seeds	Survival rate (%)
2-1	364	0	100
2-2	260	0	100
2-3	175	0	100
2-4	225	10	95.6
2-5	206	0	100
2-6	317	0	100
4-1	188	70	72.9
4-2	131	48	73.2
4-3	166	0	100
4-4	227	0	100
5-1	319	104	75.4
5-2	229	0	100
5-3	263	0	100
5-4	204	0	100
5-5	292	83	77.9
5-6	253	0	100
6-1	257	78	76.7
6-2	239	81	74.7
6-3	195	66	74.7



表 3.10 阿拉伯芥 AtPCS1-S354A 補償性轉植株抗生素篩選之存活率

Table 3.10 Survival rates of AtPCS1-S354A transgenic lines by antibiotic selection

詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.2)。

Arabidopsis line	No. of resistant seeds	No. of sensitive seeds	Survival rate (%)
3-1	291	0	100
3-2	194	0	100
3-3	230	81	74.0
3-4	335	0	100
3-6	189	59	76.2
4-1	177	55	76.3
4-2	315	0	100
4-3	236	0	100
4-4	172	54	76.1
4-5	201	69	74.4
4-6	112	23	83.0
6-1	217	60	78.3
6-2	251	0	100
6-3	200	60	77.0
6-4	313	0	100
6-5	187	0	100
8-1	240	28	89.6
8-2	189	59	76.2
8-3	234	15	94.0
8-4	125	36	77.6
8-5	183	56	76.6

表 3.11 阿拉伯芥 AtPCS1-S13A-S352A 補償性轉植株抗生素篩選之存活率

Table 3.11 Survival rates of AtPCS1-S13A-S352A transgenic lines by antibiotic selection

詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.2)。

Arabidopsis line	No. of resistant seeds	No. of sensitive seeds	Survival rate (%)
1-2	204	74	73.4
1-3	201	37	84.5
1-4	249	0	100
1-5	155	48	76.4
1-6	148	54	73.3
6-1	137	54	71.7
6-2	169	46	78.6
6-3	117	43	73.1
6-4	87	29	75.0
6-5	174	0	100
6-6	138	0	100
11-1	174	19	90.1
11-2	224	0	100
11-3	301	0	100
11-4	196	0	100
11-5	131	36	78.4
11-6	170	0	100
16-1	86	44	66.2
16-2	237	0	100
16-3	116	45	72.0
16-4	195	70	73.6
16-5	156	49	76.1
16-6	125	40	75.8

3.3.7 阿拉伯芥 *AtPCS1*-S13A、S352A 補償性轉殖株之基因表現

本研究選擇 T3 代轉殖株 S13A 1-4 和 4-2，S352A 4-2、4-3、5-5 和 5-6，S13A-S352A 1-1、1-4、6-5 和 6-6 分析其 *AtPCS1* 基因表現量。由半定量 RT-PCR 結果看來，各轉殖株皆有不同程度的 *AtPCS1* mRNA 表現，而且大多都高於 wild type 的表現量 (圖 3.23A)，顯示不同的基因插入位置可能會影響 *AtPCS1* 轉錄的效率。由於 *cad1-3* 為化學突變法篩選出的 *AtPCS1* 突變株，因此也偵測得到 *AtPCS1* mRNA 的累積。另一方面，儘管本研究使用調節區域包含 5' UTR 的啟動子序列，但是未構築包含 intron 的完整 *AtPCS1* gDNA，這也可能是影響轉殖株基因表現量的原因之一。先前已有研究指出 *AtPCS1* 的 intron 可能有調節基因表現的功能，相對於使用 *AtPCS1* cDNA，表現 *AtPCS1* gDNA 的轉殖株會有較高的基因表現量 (Lee and Korban, 2002)。

從蛋白質表現量看來，本研究篩選到的轉殖株 *AtPCS1* 蛋白質累積量都符合其基因轉錄量的趨勢。其中 S13A 和 S352A 都較 wild type 高出數倍，而 S13A-S352A 之蛋白質含量與 wild type 相近 (圖 3.23A、B)。另一方面，本研究也初步檢測其他 Ser 突變株 (S10A、S350A、S354A) T3 代轉殖株的蛋白質表現量，確定每個突變株中都有 *AtPCS1* 蛋白質的累積 (圖 3.23C)。確定 T3 代轉殖株表現量之後，由每一種 Ser 突變株中分別選擇兩種不同 *AtPCS1* 表現程度的品系進行性狀分析，分別為 S13A 1-4 和 4-2，S352A 4-3 和 5-6，S13A-S352A 1-4 和 6-5。

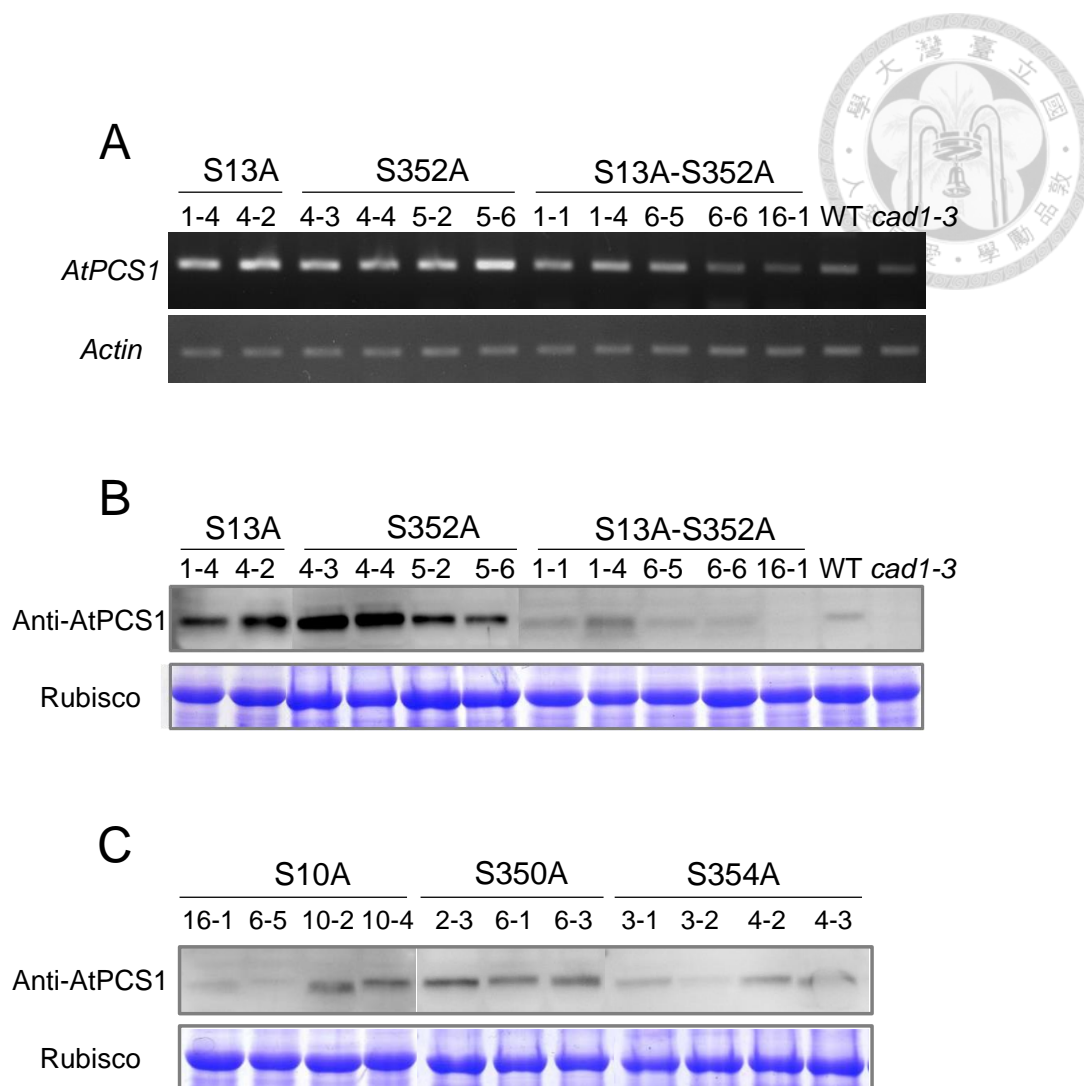


圖 3.23 阿拉伯芥 *AtPCS1* Ser 點突變轉殖株之基因和蛋白質表現量

Figure 3.23 Expression analysis for Ser mutated-*AtPCS1* transgenic lines detected by using semi-quantitative RT-PCR and western blot.

(A) 以半定量 RT-PCR 偵測阿拉伯芥轉殖株 *AtPCS1* mRNA 表現量；(B) 以 *AtPCS1* 專一性抗體檢測 S13A、S352A、S13-352A 補償性轉殖株蛋白質表現量；(C) 以 Western blot 檢測 *AtPCS1*、S10A、S350A、S354A 補償性轉殖株蛋白質表現量。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.3 和 2.5.4)。



3.3.8 AtPCS1 磷酸化位置突變會影響阿拉伯芥對鎘之耐受性

先前有研究指出，阿拉伯芥幼苗生長於鎘逆境時，其 *AtPCS1* 基因表現可能會受到誘導 (Lee and Korban, 2002)，因此我們檢測了生長於不同重金屬之中的轉殖株幼苗 *AtPCS1* 蛋白質是否有增加的現象，除了本論文建立的穩定性轉殖株之外，本實驗也使用邵子瑜於 2012 年篩選出可表現正常 *AtPCS1* 的兩個補償性轉殖株 cPCS 2-5 和 cPCS 3-4。參考本實驗室先前進行植株重金屬處理的鎘濃度 (邵子瑜, 2012) 和其他相關研究的實驗條件 (Song et al., 2010; Brunetti et al., 2011; Park et al., 2012)，我們選擇將轉殖株種子分別播種於含有 25 μM CdCl_2 、25 μM HgCl_2 或 75 μM Na_2HAsO_4 的培養基中。結果顯示，轉殖株幼苗於鎘、汞、砷三種重金屬逆境中生長九天之後，*AtPCS1* 蛋白質累積量與在正常生長情況下相同，並無明顯的改變 (圖 3.24)。

我們進一步使用 25 和 50 μM CdCl_2 對 S13A 和 S352A 轉殖株進行處理，試著比較這些磷酸化位置突變的 PCS 是否會影響植株的鎘耐受性。圖 3.25 顯示阿拉伯芥植株在一般培養基中生長情況類似，但是隨著鎘處理濃度增加，生長明顯受到抑制 (圖 3.25)。其中以完全失去 *AtPCS1* 活性的 *cad1-3* 受到抑制情況最為嚴重，而表現磷酸化位置突變 PCS 的轉殖株的生長情況則介於 wild type 和 *cad1-3* 之間。從量化數據看來，表現正常 PCS 的補償性轉殖株 cPCS 2-5 和 3-4 的在鎘逆境下根長和鮮重都與 wild type 類似，而且在 50 μM CdCl_2 處理下的根長甚至比 wild type 來得高；這可能跟 cPCS 2-5 和 3-4 的 PCS 表現量稍高於 wild type 有關 (圖 3.26)。另一方面，雖然 S13A 和 S352A 轉殖株的 PCS 表現量高出 wild type 許多，但是它們在鎘處理下的根長和鮮重還是低於 wild type；表現 S13A-S352A 突變 PCS 的轉殖株也有類似的生長情況 (圖 3.26)。這些實驗結果說明 *AtPCS1* 磷酸化位置突變，可能會影響其在重金屬逆境下的生理功能。因此轉殖株的 PCS 表現量雖然較高，生長狀況卻不及 wild type。

AtPCS1 在含有重金屬的環境中除了負責合成 PC 之外，另外也可以直接金屬離子結合，降低重金屬破壞其他蛋白質活性的機會。從這個角度思考 PCS 於逆境中的功能，可以推測即使表現沒有催化活性的 PCS，此蛋白質本身還是有保護細

胞的功能。所以在性狀分析結果中，PCS 表現量較高的 S13A 1-4、S13A 4-2 和 352A 4-3 轉殖株於鎘逆境下，其生長受到的抑制情況較其他轉殖株來得不明顯。同樣的，我們也在 T49A 補償性轉殖株中觀察到表現失活的 PCS 仍然能部分回復 *cad1-3* 鎘耐受性的性狀 (邵子瑜, 2012)。

在比較各突變株之間的性狀時，我們必須同時考慮重金屬耐受性、AtPCS1 表現量與蛋白質活性之間的關係。雖然在轉殖株篩選階段，我們是以 AtPCS1 蛋白質表現量高者為優先，但是最後得到的各轉殖株的 PCS 表現量並不一致，因此最終在性狀分析沒有看到如預期一般顯著的差異。例如 S13A 1-4、4-2 和 S352A 4-3 轉殖株的 AtPCS1 表現量都遠高於野生種，但是 S352A 5-6 和 S13A-S352A 雙重突變株的 AtPCS1 累積量卻較少 (圖 3.24)。由於上述差異，所以我們很難斷定 S13A-S352A 雙重突變株對鎘耐受性較其他轉殖株低，單純是因為 PCS 活性受到影響。為了釐清這些轉殖株的重金屬耐受性與 AtPCS1 活性的關係，我們將進一步分析轉殖株的 PC 含量與 PCS 表現量的比值。另一方面，也將重新篩選 PCS 表現量相當的轉殖株進行重金屬逆境性狀分析。

綜合目前的轉殖株性狀分析結果，我們認為 Ser13 和 Ser352 確實是具有生理意義的兩個磷酸化位置。而它們影響 PCS 活性的作用方式和在生理環境下受到何種調控，仍有待進一步的釐清。植物細胞在重金屬逆境下的訊息傳導路徑非常複雜，目前已知 PCS 可能為其中的一員 (Finnegan and Chen, 2012)。本論文證實的兩個 AtPCS1 磷酸化後修飾位點將有助於理解 PCS 於逆境訊息傳導網路中的位置，以及 PCS 與其他蛋白質之間可能的交互作用。

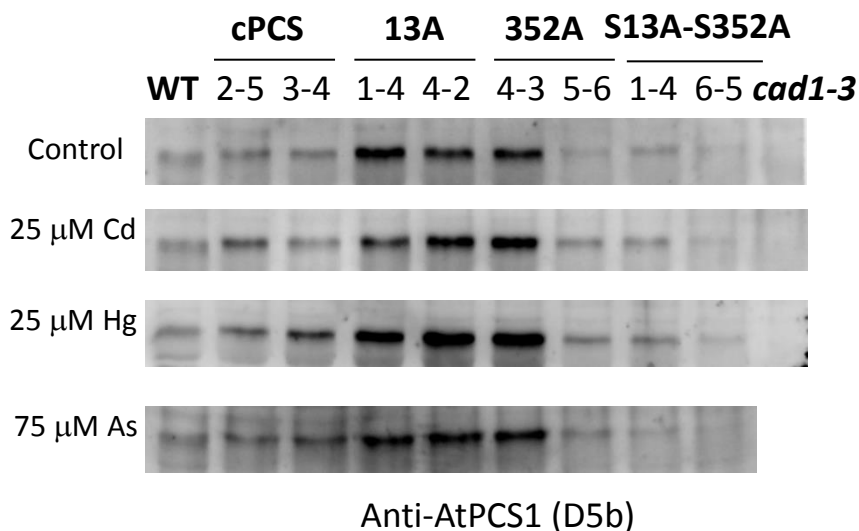


圖 3.24 轉殖株生長於不同重金屬逆境下的 AtPCS1 表現量

Figure 3.24 AtPCS1 accumulation in Ser mutated-AtPCS1 transgenic lines under heavy metal stress

阿拉伯芥種子播種於含有 1% sucrose 和指定重金屬濃度的 1/2 MS 培養基中，22 °C 培養垂直培養 9 天後抽取總蛋白質，以專一性抗體偵測 AtPCS1 的蛋白質含量。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.5.4 和 2.6)。

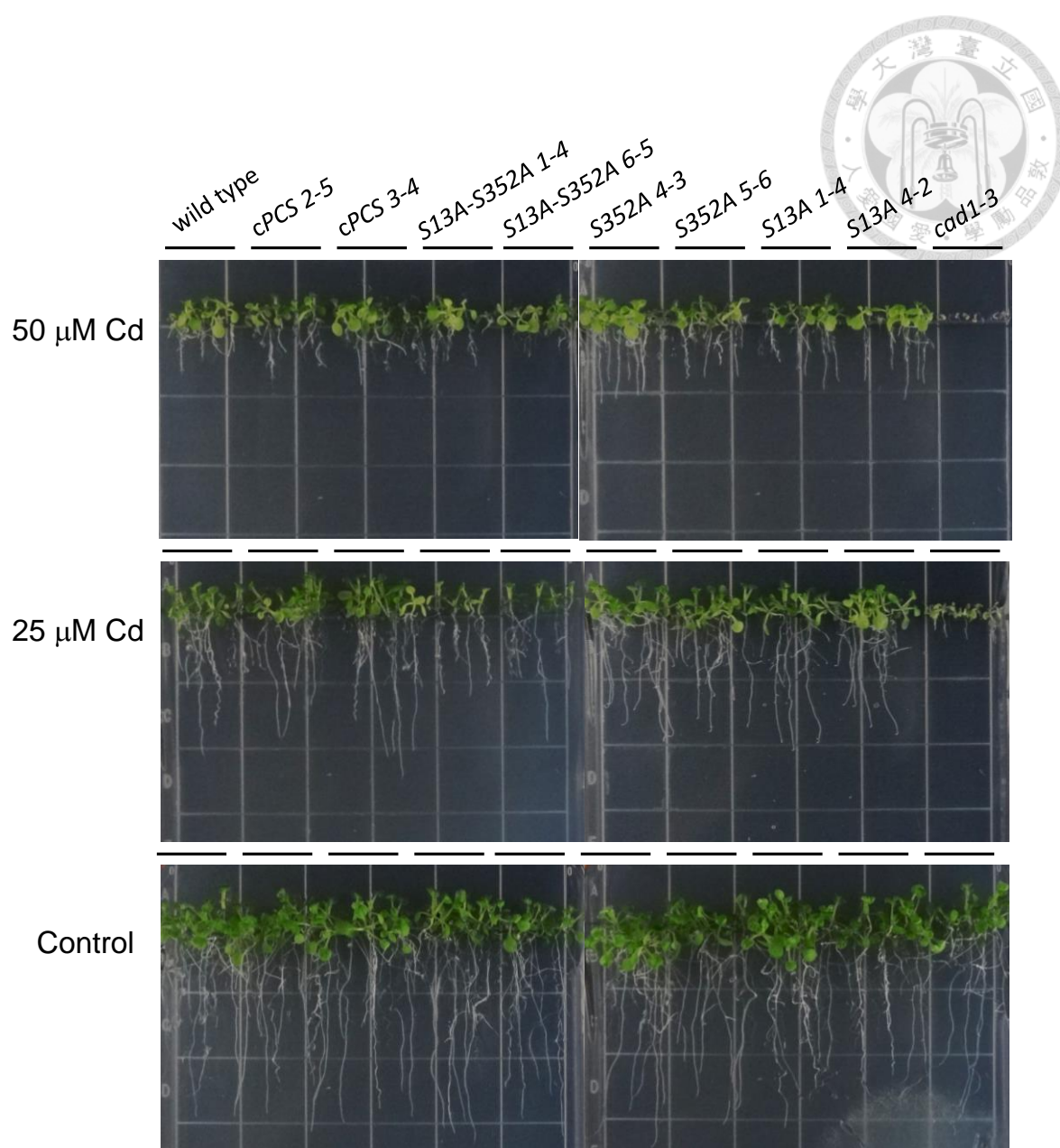


圖 3.25 野生型、*cad1-3*及補償性轉植株 cPCS、S352A、S13A 和 S13A-S352A 於鎘逆境下生長之性狀

Figure 3.25 The phenotype of wild-type, *cad1-3*, and transgenic lines cPCS, S352A, S13A and S13A-S352A grown in the presence of cadmium

阿拉伯芥種子播種於含有指定重金屬濃度的培養基 1/2 MS 中，22 °C 培養垂直培養 9 天；其他生長條件列於材料與方法 (2.1.2 和 2.6)。

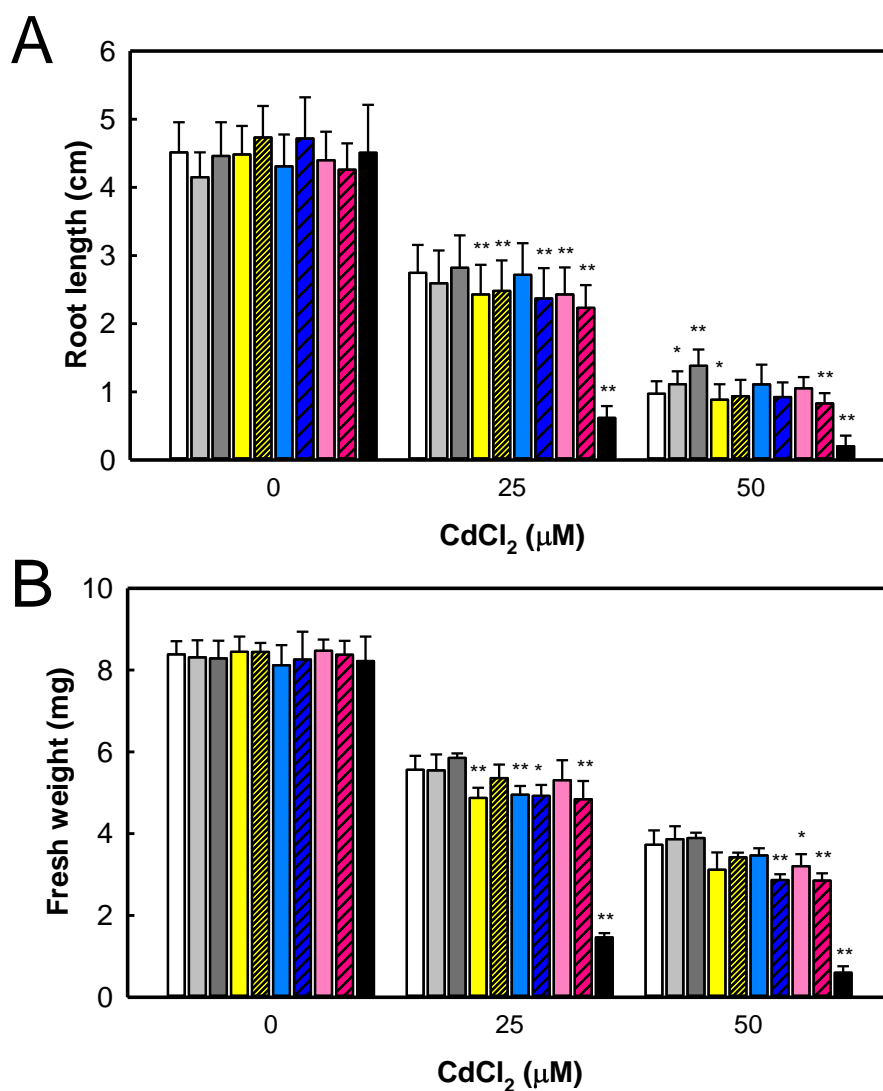
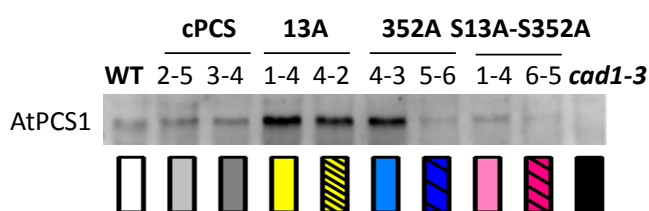


圖 3.26 S13A、S352A 和 S13A-S352A 點突變 AtPCS1 補償性轉殖株對鎘逆境的耐受性低於正常阿拉伯芥植株

Figure 3.26 Transgenic lines cPCS, S352A, S13A and S13A-S253A showed inhibited growth on medium containing cadmium.

(A) 轉殖株於 0、25 μM、50 μM 鎘離子逆境下生長的平均根長；(B) 轉殖株於 0、25 μM 和 0 μM 鎘離子逆境下生長的平均鮮重。根長數值為 60 株幼苗之平均 ± 標準偏差，鮮重以 10 棵幼苗為一組，共收集 4 組數據計算平均和標準偏差。最後以 ANOVA 計算野生種阿拉伯芥與突變株之間是否有顯著差異；*代表 P value < 0.01，**代表 P value < 0.001。實驗條件詳列於材料與方法 (2.6)。

3.4 阿拉伯芥內生性 PCS 之純化

自 1985 年 Grill 等人首度發現 PCS 以來，關於 PCS 的研究都是以偵測細胞液中酵素活性或是利用表現 PCS 重組蛋白質的方式進行。由於 PCS 在細胞中表現量非常少，目前尚未有研究團隊成功自生物體中純化出內生性 PCS。本實驗室在研究 PCS 轉譯後修飾這方面已經有了相當紮實的基礎，為了更深入了解 PCS 在生理環境下受到的調控，本論文嘗試純化阿拉伯芥中的內生性 PCS，希望藉此印證先前以 AtPCS1 重組蛋白質為材料得到的實驗結果。

植物細胞總蛋白質中將近有 50% 為 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco)，加上 AtPCS1 與 Rubisco large subunit 有類似的分子量及 *pI* 值，因此 Rubisco 對內生性 PCS 的純化造成極大干擾。也由於兩者具有類似特性，所以先前使用 phytate 或免疫沉澱法去除阿拉伯芥樣本中的 Rubisco 會間接減少 AtPCS1 於樣本中的含量；以 AtPCS1 專一性抗體直接純化內生 PCS 並沒有得到正面的結果 (林啟祐, 2011)。承接上述實驗結果，本論文捨棄親和層析法，改以膠體過濾和蛋白質二維電泳，期望部分純化出阿拉伯芥內生性 PCS。

3.4.1 部分純化阿拉伯芥內生性 PCS

首先利用硫酸銨沉澱，以不同飽和度的硫酸銨將蛋白質鹽析下來，再使用專一性抗體偵測 AtPCS1 和 Rubisco 所在分劃。圖 3.27 結果顯示阿拉伯芥內生性 PCS 主要位於 20-40% 及 40-60% 兩種硫酸銨分劃中，而 50 kD 的 Rubisco large subunit 幾乎存在於所有分劃，尤其以 40-60% 硫酸銨飽和度中最多。為了減少後續實驗中 Rubisco 的干擾，本研究選擇 20-40% 樣本進行下一步純化。

Rubisco 原態分子量約 540 kD (Berg et al., 2002)，與原態分子量約 100 kD 的 AtPCS1 差異很大，因此選用 Sephacryl S-300 以膠體過濾法這兩種不同分子量的蛋白質。由圖 3.28 可知 Rubisco 所在高峰與內生性 PCS 相差 10 個分劃以上，大部分的 Rubisco 在此步驟可與 AtPCS1 分開。然而，從 SDS-PAGE 的蛋白質染色結果仍然看到 AtPCS1 所在的分劃中，還是帶有一些 Rubisco large subunit 的片段 (圖 3.28B)，需要進一步加以分離。

收集膠體過濾法得到的部分純化 PCS，將樣本中的蛋白質沉澱出來進行二維電泳分析。蛋白質二維電泳圖譜顯示，經過兩步驟純化的樣本中仍有多種不同位點的蛋白質 (圖 3.29)。令人驚訝的是，AtPCS1 專一性抗體在圖譜上偵測到多個訊號，而且最主要的訊號並非位於先前於阿拉伯芥總蛋白質二維電泳中觀察到的位置 (圖 3.15C)。這個訊號的分子量稍微高於 55 kD，在進行先前幾個純化步驟的 SDS PAGE 時可能與 PCS 訊號重疊，造成錯誤的判讀結果。另一方面，雖然本實驗使用的 PCS 抗體經過單株化、可專一性辨認 AtPCS1 C-terminal domain (王信傑, 2009)，仍有可能辨認到其他蛋白質上相似度高的 epitopes，所以才造成抗體在二維圖譜上的多個訊號。雖然這次純化沒有成功的放大 PCS 蛋白質於樣本中的比例，本研究仍然利用 LC-MS/MS 確認這些抗體辨認位點的身份。

3.4.2 LC-MS/MS 身份鑑定

將二維電泳蛋白質染色圖譜和抗體辨認到的訊號重疊，選擇了四個可能為抗體偵測位置的蛋白質點進行 LC-MS/MS 身份鑑定 (圖 3.29C)。在比較接近 AtPCS1 理論位置的第一和第二點的定序結果中沒有找到任何是 PCS 的片段，而抗體主要訊號出現位置的第三和第四點身份確定為阿拉伯芥中的 V-type proton ATPase catalytic subunit A (VHA-A) (表 3.12)。為了解抗體辨認到這個蛋白質的原因，我們進一步比對 VHA-A 和 AtPCS1 兩者的蛋白質序列。比對結果顯示 VHA-A 上有大約 10 個胺基酸與 AtPCS1 C 端序列有部分保守性 (圖 3.30)，也解釋了使用 AtPCS1 單株抗體為何能辨認到此蛋白質的原因。

整體看來，膠體過濾法可以有效分離 PCS 和樣本中的干擾物 Rubisco，但由於抗體專一性問題，因此在整個純化過程無法正確的辨認 AtPCS1 色帶，最後無法純化出內生性 PCS。未來將整合其他 AtPCS1 單株抗體與現有純化方式，期望能在純化 PCS 這個環節上做出貢獻。

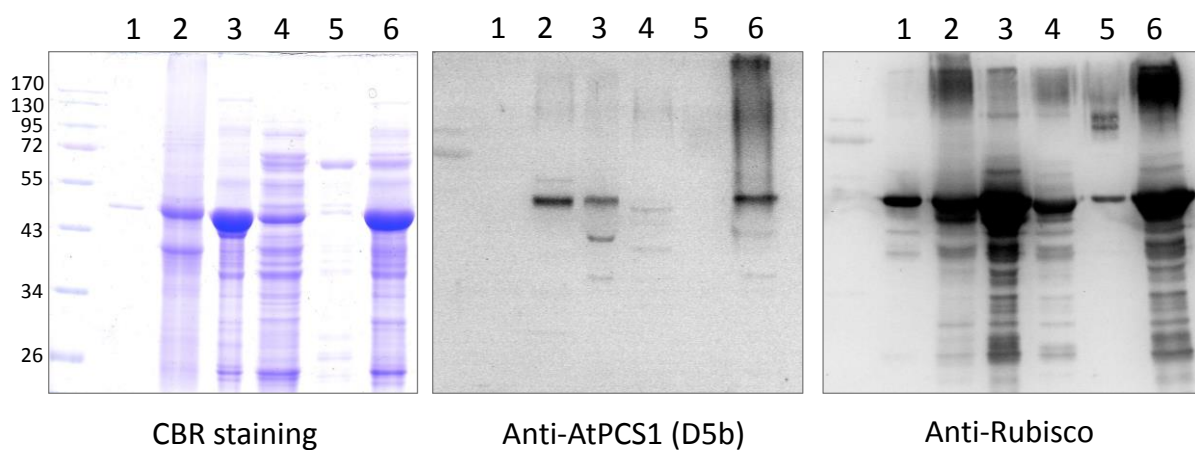


圖 3.27 以硫酸銨分劃部分純化阿拉伯芥總蛋白質中的內生性 PCS

Figure 3.27 Partial purification for intact PCS in Arabidopsis by ammonium sulfate precipitation

Lane 1-5 為 0-20%、20-40%、40-60%、60-80% 和 80-100% 硫酸銨飽和濃度沉澱出之蛋白質，Line 6 為總蛋白質。PCS 主要分布於 20-40% 分劃中；rubisco 則存在於所有分劃，其中以 40-60% 分劃含量最多。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.7)。

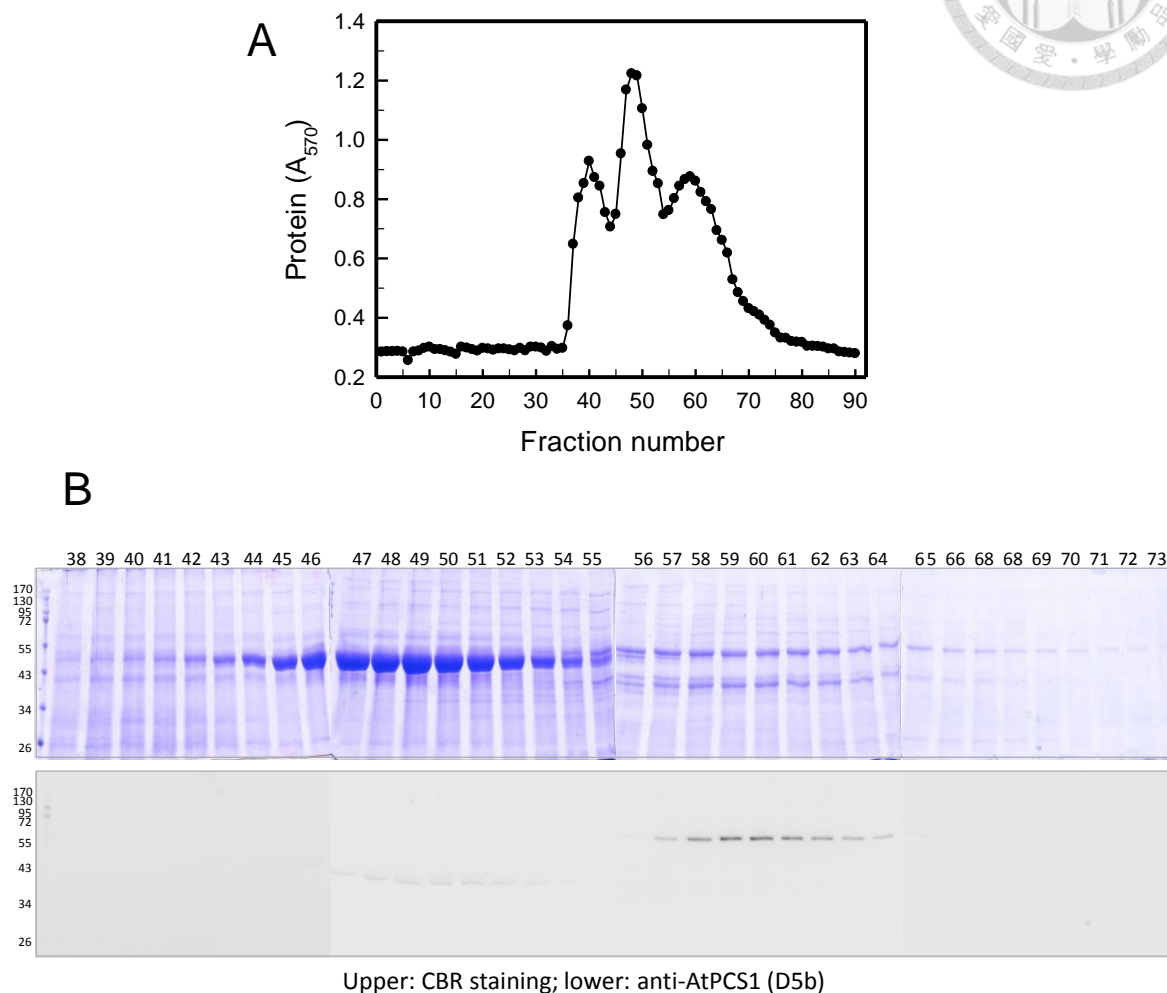


圖 3.28 利用膠體過濾法分離阿拉伯芥總蛋白質 20-40% 硫酸銨分劃樣本

Figure 3.28 Gel filtration for Arabidopsis proteins precipitated in 20-40% ammonium sulfate

(A) 以膠體過濾法分離 20-40% 硫酸銨分劃得到的樣本，以 Bradford method 定出樣本於 A₅₇₀ 下之吸光值，可代表各分劃中相對的蛋白質濃度；(B) 以 12.5% SDS-PAGE 分析主要分劃中的蛋白質分子量，並以 AtPCS1 專一性抗體偵測含有 PCS 的分劃，收集第 57-64 管得到阿拉伯芥部分純化之 AtPCS1。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.7)。

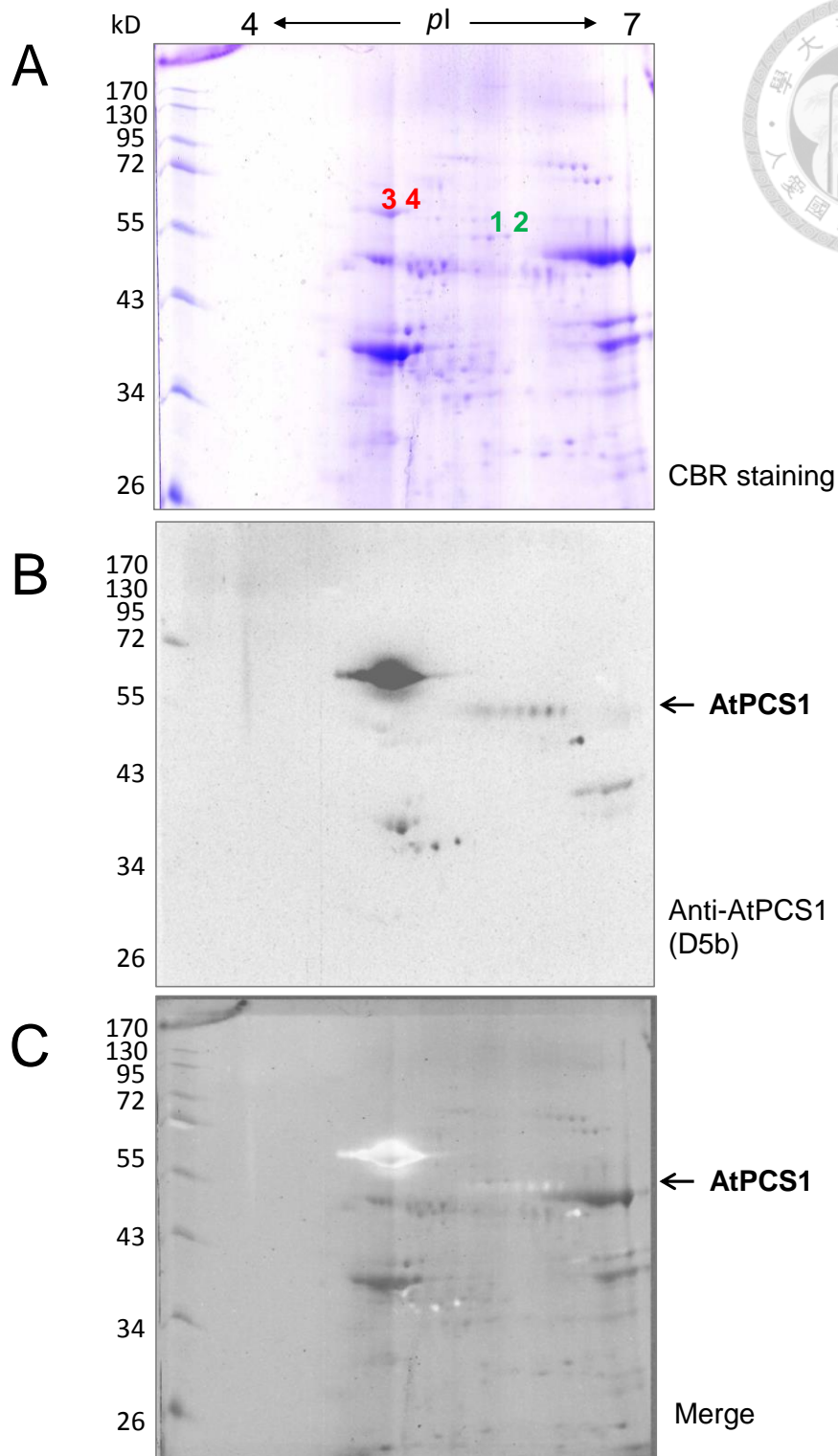


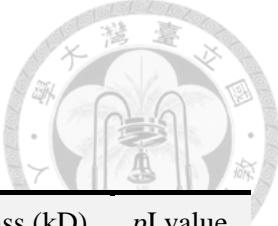
圖 3.29 以二維電泳分離部分純化之 PCS 樣本

Figure 3.29 Two-dimensional electrophoresis for partially purified PCS

(A) 部分純化之 AtPCS1 樣本 CBR 染色結果 (B) 以 AtPCS1 專一性抗體偵測 PCS 的分布；(C) CBR 染色結果與抗體染色結果之重疊影像，反白處為抗體訊號位置。詳細實驗條件列於材料與方法 (2.7)。

表 3.12 以 LC-MS/MS 鑑定部分純化 PCS 之身份

Table 3.12 Identity for partially purified PCS by using LC-MS/MS



No.	Identity	Species	Score	Mass (kD)	pI value
1	F-box/kelch-repeat protein	<i>A. thaliana</i>	28	36	8.78
	Arogenate dehydratase 5	<i>A. thaliana</i>	28	46	6.57
	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	<i>A. thaliana</i>	27	84	6.09
	Probable galacturonosyltransferase	<i>A. thaliana</i>	25	61	9.17
	Transcription factor E2FA	<i>A. thaliana</i>	25	53	5.14
2	Catalase 3	<i>A. thaliana</i>	148	57	7.31
	Myrosinase 2	<i>A. thaliana</i>	67	63	7.14
	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	<i>A. thaliana</i>	28	74	7.58
	COP9 signalosome complex subunit 2	<i>A. thaliana</i>	27	51	5.43
	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription factor	<i>A. thaliana</i>	24	38	6.62
3	V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>A. thaliana</i>	1383	69	5.11
	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor TEM1	<i>A. thaliana</i>	29	41	9.30
	Transcription factor TGA3	<i>A. thaliana</i>	28	44	5.05
	Transcription factor bHLH64	<i>A. thaliana</i>	28	38	5.89
	GDSL esterase/lipase LTL1	<i>A. thaliana</i>	27	40	5.60
4	V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>A. thaliana</i>	305	69	5.11
	Probable WRKY transcription factor 58	<i>A. thaliana</i>	47	47	8.17
	Transcription factor PERIANTHIA	<i>A. thaliana</i>	24	50	5.86
	Filament-like plant protein 5	<i>A. thaliana</i>	17	112	5.95

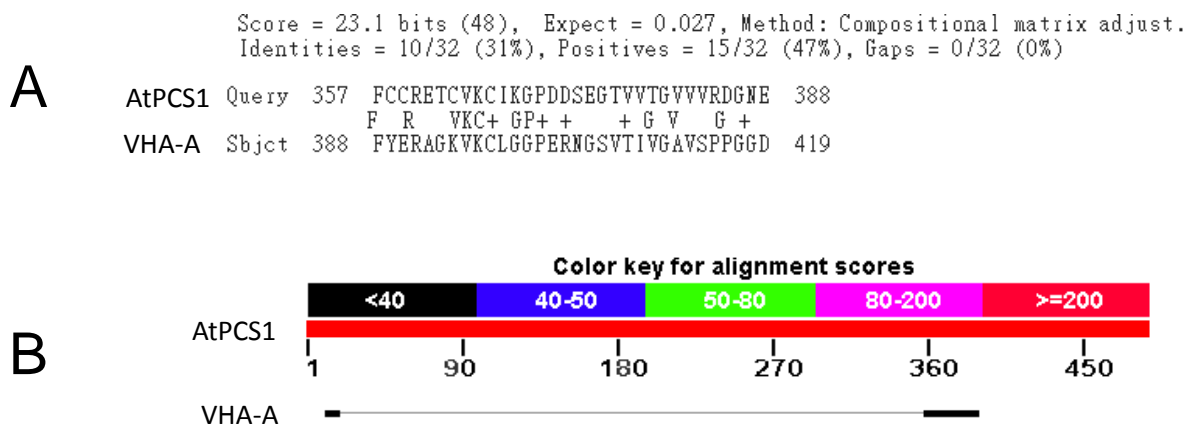


圖 3.30 AtPCS1 和 V-ATPase catalytic subunit A (VHA-A) 蛋白質序列比對結果

Figure 3.30 Sequence alignment of AtPCS1 and V-ATPase catalytic subunit A (VHA-A)

(A) AtPCS1 與 VHA-A 比對到一段位於 AtPCS1 C-terminal domain 的相似序列；(B) 兩者同源序列的相對位置。



第四章 總結



PCS 是植物中重要的一種逆境相關蛋白質，在重金屬環境下會合成 PC 與金屬離子螯合，防止細胞遭受傷害。目前大多認為 PCS 恆常性低量表現於細胞質中，在感受重金屬的存在之後活性才會受到開啟 (Cobbett, 2000)。針對 PCS 催化機制的研究解釋了重金屬啟動酵素活性的原因可能與轉飾後修譯有關，或者是金屬離子與細胞質中的 GSH 形成 PC 催化過程中必需的第二基質 $Cd-GS_2$ ，進而開啟完整的催化機制 (Vatamaniuk et al., 2000)。因此，了解 PCS 與基質之間如何進行辨認和結合成為研究 PCS 催化功能的一個重要環節。

雖然植物中沒有任何 PCS 的真正立體構造被解出，但是藉由原核生物中的同源蛋白質 NsPCS 結晶構形 (Vivares et al., 2005)，本研究模擬出阿拉伯芥 AtPCS1 活性催化區可能的構造。三個序列保守性相當高的 loops 包圍住活性區並形成第二基質結合口袋，位於其上的保守性胺基酸對蛋白質活性都有重大貢獻，尤其是可能直接結合第二基質的 Arg152、Lys185 和 Tyr55 (圖 3.3)。這些功能性胺基酸的研究成果描繪出 PCS 整體催化過程的分子機制，Tyr55 對第二基質上金屬離子的辨認作用也印證了為何重金屬是啟動 PCS 活性開關的關鍵。由於不同金屬離子開啟活性的效能也各有差異 (Rea, 2012)，Tyr55 與第二基質的辨認作用機制或許提供一些線索，繼續深入研究 PCS 如何選擇不同金屬形成的第二基質。

針對 PCS 活性區和第二基質結合區的研究成果，本論文不僅解釋 PCS 與基質之間可能的交互作用，也更完整的說明了位於活性區附近的磷酸化修飾位 Thr49 的重要性。本實驗室先前的研究指出磷酸化之後的 Thr49 可能會吸引立體構造上相近的 Arg183，以此穩定活性區的結構 (Wang et al., 2009)。在深入了解 PCS 活性區與基質結合區的構造和重要胺基酸之後，本研究更加確定 Thr49 磷酸化可能對蛋白質活性有正向的調控 (圖 3.12)，而這個胺基酸附近的高度序列保守性也說明了此類磷酸化調控可能廣泛存在於真核生物的 PCS 中 (圖 3.1)。這些關於 Thr49 磷酸化的研究引導出另一個重要的議題— 轉譯後修飾對於 PCS 的活性調節機制。

除了 Thr49 外，本論文也發現阿拉伯芥 PCS 上還帶有兩個 Ser 磷酸化修飾位

置。相較於 Thr49 可以開啟 PCS 活性，Ser13 和 Ser352 的磷酸化修飾作用可能是負責調節活性高低，因此突變這兩個 Ser 磷酸化修飾位置之後，PCS 的催化活性不會完全消失。其中 Ser352 位於 C-terminal domain 的金屬結合位附近，因此可能與 PCS 對重金屬的感受能力和異位調控相關。阿拉伯芥補償性轉殖株在鎘逆境下的性狀顯示，這兩個 Ser 磷酸化修飾位置對植物對鎘的防禦能力有正向的幫助，但是 PCS 就算失去 Ser13 和 Ser352 磷酸化修飾，仍然能夠部分回復 *cad1-3* 對重金屬的耐受性。

比對先前針對 Thr49 磷酸化位置突變的轉殖株研究 (邵子瑜, 2012)，發現 PCS-T49A 和 PCS-T49E 補償性轉殖株對鎘的敏感性似乎高於 S13A 和 S352A，這個現象也說明了 Ser13 和 Ser352 具有輔助性的生理功能，而非開啟活性的關鍵。從序列保守性的角度看來，Thr49 磷酸化可能最為重要，Ser 磷酸化修飾作用和對 PCS 的活性調節機制可能只存在於高等植物中。綜合這個部分的研究，本論文證實了 PCS 的磷酸化可提升阿拉伯芥對重金屬逆境的耐受性，也可能是阿拉伯芥受到重金屬危害時引發的防禦性代謝機制之一。未來可再深入研究與 PCS 有關的蛋白質交互作用機制，以探討 PCS 在逆境相關代謝之中扮演的角色。

未來工作大約包含三個方向：(1) 深入了解 Ser13 和 Ser352 磷酸化與否對整體催化活性的影響，以及是何種酵素動力學參數受到磷酸化修飾而改變；(2) 探討 Ser352 磷酸化修飾與金屬結合位是否存在著交互作用，Ser352 的修後飾可能會影響 AtPCS1 的金屬結合能力，又或是金屬結合上 C 端的 Cys motif 之後造成 Ser 後修飾；(3) 對 Ser13 和 Ser352 點突變株的穩定性轉殖株進行進一步的性狀分析，比較這些轉殖株在逆境下生長情況與體內的 PC 含量是否有正相關，除了 PC 產量可能受到 AtPCS1 活性影響之外，植株 non-protein thio (NPT) 的累積量是否也受到改變，與轉殖株的重金屬耐受性又有何種關聯。若能完成以上工作，相信能完整的勾勒出 AtPCS1 轉譯後修飾對酵素催化活性及生理作用兩種層面的影響。

參考文獻

- 翁震忻 (2006) 農作物重金屬汙染監測與管制措施. 農政與農情 **169**: 42-46 行政院農業委員會 臺北
- 王信傑 (2009) 植物螯合素合成酶催化機制研究. 博士論文 國立臺灣大學 臺北
- 黃迺茵 (2010) 阿拉伯芥金屬螯合素合成酶轉殖株之分子鑑定及 Thr49 突變株之活性分析. 碩士論文 國立臺灣大學 臺北
- 林歆祐 (2011) 磷酸化及 Tyr55 突變對阿拉伯芥植物螯合素合成酶之催化活性影響. 碩士論文 國立臺灣大學 臺北
- 邵子瑜 (2012) 阿拉伯芥金屬螯合素合成酶 Thr49 突變株活性分析及轉殖株之鎘耐受性. 碩士論文 國立臺灣大學 臺北
- 陳怡靜 (2013) 阿拉伯芥植物螯合素合成酶 C 端功能區塊之研究 碩士論文 國立臺灣大學 臺北
- Beck A, Lenzian K, Oven M, Christmann A, Grill E** (2003) Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* **62**: 423-431
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L** (2002) Chapter 20. The Calvin Cycle and the Pentose Phosphate Pathway. *In Biochemistry*, 5th edition. W H Freeman, New York
- Blum R, Beck A, Korte A, Stengel A, Letzel T, Lenzian K, Grill E** (2007) Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J* **49**: 740-749
- Blum R, Meyer KC, Wünschmann J, Lenzian KJ, Grill E** (2010) Cytosolic action of phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **153**: 159-169
- Bräutigam A, Schaumlöffel D, Preud'Homme H, Thondorf I, Wesenberg D** (2011) Physiological characterization of cadmium-exposed *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ* **34**: 2071-2082
- Brunetti P, Zanella L, Proia A, De Paolis A, Falasca G, Altamura MM, Sanità di Toppi L, Costantino P, Cardarelli M** (2011) Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene *AtPCS1*. *J Exp Bot* **62**: 5509-5519
- Cazalé A-C, Clemens S** (2001) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett* **507**: 215-219
- Chang HJ, Jou CJG, Lee CL** (2011) Treatment of Heavy Oil Contaminated Sand by Microwave Energy. *Environ Eng Sci* **28**: 4
- Chen A, Komives EA, Schroeder JI** (2006) An Improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**: 108-120
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI** (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* **18**: 3325-3333
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-743

- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann Rev Plant Biol* **53**: 159-182
- Cobbett CS** (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**: 825-832
- Estrella-Gómez N, Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez R, González-Mendoza D, Zapata-Pérez O, Martínez-Hernández A, Santamaría JM** (2009) The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatins via changes in *SmPCS* expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquat Toxicol* **91**: 320-328
- Finnegan P, Chen W** (2012) Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Fron Plant Physiol* **3**: 182
- Gaetke LM, Chow CK** (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189**: 147-163
- Gallivan JP, Dougherty DA** (1999) Cation- π interactions in structural biology. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9459-9464
- Gasic K, Korban S** (2007) Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta* **225**: 1277-1285
- Gasic K, Korban S** (2007) Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an Arabidopsis phytochelatin synthase (*AtPCS1*) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Plant Mol Biol* **64**: 361-369
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI** (2003) Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10118-10123
- Gonzalez-Mendoza D, Moreno AQ, Zapata-Perez O** (2007) Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquat Toxicol* **83**: 306-314
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6838-6842
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 674-676
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1986) Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett* **197**: 115-120
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 439-443
- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS** (1999) Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* **11**: 1153-1164
- Harada E, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S** (2004) A cyanobacterial protein with similarity to phytochelatin synthases catalyzes the conversion of glutathione to

- γ -glutamylcysteine and lacks phytochelatin synthase activity. *Phytochemistry* **65**: 3179-3185
- He Z, Li J, Zhang H, Ma M** (2005) Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Sci* **168**: 309-318
- Heiss S, Wachter A, Bogs J, Cobbett C, Rausch T** (2003) Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *J Exp Bot* **54**: 1833-1839
- Herbette S, Tacconat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette MLM, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N** (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* **88**: 1751-1765
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS** (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107**: 1059-1066
- Küpper H, Parameswaran A, Leitenmaier B, Trtílek M, Šetlík I** (2007) Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* **175**: 655-674
- Kim JH, Lee S** (2007) Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase (*AtPCSI*) does not change the maximum capacity for non-protein thiol production induced by Cadmium. *J Plant Biol* **50**: 4
- Koide S, Sidhu SS** (2009) The importance of being tyrosine: lessons in molecular recognition from minimalist synthetic binding proteins. *ACS Chem Biol* **4**: 325-334
- Konishi T, Matsumoto S, Tsuruwaka Y, Shiraki K, Hirata K, Tamaru Y, Takagi M** (2006) Enhancing the tolerance of zebrafish (*Danio rerio*) to heavy metal toxicity by the expression of plant phytochelatin synthase. *J Biotechnol* **122**: 316-325
- Kyte J, Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132
- Lee S, Kang BS** (2005) Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase 2 is too low to complement an *AtPCSI*-defective *Cad1-3* mutant. *Mol cells* **19**: 81-87
- Lee S, Korban S** (2002) Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (*AtPCSI*) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* **215**: 689-693
- Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS** (2003) Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol* **131**: 656-663
- Lee S, Petros D, Moon JS, Ko T-S, Goldsbrough PB, Korban SS** (2003) Higher levels of ectopic expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase do not lead to increased cadmium tolerance and accumulation. *Plant Physiol Biochem* **41**: 903-910
- Li Y, Dhankher OP, Carreira L, Lee D, Chen A, Schroeder JI, Balish RS, Meagher RB** (2004) Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. *Plant Cell Physiol* **45**: 1787-1797

- Liu GY, Zhang YX, Chai TY** (2011) Phytochelatin synthase of *Thlaspi caerulescens* enhanced tolerance and accumulation of heavy metals when expressed in yeast and tobacco. *Plant Cell Rep* **30**: 1067-1076
- Loeffler S, Hochberger A, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1989) Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett* **258**: 42-46
- Loscos J, Naya L, Ramos J, Clemente MR, Matamoros MA, Becana M** (2006) A reassessment of substrate specificity and activation of phytochelatin synthases from model plants by physiologically relevant metals. *Plant Physiol* **140**: 1213-1221
- Maier T, Yu C, Küllertz G, Clemens S** (2003) Localization and functional characterization of metal-binding sites in phytochelatin synthases. *Planta* **218**: 300-308
- Maniatis T, Fritsch EE, Sambrook J** (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y.
- Mengel K, Kirkby EA** (1987) *Principles of plant nutrition*. International Potash Institute, Berne-Worblaufen
- Meyer CL, Peisker D, Courbot M, Craciun A, Cazalé AC, Desgain D, Schat H, Clemens S, Verbruggen N** (2011) Isolation and characterization of *Arabidopsis halleri* and *Thlaspi caerulescens* phytochelatin synthases. *Planta* **234**: 83-95
- Nakagami H, Sugiyama N, Mochida K, Daudi A, Yoshida Y, Toyoda T, Tomita M, Ishihama Y, Shirasu K** (2010) Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol* **153**: 1161-1174
- Ogawa S, Yoshidomi T, Yoshimura E** (2011) Cadmium(II)-stimulated enzyme activation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase 1. *J Inorg Biochem* **105**: 111-117
- Olaniran A, Balgobind A, Pillay B** (2013) Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 10197-10228
- Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM** (2002) Molecular Characterization of the Homo-phytochelatin Synthase of Soybean *Glycine max*. *J Biol Chem* **277**: 4747-4754
- Park J, Song W-Y, Ko D, Eom Y, Hansen TH, Schiller M, Lee TG, Martinoia E, Lee Y** (2012) The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant J* **69**: 278-288
- Peterson AG, Oliver DJ** (2006) Leaf-targeted phytochelatin synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **44**: 885-892
- Picault N, Cazalé AC, Beyly A, Cuiné S, Carrier P, Luu DT, Forestier C, Peltier G** (2006) Chloroplast targeting of phytochelatin synthase in *Arabidopsis*: effects on heavy metal tolerance and accumulation. *Biochimie* **88**: 1743-1750
- Pomponi M, Censi V, Girolamo V, Paolis A, Toppi L, Aromolo R, Costantino P, Cardarelli M** (2006) Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* **223**: 180-190
- Ramos J, Clemente MR, Naya L, Loscos J, Pérez-Rontomé C, Sato S, Tabata S, Becana M** (2007) Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiol* **143**: 1110-1118

- Ramos J, Naya L, Gay M, Abián J, Becana M** (2008) Functional Characterization of an Unusual Phytochelatin Synthase, LjPCS3, of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **148**: 536-545
- Ray D, Williams DL** (2011) Characterization of the Phytochelatin Synthase of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1168
- Rea PA** (2012) Phytochelatin synthase: of a protease a peptide polymerase made. *Physiol Plant* **145**: 154-164
- Rea PA, Vatamaniuk OK, Rigden DJ** (2004) Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **136**: 2463-2474
- Reese RN, White CA, Winge DR** (1992) Cadmium-sulfide crystallites in Cd-(γ EC)_nG peptide complexes from tomato. *Plant Physiol* **98**: 225-229
- Rigouin C, Nylín E, Cogswell AA, Schaumlöffel D, Dobritzsch D, Williams DL** (2013) Towards an understanding of the function of the phytocheatin synthase of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* **7**: e2037
- Romanyuk ND, Rigden DJ, Vatamaniuk OK, Lang A, Cahoon RE, Jez JM, Rea PA** (2006) Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol* **141**: 858-869
- Ruotolo R, Peracchi A, Bolchi A, Infusini G, Amoresano A, Ottonello S** (2004) Domain organization of phytochelatin synthase. *J Biol Chem* **279**: 14686-14693
- Sachiko M, Kentaro S, Naoki T, Kazumasa H, Kazuhisa M, Masahiro T** (2004) Functional analysis of phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana* and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Technol Adv Mat* **5**: 377
- Salt DE, Rauser WE** (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol* **107**: 1293-1301
- Schützendübel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365
- Singh NJ, Min SK, Kim DY, Kim KS** (2009) Comprehensive energy analysis for various types of π -interaction. *J Chem Theory Comput* **5**: 515-529
- Singh S, Lee W, DaSilva NA, Mulchandani A, Chen W** (2008) Enhanced arsenic accumulation by engineered yeast cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Biotechnol Bioeng* **99**: 333-340
- Song WY, Park J, Mendoza-Cózatl DG, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hörtensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea PA, Rentsch D, Schroeder JI, Lee Y, Martinoia E** (2010) Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 6
- Speiser DM, Abrahamson SL, Banuelos G, Ow DW** (1992) *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. *Plant Physiol* **99**: 817-821
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y** (2008) Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol Syst Biol* **4**: 193

- Tennstedt P, Peisker D, Böttcher C, Trampczynska A, Clemens S** (2009) Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. *Plant Physiol* **149**: 938-948
- Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Matsumoto S, Shiraki K, Miyasaka H, Takagi M, Miyamoto K, Hirata K** (2005) Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta* **222**: 181-191
- Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Shiraki K, Miyasaka H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K** (2004) Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by *alr0975* from a prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 751-755
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ** (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol* **92**: 1086-1093
- Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA** (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals. *J Biol Chem* **276**: 20817-20820
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA** (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis. *J Biol Chem* **279**: 22449-22460
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (1999) AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7110-7115
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA** (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *J Biol Chem* **275**: 31451-31459
- Vestergaard M, Matsumoto S, Nishikori S, Shiraki K, Hirata K, Takagi M** (2008) Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the Cysteine-rich C-terminal. *Anal Sci* **24**: 277-281
- Vivares D, Arnoux P, Pignol D** (2005) A papain-like enzyme at work: Native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18848-18853
- Wang HC, Wu JS, Chia JC, Yang CC, Wu YJ, Juang RH** (2009) Phytochelatin synthase is regulated by protein phosphorylation at a threonine residue near its catalytic site. *J Agric Food Chem* **57**: 7348-7355
- Wojas S, Clemens S, Hennig J, Skłodowska A, Kopera E, Schat H, Bal W, Antosiewicz DM** (2008) Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium. *J Exp Bot* **59**: 2205-2219
- Wojas S, Clemens S, Skłodowska A, Antosiewicz DM** (2010) Arsenic response of *AtPCS1*- and *CePCS*-expressing plants – effects of external As(V) concentration on As-accumulation pattern and NPT metabolism. *J Plant Physiol* **167**: 169-175
- Wojas S, Ruszczyńska A, Bulska E, Clemens S, Antosiewicz DM** (2010) The role of subcellular distribution of cadmium and phytochelatin in the generation of distinct phenotypes of *AtPCS1*- and *CePCS3*-expressing tobacco. *J Plant Physiol* **167**: 981-988

Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**: 339-353

Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* **179**: 21-30

Zhang H, Xu W, Guo J, He Z, Ma M (2005) Coordinated responses of phytochelatins and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Sci* **169**: 1059-1065



問答錄

博士學位口試問答摘要

時間：中華民國 102 年 12 月 26 日 15:00

地點：國立臺灣大學農化新館 509 會議室

論文口試委員 (依照發問順序排列)：吳裕仁教授、楊健志教授、陳翰民教授、張世、莊榮輝教授宗教授



吳裕仁老師：

1. 我們先看 PCS 純化的 2-DE 結果，妳選擇定序的位點 3 和 4 看起來和 PCS 抗體辨認到的位置不太一樣？

答：應該是投影片上的圖標錯了，做實驗時選擇的是比較靠近 55 kDa 的位點，會修正論文內容，謝謝老師指正。

2. 論文中的 PCS 純化結果似乎不是很成功，有試過用免疫共沉澱配合 2-DE 來純化 PCS 嗎？

答：有。先前實驗室的碩士班學生林歆祐用 D5b 這株抗體進行免疫共沉澱之後，再用 2-DE 展開蛋白質。但是在 2-DE 免疫染色的結果中並沒有對應 PCS *pI* 值的訊號。挖下其他可能位於分子量 55 kDa 的位點，沒有定出 PCS 身份。因為覺得只用 D5b 這株單株抗體效力可能不夠好，加上 D5b 可能會辨認其他蛋白質，所以這次回歸比較傳統的純化方法。

3. 你針對 PCS 純化部分所下結論是 D5b 抗體專一性不夠，如果對這株抗體有疑慮，那麼前面使用這個抗體的 western 結果是否也可能有問題？

答：我認為 D5b 主要還是辨認 PCS，但是也有可能與 V-type ATPase 結合，只是能力比較弱。所以如果純化過程中 PCS 降解了，抗體就有機會去抓 V-type ATPase。的確，用這株抗體做阿拉伯芥粗萃取液的免疫染色，有時候結果不是很穩定。論文中表現蛋白質的 western 結果有使用 anti-His tag 抗體做雙重確認，應該是可信的；轉殖株的 western 實驗，可能要再用 anti-FLAG tag 抗體確認一次才行。

4. PCS 上 Ser13 這個磷酸化位置可能和穩定結構有關，是與那個胺基酸有交互作用？

答：從 AtPCS1 的分子模形看來，Ser13 最有可能是和 Gln157 有交互作用。不過因為一開始用來做為分子構形模版的 NsPCS 比 AtPCS1 短，使得 Ser13 剛好位在分子模形的第二個胺基酸，所以我覺得可信程度不是很高。

5. 論文中提到 Ser352 可能會促進 PCS 的異位調控，妳認為磷酸化修飾的效果是什麼？

答：因為 Ser352 剛好位在 Cd binding motif 上，而且無論是 Ser352 或 Cd binding motif 突變會使 PCS 活性下降。所以我推測 Ser352 磷酸化應該會促進 Cd binding motif 與金屬離子結合，改變 PCS 的構形，間接提升 N 端 domain 的催化活性。實際上的調控機制還是要測 S352A 的酵素動力學才能釐清。



6. 如何利用 Tryptophan fluorescence 觀察蛋白質構形的變化?

答：Tryptophan 位於表面疏水性區域時，放出的螢光較強。所以如果蛋白質構形改變，那麼位於表面附近的 Tryptophan 的螢光強度有可能改變，理論上蛋白質表面越親水，Tryptophan 螢光強度會降低。

楊健志老師補充：應該強調是 Tryptophan 附近的環境疏水性會影響螢光強弱，也要考慮位於疏水環境的 Tryptophan 有多接近蛋白質表面，所以螢光下降不絕對是蛋白質變得比較親水的緣故。

楊健志老師：

1. 延續剛剛的問題，Tryptophan fluorescence 實驗可能要增加一組加鎘後都光譜沒有變化的控制組，確認是那個 Tryptophan 對螢光改變有貢獻。

答：謝謝老師提醒，會先鎖定 N 端表面的幾個 Tryptophan 進行點突變實驗。

莊榮輝老師補充：如何確定螢光強度改變代表構形有變化?

答：Tryptophan 螢光光譜是確認構形改變的初步結果，還是要找到真正貢獻螢光的胺基酸位置才能確定這件事。

2. 這組實驗加鎘之後是不是光譜馬上就改變了？建議可以用 real time fluorescence spectrometry 偵測，測定 Cd binding site mutants 構形變化的動力學。

答：謝謝老師的建議。

3. Cd binding site mutants 在加鎘前的螢光強度就不同了，如何比較這些突變株加鎘後的構形變化?

答：考慮到這點，先前陳怡靜同學在分析結果時有做 normalization，將每個突變株加鎘前的螢光強度視為 1，去比較螢光下降的相對值。

陳翰民老師

1. 第二基質結合位分子圖示 (Fig. 3.12) 上有沒有什麼不正確的地方?

答：好像少標出一個氧原子，其他部分看不出來…請老師提示一下。

2. 圖上的第二基質 (GSH) 似乎少了一個 Gly，為什麼?

答：這個部分我沒有注意到，會再修正。

莊榮輝老師補充： γ -EC 原本要接 Gly 的鍵結是以一個斷面取代，因為第二基質有可能是 PC₂、PC₃、PC₄，所以 γ -EC 之後接的可能是 Gly，也有可能是另一個 γ -ECG。要再補充圖說。

3. 妳在討論 Tyr55 的功能時有用到 amphipathic 這個形容詞，請說明它的定義是什麼。生化領域是否適合用這個字？

答：Tyr、Phe、Trp 上的 aromatic group 是一個大分子非極性基團，因為有共振的 π 電子雲可以和極性基團結合，所以把它稱為 amphipathic。是指這個用法是參考一篇討論 cation- π interaction 的文獻，用來形容帶有 aromatic group 的胺基酸可以與親、疏水性基團作用的特性。這篇文獻是屬於有機化學領域，我沒有把握 amphipathic 在生化領域是否常用。

楊健志老師補充：應該再說明清楚，是共振的 π 電子雲因為垂直於芳香環平面，容易與極性分子作用使得芳香環產生 partially negative 或 partially positive charge。Amphipathic 這個形容詞是否恰當可以再參考 Gallivan and Dougherty (1999) 以及之後發表的 review。

4. 為何認為是 Tyr55 影響 PCS 與第二基質結合的能力，有測試過 Ala54 的影響嗎？

答：有測試過 A54G 點突變株的活性，跟 wild type 相比沒有下降很多。但是因為突變成 Gly 似乎不是很恰當，所以之後沒有採用這個實驗結果。

楊健志老師補充：Gly 的側基太小很容易影響蛋白質構形，所以一般點突變不會選用 Gly 做為目標。如果要對 Ala 做點突變的話，應該改成那個胺基酸比較好？

答：應該是 Val 或 Leu，但是 Leu 基團可能又太大了。

5. 轉殖株重金屬耐受度性狀的比較基準是 wild type 嗎？實際看起來差異好像不是很大，如何算出 p value 的？

答：是以 wild type 數值當做控制組，與其他組數據比較、用 student's test 計算 p value。

張世宗老師補充：比較合理的控制組是否為 *cad1-3* 或表現正常 PCS 的補償性轉殖株？

答：實驗目的是要比較在 *cad1-3* 中表現正常或突變的 PCS，對植株的重金屬耐受性是否有影響，所以理想的控制組應該是表現正常 PCS 的補償性轉殖株。但是因為這些轉殖株的 PCS 表現量差異很大，我之後會試著量化植株的 PCS 累積量，再計算固定 PCS 蛋白質量時的根長與鮮重差異。

6. 實際看起來差異好像不是很大，顯著差異應該要分級（例如* 代表 p value <0.05，** 代表 p value <0.01），像 *cad1-3* 和其他突變株看起來差很多，應該有不同的標示。

答：謝謝老師提醒，會再補上。

楊老師補充：種子點得太密了，這樣很難看出每個植株的根長。另外在篩選轉殖株時應該要用 PCR 確認為 homozygotes。

7. CWT 這個名字很容易造成混淆，如果是在 *cad1-3* 中表現 AtPCS1，應該稱為 cCAD 或其他名稱。
8. Ser 點突變株的表現蛋白活性測定實驗中，每一個突變株處理 CIAP 之後下降的幅度都差不多 (圖 3.19)，應該增加一組同時加入 CIAP 和 phosphatase inhibitor 的控制組，增加可信度。

答：謝謝老師指正。

9. 測定轉殖株的蛋白質表現量的圖中，用來代表總蛋白質量的 Rubisco 是否應該改用 anti-Rubisco 的免疫染色結果? (圖 3.23)

答：我參考了一些期刊論文，發現用 Rubisco 的蛋白質染色代表總蛋白質量是可行的，因此沒有再做 Rubisco 的免疫染色。

張世宗老師：

1. 論文的研究主軸是針對磷酸化，其他種類的後修飾提到的很少，論文題目是否應該修正?
2. 論文文字中多處提到「我們」，應該使用「本論文」或「本研究」比較正確，要再仔細修改文章內容。

答：謝謝老師提醒，會再斟酌題目並修改內容。(後因口試委員審定書上之題目為原題目，因此決定延用。)

3. 一開始篩選轉殖株的時候，就發現蛋白質表現量差異很大，為什麼還要選擇繼續做下去?

答：篩選完這一批轉殖株時，我想如果 S13A 或 S352A 蛋白質表現量雖然大，但是對鎘的耐受性較低的話，還是可以解釋這兩個 Ser 的重要性。最後得到的結果的確符合期望。不過還是要再篩選表現量差不多的轉殖株，再去比較性狀比較理想。

4. 相同的 mutant line (例如 S352A 4-3 和 5-6 的 PCS 表現量差很多，但是最後呈現的性狀差異不大，要如何解釋?

答：可能因為 S352A mutant 與野生種相比，性狀改變差異就不夠明顯，所以同一個 mutant、不同蛋白質表現量的兩種品系差異就更小。這點我想從篩選相同表現量的轉殖株下手改善。

莊老師補充：補做實驗之後結果仍無改善要怎麼辦?

答：至少這些轉殖株可以過量表現 AtPCS1，而且帶有 FLAG tag，可以將這些 AtPCS1 純化出來，進行磷酸化後修飾分析，試著證明 Thr49 有 *in vivo* phosphorylation。

5. 為何 S13A-S352A double mutant 這組篩選出的轉殖株，PCS 表現量都很低?

答：雙重突變株的篩選過程不是很順利，我篩選了 4、5 個品系表現量都很低，或者幾乎不表現。或許 PCS-S13A-S352A 這種蛋白質在細胞內容易被降解，所以表現量才一直不高。但是還需要篩選更多轉殖株，加上其他蛋白質穩定性實驗才能證實這個想法。

楊健志老師：

1. 為何認為含 Thr49 的 peptides 不容易被 LC-MS/MS 偵測到？有沒有與操作實驗的專員討論過？

答：ESI-MS 主要是讓片段上的 Arg 或 Lys 帶正電，才能在電場中飛行。但是相對其他序列，包含 Thr49 的片段附近 Arg 和 Lys 很少，而且酵素切解出來的片段有將近 45 個胺基酸的長度，所以用 ESI-MASS 可能不容易分離出這個片段。我也與負責操作分析 LC-MS/MS 的專員討論過多次、調整實驗參數，但是最終還是沒有得到理想的結果。

吳裕仁老師補充：是否用重組蛋白進行 MASS 鑑定？有沒有試過用 phosphopeptide enrichment？

答：這個實驗是用酵母菌 *P. pastoris* 表 AtPCS1，用 affinity colum 純化後再進行 LC-MS/MS。Phosphopeptide enrichment 前後的樣本都有送定序。不過問題在於 enrichment 之前就定不出包含 Thr49 的片段，所以我覺得問題可能出在這個片段不容易被分析出來，而不是它沒有磷酸化。

張世宗老師補充：如果用 S13A-S352A 表現蛋白質做 MASS 鑑定，可能比較容易定出 phospho-Thr49 的結果。

答：謝謝老師，我會再試著做做看。

莊榮輝老師補充：確定酵母菌系統表現出的 PCS 可以對 Thr49 做磷酸化修飾嗎？

答：Invitrogen 提供的 handbook 指出 *P. pastoris* 包含有完整的蛋白質後修飾系統，因為 Thr49 可以被外加的 CK2 磷酸化，所以我推測這個修飾應該不是非常專一，在 *P. pastoris* 中應該也能做到。

2. 剛剛妳在說明 PCS 分子模型的時候，提到「分子表面的重要胺基酸」，但是分子表面沒有重要胺基酸，請問為什麼？

答：我想不出答案，老師能不能提示？

楊健志老師補充：關鍵字是水合 (solvation)。

答：是否因為水籠的現象，水分子包圍蛋白質和基質表面讓兩者不容易結合，所以分子表面其實沒有重要胺基酸？

楊健志老師補充：對，因為要排除水分子的干擾，蛋白質中重要的作用位置大部分是部分親水的非極性口袋。所以重要胺基酸大多不是位於分子表面，而是位在疏水性口袋。

3. 在自然環境中的植物會接觸到重金屬逆境嗎？

答：我覺得應該沒有，因為重金屬污染大多是人為因素引起的，我想 PCS 在演化上的生理意義可能是為了調控細胞質的 metal pool。

楊健志老師補充：重金屬因為比重很大，所以多存在於地殼比較深層的地方，可能也會存在海底火山附近。因此生活在這類環境中的生物可能會接觸到重金屬逆境，因此演化出 PCS。妳論文緒論中應該要簡介重金屬的特性，增加 1-2 頁內容。

答：謝謝老師提醒。

4. 論文第二部分的結論中，妳提出 Ser352 可能跟 Cd binding sites 有 cross talk，除了這個名詞之外有沒有其他的說法？

答：應該要用 interaction?

莊榮輝老師補充：Cross talk 通常用於分子與分子之間的作用，如果要形容同一個蛋白質上不同基團的交互作用，用這個詞比較不正確。

5. PCS 酵素動力學參數為何沒有呈現 K_{cat} ?

答：論文中提到的 V_{max} 應該是 K_{cat} 。為了和 Vatamaniuk 等人 (2000) 的數據互相比較，所以我計算酵素動力學參數時是參考他們當時呈現的單位， V_{max} 中就有除上酵素濃度。

