

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

β -BUNGAROTOXIN 之 BINDING PROTEIN 分子選 殖及 β -BUNGAROTOXIN 與其 BINDING PROTEIN 交互作用之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89-2320-B-041-014-

執行期間：89年 8月 1日至90年 7月 31日

計畫主持人：吳佩芳

本成果報告包括以下應繳交之附件：

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

執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

中華民國 90 年 10 月 20 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2320-B-041-014

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：吳佩芳 嘉南藥理科技大學藥學系

一、中文摘要

在本計劃中，我們分別將台灣兩傘節 β 1-Bgt (β 1-bungarotoxin) A1 chain 及 B1 chain cDNA 一起裝載至 pBridge vector 中及分別裝載至 pAS2-1 vector 中，利用酵母菌雜交系統與 Rat brain cDNA library 進行 β -Bgt binding protein 的選殖工作。透過 Yeast hybrid system 的 Protein-Protein interaction 作用，我們發現約有 5 個生長在 SD/-Leu/-His/-Trp +3AT 培養基上的 colony，進一步純化酵母菌中的質體 DNA 及進行 DNA 序列分析比對後發現，其中有一段基因序列(編號 YB18)經由比對之後與 Rat brain 的 KChIP3 (potassium channel interacting protein) cDNA 序列有極高(90% 以上)的相似性，在酵母菌雜交系統中此選殖的 YB18 基因會與 B1 chain 有交互作用。我們進一步將此基因裝入 pGEX-5X-2 表現載體，並 Transform 至 BL21 菌種中表現蛋白質，經由 SDS-PAGE 電泳後染色發現，此基因以 Fusion protein 方式表現蛋白質，而 Fusion protein 的表現有利於日後的純化工作。另一方面，我們也參考已知 KChIP3 cDNA 序列，設計專一性引子，利用 RACE-PCR 與 Nested PCR 選殖出完整 KChIP3 的 cDNA 序列。由於在先前的研究曾發現單獨的 B chain 具有阻斷 Potassium channel 的活性，而在此計畫中發現 B chain 與 Potassium channel interacting protein 有分子交互作用之情形，我們在比對 DNA 序列後更發現 KChIP 是 A type voltage-gate potassium channel 的 Interacting protein；由於過去的文獻曾指出 Dendrotoxin 作用的 Potassium channel 是屬於 A type 的 Potassium channel，因此更引起我們想進一步探討其與 β -Bgt 及 Potassium channel 之間

的關聯性及其交互作用之機制。目前我們已有 KChIP3 的 cDNA 序列，在 90 年度的工作中我們將以 *In vivo* 及 *In vitro* 的方法探討 KChIP3 與 B chain 交互作用的關聯性及其交互作用後的影響。

關鍵詞： β 1-Bgt、酵母菌雜交系統、KChIP3

Abstract

Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A₂ (PLA₂) activity block nerve terminals in an unknown way. β -bungarotoxin (β -Bgt), the main presynaptic phospholipase A₂ neurotoxin purified from the venom of *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait), consist of two dissimilar polypeptide chains, the A chain and B chains, cross-linked by an interchain disulphide bond. In order to screen the binding protein of β -Bgt, the B1 cDNA of β -Bgt was subcloned into the yeast shuttle vector pAS2-1. A rat brain cDNA library was screened by co-transforming yeast strain YRG-2 with pAS2-1-B1 and rat brain library plasmid. Fortunately, a protein with its high homology nucleotide sequences with KChIP3 was interacted with the β -Bgt B chain by yeast-two hybrid from rat brain. KChIP, the Kv channel-interacting protein was identified and elucidated that which may regulate A-type currents, and hence neuronal excitability, in response to changes in intracellular calcium. In view of the findings of KChIP interact with the B chain of β -Bgt, it is proposed that the activity in blocking voltage-gated potassium channel of β -Bgt which may introduce by these KChIPs. Furthermore, the interaction of B1 chain and KChIP3 and the expression of KChIP3 are now studying.

Keywords: β -Bgt, *Bungarus multicinctus*,
KChIP

二、緣由與目的

β -Bungarotoxin (β -Bgt)係台灣兩傘節 (*Bungarus multicinctus*, Taiwan banded krait)毒液中重要成分之一，其分子組成乃由大分子 A chain (14 KDa)與小分子 B chain (7 KDa)以共價鍵組成具微弱 Phospholipase A₂ (PLA₂)活性之突觸前神經毒素[1]。A chain 分子由 120 個胺基酸組成，其一級結構與 PLA₂ 相似，分子本身具酵素活性及神經毒性；而 B chain 分子由 61 個胺基酸組成，其一級結構被認為與一些 Dendrotoxin、Toxin I、Toxin K 及 Protease inhibitor 相似[2-6]。除此之外 β -Bgt 作用於神經肌肉交接點會使神經傳導物質的釋放具一 Triphasic response，剛開始時會減少神經傳導物質的釋放，接著神經傳導物質的釋放持續增加，最後 β -Bgt 完全阻斷神經傳導物質的釋放[7]。另一方面有些研究亦指出 β -Bgt 具有阻斷鉀離子通道之活性，而此一結果會引起神經傳導物質釋放的增加，所以 β -Bgt 作用於神經肌肉交接點所引起的神經傳導物質釋放的增加應可視為阻斷鉀離子通道後所造成的結果[8-10]。曾有學者指出 β -Bgt 阻斷鉀離子通道之活性應來自於與 Dendrotoxin 一級結構相似的 B chain，此一結果也在先前的實驗中得到證實[6]。除此之外由於 B chain 具有阻斷鉀離子通道之活性，所以有些學者認為 B chain 在 β -Bgt 分子上應扮演與 Target membrane 辨認的角色[11]，但是有些學者的研究結果也支持與 Target membrane 的辨認應來自具有酵素活性的 A chain [12-14]，所以截至目前為止 A chain 與 B chain 在 β -Bgt 分子上所扮演的真正角色仍有相當大的爭議。

因此本計劃主要重點在於利用酵母菌雜交方法(Yeast Hybrid System)，藉由 Protein-Protein interaction 以期篩選出 β -Bgt 的 Binding protein，以利我們未來進一步探討 β -Bgt 的作用機制。

三、結果

在本計劃中，首先我們將 β 1-Bgt A1 chain 及 B1 chain cDNA 一起裝載至 pBridge vector 中及分別裝載至 pAS2-1 vector 中，並利用酵母菌雜交系統與 Rat brain cDNA library 進行 β -Bgt binding protein 的選殖工作。在此工作中我們發現一基因(YB18)在 Yeast hybrid system 中會與裝載在 pAS2-1 中的 B1 chain 有交互作用之情形；經由 DNA 序列分析後發現此基因含有 714bp，初步比對其核醣序列後更發現其核醣序列與老鼠及人類鉀離子通道(Voltage-gated potassium channel)的調節蛋白(KChIP)之核醣序列及胺基酸序列有極高的相似性[15-19]，由於此部份基因約包含完整 Rat brain KChIP3 的 80%序列(欠缺 5'端 67bp)，所以我們一方面將此 YB18 基因裝入 pGEX-5X-2 Vector 中並 Transform 至 BL21 菌種中表現蛋白質；另一方面我們參考已發表的小白鼠(Mouse) KChIP3 cDNA 序列[20]，設計 Sense 與 Antisense primer，與購自 Clontech 的 Rat brain cDNA Library 進行 RACE-PCR 及 Nested PCR 以選殖完整 KChIP3 cDNA 基因。

結果顯示：經由 Nested PCR，可從 2%瓊脂凝膠的電泳圖上觀察一約 850bp 的片段(圖一)，進一步將此片段純化並裝至 pGEX-T Eazy Vector 中進行 DNA 序列分析；由分析結果顯示，選殖的 cDNA 序列(編號 CH15=KChIP3)，由 852bp 組成，已包含已知完整 Rat brain KChIP3 [18]的 Coding region，另外選殖的 CH15 在 5'及 3'的 Non-coding region 亦多 52bp 及 29bp；比對其 Coding region 發現有 3 個 bp 的差異，但轉譯後的胺基酸序列則皆相同(data not show)。

另一方面，裝入 pGEX-5X-2 Vector 表現的 YB18 基因，在加入 IPTG Induction 及收集菌種，利用超音波震盪儀震破細胞後，經由 SDS-PAGE 電泳及 Coomassie blue 染色後觀察發現，此基因以 Fusion protein 的形式表現出(圖二)，而此 Fusion protein 的表現方式則有利於日後的純化與功能分析。截至目前為止，完整 KChIP3 基因的表

現工作正在進行中。

四、討論

具研究顯示，在人類及老鼠大腦發現的 KChIP1、KChIP2 and KChIP3 其 Peptide 長度分別由 216、252 及 256 個胺基殘基所組成，[15-19]，且這三種 Kv channel-interacting protein 的分子上皆具有 EF-hand-like motif；除此之外，經由核酸序列的比對中同時發現 KChIP3 的核酸序列與 Calsenilin (Calcium-binding protein)[21] 有 99% 的相似性及與另一 Rat DREAM (Ca^{2+} -regulated transcriptional modulator) 的核酸序列完全相同，並且在此研究中指出 KChIP、Calsenilin 及 DREAM (Ca^{2+} -regulated transcriptional modulator) 皆具有結合 Ca^{2+} 的能力[22]。

據研究顯示，Voltage-gated potassium channel (Kv channel) 主要分成兩大類，第一類為 Delayed rectifier-type Kv (slowly inactivating)[23]，第二類為 A-type Kv (rapidly inactivating)[24]；而 A-type Kv 在突觸前及突觸後神經訊息的調節扮演一很重要的角色[24]，並且 A-type Kv 為神經系統中主要的 Kv channel [8]。另外，研究亦指出，除了 β subunit 會調節 α subunit 之外，研究亦發現有些 Regulating protein 會與 α subunit (KChIP; Kv channel-interacting protein) 或與 α 及 β subunit (KChAP; K^+ channel-associated protein) 交互作用 [19;25]。在 An *et al.*, 2000 的研究中指出 KChIP 會與 A-type Kv $\alpha 4$ 交互作用，並且 KChIP 分子上具有 Calcium binding domain；而在 Wible *et al.*, 1998 的研究中則指出 KChAP 會與 α subunit 的 N 端及 β subunit 的 C 端交互作用。此一結果顯示，在正常生理環境下可能還有一群 Protein 以 Chaperon 的分子模式在調節細胞膜上 Potassium channel 的活性。

由於在 Wible *et al.*, 1998 及 An *et al.*, 2000 的文獻中皆指出在細胞中應有一群扮演著類似 Chaperon 角色的蛋白質在調控 Potassium channel 的活性。而在本計劃中，我們利用 β -Bgt B1 cDNA 當餌利用酵母菌雜交方法與 Rat brain 的 cDNA Library

進行 Protein-Protein interaction，我們幸運的選殖到 KChIP3 基因，因此我們初步大膽推測， β -Bgt 可能透過與此種類似 Chaperon 的 KChIP 分子作用再進一步與 Potassium channel 作用，而此一推測則有待將 KChIP3 表現及純化後作進一步的探討。

五、計劃成果自評

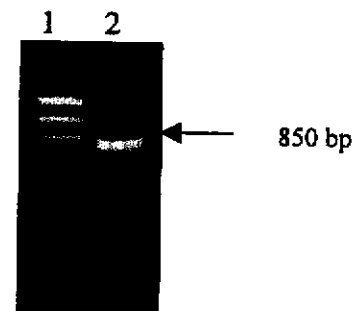
在本年度的計畫中，我們選殖到一 Voltage-gate potassium channel 的 Interaction protein (KChIP3)，此基因的選殖與表現將有助於我們進一步解釋 B chain 或 β -Bgt 與 Potassium channel 的關係。另一方面，在本計劃中目前只在 Yeast two hybrid system 中觀察到 B chain 與 KChIP3 有 Interaction，所以我們還需再利用 *In vitro* 及 *In vivo* 的方法進一步證實 B chain 與 KChIP3 的 Interaction 確實存在。

六、參考文獻

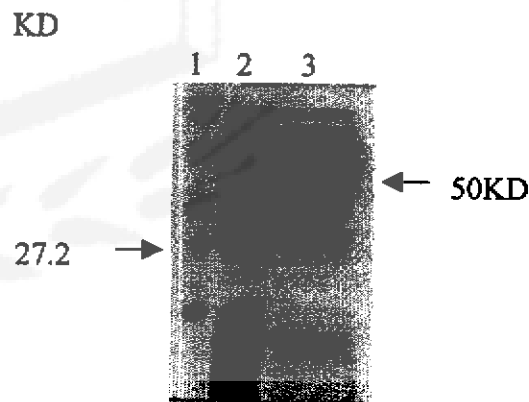
- [1] Strong, P.N., Goerke, J., Oberg, S.G. and Kelly, R.B. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73, 178-182.
- [2] Abe, T., Alema, S. and Miledi, R. (1977) *J. Physiol.* 270, 55-56p.
- [3] Kondo, K., Narita, K. and Lee, C.Y. (1978b) *J. Biochem.* 83, 101-115.
- [4] Dufton, M.J., and Hider, R.C. (1983) *Eur. J. Biochem.* 137, 545-552.
- [5] Kwong, P.D., McDonald, N.Q., Sigler, P.B. and Hendrickson, W.A. (1995) *Structure* 3, 1109-1119.
- [6] Wu, P.F., Wu, S.N., Chang, C.C. and Chang, L.S. (1998) *Biochem. J.* 334, 87-92.
- [7] Abe, T., Alema, S. and Miledi, R. (1976) *J. Physiol.* 270, 55-56p.
- [8] Rudy, B. (1988) *Neuroscience* 25, 729-749.
- [9] Nigel, S.C. (1988) *TIPS.* 9, 21-28.
- [10] Hollecker, M., Marshall, D.L. and Harvey, A.L. (1993) *Br. J. Pharmacol.* 110, 790-794.
- [11] Kini, R.M. and Iwanaga, S. (1986) *Toxicol.* 24, 527-541.
- [12] Wernicke, J.F., Vanker, A.D. and Howard, B.D. (1975) *J. Neurochem.*

25,483-496.

- [13] Rehm, H. and Betz, H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257,10015-10022.
- [14] Nicholls, D., Snelling, R. and Dolly, O. (1985) *Biochem. J.* 229,653-662.
- [15] Ohya, S. and Imaizumi, Y. (2000) EMBL accession no. AB046443
- [16] Ohya, S. and Imaizumi, Y. (2000) EMBL accession no. AB040031
- [17] Ohya, S. and Imaizumi, Y. (2000) EMBL accession no. AB040032
- [18] Ohya, S. and Imaizumi, Y. (2000) EMBL accession no. AB043892
- [19] An W. F., Bowlby M. R., Betty M., Cao J., Ling H-P., Mendoza G., Hinson J. W., Mattsson K. I., Strassle B. W., Trimmer J. S. and Rhodes K. J. (2000) *Nature* 403, 553-556.
- [20] Fabio S., Jaroslaw J.B., Cinthia F. and Michael M. (2001) *Molecular and Cellular Neuroscience* 17, 1-16.
- [21] Buxbaum, J.D., Choi, E.K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A.C., Merriam, D.E. and Wasco, W. (1998) *Nature Med.* 4, 1177-1181.
- [22] Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B. and Naranjo, J.R. (1999) *Nature* 398, 80-84.
- [23] Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O. and Pongs, O. (1994) *Nature* 369, 289-294.
- [24] Connor, J.A. and Stevens, C.F. (1971) *J. Physiol.* 213, 21-30.
- [25] Wible, B.A., Yang, Q., Kuryshev, Y.A., Accili, E.A. and Brown, A.M. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 11745-11751.



圖一. CH15 (KChIP3) Nested PCR 產物經 2%瓊脂凝膠電泳分析之結果。 Lane 1 為 marker ; Lane 2 為 Nested PCR 之結果。



圖二. Partial KChIP3(YB18)在 pGEX-5X-2 表現載體中表現的 Fusion protein 經由 SDS-PAGE 電泳分析之結果。 Lane 1 : Marker ; Lane 2 : pGEX-5X-2 的 Fusion protein ; Lane 3 : Partial KChIP3(YB18)在 pGEX-5X-2 表現載體中表現的 Fusion protein。