

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

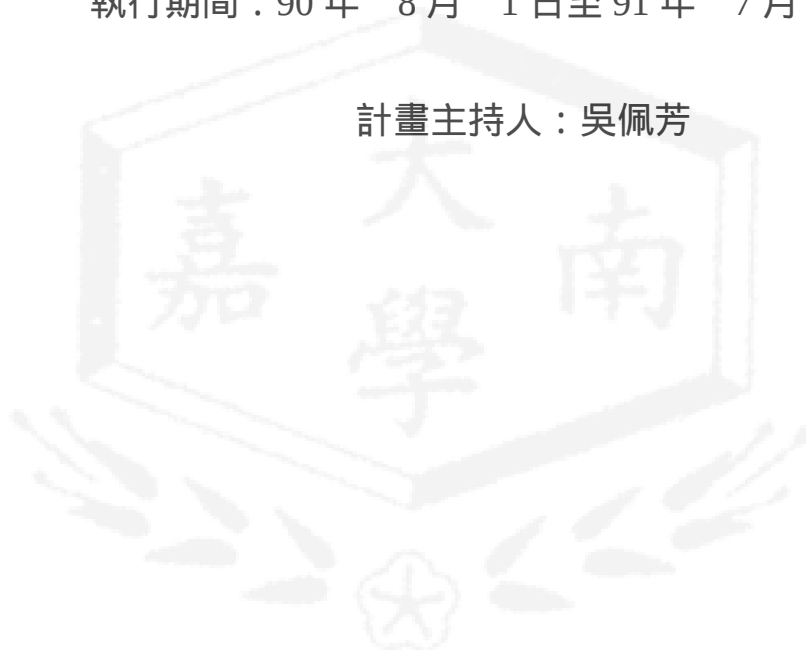
台灣雨傘節突觸前神經毒素 beta-bungarotoxin 作用機制之探討

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：NSC90 - 2320 - B - 041 - 013 -

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 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 91 年 10 月 29 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 90-2320-B-041-013-

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 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

在本實驗中，我們選用老鼠 Neuroblastoma 當本實驗之細胞株，並以 Calcium ionophore 刺激細胞使其增加 cytosol 中鈣離子的濃度，再收集細胞蛋白質，利用 Western blotting 的結果觀察 KChIP3 蛋白質濃度的變化。我們發現利用 Calcium Ionophore 讓細胞 Cytosol 增加鈣離子濃度，及隨著時間作用的增加並不會改變細胞中 KChIP3 蛋白質的濃度。此一結果顯示細胞中 KChIP3 蛋白質的濃度變化可能不會直接受到 Cytosol 中鈣離子濃度增加之影響，但減少細胞中鈣離子之濃度是否影響 KChIP3 之蛋白質濃度目前正在進行中。

另一方面，在去年的計劃中我們以 β -Bgt B chain 當餌，利用 Yeast two-hybrid system 選殖到 KChIP3，為進一步證實 β -Bgt 與 KChIP3 的交互作用，我們也以 β -Bgt treating 老鼠 Neuroblastoma cell，並收集細胞蛋白質，利用 Western blotting 的結果觀察 KChIP3 蛋白質濃度的變化，我們初步發現在 β -Bgt 作用後所收集的細胞萃取液進行 Western blotting 亦發現 KChIP3 蛋白質表現量沒有隨著時間作用的增長而影響其蛋白質之表現量，但 β -Bgt 在細胞中是否與 KChIP3 蛋白質結合目前實驗正在進行中。

關鍵詞： β -Bgt、Yeast two-hybrid system、KChIP3

二、緣由與目的

β -Bungarotoxin (β -Bgt)係台灣雨傘節

(*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。

在去年的計劃中我們以 β -Bgt B chain 當餌，利用 Yeast two-hybrid system 選殖到 KChIP3 基因，為進一步證實 β -Bgt 與 KChIP3 的交互作用，在本實驗中我們已建

立好老鼠 Neuroblastoma 細胞培養的條件，並且以 β -Bgt 作用於 Neuroblastoma 時也初步觀察到一些結果，並且目前也已有 KChIP3 抗體，可以幫助我們以動物細胞培養模式進一步探討 β -Bgt 的作用機制。

三、結果

在本計劃中，我們選擇老鼠 Neuroblastoma cell line (NB41A3)作為本實驗之細胞株。首先我們純化 NB41A3 中之 RNA，並利用先前設計的 KChIP3 專一性之引子，利用 RT-PCR 放大 KChIP3 基因(圖一)，我們發現在 NB41A3 Cell line 中有高表現量之 KChIP3 RNA 存在。但是在此細胞株中是否也有高表現量的 KChIP3 蛋白質存在，則需有 KChIP3 抗體方能進行本實驗，因此取得 KChIP3 抗體是本實驗能否繼續進行的最大關鍵，最後我們很幸運的購買到 KChIP3 抗體得以繼續進行。經由 Western blotting 發現，在 NB41A3 細胞中也有穩定的 KChIP3 蛋白質的表現量，因此我們利用 Calcium Ionophore 作用於 NB41A3，使其增加細胞質中鈣離子的濃度，再收集細胞蛋白質進行 Western blotting 觀察 KChIP3 蛋白質的表現量是否因鈣離子濃度之增加而有所影響。其結果如圖二(A)所示，細胞中 KChIP3 蛋白質濃度沒有隨著細胞質中鈣離子濃度之增加而有所影響，顯示細胞中 KChIP3 的作用應該沒有直接受到鈣離子增加的影響，但是細胞中哪些因素影響 KChIP3 與鈣離子的結合，仍有待進一步之探討。

另一方面，我們亦將 β -Bgt 做用於 NB41A3 細胞，並收集細胞蛋白質利用 Western blotting 觀察 KChIP3 蛋白質之表現量，結果發現 β -Bgt 作用後所收集的細胞萃取液進行 Western blotting 亦發現 KChIP3 蛋白質表現量沒有隨著時間作用的增長而影響其蛋白質之表現量(圖二 B)，但 β -Bgt 是否與 KChIP3 蛋白質作用，目前實驗正在進行中。

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，我們經由 Western blotting 發現，在 NB41A3 細胞中也有穩定的 KChIP3 蛋白質的表現量，因此我們進一步利用 Calcium Ionophore 作用於 NB41A3，使其增加細胞質中鈣離子的濃度，再收集細胞蛋白質進行 Western blotting 觀察 KChIP3 蛋白質的表現量是否因鈣離子濃度之增加而有所影

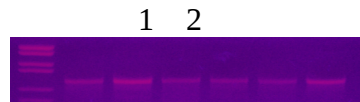
響 其結果顯示細胞中 KChIP3 蛋白質濃度沒有隨著細胞質中鈣離子濃度之增加而有所影響,表示細胞中 KChIP3 的作用應該沒有直接受到鈣離子增加的影響,但是細胞中哪些因素影響 KChIP3 與鈣離子的結合,仍有待進一步之探討。另一方面,我們亦將 β -Bgt 做用於 NB41A3 細胞,並收集細胞蛋白質利用 Western blotting 觀察 KChIP3 蛋白質之表現量,結果發現 β -Bgt 作用後所收集的細胞萃取液進行 Western blotting 亦發現 KChIP3 蛋白質表現量沒有隨著時間作用的增長而影響其蛋白質之表現量。另一方面 β -Bgt 在細胞中是否有與 KChIP3 作用目前實驗正在進行中。

五、計劃成果自評

在本年度的計畫中,我們必須克服兩個問題;第一,選擇可以穩定表現 endogenous KChIP3 的 Cell line,第二,購買或自行合成 KChIP3 抗體。在還沒有 KChIP3 抗體的情況下,我們在實驗室中利用 RT-PCR 的方法放大不同腦細胞株中的 KChIP3 基因,選擇 KChIP3 RNA 表現量多的細胞株當本實驗的細胞株,最後我們先選定老鼠 neuroblastoma cell line。我們也花了一些時間培養 neuroblastoma,目前我們也可以很穩定的在實驗室中培養 neuroblastoma。很幸運的最後我們也找到 KChIP3 抗體繼續進行本實驗。雖然在本計劃中我們沒有很多很具體的結果,但是至少已經找到最重要的 KChIP3 抗體,並且也初步得到增加細胞質中鈣離子的濃度並不會影響 endogenous KChIP3 蛋白質的表現量,其它實驗目前正在陸續進行中。

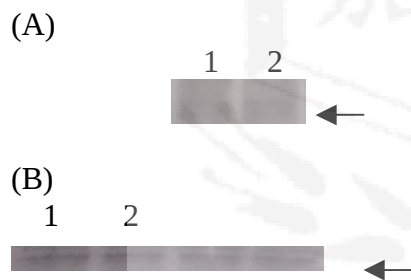
六、參考文獻

- [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) *Toxicon* 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.*



圖一. 以 RT-PCR 放大老鼠 neuroblastoma cell 中之 KChIP3, RT-PCR 產物經 2%瓊脂凝膠電泳分析之結果。

Lane 1 為 marker ; Lane 2 為 RT-PCR 之結果(850 bp)。



圖二. 以 Western blotting 分析老鼠 Neuroblastoma cell line 中 KChIP3 (32 KD) 表現之結果。

(A) Lane 1 : Total protein lysate without calcium ionophore ; Lane 2 : Total protein lysate with calcium ionophore

(B) Lane 1 : Total protein lysate without β -Bgt ; Lane 2 : Total protein lysate with β -Bgt