

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

胎兒蛋白之可能受體：純化，鑑定及基因選殖

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2311-B-002-104-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生化科學研究所

計畫主持人：張震東

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 3 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

胎兒蛋白之可能受體：純化、鑑定及基因選殖

計畫類別：X 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC -92-2311-B-002-104

執行期間：92年 08月 01日至 93年 07月 31日

計畫主持人：張震東

共同主持人：

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：國立台灣大學生命科學院生化科學研究所

中華民國 93 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 92-2311-B002-104

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：張震東 國立台灣大學生命科學院生化科學研究所

一、中文摘要

本實驗室過去的研究發現鯉魚頭腎分泌蛋白中含一蛋白分解酶，也成功地純化出該蛋白分解酶及選殖到它的cDNA，由於它的分佈並將它命名為腎泌分解酶（Nephrosin）。腎泌分解酶的基本特性如下：（1）它屬 Zinc-metalloproteinase，活性可被金屬離子耦合劑（Metal chelators）抑制，（2）僅出現在頭腎、腎臟及脾臟（均含造血及免疫細胞）及鰓，（3）從cDNA轉譯之氨基酸序列和已知 Zinc-metalloproteinase 比對發現它屬 Astacin family 的成員，它們的鋅離子耦合屬五配位（Penta-coordination）。Astacin family 成員包括 crayfish astacin, medaka hatching enzymes, mammalian meprins, hydra HMP, Xenopus BMP-1, Drosophila tolloid 等，功能各不相同，但是有二共同點：它們的一級結構相似及它們屬分泌蛋白分解酶或膜蛋白分解酶。我們由腎泌分解酶的組織分佈及分泌的調節預測它與免疫或造血功能有關。

鯉魚頭腎含一腎泌分解酶之內生性抑制蛋白質(p40)。本實驗室以西方墨點法發現p40的前身是一個血清蛋白p65分子，而且由cDNA cloning 發現它是胎兒蛋白(Fetuin, p65)的部份分子。胎兒蛋白在哺乳動物功能有：調節骨鈣形成、抑制 Insulin Receptor 活化、參與大腦皮質發育及抑制巨噬細胞活化等，而抑制 Astacin Metalloproteinase 則屬首次發現。眾多證據指出胎兒蛋白的許多功能應是透過細胞膜上受體來執行，而目前卻對受體分子之生化特性完全缺乏。本計劃決定以蛋白質體學方法來找尋小鼠之胎兒蛋白受體；純化依賴胎兒蛋白共價鍵結而成的親和力膠體，鑑定依賴遠西方墨點法(Far-Western blotting)或 Gel pull-down assay 來確認其結合活性、質譜儀(Mass Spectrometry)分析找尋蛋白質身分與部份胜肽序列決定、最後將可能之受體分子以 PCR cloning 方法選殖出 cDNA。本實驗以老鼠肺臟及脾臟等富含巨噬細胞的組織為材料，使用 detergent 溶液萃取巨噬細胞的分子，再通以 fetuin 親和性層析管柱，獲得與 fetuin 有強烈疏水性作用力的結合分子群。鎖定這些結合分子，經由蛋白質譜分析、比對資料庫，再製作抗體辨識。在此分子群中鑑定出三個 fetuin 結合分子，分別為二個粒線體內膜之蛋白質分子 Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2、mitochondrial inner membrane protein (IMMT)，以及一個 ECM 分子 alpha 3 B chain of laminin-5。以 Fetuin 在細胞中的重要調節角色來評估，其與粒線體內分子、ECM 分子之結合應有重要之生理意義，有待我們進一步地探討。

關鍵詞：腎泌分解酶、胎兒蛋白、受體

Abstract

The head kidney of bony fish is composed of chromaffin cells (similar to mammalian adrenal medulla), interrenal (similar to mammalian adrenal cortex), immune tissue and hematopoietic tissue (similar to mammalian bone marrow). We have studied secretory proteins from head kidney for some years and found that one of the secreted proteins is a zinc-metalloproteinase. We have successfully purified this zinc-metalloproteinase and also isolated one cDNA encoding this protein. Due to the discrete tissue distribution, we named this zinc-metalloproteinase as nephrosin. Nephrosin is a zinc-metalloproteinase and its activity can be inhibited by metal chelators. It is present only in the kidney, head kidney, spleen and gill, all of which are rich in lymphohematopoietic cells. From amino acid sequence comparison, nephrosin belongs to the astacin family. The astacin family includes crayfish astacin, medaka hatching enzymes, hydra HMP, Xenopus BMP-1, Drosophila tolloid and mammalian meprins. So far, nephrosin is the first member of this family involved in the immune or hematopoietic functions.

Recently, we have purified a novel protein inhibitor of carp nephrosin (p40) from carp kidney. The nephrosin inhibitor forms a 1:1 tight complex with nephrosin and thus inhibits the enzyme activity. Interestingly, nephrosin/inhibitor complex seems to be present only in the lymphohematopoietic tissues. For the first time, an endogenous inhibitor of the astacin family has been identified. Immunoblotting analysis revealed that a serum protein p65 can be recognized by the anti-p40 antiserum. Cloning of cDNA encoding p65 reveals that p40 is derived from carp fetuin. Mammalian fetuins are involved in diverse functions; opsonization of cationic macrophage-deactivating molecules, tyrosine kinase inhibition of the insulin receptor, osteogenesis and bone resorption, and neocortex development. It is believed that some of the function of fetuin is mediated by putative membrane receptors. However, little is known about the putative fetuin receptors. Fetuin is a mammalian fetal protein present in fetal blood, liver, cerebrospinal fluid, and cerebral cortex. During the fetal development, it

plays an essential role in regulating the tissue differentiation and transformation, especially in the nervous system and the osteogenesis. It also participates in the inflammatory response mediated by macrophages. It may function as a carrier to bring anti-inflammatory factors into the macrophages. In this study, we use mouse lung and spleen in which macrophages are enriched to purify fetuin binding proteins by fetuin affinity chromatography. We have found a group of proteins that bind strongly through hydrophobic interactions with fetuin. Using MALI-TOF, and LC-MS/MS spectrometry analysis, and PCR as well, we isolated partial cDNA sequences of these binding proteins. After antibody recognition, three molecules were identified as the putative binding proteins, ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, mitochondrial inner membrane protein(IMMT) and alpha 3 B chain of laminin-5. The first two molecules are resided in the mitochondrial inner membrane and the third one is an ECM protein. The physiological significance of the interactions between fetuin and the three molecules is needed to be further elucidated.

Keywords: Nephrosin, nephrosin inhibitor, fetuin, metalloproteinase, receptor

二、緣由與目的

本計劃之目的與重要性

我們從鯉魚頭腎純化到一個新的蛋白質分解酶屬於Astacin家族成員，命名為腎泌分解酶(Nephrosin)，也同時取得其cDNA，瞭解它的一級結構、酵素作用特性、組織分佈、分泌調節等。由於Astacin家族在蛋白質分解酶是個較晚被發現的，可預期仍有新的成員等待被發現，腎泌分解酶是這個家族成員第一次出現在免疫及造血系統的，是個相當特殊的例子。由我們的研究可發展出重要題目如(1)魚類其它Astacin家族成員有那些？(2)哺乳類有無腎泌分解酶？(3)腎泌分解酶之真正受質除了Fibronectin還有那些蛋白質？(4)腎泌分解酶的作用機制及活性調節機制。過去三年我們又完成三個子題目：(1)腎泌分解酶透過與Heparin或Hyaluronic acid結合而出現在細胞間質、(2)腎泌分解酶之活化機制需要二個金屬離子，而且也提出腎泌分解酶分泌前、後活性調節的假設模式(目前正在投稿中)、(3)腎泌分解酶內生性抑制蛋白之純化與cDNA選殖。

Zinc-endopeptidases依一級結構相似程度可分類為四大類：(1)astacins，以crayfish astacin為代表、(2)serralysins，屬Serratia表現之蛋白質分解酶、(3)adamalysins(又稱reprolysins)，以出血性蛇毒蛋白adamalysins及生殖功能的Fertillins為代表及(4)matrixins，又稱Matrix metalloproteinases，以collagenases、gelatinases、stromelysins、matrilysin為代表(詳見Stöcker and

Bode, 1995之review)。四個家族中僅有Matrixins(MMPs)家族有內生性抑制蛋白的報導；TIMP1、TIMP2、TIMP3、及TIMP4。對於非消化功能的蛋白質分解酶而言，理論上應有對應之分解酶抑制蛋白來調控它們的活性，至於為何仍有眾多之蛋白質分解酶尚未有分解酶抑制蛋白的報導，可能是下列原因造成：(1)許多蛋白質分解酶的發現是由基因選殖得到，缺乏酵素本身、(2)酵素活性及分解酶抑制蛋白活性測定方法尚未建立、(3)該領域發展歷史太短，因為Astacin家族成員大多於九十年代才被發現。因此腎泌分解酶所屬之Astacin家族也尚未有分解酶抑制蛋白的報導，本實驗室目前已純化出腎泌分解酶抑制蛋白(p40)並由N-端氨基酸序列鑑定出它是胎兒蛋白(fetuin)的部份結構而完整的胎兒蛋白(p65)則出現在血清中，而且p40僅出現在免疫造血器官如頭腎、體腎及脾臟少數組織。這是Astacin家族報告內生性抑制蛋白的首例。我們已成功從肝臟cDNA庫選殖出p65之cDNA clone，也完成定序，證實p40是由p65轉變而來，有趣的是p40可抑制腎泌分解酶(Nephrosin)與p65卻被分解，也支持此論點。

為瞭解胎兒蛋白作用的分子機制，我們挑選富含巨噬細胞的組織-肺臟及脾臟作為純化胎兒蛋白受體的來源，萃取出膜蛋白，並使用bovine fetuin-Fractogel親和力管柱純化胎兒蛋白結合蛋白。接著就是二個鑑定工作：一是鑑定那些蛋白是真實的結合蛋白，而不是污染物、另一是鑑定各結合蛋白的身分。前者可利用Gel pull-down assay或Far Western blotting而後者則依賴質譜儀分析(MALDI-TOF及LC-MS/MS)和PCR cloning。希望藉由胎兒蛋白在細胞膜上的結合蛋白的純化、鑑定及基因選殖來瞭解胎兒蛋白多重功能的分子機制，也可能因此建立胎兒蛋白研究的新方向。

三、材料與方法

壹、蛋白質膠體電泳

電泳配方及條件參考Schägger & Jagow(1987)所著Tricine-SDS方法，Running gel之濃度為7.5%，stacking gel濃度為4%，Cathode buffer組成是0.1 M Tris、0.1M Tricine、0.1% SDS，pH 8.25。Anode buffer組成是0.2 M Tris，pH 8.9。Gel buffer組成是1 M Tris、0.1% SDS，pH 8.45。電泳條件是五十伏特二十分鐘及一百伏特七十分鐘。之後膠體以水洗六十分鐘後以Colloidal Coomassie blue G-250 染色六十分鐘，再用水洗淨二十分鐘。銀染色則採取Amersham-Pharmacia Plus One Silver Stain Kit，並依原廠商提供步驟進行染色，但是退染改為5% 醋酸。

貳、遠西方墨點法及pull-down assay

Bovine fetuin以Pierce公司產品Biotinylation Kit作低密度Biotin接合，以二次Centricon離心除去殘餘Biotin-LC-NHS。欲測蛋白材料以SDS-PAGE解析後轉漬至PVDF，以3% BSA/PBS blocking buffer處理一小時，

加入biotinlyated fetuin (20 µg/ml)培育三十分鐘，PBS清洗5分鐘共三次，加入 Streptavidin-HRP (2 µg/ml)培育三十分鐘，PBS清洗5分鐘共三次，最後以DAB (0.6 mg/ml)、0.01% 氯化鎳、1 ul/ml 雙氧水呈色。取1 mg Bovine fetuin溶於0.9 ml 0.1 M NaHCO₃，加入溶於DMF的 NHS-LC-Biotin (Pierce Co.,USA) 0.1 ml (0.1 mg)，置於冰上二小時，加入3 ml TE buffer中止反應，以Centricon (Millipore, Cutoff 10k)離心濃縮溶液至0.1 ml，加入3 ml TE buffer再覆二次上述濃縮/稀釋步驟，去除未反應之 NHS-LC-Biotin。將欲測對象與 Biotin-fetuin於冰上結合一小時(TE buffer/2% Triton)，加入 Streptavidin-Agarose混合後靜置十分鐘，離心去除上清液，再以TE buffer/2% Triton清洗二次，以8M urea/2% Chaps清洗出結合蛋白。

參、胎兒蛋白之受体純化

新鮮小鼠組織(脾、肺臟)以TE buffer研磨，離心除去上清液，不溶物以80% 飽和硫酸銨洗淨二次後以2% Triton X-100/TE buffer及2% SB 3-8/TE buffer陸續萃取，萃取液分別通入以2% Triton X-100/TE buffer或2% SB 3-8/TE buffer平衡之Fetuin-Fractogel (0.5 mg/ml density)，以2% Triton X-100/TE buffer或2% SB 3-8/TE buffer清洗後，以2% Chaps/TE buffer、8 M urea/2% Chaps/TE 及2% SDS沖洗出結合蛋白

肆、西方墨點法(Western blotting)

將欲分析之材料進行膠體電泳分析，利用 Semi-dry blotter (Hoeffer Semi-Phor)將蛋白質轉印至PVDF濾紙上。以Phosphate buffered saline (PBS)洗滌十分鐘，加入Blocking solution (5% skim milk in PBS)室溫反應一小時，再以PBS洗滌三次。接著加入抗血清(一比一千稀釋於PBS，含1 mM EDTA、3 mg/ml BSA)於攝氏四度反應十六小時，再以PBS洗滌三次，然後加入Peroxidase-conjugated anti-guinea pig IgG抗體(溶於PBS含1 mM EDTA、3 mg/ml BSA)反應於室溫二小時，再以PBS洗滌三次。最後以DAB (0.6 mg/ml)、0.01% 氯化鎳、1 ul/ml 雙氧水呈色。

伍、質譜分析 (Mass spectrophotometry analysis and protein in-gel digestion)

將純化得到之蛋白質作SDS電泳，以Coomassie blue染色，待褪色後，以刀片將色帶切下，放入微量管中，加入100 µl之DTT/25 mM碳酸氫氣。於37°C反應一小時，加入100 µl Acetonitrile，振盪數分鐘，離心除去上清液。加入100 µl 65 mM Iodoacetamide/25 mM 碳酸氫氣，於室溫反應一小

時，加入100 µl Acetonitrile，振盪數分鐘，離心除去上清液。加入200 µl 50% Acetonitrile/25 mM 碳酸氫氣，振盪數分鐘，離心除去上清液。加入200 µl 100% Acetonitrile，振盪數分鐘，離心除去上清液。加入10-15 µl trypsin 溶液(0.1-0.15 µg配於25 mM碳酸氫氣)，於37°C反應16小時，加入10 µl 100% Acetonitrile，振盪數分鐘，離心收集上清液。殘餘膠體加入20 µl 100% Acetonitrile/0.1% TFA萃取，振盪數分鐘，離心收集上清液。殘餘膠體加入20 µl 50% Acetonitrile/0.1% TFA萃取，振盪數分鐘，離心收集上清液。殘餘膠體加入20 µl 100% Acetonitrile/0.1% TFA萃取，振盪數分鐘，離心收集上清液。把各次收集之上清液混合，並以SpeedVac抽至殘留體積約10 µl，送中央研究院基因體/蛋白質體中心，以LC-Mass-Mass作蛋白質定序。

四、結果與討論

我們自小鼠組織中以2% Triton X-100/TE萃取膜蛋白後通入以Fetuin為ligand之親和力膠體管柱，膠體先後以2% Triton X-100/TE buffer、2% Chaps/TE、1 M NaCl/2% Chaps/TE清洗後以8 M urea/2% Chaps/TE 及2% SDS沖洗出結合蛋白。將結合蛋白進行SDS電泳及銀染色，可觀察到多個分子(Fig. 1)。不論是由肺臟或脾臟而來的結合蛋白，在經過gel pull-down實驗後，其電泳的pattern改變了。一些分子因為時間短暫，無法結合住fetuin，使電泳結果變得乾淨許多，最多只剩下約3-4個major bands。肺臟的部分剩下約280、70、60、28 kDa的分子量，而脾臟的部分剩下約280、65 kDa的分子量。初步預估這些分子和fetuin結合最力最強，也最有可能是receptor分子，尤其是接近280 kDa的分子，又在這裡重複出現。便將染色後色帶切下，進行脫色、平衡、還原、Alkylation、trypsinization、以及peptide elution。將收集之peptide送至中央研究院基因體/蛋白質體中心進行LC-MS-MS分析。經由兩次蛋白質質譜鑑定，總算鎖定15個對象，最有可能是fetuin的結合分子。依照比對出來的分子代號，搜尋NCBI database，找到這些分子的蛋白質序列，接著設計此序列對應之primer，使用肺臟和脾臟的cDNA進行PCR反應，篩選這15個基因的表現情形。

歷經三重複的PCR反應、TA cloning以及 autosequencing之後，只剩下6個分子在肺臟和脾臟有基因表現，而且PCR產物的序列正確。這6個分子分別是L1 (alpha 3 B chain of laminin-5)、AIF(apoptosis-inducing factor)、CytC rc2 (ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2)、ATPsyn β (ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit)、Unnamed protein 1和Unnamed protein 2。

在篩選出結合分子的可能身份後，必須表現這些蛋白分子作為抗原，製備抗體血清，並且辨識到當初所純化到的binding protein (即2% CHAPS加8 M urea fraction)，才能確定質譜鑑定的結果無誤。所選用的表現載體為pQE30，使用*E. coli* JM109作為宿主，表現這6個分子的部分片段。

收集各分子的多株抗體血清之後，進行西方轉

印法 (western blotting) 偵測所得抗體的titer, 決定以 1:2000的稀釋倍數進行反應。將純化到之binding protein濃縮約20倍, 進行SDS-PAGE及轉印後, 以各分子的抗體血清操作西方轉印法。由圖三CytC rc2的抗體辨識到分子量約48 kDa及40 kDa共兩個訊號, Un1抗體的辨識結果呈現出smear的訊號, 但仍看得出有一個約80 kDa的major band, L1抗體辨識到的訊號分子量約270~280 kDa左右。Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2的分子量為48.2 kDa, 所以抗體所辨識到的48 kDa訊號應該就是此蛋白質分子。Unnamed protein 1分子量為82 kDa, 抗體所辨識到的80 kDa major band應該就是Unnamed protein 1所產生的訊號, 而alpha 3 B chain of laminin-5的分子量為282 kDa, 抗體所辨識到的280 kDa訊號應該沒錯。經由這三個western結果的驗明正身, 可以確認Mass的比對結果無誤。而另外三個抗體: anti-apoptosis-inducing factor、anti-unnamed protein 2以及anti-ATP synthase/H⁺ transporting mitochondrial F1 complex/ beta subunit, 沒有認到任何的分子量, 這表示Mass的比對判讀有誤, 這三個蛋白質分子量應該是屬於別的身份, 仍有待查明。

經由western blotting做最後確認, 鑑定了三個我們所純化到的fetuin結合分子, 分別是兩個來自於粒線體內膜附近的分子 Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2、Unnamed protein product, 以及一個extra cellular matrix蛋白alpha 3 B chain of laminin-5。

Ubiquinol-cytochrome C reductase complex是粒線體呼吸鏈的組成之一 (complex III), core protein 2則是形成complex III所必須的subunit, 位處粒線體inner membrane的matrix site, 是一個soluble protein。而Unnamed protein是一個老鼠的mitochondrial inner membrane protein (IMMT), 具有transmembrane domain, 目前未知其功能, 只知有可能是由alternative splicing而來。人類有一個分子與其非常相似, 稱為mitofilin (HMP), 其序列特徵具有coiled coil domain及inner membrane targeting domain。Mitofilin在心肌被發現, 因為心肌具有高含量的粒線體, 所以在萃取心肌時相對量便增加, 容易被萃取出, 但其實組織分佈調查的結果顯示, 其cDNA分佈於人類的各種細胞中 (Icho et al, 1994; Odgren et al, 1996)。以Fetuin在細胞中的重要調節角色來評估, 其與粒線體內分子之結合應有重要之生理意義, 有待我們進一步地探討其作用機制。

五、參考文獻

1. Hung, C.H., Huang, H.R., Huang, C.J., Huang, F.L. and Chang, G.D. (1997), Purification and cloning of carp nephrosin, a secreted zinc endopeptidase of the astacin family. *J. Biol. Chem.*, 272, 13772-13778.
2. Bond, J.S., and Beynon, R.J. (1995), The astacin family of metalloendopeptidases, *Protein Science*, 4, 1247-1261.
3. Gomis-Rüth, McKay, D.B., and Bode, W. (1995) The metzincins-Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and

matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases, *Protein Sci.* 4, 823-840.

Wang, H., Zhang, M., Bianchi, M., Sherry, B., and Sama, A. (1998) Fetuin (α_2 -HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 95, 14429-14434.

5. Nie, Z. (1992) Fetuin: its enigmatic property of growth promotion. *Am. J. Med.* 263, 551-562

6. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S. and Mische, S. M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20, 601-605

7. Dziegielewska, K. M., Daikuhara, Y., Ohnishi, T., Waite, M. P., Ek, J., Habgood, M. D., Lane, M. A., Potter, A. and Saunders, N. R. (2000) Fetuin in the developing neocortex of the rat: Distribution and origin. *J. Comp. Neur.* 423, 373-38

8. Odgren, P. R., Toukatly, G., Bangs, P. L., Gilmore, R., Fey, E. G. (2003) Molecular characterization of mitofilin (HMP), a mitochondria-associated protein with predicted coiled coil and intermembrane space targeting domains. *J Cell Sci.* 109, 2253-2264

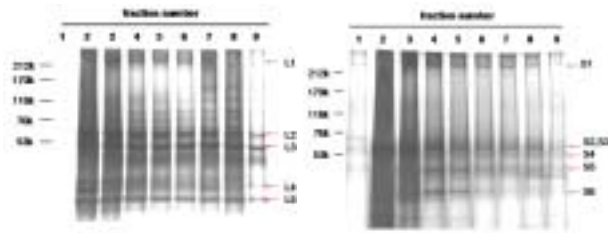


Fig. 1. Purification of fetuin-binding proteins from Mouse spleen and lung.

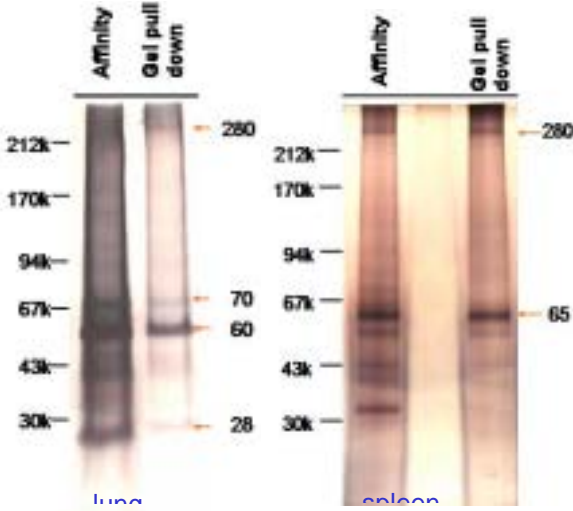


Fig. 2. Gel-pull down assay of fetuin-binding proteins From mouse spleen and lung.

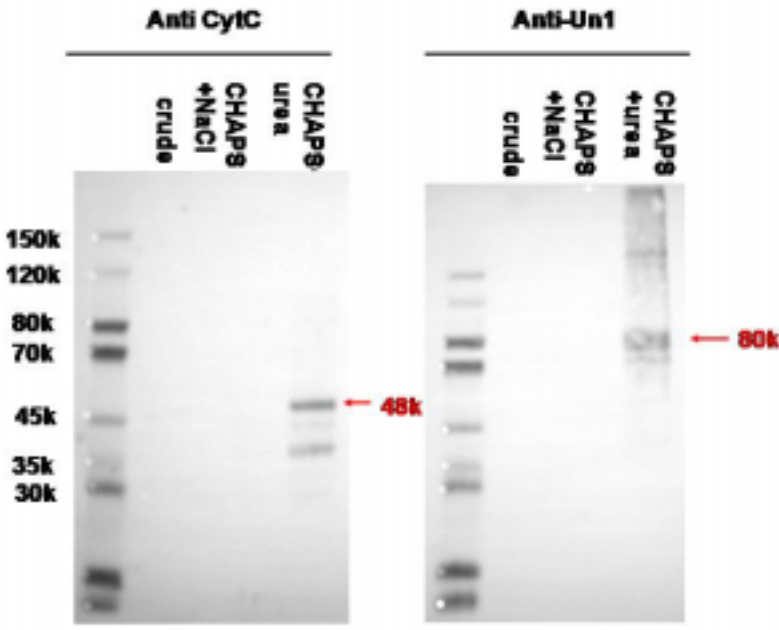


Fig. 3. Immunoblotting of fetuin-binding proteins with Anti-cytC and anti-Un1.