

行政院國家科學委員會專題研究計畫執行進度報告

利用蛋白質體來定性高粱胚乳澱粉粒結合性蛋白(1/3) Characterization of sorghum endosperm starch granule associated proteins using proteomics

計畫編號：NSC-90-2313-B-002-270

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：謝兆樞 執行機構及單位：台灣大學農藝學系

e-mail: jawar@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

澱粉是禾穀類種實胚乳最主要的部分，約佔種實乾重的 65%。而在胚乳中的粉質澱粉 (amylose) 與臘質澱粉 (amylopectin) 的比率更是攸關種實之食味與加工品質的重要因素。在育種上，這種比率是育種家很注重的性狀；在食品加工上，它對加工食品品質的影響，例如釀酒、粉製食品等，是絕對無法以分別外加另類澱粉〔或純化的粉質澱粉〕來調整其比率所能取代的。無論是直接供應糧食的生產者或加工業者，總是殷切期待有特定粉質澱粉與臘質澱粉比率的品種，因此對育種者而言，皆亟待能經由探討種實胚乳發育時澱粉合成途徑及其相關基因的調控，進而能選育出各種適當粉質澱粉與臘質澱粉比率的基因型〔品種〕，以因應不同用途的需求。過去五年裡，我們也針對可溶性澱粉合成^o的活性進行探討並選殖其 cDNA。另外，我們也針對澱粉顆粒形成時的結合性蛋白進行定性研究。除了我們先前所著重的 60kD 的 waxy protein (granule bound starch synthase, GBSS) 及其錯意突變蛋白分子之外，我們亦已用 RT-PCR 及 PCR 的技術定出 branching enzyme 與 soluble starch synthase 的 cDNA 序列。

在未來的三年內、我們擬以基因體 (genomics) 與蛋白質體 (proteomics) 的方式研究高粱種實的澱粉生合成之相關機制。在第一年的工作中，我們將把高粱種實的 debranching enzyme 與 ADPG pyrophosphorylase 的 cDNA 加以定序。如此、加上我們原來已找到的基因 (包括 granule-bound starch synthase, soluble synthase, branching enzyme)，則幾將高粱種子中澱粉生合成的關鍵酵素全部定序。這些序列資料將可作為進行蛋白質體分析的基礎。同時並擬用 mass spectrometry 的方法來探討 wild type 與我們以 EMS 誘導所得的 waxy mutant (含有 GBSS 蛋白質但未具酵素活性) 的 GBSS 蛋白是否有轉譯後修飾 (post-translational modification)。

Abstract

The *waxy* locus of cereals determines the amylose content in endosperm of developing grain. It encodes the starch granule-bound starch synthase (GBSS), which forms straight chain polymer amylose. The proportion of amylose and amylopectin content in cereal endosperm starch is a major determinant of cooking and industrial qualities. This required proportion can not

be adjusted by adding amylose externally to the original starch. Therefore, the unique line with specific amylose content is searching for urgently by the plant breeders. In our previous studies we had emphasized on the enzymes which are linked to this traits. We had already sequenced the cDNAs of GBSS, soluble starch synthase (SSS) and branching enzyme of sorghum grains. In this proposed work, we will further sequence the cDNAs of sorghum debranching enzyme and ADPG pyrophosphorylase. And then we will go on the studies on post-translational modification of these starch proteins.

二、緣由與目的

澱粉是植物能量儲存及代謝的主要形式，主要是由直鏈的粉質澱粉(amylose)及具支鏈的臘質澱粉(amylopectin)所組成，粉質澱粉和臘質澱粉的比例是影響種實食味與加工品質的重要因素。高粱的種實可用於主食、飼料、製醋與釀酒，甜高粱可製作糖漿，有色之小穗可提製染料，用途相當廣泛。種實內澱粉約佔乾重的 65%，而粉質澱粉和臘質澱粉的比例更是影響食味及釀酒品質的重要因素(Hiseh and Pi, 1979)。若能充分瞭解，在種實發育過程中，有關澱粉生合成途徑及其相關基因的調控，將有助於育種家選育出特定粉質澱粉與臘質澱粉比例之品種以提供不同需求。

本實驗以高粱 I⁺、I⁻、Mu 三品系為材料，利用雙向電泳，接著以 75KD 澱粉分支 60KD 臘質蛋白及 22KD 高粱儲存性蛋白之抗體進行西方墨點法，定出在蛋白雙向電泳膠片上之位置。並純化出此三個品系胚乳之澱粉粒，經 themolysin 處理，可去除澱粉粒表面之蛋白質，所得之澱粉粒，經 SDS-PAGE 及雙向電泳分析後，可得位於澱粉粒中之蛋白，並進一步

加以定序、比對分析。

三、結果與討論

高粱 60KD 臘質蛋白之免疫墨點轉印分析

I⁺及 EMS-wx 兩個品系，能被兔子抗高粱臘質蛋白之抗血清所辨認，I⁻則無蛋白被辨認。推測此一位置之蛋白為臘質蛋白在雙向電泳之位置。根據前人實驗結果，臘質蛋白在胚乳中與澱粉粒結合（林，1991）。經 themolysin 處理後之澱粉粒，在電泳膠片上，亦可見臘質蛋白，故可知臘質蛋白與澱粉粒結合，與前人實驗吻合。且所偵測之臘質蛋白，出現連續之 6 個 spots，已證實高粱只有一個臘質蛋白之基因，故推測此一情形為蛋白經過後轉譯修飾作用所造成，但須經更進一步之分析，希望可知為何種作用所造成。

高粱 I⁺及 I⁻兩個品系為臘質近同源系，兩者的差別在於 Wx protein 之有無，根據此一特性，比較高粱 I⁺的雙向電泳圖 (Fig.1) 與高粱 I⁻之雙向電泳圖 (Fig.2)，可以確定 Wx protein 之位置。根據前人實驗結果，Wx protein 在胚乳中與澱粉粒結合（林，1991）。Themolysin 為一種蛋白質酵素，在澱粉粒未糊化的狀態下，它只會分解位於澱粉粒外層之蛋白，因此經 themolysin 處理後之澱粉粒，所萃取出之蛋白，在 SDS-PAGE 電泳膠片上所見之條帶表示位於澱粉粒之中的蛋白。在經過 themolysin 處理之高粱 I⁺品系的澱粉粒，仍保有 Wx protein 之條帶 (Fig.3)，故可知 Wx protein 與澱粉粒結合，受到澱粉粒之保護，在 themolysin 作用下，不會分解，可證明前人實驗結果。且所偵測到之 Wx protein，出現連續之 6 個 spots，已證實高粱只有一個臘質蛋白之基因，故推測此一情形為蛋白經過修飾作用所造成，但須經更進一步之分析，希望可知為何種作用所

造成。之後，為了了解何種修飾作用造成連續的 spots，採用 MALDI-TOF 進行分析。以 Ruby 染色之後，將 gel 至於 UV box 上，找到 wx protein 用 tip 將其挖下，為確保所挖的點不受到其他點之污染只挖了中間分離較開，且量較多之四點，之後進行 trypsin digest，最後送至中研院生化所進行 MALDI-TOF。

高粱胚乳75KD蛋白之免疫墨點轉印分析

在三個品系中，皆能被兔子抗高粱胚乳75KD的抗血清所辨認，辨認之結果呈現一連串的spots，但是由於胚乳全蛋白所偵測之訊號不強，因此需進一步使用澱粉粒蛋白進行實驗，以得到更詳盡之資料。

高粱醇溶性蛋白Kafirin(22KD)之免疫墨點分析

此三品系均可被兔子抗高粱22KD Kafirin的抗血清所辨識，由於此一蛋白為種子儲存性蛋白，含量相當高，且發現其 pI 值範圍相當廣。

Themolysin處理之結果

Themolysin處理之澱粉粒，經 SDS-PAGE 電泳比較後，發現儲存性蛋白及一些蛋白被分解，推測這些蛋白應位於澱粉粒表面。將處理後的澱粉粒進行雙向電泳，發現所得之蛋白，PI 值為5~8之間，分子量較大，將這些蛋白定序所得之資料，與資料庫中相近物種之澱粉生合成相關酵素加以比對，希望可以得知這些蛋白為何。

四、計畫成果自評

□ 我們在此計畫中如期地進入蛋白修飾機制的探討。預計由 MALDI-TOF 之結果我們將可以釐清 Wx 蛋白的變化特

性。

- 我們在此計畫中將利用以前所製作的三個高粱種子蛋白的抗體，即抗 22 kD Kafirin，抗 23 kD Kafirin，與抗 75 kD 澱粉粒蛋白的抗體，加上數年前我們所製作的抗 Waxy protein 抗體，作為我們日後研究工作的很好 internal control；另外兩個則是抗澱粉粒蛋白，在我們以澱粉為主要研究對象的工作中是很重要的必備工具。
- 我們在此計畫執行期間找出了純化高粱種子澱粉粒蛋白的方法、得以順利的去除貯存蛋白等污染，如此將可順利進行進一步的蛋白體學之研究。
- 植物的種子與葉片中均可製造澱粉，也有一些共同的基因表現。例如 soluble starch synthase 在種子與葉片中均有表現，而 granule-bound starch synthase (Waxy protein) 則只在種子而不在葉片中表現。以 Western blot analysis 的結果來看，75 kD 澱粉粒蛋白亦只在種子才會表現，且在 10 DAP – 30 DAP 期間均可發現。
- 我們目前除了有四種高粱種子蛋白的抗體，亦有數個澱粉合成有關基因的 cDNA clones、包括 granule-bound starch synthase, soluble starch synthase, branching enzyme, debranching enzyme 等。這些工具可以讓我們更快速的進行穀粒品質分析、改善、育種等工作。

五、參考文獻

- 林百昌。1999。高粱胚乳澱粉的分子定性及胚乳 79KD 蛋白的表現。台灣大學農藝學研究所 碩士論文。
- 林智良。1991。蜀黍胚乳臘質基因表現的研究：蛋白質與 RNA 層次之探討。台灣大學農藝學研究所 碩士論文。
- 陳妙如。1999。高粱胚乳可溶性澱粉合成 cDNA 的分子定性。台灣

- Granier, F. (1988) Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9: 712-718.
- Hsieh, J.S., and Pi, C. P. (1979) Effect of the *waxy* gene on grain quality and wine production in sorghum. *J. Agric. Assoc. China New Series* 106: 30-51.
- Marshall, T. (1984) Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal. Biochem.* 136: 340-346.
- Mu-Forster C, Wasserman B. P. (1998) Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm. Proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linking of granule-associated polypeptides. *Plant Physiol.* 116(4):1563-71.
- O'Farrell, P.H. (1974) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed.; Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tsang, C. W., Bers, G. E. and Hancock, K. (1985) *Enzyme-linked Immuno-electrotransfer Blot Enzyme-mediated Immunoassay.* (Ed. Ngo, T. T. and Lenhoff, H. M.) Plenum Press. New York and London. p. 389-414.