

運用耶氏酵母菌胞外分泌系統執行降血糖機能性胜肽 GHP 之蛋白質 開發與生產

專 題 生：李至軒

指導教授：簡宏堅

E-mail：nightstart0615@hotmail.com

摘要

所謂的“胜肽”就是小分子胺基酸鏈，蛋白質經水解後，轉變成為由數個胺基酸組成之極小分子量物質，一般身體分解食物中的蛋白質必須經過多種酵素的輔助才可分解吸收。胜肽是蛋白質的裂解物，因其分子極小（分子量約為 1kDa，只有蛋白質的幾十或幾分之一的大小），可溶於水，不會被酸分解且耐高溫，不必經消化分解，很容易就可以由腸吸收，被人體的吸收率是一般蛋白質的 5 倍。近年來科學家以現代的科學方法檢驗，證實苦瓜確有降血糖的功能。進一步的研究更發現苦瓜中有降血糖功能的成分，以及其降血糖的原理。細胞實驗證實，這些由白蓮苦瓜或山苦瓜分離出的三萜類化合物，可解開發炎性細胞激素對細胞所造成的胰島素抗性，使細胞恢復吸收葡萄糖的能力。作用類似臨床上使用的胰島素增敏劑，因此對於改善第二型糖尿病或胰島素抗性有很大的潛力。其中有些三萜類分子還可以取代胰島素，直接活化胰島素訊息傳遞路徑，促進細胞對葡萄糖的吸收。我們先在 Human Tyrosine Hydroxylase (HTH) 之中，選 5 個區段(不影響蛋白活性之區段)，利用置換的方式將胜肽 GHPYYSIKKS 構築在 HTH 之中並在前後各加一 F(phenylalanine) 的胺基酸幫助往後被 pepsin 給分解而釋放出來。將其選殖入 *Yarrowia lipolytica* (*Y.lipolytica*) 酵母菌之胞外表現載體 *pYLSC1* 最後將其轉形至含 82 組 Gentomycin 基因 *Y.lipolytica* 酵母菌染色體中進行生產

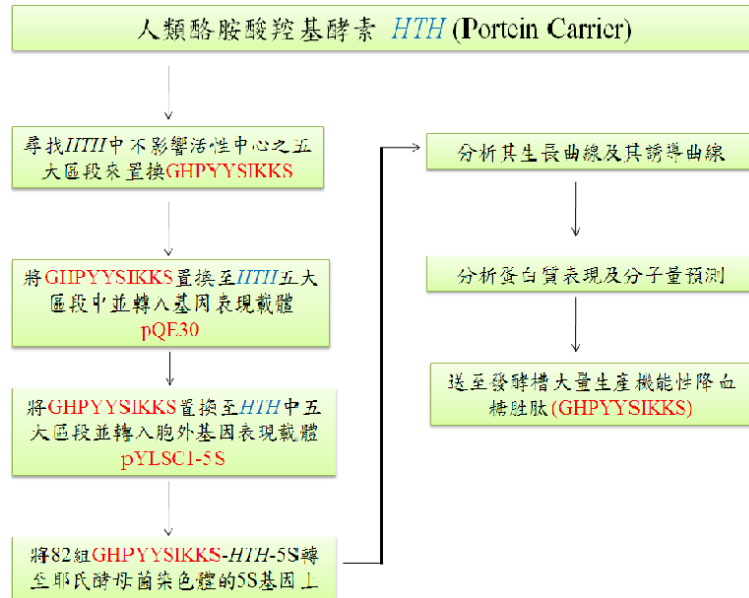
關鍵字：胜肽、降血糖、糖尿病、GHPYYSIKKS

引言

現代藥理研究證明苦瓜具有降血糖、降血脂、抗癌、抗艾滋病病毒、抑菌、抗氧化等功效。將山苦瓜萃取物的降血糖活性進行了研究，並從中篩選出降血糖活性肽。同時通過鹼性蛋白酶 Alcalase 酶法水解紅外光譜圖顯示多肽 MC2-1-5 在 500~4000 cm^{-1} 範圍具有肽的特征吸收峰。串聯質譜儀測得 MC2-1-5 的相對分子質量為 3405.5174。蛋白測定序得到 MC2-1-5 的 N 端前 10 個氨基酸殘基排列次序為 GHPYYSIKKS。MC2-1-5 降糖機制是修復胰導 β 細胞，增加肝糖原含量及提高抗氧化能力。我們已經知道，GHPYYSIKKS 胜肽具有修復胰導 β 細胞，增加肝糖原含量及提高抗氧化能力，從而促使血糖降低。將此胜肽 GHPYYSIKKS 置換到 Human Tyrosine Hydroxylase (HTH)

之中。之後 Transform 到 *Yarrowia lipolytica* 利用胞外分泌系統來做 HTH 蛋白質大量生產，並由 Pepsin 分解從中獲得 11 套 GHPYYSIKKS 降血糖性機能胜肽。

實驗流程



結果

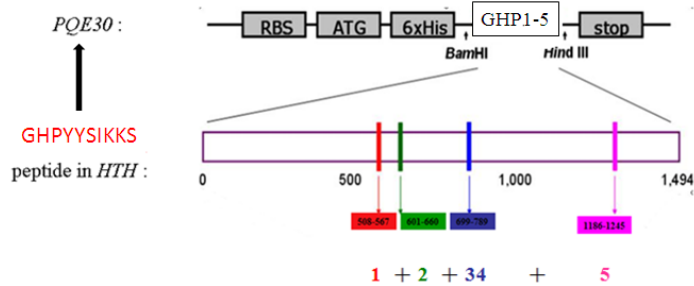


圖 1.在 HTH 中設計示意圖

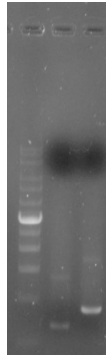


圖 2.利用 PCR 將胜肽 F、R 斷複製出來

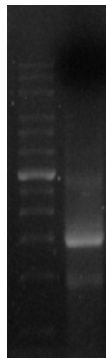


圖 3.利用 overlapping 技術連接

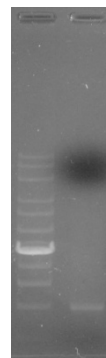


圖 4.利用 PCR 將連接完成的基因大量複製

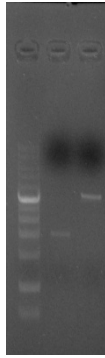


圖 5.將 insert、vector 進行酵素切割

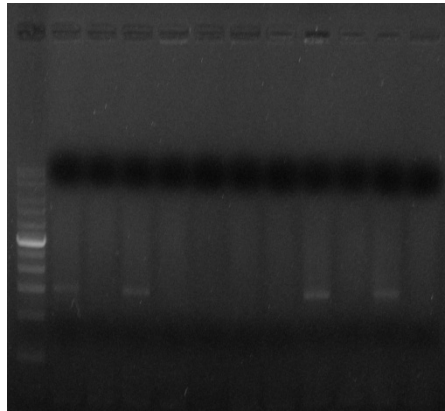


圖 6.利用 PCR 進行篩選

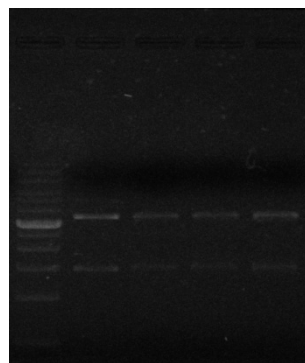


圖 7.利用酵素進行酵素切 check

```

Sequence 0_361 ----- 419.
Sequence 0_365 CCGATACATACAGGATC----- 419.
Sequence 0_362 ----- 479.
Sequence 0_363 ----- 485.
Sequence 0_364 ----- 539.
Sequence 0_368 ----- 254.
Sequence 0_362 ----- 599.
Sequence 0_365 ----- 218.
Sequence 0_365 ----- 455.
Sequence 0_365 ----- 574.
Sequence 0_360 ----- 719.
Sequence 0_370 ----- 494.
Sequence 0_370 ----- 779.
Sequence 0_372 ----- 494.
Sequence 0_370 ----- 812.
Sequence 0_382 ----- 554.
Sequence 0_382 ----- 570.
Sequence 0_382 ----- 616.
Sequence 0_379 ----- 932.
Sequence 0_379 ----- 974.
Sequence 0_379 ----- 938.
Sequence 0_379 ----- 704.
Sequence 0_388 ----- 1058.
Sequence 0_388 ----- 794.
Sequence 0_388 ----- 1119.
Sequence 0_388 ----- 884.
Sequence 0_388 ----- 1170.
Sequence 0_388 ----- 914.
Sequence 0_388 ----- 1228.
Sequence 0_388 ----- 974.
Sequence 0_388 ----- 1028.
Sequence 0_388 ----- 1034.
Sequence 0_388 ----- 1094.
Sequence 0_388 ----- 1094.
Sequence 0_388 ----- 1428.
Sequence 0_388 ----- 1154.

```

圖 8. 送生技公司定序結果

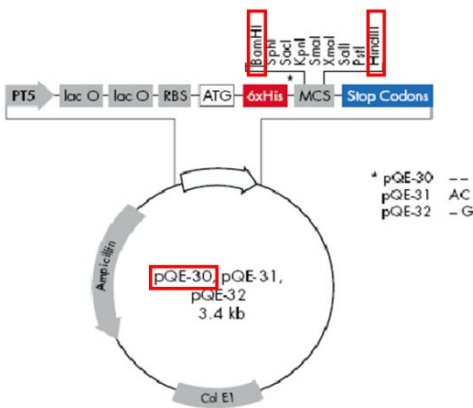


圖 9. 在 pQE30 中構築之位子

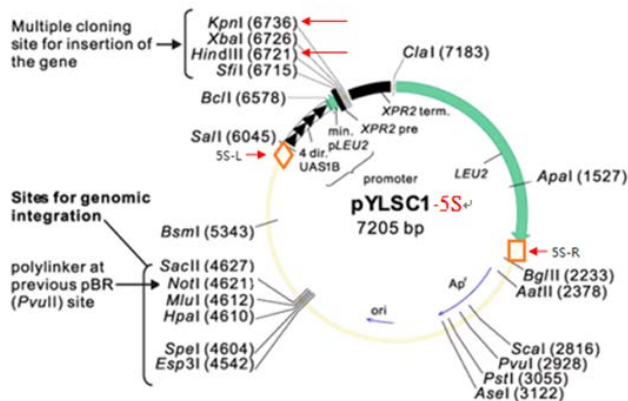


圖 10. 在 pYLSC-5 胞外分泌系統中插入之區域

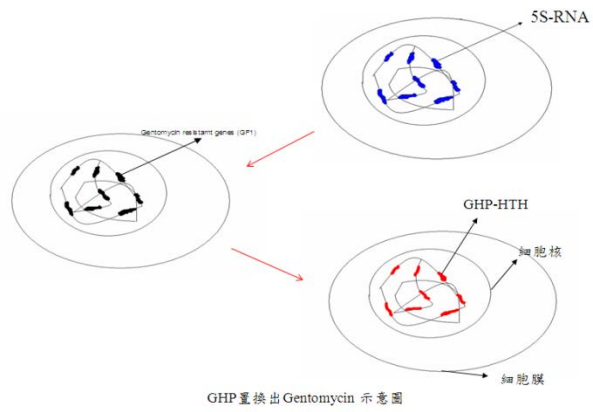


圖 11.轉入酵母菌示意圖

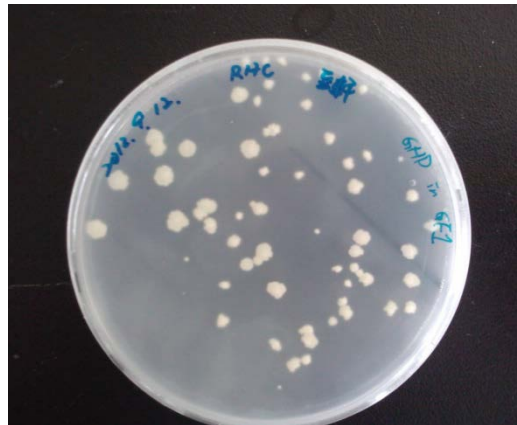


圖 12.利用營養篩選出轉入菌株



圖 13.利用抗生素篩選之菌株


```

Sequence J...1  MPTFDATTIQAKGFRRAVSELDKQAEA IMS PR F I G R P Q S L I E D A R P E P E A V A A A A A A V P S 62k
Sequence S...1  MPTFDATTIQAKGFRRAVSELDKQAEA IMS PR F I G R P Q S L I E D A R P E P E A V A A A A A A V P S 62k
Sequence J...63  P G D P L E A V A F E H G K H A V L N L L F S P R A I K F S A L S R A V Y F E T F E A M I H H L E T R P A Q R F R A G 124k
Sequence S...63  P G D P L E A V A F E H G K H A V L N L L F S P R A I K F S A L S R A V Y F E T F E A M I H H L E T R P A Q R F R A G 124k
Sequence J...125  S P H L E Y F V R L E V R R G D L A A L L S G V R Q V S E D V R S P A G F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P 186k
Sequence S...125  S P H L E Y F V R L E V R R G D L A A L L S G V R Q V S E D V R S P A G F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P 186k
Sequence J...187  Y Y S I K K S F S D Q V Y F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y 248k
Sequence S...187  Y Y S I K K S F S D Q V Y F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y 248k
Sequence J...249  Y S I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P 298k
Sequence S...249  Y S I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F G H P 298k
Sequence J...311  C Y T R H A S S P M N S P E P D C C H I L L G V Y F M L A D R T A C F S Q D G L A S L G A S D E E T E K L S T L Y W F T 372k
Sequence S...311  C Y T R H A S S P M N S P E P D C C H I L L G V Y F M L A D R T A C F S Q D G L A S L G A S D E E T E K L S T L Y W F T 372k
Sequence J...373  E S T 4k
Sequence S...373  E S T 4k
Sequence J...434  E F S L G K N S E V G A V S A S L I F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F A V Q P Y Q Q T T Q S Y Y F V S E 496k
Sequence S...434  E F S L G K N S E V G A V S A S L I F G H P Y Y S I I K K S F G H P Y Y S I I K K S F A V Q P Y Q Q T T Q S Y Y F V S E 496k
Sequence J...497  H H H H H H 502k
Sequence S...497  H H H H H H 502k

```

Pepsin切位示意圖

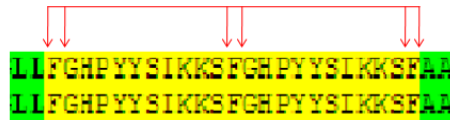


圖 17.胜肽經胃液切割位置示意圖

結論

- 1.將 11 套 GHPYYSIKKS 胜肽置換到 HTH 中
- 2.先完成 E.coli pQE30 系統中完成構築的動作
- 3.完成 82 組 Gentomycin 送入酵母菌 5S-RNA 基因中
- 4.將 82 組 Gentomycin 基因置換成 GHP-HTH
- 5.利用 Starch binding 回收蛋白，HTH 蛋白大小為 54.5 kda，因酵母菌分泌時的糖化作用會提升 10 kda，故最後蛋白大小為 64.5 kda

未來工作

- 1.在未來能將 GHP 降血糖機能性胜肽大量生產並純化
- 2.通過人體試驗確認無毒無損害的物質，並以保健食品上市並造福社會大眾

參考文獻

1. Bailey CJ, Day C, Turner SL, Leatherdale BA. Cerasee. A traditional treatment for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. Diabetes Research.1985;2, 81–84.
2. Chen,D-C.,Beckerich,J-M.,and Gaillardin,C.One-step transformation of the dimorphic

- yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol biotech.* 1997;48:232-235.
3. Fitzpatrick PF. Steady-state kinetic mechanism of rat tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* 30,(1991),3658-3662.
 4. Goodwill KE, Sabatier C, Stevens RC. Crystal Structure of Tyrosine Hydroxylase with Bound Cofactor Analogue and Iron at 2.3 Å Resolution: Self-Hydroxylation of Phe300 and the terin-Binding Site. *Biochemistry*, 1998 ; 37(39): 13437-45.
 - 5 Khanna, Jain. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. *Journal of natural products.* 1981;44(6):648-655.
 6. Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
 7. Lauge Schaffer. A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur. J. Biochem.* 1994; 221, 1127-1132.
 8. Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol*, 2004 ; 109(1-2):63-81.
 9. Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., and Sugino Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic acid research* ,18:61-69.
 10. R. Rodríguez-Sanoja,* B. Ruiz, J. P. Guyot, and S. Sanchez. Starch-Binding Domain Affects Catalysis in Two *Lactobacillus* α -Amylases
 11. S.G. Paule, B. Nikolovski, R.E. Gray, J.P. Ludeman, A. Freemantle, R.A. Spark, J.B. Kerr, F.M. Ng, P.Z. Zimmet, M.A. Myers. GHTD-amide: A naturally occurring beta cell-derived peptide with hypoglycemic activity. *Peptides*; 2009, 30, 955-961.
 12. Sambrook J and Russell D.W. 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual*, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 13. Shibib BA, Khan LA, Rahman R. Activity of *Coccinia indica* and *Momordica charantia* in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase and elevation of both liver and red-cell shunt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. *The Biochemical journal.* 1993; 267-270, 292.
 14. Xiaoqing Yuan, Xiaohong Gu, Jian Tang. Purification and characterisation of a hypoglycemic peptide from *Momordica Charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. *Food Chemistry*; 2008, 111, 415-420.