

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

專 題 生：翁毓晴

指導教授：簡宏堅

E-mail : leah0119@yahoo.com.tw

## 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 GQEGSQMLQK 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、GQEGSQMLQK

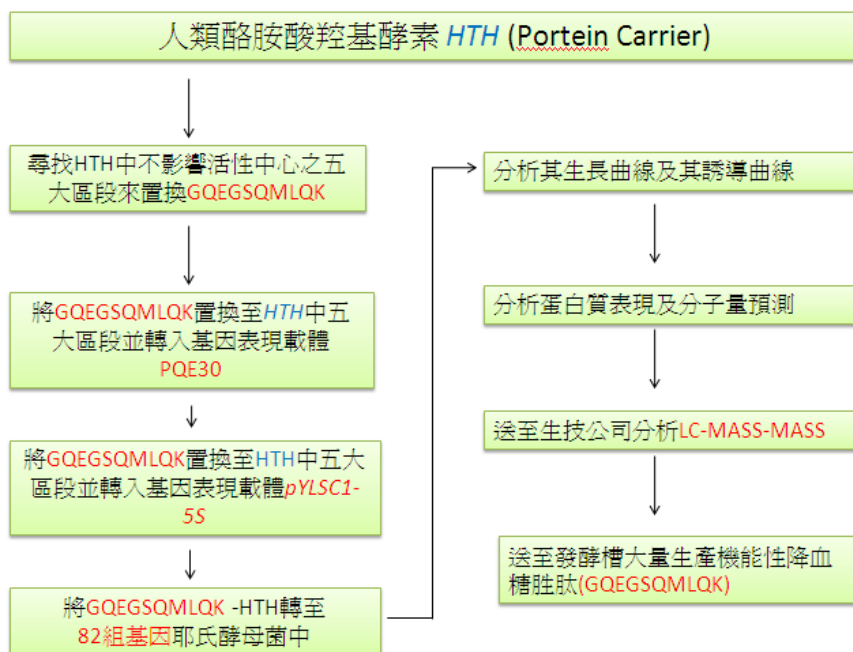
## 引言

降糖胜肽 (Hypoglycemic peptide) 研究大多偏向動物試驗，很少有其作用機制以及其成份功能性的研究。對於各種動物試驗研究表示，其降糖胜肽的來源廣泛，有包括苦瓜及尿液。短角苦瓜 (*Momordica Charantia*；或稱短小苦瓜、山苦瓜) 是葫蘆科、屬於中草藥亦屬於一般民眾日常生活食用之蔬果。經動物試驗表示，萃取其蛋白質經分析後的多胜肽 polypeptide-p (DTSEPGA VCMILYFHK；Khanna *et al.*, 1981)<sup>8</sup> 經由注射給藥的方式可以調節沙鼠和齡猴的血糖值，在最近另有研究將其蛋白萃取液經 Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) 以及 Matrix-assisted laser desorption ionization time of spectrometry (MALDI-TOF-MS) 分析後的

多胜肽 GQEGSQMLQK 經舌下給藥的方式可調節小鼠的血糖值(申一中碩士論文, 2007)<sup>1</sup>。

另外，早在1970 年由人類尿液中就已經萃取出降糖胜肽，在最近經由動物試驗中測試其同一時間的肝糖生成量與血糖下降量分析其血糖轉肝糖之降糖能力證實具有降血糖活性，其胺基酸序列為 GHTD-amide ( S.G. Paule *et al.*, 2009 )<sup>13</sup> 。

### 實驗流程



### 結果

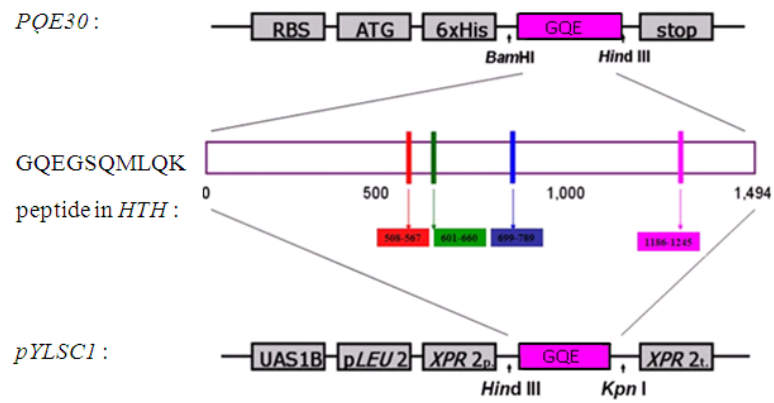


圖 1.在 HTH 中設計示意圖

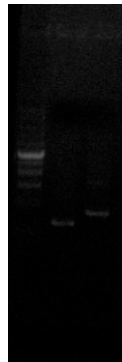


圖 2.利用 PCR 將胜肽 F、R 斷複製出來

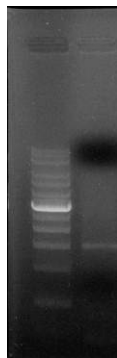


圖 3.利用 overlapping 技術連接

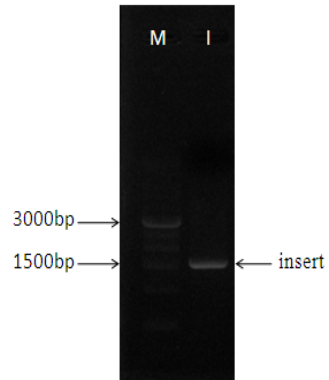


圖 4.利用 PCR 將連接完成的基因大量複製

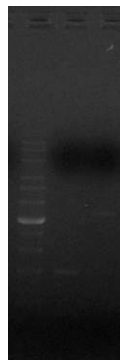


圖 5.將 insert、vector 進行酵素切割

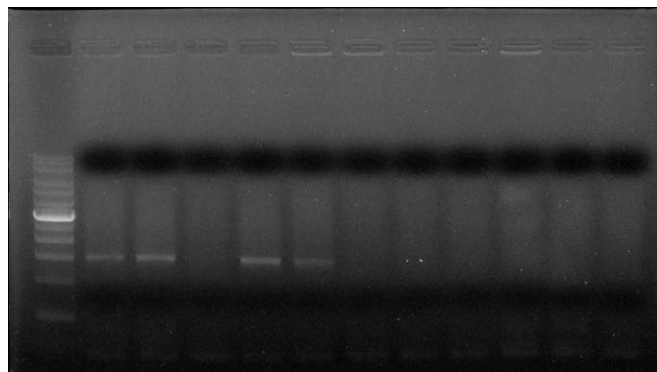


圖 6.利用 PCR 進行篩選

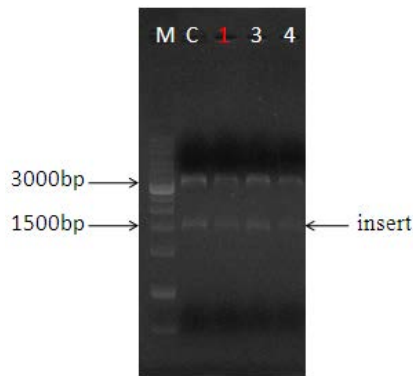


圖 7.利用酵素進行酵素切 check

```

Sequence 0 212  GGACAAATATCCCCAGTTTCGGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCC 271.
Sequence 1 361  GGACAAATATCCCCAGTTTCGGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCC 420.
Sequence 0 272  CTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTTC 331.
Sequence 1 421  CTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTTC 480.
Sequence 0 332  GGACAGGTGTACTTTGGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCATCTTA 391.
Sequence 1 481  GGACAGGTGTACTTTGGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCATCTTA 540.
Sequence 0 392  TTATTCATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGAGGT 451.
Sequence 1 541  TTATTCATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGAGGT 600.
Sequence 0 452  CTACCGTGGACTTTGGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCATCTTA 511.
Sequence 1 601  CTACCGTGGACTTTGGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCATCTTA 660.
Sequence 0 512  TTATTCATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTCTGGGA 571.
Sequence 1 661  TTATTCATCAAGAAGTCTTTGGGCCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTCTGGGA 720.
Sequence 0 572  GGACGTCTCTGGCTTCTCAAGGAGGGCAAGGGCTTCCAGCTGGTGGCTGGCCGGCC 631.
Sequence 1 721  GGACGTCTCTGGCTTCTCAAGGAGGGCAAGGGCTTCCAGCTGGTGGCTGGCCGGCC 780.
Sequence 0 632  CCTCTGGCCGGGACTTCTGGCCAGCTGGCCCTTCCGGTGTCCAGTGGCCAGCTTA 691.
Sequence 1 781  CCTCTGGCCGGGACTTCTGGCCAGCTGGCCCTTCCGGTGTCCAGTGGCCAGCTTA 840.
Sequence 0 692  TATCCGCAAGGCTCTCCGGCCATGCACTCCCTGAGCCGGACTGCTGGCAGGATGGCT 750.
Sequence 1 841  TATCCGCAAGGCTCTCCGGCCATGCACTCCCTGAGCCGGACTGCTGGCAGGATGGCT 899.
Sequence 0 751  GGGCAGCTGGCCATGGCTGGCCAGGCAAGCTTGGCCATGCTGGCCAGGATGGCT 810.
Sequence 1 900  GGGCAGCTGGCCATGGCTGGCCAGGCAAGCTTGGCCATGCTGGCCAGGATGGCT 958.
Sequence 0 811  GGGCTCTCTGGGGCTCCGATGAGGAAATGAGAAAGTGTCCAGCTGTACTGGTCCAG 870.
Sequence 1 959  GGGCTCTCTGGGGCTCCGATGAGGAAATGAGAAAGTGTCCAGCTGTACTGGTCCAG 1016.
Sequence 0 871  GGTGGAGTTGGGCTGTGTAAAGCAAGAGGGAGGTGAAAGGCTATGGTCCGGGCTGGCT 929.
Sequence 1 1017  GGTGGAGTTGGGCTGTGTAAAGCAAGAGGGAGGTGAAAGGCTATGGTCCGGGCTGGCT 1073.
Sequence 0 930  TTTCGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCATCTTAATATTCGATCAA 988.
Sequence 1 1074  TTTCGGCACCCCTACTACTCTATCAAGAAGTCTTTGGGCATCTTAATATTCGATCAA 1132.
Sequence 0 989  GAAGTCTTTCCGGCCCTGAGCCCTAACAGACAGCTACCAAGTCAAGTCTACTTGGT 1048.
Sequence 1 1133  GAAGTCTTTCCGGCCCTGAGCCCTAACAGACAGCTACCAAGTCAAGTCTACTTGGT 1178.

```

圖 8.送生技公司定序結果

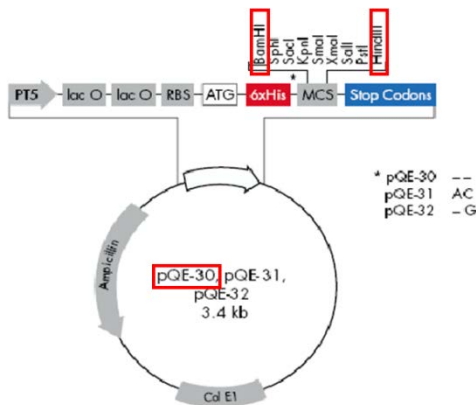


圖 9.在 pQE30 中構築之位子

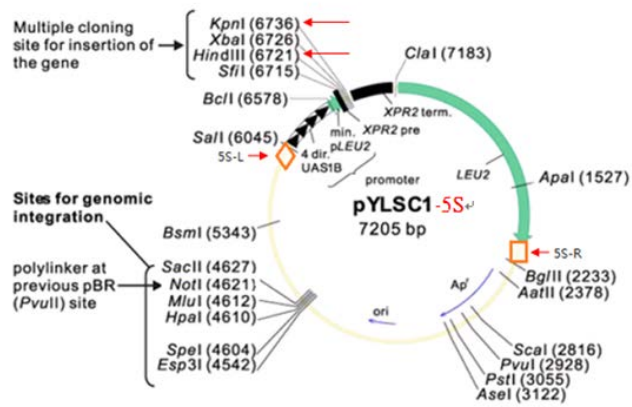
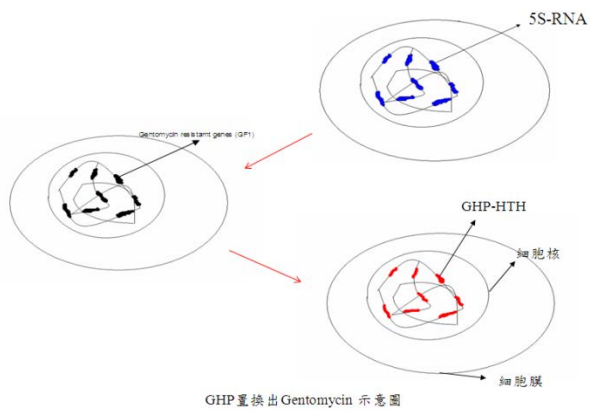


圖 10.在 pYLSC-5 胞外分泌系統中插入之區域



GHP置換出Gentomycin 示意圖

圖 11.轉入酵母菌示意圖



圖 12.利用營養篩選出轉入菌株

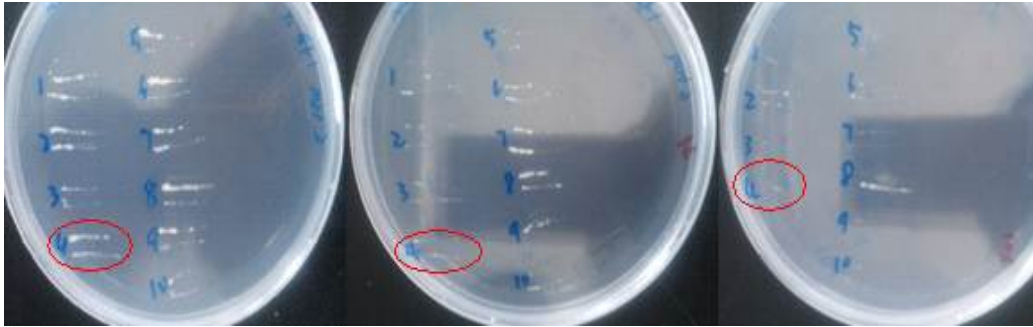


圖 13.利用抗生素篩選之菌株

Original design 1	1	..	1	..	62	Domain I
.....	2	..	1	.....	62	.....
Original design 1	63	..	63	..	124	Domain II
.....	2	..	63	.....	124	.....
Original design 1	125	..	125	..	186	Domain III
.....	2	..	125	.....	186	.....
Original design 1	187	..	187	..	248	Domain IV
.....	2	..	187	.....	248	.....
Original design 1	249	..	249	..	310	Domain V
.....	2	..	249	.....	310	.....
Original design 1	311	..	311	..	372	Starch
.....	2	..	311	.....	372	binding
Original design 1	373	..	373	..	434	Domain
.....	2	..	373	.....	434	.....
Original design 1	435	..	435	..	496	.....
.....	2	..	435	.....	496	.....
Original design 1	497	..	497	..	497	.....
.....	2	..	497	.....	497	.....

圖 14.HTH 定序與 starch binding domain 比對

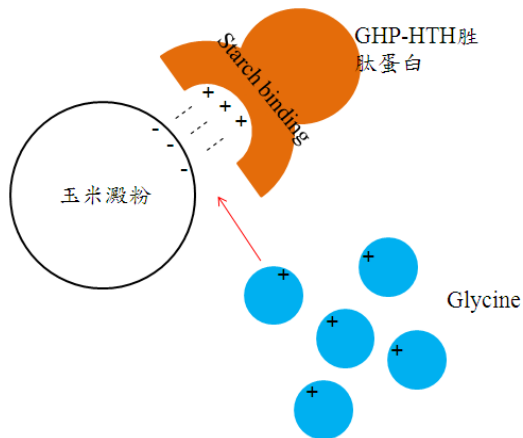


圖 15.starch binding 吸附蛋白示意圖

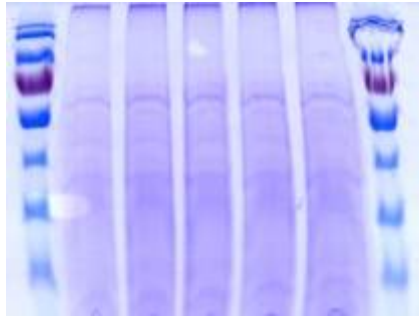


圖 16.SDS 聚丙烯酰胺凝膠電泳

## 結論

- 1.將 11 套 GQEGSQMLQK 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 GQE-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 GQE 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 tetra-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*  $\alpha$ -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.