

[研究新領域報導]

蛋白質摺疊研究的新方向－ 超快速蛋白質摺疊與轉譯中蛋白質摺疊研究

中央研究院化學研究所 黃人則 詹健偉

一、前言

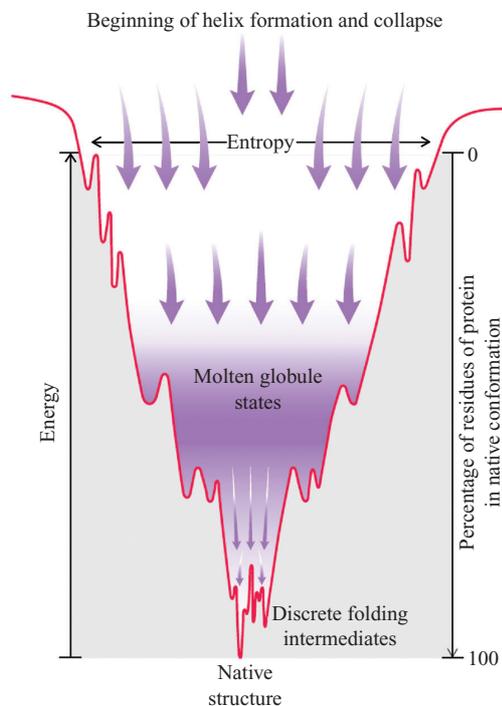
蛋白質負責催化細胞內的各種生化反應，也是生物體內重要的結構分子。這個生物巨分子在核糖體內，由胺基酸單體所聚合形成。而這些剛生成的胜肽不斷調整其構形，直到摺疊成“自然態”(native state)時，才能夠發揮該蛋白質正確的生理功能。蛋白質在摺疊、運輸與降解(degradation)的過程中，可能會有各種不同的構形(conformation)。在細胞中，這些不同蛋白質構形的特性與分子間的關係，會決定該蛋白的最終結構。一般而言，絕大多數的蛋白可摺疊成具有生理功能的自然態，少數錯誤摺疊的結構的可能會被降解或是產生聚集(aggregation) [1]。

在細胞中，伴隨蛋白(chaperone protein)能夠幫助錯誤摺疊的蛋白質，摺疊回具生理功能的自然態構形。如果這些錯誤摺疊的蛋白仍然無法正確摺疊，將會由降解系統回收。然而，還是不能被降解的蛋白，則可能會聚集成塊，或是進一步造成疾病[1]。事實上，有很多疾病與這些錯誤摺疊蛋白聚集有關。這些疾病大致可分為“澱粉樣蛋白”(amyloid)的疾病，或非澱粉樣蛋白的疾病，其中，有些疾病甚至會造成死亡。著名的狂牛症和阿茲海默症，也都被證實和蛋白質的不正當摺疊有關。因此，要試著治療這些疾病，就必須試著了解蛋白質摺疊的動力學，並深入探討其作用機制[1]。

近年來，國內外有許多人投入相關的研究。其中，陳長謙院士及其團隊在中央研究院開發了新的研究方法來觀測初期蛋白質摺疊的動力學。我們應用這些方法來模擬超快速蛋白質摺疊的過程。此外，為了能夠模擬細胞內蛋白質摺疊的狀態，我們也結合了新的生物物理技術，開始進行一系列關於轉譯中蛋白質摺疊(co-translational protein folding)的研究。

二、超快速蛋白質摺疊的研究

關於蛋白質的摺疊，一直有許多不同的模型及理論[2]，而其中漏斗模型(funnel model) 是一個較為客觀的模型[3] (圖一)。與傳統不同的是，該模型並不試圖以典型的化學反應來解釋蛋白質摺疊，而是以摺疊反應的自由能和熵等熱力學常數，來描述摺疊的過程。然而，雖然我們知道蛋白質的自然態構型，決定自該蛋白的一級序列，但是對於蛋白質如何由一級序列摺疊到三級結構，仍然所知不多[4]。多數蛋白質摺疊實驗是利用傳統的動力學實驗法，如停流法(stopped-flow) 搭配圓二色光譜儀(circular dichroism)或是螢光光譜儀(fluorescence spectroscopy)來觀測。然而，



圖一 蛋白質摺疊的漏斗模型

From: J. N. Onuchic, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 3626 (1995).

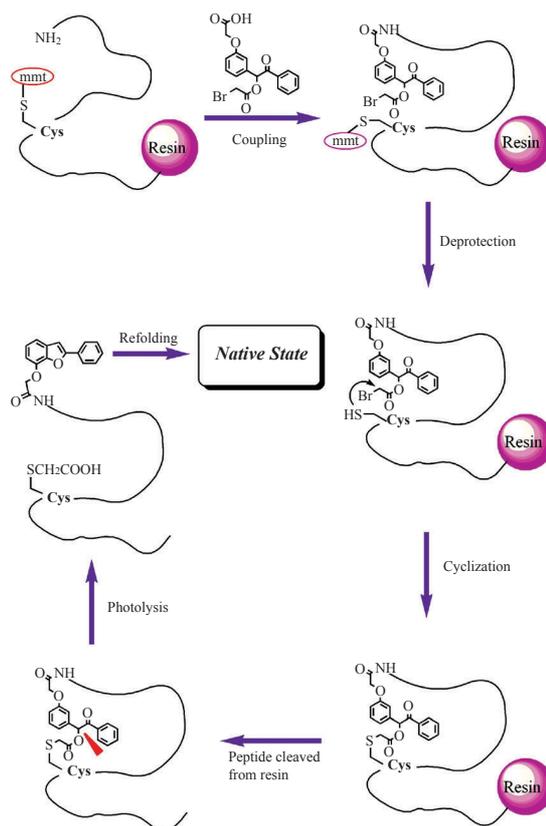
因為傳統的動力學研究觀測的時間不夠快，因此，所得到的動力學數據，往往只反映了蛋白質摺疊晚期的黏合機制，而不是完整的摺疊過程，導致所推得的動力學數據，往往不一致而無法歸納出合適模型[5]。

近年來，越來越多的證據指出，蛋白質的“結構模組”(structural motif)在摺疊過程的初期便快速的產生。蛋白質在剛開始摺疊時，便會在能量漏斗的頂端試驗各種構型[6]，並且從一級結構開始形成某些結構模組。在這個過程中，如果不幸的，不可逆地形成錯誤的結構模組，這些具有錯誤結構模組的蛋白，將有可能無法在之後的摺疊過程中，回到正確的構型，並且可能對細胞造成傷害[7]。由此可見，蛋白質的初期摺疊在整個摺疊過程的重要性[8]。

因此，研究學者積極的開發出許多快速偵測的方法，像是溫度跳躍[9,10]，酸鹼跳躍[11]和壓力跳躍[12]等方法，以便分析蛋白質的摺疊初期機制。不同於這些方式，我們研發了一種新的環化策略來研究蛋白質摺疊的初期過程[13-16]。整個實驗包括三部份：(1)用連結分子使蛋白質變性。(2)利用光解反應使變性後的蛋白質再摺疊。(3)以超快速動力學方法偵測蛋白質的摺疊過程。

我們合成了許多不同的光不穩定的連結分子(photolabile linker)來環化胜肽[13]，在這些連結分子中，*o*-Bromoacetyl-3-carboxymethoxybenzoin 可有效的環化胜肽的 N 端到側鏈的胱氨酸(cysteine) [14,15] (圖二)。以破壞其胜肽的自然態構形。以紫外光照射後，胜肽上用來環化的連結分子會立刻被光解，導致胜肽開始摺疊回自然態。因為摺疊過程實在發生的太快，我們必須使用超快速的動力學偵測法，如光聲波熱卡計(photoacoustic calorimetry, PAC)或是光熱雷射折射儀(phothermal beam deflection spectroscopy, PBD)追蹤[17,18]。一般來說，光聲波熱卡計可偵測 30 奈秒到 50 微秒的熱焓或容積變化，光熱雷射折射儀可偵測 1 微秒到 50 毫秒的熱焓或容積改變。

胜肽摺疊時所產生的容積改變，會對溶劑造成短暫的密度變化，並產生壓力波。溶液的壓力波[18]，可被光聲波熱卡計所偵測。而溶劑短暫的密度變化也會造成溶液隨時間折射率的改變，而被光熱雷射折射儀追蹤。結合這兩種儀器



圖二 利用可光解的連結分子來環化胜肽，再以紫外光打斷連結分子，模擬蛋白質摺疊的過程

數據，我們便可以偵測從奈秒到毫秒等級的胜肽結構變化。

我們成功的利用這個方法，環化了一系列不同的蛋白質，進行了許多蛋白質摺疊初期動力學的研究[15-17]。根據這些實驗結果，我們發現：簡單的 α 螺旋(α helix)結構可以發生在 10^{-9} ~ 10^{-8} 秒，而某些 β 髮夾與 β 轉折結構(β -hairpin or β -turn)在 10^{-6} 秒便已完成[15]。此外，胺基酸的序列可以決定該蛋白質的區域構形。而這個區域構形的傾向，會大大限制該蛋白質所能試驗構形的數量，使漏斗的構形空間(conformational space)大為減少(圖一)。不論是在 α 螺旋或是 β 摺板的胜肽中，“轉折的形成”(turn formation)擔任了誘發蛋白質摺疊的重要角色，使該蛋白質進一步的進行熱焓崩潰(enthalpic collapse)。轉折的形成在蛋白質摺疊中是最快速的，可以發生在 10^{-8} 秒左右的時間。然而，如果該蛋白質的各個區域中沒有形成轉折的傾向，摺疊的過程則可能會進一步的利用疏水基作用力來形成正確構形，進而

得到大量的熱焓。相較於轉折的形成，這個過程較為緩慢，大約需要 10^{-6} 到 10^{-3} 秒的時間。藉由這個環化的實驗，我們成功的模擬蛋白質初期的摺疊過程。並且讓我們能觀測到不同作用力(例如：轉折結構的形成，或是疏水基的作用力)，對於初期蛋白質結構，以及其摺疊動力學的影響。

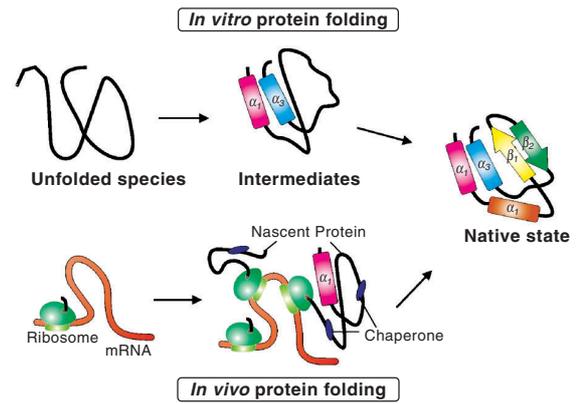
三、轉譯中蛋白質摺疊的研究

近數十年來，大多數蛋白質摺疊的實驗，是以化學或物理方式將蛋白變性(denature)來研究細胞外蛋白質的折疊。然而，無論是以物理或是化學方法來模擬蛋白質摺疊，都不同於生物體內的真實情況[19,20]。

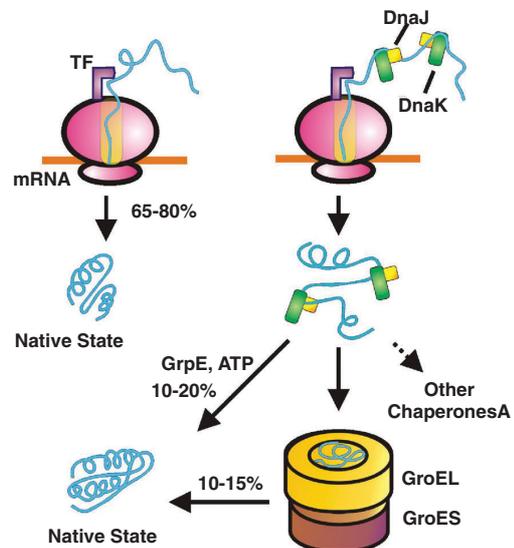
事實上，蛋白質在細胞中生成時，是在一個分子極端擁擠的環境中所進行的。此外，細胞內蛋白質摺疊包含“轉譯中”(co-translational)和“轉譯後”(post-translational)兩個部份。由於蛋白的轉譯速度較摺疊的速度慢，當蛋白質還在合成時，新生的胜肽便已經開始進行摺疊[21]。基於上面的原因，細胞內的蛋白質摺疊機制，可能與細胞外所模擬的摺疊路徑非常不同(圖三)。

當胜肽在轉譯時，很多因素便可能已經參與並影響蛋白質摺疊的過程。像是分子擁擠的環境，或是核糖體表面的負電荷，都會影響新生胜肽的構形。此外，伴隨蛋白也可能在此時與新生胜肽作用，幫助蛋白摺疊至自然態[22,23]。各類的伴隨蛋白，可以用不同的機制來幫助蛋白質正確的摺疊。目前已知常見的伴隨蛋白包括：誘發子(trigger factor)、DnaJ、DnaK、GrpE 蛋白及 GroEL/ES。但是，我們至今對這些伴隨蛋白的功能仍然所知不多[22,23]。目前，有報導指出，多數較小蛋白的在誘發子的幫助下摺疊較為迅速，而較大的蛋白質可能會與 DnaJ 或 DnaK 作用，幫助蛋白質的摺疊[24](圖四)。在細菌中，誘發子可以結合在核糖體上，並且與剛離開核糖體通道的胜肽結合。DnaK 與 DnaJ 則會直接結合在新生胜肽鏈上，一起幫助胜肽摺疊[22,23]。

在了解轉譯中蛋白質折疊的重要性之後，我們便希望建立一個新的生物物理方法，來探討轉譯中蛋白質的折疊機制，以及新生胜肽與各種伴隨蛋白的交互作用。我們合成一系列帶有螢光氨基酸的轉譯核糖核酸(tRNA)並將此轉譯核糖核



圖三 細胞內與細胞外蛋白質摺疊的差異和比較



圖四 在真細菌(Eubacteria)中，伴隨蛋白會參與蛋白質摺疊的過程

酸置於大腸桿菌的“無細胞系統”(cell free system)中，使連結在核糖體的新生胜肽在預設的位置接上特定螢光標定的胺基酸。藉著“螢光共振能量轉譯”(fluorescence resonance energy transfer; FRET)光譜，我們可以利用這把分子層級的“尺”，在蛋白質轉譯的不同階段中，量測特定螢光標定在新生胜肽結構中“分子內”(intramolecular)的距離，以及這些距離的分佈統計。並且，進一步的比較這些參數受到伴隨蛋白的影響。另外，我們也將利用“螢光非等向性”(fluorescence anisotropy)光譜的輔助，推測螢光標定的新生胜肽上，螢光發光團周圍的環境及新生胜肽的整體結構。有關此部份的研究，目前仍在進行中。

四、結語

有關蛋白質摺疊的研究，隨著相關疾病被逐漸的發現，越來越受到重視。而研究的方向，也在過去的十年中，有了很大的轉變。隨著新的技術的開發，蛋白質摺疊的動力學實驗早已突破以往毫秒的限制，而進入超快速蛋白質摺疊的研究。此外，有非常多的研究開始探討蛋白質錯誤摺疊的過程，以及在相關的疾病中所扮演的角色。其中，有關某些疾病的類澱粉聚集，無論是其產生的過程，或是該聚集本身的結構，都是研究的重點之一。最後，由於在細胞內的蛋白質摺疊過程比細胞外要複雜很多。除了考量蛋白質本身的結構之外，還必須考慮很多其他的因素，像是核醣體的存在，輔助蛋白的參與，以及分子擁擠的環境的影響。因此，研究細胞內的蛋白質摺疊，與了解轉譯中蛋白質摺疊與轉譯後蛋白質的修飾過程，也勢必成爲蛋白質研究新的趨勢。

參考資料

- [1] S. E. Radford and C. M. Dobson, *Cell*, **97**, 291 (1999).
- [2] P. S. Kim and R. L. Baldwin, *Anal. Rev. Biochem.*, **59**, 631 (1990).
- [3] P. Leopold and J. N. Onuchic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 8721 (1992).
- [4] P. G. Wolynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 6170 (1997).
- [5] J. C. Lee, H. B. Gray and J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 7760 (2001).
- [6] P. G. Wolynes, Z. LutheySchulten and J. N. Onuchic, *Chem. Biol.*, **3**, 425 (1996).
- [7] C. M. Dobson, *Nature*, **426**, 884 (2003).
- [8] W. A. Eaton, V. Munoz, P. A. Thompson, E. R. Henry and J. Hofrichter, *Acc. Chem. Res.*, **31**, 745 (1998).
- [9] M. Gruebele, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 161 (2002).
- [10] S. J. Maness, S. Franzen, A. C. Gibbs, T. P. Causgrove and R. B. Dyer, *Biophys. J.*, **84**, 3874 (2003).
- [11] S. Abbruzzetti *et al.*, *Biophys. J.*, **78**, 405 (2000).
- [12] J. Font *et al.*, *Biophys. J.*, **91**, 2264 (2006).
- [13] R. S. Rock and S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 10766 (1998).
- [14] K. C. Hansen, R. S. Rock, R. W. Larsen and S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 11567 (2000).
- [15] R. P.-Y. Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7305 (2004).
- [16] N. N. W. Kuo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 16945 (2005).
- [17] S. I. Chan, J. J.-T. Huang, R. W. Larsen, R. S. Rock and K. C. Hansen, in *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Eds: M. Goeldner, R. Givens), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, pp. 479-494 (2005).
- [18] J. Miksovska and R. W. Larsen, *Methods Enzymol.*, **360**, 302 (2003).
- [19] P. Genevaux *et al.*, *Embo Reports*, **5**, 195 (2004).
- [20] C. A. Woolhead, A. E. Johnson and H. D. Bernstein, *Mol. Cell*, **22**, 587 (2006).
- [21] S. T. D. Hsu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 16516 (2007).
- [22] M. S. Svetlov, A. Kommer, V. A. Kolb and A. S. Spirin, *Protein Sci.*, **15**, 242 (2006).
- [23] A. Hoffmann *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 6539 (2006).
- [24] V. R. Agashe *et al.*, *Cell*, **117**, 199 (2004).