

解了。與傳統的解法來比較，我們所提出的方法不僅在準確度方面大大提昇，同時也在收斂速度（效率）方面增快了許多。上述的說法由我們的實驗得到了確切的印證。圖四為兩組利用我們的方法所求得的三維物面結果。



廖弘源

學經歷：

國立清華大學物理系
(1981)

美國西北大學電機電

腦系碩士(1985)、博士(1990)

本院資訊研究所助研究員(1991-95)、副研究員
(1995-迄今)

蛋白質輸入葉綠體機制的研究

李秀敏

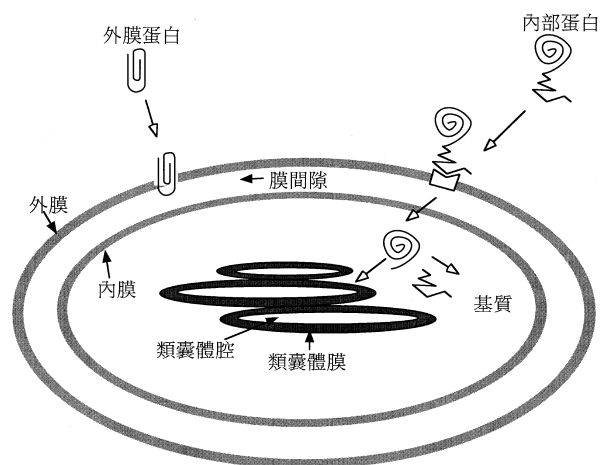
分子生物研究所助研究員

高等生物細胞與低等生物細胞最大的差別之一是，高等生物細胞除了細胞最外面的一層細胞膜外，細胞內又有另外一些膜，分隔出一個個的胞器。每一類的胞器內部皆含有不同的蛋白質，使得它們可以執行不同的功能，例如有的胞器負責產生能量，有的胞器負責分解廢物。這樣的“分區制度”，使得細胞能在最小的空間內做最有效率的運作。然而這樣的分區制度也產生了一個問題，亦即各胞器所含的蛋白質雖不同，但這些蛋白質卻是在同一個地方，即細胞質中，製造出來。因此一個蛋白質在被製造出來後，細胞必須要有一套系統，辨

識出這個蛋白質是屬於哪一個胞器，然後正確地將這個蛋白質運送至該胞器，如此這個蛋白質，以至於這個胞器，才能發揮它們的功能。我們實驗室便是研究這個蛋白質辨識與運輸的過程，而我們研究的胞器是植物細胞特有的葉綠體。

葉綠體是植物行光合作用的地方。光合作用是植物利用陽光的能量將無機的二氧化碳及水，轉換成有機的碳水化合物，如醣類及澱粉。這些碳水化合物除了供植物本身生長所需外，也是人類食物的主要來源。而對於研究蛋白質運輸的人來說，研究葉綠體除了因為它的重要性之外，葉綠體另一個吸引人的地方在於它結構的複雜性。葉綠體由三層膜包圍三個液態空間，總共分為六個部份（圖一）：分別是外膜、膜間隙、內膜、基質、類囊體膜及類囊體腔。因此一個葉綠體蛋白在細胞質合成好之後，不但要能正確地被送到葉綠體，還要能被送到葉綠體的六個部分中正確的一個，這個蛋白質才能執行它的功用。

所有要運往葉綠體的蛋白，依它們運送的方法可大概分為兩大類（圖一）。第一類為運



圖一 葉綠體結構簡圖及兩類葉綠體蛋白

往葉綠體內部的蛋白，這一類蛋白在細胞質合成時，在蛋白質的最前端（N端）便多出一小段，這一小段包含了運送過程所需的導引訊息，這一小段便如同“地址標籤”，能將蛋白質指引到葉綠體表面。而在葉綠體表面有一組特殊的接收器，認得這個地址標籤，經辨認後，接受器會將含正確地址標籤的蛋白質轉運入葉綠體，而這些辨識與轉運的過程皆需ATP作為能量。在進入葉綠體基質後，這多出來的一段地址標籤便會被切除。已有許多實驗證明，若將一個內部蛋白的地址標籤拿下來接在一個本來不會去葉綠體的外來蛋白上，則這個地址標籤依舊可將這個外來的“乘客”送到葉綠體內部。

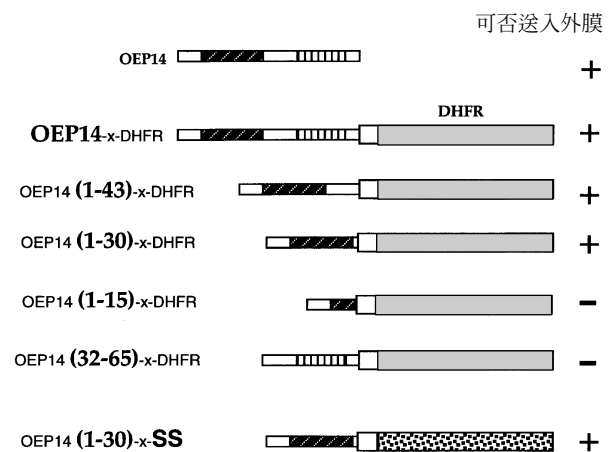
第二類葉綠體蛋白為外膜蛋白，外膜蛋白之所以會被獨立分為一類，最主要有三個原因。首先外膜蛋白在細胞質製造出來時，前端並沒有多出一段，因此我們並不知道導引外膜蛋白至葉綠體外膜的“地址標籤”藏在哪裡，長什麼樣子。其次外膜蛋白運送與插入外膜的過程並不須要ATP。最後，雖然目前尚不知外膜蛋白所用的接受器成員為何，但有實驗證據顯示，此接受器與內部蛋白所用的接受器並不相同。

由以上的簡介，大家可以看出我們對內部蛋白運輸的了解遠較對外膜蛋白的了解來得多，這是研究葉綠體生化功能以至生技應用上的一大缺憾。因外膜乃是葉綠體與細胞其他胞器交流的地方，其重要性一如沿海地區在兩岸交流上所扮演的角色。此外許多生化合成反應，如半乳糖脂和胡蘿蔔素的製造，其中一些重要的步驟也是由一些位在外膜上的酵素來執行。我們若要利用遺傳工程及轉殖作物的技術來改良這些酵素的性質，以期它們的產物能更

符合人類的需求，我們就必須要有方法，把這些改良過的酵素正確地送到葉綠體的外膜，這些酵素才能發揮它們的作用。

研究外膜蛋白的運輸機制，首要工作是要找出運送蛋白至外膜的“地址標籤”。我們的做法是拿一個本來就自己會去外膜的蛋白，將其切割分析，找出內藏的地址標籤。我們首先拿了一個稱為OEP14外膜蛋白，OEP14是一個非常小的蛋白，總共只由65個胺基酸組成，所以我們若要將其切割分析，可能不需切成很多段就可找到內藏的外膜導引訊息。我們將OEP14的各個片段，接在一個本來不會去外膜的乘客蛋白上，結果發現凡是含OEP14前30個胺基酸時，乘客蛋白便可被送至外膜（圖二）。我們同時也試了另一個乘客蛋白，發現也可被OEP14的前30個胺基酸的片段送到葉綠外膜。由此證明這30個胺基酸的片段的確含有足以將蛋白質送往葉綠體外膜的導引訊息。

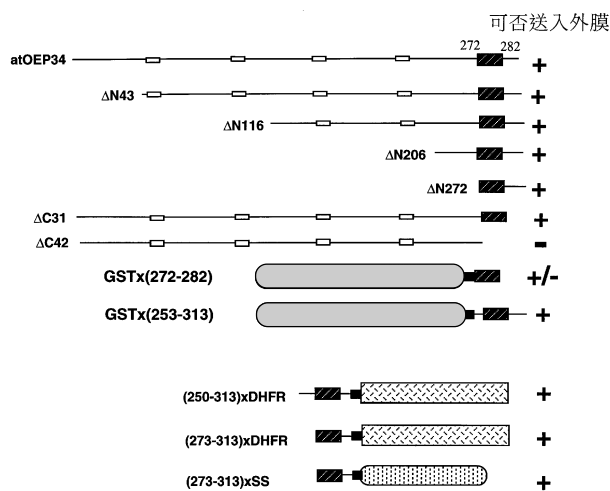
接下來我們又著手開始尋找第二個外膜蛋白的內藏導引訊息，因為我們想從比較兩個或兩個以上的外膜導引訊息，來推測出外膜導引訊息的共同性或規則，以期對其運輸機制有更深的了解。我們所用的第二個蛋白，名為



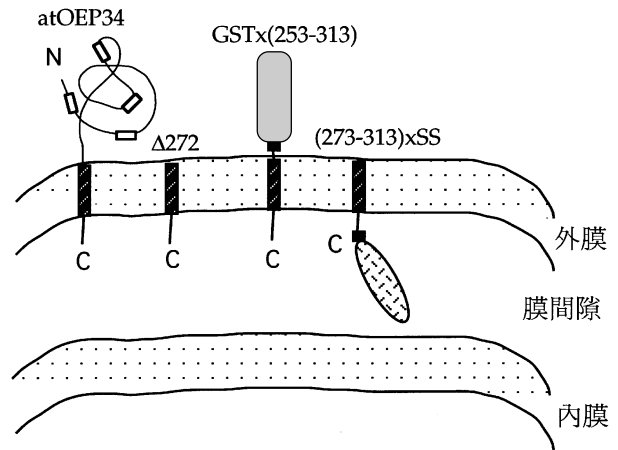
圖二 OEP14外膜導引訊息的定位

atOEP34。atOEP34總長為313個胺基酸，因此我們先從前端將其切除縮短，發現把前面272個胺基酸全部切除，剩下的一小段仍可自行插入外膜，顯示其仍含外膜導引訊息。我們若從後面（C端）切過來，發現若切掉31個胺基酸還可以，若切掉42個胺基酸則再也無法被送到外膜，由此可見atOEP34的外膜“地址標籤”可能就藏在第272至282這11個胺基酸上。為進一步證明這一點，我們將這11個胺基酸接在一個乘客蛋白後面，發現這一小段的確可將乘客蛋白帶至外膜，但卻無法嵌入膜內，只能附著在膜上，若要嵌入膜內，則需尾端約第273至313個胺基酸。

我們接下來又做了另一個有趣的實驗。我們想試試看如果把atOEP34的外膜導引／嵌入訊息（第273至313個胺基酸）接在一個乘客蛋白的最前端，而非最尾端，是否這段導引訊息仍能帶領乘客蛋白來到外膜，並以同一個方面插入外膜。如果可以，乘客蛋白將會被送至膜間隙（圖四），如此我們便有了一個可將蛋白質送至膜間隙的方法。我們試了兩個乘客蛋白，結果皆顯示若將乘客蛋白接在atOEP34的



圖三 atOEP34外膜導引訊息的定位

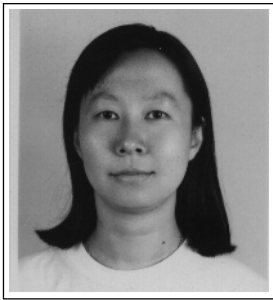


圖四 atOEP34的外膜導引訊息可將乘客送至膜間隙

導引訊息的後面，則乘客蛋白的確可被送到膜間隙（圖三下半部及圖四）。由此我們得知atOEP34的外膜訊息是一個非常特別且好用的地址標籤，我們不但可以用它來把想要的蛋白送至葉綠體外膜，我們還可以隨意控制乘客蛋白座落於外膜的任何一側。

我們最初要尋找atOEP34的外膜導引訊息的用意，雖是要與OEP14的外膜導引訊息比較，以找出共同性，但我們發現這個兩個“地址標籤”在胺基酸序列上並沒有相似的地方，且這兩個標籤不但位於蛋白質的不同端，插入外膜的方向也相反（OEP14為前端朝向膜間隙）。我們也有其他的實驗結果顯示，OEP14與atOEP34是用不同的運輸機制被送到外膜。我們目前的研究重點放在找出參與這兩個運輸機制的成員及它們的功用。

最後我要謝謝我實驗的所有成員，他們才是這些實驗結果的最大貢獻者。



李秀敏

學經歷：

國立台灣大學植物系
學士(1986)

美國威斯康辛州立大

學分子生物學博士(1992)

美國加州Salk Institute博士後研究(1992-94)

美國奧克拉荷馬州Noble Foundation博士後研究
(1994-95)

本院分子生物研究所助研究員(1995-迄今)

大腸桿菌素之解毒劑 — 免疫蛋白的結構分析

袁小玲

分子生物研究所副研究員

一、前言

來到中研院開始自己的研究工作，至今匆匆已快六年了。當初在美國攻讀學位以及做博士後研究工作的九年時間，主要是學習一門頗為專門與尖端的技術-蛋白質晶體學。這門學科的理論基礎與實驗方法早於六零年代即已奠定。當時M.F. Perutz和J.C. Kendrew測定出血紅素(hemoglobin)與肌紅素(myoglobin)之結構而轟動一時。然而此後的一、二十年間，蛋白質晶體學的成果寥寥可數。直到近十來年來，此學門才蓬勃發展，成為測定蛋白質三維結構的利器，分子生物學中重要的一環。

為什麼一個早已證明可行的方法卻直到八

零年代以後，才開始被廣為運用？這必需由蛋白質晶體學的實驗方法上來解釋。所謂的蛋白質晶體學是將高純度的蛋白質培養成晶體，再運用X-光繞射方法來測定折疊後的蛋白質之三度空間分子結構。所以這個方法第一步便需要製備大量且高純度的蛋白質，以便篩選出培養晶體的條件。這在十幾二十年前，是很不容易克服的難關。一直等到基因遺傳工程的技術成熟後，可以將負責生產蛋白質的基因，嵌入大腸桿菌或其他易於大量培養的生物體基因中，經由特別設計好的調控方式，才較容易獲得大量(> 10 mg)的蛋白質。培養出晶體後，便可進行X-光繞射實驗。老式的X-光繞射儀或照相機記錄速度曠日費時，而蛋白質晶體通常十分脆弱，無法忍受長時間曝露在X-光的照射之下。直到八零年代“面積偵測儀”的出現，可在一天內記錄下一顆晶體完整的繞射數據，而解開了另一個瓶頸。蛋白質晶體繞射數據，數量龐大，而計算結構的工作更牽涉到大量的運算。電腦的軟硬體發展與進步，解決了最後一道難題。以前需要花費幾個月、數十名人工運算下才能得到的結果，現在只要一個人在電腦的幫助下，彈指之間便可獲得。所以在基因工程以及電子電腦工程的配合下，蛋白質晶體學在X-光被發現一百年後，終於開花結果開始發揮其影響力。

二、大腸桿菌素與免疫蛋白之簡介

過去幾年來，我們與陽明大學生化所的翟建富教授的實驗室合作，運用X光繞射方法，在大腸桿菌素與免疫蛋白的晶體結構分析上，得到一些較有趣的結果。大腸桿菌素(colicin)是一種由大腸桿菌所分泌出來的細菌毒素(bacteriocin)，用來抑制其他不同種類的腸桿