



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

菌科細菌族群的生長。所以大腸桿菌素好比是大腸桿菌的導彈系統，可以分泌到細胞外，纖滅敵人。早在1925年，既已發現了第一個大腸桿菌素。到今天為止已鑑定出二十幾種大腸桿菌素。這些大腸桿菌素都是蛋白質類抗生素，分子量大小從1.5到90kDa。大腸桿菌素通常具有三個不同的功能區：(1)接受器結合區，負責與受攻擊細胞的細胞膜上的接受器結合。好比是飛彈的導引系統，可以指引大腸桿菌素攻擊的目標所在；(2)細胞膜翻越區，可幫助大腸桿菌素穿越受攻擊細胞的細胞膜；(3)毒性區，可有效的破壞受攻擊的細胞，造成細胞的死亡。有些桿菌素的毒性區具有脫氧核糖核酸酶(DNase)或核糖核酸酶(RNase)的活性，可切斷受攻擊細胞的脫氧核糖核酸或核糖核酸分子。有些則可在細胞膜上，形成離子洞穴，破壞細胞內離子濃度的平衡。

桿菌素的毒性區，好比是導彈的爆炸系統。大腸桿菌如何控制桿菌素不在自己體內引爆呢？桿菌素的表現生產是經由一個SOS啟動子所調控（見封底插圖）。當桿菌的脫氧核糖核酸受到破壞時，桿菌意識到自己的生存受到威脅，即打開SOS啟動子的開關，而一連串的生產出三個蛋白質，包括了大腸桿菌素、免疫蛋白(immunity protein)與溶胞素(lysis protein)。免疫蛋白很快的與大腸桿菌素之毒性區結合，以抑制桿菌素之毒性。如此一來，大腸桿菌素便無法毒害到自己了。所以免疫蛋白好比是導彈的防爆裝置，可與桿菌素一併被送出胞外，直到接觸到受攻擊的目標細胞後，此防爆裝置才予拆除。至於溶胞素的作用則在增加細胞膜的穿透性，以便協助桿菌素與免疫蛋白之複合物輸送到胞外。

與我們合作的翟建富教授於九零年左右，

挑選出一組可產生桿菌素Colicin E7的質體。這一個桿菌素其毒性區具有脫氧核糖核酸酶的活性，其接受器結合區則可特別選擇維他命B12的接收器，所以被歸類為E-族脫氧核糖核酸酶型。這一型的桿菌素至今已鑑定出四種，他們各別與免疫蛋白之間的互相結合力，是所有已知的蛋白質交互作用中，最強的一種（解離常數 $K_d > 10^{-14}M$ ）。是什麼力量主導兩個蛋白質之間，產生如此緊密的結合？正負電的吸引力、疏水性胺基酸的結合力、氫鍵結力、或是結構形狀的互補？這個問題，我們希望藉由大腸桿菌素與免疫蛋白的三維結構的測定，而能得到一些線索。另外這一族群的四種桿菌素的胺基酸序列非常相似，他們的免疫蛋白，雖然彼此之間亦十分相似，卻只能完全抑制和自己同一個操縱子所產生出的桿菌素的毒性。也就是說免疫蛋白只能針對一種炸彈產生較好的防爆效果。免疫蛋白如何選擇與其結合之蛋白質，是另一個重要而有趣的課題。蛋白質之間相互認知的方式，過去十來年來，研究的重心集中在抗體與抗原、蛋白質分解酶與抑制劑以及荷爾蒙與接受器的結合分析。這些蛋白質之間的結合力較弱。所以大腸桿菌素與免疫蛋白的結構分析，可以作為如何產生緊密結合的一個參考。另外同一個免疫蛋白對不同的大腸桿菌素有強弱不一的結合力，所以可以各別分析其結合力減低或增強的原因。相較於其他的蛋白質與蛋白質之間的認知，這是一個頗為有利的系統。

翟教授實驗室的研究重心在分析ColE7桿菌素操縱子之調控機制，也利用基因突變的方式，來探討桿菌素與免疫蛋白之間互動的關係。在SOS啟動子被打開時，或可形容為當戰爭發生時，除了大量的桿菌素與免疫蛋白被生

產出來外，大量的溶胞素亦一起被表現生產。溶胞素可使細胞溶解，如果持續過量生產，最後會導致細胞本身的死亡。而在SOS啓動子沒有被打開時，桿菌素與免疫蛋白自己也另有分別的啓動子。所以在“非戰時”，也會有一些桿菌素與免疫蛋白被產生出來，擔任基本的防禦工作。所以不論在戰時或非戰時，如何防止緊接在免疫蛋白基因下游的溶胞素過量生產出來呢？這是整個調控機制中，尚未被回答的一個關鍵性問題。在合作的開始時，我們希望經由蛋白質結構的觀點，來探討桿菌素與免疫蛋白之間的作用。然而結構分析的結果，亦提供了線索來分析可能的基因調控機制，是我們始料所未及的意外收穫。

三、結構測定的結果

由於翟教授的實驗室已成功的大量生產並純化出大腸桿菌素ColE7之免疫蛋白(Im7)，我們的重心即先鎖定在免疫蛋白的晶體結構分析。很幸運的我們培養出兩種不同型式的晶體。從第一種的晶體結構中，我們發現免疫蛋白具有四個螺旋柱狀結構。是屬於變異性的“四螺旋組”型(four-helix bundle)的折疊方式。過去的文獻中，有很多蛋白質分解酶的抑制蛋白之結構分析報導，而缺少脫氧核糖核酸酶的抑制蛋白之結構分析結果。所以免疫蛋白的結構測定，提供了一個範例。我們發現免疫蛋白部分分子表面帶有很多酸性胺基酸，這塊區域在四個同型的免疫蛋白中正好又是胺基酸序列變化最大的地方，故推測這個區域可能直接與帶鹼性的大腸桿菌素毒性區作用，負責區分選擇自己的桿菌素。最近翟教授實驗室利用突變的方法，已進一步分析出這塊區域內的幾個特定的胺基酸，確實具有決定性的影響力。

第二型的晶體，在結構測定完成後，我們才驚訝的發現部分結構上有細微的變化，而整個蛋白質是以雙體(dimer)的形式存在。原本我們估計可能與大腸桿菌素毒性區作用的區域，卻掩埋在彼此相交的界面中。我們早已知道桿菌素與免疫蛋白是以一對一的方式結合，所以這個雙體的結構，一時讓我們頗為疑惑。翟教授提出以前曾經觀測到ColE7操縱子之轉錄核糖核酸在負責轉錄免疫蛋白的區域有定點斷裂的現象，而且免疫蛋白自己可能參與此斷裂反應。我們因此而清查文獻中已有三維結構的核糖核酸酶之報告。結果發現不論是高等或低等生物，其核糖核酸酶之整體胺基酸序列或結構或許不同，但反應中心的胺基酸的組成與排列方式卻都非常相似。所以這些核糖核酸酶可能以同樣的機制來切斷核糖核酸。雙體免疫蛋白的結構在雙體界面處，有三個胺基酸殘基的排列方式與這些已知的核酸酵素的反應中心相類似，表示免疫蛋白很可能以雙體的形式來執行切斷核酸之功效。

由於此核糖核酸的斷裂點位於免疫蛋白的轉錄核糖核酸區域中，所以會導致免疫蛋白無法被轉譯生產出來。另外位於免疫蛋白基因下游的溶胞素基因亦連帶的無法被表現出來。所以我們懷疑這個斷裂是不是負責調控免疫蛋白與溶胞素的表現生產？根據我們的實驗結果，我們推測免疫蛋白除了抑制大腸桿菌素的毒性外，亦參與切割自己的轉錄核糖核酸，所以在整個ColE7操縱子的調控機制中也扮演重要的一角。

四、結語

雖然我們已測定了免疫蛋白的三維結構，然而對大腸桿菌素的結構以及兩個蛋白質之間

結合的方式，仍然所知不多。根據免疫蛋白的結構與一些初步的分析結果，所提出的調控機制，亦需要進一步的確定。所以革命尚未成功，這個研究課題有一個好的開始，但以後的路是否能走的好、走的遠，尚待同志努力。

最後要謝謝在分生所一起工作的同仁，以及陽明生化所翟建富教授和其實驗室成員。由於翟教授在桿菌素這個研究課題上，已經投入多年的心力，我們的結構測定，一開始才能很快的進入狀況。免疫蛋白的結構，配合翟教授實驗室詳細的生化以及基因層次上的分析結果，互相的激發才有相乘的效果。以不同的角度觀點來探討一個問題，我想是這個合作的計畫，能夠有一點小小成果的最大因素。



袁小玲

學經歷：

東海大學化學系學士
(1983)

美國南加州大學化學

博士(1988)

美國洛杉磯加州大學分子生物研究所博士後研究
(1988-1992)

本院分子生物研究所副研究員 (1992-迄今)

由激情而冷漠

—A_{2A}腺苷酸受體的脫敏作用

陳儀莊

生物醫學研究所副研究員

「入芝蘭之室，久而不聞其香」，第一次的經驗總是令人印象最為深刻，但習以為常之後，便漸漸由激情轉為冷漠，這種現象稱為「脫敏作用」。人體為了因應各種外界刺激，避免興奮過度，便產生許多不同型式的脫敏作用。我們研究室所探討的便是一個神經傳導物質—腺苷酸(Adenosine)的脫敏作用。

腺苷酸是我們體內一個相當重要的小分子，可以調控多種生理功能，包括心跳、血壓、睡眠及痛覺等等。咖啡及其他含咖啡因的飲料之所以能產生提神的作用，便是由於咖啡因能干擾腺苷酸在體內的作用。為了充分利用腺苷酸，人體製造了四種稱為腺苷酸受體的蛋白質，分別為A₁、A_{2A}、A_{2B}以及A₃。這些蛋白質負責結合腺苷酸，傳遞腺苷酸的訊號至細胞內，藉以控制身體的功能。我們在1992年自大白鼠的基因庫中，釣出A_{2A}腺苷酸受體的基因，並進一步探討這個蛋白質的生理調控。

我們以一個類神經細胞株—PC12細胞，做為研究模型。這株細胞具有一些神經細胞的特性，並表現大量的A_{2A}腺苷酸受體。刺激A_{2A}腺苷酸受體會在PC12細胞中提高一個二級訊號物質(cAMP)的含量。但若是過度刺激這個受體，它所傳遞的cAMP訊號卻會愈來愈小，而造成脫敏作用。我們發現脫敏作用發生之後，cAMP訊號的傳遞活力雖然只有原來的十分之一，但在細胞表面的受體數目，以及對腺苷酸的親和力，卻沒有明顯地改變。有趣地