

知識天地

蛋白質摺疊:從核糖體到細胞功能的旅程

黃人則助研究員、陳長謙特聘講座、林谷峰博士後(化學研究所)

蛋白質是生物體中基本的巨分子之一。其主要功能除了催化細胞內的各種生化反應外，也是組成各種胞器的重要原料。這個生物巨分子，從核糖體內由胺基酸的單體一個接一個的聚合成後，便會不斷調整其構型(conformation)。由一開始可能不具任何結構的新生胜肽鏈，直到摺疊成結構上的“自然態”(native state)後，才能夠發揮該蛋白質正確的生理功能。而蛋白質在摺疊過程中容易在環境與其他分子影響下，摺疊成各種不同的構形。但是一般而言，大多蛋白質都能自發性的、或經由伴護蛋白(chaperone protein)的幫助，摺疊成具有生理功能的自然態構形。少數錯誤折疊的蛋白質就由降解系統回收清除。然而，還是不能被降解的蛋白質，則可能會聚集成塊，或是進一步造成疾病(1, 2)，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、阿茲海默症、亨丁頓氏舞蹈症、或是漸凍人症，也都可能和蛋白質的不正當摺疊有關(3-6)。為了深入了解這些蛋白質的不正當摺疊與可能的致病機制，我們試著從兩方面來探索蛋白質的摺疊過程。我們結合了各種新的生物化學及生物物理技術，除了研究在細胞內轉譯過程中的蛋白質摺疊外，在試管中也試著模擬超快速蛋白質摺疊現象，以便全面性的瞭解這個生物體內重要反應的過程。

新生蛋白在轉譯過程中的摺疊

由於蛋白質的摺疊速度比生成速度快，在合理的推論下，細胞中的新生胜肽在生成時非常可能已同步在進行摺疊(7, 8)。而這個在生物體內最初期的摺疊過程，即被稱為“轉譯過程中的蛋白質摺疊”(co-translational protein folding)。一開始，大家認為只有長出核糖體外的新生胜肽才會進行摺疊。而新的結果顯示，某些新生胜肽在核糖體中的通道(ribosome tunnel)時，就可能已經形成螺旋構型(helical conformation)。而這些早期形成的螺旋構型，可能就是誘發許多生物現象的重要原因(7)。

為了確認這些假設，我們藉著“螢光共振能量轉移”(FRET)光譜，來量測特定螢光標定在新生胜肽上的“分子內”(intra-molecular)距離，以推論新生胜肽在核糖體通道中的初期構型。與傳統的螢光標定方法不同的是，為了使連結在核糖體的新生胜肽能在預設的位置接上特定螢光標定的胺基酸，我們合成了帶有螢光胺基酸的轉移核糖核酸(tRNA) (圖一)，並使用大腸桿菌的“無細胞系統”(cell free system)來生成整個核糖體-新生胜肽複合物。

經由在模板序列中的不同區域插入特殊的聚丙胺酸(poly-Alanine)片段(2A, 8A, 17A, 圖一)，我們更進一步探究核糖體通道中的摺疊現象是否只發生在某些特定區域。結果顯示，含有特殊片段的新生胜肽上皆可偵測到標定螢光的螢光共振能量轉移現象。不論這些片段位於核糖體通道中的哪個區域，偵測到的螢光共振能量轉移效率(FRET efficiency)與這些片段形成螺旋構形時的理論值完全相符。反之，不含這些片段的新生胜肽(sG, 圖一)則無任何可偵測的螢光共振能量轉移現象。因此，我們可以推測，在核糖體中，當具有形成螺旋構形傾向的新生胜肽(如:聚丙胺酸片段)生成後，他們便具有摺疊為螺旋構形的能力(圖一)，此摺疊過程並不會因為位於核糖體中就受到限制。但是，除螺旋構形外的其他構形，如 β -摺板(β -sheets)或轉折結構(turn)，甚至三級結構的摺疊，由於通道內的空間限制，皆已被認為不可能發生在核糖體中。

事實上，這些轉譯過程中的蛋白質摺疊也會影響新生胜肽和伴護蛋白的互動以及後續的蛋白質導向過程(protein targeting)。我們的結果也發現，具螺旋構形的新生胜肽在核糖體通道中，可以有效降低核糖體表面上的激發因子(trigger factor，原核生物中的伴護蛋白之一)與核糖體的結合能力(圖一)。此現象，除了可確保激發因子對他們天然的受質：細胞質蛋白質(cytosolic protein)，保有較高的專一性外。更重要的是，也可同時藉此預防由激發因子錯誤的辨識到新生的膜蛋白後(membrane protein, N端含有會形成螺旋型的信號序列)所可能造成的蛋白質錯誤導向。

超快速蛋白質摺疊研究

除了在核糖體內，在試管中也發現蛋白質的“結構模組”(structural motif)在摺疊過程的初期便快速的發生。蛋

蛋白質在剛開始摺疊時，會從一級結構根據其摺疊反應的自由能和熵開始試驗性的形成各種結構模組。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質，將有可能無法再重新摺疊回正確的構形，並且可能對細胞造成傷害(9)。由此可見，蛋白質的初期摺疊在整個摺疊過程的重要性(10)。

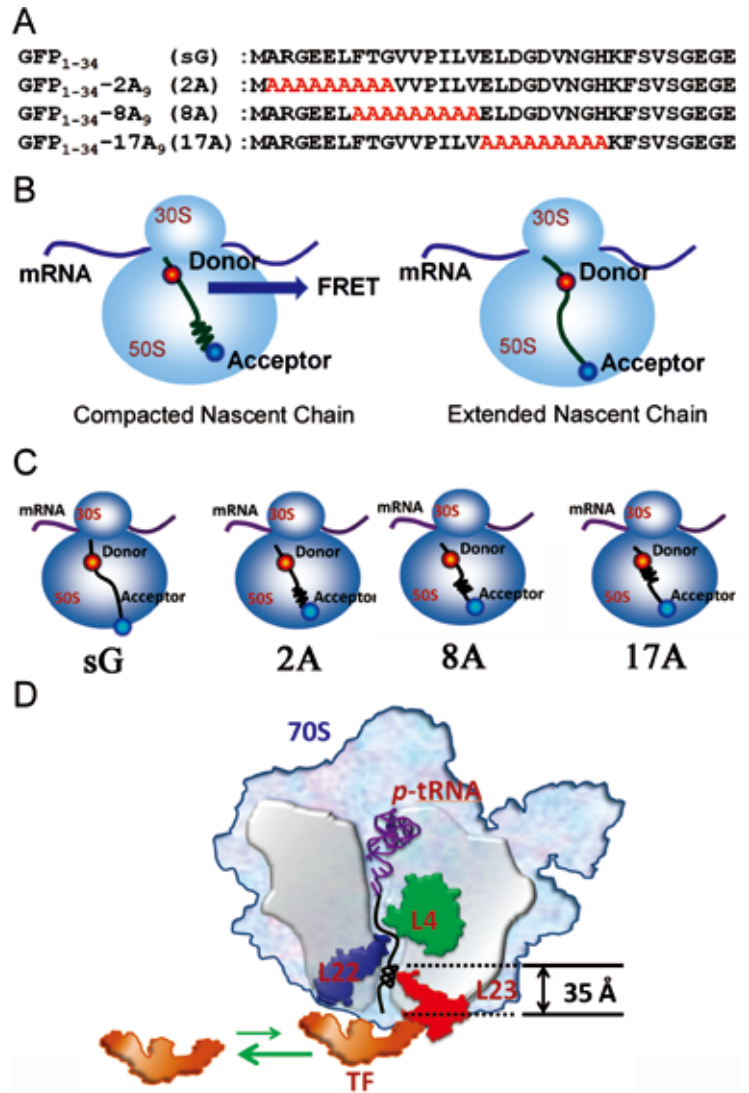
因此，許多快速偵測的方法，像是溫度跳躍，酸鹼跳躍和壓力跳躍等方法都被開發，以便分析蛋白質的摺疊初期機制。不同於這些方式，我們研發了一種新的環化策略來研究蛋白質摺疊的初期過程(11-14)。整個實驗包括三部份：一、連結可光解分子使蛋白質變性。二、利用光解反應使變性後的蛋白質重新摺疊。三、以超快速動力學方法偵測蛋白質的摺疊過程。

我們合成了許多不同的可光解分子來環化胜肽(11)，利用這些分子可有效連結胜肽中N端胺基酸的胺基到胱胺酸(cysteine)側鏈的能力(12, 13) (圖二)，來環化待測胜肽並破壞其自然態構形。利用此連結分子對光的不穩定性，經紫外光照射後，用來環化的連結分子會立刻被光解，並允許胜肽開始自動摺疊回自然態。為了追蹤此摺疊過程，我們使用了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)(15, 16)。其主要的原理是利用胜肽摺疊時所產生的容積改變，對溶劑造成短暫的密度變化，而此密度變化會同時產生壓力波並使溶液的折射率改變。前者可由光聲波熱卡計所偵測，而後者則利用光熱雷射折射儀追蹤。結合這兩種儀器數據，我們便可以偵測從奈秒等級到毫秒等級的胜肽結構變化。

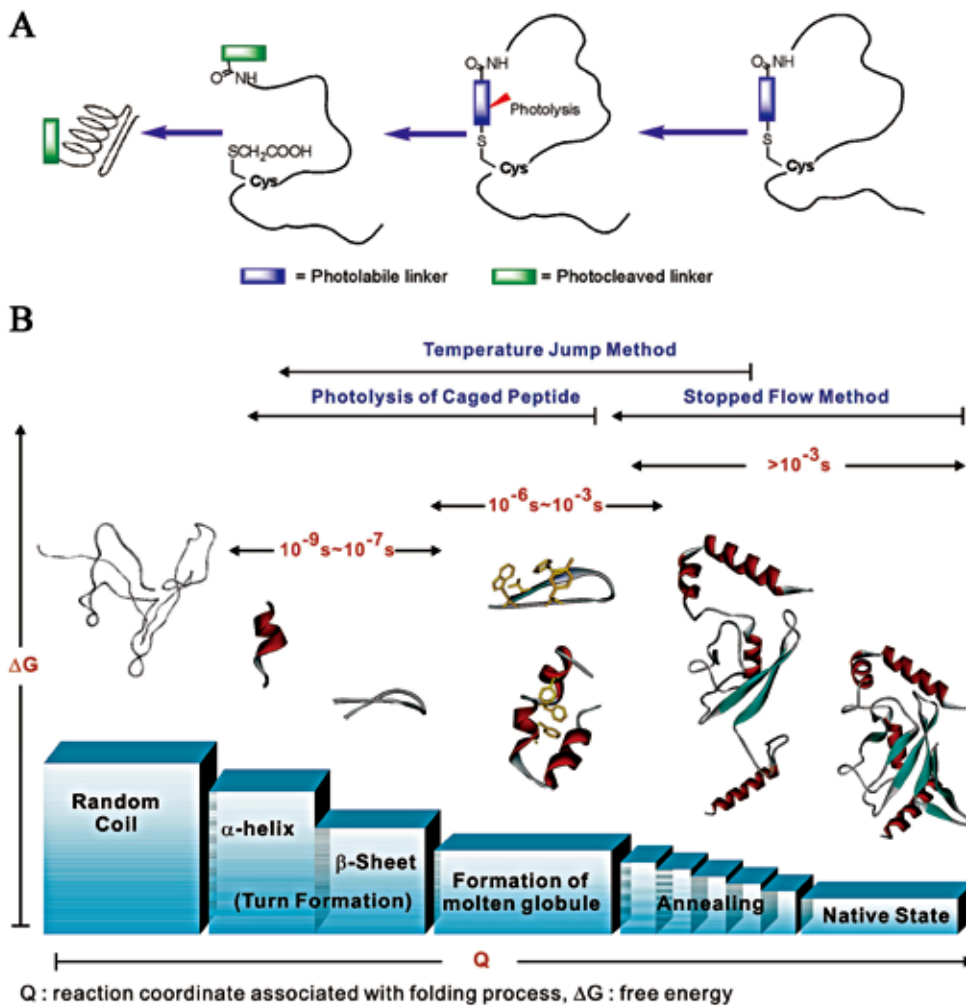
根據實驗結果，我們發現：簡單的 α -螺旋(α -helix)結構可以發生在 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ 秒，而某些 β 髮夾與 β 轉折結構(β -hairpin or β -turn)在 10^{-6} 秒便已完成(13)。此外，胺基酸的序列可以決定該蛋白質的區域構形。而不論是在 α -螺旋或是 β -摺板的胜肽中，“轉折的形成”(turn formation)擔任了誘發蛋白質摺疊的重要角色，使蛋白質進一步的進行熱焓崩潰(enthalpic collapse)。事實上，轉折的形成在蛋白質摺疊中是最快速的，可以發生在 10^{-8} 秒左右的時間。然而，如果該蛋白質的各個區域中沒有形成轉折的傾向，摺疊的過程則可能轉而利用疏水基作用力來形成正確構形，進而得到大量的熱焓。而這個過程相對較為緩慢，大約需要 10^{-6} 到 10^{-3} 秒的時間。藉由這些環化胜肽光解的實驗，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，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。

新的挑戰與方向

近數十年來，大多數蛋白質摺疊的實驗，皆是以化學或物理方式將蛋白質變性(denature)後研究細胞外蛋白質



圖一 核糖體中的新生胜肽的摺疊研究。A. 新生胜肽的胺基酸序列；B. 當新生胜肽摺疊成螺旋構形(左)或是完全伸展(右)時，相對應的螢光共振能量轉移(FRET)現象；C. 新生胜肽在核糖體通道中的可能的構型示意圖；D. 新生胜肽的螺旋構形在靠近核糖體通道出口時，可調控激發因子(TF)與核糖體的結合之理論模型。



圖二 超快速蛋白質摺疊研究。A. 模擬蛋白質摺疊過程的實驗設計。主要利用可光解的連結分子(photolabile linker)來環化胜肽，再以紫外光打斷連結分子使其重新快速摺疊；B. 單一區域蛋白質(single domain protein)重新摺疊時的動力學層次順序。

的折疊。雖然這些研究大為提升對蛋白質的了解，但因實驗設計與生物體的環境大為不同，常被質疑無法反映事實。因此，未來的蛋白質研究更傾向模擬細胞的環境來偵測蛋白質摺疊，也就是觀察轉譯過程中的蛋白質摺疊(7)。由於在細胞內蛋白質摺疊的過程比細胞外複雜很多。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，像是核糖體的存在，伴護蛋白的參與，以及分子擁擠的環境。另一方面，由於蛋白質與胜肽皆為高動態分子，透過初期蛋白質摺疊的動力學研究，也可以詳細了解摺疊過程中各種可能構型的平衡與傾向。而總結這些實驗，都是希望未來可以結合所有對蛋白質初期摺疊的知識，以及對於伴護蛋白功能新的瞭

解，來幫助開發治療神經性退化疾病的策略或藥物。

參考資料

1. J. J. Huang, R. W. Larsen, S. I. Chan, *Chem. Comm.* 48, 487 (2012).
2. S. E. Radford, C. M. Dobson, *Cell* 97, 291 (1999).
3. L. Y. Lee, R. P. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1644 (2007).
4. M. C. Chiang *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 19, 4043 (2010).
5. H. Y. Li, P. A. Yeh, H. C. Chiu, C. Y. Tang, B. P. Tu, *PLoS One* 6, e23075 (2011).
6. A. K. Chen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1186 (2010).
7. D. V. Fedyukina, S. Cavagnero, *Annu. Rev. Biophys.* 40, 337 (2011).
8. S. T. D. Hsu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16516 (2007).
9. C. M. Dobson, *Nature* 426, 884 (2003).
10. W. A. Eaton, V. Munoz, P. A. Thompson, E. R. Henry, J. Hofrichter, *Acc. Chem. Res.* 31, 745 (1998).
11. R. S. Rock, S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 10766 (1998).
12. K. C. Hansen, R. S. Rock, R. W. Larsen, S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 11567 (2000).
13. R. P.-Y. Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7305 (2004).

14. N. N. W. Kuo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 16945 (2005).
15. S. I. Chan, J. J.-T. Huang, R. W. Larsen, R. S. Rock, K. C. Hansen, in *Dynamic Studies in Biology: Phototriggered, Photoswitches and Caged Biomolecules* M. Goeldner, R. Givens, Eds. (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 2005), 479-494.
16. J. Miksovská, R. W. Larsen, *Methods Enzymol.* 360, 302 (2003).