

膜蛋白的結構生物學研究

Membrane Protein Structural Biology

馬徹

Che Ma

膜蛋白是一種重要的蛋白質，是使細胞能夠正常運作的重要組成之一。它們負責細胞內外像是離子傳導、分子傳輸、酵素反應及訊息接收等重要工作。膜蛋白的正常運作對於生物功能非常重要，異常的膜蛋白與許多嚴重的疾病有密切的關係。最近結構生物學的發展對於膜蛋白的結構有更深入的了解，具原子解析度的膜蛋白之三維空間結構是瞭解它們的功能及作用機制不可或缺的重要資訊。

Membrane proteins are an important class of proteins. They are essential components for cellular functions and processes; they play important roles as ion channels, transporters, enzymes and receptors. Their normal functions are fundamental to our health, and many impaired membrane proteins have been linked to serious diseases. Recent advances in the field of structural biology have enabled us to have better understanding of membrane protein structures. The three-dimensional atomic resolution structural information of membrane proteins is critical to understand their function and mechanism.

一、膜蛋白

所有的細胞都是由一層約 40–50 Å 厚度的細胞膜與環境作為區隔，而所有與生命有關的化學反應就發生在細胞膜的內部。除了細胞膜之外，高等生物的細胞內部更進一步的包含了許多的胞器 (organelles)：包含了像是細胞核 (nucleus)、高基氏體 (Golgi apparatus)、粒腺體 (mitochondria)、內質體 (endoplasmic reticulum) 與 lysosome 等。同樣的，這些細胞內部的胞器也是由細胞膜來作為內外及彼此間的區隔。區隔化 (compartmentalization) 使得特定的化學反應能夠在特定的地方發生，而這些

特定的化學反應在特定的地方及時間發生，以及它們彼此間的相互配合，是生命賴以生存的重要基礎。

細胞膜形成了細胞內外良好的阻隔，使得各式各樣的離子、分子並不能夠自由的進出，但是這些離子、分子及營養素必須在適當的時候進入細胞。另一方面，細胞內的代謝產物也必須在適當的時候被排出。細胞膜上的膜蛋白於是擔任了負責細胞內外離子輸導、分子傳輸、酵素反應以及訊息接收、傳導等重要的任務。從已知的基因體序列，包括細菌到人類，膜蛋白約佔了所有被表現蛋白質的三分之一左右。膜蛋白雖然重要，但是我們對於它們的

瞭解卻相當有限，最主要的原因是因為相對於水溶性蛋白質的結構，膜蛋白的三級立體結構仍然非常稀少。

二、膜蛋白的結構

結構生物學的一項重要基礎，即是由對於蛋白質、核醣核酸等生物巨分子的三級立體結構的探討，進一步來瞭解這些生物巨分子的作用機制及其功能。Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) 收集了所有已知的生物巨分子結構。於 2005 年 12 月，已發表的所有生物巨分子結構已超過了 34000 個。但其中膜蛋白的結構卻只有 186 個，只佔所有結構的百分之 0.5。若去除重複的膜蛋白分子，膜蛋白的結構則只有 99 個。

在加洲大學 Irvine 分校，Stephen White 實驗室則另維持了一個網頁：http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html。這個網頁收集並更新至今已被解出的膜蛋白結構，以及其參考文獻（對於膜蛋白結構有興趣的讀者可瀏覽此網站獲得更詳細的資訊）。第一個高解析度的蛋白質結構是 Kendrew 等人於 1960 年發表在 Nature 的 myoglobin 結構。Richard Dickerson 於 1978 年歸納了當時已知的 132 個結構，並由被解出新結構的數目，預測了每年將被解出的新結構的等比級數關係。同樣的，Stephen White 於 2003 年對於膜蛋白結構的成長也做了類似的分析。第一個膜蛋白結構是由 Deisenhofer 等作者於 1985 年發表於 Nature 的 photosynthetic 反應中心的結構。White 預測，在 2005 年將有超過 100 個膜蛋白結構，在 2025 年則將有超過 2000 個膜蛋白結構被解出⁽¹⁾。

另外值得一提的是，從 1985 年至 1998 年所有被解出結構的膜蛋白都是一些在自然界中原本產量就很高的膜蛋白，像是 photosynthetic 反應中心及 bacteriorhodopsin 等於 1998 年才第一次由大量表現重組 (recombinant) 膜蛋白於大腸桿菌的方式，成功地獲得了足夠的膜蛋白樣品，進而解出了其 X 光結構 (MscL, Rees 實驗室, Caltech 以及 KcsA, MacKinnon 實驗室, Rockefeller University)^(2,3)。

三、膜蛋白樣品的製備與結構生物學

相較於一般蛋白質，膜蛋白的結構與功能研究遠遠落後的最重要原因是，膜蛋白的取得相當不容易。1980 年以來分子生物學在重組蛋白質大量表現於大腸桿菌的應用，使得結構生物學研究蓬勃發展。因為不管是 X 光結晶學或者是核磁共振光譜學，都需要約大於 10 毫克而且純度達 95% 以上的樣品。此要求對於膜蛋白來說是相當困難，因為大部分膜蛋白原本僅存在二維空間的細胞膜上。相較於一般水溶性蛋白質可以被表現在大腸桿菌的細胞質內，成功地大量表現外來的膜蛋白在大腸桿菌的細胞膜上並不多見。其中一個原因是大腸桿菌的細胞膜上原本已有重要的膜蛋白存在，大量表現外來的膜蛋白的多餘空間本已不多。表現外來膜蛋白往往造成細胞的毒性，甚至死亡。若幸運地能夠成功表現外來的膜蛋白於大腸桿菌的細胞膜上，產量也通常相當有限。

舉例來說，在大腸桿菌所表達的水溶性蛋白質產量大於每公升 10 毫克不少見。但若表現的是膜蛋白，往往每公升產量只有 0.1 毫克。因此利用發酵槽將大腸桿菌的培養量產 (大於 100 公升)，則可以獲得足夠的膜蛋白表現。除了利用大腸桿菌表現膜蛋白之外，其他的表現寄主 (expression hosts) 或方式也應該被探討。細菌的膜蛋白通常有較高的機率能夠運用大腸桿菌來表現。其理由是大腸桿菌的細胞膜與被表現的細菌膜蛋白存在的環境較為類似。

若是所研究的膜蛋白是來自於較高等的生物，則成功地運用大腸桿菌來表達的機率便大幅降低。但是因為分子生物學在大腸桿菌上的應用非常方便，而且大腸桿菌生長快速，培養基也相對的便宜，因此大多數實驗室仍然以嘗試大腸桿菌作為表現寄主為第一優先。如果表現的膜蛋白來自於高等生物，而大腸桿菌無法提供可使用的膜蛋白樣品，其他的表現寄主，像是酵母菌、昆蟲細胞、CHO 細胞、HEK 細胞或其他細胞株則可被考慮。這些較高等生物的細胞不僅提供了比較適當的細胞膜環境，另外值得注意的是其膜蛋白的「轉譯後修飾」(post-translational modification) 可能會較正確。舉例

來說，於 2005 年利用酵母菌 (*Pichia pastoris*) 來表現哺乳類 (rats) 的鉀離子通道膜蛋白 (mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel) 也成功地被 MacKinnon 實驗室應用，並解出其 X 光結構^(4,5)。

另一表現膜蛋白的選擇，則是應用無細胞 (cell-free) 的表現方式。一般常見利用無細胞表現的方法包含大腸桿菌 S30 萃取物系統、小麥胚芽萃取物系統以及 rabbit reticulocyte 系統。三種方式之中則以大腸桿菌 S30 萃取物的製備較為容易，亦較常被採用。於 2005 年 Chang 實驗室成功地利用此一表現方式，使得原來無法被 Se-Methionine label 的一個膜蛋白變為可行，進而解出一個多重抗藥性的膜蛋白 EmrE 的結構⁽⁶⁾。

其次，如何選擇適當的界面活性劑 (detergent) 來萃取以及純化表現的膜蛋白，是相當不容易的事，需要不斷地嘗試不同種類及條件。以目前已知的膜蛋白結構來說，各式不同長度的 maltopyranosides 以及 glucopyranosides 這兩類界面活性劑的成功機會較高。界面活性劑的選擇需要同時配合其膜蛋白的生物活性分析。實驗者必須要同時兼顧維持膜蛋白的活性，並找出適合長晶的條件 (X 光結晶學)，或是合適的核磁共振光譜樣品。表現方式以及界面活性劑的選擇都必須配合被研究之膜蛋白生物活性的分析。因為膜蛋白結構的研究畢竟是為了能夠更深入地瞭解膜蛋白的功能及作用機制。花大量人力物力去解出一個不具有活性的膜蛋白結構，並沒有太大意義。

對於 X 光結晶學來說，獲得高解析度繞射的晶體是最重要的第一步。相對於水溶性蛋白質的長晶條件，膜蛋白長晶的條件通常不容易找到。以筆者本身研究細菌的多重抗藥性膜蛋白 (SMR) 結構的經驗，於計劃開始之時，便同時準備了九種不同細菌物種的 SMR，並嘗試它們在大腸桿菌的表現。其中的三個物種的 SMR 的產率可達到每公升大於 0.05 毫克的表現。於是便更進一步利用發酵槽來量產這些膜蛋白。大約經過了四個月的時間，超過六十次的發酵槽量產此膜蛋白，嘗試了約一萬五千種不同的結晶條件，才獲得了第一種的 SMR 結晶^(7,8)。爾後又經過了多次的長晶條件的調整，才獲得可接受的具可繞射解析度的晶體 (圖 1)。不間斷地嘗試不同的長晶條件，不輕易放棄，是膜蛋白結晶的唯一秘訣。膜蛋白結晶的 X 光繞射數據分析則與一般蛋白質結晶學相同，於此不再贅述。唯膜蛋白結晶的 X 光繞射解析度通常比一般水溶性蛋白的結晶繞射還要低，因此電子雲密度的判讀較為不易。多試不同條件仍然是長出較高解析度晶體的唯一方法。

液態核磁共振光譜因為有分子大小的限制 (小於 80 kDa)，因此須考慮所選擇的膜蛋白分子量大小。同樣的對於界面活性劑的選擇也相當重要，因為界面活性劑 micelles 的性質與大小決定了是否能夠得到合適的 HSQC 圖譜。得到好的 HSQC 圖譜才能使得之後的膜蛋白的結構分析可行。因為核磁共振光譜樣品通常需要是同位素 labeled (^{15}N , ^{13}C , ^2H)，所以膜蛋白的產量要求比起 X 光結晶學

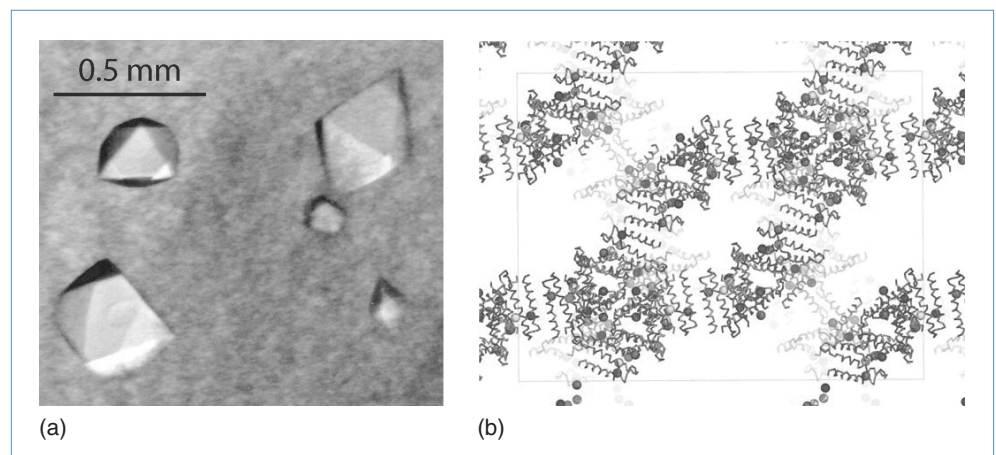


圖 1.
(a) EmrE 的結晶以及 (b)
EmrE 分子在晶格中的
排列。

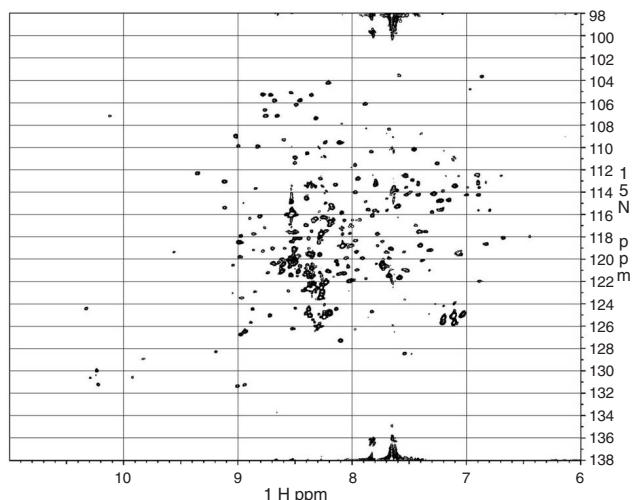


圖 2. EmrE 的 TROSY 核磁共振圖譜。

更為嚴格。以同樣一個膜蛋白 SMR 為例，每公升只有 0.1 毫克的產量使得同位素 ^{15}N 、 ^{13}C 及 ^2H 的 labeling 因太昂貴而不可行。後來筆者嘗試了不同的表現載體 (expression vectors)，進而提高了約 10 倍的產量，才成功地得到了此膜蛋白的 HSQC 圖譜 (圖 2)。膜蛋白與界面活性劑 micelles 形成的 complex 因為已經到達液態核磁共振光譜可容忍的極限，因此還需要配合 perdeuteration 以及 TROSY 類型的實驗，才能成功地獲得有用的圖譜。製備液態核磁共振光譜的樣品，通常以大腸桿菌來表現需達到約每公升一毫克的產量。若少於此產量，則可考慮用 *in vitro* 無細胞表現蛋白的方式。使用無細胞表現蛋白的方式不僅對 label 產量少的膜蛋白有幫助，對於核磁共振光譜樣品 label 特定的胺基酸，以及 X 光結晶學所常用的 Se-Methionine 的 labeling 也是一種非常好的選擇。

Roderick MacKinnon 於 2003 年獲得了諾貝爾化學獎。此獎是為了肯定 MacKinnon 對於研究鉀離子通道膜蛋白結構的重要貢獻。他在得獎的演講之中，詳細的敘述了他在鉀離子通道研究的心路歷程⁽⁹⁾。為了更深入地瞭解鉀離子通道膜蛋白的功能與作用機制，MacKinnon 毅然決然由一位電生理學家轉而進入膜蛋白結構生物學的研究領域，並且獲得了最高的學術肯定。有興趣的讀者請參考文獻 9。

研究膜蛋白是一項相當昂貴的研究工作，要成功地解出膜蛋白結構需要投入大量的人力及研究經費。美國、歐洲以及日本已經由政府投入大量的研究經費來支持膜蛋白的結構研究。美國的衛生署於 2005 年於 The Scripps Research Institute 以及加州大學舊金山分校成立了兩個膜蛋白生產研究中心，投入約五年 17 億台幣的經費⁽¹⁰⁾。歐盟也投入了五年約 4 億台幣經費成立了膜蛋白研究中心⁽¹¹⁾。台灣在膜蛋白結構研究正處於起步的階段，筆者希望能夠有更多的學生及研究人員投入此一領域。如果能配合政府的財力支持，膜蛋白結構生物學在未來 10–20 年將陸續會有重大研究成果。

參考文獻

1. S. H. White, *Protein Science*, **13**, 1948 (2004).
2. G. Chang, R. H. Spencer, A. T. Lee, M. T. Barclay, and D. C. Rees, *Science*, **282**, 2220 (1998).
3. D. A. Doyle et al., *Science*, **280**, 69 (1998).
4. S. B. Long, E. B. Campbell, and R. MacKinnon, *Science*, **309**, 897 (2005).
5. S. B. Long, E. B. Campbell, and R. MacKinnon, *Science*, **309**, 903 (2005).
6. O. Pornillos, Y.-J. Chen, A. P. Chen, and G. Chang, *Science*, **310**, 1950 (2005).
7. C. Ma and G. Chang, *Acta Cryst.*, **D60**, 2399 (2004).
8. C. Ma and G. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 2852 (2004).
9. R. MacKinnon, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, **43**, 4265 (2004).
10. <http://grants2.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-RM-04-026.html>
11. <http://www.e-mep.org/>

-
- 馬徹先生為美國賓夕法尼亞大學博士，現任中央研究院基因體研究中心助研究員。
 - Che Ma received his Ph.D. from the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. He is currently an assistant research fellow at Genomics Research Center, Academia Sinica.