

同步輻射在蛋白質結晶學上的應用

Recent Progress of Protein X-Ray Crystallography and Synchrotron Radiation

陳彥儒

Yen-Ju Chen

蛋白質的立體結構是了解其功能及活性的重要依據，在各國的基因體計畫中扮演重要的角色。在解決蛋白質結構的數種技術之中，使同步輻射 X 光源的蛋白質結晶學則是最被廣泛使用且不可或缺的。本文介紹蛋白質結晶學在最近幾年的發展，包含使用硫原子解決相位角問題，使用無細胞技術表現蛋白質，以及使用脂質立方體培養蛋白質結晶。最後舉兩個最近解出之膜蛋白結構，分享其使用的技術。

Protein structures play important roles in understanding their functions and activities. Structural research is a corner stone in every genomic project worldwide. Among all the techniques used to solve protein structures, protein X-ray crystallography is the most widely used and indispensable. And synchrotron radiation is an essential tool for protein X-ray crystallography. In this article, latest techniques will be introduced, including using sulfur-SAD for phase problem, expressing proteins with cell-free system and crystalizing membrane protein with lipidic cubic phase. Two examples of recently solved membrane proteins will show the progress of protein crystallography in last few years.

一、前言

蛋白質為氨基酸組成的長鏈，再折疊為立體結構，大小在奈米階層。蛋白質在細胞中如同零件一般，各自扮演不同的功能。要了解蛋白質的特性與功能，其立體結構為不可或缺的資料，而使用 X 光繞射 (X-ray diffraction) 的蛋白質結晶學是了解蛋白質結構的主要技術之一。自 1958 年第一個蛋白質 myoglobin 結構被解出之後⁽¹⁾，蛋白質結晶學已被廣泛地應用在生命科學的領域。生物資料庫 (Protein Data Bank, PDB) 自 1971 年成立以來，已經有超過五萬個蛋白質結構被解出來。自 2000 以來，每年平均皆有超過五千個蛋白質結構被解出⁽²⁾，

以 X 光繞射技術所解出之結構約占總數的百分之八十五。

自 1980 年代第二代同步輻射加速器陸續成立之後，使用同步輻射 X 光繞射技術所解出之蛋白質結構就以倍數成長。在 1991 年 5% 的 PDB 結構是由同步輻射 X 光繞射所解出，至 1999 年時達到 62%⁽³⁾。至今使用同步輻射 X 光繞射解蛋白質結構已成為標準的實驗技術。國家同步輻射研究中心在新竹及日本提供幾條光束線，專為研究蛋白質結構之用。「科儀新知」雙月刊曾於民國 95 年第 150 期專題報導結構基因體學，其中詳述蛋白質結晶學之技術及發展。本文以此為基礎，介紹這幾年來的最新發展。

二、硫原子單波長異常散射相位解析法 (Sulfur-SAD)

相位角問題 (phase problem) 一直是蛋白質結晶學的重要課題，為了要計算出蛋白質繞射的相位角，必須在蛋白質分子中固定的位置植入重原子。目前常用的技術需將蛋白質結晶浸泡在含有重原子的溶液中，待重原子被吸附到蛋白質上的特定位置，再利用重原子對 X 光的異常散射 (anomalous scattering) 來解決相位角問題 (詳見「科儀新知」第 150 期)。常用的重原子有 Pt、Hg、Au 及 Os 等，這些重原子的化合物都非常毒，誤食嚴重會致命，在處理時及實驗室的管理上要非常小心。

另外一個方法是在蛋白質表現時，使用 seleno-methionine 取代 methionine，並強迫細菌使用人工添加的 seleno-methionine。如此一來，表現出來的蛋白質便內含重原子硒，不需在結晶之後額外加入。Seleno-methionine 是加在培養液中，且仍是微毒的，若是使用量大，廢液處理是個大問題。即便大部分的蛋白質結構可以使用硒或其他重原子解決相位角問題，仍有許多蛋白質無法植入重原子，失敗的原因可能是含重原子溶液會破壞蛋白質結晶，或是使用 seleno-methionine 時蛋白質表示的結果不佳，無法取得足夠的蛋白質。

近年來研究人員嘗試使用蛋白質本身就含有的硫原子 (cysteine 及 methionine)，來解決相位角問題，並有成功的結果，最近解出的結構為 VEGF-E⁽⁴⁾。針對能成功使用硫原子解決相位角的條件，之前推算 phasing power $\langle \Delta F^{+/-} \rangle / \langle F \rangle$ 需大於 0.6% (最好大於 1%)。最新的分析指出，在每一個解析度範圍 (resolution shell)， $\langle |\Delta_{ano}| / \sigma(\Delta_{ano}) \rangle$ 都要大於 1.5 是較好的判斷依據。如果繞射的訊號較弱，可使用較長的波長 (大於 2Å) 來提高異常散射的強度，或是增加資料重複性 (redundancy)，以降低雜訊⁽⁵⁾。以 Lysozyme 為例，使用波長 2.29 Å 時需要收集 120 度資料，才能使用 SHELXD 找到硫的位置，使用波長 0.979 Å 時，則需要收集 991 度，這個作法的前提是蛋白質結晶能忍受較長的資料收集時間及其所造成的輻射傷害。

三、無細胞蛋白質表現

蛋白質結晶學的一個困難之處在於取得足夠的蛋白質分子，這個問題在膜蛋白上更是嚴重。無細胞 (cell-free) 蛋白質表現在最近有普遍化的趨勢，尤其是大腸桿菌及小麥胚芽 (wheat germ) 兩種系統。大腸桿菌系統在製作上較為簡單，一般實驗室的設備即可處理，只是在準備所需的成分則需要有一些經驗 (如表 1 所示)。目前已有實驗室大量使用在蛋白質的產生⁽⁶⁾，詳細的方法可以查閱參考文獻 (7) 及 (8)。

使用無細胞蛋白質表現的另一項好處是，無細胞蛋白質表現的產量一般在一毫升的反應可以產生一毫克的蛋白質。如果使用 seleno-methionine 來植入重原子，蛋白質表現所得的廢液只有幾毫升，比起一般養菌產生的幾公升廢液少了許多，同時也可節省實驗成本。儘管無細胞蛋白質表現較一般養菌的方法來得簡單，但由於無細胞蛋白質表示所做出來的蛋白是處於一個非自然的環境，對於該蛋白活性的影響需要進一步確認。針對膜蛋白的表現，會在無細胞蛋白質表現的反應中加入界面活性劑 (detergent)。

最常使用的界面活性劑為 Brij 系列，按分子長度有 Brij-35, Brij-58 等多種選擇，但 Brij 並非蛋白質純化常用的界面活性劑，其分子量亦較一般常用的界面活性劑大上兩倍。將膜蛋白分子從含 Brij

表 1. 大腸桿菌無細胞蛋白質表現主要成分。

功能	成分
酵素	細胞萃取物 (S30 lysate) T7 polymerase
緩衝液	Hepes Potassium Glutamate Ammonium Acetate Magnesium Acetate
原料	dNTP 20 種氨基酸
能量來源	Pyruvate Phosphoenolpyruvate (PEP) 3-phosphoglycerate Glucose-6-phosphate
基因	為無細胞蛋白質表現而設計的載體 (vector)，如 pIVEX。

的溶液換至一般常用的界面活性劑不見得能成功，在很多情況下膜蛋白會因此沈澱。

根據 lactose permease (LacY) 的研究指出，脂質含量在膜蛋白結晶中扮演重要的角色⁽⁹⁾，並表示在膜蛋白純化的過程中，脂質會不斷的流失。無細胞蛋白質表現中所取得有膜蛋白，與一般從大腸桿菌取得的，理論上有較少的脂質，因此膜蛋白可能處於較不穩定的狀態，在界面活性劑交換時，較易沈澱。無細胞蛋白質表現雖是以大腸桿菌為基礎，亦可以成功地表現真核生物的膜蛋白，但缺乏真核生物細胞中常有的脂質種類。

最近數個 G protein-coupled receptor (GPCR) 的結構顯示膽固醇會結合在 GPCR 的表面上，因此在無細胞蛋白質表現的過程中，可能要額外添加膽固醇。因為這種種因素，無細胞蛋白質表現所取得的膜蛋白與一般養菌所取得的，其活性及功能需要進一步的比較。無細胞蛋白質表現也缺乏一般所有的蛋白質折疊系統 (folding machinery)，這個問題可以藉由加入大腸桿菌內層細胞膜 (inner membrane vesicle) 來解決⁽¹⁰⁾。

內層細胞膜含有膜蛋白所需要的蛋白質折疊系統，可以將膜蛋白整合進入內層細胞膜中。若是使用界面活性劑，則膜蛋白質是否正確折疊有待確定。筆者曾接觸過一個 beta-barrel 的膜蛋白，在含 Brij 界面活性劑的無細胞蛋白質表現中是 alpha-helices 結構，待交換至另一種界面活性劑之後，再轉為 beta-barrel，可見膜蛋白在無細胞蛋白質表現的系統中，其立體結構會隨著環境中的界面活性劑而改變。整體來說，無細胞蛋白質表現提供了一個快速的蛋白質表現方法，可以節省養菌及破菌的時間。但畢竟是人工組成的系統，其產出的蛋白質，尤其是膜蛋白，需要確認其活性及折疊，才能進一步到長晶的步驟。

四、脂質立方結構相

膜蛋白結構一直是蛋白質結晶學的一大難題。膜蛋白約占有所有基因之百分之三十，其中一半為發展新藥的目標。但上述五萬個解出之蛋白質結構中，只有四百多個是膜蛋白，其中只有一百多種膜

蛋白 (unique proteins)⁽¹¹⁾，在比列上相當低，其中一個困難為膜蛋白結晶不易。為了要使膜蛋白溶於水中，界面活性劑常被用於將膜蛋白自細胞膜中取出，並使其在水溶液中保持穩定。界面活性劑的使用，使得膜蛋白研究迅速成長。但界面活性劑也可能是妨礙膜蛋白形成結晶的原因，且膜蛋白處於細胞膜及界面活性劑中的環境不同，解出的結構不見得會與生理上的結構相同。

近幾年來研究人員使用脂質立方結構相⁽¹²⁾，成功地解出數個 G protein-coupled receptor，為膜蛋白結晶打開了一扇窗。脂質立方結構相 (lipid cubic phase) 的發現源自對脂質於水溶液中的相變化 (phase transition) 的研究。Monoolein 與水以 4:6 至 6:4 的比例在室溫混合時，會形成立方結構相。立方結構相基本上是一個連續的雙層脂質膜 (bilayer membrane) 與水分子交錯，此雙層脂質膜結構與細胞膜相同。將含有膜蛋白的溶液與脂質以適當的比例混合，形成立方結構體，膜蛋白會處於與生理環境相類似的環境中。這時再混以其他常用於蛋白質結晶中的沈澱液 (precipitant)，將雙層膜緩慢破壞。這會將膜蛋白推擠至有限的空間，而形成三度空間結晶。這個技術最早成功的使用在 rhodopsin，後來更延伸至其他膜蛋白。

使用脂質立方體有兩項問題，一是所取得的結晶較小，需要微聚焦 (microfocus)，這必須有同步輻射光束線的配合。脂質立方體在冷凍時會變得不透明，無法觀察到蛋白質結晶是否在 X 光的範圍之內，因此在收集實驗結果時，會有操作上的困難。自 2007 年底，數個重要的 GPCR 以這個方式解出結構。脂質立方體如同牙膏，非一般實驗室所熟悉的液體，因此在製作及操作上也相較繁瑣許多，一般需要使用自動化機器的協助。另外有研究指出，被沈澱液破壞的脂質立方體，會形成海棉結構相 (sponge phase)⁽¹³⁾，這種結構相也可以協助膜蛋白形成結晶，並且在操作上較為簡單。

五、最新研究成果

在此介紹兩項最新的研究成果，一是 GPCR，另一是 VDAC。

1. G Protein-Coupled Receptor (GPCR)

GPCR 是真核生物中重要的膜蛋白，負責將許多外界的刺激傳遞進入細胞，視覺及味覺都是通過 GPCR 傳入細胞之中。GPCR 是藥廠的主要研究目標。除了 rhodopsin 之外，自 2007 年底，數個 GPCR 結構陸續被解出，其技術皆源自於 Kobilka⁽¹⁴⁾ 及 Stevens⁽¹⁵⁾ 等人於 2007 年底所發表的研究。Rasmussen 等人以抗體接合至 beta-2-adrenergic G protein-coupled receptor (b2AR) 於第五及第六個 transmembrane helices 的 loop。這個方法類似於 MacKinnon 於 2005 解出的鉀離子通道⁽¹⁶⁾。蛋白質在形成結晶的過程之中，蛋白質間接觸 (protein-protein contact) 是形成蛋白質結晶的主要原因。如前所述，膜蛋白斥水性的部分會與界面活性劑結合，不易形成蛋白質間接觸，因此對膜蛋白而言，蛋白質間接觸主要是由親水性的部分組成。為了增加這些接觸，使用抗體去結合膜蛋白的特定部位後再結晶，可以增加蛋白質間接觸而提高成功率。

Rasmussen 等人使用這個方法，可以得到 3.4 Å/3.7 Å 解析度的 b2AR 結構。Cherezov 等人則直接將這個 loop 改成有固定結構的 T4 lysozyme。這樣子不但減少了一段活動的 loop，還可以大幅增加蛋白質間接觸，再加上脂質立方體的使用，使得其結構的解析度達到 2.4 Å (圖 1)。以同樣的系統 (T4 lysozyme 及脂質立方體)，human A2A adenosine receptor 的結構也於 2008 年被解出⁽¹⁷⁾。

2. VDAC

VDAC 是粒線體上的一個離子通道，為 beta-barrel 結構，被認為與細胞死亡 (apoptosis) 有關。在 2008 年三個 VDAC 結構透過 NMR 及 X 光結晶學兩種方法解出⁽¹⁸⁻²⁰⁾ (圖 2)。VDAC 分子量為 30 kD，有 19 beta-strand 形成一個孔洞，一個 alpha-helix 在通道中間。使用 NMR 解蛋白質結構一般有分子大小的限制。VDAC 在 LDAO 界面活性劑中預估的分子量為 75–90 kD，推估一個 VDAC 週邊約有 250–300 個 LDAO 分子。相較於 X 光結晶學，NMR 較少被使用來解膜蛋白結構，但 NMR 適合研究膜蛋白在水溶液中的活性，與 X 光結晶

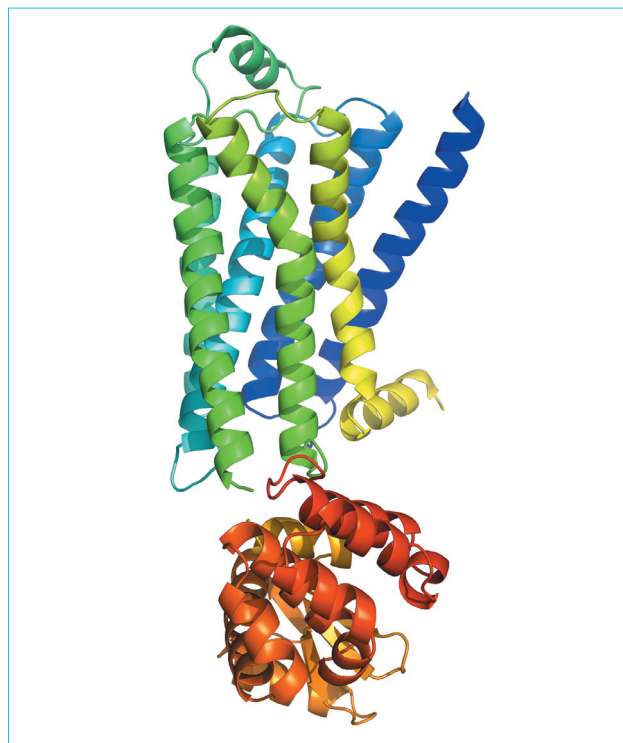


圖 1. Beta-2-adrenergic receptor 三維立體結構 (2RH1)。

學算是相輔相成的技術。NMR 需要在蛋白質上使用同位素原子，如 ¹³C、¹⁵N 等。無細胞蛋白質表現也可以提供 NMR 一個簡單而快速的技術來植入所需的同位素。研究亦指出 VDAC 需要膽固醇才能有與生理環境下接近的功能，再次說明了膽固醇在真核生物膜蛋白的重要性。

最後值得一提的是，全球數個同步輻射中心正在發展 X 光自由電子雷射 (X-ray free-electron laser, XFEL)，其中一個目標就是要解困難的蛋白質結構，特別是膜蛋白⁽²¹⁾。筆者這次參加於澳洲墨爾本舉行的 Asia-Oceania Synchrotron Radiation Research Forum 2008，在其中有許多 XFEL 的討論，德國 DESY 的 FLASH 是目前第一台 XFEL，提供軟 X 光範圍 (soft X-ray) 的自由電子雷射。美國 SLAC 的 LCLS 預計在今年可以提供硬 X 光 (hard X-ray) 自由電子雷射，可用在蛋白質分子的研究。日本 Spring-8 的 XFEL 預計在 2010 左右可以完成。

XFEL 在蛋白質結構上的應用，簡單來說，是使用高強度度的 X 光照射單一蛋白質分子，收集

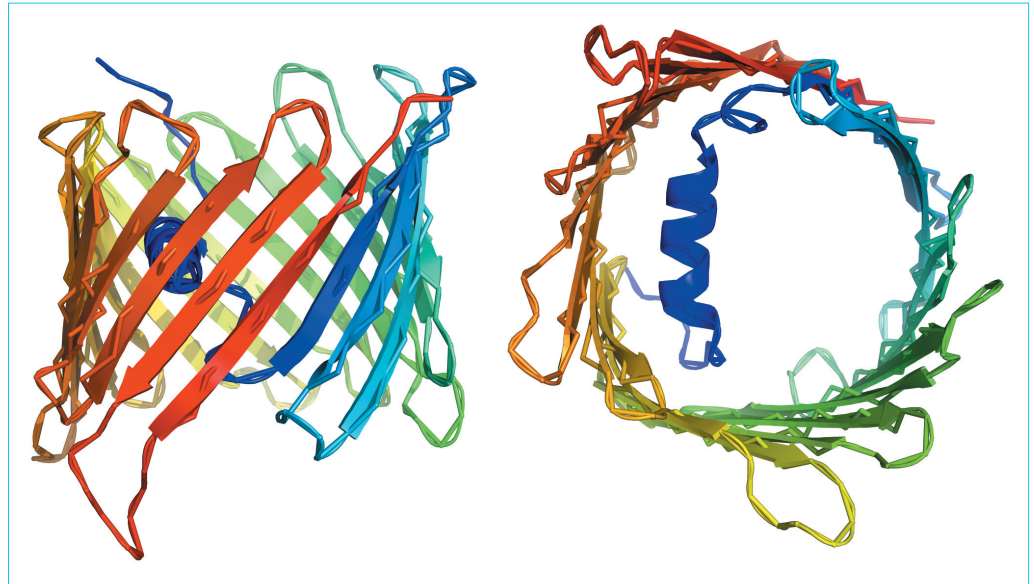


圖 2.
VDAC 三維立體結構
(PDB: 2JK4)。

其產生的散射。在概念上如同低溫穿透式電子顯微鏡 (cryo-TEM) 重組蛋白質結構 (single-protein reconstruction) 一般，在收集上萬個蛋白質分子的散射之後 (在 cryo-TEM 中為蛋白質分子的投影，projection)，用電腦找出每個散射影像在三維空間中的相對位置，即可還原這蛋白質分子在三度空間的散射，進而計算出其立體結構。在 cryo-TEM 中所取得的投影含有相位角的資訊，在 XFEL 則需要使用 density modification 來計算出可能的相位角。XFEL 不需要蛋白質結晶，可以避免相位角問題，但該技術還在早期發現階段，仍有許多困難有待克服。

六、結論

蛋白質結晶學經過五十多年的發展，一方面數萬個蛋白質結構被解出，提供生命科學研究不可或缺的知識，另一方面在技術上不斷的發展，已達到自動化及高效能 (high throughput) 的地步。研究者可以在自己的實驗室將結晶準備好，郵寄至同步輻射加速中心，使用機器手臂及遠端操作 (remote control) 來收集資料，大大地提升了研究上的效率。如上所述，往後的幾個方向，一是針對困難處理的蛋白質，特別是膜蛋白，提高其產量及結晶的成功率；二是為相位角問題找出更簡易的解決方

法，如此可減少對蛋白質結晶數量上的需求；三是發展其他新的技術，如 X 光自由電子雷射，在未來也許可以取代 X 光繞射蛋白質結晶學。

在研究題材上，也將由單一蛋白質結構往更大分子或數個蛋白質結合體 (protein complex) 的方向移動。研究者不但要能看到蛋白質結構，更要能藉由蛋白質結構解釋其重要的生理功能。配合其他能觀察蛋白質動態的技術，如核磁共振 (NMR)、圓二色旋光光譜 (circular dichroism, CD) 及小角度散射 (small angle X-ray scattering, SAXS)，將能完全了解蛋白質在生物體內的地位及其所扮演的角色。

參考文獻

1. J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, and D. C. Phillips, *Nature*, **181** (4610), 662 (1958).
2. Protein Data Bank Statistics (http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html&)
3. *Biological Applications of Synchrotron Radiation: An Evaluation of the State of the Field in 2002*, A BioSync Report, The Structural Biology Synchrotron Users Organization, October (2002).
4. A. Wagner, M. Pieren, C. Schulze-Briese, K. Ballmer-Hofer, and A. E. Protal, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62** (11), 1430 (2006).
5. M. Cianci, J. R. Helliwell, and A. Suzuki, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **64** (12), 1196 (2008).
6. D. Schwarz, V. Dötsch, and F. Bernhard, *Proteomics*, **8** (19), 3933 (2008).

7. D. Schwarz, C. Klammt, A. Koglin, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch, and F. Bernhard, *Methods*, **41** (4), 355 (2007).
 8. D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frölich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dötsch, and F. Bernhard, *Nature Protocols*, **2** (11), 2945 (2007).
 9. L. Guan, I. N. Smirnova, G. Verner, S. Nagamori, and H. R. Kaback, *PNAS*, **103** (6), 1723 (2006).
 10. J. J. Wu and J. R. Swartz, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778** (5), 1237 (2008).
 11. Membrane Proteins of Known Structures (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html)
 12. M. Caffrey, *J. Struct. Biol.*, 142 (1), 108 (2003).
 13. A. B. Wöhri, L. C. Johansson, P. Wadsten-Hindrichsen, W. Y. Wahlgren, G. Fischer, R. Horsefield, G. Katona, M. Nyblom, F. Oberg, G. Young, R. J. Cogdell, N. J. Fraser, S. Engström, and R. Neutze, *Structure*, **16** (7), 1003 (2008).
 14. S. G. Rasmussen, H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis, and B. K. Kobilka, *Nature*, **450** (7168), 383 (2007).
 15. V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, and R. C. Stevens, *Science*, **318** (5854), 1258 (2007).
 16. S. B. Long, E. B. Campbell, and R. Mackinnon, *Science*, **309** (5736), 897 (2005).
 17. V. P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman, and R. C. Stevens, *Science*, **322** (5905), 1211 (2008).
 18. S. Hiller, R. G. Garces, T. J. Malia, V. Y. Orekhov, M. Colombini, and G. Wagner, *Science*, **321** (5893), 1206 (2008).
 19. R. Ujwal, D. Cascio, J. P. Colletier, S. Faham, J. Zhang, L. Toro, P. Ping, and J. Abramson, *PNAS*, **105** (46) 17742 (2008).
 20. M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, C. Vornrhein, C. Griesinger, M. Zweckstetter, and K. Zeth, *PNAS*, **105** (40) 15370 (2008).
 21. W. Gordon and R. Hilgenfeld, *Single Molecules*, **3** (1), 63 (2002).
-
- 陳彥儒為美國維吉尼亞大學博士，現任國家同步輻射研究中心助研究員。
 - Yen-Ju Chen received his Ph.D. in biology from the University of Virginia, USA. He is currently an assistant scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.