

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用基因選殖,表現和定點突變法對具分子保護者活性之
A-水晶體蛋白機制研究(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2311-B-002-035-

執行期間：91年08月01日至92年10月31日

執行單位：國立臺灣大學生化科學研究所

計畫主持人：邱式鴻

報告類型：完整報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 6 月 10 日

行政院國家科學委員會補助研究成果報告

計劃名稱：利用基因選殖，表現和定點突變法對具分子保護者活性之 α -

水晶體蛋白機制研究 (3/3)

計劃編號：NSC 91-2311-B-002-035

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：邱式鴻 國立台灣大學生化科學研究所

一、中文摘要

蛋白凝集可能是引起光散射及水晶體白內障形成的主因，由於 α -水晶體蛋白具分子保護者活性，可能可以保護其它水晶體蛋白，以避免水晶體蛋白在長期受到紫外線、醱化及氧化的影響下失去結構的穩定性，凝集產生沉澱，暗示其與水晶體因老化而形成白內障有重大關聯。除此之外， α B-水晶體蛋白在其它器官組織中，尤其是心臟及骨骼肌，被發現與細胞骨架 (cytoskeleton) 尤其是 intermediate filaments 的穩定性有很大的關聯性，為探討 α -水晶體蛋白結構及功能的相關性，因此我們選殖並表現豬 α B-及土虱 α B-水晶體蛋白，以比較重組 α B-水晶體蛋白的熱穩定性及凝集性質的差異與蛋白結構上的關聯性。在本計畫年度中，由於 α -水晶體蛋白 C 末端的延伸區被認為與 α -水晶體蛋白對水溶液溶解度有決定性的影響 (1,2)，而且 C 端的變異在生物體系統中則常見於 α -水晶體蛋白的重大破壞性的改變 (3)；而這些改變很可能導致保護性功能的喪失，甚至可能引發白內障的

形成，因此我們利用定點突變法進行豬 α B-水晶體蛋白位於 C 末端的延伸區胺基酸的突變。結果發現，去除尾端具高保守性的兩個 Lysine 殘基後在高溫下仍具有蛋白保護活性，除此之外，利用圓二色偏光譜儀、動態光散射光譜儀來探討蛋白質的立體結構與聚集特性。另外，土虱由於其生活環境之故，被認為其眼睛在退化中，比較氨基酸序列的結果顯示在 α B-水晶體蛋白的 N 端有三個高保守性的氨基酸缺失(圖十一)，由於 α B-水晶體蛋白的 N 端與其形成聚合體有關，而且土虱 α B-水晶體蛋白的聚合體分子量約在 400,000 Da，約為豬 α B-水晶體蛋白的 2/3，由此建構土虱多三個氨基酸與豬少三個氨基酸的 α B-水晶體蛋白突變株，藉以了解這三個氨基酸對 α B-水晶體蛋白聚合體分子量的影響。再其次，土虱 α B-水晶體蛋白的熱穩定性研究中發現，其半凝集溫度比豬高 14.5 °C，在蛋白保護活性研究中發現，土虱 α B-水晶體蛋白的蛋白保護活性比豬的來源高或相似，可能是因為魚類接觸外來蛋白質變性物質的機會比哺

乳類高的緣故。

關鍵詞：水晶體蛋白、分子保護者、抗熱「保護者」活性、老年性白內障、熱休克蛋白

ABSTRACT

α -Crystallin, a major protein of all vertebrate lenses, consisting of two subunits α A and α B, forms polymeric aggregates with an average molecular mass of about 800 kDa. In this study, we have employed various physical methods to study aggregate sizes and conformational properties of porcine α -crystallin and homomultimeric aggregates of its purified α A, α B subunits and cloned recombinant α B subunit. From far- and near-UV CD spectra, native α -, α A-, α B- and recombinant α B-crystallins from porcine lenses all show similar β -sheet conformation to that from bovine and human lenses. By means of gel-filtration chromatography and dynamic light scattering, we have found that the molecular sizes of all four crystallin aggregates are polydispersedly distributed in the following order of aggregate sizes, *i.e.*, native $\alpha > \alpha$ A $>$ α B \approx recombinant α B. In contrast, the

molecular weights as determined from sedimentation velocity and equilibrium studies appear to indicate that the molecular size of native or recombinant α B-crystallin is somewhat greater than α A-crystallin. To further investigate the structural and functional relationship, we have also compared the chaperone activities of all four α -crystallin aggregates at different temperatures. From the results of chaperone-activity assays, ANS (8-anilo-1-naphthalene sulfonate) binding and thermal stability studies, there appeared to be at least two factors playing major roles in the chaperone-like activity of these lens proteins: one is the hydrophobicity of exposed protein surface and the other is the structural stability associated with each protein. We showed that α A-crystallin is a better chaperone to protect γ -crystallin against UV-irradiation than α B-crystallin, in contrast to the observation that α B is generally a better chaperoning protein than α A for enzyme protective assays at physiological temperatures.

We have also analyzed, expressed and characterized the catfish

α B-crystallin, which presents itself as a major structural component in eye lenses and as a small heat shock protein in other tissues of most mammals. Catfishes which reside generally in streams, ponds, ditches and reservoirs, always in the dark or underground environment, are good examples of nocturnal scavengers with atrophied eyes. Sequence comparison with homologues of distantly related taxa has revealed conservation of intron splicing sites and coding regions; however the two intron sequences, 5' and 3' untranslated regions of catfish α B-crystallin are shorter than those reported for other vertebrates. The deduced amino-acid sequence of catfish α B-crystallin gene was found to lack a segment of three amino acids (SPF, *i.e.* Ser-Pro-Phe) in the N-terminal region, which were conserved in all of its homologues characterized from other vertebrate classes. The phylogenetic analysis based on protein sequences indicated that the molecular evolution of α B-crystallins of dogfish, zebrafish and catfish followed three independent evolutionary routes, distinct from

α B-crystallins of other vertebrate species. The wild type and insertion mutant (+SPF mutant) of catfish α B-crystallins were expressed and characterized. The most striking feature was that the midpoint for aggregation (T_a) of the purified recombinant catfish α B-crystallin was 15°C higher than that of porcine one, whereas T_a of +SPF mutant was slightly lower than that of wild type. The molecular mass of +SPF mutant as determined by analytical gel filtration is higher than that of the wild type (~440 kDa) and similar to porcine one (~600 kDa). The relative order of chaperone activity was found to be as follows: catfish wild type > catfish +SPF mutant > porcine wild type α B-crystallin for enzyme protection assay at 60°C and insulin reduction assay at 37°C. The surface hydrophobicity as determined by fluorescent dye-binding analysis for the wild type α B-crystallins of catfish is similar to that of porcine but higher than that of catfish +SPF mutant. Therefore both aggregate size and surface hydrophobicity of crystallin may play some role in the chaperone-like function

of α B-crystallin.

二、緣由與目的

從分子和結構層次瞭解水晶體蛋白的多樣化是我們研究工作的主要目的，它提供了一個架構以闡釋結構穩定性與水晶體蛋白在演化下的複雜過程。最近發現 α -水晶體蛋白具分子保護者活性，暗示其與生物體因老化而形成白內障有重大關聯。蛋白凝集可能是引起光散射及白內障形成的主因，而 α -水晶體蛋白的分子保護者活性則可以保護水晶體避免在長期的蛋白分子失去活性和凝集過程下產生混濁。本研究室在水晶體蛋白的分離及分析上有相當豐碩的成果，對於 α -水晶體蛋白的抗熱保護者活性也投以相當多的關注(4,5,6,7)。近年來由於分子生物學技術的快速演進，本實驗室也持續性的由低等的魚類、兩棲類至高等的哺乳類動物等不同種動物中，進行 α -水晶體蛋白的基因選殖及分析，也有相當多的進展。在前期計劃實施期間，已針對豬的 α B-水晶體蛋白進行基因的突變 (mutagenesis) 及表現，輔以各種熱安定性的實驗測試，瞭解 α B-水晶體蛋白「抗熱保護者」之結構-功能相關部位。另外也針對體溫比哺乳動物高(約 43.5)的鳥禽類與眼睛幾乎退化的土虱中，進行 α -水晶體蛋白的基因選殖及蛋白表現分析，藉比較 α -水晶體蛋白氨基酸序列結構與抗熱保護者功能之間的差異，以瞭解 α -水晶體蛋白抗熱保護者功能的分子機制。

為進一步了解 α -水晶體蛋白結構與功能之間的關係，對 α -水晶體蛋白進行結晶研究是一件必須進行的工

作，由於許多研究發現 α -水晶體蛋白的次單元分子之間的交換相當頻繁，以致於使其分子量不定，因此本實驗室初步將對 α -水晶體蛋白進行突變，藉此不但可以進一步了解各氨基酸對於 α -水晶體蛋白抗熱保護者功能的貢獻程度，也可藉此嘗試 α -水晶體蛋白的結晶工作。最近，Kim 等人成功獲得古細菌 *Mathanococcus janashii* 的小熱休克蛋白 MjHsp16.5 結晶並進行 X-ray 繞射分析，完成其結構的鑑定(8)。由於 MjHsp16.5 與 α -水晶體蛋白同樣屬於小熱休克蛋白大家族 (small heat shock protein superfamily) 的一員，兩者在 α -crystallin domain 約有近三成的相似度，因此 MjHsp16.5 的結晶成功提供 α -水晶體蛋白結晶工作的指引，及以 X-ray 繞射完成其結構的鑑定之可能性。

三、結果與討論

我們利用已建構好的豬 α B-水晶體蛋白 DNA 進行人為突變，目前我們的研究主要集中於其 C-末端的延伸區，我們建構一系列的突變種蛋白(如圖一所示)，前人的研究報告指出此延伸區可能與該蛋白的對水溶解度有關，亦有報告指陳此延伸區可能環抱其它次單位，或在分子保護作用時環抱被保護分子。在計畫草擬之初，我們建構的突變種蛋白混雜著兩個突變區域包括 C-末端延伸區和 N-端的突變，為釐清此兩區域各別的作用，我們重新建構新的突變種蛋白來研究。在完成 DNA 的定序後，我們進行表現和純化的工作，表現和純化的方法依計畫所提的 non-soluble fraction 純化

方式，以膠體分子篩管柱層析和逆相液態高壓層析分離。分離純化後所得之蛋白樣品其 SDS-PAGE 如圖二所示，同時以 ES-Mass 進行質量的鑑定，其理論分子量與測出分子量的比較列出如表一。

在確定突變種蛋白的分子量與純度後，我進行結構的相關鑑定，由遠紫外線圓二極光譜 (Far UV-CD spectra) 可知這些突變種蛋白基本的結構相近，如圖三所示均以 Beta-sheet 結構為主，由程式估計其二級結構所得如表二所列。由圖三可知 T5 的二級結構與 wild-type α B-水晶体蛋白有相當的差異，顯示 T5 的突變已略為影響二級結構的完整性。由該突變種蛋白的前處理過程中發現 T5 的對水溶液溶解度較差，餘者其對水溶液溶解度相近尚可。在進行其二級結構的鑑定後，我們進行其三級結構的相關鑑定，由螢光光譜初步得知其 Tryptophan 螢光光譜相近，因該蛋白的 Tryptophan 主要位於 N-端，可見一系列的突變對 N-端的影響甚小，關於螢光光譜的部分我們將再詳細鑑定。除螢光光譜外我們也以圓二極光譜對突變種蛋白的三級結構進行偵測，近紫外線圓二極光譜 (Near UV-CD spectra) 可知其 Tryptophan, Tyrosine 和 Phenylalanine 的訊號變化差異不大，除 T5 的突變莫耳橢圓率值較低外，其餘相近 (見圖四)。因此我們推論這些突變蛋白其三級結構相近。

四級結構的部分，我們目前完成動態光散色 (Dynamic Light Scattering) 的測定，除 T5 的樣品在同樣的條件下仍無法得到較佳的測定值外，其餘各樣品的大小測定值列於表三。由此資

料來看突變與四級結構的關係尚缺明顯的相關性，因此我們將以離心速度和平衡的實驗和膠體分子篩管柱層析定分子量對四級結構進行研究。根據上述的觀察目前我們選定以 T4 的突變蛋白為初步嘗試結晶的蛋白樣品，以九十六種蛋白結晶條件進行測試，然而於九十六種常見的條件中，大多數條件均呈現沉澱，少數為澄清狀，在數個星期的觀察後仍無任何結晶。

由於無法獲得結晶，因此，我們著重於結晶外的研究，在功能上的研究方面，我們已完成對 γ -水晶体蛋白在高溫下 (70 °C) 的保護作用測定，T1, T2, T3 和 T4 在高溫下仍然保有其保護者活性，而 wild-type α B-水晶体蛋白和 T5 則在相同條件下喪失其保護者活性 (見圖五)。我們陸續進行其他的活性測試，目前，我們已完成對 β -水晶体蛋白在 60 °C 下 (見圖六) 和對酒精去氫醇素在 45 °C 下 (見圖七) 的保護作用。由上述的活性測試初步猜測突變影響到蛋白的熱穩定性，因此，我們進行熱穩定性相關的實驗。在同濃度、同體積的情況下，於不同溫度下加熱十分鐘後測其混濁度 (O.D.340 nm)，由圖八中可知 wild-type α B-水晶体蛋白與 native purified α B-水晶体蛋白同樣在 62 °C 後去自然，T1, T2, T3 和 T4 在 62 °C 後同樣去自然，但是其所造成的混濁度則較低。而 T5 則於 55 °C 後去自然並造成明顯的混濁度上升。在更詳細測量持續加溫並監測其混濁度後 (見圖九)，我們發現 T1, T2, T3 在 70 °C 後去自然，T4 在 64 °C 後同樣去自然而 T5 則於 57 °C 後去自然。因此，去除 C-末端的延伸區將造成其熱穩定性變差，但是去除部分的

C-末端延伸區則否。我們進一步於不同溫度下測定其遠紫外線圓二極光譜(見圖十),我們以程式計算每個突變蛋白的 T_m 值,然而程式計算結果紛亂難以歸納。因此無法由遠紫外線圓二極光譜在 217nm 的光譜改變來進一步確認,僅能肯定 T5 突變蛋白特別不穩定。由於突變蛋白刪除了數個帶電氨基酸殘基,因此我們進一步確認其等電點差異,透過非破壞性的等電點電泳(見圖十一),我們可知數個蛋白的等電點差異不大,均位於 5.8 左右。因此突變對蛋白整體的等電點影響不大,但我們不排除突變對蛋白局部的影響。

在土虱 α B-水晶體蛋白的研究中,從氨基酸組成的分析中發現在 N 端有三個連續的氨基酸缺失(圖十一),由此建構土虱多三個氨基酸與豬少三個氨基酸的 α B-水晶體蛋白突變株,利用前述表現純化及活性分析系統進行與豬 α B-水晶體蛋白之蛋白保護活性的比較,結果發現,土虱 α B-水晶體蛋白的熱穩定性比豬高 14.5 (圖十二),而且蛋白保護活性比豬 α B-水晶體蛋白或高或相似(見圖十三及十四),意味著與水中蛋白質變性物質接觸機會的高低與蛋白保護活性可能相關。

五、參考文獻

1. Plater, M. L., Goode, D., and M. James C. Crabbe. (1996) Effects of site-directed mutations on the chaperone-like activity of α B-crystallin. *J. Biol. Chem.* 271, 28558-28566.
2. Smulders, R. H. P. H., Caver, J. A., Linder, R. A., van Boekel, M. A. M., Bloemendal, Hans, and de Jong, W. W. (1996) Immobilization of the C-terminal extension of bovine α A-crystallin reduces chaperone-like activity. *J. Biol. Chem.* 271, 29060-29066.
3. Kumar, L. V. S., Ramakrishna, T., and Rao, Ch. Mohan. (1999) Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in α A and α B-crystallin. *J. Biol. Chem.* 274, 24137-24141.
4. Lee, J. - S., Liao, J. - H., Wu, S. - H. and Chiou, S. - H. (1997) α -Crystallin acting as a molecular chaperonin against photodamage by UV-irradiation. *J. Protein Chem.* 16, 283-289.
5. Lee, J. - S., Satoh, T., Shinoda, H., Samejima, T., Wu, S. - H. and Chiou, S. - H. (1997) Effect of heat-induced structural perturbation of secondary and tertiary structures on the chaperone activity of α -crystallin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 277-282.
6. Liao, J. - H., Hung, C. - C., Lee, J. - S., Wu, S. - H. and Chiou, S. - H. (1998) Characterization, cloning and expression of porcine α B crystallin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 131-137.
7. Lee, J. - S., Samejima, T., Liao, J. - H., Wu, S. - H. and Chiou, S. - H. (1998) Physiological role of the association complexes of

α -crystallin and its substrates on the chaperone activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 379-383.

8. Kim, K. K., Kim, R., and Kim, S. H. (1998) Crystal Structure of a small heat-shock protein. *Nature.* 394, 595-599.