

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用定點突變探討具有分子保護者活性的豬和魚類脉-水晶  
體蛋白的結構 - 活性相關性

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2311-B-002-098-

執行期間：92年08月01日至93年11月30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：精簡報告

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 94 年 6 月 30 日

# 行政院國家科學委員會補助研究成果報告

計劃名稱：利用定點突變探討具有分子保護者活性的豬和魚類  $\alpha$ -水晶  
體蛋白的結構 - 活性相關性

計劃編號：NSC 92-2311-B-002-098

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 11 月 30 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

眼睛的水晶體蛋白 (crystallins) 在長期受到紫外線、醣化 (glycation) 及氧化 (oxidation) 的影響下失去結構的穩定性，進而凝集產生沉澱是形成白內障 (cataract) 的主要原因之一。 $\alpha$ -水晶體蛋白在哺乳類動物水晶體蛋白組成中約佔 30%，含有兩種次單元蛋白，分別是  $\alpha$ A 與  $\alpha$ B 水晶體蛋白，其所具有的分子保護者活性 (chaperone-like activity)，可能可以保護其它水晶體蛋白免於變性凝集，暗示其與水晶體因老化而形成白內障有重大相關性。除此之外， $\alpha$ -水晶體蛋白的組成分子之一的  $\alpha$ 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  $\alpha$ -水晶體蛋白結構及功能的相關性，因此在本實驗室之前的實驗中，已選殖並表現豬及土虱  $\alpha$ B-水晶體蛋白，並比較兩者之間的熱穩定性、分子保護者活性及其他基本物化性質的差異，並嘗試解釋其與蛋白結構上的關聯性，此部分結果業已發表。在本計畫年度中，我們對於豬及土虱  $\alpha$ B-水晶體蛋白結構與功能的差異性上進行進一步的結構功能分析。經由保守性結構功能區段交換的基因重組結果發現， $\alpha$ B-水晶體蛋白的功能決定結構並不意外的是尤其保守性最高的  $\alpha$ -crystallin domain，包括熱穩定性、分子保護者活性以及其他的物化特性。由於  $\alpha$ -crystallin domain 是小熱休克蛋白家族 (small heat shock

protein family)的識別結構, 因此未來仍可對  $\alpha$ -crystallin domain 進行近一步的結構功能解析。

**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**

Crystallins in the eyes would lose their structural stability and then aggregate because of UV damage, glycation, and oxidation during lifespan. Crystallin aggregation might be a major cause to cataract formation.  $\alpha$ -Crystallin, a major protein of all vertebrate lenses (about 30%), consisting of two subunits  $\alpha$ A and  $\alpha$ B, could prevent other crystallin aggregations by its chaperone-like activity. It suggested that the chaperone-like activity of  $\alpha$ -crystallin might be related to the cataract formation during aging.  $\alpha$ B-crystallin, one subunit of  $\alpha$ -crystallin, could be found in heart and muscle and other tissues.  $\alpha$ B-crystallin was found to be functionally related to the stability of cytoskeletons, especially with intermediate filaments. In our previous studies, we cloned and expressed the recombinant  $\alpha$ B-crystallins from porcine and catfish. The comparison studies were focused on the structural stability, chaperone-like activity, and other biophysical characteristics. We tried to explain the dependence of functional differences on structure. These results have been published. In this study, we have constructed the conserved domains chimeric mutants to explore the structure-function relationship directly. These results indicated that the determinant of functional differences was the  $\alpha$ -crystallin domain, the most conserved domain in small heat shock protein family. The further studies on  $\alpha$ -crystallin domain might give us detail mechanism of  $\alpha$ -crystallin chaperone-like activity.

## 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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中產生混濁。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  $\alpha$ -水晶體蛋白的抗熱保護者活性也投以相當多的關注 [1-7]。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  $\alpha$ -水晶體蛋白的基因選殖及分析，也有相當多的進展 [4, 7]。在前期計劃實施期間，已針對豬的  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ -水晶體蛋白的基因選殖及蛋白表現分析，藉比較  $\alpha$ -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  $\alpha$ -水晶體蛋白抗熱保護者功能的分子機制。

為進一步了解  $\alpha$ -水晶體蛋白結構與功能之間的關係，對  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -水晶體蛋白抗熱保護者功能的貢獻程度，也可藉此嘗試  $\alpha$ -水晶體蛋白的結晶工作。

## 三、結果與討論

我們利用已建構好的各種豬與土虱  $\alpha$ B-水晶體蛋白的嵌合突變株 (Figure 1)，進行熱穩定的實驗結果發現，含有土虱  $\alpha$ B-水晶體蛋白  $\alpha$ -crystallin domain

的嵌合突變株的熱穩定性結果皆與土虱  $\alpha$ B-水晶體蛋白野生株相似，含有豬  $\alpha$ B-水晶體蛋白  $\alpha$ -crystallin domain 的嵌合突變株的熱穩定性結果皆與豬  $\alpha$ B-水晶體蛋白野生株相似 (Figure 2)。相似的實驗結果亦見於分子保護者活性測試 (Figure 3)。因此我們可以得知， $\alpha$ -crystallin domain 這個小休克蛋白家族所共同保守性具有的結構對於  $\alpha$ B-水晶體蛋白的結構穩定性與功能扮演非常重要的角色。

## 五、參考文獻

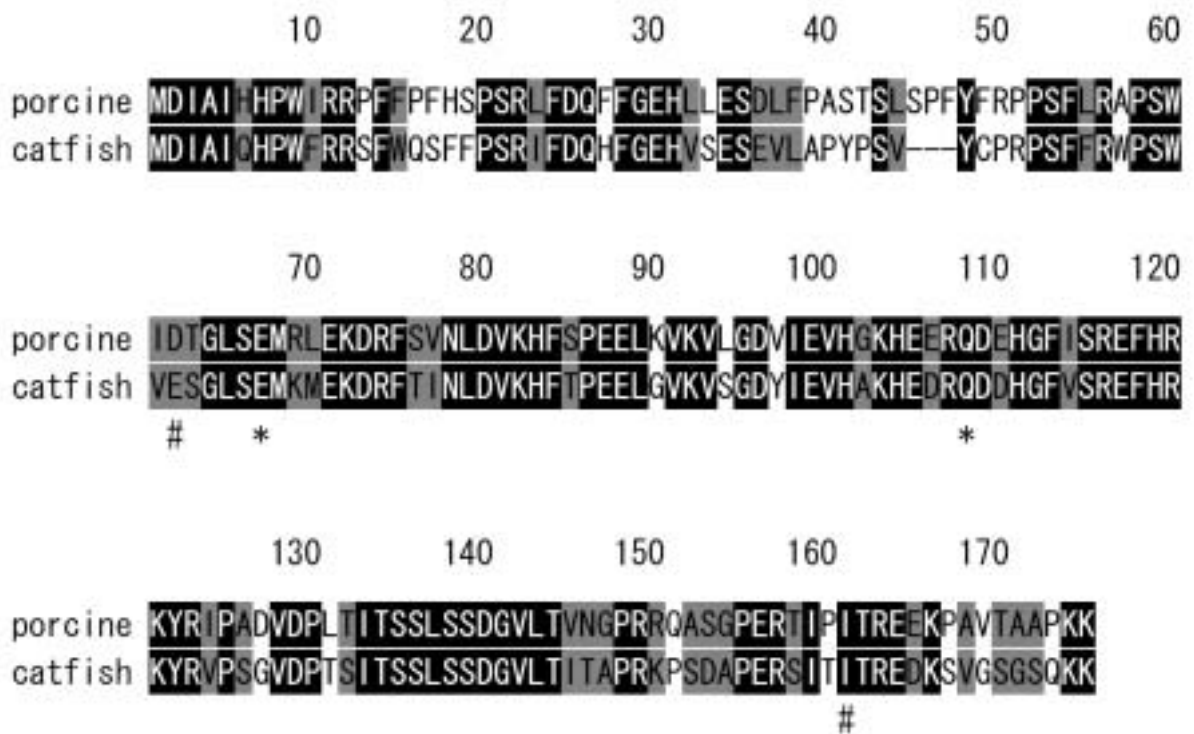
- [1] J.S. Lee, J.H. Liao, S.H. Wu, S.H. Chiou,  $\alpha$ -Crystallin acting as a molecular chaperonin against photodamage by UV irradiation, *J Protein Chem* 16 (1997) 283-289.
- [2] J.S. Lee, T. Samejima, J.H. Liao, S.H. Wu, S.H. Chiou, Physiological role of the association complexes of  $\alpha$ -crystallin and its substrates on the chaperone activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (1998) 379-383.
- [3] J.S. Lee, T. Satoh, H. Shinoda, T. Samejima, S.H. Wu, S.H. Chiou, Effect of heat-induced structural perturbation of secondary and tertiary structures on the chaperone activity of  $\alpha$ -crystallin, *Biochem Biophys Res Commun* 237 (1997) 277-282.
- [4] J.H. Liao, C.C. Hung, J.S. Lee, S.H. Wu, S.H. Chiou, Characterization, cloning, and expression of porcine  $\alpha$ B crystallin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244 (1998) 131-137.
- [5] J.H. Liao, J.S. Lee, S.H. Chiou, C-terminal lysine truncation increases thermostability and enhances chaperone-like function of porcine  $\alpha$ B-crystallin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002) 309-316.
- [6] J.H. Liao, J.S. Lee, S.H. Chiou, Distinct roles of  $\alpha$ A- and  $\alpha$ B-crystallins under thermal and UV stresses, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 (2002)

854-861.

- [7] C.M. Yu, G.G. Chang, H.C. Chang, S.H. Chiou, Cloning and characterization of a thermostable catfish alphaB-crystallin with chaperone-like activity at high temperatures, *Exp. Eye Res.* 79 (2004) 249-261.

Figure 1

(A)



(B)

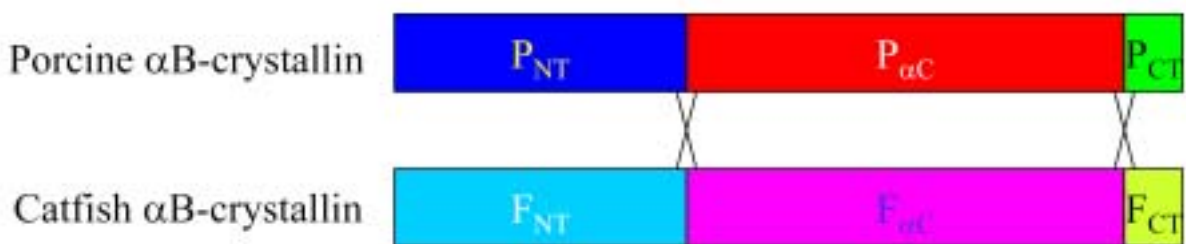


Figure 1: Sequence alignment and chimeric construction between catfish and porcine

$\alpha$ B-crystallins. (A) Sequence alignment result of catfish and porcine  $\alpha$ B-crystallins.

The symbol “\*” indicates the intron splicing sites. The symbol “#” indicates the

positions of chimeric constructions. (B) The domain switching map of catfish and

porcine  $\alpha$ B-crystallins.

Figure 2

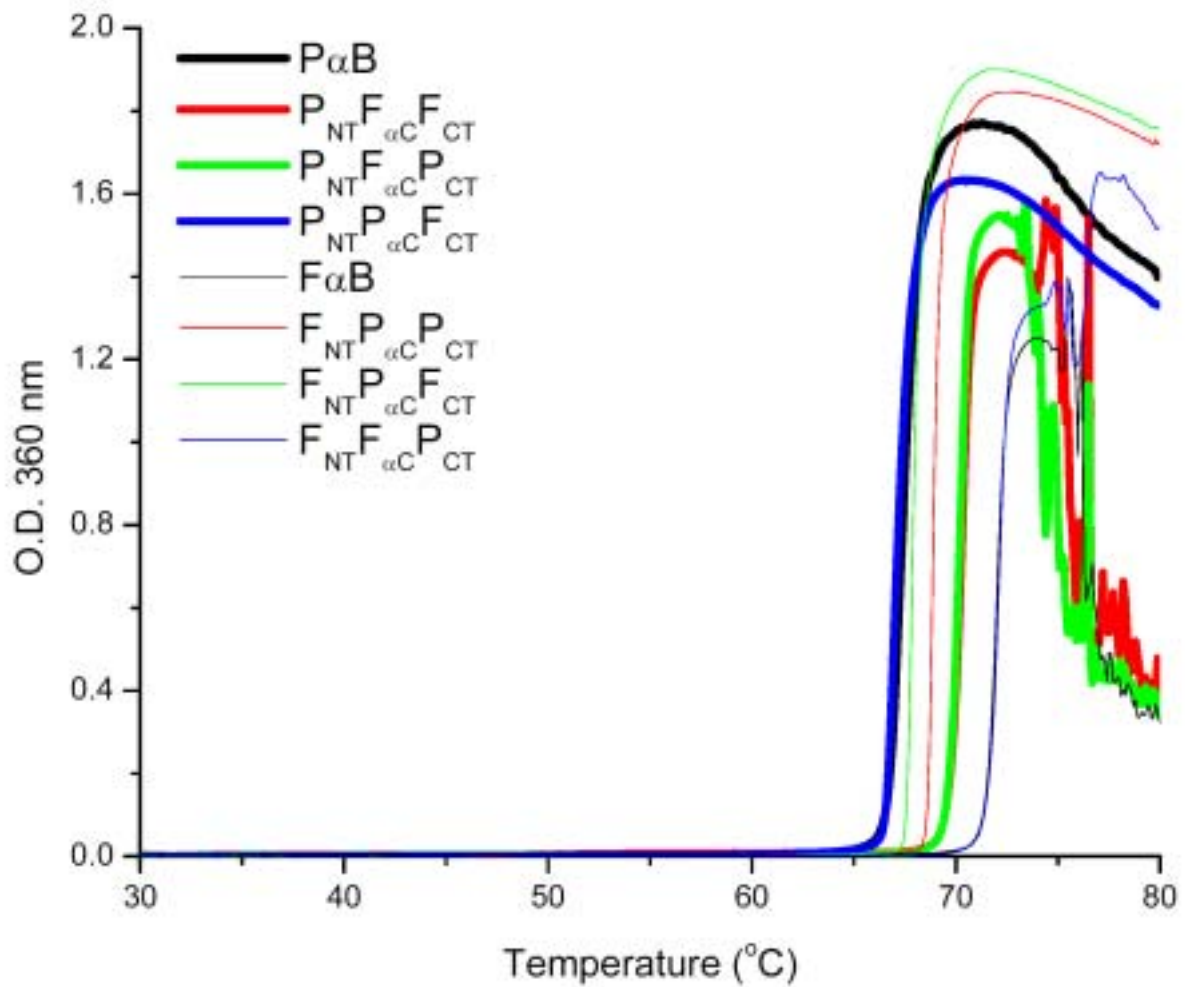


Figure 2: Thermostability of the wild type and chimeras of catfish and porcine  $\alpha$ B-crystallins. Temperatures at 50% precipitation during heating process of the wild type and chimeras of catfish and porcine  $\alpha$ B-crystallins were  $P_{\alpha B}$ , 67.4°C;  $P_{NT}F_{\alpha C}F_{CT}$ , 70.3°C;  $P_{NT}F_{\alpha C}P_{CT}$ , 70.3°C;  $P_{NT}P_{\alpha C}F_{CT}$ , 67°C;  $F_{\alpha B}$ , 72°C;  $F_{NT}P_{\alpha C}P_{CT}$ , 68.9°C;  $F_{NT}P_{\alpha C}F_{CT}$ , 67.9°C;  $F_{NT}F_{\alpha C}P_{CT}$ , 72.1°C. These midpoint temperatures are differentiated from the light-scattering data by Origin 6.0 (Microcal). The protein concentration used in these assay is 0.5 mg/ml.



Figure 3

(A)

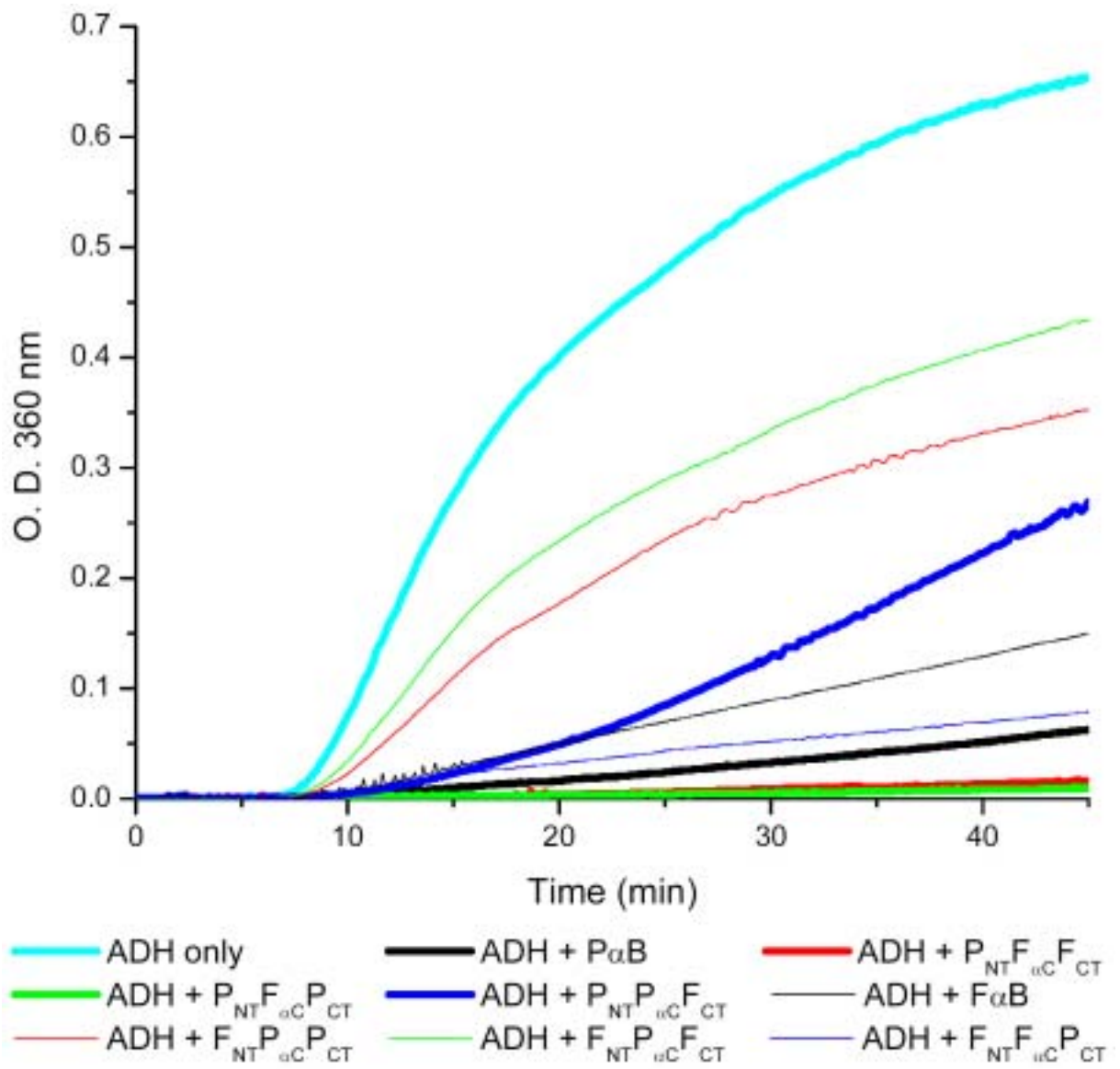


Figure 3 (continued)

(B)

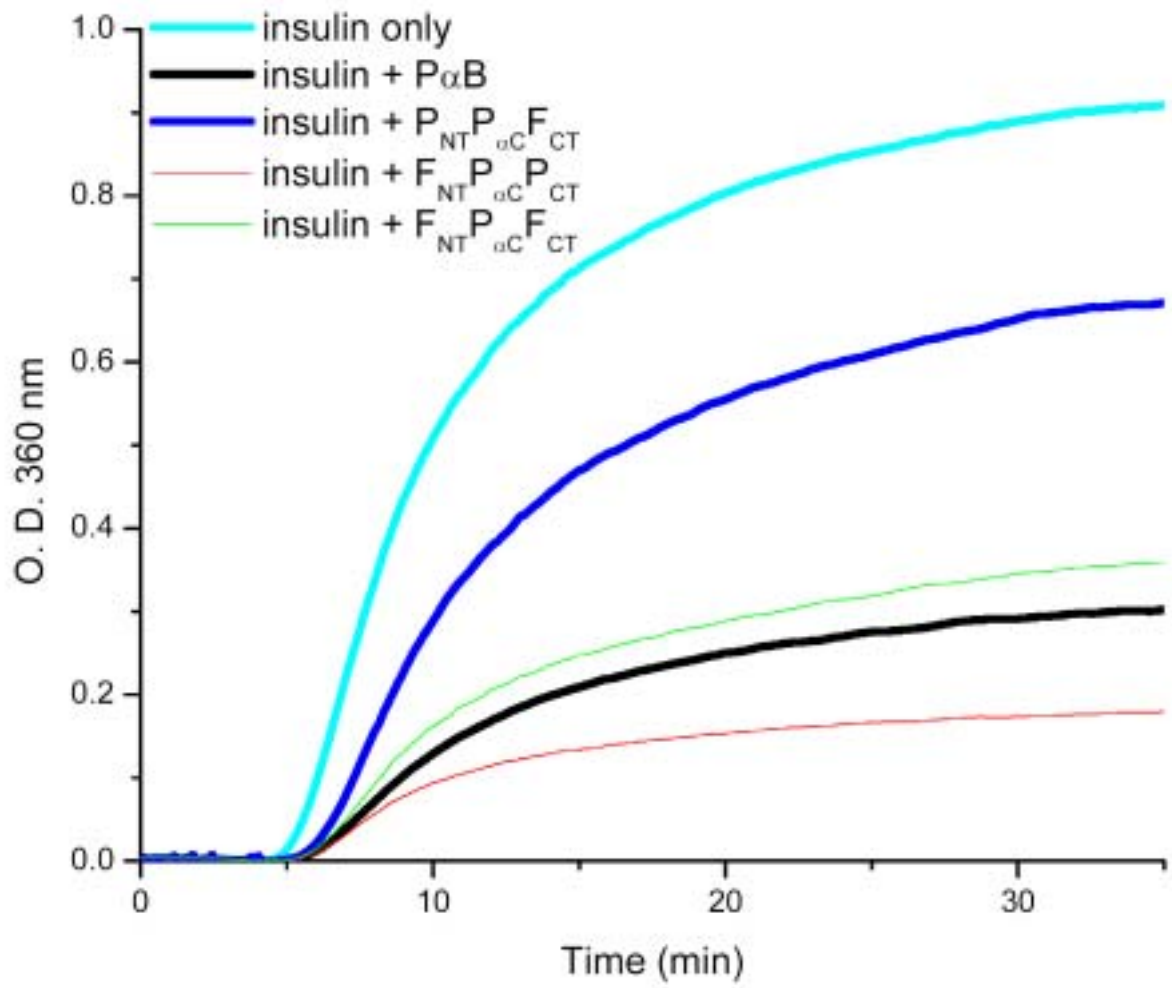


Figure 3 (continued)

(C)

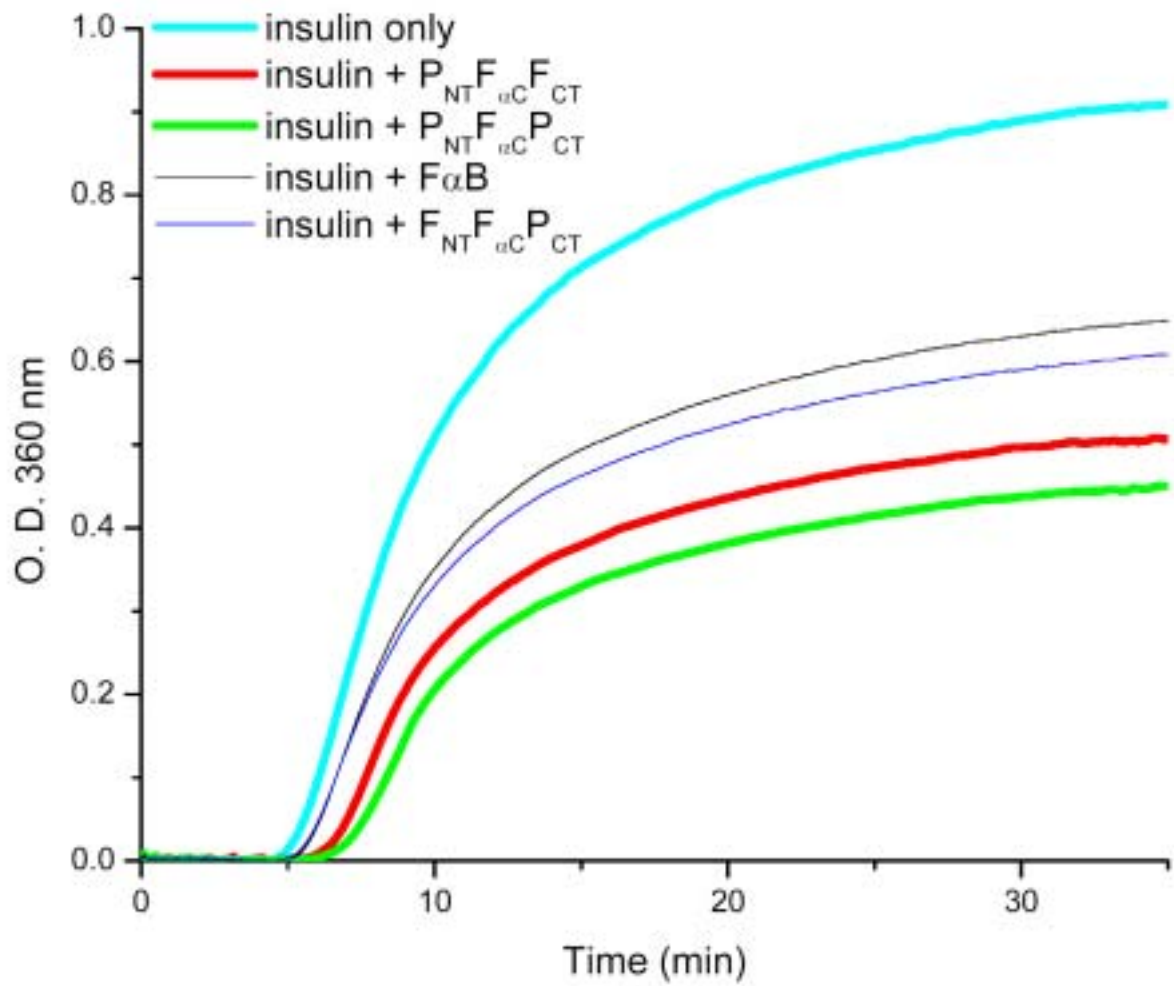


Figure 3: Molecular chaperone activity of wild type and chimeras of catfish and porcine  $\alpha B$ -crystallins. (A) The chaperone activity to prevent heat-induced ADH aggregation in a molar ratio of 8:1 (ADH: $\alpha B$ -crystallin) at 50°C. (B) The chaperone activity to prevent DTT-induced insulin aggregation in a molar ratio of 10.2:1 (insulin: $\alpha B$ -crystallin) at 37°C. (C) The chaperone activity to prevent DTT-induced insulin aggregation in a molar ratio of 40.8:1 (insulin: $\alpha B$ -crystallin) at 37°C.