

草菇毒蛋白A2 晶體之 Br 多波長異常繞射實驗

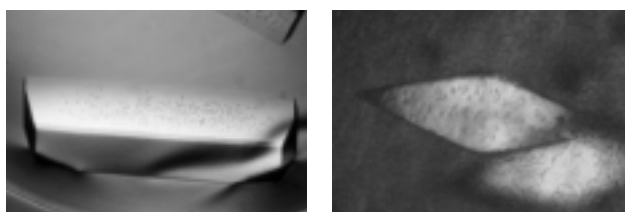
林世昌、廖彥銓 (中央研究院分子生物研究所)

近年來由同步輻射所產生的硬 X 光已在強度與穩定度上有很大的提昇，此硬 X 光配合由液態氮所維持的晶體低溫冷凍設備，與後續相關的結構鑑定軟體，成為鑑定生物大分子晶體結構的強力工具。其最具威力的地方，乃是被應用於多波長異常繞射實驗 (Multiple wavelength Anomalous Diffraction, MAD) 來解決所謂相位的問題 (phase problem)。MAD 實驗是利用晶體內分子中的異常繞射原子或重金屬，在其吸收邊緣 (absorption edge) 附近，精確收集數組不同能量的繞射數據，再經由數據處理分析來尋找這些異常繞射原子或重金屬的位置，以進一步鑑定生物大分子結構^[1]。過去為了得到足夠強大的訊號以供鑑定，常常利用的是有百分之百占有率的異常繞射原子，如 Se，或是較重的原子，如 Au、Pt 等，但是要得到合適的晶體並非十分容易，因為含 Se 的晶體需要先利用大腸桿菌來表現所需含 Se 的蛋白質，再用來生長出含 Se 晶體，必須通過蛋白質表現和純化與晶體養成的兩道難關，而含重原子晶體的獲得又常苦於重金屬化合物對晶體的破壞，甚至化合物不與蛋白質接合反應，兩者在時間與人力的消耗上會成爲一種負擔。隨著硬 X 光品質的提昇與鑑定軟體的改進，現在已經可以利用游離於晶體中的異常繞射原子來取代以往的做法，不但快速而且經濟，這也是本實驗鑑定草菇毒蛋白晶體結構所利用的方法。

草菇毒蛋白 A2 (volvatoxin A2) 爲一種自日常食用草菇所分離之熱不穩定毒蛋白，其大小爲 199 個氨基酸，在實驗室的研究中可發現草菇毒蛋白 A2 的生物毒性可以分爲三類，第一類是對於癌細胞具有細胞毒性，第二類是對紅血球具有溶血毒性，第三類是對心肌細胞造成鈣離子逸失而有心臟毒性^[2,3]，但一般人食用時因加熱與胃中酵素分解的作用下並不具毒性。其在學術上的價值乃在於其產生的毒性的作用模式是藉由在細

胞膜上形成孔洞 (pore-forming) 造成細胞內物質的逸失而殺死細胞，故由其立體結構可推論其在細胞膜上形成孔洞的機制以對孔洞形成毒蛋白的作用方式有更進一步的了解，並且對於目前尚不清楚的膜蛋白嵌入細胞膜的機制提供一個研究的方向。

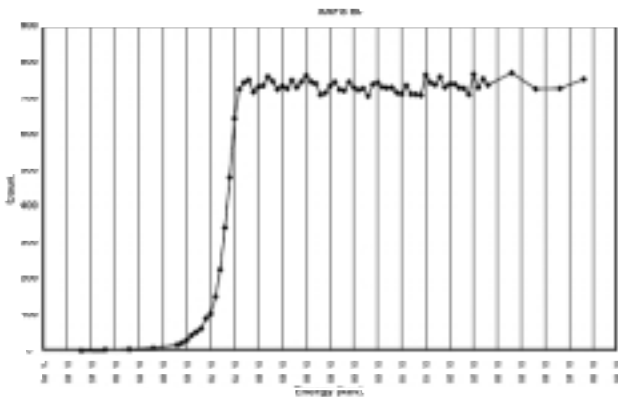
本實驗室已於 1996 年便得到草菇毒蛋白 A2 的單斜晶系晶體，空間群爲 $C2^{[4]}$ ，晶體外觀如圖一左所示，並利用實驗室的光源與各種不同重金屬衍生物，嘗試以多重同形置換法 (Multiple Isomorphous Replacement, MIR) 的方法來鑑定結構，其解析度約爲 2.20 Å，但是卻一直得不到可以解決相位問題的晶體。目前由鑑定出的草菇毒蛋白 A2 的結構回去檢視當時的數據，發現此晶體有兩個特性會使得以 MIR 方式鑑定結構相當困難，第一點是草菇毒蛋白 A2 在此晶體中具有獨特的非結晶學對稱軸 (non-crystallographic symmetry)，並且此軸在 Patterson map 所造成的 Harker section，其強度已經大到足以影響一般結構鑑定軟體的分析。第二點是由於此晶體中一個不對稱單元體 (asymmetric unit) 中含有四個蛋白質分子，其聚合 (packing) 是以類似形成一對 dimer 的方式排列，而 dimer 之間聚合的位置在不同晶體間又不盡相同，造成不同晶體間的非同晶形 (non-isomorphous) 效應，此效應會掩蓋了 MIR 方法中重金屬原子所造成的訊號。因此雖然投入相當多的時間與人力，依然無法以 MIR 的方法鑑定草菇毒蛋白 A2 的結構。



圖一 草菇毒蛋白 A2 晶體，左為單斜晶系晶體，右為正方晶系晶體。

表一 草菇毒蛋白A2 正方晶系晶體與單斜晶系晶體Br-MAD 實驗繞射數據之統計結果

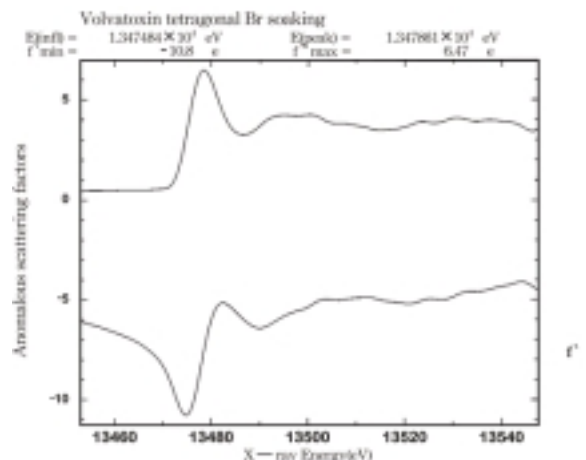
Crystal	Tetragonal			Monoclinic		
Wavelength	0.9070Å	0.9199 Å	0.9201 Å	0.9070Å	0.9199Å	0.9201Å
Unit cell	a=b=56.43, c=265.27 Å			a=154.41, b=57.59c=113.31Åbeta=119.60°		
Mosaicity	0.942	0.912	0.921	0.466	0.469	0.473
Resolution:	2.6 Å	2.6 Å	2.6 Å	2.2	2.2	2.2
Completeness						
Average	99.9%	99.9%	99.9%	93.1%	91.2%	90.9%
Outermost	100.0%	100.0%	100%	61.9%	55.6%	55.4%
I/Sigma(I):						
Average	9.6	9.9	10.8	11.5	13.0	14.8
Outermost	3.9	4.0	4.9	7.8	8.9	11.4
Rmerge:						
Average	10.3%	9.8%	8.6%	8.0%	8.0%	6.9%
Outermost	53.6%	46.0%	37.7%	17.2%	14.7%	11.5%
Chi2:						
Average	1.060	1.069	1.094	0.998	1.001	1.000
Outermost	1.021	1.020	1.015	0.913	1.004	1.003



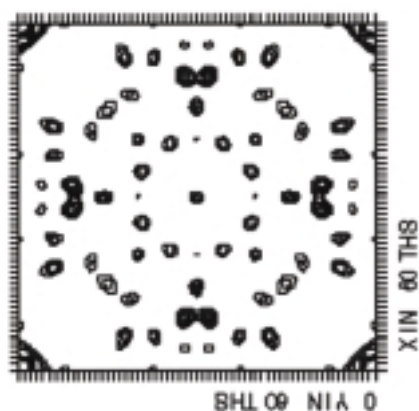
圖二 以NaBr 溶液當作樣品掃描Br 的吸收邊緣圖譜

隨著MAD 方法逐漸成爲蛋白質構造的主流時，本實驗室也探討利用此法來鑑定草菇毒蛋白A2 的結構的可行性，若同前面所提利用Se 來作爲異常繞射原子，則草菇毒蛋白A2 有兩種性質使此方式不可行，一爲草菇毒蛋白A2 會殺死大腸桿菌等表現系統，使其無法得到所需的含Se 蛋白質，另一爲草菇毒蛋白A2 只有一個 methionine 可供Se 置換，對於解決相位的問題是不足夠的。雖然在同時也有科學家提出利用蛋白質中所含的硫原子來進行MAD 實驗，同樣的，草菇毒蛋白A2 只有一個硫原子，無法解決相位的問題。直到以鹵化物的Br 或I 來作爲異常繞射原子，草菇毒蛋白A2 的結構鑑定問題才獲得了解決。

以鹵化物來進行MAD 實驗的做法相當簡單，只需將晶體浸泡於含0.5~1.0M 的鹵化物如NaBr 或NaI 溶液中，需時約1 分鐘後即完成置備晶體的動作^[5]，所需的人力時間成本相對來說降低不少，並且對大部分的蛋白質均可使用，無特別的限制。本實驗是利用Br 來當作異常繞射原子，其K 吸收邊緣是位於0.920Å，使用的晶體除前面所述的單斜晶系晶體外，尚有新得到的正方晶系晶體(見圖一右)，置備好的晶體是以低溫冷凍運送至日本SPring-8，使用BL38B1 來收集數據，首先以NaBr 溶液當作樣品來掃描Br 的吸收邊緣，所得圖譜見圖二，此數據可經由



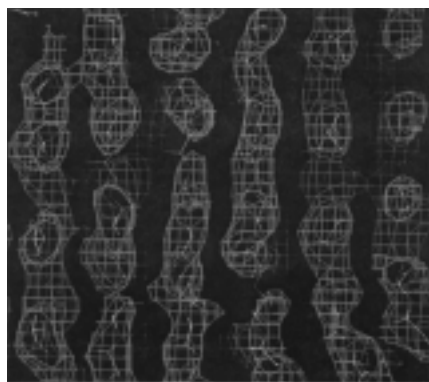
圖三 經CHOOCH 所算出Br 的f 與f'' 圖譜



圖四 草菇毒蛋白 A2 之 Anomalous Patterson map，可見由 Br 所造成的 Harker sections。

CHOOCH 軟體繪出 Br 的 f 與 f'' 圖譜(見圖三)^[6]，根據此圖譜選擇三個波長 0.9070 \AA ， 0.9199 \AA 與 0.9201 \AA 分別做為偏離吸收邊緣(remote)， f'' 最大值與 f' 最小值三組數據所用。其中單斜晶系的晶體可繞射至 1.9 \AA ，但限於偵測器 ADSC quantum 4 的面積，只能收集到 2.2 \AA 的數據，其繞射圖譜見圖四，正方晶系的晶體則只繞射至 2.6 \AA ，其繞射圖譜見圖五，數據統計表見表一。

所收集的數據經由 HKL 程式處理後，交由 SOLVE/RESOLVE 程式運算^[7,8]，其中於正方晶系晶體數據找出三個 Br 的主要佔據位置與三個次要的佔據位置，並確定其空間群為 $P4_122$ ，其 Anomalous Patterson map 見圖四，根據此六個 Br 所算出的最初電子密度圖見圖五，從此電子密度圖中可以看出蛋白質二級結構中 β -strand 排列的特徵，本實驗室就是依據此密度圖將草菇毒蛋白 A2 的立體結構建造出來(見圖六)，但是於單斜晶



圖五 草菇毒蛋白 A2 之起始 MAD map，可見一群二級結構 β -strand 的直條狀特徵。



圖六 草菇毒蛋白 A2 之立體結構

系晶體的數據中，雖然可以找到 Br 佔據的位置，但是所得資訊尚不足以直接鑑定出結構，最後是以分子置換法將結構鑑定出來。

草菇毒蛋白 A2 晶體之 Br-MAD 實驗顯示了鹵素化合物用於 MAD 的便利性與實用性，可以大幅縮短鑑定所需的時間與減少人力的耗損，只要有適當的同步輻射光源配合，此法在目前後基因體時代(post-genomic era)，與隨之而來的蛋白質體時代(proteomic era)所要面對的龐大數量之大分子立體結構鑑定需求，提供了一個良好的工具，盼望國內的同步輻射設施能趕上此一時代的潮流。

本實驗感謝 SPring-8 森山英明博士與 SRRC 湯茂竹博士的協助以及 SRRC 對旅費的補助。

參考文獻

- [1] W. A. Hendrickson, Science **254**, 51 (1991).
- [2] J.-Y. Lin, T.-W. Jen, C.-C. Chen, G.-Y. Shi, T.-C. Tung, Nature (London) **246**, 524 (1973).
- [3] J.-Y. Lin, Y.-J. Lin, C.-C. Chen, H.-L. Wu, G.-Y. Shi, T.-W. Jeng, Nature (London) **253**, 235 (1974).
- [4] S.-C. Lin, J.-Y. Lin, Y.-C. Liaw, PROTEINS **24**, 141 (1996).
- [5] Z. Dauter, M. Dauter and K.R. Rajashankar, Acta Cryst. **D56**, 232 (2000).
- [6] G. Evans and R.F. Pettifer, J. Appl. Cryst. **34**, 82 (2001).
- [7] T. C. Terwilliger, J. Berendzen, Acta. Cryst. **D55**, 849 (1999).
- [8] T. C. Terwilliger, Acta. Cryst. **D57**, 1763 (2001).