

第六章

蛋白質於細胞內之分布

Distributions of Cellular Proteins

錢宗良

台大醫學院 解剖學暨細胞生物學研究所 副教授

一、前言

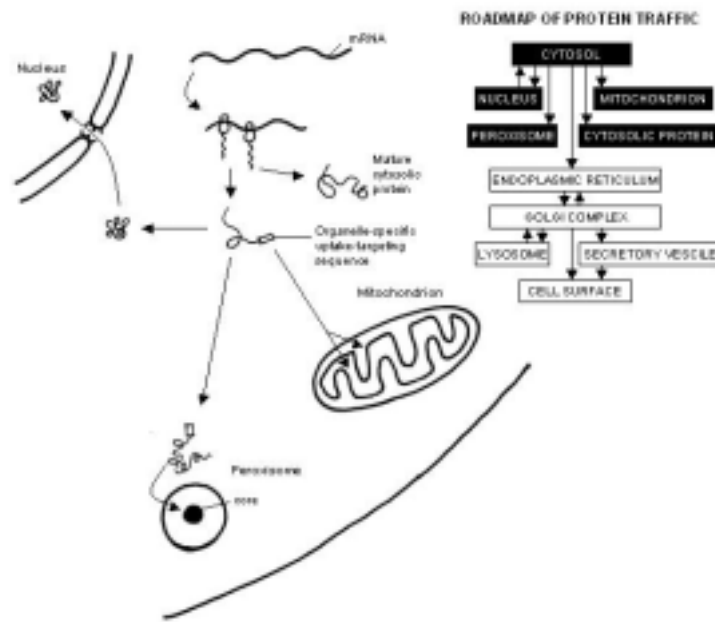
由於後基因體時代的來臨，新發現且具有功能的基因產物蛋白質在細胞中的分布，即成為近日研究的重要課題。特殊蛋白質從細胞、組織、乃至於生命個體中的生理功能，常可由其在細胞中的生成與分布而推斷得知。本章節將就細胞胞器類別，分別介紹蛋白質在各胞器分布的可能機制。並介紹一些目前研究蛋白質的常用細胞生物學方法，以期運用在基因體學研究，奠定並釐清功能性蛋白質的學理基礎。

二、功能性蛋白質的分布

1. 細胞核 (Nucleus)

大多數的核內功能性蛋白質由細胞質中的核糖體合成再運送至細胞核中，如調控細胞基因表現的轉錄因子 (transcriptional factors)。這些新合成的蛋白質可因蛋白種類不同，而經由許多種不同的訊息傳遞機制調控，最終將蛋白質送入細胞核中並發揮功效⁽¹⁾。目前已知許多核內功能性蛋白質在其胺基酸序列上均具有一段特殊的訊息序列如 -Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-，稱為核定位訊號 (Nuclear Location Signal, NLS)^(2,3)。因此，如果在新發現的蛋白質中，藉由序列比對找到此 NLS 訊息序列，即可推斷此蛋白質合成後可能會被送入細胞核中 (圖一)。此分布機制只是針對較大分子的蛋白質，這些蛋白質需要靠核輸入接受器 (nuclear import receptors) 來辨識 NLS 訊息序列，進而與特殊運送蛋白 (cargo proteins) 結合，藉由主動運輸 (active transport) 將其穿過核孔 (nuclear pores) 而送入細胞核中。對於一些較小分子的蛋白質，則不需要具備此 NLS 訊息序列與特殊運送蛋白，可藉由擴散或是其他運送機制穿過核孔而送入細胞核中。基本上，蛋白分子大於 60,000 daltons 即不太可能藉由擴散自行穿過核孔而進入細胞核中；對於較小分子的蛋白質的擴散，如 5,000 daltons 以下的蛋白質，核孔是完全通透的⁽⁴⁾。為瞭解新發現的蛋白質是否真能送入細胞核中，可藉由細胞轉染實驗 (cell transfections) 或免疫細胞化學 (immunocytochemistry) 染色 (如果有很好的專一性抗體)，再與 DNA 特殊染色如 DAPI (激發光譜約為 359 nm；與 DNA 接合後釋放光譜約為 461 nm) 或是 Hoechst 33342

(激發光譜約為 343 nm；與 DNA 接合後釋放光譜約為 483 nm) 等染色來做對比，即可確定標示蛋白質是否在細胞核中⁽⁵⁾ (圖三)。



圖一、細胞質內的蛋白質合成運送途徑。蛋白質在細胞質內經多核糖體合成後，可依蛋白質所含不同訊息序列，分送入細胞核、粒線體或過氧化 體中。

2. 粒線體 (Mitochondria)

粒線體的蛋白質合成除了少部份由粒線體自身基因體 (mitochondrial genome)轉錄、轉譯而成外，大部份的蛋白質仍由細胞核的功能基因表現訊息 RNA (mRNA)，藉由細胞質中的核糖體合成蛋白質後再運送至粒線體內膜或基質(matrix)中⁽⁶⁾ (圖一)。如同核蛋白，粒線體的蛋白質亦具有特殊的訊息序列 (signal sequence) 供粒線体外膜上的特殊接受器辨識，這訊息序列多在蛋白質的胺基端 (N-terminus)：

+H₃N –Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-，而這序列常構成 α -helix 螺旋結構供粒線体外膜上的接受器辨識，進而藉由位於粒線體內膜上的三種不同的蛋白質轉置者 (protein translocators) 運送至粒線體基質或嵌合在內膜中⁽⁶⁾。

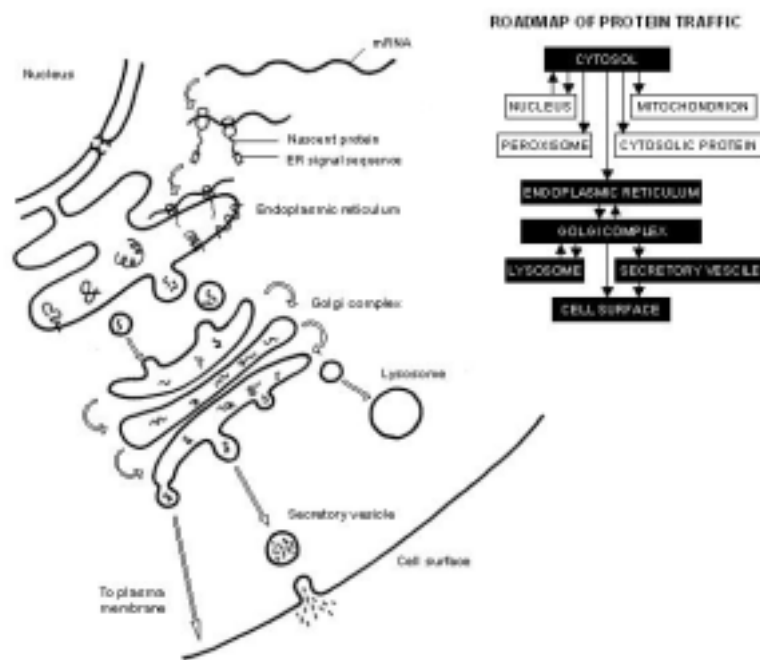
這運送的過程非常複雜，基本上需要 ATP 能量，與特殊的熱誘蛋白 70 (heat shock protein, hsp 70)參與。而訊息序列在蛋白質被送入粒線體後，立即被特殊的訊息 (signal peptidase) 切離分解⁽⁷⁾。

利用免疫細胞化學染色標示細胞內粒線體分布位置時，常用粒線體特有蛋白質的抗體，如細胞色素 c 氧化 (cytochrome c oxidase) 等參與粒線體能量代謝的蛋白質的抗體。然而亦可利用一些對於粒線體呼吸膜電位變化非常敏感的螢光化學物，如 rhodamine 123 (激發光譜約為 504 nm；釋放光譜約為 534 nm)來標示活細胞中的粒線體分布位置。另外，也有一些經過改良的螢光染劑如 Mito Tracker dyes (Molecular Probes)等，可染完活細

胞後再將細胞固定(fixed)，仍然可以觀察到染上的粒線體螢光(圖三)。當然這些螢光化學物的濃度不能太高 (小於 1 mM)，否則將造成粒線體的傷害⁽⁵⁾。

3. 顆粒性內質網 (rER)

細胞中許多與細胞膜相關的蛋白質或是分泌至細胞外的部分蛋白質，其合成與轉譯後修飾 (post-translational modifications) 主要均在顆粒性內質網 (rough endoplasmic reticulum, rER) 與高爾基氏體 (Golgi apparatus) (圖二)。而顆粒性內質網與高爾基氏體內的蛋白質常常有動態的變化，因此欲定位新發現的蛋白質是否只限於顆粒性內質網或高爾基氏體內，就比較不容易界定。然而在蛋白質的胺基端 (N-terminus) 起始訊息序列若具備： $+H_3N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-$ 內質網訊息序列，蛋白質即可被運送至內質網腔 (ER lumen) 或嵌合在內質網膜上⁽⁸⁾。大抵上蛋白質在內質網經一些修飾，如醣化作用 (glycosylation) 後，再送往高爾基氏體⁽⁹⁾。



圖二、內質網內合成蛋白質的運送途徑。蛋白質在內質網合成及在高爾基氏體修飾後，可分別送至溶體 (lysosome)、分泌小泡 (secretory vesicles) 及細胞膜 (plasma membrane)。

嘗試利用免疫細胞化學染色來標示出在細胞內顆粒性內質網新合成的蛋白質，有許多技術上的考量，例如抗體的辨識區段是否有經修飾？假若專一抗體的辨識區段是屬未經修飾的胺基酸序列，則可能無法在細胞中正確標示經過轉譯後修飾的最終蛋白質產物。抗原決定基 (epitope) 是在內質網腔或在內質網膜上？而假若抗原決定基的蛋白質是屬於在內質網腔內的

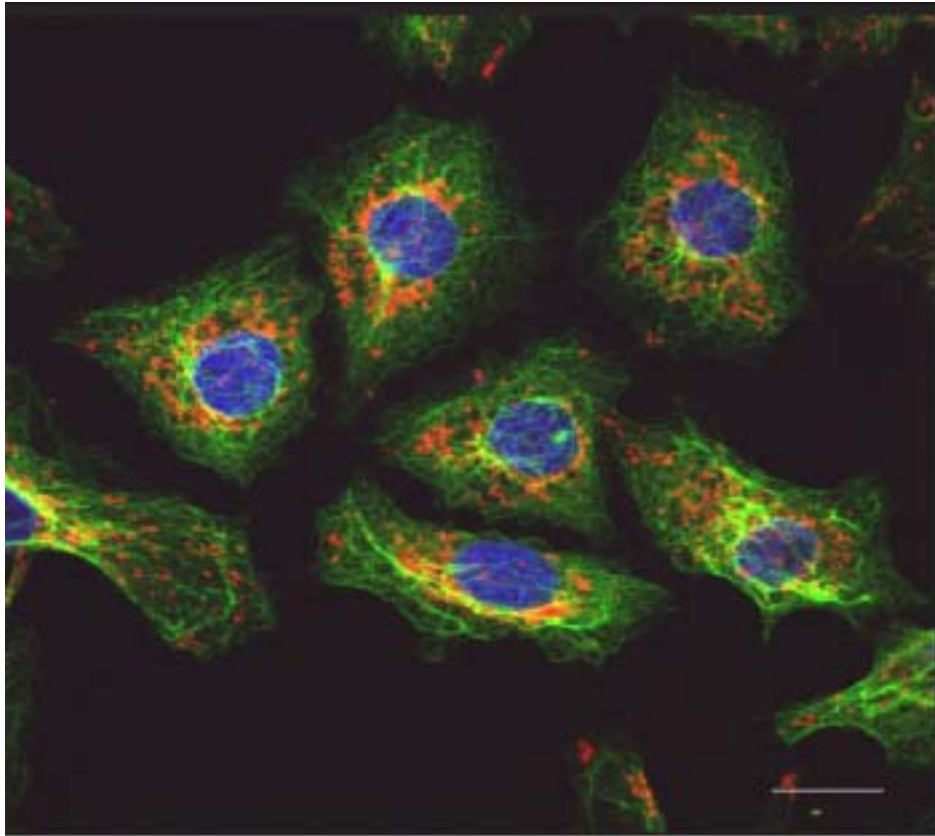
分泌性蛋白質，則可能轉置到高爾基氏體並形成分泌小泡(secretory vesicles)後，再與細胞膜融合而排放至細胞外。相對的，抗原決定基的蛋白質若嵌合在內質網膜上，則可能在與其他膜性胞器 (membranous organelles) 融合後仍共同存在於各種胞器膜的結構中。綜合釐清相關技術上的問題，再來做專一染色定位就較為可靠。當然如同粒線體一般，有一些具有螢光的物質可用來標定活細胞中的內質網，例如 DiO-C₆(3) (分子量 573 daltons) 螢光物質 (激發光譜約為 484 nm；釋放光譜約為 501 nm)⁽⁵⁾。然而 DiO-C₆(3) 亦會標示粒線體，導致其專一性不足。近來廠商研發出一種 ER Tracker Blue-White DPX 染劑 (Molecular Probes)，其激發光譜約為 374 nm；釋放光譜可在 430 nm 到 640nm 之間，較 DiO-C₆(3) 更具 ER 專一性，可供標示活細胞中內質網的分布(圖四)。

4. 高爾基氏體 (Golgi apparatus)

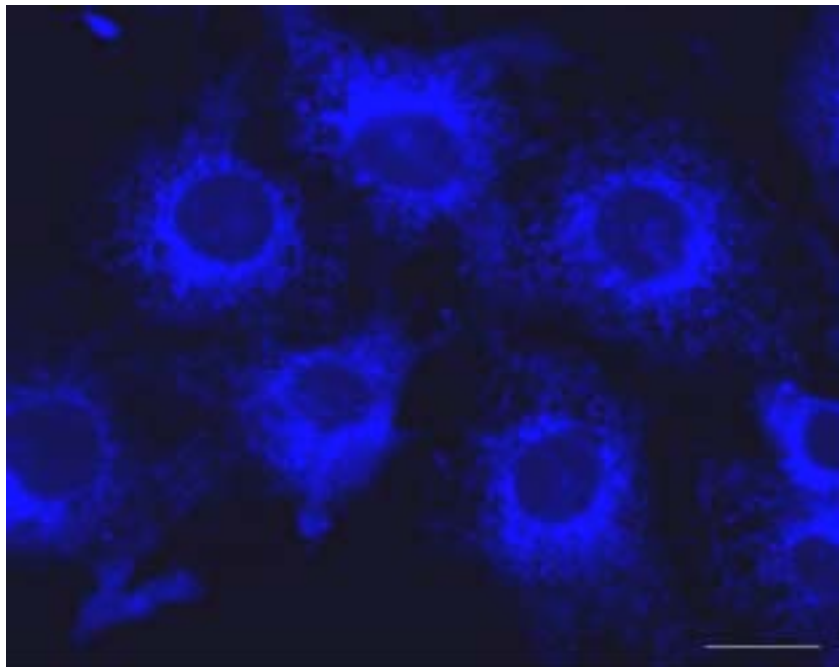
高爾基氏體形態較為特殊，一般而言是由數層盤狀膜囊構成，較靠近細胞核。蛋白質在高爾基氏體的修飾作用相當複雜，依其可能的轉置胞器的不同，就有不同功能性的分類修飾。大抵上高爾基氏體轉置出去可到溶體 (lysosome)、分泌小泡(secretory vesicles)及細胞膜(plasma membrane) (圖二)。而高爾基氏體在細胞內的結構是與內質網相連接的，與內質網相連最近的部份稱為順式高爾基氏網 (*cis* Golgi network)，相對的較為遠端的結構則稱為反式高爾基氏網 (*trans* Golgi network)。從內質網往反式高爾基氏網方向，膜內腔的 pH 梯度越來越小，內含蛋白質的周遭酸性程度因而增加⁽¹⁰⁾。因此，利用組織化學染色(histochemical stains)即可區分出不同的高爾基氏體區間，例如酸性磷酸 (acid phosphatase) 會在反式高爾基氏網 (*trans* Golgi network)，只要加入酸性磷酸 的呈色受質即可染色定位。當然，在溶體中亦有酸性磷酸 的存在。欲在細胞中單純地定位完整的高爾基氏體，則可利用高爾基氏體修飾蛋白質時的加成作用，即加入含醯基鞘氨醇(ceramide) 受質的螢光化學物，如 BODIPY-FL-ceramide (M.W. 576)(Molecular Probes) 來標示活細胞的高爾基氏體(圖五)。BODIPY-FL-ceramide，其激發光譜約為 464 nm；釋放光譜約為 532 nm⁽⁵⁾。

5. 溶體 (Lysosome)

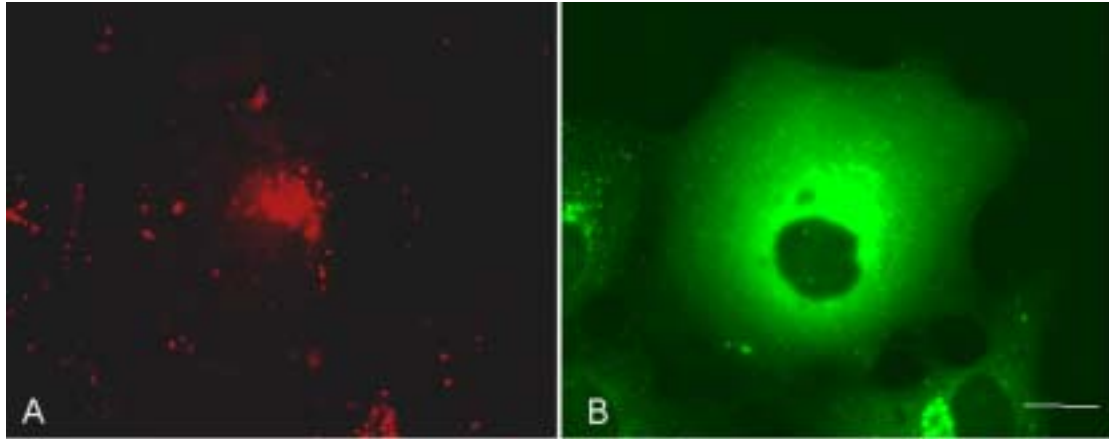
細胞內的溶體大小與形狀會因細胞生理情況不同而異。由於確知在溶體中含有數十種酸性水解 (acid hydrolases)⁽¹¹⁾。因此可利用溶體內在酸性環境的特性，來標示細胞內溶體，如化學螢光染劑 Neutral red 及 acridine orange 等。以 Neutral red 而言，染活細胞的酸性胞器包括溶體的結果，很容易觀察，其激發光譜約為 541 nm；釋放光譜約為 640 nm⁽⁵⁾。然而這兩種化學螢光染劑均不具備溶體專一性，因此廠商利用另一種化學物 N-(3-[2,4-dinitrophenyl-amino]propyl)-N-(3-aminopropyl) methylamine (DAMP)，將之修飾裝接不同螢光光譜染劑而設計出 LysoTracker 及 LysoSensor probes (Molecular Probes)，可更精確地標示不同酸性的溶體(圖六)。



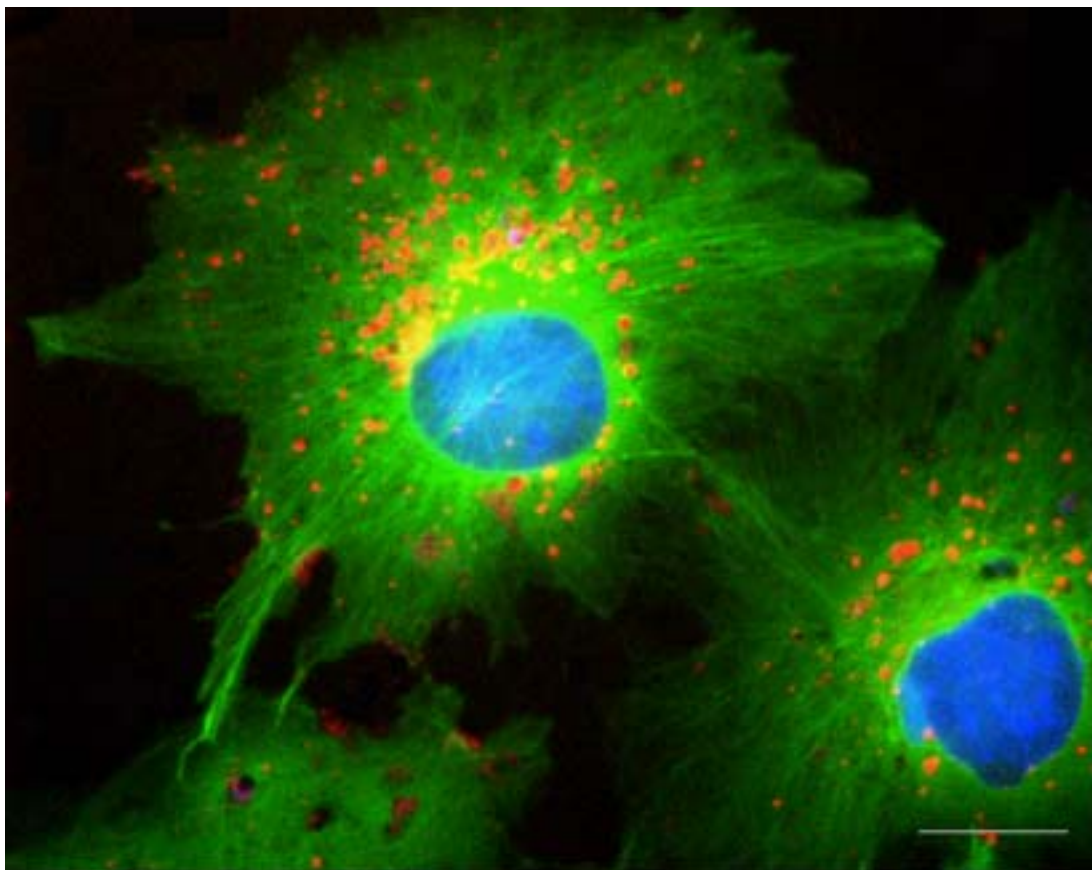
圖三、膀胱癌 T24 細胞螢光染色。Hoechst 33342 標示細胞核呈藍色，在細胞質中 MitoTracker 標示粒線體呈紅色，Keratin 18 中間絲蛋白則呈綠色絲狀分布。(Scale bar = 20 μm)



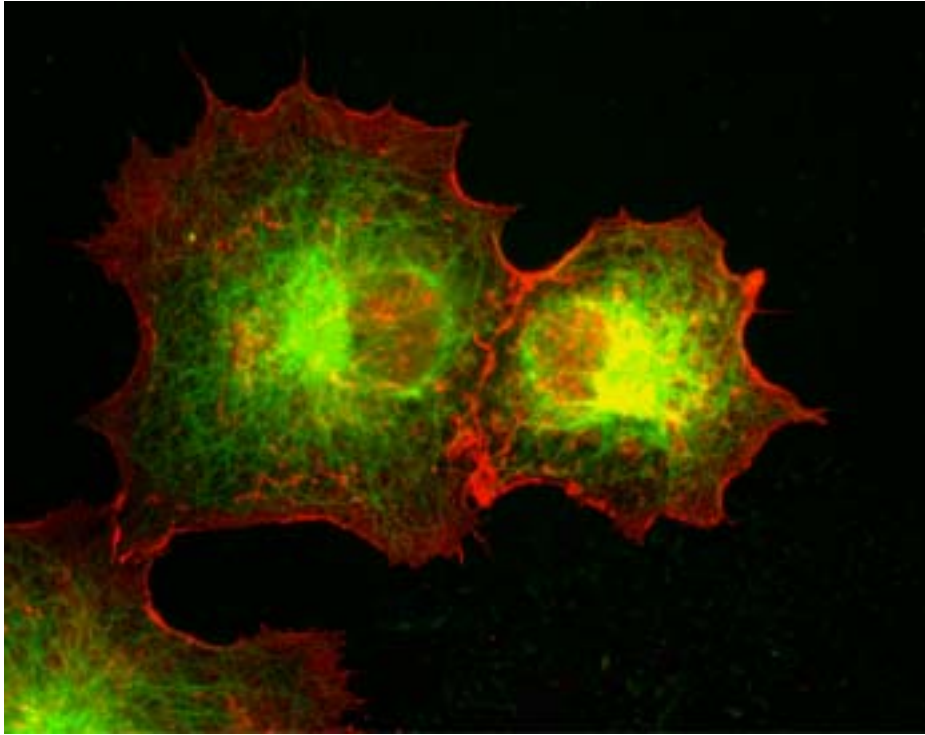
圖四、COS7 活細胞的內質網染色。ER Tracker Blue-White DPX 標示散布在細胞質中的內質網。(Scale bar = 20 μm)



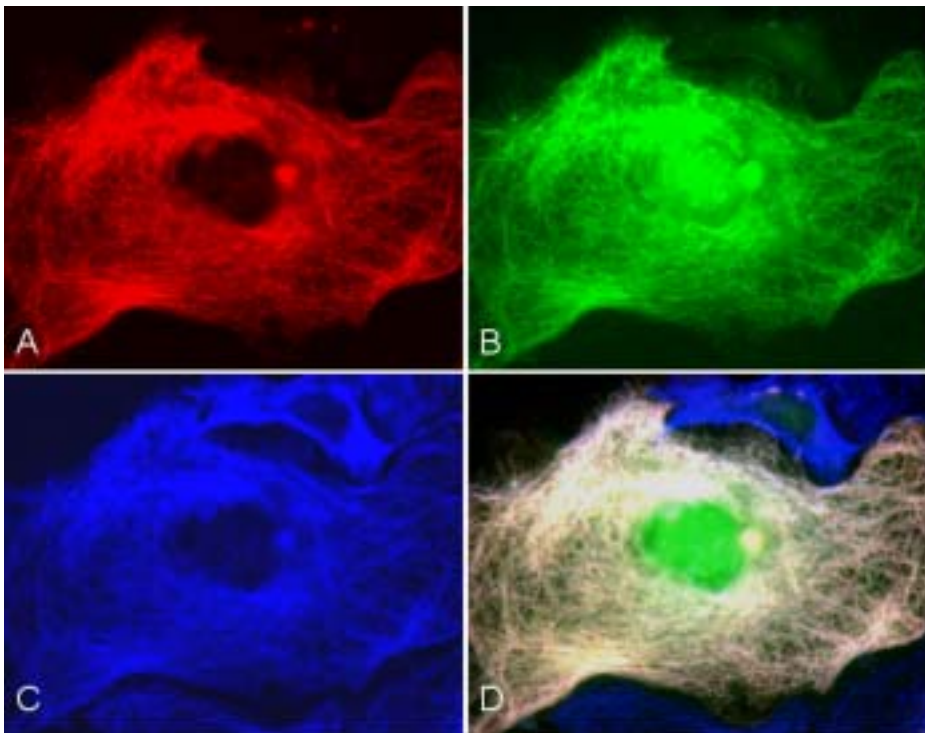
圖五、表現綠色螢光蛋白質 (GFP) 的 COS7 活細胞的高爾基氏體染色。BODIPY-FL-ceramide 標示分布在核周圍的高爾基氏體(A)，GFP 自體螢光散布在細胞質 (B)。(Scale bar = 20 μm)



圖六、表現 YFP-EB1 的 COS7 活細胞。以 Hoechst 33342 標示細胞核呈藍色。在細胞質 LysoTracker 標示溶 體呈紅色，而 YFP-EB1 蛋白質則與微小管接合呈現綠色絲狀分布。(Scale bar = 20 μm)



圖七、COS7 細胞骨架的螢光染色。綠色免疫螢光染色標示微小管，與紅色 Rhodamine Phalloidin 標示肌動蛋白。(Scale bar = 20 μm)



圖八 經紫杉醇處理後的 COS7 細胞螢光形態。細胞經固定後，紅色微小管相關蛋白 MAP1A 重鏈(DsRed-HC, A)與綠色 MAP1A 輕鏈(GFP-LC, B)仍然存在。再以藍色 AMCA 免疫螢光標示微小管(C)。細胞內的微小管和微小管相關蛋白 MAP1A 均受紫杉醇的作用，而產生束狀的聚集(D)。(Scale bar = 20 μm)

6. 過氧化 體 (Peroxisome)

在蛋白質的羧基端 (C-terminus) 若具備訊息序列: -Ser-Lys-Leu-COO⁻ 即有可能被運送至過氧化 體(圖一)。已知許多氧化 (oxidative enzymes)如 catalase 及 urate oxidase 均大量聚集在過氧化 體中。經由過氧化 體內作用, 過氧化氫(hydrogen peroxide)的釋放, 進而分解或氧化細胞質內的有害物質, 如: 醛類(aldehyde)及酚類(phenol)⁽¹²⁾。目前過氧化 體的功能仍有許多未知, 然而藉由已知的過氧化 體酵素蛋白質的抗體, 仍可以免疫細胞化學染色的方法, 定位出過氧化 體在細胞內的分布。

7. 細胞骨架蛋白 (Cytoskeletons)

大多數構成細胞骨架的蛋白質及相關的蛋白質是由細胞質中的多核醣體 (polyribosome)合成後, 藉由特殊的運送蛋白轉置到細胞各部位。細胞骨架蛋白基本上均需聚合成多分子結構才能構成所謂的“細胞骨架”。根據聚合而成的絲狀粗細大略可分為三類⁽¹³⁾ :

(a) 微小絲 (Microfilaments) : 細胞微小絲的主要成份為肌動蛋白(actin), 而會與肌動蛋白直接或間接接合的蛋白質不下數十種。為探討新發現的蛋白質是否會與肌動蛋白作用或接合, 首先就必須將成為絲狀的肌動蛋白(F-actin)標示出來。最常用來標示絲狀肌動蛋白的化學物就是 phallotoxins 中的 phalloidin, 因為 phallotoxins 對於絲狀肌動蛋白具有非常高的親和性。因此, 只要將具有螢光的染劑 (如 Rhodamine ; 激發光譜約為 495 nm ; 釋放光譜約為 520 nm)先接合在 phalloidin 上, 然後再來染細胞, 細胞內絲狀的肌動蛋白均可被染出⁽⁵⁾(圖七)。

(b)中間絲蛋白(Intermediate filaments) : 細胞中間絲蛋白聚合成多分子結構後, 其絲狀結構直徑約 10 nm。組成中間絲蛋白的蛋白質大抵會依不同組織的分布而有所區別⁽¹⁴⁾, 例如在上皮組織細胞即表達以角質蛋白(keratins)為主的中間絲蛋白(圖二); 中胚層衍生的結締組織則以 vimentin 中間絲蛋白為主, 而肌肉組織含 desmin 中間絲蛋白; 神經組織亦含有其特殊的神經元中間絲蛋白。因此, 要探討新發現的蛋白質是否會與中間絲蛋白作用或接合, 先初步瞭解此蛋白質在何種組織或細胞表現, 再選用具組織特性的中間絲蛋白的抗體, 即可探討新蛋白質的定性與定位⁽¹⁵⁾。

(c) 微小管(Microtubule) : 細胞中有許多由微管素(tubulin) 聚合成多分子結構的微小管結構, 其絲狀結構直徑約 23 nm。細胞有絲分裂的紡錘絲(mitotic spindle) 亦是由微小管所構成。就因為微小管參與許多細胞生理的動態變化, 因此標示微管素的化學物質可能直接影響細胞的正常生理功能。目前常用來標示微小管的紫杉醇 Paclitaxel (Taxol), 即有穩定微小管的功能, 導致細胞無法形成正常地有絲分裂紡錘絲, 也因此紫杉醇可用來治療部分癌症, 抑制癌細胞的增殖⁽¹⁶⁾。利用紫杉醇與微管素的高親和性, 將具有螢光的染劑(如 FITC)先接合在 Paclitaxel 上, 再用來染細胞, 就可染出細胞內絲狀的微小管

結構。一般培養的細胞經由紫杉醇處理，其微小管會聚集成絲束狀結構，藉由微管素抗體標示可明顯觀察到細胞微小管的變化 (圖八)。

三、利用活體螢光蛋白標示功能性蛋白質之動態及相對分布

人類基因體定序已接近完成。許多蛋白質可藉由已知的序列推斷其在細胞中可能的位置，然而為了進一步確認蛋白質的生成與運送途徑等動態變化，利用活體螢光蛋白標示蛋白質已成為今日細胞生物學重要的研究方向。

目前常被廣泛運用的綠色螢光蛋白(Green Fluorescence Protein, GFP)，原本來自水母(Jellyfish, *Aequorea victoria*)的活體螢光蛋白，經由基因突變改良處理後，此綠色螢光蛋白基因可轉殖進入哺乳類細胞，產生強而穩定的螢光(其激發光譜約為 488 nm；釋放光譜約為 507 nm) (圖五)^(17, 18)。利用基因重組，可將綠色螢光蛋白基因銜接在欲探討的標的基因(target gene)的前面或後面，轉譯出標的蛋白質與綠色螢光蛋白之融合蛋白(fusion protein) (圖八)。如此，就如同在標的蛋白貼上一個綠色螢光標籤，可在不同的細胞或組織，甚至動物個體中，追蹤標的蛋白在細胞、組織，或是在個體表現與動態變化。

除了被廣泛運用的綠色螢光蛋白外，1999 年又從海葵(*Discosoma striata*)中找到紅色螢光蛋白，生技公司將它經由基因突變改良修飾，命名為 DsRed (BD Biosciences, Clontech)⁽¹⁹⁾。此紅色螢光蛋白基因亦可轉殖進入哺乳類細胞，進而產生強而穩定的紅色螢光 (其激發光譜約為 558 nm；釋放光譜約為 583 nm) (圖八)。然而，經過多人實驗證實 DsRed 蛋白很容易將原該在細胞質表現的融合蛋白送進細胞核中，因此 Clontech 生技公司在 2001 年改良修飾紅色螢光蛋白基因，命名為 DsRed2。而此改良修飾過的紅色螢光蛋白 DsRed 2 比較不會因為過量表現，而將融合蛋白送進細胞核中。此外，一些變異螢光蛋白，如：黃綠色的黃螢光蛋白 (Yellow Fluorescence Protein, YFP；激發光譜約為 513 nm；釋放光譜約為 527 nm) (圖六)、青藍螢光蛋白 (Cyanine Fluorescence Protein, CFP；激發光譜約為 433 nm；釋放光譜約為 475 nm)，均如同綠色螢光蛋白，可運用在標示不同的蛋白質，再利用相對應的螢光濾鏡，分別確認不同螢光標示的蛋白的相對分布位置。

利用多種不同顏色的活體螢光蛋白標示不同的蛋白質，來確認合成、運送途徑與蛋白交互作用的動態變化，是非常有趣但耗費時間的研究。其實驗變異性較大，因此需要重複實驗多次並累積實驗結果，才能下實驗結論。尤其是在細胞轉殖實驗中，過量表現標的蛋白與螢光蛋白的融合蛋白，常會導致蛋白的不正常分布，例如前面所提的 DsRed 融合蛋白原僅分布於細胞質中，過量表現時卻會送入細胞核的現象。此外，螢光蛋白的大小及結構，亦有可能會干擾到蛋白質與蛋白質的正常交互作用，進而為害細胞正常生理功能等，種種變因均須在原始設計實驗時考慮到。

四、結論

後基因體時代的研究的最大課題，在於基因產物蛋白質功能的探討。利用細胞生物學的

技術，做蛋白質定性與定位的研究，配合共軛焦顯微鏡(confocal microscope)的高效能運用，不僅可獲得蛋白質在三度空間的立體分布，更可以長時間記錄觀察生物體內最可貴的動態細胞生理變化⁽²⁰⁾。本章節針對蛋白質在細胞胞器的可能分布，做簡明扼要的介紹。並在細胞染色定位技術層面依照通則判斷，提出可行的實驗方法。而詳細的實驗操作步驟與共軛焦顯微鏡相關技術，可參考教育部補助之追求卓越計畫：迎向生物科技發展之新紀元核心實驗室網站([Http://info.ntu.edu.tw/biotech/core3-1.htm](http://info.ntu.edu.tw/biotech/core3-1.htm))。期盼藉此相關訊息能夠提供基因醫學研究者與相關生物技術研發者重要的參考。

五、參考文獻

1. McKnight, S.L. and Yamamoto, K.R. (1992). *Transcription Regulations*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, U.S.A.
2. Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
3. Adam, S.A. (1999). Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 402-406.
4. Wentz, S.R. (2000). Gatekeepers of the nucleus. *Science* **288**, 1374-1377.
5. Spector, D.L., Goldman, R.D., and Leinwand, L.A. (1998). *Cells, A Laboratory Manual*. Vol. 3, pp. 101.1-101.22. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, U.S.A.
6. Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* **66**, 863-917.
7. Jensen, R.E. and Johnson, A.E. (1999). Protein translocation: is Hsp70 pulling my chain? *Curr. Biol.* **9**, R779-R782.
8. Mellman, I. and Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**, 99-112.
9. Klumperman, J. (2000). Transport between ER and Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 445-449.
10. Warren, G. and Malhotra, V. (1998). The organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 493-498.
11. Andrews, N.W. (2000). Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends. Cell Biol.* **10**, 316-321.
12. Tabak, H.F., Braakman, I., and Distel, B. (1999). Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol.* **9**: 447-457.
13. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed., pp. 907-982. Garland Science, New York, NY, U.S.A.
14. Fuchs, E. (1996). The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Ann. Rev. Genet.* **30**, 197-231.
15. Spector, D.L., Goldman, R.D., and Leinwand, L.A. (1998). *Cells, A Laboratory Manual*. Vol. 3,

pp. 103.1-103.10. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, U.S.A.

16. Downing, K.H. (2000). Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 89-111.
17. Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
18. Prasher, D.C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends Genet.* **11**, 320-323.
19. Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 11984-11989.
20. Paddock, S.W. (1999). *Confocal Microscopy Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A.

