

近五年之研究計畫內容及主要研究成果說明

本實驗室於三年前開始執行國科會研究計畫，主要研究對象為來自於人體肝臟細胞內之孕酮受體膜蛋白 (Progesterone Membrane-associated Receptor Component 1 from human liver cell, PGMRC1)。PGMRC1由195個氨基酸所組成。依據蛋白質體分析軟體 (Hidden Markov Models, TMHMM) 對PGMRC1進行其蛋白質穿膜區域的預測結果顯示存在著單一跨膜區(signal trans-membrane spanning region)。有許多的研究證據顯示PGMRC1參與類固醇代謝及訊息傳遞相關的功能表現，但是學術界目前對於孕酮受體膜蛋白與類固醇激素結合的方式與機制的看法並不完全一致，PGMRC1的精細結構與具體生理作用迄今依然尚未得到確認。此一膜蛋白屬於高度保留性membrane-associated progesterone binding protein (MAPRs) 家族的一員，過去已知MAPRs與藥物代謝、膽固醇合成、荷爾蒙合成有關，PGMRC1具有與Cytochrome b5相似的血基質 (Heme) 結合位。

在過去的三年中，本實驗室研究克服表現此膜蛋白技術上的困難，順利發展出利用大腸桿菌及酵母菌表現系統表達人體孕酮受體膜蛋白完整全長形式的轉殖技術，並利用各種生物物理學的方法及光譜儀器探討人體孕酮受體膜蛋白作為細胞膜孕酮受體在生理反應調節的具體角色。由於PGRMC1與Heme的結合能力將會影響生物系統中細胞色素P450 (CYP)的生成與穩定，對於維持細胞正常的生理功能有很大的影響。我們成功的解決孕酮受體膜蛋白在大腸桿菌表現系統無法負載血紅素的問題。在培養液添加血紅素的前驅物5-氨基乙醯丙酸鹽 (5-aminolevulinic acid; ALA)，成功的提高人體孕酮受體膜蛋白中血紅素的含量。本研究在培養液中加入4mM ALA，明顯的使PGRMC1與Heme的結合率提升，由微量提升至87%，而且經由初步的圓二色光譜偵測後顯示其具有完整的二級結構，更重要的是以添加ALA以重建heme中心的酵素活性偵測結果顯示富含heme較缺乏heme的PGRMC1對於酵母菌中CYP51的活性提高了約50%。此外，我們亦同時以hemin作為血基質前驅物，將heme重建於PGRMC1的紫質結合位上，並進一步與利用細胞生合成等其他方式重建血基質的酵素活性比較。由UV-VIS吸收光譜的結果顯示，在純化完成的PGRMC1加入過量的Hemin，PGRMC1中heme的負載量可達63%。由CYP51活性調控的實驗結果，我們相信Heme正扮演著輔因子的角色，並以PGRMC1調控CYP51的活性。由於細胞色素P450為雙電子反應機制，其中一個電子乃是利用Cytochrome b5及其還原酶由NADH獲得，由於PGRMC1具有與細胞色素b5類似Heme結合位，因此PGRMC1可能在特定的細胞環境中，用以輔助或替代Cytochrome b5，擔任電子轉移酶的角色，進而改變CYP 51/21的活性，達到調控細胞內固醇的代謝路徑。根據實驗的結果顯示，我們認為PGMRC1的主要生理功能之一為和Heme結合，並進一步與細胞內cytochrome P450 21 (CYP21)及cytochrome P450 51 (CYP51)形成活化態蛋白質複合體，擔負調控細胞內各項重要膽固醇合成與的代謝角色。透過這些實驗與探討，我們已進一步理解PGRMC1基質結合區的化學環境及其功能架構