

當今液態核磁共振儀在蛋白質分子之重要發展及應用

核磁共振技術 (NMR) 可用於尋找蛋白質在水溶液中的結構，亦可藉由改變溶液條件研究蛋白質分子的構形變化。此外，NMR 在分子動態 (molecular dynamics) 研究上亦有廣泛的應用，藉由動態行為的研究往往能幫助我們了解蛋白質的內部性質。隨著人類基因組計畫的完成，蛋白質之結構與功能的研究已成為各國的研究重點，具有多方面優點的核磁共振技術勢必會在結構基因組計畫中扮演重要的角色。

謝惠珠、余靖

一、前言

利用液態核磁共振技術研究生物分子結構為近二十年來的新興技術，此技術的主要特點為研究生物分子在溶液狀態下的結構，它除了能更符合生物分子的生理狀態外，亦可藉由改變溶液條件 (溫度、酸鹼度、離子種類及強度等) 來得到不同狀態下分子構形的變化資訊，如自然態 (native state) 到變性態 (denatured state) 的轉換等。此外，核磁共振亦能探討生物分子的動態行為，而此種動態行為的研究往往更能幫助我們了解生物分子的活性及功能。雖然核磁共振在過去一直受到靈敏度及分子量的限制，在生物分子的應用上不是很普遍，但是由於最近的發展與突破，使得這些限制慢慢的被克服

謝惠珠小姐為國立清華大學化學所博士班學生。

余靖先生為美國佛羅里達州立大學博士，現任國立清華大學化學系教授。

了。在靈敏度方面，除了高磁場的應用外，最近新發展出的低溫探頭 (cryo-probe)，更能大大地減小雜訊的干擾，將靈敏度提高 5 倍以上。而在分子量的限制方面，藉著同位素 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^2H 標註技術的應用，將可研究分子的大小提昇至 30 kD 左右。最近剛發展出的 TROSY (transverse relaxation optimized spectroscopy) 技術更使得應用範圍提昇至 50 kD⁽¹⁾，時至今日，核磁共振技術已變成結構生物學的重要利器。

二十一世紀是生物科技的時代，人類基因草圖已於去年完成，緊接而來更複雜更重要的結構基因體 (structure genomics) 計畫已在世界各地如火如荼地展開。在結構生物學有多方面應用的核磁共振技術勢必會在結構基因體或蛋白質體學 (proteomics) 領域中扮演著舉足輕重的角色，故以下本文將就液態核磁共振技術在分子三維結構的尋求、蛋白質分子與配位基 (ligand) 的交互作用、分子動態研究

(molecular dynamics) 及蛋白質摺疊研究 (protein folding) 上的應用作簡略的介紹。

二、蛋白質分子三度空間結構之尋求

1. 原理

利用 NMR 技術求得三維結構的原理在於尋求許多限制條件 (constraints), 找出符合這些限制條件且具有最低能量的結構。如圖 1 所示, 已知排列順序的六個點 A、B、C、D、E、F, 求得點 A 與 F、C 與 D 及 B 與 E 之距離小於 5 \AA 的限制條件後, 則可得到此分子之三度空間結構。由此例子我們可以知道, 若限制條件愈完整, 所求得的三維結構就愈正確。將此原理應用於一已知氨基酸序列之蛋白質, 以 NMR 為工具完整地求得該分子的限制條件, 便可得到此蛋白質的三維結構。不同於圖 1 所示的是將此技術應用於高分子時, 除了須儘量找出各原子的距離限制條件外, 雙面角及氫鍵的位置皆是找尋正確結構的重要線索。

2. NMR 光譜的判定

欲以 NMR 求得蛋白質之三維結構的首要步驟為各種 NMR 光譜的獲得及判定 (assignment), 可分為同核 (homonuclear, ^1H) 及異核 (heteronuclear, ^{15}N , ^{13}C) 兩類, 分述如下。

(1) ^1H NMR 光譜的判定

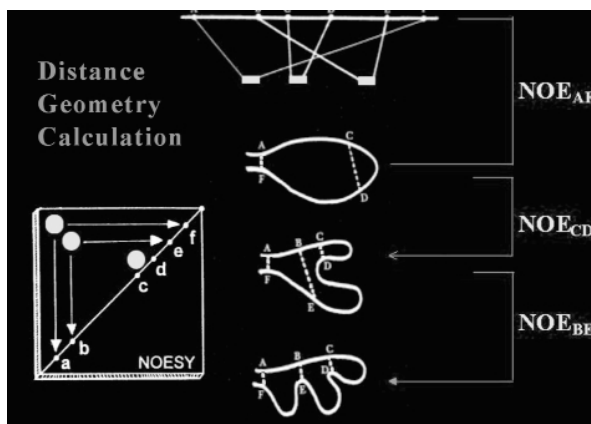


圖 1. 由 NOE 距離限制計算分子幾何空間結構。

從 NMR 的各種實驗所得到的訊息大致可分為兩種, 一種是透過化學鍵的連結 (through bond connectivity), 另一種則為透過空間的連結 (through space connectivity)。前者是藉由共價鍵來傳遞, 最常用的有 COSY、DQF-COSY、TOCSY 等。COSY 類的實驗可觀察到相隔兩、三個化學鍵的二質子間之向量偶合 (scalar coupling) 所造成的相關訊號, 如同殘基內 $d_{\alpha\text{N}}$ 的偶合訊號。而 TOCSY 則可觀察到相隔更多化學鍵的相關訊號, 所以大部分殘基支鏈 (sidechain) 上的質子訊號皆會呈現在 TOCSY 圖譜上, 藉由比對已知之各種氨基酸所具有的偶合圖譜特徵, 我們即可將訊號組與氨基酸種類作初步的配對。完成氨基酸種類的判定後, 我們需要再配合 NOESY 實驗及蛋白質的氨基酸序列做循序判定 (sequence-specific assignment)。NOE 的訊號是二質子透過空間的偶合而非經由共價鍵, 這種透過空間的雙偶極偶合 (dipolar coupling) 與距離的 6 次方成反比, NOESY 不僅能提供我們蛋白質在三度空間上的距離限制條件, 其 $d_{\alpha\text{N}+1}$ 偶合訊號更可用以作循序判定。

雖然二維的 NMR 技術因其較高之解析度已被廣泛地用於蛋白質結構之尋求, 然而當蛋白質分子大於 10 kDa 時, 即使憑藉二維光譜的解析度仍不足以解決圖譜重疊的問題, 故由結合多個二維實驗之更高維的核磁共振技術便應運而生。在三維或四維的核磁共振實驗中, 擁擠的二維光譜被展開至一個或多個三度空間中, 減少了圖譜重疊的情形 (圖 2)。

(2) 異核核磁共振的應用

雖然二維及三維 ^1H NMR 技術可將應用範圍推展至分子量 12 kDa 的蛋白質, 但對於更大的蛋白質分子而言, 質子數及轉動相關時間 (τ_m) 會隨著分子量的增加而增加, τ_m 的增加會導致譜線變寬, 而譜線變寬的結果不但使得交叉峰重疊的情形變得更加嚴重, 也導致 3J 偶合常數小 ($< 10 \text{ Hz}$) 的 ^1H 相關實驗的靈敏度減少許多。然而以 ^{13}C 或 ^{15}N 同位素標定的蛋白質配合異核核磁共振的技術克服了這些問題, 因為在 ^{13}C 或 ^{15}N 等異核與異核間或異核與其鍵結質子間具有較大的 1J 及 2J 偶合常數, 這項技術的成功應用, 使其應用範圍再擴展至分子量

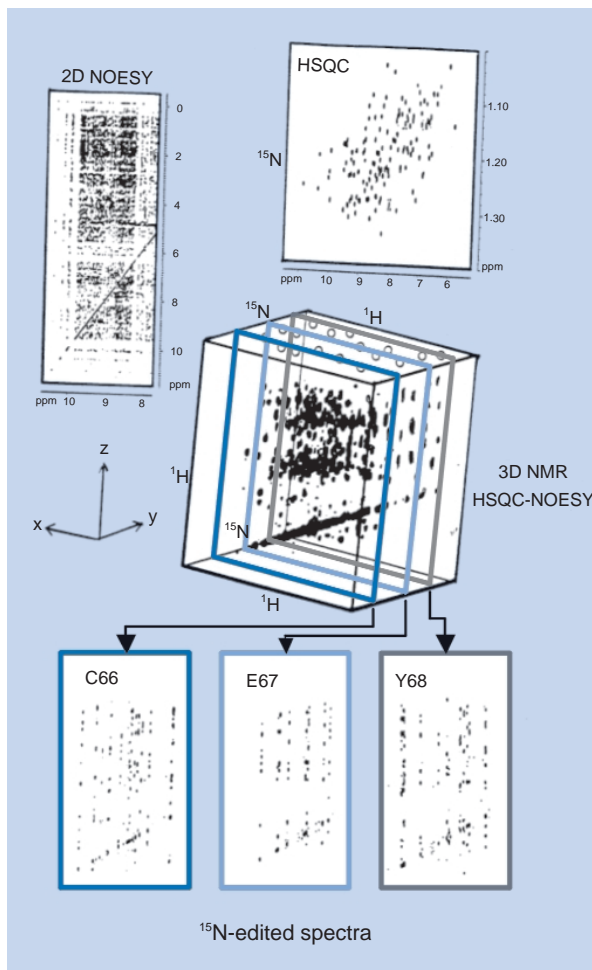


圖 2. 多維核磁共振技術。

30 kDa 的蛋白質。常用的異核核磁共振實驗有 2D ^{15}N - ^1H HSQC、3D ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY、3D ^{15}N - ^1H HSQC-TOCSY，我們甚至可更進一步地將蛋白質分子同時做 ^{15}N 及 ^{13}C 的標註，進行三核共振 (triple resonance) 實驗，如 HNCA、HNCO、HN(CO)CA、HNCA(CO)、CBCANH、CBCA(CO)NH、HBHA(CBCA)NH、HBHA(CBCACO)NH 等⁽²⁾ 皆能有效地幫助我們完成最後圖譜的判定。

^{15}N - ^1H HSQC 圖譜中的交叉峰來自於各氨基酸的 amide proton 和 ^{15}N 的偶合，而每個交叉峰之化學位移會因各個殘基之化學環境不同而不一樣，故即使相同種類之氨基酸亦不會具有完全相同的化學位移。換言之，每個交叉峰即代表一個殘基 (假設沒有圖譜重疊的情形)。而 3D ^{15}N - ^1H HSQC-

NOESY 便是結合了 2D ^1H - ^1H NOESY 及 ^{15}N - ^1H HSQC 而成的三維實驗，它可將擁擠的二維 NOESY 圖譜根據 HSQC 的分布分散在三度空間中，我們可選擇一特定 ^{15}N 化學位移平面觀察座落於此平面上之各殘基的 NOE 訊號 (見圖 2)，相較於二維 ^1H - ^1H NOESY 圖譜，這特定平面上的 NOESY 圖便顯得簡單而易於指定。我們甚至可依特定殘基來觀察此殘基與其他原子在空間上的偶合情形，尤其與相鄰殘基間透過空間的 $d_{\alpha\text{N}+1}$ 、 $d_{\beta\text{N}+1}$ 及 $d_{\text{NN}+1}$ 的聯結更是循序判定的依據。圖 3 為蠓蠟酸性纖維生長素 (nFGF) 的 3D ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY 的圖譜，nFGF 共有 132 個氨基酸，其二維 ^1H - ^1H NOESY 及 ^1H - ^1H TOCSY 顯得相當擁擠而不易指定，然而在 ^{15}N - ^1H HSQC 圖中，各殘基的交叉峰有相當好的分離度，所以利用 3D ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY 及 3D ^{15}N - ^1H HSQC-TOCSY 可以使這原本複雜而不易的工作變得更簡單而正確，圖中我們將各殘基的圖依其 ^{15}N 及 amide proton 的化學位移切成條狀後便可利用 $d_{\alpha\text{N}+1}$ 及 $d_{\text{NN}+1}$ 的聯結找到下一個殘基，依此類推即可完成循序判定。⁽³⁾

近年來各種三核共振技術的發展對於 NMR 圖譜的指定貢獻良多。例如在 HNCA (圖 4) 實驗中，我們可觀察到各個氨基酸內的 ^{15}N 、 ^1H 、 $^{13}\text{C}^\alpha$ 及 ^{15}N 、 ^1H 、 $^{13}\text{C}^{\alpha-1}$ 的共振交叉峰，HN(CO)CA 則可提供我們有關一胺基酸中 ^{15}N 及 ^1H 和前一氨基酸的 ^{13}C 的關聯資訊，將此二互補的實驗結合在一起便可做氨基酸序列的循序循序判定。而 HNCO 及 HN(CA)CO 實驗中所獲得殘基內 ^{15}N 及 ^1H 和前一氨基酸的 $^{13}\text{C}^\alpha$ 共振訊號，亦可用以協助光譜的判定，而 CBCANH、CBCA(CO)NH 及 HCCH-TOCSY 等實驗在判斷氨基酸種類上則是助益良多。

3. 限制條件的找尋

化學位移、向量偶合及雙偶極弛緩 (dipolar relaxation) 皆會受到分子構形的影響而改變。因此，這些係數的定量使得利用 NMR 光譜作結構分析得以實行。經由上述光譜判定各個原子之化學位移後，便可由 NMR 之相關資料中找尋計算結構所需的距離、雙面角及氫鍵等限制條件。

圖 3.
根據 3D ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY 圖譜所做的蠓蠟纖維生長素之循序聯結。

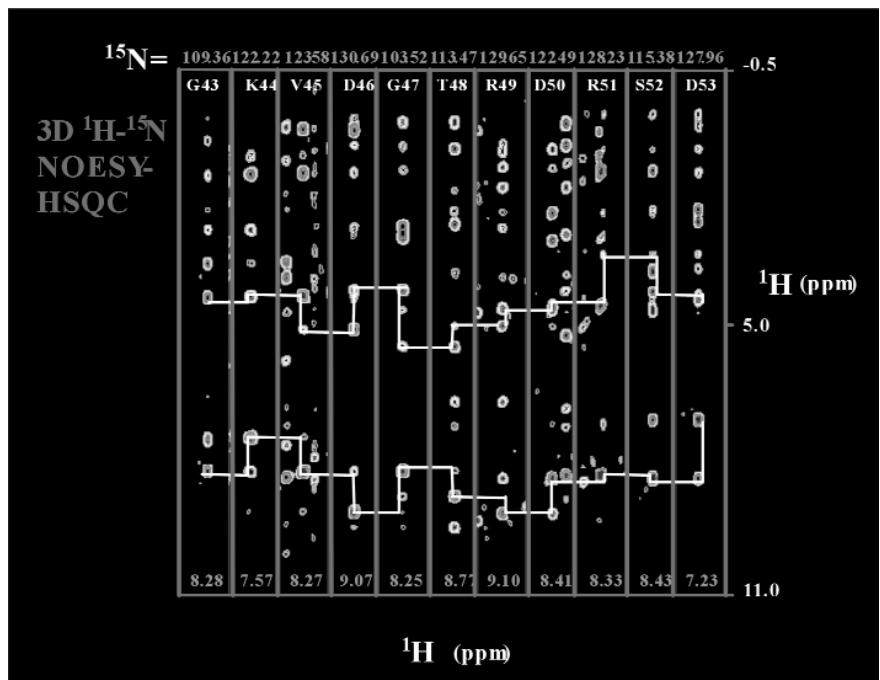
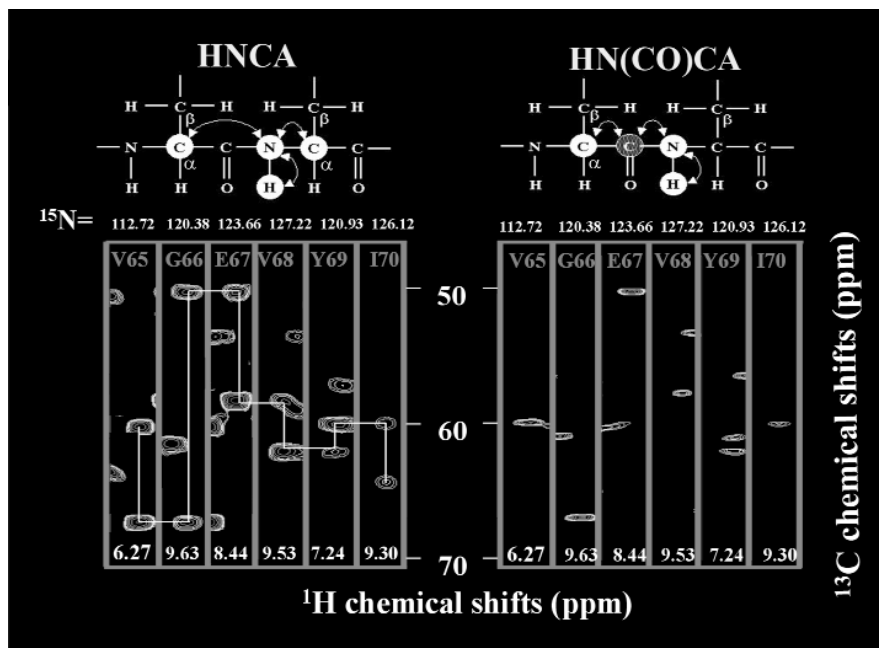


圖 4.
利用 HNCA 及 HN(CO)CA 三核共振實驗所做的蠓蠟纖維生長素之循序聯結。



(1) 距離限制條件 (NOE Distance Constraints)

NOESY 實驗中的 NOE 是找尋蛋白質結構最重要的一項，因為 NOE 交叉峰的強度與兩作用質子距離的六次方成反比。其關係式如下：

$$\gamma_i = \gamma_{\text{ref}} \left(\frac{S_{\text{ref}}}{S_i} \right)^{1/6}$$

其中 γ_i 為兩作用質子之距離， γ_{ref} 為已知二質子距離， S_{ref} 及 S_i 為其交叉峰之積分強度， γ_{ref} 可來自

germinal methylene 質子，在蛋白質中 γ 的值通常不會直接計算出來，而是會將之分為短、中、長三等。

(2) 雙面角限制條件 (Dihedral Angle Constraints)

雙面角限制條件的獲得主要是根據 Karplus 方程式：

$$3J = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C$$

θ 為雙面角，常數 A 、 B 、 C 取決於參與共價鍵的核種。而用於結構計算的 φ 、 χ^1 雙面角限制條件來自於 $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{H}^{\beta}}$ 及 $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{H}^{\gamma}}$ ，常數 A 、 B 、 C 分別為 6.4、-1.4、1.9 及 9.5、-1.0、1.4 等。通常若 $^3J_{\text{H}^{\alpha}\text{H}^{\beta}} < 5$ Hz，則為 α -helix。

(3) 氫鍵限制條件 (Hydrogen Bonding Constraints)

蛋白質分子內常具有許多氫鍵以穩定分子結構，氫鍵往往會導致氮化物質子具有較緩慢的交換速率，我們可將樣品快速地由 H_2O 交換成 D_2O ，再藉由 ^1H - ^1H TOCSY 或 ^{15}N - ^1H HSQC 實驗，觀察交叉峰隨時間減少的情形，具有緩慢交換速率的 amide proton 便可能導因於氫鍵的形成。

4. 蛋白質分子三度空間結構之尋求

待 NMR 所得到的各項限制條件收集完全後，最後的分子結構可以分子動態模擬焯熄 (simulated annealing approach) 的方法來計算，再配合 X-PLOR 軟體作修飾 (refinement procedure)。由 NOE 的強度、偶合常數及氫鍵所找出之限制條件被一步一步地加入動態模擬焯熄，最後所得到的結構可再以 PROCHECK 作最後的核定。圖 5 為利用核磁共振技術所解出之酸性蠓蠟纖維生長素的結構，根據同核二維實驗 (TOCSY、DQF-COSY、NOESY) 及多種異核實驗 (HNHA、HNCA、HNCO、HN(CA)CO、CBCA(CO)NH、CC(CO)NH、HCCH-TOCSY、 ^{13}C HSQC-TOCSY、 ^{15}N HSQC-TOCSY、 ^{13}C HSQC-NOESY 及 ^{15}N HSQC-TOCSY) 所得到的

1344 個 NOE 限制條件、22 個氫鍵及 43 個雙面角限制條件，計算得到了最後的 14 個結構，而此 14 個結構之骨架相對於平均位置的 RMSD 為 $0.65 \text{ \AA}^{(3)}$ 。

三、蛋白質 - 配位基的交互作用

蛋白質與小分子配位基的交互作用 (protein-ligand interaction) 對一些生化反應是非常重要的，它不僅參與了細胞內的許多反應，也可以作為組織和外界溝通的一種方式，例如酵素與其抑制劑、荷爾蒙和受體間的交互作用等。利用核磁共振技術我們可輕易地藉由測量化學位移擾動 (chemical shift perturbation) 的方式找出與配位基作用的殘基，亦可進一步解出整個錯合物 (complex) 的結構。化學位移的擾動主要是因為蛋白質與配位基結合後，某些殘基會和配位基接觸或作用而使得化學環境改變，藉由測量各個殘基化學位移的變化情形，便能找出配位基的結合位置 (活性位置)，最近所謂的核磁共振技術在結構 - 活性關係上的應用 (SAR by NMR) 便是根據這樣的原理⁽⁴⁾，而這種技術的應用

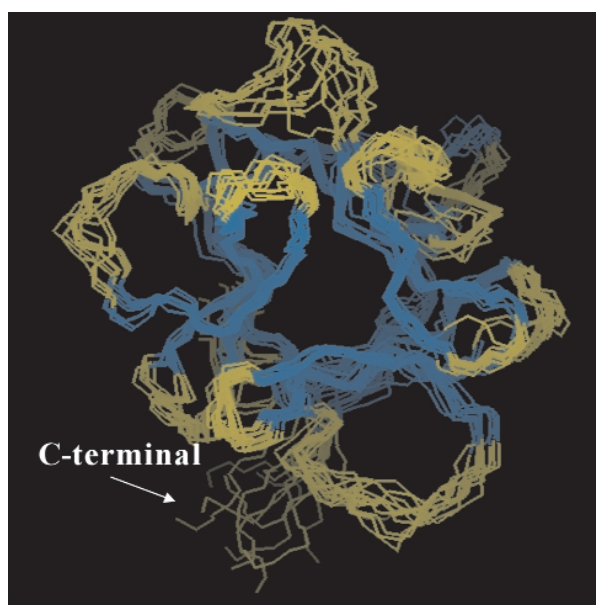


圖 5. 由 NMR 求得的 12 個蠓蠟纖維生長素之結構重疊圖。

在藥物篩檢上是很有幫助的。圖 6 為 nFGF 與其 sucrose octasulfate (SOS) 結合下之 ^{15}N - ^1H HSQC 圖及各殘基之化學位移變化。由圖可發現殘基 130、131、132、134、136、137、138、139 及 143 的化學位移有明顯的改變，表示這些殘基可能構成了 SOS 的結合位置⁽³⁾。除了化學位移擾動外，蛋白質和配位基間 NOE 的測量也能提供我們蛋白質分子與配位基結合情形的線索，而這些訊息皆是找尋錯合物結構的重要條件。

四、蛋白質運動及弛緩測量的研究

瞭解蛋白質運動的性質對研究蛋白質功能是很重要的，因為許多蛋白質的活性位置常常不是緊密的結構，而是具有較高的活動性 (flexibility)。NMR 弛緩研究提供了有關生物蛋白質內部動態的細節資訊，很多蛋白質系統的分子動態研究是建立在弛緩參數的測量上。這些研究顯示，儘管蛋白質內部結構緊密，但事實上蛋白質仍有在奈秒 (ns) 時間尺度之波動 (fluctuation)。再者，由 2D 異核核磁共振實驗中交叉峰強度的不同，顯示在蛋白質中有著低頻率範圍的運動 (釐秒時間範圍)。既然核的弛緩主要由此核及與其直接鍵結之質子間雙偶極交互作用機構所操控，所以測量各殘基 ^{15}N 和 ^{13}C 的弛緩速率便可推知分子的內部動態，而我們所獲得的動態資訊使我們對蛋白質的結構和功能有更進一步的了解。

最早使用一維異核極化轉移步驟測量異核弛緩速率的是 Sklenar⁽⁵⁾ 及 Kay⁽⁶⁾ 等人，而 Nirmala 及 Wagne⁽⁷⁾ 利用這些方法完成二維異核相關圖譜，接著一組包含縱向弛緩 (T_1)、橫向弛緩 (T_2) 及 NOE 的 ^{15}N 弛緩參數的測量被應用於富含 ^{15}N 同位素的 staphylococcal nuclease⁽⁸⁾。最近 Lipari 及 Szabo 提出了所謂「model free approach」來描述由弛緩實驗所得到的分子內運動資訊^(9,10)，他們認為不管 isotropic 或 anisotropic overall motion 的分子動態資訊皆可用次序參數 (S)、有效相關時間 (τ_e) 及化學交換 (chemical exchange; R_{ex}) 來描述， S^2 可用以測量運動的空間限制， τ_e 則代表運動的速率，正因 S^2 與 τ_e 皆與運動模式無關 (model independent)，故此

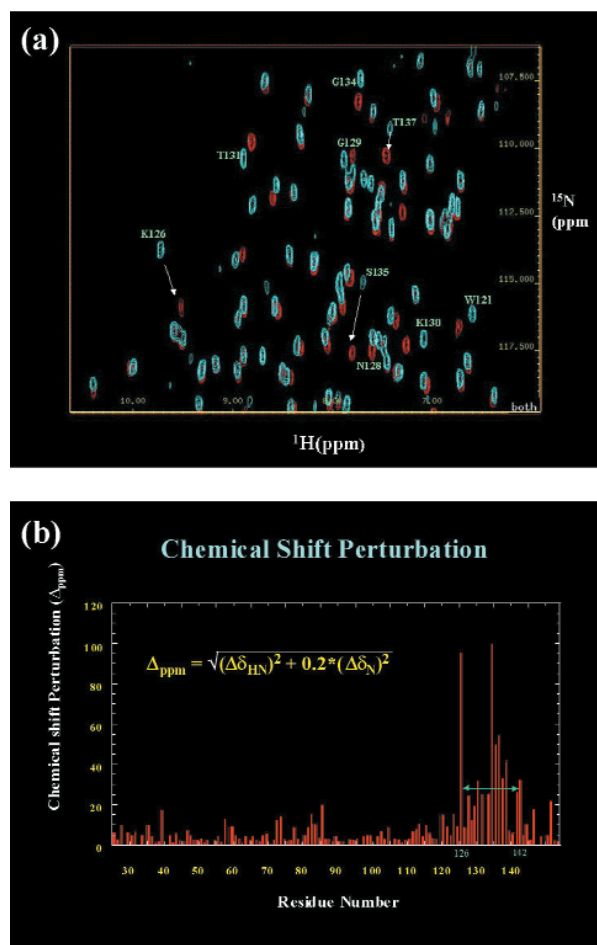


圖 6. nFGF 與 SOS 結合下之 (a) ^{15}N - ^1H HSQC 圖；(b) 各殘基之化學位移變化。

方法稱之為「model free」。

1. ^{15}N 弛緩速率的測量

藉由具有 ^{15}N 標定的蛋白質來測量 ^{15}N 的弛緩速率是目前研究骨架動態最常用的方法。此 ^1H - ^{15}N 相關實驗的脈衝序列如圖 7 所示⁽¹¹⁾，縱向弛緩速率 (R_1) 及橫向弛緩速率 (R_2) 的獲得來自不同演化時間 (T) 的實驗，每個實驗演化時間須各做 3 組以決定誤差範圍，這些實驗所得交叉峰的強度會依 t_1 成指數衰退，而此衰退常數即是弛緩速率常數。NOE 值得決定則等於有 ^1H 飽和 (saturation) 及沒有 ^1H 飽和的 NOE 實驗所得交叉峰之比值，而 NOE 標準差則由圖譜中背景雜訊之方均根值 (root mean

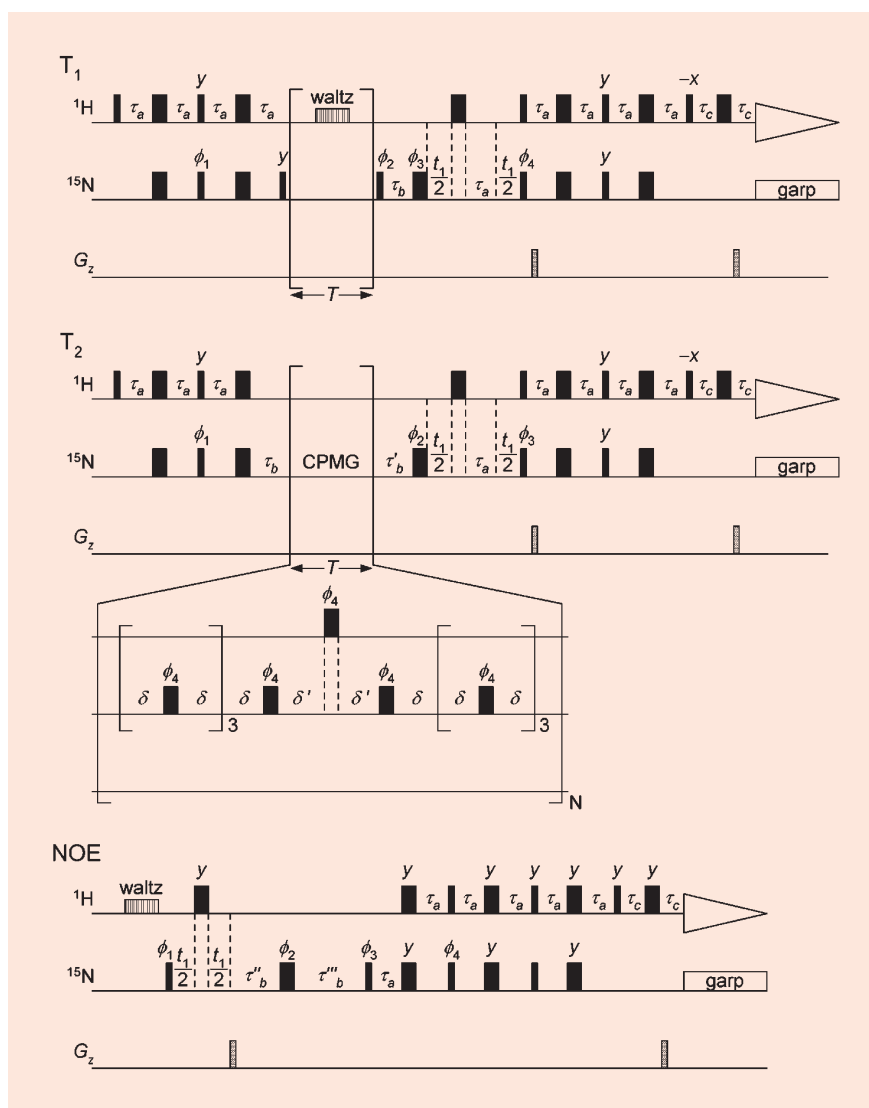


圖 7. NMR 弛緩實驗 T_1 、 T_2 及 NOE 的脈衝序列圖。

square) 決定。

R_1 、 R_2 及 NOE 能提供我們有關分子在 $10^8 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$ 頻率範圍內的運動訊息，三者之中又以 NOE 對這種高頻率的骨架運動最為敏感，如果 NOE 值接近 1.0 時，代表此分子骨架缺乏這類型的運動，而較低的 NOE 值則表示此區域較具活動性。而 R_2 則不僅與此高頻率之運動有關，亦會受到微秒至毫秒範圍之動態所影響，藉由 R_1 、 R_2 及 NOE 測量我們可大略推知蛋白質分子內的動態情形。

圖 8 為人類酸性纖維生長素 (hFGF) 及 hFGF-SOS 錯合物的 R_1 、 R_2 及 NOE 對各殘基的柱狀圖，

由 free hFGF 的 R_1 結果可看出，在殘基 78 至 86 間有許多的殘基其 R_1 高於平均值，代表著這一區域的運動性較受侷限；另外有 10 個殘基的 R_1 低於平均值，顯示這些殘基具有較高的活動性，而這些殘基中有一部份正是位於 SOS 的結合位置。而在 hFGF-SOS 中，大部分在 SOS 結合位置上的殘基其 R_1 值增加，表示 hFGF 與 SOS 結合後，這些殘基的高頻率運動減少了。相較於 R_1 ， R_2 對低頻率的運動更為敏感，由圖我們可看出 free hFGF 的 N 端、C 端、殘基 62 - 66、87 - 94 及 108 - 113 具有較低的 R_2 值，顯示了這些區域可能有快速的內部動態；而在錯合物中位於 C 端的某些殘基，如

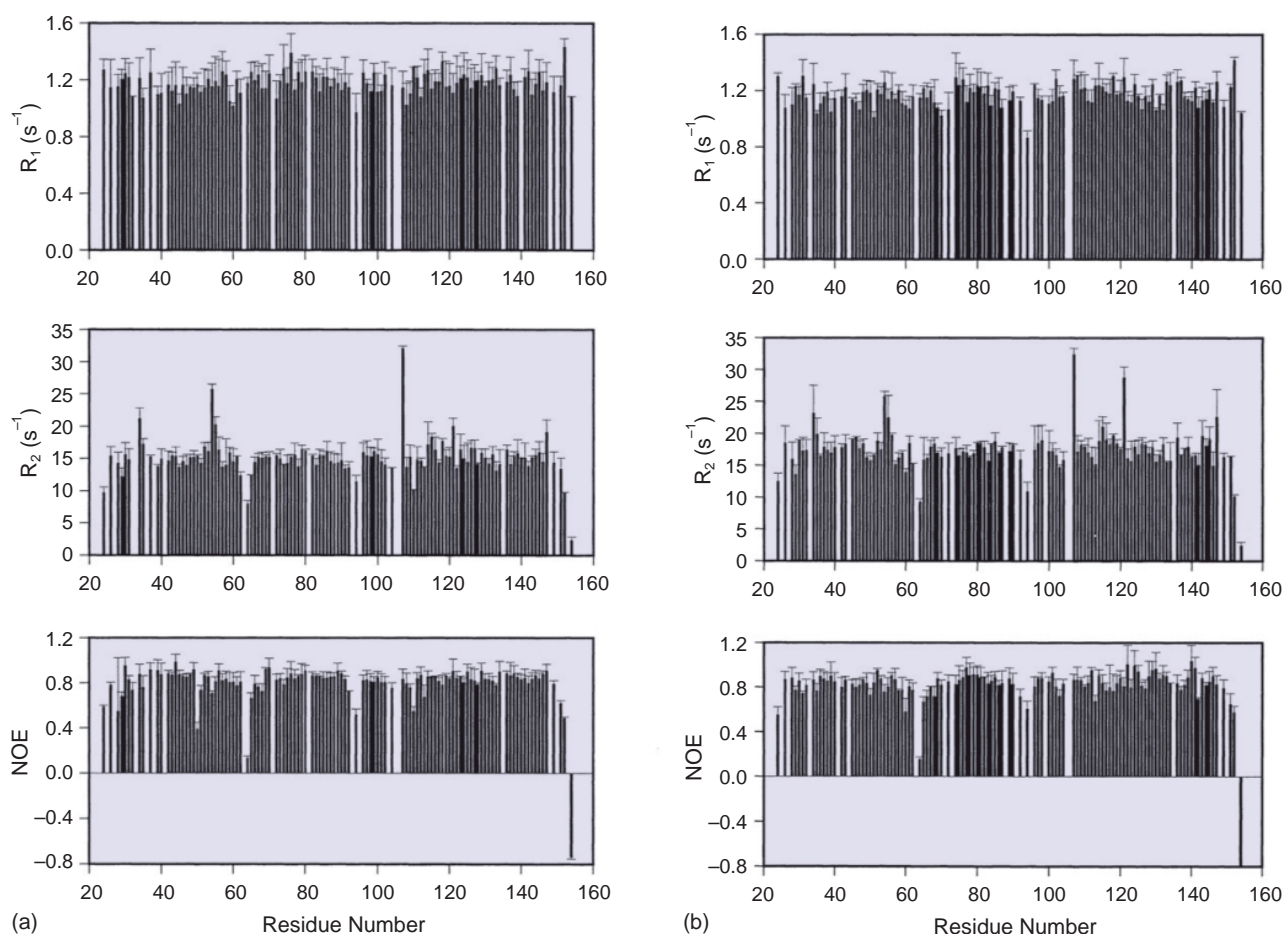


圖 8. (a) free hFGF ; (b) hFGF-SOS 錯合物的 R_1 、 R_2 及 NOE。

135、136、143 及 147 的 R_2 值則變得高於平均值，這證明了 SOS 與 hFGF 的 C 端的確有某個程度的交互作用⁽¹²⁾。此外，我們必須注意到有些殘基的 R_2 值異常的高，這可能不是單純因為區域骨架動態，而是受到微秒至毫秒範圍內的慢速構形交換 (R_{ex}) 如 cis-trans proline isomerization 等的影響。除了 R_1 及 R_2 外，更為靈敏的 NOE 也給於我們相同的結果，而這些結果皆證明了 hFGF 與 SOS 結合後可使蛋白質結構變得更為緊密 (rigid)⁽¹²⁾。

2. Model Free 計算

^{15}N 的弛緩主要受到鍵結質子與 ^{15}N 間的雙偶極作用 (dipolar interaction) 及非均勻性化學位移 (chemical shift anisotropy, CSA) 的影響，這些弛緩係數可被表示為⁽¹³⁾：

$$R_1 = \frac{d^2}{4} [J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2 J(\omega_H)$$

$$R_2 = \frac{d^2}{8} [4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + \frac{c^2}{6} [4J(0) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H)]$$

$$\text{NOE} = 1 + \frac{d^2}{4R_1} \left(\frac{\gamma_N}{\gamma_H} \right) [6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)]$$

$$d = \mu_0 h \gamma_N / \gamma_H \langle \gamma_{NH} \rangle / (8\pi^2), \quad c = \omega_N \Delta \sigma / \sqrt{3}$$

其中

- μ_0 ：自由空間的磁導率 (permeability)
- h ：普朗克常數 (Planck's constant)
- γ_H ： ^1H 的迴轉磁比 (gyromagnetic ratio)

γ_N : ^{15}N 的迴轉磁比

γ_{NH} : NH 的鍵長

ω_H : ^1H 的拉莫頻率 (Larmor frequency)

ω_N : ^{15}N 的拉莫頻率

$\Delta\sigma$: ^{15}N 的非均勻性化學位移

R_{ex} : 因化學交換導致的 line broadening

根據 Lipari 和 Szabo 所描述的 model free 公式, 分子內運動的振幅及時間範圍的決定是藉由 modeling 圖譜密度函數 $J(\omega)$, 而

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_m}{1 + (\omega \tau_m)^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau)^2} \right]$$
$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_e}$$

τ_m 為 isotropic overall rotational correlation time; 對於具有均勻性運動的分子, τ_m 等於 R_2/R_1 。由 model free 得到的 τ_e 取決於 amide bond 的波動運動速率, S^2 則為一無單位的係數用以描述 NH 鍵在空間上的運動程度, 當 $S^2 = 0$ 表示一種完全均勻 (isotropic) 的運動, 若 $S^2 = 1$ 則代表運動完全被限制。此外, R_{ex} 則代表毫秒到微秒範圍內的化學 (構形) 交換。圖 9(a)、(b) 為 hFGF 及 hFGF-SOS 錯合物各殘基的 R_{ex} , 由圖可看出在 free hFGF 中有 21 個殘基具有毫秒至微秒間的慢速運動, 這些進行慢速構形交換的殘基遍及整個蛋白質分子, 顯示 hFGF 可能有摺疊構形間的轉換。另外, 值得注意的是當 hFGF 與 SOS 結合後, 僅有 3 個殘基具有明顯的 R_{ex} , 這說明了 SOS 與 hFGF 結合後, 可穩

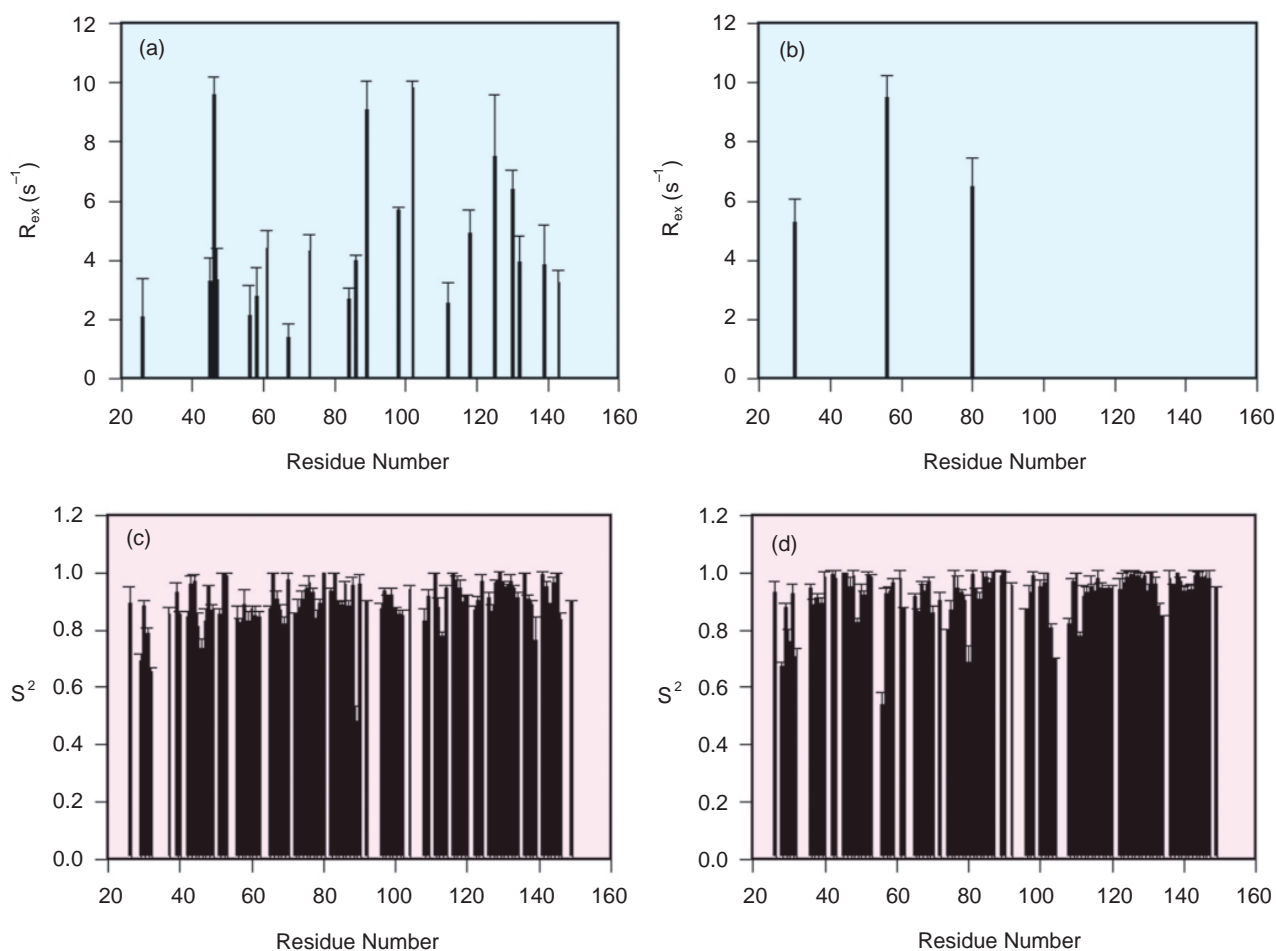


圖 9. (A) free hFGF 的 R_{ex} ; (b) hFGF-SOS 錯合物的 R_{ex} ; (c) free hFGF 的 S^2 ; (d) hFGF-SOS 錯合物的 S^2 。

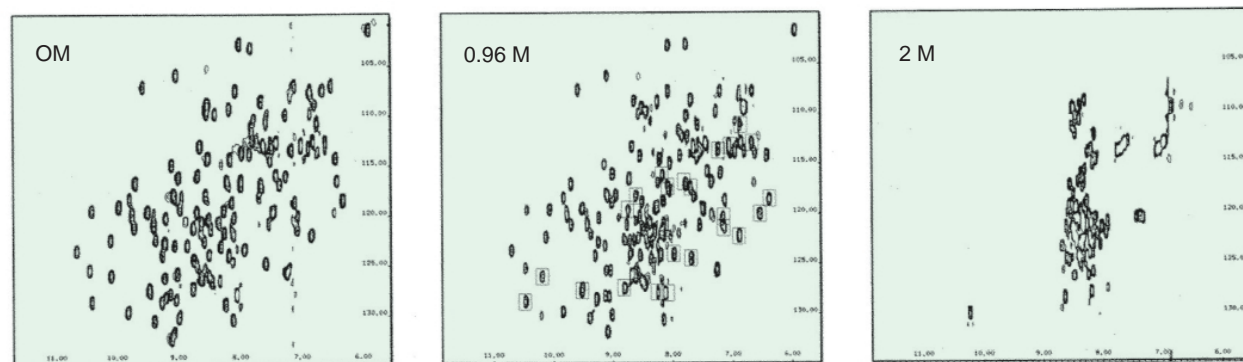
定整個蛋白質的構形。而在次序係數方面，正如圖 8(c)、(d) 結果顯示，hFGF 與 SOS 結合後 S_2 由 0.89 至 0.94，表示整個 hFGF 分子因為與 SOS 結合而變得更為緊密⁽¹²⁾。

五、蛋白質的摺疊研究

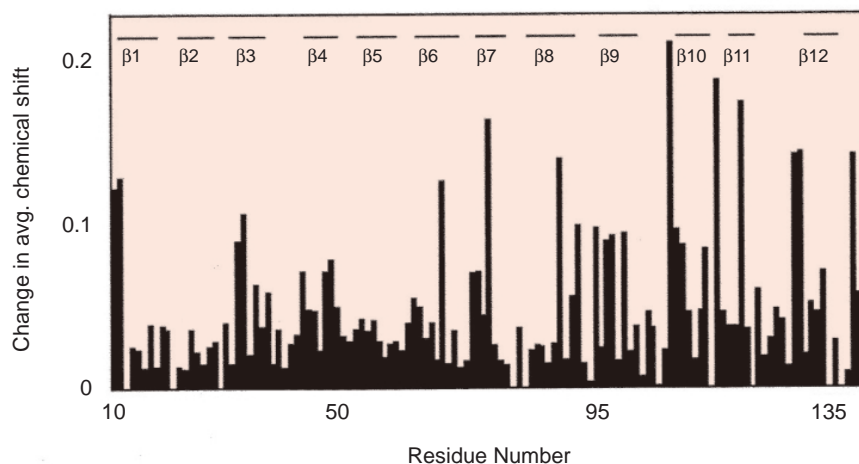
蛋白質是一巨大的分子，必須在特定的摺疊構形下才具有生化活性，然而蛋白質分子是如何在短時間 (ms - s) 內找到最穩定的構形一直是許多人試圖要解開的謎題。而利用核磁共振技術研究蛋白質摺疊讓我們可以對這個謎題有更深入的探討。正因為 NMR 所給與的蛋白質資訊分別來自各個殘基，不像一般光學技術只能提供分子整體平均的訊息，

利用 NMR 加上氫氬交換實驗或 fast quench pulse labeling 技術，我們便可觀察各殘基參與蛋白質摺疊或開散的情形，以便一步步地研究蛋白質的摺疊或開散過程。

將氫氬交換應用於蛋白質摺疊研究的想法是由 Englander⁽¹⁴⁾ 所提出，他認為根據波茲曼分布，即使在自然條件下仍然會存在著一小部份處於開散狀態的蛋白質分子，而這些是我們用光學儀無法觀察得到，但卻可以利用氫氬交換實驗配合核磁共振儀來偵測。將蛋白質置於 D_2O 中，在不同時間或變性條件下，我們可觀察到某些殘基的 amide proton 是較易被交換的，顯示蛋白質的整個開散過程是由這些殘基開始；而位於某些區域的殘基則因為較受到保護，所以不易被交換。此外，氫氬交換實驗亦



(a)



(b)

圖 10. (a) hFGF 在自然態 (0 M Gdn-HCl)、中間物 (0.96 M Gdn-HCl) 及變性態 (2 M Gdn-HCl) 之 ^{15}N - 1H HSQC 圖；(b) 各殘基之化學位移變化。

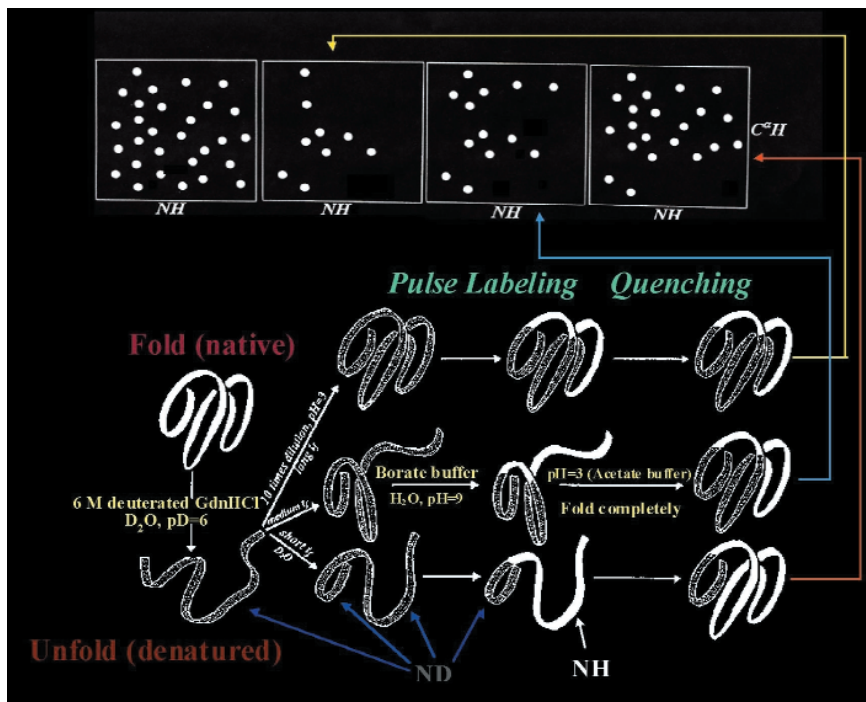


圖 11. Fast quench pulse labeling technique 應用原理之示意圖。

可用以找尋蛋白質開散過程中的中間物。圖 10 為 hFGF 的 ^{15}N - ^1H HSQC 圖，在自然態時 (0 M Gdn-HCl) ^{15}N - ^1H HSQC 圖之交叉峰有很好的分散度，當 Gdn-HCl 增加至 0.6 M 時，化學位移並沒有太大的變化，僅在 N 端具有較明顯的改變。而在 Gdn-HCl 為 0.96 M 時，在 C 端的殘基 (95 - 140) 出現了很大的變化，且大部分具有明顯變化的殘基皆位在非二級結構區，而屬於二級結構的部分並沒有太大的改變，所以我們推測在 Gdn-HCl 引發的開散過程中有中間物的存在⁽¹⁵⁾。此外，在 C 端的某些殘基的交叉峰峰寬變大，可能是導因於自然態和中間物間的構形交換或在中間物狀態下構形波動的增加。

Fast quench pulse labeling 技術的應用，讓我們得以研究蛋白質在動力學上的摺疊或開散過程。此技術應用在摺疊研究上的原理如圖 11 所示，首先將蛋白質以高濃度的變性劑在 D_2O 下加以變性，再以快速混合裝置 (quench flow) 將此變性蛋白質溶液以 refolding buffer 做 10 倍稀釋，使已變性的蛋白質開始回疊，並在不同的回疊時間下做氫氣交換，待蛋白質分子摺疊完畢後，利用 NMR 求得其

COSY 或 ^{15}N - ^1H HSQC 圖。當我們在不同時間下做氫氣交換，已經摺疊的部分可能因受到氫鍵或周圍疏水性環境的保護而不被交換成氫，故不會在 NMR 圖譜上被觀察到，藉由將殘基的交叉峰強度對回疊交換時間做圖便可求出各殘基的回疊速率，蛋白質摺疊過程的先後順序及是否有動力學中間物的存在皆可由此得知。圖 12 為 nFGF 的摺疊過程，nFGF 為具有 12 個 β -strand 蛋白質分子，由

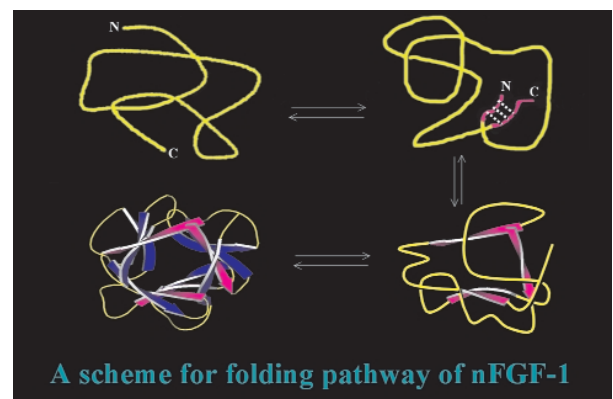


圖 12. nFGF 之摺疊過程圖。

quench-flow NMR 的結果可發現，一開始時此分子 N 端及 C 端先靠攏，然後其中 4 個 strand (strand 1,4 8,9) 會先摺疊，其他 8 個 strand 繼之，最後再摺疊成整個分子的三級結構⁽¹⁶⁾。

Fast quench pulse labeling 能讓我們了解蛋白質的摺疊或開散過程，自然態的氫氬交換能幫助我們求得各殘基的 protection factor 及相對穩定性，而骨架動態研究能提供我們分子骨架的活動性，由此可見 NMR 在生物分子上的應用，不只是結構的找尋，藉由不同技術的配合我們還能研究分子的許多特性，這些特性的了解在生物學上 (如蛋白質功能及穩定性的研究) 及醫學上 (如藥物的開發等) 都會有很大的幫助。

六、核磁共振技術與結構基因組計畫

二十世紀末科學家給人類的最大獻禮莫過於人體基因草圖的完成，然而這並不是人類基因組計畫的結束，而是另一個開始，因為雖然生命的秘密被隱藏在基因裡，但是用以維持生命的許多機制卻是由蛋白質來執行的，顯示了蛋白質在生物體中所具有的重要性是絲毫不低於 DNA 的。人類約有 35000 個基因，但超過 80% 的基因其功能仍不為所知，其中可能包含了癌症及各種疾病的基因，這些未知功能基因的研究對生物學或醫學都將會有莫大的幫助，所以一項名之為結構基因體的計畫亦在各國之間興起，在這個計劃中科學家們計畫將解出未知功能基因所轉譯出蛋白質的結構，以幫助了解這些蛋白質的功能。

我們都知道蛋白質的功能與其結構息息相關，而包含在這結構基因組計畫中的蛋白質可能有幾萬種，若要一一解出其結構將是困難又費時的。雖然蛋白質種類繁多，但根據估計自然界中所存在的摺疊構形約只有 1000 - 3000 種⁽¹⁷⁾，且有許多蛋白質屬於同一個家族 (family)，具有高的 sequence homology，這提供我們一個更有效率的解決方式。只要我們定出這 1000 - 3000 種蛋白質的摺疊構形，並研究這些構形所具有的生化活性，便能提供其他屬於同家族的蛋白質在結構與功能上的資訊，如定位突變 (site-directed mutagenesis)、配位基

與蛋白質結合之研究 (ligand binding studies)、酵素分析 (enzyme assay) 及蛋白質間的作用等⁽¹⁸⁾。

欲解出蛋白質結構的方法不外乎 X 光繞射技術及核磁共振技術。X 光繞射技術已發展得非常完備，它不但快速且較不受分子量的限制，但是並不是每一種蛋白質都能得到良好的結晶，如膜蛋白結晶的取得仍然是現今結晶技術的一大挑戰。以核磁共振找尋蛋白質結構較耗費人力及時間，尤其是圖譜指定的工作既複雜又費時，一個具有 20 kD 的蛋白質往往需要一年以上的時間才能解出，而具有較大分子量的蛋白質也因為有較短的 T_2 ，使得 line broadening 變得更嚴重，增加了困難度。值得慶幸的是這兩問題可以因為最近發展的 automated assignment 及 TROSY 技術而改善，雖然 automated assignment 的技術目前應用的還不廣，但其發展性及應用性應該是值得預期的，屆時將可大大的縮短需要的時間。TROSY 技術的發展將 NMR 在蛋白質結構上的應用帶往另一個新境界，配合各種同位素標定方法，可將分子量的界線推至 50 kD。正因為各種 NMR 技術仍不斷的發展與改善，相信 NMR 在未來結構生物學及結構基因組計畫上的貢獻將會越來越大。

七、結語

核磁共振技術因其多元性的應用已成為結構基因學上不可或缺的工具，其未來的發展更是不可限量，尤其在未來的結構基因組計畫中必能扮演著舉足輕重的角色。台灣有幸能在人類基因定序計畫中參與了 4 號染色體的定序，在這項劃時代的創舉中有所貢獻。而我們在核磁共振方面的研究人才菁英輩出，研究成果也相當輝煌，藉由整合國內其他分子生物學、生物資訊學及 X 光繞射技術方面的專家，台灣有能力也有責任貢獻我們在結構生物學上的專長，讓台灣在結構基因組計畫中亦佔有一席之地。

參考文獻

1. K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, and K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366-12371 (1997).

2. J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, and N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy-principle and practice*, San Diego CA: Academic Press, 533 (1996).
3. A. I. A. Kumar, S. Srisailam, T. K. S. Kumar, K. M. Kathir, I. M. Chiu, and C. Yu, in press.
4. S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, and S. W. Fesik, *Science*, **274**, 1531 (1996).
5. V. Sklenar, D. Torchia, and A. Bax, *J. Magn. Reson.*, **73**, 375 (1987).
6. L. E. Kay, T. Jue, B. Bangerter, and P. C. Demoi, *J. Magn. Reson.*, **73**, 558 (1987).
7. N. R. Nirmala and G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7557 (1988).
8. L. E. Kay, D. A. Torchia, and A. Bax, *Biochemistry*, **28**, 8972 (1989).
9. G. Lipari and A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4546 (1982).
10. G. Lipari and A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4559 (1982).
11. N. A. Farrow, R. Muhandiram, A. U. Singer, S. M. Pascal, G. Gish, S. E. Shoelson, T. Pawson, I. D. Forman-Kay, and L. E. Kay, *Biochemistry*, **33**, 5984 (1994).
12. Y. H. Chi, T. K. S. Kumar, I. M. Chiu, and C. Yu, *J. Bio. Chem.*, **275**, 39444 (2000).
13. A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford: Clarendon Press (1961).
14. Y. Bai, T. R. Sosnick, L. Mayne, and S. W. Englander, *Science*, **269**, 192 (1995).
15. D. Samuel, T. K. S. Kumar, T. Srimathi, H. C. Hsieh, and C. Yu, *J. Bio. Chem.*, **275**, 34968 (2000).
16. D. Samuel, T. K. S. Kumar, K. Balamurugan, W. Y. Lin, D. H. Chin, and C. Yu, *J. Bio. Chem.*, **276**, 4134 (2001).
17. S. E. Brenner, C. Chothia, and T. Hubbard, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 369 (1997).
18. S. K. Burley, *Nature Struct. Biol.*, **7**, 932 (2000).