

克雷伯氏肺炎桿菌核磁共振結構基因 體學研究

NMR Structural Genomics of *Klebsiella Pneumoniae*

羅世奇、羅元超、江盛國、潘韻如、陳金榜

Shih-Chi Luo, Yuan-Chao Lou, Sheng-Kuo Chiang, Yun-Ru Pan, Chin-Pan Chen

依據衛生署的資料，肺炎在臺灣十大死因中幾乎年年上榜。而導致肺炎菌種之一的克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 更是造成台灣社區和院內感染的前五大致病菌之一。在一些免疫力差的病人 (如糖尿病) 身上常造成伺機性感染，引起敗血症合併化膿性肝膿瘍，其中有一成病人會伴隨腦膜炎和轉移性眼球炎。最近流行病學調查發現，台灣因抗生素濫用造成 KP 菌抗藥性基因突變，甚至衍生出新品種，大大增加了治療上的困難。有鑑於此，國家基因體計畫將 KP 菌列為重點研究菌群之一，本實驗室則為 KP 菌功能性結構基因體學群體計畫之一員。根據國衛院蔡世峰博士的基因定序團隊與其他研究組所發現的毒性因子和抗藥性組群，我們挑選出相關標靶蛋白，並將利用旋光光譜儀及核磁共振光譜儀研究這些標靶蛋白的三維立體結構，以探討結構與功能之關係，期能幫助發展治療 KP 菌所衍生相關疾病之藥物。

Based on the statistical analysis by the Department of Health, *pneumonia* is one of the top ten cases causing death every year in Taiwan. *Klebsiella pneumoniae* (KP) is one of the top five pathogenic bacteria that cause community and hospital infection of *pneumonia* in Taiwan. In some immunodeficient patients such as diabetic, KP forms opportunistic infection and causes septicemia combining with Pyogenic liver abscess. It is estimated that ~ 10% of these patients accompany meningitis and metastatic ophthalmitis. Recently, on the basis of the epidemiological investigations, the drug-resistant mutant genes of KP have been found due to the misuse of antibiotics, and even evolve into new strains which make lots of difficulties on therapies. It is therefore that the National Research Programs for Genomic Medicine (NRPGM) lists KP as one of the major bacterial researches that should be pursued. Our laboratory, a member of the KP functional and structural genomics projects of Academia Sinica, has selected several target proteins related to virulence and drug-resistance factors, as discovered by Dr. Shih-Feng Tsai in NHRI, for structural study. A variety of biophysical techniques, especially high-resolution NMR experiments, will be carried out on these target proteins. It is hoped that the 3D solution structures of these target proteins as well as other biophysical properties could provide valuable information for drug development on therapeutics related to *Klebsiella pneumoniae*.

一、前言

克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 屬於革蘭氏陰性腸內桿菌科 (*Enterobacteraceae*)，是一種伺機性感染的病原細菌，平時少量存在於健康人體的呼吸道或腸道中，對免疫力下降的病人會造成嚴重感染，可引起肺炎、敗血症、腦膜炎、肝膿瘍、眼內炎、泌尿系統發炎或是傷口感染等，若治療不當則死亡率極高。在台灣地區，造成化膿性肝膿瘍的菌株中，以 KP 最為常見。

KP 是院內感染常見的菌種之一，且多數的分離株都為多重抗藥性的菌種，在治療上造成極大的困擾。值得注意的是已有 10%–20% 的院內感染菌株產生廣效性頭孢子黴素水解酵素 (extended spectrum β -lactamases, ESBLs)⁽¹⁾，嚴重的抗藥性讓 KP 成為醫療管控問題中的燙手山芋。如何預防 KP 感染、早期診斷以及有效治療受到抗藥菌株感染的病患真是當務之急。然而，發展有效的抗菌策略則仰賴我們對該菌致病機轉的深入瞭解。

二、克雷伯氏肺炎桿菌毒性因子介紹

根據文獻報導⁽²⁾，已知的 KP 致病相關毒性因子 (圖 1) 說明如下。

1. 多醣類的莢膜

多醣類的莢膜 (capsular polysaccharides, CPS) 主要包圍在 KP 菌的最外層，它是一種細菌表面抗原，其組成成分中含有尿酸 (uronic acid)，CPS 上的酸性組成可以使 KP 具有黏性表現，而黏性程度則被報導出與感染的形成有關。此外，尿酸還會跟數個醣類單元形成 K 抗原 (K antigen)，在 KP CPS 的血清型以第一、二型 K 抗原 (K1、K2) 最具致病力，因為它們缺乏 mannose- α -2/3-mannose 的結構而不會被巨噬細胞所辨認吞噬，因此莢膜可使細菌具有抗吞噬 (anti-phagocytosis) 同時又能抗血清殺菌的能力。

2. 脂多醣體

脂多醣體 (lipopolysaccharides, LPS) 位在細胞壁上被 CPS 包覆在內，組成單元包括脂質 A、核

心醣脂與 O 抗原。其中 O 抗原側鏈會延伸到 CPS 外，具有抵抗殺菌的效果，脂質 A 則會引起發燒，產生敗血性休克等的免疫反應。

3. 纖毛黏附因子 (Fimbrial Adhesins)

在感染宿主之前，細菌必須先黏附到宿主細胞上，這時候，纖毛黏附蛋白就發揮了很大的功能。通常細菌都擁有多種不同型式的纖毛黏附蛋白，根據報導指出，KP 中最常見的是第一及第三型纖毛黏附蛋白。第一型纖毛是屬於具有 mannose sensitive 的纖毛，其特徵為纖毛呈瘦長型，具有部分的 lectin-like protein，使得纖毛會跟紅血球上的 N-acetyl-D-galactose-like receptor 互相作用而產生紅血球凝集的現象。當 mannose 存在時會抑制與紅血球產生凝集反應。第三型纖毛是屬於 mannose resistant 的纖毛，顧名思義，纖毛與紅血球的凝集反應不會受到 mannose 存在與否影響。此外還有非線毛型的黏附蛋白，如 CF29K 與 KPF28 等。

4. 螯合鐵蛋白 (Siderophore)

即奪取鐵的系統 (iron acquisition system)。抓鐵可促進細菌的生長速度，此類物質對鐵離子具有極高的親和力，可以分成 enterochelin 以及 aerobactin 兩種，KP 可利用抓鐵的機制來增強致病力。關於 enterochelin 致病力與否的說法眾說紛紛。在沙門氏桿菌的動物實驗中，有人發現它的突變會造成致病力下降，但也有人發現合成 enterochelin 的能力和細菌的致病性並無相關。相對於 enterochelin，aerobactin 對細菌致病力的貢獻

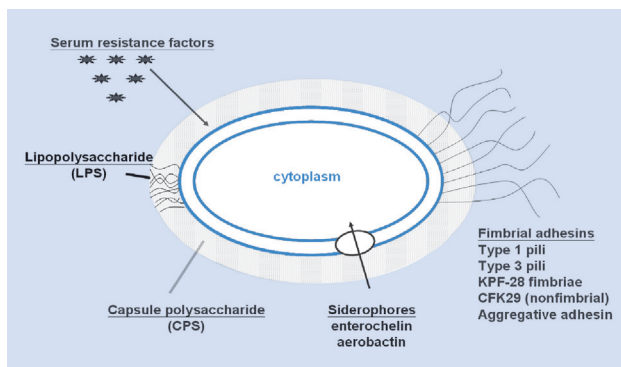


圖 1. 克雷伯氏肺炎桿菌的毒性因子說明圖。

則有較明確的說法。首先，aerobactin 具有較佳的生理穩定性與溶解度，也因此具有較高的執行效率。此外，雖然 aerobactin 在傳遞完鐵離子後會被 esterase 水解，在每次的鐵離子運輸後它仍可被重複利用。而且，根據 Nassif 和 Sansonetti 的研究發現⁽³⁾，如果把 aerobactin 的基因從 *Klebsiella pneumoniae* 菌中的 K1 與 K2 血清型菌株抽取出來後，再轉移到不具毒性的 KP 菌株上 (siderophore-negative)，則這些菌株可以在小鼠的腹膜炎疾病模式中呈現明顯加強的致病力。由此可證明 aerobactin 對於 *Klebsiella pneumoniae* 的致病能力扮演重要角色。

5. 血清抵抗因子 (Serum Resistance Factor)

大多數革蘭氏陰性細菌對於人類血清的殺菌效應都很敏感，為了對抗寄主細胞的血清防禦機制，致病性微生物發展出許多策略來反擊血清的殺菌能力，即抗血清的特性。臨床上具有疾病性的菌株通常也都具有抗血清效果，也因此抗血清效應被認為是與疾病感染起始和症狀嚴重程度的相關特徵之一。到目前細菌血清抵抗因子的確切機制仍不是很清楚。

三、克雷伯氏肺炎桿菌結構基因體群體計畫

由於克雷伯氏肺炎桿菌在台灣臨床上扮演重要角色，國家基因體醫學計畫乃將之列為重點研究菌群之一，國衛院蔡世峰博士的研究團隊已完成台灣最具毒性的台大醫院 K2044 號克雷伯氏肺炎桿菌基因定序工作，並預測該菌的染色體含有 5110 個基因，其質體則含有 312 個基因。隨著大量基因體定序計畫的完成以及蛋白質結構決定方法的長足進步，世界各國的結構基因體計畫群起而生。例如 Structural Genomics Research Consortium — <http://proteome.bnl.gov/>；New York Structural Genomics Consortium — <http://www.nysgrc.org/>；Northeast Structural Genomics Consortium — <http://www.nesg.org/>；Berkely Structural Genomics Center — <http://www.strgen.org/>；Structural Biology

Industrial Platform — <http://www.sbip.org>；RIKEN Genomics Sciences Center — <http://www.riken.go.jp/>。於是在中央研究院生物醫學所黃太煌研究員 (計畫總主持人) 的帶領下，全世界第一個以克雷伯氏肺炎桿菌做為大規模結構基因體學研究的團隊誕生了。這個團隊包括中研院兩組核磁共振研究實驗室 (黃太煌與陳金榜研究員)，三組 X 光一晶體繞射實驗室 (蕭傳鐙，廖彥銓及王惠鈞研究員)，一組細胞膜蛋白結構實驗室 (馬徹研究員)，及一組生物資訊實驗室 (清大呂平江教授)。

為了瞭解 KP 所引發相關疾病的致病機轉，有必要針對該菌的毒性因子蛋白群及抗藥性蛋白群組進行有系統的結構基因體學研究。本計畫的目標是希望能以實驗方式提供在 KP 基因體中所有蛋白的三度空間結構，標地物的選定主要是針對那些不能以同源序列模擬 (sequence homology modeling) 方式預測結構折疊的蛋白做為研究對象，結構與功能的預測將會根據與已知功能及結構的蛋白相似程度做命名。結構基因體學的終極目標除了希望以實驗方式決定所有結構，也希望能提供在蛋白質場 (protein space) 內的蛋白質所有可能折疊方式，進而提高目前根據一級序列預測三級蛋白質結構的精準度。我們實驗室主要是利用核磁共振光譜儀來定出蛋白質的立體結構，整個實驗的流程如圖 2 所示，以下將依照各流程做介紹並舉例說明。

四、標靶蛋白的選擇

根據由呂平江教授所建構的克雷伯氏肺炎桿菌結構基因體學專屬網頁 (<http://kp.life.nthu.edu.tw>) (圖 3) 中的抗藥性蛋白群組與逆境蛋白群組，一共挑選了 23 個標靶蛋白 (表 1)，因為 KP 可能在治療過程中，藉由表現這些抗藥性與逆境忍受能力相關基因產物而得以存活或甚至變得更具侵襲性。這些蛋白中共有五個第一優先順位蛋白，其中有三個屬於抗藥性蛋白 (KP2657、KP3573、KP3357)，有兩個屬於逆境蛋白 (一個是熱休克蛋白 KP0633，另一個是冷休克蛋白 KP3393)。

KP2657、KP3573、KP3357 分別是 multiple antibiotic、polymyxin 以及 albicidin resistance 蛋

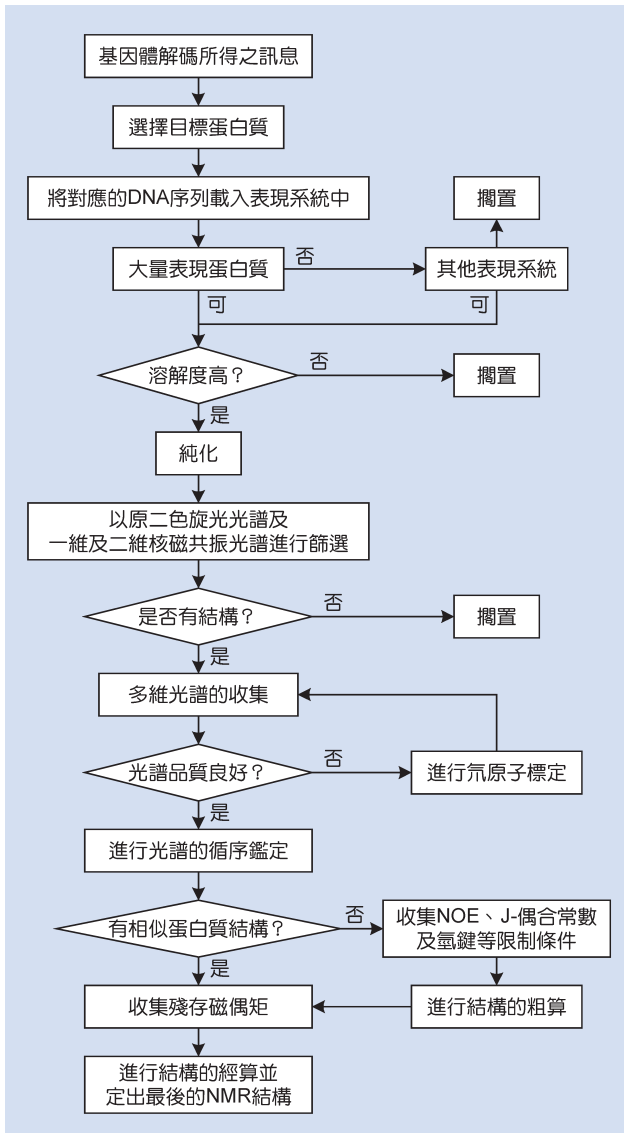


圖 2. 利用核磁共振光譜定出蛋白質立體結構的簡易流程圖。

白。目前已經知道不同種類的抗生素分別會作用在不同時間點的細菌生活史中。一般而言，細菌會採用三種不同型式的抗藥性機制來抵抗這些抗生素的作用。首先是將抗生素去活化，例如產生 β -lactamases，此種酵素可以水解例如 cephalosporins、penicillins 及 aztreonam 等的抗生素，見於 *Klebsiella* 與 *E. coli* 等菌種。它跟抗生素的多抗藥性也有很大的關連，且通常是由質體編碼 (plasmid encoded) 而來⁽¹⁾。第二種機制是限制抗生素進入細菌的機會，例如藉由改變 vancomycin

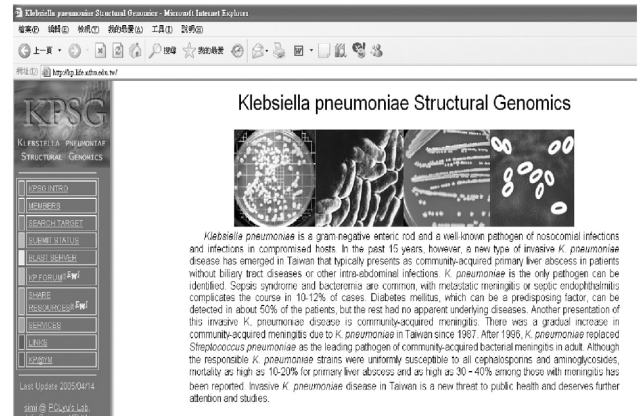


圖 3. 克雷伯氏肺炎桿菌結構基因體計畫專屬網頁。

表 1. 本實驗室所選定做為核磁共振研究的 23 個抗藥性與逆境標靶蛋白。

類型	代號	長度 (胺基酸)	順序
抗藥性蛋白	KP2657	72	1
	KP3573	81	1
	KP3357	221	1
	KP3486	127	2
	KPP267	151	2
	KPP270	192	3
	KPP271	191	3
	KPP265	194	3
	KPP254	213	3
	KP3007	198	3
KPP136	228	3	
逆境蛋白	KP0633	156	1
	KP3393	160	1
	KP2343	74	2
	KP2344	119	2
	KP2345	72	2
	KP1881	83	2
	KP3077	135	2
	KP2622	157	2
	KP2342	222	2
	KP5468	137	3
	KP0088	176	3
	KP5266	70	3

pentapeptide 上的某一取代基而達到抗藥性的目的⁽⁴⁾。第三種機制是透過細菌的不滲透性，在細胞膜上的 porin 會透過外膜限制抗生素滲入，以及利用 efflux pump 將抗生素從細菌細胞質內排出⁽⁵⁾。

KP0633 是一種假定的熱休克蛋白，除了抗生素的處理外，溫度的改變對細菌而言也是一種重要的壓力來源，它會影響細胞膜內的流動性、蛋白質的可動性，以及核酸的構形變化，這些改變都會造成重大的調控結果。

K3393 也是一種假定的冷休克蛋白，冷休克會誘發細菌改變以維持適當的細胞膜流動性。當溫度從攝氏 37 度降到 15 度時，大部分的蛋白合成會被抑制，但約有十五種冷休克蛋白 (CSPs) 的表現量會增加，其中 CspA 被認為是最主要的蛋白，其他大約有五十多個同源蛋白也在細菌中被發現。有人提出假說認為 CspA 會跟 RNA 結合，使其二級結構變得較不穩定，它有可能是扮演一種 chaperone 的角色，使冷休克過程中的轉譯作用變得更有效率⁽⁶⁾。

五、標靶蛋白的表現、純化與核磁共振光譜樣本製備

選定好的蛋白基因是以聚合酶鏈鎖反應從雷伯氏肺炎桿菌基因體 DNA 中複製得到後，再選殖到 pET 蛋白質表現系統 (Novagen) 後，以 *E. coli* BL21 做為表現重組蛋白的勝任細胞。在蛋白質的 C 端將多出六個重複的組胺酸 His-6 tag 以形成一融合蛋白，便於用親附性管柱做進一步純化。關於未含同位素標定的蛋白製備，是讓轉型好的大腸桿菌株生長在攝氏 37 度含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin 的 LB broth 中，直到 OD_{600} 值到達 0.6 後，蛋白質可以被 1 mM IPTG (isopropyl-D-thiogalactoside) 誘發表現出來 (大約需時三小時)。接著將菌液離心下來後用緩衝液回溶 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)，然後再用均質機將細胞壁打破，取上清液進行蛋白質純化，純化好的蛋白則是以 SDS-PAGE 與 ES/MS 做進一步分子量分析與確認。

^{15}N 及 ^{13}C 同位素標定蛋白則是從生長在含有 1 g/L $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 1.5 g/L ^{13}C -glucose 的 M9 培養基的菌液製備而得。此外，為了研究大分子量蛋白質，我們也採用部分氘原子標定 (fractional deuteration)。此方法是將養菌的培養液中的水換成重水，如果氘原子標定比例要達到 90% 以上，則需將培養液中的養分來源葡萄糖換成氘原子標定之葡萄糖，如此

一來表現出的蛋白質分子上的氘原子便會被置換成氘原子。由於氘原子的迴旋磁性比 (gyromagnetic ratio) 比氫原子要小很多，將氫原子置換成氘原子可減少氫氫偶極弛緩 ($^1\text{H}-^1\text{H}$ dipolar relaxation) 及氫氫偶合 ($^1\text{H}-^1\text{H}$ scalar couplings) 所造成的自旋-自旋弛緩 (spin-spin relaxation) 速率的加快，而自旋-自旋弛緩速率愈慢，光譜靈敏度愈好，訊號的解析度也會加強，因此氘原子標定對改善大分子量蛋白質的光譜訊號相當有幫助。

六、圓二色旋光光譜儀篩選蛋白質穩定最佳條件

關於那些不能溶解在高濃度下 ($\sim 1 \text{ mM}$) 的蛋白，本實驗室是先以圓二色旋光光譜儀 (circular dichroism, CD) 來偵測其二級結構。藉由比較在不同條件下 (如緩衝液、pH 值和溫度等) 的蛋白質溶液，可以幫助我們找到蛋白質溶解度最高與結構最好的條件。光譜儀會先用溫度 298 K (+)-10-camphorsulfonic acid (CSA) 校正，一般實驗的進行是用 1 mm 光徑的比色槽，內含有濃度大約 20 mM 的蛋白溶液。例如圖 4 為 KPP267 在不同 pH 值下的 CD 光譜圖，從該圖可以看出該蛋白在 pH 4 和 pH 6 的環境下具有較強的訊號 (在 205 nm 與 220 nm 波長的位置)，表示有可能在該條件下的蛋白結構性較強，也暗示其穩定性在這兩種 pH 值

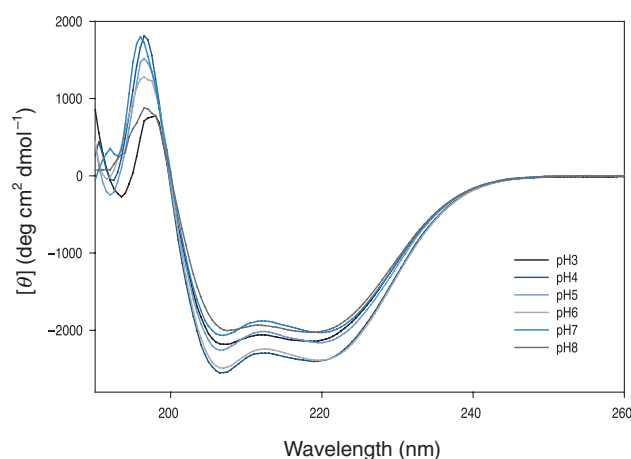


圖 4. 蛋白 KPP267 在不同酸鹼值下的 CD 旋光光譜。

下比較好。利用這樣的技術我們可以少量蛋白來大量篩選蛋白質穩定的最佳條件。

七、核磁共振光譜多維實驗訊號之收集

利用圓二色旋光光譜儀篩選出高溶解度及高穩定度的蛋白及其最佳緩衝液條件後，便可製備 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 同位素標定的蛋白樣品。一般來說蛋白質的濃度達 1 mM，體積約 250 μL ，純度高於 90% 以上，即可用於收集多維光譜。蛋白質的核磁共振多維光譜最重要的兩個要點是解析度及靈敏度，尤其在結構基因體計畫中往往有較高分子量之蛋白質標的，一般來說分子量越大，光譜中交叉峰的寬度越寬而強度越低，也就是解析度越差而靈敏度越低，這也是為何以往核磁共振只能用於研究分子量小於 25 kDa 以下的蛋白結構。所幸隨著核磁共振領域的發展，現今已有不少的進展可以克服上述瓶頸。首先是磁場強度的提升，磁場強度愈大其收集的光譜解析度也愈好，越能分辨鄰近的交叉峰（圖 5），進而分析更大的蛋白質分子。此外，核磁共振儀的靈敏度也與磁場強度的平方成正比，故在實驗中所使用的磁場強度增加兩倍時，其靈敏度就可以增加為原先的四倍，如此一來在同樣的實驗時間內，樣品中蛋白質濃度為原先的四分之一，即可測得所需的光譜，這對分子量較大的蛋白質樣品來說有相當

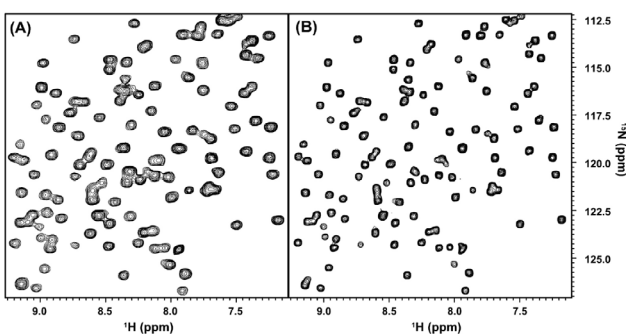


圖 5. 蛋白 KPP270 的二維 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC 光譜，利用一般探頭的 600 MHz 核磁共振儀 (a) 及利用配備超低溫探頭的 800 MHz 核磁共振儀收集 (b)，由此圖可看出利用 800 MHz 核磁共振儀收集的光譜解析度較好。

的助益，因為一般大分子量蛋白質往往不易濃縮至高濃度。核磁共振光譜儀的靈敏度與收集訊號的探頭也有相當大的關連。探頭是進行核磁共振實驗和收集實驗訊號最重要的裝備，而探頭中的核心部分，是由能進行放射與收集無線電波的線圈所組成，這些線圈在收集訊號時的靈敏度會受到本身雜訊的影響，而雜訊的大小和溫度有關，若線圈自身的溫度愈低，雜訊愈小，其收集訊號之靈敏度也就愈高。近幾年新發展的超低溫探頭 (cryogenic probe)，可以將線圈冷卻至絕對溫度 25 K，並且不會影響到樣品的控溫。而隨著線圈的低溫效應，超低溫探頭的靈敏度可以達到一般探頭的四倍（在低鹽的條件下）。

目前本實驗室所有的樣品都利用隸屬於行政院國家科學委員會的高磁場液態核磁共振核心的核磁共振光譜儀收集光譜（圖 6），核心內共有五台核磁共振光譜儀，一台 500 MHz，三台 600 MHz，及一台 800 MHz，其中一台 600 MHz 及 800 MHz 配備有超低溫探頭。有了超低溫探頭 800 MHz 核磁共

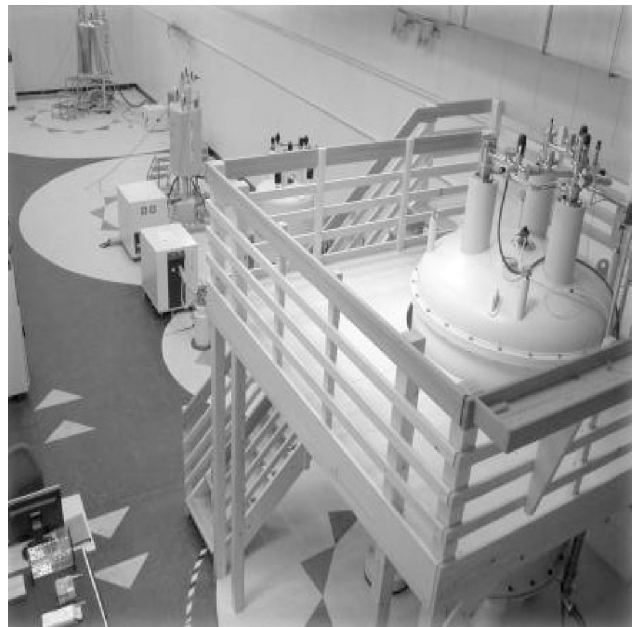


圖 6. 行政院國家科學委員會的高磁場液態核磁共振核心的核磁共振光譜儀。核心內共有五台核磁共振光譜儀，一台 500 MHz、三台 600 MHz，及一台 800 MHz，其中一台 600 MHz 及 800 MHz 配備有超低溫探頭。

表 2. 利用配備超低溫探頭的 800 MHz 核磁共振儀收集蛋白樣品 KPP270 (22 kDa) 各種 3D 光譜的參數設定及其所花費的時間，總和起來，八個 3D 光譜總共只花了 12 天又 3 個小時。

3D 實驗	核種			光譜頻寬 (ppm)			複和點 (complex points)			Scans	時間 (小時)
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3		
HNCO	^{13}C	^{15}N	^1H	16	36	16	96	32	1024	8	11
HN(CA)CO	^{13}C	^{15}N	^1H	16	36	16	96	32	1024	16	22
CBCA(CO)NH	^{13}C	^{15}N	^1H	66	36	16	120	32	1024	8	14
HNCACB	^{13}C	^{15}N	^1H	66	36	16	120	36	1024	24	48
C(CO)NH	^{13}C	^{15}N	^1H	70	36	16	110	36	1024	16	29
HBHACONH	^1H	^{15}N	^1H	7	36	16	110	36	1024	12	22
HCCH-TOCSY	^1H	^{13}C	^1H	8.5	36	16	110	64	1024	16	49
NOESY-HSQC	^1H	^{15}N	^1H	15	36	16	256	52	2048	16	96

振光譜儀的幫助，一些溶解度不高 (~ 0.3 mM) 及分子量較大 (~ 22 kDa) 的蛋白樣品，也能輕易收集到清晰的三維光譜，大大提高了核磁共振研究 25 kDa 的分子量限制。表 2 列出了配備超低溫探頭的 800 MHz 核磁共振儀收集蛋白樣品 KPP270 (22 kDa) 各個 3D 光譜的參數設定及其所花費的時間。

八、蛋白質胺基酸骨架循序判定與二級結構預測

循序判定主要依賴 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 同位素標定的蛋白質樣品所進行之三維實驗。雙重標定的蛋白質分子其 ^{13}C 和 ^{15}N 原子之間會產生偶合的現象，利用這

些偶合現象我們可將第 i 個殘基的共振訊號傳送至第 $i + 1$ 個殘基的醯胺基氮原子上，如此兩兩相互組合再加上不同的胺基酸會有不同的化學位移交叉峰的分布，以此對照蛋白質分子的胺基酸序列，便能依照順序從 N 端至 C 端完成所有殘基骨架及側鏈上的化學位移鑑定。上述方法就是所謂的循序判定⁽⁷⁻⁹⁾，也是一般核磁共振光譜學家所採用的判定策略。舉例來說，圖 7 即為蛋白 KP3573 的 HNCACB

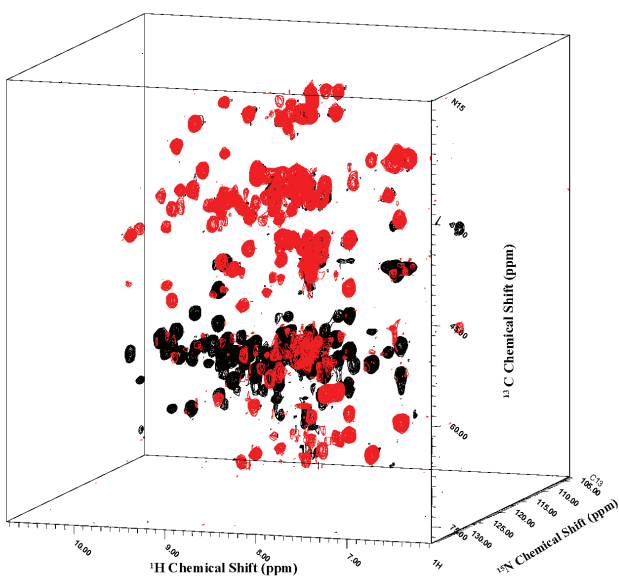


圖 7. 蛋白 KP3573 的 HNCACB 三維實驗光譜圖。

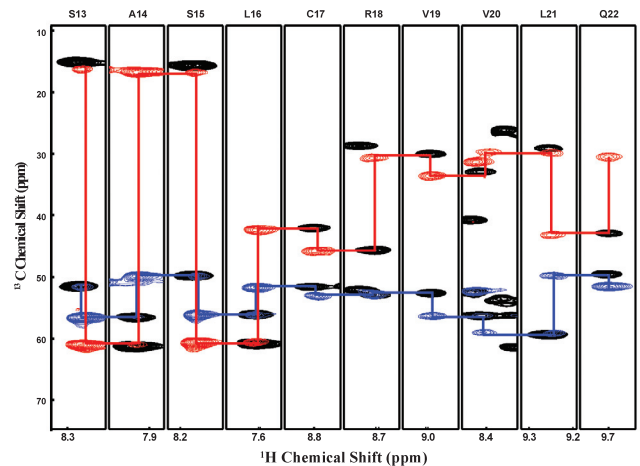


圖 8. 蛋白 KP3573 的 HNCACB 和 CBCA(CO)NH 光譜的部分氨基酸循序判定條狀圖 (strip plot)，CBCA(CO)NH 實驗以黑色表示，代表前一個氨基酸的 C_α 與 C_β 的訊號，而在 HNCACB 圖譜中，可同時看到自己和前一個氨基酸的 C_α (藍色) 與 C_β (紅色) 的訊號，利用這兩個光譜，便可完成蛋白質骨架的循序判定。

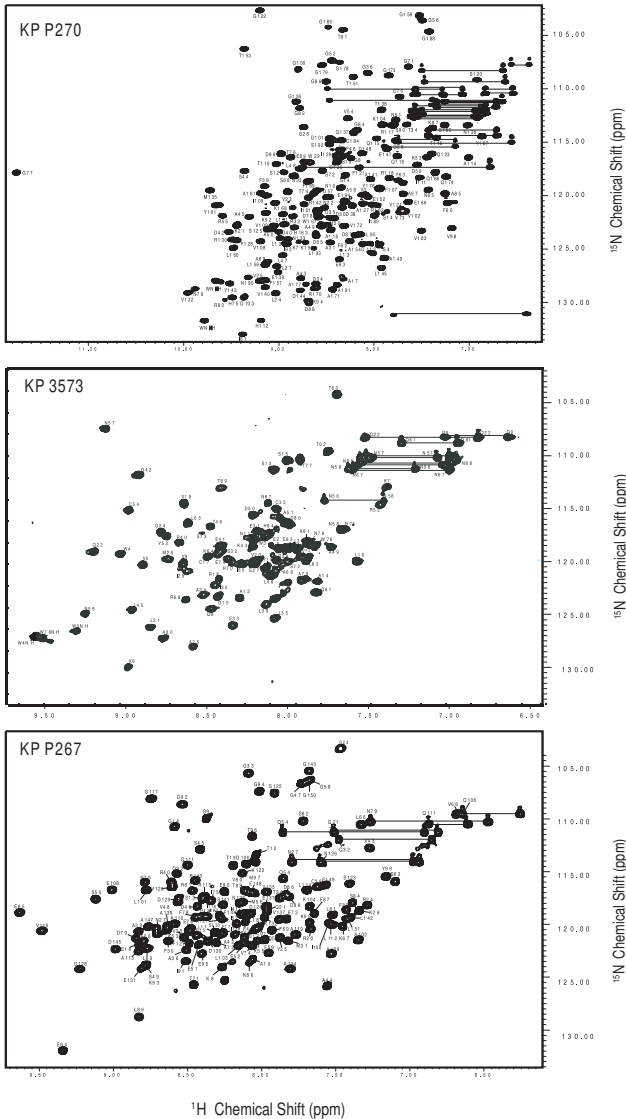


圖 9. 蛋白 KPP270、KP3573 與 KPP267 的二維 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC 光譜，這三個蛋白質目前都已完成了骨架的循序判定。

三維實驗光譜圖，利用該組實驗 (HNCACB 與 CBCACONH) 所收集到的訊號，我們可以用來循序判定蛋白分子所有殘基骨架的化學位移 (圖 8)。本實驗室已經完成三個 KP 標靶蛋白的骨架化學位移循序判定 (圖 9)。另外根據 ^{15}N NOESY-HSQC (圖 10) 與 ^{15}N TOCSY-HSQC 的三維光譜實驗，我們可以進行蛋白質分子的側鏈化學位移鑑定 (圖 11) 並找尋 NOE 限制條件，做為結構計算的基礎。目前有不少分析軟體嘗試將骨架化學位移循序判定流程自動化，例如 AutoAssign⁽¹⁰⁾、CONTRAST⁽¹¹⁾ 及

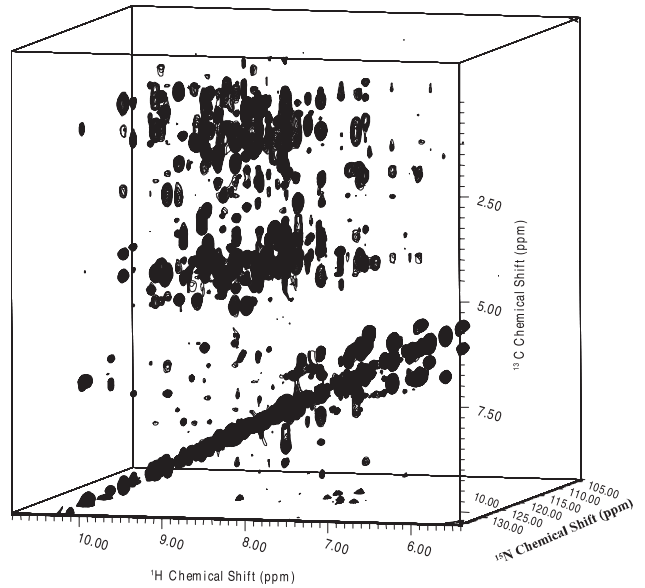


圖 10. 蛋白 KP3573 的三維實驗光譜圖 (^{15}N NOESY-HSQC)。

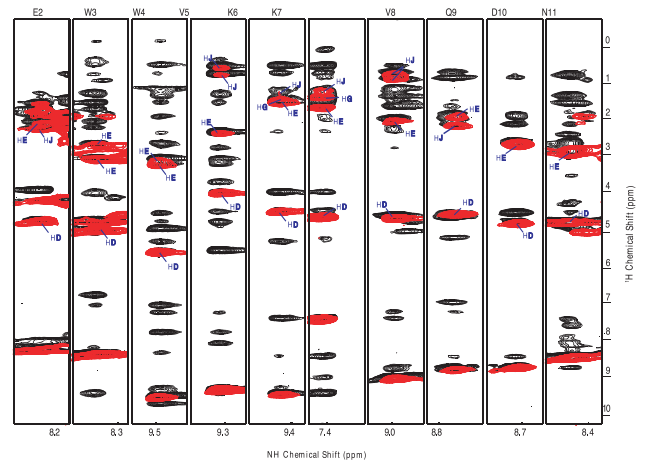


圖 11. KP3573 的 ^{15}N NOESY-HSQC 與 TOCSY-HSQC 光譜的條狀圖。紅色代表 ^{15}N TOCSY-HSQC，可用來判定殘基本身的質子化學位移訊號；黑色代表 ^{15}N NOESY-HSQC，可用來判定質子間的 NOE 限制條件，做為結構計算的基礎。

GARAN⁽¹²⁾ 等。本實驗室因為利用軟體 NMRView⁽¹³⁾ 來分析光譜，因此選擇 smartnotebook⁽¹⁴⁾ 作為循序判定的輔助軟體。不過值得注意的一點是所有自動鑑定軟體都極度依賴解析度良好的三維光譜，當重疊的訊號增加時，判定的失敗率與錯誤率也會跟著

上升。循序判定完成之後，根據 H_{α} 、 C_{α} 、 C_{β} 、 CO 及 N 的化學位移，我們可利用化學位移指標 (chemical shift index) 來判斷此蛋白質的二級結構 (圖 12)，並進一步以 TALOS⁽¹⁵⁾ 來得到蛋白質胺基酸骨架雙面角 (ϕ , ψ dihedral angles) 的限制條件。

九、蛋白質結構計算

傳統以核磁共振決定蛋白質三維結構所採用的限制條件主要有 NOE、雙面角及氫鍵這三種限制條件。核子自旋經由化學鍵所產生的偶合現象會使氫原子的吸收峰一分為二，兩個吸收峰在化學位移上的差值便是 J-偶合常數。一般較常量測的 J-偶合常數是 $^3J_{HN\alpha}$ (由醯胺基上的質子和鄰接的 C^{α} 質子

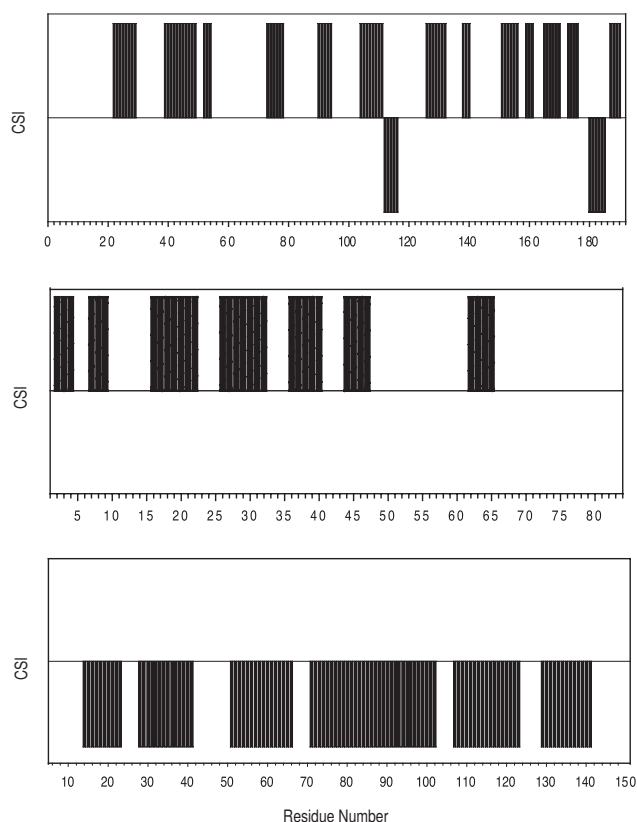


圖 12. 三個不同標靶蛋白的 CSI 二級結構預測圖。依序為 KPP270、KP3573 與 KPP267。由 CSI 的結果可以預測 KPP270 含有 13 個 β -摺板與 2 個 α -螺旋結構；KP3573 含有大約 7 個 β -摺板而 KPP267 則有 6 個 α -螺旋。

偶合所產生)，其偶合常數的大小會因雙面角的不同而有差異，而不同的二級結構會有不同的雙面角，因此經由雙面角這個限制條件，我們便可很清楚地知道蛋白質骨架的二級結構。氫鍵的確認可由量測醯胺基氫原子和水溶液中質子的交換速率而來，參與形成氫鍵的氫原子其交換速率會比一般醯胺基氫原子來得慢，透過氫鍵限制條件的獲得，也可幫助我們了解蛋白質骨架的二級結構。

以上兩種限制條件雖然都很容易取得，不過它們主要用來幫助光譜學家了解一個蛋白質的二級結構，而要得到一個高解析度的三維結構主要依賴 NOE 限制條件的取得。NOE 的效應是由於原子核自旋的磁偶矩交互作用所造成，其大小和兩原子核間的距離六次方成反比，也就是兩個氫原子間的距離越短，NOE 光譜上所量測到交叉峰的強度就越強。不過 NOE 效應有距離的上限，通常我們只能量測到小於 5 Å 的距離所造成的 NOE 效應。而對結構計算來說，一個殘基要有 10 個以上的 NOE 限制條件方能得到一個高解析度的三維結構，所以核磁共振光譜學家在決定蛋白質的三維結構時，會花上數個月甚至一年以上的時間在鑑定氫原子間的 NOE 限制條件。而如何正確無誤又快速的完成 NOE 的鑑定，是核磁共振光譜學家在結構蛋白質體學計畫中所面臨的最大難題。

本實驗室在 NOSEY 光譜的判定上除了以人工的方式進行之外，也利用自動判定軟體 CYANA⁽¹⁶⁾ 來加速整個流程。CYANA 結合了自動 NOSEY 光譜判定和結構計算的功能，在 NOSEY 光譜判定上，它除了根據化學位移的位置做判定外，最重要的是它採用了網狀定位 (network-anchoring) 的策略。所謂的網狀定位就是：假設 A、B、C 三個質子彼此的距離很接近，當程式發現一個 X 質子和 A 質子的 NOE 交叉峰時，它會預期也可以發現 X 質子和 B、C 兩個質子的交叉峰，如果發現了，它會把這些 NOE 交叉峰當成確定的限制條件，如果沒有發現，則程式會降低 X 質子和 A 質子的 NOE 交叉峰的可信度，甚至將其排除在結構計算之外。這種網狀定位的策略大大提升了自動 NOSEY 光譜判定的可信度，也讓 CYANA 成為目前較多人採用的自動 NOSEY 光譜判定和結構計算的軟體。

除了上述傳統的限制條件之外，近幾年來核磁共振實驗新的進展也讓結構計算更加快速和準確，其中殘存磁偶矩耦合常數 (residual dipolar coupling, RDC)⁽¹⁷⁾ 實驗可說是最重要的里程碑。傳統核磁共振決定三維結構所採用的 NOE、雙面角及氫鍵等，都是小範圍的限制條件，對大分子蛋白質來說，其結構往往是由幾個區塊 (domain) 彼此以迴圈 (loop) 相連結所成，而迴圈部分由於動性較大所以 NOE 的數量較少，計算出的結構其區塊和區塊的相對位置便不容易確定。而 RDC 可以測量兩核子自旋之間的磁偶矩和磁場的夾角，這是一種整體方位上的限制條件，剛好可以彌補 NOE 條件的不足。

殘存磁偶矩耦合常數的原理如下：一對核子自旋之間的磁偶矩耦合常數和兩核子間的距離及連接兩核子的向量與磁場方向的夾角角度有關，其關係式可以簡化如下： $\langle D \rangle = C(3\cos^2\theta - 1)/2r^3$ ， $\langle D \rangle$ 是磁偶矩耦合常數， C 是一個簡化後的常數， θ 是連接兩核子的向量與磁場方向的夾角角度， r 是兩核子的距離。當蛋白質溶解在一般的緩衝溶液時，其分子運動是散亂的，此時夾角角度會因為時間的平均而趨於零，磁偶矩耦合常數也就等於零。

不過在 1997 年時，光譜學家 A. Bax 在這方面有了驚人的突破，他在緩衝溶液中加入少量的「雙層磷脂」(phospholipid bilayer)，這些脂肪類會在溶液中形成所謂的「bicells」，並將整個溶液轉變成液晶 (liquid crystal) 的型態，而在這種液晶型態的溶液中，蛋白質分子的運動便出現了少許的非均勻性，這小於千分之一的非均勻性會造成一明顯的偶合常數，因此稱之為殘存磁偶矩耦合常數。除了加入磷脂類外，後續的研究也發現某些病毒或噬菌體在高磁場下也會形成規律的排列⁽¹⁸⁾，而引發 RDC 效應。

在 RDC 值的量測上，目前也發展出了許多光譜可量測不同鍵結的 RDC 值，其中以量測異核一鍵 ($^1\text{H}-^{15}\text{N}$) 的 RDC 值： $^1D_{\text{HN}}$ 最為直接。實驗的方法是進行 ^1H 去偶極化的 HSQC 光譜⁽¹⁷⁾，在光譜中每個交叉峰都會被分裂成兩個，這兩個交叉峰化學位移的差值就等於 RDC 加上 ^1H 和 ^{15}N 的偶合常數，而 ^1H 和 ^{15}N 的偶合常數只要用溶在一般緩衝溶液的樣品進行相同的實驗便可量得，兩組實驗一比較我們便可輕易得到各個 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 鍵結的 RDC 數值 (圖 13)。

RDC 的數值經由公式轉換可以得到量測的兩

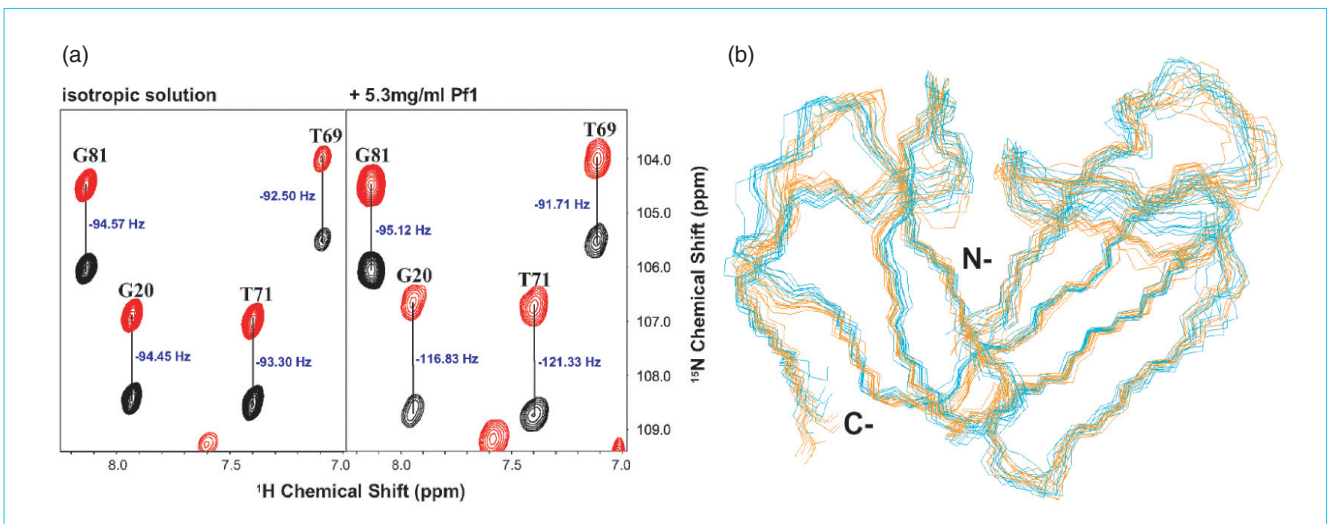


圖 13. ^1H 去偶極化的二維 HSQC 光譜，圖 (a) 左是在一般水溶液中，圖 (a) 右則是加入了 Pf1 形成液晶的狀態，以 G20 為例，一般水溶液中上下交叉峰的差值是 -94.45 Hz，在液晶的狀態的差值是 -116.83 Hz，兩者的差值： -22.38 Hz 就是 G20 的 $^1D_{\text{HN}}$ RDC 值。圖 (b) 橘色部分代表使用 RDC 限制條件所算出來的十個平均結構，藍綠色部分則是未使用 RDC 限制條件計算的結果。

表 3. 本實驗室已成功選殖到蛋白質表現系統的結構基因體標靶蛋白群組與目前的進展。

ID	Annotation	M.W.	Express*	Yield (mg/L LB)	NMR	Backbone assignment	Side-chain assignment
KP3573	polymyxin B resistant protein	10 kDa	S	20	ok	finished	on going
KPP270	putative phage inhibition, colicin resistance and tellurite resistance protein	22 kDa	S	100	ok	finished	on going
KPP267	putative phage inhibition, colicin resistance and tellurite resistance protein	18 kDa	S	50	ok	finished	on going
KP3393	putative cold-shock protein	19 kDa	S + I	30	ok		
KPP265	putative phage inhibition, colicin resistance and tellurite resistance protein	22 kDa	S	20	ok		
KP1881	cold shock-like protein, cspD	10 kDa	S + I	5	ok		
KPP271	putative phage inhibition, colicin resistance and tellurite resistance protein	20 kDa	S	150	ok		
KP0088	heat shock protein	19 kDa	S + I				
KP5266	cold shock protein	8 kDa	S	14			
KPP136	probable two-component-system response regulator involved in copper resistance	26 kDa	I	Low			
KP2622	putative heat shock protein	18 kDa	S + I	150	ok	no structure	
KP0633	putative heat shock protein	18 kDa	S + I	35	ok	no structure	
KP5468	heat shock protein A	16 kDa	S + I	15	ok	no structure	
KP2657	multiple anitbiotic protein	5 kDa			no induction		
KP2344	page shock protein C	14 kDa			no induction		

* S : soluble protein, I : inclusion body

個核子間的向量和磁場方向的夾角角度，這種全面性的限制條件對於結構的計算有相當大的幫助。一般的流程是在結構精算時加入這種限制條件，所以光譜學家只需要完成明確 NOE 的鑑定進行粗算，省略掉鑑定不明確的 NOE 所耗的大量時間，再加入 RDC 的限制條件進行精算，便可以快速得到一個高解析度的蛋白質三維結構。本實驗室採用噬菌體 Pf1 作為引發 RDC 的界質，並已成功量測了兩個蛋白質的 $^1D_{HN}$ RDC 值，及應用到結構計算上 (圖 13)^(19,20)，因此要利用此技術來加速 KP 結構基因體學的研究將是駕輕就熟。

十、結語

到目前為止，本計畫進行不到一年，我們實驗室已將十五個標靶蛋白成功地選殖到大腸桿菌蛋白質表現系統中 (表 3)，其中有十三個可以表現出正確分子量的蛋白，這裡面又有七個可以獲得分布良

好 (well-dispersed) 的一維核磁共振光譜，表示這些蛋白具有折疊良好的結構，目前已經完成五個蛋白的二維 HSQC 光譜圖。其中有三個標靶蛋白的多維核磁共振光譜實驗 (表 2) 已經全部收集完畢，利用這些光譜，我們也順利完成這三個標靶蛋白各個殘基化學位移的骨架循序判定 (圖 9)，其中有兩個蛋白的側鏈質子化學位移幾近完成，即將進入結構計算的階段 (KPP267 與 KP3573)，相信在本實驗室成熟的結構計算平台之下，應該可以很快完成這兩個蛋白分子的立體結構計算。

在此，我們要特別感謝國科會對結構基因體學的重視，於國家基因體醫學計畫項下設立 NMR 核心設施 (core facility)，並投入大筆經費購買 600 MHz 和 800 MHz NMR 儀器，並裝備超低溫探頭。這些儀器為 KP 菌結構基因體計畫提供了強而有力的神兵利器，希望這些標靶蛋白的立體結構在解出後，能做為 KP 菌相關疾病藥物設計的基礎，並用於篩選相關藥物之先導化合物。

參考文獻

1. G. A. Jacoby, *Clin. Infect. Dis.*, **18**, 951 (1994).
 2. R. Podschun and U. Ullmann, *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**, 589 (1998).
 3. X. Nassif and P. J. Sansonetti, *Infect. Immun.*, **54**, 603 (1986).
 4. C. T. Walsh, S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahalad, and Z. Wu, *Chem. Biol.*, **3**, 21 (1996).
 5. H. Nikaido, *Science*, **264**, 382 (1994).
 6. W. Jiang, Y. Hou and M. Inouye, *J. Biol. Chem.*, **272**, 196 (1997).
 7. K. Wuthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, New York: Wiley (1986).
 8. T. H. Huang, C. Chen, and T. H. Lin, *Chemistry*, **55**, 77 (1997).
 9. 陳金榜, 科儀新知, **15** (6), 40 (1994).
 10. D. E. Zimmerman, C. A. Kulikowski, Y. Huang, W. Feng, M. Tashiro, S. Shimotakahara, C. Chien, R. Powers, and G. T. Montelione, *J. Mol. Biol.*, **269**, 592 (1997).
 11. J. B. Olson, Jr. and J. L. Markley, *J. Biomol. NMR*, **4**, 385 (1994).
 12. D. Malmodin, C. H. Papavoine, and M. Billeter, *J. Biomol. NMR*, **27**, 69 (2003).
 13. B. A. Johnson, *Methods Mol. Biol.*, **278**, 313 (2004).
 14. C. M. Slupsky, R. F. Boyko, V. K. Booth, and B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR*, **27**, 313 (2003).
 15. G. Cornilescu, F. Delaglio, and A. Bax, *J. Biomol. NMR*, **13**, 289 (1999).
 16. T. Herrmann, P. Guntert, and K. Wuthrich, *J. Mol. Biol.*, **319**, 209 (2002).
 17. N. Tjandra and A. Bax, *Science*, **278**, 1111 (1997).
 18. M. R. Hansen, L. Mueller, and A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1065 (1998).
 19. I. Wang, Y. C. Lou, K. P. Wu, S. H. Wu, W. C. Chang, and C. Chen, *J. Mol. Biol.*, **346**, 1071 (2005).
 20. Y. C. Lou, Y. C. Huang, Y. R. Pan, C. Chen, and Y. D. Liao, *J. Mol. Biol.*, **355**, 409 (2006).
-
- 羅世奇先生為國立清華大學生物資訊暨結構生物學研究所博士班學生。
 - 羅元超先生為國立清華大學生命科學博士，現任中央研究院生物醫學所博士後研究員。
 - 江盛國先生為國立清華大學生命科學碩士，現任中央研究院生物醫學所研究助理。
 - 潘韻如小姐為國立清華大學生物資訊暨結構生物學研究所博士班學生。
 - 陳金榜先生為美國西雅圖華盛頓大學生物物理博士，現任中央研究院生醫所副研究員。
 - Shih-Chi Luo is a Ph.D. student in the Institute of Bioinformatics and Structural Biology at National Tsing Hua University.
 - Yuan-Chao Lou received his Ph.D. in life science from National Tsing Hua University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Biomedical Science, Academia Sinica.
 - Sheng-Kuo Chiang received his M.S. in life science from National Tsing Hua University. He is currently a research assistant in the Institute of Biomedical Science, Academia Sinica.
 - Yun-Ru Pan is a Ph.D. student in the Institute of Bioinformatics and Structural Biology at National Tsing Hua University.
 - Chin-Pan Chen received his Ph.D. in biophysics from the University of Washington, Seattle, USA. He is currently an associate fellow in the Institute of Biomedical Science, Academia Sinica.