

X 光晶體繞射與核磁共振在胃幽門螺旋桿菌的結構基因體之研究

X-Ray Diffraction and Nuclear Magnetic Resonance in the Structural Genomics Study of *Helicobacter Pylori*

程家維、孫玉珠

Jya-Wei Cheng, Yuh-Ju Sun

蛋白質的立體結構是近幾年用來研究生物功能的熱門主題，X 光晶體繞射與核磁共振為此領域中相當重要的方法。國立清華大學生命科學院結構生物實驗室在國家科學委員會基因體醫學國家型科技計畫的支持下，進行胃幽門螺旋桿菌結構基因體之研究。在本文中，將介紹這兩種方法的原理及如何應用在胃幽門螺旋桿菌之結構基因體的研究。蛋白質必須具有正確的摺疊，才能執行它應有的生物功能。因此可以藉著研究蛋白質立體結構，來了解此蛋白質的生物功能。同時可以精確地決定蛋白質的功能區域以及關鍵的胺基酸，此方法可達到高於奈米的原子解析度。

The three-dimensional structure of protein is an essential topic for the biochemical function research in recent year. X-ray diffraction and nuclear magnetic resonance (NMR) are two important methods in this field. In this article, we will introduce the principles and circumstance of these two methods, and how we apply these two methods in our study: *Helicobacter pylori* structural genomics research. Proteins carry out their biological functions only when they fold correctly. A unique protein folding respects to have a specific biological function. So, we can investigate the three-dimensional structure of protein to study the possible biological function of protein. We determine the active site of protein and the key residues involved in the biological function. The resolution of these methods is in atomic resolution.

一、前言

澳大利亞學者巴裏·馬歇爾 (Barry J. Marshall) 和羅賓·沃倫 (J. Robin Warren) 於 1982 年發現胃

幽門螺旋桿菌，胃幽門螺旋桿菌為引起人類胃潰瘍、胃炎等腸胃病的主因，而且於 1994 年胃幽門螺旋桿菌也被世界衛生組織 (the World Health Organization, WHO) 歸類為第一類致癌物。1997 年

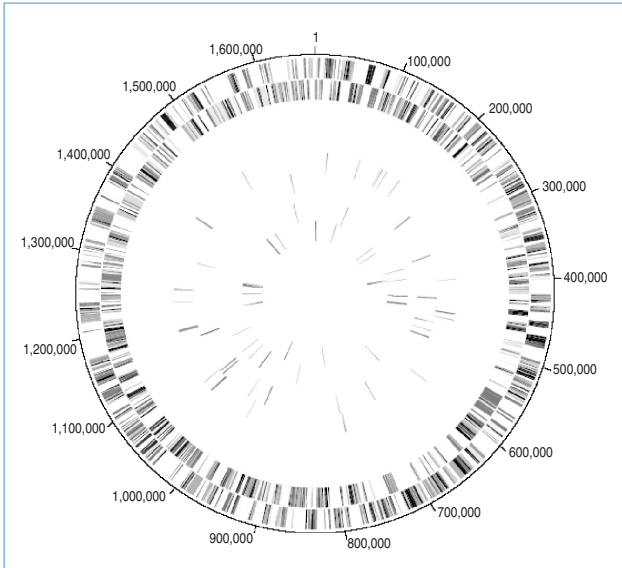


圖 1. 胃幽門螺旋桿菌基因圖⁽¹⁾。

胃幽門螺旋桿菌品系 26695 基因體圖譜被完成，發現其有 1,590 個密碼序列 (coding sequence) (圖 1)。馬歇爾和沃倫也因為在胃幽門螺旋桿菌研究的貢獻，獲得今年諾貝爾醫學獎。由於胃幽門螺旋桿菌在人類醫學上的重要性，及其基因體序列已完成，因此我們選擇胃幽門螺旋桿菌來當作研究的主題。根據致癌物這一點，以胃幽門螺旋桿菌中的毒性因子進行結構與功能的研究，希望藉由活化位置設計出可能的藥物分子，另外，也選了一些功能未定的蛋白質，希望能發現新的蛋白質折疊方式 (novel fold) 進而了解它們可能的生物功能。

使用 X 光單晶繞射儀是因為其解析度在 0.1 奈米範圍，在生物巨分子的研究上，實驗室一般使用銅靶當作 X 光來源。X 光晶體繞射的方法沒有分子量上的限制，只要能培養出品質好的晶體，都可以利用此方法來決定蛋白質立體結構。核磁共振光譜學法是用來決定生物巨分子在水溶液中的立體結構。在本文中，首先會介紹胃幽門螺旋桿菌的發現以及其對人類的影響，其次介紹 X 光繞射以及核磁共振兩種生物物理方法。

二、胃幽門螺旋桿菌

胃幽門螺旋桿菌 (圖 2) 是導致人類胃炎、胃潰瘍和十二指腸潰瘍的主因，這個發現使胃潰瘍從慢

性疾病變成可用抗生素與制酸劑治癒的疾病⁽⁷⁾。人是胃幽門螺旋桿菌的宿主，全世界約有一半的人口受到胃幽門螺旋桿菌的感染。此菌可在胃黏膜處生存達十年之久，大多數的人感染後並沒有明顯的症狀，只有少數感染者會出現嚴重的臨床症狀。研究指出超過 90% 的十二指腸潰瘍和 80% 左右的胃潰瘍，都是胃幽門螺旋桿菌所引起的。胃幽門螺旋桿菌主要透過接觸傳染，亞洲為高傳染區，目前台灣地區的感染率約 55%⁽⁶⁾。

胃幽門螺旋桿菌是一種革蘭氏陰性菌，微需氧，具有四到六根鞭毛，鞭毛構造以及破壞胃黏膜的酵素可協助胃幽門螺旋桿菌穿透胃黏膜。除此之外，還有重要的毒性因子可使其存活在多數微生物無法生存的酸性環境中，包括尿素酶 (urease)，可將尿素分解為氨進而中和胃幽門螺旋桿菌周圍的酸性環境，這也是胃幽門螺旋桿菌能生存於胃中最重要的因素。吸附性蛋白質 (adhesin)，可以辨認宿主胃黏膜細胞上的受體 (receptor)，附著到胃上皮細胞形成菌落，並長期寄居於胃中。液泡毒素 (vacA) 及細胞毒素攜帶抗原 (cagA)，cagA 是第一被發現可經由第四型分泌系統進入胃上皮細胞的蛋白質，具相當高的變異性，且感染具 cagA 基因的菌株具有較高的機會併發胃癌等較嚴重的腸胃疾⁽⁴⁾。更特別的是，分析胃幽門螺旋桿菌中有超過 70% 的蛋白質，其等電點 (pI) 大於 7.0，這也是胃幽門螺旋桿菌能適應胃中酸性環境的原因之一 (圖 3 與 4)。



圖 2. 胃幽門螺旋桿菌在穿透式電子顯微鏡下觀察的結果⁽¹¹⁾。

三、X 光繞射儀器原理

X 光繞射分析儀的構造大致上可以分為 X 光源產生器 (generator)、晶體測向旋轉裝置 (goniometer head) 及 X 光射線面積偵測器 (area detector) 等部分。1895 年德國物理學家倫琴 (Roentgen) 發現以陰極射線打擊放電管壁會得到輻射線，而將此輻射線命名為 X 光 (X-ray)。帶電粒子在加速或減速過程中會釋出電磁波，在此過程中釋放出來的電磁波具有高能量 (10 keV)，當波長在 $10^{-12} - 10^{-8}$ m 則成 X 光，屬於短波長高能量的電磁輻射。當加速的電子撞擊金屬靶 (例如：銅靶)，會使金屬靶內的原子將能量傳遞給外圍的電子，電子游離，而使原子離子化。當原子內層軌域 (K shell) 的電子被激發之後，空出的位置會立刻被外層軌域 (L、M shell) 的電子填滿，這種過程所產生的 X 光與原子中電子軌域的能階有關，因此其波長與原子種類有關，稱之為線性 X 光 (characteristic X-ray)，或單色 X 光 (monochromatic X-ray)。另外還有一部分的高速電子會受到金屬靶內原子的阻擋而急遽停

止，部分動能會以 X 光形式釋放出來，這種由急遽停止的電子所產生的 X 光與原子的特性無關，是以連續性不同波長同時出現，其中最短波長取決於撞擊電子的最高能量，這種光譜也可稱為白光光譜，應用於同步輻射的研究。

當加速電子束的電壓繼續提高，撞擊金屬靶的頻率增加，X 光強度隨之增強。當電子束的加速能量超過金屬靶內原子最內層軌道的電子束縛能，才有機會撞出內層電子，產生線性 X 光。此外，加速電子也會增加撞擊金屬靶的頻率，使連續 X 光的強度也加大。以銅靶為例，10 keV 的電壓就足夠使電子離開 K 層軌域，產生的空缺也立即由外層的電子填補。 K_{α} 符合 L、K 層之間的躍遷， K_{β} 符合 M、K 層之間的躍遷 (圖 5)。一般實驗室 X 光繞射分析儀所使用的光源為銅靶的 K_{α} 光。

另一種 X 射線光源則來自於同步加速器輻射。同步加速器輻射光源為電子在急遽加 (減) 速時，會產生 X 光輻射。電子在 GeV 高能量時，以接近光速循環運轉，在每一個附加的磁場偏向運轉，產生由 UV-X-ray 輻射能量。新竹的國家同

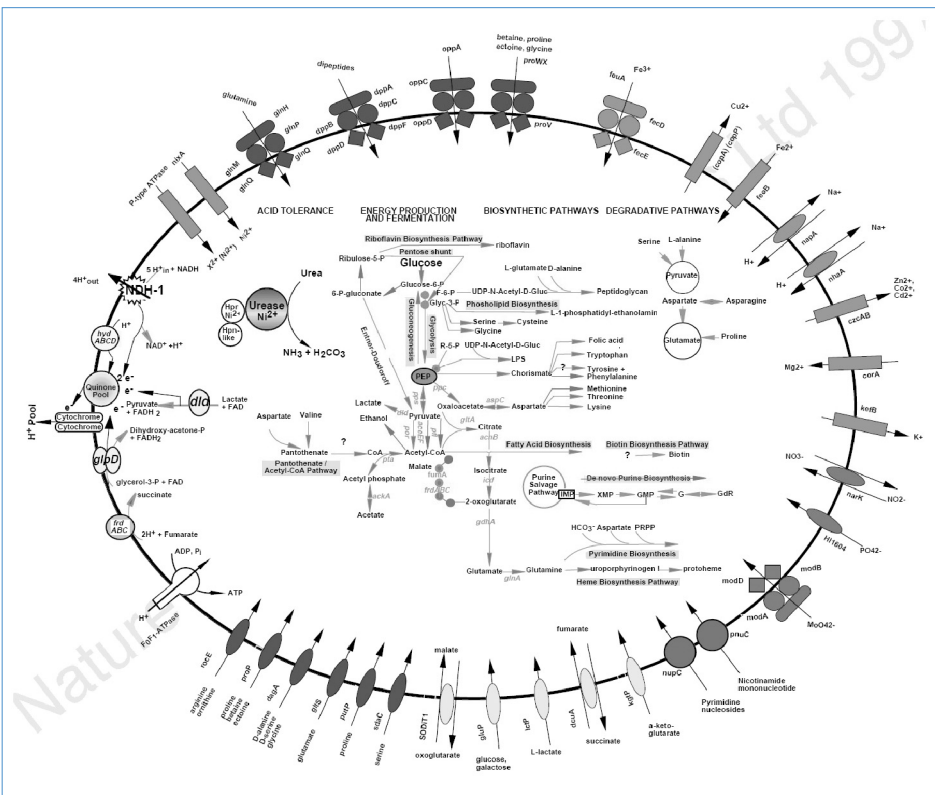


圖 3. 胃幽門螺旋桿菌的運輸與代謝途徑⁽¹⁾。

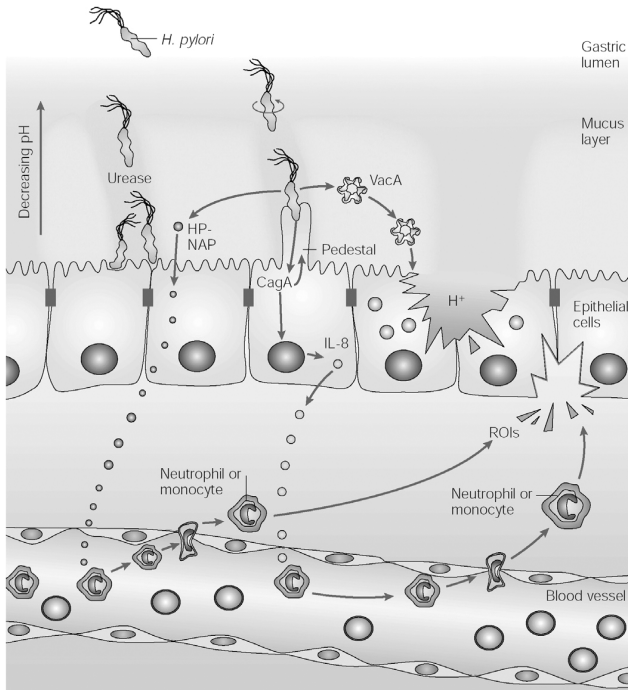


圖 4. 胃幽門螺旋桿菌感染胃黏膜的機制以及主要參與的毒性因子⁽²⁾。

步輻射研究中心 (NSRRC) 的光束線 BL13B1 就是應用於生物巨分子 X 光繞射的研究。同步光源與傳統光源的不同處在於同步光源為連續光譜，波長可以調整到需要的長度，具有選擇性與極性；而傳統光源為線性 X 光，波長固定 (由選用的迴轉陽極 X 光產生器來決定)，且產生的 X 光不具極性。

現在常用的兩種 X 光產生器 (X-ray generator)：第一種為封管式 X 光產生器 (sealed tube generator)，在電子加速區抽真空並密封，稱為封管。真空下可產生強的 X 光，有利數據的收集；若管中非真空，電子束會被空氣散射，減弱 X 光強度，導致能量降低；另外，真空條件也可避免燈絲氧化。第二種為迴轉陽極 X 光產生器 (rotating anode generator)，金屬靶可快速轉動而使電子在不同時間點撞擊金屬靶上不同的位置。由於提高電壓電流會產生大量的熱量，因此必須有冷卻循環水系統來降低溫度。由於封管式 X 光產生器的電子永遠撞擊在金屬靶的同一地方，容易造成過熱的現象，且光強度較弱，而迴轉陽極 X 光產生器的冷卻循環水系統有充足的時間可以將金屬靶上的熱量帶走，

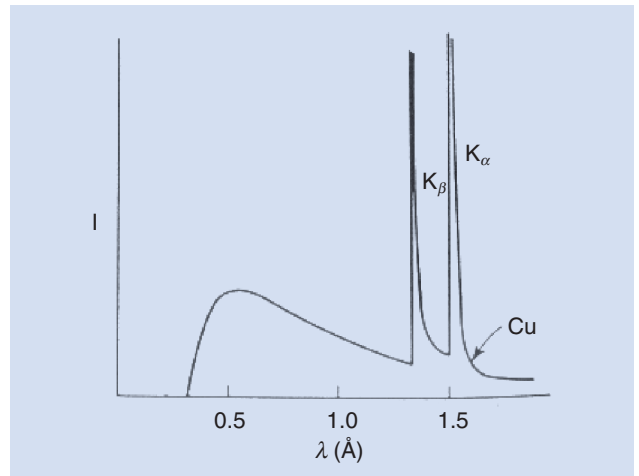


圖 5. 銅金屬靶 X 光光譜圖，為一連續光譜，具有兩個明顯的高峰，源於銅金屬靶電子的量子化，I 代表輻射光強度。

以減緩過熱的現象，且光強度較強。所以在巨分子研究中多使用迴轉陽極 X 光產生器。

X 光束撞擊原子產生散射的方法與光學顯微鏡的原理相似，不同的是沒有任何透鏡可直接將 X 光聚焦成像，因此使用此方法無法直接收集到物體的影像，必須利用晶體中有序重複且規則排列的晶格散射後產生的干涉 (包括建設性干涉與破壞性干涉) 來收集繞射點強度的數據，再利用晶體學的原理以及數學運算來重組分子的影像。

1913 年 Bragg 父子在晶體結構分析實驗中發現，由散射 X 光的分佈情形可以將繞射現象視為入射光受到晶面反射，因此入射角等於反射角。當 X 光射入間距為 d 的兩晶格面 (hkl) 時，對此 X 光產生反射的光徑 (optical path) 差等於「 $2d \sin\theta$ 」。若光徑差「 $2d \sin\theta$ 」為 X 光波長的整數倍時，即可產生建設性干涉。滿足此條件便可產生繞射，此稱為布拉格定律 (Bragg's law)，Bragg 父子在 1915 年因此項發現而獲得諾貝爾物理獎。

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \text{ (圖 6)}$$

不同的晶體結構，晶面間距不同，會有不同組合的繞射角， d 與 θ 兩者之間呈倒數關係。繞射的發生除了要滿足布拉格定律，還會受到晶體本身對

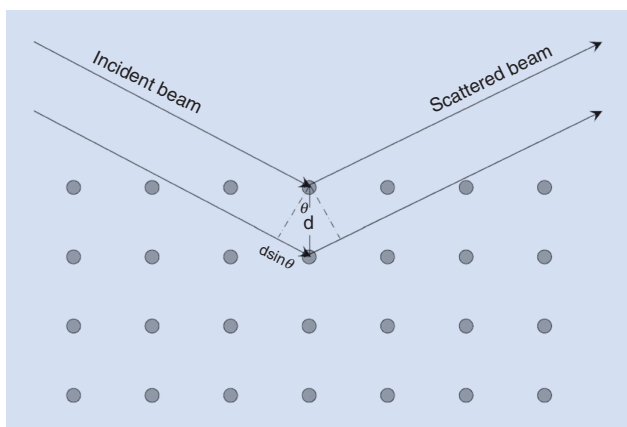


圖 6. 布拉格定律示意圖。 n 代表整數， λ 代表 X 光波長， d 為晶面間距， θ 為入射光與晶面的夾角。

稱性的影響。因此，X 光照射晶體時，只有在某些特定的入射角才會形成繞射波。晶格內的分子具有的電子數目 (electron density) 決定了 X 光繞射的強度。

厄瓦特 (Ewald) 利用倒立晶格 (reciprocal space) 和反射球 (Ewald's sphere) 的觀念來解釋布拉格理論，並應用於晶體的立體空間繞射。在倒立晶格空間，反射球若與倒晶格點相交 (圖 7)，則射入的 X 光由球心反射向交點以 2θ 的方向射出，此反射光束即滿足布拉格定律。

研究生物巨分子 (蛋白質或核酸) 晶體，由於巨分子的分子量大，分子數、原子數多，倒晶格繞射點密布，導致分辨率降低。並且因為蛋白晶體中含水量較高，所以蛋白晶體較一般有機無機小分子

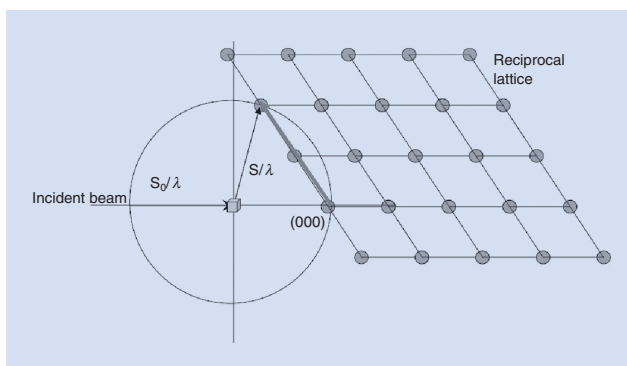


圖 7. 反射球與倒立晶格面。

晶體脆弱，分子的解析度也受到相當大的限制。繞射數據收集完之後，進行數據分析，決定晶體的晶胞參數，之後解決相位角問題，最後再利用傅利葉函數的運算 (Fourier transfer) 將繞射數據轉換成電子密度圖。

四、X 光晶體繞射在胃幽門螺旋桿菌的結構基因體之研究

如今單晶 X 光繞射的方法已廣泛應用在蛋白質立體結構與功能的研究發展上，並測定原子在三度空間中的座標 (coordinate)，因而決定分子在晶格中的立體結構，包括：鍵長 (bond length)、鍵角 (bond angle) 及分子構型 (configuration and conformation)。整個實驗主要分為五個步驟：(1) 晶體的培養 (crystal growing)、(2) 繞射數據的收集 (diffraction data collection)、(3) 相位角的決定 (phase angle determination)、(4) 分子模型的建立 (model building)、(5) 實驗數據與分子結構的精算 (structural refinement) (圖 8 與 9)。

最常用的結晶法有透析法 (dialysis) 和蒸汽擴散法 (vapor diffusion)，而蒸汽擴散法中最常用的兩種為座滴法 (sitting drop) 以及懸滴法 (hanging drop)

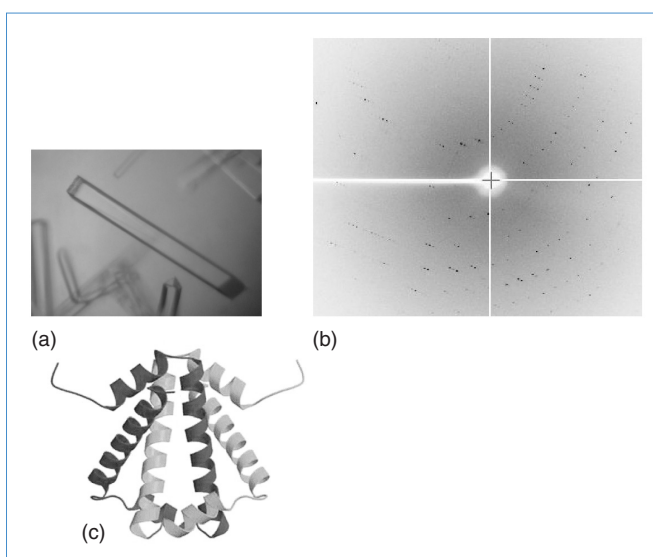


圖 8. (a) HP0242 晶體，(b) HP0242 的繞射數據，(c) HP0242 晶體結構。

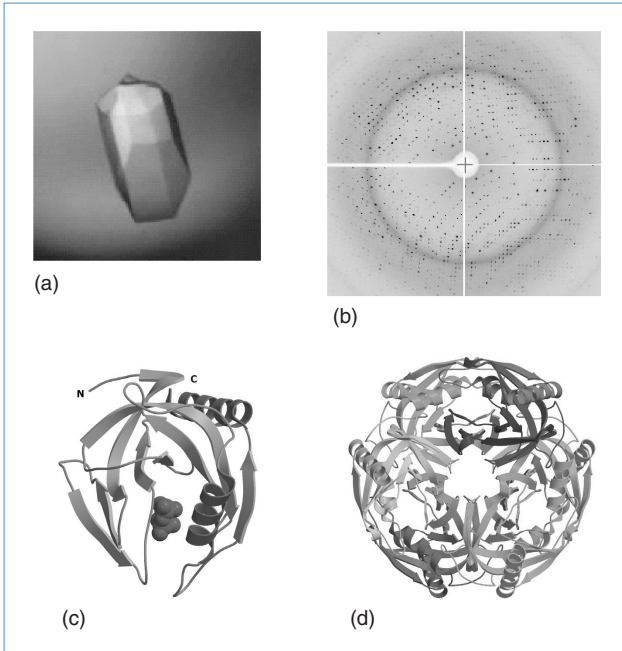


圖 9. (a) 焦磷酸酶 (pyrophosphatase, PPase) 晶體，(b) 焦磷酸酶繞射數據，(c) 焦磷酸酶單體 (monomer)，(d) 焦磷酸酶生物單位 (biological unit) - 六聚體 (hexamer)。

(圖 10)，當蛋白質溶液達過飽和時即可長出晶體。影響過飽和的因素有溫度、添加不同的化學物質以及溶液 pH 值等等。在研究蛋白質複合物方面則可藉由浸泡 (soaking) 或共結晶 (co-crystal) 的方法來培養出晶體。

當收到一套晶體繞射的數據時，可以利用數學的運算得到每個原子所干涉的強度，卻無法得到相位角，進而無法解析出蛋白質的立體結構。所以解

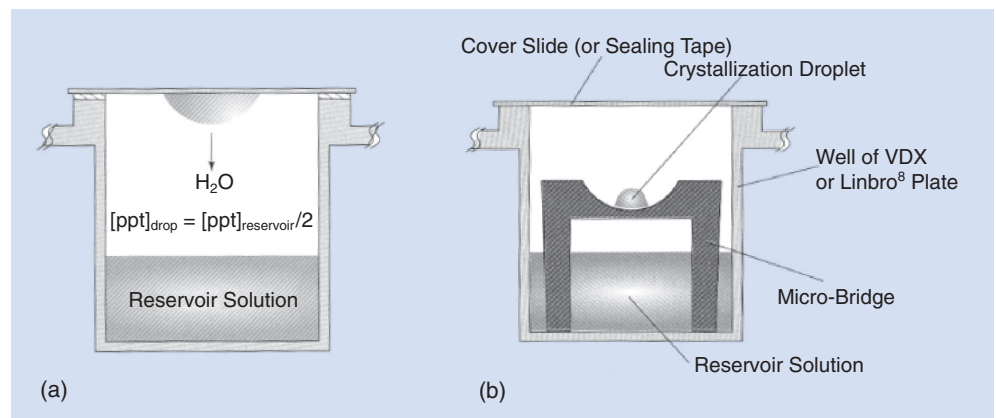
決相位角在 X 光繞射實驗很重要的關卡。決定相位角的方法主要可分為四大類：

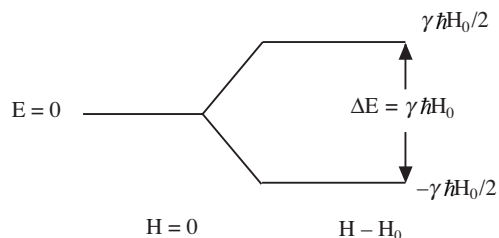
1. 直接法：適用於有機無機小分子
2. 分子取代法 (molecular replacement method)：若有同源分子 (homologue) 的立體結構已解出，則可利用分子取代法找出相位角，進而建構出準確的蛋白質結構。同源分子間的相似度越高，越容易利用此方法找出相位角。
3. 多種同形取代法 (multiple isomorphous replacement (MIR) method)：蒐集原有晶體的繞射強度數據和多種重原子衍生物的晶體繞射強度數據，進行相位的決定；這個方法的先決條件是，使用的重原子不能改變原晶體的晶胞參數 (cell parameter)。
4. 多重波長異常散射定位法 (multi-wavelength anomalous dispersion (MAD) method)：利用選擇多種 X 光波長來蒐集繞射數據，由於需要不同的波長，因此只能利用同步輻射光源來蒐集數據。如利用甲硫胺酸硒 (selenomethionine) 來取代甲硫胺酸。

五、核磁共振原理

自然界存在的同位素中約有一半具有核子自旋，每個原子核皆擁有磁偶矩 $\mu = \gamma I$ ， γ 為迴轉磁比 (gyromagnetic ratio)。原子核於磁場 H_0 中分別佔據 $-\gamma \hbar H_0/2$ 及 $\gamma \hbar H_0/2$ 兩能層；能量差 $(\Delta E) = \gamma \hbar H_0 = \hbar \omega_0$ ，稱為拉莫爾方程式 (Larmor equation)， ω_0 代表核子自旋在磁場 H_0 下的共振頻率。

圖 10. (a) 懸滴式養晶法；(b) 座滴式養晶法⁽¹²⁾。





目前最高核磁共振儀的磁場為 21 萬高斯 (Gauss)，在此磁場下質子的共振頻率為 900 MHz。

核磁共振的基本參數有：

1. 化學位移 (chemical shift)：核子自旋的共振頻率因化學結構而有所不同，不同的官能基具有不同的共振頻率；因此可以標定不同氨基酸中所有核子自旋的共振頻率 (化學位移)。
2. J-耦合 (J-coupling)：核子自旋可藉由化學鍵產生耦合現象，例如： $^3J_{\text{HN}\alpha}$ ；可藉由測定 $^3J_{\text{HN}\alpha}$ 而間接算出雙面角 (dihedral angle)。
3. nuclear overhauser effect, NOE：核子自旋藉由磁偶矩的交互作用產生磁性轉移的現象，與距離六次方成反比。
4. 核子自旋弛緩時間 (relaxation time)：Z 方向的磁性弛緩現象稱為自旋-晶格弛緩 (spin-lattice relaxation, T1)；x-y 平面失去磁性的現象稱為自旋-自旋弛緩 (spin-spin relaxation, T2)，可藉由測定 T1 與 T2 算出分子動性 (dynamics)。

利用核磁共振法決定生物巨分子結構可分為幾個步驟：

1. 樣品取得：蛋白質必須以 ^{13}C (glucose) 與 ^{15}N (NH_4Cl) 標定。
2. 光譜取得：高磁場可增加解析度與靈敏度，還需考慮：
 - (1) 擇性測定特定作用：減低光譜的複雜度。
 - (2) 間接測定靈敏度低的核子自旋：通常利用 J-coupling 將 ^{13}C 、 ^{15}N 磁性轉移到 ^1H ，以增加靈敏度。
 - (3) 多維核磁共振光譜。
 - (4) dynamic range：溶液中水的 ^1H 濃度 110 M，遠高於蛋白質濃度；若不去除水的訊號，將會遮蔽樣品的訊號。
3. 脈衝的設計

4. 結構限制條件 (structure restraints)

- (1) 距離：兩核子自旋間的距離可利用 NOESY 求得。
- (2) 雙面角 (dihedral angle)：可利用 $^3J_{\text{HN}\alpha}$ 求得。
- (3) 氫鍵：蛋白質的二級結構可利用 NMR 光譜的化學位移指標 (chemical shift indices, CSI) 求得。
- (4) 殘存磁偶矩 (residual dipolar coupling)：兩核子自旋間的磁偶矩交互作用具方向性，但一般蛋白質在水溶液中快速旋轉，導致磁偶矩交互作用時間平均值為零；若使蛋白質轉動受到限制，磁偶矩的時間平均值不等於零，此即為殘存磁偶矩。

5. 結構計算與分析

結構計算與分析則包括電性分布以及蛋白質動性。

六、核磁共振在胃幽門螺旋桿菌的結構基因體之研究的實例

HP1442 是非常重要的調控蛋白，對胃幽門螺旋桿菌的運動力以及對抗氧化環境的能力有絕對的影響力。HP1442 會抑制一些毒性因子的表現，例如：cagA、vacA 以及 urease。當 HP1442 失去其生物功能時會使胃幽門螺旋桿菌的感染力減弱，這些現象也顯示了 HP1442 可以調控胃幽門螺旋桿菌對環境刺激所引發的生理反應；當胃幽門螺旋桿菌附

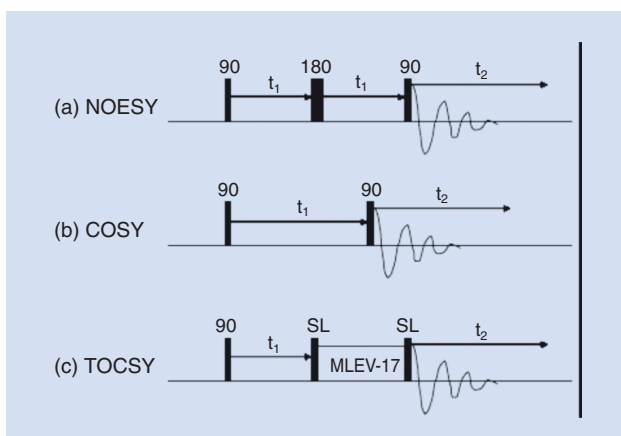
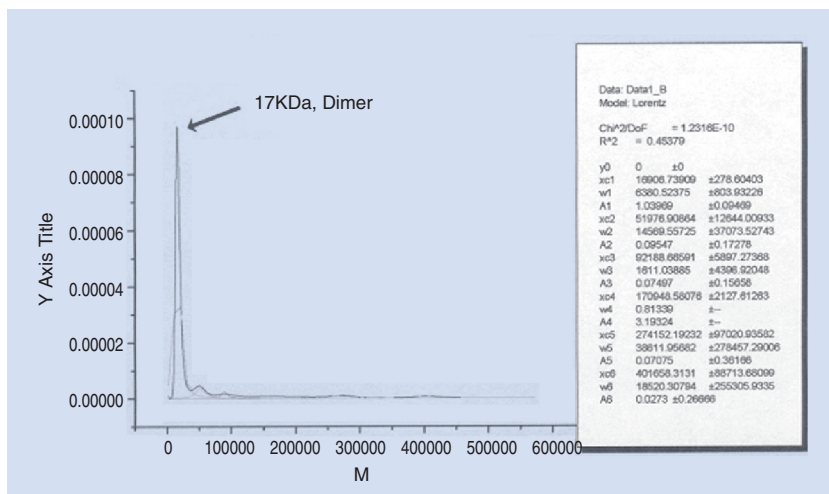


圖 11. 同核二維核磁共振脈衝系列⁽⁵⁾。

圖 12. 超高速離心 (ultra centrifugation) 結果顯示 HP1442 在水溶液中以雙體形式存在。



著到胃黏膜上時，HP1442 更可以協助胃幽門螺旋桿菌適應周圍的環境。在水溶液環境下，HP1442 是以雙體的形式存在 (圖 12)，由結構上我們可以了解 HP1442 在調控中所扮演的角色 (圖 13 與 14)。

七、結語

近年來 X 光面積收集儀發展快速，光源強度的提升使得蒐集數據所需的時間縮短，從原本的兩

三天到現在幾小時就可以收完一套完整的數據；除此之外，原子的鑑別率也大幅提昇，結構準確性增加。生物巨分子的解析度至今可達 0.54 Å，而解出的結構中，最大分子量可到數百萬，例如核糖體 (ribosome) 複合物的晶體結構，這對於利用 X 光繞射技術來探討蛋白分子之間的交互作用的研究有很大的幫助，例如藥物小分子與受體蛋白的複合物、抗原與抗體的複合物，並可將其應用於藥物設計上。在核磁共振技術方面，因為多了低溫探針以及固態核磁共振儀的發明，即使是分子量為數萬的生物巨分子也可以用核磁共振技術來研究。另外，因為核磁共振可以用來計算分子動性，對醫藥發展也有一定的貢獻。

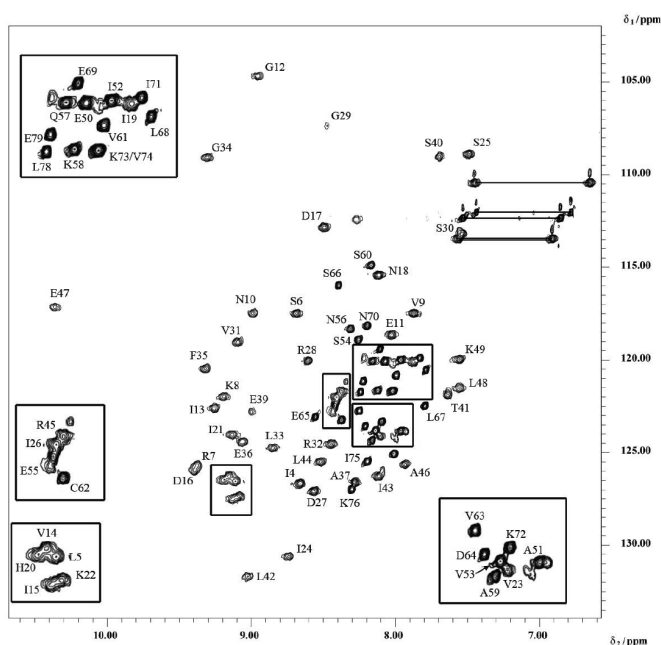


圖 13. HP1442 的 HSQC 光譜圖。

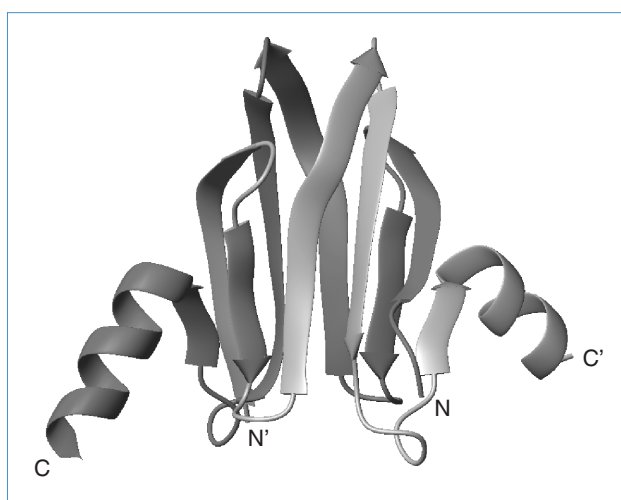


圖 14. 由核磁共振獲得的 HP1442 雙體結構。

參考文獻

1. J.-F. Tomb *et al.*, *Nature*, **388**, 539 (1997).
 2. C. Montecucco and R. Rappuoli, *Nature Reviews*, **2**, 457 (2001).
 3. 盧天惠, X光繞射與應用, 初版, 台中: 滄海, 333.8 (2002).
 4. 科學人, 遠流, **37** (2005).
 5. 物理雙月刊, **24** (3), 403 (2001).
 6. 高醫醫訊月刊, **19** (3) (1999).
 7. 高醫醫訊月刊, **22** (1) (2002).
 8. G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*, 2nd edition, Academic Press (2000).
 9. J. P. Glusker and K. N. Trueblood, *Crystal Structure Analysis A Primer*, 2nd edition, Oxford University Press (1985).
 10. J. Drenth, *Principles of Protein X-ray Crystallography*, 2nd ed., Springer (2002).
 11. B. U. Bridge, *Week of 2 April 2004*, 7 (26).
 12. Hampton Research, *Crystallization Research Tools* (2005).
-
- 程家維先生為美國西雅圖華盛頓大學博士，現任國立清華大學生物科技研究所教授。
 - 孫玉珠小姐為美國匹茲堡大學博士，現任國立清華大學生命科學院生物資訊與結構生物研究所教授。
 - Jya-Wei received his Ph.D. from the University of Washington, U.S.A. He is currently a professor in the Institute of Biotechnology at National Tsing Hua University.
 - Yuh-Ju Sun received her Ph.D. in crystallography from the University of Pittsburgh, USA. She is currently a professor in the Institute of Bioinformatics and Structural Biology at National Tsing Hua University.