

從核磁共振技術到同步輻射光源 的生命科學應用

NMR and Synchrotron Light Source in Life Sciences Research

吳文桂

Wen-guey Wu

未來的生物醫藥科技發展，有賴於整合多方位技術平台，以及建立具有特色的研發領域，本文以國內外二十年來結構生物基礎核心設施在生命科學的應用為例，說明目前歐洲推動高科技產業的作法，值得台灣參考借鏡。

Biomedical research and pharmaceutical industry rely heavily on powerful core facilities such as X-ray, NMR and neutron source for structural determination of biological macromolecules and machinery. Herein, we review the technical and infrastructural development of the structural biology platform in Taiwan during the last 20 years to suggest that current European integrative research infrastructure in Grenoble may be a good model for the future converting of Hsinchu Industrial park into high tech oriented innovation campus.

一、前言

有鑑於科學研究對於分析儀器及先進光源的需求，1981年由當年的國科會企劃處處長劉兆玄教授首先在國立清華大學成立貴重儀器使用中心，並著手購置高解析核磁共振儀；行政院於1983年在新竹科學工業園區也投入同步加速光源的研發，於1993年試車運轉完成亞洲第三代低能量同步加速光源 (Taiwan Light Source, TLS)。同時政府為了發展生物科技，加強其人才培育工作，亦於1985年前後，在中央研究院分別成立分子生物研究所及生物醫學研究所籌備處，於國立清華大學成立國內第

一個以重視理科基礎，亦即以數學、物理及化學為基礎的生命科學研究所。這一連串的發展，也就促成了國內外學者於1986年在南園及國立清華大學召開台灣未來結構生物發展的規劃會議，確立了核磁共振技術及同步輻射 X 光光源作為未來生命科學發展的兩大研究利器。

在二十年後的今天看來，除了同為生命科學研究所常使用的電子顯微鏡及質譜儀，由於當時分由材料科學界及化學界為主要的用戶，而自然成了該兩項儀器的研究主導單位外，生物分子的核磁共振技術研究與同步輻射 X 光光源的巨分子單晶繞射，至今仍是生醫領域國家基因體計畫的兩大核心

設施，而「科儀新知」在上述四項貴重儀器的發展一直扮演著推動的角色。在此雙月刊成立三十年的專輯中，我們僅回顧 1986 年至 2009 年間國內外在上述兩個領域的重要進展，並以本實驗室過去探討心臟毒蛋白在細胞膜形成孔洞的機制為例，說明未來的發展應強調不同結構生物技術的整合：亦即結合核磁共振、X 光繞射及散射、電子顯微鏡、中子散射、同步圓二色光譜 (synchrotron radiation circular dichroism, SRCD)，以及生物資訊等多方位的研究方法，並仿效歐盟結構生物聯盟 (Partnership for Structural Biology, PSB) 的作法，建立生物樣品準備的技術平台，一方面促進研發的效率，另一方面進而能夠在 (1) 生物分子的動態、(2) 多分子的聚合結構，以及 (3) 細胞膜蛋白結構，更有挑戰性的課題上加倍努力，以期在未來具有國際競爭力，並將這些研究成果轉為推動國內生醫製藥產業的重要基礎建設。

二、核磁共振與生物分子動態結構

就核磁共振技術的發展而言，二十年前國家實驗研究院儀器科技研究中心 (原為國家科學委員會精密儀器發展中心) 曾編輯兩冊「核磁共振儀專輯」，基本上對於當時的核磁共振技術在決定分子量小於 20 kD 的蛋白質之三度空間結構，已有充分的介紹。如今因為 (1) 脈衝軟硬體技術的進展，(2) 高速魔角旋轉技術穩定度的開發，以及 (3) 含 ^{13}C 、 ^{15}N 及 ^2H 的生物分子的備製等技術的進步，不僅已能夠決定分子量高達 100 kD 的水溶性，以及在固態粉末或多晶體狀態下的蛋白質結構，更重要的，利用光譜訊號寬度的改變程度以及化學位移的訊息，更可間接取得在動態平衡下的結構資訊，進而決定所謂「看不到訊號」的微量蛋白質構形的立體結構。這一個進展，確定了核磁共振技術在生物分子動態的研究上較 X 光晶體繞射有相對的優勢。而且也因此提供了更多的實驗證據，支持只有在對分子動態結構的完整了解下，才有可能了解生物分子結構與功能的關聯。

從儀器研發及設施建立的觀點來看，目前能夠進行生物分子結構決定的所謂「高磁場」核磁共振

儀已從當年的 400 MHz 發展到現今 900 MHz，而過去裝設此光譜儀因磁場影響的空間過大而導致的不方便，如今也因有所謂的超級隔離 (super shield) 的防護設施，而不需要特殊的建築物配合。另一個發展是利用零磁場的概念以及跳脫既有自由誘導衰減 (free induction decay, FID) 的偵測方式，而使得核磁共振在電腦控制的配合下有多樣的發展。

事實上，核磁共振與電腦的結合，利用多維光譜的取得，不僅在偵測系統大大的改進了核磁共振技術在偵測靈敏度 (相較於其他如螢光或 UV 光譜技術) 的缺失，也在三度空間結構的計算上，化困難為可能或簡單，這也是為何利用鍵角以及 NOE (nuclear Overhauser effect) 取得氫原子彼此之間的距離，就能夠決定蛋白質結構的主要原因。目前由於大量的化學位移數據可供使用，進一步的結構訊息，亦可由過去無法想像的化學位移訊息來萃取，甚至在動態的狀況下生物醣分子的構形，亦可由分子模擬的方式來決定 (圖 1)，而降低了探討蛋白質與醣類分子作用模式的困難度。這些例子充分地顯示未來核磁共振技術在進行生物醫藥研發的潛力。

三、同步光源及 X 光晶體繞射

同步輻射光源實驗設施的建構與推廣，不容置疑的是國內科學界所推動過的最大且最久的計畫，從 1993 年的台灣光源 (TLS) 運轉到 2007 年行政院原則上同意國家同步輻射研究中心再接再厲興建第三代中能量高亮度的台灣光子源 (Taiwan Photon Source, TPS)，並預計於 2013 年出光。在整整的三十年間，我們見證了台灣從無到有，並在不久的將來更進一步將躋身歐、美、日科技先進國家，提供國人一座世界頂尖的跨領域實驗設施。

從國際的角度來看，世界同步輻射光源的提供主要分布在美國、歐洲以及亞洲三個地區 (圖 2)。由於我國很早就進入這個領域，又與日本有相當密切的合作關係，使得我們在東亞相關科技的推動扮演重要的角色，也因此受到世界各國的重視。可惜的是，雖然我們在光源設施的興建上與世界各國並駕齊驅，但是在科學及其應用技術的開發上卻顯得遜色許多。當然這個落後與國內特有的學術環境，

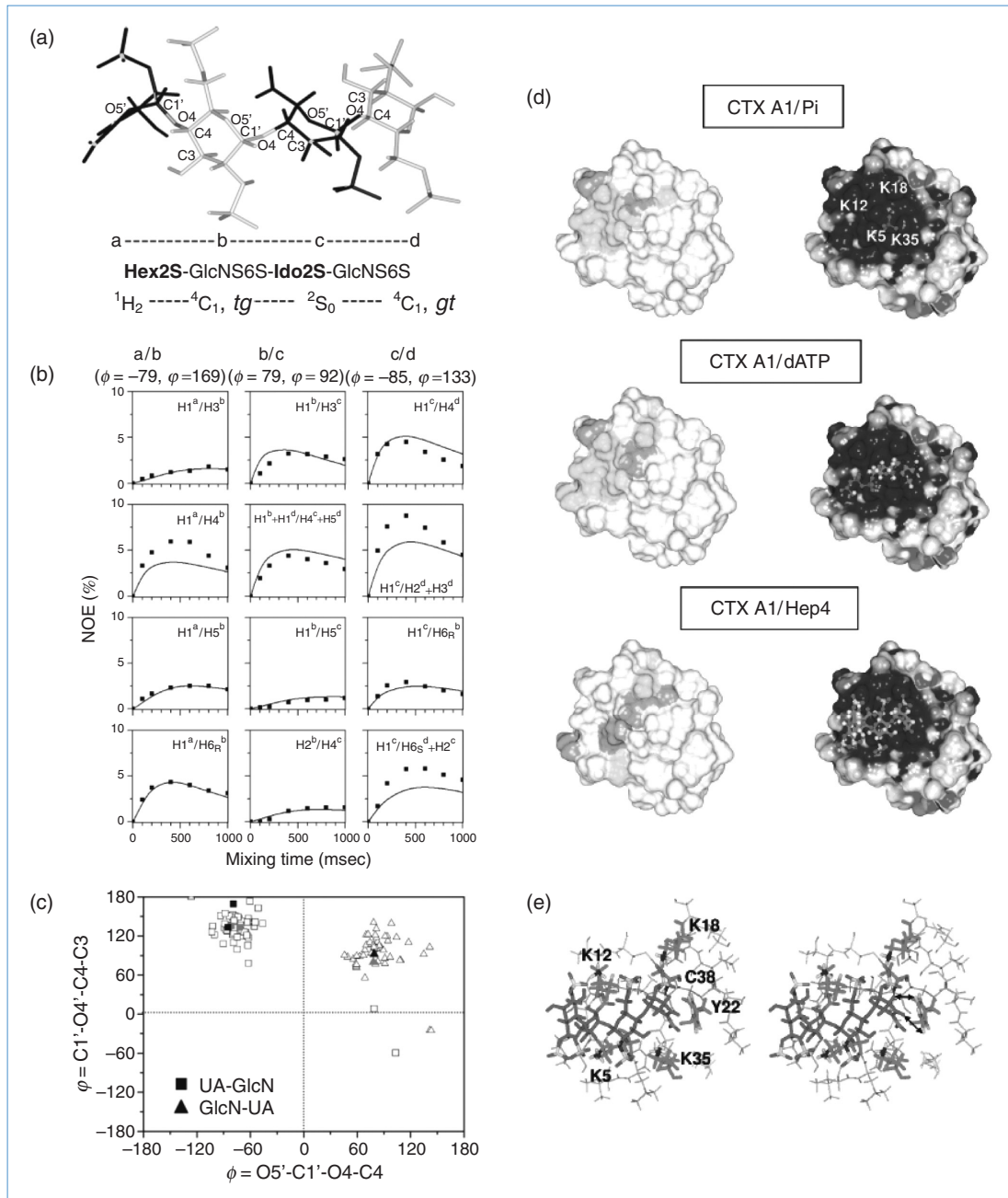


圖 1. 利用分子動態模擬的軟體分析技術，我們能夠運用核磁共振來決定結構極相似的醣分子構形及動態以及與蛋白質的結合態，同樣的技術亦可用於生物醫藥的開發。(a) 利用 CORCEMA 分析法得到四醣肝素結合到心臟毒蛋白 A1(CTX A1) 的構型；(b) 實驗得到 (■) 與 CORCEMA 算出來 (實線) 的四醣肝素結合後的醣鍵 NOE 之比較；(c) 已發表的肝素 (白色符號)、結合前四醣肝素 (灰色符號) 及結合後四醣肝素 (黑色符號) 的雙面角的分布圖；(d) 各種不同的配體 (由上到下：Pi, dATP, Hep4) 與 CTX A1 結合在相同的位置，左：配體結合後受影響的 CTX A1 胺氨酸的分布圖，右：CTX A1 電荷分布圖與他結合的配體；(e) Hep4 與 CTXA1 作用的細部示意圖。

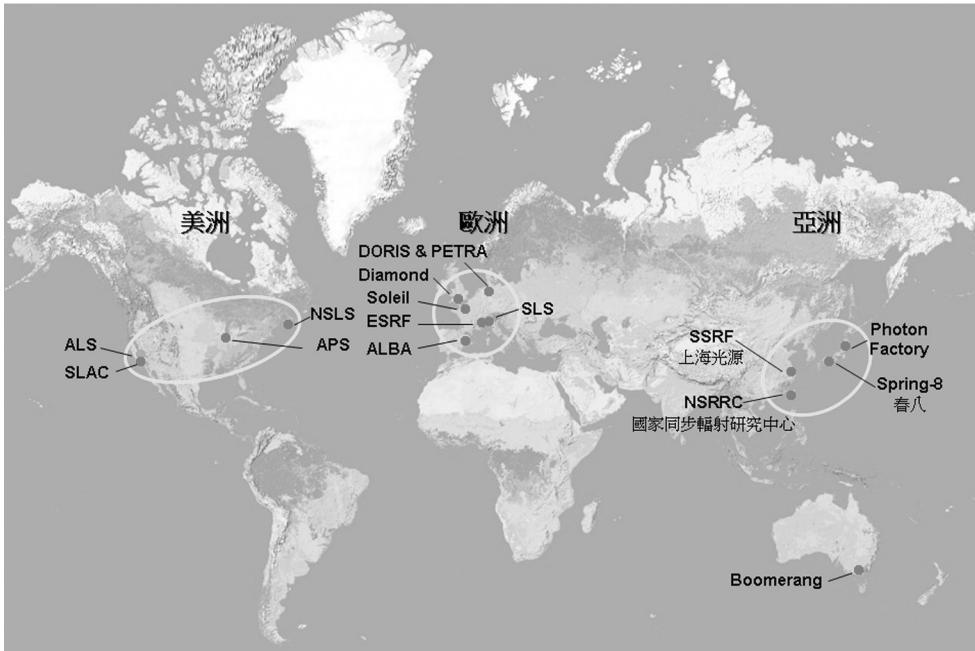


圖 2. 同步光源主要分布在美國、歐洲及亞洲三個地區，並有低能量、高能量及超高能量的光源可供使用，用戶可依需要提出需求，並設計實驗。

如跨領域合作的困難、學術研究環境國際化的不易等，息息相關，但無可諱言的，推廣的腳步太慢、開放的程度太少，以及外界參與的意願過低，都是造成研發成果受限的原因，也是未來可改進的方向。若以目前同步輻射光源的重要應用領域—生物醫學來看，國際上生命科學界運用同步光源，大致而言占其學術活動的 30%，但是在國內，即使在 2006 年也僅有約 5% 的用戶，這項明顯的差異或多或少的反應出國內在兩個學術領域存在著鴻溝，有待未來的克服。

由於重要科學問題的突破，除了要能運用手邊既有的研究利器外，新技術的開發亦經常是開拓新領域的關鍵。依據目前的規劃，我們在未來可用的同步輻射實驗設施，如果透過國際合作將日本 2013 年亦將運作的第四代光源納入考慮的話，我國學者從低能量的台灣光源 (TLS) 到中能量的台灣光子源 TPS、高能量的日本 SPring-8 及超高亮度的 SPring-8 Compact SASE Source (SCSS) 均可方便使用。屆時只要手邊有重要的科學問題，結合我們累積的同步輻射研究設施的經驗，未來的科學進展及科技產業的帶動將是指日可待，更是責無旁貸。

從 X 光單晶繞射技術的發展來看，在 1986 年

之前主要有賴於電腦 (如 VAX) 運算能力的提昇，使得 1972 至 1976 年間已建立的蛋白質晶體利用 X 光解構的成熟技術，得以進行更有效率的蛋白質結構的決定。但是真正的起飛點是在於 1990 年代同步輻射 X 光光源的提供，以及液態氮低溫處理晶體樣品技術的突破，使得 X 光蛋白質靜態結構決定能快速凌駕於核磁共振之上，再加上世界各國國家結構基因體計畫的推動，目前幾乎所有的單一蛋白質折疊形式都已被完成。而 X 光技術在分子動態的了解上，因無法與核磁共振競爭，很自然的 X 光晶體繞射的發展，就逐步的推向 (1) 多分子超大聚合的生化機器構形以及 (2) 膜蛋白分子三度空間結構的研究。這項進展有賴於增加蛋白晶體的長成效率 (可藉現代分子生物技術的協助，來改造有礙晶體長成的分子動態區域)，以及微米尺度單晶繞射的開發 (可藉微米大小 X 光光束線技術建立，並自動化來進行)。由此可見，X 光晶體繞射技術未來必須在 (1) 生物樣品備製，(2) 偵測微米尺度晶體技術的突破，以及 (3) X 光同調光源，如 X 光自由電子雷射 (X-ray free-electron laser, X-FEL) 新技術的開發多作努力，這也是目前國際上的發展趨勢。

四、綜合核磁共振與 X 光繞射技術探討蛇毒作用機制

台灣的生物醫學研究，在二十世紀初就已由杜聰明教授以鴉片及蛇毒兩項當時國家社會關心的課題為出發點，經過了半個世紀的努力，在蛇毒的研究上，因為國內蛇毒研究前輩，如李鎮源、張傳炯、楊振忠及歐陽兆和等教授對於「神經毒」及「出血毒」的研究突破，並透過國際合作，開展了藥理受體 (receptor pharmacology) 領域的先端，也因此登上國際舞台。有趣的是，在蛇毒成分中所謂「神經毒蛋白」或「出血毒蛋白」非常少量，從演化的觀點，其他尚有大量的蛇毒蛋白，但是功能仍不清楚，若能探究其結構與功能的關聯性，除了對蛇毒毒理機制可進一步了解外，更可能因此在人體

組織復原機制或醫藥研發上有新發現。其中眼鏡蛇毒中的心臟毒蛋白佔了蛇毒中約一半的含量，如能了解其影響心跳動及導致肌肉組織糜爛的毒理機制，並在國內這項有傳承的研究體系上能有所突破的話，雖然它目前不是國際流行的生物醫學研究之重點課題，但是卻可在國內少數有傳承的研究課題上紮下深厚的根基。

心臟毒蛋白是一個高度水溶性的蛋白質分子，但是它既能與醣分子作用，又會和厭水性的細胞膜脂質作用，因此提供了一個有趣的研究體系，來了解目前「醣生物學」中所欲了解的醣分子結構與功能關聯，以及細胞膜毒蛋白分子如何能同時溶於水，卻又溶於細胞膜，以形成孔洞 (圖 3)。如果在此問題有所突破，則對目前學界想了解的細胞膜蛋白作用機制能提供更深入的學理。在這項基礎上，

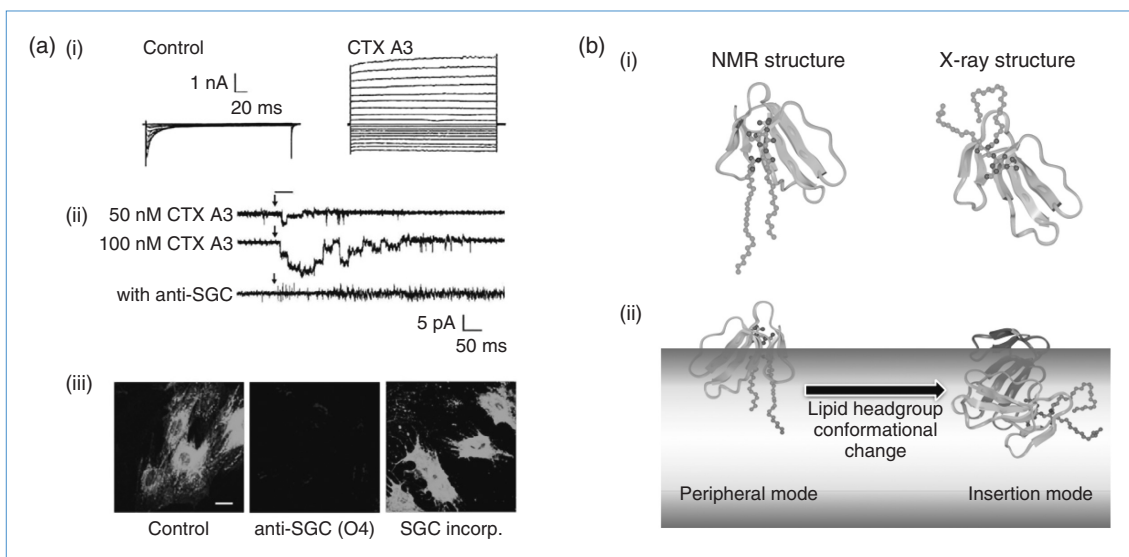


圖 3. 生命科學問題的解決需要多方位技術的結合，以本實驗室探討心臟毒蛋白在細胞膜形成孔洞的機制為例，說明實驗上須運用到單分子薄膜離子偵測、共軛焦顯微技術、核磁共振技術和 X 光單晶繞射等多樣平台，才能充分了解蛇毒蛋白的毒理機制。其中 (a) 心臟毒蛋白 A3 (CTX A3) 導致膜孔洞之形成以及腦硫脂 (SGC) 相關細胞內吞。(i) 全細胞記錄法顯示 CTX A3 誘發心肌細胞的額外電流；(ii) 利用外側向外式離子通道記錄法 (outside-out patch clamp) 來偵測 CTX A3 誘發心肌細胞上單一通道的現象；(iii) 共軛焦顯微鏡實驗顯示 CTX A3 內吞效應受心肌細胞上的腦硫脂調控。(b) 腦硫脂的構型改變在 CTXA3 形成膜上孔洞扮演重要角色：(i) 藉由核磁共振及 X 光結晶學所解出的 CTX A3/SGC 共和體顯示不同的結合模式：在膜表面的結合模式中，SGC 脂肪酸鏈是朝向 CTX A3 的三指環 (左)，然而在膜內的結合模式中，SGC 脂肪酸鏈是朝向相反的方向 (右)；(ii) 結合在膜表面的 CTX A3/SGC 共和體，藉由其脂質頭部的構型改變與另一個 CTX A3 分子作用後形成 CTX A3 D1 二聚物，此聚合體為形成細胞膜孔洞的中間體。

心臟毒蛋白的三度空間結構在 80 至 90 年代已由核磁共振及 X 光單晶體繞射技術解出，但是就像其他蛋白質一樣，這些結構仍無法協助我們了解心臟毒蛋白的構形為何卻能同時進行多種不同的分子交互作用。

答案的關鍵在於，當心臟毒蛋白在水溶液時是以單體存在，而當與脂質作用，尤其是作用在有專注結合能力的腦磷脂時，則會激發其雙體、甚至多體的形成，甚至導致原本水溶性的分子變成脂溶性。這個發現解釋了醣類分子可在協助毒蛋白分子辨識上扮演重要角色，而蛋白分子間的聚合態改變亦可解釋其水溶性與脂溶性的變化，同時也首度提出與蛋白質作用的脂質結構改變，亦能在細胞膜蛋白的運作功能上扮演重要角色。這些結論如果未能利用多方位結構生物技術來研究，勢必就像瞎子摸象一般地很不容易有正確的結論。這也是為何在未來結構生物技術平台的建立，國際上多採用有多元且長期的規劃模式。

五、未來結構生物研究需要多方位的技術結合—以 SRCD 為例

另外值得一提的是結構生物的研究進展，在低溫電子顯微技術方面，現今已能在二維晶體的樣品中取得高解析 ($< 2\text{\AA}$) 的蛋白質與脂質結構，而且能在單一分子的影像分析中得到合理解析度 ($\sim 7\text{\AA}$) 的圖像，這項進展若與 X 光散射技術配合，將可確定多分子聚合結構的基本構形，並可與生物資訊的分析技術配合，而取得可靠的分子聚合模式。由於目前主要的蛋白質折疊方式均已被確定，如果利用能測定生物分子二級結構分布的同步圓二色 SRCD 光源技術及生物結構計算的進展，則利用簡單的同步 SRCD 光譜的取得，以及已知的氨基酸序列的訊息，將可在不需結晶的狀態下，決定可靠的水溶液甚或膜蛋白的分子結構。從這個觀點來看，不久的將來任何單一蛋白質分子三度空間結構的決定，恐怕就會像現在利用質譜儀決定其一級結構一般，將成為日常使用的分析工具。

在此，我們特別強調在台灣利用同步光源來進

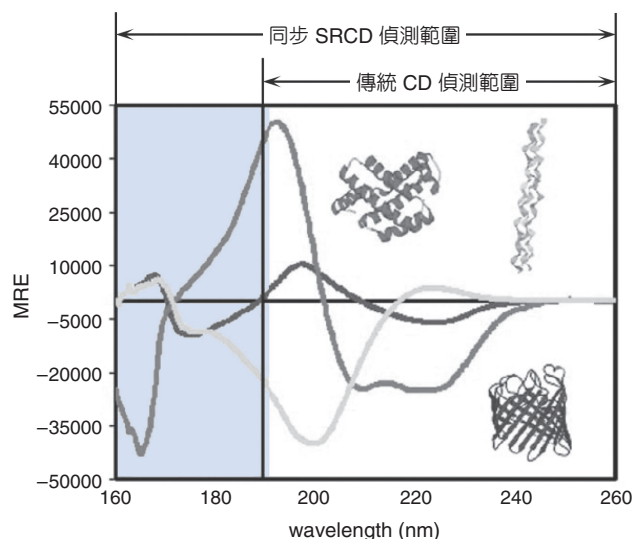


圖 4. 利用同步光源進行圓二色 SRCD 光譜的實驗，相較於傳統光源，能有較大的偵測區，並具更彈性的實驗條件，未來可用來研究細胞膜蛋白的構形改變，甚至與理論計算及生物資訊結合，而用來快速決定蛋白分子的三度空間結構。

行蛋白質構形分析的優勢。首先，因為台灣光源 (TLS) 的光源能量低，與目前英法兩國高能量光源的 SRCD 光束線相較，其光源的波長更適合圓二色光譜的實驗，亦較少有偵測系統過熱的問題，因此，如果我們仔細設計實驗站，台灣光源 (TLS) 的 SRCD 工作站應有較好的表現。其次，過去傳統上 CD 僅使用在二級結構的含量分析，但由於 (1) 同步光源對 SRCD 的可偵測區較傳統光源為大 (圖 4)，(2) 同步光源可彈性地調整偵測系統角度，而減少樣品散射所造成的光譜扭曲，適合進行膜蛋白實驗，以及 (3) 結構基因體已有完整的蛋白質構形資料庫，如果同時配合 SRCD 資料庫的建立，以及理論預測技術的改進，未來同步光源 SRCD 光譜應可提供完整的結構訊息，而上述的訊息整合正可由位於同步輻射中心旁的國家高速網路與計算中心來進行。最後，SRCD 光束線的投資經常不到 X 光光束線的五分之一，推動也相對的容易。我們相信台灣光源 (TLS) 如能在此加強其研發，將可為此研究領域開闢新天地。



圖 5. 歐洲所建構位於法國東部科技大城—格諾勒博的生命科學全方位結構生物研究設施，包括能提供 X 光源的 ESRF 同步輻射中心、中子束的 ILL 中子研究所，以及生物分子研發的「歐洲分子生物實驗室」(EMBL)，未來該地區亦將以此為技術核心，依 GIANT 計畫將格諾勒博規劃成全新的科技城，此架構可供新竹科學園區目前正建構的台灣光子源及竹北生醫園區朝向高科技發展規劃之參考。

六、歐洲建立多方位整合技術平台的作法

格諾勒博 (Grenoble) 科技城是目前全世界同時擁有高強度的中子束以及同步輻射光源的地方，全世界有超過 8000 位研究員來此使用該項設備。由於中子看到的是原子核，並且對於氫原子特別敏感，而 X 光看到的是電子，如能同時利用兩項設施，可以對生物分子或奈米材料在原子的解析程度有更完整的了解。由於歐盟預見此設施的潛力，在該地特別投資兩個跨領域的實驗室：歐洲分子生物實驗室及奈米材料研究中心，並對整個區域進行整體規劃，希望藉由這些研究工作，進一步建立高科技城，並推動相關產業，圖 5 顯示的就是歐盟如何藉由生物分子的技術平台，來充分發揮多方位技術平台的整合功能。這個作法目前世界各國如英國的 Diamond 及法國的 Soleil 同步光源均爭相效法。我國目前已決定興建新的同步光源，而其能量與大小

均與英法相當，因此目前最迫切且重要的問題，便是及早規劃與歐洲各國類似的整合平台，並針對我們的地區特色推動高科技產業。例如新建的台灣光子源 TPS 就在國立清華大學及國立交通大學旁，周邊更圍繞有新竹科學園區，以及國科會的各型國家實驗室，只要及早規劃，並建立相關的基礎建設來連結竹北生醫園區及竹南國家衛生研究院，相信未來台灣的生醫產業的起飛，應該指日可待。

七、結論

國科會為了提升國內的科學研究水平，並建立相關的技術平台，早在三十五年前就成立了精密儀器發展中心 (目前儀器科技研究中心的前身)，並於 1979 年創辦「科儀新知 (Instruments Today)」雙月刊，這個努力促使了儀器科技研究中心不僅成為台灣儀器科技的搖籃，並為國內各儀器的發展與應用，建立學術交流的平台。從上述近二十年結構生

物技術的突飛猛進來看，預期未來的生命科學研究，決定生物分子的三度空間結構，將成為類似決定DNA 或蛋白質序列一般的基本要求，如果要能在未來的結構生物領域迎頭趕上世界先進國家，我們必須加快技術平台整合的腳步，而國家實驗研究院的儀器科技研究中心正可以扮演這個關鍵角色。



吳文桂先生為美國維吉尼亞大學生物物理博士，現任國家同步輻射研究中心研究員兼副主任暨國立清華大學生物資訊與結構生物研究所教授。

Wen-Guey Wu received his Ph.D. in biophysics from the University of Virginia, USA. He is currently a scientist and the deputy director of National Synchrotron Radiation Research Center, and also a professor in the Institute of Bioinformatics and Structural Biology at National Tsing Hua University.