

結構生物學— 現代生命科學研究的利器

Structural Biology—A Powerful Tool for the Modern Life Science Research

周三和

Shan-Ho Chou

本文主要報導結構生物學如何影響現代生命科學的研究。生命科學的研究已從過去的傳統巨觀生物學到微觀分子生物學，再到目前的奈米級結構生物學。本文將談到筆者實驗室目前在微生物結構基因體學方面研究出來的成果，及結構生物學如何讓吾人更能洞悉生命科學的奧秘，其中也包括同步輻射此一國際級的儀器中心，及其對結構生物學所產生的巨大影響。

I will discuss in this article how the progress of structural biology has revolutionized the research of modern life science. The life science research has been transformed a great deal from a classical, macro-scale biology to a micro-scale, molecular biology to the now nano-scale structural biology. I will also talk how these developments have enabled us to investigate deeply into the mystery of the modern life science from a series of results in our recent studies in microbial structural genomics. I shall also discuss the significant impact of the national synchrotron core facility on research in Taiwan.

一、結構生物學

二十一世紀初是人類文明史上一個值得大書特書的年代，不僅整個人類基因體已經被順利完成(就如一本劃時代的有字天書，讓科學家可以按圖索驥探索生命的奧秘)，目前進展極快速的生物資訊學及結構生物學也讓人類握有兩把極佳的利器，使得人類可從容地在這本有字天書中奔馳，找尋具重要功能的基因及其所產生的蛋白質及結構，以增進人類的福祉。在過去知識尚未發達的年代，一個小小致病微生物的傳染往往就引起數千萬人的死

亡，造就多少生離死別的遺憾。即如過去的秦始皇，雖然貴為當時最重要的人上人，也脫離不了死亡的陰影。雖然秦始皇曾派人試圖找尋長生不老的仙藥，但終究徒勞無功。而過去中國人的杜撰人物如神農氏，也被冠上傳奇色彩。蓋因人類夢想有一位傳奇人物，可利用舌頭(神農嚐百草)找尋各種不同藥物，以解決人類所受各式各樣的痛苦，但是夢想最終還是需要知識來實現。雖然現代科技進展快速，但人類目前還是處在一個危險的環境中，此乃由於人類所產生大量的污染，導致人類正飽受各種不同癌症的侵襲。同時由於微生物的高度突變

性，過去人類賴以維生的抗生素已幾乎大部份失效，將來可能面臨無藥可用的窘境。所幸二十一世紀初生命科學的高度進展，使得過去人類只能在夢境裡得以實現的奇蹟已經露出曙光，過去認為不可能的任務也已經漸漸地被付諸實現。

如最近陽明大學蔡亭芳教授領導的研究團隊在老鼠身上所發現的 aging 基因，及其可能帶來的影響，將使得秦始皇後悔不是在廿十一世紀出生。蔡教授所發現的此一基因不過只產生短短的一百多個胺基酸的蛋白質，但當其功能被剔除 (knockout) 或基因被剔除時，就可發現突變老鼠迅速的產生 aging 徵狀，如駝背、骨質疏鬆、視盲、髮白等老年人的典型特徵。如果能進一步的利用結構生物學的技术，決定其三度空間結構，使得吾人得以「看」到它，並據以設計或找出可加強其功能的小分子藥物，則人類或許在廿十一世紀就可大幅延長壽命，一步步地實現人類長生不老的夢想。當然找尋人類身上的 aging 基因及找尋真正有用的小分子藥物以提高人類壽命可能還得花費一番工夫，但人類總算已邁出一大步。

另一個高度引人關心的話題，即為上述微生物抗藥性菌種的產生。目前由於生命科學的進步，人類已經開始思考不會引起細菌抗藥性的新型藥物的研發。此一關鍵性的認知即為人類不應再發展將微生物趕盡殺絕的藥物，而應致力於發展讓微生物不會產生毒性的藥物。將微生物趕盡殺絕的工作應交給人類的免疫系統來處理，如此微生物就不會產生抗藥性。目前此一觀念正吸引科學家們針對產生毒物的標的蛋白，利用結構生物學設計出新型控制微生物致病性的藥物，此一發展將對於人類文明發展產生重要的影響，也許有一天人類將可活到兩百歲以上。同時受到各式微生物的攻擊時也將有各種高效能的藥物能治療，這樣的發展能否實現呢？就讓我們拭目以待吧！

二、烷基過氧化物的還原

上述說明了結構生物學在現代生命科學所扮演的重要角色。筆者將在下文中敘述我們實驗室目前利用結構生物學及同步輻射儀所發現的一系列研究

成果。在此段落中筆者將談到烷基過氧化物的還原機制，此亦與生命體老化息息相關。因為地球上氧氣的出現，當生命體從無氧狀態進步到有氧狀態時，生命體產生了重大的變化。此乃因在有氧狀態時，生命體的形態可獲得超過無氧狀態數倍的能量，而能量的獲取則為生命能否繼續存在的一個重要指標。此時生命以更多不同型態出現，也變得更加多采多姿，高等生物也就相繼在地球出現。但可惜的是，氧氣為一雙自由基的物質，其特色為很容易與細胞中的高分子物質，如核酸、蛋白質或細胞膜起作用，產生烷基過氧化物，進而破壞其功能。所以生命體不可避免的會隨著時間進行而產生老化，此為生命體老化的主要原因之一 (上述 aging 基因的功能可能有一部分為產生可還原烷基過氧化物的酵素！)。

市面上許多號稱可去除自由基的營養食品如維生素 E 等的確有其原理，但是生物體中產生的烷基過氧化物還原酶才是真正作用的蛋白，故其作用機理頗值得研究。我們的研究小組有幸在最近能利用國內同步輻射儀解析出三個重要烷基過氧化物還原酶及其中間體的結構，以此為基礎，我們建立了一套烷基過氧化物還原酶的作用機理，可說是利用結構生物學解釋生命科學現象的一典型例子。以下將針對此作詳細說明。

三、烷基過氧化物還原酶

烷基過氧化物還原酶 (peroxiredoxin, Prx) 為最近所發現主要的烷基過氧化物還原酶^(1, 2)。而 Prx 較特別的是它不含有氧化還原所需的輔助因子，如金屬離子等。相反的，它主要以一個保留 Cys 胺基酸 (peroxidate Cp-SH) 為主要催化中心。首先，它被烷基過氧化物氧化成 Cp-SOH，而此一中間產物再被其他途徑還原回來，所以顯然地此一保留 Cys 胺基酸催化中心附近的胺基酸及其附近的受質接受區對此一酵素的催化將扮演相當重要的角色。而按照中間產物 Cp-SOH 如何被還原回 Cp-SH，Prx 尚可細分成 1-Cys、typical 2-Cys 及 atypical 2-Cys 等三類型。筆者所討論的 Prx 屬於 atypical 2-Cys 此一類型，其中間產物 Cp-SOH 係由自己的另

一 resolving Cys 還原，而形成一含有分子內雙硫鍵的氧化態 Prx。此一中間氧化態 Prx 再藉由其他含 Cys 胺基酸的蛋白，如 thioredoxin，將其轉變成還原態 Prx。此一反應機制已被探討過（請參考回顧性論文^(1,2)），但有關 atypical 2-Cys Prx 的結構及其詳細反應機制尚需有中間產物與酵素的複合體結構才能確認。本文即為探討十字花科植物病原菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 一 Prx 蛋白及其突變體與一些新發現受質的三級結構，並由此複合體結構得以建立一 atypical 2-Cys Prx 還原烷基過氧化物的詳細反應機制。

四、三種不同氧化態的烷基過氧化物還原酶結構

XcBCP 含有兩個主要的 Cys 胺基酸，即 C48 (peroxidate Cp-SH) 及 C84 (resolving C_R-SH)，而它們的氧化還原作用即為該蛋白氧化還原烷基過氧化物的主要關鍵。幸運的是，我們利用一些突變蛋白，得以偵測到此一蛋白的三種不同氧化態及其與不同受質的複合體結構，即為自由硫基態（如圖 1(a)）、分子間雙硫鍵態（圖 1(b)）及分子內雙硫鍵態（如圖 1(c)）。

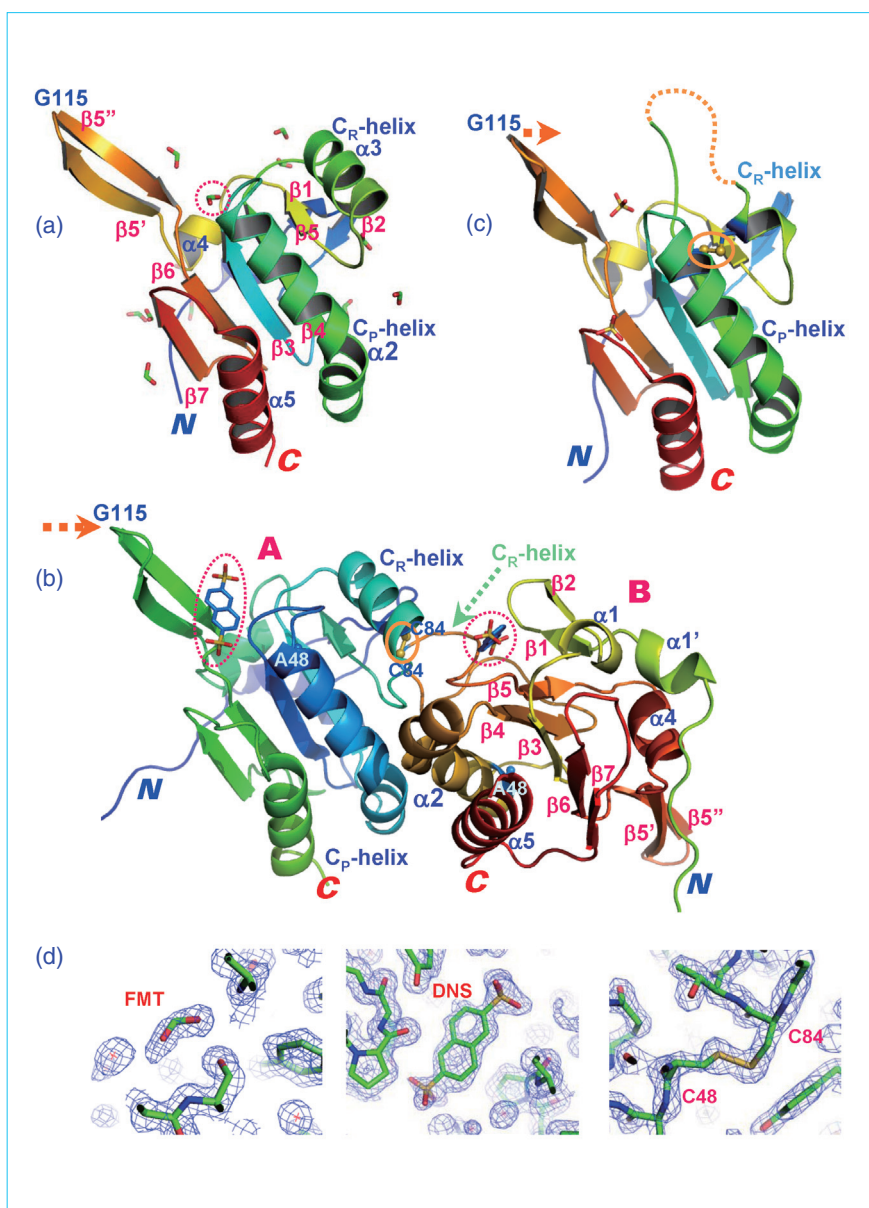
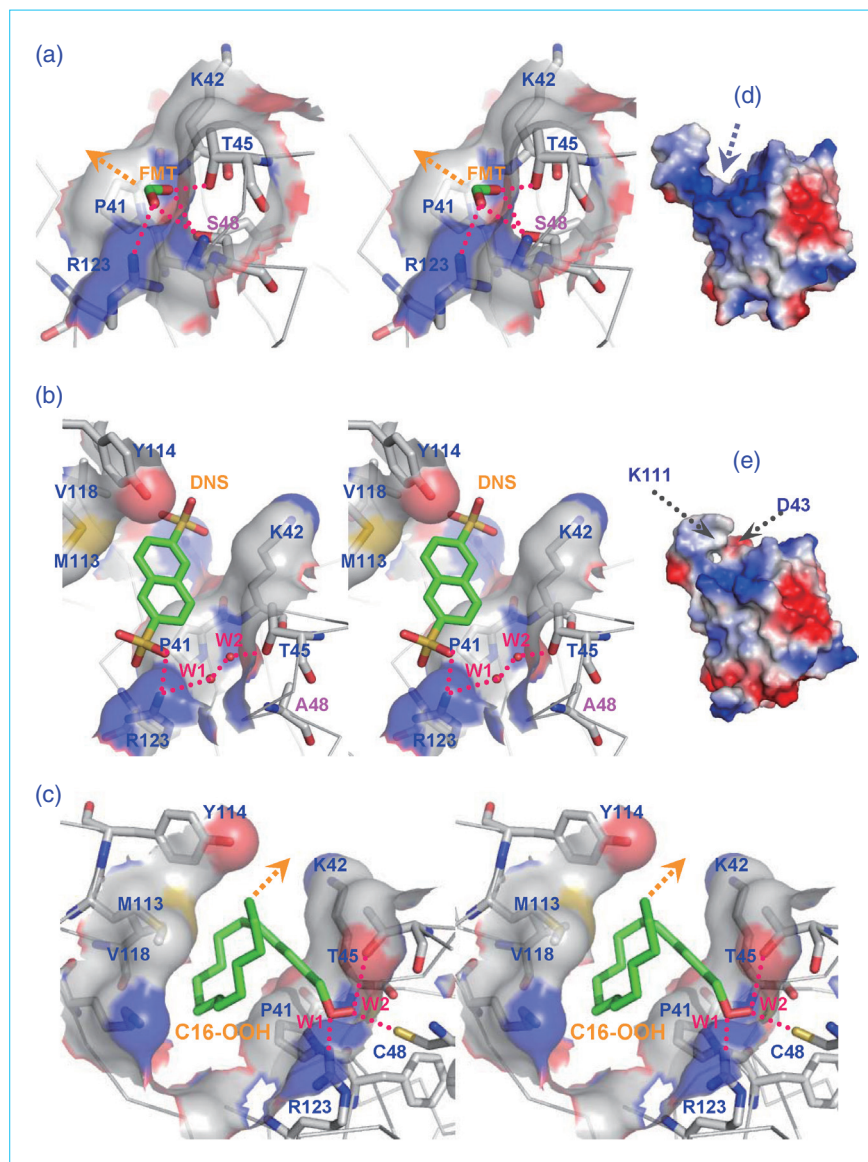


圖 1. XcBCP 蛋白在三個不同氧化態並與不同受質如甲酸根 (formate) 及 DNS 的複合體結構。(a) 自由態與甲酸根的複合體結構，甲酸根分子以點狀紅色圓圈圈住。重要的 C_P-48 胺基酸位於 C_P-helix，C_R-84 則位於 C_R-helix。(b) 分子間雙硫鍵態與 DNS 的複合體結構，二個 DNS 配位子以點狀紅色橢圓圈住，一對分子間雙硫鍵則以點狀橘色圓圈圈住。由於氧化後，另一 XcBCP 蛋白的 C_R-helix 結構發生改變 (由螺旋體變成線狀體)，此一變化區域以點狀綠色箭頭表示。(c) 分子內雙硫鍵態與 DNS 的複合體結構，一對分子間雙硫鍵則以點狀橘色圓圈圈住。氧化後，XcBCP 蛋白自身的 C_R-helix 結構發生改變 (由螺旋體變成線狀體)，有些胺基酸產生較大的動態改變，以致於在電子密度圖無法被觀察到，此消失的胺基酸以點狀橘色線表示。(d) 一些重要區域的 XcBCP 蛋白電子密度圖。最左方為甲酸根 (FMT)，中間為 DNS，右方則為 C48-C84 所形成的分子內雙硫鍵。

圖 2.

XcBCP 蛋白的催化中心及電荷分布圖。(a) XcBCP 蛋白自由態的催化中心圖，它含有四個重要胺基酸，分別為 P41、T45、S48 及 R123，甲酸根則以 FMT 標示。甲酸根與此四個胺基酸形成的氫鍵，以紅色點狀線表示。(b) XcBCP 蛋白分子間雙硫鍵態的催化中心圖，從圖中可看到 DNS 巧妙地塞在 XcBCP 蛋白的催化中心。兩個類似甲酸根的氧原子以 W1 及 W2 表示，它們與 DNS 及 XcBCP 蛋白催化中心的胺基酸所產生的氫鍵，以紅色點狀線表示。(c) XcBCP 蛋白模擬的 C16-OOH 受質與催化中心圖。由圖可知，此一催化中心含有一大的空間可容納大於 16 個碳原子的烷基過氧化物。(d) XcBCP 自由態的電荷分布圖。在自由態時，左上方的一個受質區有一個大空間，可容納受質分子進駐。(e) XcBCP 蛋白分子間雙硫鍵態的電荷分布圖。在分子間雙硫鍵態時，左上方受質區的空間已被關閉，無法容納受質分子進駐。



1. 自由硫基態結構

由於 C48 及 C84 兩個 Cys 胺基酸極易被氧化，所以不易得到兩個 Cys 胺基酸皆在還原態中的三級結構。為了得到自由硫基態結構，我們利用 C48S/C84S 的雙突變種。當 Cys 胺基酸被突變成 Ser 胺基酸後，此一蛋白的結構即處在還原態中 (-OH 不能被氧化)，而採取一類似 thioredoxin 的構型。有意思的是，有十幾個甲酸根分子被發現，其中一個被發現位於此一蛋白的催化中心 (由 P41、T45、C48 及 R123 胺基酸組成，詳見圖 2)。值得注意的是，在篩選及養成 XcBCP 晶體時，並沒有加入額

外的甲酸根分子，但這些甲酸根分子卻自動加入 XcBCP 以形成晶體，表示甲酸根分子為 XcBCP 的天然配位子，並可穩定 XcBCP 的三級結構。此一配位子意外的加入以穩定蛋白結晶，為利用 X 光繞射解析它們的三級結構的一個重要額外紅利。蓋因結構與功能未知時，無法預測何種配位子是此一蛋白的受質。但這些配位子的出現，對於解釋此一蛋白的功能將有很大的助益。圖 2(d) 即為此一甲酸根分子的電子密度圖，由圖可知甲酸根分子的確出現在 XcBCP 自由硫基態的三級結構中，並可知其與附近重要胺基酸的作用關係 (圖 2(a))。

2. 分子間雙硫鍵態結構

由於 C48 為 XcBCP 在氧化還原反應中最重要胺基酸，當 C48 被突變成 C48S 後，我們卻意外發現 resolving C84 與另外一個 XcBCP 的 resolving C84 形成一個分子間雙硫鍵態的雙體結構 (圖 1(b))。更重要的是，也發現另外一個很重要的配位子 DNS (2,6-dinaphthalenedisulphonic acid) 出現在 XcBCP 蛋白的催化中心附近。此一配位子含有十個碳原子，證實 XcBCP 蛋白的確可容納至少十個碳原子的受質。此一特別的配位子亦是在 XcBCP 蛋白晶體篩選時出現在篩選溶液中的，更印證了以上所述，利用 X 光繞射解析蛋白三級結構的一個重要因素，即吾人可能在不經意中意外發現了重要的受質。此一特別的受質亦有很強的電子密度，如圖 1(d) 所示。

3. 分子內雙硫鍵態結構

由於 C48 及 C84 兩個 Cys 胺基酸極易被氧化，所以當以原生種 (wild type) 的 XcBCP 蛋白篩選其晶體時，的確發現此二個 Cys 胺基酸互相反應，而形成一個分子內雙硫鍵態結構，如圖 1(c) 所示。而此一分子內雙硫鍵亦有相當強度的電子密度，如圖 1(d) 所示，所以我們利用三個不同的 XcBCP 序列，而得到三個 XcBCP 在不同氧化態的結構。以下將討論此三項結構的活化中心。

五、XcBCP 蛋白的催化中心

圖 2 顯示 XcBCP 蛋白的催化中心，當 XcBCP 蛋白處於還原態時，它整個結構事實上是準備接受一個烷基過氧化物，利用 C48 的親核性進行還原烷基過氧化物的還原反應。在圖 2(a) 中可看到催化中心的四個重要胺基酸 (P41、T45、S48 及 R123) 及一個甲酸根。在圖中可看到甲酸根的兩個氧原子與 T45、R123 及 S48 的側鏈原子產生四個氫鍵，將甲酸根分子牢牢固定在催化中心。同時在此一還原態時，也可看到催化中心附近有一個很大的空間，可供較大的烷基過氧化物進入 (如圖 2(d) 的箭頭所示)。此一事實更可由 C48A 變種的三級結構看得更清楚 (圖 2(b))。在此結構中，一個龐大

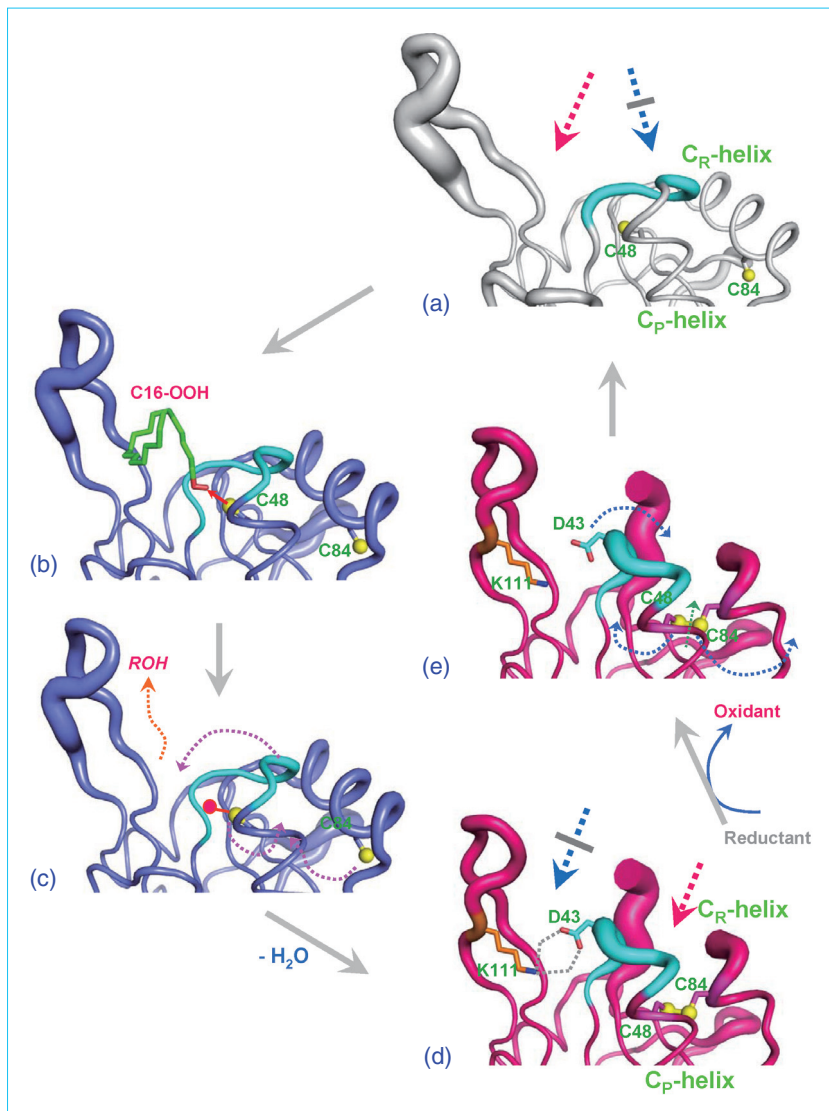
的 DNS 配位子正處於催化中心的附近空間內，同時也可看到兩個水分子 (W1 及 W2) 位於與上圖甲基根的氧原子附近，而形成一連串的氫鍵。除此之外，吾人尚可觀察到一些凡得瓦爾力的存在，如 K42、Y114、V118 及 M113 的側鏈與 DNS 的碳原子間的作用力，可大大地穩定 DNS 在此催化中心的存在。事實上，此一催化中心附近的空間尚可容納更大如含 16 個碳原子的過氧化物，如圖 2(c) 所示。但當烷基過氧化物被還原後，它形成的產物 (一般的醇類) 即迅速離開催化中心，造成催化中心的關閉，如圖 2(e) 所示。從這些結構可以得到建立一個烷基過氧化物被還原的機制，如以下所述。

六、烷基過氧化物被還原的機制

圖 3 顯示 XcBCP 蛋白如何催化烷基過氧化物的還原。在此圖中使用另一種卡通圖型來表示蛋白胺基酸的動態情形。當它較具動態時，則以較肥胖的卡通線形圖來表示。相反的，當它較不具動態時，則以較狹窄的線形圖表示。基本上，當蛋白質的胺基酸群進行與烷基過氧化物的還原反應有關時，它們就會表現較大的動態行為，以進行反應。相反的，如果這些胺基酸係負責穩定蛋白的整體結構並與催化行為無關時，則它們就較不具動態行為。故此卡通圖型的結果，就很容易表示那些區域與烷基過氧化物的還原反應有關。圖 3(a) 為 XcBCP 蛋白在還原態時的結構。最重要的是，在此狀態下左方的空間是打開的，容許烷基過氧化物進入 (以點狀紅色箭頭表示)。而右方的空間則被 C48 附近的 loop (以淺藍色表示) 所關閉 (以點狀藍色箭頭表示)。所以在此一狀態下只容許烷基過氧化物進入左方的催化中心，但不容許它進入右方的空間，此仍因最重要的胺基酸 (C48) 只能往左方起反應。圖 3(b) 顯示一個含 16 個碳原子的烷基過氧化物進入左方催化中心的情形，可清楚地看到 C48 的 -SH 官能基正擬攻擊烷基過氧化物的氧原子 (紅色箭頭)。當反應完成後，反應後的產物迅速離開，而 C48 的 -SH 官能基變成 -SOH，同時造成催化中心構型產生很大變化；右方淺藍 loop 往左方移動，C48 的 -SOH 官能基往右方移動，而處於

圖 3.

XcBCP 蛋白的烷基過氧化物反應機制示意圖。本圖主要以分子動態的卡通圖表示。當蛋白的動態較低，它形成了較細的線條。但當蛋白的動態較高時，它就形成了較胖的線條。此一示意圖可容易地看出那一區域在 XcBCP 蛋白經歷氧化還原反應時，有較大的動態改變。很顯然地，C48 胺基酸所在的催化中心迴紋（天藍色 loop）附近有較大的改變。它從較穩定的還原狀態轉化成較不穩定的氧化狀態，再轉化回穩定的還原狀態。詳細的機制說明可參考本文。



CR-helix 的 C84 胺基酸亦往左方移動（圖 2(c)）。在此狀態下 C48 的 -SOH 官能基就與 C84 的 -SH 官能基靠近，而形成一個雙硫鍵。重要的是，左方的空間因淺藍 loop 的移動而被封閉（圖 2(d)，以藍色箭頭表示），而右方原本封閉的空間則因淺藍 loop 的移動而被打開（圖 2(d)，以紅色箭頭表示），進而容許另一含雙硫基胺基酸的小蛋白或分子進入，以進行雙硫鍵的交換還原反應。

另一值得強調的是，淺藍 loop 區的動態變得較高，而含 C84 胺基酸的 C_R-helix 則變成極端動態，甚至其中一小段胺基酸已快速運動得無法在電子密度圖中被辨識（C_R-helix 以紅色表示）。此一現象亦可加速其他含雙硫基胺基酸的小蛋白或分子進

入以進行雙硫鍵的交換還原反應。而當原來的雙硫鍵被還原後，淺藍 loop 區將回到原有位置，被還原的 C48 已無雙硫鍵的限制，亦回轉至原來靠左方的位置（圖 2(e)）。顯然的是，中間態的構型較不穩定（圖 2(d)）。但當反應完成後，XcBCP 蛋白就回復到原來的穩定狀態（圖 2(a)），以接受下一個烷基過氧化物的進入及反應。XcBCP 酵素就如此周而復始地將所有烷基過氧化物分子進行還原反應。

七、同步輻射研究中心與結構生物學

以上整個烷基過氧化物分子的還原機制實在是拜同步輻射研究中心所提供的優異光束線 (beam

line) 才能完成。顯然同步輻射研究中心將繼續在台灣結構生物學及基因體學領域扮演重要角色。事實上，這也是世界各先進國家正大力構築不同規格及等級的同步輻射中心的主要原因之一。同步輻射儀實在是一部超強的儀器，可快速地提供蛋白的三級結構解析。但是台灣目前擁有的同步輻射儀已較老化，需再升級才能與國外更優質的同步輻射儀競爭。很高興的是，國科會亦體會此一趨勢，已同意台灣建造另一光子源中心，屆時台灣將有一光源強度更強，而且也能針對較小晶體作更有效的繞射數據收集，此對於結構生物學領域及其他須利用該項儀器的學者都是一大福音，相信台灣亦將在此領域大放光芒。

誌謝

筆者誠摯地感謝國科會研究經費的提供及國家同步輻射研究中心的同仁們所提供良好的設備及服

務，使得我們的研究成果能順利地發表在有名的國際期刊上⁽³⁾，並頗獲好評。

參考文獻

1. Z. A. Wood, E. Schroder, J. R. Harris, and L. B. Poole, *Trends in Biochem. Sci.*, **28**, 32 (2003).
2. B. Hofmann, H. J. Hecht, and L. Flohe, *Biol. Chem.*, **383**, 347 (2002).
3. S.-J. Liao, C.-Y. Yang, K.-H. Chin, A. H.-J. Wang, and S.-H. Chou, *J. Mol. Biol.*, **390**, 951 (2009).



周三和先生為美國西雅圖華盛頓大學博士，現任國立中興大學生化研究所講座教授。

Shan-Ho Chou received his Ph.D. from the University of Washington, Seattle, USA. He is currently a chair professor in the Institute of Biochemistry at National Chung Hsing University.