

液態核磁共振光譜技術 在蛋白質藥物設計之運用

Application of Solution NMR in Protein Drug Design

許家豪、莊偉哲

Jia-Hau Shiu, Woei-Jer Chuang

近年來蛋白質藥物已漸漸地使用在許多疾病的治療上，這樣的趨勢顯示蛋白質藥物在藥物開發上扮演極重要的角色。為了設計具有生物功能性的蛋白質來當作藥物，我們必須對其蛋白質結構與其受體在結合時的作用有完整清楚的瞭解，而核磁共振光譜具有獨特的能力，可以獲得溶液狀態下蛋白質結構以及蛋白質與標的蛋白質交互作用間的資訊，目前已有許多核磁共振光譜技術運用到蛋白質藥物的研究，並確認它們與其標的蛋白質間的作用模式，筆者將在本文中介紹這些技術，以及如何運用它們來獲取重要資訊，俾設計蛋白質藥物。

During recent years, protein therapeutics are increasingly used for the treatment of many diseases. This trend lights on the significant role of protein drugs in the development of drugs. To facilitate the applications of biologically functional protein in drug design, it is necessary to have a thorough understanding of their conformations and their interactions with the receptors. NMR spectroscopy has the unique ability to retrieve information about 3D structures of proteins and their interactions with the target proteins in solution. Many NMR techniques have been used to study a number of pharmaceutically important proteins and characterize their interactions with the targets. In this review, we will introduce these NMR methods and show how to utilize them for protein drug design.

一、前言

生技藥品 (biopharmaceuticals) 係指利用基因工程等生物技術所開發的藥品，隨著生物技術產業之日益成熟，全球生技藥品產業在近年來快速地發展。因蛋白質藥物具有高專一性、低副作用、研發期較短及高產值等特性，更成為未來藥物主要發展趨勢。而單株抗體藥物更為近年來生技藥品市場中成長速度最快之領域。目前美國食品和藥物管理局

(FDA) 已批准超過 130 種不同的蛋白質或胜肽藥品在臨床中使用，而且還有更多正在開發中。

蛋白質是我們身體內最具有活性與多樣性的生物巨大分子，它們肩負著體內重要的生物催化反應，且在細胞膜形成受體或通道，以溝通細胞內外的訊息，並提供細胞支撐的骨架，更擔任運輸的角色，將不同分子運送到各個細胞或器官組織，因此在身體內各種不同蛋白質的生物功能研究變得極為重要且必需，尤其與疾病相關的蛋白質。依據目前

估計約有 20000–23000 種不同基因在人類基因組中，經過基因選擇性裁接和轉譯後修飾的蛋白質(磷酸化或糖基化)，其蛋白質的數量與功能與我們目前已知的相比可能高得許多⁽¹⁾。許多疾病的產生大多來自某些蛋白質含有突變或其他異常，抑或存在於一個異常高或低濃度的不平衡，故從疾病機制構成的角度來看，蛋白質研究變成是一個龐大且複雜的挑戰，但從治療方面來說，蛋白質藥物的研究也給予我們很好的機會，可利用蛋白質藥物治療疾病，以減輕疾病對人類所帶來的痛苦。

蛋白質藥物相對於小分子化學藥物有下列六項優點：第一，蛋白質具有執行專一與一連串複雜反應的功能，是化學化合物藥物所無法達到的。第二，蛋白質的作用是非常專一的，藉由蛋白質來治療，可避免干擾正常的生理機制和造成不良影響。第三，由於人體自然產生的許多蛋白質可用於治療，而這些藥物往往耐受性好且較不易引起免疫反應。第四，大多數遺傳性疾病在疾病的基因發生突變或刪除，蛋白質藥物療法可以提供有效的替代治療。第五，發展蛋白質藥物其獲得 FDA 的批准時間可能會快於小分子化學藥物。就過去的統計發現，1980 年至 2002 年中 33 個蛋白質藥物比 294 個小分子化學藥物平均批准的時間快了一年。第六，因為蛋白質藥物的獨特性與功能，製藥公司可以獲得較多的專利保護而參與更多藥物開發⁽²⁾，因此蛋白質藥物之研發為近年來醫療藥品市場中成長最快速之領域。

二、結構生物學在藥物設計所扮演的角色

結構生物學在近代藥物研發中扮演重要的角色，利用 X-ray 晶體繞射與核磁共振光譜技術決定藥物靶標 (drug target) 的蛋白質結構後，可經由分子結構的分析，瞭解藥物靶標的結構與功能之間的關係，進而針對活性中心進行藥物設計。針對藥物靶標開發具有高強度兼具高選擇性的抑制物，是目前藥物研發中最重要的課題。專一性設計可以減低對其他相似的藥物靶標的抑制，減少不必要的副作用。目前 X-ray 晶體繞射技術是決定蛋白質結構的

最佳工具，但研究顯示蛋白質是藉由內部的運動來影響它自己的功能。這顛覆了過去所研究的蛋白質結構與功能關係的論點，同時也揭露了為什麼要設計出一個藥物是如此困難的原因。過去在設計藥物分子時所依據的模型都是蛋白質的靜態模型，它不會動，但實際的狀況是蛋白質會不斷的變換其自身的結構。因此我們必須瞭解蛋白質的動態 (dynamics)，並且將這個新的資訊應用在藥物的設計上，以提升設計藥物的精確度。核磁共振光譜技術正是決定蛋白質動態的最佳工具。

在蛋白質藥物研究中，蛋白質可以作為藥物或藥物靶標兩個面向來探討。當蛋白質作為藥物時，蛋白質的三維結構可以幫助我們理解它與標的蛋白 (target protein) 的作用方式。當蛋白質作為藥物靶標時，蛋白質的三維結構可以有助於研究它如何被活化或抑制。蛋白質支架 (protein scaffold) 可用於蛋白質藥物的設計 (圖 1)。經由突變蛋白質支架迴圈 (loop) 的殘基 (residues) 可以讓具有三維結構支架蛋白與藥物靶標有高專一性的作用。篩選 (screening) 系統與疾病動物可以幫助確認 (validate) 蛋白藥物的療效。隨著核磁共振光譜 (NMR) 技術在生物大分子結構上的快速發展，針對在此兩領域以蛋白質為基礎的藥物研發，核磁共振光譜可以發揮很好的利基⁽³⁾。核磁共振光譜技術不僅揭示重要蛋白質的結構資訊，更重要的目的是允許科學家去探索蛋白質在溶液中的動態情況，還有蛋白質之間交互作用和結合的發生過程，這些都是非常重要

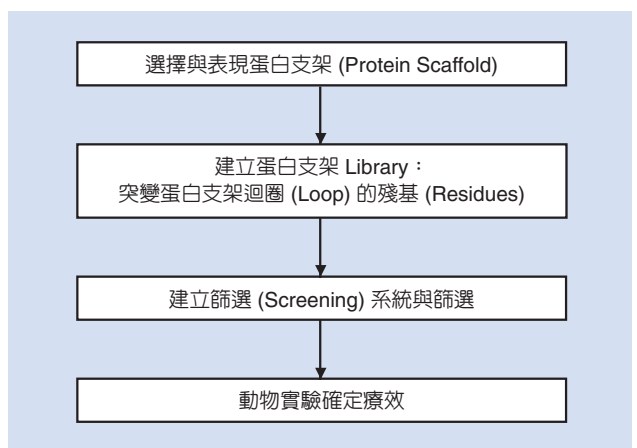


圖 1. 以蛋白質支架研究蛋白質藥物的設計流程。

的資訊來了解蛋白質成為藥物時的作用模式，進而設計或發現新蛋白藥物的開發線索。

三、核磁共振光譜 (NMR) 在蛋白質藥物設計所扮演的角色

由於核磁共振的多功能性，目前的核磁共振光譜技術在蛋白質藥物開發方法，不僅能補足由蛋白結晶結構所看不見的資訊，更能提供在接近生理值溶液狀態下蛋白質結構與特定動態變化的重要數據，加強了蛋白質藥物開發的優勢。不過，核磁共振光譜仍有其研究的限制條件，主要在於蛋白質分子量大於 150 kDa，以核磁共振光譜來研究，會面臨解析度不足與圖譜重疊的問題，這些問題也是許多科學家企圖解決與突破的，目前有許多關鍵技術已有所創新與改善。而在蛋白藥物研究的領域中，多數研究人員會選擇有利於 NMR 技術研究的蛋白，這類蛋白特徵包括：(1) 小型且高度動態的胜肽 (peptide) 或激素 (hormone)，(2) 較小 (小於 30 kDa) 具有散亂結構 (disordered) 或動態的蛋白質，(3) 具有生物功能之片段蛋白質 (functional domain)，(4) 小型配體蛋白 (ligand) 與受體 (receptor) 間的相互作用^(4, 5)。就目前而言，核磁共振光譜的蛋白藥物開發研究已有很大的進展，部分已利用核磁共振光譜來研究重要胜肽和蛋白質藥物的候選者，如表 1 所示。

由表 1 重點地指出，現階段有幾類蛋白質常用核磁共振光譜來研究蛋白質藥物開發，其中包括趨化激素 (chemokine)，如介白素 (interlukines) 和干擾素 (interferons)、生長因子或激素 (TGF、EGF、BFGF 與 HGH)、抗菌胜肽 (hepcidins、bacteriocin 與 tachystatin)、免疫蛋白 (FK506、cyclophilin 與 defensins) 和病毒標的蛋白。這些都反映了核磁共振確定結構更小、更靈活的蛋白質和胜肽的優勢。但隨著核磁共振技術的進步，更大分子量的蛋白質結構可以被決定，這也表示在不久的未來可能有許多酶 (kinases、phosphatases、proteases 與 metabolic enzymes) 可以核磁共振光譜的方式來研究。透過核磁共振光譜，可讓研究人員得以觀測蛋白質鍵結狀況的內部運動之改變。

四、核磁共振光譜學技術運用在蛋白質藥物設計的方法

在新的先導藥物開發策略上大致可以分為兩大類：理性設計為基礎 (rational design-based) 和篩選為基礎 (screening-based) 的方法。而筆者主要探討的是以理性藥物設計為主要的研究方式，其內容可以進一步細分為兩部分：受體為基礎 (receptor-based) 的設計和配體為基礎 (ligand-based) 的設計。一般來說，這兩個藥物開發的研究，都包含於核磁共振研究的範疇內⁽⁶⁾。而筆者實驗室較感興趣的研究是以配體為基礎的方法，根據其結構構型變化和與其目標蛋白的結合模式為設計蛋白質藥物的主軸，而且配體的分子量大都小於 10 kDa 左右的胜肽或蛋白質，非常適合於利用核磁共振來作研究。配體與受體間作用的重要資訊，主要來自如何決定該配體的結合專一性和結合動力性質，更重要的是，確定配體上與受體結合的位置與結合後的構型變化。

以下將概括地說明如何利用核磁共振光譜發展與設計蛋白藥物的過程。圖 2 為總結不同類型的核磁共振實驗方法對蛋白質研究的貢獻。圖中反映三個要素的關聯性：即目標配體蛋白或胜肽、受體，和兩者間的結合作用。配體胜肽或蛋白質的獲得可以透過固相化學合成，或利用生物表現系統來生產高量的蛋白，其中可以利用同位素標定，提高結構分析的解析度，利用標準化的核磁共振結構分析光譜來獲得配體蛋白的三維結構。而在另一端受體分子的研究，因受體大都屬於細胞膜上大分子，蛋白的表現與純化皆為困難的工作，因此受體蛋白的獲得是目前藥物開發上急欲突破的瓶頸，受體蛋白的結構可利用標記多種同位素的蛋白質，並以多維核磁共振方法來分析，或直接利用 X 光繞射蛋白結晶的方式來取得。最重要的是在於圖 2 中間反灰的部分，配體與受體的結合作用模式可以利用目前常用的核磁共振技術來探討，這也是本文主要討論的內容。

筆者列舉幾項核磁共振光譜實驗來說明。(1) 化學位移擾動 (chemical shift perturbation)：該實驗可用來觀察配體或受體蛋白在結合時，哪些胺基酸殘基參與結合作用⁽⁷⁾；(2) 傳輸的歐豪效應實驗

表 1. 目前已知以核磁共振方式研究在藥物開發上重要的蛋白質或胜肽 (由左依序為蛋白名稱、蛋白質資料庫序號與生物分子核磁共振資料庫序號)⁽³⁾。

蛋白質名稱	蛋白質資料庫序號 (PDB ID)	生物分子核磁共振資料庫序號 (BMRB ID)
變形生長因子 (Transforming growth factor alpha, TGF)	2TGF	183
介白素-8 (Interleukin 8)	3IL8	280
介白素-1b (Interleukin 1-beta)	1I0B	434
表皮生長因子 (Epidermal growth factor, EGF)	1JL9	1377
親環素 (Cyclophilin)	1FGLA	2208
FK506 結合蛋白 (FK506 binding protein)	2FKE	4077
干擾素 (Interferon alpha)	1ITF	4081
鹼性纖維母細胞生長因子 (Basic fibroblast growth factor, BFGF)	1BFG	4091
介白素-4 (Interleukin 4)	1ARA	4094
人類免疫缺陷病毒核糖核酸酶 H (HIV RNase H)	1RT6A	4097
單核球趨化蛋白質-3 (Monocyte chemo-attractant protein 3)	1BO0	4177
豚草過敏原蛋白 (Ragweed allergen protein)	2BBG	4211
二氫葉酸還原酶 (Dihydrofolate reductase)	3DFR	4262
類胰島素生長因子 (Insulin-like growth factor, IGF)	1GZZB	4278
人類朊蛋白 (Human prion protein)	1I4MA	4379
樺樹過敏原蛋白 (Birch allergen protein)	1B6F	4417
人類免疫缺陷病毒整合酶 (HIV integrase)	1E0EA	4619
防禦素 (Human defensin)	1FD3D	4642
人類生長激素 (Human growth hormone, HGH)	1HWGA	4689
A 型肝炎病毒 3C 蛋白酶 (Hepatitis A virus 3C protease)	1HAVA	4836
C 型肝炎病毒解旋酶 (Hepatitis C virus helicase)	1A1VA	4885
p53 腫瘤抑制蛋白 (p53 tumor suppressor protein)	1HS5B	4934
人類免疫缺陷病毒負調控因子 (HIV nef protein)	1QA5A	4951
介白素-13 (Interleukin 13)	1F80E	5004
淋巴細胞趨化因子 (Lymphotactin chemokine)	1J9OA	5042
阿滋海默胜肽 (Alzheimer peptide)	1BA4	5057
巨噬細胞發炎胜肽 (Macrophage inflammatory peptide)	1HUMA	5073
血管內皮細胞生長因子 (Vascular endothelial growth factor)	2VPP	5185
Tachystatin 抗菌胜肽 (Tachystatin antimicrobial peptide)	1CIXA	5268
人類免疫缺陷病毒基質蛋白 (HIV matrix protein)	1HIW	5316
介白素-5 (Interleukin 5)	1HULA	5373
酪氨酸磷酸酶 1b (Tyrosine phosphatase 1b)	1G7FA	5474
櫻花過敏原蛋白 (Cherry tree allergen protein)	1H2O	5490
鐵調素抗菌胜肽 (Hepcidin antimicrobial peptide)	1M4EA	5501
神經胜肽 Y (Neuropeptide Y)	1F87A	5550
催乳素 (Prolactin)	1N9DA	5599

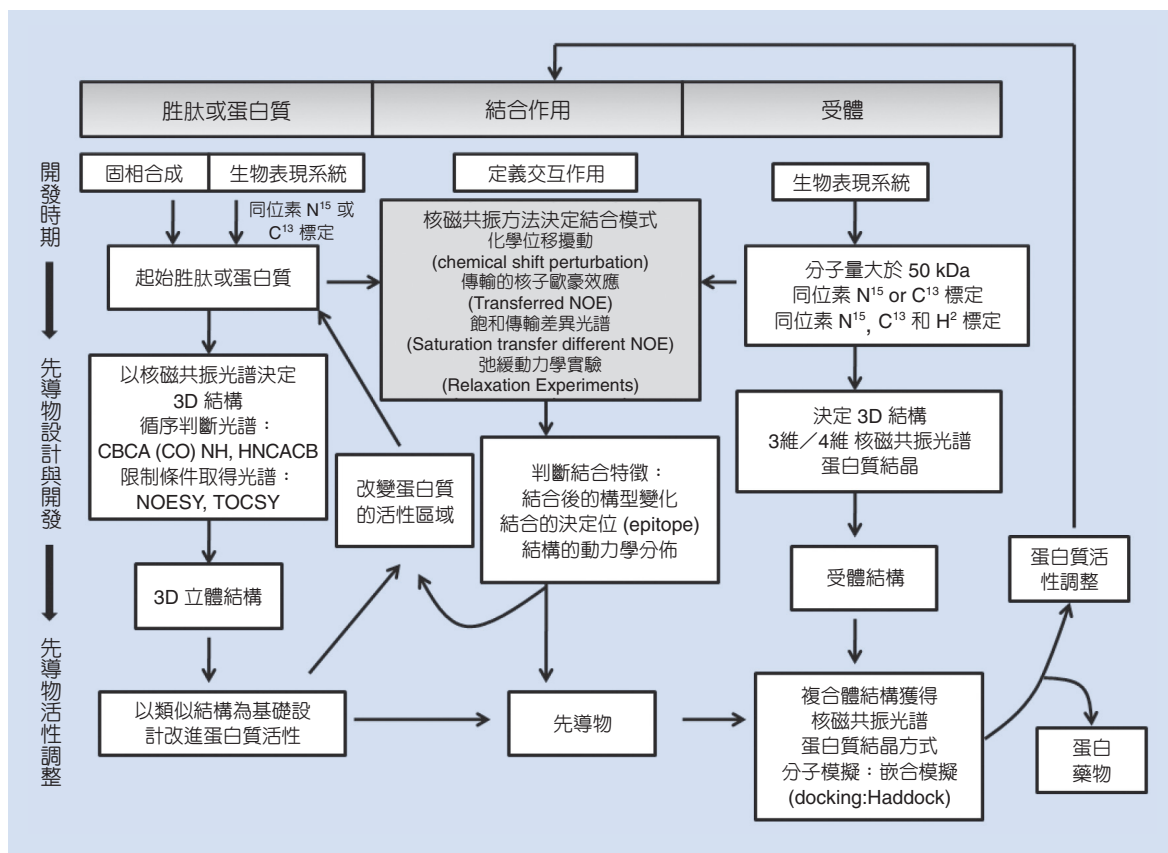


圖 2. 以核磁共振方式來研究蛋白質藥物設計與開發的總覽，灰底的部分為本文所探討之核磁共振技術。

(transferred NOEs) 與 (3) 飽和傳輸差異光譜 (saturation transferred difference NMR)：這兩項實驗皆可獲得配體與受體結合後的配體構型結構，進而與未結合時的配體比較構型上的變化^(8, 9)；(4) 弛緩 (relaxation) 動力學實驗：可以了解蛋白質那些區域的胺基酸較易有動態性質，藉此便可推論動力性質與蛋白活性區域的相關性。

歸納上述實驗，可提供非常有意義的資訊，有助於瞭解結合時的活性區域，並利用置換相關活性區域的胺基酸來調整蛋白質活性，進而設計活性更高與專一性的配體蛋白⁽¹⁰⁾。最後，配體與受體複合物結構的呈現是最終目標，但就目前以核磁共振或蛋白 X 光繞射結晶技術都是十分困難的研究。因此分子模擬嵌合技術 (molecular docking) 的產生可以間接來探討複合物結構，HADDOCK⁽¹¹⁾ 是一個以核磁共振光譜開發出來嵌合軟體，當僅知配體與受體各自的結構，利用上述核磁共振光譜實驗知道配體與受體結合時的相關資訊，便可透過此軟體

的模擬，推論結合時複合物的結構。以下將詳細說明各項實驗的運用。

1. 化學位移擾動 (Chemical Shift Perturbation) 方法

核磁共振化學位移是對原子周遭環境高度敏感的一個重要參考數值，也因此當一個配體蛋白結合到其受體蛋白質或其他大分子時，配體蛋白的哪一個部分牽涉到與受體結合的環境便受到改變，因而改變了其結合位置的胺基酸殘基之化學位移數值。核磁共振光譜中以 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 或 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC 實驗對這些結合作用的研究特別有用，如圖 3 所示，當結合作用發生時，在配體蛋白上靠近受體的胺基酸殘基會有化學位移的改變，相對的不參與結合作用的殘基便不會有化學位移的變化，更進一步可以針對各殘基化學位移的改變程度加以量化。以 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC 圖譜為例，透過公式： $\text{擾動量} = \{0.2(\Delta\delta_{\text{N}})^2 + (\Delta\delta_{\text{H}})^2\}^{1/2}$ ， $\Delta\delta_{\text{N}}$ 與 $\Delta\delta_{\text{H}}$ 分別為 N^{15} 與 H^1 由圖譜所

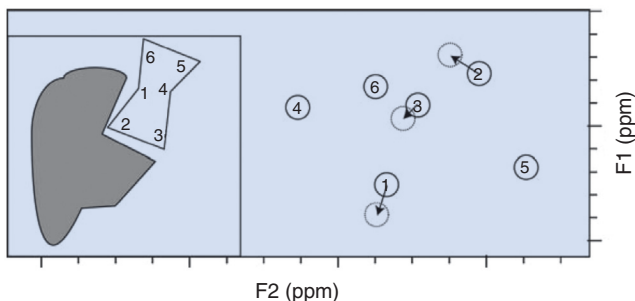


圖 3. 化學位移改變簡圖，實線為未結合態的配體蛋白交叉峰，當與受體結合後，虛線部分為靠近受體的殘基位移後之交叉峰⁽⁶⁾。

看的化學位移差值，藉由量化的計算，就可知擾動量最大的殘基可能是與結合最相關的位置⁽¹²⁾。

2. 傳輸的歐豪效應實驗方法

傳輸的歐豪效應 (transferred NOEs) 主要是用於探測配體構型變化，當配體與一大分子受體結合時的核磁共振實驗。它主要用於系統的化學交換速度快的狀態 (fast exchange)，該配體質子核磁共振單峰訊號會平均在游離態和結合態。當配體結合到大的受體蛋白質後，結合態的配體具有大的 NOE 效應，並且在快速交換下，此大的 NOE 在配體自受體解離後，會傳到游離態的配體上，如圖 4 所示，因此受體和配體混合物的 NOESY 光譜和游離態配體單獨 NOESY 光譜會有很大差異，所以可由游離配體的光譜與傳輸的 NOE 光譜來研究結合態

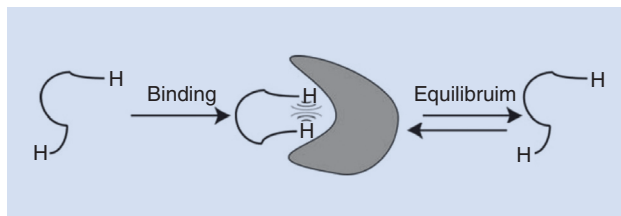


圖 4. 傳輸的歐豪效應示意圖，左邊為未結合態的配體構型，兩個質子因距離遠，沒有 NOE 的效應，而當配體與受體結合後兩個質子因結合作用產生構型變化，便發生 NOE 效應，然而在結合態與游離態的配體達成平衡時，之前在結合態所產生之 NOE 效應會傳輸到游離態之配體質子上⁽⁶⁾。

配體的結構變化。快速交換的情形，一般相當於分子結離常數 (Kd) 大於 10^{-6} 莫爾濃度 (M)，實驗上會使用超量的配體，一般濃度比例上，配體比上受體的比率約 10 至 50⁽⁸⁾。此技術的應用已在藥物設計之策略上受到相當的重視，目前已有一些研究利用傳輸的 NOE 光譜來研究結合態的配體構型。

在 2002 年 Zhang 的研究中⁽¹³⁾，他們運用傳輸的 NOE 光譜確定了環狀胜肽 [MpaRGDDVC] 與整合蛋白 (integrin) $\alpha_5\beta_1$ 結合後的結構，如圖 5 所示，比較其結構與該配體在自由態的變化。他們發現在自由態的胜肽上 Arg¹C _{β} 原子和 Asp³C _{β} 原子之距離為 7.5 Å，然而在結合態的胜肽上卻縮小為 5.6 Å，表明該胜肽結合至整合蛋白 $\alpha_5\beta_1$ 的結合口袋是較

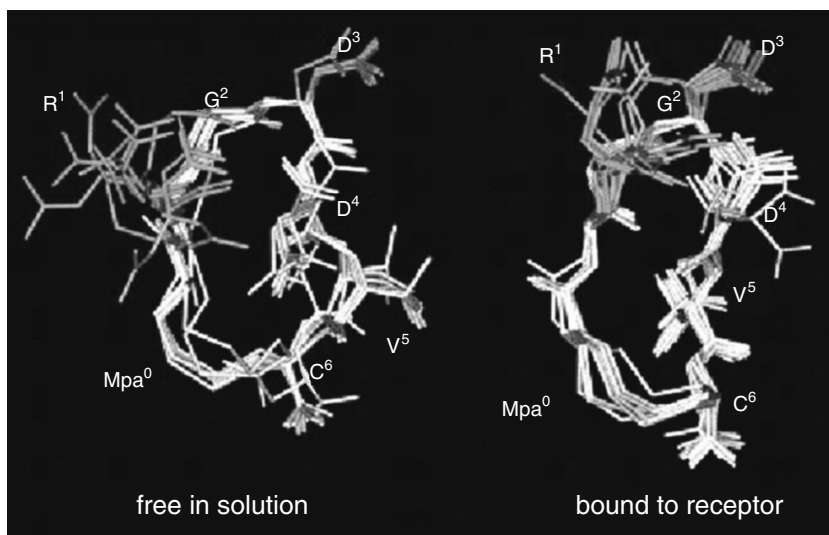


圖 5. 以核磁共振光譜決定環狀胜肽 [MpaRGDDVC] 在未結合上受體整合蛋白 $\alpha_5\beta_1$ 的結構 (左邊)，以傳輸的 NOE 光譜決定出與整合蛋白 $\alpha_5\beta_1$ 結合後的結構 (右邊)⁽¹³⁾。

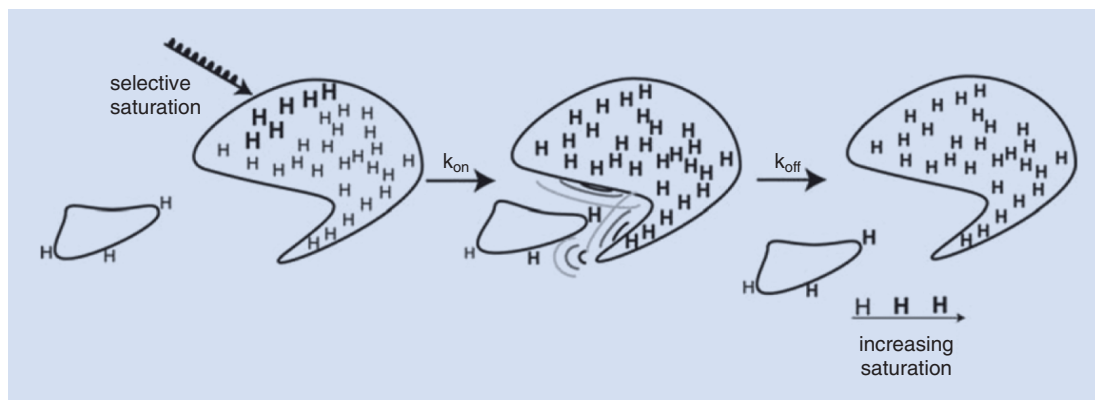


圖 6. 飽和傳輸效應簡圖，受體上的質子受到特定脈衝後而具有飽和性，當配體與受體結合後，在配體上靠近受體區域的質子會受到受體質子的飽和性傳輸效應影響⁽⁶⁾。

小的，比起之前已推論的整合蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 的結合袋口還要小，因此這樣的結果對設計藥物的專一性有很大的幫助。

3. 飽和傳輸差異光譜方法

飽和傳輸核磁共振效應是採用一系列的低功率脈衝去選擇受體上具飽和性之質子共振。如果受體分子量大於 10 kDa 時，受體通常是自旋擴散，從而導致所有質子共振的飽和性會均勻地分散在受體上。當受體與配體結合時飽和性共振可以轉移到結合的配體分子，如圖 6 所示。而在結合態的配體之質子飽和性也會因為化學交換而轉移到游離的配體上，因此造成游離配體訊號的削減⁽⁹⁾。由此，與受體蛋白質越靠近的質子，因飽和轉移所受到削減變得越大，進而知道結合態配體中哪一個區域靠近與受體蛋白質的活性中心，一個典型的 STD 核磁共振譜為在沒有飽和效應非共振頻率 (off-resonance) 下的光譜減去有共振頻率 (on-resonance) 具飽和傳輸效應的光譜，而最後訊號相減下來的光譜，便是 STD 光譜所呈現出配體中與受體靠近的區域，如圖 7 所示。在 2001 年 Meinecke 的研究中⁽¹⁴⁾ 也利用了 STD 光譜，研究同樣含有環狀的 RGD 胜肽 cyclo (RGDfV)，*f* 為 D-form 的 phenylalanine 胺基酸 (D-Phe)，他們研究在含有整合蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 存在下，觀測胜肽哪些胺基酸牽涉到與整合蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 結合。由圖 8 的結果得知，在 D-Phe 芳香環上的質子具有最大的飽和性轉移現象，表示其與受體可能

非常接近，其次，Arg 和 D-Phe 的 β 質子、Gly 質子、Asp β 質子以及 Val 的 γ 質子都會與受體整合蛋白 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 有所接觸，而反映到 STD 光譜上，這些資訊都是未有胜肽與整合蛋白複合物出現前，可以利用核磁共振的方式來獲得，並且這些資訊皆可用來改進配體結構，以增加它與受體蛋白質結合作用的強度。

4. 弛緩動力學實驗方法

蛋白質分子在水溶液狀況下，其分子內部是屬於動態狀況，而核磁共振弛緩動力學實驗為探討蛋

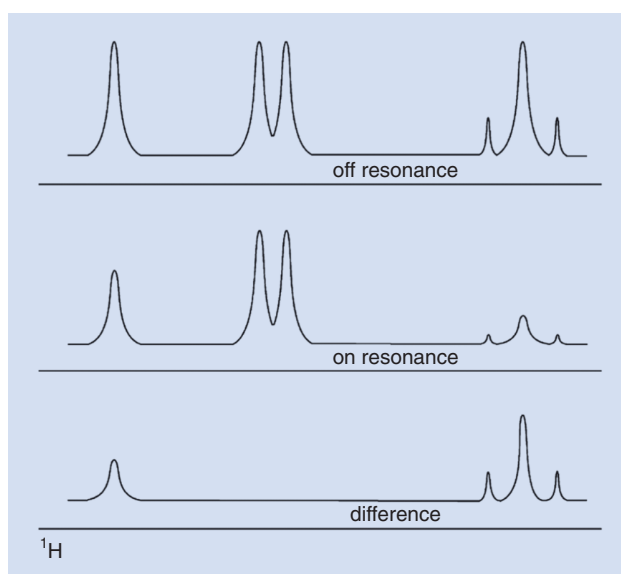


圖 7. STD 光譜產生示意圖⁽⁶⁾。

白質動態性質的有利工具，在核磁共振弛緩實驗中，最常使用的為核子自旋-晶格弛緩時間 (spin-lattice relaxation time, T_1)、核子自旋-自旋弛緩時間 (spin-spin relaxation time, T_2) 及 ^1H - ^{15}N 之 NOE (XNOE) 實驗。自旋-晶格弛緩速率 ($R_1 = 1/T_1$) 及自旋-自旋弛緩速率 ($R_2 = 1/T_2$) 的獲得來自不同演化時間 (t) 的實驗，這些實驗所得到交叉峰的強度會依 t 呈指數衰退，而此衰退常數即為弛緩速率常數，公式表示如： $I(t) = I(0) \exp(-R_{1,2} \times t)$ ， $I(t)$ 為時間 t 的交叉峰強度， $I(0)$ 為時間零時所得強度，故利用不同時間所獲的強度來畫出衰退曲線，以公式擬和曲線便可獲得 R_1 及 R_2 的數值。NOE 的數值決定，則為有 ^1H 飽和 (saturation) 及沒有 ^1H 飽和的 NOE 實驗所得交叉峰之比值⁽¹⁵⁾。 R_1 、 R_2 及 NOE 能提供有關分子在 $10^8 - 10^{12}\text{s}^{-1}$ 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，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，可大略推知蛋白質分子內的動態情形。而在筆者實驗室的研究中探討一個蛇毒蛋白 Rhodostomin (Rho) 的動態性質⁽¹⁶⁾，透過弛緩實驗的分析，尤其是 NOE 數值反映出活性區

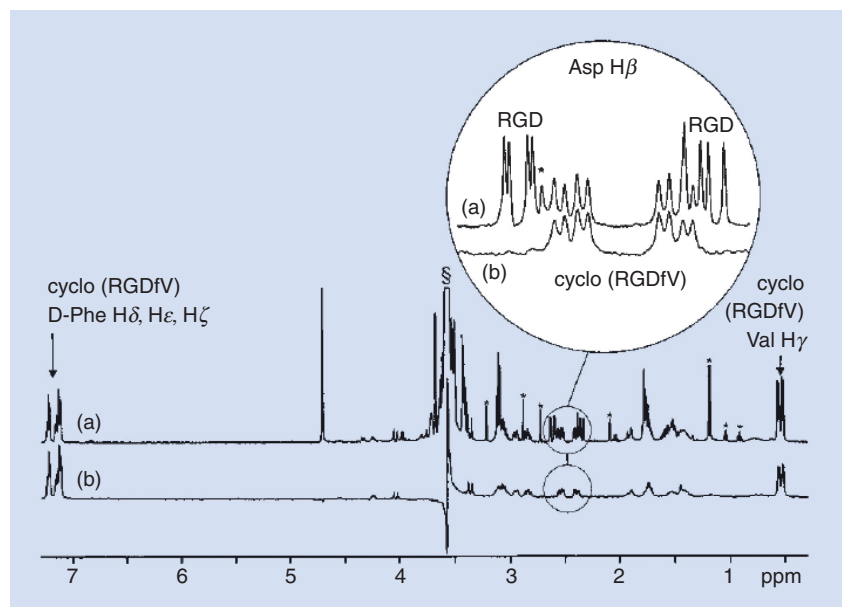
域 $^{49}\text{RGD}^{51}$ 區間具有高度的變動性，此動態性質與其活性能力之間有直接之關連 (圖 9)。

5. 分子嵌合技術建立複合體模型 (Docking)

以 NMR 或 X-ray 的方式獲得蛋白質-蛋白質之間的複合體結構，往往需要長時間與繁複的實驗步驟，現在由於電腦運算速度的改善，使得蛋白嵌合程式的開發越趨成熟，在此介紹嵌合程式是 HADDOCK (high ambiguity driven protein-protein docking)⁽¹¹⁾ 以 NMR 實驗為基礎所開發出的軟體，其運作方式如圖 10 所示，可藉由蛋白複合體實驗得到的 NMR 化學位移擾動 (chemical shift perturbation) 分布，進而得知哪些胺基酸可能參與作用，以及由胺基酸突變的研究與結合能力的改變，推知參與結合的胺基酸，便可提供程式限制嵌合的條件。程式的計算會將兩個欲嵌合之蛋白隨意的轉動，且限定兩者相距 150 \AA 之後，利用所放入之限制條件將兩者以硬式嵌合的方式接合在一起，然後再利用分子動力模式 (molecular dynamics) 軟性調整嵌合位置週遭胺基酸的側鏈轉動至最適合之模式狀態，最後再經由精緻化得到嵌合模型。圖 11 為筆者實驗室利用 HADDOCK 程式嵌合蛇毒蛋白 Rho 到整合蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 的結構中，由所獲得的複合體模型 (docking)，確認了兩者間交互作用更多

圖 8.

(a) 為 cyclo (RGDfV) 胜肽在含有整合蛋白 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 存在下的一維核磁共振光譜。(b) 以 STD 核磁共振光譜在相同結合態下所測得結果，箭頭所指皆為配體胜肽與受體有接觸的位置⁽¹⁴⁾。



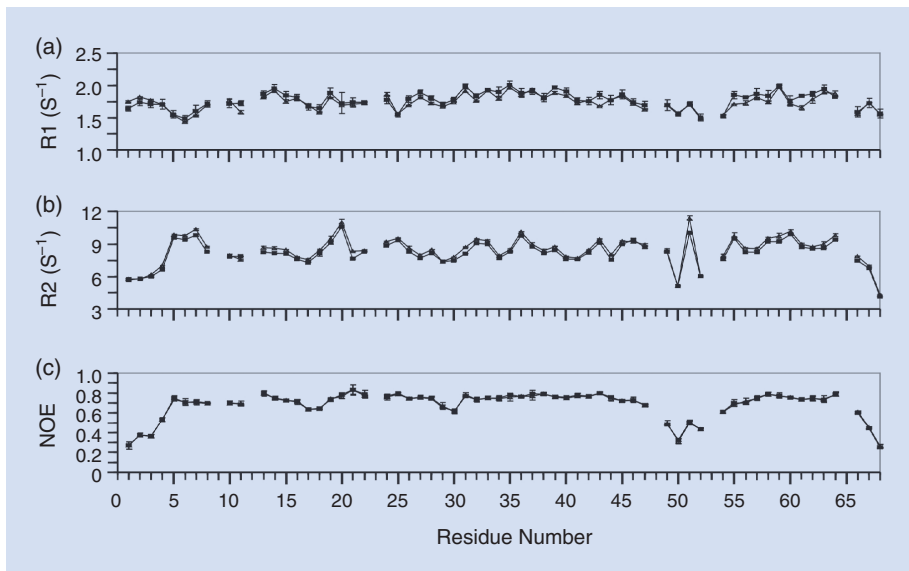


圖 9. 蛇毒蛋白 Rho (實心方框) 與突變株 D51E (空心三角) 所測得之弛緩參數 R_1 、 R_2 與 NOE⁽¹⁶⁾。

的重要位點，而這些資料將是未來設計蛇毒蛋白成為藥物蛋白非常重要的基礎⁽¹⁶⁾。

五、結論

蛋白質藥物的開發已是未來發展的趨勢，尤其小分子化學藥物較易有副作用的問題出現，而蛋白

質藥物因有較高專一性，較易避開副作用的問題。但是避免免疫毒性 (immunogenicity) 是蛋白質藥物目前最大的課題。開發新穎與高專一性的蛋白質藥物已是刻不容緩的事，在此所介紹以理性藥物設計為基礎所發展之核磁共振技術，已漸漸成為研究蛋白質藥物的利器，讓我們探索蛋白質活性與結構及動態間的秘密。隨著更多蛋白支架的發現與核磁共

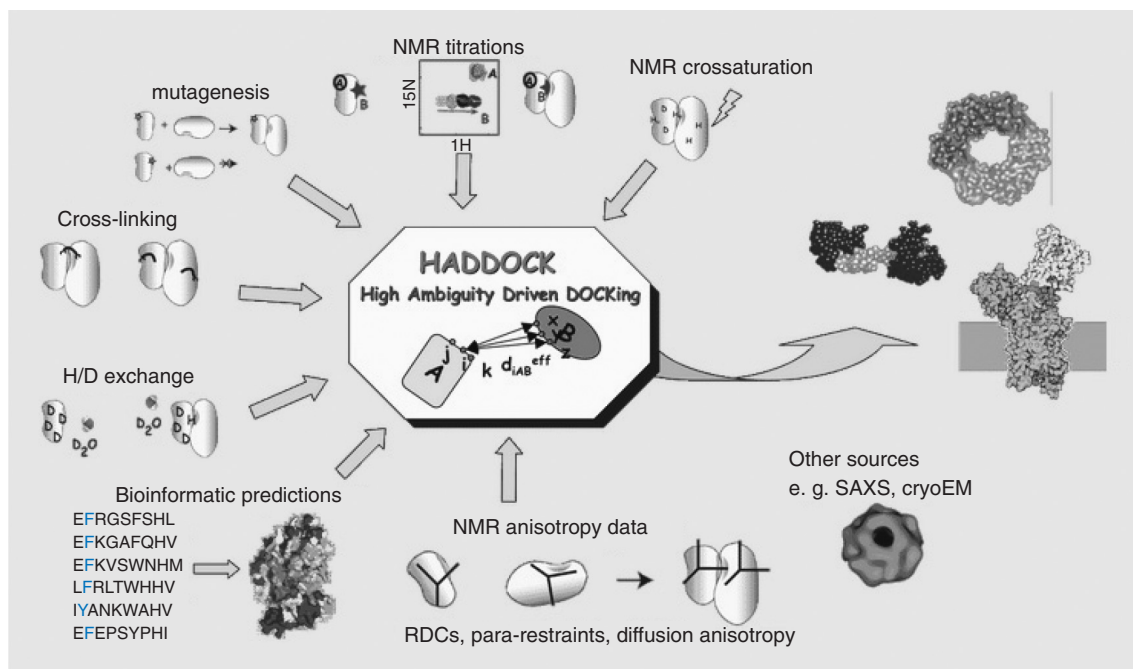


圖 10. HADDOCK 嵌合程式在限制條件下取得方式示意圖 (此圖摘錄於 HADDOCK 網頁：<http://www.nmr.chem.uu.nl/haddock/>)。

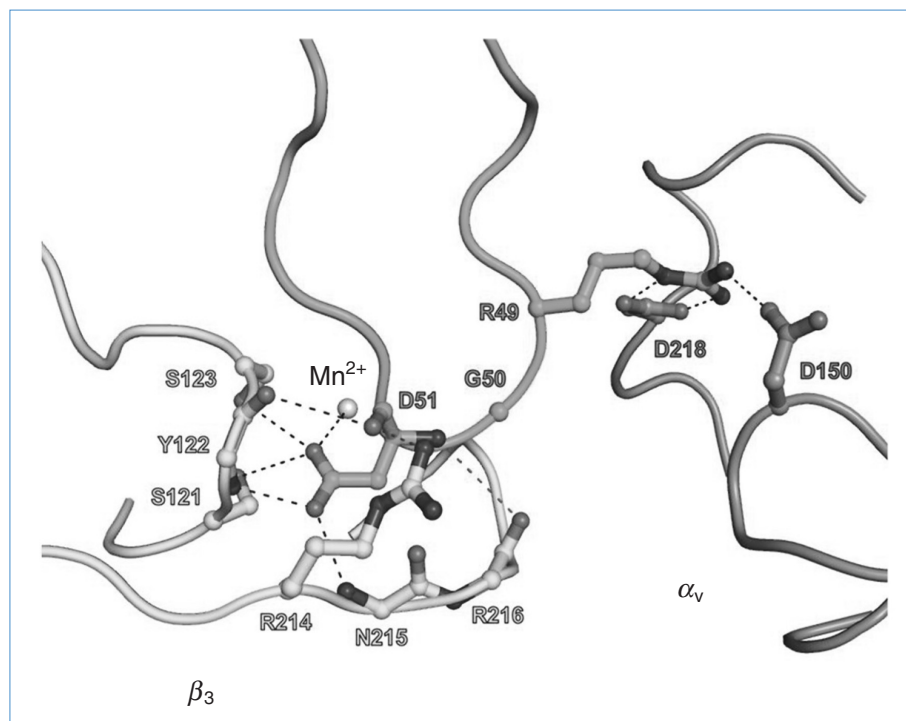


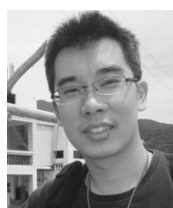
圖 11.
蛇毒蛋白 Rho 嵌合至整合蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 結構對應圖⁽¹⁶⁾。

振儀器硬體快速的加強，如高磁場強度的提升與低溫探頭的改進，加上更多的核磁共振新技術的開發，相信未來核磁共振在蛋白藥物的開發運用上會有快速的進展與成果。

參考文獻

1. B. Leader, Q. J. Baca, and D. E. Golan, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **7**, 21 (2008).
2. J. M. Reichert, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2**, 695 (2003).
3. D. Wishart, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **6**, 105 (2005).
4. E. R. Zuiderweg, *Biochemistry*, **41**, 1 (2002).
5. D. Staunton, J. Owen, and I. D. Campbell, *Acc. Chem. Res.*, **36**, 207 (2003).
6. J. C. Westermann and D. J. Craik, *Methods. Mol. Biol.*, **494**, 87 (2008).
7. M. Pellecchia, D. S. Sem, and K. Wuthrich, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **1**, 211 (2002).
8. C. B. Post, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 581 (2003).
9. M. Moriz and M. Bernd, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1784 (1999).
10. M. Pellecchia, I. Bertini, D. Cowburn, C. Dalvit, E. Giralt, W. Jahnke, T. L. James, S. W. Homans, H. Kessler, C. Luchinat, B. Meyer, H. Oschkinat, J. Peng, H. Schwalbe, and G. Siegal, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **7**, 738 (2008).
11. C. Dominguez, R. Boelens, and A. M. Bonvin, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1731 (2003).
12. J. Clarkson and I. D. Campbell, *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1006 (2003).

13. L. Zhang, R. H. Mattern, T. I. Malaney, M. D. Pierschbacher, and M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2862 (2002).
14. R. Meinecke and B. Meyer, *J. Med. Chem.*, **44**, 3059 (2001).
15. J. Kordel, N. J. Skelton, M. Akke, A. G. Palmer, 3rd, and W. J. Chazin, *Biochemistry*, **31**, 4856 (1992).
16. C. Y. Chen, J. H. Shiu, Y. H. Hsieh, Y. C. Liu, Y. C. Chen, W. Y. Jeng, M. J. Tang, S. J. Lo, and W. J. Chuang, *Proteins*, **76**, 808 (2009).



許家豪先生為國立成功大學基礎醫學研究所博士候選人。

Jia-Hau Shiu is a Ph.D. candidate in the Institute of Basic Medical Sciences at National Cheng Kung University.



莊偉哲先生為美國佛羅里達州立大學化學博士，現任國立成功大學生物化學暨分子生物學研究所教授。

Woei-Jer Chuang received his Ph.D. in chemistry from Florida State University, USA. He is currently a professor in the Institute of Biochemistry and Molecular Biology at National Cheng Kung University.