

# 知識天地

## 人類麩氨酸環化酶之高解析度 X-光晶體結構

黃開發、王惠鈞（生物化學研究所研究助理、特聘研究員兼所長）

生物體正常生理機能及新陳代謝的維持，絕大部分是仰賴蛋白質的運作；因此，當某些蛋白質功能異常時，往往會導致生理機能失衡，最終導致疾病。經由三度空間立體分子結構，分析蛋白質的運作機制、彼此間交互作用、如何被調控…等等，是瞭解人類疾病形成原因的利器之一，也是設計或篩選有效對抗疾病藥物的重要途徑。然而，在後基因時代的今天，人類染色體 DNA 定序已完成，我們仍無法由 DNA 序列精確預測蛋白質的三度及四度之空間結構。現今，欲精確得知蛋白質乃至其他生物大分子的立體結構，X-光繞射結晶學（X-ray crystallography）是目前最普遍也是最有效的方法。有鑑於此，許多先進國家，如美、日、德等，皆相繼投入大量財力及人力，試圖以此方法大量解析功能性蛋白質的三度空間立體結構。

本研究主要是以 X-光繞射結晶學，研究一個與老年癡呆症及骨質疏鬆症有關的酵素；相關成果發表在《美國國家科學院》院刊 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13117-13122 (2005)] 及《蛋白質表達及純化》期刊 [*Protein Expr. Purif.* **43**, 65-72 (2005)]。人體內有許多重要的多胜（polypeptides），如由下視丘釋放至腦下腺的一些賀爾蒙及周邊血液內由白血球合成的化學趨化蛋白（chemotactic proteins），常會在其胜鏈的氮端形成焦麩氨酸（pyroglutamate, pGlu），如此，方能使這些胜正常行使其生理功能，並防止被體內的胜水解酶（aminopeptidases）所分解。有趣地，導致如阿茲海默症（Alzheimer's disease）等的樣澱粉病變（amyloidotic diseases）之樣澱粉胜（amyloid- $\beta$  peptides）也常在其氮端加上 pGlu，如此，一般認為會加劇樣澱粉胜的聚集，進而加速樣澱粉斑（amyloid plaque）的形成，而使疾病惡化。這種在胜鏈的氮端加上 pGlu 的反應已知是由一種叫麩氨酸環化酶（glutaminyl cyclase, QC）所催化；而且，目前為止，這種酵素已經在包括人類在內的許多哺乳動物之腦部及白血球發現。根據日本一項骨科相關的研究，發現成年婦女麩氨酸環化酶之基因（*QPCT*）差異與是否罹患骨質疏鬆症（osteoporosis）有顯著的關聯性。這個研究團隊報告至少有 13 個 SNPs（single-nucleotide polymorphisms）存在於高危險的骨質疏鬆症患者；其中又以造成 QC 編碼區域將 Arg-54 轉變成 Trp-54 的 SNP 為統計上最顯著。他們認為因 *QPCT* 突變導致 QC 活性降低，而使親性腺激素釋放因子（gonadotropin-releasing hormone）無法成熟（因無法在氮端形成 pGlu），使周邊組織親性腺激素濃度太低，最終影響下游的骨質沉積作用。此外，QC 在周邊血液白血球內的濃度，被發現也與成人是否罹患風溼性關節炎（rheumatoid arthritis）息息相關。同時，根據一篇最新的報告，體內 QC 濃度的增加，也與黑色素瘤（melanoma）的形成有關。因此，一些科學家乃至於一些藥廠，認為此酵素可能是減緩樣澱粉病變的藥物標的（drug target）蛋白質，同時也可能是黑色素瘤、風溼性關節炎和成年婦女骨質疏鬆症的生物標識（bio-marker）蛋白質。

於 2005 年，我們首先發表自人類骨髓組織之互補去氧核糖核酸庫（cDNA library）中找出編碼 QC 的互補去氧核糖核酸（cDNA）；然後，經過至少 15 種以上不同表現載體（expression vectors）的測試，終於將人類 QC cDNA 在大腸桿菌（*Escherichia coli*）細胞內表達出具生物活性的酵素。接著，藉由 X-光蛋白質結晶學核心設施之高速晶體篩選平台，篩選超過 1,200 種以上養晶條件，順利得到人類 QC 高品質的蛋白質晶體。之後，利用這種蛋白質晶體，以多波長異常繞射（multiwavelength anomalous diffraction）方式，我們成功解出世上第一個人類 QC 的高解析度（1.66 Å）X-光晶體結構；同時，也解出此酵素與受質（substrate）及一些抑制劑之複合體的晶體結構。這些人類 QC 之抑制劑，被德國 Probiobdrug 藥廠認為是改良成為對抗樣澱粉病變的起始化合物。

人類 QC 是一個球狀的， $\alpha$ -helix 及  $\beta$ -sheet 混合摺疊的蛋白質（圖一，A）。其形狀就像一個三明治；餡的部分由 6 條  $\beta$ -strands 所組成，上下層麵包則分別由 2 個及 6 個  $\alpha$ -helices 所組成，另外有 42% 的氨基酸參與 loops 或 turns 的部分，連結以上這些二級結構。有一半的 loops 或 turns 的部分（綠色），組成了人類 QC 催化部位的結構（圖一，B）。與現有已發表的蛋白質結構比較，我們發現人類 QC 與雙鋅離子的外切多胜胜水解酶（double-zinc exopeptidases）分享一個演化上高度保留的架構。然而，比起這些水解酶，人類 QC 的結構含有許多插入及刪除的氨基酸序列，特別是在負責催化的部位，而使得人類 QC 活性部位之結構相對上較封閉。

與骨質疏鬆症有關的人類 QC 突變種（mutant），R54W，我們發現它還保留 70% 左右的酵素活性。然而，R54W 的晶體結構卻顯示 Trp-54 與催化部位約有 34 Å 之遙（可參考圖一，A）。我們認為，R54W 突變種的活性降低可能

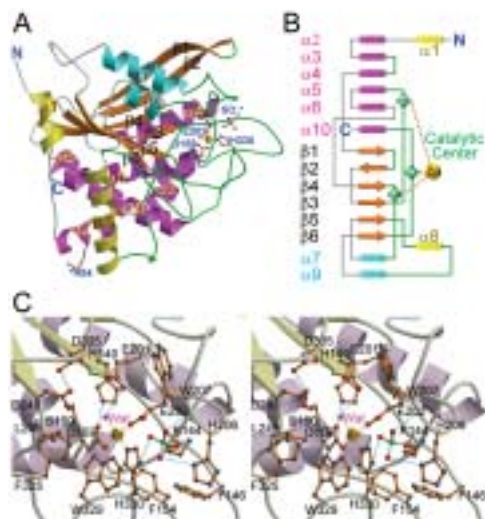
起因於其疏水性 (hydrophobicity) 增加, 而使得酵素穩定性下降。此外, 也可能人類 QC 之 Arg-54 附近, 為和某些未知且重要的蛋白質交互作用的位置。

人類 QC 的活性部位 (active site) 主要是由 6 條 loops 所組成 (圖一, B), 並由一些疏水性的氨基酸圍成一個大小約  $13 \times 11 \times 7 \text{ \AA}^3$  的袋狀結構。其催化中心靠近中央  $\beta$ -strands 的羧基端, 與周圍的溶液保持一個通道。我們首先利用原子吸收光譜儀 (atomic absorption spectrophotometer), 證實一個分子的人類 QC 含有一分子的鋅離子。由結構得知這個鋅離子正是位在催化中心, 與三個演化上高度保留的氨基酸 (分別為 Asp-159, Glu-202 及 His-330) 及一個水分子形成配位鍵 (圖一, C)。另外, 有一些高度保留的氨基酸圍繞著這個以鋅離子為中心的催化中心; 經過一系列定點突變 (site-directed mutagenesis) 的實驗, 我們發現這些氨基酸皆與酵素活性息息相關。由晶體結構, 我們也發現人類 QC 的活性部位具有兩種構形 (conformations), 其最大不同是位在 Leu-205, His-206 及 Trp-207 等氨基酸處, 尤其是 Trp-207, 其側基 indole 環幾乎是相反的方向。

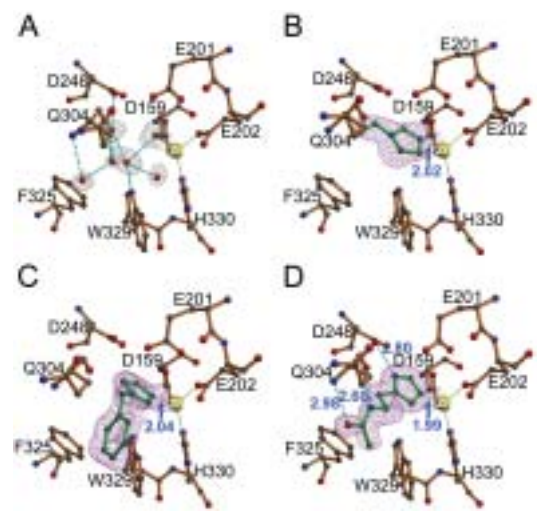
為要分析人類 QC 與受質 (glutamine *t*-butyl ester) 複合體的結構, 我們試圖用一個幾乎沒活性的突變種, E201Q, 來和受質進行共結晶實驗 (避免受質轉化成產物)。我們發現人類 QC 活性部位因有兩種構形, 以致於可觀察到兩種受質結合的模式。由受質結合的模式, 我們推測活性部位的兩種構形可能是人類 QC 催化過程所必需的, 一個構形是為結合受質, 另一個則方便容納環化後的產物。

至於人類 QC 與抑制劑複合體的結構, 我們採用了三個 imidazole 的衍生物, 分別為 1-vinylimidazole, 1-benzylimidazole 及 *N*- $\omega$ -acetylhistamine, 它們皆被德國 Probiobdrug 藥廠證實是很好的人類 QC 抑制劑。由結構得知, 人類 QC 活性部位正常存在 6 個水分子 (圖二, A)。當抑制劑結合上活性部位時, 會將這些水趕走, 包括與鋅離子配位的水分子, 將被抑制劑 imidazole 的一個氮原子所取代 (圖二, B、C 及 D)。我們發現, 這三個抑制劑因為 imidazole 上的取代基不同, 而有不同的結合模式; 其中, 1-benzylimidazole 及 *N*- $\omega$ -acetylhistamine 分別主要以疏水性作用 (hydrophobic interaction) 及氫鍵和活性部位作結合 (圖二, C 及 D)。然而, 我們注意到活性部位仍有一些空間未被抑制劑佔滿, 這將是未來改善抑制劑效能值得注意的地方。

最後, 根據一系列突變種的活性及結構分析, 我們提出一個合理的人類 QC 之催化反應的化學機制。同時, 我們也首次以高壓液相層析 (HPLC) 法證實人類 QC 可以催化 amyloid- $\beta$  peptides 氮端 pGlu 的形成。並且, 我們也建立了快速篩選人類 QC 抑制劑的標準步驟。這些研究成果, 將有助於瞭解因人類 QC 基因 (*QPCT*) 差異所導致之骨質疏鬆症的結構基礎; 同時, 也提供了第一個三度空間的結構平台, 用於日後合理的設計 (rational design) 及篩選有效抑制人類 QC 的抑制劑, 以便作為治療或減緩與此酵素有關的人類疾病, 諸如阿茲海默症及風溼性關節炎。



圖一：人類羧酸胺環化酶之三度空間立體結構。(A) 整體酵素結構。參與活性部位鋅離子配位的氨基酸殘基 (Asp-159、Glu-202 及 His-330) 及一個常易突變導致成年婦女罹患骨質疏鬆症的氨基酸殘基 (Arg-54) 被特別標示出。(B) 酵素結構拓撲示意圖 (topology diagram)。由所用的顏色可與 A 作比較。(C) 酵素活性部位結構立體示意圖 (stereoview)。



圖二：人類羧酸胺環化酶 (A) 以及其與抑制劑 1-vinylimidazole (B)、1-benzylimidazole (C) 及 *N*- $\omega$ -acetylhistamine (D) 結合的活性部位結構。當抑制劑結合上酵素之活性部位, 會以一個氮原子將結合在鋅離子上的水分子取代。水分子 (灰色) 及抑制劑 (紫色) 的電子雲密度 ( $2F_o - F_c$  electron density map, contoured at  $1.0 \sigma$ ), 則特別被顯示出。