

知識天地

從膜蛋白結構開發新型抗生素

宋明達博士後研究學者、翁啟惠特聘研究員、馬徹副研究員（基因體研究中心）

在人類與細菌的長期戰爭中，人類贏得初期勝利。但抗藥性細菌近年來強力反攻，唯有仰賴新的技術與思維，快速找到新的抗生素，才能勝券在握。

20世紀人類醫療史上最偉大的成就之一，莫過於抗生素的發現以及在臨床上的應用。1928年，英國科學家佛萊明（Alexander Fleming）在被青黴菌污染的培養皿中發現，青黴菌能夠分泌某種抑制細菌生長的物質，這種抑菌物質就是史上第一個被發現的抗生素：青黴素（penicillin，又稱為盤尼西林）。青黴素的發現，使得以往只因為傷口被細菌感染導致死亡的人數大減。尤其在二次世界大戰時，青黴素拯救了許多受傷士兵的生命，使得它的神奇效果廣為流傳。繼青黴素之後，科學家也陸續在微生物中發現許多天然的抗生素，並應用於各種殺菌用途上。當時在這場人類與細菌對抗的戰爭中，人類算是贏得相當漂亮！

然而半個多世紀以來，因為抗生素的濫用與誤用，越來越多細菌發展出抵抗抗生素的方法，抗生素不再是萬靈丹，隨之而來的抗藥性問題也日益嚴重。現今，這些突變且具有抗藥能力的細菌似乎蓄勢待發，全球多起致命性的醫院內感染案例，似乎都與之有關；這些隱藏在醫院裡的可怕殺手，就是廣為人知的抗藥性金黃色葡萄球菌（MRSA）和抗萬古黴素腸球菌（vancomycin-resistant Enterococci）。這些抗藥性細菌的盛行，使得醫療界陷入窘境，得再度尋找有效的抗菌新藥。

抗生素新標靶：細菌轉醣酶

然而，現在的局勢對人類而言也不算太糟，因為科學界已經了解青黴素能克服細菌的原因。細菌必須有細胞壁的保護才能存活、繁殖，細胞壁是由肽聚醣（peptidoglycan）構成的網狀結構，能維持細菌形狀的完整，也可以保護細菌不會因為環境中的滲透壓改變而死亡。細胞壁的合成由一些特定的酵素進行，如果這些酵素失去活性，細菌自然會死亡。青黴素及其衍生物的作用方式，就在於抑制細胞壁合成過程中關鍵的膜蛋白：轉勝肽酶（transpeptidase, TP）的作用，進而阻止細菌生長。

目前臨床使用藥物的標靶超過 50% 都位於膜蛋白上，大多數藥物可藉由與膜蛋白結合後，促進或抑制膜蛋白的活性，進而引起反應，達到治療的效果。然而，儘管膜蛋白的角色非常重要，結構卻非常難以測定，目前約有 5 萬 9000 種蛋白質的結構解析出來了，其中大約只有 500 種是膜蛋白。不論是利用 X 光晶體學或是核磁共振光譜學的方法研究膜蛋白，都是希望能知道膜蛋白在原子層次上的結構，因為這是現今從事新藥發展最重要的基礎之一。

細菌的膜蛋白「青黴素結合蛋白 1b」（penicillin binding protein 1b, PBP1b）含有轉醣酶（transglycosylase, TG）和轉勝肽酶，都是細菌合成細胞壁不可缺少的酵素。轉醣酶會以醣脂物質 lipid II 為原料，與轉勝肽酶一同編織出類似網子的細胞壁。青黴素及其衍生物是藉由抑制轉勝肽酶的活性，使細胞壁無法順利合成而抑制細菌的生長。然而越來越多抗藥性細菌的出現，似乎宣告針對轉勝肽酶來研發的抗生素幾乎已經走到盡頭了。

中研院基因體研究中心的團隊另闢蹊徑，針對 PBP1b 上另一個同樣重要且可做為新型抗生素的標靶轉醣酶，加以研究。因為人類沒有這類酵素，因此不會有「是解藥也是毒藥」的顧慮，同時全球至今仍未針對這個酵素研發出抗生素，在細菌中當然也無抗藥性的問題。

數十年來，醫藥研發界一直在研究如何才能抑制轉醣酶的活性，然而來自於鏈黴菌（Streptomyces）的富樂黴素（moenomycin）是目前唯一發現的轉醣酶抑制劑。雖然富樂黴素能有效抑制細菌生長，但這個分子太大，人體不易吸收，所以一直沒有使用在治療上，反而是用來做為家禽、家畜飼料中的添加物。不過，如果能了解富樂黴素是如何抑制轉醣酶的活性，科學家就可以在類似基礎下，尋找或研發出能夠在人體內抑制轉醣酶且能有效殺死細菌的新型抗生素。

臺灣首次解出結構的膜蛋白

在細菌表面的膜蛋白 PBP1b 是一種少量難得的物質。為了要取得足夠的實驗用量，我們從大量的大腸桿菌取出 PBP1b，製成結晶，花了近五年的努力，利用 X 光繞射技術，成功解出 PBP1b 的完整結構（見圖 1），於 2009 年 6 月 2 日《美國國家科學院學報》網站上發表。由於這是全新的突破，且可加速新型抗生素的研發，

因此立即引起全球學術界的重視，而這也是臺灣第一個成功解出來的膜蛋白結構。

PBP1b 的結構可細分為轉脢肽酶、轉醣酶、穿膜區 (transmembrane, TM) 以及 UvrB 的類似區 (UvrB domain 2 homolog, UB2H) 四個區塊，前兩者是合成細胞壁的酵素，穿膜區可讓蛋白質牢牢插在細胞膜上，UB2H 則負責蛋白質與蛋白質之間的聯繫。在完整繪出 PBP1b 的立體結構後，我們根據富樂黴素的作用位置與機制，提出立體動畫的模型，模擬細菌表面 PBP1b 製造細胞壁的過程 (見圖 2)。

近年來，除了中研院基因體中心之外，美國哈佛大學、加拿大卑詩省大學以及歐洲的一些頂尖研究團隊，也傾全力研究具有轉醣酶的膜蛋白，藉由測定蛋白質結構來探討酵素的反應機制，以及了解富樂黴素如何抑制酵素的活性，企圖運用這些資訊尋找全新的抗生素。PBP1b 是第一個被解出完整結構且具有轉醣酶的膜蛋白，除了可供了解細菌細胞壁的合成過程，更提供科學家完整的藍圖，對發展新一代抗生素非常重要。

我們還發現，根據目前的研究成果，不論是革蘭氏陽性菌或是革蘭氏陰性菌，它們的轉醣酶與富樂黴素之間交互作用的位置都非常相似，而這個位置的細節是設計新藥物所需要的資訊，預計幾年之內就可研發出能抑制轉醣酶活性、有效殺死細菌的全新抗生素。

另外，我們從之前的研究中就已經知道，穿膜區的功能對於 PBP1b 與富樂黴素的結合是很重要的；若 PBP1b 失去穿膜區，與富樂黴素的結合能力將會降低許多，同時蛋白質的酵素活性也會受到嚴重影響。然而當時對於穿膜區的功能並不清楚，穿膜區是否會直接與富樂黴素有交互作用？它又是如何影響 PBP1b 的活性？這些問題在 PBP1b 的完整立體結構被測定出來之後，才有了解答。

我們認為，穿膜區最主要的功能是将 PBP1b 固定在細胞膜上，使得同樣依附在細胞膜上的細胞壁合成原料 lipid II (或是富樂黴素) 可以順利地與轉醣酶結合，進而進行細胞壁的合成 (或是抑制轉醣酶的活性)。在我們提出的模型裡，可以清楚看到螺旋狀的穿膜區像是樁子一樣插入細胞膜中，讓細胞壁的形成有所依靠。基於穿膜區的重要性，我們也認為，可以針對穿膜區設計新的化合物，來去除穿膜區的附着力，這也是發展抗生素的新方向。

雙管齊下，尋找新型抗生素

在完整繪出 PBP1b 的立體結構後，我們下一個目標是尋找和富樂黴素一樣能抑制轉醣酶的作用、且取代富樂黴素的化合物。現階段而言，全球開發新藥的研究方式有兩種，一是進行大規模的篩選，二是「依結構從事藥物設計」。

面對數量龐大的天然物或化學合成物，如果使用高效能機器進行快速篩選，有可能在數十萬或數百萬種化合物中，找到發展成為新藥的先導化合物 (lead compound)。2008 年，我們的團隊聚集多名科學領域的專才，開發出一套完整的藥物篩選平臺。這項技術對於尋找有效的轉醣酶抑制劑來做為新的抗菌武器，是一項重大的突破。

這項技術主要是利用依附在富樂黴素上卻不影響其性質的螢光探針，來偵測富樂黴素的行蹤，進而發展出大規模且快速篩選出轉醣酶抑制劑的方法。高速藥物篩選實驗室存有數十萬種各式各樣的化學合成物，這其中有已經核可的藥物，也有研究團隊辛苦研發的獨特合成物。我們篩選約 5 萬 7000 種化合物後，有 11 種化合物脫穎而出，再經過抑菌效果的測試與篩選後，判定其中 3 種化合物可以做為研發新抗生素的候選物。

「依結構從事藥物設計」是近年來越來越多的科學家建議使用的方法，它是利用電腦計算方式，進行合理的藥物設計或篩選，尋找新藥的先導化合物。這種方法可大幅減少合成或取得各種化合物所需的時間與金錢，普遍受到藥物研發人員的重視且廣泛應用。

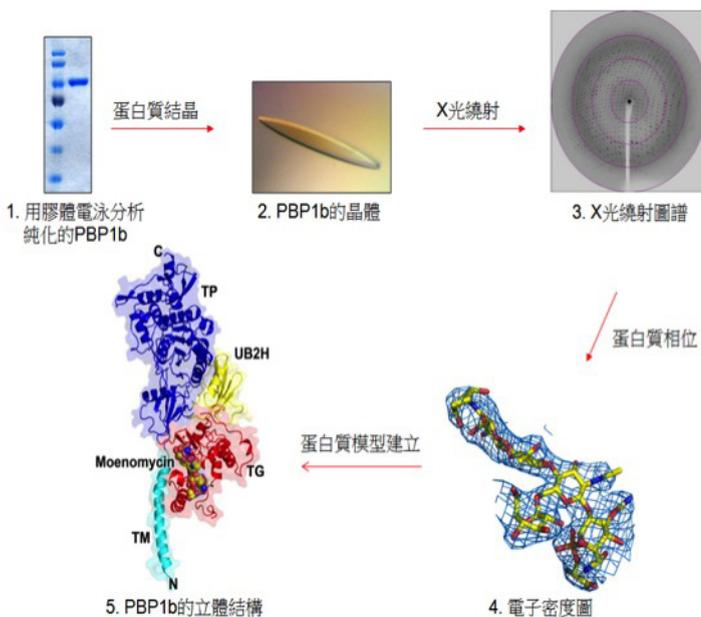
從 PBP1b 精確的結構資訊、富樂黴素在轉醣酶的結合部位，以及與胺基酸之間的交互作用，我們可以從結合部位的分子間配置 (氫鍵、疏水區、凡得瓦力等分子間的作用力)，設計出新穎的化合物；或者利用「電腦虛擬篩選」，以高效能的電腦計算方式，大規模篩選化學資料庫中的化合物，經過反覆篩選與確認，最後再將這些選出的化學物質，利用「最小殺菌濃度」的測試與篩選實驗，尋找出可當做新藥開發的先導化合物。一般相信，這種方式將提供更便宜、合理且快速尋找先導化合物的方法。

現代醫療科技靠著電腦的模擬與先進的篩選技術，會使得藥物的發展比以往更為快速，效率也能大幅提升，目前抗藥性細菌雖然來勢洶洶，但是我們仍然可以發展新的藥物，持續對抗。

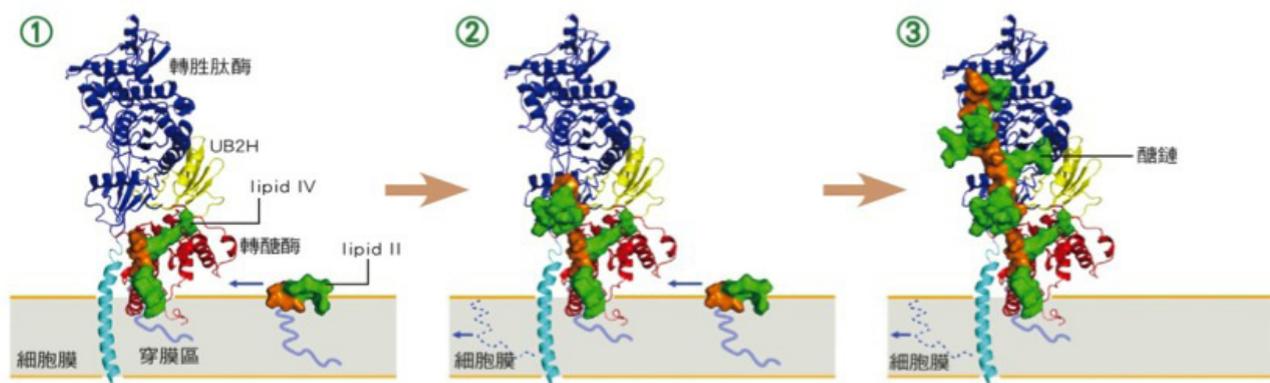
參考文獻

1. C. Taubes (2008) The bacteria fight back. *Science* 321, 356-369.
2. M.-T. Sung, Y.-T. Lai, C.-Y. Huang, L.-Y. Chou, H.-W. Shih, W.-C. Cheng, C.-H. Wong and C. Ma (2009) Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8824-8829.
3. T.-J. Rachel Cheng, M.-T. Sung, H.-Y. Liao, Y.-F. Chang, C.-W. Chen, C.-Y. Huang, L.-Y. Chou, Y.-D. Wu, Y.-H. Chen, Y.-S. E. Cheng, C.-H. Wong, C. Ma, and W.-C. Cheng (2008) Domain requirement of moenomycin binding to bifunctional transglycosylases and development of high-throughput discovery of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:431-436.

原刊載於「科學人」2009年8月號。



圖一、測定膜蛋白 PBP1b 結構的流程。為了要取得足夠的 PBP1b，先要大量培養產生 PBP1b 的大腸桿菌，接著使用界面活性劑將 PBP1b 從細菌的細胞膜上溶出來，以層析法純化得到的大量 PBP1b，並以電泳的方式測定蛋白質的純度，再運用結晶學的技術得到 PBP1b 的蛋白質晶體，然後利用 X 光繞射技術在新竹的同步輻射中心與日本的 SPring-8 取得 X 光繞射圖譜，建立蛋白質的模型，描繪出 PBP1b 的立體結構。PBP1b 可以分成四個區塊：轉醣酶（紅色）、轉胜肽酶（藍色）、UB2H（黃色）、穿膜區（淺藍色），與轉醣酶結合的分子（彩色球狀）即為富樂黴素。



圖二、膜蛋白 PBP1b 製造細胞壁的過程。PBP1b 分為四個區塊：轉醣酶（紅色）、轉胜肽酶（藍色）、UB2H（黃色）、穿膜區（淺藍色），穿膜區幫助 PBP1b 固定在細胞膜（藍灰色）上。PBP1b 合成細胞壁的原料是 lipid IV 與 lipid II，圖中 lipid IV 中間橘色的部份是醣分子，兩個綠色的部份是胜肽，藍色的線狀物是脂質尾部，lipid II 與 lipid IV 相似，但只有一條胜肽①。在製造細胞壁過程中，細胞膜上單獨的 lipid II 會接到 lipid IV 上，同時原本在 lipid IV 上的脂質尾部會被剔除②，如此反覆連了八個 lipid II 之後，會形成一條醣鏈③。然後，經由轉胜肽酶的作用，將一條條醣鏈編織成網狀的結構，從線（醣鏈）逐漸變成面（細胞壁）。整個過程的動畫請見網站：http://www.genomics.sinica.edu.tw/index.php?option=com_content&view=article&id=32%3A2009-07-31-06-22-13&catid=6%3Anews-archives&Itemid=282&lang=zh。富樂黴素與轉醣酶的結合能力高過 lipid IV，因此能能夠抑制細胞壁的合成。