

## 一、研究目的

在細菌合成細胞壁的過程中，十一異戊二烯焦磷酸合成酶 (UPPs) 所合成出 55 個碳的十一異戊二烯焦磷酸酯 (UPP) 扮演醣轉移及固定醣的位置以利與細胞膜上的醣素反應等角色。如果可以抑制十一異戊二烯焦磷酸合成酶的生物活性，將使得 lipid II 無法翻轉至細胞膜外進行細胞壁的生合成，達到殺死細菌的效果。而且和目前已知的抗生素抑制細菌細胞壁合成的途徑有所不同，可以對於抗生素的設計提供一個新的方向。

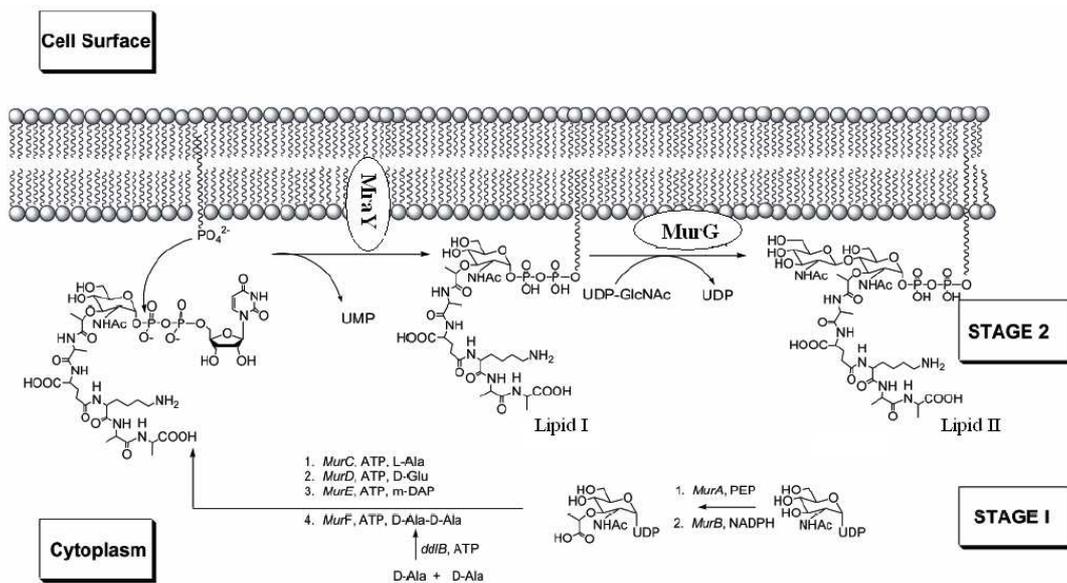


圖 1 肽聚醣細胞膜內合成情形。

## 二、十一異戊二烯焦磷酸合成酶 (UPPs) 的介紹

*E. Coli* 大腸桿菌的 UPPs 的繞射結晶分析圖於 2001 年由王惠鈞

教授及梁博煌教授實驗室發表，(如圖 2)。UPPs 是一個二聚體 (dimer)，由兩個次單元 (subunit) 所組成，每個 subunit 有 253 個胺基酸，7 個  $\alpha$  helices 和 6 個  $\beta$  strands 大致可分成兩個區域：催化區域及一般區域。催化區域是一個疏水性的隧道，由四個  $\beta$  strands (綠色及藍綠色的  $\beta$ A- $\beta$ B- $\beta$ D- $\beta$ C) 和兩個  $\alpha$  helices (紅色及玫瑰紅色的  $\alpha$ 2 和  $\alpha$ 3) 組成。 $\alpha$ 3 helix 有兩種構形 (如圖 3) 開啟及關閉的構形。開啟構形隧道呈現開啟狀態 (open form)，然而關閉構形可以看到  $\alpha$ 3 helix 彎曲朝內，使隧道呈現閉關狀態 (closed form)。而經由增加、減少或改變連接  $\beta$ B 和  $\alpha$ 3 的 flexible loop 72-83 上的胺基酸可以使 UPPs 變成 open form，UPPs 的  $k_{cat}$  (turnover number, 每單位時間酵素將受質轉換成產物的最大數量) 下降了 4~5 個數量級且 IPP 的  $K_m$  值增加 (親和力下降)，顯示了 UPPs 和 FPP 結合時會牽動  $\alpha$ 3 helix 而變成 closed form，而 closed form 就是活性狀態 (active form)，促進和 IPP 進行縮合反應。

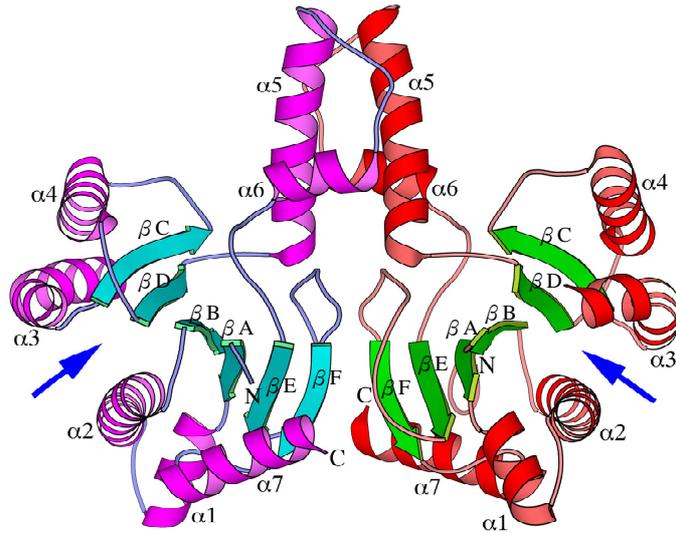


圖 2 UPPs 結晶分析圖：紅色及玫瑰紅色部分各為 7 個  $\alpha$  helices，綠色及藍綠色的部分各為 6 個  $\beta$  strands，藍色箭頭所指地方為催化區域。

(A)

(B)

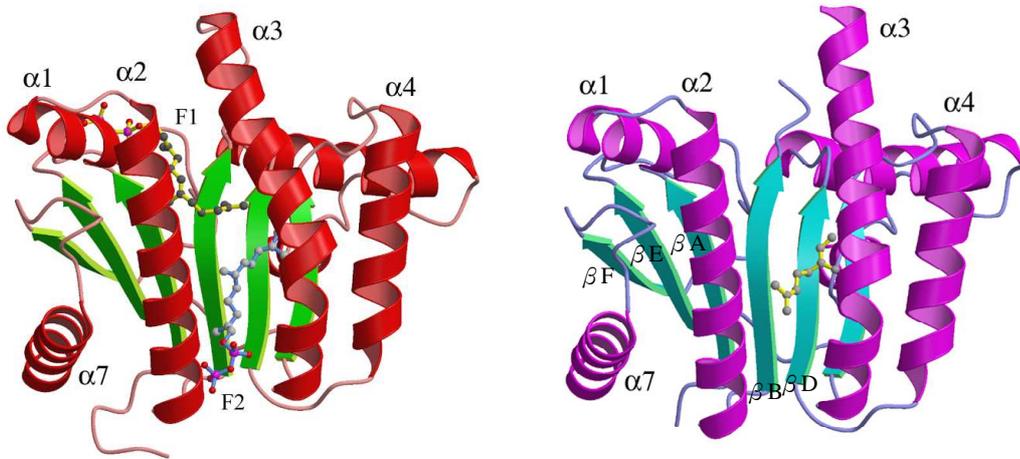


圖 3 FPP 與 UPPs 單體的共結晶分析圖。(A)為 closed form 的 UPPs，催化區內有兩個 FPP 分別標示為 F1 和 F2；(B)為 open form 的 UPPs，在催化區內可以看到 F2 FPP 結合在靠近底部的位置。

為了瞭解 UPPs 是如何決定其產物的長度，利用定點突變實驗，

發現了決定碳鏈長度的胺基酸位置：Leu-137 的側鏈阻擋了 C<sub>55</sub> 碳鏈繼續延伸的可能性；如示意圖 4。不過只有在界面活性劑 Triton X-100 存在下，UPPs 可以在兩秒內生成 C<sub>55</sub> 的產物，否則會因為產物釋放的速度過慢而繼續產生超過 C<sub>55</sub> 的產物。

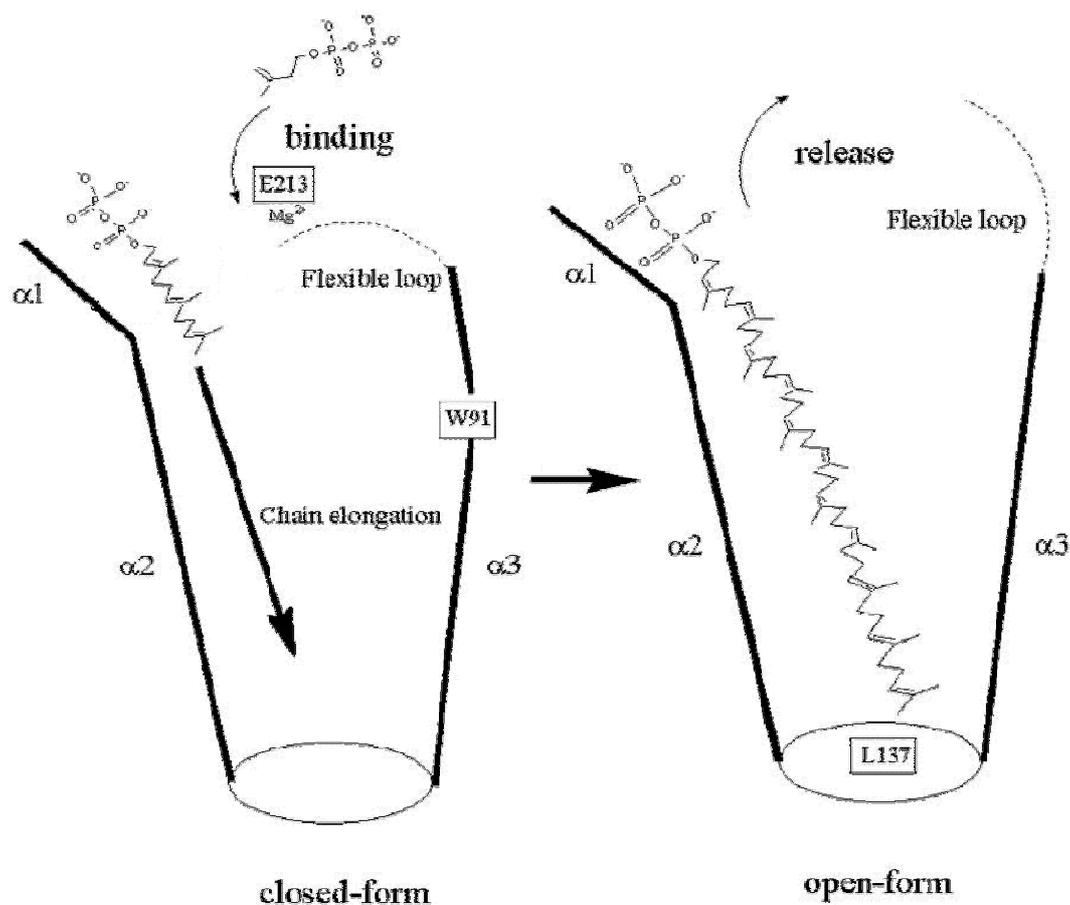


圖 4 FPP 與 UPPs 結合及反應產物示意圖。

### 三、分子模擬計算及分子設計構想

我們所使用的分子模擬計算軟體為 Discovery Studio 2.0。在進行能量及評分函數的計算之前，先將從 PDB 所下載的 UPPs 檔案，代碼為 1v7u，進行除水、加氫及結構最適化 (clean geometry)，再帶入

CHARMm 力場函數，進行蛋白質分子的前處理。另外將抑制劑小分子建立在一個 3D 的視窗，將其結構最適化，再帶入 CHARMm 力場函數。之後將抑制劑分子放進我們所選擇的活性中心範圍 (sphere) 如圖 5 (A)。進行蛋白質-配體 (protein-ligand) 的結構最適化 (ligand minimization) 計算小分子配體在蛋白質受體中的最低自由能 (in-situ final energy)。接著將蛋白質-配體最適化過後的抑制劑分子，代入事先在 UPPs 活性中心位置所建立好的格網中，如圖 5 (B)。進行評分函數的計算。進行運算時所選用的演算法 (algorithm) 為 smart minimization，另外評分函數的選擇為：LigScore1、Ligscore2、PLP1、PLP2、Jain、PMF、Ludi Energy Estimate1、Ludi Energy Estimate2 及 Ludi Energy Estimate3。運算結果中除了上述評分函數所給的結果之外，在 Discovery Studio 2.0 的軟體中另有一項 DockScore，主要是將上述幾個評分函數所運算出來的結果做綜合評比，我們也以此當做電腦模擬運算的評分標準。

(A)



(B)

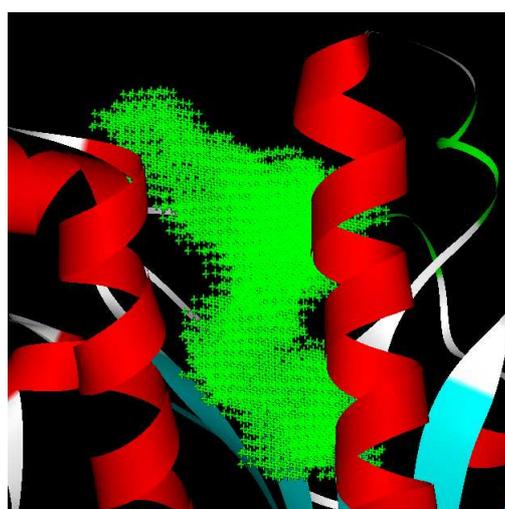
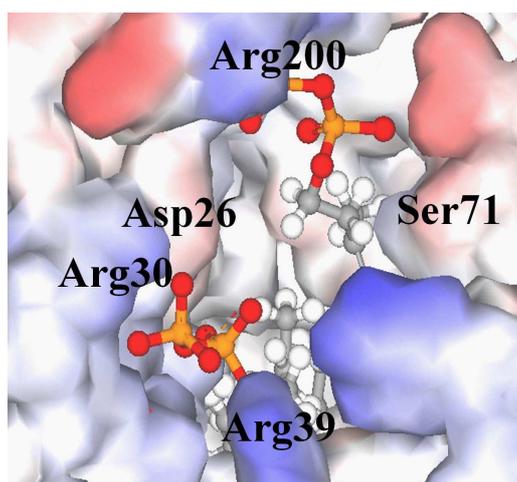


圖 5 分子模擬計算的格網及參數設定。(A) 圖中紅色部分為進行 In

Situ Minimization 及 CDOCKER 運算時所圈選的範圍。(B) 圖中綠色部分為進行評分函數計算時依照 FPP 及 IPP 結合位置所圈選的格網範圍。

UPPs 和 FPP 及 IPP 的辨識是依據靜電及疏水性這兩種作用力。由電子密度圖 6 (A) 可以知道活性中心的上半部具有較多帶電荷的氨基酸 (圖中藍色的部分為氮原子, 紅色的部分為氧原子), 活性中心下半部淺灰色的部分則屬於較為疏水性的通道。因此我們可以將活性中心區分成兩大部份, 第一個部份是活性中心位置的上半部, 屬於有較多靜電作用力的區域, 另一個部份是活性中心下半部的部份, 屬於疏水性的區域, 如圖 6 (B)。

(A)



(B)

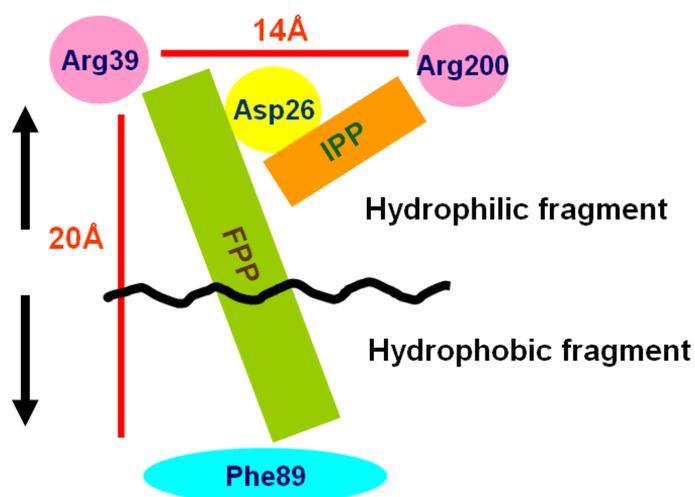


圖 6 UPPs 活性中心電子密度及分子片段卡通圖 (A) 活性中心的電子密度圖。(B) 活性中心位置疏水性及親水性片段示意圖。

由圖 6 中可看到靜電作用力的部份，所佔空間較大，包含了 FPP 及 IPP 結合位置，從與 FPP 焦磷酸根結合的 Arg-39 到與 IPP 焦磷酸根結合的 Arg200 距離大約為 14Å。因此可以考慮設計較大的分子片段，以利和 Arg39 及 Arg200 進行氫鍵作用力或是靜電作用力。下半部疏水作用力的區域則較屬於一個狹長的通道，由頂端的 Arg-39 到底端的 Phe-89 距離大約為 20Å。

在 UPPs 活性中心周圍的天冬醯胺酸 28、甘胺酸 29、精胺酸 30、精胺酸 39 可以和法呢基焦磷酸的焦磷酸根產生靜電引力與氫鍵作用力；而法呢基焦磷酸的疏水碳鏈則可以跟活性中心的白胺酸 85、白胺酸 88、苯丙胺酸 89，產生疏水性作用力。因此在分子設計上，我們引入了親水性的苯磺醯胺、及丙二酸根官能基與活性中心周圍胺基酸支鏈產生氫鍵及靜電引力；而在疏水性通道的部分，則是以二苯並呋喃(dibenzofuran)、二苯並噻吩(dibenzothiophene)或香豆素(coumarin)作為分子骨架與疏水性的胺基酸形成疏水性作用力，如圖 7 所示。並進行生物活性的測試及探討。

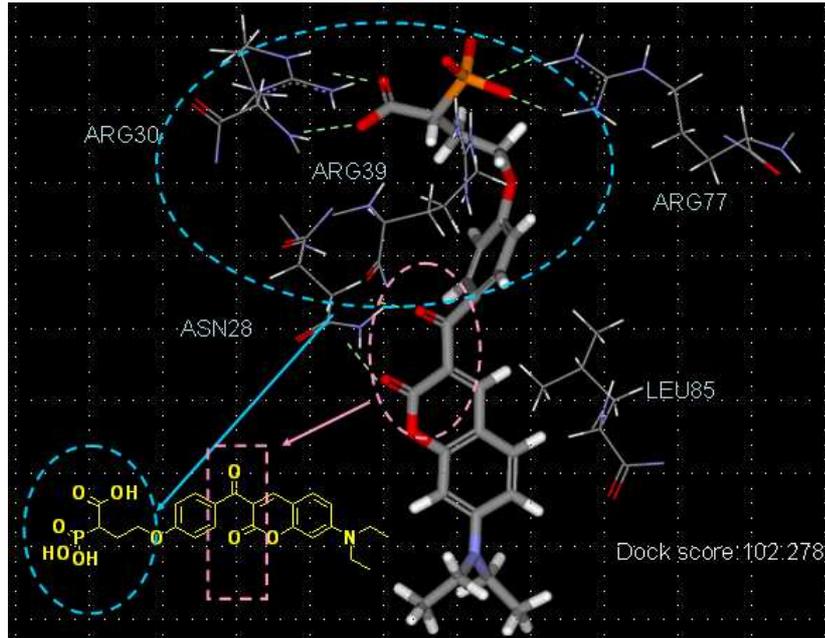


圖 7 化合物與 UPPs 活性中心 docking 作用力圖示。

#### 四、結論

我們希望能藉由 Discovery Studio 這套軟體的功能來輔助在針對 UPPs 抑制劑分子的設計上能更有效率。先以 Discovery Studio 進行分子庫的大量快速篩選，由評分函數的高低以及蛋白質和小分子結合的三度空間結構，來挑選出有潛力的分子進行合成。而從生物活性測試的結果，再以軟體計算其他結構上的衍生物，以進行循環性的藥物設計，合成出可以抑制 UPPs 活性的抑制劑。