

(一)摘要：

利用Discover Studio所提供的蛋白質三級結構預測之同源模擬(Homology Modeling)的方法，可以很快速及有效率的獲得離子通道蛋白之三維結構，再深入探討分析其結構所提供的資料，進一步了解離子通道蛋白的功能，可用來指引生物實驗，例如site - directed mutagenesis、rational drug design 和 protein - protein interaction 等等。模擬之後的結構再透過Discover Studio所提供之LigandFit、LibDock以及CDOCKER等計算方法，進行藥物與通道蛋白的對接，再經過Discover Studio生物軟體計算預測藥物可能在通道上可能的結合位置以及可能相互作用的關鍵胺基酸。

(二)研究動機：

細胞膜上的離子通道是所有生命體的基本要件，很多疾病，例如一些神經系統疾病和心血管疾病就是由於細胞上的離子通道功能發生紊亂或蛋白結構的缺陷所造成。例如本實驗室研究項目之一的離子通道「NMDA 受器」，在哺乳類動物中樞神經系統中扮演重要角色，從興奮性突觸的訊息傳遞、突觸的可塑性、到學習與記憶的整合此通道受器都參予其中，許多神經性疾如急性腦中風或慢性的阿茲海默症、帕金森氏症、精神分裂症、癲癇等等都認為和 NMDA 受器有關，因此增加對它們的認識是幫助了解許多疾病狀態的重要基礎，目前許

多離子通道已成為製藥界開發新藥的目標，離子通道的研究還有非常大的潛力和應用空間。

由於生物資訊近幾年來發展迅速，尤其基因體計劃的進行更增加了資料庫中的數量，包括核酸、蛋白質及結構等資料庫。一般說來，蛋白質三維結構主要以實驗方法來決定，例如X-射線繞射法或NMR光譜法。事實上，技術上的困難使得蛋白質三維結構決定的速度相當地緩慢，因此發展出利用電腦並依據蛋白質的序列來預測其三級結構的方法。這些方法包含以物理化學原理的*ab-initio* methods 及以資料庫提供的序列和結構知識衍生的蛋白質摺疊認識fold- recognition methods（亦稱threading 穿針引線法），和同源模擬法（homology modeling）。

我們想透過 Discover Studio 中的 homology modeling 方法來預測離子通道蛋白經胺基酸點突變之後可能的構型變化，以及預測相關藥物與通道蛋白之間可能的作用位置，並且可以有效率的篩選出可能作用的關鍵胺基酸，再透過電生理的方式來探測藥物對離子通道的行為模式，有助於進一步且有效率的了解離子通道可能的分子機制。

(三)研究方法與步驟：

同源模擬法五個主要的步驟：

(1)資料庫搜尋及選擇模版（**templates**）

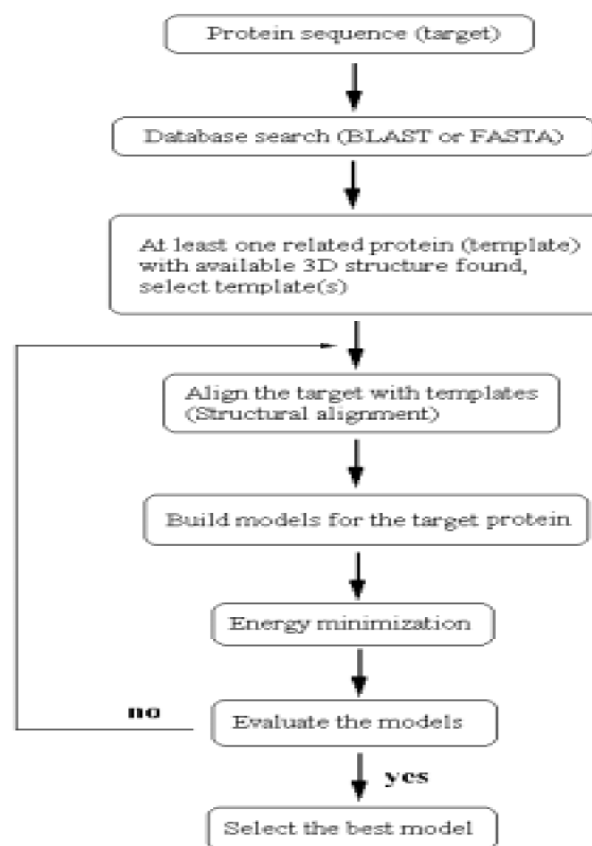
(2) 多重序列排列 (**multiple sequence alignment**)

(3) 骨架(**framework**)的建構, 環狀結構(**loop**)模擬及側鏈(**side-chain**)

模擬

(4) 能量最小化 (**energy minimization**)

(5) 結構合理性評估



Homology Modeling 的第一個步驟是搜尋蛋白質及結構資料庫, 例如 Swiss-Prot 或 PDB, 期望能在與此未知結構蛋白質 (target) 有序列相關的蛋白質中, 獲得一個或一個以上具有三維結構的蛋白質作為模版 (template)。模版的首要條件是其蛋白質序列與未知結構蛋白質序列之間的一致性必須大於 30%, 相似度越高, 模擬出來的準確

性也越高。假如可作為模版的結構很多時，則從這些結構中選擇出更適當的結構作為模版，來提高新結構的準確性。接著透過 Discover Studio 生物軟體的運算即可模擬出可能的蛋白質結構，最初的結構必須進行模型修飾 (model refinement) 的過程，藉由分子力學 (molecular mechanics) 的能量最小化來修正不利的非共價碰觸及達到理想的鍵結幾何和能量最低的狀態 (configuration)。能量最小化是一連串的计算，包括鍵長、鍵角、二面角、靜電作用力 (electrostatics) 和凡得瓦力作用力等位能參數 ($E_{total} = E_{stretching} + E_{bending} + E_{dihedral} + E_{out-of-plane} + E_{cross\ terms} + E_{vdw} + E_{coulombic}$)。能量最小化常用的力場 CHARMM, AMBER, CVFF, CFF91 或 GROMOS 等，Discover Studio 主要是利用 CHARMM 來計算最初的結構的能量，再調整結構中上述的各項參數直到最低總能量。

當能量最佳化之後，要進行結構合理性評估，包括 stereochemistry、energy profile、residue environment、structure similarity 等等。

a. stereochemistry：運用 PROCHECK，AQUA 或 SQUID 等方法評估結構是否符合的一般的常規，例如鍵長，鍵角，主鏈二面角，側鏈 χ_1 二面角，和非共價碰觸等，以及包裝、溶劑可接觸性、厭水性及親水性胺基酸分佈、主鏈氫鍵等結構上的特性。

b. energy profile: ProsaII 或 VERIFY3D 是根據三維輪廓 (3D profile)

和平均力的統計位能來計算結構的能量分佈。

c. residue environment : Profiles-3D 程式是以演算法將三維結構還原為一維的表示方式來計算胺基酸序列和三維結構之間的相容性，可用來評估新模型與模版中每一個胺基酸的環境狀態是否相同。

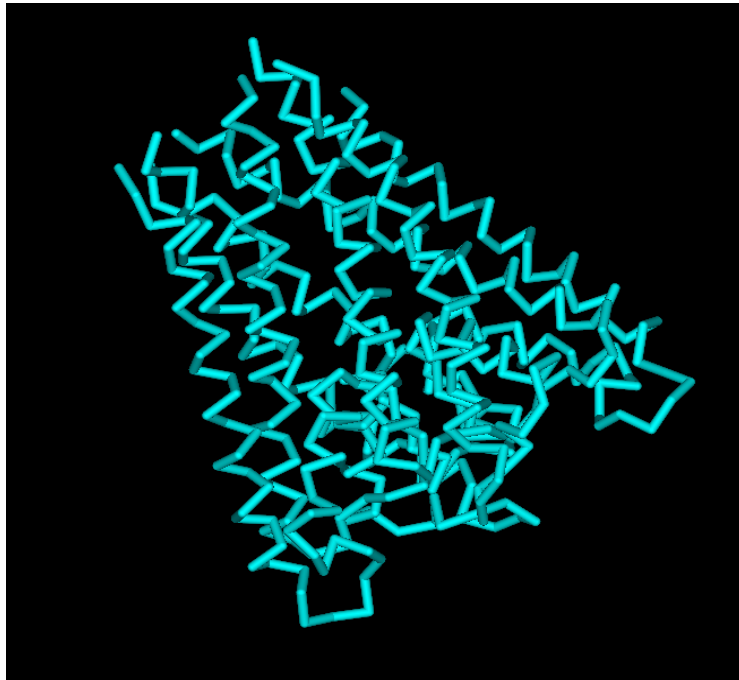
d. structure similarity : 首先判斷新結構是否具正確的摺疊，通常新結構在幾何上 (geometrical) 會比較接近模版結構。計算r.m.s.d.的數值常用於結構相似性的比較，亦即將新結構與模版結構重疊後，計算C α atoms 的距離求出r.m.s.d.的數值，r.m.s.d.越低則結構越相似。

最後，分析新模型與模版的結構和參考文獻所得的資訊，進一步地修正新結構，來增加其合理性及可信度。

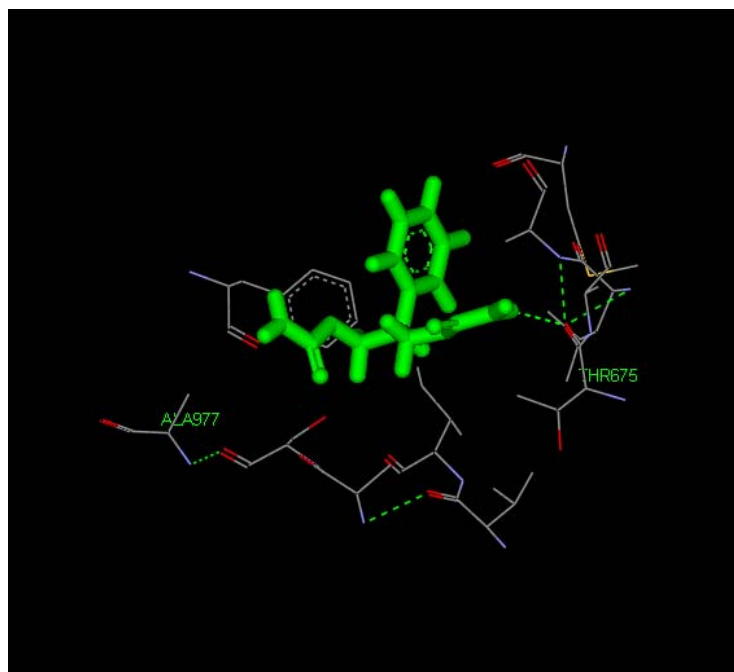
當離子通道蛋白完成結構最佳化之後，先採用Discover Studio所提供之 Ligand Fit 計算方式，掃描表面的結構觀察蛋白質可能的凹陷區塊，再將可能的凹陷區塊與藥物分子進行對接，再透過LibDock及 CDOCKER 做精準的計算，以求得更精確的作用模式。

(四)預期結果：

透過同源模擬法以及能量最小化的方式，我們將會模擬出研究中未知構型的離子通道蛋白，再加入小分子藥物進行對接，計算出各種自由能的評估數據，篩選出最合理的交互作用，透過電生理的功能性分析相互佐證。



圖一：利用 Homology Modeling 模擬的結果



圖二：利用圖一模擬之後的結果，加入藥物進行對接，並於圖中顯示出與藥物作用的關鍵胺基酸

(五)參考文獻：

1. Fiser A, Giian D R and Šali A. Modeling of loops in protein structures.

- Protein Sci.*, 2000, 9, 1753-1773.
2. Al-Lazikani B, Jung J, Xiang Z and Honig B. Protein structure prediction. *Curr. Opin. in Chem. Biol.*, 2001, 5, 51-56.
 3. Guex N, Diemand A and Peitsch M C. Protein modelling for all. *TIBS*, 1999, 24, 364-367.
 4. Sippl M J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, 1993, 17, 355-362.
 5. Luthy R, Bowie J U and Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 1992, 356, 83-85.
 6. Allen FH. 3D search and research using the Cambridge structural database. *Chem. Des. Autom. News*, 1993, 8, 31-37.
 7. Barton, GJ. ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng*, 1993, 6, 37-40.
 8. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN and Bourne PE. The protein data bank. *Nucleic Acids Res (Online)*, 2000, 28, 235-242.
 9. Johnson MS and Lehtonen JV. Comparison of protein three-dimensional structures. *Bioinformatics, Sequence, Structure and Databanks*, 2000, 15-50.
 10. Johnson, MS, May ACW, Rodionov, M.A. and Overington JP. Discrimination of common protein folds: application of protein structure to sequence/structure comparisons. *Methods Enzymol*, 1996, 266, 575-598.
 11. 孫慶姝. Homology Modeling(Knowledge - Based Structure Modeling). 中央研究院生物醫學科學研究所

鄒文雄與黃明經 蛋白質結構之電腦預測 *Chemistry* (The Chinese Chem. Soc. Taipei), 1997, 55, 101-109.