

中國醫藥大學 藥物化學研究所  
博士論文

指導教授：郭盛助 教授

指導教授：陳勝智 教授

1. 以偶合 COMT 螢光檢測甲硫氨酸腺苷基轉移酶活性之  
高效液相層析法的開發
2. HotLig: 以分子表面導向之方法評估蛋白質-配體之交互  
作用
  1. HPLC method for the determination of methionine  
adenosyltransferase activity using  
catechol-*O*-methyltransferase-coupled fluorometric detection
  2. HotLig: A molecular surface-directed approach to scoring  
protein-ligand interactions

研究生：王 勝 弘

Wang, Sheng-Hung

中 華 民 國 95 年 6 月

## 謝 辭

首先由衷感謝口試委員台北醫學大學陳繼明老師和靜宜大學陳香惠老師，以及本校黃麗嬌所長、林宗平老師與連金城老師，細心審查本論文並且給予珍貴的意見與教導。我的指導教授郭盛助教授以及陳勝智教授在我研究求學階段，相當用心、耐心與包容地指導我，不僅僅是在學術上的啟發，他們的人格修養更是我人生的導師。

還有研究所內許許多多的好友們，要感謝的人太多了，感謝你們的陪伴與鼓勵，這裡實在有太多美好的回憶！希望你們都能有更卓越的研究成果以及璀璨的人生！感謝龔姊多年來的照顧，讓我們許許多多的事務都能順利進行，希望您青春永駐。還有更要感謝賴建銘老師，我們都會想念您的。

這裡也要感謝泰霖一直以來的支持鼓勵與陪伴，豐富了我人生的色彩。最後要感恩我的父母親，當我完成學位時，他們都已年近七旬，心中除了不捨，更有無盡的感恩！

中國醫藥大學 藥物化學研究所  
博士論文  
(一)

指導教授：郭盛助 教授  
指導教授：陳勝智 教授

以偶合 COMT 螢光檢測甲硫氨酸腺苷基轉移酶活性之高效液相層析法的開發

HPLC method for the determination of methionine  
adenosyltransferase activity using  
catechol-*O*-methyltransferase-coupled fluorometric detection

研究生：王 勝 弘

Wang, Sheng-Hung

中 華 民 國 95 年 6 月

## 目錄

圖目錄 .....	ii
表目錄 .....	iii
中文摘要 .....	iv
英文摘要 .....	v
縮寫 .....	vi
第一章 緒論 .....	1
第一節 MAT 的分子生物學 .....	1
第二節 Methionine 的代謝路徑及其在醫療上的意義 .....	7
第三節 過去 AdoMet 與 MAT 活性之檢測方法 .....	15
第二章 研究動機與目的 .....	22
第三章 實驗器材與方法 .....	23
第一節 實驗材料與儀器 .....	23
第二節 細胞培養與 MAT 酵素製備 .....	26
第三節 MAT 活性分析方法 .....	27
第四章 結果與討論 .....	31
第五章 結論 .....	46
參考文獻 .....	47

## 圖目錄

Scheme 1.	COMT 偶合酵素螢光檢測法之示意圖 .....	22
圖 1.	MAT 所催化的反應 .....	1
圖 2.	老鼠肝細胞 $\alpha$ subunit 模型 (PDB code: 1QM4).....	4
圖 3.	NO 與 GSH 對 MAT 的調節作用 .....	5
圖 4.	Methionine 的代謝路徑 .....	8
圖 5.	異常甲基轉移酵素調節細胞分裂和細胞分化的角色 .....	11
圖 6.	AdoMet 之 isoindole 類螢光化合物形成原理 .....	18
圖 7.	COMT 偶合酵素檢測 MAT 活性之機轉 .....	34
圖 8.	MGBG 在 COMT 偶合酵素法中對測定結果之影響 .....	36
圖 9.	COMT 使用量對 scopoletin 生成之影響 .....	38
圖 10.	Scopoletin 生成與時間的關係 .....	39
圖 11.	COMT 偶合酵素轉換 AdoMet 之效能 .....	41
圖 12.	Scopoletin 檢量線 .....	42
圖 13.	MAT 酵素抽取液用量與檢測值之線性關係 .....	43
圖 14.	HL-60 MAT 酵素動力學之 Eadie-Hofstee plots .....	45

## 表目錄

Table 1.	MAT isozymes 之間的比較.....	2
----------	-------------------------	---



## 中文摘要

甲硫氨酸腺苷基轉移酵素 Methionine adenosyltransferase (MAT; EC 2.5.1.6) 是體內代謝中甲基的主要來源，影響範圍包括 DNA、RNA 以及蛋白質與其他小分子的代謝。然而至今 MAT 酵素的活性依舊只能以放射性同位素法進行測定。這個研究當中，我們建立了一個高感度，有專一性，又快速簡便的酵素偶合之螢光液相層析分析法來分析 methionine adenosyltransferase (MAT) 酵素活性及酵素動力學常數。這個方法利用 catechol-*O*-methyltransferase (COMT) 將 *S*-adenosyl-*L*-methionine (AdoMet) 上的甲基轉移到 esculetin (ECL) 上形成甲基化的 scopoletin (SPL)，經由 *n*-hexane:ethyl acetate (7:3, v/v) 萃取後，利用高效液相層析 (HPLC) 配接 Si 60 管柱以及螢光檢測器分析 SPL (ex: 347 nm; em:415 nm)，測定 MAT 的活性及酵素動力學常數。SPL 之最低檢測量約為 100 fmol；這個方法僅需要酵素約相當於 2.5  $\mu\text{g}$  的蛋白質，酵素反應時間可少於 30 分鐘，每個檢品之 HPLC 分析時間約只需 5 分鐘。酵素動力學的研究顯示 HL-60 MAT 呈現了 Hill coefficient 為 0.5 之 negative cooperativity,  $K_m = 6.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$  (for methionine),  $V_{\max} = 135.4 \pm 1.5 \text{ nmole AdoMet/mg protein/hr}$ 。故此新穎的 COMT 偶合 HPLC 螢光分析法能成功的應用於測定微量 AdoMet 以及 MAT 酵素活性，並成為放射性同位素法之替代方法。

## 英文摘要

A non-radioactive, sensitive, rapid and specific method for the determination of methionine adenosyltransferase activity has been established. In this method, the methyl group of *S*-adenosyl-L-methionine was enzymatically transferred to esculetin with the aid of catechol-*O*-methyltransferase and then the resulting scopoletin was extracted with *n*-hexane:ethyl acetate (7:3, v/v) and measured by high-performance liquid chromatography with Si 60 column and fluorometric detection with excitation and emission wavelengths at 347 and 415 nm, respectively. The detection limit for scopoletin was about 100 fmol. Using this method to determine MAT activity in HL-60 cells only required about 2.5  $\mu$ g of protein and the incubation time needed for enzymatic reaction is less than 30 min. The HPLC analysis procedure took only 5 min per sample. The kinetic study showed that MAT in HL-60 cells exhibited negative cooperativity with a Hill coefficient of 0.5. The values of  $K_m$  and  $V_{max}$  were  $6.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$  and  $135.4 \pm 1.5 \text{ nmol AdoMet formed/mg protein/h}$ , respectively.

**Key words:** methionine adenosyltransferase (MAT); catechol-*O*-methyltransferase (COMT); *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet); methylglyoxal bis(guanylhydrazone) (MGBG); esculetin; scopoletin; enzyme-coupled; fluorescence; HPLC; HL-60.



## 縮寫

AdoHcy : *S*-adenosyl-L-homocysteine

AdoMet : *S*-adenosyl-L-methionine

ATP : adenosine 5'-triphosphate

COMT : catechol-*O*-methyltransferase

DMSO : dimethyl sulfoxide

DTT : 1,4-dithiothreitol

ECL : esculetin

GSH : glutathione

Hcy : homocysteine

L-Met : L-methionine

MAT : methionine adenosyltransferase

MAT<sup>H</sup> : MAT isozyme with high  $K_m$  for methionine

MAT<sup>I</sup> : MAT isozyme with intermediate  $K_m$  for methionine

MAT<sup>L</sup> : MAT isozyme with low  $K_m$  for methionine

MAT<sup>LT</sup> : MAT<sup>L</sup> with tumor factor

MGBG : methylglyoxal bis-(guanylhydrazone)



MT : Methyltransferase

PIPES : piperazine-*N-N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)

SAH : *S*-adenosyl-L-homocysteine

SAHH : *S*-adenosylhomocysteine hydrolase

SAM : *S*-adenosyl-L-methionine

SPL : scopoletin

Tris-acetate : tris(hydroxymethyl)aminomethane acetate

Tris-HCl : tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride



# 第一章 緒論

## 第一節 MAT 的分子生物學

甲硫氨酸腺苷基轉移酶 Methionine adenosyltransferase (MAT ; SAMS ; EC 2.5.1.6) , 存在於所有的生物細胞中 , 被認為是生命所必須的酵素之一 [1-3] 。 它先將 ATP 上的 adenosyl group 轉移到 L-methionine 的硫原子 , 形成硫帶正電的 S-adenosyl-L-methionine (AdoMet ; SAM) , 繼而水解三個磷酸根成為 pyrophosphate (PPi) , 及 orthophosphate (Pi) [4] 。 (圖 1)

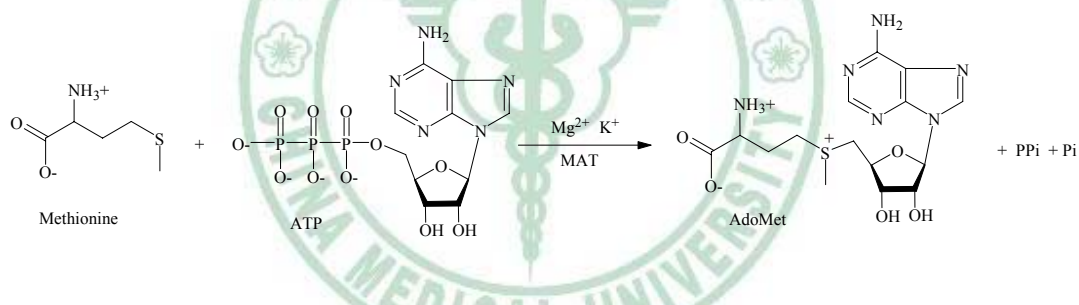


圖 1. MAT 所催化的反應。

從細菌乃至到人類 , MAT 不論在整體的胺基酸序列還是在構形上 , 尤其是活性部位 , 其胺基酸序列在演化過程中被高度的保存著 [5-10] , 就拿老鼠和人類肝臟  $\alpha$  subunit 來比較 , 序列就有 95% 的相似度 [3] 。 哺乳動物的 MAT

可分為兩大類：肝系列 (liver specific) 的 MAT I/III<sup>1</sup> 與非肝系列 (non-liver specific) 的 MAT II<sup>2</sup>，前者來自於基因 *MAT1A*，後者來自於基因 *MAT2A* 和 *MAT2B* (Table 1)，*MAT1A* 表現  $\alpha 1$  subunit，*MAT2A* 表現  $\alpha 2$  subunit，*MAT2B* 則表現  $\beta$  subunit [9,11-16]。

**Table 1.** MAT isozymes 之間的比較

MAT isozyme	Catalytic subunit	Gene encoding MAT catalytic subunit	Regulatory subunit	Gene encoding MAT regulatory subunit	Subunit composition
MAT I	$\alpha 1$	<i>MAT1A</i>			$(\alpha 1)_4$
MAT II	$\alpha 2$	<i>MAT2A</i>	$\beta$	<i>MAT2B</i>	$(\alpha 2, \alpha 2')_x \beta_y$
MAT III	$\alpha 1$	<i>MAT1A</i>			$(\alpha 1)_2$

MAT I/III 與 MAT II 在特性上有一個明顯的區別，就是體外活性分析時，若有 10 % DMSO 存在，則 MAT I/III 活性會提高 (尤其是 MAT III 活性提高 5 倍)，而 MAT II 活性則是被抑制下來 [17]。此外，胎兒肝臟所表現出的 isozyme 是 MAT II，出生後則表現 MAT I/III，這一點和  $\alpha$ -fetoprotein 及 albumin 一樣，都是肝細胞分化成熟的指標 [18]。

<sup>1</sup> MAT I 又稱 MAT  $\alpha$  或 MAT<sup>L</sup>；MAT III 又稱 MAT  $\beta$  或 MAT<sup>H</sup>。

<sup>2</sup> MAT II 又稱 MAT  $\gamma$  或 MAT<sup>L</sup>。

MAT I 由 4 個  $\alpha 1$  組成 homotetramer, MAT III 由 2 個  $\alpha 1$  組成 homodimer, 兩者只存在於成熟的肝細胞 [19-20]。兩個  $\alpha$  subunit 組成 dimer 的作用力較強, 兩個 dimer 組成 tetramer 的作用力較弱 [21], 在肝臟中, dimer 與 tetramer 處於平衡狀態 [22], 雖然兩者同樣是  $\alpha 1$  所組成, 卻表現出不一樣的性質, 除了動力學特性不同外, MAT I 的性質是 nonhydrophobic 而 MAT III 則是 hydrophobic [22-23]; MAT I 會被 AdoMet 回饋抑制, 而 MAT III 則反被 AdoMet 活化 [24-25]。

事實上, 兩個  $\alpha$  subunit 組成 dimer 是 MAT 催化反應的必要條件, 如圖 2, 當兩個  $\alpha$  subunit 組成 dimer 時, L-Met binding site 與 ATP binding site 對應疊合, 形成了兩個活性部位, 此時 MAT 才具有活性 [26]; 除了兩個活性部位外, 還有另一個凹洞, 是相當厭水性的區域, 是否有生物分子與之相結合, 是值得研究的主題。

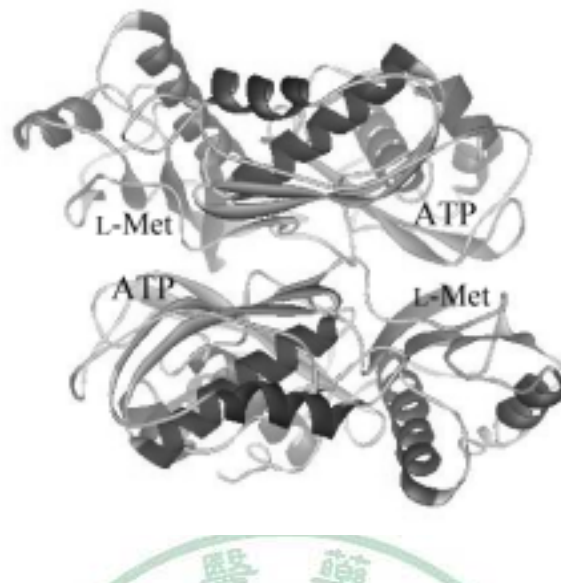


圖 2. 老鼠肝細胞  $\alpha$  subunit 模型 (PDB code: 1QM4)，圖中標示出 L-Met 和 ATP 的結合位置。兩個  $\alpha$  subunit 組成 dimer 時，L-Met binding site 與 ATP binding site 對應組合成一個 binding site，故總共可形成兩個活性部位。

MAT II 則廣泛存在於所有組織細胞，肝臟中也有少量 [9,11-16]，事實上，MAT II 的組成目前還不是很了解。其組成包含  $\beta$  subunit，是一個無催化活性的調節單位。在人類， $\alpha 2'$  則是  $\alpha 2$  轉譯後處理的產物 [27]，具酵素活性，也能被  $\alpha 2$  的抗體辨識，故兩者差異不大。 $\beta$  subunit 和  $\alpha 2$ 、 $\alpha 2'$  結合後，會提高其活性，但也同時使其更容易受到 AdoMet 的回饋抑制；沒有  $\beta$  subunit 存在時，其對 methionine 的  $K_m$  為 75  $\mu\text{M}$ ，有足夠量的  $\beta$  subunit 時，其對 methionine 的  $K_m$  為 17  $\mu\text{M}$  [28]。

影響 MAT 活性的因素很多，除了 MAT I/III tetramer 與 dimer 的轉變和 MAT II 的  $\beta$  subunit 外，還有回饋抑制如 AdoMet、Pi、PPi、polyamine [28-30]，

不過這些代謝物的抑制作用都不強；在 *MAT1A*、*MAT2A* 基因上的調控則有 DNA methylation 抑制轉錄，histone acetylation 增加轉錄 [31-32]；glucocorticoid 亦會促進 *MAT1A* 基因的轉錄以及增加其 mRNA 的安定性 [33]；蛋白質的修飾，則以 S-nitrosylation 最重要，當老鼠肝細胞的 MAT，C121 硫原子被 nitrosylation 後則失去活性 [34-37]，而被 nitrosylation 的 MAT，可被 GSH 再次活化，這表示了 NO 與 GSH 在 MAT 活性調控上的重要性 (圖 3) [37]。

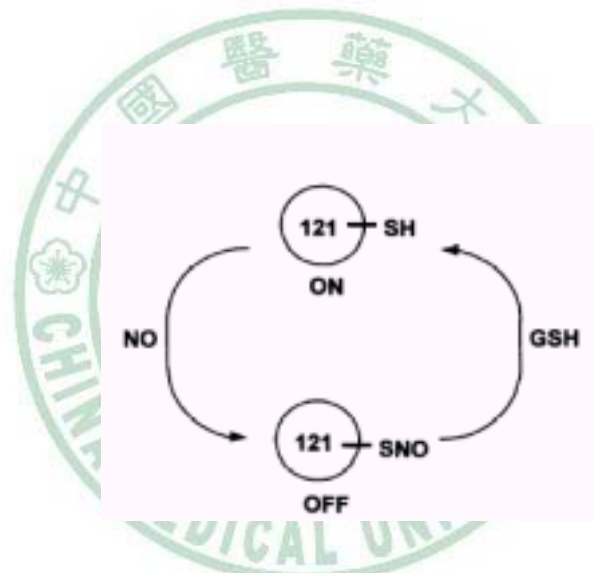


圖 3. NO 與 GSH 對 MAT 的調節作用 [37]。

除了受上面因素影響外，另有研究報告指出，當細胞培養時，培養液中 methionine 濃度愈低時，其 MAT 的  $K_m$ 、 $V_{max}$  均相對增加 [38]。此外，不同物種來源的 MAT 其  $K_m$ 、 $V_{max}$  都不同，從酵素的胺基酸序列及結構來看，活性部位差異不大，唯活性部位外有一曲環 (flexible loop)，隨物種來源而有不同，

被認為是影響其動力學的重要因素。此曲環是一段活躍而不安定的構造，可以打開或關閉，其構形與溫度、受質存在與否有關 [39]，前面所提發生 *S*-nitrosylation 的 C121 位置就在曲環上面。

由於影響 MAT 酵素動力學特性的因素很多，而且不一樣的研究方法，不同的酵素純度都影響結果，所以許多研究報告都有不小的差異。一般而言，MAT II 對 methionine 的  $K_m$  為 4~10  $\mu\text{M}$ ，MAT I 為 23  $\mu\text{M}$  ~ 1 mM，MAT III 為 215  $\mu\text{M}$  ~ 7 mM [40]。

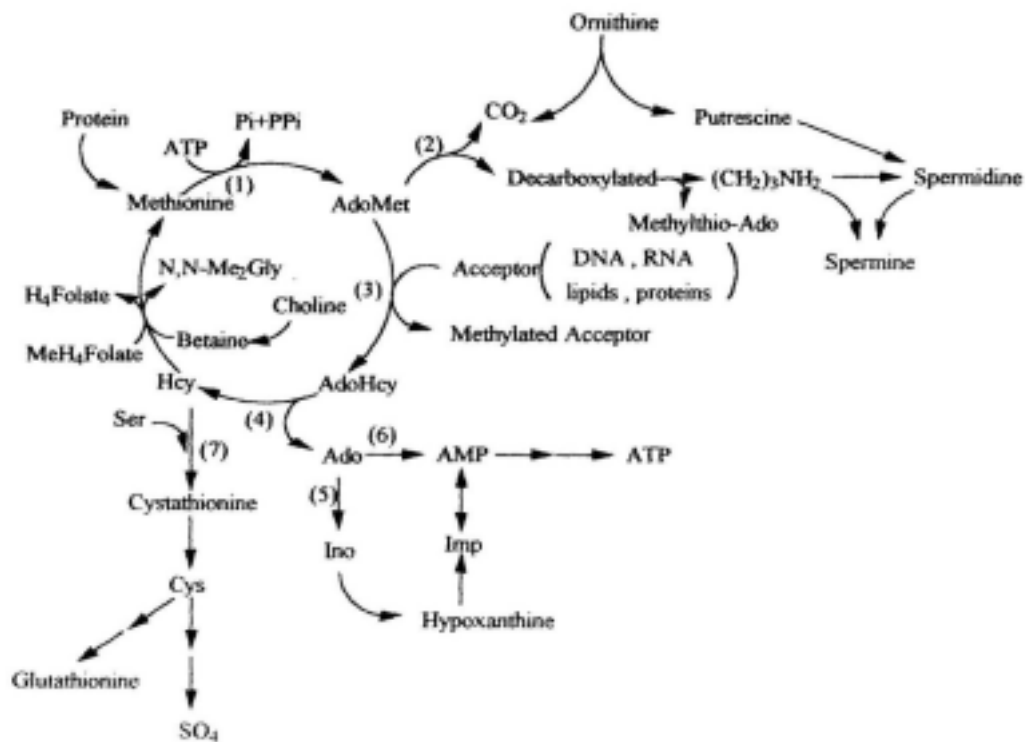




## 第二節 Methionine 的代謝路徑及其在醫療上的意義

整個 methionine 代謝路徑如圖 4 所示，methionine 經 MAT 作用後產生了 AdoMet，AdoMet 是體內代謝過程中甲基的主要來源，可接受甲基的分子包括 DNA、RNA、proteins、phospholipids、及其他小分子。透過許多不同甲基轉移酶的作用，能在不同的分子上甲基化，而進行代謝作用或調節生理功能 [41]。

除了提供甲基外，AdoMet 經過 decarboxylation，能提供 aminopropyl group，而參與了 polyamine (putrescine、spermidine 與 spermine) 的生合成。在 polyamine 生合成路徑也有一些與細胞分化有關的研究，如 spermidine 的代謝產物， $N^1$ -acetylspermidine 及  $N^8$ -acetylspermidine 在誘導 HL-60 細胞分化的能力上有著極不同的結果， $N^8$ -acetylspermidine 在 15  $\mu$ M 時，即能誘導 80%~90% HL-60 細胞進行分化，而  $N^1$ -acetylspermidine 一直到 1.2 mM 都無誘導分化，也不會抑制細胞生長 [69]。此外，Ornithine decarboxylase 的抑制劑 difluoromethyl ornithine，能誘導 F9 teratocarcinoma stem cells 進行細胞分化 [70]，但一般還是認為，polyamine 與細胞增殖是較有關係的 [71-73]。



- (1) MAT
- (2) AdoMet decarboxylase
- (3) Methyltransferase
- (4) AdoHcy hydrolase
- (5) Ado deaminase
- (6) Ado kinase
- (7) Cystathionine  $\beta$ -sythetase

圖 4. Methionine 的代謝路徑 [41]。

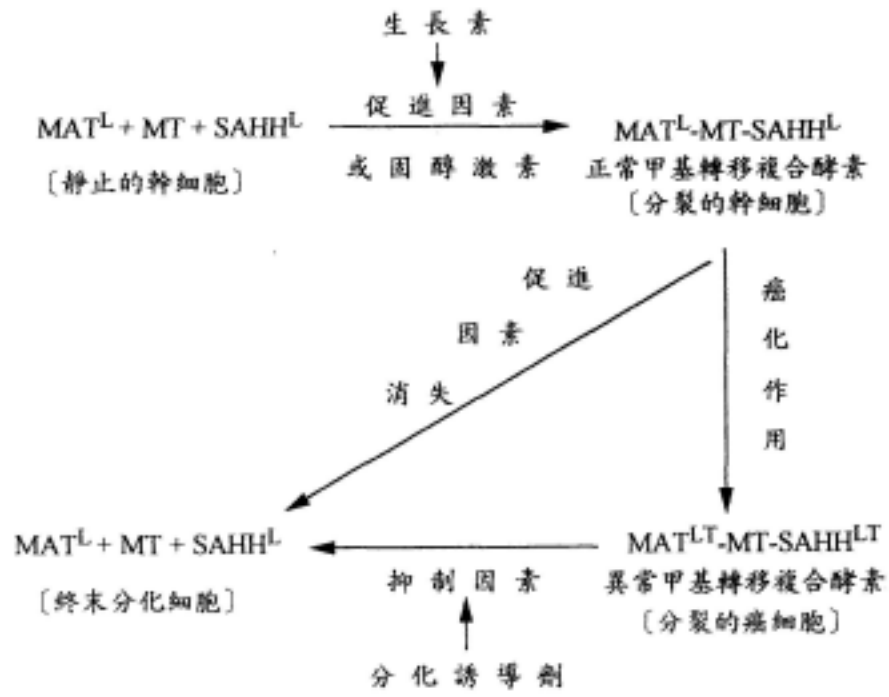
AdoMet 轉移甲基後成為 *S*-adenosylhomocystein (AdoHcy; SAH)，本身是一種甲基轉移酶抑制劑，SAH 的抑制劑會誘導細胞分化，原因可能是 AdoHcy 量提高的緣故 [41]。AdoHcy 經水解後，生成 homocystein (Hcy)，近來發現 Hcy 是個心血管疾病的危險因子，當缺乏葉酸、維生素 B6、B12 等時，Hcy 會無法轉變為 methionine 而堆積，而與動脈粥狀硬化有關 [74-75]。

Hcy 又是 glutathione (GSH) 生合成前驅物，GSH 具有抗氧化功能，而 AdoMet 的量是否因此影響到細胞抗氧化以及老化、凋亡，仍不確定。

其實 AdoMet 還有其他用途，儘管藥效學或藥動學上了解不多，AdoMet 仍被認為對肝臟有保護作用，慢性肝病的 MAT 活性減少，由於 AdoMet 減少使得 GSH 也減少，而在肝臟疾病治療上，給予 AdoMet 後，肝臟的 GSH 將增加 [3,76]。還有研究顯示，口服 AdoMet 可能可以通過血腦障蔽 [77]，並影響中樞 monoamine 代謝，在歐洲已用於治療憂鬱症 [78-81]。AdoMet 和軟骨組織修復有關，也被認為對關節炎有療效 [82]。目前 AdoMet 已為一種健康食品上市。

MAT 與癌症的關係，一般認為和 DNA 的甲基化有關。DNA 的甲基化通常發生在 CpG，使 cytosine 變成 5-methylcytosine，cytosine 甲基化後易突變為 thymine，可能與腫瘤發生有關。基因的 promoter 若被甲基化，則這段基因常無法表現 [42-44]。有研究報告認為，若阻斷 DNA 甲基化，或使 DNA 去甲基化，可能可以活化某些被抑制的基因，進而誘導癌細胞分化並表現細胞功能，如 DNA 甲基轉移酶的抑制劑 5-azacytidine 等 [41,45-46]。由以上可知，DNA 的甲基化，在基因表現與癌症發生上扮演相當重要的角色，同時也是藥物設計的新標靶 [47]。

癌細胞是細胞分裂與分化過程發生錯誤，以致於細胞停留於分裂週期運轉不息，不能遂行終末分化，所以 Potter 認為細胞分化被阻斷是癌症的最中心問題 [48]。廖明徵博士發現癌細胞都有異常甲基轉移複合酶，導致細胞不能進行分化，因此異常甲基轉移複合酶是癌症的最根本病因 [49-51]。這種異常酶在癌細胞中調節細胞分裂及分化的功能可由圖 5 解詳加說明：



MAT : methionine adenosyltransferase  
 MT : methyltransferase  
 SAHH : S-adenosylhomocysteine hydrolase  
 L : Low Km for methionine  
 T : 代表一個特殊的癌因素

圖 5. 異常甲基轉移酵素調節細胞分裂和細胞分化的角色。

如圖 5 所示，MAT、MT、SAHH 三個成員酵素在正常細胞中要結合成甲基轉移複合酵素才能發揮甲基轉移的活性，而這種結合完全依賴外來活化因子(生長素、固醇激素)，當這些活化因子存在時複合酵素活性提高，核糖體的生產和甲基的複製就可以順利進行，細胞就在分裂週期運轉。然而一旦活化因子消失，甲基轉移複合酵素失去活性，此時細胞會合成缺甲基的核酸，這是細胞由分裂轉入分化的關鍵，核糖體不再生產 [52]，分化基因得以表達，細胞被導入終末分化變成不再分裂之終末細胞 [49-51]。癌細胞會產生特異的蛋白質因子 (specific protein factor) 與 MAT 和 SAHH 結合後再與 MT 結合在一起，形成 MAT<sup>LT</sup>-MT-SAHH<sup>LT</sup>，這種異常之甲基轉移複合酵素活性高且非常穩定，會使甲基化之活性劇增，致使細胞分裂之速度比正常細胞快，不受外來活化因子控制，能自行維持長期之活性，使癌細胞在分裂週期運轉不息 [49-51]。癌細胞須外來抑制物質 (如 CDA-II) 將甲基轉移複合酵素之癌因子去除，癌細胞就會像正常細胞進行終末分化。

廖明徵博士進一步地發現所有之癌組織都存在異常甲基轉移複合酵素，更指出正常組織中不管是否正在進行細胞分裂都沒有異常甲基轉移複合酵素之存在，所有癌細胞都有異常甲基轉移複合酵素，造成細胞不斷分裂。因此他們認為能抑制異常甲基轉移複合酵素之活性化合物，才是理想之癌細胞分化誘導劑。而這種作用在異常甲基轉移複合酵素的癌細胞分化誘導劑，可以

從  $\text{MAT}^{\text{LT}}$  的抑制活性檢測篩選出來，因為當  $\text{MAT}^{\text{LT}}$  失去腫瘤因子後恢復成  $\text{MAT}^{\text{L}}$ ，活性會降低，而且兩者的動力學常數不一樣， $\text{MAT}^{\text{L}}$  對 methionine 的  $K_m$  為  $3 \mu\text{M}$ ，而  $\text{MAT}^{\text{LT}}$  為  $20 \mu\text{M}$  [49-51]。

從這個理論看來，固醇激素、腫瘤因子與癌細胞分化誘導劑似乎可能作用在同一個地方，先前提過 MAT 的兩個  $\alpha$  subunit 形成 dimer 後，除了產生兩個活性部位外，還有一個厭水性區域的凹洞，這裡是否就是固醇激素，腫瘤因子，與癌細胞分化誘導劑的結合位置，仍需進一步研究。

在癌細胞中通常可發現致癌基因 (oncogenes) 的 hypo-methylation，與抑癌基因 (suppressor genes) 的 hyper-methylation [53-59]，然而造成這種異常的甲基分布不均，原因仍不清楚。正常細胞的 DNA，其甲基化乃受 maintenance methyltransferase 所催化，而癌細胞中有 *de novo* methylation 發生，*de novo* methylation 究竟是由 maintenance methyltransferase 所催化，或是由其他異常 methyltransferase 催化，則仍屬未知 [47]。癌細胞異常甲基轉移複合酵素中的 methyltransferase 有何不同，以及它與這些異常甲基分布是否有關，亦有待研究。

一般來說，MAT 與快速生長的細胞有關，尤其是 MAT II [60-63]，也就是  $\text{MAT}^{\text{L}}$ 。除了廖明徵博士等人所提的  $\text{MAT}^{\text{LT}}$  以外，還有許多 MAT 異常表現或突變的研究報告。如肝癌細胞中，*MAT1A* 基因沒有表現出來，反而表現 *MAT2A*

基因，其 MAT 活性在正常 methionine 生理濃度下，比正常肝細胞的 MAT 活性來的高，但卻比較容易被 ethionine 所抑制，因此被認為是有選擇性的標靶 [40]。從 Hypermethioninemia 病人的研究，發現是一種 MAT 先天缺陷疾病，肝臟中的 *MAT1A* 基因發生 R264H 突變，使得兩個  $\alpha 1$  subunit 無法形成 dimer，同時也失去活性 [64-66]，MAT 的缺陷甚至也和 brain demyelination 的發生有關 [67-68]。

以上可知，整個 methionine 代謝路徑影響層面很廣，其中 AdoMet 是這個路徑的關鍵，這也突顯了 MAT 的重要性。





### 第三節 過去 AdoMet 與 MAT 活性之檢測方法

如前所述，MAT 與許多重要的生理功能與疾病有關，而其活性之測定也是相關研究所必須的，包括生理檢測以及抑制劑篩選等，然而目前為止 MAT 的活性分析幾乎都是以放射線同位素測定，以廖博士等的方法為例 [83]，其分析的原理為利用 L-[methyl-<sup>3</sup>H] methionine 當作 MAT 的受質，酵素催化反應後，產生有放射性的 AdoMet，由於 AdoMet 的硫原子帶正電，故用 P81 陽離子交換層析試紙吸附後，再以 pH 7 的緩衝液洗去殘留的 L-[methyl-<sup>3</sup>H] methionine，接著偵測剩餘的放射線量，若需要定量則可以 L-[methyl-<sup>3</sup>H] methionine 做檢量線定量之。

HPLC 分析法方面，已有不少測定 AdoMet 的方法被建立 [84-92]，都是用以測定組織細胞中 AdoMet 的含量，由於從組織來的細胞數目夠多，通常 UV 偵測器的感度已經足夠。但是如果將其應用於酵素活性分析，尤其是細胞來源有限的 culture system cells 之酵素活性分析，或者如血漿中 AdoMet 濃度低的檢品，這些方法感度都不夠，而且需用到大量檢品，及繁瑣或耗時的分析程序。其中代表性的方法如 1992 年 Jennifer 等人 [84] 及 1997 年 Carolyn 等人 [85] 所發表，螢光法則由 1998 年 Capdevila 等人 [86] 所提出，還有本所先前的研究使用 BIACORE 檢測 MAT 與小分子親和力的方法 [112]。這些方法簡述如下：

1. 1992 年 Jennifer 等人之方法：

Solid-phase extraction 前處理

↓檢品置陽離子交換樹脂 (cation-exchange resin)

↓以甲醇沖洗

↓以 0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 2.0) 沖洗

↓以 0.05 M disodium hydrogen phosphate buffer (pH 11.0) 洗出 AdoMet

*HPLC analysis*

Column : C18 reversed-phase analytical column (100 mm × 4.6 mm)

Mobile phase : 0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 5.7)

Flow rate : 1.2 ml/min

UV Detector : 254 nm

Analysis time : 8 min

此方法用 cation-exchange resin 做前處理，目的在先除去大量雜質，然而 UV 檢測器感度不夠，若要應用到酵素分析上，檢品、試劑用量以及反應時間均需要大幅度增加。如果酵素來源是培養的細胞，很難供應大量的酵素蛋白，而且 AdoMet 不安定，延長反應以及處理的時間會損失更多的 AdoMet。

## 2. 1997 年 Carolyn 等人之方法：

↓於 0.1 M sodium acetate buffer (pH 6.0) 打破細胞

↓trichloroacetic acid 沉澱蛋白質

↓離心：25,000g，10 min，5°C

↓取上清液，再用乙醚萃取除去低極性物質

↓水層 0.45  $\mu\text{m}$  過濾

↓檢品 0~4°C 保存

### *HPLC analysis*

Column： ODS，25  $\times$  0.46 cm (5  $\mu\text{m}$ )

Mobile phase： 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 4.38)，10 mM Sodium heptanesulfonate，  
20% methanol

Flow rate： 0.9 ml/min

UV Detector： 254 nm

Analysis time： 20 min

這個方法若應用於 MAT 酵素活性分析是有困難的，同樣有敏感度不夠的問題，而且酵素反應時添加了許多高濃度物質會干擾 AdoMet 的分析，ion pair reagent 在使用上則較不易控制，試劑配製需更加精準，HPLC 平衡時間需較長，column 溫度影響也較大。

### 3. 1998 年 Capdevila 等人之方法

檢品先經過 HPLC，以 C-8 column 初步分離後，再利用 AdoMet 的 amino group 與 naphthalenedialdehyde 及 cyanide 於 pH 9.0 反應 10 分鐘，形成 isoindole 類螢光化合物 (圖 6)，接著用 HPLC 以 C-18 column 及螢光檢測器進行分析。這個方法為螢光分析法，感度較高，測得血漿中 AdoMet 的濃度為 102.7 nM，然而過程繁瑣是其缺點，而且所使用之試劑毒性較大。

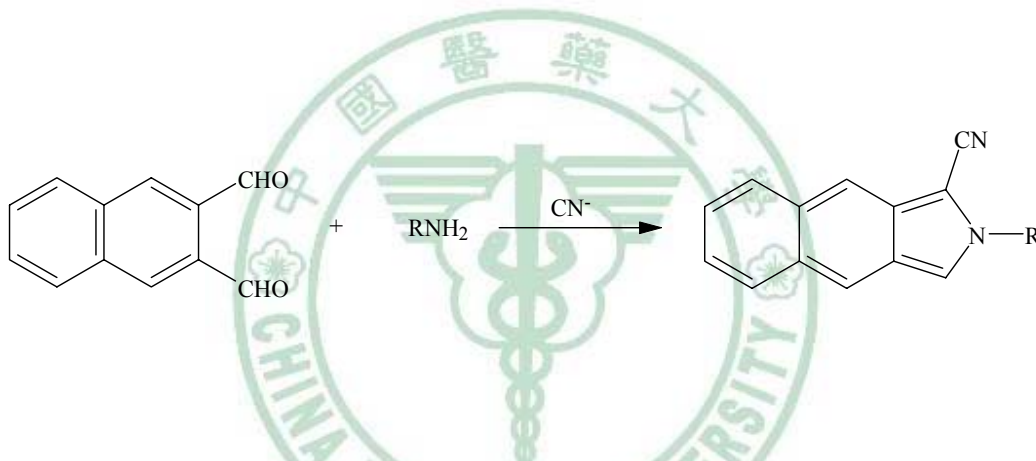


圖 6. AdoMet 之 isoindole 類螢光化合物形成原理。1998 年 Capdevila 以 naphthalenedialdehyde 及 cyanide 於 pH 9.0 反應 10 分鐘進行衍生。

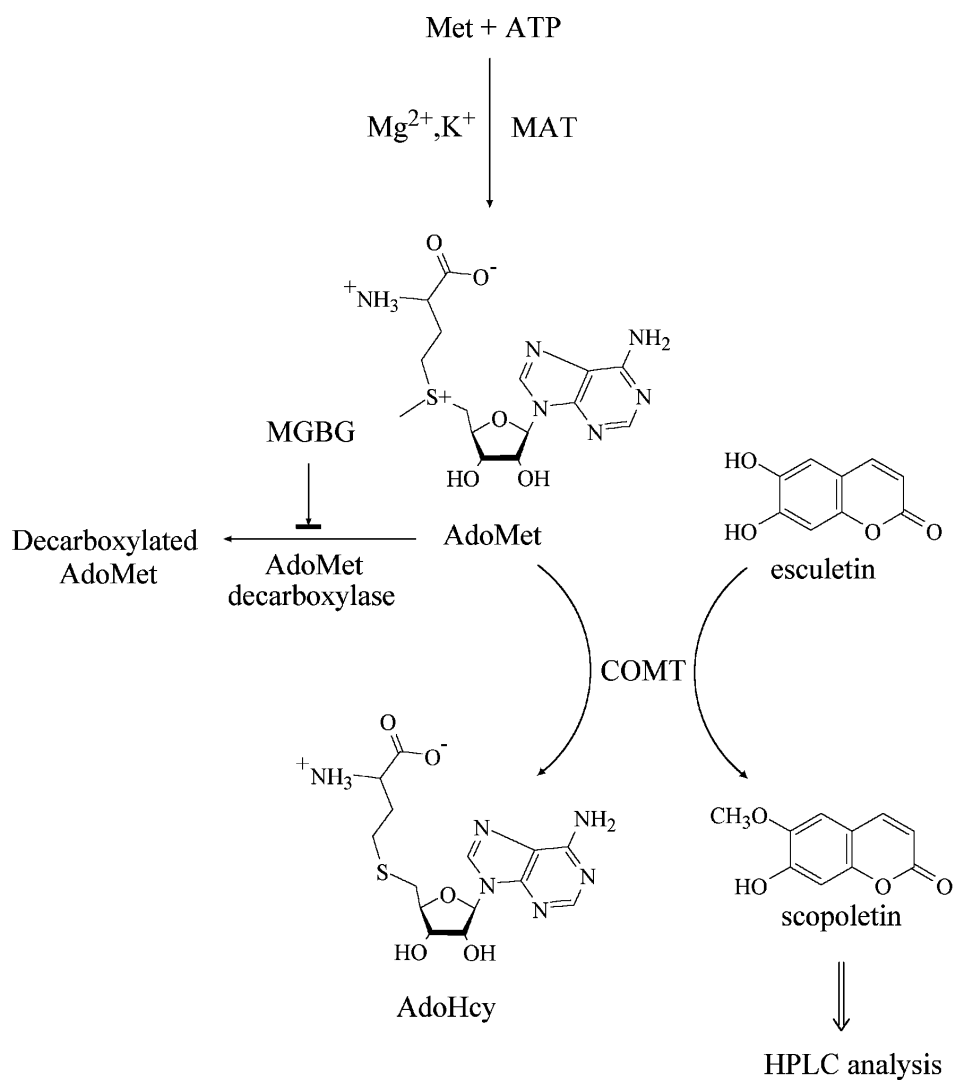
#### 4. BIACORE - Biomolecular Interaction Analysis

BIACORE 是應用表面薄膜共振技術 (surface plasmon resonance, SPR)，去分析生物分子間的相互作用，包括結合與解離的情形，雖然並不是真正的在檢測 MAT 酵素活性，不過卻也是一種 MAT 與受質，或者與抑制劑之結合親和力的探討方式。本所先前的研究中，也利用此設備與技術，探討了合成之 hemoregulatory peptide (HP) 系列衍生物對 MAT 酵素之結合作用[112]。表面薄膜共振技術是一種光學現象，先將分子鍵結到晶片上面，當另一種分子加入移動溶液，流經過晶片時，會因結合與未結合呈現不同的訊號，因而能夠很快速的初步了解，兩分子之間是否可能有結合作用力。



在酵素活性的測定方法中，酵素偶合 (enzyme-coupled) 法是在進行酵素反應時，另外加入一個以上的酵素，將欲檢測酵素之產物轉變成較安定，或者感度較高，或者較易分離的化合物，再進行分析，是一種間接的分析方法，亦曾應用於一些酵素的活性分析 [93-102]。

本研究開發了一個新的酵素偶合螢光分析方法，並應用 HPLC 作為定性定量的工具。我們利用 catechol-*O*-methyltransferase (COMT) 以及已知的 COMT 螢光受質 esculetin (ECL) [103-106] 來分析 MAT 活性與動力學常數測定。反應中 MAT 產生的 AdoMet 會被 COMT 轉移甲基給 ECL，接著經 HPLC 分析被甲基化的螢光物質 scopoletin (SPL)，進而評估 AdoMet 的產量及 MAT 的活性 (Scheme 1)。這個方法的評估及其可行性、優缺點將於本文陳述討論。



**Scheme 1.** Stepwise representation of the COMT-coupled fluorometric assay of MAT activity. The methyl group of AdoMet was transferred to esculetin by coupling with COMT and the formation of scopoletin was measured by HPLC fluorometric analysis. MGBG was used to prevent AdoMet from decarboxylation.

## 第二章 研究動機與目的

如上所述，MAT 是一個重要的酵素，在整個 methionine 代謝途徑中扮演了一個關鍵角色，它關係到細胞的增殖分化，基因表現，乃至於牽涉到許多疾病的發生包括心血管疾病、肥胖、帕金森氏症、老化以及癌症 [107-108]。

廖明徵博士提出的 methylation complex [49-52,83]，被認為是造成癌細胞不能進行終末分化的主因，本實驗室根據此理論基礎，從尿液抽取物以及合成相關化合物中，希望尋找到作用在此標的之理想有效的癌細胞分化誘導劑。

過去一直以放射線同位素的方法，進行 MAT<sup>LT</sup> 的抑制劑篩選，由於放射線同位素有環境污染以及對操作者有害的顧慮，而且目前並無一快速簡便，感度又高的分析方法可用於 MAT 的活性分析與動力學研究，所以著者嘗試開發螢光分析法，以期應用於 MAT 的相關研究。同時也希望這個方法將來能應用於臨床診斷以及抗憂鬱藥 AdoMet 的血中濃度分析。



### 第三章 實驗器材與方法

#### 第一節 實驗材料與儀器

##### (一) 化學藥品

1. 購自 New<sup>TM</sup> Life Science Products, INC 者

L-[methyl-<sup>3</sup>H] methionine (1 mCi/ml ; 70-85 Ci/mmol)

2. 購自 EcoLume 者

Cocktail

3. 購自 Sigma Chemical Co. (St.Louis , MO) 者

Adenosine 5'-triphosphate

Catechol-*O*-methyltransferase:

One unit will catalyze the methylation of 1.0 nmol of protocatechuic acid per h at pH 7.9 at 37°C.

Dimethyl sulfoxide

1,4-Dithiothreitol

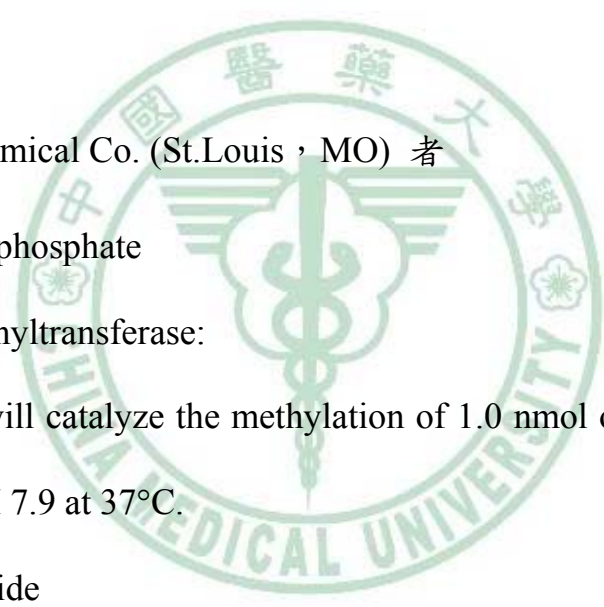
L-Methionine

Methylglyoxal bis-(guanylhydrazone) (MGBG)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

4. 購自西德默客 (Merk) 公司者

Ethanol



Hydrochloric acid

Isopropanol

Magnesium chloride

Methanol

Perchloric acid

Potassium chloride

Potassium dihydrogen phosphate

Sodium dihydrogen phosphate

Sodium hydroxide

Sulphuric acid

Tris(hydroxymethyl)aminomethane acetate

5. 購自 Aldrich 者

2,2'-Dithiobis(1-aminonaphthalene)

6. 購自日本東京化成 (TCI) 者

3,4-Dihydroxybenzaldehyde

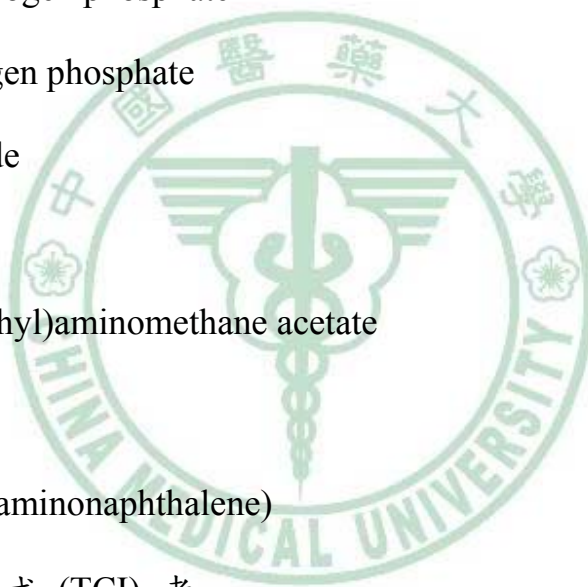
Esculetin

Scopoletin

Tri-*n*-butylphosphine

7. 購自 American biorganicx, INC 者

Piperazine-*N-N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)



8. 購自 Tedia Company, INC 者

Chloroform

Ethyl acetate

*n*-Hexane

Methanol

(二) 實驗儀器

Beckman 放射線自動偵測儀器 Model No: L96500

Homogenizer

HP 1050 Series of HPLC Modules

HP 1046A Programmable Fluorescence Detector

HP 3394A integrator

Incubator

Merck Lichrocart 125-4 Lichrospher Si 60 (5  $\mu$ m)

離心機 (Hettich zentrifugen)

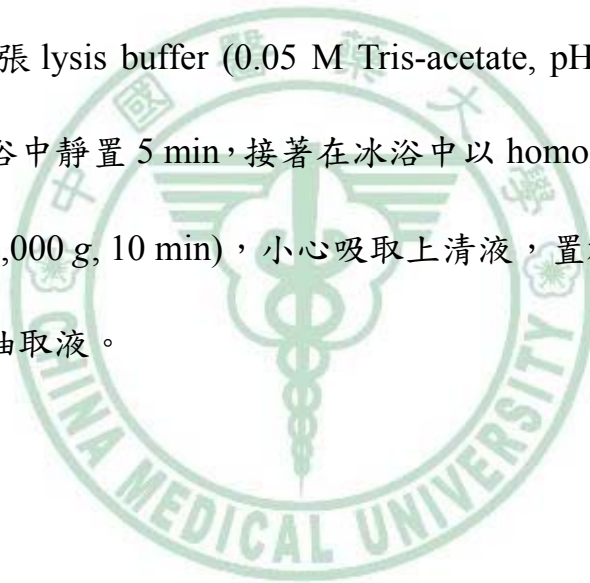
(三) 癌細胞株

HL-60 cell line: American Type Culture Collection (Maryland , USA)。

## 第二節 細胞培養與 MAT 酵素製備

HL-60 細胞懸浮培養於包含 15%胎牛血清之 RPMI 1640 培養液。培養環境控制維持於溫度 37°C、飽和溼度、以及 5% CO<sub>2</sub> [113]。

MAT 酵素溶液的製備，則取  $2 \times 10^7$  HL-60 cells，以 1 ml 含 0.25 M 蔗糖的高張 lysis buffer (0.05 M Tris-acetate, pH 7.0; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 清洗，離心 (4 °C, 1500 rpm, 3 min)，倒去上清液，沖洗第二次，離心 (4 °C, 300 g, 3 min)，再以不含蔗糖的低張 lysis buffer (0.05 M Tris-acetate, pH 7.0; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 充分混和後，於冰浴中靜置 5 min，接著在冰浴中以 homogenizer 將細胞打破，高速離心 (4 °C, 10,000 g, 10 min)，小心吸取上清液，置於 1.5-ml 離心管，此即含 MAT 酵素的抽取液。



### 第三節 MAT 活性分析方法

#### *Method I: Traditional Radioactive Method*

測定 MAT 酵素活性之放射性同位素檢測法原則上採用先前的研究方法 [114]。簡單來說，酵素反應液中包含了 10  $\mu$ l 酵素抽取液 (2.5  $\mu$ g of protein)、20  $\mu$ l 的酸鹼緩衝液 (500 mM PIPES, pH 7.0; 750 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub> and 25 mM DTT)、10  $\mu$ l 的 20 mM ATP、50  $\mu$ l 的去離子水，以及 10  $\mu$ l 的 1.2  $\mu$ M L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (0.1 mCi/ml)，最後反應液總體積為 100  $\mu$ l。空白試驗則是以不包含 ATP 時之檢測值作為參考值。酵素反應液於 37°C 下反應 30 分鐘，然後移至冰浴中，以 10  $\mu$ l 之 4 N HClO<sub>4</sub> 終止酵素反應。經過離心後 (3,000 g, 1 min)，90  $\mu$ l 的上清液被吸取出來轉移到 P-81 陽離子交換層析試紙上 (1×1 inch)。然後 P-81 陽離子交換層析試紙使用 100 ml 之 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 清洗十次，以去除含有放射性的受質 (L-Met)。乾燥後，P-81 試紙置於 5-ml counting vial，同時以 150  $\mu$ l 的 2 M KCl 將 <sup>3</sup>H-AdoMet 從試紙上沖洗出來，加入 3 ml 的閃爍計數液，利用  $\beta$ -counter 檢測其放射性含量。

### *Method II: COMT-coupled Method*

大致上來說，Method II 的酵素反應條件與 Method I 方法相同，不過不使用放射性物質，而是使用偶合酵素的方式進行。要配製成酵素反應液 100  $\mu\text{l}$ ，首先加入 10  $\mu\text{l}$  酵素抽取液 (2.5  $\mu\text{g}$  of protein)，20  $\mu\text{l}$  的酸鹼緩衝液 (500 mM PIPES, pH 7.0; 750 mM KCl; 25 mM  $\text{MgCl}_2$  and 25 mM DTT) 以及 20  $\mu\text{l}$  去離子水，並加入 10  $\mu\text{l}$  的 1 mM Methylglyoxal bis-(guanylhydrazone) (MGBG) 水溶液，用以防止 AdoMet 發生 decarboxylation 反應。接著，為了檢測 AdoMet 之生成，需加入 10  $\mu\text{l}$  的 50 units COMT 酵素溶液 (50 mM Tris-acetate; pH 7.0, and 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 使用前保存在  $-80^\circ\text{C}$ )，以及 10  $\mu\text{l}$  溶於 isopropanol:water (1:1, v/v) 之 10 mM esculetin。最後，10  $\mu\text{l}$  的 20 mM ATP 以及 10  $\mu\text{l}$  的 10 mM L-Met 加入酵素反應液中。空白試驗則是以不包含 ATP 時之檢測值作為參考值。酵素反應液經由 Vortex mixer 混合並稍微離心後 (300 g for 1 min)，在  $37^\circ\text{C}$  下反應 30 min，移至冰浴中，加入 100  $\mu\text{l}$  boric acid 飽和溶液終止酵素反應。Boric acid 同時也用於和 esculetin 的 catechol 部位反應形成水溶性鹽類。然後使用 300  $\mu\text{l}$  的 *n*-hexane:ethyl acetate (7:3, v/v) 萃取所生成之 scopoletin。接著混合液經過 Vortex 混合 1 min，經過離心 (1,500 g for 2 min) 使之分層，從上層有機溶媒層取出 40  $\mu\text{l}$  用於 HPLC 分析，並定量所生成之 scopoletin。

### *Calibration Curve for Method II*

使用 HPLC 進行分析已知量的 scopoletin，用以製作檢量線，酵素反應在理想條件下所測得 scopoletin 的量，可代表 AdoMet 之生成量。同時所測得的 scopoletin 定量時，以其回收率進行校正。MAT 酵素活性之表示，使用 units/mg protein，其中 1 unit 的蛋白定義為 1 小時內可生成 1 nmol AdoMet。

### *Kinetic Properties of MAT in HL-60 Cells*

MAT 酵素動力學則使用了所建立的 COMT 偶合螢光檢測液相層析法進行研究。MAT 受質 L-Met 濃度範圍從 1.6 到 1,000  $\mu\text{M}$ ，而 ATP 則固定在 2 mM。所得到的數據以 SigmaPlot 軟體之 Enzyme Kinetics Module (SPSS Science Inc.) 進行分析。MAT 動力學之作圖使用 Eadie-Hofstee plots，並且使用 Hill equation 進行回歸，以求得動力學參數。

### *HPLC System*

HPLC 系統使用 HP 1050 Series 之 HPLC Modules，配接 Merck Lichrocart 125-4 Lichrospher Si 60 (5  $\mu\text{m}$ ) 分析型管柱，層析結果則以 HP 1046A Programmable Fluorescence Detector (ex 347, em 415) 和 HP 3394A integrator 進行檢測和記錄。移動相是 dichloromethane : methanol : acetic acid (40:1:0.06,

v/v/v) 之混合溶液，流速為 1 ml/min。經過系列分析使用後，HPLC 系統則使用 ethyl acetate : methanol : acetic acid (40:1:0.06, v/v/v) 清洗 1 小時。

### *Assay of Protein*

利用 Bradford 方法 [109]，由 bovine serum albumin (BSA) 做標準蛋白溶液及 Bio-Rad 蛋白質 assay kit 當反應之染料。配置各個已知濃度之標準液，以分光光度計 (spectrophotometer)，設定波長 595 nm，檢測其吸光度，做成檢量線，再標定欲測定之酵素製劑。





## 第四章 結果與討論

使用 HPLC 以及 UV 檢測器去分析 MAT 酵素活性通常都達不到理想的感度而無法檢測。此外，AdoMet 相當容易吸潮而且不安定，根據研究，純化過的 (*S,S*)-AdoMet 在 37°C、pH 7.5 環境下 4 小時後可能已經衰減 14%。其中分解後可產生 adenine、*S*-pentosylmethionine、5'-deoxy-5'-(methylthio) adenosine、homoserine lactone 以及無生理活性的 (*R,S*)-AdoMet stereoisomer [115]。這也代表著，在分析過程中如果歷經太長時間的酵素反應以及檢品處理，AdoMet 亦將自行衰減並且產生更多干擾分析的產物。因此，AdoMet 要準確定量並不容易，而且也不適合作為參照標準品 (reference standard)。要克服這些困難，則可以利用偶合酵素的方式，將 COMT 加入於 MAT 的酵素反應中，當 AdoMet 產生後，隨即被 COMT 將其甲基轉移至 esculetin，因而克服 AdoMet 變質分解而影響定量的問題。此外，所生成的 scopoletin 較安定而且具有高螢光性質，定性定量上都容易許多，故在最佳化的酵素反應條件下，採用 scopoletin 當作定量 AdoMet 之參照標準品是較適當的，在應用上也較簡便。

### *Evaluation of the COMT-coupled Reaction*

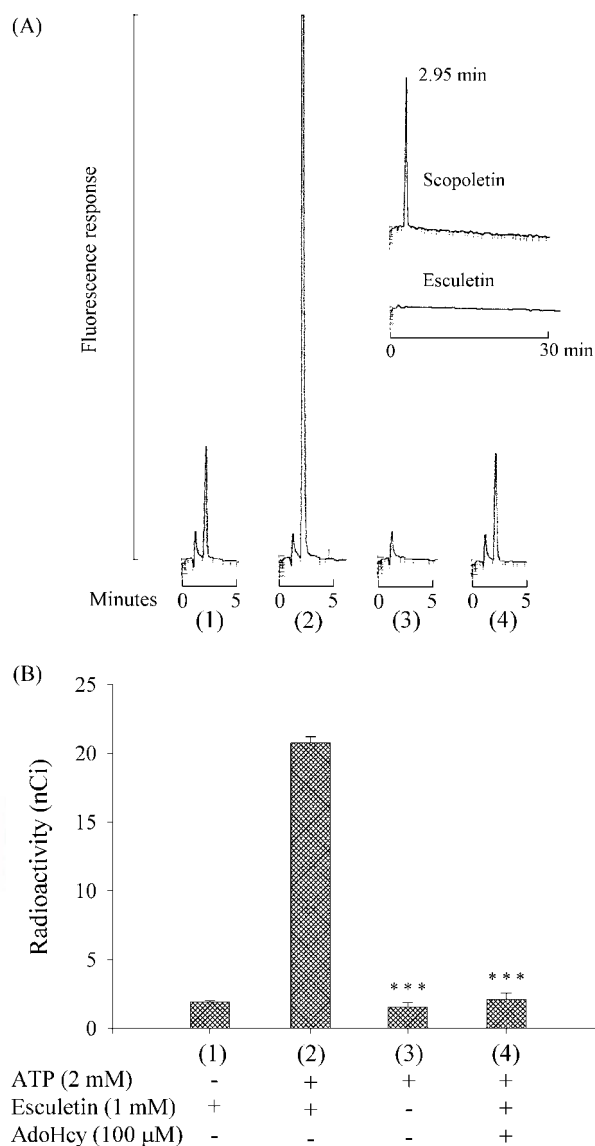
在 COMT 耦合的方法中，由於 esculetin 水溶解度不佳，因此溶於 isopropanol:water (1:1, v/v)。最後酵素反應液裡共含有 5% 的 isopropanol，經過驗證，其對酵素反應沒有抑制作用。參照標準品 scopoletin 溶液平時儲存於 -20°C 中，其安定性至少能維持一個月。Scopoletin 溶解在移動相溶液中，其螢光之激發波長與放射波長分別為 347 及 415 nm。標準品之 HPLC 分析，使用 2 pmol scopoletin 以及 20 pmol 的 esculetin。Scopoletin 的滯留時間約為 2.95 min，而 esculetin 則滯留於 Si 60 管柱 (圖 7A, inset) 至少超過 30 min。為了避免過量的 esculetin 積存於管柱內，加入 100 µl 的 boric acid 飽和溶液，除了可終止酵素反應外，還具有和 esculetin 反應形成高水溶性鹽類的功能，使 esculetin 在萃取過程中停留於水層。萃取過程中，esculetin 的回收率少於 1%，而 scopoletin 則約為 80%。

為了確認 Method II 中耦合酵素之機轉，酵素反應分別在 ATP (2 mM)、esculetin (1 mM) 以及 *S*-adenosylhomocystein (AdoHcy; 100 µM) 存在與否的條件下進行分析。AdoHcy 是強效的非專一性 COMT 競爭性抑制劑，能和 AdoMet 競爭 (圖 7A)。同樣的實驗，也以 10 µl 的 1.2 µM L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (0.1 mCi/ml) 代替 10 µl 的 10 mM 非放射性 L-Met 重複驗證 (圖 7B)，如此則能利用放射性同位素標定甲基的 L-Met，追蹤其甲基

在 COMT 偶合酵素法測定 MAT 酵素活性過程中的流向。

在 COMT 偶合方法當中，當使用 L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine 作為 MAT 受質時，其步驟如 Method II 所描述。但是當反應結束後，改以 300  $\mu$ l 的 *n*-hexane:ethyl acetate (7:3, v/v) 進行萃取，100  $\mu$ l 的上層有機溶液轉移到 5-ml 的計數瓶，加入 3 ml 的閃爍計數液，混合後進行放射性強度的檢測。Scopoletin 的生成量，以放射性強弱表示。

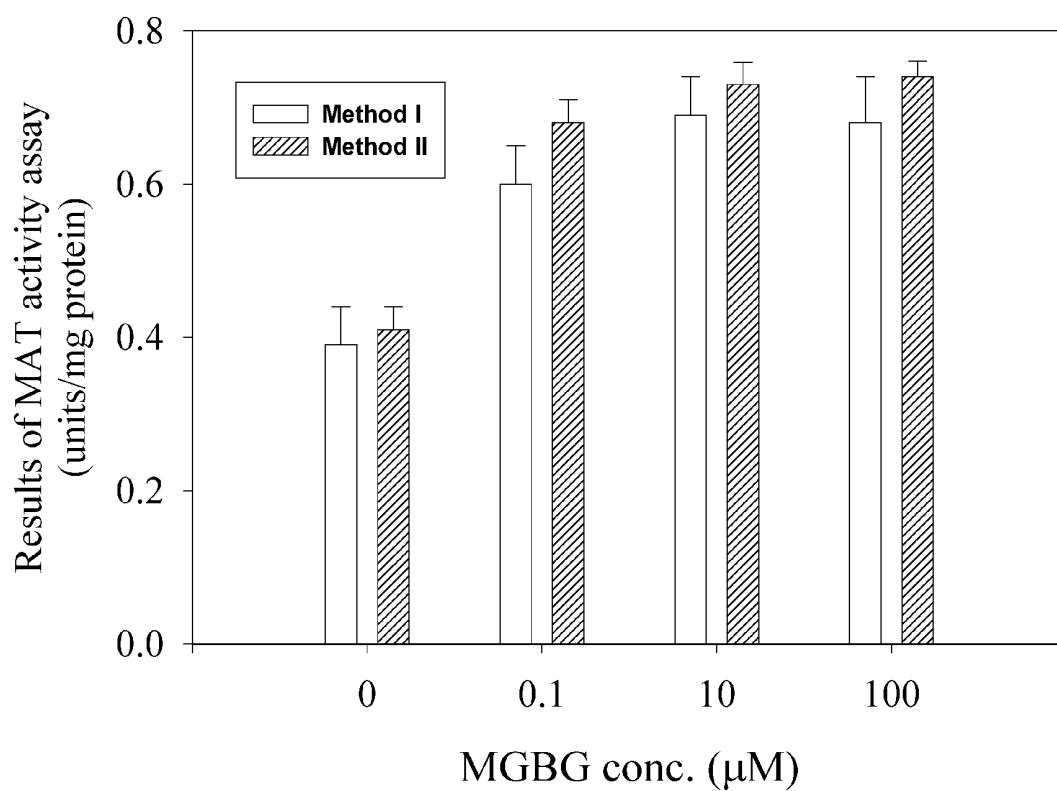
在 COMT 偶合酵素之螢光分析法中，空白實驗酵素反應液沒有加入額外的 ATP 時 (圖 7A(1)) 有微量的 scopoletin 被檢測到。這可能來自於細胞抽取液中微量的 AdoMet、ATP 以及部分存在於 esculetin 之雜質。當酵素反應液中沒有加入 esculetin 時，則也沒有任何 scopoletin 被檢測到 (圖 7A(3))。另外，當 100  $\mu$ M AdoHcy 加入酵素反應液中，scopoletin 的生成跟控制組比較，明顯地被阻斷 (圖 7A(4))。這些結果顯示，scopoletin 的生成，完全同時依賴於 MAT 和 COMT 的活性。同樣的結果也可在使用 radioactive L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine 當作 MAT 受質之實驗觀察到 (圖 7B)。因此 COMT 偶合酵素檢測 MAT 酵素活性的機轉可以得到進一步的確認。



**图 7.** Confirmation of the mechanism of the COMT-coupled reaction in MAT activity determination. The different conditions for each reaction were (1) blank, lacking in ATP, (2) control, MAT activity measured in (A) and (B) was 122 units/mg protein and 0.74 units/mg protein, respectively, (3) lacking in esculetin and (4) in the presence of 100 μM AdoHcy. (A) HPLC chromatograms with fluorometric detection. A 10-μl aliquot of 10 μM L-Met was used as substrate, and the procedure was described in Method II. Inset shows the retention time of 2 pmol of scopoletin was 2.95 min and 20 pmol of esculetin strongly retained in Si 60 column over 30 min. (B) The same experiments were repeated, but a 10-μl aliquot of 1.2 μM L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (0.1 mCi/ml) was used instead. The other conditions were the same as Method II, but after the reaction was terminated and the reaction mixture was extracted with 300 μl of *n*-hexane:ethyl acetate (7:3, v/v), 100 μl of upper organic layer was used to count radioactive intensity. Other details are described in the text. Values are represented as mean ± S.D. of three experiments. Significant differences were calculated using Student's unpaired *t*-test. \*\*\* *P* < 0.001 compared to (2).

### *Effect of MGBG on the Determination of MAT Activity in Method I and Method II*

在過去許多研究測定 MAT 酵素活性時，使用的傳統分析方法中，AdoMet decarboxylase 抑制劑都沒有被加入到酵素反應液裡。然而 AdoMet decarboxylase 勢必存在細胞抽取液當中，而且可能會減少 MAT 活性測定時所能檢測得到的 AdoMet 之量。所以 MGBG 在這個研究裡，被使用來阻斷 AdoMet decarboxylase 之活性。為了探討 MGBG 對 COMT 偶合酵素法檢測 MAT 酵素活性時之影響，同樣利用 10  $\mu$ l 的 1.2  $\mu$ M L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (0.1 mCi/ml) 當作 MAT 受質，並分別使用 Method I 以及 Method II 進行分析比較 (圖 8)。其結果顯示 100  $\mu$ M 的 MGBG 存在於酵素反應液中時，能有效阻斷 AdoMet decarboxylase 之活性，而使 COMT 偶合酵素的方法達到檢測的最大值。同樣的反應條件下，Method II 檢測到的值似乎比 Method I 還要高一些，這表示 Method I 在清洗 P-81 試紙過程中，難免有 AdoMet 流失掉，這個實驗也同時看得出，COMT 偶合酵素能夠有效轉換非常微量的 AdoMet。此外，兩種方法都顯示，在 100  $\mu$ M 的 MGBG 存在時，所測得之 MAT 酵素活性，大約是沒有 MGBG 時所測得之兩倍。很明顯地，在過去的研究方法中，如果使用了沒有純化的酵素溶液，又沒有阻斷 AdoMet 之 decarboxylation，將造成很大的誤差。因此，從細胞抽取液中測定 MAT 酵素活性時，使用 MGBG 是不可或缺的。



**圖 8.** The effect of MGBG on the results of COMT-coupled method (Method II) and traditional method (Method I). A 10- $\mu\text{l}$  aliquot of 1.2  $\mu\text{M}$  L-[methyl- $^3\text{H}$ ]methionine (0.1 mCi/ml) was used as substrate for both methods, and the radioactivity of  $^3\text{H}$ -AdoMet or  $^3\text{H}$ -scopoletin was measured. Values are represented as mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

### *Effect of COMT Concentration and Time-Course of Scopoletin Formation*

這裡針對 COMT 使用量以及 scopoletin 生成之 time-course (10-60 min) 進行探討。圖 9 表示 Method II 中使用 50 units 的 COMT 是足量的。Scopoletin 生成之 time-course 顯示 COMT 偶合酵素法中，30-min 的反應時間介於良好的線性範圍之內 (圖 10)。這些結果顯示，不論是 substrate depletion (L-Met, ATP or esculetin) 或者是 product accumulation (AdoMet or AdoHcy) 在 Method II 條件之分析過程中，都不會造成反應速率的限制與干擾。



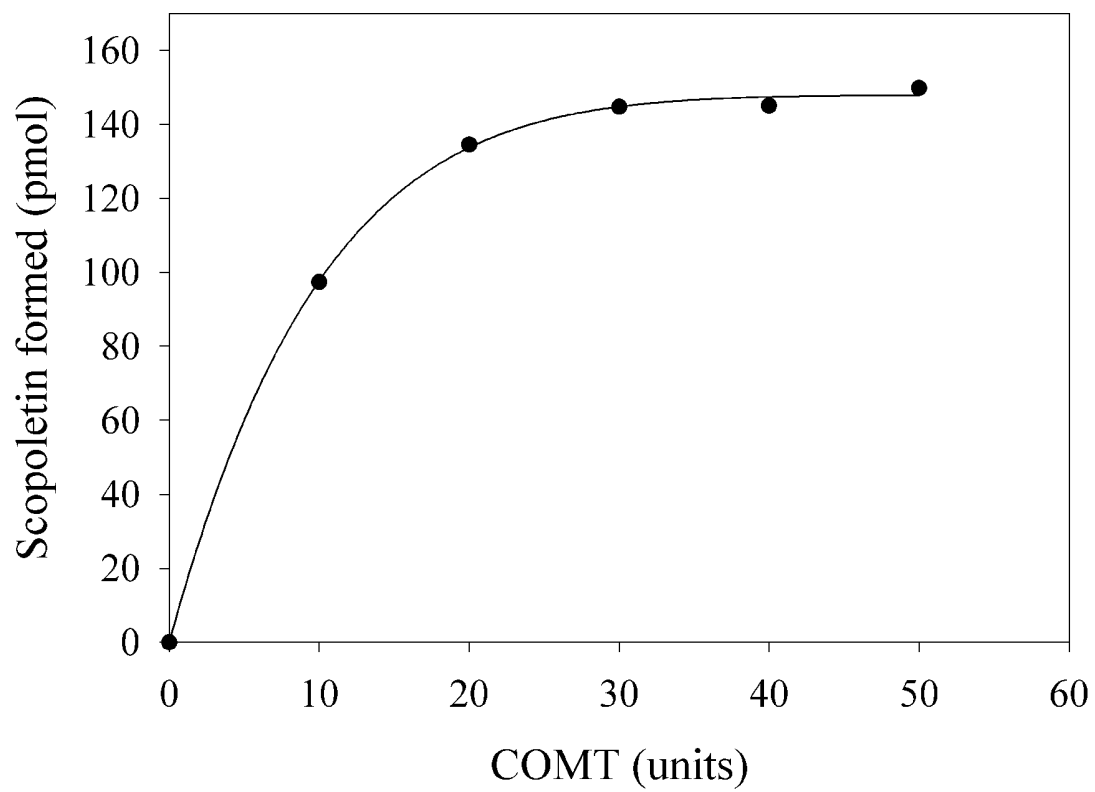


圖 9. The effect of the quantity of COMT on scopoletin formation.



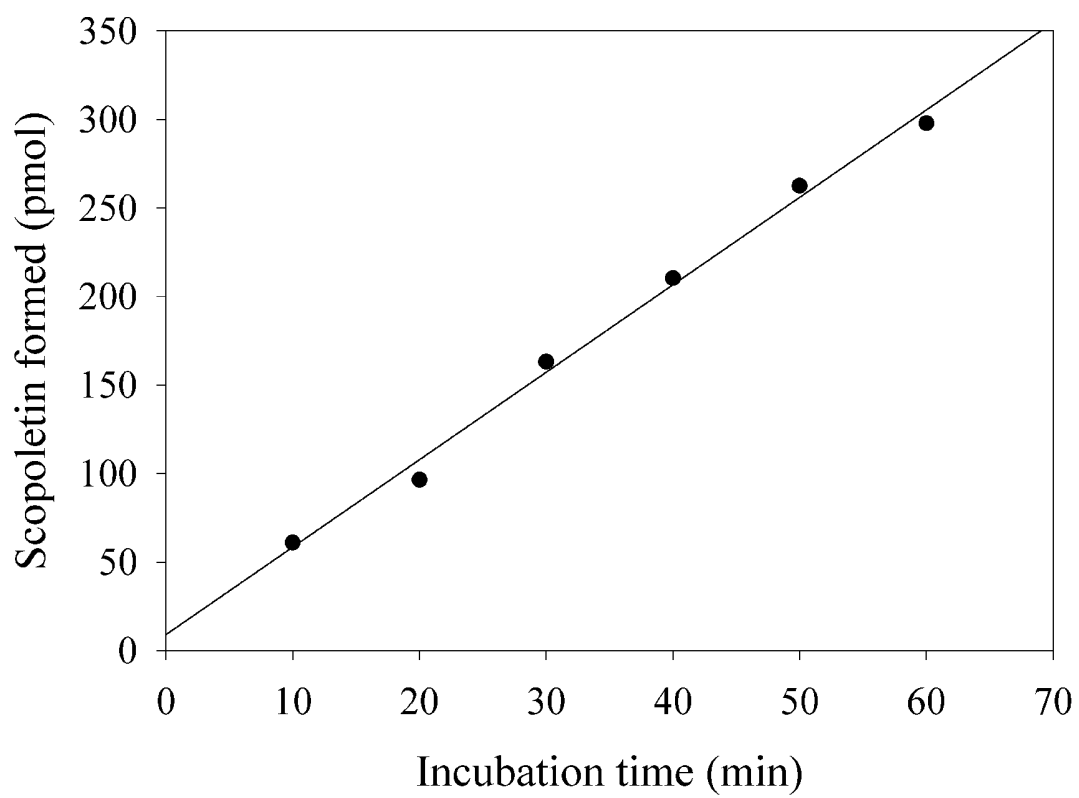


圖 10. Time-course of scopoletin formation. ( $R^2 = 0.9933$ ).

### *Validation of the Conversion Efficiency of COMT-coupled Method*

Method II 所描述的檢測條件裡，COMT 偶合酵素轉換 AdoMet 的效能以及 50 units 之 COMT 在 30-min 內所能轉換 (*S,S*)-AdoMet 量的限制範圍也被研究探討。由於只有 (*S,S*)-AdoMet epimer 具有生理功能而當作甲基轉移酵素的受質，因此，要進行確效前，必須先對標準品 AdoMet 進行 (*S,S*)-AdoMet 定量，方法是依據 L.K. Revelle 所描述之方法，使用 NMR 定量 [116]。結果顯示，50 units 的 COMT 至少能夠依線性地有效轉換 50 到 500 pmol 範圍內的 (*S,S*)-AdoMet，其 conversion coefficient 為  $101 \pm 5.6\%$  (圖 11)。



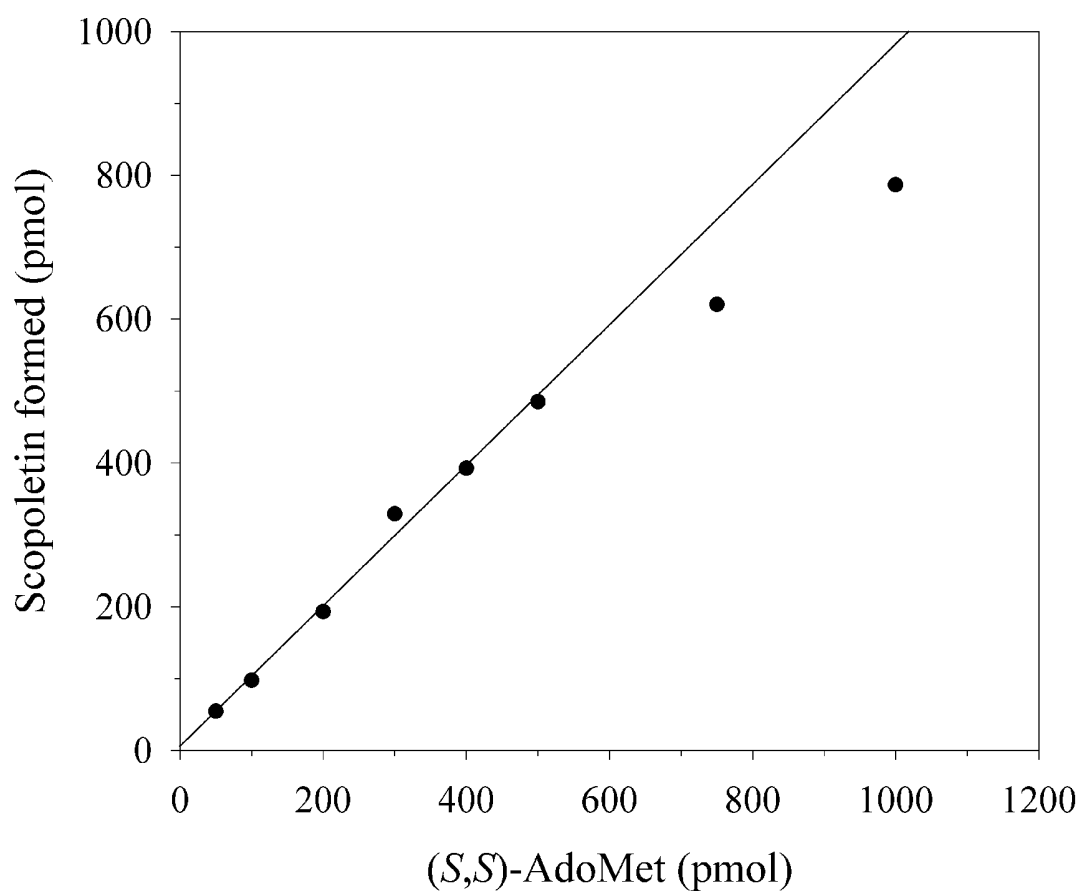


圖 11. Validation of the conversion efficiency of COMT-coupled method. The conversion efficiency and the quantity limit of (S,S)-AdoMet were investigated with 50 units of COMT in 30 min. The converting ability of 50 units COMT is linear from 50 to at least 500 pmol of (S,S)-AdoMet with the conversion coefficient of  $101 \pm 5.6\%$ .

### *Determination of MAT Activity*

MAT 活性之測定，是在理想條件下，以檢測到之 scopoletin 的量進行計算。已知量的 scopoletin 使用 HPLC 分析得到檢量線，其檢測極小值約為 100 fmol，而且 scopoletin 之螢光強度與其濃度呈現良好的線性關係 (圖 12)。

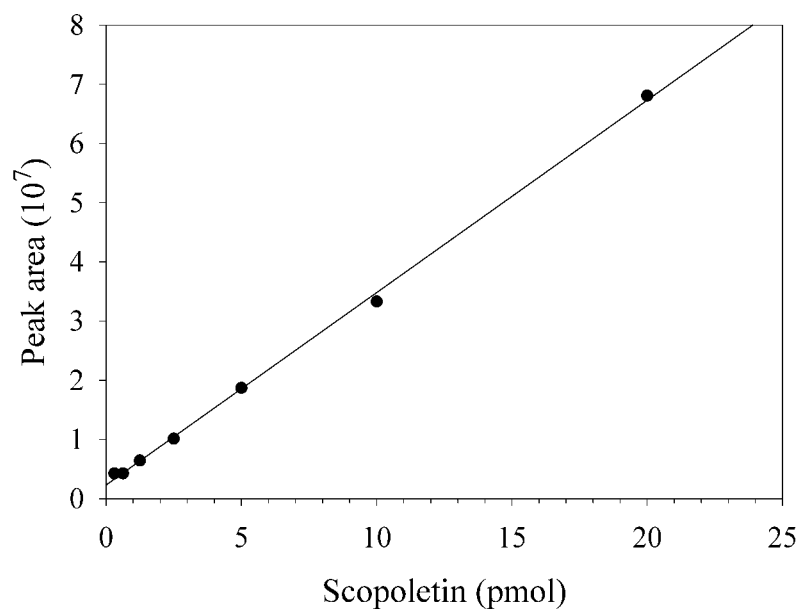


圖 12. Scopoletin 檢量線。

### *Activity and Kinetic Properties of MAT in HL-60 Cells*

依據本研究所設定的 COMT 偶合酵素之反應條件，對細胞抽取液中蛋白質含量以及 MAT 酵素活性測定值之線性關係進行研究，圖 13 顯示，0.5 到 7.5  $\mu\text{g}$  的細胞抽取蛋白量和所測得之 MAT 酵素催化速率呈現良好的線性關係，而本研究使用的蛋白質量介於良好線性範圍之內。

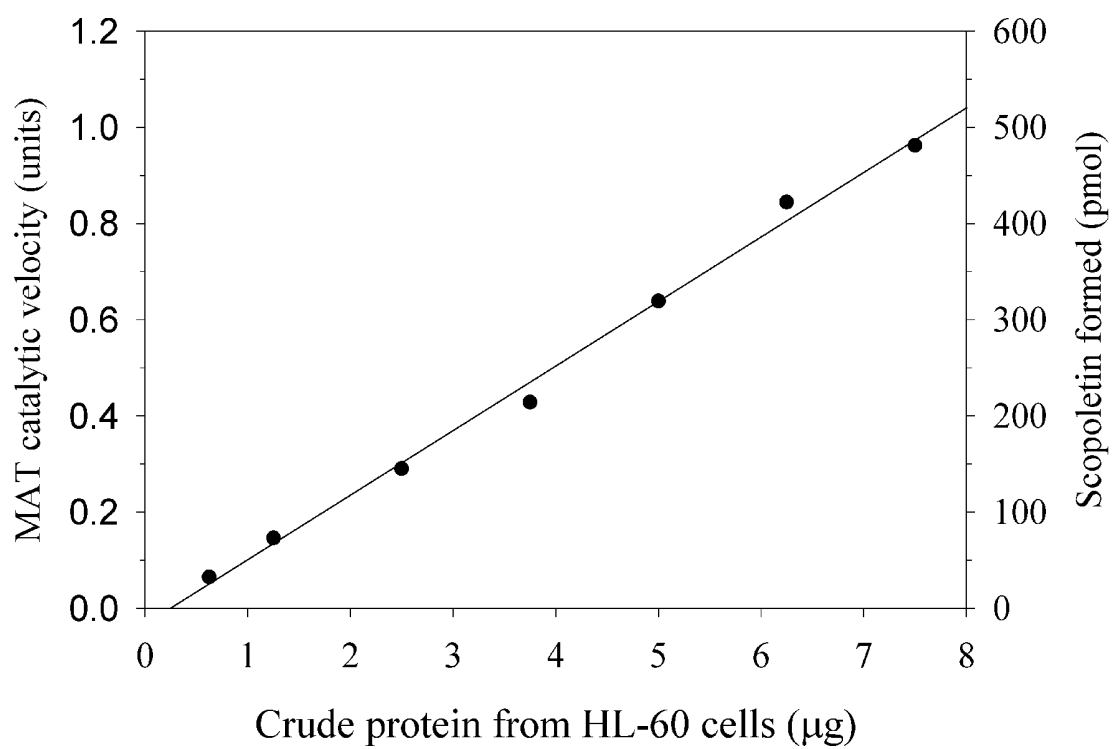
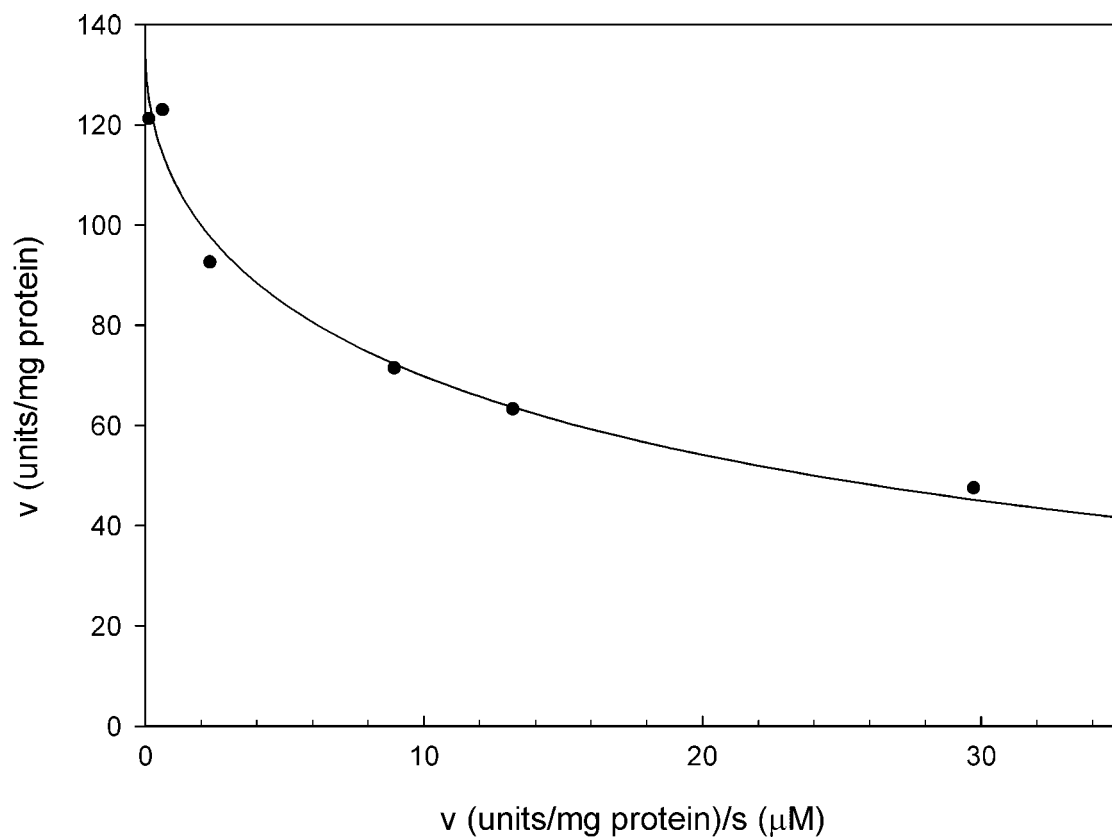


圖 13. Linear correlation between enzyme activity and the amount of MAT.

接者，利用本研究建立的 COMT 偶合酵素螢光分析法，針對 HL-60 之 MAT 活性以及酵素動力學特性進行研究。結果所得之酵素動力學數據使用 Eadie-Hofstee plots 作圖表示，並且使用 Hill equation 進行回歸分析( $v = 135.4s^{0.5}/(6.1^{0.5} + s^{0.5})$ ;  $v$ : units/mg protein,  $s$ :  $\mu\text{M}$  of L-Met) (圖 14)。這些結果顯示，HL-60 細胞內所含之 MAT 酵素呈現了 negative cooperativity，其 Hill coefficient 為 0.5，這個結果和先前的 MAT II isozyme 的動力學研究相類似 [24]。在 200  $\mu\text{M}$  的 L-Met 存在下，MAT 達到反應速率的最大值。計算所得之  $V_{\max}$  為  $135.4 \pm 1.5$  units/mg protein，和其他正常組織比較起來，高出了許多 (erythrocytes 約  $13.9 \times 10^{-3}$  units/mg protein；parietal cortex 約 25.72 units/mg protein) [108, 110]。而計算所得之  $K_m$  為  $6.1 \pm 0.3$   $\mu\text{M}$ ，這個數據則和先前研究 human leukemia cells (3.5-20  $\mu\text{M}$ ) 的數據相似 [27]。綜合以上所述，HL-60 細胞中的 MAT，呈現明顯的 negative cooperativity 以及特別高的酵素活性，都可能表示有異常的 MAT 酵素的表現，或者有其他型式的 MAT 存在於 HL-60 細胞中。



**Figure 14.** Eadie-Hofstee plots of kinetic properties of MAT in HL-60 cells. MAT activity was assayed by COMT-coupled fluorometric method. The concentration of ATP was fixed at 2 mM and L-Met was varied from 1.6 to 1,000  $\mu\text{M}$ . The data were analyzed by SigmaPlot software with Enzyme Kinetics Module. The Eadie-Hofstee plots and Hill equation were used for kinetic analyses.

## 第五章 結論

在 MAT 的研究領域上還有很多是未知的，而其在醫藥上也扮演重要角色。由於過去 MAT 活性分析除了放射線同位素法外，一直缺少一個高感度，又簡便的分析方法。本研究我們建立了一個酵素偶合螢光檢測之液相層析法來分析 MAT 酵素活性及酵素動力學常數。這個方法利用 catechol-*O*-methyltransferase 將 AdoMet 上的甲基轉移到 esculetin 上形成 scopoletin，接者利用 HPLC 螢光檢測分析這些被甲基化的生成物，進而檢測出 MAT 的活性及酵素動力學常數。並測得 HL-60 MAT 的  $K_m = 6.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ， $V_{\max} = 135.4 \pm 1.5 \text{ nmole AdoMet/mg protein/hr}$ 。

這個方法感度高，對 AdoMet 有專一性，分析時干擾少，過程簡便快速，花費便宜，故此法在 MAT 活性分析以及酵素動力學研究上，提供了一個較好的選擇，將來也可試著應用於臨床診斷與抗憂鬱藥 AdoMet 血中濃度監測。



## 參考文獻

1. Tabor, C.W. and Tabor, H. Methionine adenosyltransferase (*S*-adenosylmethionine synthetase) and *S*-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, 1984;56:251-282.
2. Kotb, M. and Geller, A.M. Methionine adenosyltransferase: structure and function. *Pharmacol. Ther.*, 1993;59(2):125-143.
3. Mato, J.M., Alvarez, L., Ortiz, P. and Pajares, M.A. *S*-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol. Ther.*, 1997;73(3):265-280.
4. Mudd, S.H. and Cantoni, G.L. Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of Bakers' yeast. *J. Biol.Chem.*, 1958;231:481-492.
5. Markham, G.D., DeParasis, J. and Gatmaitan, J. The sequence of *metK*, the structural gene for *S*-adenosylmethionine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1984;259(23):14505-14507.
6. Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. SAM1, the structural gene for one of the *S*-adenosylmethionine synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequence and expression. *J. Biol. Chem.*, 1987;262(34):16704-16709.

7. Peleman, J., Saito, K., Cottyn, B., Engler, G., Seurinck, J., Van Montagu, M. and Inze, D. Structure and expression analyses of the *S*-adenosyl methionine synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 1989;84(2):359-369.
8. Peleman, J., Boerjan, W., Engler, G., Seurinck, J., Botterman, J., Alliotte, T., Van Montagu, M. and Inze, D. Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding *S*-adenosylmethionine synthetase. *Plant. Cell.*, 1989;1(1):81-93.
9. Alvarez, L., Corrales, F., Martin-Duce, A. and Mato, J.M. Characterization of a full-length cDNA encoding human liver *S*-adenosylmethionine synthetase: tissue-specific gene expression and mRNA levels in hepatopathies. *Biochem. J.*, 1993;293 (Pt 2):481-486.
10. Horikawa, S. and Tsukada, K. Molecular cloning and developmental expression of a human kidney *S*-adenosylmethionine synthetase. *FEBS Lett.*, 1992;312(1):37-41.
11. Horikawa, S., Ishikawa, M., Ozasa, H. and Tsukada, K. Isolation of a cDNA encoding the rat liver *S*-adenosylmethionine synthetase. *Eur. J. Biochem.*, 1989;184(3):497-501.

12. Horikawa, S., Sasuga, J., Shimizu, K., Ozasa, H. and Tsukada, K. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the rat kidney *S*-adenosylmethionine synthetase. *J. Biol. Chem.*, 1990;265(23):13683-13686.
13. Horikawa, S. and Tsukada, K. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the human liver *S*-adenosylmethionine synthetase. *Biochem. Int.*, 1991;25(1):81-90.
14. Sakata, S.F., Shelly, L.L., Ruppert, S., Schutz, G. and Chou, J.Y. Cloning and expression of murine *S*-adenosylmethionine synthetase. *J. Biol. Chem.*, 1993;268(19):13978-13986.
15. De La Rosa, J., Ostrowski, J., Hryniewicz, M.M., Kredich, N.M., Kotb, M., LeGros, H.L. Jr., Valentine, M. and Geller, A.M. Chromosomal localization and catalytic properties of the recombinant alpha subunit of human lymphocyte methionine adenosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 1995;270(37):21860-21868.
16. Kotb, M., Mudd, S.H., Mato, J.M., Geller, A.M., Kredich, N.M., Chou, J.Y. and Cantoni, G.I. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet.*, 1997;13(2):51-52.

17. van Faassen, H. and Berger, R. Separation of different forms of *S*-adenosylmethionine synthetase by fast protein liquid chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 1990 Mar;20(3):189-194.
18. Gil, B., Casado, M., Pajares, M.A., Bosca, L., Mato, J.M., Martin-Sanz, P. and Alvarez, L. Differential expression pattern of *S*-adenosylmethionine synthetase isoenzymes during rat liver development. *Hepatology*, 1996 Oct;24(4):876-881.
19. Alvarez, L., Mingorance, J., Pajares, M.A. and Mato, J.M. Expression of rat liver *S*-adenosylmethionine synthetase in *Escherichia coli*. results in two active oligomeric forms. *Biochem. J.*, 1994;301 ( Pt 2):557-561.
20. Cabrero, C., Puerta, J. and Alemany, S. Purification and comparison of two forms of *S*-adenosyl-L-methionine synthetase from rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 1987;170(1-2):299-304.
21. Takusagawa, F., Kamitori, S. and Markham, G.D. Structure and function of *S*-adenosylmethionine synthetase: crystal structures of *S*-adenosylmethionine synthetase with ADP, BrADP, and *PPi* at 2.8 angstroms resolution. *Biochemistry*, 1996;35(8):2586-2596.
22. Mingorance, J., Alvarez, L., Pajares, M.A. and Mato, J.M. Recombinant rat

- liver *S*-adenosyl-L-methionine synthetase tetramers and dimers are in equilibrium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997;29(3):485-491.
23. Hoffman, J.L. Fractionation of methionine adenosyltransferase isozymes (rat liver). *Methods Enzymol.*, 1983;94:223-228.
24. Sullivan, D.M. and Hoffman, J.L. Fractionation and kinetic properties of rat liver and kidney methionine adenosyltransferase isozymes. *Biochemistry*, 1983;22(7):1636-1641.
25. Suma, Y., Shimizu, K. and Tsukada, K. Isozymes of *S*-adenosylmethionine synthetase from rat liver: isolation and characterization. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1986;100(1):67-75.
26. Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Pao, V.Y., Pearlstein, R.A. and Yang Chou, J. Structural requirements for catalysis and dimerization of human methionine adenosyltransferase I/III. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000;373(1):56-62.
27. Kotb, M. and Kredich, N.M. *S*-Adenosylmethionine synthetase from human lymphocytes. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 1985;260(7):3923-3930.
28. Halim, A.B., LeGros, L., Geller, A. and Kotb, M. Expression and functional interaction of the catalytic and regulatory subunits of human methionine

- adenosyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 1999;274(42):29720-29725.
29. Wabiko, H., Ochi, K., Nguyen, D.M., Allen, E.R. and Freese, E. Genetic mapping and physiological consequences of metE mutations of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 1988;170(6):2705-2710.
30. Geller, A.M., Legros, H.L., Wherry, K. and Kotb, M.Y. Inhibition of methionine adenosyltransferase by the polyamines. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997;345(1):97-102.
31. Latasa, M.U., Boukaba, A., Garcia-Trevijano, E.R., Torres, L., Rodriguez, J.L., Caballeria, J., Lu, S.C., Lopez-Rodas, G., Franco, L., Mato, J.M. and Avila, M.A. Hepatocyte growth factor induces *MAT2A* expression and histone acetylation in rat hepatocytes: role in liver regeneration. *FASEB J.*, 2001;15(7):1248-1250.
32. Torre, L., Lopez-Rodas, G., Latasa, M.U., Carretero, M.V., Boukaba, A., Rodriguez, J.L., Franco, L., Mato, J.M. and Avila, M.A. DNA methylation and histone acetylation of rat methionine adenosyltransferase 1A and 2A genes is tissue-specific. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000;32(4):397-404.
33. Gil, B., Pajares, M.A., Mato, J.M. and Alvarez, L. Glucocorticoid regulation

- of hepatic *S*-adenosylmethionine synthetase gene expression. *Endocrinology*, 1997;138(3):1251-1258.
34. Castro, C., Ruiz, F.A., Perez-Mato, I., Sanchez del Pino, M.M., LeGros, L., Geller, A.M., Kotb, M., Corrales, F.J. and Mato, J.M. Creation of a functional *S*-nitrosylation site in vitro by single point mutation. *FEBS Lett.*, 1999;459(3):319-322.
35. Perez-Mato, I., Castro, C., Ruiz, F.A., Corrales, F.J. and Mato, J.M. Methionine adenosyltransferase *S*-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *J. Biol. Chem.*, 1999;274(24):17075-17079.
36. Ruiz, F., Corrales, F.J., Miqueo, C. and Mato, J.M. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase In vivo by *S*-nitrosylation. *Hepatology*, 1998;28(4):1051-1057.
37. Corrales, F.J., Ruiz, F. and Mato, J.M. In vivo regulation by glutathione of methionine adenosyltransferase *S*-nitrosylation in rat liver. *J. Hepatol.*, 1999;31(5):887-894.
38. Gomes Trolin, C., Ekblom, J. and Oreland, L. Regulation of methionine adenosyltransferase catalytic activity and messenger RNA in SH-SY5Y

- human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 1998;55(5):567-571.
39. Fu, Z., Hu, Y., Markham, G.D. and Takusagawa, F. Flexible loop in the structure of *S*-adenosylmethionine synthetase crystallized in the tetragonal modification. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1996;13(5):727-739.
40. Cai, J., Sun, W.M., Hwang, J.J., Stain, S.C. and Lu, S.C. Changes in *S*-adenosylmethionine synthetase in human liver cancer: molecular characterization and significance. *Hepatology*, 1996;24(5):1090-1097.
41. Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K. and McCann, P.P. *S*-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.*, 1996;10:471-480.
42. Tajima, S. and Suetake, I. Regulation and function of DNA methylation in vertebrates. *Biochem. (Tokyo)*, 1998;123(6):993-999.
43. Schmutte, C. and Jones, P.A. Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. *Biol. Chem.*, 1998;379(4-5):377-388.
44. Zingg, J.M. and Jones, P.A. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1997;18(5):869-882.
45. Momparler, R.L., Cote, S. and Eliopoulos, N. Pharmacological approach for



- optimization of the dose schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) for the therapy of leukemia. *Leukemia*, 1997;11(2):175-180.
46. Tutt Landolfi, M.M., Scollay, R. and Parnes, J.R. Specific demethylation of the CD4 gene during CD4 T lymphocyte differentiation. *Mol. Immunol.*, 1997;34(1):53-61.
47. Bender Christina, M., Zingg Jean-Marc and Jones Peter, A. DNA methylation as a target for drug design. *Pharmaceutical Research*, 1998;15(2):175-187.
48. Potter, V.R., Phenotypic diversity in experimental hepatoma concept of partially blocked ontogeny. *Br. J. Cancer.*, 1978;38:1.
49. Liau, M.C., Chang, C.F. and Giovanella, B.C. Demonstration of an altered S-adenosylmethionine synthetase in human malignant tumors xenografted into athymic nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1980;64:1071.
50. Liau, M.C., Chang, C.F., Saunders, G.F. and Tsai, Y.H. S-adenosylhomocysteine hydrolases as the primary target enzymes in androgen regulation of methylation complexes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981;208:261.
51. Liau, M.C. and Burzynski, S.R. Altered methylation complex isozymes as

- selective targets for cancer chemotherapy. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 1986;12 Suppl 1:77-86.
52. Liao, M.C., Hunt, M.E. and Hurlbert, R.B. Role of ribosomal RNA methylases in the regulation of ribosome production. *Biochem.*, 1976, 15:3158.
53. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. and Reed, J.C. *bcl-2* gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1993;82(6):1820-1828.
54. Crossen, P.E. and Morrison, M.J. Hypermethylation of the M27beta (DXS255) locus in chronic B-cell leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 1998;100(1):191-193.
55. Iravani, M., Dhat, R. and Price, C.M. Methylation of the multi tumor suppressor gene-2 (MTS2, CDKN1, p15INK4B) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, 1997;15(21):2609-2614.
56. Eguchi, K., Kanai, Y., Kobayashi, K. and Hirohashi, S. DNA hypermethylation at the D17S5 locus in non-small cell lung cancers: its association with smoking history. *Cancer Res.*, 1997;57(21):4913-4915.
57. Wicki, R., Franz, C., Scholl, F.A., Heizmann, C.W. and Schafer, B.W. Repression of the candidate tumor suppressor gene S100A2 in breast cancer is

- mediated by site-specific hypermethylation. *Cell Calcium*, 1997;22(4):243-254.
58. Martin, V., Ribieras, S., Song-Wang, X., Rio, M.C. and Dante, R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene*, 1995;157(1-2):261-264.
59. Makos, M., Nelkin, B.D., Lerman, M.I., Latif, F., Zbar, B. and Baylin, S.B. Distinct hypermethylation patterns occur at altered chromosome loci in human lung and colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992;89(5):1929-1933
60. Huang, Z.Z., Mao, Z., Cai, J. and Lu, S.C. Changes in methionine adenosyltransferase during liver regeneration in the rat. *Am. J. Physiol.*, 1998;275(1 Pt 1):G14-G21.
61. Cai, J., Mao, Z., Hwang, J.J. and Lu, S.C. Differential expression of methionine adenosyltransferase genes influences the rate of growth of human hepatocellularcarcinoma cells. *Cancer Res.*, 1998;58(7):1444-1450.
62. Frago, L.M., Gimenez, A., Rodriguez, E.N. and Varela-Nieto, I. Pattern of methionine adenosyltransferase isoenzyme expression during rat liver

- regeneration after partial hepatectomy. *FEBS Lett.*, 1998;426(3):305-308.
63. Newman, E.B., Budman, L.I., Chan, E.C., Greene, R.C., Lin, R.T., Woldringh, C.L. and D'Ari, R. Lack of *S*-adenosylmethionine results in a cell division defect in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1998;180(14):3614-3619.
64. Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Mudd, S.H., Levy, H.L. and Chou, J.Y. Dominant inheritance of isolated hypermethioninemia is associated with a mutation in the human methionine adenosyltransferase 1A gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997;60(3):540-546.
65. Nagao, M. and Oyanagi, K. Genetic analysis of isolated persistent hypermethioninemia with dominant inheritance. *Acta. Paediatr. Jpn.*, 1997;39(5):601-606.
66. Mato, I.P., Sanchez del Pino, M.M., Chamberlin, M.E., Mudd, S.H., Mato, J.M. and Corrales, F.J. Biochemical basis for the dominant inheritance of hypermethioninemia associated with the R264H mutation of the *MAT1A* gene. A monomeric methionine adenosyltransferase with tripolyphosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 2001;276(17):13803-13809.
67. Surtees, R., Leonard, J. and Austin, S. Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid *S*-adenosylmethionine in inborn errors of

- methyl-transfer pathway. *Lancet.*, 1991;338 (8782-8783):1550-1554.
68. Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Mudd, S.H., Wilson, W.G., Leonard, J.V. and Chou, JY. Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *J. Clin. Invest.*, 1996;98(4):1021-1027.
69. Snyder, S.W., Egorin, M.J. and Callery, P.S. Induction of human leukemia cell differentiation by regiospecifically acetylated spermidines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991;180(2):591-596.
70. Bjersing, J.L., Brorsson, A. and Heby, O. Increased expression of *c-jun*, but not retinoic acid receptor beta, is associated with F9 teratocarcinoma stem cell differentiation induced by polyamine depletion. *J. Cell. Biochem.*, 1997;67(3):378-385.
71. Luk, G.D., Civin, C.I., Weissman, R.M. and Baylin, S.B. Ornithine decarboxylase: essential in proliferation but not differentiation of human promyelocytic leukemia cells. *Science*, 1982;216(4541):75-77.
72. Sugiura, M., Shafman, T., Mitchell, T., Griffin, J. and Kufe, D. Involvement of spermidine in proliferation and differentiation of human promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 1984;63(5):1153-1158.
73. Riscoe, M.K., Schwamborn, J., Ferro, A.J., Olson, K.D. and Fitch, J.H.

- Inhibition of growth but not differentiation of normal and leukemic myeloid cells by methylthioadenosine. *Cancer Res.*, 1987;47(14):3830-3834.
74. Sydow, K. and Boger, R.H. Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options. *Z. Kardiol.*, 2001;90(1):1-11.
75. Kaletha, K., Chodorowski, Z., Sein-Anand, J., Gazda, M. and Nagel-Starczynowska, G. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis. *Przegl. Lek.*, 2000;57(10):591-595.
76. Lu, S.C. S-Adenosylmethionine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, 2000;32(4):391-395.
77. Bottiglieri, T., and Hyland, K. S-adenosylmethionine levels in psychiatric and neurological disorders: a review. *Acta. Neurol. Scand.*, 1994;154:19-26.
78. Fava, M., Giannelli, A., Rapisarda, V., Patralia, A. and Guaraldi, G.P. Rapidity of onset of the antidepressant effect of parenteral S-adenosyl-L-methionine. *Psychiatry Res.*, 1995;56(3):295-297.
79. Bottiglieri, T., Hyland, K. and Reynolds, E.H. The clinical potential of ademetionine(S-adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs*, 1994;48(2):137-152.

80. Bressa, G.M. *S*-adenosyl-l-methionine (SAME) as antidepressant: meta-analysis of clinical studies. *Acta. Neurol. Scand. Suppl.*, 1994;154:7-14.
81. Bottiglieri, T., Godfrey, P., Flynn, T., Carney, M.W., Toone, B.K. and Reynolds, E.H. Cerebrospinal fluid *S*-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral *S*-adenosylmethionine. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1990;53(12):1096-1098.
82. Schumacher, H.R. Jr. Osteoarthritis: the clinical picture, pathogenesis, and management with studies on a new therapeutic agent, *S*-adenosylmethionine. *Am. J. Med.*, 1987;83(5A):1-4.
83. Liao, M.C., Chang, C.F. and Becker, F.F. Alteration of *S*-adenosylmethionine synthetases during chemical hepatocarcinogenesis and in resulting carcinomas. *Cancer Res.*, 1979;39(6 Pt 1):2113-2119.
84. Jennifer, Lagendijk, Johan, B., Ubbink, W.J. and Hayward, Vermaak  
Quantification of erythrocyte *S*-adenosyl-L-methionine levels and its application in enzyme studies. *J. Chromatogr.*, 1992;576:95-101 Biomedical Applications.
85. Carolyn K. Wise, Craig A. Gooney, Syed F. Ali and Lionel A. Poirier  
Measuring *S*-adenosylmethionine in whole blood, red blood cells and cultured

- cells using-a fast preparation method and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 1997;696:145-152.
86. Capdevila, A. and Wagner, C. Measurement of plasma *S*-adenosylmethionine and *S*-adenosylhomocysteine as their fluorescent isoindoles. *Anal. Biochem.*, 1998;264(2):180-184.
87. She, Q.B., Nagao, I., Hayakawa, T. and Tsuge, H. A simple HPLC method for the determination of *S*-adenosylmethionine and *S*-adenosyl-homocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B6 deficiency on these concentrations in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994;205(3):1748-1754
88. Hamedani, M.P., Valko, K., Qi, X., Welham, K.J. and Gibbons, W.A. Two-dimensional high-performance liquid chromatographic method for assaying *S*-adenosyl-L-methionine and its related metabolites in tissues. *J Chromatogr.*, 1993;619(2):191-198.
89. Valko, K., Hamedani, M.P., Ascah, T.L. and Gibbons, W.A. A comparative study of the reversed-phase HPLC retention behaviour of *S*-adenosyl-L-methionine and its related metabolites on Hypersil ODS and Supelcosil LC-ABZ stationary phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993;11(4-5):361-366.



90. Bottiglieri, T. Isocratic high performance liquid chromatographic analysis of *S*-adenosylmethionine and *S*-adenosylhomocysteine in animal tissues: the effect of exposure to nitrous oxide. *Biomed. Chromatogr.*, 1990;4(6):239-241.
91. Wagner, J., Claverie, N. and Danzin, C. A rapid high-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of methionine, ethionine, *S*-adenosylmethionine, *S*-adenosylethionine, and the natural polyamines in rat tissues. *Anal. Biochem.*, 1984;140(1):108-116.
92. Wagner, J., Danzin, C., Huot-Olivier, S., Claverie, N. and Palfreyman, M.G. High-performance liquid chromatographic analysis of *S*-adenosylmethionine and its metabolites in rat tissues: interrelationship with changes in biogenic catechol levels following treatment with L-dopa. *J. Chromatogr.*, 1984;290:247-262.
93. Gutheil, W.G., Stefanova, M.E. and Nicholas, R.A. Fluorescent coupled enzyme assays for D-alanine: application to penicillin-binding protein and vancomycin activity assays. *Anal. Biochem.*, 2000;287(2):196-202.
94. Yasmineh, W.G., Chung, M.Y. and Caspers, JI. Determination of serum catalase activity on a centrifugal analyzer by an NADP/NADPH coupled enzyme reaction system. *Clin. Biochem.*, 1992;25(1):21-27.

95. Alon, R., Bayer, E.A. and Wilchek, M. Related Articles A coupled enzyme assay for measurement of sialidase activity. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 1991;22(1):23-33.
96. Van Lente, F. and Pepoy, M. Coupled-enzyme determination of catalase activity in erythrocytes. *Clin. Chem.*, 1990;36(7):1339-1343.
97. Hirashima, Y., Farooqui, A.A. and Horrocks, L.A. Related Articles Fluorimetric coupled enzyme assay for lysoplasmalogenase activity in liver. *Biochem. J.*, 1989;260(2):605-608.
98. Tsai, S.F., Bishop, D.F. and Desnick, R.J. Coupled-enzyme and direct assays for uroporphyrinogen III synthase activity in human erythrocytes and cultured lymphoblasts. Enzymatic diagnosis of heterozygotes and homozygotes with congenital erythropoietic porphyria. *Anal. Biochem.*, 1987;166(1):120-133.
99. Teruel, J.A., Tudela, J., Fernandez-Belda, F., Garcia-Carmona, F., Garcia-Canovas, F. and Gomez-Fernandez, J.C. A kinetic study of the irreversible inhibition of an enzyme measured in the presence of coupled enzymes. Fluorescein isothiocyanate as inhibitor of the adenosinetriphosphatase activity from sarcoplasmic reticulum. *Biochim.*

- Biophys. Acta.*, 1986;869(1):8-15.
100. Ozer, N. A new enzyme-coupled spectrophotometric method for the determination of arginase activity. *Biochem. Med.*, 1985;33(3):367-371.
101. Wilkinson, A.P., Rhodes, M.J. and Fenwick, G.R. Determination of myrosinase (thioglucoside glucohydrolase) activity by a spectrophotometric coupled enzyme assay. *Anal. Biochem.*, 1984;139(2):284-291.
102. Giampietro, P.F. and Desnick, R.J. Determination of *delta*-aminolevulinate dehydratase activity by a specific fluorometric coupled-enzyme assay. *Anal. Biochem.*, 1983;131(1):83-92.
103. Nohta, H., Noma, S. and Ohkura, Y. Assay for Catechol-*O*-methyltransferase in erythrocytes using a new fluorogenic substrate, 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)naphtho[1,2-*d*]thiazole. *J. Chromatogr.*, 1984; 304:93-100.
104. Nohta, H., Noma, S. and Ohkura, Y. High-performance liquid chromatographic assay for Catechol-*O*-methyltransferase in human and rat erythrocyte membrane and soluble fractions, and rat tissues. *Chem. Pharm. bull.*, 1986;34(11):4687-4693.
105. Muller-Enoch, D., Seidl, E. and Thomas, H. [6,7-Dihydroxycoumarin (Aesculetin) as a substrate for catechol-*O*-methyltransferase (author's transl)].

- Z. Naturforsch. [C]*, 1976;31(5-6):280-284.
106. Thomas, H., Veser, J. and Muller-Enoch, D. [A sensitive fluorometric determination of catechol methyltransferase activity (author's transl)]. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.*, 1976;357(10):1347-1351.
107. Hoffman, R.M. Methioninase: a therapeutic for diseases related to altered methionine metabolism and transmethylation: cancer, heart disease, obesity, aging, and Parkinson's disease. *Hum. Cell*, 1997;10(1):69-80.
108. Cheng, H., Gomes-Trolin, C., Aquilonius, S.M., Steinberg, A., Lofberg, C., Ekblom, J. and Orelund, L. Levels of L-methionine S-adenosyltransferase activity in erythrocytes and concentrations of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in whole blood of patients with Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 1997;145(2 Pt 1):580-585.
109. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976;72,248-254.
110. Trolin, C.G., Lofberg, C., Trolin, G. and Orelund, L. Brain ATP:L-methionine S-adenosyltransferase (MAT), S-adenosylmethionine (AdoMet) and S-adenosylhomocysteine (SAH): regional distribution and age-related changes.

*Eur. Neuropsychopharmacol*, 1994;4(4):469-477.

111. Ekegren, T., Aquilonius, S.M. and Gomes-Trolin, C. A comparative study of methionine adenosyltransferase activity and regional distribution in mammalian spinal cord. *Biochem. Pharmacol.*, 2000;60(3):441-445.
112. Tu, Y.S., Huang, L.J., Hsu, M.H., Wang, S.H., Lai, J.M., Yeh, C.C., Liao, M.C. and Lung, F.D. Synthesis of hemoregulatory peptide (HP) derivatives as inhibitors of the interaction between methionine adenosyl transferase and methionine. *The Chin. Pharm. J.*, 2000;52:139-149.
113. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., and Gallo, R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1979; 54:713-733.
114. Liao, M. C., Lin, G. W., and Hurlbert, R. B. Partial purification and characterization of tumor and liver S-adenosylmethionine synthetases. *Cancer Res.*, 1977;37:427-435.
115. Hoffman, J. L. Chromatographic analysis of the chiral and covalent instability of S-adenosyl-L-methionine. *Biochemistry*, 1986;25:4444-4449.
116. Revelle, L. K., d'Avignon, D. A., Reepmeyer, J.C. and Zerfing, R. C.

Stability-indicating proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determination of *S*-adenosyl-L-methionine in tablets. *J. AOAC Int.*, 1995;78:353-358.



中國醫藥大學 藥物化學研究所  
博士論文  
(二)

指導教授：郭盛助 教授  
指導教授：陳勝智 教授

**HotLig: 以分子表面導向之方法評估蛋白質-配體之交互作用**

**HotLig: A molecular surface-directed approach to scoring  
protein-ligand interactions**

研究生：王 勝 弘

**Wang, Sheng-Hung**

中 華 民 國 95 年 6 月

## 目錄

圖目錄 .....	iii
表目錄 .....	v
中文摘要 .....	vi
英文摘要 .....	viii
縮寫 .....	x
第一章 緒論 .....	1
第一節 分子對接軟體發展背景 .....	3
第二節 評分方程式的發展 .....	5
第三節 現行評分方程式演算法概論 .....	7
第四節 評分方程式效能的評估 .....	12
第二章 研究動機與目的 .....	16
第一節 現行評分方程式準確度不足 .....	16
第二節 評分方程式設計上常見的缺陷 .....	18
第三節 多數軟體不易獲得 .....	21
第四節 HotLig 發展設計的概念 .....	22
第三章 研究方法 .....	26
● PscanMS 之演算法 .....	26



● 收集用於分析蛋白質-配體交互作用之統計組.....	33
● 極性作用力之距離相依性勢能函數.....	35
● 疏水效應之距離相依性勢能函數.....	36
● 勢能總變化值公式 .....	37
● 收集用於訓練能量參數之訓練組.....	38
● 效能之評估 .....	41
● 其它 CADD 軟體之研發 .....	44
● 硬體設備與軟體系統 .....	45
第四章 結果與討論.....	46
● 統計組之特性 .....	46
● 距離相依性勢能函數 .....	48
● 訓練組之特性 .....	56
● 能量參數之最佳化 .....	58
● 效能評估: 結合模式之預測 .....	60
● 效能評估: 親和力之預測 .....	63
● 效能評估: 虛擬篩選 .....	66
第五章 結論 .....	69
參考文獻 .....	71
投稿論文 .....	79

## 圖目錄

Scheme 1.	HotLig 之設計與發展.....	25
圖 1.	Type of Lennard-Jones 12-6 dispersion-repulsion energy function.....	7
圖 2.	疏水效應示意圖.....	19
圖 3.	Solvent-accessible surface.....	23
圖 4.	Connolly surface.....	24
圖 5.	網格座標區域設定 PscanMS 掃描範圍.....	27
圖 6.	移動掃描格並選取蛋白質原子.....	28
圖 7.	掃描球在掃描格內進行掃描.....	28
圖 8.	掃描點之紀錄.....	29
圖 9.	Binding pocket 掃描結果.....	30
圖 10.	組成 Connolly surface 之三種表面描述.....	31
圖 11.	建構 Connolly surface 之三種基本幾何圖形.....	31
圖 12.	十種已知的 HSV-1 thymidine kinase 配體結構.....	43
圖 13.	統計組 600 個複合結構中配體結構特性之分布.....	47
圖 14.	氫鍵作用力之統計結果與勢能曲線.....	49
圖 15.	離子作用力之統計結果與勢能曲線.....	50

圖 16.	金屬配位共價鍵作用力之統計結果與勢能曲線.....	51
圖 17.	疏水效應非極性區域之統計結果與勢能曲線.....	52
圖 18.	訓練組 214 個複合結構中配體結構特性之分布.....	56
圖 19.	HotLig 之蛋白質-配體親和力預測值與實驗數據值相關圖.....	63
圖 20.	HSV-1 thymidine kinase (TK) 之虛擬篩選測試.....	67



## 表目錄

表 1.	Novel ligands recently identified through structure-based VS. ....	2
表 2.	現行各種評分方程式蛋白質-配體結合模式預測成功率之 比較.....	17
表 3.	現行評分方程式在不同性質 subsets 結合模式預測成功率之 差異.....	18
表 4.	Statistics set.....	34
表 5.	Training set.....	39
表 6.	The optimized parameters and the best success rate of predicting binding modes of training sets.....	57
表 7.	HotLig 與其他評分方程式對 Wang 100 dataset 預測結合模 式成功率之比較.....	60
表 8.	HotLig 與各種評分方程式對不同性質之 subset 預測結合模 式成功率之比較。.....	60
表 9.	HotLig 與 DOCK 在 Gold 100 dataset 預測結合模式成功率之 比較。.....	61
表 10.	HotLig 與其他方程式預測 binding affinities 效能之比較.....	64

## 中文摘要

隨著蛋白質功能與結構的了解越來越多，分子對接技術在電腦輔助藥物設計的應用上更加普遍與重要，評分方程式是其中相當重要的一個環節。然而現今普遍使用的評分方程式預測成功率偏低，尤其偽陽性 (false-positive) 結果比例太高，是許多研究者的困擾。本研究發展出的 HotLig，是一種結合知識基礎 (knowledge-based)、經驗基礎 (empirical-based) 以及藥效基團基礎 (pharmacophore-based) 的高準確度評分方程式，首先以 PscanMS 計算出結合部位的 Connolly surface，然後以此去評估蛋白質與配體之間的親和力並預測結合模式 (binding modes)。各種作用力之勢能函數則是從 database knowledge 所衍生，總共 600 個蛋白質與配體晶體結構經過分析統計，依各種作用力出現頻率，分別得到氫鍵、離子作用力、金屬配位共價鍵以及疏水效應之距離相依性的勢能曲線。然後挑選 214 個訓練組，分為基本組 101 個、離子作用力組 56 個以及金屬離子組 57 個，依序以經驗法則求得各種作用力的基本能量參數。HotLig 效能的評估試驗，使用 Wang 100 dataset 以及 GOLD 100 dataset 進行蛋白質與配體結合模式之預測，設定  $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$  為預測成功與否之標準，其中 Wang 100 測試組預測成功率達 91%，而 GOLD 100 測試組預測成功率達 87%。在親和力的預測方面，HotLig 預測值與實驗值之相關係數  $R_s$  為 0.6091。在虛擬篩選測試方面，使用 thymidine kinase (PDB code: 1kim)，以及

1000 個 decoys 與 10 actives 進行研究，結果顯示 HotLig 能夠有效地在前 25 名找出所有的 submicromolar actives。因此，HotLig 在分子對接及電腦輔助藥物設計領域中，提供了更準確、更有效能的工具。



**關鍵字：**分子對接，評分方程式，統計，知識基礎，經驗基礎，藥效基團基礎，高準確度，預測蛋白質-配體結合模式，電腦輔助藥物設計。

## 英文摘要

Molecular docking is an increasingly important method for computer-aided drug design, and scoring functions play an essential role in docking strategy. However, high false-positive rates remain a common issue in structure-based virtual screening. In this study, we developed a pharmacophore-based, knowledge-based and empirical-based scoring function (HotLig) to predict protein-ligand interactions. Connolly surface of binding pocket was constructed by PscanMS first and was used to estimate the hydrophobic effect between protein and ligand. The distance-dependant potential for polar interactions (including H-bond, ionic bond and metal bond) and hydrophobic effect were derived from 600 complexes in protein data bank (PDB) according to the statistic frequency of each molecular interaction. Then the energy parameter of each interaction was determined by 214 complexes of training set. The training set was classified into three subsets: basic set (101 complexes), ionic set (56 complexes) and metal set (57 complexes). The Wang 100 dataset and GOLD 100 dataset were used for evaluation of prediction of binding modes. The success rate ( $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ ) for Wang 100 dataset and GOLD 100 dataset were 91% and 87%, respectively. The Wang 100 dataset was also used for evaluation of prediction of binding affinities. The Spearman correlation coefficient ( $R_s$ ) was 0.6091. In the evaluation of virtual screening, thymidine kinase (PDB code: 1kim) was used for docking. The ligand

database contained 1000 decoys and 10 actives. All submicromolar actives were found in the top 25 ligands of ranked database. Thus, HotLig predicts the interactions between protein and ligand with high accuracy, and provides a novel choice of scoring function in molecular docking studies.



**keywords:** docking, scoring function, statistics-based, knowledge-based, empirical-based, pharmacophore-based, high accuracy, prediction, protein-ligand binding modes, CADD.



## 縮寫

**CADD:** computer-aided drug design

**HTD:** high-throughput docking

**HTS:** high-throughput screening

**PDB:** protein data bank

**PSA:** polar surface area

**SARs:** structure-activity relationships

**SAS:** solvent-accessible surface

**RMSD:** root-mean-square deviation

**VS:** virtual screening

**TK:** thymidine kinase



## 第一章 緒論

一個新藥發展的時程是漫長的，而且成功機會是相當低的。有些是依照先人的天然藥物使用經驗，然後研究得到的，像水楊酸類化合物、青蒿素等；有些是經由模仿已知的受質結構而設計出來的，如 acyclovir、zidovudine 等；甚至不少例子其實是在偶然的情況之下所發現的，最有名的就是青黴素等；在過去，藥物結構的設計，只能靠藥物化學家豐富的想像力，並且從許多 structure-activity relationships (SARs) 以及 quantitative structure-activity relationships (QSARs) 的研究中去改良已知結構的藥物，至於要得到結構新穎的新引導化合物 (new lead) 則是相當不容易，有時候反而是在藥理研究中，或臨床使用時發現新用途，甚至是副作用，才使得該疾病的治療獲得新類型結構藥物的加入發展，如 minoxidil 與 thalidomide。故發現新引導化合物往往仍需要透過大量的藥理活性篩選才能得到，近年來技術發達的 high-throughput screening (HTS)，由於速度快，使得獲得新引導化合物的機會增加不少，然而 HTS 在實際應用上是有限制的，而且成功機會低，依然需要很大量篩選，所費不貲。隨著生物科技與電腦軟硬體技術的發展，電腦輔助藥物設計 (computer-aided drug design; CADD) 已成為藥物設計不可或缺的重要工具，相對於 HTS，high-throughput docking (HTD) 則是更受人注目的新藥研發策略，由於越來越多的蛋白質結構被解析出來，應用分子對接 (docking) 來獲得新引

導化合物以及改良藥物亦越趨重要，成功機會也比盲目篩選更高，根據一篇 HTS 以及分子對接的研究 [1]，以電腦做虛擬篩選 (virtual screening; VS) 比盲目篩選命中率高了 1700 倍，同時更加的節省經費和時間。表 1 列出了近年來經由 structure-based virtual screening 的成功例子 [2]。

**表 1.** Novel ligands recently identified through structure-based virtual screening [2].

Target [reference]	Target class	Target structure	Approximate database size	Method(s) used	Lead potency ( $\mu\text{M}$ )
AmpC $\beta$ -lactamase [3]	Hydrolase	X-ray	200 k	NWU DOCK	26
BCR-ABL [4]	Kinase	X-ray	200 k	DOCK	25
Anthrax EF [5]	Adenylyl cyclase	X-ray	200 k	NWU DOCK	20
IMPDH [6]	Dehydrogenase	X-ray	3500 k	FlexX	30
Casein kinase II [7]	Kinase	Homology	400 k	DOCK	0.08
K <sup>+</sup> Channel [8]	Ion channel	Homology	50 k	DOCK	10
Thyroid hormone receptor [9]	Nuclear receptor	Homology	250 k	ICM	0.75
CDK2 [10]	Kinase	X-ray	50 k	LIDAEUS	2
TGF $\beta$ RK [11]	Kinase	X-ray	200 k	Catalyst	0.005
Cyclophilin [12]	Immunophilin	X-ray		Unity/FlexX	6
tRNA guanine transglycosylase [13]		X-ray	800 k	Unity/FlexX	0.25
PfDHFR [14]	Reductase	Homology	230 k	Catalyst/DOCK	0.9
$\alpha$ -Amylase [15]	Hydrolase	X-ray	200 k	Unity/FlexX	None

## 第一節 分子對接軟體發展背景

早期的藥物化學家即已注意到，藥物的作用和其結構特性有關。他們了解到藥物的基本結構與官能基的變化，乃至於藥物分子理化性質都對藥物作用有所關聯與影響。從不斷的藥物合成設計，還有 SARs 和 QSARs 的研究探討，伴隨著藥理學與分子生物學的發展，藥物和標的物之作用方式，逐漸得到更多的相互印證。此外，X-ray，NMR 等技術，除了能解析出蛋白質四級結構，更讓人們得以一窺藥物在標的蛋白之結合位置以及結合模式，並能進一步直接探討藥物與標的蛋白之間的相互作用力，或者酵素催化反應的機轉，這些在藥物設計上均有莫大的幫助。由於基因轉殖技術的發達，蛋白質晶體取得容易，質與量也都獲得提昇，截至 2006 年 5 月 30 日為止，Protein Data Bank (PDB) 收錄的蛋白質結構已經高達 36837 個，是十年前的 7.35 倍 [16]，解析度也越來越好，而且每年還在快速增加當中。在生物資訊快速發展的背景之下，資訊量與運算需求極為龐大，故新穎的電腦硬體與資訊軟體介入是必然的，也是重要的。其中跟藥物設計發展最相關的，以 QSARs 軟體和分子對接的軟體為主流。而分子對接相關的軟體與資源，包括小分子資料庫，更是蓬勃發展中 [17-18]。

其實分子對接的觀念由來已久，從最早認為藥物與標的蛋白的作用為類似"鎖"與"鑰匙"的模式開始，其概念已經影響了藥物化學家在藥物設計上的策

略，只是當時是以想像力在腦海中作分子對接，去模擬已知結構的分子來做設計。至今分子對接技術的發展有許多領域的介入，至少包括分子拓樸學、分子熱力學、蛋白質體學、分子力場預測、演算法的進展以及電子資訊軟體的進步等等，當然也包括藥學領域觀念的導入。約在 1970 年代，開始有人做分子熱力學的模擬研究 [19]；在 1982 年，Kuntz 等人首先發表了 DOCK 的演算法 [20]。不過當時是屬於"硬性"的分子對接 (rigid docking)，數年之後，配體的柔性構形變化，才開始實踐於分子對接當中 (flexible-ligand docking)。由於 DOCK 一直是免費提供於學術界研究使用的軟體，至今仍相當廣泛地為人使用。此外，如 1994 年的 Flexibase/FLOG [21]，1996 年的 FlexX [22-23]，1997 年的 GOLD [24] 以及 1998 年的 AutoDock [25]，都是後來較廣泛應用的 flexible-ligand docking 軟體。而 1990 年代開始，正好也是蛋白質體學快速發展的時候。目前雖然也有包含 flexible protein 的分子對接研究 (induced-fit)，不過應用上還不普遍 [26]。

## 第二節 評分方程式的發展

整個分子對接的過程，最重要的有兩個部份，一個為分子構形及位向的搜尋；另一個為評分方程式評估蛋白質與配體之作用力。分子構形的搜尋技術已算相當成熟，大多數情況之下，都能在對接過程中產生合理的構形與位向並對接到結合部位裡。儘管分子對接的技術，有許多應用成功的例子，也確實足以縮短新藥研發的時程，然而評分方程式在目前仍然是最需發展的部分，其中偽陽性 (false-positive) 太高一直是主要的問題 [2,27-29]，意即程式挑出太多無意義、與 pocket 不合適或者沒有活性的結構。False-positive 太高將降低命中率 (hit rate)，同時為了尋獲有活性化合物，只能做更大量的藥理篩選，如此則增加研究時間與費用。事實上，要預測藥物活性是非常困難的！成功的機會也會因個別的特異例子而有差異。我們都知道，蛋白質功能的改變，和其構形變化有關，某些構形是有功能的，某些構形是沒有功能的，目前很難預測配體與蛋白質結合後，能對蛋白質的構形產生何種變化，我們更無法預測何種的蛋白質構形變化會對其功能有什麼樣程度的影響，因為這不盡然能以構形或結合狀態能量的高低來解釋。再者，藥物進入體內後面臨體內複雜的環境，還有藥物動力學的問題，這許多複雜因素，使得預測藥物活性變成一種極為困難的任務，也使得評分方程式的發展具有相當的挑戰性。然而，我們應先把問題單純化。分子對接要應用在藥物設計上，我們首先要

挑選出能夠和蛋白質結合部位有高親和力，高合適性的化合物。標的蛋白對配體化合物結構有一定程度的選擇性，我們從蛋白質-配體之晶體結構去研究觀察，同樣可以發現配體和結合部位之相互配對有很高程度的合適性，這也使得分子對接的技術有了成功的機會。所以要提高分子對接預測的成功機會，首先就要讓評分方程式有最佳的能力挑出高合適性的配體結構，如此當能減少 false-positive 的發生。當然有一點仍需謹記在心的，即高親和力並不同於高藥理活性。至於 false-negative 則相對比較難以克服，畢竟目前是利用晶體狀態下的蛋白質結構，以 rigid 構形進行分子對接，除非該蛋白有多種的晶體結構可供交叉對接驗證 (cross-docking validation)，才能降低 false-negative 的發生。當然，在選擇晶體結構時，holo structure (含有 co-crystal ligand) 是較理想的；apo 或者 modeled structures 則相對較不理想。

### 第三節 現行評分方程式演算法概論

關於評分方程式演算法，大致上分為三類 [30-31]:

#### 1、力場法則 (force field methods)

例如：DOCK、AutoDock、G-Score 和 D-Score 等。

這是從分子力學而來的力場概念，後來應用於蛋白質與配體結合的評分，主要用以評估靜電力以及凡得瓦爾作用力。常使用的力場如 AMBER，Kollman，小分子則常用 Gasteiger，每個原子加上部分電荷 (有些力場不包含氫原子)，至於 distance-dependant energy function 則以 Lennard-Jones 12-6 dispersion-repulsion 類型曲線( $\Delta W = \alpha \left( \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \right)$ )為主 (圖 1)。

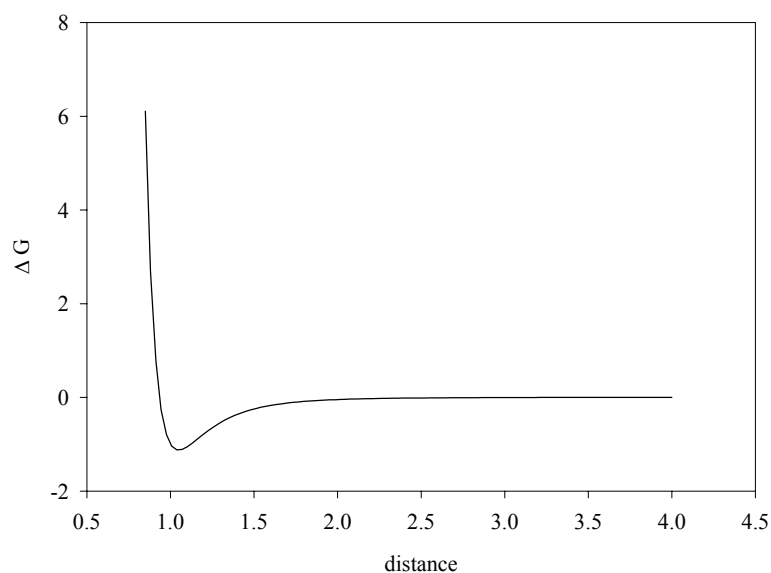


圖 1. Type of Lennard-Jones 12-6 dispersion-repulsion energy function.



## 2、經驗評分法則 (empirical method)

例如：X-Score、Cerius2/PLP、ChemScore、LigScore、LUDI 和 F-Score。

以 X-Score 為例 [32]，先選定一組數據當作訓練組 (training set)，另一組當作測試組 (test set)。通常訓練組會特別設計挑選過，以達到廣泛與合理的原則；測試組則通常是盡量隨機挑選，或者使用先前別人研究使用過的 dataset，如此則還可以進行比較。選定相關變因後，進行多變數線性或非線性回歸，得到各個變數的參數，以及與活性相關的方程式。然後則以此方程式預測配體的活性或與蛋白質間的親和力。經驗法則的評分方程式通常在不同性質作用力之間能取得較好的平衡。

## 3、知識基礎的勢能法則 (knowledge-based potentials)

例如：DrugScore、SmoG2001 和 PMF。

以 DrugScore 為例 [33]，主要是以 knowledge-based potential 代替傳統的 force-field energy function。這原本是用於預測 protein folding 的研究，後來則進而應用於蛋白質與配體親和力的預測。這種方式並不以理論上的能量曲線作為預測的依據，而是將原子型態或作用力細分多種配對的類型，從資料庫中去分析，個別統計其與距離相關的分佈，再根據此分佈以及出現頻率，轉換成與距離相依性的勢能曲線，雖然這並不完全等同於能量值的預測，但此

種方式以及經驗法則較符合實際分布情形，故大致來說，是準確度較高的演算法。

本研究評估極性作用力的演算法也是採用此種模式，故這裡先針對 Sippl [34] 以及 Gohlke [33] 使用之演算法進行說明。

在水溶液環境裡面，配體  $L_{aq}$  與蛋白質  $R_{aq}$ ，產生非共價鍵結的結合形成  $RL_{aq}$ ， $K_i$  為 binding constant。而其在 Gibbs 自由能的能量變化可以描述為：

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K_i \quad (1)$$

然而 entropic effects 其實不容易單純用原子型態或作用力去描述。早期是 Sippl 等人將這種能量的變化，利用 database knowledge 所衍生出的勢能方程式(distance-dependent pair-potentials)表示出來，如方程式 (2)，其中  $i$  與  $j$  則分別代表配體與蛋白質的原子型態， $\Delta W_{i,j}(r)$  則是發生率所轉換勢能的淨值。

$$\Delta W_{i,j}(r) = W_{i,j}(r) - W(r) = -\ln \frac{g_{i,j}(r)}{g(r)} \quad (2)$$

$$g(r) = \frac{\sum_i \sum_j g_{i,j}(r)}{i \times j} \quad (3)$$

其中，每次計算的範圍為原子距離在  $r$  以及  $r + dr$  之間， $dr$  理想值為  $0.1\text{\AA}$ ：

$g_{i,j}(r)$ : normalized radial pair distribution function for atom type  $i$  and  $j$ ；

$g(r)$ : normalized mean radial pair distribution function for any two atoms；

因為半徑越大，所計算到的原子數目會越多，所以需要經過標準化，即轉換成單位空間內（除以 $4\pi r^2 dr$ 之球殼體積）特殊原子型態配對出現的頻率，然後再進行觀察值與常態基準值的比較。

這種概念可以簡單如此解釋：

$$quantity = -\ln \frac{g_{observed}}{g_{expected}} \quad (4)$$

如果某種特殊的原子型態配對，例如 N.am (N of amide) 和 O.2 (O of  $sp^2$ )，在某個特殊範圍之內，假設在原子中心距離 2.7 Å 至 2.8 Å 之間，出現頻率高於常態現象的基準值（因為大多數原子的凡得瓦爾半徑總合會遠於此範圍，所以形成氫鍵的原子配對在此距離之內將高於常態基準值），經過  $-\ln()$  函數之後，則會得到負值；當在某範圍出現頻率低於基準值（如原子太過接近），則得到正值；相當於基準值時，則表示接近零（沒有結合作用力）。此現象則相當於能量與距離曲線的特性，並且出現頻率越高的，得到的分數越好（負的值越大）。

至於非極性表面相關的勢能曲線，則是粗略計算空間座標方格內，分子間佔據的小方塊，去逼近分子表面的方式估計結合狀態與分離狀態，蛋白質和配體排除非極性區域 solvent accessible surface 面積的變化：

$$\Delta W_i(SAS, SAS_0) = W_i(SAS) - W_i(SAS_0) = -\ln \frac{g_i(SAS)}{g_i(SAS_0)} \quad (5)$$

其中：

$g_i(SAS)$  為在結合狀態下  $i$  原子在非極性區域 SAS 面積方程式，

$g_i(SAS_0)$  為在蛋白質與配體分離並水合的情形下， $i$  原子在非極性區域 SAS 面積方程式。結合狀態下，非極性與非極性區域的接觸面積大，得分就較好。

所以最後，總合淨  $\Delta W$  為：

$$\Delta W = \gamma \sum_{ki} \sum_{lj} \Delta W_{i,j}(r) + (1-\gamma) \times \left[ \sum_{ki} \Delta W_i(SAS, SAS_0) + \sum_{lj} \Delta W_j(SAS, SAS_0) \right] \quad (6)$$

以上這些演算法納於 DrugScore 軟體當中。



#### 第四節 評分方程式效能的評估

其實評分方程式效能的評估與確效是相當不容易的，要比較不同的軟體通常很難保證客觀性。基本上一個評分方程式效能的評估方法大致有三種 [30-31]：

##### 1、預測結合模式之成功率

從已知的蛋白質-配體之晶體結構去做驗證，將配體取出，進行分子對接做構形與位向的搜尋，產生許多可能的結合模式，然後交由評分方程式去評分並排序，看看是否能挑選出原本的結合模式 (native pose)，或者挑出很接近的結合模式 (near-native pose)。通常成功與否的判定就是以 docked conformer 和 native pose 比較之 RMSD (root-mean-square deviation) 值作判定，一般而言是以  $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$  作為成功與否的標準。其實用 RMSD 作為預測成功與否的判定是有爭議性的，這種方式有一些缺點：

(1) 分子大小會影響 RMSD 值：分子越小，即使結合狀態是翻轉過的，RMSD

可能也不太大。分子較大，即使結構主體是很正確的結合模式，但是部分柔性的官能基，可能位於 pocket 外面，對結合作用較不重要，而轉到不同方向，結果造成 RMSD 超過  $2 \text{ \AA}$ 。

(2) RMSD 無法代表分子間作用力成功預測：氫鍵是有方向性的，即使

RMSD 小於  $2 \text{ \AA}$ ，卻未必代表該結合模式正確找出作用力的位置。至於

非極性區域，因為不具方向性，所以結合位置正確就應該認為是正確的預測，然而 RMSD 只認定原本的結合模式是好的，故非極性區域通常得到較大的 RMSD 值。

(3) 對稱性結構的誤判：配體或者結合部位呈現對稱性，或者某官能基是對稱性官能基，在對接過程中可能翻轉或旋轉，即使是得到預測正確的結合模式，卻可能得到相當大的 RMSD。

儘管如此，這種方式因為簡便，目前仍是較普遍的方式，同時為了與先前的研究成果作比較，本研究仍依照先前的研究方法，使用 RMSD 來評估預測結合模式之成功率。

## 2、預測親和力與結合能量

在 PDB 內的蛋白質-配體複合晶體結構中，有些配體的藥理活性 ( $IC_{50}$ 、 $K_i$ ) 或者親和力 (結合常數  $K_a$ 、解離常數  $K_d$  或者結合能量  $\Delta G$ ) 是已知的，故這些結構經由評分方程式評分後，可以比較預測數據和真實數據之相關性，相關性越好表示越準確。其相關性的好壞通常以 Spearman correlation coefficient ( $R_s$ ) [44] 來比較，它是用於比較兩組排序數據的相關性：

$$R_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n di^2}{n(n^2 - 1)} \quad (7)$$

其中  $di$  是兩組數據中，第  $i$  個複合體之排名的差異， $n$  為複合體之總數。

要注意的是，其實  $R_s$  只強調排序上的相關性，所以不能完全等同於活性預測之正確性。目前可應用於研究親和力預測的 dataset 不多，畢竟需要有藥理活性或結合常數的數據，而且另一個關鍵就是這些數據的可信度非常重要。不一樣的蛋白質特性不同，很難用一樣的標準去評估，所以要直接預測藥理活性，需要考慮的因素相對的較多，也相對的困難，故目前之研究仍使用排序的相關性 ( $R_s$ ) 來作為效能判斷的依據。

### 3、虛擬篩選

使用設計過的配體結構資料庫，裡面包含了已知各種強弱活性的結構 (actives)，通常是從複合晶體結構所取出的配體，同時再加上較大量的已知沒有活性的結構 (decoys)，然後進行虛擬篩選，讓評分方程式去挑出 actives。判定方式則以排序後，能在前多少百分比的整體資料庫中，找到多少個 actives。這種方式是很實際的評估方式，不過這種 dataset 目前仍不足，而且通常 actives 和 decoys 數量不夠多，因此也有不用 decoys，而是從一般的 database 去挑選分子量相當之結構，或者 drug-like 之結構，加入 actives 後，供虛擬篩選使用，雖不確定其藥理活性，但可比較 actives 的分布。

綜合上面所述，各種評估方式，均有賴於完整考量與精心設計的 datasets，可惜目前 datasets 選擇性不多。所以，整理並設計出實用的 dataset 提供確效測試，也是一個有意義的研究主題。本研究 HotLig 效能的評估也將同時採取這三種策略，以期得到更全面、更值得信賴的效能評估。





## 第二章 研究動機與目的

### 第一節 現行評分方程式準確度不足

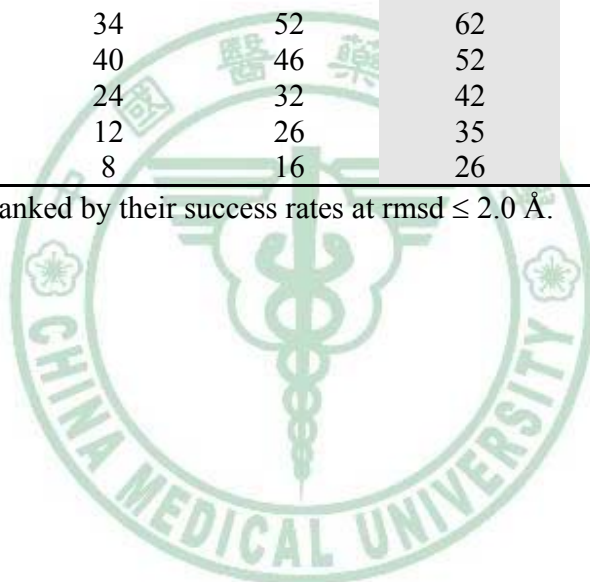
在 2003 年 Wang 等人評估並比較了十一種常見的評分方程式的準確性 [30]。準確性的評估則是利用 100 個蛋白質-配體複合晶體結構，將配體取出，並從新經過分子對接產生許多對接的構形與位向，接著讓評分方程式去預測並挑選，那一種才是真正原本的蛋白質-配體結合模式，其預測成功與否，以  $RMSD \leq 2$  當作準確性的標準，結果發現成功率多不盡理想，最差為 26%，最好的也只有 76% (表 2)，差異很大。乍看之下，或許會覺得能有七成的預測成功率是不錯的，事實上，由於這是拿已知的晶體來預測蛋白質與配體結合模式，用於對接的蛋白質構形，是與該配體結合狀態下的構形，故應該要有更高的預測成功率。另一方面，現在大多的研究，虛擬篩選最後的命中率其實只有 3~10% [2]，少數有 20~30% [1,35]，而且往往還有人為挑選的策略介入。儘管所謂『命中率』需要有更客觀的定義與評估，但仍看得出 false-positive 所帶來的困擾。

這些數據均突顯出整個分子對接模擬預測的過程中，評分方程式仍是目前較弱的一個環節。正因如此，最近不斷有新的評分演算法與軟體發展出來，評分的技巧上，也有交叉評分 (consensus scoring) 的概念產生 [36-37]，即應用多種評分方程式串聯或並聯交叉評分，以降低 false-positive。

表 2. 現行各種評分方程式蛋白質-配體結合模式預測成功率之比較 [30]。

Scoring function <sup>a</sup>	success rate (%)				
	RMSD ≤ 1.0 Å	RMSD ≤ 1.5 Å	RMSD ≤ 2.0 Å	RMSD ≤ 2.5 Å	RMSD ≤ 3.0 Å
Cerius2/PLP	63	69	76	79	80
SYBYL/F-Score	56	66	74	77	77
Cerius2/LigScore	64	68	74	75	76
DrugScore	63	68	72	74	74
Cerius2/LUDI	43	55	67	67	67
X-Score	37	54	66	72	74
AutoDock	34	52	62	68	72
Cerius2/PMF	40	46	52	54	57
SYBYL/G-Score	24	32	42	49	56
SYBYL/ChemScore	12	26	35	37	40
SYBYL/D-Score	8	16	26	30	41

<sup>a</sup>Scoring functions are ranked by their success rates at rmsd ≤ 2.0 Å.



## 第二節 評分方程式設計上常見的缺陷

Wang 等人用於測試評分方程式的 test set 還分為 hydrophilic、hydrophobic 以及 mixed 三個 subset。其中只有 Cerius2/PLP 以及 SYBYL/F-Score 還能在這三個 subsets 維持均衡的準確度，其它的方程式在 hydrophilic subset 以及 hydrophobic subset 之預測成功率有明顯落差。這也突顯了多數評分方程式有 hydrophilic 與 hydrophobic，以及 enthalpic 與 entropic 評估失衡問題 (表 3)。

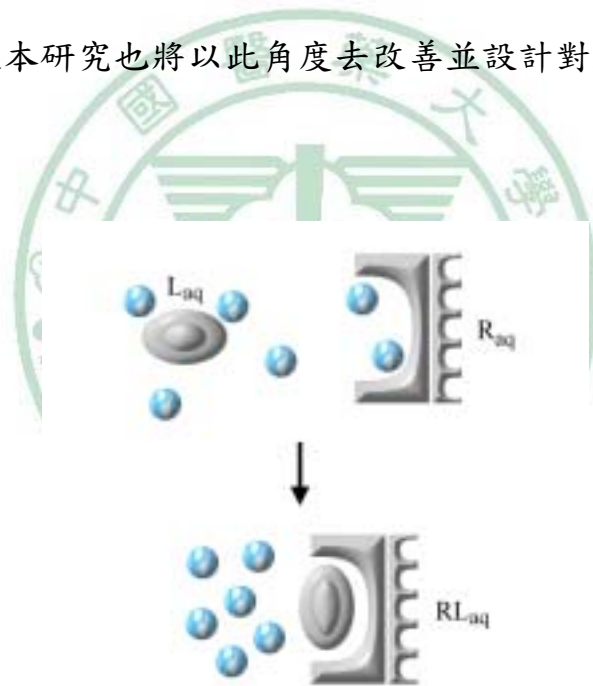
表 3. 現行各種評分方程式在不同性質 subset 結合模式預測成功率之差異 [30]。

scoring function <sup>a</sup>	success rate (%)			
	overall (100)	hydrophilic (44)	mixed (32)	hydrophobic (24)
Cerius2/PLP	76	77	78	71
SYBYL/F-Score	74	75	75	71
Cerius2/LigScore	74	77	75	67
DrugScore	72	73	81	58
Cerius2/LUDI	67	75	66	54
X-Score	66	82	59	46
AutoDock	62	73	53	54
Cerius2/PMF	52	68	44	33
SYBYL/G-Score	42	55	34	29
SYBYL/ChemScore	35	32	34	42
SYBYL/D-Score	26	23	28	29

<sup>a</sup>Scoring function are ranked by their overall success rates.

探討其原因，部分評分方程式其實只有計算好的作用力；疏水效應的評估，有些則僅僅粗略計算接觸面積，或者估算分子形狀的契合。另一問題則是作用力勢能評估的問題。

疏水效應是複雜的，它代表著蛋白質 - 配體 - 水分子三者之間重新排列造成的能量變化 (圖 2)，所以若將水分子考量進來，蛋白質與配體結合過程中，除了兩者本身之直接作用力外，應該還要考量水分子從極性區域移除所需耗費的能量，以及所有接觸表面之水分子重排之後，彼此間氫鍵增加而對系統  $\Delta G$  的貢獻。然而先前的研究都僅粗略估算 SAS 之接觸面積而已，並沒有仔細計算排除多少非極性區域面積，也沒有探討分子表面距離在疏水效應評估上的影響。故本研究也將以此角度去改善並設計對疏水效應考量更周全的評分方程式。



**圖 2.** 疏水效應示意圖。蛋白質和配體在結合過程中，疏水效應會有 entropy 的變化。在水溶液裡面，結合的過程包括將水分子從極性表面移除，也包括所有表面移除的水分子重排後，自由水分子數目增加，彼此之間的氫鍵也增加。

關於作用力勢能的評估，force field potential 評分方程式，是用預測過的力場數據再來預測蛋白質與配體的作用力，這些電荷值會影響結果；而且它通常假設兩原子之間的作用力場是單純與均衡的狀態下來評估，然而事實並非如此！不同的分子間作用力特性不同，以氫鍵為例，不僅僅包含 dipole-dipole 的極性吸引力，氫鍵發生時，同時還包括了電子的作用，這種作用力具有方向性，而且兩原子之間的距離更會比其凡得瓦爾半徑總合還要來的短。故至少有兩種力量在影響，在不同的距離下，個別的影響力也會不同。所以知識基礎的評分方程式以統計方式研究，能得到更貼近真實的勢能曲線，是它比力場法則準確的地方；然而各種作用力的強弱平衡就不是單純的知識基礎法則所能統計出來，而須靠經驗法則的方式來得到。故著者認為先以 pharmacophore-based concept 為作用力分類，然後以知識基礎法則去作勢能評估，並配合經驗法則，以求得各種作用力的平衡，是較理想的評分方程式的設計。至於結合前後分子構形變化所造成的內能差異，目前還未考量進來，基本上在對接過程構形搜尋時，這些分子對接軟體已經對配體構形作了合理的篩選，故本研究仍以分析蛋白質與配體之作用力為主。

### 第三節 多數軟體不易獲得

而較新發展的評分方程式，即使在準確度上有所改善，但這些新穎的程式未必容易取得，大多數商業軟體其實是相當昂貴的。故著者希望能將開發出的高準確度評分方程式，除了供我們研究使用外，也將以 GNU/GPL 的方式釋放出來，開放原始碼並且能讓學術界藥物開發的人員能夠容易取得使用，以期待這種電腦輔助藥物設計的策略，能夠充分發揮功能，帶來更多理想的藥物與治療疾病的新契機。



#### 第四節 HotLig 發展設計的概念

這篇研究中，著者開發的 HotLig 評分程式，包含 knowledge-based potential 與 empirical method 的策略。勢能函數是由 PDB 資料庫統計所衍生，在極性作用力評估上，同樣採用了 Gohlke 的演算法公式 [33]，不過並不採用複雜的原子型態分類，而改採用更實際的 pharmacophore-based interaction 的分類，然而在統計距離的分布曲線時，不直接使用原子中心點的距離，而是計算原子表面之間的距離，以避免不同原子之不同凡得瓦爾半徑造成的差異，不用細分各種原子型態而能簡化計算。

分子間作用力之型態與產生原因，像氫鍵、離子作用力、金屬離子配位共價鍵等，這些作用力明確，容易估算，惟獨在疏水效應的評估上仍然缺乏明確的方式，習慣上還是以評估排除的 solvent accessible surface (SAS) 為主(圖 3)。然而如何計算蛋白質與配體之間有多少接觸面積，而所謂的『接觸』，其距離該如何定義，還有疏水效應的強弱除了跟面積有關，又是否與其它作用力一樣，能反應在兩分子表面之間的距離上面，像這些因素都仍不夠明確，先前的研究也沒有將距離的因素編在疏水效應的計算。於是本研究則嘗試利用統計作用力距離頻率分布的方式，從 PDB 資料庫中的蛋白質-配體結晶分析大量數據，去探討是否能以『接觸面積』和『分子表面距離』兩個因子來衍生出新穎的疏水效應評估方式。

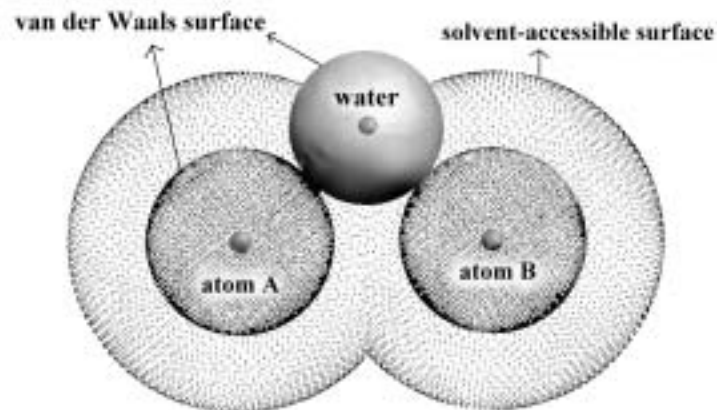


圖 3. Solvent-accessible surface 是溶媒分子中心點所在位置之集合所形成的一種表面的描述，通常是水分子，故也常稱 water-accessible surface。

由於疏水效應和分子之間的接觸面積有關，描述分子表面的定義中，以 Connolly surface 的描述最接近分子真實表面 (圖 4)，相對於 SAS，此表面代表著 solvent contactable surface。所以 HotLig 在疏水效應 (hydrophobic effect) 的評估，使用 Connolly surface 做計算，以彌補先前研究的不足，期望能提高預測準確度。



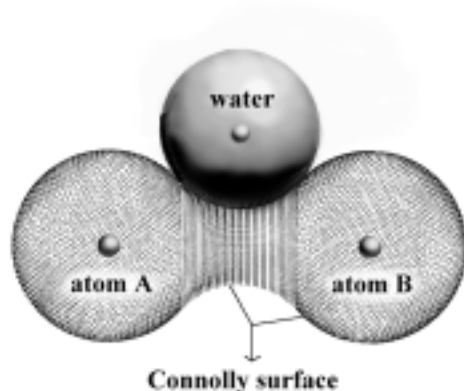
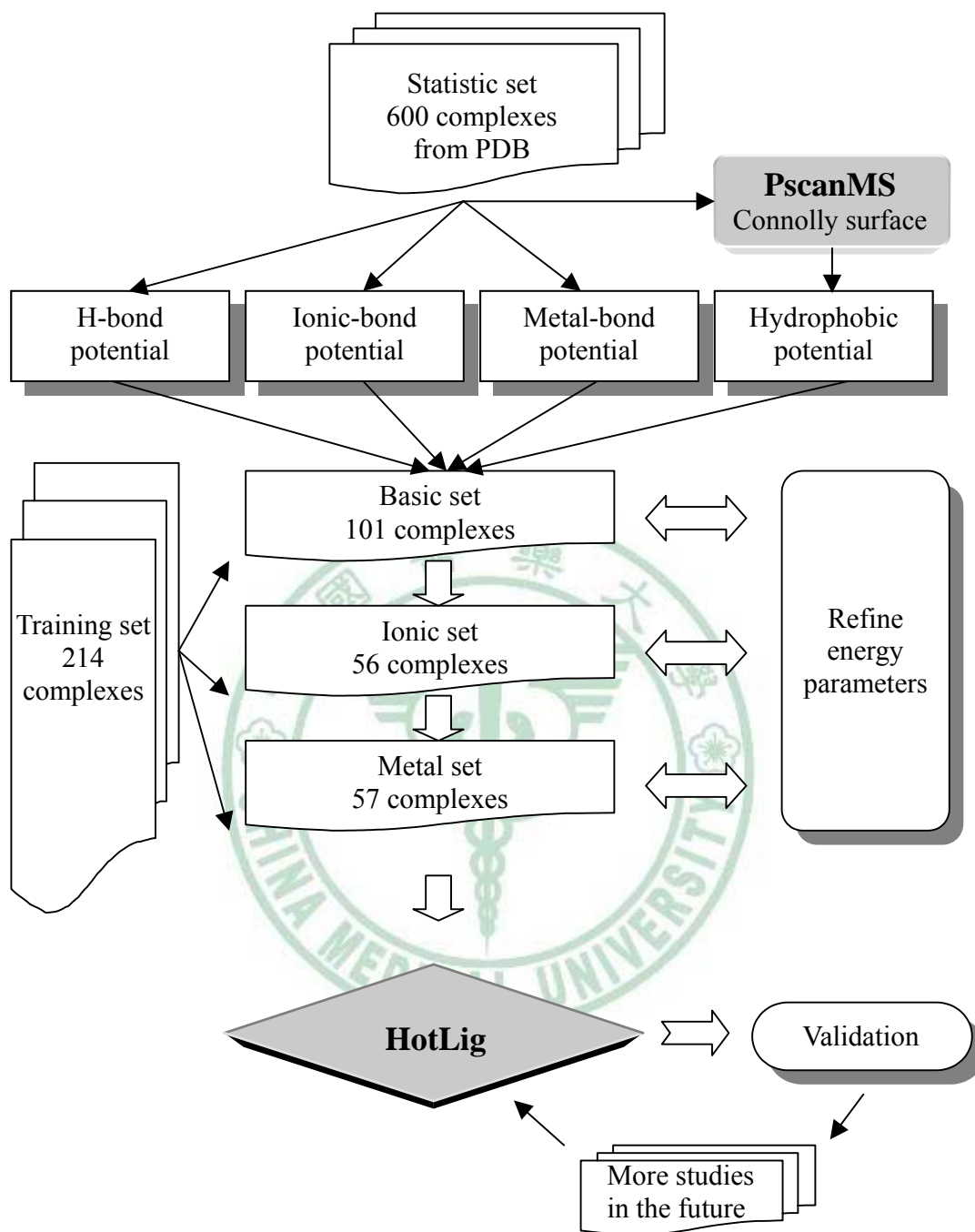


圖 4. Connolly surface 是水分子表面所接觸區域之集合，是一種分子表面描述的方式。除了水分子碰得到的蛋白質原子之 van der Waals surface，水分子進不去的空間，則以水分子表面所能達到之區域作填補，最後得到一個連續完整的分子表面描述。

故著者先開發了 PscanMS 計算蛋白結合部位的 Connolly surface，輸出格式則與 DMS 軟體相容。其分子表面點的描述，包含了小單位的面積以及單位法向量，適合應用於蛋白質-配體結合狀態的評估，除了能估算分子表面接觸面積外，還可計算表面各點的距離，進而統計距離分布頻率，轉換成疏水性區域表面與距離相依性的勢能曲線，得到新的評分方程式。至於各種作用力能量參數的最佳平衡比例，則由經驗法則 (empirical-base method) 所得到；本研究中，將收集的 training set，依所具有的分 子間作用力類型分為三類，基本組，離子組以及金屬組。如此則可由簡而繁，一步一步將各種能量參數比例求出來。整個設計流程如 Scheme 1 所示。



**Scheme 1.** HotLig 之設計與發展。

### 第三章 研究方法

#### *PscanMS* 之演算法

HotLig 使用 ms 格式之 Connolly surface 來評估蛋白質與配體之疏水效應。然而目前除了商業軟體 QCPE MS 外，僅有 DMS 是容易獲得的軟體，不過 DMS 功能較簡單，而且是計算整個蛋白質之表面，也沒有尋找 binding pocket 的功能。故著者另行撰寫計算 Connolly surface 之軟體，作為 HotLig 之輔助工具。*PscanMS* 的目的在找出並描繪任何可能 binding pocket，同時計算出結合位置的 solvent-accessible surface 以及 Connolly surface。*PscanMS* 以 C/C++ 語言所撰寫，其演算法如下所述：

首先建立一個網格，包含所要計算的區域，分別依照  $x$ ， $y$  和  $z$  三個軸進行掃描。如圖 5 所示：

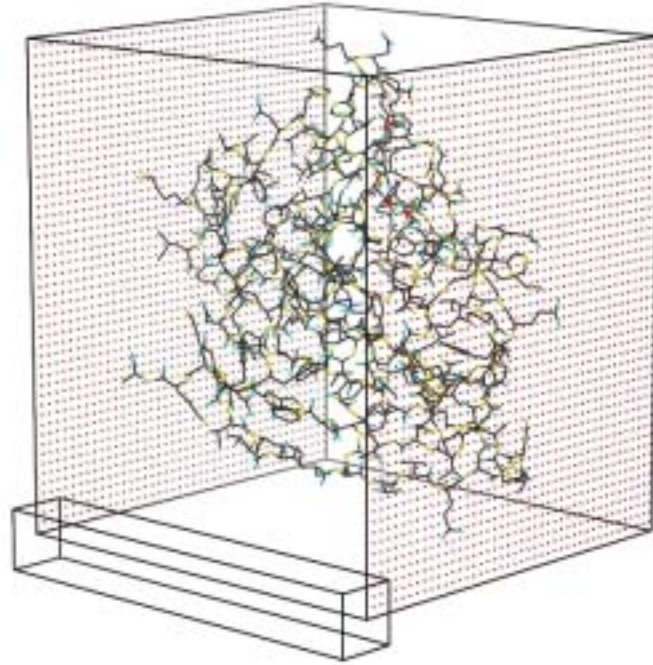


圖 5. 網格座標區域設定 PscanMS 掃描範圍。PscanMS 利用網格定義掃描座標範圍，此網格大小可以透過參數指定，故能控制整體掃描或者局部掃描。

網格包含了所有要計算之蛋白質座標區域，而掃描格會依序延三個軸方向移動，如圖 6 所示。當掃描格包覆到蛋白質原子時，這些原子會被選取出來進行蛋白質內潛在空間的掃描 (圖 7)，此外，每次掃描格所選取的蛋白質原子數目，可以用來當作整體蛋白掃描區域的控制參數，如：若掃描格內所包含的蛋白原子小於某個數值，即省略不進行掃描，如此蛋白比較表淺的位置則將不會掃描，也就是掃描區域將比較集中深層空間的掃描。若不設限制，較表淺的區域亦將進行掃描。

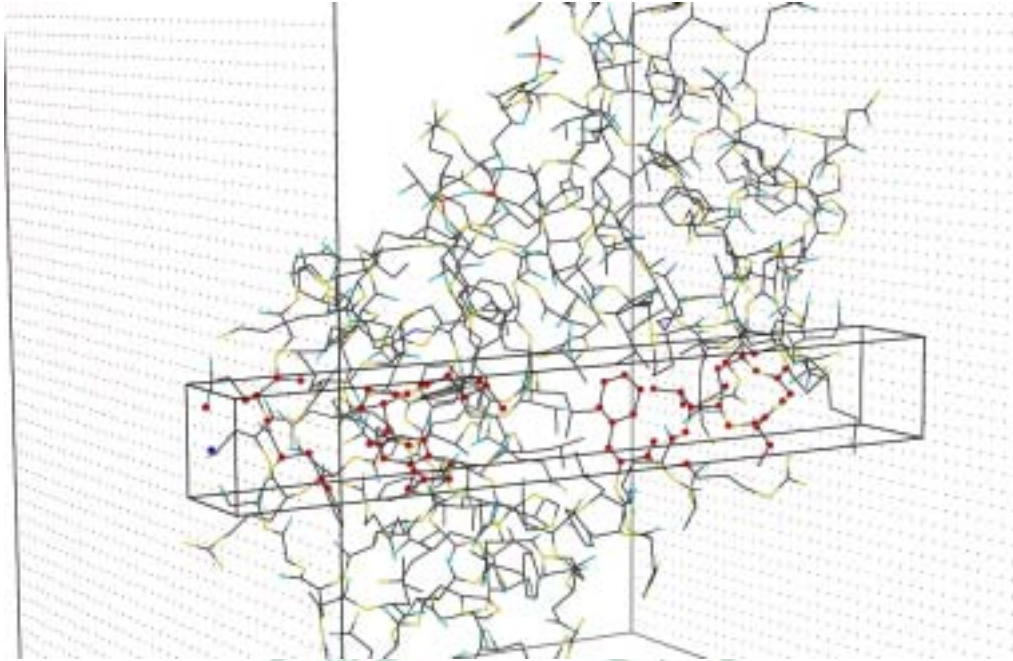


圖 6. 移動掃描格並選取蛋白質原子。掃描格依序沿著 x, y 和 z 移動，當包含到蛋白質原子時，這些原子會被選取出來。所選取到的蛋白質原子數目可以用來控制該區域是否要進行掃描。

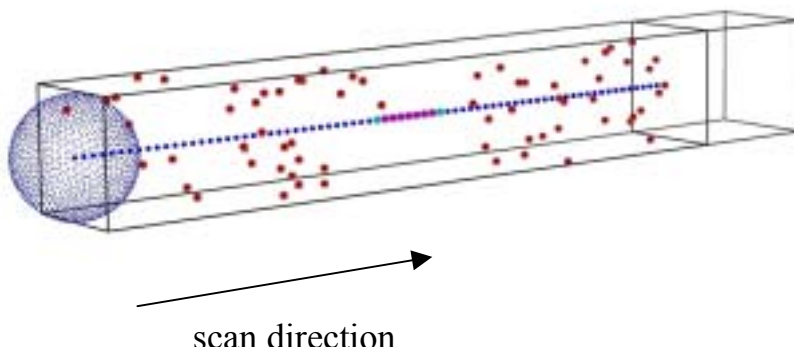


圖 7. 掃描球在掃描格內進行掃描。掃描格選取蛋白質原子後，掃描球即開始移動，尋找存在蛋白質內的 cavity。

進行空間掃描時，掃描球會一步一步移動，掃描到掃描格內所有的蛋白質原子結束的地方。在掃描過程中，如果有掃描球在某個位置時，沒有碰觸到任何一個蛋白質原子，則這些空間的兩端，最邊緣有碰觸蛋白質原子的掃描點位置(A 與 B 兩點)座標則被記錄下來。如圖 8。

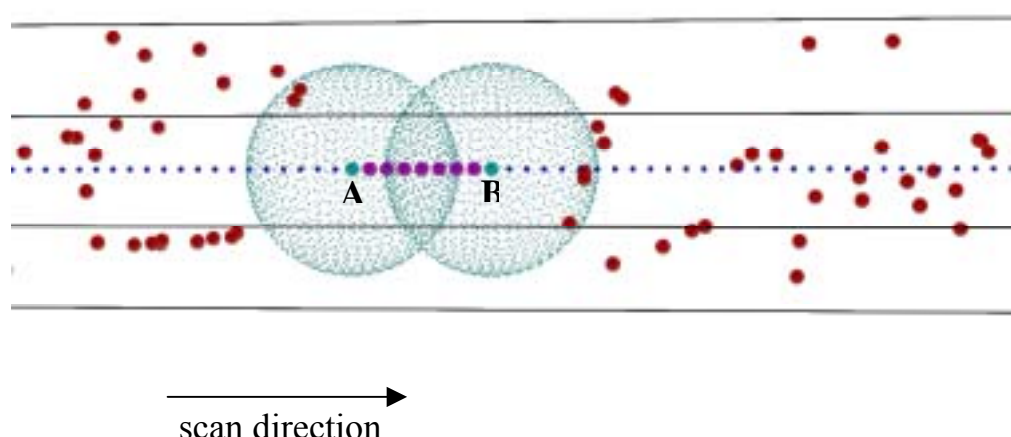


圖 8. 掃描點之記錄。發現有 cavity 存在時，其邊界的掃描球 (A 和 B) 中心座標則被記錄出來，這些點能用來描述 cavity 之形狀與性質。

假設掃描點半徑為  $r \text{ \AA}$ ，掃描點每次移動距離為  $dS \text{ \AA}$ ，故所記錄的點與蛋白質之間的最長距離為  $r \text{ \AA}$ ，最短距離為  $(r-dS) \text{ \AA}$ ；而所能掃描出最小蛋白質原子空隙之距離至少為  $2(r+dS) \text{ \AA}$ 。

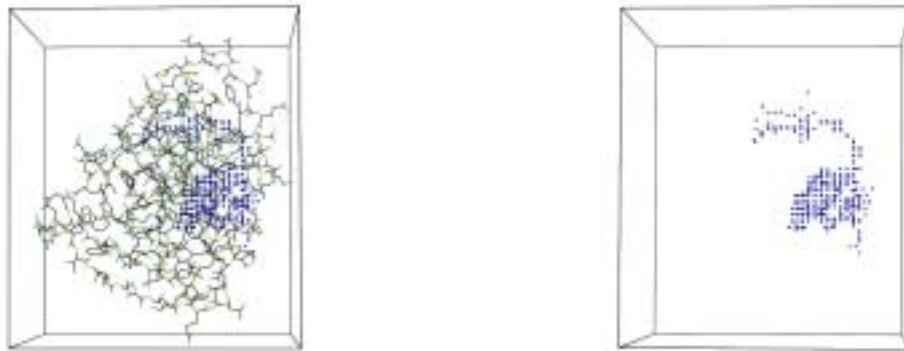


圖 9. Binding pocket 掃描結果。最後三個軸均完成掃描後，經過最佳化，刪除雜點，則可得到 cavity 的描繪。

如圖 9 所示，當三個軸方向都掃描完後，經過最佳化，則可以得到結合位置的描繪圖。事實上，這一個描繪圖接近於蛋白質分子結合位置的 solvent-accessible surface。同時，掃描完後，蛋白質的表面原子則被記錄下來，這些位於表面的原子，則可以進一步用來建構準確的 solvent-accessible surface 以及 Connolly surface。

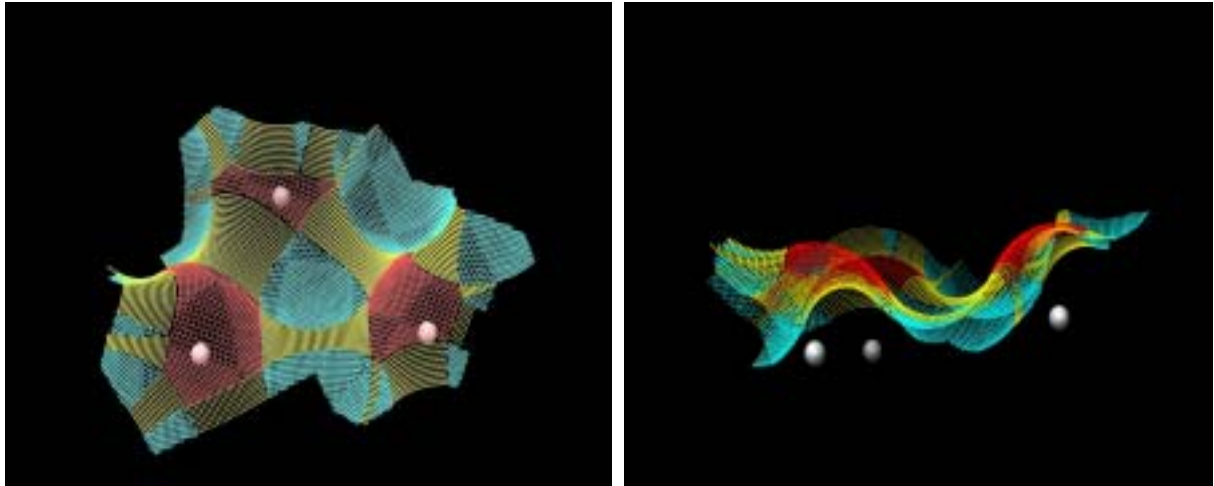


圖 10. 組成 Connolly surface 之三種表面描述。紅色為 convex 表面，是原子本身的凡得瓦爾表面；黃色為 saddle surface，介於兩原子中間；青色為 reentrant surface，屬於三個原子中間的區域。右圖為 side view。

Connolly surface 包含 convex、saddle 以及 reentrant 三個部分，在 DMS 格式裡面，分別標示為 SC0、SS0 以及 SR0。圖 10 中，蛋白質原子本身可被水接觸到的凡得瓦爾表面標示為紅色，這一部份即是 convex surface；兩個原子中間馬鞍形的部分，則是 saddle surface，標示為黃色；至於三個原子之間所形成的 reentrant surface，則標示為青色。PscanMS 建構 Connolly surface 時，三種基本的幾何圖形分別使用於建構 convex、saddle 以及 reentrant 表面，包括球形、半 torus 以及半球形 (圖 11)。



圖 11. 建構 Connolly surface 之三種基本幾何圖形。PscanMS 使用三種基本幾何圖性，sphere、half-torus 及 half-sphere，分別用於建構 Connolly surface 中的 convex、saddle 以及 reentrant surface。



Connolly surface 分別用很多小點來作為表面的描述。saddle surface 以及 reentrant surface 並不是真正的分子表面，它是以水分子表面所能達到的區域作為銜接，而形成整個連續的表面，其上面的點所屬的原子為距離最近的蛋白質原子。每個點均記錄該表面形狀的一個小區塊面積，並且記錄垂直於平面，長度為 1 之單位法向量，如此則方便於進行許多蛋白表面相關的研究，包括蛋白質與配體之間的親和力計算與預測。



### 收集用於分析蛋白質-配體交互作用之統計組

為了從 database knowledge 得到描述勢能之距離相關曲線，著者共收集了 600 個蛋白質與配體晶體結構 (表 4)，將其配體取出，轉換成 mol2 格式，蛋白質之配體結合部位則使用 PscanMS 計算出該部位之 Connolly surface，接著進行蛋白質與配體之間作用力的分析，記錄作用力的類型，還有原子中心距離以及表面之間的距離，最後再進行統計研究，各類型作用力的統計分析於後面方法敘述。

本研究對兩原子接觸與否的定義為，兩原子之間的距離，若小於一個水分子直徑大小，則定義為此兩原子有接觸，也就是有效接觸距離為兩原子之凡得瓦爾半徑以及水分子直徑之總合。當兩原子距離小於此有效接觸距離時，則會被記錄出來進行統計分析。

水分子的半徑在本研究中，模擬為半徑 1.4 Å 的球。其它原子之凡得瓦爾半徑的定義則依據 Bondi 之定義 [38]，金屬離子則以 Shannon 之離子半徑作計算 [39]，

表 4. Statistics set. There were 600 complexes collected from PDB for the study of knowledge-based potential.

1a0j	1a42	1a46	1a4k	1a50	1a5g	1a8i	1a8t	1a94	1aaq	1abe	1abf	1acj	1acl	1acm
1aco	1adb	1add	1adf	1aec	1af2	1ah0	1ah3	1aha	1aj7	1anf	1apb	1apt	1apu	1apv
1apw	1ase	1ayx	1azm	1b05	1b0h	1b1h	1b2h	1b32	1b3f	1b3g	1b3h	1b3l	1b40	1b46
1b4h	1b4p	1b4z	1b51	1b52	1b58	1b5g	1b5h	1b5i	1b5j	1b6a	1b6h	1b7h	1b9j	1ba8
1baf	1bai	1bap	1bb0	1bbz	1bcu	1bhf	1bll	1bn1	1bn3	1bn4	1bnm	1bnn	1bnq	1bnt
1bnu	1bnv	1bnw	1bra	1bxo	1bxq	1bzm	1bzy	1c1c	1c5c	1c8k	1cbx	1cil	1cla	1cnw
1cnx	1cny	1coy	1cps	1cru	1csc	1ct8	1ctt	1cx2	1d0c	1d3d	1d3p	1d3q	1d3t	1dbb
1dbj	1dbk	1dbm	1dcy	1dhf	1did	1die	1dih	1dr1	1drf	1duv	1dwb	1dwc	1dwd	1dy3
1dyr	1e1y	1e2f	1e66	1e7v	1e8w	1e96	1eap	1ebg	1ee2	1eed	1efy	1ejb	1ela	1elc
1epb	1epo	1epp	1eqc	1eqg	1eta	1etr	1ets	1ett	1ewl	1exw	1eyq	1f2a	1f74	1f8e
1f9y	1fbc	1fbf	1fbp	1fe2	1ffq	1fjs	1fkb	1fkf	1fkg	1fki	1fl3	1fl6	1flr	1fm7
1fmo	1fq4	1fq5	1fq6	1fq8	1gl d	1g27	1g45	1g46	1g48	1g4j	1g4o	1g52	1g53	1g54
1gaf	1gg5	1ghb	1gic	1gj7	1glq	1gz8	1h1i	1h3a	1hak	1hb1	1hbv	1hdc	1hdy	1hef
1hew	1hfs	1hlk	1hpv	1hri	1hsl	1ht8	1htf	1htg	1hvi	1hvj	1hvk	1hvl	1hvr	1hvs
1hw8	1hw9	1hy7	1hyt	1hyx	1hyy	1i76	1i9l	1i9m	1i9n	1i9o	1i9p	1i9q	1icn	1ida
1if8	1igj	1ij8	1ik3	1ikg	1iki	1inc	1itu	1ivd	1ive	1ix1	1iyl	1j4r	1jak	1jcx
1jet	1jeu	1jev	1jk7	1jkx	1jq3	1kel	1kgj	1ki8	1klk	1kmv	1kn2	1kn4	1kno	1kqb
1kvo	1kz8	1l82	1l83	1l86	1l87	1ld8	1ldm	1lgr	1lic	1llo	1lnm	1lpd	1lrh	1lri
1lst	1ly3	1lyb	1m17	1m2x	1m52	1m79	1m7y	1mcb	1mcf	1mch	1mcj	1mer	1mcs	1mdq
1mdr	1me8	1mfc	1mfe	1ml4	1mnc	1moq	1mrk	1mrs	1mup	1ncl	1nhx	1nis	1njs	1nms
1nnb	1nqu	1nqx	1o9f	1odc	1ogx	1oiy	1ooq	1oq5	1ow2	1oyn	1p4f	1p6k	1p6o	1pa9
1pbd	1pgp	1pha	1phd	1phg	1phh	1pmq	1pmv	1pn9	1poc	1ppc	1pph	1ppk	1ppl	1ppm
1pso	1q6z	1q92	1qci	1qhy	1qka	1qkb	1ql7	1ql8	1qmg	1qxy	1rbp	1rds	1rgk	1rgl
1rne	1rnt	1rob	1rpa	1rus	1s2a	1s5s	1sln	1slt	1snc	1sre	1srj	1stp	1t31	1t46
1t4e	1tbb	1tdb	1tet	1tha	1the	1thz	1tka	1tlp	1tmn	1tmt	1tng	1tnh	1tni	1tnj
1tnk	1tnl	1tpp	1tt8	1ttm	1tu7	1tx2	1u0h	1ulx	1u2y	1u32	1u4g	1ulb	1uof	1us0
1uu3	1uw h	1uwz	1uzf	1v2k	1val	1vam	1vot	1w82	1w96	1w9u	1wb0	1wvm	1x7r	1x8b
1xid	1xie	1xii	1xli	1xnk	1xnz	1xo2	1xoz	1xpo	1xuo	1y57	1yda	1ydb	1ydd	1yeg
1yei	1yej	1yqy	1yuh	1yvm	1yvx	1ywn	1yyy	1zkl	1zl2	1zos	1zsb	1zz3	1zzz	2a1h
2a3i	2ab2	2ack	2ada	2ai2	2ai8	2aie	2ak3	2akw	2anj	2ao0	2b0m	2b7a	2bb7	2bik
2bre	2bua	2byi	2bz6	2c1a	2c4w	2cbu	2ccs	2cgr	2chl	2cht	2cpp	2csc	2ctc	2cvd
2dbl	2dri	2er0	2er6	2er7	2er9	2f4j	2f7d	2f8c	2f94	2fda	2fdd	2fm0	2fm5	2fp7
2fq9	2fqr	2g28	2gbp	2gfs	2gke	2gss	2h4n	2ifb	2ldb	2mcp	2msb	2olb	2pcp	2phh
2pk4	2plv	2qwb	2qwc	2qwd	2qwe	2qwf	2qwg	2r04	2r07	2rnt	2sim	2sns	2tmn	2xim
2xis	2yhx	2ypi	35c8	3cla	3cpa	3csc	3er3	3fx2	3gch	3gpb	3hvt	3mth	3pgm	3ptb
3tmn	3tpi	3ts1	43ca	4aah	4cla	4cts	4dfr	4er1	4er2	4er4	4erk	4est	4fab	4gr1
4hvp	4mdh	4pah	4phv	4sga	4tim	4tln	4tmn	4ts1	4xia	5abp	5acn	5cna	5enl	5er2
5hvp	5icd	5ldh	5p21	5p2p	5pah	5sga	5std	5tim	5tln	5tmn	5xia	6abp	6acn	6apr
6cpa	6enl	6rnt	6rsa	6tim	6tmn	7abp	7acn	7cat	7dfr	7est	7hvp	7taa	7tim	7tln
8a3h	8abp	8acn	8atc	8cpa	8gch	8hvp	8icd	8xia	9aat	9abp	9hvp	9icd	9ldt	9rub

### 極性作用力之距離相依性勢能函數

原則上，方法以及演算法沿用 Gohlke 的研究，不過並不細分繁雜的原子型態，而以作用力分類；同時在選定常態基準值的方式也不同。其中極性作用力在本研究分為三類計算，包括氫鍵、離子作用力及金屬共價鍵等。氫鍵則有角度上的限制，donor-H-acceptor 的角度以及 R-acceptor-donor 的角度均需大於 90°，符合這個條件才列入距離分布的統計。

標準化公式如下：

$$g_{i,j}(r) = N_{i,j}(r) / 4\pi r^2 dr \quad (8)$$

其中  $N_{i,j}(r)$  為在原子中心距離  $r$  到  $r + dr$  以內，蛋白原子  $i$  以及配體原子  $j$  形成特定極性作用力數目，並除以球殼  $r$  到  $r + dr$  之體積。然後將  $r$  轉變為原子表面的距離，也就是兩原子中心距離扣除掉兩原子凡得瓦爾半徑總合，作為新的距離分布曲線。而  $g_{i,j}(r)$  函數中，遠距離數據達到平衡穩定狀態後的平均值視為無作用力狀態之分布  $g_{i,j}(r_s)$ ，最後以此值直接作為常態基準值。故：

$$\Delta W_{i,j}(r) = W_{i,j}(r) - W_{i,j}(r_s) = -\ln \frac{g_{i,j}(r)}{g_{i,j}(r_s)} \quad (9)$$

最後應用時， $\Delta W_{i,j}(r)$  函數的最小值標準化至 -1。

### 疏水效應之距離相依性勢能函數

Connolly surface 上面每一個點，均記錄一個小區塊面積值以及一個單位法向量。首先將單位法向量長度調到 6 Å，然後計算並記錄與此法向量最接近之配體原子表面距離，即為新的法向量長度。其中形成疏水效應之非極性區域，所有表面點  $s$  之距離分布編為函數  $g_s(r)$ 。

分子表面接觸距離由單方向的法向量而來，故並不需經過標準化過程，同樣的， $g_s(r)$  遠距離數據達到平衡穩定狀態後的平均值視為無作用力狀態之分布  $g_s(r_s)$ ，最後以此值直接作為常態基準值。故：

$$\Delta W_s(r) = W_s(r) - W_s(r_s) = -\ln \frac{g_s(r)}{g_s(r_s)} \quad (10)$$

最後應用時， $\Delta W_m(r)$  函數的最小值標準化至 -1。

當兩個原子被認定為接觸時，其 Connolly surface 之表面積同時做積分，由於接觸面屬於兩個分子共有，故接觸面積以兩倍計算。此外，所有蛋白質極性原子以及配體極性原子之 polar surface area (PSA) 也在此被另外總合計算出來。沒有形成任何極性作用力之 PSA，則依面積編為扣分的函數（數值為正值）。

### 勢能總變化值公式

將上述之計算最後整合，得到一個預估勢能的總變化值公式：

$$\begin{aligned}\Delta W = & E_{H-bond} \times \sum_{hi} \sum_{hj} (\cos \theta \times \Delta W_{i,j}(r)) + E_{ion} \times \sum_{ii} \sum_{ij} \Delta W_{i,j}(r) + E_{metal} \times \sum_{mi} \sum_{mj} \Delta W_{i,j}(r) \\ & + E_{hydrophobic} \times \sum_s (Area_s \times \Delta W_s(r)) \\ & + E_{unfit} \times \sum_u (Area_u)\end{aligned}\tag{11}$$

其中：

$\theta=180$  – angle of donor-H-acceptor；

能量參數 $E_{H-bond}$  在本研究標準化至 1，接著其它 $E_{ion}$ ， $E_{metal}$ ， $E_{hydrophobic}$  以及 $E_{unfit}$

則需由訓練組去作最佳化調整，方法描述於後。



### 收集用於訓練能量參數之訓練組

為了使 HotLig 能在各種作用力之評估達到最佳的平衡，故應用經驗法則方式訓練出各種作用力之基本能量參數。首先盡量從 PDB 收集蛋白質-配體複合結構，由於目的是用於 scoring function 之訓練，故下列會干擾評分的情形則盡量避免選取，以達到理想訓練效果：

1. 對接失敗，無法產生接近 native pose 之構形與位向。然而由於 DOCK 在離子類組以及金屬類組之失敗率太高，故此二類並無嚴格排除。評分時，則加入 native pose 與否進行評分比較，以排除對接失敗的影響；同時 DOCK 本身的評分方程式與 HotLig 之優劣亦將一併比較。
2. 結合部位不完整。
3. 對稱性的配體結構或者對稱性的結合部位。

在本研究中，共挑選收集了 214 個蛋白質配體之晶體結構，並依照蛋白質與配體分子間作用力分為三類，包括基本類組 101 個，離子類組 56 個以及金屬類組 57 個等三類 (表 5)。在 214 個蛋白質-配體結構中，結合部位內只要有金屬離子存在的，都歸類到金屬類組；蛋白質與配體分子間作用力只要有離子作用力形成，但無金屬離子存在的，歸類到離子類組；剩下的為完全沒有金屬離子，也沒有離子間作用力的，列為基本組。

表 5. There were 214 complexes were collected for training set. Three subsets were classified according to the molecular interactions between protein and ligand.

---

*Basic set (101 complexes)*

1a50 1a8i 1ah0 1ah3 1bxo 1c1c 1c8k 1cx2 1d0c 1dyr 1e1y 1e66 1e7v 1e8w 1efy  
1ewl 1eyq 1fm7 1fmo 1gg5 1gz8 1h3a 1ij8 1iki 1iyl 1j4r 1kgj 1ki8 1klk 1kmv  
1kz8 1lnm 1lpd 1lri 1ly3 1m17 1m52 1m79 1me8 1moq 1nc1 1nhx 1nqu 1ogx 1oiy  
1ooq 1oyn 1p4f 1pmq 1pmv 1qci 1s5s 1t46 1t4e 1tbb 1tnj 1tx2 1u0h 1u2y 1u32  
1us0 1uu3 1uwh 1v2k 1vot 1w82 1w96 1w9u 1x7r 1x8b 1xnk 1xo2 1xoz 1xuo 1y57  
1yvx 1ywn 1zkl 1zl2 1zos 2a1h 2a3i 2ab2 2ao0 2b7a 2bik 2brc 2byi 2bz6 2c4w  
2ccs 2chl 2cvd 2f4j 2f7d 2fdd 2fm0 2gfs 4erk 5std 8a3h

*Ionic set (56 complexes)*

1a0j 1ayx 1b4p 1dhf 1duv 1ejb 1eqc 1eqg 1f74 1f8e 1fe2 1ffq 1fjs 1gj7 1ht8  
1hw8 1hw9 1ikg 1ivd 1jak 1jcx 1jk7 1jkx 1jq3 1kqb 1m7y 1ml4 1njs 1nms 1nqx  
1p6k 1pa9 1pn9 1q92 1t31 1thz 1tnl 1tt8 1tu7 1u1x 1wb0 2ai2 2akw 2anj 2b0m  
2bua 2c1a 2cbu 2fda 2fp7 2fqr 2gke 2gss 2qwd 35c8 7taa

*Metal set (57 complexes)*

1a8t 1b6a 1bzy 1cil 1cru 1ctt 1dcy 1dy3 1e2f 1ee2 1f9y 1g27 1h1i 1hb1 1hfs  
1hlk 1hy7 1i76 1ik3 1itu 1ix1 1kvo 1ld8 1lrh 1m2x 1mrs 1oq5 1ow2 1p6o 1q6z  
1qmg 1qxy 1s2a 1sln 1snc 1ttm 1u4g 1uof 1uwz 1uzf 1xii 1xnz 1xpo 1yqy 1yvm  
1zz3 2ai8 2aie 2bb7 2cpp 2f8c 2f94 2fm5 2g28 4pah 4tln 5pah

---

這樣子的設計，由簡單到複雜，可以循序漸進，調整出所有作用力型態的參數比例。首先 $E_{\text{H-bond}}$ 標準化為 1，然後利用基本類組去調整並找出結合模式預測成功率最高的能量參數，作為最佳化的 $E_{\text{hydrophobic}}$ 以及 $E_{\text{unfit}}$ ，接者再用找尋出來的參數進一步去測試離子類組，並且調整找出最佳化的 $E_{\text{ion}}$ ，然後同樣地，再由金屬類組去求得 $E_{\text{metal}}$ ，如此個評分方程式得以完成。



進行對接時，首先移除蛋白質結構內所含之配體以及結晶水，但保留金屬離子。配體利用 DOCK 進行分子對接，並將對接過程產生的各種構形輸出。所有的蛋白質與配體皆經過詳細完整的構形搜尋。最後將原本配體座標檔案 (native pose) 加到對接產生的構形檔案裡，再由 HotLig 去做評分與排序，排序第一名的構形與 native pose 相比之 RMSD 值作為預測成功與否的判斷依據， $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$  才列入成功率的計算。



## 效能之評估

### (1) Prediction of binding modes

Wang 100 dataset 以及 GOLD 100 dataset 被選用來測試 HotLig 的準確度。這兩組 datasets 已經被許多研究使用過 [30,24,45]，故選用來測試 HotLig 的效能。其中 Wang 100 dataset 在先前的研究裡使用的 docked poses 可以下載得到 [30,40]，無須從新對接，所以此 dataset 的預測結果可以客觀地和先前的研究結果進行比較。而 GOLD100 dataset 其對接以及計算成功率的方式如同訓練組的方法中所述。測試時，結合部位之金屬離子均保留，所有結晶水均去除。

### (2) Prediction of binding affinity

Wang 100 dataset 當中，蛋白與配體之親和力或者配體活性都是已知的，故同時也可作為預測 binding affinity 之確效。其預測結果排序後，評分分數和實驗數據之排序進行相關性的比較，並計算 Spearman correlation coefficient ( $R_s$ ) 來作為相關性之評估。

### (3) Virtual screening

虛擬篩選測試使用之標的蛋白為 HSV-1 thymidine kinase (TK)，PDB code 1kim；配體資料庫則使用 Glide 軟體以及 Bissantz 等人所使用的 decoys dataset

[41-43]，包括從 PDB 獲得的十個已知活性的結構 (圖 12)。不過原論文並無詳細記載個別結構的活性，只有說明其中 dT 和 idu 具有 submicromolar 之結合常數，其它配體活性範圍則為 1.5~200  $\mu\text{M}$ 。這十個 actives 所屬的 PDB code 分別為：

**dT:** 1kim    **idu:** 1ki7    **ahiu:** 1ki6    **dhbt:** 1e2p    **hpt:** 1e2m  
**hmtt:** 1e2n    **mct:** 1e2k    **acv:** 2ki5    **gcv:** 1ki2    **pcv:** 1ki3

由於這些 thymidine 類的配體和 TK 之間的作用力，原本就有透過水分子結合，亦即該水分子對 TK 辨識 thymidine 是重要的，故本測試中，分別在保留結晶水以及去除結晶水的條件下，進行虛擬篩選，其對結果之影響將一併探討。

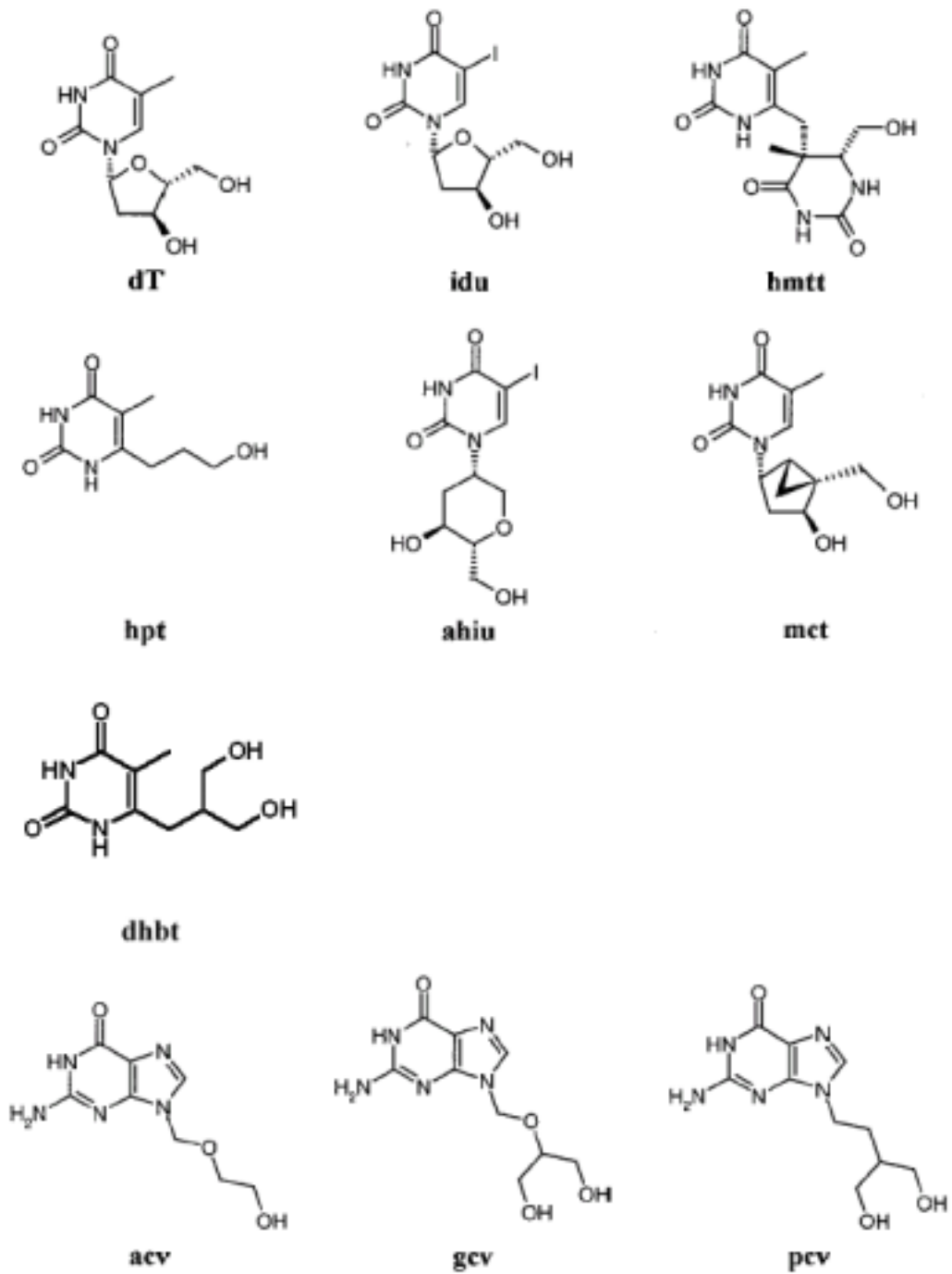


圖 12. 十種已知的 HSV-1 thymidine kinase 之配體結構。其中 dT 與 idu 為 submicromolar ligand.

## 其它 CADD 軟體之研發

在 HotLig 研發過程中，著者還開發幾個其它輔助工具，包過 DBfilter、DBstat 以及 Pmol2Q，均以 C/C++ 程式語言所撰寫。其中 DBfilter 是小分子資料庫 drug-like 過濾篩選工具，而 DBstat 是 drug-like 統計分析工具，本研究中用來統計 datasets 配體結構之特性分布。它們可以針對十二種結構特性進行分析或者篩選，包括 Allowed\_atoms、Molecular\_weight、LogP、H\_bond\_donors、H\_bond\_acceptors、Sum\_of\_N+O、Halogens、Rings、Max\_ring\_members、Rotatable\_bonds、CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- 以及 CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-。其中 LogP 計算需搭配 XLOGP 軟體使用 [48]。

Pmol2Q 是蛋白質檔案格式之轉換工具，能將蛋白質檔案從 pdb 格式轉換為 mol2、pdbq 以及 pdbqs 等格式，並且處理加氫加電荷的工作。能夠使用的電荷型態包括：

- (1) KOLLMAN\_ALL
- (2) KOLLMAN\_UNITED
- (3) AMBER\_4.1
- (4) AMBER\_7\_FF02
- (5) AMBER\_7\_FF99
- (6) GAST\_HUCK
- (7) MMFF94

## 硬體設備與軟體系統

本研究所使用之硬體為個人電腦，中央處理器為 Intel Pentium4 2.0 AGHz，搭配金士頓 512 MB DDR333 RAM，作業系統為 RedHat Linux 9.0，編譯軟體為 gcc-3.2.2。



## 第四章 結果與討論

### 統計組之特性

統計組 600 個複合結構，其配體結構特性的分布，經由 DBstat 統計後如圖 13 所示。這裡列出六種重要特性之分布，包括元素種類、結構之 flexibility (rotatable bonds)、分子量、logP、H-bond donor 和 H-bond acceptor。圖中可看出 statistics set 配體在各種特性上都能廣泛分布，尤其是 logP 分布範圍很廣，這樣對一個 statistics set 來說是重要的，表示極性到非極性作用力能被廣泛的考量。此外，從這些複合結構之配體分析，大致看得出這些特性有特殊分布的趨勢。如 rotatable bonds 數量為 0~5、分子量 100~500、logP 範圍-4 ~ 4、H-bond donor 數量 0~5、H-bond acceptor 數量 2~8，這些範圍是明顯較集中的。

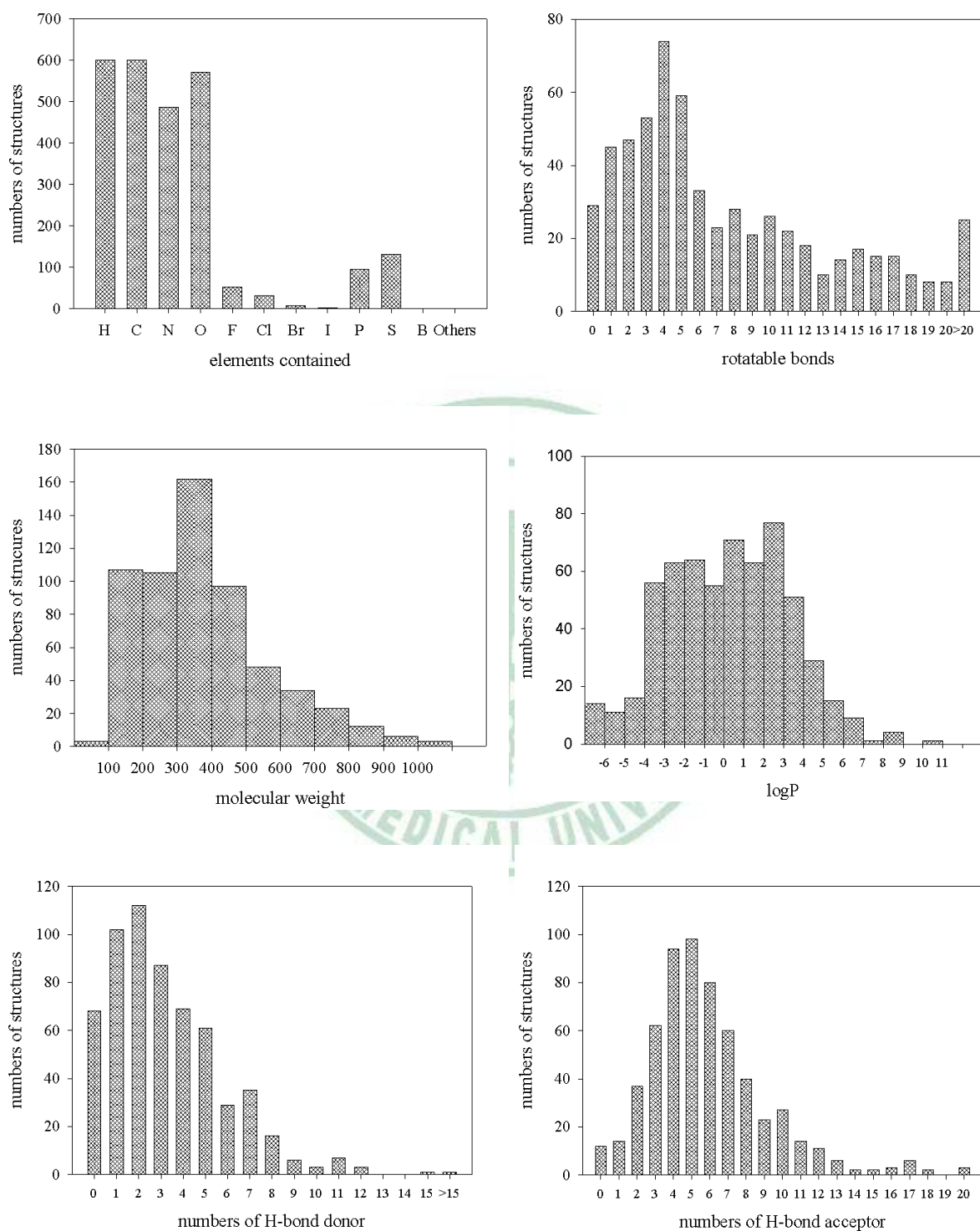


圖 13. 統計組 600 個複合結構配體結構特性之分布。



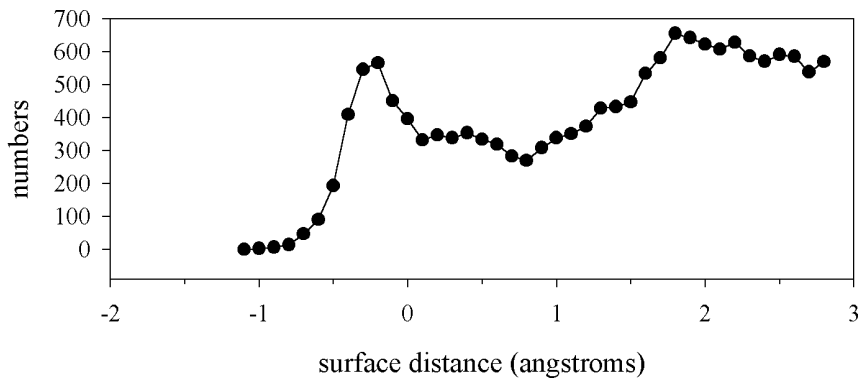
### 距離相依性勢能函數

統計組 600 個蛋白質與配體晶體結構，經過作用力分析之後，得到的氫鍵、離子作用力以及金屬離子配位共價鍵之距離相依性的分布曲線 (A)，標準化函數曲線  $g(r)$  (B) 以及  $\Delta W$  勢能曲線 (C)，如圖 14 至圖 16 所示。疏水效應非極性區域表面的分布圖與勢能圖如圖 17 所示。

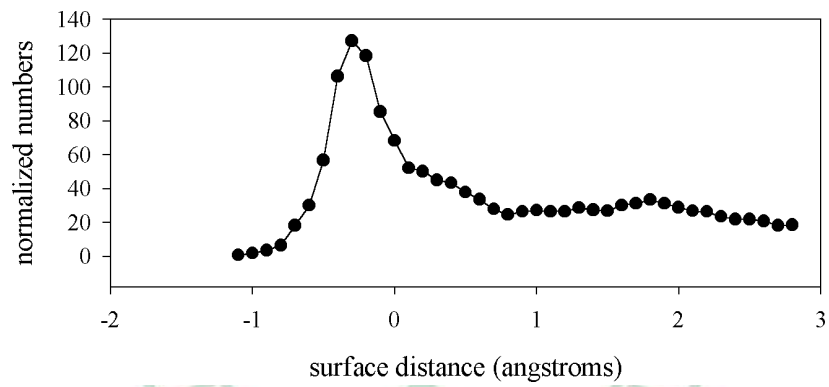
很明顯的，極性作用力之高峯值均出現在  $-0.3 \sim -0.2 \text{ \AA}$  之間，而金屬離子配位共價鍵由於統計上數量相對較少，故其勢能曲線起伏也較大，不過足以看出其作用力距離範圍與型態。疏水效應非極性區域表面之距離分布圖則可以看出，高峯值分布在  $1 \text{ \AA}$ 。



(A)



(B)



(C)

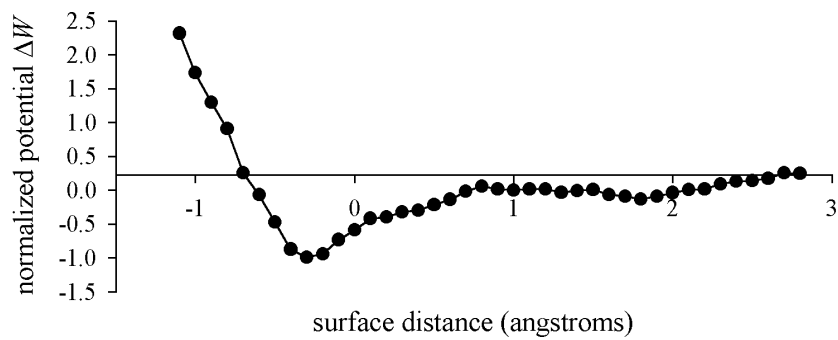
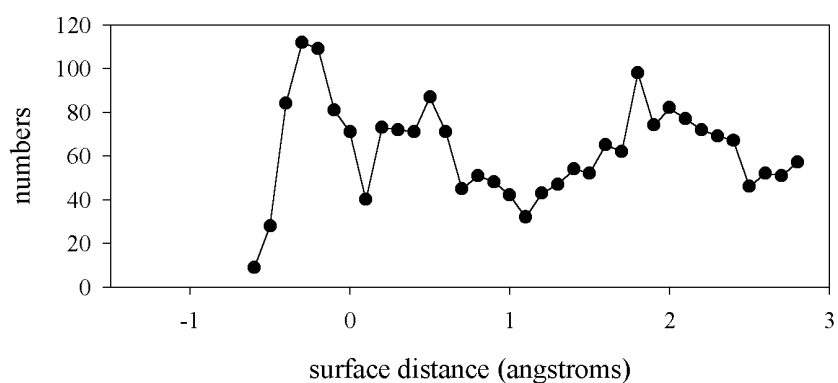
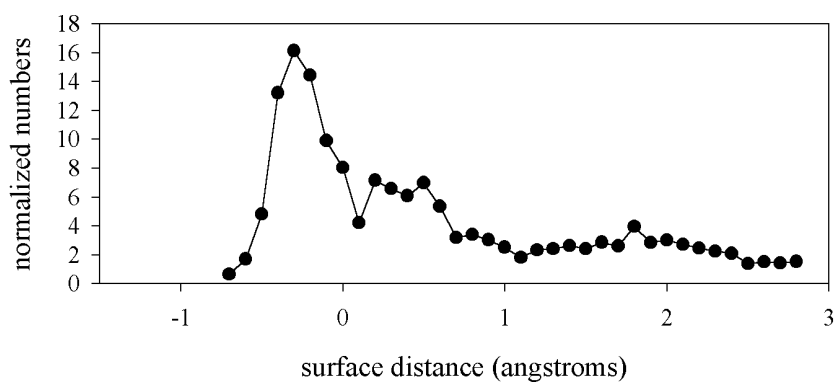


圖 14. (A) Results of statistic distribution curve for H-bond interaction. (B) shows the normalized curve of (A). (C) was the distance-dependant potential for H-bond interaction computed by equation (9).

(A)



(B)



(C)

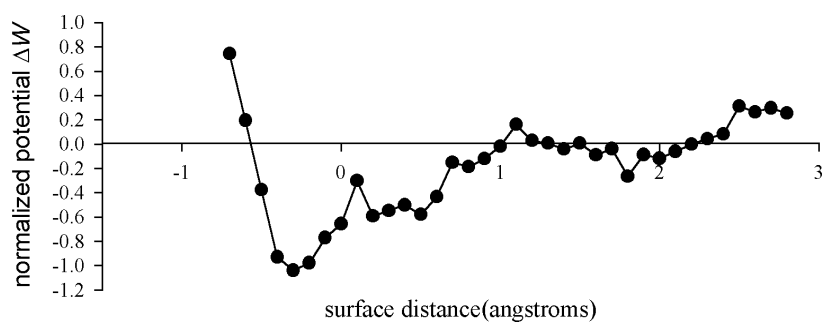


圖 15. (A) Results of statistic distribution curve for ionic interaction. (B) shows the normalized curve of (A). (C) was the distance-dependant potential for ionic interaction computed by equation (9).

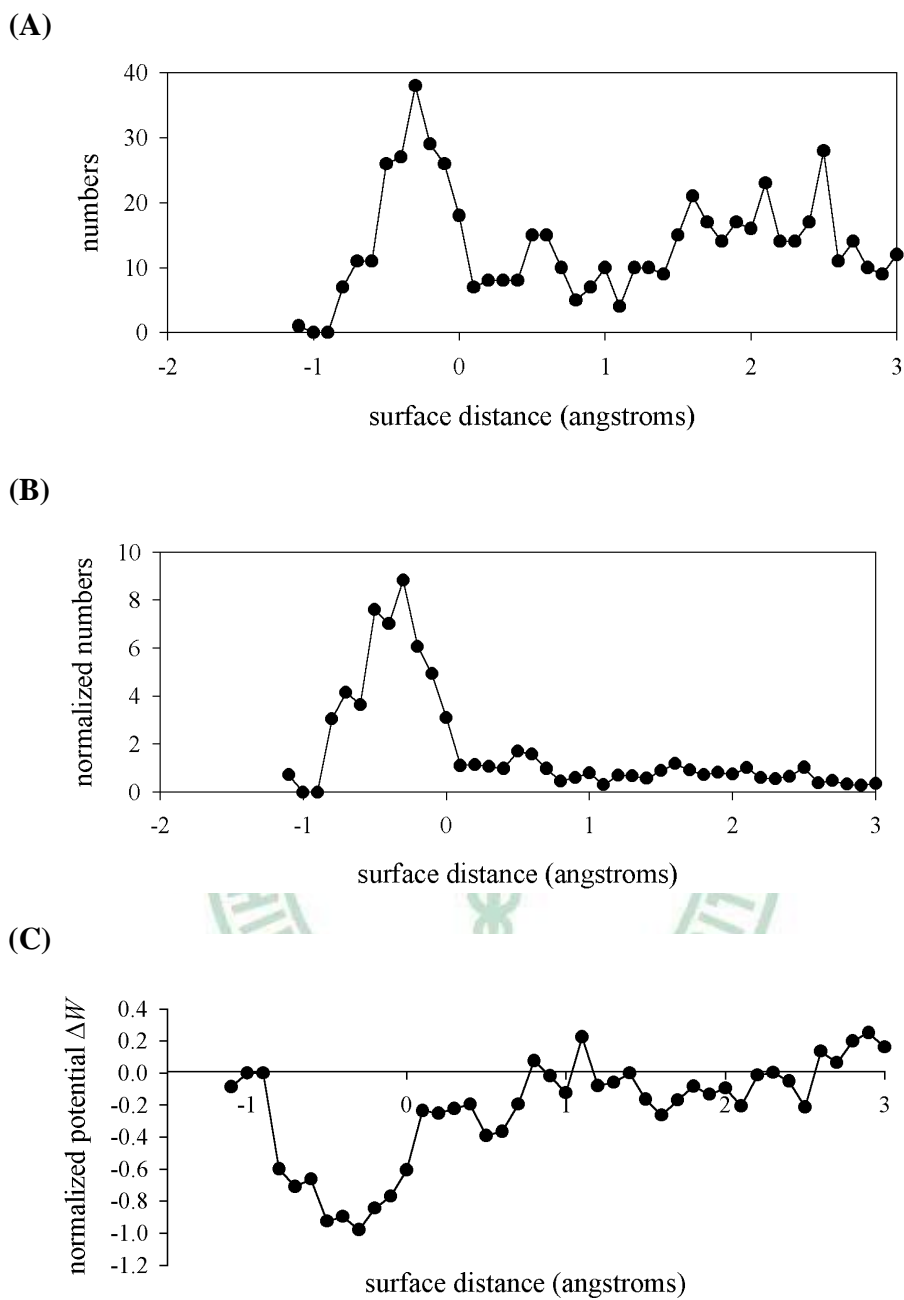
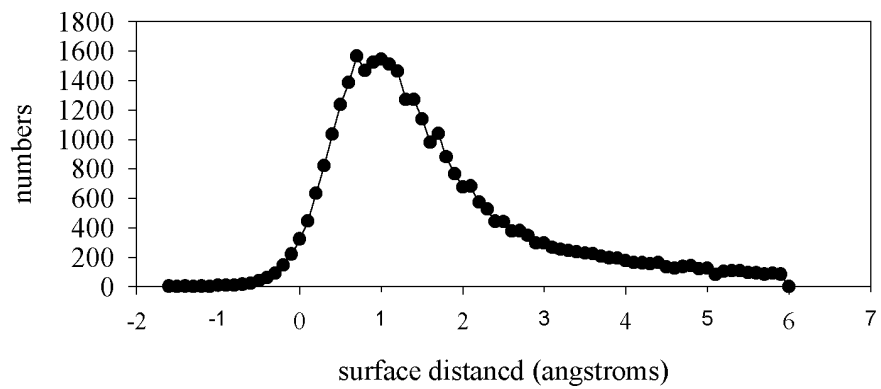


Figure 16. (A) Results of statistic distribution curve for metal bond interaction. (B) shows the normalized curve of (A). (C) was the distance-dependant potential for metal bond interaction computed by equation (9).

(A)



(B)

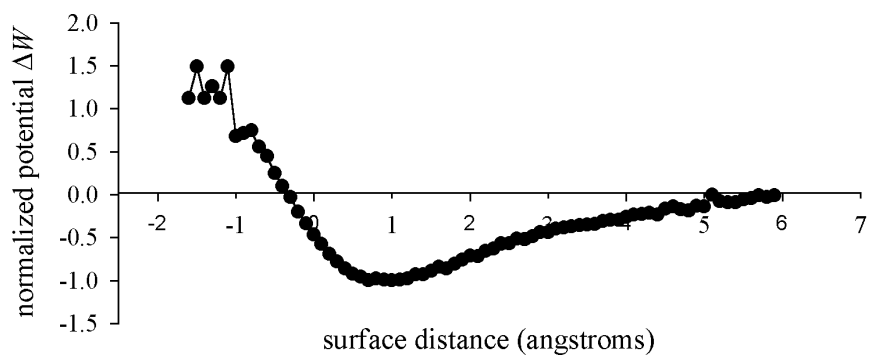


圖 17. (A) Results of statistic distribution curve for no-polar-interaction surface area. (B) was the distance-dependant potential computed by equation (10).

我們可以看出統計結果中，距離相依性的分布圖是相當有意義的。以 H-bond 的分布圖來說，跟傳統上描述分子能量與距離關係的 Lennard-Jones 12-6 曲線比起來，H-bond 距離分布勢能曲線呈現了雙蜂的形勢，這可能表示當中作用力並不是單純均勻的力場，而是有兩種以上的作用力同時發生，這兩種力量可能一個是 dipole-dipole 的吸引力，其分布以 0.5 Å 附近為主；另一個主峰才是氫鍵的作用力所造成，分布在表面距離 -0.3 ~ 0.1 Å 之間，表示這是形成氫鍵的主要距離，也就是在兩個原子靠近到原子表面將要接觸時，這時氫鍵的作用力開始明顯增加，即原子表面距離在 0.1~0.3 Å 時，這時引發形成氫鍵的吸引力產生，造成此距離附近的位能增加而不安定，促使兩原子更加地接近，所以在統計分布上，0.1~0.3 Å 之間部分的分布相對較少，反之，更短距離 (-0.3 ~ -0.2 Å) 的分布大幅提高，形成主峰的分布以及雙蜂的呈現。此主峰分布可以看出，氫鍵發生後，兩原子的距離短於兩者的凡得瓦爾半徑總合，平均少了 0.3 ~ 0.4 Å，約 10% 左右。

同樣的情形，我們在離子作用力的勢能分布圖也一樣可以看到雙蜂的型態。而且比氫鍵的分布圖還要明顯，金屬離子配位共價鍵亦是如此。這可能是因為離子作用力在 dipole-dipole 的吸引力上較強，另一方面，由於-COOH 兩個氧均有機會帶負電，arginine 也一樣，正電荷可以分布在鄰近的幾個原子

上，這樣官能基的特性，也有可能造成分布圖雙峰更加明顯的因素之一。

至於疏水效應非極性表面點的距離分布圖，相對於極性作用力，其在型態上則較接近於 Lennard Jones 之曲線型態。



### 訓練組之特性

訓練組 214 個複合結構，配體結構特性的分布統計，經由 DBstat 統計如圖 18。由於訓練組的目的是要訓練評分方程式之能量參數，故會特別挑選並排除可能會影響評分公正性的結構。經過這個程序，我們可以發現，這一組在結構特性的分布上，與統計組有些差異出現。最明顯的就是 rotatable bonds 超過 13 的結構數量分布變少，flexibility 太高的結構通常構形的搜尋比較困難，容易造成對接過程的失敗，故挑選訓練組時常被排除。在 logP 的分布上顯示，訓練組更加集中在 drug-like 的範圍，不過分布範圍還是可以很廣，其它特性之分布型態與範圍大多仍和統計組相似。





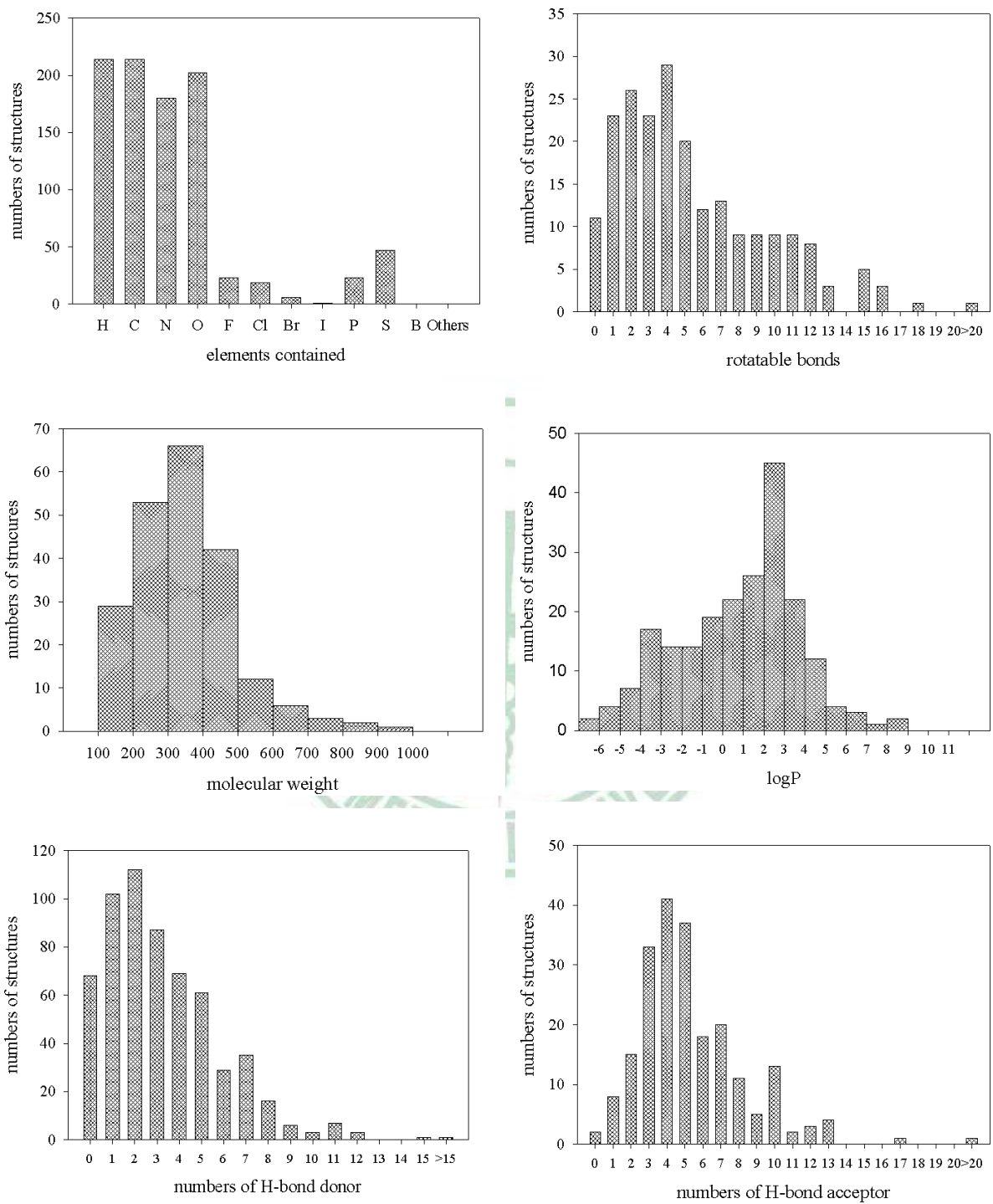


圖 18. 訓練組 214 個複合結構配體結構特性之分布。

## 能量參數之最佳化

在求得各種作用力的勢能函數以後，各種作用力的能量參數比例，則透過分類過的 training set 進行能量參數最佳化。其中  $E_{\text{H-bond}}$  首先標準化成 1，其餘各個參數經過重複驗證基本組、離子組以及金屬組之預測成功率，調整至最佳化。其結果如表 6。

表 6. The optimized parameters and the best success rate of predicting binding modes of training sets.

Training sets (number)	Optimized parameters <sup>a</sup>	The best success rate <sup>b</sup> (%)		
		DOCK	HotLig <sup>-</sup>	HotLig <sup>+</sup>
Basic set (101)	$E_{\text{hydrophobic}} = 0.08$ $E_{\text{unfit}} = 0.5$	54.46	84.16	89.11
Ionic set (56)	$E_{\text{ion}} = 1$	44.64	69.64	89.29
Metal set (57)	$E_{\text{metal}} = 4.5$	26.32	52.63	85.96
Overall (214)		44.39	71.96	88.32

<sup>a</sup>  $E_{\text{H-bond}} = 1$

<sup>b</sup> HotLig<sup>-</sup>: without native poses ; HotLig<sup>+</sup>: with native poses.

表 6 中可以看出，DOCK 在離子類組以及金屬類組對接過程較不易產生 near-native pose 之構形，可能有兩個原因，一個是 DOCK 原子半徑參數的問題；一個可能是所應用之 force field 的問題，也許是電荷的錯誤，也許是本身演算法的缺陷。

評分過程加入 native pose (HotLig<sup>+</sup>) 時，可看出 HotLig 在各類組之結果差異不大。而未加入 native pose 時之數據 (HotLig<sup>-</sup>)，則可以用來和 DOCK 評分方程式的效能進行比較。我們可以看出，利用 HotLig 從新評分後，可以使 DOCK 預測成功率從 44.39% 提昇至 71.96%。若排除 DOCK 對接過程，構形搜尋失敗的影響，HotLig 在訓練組的總成功率可達 88.32%。

在 energy parameters 最佳化的研究中，我們發現， $E_{\text{H-bond}}$  和  $E_{\text{ion}}$  的值相當，表示這兩種作用力的強弱大致上相當，另外金屬配位共價鍵則相對的強了許多，約為 4.5 倍。

在這些 dataset 的研究中，著者也發現，氫鍵的作用力對配體結構的選擇性上幫助較大，如果氫鍵作用力太少，則其結合模式的預測也較不易成功。整體來看，非極性區域在蛋白質與配體結合力的貢獻上相當重要，然而該結合部位對配體結構的選擇性，則需要靠氫鍵等極性作用力。

### 效能評估: 結合模式之預測

Wang 100 dataset 以及 GOLD 100 dataset 被選用於測試 HotLig 之預測準確度。如研究方法中所述，透過 DOCK 作細緻的分子對接產生大量的分子構形後，最後 HotLig 評分排序，排序第一名之構形與原構形作 RMSD 的比較。這兩組 dataset 由於已經被許多研究使用過，這裡將 HotLig 的預測結果和先前的研究結果作一個比較。

表 7 中與其他評分方程式比較，顯示出 HotLig 在 Wang 100 dataset 的測試結果中，表現非常優異，成功率可達 91%；即使是  $\text{RMSD} \leq 1 \text{ \AA}$  之比率也可達到 79%。

表 8 列出了在 hydrophilic、hydrophobic 以及 mixed 三個 subset 之測試結果，可以看出 HotLig 在評估 hydrophilic (88.64%) 以及 hydrophobic (87.5%) 之間有良好之平衡。跟過去的評分方程式比較來看，HotLig 在 hydrophobic subset 評估可以有更精準的預測，這表示 HotLig 使用 Connolly surface 以及 knowledge-based potential 評估疏水效應的策略奏效。此外，HotLig 在 mixed subset 預測成功率更是高達 96.88%。

表 7. HotLig 與其他評分方程式對 Wang 100 dataset 預測結合模式成功率之比較。

scoring function <sup>a</sup>	success rate (%)				
	RMSD ≤ 1.0 Å	RMSD ≤ 1.5 Å	RMSD ≤ 2.0 Å	RMSD ≤ 2.5 Å	RMSD ≤ 3.0 Å
<b>HotLig</b>	<b>79</b>	<b>87</b>	<b>91</b>	<b>93</b>	<b>94</b>
Cerius2/PLP	63	69	76	79	80
SYBYL/F-Score	56	66	74	77	77
Cerius2/LigScore	64	68	74	75	76
DrugScore	63	68	72	74	74
Cerius2/LUDI	43	55	67	67	67
X-Score	37	54	66	72	74
AutoDock	34	52	62	68	72
Cerius2/PMF	40	46	52	54	57
SYBYL/G-Score	24	32	42	49	56
SYBYL/ChemScore	12	26	35	37	40
SYBYL/D-Score	8	16	26	30	41

<sup>a</sup>This table corresponds to Table 2 from ref 30. Scoring functions are ranked by their success rates at rmsd ≤ 2.0 Å.

表 8. HotLig 與各種評分方程式對不同性質之 subset 預測結合模式成功率之比較。

scoring function <sup>a</sup>	success rate (%)			
	overall (100)	hydrophilic (44)	mixed (32)	hydrophobic (24)
<b>HotLig</b>	<b>91</b>	<b>88.64</b>	<b>96.88</b>	<b>87.5</b>
Cerius2/PLP	76	77	78	71
SYBYL/F-Score	74	75	75	71
Cerius2/LigScore	74	77	75	67
DrugScore	72	73	81	58
Cerius2/LUDI	67	75	66	54
X-Score	66	82	59	46
AutoDock	62	73	53	54
Cerius2/PMF	52	68	44	33
SYBYL/G-Score	42	55	34	29
SYBYL/ChemScore	35	32	34	42
SYBYL/D-Score	26	23	28	29

<sup>a</sup>This table corresponds to Table 4 from ref 30. Scoring function are ranked by their overall success rates.

表 9. 顯示 GOLD testset 使用 DOCK 來對接時，失敗的比例較高，DOCK 之預測成功率只有 35%，不過當使用 HotLig 從新評分，可以使預測成功率提昇至 69%。若排除對接失敗的因素，加入 native pose 評分，成功率則達到 87%。

表 9. HotLig 與 DOCK 在 Gold 100 dataset 預測結合模式成功率之比較。

scoring function <sup>a</sup>	success rate (%)					
	RMSD ≤ 0.5 Å	RMSD ≤ 1.0 Å	RMSD ≤ 1.5 Å	RMSD ≤ 2.0 Å	RMSD ≤ 2.5 Å	RMSD ≤ 3.0 Å
HotLig <sup>+</sup>	<b>58</b>	<b>71</b>	<b>80</b>	<b>87</b>	<b>88</b>	<b>93</b>
HotLig <sup>-</sup>	9	39	57	69	73	79
DOCK	5	12	22	35	40	51

<sup>a</sup>Scoring functions are ranked by their success rates at rmsd ≤ 2.0 Å.

在這兩組測試組中，其預測失敗的原因大致可歸類為下列幾種：

1. 蛋白質與配體形成一般共價鍵結，或者晶體結構不良，有嚴重的 bump；
2. 蛋白質本身即具有多種配體結合模式之可能；
3. 結合部位相當寬鬆，或位置過於淺表，缺乏對配體之選擇性；
4. 極性作用力太少；

第一種狀況主要造成對接過程的失敗，從 HotLig<sup>+</sup>與 HotLig<sup>-</sup>的數據差異可以看得出來，另外後三種狀況則是屬於評分方程式失敗的原因，也是將來探討改進的方向。

### 效能評估: 親和力之預測

Wang 100 dataset 被使用於 HotLig 預測親和力的測試組。該 dataset 有親和力或藥理活性的實驗數據，故 HotLig 評分後，可以驗證預測結果和實驗結果之相關性是否理想。圖 19 為 HotLig 之親和力預測值以及實驗數據值之比較，其排序相關係數  $R_s$  為 0.6091。此外，我們若將其分布區域分為四個區塊，以實驗數據  $-7 \text{ kcal/mol}$  左右 (換算為  $pK_d$  約為 5~6) 以及 binding score  $-15$  左右作為區隔。其中 false-positive 以及 false-negative 之比例並不多。該圖也可看出，當 HotLig 應用於虛擬篩選時，binding score 為  $-15$  以下時之配體，可以視為候選配體。

HotLig 與其他方程式蛋白質-配體親和力預測結果之比較，列於表 10。可以看出 HotLig 在這方面表現仍相當優異，只有 X-score 和 HotLig 之  $R_s$  值超過 0.6。

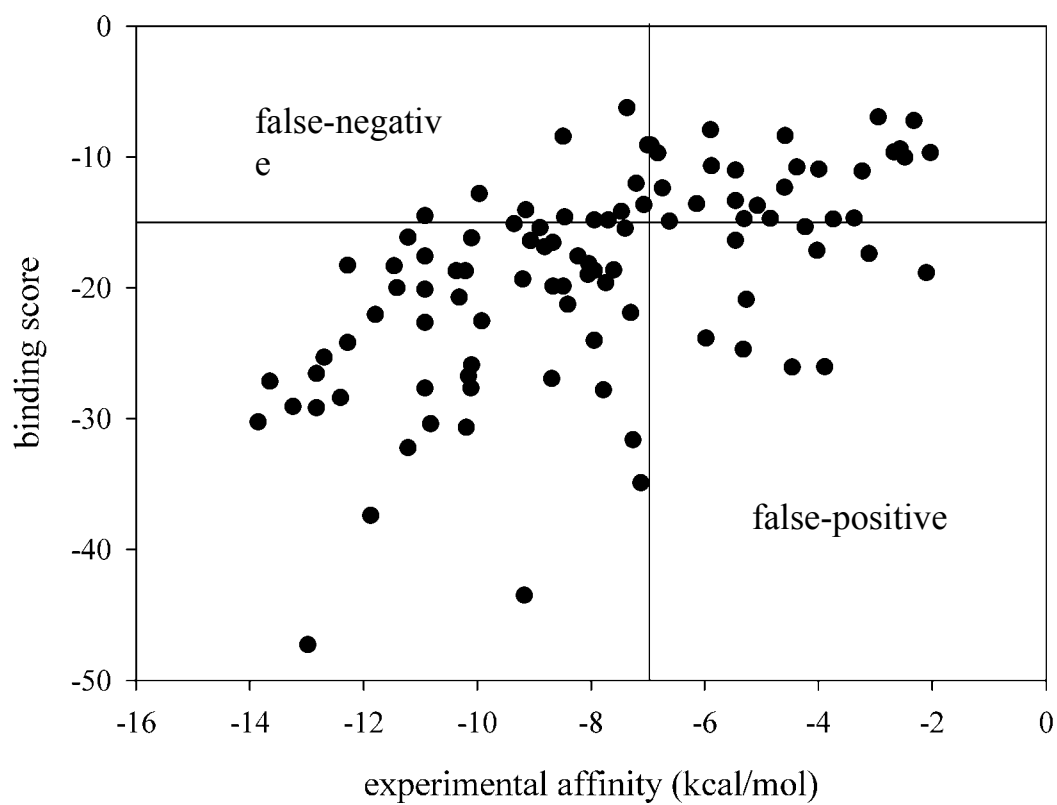


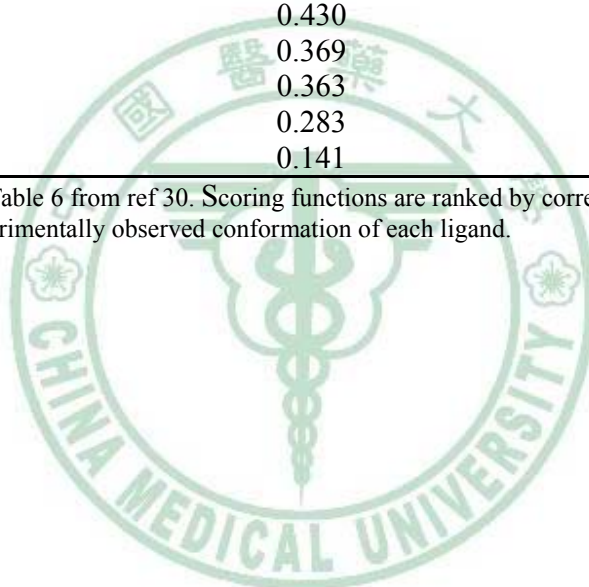
圖 19. HotLig 之蛋白質-配體親和力預測值與實驗數據值相關圖。其排序相關係數  $R_s$  為 0.6091，所使用之測試組為 Wang 100 dataset。



表 10. HotLig 與其他方程式預測 binding affinities 效能之比較。

scoring function <sup>a</sup>	Spearman correlation coefficient ( <i>R</i> <sub>s</sub> ) based on	
	the experimentally observed conformations	the best-scored conformations
X-Score	0.660	0.698
<b>HotLig</b>	<b>0.609</b>	<b>0.606</b>
Cerius2/PLP	0.592	0.607
DrugScore	0.587	0.601
SYBYL/G-Score	0.569	0.531
SYBYL/D-Score	0.475	0.488
SYBYL/ChemScore	0.431	0.435
Cerius2/LUDI	0.430	0.456
Cerius2/PMF	0.369	0.367
Cerius2/LigScore	0.363	0.418
SYBYL/F-Score	0.283	0.253
AutoDock	0.141	0.423

<sup>a</sup> This table corresponds to Table 6 from ref 30. Scoring functions are ranked by correlation coefficients that are calculated by using the experimentally observed conformation of each ligand.



### 效能評估: 虛擬篩選

虛擬篩選測試使用之標的蛋白為 HSV-1 thymidine kinase (TK), PDB code 為 1kim, test set 總共有 1000 個 decoys, 加上 10 個 actives, 其中 dT 與 idu 為 submicromolar ligand; 在這個測試例子裡, 由於 thymidine 透過水分子與蛋白質結合, 因此該水分子對於 TK 辨識 thymidine 是重要的, 故這裡做了保留水分子以及去除水分子之 cross-docking。

對接後經過 HotLig 評分與排序, 結果當保留結合部位之結晶水時, idu 出現於所有 1100 個分子中之第 1 名, 而 dT 出現在第 25 名, 這兩個是 actives 裡面之 submicromolar ligands。當去除水分子時, idu 則落在第 32 名, dT 在第 93 名才出現。這結果如預期的, 該水分子對於 TK 辨識 thymidine 是重要的, 當保留水分子時, 我們才容易篩選出 thymidine 類的結構。

這些結果引出了 cross-docking 之重要性, 有些配體會置換掉水分子, 有些則與水分子同時進到結合部位形成穩定的結合狀態, 另外, 因為蛋白質與配體的結合是 induced-fit, 當蛋白質為 apo protein 或者與不同配體結合時, 其構形必然會有不一樣的變化。所以實際進行虛擬篩選時, 我們可以選擇各種狀態下的蛋白質進行分子對接, 也包括保留或去除水分子, 或者保留部分水分子, 因為 cross-docking 能給我們截然不同的答案, 可增加尋獲活性結構的可能性。金屬離子也一樣, 不過大部分情形, 保留金屬離子是被建議的。相

對於交叉評分能減少 false-positive，cross-docking 則是一種減少 false-negative 的策略。適當的運用這些策略，在實際進行虛擬篩選時，尋獲活性結構或者新穎引導化合物的成功機會往往能得到有效地提昇。



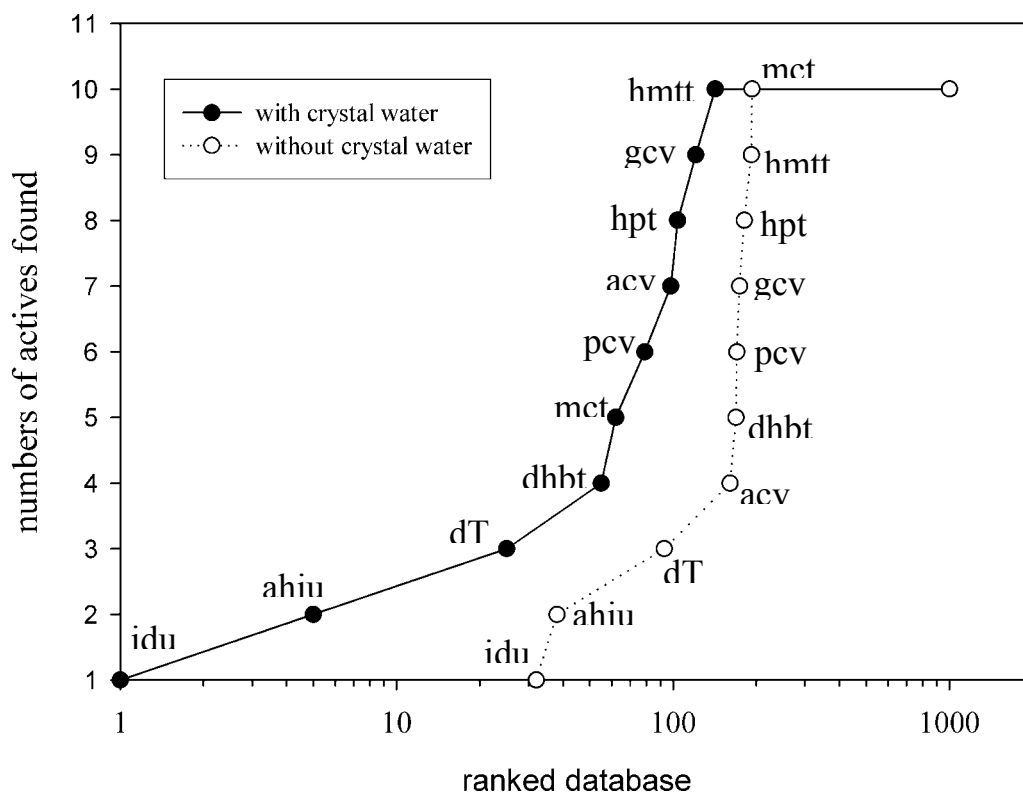


圖 20. HSV-1 thymidine kinase (TK) 之虛擬篩選測試。HotLig 能夠有效地在前 25 名找出所有的 submicromolar actives (idu 與 dT)。圖中同時顯示出保留結晶水與去除結晶水對 thymidine 選擇性的影響。

## 第五章 結論

如結果所呈現，HotLig 在預測結合模式測驗中，展現了高準確度的預測能力，表示此評分方程式挑選與結合位置之高合適性配體的能力相當好，著者認為，這主要歸功於利用 Connolly surface 進行疏水效應之評分計算，並加入距離參數，如此則能更進一步鑑別兩分子之間結合狀況的好壞。同時 HotLig 也考量到各種不同作用力之平衡，以及沒有形成任何作用力區域 PSA 的影響。尤其是 PDB database 衍生的 knowledge-based 勢能演算法的納入，使之有別於單純的 Lennard-Jones 曲線，而能得到更接近真實狀況的勢能函數。綜合以上特性，都是 HotLig 成功的重要原因。

著者認為，在預測蛋白質與配體的晶體結合模式的預測成功率上，平均應達到 85% 以上方為理想。100% 的預測成功率其實是不可能的，因為不是所有的蛋白質晶體結構都很完美，實有先天上的限制。有些例子，在分子間嚴重的 bump，有些則是形成共價鍵，如此在對接過程當中不易產生接近結晶狀態的配體構形，也不易得到好的評分分數；此外，蛋白質與配體之間的結合模式也不一定都非常明確，從 PDB 裡面的例子可以觀察到，同樣的蛋白質與同樣的配體，可能出現兩種以上的結合模式之晶體 [46-47]。像上述這些狀況，要預測蛋白質與配體之間的晶體結合模式，其成功機會不大是可以預期的。

儘管預測配體藥理活性是困難的，但是分子對接的模擬在藥物設計開發上，仍相當有意義，它屬於合理性的藥物設計，是有證據基礎 (evident-based) 的一種研究方法。提高評分方程式的準確度，提高對理想配體的挑選能力是目前最具挑戰性的主題。此外，開發新演算法的評分方程式是相當有價值的，尤其應用在交叉評分的策略時，不同理論基礎的評分方程式得以互補，有效降低 false-positive 並提高命中率；另一方面，cross-docking 的策略，則能夠降低 false-negative。因此除了評分方程式方面的改良，這些分子對接策略以及評分策略的應用，是相當實際且重要的。

其實 HotLig 仍有改善空間，包括 unfit 區域 PSA 的計算，該如何加入距離之參數進行評分，以及在預測 binding affinity 時，如何針對不同的配體性質作 binding score 的最佳化，都將是將來改良的目標，因此研發出更理想的評分方程式將是可以預期的。

## 參考文獻

1. Doman, T.N., McGovern, S.L., Witherbee, B.J., Kasten, T.P., Kurumbail, R., Stallings, W.C., Connolly, D.T. and Shoichet, B.K. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Med. Chem.*, 2002;45(11):2213-2221.
2. Alvarez, J.C. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004;8(4):365-370.
3. Powers, R.A., Morandi, F. and Shoichet, B.K. Structure-based discovery of a novel, noncovalent inhibitor of AmpC beta-lactamase. *Structure.*, 2002;10(7):1013-1023.
4. Peng, H., Huang, N., Qi, J., Xie, P., Xu, C., Wang, J. and Yang, C. Identification of novel inhibitors of BCR-ABL tyrosine kinase via virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003;13(21):3693-3699.
5. Soelaiman, S., Wei, B.Q., Bergson, P., Lee, Y.S., Shen, Y., Mrksich, M., Shoichet, B.K. and Tang, W.J. Structure-based inhibitor discovery against adenylyl cyclase toxins from pathogenic bacteria that cause anthrax and whooping cough. *J. Biol. Chem.*, 2003;278(28):25990-25997.

6. Pickett, S.D., Sherborne, B.S., Wilkinson, T., Bennett, J., Borkakoti, N., Broadhurst, M., Hurst, D., Kilford, I., McKinnell, M. and Jones, .PS. Discovery of novel low molecular weight inhibitors of IMPDH via virtual needle screening. *Bioorg. Med. Chem., Lett.*, 2003;13(10):1691-1694.
7. Vangrevelinghe, E., Zimmermann, K., Schoepfer, J., Portmann, R., Fabbro, D. and Furet, P. Discovery of a potent and selective protein kinase CK2 inhibitor by high-throughput docking. *J. Med. Chem.*, 2003;46(13):2656-2662.
8. Liu, H., Li, Y., Song, M., Tan, X., Cheng, F., Zheng, S., Shen, J., Luo, X., Ji, R., Yue, J., Hu, G., Jiang, H. and Chen, K. Structure-based discovery of potassium channel blockers from natural products: virtual screening and electrophysiological assay testing. *Chem. Biol.*, 2003;10(11):1103-1113.
9. Schapira, M., Raaka, B.M., Das, S., Fan, L., Totrov, M., Zhou, Z., Wilson, S.R., Abagyan, R. and Samuels, H.H. Discovery of diverse thyroid hormone receptor antagonists by high-throughput docking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003;100(12):7354-7359.
10. Wu, S.Y., McNae, I., Kontopidis, G., McClue, S.J., McInnes, C., Stewart, K.J., Wang, S., Zheleva, D.I., Marriage, H., Lane, D.P., Taylor, P., Fischer, P.M. and Walkinshaw, M.D. Discovery of a novel family of CDK inhibitors with



the program LIDAEUS: structural basis for ligand-induced disordering of the activation loop. *Structure.*, 2003;11(4):399-410.

11. Singh, J., Chuaqui, C.E., Boriack-Sjodin, P.A., Lee, W.C., Pontz, T., Corbley, M.J., Cheung, H.K., Arduini, R.M., Mead, J.N., Newman, M.N., Papadatos, J.L., Bowes, S., Josiah, S. and Ling, L.E. Successful shape-based virtual screening: the discovery of a potent inhibitor of the type I TGFbeta receptor kinase (TbetaRI). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003;13(24):4355-4359.
12. Wu, Y.Q., Belyakov, S., Choi, C., Limburg, D., Thomas, IV B.E., Vaal, M., Wei, L., Wilkinson, D.E., Holmes, A., Fuller, M., McCormick, J., Connolly, M., Moeller, T., Steiner, J. and Hamilton, G.S. Synthesis and biological evaluation of non-peptidic cyclophilin ligands. *J. Med. Chem.*, 2003;46(7):1112-1115.
13. Brenk, R., Naerum, L., Gradler, U., Gerber, H.D., Garcia, G.A., Reuter, K., Stubbs, M.T. and Klebe, G. Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis. *J. Med. Chem.*, 2003;46(7):1133-1143.
14. Rastelli, G., Pacchioni, S., Sirawaraporn, W., Sirawaraporn, R., Parenti, M.D. and Ferrari, A.M. Docking and database screening reveal new classes of

- Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2003;46(14):2834-2845.
15. Westerfors, M., Tedebark, U., Andersson, H.O., Ohrman, S., Choudhury, D., Ersoy, O., Shinohara, Y., Axen, A., Carredano, E. and Baumann, H. Structure-based discovery of a new affinity ligand to pancreatic alpha-amylase. *J. Mol. Recognit.*, 2003 Nov-Dec;16(6):396-405.
16. RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/>
17. Irwin, J.J. and Shoichet, B.K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.*, 2005;45(1):177-182.
18. Block, P., Sotriffer, C.A., Dramburg, I. and Klebe, G. AffinDB: a freely accessible database of affinities for protein-ligand complexes from the PDB. *Nucleic Acids Res.*, 2006;34(Database issue):D522-D526.
19. Levitt, D.G. and Subramanian, G. A new theory of transport for cell membrane pores. II. Exact results and computer simulation (molecular dynamics). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1974;373(1):132-140.
20. Kuntz, I.D., Blaney, J.M., Oatley, S.J., and Langridge, R.L., A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. *J. Mol. Biol.*, 1982;161:269-288.

21. Kearsley, S. K., Underwood, D. J., Sheridan, R. P., and Miller, M. D., Flexibases: A Way to Enhance the Use of Molecular Docking Methods. *J. Comput-Aided Mol. Des.*, 1994;8:565-582.
22. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., and Klebe, G., A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.*, 1996;261(3), 470-489.
23. Kramer, B., Rarey, M., and Lengauer, T., , Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins*, 1999;37:228-241.
24. Jones, G., Willet, P., Glen, R. C. and Leach, A. R., Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.*, 1997;267:727-748.
25. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comp. Chem.*, 1998;19:1639-1662.
26. Cavasotto, C.N. and Abagyan, R.A. Protein flexibility in ligand docking and virtual screening to protein kinases. *J. Mol. Biol.*, 2004;337(1):209-225.

27. Krovat, E. M., Steindl, T. and Langer, T. Recent advances in docking and scoring. *Current Computer-Aided Drug Design.*, 2005;1(1):93-102.
28. Graves, A.P., Brenk, R. and Shoichet, B.K. Decoys for docking. *J. Med. Chem.*, 2005;48(11):3714-3728.
29. Perola, E. Minimizing false positives in kinase virtual screens. *Proteins.*, 2006;64(2):422-435.
30. Wang, R., Lu, Y. and Wang, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J. Med. Chem.*, 2003;46(12):2287-2303.
31. Cole, J.C., Murray, C.W., Nissink, J.W., Taylor, R.D. and Taylor, R. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. *Proteins.*, 2005;60(3):325-332.
32. Wang, R., Lai, L. and Wang, S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 2002;16(1):11-26.
33. Gohlke, H., Hendlich, M. and Klebe, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, 2000;295(2):337-56.
34. Sippl, M.J. Knowledge-based potentials for proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1995;5(2):229-235.

35. Maggio, E.T. and Ramnarayan, K. Recent developments in computational proteomics. *Drug Discov Today.*, 2001;6(19):996-1004.
36. Charifson, P.S., Corkery, J.J., Murcko, M.A. and Walters, W.P. Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J. Med. Chem.*, 1999;42(25):5100-5109.
37. Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W. and Taylor, R.D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins.*, 2003;52(4):609-623.
38. Bondi, A. van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.*, 1964;68:441-451.
39. Shannon, R.D., Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides., *Acta. Cryst.*, 1976;A32, 751-767.
40. X-score, Scoring function for predicting protein-ligand binding affinities. <http://sw16.im.med.umich.edu/software/xtool/>
41. Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P. and Shenkin, P.S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and

- scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.*, 2004;47(7):1739-1749.
42. Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Pollard, W.T. and Banks, J.L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.*, 2004;47(7):1750-1759.
43. Bissantz, C., Folkers, G. and Rognan, D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J Med Chem.*, 2000;43(25):4759-4767.
44. Lane, D. M. HyperStat Online Textbok;  
<http://davidmlane.com/hyperstat/index.html>.
45. Yang, J.M. and Chen, C.C. GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins.*, 2004;55(2):288-304.
46. Bocskei, Z., Groom, C.R., Flower, D.R., Wright, C.E., Phillips, S.E., Cavaggioni, A., Findlay, J.B. and North, A.C. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature.*, 1992;360(6400):186-188.

47. Timm, D.E., Baker, L.J., Mueller, H., Zidek, L. and Novotny, M.V. Structural Basis of Pheromone Binding to Mouse Major Urinary Protein (MUP-I) *Protein Sci.*, 2001;10:997-1004.
48. Wang, R., Fu, Y. and Lai, L. A New Atom-additive Method for Calculating Partition Coefficients. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1997;37: 615-621



## 投稿論文

1. Tu, Y.S., Huang, L.J., Hsu, M.H., Wang, S.H., Lai, J.M., Yeh, C.C., Liao, M.C. and Lung, F.D. Synthesis of hemoregulatory peptide (HP) derivatives as inhibitors of the interaction between methionine adenosyltransferase and methionine. *The Chin. Pharm. j.*, 2000;52: 139-149.
2. Wang, S.H., Kuo, S.C. and Chen, S.C. High-performance liquid chromatography determination of methionine adenosyltransferase activity using catechol-*O*-methyltransferase-coupled fluorometric detection. *Anal. Biochem.*, 2003;319:13-20.
3. Wang, S.H., Chen, S.C. and Kuo, S.C. HotLig: A molecular surface-directed approach to scoring protein-ligand interactions. (in progress)

