

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：類黃酮與受質衍生物對二氫嘧啶水解酵素的抑制機制與藥物優化 *
* ***** *

執行計畫學生：許維哲
學生計畫編號：MOST 104-2815-C-040-035-B
研究期間：104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授：黃晟洋

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105年04月01日

(一) 摘要

二氫嘧啶水解酵素(dihydropyrimidinase)是代謝 DNA 鹼基途徑中極重要的酵素，並廣泛存在於各生物間，然而細菌與真核生物來源的二氫嘧啶水解酵素的差異極大，因此若是能開發具有可以抑制細菌二氫嘧啶水解酵素活性的化合物，則可能可以阻斷細菌 DNA 鹼基代謝與生合成進而影響細菌的生長，就如同與已廣泛使用的磺胺劑抗生素相當。此計畫找到了數種類黃酮物質 (flavonoids)與受質類似物可抑制綠膿桿菌的二氫嘧啶水解酵素。在優化類黃酮化合物成為抑制劑的過程中，我們雖嘗試了多種化合物，但仍找不到特別重要的區域。然而在優化酵素受質類似物成為抑制劑的過程中，我們卻驚訝的發現受質類似物 5-fluorouracil 可能是一個新的、未被發現的新受質(必須再經嚴格的分析)。我們經過篩選並結晶了二氫嘧啶水解酵素，接著利用分子置換法解出了此酵素的 X-ray 繞射晶體結構，後續我們利用分子結構對接軟體 PatchDock 來解釋 5-fluorouracil 為何是新受質的原因。總的來說，執行此計畫後我們找到數個抑制劑，但其半抑制數值(IC₅₀)落在數百 μM 區間，並非是有潛力的抑制劑。然由於我們解出了此酵素的結晶結構，也因此更可以結構為基礎來研究之後的抑制劑構效關係 (Structure-activity relationship, SAR)。希望在未來能據此結構以及功能性研究找到更多、更有潛力的酵素抑制劑，其強度能達到臨床壓制抗藥性細菌所引起之感染症使用。

(二) 研究背景

近年由於過度使用抗生素，導致細菌演化出多種抵抗抗生素的機制，這些具有多重抗藥性的細菌造成了許多公共衛生的問題，包括嚴重的群落感染(1-4)。最早於印度被報導的超級細菌，即 NDM-1 腸道菌感染症(2,3)，帶有 NDM-1 基因的克雷白氏菌、綠膿桿菌與大腸桿菌目前正逐步流行至全球各地。MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*) 及 VRE (Vancomycin-Resistant *Enterococcus*) 等具有抗藥性的細菌在院內感染中占的比例也逐

年上升(4)。這些細菌所引發的感染症第一線治療用藥均是使用 β -lactam 類抗生素治療，然而這些細菌已經經由突變或是交換基因等方式發展出對抗這些傳統抗生素的能力，尤其是 β -lactam 及 aminoglycoside 類抗生素，具有多重抗藥性的細菌不斷被發現與報導，尤其像是綠膿桿菌已被發現至少超過 120 種以上的 β -lactamases (5-6)，因此在臨床治療中不得不選用具有較多副作用的後線抗生素或甚至面臨無藥可醫的情況。因此若能開發出新的攻擊標靶，也許對此棘手的問題將可能有所幫助。本計畫提出之二氫嘧啶水解酵素，為細菌鹼基代謝中必須之酵素，且其結構與功能與真核生物之水解酵素相比有顯著的不同，因此我們相信據此開發出的藥物可能對人體較無副作用。此計畫所提出的二氫嘧啶水解酵素廣泛存在於細菌、真菌、植物與動物中，催化二氫嘧啶開環並產生溶解度高的產物，為 DNA 鹼基合成中關鍵的反應之一。然而各物種的二氫嘧啶水解酵素經長時間的演化，其結構與功能迥異；細菌來源的二氫嘧啶水解酵素不像人類來源的酵素喜歡催化六環類的嘧啶，反而較喜歡催化五環 hydantoin 相關類似物，其特異性相差至少百倍(7)，因此給了我們一個如同與磺胺劑抗生素藥物研發相當的理由，來據之以研究。近年來，具有多重抗藥性的細菌在公共衛生與群落感染造成了許多問題，新的、不同以往的分子標靶，不是針對細胞壁也不是核糖體攻擊的小分子抗生素應當需要被開發出來，例如帶有 NDM-1 基因的超級細菌在最後一線的臨床用藥上僅剩 2 個抗生素有效 (2,3)，也因此本來簡單輕鬆服用抗生素即可治療的感染症或在醫院開刀預防投藥時有時將可能甚至面臨無藥可醫的情況。

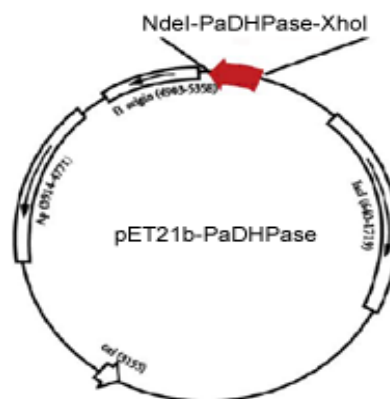
最近開始有此酵素抑制劑的相關研究被報導，部分類黃酮物質發現竟有相當好的抑制能力，例如利用 dihydromyricetin 加入酵素反應時其 IC_{50} 為 48 μ M (11)。類黃酮在行光合作用的生物中廣泛的存在，在許多研究中指出類黃酮具有抗發炎、抗腫瘤、抗自由基及抗微生物等功能；在開花植物中，類黃酮具有吸引傳粉者的功能並在葉片中具有抗真菌病原體等功能 (8)。主要類黃酮結構的核心具有兩個芳香環，並與一個 pyrane 連接，一

般可分為以下六大類：flavonols (黃酮醇)、flavones、flavanones、flavanols、anthocyanidins、與 isoflavones。類黃酮亦被發現可抑制多種酵素，包括二氫乳清酸水解酵素與尿囊素水解酵素；這些酵素的反應機制與二氫嘧啶水解酵素相當類似 (9,10)。由於類黃酮多年來累積的研究均顯示對人體有益而無害，因此我們相信在研發新型抗生素時，以類黃酮為基礎的衍生物將較不具副作用。

我們在此計畫購買了數十個酵素受質類似物希望成為可能的抑制劑，另外也試著根據部分類黃酮結構(11)，來嘗試優化出更好的抑制劑。另外我們亦同步進行結晶結構的解析，期望此計畫所帶出的研究結果，將可能讓吾人更加了解二氫嘧啶水解酵素其更詳細的反應機制，以及成為不同於傳統攻擊細胞壁合成等的新的抗生素研發的分子標靶。希望在未來，在臨床應用上能得到數個對於原核水解酵素專一性高的前導抑制化合物，以便對抗越趨嚴峻的抗藥性細菌現況。

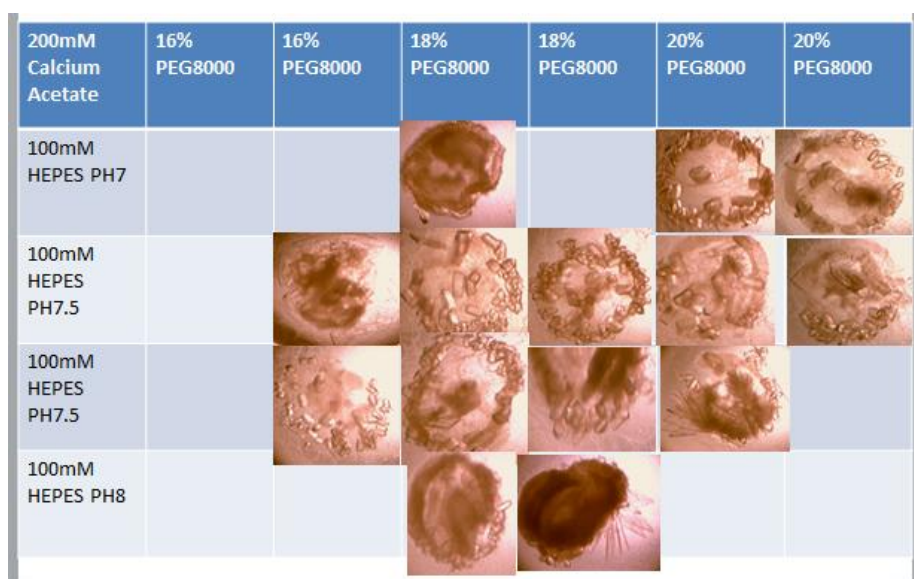
(三) 結果與討論

1. 綠膿桿菌的二氫嘧啶水解酵素基因選殖與質體之構築。此基因已構築入 pET21 表現載體上，並經基因定序無誤。經過基因表達與純化，我們利用親和管柱層析法(Ni-NTA column)得到純的酵素。



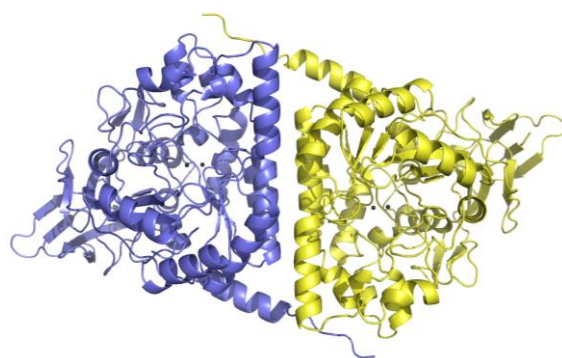
圖一：質體示意圖。此基因已接入於表現載體 pET21 並經定序確認無誤。我們已純化出此酵素。

2. 綠膿桿菌的二氫嘧啶水解酵素的結晶。我們利用不同的晶體成長條件篩出 PEG 8000 是好的蛋白質結晶主成份。我們接著嘗試細分各濃度與酸鹼值，發現在 pH 7.0-7.5 可得長方形柱狀晶體，而 pH 8.0 會有針狀蛋白質晶體產生。最重要的是控制 PEG 8000 的濃度須在 16%-20%；相對來說以 18% 的 PEG 8000 為最佳主沉澱劑。



圖二：蛋白質結晶篩選與優化。我們在嘗試過數千種條件下，順利找到數種條件可得到蛋白質晶體，並利用其中一種條件進行優化，以便進入結構的解出。

3. X-ray 蛋白質結構的解出。我們將綠膿桿菌的二氫嘧啶水解酵素晶體使用同步輻射光 13C1 光束線蒐集到繞射數據，並利用同為此家族的酵素結構作為模板解出此結構。此結構為一著名的 TIM barrel 構型，穩定的桶狀結構恰可解釋為何此酵素如此的耐熱。

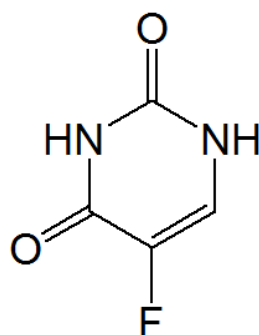


圖三：蛋白質結構解出。我們利用同步輻射光得到了繞射數據並解出了綠膿桿菌的二氫嘧啶水解酵素的結晶結構，解析度為 2.1 Å。其活性中心擁有兩個金屬鋅原子。

4. 蛋白質晶體 X-ray 繞射統計表。

Data collection	
Crystal	PaDHPase
Wavelength (Å)	0.975
Resolution (Å)	117.786-2.17
Space group	C2221
Cell dimension (Å)	a = 108.912 α = 90 b = 155.699 β = 90 c = 235.572 γ = 120
Completeness (%)	99.8 (100)*
$\langle I/\sigma I \rangle$	15.13(3.7)
R_{sym} or R_{merge}	0.122 (0.599)
Redundancy	7.1 (7.3)
Refinement	
Resolution (Å)	30–2.17
No. reflections	100197
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.17169/0.22757
No. atoms	
Protein	1912
Water	201
R.m.s deviation	
Bond lengths (Å)	0.0151
Bond angles (°)	1.6655
Ramachandran Plot	
In preferred regions	1798 (94.43%)
In allowed regions	96 (5.04%)
Outliers	10 (0.53%)

5. 新酵素受質的發現。經由受質類似物的結構分析，我們原想當成綠膿桿菌二氫嘧啶水解酵素抑制劑的 5-fluorouracil，竟發現在光譜分析下會產生開環的水解反應(未加酵素時不會自行水解)。因此判斷此化合物可能是一個新的酵素受質。詳細資料我們暫待更清楚地研究後再予以揭露。

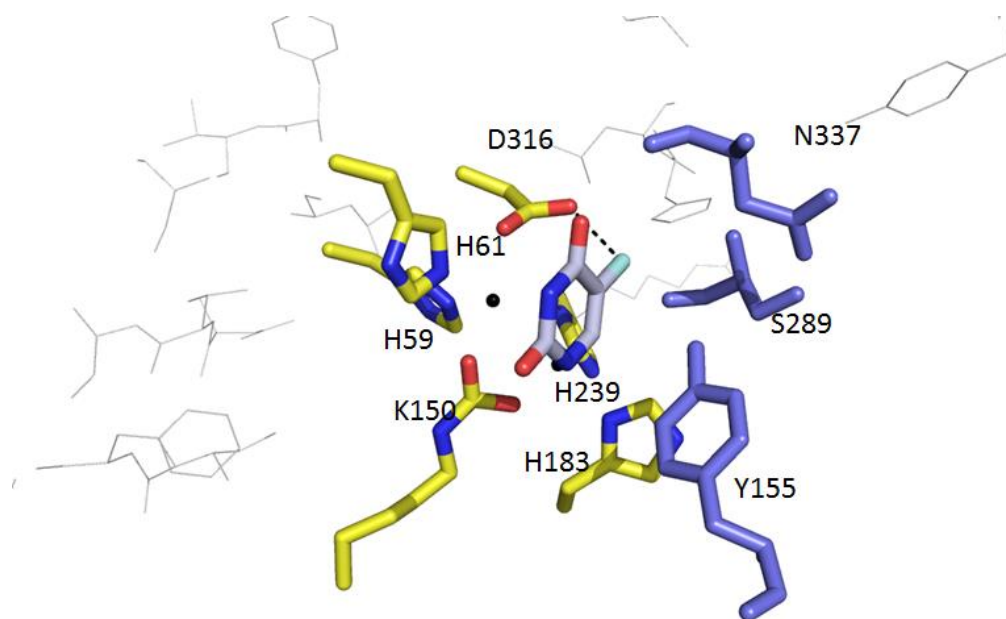


圖四：5-fluorouracil 的化學結構式。我們認為此化合物可能是新酵素受質。

6. 以受質類似物作為抑制劑分析。我們根據結構購買了許多可能的化合物來對此酵素抑制，我們用兩種不同的受質以及不同的抑制劑濃度做測試，雖有發現抑制力，唯抑制強度落在數百 μM 區間皆仍不夠成為抗生素前導物。然而在此計畫報告之外，我們尚有購買多種相關可能的抑制劑(期貨)並仍在進行測試之中。

Compound	Conc. (mM)	Dihydropyrimidinase activity (100%)	
		Dihydrouracil	5-Propyl-hydantoin
Non		100	100
Allantoin	1	100	100
	5	100	100
	10	—	95
Dihydroorotate	1	95	90
	5	90	85
	10	—	70
	30	—	50
5-Hydantoin acetic acid	1	100	100
	5	95	90
	10	—	80
	50	—	50
Acetohydroxamate	1	100	100
	5	100	100
	100	—	95
	500	—	50
Orotic acid	1	100	100
	5	—	95
<i>N</i> - ω -Acetylhistamine	10	—	100
	100	—	100
3,5-Diamino-1,2,4-triazole	10	—	100
	100	—	100
3-Amino-1,2,4-triazole	10	—	100
	100	—	95
	500	—	75
	750	—	60

7. 利用生物資訊軟體 PatchDock 模擬 5-fluorouracil 與此酵素的結合模式並印證實驗的結果：結合至酵素活性區，因此成為受質。然而我們更須小心求證的是，此物質為一極為重要且已廣泛於臨床使用的抗癌劑。因此若此酵素能在特定酵素反應條件下催化 5-fluorouracil，則後續將可能產生許多須待研究的疑問。



圖五：利用電腦 docking。我們利用解出的綠膿桿菌二氫嘧啶水解酵素與 5-fluorouracil 作 docking 以便理解其可能的結合模式。我們發現 5-fluorouracil 可結合於酵素活性區(金色胺基酸為雙金屬結合區，藍色則為受質結合區)，搭配我們的光譜研究數據的話，5-fluorouracil 看來可能是一個新酵素受質。

(四) 結論與檢討

此計畫找到了數種受質類似物可抑制綠膿桿菌的二氫嘧啶水解酵素，並且找到受質類似物 5-fluorouracil 可能是一個新的、未被發現的新受質(必須再經嚴格之分析)。我們解出了此酵素的 X-ray 繞射晶體結構，並利用分子結構對接軟體 PatchDock 來解釋 5-fluorouracil 為何是新受質的原因。總的來說，執行此計畫後我們找到數個抑制劑，但其半抑制數值(IC₅₀)落在數百 μM 區間，並非是有潛力的抑制劑，因此我們並未達成撰寫計畫時的預期結果。未來我們會利用解出的二氫嘧啶水解酵素的結晶結構，

更加地以結構為基礎的抑制劑研發。希望在未來能據此結構以及功能性研究找到更多、更有潛力的酵素抑制劑，其強度能達到臨床壓制抗藥性細菌所引起之感染症使用。

(五) 參考文獻

1. Wilson, D.N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 35-48.
2. Bush, K. (2010) Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 558-564.
3. Tempe, D.K. (2010) New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 750-751.
4. Rossolini, G.M., Mantengoli, E., Montagnani, F., Pollini, S. (2010) Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 582-588.
5. Bush K (2010) Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 558-564.
6. Zhao WH, Hu ZQ (2010) Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**, 245-258.
7. Huang CY, Hsu CC, Chen MC, Yang YS (2009) Effect of metal binding and posttranslational lysine carboxylation on the activity of recombinant hydantoinase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 111-121.
8. Ross, J.A., Kasum, C.M. (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 19-34.
9. Ho, Y.Y., Huang, Y.H., Huang, C.Y. (2013) Chemical rescue of the post-translationally carboxylated lysine mutant of allantoinase and dihydroorotase by metal ions and short-chain carboxylic acids. *Amino Acids*, **44**, 1181-1191.
10. Peng, W.F., Huang, C.Y. (2014) Allantoinase and dihydroorotase binding and inhibition by flavonols and the substrates of cyclic amidohydrolases. *Biochimie* **101**, 113-122.
11. Huang, C.Y. (2015) Inhibition of a putative dihydropyrimidinase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by flavonoids and substrates of cyclic amidohydrolases. *PLoS One*, **10**, e0127634.