



姓名：梁博煌

學歷：

國立台灣大學化學系學士 (1982/09-1986/06)

美國馬里蘭大學生化博士 (1989/09-1994/04)

現職及經歷：

中研院生化所副研究員 (2002/11- 迄今)

中研院生化所助研究員 (1999/03-2002/11)

美國 SmithKline Beecham 藥廠研究員
(1996/10-1999/02)

美國耶魯大學藥學系助理研究員 (1995/07-1996/09)

美國耶魯大學藥學系博士後研究 (1994/05-1995/06)



著作名稱：

1. Pan, J. J., Chiu, S. T., and Liang, P. H.* (2000) Product Distribution and Pre-Steady-State Kinetic Analysis of E. coli Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase Reaction. *Biochemistry* **39**, 10936-10942.

2. Ko, T. P., Chen, Y. K., Robinson, H., Tsai, P. C., Gao, Y.-G., Chen, A. P.-C., Wang, A. H.-J.*, and Liang, P. H.* (2001) Mechanism of the Product Chain Length Deter-

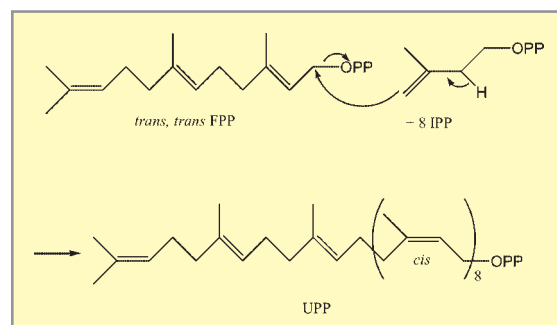
mination and the Role of a Flexible Loop in E. coli Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase Catalysis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 47474-47482.

3. Chen, Y. H., Chen, A. P.-C., Chen, C. T., Wang, A. H.-J., and Liang, P. H.* (2002) Probing the Conformational Change of E. coli Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase During Catalysis Using an Inhibitor and Tryptophan Mutants. *J. Biol. Chem.* **277**, 7369-7376.

中文簡介：

根據本人在耶魯大學藥學系及史克美占藥廠的工作經驗，本實驗室有興趣的主題為針對重要酵素作藥物研發。所需要的技術為發現藥物研發的目標、大量表達有活性的酵素、研究酵素活性及反應機制、解析酵素三級結構、從事電腦模擬以設計酵素抑制劑、合成及測試酵素抑制劑。在發現作為藥物研發的目標，我們可使用基因體及蛋白質體的方法找尋藥物的標的。發現目標後表達蛋白作酵素動力學研究並取得蛋白三級結構資訊，接著以結構為藍本用定點突變來研究特定氨基酸的催化功能，再以功能性結構為基礎來設計藥物，輔佐以電腦軟體諸如 IN-SIGHT II、DOCK等軟體，然後有機合成出可能的酵素拮抗劑並在體外或細胞內測試其效能，這時可以再將拮抗劑和酵素共結晶，依其結構修飾拮抗劑結構以便合成更佳藥物。由於藥物設計需多種專業結合，本實驗室最主要的合作夥伴為本所特聘研究員兼所長 王惠鈞院士負責結構生物學部份。我的主要專長為快速酵素動力學及藥物篩選。

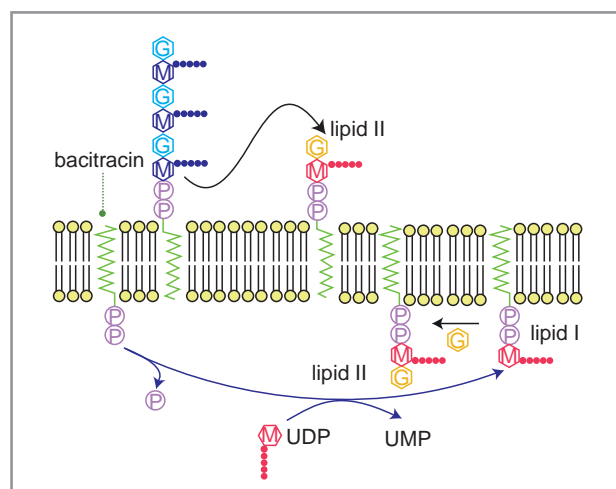
現在實驗室主要作抗病菌及SARS病毒的藥物研發。而此次得獎的三篇代表作即在研究細菌共有的一個酵素稱為十一異戊二烯焦磷酸合成酶。此酵素催化含十五個碳的法呢焦磷酸和八個含五個碳的異戊二烯焦磷酸的結合生成總共含五十五個碳的十一異戊二烯焦磷酸（圖一），此長鏈物質用來將細胞壁合成所需的醣質攜帶通過細胞膜到達胞外（圖二），因此酵素對於細菌生長是絕對必須的且抑制此酵素活性便



圖一：十一異戊二烯焦磷酸合成酶催化八步反應。

能殺菌而作為新抗生素，在抗藥性細菌逐漸增加而萬古黴素也會逐漸失效的同時，研發新抗生素是刻不容緩的。

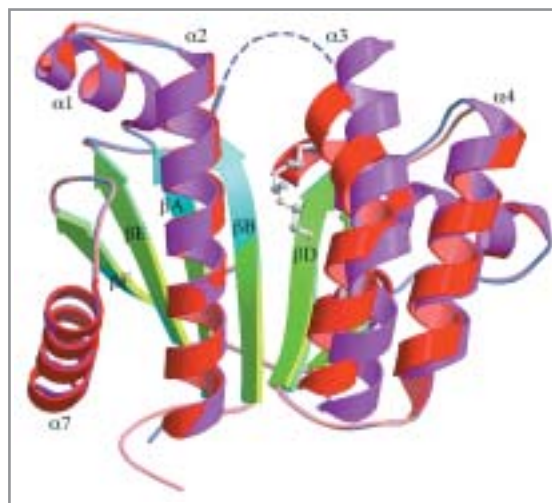
但我們研究此酵素的另一意義在於它複雜的反應機制及相似酵素在自然界廣泛存在，這些酵素統稱為異戊二烯轉移酶包括合成高等生物醣蛋白、膽固醇、ubiquinone支鏈、甚至將 Ras 訊息傳導蛋白活化刺激細胞生長的酵素，有興趣者請參閱評論[Liang, PH, Ko, TP & Wang, AHJ (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3339-3354]。研究此類轉移酶同時也可發展抗癌等其他藥



圖二：十一異戊二烯焦磷酸（綠色部分）將 lipid II 送到膜外以合成細胞壁。

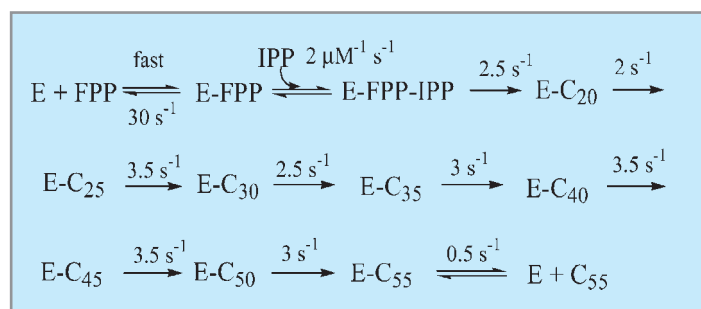
物。十一異戊二烯焦磷酸合成酶需催化八步反應，前人發現一些活性介面劑和磷脂可大量增加酵素活性，原因推測為這些物質可加速疏水性產物的離開。我們發表在 *Biochemistry* 雜誌的第一篇代表作即用較進步的 rapid-quench 快速動力學儀器來研究此酵素的動力學，不同於一般動力學，快速動力學方法可在酵素濃度大於基質 (substrate) 濃度的狀況下偵測中間物和產物在酵素中的生成和消失，對於產物不易離開的酵素而言為一研究利器。我們因此得到八步化學反應及產物離開的各別反應速率常數 (圖三)，也解釋了活性介面劑活化酵素的原因。

在第二篇代表著作我們解出酵素三度空間結構 (圖四)，發現酵素中有一狀似隧道的中空組織可能是容納產物的所在地。在此隧道的底部有幾個大型氨基酸擋住出口，我們懷疑這些氨基酸即在避免產物的過度延長而使其固定具有五十五個碳。為了驗證這個假設，我們把這些氨基酸逐一置換成小的丙氨酸並測量突變酵素的產物長度，最後發現控制產物最後長度的特定氨基酸。先前我們的定點突變研究 [Pan, JJ, Yang, LY & Liang, PH (2000) Effect of the site-directed mutagenesis of the conserved aspartate and



圖四：十一異戊二烯焦磷酸合成酶活性區之結構，當基質結合時 loop (藍色) 可將 $\alpha 3$ 螺旋從打開狀態 (粉紅) 拉成關閉狀態 (紅色)。

glutamate on *E. coli* undecaprenyl pyrophosphate synthase catalysis. *Biochemistry* 39, 13856-13861] 配合三級結構發現基質結合在隧道上緣，此區域我們發現一個具高柔軟度的 loop 包括 72-82 號氨基酸，這個 loop 在三級結構看不到其電子雲密度但定點突變顯示其和基質結合於正確位置確保反應發生有關，似乎憑藉其柔軟度來撷取基質並把中間物往下推擠以利下一個基質進入酵素，反應後更藉此 loop 將酵素上緣打開讓產物離去。這些發現之所以重要乃因它提供這類酵素之能夠催化眾多基質反應並精準控制產物長度的模式 (圖五)。

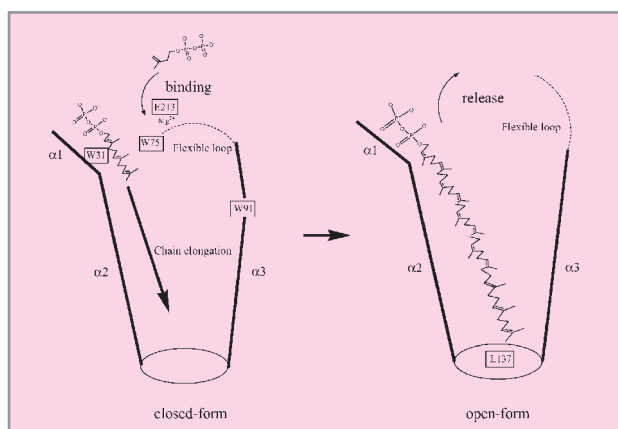


圖三：十一異戊二烯焦磷酸合成酶的反應速率常數。

既然為了反應酵素必須是柔軟的，在第三篇代表著作我們利用螢光的方法來觀察酵素本身的色氨酸在酵素催化過程的因為形態不同產生的螢光強度變化。為了知道變化的所在我們將酵素所含的六個色氨酸逐一換成不具螢光的苯丙氨酸，

我們發現法呢焦磷酸結合至酵素會促使 91 號色氨酸螢光強度變小，而從三級結構我們發現此色氨酸所在的位置為 α 螺旋 -3。從結構來看，當有物質結合到酵素活性區 α 螺旋 -3 會被柔軟的 loop 拉動而使酵素形成關閉狀態 (closed form)，而當產物形成後為了要離開酵素會推開此 α 螺旋使酵素形成打開狀態 (open form)。這些蛋白形態互換可用 stopped-flow 螢光儀器來觀察，我們發現一個螢光強度上升再下降的訊號，而此訊號發生的快慢剛好符合反應速率，佐證此蛋白形態變和酵素催化的關聯性。為了瞭解訊號是因反應或只是基質結合引起的，我們把焦磷酸部份用硫取代氧造成外形一樣但反應性極低的法呢焦磷酸類似物，用此類似物我們釐清 stopped-flow 的螢光訊號包含三個階段，首先酵素-法呢焦磷酸複體和另一基質結合使螢光上升，然後螢光再上升而後下降的階段代表反應時酵素關閉以結合基質及反應後打開以吐出產物的過程 (圖五)。

我們接著又合成帶螢光發光團的法呢焦磷酸類似物以提供新穎篩選藥物的方法



圖五：十一異戊二烯焦磷酸合成酶的形態變化，當基質結合時則關閉以利反應，當產物形成則打開讓產物離去。

[Chen, APC, Chen, YH, Liu, HP, Li, YC, Chen, CT & Liang, PH (2002) Synthesis and application of a fluorescent substrate analogue to study ligand interactions for undecaprenyl pyrophosphate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 15217-15224]。解出酵素和其所需的鎂離子、基質及產物相似物的三級結構[Chang, SY, Ko, TP, Liang, PH & Wang, AHJ (2003) Catalytic mechanism revealed by the crystal structure of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with sulfate, magnesium and Triton. *J. Biol. Chem.* **278**, 29298-29307]，並解出蛋白和真正基質的共結晶結構(Chang, S. Y. *et al.*)，及根據結構合成有活性的抑制劑，正測試及與酵素共結晶中。這些均有利於抗生素的新藥物研發。

評審簡評：

梁博煌博士的研究有三篇代表作，為一系列報導大腸桿菌—酵素 undecaprenyl pyrophosphate synthetase (UPPs) 作用機制的研究。

梁博士首先探討 UPPs 的生化性質，研究此酵素催化反應的化學動力機制。接著他藉由合作，得到此酵素之三級結構，對此酵素反應機制與結構之關係有了更新的了解。此外加上利用突變酵素及抑制物作用的動力變化，梁博士得以建立一分子模式，來解釋 UPPs 在與 Substrate 作用產生產物之際，其結構如何改變，而調控反應速率。上述研究表現出梁博士具有單獨研究的能力，又可與其他學者合作，研究成果突出，值得肯定及獎勵。