

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

Identification of N-terminal Fragment of NMDA Receptor Subunit NR1 As a Possible Antagonist Binding Site of Conantokin -G (2/2)

確認 NMDA 受體次元 NR1 之 N 端片段為芋螺毒素

CONANTOKIN-G 可能的拮抗結合位 (2/2)

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2113 - M - 041 - 009 -

執行期間： 89 年 08 月 01 日 至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：林朝賢

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

中華民國九十年十月 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

確認 NMDA 受體次元 NR1 之 N 端片段為芋螺毒素 CONANTOKIN-G 可能的拮抗結合位 (2/2)

Identification of N-terminal Fragment of NMDA Receptor Subunit NR1 As a Possible Antagonist Binding Site of Conantokin G (2/2)

計畫編號：NSC 90-2113-M-041-001

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：林朝賢 nchlin@mail.chna.edu.tw

執行機構單位名稱：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

一、中文摘要

本計畫的目的是想要證明 N1 區域是 NMDA 受體最有可能與 Con-G 結合的位置。圓二色 CD 輻光光譜測定實驗，可發現 spermine，確能引起 Con-G 產生穩定的螺旋結構。可見 spermine 與 Con-G 之間有交互作用。經模擬顯示 spermine 的陽性電荷間距剛好可以與 Con-G 的 Gla 殘基之陰電荷形成吻合性的離子鍵。將 N1 peptide 滴入 Con-G 會引起產生結構改變成類似摺板結構（參見圖三、四）。唯經過多次的變溫（10、40、60°C）試驗，證實是樣品產生蛋白質凝聚現象問題，製備核磁共振樣品亦有相同現象。

關鍵詞：芋螺毒素，圓二色輻光光譜，核磁共振光譜，靜電作用

Abstract

The major step of this project is to identify if the cationic N1 fragment is a specific Conantokin-G (Con-G) binding site of NMDA receptor. CD studies show that Con-G can form a stable helical structure in the presence of polybasic compound spermine. We also performed molecular simulations to show the electrostatic interaction between Con-G and spermine. NMR studies indicate that the titration of N1 peptide to Con-G solution, will trigger them to aggregate due to the charge neutralization.

二、緣由與目的

依據1994年Zukin等人研究指出N1 loop 對調控N-methyl-D-aspartate (NMDA)受體的離子通道開關相當重要。N1 loop是在NMDA受體NR1次元之N端暴露在細胞外的無定序構造 (random coil)。主要為 21 個胺基酸所組成，序列如下：
SKKRNYENLDQLSYDNRGPK，由胺基酸組成可

看出此段序列具有高密度之帶陽性電荷胺基酸（機率 6/21）。由蛋白質資料庫PDB找尋NR1胺基酸序列亦發現只有N1 loop的區域帶陽性電荷密度最高。據研究指出N1 loop的活性功能可像體內的 antagonist 多胺化合物 (polyamine) 一樣調控NMDA 受體離子通道打開。N1與polyamine一樣同是帶高密度陽性電荷，對NMDA受體的調節位置也一樣。

體內的 polyamines 例如 spermine 和 spermidine 在中樞神經系統可具有神經傳遞和神經調節雙重功效。尤其是調節 N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) 大型 glutamate receptor 的離子通道，依 1995 年 Macdonald 等人的電生理研究指出，polyamines 可增加 NMDA 受體對 glycine 的親和力並促進 NMDA 的離子通道打開使測量電流增強。

NMDA 受體對神經的生長及記憶相當重要。在臨床病理上 NMDA 受體影響到的疾病有中風，慢性疼痛、帕金森症、艾茲澤默症及癲癇症。芋螺毒素 conantokins，特別對腦部神經的 NMDA 受體有專一性拮抗作用，可阻斷受體對鈣離子的通入而終止神經訊號傳遞，相當有潛力作為神經保護劑的藥物開發，同時也適用在研究神經科學的受體探針材料。Conantokin-G (Con-G)，有 17 個胺基酸，序列为 GE $\gamma\gamma$ LQ γ NQ γ LIR γ KSN-NH₂，含有許多高密度陰電荷且獨特的胺基酸 γ -carboxylglutamate (Gla)。這些 Gla 殘基的排列與個數顯然對 Con-G 的生理功能相當重要。

本計畫之目的即想要證明 Con-G 是否透過 N1 loop 的結合，以作為 NMDA 受體異位抑制 (allosteric inhibition) 調控。因此，實驗設計朝兩個方向進行：
(一) Con-G 是否與 N1 peptide 有專一性交互作用
(二) Con-G 是否可中和 polyamine 的多陽電荷，使 antagonist 的能力喪失。Con-G 可能就是利用這兩種途徑，干擾 NR1 次元的 N1 loop 與 polyamine 調控 NMDA 受體離子通道打開，以達到 antagonist 的作用。

三、結果與討論

Con-G 是否與 polyamine 之間有交互作用？利用圖二色 CD 旋光光譜滴定實驗，可發現 spermine (purchased from Sigma Chemical Co.)，確能引起 Con-G 產生結構劇性改變，從無序構造變成穩定的螺旋結構（螺旋率約 65%，參見 89 年度結果報告）。可見 spermine 與 Con-G 之間能有交互作用。這也暗示在生理上 spermine 調控的 NR1 次元使 NMDA 受體產生結構改變，而使得離子通道被打開，這機制可因為 Con-G 的存在中和 spermine 的電性，干擾 spermine 的對 NR1 的調控，產生抑制作用。

利用二維核磁共振光譜 NOESY、TOCSY、DQF-COSY 光譜，分析 Con-G 與 spermine 結合誘形之結構。從 NOESY 二維核磁共振光譜（參見圖一）發現高濃度之 Con-G (5 mM) 與 spermine 結合將產生蛋白質凝聚現象 (aggregation)，此問題有待克服。

利用 Silicon Graphics O2 Workstation 作電腦模擬，Con-G 的分子座標是採用 PDB 資料庫檔案：1AWY (Ca^{2+} -loaded)；而 polyamine 之模型建立則以 Insight II Module (Biosym Technologies, Inc., San Diego, California) 所造，選擇以一分子帶四個電荷的精胺 (spermine) 為代表。經模擬顯示精胺的陽性電荷間距剛好可以與 Con-G 的 Gla 殘基之陰電荷形成吻合性的離子鍵（平均約 2.7 Å）。(參見圖二)

至於 Con-G 與 N1 peptide 是否有專一性交互作用？利用圖二色 CD 旋光光譜滴定實驗，可發現將 N1 peptide 滴入 Con-G 會引起產生結構改變成類似摺板結構（參見圖三、四）。唯經過多次的變溫 (10、40、60°C) 試驗，證實是樣品產生蛋白質凝聚現象問題，製備核磁共振樣品亦有相同現象。

目前蛋白質凝聚現象的問題，也可能暗示 Con-G 與 N1 peptide 之間有靜電交互作用，中和電性的結果，使結合複體以凡得瓦力吸引，而產生凝聚。若要改善此問題，將朝向嘗試用不同的氘溶劑。

四、計畫成果自評

本計畫成果執行至今，以完成下列目標：

(一) 純化胜肽樣品

N1 共有 21 個胺基酸序列如下：
SKKRNYYENLDQLSYDNRRGPK；N1A 序列如下：
SAAANYENLDQLSYDNAAGPA，純化條件利用 HPLC RP C18 層析管柱 (300Å, 10 mm x 25 cm)，ACN 條度為 15 – 50%，30 min，流速 2.0 ml/min。偵測器波長設定 220 nm。

(二) 圖二色 CD 旋光光譜

Con-G 與 N1 peptide 的滴定實驗與變溫實驗；Con-G 與 spermine 的滴定實驗。

(三) 電腦模擬

利用 Insight II 軟體，電腦模擬，完成 Con-G 與 spermine 分子 docking 後之模型建立。

(四) 核磁共振光譜

完成 Con-G 與 spermine 結合誘形之結構二維

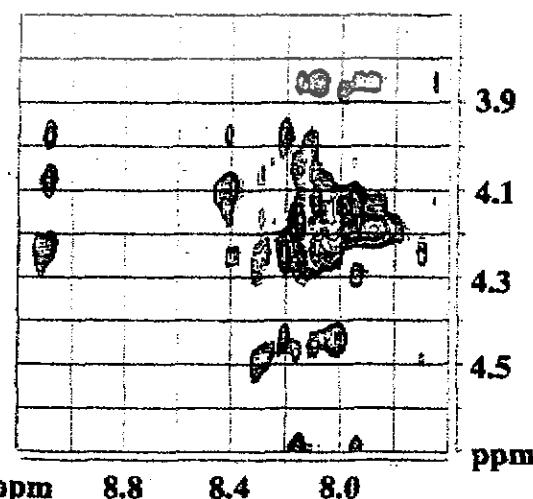
核磁共振光譜 NOESY、TOCSY、DQF-COSY 光譜實驗，唯信號峰因蛋白質凝結重疊嚴重，難以指認。

(五) 資料整理與圖表製作

五、參考文獻

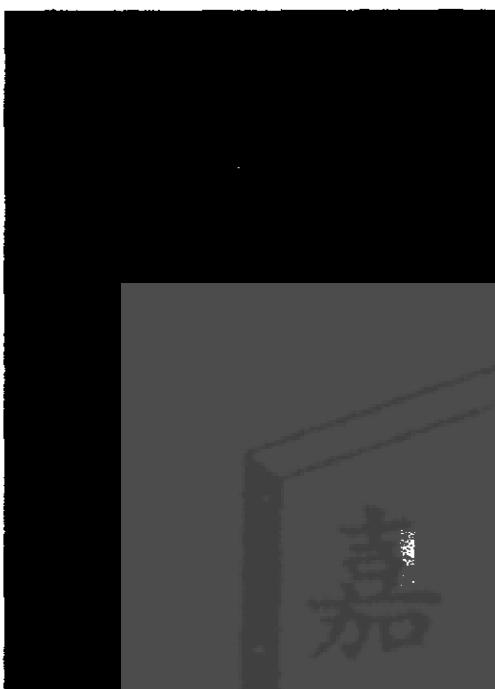
- [1] Blandl T, Warder SE, Prorok M, Castellino FJ. (2000) Structure-function relationships of the NMDA receptor antagonist peptide, conantokin -R. *FEBS Lett.* Mar 24;470 (2):139-46.
- [2] Castellino FJ, Prorok M. (2000) Conantokins: inhibitors of ion flow through the N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Curr Drug Targets* Nov;1(3):219-35.
- [3] Lin, C.H., Chan, F.C.H., Hwang, J.K. and Lyu, P.C. (1999) Calcium binding mode of gamma-carboxyglutamic acids in conantokins. *Protein engineering*, 12, 589-595.
- [4] Lin, C.H., Chen, K.S., Hsu, K.S., King, D.S. and Lyu, P.C. (1997) Role of modified glutamic acid in the helical structure of conantokin-T. *FEBS Lett.*, 407, 243-248.
- [5] 林朝賢 (2000) Identification of N-terminal Fragment of NMDA Receptor Subunit NR1 As a Possible Antagonist Binding Site of Conantokin G (1/2) 89 年度國家科學委員會專題研究計畫成果報告 (計畫編號：NSC 89-2113-M-041-004)
- [6] Rock DM, Macdonald RL. (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35:463-82.

六、圖表

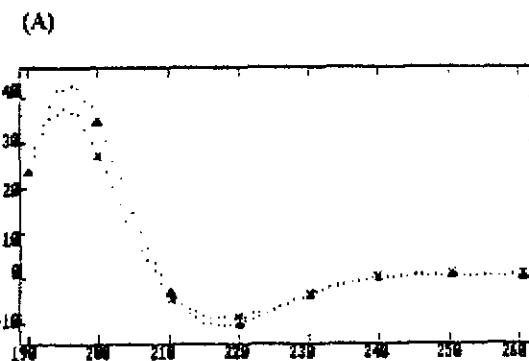


圖一、Con-G 之 NOESY 核磁共振光譜圖。此區域為 NH 對 CaH 的共振訊號峰指紋區。Con-G 樣品的濃度大約為 5 mM 配製在 90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$ 比例的

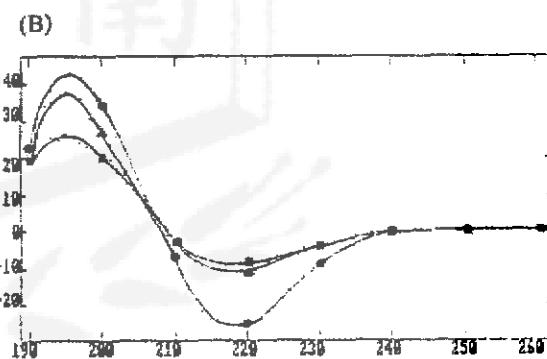
水溶液中，逐漸滴入 spermine 直到濃度 5 mM。掃瞄過程在 25°C 下進行。核磁共振儀器型號為 Bruker DMX-600 spectrometer。Mixing time 400 ms 二維核磁共振光譜 phase-sensitive 圖譜技術依 Time-proportional phase incrementation (TPPI; Bodenhausen et al., 1984) 而收集。得到的資料將傳至 O2 電腦工作站利用 Xwinnmr 軟體處理。



圖二、Con-G 與 spermine 分子經電腦模擬 docking 後之模型。Con-G 的分子座標是採用 PDB 資料庫檔案：1AWY；而 spermine 之模型建立則以 Insight II Module (Biosym Technologies, Inc., San Diego, California) 所造。利用 Silicon Graphics O2 Workstation 作電腦模擬。經模擬顯示 spermine 的陽性電荷間距剛好可以與形成螺旋結構的 Con-G (紫色纖帶骨架表示) 之 Gla $i, i+3$ 或 4 殘基之陰電荷形成吻合性的離子鍵 (平均約 2.7 Å)。模擬過程利用 Minimize 和 Dynamics 程式，Potentials，Partial Charges 和 Formal Charges 此三項固定在 CVFF Forcefield 模式。水分子溶劑以 sphere 20；Calc. method =steepest descent algorithm；maximum derivative =0.01 Kcal/Å；Dynamic Temp=300K，Steps=10 ps)；介電常數 80。



圖三、N1 peptide 滴定 Con-G 的圓二色 CD 旋光光譜圖二色旋光光譜圖。儀型號是 Aviv Model 202 spectropolarimeter。實驗條件在 25°C，石英管管徑長 1 mm 的條件下執行。掃瞄波長設定在 222 nm；每點數據的取得間隔 0.5 nm，且經過重複三次掃瞄後求平均值。Con-G 50 μM，通過 Chelex-100 (Bio-rad)離子交換樹脂前處理為避免有殘餘微量的金屬離子污染干擾實驗。溶液 10 mM HEPES buffer, pH=7.2± 0.2。■與▲線條分別各代表滴入 N1 peptide 5 μM 與 20 μM 的結構改變結果。



圖四、變溫試驗之 Con-G 圓二色 CD 旋光光譜圖。經過變溫試驗，-□-線條代表 10 °C、-▲-線條代表 40 °C、-■-線條代表 60 °C。Con-G 樣品濃度 50 μM，滴入 N1 peptide 濃度為 20 μM，溶液 10 mM HEPES buffer, pH=7.2± 0.2，1 mm 管徑石英管。