

第一章 緒論

1.1 研究背景

在生物系統中，酵素 (enzyme，或稱為酶) 可催化諸多反應，而讓我們的生命得以延續；對於 DNA 轉錄、轉譯成蛋白質的過程，或是產生出維持細胞所需動力來源的能量，這些反應都需要酵素的參與，因此酵素在每一個生化過程中都扮演著重要的角色。生物體內各種不同種類的酵素常伴隨著金屬離子之存在，而這些金屬離子總是扮演著關鍵性的角色。

在目前醫學上，有一些難以治療的疾病，例如癌症，仍沒有一種很好控制、治癒的方法，因此，利用具有專一性辨識功能的藥物或基因療法，為目前最直接且有效的治療方式。人造 DNA/RNA 切割試劑即利用具有專一性辨識功能的藥物，配合基因定序技術，將致病的基因序列切除或抑制其製造出致病的蛋白質。此研究方向除了在學術上的價值引起科學家的注意外，更在科學及醫學上有其實際的用途¹。

人造 DNA/RNA 切割試劑其主要的設計構想是由一個具備切割 DNA 或 RNA 能力的活性部分與一段 DNA 短鏈 (DNA oligonucleotide) 共價鍵結而形成。辨識區為 DNA 短鏈，其專一性主要就是透過此 DNA 短鏈與欲被切割的 DNA 或 RNA 之間所形成的 “Watson-Crick hydrogen bonding” 鍵結而成，再經由活性區切割 DNA 或 RNA，如圖 1-1 所示^{1,2}。

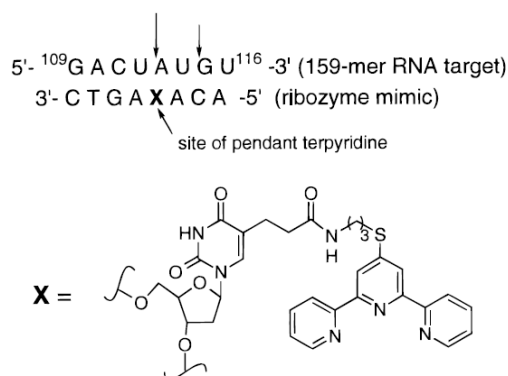


圖 1-1、第一個最先被合成的人造 ribozyme。

圖 1-1 中 X 為具有活性切割的化合物，由一個三吡啶 (terpyridine) 和二價銅離子所形成的錯合物，在切割的時，X 兩端的鹼基會辨識相對的 RNA target 片段，而 X 則負責切割的部分；RNA target 之箭頭表示為被切割的位置。

現今雖然已有天然限制酶可以使用，但是將天然的酵素從生物體內分離純化所需要的成本很高，所得到的量又不多，且天然限制酶的辨識區常只有 4-6 個鹼基，故核糖核酸長鏈除了會被切割成很多小片段外，又會有辨識度不足的缺點；利用人造 DNA/RNA 切割試劑，我們可以切割在特定某一位置上，並可隨著需要而調整辨識區對欲切割區的親和力，以及切割區的切割活性。除此之外，更可以透過對人造限制酶的研究，讓我們可以更瞭解天然限制酶的反應機制。

早期對人造 DNA/RNA 切割試劑的研究，主要是著重於 RNA 切割。RNA 在其五碳糖的第二位置上有一氫氧基 (2'-OH)，此氫氧基在反應機制中被認為扮演極重要的角色；較被廣泛接受水解 RNA 的反應機制包括兩個步驟，轉酯反應和水解反應。在第一個步驟的轉酯反應中，RNA 上五碳糖的 2'-OH 會先解離脫掉氫質子 (deprotonation)，並形成強親核基 alkoxide，之後 alkoxide 會攻擊五碳糖 3' 端磷酸酯鍵之磷原子，形成 2',3'-cyclic phosphate；在第二個步驟的水解反應中，2',3'-cyclic phosphate 會水解為 2'-phosphate 及 3'-phosphate，至此完成整個水解反應。然而在轉酯反應中，可能會形成一個雙三角椎 (trigonal bipyrimide) 之中間物或過渡態，如圖 1-2 所示³⁻⁶。

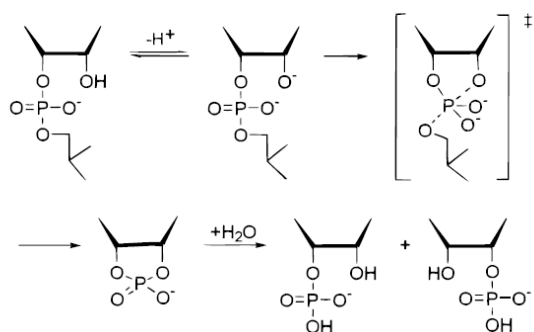


圖 1-2 、 RNA 水解反應機制之圖解說明。

自然界中存在的 RNA 常不穩定，很容易就會被分解掉，但和 DNA 比較 DNA 的水解就相對地困難許多，因 DNA 在五碳糖 2' 端的是 H，而 RNA 為 OH，所以在水解過程中所需要的親核基就必須由外來提供；另外，外來的親核基帶負電，而磷酸酯鍵也帶負電，由於同性相斥，會使得整個水解反應更不容易進行，這就是為什麼 DNA 水解的半生期常在數萬年以上的原因。

DNA 的酵素水解通常是依照下列兩步驟，如圖 1-3 所示⁷：

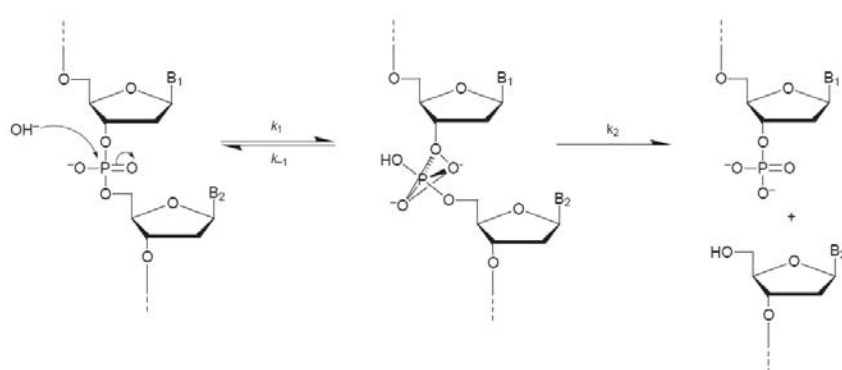


圖 1-3、DNA 水解可能的反應途徑。

(1) 藉由外來的親核基攻擊在磷原子上，例如：外來的 OH⁻，形成五配位的中間物。

(2) 移除 2'-deoxyribonucleotide 位置上的 5'-OH，且 P-O 鍵斷裂。

此反應的速率決定步驟推測是在第二步，也就是 P-O 鍵斷裂。而在非酵素水解反應中，在 3' 端 P-O 鍵的分裂也會發生⁷。

天然的核酸酶和限制酶是非常具有專一性，但是卻有鍵結過強的缺點；且加上 DNA 水解不易，RNA 水解速率是比 DNA 快 10^5 - 10^6 倍，因此除了參考 RNA 水解的反應特性外，觀察自然界中的水解 DNA 酵素也是一項很好的選擇，例如：*E. coli* 的 alkaline phosphatase，如圖 1-4 所示，就是兩個含有鋅離子的酵素，利用 Ser₁₀₂ 在鹼性的條件下無選擇性的水解磷酸單酯鍵 (ROPO₃²⁻)^{8,9}。

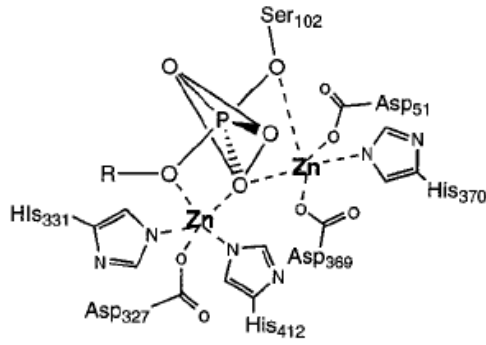


圖 1-4 、 *E. coli* alkaline phosphatase 磷酸化的轉移反應可能的過渡狀態結構。

因此很多科學家便想藉由觀察天然的水解磷酸酯鍵類酵素的結構，並仿照限制酶 (restriction enzyme) 其擁有專一切割能力的特質，以期合成出能夠水解磷酸酯鍵的人造限制酶，是故設計具有彈性的個別受質鍵結和切割區之人造 DNA/RNA 切割試劑，能提供許多優點^{1, 3, 10}。

在水解過程中，如有金屬離子的參與，將會使轉酯和水解兩步驟更容易進行。金屬離子在轉酯跟水解反應中可能扮演的角色如圖 1-5 所示⁹：

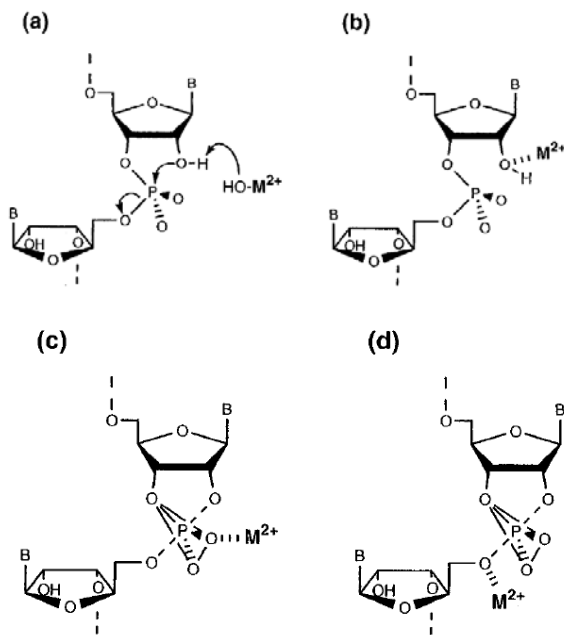


圖 1-5 、金屬催化之轉酯或水解反應可能扮演的角色。

(a) 和水配位後並解離形成金屬氫氧根離子 (metal-bound hydroxy anion)，金屬氫氧根離子當作是一個路易斯鹼 (Lewis base) 來拔除 2'-OH 上的氫，使其成為 2'-O⁻ 強親核基，攻擊五碳糖 3' 端磷酸酯鍵之磷原子。

(b) 配位在 2'-OH 的氧原子上，吸引氧原子上電子雲，使 2'-OH 的氫更容易解離，以形成 2'-O⁻ 親核基。

(c) 轉酯過程中所形成的中間物或過渡態，會由於靜電相吸而提供其穩定性。

(d) 配位在離去基 (leaving group) 上，穩定離去基，使反應朝向水解方向進行。

在親核基攻擊的反應部分，可用來幫助加速水解反應的金屬離子包括鎂離子 (Mg²⁺)、鈣離子 (Ca²⁺)、鐵離子 (Fe³⁺)、鎳離子 (Ni²⁺)、銅離子 (Cu²⁺)、鋅離子 (Zn²⁺)、鉛離子 (Pb²⁺)、鑷系金屬離子 (Ln³⁺)、二氧化鈾離子 (UO²⁺) 和鈷鹽 (Th salts) 等，以及非金屬離子的氫質子 (proton)、氫氧根離子 (OH⁻)、氨類 (amines) 和其他含氮化合物¹。

由過去的文獻得知，由過渡金屬¹⁰⁻¹⁷和鑷系金屬離子¹⁸⁻²⁶所形成之錯合物的人造切割試劑中，以三價的鑷系金屬離子對於 RNA 的水解是最有效率的⁴⁴，且反應速率會隨著鑷系金屬的原子序增加而遞增；雖然 Ce(IV) 被認知是最有效率的 DNA 促進劑，但是在 RNA 促進劑中，卻發現 Tm(III)、Yb(III) 和 Lu(III) 等三價離子是較有效率的^{7,27}。

雖然鑷系金屬離子在水溶液下是很有效率的 DNA 切割試劑，但其在高 pH 值的離子狀態下會產生沈澱，且會對生物體產生毒性；因此設計出一種錯合物是可保有鑷系金屬的水解切割能力，且不具有生物毒性及安全性，是科學家努力的方向。為設計出對鑷系金屬有較高親和力的配位子，我們參照 MRI 核磁共振造影試劑的設計，發現大環配位子遠比線性配位子對鑷系金屬所形成的錯合物較穩定，更發現到當配位子中在氮原子上有 carboxymethyl group (乙酸基) 的鍵結，可提供一個帶中性或正電的錯合物之設計方法。在 MRI 試劑中被廣泛研究且穩

定的配位子為多胺多酸基大環配位子：

1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) 及 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid (TETA) ，由於對 Ln (III) 有高親和力，且動力學及熱力學穩定性都較高，因此也可作為人造 DNA/RNA 切割試劑之配位子架構。

另外，在人造切割試劑中，多核金屬錯合物與雙金屬氫氧根離子團簇錯合物的發現，也提供磷酸酯鍵水解可能的改良方向。然而，由於錯合物水解的性質，與陽離子鑷系金屬錯合物“鑷系金屬—氫氧根離子團簇錯合物”之形成，對於有效率的切割試劑設計，以及對磷酸酯鍵最有可能之水解機制的解釋，仍然是非常大的挑戰。²⁸

大環鑷系金屬錯合物系統除了可應用在作為人造 DNA/RNA 切割試劑、核磁共振造影試劑及核醫診斷藥劑外，亦能作為影響磷酸與磷酸酯鍵水解之殺蟲劑和神經毒氣上。



1.2 研究動機

我們實驗室對於多胺基多酸基大環配位子與鏷系金屬形成的錯合物之研究領域上一直很感興趣，因由文獻得知，鏷系金屬與多胺基多酸基大環配位子形成的錯合物可以增加 DNA/RNA 水解的效率。

從過去到現在，我們實驗室已完成一系列的多胺基多酸基大環配位子研究，如 TETA、K21DA、K22DA、DOTA、DO2A 和 NO2A 等與鏷系金屬形成之錯合物，分析其熱力學、動力學及切割 DNA/RNA 效率。

然而一系列多胺基多酸基大環配位子及與鏷系金屬形成錯合物之合成、熱力學、動力學分析，以至於錯合物在切割 DNA/RNA 的效率研究上，要拿來相互比較，是需要花費很多時間跟精神的；倘若我們藉由目前的模擬軟體進行預測，並利用之後的實驗數據資料來驗證，或是由已知的結果來反檢測模擬軟體對於預測分子結構變化及穩定度的可行性、適用性以及準確度，此種研究方向已逐漸演變成目前的趨勢，因其可以省下許多時間、金錢以及人力。

利用分子模擬軟體來模擬計算多胺基多酸基大環配位在真空及水溶液下最佳化的構型，並計算其能量。由於氮上酸基的多寡及不同官能基會影響到大環配位子之結構，且在不同的 pH 值條件下，氮上會有質子化 (protonation) 現象，而不同的質子化位置亦會影響到大環配位子的結構。因此最後可能質子化的位置，以及鏷系金屬與大環配位子形成錯合物最可能之結構，都是我們將探討的主題。

1.3 論文架構

論文總共可分為七章。第一章為研究背景及動機的介绍；第二章為文獻回顧，介绍分子模拟於過去對大環分子以及大環鑰系金屬離子錯合物方面的研究；第三章為計算化學理論方法简介，包括分子力學與量子力學之原理簡述及其優缺點。第四章為利用分子模拟軟體 (CHARMm) 預測不同員環與不同取代基之多胺基多酸基大環配位於真空及水溶液下，其於不同質子化位置之最佳化結構，以及利用量化軟體 (Gaussian 03) 預測鑰系金屬離子錯合物之最佳化結構；第五章為模拟計算之結果；第六章為討論；第七章為結論。

