

一、緒論

1-1 蝦白點症

1-1-1 蝦白點症的症狀及危害

蝦類傳染性的疾病包括病毒、細菌、立克次氏體及寄生蟲之感染症，其中以病毒感染對養蝦產業的危害最大，特別是病毒性白點症(white spot syndrome; WSS)，白點症顧名思義就是罹患此症的蝦體之外骨骼上經常會出現白點或白斑[1]。此疾病以極快的速度蔓延至全球，使世界養蝦產業的成長頓時停滯，具有草蝦王國美名的台灣也是其中之一。其病原體為蝦白點症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)，得此疾病的蝦類症狀為食慾減退、行動遲鈍、彈跳無力、靜臥不動或於水面打轉。這些異常行為會不斷地重複，直至無力、死亡，爾後被其它蝦子所吞食，而重複上述之循環終至整池蝦群的死亡。

感染蝦白點症的蝦體末期的主要症狀為病蝦的皮下、甲殼及附肢上出現白色的斑點，而且又以頭胸甲最為明顯、頭胸甲也易於剝離、殼與真皮分離。此病感染力強，且致死率幾乎達到100%，通常出現病症的病蝦會在2~10天死亡。而目前為止並無發現任何種類的蝦對此病毒具有免疫力[2]，因此更顯示出解決此病毒危害的迫切性。

1-1-2 傳播途徑

此病毒極易傳播，傳播方式主要可分為三類：水平傳播、垂直傳播以及其他傳播途徑。

水平傳播：病蝦的排泄物、污染的飼料或水源、以及染病死亡的蝦體，這些被健康的蝦體食入後，健康的蝦體也會遭受感染。其它節肢類的生物也是此種病毒的可能帶原者。

垂直傳播：親代蝦和子代蝦都存在潛伏感染，在對蝦的卵巢中也檢測到白斑病毒的存在。

其它傳播途徑：水中的病毒粒子可經由鰓腹膜的微孔進入蝦體，並引起鰓和全身的病變。在進行感染實驗過程中，發現以鰓下注入感染組顯示的死亡率較高，甚至明顯高於皮下注射感染組。表示致病病毒可能以鰓部為主要感染途徑。

1-1-3 蝦白點症的病理

原位雜合法(*in situ* hybridization)是常用於研究基因組織特異表現(tissue-specific expression)和偵測基因表現位置的方法。結合細胞遺傳學、分子生物學、螢光顯微技術及電腦影像處理，發展出新的基因篩檢及定位技術，稱為螢光染色體原位雜交技術(Fluorescence *in situ* Hybridization; FISH)，這個方法利用螢光標定之 DNA 探針，藉由雜交(hybridization)的過程，在染色體上將基因或 DNA 定位。利用原位雜合法分析結果顯示此病毒侵害的主要組織和器官是皮下組織、表皮角質層組織、觸角腺、造血組織、鰓、類淋巴器官、肌肉纖維質細胞、食道、胃的表皮與結締組織，同時在心臟、眼、神經及生殖腺組織中廣泛分佈。亦即只要是源自中胚層及外胚層的細胞都是此病毒攻擊的對象。病毒感染的細胞會出現脹大、均質化且呈嗜鹼性的變異細胞核[3]，且因為在卵巢及發育中的卵細胞發現有病毒感染的情形，因此此病毒可能有垂直感染的能力[4]。

對於血液檢查，發現血淋巴(haemolymph)細胞減少、血淋巴混濁、類淋巴器官和肝胰臟腫大，血淋巴液凝固時間超過 3 分鐘。瀕死蝦殼變軟，血淋巴液發黃，不易凝固。病毒粒子散於細胞質中，並可在細胞質中繼續組裝。最後細胞解體，病毒粒子再感染周圍細胞。在腹部肌肉纖維之間有時也發現病毒粒子，某些病蝦在鰓和觸角腺中可看到血細胞變性壞死，包圍成結狀構造，其大小約為 20~50 μm ；類淋巴器官有血細胞浸潤。

1-1-4 病原特徵及分類

自 1993 年蝦白點症爆發以來，便有許多學者投入研究。研究報告指出蝦白點症病毒為雙層囊膜但不形成封埋體(non-occluded)，其封套(envelope)

長約 250~380 nm，寬約 70~150 nm，成紡錘形或桿形，部分病毒顆粒可見到尾狀突起構造(tail-like projection)[3]，此病毒由雙股 DNA 所組成基因體，大小約 200~300 kbp，包含了 531 個預測的個開放讀碼區(open reading frames; ORFs)，其中有 181 個開放讀碼區可能是功能性蛋白質[表 1]，這是目前已得到完整序列的動物病毒中最大的一種[1,5,6]。這株病毒具有許多別名：hypodermic and hematopoietic necrosis baculovirus(HHNBV)[7]、rod-shaped nuclear of *Penaeus japonicus*(RV-PJ)[8]、systemic ectodermal mesodermal baculovirus(SEMBV)[9]、white spot baculovirus(WSBV)[1]以及 white spot syndrome virus(WSSV)，本實驗所採用的名稱為 WSSV。在分類上雖然也有許多不同的說法，如桿狀病毒科(Baculoviridae)、裸桿狀病毒亞科(Nudibaculovirinae)、非封埋性桿狀病毒屬(Non-occluded Baculovirus)，但都是依據其形態分類。1995 年國際病毒分類委員會(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)第六次報告取消了裸桿狀病毒亞科的病毒收錄，並且無包涵體桿狀病毒不再歸於桿狀病毒科，這株病毒便沒有較明確的分類定位，而且此病毒在胺基酸的比對上，似乎更接近於真核生物，卻與其它病毒不相似，因此此病毒在分子資訊(molecular information)不足情況下分類地位確實尚待確認，甚而也許是一個新種類的病毒。由於它不屬於桿狀病毒科，因此目前只能列為未分類的無脊椎動物病毒(unassigned invertebrate viruses)，尚需更多證據方能確認其明確的分類地位。

1-1-5 目前蝦白點症病毒的防治對策

早自 1993 年起，白點症就自中國大陸爆發而造成蝦群大量死亡，而亞洲地區每年因白點症而造成的損失達 10 億美元，而且白點症的宿主範圍極為廣泛[10]，造成此病毒極容易散布至其它地區。目前並沒有有效的藥物可以控制或減低疫情，因此只能利用防範的方式避免疫情的擴散以及蝦群的死亡，所以除去帶原者以及提供良好的環境便成了防治的重要課題。

養殖蝦類所造成的疾病是由蝦子、病原體和環境所共同造成的，由於此病毒具有水平及垂直感染的能力，加上目前為止養殖蝦苗仍為天然種蝦之蝦苗，因此只能從除去病蝦以及良好養殖環境控制著手。在除去病蝦方面，

已有高專一性白點症病毒 PCR 檢測系統[2,11]，利用此方式檢測種蝦及蝦苗來控制來源，可大幅降低草蝦養殖的損失，因此需建立對抗病毒的良好養殖條件，包括：

- (1) 利用白點症病毒檢測系統檢測種蝦，生產蝦苗及監視池蝦帶原之狀況。
- (2) 以放養無白點症病毒之蝦苗為原則，若放養輕度帶原之蝦苗，則此蝦苗之帶原率不得超過 30%。
- (3) 蝦苗之放養密度不得超過每公頃 50 萬尾。
- (4) 嚴格之養殖管理，例如：避免帶原生物的進入、避免使用未經檢測之生物餌料或生物製劑、注意水溫、鹽度、及溶氧量之變化及餵飼良質之飼料等。

正因尚未有有效的治療方法，所以不論是利用中草藥、營養強化、人工轉殖種蝦或是有效藥物的研發，都需要快速地加強進行。



開放讀碼區	最佳比對結果[來源]	可能的功用
WSV001	L23982, collagen type VII [<i>Homo sapiens</i>]	Collagen, TMN ucleocapsid protein VP24, TM, SP
WSV006	U07025, chitinase [<i>Janthinobacterium lividum</i>]	Glycosyl hydrolase, Pro-rich cluster (147–175), TM SP Ser/Gly-rich region (4–80), TM
WSV011	AF128951, flagellin [<i>Escherichia coli</i>]	TM, SP,
WSV026	AE003491, <i>sno</i> gene product [<i>Drosophila melanogaster</i>]	Acidic region (1406–1445), TM
WSV035	X77514, pupal cuticle protein [<i>Galleria mellonella</i>]	TM, SP
WSV063	AF078683, Ring-H2 finger protein RHA1a [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Cys2/Cys2-type zinc finger
WSV067	NP-001062, thymidylate synthetase [<i>Homo sapiens</i>]	Thymidylate synthase
WSV078	AE003485, CG11122 gene product [<i>Drosophila melanogaster</i>]	
WSV079	AL022223, putative protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	EF-hand calcium-binding motif; Ring finger protein-like; Ser/Asp-rich region (204–330)
WSV083	AC018363, putative protein kinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Protein kinase, Ser/Thr protein kinase activesite signature, TM
WSV100	AC024128, putative CBP [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	CBP; Cys2/Cys2-type zinc finger, TM
WSV108	NP-012284, cell surface flocculin [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	Membrane-associated protein, TM
WSV112	Q89662, dUTP pyrophosphatase [fowl adenovirus type 1]	dUTPase
WSV129	X73481, mst101(2) [<i>Drosophila hydei</i>]	Repeat region (20–322)
WSV143	AB037755, KIAA1334 protein [<i>Homo sapiens</i>]	Repeat region (325–427); Asn-rich cluster (990–1094), TM
WSV166	AE003593, CG10523 gene product [<i>Drosophila melanogaster</i>]	Cys2/Cys2-type zinc finger, TM
WSV172	P21524, ribonucleoside-diphosphate reductase large chain [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	Ribonucleotide reductase large subunit, TM
WSV178	T29757, protein UNC-89 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	Repeat region (82–302), TM, SP
WSV188	AF117061, ribonucleotide reductase R2 subunit [<i>Aedes albopictus</i>]	Ribonucleotide reductase small subunit, TM
WSV191	AJ133437, deoxyribonuclease I [<i>Penaeus japonicus</i>]	Nuclease, TM, SP
WSV199	AF156271, Ring finger protein terf [<i>Homo sapiens</i>]	Ring-H2 finger motif, TM
WSV214	L41834, nuclear protein [<i>Ensis minor</i>]	DNA-binding protein
WSV222	AK016037, putative [<i>Mus musculus</i>]	Ring-H2 finger motif, ATP/GTP

		binding motif, TM
WSV249	AC024760, contains similarity to TR [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	Ring-H2 finger motif, repeat region (454–633)
WSV271	S59310, probable membrane protein YMR317w [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	Lys/Ser-rich region (455–526), TM
WSV277	D86346, crystal protein [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	TM
WSV285	AE003824, CG13185 gene product [<i>Drosophila melanogaster</i>]	ATP/GTP binding motif, TM
WSV289	NP-011856, serine/threonine protein kinase [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	Protein kinase, TM, SP
WSV303	NP-069209, transcription initiation factor IID [<i>Archaeoglobus fulgidus</i>]	TBP Cys2/Cys2-type zinc finger, TM
WSV360	U96166, srpA [<i>Streptococcus cristatus</i>]	Leucine-zipper motif, TM
WSV395	T41553, thymidylate kinase [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	Thymidylate kinase; ATP/GTP binding motif
WSV406	T27927, hypothetical protein ZK593.8 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	Ring-H2 finger motif, repeat region (435–494), SP
WSV423	T22255, hypothetical protein F45H7.4 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	Protein kinase, TM
WSV447	Z70204, similarity to yeast hypothetical helicase [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	Helicase, ATP/GTP binding motif, Asp-protease motif, TM
WSV486	AF154037, surface protein PspC [<i>Streptococcus pneumoniae</i>]	Lysine-rich, TM
WSV502	AL352992, ariadne-like protein [<i>Leishmania major</i>]	Cys2/His2, Cys2/Cys2-type zinc finger, ATP/GTP binding motif, TM, SP
WSV514	X61920, DNA polymerase III catalytic subunit [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	DNA polymerase, TM

表 1-1：白斑病毒之開放解碼區列表。僅示出在序列比對上能夠獲得相似序列的開放解碼區；TM, transmembrane domains; SP, signal peptides[32]

1-2 胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶

1-2-1 胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶的功能與其重要性

DNA 的合成途徑可分為兩類：(1)利用低分子量的前導物合成嘌呤(purine)和嘧啶(pyrimidine)的新合成路徑(de novo pathway)，以及(2)利用從飲食或核酸降解而得的核苷和鹼基進行生合成的回收利用路徑(salvage pathway)。而胸腺嘧啶激酶為回收利用路徑中重要的蛋白質之一，它能將去氧胸腺核苷磷酸化，形成去氧胸腺核苷單磷酸(deoxythymidine monophosphate；thymidylate；dTMP)，接著經由唯一的路徑，由胸腺嘧啶磷酸激酶將去氧胸腺核苷單磷酸進一步磷酸化，形成去氧胸腺核苷雙磷酸(deoxythymidine diphosphate；dTDP)，接著再進行最後的磷酸化步驟，形成去氧胸腺核苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate；dTTP) [圖 1-1]，這些步驟都是以三磷酸腺苷(ATP)做為磷酸根的提供者。

正因為胸腺嘧啶激酶是合成 DNA 回收利用路徑中一個非常重要的蛋白質，控制去氧胸腺核苷以及去氧尿核苷(deoxyuridine；dU)的回收，而病毒大多利用這個方法形成所需的去氧胸腺核苷三磷酸進行 DNA 的合成，研究也顯示若是核苷衍生物可被胸腺嘧啶激酶磷酸化，並進一步地形成三磷酸的形式，就有可能可以進入其 DNA 複製過程，使病毒之 DNA 複製中斷或破壞[12]。因此胸腺嘧啶激酶成為一個核苷衍生藥物重要的目標物，像是抗人類免疫力缺乏病毒(anti-HIV)藥物疊氮胸苷(3'-azidideoxythymine；Zidovudine；AZT)以及抗單純疱疹病毒(anti-HSV；anti-Herpes simplex virus)的藥物無環鳥苷(Acyclovir；ACV)等等，就是針對胸腺嘧啶激酶而設計的，此外單純疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶也被用來研究癌症的基因治療法[26]。

胸腺嘧啶磷酸激酶通常為二聚體(dimer)，與其他核苷單磷酸的磷酸化酵素(nucleoside monophosphate kinase)具有相類似的構形，許多研究發現胸腺嘧啶磷酸激酶為核苷酸衍生藥物磷酸化的第二個步驟，而這一步也是許多核苷酸衍生藥物進入干擾或甚至破壞 DNA 的合成的瓶頸[13,14]，因此如何設計開發具有高專一性且能被胸腺嘧啶磷酸激酶所接受的藥物便成為研究的方向之一。

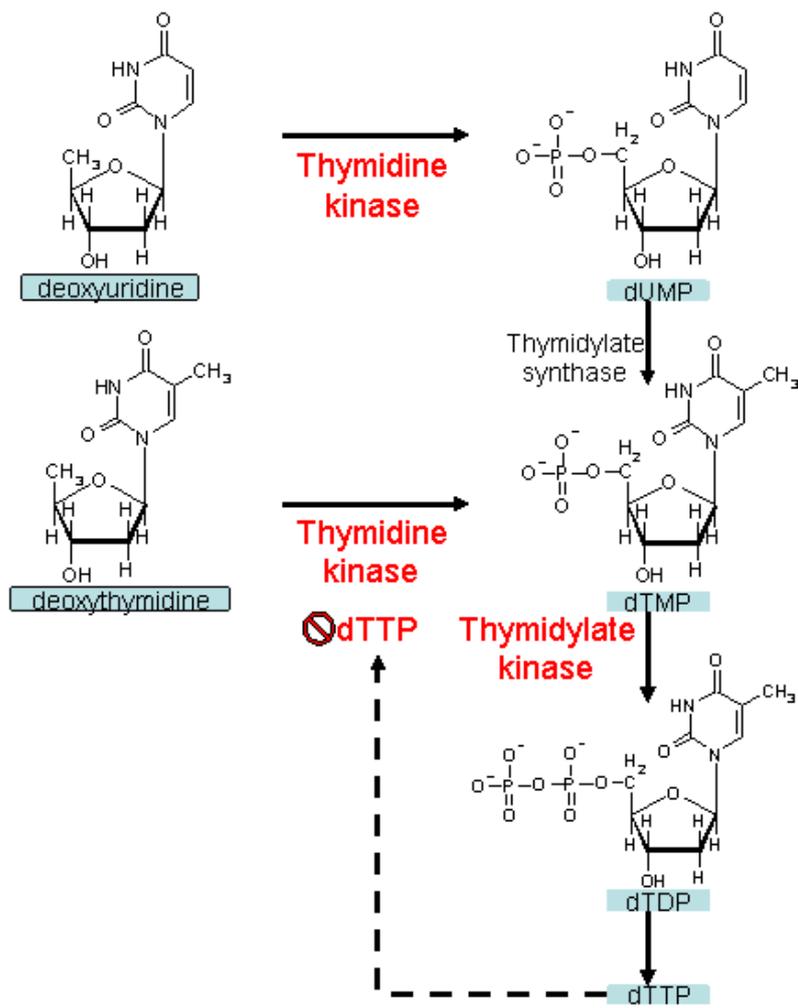


圖 1-1：dTTP 合成途徑中 TK 與 TMK 所扮演的角色

1-2-2 胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶的分類

人類具有兩種胸腺嘧啶激酶，一種為細胞質與細胞核的胸腺嘧啶激酶(胸腺嘧啶激酶1；TK1)和粒線體的胸腺嘧啶激酶(胸腺嘧啶激酶2；TK2)。其中胸腺嘧啶磷酸激酶1通常為96~110 kDa的四聚體(tetramer)，具有較佳的專一性，它能夠以去氧胸腺核苷以及去氧尿核苷做為受質，並受到去氧胸腺核苷三磷酸的抑制。雖然其他物種的胸腺嘧啶激酶不一定是形成四聚體，但性質上與其非常的相近—不論是在受質或是抑制物，因此都被歸類為胸腺嘧啶激酶家族(thymidine kinase family; TK family)；相較之下29

kDa、單體(monomer)的胸腺嘧啶激酶2專一性就較差，它能夠以去氧胸腺核苷、去氧胞核苷(deoxycytidine; dC)以及去氧尿核苷做為受質，而可受去氧胸腺核苷三磷酸和去氧胞核苷三磷酸的抑制。因此它被歸類在去氧核苷家族(deoxynucleoside kinase family; dNK family)－其中包含了胞嘧啶激酶(cytidine kinase)、鳥糞嘌呤激酶(guanosine kinase)、腺嘌呤激酶(adenosine kinase)以及能夠以去氧尿核苷和去氧胞核苷為受質的胸腺嘧啶激酶。上述這兩個家族幾乎包含了所有目前已知的胸腺嘧啶激酶，而單純疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶卻是唯一的例外，它自成了一個稱為單純疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶家族(thymidine kinase from herpesvirus family; Herpes_TK family)，通常的形態為二聚體、約為70~75 kDa，不具高專一性，可以去氧胸腺核苷、去氧胞核苷、去氧尿核苷以及去氧胸腺核苷單磷酸做為受質，而且不受其產物(product)的抑制。如今被研究許久的單純疱疹病毒胸腺嘧啶激酶已進入到用來做為基因治療階段，其基因被稱之為自殺基因，只要將這段基因送入癌細胞內，再將核苷衍生物(ganciclovir; GCV)注入靜脈，便能使癌細胞複製時將其當做基因物質，導致基因錯亂而死亡[15-21]。

另一個蛋白質－胸腺嘧啶磷酸激酶，不論是在何種物種，都被歸類在胸腺嘧啶磷酸激酶家族(thymidylate kinase family)，也都具有兩個必備的部份[圖 1-2]：

- (1)P-loop：為一個靠近 N 端的序列，介於褶板(sheet)與螺旋(helix)之間的環線(loop)，具有保留序列“GXXXXGKS/T”，功能為固定磷酸根(phosphate-binding)，在 TMK 的催化機制上扮演了相當重要的角色。
- (2)LID region：為一個靠近 C 端的序列，功能為穩定磷酸根提供者(phosphate donor binding site)，二級結構為環線形，此區域具有高度的伸展性。

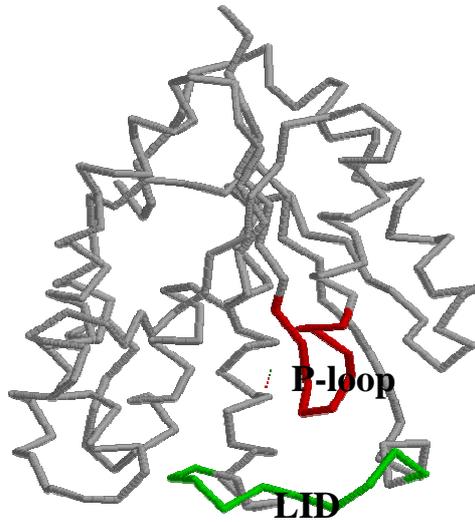


圖 1-2：人類 TMK 的蛋白質立體結構，其中紅色為 P-loop，綠色為 LID region

根據胸腺嘧啶磷酸激酶家族中 P-loop 的不同可以分為兩類：第一型 (Type I) 以及第二型 (Type II)。第一型為 P-loop 上具有一個鹼性殘基 (basic residue)，此殘基會與三磷酸腺苷上的第三個磷酸 (γ -phosphate) 產生交互作用，此種型式大多為真核生物；第二型為 P-loop 上具有一個甘氨酸 (glycine) 且在 LID region 上具有一個鹼性殘基，同樣的此鹼性殘基也會與三磷酸腺苷產生交互作用，此種型式大多為原核生物。

利用這樣的分類比較細菌與真核生物對於疊氮胸苷單磷酸 (AZT-MP) 的催化反應，發現細菌的胸腺嘧啶磷酸激酶對其催化的效率比催化原有受質去氧胸腺核苷單磷酸下降了兩倍，而這樣的反應在酵母菌或是人類的胸腺嘧啶磷酸激酶卻下降了 200 倍。分析含有疊氮胸苷單磷酸的酵母菌胸腺嘧啶磷酸激酶以及細菌胸腺嘧啶磷酸激酶結晶構形後，前者在 P-loop 上負責穩定過渡狀態 (transition-state-stabilizing) 的精氨酸 (arginine) 因為鄰近天門冬氨酸 (aspartate) 與疊氮胸苷單磷酸的醯胺基 (amide group) 產生作用力而位移，使得催化能力大為下降；後者因為這個必需的精氨酸座落於具有高度伸展性的 LID 區域，所以不會對整體的催化能力造成太大的影響 [22]。

除了上述對於胸腺嘧啶激酶和胸腺嘧啶磷酸激酶的分類法外，對於胸腺嘧啶磷酸激酶尚有另一種分類法，是根據胸腺嘧啶磷酸激酶的反應機制，藉著受質結合以及進入順序的不同而將其分為細菌以及其它物種的胸腺嘧啶磷酸激酶。在細菌方面去氧胸腺嘧啶單磷酸不能夠直接與胸腺嘧啶磷酸激酶結合，需要三磷酸腺苷與胸腺嘧啶磷酸激酶結合成為〔三磷酸腺苷·胸腺嘧啶磷酸激酶〕聚合體後，去氧胸腺嘧啶單磷酸才能進入胸腺嘧啶磷酸激酶的蛋白質活性區進行反應，而後者不論是去氧胸腺嘧啶單磷酸或是三磷酸腺苷皆可各自與去氧胸腺嘧啶磷酸激酶結合，爾後等待對方進入蛋白質活性區結合後，才進行反應[23] [圖 1-3, 1-4]。



1-2-3 蝦白點症病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶 (WSSV—TK-TMK)

到目前為止的研究中，各個物種的胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶基因表現都是獨立的，而蝦白斑病毒的胸腺嘧啶激酶與胸腺嘧啶磷酸激酶卻是兩個功能由一段基因所表現，其可轉譯區全長有 1167 個核苷酸，可轉譯出 388 個胺基酸，其中第 1 到 182 個胺基酸為胸腺嘧啶激酶，第 191 到 388 個胺基酸為胸腺嘧啶磷酸激酶，其所對應之蛋白質大小分別約為 20 kDa 和 23 kDa。蝦白斑病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶基因含有 6 個區域 (Domain)[圖 1-5]，序列上的位置依序分別為 domain I (10~17)、domain II (38~45)、domain III (82~87)、domain IV (169~182)、domain V (199~206)、domain VI (280~292)[圖 1-5]。其中胸腺嘧啶激酶含有第 I 至第 IV 個區域；而胸腺嘧啶磷酸激酶則具有第 V 跟第 VI 區域[圖 1-5]。I、III、V 這三個區域與核苷酸的結合有關，其中區域 I、區域 V 為 P-loop，主要的功能與固定三磷酸腺苷和鳥糞核苷三磷酸 (GTP) 有關，序列通式為 [AG]-x(4)-G-K-[ST]，而區域 3 為核苷酸固定區 (nucleotide binding motif B)；區域 IV、區域 VI 兩區域則分別為胸腺嘧啶激酶及胸腺嘧啶磷酸激酶的識別標誌 (signature)，這個標誌可用來辨識出蛋白質可能擁有的功能，序列通式分別為 [GA]-x(1,2)-[DE]-x-Y-x-[STAP]-x-C-[NKR]-x-[CH]-[LIVMFYWH] 和 [LIV]-[LIVMGSTC]-[DET]-[RH]-[FYHCS]-x(2)-S-[GSTNP]-x-[AVC]-[FY]-[STANQ]。至於區域 2 為酪胺酸激酶作用區 (tyrosine kinase phosphorylation site)，序列通式為 [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y。酪胺酸激酶 (tyrosine kinase) 與細胞複製能力有很大的關係，當細胞要生長時會產生大量的多勝肽荷爾蒙 (polypeptide hormones) 和生長因子 (growth factors)，這些會誘發酪胺酸激酶的酪胺酸磷酸化及活性激發，進而磷酸化其他訊息傳遞分子，而導致基因表現。在序列分析中可發現哺乳類及病毒的胸腺嘧啶激酶均含有此一區域，因此胸腺嘧啶激酶的活性可能會利用細胞內的酪胺酸激酶來調控[24]。註：上述序列通式為 PROSITE 標準格式，將序列輸入至 PROSITE 網頁 (<http://ca.expasy.org/tools/scanprosite/>) 後，PROSITE 便會列出輸入序列可能具有的 motif 或 domain 以及其通式。‘x’：代表任意胺基酸，其後若接數字則

代表可填的數目；‘[]’：可選擇此附號中任一胺基酸。以前述P-loop為例：[AG]-x(4)-G-K-[ST]表示第一個胺基酸為A或G，接下來為4個任意胺基酸，接著是G和K，最後為S或T。

經由序列分析可得知由於白斑病毒胸腺嘧啶磷酸激酶的P-loop上具有一個鹼性殘基，與人類胸腺嘧啶磷酸激酶同屬於第一型的胸腺嘧啶磷酸激酶[圖 1-6, 1-7]。在一些探討人類胸腺嘧啶磷酸激酶的文獻中，最常被提出的胺基酸有三個，分別為Asp15、Arg16和Arg97。Asp15主要的功能被推測為Asp15的側鏈質子化(protonated)後產生親核性的攻擊(nucleophilic attack)將質子提供給ATP的 γ -磷酸。Arg16除了和磷酸提供者(phosphate donor)產生相互作用之外，尚未確認其主要的角色為何，若單獨就Arg16而言，也許它並不是與酵母菌的Arg15同樣地扮演了非常重要的。Arg97在磷酸化的反應中扮演著類似夾鉗(clamp)的角色，它會與磷酸提供者的 γ -磷酸和接受者的磷酸分別產生交互作用，並使兩者緊鄰。白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶的胺基酸序列與上述胺基酸的相對位置是相同的，也許扮演的角色以及重要性也會類似。在活性分析方面，台大羅竹芳老師的實驗室已將白斑病毒胸腺嘧啶磷酸激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶基因接合入桿狀病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus; AcMNPV)中，然後再將此重組的基因轉殖進入昆蟲細胞SF9中以進行大量蛋白質的表現，之後將表現出的蛋白質純化以及進行活性測試，得到胸腺嘧啶磷酸激酶的性質：對於去氧胸腺嘧啶和三磷酸腺苷的 K_m 分別為 4.1 ± 0.5 和 $76 \pm 6 \mu\text{M}$ ，反應的進行受到dTTP回饋抑制，目前已知用來抑制疱疹病毒胸腺嘧啶磷酸激酶的核苷衍生物都無法當做其受質，而且性質與人類胸腺嘧啶磷酸激酶 1 相近。至於胸腺嘧啶磷酸激酶的活性則尚未得到證實[25]。

```

atg gct ggt cgt gta gag ctc gtc act gga ccc atg ttt gcg ggc aag tct
M A G R V E L V T G P M F A G K S
acc tac ctg aaa aac ata tac caa caa gaa aat gga ggc aat aaa cat tgc
T Y L K N I Y Q Q E N G G N K H C
ctg ttt gtc aaa cac tcc cta gaa act agg tac ggt tgt gga act gga aca
L F V K H S L E T R Y G C G T G T
ata gtc act cat gcc gga gaa gtg att gaa ggt tgt act aca gtt tct tct
I V T H A G E V I E G C T T V S S
atc aag gaa cta atc agt gtg tta cca gaa gtt gtg gat gtg att ctc att
I K E L I S V L P E V V D V I L I
gac gaa ggg caa ttc ttc acg gat ttg gtg cta gtc aat aga ctg gct gac
D E G Q F F T D L V L V N R L A D
aag ggg aaa agg att gtg att gca gca ctt gat gga act tct gac cag caa
K G K R I V I A A L D G T S D Q Q
atg ttc agt cct att cat aag cta ttg cct tat aca aat tcc att gtt aag
M F S P I H K L L P Y T N S I V K
cta gca tct aaa tgt atg att tgt aaa att gat acc aaa gaa gct cct ttt
L A S K C M I C K I D T K E A P F
act gta agg ttt ggt aat gac aat gat aat aat gtt ata tgt gta gga gga
T V R F G N D N D N N V I C V G G
gct gaa atg tac gct gct gcc tgc egg gac tgt tac aaa aaa att aac aag
A E M Y A A A C R D C Y K K I N K
aaa aag aac aag ggg aaa ctt gtt gta ctt gaa gga ggt gac agg tgc ggt
K K N K G K L V V L E G G D R C G
aag agt acc caa gcc aaa ctc ttg ttg acc aat aaa aac tcg cct ctt tat
K S T Q A K L L L T N K N S P L Y
gga gga gaa tac atg tgc ttt ccc gac agg agc agc cat acg ggt aaa ctc
G G E Y M C F P D R S S H T G K L
atc aat gat tat tta act aag aaa att gaa cta gat gat cat gca gct cac
I N D Y L T K K I E L D D H A A H
ttg tta ttt tct gca aat aga tgg gaa gtt tgt agt aaa att aag cag ttg
L L F S A N R W E V C S K I K Q L
tta gac gat gga atc cat gtt gtg atg gat aga tat tac tac tgc ggg att
L D D G I H V V M D R Y Y Y S G I
gtt ttc tct tta gct aga gga gtg gat acc gtt gag tgg tgc tct gct agc
V F S L A R G V D T V E W C S A S
gat gag gga ctt cct cag ccc gat ctt gta ttg ttg atg ctt tta gat gtt
D E G L P Q P D L V L L M L L D V
gaa aag tgt tca aat agg gat act ttt ggt gtc gaa aga ttt gag aca aat
E K C S N R D T F G V E R F E T N
tcc att caa gaa cgt gct aga gcc cta ttc cta gac ctc gca aat aag gac
S I Q E R A R A L F L D L A N K D
gaa aag aat gta tgg att aag gta gac gct cgc ggc acc att gag gag gtg
E K N V W I K V D A R G T I E E V
caa act aaa att ata aat att gta tat aat att gtt gaa gaa taa
Q T K I I N I V Y N I V E E *

```

圖 1-5 胸腺嘧啶激酶—胸腺磷嘧啶酸激酶 DNA 以及蛋白質序列。紅色為 domain I，橙色為 domain II，黃色為 domain III，綠色為 domain IV，藍色為 domain V，紫色為 domain VI。

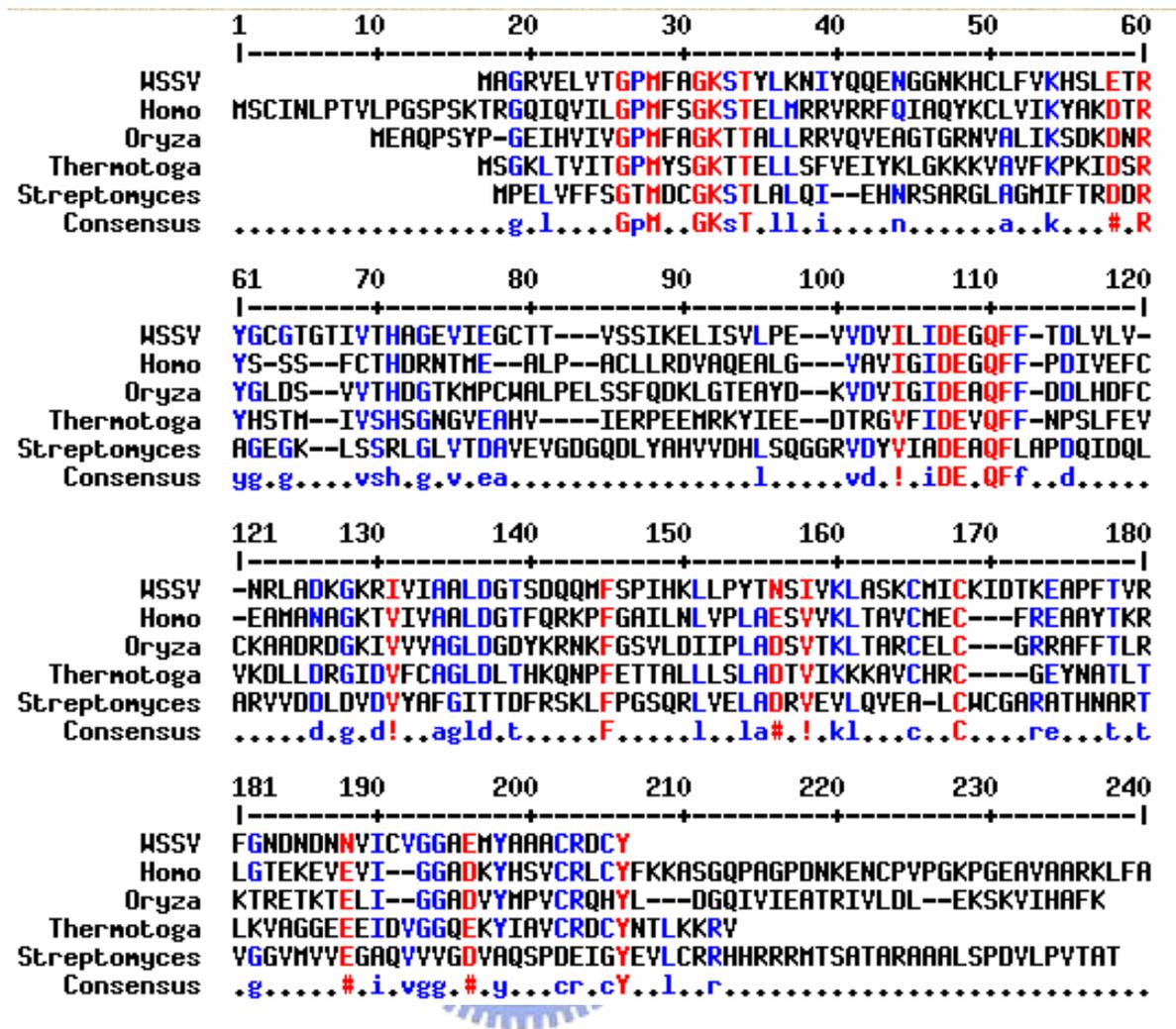


圖 1-6 TK 家族序列比較。可看出白點症病毒與其它物種的 TK 具有一定程度的序列相似度，但直至目前為止並無任何一個 TK 家族的成員的三級結構。

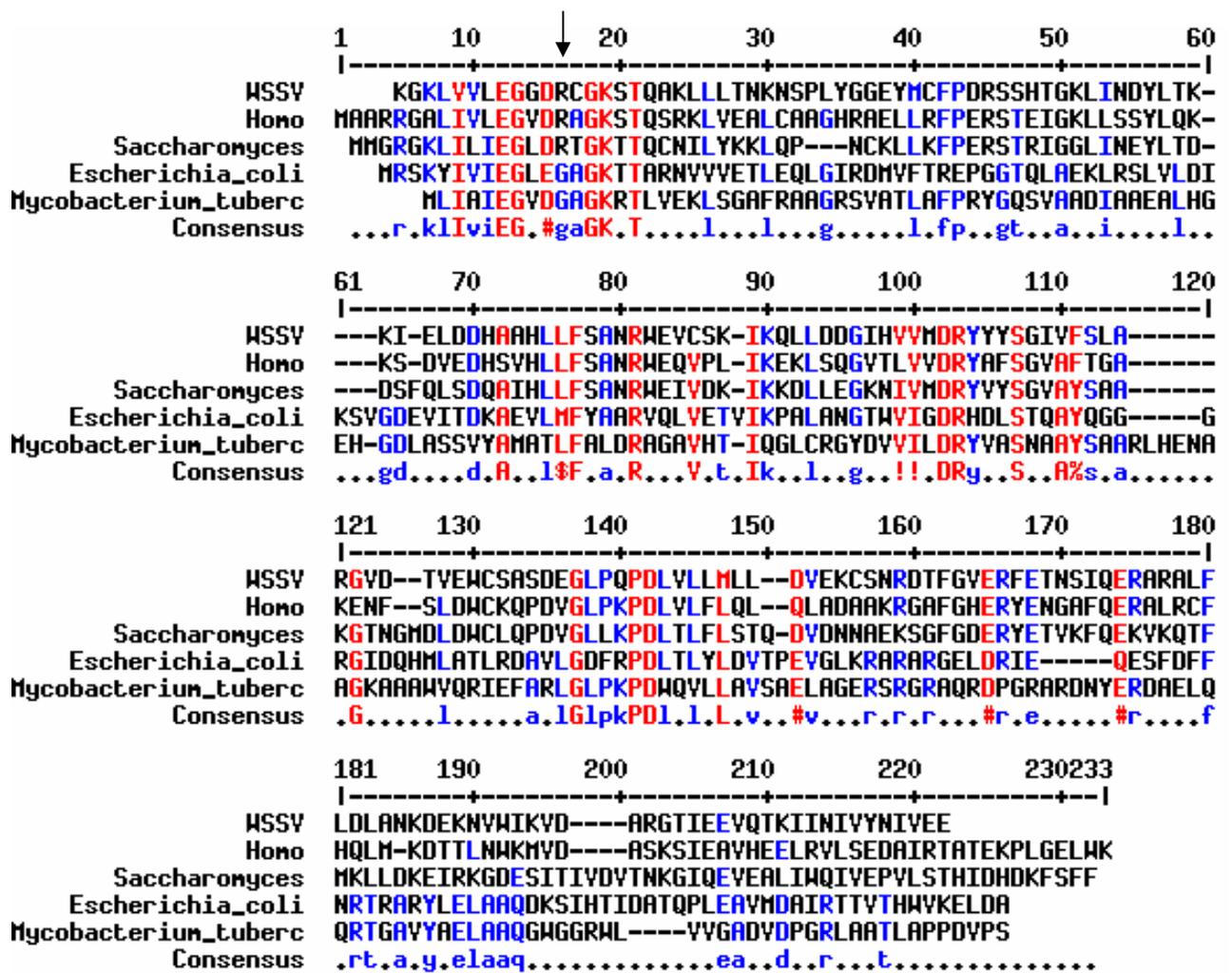


圖 1-7 TMK 家族序列比較。這些都是已解出三級結構的序列，序列中可發現白點症病毒 TMK 與人類及酵母菌兩種真核生物較相近，而與大腸桿菌及肺炎桿菌較不相似。而單就 P-loop 而言，白點症病毒在其上具有 Arg，因此也許較相似於真核生物

1-3 電腦模擬

1-3-1 蛋白質結構模擬

人類基因體定序計畫完成後，蛋白質三度空間立體結構已成為新一波的研究熱潮。蛋白質是生物體內照著基因體的資訊所合成的最終產物，也是生命活動的基本分子，所以許多藥物前導物的設計上都以抑制蛋白質為目標，而且若是在實驗上直接進行蛋白質與“可能抑制劑”的活性試驗，也許會因為“可能抑制劑”範圍太大，而浪費時間金錢。在這樣的情形下，三度空間立體結構的確定便決定了新藥物開發的基礎，因為有蛋白質的三維結構，便可利用電腦模擬的方法進行虛擬的藥物篩選。

目前在實驗上決定蛋白質三度空間立體結構的方法有下列兩種：

(1)X 光繞射(X-ray diffraction)-利用 X 光對結晶的蛋白質進行繞射，再將所得到的圖譜加以分析便能得到其立體結構。(2)核磁共振光譜(NMR; nuclear magnetic resonance spectroscopy)-利用外加的磁場來獲得蛋白質的電子雲圖，再將圖譜做分析便能得到立體結構。但是想要獲得結晶的蛋白質是非常困難的，而 NMR 又只能對於較小的蛋白質作分析，所以想要利用實驗得到蛋白質的三度空間立體結構是很不容易的。這也是為什麼所解析出新的蛋白質三度空間立體結構在數量上一直無法大步進展的原因。因此科學家就想用生物資訊的方法，利用電腦快速且大量的計算來獲得蛋白質的立體結構。方法有下列三種：(1)同源模擬法(homology modeling)-經由胺基酸序列的比對，從蛋白質結構資料庫(Protein Data Bank: PDB)中選出具有與目標物高相似度的三級結構做為模板，之後再進行最佳化的運算，以得到模擬的三級結構。(2)折疊辨識法(folding recognition)-先找出與目標蛋白質具有高相似度(大於 30%)且已知結構的序列，這一部份通常為螺旋狀結構(alpha helices)或是線股(beta strands)，接著再用計算的方式將環(loop)加入其中，使所有的片段連結。(3)從頭算起法(AB initio)-這是一種原子層次的方法，考慮所有造成原子間作用力的電子行為的已知基本定理，來計算胺基酸在溶液中的作用力，進而模擬出蛋白質的三級結構。

同源模擬法又稱為比較性模擬法(comparative modeling)或知識基礎模擬

法(knowledge-base modeling)，一般來說，當所要解析的蛋白質序列和模板間的相似性越高，所模擬出來的結構正確性、可信度也就越高，而電腦運算時所耗費的時間又較其他兩種方法少，故廣泛地被用來預測及模擬蛋白質三級結構。但是模擬出一個結果，並不代表這個結果就一定是可靠的，因此還須要做其他的驗證，若驗證出的結果令人無法接受，就必須從頭開始。目前有許多同源模擬法的軟體或提供這樣功能的網內伺服器(web server)。“PBIL Lyon-Gerland”團隊所研發的 GENO3D (<http://geno3d-pbil.ibcp.fr>)就是其中之一，它同意輸入蛋白質序列，之後進行六個程序：(1)經由序列的比對(PSI-BLAST)之後，從蛋白質結構資料庫中找出高相似度的三級結構做為模板；(2)提供可做為模板的蛋白質資訊，讓使用者選擇以何者為模板；(3)比對樣本及選擇的模板；(4)利用幾何學的限制，取出樣本及模版間相對應的原子；(5)利用 distance geometry approach 建構出樣本三級結構；(6)將結果寄與使用者，其中除了 3 個模擬出的三級結構外，並附有其它關於能量、Ramachandran plot…等資訊以提供結構初步的合理性判斷[27,28]。本實驗即採用了 GENO3D 來進行蛋白質結構的模擬，除了操作極為便利之外，也因為對於欲模擬的蛋白質具有序列相似度夠高的模板(> 40%)，但最主要的是因為 GENO3D 可選擇多個模板(最多四個)進行模擬，更增加了模擬上的可行性。

1-3-2 入塢交互作用

有了三級結構後可以再進行更進一步結構上的證明[29, 30, 31]，以確定模擬的結果具有較合理的構形。接著便能開始進行虛擬藥物篩選，這個方式稱為入塢“DOCK”，它是利用物理理論上蛋白質與受質間的交互作用力，去找出在蛋白質中“位置正確”以及“能量較低”的受質為可能性的受質。這樣的方式，可以大範圍且快速地篩選較有可能為抑制物的受質，接著再以這些篩選出的受質進行實驗上的試驗來找出真正具有抑制作用的化合物，大量地減少了實驗所需花費的時間。這樣的軟體中較著名的有 DOCK、GLIDE、GOLD、AUTODOCK。這些軟體都是以基因演算法(genetic algorithm; GA)為基礎。基因演算法模仿自然界的適者生存，不適者淘汰的

原則來求出問題的近似最佳解，主要是依據適應函數(fitness function)來求得適應值(fitness value)。主要有下面四個步驟：

1. 建立起始的解集合(initial population)
2. 依適應值及亂數值來找出配對的組合
3. 利用相交(crossover)及突變(mutate)衍生出下一代
4. 重複 2、3 兩步直到設定的次數或是得到最佳解

得到最佳解後，便可根據其適應值來分辨所得到的結果是否有進行實驗上操作的必要。

在本試驗中，選擇了以 GENO3D 來做蛋白質的模擬(先前介紹過)，因為除了具有操作簡易之外，回傳的資訊也很詳細，更有 ProCheck 結果的回傳。而 docking 的部份則使用國家高速電腦中心所提供的 GOLD，選擇這個軟體是因為其操作介面詳盡，從輸入檔案、適應含數設定、一直到基因演算法參數設定，應有盡有，使得設定更容易外，也因為它能接受的檔案格式眾多：蛋白質方面格式可為*.MOL2 或是*.PDB，而配位體(ligand)格式可為*.MOL2、*.MOL 以及*.PDB。更因為其測試(Protein Data Bank)PDB 中 100 個蛋白質與化合物後，有 70~80%的成功預測率。

國內應用電腦模擬方式於新藥發展的首篇發表文獻是利用 CATALYST 軟體分析 16 個已知不同程度的 5 α -還原酶 (5 α -reductase)，產生假設性的化合物，再以此假設性的化合物搜尋資料庫，篩選出具有與此化合物高相似度的其他化合物，進而進行這些化合物對 5 α -還原酶的抑制性測試，證明出具有抑制作用[32]。也有國外學者利用類似藥物設計的方式，定出化合物形態需有類似鹼基的標準，並且大小在 800 分子量以下，再根據這個標準從資料庫中找出可能作為單純疱疹病毒胸腺嘧啶激酶以及肺結核桿菌胸腺嘧啶磷酸激酶抑制劑的化合物後，接著利用蛋白質三級結構以 DOCK 進行進一步的篩選後，再進行實驗上的測試以找出具有抑制作用的化合物，結果成功地發現了幾個具有抑制效果的化合物。這些例子的成功，說明了利用電腦模擬配合藥物資料庫找尋及開發藥物的可行性，也更增加了我們的信心。

1-4 實驗目的

白點症病毒每年造成養殖業大量的損失，但直至目前為止，一直缺乏有效的藥物可以控制病情。一直致力於這方面研究的台大教授羅竹芳老師帶領著其實驗室成員，於 2000 年發表了解析出白點症病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶基因，並於 2002 年發表了 TK 蛋白質的表現及活性測試，為養殖業增添了一道曙光。

為了更了解這個蛋白質，我們以電腦模擬的方法進行試驗，因為此蛋白質目前尚未有 X 光晶體結構，所以利用 GENO3D 軟體，以人類胸腺嘧啶磷酸激酶為模板，以同源模擬法模擬出白點症病毒胸腺嘧啶磷酸激酶，並經過 ProCheck、Errat、Verify_3D 三個應用統計學分析蛋白質結構的軟體證明其可靠性，從而選出較佳的模擬蛋白質結構。接著再利用 GOLD，以 NH₂TMP 為配體進行入塢試驗，將結果與人類胸腺嘧啶磷酸激酶比較確定模擬結構入塢作用的可行性。得到了可靠的蛋白質結構後便利用 GOLD 對於 MDDR 以及 CMC 兩個資料庫進行入塢試驗以篩選出可能為有效的抑制劑的化合物。在入塢試驗我們執行兩個階段：第一個階段以程式內定的參數來進行篩選，第二階段以經由去氧胸腺核苷單磷酸做測試，可得到極為收斂的結果時所設定的參數來進行篩選。

另一方面為了配合篩選出的藥物進行實驗上的測試，我們將白點症病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶基因接入表現載體 pMAL-c2 後，將其轉殖入大腸桿菌菌株 BL21(DE3)RIL，以期取得大量表現之胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶進行活性上分析測試。希望透過電腦模擬以及實驗上的配合而能夠更了解蝦白點症病毒胸腺嘧啶激酶—胸腺嘧啶磷酸激酶，以及篩選出具有抑制此酵素活性之可能抑制劑。