เอกสารการบรรยายในรายการสารสัมพันธ์สู่สันติวัฒนธรรมที่ประเทศไทย วันที่ 13-16 ธันวาคม 2547

"โครงสร้างโมเลกุลแห่งชีวิต-ผลกระทบที่มีต่อการวิจัยด้านชีวแพทย์ยุคใหม่"

โดยศาสตราจารย์ เคิร์ท วุทริช
ศาสตราจารย์ด้านชีววิทยาโครงสร้าง สถาบันวิจัยสคริปป์ รัฐแคลิฟอเนียร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา
และศาสตราจารย์ด้านชีวฟิสิกส์ ซูริช ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

<u>บทสรุป</u>

งานวิจัยของกลุ่มเราคือ ชีววิทยาโครงสร้างและการศึกษาโครงสร้างจีโนม (การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนทั้งหมดในโครงการจีโนม) กลุ่มวิจัยของข้าพเจ้ามีความเชี่ยวชาญในการใช้เทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์ (NMR) สเปกโทรสโคปี ในการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลและอันตรกิริยาเชิงบทบาทของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาโครงสร้างโดยการใช้เทคนิคทาง X-ray crystallography และวิธี NMR พบว่า วิธีทาง NMR สามารถศึกษาโครงสร้างระดับอะตอมของโมเลกุลชีววิทยาที่มีขนาดใหญ่ได้ในสภาวะสารละลาย โดยสามารถปรับให้มีความใกล้เคียงกับสภาวะทางสรีรวิทยาของของเหลวในร่างกาย เช่น เลือด น้ำย่อยในกระเพาะอาหารและน้ำลายได้ ข้าพเจ้าจะสรุปผลของการใช้ NMR ในการบรรยายโครงสร้างของสารละลายโปรตีนที่ใช้ในงานวิจัยทางชีววิทยาแนวใหม่และการวิจัยทางด้านชีววิทยาการแพทย์ รวมทั้งจะเล่าชีวประวัติ และประสบการณ์ของข้าพเจ้าที่เกี่ยวข้องกับการจัดตั้งหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ธรรมชาติและงานให้คำแนะนำที่ให้แก่ทีมวิจัยทั้งในกลุ่มประเทศยุโรปและในสหรัฐอเมริกา

<u>เติบโตขึ้นมากับวิทยาศาสตร์ธรรมชาติ-ชีวประวัติอย่างย่อ</u>

ข้าพเจ้าใช้ชีวิตในวัยเด็กในเขตแคนตัน (Kanton) ของกรุงเบิร์น (Bern) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ อันเป็นเขตการเกษตรชนบทที่มีป่าเขาและแม่น้ำ ข้าพเจ้าเติบโตมาท่ามกลางมวลต้นไม้และสัตว์ ดังนั้นวิชาวิทยาศาสตร์ทางธรรมชาติจึงเป็นสิ่งที่ดึงดูดใจสำหรับข้าพเจ้าในขณะที่ศึกษาระดับมัธยมปลาย เมื่อข้าพเจ้าได้ศึกษาต่อที่มหาวิทยาลับเบิร์น (University of Bern) ในปี พ.ศ. 2500 จำนวนอาจารย์และนักศึกษาในชั้นมีน้อยมาก คือมีนักศึกษาวิชาเอกฟิสิกส์ 3 คน และนักศึกษาวิชาเอกเคมี 7 คน ข้าพเจ้านอกจากจะได้ศึกษาวิชาทางเคมีและฟิสิกส์แล้วยังเข้าศึกษาคณิตศาสตร์ด้วย ซึ่งในภายหลังข้าพเจ้ารู้สึกขอบคุณที่ได้มีโอกาสได้เรียนหลายสาขาวิชา จึงเป็นการปูพื้นฐานที่ดีเยี่ยมสำหรับงานวิจัยวิทยาศาสตร์ในหลาย ๆ ด้านของข้าพเจ้าในภายหลัง

ในฤดูใบไม้ผลิปี พ.ศ. 2505 ข้าพเจ้าได้ย้ายจากมหาวิทยาลัยเบิร์น มาศึกษาต่อที่มหาวิทยาลัยบาเซล (University of Basel) ซึ่งเป็นที่ที่ข้าพเจ้าได้เข้าร่วม "Turn-and Sportlehrerkurs" นอกเหนือจากการออกกำลังกาย 25 ชั่วโมงต่อสัปดาห์แล้ว การศึกษาที่นี่ยังรวมการเรียนวิชากายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยาของมนุษย์ด้วย ประสบการณ์ที่ได้รับจากการสังเกตการณ์ด้วยตัวเองในการแข่งขันกีฬาทำให้

การศึกษาของข้าพเจ้ามีทิศทาง ในฤดูใบไม้ร่วงปี พ.ศ. 2505 ข้าพเจ้าได้เริ่มเข้าศึกษาเคมีต่อที่มหาวิทยาลัยบาเซล และได้รับปริญญาเอกสาขาเคมีอนินทรีย์ โดยทำงานวิจัยกับศาสตราจารย์ซิลวิโอ ฟาลแลบ (Prof. Silvio Fallab) เนื้อหาในวิทยานิพนธ์ปริญญาเอกของข้าพเจ้าคือศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของสารประกอบคอปเปอร์ในปฏิกิริยา autoxidation ในงานวิจัยนี้ได้ทำให้ข้าพเจ้ามีประสบการณ์ในการใช้เทคนิคสเปกโทรสโคปีเรโซแนนซ์เชิงแม่เหล็กพาราของนิวเคลียส โดยใช้เครื่องเรโซแนนซ์เชิงแม่เหล็กพาราของอิเล็กตรอน (EPR) สเปกโทรสโคปีชั้นเยี่ยมที่มีอยู่ในสถาบันฟิสิกส์ ถึงแม้ว่าในการทดลองที่แท้จริงจะใช้สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะที่มีมวลโมเลกุลต่ำ แต่การศึกษานี้จะมุ่งเน้นเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับหน้าที่ของโปรตีน ที่มีคอปเปอร์เป็นส่วนประกอบ (copper-containing metalloproteins) ข้าพเจ้าได้สำเร็จการศึกษาในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2507

เมื่อข้าพเจ้าได้รับทั้งปริญญาเอกทางเคมีและประกาศนียบัตรที่เรียกว่า "Eidgenossisches Turn- and Sportlehrerdiplom" เป็นที่น่าสังเกตว่างานวิจัยของเรานั้นยังไม่ก้าวหน้านักในปี พ.ศ. 2507 และไม่ได้เป็นส่วนหนึ่งในการศึกษาระดับมหาวิทยาลัยของข้าพเจ้า ในขณะนั้นเพิ่งมีการนำ NMR มาใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ในสาขาเคมี และชีววิทยาระดับโมเลกุลก็ยังไม่ได้เป็นสาขาวิชาที่แยกออกมาโดยเฉพาะ โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนที่ละเอียดระดับอะตอมก็เพิ่งจะเริ่มต้นขึ้น

หลังจากสำเร็จการศึกษา ข้าพเจ้าได้ใช้เวลาอีก 1 ปี ในมหาวิทยาลัยบาเซล ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และเมื่อถึงฤดูใบไม้ผลิปี พ.ศ. 2508 ข้าพเจ้าได้ย้ายมาทำงานวิจัยหลังปริญญาเอกกับศาสตราจารย์โรเบิร์ต อี คอนนิค (Prof. Robert E. Connick) ที่มหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย แห่งเบิร์คลีย์ เราได้ทำงานวิจัยโดยทำการวัดการผ่อนคลาย สปินของเรโซแนนซ์เชิงแม่เหล็กของนิวเคลียส (NMR spin relaxation) ของ ^{17}O , ^{2}H และ ^{1}H เพิ่มเติมจากการใช้เทคนิคทางด้านเรโซแนนซ์เชิงแม่เหล็กพาราของอิเล็กตรอน (EPR) ในการศึกษาการรวมตัวกับน้ำ (hydration) ของไอออนของโลหะและสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ ในปี พ.ศ. 2510 ข้าพเจ้าได้เข้าร่วมทำงานกับ ดร.โรเบิร์ต จี ชูลแมน (Dr. Robert G. Shulman) แห่งภาควิชาชีวฟิสิกส์ที่ห้องปฏิบัติการโทรศัพท์เบลล์ (Bell Telephone Laboratories) ในเมืองเมอร์รี่ฮิลล์ (Murray Hill) รัฐนิวเจอร์ซี่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งในขณะนั้นเป็นสถาบันชั้นนำสำหรับงานวิจัยทางด้านฟิสิกส์และฟิสิกส์เชิงเคมี ข้าพเจ้าเป็นผู้รับผิดชอบดูแลเครื่อง NMR สเปกโตรมิเตอร์ที่มีกำลังแยกภาพสูงด้วยอำนาจสภาพนำยวดยิ่ง (superconducting high resolution NMR spectrometers) ซึ่งเป็นเครื่องรุ่นแรก ๆ โดยเครื่องนี้ทำงานที่ความถี่เรโซแนนซ์ของโปรตอน (proton resonance frequency) 220 MHz และได้เริ่มใช้เครื่องเรโซแนนซ์เชิงแม่เหล็กของนิวเคลียส (nuclear magnetic resonance) สำหรับงานวิจัยโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนนั้น ข้าพเจ้าได้ใช้เลือดจากแขนของข้าพเจ้าในการเตรียมฮีโมโกลบิน (เคดับเบิลยู) (hemoglobin (KW)) และหลังจากนั้นไม่นานคณะวิจัยของเราก็ได้พบวิธีใหม่ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับหน้าที่ของฮีโมโกลบินและโปรตีนที่มีฮีมเป็นส่วนประกอบ (hemoproteins) อย่างละเอียดจากสเปกตรัมของเรโซแนนซ์เชิงแม่เหล็กของนิวเคลียส หลายปีต่อมาคุณสมบัติเฉพาะของสเปกตรัม NMR ของโปรตีนที่มีฮีมเป็นส่วนประกอบก็ได้มีส่วนช่วยพัฒนาวิธีทาง NMR ในการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน

มาก ในปี พ.ศ. 2512 ข้าพเจ้าได้เดินทางกลับประเทศสวิตเซอร์แลนด์และเข้าทำงานที่สถาบัน Eidgenossische Technische Hochschule (ETH) ในเมืองซูริช (Zurich) โดยได้ทำงานวิจัยและการสอนในฐานะศาสตราจารย์ชีวฟิสิกส์จนถึงปัจจุบัน ในปี พ.ศ. 2544 ข้าพเจ้าได้แบ่งเวลาในการทำงานระหว่าง ETH ที่เมืองซูริชและที่สถาบันวิจัยสคริปป์ (The Scripps Research Institute (TSRI)) ในเมืองลาฮอลลา รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

ถึงแม้ว่างานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เป็นงานที่ข้าพเจ้าให้ความสำคัญมาตลอดการทำงานของข้าพเจ้า แต่มีกิจกรรมอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าได้ทุ่มเทเวลาและแรงกายให้เช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานขององค์กรนานาชาติชีวฟิสิกส์บริสุทธิ์และชีวฟิสิกส์ประยุกต์ (International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB)) และในสมาพันธ์นานาชาติขององค์กรวิทยาศาสตร์ (International Council of Scientific Union (ICSU)) จากปี พ.ศ. 2521 ถึงปี พ.ศ. 2523 ข้าพเจ้าได้เป็นสมาชิกขององค์กร (Council Member) เลขาธิการ (Secretary General) และรองประธานของ IUPAB และยังเป็นสมาชิกในฐานะกรรมการใหญ่ General Committee และ Standing Committee on the Free Circulation of Scientists ของ ICSU นอกจากตำแหน่งต่าง ๆ เหล่านี้ ข้าพเจ้ายังมีส่วนร่วมในการจัดการประชุมทางวิทยาศาสตร์หลายงานประชุมในประเทศที่กำลังพัฒนา จากมุมมอง ณ วันนี้ กิจกรรมต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสิ่งที่มีคุณค่ามากที่สุดในชีวิตทางวิชาการของข้าพเจ้า ทั้งการเชื่อมโยงงานวิจัยระหว่างประเทศและความเป็นมิตรกับนักวิจัยทั่วโลก

NMR กับการศึกษาชีววิทยาโครงสร้าง

เทคนิคสเปกโทรสโคปีแบบเรโซแนนซ์เชิงแม่เหล็กของนิวเคลียส (NMR spectroscopy) เป็นวิธีหนึ่งในบรรดาวิธีต่าง ๆ ที่สามารถใช้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ละเอียดระดับอะตอมได้ เนื่องจากข้อมูล NMR สามารถตรวจวัดจากสารตัวอย่างที่เป็นสารละลายได้ เมื่อพิจารณาของเหลวในร่างกาย เช่น เลือด น้ำย่อยในกระเพาะอาหารและน้ำลายซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนที่ทำหน้าที่ทางสรีระวิทยา ความรู้ด้านโครงสร้างโมเลกุลของสารละลายจึงมีความเกี่ยวข้องกันมาก ในการทดลองทาง NMR นั้น สภาวะต่าง ๆ ของสารละลาย เช่น อุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของเกลือ สามารถปรับให้ใกล้เคียงกับสภาวะทางสรีระวิทยาในร่างกายได้ แต่ในทางตรงกันข้าม สภาวะของสารละลายอาจถูกปรับเปลี่ยนให้แตกต่างจากสภาวะในร่างกายอย่างสิ้นเชิงก็ได้ เช่น ในการศึกษาการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) นอกเหนือจากการศึกษาโครงสร้างแล้ว NMR ยังมีประโยชน์ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุล และการศึกษาด้านเทอร์โมไดนามิกส์และไคเนติกของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก กับโมเลกุลอื่น ๆ ในสารละลาย ซึ่งอาจเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่หรือลิแกนด์ที่มีขนาดเล็กด้วย ซึ่งข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้สามารถวัดได้โดยตรงในสารละลาย

สิ่งที่น่าตื่นเต้นในการตรวจสอบโครงสร้างในสารละลายคือ การสามารถศึกษาสายโพลิเปปไทด์ได้ถึงแม้ว่าสายโพลิเปปไทด์จะมีการพับตัวเพียงบางส่วน (partially folded) ลักษณะของโปรตีนที่

พับตัวเพียงบางส่วนนั้นโดยปกติแล้วจะทำให้ตกผลึก (crystallize) ได้ยาก แต่ถ้าโปรตีนสามารถตกผลึกได้ ส่วนของสายโพลีเปปไทด์ที่ไม่เป็นระบบในสารละลายก็อาจถูกทำให้เป็นระเบียบโดยการจัดโมเลกุลให้สัมผัสกันภายในโครงร่างผลึกหรือไม่เช่นนั้นก็อาจจะมองอะไรไม่เห็นเลยเมื่อใช้วิธีเลี้ยวเบน (diffraction) ด้วยเหตุนี้ในหลาย ๆ กรณี NMR จึงเป็นวิธีเดียวที่สามารถให้รายละเอียดของโครงสร้างของสายโพลิเปปไทด์ที่พับตัวเพียงบางส่วนได้ ถึงแม้ว่าวิธีมาตรฐานในการศึกษาโครงสร้างทาง NMR จะให้เพียงภาพของสายโพลิเปปไทด์ที่ไม่เป็นโครงสร้าง แต่ข้อมูลที่ได้จากการทำ NMR หลาย ๆ ครั้งจะทำให้รู้ข้อมูลของความถี่ของอัตราการเปลี่ยนแปลงระหว่างสภาวะที่แตกต่างกันของโมเลกุลที่อยู่ภายในช่องว่าง โดยสรุป ความสามารถของเทคนิค NMR ในการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่และปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลทั้งในประเด็นตำแหน่งและเวลาอย่างละเอียดได้ทำให้ NMR เป็นอุปกรณ์ที่น่าสนใจยิ่งในการศึกษาชีววิทยาโครงสร้างและการศึกษาโครงสร้างจีโนม

หนทางสู่การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนโดยวิธี NMR

ในช่วงปี พ.ศ. 2503 - 2522 ความสำเร็จในการแปลข้อมูล NMR ได้ช่วยเป็นข้อมูลเพิ่มเติมเรื่องโครงสร้างของโปรตีนชนิดเดียวกันที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างผลึกด้วยวิธี X-ray โดยการวัดที่เรียกว่า "chemical shifts" อย่างไรก็ตาม การหาโครงสร้างของโปรตีนตั้งแต่เริ่มต้นยังมีความคลุมเครือในการแปลผลจาก chemical shifts จึงได้มีการนำวิธี NMR มาหาโครงสร้างของโปรตีนด้วย และในที่สุดการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนโดยวิธี NMR ขึ้นอยู่กับหลักการพื้นฐาน 4 ประการคือ

1. Measurement of NOE upper distance limits as conformational constraints

Nuclear Overhauser effects (NOE) เกิดเนื่องจากอันตรกิริยาสองขั้ว (dipolar interaction) ระหว่างนิวเคลียสที่แตกต่างกัน ความเข้มของ NOE ผกผันกับระยะห่างระหว่างนิวเคลียสทั้งสอง (internuclear distance, r) ยกกำลังหก และค่าฟังก์ชันสหสัมพันธ์ (correlation function) (f (τ_c)) ซึ่งอธิบายอันตรกิริยาแบบ dipole-dipole ตามสมการ

$$\text{NOE} \;\alpha\; \frac{1}{\langle r \rangle^6} \cdot f(\tau_c) \qquad (1)$$

ถึงแม้ว่า NOE จะเป็นปรากฏการณ์ทั่วไปที่เกิดระหว่าง nuclear spin ที่อยู่ใกล้กันแต่ NOE ระหว่างคู่อะตอมของไฮโดรเจน เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาโครงสร้างของชีวโมเลกุลขนาดใหญ่มากที่สุด NOE ของ ^1H - ^1H สัมพันธ์กับระยะห่างระหว่างคู่ของอะตอมที่ไม่ได้เชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (intermolecular NOE) หรือระหว่างคู่ของอะตอมที่อยู่ไกลกันในลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์

การศึกษาของเราได้แสดงให้เห็นเงื่อนไขที่เหมาะสำหรับการวัดระยะแบบ NOE ของโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งมีสหสัมพันธ์เชิงเวลาสำหรับการปรับค่าของอันตรกิริยาคู่ควบ dipole-dipole เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า โดยการใช้สภาวะที่เรียกว่า "extreme motional narrowing" ด้วยการเลือกระยะเวลาของตัวแปรหนึ่งในการทดลองซึ่งเรียกว่า "mixing period" ได้อย่าง

เหมาะสม ทำให้เราสามารถจัด ^{1}H - ^{1}H NOE ระหว่างระยะห่างของคู่ของอะตอมไฮโดรเจนในโปรตีนและกรดนิวคลีอิกในสารละลายได้

2. Sequence-specific resonance assignments

ในกรดอะมิโนที่ใกล้กันภายในสายของโพลีเปปไทด์จะมีคู่อะตอมไฮโดรเจนที่อยู่ใกล้กันมาก ซึ่งสามารถเชื่อมโยงกันได้โดยการสังเกต "sequential NOEs" การรวมกันของ ^{1}H - ^{1}H ที่เชื่อมกันภายในกรดอะมิโนอย่างเหมาะสมสามารถทำได้โดยใช้อันตรกิริยาแบบ scalar spin-spin และการเชื่อมโยงระหว่างกรดอะมิโนก็อาจกำหนดได้โดย sequential NOE ซึ่งจะทำให้มีการกำหนด resonance แบบก้าวหน้า ขณะที่มีการ "เดินไปตามแกนของโพลีเปปไทด์" หรืออีกนัยหนึ่ง กรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กันก็อาจจะเชื่อมกันได้โดยกระบวนการ intervening sequential NOE connectivities ณ วันนี้ การกำหนดเรโซแนนซ์แบบเป็นลำดับสำหรับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ติดฉลากด้วย ^{13}C และ ^{15}N (recombinant ^{13}C, ^{15}N –labeled proteins) ส่วนใหญ่ได้จากวิธีที่เรียกว่า "heteronuclear triple-resonance"

3. Two-dimensional (2D) NMR

เมื่อมีการทดลอง NMR แบบ 2 มิติ และต่อมาแบบ 3 และ 4 มิติแล้ว การศึกษา NMR ของชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ก็ได้รับการพัฒนาขึ้นมาก จากการที่เป็นเพียงเรื่องกระตุ้นเชิงความคิดก็ได้กลายเป็นสิ่งที่ทำให้การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนเป็นไปได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลอง NMR 1 มิติแบบดั้งเดิม (old-fashioned) พบว่ามีผลสำคัญของ NMR แบบหลายมิติ (multi-dimensional NMR) สองประการที่ได้จากการศึกษาโปรตีน คือประการแรก ^{1}H NMR 2 มิติ สามารถทำให้การบันทึกอันตรกิริยาเฉพาะระหว่างคู่อะตอมของไฮโดรเจนปราศจากการแผ่รังสีของเรโซแนนซ์แต่ละเส้น ดังนั้นจึงสามารถใช้วิเคราะห์สเปกตรัมของ ^{1}H NMR ของโปรตีนได้อย่างละเอียด ซึ่งตรงข้ามกับ NMR 1 มิติที่มีข้อจำกัดคือให้เส้นสเปกตรัมเพียงไม่กี่เส้น ประการที่สองคือการกระจายของเรโซแนนซ์ในสองหรือหลายมิติความถี่ให้การจำแนกพีกได้ดีกว่า

4. Structural interpretation of NOE distance constraints

สายโพลิเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนมากกว่า 100 ตัวจะมีความยาวประมาณ 400 Å ในขณะที่ NOE ที่สามารถอ่านได้ระยะสั้นกว่า 5 Å ดังนั้น NOE ที่สังเกตได้ระหว่างคู่อะตอมของไฮโดรเจนที่มีตำแหน่งการเลื่อนเชิงเคมี (chemical shift) จะมีโครงสร้างเป็นวง (ring-like structure) การหาโครงสร้างสำเร็จทำให้สายโพลิเปปไทด์มีการจัดเรียงแบบ 3 มิติ เป็นโครงสร้างลักษณะวงกลมทั้งเล็กและใหญ่ซ้อนทับกับกลุ่มพีกของ NOESY สำหรับการคำนวณโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนที่สมบูรณ์จากข้อมูล NMR นั้นเป็นที่แน่ชัดจากผลที่ได้ว่า input ของ NOE เชิงปริมาณขึ้นกับระยะห่างระหว่างโปรตอน (r) กับค่า effective rotational correlation times (τ_c) (สมการที่ [1]) เนื่องจากในแบบคู่อะตอมของไฮโดรเจน ค่า τ_c ไม่เพียงขึ้นกับการหมุนของโมเลกุลในการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian motions) ซึ่งขึ้นกับขนาดและรูปร่างของโปรตีนและความหนืด (viscosity) ของตัวทำละลาย แต่ยังขึ้นกับการเคลื่อนที่ในโมเลกุล (intramolecular motions ($f(\tau_c)$)) ด้วย ซึ่งอาจแตกต่างสำหรับอะตอมไฮโดรเจนแต่ละคู่ในโมเลกุลของโปรตีน ในประเด็นข้อจำกัดภายในของการวัดระยะ NOE เชิงปริมาณ

นั้น เราได้ตัดสินใจใช้ค่าคงที่ค่าหนึ่งเป็นค่า correlation function (f (τ_c) ในสมการที่ [1] สำหรับ ^{1}H - ^{1}H ทุกคู่ในโปรตีน และเพื่อให้ได้ค่าจำกัดขีดบนของระยะห่างระหว่าง ^{1}H - ^{1}H ในการวัด NOE ในทางปฏิบัติ ใช้ข้อมูลสำหรับการคำนวณโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยระยะห่างที่ถูกล้อมรอบโดยค่าจำกัดขีดบนของ NOE ที่ค่า 3.0-5.0 Å ซึ่งปริมาณนี้ขึ้นกับความเข้มของ NOE และค่าจำกัดขีดล่างของ 2.0 Å ซึ่งเป็นค่าผลรวมของรัศมี van der Waals ของอะตอมของไฮโดรเจนทั้งสองที่เชื่อมกันแบบ NOE ถึงแม้ว่าแต่ละข้อมูลที่ได้เข้าไปจะมีความเที่ยงตรงจำกัด วิธีการนี้ก็เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและสามารถทำให้เห็นได้ว่าการเคลื่อนที่ภายในโมเลกุลนั้นเป็นเรื่องปกติในโครงสร้างของโปรตีน สำหรับการคำนวณโครงสร้างระดับโมเลกุลของโปรตีนจากข้อมูลที่ได้จาก NMR นั้น เราใช้โปรแกรม matrix ตรวจหาโครงสร้างเชิงเรขาคณิต โปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งสอดคล้องกับผลลัพธ์ของค่าที่ได้จากการทดลองเรื่องระยะห่างของ NOE ในการคำนวณแต่ละค่าจะทำให้ผลผิดพลาดที่น้อยที่สุด และความผิดพลาดที่เหลือคือค่าที่ได้จากการวัดโดยตรง ความสำเร็จในการตรวจพบ geometry ระดับโมเลกุลซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการทดลอง ในรูปแบบระยะทาง (distance-range) ที่กล่าวมาในข้างต้น เป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างมากในการประเมินความเป็นเอกลักษณ์ของโครงสร้างที่คำนวณได้ เมื่อโครงสร้างที่คำนวณได้จะถูกคำนวณซ้ำโดยใช้ข้อมูลชุดเดียวกันแต่ภายใต้เงื่อนไขขอบเขตที่แตกต่างกัน ความเป็นเอกลักษณ์ของโครงสร้าง NMR จะถูกตัดสินจากความสอดคล้องกันของ ensemble of conformers ซึ่งโดยทั่วไปมีประมาณ 100 conformers ก็จะถูกสร้างขึ้น และ 20 กลุ่มย่อยของ conformer ที่มีความผิดพลาดที่น้อยที่สุดจะถูกกำหนดให้เป็นโครงสร้าง NMR ของโปรตีน ค่าเฉลี่ยของคู่ root mean-square distances (RMSD) ที่คำนวณได้สำหรับชุด conformers จะถือว่าเป็นการวัดสำหรับความเที่ยงตรงของโครงสร้าง ปัจจุบัน metric matrix distance geometry algorithms จะถูกนำมาแทนที่โดยเทคโนโลยีระดับโมเลกุลสำหรับการคำนวณหาโครงสร้างโปรตีนจากข้อมูล NMR

The NMR View of Protein Structures in Solution

วิธีทดลองมาตรฐานสำหรับใช้หาโครงสร้าง NMR ของชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ได้เริ่มใช้อย่างสัมฤทธิ์ผลครั้งแรกในปี พ.ศ. 2527 โดยการเตรียมสารละลายโปรตีนเอกพันธุ์ (homogeneous protein solution) การบันทึกและการจัดการข้อมูลของ NMR รวมทั้งการแปลผลโครงสร้างของข้อมูล NMR ในเวลาต่อมา วิธีทดลองนี้ก็ได้มีการปรับปรุงอย่างสม่ำเสมอ และมีการนำไปใช้หาโครงสร้างของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกกว่า 3,000 ชนิด

ในการหาโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน NMR นั้นมักมีตัวแปรด้านความเที่ยงตรงของโครงสร้างที่หาได้ตลอดสายของโพลีเปปไทด์ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างผลึกพบว่าความไม่เป็นระเบียบจะเกิดมากขึ้นเมื่อศึกษาผิวหน้าของโมเลกุล ความไม่เป็นระเบียบที่ผิวหน้าที่เด่นชัดนี้มักจะพบที่ส่วนปลายของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งเป็นความแตกต่างที่สำคัญระหว่างโครงสร้างของโปรตีนที่อยู่เป็นผลึกและที่อยู่ในสารละลาย จากการใช้วิธี NMR spin relaxation เราสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างความไม่เป็นระเบียบที่อยู่นิ่งกับที่และความไม่เป็นระเบียบที่เปลี่ยนแปลง

ตลอดเวลาได้ ในการเคลื่อนที่ภายในโมเลกุลที่ระดับเศษ 1 ส่วนพันล้านวินาที (nanosecond) และที่ระดับต่ำกว่าเศษ 1 ส่วนพันล้านวินาที โดยสรุป การศึกษาสายโพลีเปปไทด์ที่พับตัวเพียงบางส่วนในสารละลายเป็นข้อมูลที่สำคัญซึ่งต้องใช้ควบคู่ไปกับการศึกษาผลึกโปรตีน นั่นคือเหตุผลว่าทำไมการหาโครงสร้างของโปรตีนโดย NMR จึงไม่กระทำในเงื่อนไขเดียวกันตลอด

ความสำคัญของการศึกษาโปรตีนในสารละลายนั้นเกิดจากผลการใช้ NMR ที่มีความละเอียดสูงในการศึกษาโปรตีนในสารละลาย ซึ่งตำแหน่งของโมเลกุลน้ำที่อยู่ล้อมรอบโปรตีนสามารถหาได้โดยการศึกษา NOE ระหว่างโปรตอนของน้ำและอะตอมของไฮโดรเจนในสายโพลีเปปไทด์ และเนื่องจาก NOE ผกผันกับระยะ ^{1}H - ^{1}H ยกกำลัง 6 ดังนั้นจึงศึกษาโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโปรตีนได้เพียงชั้นเดียว สำหรับการศึกษานี้ความเข้มของ NOE ขึ้นกับความสัมพันธ์ทางหน้าที่ที่ใช้อธิบาย stochastic modulation ของการเกิดอันตรกิริยาควบคู่ dipole-dipole ระหว่างโปรตอนตามสมการ [1] เพราะปริมาณนี้ มีบทบาทสำคัญ ค่าของ f (τ_c) อาจขึ้นกับการหมุนตัวล้มแบบบราวน์เนียนของโมเลกุลโปรตีนที่ถูกล้อมรอบด้วยน้ำ หรือจากการขัดขวางอันตรกิริยาแบบ dipolar ในการแพร่ของน้ำแบบย้ายตำแหน่ง เมื่อเทียบกับผิวของโปรตีน โดยขึ้นกับว่าปริมาณใดเร็วกว่ากัน จากพื้นฐานนี้เราจึงอาจกล่าวได้ว่าผิวของเปปไทด์ของโปรตีนที่ถูกล้อมรอบด้วยน้ำจะถูกศึกษาในเวลาที่สั้นมากระหว่าง 20-300 ส่วนของล้านล้านวินาที (picosecond) ที่อุณหภูมิ 10 ^{o}C ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นเหตุผลสำหรับความไม่เป็นระเบียบที่มักเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผิวหน้าของโปรตีนในสารละลาย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการดึงน้ำออกจาก ผิวหน้าของโพลีเปปไทด์ไม่เป็นข้อจำกัดใด ๆ ในการกำหนดอัตราเร็วของการพับตัวของโปรตีนหรืออันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีน

การศึกษาโดย NMR ที่น่าสนใจมากอีกรูปแบบหนึ่งคือการเคลื่อนที่ภายในโมเลกุลของโปรตีน เช่น การเคลื่อนที่แบบกลับทิศ 180 องศา ของวงแหวน aromatic ของ phenylalanine และ tyrosine ซึ่งเป็นการเห็นการกลับทิศ 180 องศา เป็นครั้งแรกที่เวลาเศษ 1 ส่วนพันวินาที ถึงเศษ 1 ส่วนล้านวินาที ในปี พ.ศ. 2518 และก็เป็นที่น่าประหลาดใจเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากวงแหวนอะโรมาติกของ phenylalanine และ tyrosine เป็น side chain ที่ได้รับศึกษามาอย่างดีที่สุดในบรรดาโครงสร้างผลึกของโปรตีนทั้งหลาย การศึกษาบทบาทของการเคลื่อนที่แบบ breathing motion ของโปรตีนที่เกิดจากการกลับทิศของวงแหวนนี้ยังคงเป็นสิ่งที่ต้องศึกษากันต่อไปและเชื่อว่าจะมีผลกระทบมากในศาสตร์ใหม่ เช่นโครงสร้างจีโนม เป็นต้น

<u>การก้าวหน้าในปัจจุบันและในอนาคต</u>

จากการที่โครงการจีโนมหลายโครงการได้สำเร็จลุล่วง ทำให้มีประเด็นท้าทายเกิดขึ้นสำหรับการหาวิธีหาโครงสร้าง 3 มิติ ในวิถีทางหนึ่งนั้น การศึกษาจีโนมเชิงโครงสร้างในสถาบันวิจัยชั้นนำหลายแห่งได้มุ่งเป้าไปที่การพัฒนาเทคโนโลยีที่จะสามารถหาโครงสร้างโปรตีนได้เป็นจำนวนมาก เพื่อให้เข้าใจถึงแผนที่การพับตัวของโปรตีนเพื่อปิดช่องโหว่ของการทำนายโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งจะเห็นว่ายังมีจุดบกพร่องอีกมากในการปรับปรุงประสิทธิภาพในแต่ละขั้นตอนของ NMR เพื่อ

การศึกษาโครงสร้างของโปรตีน ส่วนในอีกหนทางหนึ่ง การศึกษาจีโนมเชิงโครงสร้างได้ทำให้เราต้องเผชิญสภาวะการณ์ที่ต้องทำนายหน้าที่ใหม่จากโครงสร้างของโปรตีน ในขณะที่การศึกษาชีววิทยาเชิงโครงสร้างแบบดั้งเดิม เราต้องเผชิญความท้าทายในการหาหน้าที่ของโปรตีนบนพื้นฐานของโครงสร้าง 3 มิติ

เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนชนิดใหม่เสริมการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล การศึกษาทั้งสองนี้อาจนำไปสู่การรู้หน้าที่ที่ยังไม่รู้ของยีนได้ เนื่องจากประสิทธิภาพของ NMR แบบดั้งเดิมในการศึกษาสารละลายนั้นถูกจำกัดโดยขนาดของอนุภาคที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน เท่านั้นเอง ความท้าทายใหม่ในการใช้ NMR ในสารละลายจะเกิดขึ้นจากความรู้ที่ว่า โครงสร้างของโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นจากการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป หรือระหว่างองค์ประกอบของโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งมักมีน้ำหนักโมเลกุลสูง การใช้ NMR กับโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 30,000 ดาลตันจึงไม่เหมาะสม ทำให้จุดมุ่งหมายของการศึกษาแคบลงมาก เช่น การศึกษาระบบตัวรับ (receptor system) ในการหายาชนิดใหม่ (drug discovery) โดยใช้ NMR ก็จะถูกจำกัดอยู่ในวงที่แคบลง รวมทั้งการศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนและกรดนิวคลีอิกโดยใช้ NMR ก็จะถูกจำกัดอยู่คือมีจำนวนที่น้อยลง นอกจากนี้ก็ยังรวมถึงการไม่สามารถใช้ NMR ในการศึกษาโปรตีนในเมมเบรน ซึ่งต้องถูกทำให้เป็นสารละลาย micelle ขนาดใหญ่ก่อน โดยใช้ดีเทอร์เจนต์หรือไขมัน เมื่อ 2-3 ปีที่ผ่านมา ข้อจำกัดเหล่านี้ได้ถูกทำให้น้อยลงโดยการใช้เทคนิค transverse relaxation-optimized spectroscopy (TROSY) และจากการใช้ TROSY นี้ทำให้เราสามารถใช้ NMR ในสารละลายเพื่อศึกษาโครงสร้างโปรตีนในเมมเบรนได้ และทำให้การศึกษาหน้าที่ของระบบตัวรับที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 100,000 ดาลตันเป็นไปได้ ข้อมูลในห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้า แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้ NMR หาโครงสร้างของโมเลกุลที่มีขนาด 870,000 ดาลตันได้

ส่วนความเป็นไปได้ในอนาคตของการใช้เทคนิคใหม่ของ NMR นี้คือสามารถใช้ในโครงการหายาชนิดใหม่ที่มีตัวรับขนาดใหญ่มาก ๆ ได้ และจากการใช้การติดฉลากสารกัมมันตรังสีร่วมด้วยเทคนิค NMR ที่ใช้ TROSY นี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป การใช้ NMR ศึกษาโครงสร้างขนาดใหญ่ตั้งแต่ต้น (de novo) ดูเหมือนจะเป็นเรื่องที่น่าสนใจและไม่จำกัดเฉพาะสารเชิงซ้อนของกรดนิวคลีอิกและโปรตีน และเมมเบรนโปรตีนขนาดเล็กที่ถูกละลายในดีเทอร์เจนต์หรือ micelle ของไขมัน การศึกษาโครงสร้างเหล่านี้จะปูพื้นฐานใหม่ ๆ ในการศึกษาหน้าที่ของโครงสร้างที่ซับซ้อนมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในวิทยาการของการหายาชนิดใหม่

ผู้แปล: ดร.อภิญญา ชัยวิสุทธางกูร
ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร
ผู้ตรวจ: ศ. ดร. สุทัศน์ ยกส้าน