

抗菌小蛋白 在細胞膜上打洞

■ 李明道

抗菌小蛋白會與細菌細胞膜直接作用，進而在膜上打洞，破壞細胞內外物質的平衡來殺死細菌。

這種新的抗菌機制不易因基因突變而產生抗藥性，可望開發出新一代的抗菌藥物。

借助外力滅菌

從 1930 年代發現第 1 個抗生素—青黴素（盤尼西林）—並應用於殺死致病細菌以來，科學家陸續發現與合成許多抗生素，使得人類在這場亙古以來與細菌的戰爭中掌握優勢，許多疾病得以治癒，勝利的天平似乎慢慢向人類傾斜。

但曾幾何時，這些曾橫掃千軍、無往不利的抗生素，在短短不到 1 世紀的頻繁使用後，就因為細菌產生抗藥性而節節敗退，失去往日的光環。就像達爾文演化論所說的「適者生存」或電影〈侏儸紀公園〉的經典台詞—生命會自己找出路，細菌藉由產生抗藥性來適應人類的用藥，在這場戰爭中醞釀反撲的氣勢。

一般來說，抗生素殺菌的機制是藉由與細菌細胞膜上的受體蛋白質結合，抑制或改變蛋白質的功能，使細菌不能進行正常的生化過程而死亡。這種機制最大的優點就像鑰匙插入鑰匙孔，具有一對一的高度選擇性與專一性，因此非常準確有效。但「成也蕭何，敗也蕭何」，正因為有著高度的專一性，容易由於突變造成蛋白質結構的變化而失效，這就是細菌可以對抗生素產生抗藥性的原因。

反求諸己滅菌

就在細菌發起逆襲的同時，科學家關愛的眼神又回到動植物體內的先天免疫系統—由遺傳基因所控制用來抵抗細菌入侵的防衛系統，希望藉由了解先天免疫系統，從動植物本身學習並得到更有效率的殺菌方法。皇天不負苦心人，這些研究終於有了突破性的進展。

1960 年代，科學家發現動植物的先天免疫系統內有許多不同的抗菌小蛋白，不同物種有不同的抗菌小蛋白。這類蛋白會與細菌細胞膜直接作用，並在細胞膜上打洞，藉以破壞細胞

內外物質的平衡來殺死細菌。這種與抗生素截然不同的抗菌機制，被寄予厚望開發出新一代的抗菌藥物，它的優點是不易因基因突變而產生抗藥性，缺點是其選擇性及專一性不如抗生素。

令人惋惜的是經過了多年的研究，抗菌小蛋白在細胞膜上打洞的過程與機制仍未釐清。本文將以生物物理的方法，一步步揭開這過程的神祕面紗。

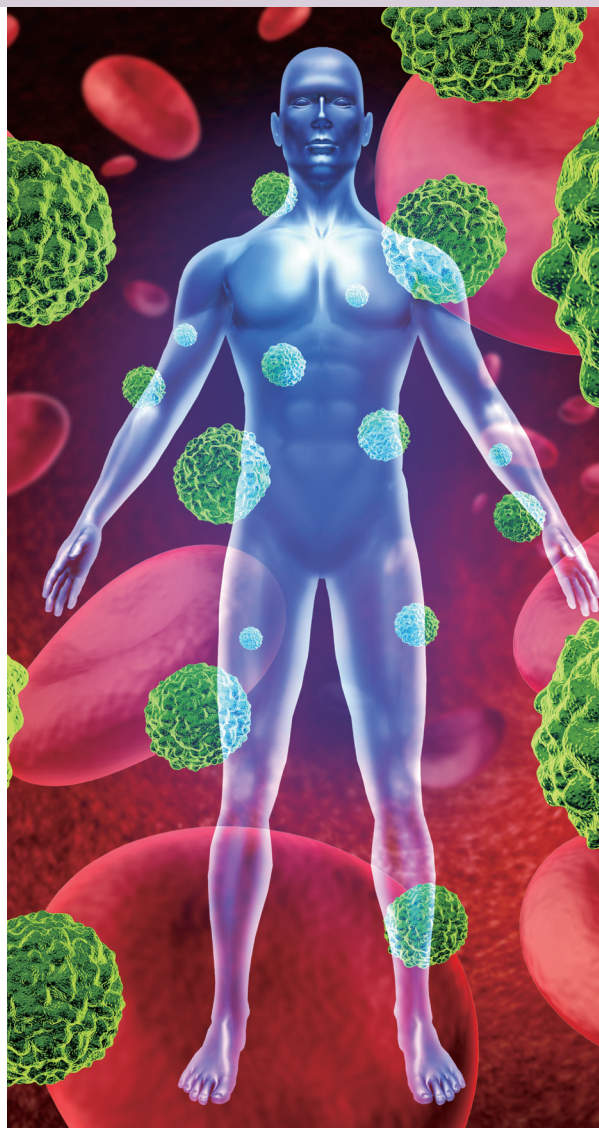
堅實的城牆

細胞是構成生命的基本單元，不論動物、植物或細菌的細胞都被細胞膜所圍繞，做為細胞外圍的屏障。細胞膜除了有區隔與保護的作用外，更是控制物質進出細胞與細胞內各個重要組成如細胞核、核糖體等的界面，所有物質要進出細胞，都必須穿越細胞膜，細胞需要藉由細胞膜才可以精確控制細胞內外物質的平衡，維持生命現象。用具體的例子來說，如果細胞是城堡，細胞膜就是城牆，城牆上有許多可以控制人員進出的城門。

這個城牆主要是由脂質分子做成的「磚」建築而成的雙層城牆（雙層膜），特別是這個雙層膜並不是固體而是局限於平面上的流體，因此賦予細胞膜更大的彈性、可塑性及韌性。此外，膜上鑲嵌了許多蛋白質、醣類與膽固醇，用來支持細胞的形狀、加強細胞膜的強韌度並具備特殊功能，使細胞膜成為堅實且具彈性的城牆。

搜尋攻擊目標

抗菌小蛋白要殺死細菌，不但得在茫茫人海中找到細菌細胞，同時要區別宿主（自己）的細胞與入侵的細菌細胞，不像抗生素具有一對一的專一性，因此必須發



細菌藉由產生抗藥性來適應人類的用藥，在這場戰爭中醞釀反撲的氣勢。（圖片來源：種子發）

展出一套有效率的方法來搜尋並盡量接近攻擊目標。

研究發現，多數細菌的細胞膜帶負電，一般動植物的細胞膜不帶電，而大部分的抗菌小蛋白帶正電。基於靜電力的「同性相斥，異性相吸」原理，抗菌小蛋白會自然而然地聚集在帶負電的細菌細胞膜附近，使局部濃度大增以利打洞殺菌。

細胞膜變薄了

抗菌小蛋白在接近目標細胞後會與細胞膜直接作用，其作用力除了靜電力以外還有親油作用力。這時抗菌小蛋白會如變形金剛一樣，把像毛線球般的不規則結構變成像彈簧般的螺旋結構，並把親油的一面擠進細胞膜的親油區中。因此，第1個問題是作用後細胞膜的結構會有什麼變化？

依據組成脂質分子的不同，細胞膜的厚度是3~5奈米。硬X光的波長範圍是0.05~0.2奈米，因此硬X光是研究細胞膜結構的利器，可使用同步輻射高品質的X光光源進行多片層X光繞射來測量細胞膜的厚度。

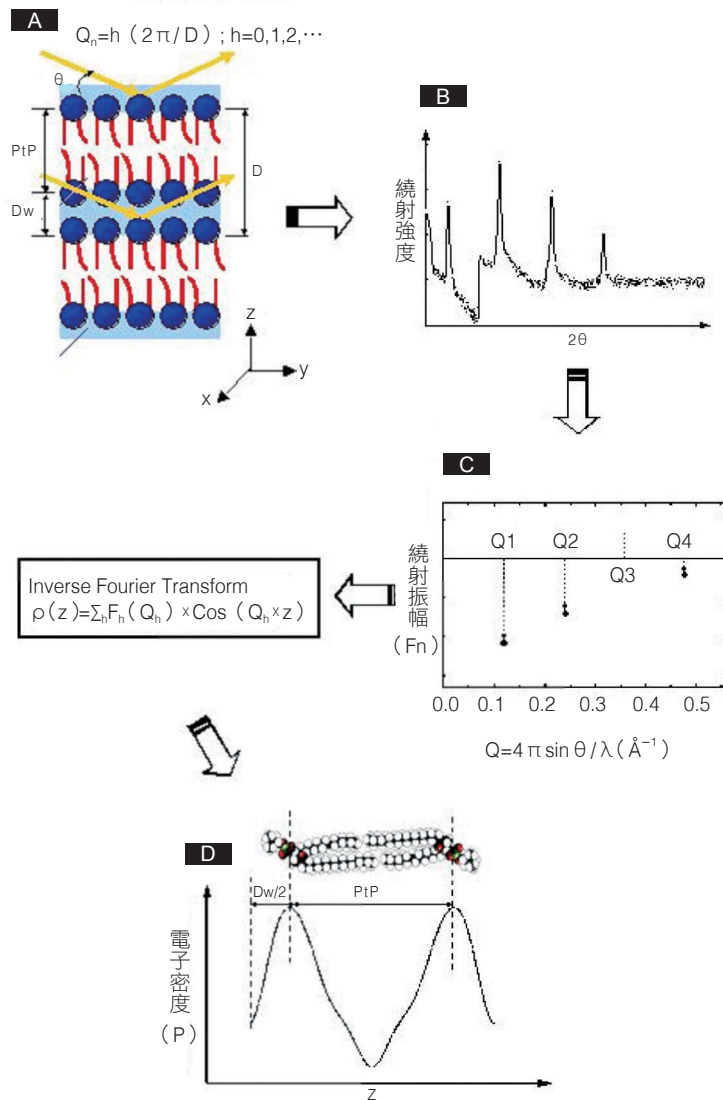
結果顯示，細胞膜與抗菌小蛋白作用後，厚度會隨著蛋白濃度增加而減少，但超過臨界濃度後就不再變化。表示抗菌小蛋白與細胞膜作用的第一步是使膜變薄，且在超過臨界濃度後，其作用開始改變，使得細胞膜厚度不再改變。

開始打洞

接下來的問題是在臨界濃度前後，抗菌小蛋白與細胞膜的作用到底發生什麼變化？

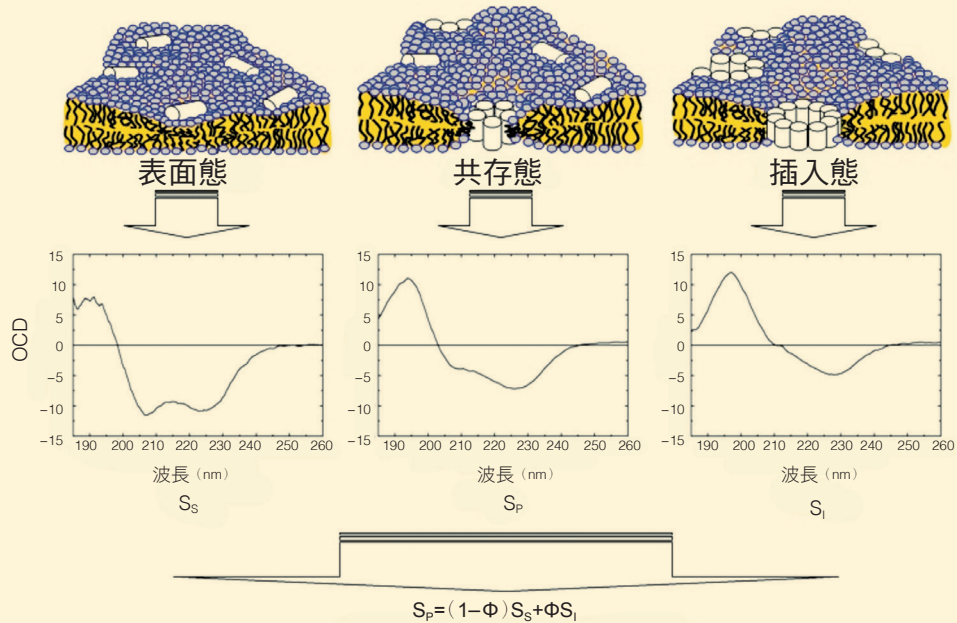
抗菌小蛋白在水溶液中呈現像毛線球的結構，與細胞膜作用後會變成螺旋結構，因此使用指向性圓二色光譜儀來測量抗菌小蛋白所形成的螺旋結構相對於細胞膜的方位。

結果顯示，在濃度低於臨界濃度時，螺旋結構的抗菌小蛋白平躺在細胞膜的表面上，就像把螺絲釘灑在木板上，這時螺絲釘會平躺在木板上。而當細胞膜上的抗菌小蛋白數量（濃度）多到一定的程度時，部分蛋白會開始垂直插入膜面，這時的濃度稱為臨界濃度。就好像有人把螺絲釘釘



多片層X光繞射原理：把適量樣品溶到有機溶劑中，多次滴定在玻璃基底上以製備脂質雙層膜的多片層樣品。再把樣品置於控制溫溼度的繞射腔內，把繞射腔架設在繞射儀上，讓X光以 θ 角度入射（圖A），並把偵測器置於 2θ 角度。這時樣品就好像千層派一樣，在垂直方向有周期性的堆疊，而可以在垂直方向得到繞射訊號（圖B）。經扣除背景訊號及相關修正後可得到繞射振幅的大小，再決定相位正負（圖C），最後經數學運算就可得到脂膜的相對電子密度圖（圖D）。脂質分子頭部區有一個磷原子，相對於其他的碳氫氧氮原子有較多的電子，因此電子密度圖中雙正峰間的距離就代表脂質雙層膜中磷原子到磷原子的距離，就是脂膜的厚度（圖D）。

入射光



指向性圓二色光譜儀原理：把適量樣品溶到有機溶劑中，多次滴定在石英玻璃上以製備脂質雙層膜的多片層樣品，再把樣品置於控制溫溼度的測量腔內測量。入射紫外光以垂直膜面的方向入射，螺旋結構的抗菌小蛋白平躺（表面態）與垂直插入膜面（插入態）會呈現不同的特徵光譜一圖中 S_S 與 S_I ，所有測量的光譜可使用 S_S 與 S_I 的線性組合求得插入的蛋白占所有蛋白的比率。

到木板中，這時有些蛋白平躺，有些蛋白插入，且插入比率隨濃度增加而變大，狀態改變的臨界濃度與 X 光實驗結果不謀而合。當抗菌小蛋白轉變為插入態時，同時可以偵測到細胞膜上產生的孔洞。

總結上述兩個實驗的結果，可以用兩態模型來描述抗菌小蛋白與細胞膜的作用。即當濃度低於臨界濃度時，螺旋結構的抗菌小蛋白平躺在膜面上，並使得細胞膜變薄；當濃度高於臨界濃度時，抗菌小蛋白插入細胞膜並開始打洞，這時細胞膜的厚度不再改變。由這推論，抗菌小蛋白造成細胞膜變薄是打洞的重要過程。

模擬真實細胞系統

雖然前述實驗讓我們對抗菌小蛋白打洞的機制有了初步的了解，但美中不足的是，這兩個實驗是把基底上的多層細胞膜樣品置於 100% 相對溼度的環境中，與真實生物細胞只有一層細胞膜且處於水溶液中有很大的差別。另外，X 光與圓二色光譜的結構研究雖然給我們分子尺度的結構，但畢竟不如雙眼所見來得直觀。

於是發展了螢光顯微鏡的單層巨型微胞實驗，運用影像的方法觀察水溶液中抗菌小蛋白與細胞膜微胞作用的動態過程。

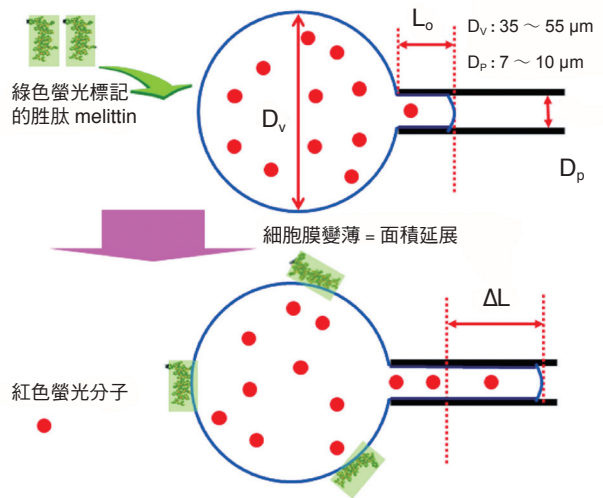
結果顯示，玻璃微管內伸長量變化的確隨著抗菌小蛋白吸附在細胞膜上而增加，由這推論細胞膜面積變化量也隨著增加。因為細胞膜的體積守恆，所以面積變大等同於厚度變薄。利用這特性，比較 X 光厚度變化與微胞實驗面積變化，得到幾乎相同的結果。也就是在打洞之前，抗菌小蛋白除了使細胞膜厚度變薄外，也使細胞膜的面積增加，等到細胞膜厚度和面積都不再變化，且巨型微胞內的螢光分子開始洩漏出來，代表抗菌小蛋白已經在細胞膜上打洞了。

形成什麼樣的孔洞

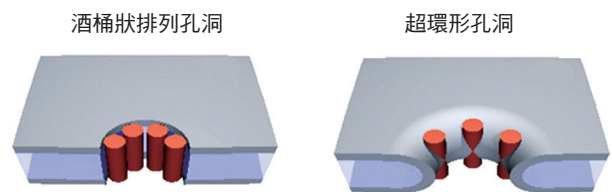
膜上孔洞的形態可分為兩種，分別是酒桶狀排列孔洞與超環形孔洞。不同的孔洞有不同的殺菌機制與殺菌效率，因此測量孔洞的結構是了解抗菌小蛋白與細胞膜作用的重要工作。

細胞膜是二維流體，脂質分子像水面上的浮萍般可以任意移動，甚至內外層的脂質分子可以交換，因此膜上形成的孔洞並非固定不動。因溫度所造成的干擾，孔洞與孔洞間的作用與關聯性非常微弱，不會形成周期性的排列，用傳統結晶學的方法並無法量測膜上孔洞的結構。

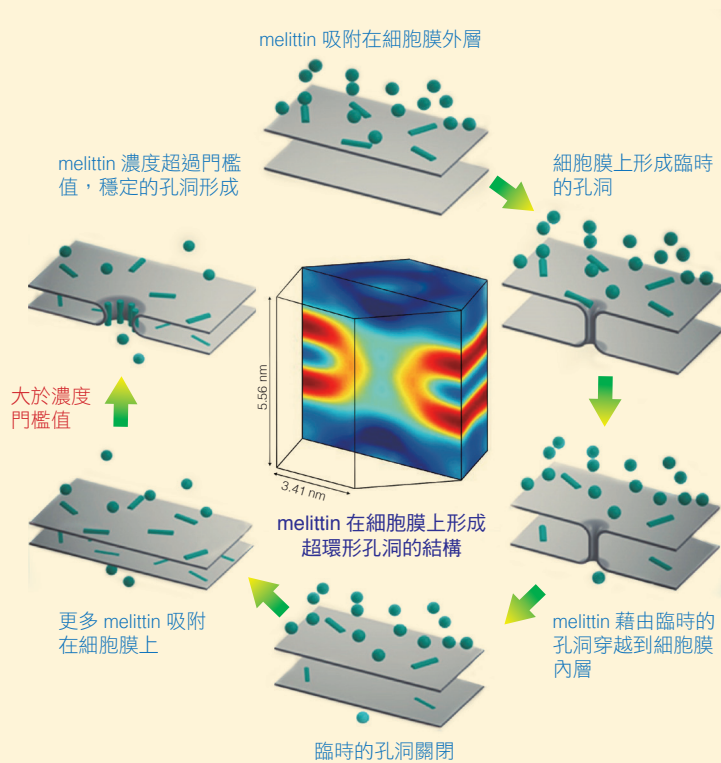
藉由細胞膜的脂質分子中標記溴原子來加強對比，並且降低溼度來增強關聯性，同時利用同步輻射 X 光光源可改變波長的特性進行異常 X 光繞射實驗，來決定抗菌小蛋白 melittin 在細胞膜上形成孔洞的結構。結果顯示，melittin 所形成的孔洞是超環形孔洞。



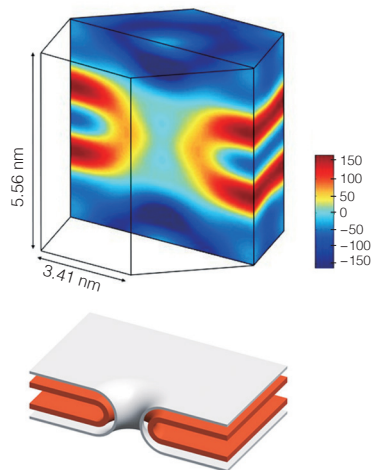
螢光顯微鏡的單層巨型微胞實驗：用電場產生法生成直徑約 35 ~ 55 微米（大約是頭髮直徑的一半）的巨型單層膜微胞，並讓紅色螢光分子包覆其中。再用直徑約 7 ~ 10 微米的玻璃微管輕輕吸住微胞，讓微胞在玻璃管中有微量的伸長（圖中的 L_0 ）。再把玻璃微管連同微胞送到含有綠色螢光標記抗菌小蛋白的溶液中，這時可以觀察到因蛋白吸附在微胞表面的動態過程及所造成的伸長量變化，同時可以觀察內部紅色螢光分子的洩漏來判斷膜上是否產生孔洞。



兩種孔洞結構的卡通示意圖：紅色圓柱代表螺旋結構的抗菌小蛋白，灰色部分代表細胞膜親水的頭部區，兩種孔洞結構的差異在於超環形孔洞邊緣的細胞膜會彎曲連接在一起，且抗菌小蛋白並未緊密排列。



抗菌小蛋白 melittin 在細胞膜上打洞的過程



(上圖) 孔洞結構中溴原子的電子密度分布圖，紅色部分是標記脂質分子中溴原子所在位置，明顯可以看出在孔洞邊緣的雙層膜是彎曲並連接在一起的，這正是超環形孔洞的特徵。(下圖) 超環形孔洞的卡通示意圖。

結合平衡態的結構研究與動態的螢光顯微鏡影像研究，使結構研究高精準度與影像研究高真實性的優勢互相搭配，截長補短，除了釐清抗菌小蛋白在細胞膜上打洞的完整過程外，也提供了未來研究生物分子與細胞膜作用的利器。

李明道
國家同步輻射研究中心