

蛋白質研究簡介

國立中山大學生物科學系
許清玫

緒論

當 Watson 與 Crick (1962 年諾貝爾生醫獎得主) 在 1953 年解開遺傳物質 DNA 的構造之謎時，遺傳訊息的傳遞與細胞內生物大分子的研究隨即開啟了新紀元。一般認為遺傳訊息的傳遞是由 DNA 經 RNA 再到蛋白質，其中 DNA 負責訊息的儲存、RNA 負責訊息的傳遞或暫時的攜帶者、而蛋白質則是訊息的表現者。1990 年為了解開人類生命的奧秘，人類基因組計劃終於展開，而也在 2002 年提前完成。由於蛋白質是遺傳訊息的表現者，唯有了解蛋白質的特性與功能，有朝一日才有可能回答有關生命奧秘的問題，因而在所謂的後基因組時代、人類蛋白質組計劃已經隆重登場了。

蛋白質的功能與形狀

蛋白質是細胞的主要成份，其重要性可由蛋白質在生物體所擔任的多種功能得知：如擔任結構功能的角質蛋白、絲纖維蛋白與膠原蛋白；擔任催化功能的各種酵素；擔任運輸功能的血紅素、血青素與輸鐵蛋白；擔任運動功能如肌肉收縮的肌紅蛋白及肌動蛋白；擔任防禦保護功能的抗體、補體與防止血流不止的凝血酵素；擔任儲存功能的酪蛋白、卵白蛋白與儲鐵蛋白；擔任調節管制功能的胰島素與生長激素；及會引起食物中毒的細菌毒素及蛇毒蛋白等。通常在細胞內擔任結構性角色的蛋白質，其形狀為纖維狀或條狀（如絲纖維蛋白與膠原蛋白）；而擔任功能性角色的蛋白質，則為球狀的（如血紅素與肌紅蛋白）。此外觀形狀不同的蛋白質過去多以離心沉降的方法分析或以水溶性的差異加以區別。

蛋白質的分離與純化

要分析特定蛋白質的結構與功能，就必須將此蛋白質由其原本存在的複雜環境（如細胞抽取液）中分離出，此通常需經一系列步驟將許多非研究興趣的蛋白質移除而保留特

定蛋白質，此過程即為蛋白質純化。純化的蛋白質由於組成均一而有多種用途：如進行活性分析的生理生化研究，進行晶體析出的結構研究，及工業上固定化酵素的應用等。蛋白質的分離與純化可依蛋白質的分子量大小、帶電特性、溶解度及蛋白質與特定物質的非專一性（如活性碳）或專一性（如抗體與抗原關係）的吸附作用等為分離的原理。

蛋白質的結構

蛋白質可由一條或多條多肽鏈組成，因此其結構可依次分為四級（圖一）。蛋白質的一級構造是指（各）多肽鏈中胺基酸的組成與排列次序；二級構造則是指連接各胺基酸的多肽鏈間因氫鍵作用而形成的特殊且重複出現之結構，如 α -螺旋、 β -褶片與 β -轉折等（Pauling與Corey因提出此類構造的貢獻而同獲1954年的諾貝爾化學獎）；三級結構是已具有一、二級構造的多肽鏈因胺基酸官能基間的交互作用，而折疊扭轉成特有的緊密立體形狀；四級結構則是當具有生物功能的蛋白質是由兩條或兩條以上的多肽鏈（次單元）組成時，次單元在立體空間的相互關係。而近年更有超分子結構（supermolecular organization）一詞出現，以描述不同蛋白質在細胞內部因行使生物功能而必須產生交互作用的實際狀態（如核糖體）。

維持蛋白質特有結構的作用力，除了一級構造的多肽鏈和三級結構中的雙硫鍵為共價鍵外，其餘二、三、四級結構的維持都是靠較弱的氫鍵、離子鍵、凡得瓦爾或疏水作用等非共價的作用力，因此大部份的蛋白質只能在溫和的環境中發揮其正常的生物功能。當環境（如溫度或pH值）的改變過於激烈時，蛋白質會因維持結構的作用力受破壞而失去特有的結構與活性，此即所謂的“變性”。由於蛋白質的變性通常只是蛋白質特有的形狀遭受破壞，繼而失去特有的生物活性，因此有時候蛋白質的變性是可逆的，而此種蛋白質結構與功能的密切關係更有Anfinsen等人以核糖核酸水解酶（RNase）進行一系列的實驗證明（圖二）。RNase是個含124個胺基酸

的酵素，具有四個能被可逆還原的雙硫鍵。當Anfinsen以還原劑（還原雙硫鍵）及會破壞非共價作用力的試劑（如尿素）處理RNase時，發現RNase發生“變性”且喪失了水解RNA的活性，而當在適當的條件下將還原劑及尿素移除時，RNase的活性幾乎可完全恢復，此時再重新折疊的RNase不但活性恢復且所測得的物理化學特性均和原來的酵素相同。由於實驗中的處理皆不會破壞連接各胺基酸間的共價鍵結，因此可說蛋白質特定結構的形成決定在此蛋白質的一級構造，而蛋白質的特定功能更與其特有的結構有關。以上論點確立了蛋白質結構與功能的關係，並且促進了以生物分子為基礎探討演化過程的研究，此貢獻使得Anfinsen獲得1972年的諾貝爾化學獎。

蛋白質結構與功能關係的研究實例

一、肌紅蛋白與血紅素

肌紅蛋白是負責肌肉細胞內 O_2 輸送與儲存的功能性蛋白質，含有153個胺基酸與鐵紫素，其結構是經由研判X光晶體繞射的結果所得知，Perutz即因此獲得1962年的諾貝爾化學獎。整個肌紅蛋白分子是一個折疊非常緊密的形狀蛋白（圖三），其中75%是 α -螺旋的構造，而鐵紫素約位於蛋白分子的中心並以其所含的 Fe^{+2} 與 O_2 接合進而輸送及儲存 O_2 。血紅素的功能則是在肺與組織間擔任 O_2 的運送，是一個具有四級構造的蛋白質，Kendrew因解出此構造而與Perutz同獲1962年的諾貝爾獎。血紅素由兩個 α 次單元與 β 次單元組成，成一四面體的立體排列，組成的 α 次單元（含141個胺基酸）與 β 次單元（含146個胺基酸）約略在其分子的中心也分別含有鐵紫素可與 O_2 接合， α 次單元與 β 次單元的結構雖不完全相同但非常類似，且個別的立體構造和肌紅蛋白均頗類似（圖三），顯示高度相似的立體結構與其同為攜氧蛋白的功能有關。此外血紅素的四級構造對其在肺與組織間攜帶 O_2 的功能有重要影響，不同的 O_2 濃度（ O_2 分壓）下、 O_2 和血紅素的接合關係呈“S”型曲線，與 O_2 與肌紅蛋白間的“雙曲線”型的

關係明顯不同（圖四），表示血紅素的四個次單元間對 O_2 的接合具有協同作用，即 O_2 與任一次單元的接合會加速 O_2 與其餘次單元的接合。此外血紅素與 O_2 的接合亦會受到 O_2 分壓（ pO_2 ）與pH值（波爾效應）等的影響， pO_2 愈高、pH值愈高、血紅素被 O_2 飽和（接合）的程度就愈高。當在肺部時， pO_2 與pH值均高，則大部分的血紅素均被 O_2 飽和；在組織， pO_2 低且pH值因代謝產生的 CO_2 而降低時，則血紅素與 O_2 的接合減弱，因而可因應組織的需要而釋出 O_2 以供利用。但同樣條件下，肌紅蛋白因不具四級構造，因此對 O_2 的接合不但無協同作用且不受 pO_2 或pH值的影響。

二、膠原蛋白與絲纖維蛋白

膠原蛋白與絲纖維蛋白均是扮演結構功能的纖維狀蛋白，其構造通常具有規則性，此規則性也反映在蛋白質的胺基酸序列上。膠原蛋白的基本構造是特殊的三股螺旋狀構造，而絲纖維蛋白則全為褶片的構造（圖五）；此兩種特殊的構造均具有較強韌、較穩定的特性，正符合其擔任保護與支撐的生物功能。而同樣地，膠原蛋白與絲纖維蛋白會形成此類特殊的結構都是因為其特殊的一級構造（即特定的胺基酸組成與排列），再次驗證了Anfinsen等人對蛋白質結構的形成與結構功能關係的論點，即蛋白質的一級構造決定了蛋白質特定的結構。

蛋白質結構的測定

蛋白質一級構造的測定是求出多肽鏈中胺基酸的組成與排列次序，胺基酸的組成可利用由1972年諾貝爾化學獎得主Stein與Moore所發明的胺基酸分析儀（圖六）求出。至於胺基酸的排列順序則需利用胺基酸定序儀取得。而蛋白質的二級、三級與四級結構的研究則需利用物理的方法：如利用蛋白質分子對偏極光的轉向能力或核磁共振的原理估測二級構造中 α -螺旋或 β -褶片的含量；或利用X光繞射法研究蛋白質結晶的構造而取得蛋白質的三級與四級結構等。

蛋白質的結構與演化

分析不同蛋白質的胺基酸組成與序列可推斷蛋白質是否源自同一祖先（即同源蛋白），如肌紅蛋白與血紅素的研究即是一例。由於肌紅蛋白的結構與血紅素的 α 次單元或 β 次單元的結構均非常類似，且同樣具有攜氧的功能，因此他們極可能源自一個共同祖先（一原始球蛋白）。而比較不同來源的細胞色素c的胺基酸序列時，更說明蛋白質的結構研究對演化關係建立的重要性。細胞色素c是粒線體電子傳遞鏈的成分之一，對細胞存活極為重要。在分析得自酵母菌到人類等40多種來源的細胞色素c時，發現雖然這些蛋白質的一級構造不盡相同但卻有一些令人訝異的相似處。如在細胞色素c平均含有104個胺基酸中有28個完全相同，且目前已知這28個胺基酸和細胞色素c的功能有密切關係，只要任一個胺基酸被其他種類的胺基酸取代時都會影響細胞色素c的功能。而比較不同物種的細胞色素c的胺基酸序列時，可發現不同物種間的序列差異程度和其親緣關係有一定的比例關係（圖七）；如人的細胞色素c胺基酸序列與黑猩猩的完全相同，和其他哺乳類有10個胺基酸的差異，和爬蟲類有14個差異，和魚類、軟體動物、昆蟲與酵母或高等植物則分別有18個、29個、31個與40個以上的差異，更有趣的是由分析細胞色素c的胺基酸序列差異所架構的“演化樹”和使用傳統方法所建立的演化關係極為符合，因而衍生出利用分析特定蛋白質的胺基酸序列以架構演化關係的分子演化學。