

蛋白質

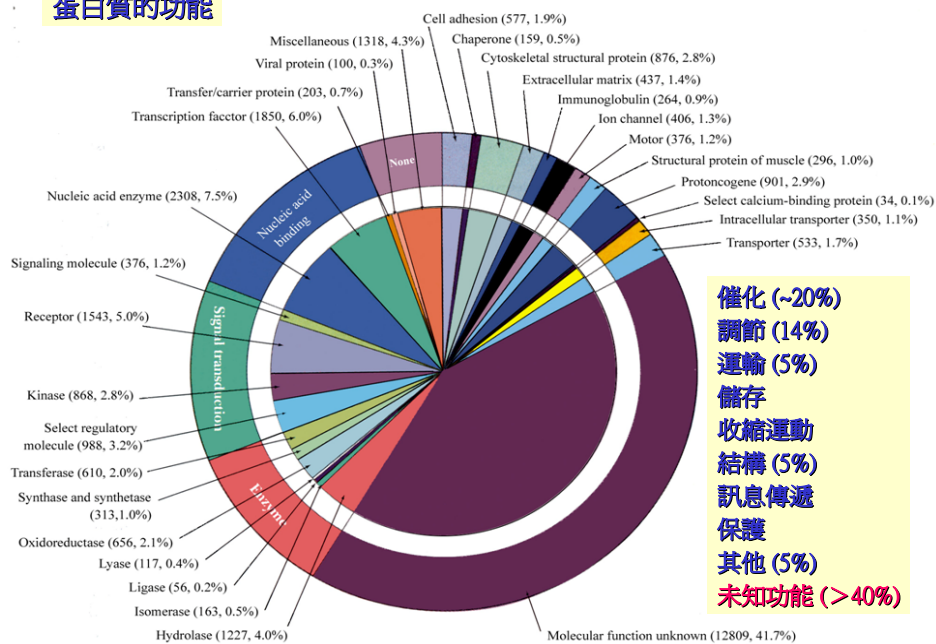
《緒論》

1. 蛋白質是細胞的主要成份，約佔總乾重的一半以上，為細胞生物大分子中**最重要者**，擔任多種功能*
2. 蛋白質是遺傳訊息的**表現者**
蛋白質體計劃 (proteomics)
 - 了解蛋白質的種類、含量變化與分佈等，唯有了解蛋白質的特性與功能才可能回答有關生命奧秘的問題
 - **但未知功能的蛋白質仍佔多數**

蛋白質的生物功能

生物功能	例子
催化功能	酵素
結構功能	角蛋白, 膠原蛋白, 纖維蛋白
運動功能	肌紅蛋白, 肌動蛋白
運輸功能	血紅素, 肌紅蛋白
防禦保護功能	抗體, 補體, 凝血因子
儲存功能	酪蛋白(牛奶), 卵白蛋白, 儲鐵蛋白
調節管制功能	胰島素, 生長激素
其它	細菌毒素, 蛇毒蛋白

蛋白質的功能



3. 蛋白質是由胺基酸組成的生物大分子

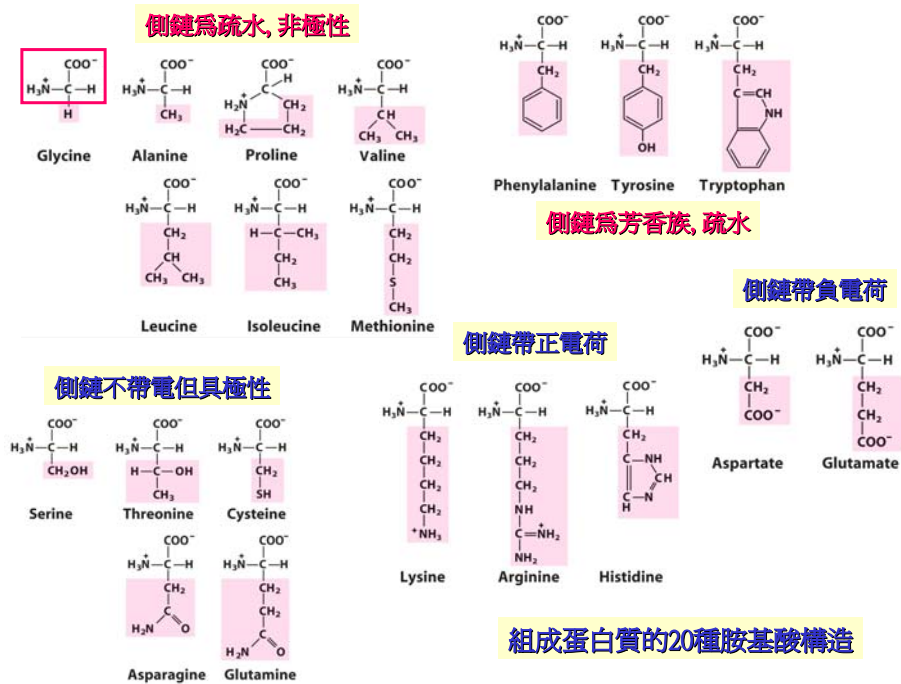
由20種胺基酸構成，每種胺基酸的側鏈構造不同*

- 極性或親水的(如帶電荷或不帶電具極性的)
- 非極性或疏水的
- 有些胺基酸併入蛋白質後可經轉譯後修飾作用(post-translational modification)*

與蛋白質的功能有關，如凝血因子與膠原蛋白

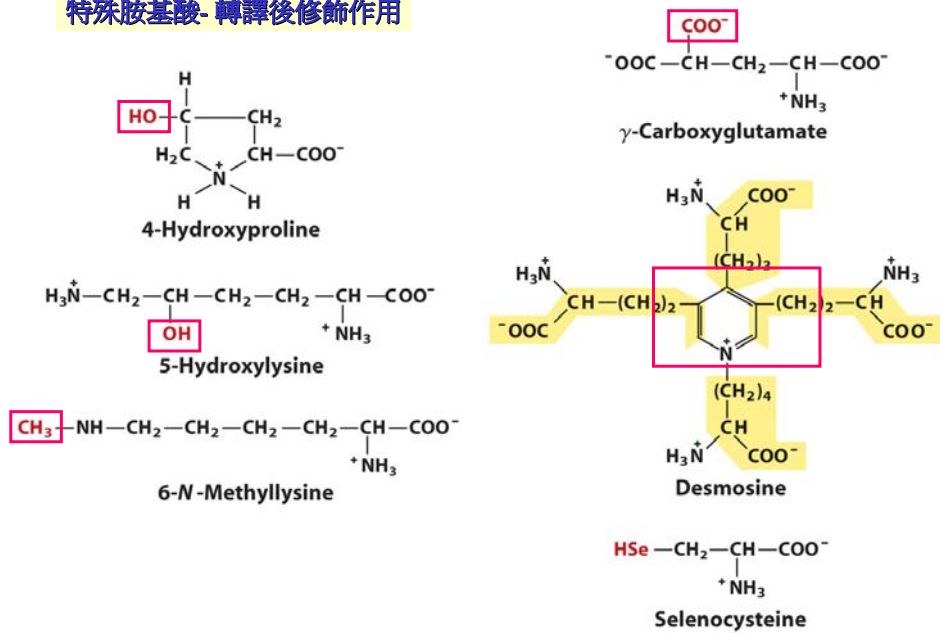
蛋白質的大小

- 範圍廣，如胰島素含51個胺基酸，細胞色素c含104個胺基酸，血紅素含574個胺基酸，肌聯蛋白titin含26,926個胺基酸



組成蛋白質的20種胺基酸構造

特殊胺基酸-轉譯後修飾作用



4. 蛋白質的分類

依外觀形狀與溶解度*

- 球狀蛋白，纖維狀蛋白，膜蛋白

依組成*

- 簡單蛋白

- 複合蛋白

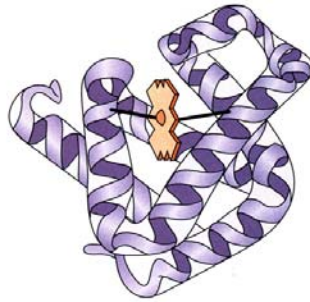
5. 纖維狀蛋白

外觀為纖維狀或長條狀，擔任結構、支撐、保護的角色

- 如皮膚、韌帶、軟骨等構造的膠原蛋白，蠶絲的絲蛋白，頭髮的角蛋白

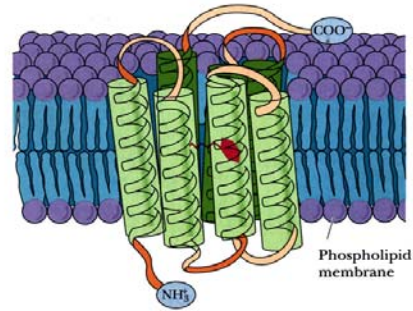
蛋白質的分類

纖維狀蛋白
(膠原蛋白)



球狀蛋白(肌紅蛋白)

膜蛋白(細菌視紫素)



複合蛋白

TABLE 3-4 Conjugated Proteins

Class	Prosthetic group	Example	
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood	脂蛋白
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G	醣蛋白
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk	
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin	血基質蛋白
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase	核黃蛋白
Metalloproteins	Iron	Ferritin	金屬蛋白
	Zinc	Alcohol dehydrogenase	
	Calcium	Calmodulin	
	Molybdenum	Dinitrogenase	
	Copper	Plastocyanin	

6. 球狀蛋白

外觀為球形，立體結構緊密，水分子不易進入

- 表面有極性(親水性)的胺基酸側鏈可與水接觸或與其他分子產生交互作用
- 擔任功能性角色，以酵素最為重要

7. 膜蛋白

在水溶液中的溶解度極低，位於膜構造的環境，蛋白質表面多為非極性的胺基酸側鏈

- 有些鑲嵌於膜構造中，有些附著於膜上，有些懸掛於膜上

膜蛋白多為球狀蛋白

- 可形成通道控制物質進出，如運輸蛋白與離子通道
- 參與外界訊號的傳遞，如激素的受體蛋白
- 參與能量的產生，如細胞呼吸鏈與ATP合成酶

《蛋白質的分離與純化》

1. 蛋白質純化

利用一系列步驟將無興趣的蛋白質自樣品中移除，並保留特定蛋白質的過程

- 分析特定蛋白質的結構與功能時，必需將此蛋白質由其存在的環境(如細胞抽取液)中分離出

純化蛋白質的用途

- 純化所得的蛋白質組成均一，可用於進行活性分析的生理生化研究、析出晶體的結構研究、工業上固定化酵素的應用

2. 蛋白質分離與純化的原理

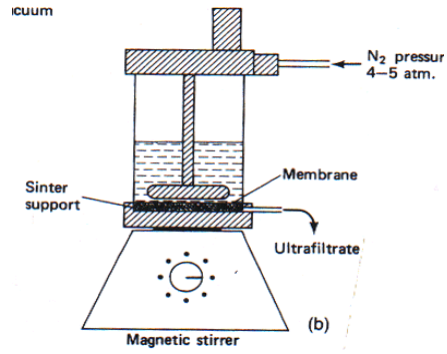
分離的原理

- 利用蛋白質的分子量大小、帶電特性、溶解度或蛋白質與特定物質間的吸附作用等

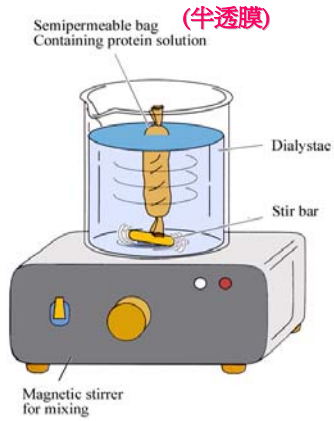
利用分子量大小

- 透析*
- 超過濾*
- 分子篩或膠體過濾管柱層析*

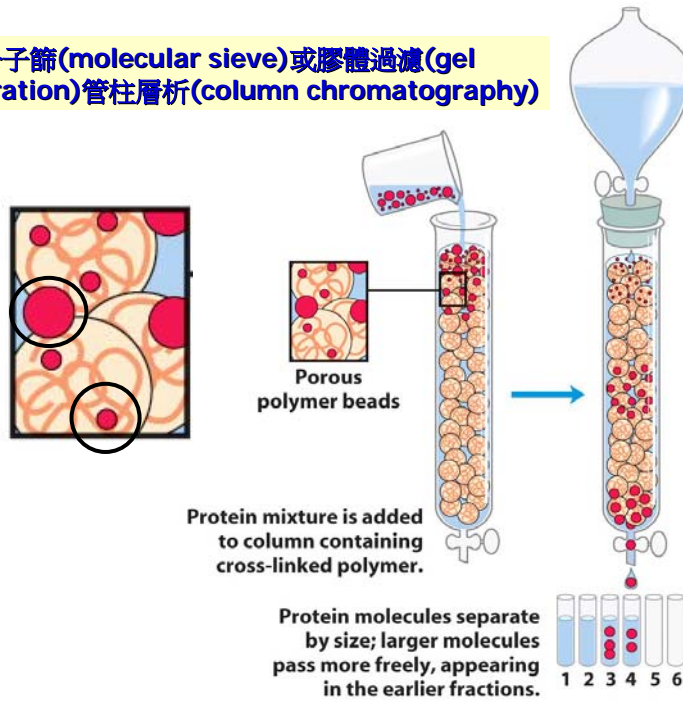
超過濾(ultrafiltration)



透析(dialysis)



分子篩(molecular sieve)或膠體過濾(gel filtration)管柱層析(column chromatography)



利用帶電特性

- 離子交換管柱層析法*

- 等電點聚焦*

等電點 (pI)

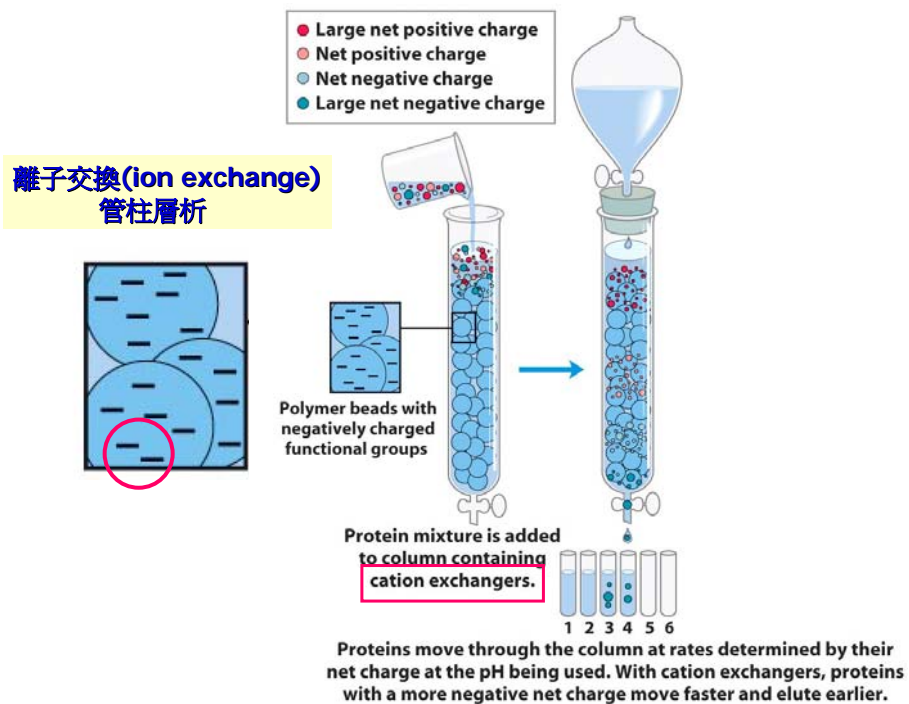
特定pH值時，蛋白質所帶的正、負電荷相等，蛋白質分子的淨電荷為零，在電場中不移動

- 電泳

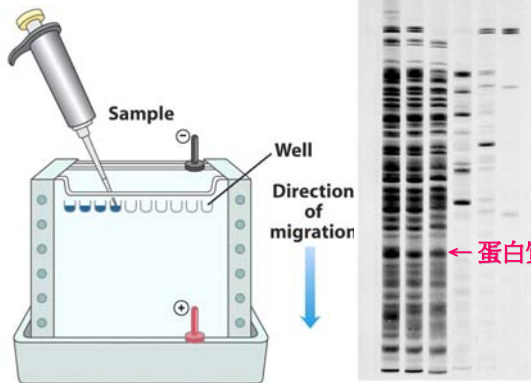
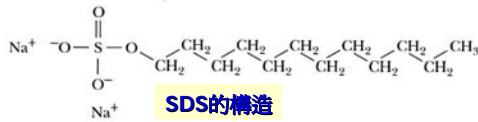
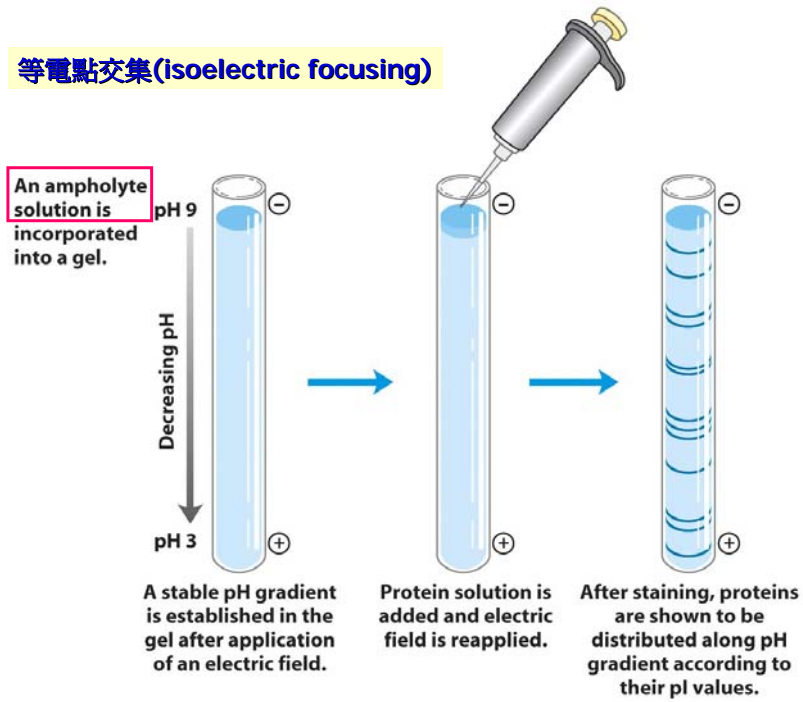
SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)*

2D電泳(two-dimensional gel electrophoresis)*

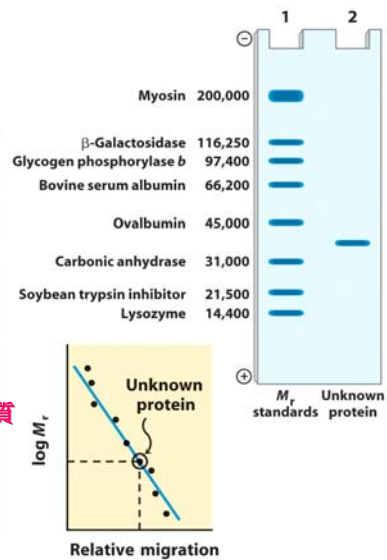
毛細管電泳



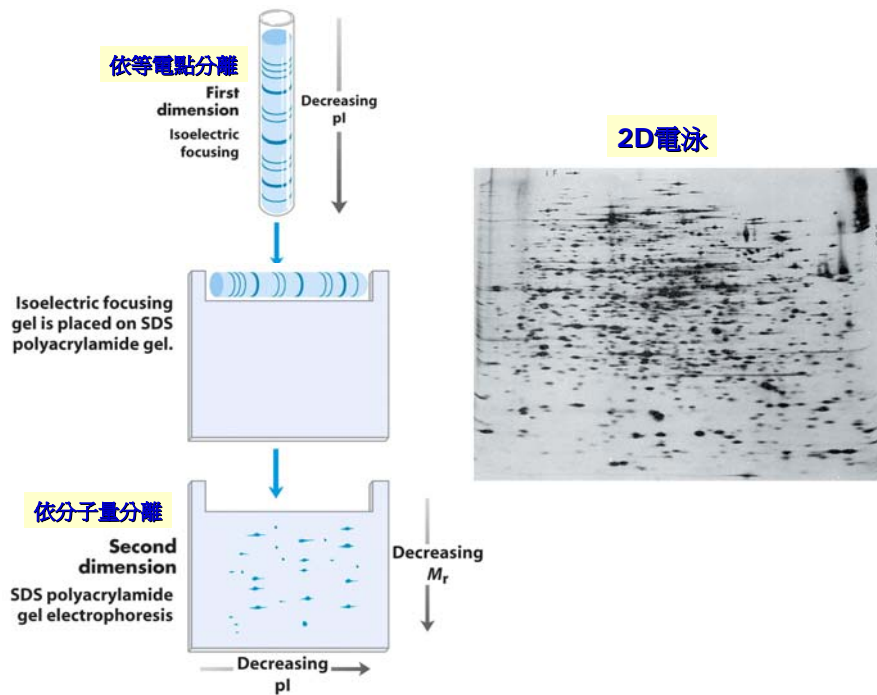
等電點交集(Isoelectric focusing)



膠體電泳(gel electrophoresis)



SDS-PAGE可用於估測蛋白質分子量



利用溶解度

- 鹽析法*

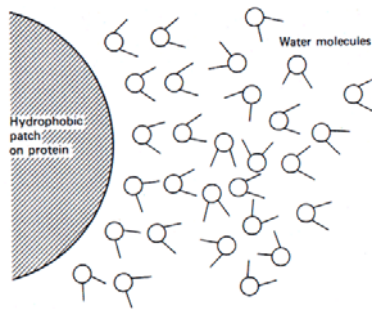
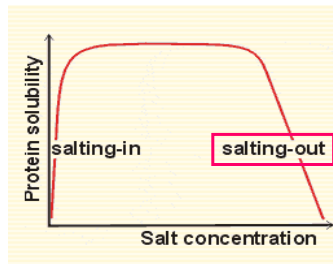
利用非專一性的吸附作用

- 活性炭

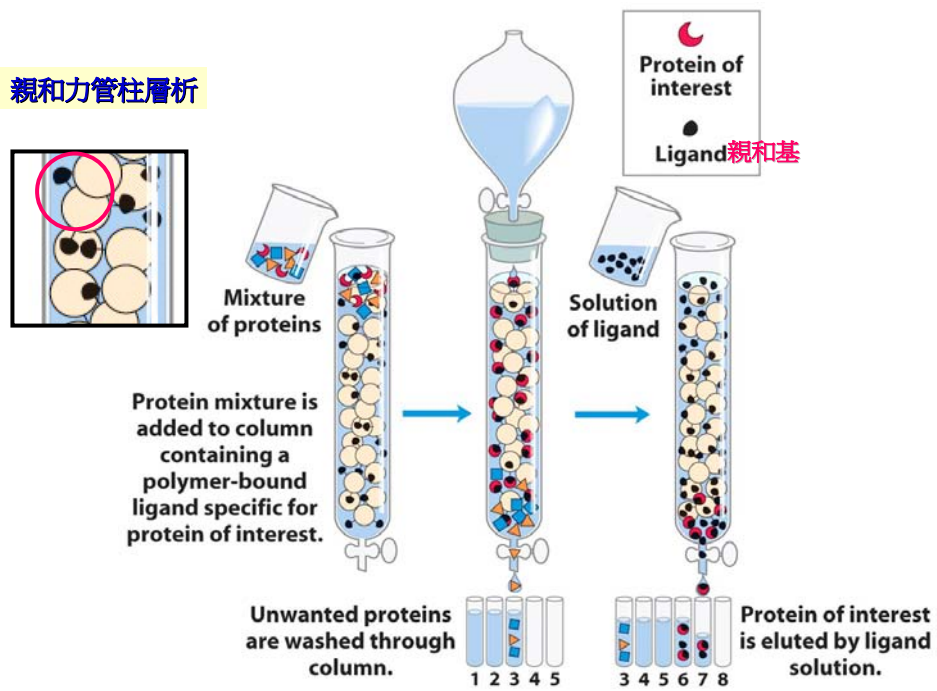
利用專一性的吸附作用

- 專一性的吸附
抗體與抗原或酵素與受質
- 親和力管柱層析*

鹽析法 (salting out)



親和力管柱層析



蛋白質的純化結果

TABLE 3-5 A Purification Table for a Hypothetical Enzyme

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

Note: All data represent the status of the sample after the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 94.

《蛋白質的結構》

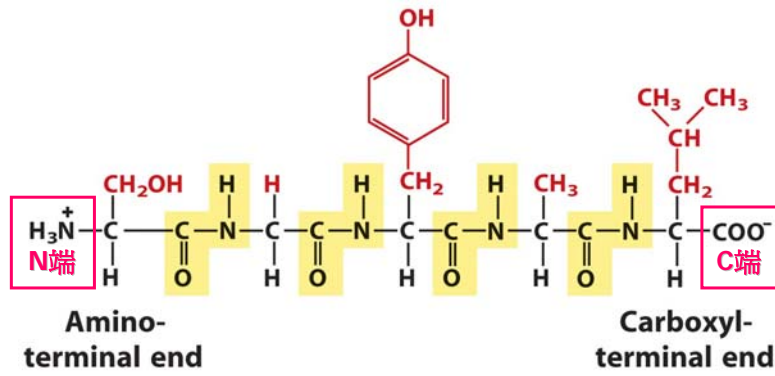
1. 一級結構

(各)多肽中胺基酸的組成與排列次序*

2. 二級結構

多肽因連接各胺基酸的肽鍵(peptide bond)間產生氫鍵，而形成重複出現的特殊結構

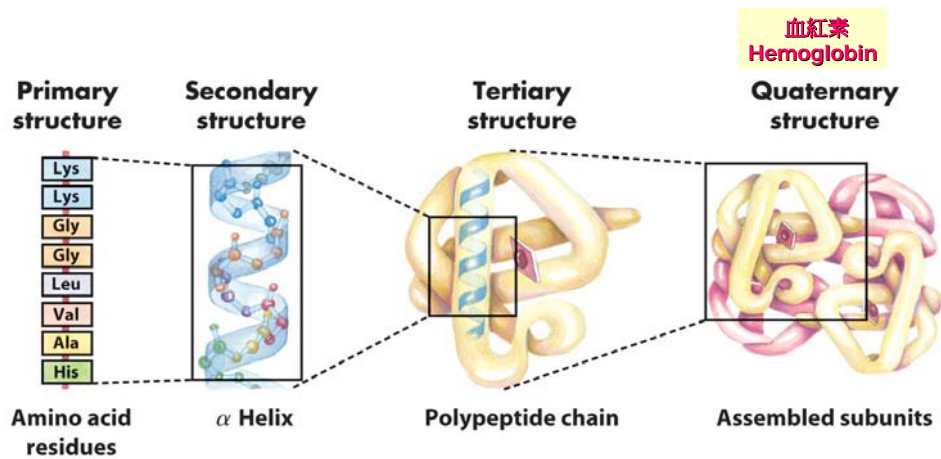
- α -螺旋
- β -褶片



多肽的表示方式與方向性

- Serylglycyltyrosylalanylleucine, Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu, **SGYAL**

血紅素的四個結構層次

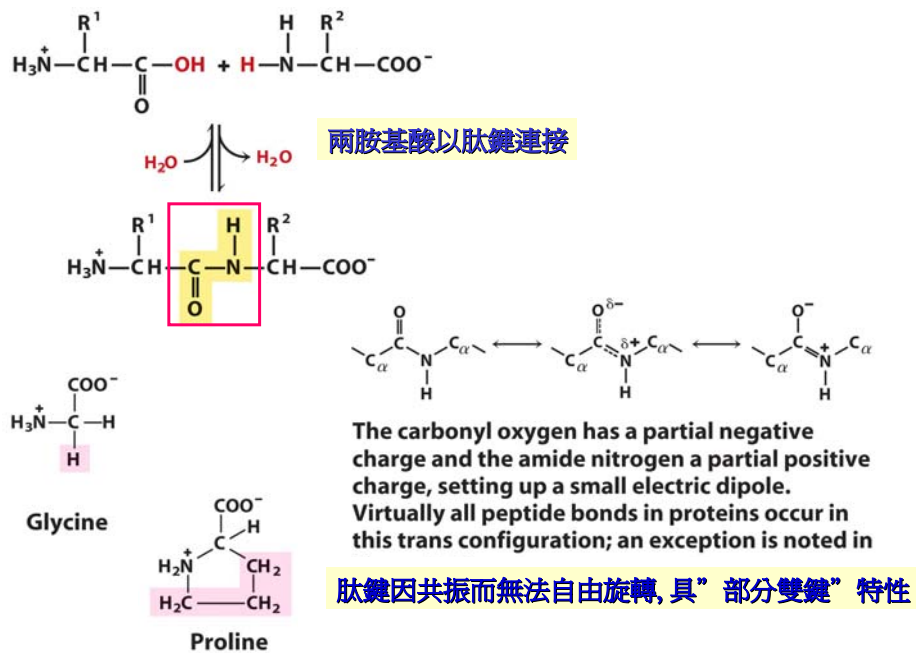


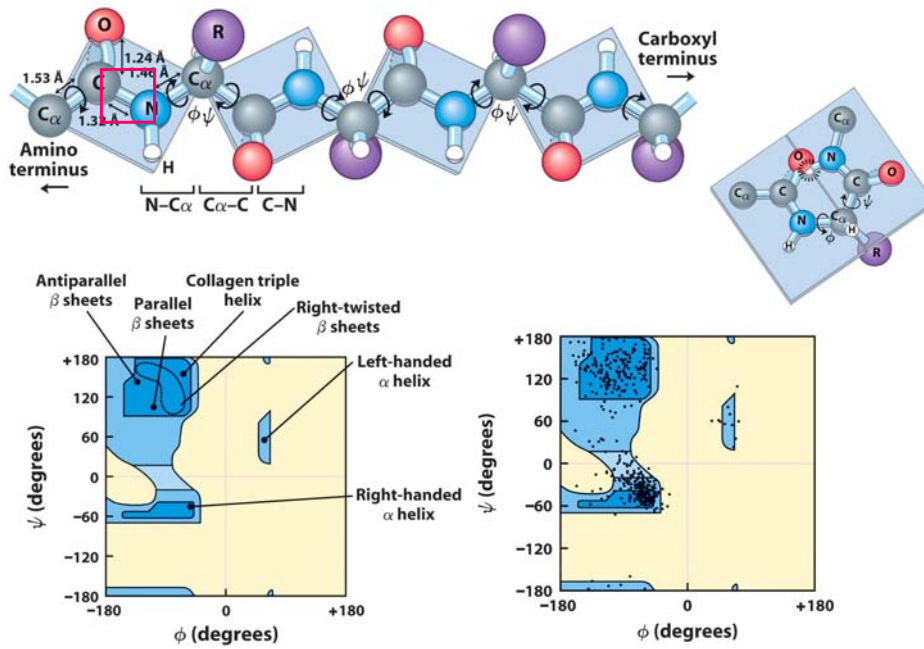
肽鍵的構造與特性

- $-C_{\alpha}-C_{O}-N-C_{\alpha}-$ ，具部份雙鍵特性*
- 為一平面構造 (amide plane, peptide plane)
- 自由旋轉度 (Φ, Ψ)

Ramachandran plot *

- 甘胺酸 (glycine)* 與脯胺酸 (proline)* 為 α -螺旋的破壞者





由Ramachandran plots預測的各種構造

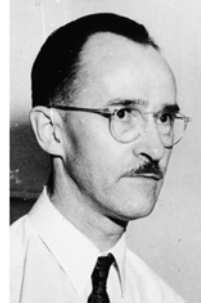
實例(兔的pyruvate kinase), 排除Gly

典型的二級構造

- 由Pauling與Corey提出*，Pauling因而獲得1954年諾貝爾化學獎
- α -螺旋與 β -褶片*的結構特性
特定蛋白質中特定二級構造的含量*
- β -轉折*的結構特性

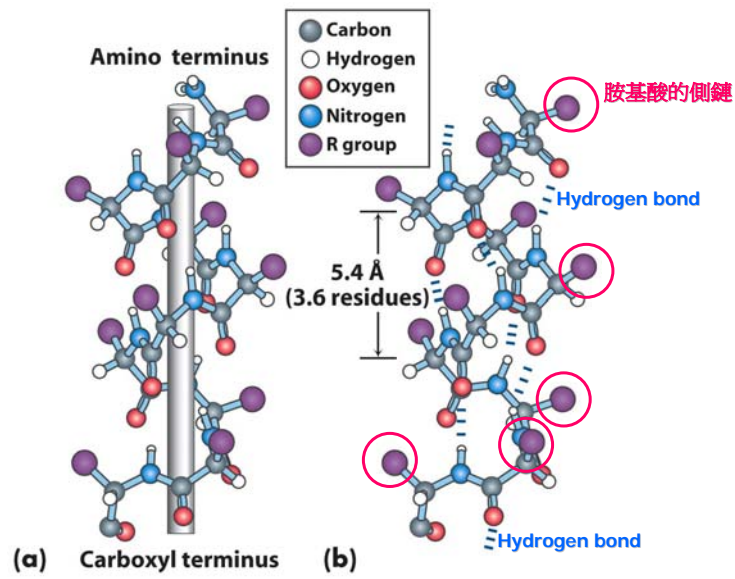


Linus Pauling (1901-1994)
- 1954年諾貝爾化學獎

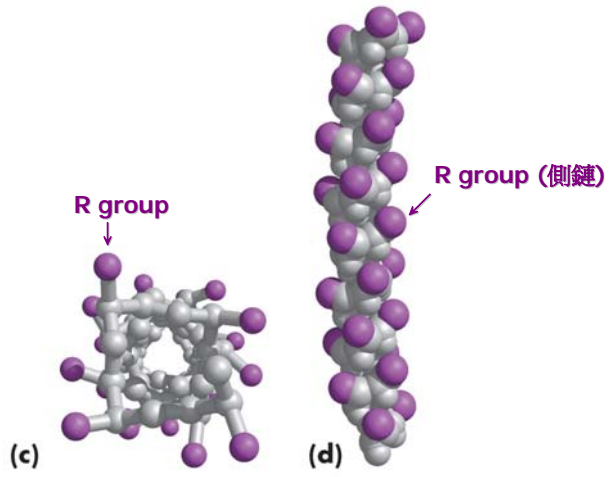


Robert Corey (1897-1971)

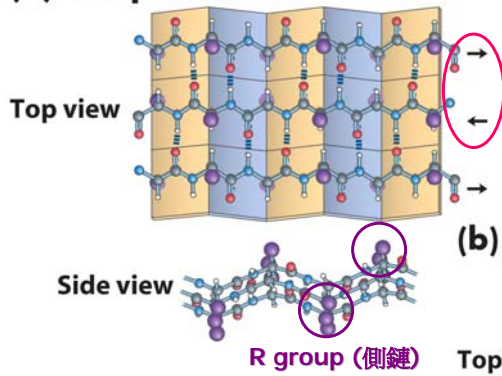
α -螺旋構造(1)



α -螺旋構造(2)

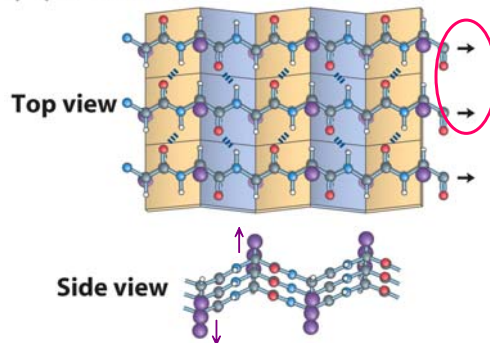


(a) Antiparallel 逆向平行

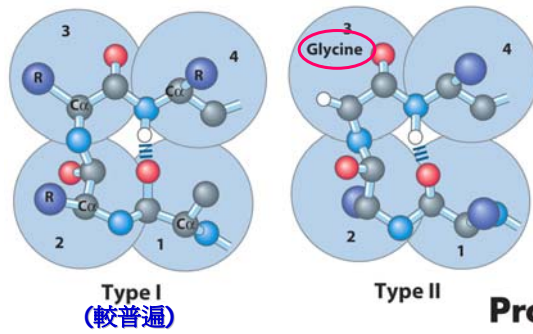


β -褶片構造

(b) Parallel 同向平行

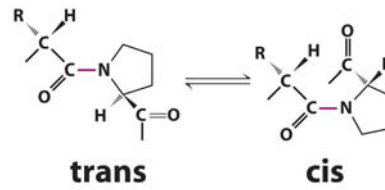


(a) β Turns



β -轉折構造

Proline isomers



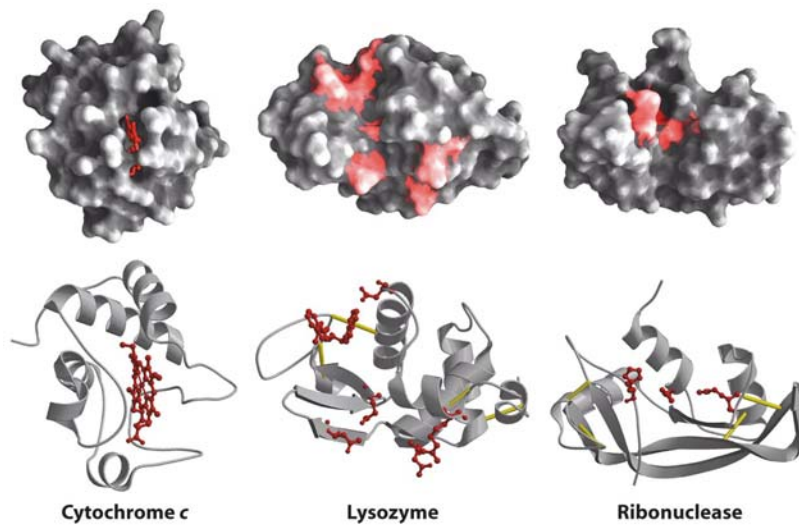
多肽鏈中含Pro時，其肽鍵具有 *trans* 與 *cis* 異構形式

TABLE 4-2 Approximate Amounts of α Helix and β Conformation in Some Single-Chain Proteins

Protein (total residues)	Residues (%)*	
	α Helix	β Conformation
Chymotrypsin (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxypeptidase (307)	38	17
Cytochrome c (104)	39	0
Lysozyme (129)	40	12
Myoglobin (153)	78	0

Source: Data from Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W. H. Freeman and Company, New York.

*Portions of the polypeptide chains that are not accounted for by α helix or β conformation consist of bends and irregularly coiled or extended stretches. Segments of α helix and β conformation sometimes deviate slightly from their normal dimensions and geometry.



胺基酸數目	~ 100	129	124
α -螺旋構造	40%	40%	Very little

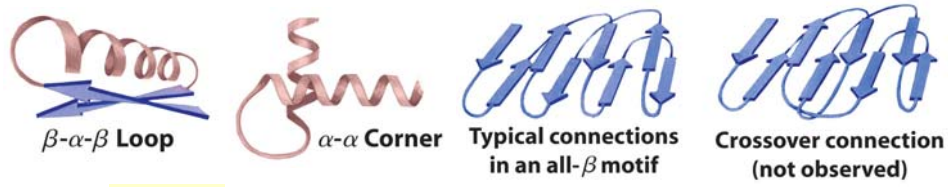
Supersecondary structures

- 結構模組(motif, fold)或結構區域*，為二級構造的組合
- 功能區域(domain)*，為具功能性的特定二級構造組合

Random coil or unorganized structures

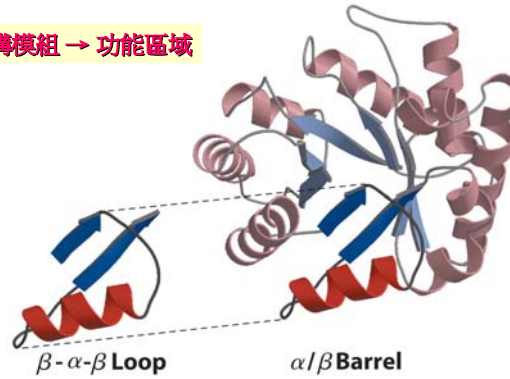
- "Random coil is not random!"

蛋白質中常見的摺疊模式



結構模組

結構模組 → 功能區域



兔的pyruvate kinase的特定功能區域是由數個結構模組組成的

β Conformation
2,000 × 5 Å

α Helix
900 × 11 Å

Native globular form
100 × 60 Å

球形蛋白具有緊密的構形

- 以人類血清白蛋白(human serum albumin)為例
Mr 64.500 kDa, 585 胺基酸 residues in a single chain

3. 三級結構

指已具有二級構造的多肽，因**胺基酸側鏈間的交互作用**而折疊扭轉成特有的緊密立體形狀

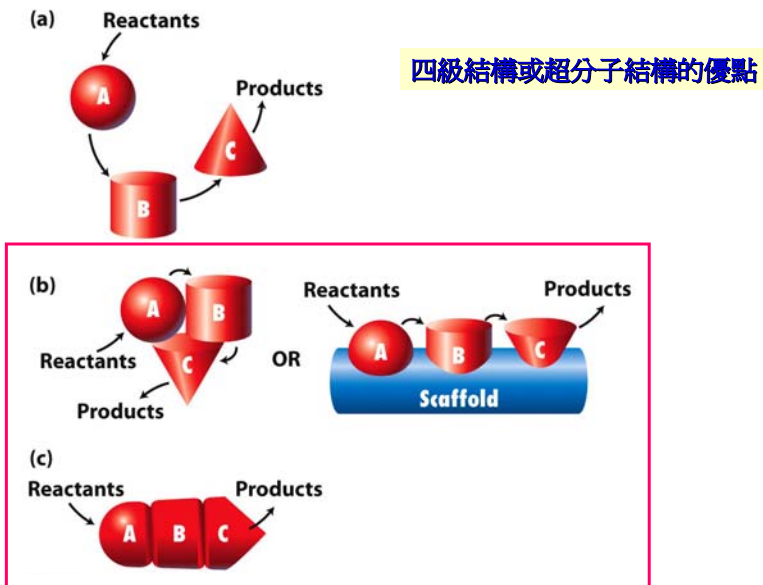
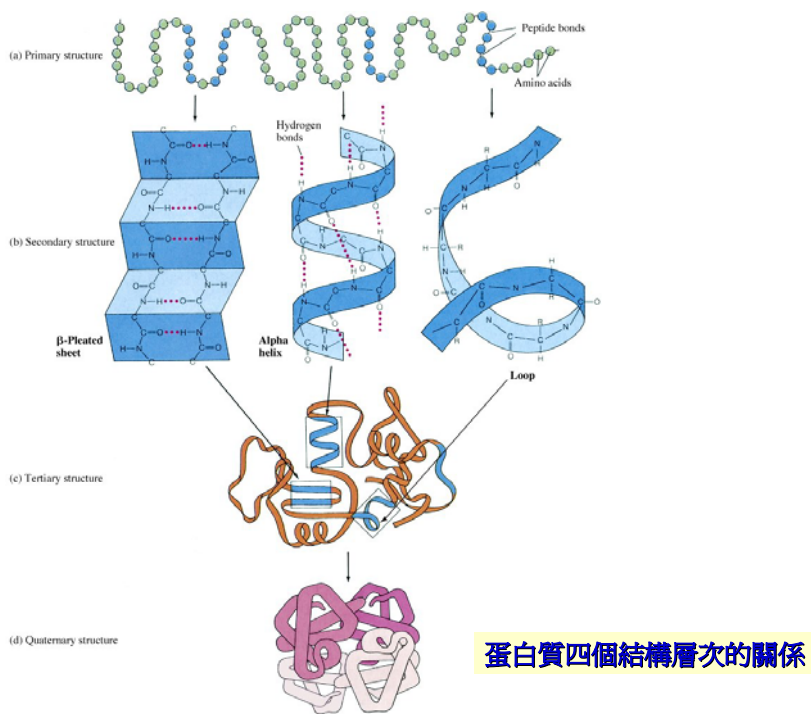
4. 四級結構

當具有生物功能的蛋白質*是由兩條或兩條以上的多肽(次單元)組成時，次單元在立體空間的相互關係形成四級構造的優點

- 增加結構安定性
- 遺傳物質能有效利用
- 形成功能或活性部位
- 調節與協同效應

TABLE 3-2 Molecular Data on Some Proteins

	<i>Molecular weight</i>	<i>Number of residues</i>	<i>Number of polypeptide chains</i>
Cytochrome c (human)	13,000	104	1
Ribonuclease A (bovine pancreas)	13,700	124	1
Lysozyme (chicken egg white)	13,930	129	1
Myoglobin (equine heart)	16,890	153	1
Chymotrypsin (bovine pancreas)	21,600	241	3
Chymotrypsinogen (bovine)	22,000	245	1
Hemoglobin (human)	64,500	574	4
Serum albumin (human)	68,500	609	1
Hexokinase (yeast)	102,000	972	2
RNA polymerase (<i>E. coli</i>)	450,000	4,158	5
Apolipoprotein B (human)	513,000	4,536	1
Glutamine synthetase (<i>E. coli</i>)	619,000	5,628	12
Titin (human)	2,993,000	26,926	1



5. 超分子結構(supermolecular organization)

細胞內不同的蛋白質(具有三級或四級構造)因行使功能而產生交互作用的實際狀態

例子

- DNA複製體(replisome)
- 蛋白質降解體(proteasome)
- 轉錄體(transcriptosome)
- 凋亡體(apoptosome)
- 發炎體(inflammasome)
- ATP合成體(ATP synthasome)
- 呼吸體(respirasome)

6. 維持蛋白質結構的作用力

共價作用力，如一級構造中的肽鍵與三級結構中的雙硫鍵*

非共價作用力，如二，三，四級結構中的氫鍵、離子鍵、凡得瓦爾力與疏水作用

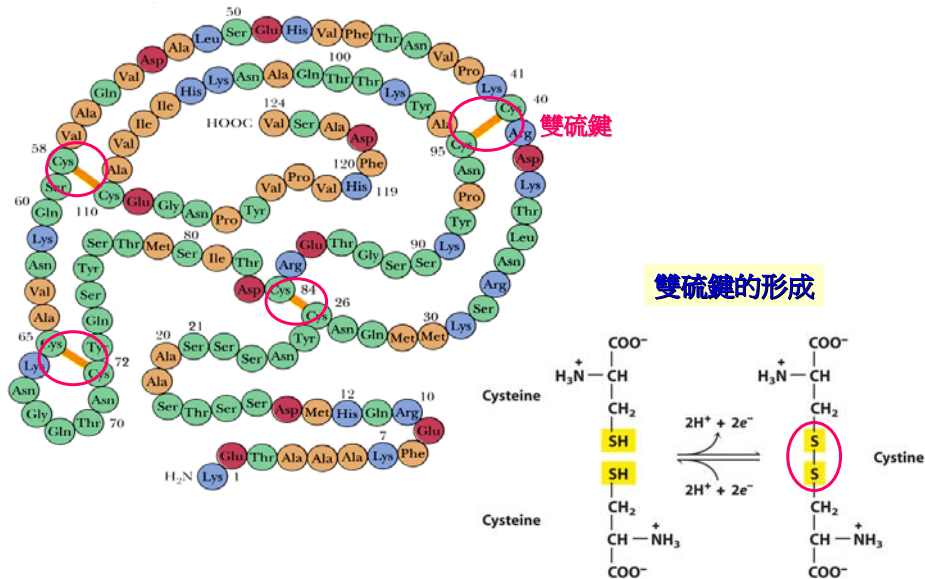
- 為弱的作用力，因此大部份蛋白質只能在溫和的環境(溫度, pH值)中發揮功能

7. 蛋白質的變性(denaturation)

蛋白質因維持結構的作用力受破壞而失去特有的結構與活性

- 通常是蛋白質特有的形狀遭受破壞，因此蛋白質變性有時是可逆的

牛胰臟分泌的RNase由124個胺基酸組成, 含有4個雙硫鍵

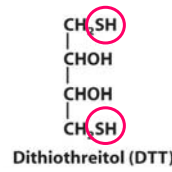
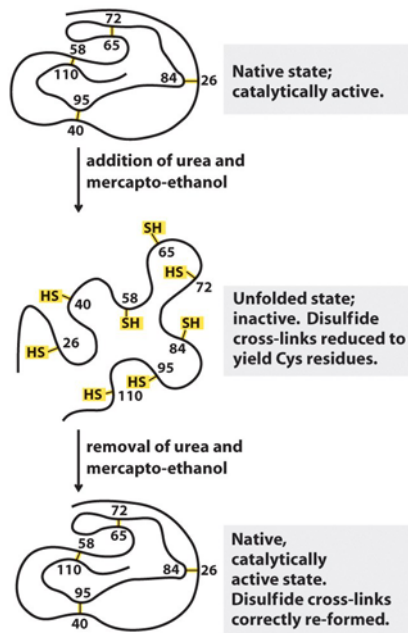


8. 蛋白質結構與功能的密切關係

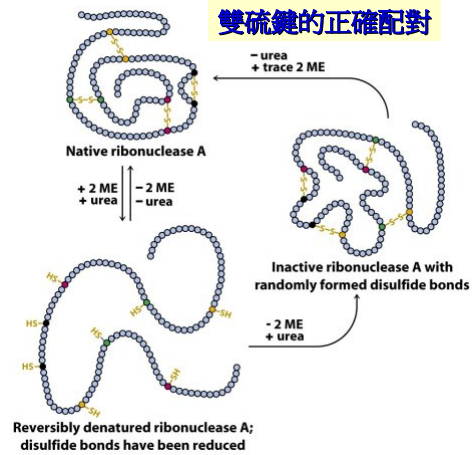
由Anfinsen等人以核糖核酸水解酶(RNase)進行一系列的實驗證明

- RNase*含124個胺基酸, 有4個雙硫鍵
- 以還原劑及尿素處理RNase*
雙硫鍵被還原, 非共價作用力被破壞
- RNase發生“變性”, 喪失水解RNA的活性
- 在適當條件下移除還原劑及尿素時, RNase的活性可完全恢復
重新折疊的RNase, 所測得的物理或化學特性均和原來酵素相同

Anfinsen等人的實驗



雙硫鍵的正確配對



Anfinsen等人的實驗

- 所有的處理皆不會破壞連接各胺基酸間的共價鍵結，即蛋白質的一級構造不受影響
- 提出“蛋白質的一級構造決定蛋白質特定的立體構形”與“蛋白質的功能與其特有的構形有關”的論點
- 確立蛋白質結構與功能的關係，促進以生物分子為基礎探討演化過程的研究
- Anfinsen等人獲得1972年諾貝爾化學獎

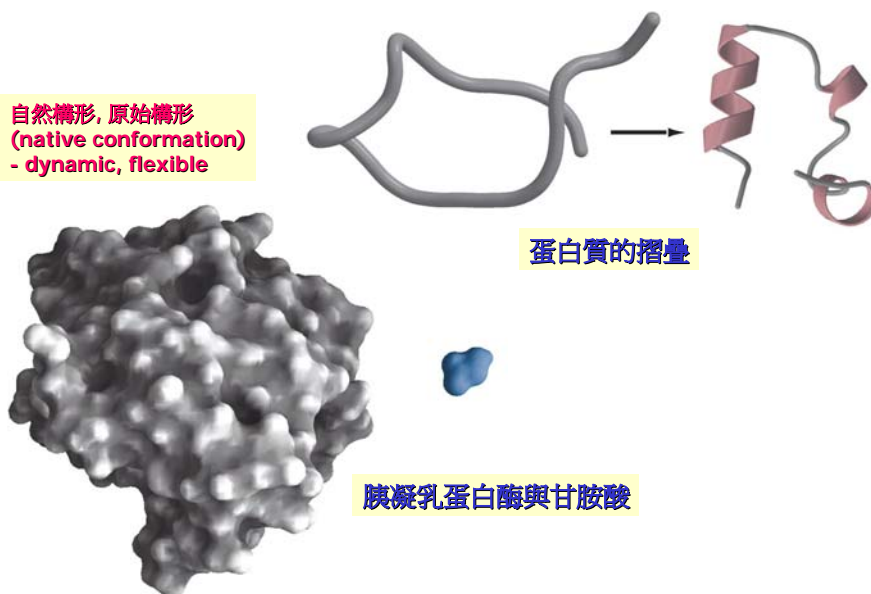
9. 蛋白質立體構造的摺疊

Anfinsen等人的實驗提出“**All of the information necessary for folding the peptide chain into its “native” structure is contained in the amino acid sequence of the peptide**”

蛋白質特有構形的形成*

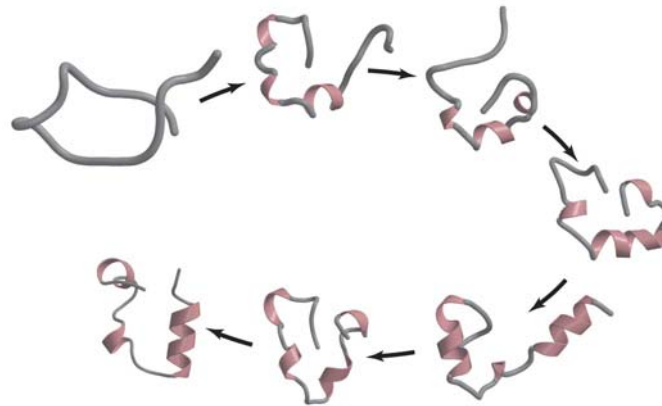
- Levinthal's paradox (1968年)

假設一蛋白質含有100胺基酸，若每一個胺基酸只有兩種可能的空間分佈情形，則此蛋白質的構形有 2^{100} 個可能性，如測試每一種可能性需 10^{-13} 秒，則需 4×10^9 年，但 *in vivo* 卻只需 ~ 5秒



摺疊的過程*

- 以overall **energy minimum**為準則
- 摺疊的驅動力(driving force)
 - 亂度(entropy)
 - 疏水的胺基酸側鏈
- 漏斗模式(funnel model)*
Energy landscape (能量圖景，位能鳥瞰)
二級構造 → 功能區域



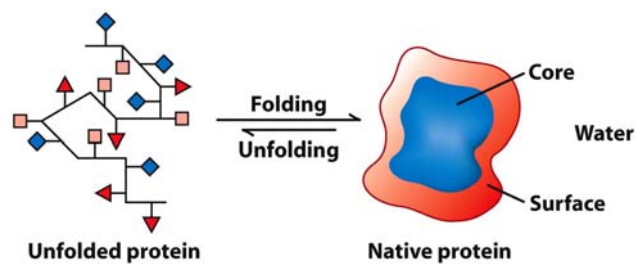
模擬的蛋白質摺疊過程

- 含36個胺基酸的蛋白質villin片段(為actin接合蛋白, 存於小腸的microvillin lining)
- 模擬的摺疊過程需耗時1 msec



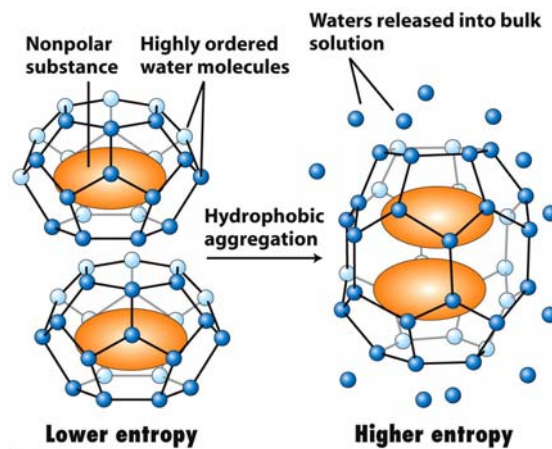
Substantial exclusion of water
 - Occurs very early in the folding process

The funnel represents a free energy surface or energy landscape for the folding process, the folding process is **highly cooperative, rapid** and reversible formation of **local secondary structures** followed by a slower phase to establish the partially folded intermediates that leads to the final tertiary structure



蛋白質摺疊的油滴模式

- The hydrophobic residues of a polypeptide chain tend to cluster together, somewhat like an oil drop, on the inside, or core, of a folded protein, driven away from the aqueous surroundings by the **hydrophobic effect**
- The charged and uncharged polar side chains appear on the protein's surface where they can form stabilizing interactions with surrounding water and ions



疏水效應

10. 參與摺疊的蛋白質

蛋白質在合成後，並非皆能及時自發摺疊成正確構形，其快速且正確的摺疊需許多其他蛋白質的協助

分子伴護蛋白 (molecular chaperones)

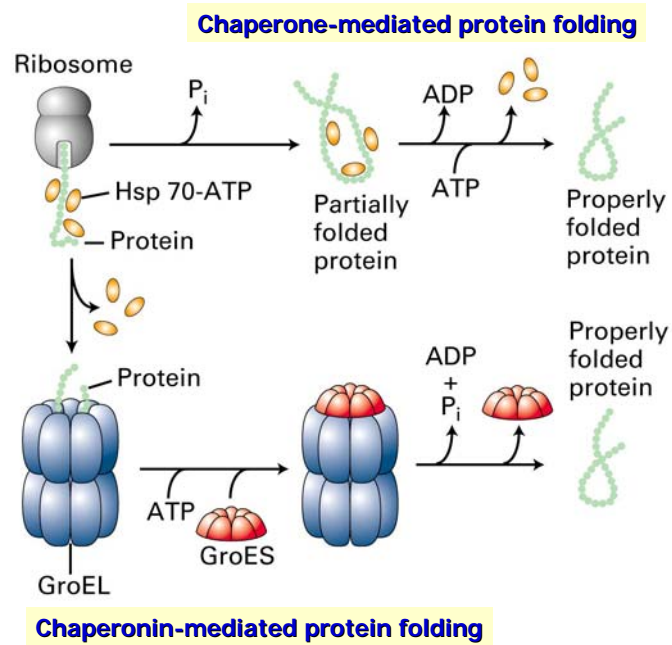
- 伴隨蛋白或伴從蛋白 (chaperones, 被動角色)*

會與未摺疊或部份摺疊的蛋白質接合，以避免其黏集或被降解

in vivo 的實驗顯示是蛋白質正確摺疊及形成四級構造所必需，如Hsp70s (熱休克蛋白70)

- 伴護蛋白 (chaperonins, 主動角色)*

會直接促進蛋白質的摺疊，如Hsp60



其他蛋白

- Protein disulfide isomerase (PDI)

雙硫鍵的正確配對

- Peptide proyl *cis-trans* isomerase (PPI)

脯胺酸

11. 與蛋白質摺疊缺失有關的疾病

普昂疾病 (the prion disease)

- Prion (**proteinaceous infectious only**)

Prusiner, 1997年諾貝爾生醫獎

纖維囊腫 (cystic fibrosis)

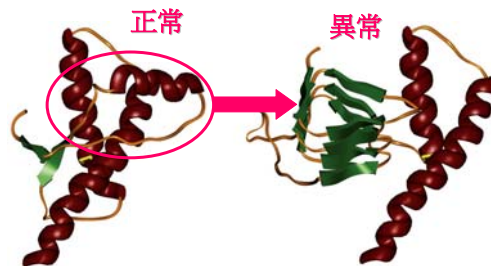
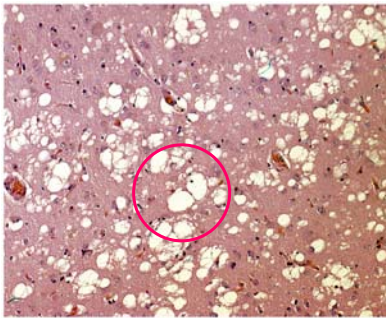
- Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

因胺基酸 (F508) 刪除突變，導致摺疊過程的中間產物
無法自伴隨蛋白脫離，CFTR無法抵達其最終作用場所
肺氣腫 (emphysema)

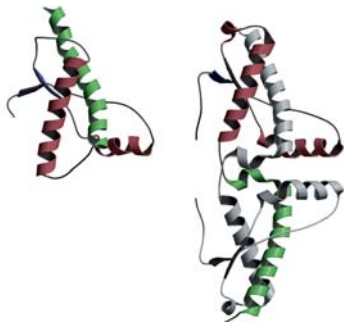
- α_1 -Antitrypsin

彈力蛋白，elastase

Stained section of cerebral cortex from autopsy of a patient with C-J disease shows spongiform degeneration



The propagation of infectious prion protein
Occurs via conversion of normal prion protein
(left) to a disease-causing form (right)



人類PrP蛋白單體(左)與雙聚體(右)形式

《蛋白質結構與功能關係的研究實例》

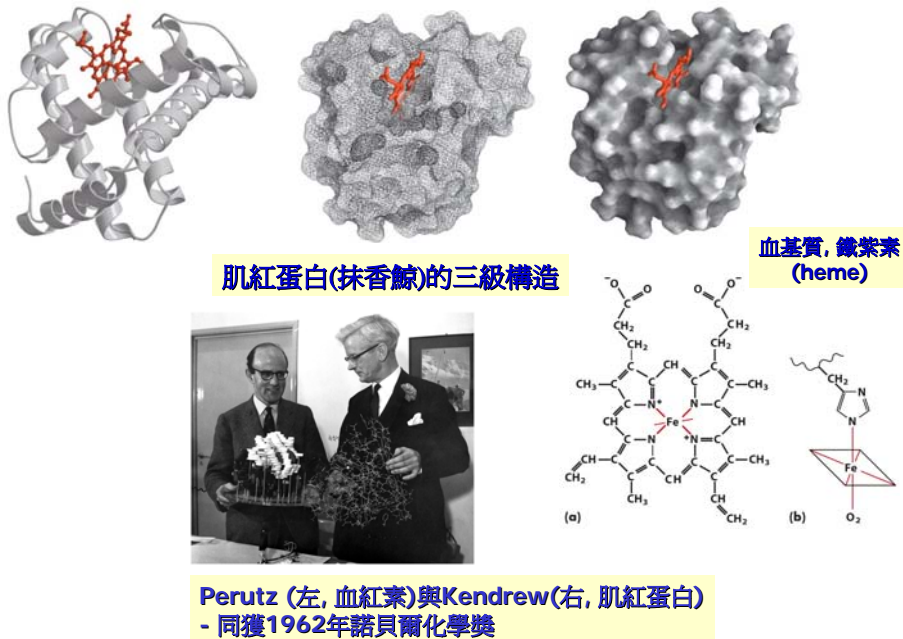
1. 肌紅蛋白與血紅素

肌紅蛋白(myoglobin, Mb)

- 負責肌肉細胞內 O_2 的輸送與儲存，屬功能性蛋白質，含153個胺基酸與血基質*

- 肌紅蛋白的結構*

由研判X光晶體繞射結果得知，整個分子為球狀，摺疊十分緊密，其中75%為 α -螺旋構造，血基質約位於分子中心並以所含的 Fe^{+2} 與 O_2 接合進行輸送及儲存 O_2 ，Perutz因解出結構的貢獻獲得1962年諾貝爾化學獎



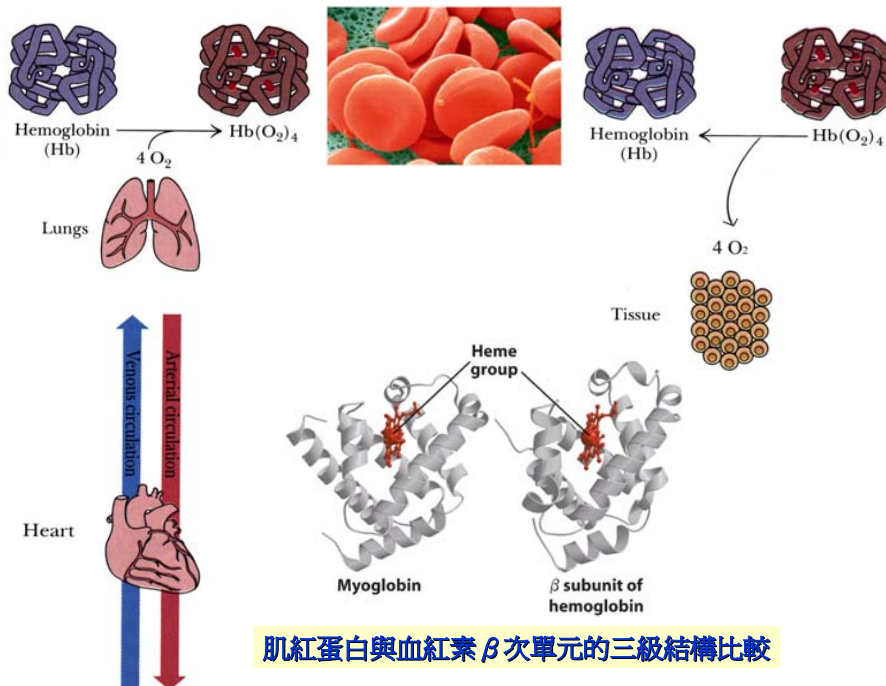
血紅素(hemoglobin, Hb)

- 在肺與組織細胞間擔任 O_2 的輸送*
- 具有四級構造*

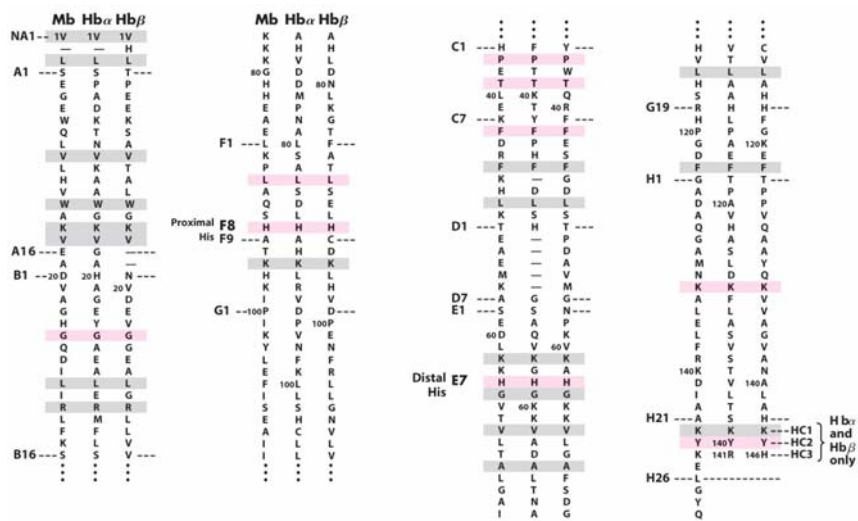
Kendrew因解出構造而與Perutz同獲諾貝爾獎

由兩個 α 次單元與兩個 β 次單元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)的分子中心，分別含血基質可與 O_2 接合

α 次單元與 β 次單元的結構雖非完全相同但極類似，且其個別的立體構造也均與肌紅蛋白類似*，顯示高度相似的立體結構與其同為攜氧蛋白的功能有關



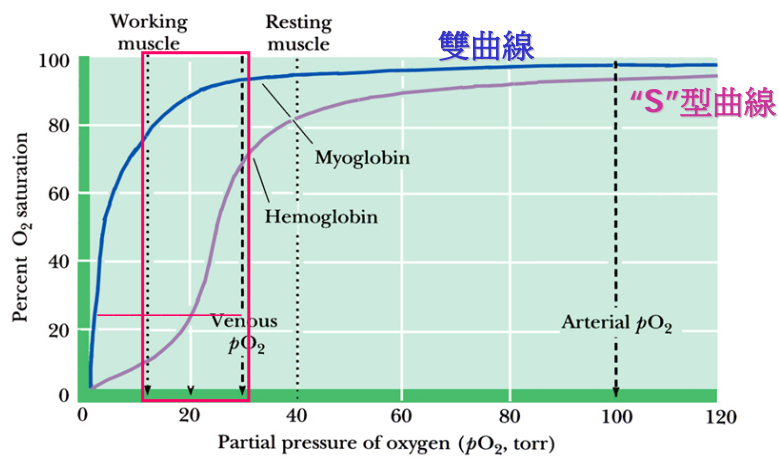
肌紅蛋白與血紅素 β 次單元的三級結構比較



鯨魚肌紅蛋白與人類血紅素 α 次單元與 β 次單元的胺基酸序列比對

血紅素四級構造對其功能的影響

- 不同的 O_2 濃度 (O_2 分壓, pO_2) 下, O_2 和血紅素的接合關係呈現 "S" 型曲線*, 與 O_2 與肌紅蛋白間的 "雙曲線" 型關係明顯不同
- 血紅素的 4 個次單元與 O_2 的接合具有正的協同作用, 即 O_2 與任一個次單元接合會加速 O_2 與其他次單元的接合



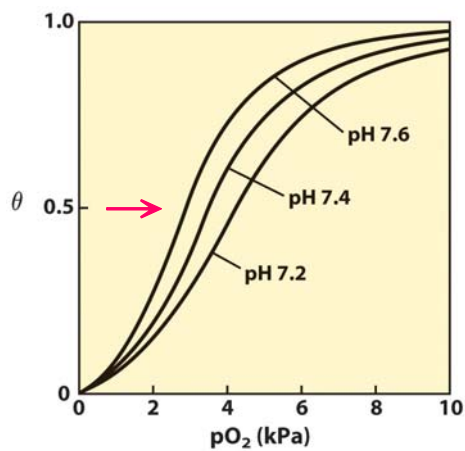
- 波爾效應

血紅素與 O_2 的接合亦受到 pO_2 與pH值的影響

pO_2 愈高，pH值愈高，血紅素被 O_2 飽和(接合)的程度愈高

在肺部， pO_2 與pH值均高，大部分血紅素均被 O_2 飽和
 在組織， pO_2 低且pH值因代謝產物及 CO_2 而降低時，
 血紅素與 O_2 的接合減弱，因而可因應組織的需求而
 釋出 O_2 供利用

相同條件下，肌紅蛋白不具有四級構造，其對 O_2 的
 接合不具協同作用，也不受 pO_2 或pH值的影響

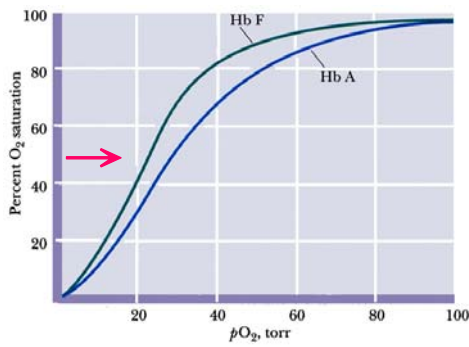


pH值對血紅素與O₂接合的影響

- 血紅素與O₂的接合可受2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG)的調控，對胎兒發育極為重要

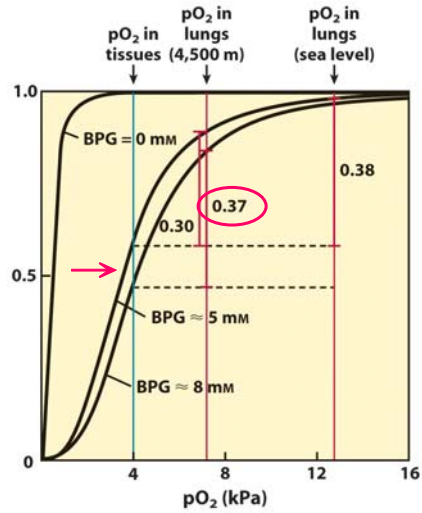
成人的血紅素(HbA, $\alpha_2\beta_2$)，2,3-BPG可接合至 β 次單元，使得成人血紅素對O₂的親和性較低

胎兒血紅素(HbF, $\alpha_2\gamma_2$)，無 β 次單元可與2,3-BPG可接合，不受2,3-BPG影響，對O₂的親和性較成人血紅素高

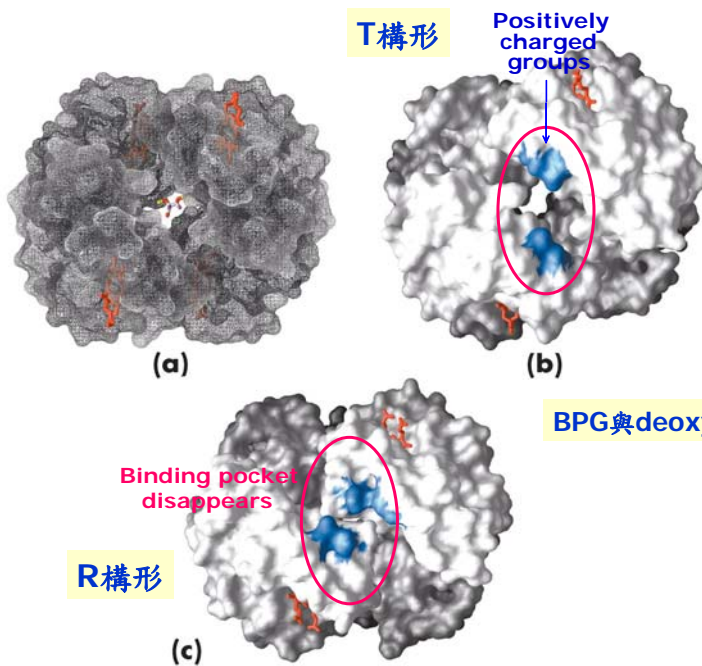


相同pH值與2,3-BPG濃度下，
HbA與HbF對氧分壓的飽和曲線

正常人類血液中BPG的濃度
 - ~ 5 mM at sea level
 - ~ 8 mM at high altitude



2,3-BPG對血紅素與O₂接合的影響



BPG與deoxy血紅素的接合

與血紅素相關的疾病

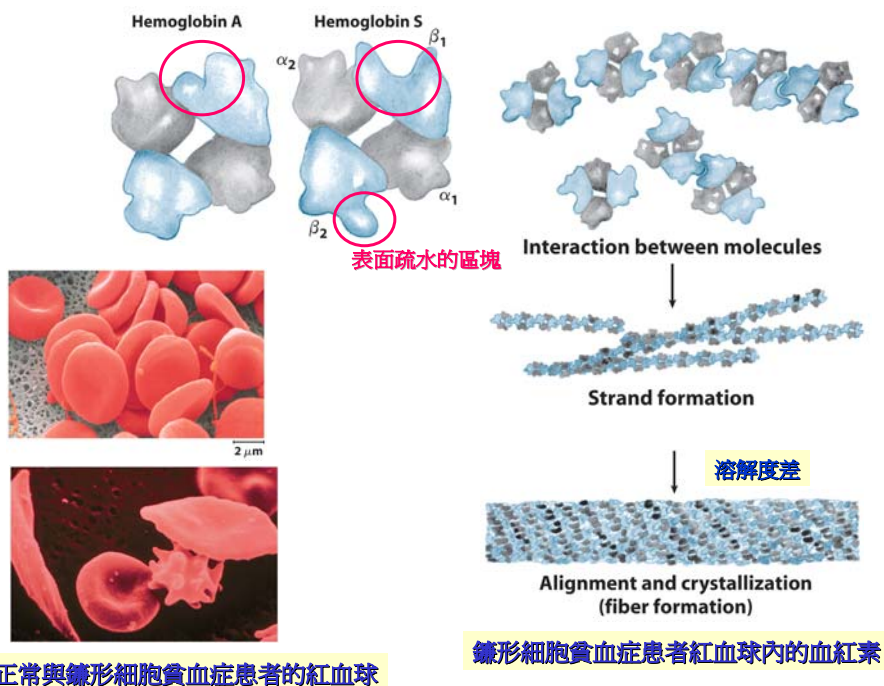
- 鎌形細胞貧血症 (sickle-cell anemia)*

由Pauling於1949年提出的“molecular disease”
Sickle-cell hemoglobin (HbS), 其 β 次單元的
Glu6 (側鏈帶負電) 置換為Val6 (側鏈為疏水)

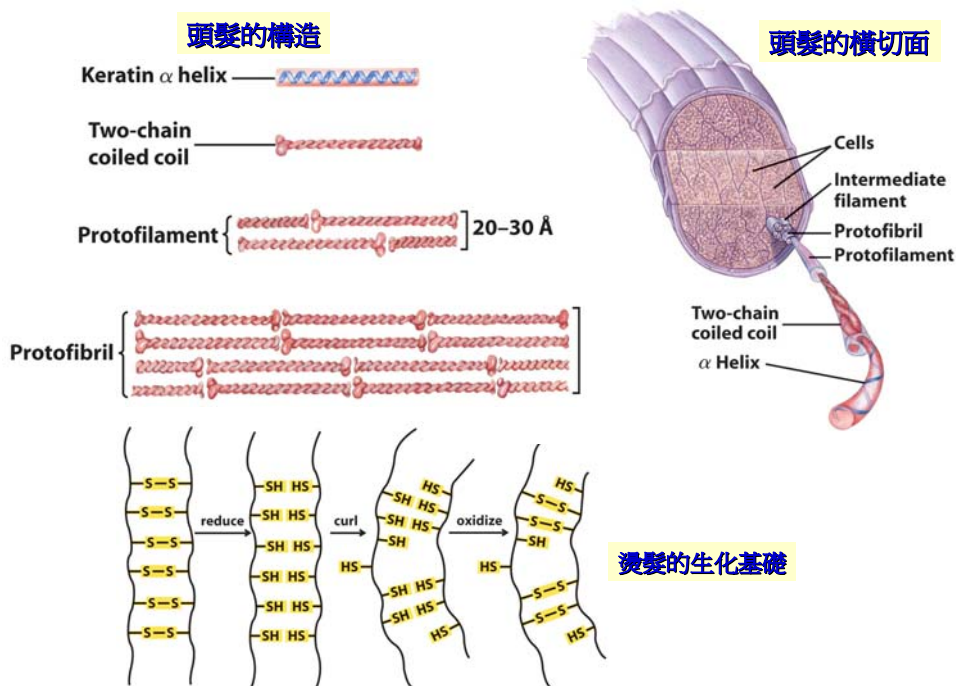
- 地中海型貧血症 (thalassemias)

α -thalassemias (甲型, β_4 或 γ_4), 其 α 次單元
有缺失

β -thalassemias (乙型), 其 β 次單元有缺失



2. 角蛋白，膠原蛋白與絲纖維蛋白
 均為扮演結構功能的纖維狀蛋白
 通常由規則性的二級結構組合形成特殊的構造
- 具有較強韌，較穩定的特性，符合擔任保護與支撐的生物功能
- 角蛋白
- 由兩股 α -螺旋相互纏繞形成coiled coils*
 - 一級構造具有(a-b-c-d-e-f-g)_n，其中a與d為非極性胺基酸
 - 頭髮的構造*
- 共價的cross-links
- 燙髮(permanent wave)的原理與所含的半胱胺酸(cysteine具-SH)有關



膠原蛋白

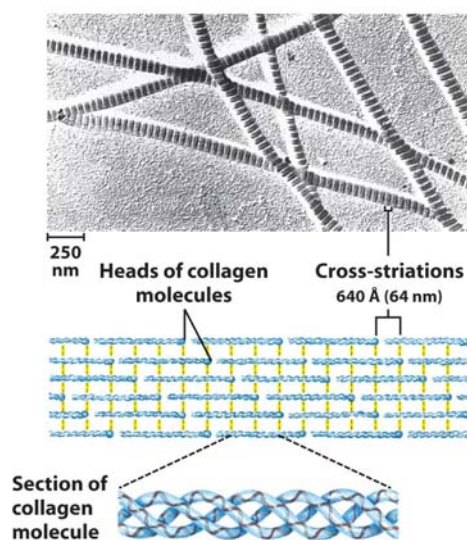
- 基本構造為特殊的三股螺旋狀構造*
- 甘胺酸(glycine)含量佔1/3且富含脯胺酸(proline)
- 一級構造具有Gly-X-Y序列，其中X為Pro，Y為Pro或Hyp (Gly佔35%，Pro或Hyp佔21%)

Hyp為Pro經轉譯後修飾作用加上-OH

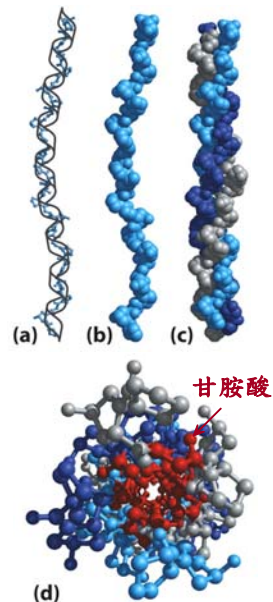
- 酵素活性仰賴維生素C (抗壞血酸)，維生素C嚴重缺乏會導致壞血病(scurvy)

Ehlers-Danlos syndrome

- 甘胺酸置換成側鏈較大的胺基酸，三股螺旋狀構造不穩定，與習慣性脫臼有關



膠原蛋白纖維的結構



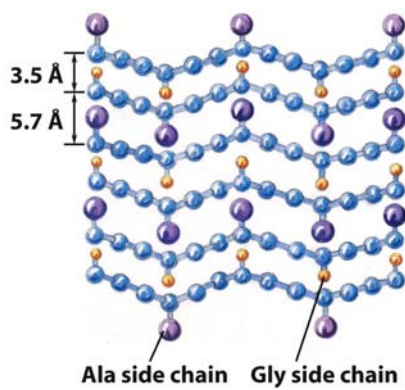
膠原蛋白的結構

絲纖維蛋白

- 為 β -褶片構造，層層相疊*
- 富含甘胺酸與甲胺酸(alanine)，且每兩個胺基酸就有一個甘胺酸出現

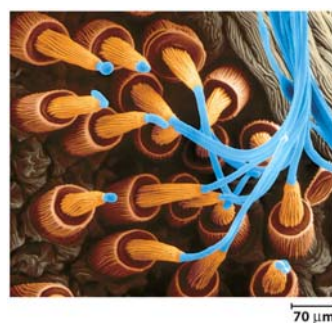
纖維狀蛋白會形成特殊的結構都是因具有特殊的一級結構，即特定的胺基酸組成與排列

- 再次驗證Anfinsen等人對蛋白質結構的形成與結構功能關係的論點



絲纖維蛋白為層層 β -褶片相疊的構造，富含甘胺酸Gly與甲胺酸Ala

絲的構造



《蛋白質構形的變化》

1. 蛋白質的構形

蛋白質分子為dynamic

球狀蛋白

- 分子振動，如胺基酸側鏈的擺動*等

Subtle，如“breathe”

- 構形變化(conformational change)*

Dramatic，與活性有關

例子

- 酵素與受質，血紅素與O₂

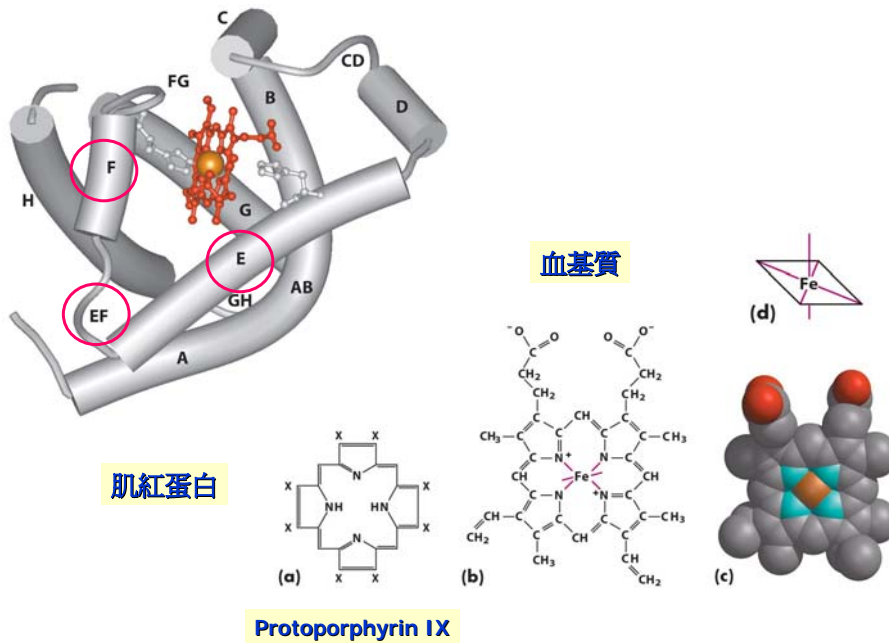
- 肌肉收縮時肌凝蛋白與肌動蛋白，Ca⁺²的角色

Motion and Fluctuations in Proteins			
Type of Motion	Spatial Displacement (Å)	Characteristic Time (sec)	Source of Energy
Atomic vibrations	0.01–1	10 ⁻¹⁵ –10 ⁻¹¹	Kinetic energy
Collective motions	0.01–5 or more	10 ⁻¹² –10 ⁻³	Kinetic energy
1. Fast: Tyr ring flips; methyl group rotations 2. Slow: hinge bending between domains			
Triggered conformation changes	0.5–10 or more	10 ⁻⁹ –10 ³	Interactions with triggering agent

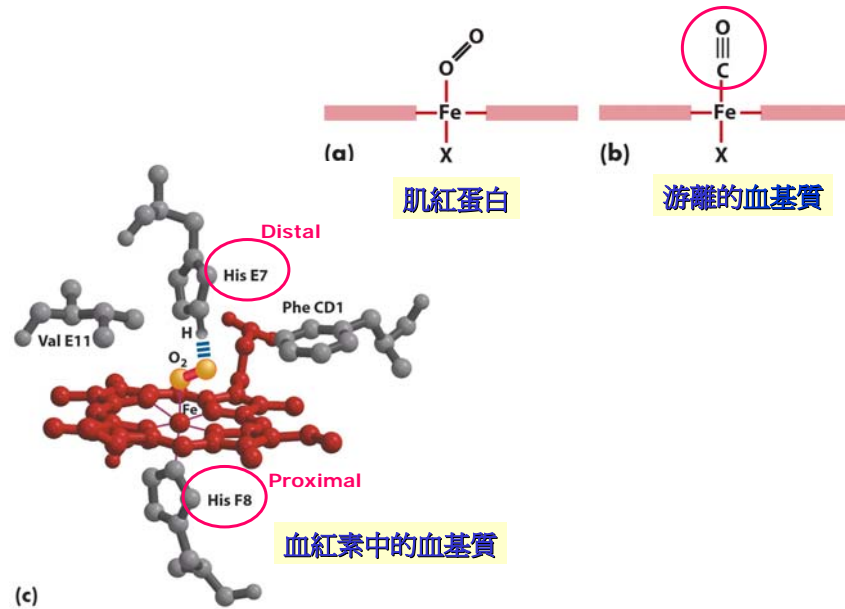
2. 氧的接合蛋白

肌紅蛋白(Mb)與血紅素(Hb)

- O₂的接合部位
鐵紫素或血基質(heme, Fe⁺²)
- 與O₂接合的能力受蛋白質結構影響
- 游離的血基質
CO的接合: O₂的接合 = 25,000 : 1
- 含血基質的蛋白(Mb, Hb)*
CO的接合: O₂的接合 = 200 : 1

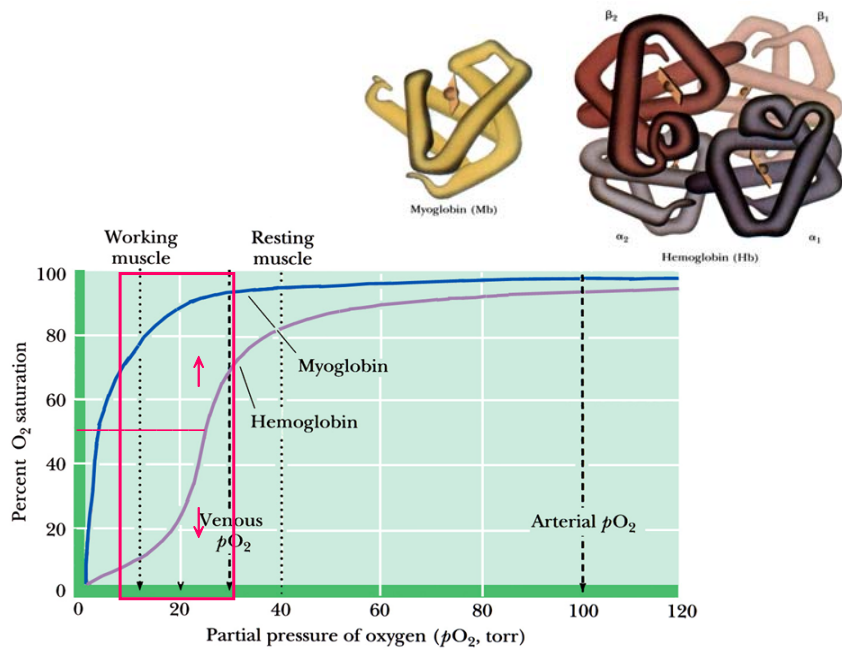


Steric effects caused by ligand binding to the heme of myoglobin



肌紅蛋白與血紅素的功能受結構影響

- 生物功能*
 - 氧的儲存：氧的輸送
- 結構*
 - 具三級構造：具四級構造($\alpha_2\beta_2$)
- 與氧的接合*
 - 無協同性(雙曲線)：具協同性("S"形曲線)
 - 不受調節：受調節



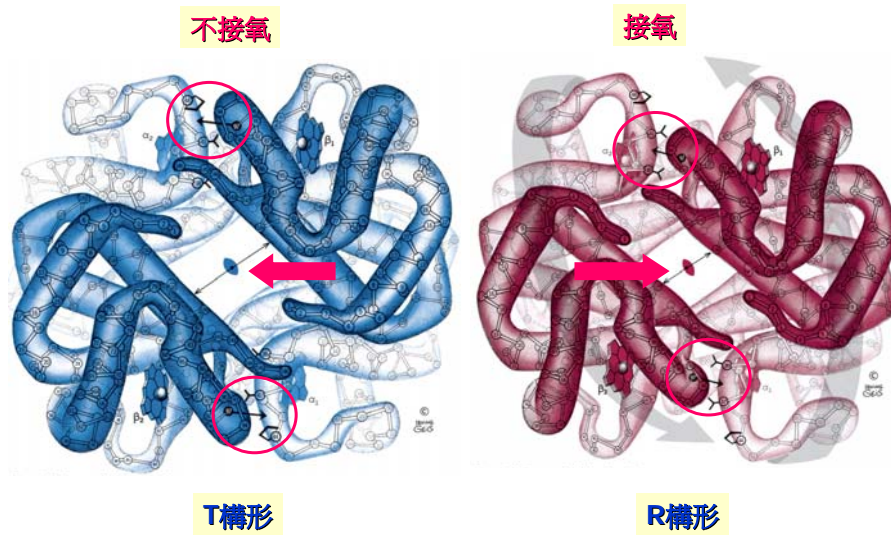
血紅素的構形變化*

- T構形(T state, tensed或taut)

分子結構較緊縮，不接氧的形式(deoxy form)，對 O_2 的親和力弱

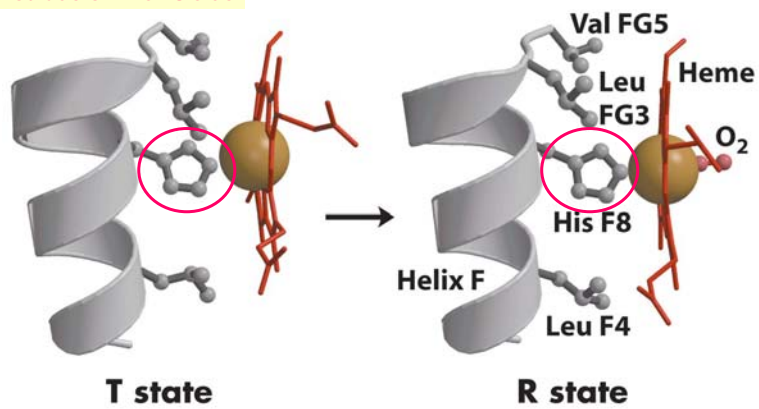
- R構形(R state, relaxed)

分子結構較膨鬆，接氧的形式(oxy form)，對 O_2 的親和力強



Prophyrin is slightly Puckered, heme iron protrude on His F8 side

Heme assumes a more Planar conformation, shift the position of His F8 and F helix



血紅素接O₂時血基質鄰近區域構形的改變

血紅素為異位蛋白(allosteric protein)

- Allos (希臘文意為other)，Stereos (希臘文意為shape)

- 活性部位

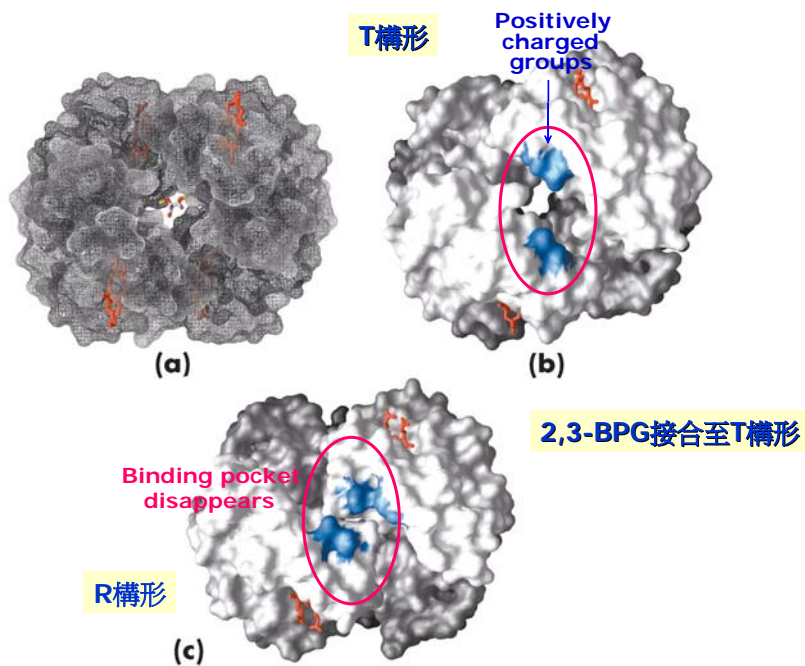
血紅素接 O_2 的部位，相當於酵素接受質的部位，與 O_2 的接合有協同性

- 調節部位

調節劑的接合部位

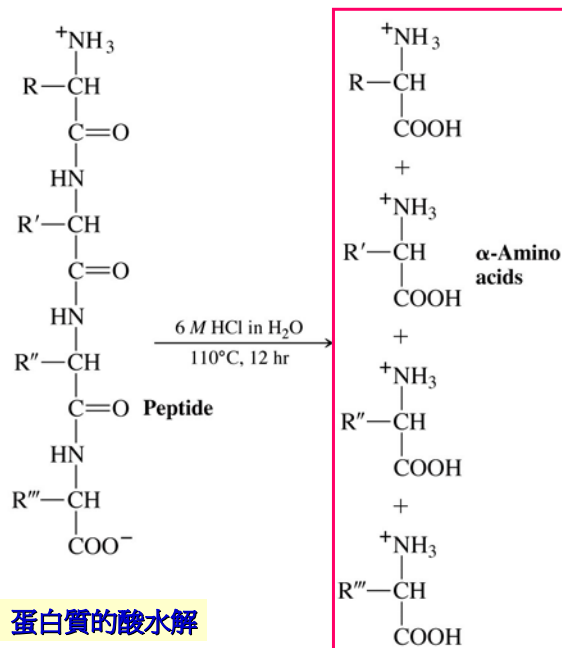
阻礙劑，如2,3-BPG、 H^+ 、 CO_2 等

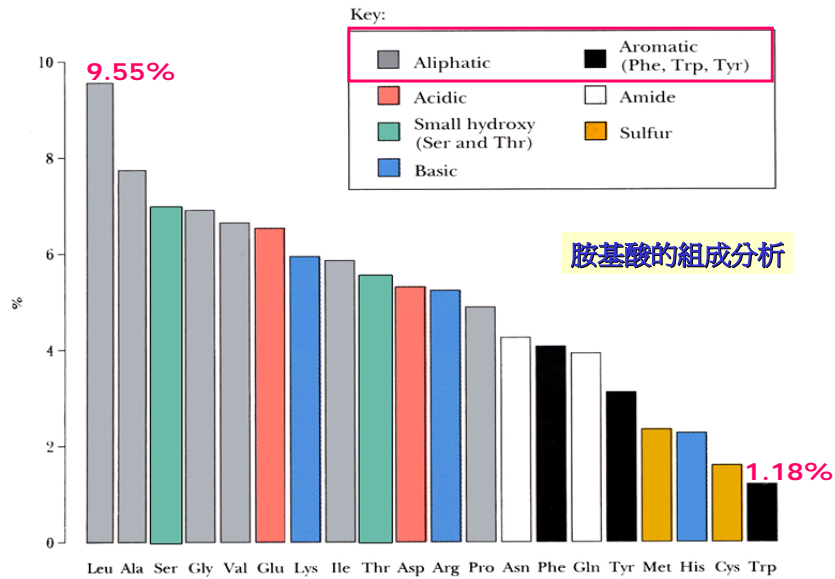
活化劑



《蛋白質結構的測定與預測》

1. 不同數目的胺基酸、不同的組成與排列可生成不同的蛋白質，不同的蛋白質因構造不同而有不同的生物功能，因此研究蛋白質的一級構造對蛋白質的功能研究日漸重要
2. 蛋白質一級構造的測定
求出多肽中胺基酸的組成與排列次序
 - 胺基酸的組成分析
蛋白質酸水解*
利用由1972年諾貝爾化學獎得主Stein & Moore所開發的胺基酸分析儀
胺基酸組成可提供的資訊*





胺基酸的組成分析: Frequencies of various amino acids in proteins
數據來自超過10萬個蛋白質的胺基酸組成, 共約4千萬個胺基酸
(the SWISS-PROT protein knowledgebase)

TABLE 3-3 Amino Acid Composition of Two Proteins

Amino acid	Number of residues per molecule of protein*	
	Bovine cytochrome c	Bovine chymotrypsinogen
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Total	104	245

細胞色素 c: 50/104 (48%)

Chymotrypsin: 126/245 (51%)

Aliphatic,
Aromatic
疏水性

*In some common analyses, such as acid hydrolysis, Asp and Asn are not readily distinguished from each other and are together designated Asx (or B). Similarly, when Glu and Gln cannot be distinguished, they are together designated Glx (or Z). In addition, Trp is destroyed. Additional procedures must be employed to obtain an accurate assessment of complete amino acid content.

Amino Acid Composition of Some Selected Proteins					
Values expressed are percent representation of each amino acid.					
Amino Acid	Proteins*				
	RNase	ADH	Mb	Histone H3	Collagen
Ala	6.9	7.5	9.8	13.3	11.7
Arg	3.7	3.2	1.7	13.3	4.9
Asn	7.6	2.1	2.0	0.7	1.0
Asp	4.1	4.5	5.0	3.0	3.0
Cys	6.7	3.7	0	1.5	0
Gln	6.5	2.1	3.5	5.9	2.6
Glu	4.2	5.6	8.7	5.2	4.5
Gly	3.7	10.2	9.0	5.2	32.7
His	3.7	1.9	7.0	1.5	0.3
Ile	3.1	6.4	5.1	5.2	0.8
Leu	1.7	6.7	11.6	8.9	2.1
Lys	7.7	8.0	13.0	9.6	3.6
Met	3.7	2.4	1.5	1.5	0.7
Phe	2.4	4.8	4.6	3.0	1.2
Pro	4.5	5.3	2.5	4.4	22.5
Ser	12.2	7.0	3.9	3.7	3.8
Thr	6.7	6.4	3.5	7.4	1.5
Trp	0	0.5	1.3	0	0
Tyr	4.0	1.1	1.3	2.2	0.5
Val	7.1	10.4	4.8	4.4	1.7
Acidic	8.4	10.2	13.7	8.1	7.5
Basic	15.0	13.1	21.8	24.4	8.8
Aromatic	6.4	6.4	7.2	5.2	1.7
Hydrophobic	18.0	30.7	27.6	23.0	6.5

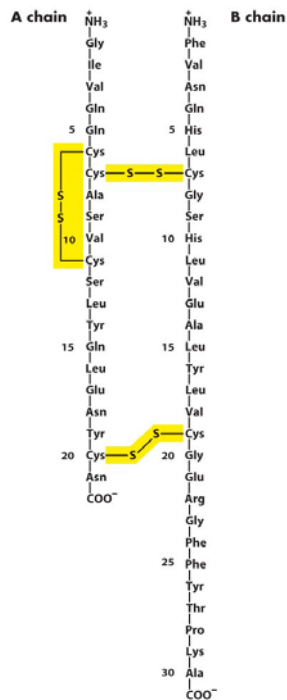
- 胺基酸的排列順序

利用胺基酸定序儀取得

Sanger* 因決定胰島素分子的構造並提出分析蛋白質一級構造的方法，而獲得1958年諾貝爾化學獎

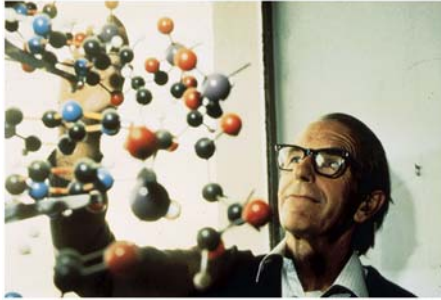
現今，大多數蛋白質的胺基酸序列可由基因的核苷酸序列推知，但一級構造的分析對研究蛋白質是否具有轉譯後的修飾作用仍深具價值

- Sanger 因提出分析DNA序列的方法再獲得1980年諾貝爾化學獎



牛胰島素的定序

- 耗時約10年, 使用約100克的蛋白質



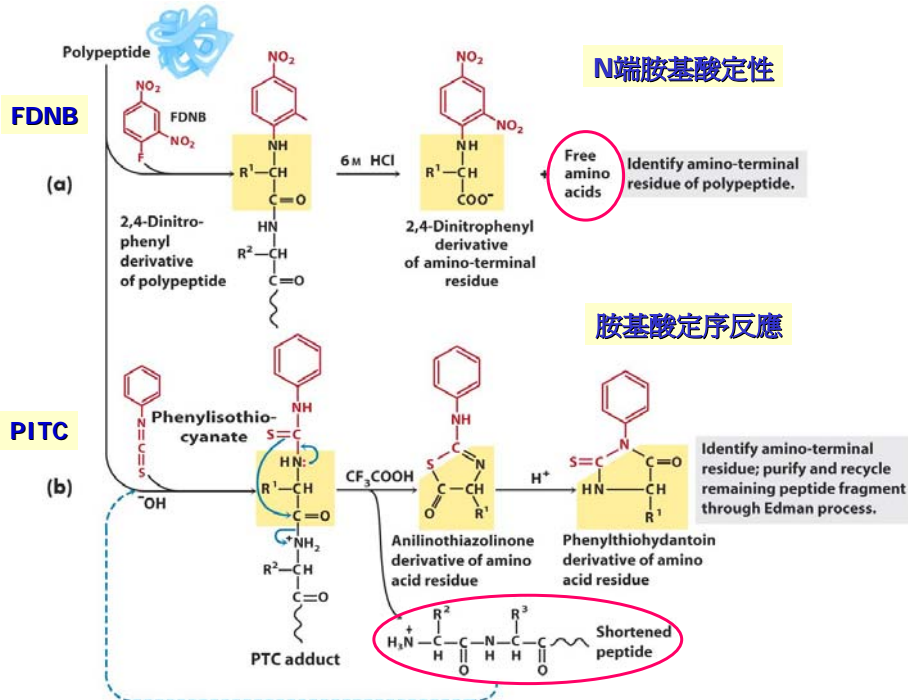
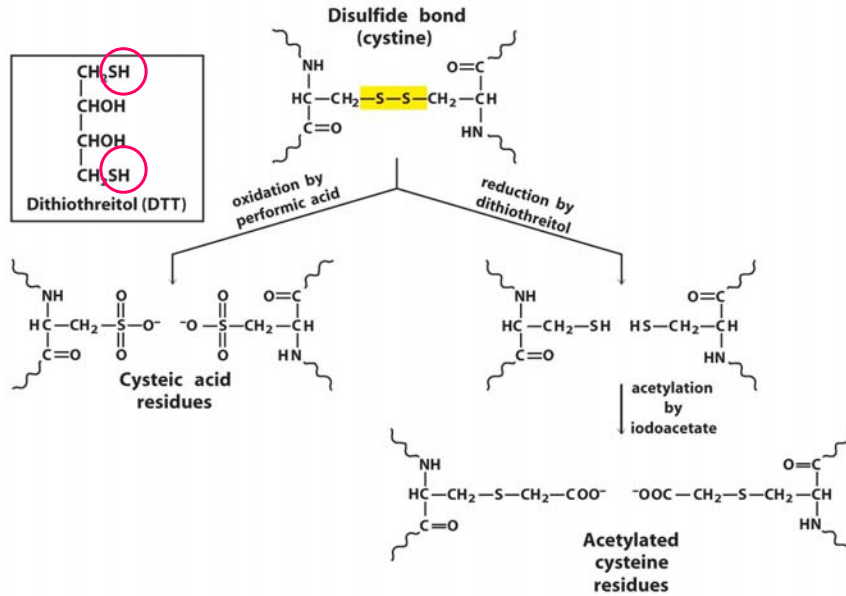
Frederick Sanger (1918~)

- 1958年諾貝爾化學獎(蛋白質定序)
- 1980年諾貝爾化學獎(DNA定序)

蛋白質定序步驟*

- 純化
- 次單元的分離
- N端與C端胺基酸的定性
- 多肽鏈分割成小片段
- 胺基酸自動定序
- 序列重組
- 雙硫鍵定位*

蛋白質雙硫鍵的破壞



專一性, 可預測

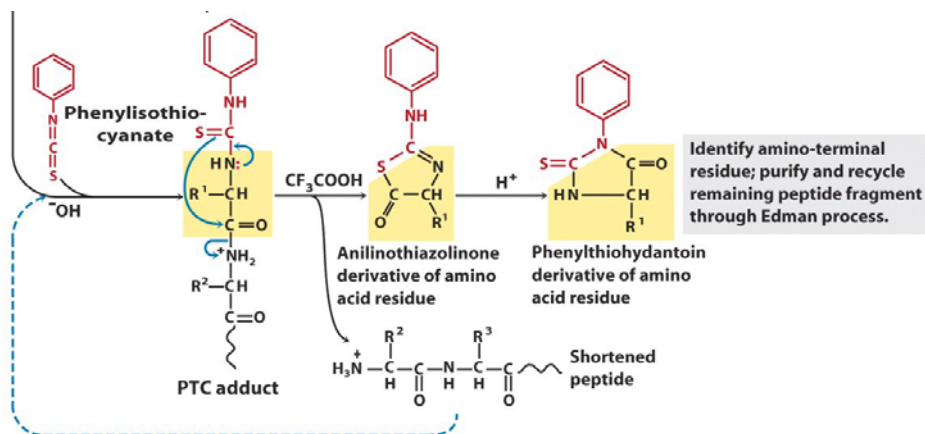
TABLE 3-7 The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

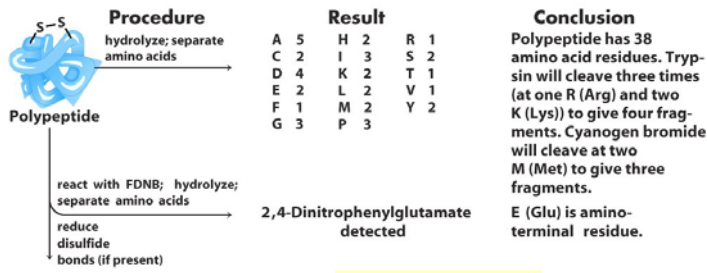
Reagent (biological source)*	Cleavage points†
Trypsin (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
Submaxillary protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease (bacterium <i>S. aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease (bacterium <i>Pseudomonas fragi</i>)	Asp, Glu (N)
Pepsin (porcine stomach)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C (bacterium <i>Lysobacter enzymogenes</i>)	Lys (C)
Cyanogen bromide	Met (C)

*All reagents except cyanogen bromide are proteases. All are available from commercial sources.

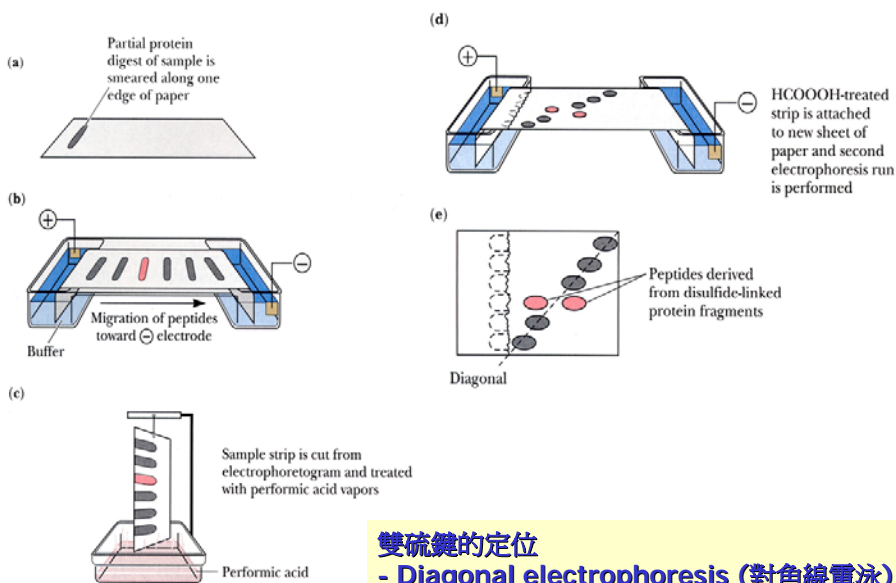
†Residues furnishing the primary recognition point for the protease or reagent; peptide bond cleavage occurs on either the carbonyl (C) or the amino (N) side of the indicated amino acid residues.

Edman degradation





蛋白質定序過程



其他定序方法

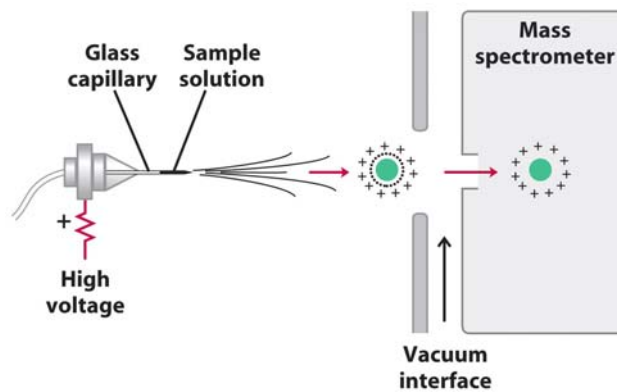
- 質譜分析法(mass spectrometry)*

離子化，質量電荷比(電場)

Fenn與Tanaka同獲2002年諾貝爾化學獎

- 生物資訊學

蛋白質的電噴灑質譜分析



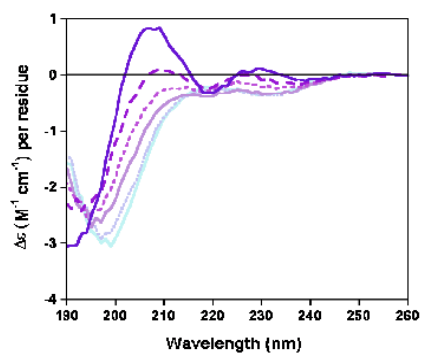
- (1) A Protein solution is dispersed into charged droplets by passage through a needle under a high-voltage electric field
- (2) The droplets evaporate and ions enter the mass spectrometer for m/z measurement

3. 二級、三級與四級結構的研究

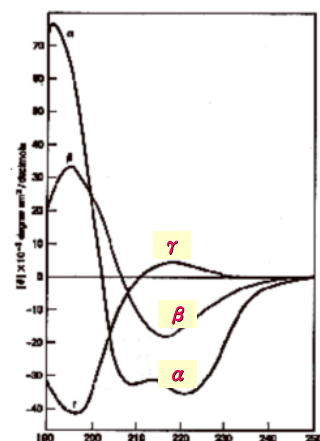
利用物理的方法

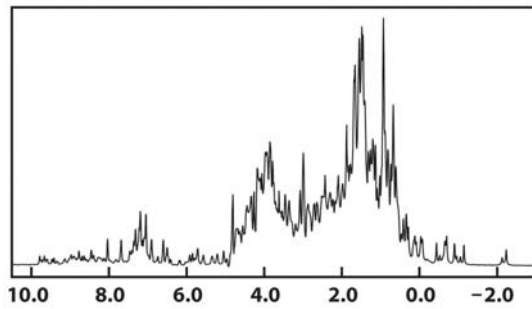
- 利用蛋白質分子對偏極光的轉向能力*或核磁共振*的原理，估測二級構造中 α -螺旋或 β -褶片的含量
- 利用X光繞射法*研究蛋白質結晶的構造，取得蛋白質的三級與四級結構等

CD光譜分析



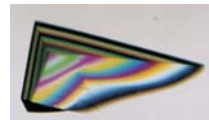
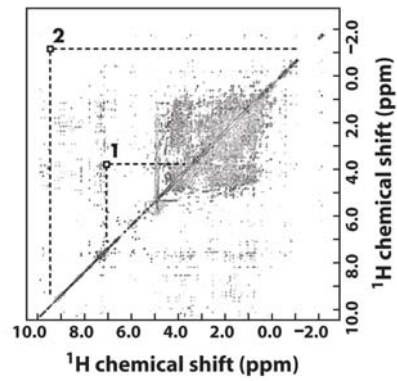
Standard



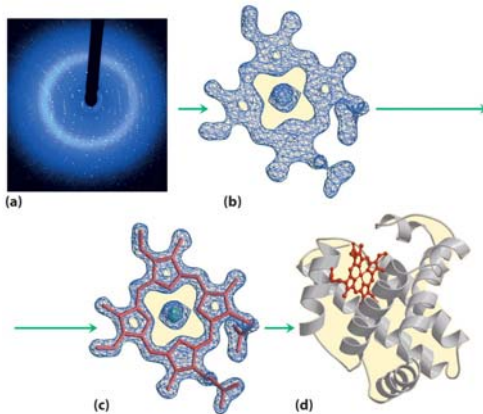
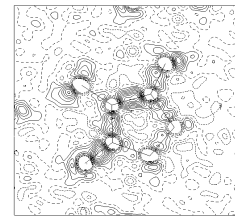
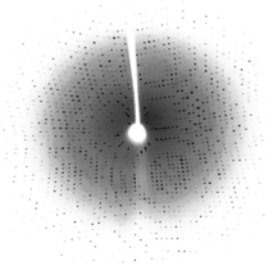
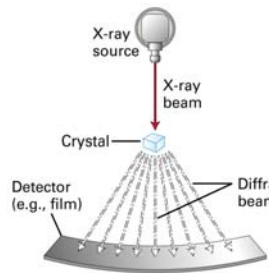


One-dimensional NMR spectrum of a globin from a marine blood worm

2D核磁共振圖譜



X光晶體繞射法



以X光晶體繞射法研究抹香鯨肌紅蛋白結構的過程

4. 蛋白質結構的預測

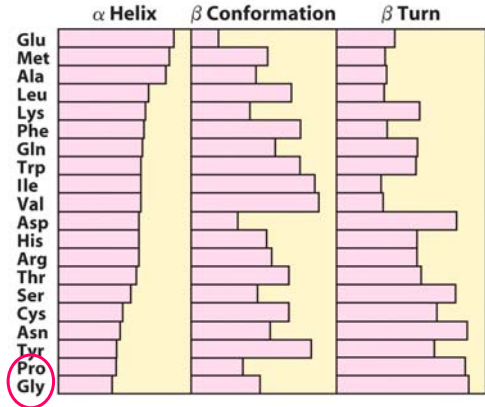
Anfinsen等人的實驗證明“蛋白質的一級構造決定蛋白質的立體結構”，而蛋白質的立體結構又與其功能息息相關

- 如能由蛋白質的一級構造預測蛋白質的立體結構，則蛋白質體計劃的研究將大大加速

由蛋白質的一級構造預測二級構造

- 目前多以分析已知結構的蛋白質中，各類二級構造所出現的胺基酸種類為準*
- 由Chou與Fasman於1974年提出
對每一種胺基酸出現在各類二級構造中的相對頻率給予特定數值(如 P_{α} , P_{β} , P_t)，經計算後可預測蛋白質的二級構造，此法經已知結構的蛋白質研究與預測結果比對驗證，其準確性可達95%以上

特定胺基酸出現在三種常見二級結構的相對機率



Helix-Forming and Helix-Breaking Behavior of the Amino Acids			
Amino Acid	Helix Behavior*		
A	Ala	H	(I)
C	Cys	Variable	
D	Asp	Variable	
E	Glu	H	
F	Phe	H	
G	Gly	I	(B)
H	His	H	(I)
I	Ile	H	(C)
K	Lys	Variable	
L	Leu	H	
M	Met	H	
N	Asn	C	(I)
P	Pro	B	
Q	Gln	H	(I)
R	Arg	H	(I)
S	Ser	C	(B)
T	Thr	Variable	
V	Val	Variable	
W	Trp	H	(C)
Y	Tyr	H	(C)

*H = helix former; I = indifferent; B = helix breaker; C = random coil; () = secondary tendency.

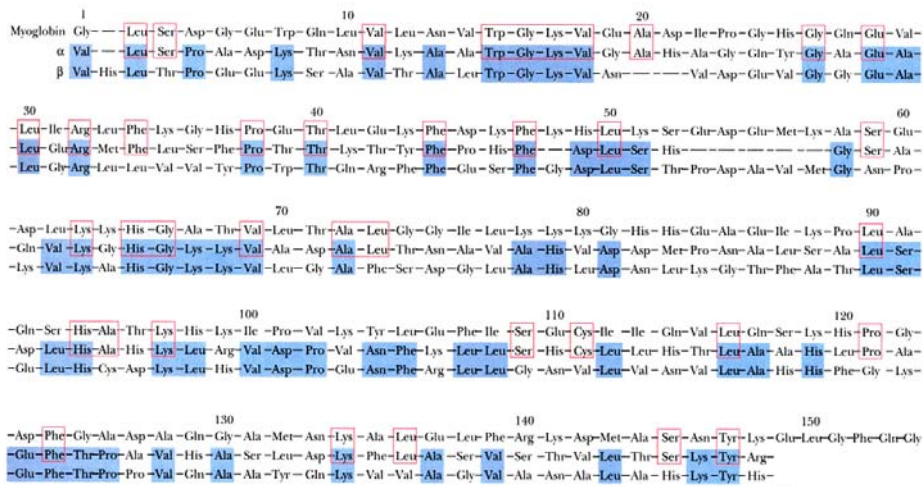
Chou-Fasman Helix and Sheet Propensities (P_α and P_β) of the Amino Acids				
Amino Acid	P_α	Helix Classification	P_β	Sheet Classification
A	1.42	H_α	0.83	i_β
C	0.70	i_α	1.19	h_β
D	1.01	I_α	0.54	B_β
E	1.51	H_α	0.37	B_β
F	1.13	h_α	1.38	h_β
G	0.57	B_α	0.75	b_β
H	1.00	I_α	0.87	h_β
I	1.08	h_α	1.60	H_β
K	1.16	h_α	0.74	b_β
L	1.21	H_α	1.30	h_β
M	1.45	H_α	1.05	h_β
N	0.67	b_α	0.89	i_β
P	0.57	B_α	0.55	B_β
Q	1.11	h_α	1.10	h_β
R	0.98	i_α	0.93	i_β
S	0.77	i_α	0.75	b_β
T	0.83	i_α	1.19	h_β
V	1.06	h_α	1.70	H_β
W	1.08	h_α	1.37	h_β
Y	0.69	b_α	1.47	H_β

三級構造的預測

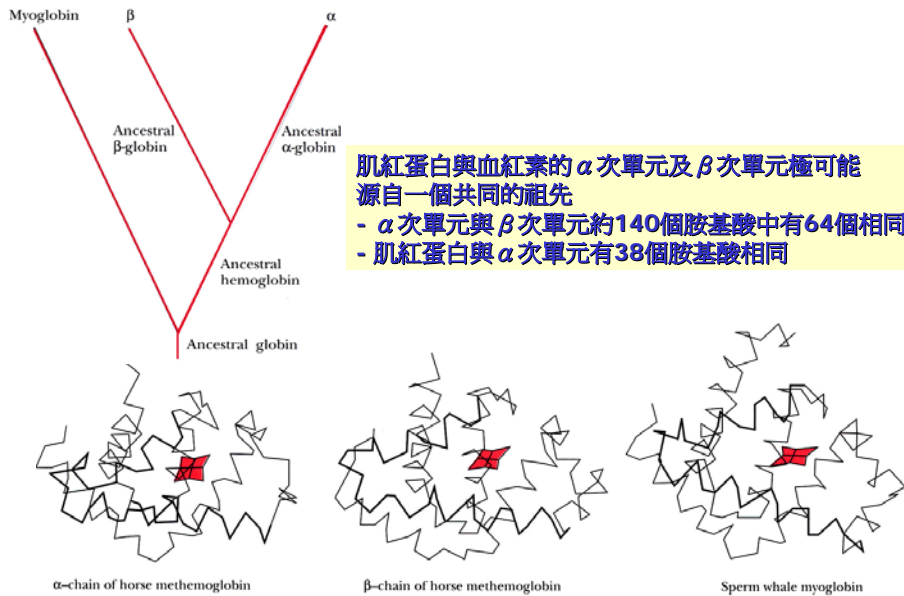
- 較為複雜，目前仍仰賴計算機龐大的資料存取與計算能力(computer-based calculation, 以 energy minimum為原則)，配合進一步分析已知結構的蛋白質中不同層級的細部構造(knowledge-based method, database)
- 尚未能精準有效的預測結果

《蛋白質的結構與演化》

1. 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)
肌紅蛋白與血紅素的研究即是一例
2. 肌紅蛋白與血紅素的研究
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，極可能源自於一個共同的祖先*
 - 一個原始的球蛋白



肌紅蛋白與血紅素的 α 次單元或 β 次單元的胺基酸序列比較



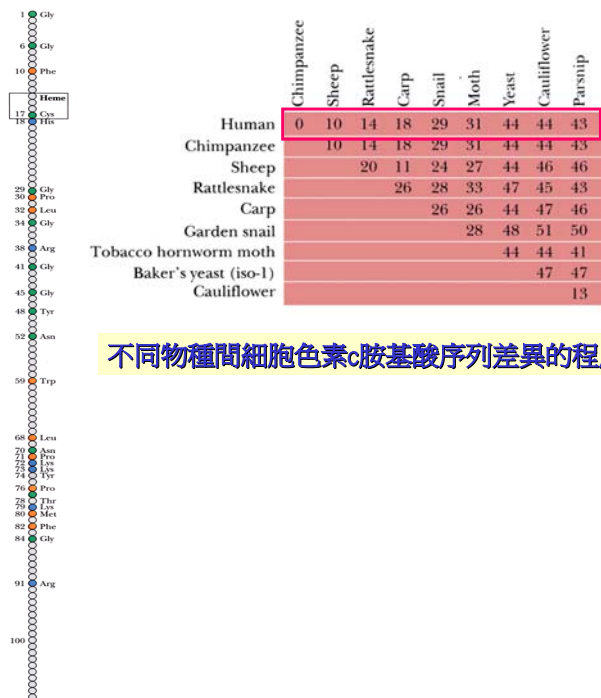
肌紅蛋白與血紅素的 α 次單元或 β 次單元的立體結構比較

3. 細胞色素c的研究

比較不同來源的細胞色素c的胺基酸序列，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，對細胞的存活極為重要
- 分析得自酵母至人類等40多種來源的細胞色素c，雖然蛋白質的一級構造不盡相同但卻有令人訝異的相似處

細胞色素c平均含有104個胺基酸，其中有28個完全相同*，目前已知此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皆會影響細胞色素c的功能



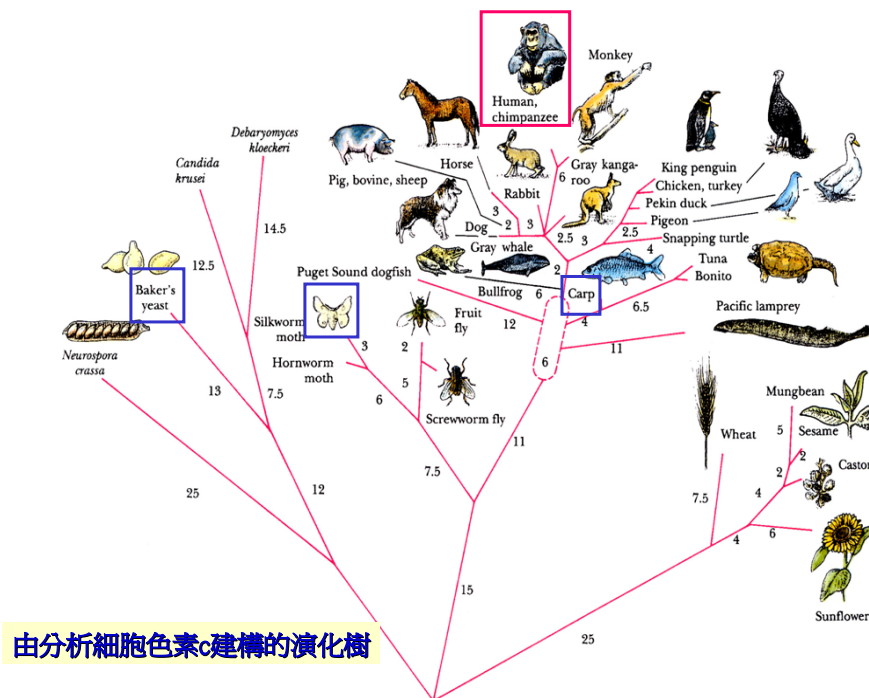
不同物種間細胞色素c胺基酸序列差異的程度比較

比較不同物種的細胞色素c的胺基酸序列，發現不同物種間的序列差異程度與其親緣關係有一定的比例關係*

- 如人的細胞色素c胺基酸序列與黑猩猩的完全相同，與其他哺乳類有10個胺基酸的差異，與爬蟲類有14個差異，與魚類、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

由分析細胞色素c的胺基酸序列差異所建構的“演化樹”(phylogenetic tree, 系統發生樹)與使用傳統方法所建立的演化關係極為符合*

- 衍生出利用分析特定蛋白質的胺基酸序列以建構演化關係的分子演化學
- 趨異演化(divergent evolution)
- 趨同演化(convergent evolution)



《蛋白質與其它分子的交互作用》

1. 蛋白質表現生物功能時需與其它分子有直接的接觸，此接觸通常是緊密、專一的、並且會形成複合體，如調控基因表現的核酸蛋白或細胞辨識的糖蛋白與細胞膜上的脂蛋白等
 此接觸雖然與細胞的繁殖、生長、發育等不同的活性有關，但其間的交互作用與專一辨識過程均十分相似
 - 與特定蛋白質產生專一性接合的分子統稱為親和基 (ligand)，如酵素的受質、產物、輔因子、阻害劑或活化劑，甚至運輸蛋白所輸送的物質等

2. 親和基的接合作用

特定蛋白質與親和基的接合通常具有專一性

- 專一性來自兩者構造的互補與兩者接合後可產生新的安定作用力

蛋白質與親和基之間的接合多經由非共價的作用力，為一可逆的過程

每個蛋白質與親和基的接合可發生在分子內的一個或多個部位

- 多個部位中，與同一種親和基接合的能力可能相同或不同，因此可產生接合協同性(cooperativity)，此種關係稱為同質性效應(homotropic effect)，如血紅素與 O_2 的接合

一個蛋白質分子內也可有不同種類的親和基接合部位

- 不同親和基接合部位在親和基接合時會有相互溝通的特性，此種關係稱為異質性效應(heterotropic effect)，如血紅素與 O_2 的接合受2,3-BPG與波爾效應的影響

3. 異位效應 (allostery)

蛋白質的不同部位之間的相互影響

- 為具有四級結構之蛋白質所特有
 - 具異位效應的蛋白質含有不同的次單元
 - 一為催化或活性次單元，是受質或反應物接合的部位
 - 一為調節次單元，是調節物接合的部位
- 當兩種不同親和基接合部位因親和基接合而引發構形改變，進而彼此溝通
- 血紅素攜氧特性與影響其攜氧能力的因子研究為此效應的最佳例子

《蛋白質活性的調節》

1. 影響蛋白質活性的因子

除溫度、pH值、受質、輔因子或調節劑濃度等外，尚有三個較為重要的機制

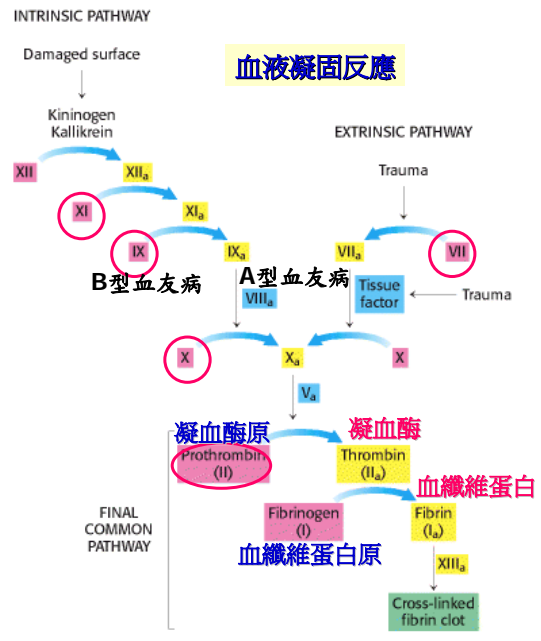
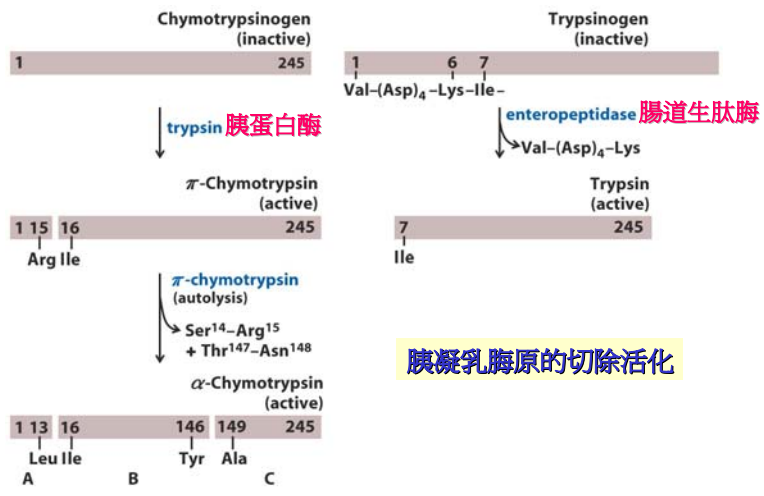
2. 切除活化

如消化酵素、凝血因子與一些激素

- 通常合成時是不具活性的先質 (precursors)

切除活化作用 *

- 當需要時會因一小段肽鏈被切除而具有活性，為一不可逆的調節方法

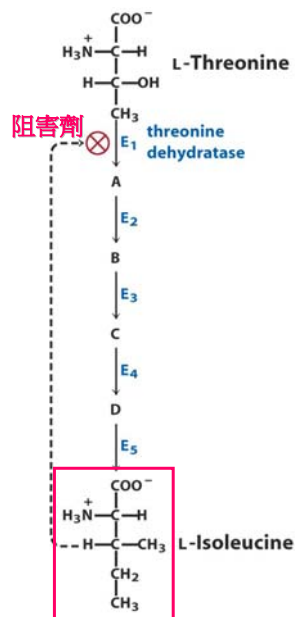


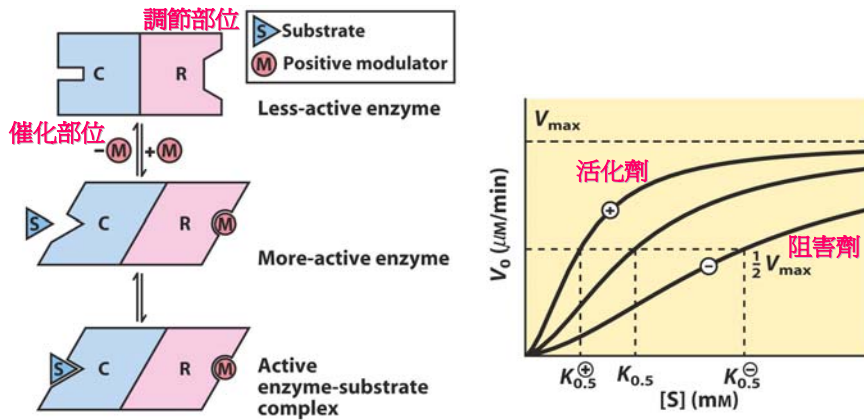
3. 異位調節

為多種代謝路徑中調節酵素或異位酵素的活性調控方式

- 代謝路徑的產物回饋抑制調控*
- 當調節劑接合到蛋白質的調節部位後，引發該部位的構型發生改變，此改變因四級結構中不同次單元的相互接觸而傳達到催化部位，因而改變催化部位的特性，使蛋白質的活性改變*

以酵素為例，較普遍的是改變酵素對受質的親和力 (K_m 值)，少數是改變酵素的催化效率 (V_{max} 值)





異位蛋白與調節劑接合後改變蛋白質(酵素)的活性

4. 共價修飾

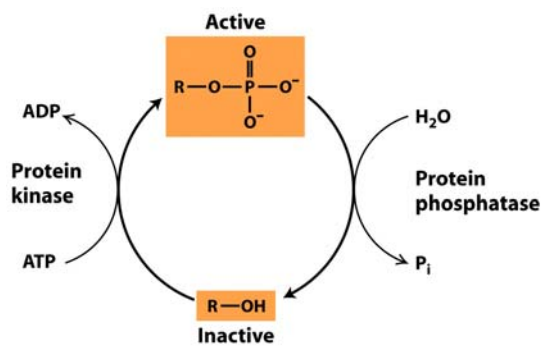
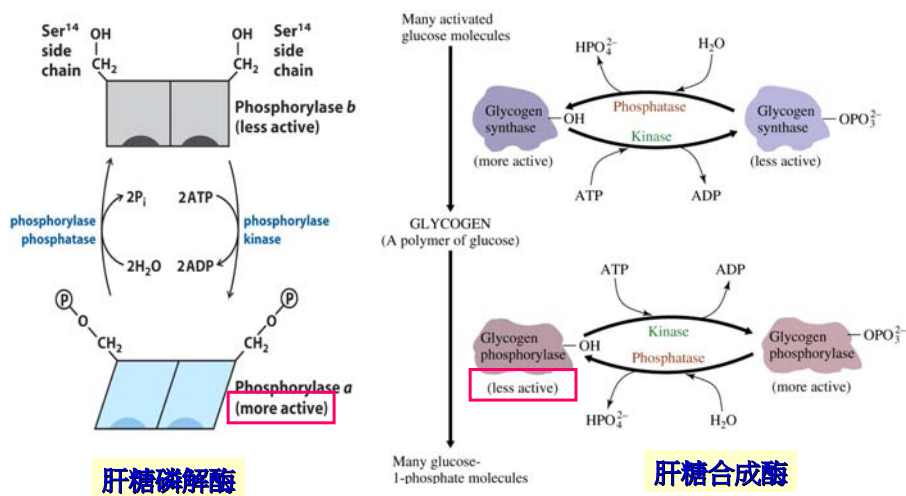
肝糖代謝的調控為最佳例子*

共價修飾作用

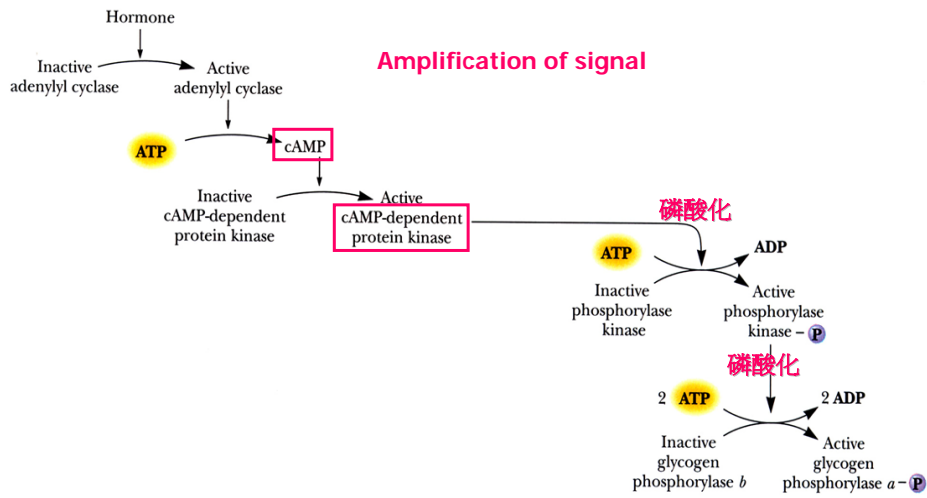
- 蛋白質因特定胺基酸被接上特定的化學基團後而改變其活性

此修飾作用屬共價鍵結的形成，因此活性變化之間需其它酵素參與*

- 此機制通常是細胞代謝受激素調節的方式，有訊號放大的效果



藉由蛋白質激酶與蛋白質磷酸水解酶調控蛋白質活性



5. 其他機制

與其他蛋白質的接合作用

- 蛋白質激酶A (protein kinase A, PKA)*

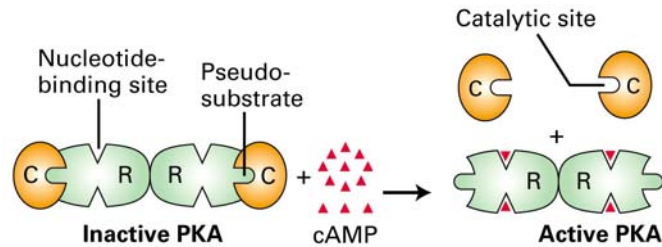
調節次單元的接合

- 受Ca²⁺調控的蛋白質或酵素

調鈣蛋白(calmodulin)

蛋白質的分佈(protein compartmentation或 localization)

- 葡萄糖運輸蛋白



蛋白質激酶A的活化

《蛋白質的新陳代謝》

1. 細胞內蛋白質的新陳代謝(分解)

蛋白質雖有許多驚人的特性，卻非“長生不老”，隨著“年紀”的增長，蛋白質會累積多種發生的化學反應而造成生物活性的喪失

- 如胺基酸支鏈的硫原子氧化，天門冬醯胺酸與麩醯胺酸鏈的去醯胺作用，碳的異構化作用，胺基與葡萄糖間非酵素的反應(最普遍)等
- 不正常或老化的蛋白質需持續被移走

特定蛋白質的量在細胞內為**動態平衡**

- 蛋白質是持續地被製造與被分解
 - 蛋白質持續地被分解
- 一般的新陳代謝，移除外來的蛋白質，對環境的調適
(如因應養份不足與不同發育階段的需求等)

2. 影響蛋白質分解速率的因子

蛋白質分解(水解)的過程

- 需能量的投入
- 具一級反應的動力特性
- 被分解的蛋白質分子是隨機選取

正常細胞內不同的蛋白質有不同的分解速率

- 蛋白質的半生期(**half-life**)
- 細胞內分解速率較快的蛋白質(半生期較短)
通常分子量較大，等電點為酸性，在細胞的新陳代謝中擔任關鍵的調節角色，在試管內對熱或蛋白酶的處理較敏感

哺乳類細胞內蛋白質的半生期

酵素或蛋白質種類	半生期(hr)
c-myc, c-fos, p53 oncogene products	0.5
RNA polymerase I	1.3
Tyrosine aminotransferase	2.0
Deoxythymine kinase	2.6
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	5.0
Aldolase	118
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	130
Lactate dehydrogenase (isozyme 5)	144
Cytochrome <i>c</i>	150

近年的研究發現蛋白質N端的胺基酸種類及特定序列(PEST)的數目與蛋白質的半生期有密切關係

- N端的胺基酸種類

穩定(半生期 > 20 hr)者為Met、Ser、Gly、Ala、Thr、Val

不穩定(半生期 7 ~ 30 min)者為Arg、Lys、Asp、Leu、Phe

高度不穩定(半生期 2 ~ 3 min)者為Ile、Glu、Pro、Tyr、Gln

- PEST序列(Pro、Glu、Ser、Thr)

10 ~ 60 residues

3. 蛋白質分解的機制

細胞內蛋白質的分解主要經由兩個途徑

- 溶體或溶酶體系統，負責代謝外來或不正常的蛋白質
- 細胞液的蛋白質降解體(proteasome)系統，負責代謝一般正常蛋白質

蛋白質降解體媒介的蛋白質水解(proteasome-mediated proteolysis)

- Ciechanover, Hershko & Rose 共同獲得2004年諾貝爾化學獎
- 泛素(ubiquitin)標記的蛋白質(ubiquitination)被26S蛋白質降解體*辨識並分解，需ATP及多種蛋白質參與(酵素E1, E2, E3)

