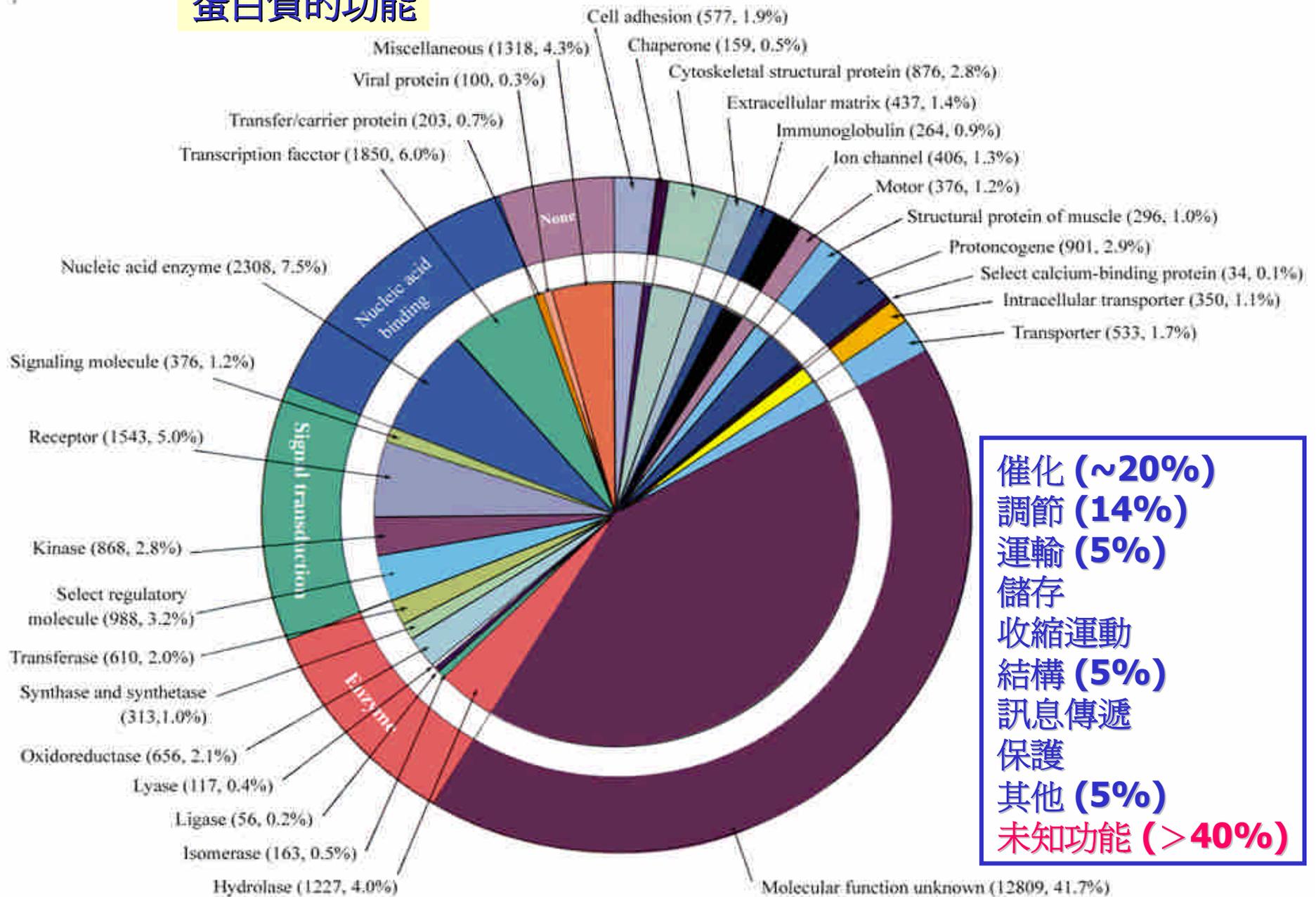


蛋白質

《緒論》

1. 蛋白質是細胞的主要有機成份，擔任多種功能，是**最重要**的生物大分子
2. 蛋白質是遺傳訊息的**表現者**
蛋白質體學 (proteomics)
 - 研究蛋白質的種類、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**

蛋白質的功能



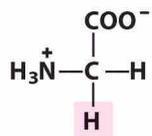
催化 (~20%)
 調節 (14%)
 運輸 (5%)
 儲存
 收縮運動
 結構 (5%)
 訊息傳遞
 保護
 其他 (5%)
 未知功能 (>40%)

- 3. 蛋白質是由胺基酸組成的大分子**
- 組成的胺基酸有**20種**(目前一說為**22種**)，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***加上其他官能基，此修飾作用與蛋白質的功能有關，如凝血因子與膠原蛋白等

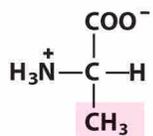
蛋白質的大小

- 蛋白質分子量的範圍廣，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**)則含**26,926**個胺基酸

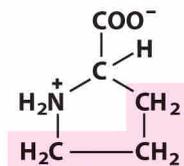
側鏈為疏水, 非極性



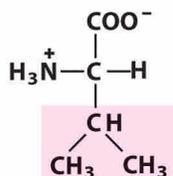
Glycine



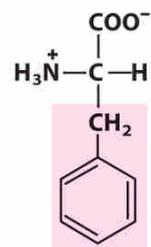
Alanine



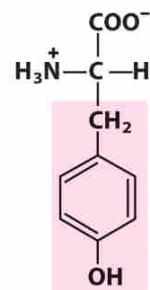
Proline



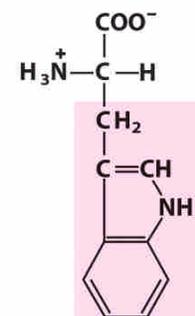
Valine



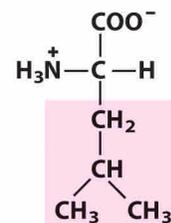
Phenylalanine



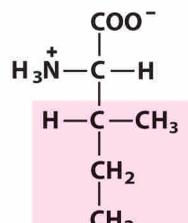
Tyrosine



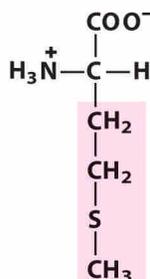
Tryptophan



Leucine



Isoleucine

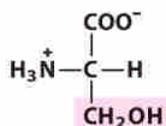


Methionine

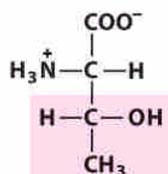
側鏈為芳香族, 疏水

側鏈帶負電荷

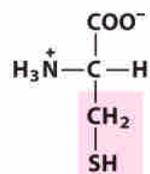
側鏈不帶電但具極性



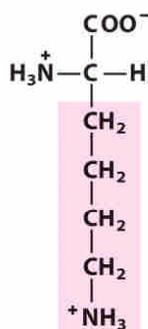
Serine



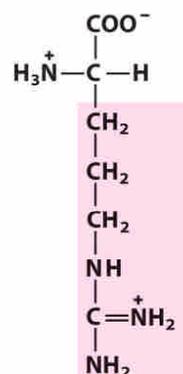
Threonine



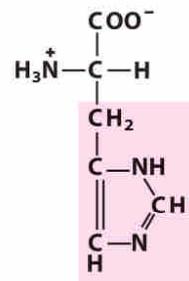
Cysteine



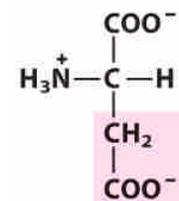
Lysine



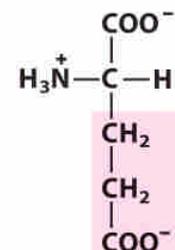
Arginine



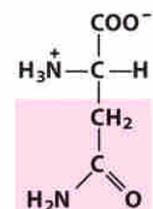
Histidine



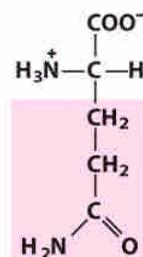
Aspartate



Glutamate



Asparagine

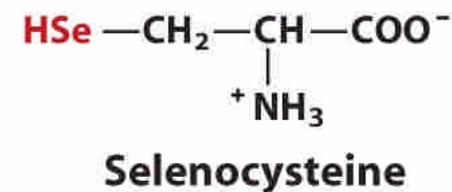
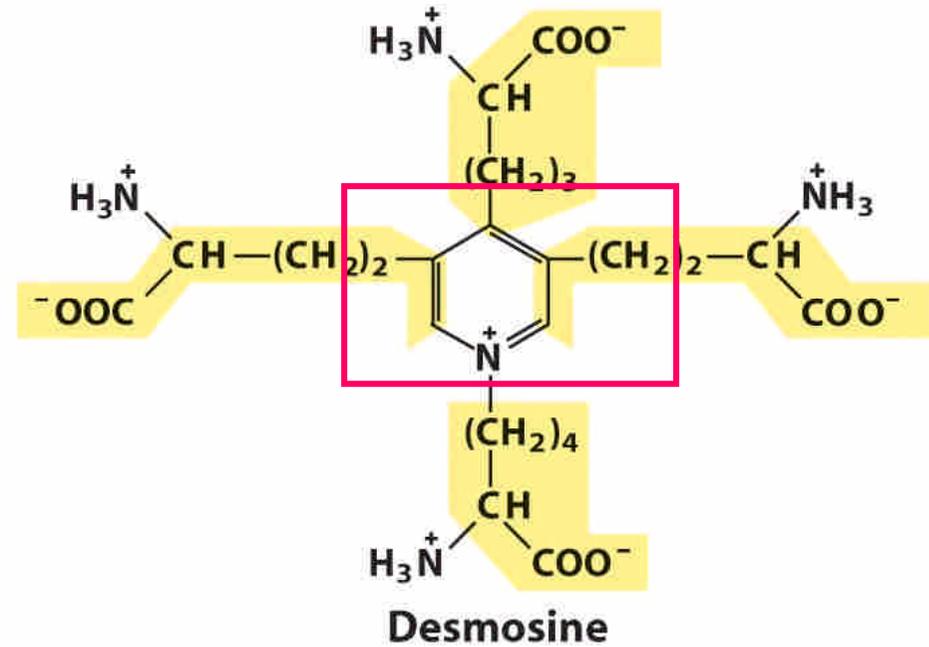
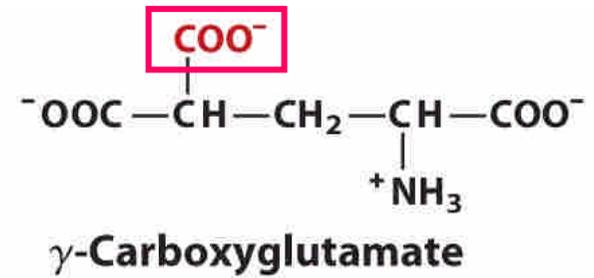
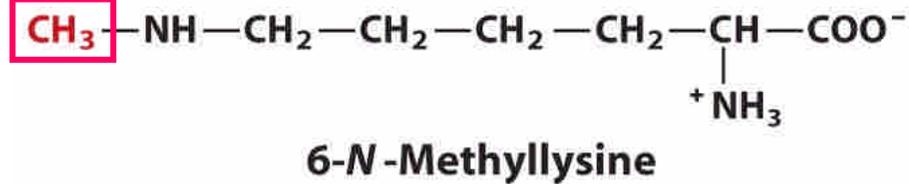
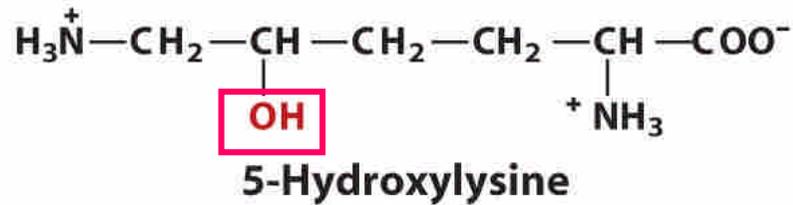
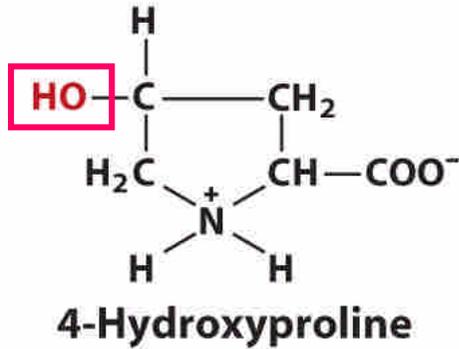


Glutamine

側鏈帶正電荷

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，擔任功能性角色，以酵素最為重要
- 纖維狀蛋白，擔任結構支撐或保護性角色，如皮膚、韌帶、軟骨等構造的膠原蛋白，蠶絲的絲蛋白與頭髮的角蛋白等
- 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)，可參與外界訊號的傳遞(如激素的受體蛋白)，可參與能量的產生(如細胞呼吸鏈與**ATP**合成酶)

依組成

- 簡單蛋白只含胺基酸
- 複合蛋白*除含胺基酸外尚有其他成份

複合蛋白

TABLE 3-4 Conjugated Proteins

<i>Class</i>	<i>Prosthetic group</i>	<i>Example</i>	
Lipoproteins	Lipids	β_1 -Lipoprotein of blood	脂蛋白
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G	糖蛋白
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	

《蛋白質的分離與純化》

1. 當分析特定蛋白質的結構與功能時，需將此蛋白質由其存在的環境(如細胞抽取液)中分離出，此即蛋白質的純化

蛋白質純化是利用一系列步驟保留樣品中的特定蛋白質而同時將其他蛋白質移除的過程

2. 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等

3. 蛋白質分離與純化的原理

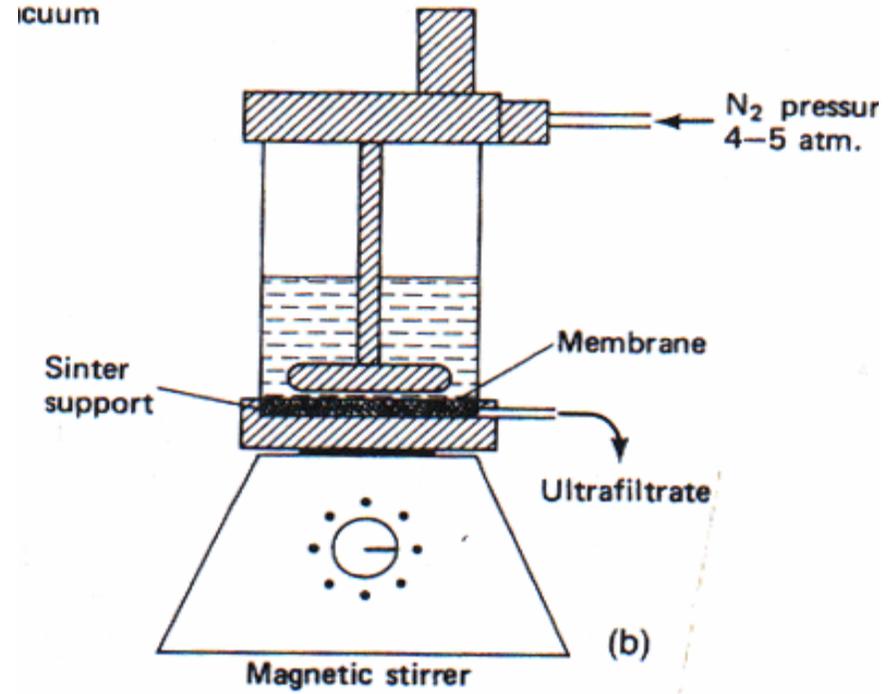
分離的原理

- 可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

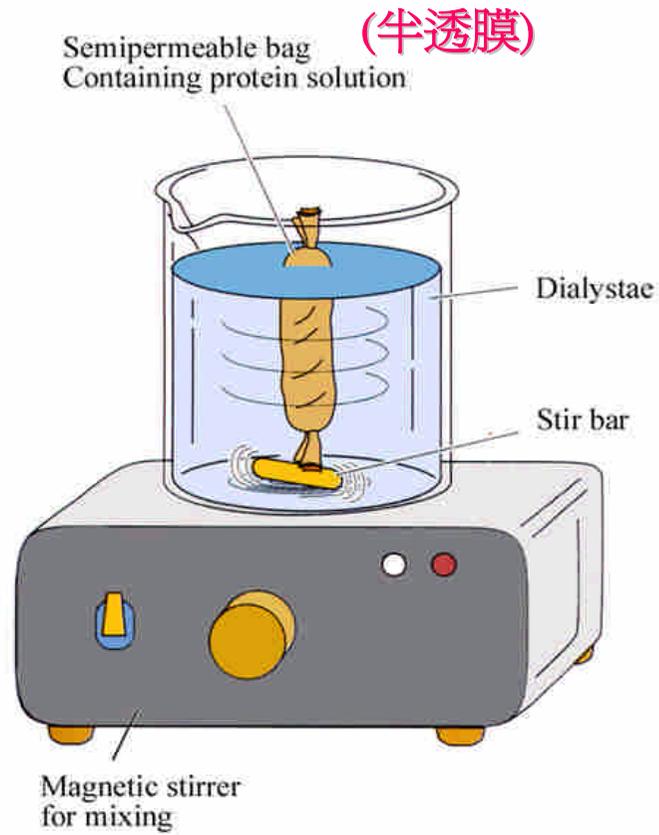
利用分子量大小的方法

- 透析*
- 超過濾*
- 分子篩或膠體過濾管柱層析*

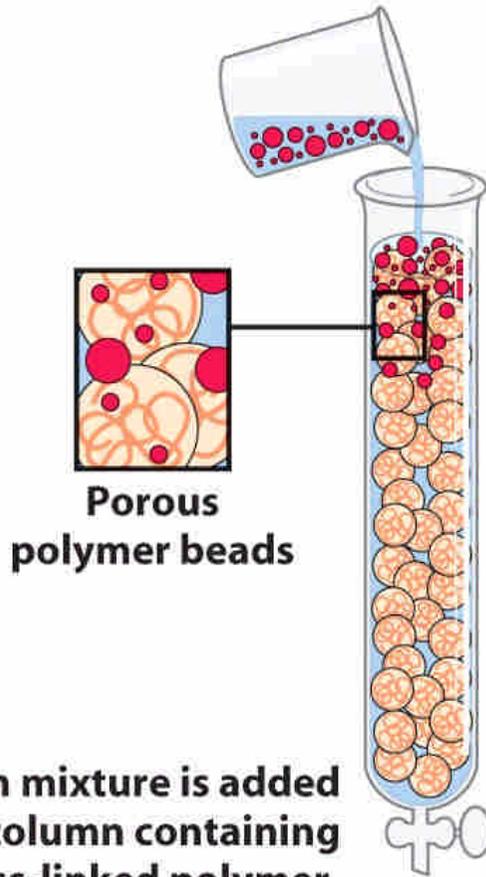
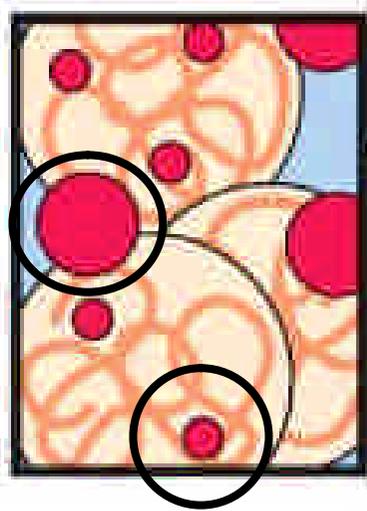
超過濾(ultrafiltration)



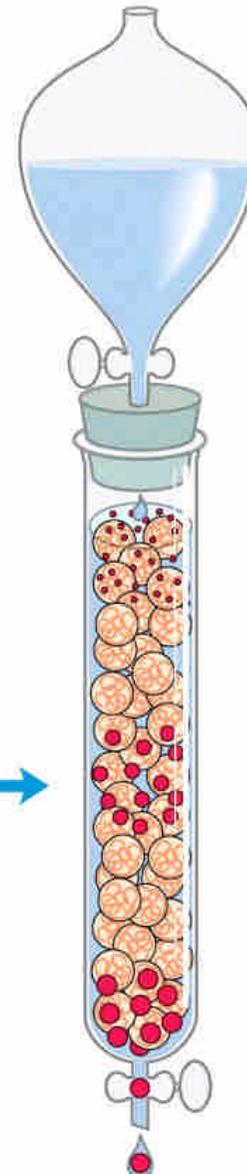
透析(dialysis)



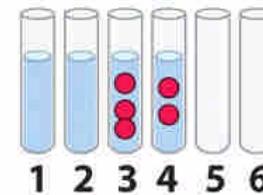
分子篩(molecular sieve)或膠體過濾(gel filtration)管柱層析(column chromatography)



Protein mixture is added to column containing cross-linked polymer.



Protein molecules separate by size; larger molecules pass more freely, appearing in the earlier fractions.



利用帶電特性的方法

- 離子交換管柱層析法*
- 等電點聚焦*

在特定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，此pH值稱為等電點(pI)

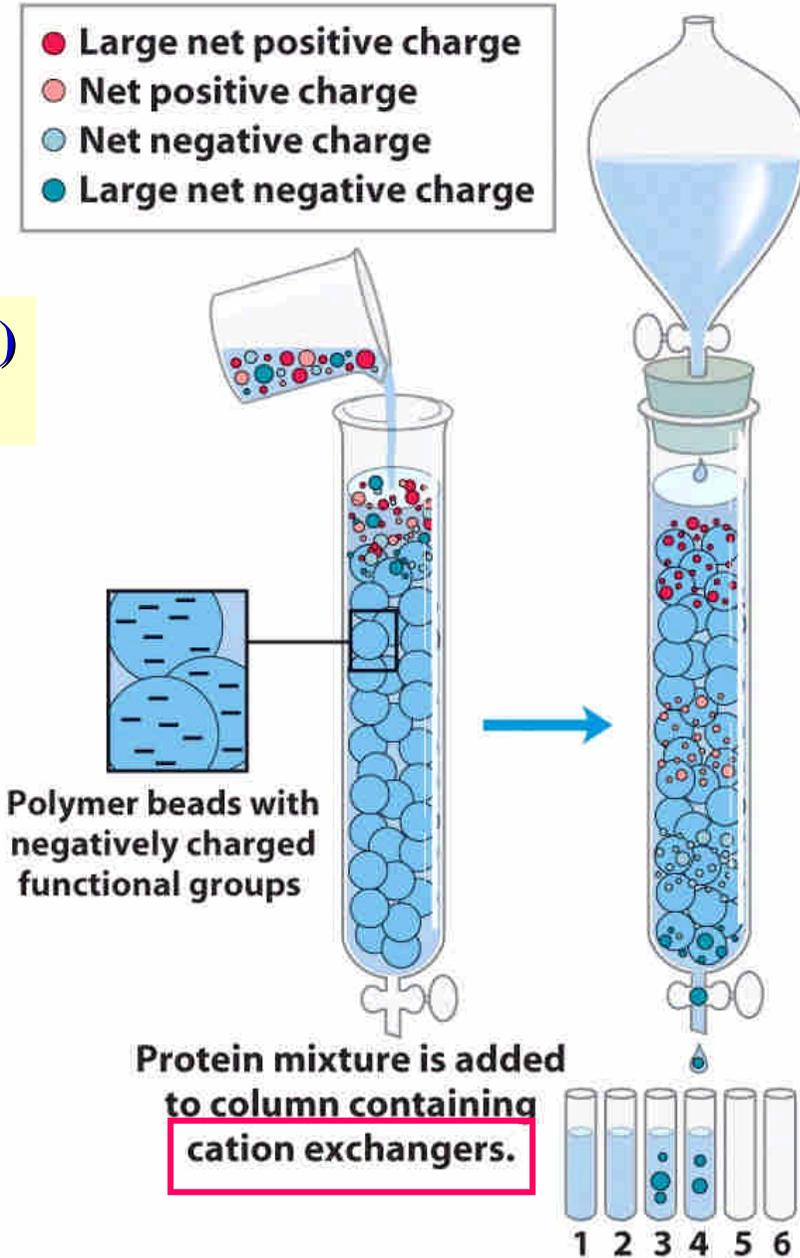
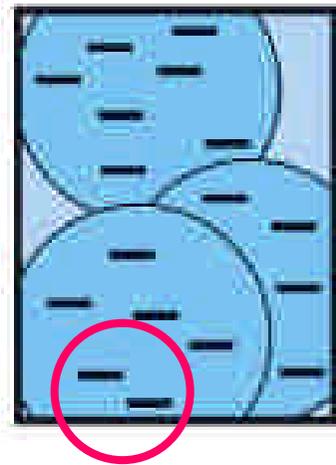
- 電泳

SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)*

二維電泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2D電泳)*

毛細管電泳

離子交換(ion exchange) 管柱層析



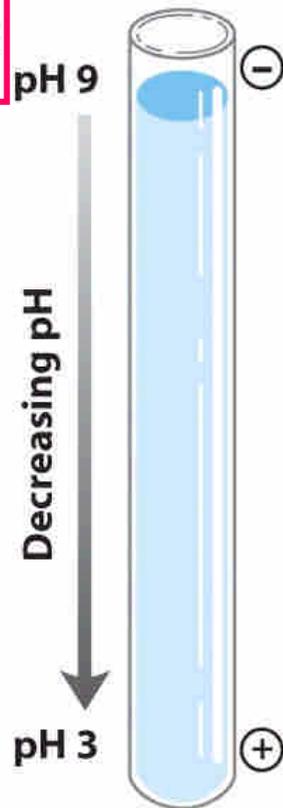
Polymer beads with negatively charged functional groups

Protein mixture is added to column containing cation exchangers.

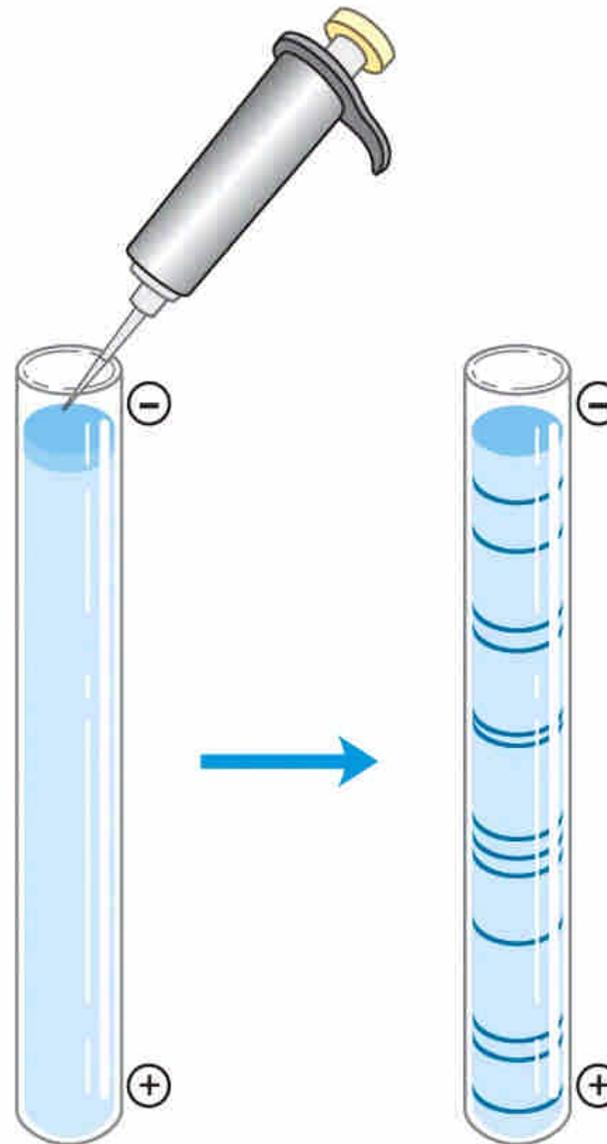
Proteins move through the column at rates determined by their net charge at the pH being used. With cation exchangers, proteins with a more negative net charge move faster and elute earlier.

等電點交集(isoelectric focusing)

An ampholyte solution is incorporated into a gel.



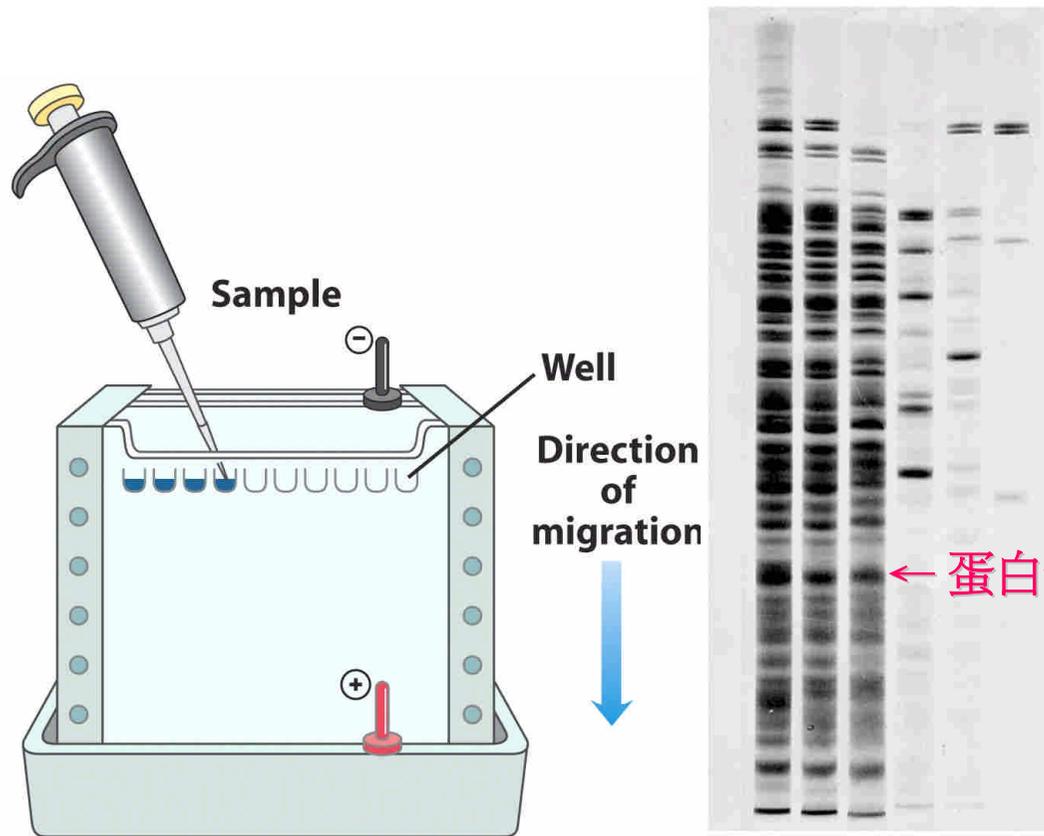
A stable pH gradient is established in the gel after application of an electric field.



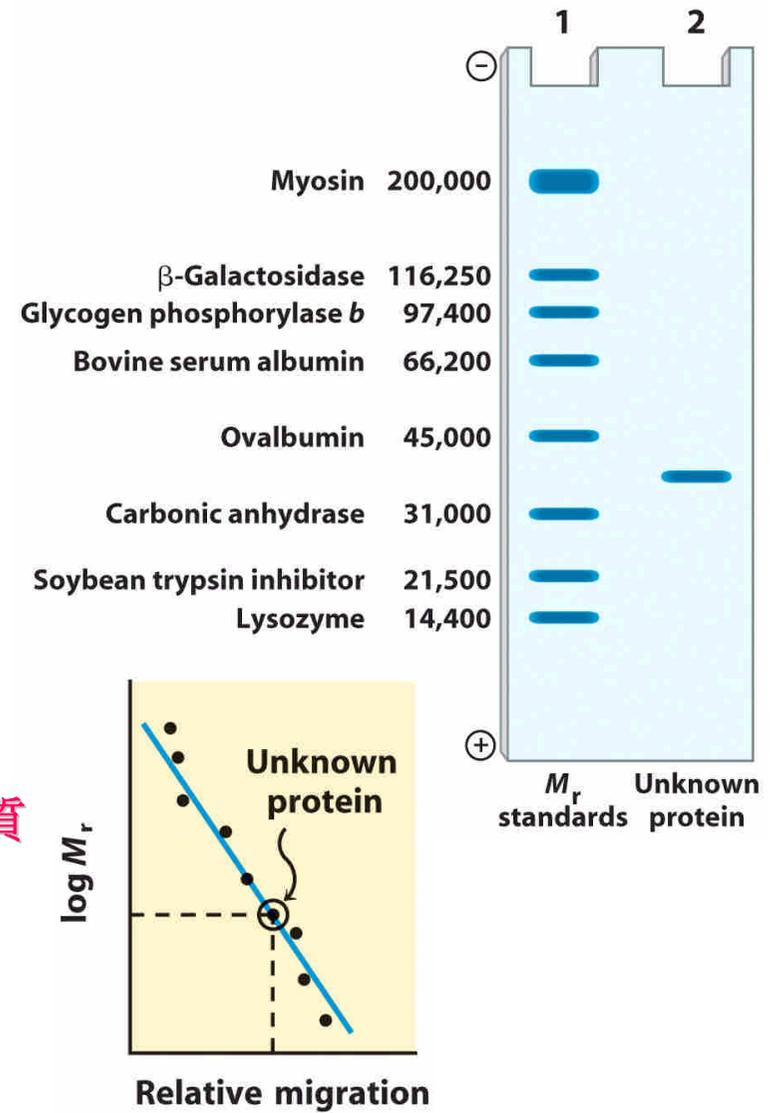
Protein solution is added and electric field is reapplied.



After staining, proteins are shown to be distributed along pH gradient according to their pI values.



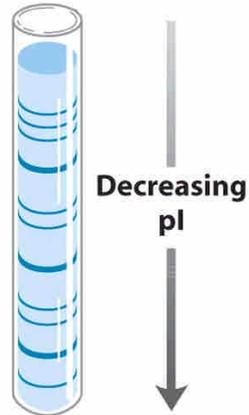
膠體電泳(gel electrophoresis)



SDS-PAGE可用於估測蛋白質分子量

依等電點分離

First dimension
Isoelectric focusing

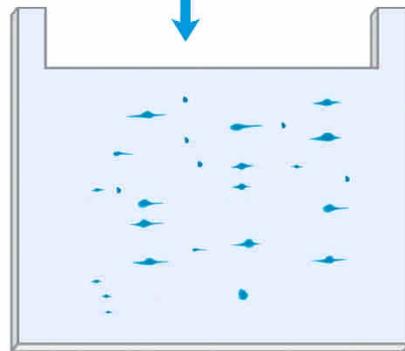


Isoelectric focusing gel is placed on SDS polyacrylamide gel.



依分子量分離

Second dimension
SDS polyacrylamide gel electrophoresis



Decreasing M_r



2D電泳



利用溶解度的方法

- 鹽析法*

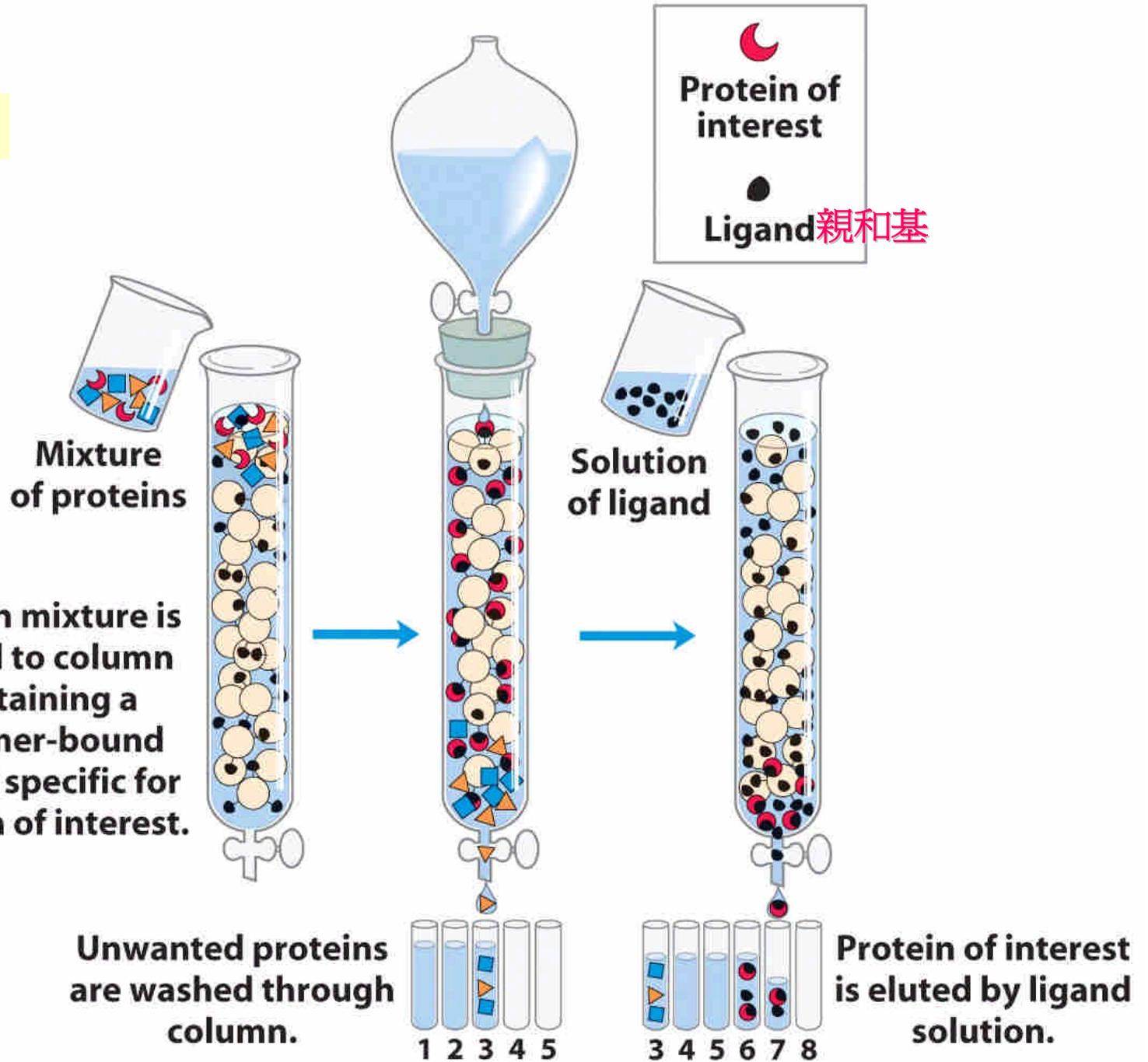
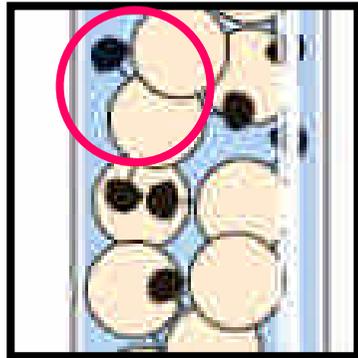
利用非專一性吸附作用的方法

- 活性碳
- 磷酸鈣

利用專一性吸附作用的方法

- 如抗體與抗原或酵素與受質間的專一性接合特性
- 親和力管柱層析*

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

<i>Procedure or step</i>	<i>Fraction volume (ml)</i>	<i>Total protein (mg)</i>	<i>Activity (units)</i>	<i>Specific activity (units/mg)</i>
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	溶解度 280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	帶電特性 90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	分子大小 80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	專一性的吸附 ⁶ 3	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.

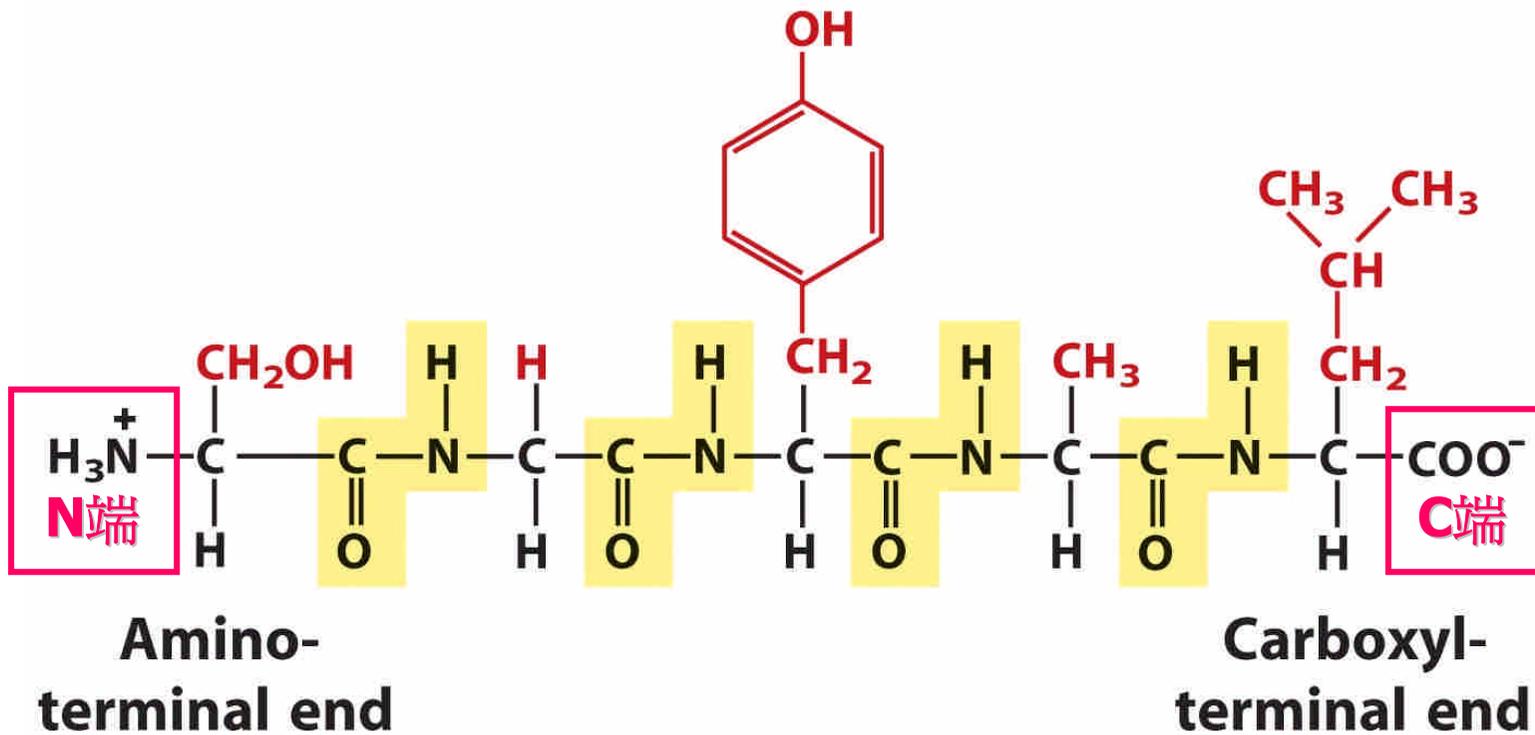
《蛋白質的結構》

1. 一級結構是(各)多肽中胺基酸的組成與排列次序*
2. 二級結構是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如 α -螺旋與 β -褶片

肽鍵的構造與特性

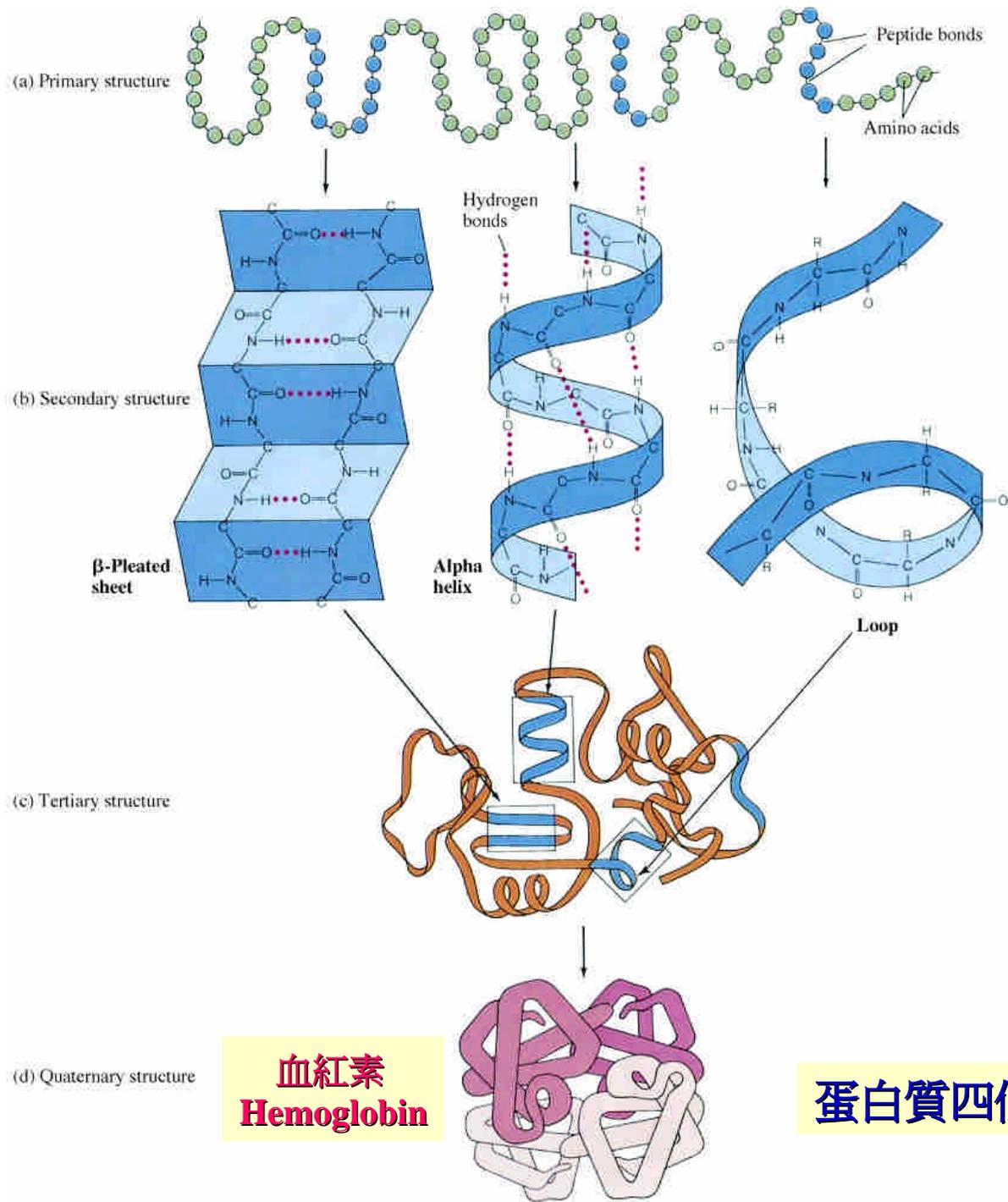


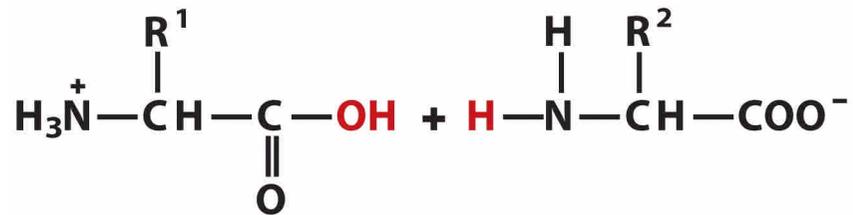
- 具部份雙鍵特性*，為一平面構造(**amide plane, peptide plane**)，自由旋轉角度為 Φ 與 Ψ



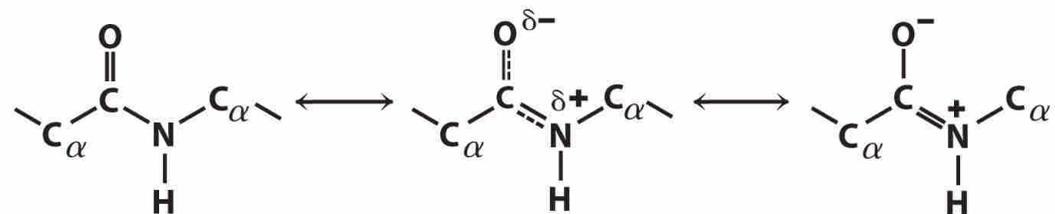
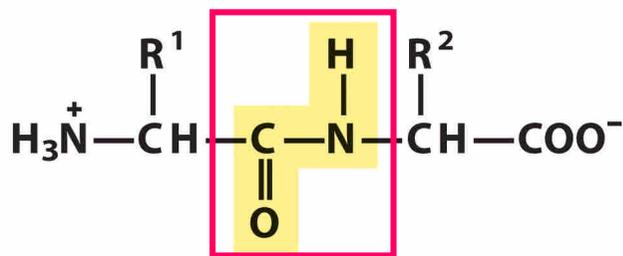
多肽的表示方式與方向性

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

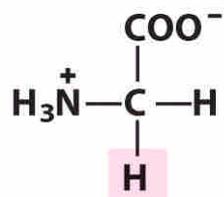




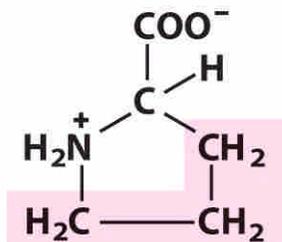
兩胺基酸以肽鍵連接



The carbonyl oxygen has a partial negative charge and the amide nitrogen a partial positive charge, setting up a small electric dipole. Virtually all peptide bonds in proteins occur in this trans configuration; an exception is noted in

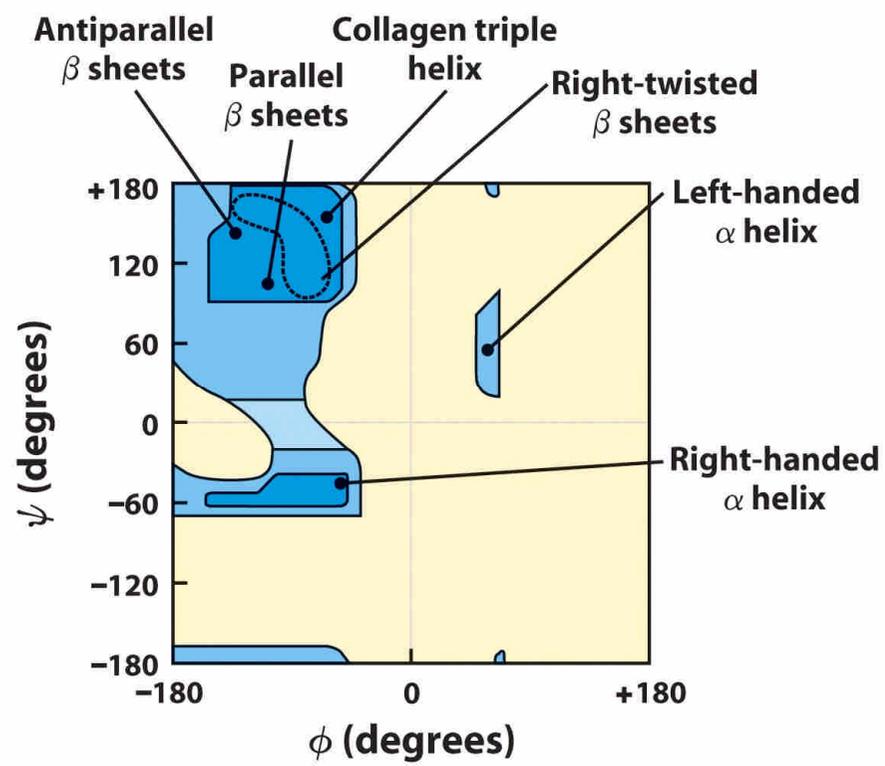
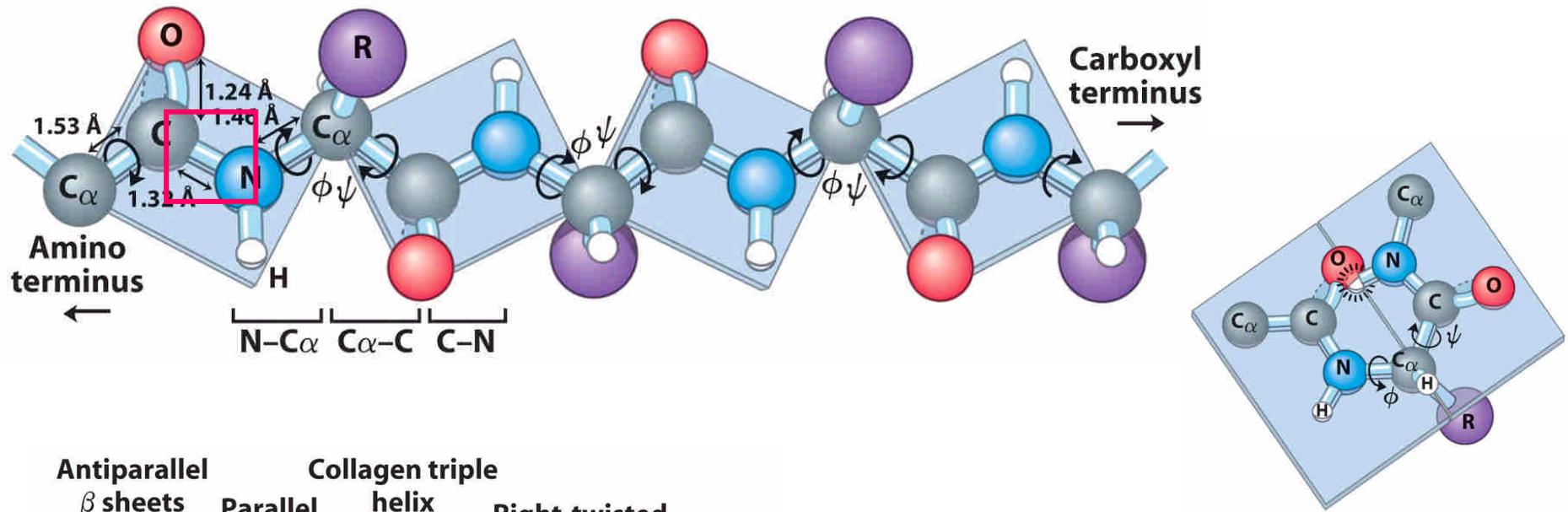


Glycine

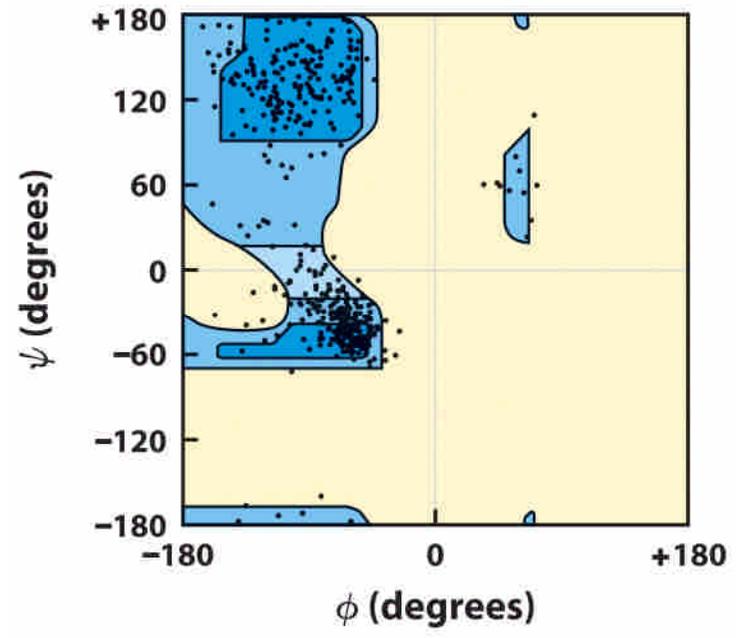


Proline

肽鍵因共振而無法自由旋轉, 具“部分雙鍵”特性



由Ramachandran plots預測的各種構造



實例(兔的pyruvate kinase), 排除Gly

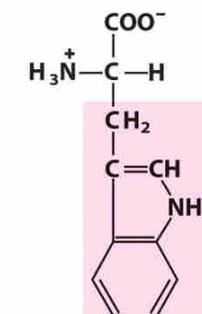
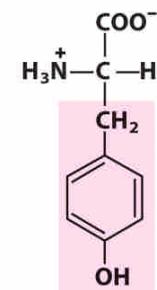
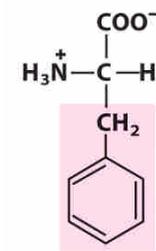
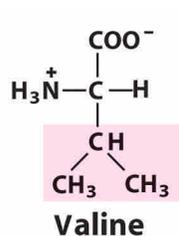
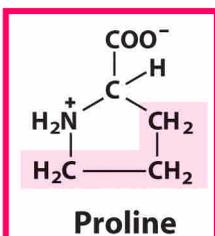
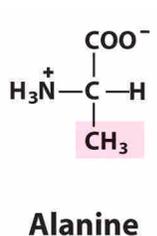
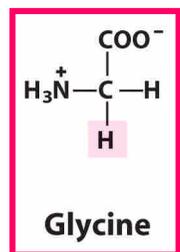
Ramachandran plot*

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

典型的二級構造為 α -螺旋與 β -褶片

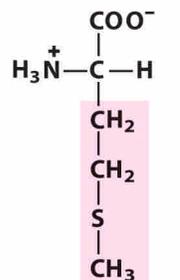
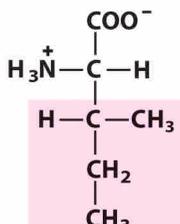
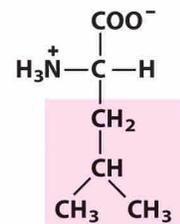
- 由Pauling與Corey提出*，Pauling因而獲得1954年諾貝爾化學獎
- α -螺旋與 β -褶片*的結構特性
- 特定蛋白質中特定二級構造的含量*
- β -轉折*的結構特性

側鏈為疏水, 非極性



Phenylalanine Tyrosine Tryptophan

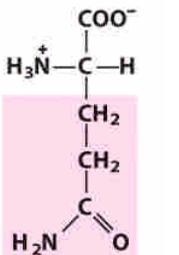
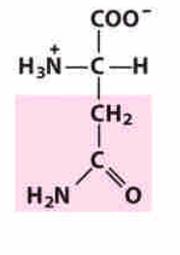
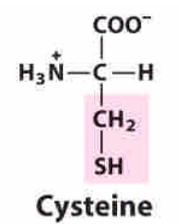
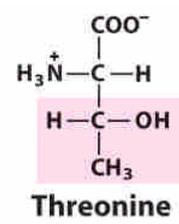
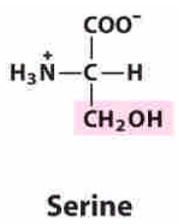
側鏈為芳香族, 疏水



Leucine Isoleucine Methionine

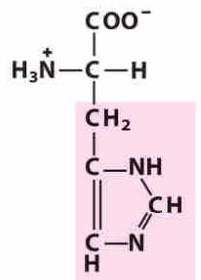
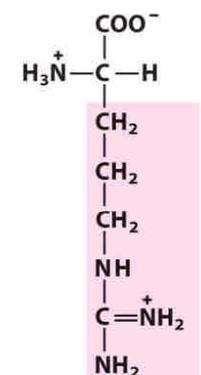
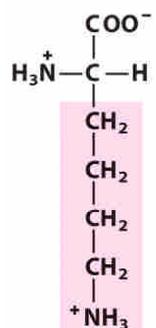
側鏈帶負電荷

側鏈不帶電但具極性

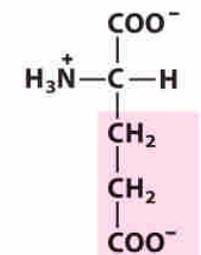
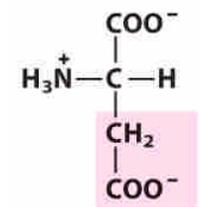


Asparagine Glutamine

側鏈帶正電荷



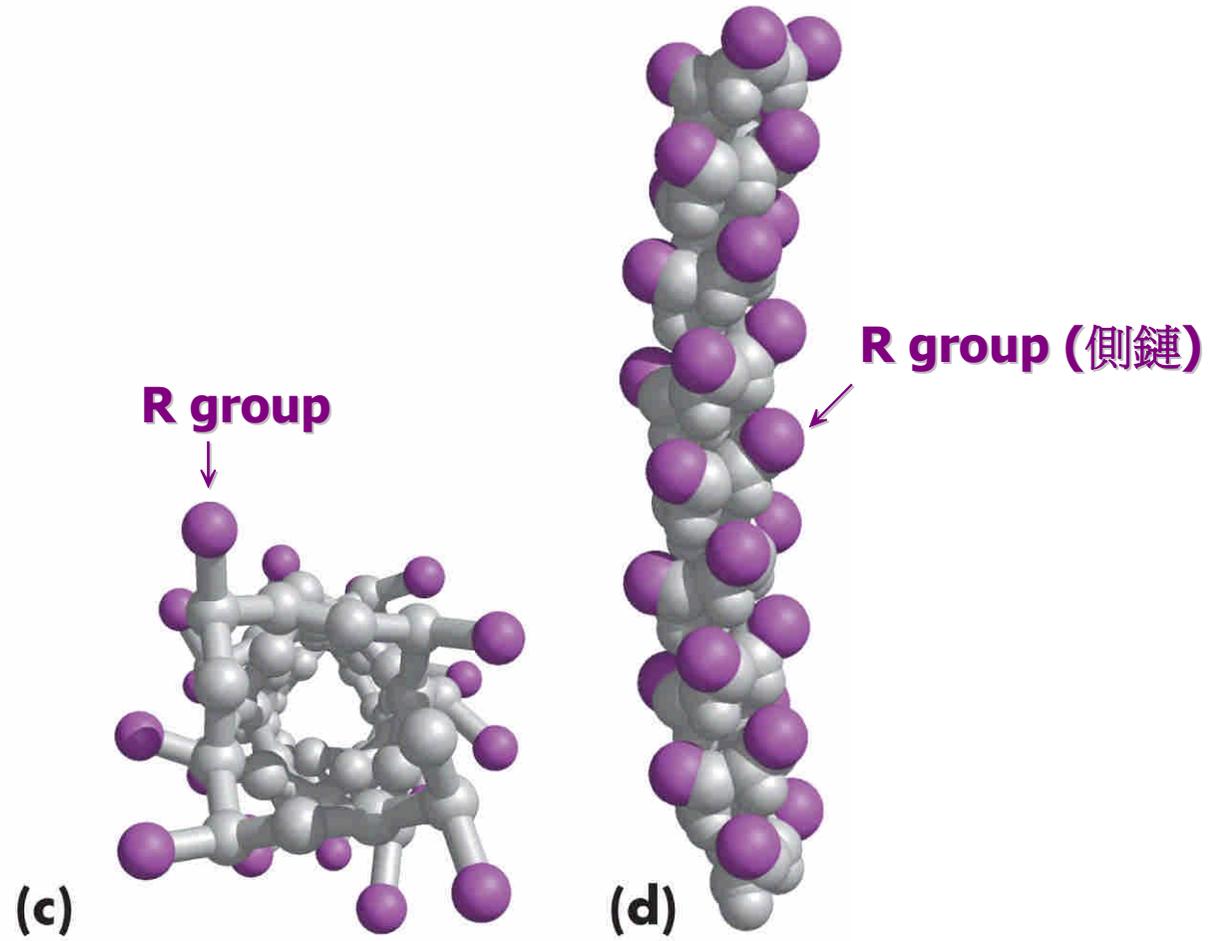
Lysine Arginine Histidine



Aspartate Glutamate

組成蛋白質的20種胺基酸構造

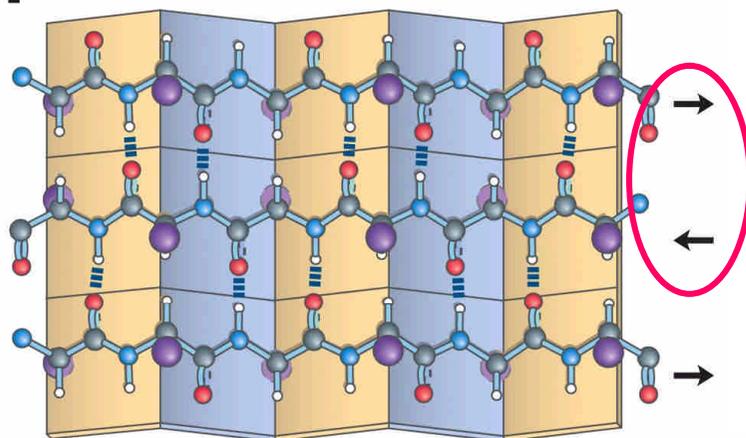
α -螺旋構造(2)



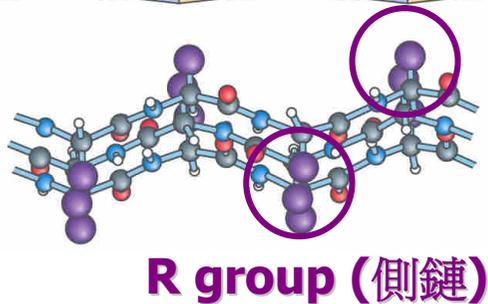
(a) Antiparallel 逆向平行

β -褶片構造

Top view

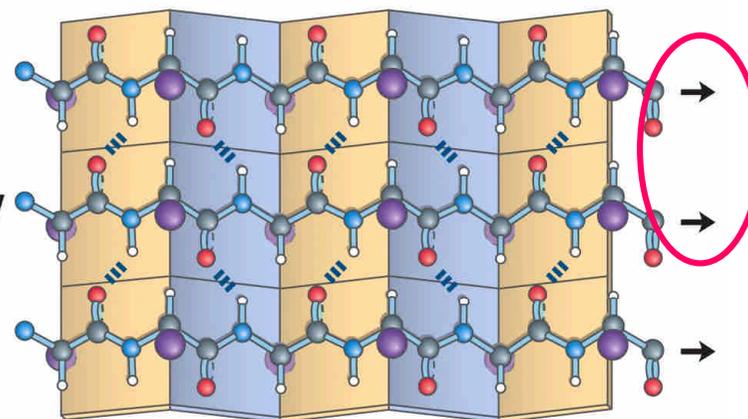


Side view



(b) Parallel 同向平行

Top view



Side view

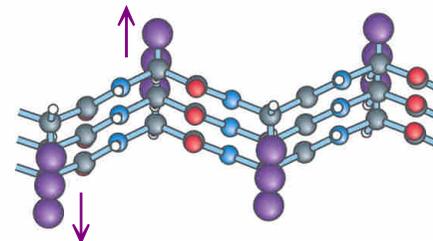


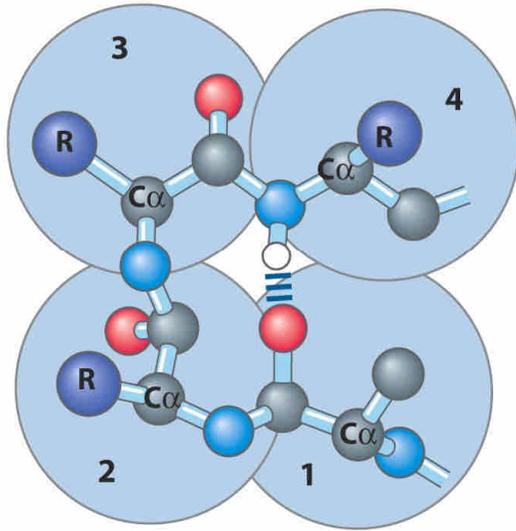
TABLE 4-2 Approximate Amounts of α Helix and β Conformation in Some Single-Chain Proteins

<i>Protein (total residues)</i>	<i>Residues (%)*</i>	
	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

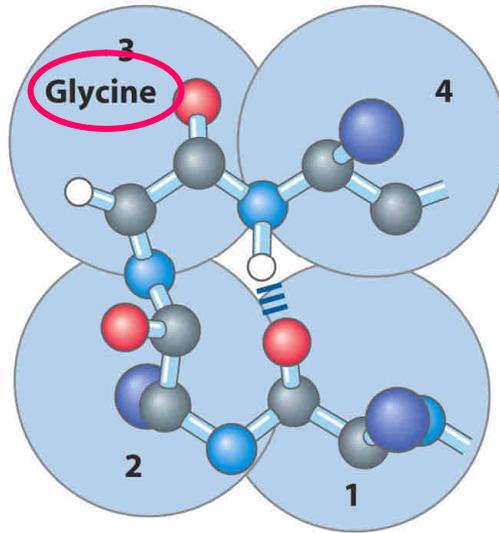
Source: Data from Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W. H. Freeman and Company, New York.

*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.

(a) β Turns



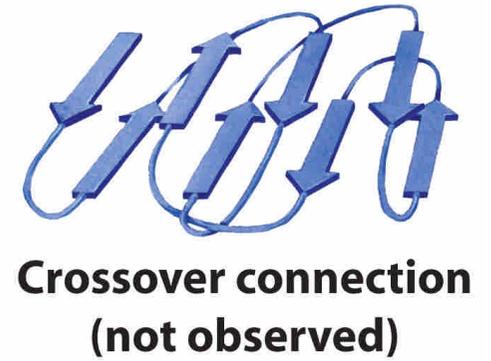
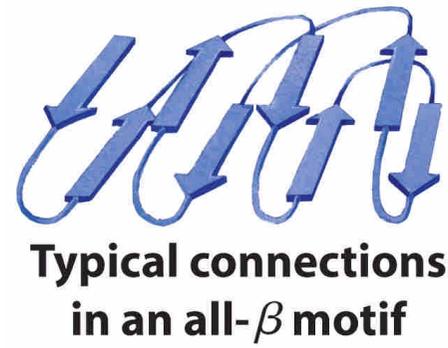
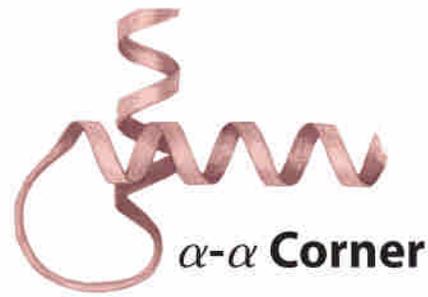
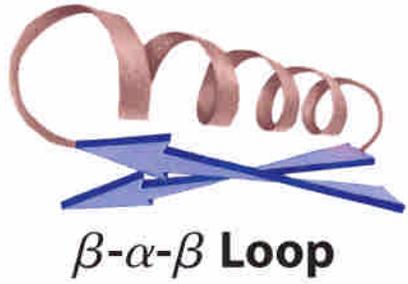
Type I
(較普遍)



Type II

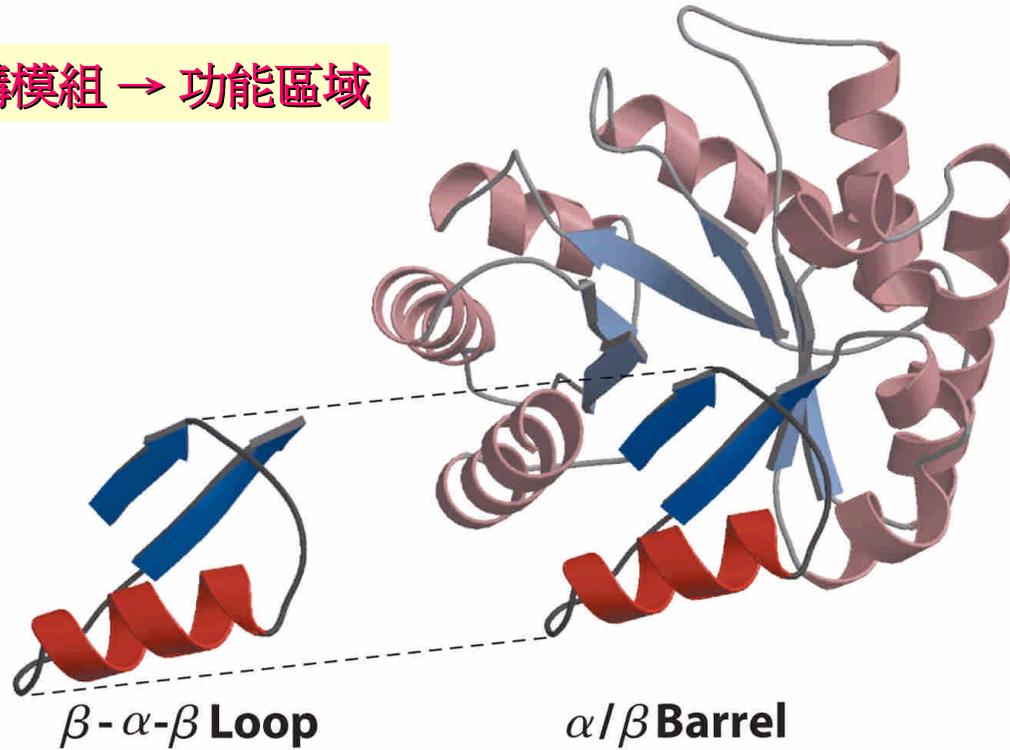
β -轉折構造

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

超二級構造(**supersecondary structures**)為二級構造的組合

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

Random coil or unorganized structures

- **“Random coil is not random!”**

β Conformation
 $2,000 \times 5 \text{ \AA}$

α Helix
 $900 \times 11 \text{ \AA}$



Native globular form
 $100 \times 60 \text{ \AA}$

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. 三級結構是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(球狀)
4. 四級結構是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

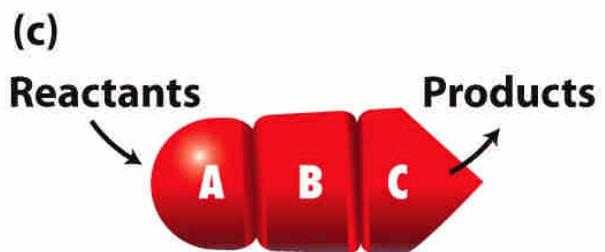
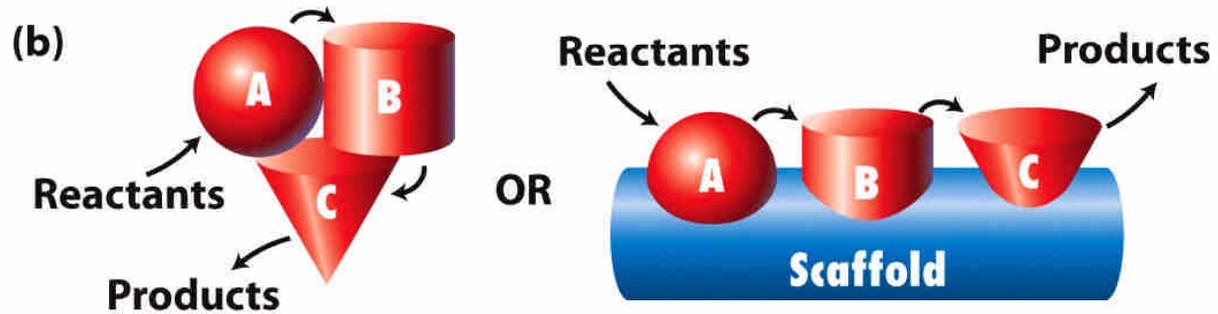
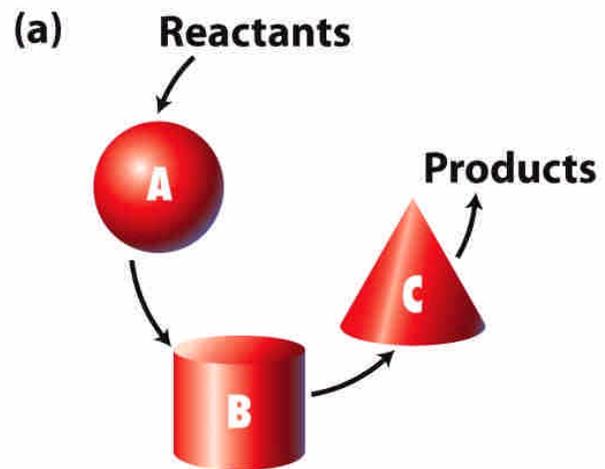
蛋白質具有四級構造的優點

- 可增加結構安定性，遺傳物質能更有效利用，可形成功能或活性部位，有調節與協同的效應

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

四級結構或超分子結構的優點



5. 超分子結構(supermolecular organization)是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

超分子結構的例子

- **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

共價鍵結

- 如一級構造中的肽鍵與三四級結構中的雙硫鍵*

非共價作用力

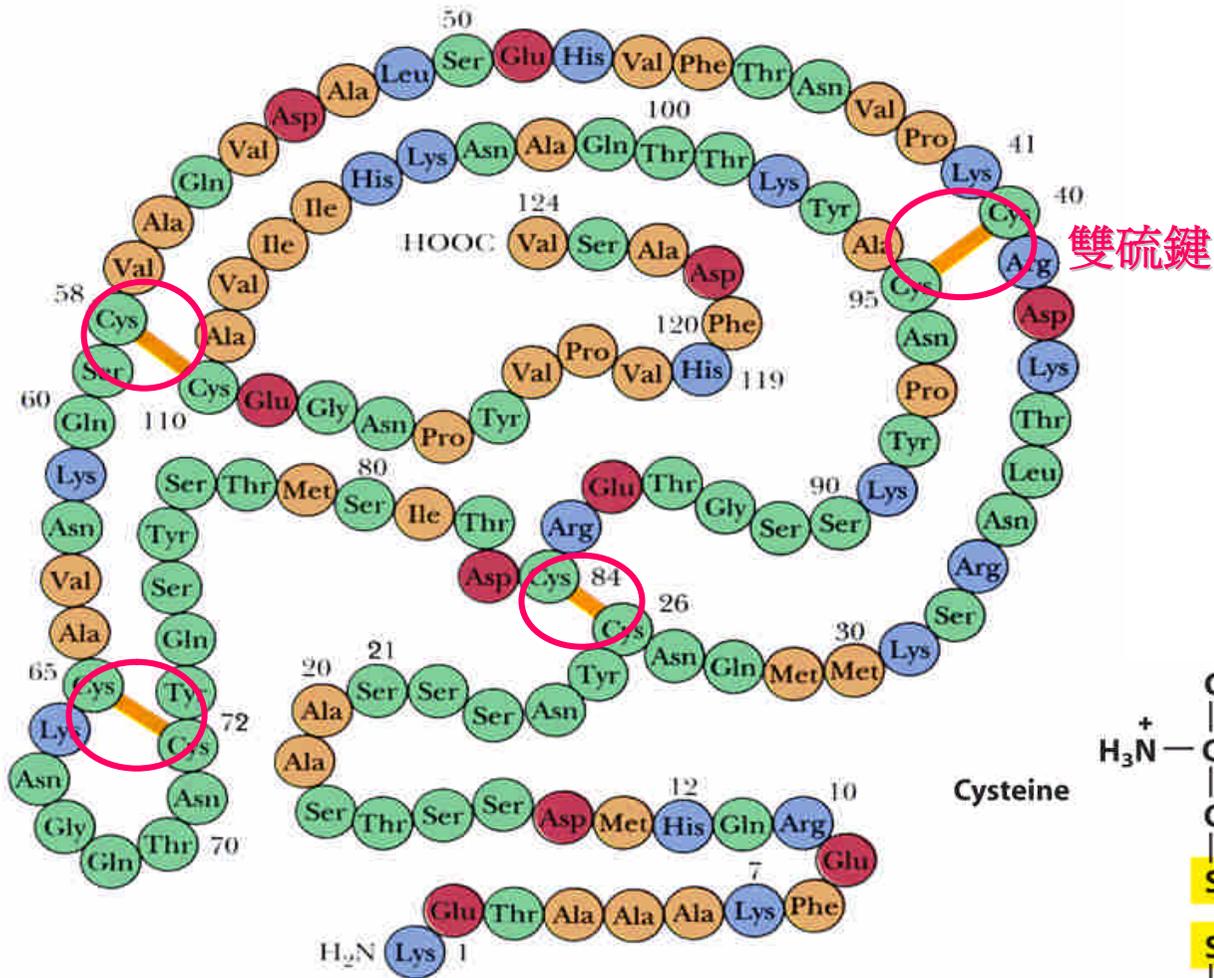
- 如二，三，四級結構中的氫鍵，離子鍵，凡得瓦爾力與疏水作用
- 為弱的作用力，因此大部份蛋白質只能在溫和的環境(溫度, pH值)中發揮功能

7. 蛋白質的變性(denaturation)

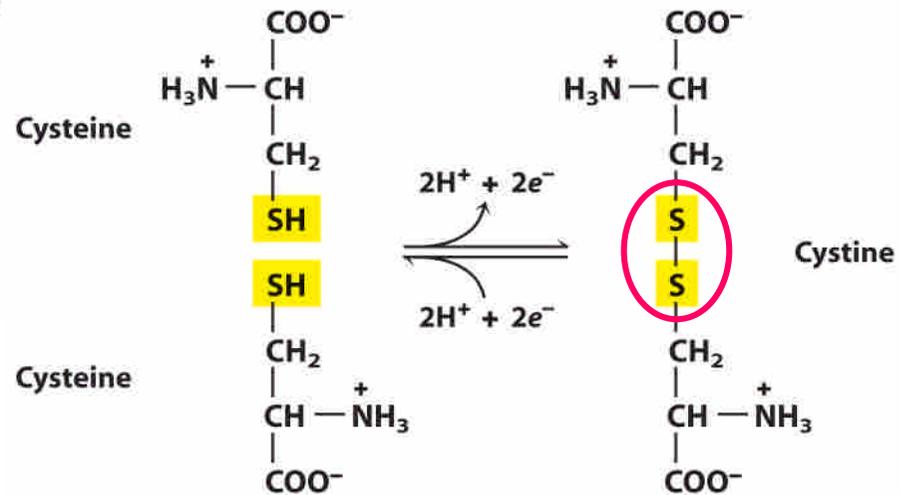
蛋白質變性即是蛋白質因維持結構的作用力受破壞而失去特有的結構與活性

- 變性通常是蛋白質特有的構形遭受破壞，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



雙硫鍵的形成

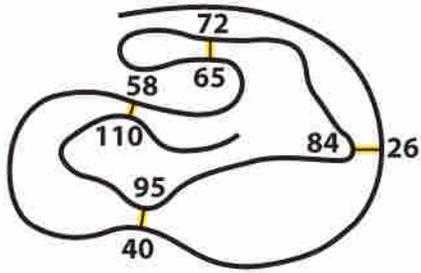


8. 蛋白質結構與功能的密切關係是由**Anfinsen**等人以核糖核酸水解酶(**RNase**)所進行的一系列實驗證明

RNase*含有**124**個胺基酸，有**4**個雙硫鍵

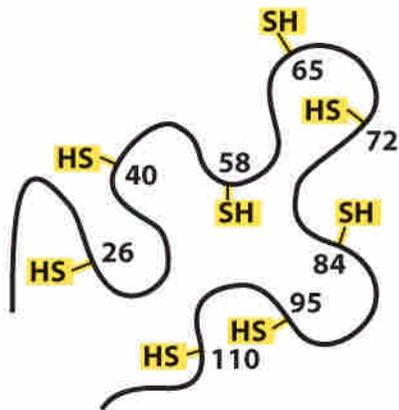
- 當以還原劑及尿素處理**RNase***時，雙硫鍵被還原，非共價作用力被破壞，**RNase**發生“變性”，喪失水解**RNA**的活性
- 當以適當條件移除還原劑及尿素時，**RNase**的活性可完全恢復，而重新折疊的**RNase**，所測得的物理或化學特性均和原來的酵素相同

Anfinsen等人的實驗



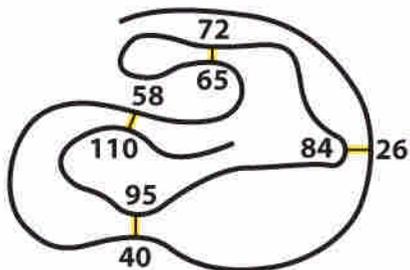
Native state;
catalytically active.

addition of urea and
mercapto-ethanol

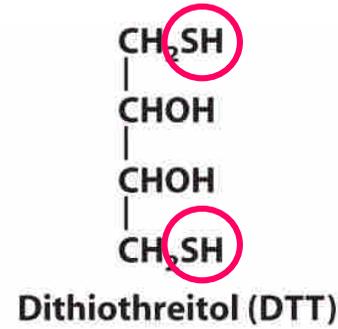


Unfolded state;
inactive. Disulfide
cross-links reduced to
yield Cys residues.

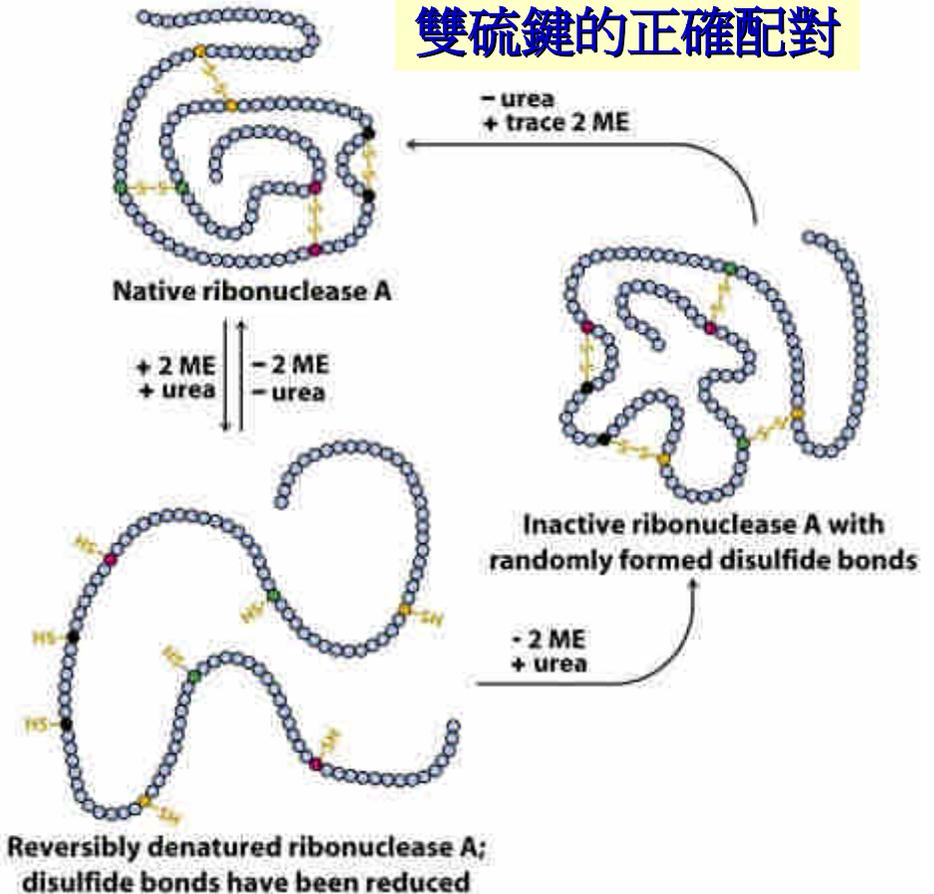
removal of urea and
mercapto-ethanol



Native,
catalytically
active state.
Disulfide cross-links
correctly re-formed.



雙硫鍵的正確配對



Anfinsen等人的實驗中

- 所有的處理皆不會破壞連接各胺基酸之間的共價鍵結(肽鍵)，即蛋白質的一級構造不受影響
- **Anfinsen**因此提出“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
- 此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

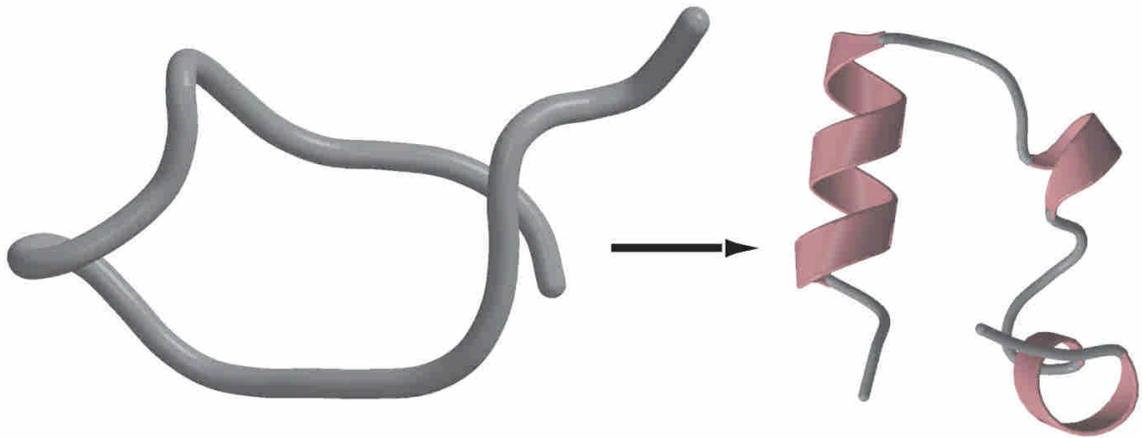
Anfinsen等人的研究結果提出“**All of the information necessary for folding the peptide chain into its “native” structure is contained in the amino acid sequence of the peptide**”

蛋白質特有構形的形成*

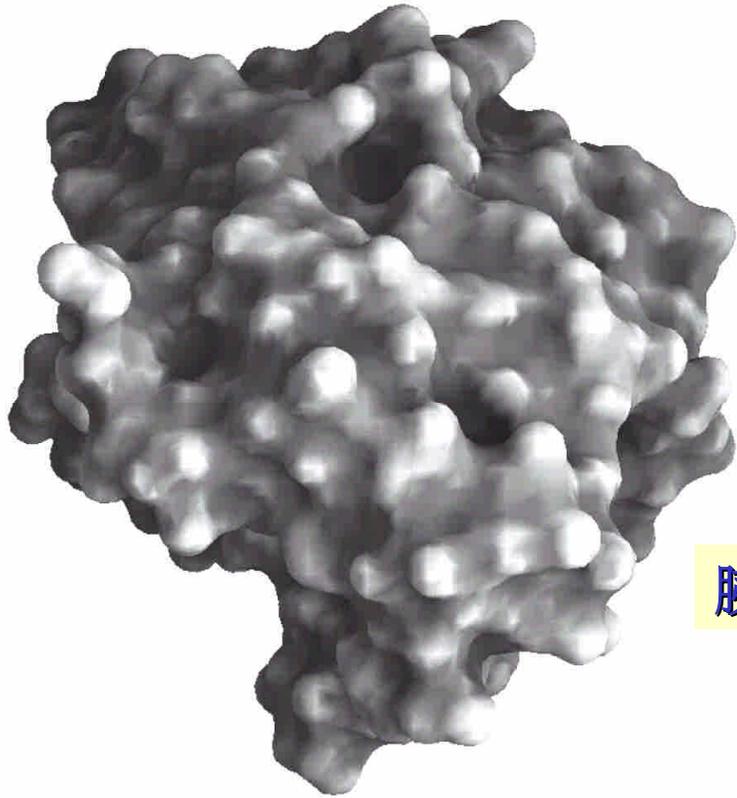
- **Levinthal's paradox (1968年)**

- 假設蛋白質A含有**100**個胺基酸，若每一個胺基酸只有兩種可能的空間分佈情形，則此蛋白質的構形可有 **2^{100}** 個可能性，如測試每一種可能性需 **10^{-13}** 秒，則需 **4×10^9** 年才能達到特有構形，但生理狀況(*in vivo*)下蛋白質A卻只需約**5秒**即可摺疊成特有的構形

自然構形, 原始構形
(native conformation)
- dynamic, flexible



蛋白質的摺疊



胰凝乳蛋白酶與甘胺酸

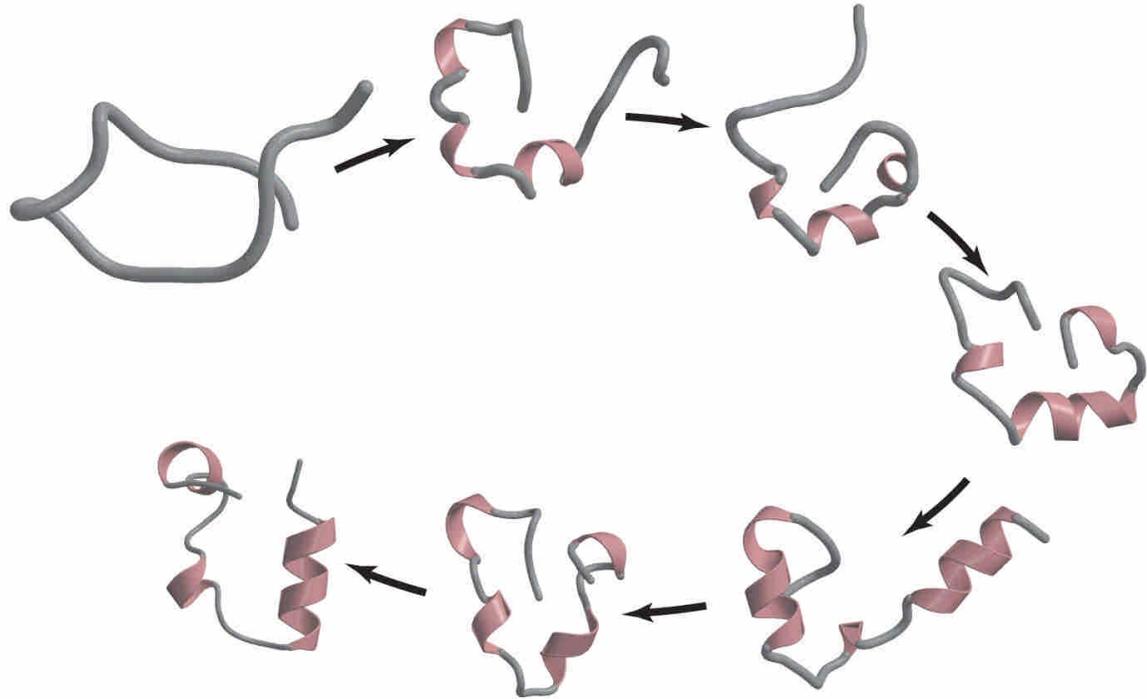
蛋白質摺疊的過程

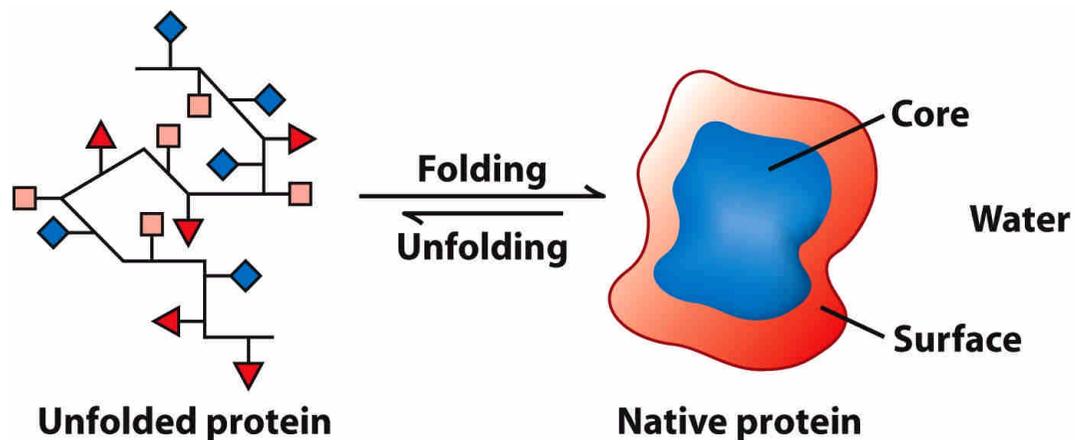
- 以**overall energy minimum**為準則*
- 摺疊的驅動力(**driving force**)為亂度(**entropy**)因素，即疏水的胺基酸側鏈的分佈
- 漏斗模式(**funnel model**)*中，漏斗為**energy landscape** (能量圖景，位能鳥瞰)，蛋白質的特有構形所含能量最低，因此最穩定
- 二級構造 → 結構區域 → 功能區域 → 特有立體構形



漏斗模式

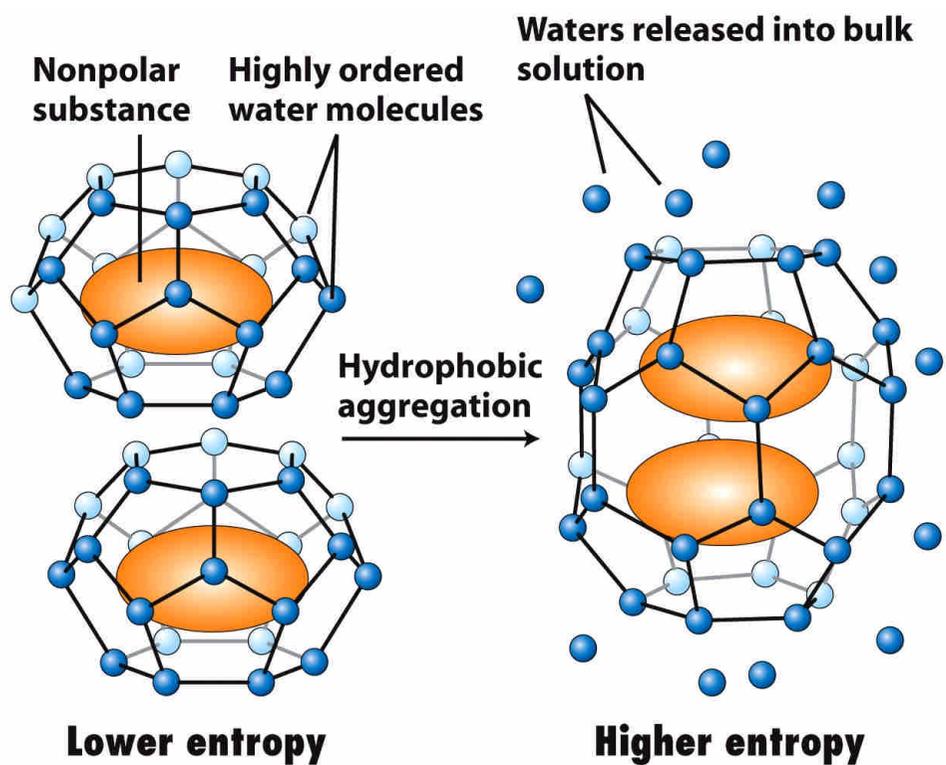
模擬的蛋白質摺疊過程
- 蛋白質villin片段(36個胺基酸), 存於小腸的
microvillin lining, 模擬的摺疊過程耗時1 msec





疏水效應

蛋白質摺疊的油滴模式



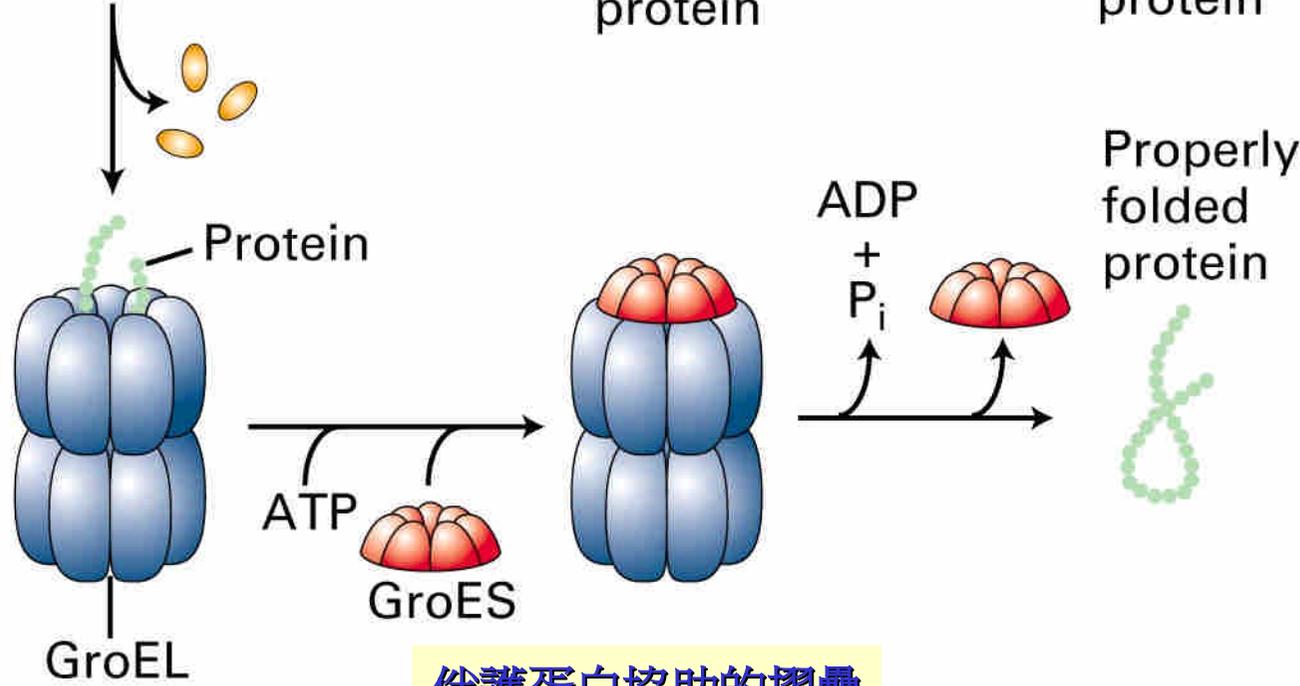
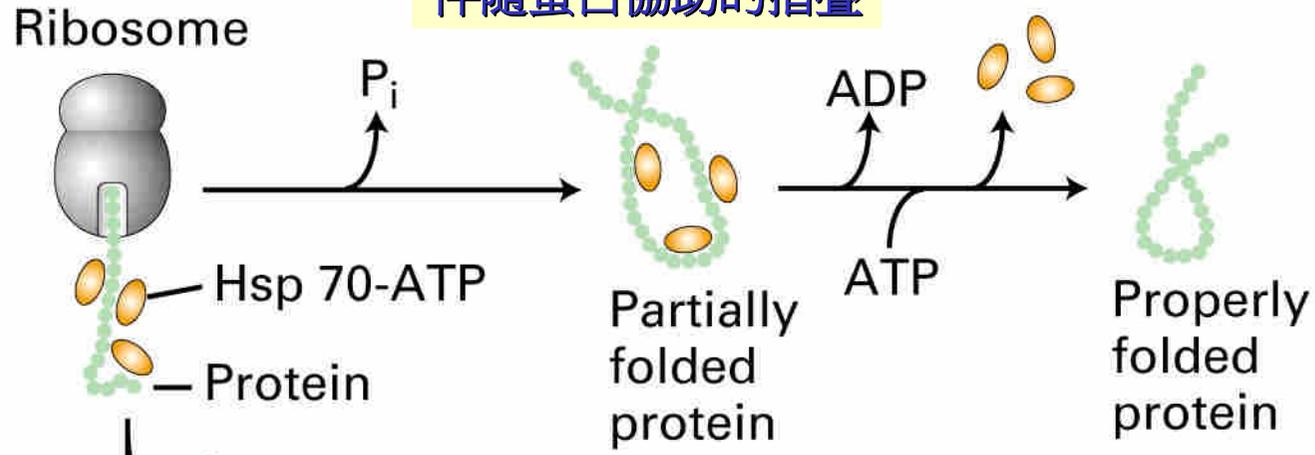
10. 參與摺疊的蛋白質

蛋白質在合成後，並非所有蛋白質皆能及時自發地摺疊成正確的構形，其快速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)*扮演被動角色，如**Hsp70s (熱休克蛋白70)**會與未摺疊或部份摺疊的蛋白質接合，避免未摺疊或部份摺疊的蛋白質黏集而被降解，而*in vivo*的實驗也顯示伴隨蛋白是蛋白質正確摺疊及形成四級構造所必需的
- 伴護蛋白(chaperonins)*扮演主動角色，如**Hsp60**會直接促進蛋白質的摺疊

伴隨蛋白協助的摺疊

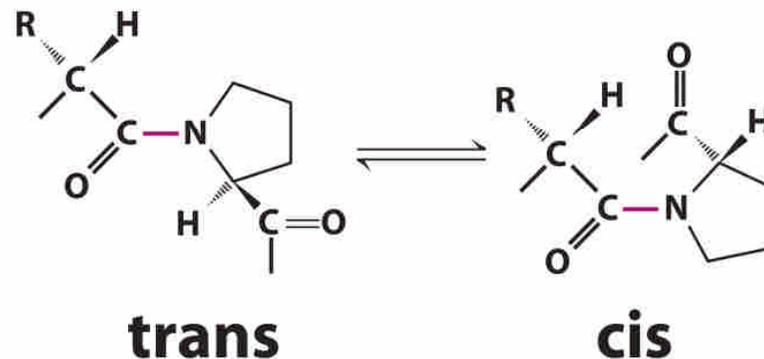


伴護蛋白協助的摺疊

其他蛋白

- **Protein disulfide isomerase (PDI)** 負責雙硫鍵的正確配對
- **Peptide proyl *cis-trans* isomerase (PPI)** 負責脯氨酸參與肽鍵時的異構化反應

Proline isomers



多肽中含Pro時, 其肽鍵具有*trans*與*cis*異構形式

- Pro為*cis*異構形式的機率為5 ~ 30%, 其他胺基酸則少於0.1%

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因此獲得**1997**年諾貝爾生醫獎

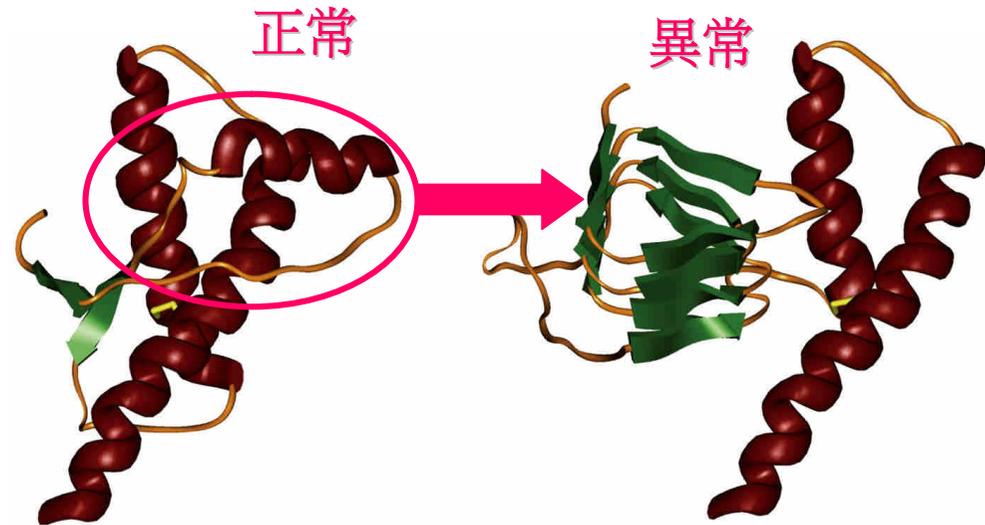
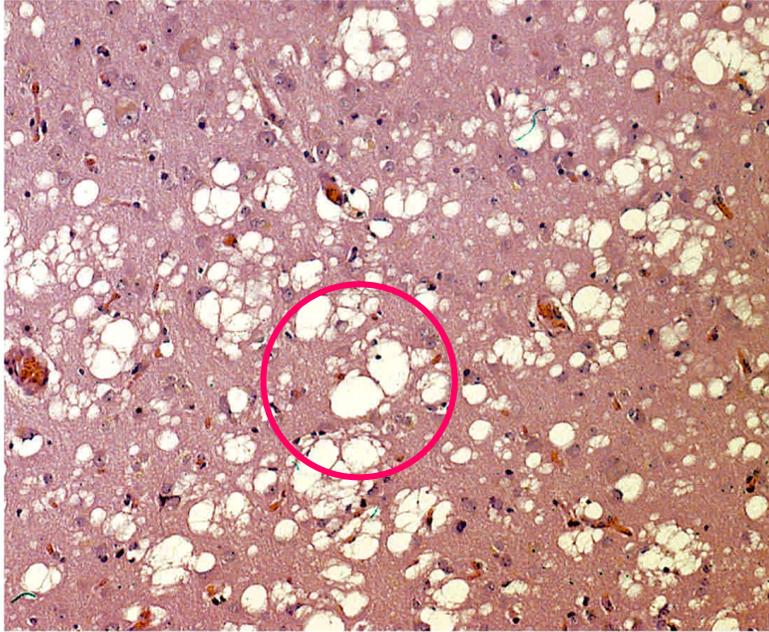
纖維囊腫(cystic fibrosis)

- Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)因發生胺基酸(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

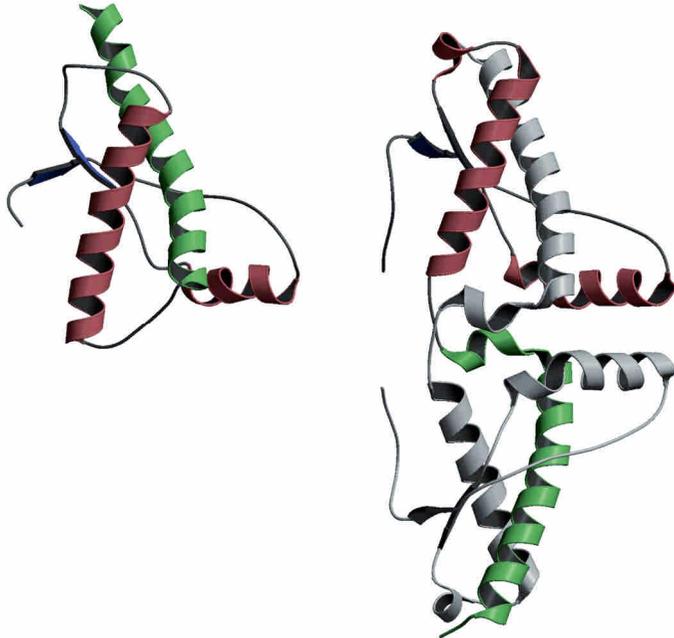
肺氣腫(emphysema)

- α_1 -Antitrypsin發生缺失，無法抑制彈力蛋白酶(elastase)，彈力蛋白受損

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》

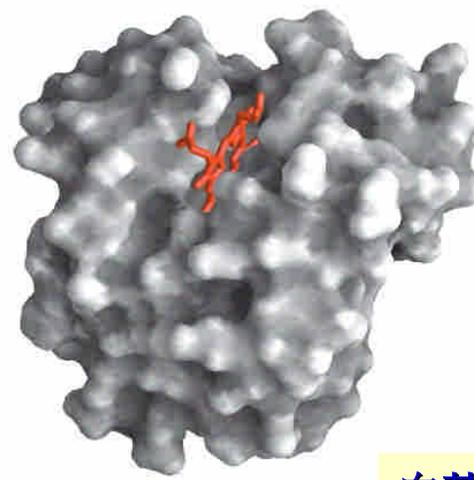
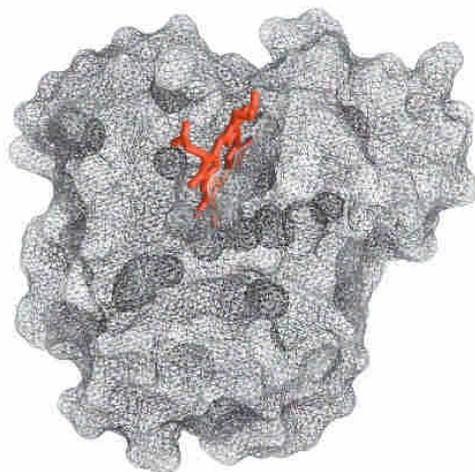
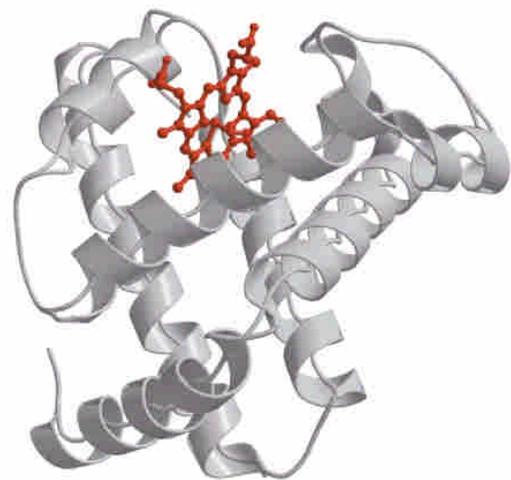
1. 肌紅蛋白與血紅素

肌紅蛋白(myoglobin, Mb)

- 肌紅蛋白負責肌肉細胞內 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X光晶體繞射的結果研判得知，整個肌紅蛋白分子為球狀，摺疊十分緊密，其中**75%**為 α -螺旋構造，血基質約位於蛋白分子的中心並以所含的 Fe^{+2} 與 O_2 接合進行輸送及儲存 O_2
- **Kendrew**因解出結構的貢獻而獲得**1962**年諾貝爾化學獎

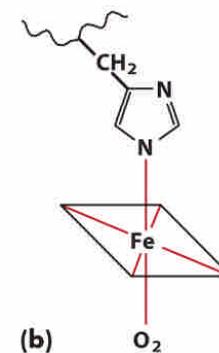
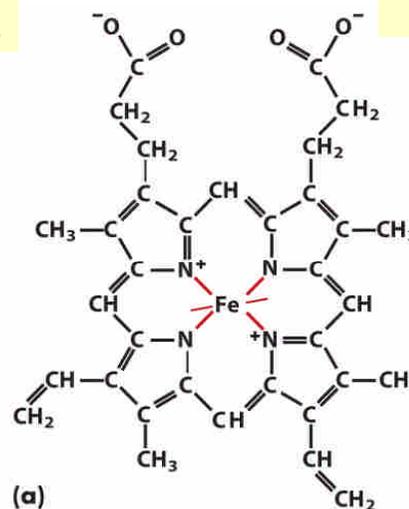


肌紅蛋白(抹香鯨)的三級構造

血基質, 鐵紫素 (heme)

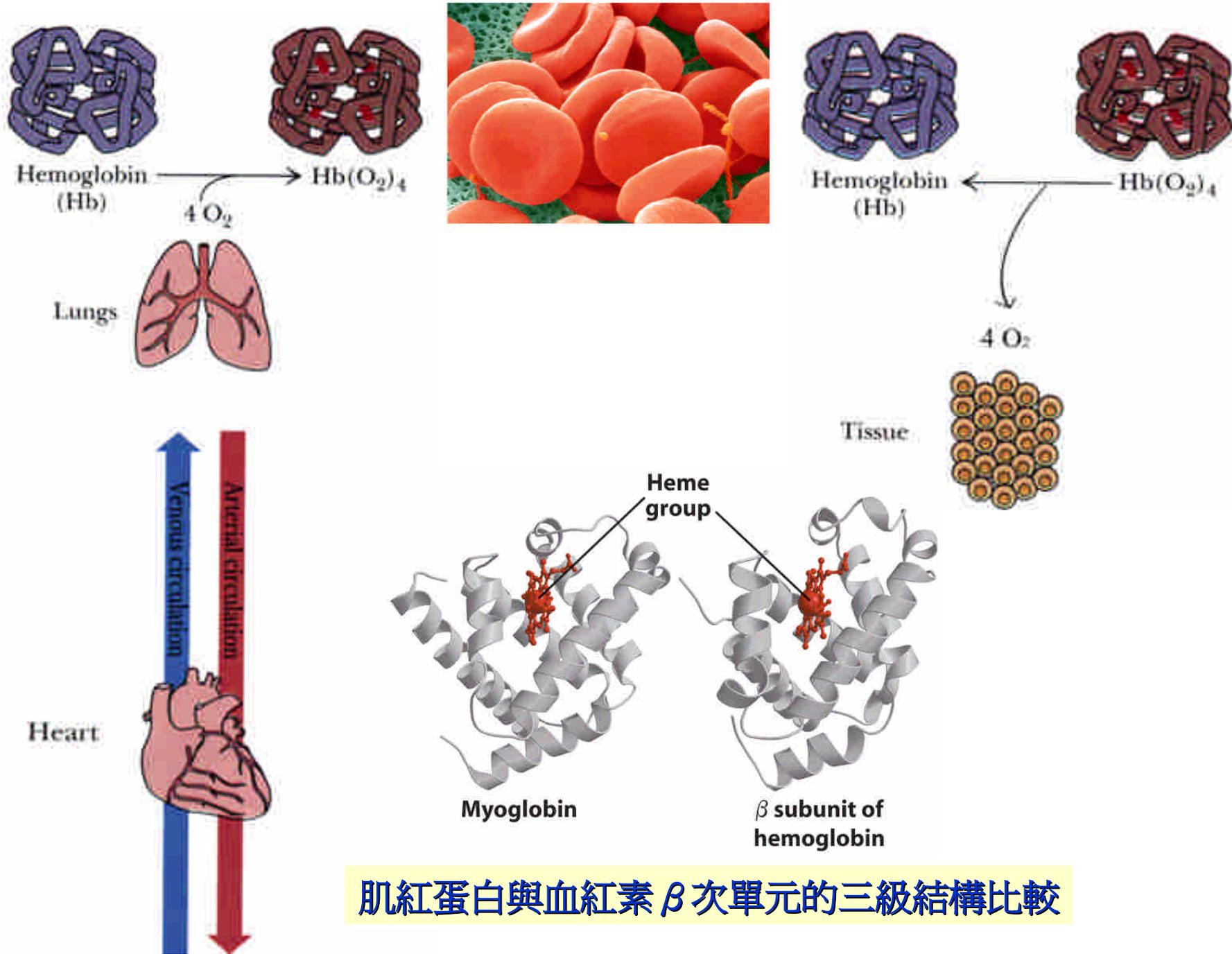


Perutz (左, 血紅素)與Kendrew(右, 肌紅蛋白)
- 同獲1962年諾貝爾化學獎



血紅素(hemoglobin, Hb)

- 血紅素在肺與組織細胞間擔任 O_2 的輸送*
- 血紅素具有四級構造*，由兩個 α 次單元與兩個 β 次單元構成一個四面體的立體排列，組成的 α 次單元(含有**141**個胺基酸)與 β 次單元(含有**146**個胺基酸)的分子中心，分別含有血基質可與 O_2 接合
- **Perutz**因解出構造而與**Kendrew**同獲諾貝爾獎
- α 次單元與 β 次單元的結構雖非完全相同但極為類似，且其個別的立體構造也分別與肌紅蛋白類似*，顯示高度相似的立體結構與其同為攜氧蛋白的功能有關(結構與功能高度相關)



肌紅蛋白與血紅素 β 次單元的三級結構比較

	Mb	Hb α	Hb β
NA1	--1V	1V	1V
	—	—	H
	L	L	L
A1	---S	S	T---
	E	P	P
	G	A	E
	E	D	E
	W	K	K
	Q	T	S
	L	N	A
	V	V	V
	L	K	T
	H	A	A
	V	A	L
	W	W	W
	A	G	G
	K	K	K
	V	V	V
A16	---E	G	---
	A	A	—
B1	--20D	20H	N---
	V	A	20V
	A	G	D
	G	E	E
	H	Y	V
	G	G	G
	Q	A	G
	D	E	E
	I	A	A
	L	L	L
	I	E	G
	R	R	R
	L	M	L
	F	F	L
	K	L	V
B16	---S	S	V---
	:	:	:
	:	:	:
	:	:	:

	Mb	Hb α	Hb β	
		K	A	A
		K	H	H
		K	V	L
	80G	D	D	D
		H	D	80N
		H	M	L
		E	P	K
		A	N	G
		E	A	T
F1	---L	80L	F---	
		K	S	A
		P	A	T
		L	L	L
		A	S	S
		Q	D	E
		S	L	L
Proximal His F8		H	H	H
His F9	---A	A	A	C---
		T	H	D
		K	K	K
		H	L	L
		K	R	H
		I	V	V
G1	--100P	D	D	---
		I	P	100P
		K	V	E
		Y	N	N
		L	F	F
		E	K	R
		F	100L	L
		I	L	L
		S	S	G
		E	H	N
		A	C	V
		I	L	L
		:	:	:
		:	:	:
		:	:	:

	:	:	:	
C1	---H	F	Y---	
	P	P	P	
	E	T	W	
	T	T	T	
	40L	40K	40R	
	E	T	Q	
C7	---K	Y	F---	
	F	F	F	
	D	P	E	
	R	H	S	
	F	F	F	
	K	—	G	
	H	D	D	
	L	L	L	
	K	S	S	
D1	---T	H	T---	
	E	—	P	
	A	—	D	
	E	—	A	
	M	—	V	
	K	—	M	
D7	---A	G	G---	
E1	---S	S	N---	
	E	A	P	
	60D	Q	K	
	L	V	60V	
	K	K	K	
	K	G	A	
Distal His E7		H	H	H
		G	G	G
		V	60K	K
		T	K	K
		V	V	V
		L	A	L
		T	D	G
		A	A	A
		L	L	F
		G	T	S
		A	N	D
		I	A	G

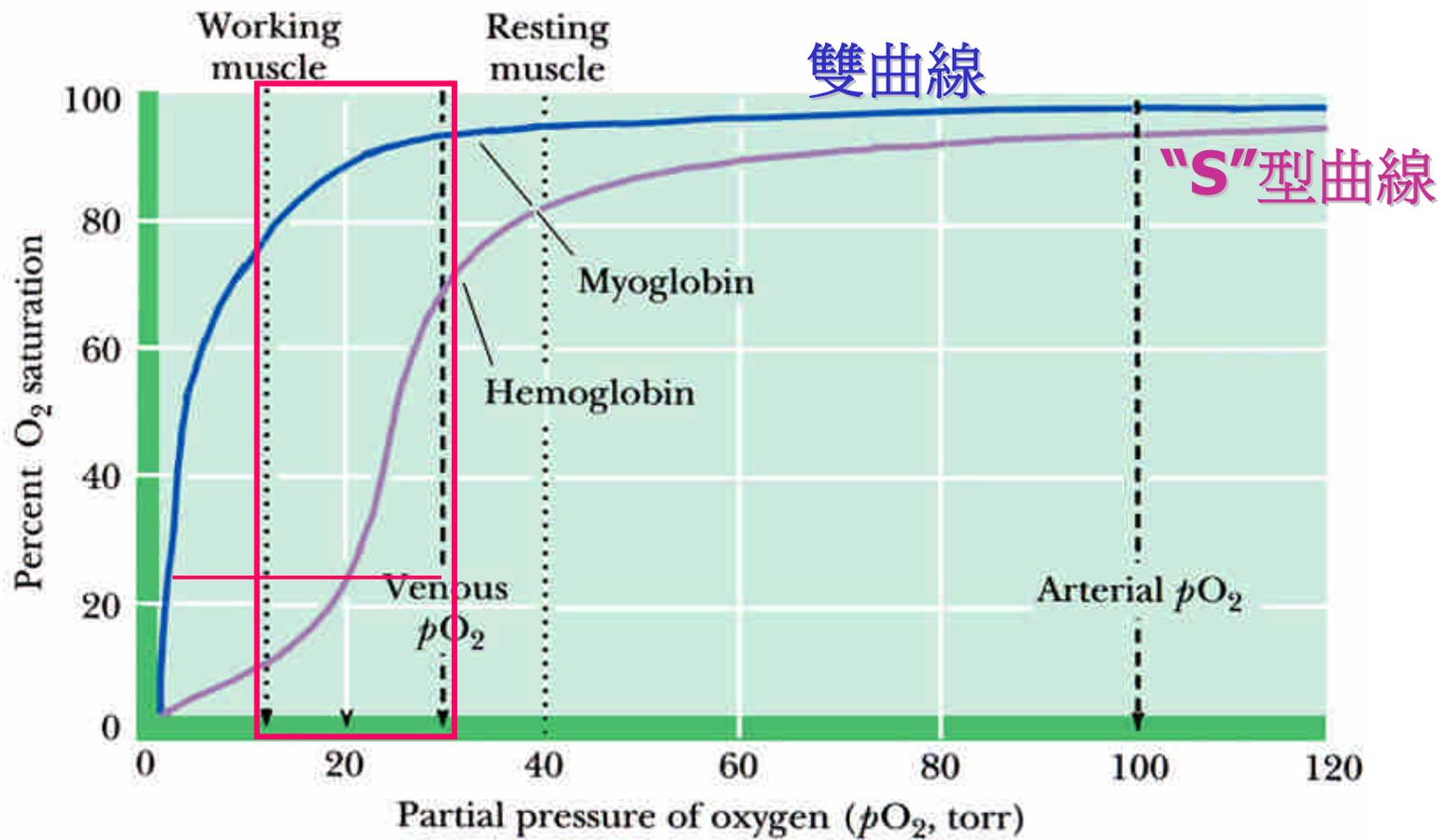
	:	:	:
	H	V	C
	V	T	V
	L	L	L
	H	A	A
	S	A	H
G19	---R	H	H---
	H	L	F
	120P	P	G
	G	A	120K
	D	E	E
	F	F	F
H1	---G	T	T---
	A	P	P
	D	120A	P
	A	V	V
	Q	H	Q
	G	A	A
	A	S	A
	M	L	Y
	N	D	Q
	K	K	K
	A	F	V
	L	L	V
	E	A	A
	L	S	G
	F	V	V
	R	S	A
	140K	T	N
	D	V	140A
	I	L	L
	A	T	A
H21	---A	S	H---
	K	K	K
	Y	140Y	Y
	K	141R	146H
	E		
H26	---L	---	---
	G		
	Y		
	Q		

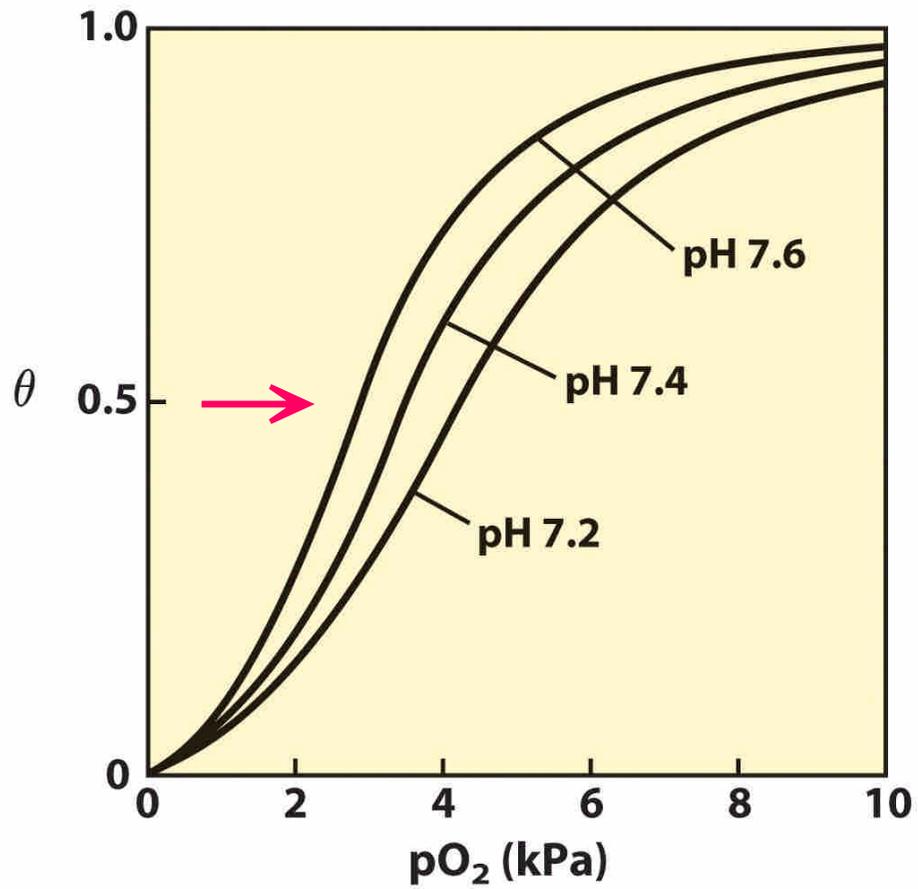
Hb α
and
Hb β
only

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

血紅素具有四級構造對其功能的影響

- 在不同的 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***，而 O_2 和肌紅蛋白間的接合關係則呈現**"雙曲線"**型關係
- 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 與任何一個次單元的接合會加速 O_2 與其他次單元的接合
- **波爾效應**描述 pO_2 與**pH值**對血紅素與 O_2 接合的影響， pO_2 愈高，pH值愈高，血紅素被 O_2 飽和(接合)的程度愈高，如在肺部， pO_2 與pH值均高，大部分血紅素均被 O_2 飽和，而在組織， 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，但相同的條件下，



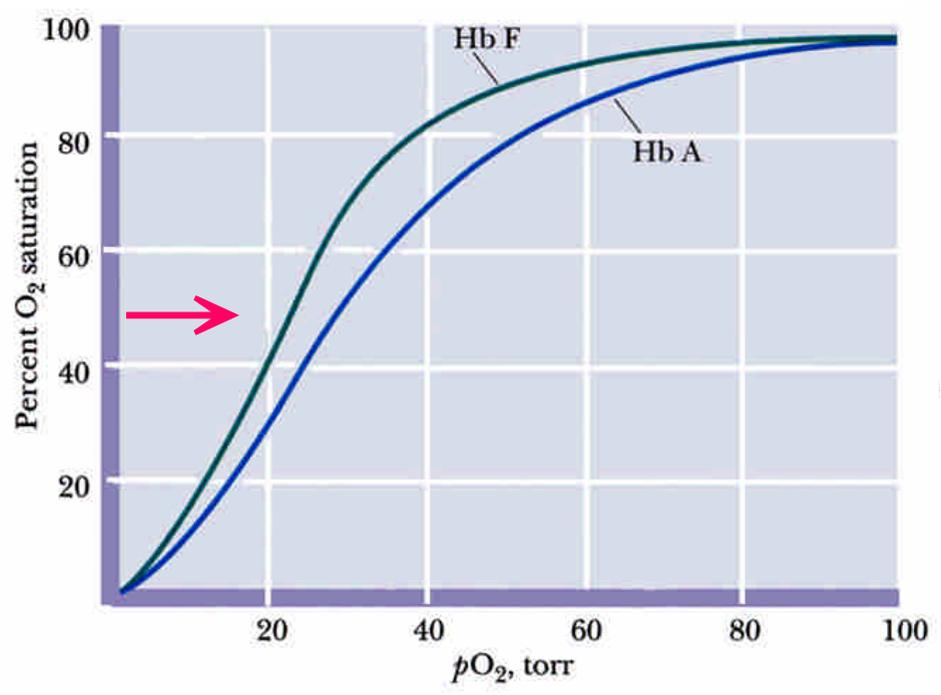


pH值對血紅素與 O_2 接合的影響

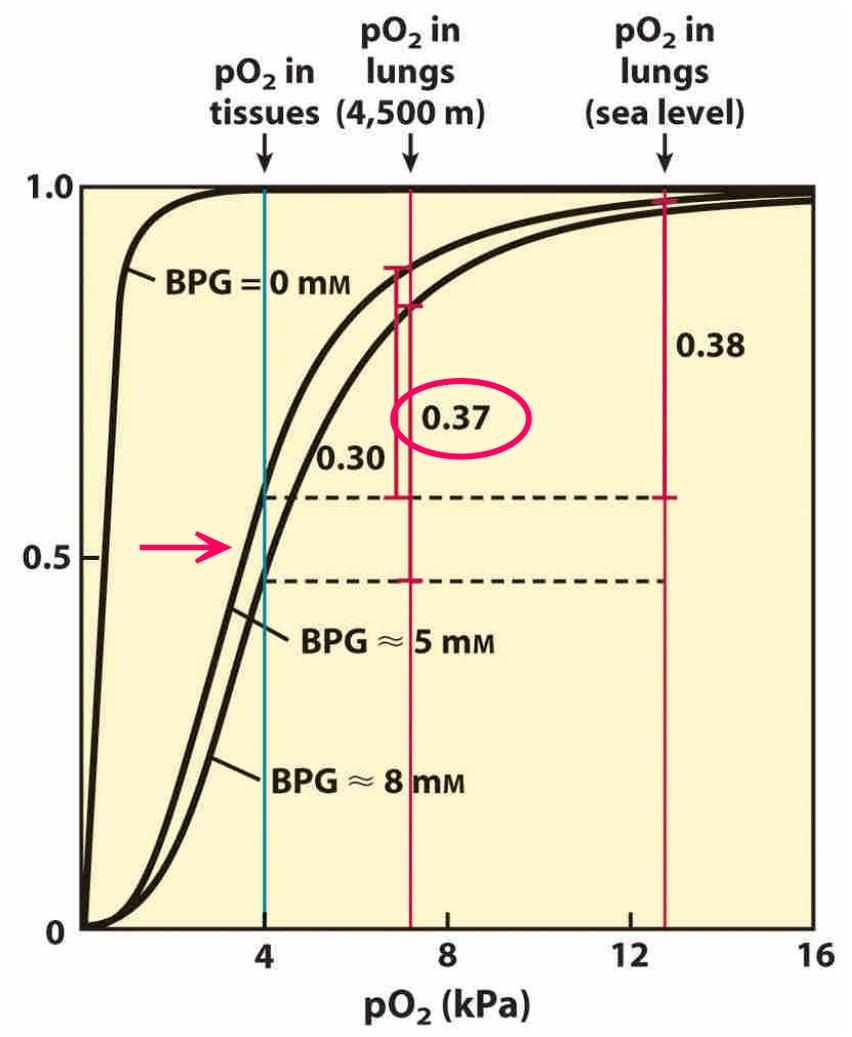
肌紅蛋白不具有四級構造，其對 O_2 的接合不具協同作用，也不受 pO_2 或 pH 值的影響

- 血紅素與 O_2 的接合尚可受到**2,3-BPG (2,3-bis-phosphoglycerate)**的調控，此調控對胎兒的發育極為重要，成人的血紅素(**HbA**)的組成為 $\alpha_2\beta_2$ ，**2,3-BPG**可接合至 β 次單元，使得成人血紅素對 O_2 的親和性降低，而胎兒血紅素(**HbF**)的組成為 $\alpha_2\gamma_2$ ，無 β 次單元可與**2,3-BPG**可接合，不受**2,3-BPG**影響，對 O_2 的親和性較成人血紅素高

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



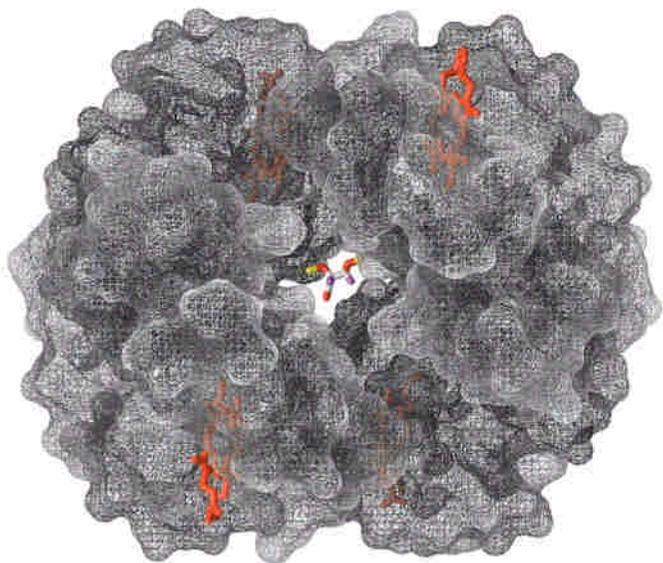
相同pH值與2,3-BPG濃度下,
 HbA與HbF對氧分壓的飽和曲線



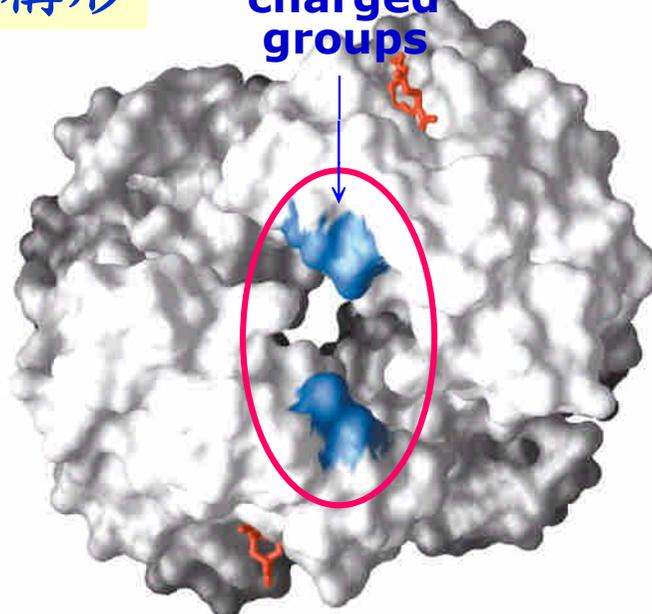
2,3-BPG對血紅素與O₂接合的影響

T構形

Positively charged groups



(a)

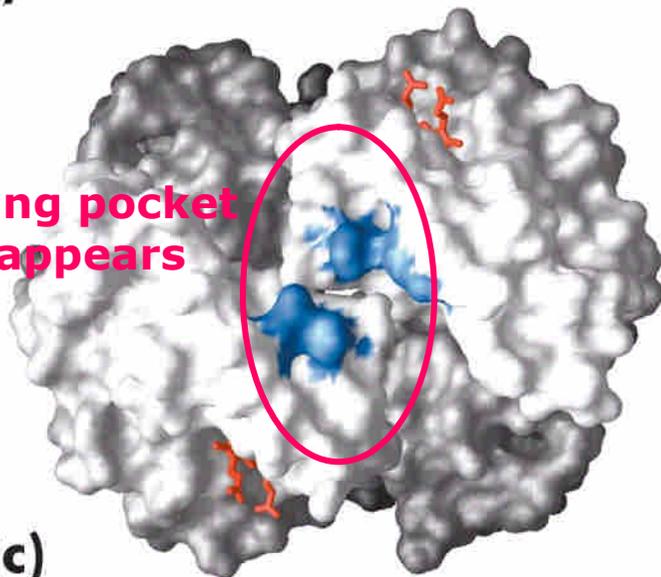


(b)

BPG與deoxy血紅素的接合

Binding pocket disappears

R構形



(c)

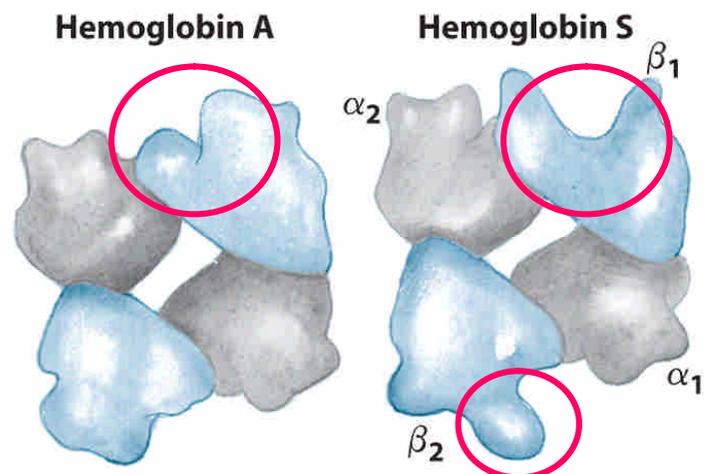
2. 與血紅素相關的疾病

鐮形細胞貧血症(**sickle-cell anemia**)*

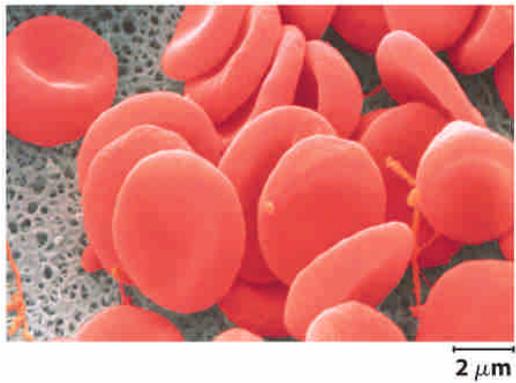
- 此病症為一“**molecular disease**”，由**Pauling**於**1949**年提出的
- **Sickle-cell hemoglobin (HbS)**分子，其 β 次單元的**Glu6**(側鏈帶負電)因突變置換為**Val6** (側鏈為疏水)

地中海型貧血症(**thalassemias**)

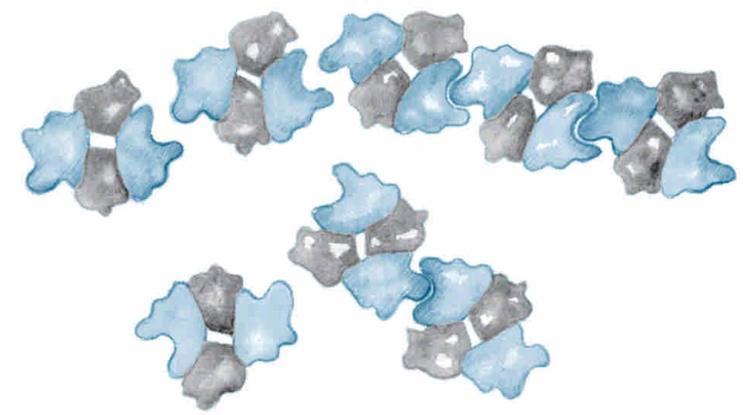
- α -**Thalasseмииs** (甲型, β_4 或 γ_4)，其 α 次單元有缺失
- β -**Thalasseмииs** (乙型)，其 β 次單元有缺失



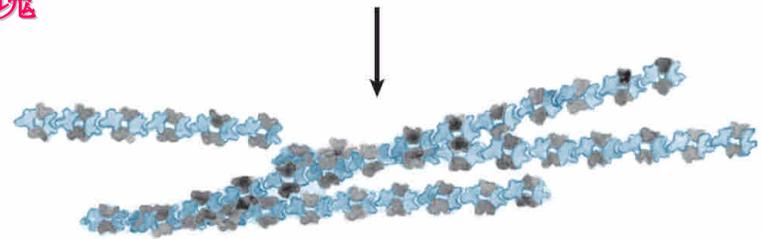
表面疏水的區塊



正常與鐮形細胞貧血症患者的紅血球

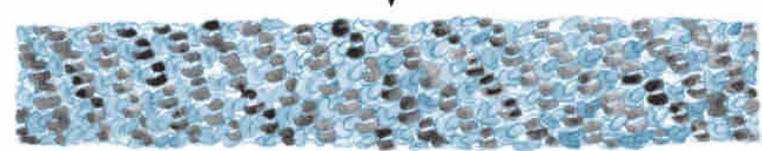


Interaction between molecules



Strand formation

溶解度差



Alignment and crystallization
(fiber formation)

鐮形細胞貧血症患者紅血球內的血紅素

3. 角蛋白，膠原蛋白與絲纖維蛋白

此三種蛋白質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進一步組合形成特殊的構造

- 組成的構造具有強韌與穩定的特性，符合擔任保護與支撐的功能

角蛋白

- 角蛋白由兩股 α -螺旋相互纏繞形成**coiled coils***，其一級結構具有**(a-b-c-d-e-f-g)_n**的序列，其中**a**與**d**為非極性胺基酸
- 頭髮的構造*含有共價的**cross-links** (雙硫鍵)
- 燙髮(**permanent wave**)的原理與所含的半胱胺酸(具有**-SH**官能基)有關

頭髮的構造

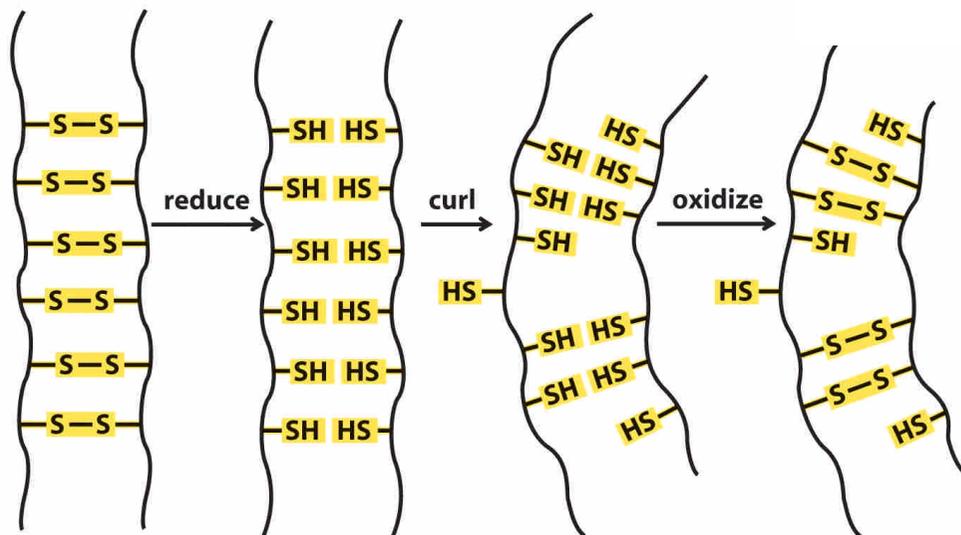
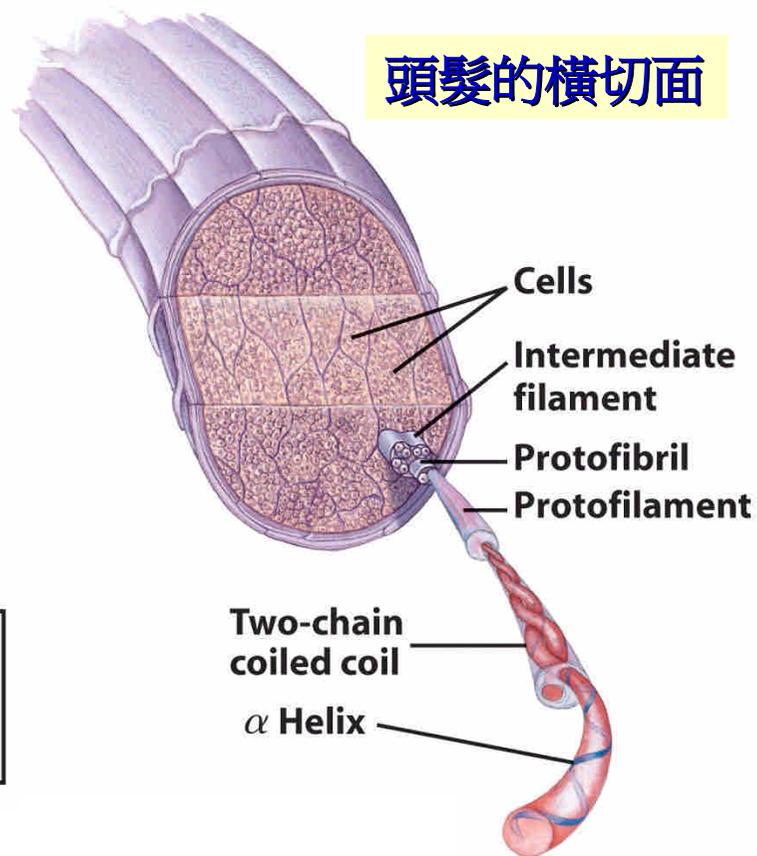
Keratin α helix 

Two-chain coiled coil 

Protofilament {  } 20-30 Å

Protofibril {  }

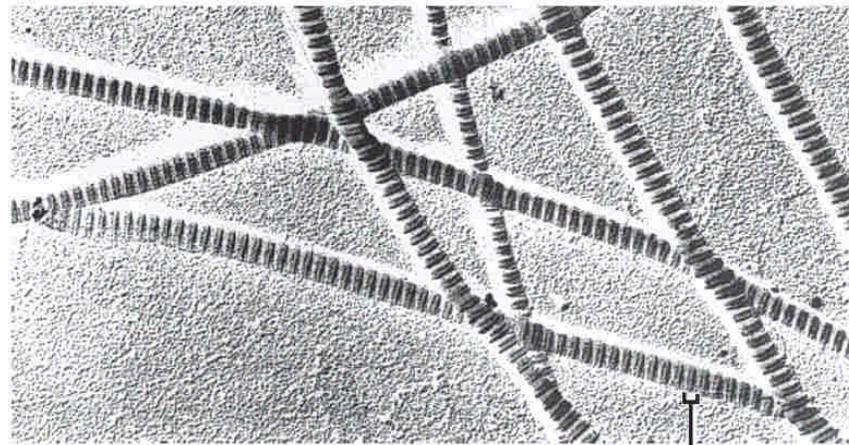
頭髮的橫切面



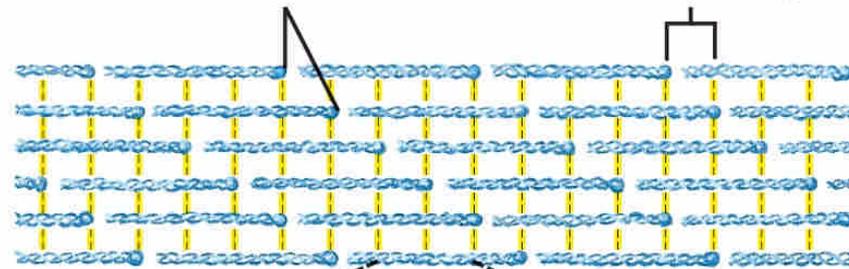
燙髮的生化基礎

膠原蛋白

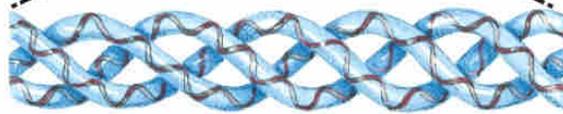
- 膠原蛋白的基本構造為特殊的三股螺旋狀構造*
- 甘胺酸(**Gly**)含量佔**1/3**且富含脯胺酸(**Pro**)
- 膠原蛋白的一級構造具有**Gly-X-Y**序列，其中**X**為**Pro**，**Y**為**Pro**或**Hyp** (**Gly**佔**35%**，**Pro**或**Hyp**佔**21%**)
- **Hyp**為**Pro**經轉譯後修飾作用加上**-OH**，此修飾作用有助於維持蛋白質結構的穩定，修飾酵素的活性仰賴維生素**C** (抗壞血酸)，維生素**C**嚴重缺乏會導致壞血病(**scurvy**)
- **Ehlers-Danlos syndrome**即因甘胺酸被置換成側鏈較大的胺基酸，因此三股螺旋狀構造不穩定，與習慣性脫臼有關



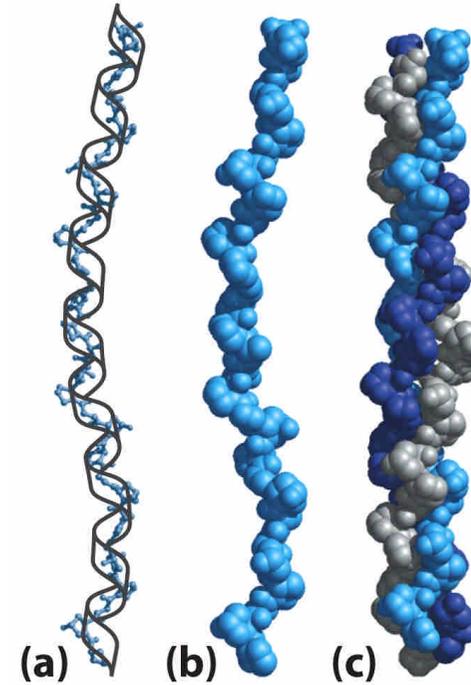
250 nm
Heads of collagen molecules
Cross-striations
640 Å (64 nm)



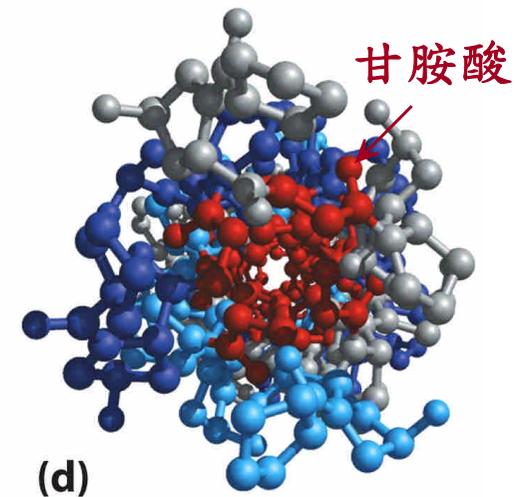
Section of collagen molecule



膠原蛋白纖維的結構

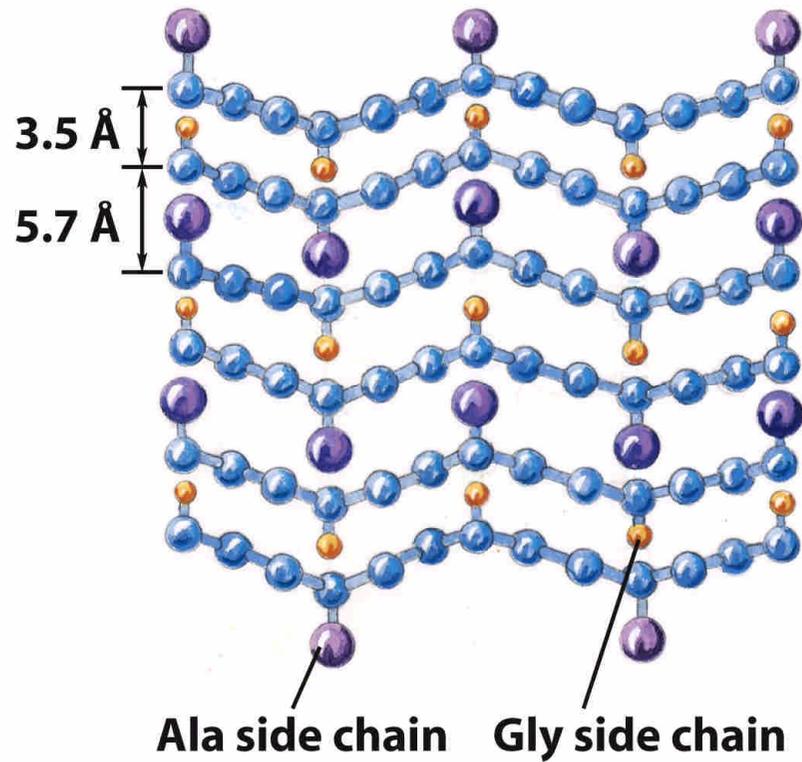


(a) (b) (c)



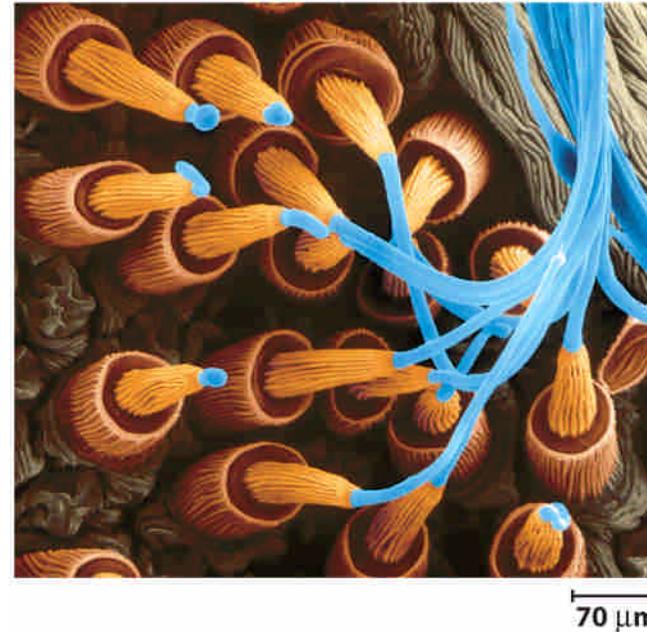
(d)

膠原蛋白的結構



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



絲纖維蛋白

- 絲纖維蛋白形成 β -褶片構造，且層層相疊*
- 絲纖維蛋白富含甘胺酸與甲胺酸(**Ala**)，且每兩個胺基酸就有一個甘胺酸出現

纖維狀蛋白因具有特殊的一級結構(特定的胺基酸組成與排列)而形成特殊的構造，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

《蛋白質構形的變化》

1. 蛋白質的構形變化

蛋白質分子為**dynamic**分子

以球狀蛋白為例

- 分子的振動，如胺基酸側鏈的擺動*等，變化微小，有如“**breathe**”般
- 構形的變化(**conformational change**)*，變化較顯著，與蛋白質的活性或功能有關

2. 蛋白質構形變化的例子

酵素與受質，**血紅素與O₂**與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
<ol style="list-style-type: none"> 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

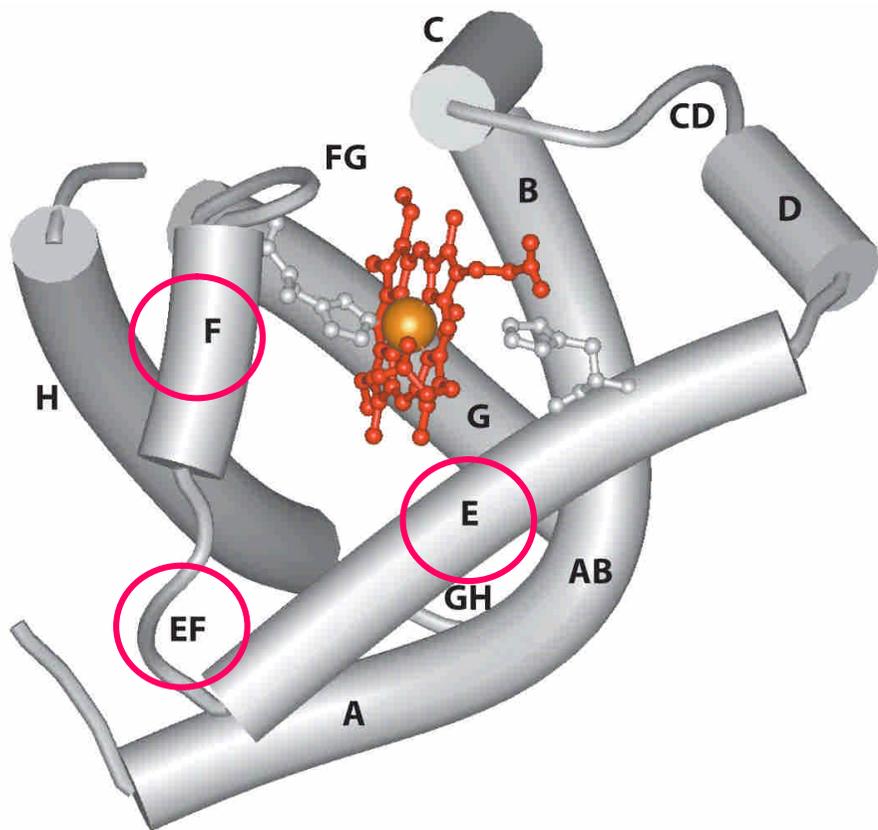
3. 氧的接合蛋白

肌紅蛋白(Mb)與血紅素(Hb)

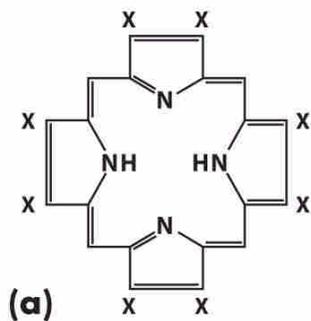
- O_2 的接合部位為鐵紫素或血基質(heme, Fe^{+2})
- 血基質與 O_2 接合的能力受蛋白質結構的影響，游離的血基質，其CO的接合與 O_2 的接合為**25,000 : 1**，而肌紅蛋白與血紅素*，其CO的接合與 O_2 的接合為**200 : 1**

肌紅蛋白與血紅素的功能受其結構的影響

- 在生物功能上，肌紅蛋白負責 O_2 的儲存，血紅素負責 O_2 的輸送*
- 在結構上，肌紅蛋白具有三級構造，血紅素具有四級構造($\alpha_2\beta_2$)*

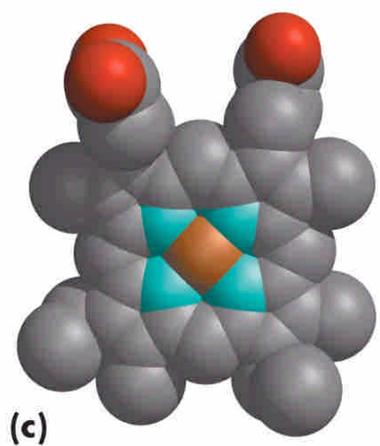
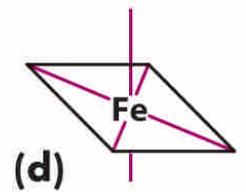
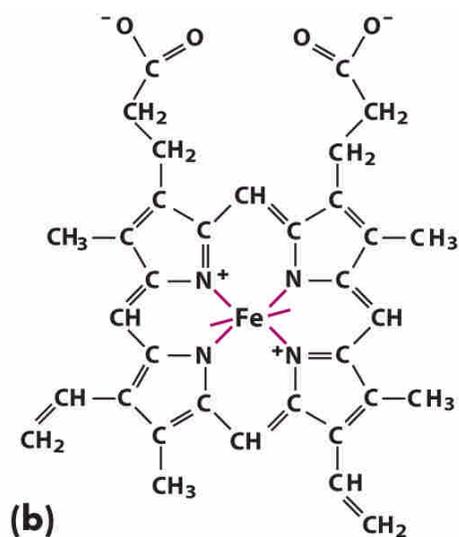


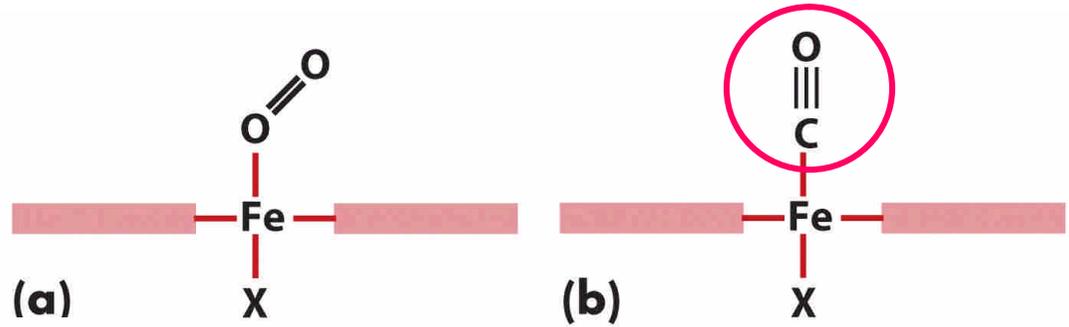
肌紅蛋白



Protoporphyrin IX

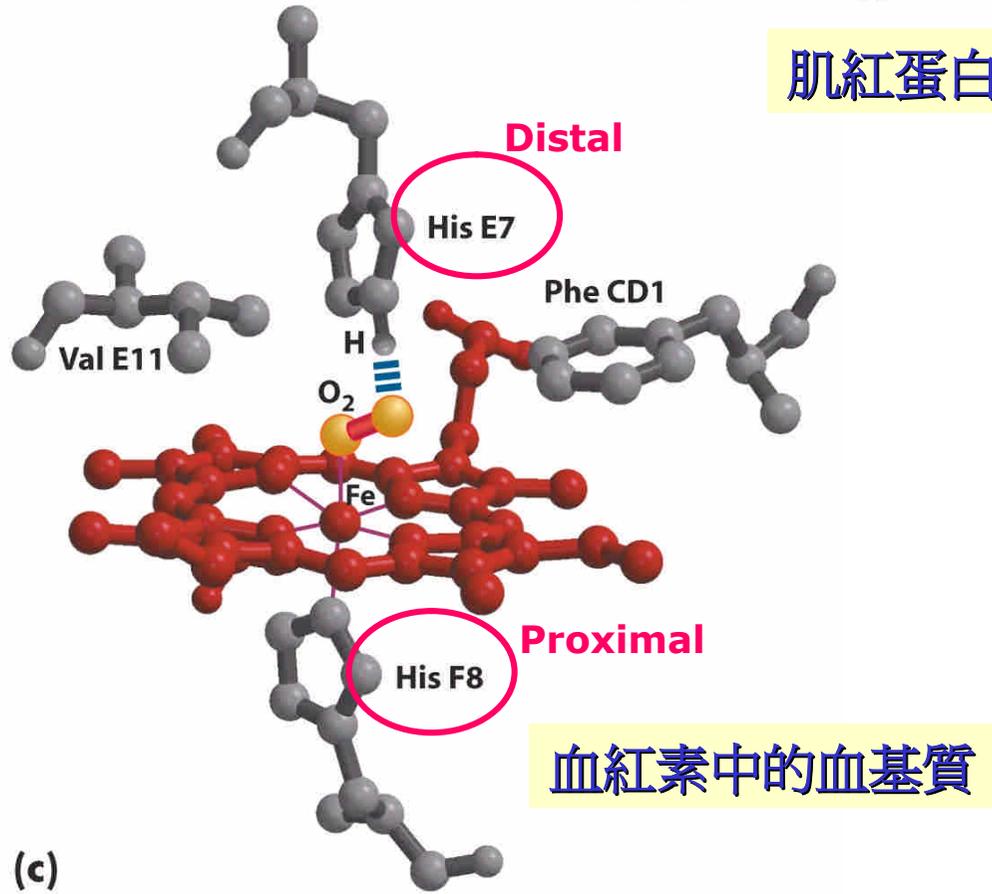
血基質



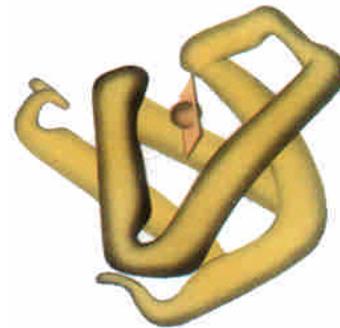


肌紅蛋白

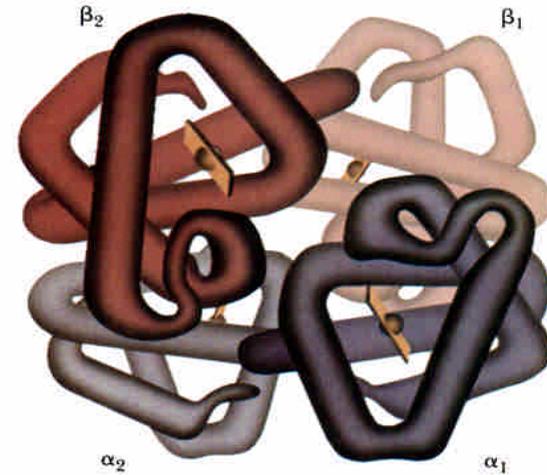
游離的血基質



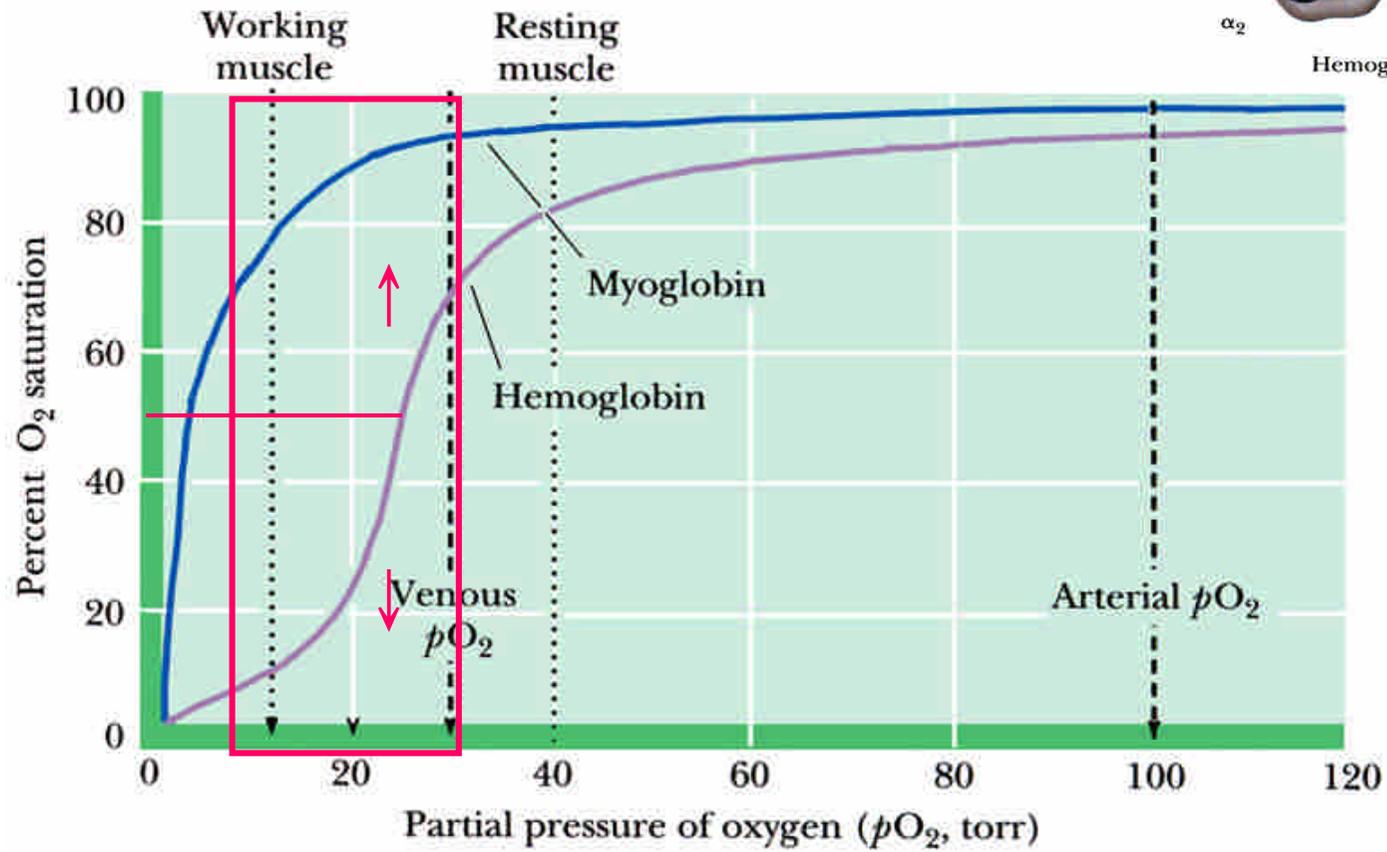
血紅素中的血基質



Myoglobin (Mb)



Hemoglobin (Hb)

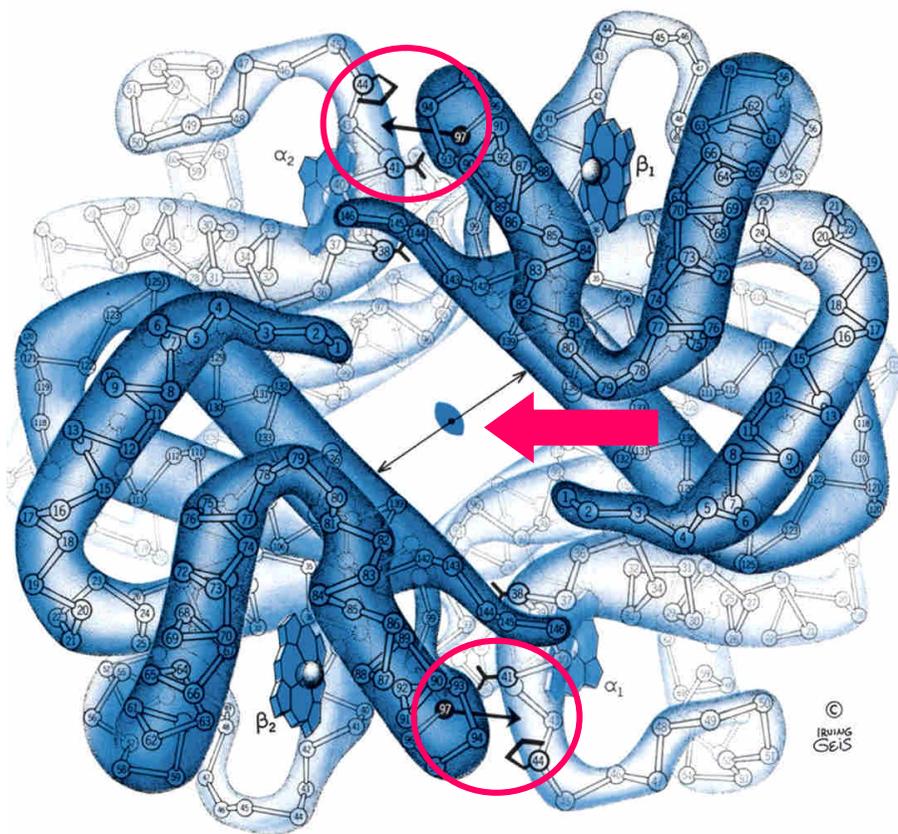


- 在與 O_2 的接合上，肌紅蛋白無協同性(雙曲線圖形)，血紅素具協同性("S"形曲線圖形)*，肌紅蛋白接 O_2 的能力不受調節，血紅素接 O_2 的能力受多種因素調節

血紅素的構形變化*

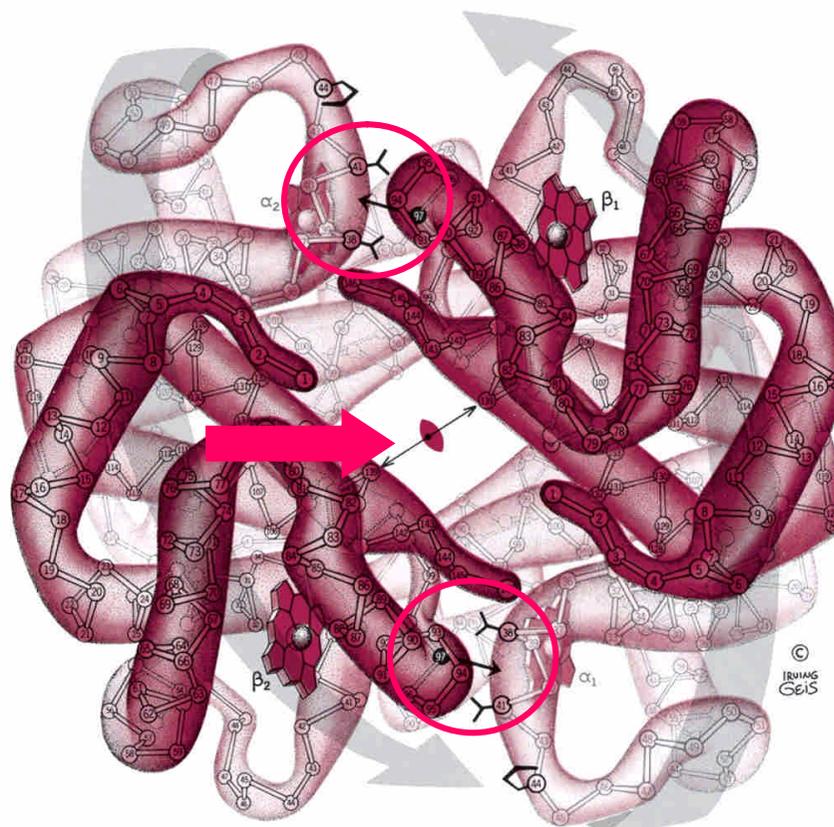
- **T構形(T state, tensed或taut)**指血紅素分子結構較緊縮，為不接氧的形式(**deoxy form**)，對 O_2 的親和力弱
- **R構形(R state, relaxed)**指血紅素分子結構較膨鬆，為接氧的形式(**oxy form**)，對 O_2 的親和力強

不接氧



T構形

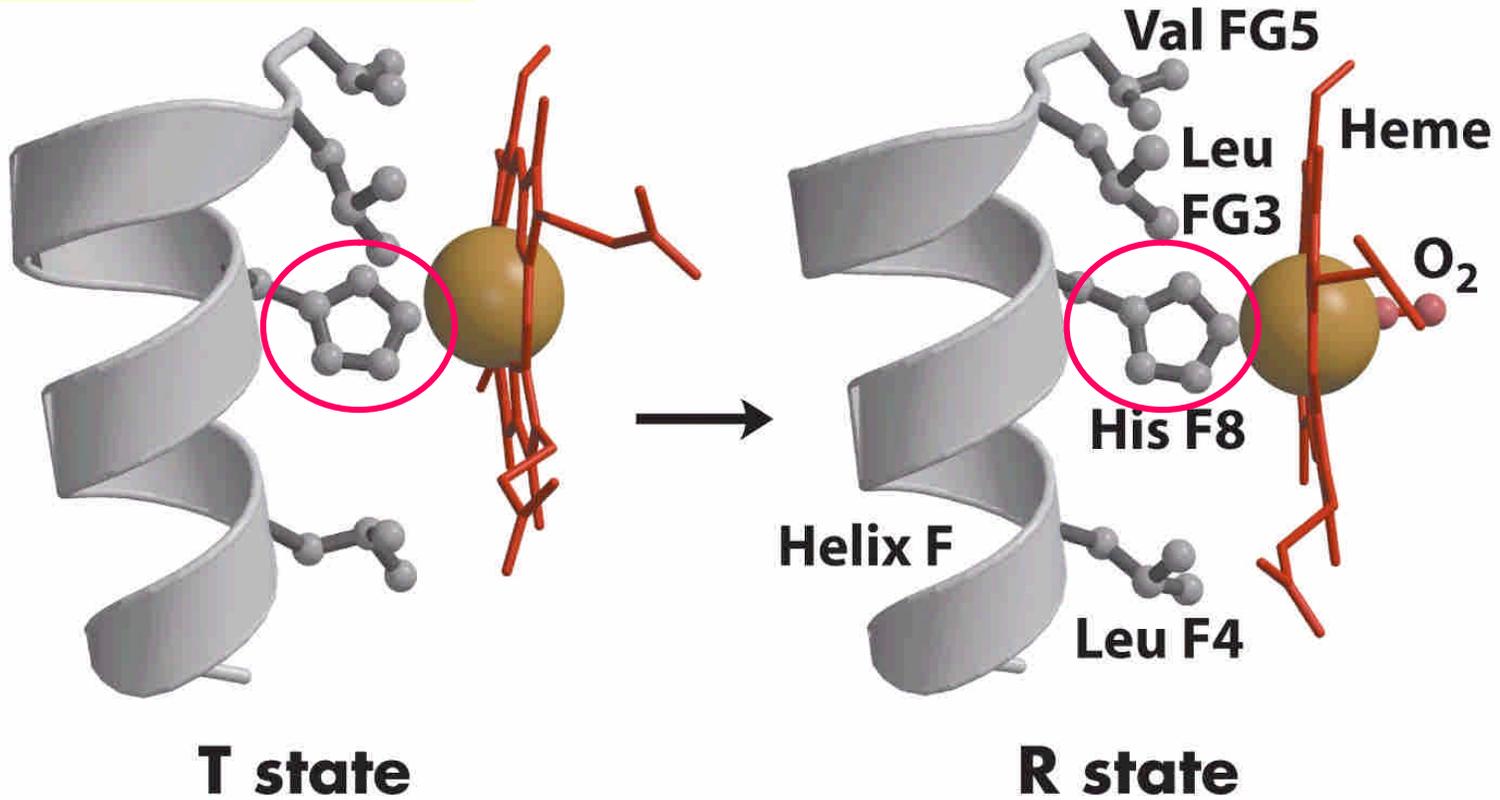
接氧



R構形

Porphyrin 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



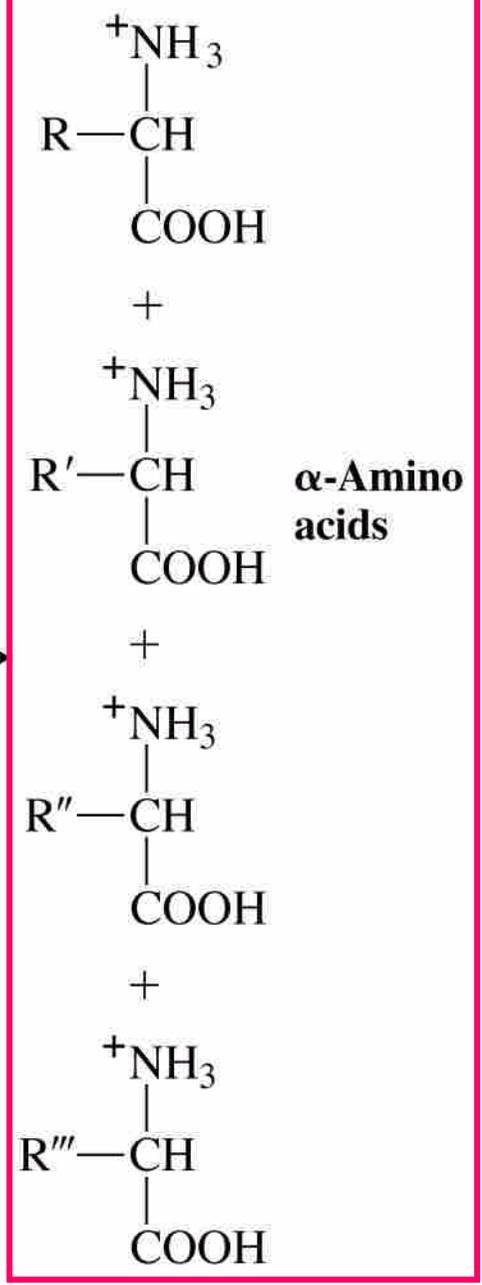
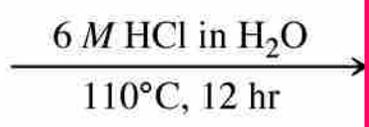
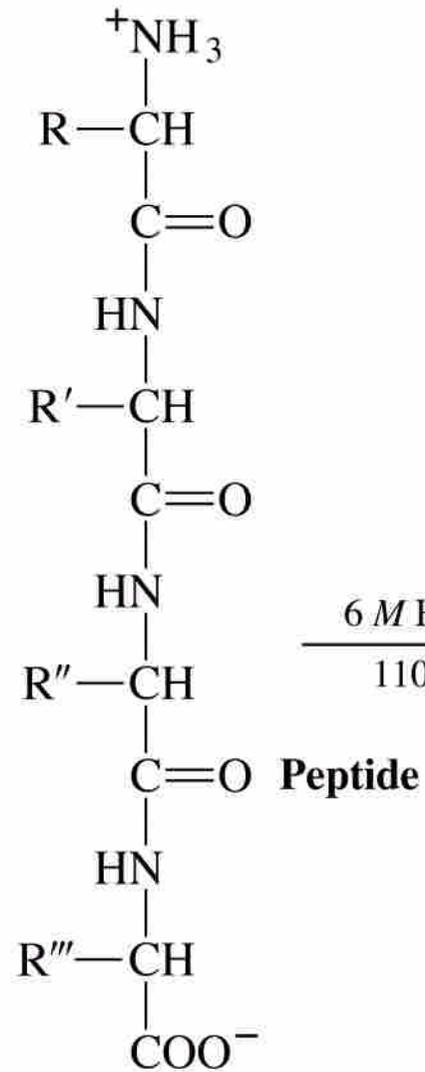
血紅素接O₂時血基質鄰近區域構形的改變

血紅素為一種異位蛋白(**allosteric protein**)，具有
活性部位與調節部位

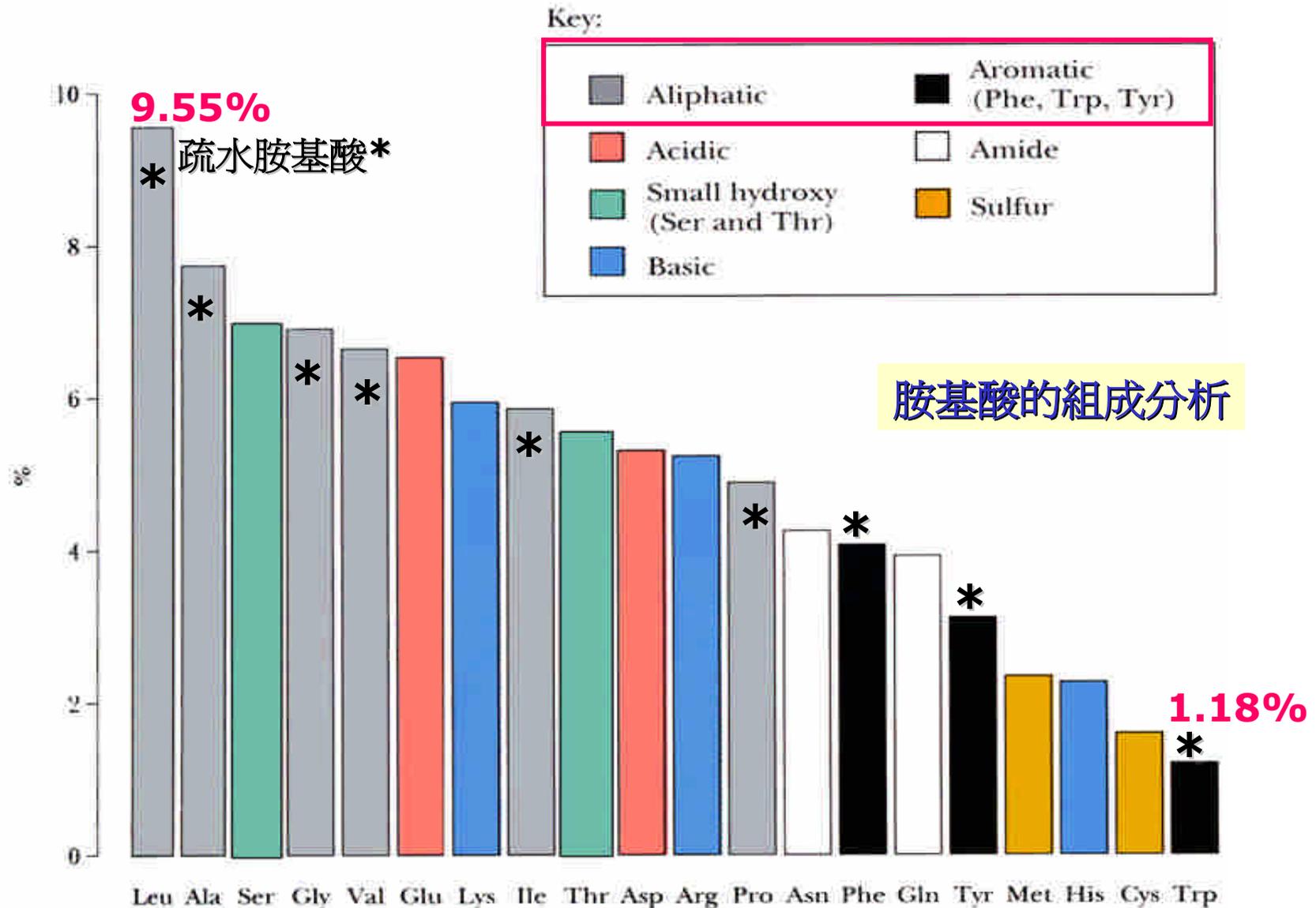
- **Allos** (希臘文意為“other”)，**Stereos** (希臘文意為“shape”)
- 活性部位是血紅素與 O_2 接合的部位(相當於酵素的受質接合部位)，與 O_2 的接合具有協同性
- 調節部位是調節劑接合的部位，如**2,3-BPG**、 H^+ 與 CO_2 等阻礙劑對血紅素的影響阻礙劑，另尚有活化劑

《蛋白質結構的測定與預測》

1. 蛋白質的一級構造決定其立體構造，而蛋白質的立體構造與其生物功能有密切的關係，因此研究蛋白質的功能需了解蛋白質的一級構造
2. 蛋白質一級構造的測定為求出多肽中胺基酸的組成與排列次序
胺基酸的組成分析
 - 蛋白質經酸水解*後，胺基酸的混合物可利用由 **Stein & Moore (1972年諾貝爾化學獎得主)**所開發的胺基酸分析儀分析其組成
 - 胺基酸的組成可提供多種資訊*



蛋白質的酸水解



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.

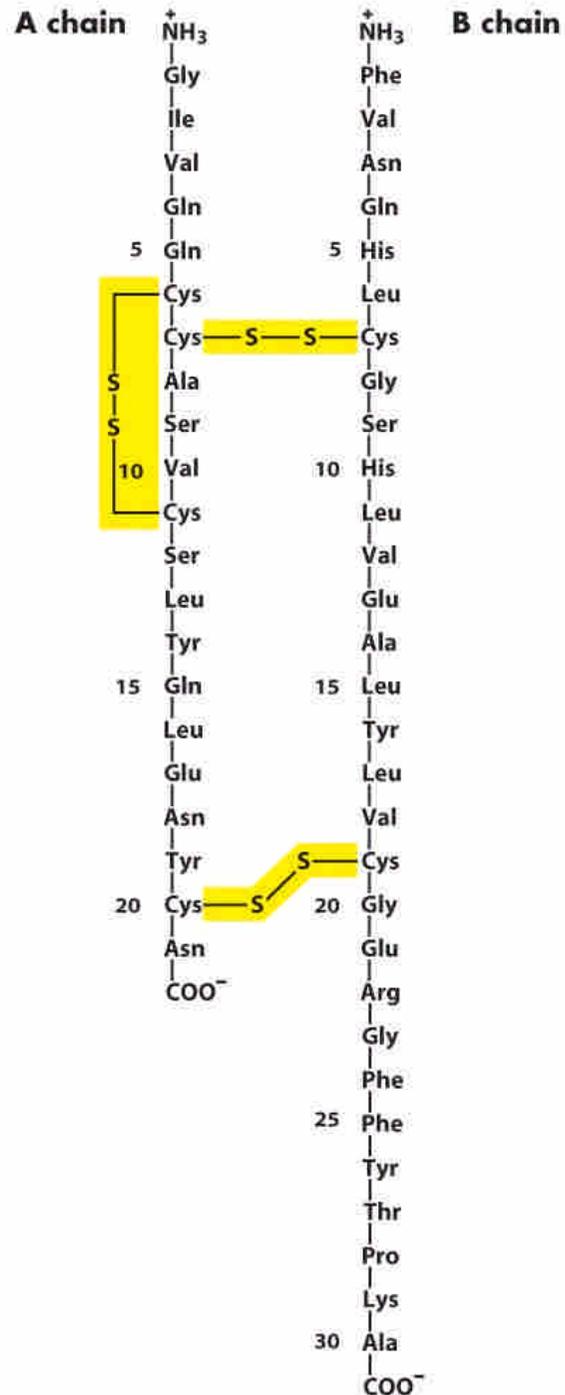
Amino Acid Composition of Some Selected Proteins

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

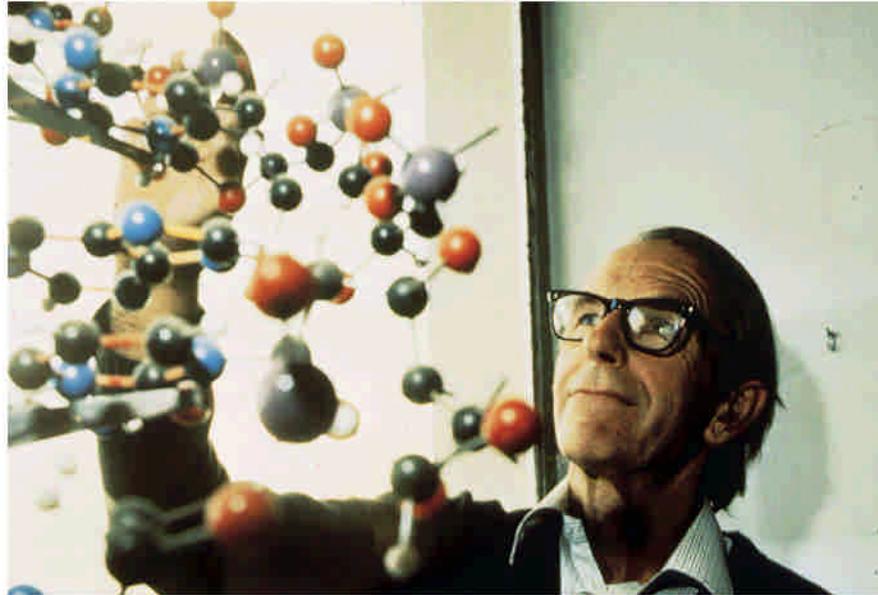
胺基酸的排列順序

- 可利用胺基酸定序儀取得
- **Sanger***因定出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
(**Sanger**另因提出分析**DNA**序列的方法，於**1980**年再獲得諾貝爾化學獎)
- 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



牛胰島素的定序

- 耗時約10年, 使用約100克的蛋白質



Frederick Sanger (1918~)

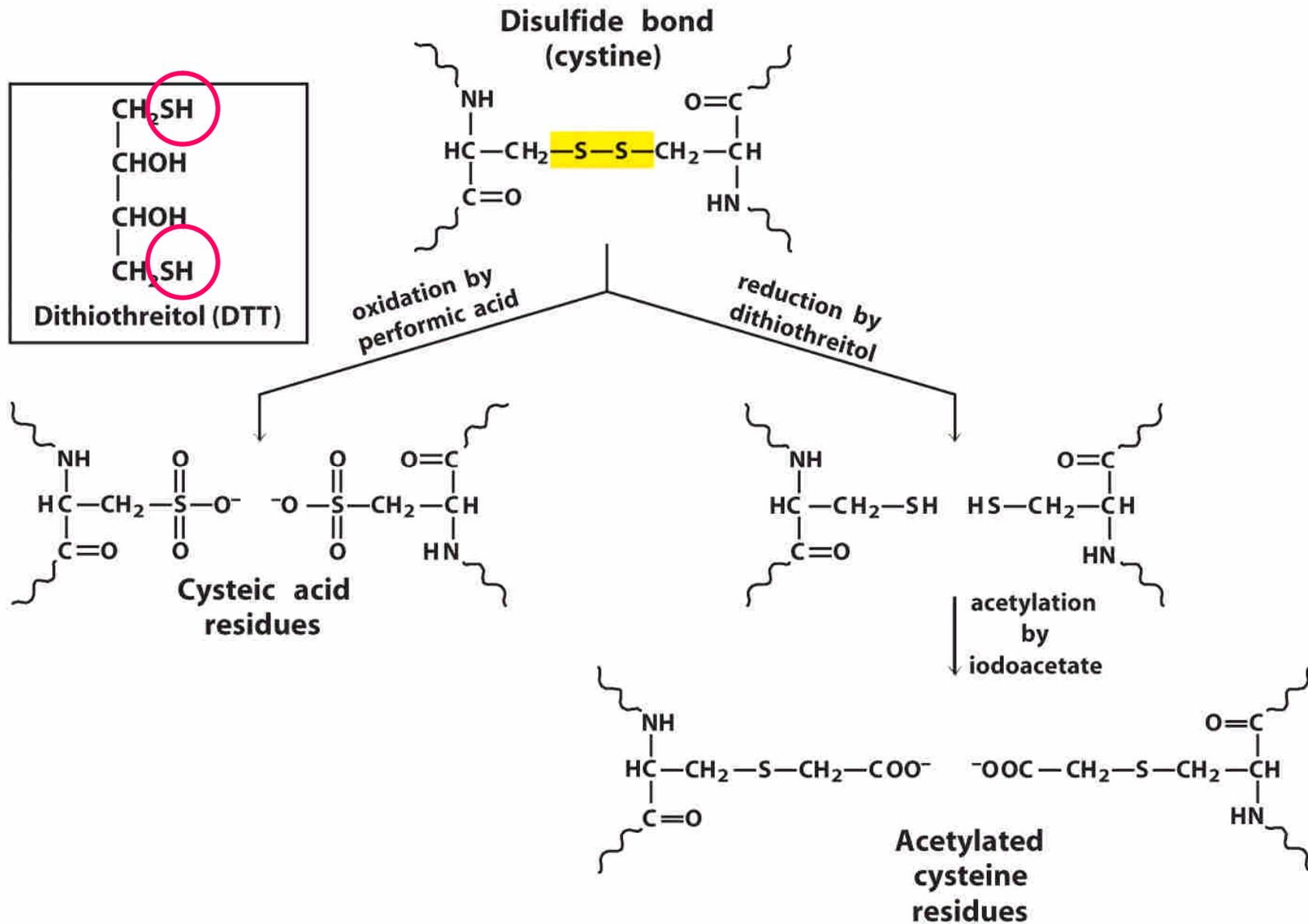
- 1958年諾貝爾化學獎(蛋白質定序)

- 1980年諾貝爾化學獎(DNA定序)

蛋白質定序步驟*

- 蛋白質純化，可利用蛋白質的大小、帶電特性、溶解度或與特定物質的吸附作用等
- 次單元的分離，可利用高鹽濃度或改變溶液的pH值
- **N**端與**C**端胺基酸的定性分析
- 利用酵素或化學試劑的作用將多肽鏈分割成小片段，確保定序結果的正確性
- 胺基酸自動定序
- 序列的重組
- 雙硫鍵的定位*，可利用對角線電泳

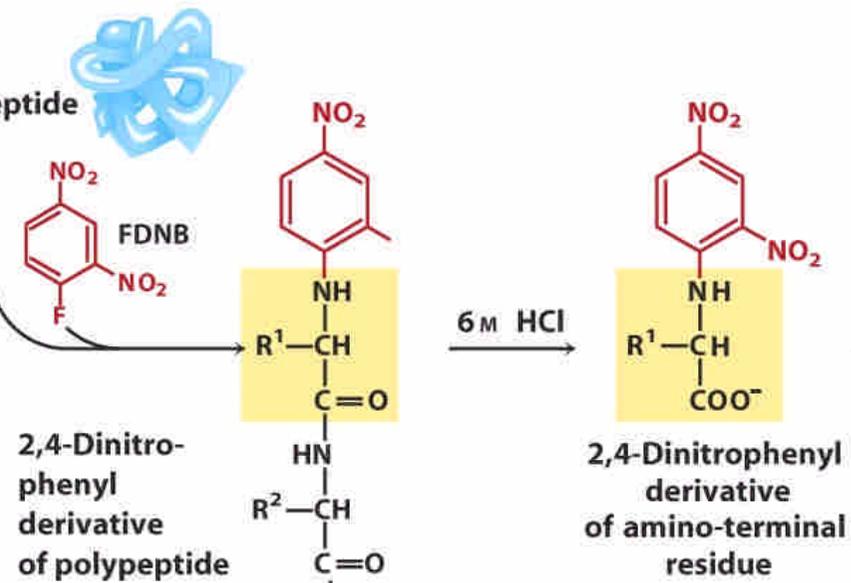
蛋白質雙硫鍵的破壞



N端胺基酸定性

FDNB

(a)



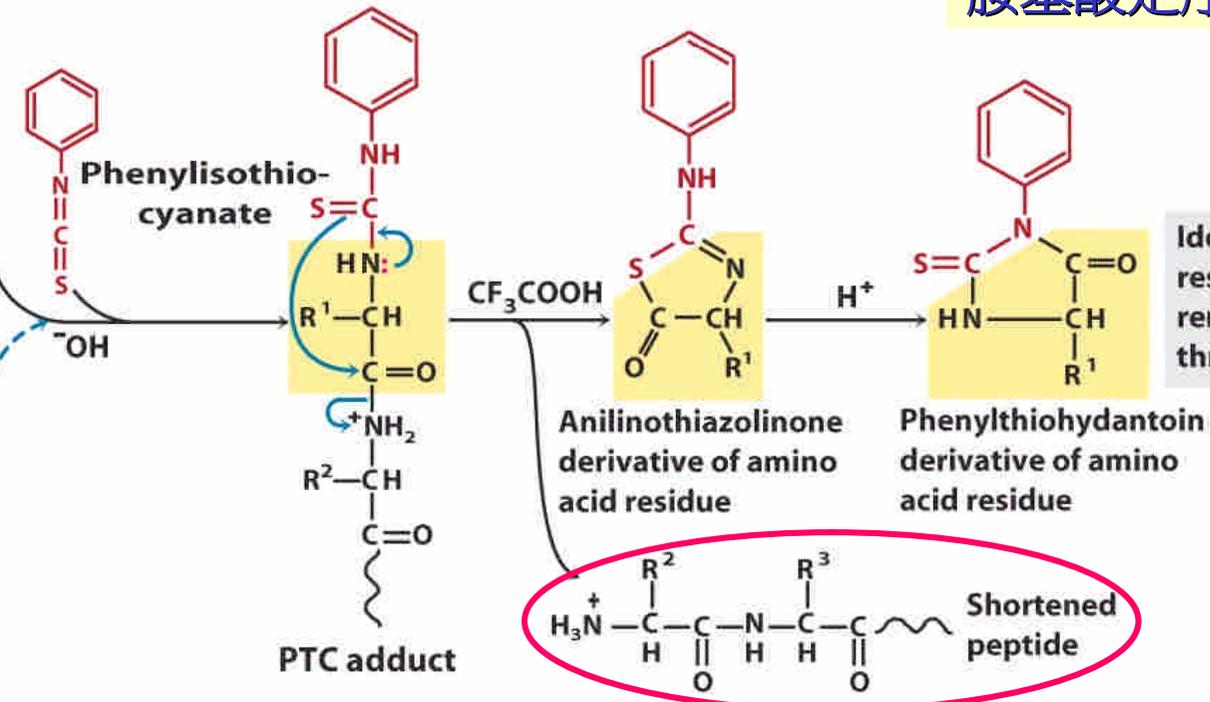
Free amino acids

Identify amino-terminal residue of polypeptide.

胺基酸定序反應

PITC

(b)



Identify amino-terminal residue; purify and recycle remaining peptide fragment through Edman process.

專一性, 可預測

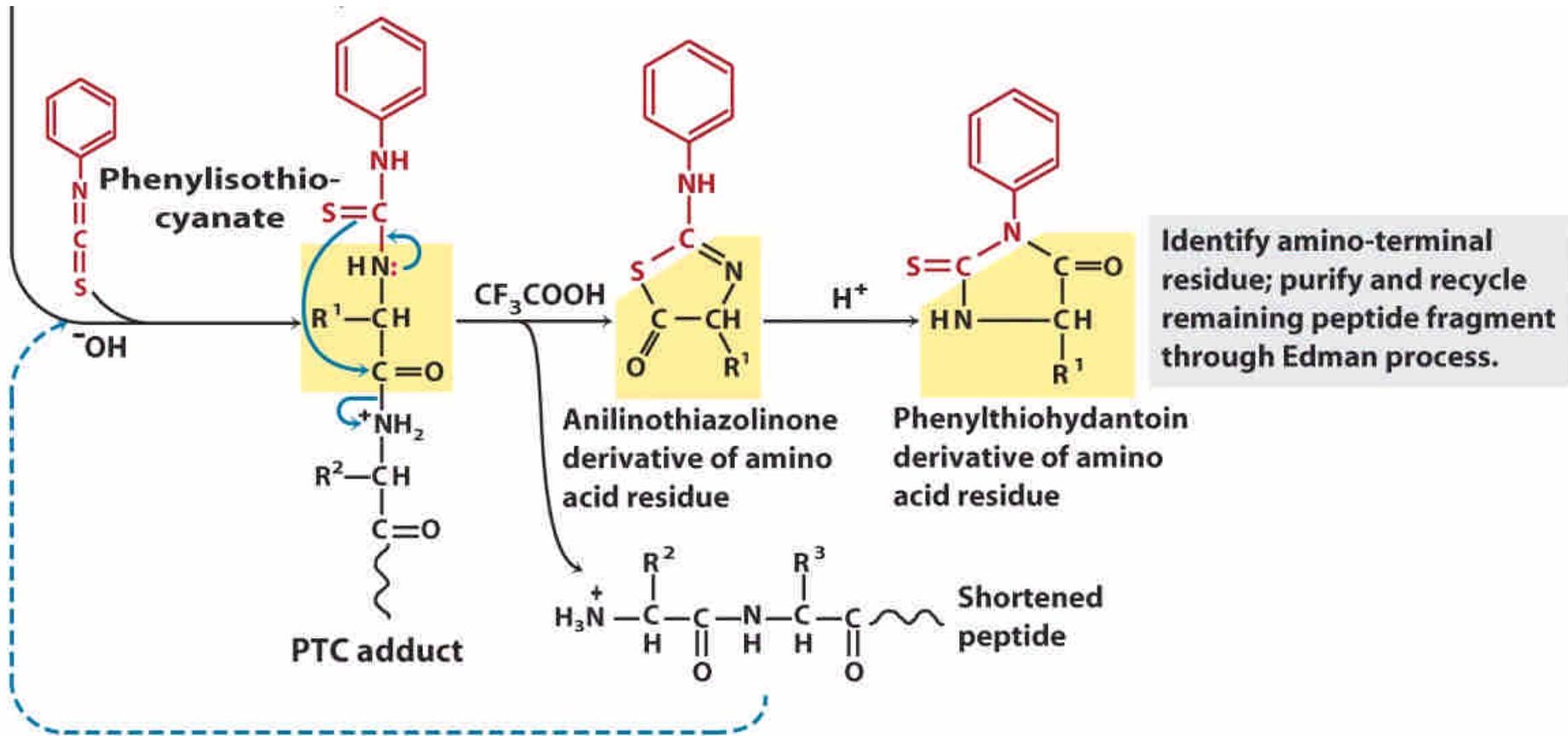
TABLE 3-7 The Specificity of Some Common Methods for Fragmenting Polypeptide Chains

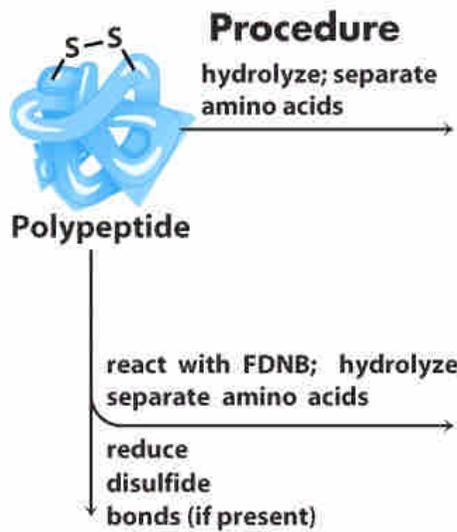
<i>Reagent (biological source)*</i>	<i>Cleavage points†</i>
Trypsin (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillaris</i> protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
Chymotrypsin (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease (bacterium <i>S. aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease (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降解反應





Result

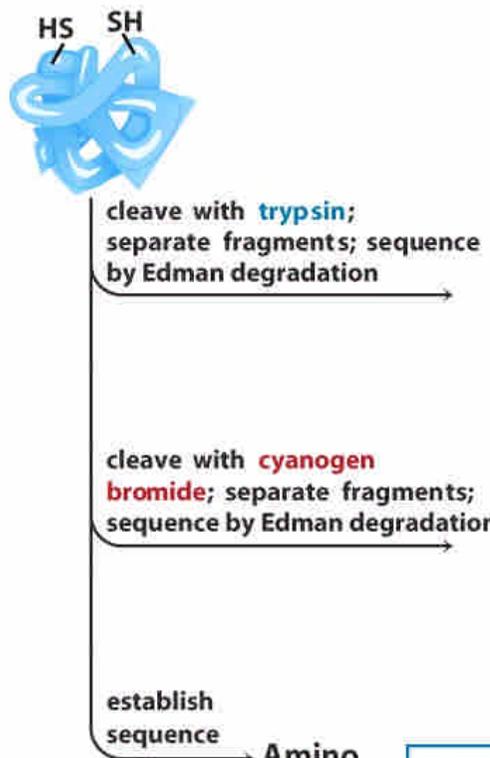
A	5	H	2	R	1
C	2	I	3	S	2
D	4	K	2	T	1
E	2	L	2	V	1
F	1	M	2	Y	2
G	3	P	3		

2,4-Dinitrophenylglutamate detected

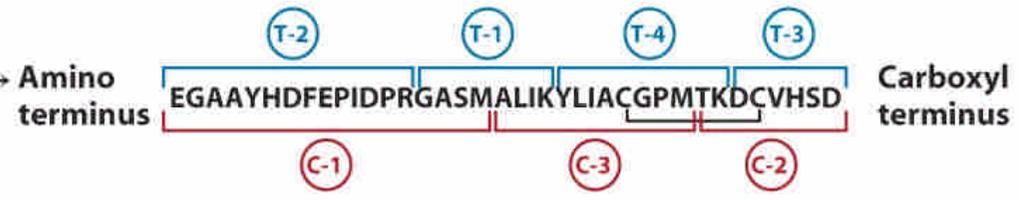
Conclusion

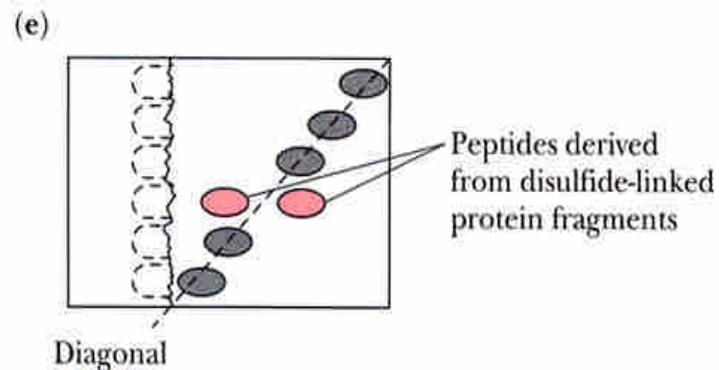
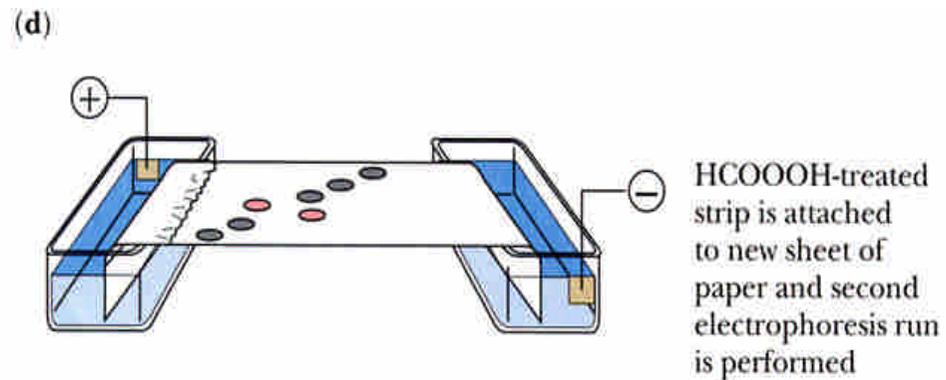
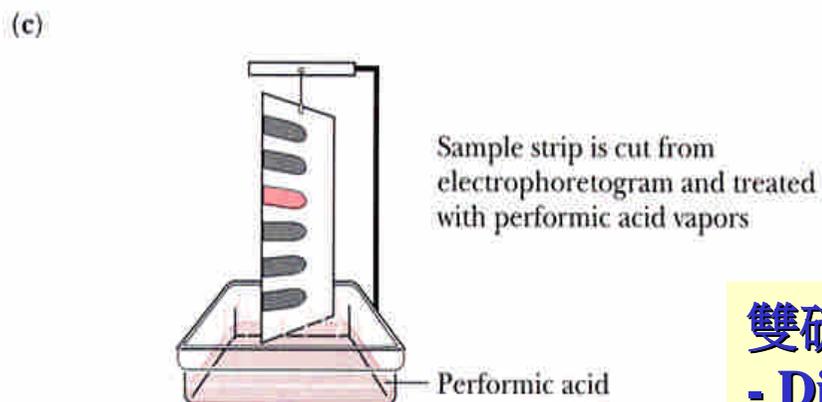
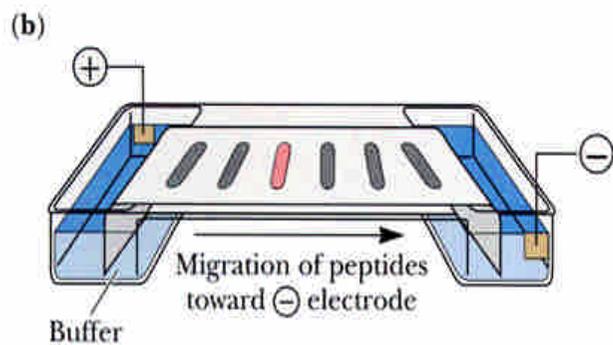
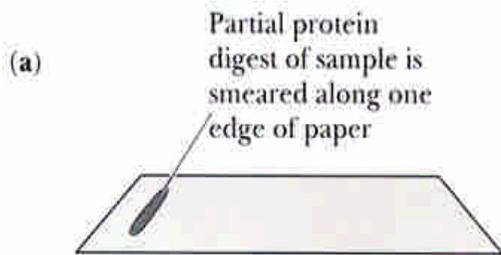
Polypeptide has 38 amino acid residues. Trypsin will cleave three times (at one R (Arg) and two K (Lys)) to give four fragments. Cyanogen bromide will cleave at two M (Met) to give three fragments. E (Glu) is amino-terminal residue.

蛋白質定序過程



- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> (T-1) GASMALIK (T-2) EGAAYHDFEPIDPR (T-3) DCVHSD (T-4) YLIACGPMTK | <ul style="list-style-type: none"> (T-2) placed at amino terminus because it begins with E (Glu). (T-3) placed at carboxyl terminus because it does not end with R (Arg) or K (Lys). |
| <ul style="list-style-type: none"> (C-1) EGAAYHDFEPIDPRGASM (C-2) TKDCVHSD (C-3) ALIKYLIACGPM | <ul style="list-style-type: none"> (C-3) overlaps with (T-1) and (T-4), allowing them to be ordered. |





雙硫鍵的定位
- Diagonal electrophoresis (對角線電泳)

其他的定序方法

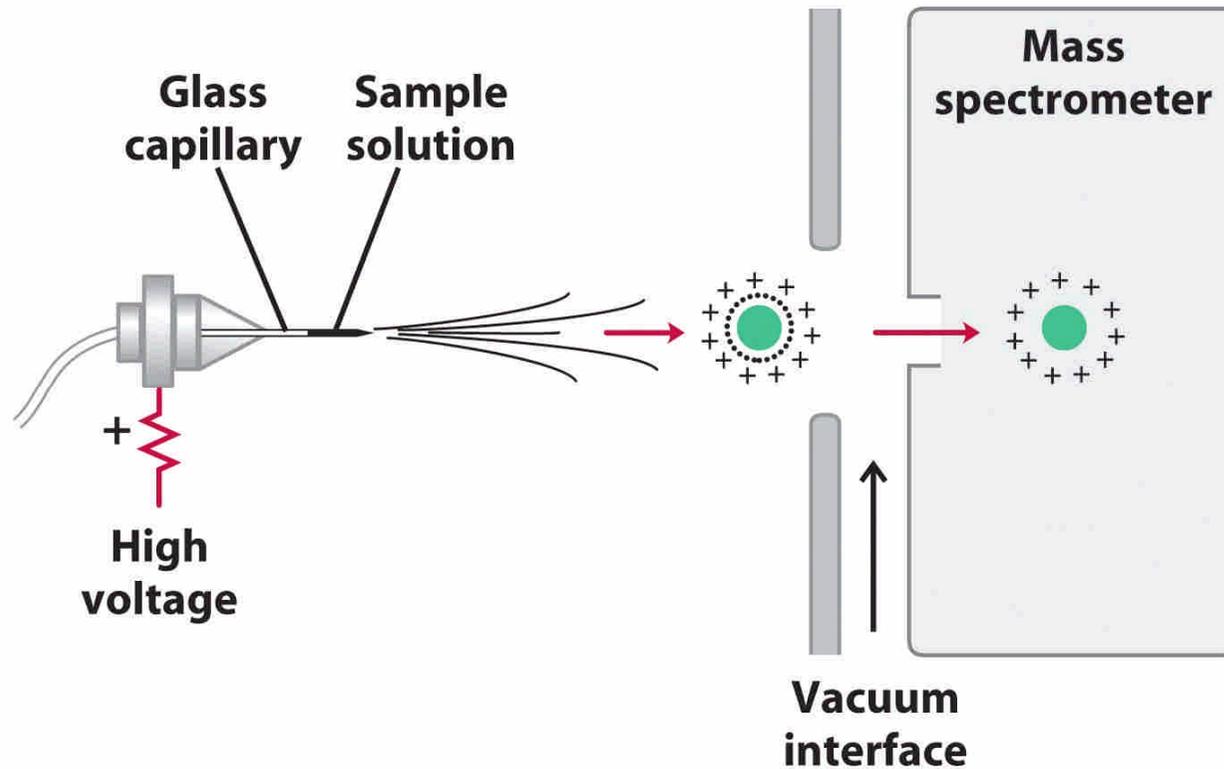
- 質譜分析法(**mass spectrometry**)*，蛋白質離子化後，其片段可依質量電荷比分離(電場)，**Fenn**與**Tanaka**因開發此方法而同獲**2002**年諾貝爾化學獎
- 生物資訊學

3. 蛋白質的二級、三級與四級結構的研究

利用物理方法

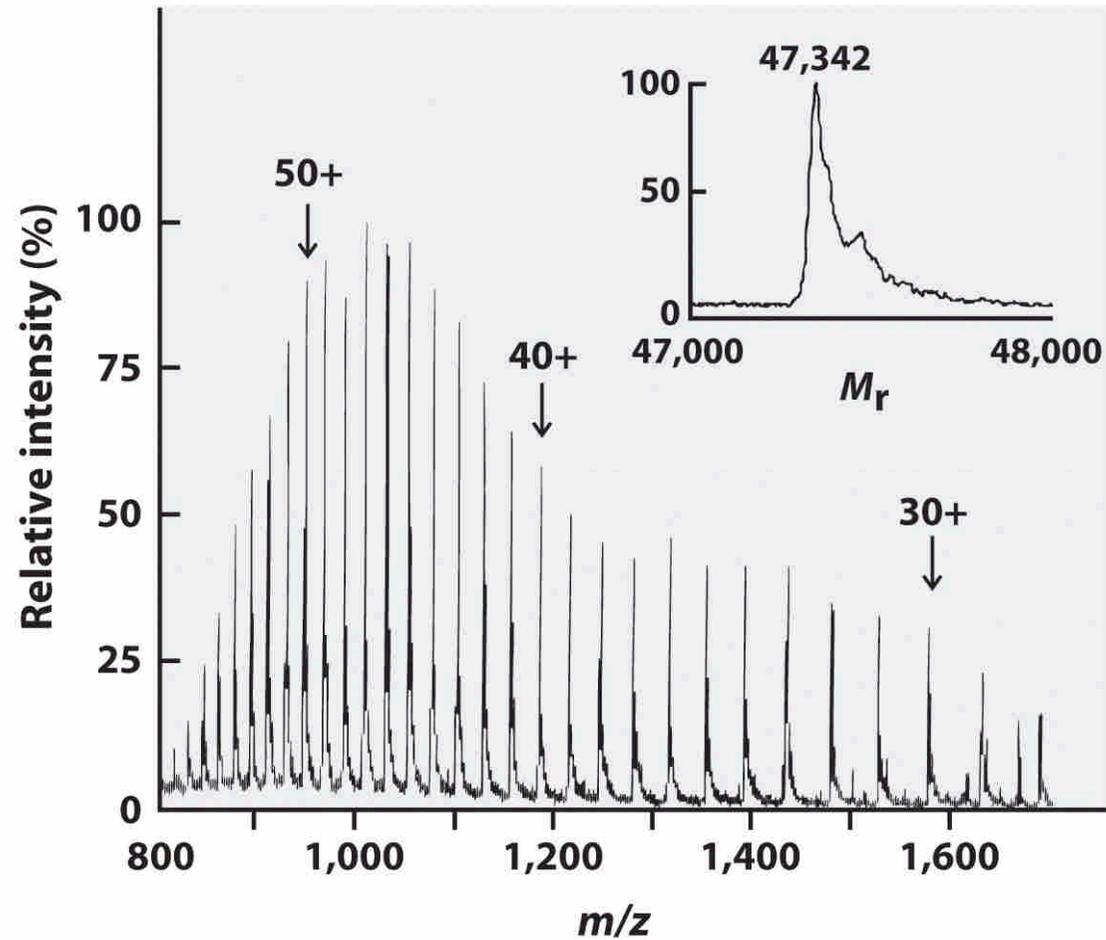
- 如利用蛋白質分子對偏極光的轉向能力*或核磁共振*的原理，估測二級構造中 α -螺旋或 β -褶片的含量
- 如利用X光繞射法*研究蛋白質結晶的構造，以取得蛋白質的三級與四級結構等

蛋白質的電噴灑質譜分析



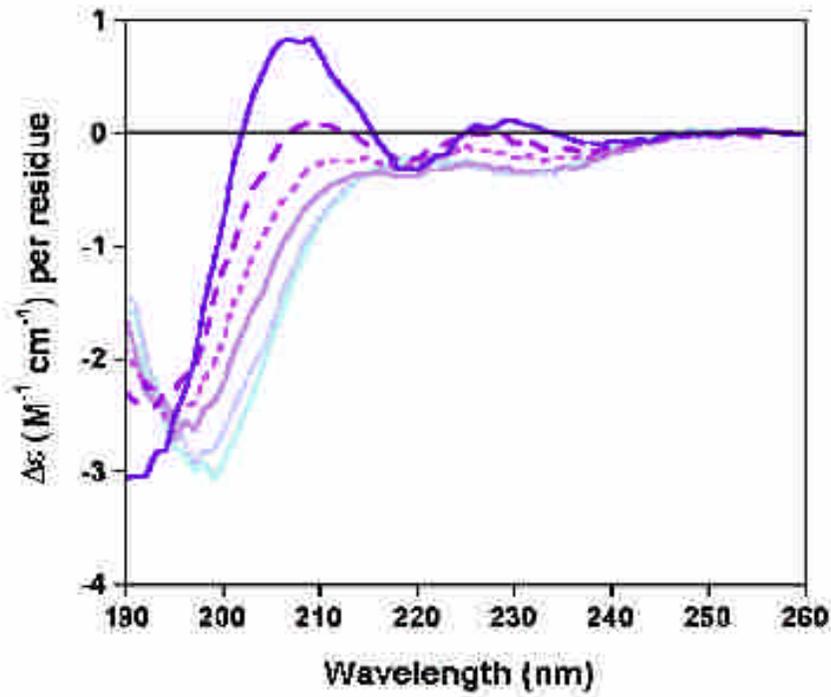
- (1) A Protein solution is dispersed into charged droplets by passage through a needle under a high-voltage electric field
- (2) The droplets evaporate and ions enter the mass spectrometer for m/Z measurement

蛋白質的質譜分析圖譜

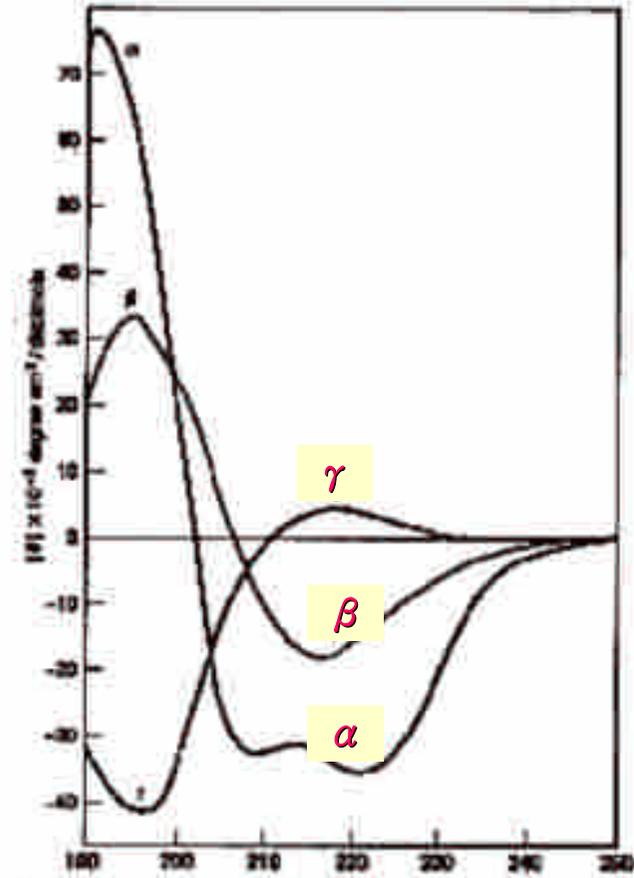


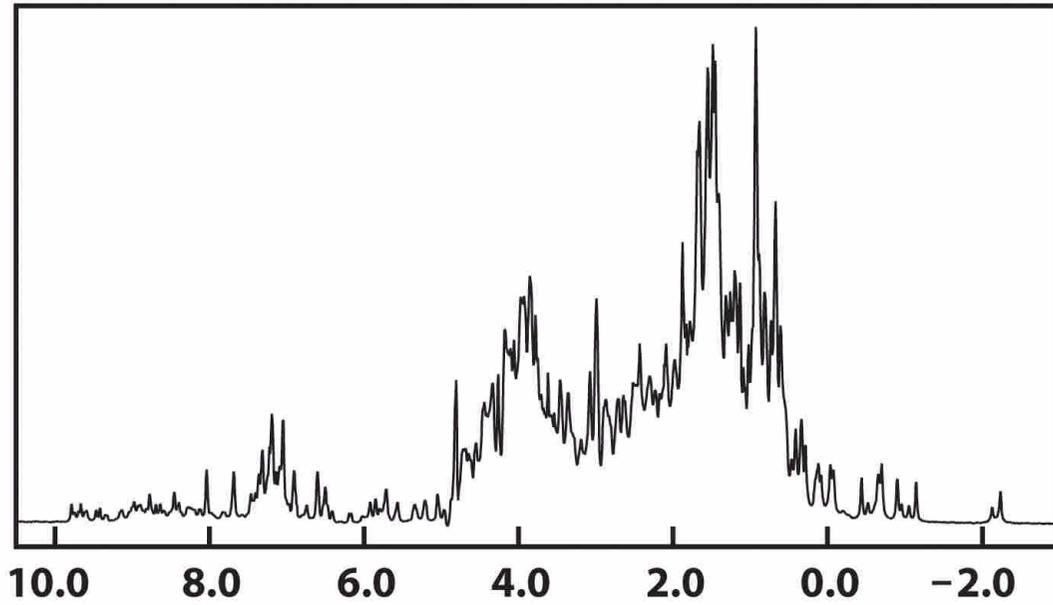
The spectrum generated and a computer-generated transformation of the spectrum

CD光譜分析



Standard

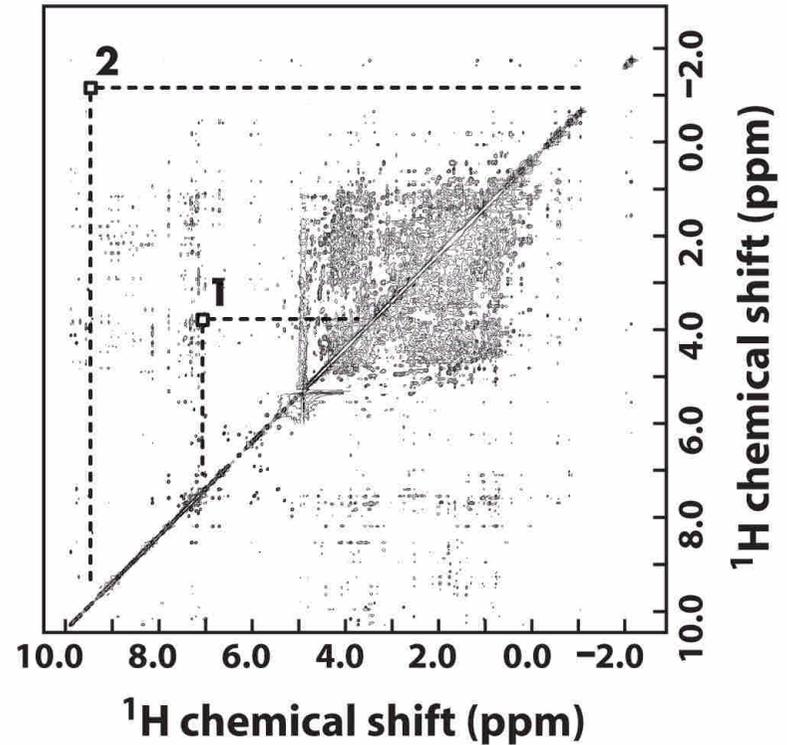




^1H chemical shift (ppm)

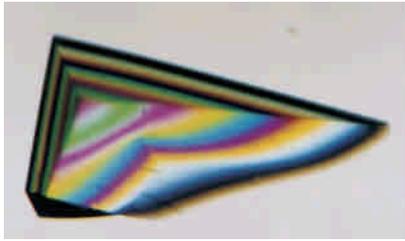
One-dimensional NMR spectrum of a globin from a marine blood worm

2D核磁共振圖譜

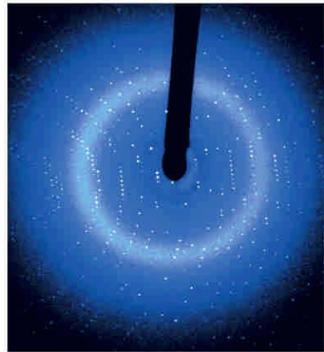
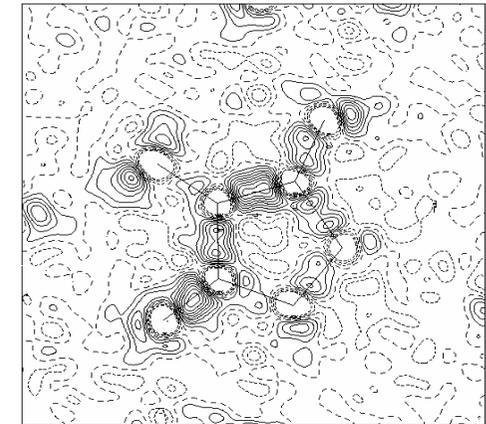
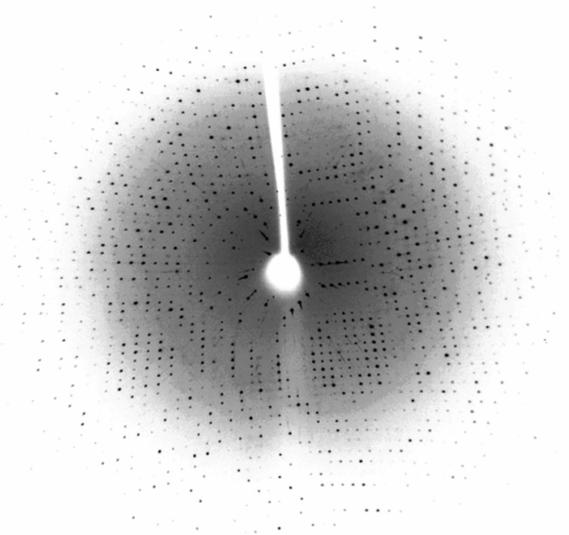
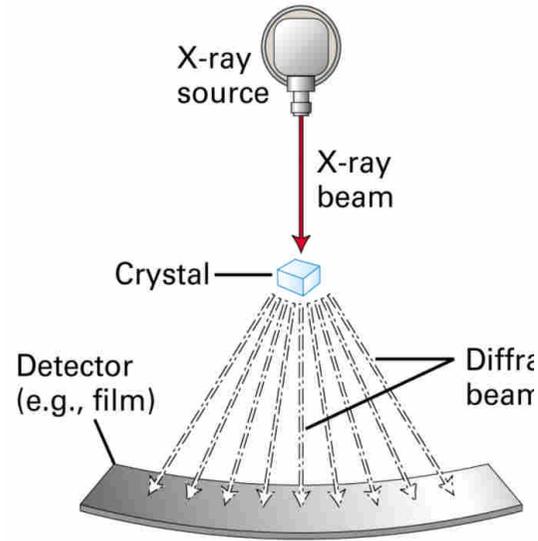


^1H chemical shift (ppm)

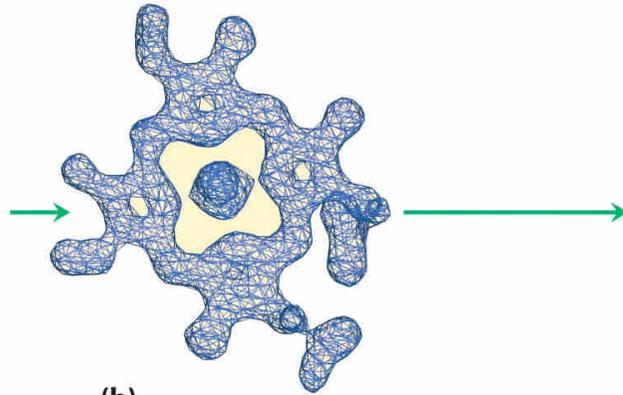
^1H chemical shift (ppm)



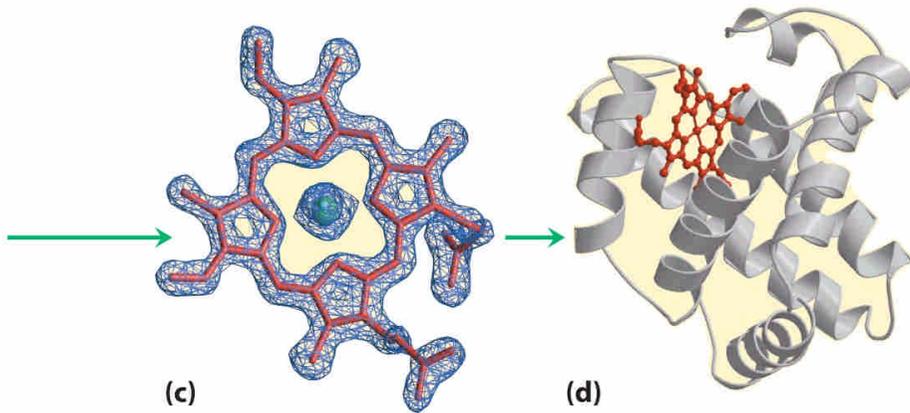
X光晶體繞射法



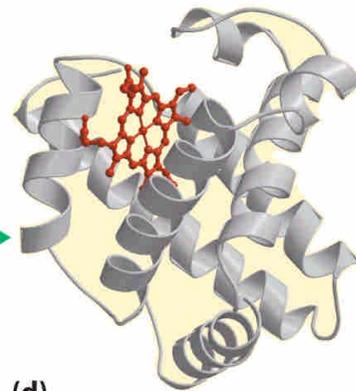
(a)



(b)



(c)



(d)

以X光晶體繞射法研究
抹香鯨肌紅蛋白結構的過程

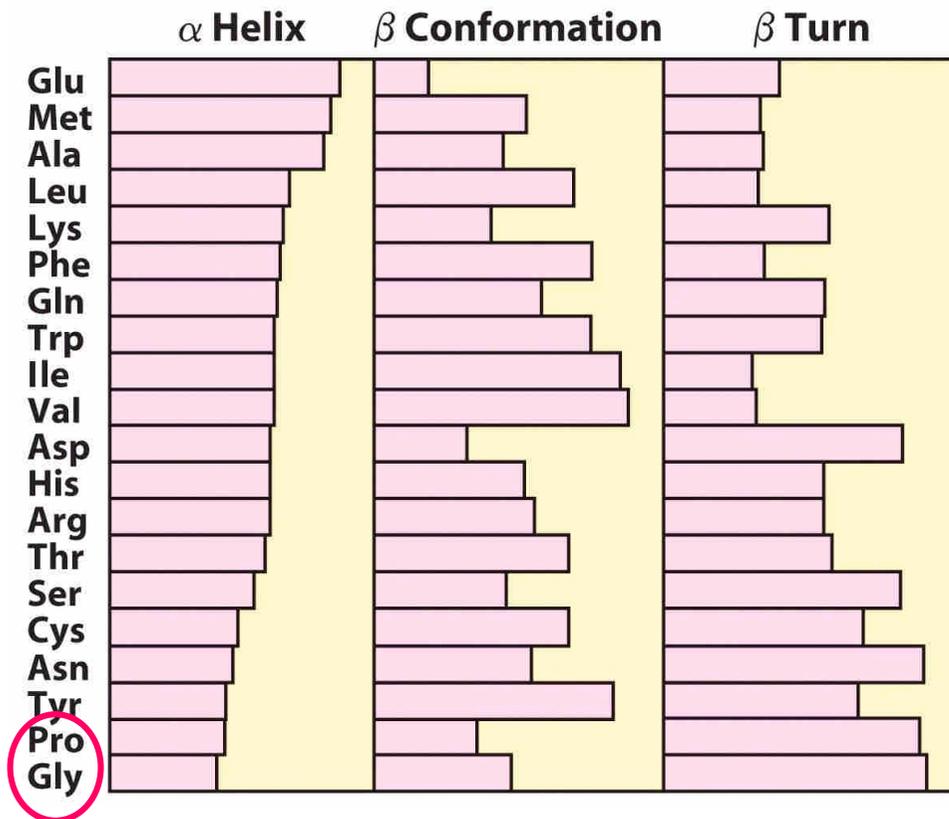
4. 蛋白質結構的預測

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

蛋白質二級構造的預測

- 目前多以分析已知結構的蛋白質中，各類二級構造中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)

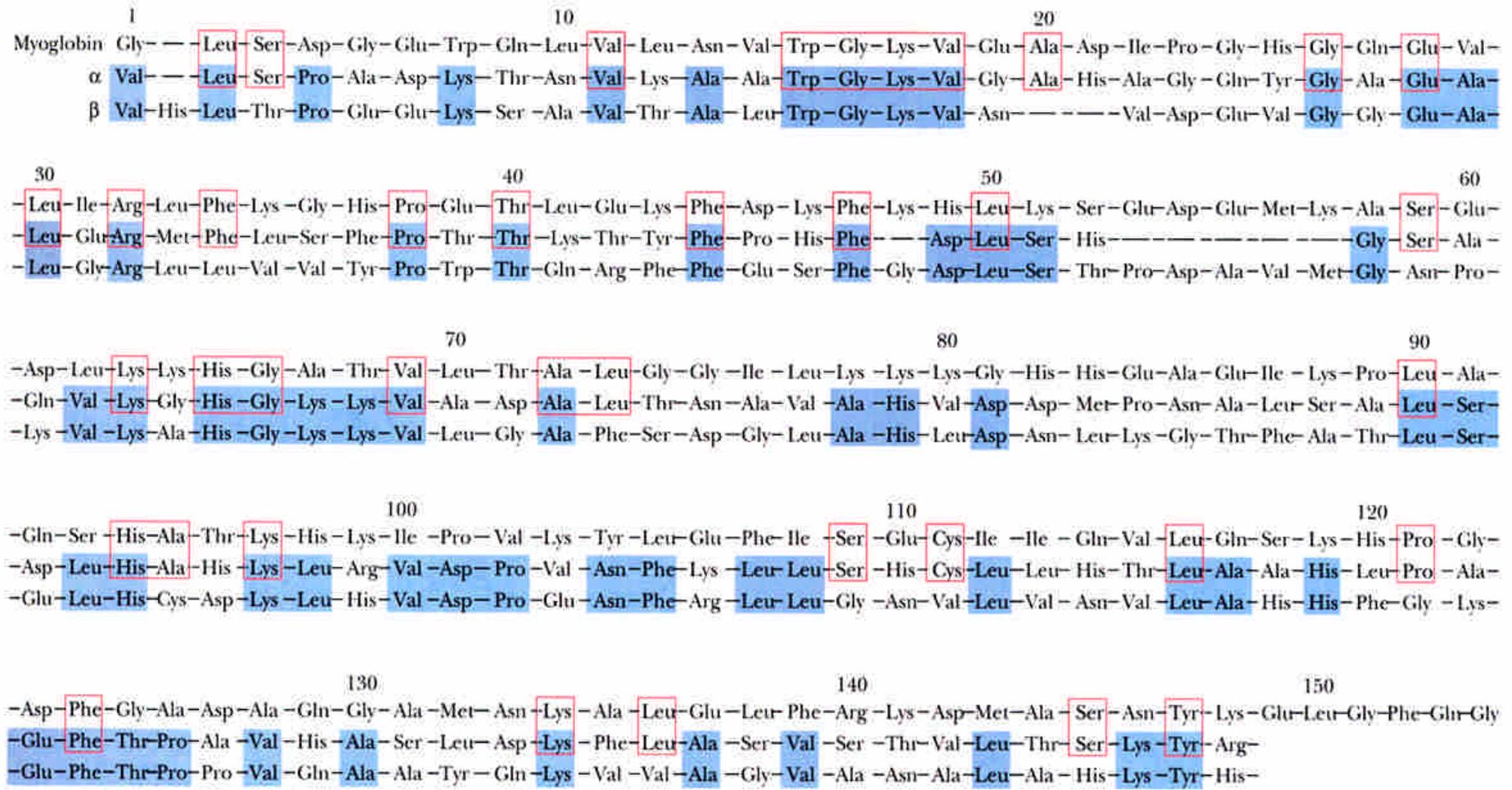
*H = helix former; I = indifferent; B = helix breaker; C = random coil; () = secondary tendency.

Chou–Fasman Helix and Sheet Propensities
 (P_α and P_β) of the Amino Acids

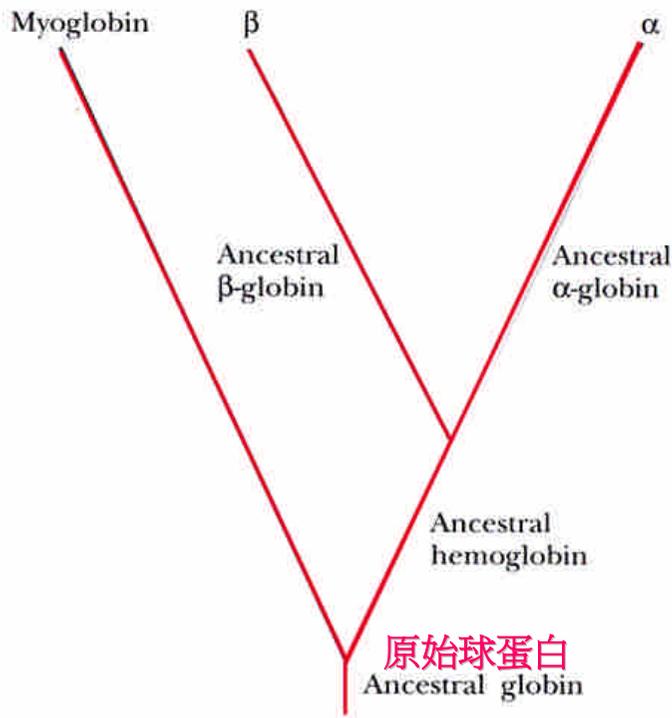
Amino Acid	P_α	Helix Classification	P_β	Sheet Classification
A Ala	1.42	H $_\alpha$	0.83	i $_\beta$
C Cys	0.70	i $_\alpha$	1.19	h $_\beta$
D Asp	1.01	I $_\alpha$	0.54	B $_\beta$
E Glu	1.51	H $_\alpha$	0.37	B $_\beta$
F Phe	1.13	h $_\alpha$	1.38	h $_\beta$
G Gly	0.57	B $_\alpha$	0.75	b $_\beta$
H His	1.00	I $_\alpha$	0.87	h $_\beta$
I Ile	1.08	h $_\alpha$	1.60	H $_\beta$
K Lys	1.16	h $_\alpha$	0.74	b $_\beta$
L Leu	1.21	H $_\alpha$	1.30	h $_\beta$
M Met	1.45	H $_\alpha$	1.05	h $_\beta$
N Asn	0.67	b $_\alpha$	0.89	i $_\beta$
P Pro	0.57	B $_\alpha$	0.55	B $_\beta$
Q Gln	1.11	h $_\alpha$	1.10	h $_\beta$
R Arg	0.98	i $_\alpha$	0.93	i $_\beta$
S Ser	0.77	i $_\alpha$	0.75	b $_\beta$
T Thr	0.83	i $_\alpha$	1.19	h $_\beta$
V Val	1.06	h $_\alpha$	1.70	H $_\beta$
W Trp	1.08	h $_\alpha$	1.37	h $_\beta$
Y Tyr	0.69	b $_\alpha$	1.47	H $_\beta$

蛋白質三級構造的預測

- 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)進行
- 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**, 利用多種**database**)，尚未能精準有效的預測結果
- 其他方法

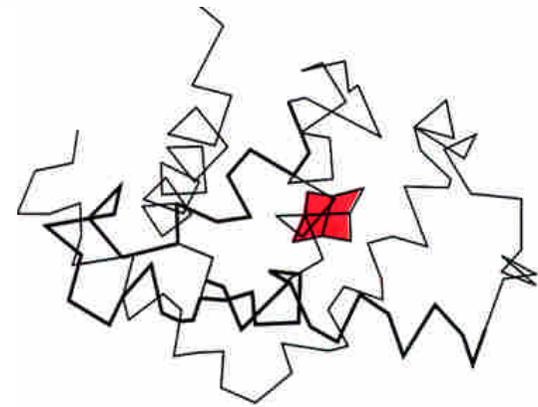


肌紅蛋白與血紅素的 α 次單元或 β 次單元的胺基酸序列比較

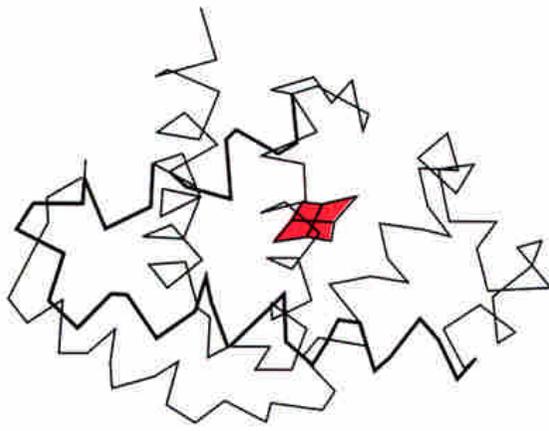


肌紅蛋白與血紅素的 α 次單元及 β 次單元極可能源自一個共同的祖先

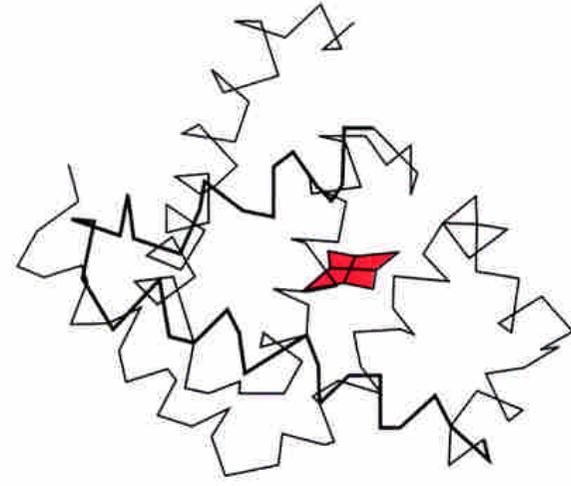
- α 次單元與 β 次單元約**140**個胺基酸中有**64**個相同
- 肌紅蛋白與 α 次單元有**38**個胺基酸相同



α -chain of horse methemoglobin



β -chain of horse methemoglobin



Sperm whale myoglobin

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

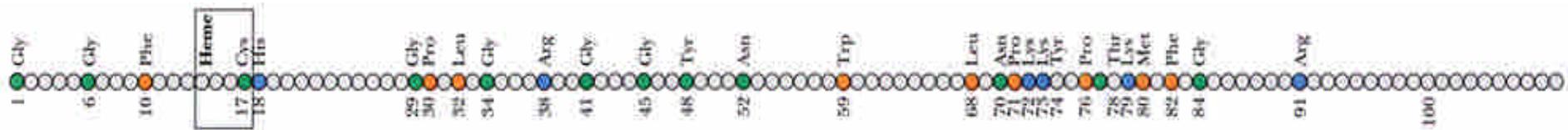
《蛋白質的結構與演化》

- 1. 分析不同蛋白質的胺基酸序列，可推斷蛋白質是否為同源蛋白，即源自同一個祖先**
- 2. 以肌紅蛋白與血紅素的研究為例**
肌紅蛋白的結構與血紅素的 α 次單元或 β 次單元的結構均十分類似，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）*
- 3. 以細胞色素C的研究為例**
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建立演化關係的重要性

- 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
- 分析得自麵包酵母及人類等**40**多種不同來源的細胞色素**C**，雖然其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**的功能有密切的關係，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

當比較不同物種的細胞色素**C**的胺基酸序列時，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，

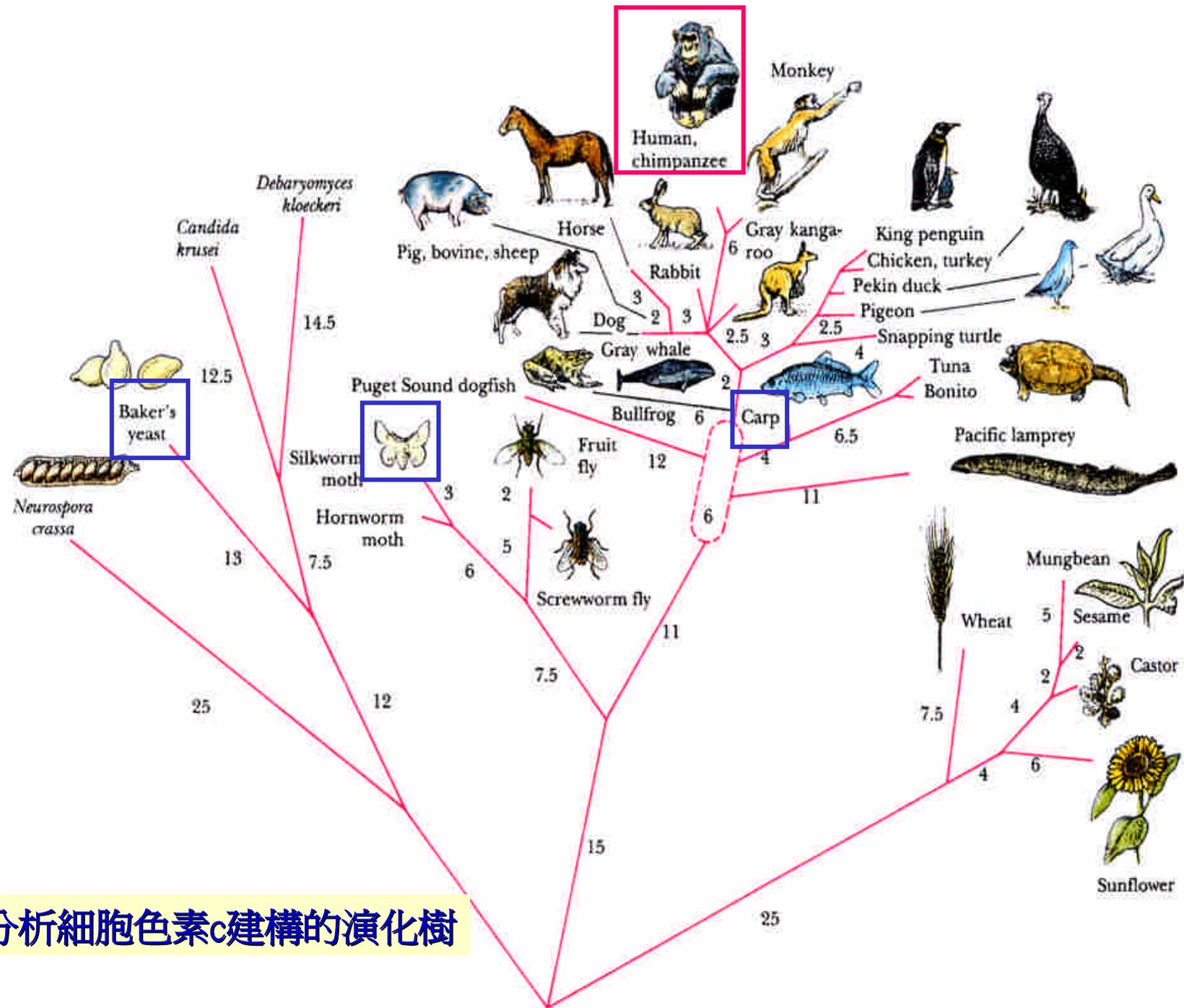


	Chimpanzee	Sheep	Rattlesnake	Carp	Snail	Moth	Yeast	Cauliflower	Parsnip
Human	0	10	14	18	29	31	44	44	43
Chimpanzee		10	14	18	29	31	44	44	43
Sheep			20	11	24	27	44	46	46
Rattlesnake				26	28	33	47	45	43
Carp					26	26	44	47	46
Garden snail						28	48	51	50
Tobacco hornworm moth							44	44	41
Baker's yeast (iso-1)								47	47
Cauliflower									13

不同物種間細胞色素c胺基酸序列差異的程度比較

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

- 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*
- 此類研究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”



由分析細胞色素c建構的演化樹

《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接合，此接合通常是緊密、專一、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醣蛋白與細胞膜上的受體蛋白或運輸蛋白等

此接合雖然與細胞的繁殖、生長與發育等不同的生理作用有關，但蛋白質與其它分子間的交互作用與專一辨識過程均十分相似

- 親和基(**ligand**)是與特定蛋白質產生專一性接合的分子，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

蛋白質與其親和基的接合通常具有專一性，此專一性來自於兩者構造的互補特性與兩者接合後可產生新的安定作用力

蛋白質與親和基的接合多經由非共價作用力，因此接合為一可逆的過程

每個蛋白質與同一種親和基的接合可發生在分子內的一個或多個部位

- 如發生在多個部位時，與同一種親和基接合的能力可能相同或不同，因此產生了接合的協同性，此種關係稱為同質性效應，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

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

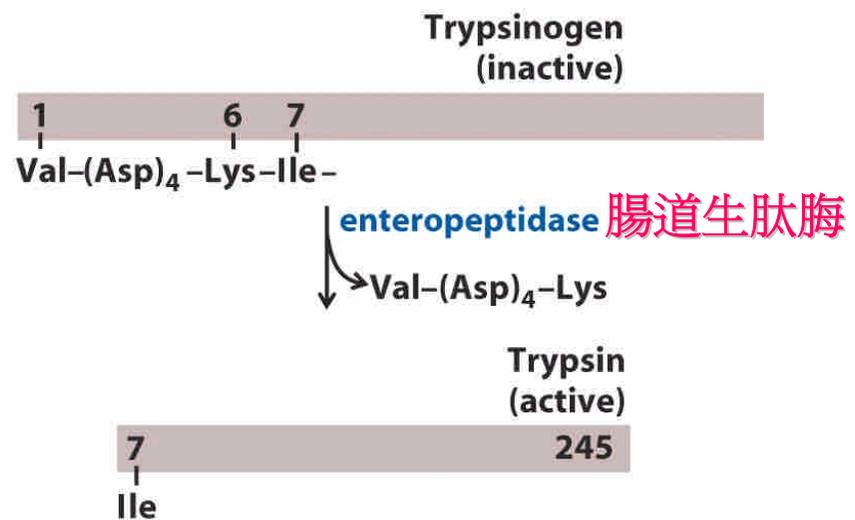
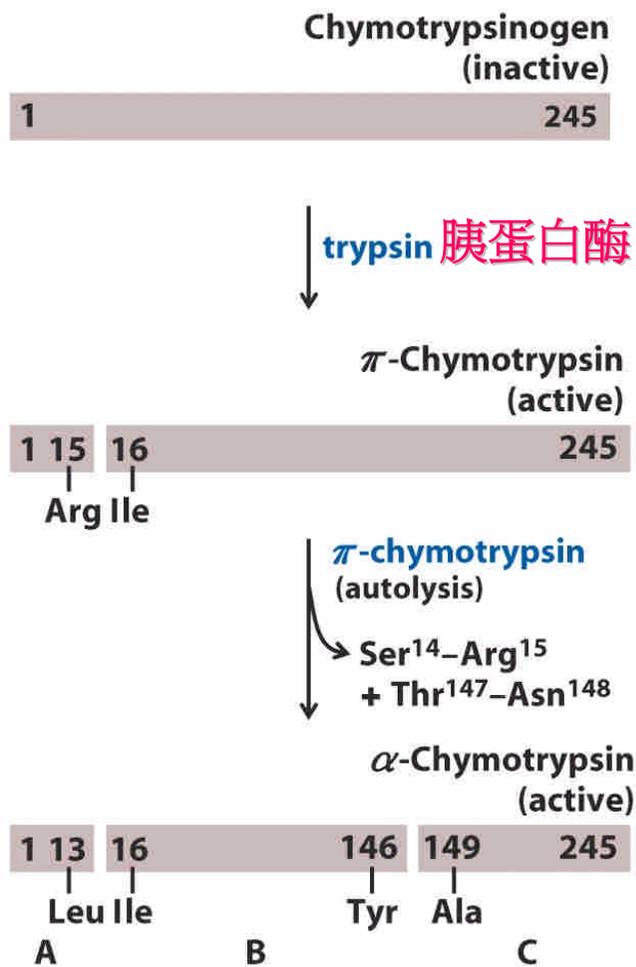
3. 異位效應是蛋白質不同部位之間的相互影響

異位效應(**allostery**)是具有四級結構的蛋白質所特有

- 此類蛋白質含有不同的次單元，如催化或活性次單元是受質或反應物接合的部位，而調節次單元則是調節物的接合部位
- 當兩種不同的親和基接合部位，因親和基接合後引發的構形改變進而彼此溝通，如血紅素攜氧特性與影響其攜氧能力的因子研究即為此效應的最佳例子

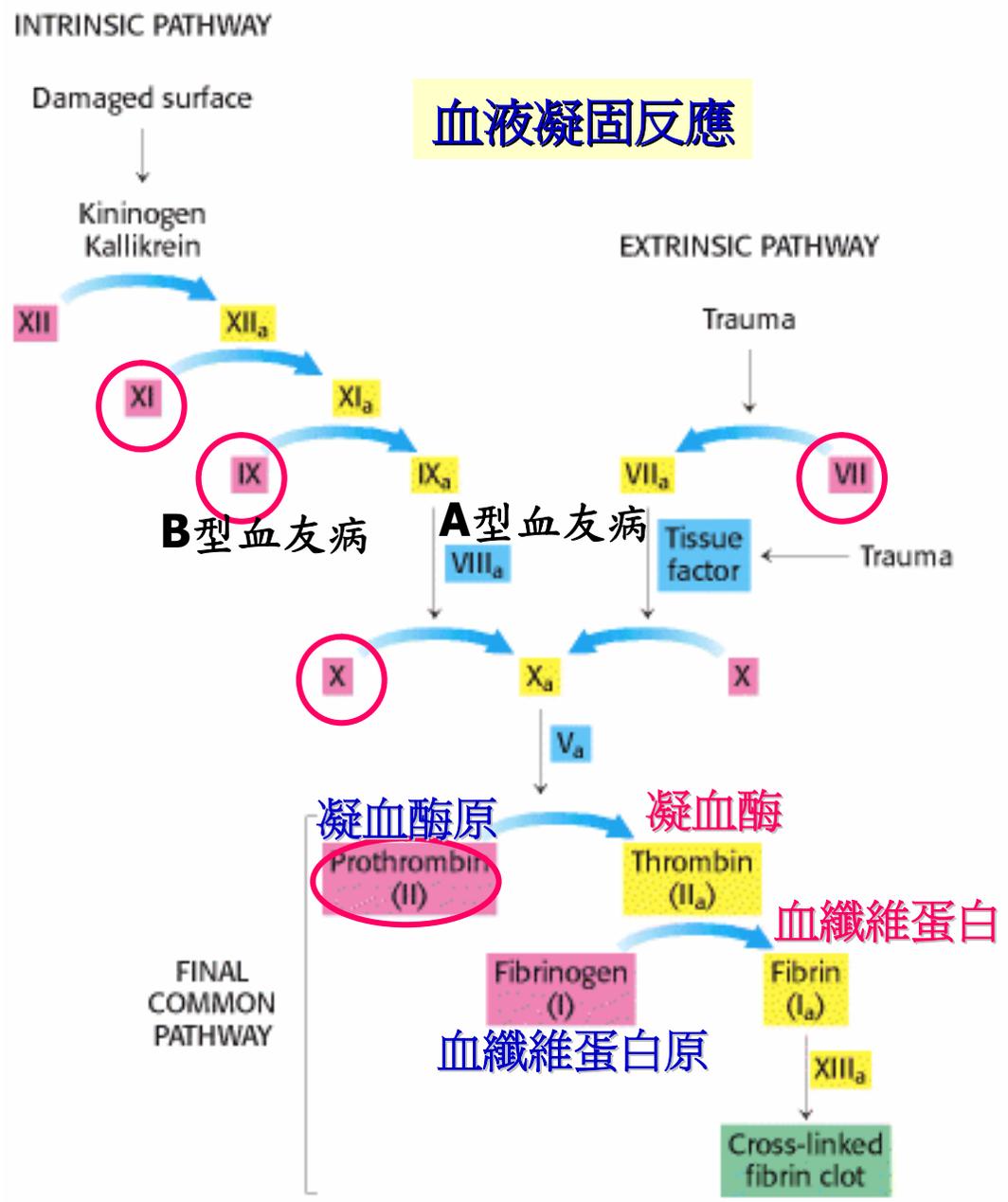
《蛋白質活性的調節》

1. 影響蛋白質活性的因子除了溫度、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. 蛋白質的切除活化作用*
如消化酵素、凝血因子與一些激素等蛋白質通常合成時是不具有活性的先質(**precursors**)，當需要時會因一小段肽鏈被切除而具有活性
 - 切除活化作用為一不可逆的調節方法
3. 蛋白質的異位調節作用
此調節作用是多種代謝路徑中調節酵素或異位酵素的活性調控方式



胰凝乳酶原的切除活化

血液凝固反應

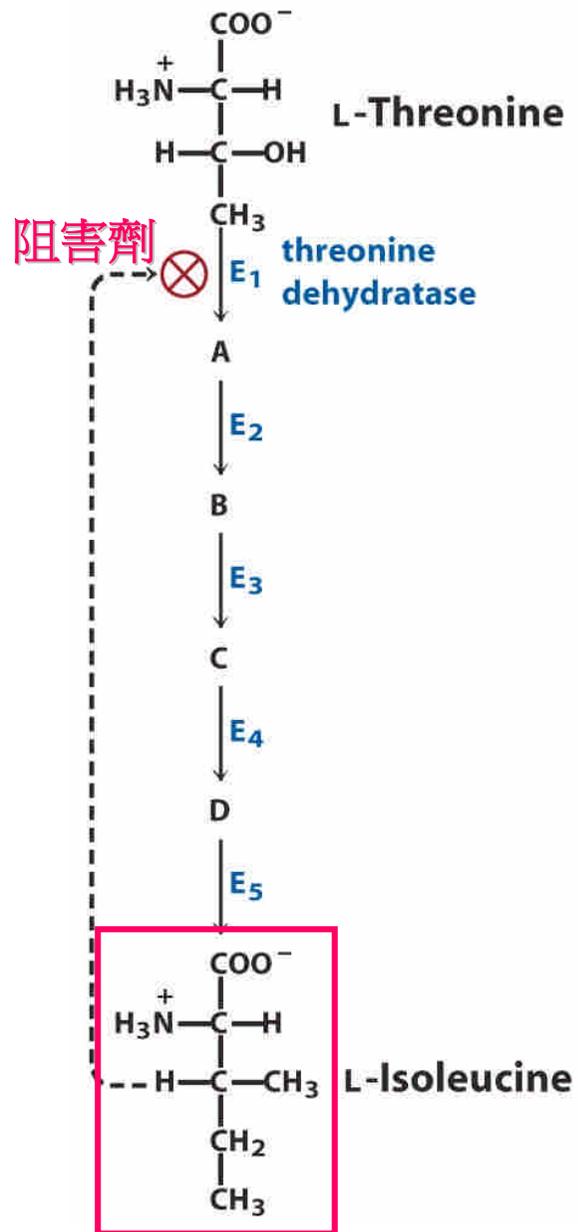


- 如代謝路徑的終產物(調節劑)之回饋抑制調控*
- 當調節劑與蛋白質的調節部位接合後，引發該部位的構形發生變化，此變化因四級結構中不同次單元的相互接觸而傳達到催化部位，因而改變催化部位的特性，使蛋白質的活性改變*
- 以酵素為例，較普遍的是改變酵素對受質的親和力，少數則是改變酵素的催化效率

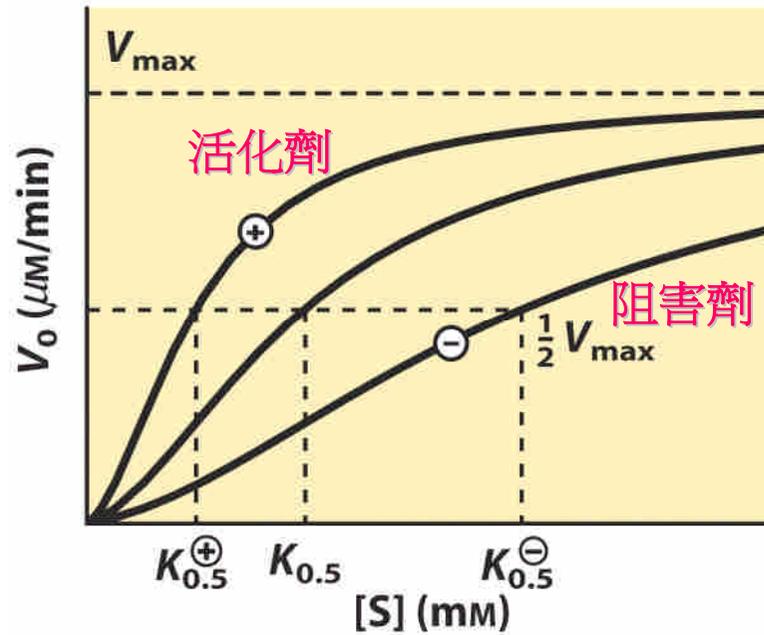
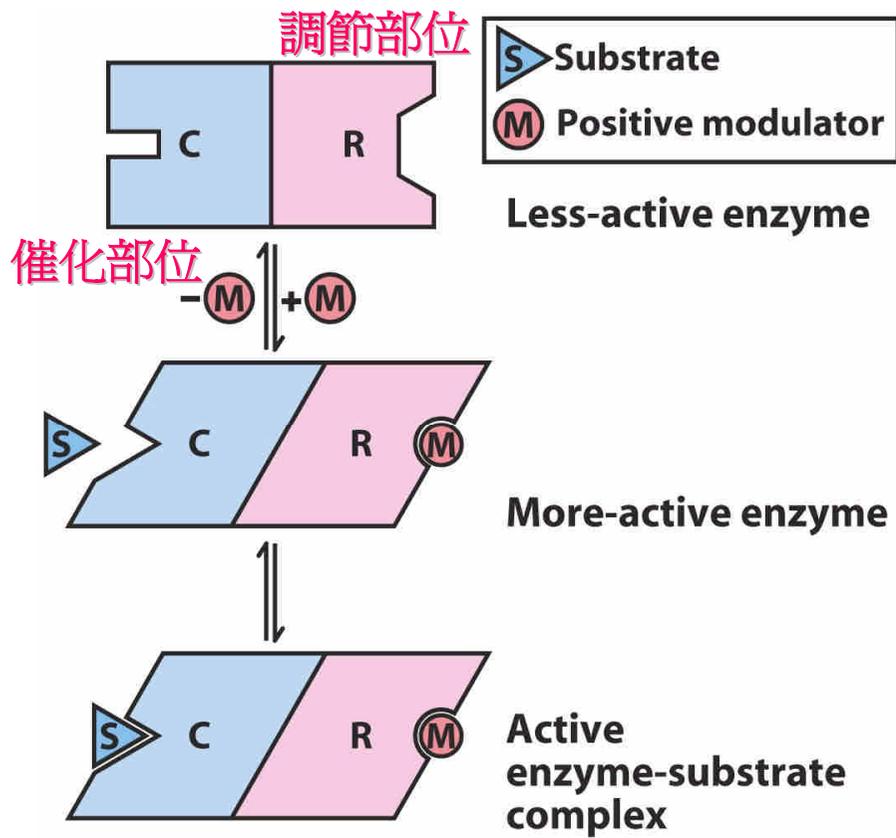
4. 蛋白質的共價修飾作用

肝糖代謝的調控為共價修飾作用的最佳例子*

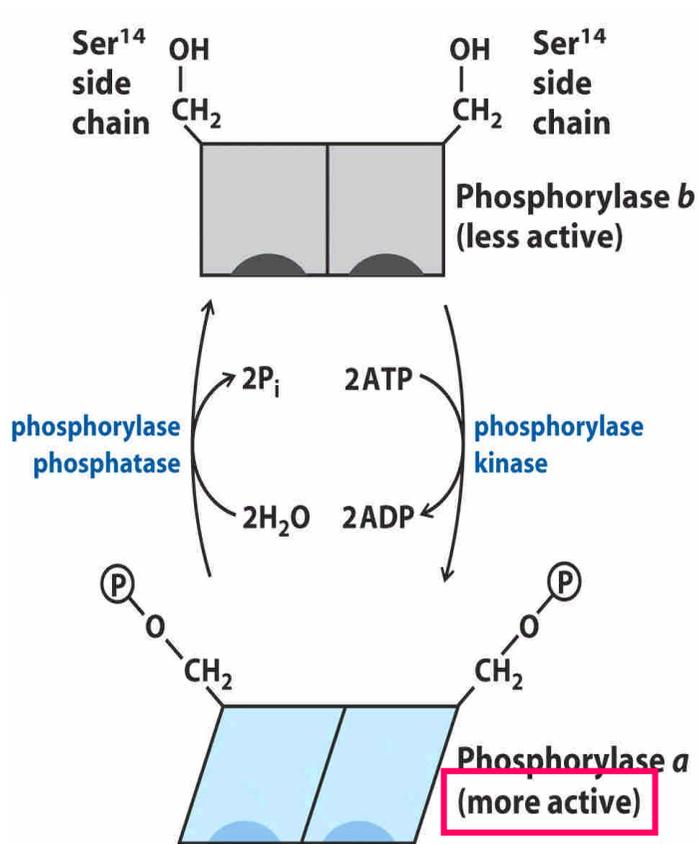
- 蛋白質(肝糖磷解酶)因特定胺基酸接上特定的化學基團(磷酸基)後而改變其活性，此修飾作用屬共價鍵結的形成，因此活性變化之間需其他酵素的參與*



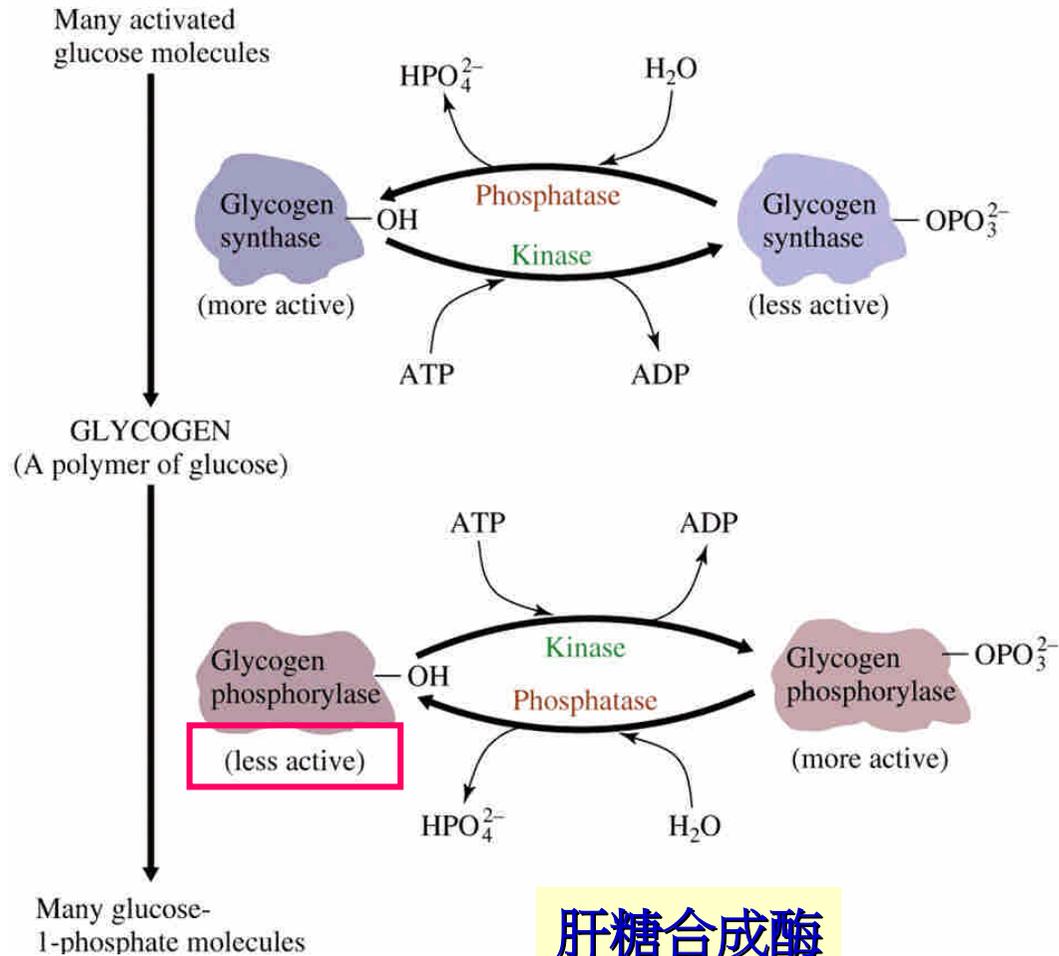
異白胺酸合成的回饋抑制調控



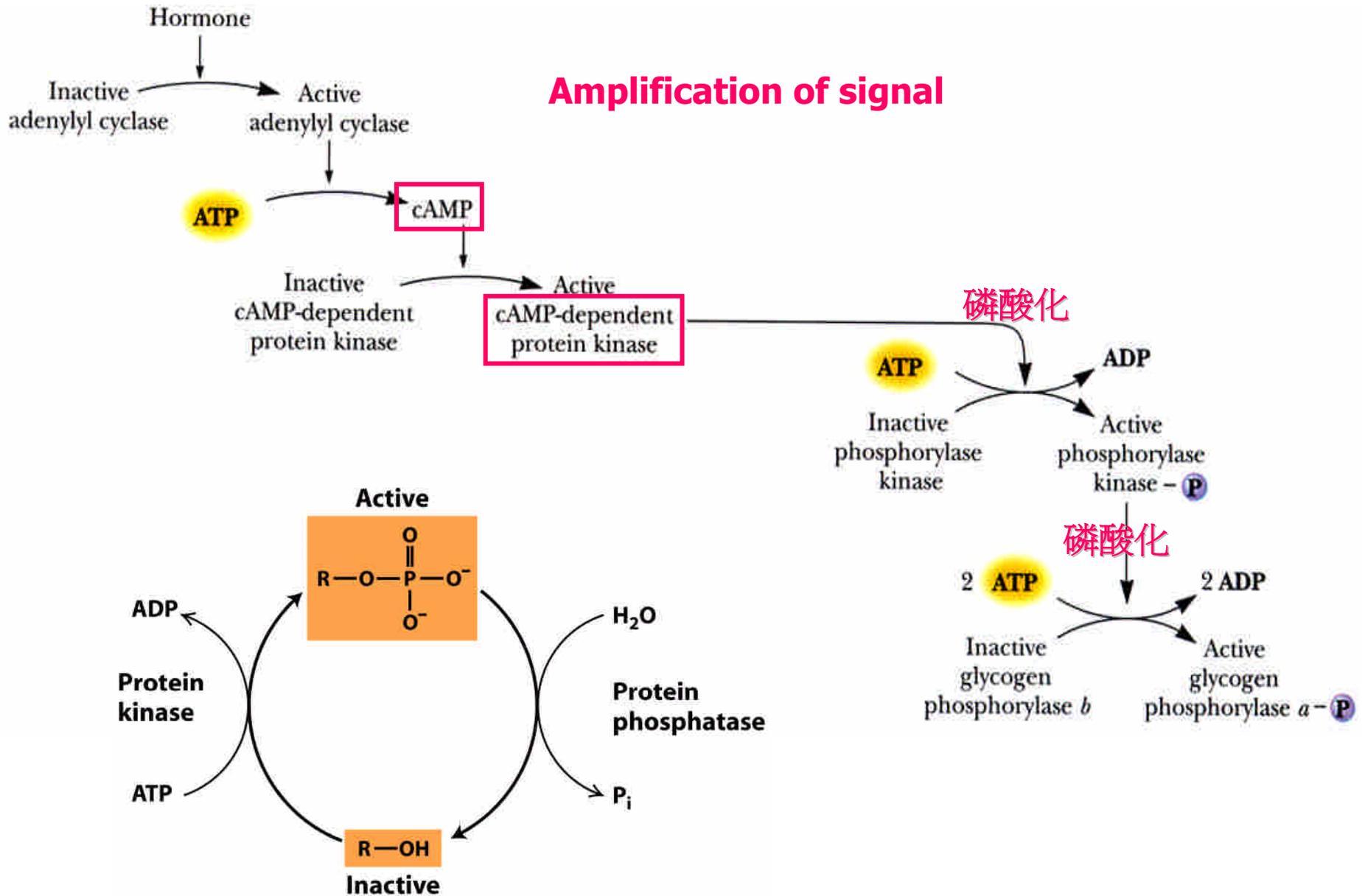
異位蛋白與調節劑接合後改變蛋白質(酵素)的活性



肝糖磷解酶



肝糖合成酶



藉由蛋白質激酶與蛋白質磷酸水解酶調控蛋白質活性

- 共價修飾的調控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

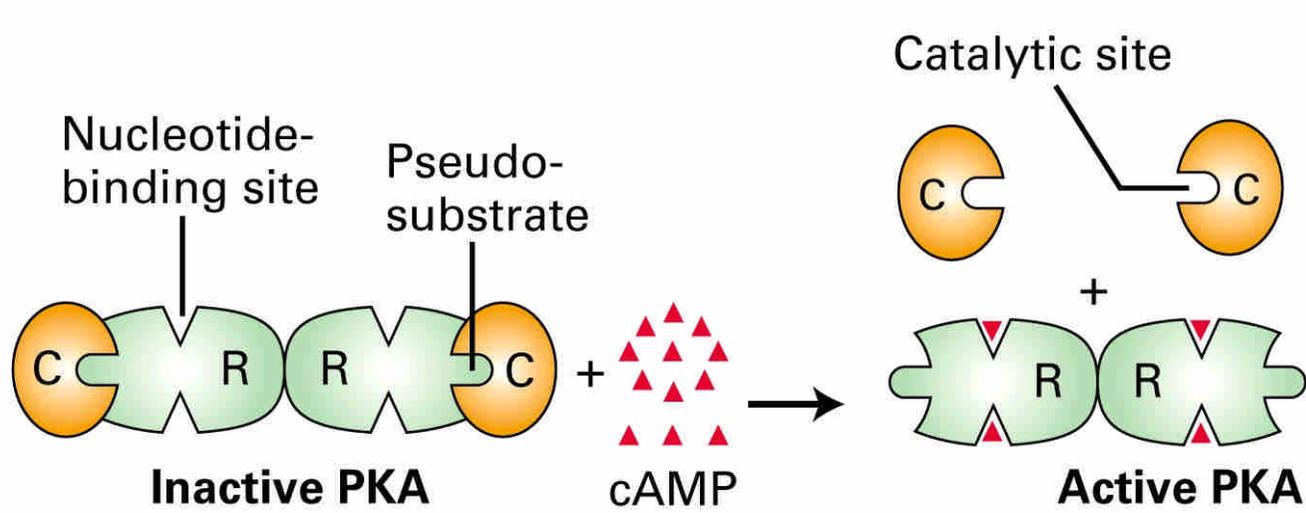
5. 其他機制

與其他蛋白質的接合作用

- 如蛋白質激酶A (**protein kinase A, PKA**)*與調節次單元的接合
- 如調鈣蛋白(**calmodulin**)可調控受 Ca^{2+} 調節的蛋白質或酵素

蛋白質的分佈(**compartmentation**或**localization**)

- 如葡萄糖運輸蛋白的細胞表面受胰島素的影響



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)

蛋白質雖有驚人的特性，卻非“長生不老”，蛋白質隨著“年紀”的增長，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的側鏈的去醯胺作用，碳的異構化作用，胺基與葡萄糖間非酵素的反應(最普遍)等
- 此類不正常或老化的蛋白質需持續被分解移除

2. 細胞內特定蛋白質的含量是維持動態平衡的狀態

蛋白質持續地被製造與被分解

- 蛋白質的持續分解除除了是一般的新陳代謝外，也可用來移除外來的蛋白質及對環境變化的調適(如因應養份不足與不同發育階段的需求等)

3. 影響蛋白質分解速率的因子

蛋白質分解(水解)的過程需要能量，具有一級反應的動力特性，且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**)較短者，細胞內分解的速率較快

- 半生期較短的蛋白質通常分子量較大，具有酸性pI值，在細胞的新陳代謝中擔任關鍵的調節角色*，且在試管內對熱或蛋白酶的實驗處理較為敏感

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，穩定者(半生期>20小時)為Met、Ser、Gly、Ala、Thr與Val，不穩定者(半生期7~30分鐘)為Arg、Lys、Asp、Leu與Phe，高度不穩定者(半生期2~3分鐘)為Ile、Glu、Pro、Tyr與Gln
- 蛋白質的PEST (Pro、Glu、Ser、Thr)序列出現次數愈多，其半生期愈短

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

4. 蛋白質降解的機制

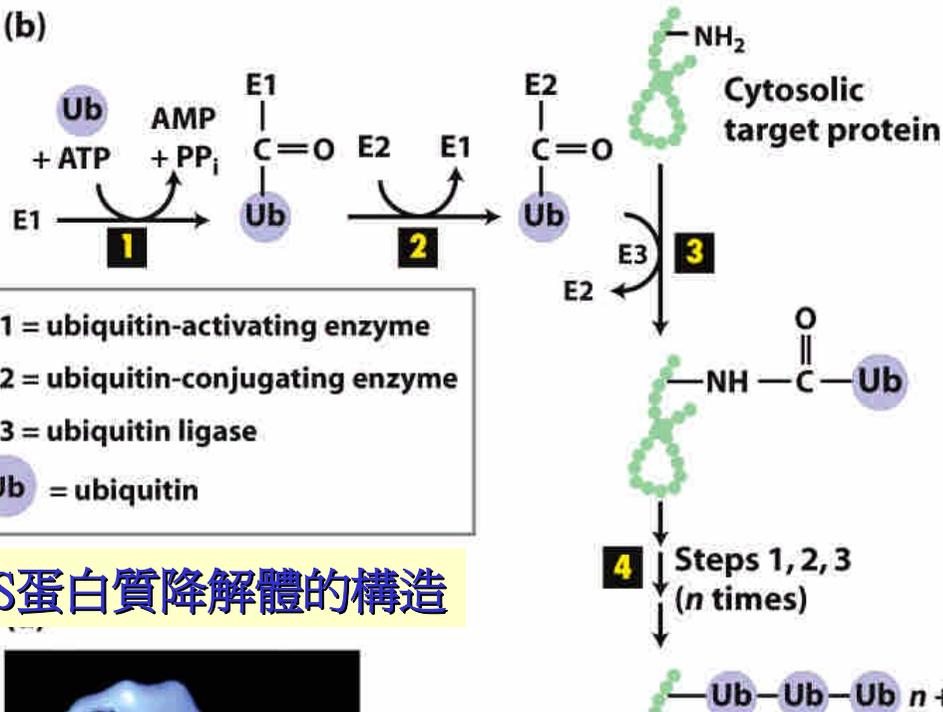
細胞內蛋白質的降解主要經由兩個途徑

- 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**)

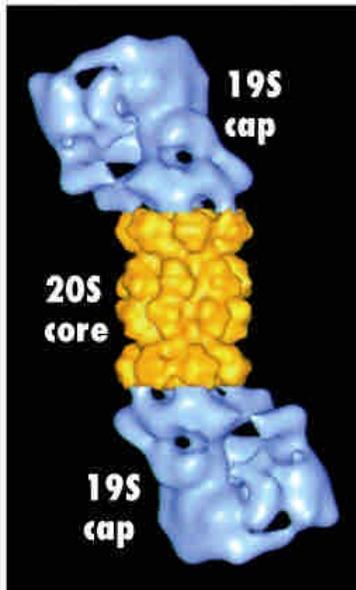
- **Ciechanover, Hershko**與**Rose**因其貢獻而同獲**2004年諾貝爾化學獎**
- 泛素(**ubiquitin**)標記的蛋白質(**ubiquitination**)被**26S**蛋白質降解體*辨識並分解，需**ATP**及多種蛋白質(**酵素E1, E2, E3**)參與蛋白質的降解

(b)



E1 = ubiquitin-activating enzyme
E2 = ubiquitin-conjugating enzyme
E3 = ubiquitin ligase
Ub = ubiquitin

26S蛋白質降解體的構造



蛋白質降解體系統的蛋白質水解

