

國立清華大學化學系

碩士論文

甘胺酸變異對膠原蛋白穩定性影響之研究

Mutation of glycine residues and collagen stability

指導教授：洪嘉呈 博士 (Dr. Jia-Cherng Horng)

研究生：陳頤珊 (Yi-Shan Chen)

學號：9623532

中華民國九十八年七月

國立清華大學碩士學位論文  
指導教授推薦書

化學 學系 研究所 陳頤珊 君所提之論文

甘胺酸變異對膠原蛋白穩定性影響之研究  
(題目)

經由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 洪嘉良 (簽章)

中華民國 98 年 07 月 01 日

國立清華大學碩士學位論文  
考試委員審定書

化學 學系 研究所 陳頤珊 君所提之論文

甘胺酸變異對膠原蛋白穩定性影響之研究  
(題目)

經本委員會審查，符合碩士資格標準。

學位考試委員會 主持人 江明璋 (簽章)

委員 洪嘉宏  
黃人則

中華民國 98 年 07 月 01 日

## 謝誌

能順利取得碩士學位，首先要感謝我的指導教授洪嘉呈老師，謝謝老師兩年來在學業及實驗上的指導，並且常與我們討論使我在研究上能有發揮的空間，此外，老師與我們亦師亦友的相處模式，讓實驗室氣氛總是一片和樂融融，非常感謝老師給我獲益良多的兩年碩士班生涯。

同時，非常感謝我的兩位論文口試委員：江昀緯老師及黃人則老師，謝謝老師在口試前幫我打氣，提醒我不要緊張，以及對我的論文提供許多寶貴的意見，並指導我可以再加強改進的部份，在此對兩位老師獻上我最由衷的感謝。

接著要謝謝實驗室的成員：謝謝一起作伴、同窗五年的姜君及阿罵，謝謝兩年一起努力，告訴我很多實驗技巧的統元，謝謝前實驗室助理張銘中學長在實驗室剛建立時幫我們很多忙，謝謝育如在我碩二時常陪我在實驗室留到很晚、陪我聊天，謝謝佳青在實驗上幫忙我很多，謝謝小雨常搞笑娛樂我們且讓我差遣，謝謝專題生徐維、維麟、中則、睿言和老江帶給實驗室許多歡笑聲，因為有你們大家，使碩班生活變得很豐富，這些回憶我會永遠珍惜。

另外，還要感謝許多好朋友：謝謝怡伶從大二到現在的陪伴以及在我最低潮的日子給我最大的力量，謝謝蔣彎、小蠢、塞婷、笑笑、小文、色杯、大力，聚會時有你們的搞笑打鬧真是有趣，謝謝瑋瑋、捏口、歷歷、馬力克、哈哈、阿雅，常替我加油打氣，能遇到妳們並成為好友是在清大五年裡最棒的事，還要特別謝謝我的男友康康總是默默支持、鼓勵著我，還常帶我去玩。

最後要感謝我的家人，謝謝爸爸、媽媽栽培我，給我很好的成長環境，謝謝姑姑、奶奶從小到大疼我、照顧我，謝謝姊姊常打電話關心我，遇到困難時給我很多意見，還要謝謝大姑姑、三姨一家對我的照顧，謝謝我們家族的每個人。

能完成這論文並擁有充實的大學及碩班生活，都是因為有你們大家的作伴、鼓勵及幫忙，真心的說聲，謝謝你們！

## 中文摘要

膠原蛋白是由三條延伸的第二型聚脯氨酸螺旋結構 (PP II) 沿一個軸向扭轉而成，藉氫鍵作用形成一個排列緊密的右旋三股螺旋結構。在膠原蛋白中最常見也最穩定的胜肽序列是 Pro-Hyp-Gly，因此我們以胺基酸序列為 (Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub> 的模擬胜肽來研究膠原蛋白的穩定性。合成一系列的主客模擬胜肽 (Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub>-Pro-Hyp-Xaa-(Pro-Hyp-Gly)<sub>m</sub>，Xaa 為 β-丙胺酸 (β-Ala)、L-丙胺酸 (L-Ala)、D-丙胺酸 (D-Ala) 和肌胺酸 (Sar)，目的是分別探討 backbone 的延長、側鏈造成的立體效應以及氫鍵的破壞對膠原蛋白穩定性的影響。CD 及 NMR 實驗顯示胺基酸變異的胜肽會形成比 Ac(POG)<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> 更不穩定的三股螺旋結構，但不同變異位置的胜肽，其穩定性降低的程度也會不同，變異位置在胜肽 C 端的結構穩定性比變異位置在 N 端的結構穩定性高。我們推測變異位置在 C 端時，由 C 端往 N 端的折疊會略過變異位置，再繼續折疊形成較大區域的 Pro-Hyp-Gly 三股螺旋結構，但當變異位置在 N 端，結構折疊到變異位置時會鬆開，且形成較小區域的 Pro-Hyp-Gly 序列重疊，使結構較不穩定。另外，D-丙胺酸取代在胜肽 N 端及 C 端位置，其穩定性都比 L-丙胺酸的取代穩定性更低。因為 D-胺基酸的正 φ 角度使其不利於三股螺旋結構的形成。肌胺酸取代胜肽中間位置的甘胺酸 (Gly) 仍可形成三股螺旋，表示氫鍵的破壞對結構穩定性的影響小於 backbone 改變或立體障礙對結構穩定性的影響。此外，動力學實驗顯示側鏈的立體障礙是影響三股螺旋結構折疊速率的主要因素。

## Abstract

Collagen is a right-handed triple helix consisting of three left-handed PP II helices interacted by hydrogen bonding. It involves many repeats of the tripeptide sequence : Pro-Hyp-Gly, and thus we use it as the peptide model to investigate the stability of collagen. A series of host-guest collagen peptides, (Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub>-Pro-Hyp-Xaa-(Pro-Hyp-Gly)<sub>m</sub>, where Xaa is β-Ala, L-Ala, D-Ala, and sarcosine, were prepared to investigate the effects of a prolonged backbone, the side chain steric strain, and the hydrogen bond breaking on collagen stability. CD and NMR measurements indicated that the mutated peptides formed less stable triple helices compared to the wild type peptide, but the destabilizing effects at different sites were different. Our data have shown that the mutation at the N-terminus destabilized the triple helix more than that at the C-terminus. We suggest that coming across the N-terminal mutation while folding from the C- to N-terminus would significantly disperse the triple helix, but it could skip the C-terminal mutation site and then hold on folding at the other site to form a larger section of Pro-Hyp-Gly repeats. The substitution of a sarcosine at the middle site of a collagen peptide could still form a triple helix, suggesting that the hydrogen bond-breaking has less destabilization effects than the perturbation of backbone. Moreover, the kinetic studies have shown that steric effects of the side chains might be the main factor retarding the folding of a triple helix.

# 目錄

	頁次
中文摘要	i
Abstract	ii
目錄	iii
圖目錄	vii
表目錄	x
Scheme	x
第一章 緒論	1
1-1：前言	1
1-2：膠原蛋白 (Collagen)	1
I. 介紹	1
II. 結構	2
1-3：膠原蛋白折疊過程	4
1-4：脯胺酸 (Pro) 穩定膠原蛋白的能力	6
1-5：膠原蛋白突變引起的疾病	7
1-6：甘胺酸 (Gly) 被不同胺基酸置換	9
1-7：膠原蛋白穩定性和突變位置的關聯性	10



1-8 : 研究模擬胜肽穩定性之方法	12
1-9 : 特殊胺基酸之特性	14
1-9-1 : Beta-胺基酸	14
1-9-2 : 肌胺酸 (Sarcosine, Sar)	15
1-9-3 : D-胺基酸	16
1-10 : 研究方向	18
 第二章 實驗部分	 20
2-1 : 儀器	20
2-2 : 藥品	21
2-3 : 固相胜肽合成法 (Solid-phase peptide synthesis, SPPS)	24
2-4 : 圓二色光譜儀介紹	28
2-5 : 實驗步驟	30
2-5-1 : 合成 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH (Fmoc-POG-OH)	30
I . 合成 Boc-Hyp-OH	30
II . 合成 Boc-Hyp-Gly-OBn	31
III . 合成 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn	31
IV . 氫化反應得到 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH	32
2-5-2 : 合成 Kemp's triacid-(Gly-OH) <sub>3</sub> (KTA-(Gly-OH) <sub>3</sub> )	33
I . 合成 KTA-(Gly-OBn) <sub>3</sub>	34



II. 氫化反應得到 KTA-(Gly-OH) <sub>3</sub>	34
2-5-3 : 合成模擬胜肽	35
2-6 : 分析模擬胜肽	36
2-6-1 : 樣品置備和純化	36
2-6-2 : Circular Dichroism Spectroscopy (CD 光譜)	38
2-6-3 : NMR 光譜	40
2-6-4 : UV/VIS 光譜	40
第三章 結果與討論	41
3-1 : 設計膠原蛋白模擬胜肽	41
3-2 : 研究膠原蛋白胜肽結構及穩定性	43
3-2-1 : β-Ala 取代	44
3-2-2 : L-Ala 取代	47
3-2-3 : D-Ala 取代	49
3-2-4 : Sar 取代	52
3-2-5 : Kemp's triacid 接上 Ala 取代之胜肽的比較	54
3-3 : 胺基酸置換對三股螺旋結構穩定度之影響比較	57
3-4 : 熱力學分析	61
3-5 : 胜肽折疊速率的比較	65
3-5-1 : Refolding 速率	65

3-5-2 : Unfolding 速率比較	69
第四章 結論	70
參考文獻 (References)	71
附錄	74



## 圖目錄

	頁次
圖 1-1 膠原蛋白三股螺旋結構之片段	3
圖 1-2 膠原蛋白三股螺旋間氫鍵作用	4
圖 1-3 三股螺旋結構由 C 端往 N 端折疊的過程	5
圖 1-4 $O_{i-1}$ 到 $C_i'$ 的 $n \rightarrow \pi^*$ 作用力，分子為 N-acetyl-L-proline methyl ester 的反式異構物	7
圖 1-5 胜肽的羰基及 Hyp 的羥基和水分子形成的氫鍵網狀作用	7
圖 1-6 T1-892 第 10 和 25 個 Gly 被 Ala 取代的折疊情況	11
圖 1-7 胜肽溶液之熔化曲線 (A) $Ac-(Gly-Pro-Hyp)_n-NH_2$ ( $n = 5, 6, 9$ ) (B) $KTA-[Gly-(Gly-Pro-Hyp)_n-NH_2]_3$ ( $n = 3, 5, 6$ )	13
圖 1-8 $\beta$ -Ala	15
圖 1-9 $\alpha$ 胜肽、 $\beta^3$ 胜肽、 $\beta^2$ 胜肽	15
圖 1-10 Gly-Sar 所形成之 dipeptide, Sar 為 Gly 的胺基氫原子以甲基取代	15
圖 1-11 (A) L-胺基酸、(B) Gly、(C) D-胺基酸的 $\phi$ , $\psi$ 角度分布 (Ramachandran plots)	17
圖 2-1 固相胜肽合成法 (SPPS) 合成胜肽鏈的流程	25
圖 2-2 SPPS 使用的兩種 N 端保護基 (A) Fmoc 系列 (B) Boc 系列	26

圖 2-3 Fmoc SPPS 的 N 端保護基、側鏈保護基及 cleavage 方法	26
圖 2-4 (A) HBTU (B) HOBt 之結構式	27
圖 2-5 蛋白質分子二級結構 ( $\alpha$ -螺旋結構及 $\beta$ -摺板) 之圓二色光譜圖	29
圖 3-1 $\beta$ -Ala 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖與 (B) 在 225 nm 之融化曲線	45
圖 3-2 Gly15 $\beta$ -Ala 胜肽溶液的 $T_m$ 值與 TMAO 濃度關係圖	46
圖 3-3 (A) Gly21 $\beta$ -Ala (B) Gly6 $\beta$ -Ala 於 10°C 和 45°C 所測得之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜	47
圖 3-4 L-Ala 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖與 (B) 在 225 nm 之融化曲線	48
圖 3-5 D-Ala 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖與 (B) 在 225 nm 之融化曲線	50
圖 3-6 (A) Gly21L-Ala (B) Gly6L-Ala (C) Gly21D-Ala (D) Gly6D-Ala 於 10°C 和 45°C 所測得之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜	51
圖 3-7 Sar 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖與 (B) 在 225 nm 之融化曲線	53
圖 3-8 (A) Gly21Sar (B) Gly6Sar (C) Gly15Sar 於 10°C 和 45°C 所測得之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜	54
圖 3-9 膠原蛋白胜肽 KTA- $\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$ (實心) 與 KTA- $\{\text{GG}$	

(POG)<sub>3</sub>POdA(POG)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>}<sub>3</sub> (空心) 在 225 nm 之熔化曲線 55

圖 3-10 於 4°C 時 CD 所量測之膠原蛋白胜肽的 chemical denaturation 實驗

56

圖 3-11 膠原蛋白模擬胜肽 KTA-{GG(POG)<sub>3</sub>POA(POG)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>}<sub>3</sub> (實心) 與 KTA-{GG(POG)<sub>3</sub>POdA(POG)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>}<sub>3</sub> (空心) fraction unfolded 與 [GuHCl] 之關係圖 57

圖 3-12 突變位置在 N 端及 C 端胜肽可以形成的 POG 序列長度 58

圖 3-13 變溫實驗得到的熔化曲線， $y_n$  定義三股螺旋含量與溫度之線性關係，

$y_d$  定義胜肽單鏈含量與溫度之線性關係 61

圖 3-14 三股螺旋折疊比例對時間作圖 66

圖 3-15 Gly 的胺基氫原子和亞胺酸的羰基形成氫鍵 69



## 表目錄

	頁次
表 1-1 主客模擬胜肽 $T_m$ 值及 enthalpy 的變化	9
表 2-1 合成的聚胺酸胜肽之質譜結果	37
表 3-1 本研究所合成的四種聚胺酸模型	41
表 3-2 膠原蛋白模擬胜肽的 CD 訊號最大值及其對應的波長及 $T_m$ 值	49
表 3-3 D-Ala, L-Ala 取代膠原蛋白中間位置 Gly 之 $T_m$ 值	59
表 3-4 膠原蛋白模擬胜肽 $T_m$ , $\Delta H^\circ$ 及 $\Delta S^\circ$ 的比較	63
表 3-5 膠原蛋白模擬胜肽的折疊速率比較	67

## Scheme

Scheme 2-1 (A) HBTU 之活化反應	27
Scheme 2-1 (B) Fmoc 系列之偶合反應	28
Scheme 2-2 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH 合成流程圖	30
Scheme 2-3 Kemp's triacid-(Gly-OH) <sub>3</sub> 合成流程圖	33

# 第一章 緒論

## 1-1 前言

蛋白質在生物體中扮演著很重要的角色，例如：細胞架構、酵素催化、訊息傳遞、物質傳輸、能量儲存等，而其中膠原蛋白是動物體內含量最多的蛋白質，存在於皮膚、骨骼、關節等結構的細胞外間質中最主要的結構蛋白質，可作為結締組織黏合物，且作為支架並保護組織。因為膠原蛋白具有低免疫性、生物相容性等特性，近年來廣泛被運用在生醫材料、化妝品及食品等方面。<sup>1~3</sup>

膠原蛋白是一個由三條平行的第二型聚脯胺酸螺旋結構 (PP II) 所形成的三股螺旋，當胺基酸序列被改變或是蛋白質折疊不正常，會使膠原蛋白結構不穩定，而很多疾病如關節炎和成骨發育不全等都與它的異常有關。<sup>2, 4</sup> 我們實驗室從事膠原蛋白變異這方面的研究，希望藉由研究膠原蛋白變異對結構穩定度的影響，以及如何增加膠原蛋白穩定性，對膠原蛋白突變所導致的疾病能有更進一步地了解。

## 1-2 膠原蛋白 (Collagen)

**I. 介紹：**膠原蛋白是一種脊椎動物結締組織中的非水溶性纖維狀含醣蛋白質，是脊椎動物體內含量最豐富的蛋白質，也是構成各種細胞外間質的聚合物。基本結構由大約一千個胺基酸組成，由三條分子量約為九萬五千道爾頓 (Daltons) 的胜肽鏈，互相纏繞形成分子量達三十萬道爾頓的巨大蛋白質螺旋狀分子。<sup>2, 3</sup>

膠原蛋白在人體內蛋白質中約佔 25% ~ 35% ，相當於人體重量的 6% ，分布遍及全身各個組織器官，例如：皮膚、骨骼、關節、韌帶等。膠原蛋白亦是組成皮膚的主要結構性蛋白質，佔 50% 以上，主要存在於皮膚的真皮層中，生理機能是作為結締組織的黏合物，能將水分鎖住，是使皮膚保持彈性的主要物質，並提供有力的支撐架構可以保護皮膚。<sup>2,3</sup>

膠原蛋白的其它功能是當作細胞黏著分子的辨識位置，藉以傳遞訊號或使細胞能固定在身體組織上，以及使骨骼堅硬具有彈性，提供保護內臟的功能，幫助傷口癒合與組織復原，修復皮膚疤痕，供應表皮層及表皮附屬器官營養。且具有非抗原性、低免疫性、生物降解性、生物相容性、生物吸收性等優異的特性。<sup>3,5</sup>

到目前為止，已有二十七型人體內的膠原蛋白可被辨認，但廣泛運用及研究的仍侷限於前五型，因為身體所有組織中，第一型到第五型的膠原蛋白含量最豐富，其中第一、二、三型及較少的第五型和第十一型是纖維組成的主要成分。第一型膠原蛋白是皮膚真皮層間連接細胞的物質，是由人體的纖維母細胞負責製造的纖維狀蛋白質。第二型膠原蛋白主要存在於人體的軟骨中，可以強化關節軟骨在運動摩擦時的滑潤度，它的變異會導致軟骨成長及骨骼的病變。<sup>2,3,6</sup>

膠原蛋白可重組或處理成多種型態，如薄膜、管狀或柔軟的纖維織品，目前已應用在止血材料、神經重建、組織整型、燒燙傷敷料、藥物釋放、血管壁手術及手術縫線...等生醫材料，也可以應用在化妝品、食品的方面。<sup>3</sup>

**II. 結構：**膠原蛋白的結構屬於螺旋分子形狀，是由三條延伸的第二型聚脯

胺酸螺旋結構 (PP II) 沿一個軸向扭轉而成，彼此緊密纏繞形成一條排列緊密的右旋超螺旋形結構，如圖 1-1。三股螺旋結構是形成纖維的膠原蛋白（第一、二、三、五和十一型）中的主要組成，也存在於 15 種以上非纖維的膠原蛋白及其它不同形式的蛋白質中。<sup>2,4</sup>

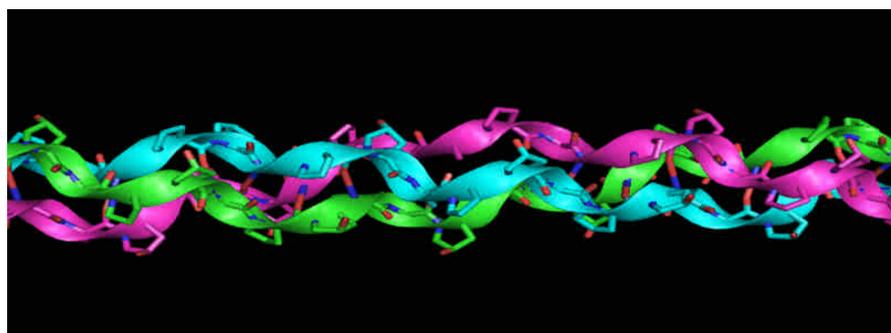


圖 1-1 膠原蛋白三股螺旋結構之片段，資料來源：Protein Data Bank (ID : 1CAG)

膠原蛋白胺基酸序列以  $(\text{Gly-X-Y})_n$  的形式重覆排列，Gly 是甘胺酸 (Glycine)，X 和 Y 位置最常見的是脯胺酸 (Proline, Pro)，在 Y 位置 Pro 經由酵素修飾為 4R-氫氧脯胺酸 (4R-Hydroxyproline, Hyp)。<sup>2</sup> Gly-Pro-Hyp 在膠原蛋白中是最穩定也最常見的胜肽序列，佔膠原蛋白  $(\text{Gly-X-Y})_n$  胺基酸序列的十分之一，Pro, Hyp 可促進膠原蛋白三股螺旋結構穩定，而 Hyp 穩定結構的能力比 Pro 更強，因為 Hyp 可和水分子形成氫鍵幫助穩定結構，另外，Hyp 偏好的環結構以及其立體電子效應也和結構穩定性有關。<sup>7~9</sup>

膠原蛋白的螺旋結構被胺基酸序列精確的限制著，三條 PP II 胜肽鏈彼此緊密地纏繞形成右旋超螺旋形結構，每三個胺基酸會靠近超螺旋形結構的中心軸，Gly 體積最小且沒有側鏈，容納在此位置可以使結構不扭曲，加上其具有胺基氫

原子可作為氫鍵的給體 (H-bond donor)；因此，每三個胺基酸就有一個 Gly 是形成膠原蛋白最重要的特性之一。<sup>2, 4</sup> 結構中三條胜肽鏈彼此相差一個胺基酸排列，胺基氫原子會和另一胜肽鏈的羧基氧原子形成氫鍵，藉以穩定三股螺旋結構，如圖 1-2。<sup>10</sup> 每條胜肽鏈形成的第二型聚脯胺酸螺旋結構 (PP II) 被膠原蛋白內高含量亞胺酸 (imino acids) 的立體結構限制而穩定。<sup>11</sup>

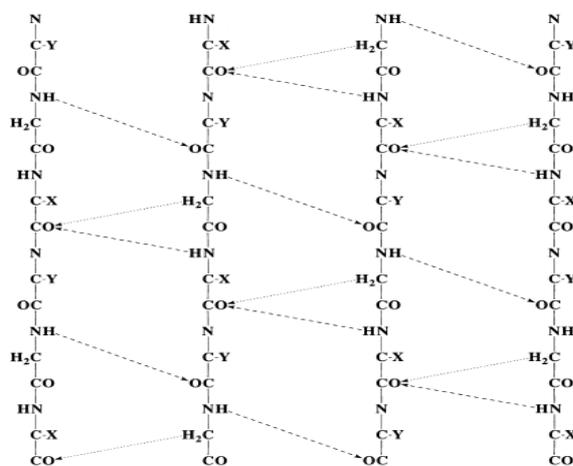


圖 1-2 膠原蛋白三股螺旋間氫鍵作用，NH...O=C (虛線)，C<sup>α</sup>-H...O=C (實線)<sup>10</sup>

研究最廣泛的第一型膠原蛋白是主要的結構蛋白質，主要存在於骨頭、皮膚和肌腱內的細胞外間質，由兩條 α1 鏈和一條 α2 鏈組成。三條鏈的中心區域包含 338 個重覆的 Gly-X-Y 序列，Gly-Pro-Hyp 也是其中最常見的膠原蛋白胺基酸序列。<sup>2, 12</sup>

### 1-3 膠原蛋白折疊過程

膠原蛋白的折疊經過很多複雜的步驟，精確的堆疊排列、高含量的亞胺酸以及時間和溫度的控制都必須考慮。在生物體內，第一型膠原蛋白是在內質網的網

狀結構內先形成 procollagen form，也就是在中心區域  $(\text{Gly-X-Y})_n$  的兩端有 N 端和 C 端球形胜肽，procollagen 的 C 端會負責胜肽鏈之選擇以及結合三條胜肽鏈 (nucleation)。胜肽鏈還未折疊時 Pro 會經由 post-translational hydroxylation 作用轉換成 Hyp，再開始進行三股螺旋結構的折疊。第一型膠原蛋白  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  鏈 C 端的  $(\text{Gly-Pro-Hyp})_4\text{-Gly-Pro-Pro}$  序列位於 nucleation 位置，三條胜肽鏈結合後再由 C 端往 N 端形成三股螺旋結構，如圖 1-3。第三型膠原蛋白的 C 端也有許多 Hyp 可幫助三股螺旋的形成，而膠原蛋白胜肽鏈的其它部分沒有發現超過連續兩個的 Gly-Pro-Hyp 排序。<sup>11~14</sup>

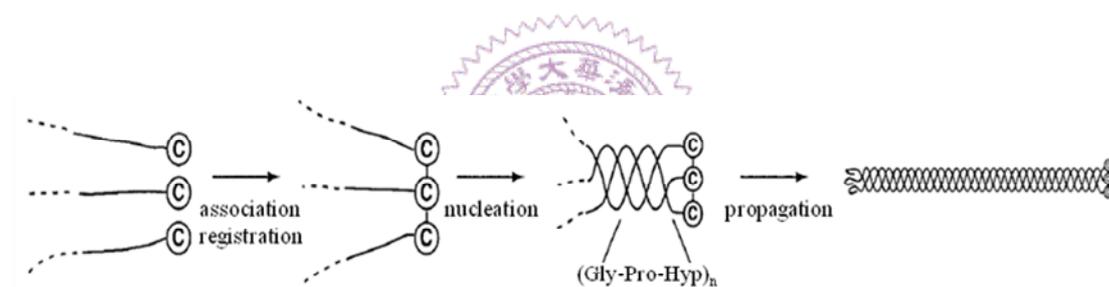


圖 1-3 三股螺旋結構由 C 端往 N 端折疊的過程<sup>13</sup>

C 端往 N 端形成三股螺旋的速率會被亞胺酸的順式、反式 (*cis-trans*) 結構轉換所影響。結構未折疊的平衡情形下，約 10% 亞胺酸是順式胜肽鍵結，而胜肽鍵結全是反式結構的膠原蛋白，其結構形成的速率會受到順式、反式結構轉換的快慢影響。<sup>15, 16</sup>

Buevich 等人於 2004 年研究將胜肽 T1-892 C 端的  $(\text{Gly-Pro-Hyp})_4$  序列轉換到 N 端 (T1'-892n)，探討三股螺旋的折疊過程，研究顯示不管  $(\text{Gly-Pro-Hyp})_4$  序列在胜肽鏈 N 端或 C 端都可形成穩定的三股螺旋結構而且穩定性接

近。由 NMR 實驗觀察到 T1-892 折疊過程是 (Gly-Pro-Hyp)<sub>4</sub> 作為 nucleation 位置，再由 C 端往 N 端進行折疊，但是 (Gly-Pro-Hyp)<sub>4</sub> 序列轉換到 N 端位置後，三股螺旋折疊過程改變，沒有明確偏好的折疊方向，這種無方向性的折疊方式不會影響三股螺旋的形成，但折疊速率比較慢。<sup>16</sup>

#### 1-4 脯氨酸 (Pro) 穩定膠原蛋白的能力

第二型聚脯氨酸結構 (PP II) 的胜肽鍵結偏好反式構型，除了立體效應的影響，也包含胜肽鍵氧原子 (O<sub>i-1</sub>) 的未鍵結電子到胜肽鏈上相連羰基碳原子 (C<sub>i</sub>' = O<sub>i</sub>) 的反鍵結軌域之間的 hyperconjugative delocalization 的貢獻 ( $n \rightarrow \pi^*$  作用力)，如圖 1-4。 $n \rightarrow \pi^*$  作用力決定於 O<sub>i-1</sub> 到 C<sub>i</sub>' 的距離及 O<sub>i-1</sub> 到 C<sub>i</sub>' = O<sub>i</sub> 的角度，第二型聚脯氨酸螺旋結構 (PP II)、右旋螺旋結構、左旋螺旋結構內皆有此種作用力，可以幫助這些二級結構提升穩定性。不像  $\alpha$  結構，PP II 結構缺乏分子內氫鍵，所以  $n \rightarrow \pi^*$  作用力對第二型聚脯氨酸螺旋結構 (PP II) 的穩定性很重要。Pro 在膠原蛋白結構有特殊的影響，因為 pyrrolidine ring 使它的  $\phi$  角度有限制範圍，從  $-75^\circ$  (C <sup>$\gamma$</sup> -endo pucker) 到  $-60^\circ$  (C <sup>$\gamma$</sup> -exo pucker)。理想的 PP II 結構角度是  $\phi = -75^\circ, \psi = +145^\circ$ ，角度符合  $n \rightarrow \pi^*$  作用力。所以穩定 PP II 結構的作用力包含水分子和不同條胜肽鏈之間形成的氫鍵網狀作用，如圖 1-5，以及立體電子效應 ( $n \rightarrow \pi^*$  作用力) 也可以增加結構穩定性，因此，甲醇、苯甲醇等溶劑內也可以形成 PP II 結構。<sup>17, 18</sup>

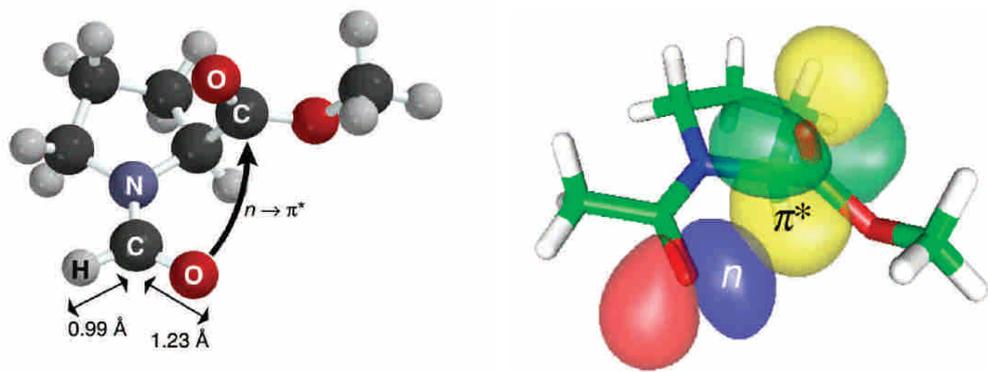


圖 1-4  $O_{i-1}$  到  $C_i'$  的  $n \rightarrow \pi^*$  作用力，分子為 N-acetyl-L-proline methyl ester 的反式異構物。<sup>17</sup>

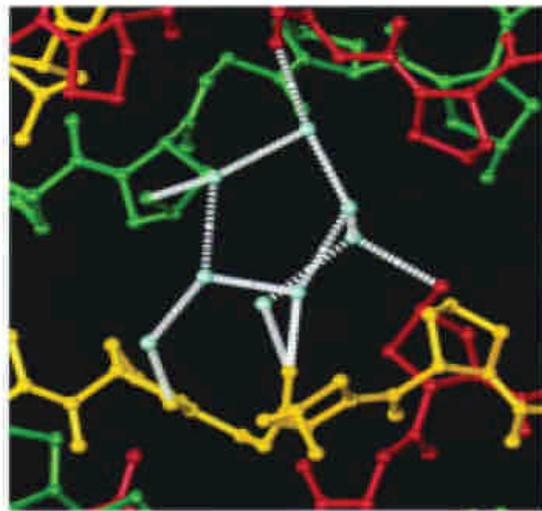


圖 1-5 胜肽的羰基及 Hyp 的羥基和水分子形成的氫鍵網狀作用<sup>18</sup>

### 1-5 膠原蛋白突變引起的疾病

蛋白質折疊異常和許多疾病有關，包含神經系統退化疾病、囊腫纖維化及第二型糖尿病等，蛋白質折疊異常也發生在膠原蛋白，重覆的 Gly-X-Y 序列中胺基酸的突變和許多遺傳組織疾病有關，例如：主要存在骨頭和肌腱內的第一型膠原蛋白突變會引起成骨發育不全 (Osteogenesis Imperfect, 簡稱：OI)，主要存在於軟骨的第二型膠原蛋白突變會導致骨骼發育不完整，第三型膠原蛋白突變導

致 Ehlers-Danlos Syndrome。突變可能是由於接合錯誤、密碼子被刪除或無意義、胺基酸被取代等，最常見的突變是膠原蛋白胺基酸序列的 Gly 被其它胺基酸取代，使膠原蛋白三股螺旋結構的折疊過程和穩定性產生問題而導致疾病。<sup>2, 11, 16</sup>

成骨發育不全 (OI) 或骨頭易碎這類疾病和骨頭重量的減少有關，容易發生多重骨折且有許多不同的症狀，嚴重的程度和第一型膠原蛋白產生突變的位置和性質有關。臨床症狀可分為四個類型，第一型是最輕微也最常見的青春期前易骨折及輕微的生長遲緩，第三型和第四型病人會經常骨折、肢體容易變形。第二型最嚴重，可能會致命。成骨發育不全疾病的發生和基因 COL1A1 及 COL1A2 複製的第一型前膠原蛋白的  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  鏈產生突變有關。<sup>2, 19</sup>

OI 發生最主要的原因是複製過程單一鹼基的改變，使得形成膠原蛋白必要的 Gly 被其它胺基酸取代。Gly 複製過程核苷酸 (nucleotide) 的改變可能產生丙胺酸 (Alanine, Ala)、精胺酸 (Arginine, Arg)、天冬胺酸 (Aspartate, Asp)、半胱胺酸 (Cysteine, Cys)、穀胺酸 (Glutamate, Glu)、絲胺酸 (Serine, Ser)、纈胺酸 (Valine, Val)、色胺酸 (Tryptophan, Trp) 的複製或複製過程提早結束，這些不同的胺基酸取代除了 Trp 都已在不同的 OI 例子被發現，Ser 和 Cys 的取代是最常見的突變，有超過 150 種第一型膠原蛋白 Gly 突變產生的症狀。<sup>2, 19</sup>

第一型膠原蛋白 OI 突變會使三股螺旋結構的折疊速率變慢，穩定性也降低而破壞膠原蛋白的功能，因為 Gly 被別的胺基酸所取代，改變 Gly-X-Y 重覆序列，也破壞三股螺旋的緊密排列方式，造成膠原蛋白不穩定及骨頭礦化。<sup>2, 16</sup>

## 1-6 甘氨酸 (Gly) 被不同胺基酸置換

Beck 等人於 2000 年利用主客胜肽模擬類似膠原蛋白的短鏈胜肽，在一致的膠原蛋白分子比例和一樣的胺基酸序列條件下，研究 Gly 突變對穩定性的影響。主胜肽由八段 Gly-Pro-Hyp 序列組成，模擬最穩定的膠原蛋白環境，再以丙氨酸 (Ala)、精氨酸 (Arg)、天冬氨酸 (Asp)、半胱氨酸 (Cys)、穀氨酸 (Glu)、絲氨酸 (Ser)、纈氨酸 (Val) 等七種胺基酸取代胜肽鏈中間位置的 Gly。研究顯示置換中間段 Gly-Pro-Hyp 序列的 Gly 會使胜肽穩定性降低很多，有些模擬胜肽短鏈只形成 PP II 結構，不會彼此纏繞形成三股螺旋結構。當 TMAO (Trimethylamine N-oxide) 存在於溶液時所測量到模擬胜肽的  $T_m$  值，可以比較 Gly 被置換後結構穩定性的改變，其不穩定大小比較為  $\text{Ala} \leq \text{Ser} < \text{Cys}$  (還原態)  $< \text{Arg} < \text{Val} < \text{Glu} \leq \text{Asp}$  (最不穩定的胺基酸取代 Gly)，如表 1-1。<sup>2, 19</sup>

表 1-1 主客模擬胜肽  $T_m$  值及 enthalpy 的變化<sup>19</sup>

Peptide	0 M TMAO		3.7 M TMAO		$\Delta T_m / [\text{TMAO}]$ , K/mol/liter
	$T_m$ (°C)*	$\Delta H^0$ (kJ/mol)	$T_m$ (°C)	$\Delta H^0$ (kJ/mol)	
GPO <sup>†</sup>	44.5	-350	n.d.	n.d.	n.d.
GSO	38.3	-510	47.1 <sup>†</sup>	-410 <sup>†</sup>	4.4
GPS	34.8	-440	n.d.	n.d.	n.d.
SPO	8.6	-590	26.5	-350	4.8
APO	9.9	-550	31.9	-380	5.9
CPO <sub>red</sub>	[-3]	—	18.1	-190	5.6
RPO	[-7]	—	12.2	-320	5.1
VPO	[-10]	—	8.2	-360	n.d.
EPO	[-16]	—	3	-380	n.d.
DPO	[-17]	—	2	-300	n.d.

由 Gly 被 Ala 取代的模擬胜肽晶體結構推測，三股螺旋結構和穩定性的改變是因為 Ala 側鏈多了一個甲基，使得胜肽間胺基氫原子和羰基形成的氫鍵作用被干擾，以及突變位置的三股螺旋結構會部分被扭開。穩定性和側鏈體積大小

有關，所以側鏈體積最小的 Ala 和 Ser 對結構影響最小，而體積較大的 Val 和 Arg 會使結構更不穩定。觀察模擬胜肽短鏈的穩定性與  $\alpha 1$  鏈產生 OI 突變的關聯性，顯示最不穩定的胺基酸取代和最嚴重的臨床症狀有關，而胜肽鏈中 Gly 被取代會較穩定的胺基酸取代則症狀較輕微，如：在同樣的胜肽鏈、同樣的突變位置，Arg, Val, Asp 的取代會產生比 Ala, Ser, Cys 的取代更嚴重的症狀。<sup>2, 4, 19</sup>

### 1-7 膠原蛋白穩定性和突變位置的關聯性

OI 症狀和膠原蛋白穩定性有關，而穩定性除了受到取代 Gly 的胺基酸性質影響，也和取代位置有關，某些位置發生突變會有致命的危險，有些位置發生突變則產生較輕微的症狀，例如：在  $\alpha 1$  鏈以 Ser 和 Cys 取代 Gly，靠近 N 端的取代較沒有致命的危險，越穩定的胺基酸序列發生突變則有更嚴重的症狀，如：在 (Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub> 序列發生突變。<sup>19, 20</sup>

Bhate 等人於 2002 年利用胜肽 T1-892 探討突變位置和胜肽穩定度的關係，胜肽 T1-892 是模擬第一型膠原蛋白  $\alpha 1$  鏈的 N 端胺基酸序列，將 T1-892 第 10 個位置的 Gly 以 Ala 取代 (T1-892(G10A)) 會使胜肽不穩定；另外，合成胜肽 T1-892(G25A)，將 T1-892 C 端 (Gly-Pro-Hyp)<sub>4</sub> 序列中的 Gly 換成 Ala，穩定性降低且折疊速率變慢，比 T1-892(G10A) 更不穩定。<sup>11</sup>

CD 實驗顯示 T1-892(G10A) 三股螺旋含量比 T1-892 少 50%，NMR 研究發現胜肽 C 端到突變位置可形成三股螺旋，但 N 端到突變位置無法形成三股

螺旋結構，表示胜肽由 C 端往 N 端折疊到突變位置後，受到突變位置阻礙而不再繼續折疊，使折疊好的螺旋結構稍微鬆開、流動性增加，所以較不穩定。而 T1-892(G25A)  $T_m$  值比 T1-892(G10A)  $T_m$  值更低，表示突變位置在 C 端使胜肽更不穩定，研究顯示胜肽 T1-892(G25A) 三股螺旋結構形成的含量極少，胜肽大部分以單鏈形式存在，所以  $T_m$  值很低，如圖 1-6。<sup>11</sup>

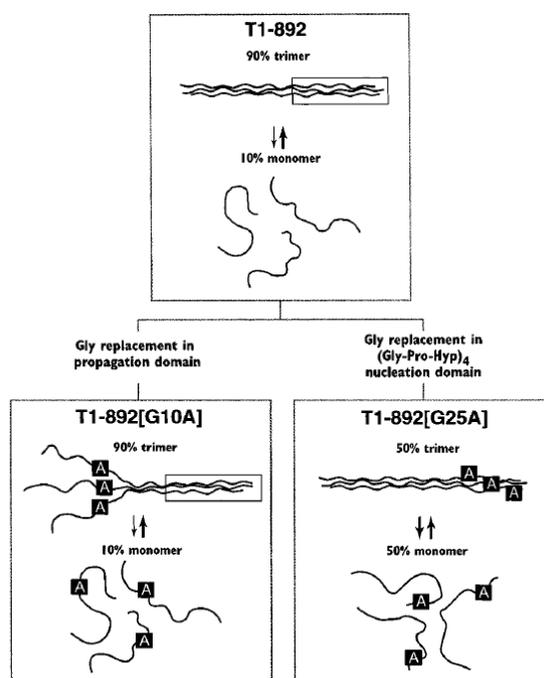


圖 1-6 T1-892 第 10 和 25 個 Gly 被 Ala 取代的折疊情況<sup>11</sup>

由 NMR 觀察到 T1-892(G10A) 由 C 端折疊到突變位置後結構會鬆開，但 T1-892(G25A) 在突變位置仍可形成有序的三股螺旋結構，表示變異位置在 C 端 (Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub> 時，胜肽會有不同的折疊過程，(Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub> 不再具有 nucleation 作用。由此可知突變位置周圍的胺基酸序列會影響三股螺旋的形成，使結構折疊過程有所不同，以及影響結構可容納體積更大的胺基酸的能力。<sup>11</sup>

歸納主要影響 OI 症狀的原因，包含取代 Gly 的胺基酸性質，如：Gly 換

成 Cys 或 Asp 會使三股螺旋產生扭結而致命，突變發生在膠原蛋白  $\alpha 1$  或  $\alpha 2$  鏈，突變位置和胜肽鏈 C 端位置的關聯以及突變位置附近的胺基酸環境，如：富含亞胺酸的胺基酸序列發生突變會有嚴重的臨床症狀，以及 N 端到突變位置再形成三股螺旋的能力。<sup>19, 20</sup>

### 1-8 研究模擬胜肽穩定性之方法

目前研究蛋白質折疊過程的方法包含，合成模擬自然界蛋白質的短鏈胜肽，藉以研究蛋白質的二級結構，以及將蛋白質中某特定位置的胺基酸以其它胺基酸取代，可得到距離較長的三級結構作用情形，如：鹽橋、側鏈間的堆疊。另外，還有重新設計蛋白質的方法 (De novo protein design approach)，也有以基因技術重新設計形成蛋白質，進而研究蛋白質內部的堆疊情形 (Natural motif approach)。最常作為研究膠原蛋白模擬胜肽的胺基酸序列是 Gly-Pro-Hyp 或 Gly-Pro-Pro，10 段以上重複的 Gly-Pro-Hyp 序列在室溫下即可形成穩定的三股螺旋結構。<sup>21, 22</sup>

Template-assembled synthetic protein (TASP) 方法也被應用於模擬蛋白質生物分子的設計及合成，以幫助蛋白質分子結構的形成及穩定性，例如：利用模板分子 (template molecules) 誘導  $\alpha$ -螺旋的形成或連結兩反平行胜肽使其形成  $\beta$ -strands。也可用於模擬膠原蛋白三股螺旋結構，膠原蛋白中三條胜肽彼此交纏形成一螺旋分子，而帶有三個官能基且具有  $C_3$  對稱的模板分子可連結此三條胜

肽，幫助其空間上的排列使三條肽容易彼此作用而形成三股螺旋結構。<sup>22</sup>

Goodman 等人於 1996 年利用一有機分子 Kemp's triacid (KTA, *cis,cis*-1, 3, 5-trimethylcyclohexane-1, 3, 5-tricarboxylic acid) 作為模板，KTA 包含三個直軸且互相平行的羧酸官能基可分別和三條肽的 N 端胺基作用，KTA 上的三條肽易彼此作用形成三股螺旋結構，使較短鏈的肽也可形成穩定的膠原蛋白結構。KTA 的羧基會先接上 Gly 形成 KTA-(Gly-OH)<sub>3</sub> 再與肽作用，Gly 作為 spacer 可使肽與 KTA 作用時減少三條肽之間的立體阻礙，並且提供彈性使三條肽排列時，利於彼此錯開一個胺基酸而形成三股螺旋結構。Goodman 等人合成重複的 Gly-Pro-Hyp 序列，Ac-(Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> (n = 1, 3, 5, 6, 9)，並將肽 N 端乙酰化，另外，再合成 KTA-[Gly-(Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>3</sub> (n = 3, 5, 6, 9)，利用 optical rotation 測量不同溫度下肽溶液的吸光訊號，如圖 1-7。<sup>22</sup>

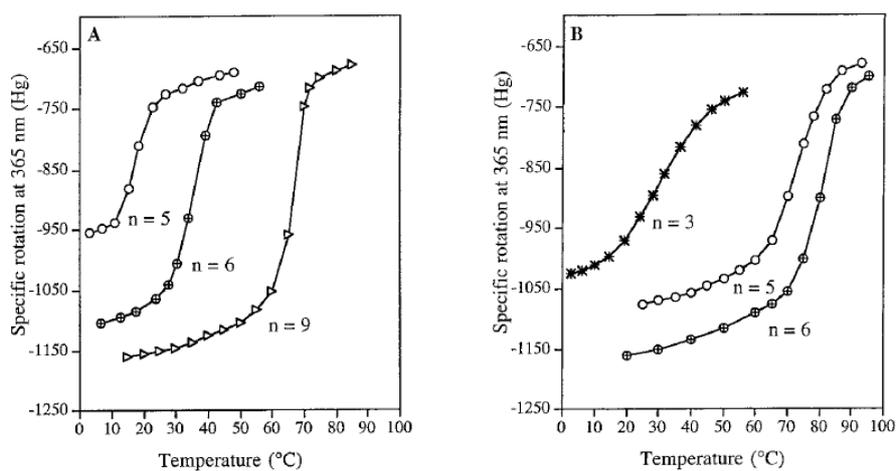


圖 1-7 肽溶液之熔化曲線 (A) Ac-(Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub> (n = 5, 6, 9)  
(B) KTA-[Gly-(Gly-Pro-Hyp)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>]<sub>3</sub> (n = 3, 5, 6) (specific rotations at 365 nmHg, 濃度 : 0.2 mg/mL in H<sub>2</sub>O)<sup>22</sup>

研究發現胜肽  $\text{Ac-(Gly-Pro-Hyp)}_n\text{-NH}_2$ ， $n$  等於 5 才能形成穩定的三股螺旋結構，接上模板後， $n$  等於 3 即可形成穩定的三股螺旋結構，而且相同長度的胜肽鏈接上模板後，可得到較高的  $T_m$  值，如  $\text{Ac-(Gly-Pro-Hyp)}_5\text{-NH}_2$   $T_m$  值為  $36^\circ\text{C}$ ，而  $\text{KTA-[Gly-(Gly-Pro-Hyp)}_5\text{-NH}_2\text{)]}_3$   $T_m$  值為  $70^\circ\text{C}$ ，由此可知模板可促進三股螺旋結構的形成並穩定其結構，且長度較短的胜肽鏈可藉由模板的幫助而形成三股螺旋結構。另外，Tong 等人於 2008 年以  $\text{Gly-Phe-Gly-Glu-Glu-Gly}$  作為一模板， $\text{Gly}$  C 端羧基和兩個  $\text{Glu}$  側鏈羧基可分別與三條胜肽作用以促進三股螺旋結構的形成，且此模板是重複的  $\text{X-Y-Gly}$  形式排列，更接近膠原蛋白的胺基酸序列，其結果顯示此一胺基酸序列亦可充當很好的模板來幫助膠原蛋白三股螺旋之形成，不過其效果沒有  $\text{Kemp's triacid}$  來得好。<sup>22, 23</sup>



## 1-9 特殊胺基酸之特性

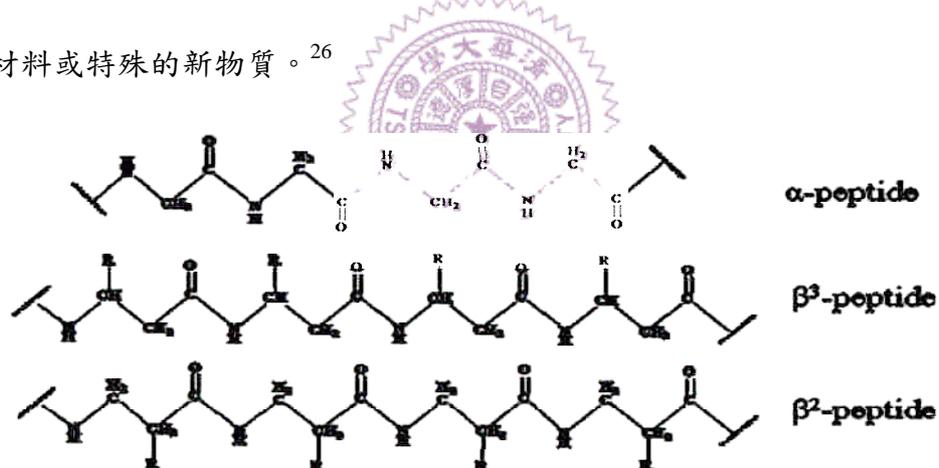
### 1-9-1 Beta-胺基酸

$\beta$  胜肽由  $\beta$  胺基酸組成， $\beta$  胺基酸是胺基接在  $\beta$  碳 (如圖 1-8)，而  $\alpha$  胺基酸的胺基接在  $\alpha$  碳上。20 種標準的  $\alpha$  胺基酸組成自然界的蛋白質，雖然  $\beta$  胺基酸不是人體蛋白質的組成成分，但它是胸腺嘧啶 (Thymine) 和纈胺酸 (Val) 代謝過程中必要的中間物。 $\beta$  胜肽分成兩種，側鏈靠近胺基的  $\beta^3$  胜肽和靠近羧基的  $\beta^2$  胜肽，許多  $\beta$  胜肽組成的螺旋結構已被合出，以形成的氫鍵包含幾個原子區分，有 8-helix, 10-helix, 12-helix, 14-helix 等，如圖 1-9。<sup>24</sup>

$\beta$  胺基酸和  $\alpha$  胺基酸的結構相似性顯示  $\beta$  胺基酸也許可以形成穩定的二級結構和四級結構，以及具有特殊作用性。Schepartz 等人於 2007 年研究設計以  $\beta^3$  胜肽形成穩定的  $3_{14}$  螺旋結構，並且在螺旋結構一側設計帶陽離子或陰離子側鏈的胺基酸，使兩螺旋結構的鹽橋作用幫助形成四級結構。<sup>25, 26</sup>



一般蛋白質類的藥物由  $\alpha$  胺基酸組成，較易被生物體內的酵素或免疫系統所降解，因此，利用與其結構相似的  $\beta$  胺基酸，希望設計出結構穩定且性質相近的蛋白質，以提高蛋白質類藥物的治療效果。另外，可以利用  $\beta$  胺基酸設計奈米材料或特殊的新物質。<sup>26</sup>



### 1-9-2 肌胺酸 (Sarcosine, Sar)

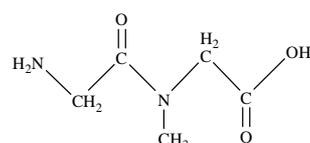


圖 1-10 Gly-Sar 所形成之 dipeptide，Sar 為 Gly 的胺基氫原子以甲基取代

肌胺酸 (Sarcosine, Sar) 是 Gly 的甲基衍生物，將 Gly 的胺基氫原子換成甲基，如圖 1-10，所以 Sar 無法和另一個胺基酸的羰基形成氫鍵，破壞蛋白質氫鍵作用。Butcher 等人於 1999 年利用 Sar 研究胜肽鏈 backbone 形成氫鍵的重要性，局部的 backbone 氫鍵作用力被改變，但三級結構作用維持不變，蛋白質結構是否可以維持穩定。蛋白質 Leucine zipper 具有二級結構 ( $\alpha$  螺旋) 和三級結構 (螺旋結構之間側鏈的堆疊排列)，將 Leucine zipper 的 f 位置以 Gly (GlyZip) 及 Sar (SarZip) 取代，取代位置遠離兩個螺旋結構的界面，不影響界面處側鏈之間的作用力。GlyZip 在水溶液中仍可維持螺旋結構及其三級結構，因為側鏈間作用力可穩定胜肽結構。但 SarZip 沒有規則的結構 (random coil)，因為氫鍵作用被破壞，影響三級結構穩定性而無法形成  $\alpha$  螺旋。此實驗顯示 backbone 的氫鍵作用和結構側鏈間的作用力對蛋白質穩定性同樣重要。<sup>21</sup>

### 1-9-3 D-胺基酸

自然界的蛋白質主要由 19 個 L-胺基酸和 achiral Gly 組成，但 D-胺基酸亦被發現於自然界蛋白質中，目前已有許多這方面的研究，例如：利用 D-胺基酸增加蛋白質結構的穩定性或是利用其結構特異性設計蛋白質，使蛋白質免於被降解，以作為藥物研究。L-胺基酸和 D-胺基酸在 Ramachandran plots 的角度分布是整個顛倒的，Gly 因為側鏈的缺乏，所以  $\phi$  ( $C_{i-1}'-N_i-C_i^\alpha-C_i'$ ) 和  $\psi$  ( $N_i-C_i^\alpha-C_i'-N_{i+1}$ ) torsion angle 有較廣泛的分布，因此很多蛋白質中某些位置的

Gly，其  $\phi$ ,  $\psi$  角度和 D-胺基酸  $\phi$ ,  $\psi$  角度是類似的，如圖 1-11。之前研究發現某些球形蛋白質利用 D-胺基酸取代 Gly 可以提升結構穩定性，其它研究更發現 D-胺基酸比 L-胺基酸更適合取代 Gly，不但可維持蛋白質結構，亦保有蛋白質的活性，然而這些研究中被取代成 D-胺基酸的 Gly 有一個共同點，即其  $\phi$  角度大於零。<sup>27-30</sup>

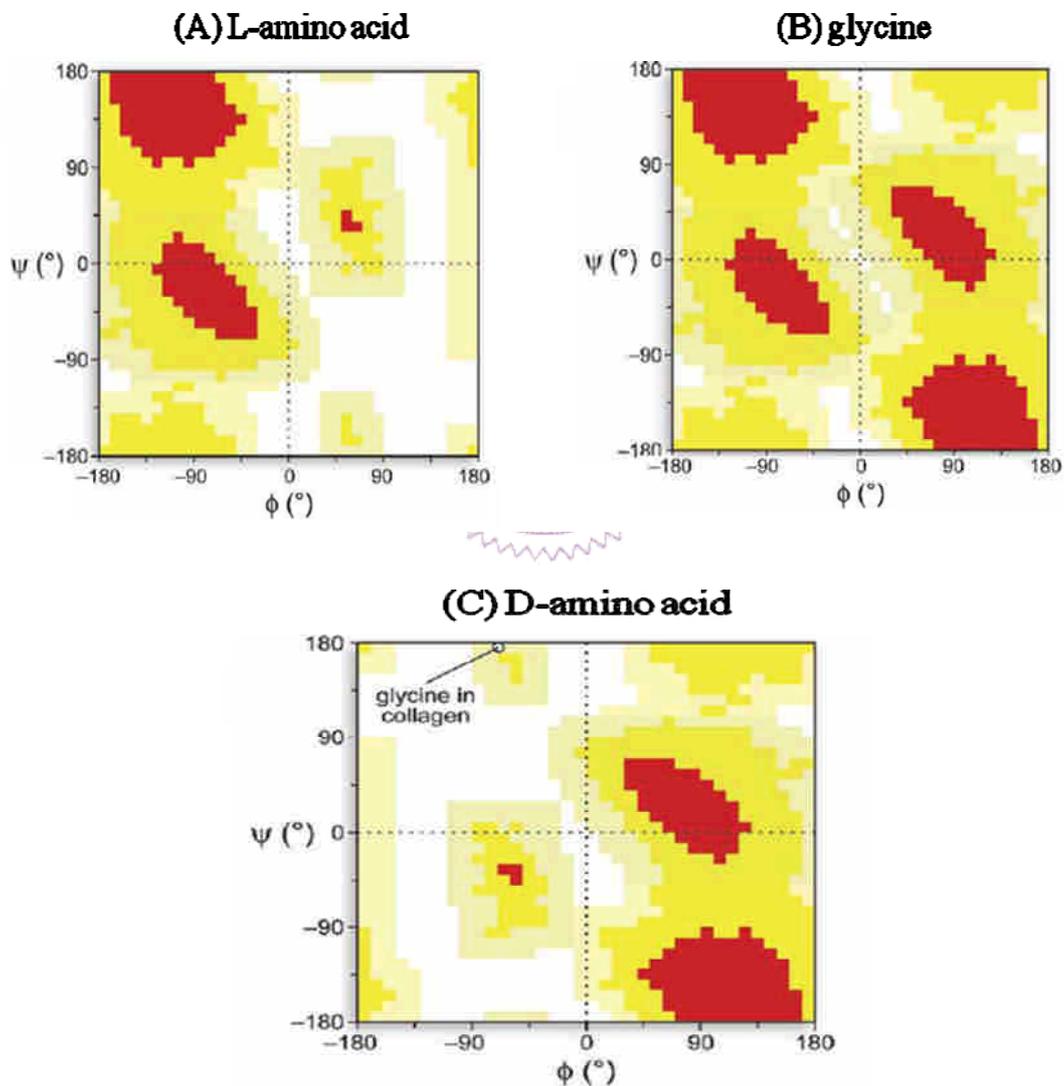


圖 1-11 (A) L-胺基酸、(B) Gly、(C) D-胺基酸的  $\phi$ ,  $\psi$  角度分布

(Ramachandran plots)<sup>28</sup>

最近 Tsai 等人於 2005 年計算研究認為膠原蛋白的 Gly 被 D-丙胺酸 (D-Ala) 或 D-絲胺酸 (D-Ser) 取代可以形成穩定的三股螺旋結構。不過膠原蛋白三股螺旋結構中 Gly 的  $\phi$  角度小於零，是不利於以 D-胺基酸置換 Gly 的角度。Horng 等人於 2006 年合成 Gly 被 D-Ala 或 D-Ser 置換的模擬膠原蛋白胜肽短鏈，發現膠原蛋白內的 Gly 以 D-胺基酸取代比以 L-胺基酸取代更不適合，三股螺旋結構更不穩定。雖然 L-丙胺酸 (L-Ala) 有一個甲基側鏈會造成立體效應，使三股螺旋結構變鬆散，而 D-胺基酸取代 Gly 雖然缺少側鏈造成的立體效應，但是膠原蛋白 Gly 的  $\phi$  角度小於零，D-胺基酸  $\phi$  角度卻大於零，造成 PP II 結構扭曲，更不利於三股螺旋的形成。這結果更說明了，利用 D-胺基酸作取代來穩定蛋白質是需要該胺基酸有正  $\phi$  角度的。<sup>19, 31, 32</sup>



## 1-10 研究方向

合成短鏈的聚胺酸模型來探討膠原蛋白穩定度，希望研究膠原蛋白內 Gly 位置的重要性，因為此位置雖然很重要但仍未清楚地被了解。因此，我們利用其它不同胺基酸取代 Pro-Hyp-Gly 合成的聚胺酸模型中 Gly 位置，<sup>8</sup> 以及取代聚胺酸模型中不同位置的 Gly，研究對胜肽鏈形成三股螺旋結構的穩定性有何影響。用來置換 Gly 的胺基酸包含  $\beta$ -丙胺酸 ( $\beta$ -Ala)、D-丙胺酸 (D-Ala)、L-丙胺酸 (L-Ala) 和肌胺酸 (Sar)，置換位置包含在胜肽鏈的 N 端部分、C 端部分或中間位置。

沒有側鏈但 backbone 位置多了一個亞甲基的  $\beta$ -Ala，可以探討 backbone 延長對三股螺旋結構的影響。以 L-Ala 和 D-Ala 取代 Gly 位置的比較可探討側鏈往內或往外造成的立體效應對結構的影響。利用 Sar 取代 Gly 探討膠原蛋白中 Gly 胺基和另一鏈的羰基形成的氫鍵作用的重要性。一般認為三股螺旋折疊是由 C 端往 N 端形成，所以胺基酸取代在胜肽鏈不同位置的 Gly，可以探討三股螺旋結構的折疊過程和穩定性如何受取代位置的影響。

另外，cis,cis-1, 3, 5-三甲基環己烷-1, 3, 5-三羧酸 (Kemp's triacid) 是已知可用來當作一模板以幫助膠原蛋白折疊成三股螺旋形結構並增加其穩定度；因此，我們希望利用此分子作為模板來幫助變異的膠原蛋白聚胺酸模型折疊成三股螺旋結構使其穩定度能被測量。

藉由以上研究探討為何 Gly 很重要，以及置換成其它胺基酸或是改變取代位置對整個結構穩定度有何影響，試圖尋找可能的方法來增加膠原蛋白的穩定性，希望對膠原蛋白變異所導致的疾病能有更進一步地了解，進而尋找有效改善疾病的方法，或應用於生醫材料的開發。

## 第二章 實驗部分

### 2-1 儀器

**胺基酸序列合成儀**：Protein Technologies, Inc. PS3<sup>TM</sup> 3 channel serial peptide synthesizer

**高效能液相層析儀 (HPLC)**：馬達型號為 JASCO PU-2080 Isocratic HPLC Pump，偵測器為 JASCO UV-2077 Multi-wavelength UV/Vis Detector，層析管柱為 Thermo BioBasic-18。

**圓二色光譜儀 (CD, Circular Dichroism Spectrometer)**：AVIV Model 410 型

**核磁共振光譜儀 (NMR)**：Varian Unity Inova 500 NMR，此部份之分析工作主要委託國科會清華大學貴重儀器中心譚惠琪小姐代測。

**質譜儀**：使用 Micromass Q-ToF LC/MS/MS 儀器 (electrospray ionization, ESI)；

此部份之分析工作主要委託國科會交通大學貴重儀器中心李蘊明小姐代測。

**MALDI-TOF**：使用 Bruker Biflex III MALDI-TOF MS 儀器；此部份之分析工作主要委託國立交通大學化學系陳月枝教授實驗室代測。

**冷凍乾燥機**：日本 Eyela，型號為 FDU-1200。

**離心機**：Hsiangtai，型號為 CN-2060。

**阿貝式折射儀**：廠牌 PTECHTM，型號為 DAR-1001。

**UV-VIS 光度儀 (UV-VIS Spectrophotometer)**：廠牌 Jasco，型號為 V-630。

## 2-2 藥品

Acetonitrile (ACN) : TEDIA

Acetic anhydride : Sigma-Aldrich

Boc-L-Hyp-OH : Fluka

Dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : Mallinckrodt

Deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) : Aldrich

Deuterium chloride in D<sub>2</sub>O (DCl) : Aldrich

Di-tert-butyl dicarbonate : Alfa Aesar

N, N'-diisopropylcarbodiimide (DIC) : Sigma-Aldrich

N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) : Alfa Aesar

N, N'-diisopropylethylamine (DIPEA) : Sigma-Aldrich

N, N'-Dimethylformamide (DMF) : Fisher

1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl] carbodiimide (EDC) : Novabiochem

Formic acid (HCOOH) : Sigma-Aldrich

Fmoc-Pro-opfp : Advanced Chemtech

Fmoc-Pro-OH : Fluka

Fmoc-Hyp (tBu)-OH : Advanced Chemtech

Fmoc-Gly-OH : Advanced Chemtech

Fmoc-β-Ala-OH : Advanced Chemtech

Fmoc-D-Ala-OH : Advanced Chemtech

Fmoc-L-Ala-OH : Advanced Chemtech

Fmoc-Sar-OH : Advanced Chemtech

Fmoc-Tyr (tBu)-OH : Fluka

Glycine benzyl ester p-toluene sulfonate salt (H-Gly-OBz • TsOH) : Sigma

Guanidine hydrochloride (GuHCl) : Amresco

H-Hyp-OH : Advanced Chemtech

Hydrogen chloride in 1, 4-dioxane (4 N HCl/dioxane) : Sigma-Aldrich

1-Hydroxybenzotriazole (HOBt hydrate) : Advanced Chemtech

O-Benzotriazole-N, N, N', N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) :

Advanced Chemtech



Kemp's triacid (KTA) : Aldrich

4-Methylmorpholine (NMM) : Fluka

Magnesium sulfate anhydrous (MgSO<sub>4</sub>) : J. T. Baker

Methyl alcohol (MeOH) : Mallinckrodt

Methyl t-butyl ether : TEDIA

Ninhydrin : RDH

N-methyl-2-pyrrolidinone (NMP) : Mallinckrodt

Potassium bisulfate (KHSO<sub>4</sub>) : RDH

Palladium, 10 wt % on active Carbon (Pd/C) : Aldrich

Piperidine : Alfa Aesar

Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) : RDH

Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ) : FSA

Sodium deuterioxide in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{NaOD}$ ) : Aldrich

Sodium Hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) : Mallinckrodt

Sodium phosphate ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) : Aldrich

Sodium phosphate, monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) : J. T. Baker

Toluene : Mallinckrodt

Triethylamine (TEA) : Sigma-Aldrich

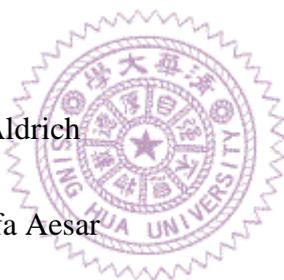
Trifluoroacetic acid (TFA) : Alfa Aesar

Triisopropylsilane : Alfa Aesar

Trimethylamine N-oxide 98% (TMAO) : Aldrich

Urea ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) : J. T. Baker

Rink Amide MBHA resin : Novabiochem



### 2-3 固相胜肽合成法 (Solid-phase peptide synthesis, SPPS)

固相胜肽合成法 (SPPS) 的原理是將胺基酸的 C 端連接到不溶於反應溶劑的聚苯乙烯支持物 (resin, 合成樹脂), 胺基酸的 N 端再與另一個胺基酸的 C 端偶合形成胜肽鍵 (peptide bond), 此反應是從所要得到的胜肽鍵的 C 端胺基酸開始向 N 端的胺基酸依序合成。合成過程會將胺基酸的  $\alpha$ -胺基和側鏈接上保護基以避免不必要的反應發生。

SPPS 合成胜肽的過程依序步驟如圖 2-1, (1) 第一個胺基酸先和樹脂的 linker 反應接上樹脂。(2) 再將第一個胺基酸的 N 端保護基拔除, 接在胺基酸 N 端的保護基分為兩種, 怕鹼的 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc 系列) 和怕酸的 *t*-butyloxycarbonyl (Boc 系列)。(3) 第二個胺基酸先被醯化試劑活化使羧基醯化, 已活化的胺基酸 (pre-activated amino acid) 再和保護基已被移除的第一個胺基酸進行偶合反應, 使兩個胺基酸接在一起。(4) 胜肽 C 端的胺基酸先接上樹脂, 再往胜肽 N 端的胺基酸依序反應接上胜肽鍵, 重覆 2~3 的步驟可以得到胜肽。最後一個胺基酸接上胜肽鍵後, 有時會再加入乙酐 (acetic anhydride) 使胜肽 N 端乙醯化。(5) 胜肽 C 端經由 linker 接在樹脂, 依樹脂種類不同, 利用試劑切除後可以得到 peptide acid 或 peptide amide, 切除樹脂同時也將側鏈和 N 端的保護基一併切除, 即可得到直鏈型胜肽。

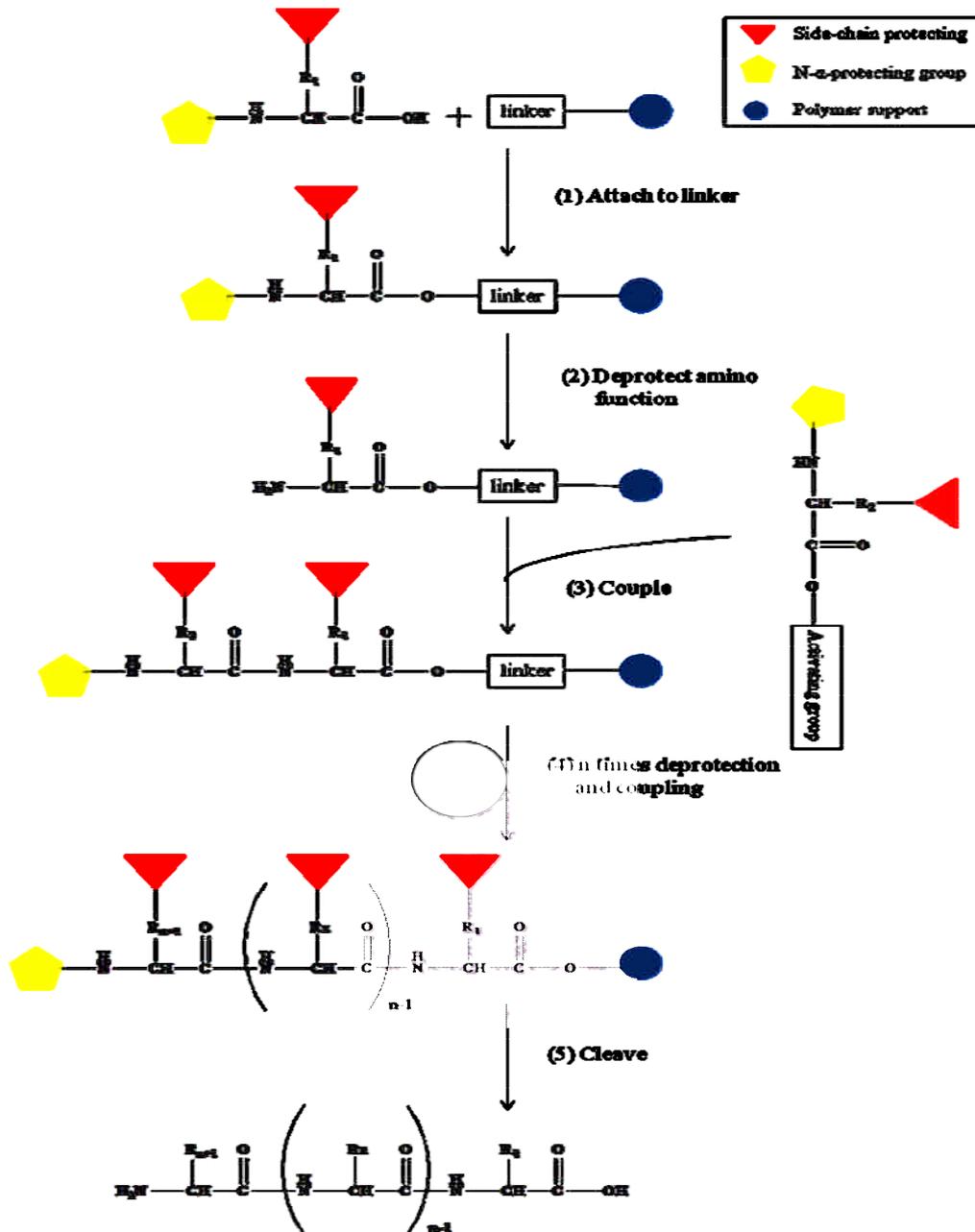


圖 2-1 固相胜肽合成法 (SPPS) 合成胜肽鏈的流程

側鏈保護基要經過選擇，反應過程中移除 N 端保護基時不能被移除，但胜肽和樹脂分開時要能一起被移除，Fmoc 系列常用 *tert*-butyl group，Boc 系列常用 benzyl group 當側鏈保護基。胜肽合成過程中，接在胺基酸 N 端的 Boc 保護基可用 trifluoroacetic acid (TFA) 移除，Fmoc 保護基則用弱鹼 piperidine 移

除。反應完成後樹脂和側鏈保護基的切除需要用強酸，Boc 保護基用氫氟酸 (HF) 或 trifluoro-methanesulfonic acid (TFMSA)，Fmoc 保護基則用 TFA，如圖 2-2。

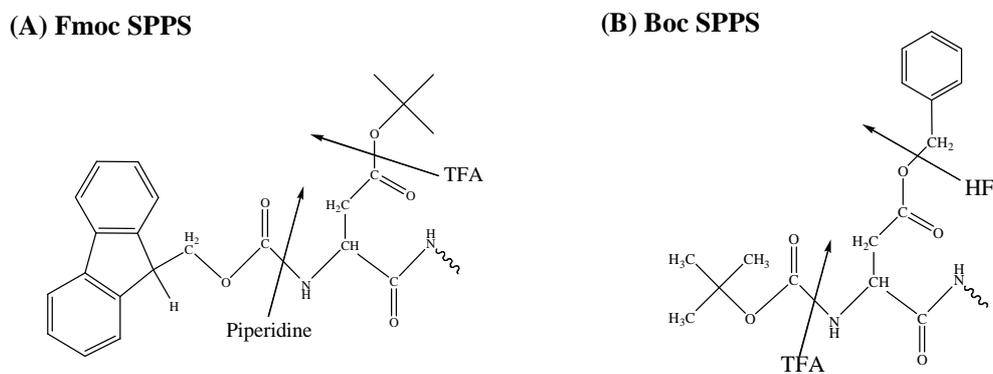


圖 2-2 SPPS 使用的兩種 N 端保護基 (A) Fmoc 系列 (B) Boc 系列

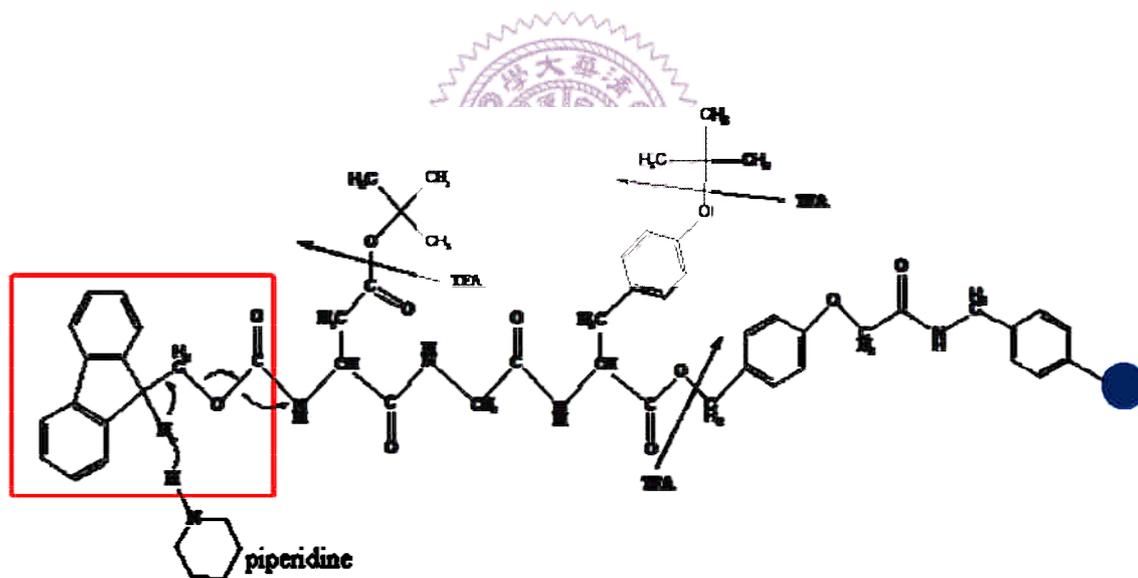


圖 2-3 Fmoc SPPS 的 N 端保護基 (框)、側鏈保護基及 cleavage 方法

Fmoc 系列使用的移除試劑都比較溫和，所以我們的實驗選用 Fmoc SPPS 合成研究需要的模擬胜肽，如圖 2-3。反應過程中活化試劑選用 HBTU 和 HOBT，如圖 2-4，將 Fmoc amino acid 碳端基活化形成 Fmoc amino acid HOBT

ester，使其易與已去 N 端保護基的另一胺基酸進行偶合反應，如 Scheme 2-1。

溶劑選擇 NMP 或二甲基甲醯胺 (DMF) 將未耦合的 Fmoc amino acid HOBT ester

ester 及產生的鹽類清洗去除，以及進行去保護、耦合的反應過程。

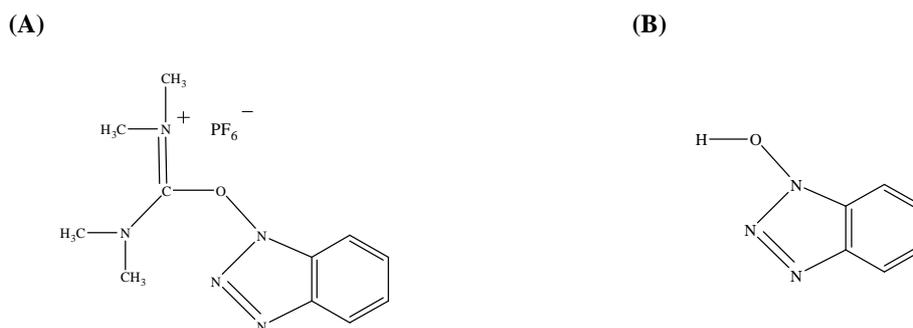
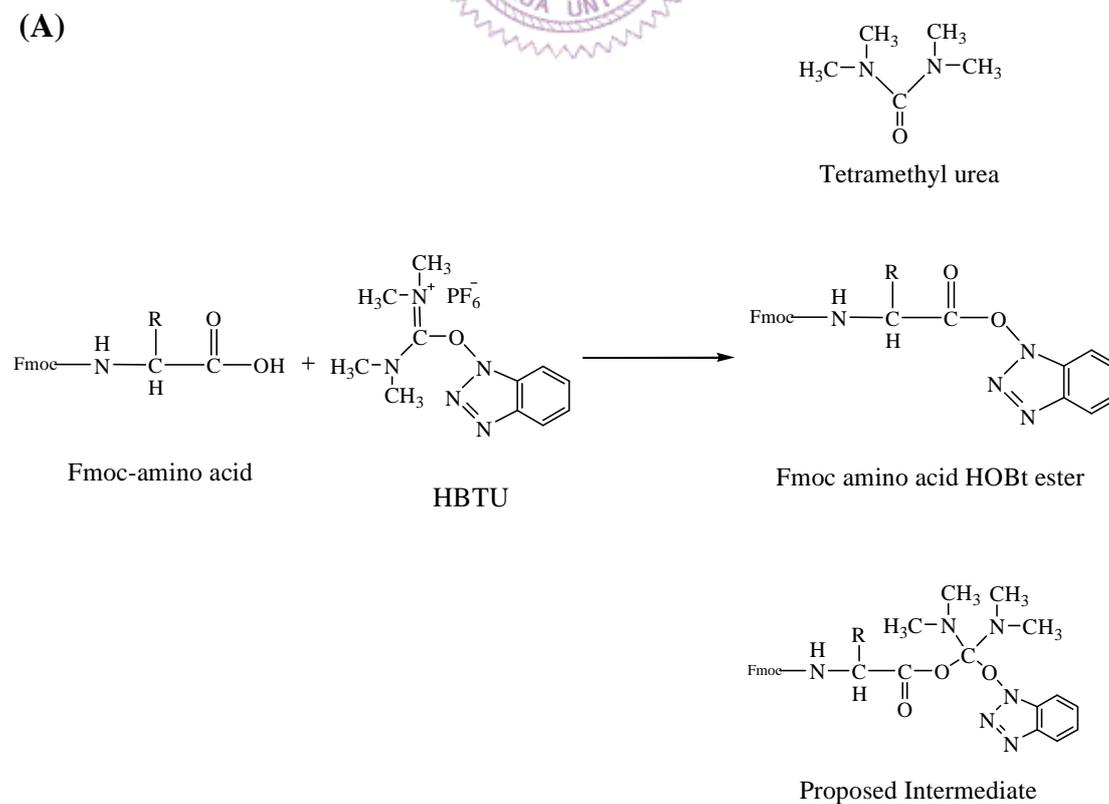
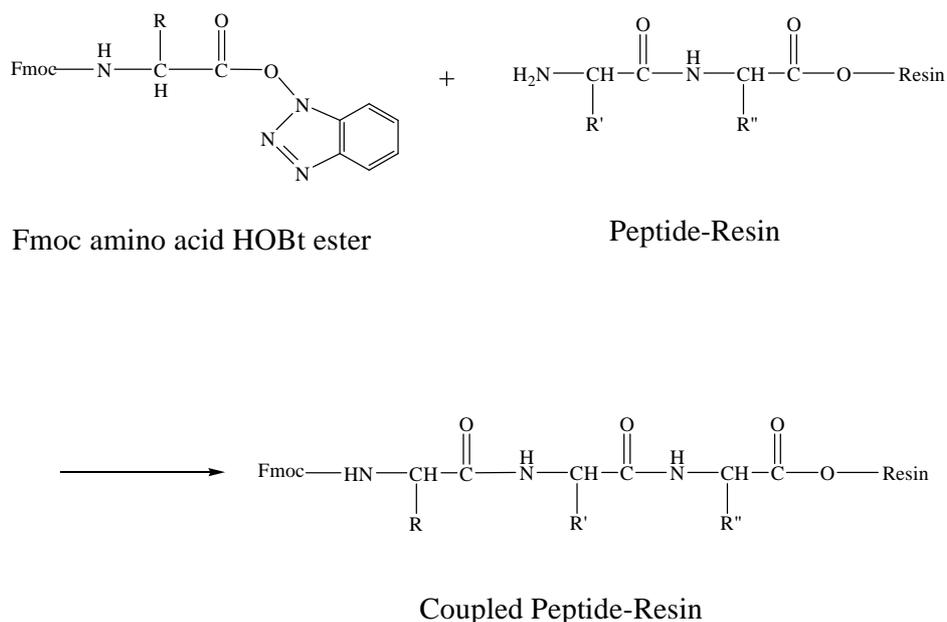


圖 2-4 (A) HBTU (B) HOBT 之結構式

Scheme 2-1 (A) HBTU 之活化反應



Scheme 2-1 (B) Fmoc 系列之偶合反應



#### 2-4 圓二色光譜儀介紹

圓二色光譜 (circular dichroism spectroscopy, CDS) 是一個用於研究具有圓二色性物質之結構變化的重要技術，常應用於鑑定蛋白質的結構與變化、判別藥物的鍵結性、探討醣類反應性等生物化學和結構生物的研究。

圓二色光譜是測量具有光學活性 (optically active) 的樣品對左旋與右旋圓偏極光 (left- and right-circularly polarized light) 吸收度的差異，主要分為紫外光區 (190 ~ 300 nm) 的電子躍遷圓二色光譜與紅外光區 (400 ~ 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) 的分子振動圓二色光譜，目前在生物分子結構的研究，以電子躍遷圓二色光譜為主。以蛋白質分子為例，分子中各個胺基酸本身的不對稱中心具光學活性外，蛋白質形成的複雜結構，包含胜肽鍵的 backbone 構型、具芳香族側鏈之胺基酸及雙硫鍵等，皆會影響蛋白質之光學活性，其光學構型常隨環境的溫度、酸鹼值的不同而

變化，因此研究電子躍遷圓二色光譜的訊號變化，可觀察到光學構型改變的過程與特性以及快速地鑑別不同的二級結構。

化學分子電子躍遷所涵蓋的波長範圍主要包含，近紫外光區 (Near UV, 270 ~ 320 nm)、遠紫外光區 (Far UV, 190 ~ 270 nm) 及真空紫外光區 (vacuum UV, < 190 nm)。不同的波長範圍可分析不同的結構資訊，如蛋白質分子 Far-UV CD 光譜是蛋白質胜肽鍵的電子躍遷訊號，可觀察不同的 backbone 構型及判斷蛋白質的二級結構，而其 Near-UV CD 光譜是由胺基酸的側鏈芳香基團產生的訊號，可觀察蛋白質的三級結構作用。例如  $\alpha$ -螺旋結構在波長約 208 nm 和 222 nm 處有兩個負訊號分別屬於  $n \rightarrow \pi^*$  和  $\pi \rightarrow \pi^*$  之電子躍遷，且在波長約 192 nm 有一個為  $\pi \rightarrow \pi^*$  電子躍遷譜帶產生的高正 CD 訊號。而  $\beta$ -摺板之蛋白質在約 217 nm 有一個  $n \rightarrow \pi^*$  電子躍遷譜帶所產生的弱負 CD 訊號及約 195 nm 有一正 CD 訊號的  $\pi \rightarrow \pi^*$  電子躍遷譜帶，如圖 2-5。

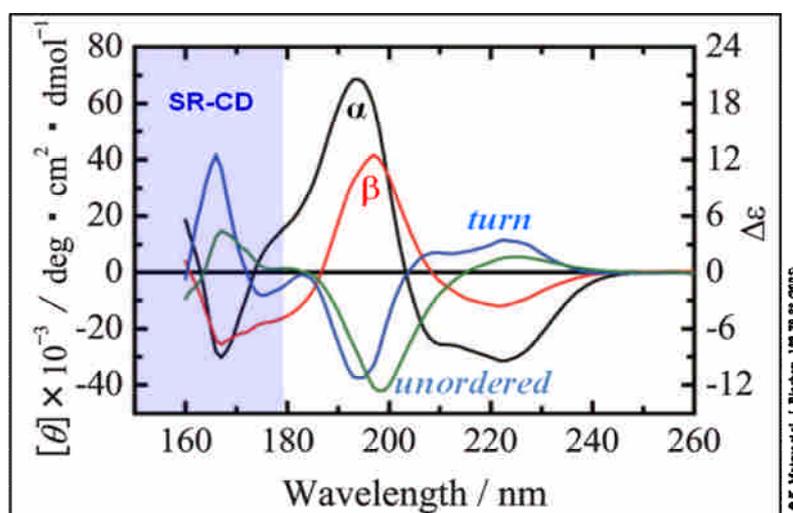
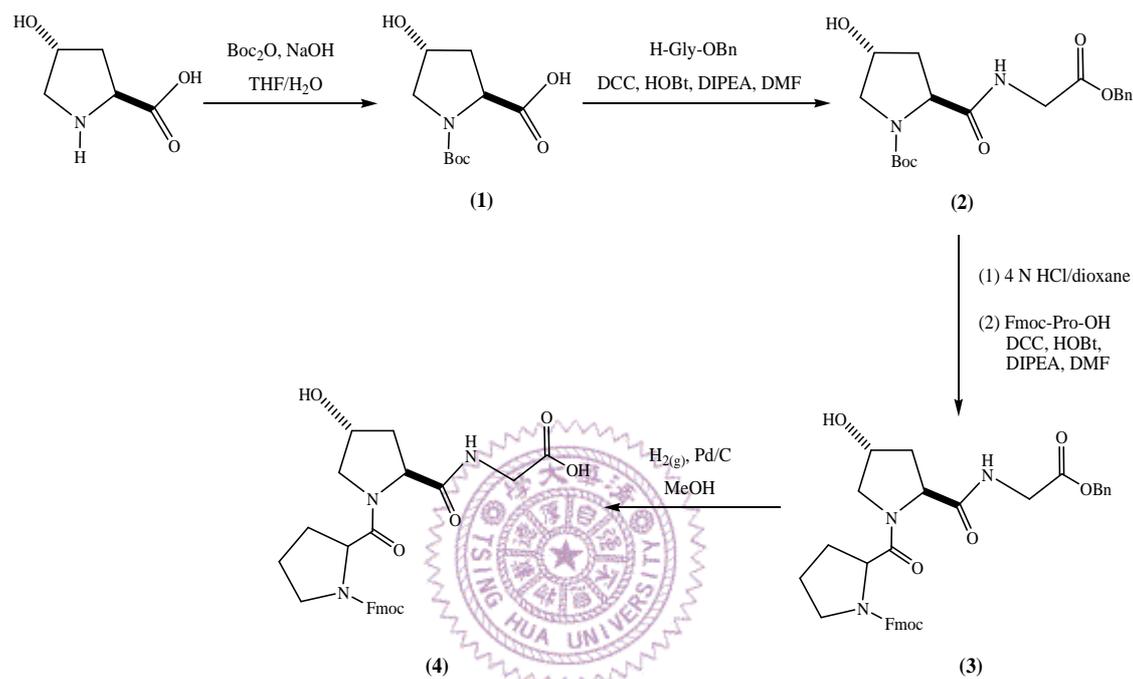


圖 2-5 蛋白質分子二級結構 ( $\alpha$ -螺旋結構及  $\beta$ -摺板) 之圓二色光譜圖

## 2-5 實驗步驟

### 2-5-1 合成 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH (Fmoc-POG-OH), 如 Scheme 2-2<sup>8</sup>

Scheme 2-2 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH 合成流程圖



#### I. 合成 Boc-Hyp-OH (1)<sup>33</sup>

將 5 g H-Hyp-OH 溶於 60 mL  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O} = 2 : 1$  溶液，並加入 10 mL 10% (w/v)  $\text{NaOH}(\text{aq})$ ，再加入 10 g di-tert-butyl dicarbonate (Boc anhydride)，攪拌 8 小時以上。反應完成後迴旋濃縮，加入乙酸乙脂 (ethyl acetate, EtOAc) 溶解濃縮物，再利用 10% (w/v)  $\text{KHSO}_4(\text{aq})$  調整至 pH 值為 2。用乙酸乙脂萃取水層三次，再用去離子水和飽和食鹽水萃取，收集有機層，加入適量無水  $\text{MgSO}_4$  除水，過濾並收集濾液後再濃縮，最後抽真空，產物為白色黏稠狀，產量：7.06 g，產

率：80%。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 4.51-4.42 (m, 2H), δ 4.14-4.10 (m, 0.6H), δ 3.62-3.51 (m, 1.4H), δ 2.44-2.35 (m, 1H), δ 2.20-2.10 (m, 1H), δ 1.49-1.43 (m, 9H).

## II. 合成 Boc-Hyp-Gly-OBn (2)

將 3 g Boc-Hyp-OH, 4.82 g H-Gly-OBz · TsOH, 2.68 g DCC, 1.76 g HOBt, 各約一當量的比例加到圓底瓶中, 以約 100 mL DMF 攪拌溶解, 通氮氣並加入 8.3 mL DIPEA (3.7 當量), 在氮氣下反應 8 小時以上。反應完成後迴旋濃縮除去 DMF, 再加入適量乙酸乙酯溶解濃縮物, 以 5% NaHCO<sub>3</sub>(aq) 和 5% KHSO<sub>4</sub>(aq) 分別萃取兩次, 再以飽和氯化鈉水溶液萃取一次, 皆收集有機層, 而後加入適量無水 MgSO<sub>4</sub> 除水, 過濾並收集濾液然後濃縮。

濃縮物以薄層層析法 (TLC) 量測, 沖提液為 EtOAc, 其 R<sub>f</sub> = 0.4 ~ 0.5, 以 silica gel 層析管柱純化濃縮物, 沖提液為 EtOAc, 收集 R<sub>f</sub> = 0.5 的溶液濃縮, 並抽真空兩小時, 可得到白色固體產物, 產量: 4.10 g, 產率: 84%。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.32 (m, 5H), δ 5.14 (m, 2H), δ 4.42 (m, 2H), δ 4.05-4.04 (m, 2H), δ 3.50-3.47 (m, 2H), δ 2.38-2.02 (m, 4H), δ 1.41 (m, 9H).

## III. 合成 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn (3)

### A. 除去 Boc 保護基

將 50 mL 左右的 4 N HCl/dioxane 加入含 Boc-Hyp-Gly-OBn 的圓底瓶

內，起始物一開始會溶解但很快就混濁沉澱而無法攪拌，反應半小時後測 TLC 片，若 TLC 片上的點停留在原點，表示 Boc 已被移除，產生極性很大之生成物，再反應半小時然後加入二氯甲烷約 70 mL，接著迴旋濃縮以除去 HCl，並置於真空下 2 小時以除去溶劑。

### B. 合成 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn (3)

將 4.10 g H-Hyp-Gly-OBn 和 5.45 g Fmoc-Pro-OH (各一當量的比例) 置於圓底瓶，以約 70 mL DMF 攪拌溶解，再加入 3.8 mL (2 當量) DIPEA，溶液會由混濁變為透明帶黃色，在氮氣下反應 8 小時以上。反應完成後迴旋濃縮除去 DMF，再加入適量乙酸乙酯溶解，以 5% NaHCO<sub>3</sub>(aq) 和 5% KHSO<sub>4</sub>(aq) 分別萃取兩次，再以飽和氯化鈉水溶液萃取一次，皆收集有機層，而後加入適量無水 MgSO<sub>4</sub> 除水，過濾並收集濾液然後濃縮。以 silica gel 層析管柱純化濃縮物，沖提液為 EtOAc : MeOH = 98 : 2，收集 R<sub>f</sub> = 0.2 的溶液濃縮，並置於真空下兩小時，可得到白色固體產物，產量 : 4.12 g，產率 : 64%。<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.74-7.28 (m, 13H), δ 5.13-4.96 (m, 2H), δ 4.78-4.75 (m, 1H), δ 4.48-3.96 (m, 9H), δ 3.63-3.49 (m, 4H), δ 2.42-2.34 (m, 1H), δ 2.17-1.88 (m, 6H).

### IV. 氫化反應得到 Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH (4)

將 4.12 g Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn 溶於約 50 mL 甲醇，通氮氣一段時間後，加入催化劑 0.4 g Pd/C (重量為起始物的 10%)，再通入氫氣進行氫化反應。

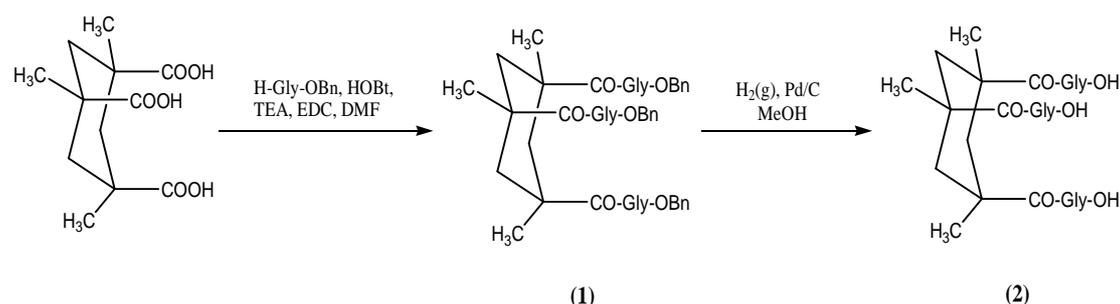
約半小時測一次 TLC 片，沖提液為  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1$ ， $R_f$  值較高的點為起始物會逐漸變淡，產物極性較大，會停留在原點位置，隨著產物濃度增加而逐漸變濃，再將 TLC 片浸入 ninhydrin 溶液然後加熱 TLC 片，若有紅點出現表示有 free amine 產生即停止氫化反應。

約兩個半小時後反應完成，以 celite 過濾並濃縮濾液，利用 silical gel 層析管柱純化濃縮物，沖提液為  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{HCOOH} = 90 : 10 : 0.5$ ，收集  $R_f = 0.2$  的溶液濃縮。並於真空下乾燥兩小時後，加入甲苯然後濃縮以除去甲酸，再抽真空兩小時，可得到白色粉末產物，產量：2.09 g，產率：60%。 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.71-7.25 (m, 8H),  $\delta$  4.63-4.00 (m, 7H),  $\delta$  3.79-3.44 (m, 7H),  $\delta$  2.27-1.83 (m, 6H). ESI-MS :  $m/z$  508.14 ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ , obsd.); 508.5 ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ , calcd.),  $m/z$  530.09 ( $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , obsd.); 530.49 ( $[\text{M}+\text{Na}^+]$ , calcd.)

### 2-5-2 合成 Kemp's triacid-(Gly-OH)<sub>3</sub> (KTA-(Gly-OH)<sub>3</sub>)<sup>22</sup>

合成 KTA-(Gly-OH)<sub>3</sub> 的反應步驟，如 Scheme 2-3，主要是參考之前的文獻報導，此部份合成主要是由實驗室的張銘中學長協助完成。<sup>22</sup>

Scheme 2-3 Kemp's triacid-(Gly-OH)<sub>3</sub> 合成流程圖



## I. 合成 KTA-(Gly-OBn)<sub>3</sub> (1)

將 0.25 g Kemp's triacid (1 當量), 1.63 g H-Gly-OBz·TsOH (5 當量) 和 0.65 g HOBt (5 當量) 加到圓底瓶中, 以 25 mL DMF 攪拌溶解, 將圓底瓶置於冰浴環境中並在氮氣下緩慢地加入 1.25 mL TEA, 攪拌五分鐘後加入 0.93 g EDC (5 當量), 接著移除冰浴並在氮氣下反應 4 小時。

反應完成後迴旋濃縮除去 DMF, 再加入約 100 mL EtOAc 溶解濃縮物, 以去離子水、飽和碳酸氫鈉水溶液和 5% KHSO<sub>4</sub>(aq) 分別萃取兩次, 再以飽和氯化鈉水溶液萃取一次, 皆收集有機層, 而後加入適量無水 MgSO<sub>4</sub> 除水, 過濾並收集濾液然後濃縮。以 silica gel 層析管柱純化濃縮物, 沖提液為 EtOAc : Hexane = 3 : 2, 收集 R<sub>f</sub> = 0.4 的溶液濃縮, 並置於真空下兩小時, 可得到白色固體產物, 產量 : 0.53 g, 產率 : 78%。

## II. 氫化反應得到 KTA-(Gly-OH)<sub>3</sub> (2)

將 0.56 g Kemp's triacid-(Gly-OBn)<sub>3</sub> 溶於約 20 mL 甲醇, 通氮氣一段時間後, 加入催化劑 0.06 g Pd/C (重量為起始物的 10%), 再通入氫氣進行氫化反應, 反應至隔夜。反應完成後以薄層層析法 (TLC) 量測, 沖提液為 EtOAc : Hexane = 3 : 2, 以 PMA 作為顯影劑, 產物極性較大會停留在原點位置, 確定反應完成後, 以 celite 過濾並濃縮濾液, 再抽真空兩小時, 可得到白色粉末產物, 產量 : 0.32 g, 產率 : 97%。ESI-MS : m/z 430.16 ([M+H<sup>+</sup>], obsd.); 430.17 ([M+H<sup>+</sup>], calcd.)

### 2-5-3 合成模擬胜肽

用固相胜肽合成法 (Solid-phase peptide synthesis, SPPS) 合成聚胺酸模型，反應瓶 (reaction vessel) 內放入 0.1 mmole 樹脂 (Rink amide MBHA resin)，利用 DMF 或 NMP 沖洗、浸泡樹脂一小時。反應試管瓶 (vial) 內放入 0.4 mmole 的 Fmoc-POG-OH tripeptide 或是其它側鏈已接保護基的胺基酸，再放入 0.38 mmole HBTU 和 0.38 mmole HOBt 活化劑，將反應試管瓶依 C 端往 N 端胺基酸序列排列在合成儀轉盤上。為防止已拔除保護基但沒有接上胺基酸的胜肽會排序錯誤合成不正確的胜肽而降低產率，所以每三個反應試管瓶作一次 capping，將未反應的胜肽 N 端乙醯化，避免其胜肽繼續反應，反應接上最後一個胺基酸後，將模擬胜肽 N 端用乙酐乙醯化。合成儀反應完成後，將反應瓶 (reaction vessel) 內接有樹脂的模擬胜肽轉移到 poly-prep chromatography column。

**TFA cleavage:** 欲得到合成的模擬胜肽，則加入 95% TFA 和 2.5% 去離子水和 2.5% triisopropylsilane，反應兩小時後可除去樹脂和模擬胜肽側鏈的保護基，濾掉樹脂後通氮氣以除去過多的 TFA。最後將冰甲基第三丁基醚加入濾液會產生白色沉澱，離心後留下固體濾掉液體，以冰甲基第三丁基醚重複洗三次可將大部分 TFA 除去，用水幫浦抽乾殘留的醚，即可得到膠原蛋白模擬胜肽之粗產物。

如果要將合成的模擬胜肽接上模板 (templates)，則先不作 cleavage 反應，第一種接上模板的方法是將 11 mg, 0.026 mmole KTA-(GlyOH)<sub>3</sub> 加入裝有 0.1

mmole 模擬胜肽的 poly-prep column，再加入 16 mg HOBt, 1 M DIC/DCM, 5% DMF/DCM，置於攪盪器反應三天。第二種方法是將約 12 mg, 0.03 mmole KTA-(GlyOH)<sub>3</sub> 加入裝有 0.1 mmole 模擬胜肽的 poly-prep column，再加入 18.4 mg HOBt, 45.5 mg HBTU, 26.4 μL NMM, 5 mL DMF，置於攪盪器反應六小時。胜肽接上模板的反應結束後，濾掉溶劑並用 DMF 和 DCM 沖洗固體再乾燥之，接著將固體移到新的 poly-prep column，再重覆上述 TFA cleavage 方法以除去樹酯和保護基，即可得到膠原蛋白模擬胜肽與 KTA 結合之粗產物。

## 2-6 分析模擬胜肽

### 2-6-1 樣品置備和純化



大約每 20 mg 胜肽產物溶於 1 mL 去離子水，再利用逆相 HPLC 以半製備 C<sub>18</sub> 管柱純化分離樣品，溶劑的梯度變化設定為一小時內乙晴 (acetonitrile) 由 0% 變化到 60%，而 H<sub>2</sub>O 由 100% 降到 40%。溶劑中並含有 0.1% (v/v) TFA 以增進分離效果，極性大且分子量小的分子會較快被沖提出來，而極性低且分子量大的分子沖提時間會比較晚。通常純化胜肽時，部分胜肽已先形成三股螺旋結構，極性會變低較晚被沖提出來，因此，所要收集的產物通常不只有單一吸收峰，後方還會有強度較低的三股螺旋結構的吸收峰。收集純化液後再濃縮除去乙晴，然後用冷凍乾燥機除去水分，再以 ESI-MS 質譜儀鑑定所得到的胜肽，至於與 KTA 結合之胜肽則以 MALDI-TOF 鑑定其分子量，結果如表 2-1。

表 2-1 合成的聚胺酸胜肽之質譜結果

Peptide	calculated mass	observed mass
	m/z ([M+H <sup>+</sup> ])	m/z ([M+H <sup>+</sup> ])
Ac(POG) <sub>8</sub> NH <sub>2</sub>	2197.01	2196.85
AcPOGPO(β-Ala)(POG) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>	2211.03	2210.99
Ac(POG) <sub>6</sub> PO(β-Ala)POGNH <sub>2</sub>	2211.03	1106.51 ([M+2H <sup>+</sup> ])
Ac(POG) <sub>4</sub> PO(β-Ala)(POG) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	2211.03	2210.82
AcPOGPO(L-Ala)(POG) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>	2211.03	2210.97
Ac(POG) <sub>6</sub> PO(L-Ala)POGNH <sub>2</sub>	2211.03	2210.94
AcPOGPO(D-Ala)(POG) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>	2211.03	2211.44
Ac(POG) <sub>6</sub> PO(D-Ala)POGNH <sub>2</sub>	2211.03	2210.89
AcPOGPOSar(POG) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>	2211.03	2210.75 ([M+H <sup>+</sup> ]) 1128.33 ([M+2Na <sup>+</sup> ])
Ac(POG) <sub>6</sub> POSarPOGNH <sub>2</sub>	2211.03	2210.86
Ac(POG) <sub>4</sub> POSar(POG) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	2211.03	2211.01
KTA-{GG(POG) <sub>3</sub> POA(POG) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> } <sub>3</sub>	6253.60	6274.64 ([M+Na <sup>+</sup> ])
KTA-{GG(POG) <sub>3</sub> POdA(POG) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> } <sub>3</sub>	6253.60	6274.87 ([M+Na <sup>+</sup> ])

## 2-6-2 Circular Dichroism Spectroscopy (CD 光譜)

**波長掃描實驗：**配置樣品濃度 1 mg/mL 溶於 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液，pH 值為 7.0，測 CD 前在 4 °C 冷藏 24 小時以上，確保全部胜肽達到平衡狀態。測量時用 cuvette (path length : 0.1 cm) 裝待測樣品，在 4 °C 下作波長掃描 (wavelength scans)，範圍是 190 nm ~ 260 nm，每隔 1 nm 收集一次訊號，即可得到 Far-UV CD 光譜。

**變溫實驗：**膠原蛋白三股螺旋結構的 Far-UV CD 光譜通常在波長 220 ~ 230 nm 之間會有一最大正訊號，固定波長在訊號最強的波長，測量熔解曲線變化 (melting transition curves)，設定溫度範圍，每 2 度測一次訊號，溫度平衡時間為 5 分鐘，每點偵測時間為 30 秒。

**測量折疊速率：**控溫水槽加熱至 70 °C，將濃度為 1 mg 胜肽溶於 1 mL 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液的樣品置於控溫水槽平衡 15 分鐘，量測用的 cuvette (path length : 0.1 cm) 先置於 CD 中且在 4 °C 下平衡一段時間，再將加熱過的樣品移入 cuvette 後進行 refolding 實驗，儀器溫度控制在 4 °C 且固定波長在 225 nm，觀察其 CD 訊號變化一小時。量測 refolding 訊號變化後，將樣品置於 4 °C 下冷藏 24 小時，接著量測溫度控制在 4 °C 時樣品的 CD 訊號變化 120 秒。

另外，將樣品置於 cuvette，冷藏在 4 °C 24 小時後，於 70 °C 下進行 unfolding 實驗，觀察在波長 225 nm 的 CD 訊號變化 500 秒。所有動力學實驗皆以 pH 值 7.0 的磷酸鹽緩衝溶液為空白溶液，量測 4 °C 時其 CD 訊號變

化 120 秒，計算速率時所有數據須先扣除空白溶液之訊號再作計算。

**Chemical denaturation**：分別配置下列幾種溶液，(A) 7 mg 胜肽溶於 1.1 mL 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液的樣品（濃度約 1 mM, pH 值 7.0）。(B) 配置 20 mL 8 M GuHCl 溶於 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液 (pH 值 7.0)。各取 0.5 mL (A) 溶液分別加入 4.5 mL 的磷酸鹽緩衝溶液 (sample/buffer) 和 4.5 mL (B) 溶液 (sample/buffer/GuHCl)。在 4 °C 下作波長掃瞄，測量時用路徑長為 1 公分的 cuvette 裝待測樣品，控制吸收訊號在 30 ~ 40 mdeg，若是濃度過高則分別以磷酸鹽緩衝溶液及 phosphate buffer/GuHCl 稀釋樣品溶液。

固定波長在訊號最強的波長，bandwidth 改為 1.5 公分以提高透光度降低儀器之 dynode voltage，溫度設定在 4 °C，sample/buffer 置於 cuvette 後攪拌兩分鐘，進行 kinetic 實驗偵測其 CD 訊號變化 45 秒。量測完畢取出 20  $\mu$ L sample/buffer 滴在折射計上，測其折射率 (refractive index)。再加入 20  $\mu$ L sample/buffer/GuHCl 於 cuvette，重複上述步驟得到 CD 訊號變化及折射率，接著再繼續加入 sample/buffer/ GuHCl，加入的量可逐漸變多，並將得到的 CD 訊號變化及折射率數值列於表格。由加入 GuHCl 減未加入 GuHCl 的樣品折射率變化 ( $\Delta\eta$ ) 代入公式可算出樣品的 GuHCl 濃度，公式： $[\text{GuHCl}] = 57.147(\Delta\eta) + 38.68(\Delta\eta)^2 - 91.60(\Delta\eta)^3$ 。CD 訊號對應其 GuHCl 濃度作圖可得到一曲線變化，由此可得 folding cooperativity (m) 及  $\Delta G^\circ(\text{H}_2\text{O})$ 。

### 2-6-3 NMR 光譜

配置 20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$  buffer，再用 DCl 和 NaOD 調整 pD (uncorrected) 值為 6.6，再將 3 mg 胜肽溶於 700  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$  buffer (濃度約 1.93 mM)，再加入標準品 Trimethylsilane propionic acid sodium salt (TSP) 10  $\mu\text{L}$ ，冷藏在 4  $^\circ\text{C}$  24 小時後，測量胜肽溶液分別在溫度 10  $^\circ\text{C}$  和 45  $^\circ\text{C}$  下一維的  $^1\text{H}$ -NMR 光譜。

### 2-6-4 UV/VIS 光譜

先配置樣品溶液濃度為 1 mg 胜肽溶於 1 mL 50 mM 醋酸水溶液，pH 值為 2.91，再配置 6 M GuHCl 溶於 20 mM phosphate buffer，調整 pH 為 6.5，取其 1.9 mL 加入 0.1 mL 20 mM phosphate buffer 當作空白溶液，另外再配置 1.9 mL GuHCl/phosphate buffer 加入樣品溶液 0.1 mL。UV 吸收波長控制在 280 nm，分別測試空白溶液訊號及樣品溶液訊號，樣品溶液訊號扣除空白溶液訊號，再代入 Beer's law ( $A = \varepsilon \times b \times c$ )，即可估算樣品實際濃度。吸收波長須控制在 280 nm，所以胜肽中有帶苯環之胺基酸才可利用此方法估算樣品濃度。

### 第三章 結果與討論

#### 3-1 設計膠原蛋白模擬胜肽

Bhate 等人於 2002 年將胜肽 T1-892 第 10 和第 25 個位置的 Gly 換成 Ala，發現三股螺旋結構穩定性會降低，且在 C 端位置胺基酸突變的影響比 N 端位置突變的影響更大，其結論為因為置換的 C 端 Gly 位於 Pro-Hyp-Gly 的區域，且三股螺旋結構是由 C 端往 N 端折疊。<sup>11</sup> 因此，我們想利用其它不同胺基酸取代 Pro-Hyp-Gly (POG) 合成的聚胺酸模型中的 Gly 位置，以及同種胺基酸取代均為 POG 所組成聚胺酸模型中不同位置的 Gly，研究對胜肽鏈形成三股螺旋結構的穩定性有何影響。我們合成八段 Pro-Hyp-Gly (POG) 胺基酸序列，將特定位置的 Gly 作置換，置換的胺基酸包含  $\beta$ -丙胺酸 ( $\beta$ -Ala)、L-丙胺酸 (L-Ala)、D-丙胺酸 (D-Ala) 和肌胺酸 (Sar) 四種胺基酸，置換位置包含在胜肽鏈的 N 端部分、C 端部分或中間位置，如表 3-1。

表 3-1 本研究所合成的四種聚胺酸模型

Peptide	Sequence *
Wild-type	Ac(POG) <sub>8</sub> NH <sub>2</sub>
C-terminal mutation (Gly21X)	Ac(POG) <sub>6</sub> POXPOGNH <sub>2</sub>
N-terminal mutation (Gly6X)	AcPOGPOX(POG) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>
Gly15X	Ac(POG) <sub>4</sub> POX(POG) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>

\* X 是取代 Gly 的胺基酸，包含  $\beta$ -丙胺酸 ( $\beta$ -Ala)、L-丙胺酸 (L-Ala)、D-丙胺酸 (D-Ala) 和肌胺酸 (Sar)。Ac 表示將模擬胜肽 N 端乙酰化。

以  $\beta$ -Ala 置換 Gly 的主要原因是，因為  $\beta$ -Ala 沒有 Ala 的甲基側鏈並不會造成立體障礙，但 backbone 位置多一個亞甲基，以此置換 Gly 會影響結構折疊時三條胜肽之間胺基酸的交疊排列，希望藉此探討 backbone 延長對三股螺旋結構的影響。

Hornig 等人於 2007 年的研究顯示 D-胺基酸取代胜肽鏈中間位置的 Gly 雖然不會有側鏈所造成的立體效應，但膠原蛋白中的 Gly  $\phi$  角度小於零，D-胺基酸  $\phi$  角度卻大於零，不正常且扭曲的骨架構型不利於三股螺旋的形成。<sup>32</sup> 因此，我們探討 D-胺基酸取代胜肽鏈兩端的 Gly 位置對結構及折疊方式的影響是否與 D-胺基酸取代在中間位置的影響相似。另外，L-胺基酸和 D-胺基酸的  $\phi$ ,  $\psi$  角度分布整個相反，利用這兩種胺基酸取代 Gly 的比較可以探討側鏈往內或往外在不同位置造成的立體效應對結構的影響。

一般認為三股螺旋的折疊過程是胜肽鏈的 C 端先聚集纏繞在一起，再由 C 端往 N 端形成三股螺旋結構，所以在 T1-892 的 C 端置換 Gly 對三股螺旋結構的破壞性比較大，<sup>11</sup> 因此我們取代胜肽鏈不同位置的 Gly，可以探討三股螺旋結構折疊過程如何受取代位置及不同胺基酸的影響，以及折疊過程的改變對結構穩定性有何影響。

Sar 是一胺基氮原子被甲基取代，在胜肽鏈中缺乏可以形成氫鍵的胺基氮原子，所以將聚胺酸模型中的 Gly 換成 Sar，螺旋結構的三條胜肽之間的氫鍵網狀結構會被破壞，藉以探討氫鍵對於維持膠原蛋白結構穩定的重要性及貢獻；另

外，也探討氫鍵作用對三股螺旋結構中不同位置的影響，所以分別將 Sar 置換在胜肽鏈的 N 端、C 端及中間位置。

### 3-2 研究膠原蛋白胜肽結構及穩定性

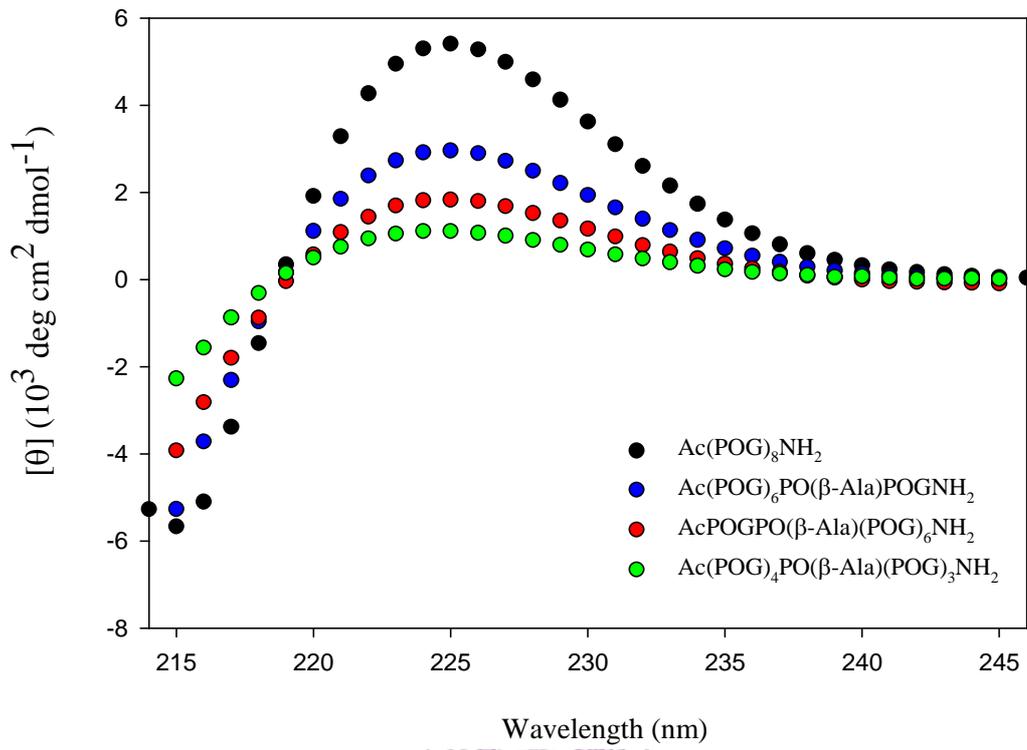
膠原蛋白三股螺旋結構的遠紫外光 CD (Far-UV CD) 光譜中，其特徵是在波長 220 ~ 230 nm 之間會有一最大正訊號。變溫量測所得曲線變化可觀察結構穩定性，溫度升高會使胜肽由三股螺旋結構轉變為單鏈形式存在，對一三股螺旋而言會得到一具合作性的熔化曲線 (cooperative thermal unfolding curve)，當溶液中有 50% 三股螺旋結構和 50% 單鏈存在的溫度稱為  $T_m$  值，較大的  $T_m$  值代表三股螺旋結構較穩定， $T_m$  值低代表結構較不穩定，無法測得  $T_m$  值表示無法形成三股螺旋結構。此  $T_m$  值可藉由簡單的 two-state 模型應用於熔化曲線求得，可用來比較與分析各個聚胺酸模型的穩定度。

一維  $^1\text{H-NMR}$  光譜也可以證實三股螺旋結構的存在，因為膠原蛋白以三股螺旋結構或以單鏈形式存在時，胜肽的氫原子接觸到的化學環境不同，在 NMR 光譜的化學位移會改變。三股螺旋結構形成時，膠原蛋白中 Pro  $\text{C}^\delta$  氫原子在 NMR 光譜 3.2 ppm 和 3.5 ppm 左右會有共振吸收，只有單鏈胜肽時此吸收峰不會出現，可以用來辨認三股螺旋的形成。當膠原蛋白結構打開 (unfolded)，胜肽以單鏈形式存在時，Gly  $\text{C}^\alpha$  氫原子在 3.9 ppm 會有 NMR 共振吸收，胜肽以三股螺旋存在時，此吸收峰會減弱、消失或和其它吸收峰重疊。<sup>22, 34, 35</sup>

### 3-2-1 $\beta$ -Ala 取代

Wild-type peptide 在波長 225 nm 得到的 CD 訊號值 (mean residue ellipticity) 為  $5.41 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ , 溶解溫度  $T_m$  值是  $49.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在胜肽鏈的 C 端也就是胺基酸序列第 21 個位置的 Gly 換成  $\beta$ -Ala 後所得的 Gly21 $\beta$ -Ala, 其訊號值降低到  $2.96 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ , 和 wild-type 比較, 三股螺旋結構含量變低,  $T_m$  值降低到  $36.0 \text{ }^\circ\text{C}$ , 代表 Gly21 $\beta$ -Ala 的穩定度降低。而在胜肽鏈的 N 端也就是胺基酸序列第 6 個位置的 Gly 換成  $\beta$ -Ala 後所得的 Gly6 $\beta$ -Ala, 在此波長之強度降低為  $1.83 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ,  $T_m$  值更降到  $20.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 穩定性及三股螺旋含量比 Gly21 $\beta$ -Ala 降低更多。至於在胜肽鏈中間位置, 胺基酸序列第 15 個位置的 Gly 換成  $\beta$ -Ala 所得的 Gly15 $\beta$ -Ala, 其在 225 nm 之強度更只有  $1.11 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ , 且在正常水溶液條件下無法形成三股螺旋結構, 表示 Gly15 $\beta$ -Ala 極不穩定 (見表 3-2)。 $\beta$ -Ala 取代之 CD 量測光譜如圖 3-1。

(A)



(B)

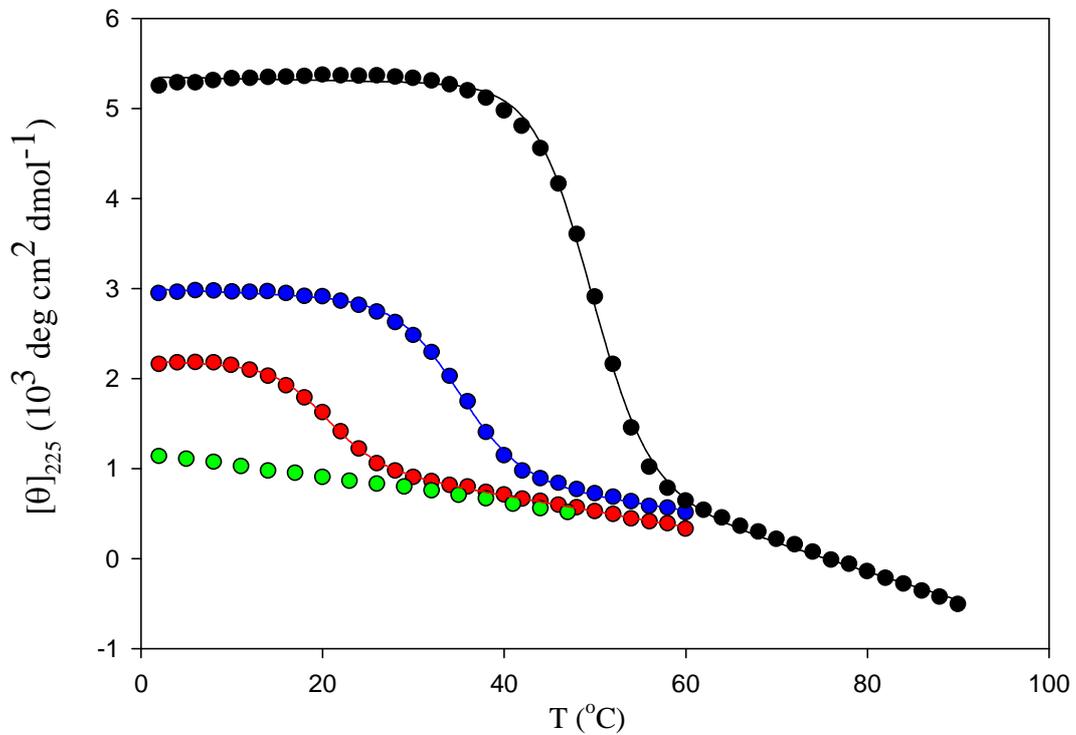


圖 3-1  $\beta$ -Ala 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖與 (B) 在 225 nm 之熔化曲線 (胜肽濃度 : 1 mg/mL)

TMAO (Trimethylamine N-oxide) 是一種可以促進蛋白質作用穩定之物質，也可穩定膠原蛋白使熔化溫度提高，因為蛋白質 backbone 不傾向與 TMAO 作用，因此，TMAO 的存在使蛋白質之間作用更緊密且穩定性增加。<sup>19</sup> 為與其它聚胺酸模型比較，我們於 Gly15 $\beta$ -Ala 胜肽溶液中加入 TMAO 使其形成穩定之三股螺旋結構。當胜肽與 TMAO 於 4 °C 環境平衡 24 小時後，由 CD 量測發現其形成了三股螺旋結構，高濃度的 TMAO 更提升了 Gly15 $\beta$ -Ala 的穩定度，在 3 M TMAO 存在下  $T_m$  值為 21 °C；同時也測量不同濃度 TMAO (2.5 M, 2 M, 1.5 M) 存在時，Gly15 $\beta$ -Ala 胜肽溶液的  $T_m$  值，並用外插法得到沒有 TMAO 存在時之  $T_m$  值為 6 °C，如圖 3-2。

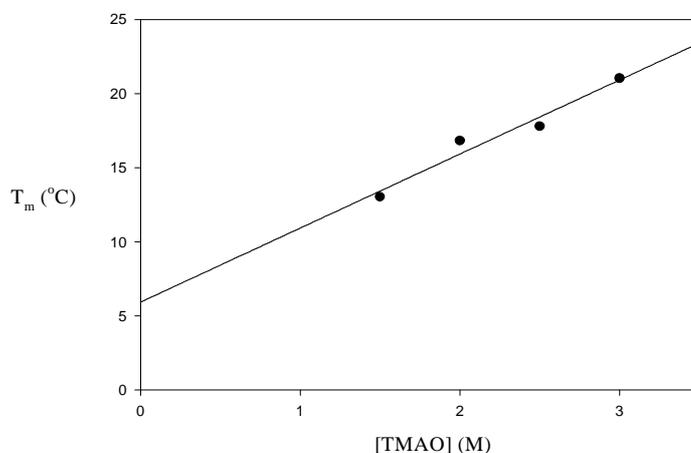


圖 3-2 Gly15 $\beta$ -Ala 胜肽溶液的  $T_m$  值與 TMAO 濃度關係圖

Gly6 $\beta$ -Ala 和 Gly21 $\beta$ -Ala 於 10 °C 測一維 <sup>1</sup>H-NMR 光譜，在 3.2 ppm 和 3.5 ppm 位置有明顯之共振吸收，證實了三股螺旋結構存在，而在 45 °C 高溫下三股螺旋鬆開，結構產生變化，這兩個共振吸收峰會減弱，但是在 3.9 ppm 會有新的共振吸收峰出現，如圖 3-3。

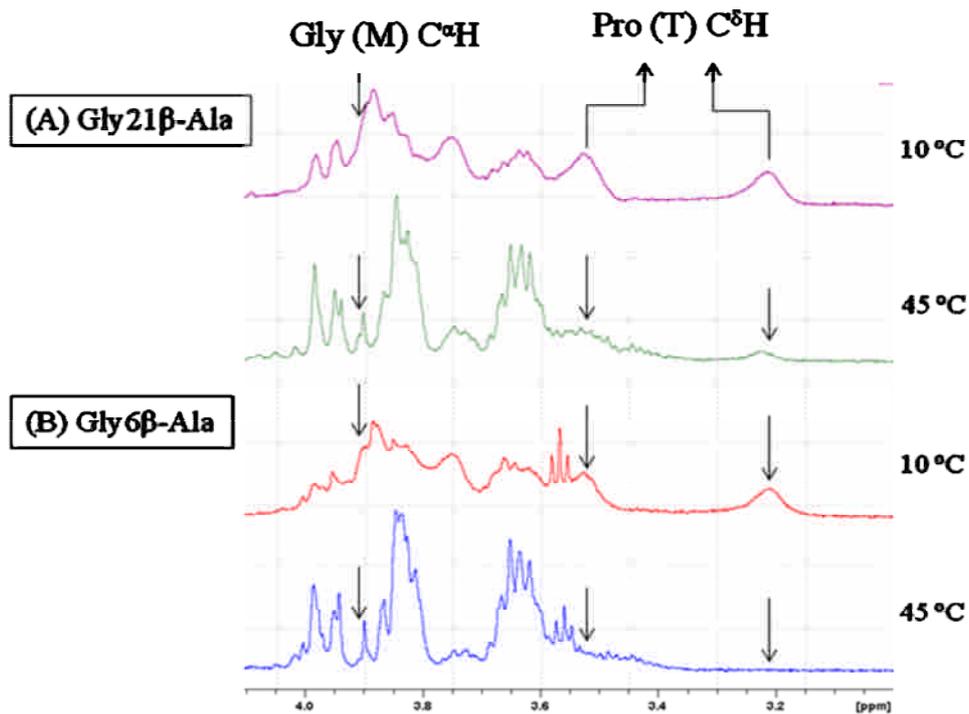
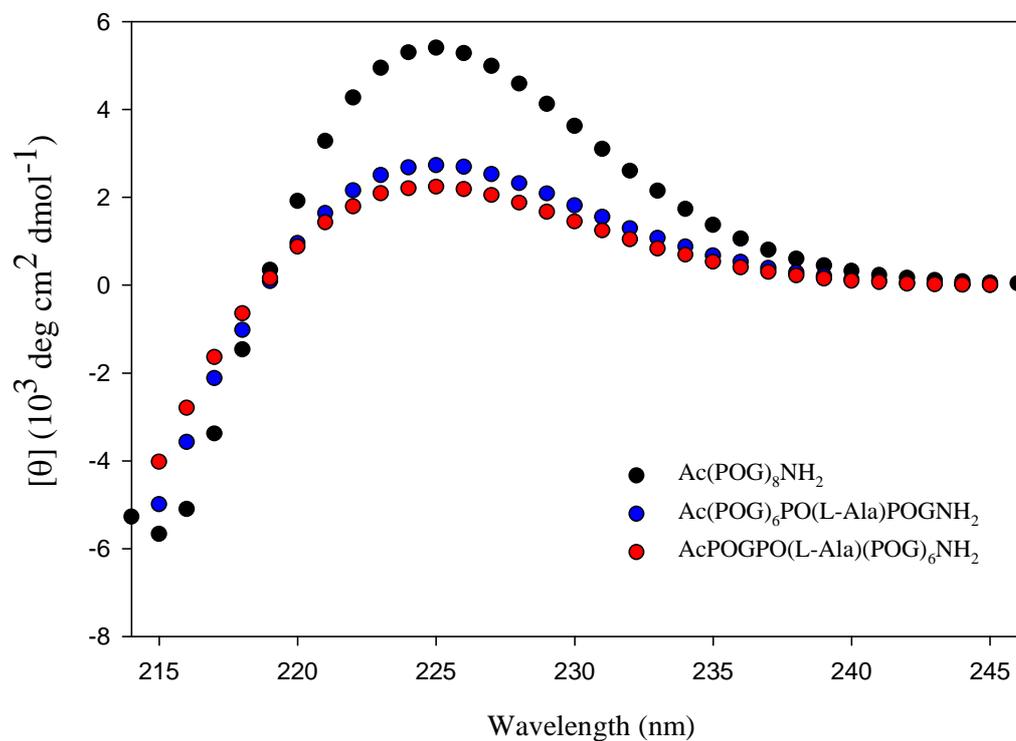


圖 3-3 (A) Gly21β-Ala (B) Gly6β-Ala 於 10 °C 和 45 °C 所測得之  $^1\text{H-NMR}$  光譜。胜肽溶於  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$  buffer, pD (uncorrected) 為 6.6, 其濃度為 1.93 mM。其中 (M) 代表單鏈存在, (T) 代表三股螺旋結構存在。

### 3-2-2 L-Ala 取代

胜肽 C 端的 Gly 換成 L-Ala 後得到的 Gly21L-Ala, 其 CD 在 225 nm 之訊號明顯比 wild-type 小 ( $2.73 \times 10^3$  vs.  $5.41 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ), 且  $T_m$  值也降低到 37.8 °C, 穩定性比 wild-type 低。胜肽鏈 N 端的 Gly 換成 L-Ala 後得到的 Gly6L-Ala, 最大值訊號為  $2.63 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ,  $T_m$  值為 24.1 °C, 穩定度比 wild-type 低更多 (見表 3-2)。Gly 置換成 L-Ala 使穩定性降低, 如同前面所述之 β-Ala, 在 N 端置換所造成之不穩定效應比 C 端來得大。以 L-Ala 取代的胜肽鏈, 其 CD 量測光譜如圖 3-4。

(A)



(B)

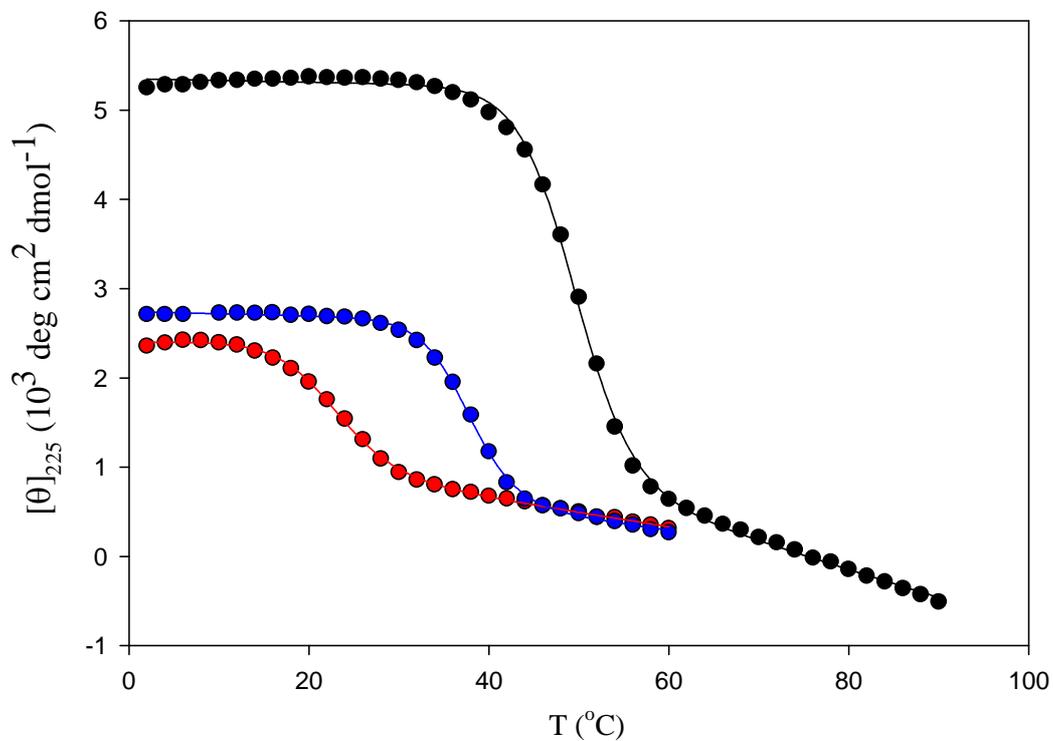


圖 3-4 L-Ala 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖與 (B) 在 225 nm 之熔化曲線 (胜肽濃度 : 1 mg/mL)

### 3-2-3 D-Ala 取代

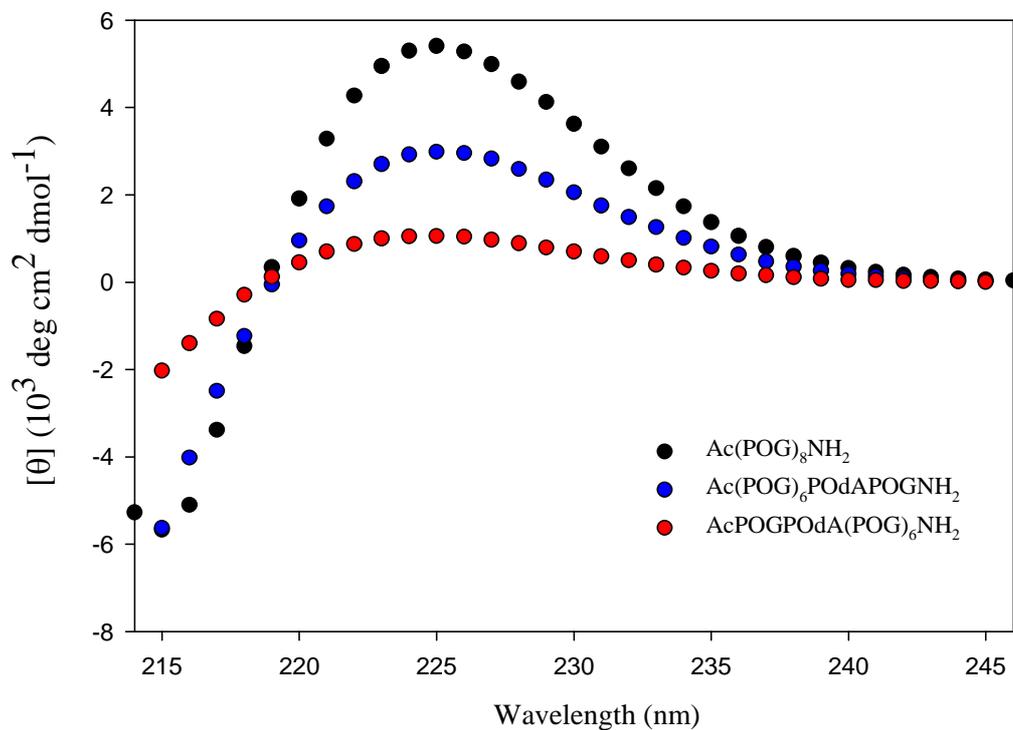
胜肽鏈 C 端的 Gly 換成 D-Ala 所得到的 Gly21D-Ala，在 225 nm 之最大值訊號為  $2.98 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ； $T_m$  值為 28.2 °C。胜肽鏈 N 端的 Gly 換成 D-Ala 所得到的 Gly6D-Ala，在 225 nm 之最大值訊號只為  $1.06 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ；且  $T_m$  值約只有 8.3 °C 左右（見表 3-2），如同之前之胺基酸置換，均造成三股螺旋結構不穩定，且不穩定的效應也是 N 端置換比 C 端置換來得大。D-Ala 取代之 CD 量測光譜如圖 3-5。

表 3-2 膠原蛋白模擬胜肽的 CD 訊號最大值及其對應的波長及  $T_m$  值

Peptide	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ ( $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ )	$T_m$ (°C)
Wild-type	225	$5.41 \times 10^3$	49.8
Gly21 $\beta$ -Ala	225	$2.96 \times 10^3$	36.0
Gly6 $\beta$ -Ala	225	$1.83 \times 10^3$	20.5
Gly15 $\beta$ -Ala	225	$1.11 \times 10^3$	5.9 (TMAO)*
Gly21L-Ala	225	$2.73 \times 10^3$	37.8
Gly6L-Ala	225	$2.63 \times 10^3$	24.1
Gly21D-Ala	225	$2.98 \times 10^3$	28.2
Gly6D-Ala	225	$1.06 \times 10^3$	< 10
Gly21Sar	225	$3.14 \times 10^3$	35.2
Gly6Sar	225	$3.10 \times 10^3$	23.0
Gly15Sar	225	$2.87 \times 10^3$	18.1

\* 利用在不同濃度 TMAO 存在下量測，並用外插法得到無 TMAO 存在時之  $T_m$  值

(A)



(B)

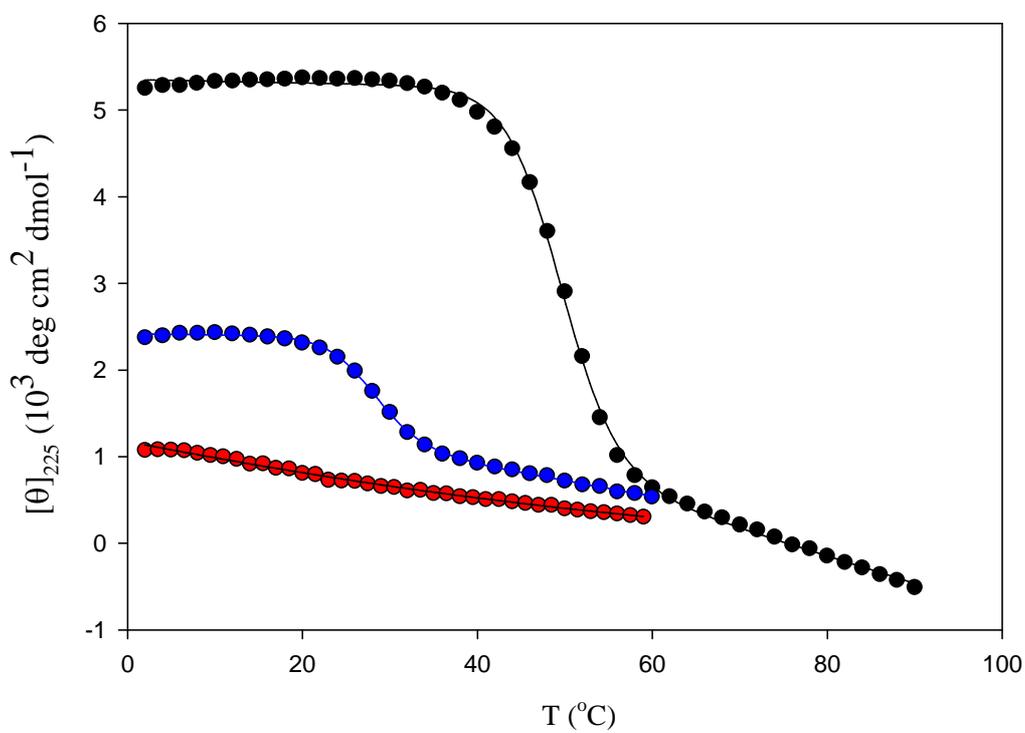


圖 3-5 D-Ala 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖與 (B) 在 225 nm 之熔化曲線 (胜肽濃度 : 1 mg/mL)

Gly6L-Ala, Gly21L-Ala, Gly6D-Ala 和 Gly21D-Ala 並於 10 °C 測一維  $^1\text{H}$ -NMR 光譜，因三股螺旋結構之存在，3.2 ppm 和 3.5 ppm 位置有明顯的共振吸收峰，而在 45 °C 高溫下因三股螺旋鬆開，結構產生變化，這兩個共振吸收峰會減弱，但是在 3.9 ppm 會有新的共振吸收峰出現，如圖 3-6。

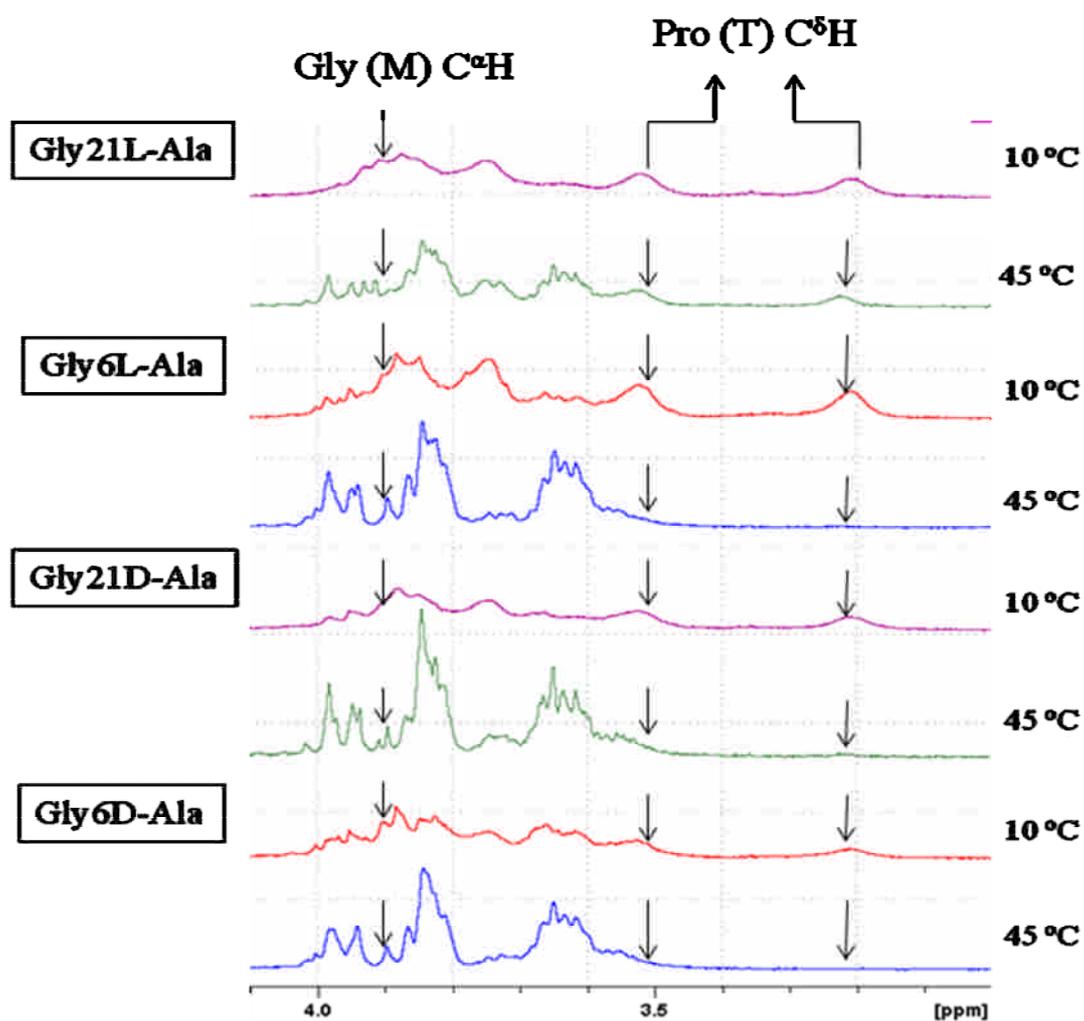


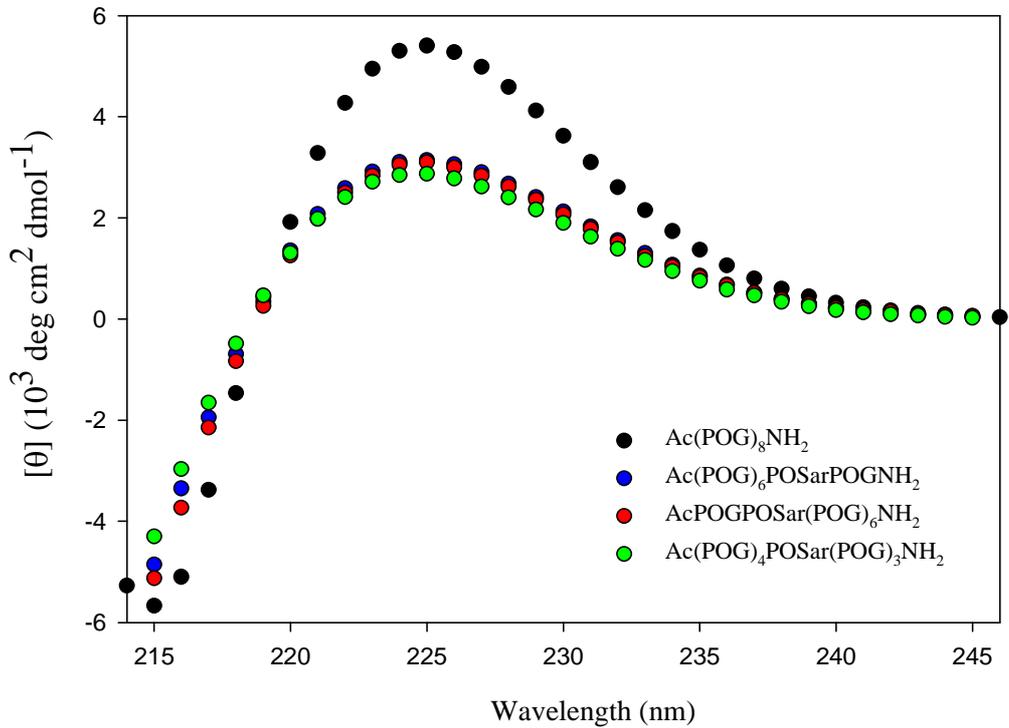
圖 3-6 (A) Gly21L-Ala (B) Gly6L-Ala (C) Gly21D-Ala (D) Gly6D-Ala 於 10 °C 和 45 °C 所測得之  $^1\text{H}$ -NMR 光譜。胜肽溶於  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$  buffer, pD (uncorrected) 為 6.6，其濃度為 1.93 mM。其中 (M) 代表單鏈存在，(T) 代表三股螺旋結構存在。

### 3-2-4 Sar 取代

胜肽鏈 C 端的 Gly 換成 Sar 所得到的 Gly21Sar，在 225 nm 之最大值訊號降低為  $3.14 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ， $T_m$  值為  $35.2^\circ\text{C}$ ，代表三股螺旋含量變低，穩定性降低。胜肽鏈 N 端的 Gly 換成 Sar 所得到的 Gly6Sar，在 225 nm 之最大值訊號為  $3.10 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ， $T_m$  值為  $23.0^\circ\text{C}$ ，穩定性更低。胜肽鏈中間位置的 Gly 換成 Sar 所得的 Gly15Sar，在 225 nm 之最大值訊號為  $2.87 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ， $T_m$  值為  $18.1^\circ\text{C}$ 。Gly15Sar 穩定性如預期的比 Gly21Sar 和 Gly6Sar 都來得低，但卻也比之前或其它研究中使用其它胺基酸在類似位置作置換所得到的胜肽鏈穩定。Sar 取代之 CD 量測光譜如圖 3-7，以上所述之量測數據列於表 3-2。

Gly6Sar, Gly15Sar 和 Gly21Sar 於  $10^\circ\text{C}$  測一維  $^1\text{H-NMR}$  光譜，因三股螺旋結構存在，3.2 ppm 和 3.5 ppm 位置共振吸收明顯，而在  $45^\circ\text{C}$  高溫下三股螺旋鬆開，結構產生變化，這兩個共振吸收峰會減弱，但是在 3.9 ppm 會有新的共振吸收峰出現，如圖 3-8。另外，以 Sar 取代 Gly 的胜肽由三股螺旋結構轉變為單鏈形式時，Sar 的胺基上甲基會暴露於溶液中，使甲基的氫原子周遭環境改變，因此，高溫時 ( $45^\circ\text{C}$ ) 在 3.1 ~ 3.2 ppm 之間會有一明顯的共振吸收峰，如圖 3-8。

(A)



(B)

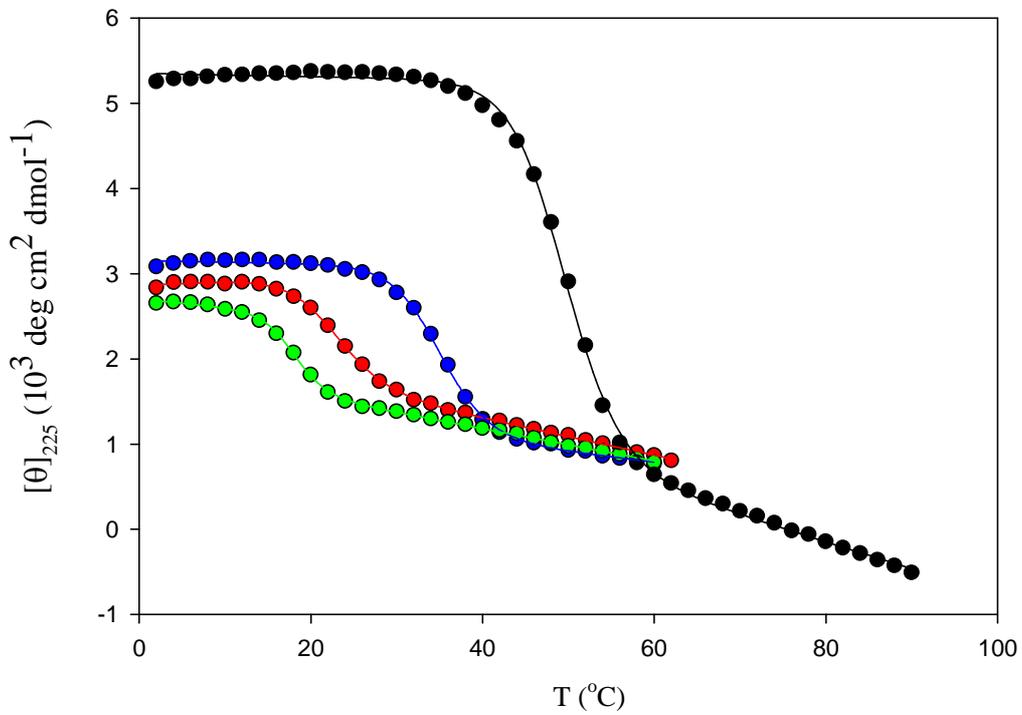


圖 3-7 Sar 取代 Gly 之膠原蛋白胜肽的 (A) Far-UV CD 光譜圖  
與 (B) 在 225 nm 之熔化曲線 (胜肽濃度 : 1 mg/mL)

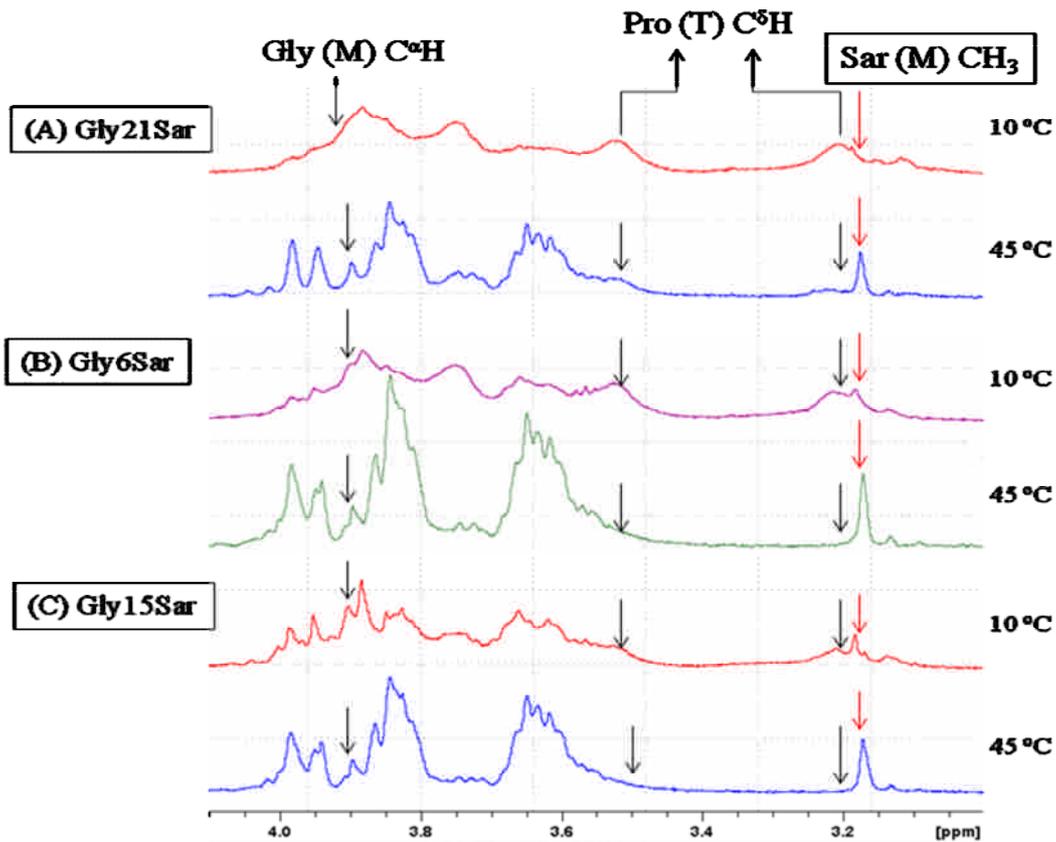


圖 3-8 (A) Gly21Sar (B) Gly6Sar (C) Gly15Sar 於 10 °C 和 45 °C 所測得之  $^1\text{H-NMR}$  光譜。胜肽溶於  $\text{Na}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$  buffer, pD (uncorrected) 為 6.6, 其濃度為 1.93 mM。其中 (M) 代表單鏈存在, (T) 代表三股螺旋結構存在。

### 3-2-5 Kemp's triacid 接上 Ala 取代之胜肽的比較

胜肽鏈中間的 Gly 換成 L-Ala 再接上 KTA 所得到的  $\text{KTA-}\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$ , 在 225 nm 測得之  $T_m$  值為 29.6 °C。而胜肽鏈中間的 Gly 換成 D-Ala 再接上 KTA 所得到的  $\text{KTA-}\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POdA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$ , 在 225 nm 無法測得  $T_m$  值。如同前面以 L-Ala 及 D-Ala 置換 Gly,  $\text{KTA-}\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$  之穩定性如預期比  $\text{KTA-}\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POdA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$  之穩定性高, 其 CD 量測之融化光譜如圖 3-9。

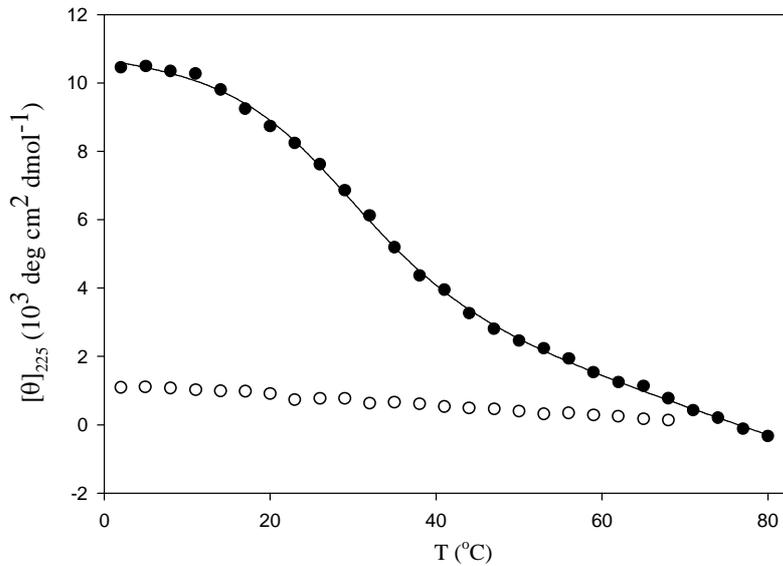


圖 3-9 膠原蛋白胜肽 KTA- $\{GG(POG)_3POA(POG)_3NH_2\}_3$  (實心) 與 KTA- $\{GG(POG)_3POdA(POG)_3NH_2\}_3$  (空心) 在 225 nm 之熔化曲線 (濃度 : 0.33 mg/mL)

於 4 °C 時，分別對兩胜肽作 chemical denaturation 實驗，得到的 CD 平均訊號與相對應的 GuHCl 濃度作一關係圖，如圖 3-10，可利用下列各式求得自由能。 $y_n$  是定義形成三股螺旋結構 (folded state) 時 CD 訊號與 GuHCl 濃度關係之基線， $y_d$  是定義胜肽未折疊 (unfolded state) 時 CD 訊號與 GuHCl 濃度關係之基線，再利用 (式 3-3)、(式 3-4) 對曲線作非線性迴歸可得到  $m$ ,  $\Delta G^\circ(H_2O)$  之數值。KTA- $\{GG(POG)_3POA(POG)_3NH_2\}_3$  之  $m$  值為  $3.32 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ， $\Delta G^\circ(H_2O)$  值為  $6.03 \text{ kcal mol}^{-1}$ ，KTA- $\{GG(POG)_3POdA(POG)_3NH_2\}_3$  之  $m$  值為  $3.19 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ， $\Delta G^\circ(H_2O)$  值為  $2.39 \text{ kcal mol}^{-1}$ 。穩定度的測量也可證實 L-Ala 置換之胜肽的穩定性遠大於 D-Ala 置換之胜肽的穩定性，與變溫實驗結果相符合。

$$y_n = a_n + b_n[\text{GuHCl}] \quad (\text{式 3-1})$$

$$y_d = a_d + b_d[\text{GuHCl}] \quad (\text{式 3-2})$$

$$\Delta G^o = \Delta G^o(\text{H}_2\text{O}) - m[\text{GuHCl}] \quad (\text{式 3-3})$$

$$y = (y_n + y_d(\exp(-\frac{\Delta G^o}{RT}))) / (1 + \exp(-\frac{\Delta G^o}{RT})) \quad (\text{式 3-4})$$

$$f_d = (y - y_n) / (y_d - y_n) \quad (\text{式 3-5})$$

$$\Delta G^o(\text{H}_2\text{O}) = -RT \ln K \quad (\text{式 3-6})$$

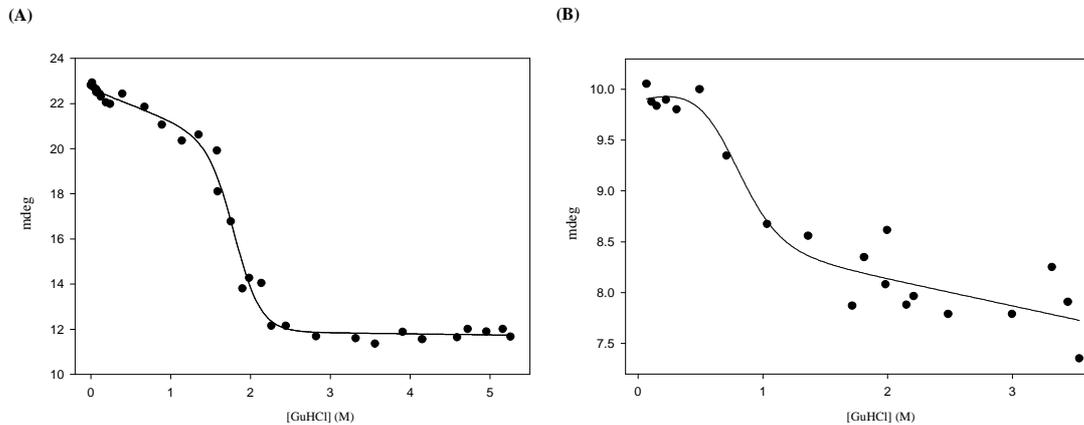


圖 3-10 於 4 °C 時 CD 所量測之膠原蛋白胜肽的 chemical denaturation 實驗  
 (A) KTA- $\{GG(POG)_3POA(POG)_3NH_2\}_3$  (B) KTA- $\{GG(POG)_3POdA(POG)_3NH_2\}_3$

以上述各式得到  $m$ ,  $\Delta G^o(\text{H}_2\text{O})$  數值時，也可得到  $a_n$ ,  $b_n$ ,  $a_d$ ,  $b_d$  的估計值，將  $a_n$ ,  $b_n$ ,  $a_d$ ,  $b_d$  代回 (式 3-1)、(式 3-2)，再配合 (式 3-5) 可得到 GuHCl 濃度增加時，以未折疊形式存在的胜肽比例變化 (fraction unfolded,  $f_d$ )，如圖 3-11；而當 50% 結構是屬於未折疊狀態時，其相對應之 GuHCl 濃度即為  $C_m$ ，L-Ala 取代之胜肽  $C_m$  值為 1.82 M，D-Ala 取代之胜肽  $C_m$  值為 0.72 M， $C_m$  值越小代表 denaturant 濃度越低就能使胜肽由三股螺旋結構成為未折

疊的形式，也代表胜肽較不穩定。 $\Delta G^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$  代入 (式 3-6) 可得到胜肽在此溫度由 unfolding 狀態轉變為 folding 狀態的平衡常數 (K)，L-Ala 取代之胜肽 K 值為 57351.8，D-Ala 取代之胜肽 K 值為 77.3。

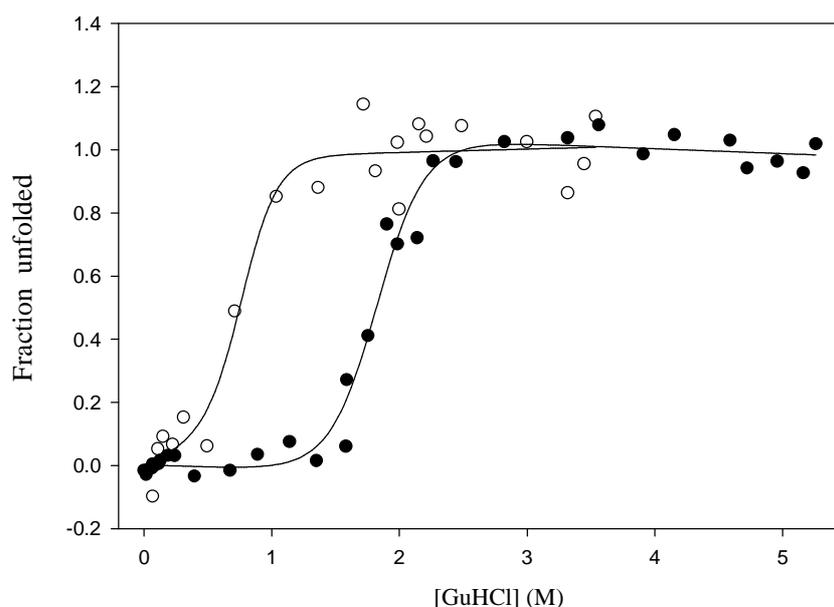


圖 3-11 膠原蛋白模擬胜肽  $\text{KTA-}\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$  (實心) 與  $\text{KTA-}\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POdA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$  (空心) fraction unfolded 與  $[\text{GuHCl}]$  之關係圖

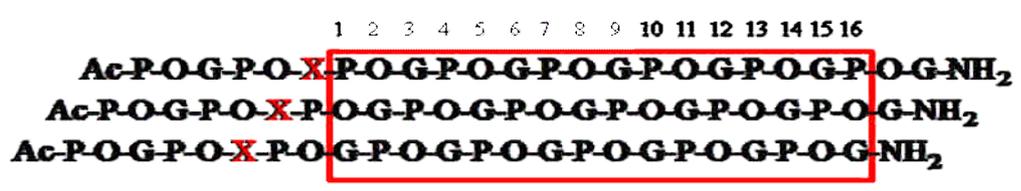
### 3-3 胺基酸置換對三股螺旋結構穩定度之影響比較

根據  $T_m$  值的比較，我們得到在胜肽鏈 C 端作 Gly 變異的穩定性比在 N 端作 Gly 變異的穩定性高的結果，和 Bhate 等人於 2002 年研究在胜肽 T1-892 C 端作 Gly 變異會使胜肽結構更不穩定的結果雖不盡相同，<sup>11</sup> 但在該研究中 T1-892 胺基酸序列和我們所使用的胜肽胺基酸序列不同，T1-892 只有在胜肽 C 端有重覆的 Pro-Hyp-Gly 序列，其餘是 X-Y-Gly 序列，所以變異位置在胜肽 C 端會破壞最穩定且具有 nucleation 作用的 Pro-Hyp-Gly 重覆部分使

胜肽更不穩定；而我們的胺基酸序列皆由 Pro-Hyp-Gly 組成，因此，我們所探討的是針對 POG 重覆區域中不同位置變異對三股螺旋結構之影響。

推測變異位置在 C 端形成的三股螺旋結構會比變異位置在 N 端形成的三股螺旋結構更穩定的原因是，因為胜肽欲進行折疊過程時每一條鏈會彼此相差一個胺基酸排列再形成三股螺旋，若變異位置在 N 端形成的三股螺旋會有 16 段含有 Pro, Hyp 和 Gly 胺基酸彼此排列緊密的螺旋結構，不過折疊到 N 端變異位置時結構會變鬆散；但若是變異位置在 C 端，折疊時可能會略過 C 端變異位置再開始往 N 端折疊形成 18 段含有 Pro, Hyp 和 Gly 胺基酸彼此排列緊密的螺旋結構。從圖 3-12 之比較上發現變異位置在 C 端可以形成比較多段穩定的含 Pro, Hyp 和 Gly 胺基酸序列之排列，所以穩定性比較好， $T_m$  值會較高。

N-terminal mutation



C-terminal mutation

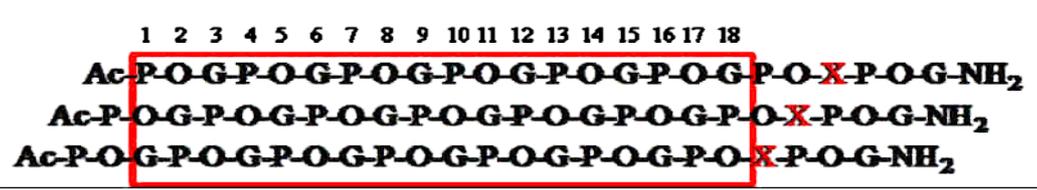


圖 3-12 變異位置在 N 端及 C 端胜肽可以形成的 POG 序列長度，X 代表變異位置。

Horng 等人於 2007 年研究將七段 POG 序列中間段的 Gly 置換成 D-Ala 和 L-Ala (POdA 和 POA)，胜肽溶於 50 mM 醋酸溶液，並無法形成三股螺旋，

如表 3-3；而 Beck 等人於 2000 年研究將八段 GPO 序列中間段的 Gly 換成 L-Ala，利用在不同濃度 TMAO 溶液下得到之  $T_m$  值，外插所估算之  $T_m$  值約只有 9.9 °C (見表 1-1)。<sup>19,32</sup> 而我們合成八段 POG 序列中，當中間段 POG 序列的 Gly 被換成 Sar 後，雖然結構中間位置的胺基氫原子被甲基取代會破壞氫鍵作用，但在正常的水溶液條件下仍可形成三股螺旋結構，且  $T_m$  值為 18.1 °C。以上結果表示氫鍵對膠原蛋白穩定性很重要，因為氫鍵的破壞會使結構穩定度降低，但變異位置在中間時，側鏈造成的立體效應比氫鍵對結構穩定的影響更大，使大約相同的胺基酸數目所形成之胜肽無法形成三股螺旋結構。

表 3-3 D-Ala, L-Ala 取代膠原蛋白中間位置 Gly 之  $T_m$  值 (POdA, POA)<sup>32</sup>

Peptide	50 mM acetic acid				Methanol
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg · cm <sup>2</sup> · dmol <sup>-1</sup> )	Rpn	$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)
(POdA) <sub>7</sub>	226	$1.63 \times 10^3$	0.087	No helix	No helix
POdA	224	$2.15 \times 10^3$	0.074	No helix	17.2
POA	224	$1.96 \times 10^3$	0.068	No helix	22.5
(POdS) <sub>7</sub>	226	$2.79 \times 10^3$	0.14	No helix	No helix
POdS	225	$1.73 \times 10^3$	0.074	No helix	22.5
(POG) <sub>7</sub>	224	$3.22 \times 10^3$	0.11	36	>60

將 POdA 和 POA 的研究結果與 D-Ala, L-Ala 取代在胜肽 N 端及 C 端 Gly 位置的實驗結果比較，變異位置在兩端仍可形成三股螺旋結構，顯示中間段 Gly 的取代比在兩端位置的取代對結構穩定性的影響更大。另外，D-Ala 取代在 N 端或 C 端位置穩定性都比其它三種胺基酸取代穩定性更低。和 L-Ala 比

較，D-Ala 雖然側鏈往外少了立體效應的阻礙，但 D-Ala  $\phi$  角度大於零，與膠原蛋白原有的  $\phi$  角度不相符，所以不利於形成三股螺旋結構，與 Horng 等人於 2007 年的研究結果符合。<sup>32</sup> 另外，Horng 等人於 2007 年的研究顯示 L-Ala, D-Ala 取代在胜肽中間無法形成三股螺旋，為了比較兩者的穩定性，我們使用 KTA 提升胜肽的穩定性，雖然無法測得 D-Ala 取代之  $T_m$  值，但可藉由 chemical denaturation 實驗測得穩定度 ( $\Delta G^\circ(\text{H}_2\text{O})$ )，且證實 KTA- $\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$  的穩定性大於 KTA- $\{\text{GG}(\text{POG})_3\text{POdA}(\text{POG})_3\text{NH}_2\}_3$  的穩定性，故以 L-Ala 取代之胜肽穩定性大於以 D-Ala 取代之胜肽，與變溫實驗結果相符合。

研究發現  $\beta$ -Ala 之置換，其胜肽穩定性皆低於 wild-type，backbone 的延長不利於三股螺旋結構的穩定性，其胜肽也比以 L-Ala 置換之胜肽的穩定性稍低，表示胜肽受 backbone 構型改變所造成的不穩定影響比側鏈造成的立體效應之影響更大。Sar 取代之胜肽主要是研究氫鍵作用對結構穩定性之影響，其  $T_m$  值皆低於 wild-type，表示氫鍵作用的消失會降低三股螺旋結構的穩定性。但比較  $\beta$ -Ala 和 Sar 取代在胜肽中間位置對結構的影響，Gly15Sar  $T_m$  值為 18.1 °C，而 Gly15 $\beta$ -Ala 卻無法形成三股螺旋，中間位置氫鍵被破壞對結構的影響比 backbone 中間位置變異對結構的影響更小，所以 Gly15Sar 穩定性較高，表示氫鍵作用力固然重要，但 backbone 位置胺基酸之排序是否正確更加影響結構的穩定度。

### 3-4 熱力學分析

在特定溫度範圍內作樣品溶液的熔化曲線，測得的 CD 訊號經由 (式 3-7) 得到 MRE 值 (mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , 單位 :  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ )，其中  $\theta$  是測量的橢圓率 (單位 : mdeg)， $c$  是濃度 (單位 : M)， $l$  是 cuvette 路徑長 (0.1 公分)， $n_r$  是胺基酸的個數。MRE 值對溫度作圖可得到熔化曲線，如圖 3-13。

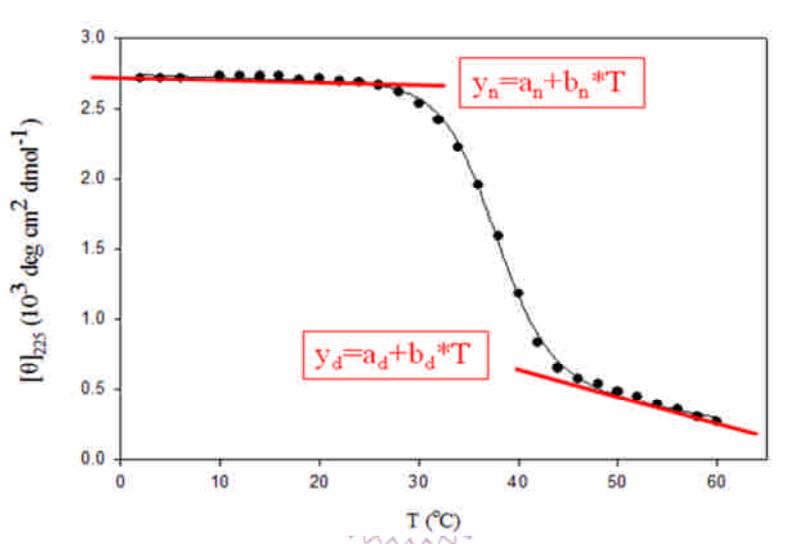


圖 3-13 變溫實驗得到的熔化曲線， $y_n$  定義三股螺旋含量與溫度之線性關係， $y_d$  定義胜肽單鏈含量與溫度之線性關係。

$y_n$  是定義三股螺旋結構還未分解成單鏈時 CD 訊號變化與溫度關係之基線， $y_d$  是定義胜肽完全以單鏈存在時 CD 訊號變化與溫度關係之基線，而  $y$  為測得之訊號，將此過程視為 two-state，利用 (式 3-8)、(式 3-9) 對曲線作非線性迴歸可得到  $a_n, b_n, a_d, b_d, T_m, \Delta H^0$  估計值。但 (式 3-8)、(式 3-9) 求得的  $\Delta H^0$  值並非真正的  $\Delta H^0$ ，因此，必須再利用 (式 3-10) 以及將得到的  $a_n, b_n, a_d, b_d$  代入求得的  $y_n, y_d$ ，並配合測量的訊號 ( $y$ ) 計算出不同溫度下的折疊比例 ( $F_T$ )。<sup>19, 36</sup>

$$[\theta] = \theta / (10n_r cl) \quad (\text{式 3-7})$$

$$K = \exp(-(\Delta H^\circ (1 - \frac{T}{T_m} - Cp((T_m - T) + T \ln \frac{T}{T_m}))) / (RT)) \quad (\text{式 3-8})$$

(K 為一般研究蛋白質折疊的平衡常數，不考慮蛋白質濃度且在此將  $C_p$  視為 0)

$$y = (y_n + y_d K) / (1 + K) \quad (\text{式 3-9})$$

$$F_T = \frac{y - y_d}{y_n - y_d} \quad (\text{式 3-10})$$

現若考慮濃度，將熔化曲線視為 two-state 可逆反應，平衡狀態可以 (式 3-11) 表示， $M$  為單鏈、 $T$  為三股螺旋狀態，起始濃度可表示為  $c_o = [M] + 3[T]$ ，折疊比例為  $F_T = 3[T] / c_o$ ，三股螺旋分子濃度為  $[T] = (F_T c_o) / 3$ ，勝肽單鏈的濃度為  $[M] = c_o (1 - F_T)$ ，考慮濃度影響，平衡常數可寫成 (式 3-12)，取位於轉換過程 (transition) 的  $F_T$  值，去計算  $K$  值，由  $\ln K$  對溫度之關係圖及 (式 3-13) 作線性迴歸決定  $\Delta H^\circ$  值和  $T_m$  值。利用所得到  $\Delta H^\circ$  值及 (式 3-14) 作線性迴歸來計算  $\Delta S^\circ$  值。<sup>19,37</sup>



$$K(T) = \frac{[T]}{[M]^3} = \frac{F_T}{3c_o^2 (1 - F_T)^3} \quad (\text{式 3-12})$$

$$\ln K = \frac{\Delta H^\circ}{RT} \left( \frac{T}{T_m} - 1 \right) - \ln(0.75c_o^2) \quad (\text{式 3-13})$$

$$3c_o^2 e^{\frac{\Delta H - T\Delta S}{-RT}} = \frac{F_T}{(1 - F_T)^3} \quad (\text{式 3-14})$$

所得的各個聚胺酸模型之  $\Delta H^\circ$  值和  $\Delta S^\circ$  值列於表 3-4。與 wild-type 的  $\Delta H^\circ$  和  $\Delta S^\circ$  比較，可知勝肽 C 端變異所造成勝肽不穩定的原因主要是由於 entropic effect。

表 3-4 膠原蛋白模擬胜肽  $T_m$ ,  $\Delta H^\circ$  及  $\Delta S^\circ$  的比較

Peptide	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (298 K) (kcal mol <sup>-1</sup> )
Wild-type	49.8	-133	-0.380	-19.8
Gly21 $\beta$ -Ala	36.0	-140	-0.422	-14.2
Gly6 $\beta$ -Ala	20.5	-112	-0.349	-8.0
Gly15 $\beta$ -Ala	5.9 (TMAO)*	--	--	--
Gly21L-Ala	37.8	-145	-0.434	-15.7
Gly6L-Ala	24.1	-124	-0.383	-9.9
Gly21D-Ala	28.2	-136	-0.420	-10.8
Gly6D-Ala	< 10	--	--	--
Gly21Sar	35.2	-139	-0.420	-13.8
Gly6Sar	23.0	-118	-0.368	-8.3
Gly15Sar	18.1	-165	-0.563	2.8

\* 利用在不同濃度 TMAO 存在下量測，並用外插法得到無 TMAO 存在時之  $T_m$  值

比較變異位置在 N 端的胜肽 Gly6 $\beta$ -Ala 和變異位置在 C 端位置的胜肽 Gly21 $\beta$ -Ala，entropy 變化 ( $\Delta S^\circ$ ) 分別為 -0.349 kcal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> 和 -0.422 kcal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>，Gly21 $\beta$ -Ala entropy 改變幅度較大。entropy 減少與三條鏈互相纏繞聚集有關，因此推測 C 端位置變異使胜肽鏈由 C 端往 N 端折疊時必須先克服 C 端的阻礙，而  $\beta$ -Ala 雖然沒有側鏈造成的阻礙，但是 backbone 多一個亞甲

基，使三條胜肽鏈排列時相對位置的排序 (register) 有問題，故造成較大之 entropy 改變，所以 Gly21 $\beta$ -Ala entropy 改變較 Gly6 $\beta$ -Ala entropy 改變大。

而 enthalpy 變化 ( $\Delta H^\circ$ ) 越大代表形成較多可穩定結構的作用力，Gly6 $\beta$ -Ala 和 Gly21 $\beta$ -Ala  $\Delta H^\circ$  分別為 -112 和 -140 kcal mol<sup>-1</sup>，表示 Gly21 $\beta$ -Ala 形成三股螺旋時產生 enthalpy 變化比 Gly6 $\beta$ -Ala 大，所以 C 端的變異雖然造成較大的 entropy 減少，但整個穩定度仍是較高，故 T<sub>m</sub> 值比較高。而 Gly21 $\beta$ -Ala  $\Delta H^\circ$  較大，推測當 Gly21 $\beta$ -Ala 形成三股螺旋時，會形成較多的作用力(包含三條胜肽間的氫鍵、和環境的水合作用等)，藉以補償 entropy 損失，來穩定三股螺旋結構。

其它三種 Gly 變異的胜肽 entropy 變化情況與  $\beta$ -Ala 變異類似，都是 C 端變異比 N 端變異大。L-Ala 和 D-Ala 皆有側鏈，Sar 則是因胺基上氫原子換成甲基，變異位置在 C 端，使胜肽鏈由 C 端往 N 端折疊時，受到較大的阻礙，所以 N 端變異胜肽的 entropy 改變比 C 端變異胜肽的 entropy 改變小，但 enthalpy 的貢獻使 C 端變異胜肽穩定性大於 N 端變異胜肽。另外，Sar 的取代研究中可知中間位置變異對三股螺旋結構之擾動程度比位於兩端的變異來得大，所以 entropy 改變幅度最大。

四種胺基酸取代在胜肽 C 端或 N 端，entropy 的變化大致接近，只有 L-Ala 在胜肽 C 端及 N 端的取代，entropy 的改變幅度稍大於  $\beta$ -Ala entropy 的改變幅度，推測因為 L-Ala 有側鏈使得三股螺旋形成時造成較大之 entropy 變化；以  $\beta$ -Ala 取代，雖然 backbone 延長使胜肽排列時 register 有問題而導致

穩定度降低，但是因為  $\beta$ -Ala 比 L-Ala 少一個側鏈，所以形成三股螺旋時 entropy 改變幅度較 L-Ala 小。而 D-Ala 因其側鏈朝三股螺旋外部，故造成的 entropy 變化比 L-Ala 小。至於 Sar，雖它有一甲基位於氮原子上，但在三股螺旋結構中因該局部空間可容許較大之取代基，所以造成的立體效應比 L-Ala 小，使得 entropy 變化亦較小。

### 3-5 胜肽折疊速率的比較

#### 3-5-1 Refolding 速率

我們利用 CD 測量各個聚胺酸模型折疊速率的快慢，將樣品置於 70 °C 控溫水槽 15 分鐘以確保所有三股螺旋結構皆恢復為單鏈狀態 (unfolded)，再置於 4 °C，使胜肽重新折疊成三股螺旋結構，同時量測波長 225 nm 的 CD 訊號變化，再折疊過程 (Refolding) 的測量時間為一小時。

折疊過程 CD 訊號變化與樣品濃度有關，無法單用一級、二級或三級速率反應去定義所有樣品的折疊速率，因此，我們利用折疊比例到達三股螺旋和胜肽單鏈各佔一半所需的時間 ( $t_{1/2}$ ) 作為折疊速率的評估。<sup>13, 36-38</sup>

$t_{1/2}$  (Refolding half-time) 計算方法：

$$y = y_0 + a(1 - \exp(-bx)) \quad (\text{式 3-15})$$

$$F_T = \frac{[\theta]_T - [\theta]_{\text{unfolding}}}{[\theta]_{\text{folding}} - [\theta]_{\text{unfolding}}} \quad (\text{式 3-16})$$

將量測時間加 40 秒代入 x，40 秒是樣品溶液轉移到 cuvette 以及儀器開

始收集訊號的延遲時間，CD 測得的樣品訊號變化扣除空白溶液的訊號後代入  $y$  值， $y$  對  $x$  作圖可得到一曲線，利用一級速率反應式 (式 3-15) 從 refolding 曲線去推測 0 秒時的訊號值 ( $y_0$ )，代表胜肽完全以單鏈形式存在時的 CD 訊號 ( $[\theta]_{\text{unfolding}}$ )。再利用 (式 3-16) 算三股螺旋結構的比例， $[\theta]_T$  是在時間  $t$  時測得的 CD 訊號， $[\theta]_{\text{folding}}$  是  $4^\circ\text{C}$  時樣品訊號扣除空白溶液的訊號，代表胜肽完全折疊為三股螺旋結構的 CD 訊號， $F_T=0.5$  對應的時間表示  $t_{1/2}$ ，時間越短代表折疊速率越快，所測得之結果如圖 3-14。<sup>13, 36-38</sup>

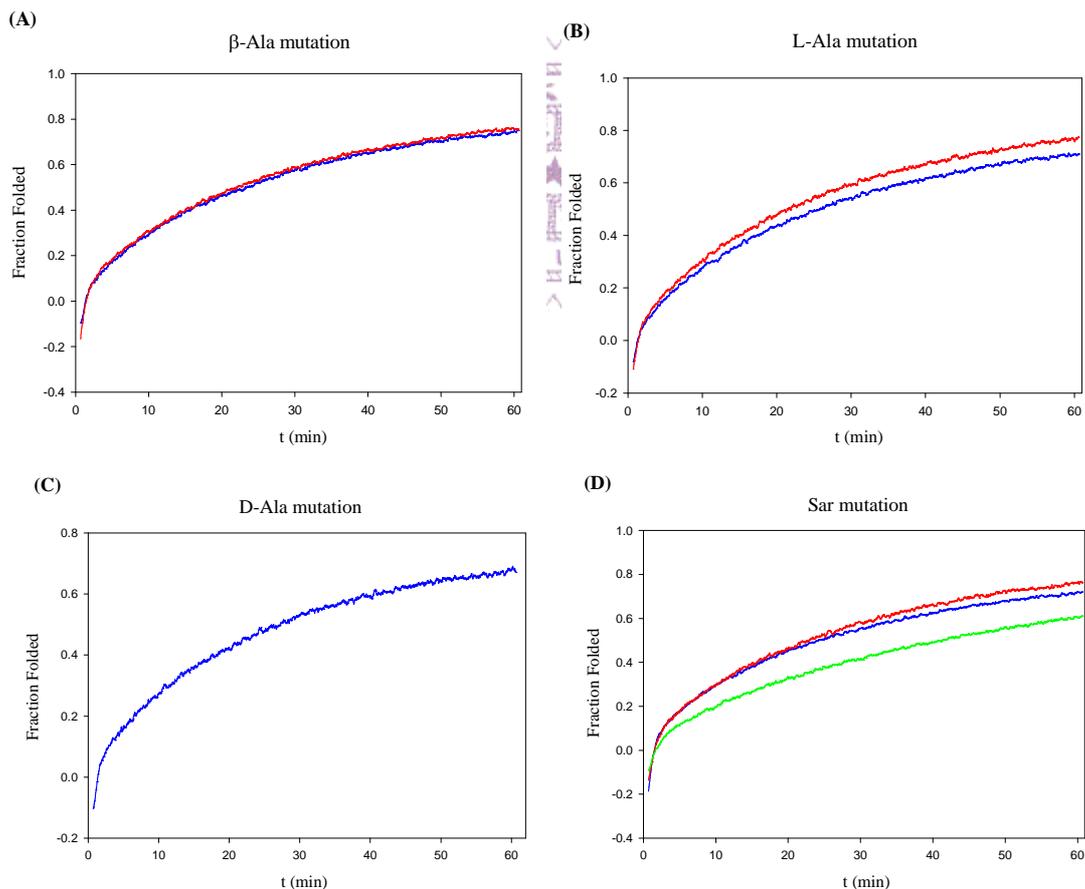


圖 3-14 三股螺旋折疊比例對時間作圖：(A) Gly6 $\beta$ -Ala (紅), Gly21 $\beta$ -Ala (藍)  
 (B) Gly6L-Ala (紅), Gly21L-Ala (藍) (C) Gly21D-Ala (藍) (D) Gly6Sar (紅),  
 Gly21Sar (藍), Gly15Sar (綠)

表 3-5 膠原蛋白模擬胜肽的折疊速率比較

Peptide	Refolding	Unfolding (70 °C)
	t <sub>1/2</sub> (min)	t <sub>1/2</sub> (sec)
Wild-type	17.2	52
Gly21β-Ala	23.6	64
Gly6β-Ala	22.0	52
Gly15β-Ala	--	--
Gly21L-Ala	27.8	56
Gly6L-Ala	22.6	43
Gly21D-Ala	26.3	54
Gly6D-Ala	--	--
Gly21Sar	24.1	50
Gly6Sar	22.9	50
Gly15Sar	41.3	52

由表 3-5 比較發現 N 端 Gly 被 β-Ala, L-Ala, Sar 取代的 t<sub>1/2</sub> 分別是 22 分、22.6 分、22.9 分，C 端 Gly 被 β-Ala, L-Ala, Sar 取代的 t<sub>1/2</sub> 分別是 23.6 分、27.8 分、24.1 分，可看出 N 端位置 Gly 被 β-Ala, L-Ala, Sar 取代的折疊速率比 C 端位置被這三種胺基酸取代的折疊速率更快。推測由 C 端往 N 端折疊時會受到 C 端變異位置的阻礙，使得 C 端變異胜肽的折疊速率變慢；但若變異位置在 N 端，C 端到變異位置仍可順利折疊成三股螺旋結構，所以速率較

快，這結果與 N 端位置變異 entropy 改變幅度小於 C 端位置變異 entropy 改變幅度的解釋相符合。 $\beta$ -Ala 取代在 N 端及 C 端位置的  $t_{1/2}$  分別是 22 分及 23.6 分，推測變異位置在兩端時其折疊速率差異較 L-Ala 取代在兩端的折疊速率差異更為接近的原因是， $\beta$ -Ala 沒有側鏈所以變異位置在 N 端或 C 端，對三股螺旋結構形成的快慢阻礙較小，雖然受 backbone 延長影響使 C 端變異造成 entropy 改變幅度較大，但對變異位置分別在肽兩端的折疊速率影響較小。

比較不同的胺基酸變異肽發現，L-Ala 取代在 C 端位置時，折疊速率比其他三種胺基酸取代的肽折疊速率都慢，推測 L-Ala 帶有側鏈，使結構折疊受到較大的立體阻礙； $\beta$ -Ala 不帶有側鏈，使其取代在 C 端時折疊速率較 L-Ala 快；D-Ala 雖帶有側鏈且 D-Ala 取代之肽較不穩定，使其折疊速率也較其它胺基酸取代更慢，但折疊形成三股螺旋時其側鏈方向是向外，所以在 C 端的取代折疊速率也較 L-Ala 取代更快；Sar 取代多了胺基上的甲基使肽穩定性降低，但折疊時因為其位置原本有氫鍵存在，會有較大的空間可以包容甲基造成的立體效應，如圖 3-15，因此，Sar 取代在 C 端位置的折疊速率也會比 L-Ala 取代的折疊速率快。以上結果可以推論主要影響折疊速率快慢的因素是側鏈對結構造成的立體效應影響。

另外，Sar 取代在中間位置的  $t_{1/2}$  是 41.3 分，表示取代在中間位置最不利於三股螺旋的折疊，與 CD 光譜得到 Sar 取代在中間位置比取代在其他位置更不穩定的結果相符合。

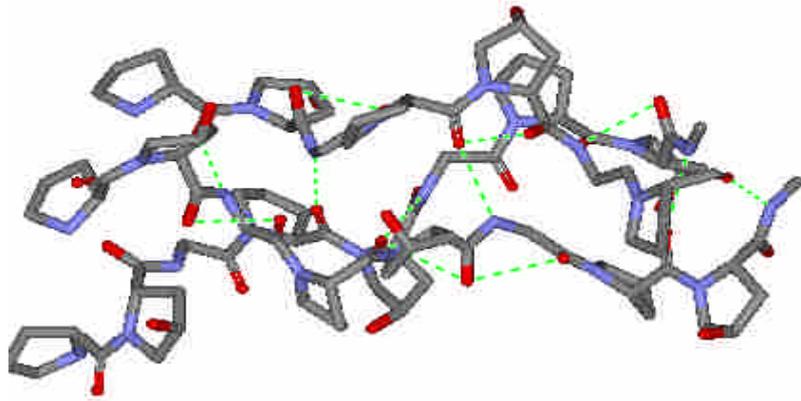


圖 3-15 Gly 的胺基氫原子和亞胺酸的羰基形成氫鍵 (綠色虛線)

### 3-5-2 Unfolding 速率比較

將量測時間加 30 秒代入  $x$ ，30 秒是樣品溶液轉移到 cuvette 以及儀器開始收集訊號的延遲時間，CD 測得的樣品訊號變化扣除空白溶液的訊號後代入  $y$  值， $y$  對  $x$  作圖可得到一曲線。利用 (式 3-16) 算三股螺旋結構的比例，將偵測 CD 訊號 100 秒後的  $y$  值取平均值可得到  $[\theta]_{\text{unfolding}}$ ，代表胜肽完全以單鏈形式存在時的 CD 訊號， $[\theta]_T$  是在時間  $t$  時測得的 CD 訊號， $[\theta]_{\text{folding}}$  是 4 °C 時樣品訊號扣除空白溶液的訊號，代表胜肽完全折疊為三股螺旋結構的 CD 訊號值， $F_T = 0.5$  對應的時間表示  $t_{1/2}$ ，時間越短代表 unfolding 速率越快。由 unfolding 實驗可知各個聚胺酸模型在 70 °C 時三股螺旋結構皆會很快恢復為單鏈胜肽形式 (約 50 秒)，如表 3-5。

## 第四章 結論

結合  $T_m$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  及折疊速率的測量，我們推測變異位置在 C 端時，胜肽由 C 端往 N 端的折疊過程需要先克服胺基酸變異所造成的 entropic effect，才能形成較多段也較穩定的 Pro-Hyp-Gly 三股螺旋結構；變異位置在 N 端時，折疊過程中雖然受到 entropic effect 影響較小，但結構折疊到變異位置時會鬆開，且形成較短的 Pro-Hyp-Gly 序列重疊，所得到之 enthalpy 變化亦較小，因此使結構變得更不穩定。

$\beta$ -Ala, L-Ala, D-Ala 取代胜肽中間位置的 Gly 皆無法形成三股螺旋結構，但 Sar 取代胜肽中間位置的 Gly 卻可以形成三股螺旋，只是穩定性較低，表示氫鍵雖然對膠原蛋白穩定性很重要，但 backbone 位置胺基酸之排序是否正確及側鏈存在所造成的立體效應更加影響結構的穩定度。以  $\beta$ -Ala, D-Ala 置換之胜肽穩定性皆低於以 L-Ala 置換之胜肽穩定性，表示胜肽受 backbone 構型改變造成的不穩定影響比側鏈造成的立體效應之影響更大。

$\beta$ -Ala, L-Ala, Sar 的取代結果顯示置換位置在 N 端之胜肽的折疊速率比置換位置在 C 端之胜肽的折疊速率更快，因為少了 C 端變異的阻礙；而  $\beta$ -Ala 沒有側鏈，所以變異位置在兩端時，其結構折疊速率的差異較為接近。不同胺基酸取代在 C 端位置的胜肽折疊速率，以 L-Ala 取代之胜肽的折疊速率最慢，我們推論側鏈對三股螺旋結構造成的立體效應是影響胜肽折疊速率的主要因素。

## 參考文獻 (References)

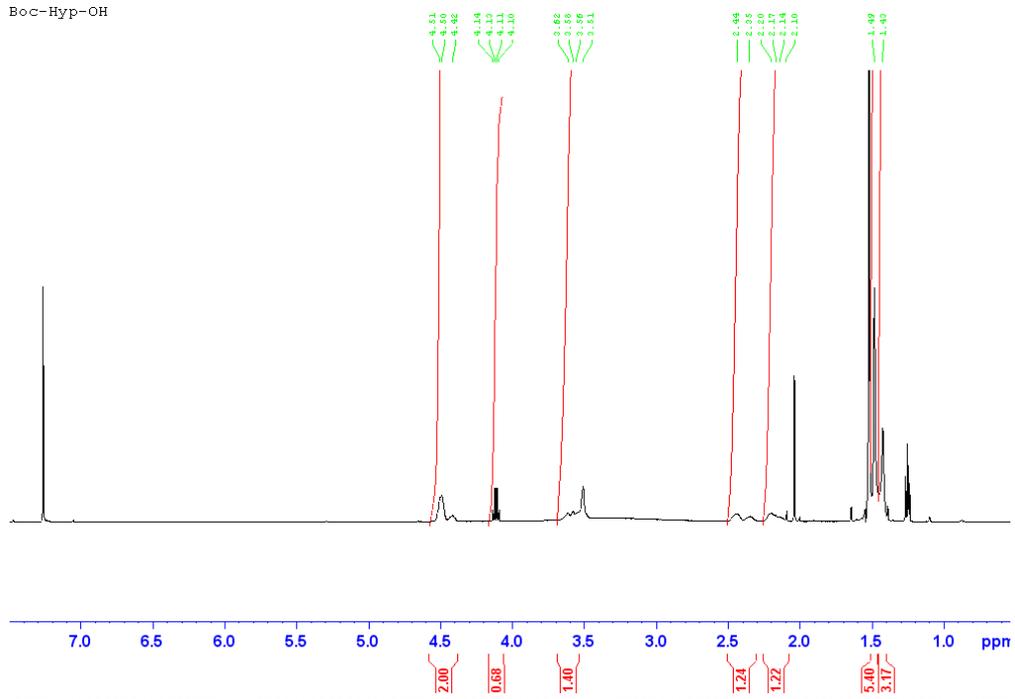
1. Marden, M. C.; Griffon, N.; Poyart, C. *Transfus Clin. Biol.* **1995**, *2*, 473.
2. Brodsky, B.; Persikov, A. V. *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 301.
3. 陳柏翰、劉中行，科學發展期刊，2004年 8月 380期 pp. 4-35.
4. Bella, J.; Eaton, M.; Brodsky, B.; Berman, H. M. *Science* **1994**, *266*, 75.
5. Reyes, C. D.; García, A. J. *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *65A*, 511.
6. Myllyharju, J.; Kivirikko, K. I. *Trends Genet.* **2004**, *20*, 33.
7. Burjanadze, T. V. *Biopolymers* **2000**, *53*, 523.
8. Bretscher, L. E.; Jenkins, C. L.; Taylor, K. M.; DeRider, M. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 777.
9. Vitagliano, L.; Berisio, R.; Mastrangelo, A.; Mazzarella, L.; Zagari, A. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2627.
10. Bella, J.; Berman, H. M. *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 734.
11. Bhate, M.; Wang, X.; Baum, J.; Brodsky, B. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6539.
12. McLaughlin, S. H.; Bulleid, N. J. *Matrix Biol.* **1998**, *16*, 369.
13. Ackerman, M. S.; Bhate, M.; Shenoy, N.; Beck, K.; Ramshaw, J. A. M.; Brodsky, B. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7668.
14. Lamande, S. R.; Bateman, J. F. *Cell Dev. Biol.* **1999**, *10*, 455.
15. Buevich, A. V.; Dai, Q. H.; Liu, X.; Brodsky, B.; Baum, J. *Biochemistry* **2000**, *39*,

- 4299.
16. Buevich, A. V.; Silva, T.; Brodsky, B.; Baum, J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46890.
17. Hinderaker, M. P.; Raines, R. T. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1188.
18. Bella, J.; Brodsky, B.; Berman, H. M. *Structure* **1995**, *3*, 893.
19. Beck, K.; Chan, V. C.; Shenoy, N.; Kirkpatrick, A.; Ramshaw, J. A. M.; Brodsky, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4273.
20. Wang, Q.; Orrison, B. M.; Marini, J. C. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25162.
21. Butcher, D. J.; Luo, Z.; Huang, Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *265*, 350.
22. Feng, Y.; Melacini, G.; Taulane, J. P.; Goodman, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10351.
23. Khew, S. T.; Tong Y. W. *Biochemistry* **2008**, *47*, 585.
24. Lelais, G.; Seebach, D. *Biopolymers* **2004**, *76*, 206.
25. Qiu, J. X.; Petersson, E. J.; Matthews, E. E.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11338.
26. Goodman, J. L.; Petersson, E. J.; Daniels, D. S.; Qiu, J. X.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14746.
27. Krause, E.; Bienert, M.; Schmieder, P.; Wenschuh, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4865.

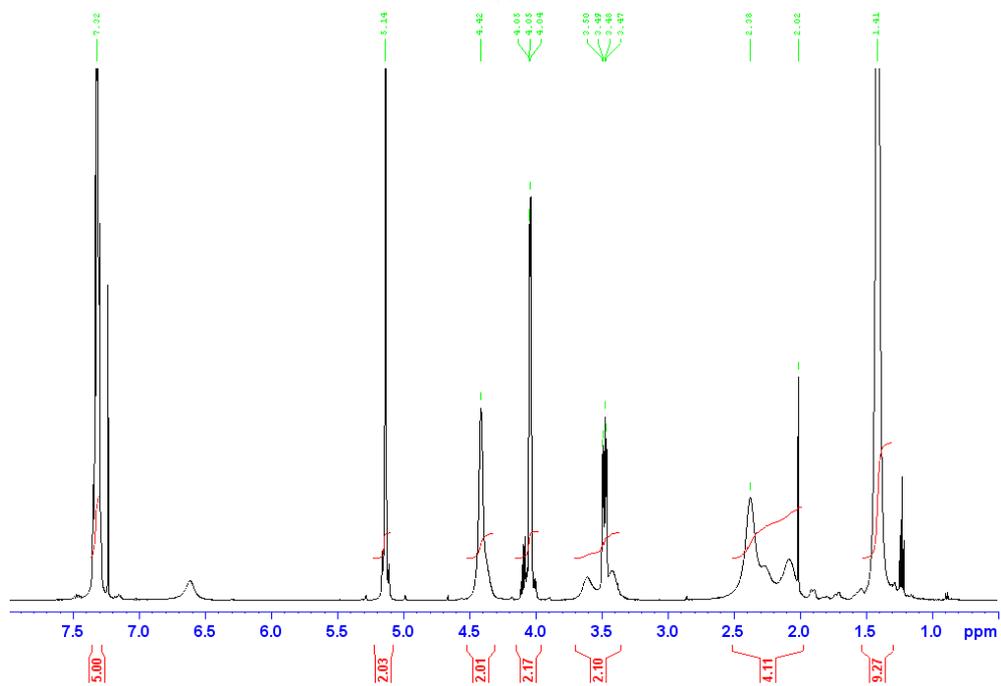


28. Schumacher, M.; Mizuno, K.; Bächinger, H.P. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20397.
29. Anil, B.; Song, B.; Tang, Y.; Raleigh, D.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13194.
30. Valiyaveetil, F.I.; Sekedat, M.; MacKinnon, R.; Muir, T.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17045.
31. Tsai, M.; Xu, Y.; Dannenberg, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14130.
32. Horng, J. C.; Kotch, F. W.; Raines, R. T. *Protein Sci.* **2007**, *16*, 208.
33. Chorghade, M. S.; Mohapatra, D. K.; Sahoo, G.; Gurjar, M. K.; Mandlecha, M. V.; Bhoite, N.; Moghe, S.; Raines, R. T. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 781.
34. Melacini, G.; Feng, Y.; Goodman, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10359.
35. Brodsky, B.; Li, M.; Long, C. G.; Apigo, J.; Baum, J. *Biopolymers* **1992**, *32*, 447.
36. Gauba, V.; Hartgerink, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15034.
37. Gauba, V.; Hartgerink, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7509.
38. Gauba, V.; Hartgerink, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2683.

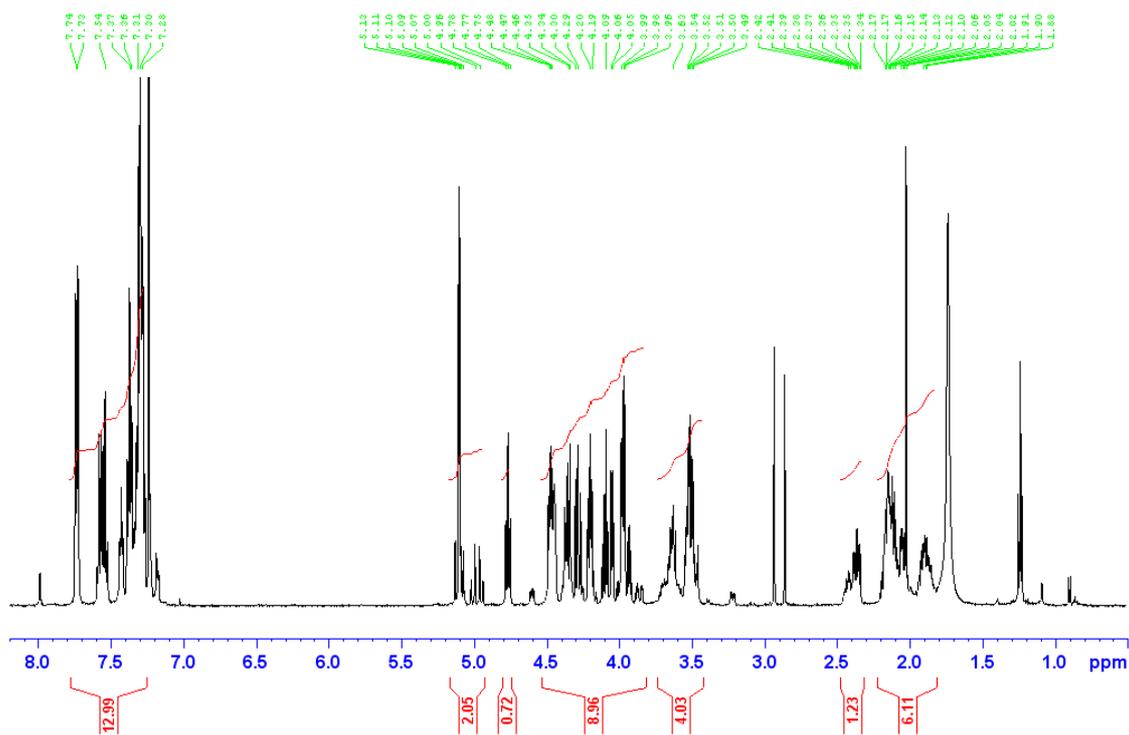
# 附錄



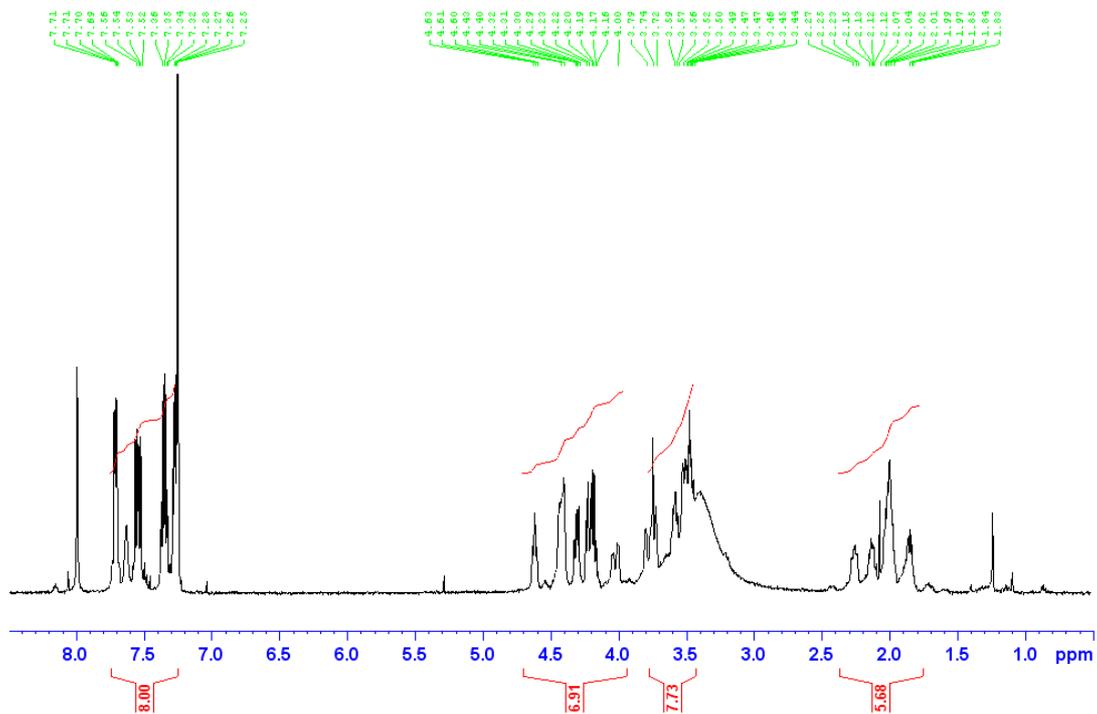
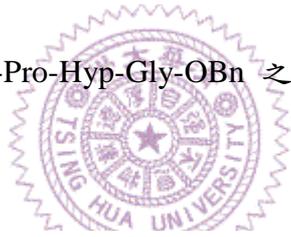
附圖 1. Boc-Hyp-OH 之 NMR 光譜圖



附圖 2. Boc-Hyp-Gly-OBn 之 NMR 光譜圖



附圖 3. Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OBn 之 NMR 光譜圖



附圖 4. Fmoc-Pro-Hyp-Gly-OH 之 NMR 光譜圖