

國立清華大學化學系

碩士論文

(I) 立體電子效應對雞絨毛蛋白 (HP36) 結構影響之探討與 (II)

電子自旋標記聚脯氨酸的合成及電子自旋共振光譜之量測

(I) Stereoelectronic Effects on Villin Headpiece Subdomain

(HP36) Structure and Stability, and (II) Synthesis and EPR

Measurements of Spin-labeled Polyproline Peptides

指導教授：洪嘉呈博士 (Dr. Jia-Cherng Horng)

研究生：鄭統元 (Tong-Yuan Zheng)

學號：9623540

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

學系
化學 研究所 鄭統元 君所提之論文

I、立體電子效應對雞絨毛蛋白 (HP36) 結構影響之探討

II、電子自旋標記聚脯胺酸的合成及電子自旋共振光譜之量測

經由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 洪嘉弘 (簽章)

中華民國 九十八年 七月 十七日

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 鄭統元 君所提之論文

I、立體電子效應對雞絨毛蛋白 (HP36) 結構影響之探討

II、電子自旋標記聚脯胺酸的合成及電子自旋共振光譜之量測 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 李政怡

洪嘉立

中華民國 九十八年 七月 十七日

謝誌

很快的就過了這兩年研究所的日子，在這些日子裡我受到了很多人的幫忙，也一起度過快樂的歲月。在這個學習的歷程中，我最要感謝的是我的指導教授洪嘉呈老師，感謝老師在課業與研究上面指導，並以討論的方式來教導我，使我在研究上更有想法與概念。老師對我們而言比較像是學長的感覺，讓實驗室時常充滿著歡樂的氣氛。真的謝謝老師這兩年的教導與包容。

再來我要感謝我的兩位口試委員：江昀緯老師與李政怡老師。感謝江老師在這兩年中的教導與實驗上的建議，在最後的一個月才知道是以前中山的學長，讓我倍感親切。我也很謝謝李老師千里迢迢來參加我的口試，並且教導我一些不夠了解的部分，還稱讚我的論文豐富讓我更有信心。在此由衷地感謝兩位老師。

接著我要感謝我實驗室的夥伴們：謝謝怡珊、阿罵、姜君在這兩年中的關心與打氣，也在實驗上給了我很多建議與幫助。也很感謝學弟妹育如、時雨、佳青，除了在實驗上給了我很多幫助與支援外，更重要的是帶給我很多的歡樂。也很感謝專題生徐維、中則、威德、睿言、維麟，帶給我們實驗室很多的活潑生氣，我要特別感謝睿言與維麟，在我的實驗上幫了很多的忙。很高興能遇到大家，讓我的實驗生活可以變的歡樂。

另外，我要感謝諮商中心的老師與朋友們：謝謝錦慧、美如、阿娘、翠華老師，在我實驗不順遂的時候給我加油打氣，幫我按摩還請我吃飯，讓我疲憊的心情一掃而空。義工團的夥伴們：均汎、怡婷、Sky、妹弟、阿娟、梓儀、函健、鮪魚、小寶、昱宏、Joy，有你們讓我覺得好溫馨，讓我在清大有個溫暖的家。

最後我要感謝我的家人，沒有他們的照顧和支持不會有今天的我。謝謝我的爸媽辛勤的工作來培養我，謝謝我的乾媽給我很多建議與支持，謝謝我的姑姑給我關心和照顧，也謝謝家裡每個人所給予我的一切。

感謝上帝可以讓我得到那麼多人的幫助，這篇論文是靠大家的給予所完成的。感謝所有我愛的與愛我的人，讓我的人生充滿歡樂與喜悅。真的謝謝你們!!

中文摘要

第一部分為研究立體電子效應在雞絨毛蛋白上的作用。脯胺酸 (proline) 會形成 *exo* 或是 *endo* 的構形，當 4*R* (反式) 位置有拉電子基取代時偏好 *C γ exo* 構形，而 4*S* (順式) 則偏好 *C γ endo* 構形，造成這樣的原因我們稱之立體電子效應。在小蛋白 Trp-cage 的研究例子中，增加脯胺酸的 *exo* 構形傾向時，其螺旋結構穩定度會增加，而此脯胺酸是位於 Trp-cage 螺旋的碳端。為了探討當立體電子效應發生於螺旋的氮端時，是否也能穩定螺旋結構，因此我們利用具有 36 個胺基酸的雞絨毛蛋白 (HP36) 來作為研究之蛋白模型。經由 CD 量測之變溫實驗與化學誘導變性實驗，我們發現當脯胺酸置換成 4*R* 位置有拉電子基之脯胺酸衍生物 (4*R*-proline derivatives) 時，HP36 的穩定度會略為下降，這是因為在 HP36 中的 Pro62 會與 Trp64 有著 proline-aromatic 作用力，所以這樣的置換會破壞 proline-aromatic 作用力，並且也會增加其立體空間障礙，導致 HP36 的不穩定。

第二部分為研究聚脯胺酸第二型結構 (polyproline type II, PPII) 的 EPR 光譜規則建立。在 α -螺旋胜肽的例子中，已成功利用兩個電子自旋標記接在胜肽上，並利用 EPR 光譜量測胺基酸間之距離。在此我們合成一系列的聚脯胺酸胜肽，並成功地製備了含有電子自旋標記的胜肽，且進一步用 EPR 光譜量測兩個電子自旋標記之間的距離；在經過一系列的數學運算後，分析計算 EPR 光譜以得到電子自旋標記間之距離。利用這樣的方法計算出 PPII 中，每個胺基酸的距

離為 0.31 nm ，這與 PPII 模型的理論值相同，所以我們成功的利用 EPR 光譜

來量測 PPII 結構中胺基酸之間的距離。



Abstract

The first part of this thesis is about stereoelectronic effects on villin headpiece subdomain (HP36). Proline can form either a C γ *exo* ring pucker or a C γ *endo* ring pucker. An electron-withdrawing substituent at the 4*R* position of proline makes proline favor an *exo* ring pucker, while that at the 4*S* position favors an *endo* ring pucker due to stereoelectronic effects. Stereoelectronic effects have been shown to tune the stability of a small helical protein, the Trp-cage. In the Trp-cage, increasing the *exo* ring pucker propensity at C-terminus of the helix can stabilize the protein. To investigate stereoelectronic effects on the N-terminus of an α -helix, we use a 36-residue helical protein, the villin headpiece subdomain (HP36), as our protein model. A few proline derivatives including (4*R*,2*S*)-4-hydroxyproline, (4*R*,2*S*)-4-methoxyproline, and (4*R*,2*S*)-4-fluoroproline were used to replace the proline in HP36. Thermal unfolding and urea denaturation measurements by CD spectroscopy have shown that the mutation destabilized the protein. Our primary results suggest that there are not only stereoelectronic effects but also proline-aromatic interactions and steric effects affecting the structure in this region.

The second part of this thesis is about establishing the PPII spectrum rule by EPR. We utilized double spin labels to get the dipole-dipole moment which can be used to calculate the distance between two spin labels. A series of polyproline

peptides were designed and synthesized for this purpose. The spin-labeled peptides were successfully prepared for EPR measurements. An mathematical method was applied to calculate the distance between amino acids in PPII helices. The value of 0.31 nm between two adjacent residues is consistent with the theoretical distance for a PPII helix.



目錄

中文摘要	i
Abstract	iii
目錄	v
圖目錄	x
表目錄	xiv
第一部份 立體電子效應對雞絨毛蛋結構影響之探討	1
一、前言	1
1.1 雞絨毛蛋白 (Villin) 簡介	1
1.2 Headpiece 介紹	4
1.3 立體電子效應 (stereoelectronic effect)	7
1.4 固相胜肽合成法	13
1.4.1、酯化反應 (Esterification)	17
1.4.2、去保護 (Deprotection)	17
1.4.3、活化 (Activation)	18
1.4.4、耦合 (Coupling)	20
1.4.5、切除 (Cleavage)	20
1.5 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism)	22
1.5.1 α -螺旋 (α -helix)	26

1.5.2 β -平板 (β -sheet)	27
1.5.3 β -轉折 (β -turn)	27
1.5.4 聚脯氨酸 II 螺旋 (Polyproline II helix, 簡寫：PPII)	28
1.5.5 無序纏捲 (Random coil)	28
1.6 研究動機	29
二、實驗步驟	31
2.1 實驗步驟流程	31
2.2 實驗儀器型號	32
2.3 使用藥品	33
2.4 脯氨酸衍生物 Fmoc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline 之合成	36
2.4.1 化合物 Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-hydroxyproline (2) 之合成	36
2.4.2 化合物 Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline (3)之合成	37
2.4.3 化合物 Fmoc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline (4) 之合成	38
2.5 HP36 和 HP15 系列胜肽之合成	38
2.6 切除 (cleavage)	41
2.7 利用高壓液相層析儀 HPLC 進行純化	41
2.8 HP36 系列或 HP15 胜肽鏈之分子量	42
2.9 利用 UV 光譜判定濃度	42
2.10 CD 光譜量測	43

2.10.1 Far-UV CD 光譜 (Wavelength scans)	43
2.10.2 變溫 CD 光譜量測 (Thermal denaturation)	44
2.10.3 化學誘導變性之 CD 光譜量測 (Chemical denaturation)	44
2.10.4 HP15 加入 TFE (trifluoroethanol) 的 far-UV CD 光譜實驗	45
2.11 CD 光譜資料處理	45
2.11.1 α -螺旋的含量比例	45
2.11.2 CD 變溫實驗的數據處理	46
2.11.3 化學誘導變性 CD 實驗的數據處理	48
2.12 NMR 光譜	51
2.13 螢光光譜	51
三、結果與討論	52
3.1 HP36 系列胜肽 CD 量測探討	52
3.2 變溫實驗探討	53
3.3 CD 化學誘導變性實驗探討	55
3.4 HP15 系列胜肽之 far-UV CD 光譜探討	57
3.5 HP36 系列胜肽之 1D NMR 光譜	60
3.6 HP36 系列胜肽之 2D NMR 光譜	62
3.7 HP36 系列胜肽之螢光光譜	67
3.8 結果討論	68



第二部分 電子自旋標記聚脯胺酸的合成及電子自旋共振光譜之量測	73
四、前言	73
4.1 聚脯胺酸 (polyproline) 介紹	73
4.2 電子自旋共振 (EPR)	76
4.3 實驗目的	81
4.4 胜肽鏈的設計與電子自旋標記反應	82
五、實驗步驟	84
5.1 實驗步驟流程	84
5.2 實驗儀器	85
5.3 使用藥品	85
5.4 實驗進行	85
5.4.1 PC 系列胜肽鏈之合成	85
5.4.2 切除 (cleavage)	87
5.4.3 利用高壓液相層析儀 HPLC 純化 PC 系列胜肽	87
5.4.4 各 PC 胜肽鏈之分子量	88
5.4.5 PC 系列進行電子自旋標記反應	88
5.4.6 EPR 溶液配置	89
5.4.7 PC 系列進行 CD 光譜測量	90
六、結果與討論	91



6.1 蔗糖溶液濃度的選擇	91
6.2 溫度條件的選擇	92
6.3 甘油溶液濃度的選擇	93
6.4 用 CD 光譜佐證 PC 系列與 PC-R1 之構型	95
6.5 利用 EPR 方法與數學運算建立 PPII 的 EPR 光譜規則	97
結論	99
參考文獻 (References)	101
附錄	105



圖目錄

圖 1.1 a. 腸道細胞的纖毛刷狀邊緣示意圖； b. 十二指腸細胞纖毛刷狀邊緣	1
圖 1.2 雞絨毛蛋白 (villin) 的超家族 (superfamily) 單元結構示意圖	2
圖 1.3 雞絨毛蛋白 (villin) 與 F-肌動蛋白 (F-actin) 結合示意圖	3
圖 1.4 HP36 之 X-Ray 晶格繞射結構與胺基酸序列	6
圖 1.5 Pro-Trp 作用力穩定迷你蛋白的例子	8
圖 1.6 脯胺酸的兩種構形	9
圖 1.7 順式與反式所傾向的 <i>endo</i> 或 <i>exo</i> 構型	9
圖 1.8 N-formyl-L-proline methyl ester 順式反式平衡的化學式	10
圖 1.9 a. N-formyl-L-proline methyl ester 的架構圖； b. 為軌域圖	10
圖 1.10 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 的 <i>exo</i> 構形立體結構圖	11
圖 1.11 Ac-L-Phe-hyp-NHMe 的 <i>endo</i> 構形立體結構圖	11
圖 1.12 a. 為 Trp-cage 的結構； b. 為所置換的脯胺酸衍生物	12
圖 1.13 固態肽合成法之合成過程	15
圖 1.14 去除 Fmoc 保護基的機制	18
圖 1.15 去除 Boc 保護基的機制	18
圖 1.16 HBTU 之活化反應	19
圖 1.17 以 HBTU 為活化劑之耦合反應	20
圖 1.18 切除試劑的選擇概要	21

圖 1.19 光通過平面極化器(polarized)之示意圖	23
圖 1.20 電磁波之電場 (E) 與磁場 (M) 示意圖	23
圖 1.21 圓偏極光的示意圖	23
圖 1.22 線性偏極光的偏轉	24
圖 1.23 圓二光譜儀 (CD) 測量在不同波長範圍與分析的各級結構	27
圖 1.25 各結構的圓二色光譜儀 (CD)訊號	28
圖 2.1 脯胺酸之反式衍生物	39
圖 2.2 典型變溫實驗的 CD 光譜特徵曲線	47
圖 2.3 典型化學誘導變性實驗的 CD 光譜特徵曲線	49
圖 2.4 化學試劑濃度與 $\Delta G_U^{\circ} (den)$ 的關係	50
圖 3.1 HP36 系列胜肽 far-UV CD 光譜，在 25 °C 下	52
圖 3.2 利用 CD 量測 HP36 系列胜肽之熱融化曲線	53
圖 3.3 HP36 的化學誘導變性 CD 訊號圖	56
圖 3.4 WT-HP15 在不同百分比 (v/v) 的 TFE 溶液中的 far-UV CD 光譜	57
圖 3.5 O-HP15 在不同百分比 (v/v) 的 TFE 溶液中的 far-UV CD 光譜	58
圖 3.6 F-HP15 在不同百分比 (v/v) 的 TFE 溶液中的 far-UV CD 光譜	58
圖 3.7 在不同百分比 (v/v) 的 TFE 溶液中的 α -螺旋比例 ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$)	59
圖 3.8 HP36 系列胜肽 1D ^1H -NMR 圖譜	60
圖 3.9 HP36 系列胜肽 1D ^1H -NMR -1.0 ppm 至 2.0 ppm 範圍圖譜	61

圖 3.10 HP36 系列 1D ^1H -NMR 5.0 ppm 至 7.0 ppm 範圍圖譜	62
圖 3.11 經由 2D ^1H -NMR 光譜判斷出 O-HP36 之 H_α 化學位移	64
圖 3.12 經由 2D ^1H -NMR 光譜判斷出 M-HP36 之 H_α 化學位移	65
圖 3.13 經由 2D ^1H -NMR 光譜判斷出 F-HP36 之 H_α 化學位移	66
圖 3.14 HP36 系列胜肽的螢光光譜圖	67
圖 3.15 PLWK 片段結構圖	70
圖 3.16 a. 脯胺酸 θ 與類苯環側鏈 P 的相對角度參數；b. 苯環類結構與脯胺酸之側鏈碳上的氫作用示意圖， ϕ 為類苯環中心與作用碳連線的差角；c. 利用參數 P 與 θ 將脯胺酸與類苯環側鏈作用歸類成基本的九種作用之圖形	71
圖 4.1 a. 膠原蛋白示意圖；b. 三股聚脯胺酸之作用力示意圖	73
圖 4.2 GYF 區位錯合的 NMR 結構圖	74
圖 4.3 a. 聚脯胺酸的順式與反式示意圖；b. 聚脯胺酸的兩個構形	75
圖 4.4 電子自旋在磁場中造成能階分裂，並分裂能量與外加磁場強度成正比示意圖	78
圖 4.5 EPR 的訊號圖	79
圖 4.3 MTSSL 與半胱胺酸反應式	83
圖 6.1 PC5-R1 於 275 K 時，在不同蔗糖濃度溶液下的 EPR 訊號	91
圖 6.2 PC 系列胜肽鏈在 40% 蔗糖水溶液，200 K 下的 EPR 訊號圖	92
圖 6.3 PC 系列胜肽鏈在 40% 蔗糖水溶液，250 K 下的 EPR 訊號圖	93
圖 6.4 PC 系列胜肽鏈在 40% 蔗糖水溶液，275 K 下的 EPR 訊號圖	94
圖 6.5 PC59-R1 於 250 K 時，在不同甘油濃度溶液下的 EPR 訊號	94

圖 6.6 PC 系列胜肽鏈在 50% 甘油水溶液， 250 K 下的 EPR 訊號圖	95
圖 6.7 PC 系列胜肽鏈在 50% 甘油水溶液， 275 K 下的 EPR 訊號圖	95
圖 6.8 PC510 與 PC510-R1 在不同溶液中的 CD 光譜圖	96
圖 6.9 a. 在 40% 的蔗糖水溶液， 275 K 下兩個電子自旋標記間距離的分布圖； b. 在 50% 的甘油水溶液， 250 K (實線) 與 275 K (虛線) 下兩個電子自旋標記 間距離的分布圖；c. 兩電子自旋標記距離對半胱氨酸位置作圖。	98



表目錄

表 1.1 脯氨酸衍生物在 AcYaaOMe 中，其胜肽鍵順式與反式的平衡常數	12
表 1.2 Trp-cage 之脯氨酸衍生物 CD 數據	13
表 1.3 胜肽合成方法使用之活化劑與 N 端保護基之結構式	16
表 2.1 HP36 系列與 HP15 系列之胺基酸序列表	39
表 2.2 HP36 系列胜肽合成：合成儀步驟條件設定	40
表 2.3 HP36 系列胜肽合成：cleavage cocktail 的配方	41
表 3.1 HP36 系列胜肽之 α -螺旋含量	53
表 3.2 HP36 系列的 T_m 值	55
表 3.3 HP36 系列的 $\Delta G_u^o(H_2O)$ 、m-value 值與 C_M 值	56
表 3.4 HP15 在水溶液中 (0% TFE) 的 α -螺旋比例 ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$)	59
表 3.5 HP36 系列胜肽的 NH 與 H_α 的 NMR 化學位移	63
表 3.6 HP36 系列胜肽的螢光放射 (emission) 最大訊號之波長	68
表 3.7 WT-HP36 的溶劑可接觸表面面積 (Solvent accessible surface areas)	69
表 4.1 PC 系列之胺基酸序列表	83
表 5.1 PC 系列胜肽合成：合成儀步驟條件設定	86
表 5.2 PC 系列胜肽合成：cleavage cocktail 的配方	87

第一部份 立體電子效應對雞絨毛蛋白 (Villin headpiece subdomain, HP 36) 結構影響之探討

一、前言

1.1 雞絨毛蛋白 (Villin) 簡介

雞絨毛蛋白 (Villin) 是一種特化的組織中的一種蛋白質，其分子量約為 92.5 kDa。主要被發現於腸道細胞與腎臟細胞的刷狀邊緣 (brush border)。刷狀邊緣是腸道細胞的纖毛所形成的刷狀表面。腸道細胞特化其細胞膜形成刷毛的形狀來增加其表面積 (圖 1.1)，以更利於腸道細胞有效率的吸收養分¹。

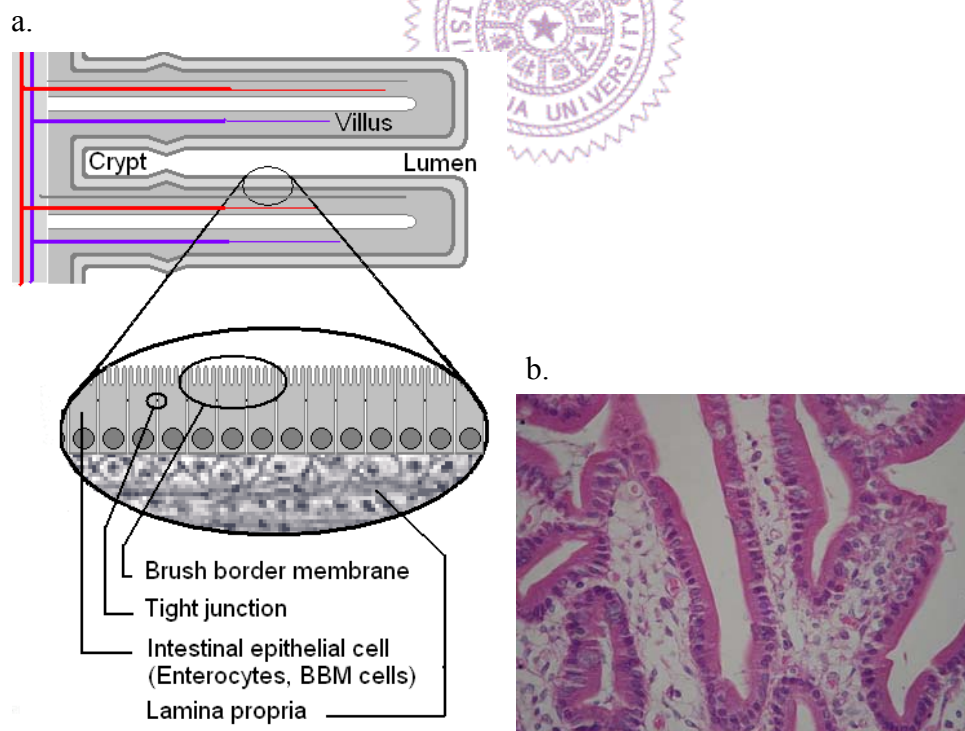
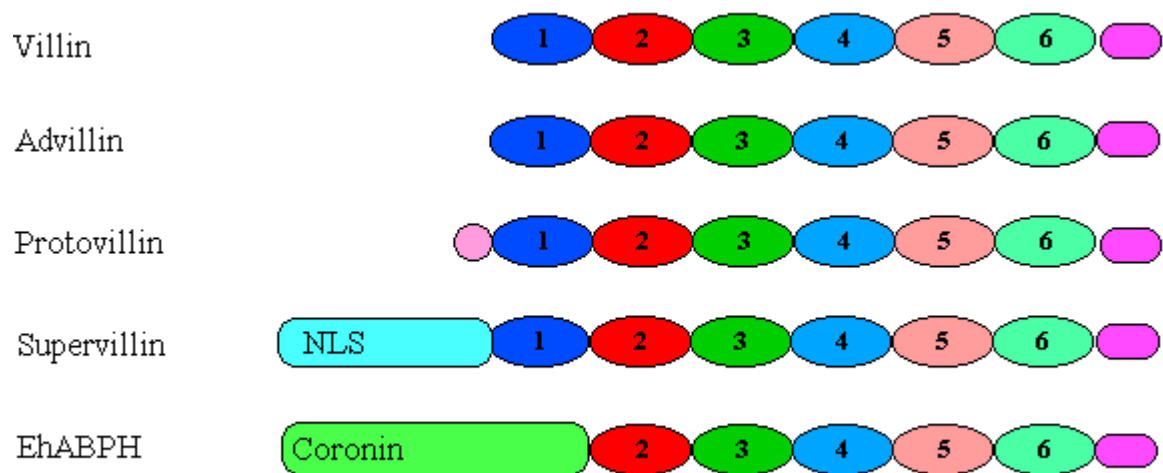


圖 1.1 a. 腸道細胞的纖毛刷狀邊緣示意圖； b. 十二指腸細胞纖毛刷狀邊緣。

雞絨毛蛋白是由主要由七個單元 (domain) 所構成：主體由位於氮端 (N-terminal) 的六個同源單元 (homologous domain) 構成，每個單元約由 150 個殘基 (residues) 組成的；最後一個單元則是位於末碳端 (C-terminal) 的 headpiece²。自然界中有類似這樣的結構，就會被歸類為雞絨毛蛋白 (villin) 的超家族 (superfamily)。



S.Maciver (c) 2001

圖 1.2：雞絨毛蛋白 (villin) 的超家族 (superfamily) 單元結構示意圖，最後一段紫粉色為 headpiece。

雞絨毛蛋白會與細胞中的肌動蛋白 (actin) 束作用，以形成高組織性的結構，進而成為細胞的支撐骨架。這些作用包含：綁束 (bundling)、積聚 (nucleation)、覆蓋 (capping)、切隔 (severing)。在脊椎動物中，雞絨毛蛋白的作用機制還未被完全理解，但是被認為也能經由切隔 F-肌動蛋白 (F-actin) 來調控細胞的彈性。雞絨毛蛋白碳端的 headpiece 會連結肌動蛋白；但雞絨毛蛋白氮端核心部分在適當的鈣離子濃度下則會切隔開 F-肌動蛋白。在正常的小鼠中，升

高鈣離子的濃度可以觀察到肌動蛋白被切隔開來；而在沒有雞絨毛蛋白的小鼠中，則觀察不到這樣的現象。鈣離子在低濃度時，碳端的 headpiece 將肌動蛋白綁束起來；加高鈣離子濃度後，雞絨毛蛋白的氮端就會將肌動蛋白切隔或是覆蓋起來，來增加肌動蛋白間的空隙。所以在雞絨毛蛋白的作用下，可以經由鈣離子來調控肌動蛋白間的緊密度與彈性。

雞絨毛蛋白具有三個 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) 的鍵結位置，其中一個就位在於 headpiece 單元上。PIP₂ 與雞絨毛蛋白連結後會抑制切隔或覆蓋肌動蛋白的動作，並且增加 headpiece 與肌動蛋白的結合作用。這樣的結合被推測是由於蛋白質形狀架構改變所造成的。PIP₂ 除了會抑制切隔或覆蓋肌動蛋白的動作外，也會刺激細胞釋放更多的肌動蛋白單體來積聚，以形成更緊密的肌動蛋白束²。

這個 headpiece 單元涉及與 F-肌動蛋白 (F-actin) 的結合，而其中分別由 K38、E39、K65、K70、K71、E72、K73、G74、L75 和 F76 分布於一個疏水性核心 (hydrophobic core) 周圍，這個部分被認為就是與 F-肌動蛋白結合的位置。

胺基酸 E39 和 K70 所形成的鹽橋 (salt bridge) 除了將 headpiece 單元的氮端與碳端拉近以外，在一些研究報告裡也顯示：當缺少此鹽橋時，headpiece 即不與 F-肌動蛋白形成連結狀態⁴。

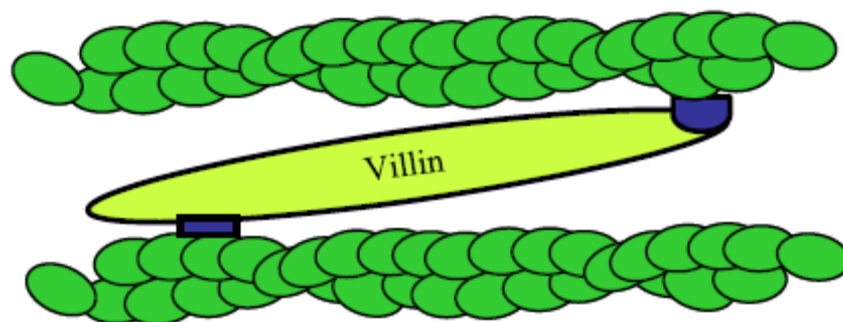





圖 1.3: 雞絨毛蛋白 (villin) 與 F-肌動蛋白 (F-actin) 結合示意圖  : Headpiece 與肌動蛋白作用處；  : F-肌動蛋白；  : 雞絨毛蛋白 N 端涉及切隔肌動蛋白處³。

胺基酸 W64 的支鏈也扮演著特別的角色，W64 形成一個疏水性的蓋子 (cap)，在這蓋子之後的一系列位置都帶有正電荷或負電荷，W64 在 villin 家族中的蛋白質幾乎都可觀察到⁵。當把 W64 變異 (Mutate) 成 A (丙胺酸, Alanine, Ala) 時，headpiece 與 F-肌動蛋白的作用活性會明顯減弱。Villin 可以進行轉譯後修飾 (post-translational modifications)，例如將酪胺酸 (tyrosine) 磷酸化⁶。Villin 也會形成雙體 (dimer)，而其雙體化 (dimerize) 作用的位置就位於其整體的末碳端³。

1.2 Headpiece 介紹

Headpiece (HP) 位在雞絨毛蛋白末碳端，約由 76 個胺基酸構成一個會與 F-肌動蛋白結合的功能單元。其中前面 9 個胺基酸可以在不影響結構穩定度與生物活性的情況下被拿掉，所以大部分實驗室的研究對象為第 10 個胺基酸到第 76 個胺基酸 (HP67)。HP67 還可以繼續維持與 F-肌動蛋白的結合。而

Headpiece 依其結構又可分成兩個次功能區 (subdomain)，在 41 號胺基酸以前的氮端次功能區 (nHP) 主要由轉折 (turn) 的構型組成，其形狀結構在 pH 值小於 5 時便會呈現無折疊 (unfolded) 結構狀態；而在之後的碳端次功能區 (cHP) 由 Leu42 - Phe76 這區段 35 個胺基酸組成，其主要結構由 3 個 α -螺旋 (α -helix) 所組成。相較於 nHP 來說，cHP 在同樣的條件下依舊可以保有其折疊 (folded) 結構。這碳末端的 35 個胺基酸即稱為 HP35。而在很多研究的系統中，都會在氮端加上一個 Met41，這是因為利用生物系統來表現 (expression) 這個蛋白質時，會自動多加一個 Met，所以為方便比較以合成的方式也會加上此 Met41，此時即稱為 HP36。在 CD (circular dichroism) 的實驗中，HP35 與 HP36 在構型與穩定度的訊號都十分接近⁷。



HP36 很小卻具有安定的構型，並且可以維持部份生物功能，因此可被當成一個迷你功能區 (minidomain)。這麼小的蛋白質分子要能維持構型，通常會包含特化的胺基酸、金屬輔因子 (metal cofactor)，或是雙硫鍵橋 (disulfide bridges)。但 HP36 並沒有以上幾個因子來幫助穩定，因此成為一個很特別的研究對象。除此之外，HP36 還具有近乎同步地 (cooperatively) 折疊過程，其折疊時間約為 3.23 μ s⁸。所以 HP36 因其體積小、折疊又快速，所以在理論與電腦計算上被很廣泛的研究，用來建立蛋白質的折疊與動力學模型。

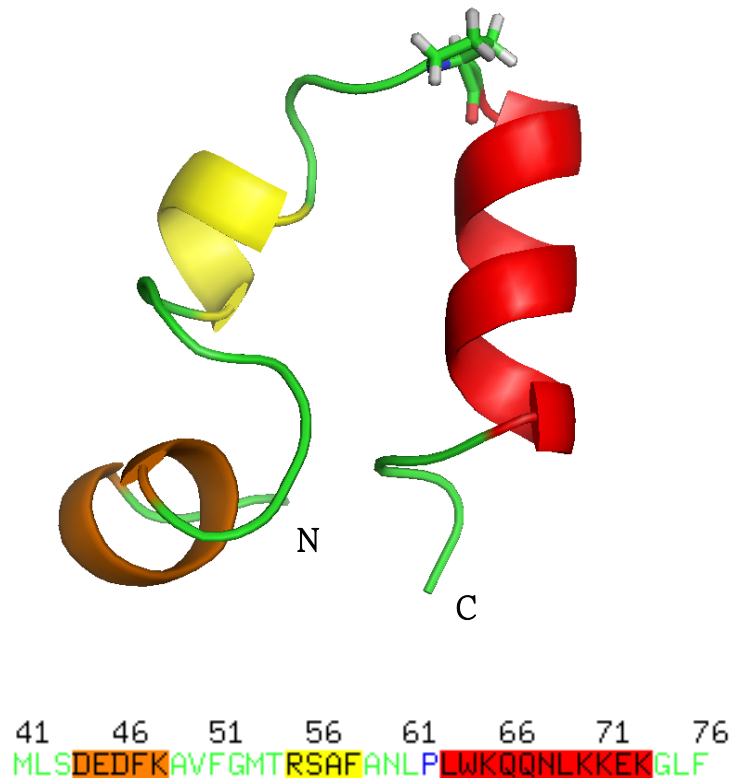


圖 1.4 HP36 之 X-Ray 晶格繞射結構與胺基酸序列，棕色部分為第一個 α -螺旋；黃色部分為第二個 α -螺旋；紅色部分為第三個 α -螺旋；P62 以藍色表示，並以棒狀顯示其立體分子結構。N 表示氮端、C 表示碳端 (PDB 編碼：1VII)

HP36 的結構穩定因素很多，主要是由一個由 F47、F51、F58 三個苯丙胺酸 (phenylalanine, Phe) 和 V50 纈胺酸 (valine, Val) 所形成的疏水性核心，來穩固整個結構。當其中任一苯丙胺酸被置換成亮胺酸 (leucine, Lue) 時都會造成穩定度大幅下降⁹，當置換的苯丙胺酸越多，其結構越不穩。這是因為 aromatic-aromatic interaction 在三個苯丙胺酸中扮演重要的角色。

除了 aromatic-aromatic interaction 以外，proline-aromatic interaction 也是個重要的作用力。HP36 其第三個 α -螺旋的氮端部位的 PLWK 序列也被認為是一個很關鍵的部位。這段序列是暴露在溶液中的疏水性群聚 (cluster)，並且涉

及到整體 HP36 折疊的結構穩定。在生物演化中，這個部位被高度的保留下來，在 villin 家族中的蛋白質常可以觀察到這樣的序列。這個序列被高度保留的原因，可能是因 Trp64 是與 F-肌動蛋白連結的部分，所以 PLWK 這段序列必須保持著特別空間結構使得 Trp64 能以正確的方式與 F-肌動蛋白連結¹¹，尤其是 Pro-Trp 所提供的作用力，即為 proline-aromatic 作用力。

Proline-aromatic 作用力在很多蛋白質中都看的見。在文獻中，自然界中 45% 的脯氨酸都有牽涉到 proline-aromatic 作用力，其中有 30% 是與色胺酸 (Trp) 作用¹¹。觀察一些迷你蛋白會發現，Pro-Trp 作用力在摺疊的穩定過程是個常見的作用力 (圖 1.5)。



1.3 立體電子效應 (stereoelectronic effects)

脯氨酸是二十個常見的胺基酸中唯一具有脂肪族環 (aliphatic ring) 的胺基酸，因此在結構上有較多的限制，並具有特定結構的特色。脯氨酸大多出現在轉折 (turn)、環線 (loop)、或是二級結構的終端位置。脯氨酸與其衍生物主要可以形成兩種構形，一種為 C_{γ} -*exo*，另一種為 C_{γ} -*endo* (圖 1.6)。

當脯氨酸的 C_{γ} 位置有拉電子的官能基時，其與 R1 (與下個胺基酸的相對位置成反式) 或 R2 (與下個胺基酸的相對位置成順式) 位置會影響脯氨酸所傾向的構形，當拉電子基置放於 R1 時，脯氨酸衍生物偏好於 *exo* 構形；當拉電子基置放於 R2 時，脯氨酸衍生物則會增加傾向 *endo* 構形 (圖 1.7)。

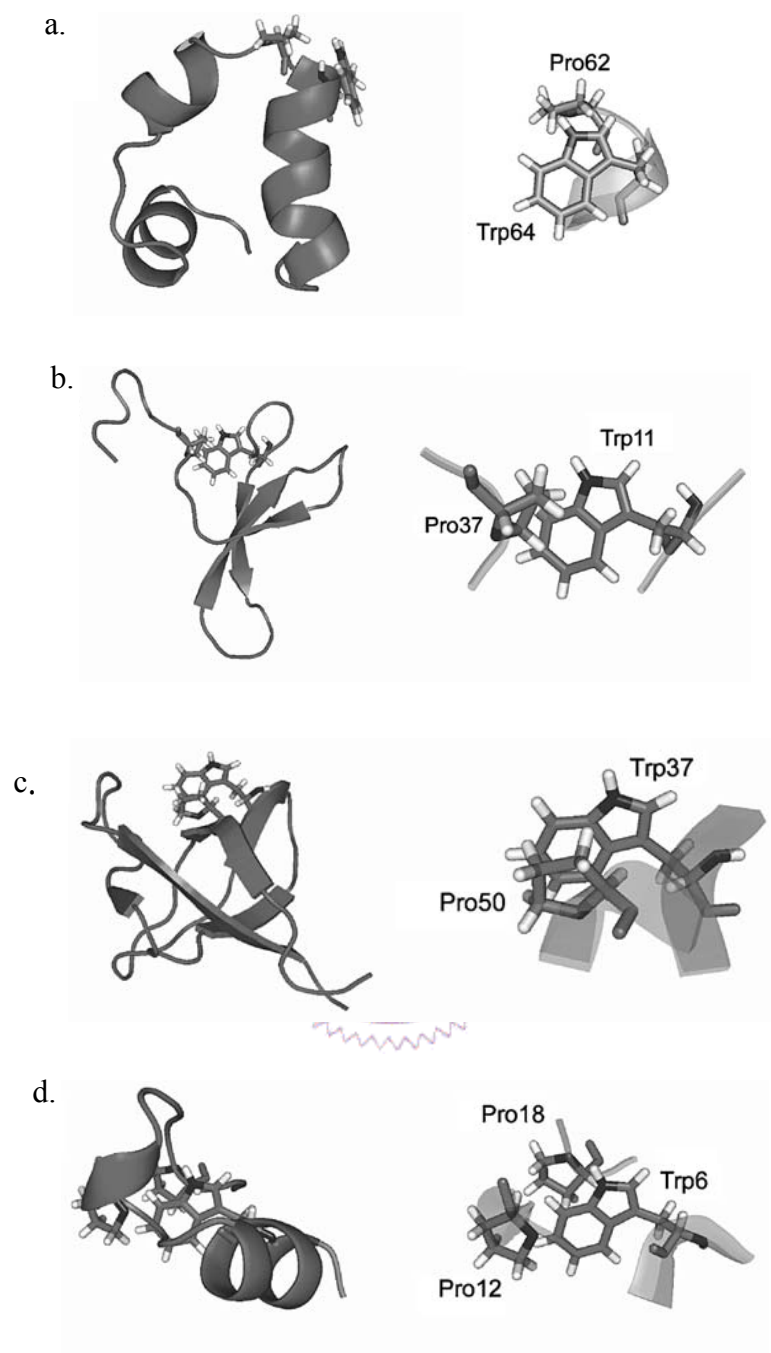


圖 1.5 Pro-Trp 作用力穩定迷你蛋白的例子； a. HP36 (PDB 編碼 1UNC)； b. WW domain (PDB 編碼 1I6C)； c. SH3 domain (PDB 編碼 1GFC)； d. Trp-cage (PDB 編碼 1L2Y)。右邊的部分為 Pro-Trp 作用位置的放大圖¹²。

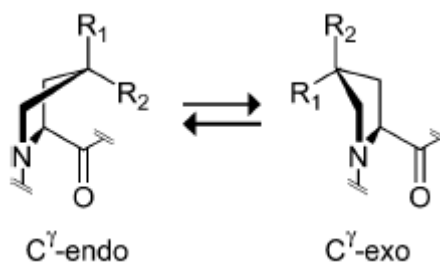


圖 1.6 脯氨酸的兩種構形：左邊為 C_{γ} -endo，右邊為 C_{γ} -exo。

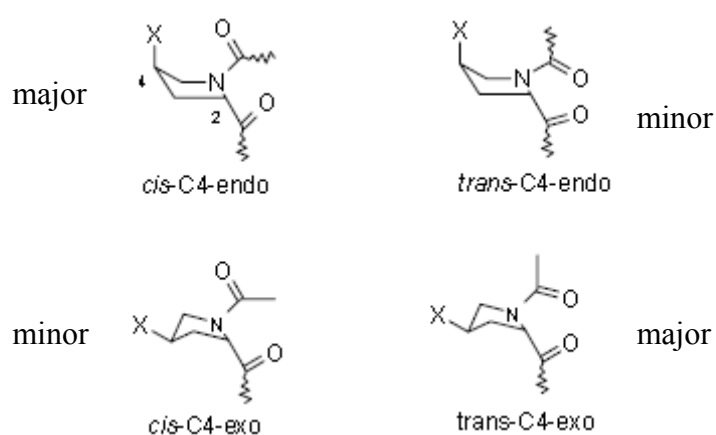


圖 1.7 順式與反式所傾向的 *endo* 或 *exo* 構型

立體效應 (steric effect) 常被用來解釋分子結構的穩定度，然而 Raines 團隊在研究 N-formyl-L-proline methyl ester 化合物 (圖 1.8) 時發現，假若只有單純立體效應的影響，此化合物的 $K_{trans/cis}$ 應該小於 1 (偏好順式)，但是實驗結果卻為 $K_{trans/cis} = 1.8$ ，顯示立體效應不是造成此化合物偏向形成反式構形的主要原因

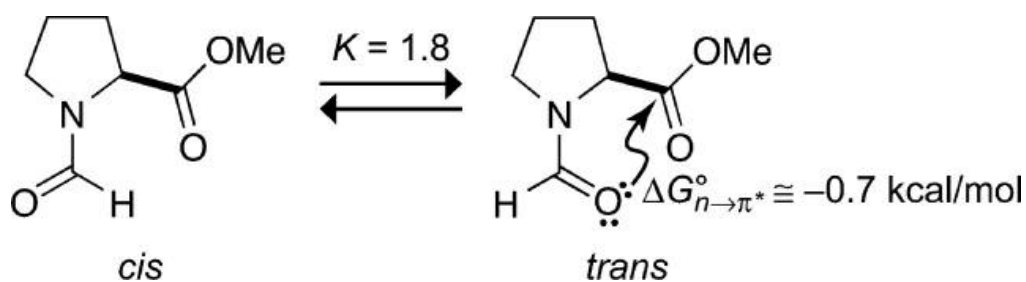


圖 1.8 N-formyl-L-proline methyl ester 順式反式平衡的化學式¹³

因此 Raines 團隊利用一系列脯胺酸以及脯胺酸衍生物，進行胜肽鍵的研究，提出在脯胺酸上會有超共軛現象，即 $n \rightarrow \pi^*$ 作用力 ($n \rightarrow \pi^*$ interaction)，圖 1.9。 $n \rightarrow \pi^*$ 作用力是指醯胺基 (amide) 上氧原子未鍵結軌域 (nonbonding orbital) 電子與酯基 (ester) 碳上的 π^* 軌域有超共軛去定域化 (hyperconjugative delocalization) 的關係。藉此 $n \rightarrow \pi^*$ 作用力使脯胺酸傾向維持在反式的構型。

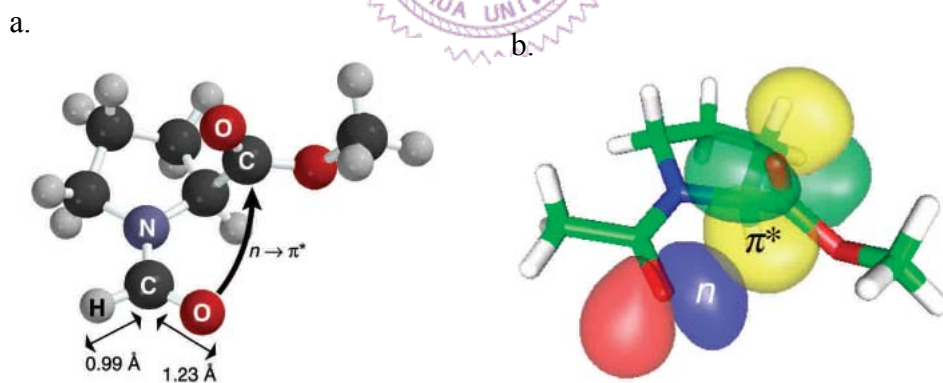


圖 1.9 a. N-formyl-L-proline methyl ester 的架構圖； b. 為軌域圖¹⁴

以 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 為例 (圖 1.10)，Hyp ((2*S*,4*R*)-4-hydroxyproline) 會傾向形成 *C γ -exo* 構形，其 peptide bond 會形成 *trans* 構形。

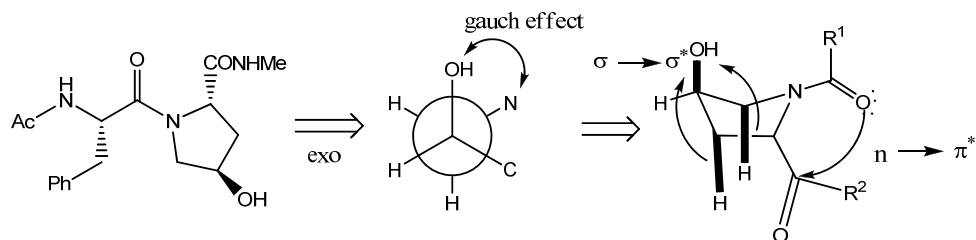


圖 1.10 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 的 *exo* 構形立體結構圖

造成此種結果的主要原因是因為形成 *C γ -exo* 構形時，Hyp 上的 OH 基與脯氨酸上的氮有 gauche effect 的穩定能，即為 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 作用力的超共軛作用力 (hyperconjugative interaction)，並在胜肽鍵形成反式構形時，有 $n \rightarrow \pi^*$ 超共軛穩定作用力，使得 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 中 Hyp 的胜肽鍵傾向形成反式構形。

而 Ac-L-Phe-hyp-NHMe 這個例子 (圖 1.11)，hyp ((2*S*,4*S*)-4-hydroxyproline) 會傾向形成 *C γ -endo*，其胜肽鍵會以順式構型存在。

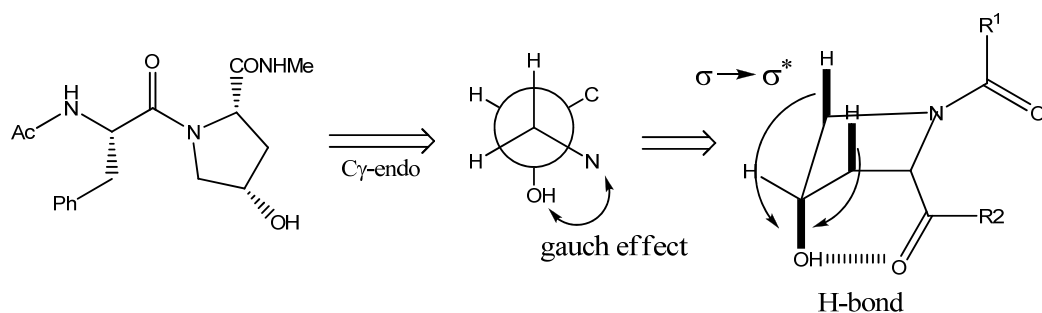


圖 1.11 Ac-L-Phe-hyp-NHMe 的 *endo* 構形立體結構圖

此種結果的主要原因是形成 *C γ -endo* 構形時，hyp 上的 OH 基與脯氨酸上的氮有 gauche effect 的穩定能，即有 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 的超共軛作用力來穩定構形，使得 Ac-L-Phe-hyp-NHMe 中 hyp 的胜肽鍵傾向以順式的構形存在。

因此，由於 $n \rightarrow \pi^*$ 作用力的影響，使得 Hyp 或 Flp ((2*S*,4*R*)-4-fluoroproline) 會使胜肽鍵傾向形成反式構形；而 hyp 或 flp ((2*S*,4*S*)-4-fluoroproline) 則因缺乏 $n \rightarrow \pi^*$ 作用力而會增加胜肽鍵形成順式構形的傾向，如表 1.1 所示。

表 1.1 脯胺酸衍生物在 AcYaaOMe 中，其胜肽鍵順式與反式的平衡常數¹⁵。

AcYaaOMe					
Yaa	Flp	Hyp	Pro	hyp	Flp
$K_{\text{trans/cis}}$	6.7	6.1	4.6	2.4	2.5

立體電子效應以有用於探討 α -螺旋蛋白的例子，如 Zondlo 等人利用人造迷你蛋白 Trp-cage (圖 1.12 a) 為模型，來研究此一效應對 Trp-cage 結構之影響。Trp-cage 是由 12 個胺基酸所構成，一端是聚脯胺酸螺旋 (polyproline helix) 與另一端 α -螺旋結構所組成的迷你蛋白，他們藉由將脯胺酸 (P12) 置換成一系列脯胺酸衍生物 (圖 1.12 b)，探討立體電子效應對 Trp-cage 蛋白在結構上與穩定度的影響¹⁶。

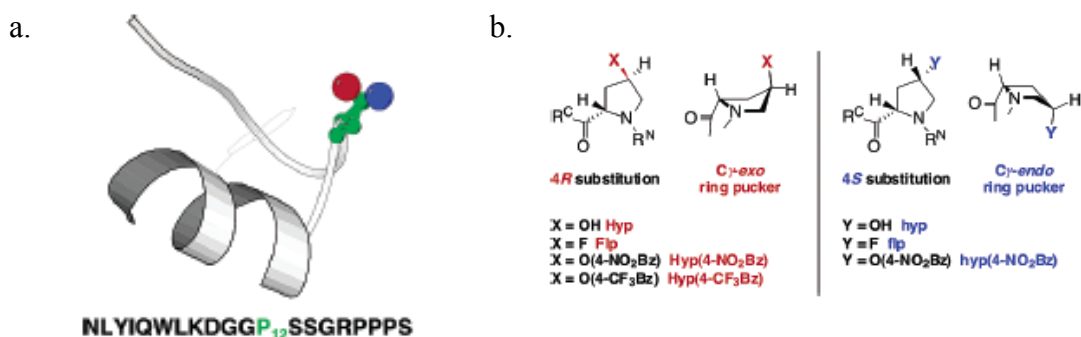


圖 1.12 a. 為 Trp-cage 的結構，脯胺酸位置特別標出；b. 為所置換的脯胺酸衍生物並其導致的 *exo* 或 *endo* 構形¹⁶

在 Trp-cage 原始結構 (native structure) 中，P12 位置為原為 C_{γ} -*exo* 構形。

將 P12 置換成偏好 *exo* 構形的脯氨酸衍生物，即 4 號碳 (C_{γ}) 位置上的拉電子基與羧酸基 (Carboxyl group) 成反式位向時，則因立體電子效應的影響，Trp-cage 可以形成更多 α -螺旋比例，並得到更穩定的結構。相對的，如果以偏好形成 *endo* 構形的脯氨酸衍生物替換，即拉電子基與羧酸基成順式時，會使 Trp-cage 形成較少 α -螺旋比例，並且導致不穩定的結構 (表 1.2)。從實驗結果判斷，立體電子效應造成 Trp-cage 穩定度上相當程度的影響。

表 1.2 Trp-cage 之脯氨酸衍生物 CD 數據 (α -螺旋比例在 25 °C 下量測)

脯氨酸衍生物	T_m (°C)	α -螺旋比例 ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$)
Hyp	40	0.93
Flp	42	0.99
Pro	37	0.85
Hyp	<0	0.34
Flp	25	0.67

1.4 固相肽合成法¹⁷：

固相肽合成法 (Solid Phase Peptide Synthesis；簡稱 SPPS)，最早是由 R.B Merrifield 在 1963 年發表。此法可以合成難以由自然界中細菌表現出來的蛋白

質或是胜肽 (peptide)，例如非天然的胺基酸、改變天然蛋白質序列的人工蛋白質、或是合成由 D-form 胺基酸所組成的 D-蛋白質 (D-proteins)。利用苯乙烯 (styrene) 與二乙烯苯 (divinyl benzene) 所聚合成的分子樹脂 (resin) 當作支持物。然後加入氮端與側鏈 (side chain) 具有保護基的胺基酸，而碳端的羧基 (carboxyl group) 會與樹脂進行酯化反應 (esterification)，之後在去除氮端上的保護基，然後再加入另一個氮端與側鏈有保護的下一個胺基酸，與暴露出來的上一個胺基酸的胺基 (amino group) 反應，形成肽鍵 (amide bond)。依照上面重複加入所欲合成的序列，最後在將樹脂與側鏈的保護基切離，再經由 HPLC 的純化即可得到所想要的胜肽鏈。

固相胜肽合成法流程如圖一，其主要過程：一、酯化反應 (Esterification)；二、去保護 (Deprotection)；三、活化 (Activation)；四、耦合 (Coupling)；五、切除 (Cleavage)。目前固相合成胜肽常用的方法有 FastMoc、Fmoc 與 Boc 此三種方法。這三種方法依使用之活化劑與胺基酸之氮端保護基而分類 (表 1.3)，在 FastMoc 方法所使用之活化劑為 HBTU，胺基酸氮端保護基為 Fmoc，Fmoc 方法與 Boc 方法所使用之活化劑與一樣為 HOBt/DCC，至於胺基酸氮端保護基方面，Fmoc 方法與 Boc 方法不一樣，Fmoc 方法為 Fmoc 官能基而 Boc 方法為 Boc 官能基。此三種方法以 FastMoc 化學方法合成之時間短，耦合反應 (coupling reaction) 效率較高，而本實驗室所使用方法即為 FastMoc 法。

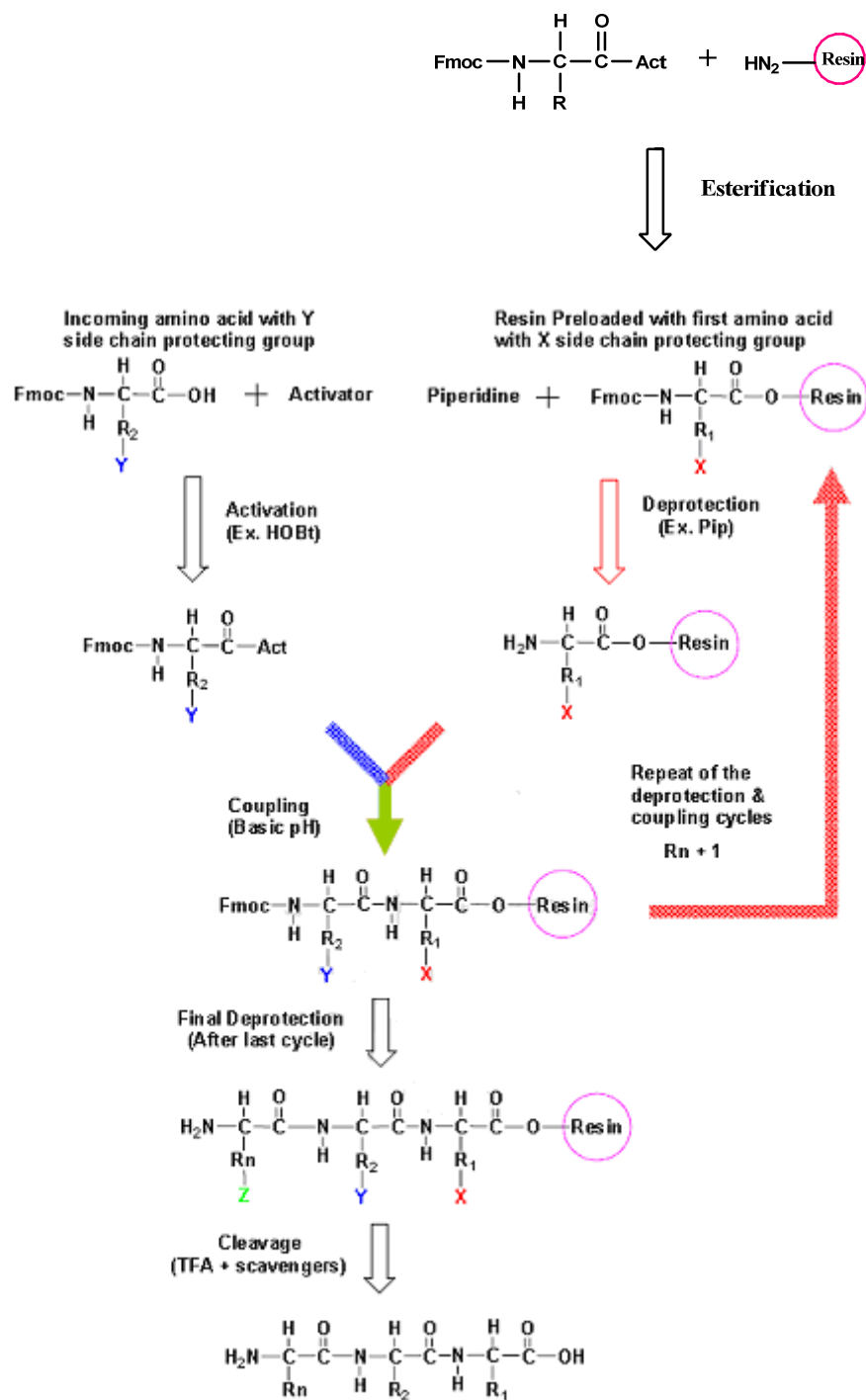


圖 1.13 固態胜肽合成法之合成過程¹⁸

表 1.3 胜肽合成方法使用之活化劑與 N 端保護基之結構式

化學方法	活化劑 (activating agents)	胺基酸 N 端保護基 (N terminus protecting group)
FastMoc	<p>HBTU</p>	<p>Fmoc-</p>
Fmoc	<p>DCC</p> <p>HOBT</p>	<p>Fmoc-</p>
Boc	<p>DCC</p> <p>HOBT</p>	<p>Boc-</p>

Fmoc- : 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

Boc- : t-Butyloxycarbonyl

HOBT : 1-Hydroxybenzotriazole

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

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

1.4.1、酯化反應 (Esterification)：

氮端有保護基的胺基酸，其碳端的羧基會與樹脂產生酯化反應形成酯鍵或醯胺鍵。讓胜肽與樹脂反應的目的是為了讓胜肽鏈附著在樹脂上，而不隨著溶劑流失，且在反應過程中的副產物、雜質則可藉著溶劑的沖洗去除。樹脂的種類有很多種，而且會隨著種類不同而具有不同性質，在酯化的過程中可形成醯胺鍵或酯鍵，並且在切除樹脂時，所形成的胜肽鏈碳端分別為醯胺基 (amide, CONH_2) 或羧酸基 (acid, COOH)。

1.4.2、去保護 (Deprotection)：

在氮端使用保護基的目的，是為防止在耦合的過程中胺基酸的氮端自行偶合而不與連結在樹脂上的胺基酸反應，而造成在許多種不同組合的複雜而導致合成失敗。而胺基酸氮端常使用的保護基有兩種，一種為 Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl group)，另一種為 Boc (tert-butyloxycarbonyl group)，而不同的保護基需要不同去保護方式，Fmoc 去保護的方法是在鹼性環境下，通常都用 piperidine 當作去保護劑 (圖 1.14)，而 Boc 須在三氟醋酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 下去保護 (圖 1.15)。

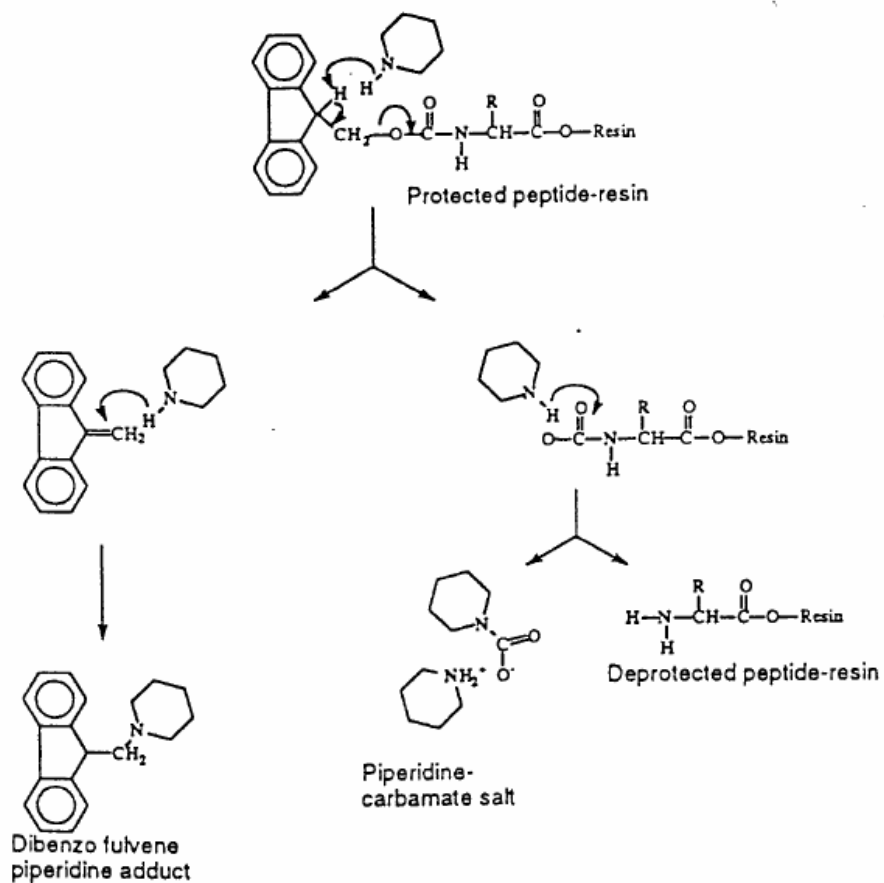


圖 1.14 去除 Fmoc 保護基的機制

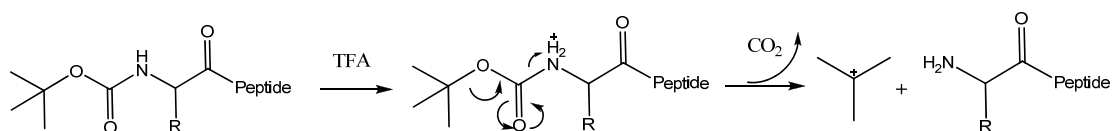


圖 1.15 去除 Boc 保護基的機制

1.4.3、活化 (Activation)：

利用活化劑活化下一個要耦合的胺基酸的羧酸基，使其形成好的離去基 (leaving group)。使反應有更好的反應性與產率。圖 1.16 顯示的活化劑為

HBTU 的活化過程。活化羧酸基的目的是為了要讓耦合反應有更好的反應性與產率，同時也減少反應的時間。

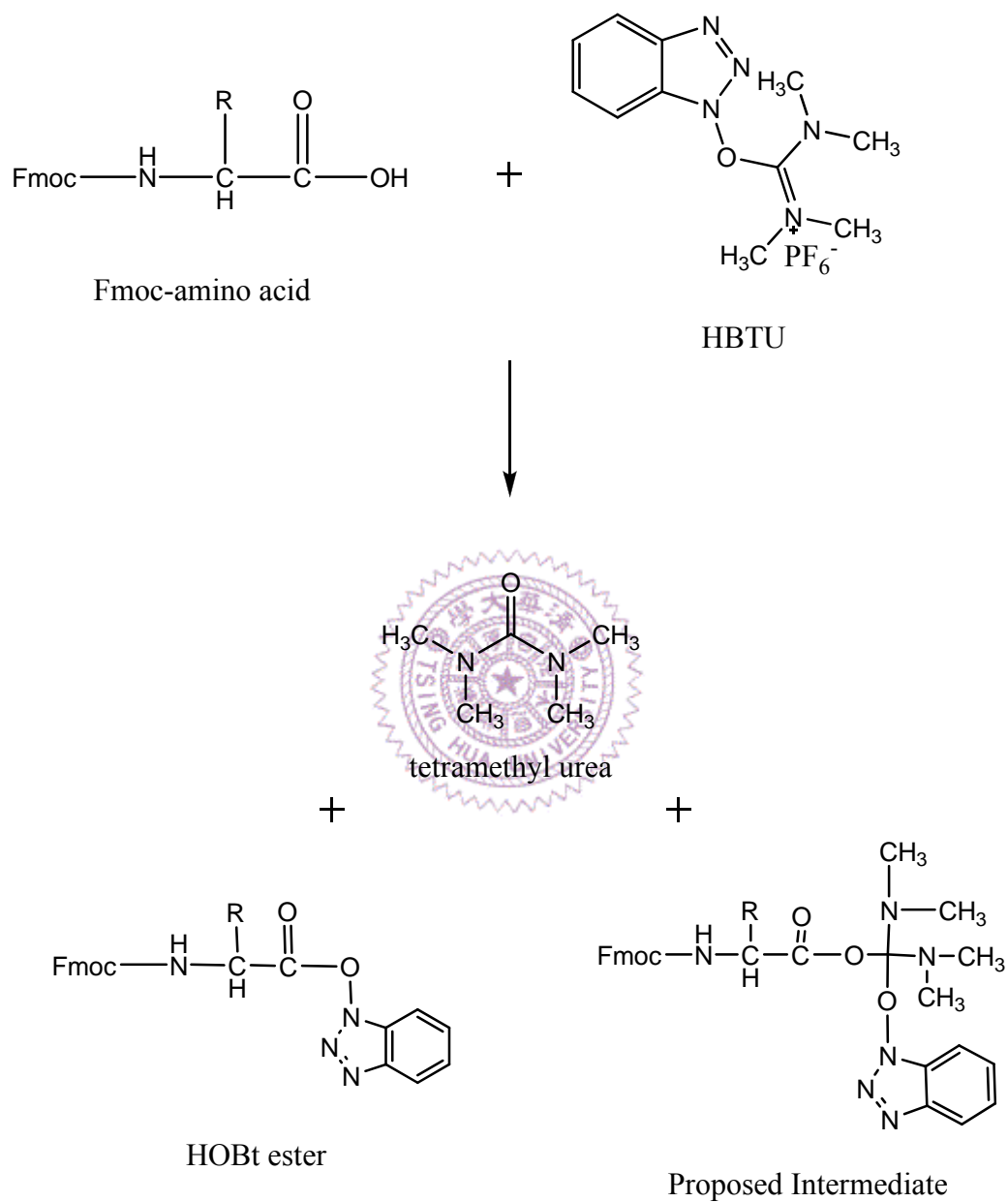


圖 1.16 HBTU 之活化反應

1.4.4、耦合 (Coupling)：

Fmoc-胺基酸碳端之羧基用 HBTU 活化形成 Fmoc-amino acid HOBt ester 後，接著將 Fmoc-amino acid HOBt ester 與已經去除 Fmoc 官能基之胜肽樹脂進行耦合反應 (圖 1.17)。

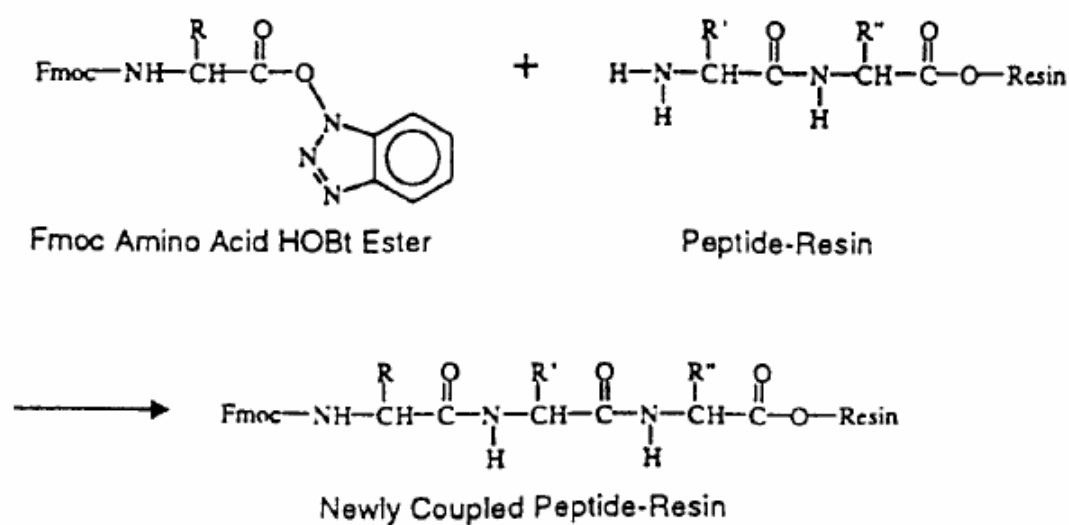


圖 1.17 以 HBTU 為活化劑之耦合反應

1.4.5、切除 (Cleavage)：

按照想要合成的氨基酸序列，重複步驟二、三、四後，得到帶著胜肽的樹脂，最後將胜肽從樹脂上切除下來，即可得到粗產物。一般來說，切除試劑大多以強酸溶液為主，如三氟醋酸。依照不同側鏈保護基與樹脂的特性來選擇不同比例的切除試劑 (cleavage cocktail) 來達到比較好的去保護及切除效果 (圖

1.18)。經過切除 (cleavage) 步驟以後，得到含有胜肽鍵的溶液，須在經過加入冷的醚類溶劑後沉澱離心得到粗產物。

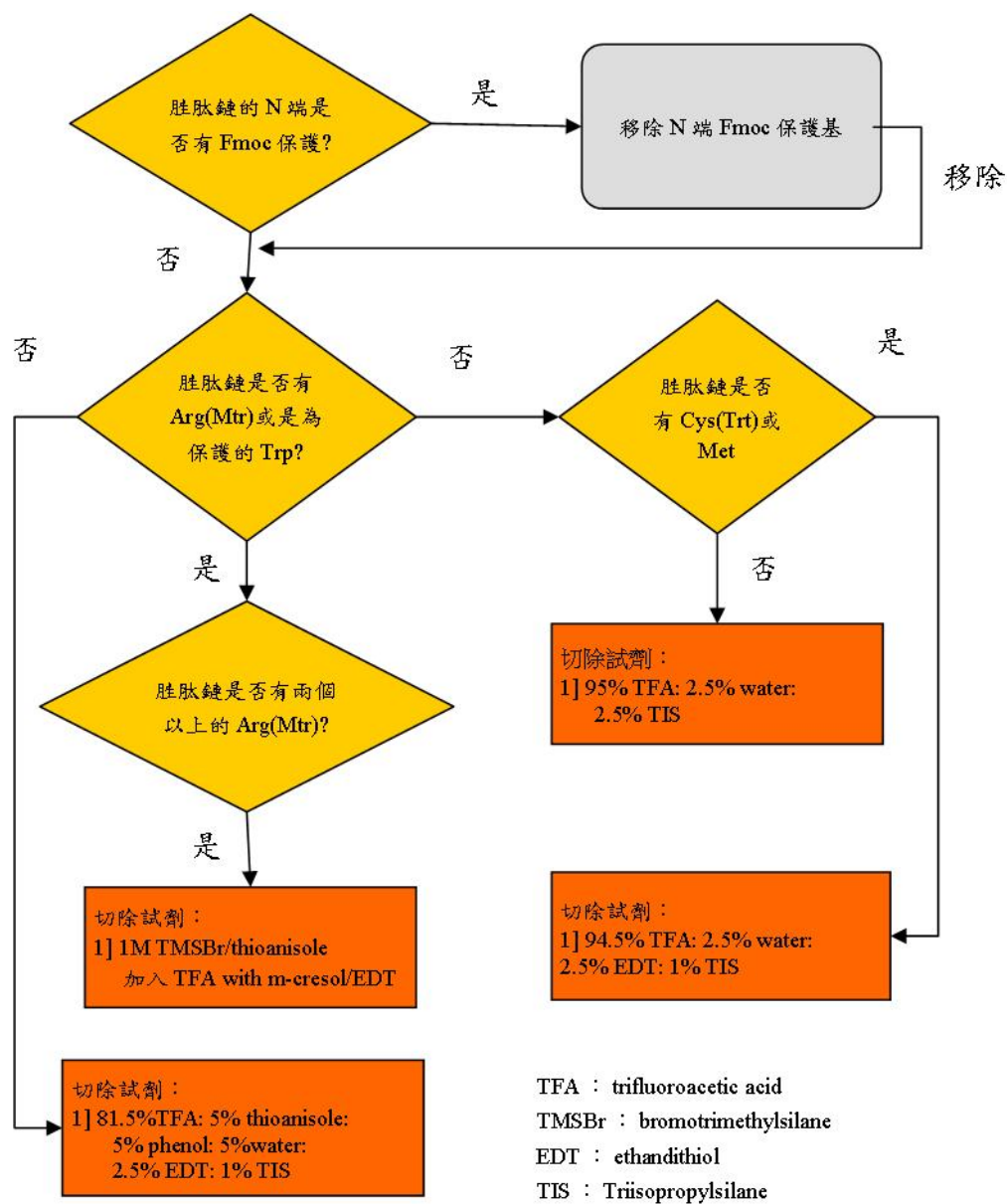


圖 1.18 切除試劑的選擇概要

1.5 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism)^{19,20}

光是一種電磁波，是由電場 (E) 與磁場 (M) 的波動所組成，含有各種方向的電磁波，是未極化的 (unpolarized)；當電磁波經過偏極光濾光器 (polarizing filter) 之後，只有某一個特定平面的電磁波可通過，而其他方向的光都會被濾掉，此光波稱為平面偏極光 (plane polarized light) 或是線性偏極光 (linear polarized light) (圖 1.19)²¹。而線性偏極光又可由旋轉方向相反且頻率相同的兩個圓偏極光表示，所謂的圓偏極光 (circularly polarized light) 是由兩個震幅相同且位向相差 90 度的電場向量 (electrical vectors) 所構成，在這情況下當一個向量為零時，另一個向量即為最大或最小 (圖 1.20)。當線性偏極光拆解成左右旋圓偏極光，向光源方向看去，順時針方向旋轉即為右旋圓偏極光 (right circularly polarized light)，另一為朝逆時針方向旋轉則為左旋圓偏極光 (left circularly polarized light)。當偏極光經過沒有光學活性的物質時，其左右旋圓偏極光的傳遞是相同的，所以其兩者的軌跡投影在 xy 平面上是相同的，所以向量和不變還是維持圓形。而當圓偏極光通過具有光學活性的物質時，例如蛋白質、胜肽、DNA 這類具有光學活性的物質時，因為左、右旋圓形偏極光在傳遞過程中電場向量與光學物質作用有差異而造成穿透率不同，導致穿透樣品的透射光和入射光會產生一個 α 角度的偏轉，以致兩者投影在 xy 平面上的向量不同，成為兩個大小不同的圓，而造成其向量和的軌跡變為橢圓形 (圖 1.21 與圖 1.22)。

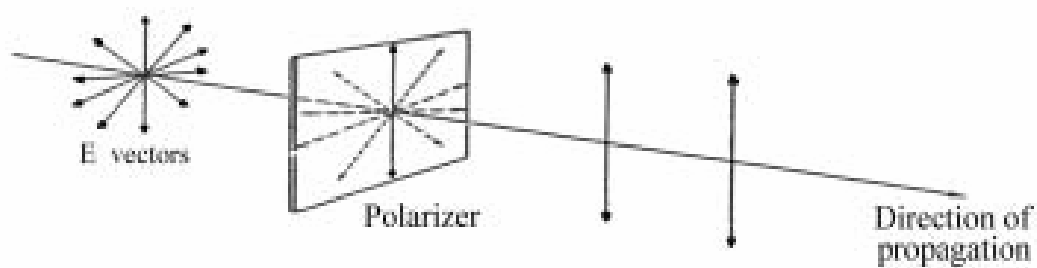


圖 1.19 光通過平面極化器(polarized)之示意圖 ²¹

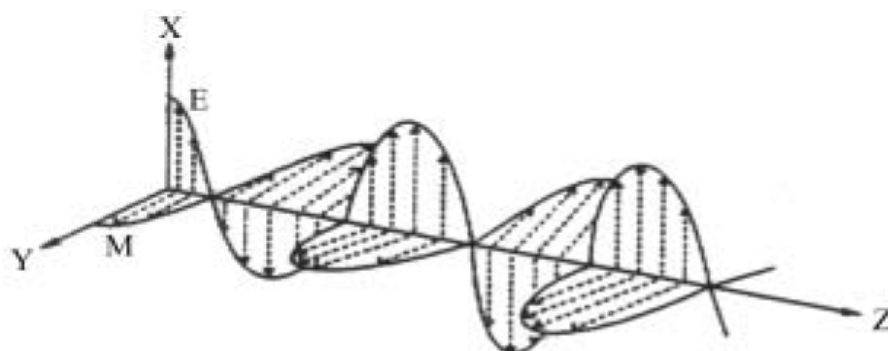


圖 1.20 電磁波之電場 (E) 與磁場 (M) 示意圖 ²²

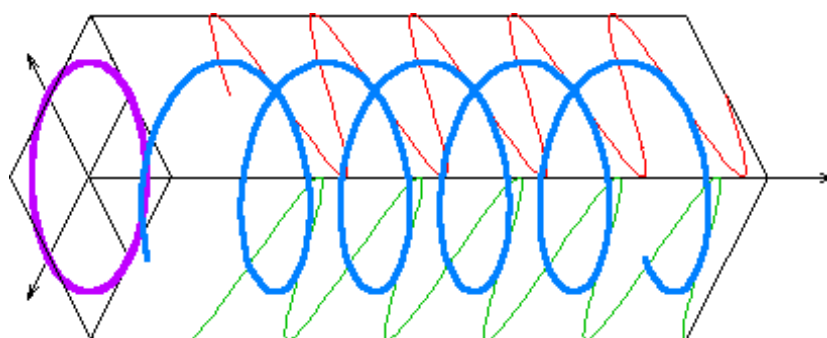


圖 1.21 圓偏極光的示意圖，紅色與綠色線分別表示兩個沿軸旋轉的電場向量，中間藍色線為兩電場向量和，紫色線圈為藍色線之 xy 軸投影。

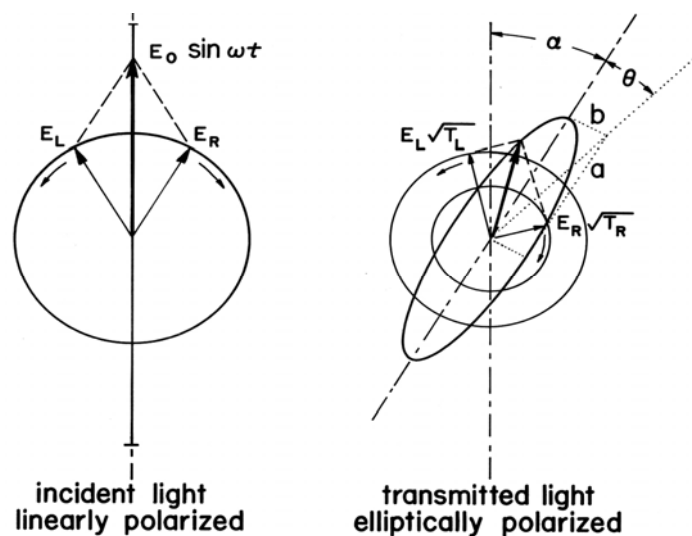


圖 1.22 線性偏極光的偏轉：左圖為線性偏極光通過沒有光學活性的物質，其向量和的軌跡為圓形；右圖為線性偏極光通過有光學活性的物質，左、右旋圓偏極光的穿透度不同，被吸收較小的偏極光振幅較大 (E_L)，穿透樣品的透射光和入射光產生一個 α 角度的偏轉，而新向量和的軌跡為橢圓形。 E 為電場向量； T 為透射比率 (Transmittance)。²³

圓二色旋光光譜儀就是測量左、右旋圓形偏極光的吸收度，再將兩圓偏極光的吸收度之差異對波長做圖，得到圓二色旋光光譜。通常會將左、右旋圓形偏極光吸收度的差值經過單位調整，最後以橢圓率 (ellipticity, θ) 來表示。按照

Beer-Lambert 定律：

$$A = \log_{10} (I_0 / I) = \varepsilon \times c \times l \quad (1-1)$$

I_0 ：光照射在樣品槽的強度

I ：為光通過樣品槽的強度

c ：樣品濃度，單位為 mol / L

ε ：莫耳吸收係數，molar absorption coefficient

l ：比色槽光徑，單位為 cm

圓二色旋光光譜儀即可測得左旋圓偏極光的吸收度 $A_L = \log_{10} (I_0 / I_L)$ 和右旋圓形偏極光的吸收度 $A_R = \log_{10} (I_0 / I_R)$ ，而左、右旋圓偏極光吸收度的差值則可表示為：

$$\Delta A = A_L - A_R = \log_{10} (I_0 / I_L) - \log_{10} (I_0 / I_R) = \log_{10} (I_R / I_L) \quad (1-2)$$

A_L ：左旋偏極光吸收度

A_R ：右旋偏極光吸收度



由式 (1-1) 和式 (1-2)，可得：

$$\Delta A = \Delta \varepsilon \times c \times l = A_L - A_R \quad (1-3)$$

$\Delta \varepsilon$ ：莫耳吸收係數差

儘管儀器所量測的為吸收度 ΔA ，但在大部分的報告中都使用橢圓率 (ellipticity, θ) 為常用單位。經過單位換算後得到橢圓率²⁴：

$$\theta_{\text{abs}} = 32.98 \times \Delta A \quad (1-4)$$

θ_{abs} ：橢圓率，單位為 degree

為了移去比色槽光徑與蛋白質濃度對 CD 測量值之影響，另定義平均殘基

莫耳橢圓率 (mean residue molar ellipticity)：

$$[\theta] = \frac{\theta_{abs}}{10 \times c \times l \times residues} \quad (1-5)$$

$[\theta]$ ：平均殘基莫耳橢圓率，單位為 degree cm² dmol⁻¹

c ：蛋白質莫耳濃度，單位為 mol / L (M)

residues：殘基，即胺基酸個數

圓二色旋光光譜儀在不同電磁波波長範圍下能測量不同的結構特性 (圖 1.23)。分析二級結構時擷取波長通常都設定在 150-250 nm 之間，因蛋白質或胜肽上的胜肽鍵 (peptide bond) 會產生兩種電子躍遷 (圖 1.24)： $n \rightarrow \pi^*$ ，其訊號大約在 210-230 nm；而 $\pi \rightarrow \pi^*$ 躍遷大約在 180-200 nm。不同的二級結構有其特定的 CD 訊號波長，而三級結構也可經由觀察芳香環 (例：Phe、Trp、Tyr) 所造成的 250-300 nm 訊號的來分析。

1.5.1 α -螺旋 (α -helix)：

此結構在 208 nm 和 222 nm 有強的負 CD 訊號，並在 192 nm 有強的正 CD 訊號。222 nm 的負 CD 訊號是 $n \rightarrow \pi^*$ 的所造成，192 nm 的正 CD 訊號和 208 nm 的負 CD 訊號則為 $\pi \rightarrow \pi^*$ 所造成。




Wavelength (nm)					
	150	250	350	450	550
					
					
Wavelength	< 250nm		250-300nm	> 300nm	
Chromophore	amide		aromatics	extrinsic groups	
Analysis	secondary str. folding		tertiary str. folding	tertiary str. ligand binding	

圖 1.23 圓二光譜儀 (CD) 測量在不同波長範圍與分析的結構

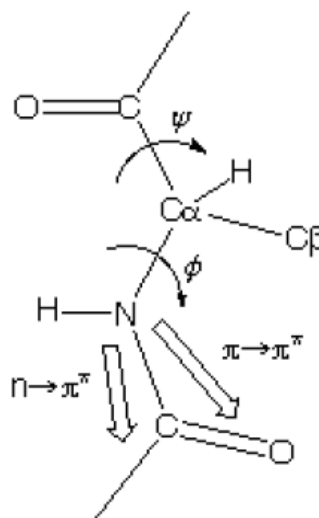


圖 1.24 胜肽電子躍遷示意圖

1.5.2 β-平板 (β-sheet) :

β-平板在 216 nm 一負 CD 訊號，此訊號為 $n \rightarrow \pi^*$ 的電子躍遷；在 195 nm 有正 CD 訊號，此訊號則為 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的電子躍遷。

1.5.3 β-轉折 (β-turn) :

β -轉折主要可分為兩種，其中一種的 β -轉折 (β -turn) 和 α -螺旋 (α -helix) 的圖形類似但是正負相反，但是短波長的負 CD 訊號強度大約只有 α -螺旋的一半，而長波長的正吸收訊號強度則大約只有 α -螺旋的三分之一到四分之一左右。

1.5.4 聚脯胺酸 II 螺旋 (polyproline II helix, 簡寫：PPII)：

此結構在 225 nm 有弱的正 CD 訊號由 $n \rightarrow \pi^*$ 的電子躍遷造成；205 nm 有強的負 CD 訊號由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的電子躍遷造成。聚脯胺酸 II 螺旋 (PPII) 的圖形和無序纏捲 (random coil) 的圖形很相似，因此在早期都將 PPII 當成無序纏捲。

1.5.5 無序纏捲 (Random coil)：

在 215-220 nm 有很微弱的正 CD 訊號由 $n \rightarrow \pi^*$ 的電子躍遷造成 190-200 nm 有強的負 CD 訊號，此訊號來自於 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的電子躍遷。

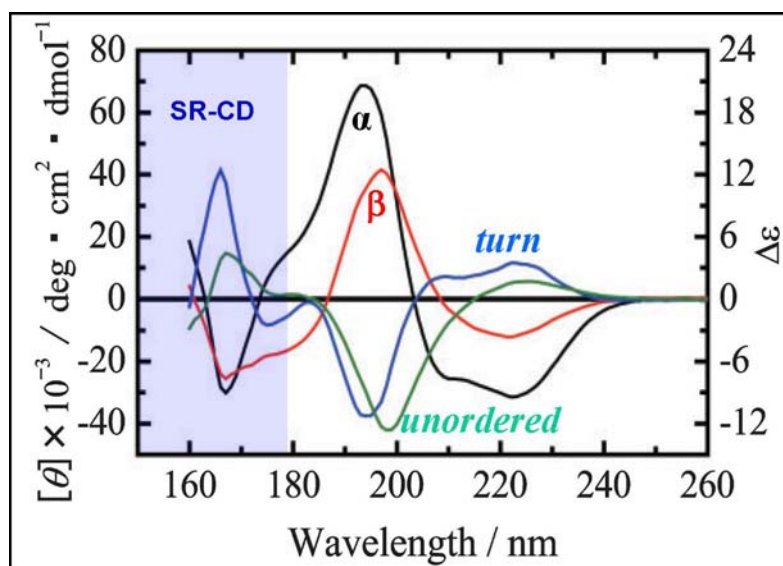


圖 1.25 各結構的圓二色光譜儀 (CD) 訊號： α 為 α -螺旋； β 為 β -平板；turn 為；unordered 為無序纏捲²⁵。

1.6 研究動機

HP36 因其結構小，所以常被當作蛋白質折疊理論計算的模型。大多數的蛋白質分子動態模擬 (molecular dynamics simulation, MD simulation) 都著重在疏水性核心與其他二級結構的要素。而最近的分子動態模擬發現，Pro62 與 Trp64 在 HP36 的折疊過程中扮演著重要的角色。在 200 奈秒的 MD 模擬中，以 1000 K 的狀態維持 1 奈秒，用以得到完全的無折疊構型，在這樣的狀態下觀察到這個轉折 (Asn60-Leu61-Pro62-Leu63) 仍然有部分維持²⁶。所以推測這個部位很有可能是折疊過程中非常先發生的區域。

HP36 雖然已經被很多不同的實驗室研究，但對於 PLWK 這部分的研究最近才開始有比較多文獻報告，但是實際的作用情形還不是很了解。大多都是以直接變異 (mutate) 的方法把 P62 換成 A 或 W64 換成 L，直接改變此位置的結構來得知其整體作用^{9,12}。

本實驗室是希望能夠在不改變基本胺基酸構造的情況下來進行實驗，進而得知 Pro-Trp 之間細節的作用模式。脯胺酸衍生物在研究立體電子效應上已經被開發出很多種類可供選擇，我們選擇在 4 號位置加上官能機的脯胺酸衍生物來作為實驗的對象。在 Trp-cage 的例子中，脯胺酸衍生物在此証實立體電子效應會發生在此迷你蛋白上，對其 α -螺旋產生影響。Trp-cage 的脯胺酸的構型為 *exo*，並且脯胺酸的位置是處在 α -螺旋的末碳端；而 HP36 的脯胺酸構型雖也

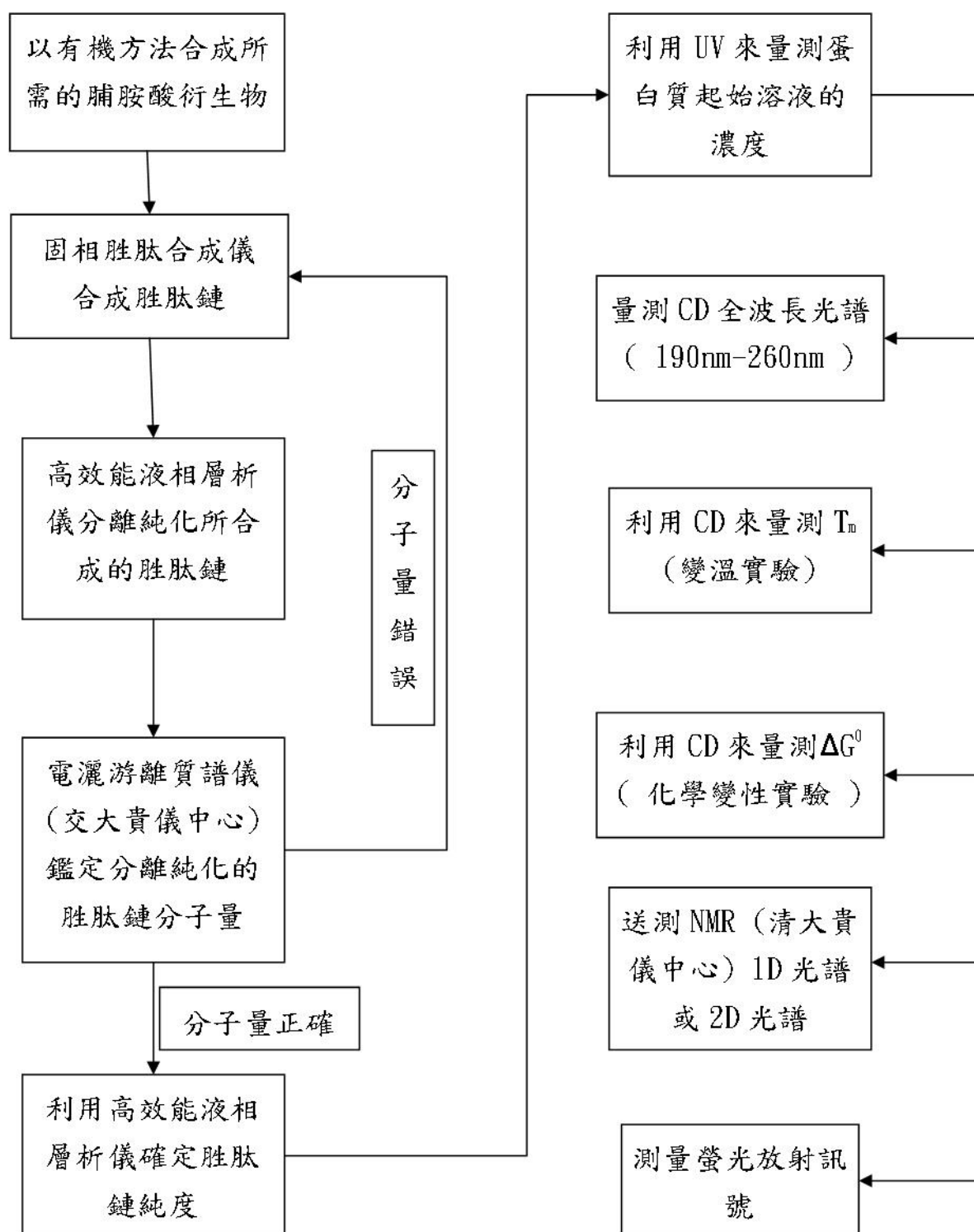
是 *exo*，但其位置則位於 α -螺旋的氮端。所以我們也想了解在 α -螺旋的氮端的例子中是否也符合立體電子效應的原則，得到相似的結果。

總體來說，本實驗室希望利用 HP36 的模型來達成兩個目的： 1. 利用不同的官能基在 4 號碳上以反式取代的脯氨酸衍生物來了解 PLWK 這個區域的作用關係； 2. 比較 4 號碳上反式與順式取代的脯氨酸衍生物，來了解是否立體電子效應也可適用在 α -螺旋的氮端的模型。



二、實驗步驟

2.1 實驗步驟流程



2.2 實驗儀器型號

1. 自動胜肽合成儀 (Automated Peptide Synthesizer) : PS-3 (Protein Technologies, Inc.)

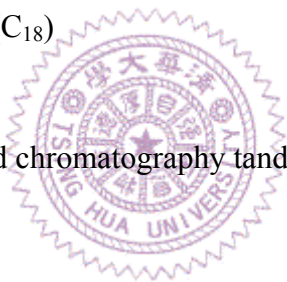
2. 高效能液相層析儀 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) :

Pump : JASCO PU-2080 Isocratic HPLC Pump

Detector : JASCO UV-2077 Multi-wavelength UV/Vis Detector

Column: Thermo BioBasic-18 (C₁₈)

3.液相層析串聯質譜儀: Liquid chromatography tandem mass spectrometer, (Q-Tof LC/MS/MS)



廠牌：MICROMASS，型號：Q-Tof，此部分測量委託交通大學貴儀中心代測。

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

使用樣品槽 (cuvette) 路徑為 1 mm。

5.冷凍乾燥機：日本 Eyela，型號為 FDU-1200，使用前先將樣品用液態氮冷凍。

6.離心機： Hsiangtai ，型號為 CN-2060。

7.pH 計：廠牌 EUTECH INSTRUMENT ，型號為 Ion 510。

8. 阿貝式折射儀：廠牌 PTECHTM，型號為 DAR-1001。
9. UV-VIS 光譜儀 (UV-VIS Spectrophotometer)：廠牌 Jasco，型號為 V-630。
10. 高磁場核磁共振儀 (500 MHz)：Varian Inova 500 NMR
11. 超高磁場核磁共振儀 (600 MHz)：Bruker AVANCE NMR。
12. 特高磁場核磁共振儀 (700MHz)：VARIAN 700 NMR。
13. 螢光光譜儀 (Fluorescence Spectrophotometer)：HITACHI 的 F-4500 FL Spectrophotometer。

2.3 使用藥品

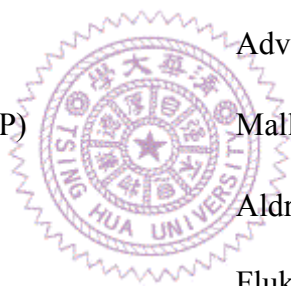
藥品名稱



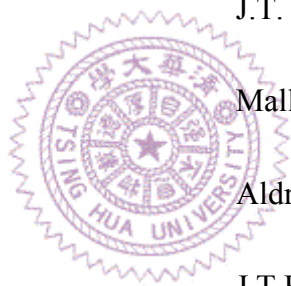
藥品來源

Rink amide MBHA resin	Novabiochem
Fmoc-Ala-OH · H ₂ O	Advanced ChemTech
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Asp(OBut)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Fly-OH	BACHEM
Fmoc-Gly-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Glu(OBut)-OH	Advanced ChemTech

Fmoc-Hyp(t-Bu)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Leu-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Met-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Phe-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Pro-OH	Fluka
Fmoc-Ser(But)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Thr(But)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Tyr(Boc)-OH	Advanced ChemTech
Fmoc-Val-OH	Advanced ChemTech
1-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP)	Mallinckrodt
Piperidine	Aldrich
4-methylmorpholine (NMM)	Fluka
Acetic anhydride	Sigma-Aldrich
Trifluoroacetic acid (TFA)	Alfa Aesar
Triisopropylsilane (TIS) 98%	Alfa Aesar
Ethanedithiol(EDT)	Fluka
1-Hydroxybenzotriazole (HOBt)	Advanced Chemtech
Celite 535	Showa
Acetonitrile (ACN)	TEDIA
Methyl t-Butyl ether	TEDIA



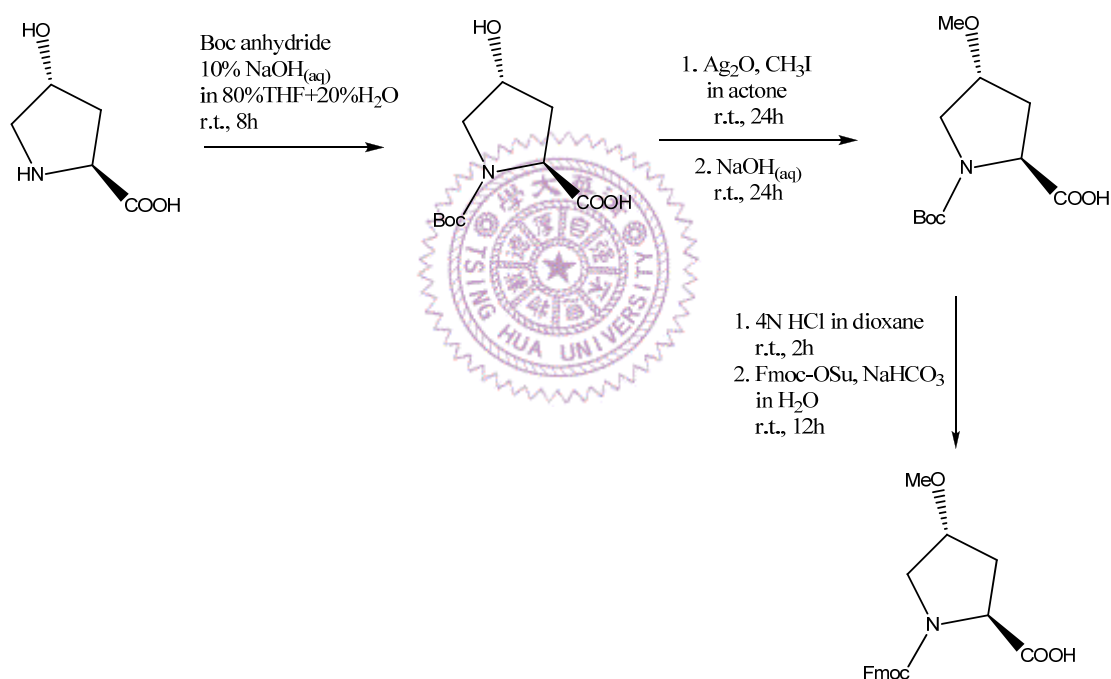
Di-tert-butyl dicarbonate	Alfa Aesar
H-Hyp-OH	Advanced ChemTech
Silver (I) oxide	Alfa Aesar
O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU)	Advanced Chemtech
D-chloroform (CDCl ₃)	Aldrich
Hydrogen chloride 4 M solution in 1,4-dioxane	Aldrich
Magnesium sulfate	Showa
Methanol (HPLC grade)	ECHO
Hydrochloric acid (HCl)	J.T. Baker
Sodium hydroxide	Mallinckrodt
2,2,2-Trifluoroethanol (TFE)	Aldrich
Urea	J.T.Baker
Acetic acid	J.T.Baker
Acetone	東京化成工業
Deuterium oxide 99.9%	Aldrich
Dichloromethane (HPLC grade)	ECHO
Guanidine hydrochloride	AMRESCO
Sodium acetate	AMRESCO
Sodium hydrogen carbonate	RDH
Tetrahydrofuran (THF)	Mallinckrodt



Methyl iodide	Riedel-de Haën
1,4-dioxane	J.T.Baker
Fmoc-OSu	Novabiochem
Ethyl acetate (EA)	ECHO

2.4 脯氨酸衍生物 Fmoc-(4*R*,2*S*)-methoxyproline 之合成²⁷：

Scheme 1：



2.4.1 化合物 Boc-(4*R*,2*S*)-hydroxyproline (2) 之合成

取起始物 (1) 5.0 g, 38.1 mmol 溶於 60 mL 的 2:1 THF/H₂O 中，再加入 10 mL 的 10% (w/v) 氫氧化鈉水溶液以及 Boc anhydride (10 g, 45.72 mmol)，此反應溶液在室溫下攪拌 overnight。反應完成後用旋轉濃縮機將 THF 抽乾，得到白色的油狀粗產物後，用 EtOAc 溶解，再用 10% (w/v) KHSO₄ 調整溶液的 pH 至 2。之後

用 EtOAc 進行萃取 (3×50 mL)，收集有機層（上層）後，再用飽和食鹽水進行洗萃，將多餘鹽類去除。收集有機層後用無水硫酸鎂除水後過濾濃縮，得到產物 Boc-Hyp-OH (2) (產率 7.0 g, 79.4%)。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 4.51-4.42 (m, 2H), 4.14-4.10 (m, 0.6H), 3.62-3.51(m, 1.4H), 2.44-2.35 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 1H), 1.49-1.42 (m, 9H).

2.4.2 化合物 Boc-(4*R*,2*S*)-methoxyproline (3)之合成

將起始物 (2) (4 g, 17.3 mmol) 加入 Ag_2O 以丙酮作為溶劑在圓底瓶中攪拌混合後，加入 CH_3I (3.8 mL, 60.6 mmol) 在氮氣環境下反應攪拌兩天。反應完用矽藻土過濾混合物，將濾液濃縮去除溶劑後在真空環境下持續抽 1 小時，再加入氫氧化鈉 (0.72 g) 溶液，在室溫下攪拌 overnight。再利用 6 N HCl 將溶液調整至 $\text{pH} = 1$ ，利用 CH_2Cl_2 (3×50 mL) 萃取後，收集有機層再以無水硫酸鎂除水後濃縮，以沖提液 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 95 : 5$ 為溶劑進行薄層層析分析 (TLC)。確定 R_f 後，再以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 95 : 5 \sim 80 : 20$ 的沖提液液進行 silica gel 管柱層析純化，得產物 Boc-Mop-OH (3) (產率: 0.45 g, 10%)。

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 4.39-4.36 (t, 0.4H), 4.32-4.29 (t, 0.6H), 3.98-3.95(m, 1H), 3.73 (m, 0.4H), 3.65-3.56 (m, 1H), 3.49-3.47 (m, 0.6H), 3.31 (overlapping s, 3H), 2.37-2.27 (m, 1H), 2.05-2.04 (m, 0.6H), 2.03-2.01 (m, 0.4H), 1.45 (s, 3H), 1.43 (s, 6H).

2.4.3 化合物 Fmoc-(4*R*,2*S*)-methoxyproline (4) 之合成

將起始物 (3) (0.45 g, 1.8 mmol) 置於圓底瓶中，在氮氣環境下，加入 20 mL 的 4 N HCl/dioxane 混和攪拌，反應約 1.5 小時後，利用 TLC 確定反應結束。利用濃縮機移除 HCl 與 dioxane 後，再加入 dioxane 6 mL 和去離子水 3 mL 混合，再加入 FmocOSu (0.9 g, 2.7 mmol) 與 NaHCO₃ (0.31 g, 3.7 mmol)，攪拌反應 overnight 後，以沖提液 CH₂Cl₂ : MeOH = 95 : 5 進行 TLC 分析，確定 R_f 後，濃縮，並直接以相同沖提液進行 silica gel 管柱層析純化，得到產物 Fmoc-Mop-OH (產率: 0.6 g, 91%)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 7.77-7.29 (m, 8H), 4.48-4.45 (m, 1H), 4.43-4.39 (m, 1H), 4.37-4.33 (m, 1H), 4.28-4.11 (m, 1H), 4.01-3.99 (m, 0.3H), 3.98-3.96 (m, 1H), 3.75-3.73 (m, 0.7H), 3.67-3.55 (m, 1H), 3.31 (s, 3H), 2.45-2.40 (m, 0.4H), 2.45-2.31 (m, 1H), 2.14-2.05 (m, 0.6H).

ESI-MS: m/z 390.04 [M+Na⁺]; calcd. 390.40

2.5 HP36 和 HP15 胜肽鏈之合成

本研究所使用的脯氨酸衍生物 (皆為反式) 如圖 (2.1)。

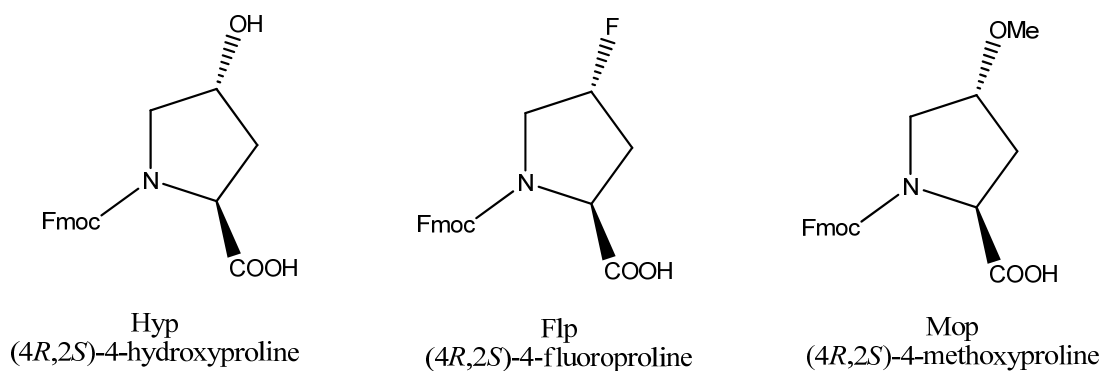


圖 2.1 脯胺酸之反式衍生物

本研究中之胜肽鏈均是使用自動胜肽合成儀來合成，其胺基酸序列如表 2.1。

表 2.1 HP36 系列與 HP15 系列胜肽之胺基酸序列表

胜肽名稱	胺基酸序列 (Sequence)
WT-HP36	MLSDedFKAVFGMTRSAFANL-Pro-LWKQQNLKKEKGLF-NH ₂
O-HP36	MLSDedFKAVFGMTRSAFANL-Hyp-LWKQQNLKKEKGLF-NH ₂
F-HP36	MLSDedFKAVFGMTRSAFANL-Flp-LWKQQNLKKEKGLF-NH ₂
M-HP36	MLSDedFKAVFGMTRSAFANL-Mop-LWKQQNLKKEKGLF-NH ₂
WT-HP15	Pro-LWKQQNLKKEKGLF-NH ₂
O-HP15	Hyp-LWKQQNLKKEKGLF-NH ₂
F-HP15	Flp-LWKQQNLKKEKGLF-NH ₂

*註：所有胜肽鏈之氮端皆為 free amine，碳端為 amide group。

a. 在反應瓶 (reaction vessel, RV 瓶) 內秤入 0.1 mmole (0.14 g) 樹脂 (Rink amide MBHA)，設定合成儀用 NMP 沖洗、浸泡樹脂一小時。之後，胺基酸瓶 (AA 瓶) 內放入 0.4 mmole 的具 Fmoc 保護胺基酸。裝好胺基酸後，每瓶再秤入 0.149 g HBTU 和 0.060 g HOBt 活化劑。

b. 配製 Solvent

1. 去保護試劑 (deprotection reagent, DEP) : 20% (v/v) piperidine/DMF

2. 活化試劑 (activation reagent, ACT) : 0.4 M N-methyl- morpholine/DMF

c. 接著將 AA 瓶依碳端往氮端胺基酸序列排列在合成儀轉盤上，因為合成儀是從碳端開始合成，跟胺基酸的序列相反。每合完六個胺基酸，其後都放上裝有約兩毫升的過量乙酐酐 (acetic anhydride) 的 AA 瓶，目的是將沒有順利合上胺基酸的樹脂以乙酐基化 (capping, acetylation) 以提升純度及產率。因為 Val 與 Thr 在側鏈上的 β 位置有取代基 (β -branch)，在偶合時會因立體障礙而降低偶合效率，所以在 Val 與 Thr 之後都各放上一個相同的胺基酸進行雙重偶合 (double coupling)，而反應時間條件設定如表 2.2。

表 2.2 HP36 系列胜肽合成：合成儀步驟條件設定

步驟	時間	次數
Deprotect	20 min	2
Coupling	60 min	1
Capping	20 min	1

註：LPLW (61-64) 這四個胺基酸的偶合反應時間加倍，為 120 分鐘。

2.6 切除 (cleavage)

在利用自動胜肽合成儀接上胜肽鏈序列，從 RV 瓶中取出帶有胜肽鏈的樹脂裝到 bio-column 之中。配置 cleavage cocktail 體積共 5.0 mL (表 2.3)。

表 2.3 HP36 系列胜肽合成：cleavage cocktail 的配方

藥品名稱	百分比	體積(mL)
Trifluoroacetic acid (TFA)	92.5%	4.625 mL
Triisopropylsilane (TIS) 98%	2.5%	0.125 mL
D.I. water (H ₂ O)	2.5%	0.125 mL
Ethanedithiol (EDT)	2.5%	0.125 mL

加入 cleavage cocktail，蓋緊並放置於搖晃儀反應二個小時。之後，將 bio-column 前端折斷 (小心液體噴出)，滴出濾液並加入 1 mL TFA 清洗 resin，並與原來濾液混合，再將濾液用 N₂ 吹約十到十五分鐘使大部分 TFA 揮發，以更利於之後沉澱蛋白質。

加入事先在 -20 °C 預冷的甲基第三丁醚 (methyl t-butyl ether) 25 mL，出現白色沉澱物，放入離心機離心使粗產物沉澱。將上層液倒出，並且加入冰醚洗去 TFA 殘液，如此重複三次，最後再用水幫浦抽乾殘留的醚。

2.7 利用高壓液相層析儀 HPLC 進行純化

將粗產物加去離子水溶成為濃度 15 mg / mL 之溶液，利用逆相 HPLC 及半製備碳 18 (C18) 管柱，來純化分離樣品，沖提液分別為加了 0.1% TFA 的去離子水與同樣加了 0.1% TFA 的乙腈。梯度設定為一小時內由 100% 水 + 0% 乙腈變化到 40% 水 + 60% 乙腈。收集純化液之後，取出一點純化液送測 ESI-MS 鑑定分子量。剩下的純化液利用旋轉濃縮儀除去乙腈，然後將樣品放入液態氮中急速冷卻，再利用凍乾機除去水分，最後得到棉絮狀的胜肽樣品。確定分子量之後，再利用 HPLC 來鑑定純度。

2.8 HP36 系列或 HP15 胜肽鍵之分子量

送樣品至交大貴儀中心之電噴灑離子化質譜儀 (electrospray ionization mass spectrometer, ESI-MS)，測得分子量：WT-HP36 m/z $[MH^+]$ 4189.73，calcd. 4188.17；O-HP36 m/z $[MH^+]$ 4203.15，calcd. 4204.16；F-HP36 m/z $[MH^+]$ 4204.96，calcd. 4206.16；M-HP36 m/z $[MH^+]$ 4216.31，calcd. 4218.18；WT-HP15 m/z $[MH_2^{2+}]$ 950.37，calcd. 949.05；O-HP15 m/z $[MH_3^{3+}]$ 638.88，calcd. 638.69；F-HP15 $[MH^+]$ m/z 1917.21，calcd. 1916.08。

2.9 利用 UV 光譜判定濃度

a. 取 25 uL 去離子水 + 975 uL 的 6 M guanidinium chloride (GndHCl) 水溶液，作為背景訊號。

b. 將收集到的棉絮狀胜肽鏈用去離子水溶解，配成起始溶液 (stock solution)，取 25 uL 起始溶液並加入 975 uL 的 6 M guanidinium chloride (GndCl) 水溶液，以便使胜肽鏈處於未折疊的狀態，使色胺酸 (Trp) 可以不被其他胺基酸影響的情況下吸收 280 nm UV 訊號。利用 Beer's Law 即可得知起始溶液濃度。

$$C = \frac{A}{\epsilon \times l} \times 40 \quad (2.1)$$

C：起始溶液濃度，單位 M。

A：UV 吸收訊號。

l：光槽路徑長，單位 cm^{-1} 。

ϵ ：莫耳吸收係數 = 5690。²⁸



2.10 CD 光譜量測

取 136.1 mg 三個結晶水的醋酸鈉 (Sodium acetate) 加入去離子水至 100 mL，再利用 6 N 的 HCl 與 6 N 的 NaOH 調整 pH 值至 5.0，配成 10 mM 的醋酸鈉緩衝溶液。

2.10.1 Far-UV CD 光譜 (wavelength scans)

從胜肽鏈起始溶液取出所需的量，利用 10 mM 醋酸鈉緩衝溶液稀釋成 300 μ L 100 μ M 的樣品，置入光徑為 0.1 cm 的 CD 樣品槽。波長範圍：190 – 260 nm。溫度：25 $^{\circ}$ C。每 1 nm 取一點訊號，每一點訊號量測時間為 10 秒。

2.10.2 變溫 CD 光譜量測 (Thermal denaturation)

從胜肽鏈起始溶液取出所需的量，利用 10 mM 醋酸鈉緩衝溶液稀釋成 2.5 mL 10 μ M 的胜肽溶液，置入光徑為 1.0 cm 的 CD 樣品槽，並且加入攪拌磁石。波長：222 nm。光柵寬 (bandwidth)：1.5 nm，溫度：2 – 98 $^{\circ}$ C，溫度平衡時間：90 秒，每 2 $^{\circ}$ C 取一點訊號，每一點訊號測量時間為 30 秒。

2.10.3 化學誘導變性之 CD 光譜量測 (Chemical denaturation)

a. Solution A：從胜肽鏈起始溶液取出所需的量，利用醋酸鈉緩衝溶液稀釋成 5.0 mL 10 μ M 的胜肽溶液。

b. Solution B：先配置一 10 M 尿素 (Urea) 及 10 mM 醋酸鈉 pH = 5.0 的緩衝溶液，再從胜肽鏈起始溶液取出所需的量，利用上述緩衝溶液稀釋成 5.0 mL 10 μ M 的胜肽溶液。

c. 取 2.5 mL 的 Solution A，置入光徑為 1.0 cm 的 CD 樣品槽，並且加入攪拌磁石攪拌，波長：222 nm。光柵寬 (bandwidth)：1.5 nm。溫度：25 $^{\circ}$ C，每一點訊號測量時間為 45 秒。

d. 每次量測完取出 20 uL，利用阿貝式折射儀 (ABBE Refractometer) 量測
折射度以計算溶液中尿素之濃度：

$$[Urea] = 117.66(\Delta N) + 29.753(\Delta N)^2 + 185.56(\Delta N)^3 \quad (2-2)$$

ΔN ：化學變性試劑溶液的折射率與水溶液折射率的差值。

並加入約莫 50 - 150 uL Solution B 至樣品槽 (裝有 Solution A)，攪拌平衡時間：90 秒，之後進行第二次 CD 光譜測量，重複此步驟至量測尿素濃度為 5 M 以上。

e. 取出 Solution A 換成 Solution B，重複步驟 d. 至尿素濃度為 5 M 以下。

2.10.4 HP15 加入 TFE (trifluoroethanol) 的 far-UV CD 光譜實驗

配置不同百分比之 TFE 溶液：先調整去離子水的 pH 值至 5.0，再依體積比例 (v/v) 與 TFE 混合。再從胜肽鏈起始溶液取出所需的量，利用配置好的各種百分比之 TEF 溶液稀釋成 300 uL 100 uM 之胜肽樣品，置入光徑為 0.1 cm 的 CD 樣品槽。波長範圍：190 – 260 nm。溫度：25 °C。每 1 nm 取一點訊號，每一點訊號量測時間為 10 秒。

2.11 CD 光譜資料處理

2.11.1 α -螺旋的含量比例

本實驗使用 α -螺旋的判斷指標有兩種，一種為 CD 光譜的 $[\theta]_{222} / [\theta]_{208}$ 的比例來判斷 α -螺旋的含量，這是比較簡單的方式，得到的數值越高， α -螺旋含量越高¹⁶。另一種方式則是使用 Baldwin 等人所使用的方法來判斷 α -螺旋的含量比例²⁹。其方法如下：

$$f_H = \frac{\theta_{222} - \theta_C}{\theta_H - \theta_C} \quad (2-3)$$

$$\theta_C = 2220 - 53T \quad (2-4)$$

$$\theta_H = (-44000 + 250T)(1 - \frac{3}{Nr}) \quad (2-5)$$

f_H ： α -螺旋的含量分率。

θ_C ：無序纏捲的橢圓率訊號 (ellipticities of the random coil)。

θ_H ：完全螺旋的橢圓率訊號 (ellipticities of the complete helix)。

T ：溫度，單位為 $^{\circ}\text{C}$ 。

Nr ：胺基酸個數。

2.11.2 CD 變溫實驗的數據處理

在量測 CD 變溫實驗時，會得到類似圖 2.2 典型圖形。這樣的曲線可以分成三個部分，折疊態 (folded state)、未折疊態 (unfolded state) 及中間的轉換曲

線 (transition)。在轉換曲線的部分的中點，此點狀態為 50% 折疊態 (F) 與 50% 未折疊態 (U)，定義此點的溫度為熔點 (melting temperature, T_m)。

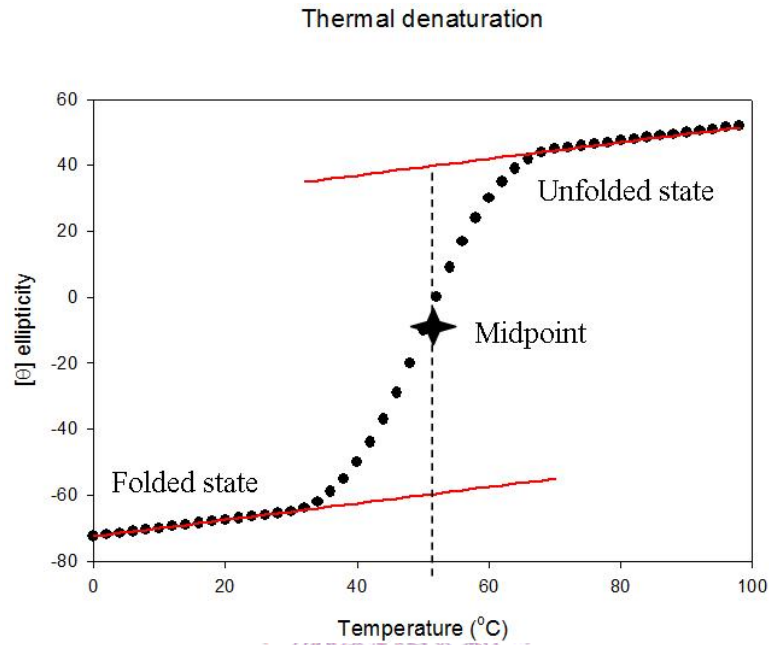


圖 2.2 典型變溫實驗的 CD 光譜特徵曲線

熔點的值可以利用 two-state 的模型方法求得，我們所使用的方程式如下：

$$\theta = \frac{\theta_n + \theta_d \exp\left(\frac{-\Delta G_U^o(T)}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-\Delta G_U^o(T)}{RT}\right)} \quad (2-6)$$

$$\theta_n = a_n + b_n T \quad (2-7)$$

$$\theta_d = a_d + b_d T \quad (2-8)$$

不同溫度下的 ΔG_U^o 是由方程式 Gibbs-Helmholtz 所描述的以下關係

$$\Delta G_U^o(T) = \Delta H^0(T_m)(1 - \frac{T}{T_m}) - \Delta C_p^0[(T_m - T) + T \ln(\frac{T}{T_m})] \quad (2-9)$$

$\Delta G_U^o(T)$ ：不同溫度時未折疊結構自由能。

T_m ：此點狀態為 50% 摺疊態 (F) 與 50% 未摺疊態 (U) 的溫度，熔點。

$\Delta H^0(T_m)$ ：在 T_m 時的熱焓變化。

ΔC_p^0 ：為摺疊態 (F) 與未摺疊態 (U) 的熱含量變化。

a_n 、 b_n 、 a_d 、 b_d ：定義為摺疊態 (F) 訊號和未摺疊態 (U) 訊號與絕對溫度的線性關係。

在此我們將 ΔC_p^0 選擇為 0.36 去作 curve fitting，而 T_m 的值和 ΔC_p^0 的選擇並無相關。而我們只利用這個部分利用這方程式來決定 T_m 值。

2.11.3 化學誘導變性 CD 實驗的數據處理

利用 CD 量測化學誘導變性實驗，會得到類似圖 2.3 典型圖形。這樣的曲線亦可以分成三個部分，折疊態 (folded state)、未折疊態 (unfolded state) 及中間的轉換曲線 (transition)。在轉換曲線的部分的中點，此點狀態為 50% 折疊態 (F) 與 50% 未折疊態 (U)，故此濃度下的 $\Delta G_U^o(den) = 0$ 。對一簡單 two-state 折疊過程而言，我們可將蛋白質的穩定度 (ΔG_U^o) 視為與化學變性試劑濃度 [den] 成一線性關係。

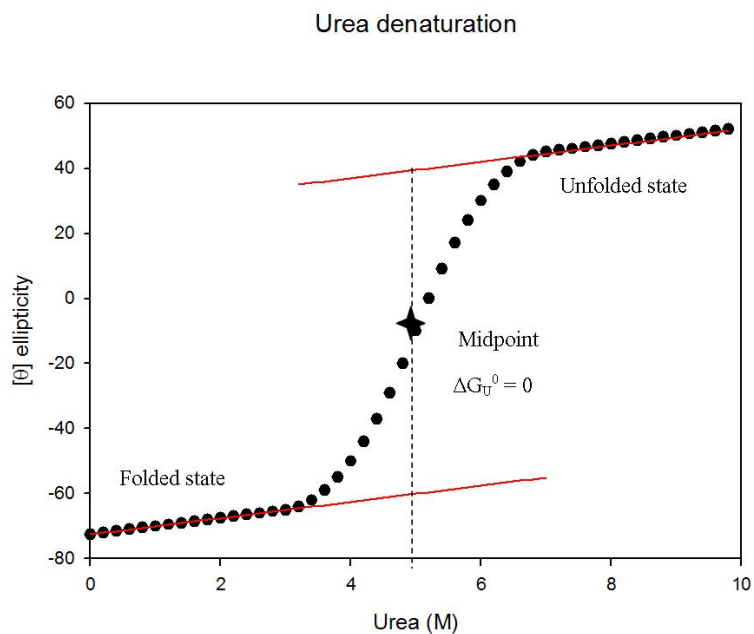
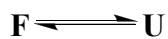


圖 2.3 典型化學誘導變性實驗的 CD 光譜特徵曲線

利用自由能與反應平衡常數的關係式，我們可以列出下列式：



$$\Delta G_U^o(\text{den}) = -RT \ln K_{eq} \quad (2-10)$$

$$K_{eq} = \frac{f_d}{f_n} \quad (2-11)$$

$$f_d = \frac{\theta - \theta_n}{\theta_d - \theta_n} \quad (2-12)$$

$$f_n = \frac{\theta_d - \theta}{\theta_d - \theta_n} \quad (2-13)$$

$$\theta_n = a_n + b_n[\text{den}] \quad (2-14)$$

$$\theta_d = a_d + b_d[\text{den}] \quad (2-15)$$

f_d ：未折疊態 (U) 的分率。

f_n ：折疊態 (F) 的分率。

[Den]：化學試劑的莫耳濃度。

利用上述式子導出轉換曲線上不同濃度的化學試劑下的 $\Delta G_U^o(den)$ 值 (圖 2.4)。並利用外插法由式 (2-15)，求得 ($\Delta G_U^o(H_2O)$) 與 m-value。

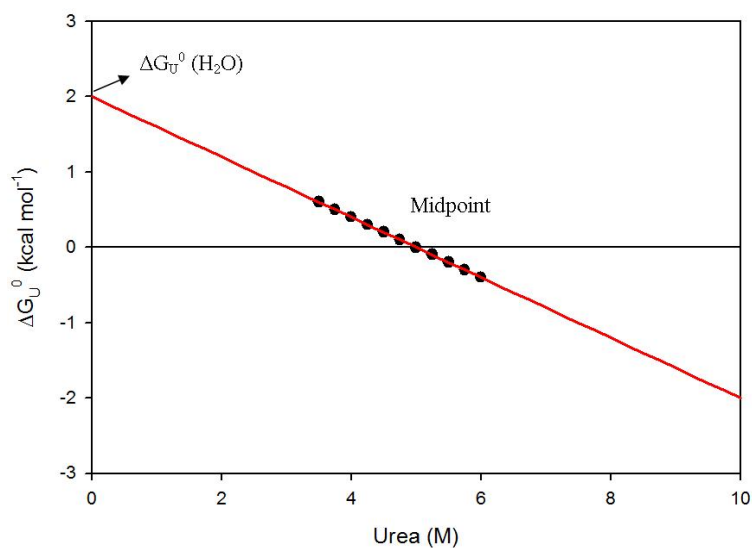


圖 2.4 化學試劑濃度與 $\Delta G_U^o(den)$ 的關係

$$\Delta G_U^o = \Delta G_U^o(H_2O) + m[den] \quad (2-16)$$

當折疊態與未折疊態的比例為 50%：50% 時， $\Delta G_U^o = 0$ ，此時 denaturant 濃度

$$\text{為 } [den]_{1/2} = C_M = \Delta G_U^o(H_2O) / m \quad (2-17)$$

C_M ：折疊態與未折疊態的比例為 50%：50% 時的尿素溶液濃度。

$\Delta G_U^o(H_2O)$ 為在沒有化學試劑的情況下，蛋白質結構展開過程的自由能。而 m (m -value) 則為蛋白質在結構展開過程中的連動度 (cooperativity)， m -value 與蛋白質從折疊態到未折疊態所改變的接觸溶劑面積也成正比 (solvent accessible surface area change, ΔASA)。所以經由化學誘導變性實驗我們可以得到這些資訊。

2.12 NMR 光譜

配製 150 mM 氯化鈉 和 10 mM 醋酸鈉 的 90% H_2O/D_2O 緩衝溶液溶液，並把緩衝溶液的 pH 值調成 5.0。再從胜肽鏈起始溶液取出所需的量以冷凍乾燥機凍乾後，加入上述緩衝溶液配成 600 μL 約 2 mM 蛋白濃度的樣品，並加入 TSP (3-(Trimethylsilyl)- propionic acid- d^4 sodium salt) 當作內標準品，其化學位移定為 0.0 ppm。送測清華大學貴儀中心超高磁場核磁共振儀(600 MHz)，F-HP36 送測特高磁場核磁共振儀 (700MHz)。NOESY 的 mixing time：250 ms；TOCSY 的 mixing time：75 ms。

2.13 螢光光譜

從胜肽鏈起始溶液取出所需的量，利用 10 mM 醋酸鈉緩衝溶液稀釋成 2.0 mL 10 μM 的樣品，置入光徑為 1.0 cm 的螢光樣品槽。激發波長(excitation wavelength)：280 nm，激發光柵寬：2.5 nm。偵測放射波長(emission wavelength)：290 – 600 nm，放射光柵寬：5.0 nm。

三、結果與討論

3.1 HP36 系列胜肽 CD 量測探討

量測 CD far-UV 光譜來判斷 WT-HP36、O-HP36、F-HP36、M-HP36 的結構。

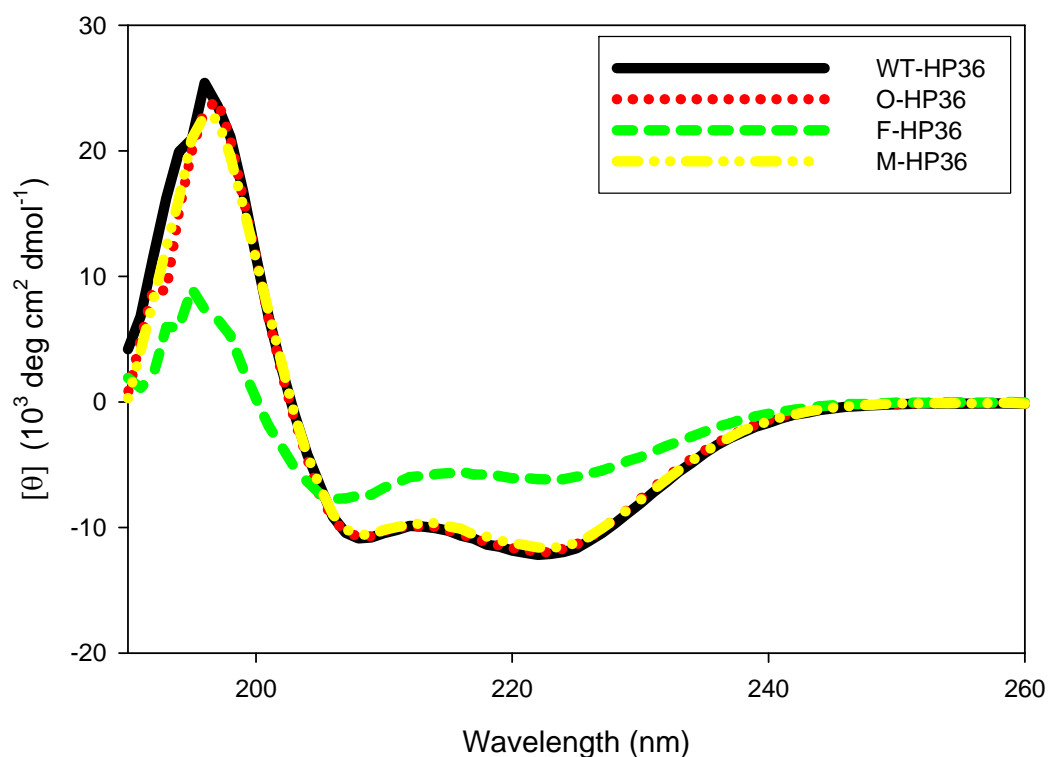


圖 3.1 HP36 系列胜肽 far-UV CD 光譜，在 25 °C 下。

由 far-UV CD 光譜 (圖 3.1) 可以發現 HP36 系列胜肽皆呈現典型的 α -螺旋光譜訊號，WT-HP36、O-HP36、M-HP36 在結構上沒有太明顯的改變，但是 F-HP36 的訊號明顯不同，其 222 nm 的訊號比起其他三條胜肽鏈的訊號弱，而此訊號的強度與 α -螺旋含量成正比的訊號。利用 Baldwin 等人所使用的方法來判斷 α -螺旋的含量比例²⁹，其結果如表 3.1。

表 3.1 HP36 系列胜肽之 α -螺旋含量

胜肽名稱	($[\theta]_{222} / [\theta]_{208}$)	α -螺旋分率(fraction of helix)
WT-HP36	1.12	36.83%
O-HP36	1.12	32.97%
F-HP36	0.81	17.37%
M-HP36	1.10	31.96%

*註：量測溫度均在 25 °C 下；溶液為 10 mM NaAc ， pH = 5.0 緩衝溶液。

由表 3.1 發現，只有 F-HP36 有明顯的差異，其 α -螺旋的含量比例大幅下降。原本預計 Pro 取代成 Hyp 或 Flp 時，HP36 都會因為立體電子效應而使得此位置的脯氨酸形成 *exo* 構型，以更符合此位置原本的 *exo* pucker 使 HP36 的 α -螺旋結構更穩定。但是從 CD 光譜看來，Hyp 與 Mop 取代皆無明顯變化，而 Flp 的取代則導致 α -螺旋的含量的減少。接下來我們用變溫實驗來了解 HP36 系列胜肽的穩定度。

3.2 變溫實驗探討

從圖 3.2 中可以發現 HP36 系列胜肽都可分別定義出折疊態與未折疊態和溫度關係之底線，所以都可以得到準確的 T_m 值。雖然 F-HP36 與其他三條胜肽鏈的訊號相對較弱，但依舊具有可定義的折疊態和溫度關係之底線，故雖誤差稍大但也能決定出其 T_m 值， T_m 值整理在表 3.2。

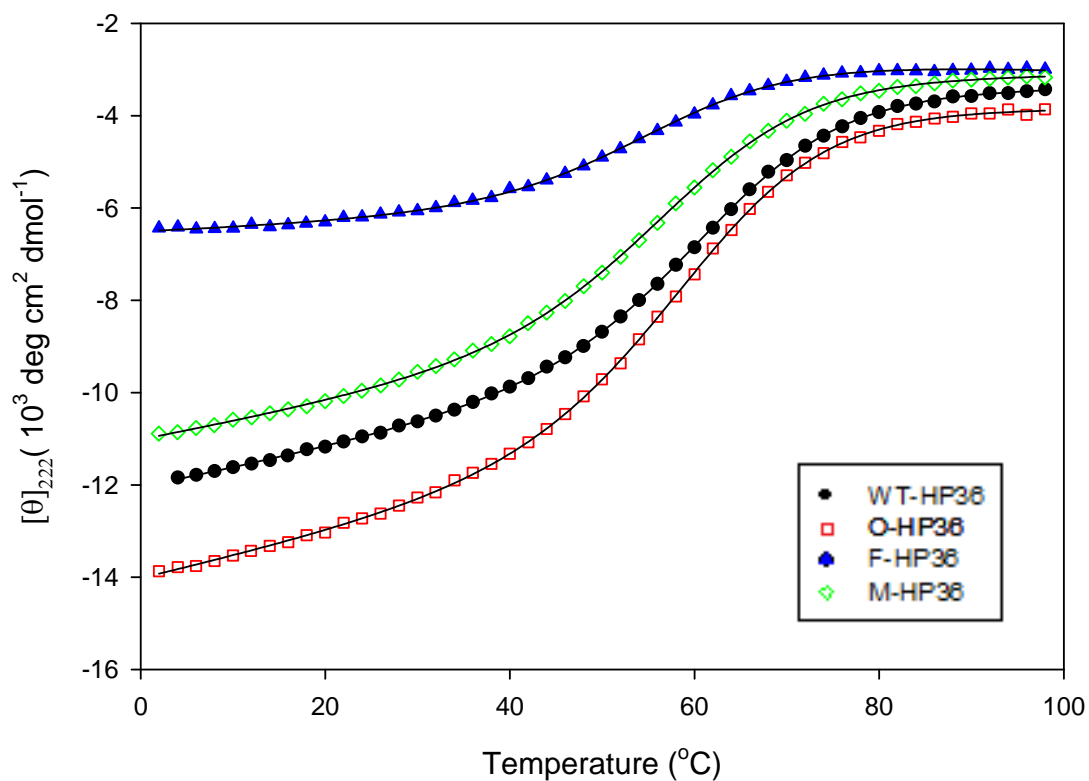


圖 3.2 利用 CD 量測 HP36 系列胜肽之熱熔化曲線，波長設定在 222 nm。

在原始結構中，Pro62 具有 *exo* pucker 構型，所以預期將 Pro 換成 Hyp 後可以使 HP36 因立體電子效應而變得更穩定。但比起 WT-HP36，O-HP36 的 T_m 卻些微下降兩度；而根據之前有關 Trp-cage 之研究¹⁶，Pro 被取代成 Flp 本來被預期能維持 *exo* pucker 構型使得 F-HP36 變穩定。但是其 T_m 值明顯地下降至 53.9 °C，這樣的置換並沒有穩定此一 α -螺旋結構，與預期的結果完全相反。而 M-HP36 雖然沒有像 F-HP36 明顯不穩定，但也使得 T_m 降到約 56 °C。

表 3.2 HP36 系列的 T_m 值

胜肽名稱	$T_m(^{\circ}\text{C})$
WT-HP36	61.2 ± 0.2
O-HP36	59.1 ± 0.3
F-HP36	53.9 ± 0.6
M-HP36	56.9 ± 0.1

3.3 CD 化學誘導變性實驗探討

接著進行化學誘導變性的實驗，觀察置換 P62 是否也會影響其結構展開過程的自由能 $\Delta G_U^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ 與 m-value，本實驗所使用的化學試劑為尿素 (urea)。

WT-HP36 與 O-HP36 的 $\Delta G_U^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ 相近，M-HP36 則稍不穩定，而 F-HP36 最不穩定，這樣的結果與變溫實驗所得到的趨勢大致相同 (表 3.3)；而 m-value 差異性並不大，這表示 P62 的置換並對於折疊連動性 (cooperation) 影響不大。

除了 $\Delta G_U^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ 外， C_M 也可以當成是一種指標。可以看到，F-HP36 的 C_M 值最低，這代表要使得 F-HP36 成為未折疊態所需的尿素濃度最低，也表示其最不穩定。從 C_M 我們得到與 $\Delta G_U^{\circ}(\text{H}_2\text{O})$ 相同的結論。

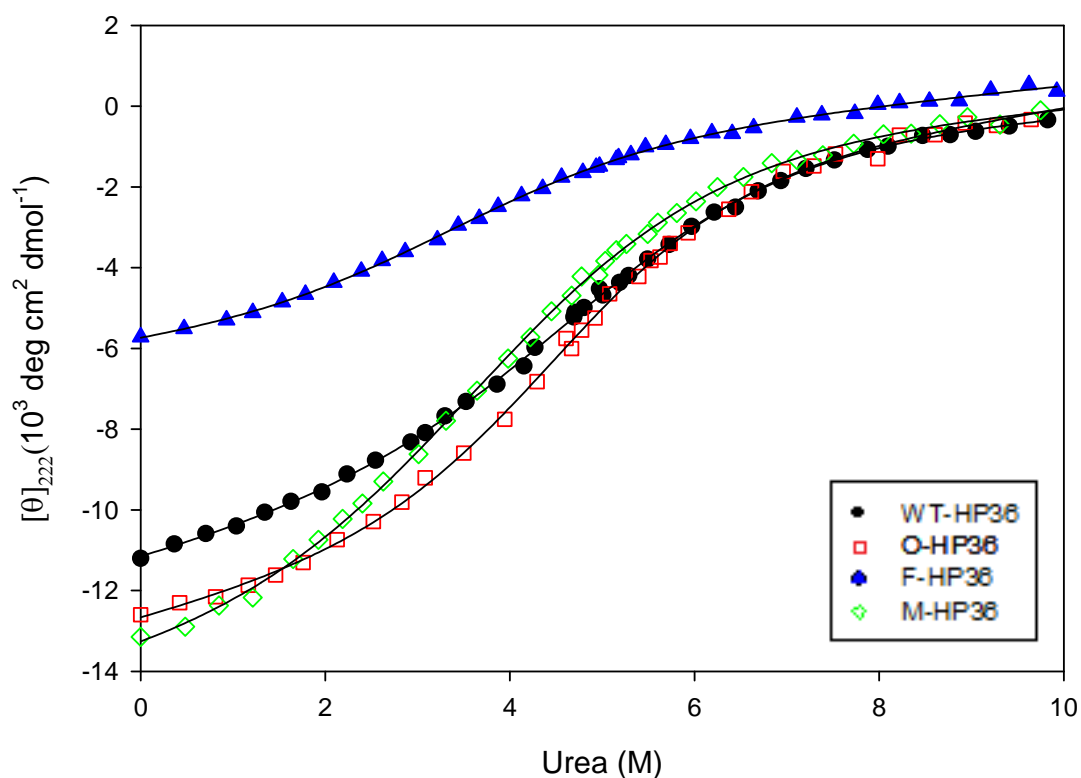


圖 3.3 HP36 的化學誘導變性 CD 訊號圖，波長設定 222 nm，WT-HP36、O-HP36 與 M-HP36 皆在 25 °C 下進行實驗；F-HP36 則在 4 °C 下進行實驗。

表 3.3 HP36 系列的 $\Delta G_U^o(\text{H}_2\text{O})$ 、m-value 值與 C_M 值

胜肽名稱	$\Delta G_U^o(\text{H}_2\text{O})$ (kcal · mol ⁻¹)	m-value (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	C_M (M)
WT-HP36	2.29 ± 0.28	0.47 ± 0.05	4.88 ± 0.17
O-HP36	2.22 ± 0.43	0.50 ± 0.08	4.42 ± 0.25
F-HP36	1.55 ± 0.46	0.46 ± 0.07	3.35 ± 0.34
M-HP36	1.80 ± 0.28	0.48 ± 0.05	3.75 ± 0.19

*註：所有量測均在 25 °C 下進行實驗

3.4 HP15 之 far-UV CD 光譜探討

經由探討 HP36 系列胜肽的 far-UV CD 光譜、變溫實驗與化學誘導變性反摺疊實驗。發現當 P62 被置換以後，穩定度都稍微下降，尤其是置換成 Flp 時，其螺旋比例與穩定度皆顯著地下降。所以我們猜測可能是這樣的置換影響到 HP36 碳端的最後一個 α -螺旋。所以我們合成最後靠近碳端之 α -螺旋片段 HP15 系列，觀察是否 P62 的置換破壞了此 α -螺旋的穩定度，進而影響整個 HP36 的穩定度。

因為 HP15 系列胜肽在 far-UV CD 光譜沒有明顯的 α -螺旋結構訊號，所以我們嘗試使用 TFE (trifluoroethanol)，來幫助 HP15 系列形成 α -螺旋，並且觀察是否在置換成不同 Pro 衍生物後會有差異。

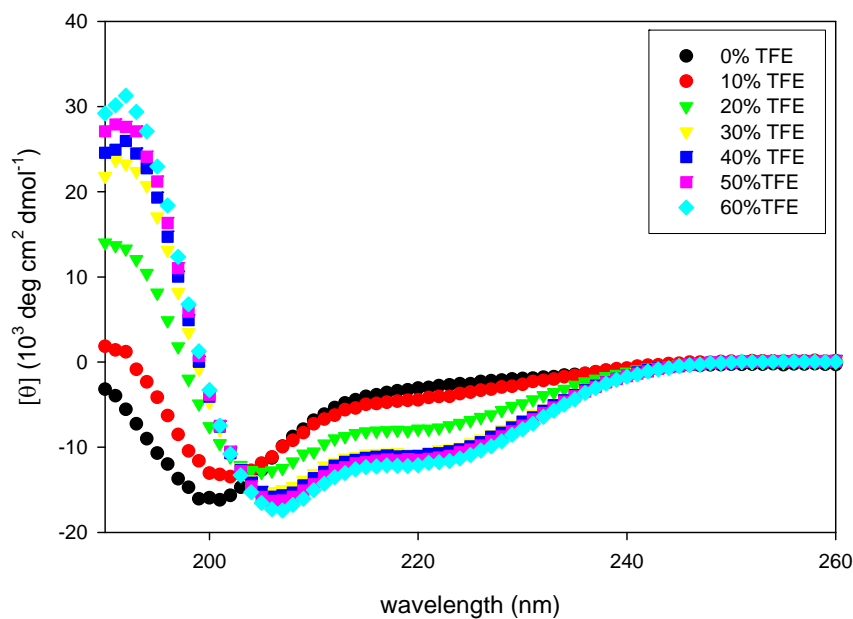


圖 3.4 WT-HP15 在不同百分比 (v/v) TFE 溶液中的 far-UV CD 光譜

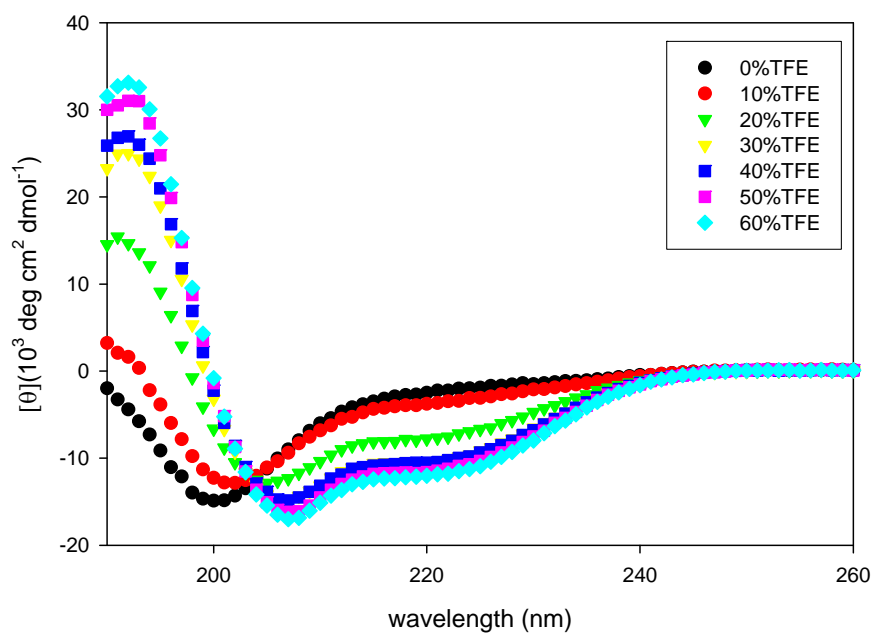


圖 3.5 O-HP15 在不同百分比 (v/v) TFE 溶液中的 far-UV CD 光譜

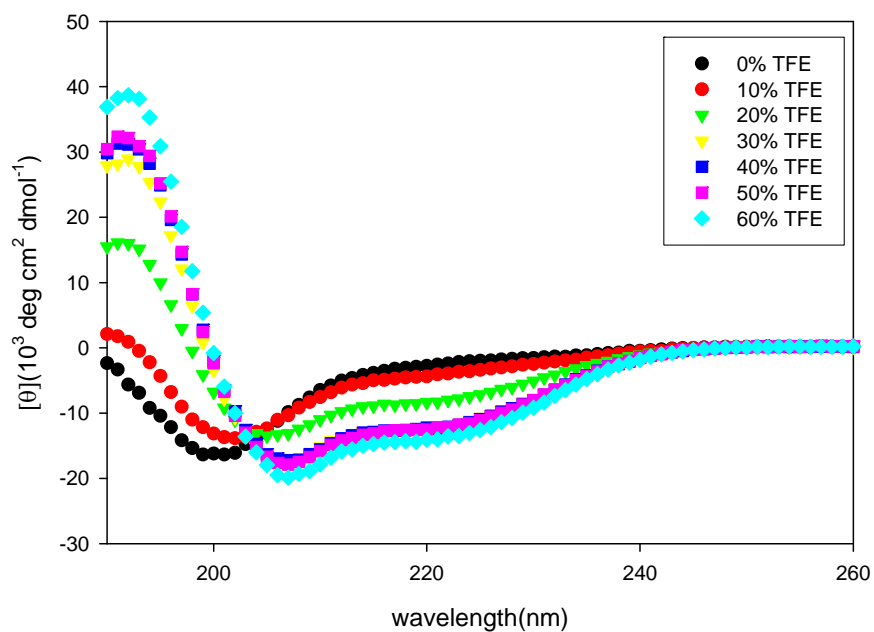


圖 3.6 F-HP15 在不同百分比 (v/v) TFE 溶液中的 far-UV CD 光譜

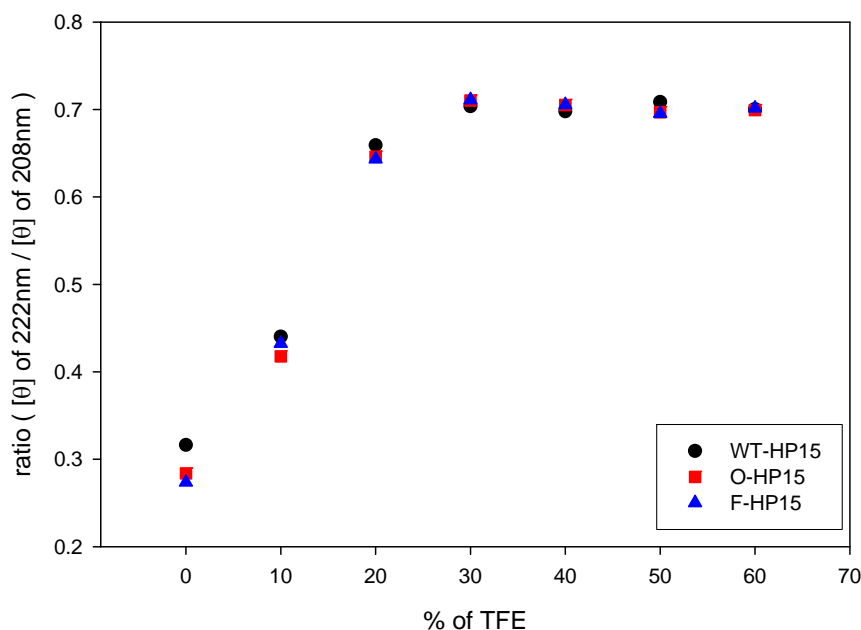


圖 3.7 在不同百分比 (v/v) 的 TFE 溶液中 α -螺旋比例 ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$)

從圖 3.7 看出不管在多少百分比的 TFE 下，WT-HP15、O-HP15 與 F-HP15 的 α -螺旋比例差異並不明顯 (表 3.4)。所以 P62 置換所產生對 HP36 之影響，可能不是因為該置換破壞第三個 α -螺旋所導致。與 Trp-cage 相比，在 α -螺旋氮端的脯胺酸，其立體電子效應對於 α -螺旋的影響相較於位在碳端的脯胺酸並不相同。因此我們從其他角度探討置換 P62 造成 HP36 不穩定的原因。

表 3.4 HP15 在水溶液中 (0% TFE) 的 α -螺旋比例 ($[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$)

胜肽名稱	($[\theta]_{222} / [\theta]_{208}$)	α -螺旋分率(fraction of helix)
WT-HP15	0.32	11.82%
O-HP15	0.28	11.20%
F-HP15	0.27	11.36%

3.5 HP36 之 1D ^1H -NMR 光譜

除了利用 CD 以外，NMR 也可以提供一些結構上的資訊。圖 3.8 為 HP36 系列的一維 (1D) NMR 圖譜。在 6 ppm 至 10 ppm 的部分中 (amide proton，NH 的化學位移分布範圍)，假如無二級結構，其上胺基酸 NH 的環境會很類似，所以 NH 的化學位移分布就會很緊密。而 HP36 的系列胜肽 NH 的化學位移皆分佈較廣，因此判斷有二級結構。

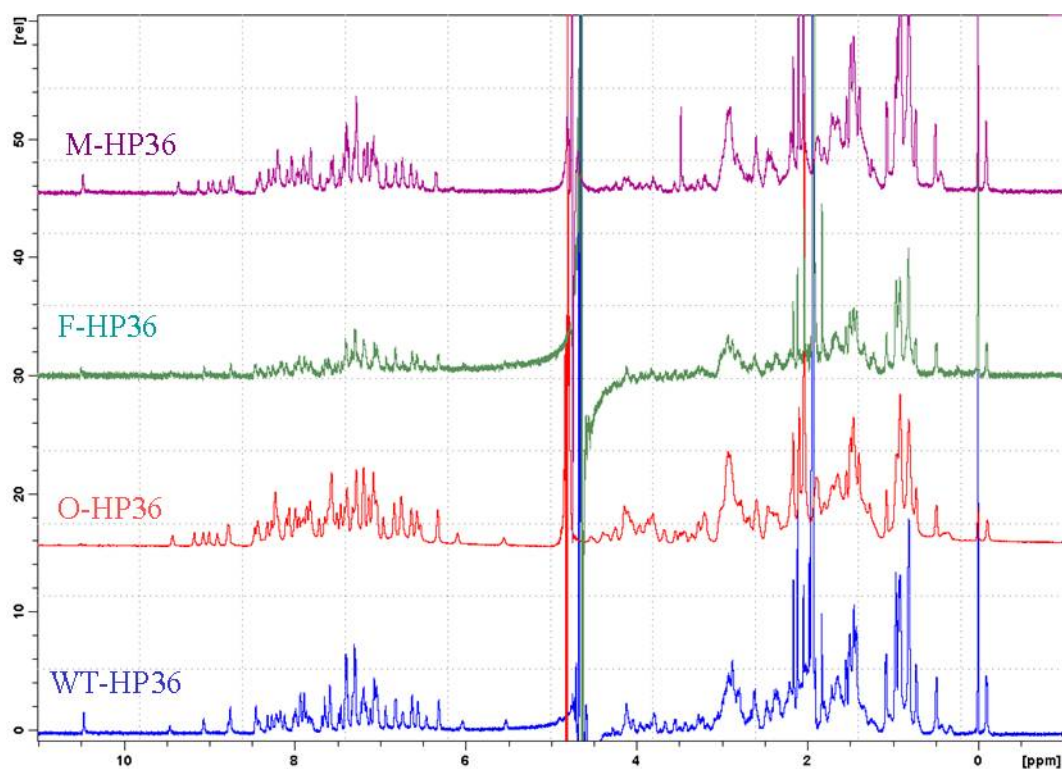


圖 3.8 HP36 系列胜肽 1D ^1H -NMR 圖譜

除此之外，在位於約 -0.11 ppm 的地方，有一個 Val 50 側鏈上甲基的化學位移訊號 (圖 3.9)。通常一般 NMR 光譜很少有負值的化學位移訊號，會導致此 Val 50 的甲基化學位移出現在負值，是因為 Val 50 也有參與在 HP36 的疏

水性核心中，受到其他三個 Phe 上苯環的環電流 (ring current) 影響所導致。

因此這個訊號可以辨別有無形成疏水性核心的一個重要的指標。在所有的

HP36 中，都可以觀察到這個訊號，表示所有 HP36 胜肽皆有形成疏水性核心

30。

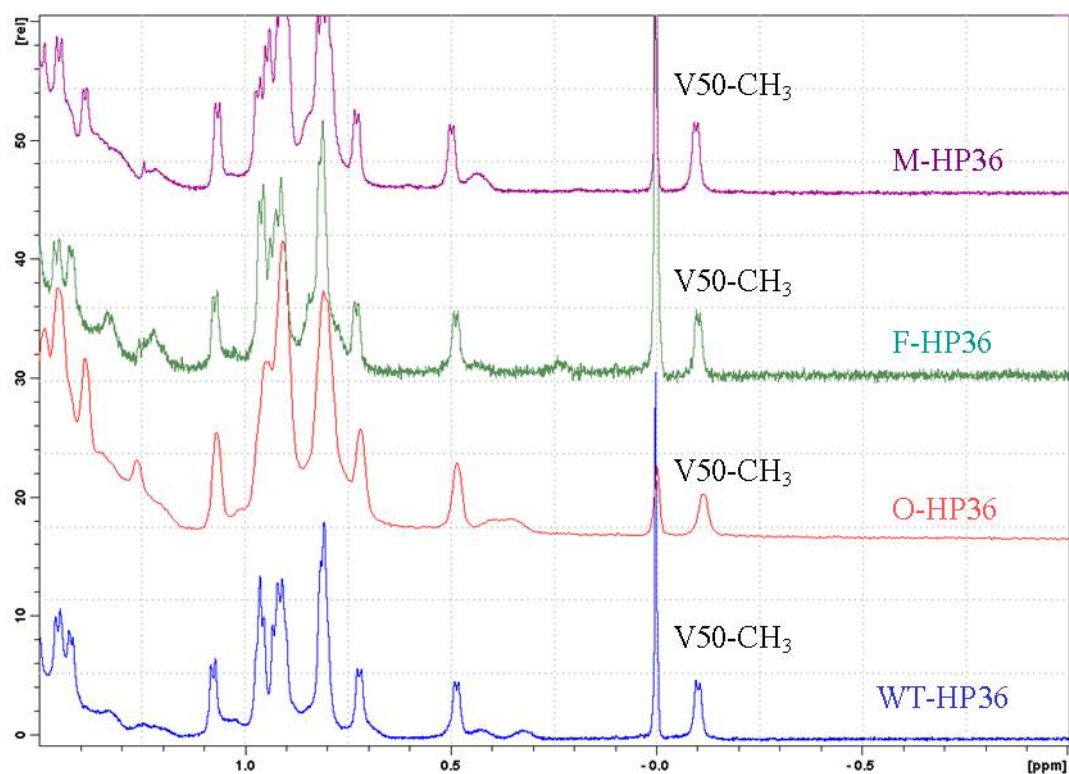


圖 3.9 HP36 系列胜肽 1D ^1H -NMR -1.0 ppm 至 2.0 ppm 範圍圖譜

另外值得注意的，Phe47 側鏈苯環上 4 號 (C4) 位置的氫原子在約 5.51 ppm，而 Phe51 在 6.32 ppm 會有一個共振訊號 (圖 3.10)³⁰。F-HP36 在這兩個位置上的訊號都相當微弱；而 M-HP36 只有觀察到 Phe51 的訊號，Phe47 的 C4 氫原子訊號則相當弱而無法判定。我們推測可能 M-HP36 的疏水性核心有些微的改變，造成此訊號的消失，也因此稍微減弱了 M-HP36 的穩定性。

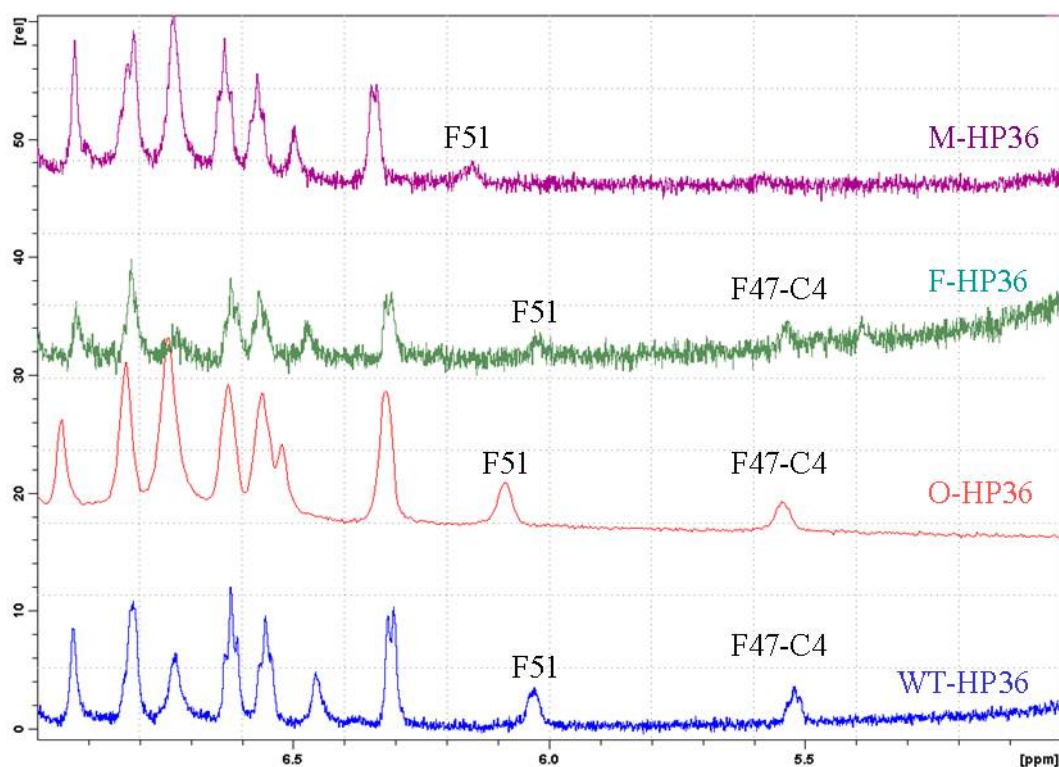


圖 3.10 HP36 系列 1D ^1H -NMR 5.0 ppm 至 7.0 ppm 範圍圖譜

3.6 HP36 之 2D ^1H -NMR 光譜

除了觀察一維的 NMR 光譜訊號外，也可藉由 2D 的 NMR 來了解 HP36 的結構改變。我們經由 NOESY 與 TOCSY 的實驗來判定各個胺基酸的 amide proton (NH) 與 C_α proton (H_α) 的化學位移。 H_α 的偏移對於二級結構環境相當敏感，所以我們可以經由觀察其 H_α 來了解其二級結構，看是否有發生明顯的差異。我們將 O-HP36 與 M-HP36 的 H_α 分別扣除 WT-HP36 的 H_α 與 random coil 的 H_α 得到圖 3.11 與圖 3.12。而 WT-HP36 的化學位移是取自 McKnight 等人所發表的文獻⁷。

表 3.5 HP36 系列胜肽的 NH 與 H_α 的 NMR 化學位移 (proton chemical shift)

Residue	O-HP36		M-HP36		F-HP36	
	HN	H _α	HN	H _α	HN	H _α
43 Ser	9.43	4.51	9.31	4.54		
44 Asp	9.18	4.40	9.73	4.42	9.01	4.57
45 Glu	8.77	4.13	8.68	4.13	8.70	4.10
46 Asp	8.06	4.51	8.02	4.53	7.96	4.51
47 Phe	9.08	3.87	8.95	3.89	8.98	3.88
48 Lys	7.81	4.34	7.80	4.34	7.92	4.37
49 Ala	7.71	4.10	7.70	4.11	7.66	4.10
50 Val	7.92	3.53	7.88	3.57	7.91	3.56
51 Phe	8.42	4.23	8.37	4.28	8.37	4.24
52 Gly	8.22	4.08, 3.94	8.19	4.08, 3.94	8.17	4.08, 3.94
53 Met	7.61	4.85	7.60	4.84	7.57	4.89
54 Thr	8.23	4.54	8.17	4.54	8.13	4.53
55 Arg	8.78	3.28	8.74	3.28	8.72	3.26
56 Ser	8.21	4.06	8.17	4.08	8.16	4.08
57 Ala	7.65	4.11	7.61	4.11	7.59	4.12
58 Phe	8.47	4.10	8.41	4.13	8.41	4.10
59 Ala	7.87	3.97	7.85	3.97	7.80	4.01
60 Asn	7.19	4.68	7.19	4.69	7.06	4.57
61 Leu	7.45	4.32	7.43	4.35	7.41	4.32
62 Pro						
63 Leu						
64 Trp	8.19	4.38	7.88	4.41		
65 Lys	6.09	3.66	6.18	3.75		
66 Gln	7.58	3.42	7.57	3.46		
67 Gln	8.19	4.04	8.16	4.05	8.12	4.05
68 Asn	7.95	4.51	7.93	4.52	7.92	4.49
69 Leu	8.44	4.26	8.39	4.26	8.43	4.27
70 Lys	8.27	4.05	8.23	4.05	8.22	4.02
71 Lys	8.10	4.13	8.07	4.15	8.07	4.13
72 Glu	8.32	4.13	8.29	4.14	8.30	4.10
73 Lys	7.83	4.32	7.81	4.33	7.80	4.32
74 Gly	7.82	3.99, 3.87	7.82	3.99, 3.88	7.79	4.00, 3.88
75 Leu	8.01	4.37	7.95	4.37		
76 Phe	7.61	4.35	7.58	4.38		

我們發現 WT-HP36 、 O-HP36 與 M-HP36 的 H_α 化學位移相差都不大，都在 ± 0.2 ppm 以內；而與 random coil 的 H_α 化學位移的差值則明顯比較大，表現出典型的 α -螺旋 NMR 訊號。

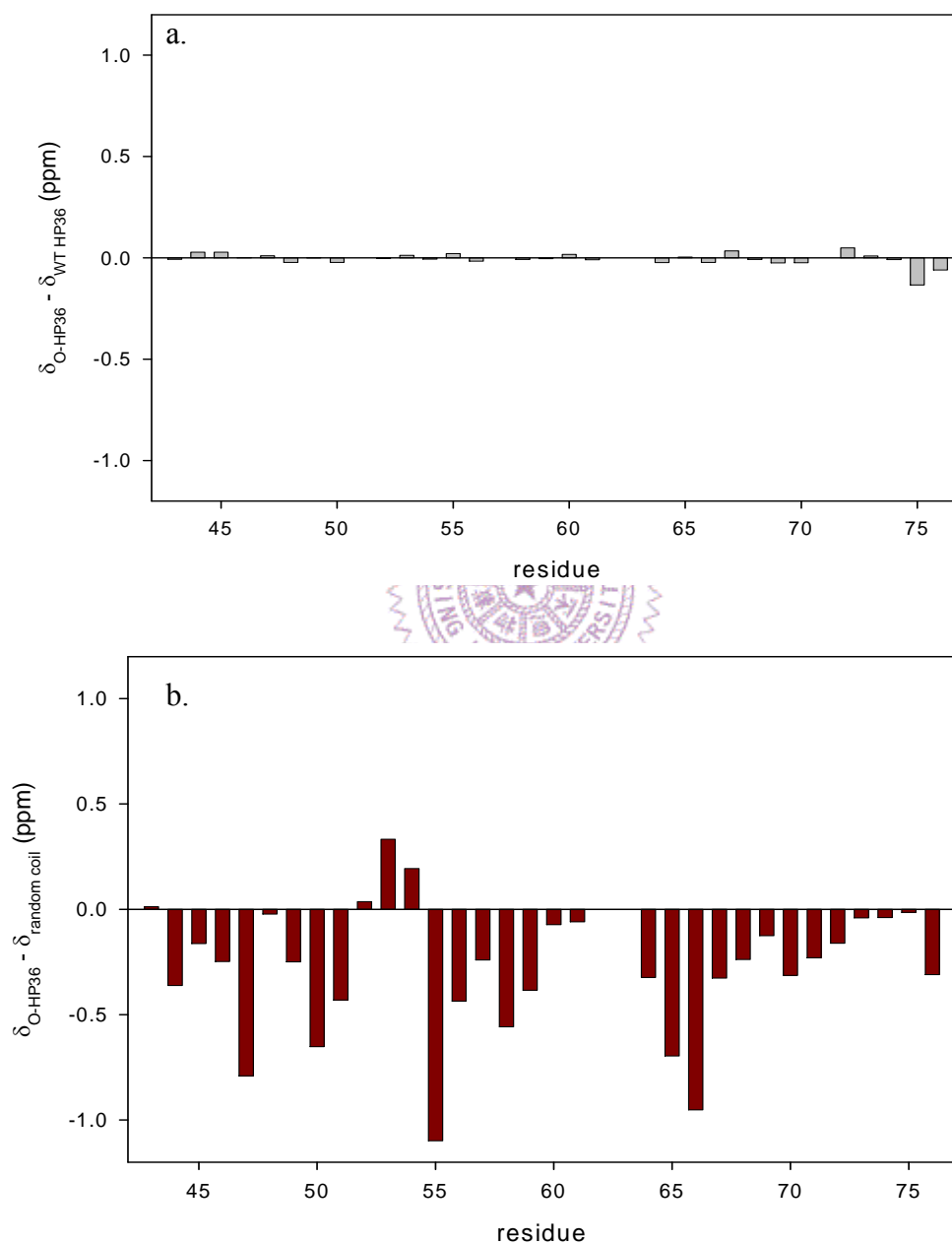


圖 3.11 經由 2D 1H -NMR 光譜判斷出 O-HP36 之 H_α 化學位移。 a. 為 O-HP36 與 WT-HP36 的 H_α 化學位移的差值； b. 為 O-HP36 與 random coil 的 H_α 化學位移的差值。

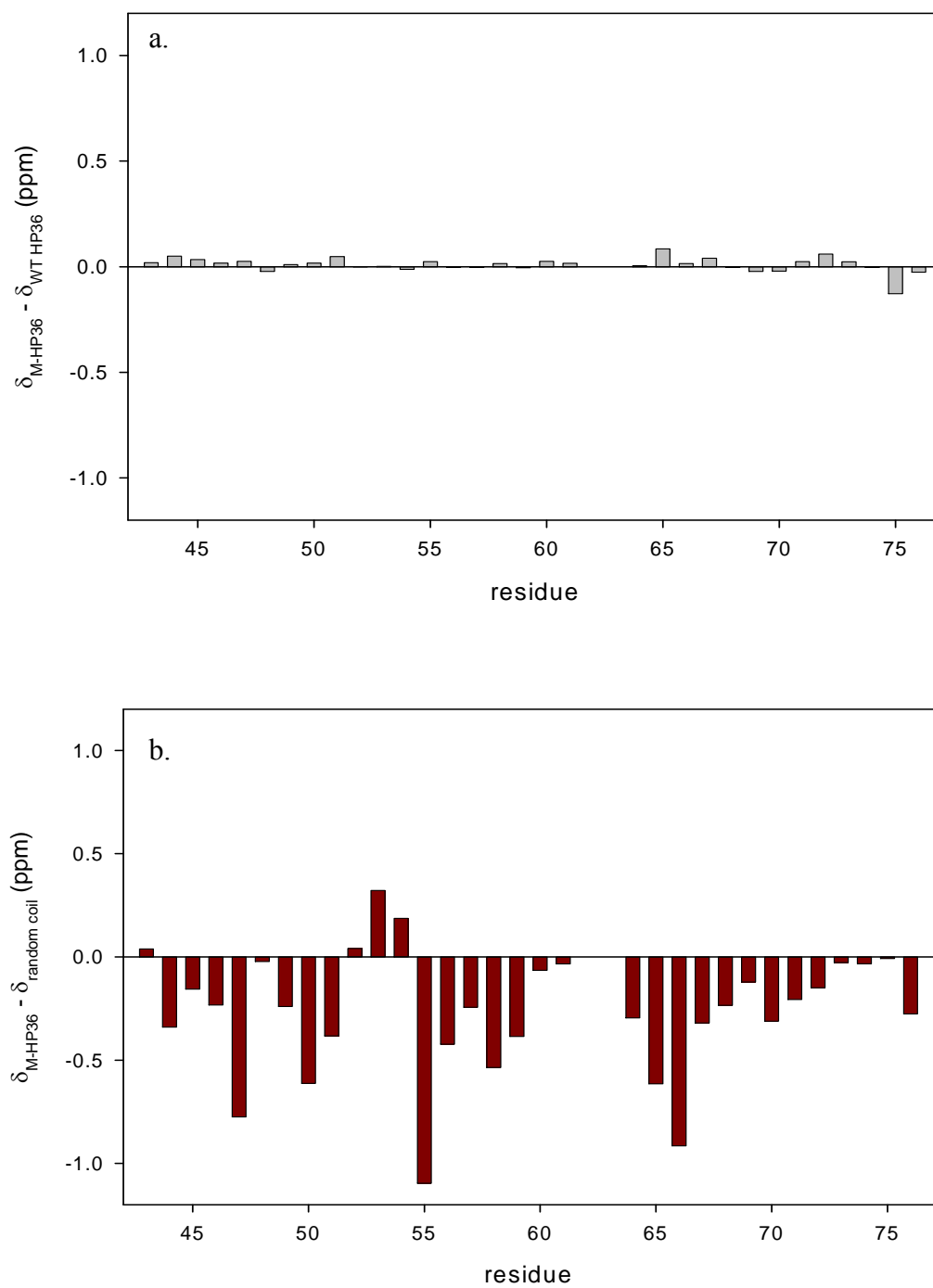


圖 3.12 經由 2D ^1H -NMR 光譜判斷出 M-HP36 之 H_α 化學位移。a. 為 M-HP36 與 WT-HP36 的 H_α 化學位移的差值； b. 為 M-HP36 與 random coil 的 H_α 化學位移的差值。

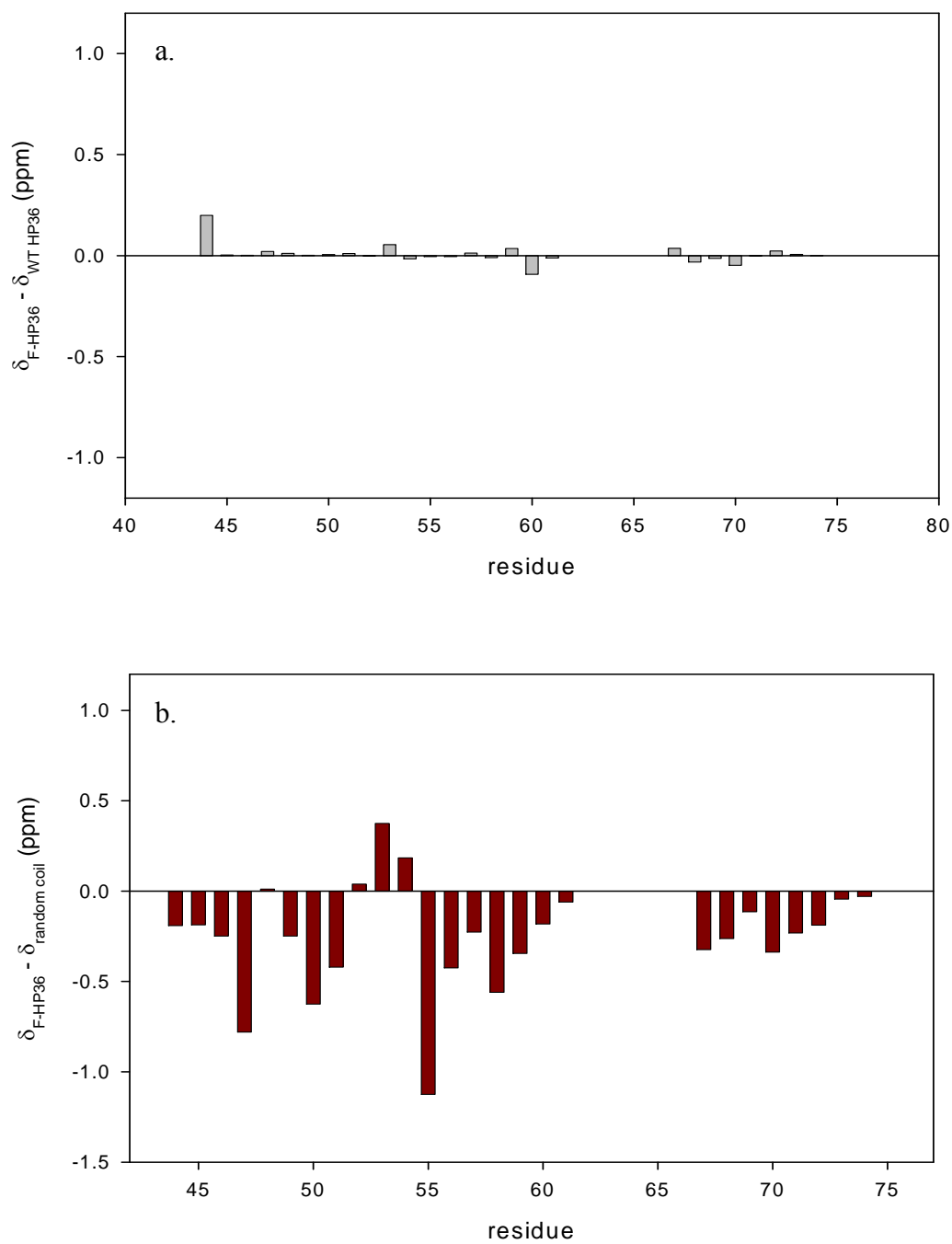


圖 3.13 經由 2D ^1H -NMR 光譜判斷出 F-HP36 之 H_α 化學位移。 a. 為 F-HP36 與 WT-HP36 的 H_α 化學位移的差值； b. 為 F-HP36 與 random coil 的 H_α 化學位移的差值。

從 2D-NMR 可證明，雖然 HP36 系列的胜肽穩定度雖然有差異，但是主要結構還是一樣的，並沒有因 Pro62 的置換而破壞整體結構。

3.7 HP36 系列之螢光光譜

觀察 HP36 之結構圖，我們發現 Pro62 與 Trp64 距離很接近，所以我們利用螢光光譜來觀察 Trp64 的螢光放射，藉以得知 Trp64 的作用環境是否受到 Pro62 置換的影響。

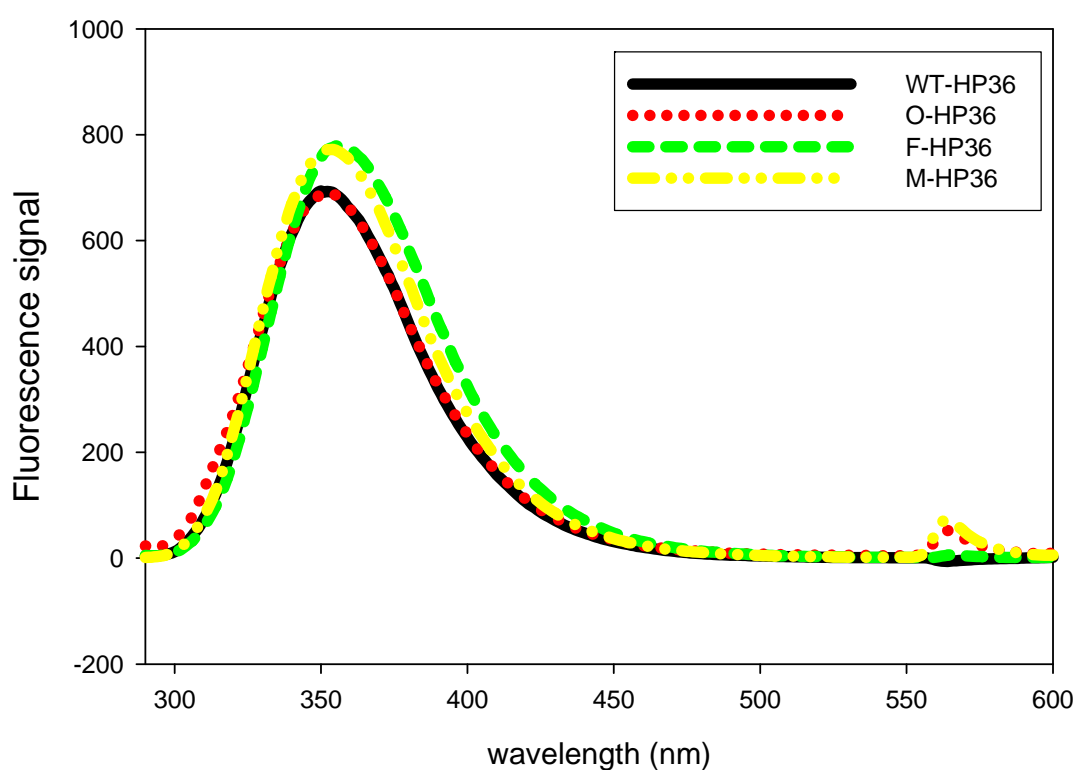


圖 3.14 HP36 系列胜肽的螢光光譜圖

從螢光放射光譜 (圖 3.14) 可以觀察到，HP36 系列在 350 nm 左右的地方都有一最強之放射峰。此處為 Trp64 所吸收 280 nm 波長後所放出的螢光訊號，由表 3.6 發現，F-HP36 有輕微的紅位移，這樣的現象被認為當 Trp 暴露在環境中的面積越大時，其螢光放射的能量就會越弱。因此，我們認為 F-HP36

的 PLWK 片段相較其他三條胜肽鏈是相對鬆散的，推測是因 proline-aromatic 作用力的減弱而造成這樣的結果。

表 3.6 HP36 系列胜肽的螢光放射 (emission) 最大訊號之波長

胜肽名稱	λ_{\max} (nm)
WT-HP36	352
O-HP36	352
F-HP36	356
M-HP36	354

3.8 結果討論

經由一系列的 CD 光譜實驗、NMR 實驗與螢光光譜實驗，我們本來預期的立體電子效應所造成的影響並沒有穩定 HP36，而且反而造成其結構上的不穩定。而 F-HP36 造成穩定度顯著地下降，這讓我們嘗試用不同的角度去解釋這個現象。在仔細觀察 HP36 的結構後，發現 Pro62 與 Trp64 有很接近的距離，Pro62 的 4 號碳與 Trp64 的芳香環最近距離約 2.9 Å (圖 3.15)。查考文獻發現，proline-aromatic 作用根據不同的角度與距離，會產生有不一樣的作用力效果 (圖 3.16)¹¹。我們也可以從胺基酸與溶劑的作用 (表 3.7) 來觀察整個蛋白質的穩定度。

表 3.7 WT-HP36 (44-76)的溶劑可接觸表面面積 (Solvent accessible surface areas)

Residue	Total (\AA^2)	Apolar (\AA^2)	Backbone (\AA^2)	Sidechain (\AA^2)
44 Asp	109.93	36.16	6.01	103.93
45 Glu	136.46	53.29	4.2	132.25
46 Asp	76	9.98	8.05	67.95
47 Phe	3.51	3.51	0	3.51
48 Lys	155.88	102.62	11.28	144.6
49 Ala	99.04	80.29	36.68	62.37
50 Val	34.7	25.48	16	18.7
51 Phe	35.43	11.91	24.33	11.1
52 Gly	52.16	32.84	52.16	0
53 Met	153.03	145.53	19.27	133.77
54 Thr	70.8	53.93	0	70.8
55 Arg	100.2	47.36	1.95	98.24
56 Ser	94.89	53.02	18.68	76.22
57 Ala	41.72	39.61	8.01	33.7
58 Phe	13.81	13.81	3.93	9.88
59 Ala	63.96	44.85	19.11	44.85
60 Asn	117.6	36.3	35.66	81.94
61 Leu	60.04	54.07	10.21	49.83
62 Pro	60.66	60.66	16.35	44.31
63 Leu	111.94	108.26	3.67	108.26
64 Trp	167.15	154.92	9.29	157.86
65 Lys	51.27	23.82	0	51.27
66 Gln	23.5	0.15	0	23.5
67 Gln	90.02	20.96	0	90.01
68 Asn	68.83	5.59	0.96	67.86
69 Leu	43.65	43.65	0.2	43.44
70 Lys	85.05	42.15	0.03	85.02
71 Lys	135.6	85.28	11.45	124.15
72 Glu	123.48	25.44	30.94	92.54
73 Lys	78.76	43.04	7.97	70.79
74 Gly	12.59	1.05	12.59	0
75 Leu	110.42	87.03	35.53	74.88
76 Phe	223	180.46	10.44	212.56

註：此表是利用 GETAREA 1.0 beta 輸入 WT-HP36 的 PDB 檔 (1VII) 所計算出來，此軟體由 University of Texas Medical Branch 的 Robert Fraczkiwicz 和 Werner Braun 所開發。網址：
<http://curie.utmb.edu/GET.html>

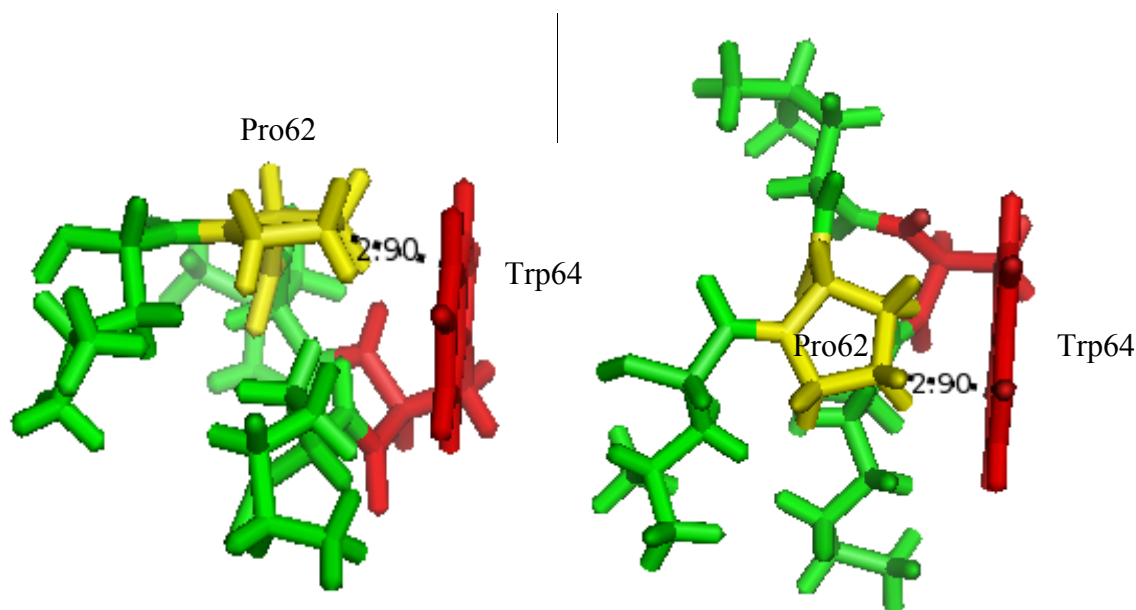


圖 3.15 PLWK 片段結構圖，黃色的部分為 Pro62，紅色的部分為 Trp64，左圖翻轉九十度後成右圖，Pro62 的 4 號碳與 Trp64 的芳香環最近距離為 2.9 Å。

統計的結果指出，自然界中脯氨酸與苯環結構之側鏈最大的比例形成圖 3.16c. 的 ef 類別，而最少的是 fe 類別。推測發現，proline-aromatic 作用力是由脯氨酸上的 C-H 與類苯環側鏈上的 π 電流作用所形成的（記為 $\text{C-H}\cdots\pi$ ）。因為脯氨酸上的氮原子為拉電子基，會將其側鏈上的 C-H 電子雲的密度拉走，造成類似 π -陽離子作用力（ π -cation interaction）。所以在 ef 類別中的作用力會比在 fe 的類別中強。而在 HP36 的情況中，其 Pro 62 與 Trp 64 的相對位置就很類似於 ef 的情況。

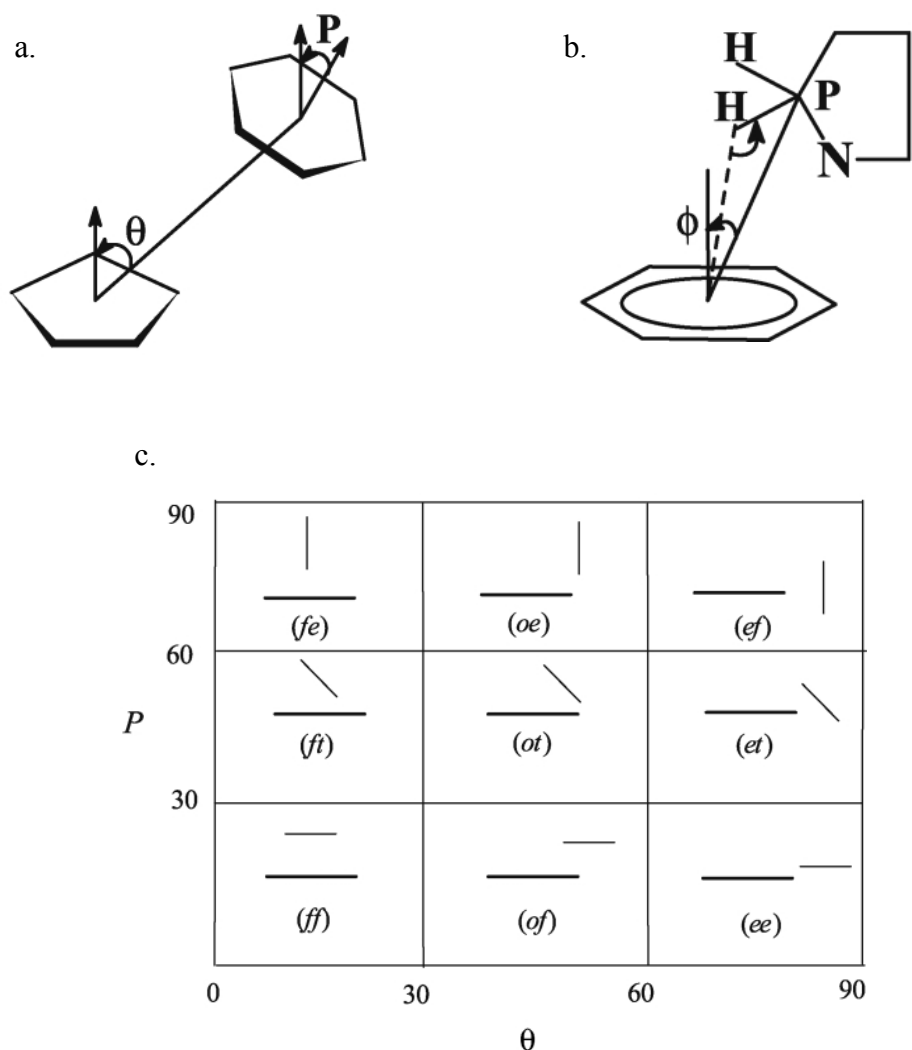


圖 3.16 a. 脯胺酸 θ 與類苯環側鏈 P 的相對角度參數；b. 苯環類結構與脯胺酸之側鏈碳上的氫作用示意圖， ϕ 為類苯環中心與作用碳連線的差角；c. 利用參數 P 與 θ 將脯胺酸與類苯環側鏈作用歸類成基本的九種作用之圖形，長線表示成與紙面垂直的脯胺酸平面，短線為與紙片垂直的類苯環側鏈平面¹¹。

PLWK 片段在理論計算中被認為是 HP36 摺疊最開始發生的區域¹²，所以此片段在整個摺疊的過程中扮演著舉足輕重的角色，而其中最重要的作用力就是 proline-aromatic 作用力。所以當我們將 Pro 置換成 Flp，即為脯胺酸 C_γ 的氫置換成氟時，導致原來的 P62 與 W64 產生立體障礙，而改變了原本作用的位向，因而 proline-aromatic 作用力就減弱了。並且從表 3.7 得知 P62 的側鏈暴

露在溶劑中的面積為 44.31 \AA^2 ，而在完全暴露時的面積為 105 \AA^2 ³¹，這表示有約有 42% 的面積是暴露在溶劑中，這與從圖 3.15 可以觀察到 P62 的側鏈有一面是暴露在溶劑中吻合。而 P62 的 C_γ 位置是暴露於水溶液環境中，因有機氟是屬於疏水性，暴露在水溶液中會造成整體能量上升而導致不穩定。而 O-HP36 雖然因 OH 基提供一個帶更多正電性質的質子，但是 Hyp62 與 Trp 64 太過接近，而造成些許的立體障礙。所以這兩個因素綜合起來就導致 O-HP36 與 WT-HP36 的穩定度差異不大，這樣的論點可以經由觀察 M-HP36 有所佐證。

在 M-HP36 的情況下，OMe 造成更大的立體障礙，導致其穩定度相較於 O-HP36 更不穩定，並且造成疏水性核心的些微破壞。而對於立體電子效應的探討，我們發現在 α -螺旋氮端的反式脯胺酸衍生物，不能像應用在 Trp-Cage (α -螺旋碳端) 一樣穩定整個螺旋結構，這可能是受到 proline-aromatic 作用力與立體障礙的影響，使我們無法單獨觀察到立體電子效應。

第二部分 電子自旋標記聚脯胺酸的合成及電子自旋共振光譜之量測

四、前言

4.1 聚脯胺酸 (polyproline) 介紹

聚脯胺酸 (polyproline) 結構常被發現於膠原蛋白 (collagen) 中，膠原蛋白是由三股聚脯胺酸胜肽鏈互相纏繞而成。因此了解聚脯胺酸的結構特性，有助於更進一步了解膠原蛋白。

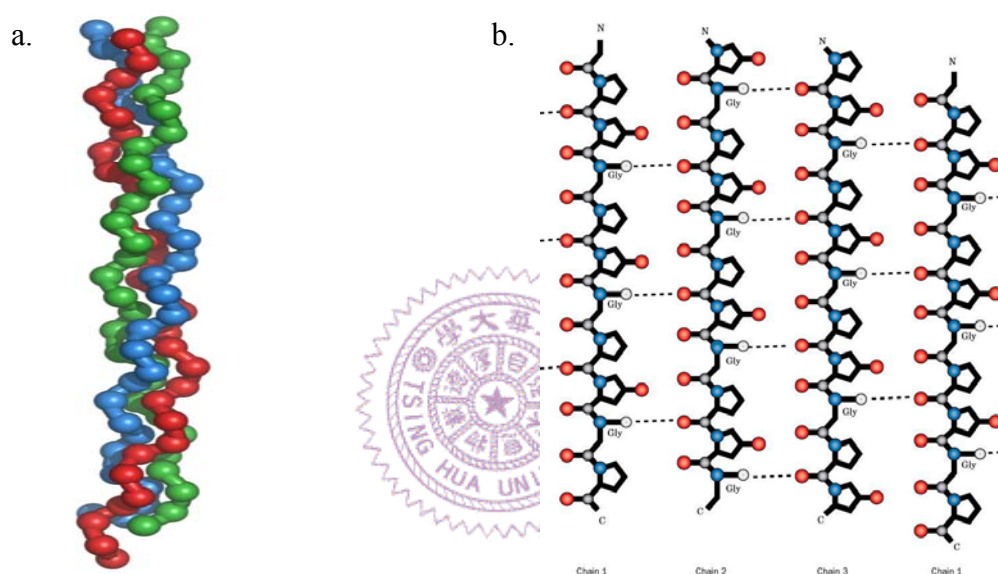


圖 4.1 a. 膠原蛋白示意圖；b. 三股聚脯胺酸之作用力示意圖

除了在膠原蛋白外，富有脯胺酸的序列 (proline-rich sequences, PRS) 在生物傳遞中的多蛋白錯合過程扮演重要的角色。舉例 Src 激酶 (kinases) 來說，PPII 螺旋對於 SH3 區位 (Src homology 3 domains) 有特殊的結合性，SH3 利用其在疏水面的芳香族類胺基酸 (aromatic residues) 與具有 PPII 結構的區位結合；SH3 區位在細胞與細胞之間的溝通或是訊息的轉導 (transduction) 上扮演重要的角色。所以 SH3 與 PPII 這樣的結合性在很多蛋白質對蛋白質之間是很

重要的。此外在蛋白質自身裡面也可觀察到這樣的作用力，SH3 區位可由分子內互相作用來調控蛋白質活性。例如 Src 這個蛋白質的 SH3 區位會與富有脯胺酸的區位結合，以形成關閉起來且無活性的結構。假如失去這樣的作用力可能會造成錯誤的改變並且形成過度活化的 Src 分子和癌症。這樣的作用力也被發現在很多其他的功能區位中例如：WW、EVH1、GYF (圖 4.2)、UEV 等。

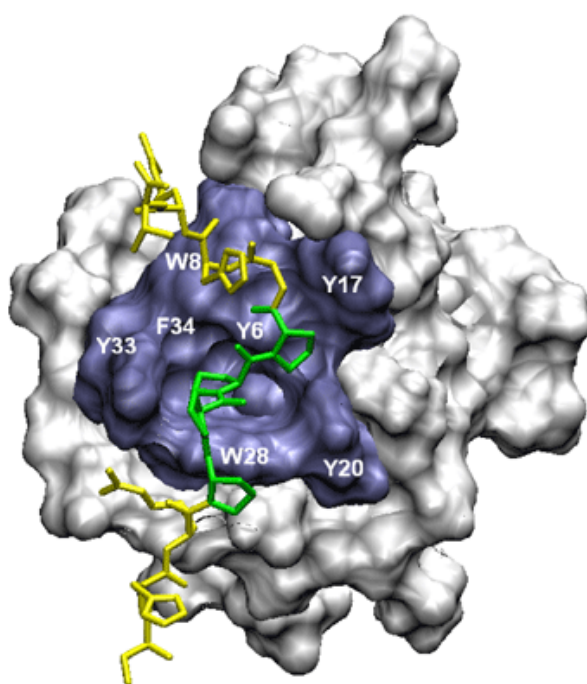


圖 4.2 GYF 區位錯合的 NMR 結構圖，GYF 區位以鏈狀表示，而綠色的鏈狀為有作用力的聚脯胺酸。暗灰色表示的凹槽，並標上胺基酸的簡碼與順序，為巨大蛋白的作用部位。

聚脯胺酸主要可以形成兩種構形：type I (PPI) 以及 type II (PPII) (圖 4.3)。

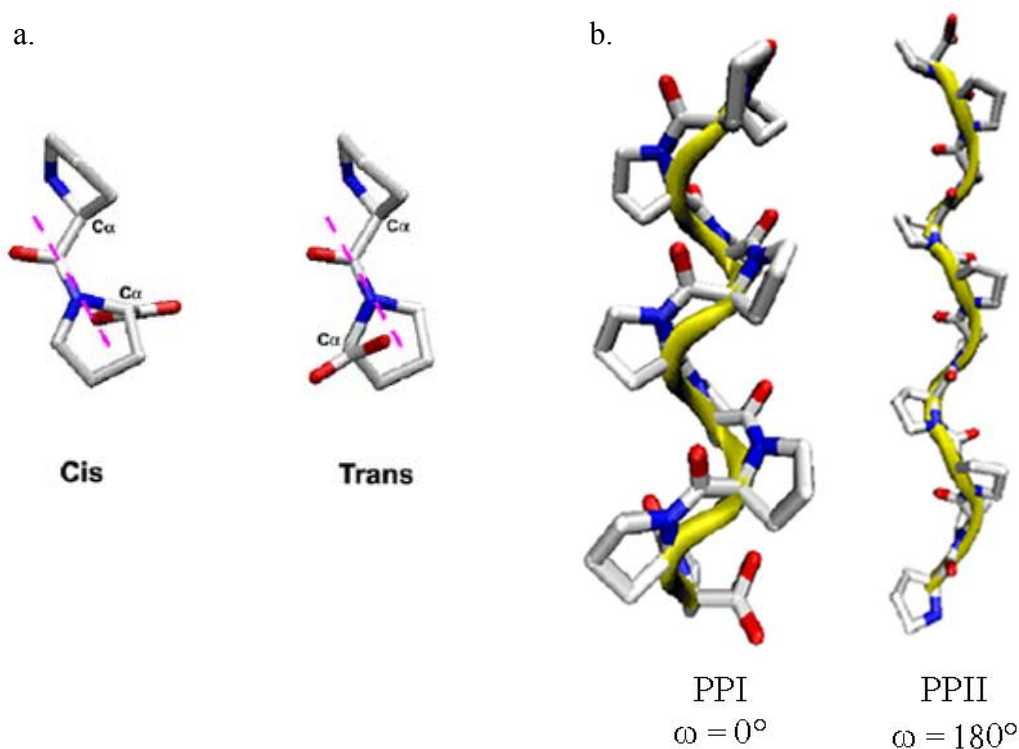


圖 4.3 a. 聚脯氨酸的順式與反式示意圖； b. 聚脯氨酸的兩個構形：type I (PPI) 以及 type II (PPII)。

PPI 屬於右螺旋結構且皆含有順式 (cis) 的肽鍵，其結構形成的二面角 (dihedral angles) $(\phi, \psi, \omega) = (-75^\circ, 160^\circ, 0^\circ)$ ，圖 4.3 b. 顯示 PPI 的簡單模型，PPI 結構較為緊密，螺旋距為 $5.6 \text{ \AA}/\text{turn}$ ，每一個螺旋 (turn) 含有 3.3 個胺基酸 (residue)；而 PPII 其二面角 (dihedral angles) $(\phi, \psi, \omega) = (-75^\circ, 145^\circ, 180^\circ)$ 。PPII 螺旋的構造是相對開放而鬆散，螺旋距為 $9.3 \text{ \AA}/\text{turn}$ ，並且在其結構之間沒有氫鍵的作用力 (hydrogen bonding)。每一個螺旋含有 3 個胺基酸 (residue)，故每個胺基酸的距離大約為 3.1 \AA 。PPII 螺旋是一個左旋的螺旋且皆含有反式 (trans) 的肽鍵，不同於其他的螺旋 (ex: α -helix、 3_{10} -helix、 π -helix)³²。胺基上的氮原子距離氧原子太遠 (大約 3.8 \AA)，並且在空間上的位向也不正確，以至於

無法形成氫鍵。而且在脯氨酸的側鏈是個環狀結構的緣故，所以只有氫鍵的受體，而沒有氫鍵的予體。圖 4.3 b. 為 PPII 的簡單模型。形成 PPI 或 PPII 結構主要取決所處的溶劑環境，PPI 構形僅存在於某些有機溶劑中例如 *n*-propanol、butanol；而 PPII 主要存在於水溶液中及大部分有機溶劑中。

儘管聚脯氨酸螺旋不像 α -螺旋一樣具有分子內氫鍵作用 (hydrogen bonding)，但其五圓環的堅硬特性產生了獨特的結構，因此曾被用來當作生物物理實驗的分子規則標準品，例如：校正螢光共振能量轉移 (Förster resonance energy transfer, FRET) 的距離測量。又因為在轉換的過程中需要高的活化能 ($E_a \approx 20$ kcal/mol)，所以造成 PPI 與 PPII 兩個構形間轉換的速率是緩慢的。所以聚脯氨酸可以提供一個很好的模型來嘗試建立起 EPR 的光譜規則。

4.2 電子自旋共振 (electron spin resonance, ESR or electron paramagnetic resonance, EPR)

過去常稱為電子順磁共振，是一種不成對電子在磁場中其自旋量子數為 $1/2$ 下的磁共振現象；類似磁場中自旋量子數為 $1/2$ 的原子核有核磁共振 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 之現象，又因有利用到電子的順磁性，故稱電子順磁共振。但是由於分子中的電子多數是成對存在，根據包利不相容原理 (Pauli Exclusion Principle)，每對電子必為一個自旋向上，一個自旋向下，因此磁性互相抵消。所以必須有不成對電子的存在，才能表現磁共振現象，例如過渡元

素重金屬或者自由基的存在的分子。雖然原理類似於核磁共振，但由於電子質量遠輕於原子核，而有強度大許多的磁矩。以氫原子核（質子）為例，電子的磁矩強度是質子的 659.59 倍。因此對於電子，磁共振所在的拉莫頻率 (Larmor frequency) 通常需要透過減弱主磁場強度來使之降低。但即使如此，電子自旋共振的拉莫頻率通常仍比核磁共振拉莫頻率所在的射頻範圍還要高，通常是在微波範圍。例：0.3 特斯拉的主磁場下，電子共振頻率發上在 8.41 GHz，而對於常用的核磁共振核種質子而言，在這樣強度的磁場下，其共振頻率為 12.77 MHz。因此在測量時，可能對帶有水分子的樣品有加熱可能或是穿透力太強的潛在問題，所以在進行人體造影時則需要用不同的方式。

當有一外在磁場 B_0 時，電子的磁量子向量排列方式會與磁場平行--順磁 (parallel, $m_s = -1/2$) 或是與磁場反平行--逆磁 (antiparallel, $m_s = +1/2$)。此兩種排列方式分裂成兩個能階 (圖 4.4)。平行磁場的自旋電子其能階能量比較低，而其兩能階的能量差異可式 (4-1) 表示：

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0 \quad (4-1)$$

ΔE ：順磁排列與逆磁排列之能階能量差異。

g_e ：g-因子，為電子磁矩與自旋角動量之比值，又稱為迴轉磁比率 (gyromagnetic ratio)

μ_B ：波耳磁元 (Bohr magneton)，值為 $9.27400915 \times 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$ ，；從式子可看出，能階的分裂是與外加磁場的強度成正比的。

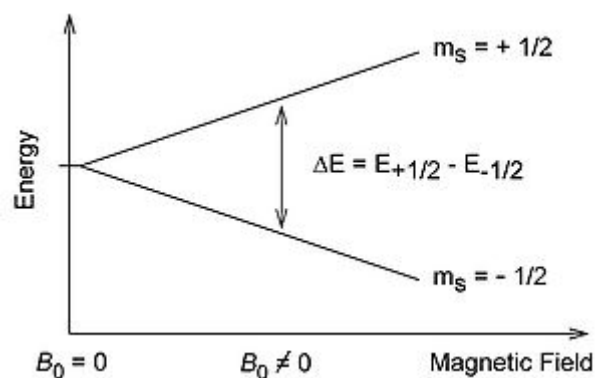


圖 4.4 電子自旋在磁場中造成能階分裂，並分裂能量與外加磁場強度成正比示意圖

不成對的電子可以經由吸收或放出一電磁波來從一能階態轉換到另一個能階態，但其所吸收或放出的電磁波能量必須與能階差異相同才能轉換能階態。

$$\varepsilon = h\nu \quad (4-2)$$

ε ：電子吸收或放出電磁波之能量

h ：普朗克常數 (Planck constant)，值為 $6.6252 \times 10^{-34} \text{ J S}$

ν ：吸收或放出電磁波之頻率

$$\varepsilon = \Delta E \quad (4-3)$$

由式 (4-1)、式 (4-2)、式 (4-3) 可得出一 EPR 光譜的基本公式：

$$h\nu = g_e\mu_B B_0 \quad (4-4)$$

在實驗上，常用的電磁波範圍為微波，其頻率約為 9-10 GHz。而其磁場通常約為 0.35 特斯拉。在操作上，EPR 光譜是由固定電磁波的頻率，並用改變磁場的去造成樣品的能階的能差變化。當能階差異符合電磁波的能量時，不成對電子可以從低能階狀態轉變成高能階狀態。因此可以經由量測電磁波被吸收的程度來得到 EPR 光譜。以圖 4.5 為例，這是以一個自由電子其 $g_e = 2.0023$ 並且固定射入電磁波之頻率為 9388.2 MHz，在改變其磁場測得下圖³³。上半部為在不同磁場下電磁波被吸收之訊號，下半部為上半部之圖的一次微分，通常 EPR 的光譜記錄方式都以下半部圖的樣式為主。

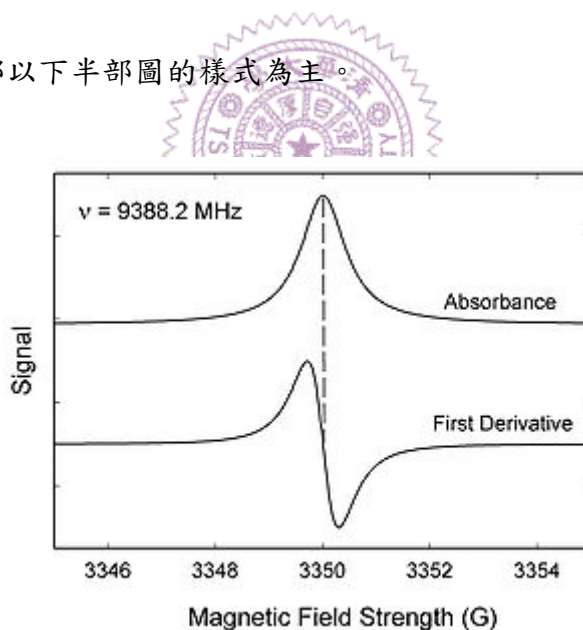


圖 4.5 EPR 訊號圖，上半部為吸收訊號與磁場作圖；下半部為吸收訊號對磁場做一次微分與磁場作圖。(此圖非本實驗使用的電子自旋標記 MTSSL 典型訊號)

EPR 應用在多個領域，包括了：

- 固態物理：辨識與定量自由基分子(即帶有成對電子的分子)。
- 化學：用以偵測反應機構。

- 晶體學：用來進行晶體內部缺陷的局部結構的研究。一般需要配合測角器 (Goniometer)。
- 生物醫學領域：可研究生物組織中的自由基，在凍乾的動物組織和植物組織內均可檢測出自由基，並且在主要代謝的器官上如肝、腎樣品內，可檢測到很高的自由基含量。也有人將 EPR 應用在研究酶的催化反應機制裡，在某些情況下，可利用 EPR 光譜來鑑定自由基的環境，並進而提供關於酶催化機制和探測有關酶活性部位的結構。也可研究生物組織中的順磁金屬離子 (包括過渡族金屬離子)，在一些動物、植物和微生物組織都能見到銅 (II)、錳 (II) 或鐵 (III) 離子的 EPR 信號。因而證實了一些含順磁性金屬的酶的活性與這些金屬的原子價態有關，這些金屬離子可能參與酶的結合，例如黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase) 中的鉬、琥珀酸脫氫酶 (Succinate dehydrogenase) 中的鐵、血漿銅藍蛋白 (ceruloplasmin) 中的銅。自旋標記法可應用在沒有自由基的分子或蛋白質上。最早是由美國的 H·M·McConnell 提出。這是將一種設計過反應性低的自由基 (常用氮氧自由基)，接合到分子或蛋白質上，進而從 EPR 光譜取得有關標記物環境的訊號的方法。自旋標記法有四個優點：1. 對溶劑的極性敏感，所以得以探究標記物周圍環境之疏水性或親水性；2. 對分子轉動的速率極為敏感，因此能測量標記物的環境內的活動程度，特別是量測生化過程中引起生物分子結構的改變；3. EPR 光譜較簡單，易於分析，由 ^{14}N 引起分裂形成的三峰圖

譜能提供許多有價值的訊息； 4. 抗磁性環境的干擾信號並不會被偵測到，所以可以減少很多雜訊。在很多情況下，自旋標記物可經由輔酶、酵素、抗體、細胞膜等等的相互作用而被連接到特定的生物位置。EPR 現已被廣泛應用於研究生物高分子的構形、酶活性部位的結構、脂質體和生物膜的結構及免疫分析等等。

4.3 實驗目的

現在有很多生物結構的研究，都是依賴先進的物理技術去量測蛋白質或是核甘酸。例如高解析度的核磁共振儀 (high resolution Nuclear Magnetic Resonance) 和 X-ray 晶格繞射都是很常被用來研究生物系統中巨大分子的結構。近年來，電子順磁共振 (EPR) 也漸漸地被應用在生物物理的研究上，成為新穎且有力的研究方法。

近來有文獻報導出利用 α -螺旋胜肽鏈來建立電子順磁共振儀 (EPR) 的光譜規則³⁴。在該研究中，作者利用電子自旋標記 (spin label) 法，將兩個硝基氧 (amine oxide, N-oxide) 化合物電子自旋標記接在胜肽鏈上，因電子-電子偶極距的作用力而可得到 EPR 的訊號光譜，並可經由計算得出兩個電子自旋標記之間的距離。應用在 α -螺旋胜肽鏈的系統上，使用 EPR 光譜所得到兩個電子自旋標記距離與利用 α -螺旋胜肽鏈的理論模型所計算得到的結果十分符合。所以我們嘗試應用 EPR 光譜在其他已知結構中，探討電子自旋標記法是否也可以應用

在其他結構中，在本實驗中選擇以類似於 α -螺旋的聚脯胺酸 PPII 結構作為研究的對象。因為電子自旋標記須與含硫官能基結合，而半胱胺酸 (cysteine, Cys) 是二十個常見的胺基酸裡面唯一含可與電子自旋標記結合硫官能基的胺基酸，故將所需標記位置置換 (mutate) 成半胱胺酸，之後可將電子自旋標記連接在胜肽鏈上。

我們設計一系列長度都為十一個胺基酸的聚脯胺酸胜肽鏈，並在其上不同位置以半胱胺酸取代原本的脯胺酸。用以量測在此 PPII 的模型中，不同距離的電子自旋標記的距離，來嘗試建立 EPR 的光譜規則。

4.4 胜肽鏈的設計與電子自旋標記反應

因為希望將電子自旋標記應用在聚脯胺酸上，所以設計了表 4.1 系列的胜肽鏈。我們設計的聚脯胺酸長度為十一個胺基酸，因為之前已有文獻指出十個脯胺酸的聚脯胺酸可以形成一個結構穩定的 PPII 構型³⁵。又因我們想嘗試間隔五個胺基酸的距離來量測，所以設計成十一個長度的胺基酸。我們使用 (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate (MTSSL) 作為電子自旋標記化合物，因為其對於半胱胺酸 (cysteine, Cys) 有獨特的選擇性反應 (圖 4.3)，並且其分子形狀類似於苯丙胺酸 (phenylalanine, Phe) 或是色胺酸 (tryptophane, Trp) 的側鏈³⁶，所以常被當作電子標記的化合物。而氮原子與其上未成對電子有 hyperfine coupling 所造成能階分裂，所以其典型訊號圖形為三個

訊號峰。我們選擇中間的 5 號位置將其脯胺酸換成半胱胺酸，之後再分別在 5 號與不同位置作雙變異 (double mutation) (表 4.1)。合成 PC5 這個單取代的胜肽鏈，是為了做為扣除單純由電子自旋標記本身造成的訊號，如此才可得到兩個電子自旋標記間的作用力所造成的訊號。

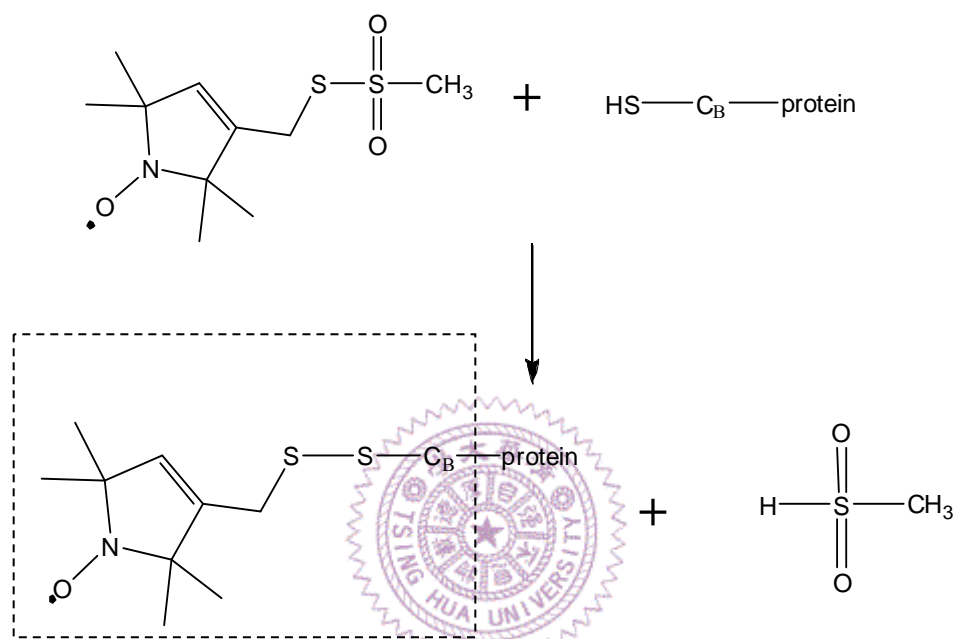


圖 4.3 MTSSL 與半胱胺酸反應式，虛線所圍起之範圍標記為 R1。例：PC56-R1 為已經接上電子自旋標記的 PC56 胜肽鏈。

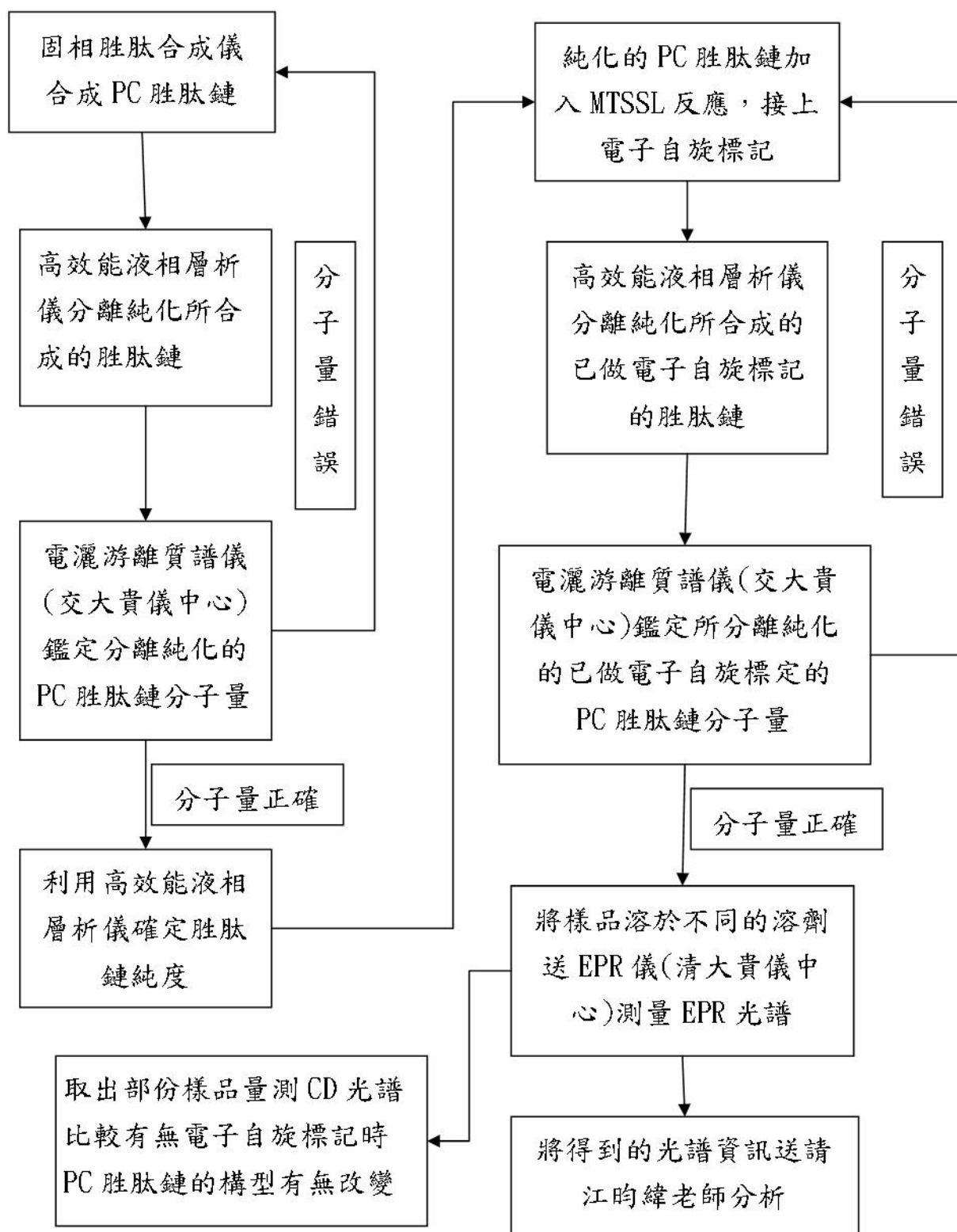
表 4.1 PC 系列之胺基酸序列表

胜肽名稱	胺基酸序列(Sequence)*
PC5	Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-NH ₂
PC56	Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Cys-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-NH ₂
PC57	Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Pro-Cys-Pro-Pro-Pro-Pro-NH ₂
PC58	Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Pro-NH ₂
PC59	Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-NH ₂
PC510	Ac-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Pro-NH ₂

* Ac 代表在 N-terminus 有 acetylation，NH₂ 則表示在 C-terminus 為 amide

五、實驗步驟

5.1 實驗步驟流程



5.2 實驗儀器

1. 電子順磁共振儀 (electron paramagnetic resonance, EPR) :

廠牌： Bruker ，型號： EPR ER 200D-SRC 。

其餘參照第一部分 2.2 實驗儀器。

5.3 使用藥品

藥品名稱	藥品來源
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Advanced Chemtech
N, N-Dimethyl Formamide (DMF)	Fisher
(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl) methanethiosulfonate (MTSSL)	Alaxxa
Glycerol	Bioshop
Sucrose	Riedel-deHaën
3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS)	Merck

其餘參照第一部分 2.3 使用藥品

5.4 實驗進行

5.4.1 PC 系列胜肽之合成

利用自動胜肽合成儀來合成表 4.1 之胜肽鏈。

- 在反應瓶 (reaction vessel , RV 瓶) 內秤入 0.05 mmole (0.07 g) 樹脂 (Rink amide MBHA)，設定合成儀用 DMF 沖洗、浸泡樹脂一小時之後，胺基酸瓶 (AA

瓶) 內放入 0.2 mmole 的 Fmoc-Pro-OH 或是 Fmoc-Cys(Trt)-OH。裝好胺基酸後，每瓶再秤入 0.075 g HBTU 和 0.030 g HOBt 活化劑。

b. 配製 Solvent

1. 去保護試劑 (deprotection reagent, DEP) : 20% piperidine/DMF
2. 活化試劑 (activation reagent, ACT): 0.4 M N-methyl- morpholine (NMM) / DMF

c. 接著將 AA 瓶依碳端往氮端胺基酸序列排列在合成儀轉盤上，因為合成儀是從碳端開始合成，跟一般數算胺基酸的序列相反。以 PC59 為例：



插入的半胱胺酸是在胜肽的第五及第九號位置，所以放入合成儀位置時須將半胱胺酸放在藥品槽的 3 號及 8 號位置 (由 1 號合成至 11 號藥品槽)，第十一號位置在擺上裝有約兩毫升的過量乙醯酐 (acetic anhydride) 的 AA 瓶，將合成完的胜肽鏈氮端乙醯化 (capping, acetylation)。而反應時間條件設定如表 5.1。

表 5.1 PC 系列胜肽合成：合成儀步驟條件設定

步驟	時間	次數
Deprotect	20 min	2
Coupling	60 min	1
Capping	20 min	1

5.4.2 切除 (cleavage)

在利用自動胜肽合成儀接上胜肽鏈序列，從 RV 瓶中取出帶有胜肽鏈的樹脂裝到 bio-column 之中。配 cleavage cocktail 體積共 2.5 mL (表 5.2)

表 5.2 PC 系列胜肽合成：cleavage cocktail 的配方

藥品名稱	百分比	體積 (mL)
Trifluoroacetic acid (TFA)	92.5%	2.3125 mL
Triisopropylsilane (TIS) 98%	2.5%	0.0625 mL
DI water (H ₂ O)	2.5%	0.0625 mL
Ethanedithiol (EDT)	2.5%	0.0625 mL

加入 cleavage cocktail 後，蓋緊並放置於搖晃儀反應二個小時。之後，將 bio-column 前端折斷 (小心液體噴出)，滴出濾液並加入 1 mL TFA 清洗 resin，並以原來濾液混合，再將濾液用 N₂ 吹約十到十五分鐘使大部分 TFA 揮發，以更利於之後沉澱蛋白質。

加入事先在 -20 °C 下預冷的甲基第三丁醚 (methyl t-butyl ether) 15 mL，出現白色沉澱物，放入離心機離心使粗產物沉澱。將上層液倒出，並且加入冰醚洗去 TFA 殘液，如此重複三次，最後再用水幫浦抽乾殘留的醚。

5.4.3 利用高壓液相層析儀 HPLC 純化 PC 系列胜肽

將粗產物加去離子水溶成為濃度 10 mg / mL 之溶液，利用逆相 HPLC 及半製備碳 18 (C18) 管柱，來純化分離樣品，沖提液分別為加了 0.1% TFA 的去離子水與同樣加了 0.1% TFA 的乙腈。梯度設定為一小時內由 100% 水 + 0% 乙腈變化到 40% 水 + 60% 乙腈。收集純化液之後，取出一點純化液送測 ESI-MS 鑑定分子量。剩下的純化液利用旋轉濃縮儀除去乙腈，然後將樣品放入液態氮中急速冷卻，再利用凍乾機除去水分，最後得到棉絮狀的胜肽樣品。確定分子量之後，再利用 HPLC 來鑑定純度。

5.4.4 各 PC 胜肽鏈之分子量

送樣品至交大貴儀中心之電噴灑離子化質譜儀 (electrospray ionization mass spectrometer, ESI-MS)，測得分子量：PC5 m/z $[MH^+]$ 1133.8，calcd. 1133.6；PC56 m/z $[MH^+]$ 1139.5，calcd. 1139.5；PC57 m/z $[MH^+]$ 1139.8，calcd. 1139.5；PC58 m/z $[MH^+]$ 1139.9，calcd. 1139.5；PC59 m/z $[MH^+]$ 1139.8，calcd. 1139.5；PC510 m/z $[MH^+]$ 1139.7，calcd. 1139.5。

5.4.5 PC 系列進行電子自旋標記反應

- 先將 PC 胜肽用去離子水配製成約 10 mM 的起始溶液 (stock solution)。
- 用 20 mM MOPS 緩衝溶液 (pH = 7.0) 各將其配成所需濃度 1 mL 溶液。
- PC5 加入 10 當量 MTSSL 反應；其他雙重變異 PC 胜肽鏈加入 20 當量 MTSSL 反應 (MTSSL 加入量與胜肽中半胱胺酸當量成 10:1)。

d. 因 MTSSL 具有光敏感性，所以須包上鋁箔紙，放入 4 °C 冰箱中，反應約十二個小時。

e. 利用 HPLC 純化已標上電子自旋標記的胜肽鏈，梯度以一小時中由 90% 水 + 10% 乙腈變化到 30% 水 + 70% 乙腈 (所有溶液皆加入 1% TFA)。

f. 得到純化液，取出微量送測質譜儀。測得分子量：PC5-R1 m/z [MH⁺] 1318.72, calcd. 1317.7; PC56-R1 m/z [MH⁺] 1508.9, calcd. 1507.7; PC57-R1 m/z [MH⁺] 1508.1, calcd. 1507.7; PC58-R1 m/z [MH²⁺] 755.2, calcd. 754.5; PC59-R1 m/z [MH⁺] 1508.0, calcd. 1507.7 calcd; PC510-R1 m/z [MH⁺] 1507.6, calcd. 1507.7。

g. 將純化液放入液態氮冷凍，置於凍乾機抽乾，並將容器以鋁箔紙包覆，凍乾後得到棉絮狀樣品。



5.4.6 EPR 溶液配置

a. 蔗糖溶液配置：秤量 5 g 的蔗糖，加入 20 mM MOPS 緩衝溶液至 10 mL，配成 50% (w/v) 之蔗糖溶液。其他百分比的蔗糖溶液皆用 50% 蔗糖溶液稀釋而成；甘油溶液配置：取約 5 mL 甘油，加入去離子水至 10 mL，配成 50% (v/v) 之甘油溶液。其他百分比的甘油溶液皆用 50% 甘油溶液稀釋而成。

b. 將所得到具自旋標記的固體樣品溶於所需的溶液中，約 0.2 mL。

c. 用細針頭將樣品注入石英材質的單口毛細管中，因為毛細管底部會有空氣。將毛細管放入離心管中，輕微離心使溶液可以進入毛細管底部，重複這個步驟直到毛細管中溶液高約 5 公分。

- d. 將毛細管管口封起放入大的石英管材質試管，用 parafilm 封起後用鋁箔紙包覆，送測 EPR 儀。
- e. 得到光譜以 Bruker winepr post processing system 軟體讀出數據，並請江昀緯老師做數學處理運算分析。

5.4.7 PC系列進行 CD 光譜測量

a. 從 PC510 起始溶液取出所需的量，各別利用去離子水、40% 蔗糖溶液緩衝溶液和 50% 甘油溶液稀釋成 300 uL 100 uM 之樣品，加入光徑為 0.1 cm 的 CD 樣品槽。波長範圍：190 – 260 nm。在溫度 25 °C 下，每 1 nm 取一點訊號，每一點訊號量測時間為 10 秒。

b. 從測完 EPR 實驗的 PC510-R1 溶液，各別利用去離子水、40% 蔗糖溶液緩衝溶液和 50% 甘油溶液稀釋至 300 uL，加入光徑為 0.1 cm 的 CD 樣品槽。波長範圍：190 – 260 nm。在溫度 25 °C 下，每 1 nm 取一點訊號，每一點訊號量測時間為 10 秒。

c. 將量測完 CD 光譜的 PC510 與 PC510-R1 溶液，取等體積，我們假設 PC510-R1 的吸收與 PC510 的 UV 吸收係數接近，再利用逆相 HPLC 分析級 C18 管柱來判斷 PC510-R1 的濃度。將已知濃度的 PC510 訊號積分值比上未知的 PC510-R1 訊號積分值，如此可求得 PC510-R1 的濃度，進而對 CD 訊號作標準化 (normalize) 處理。

六、結果與討論

6.1 蔗糖溶液濃度的選擇

在量測 EPR 光譜時，會發生因為胜肽鏈分子運動太快而導致訊號的差異性太小。有文獻顯示當蔗糖或甘油做為溶劑時，可以增加溶液的黏滯性，使其中的胜肽鏈分子的運動變慢，進而得到在緩和運動下電子自旋標記的訊號³⁷。所以我們測量在不同蔗糖溶液中 PC5 的 EPR 圖 (圖 6.1)，我們發現到濃度上升，PC5-R1 在 EPR 中的表現大致上都有差異，直到蔗糖濃度至 40% 時圖形變化與 50% 蔗糖溶液差異較小，所以我們認為 40% 的蔗糖溶液即可將胜肽鏈運動緩慢至其限度。所以我們以 40% 蔗糖濃度之溶液來做為接續實驗的溶劑。

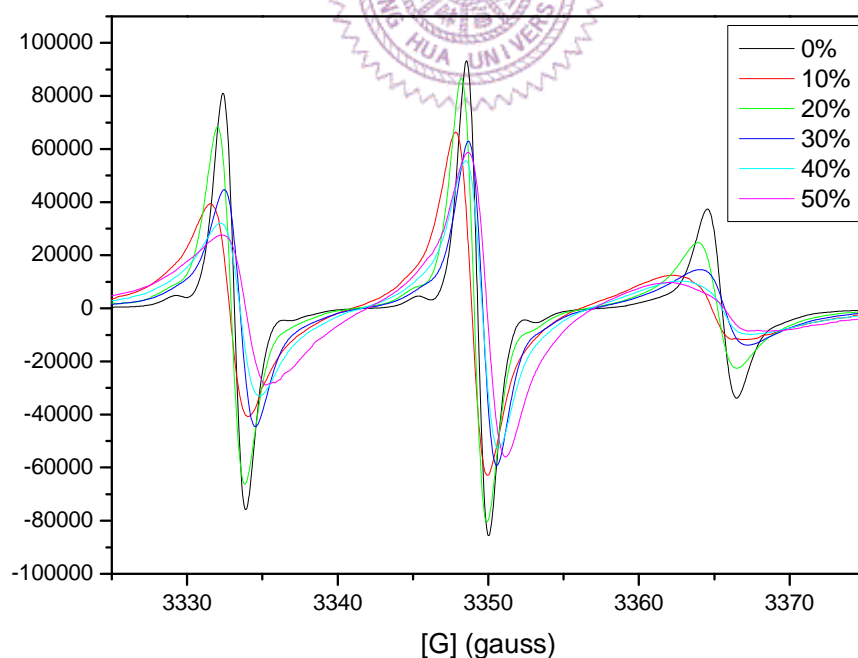


圖 6.1 PC5-R1 於 275 K 時，在不同蔗糖濃度溶液下的 EPR 訊號圖。

6.2 溫度條件的選擇

除了溶液環境會影響胜肽鏈的運動外，溫度也是個很重要的參數。所以我們測量了在 40% 蔗糖水溶液中，不同溫度下 PC 系列 (除了 PC58-R1) 的 EPR 圖譜，分別在溫度為 200 K (圖6.2)、250 K (圖6.3)、275 K (圖6.4)。由圖 6.2 發現 200 K 中訊雜比 (S/N) 似乎較高，因為其溫度太低造成訊號太弱；而在 275 K 則變為每條胜肽鏈的訊號都差不多，因為其溫度太高造成胜肽鏈運動太快而導致距離所造成的訊號差異太小；最後發現在 250 K 的溫度下，EPR 的圖譜有不錯的解析能力與好的訊雜比，故以 250 K 為接下來實驗的環境溫度。

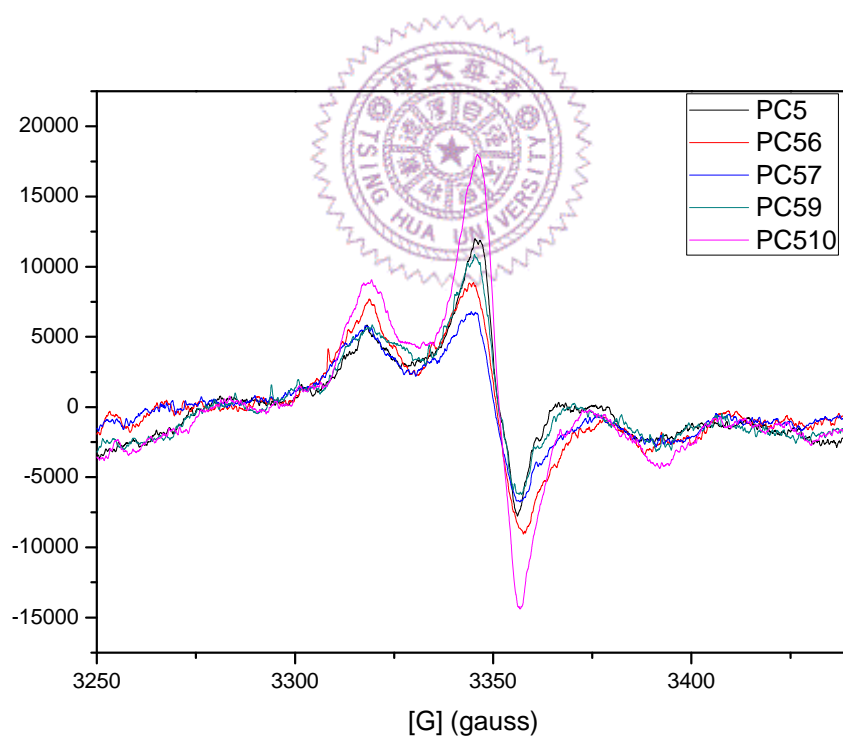


圖 6.2 PC 系列胜肽鏈在 40% 蔗糖水溶液，200 K 下的 EPR 訊號圖

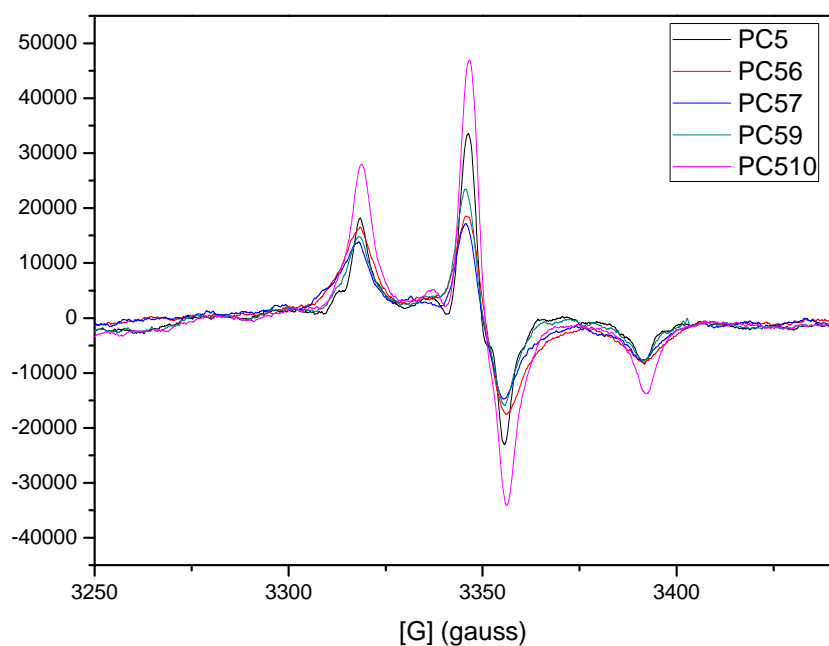


圖 6.3 PC 系列胜肽鏈在 40% 蔗糖水溶液，250 K 下的 EPR 訊號圖

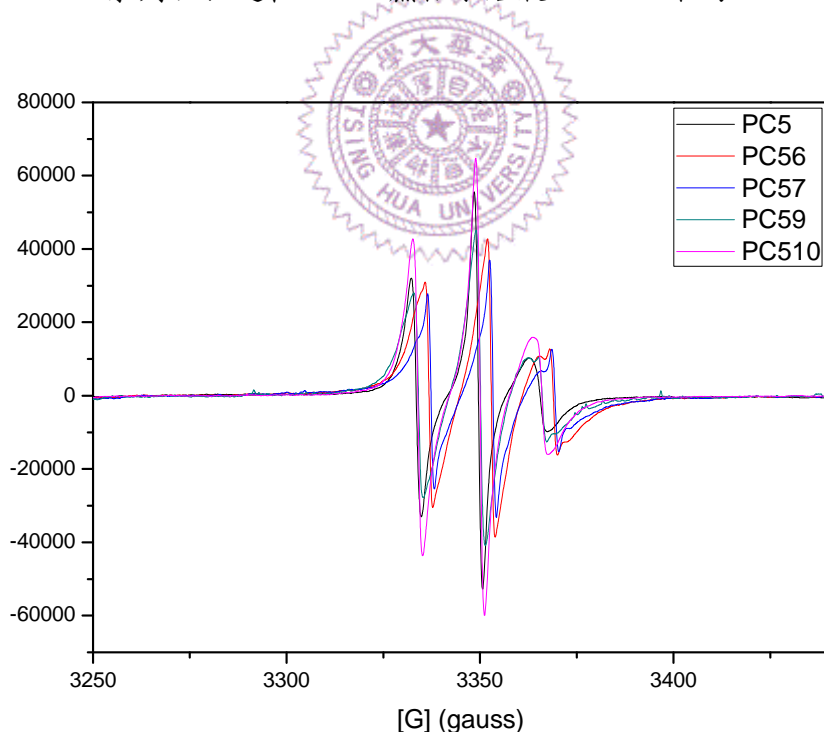


圖 6.4 PC 系列胜肽鏈在 40% 蔗糖水溶液，275 K 下的 EPR 訊號圖

6.3 甘油溶液濃度的選擇

測量過蔗糖溶液後，我們試著使用不同的溶液系統來研究。我們選擇使用

黏滯性高的甘油溶液來測試。以 PC59-R1 為實驗的胜肽鏈來測試不同的濃度 (圖 6.5)。可以發現當甘油濃度至 50% 時，訊號與 40% 還是有所差異，所以我們選擇使用 50% 的甘油溶液來當作之後的溶液條件 (圖 6.6)。

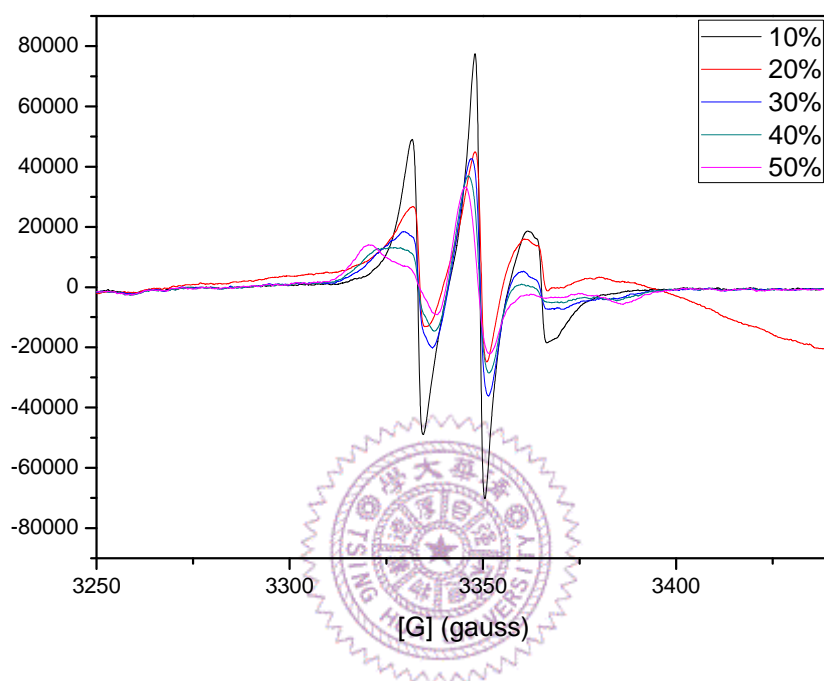


圖 6.5 PC59-R1 於 250 K 時，在不同甘油濃度溶液下的 EPR 訊號圖。

可以發現，在 50% 甘油水溶液中 250 K 的實驗條件下每條胜肽鏈的第一峰與第三峰都有明顯的差異。接著我們嘗試在 275 K 下去測試 50% 甘油系統下的訊號。(圖 6.7)

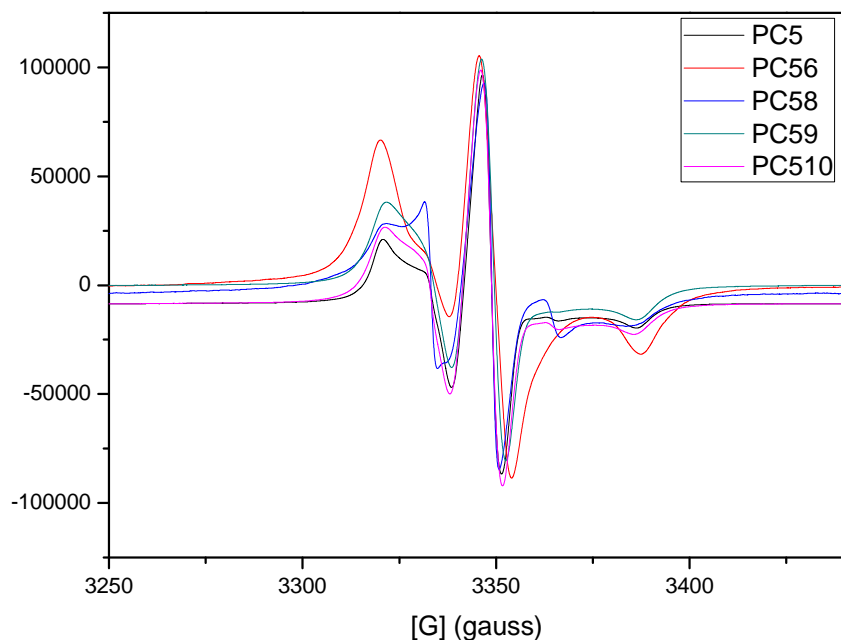


圖 6.6 PC 系列胜肽鏈在 50% 甘油水溶液， 250 K 下的 EPR 訊號圖。

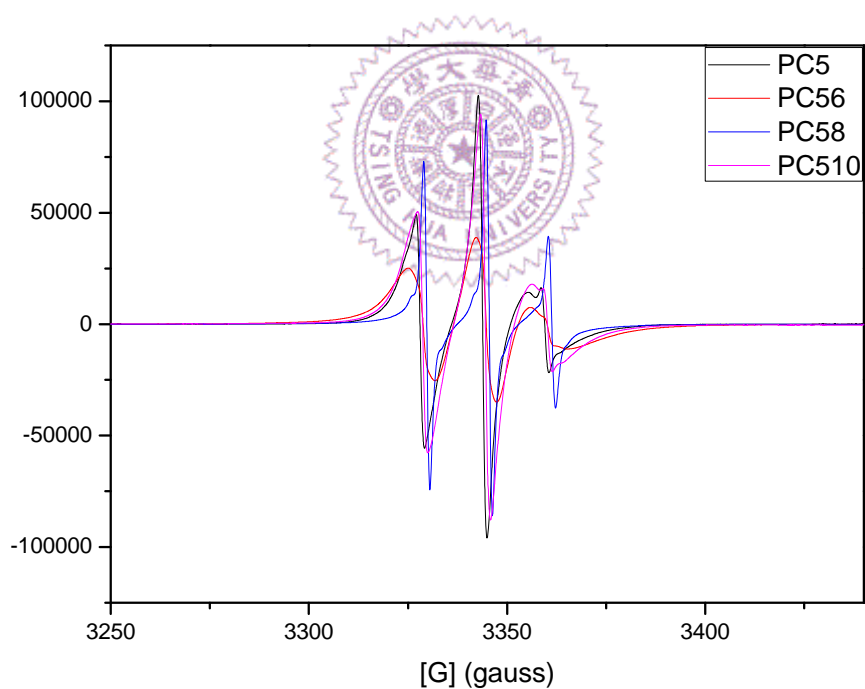
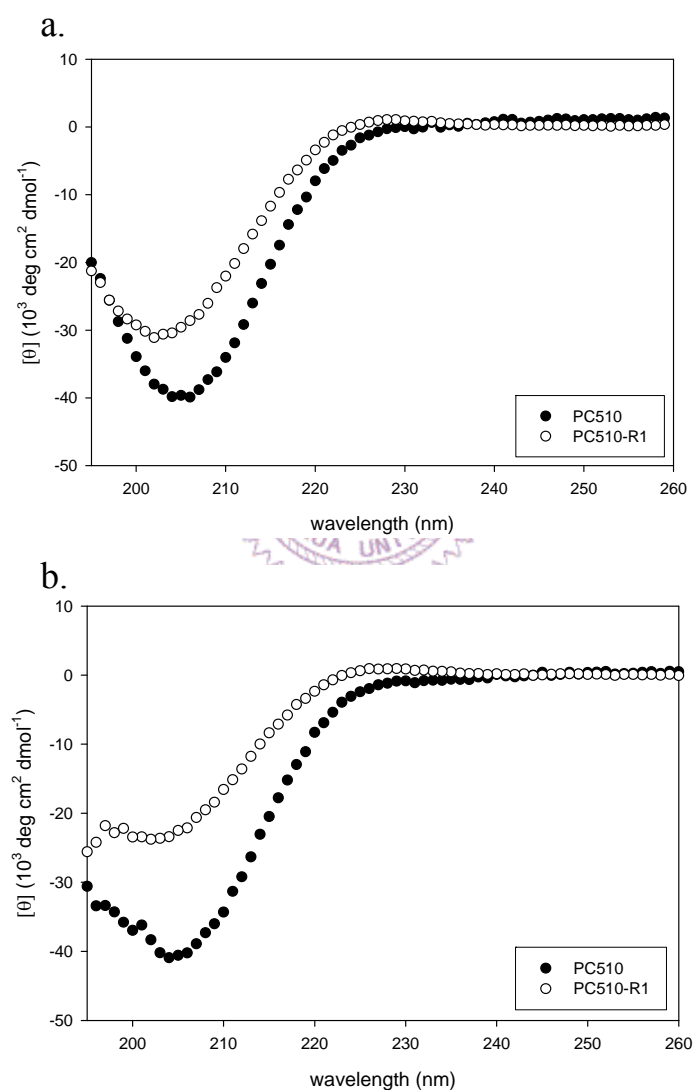


圖 6.7 PC 系列胜肽鏈在 50% 甘油水溶液， 275 K 下的 EPR 訊號圖。

6.4 用 CD 光譜佐證 PC 系列與 PC-R1 之構型

我們嘗試以 CD 光譜來判斷在接上電子自旋標記後，其構形是否會維持 PPII 結構。我們分別在去離子水中 (圖 9.8a)、40% 蔗糖水溶液 (圖 9.8b) 與

50% 甘油水溶液 (圖 9.8c) 中去量測 far-UV CD 光譜。我們取 PC510 與 PC510-R1 為實驗對象。可以發現 PC510 與 PC510-R1 圖譜形狀差異不大，其訊號強度上的差異主要是因為濃度上的誤差所造成。在 220~230 nm 有一點微上升的訊號，200~210 nm 有一強且負值的 CD 訊號，這為 PPII 的典型 far-UV CD 光譜³⁵。



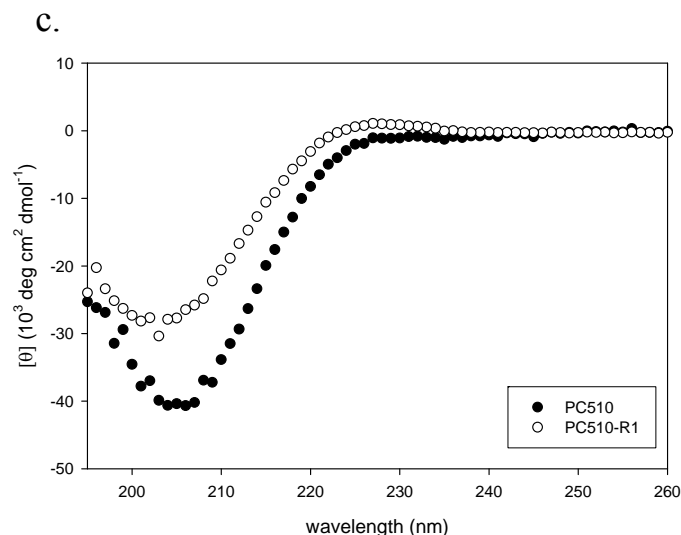


圖 6.8 PC510 與 PC510-R1 在不同溶液中的 CD 光譜圖， a. 水溶液； b. 40% 蔗糖水溶液中； c. 50% 甘油水溶液中。

6.5 利用 EPR 方法與數學運算建立 PPII 的 EPR 光譜規則

由圖 6.9 可發現，在兩個半胱氨酸距離越長時，所得到量測到的距離就越長，並且有每增加一個胺基酸其距離增加 0.31 nm 的趨勢。且當兩個點自旋電子距離越遠時，距離的分佈就越廣：在蔗糖水溶液中（圖 6.9a），PC56-R1 兩個自由基的距離為 0.60 ± 0.02 nm，而 PC59-R1 為 1.23 ± 0.07 nm，到 PC510-R1 則為 1.76 ± 0.09 nm。而在甘油水溶液中（圖 6.9b），造成距離分布的廣泛度與距離成正比的原因是因為距離遠時，其結構越有空間可以讓 R1 官能基位置有所變動。不同的溫度也會造成距離分佈的差異，例如在甘油環境下，PC510-R1 在 250 K 時的分佈範圍為 ± 0.09 nm，而在 275 K 時則為 ± 0.02 nm，這是因為在較高溫的環境中，電子自旋標記的運動太快速以致於量測不到分佈機率較低的部分，而以分佈在平均距離的方式呈現。這樣的趨勢在不同的溶液環境中的都

可以觀察到，而利用 EPR 光譜所得到兩胺基酸距離為 0.31 nm 的結果，與 PPII 兩胺基酸間的理论距離相符合。

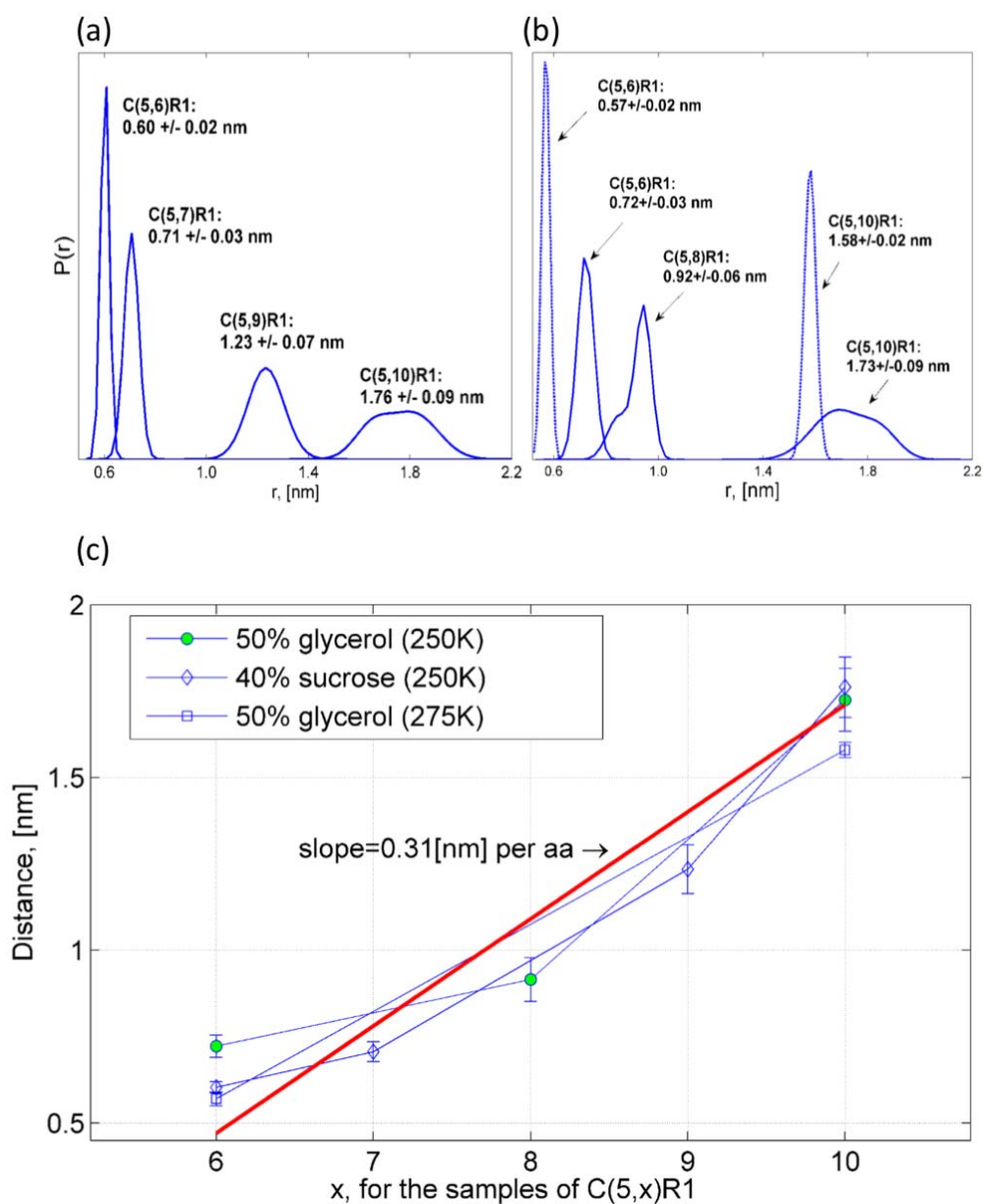


圖 6.9 a. 在 40% 的蔗糖水溶液，275 K 下兩個電子自旋標記間距離的分布圖；b. 在 50% 的甘油水溶液，250 K (實線) 與 275 K (虛線) 下兩個電子自旋標記間距離的分布圖；c. 兩電子自旋標記距離對半胱胺酸位置作圖。(此圖由江昀緯老師提供)

結論

一、立體電子效應對雞絨毛蛋白 HP36 結構影響之探討

雞絨毛蛋白 HP36 提供了一個很好的研究模型，用來了解 Pro62 與 Trp64 之間的作用力，也可以了解立體電子效應對於 HP36 整體穩定度的影響。由一系列的實驗得知，PLWK 這個部分對於 HP36 而言是非常關鍵的一個地方，當 Pro62 與 Trp64 的作用減弱時，會連帶影響疏水性核心的摺疊，進而造成整體結構的不穩定。而我們也間接證實，Pro62 與 Trp64 的作用力主要是來自脯胺酸上的氫與色胺酸上的類苯環結構形成 $C-H \cdots \pi$ 作用力。

而此影響此部分的因素不僅只有 $C-H \cdots \pi$ 作用力，我們認為此影響 PLWK 的主因有三個部分，第一個部分為 proline-aromatic 作用力，即為 $C-H \cdots \pi$ 作用力，此作用力對於 HP36 具有決定性的影響，此作用力可以經由比較 WT-HP36、O-HP36、F-HP36 來得知，這個作用力被我們視為是三個部分中最重要；第二個部分為立體空間上的立體障礙的影響，這個部分可以經由比較 O-HP36 與 M-HP36 的穩定度來了解，立體障礙對於脯胺酸衍生物與 Trp64 的作用力會有影響；而第三部分則是立體電子效應，因為受到其他兩項因素的干擾，使得我們無法單純的觀察到立體電子效應的影響。但是我們可以經由研究順式的脯胺酸衍生物取代來更了解立體電子效應對 HP36 這個結構之影響。

在這一系列的研究，我們證實了理論計算所認為 PLWK 這個部分為 HP36 很關鍵的觀點，也更了解 proline-aromatic 作用力如何影響 HP36 的穩定度。在未來的實驗中，希望可以繼續研究順式的脯胺酸衍生物置換，來更了解立體電子效應的影響。

二、電子自旋標記聚脯胺酸的合成及電子自旋共振光譜之量測探討

電子自旋標記的聚脯胺酸在應用於建立 EPR 光譜規則的模型是可行的，由模型計算出的距離或是結構的資訊與 EPR 實驗所得到的結果相同，並且在不同的緩衝溶液中也可得到相近的結果。我們也經由 CD 光譜來得知接上電子自旋標記的聚脯胺酸也能維持原本 PPII 的結構，能以不破壞的方式來進行 PPII 的結構研究。

利用一系列的 EPR 實驗數據中得到對於 PPII 結構中胺基酸位置，來建立一個模型，希望未來可以在含有 PPII 結構的巨大蛋白分子中作為辨識或是分析特性使用，對於含有 PPII 結構的蛋白質或是胜肽鏈有更進一步的認識與應用。

除了建立起距離模型外，也希望可以利用電子自旋標記的方式來了解 PPII 結構中的動力學模型。也可以更進一步應用在 PPII 與 PPI 結構轉換的研究上。PPII 的模型建立也增加了 EPR 的應用性，在未來也可應用在其他的結構上，例如 β -平板 (β -sheet) 的結構了解，進而利用 EPR 此一技術來幫助我們進一步了解生物分子結構。

參考文獻 (References)

1. Friederich, E., Vancompernelle, K., Louvard, D., Vandekerckhove, J. (1999) Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274, 26751-26760
2. Bazari, L. W., Matsudaira, P., Wallek, M., Smeal, T., Jakes, R., and Ahmed, Y. (1988) Villin sequence and peptide map identify six homologous domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81, 4986-4990
3. George, S. P., Wang, Y., Mathew, S., Srinivasan, K., Khurana, S. (2007). Dimerization and actin-bundling properties of villin and its role in the assembly of epithelial cell brush borders. *J. Biol. Chem.* 282, 26528–26541
4. Vardar, D., Chishti, A. H., Frank, B. S., Luna, E. J., Noegel, A. A., Oh, S. W., and McKnight, C. J. (2002) Villin-type headpiece domains show a wide range of F-actin-binding affinities. *Cell Motil. Cytoskeleton* 52, 9-21
5. Meng, J., Vardar, D., Wang, Y., Guo, H. C., Head, J. F., and Mcknight, C. J., (2005) High-resolution crystal structures of villin headpiece and mutants with reduced F-actin binding activity. *Biochemistry* 44, 11963 -11973
6. Panebra A., Ma S. X., Zhai L. W., Wang X. T., Rhee S. G., Khurana S. (2001) Regulation of phospholipase C-gamma(1) by the actin-regulatory protein villin. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 281, 1046–58
7. McKnight, C. J., Doering, D. S., Matsudaira, P. T., and Kim, P. S., (1996) A thermostable 35-residue subdomain within villin headpiece. *J. Mol. Biol.* 260, 126–134
8. Brewer, S. H., Vu, D. M., Tang, Y., Li, Y., Franzen, S., Raleigh, D. P., and Dyer, R. B. (2005) Effect of modulating unfolded state structure on the folding kinetics of the villin headpiece subdomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16662–16667.
9. Xiao, S., Bi, Y., Shan, B., and Raleigh, D. P. (2009) Analysis of core packing in a cooperatively folded miniature protein: the ultrafast folding villin headpiece helical subdomain. *Biochemistry*, Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/bi8021763
10. Vermeulen, W., Vanhaesebrouck, P., Troys, M. V., Verschueren, M., Fant, F., Goethals, M., Ampe, C., Martins, J. C., and Borremans, F. A. M. (2004) Solution structures of the C-terminal headpiece subdomains of human villin and advillin, evaluation of headpiece F-actin-binding requirements. *Protein Sci.* 13, 1276-1287.

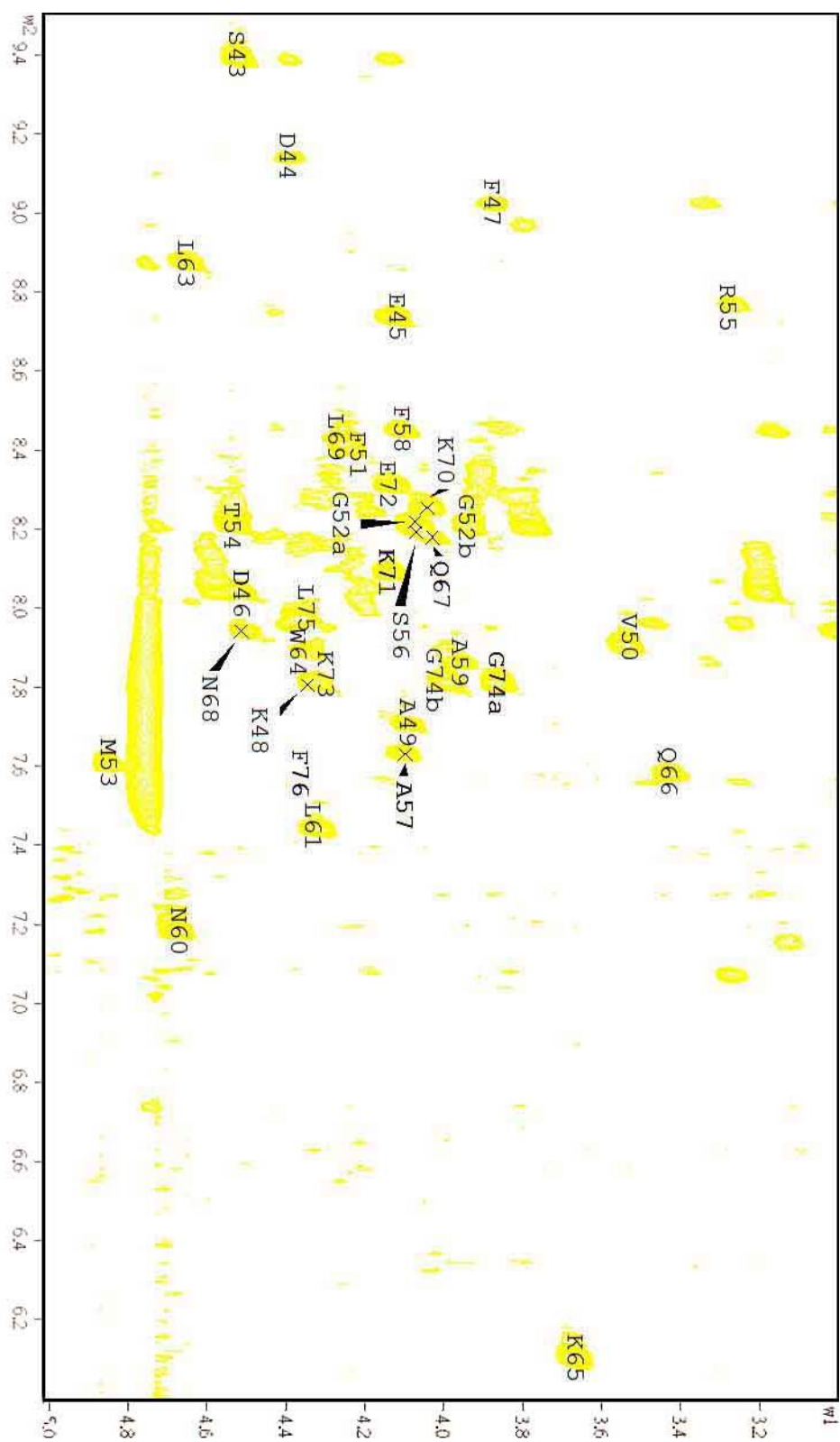
11. Bhattacharyya, R. and Chakrabarti, P. (2003) Stereospecific interactions of proline residues in protein structures and complexes. *J. Mol. Biol.* 331, 925–940.
12. Vermeulen, W., Troys, M. V., Bourry, D., Rossenu, D. D. S., Goethals, M., Borremans, F. A. M., Vandekerckhove, J., Martins, J. C. and Ampe, C., (2006) Identification of the PXW sequence as a structural gatekeeper of the headpiece C-terminal subdomain fold. *J. Mol. Biol.* 359, 1277–1292
13. DeRider M. L., Wilkens S. J., Waddell M. J., Bretscher L. E., Weinhold F., Raines R. T., and Markley J. L. (2002) Collagen stability: Insights from NMR spectroscopic and hybrid density functional computational investigations of the effect of electronegative substituents on prolyl ring conformations. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2497–2505.
14. Hinderaker, M. P. and Raines, R. T. (2002) An electronic effect on protein structure. *Protein Sci.* 12, 1188–1194.
15. Taylor, C. M., Hardré, R., and Edwards, P. J. B., (2005). The impact of pyrrolidine hydroxylation on the conformation of proline-containing peptides. *J. Org. Chem.* 70, 1306–1315
16. Naduthambi, D. and Zondlo, N. J. (2006) Stereoelectronic tuning of the structure and stability of the Trp cage miniprotein. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 12430–12431
17. Merrifield, R. B. (1986) Solid phase peptide synthesis. *Science* 232, 341–347.
18. 張湘戎，體抑素胜肽分子內雙硫鍵建構之研究，碩士學位論文，中原大學化學研究所，2003。
19. Berova, N., Nakanishi, K., and Woody, R. (2000) “Circular dichroism : Principles and applications.”
20. Skoog, D. A., Holler, F. J., and Nieman, T. A. (1998) “Principles of instrumental analysis.” Saunders College
21. 程郁郁，含假異胞嘧啶及其衍生物之去氧寡核酸鏈在水溶液中形成核酸三螺旋之研究，碩士論文，中國文化大學應用化學研究所，1997
22. Lightner, D. A., and Gurst, J. E. (2000) Organic conformational analysis and stereochemistry from circular dichroism spectroscopy. John Wiley & Sons, Inc.
23. Velluz, L., M. Legrand, M. Grosjean, (1965). “Optical circular dichroism.” Academic Press, Inc.
24. Fasman, G. D. (1996) ” Circular dichroism and the conformation analysis of biomolecules.” Plenum Press.

25. Matsuo, K., Yonehara, R., and Gekko, K. (2005) Improved estimation of the secondary structures of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *J. Biochem.* 138, 79-88
26. Duan, Y., Wang, L., and Kollman, P. A. (1998). The early stage of folding of villin headpiece subdomain observed in a 200-nanosecond fully solvated molecular dynamics simulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 9897–9902.
27. Kotch, F. W., Guzei, I. A., and Raines, R. T. (2008) Stabilization of the Collagen Triple Helix by *O*-Methylation of Hydroxyproline Residues. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2952-2953.
28. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-2423.
29. Rohl, C. A. and Baldwin, R. L. (1997) Comparison of NH exchange and circular dichroism as techniques for measuring the parameters of the helix-coil transition in peptides. *Biochemistry* 36, 8435-8442.
30. Wang, M., Tang, Y., Sato, S., Vugmeyster, L., McKnight, C. J., and Raleigh, D. P. (2003) Dynamic NMR line-shape analysis demonstrates that the villin headpiece subdomain folds on the microsecond time scale. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6032-6033.
31. Miller, S., Janin, J., Lesk, A. M., and Chothia, C. (1987) Interior and surface of monomeric proteins. *J. Mol. Biol.* 196, 641-656.
32. Adzhubei A. A., and Sternberg, M. J. E. (1993) Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 229, 472-493.
33. Rabenstein, M. D. and Shint, Y. K. (1995) Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8239-8243,
34. Odom, B., Hanneke, D., D'Urso, B., and Gabrielse, G. (2006) New measurement of the electron magnetic moment using a one-electron quantum cyclotron. *Phys. Rev. Lett.* 97, 030801
35. Horng, J. C. and Raines, R. T., (2006) Stereoelectronic effects on polyproline conformation. *Protein Sci.* 15, 74-83.
36. Steinhoff, H. J. (2002) Methods for study of protein dynamics and protein-protein interaction in protein-ubiquitination by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Front. Biosci.* 7, c97-110.

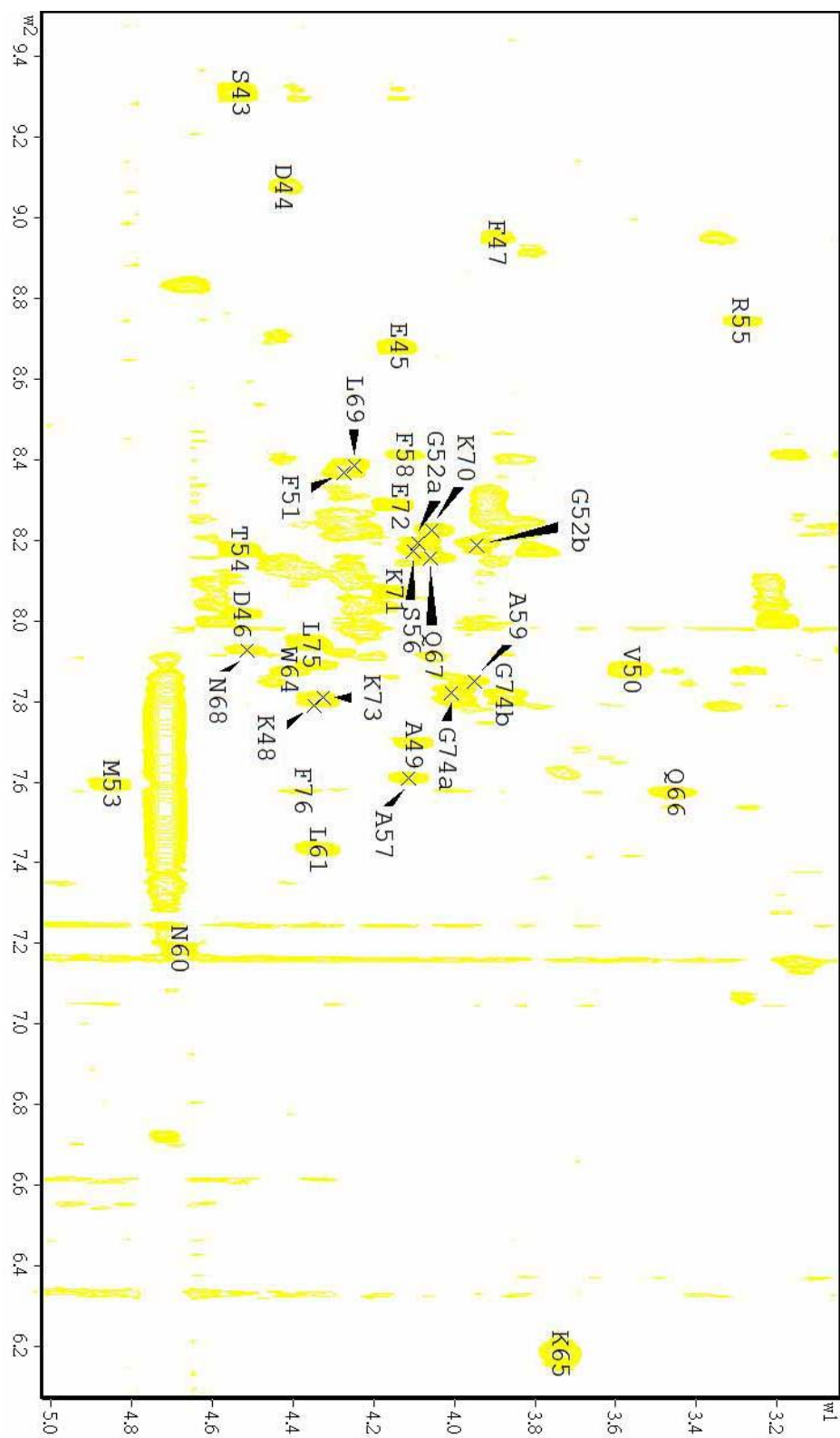
37. Altenbach, C., Oh, K. J., Trabanino, R. J., Hideg, K., and Hubbell, W. L. (2001) Estimation of inter-residue distances in spin labeled proteins at physiological temperatures: experimental strategies and practical limitations. *Biochemistry* 40, 15471-15482



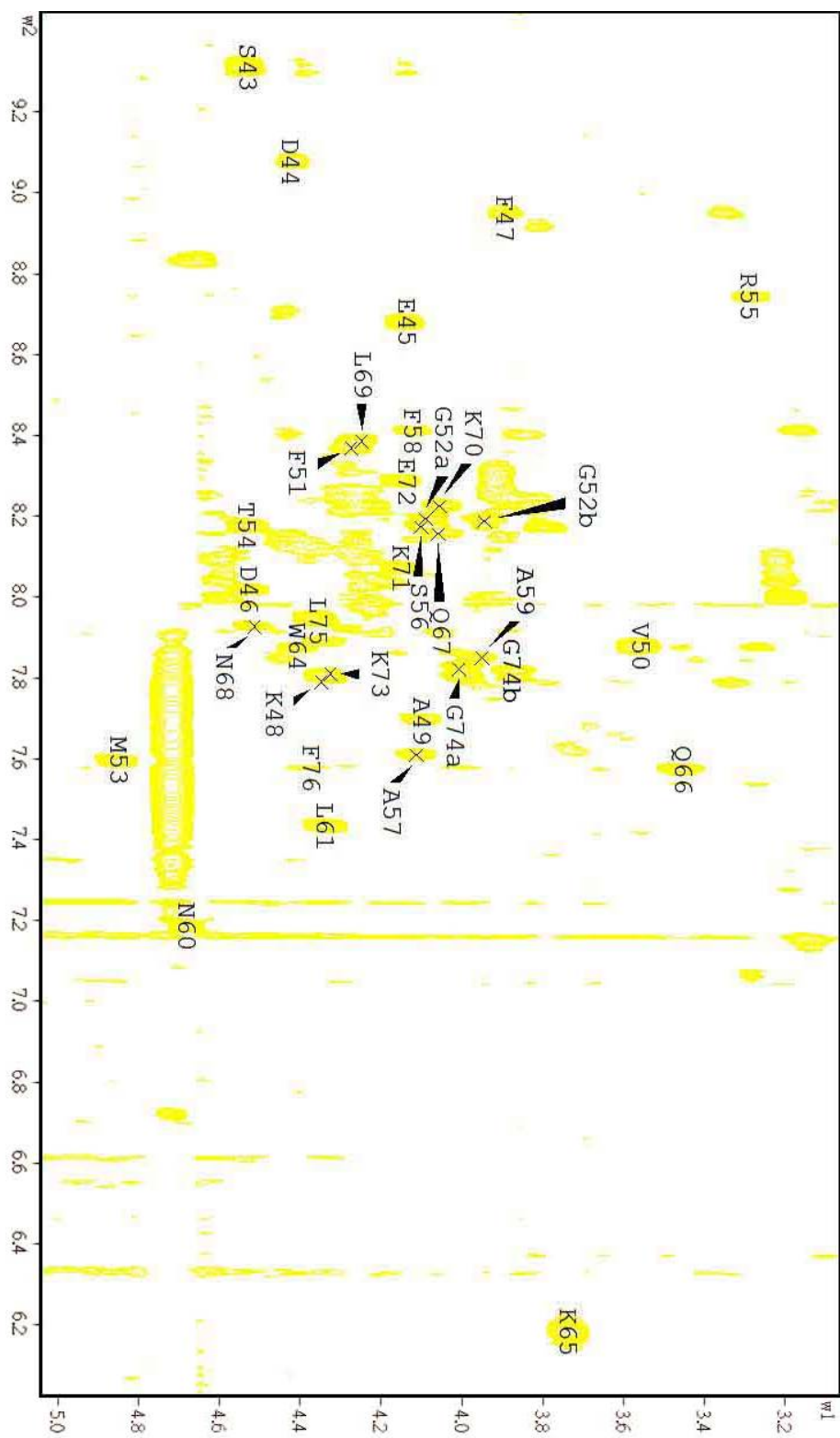
附錄



附圖 1 O-HP36 的 2D ^1H -NMR TOCSY 光譜



附圖 2 M-HP36 的 2D ^1H -NMR TOCSY光譜



附圖 3 F-HP36 的 2D ^1H -NMR TOCSY光譜