Chapter 2 아미노산, 펩티드 및 단백질

(Amino acids, Peptides, and Proteins)

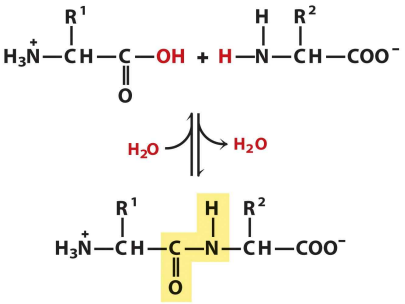
레닌즈 생화학

Amino acids and proteins	
Objective	- What are four levels of protein structure ? - What functions do proteins have in living organisms ? - What is protein denaturation and how does it occur ?
Key words	1. Zwitterion (쯔비트이온), 양극성이온 2. pI (등전점, isoelectric point) 3. Hemoglobin 과 myoglobin 기능 및 차이점 4. 마이오신과 엑틴에 대한 설명 5. 닌하이드린 반응(Ninhydrin reaction) 6. 단백질의 겹침(folding of protein) 7. Glutathione 과 vasopressin 의 구조 및 기능 8. 비대칭단소(asymetric carbon) 9. 단백질의 2차 구조 10. 협동적 결합(cooperating binding) 11. 황 함유 아미노산의 종류 및 disulfide bond 12. 단백질에서 발견되는 3 domain 13. 방향족 아미노산의 종류 및 특성 14. 효소(단백질) 정제과정 15. 사상단백질과 구상단백질의 특성 및 기능 16. 보아 효과(Bohr effects) 17. 케라틴과 콜라겐 (keratin and collagen) 18. 분자 샤페론(molecular chaperone) 19. 구조화되지 않은 단백질 (unstructure protein) 20. 단백질의 3차 구조를 안정화 시키는 작용

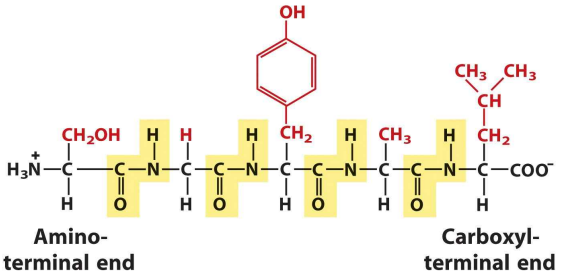
Ⅱ. Peptides

: polymers of amino acids

1. Peptide bond

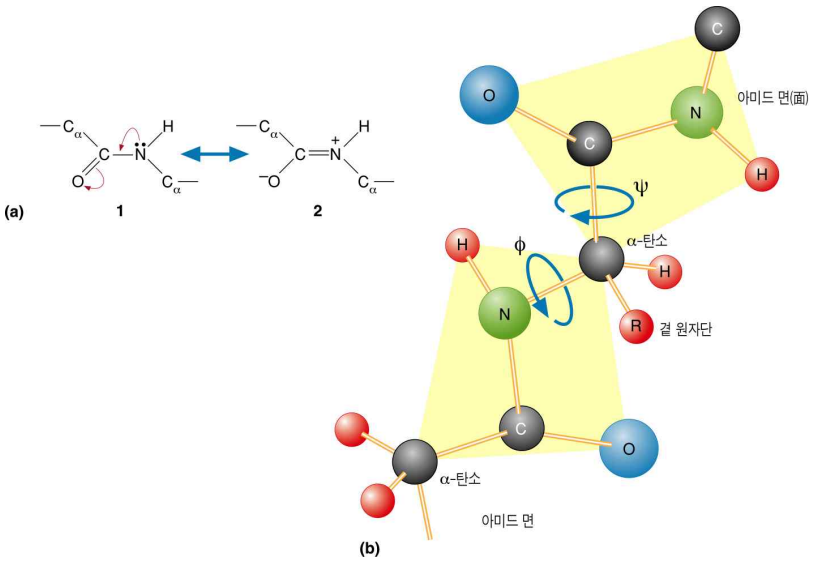


Peptide bond



N-terminal C-terminal

- Oligopeptide(올리고펩타이드)
- Polypeptide (MW : 10,000이하)
- Residue(잔기) : 단백질에서의 아미노산 units
- 한개 이상의 carboxyl or amino group을 가지는 아미노산 즉쇄는 이온화된다.



2. Primary structure determination(1차 구조결정)

Polypeptide의 아미노산 순서(amino acid sequence) 결정

1) N-terminal identification (N-말단 결정법)

① Sanger's method (DNFB)

α-amino acid + DNFB → Yellow DNP (dinitrophenyl derivatives)

↓ hydrolysis (6NHCl)

Chromatography

② Dansyl chloride procedure (DNS -Cl)

α-amino acid + dansyl chloride → Dansyl amino acid (강한 형광성)

↓ hydrolysis

Chromatography

※ Sanger' method 보다 100배 sensitive 하다.

③ **Edman degradation**

Peptide + phenylisothiocyanate (PITC)

↓

Phenylthiocarbamoyl (PTC) derivatives

↓ hydrolysis

↓ mild acid conditions (F_3CCOOH)

Phenylthiohydrantion (PTH) + Intact polypeptide

(derivatives) **(원래보다 아미노산 1개가 적은 것)**

2) C-terminal identification (C-말단결정법)

① Hydrazine 분해법 (Chemical method)

Polypeptide + hydrazine (NH_2-NH_2) → [Amino acyl hydrazides] + [Free amino acid]

② 가수분해효소이용법(Exopeptidase를 이용)

- polypeptide에서 terminal residue를 분해하는 효소
- Carboxypeptidase, aminopeptidase 등을 이용

③ Tritium 화법

- C-말단 아미노산의 α위치의 수소를 선택적으로 방사성 tritium으로 변환하고 가수분해하여 아미노산 분리 동정하는 법

3. 단백질의 3차 구조 파괴

- Peptide sequence analysis
- Polypeptide chain의 분리하기 위해
- Native protein의 conformation 형성을 방지하기 위해 3차구조 파괴

1) Disulfide bond (S-S)의 분해

· cleaved oxidatively by **performic acid**

· cleaved reductively by **mercaptans (dithiothreitol, DTT)**

…… Cystine ……

↓ ← 2-mercaptoethanal

↓ ← Dithiothreitol (cleland's reagent)

Free sulfhydryl group

↓← Iodoacetic acid 처리

Alkylation

* **Alkylation** : ① O_2의 산화에 의한 disulfide bond의 형성을 저해
② 공기 중 peptide bond의 분해에도 안정

2) 단백질변성 (Protein denaturation) : 수소결합을 파괴

- 단백질의 3차구조가 파괴되는 과정, peptide 결합의 파괴를 의미하지 않는다.
- **변성시약** : 강산 또는 강염기, 유기용매, 세제, 염 농도, 중금속 이온, 열에 의한 변성, 기계적 스트레스, 환원제(Urea, β-mercaptoethanol)

4. Specific peptide cleavage reaction : endopeptidase

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

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

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

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

※ **Cyanogen bromide** ($C{\equiv}N{-}Br$) : Methionine 잔기의 Carboxyl 쪽을 절단
ex) Peptide + 시아노겐브로마이드(cyanogen bromide)
→ Peptidy homoserine lactone + Amino acyl peptide

5. 생물학적 활성이 있는 Oligopeptide (dipeptide, tripeptide, oligopeptide)

1) Glutathione (r-glutaminyl cysteinyl glycine) : 적혈구의 산화적 손상을 방지

- $2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$

2) Vasopressin 과 Oxytosin : nanopeptide

- 뇌하수체 후엽에서 형성되는 nanopeptide로 C-(말단)에 amide group을 함유하여 **carboxy peptidase에 의해서 분해되지 않는다**.

* Vasopressin (항이뇨호르몬): 말단 혈관을 압축 → 혈압 상승

* Oxytocin : 평활근의 수축, 수유시 젖의 분비를 증가

3) Insulin : peptide hormone (51 amino acid)

- 구조 : A-chain (21 a.a). B-chain (30 a.a)
- 기능 : 혈당량 조절(고혈당시 분비)

4) Asparatame : 인공감미료 (L-asparatyl phenyalanyl methyester)

- 설탕보다 200배 더 달다

5) Gramicidin S : 10 amino acids

- 미토콘드리아 막투과에 작용하는 펩티드 항생물질, Na와 H+ 수송성
- 그람양성균의 생육을 강하게 저해하는 항생제
- 생산균주 : *Bacillus brevis*

6. 아미노산분석(amino acid analysis)

1) 산 가수분해

- Protein ——————→ amino acids(표준아미노산)
- hydrolysis(가수분해) : 6N HCl, 110℃±5℃, 18~24 hrs
  - Trp : destroy
  - Ser, Thr, Tyr : 일부가수분해

2) 아미노산 분석기기 :

- **자동아미노산분석기(automatic amino acid analyzer)**
- **HPLC**

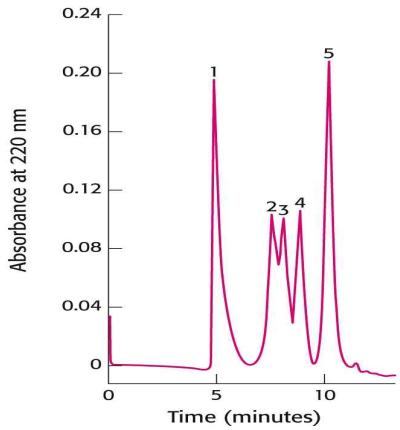


Fig. High-pressure liquid chromatography(HPLC)

III. Proteins

* Protein의 어원 : derived from the Greek "protos" first or foremost)
* 기본 구성단위 : L-amino acid, 약 20여종
* 원소 조성 : C, H, O, N(16%), S(3%), P(1%)로써 구성
* **Protein 정량** : $N(\%) \times \frac{1}{0.16} = N \times 6.25$ (조단백, crude protein)
* **단백질은 Information pathway의 가장 중요한 final product이다.**

1. 단백질의 생물학적 기능 (Biological functions of proteins)

1) **촉매기능 : 효소(Enzyme)**
2) **운반단백질** : Hb, Mb, serum albumin, lipoprotein
3) **저장단백질**
   - Ovalbumin (egg white의 주요단백질)
   - Casein (milk), prolamin
   - Ferritin (Fe저장 단백질)
4) **수축(운동)단백질** (Contractive or motive proteins)
   - Actin, myosin (filamentous protein) : 근육 수축단백질
   - Tubulin
5) **구조단백질**
   - Collagen (fibrous protein), Keratin, fibroin
6) **면역단백질**
   - Antibodies or immunoglobulin (면역 단백질)
   - Fibrinogen, thrombin : blood clotting protein (혈액응고단백질)
7) **조절단백질**
   - Hormone (insulin), Growth hormone(성장호르몬)
   - Repressor (억제단백질)

   ※ receptor protein (수용체 단백질)
8) Other proteins :
   - antifreeze protein

(a) Luciferin (b) Erythrocytes (c) Keratin

2. 분류(Classification)

1) 단백질 구조에 의한 분류

① Globular protein (구상 단백질) : cytochrome, hemoglobin
- tightly folding, water soluble

② Fibrous protein (사상 단백질) : 결체조직, 근육, keratin, collagen
- arranged along one axis, water insouble

2) 단백질 조성에 의한 분류

① 단순 단백질(simple protein) - 가수분해에 의하여 α-amino acid 만 생성
- albumin : serum albumin, ovalbumin
- globulin, glutelin, prolamin
- histone, protamin

② 접합 단백질(conjugated protein) : 단순단백질 + nonprotein(보결분자단)
- Phosphoprotein, Glycoprotein, Metalloprotein, Hemoprotein, Lipoprotein

* **아포단백질(apoprotein)** : 보결분자단이 없는 단백질
* **완전단백질(holoprotein)** : 보결분자단을 가지고 있는 단백질

TABLE 3-4 Conjugated Proteins

Class	*Prosthetic group*	*Example*
Lipoproteins	Lipids	β_1-Lipoprotein of blood
Glycoproteins	Carbohydrates	Immunoglobulin G
Phosphoproteins	Phosphate groups	Casein of milk
Hemoproteins	Heme (iron porphyrin)	Hemoglobin
Flavoproteins	Flavin nucleotides	Succinate dehydrogenase
Metalloproteins	Iron	Ferritin
	Zinc	Alcohol dehydrogenase
	Calcium	Calmodulin
	Molybdenum	Dinitrogenase
	Copper	Plastocyanin

3. 단백질의 구조 (Structure of protein)

: 단백질의 구조는 기능을 결정

1) Primary structure (1차 구조)

- polypeptide chain의 amino acid 순서

- protein 과 polypeptide 와의 한계를 보통 MW10,000을 기준

① Peptide bond는 공명에 의하여 안정된 구조

C--N single bond는 40%의 double bond 성질

C=O double bond는 40%의 single bond 성질

② 입체배치와 입체구조(Configuration and conformation)의 구분

* Configuration : stereoisomer 에서 substituent group의 입체공간배열, 이들은 서로 다른 one or more covalent bond의 breaking없이 상호 전환 될 수 없다.

ex) cis-trans isomer

* Conformation : bond의 breaking없이 분자내 bond의 자유로운 회전에 의하여 상호 변화될 수 있는 입체구조의 공간배열

ex) ethane :무한한 수의 conformation 가능

③ polypeptide chain : 무한한 수의 conformation가능

* biological 활성은 pH, temp의 정상적인 조건에서 conformation이 활성을 가짐
* Polypeptide bond → stretched out or randomly arrange

↓

biological activity 손실

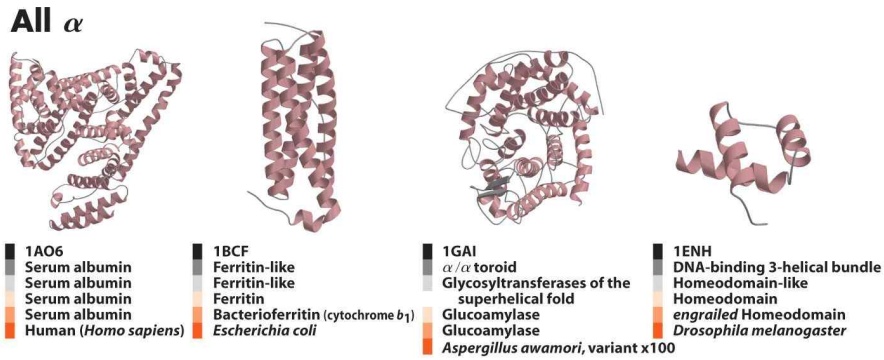
2) Secondary strucutre (2차 구조)

* **α-helix (α-나선 구조)** : right handed
* **β-pleated sheet (β-병풍구조)**
  - 평형병풍구조(paralled β-pleated sheet)
  - 역평형병풍구조(antiparallel β-pleated sheet)

① α-helix (called by Pauling and Corey) :

- **3.6 a.a /turn, right handed**
- N-Cα rotation : Φ(phi)
  Cα-C rotation : Ψ(psi)
- **0.54nm (5.4Å)/turn**
- **0.15nm / a.a residue(아미노산 잔기당)**

* Single stranded α-helix : 4nm, 긴 것 : 100nm
* α-helix가 몇 개씩 꼬여 있는 것
  - Keratin (hair), myosin (muscle)
* α-helical coil of α-keratin
  - 3~6개의 α-helix가 서로 꼬여 disulfide bond로서 연결
* α-helix함량은 protein의 종류에 따라 다름
  - Hb, Mb : 대부분 α-helix
  - Chymotrysin : virtually devoid of α-helix
* Helix breaker : Glycine, proline
  - Φ, Ψ 각을 규정하지 못함



② **병풍구조(β-pleated sheet)**

* β-pleated sheet : fully extended 0.35nm／a.a 잔기
  antiparalled β-pleated sheet
* **α- helix : tightly coiled, 0.15nm／a. a 잔기**
* 역회전 (reversing turn) : glycine
* Collagen : left handed

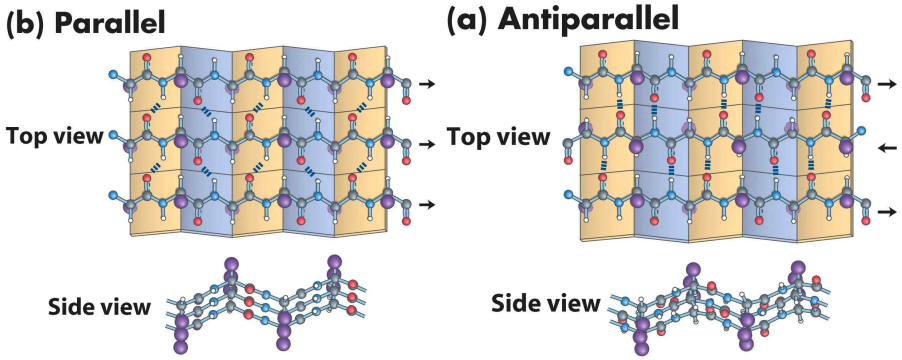


Table. Approximate amounts of α helix and β conformation in some single-chain proteins

Protein (total residues)	Residues(%)	
	α Helix	β Conformation
Chymotrypsin	14	45
Ribonuclease	26	35
Carboxypeptidase	38	17
Cytochrome C	39	0
Lysozyme	40	12
Myoglobin	78	0

3) Tertiary structure : 3차 구조의 안정성

◎ 비공유결합

- 수소결합(hydrogen bond between peptide group, or R group)
- 이온결합(Ionic bond) : 정전기적 상호작용
- 소수성 인력(Hydrophobic interaction between nonpolar R group)

◎ **S-S 공유결합(Covalent disulfide bond)**

① 단백질의 3차구조가 다르다

② 단백질은 변성에 의하여 구조와 기능을 잃는다.

- **단백질의 변성의 원인 : boiling, organic solvent, urea, detergent, pH(강산, 강염기), 중금속, 기계적 스트레스**

* Renaturation (재생)

③ **아미노산 순서는 3차 구조를 결정한다.**

- **아미노산 순서는 DNA염기서열로부터 추론할 수 있다.**
- 아미노산 순서는 중요한 생물학적 정보를 제공한다.

◎ **Three-domain found in several proteins**

(☞ Fig. 5-19 MCKee, Biochem)

a) Helix-loop-helix : EF hand form, Ca^{2+}과 결합

b) Zinc finger : **DNA 결합 protein**, DNA와 상호작용,
cysteine 잔기들은 Zn ions 에 대한 결합부위제공

c) Leucine -Zipper : DNA 결합 domain

* **Domain and region : 구조적 진화적 중요성, 효소의 활성중심**

4) Quaternary structure : subunit의 공간배열

: Subunit로 언급된 2개 이상의 polypeptide chain으로 구성되어 있다.

○ 동종 4차 구조(homogeneous quaternary structure)

○ 이종 4차 구조(heterogeneous 〃)

* **소중합체(Oligomer) :** 모든 소단위가 동일한 다중소단위 단백질(multisubunit protein)

- 1개 혹은 2개 이상의 소단위로 구성된 **기본 단위체(protomer)**로 되어있다.
- 폴리펩타이드의 소단위는 **공유교차열결** 및 **비공유결합**에 의하여 유지된다.

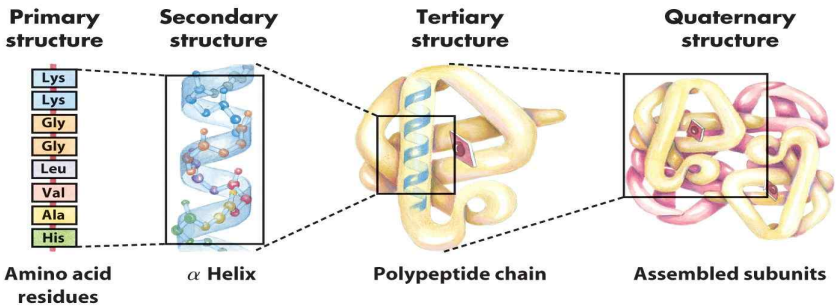


Fig. Levels of structure in proteins

4. 특정한 단백질의 구조

1) 섬유상 단백질 : α-나선구조, β-병풍구조

① α-Keratin : 머리카락, 털, 피부, 뿔, 손톱(나선구조를 촉진하는 아미노산 함유)

② Silk fibroin : β-keratin(fibroin), β-병풍구조 (Gly, Ala, Ser)

③ Collagen : 3개의 **좌선성 나선구조**(left-handed polypeptide helice)

- 척추동물에서 가장 풍부한 단백질, Gly, Pro, HO-proline 가장 풍부하다.

2) 구상단백질 :

- including enzyme, transport proteins, some peptide hormone, and immunoglobulin

① Cytochrome C : **Fe 함유, 전자 전달에 관여**

② Hemoglobin (Hb) : 헤모글로빈

: Hemoglobin binds oxygen in the lungs and release it in peripheral tissue

- **구조 : $\alpha_2\beta_2$ (tetramer), 태아($\alpha_2\gamma_2$)**
- 200 ml O_2 carry／혈액 1L
- $4O_2$／1mole Hb, (동맥 Hb; 96% 산소로 포화, 정맥 Hb; 64%만 산소 포화)
- **Hb는 산소와 협동적 결합(cooperative binding)을 한다**

※ **협동적 결합이란** 한분자의 산소가 Hb에 결합하면 다음 두 번째의 산소결합은 더욱 쉽게 결합할 수 있게 된다.

◎ **Bohr effect : Hb의 산소해리는 pH가 감소하면 O_2해리가 증가하는 현상**

- 허파 : Hb은 산소와 결합 → H^+방출, pH 증가
- 활동근육 : Hb은 산소방출 → H^+결합, pH 감소

◎ **Hb의 산소 친화력에 미치는 H^+, CO_2의 영향**

- H^+, CO_2 증가는 Hb의 **3차 구조를 변형**시켜 산소에 대한 친화력을 감소시킨다.
- Mb는 H^+, CO_2 에 영향을 받지 않음, 산소에 대한 친화력은 Mb>Hb 이다

◎ **2,3-bisphosphoglycerate (BPG) : Hb의 알로스테릭 인자**

*** Hb의 기능을 조절, 적혈구에 다량함유**

* BPG 존재는 Hb의 산소에 대한 친화력을 저하시킨다.

* BPG와 deoxyhemoglobin이 cross-linker(Hb 안정화)

* BPG에 의한 Hb의 산소결합의 조절은 태아발달에 중요한 역할 수행

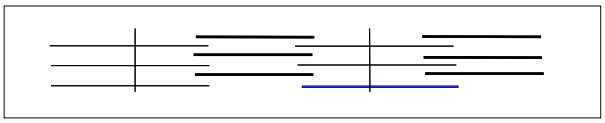
③ Immunoglobulin G (Ig G) : Glycoprotein

- **기능 : 항원과 결합하는 혈청단백질로 면역기능**
- 구조 : light chain, heavy chain : 500 a.a

④ Muscle protein

- 근원섬유(myofibril)를 함유하고 있다.
- **근절(sarcomere)**을 기본단위로 구성되어 있다.
  - 굵은 섬유(thick filament) : **myosin**
  - 가는 섬유(thin filament) : **actin**, troponin complex

* **Sliding-filament model**
* **근수축은 Ca^{2+}와 ATP를 요구**



5. Protein folding (단백질의 접힘)

: Protein folding은 단백질의 구조를 안정화시킴.

○ **Molecular Chaperone (분자 샤페론) : 분자보호자**

- **신생단백질의 접힘을 촉진, 스트레스로 부분적으로 풀어진 단백질의 refolding을 지시한다.**
- 수송과정동안 다른 단백질분자들과의 불필요한 접촉차단

ex) Hsp70 : 단백질을 heat shock로부터 보호하는 역할

Hsp60 (chaperonin) : ribosome으로부터 방출된 단백질들 중 아직 부분적으로 접혀 있는 일부단백질들이 완전하게 접히도록 돕는다.

○ **구조화되지 않은 단백질(unstructured protein)** : 원래 구조화되지 않은 단백질

- **기능 : 신호전달, 전사, 번역과 세포증식 등과 같은 과정을 조절**

6. Exploring Proteins (단백질 실험)

1) 단백질의 정제

① 추출 및 가용화

② **염석(salting out) :** 염류를 첨가하여 용해도를 감소시킴으로서 단백질을 침전

③ **유기용매에 의한 침전**

④ **투석(dialysis)** : 반투막을 이용하여 고분자 용액으로부터 무기염류 등의 저분자 물질을 제거하는 방법

⑤ **Column chromatography** : 단백질 정제에 가장 효과적으로 사용되는 방법

◎ **ion-exchange chromatography(이온교환 크로마토그래피)**

- **단백질의 전하에 따라 분리**
- **정제하고자 하는 단백질은 pH 또는 염 농도를 변화시켜 정제**

◎ **Gel filtration chromatography(겔 여과 크로마토그래피)**

- 분자량의 크기에 따라 내용물을 분리
- 주요 column resin : Polyacrylamide, Agarose, Dextran 등

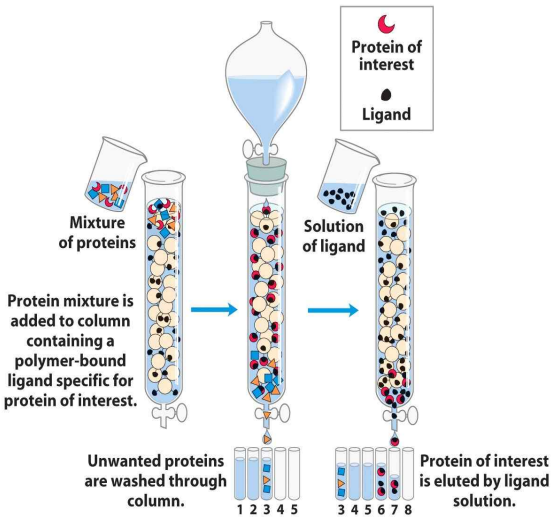
◎ **Affinity chromatography (친화크로마토그래피)**

- **단백질의 고유한 생물학적 특성을 이용하여 정제하는 방법으로 단백질과 리간드사이의 비공유결합을 이용하여 분리한다.**

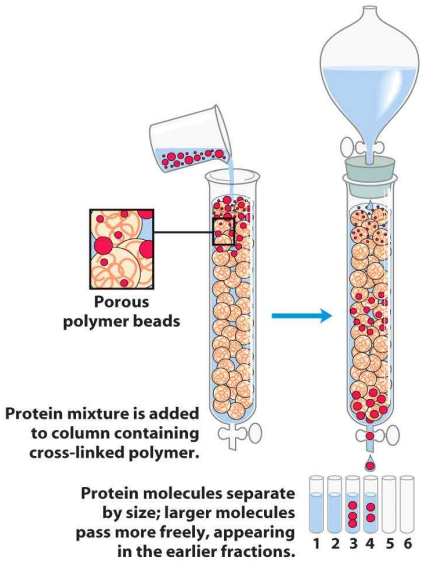
2) Protein electrophoresis(단백질 전기영동)

- 1차 전기영동 : SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
- Isoelectric focusing and two dimension electrophoresis

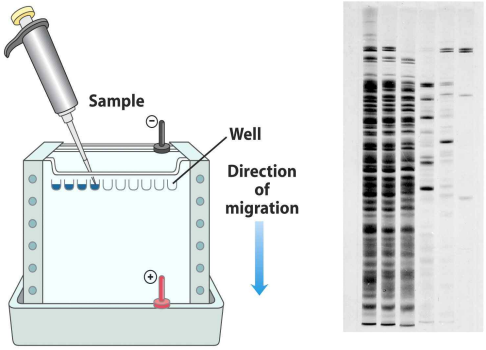
[Affinity chromatography]

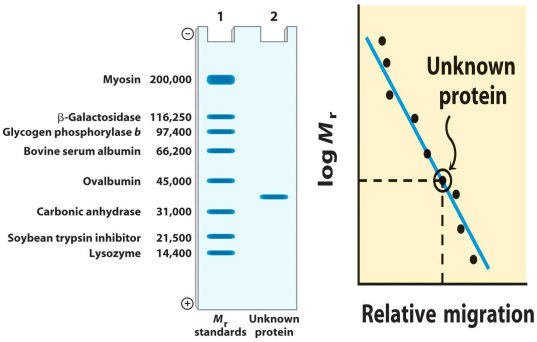


Gel filtration(겔여과)



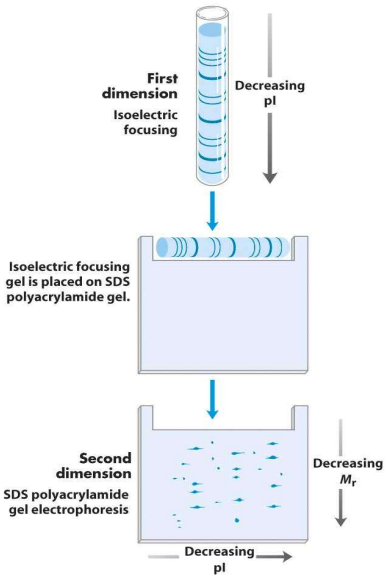
[단백질 전기영동과 분자량 측정]

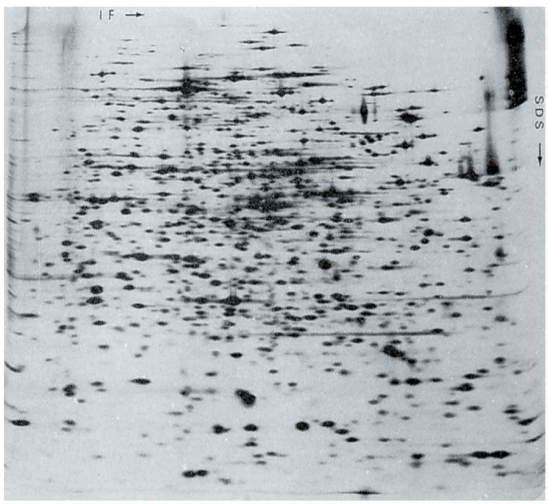




1차 전기영동

단백질 분자량 측정





[Two dimension electrophoresis]