

基礎

● 1 酵素的命名 E1

● 2 酵素的構成 E2

動力
機制

● 3 酵素動力學 E3

● 4 酵素的抑制 E4

● 5 酵素的催化機制 E5

調節

● 6 酵素活性的調節 E6

→ ● 7 細胞代謝與酵素調控 E7

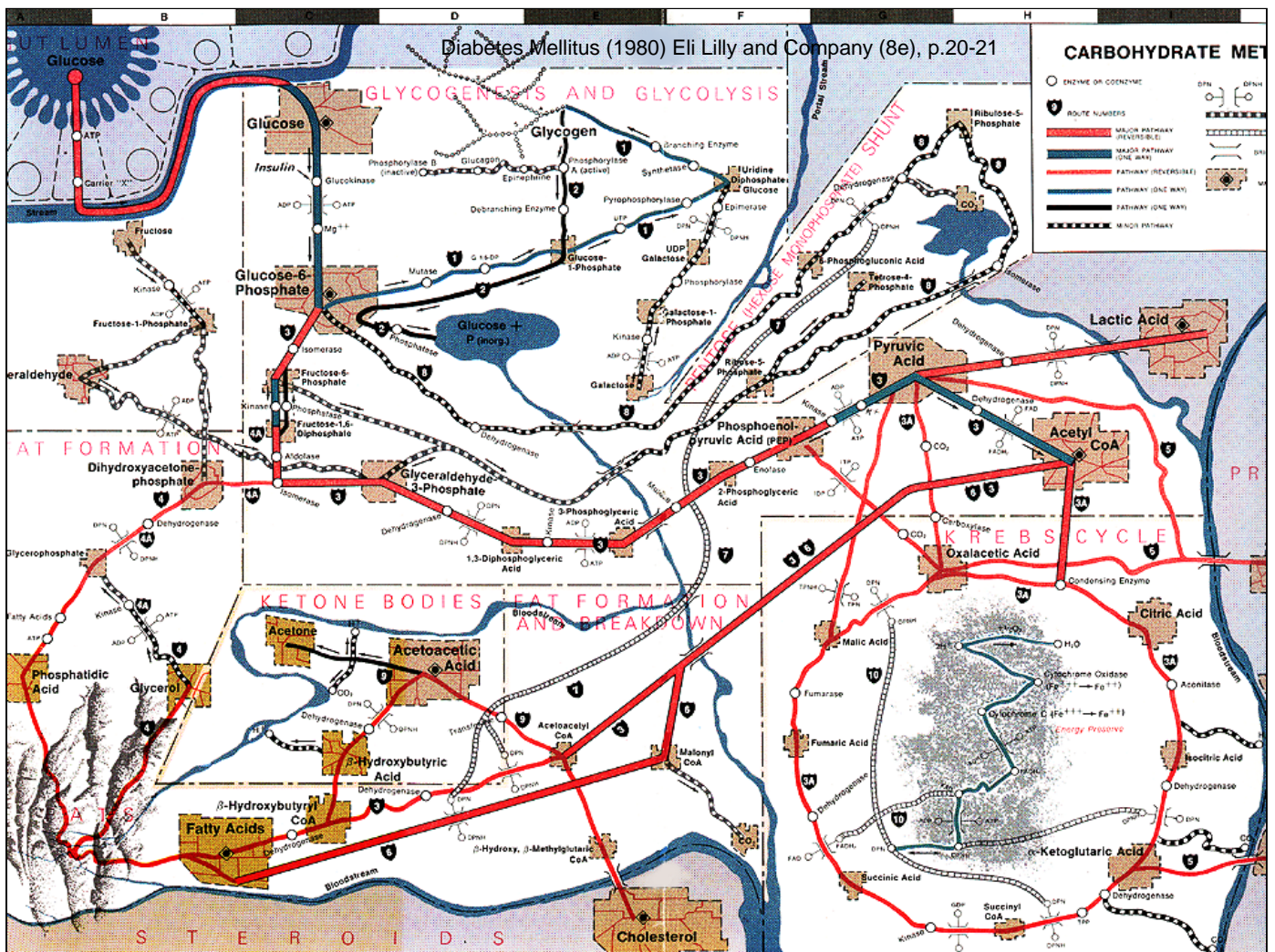
應用

● 8 酵素在生物技術上的應用

熟悉 酵素的各種性質後，將要進入各種代謝途徑（各論），因為每種代謝反應，都有一個酵素負責催化。首先我們將簡介代謝途徑的一些基本原則，並以異化代謝為例，說明細胞如何有計畫地把食物分子逐步分解成小分子，然後進入細胞內最重要的一條代謝大道（糖解作用 glycolysis）。

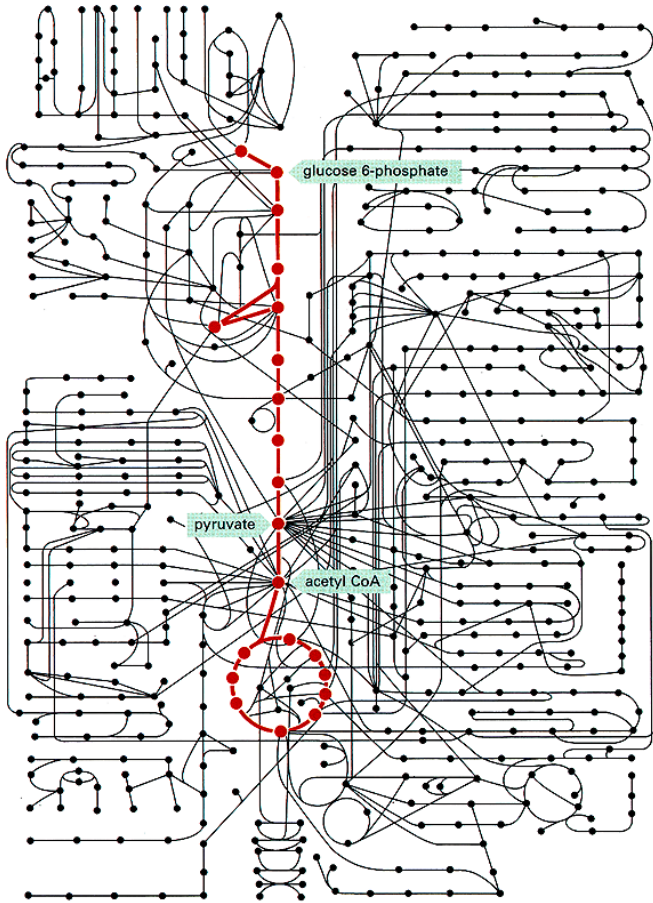
接著整理細胞內代謝途徑的調節方法，如何以控制酵素的活性來調節代謝途徑，如何以荷爾蒙開關代謝途徑，細胞甚至可以用空間上的效應來加強酵素系統的作用。最後簡要介紹研究酵素及代謝系統的材料種類，以及蛋白質純化的原理與操作原則。

這一章的討論，多相當鉅觀，沒有太多分子層次的解析。不過，這種大範圍的審視也十分重要，以免走入死胡同而不知全貌。現在的分子生物學研究，也要回歸到整個細胞、生物體、甚或整個生態的佐證，才能更有力地證明分子層次的發現是否有意義。尤其基因體學蓬勃發展，結果強迫科學家以鉅觀角度去思考生物問題，蛋白質體學同樣也提供了全面性的觀點，去檢討整個細胞的代謝、調節與分子間的相互作用。如此巨大的資料與分析，都必須依賴這五十年來電腦發展的成果，使生物學與電腦資訊學密切接軌，合流發展出計算生物學 (computational biology) 或系統生物學 (systems biology)。

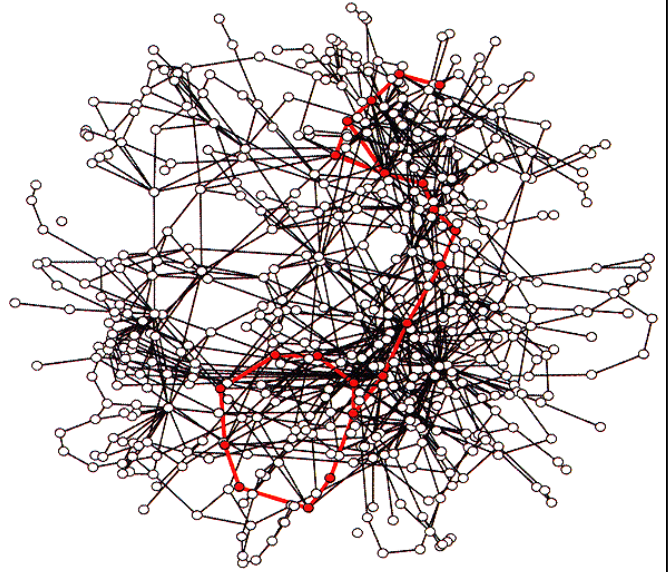


當 我們把酵素的種種性質一一說明之後，就即將準備上路；好像瞭解汽車的種種構造、性質、操控等知識後，就可以開上馬路去馳騁了，但是還必須有一張地圖，而酵素的地图就是細胞的代謝途徑。

7.1 醱解作用與醱酵途徑



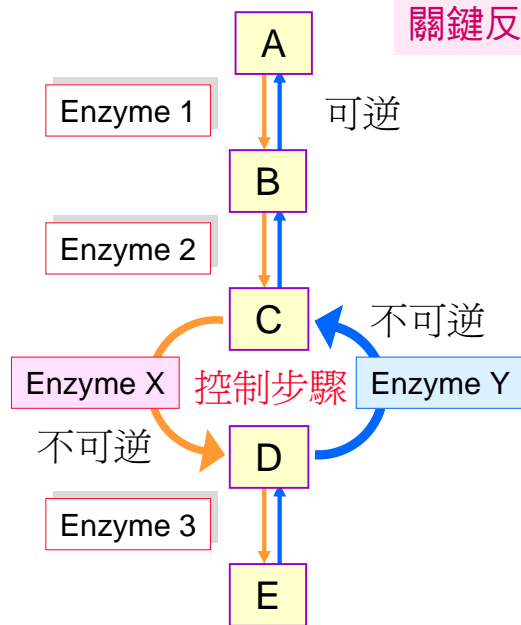
Alberts et al (2002) Molecular Biology of the Cell (4e) p.107



Dressler & Potter (1991) Discovering Enzymes, p.22

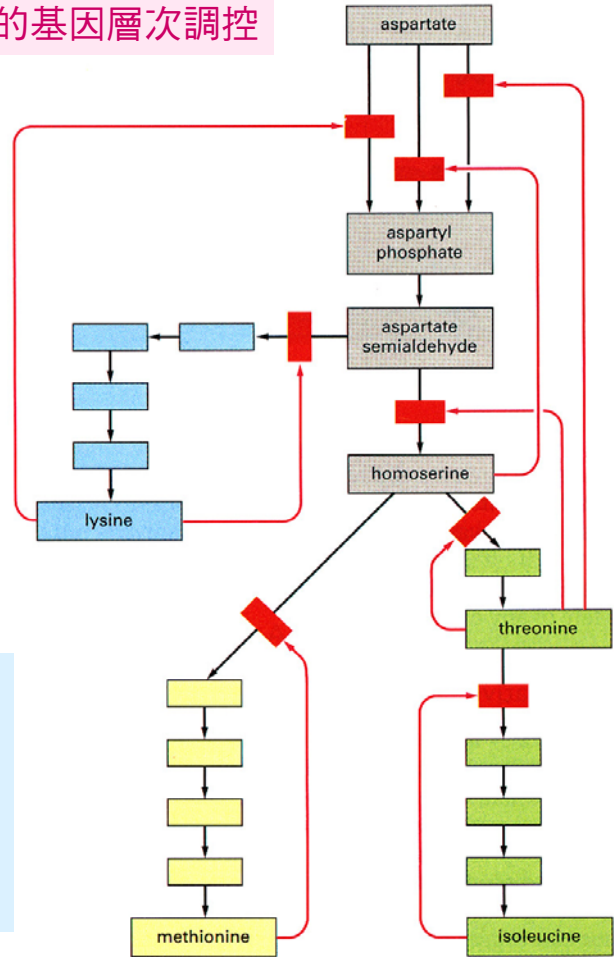
回顧 埃及人就已經會釀酒，但他們不知道其實是利用酵母菌的醱解作用，以及無氧醱酵所共同得到的成果。上面這張代謝路徑圖，只是整體代謝的一小部份，但其中也標出整個代謝中最重要的大道 - 醱解作用 (glycolysis)，以及大道末端的圓環 - 檸檬酸循環 (TCA cycle)。要徹底把這條大道及圓環理解清楚，因為上面的每一條巷道，都會再通往很重要的景點，帶你進入細胞生物化學的種種驚異旅程。

代謝路徑調控原則



- (1) 每一步反應均有酵素催化
- (2) 代謝路徑有速率決定步驟
- (3) 反應可能為可逆或不可逆
- (4) 各條代謝路徑之間可互通

Yang Cycle (楊祥發發現植物乙烯合成路徑)



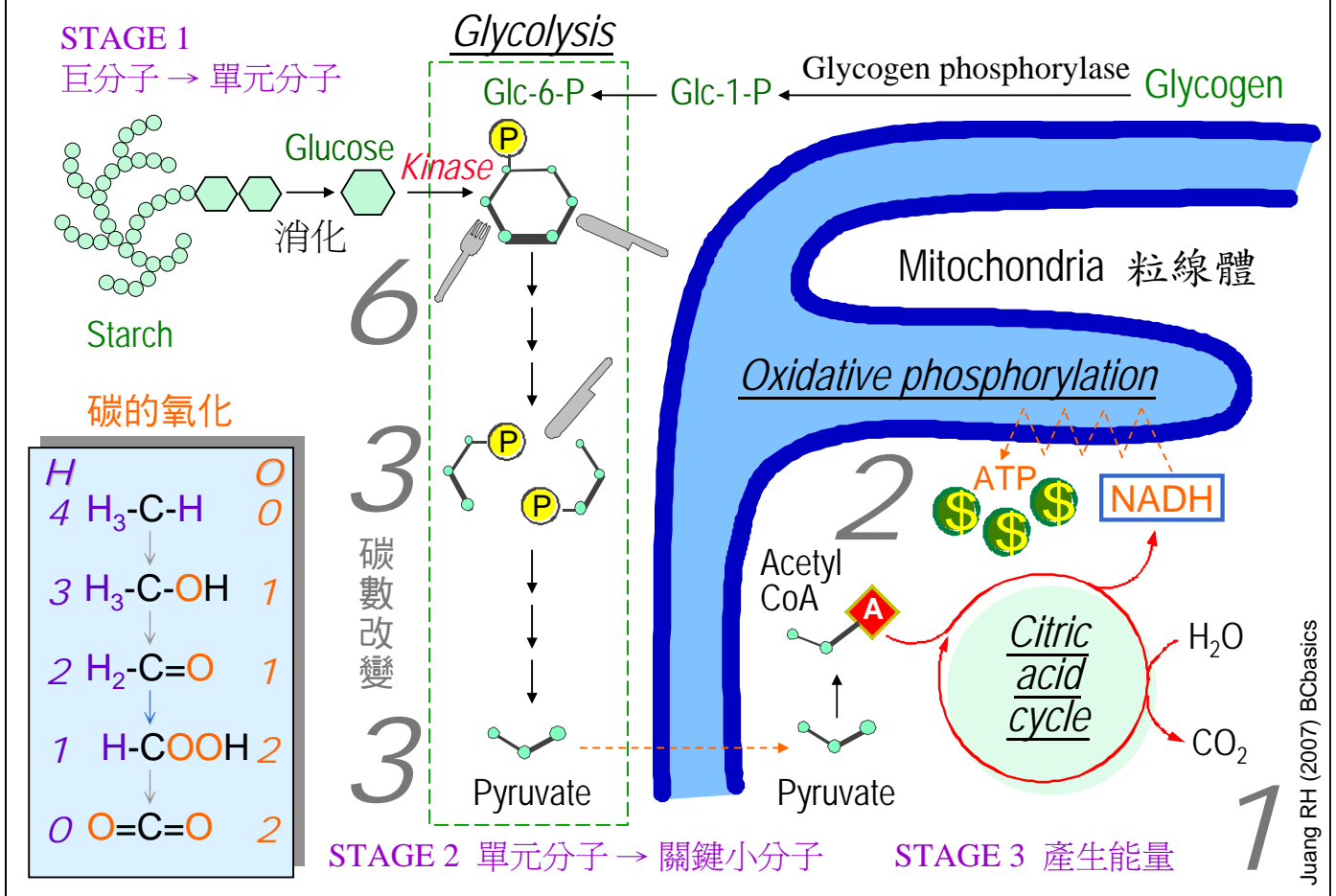
Alberts et al (2002) Molecular Biology of the Cell (4e) p.173

代謝途徑 每一個關卡，都是酵素在進行催化，因此使得細胞的整體運作，非常順暢。但是這些路徑，也不是一味往前推動，當產物太多時，會回來控制出發點上的某酵素，這個可調控的酵素，大多控制著整條路徑的速率決定步驟。

另外，個別的代謝途徑之間，都有互相的通道，以免當其中一條路徑不通時，可以曲折迂迴達到目的地；就像當高速公路不通時，大家還是可以改走省道。

大部分的道路都是雙向的，酵素的催化也大多是可逆。但是在某些關卡，酵素的催化變成不可逆的單向反應，例如前面所說的蛋白質激酶就是不可逆反應。那相反方向的反應如何進行？通常是改用另外一種酵素，例如磷酸酶就可以去除激酶所催化的磷酸。這種由酵素控制的磷酸化-去磷酸循環，成為細胞中重要的調控手段，也極為有效且快速。

7.1.2 主要代謝路徑



在 細胞內可降解澱粉或肝糖得到磷酸化的單糖，再將此單糖導入糖解作用 (glycolysis)；單糖碳數一路崩解，由六碳成為三碳 (pyruvate)，進入粒線體後成為兩碳 (acetyl CoA)，再進入檸檬酸循環完全氧化成為二氧化碳。在此過程中，產生許多能量分子，其中的 NADH 再進入氧化磷酸化反應生成 ATP。

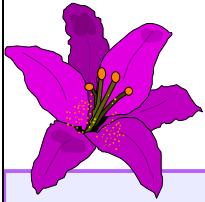
這條主要代謝路徑有幾個應注意之重點。首先是上面所說的碳數一直下降而分解，同時要注意碳數不但下降，而且碳原子一直被氧化 (失去氫原子)，最後成為二氧化碳。細胞就是靠這樣的氧化作用，消耗具有化學能的碳氫化合物 (糖類)，以產生能量。

其次，整個步驟可大分為三個階段，先是把巨分子的澱粉或肝糖分解，成為單位小分子的磷酸化單糖，進入糖解作用繼續分解成 pyruvate，pyruvate 再進入粒線體，先變成重要的 acetyl CoA，再經檸檬酸循環完全氧化成二氧化碳。

請依下列各種角度來觀察這條主要代謝路徑：

- (1) 流程：澱粉 → Glc-6-P → Glycolysis → 氧化磷酸化反應 → ATP
- (2) 分子：大分子 → 小分子 → CO₂ + H₂O
- (3) 碳鏈長度變化：6 → 3 → 3 → 1
- (4) 細胞空間：胞外或胞器 → 細胞質 → 粒線體
- (5) 氧化狀態：醇基-OH → → → CO₂

主要代謝路徑提供能量及材料



其他代謝路徑的許多原料是由主要代謝路徑生產



- ◆ 基本動作： (1) 把分子裂解 (2) 把碳分子氧化
- ◆ 空間移動： 胞外或胞器 → 細胞質 → 粒線體
- ◆ 氧化數增加 → 產生 NADH → ATP

Juang RH (2007) BCbasics

上圖 把糖解作用的主要代謝路徑，做大略的分析與解釋。

此路徑的主要基本動作是 (1) 將糖類分子分解，(2) 把碳分子氧化，(3) 並且獲得能量。其中列出主要的三個 Stages，並且把各個 Stage 的關鍵分子列出，最後在檸檬酸循環釋出二氧化碳，並在氧化磷酸化後產生水分子，完成碳原子的利用。整個過程中，糖解作用收獲得少數能量 (ATP)，而檸檬酸循環可以得到許多 NADH，這些 NADH 上的能量 (電子) 可以再經粒線體上的氧化磷酸化反應，轉換成 ATP。

7.2 細胞如何調控酵素活動

Molecular biology

7.2.1 基因表現調控：反應較慢但較長久
核酸層次 (*lac operon*: 乳糖結合 repressor)

7.2.2 酵素活性調控：轉譯後調控較快速
共價及非共價修飾 (6.1~6.4)

Metabolic pathways

7.2.3 賀爾蒙的調控：細胞間的聯繫與調控
賀爾蒙 → Second messenger

Signal transduction

7.2.4 胞內空間效用：

Cell biology

(1) 胞器 (2) 酵素複合體 (3) 胞膜酵素

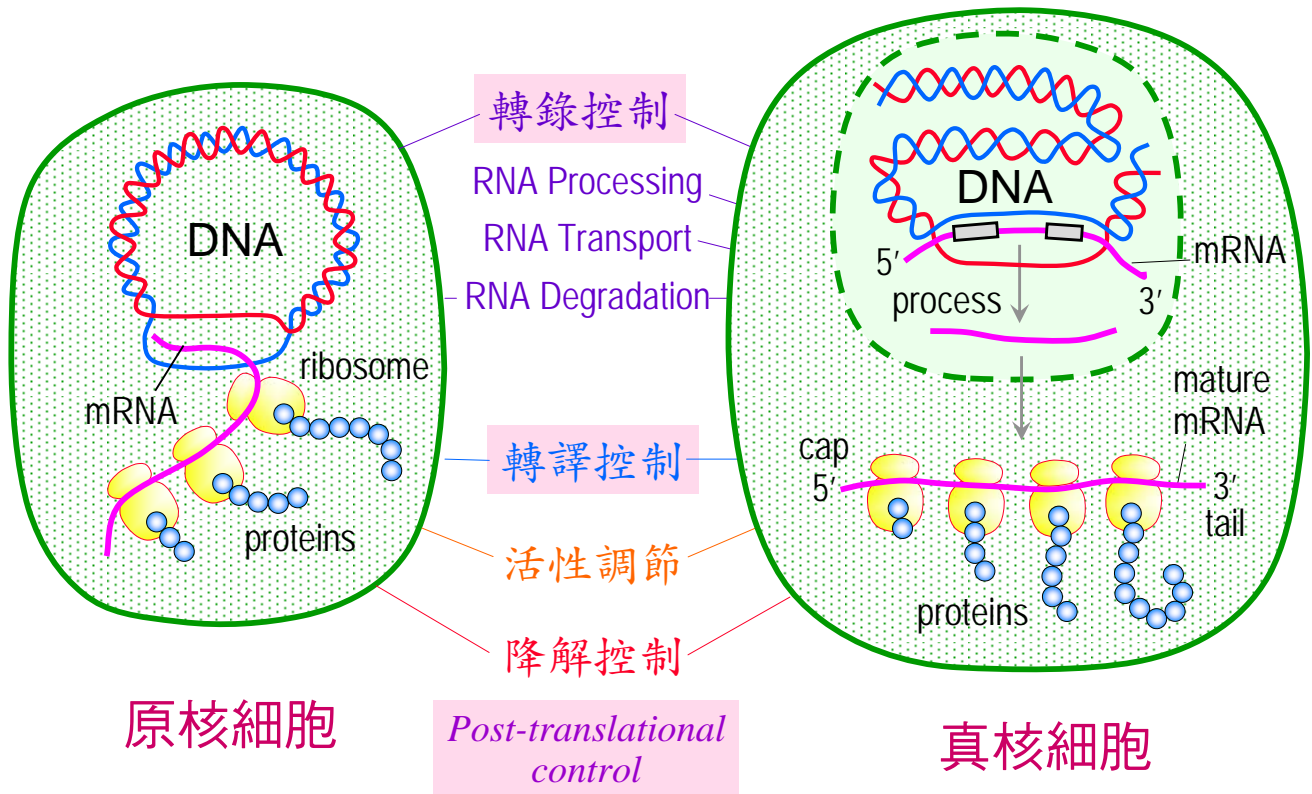
Juang RH (2007) BCbasics

細胞 為了要有效利用酵素及代謝路徑，用了很多方法來調控它們。其中基因表現層次的控制，將在核酸或分子生物學中詳細講述，我們只在下頁圖文中大略介紹；而酵素活性的調控，以及代謝途徑控制的通則，已經在前面詳細說明過。

另外有兩種方式也可以控制酵素及代謝，其中以荷爾蒙來作為全身性的長途控制，是極為常見的方式，而且在生理上極為重要。但請注意，荷爾蒙只把調控命令帶到目標細胞的表面，由細胞膜上的接受體把信息傳入，經由 second messenger (如 cAMP) 引發細胞內的反應，這是我們前面已經提過的調控方式。

另一方面，細胞可以利用空間上的隔離或集中，來達成調控的目的。例如把一些同質性或高危險的酵素集中在胞器內，或把連續幾個反應的酵素集中成為一個酵素複合體，或把酵素附在細胞膜上，都是利用空間上的便利所達成的。

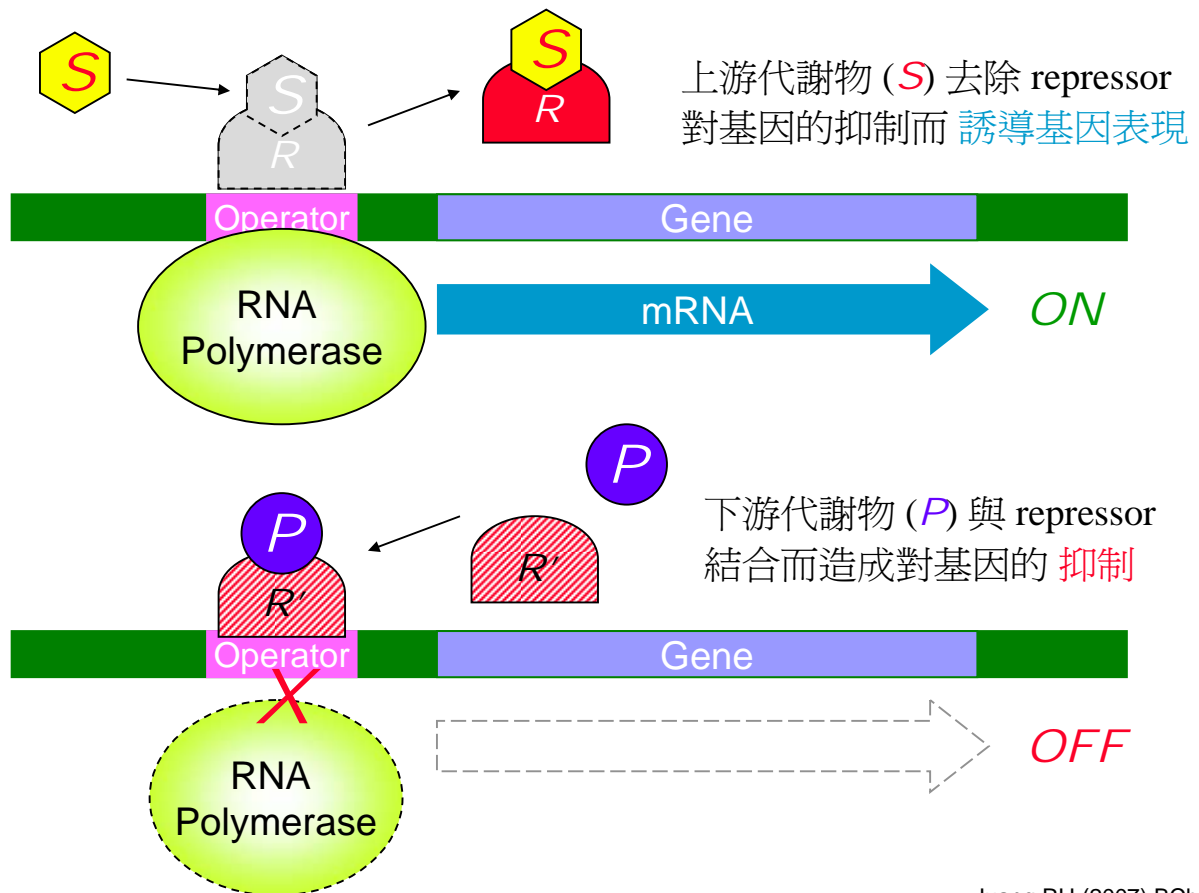
7.2.1 細胞內基因表現的控制點



Juang RH (2007) BCbasics

mRNA 生成後，在原核細胞可以很快轉譯出蛋白質，但在真核細胞者又可以有各種調控機制，控制由 mRNA 到蛋白質的轉譯過程。所轉譯出來的蛋白質或酵素，又可受到很多的調節方式，在我們酵素的部份已有詳細說明。因此，細胞為了掌控胞內蛋白質或酵素的活性，真是無所不用其極；尤其在較高等的真核細胞，擁有比原核細胞複雜的調控機制。

Operon 可運用上下游代謝物調節基因



基因 的調控是最根本的控制機制，但是通常都比較慢；原核生物利用操作子 operon 可以有效反應環境中的代謝物，以控制相關基因的開關。

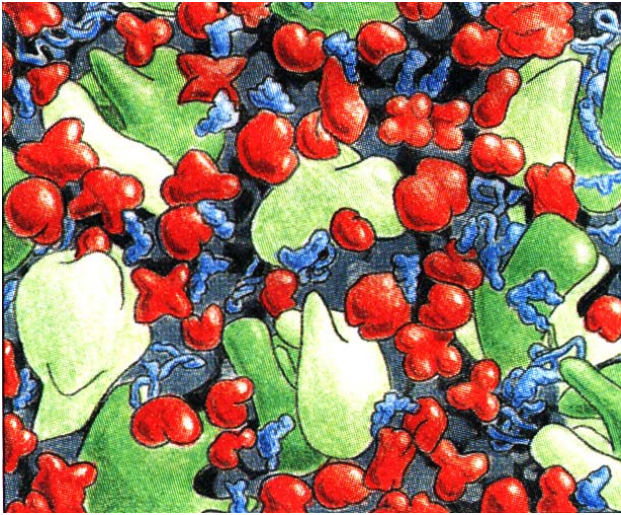
上圖是兩個簡化的例子，當環境中某種上游的代謝物 (S) 濃度較高時，就會活化利用該代謝物的基因；其機制之一，就是此代謝物可與抑制該基因表現的 repressor 結合，因而去除此 repressor 對基因的抑制。

反之，若某酵素的下游產物 (P) 太多了，此一產物可以回來抑制其上游關鍵酵素的基因；例如 P 與另一 repressor 結合後，可以結合到轉錄該酵素基因的 operator 上，阻礙 RNA 合成酶與 DNA 結合與轉錄。有沒有覺得與酵素的 regulator 很像？但是影響的對象與層次不同。

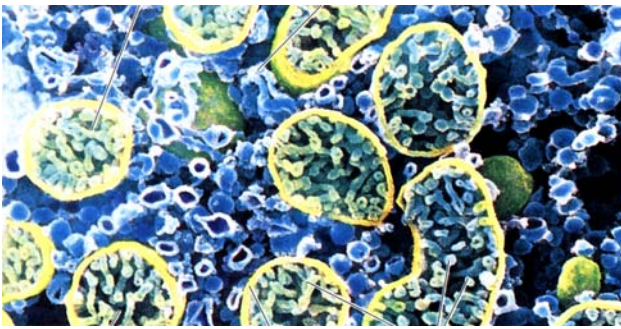
基因層次的調控絕對不只如此，可以說你想得出來的方式，細胞都可能類似的機制。種種基因調控及其原理、應用，請到分子生物學課程中研讀，但先決條件是先把生物化學念好。

7.2.4 細胞內的空間極為擁擠

Alberts et al (2002) Molecular Biology of the Cell (4e) p.78, 99

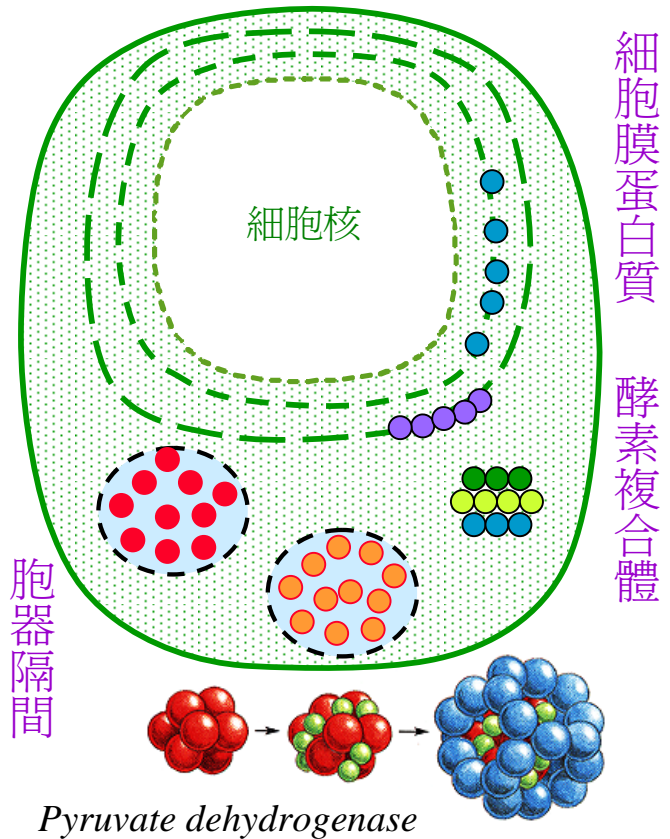


Mitochondria



Campbell (1999) Biochemistry (3e) p.513

Compartmentalization

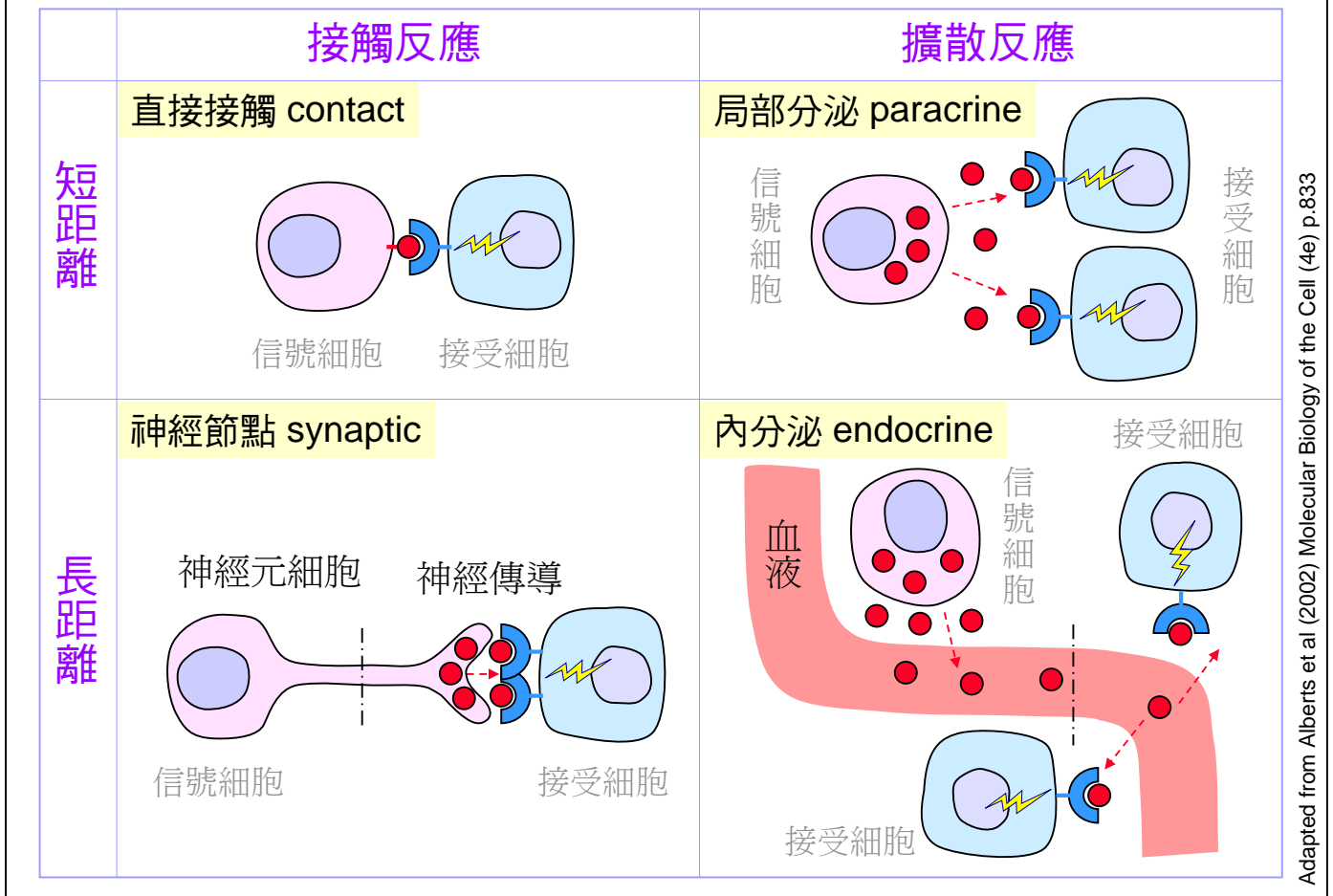


由於 要在最小的空間擠進最多的物質，細胞內是非常擁擠的，左上圖想像細胞質中如此的擁擠情形，大部分都是負責蛋白質合成的核糖體及各種酵素，還有 tRNA 穿梭其間。因此，細胞內的酵素必須發展出有效的設計，才能順利在這種空間中，找到其作用基質或專一性結合對象。

酵素可能由右圖的三種方式來提高催化效率。有些酵素吸附在各種細胞膜上，以細胞膜為空間上的依憑，把數種相關酵素或其基質集中。在細胞質中數個催化連續步驟的可溶性酵素，也可聚集成酵素複合體（如 pyruvate dehydrogenase），大大降低各步驟基質的漫遊時間。另外，胞器也是提高催化效率的方法，例如粒線體就集中了檸檬酸循環的酵素群，一起在其中有效率地產生能量；同時，一些具有危險性的酵素（如蛋白酶），可以集中在胞器中（如 lysosome），可有隔離的效果。

這些方式，都不是精緻的分子調控機制，只有利用空間管理，就可以大大提高整個細胞的運作效率，其重要性絕對不亞於分子層次的設計，千萬不要忽略此一效果。

7.2.3 細胞間的聯繫與調控系統



Adapted from Alberts et al (2002) Molecular Biology of the Cell (4e) p.833

若把 鏡頭拉到細胞外，那麼細胞與細胞之間，又是如何進行調控？上圖整理出這些可能的機制，分成長距離與短距離的調控，兩者又各分成直接接觸與擴散兩種方式。

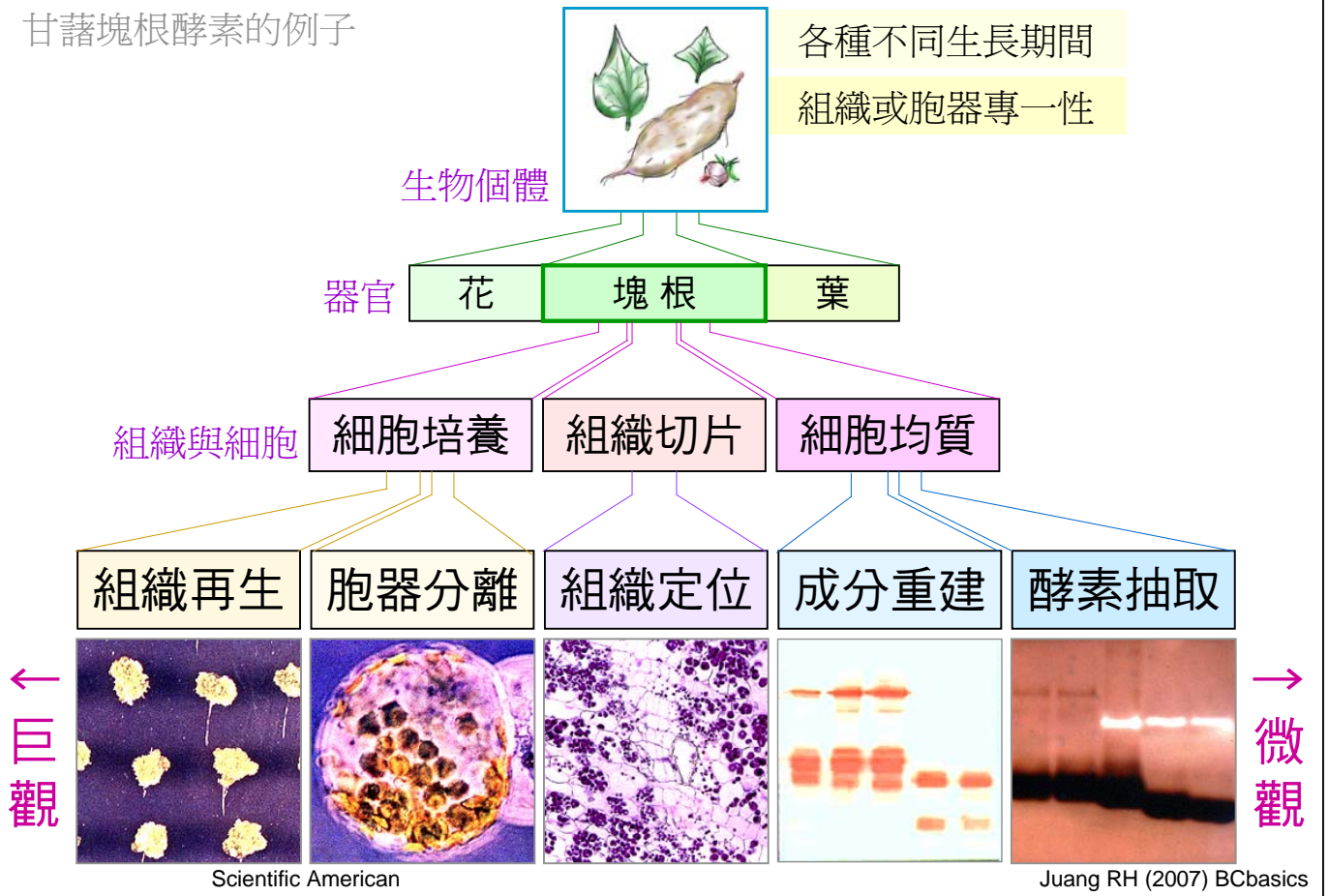
直接接觸是兩個細胞直接以細胞膜上的蛋白質互相辨認，若能有專一性的契合，就會把信息傳入細胞內，使接受者細胞啟動其效應。短距離接觸最顯著的例子，就是抗原呈現細胞把抗原碎片表達給 T 細胞；而長距離者，以神經細胞間的傳導最為熟知，雖然神經節間還有一點空隙，要靠神經傳導物質傳送信息。

細胞若以擴散方式進行，則細胞間並不直接接觸，也可分成短距離的局部分泌，以及長距離的荷爾蒙內分泌系統，前者以信息分子直接擴散到接受細胞，後者則經由血液傳送到接受細胞。

不管哪一種方式，都要靠分子間的專一性辨認，其一由信號細胞放出，另一落在接受細胞的細胞膜上。兩者之中，通常接受細胞的受體 **receptor** 都是蛋白質，而信號細胞可能是蛋白質或小分子。接受細胞接收到正確的信息後，便以信息傳導傳入細胞(上圖閃電記號)。

7.3 生物在不同組織層次的生化研究

甘藷塊根酵素的例子



終於 本課程已近尾聲。同學們應該對酵素的性質有些瞭解，也許很想開始進行有關酵素的生化學研究。但是，老實說，同學目前與實際的研究工作，仍有一段距離。好像你雖然每週兩次上館子吃料理，對所有菜餚瞭若指掌、如數家珍，但還不一定會做菜。

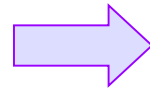
這張圖以甘藷塊根酵素為例，說明在進行研究工作時，最先可能遇到的幾個問題。首先當然就是材料，要注意你的目標酵素存在於生物個體的那一個器官或組織，更重要的是在那一個生長期間才會出現，或者要某種刺激或試劑才會產生。

再來也有很多需要考慮的細節，例如要使用何種工具，如何接近問題的核心，以便完成一個計畫。大體言之，思考一個研究專題的整體策略，最先可以注意下面三點：

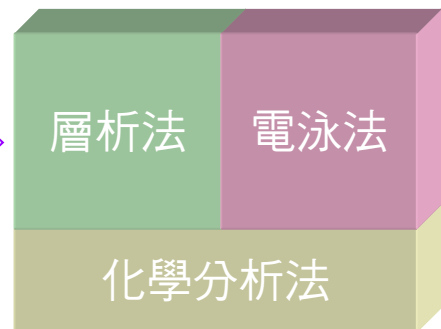
- (1) **由生理觀察開始**：一個題目通常有其目的，而此目標一般由觀察開始，尤其是生理或病理上的種種現象；確定此一觀察的再現性，並非假象，即可擬定主題或者假說。
- (2) **以分子工具探索**：生物化學提供各種分子層次的研究工具，可以用核酸、抗體或各種化學方法，追蹤上述研究主題的目標。
- (3) **用影像結果證明**：的確是眼見為真，生化研究也是極為注重可以直接看得到的結果，因此至少要以電泳結果讓人看到你的蛋白質；最好也有組織切片，染出你的酵素，讓它發亮。當然所有努力的目標，都是要回去證明最早的生理觀察及假設。

酵素純化方法及所根據原理

分子量不同
分子帶電荷不同
分子表面極性不同
分子間親和力不同
分子密度大小不同



主要的實驗操作方法



利用各蛋白質之性質差異來分離

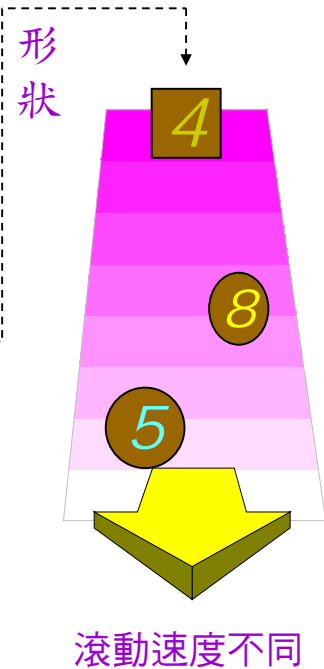
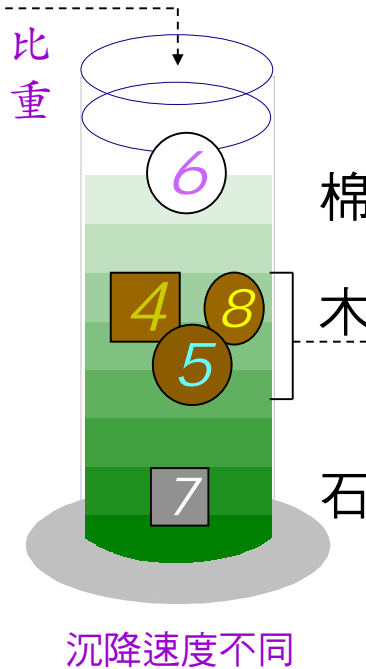
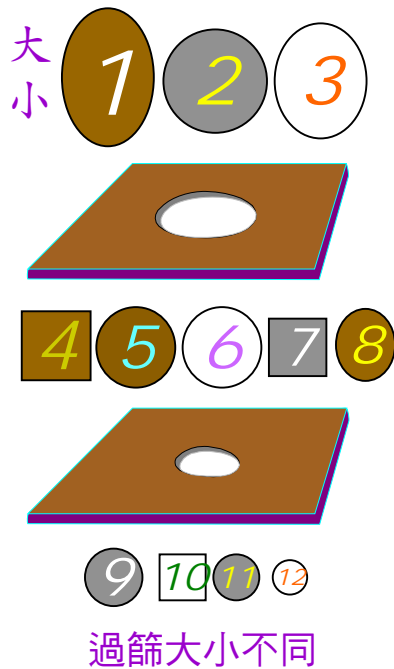
利用各蛋白質之構造特點做分析

Juang RH (2007) BCbasics

酵素 是一種蛋白質分子，而不同的蛋白質分子間，會有各種不相同的性質；例如各種蛋白質的分子量會有大小不同，其表面的帶電性也會有差異，甚至分子的密度也不一樣。以上這些性質，都可以被利用來作為分離蛋白質的依據；科學家們也設計了很多工具，可以有效地執行這些條件，達成分離的任務。

如何分離這些大小物件

形狀
大小
比重



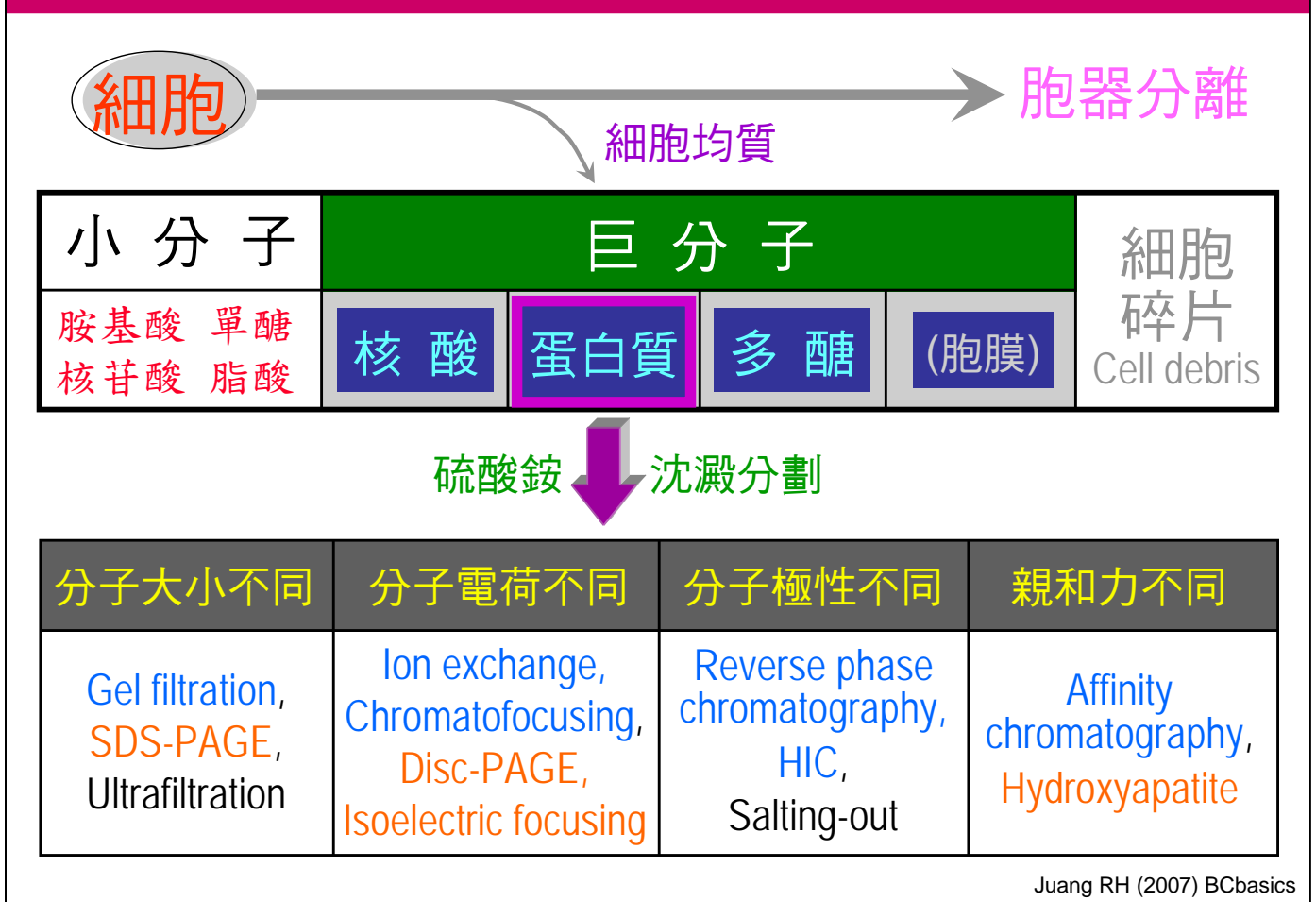
Juang RH (2007) BCbasics

若要 純化或分離出某種蛋白質，就得利用蛋白質之間某些性質上的差異，例如它們的形狀、大小、比重等不同。

如上圖的假想例中有 12 個物件，其大小、形狀與比重都不完全相同。若我們要分離出其中的 5 號木球，首先用一大一小兩種篩子，就可去掉 1, 2, 3 號三個較大者，以及 9, 10, 11, 12 號四個較小者。剩下的 4 ~ 8 號都有相同的大小，但因比重不同，在一個裝有密度梯度溶液（如甘油梯度）的量筒中，7 號石頭塊很快下沉，六號棉球又無法下沉，我們因此可以在中央部份收到木質的 4, 5, 8 號物件。然後把這最後的三個物件放在一斜坡上滾下，5 號木球會因為形狀的關係滾得最快，而 4 號因為是方塊而幾乎不動，8 號則介於兩者之間慢慢滾下來。我們因此可以分離得到 5 號木球，同時也可分得 4 號及 8 號。

在實際生活裡，我們當然不會用如此笨拙的方法來分離這些東西，但其基本原理與蛋白質的分離與純化非常類似；我們確利用蛋白質間分子量、分子形狀及密度的不同，或者分子所帶電荷不同，來作酵素的純化分離工作。

各種純化或分析方法的原理



酵素 研究大多要先把該酵素純化出來，才能夠做進一步的分析與鑑定。酵素來源通常由細胞取得，打破細胞後離心，可除去與細胞碎片。所得到的巨分子中，有核酸、蛋白質、多糖類與脂質的聚合物（脂質不是巨分子），我們可以用硫酸銨把所有蛋白質沈澱下來，酵素即在其中。

接著，我們可以利用各種酵素間不同的性質，來做進一步的純化；例如，分子量不同的酵素，可以利用膠體過濾 (gel filtration) 來分離之。以上所列的各種性質差異，都可以選擇利用來分離純化蛋白質，一直到接近純質為止。

Genome

基因表現不一定完全反映在蛋白質
由基因體較難預測蛋白質的修飾及調控
也無法預測蛋白質間的交互作用

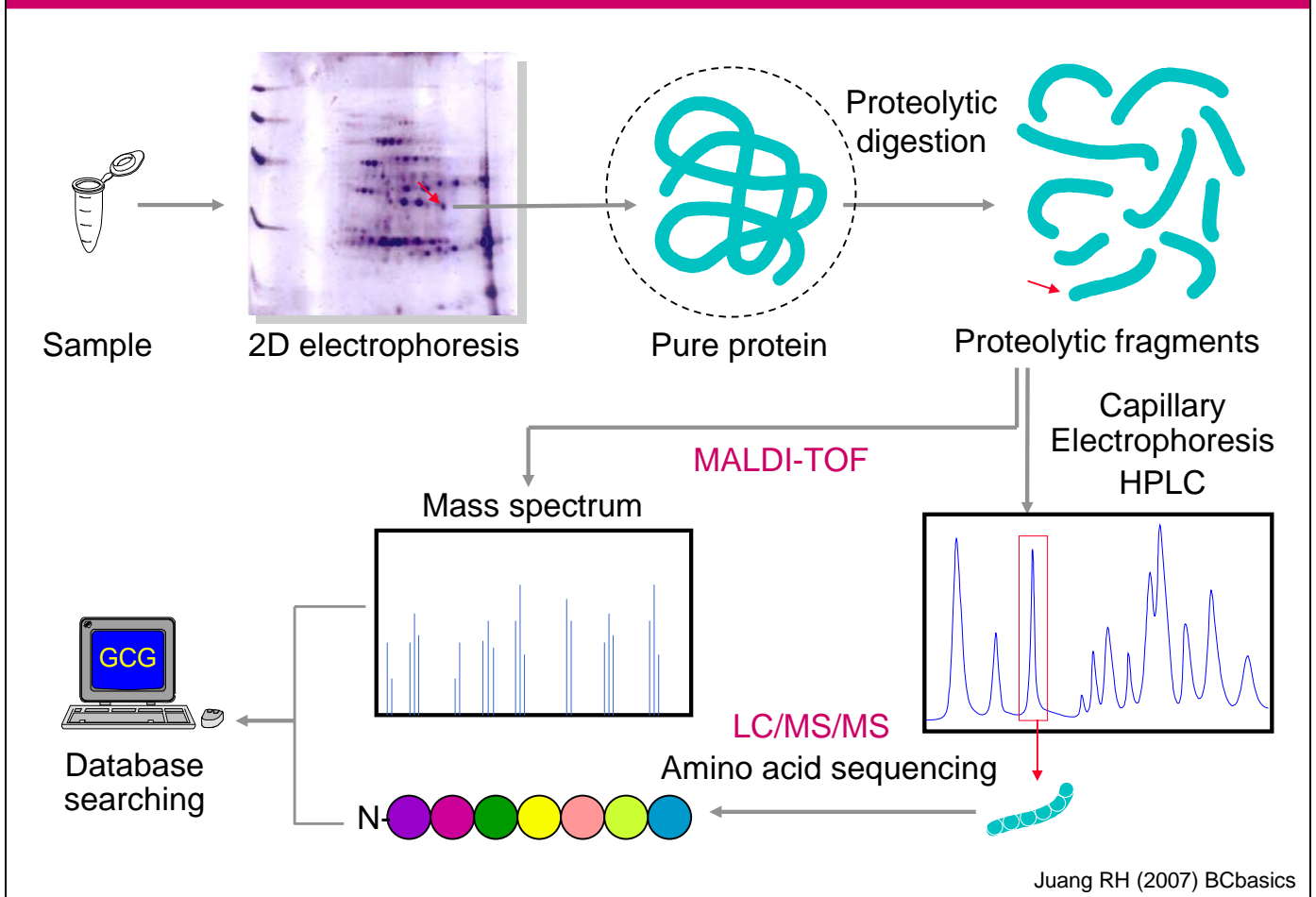
Proteome

Systems Biology, Integrated Biology

Proteome 這個字是由 genome 衍生來的，故與 genome 有密切關係。Genome 是一個細胞染色體上全體基因的總稱，假設這些基因全數表現成蛋白質，此一總體蛋白質即稱為 proteome。當各物種的 genome 一一被解出之後，我們可以翻出其總體蛋白質，由其所含的蛋白質種類，即可推測該細胞的代謝生理，或者可能的生理病變。

要注意一個細胞內的總體基因，並不是每一個基因都正在表現，因此討論蛋白質體就應該注意細胞的生長時期，或者所會表現的組織或器官。要取得正在表現的全體蛋白質，也不是一件容易的事，因為蛋白質的溶解度、表現量均不同，而且許多埋在細胞膜內的蛋白質也不容易取得。因此在解釋蛋白質體的結果時，要時時記得以上可能的弱點，以免漏失可能的發現，或者忽視可能的假象與危機。

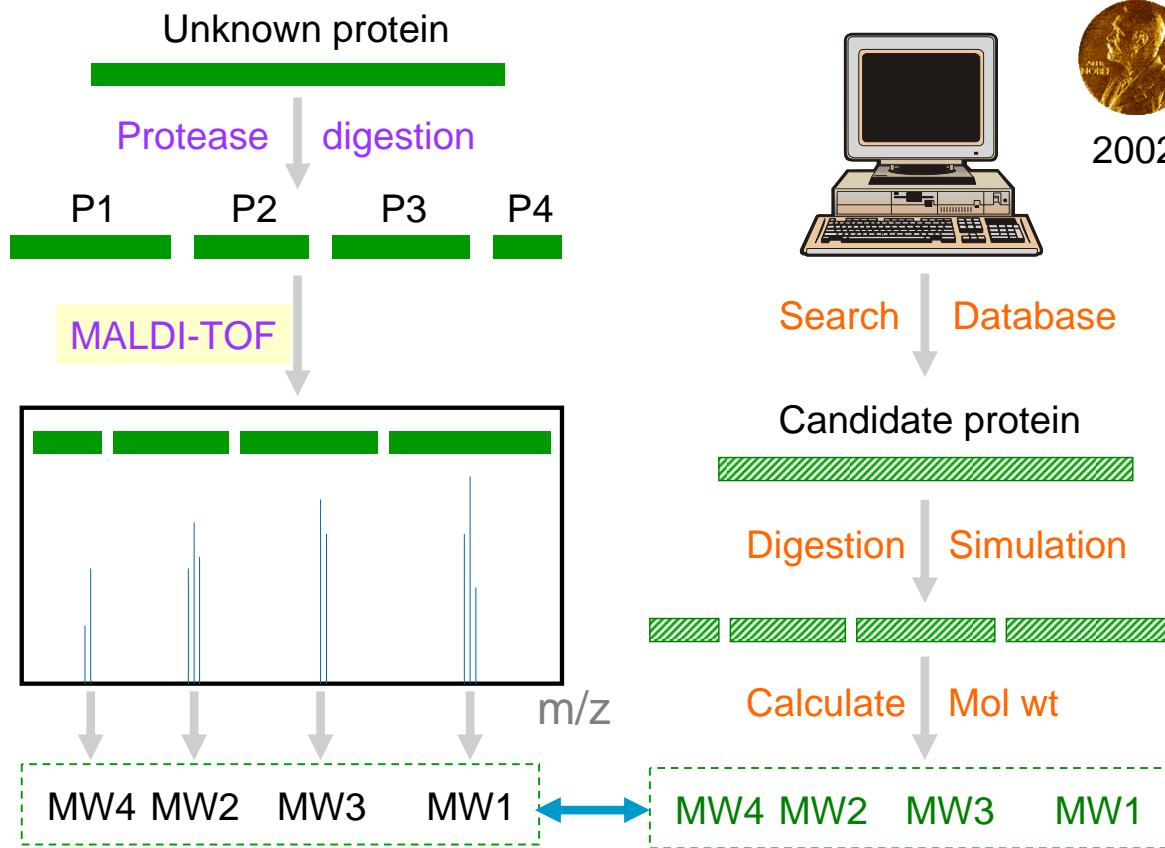
蛋白質體可綜觀蛋白質的消長與身分



微量 純化與分析技術，使得生化學家可以快速分離出一個蛋白質，並且準確判斷此蛋白質的身分。

通常從一個細胞樣本中，把總體蛋白質抽取出來，以二次元電泳分析之，定出所要找的目標蛋白質色點；切出此色點，可直接在膠體中以專一性蛋白酶水解之，所得各肽片段以 MALDI-TOF 質譜儀求得其質量，比較蛋白質資料庫中的已知蛋白質及預期的水解片段，即可推得此未知蛋白質的身分 (見下頁)。

若為全新的蛋白質，無法由上述方法推測，則以 HPLC 或毛細管電泳直接分離出各肽片段，這些片段分別用質譜儀或胺基酸定序儀分析其胺基酸序列，所得胺基酸序列在電腦資料庫中搜尋比對，可推測此蛋白質的起源或功能。



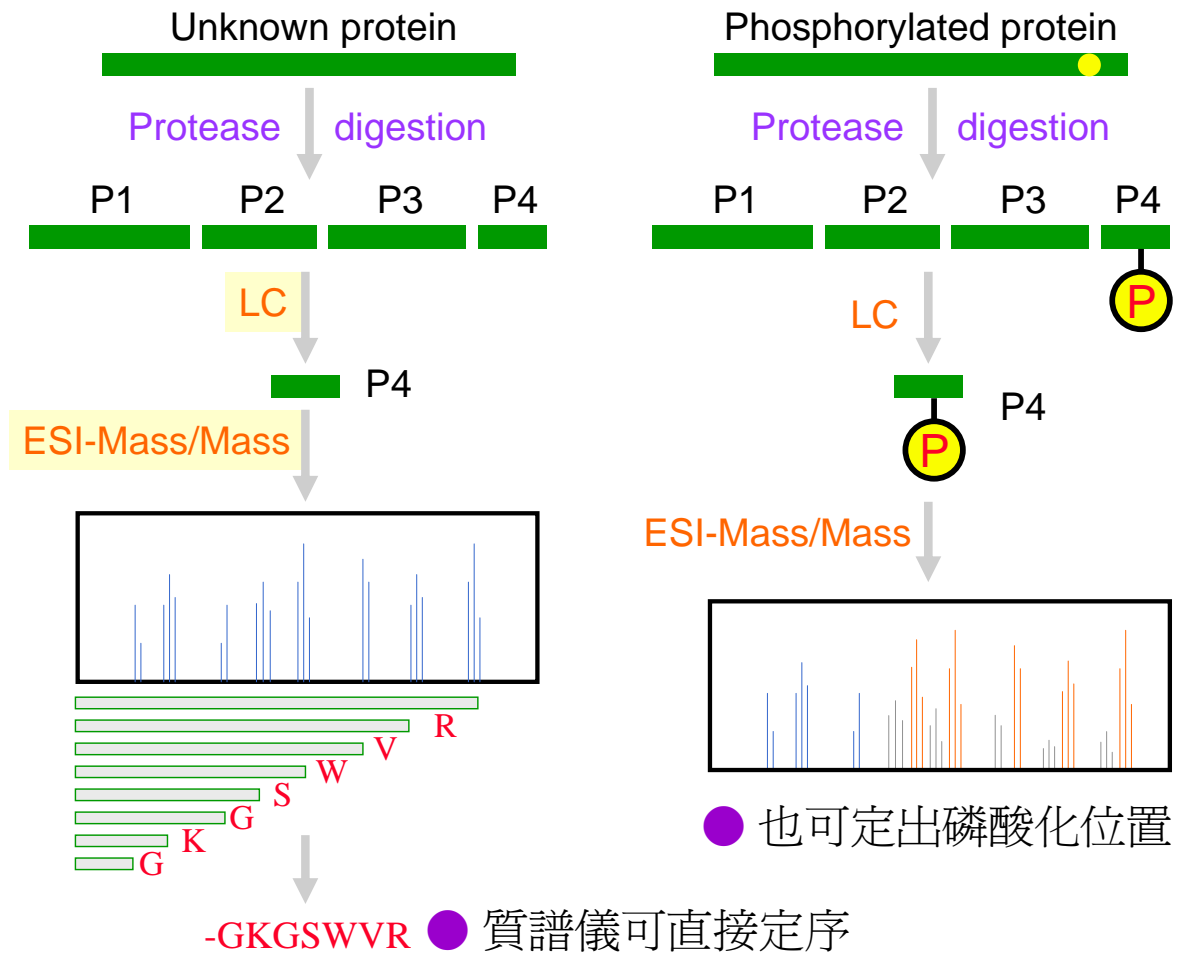
● 比對各片段分子量可確定該蛋白質身分

Juang RH (2007) BCbasics

MALDI-TOF 是兩種方法的合稱：使用以 MALDI (matrix-assisted laser desorption) 方式製備出來的離子片段，以 TOF (time of flight) 方式檢定質量大小。因為在 TOF 中，質量越大的片段飛行時間越短，因此可以計算出肽片段的質量。

若某一待測蛋白質先以專一性蛋白酶水解成四個片段 (P1~P4)，並以 MALDI-TOF 求得各片段的質量 (分子量 MW1~MW4)。另一方面，由電腦資料庫搜尋所有可能候選蛋白質，並在電腦中以相同的專一性蛋白酶模擬水解，則可得知各水解片段的分子量。比較兩組分子量，若得到的片段有相同的分子量，則可斷定此未知蛋白質即為電腦資料庫中的候選蛋白質。通常未知蛋白方面，只要比對得數條正確片段即可確定，不需全部吻合 (當然是越多越好，但若要全部吻合，在實驗技巧上有困難)。

質譜儀可進行蛋白質定序

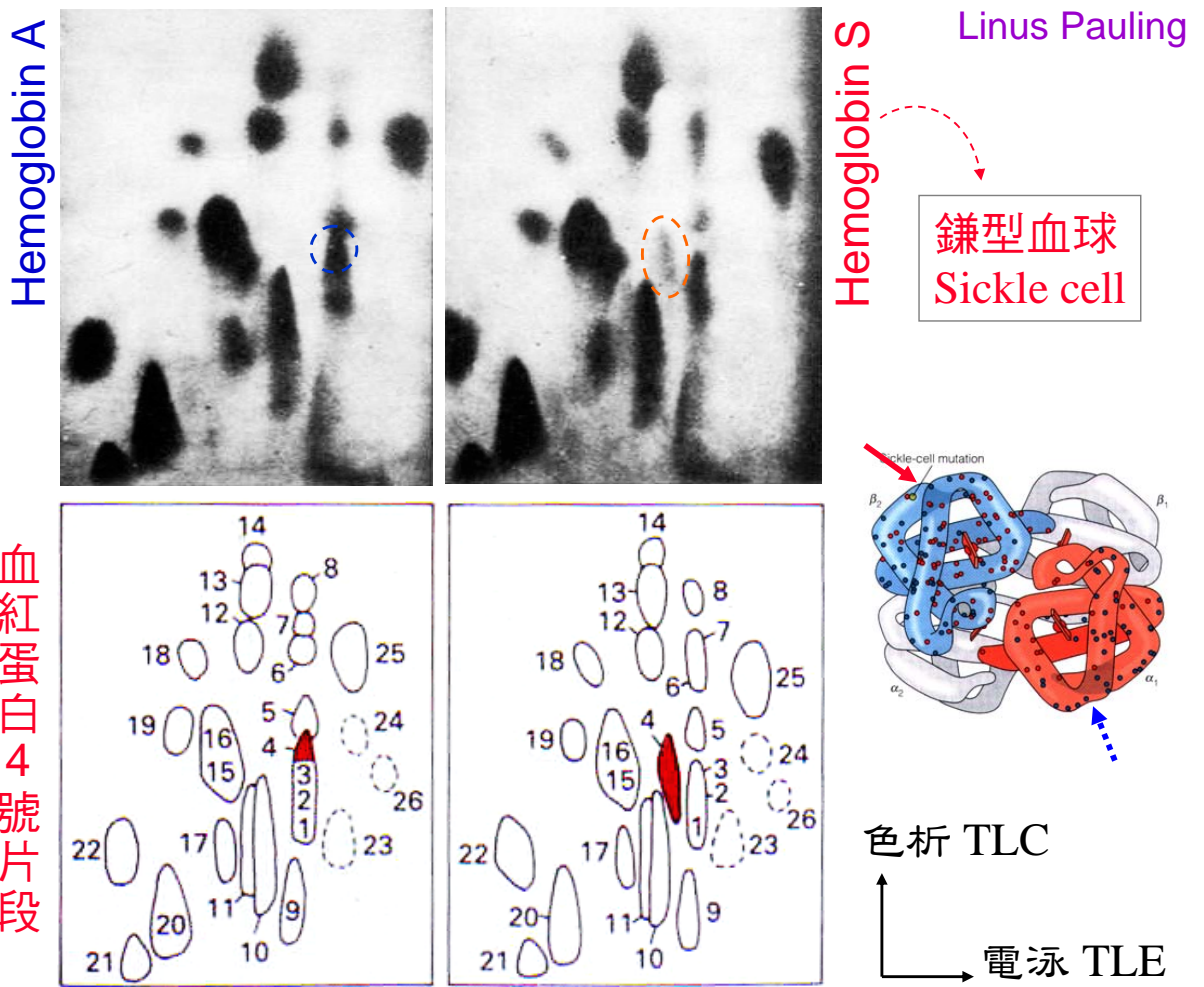


Juang RH (2007) BCbasics

另有一種更精密的質譜儀，可直接定出蛋白質片段的序列。ESI-Mass-Mass 前面的 ESI 代表 electrospray ionization，取代前面所說的 MALDI 方式，把待檢樣本溶液的 pH 調低成為正離子，這些離子被高壓噴霧出去，除去所帶的水分子後進入質譜儀分析；在所謂的 Tandem Mass (Mass-Mass) 分析方式，由第一個質譜儀所分出的各個片段，可以再進行第二次質譜儀分析，並且得以解得這些片段的胺基酸序列。

若你的胜肽片段上面有磷酸化的胺基酸，則比較磷酸化前後的質量，或者直接計算質譜儀結果，都可以推出此磷酸化胺基酸位置(右圖)。

以雙向層析與電泳檢定蛋白質片段



想起 五十年前，科學家利用簡單的二次元層析加電泳，分析鎌型血球症的血紅蛋白，發現這種病變的蛋白質，與正常型只差一個胺基酸，也因此開發了分子疾病的領域，這是由 Pauling 領導的研究團隊所貢獻。

■ 時至今日，擁有非常多樣而強大的分離檢定工具，你如何設計新的方法，去完成上述工作？