

# 酵 素

## Enzyme

Enzyme 一字源自希臘文，原意為 “in yeast”；描述在酵母菌中，含有某種神奇的催化活力，可以把糖轉變為酒精，故名為酵素。Sumner 在 1926 年首先結晶出尿素酶(urease)，並證實酵素為一種蛋白質。一般而言，酵素具有下列特性：

- a. 酵素可催化生化反應，增加其反應速率，是最有效率的催化劑。
- b. 酵素種類非常多，每一種都能催化所賦與的專一性反應，不相關酵素不易干擾；不過，可能會有酵素間的協同或抑制作用。
- c. 酵素的催化反應是可調節的，反應可受許多因子影響而加快或減緩。
- d. 通常酵素為蛋白質，但部份 RNA 也具專一性的催化能力 (ribozyme)。

總之，生物體藉著種種酵素的催化作用與調節，才能有效地完成他所需要的許多生理活動。若細胞內的酵素活動受到抑制或干擾，整個生物體就可能出現異狀，甚至死亡。

### 1 酵素的命名：

酵素的命名，有一定規則可循。

- a. 最初酵素命名並無法定的規則，但大都附有 -in 或 -zyme 等字尾，例如 trypsin, renin 及 lysozyme 等；後來漸以該酵素催化的反應加上 -ase 字尾為名，再冠上此反應的反應物，如 histidine decarboxylase (反應物 + 反應 -ase)。
- b. 1965 年命名系統化，把所有酵素依催化反應分成六大類，以四組數字名之 (IUBMB 系統)；例如 histidine carboxylase 為 EC 4.1.1.22：

Main Class :	4	Lyases	分裂 C-C, C-O, C-N 鍵
Subclass :	4.1	C-C lyase	分裂 C-C 鍵
Sub-subclass :	4.1.1	Carboxylase	分裂 C-COO 鍵
序列號碼 :	22	第 22 個 4.1.1	分裂組胺酸的 C-COO 鍵

- c. IUBMB 系統所分的六個 Main Classes：

(1) Oxidoreductase	氧化還原酶	電子或質子轉移
(2) Transferase	轉移酶	官能基團的轉移
(3) Hydrolase	水解酶	加水或脫水分子
(4) Lyase	裂解酶	共價鍵生成或裂解
(5) Isomerase	異構酶	同一分子內基團之轉移
(6) Ligase	連接酶	消耗 ATP 生成分子間新鍵

## 2 酵素的構成：

酵素主要由蛋白質所構成，不過許多酵素還需加上其它物質；有些 RNA 也具有催化的能力，在分子演化上可能是最早出現在地球上的巨分子。

### 2.1 全酶：

全酶是具有完整分子構造及催化能力的酵素。

- a. 一般酵素由蛋白質構成，但某些酵素為糖蛋白或脂蛋白，有些還要加上輔助因子 (cofactor, coenzyme)，才成為功能完全的酵素 (全酶 holoenzyme)；若全酶失去了輔助因子，剩下的部份稱為 apoenzyme：



- b. 全酶分子可能只含一條多肽，也可能含有數條多肽，並以雙硫鍵連接在一起 (如 chymotrypsin)；有的可由數個相同或不同的次體 (subunit) 組成。肝糖磷解酶為同質二元體 (dimer)；而血紅蛋白 (hemoglobin) 是  $\alpha_2\beta_2$  的四元體形式，但並非酵素。多元體蛋白質可能具有異位調節功能 (allosteric effect)，即任何一個次體改變，會影響其它各個次體的活性。

### 2.2 輔酶：

一些非蛋白質的小分子會加入酵素構造中，以幫助催化反應進行。因為二十種胺基酸的官能基中，具有強荷電性者不到五個，而酵素活性區經常需要更強的官能基來引發催化反應，部份酵素因此納入非蛋白質的輔助因子參與其構造，作為催化的重要反應基團。

#### 2.2.1 輔助因子：

包含金屬離子以及小分子的有機物質 (輔酶)。

- a. 金屬離子：如  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ，以離子鍵結合在 His, Cys, Glu 等胺基酸；細胞多使用較輕的金屬，重金屬多有害處。
- b. 有機小分子：分子構造較複雜而多樣，通稱為輔酶 (coenzyme)，在哺乳類中多由維生素代謝而來，而哺乳類無法自行合成維生素。如維生素 B 群、葉酸 (folic acid)、菸鹼酸 (niacin)。

#### 2.2.2 輔酶的作用：

輔酶的構造與其功能極為重要，請注意每一種輔酶的特定作用機制。

- a. 加入酵素分子，誘使改變其立體構形，而使得酵素與基質的結合更有利反應。
- b. 輔酶可作為另一基質來參與反應，但反應後輔酶構造不變。通常輔酶作為某特定基團的轉移，可供給或接受基團 (如  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CO}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ) 或者電子，這類輔酶最為常見。

- c. 提供一個強力的反應基團，吸引基質快速參加反應；例如維生素 B<sub>1</sub> (thiamine)，有許多維生素都是輔酶。

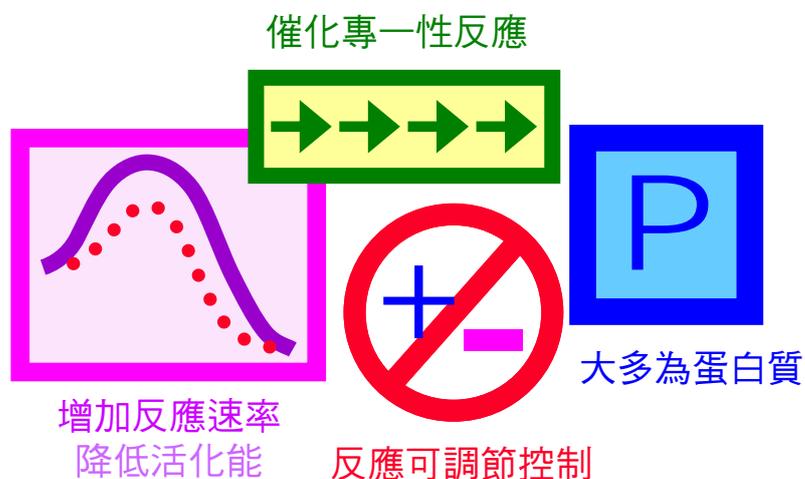
### 2.2.3 輔助因子範例：

◆ 請自行參考課本，研習以下各類酵素及輔酶的作用及構造。

- a. 各種去氫酶 (dehydrogenase) 以輔酶 NAD<sup>+</sup>/NADH 轉運 氫負離子 (hydride, H<sup>-</sup>)；要研究 alcohol dehydrogenase 以及 glyceraldehyde-3-P dehydrogenase 的作用模式，同時也請瞭解 NAD<sup>+</sup>/NADH 及氫負離子的構造。
- b. Carboxypeptidase 分子需要一個鋅離子維持分子構形 (induced fit)，同時也參與催化反應，可以抓住基質胜肽，並活化水分子。
- c. Glutamate transaminase 使用輔酶 pyridoxal phosphate 轉運胺基。
- d. Catalase 分子上有一 Fe<sup>2+</sup> 作為電子暫存區，可以把 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 還原成水分子；而血紅蛋白也有 Fe<sup>2+</sup>，因此可有類似的催化作用，但效率低很多，因為其鐵離子氧化成 Fe<sup>3+</sup> 後無法很快轉變回來。

### 2.2.4 輔酶與 ribozyme：

- a. 輔酶的構造透露了遠古 RNA 分子的催化秘密：許多輔酶的構造中都有核苷酸參與，可能是用來與遠古催化性 RNA 分子結合，以幫助 RNA 的催化反應。因為 ribozyme 雖然有分子構形，但缺乏催化所需的強烈官能基團，有如今日的蛋白質酵素與其輔酶一般。
- b. 因為 ribozyme 具有催化能力，本身又帶有遺傳訊息，加上輔酶的幫助，相信地球上最早出現的巨分子，可能是 RNA；這些事實也暗示，最早的催化性蛋白質是如何產生的。



酵素印象：反應速率、專一性、可調節、蛋白質

### 3 酵素動力學：

動力學可以公式說明酵素對基質分子的催化行為。

#### 3.1 酵素催化反應：

酵素提供基質一個穩定的空間，有利於穩定其過渡狀態，並快速轉變成為生成物。

a. 反應物 (A, B) 轉變成生成物 (A-B) 途中，有過渡狀態 [A...B] 生成：



b. 過渡狀態 (transition state) 的位能較高，其生成需要耗費能量，稱為活化能 (activation energy,  $E_{act}$ )；經由酵素的催化，可降低反應活化能，使反應速率加快，但不影響反應的平衡方向。

c. 一些過渡狀態的類似物 (analog) 會佔住酵素活性區，但無法完成反應，即成為抑制劑。若把這種過渡狀態的類似物做為抗原，免疫動物後所產生的抗體，可能有類似酵素的催化作用，但催化速率很低，稱為 abzyme (catalytic antibody)。

d. 酵素降低活化能的機制有以下幾點，都是因於活性區的特殊立體構造所致：

- (1) 酵素活性區專一性地與基質結合，提供最適的空間排列，以便穩定過渡狀態。
- (2) 活性區通常為一凹陷口袋，隔開外界的水環境，減低水分子的干擾。
- (3) 活性區附近的某些胺基酸可提供活性官能基 (通常帶有電荷) 直接參與反應。
- (4) 很多酵素含有輔酶或輔因子，輔助反應 (見上節)。

◆ 次頁圖 1 的 **酵素動力學大綱** 以流程圖方式，列出酵素動力學的主要探討項目；當研讀動力學部分時，請隨時依章節號碼參閱本圖。(圖中酵素的漫畫造型取自 Gonick, L. & Wheelis, M. 所著 *The Cartoon Guide to Genetics*, 有中譯版)

#### 3.2 酵素動力學：

動力學是如何進行的？先改變基質濃度，再看酵素的活性如何變化。

##### 3.2.1 基本概念：

酵素動力學的形成，是根基於『過渡狀態濃度恆定』的基本概念。早在 1913 年，Michaelis 及 Menten 就以轉化酶 (invertase) 系統為研究對象，發現有關酵素與基質反應的一些行為模式，他們提出：

a. **Steady state 理論**：酵素催化時，基質先與酵素結合，生成過渡狀態，再轉變成為產物。而酵素與基質的結合是可逆的 ( $E + S \rightleftharpoons ES$ )；而當反應達穩定狀態 (steady state) 時，其中的 [ES] 濃度不變 (因為 ES 生成量等於其消失量)。

b. **酵素行為的數學描述**：反應速率 ( $v$ ) 與酵素或基質的關係，可以數學式表示；在

固定的酵素量下，反應速率  $v$  與基質濃度  $[S]$  成雙曲線關係(但只有一股)，可用公式表之，即 Michaelis-Menten (M-M) 動力學公式。

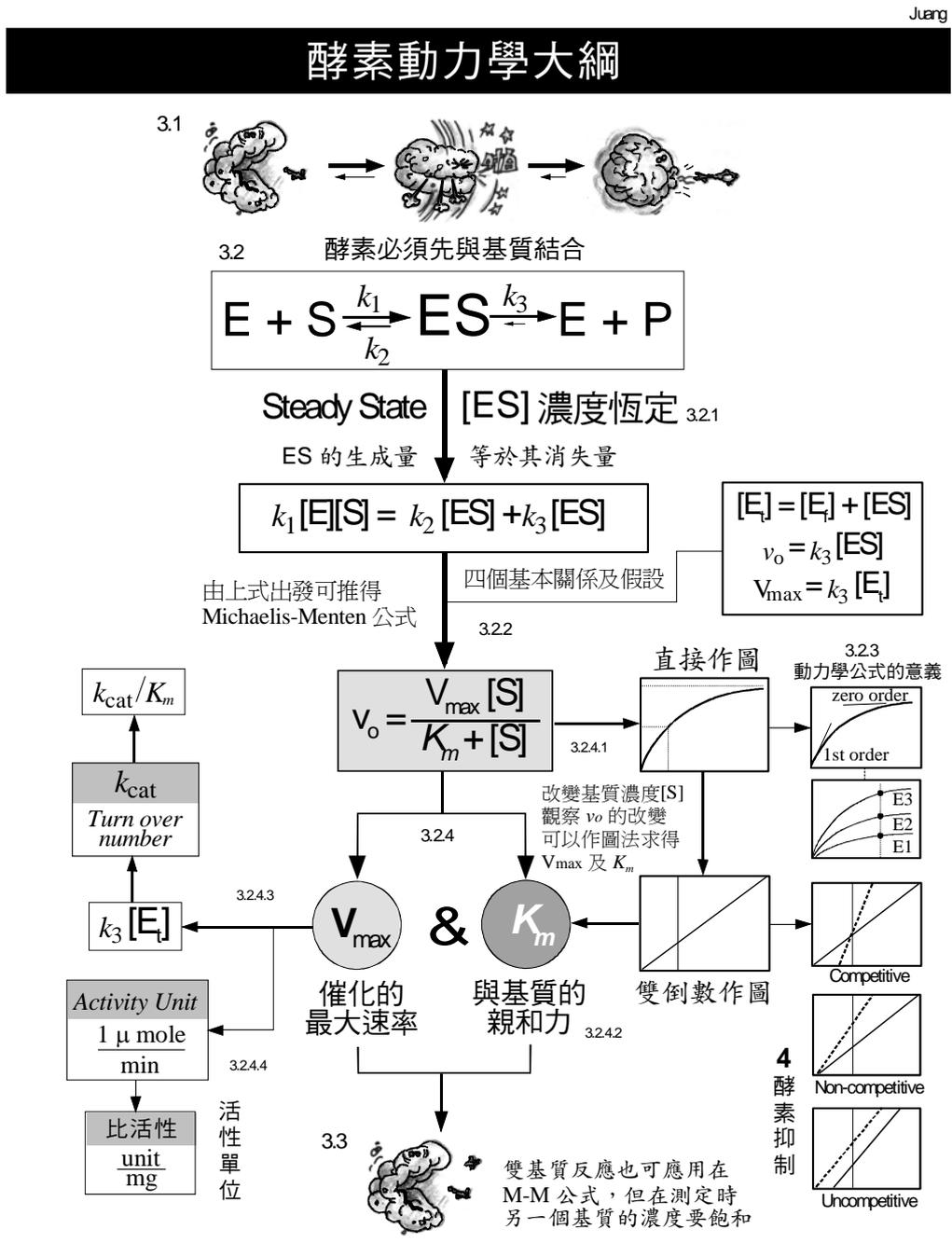


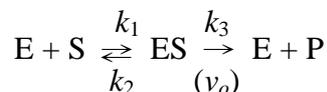
圖 1 酵素動力學公式的推演及其應用

酵素漫畫造型取自 Gonick, L. & Wheelis, M. *The Cartoon Guide to Genetics*.

### 3.2.2 Michaelis-Menten 公式的推演：

由四個基本設定開始，可一步一步推得 M-M 動力學公式。

a. 酵素 E 與基質 S 反應如下，各步驟反應速率由常數  $k_1, k_2, k_3$  表示：



b. 導 M-M 公式前的四個基本關係及假設：

(1) 因 [ES] 不變，故 ES 的消耗量等於生成量：

$$k_2 [ES] + k_3 [ES] = k_1 [E][S] \quad \text{(I)}$$

(2) 總酵素濃度  $[E_t] =$  單獨存在者  $[E_f] +$  酵德基質複合體  $[ES]$  (II)

(3) 反應初速 ( $v_o$ ) 是由後半分解反應 ( $k_3$ ) 所決定： $v_o = k_3 [ES]$  (III)

(4) 最大反應速率 ( $V_{max}$ ) 是假設所有酵素均轉變成  $[ES]$ ，

$$\text{故上式可改寫為：} \quad V_{max} = k_3 [E_t] \quad \text{(IV)}$$

c. 基於上述條件，可推 M-M 公式如下：

(1) 整理 (I) 可得： $(k_2 + k_3) [ES] = k_1 [E][S]$  移出 [ES]

$$\text{故 } [ES] = \frac{k_1}{k_2 + k_3} [E][S]; \text{ 另設 } \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \text{ 則 } [ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad \text{定義 } K_m$$

(2) 由 (III) 得  $[ES] = \frac{v_o}{k_3}$ ，故  $\frac{v_o}{k_3} = \frac{[E][S]}{K_m}$  即  $v_o = \frac{k_3 [E][S]}{K_m}$  (V) 由 [ES] 導入  $v_o$

(3) 由 (II) 得  $[E_f] = [E_t] - [ES]$ ，而  $[E_f]$  可視為  $[E]$ ，故：分解 [E]

$[E] = [E_t] - [ES]$  代入 (V) 得：

$$v_o = \frac{k_3 ([E_t] - [ES])[S]}{K_m} = \frac{k_3 [E_t][S] - k_3 [ES][S]}{K_m}$$

(4) 把 (III)  $v_o = k_3 [ES]$  及 (IV)  $V_{max} = k_3 [E_t]$  代入得：轉換得  $V_{max}$  及  $v_o$

$$v_o = \frac{V_{max} [S] - v_o [S]}{K_m} \rightarrow v_o K_m = V_{max} [S] - v_o [S] \text{ 移項}$$

$$\rightarrow v_o K_m + v_o [S] = V_{max} [S] \quad \text{(VI)}$$

提出  $v_o$

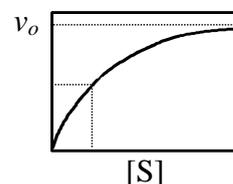
整理 (VI) 集中  $v_o$  即得 M-M 公式：

$$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

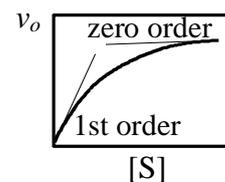
### 3.2.3 Michaelis-Menten 公式的意義：

M-M 公式可以求得  $V_{max}$  及  $K_m$ ，求得  $V_{max}$  及  $K_m$  有何意義？

a. M-M 公式是雙曲線公式。若固定酵素量，改變其基質量  $[S]$ ，則



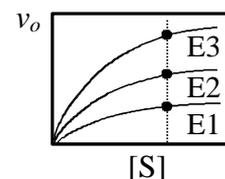
可得到不同的反應初速  $v_o$ ，再以  $[S]$  為 x 軸， $v_o$  為 y 軸作圖，可得到一股雙曲線，其漸近點為  $V_{max}$ 。



- b. 低濃度  $[S]$  時反應速率  $v_o$  與  $[S]$  成正比，即  $v_o \sim [S]^1$ ，是為一級反應 (first order reaction)；當  $[S]$  增大， $v_o$  接近漸近線時， $v_o$  的改變很小，不受  $[S]$  變化的影響，即  $v_o \sim [S]^0$ ，稱為零級反應 (zero order)。

- c. 若基質量  $[S]$  也固定，則 M-M 公式變為：

$$v_o = \frac{V_{max} (\text{常數 } [S])}{(\text{常數 } K_m) + (\text{常數 } [S])} \sim V_{max} (\text{常數})$$



由 (IV)  $V_{max} = k_3 [E_t]$ ，故  $v_o \sim [E_t]$ ，即反應速率與酵素量成正比。

- d. 事實上  $ES \rightarrow E + P$  的反應為可逆，但此逆反應可忽略，因 M-M 公式的測定，是反應初期所測的反應初速 ( $v_o$ )，此時生成物  $[P]$  的濃度很低，逆反應幾乎無從發生。

◆ 練習以紙筆自行推演 M-M 公式及上述各種情況下的變化。

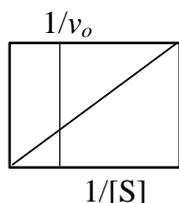
### 3.2.4 $V_{max}$ 及 $K_m$ 的測定與意義：

$V_{max}$  及  $K_m$  是每一個酵素極重要的性質指標，可以顯示其催化特性。

#### 3.2.4.1 $V_{max}$ 及 $K_m$ 測定法：

步驟相當單純，但隨著各種酵素活性測定方法的難易有別。動力學實驗的基本資料，為在一系列  $[S]$  濃度下所測得的反應初速 ( $v_o$ )，依法作圖即可求出  $V_{max}$  及  $K_m$ 。有以下數種作圖求法：

- a. 直接作圖法：是最基本的數據作圖。以  $[S]$  為橫軸  $v_o$  為縱軸，所得漸近線的最高處為  $V_{max}$ ， $K_m$  為 50%  $V_{max}$  時的  $[S]$ 。



- b. Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法：是最常用的作圖方式。因直接作圖法只能以漸近估計求得  $V_{max}$ ，若 x 及 y 軸分別改為  $1/[S]$  及  $1/v_o$ ，則可作出一條直線來，由 x 軸上的交點求出  $1/K_m$ ，由 y 軸交點求出  $1/V_{max}$ 。

◆ 循一實例練習畫出動力學測定的直接作圖及其雙倒數作圖。並請注意  $V_{max}$  及  $K_m$  的單位是什麼，為何會得到此種單位？

- c. Eadie-Hofstee 作圖法：雙倒數圖的直線，在接近 y 軸處，打點太密，求得直線稍有困難。若分別以  $v_o/[S]$  及  $v_o$  為 x, y 軸，亦可畫出直線，且各點的分佈較平均。

#### 3.2.4.2 $K_m$ 的意義：

$K_m$  是酵素與基質間親和力的指標， $K_m$  越大親和力越小。

- a. 當反應速率為 50%  $V_{max}$  時， $v_o = \frac{1}{2} V_{max}$ ，代入 M-M 公式，則得：

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}, \text{ 整理得 } K_m = [S] \text{ (只在 } v_o = \frac{1}{2}V_{\max} \text{ 條件下)}$$

因此  $K_m$  的意義表示，要達到一半最高催化速率時  $[S]$  所需濃度。

- b. 若某酵素的  $K_m$  越低，則表示它要接近  $V_{\max}$  所需的基質濃度越低。若一酵素有數種基質，各有不同的  $K_m$ ，則  $K_m$  越低的基質，表示它與酵素的親和力越大，催化反應愈容易進行。 $K_m$  與  $[S]$  一樣是濃度單位 (mM 或  $\mu\text{M}$ )。
- c. 酵素的  $K_m$  值可看成在一般細胞內，該酵素基質的大約濃度。

### 3.2.4.3 $V_{\max}$ 的意義：

請確實瞭解  $V_{\max} = k_3 [E_t]$  的意義 (公式 IV)。

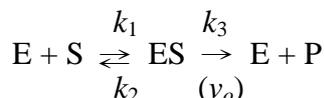
- a. 在足夠的基質濃度下，一定量的酵素所能催化的最高反應速率，即為其  $V_{\max}$ ；要讓一個酵素達致其  $V_{\max}$ ，就要把基質量調至最高濃度。在比較不同酵素的  $V_{\max}$  活性時，注意要以同樣莫耳數的酵素分子為基準。
- b. 單位時間內每莫耳酵素所能催化的基質數 (莫耳數)，稱為 **turn over number** 或 **molecular activity**，一般酵素約在 0.1~10,000 間 (每秒)，有大有小不等。這是當基質量極大於  $K_m$  時 ( $[S] \gg K_m$ )，反應推向右邊， $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$ ，其  $k_3$  成為決定因素，即為 **turn over number**，特標記為  $k_{\text{cat}}$ 。
- c. 當基質量遠小於  $K_m$  時 ( $K_m \gg [S]$ ) 則  $[E_t] = [E]$  而  $K_m + [S] = K_m$ ，則可以由 M-M 公式導得：

$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_3 [E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{k_3 [E][S]}{K_m} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E][S]$$

反應速率成為 **second order**，由  $[E]$  及  $[S]$  兩項因素決定之。

而  $k_{\text{cat}}/K_m$  常數的大小則為重要指標，同時顯示酵素的催化效率及專一性。

- d. 瞭解上述的  $K_m$  與  $V_{\max}$  後，重新回顧最早的酵素與基質反應式：



若把此式分成兩半，前半是  $E + S \rightarrow ES$  由  $k_1$  與  $k_2$  主導；後半  $ES \rightarrow E + P$  由  $k_3$  主導。顯然  $V_{\max}$  是由後半反應決定 (記得  $V_{\max} = k_3 [E_t]$ )，而  $K_m$  則大體上由前半反應所定。因此，整個酵素反應，是由這兩半反應所共同組成，前半以  $K_m$  來決定酵素與基質的親和度，後半以生成物的產生來決定最高反應速率。注意  $K_m$  的定義是  $(k_2+k_3) \div k_1$ ，故後半反應還是對  $K_m$  有影響。

### 3.2.4.4 酵素活性定義：

有兩種表示酵素活性的方式，請注意其定義不同，不要混淆。

- a. **活性單位**：酵素活性的表示方法通常使用 **活性單位 (unit)**；即酵素每分鐘若催化 1  $\mu\text{mole}$  基質的活性，即定義為 1 單位活性；注意同一種酵素可能

會有不同定義方式的活性單位。

- b. 比活性：每單位重量蛋白質 (mg) 中所含的酵素活性 (unit)，稱為比活性 (specific activity, unit/mg)；因酵素為活性分子，有時會失去活性，雖然蛋白質仍在，但比活性會下降。

### 3.3 雙基質反應：

- a. 上述  $S \rightarrow P$  催化反應，只有一種基質及一種生成物，稱為 Uni-Uni 反應。但事實上大多數酵素反應，有一個以上的基質，也可能有數個生成物，為多基質反應。例如：



- b. 雙基質反應仍可適用於 M-M 公式，但兩種基質的  $K_m$  要分別測定；測  $S_1$  的時候，反應中的  $S_2$  濃度要飽和 (使  $S_2$  成為非主導因子)，反之亦然。

- c. Bi-Bi 反應中基質 ( $S_1, S_2$ ) 及生成物 ( $P_1, P_2$ ) 的進出次序有數種情形：

- (1) **Random**：基質進入活性區並沒有一定次序，但兩個基質都要結合到酵素後，才會開始進行反應。
- (2) **Ordered sequential**：基質依固定次序進入，然後生成物再依序出來。
- (3) **Ordered ping-pong**：依 [ $S_1$  進,  $P_1$  出;  $S_2$  進,  $P_2$  出] 次序，像是兩個 Uni-Uni 組成的；也像是打乒乓球一樣地一來一往。



## 4 酵素的抑制：

酵素活性的抑制，也是一個重要的調控方式。

### 4.1 酵素的抑制方式：

- a. 抑制劑與酵素結合而導致抑制作用，這種結合是可逆或不可逆反應都有。
- b. 很多生理或藥理上的作用，都是源自於抑制劑對酵素的作用，而使酵素的活性降低，或者完全失去活性。如消炎的磺胺藥，即是一種細菌酵素基質 (PABA) 的類似物，可抑制細菌葉酸的合成，因而抑制細菌生長。
- c. 抑制劑與酵素產生非共價性結合，然後可以阻礙基質進入酵素活性區，或者改變酵素構形而使其失活。
- d. 抑制酵素的機制，依抑制劑 [I] 與酵素 [E] 的結合方式，可以分成三種：  
Competitive, non-competitive 及 uncompetitive (請見下頁圖 2 整理)；由抑制劑對酵素動力學曲線所造成的影響，即可得知是何種抑制方式。

### 4.2 不可逆的抑制：

不可逆性抑制劑會對酵素活性區上的主要胺基酸做 共價性修飾，因此酵素活性通常被嚴重破壞，便無上述三種動力學抑制方式。

- a. 青黴素 (penicillin) 喬裝成基質，可與細菌的一種酵素發生不可逆的結合，此酵素乃細菌細胞壁生合成的重要酵素，細菌無法正常生成細胞壁而死亡。有點像是分子版的『木馬屠城記』。
- b. 重金屬： $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ 及砷化物等重金屬，非專一性地與 [E] 或 [ES] 結合，取代原來酵素所需的金屬，而使酵素失去活性。
- c. 化學修飾劑：某些化合物可以專一性地修飾特定胺基酸，除了可做為專一性抑制劑外，也可用來檢定酵素活性區中，具有催化反應的胺基酸為何者(表 1)。

表 1 若干蛋白酶的抑制劑及其作用機制：

抑制劑	全 名	作用基團	目標酵素例
PCMB	<i>p</i> -chloro-mercuribenzoate	Cys -SH	Papain
DIFP	diisopropyl-fluorophosphat	Ser -OH	Ser proteases
TPCK	tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone	Ser -OH	chymotrypsin
TLCK	tosyl-L-lysine chloromethyl ketone	Ser -OH	Trypsin

◆ 日本真理教所用的沙林毒氣 (Sarin) 是一類似 DIFP 的抑制劑。

d. 蛋白酶及其抑制劑：蛋白酶廣泛存在於細胞，有其專一性抑制劑可控制其生理活性，二者互相拮抗形成調節控制網。目前極被重視的 HIV 蛋白酶及其人工抑制劑，在醫藥研究上有很大的作用及影響。

◆ 有關蛋白酶的分類，請見 6.1.2 一節。

### 三種酵素抑制機制

	▶ Competitive	□ Non-competitive	◻ Uncompetitive
圖解	<p>基質 (S) 和抑制劑 (I) 競爭酶的結合位點 (E)。</p>	<p>抑制劑 (I) 結合在酶 (E) 的另外一個位點，與基質 (S) 的結合位點不同。</p>	<p>抑制劑 (I) 只能與酶-基質複合物 (ES) 結合。</p>
抑制機理及說明	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons EI$ <p>[I] 只與自由的 [E] 結合，會與 [S] 競爭；[S] ↑ 可克服 [I] 的抑制。</p>	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons EI$ $E + I \rightleftharpoons EI$ <p>[I] 可與自由的 [E] 或已佔據有 [S] 的 [ES] 結合。[S] ↑ 不能克服 [I] 的抑制。</p>	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I \rightleftharpoons IES$ <p>[I] 只能與 [ES] 結合，[S] ↑ 反而有利 [I] 的抑制。</p>
直接作圖	<p><math>V_{max}</math> 不變；<math>K_m</math> 變大</p>	<p><math>V_{max}</math> 變小；<math>K_m</math> 不變</p>	<p><math>V_{max}</math> 及 <math>K_m</math> 均變小</p>
雙倒數作圖	<p>交於 Y 軸</p>	<p>交於 X 軸</p>	<p>兩條平行線</p>

圖 2 各種酵素抑制反應的機理及其動力學行為

## 5 酵素的催化機制：

酵素的催化機制可以化學反應逐步推得，與分子的構造也有相當大的關係。

### 5.1 酵素活性區 (active site)：

催化反應都在活性區內進行，活性區可提供有利催化的環境。

a. 活性區：是酵素與其基質 (或輔酶) 的結合區，並在此進行催化反應。活性區通常是一凹陷袋狀構造，水分子不易進入袋中。活性區內的胺基酸，只有那些具反應性基團 (reactive group) 者，才直接參與催化；但各種胺基酸都有可能參與結合基質。

b. 酵素催化的化學機制，通常是以下面三種基本方式進行反應：

(1) **Bond strain**：基質結合到酵素後，酵素的構形扭曲，使基質分子內某共價鍵受力斷裂。

(2) **Acid-base**：利用活性區內胺基酸殘基或輔酶，可以放出或接受質子 (或電子) 的特性，對基質進行質子或電子的轉送。

(3) **Orientation**：活性區可提供基質適當的排列空間，使有利於反應進行。

以上三種方式或可同時發生，為協同式 (concerted set)；亦可先後依序發生，稱順序式 (sequential mechanism)。以下兩個重要例子都是蛋白酶。

### 5.2 協同式催化機制：

以 carboxypeptidase A (CPA, 羧肽酶) 為模型酵素說明 (圖 3)。

a. CPA 的分子量 34 kD，含 307 個胺基酸，有一雙硫鍵，及一個鋅離子，是一種金屬蛋白酶。CPA 可由胜肽的 C-端，依序切下外側胺基酸 (外切酶)，當胺基酸的 R 基團為非極性者，較有利反應進行；而 carboxypeptidase B (CPB) 只切 C-端為 Lys 或 Arg 者，二者專一性不同。

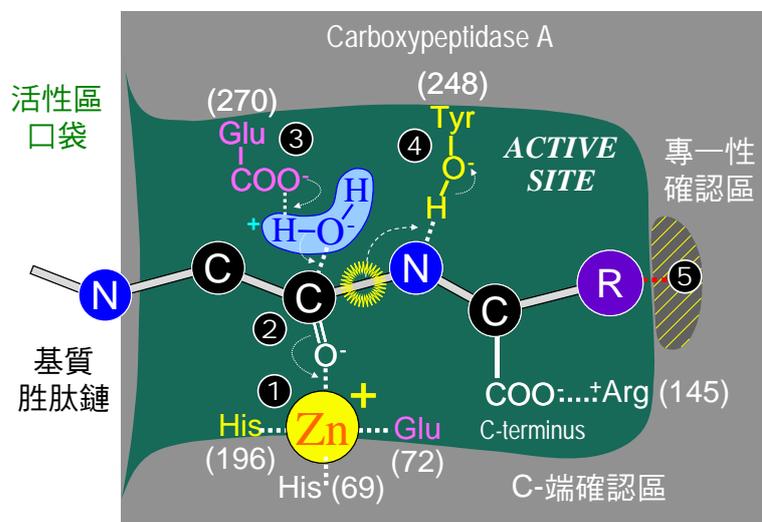


圖 3 Carboxypeptidase A 的催化機制

b. CPA 的詳細催化機制如圖 3 所示，並加說明於下：

- ①  $Zn^{2+}$  離子乃重要輔助因子，可吸住基質胜肽鏈上的 carbonyl 基，增強其極性，使②碳帶正電。
- ③ Glu270 吸住水分子，放出  $OH^-$  攻擊  $C^+$  ②，產生新的 C-OH 鍵。
- ④ Tyr248-OH 上的質子，與氮 lone pair 電子產生新鍵，原來的胜鍵斷裂。
- ⑤ 附近的胺基酸與基質 C-端的 R 基團，有專一性的結合，以辨別基質的極性；同時 Arg145 與基質 C-端的 -COOH 結合，確定基質蛋白質是以 C-端進入活性區。

### 5.3 順序式催化機制：

以 chymotrypsin (CT, 胰凝乳蛋白酶) 為代表，請找出課本的相關圖片。

- a. 分子構造：CT 的分子量為 25 kD，含三條胜肽，由兩個雙硫鍵連接，是轉譯後修飾的產物；剛轉譯出來的完整胜肽鏈沒有活性，要在接近 N-端的 Arg15 與 Ile16 之間先斷開後，CT 才能活化。
- b. 催化活性：CT 可水解胜肽鏈上面的芳香族胺基酸 (Tyr, Phe, Trp) 或 Met (具較大非極性基團者)，切開這些胺基酸 C-側的胜鍵，是一種內切酶。
- c. 活性區：CT 大部分的極性胺基酸都露在分子外表，只有三個在活性區內，對催化反應扮重要角色 (Ser195, His57, Asp102)。三者以『電荷接力』形成高反應性 Ser，其 Ser195-OH 基上的  $H^+$  被鄰近的 His57 吸收，生成具有高反應性的  $-O^-$ 。

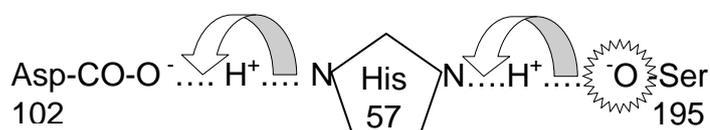


圖 4 Ser 蛋白酶催化區上由三個胺基酸所構成的電荷接力

- d. 催化機制：Ser 上的高反應性  $-O^-$  會攻擊基質胜肽上的 carbonyl 碳 (帶微正電)，形成新的 C-O 鍵 (acylation 步驟)，同時斷開基質的胜鍵，先釋出一段 C-側的胜肽；然後加水分解，破壞此 C-O 鍵 (deacylation 步驟)，釋出另一段 N-側胜肽。以上兩個步驟，依次順序發生。
- e. 穩定過渡狀態：除了 catalytic triad 可以有效催化之外，活性區也可穩定催化反應的中間過渡狀態。過渡狀態有相當高的負電荷，因此以活性區附近的 Gly193 及 Ser195 本身的 -N-H 與之產生氫鍵而中和之。
- f. Ser 蛋白酶家族：這種以 Ser 為催化主力的蛋白酶很多，統稱為 serine 型蛋白酶；除了 chymotrypsin 外，尚有許多如 trypsin (胰蛋白酶)、elastase (彈性蛋白酶)。它們的催化機制相似，整體構形相當類似，且都有 [Ser-His-Asp] 接力形式的催化機構。但對基質的專一性不同，trypsin 的基質為鹼性胺基酸 (Lys, Arg)，elastase 則只切 R 基團較小且不帶電荷者。

## 5.4 酵素的專一性：

酵素只與特定的基質結合，有很高的專一性，這是酵素重要特性之一。

### 5.4.1 專一性結合區：

大部份酵素的活性區即有專一性辨識與結合基質能力，但 CT 另有一基質的辨識區位在其活性區附近。

- 上述各 Ser 型蛋白酶的活性區除了有 [Ser-His-Asp] 催化中心外，附近還有一個袋狀的基質結合區，可以辨別基質的種類 (驗明正身)，以便與正確的胺基酸結合。
- 這種專一性結合是靠結合區上胺基酸 R 基團的形狀、大小、極性或電荷等性質的契合，以二級鍵結合。例如 chymotrypsin 的結合區多含非極性的胺基酸，故只能與非極性的芳香族胺基酸結合，催化這類胺基酸的水解。改變結合區的重要胺基酸，可能改變專一性 (*Science*, 1992, 255: 1249)。

### 5.4.2 專一性結合力量：

有兩大類構成因素，一是形狀的互補，另一是吸引力量。

- 分子間 **構形互補**：有如『鎖頭與鑰匙 lock & key』在形狀上的契合；而蛋白質分子有彈性，與基質結合可誘生更契合的構形，稱為 **induced fit**。因構形互補而吸引的主要力量來自凡得瓦爾力，如圖 5 中 A 與 B 之間的契合。
- 酵素與基質間會產生**吸引力量**，是由兩者間的若干二級鍵所共同組成。

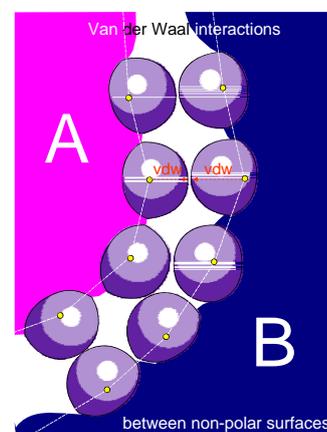
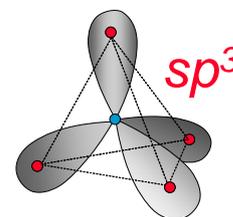


圖 5 兩分子間構形互補

### 5.4.3 立體專一性：

酵素分子如何辨認立體異構物？碳的原子軌道是根本原因。

- 酵素可辨認基質的**立體不對稱性**，只能對某一種立體異構物有催化反應 (如 L 或 D 型胺基酸之一)，而生成物也只有對應的立體異構物之一。
- 如圖 6 把基質分子中不對稱碳 ( $sp^3$ ) 四個鍵結中的一點 (A) 固定，再以酵素的專一性結合面接觸並確認 B-C-D 三點，就能分辨另一異構物的差異 (例如 B-D-C) 而排斥之 (從 A 點往下看即可分出差異，如圖 7)。



碳原子的四面體構造有很強的立體限制性是蛋白質構形的根本

圖 6 碳原子四面體

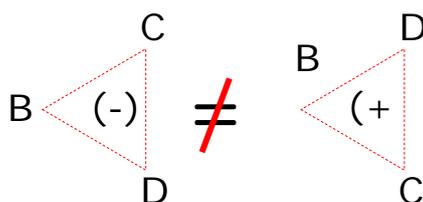


圖 7 不對稱碳鍵結排列的差異

## 6 酵素活性的調節：

酵素活性的調節，對細胞生理極為重要，因為細胞並不定期望某酵素一直保持在活性狀態。對酵素分子的共價或非共價性修飾，其調節活性的效果最為直接而迅速；有些是可逆反應，也有部分是不可逆。以下面四種方式 (6.1~6.4)，再加上抑制劑的使用，細胞就可以自由控制酵素活性的高低。

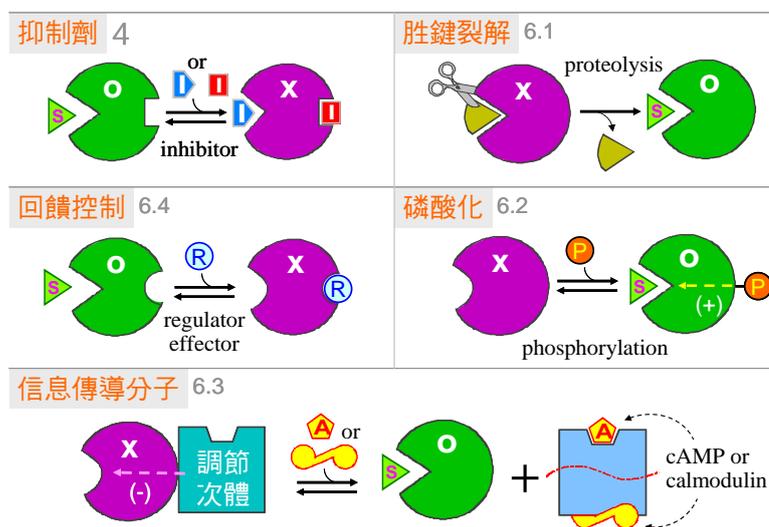


圖 8 酵素活性的調節控制方式 (上面的數字代表各說明章節)

### 6.1 蛋白質裂解：

不只是酵素，很多蛋白質都是利用降解來調節其活性或功能。

#### 6.1.1 酶原或前驅體：

以蛋白質的裂解來調節酵素活性，該酵素在裂解後得以活化；也可以把完成任務後的蛋白質分解掉，以免繼續進行著生理作用。

- a. 許多酵素 (或蛋白質) 剛由 mRNA 轉譯成蛋白質時，分子量較大而不具活性，稱為酶原 (zymogen)；在蛋白質則稱 前驅體 (precursor)。酶原或前驅體須經蛋白酶切開，或除去部分肽基，才能成為具有活性的分子。請研究下面數例，注意胰島素及腦啡是荷爾蒙而非酵素，而打有 \* 號者乃表示具有活性者：

(1) 凝血酶：Prothrombin → Thrombin\* → [凝血反應]

凝血 對生物體是一件很嚴重的事，血液不能在血管內任意凝固，但若一旦受傷又得馬上凝血。因此細胞對誘發凝血的過程，控制得非常嚴格，是以一種『梯瀑 cascade』的方式，把一個信息漸次放大。而在放大過程中有許多管制點，可避免因假警報誤導致凝血。上面的凝血酶 (thrombin) 生成是最後一步，凝血酶可立即誘發凝血蛋白聚合成凝血塊。

(2) 胰島素：Preproinsulin → Proinsulin → Insulin\*

剛轉譯出來的 preproinsulin 在分子摺疊好以後，要切除 N-端的一段肽基成

為 proinsulin，然後再切除中央的一段 C 胜肽後，才會有活性。

(3) 腦啡：先合成一長條八元體的前驅體，再以一種類似 trypsin 的蛋白酶裂解成單位腦啡，因此其產生也受到蛋白酶的控制。

b. 許多破壞性強的酵素 (如蛋白酶) 先以酶原形式合成出來，以免在到達作用目標前破壞其它蛋白質；或以胞器或細胞膜隔離，稱 區隔化 (compartmentation)。

Chymotrypsinogen  $\rightarrow$   $\pi$ -Chymotrypsin\*  $\rightarrow$   $\alpha$ -Chymotrypsin\*

Chymotrypsinogen 分子的斷裂會使其構形改變，露出新的 N-端 Ile16，這個新的  $-\text{NH}_3^+$  會吸引 Asp194 的酸基，進而固定隔壁的 Ser195，使其就定位，得以被轉換成活性基團，同時打開專一性結合區，轉變成為活性型。

c. 這種酶原裂解的活化方式是不可逆的，因為被切掉的片段無法接回；因此細胞以 抑制劑 (inhibitor) 來控制此類酵素。Trypsin 及其抑制劑為一範例，trypsin 被切開活化之後，只能用其專一性抑制劑去控制 (或者乾脆摧毀之)。

### 6.1.2 蛋白酶：

越來越多的研究發現，蛋白酶在細胞內具有重要的生理功能。

a. 依催化機制可分成四類：(1) 金屬蛋白酶、(2) Serine 蛋白酶 (3) Cysteine (或 thio) 蛋白酶、(4) Aspartyl (或 acid) 蛋白酶。

b. 同一族的蛋白酶序列都有類似的胺基酸序列及構形，尤其在活性區的保守性胺基酸幾乎不會改變 (如 Ser 蛋白酶的 catalytic triad)；但其它序列則因 趨異演化 而衍生出許多具有不同專一性的蛋白酶；構造完全無關的 acetylcholinesterase，則因 趨同演化 而生成具有類似 catalytic triad 的 ester 水解能力。

c. 類似核酸的 intron 與 exon，蛋白質也有自我剪接的現象，稱 intein 與 extein，是轉譯後的修飾作用；但此現象並不是很普遍。

### 6.1.3 Ubiquitin-Proteasome 降解路徑：

細胞內蛋白質的降解，可能是一種調節性的生理作用；最近發現很多蛋白質，都要先標上 ubiquitin 後，才以 proteasome 來進行修飾或者降解。

a. Ubiquitin (泛素)：

廣泛分布在動植物細胞中，同質性高而分子量小 (含七十多個胺基酸)，可以連到目標蛋白質分子的 Lys 胺基，作為被降解的標記 (ubiquitination)。目標蛋白質的胺基酸序列上，通常在近 N-端有一特定信號序列 (destruction box)。

b. Proteasome (蛋白酶體)：

是由很多較小單位分子所組成的巨大分子，主體看來像是四個甜甜圈疊在一起，中央的孔洞可以容納目標蛋白質，並將其分解成胜肽片段；目標蛋白質大都要先標有 ubiquitin，水解後 ubiquitin 可以回收再利用。

## 6.2 磷酸化 (phosphorylation) :

磷酸化是非常廣泛且多功能的蛋白質修飾方式，在信息傳導上極為重要；越來越多的生理現象，被發現與蛋白質的磷酸化或去磷酸化有關。而 肝糖磷解酶 (glycogen phosphorylase, GP) 是磷酸化調控活性的典型例子，請仔細研究之。

- a. 蛋白質分子上某些胺基酸，如 Ser, Thr, Tyr (或 His) 的 -OH 基 (His 為 imidazole 基團) 會被 蛋白質激酶 (protein kinase) 修飾，在其分子加上磷酸而致活化，此磷酸可再被 蛋白質磷酸酶 (protein phosphatase) 去掉而失活，但亦有很多相反的例子。
- b. 蛋白質磷酸化加上一個強負電基團，影響附近胜肽鏈的排列，造成蛋白質構形改變，而使活性升高或降低。除了磷酸化之外，蛋白質也可以接上核苷酸達到活化。
- c. 最近發現有些磷酸化蛋白質也會進入上述 ubiquitin-proteasome 路徑，引發該蛋白質的降解，以達調節目的。

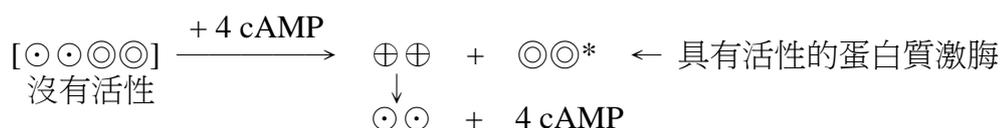
## 6.3 非共價結合之信息傳導分子 :

主要代表分子是 cAMP 及 calmodulin，都是信息傳導途徑的重要媒介，與上述的磷酸化反應共同合作，組成有效的細胞調節網路。

### 6.3.1 cAMP :

蛋白質激酶之活性受到 cAMP 調節，原不具活性的激酶與 cAMP 結合後，會釋出活化型的蛋白質激酶。下圖說明蛋白質激酶的活化方式。

(⊙, catalytic subunit; ⊙, regulatory subunit; ⊕ = ⊙ + cAMP)



### 6.3.2 Calmodulin (攜鈣素) :

當細胞內的鈣離子濃度改變時，會誘導許多生理反應，而 calmodulin 即為細胞內鈣濃度的感應與作用分子；它的分子 (17 kD) 上有四個鈣離子結合位置，與鈣結合後誘導自身分子構形的改變，可與目標蛋白質結合，並調節後者的活性。

### 6.3.3 信息傳導路徑 :

當荷爾蒙或細胞激素等胞外信息分子到達目標細胞，與胞膜上的專一性受體結合後，就會引發該細胞的一連串反應，把胞外信息帶入細胞內，以啟動所要的生理反應。細胞內的這些反應，相當複雜而有效，統稱為信息傳導。由上面所述的磷酸化及 cAMP 等小分子為主軸，加上目標酵素的活化，可分成幾個層次，各層次由許多模組所構成。

下面整理出這幾個層次，並且舉出一個對應例。

Signal → Receptor → Transducer → Effector enzyme → Effector → Effect  
 對應的分子如下例：

Glucagon → Receptor → G-protein → Adenylate cyclase → cAMP → Kinase

這種傳導途徑有兩個特點，是細胞生理極為重要的手段：

a. 放大作用 (amplification)：

上述一層一層的傳導過程中，有些是酵素 (如 cyclase, kiase)。而一個酵素分子若經活化，代表著將有大量的基質會被催化成生成物，而生成物會再傳導給下一步反應，信息因此而被放大。這種方式，非常像真空管的電流放大作用，也是上述 cascade 梯瀑式放大的一種。

b. 彈性模組 (flexibility)：

信息傳導的每一步代表一個層次，而每個層次可由數種不同模組所組成，因此可以有多樣化的彈性組合，以因應不同細胞的獨特需要。

### 6.4 異位酶 (allosteric enzyme)：

有些酵素的活性，會被它下游的產物所調節，是為 迴饋控制 (feedback) 現象；這類酵素的分子上，除了有活性區可與其基質結合外，還有可與其下游產物結合的位置，稱為 調節區 (regulatory site)，這種酵素則稱為 異位酶。

#### 6.4.1 Aspartate transcarbamoylase (ATCase)：

ATCase 是典型的異位酶。

a. 迴饋控制：ATCase 催化 aspartate 與 carbamoyl-P 連結成 carbamoyl aspartate 的反應，後者經代謝後生成 CTP；CTP 則回頭與 ATCase 上的 調節區 結合，反而抑制 ATCase 的活性 (負迴饋)。由於 ATCase 是這個反應鏈的起始酵素，控制 ATCase 即可控制整條代謝路徑。

b. 四級構造：ATCase 是由兩組 催化次體 (catalytic subunit, CCC) 以及三組 調節次體 (regulatory subunits, RR) 組成；每組催化次體由三條蛋白質組成 (C, 34 kD)，每組調節次體由兩條蛋白質組成 (R, 17 kD)：

$$2 \times (CCC) + 3 \times (RR) = C_6R_6$$

每一調節次體有一 效應物結合區，每一催化次體有一 基質結合區。



c. S 型曲線：ATCase 的動力學結果顯示，以  $v_o$  對基質 [Asp] 濃度直接作圖，可得一 S 型曲線 (sigmoidal curve)，而非典型的 M-M 單股雙曲線 (見圖 9)。這是 合作式 (cooperative) 的 協力現象，表示基質與酵素之任何一個次體結合後，可誘導改變酵素的分子構形，促進其它次體與基質間的結合能力 (positive homotropic effect)。

- d. 分子開關：此 S 曲線有一轉折點，基質在達到這個基質濃度後，酵素反應速率急速上升。可以將此轉折點看做酵素對其環境基質濃度的感應點，當基質濃度低於轉折點時酵素不太活動；而達到轉折點時，酵素便很快起動達到  $V_{max}$  (圖 9 下圖誇張為虛線，以突顯此轉折點)。
- e. 協力現象：若反應加入 CTP，則圖 9 上圖的 S 型曲線下移(但  $V_{max}$  不變)，表示 CTP 會降低 ATCase 的活性 (negative heterotropic)；而 ATP 則反可增強 ATCase 活性 (positive heterotropic)，但原 S 型曲線則變成一般的 M-M 雙曲線，協力現象消失。
- f. 效應物：ATP 與 CTP 均可影響此異位酶的活性，二者都是其代謝相關產物，稱為效應物 (effector)；兩者在構造上與基質 Asp 均不相像，故並非活性區的競爭者，而是結合在分子的其他位置 (異位調節區)，結合後會影響酵素的分子構形，使酵素與基質的親和力下降，因而降低活性；而 ATP 與 CTP 乃互相競爭此一調節區。

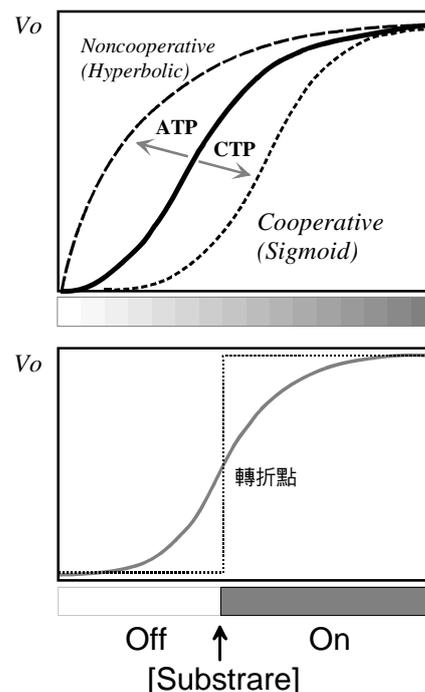


圖 9 異位酶的動力學表現

#### 6.4.2 異位酶的作用模型：

當異位酶受到效應物的影響時，其分子可能會有不同的反應行為。

- a. 異位作用：基質 (或效應物) 與異位酶的一個次體結合後，會使原來的 T (tense) 型次體，變成較易接受基質的 R (relaxed) 型，然後繼續影響其他次體的結合能力。有兩種方式：
- (1) **Concerted 協同式**：酵素的每個次體，在結合前後一起呈現 T 或 R 型，保持對稱性；若酵素為二元體，則為 RR 或 TT，而無 RT 型。效應物的結合也是同樣情形，抑制劑會使酵素固定在 TT 型，活化劑使成為 RR 型；在被效應物結合後，都失去了協力現象。
  - (2) **Sequential 順序式**：酵素的每個次體各自與基質 (或效應物) 結合後，個別由 T 型轉成 R 型，並不影響其他次體的構形 (仍為 T 型，但對其他次體與基質的親和力，可能有正或負面影響)。依基質加入順序，分子構形變化為 TT→RT→RR。
- b. 兩種效應方式：基質與異位酶的結合，可能是協同式效應；即一個次體與基質結合後，誘導所有次體都轉成 R 型，使其他次體的活性區更易接受基質。如此影響其他次體上同種結合區者 (活性區→活性區) 稱 **homotropic (同質效應)**。而效應物與異位酶的結合多為順序式，且會影響其他次體與基質的結合能力；此種不同種結合區之間相互影響 (調節區→活性區) 則稱 **heterotropic (異質效應)**。

## 7 細胞代謝與酵素調控：

酵素與細胞代謝極為密切，因為所有的代謝路徑，全是由酵素與其基質所組成的；此外，還要加上對酵素活性的調節控制，以便使得細胞正常運作。近來基因體學與蛋白質體學的蓬勃發展，使得細胞代謝與調控方面的研究，有了全新的角度與工具。

### 7.1 細胞代謝途徑：

細胞經同化作用合成所需分子，由異化代謝消耗分子、取得能量，全由酵素所控制。

#### 7.1.1 代謝調控原則：

控制酵素即可控制代謝路徑，控制代謝的大原則如下各點。

- a. 一個基因一個酵素：細胞的代謝途徑極為複雜，但並非細胞所有的代謝路徑都在進行；而進行中的每一步代謝，都由某一種酵素負責催化反應。
- b. 速率決定步驟：因此控制該酵素的活性或生成量，即可控制該步驟反應的快慢；若此反應為某一系列代謝路徑的速率決定步驟 (rate-limiting step)，則可控制這整條代謝途徑。
- c. 可逆或不可逆：大部份酵素反應是可逆的，有時為了使反應保持在某一方向，則成為不可逆反應；不可逆反應大多與消耗 ATP 的反應耦合。
- d. 代謝路徑可互通：許多代謝路徑間若有共同的中間物，則可互通，也可能有旁支或小路相連；因此若某條重要路徑失效，細胞通常不會立刻死亡，而會互補保持一種動態的穩定狀況。

#### 7.1.2 異化代謝途徑鳥瞰：

以生物分子而言，異化代謝路徑可分成三個層次，有計畫地把巨分子逐步分解，最後得到能量；其中最主要的是一條糖解作用 (glycolysis)。

- a. Stage 1: 巨分子 (蛋白質、多糖、脂質) 消化成單位小分子 (胺基酸、單糖、脂肪酸)，可說就是消化作用。
- b. Stage 2: 單位小分子再分解成更小的 acetyl CoA，初步得到一部份的能量。
- c. Stage 3: Acetyl CoA 經過氧化磷酸化反應得到大量能量，分解成 CO<sub>2</sub> 及水。

#### 7.1.3 糖類中心代謝途徑：

由糖解作用到氧化磷酸化反應，是細胞最主要的一條代謝大道；學習細胞的代謝途徑，可以此為中心，其它各類大小分子的代謝都可匯入此中心。

- a. 糖解作用：把葡萄糖分解成 pyruvate → acetyl CoA (代謝分子的焦點)。
- b. 檸檬酸循環：在粒線體中把 acetyl CoA 再分解成 CO<sub>2</sub>，產生 NADH。
- c. 氧化磷酸化反應：NADH 轉換成 ATP 並生成水。

## 7.2 代謝途徑中酵素的調控：

細胞如何控制代謝途徑上的各種酵素？可以針對酵素本身進行修飾，或者控制其基因表現。而荷爾蒙或細胞激素，是在細胞間傳遞長短程控制指令的信息分子。

### 7.2.1 基因表現的調控：

酵素在不同細胞內的表現量可能不同，同一細胞內的各種酵素量也不同。

- a. 酵素的生合成受到其基因的控制 (DNA→mRNA→protein)，因此基因的開或關，或其表現程度，會影響該酵素在細胞內的量，進而影響該酵素所控制的代謝反應，是為基因表現 (gene expression)。一個表現中的基因，應該有大量 mRNA 轉錄出來，但有大量 mRNA 卻不一定產生大量酵素。
- b. 一條代謝路徑的起始基質，可能誘導關鍵酵素基因的表現，稱為 induction；此代謝的最終產物，也可能抑制酵素表現，稱為 repression。基因操縱子 (operon) 即是一例，乳糖能夠去除 repressor 與 lac operon 之結合，而使基因開動。

### 7.2.2 酵素活性調節：

已在上一節詳述，再整理成共價及非共價修飾兩大類。是針對酵素分子所進行蛋白質層次的修飾調控，與上述之基因調控方式不同。

#### a. 非共價修飾：

使用 cAMP 或正負迴饋的效應物等方式，以非共價方式修飾酵素活性，此多為可逆性的調控。勿把異位酶與上述操縱子的調控方式混為一談，兩者都可被基質活化，但前者是修飾酵素本身，而後者是影響基因的表現。

#### b. 共價修飾：

以磷酸化或蛋白質水解的方式，來增強或降低酵素活性。多為 cascade (梯瀑) 式的連鎖代謝反應，cascade 連鎖反應會放大 (amplify) 某條代謝路徑的活性。除了正向的以生合成增加酵素量之外，蛋白質的降解也是一項重要的調控方式，並以蛋白酶或 ubiquitin 配合 proteasome 進行降解，以除去此酵素。

### 7.2.3 激素調控：

細胞與細胞之間如何傳遞信息？這是一個極有趣而且重要的問題。

- a. 賀爾蒙 (如 insulin) 傳遞長程生理指令，經由血液傳送並與目標細胞接觸，結合到細胞膜上的接受器 (receptor)，可引發一系列的信息傳導反應，把『啟動』的指令傳入細胞內，藉著蛋白質激酶或磷酸酶等，活化某些關鍵酵素，開始進行該細胞所預設的功能 (如分解肝糖)，以應身體所需。
- b. 細胞激素則多在免疫細胞之間傳遞短程的信息，可刺激局部的細胞增生；也是利用信息傳導路徑，來啟動細胞內的各種生理功能。

### 7.2.4 細胞空間的效用：

利用酵素或基質在空間上的隔離或聚集，是一有效控制方法。

- a. **胞器隔離**：真核細胞內有許多隔間 (compartmentation)，形成其胞器的隔離空間；在胞器內可聚集較濃的特定酵素及基質，以便有效進行催化反應，或避免有害的副作用。例如葡萄糖中心代謝途徑中，檸檬酸循環及氧化磷酸化反應是在粒線體中進行的。
- b. **酵素複合體**：幾個連續反應的酵素，可組合在一起成為複合體；則某酵素的生成物，可馬上被下一個酵服用為反應物，降低擴散碰撞所需時間。例如葡萄糖中心代謝途徑中的 pyruvate dehydrogenase (催化 pyruvate → acetyl CoA) 是由三種酵素組成的複合體。
- c. **膜上酵素群**：一群連續反應的酵素，也可以一起附在細胞膜上，除了可加速反應速率外，其作用也可能與細胞膜有關。例如 葡萄糖中心代謝途徑中，氧化磷酸化反應酵素群是附在粒線體的內層膜上，並利用膜內外的質子濃度差異來產生 ATP。

### 7.3 研究酵素及代謝的材料：

酵素材料的來源或取得，依其不同目的可有數個層次。

- a. 通常我們必需純化出均質酵素 (homogeneous enzyme)，以針對某一特定酵素進行研究，因此蛋白質純化技術在生化研究上極為重要，請複習這些純化及檢定方法。
  - b. 但複雜的生化反應，並非單一純質酵素所能達成，因此可分離出某種特定細胞，或者將細胞打破所得之溶胞液 (cell-free lysate)，作為研究酵素或代謝反應的材料。動物細胞大多可以建立細胞培養株，某些植物也可以癒創組織 (callus) 培養細胞。若研究需要利用特定的胞器 (organelle)，則可由細胞的溶胞液經超高速離心法取得。
  - c. 有時需要以整個生物體 (whole organism)，或其部份器官 (organ) 來進行實驗，以便觀察巨觀的反應。反應可能相當複雜，因此以放射線物質或用專一性抗體來追蹤，是較清楚、可信的方法。
  - d. 不論何種層次的研究，都需要注意目標酵素是在那一個生長時期，或是那一種器官內表現的。例如：抽取檸檬酸循環的某些酵素，可以先分離出粒線體來。
  - e. 生物化學研究大多是以分離純化的酵素來進行，要小心求證所獲得的結果，是否確實為自然的生理現象，而非僅是試管中的假象。一切觀察均得回歸整體性的細胞生理，否則難有重大意義。
- ◆ 有關酵素純化與分析方法，在生物化學實驗課程中，應該已有部分基本操作；若有更詳盡的技術引導，請參考研究所課程的『酵素化學實驗』。

## 8 酵素在生物技術上的應用：

酵素在現代生物技術的研究或應用上，是一個非常重要的範疇。雖然基因群殖等分子生物的研究蓬勃，但基因表現的產物仍是蛋白質或酵素。另外，在基因操作所應用到的核酸剪接工具，則全部是酵素。以下列舉目前生物技術研究常見的一些應用。

### 8.1 酵素免疫分析法 (ELISA)：

目前最大的生物技術應用之一。抗體可用來偵測其專一性抗原，而將抗體連接以酵素，可做為追蹤或定量的標幟。通常把免疫試劑之一的抗體固定在某固定相 (solid phase)，以利沖洗分離，稱為 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)。其應用的方式很多，下面是稱為 三明治法 的反應方式，是最直接的方法，可用來偵測樣本中的抗原量。其中抗原 (★) 為待檢樣品，須為多價抗原。

固  
定  
相  -抗體 1 (兔)...[抗原]...抗體 2 (羊)...[二次抗體 (豬抗羊)-酵素]

### 8.2 固定化酵素及酵素電極：

酵素經固定後有許多好處，以及更廣泛的應用。

- a. 用物理或化學方法把酵素固定到固相擔體上，比一般使用的溶態酵素有以下優點：

- (1) 酵素可回收重複使用，較為經濟，而且不會污染樣本。
- (2) 酵素的穩定性提高，可能較耐熱或極端的 pH。
- (3) 固相與液相的分離方便，使用上速度快而分離完全，有助於自動化。
- (4) 許多酵素是附在細胞膜上，固定化酵素可模擬細胞內酵素的實際環境。

- b. 利用上述酵素的固定化，把酵素固定在半透性薄膜上，連接到電極，偵測反應進行的結果 (例如 pH 的改變)，可作為酵素反應的自動化偵測工具。

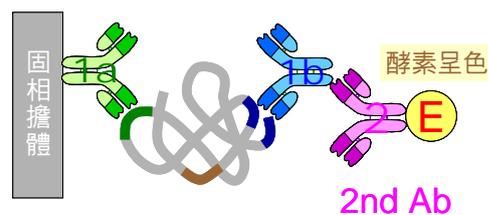


圖 10 ELISA 三明治法

### 8.3 蛋白質工程及人造酵素：

以基因重組或其它方法，可以大量生產某種酵素，也能改變酵素的催化特性。

- a. 分子群殖 molecular cloning：

cDNA 包含完整的蛋白質轉譯訊息，若把某蛋白的 cDNA 插在表現載體中 (如某質體)，則宿主可能表現此段轉殖基因，而生合成此蛋白質。若在此 DNA 接上另一種已知的酵素基因 (如 luciferase, GFP 或 GUS)，則表現出來的蛋白質是二者的連結體，稱為融合蛋白質 (fusion protein)；而此酵素活性可做為追蹤之用，稱為 reporter。

b. 蛋白質工程：

若能改變酵素活性區的胺基酸，則可能改變酵素活性，或是其專一性。通常先研究並預測改變其活性區某胺基酸後，可能引起的變化，再以人工定點突變 (site-directed mutagenesis) 改變某核苷酸，然後以分子群殖表現，並檢測突變蛋白質的活性。

c. 人造酵素：

酵素的活性區通常包含數個極性胺基酸，若在人造的分子骨架上，模仿活性區的幾何位置，接上這些胺基酸，則可能得到具有催化作用的人造分子。

d. Abzyme (催化性抗體)：

若得知酵素催化反應過程中，其基質轉換為產物的過渡狀態物質，以過渡狀態或其類似物作為抗原進行免疫，則所得到的抗體，可能具有催化能力。但其催化效率，遠不及自然酵素。最主要原因在於酵素的催化區是一凹陷口袋，可隔離外界干擾，提供最佳環境穩定過渡狀態；而 abzyme 的結合區較淺，無法十分有效地隔離並穩定過渡狀態 (*Nature* 1996, 383: 23-24)。

## 8.4 Proteome 蛋白質體：

分子生物學革新了整個生物學的觀念，也將會改變生物化學中酵素的研究方法。

### 8.4.1 Genome project 基因體計畫：

跨世紀的大事件之一，人類已解讀出自身染色體內所有 DNA 的序列，此一大計畫即為人類基因體計畫 (Human Genome Project)，由發現 DNA 雙螺旋的 J.D. Watson 主導。其他一些重要動植物或微生物，目前有很多也已解讀完成，例如水稻、小鼠、果蠅、線蟲等。

### 8.4.2 Proteomics 蛋白質體學：

- 一旦解出某種生物的染色體 DNA 序列，接著有許多工作可以進行，其中最有用的是，可以馬上把這些序列翻成表現出來的蛋白質，如此我們就可以得知某生物細胞內，可能含有的全體蛋白質，稱之為蛋白質體 (proteome)。
- 這種研究方式，與傳統的生物化學或生理學有相當不同，要靠龐大的資料庫，與演算能力強大的電腦軟體，是生物資訊學 (bioinformatics) 的主要特點。
- 生物細胞內的蛋白質體，有一大部份是酵素，由細胞所含有的酵素種類，即可導出該細胞可能有的代謝途徑；由這些代謝途徑，就可推測該細胞是如何運作。如此研究整體細胞的代謝路徑，可以叫做代謝體學 (metabolomics)。
- 若再加上基因體、蛋白質體的觀念，利用計算機的強大比對、統整、模擬能力，一起來看看整體生物的運作，甚至多個生物體之間的關係，則衍生出一個新的學問稱為系統生物學 (systems biology)。

## 問題集

1. Hemoglobin 並非酵素，但為何也會有部份裂解雙氧水  $H_2O_2$  的作用？
2. 為何 RNA 可能具有催化的能力？
3. Carboxypeptidase A 分子的活性區需要一個 Zn 離子，請問此金屬離子有何作用？
4. 寫出下列各輔酶所能轉移的基團：ATP, Coenzyme A, NADPH, Thiamine
5. 釀酒的時候，為何要把酒甕封起來？
6. Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase 含有兩個 domains，請說明它們各有何種作用？
7. 有些酵素經過磷酸化後反而失去活性，請問其機制或原因何在？
8. 酵素活性區的構形與下列三者何者較能互補？請說明為何？

基質 生成物 過渡狀態

9. 請寫出 Michaelis-Menten 公式，並說明其意義。
10. 說明為何  $k_3$  就是 turnover number？
11. 檢討一個酵素的催化活性，採用  $k_{cat}/k_m$  有何好處？
12. 寫出下列各種酵素抑制劑的作用機制：
  - a) Penicillin
  - b) Sarin
  - c) Sulfa drug
  - d) Heavy metal
13. 為何 chymotrypsinogen 分子要先經過裂解後，才會變成活性型？
14. Chymotrypsin 如何穩定所催化基質的中間過渡狀態？
15. Chymotrypsin 的 His57 對其催化機制有何貢獻？His57 如何受到環境 pH 的影響？
16. 已知 DPF (diisopropyl phosphofluoridate) 是 Ser protease 的專一性抑制劑，請問如何證明 DPF 是攻擊酵素的活性區？
17. 大部份的 proteases 似乎都有相類似的水解機制，請說明此一核心機制。
18. 許多 proteases 的抑制劑本身都是蛋白質，請問為何這種蛋白質抑制劑不會被 protease 所水解，反而能夠抑制之？
19. 請任舉三種細胞生理上的現象，都是因於蛋白質裂解所造成的結果？
 

例如：Chymotrypsinogen 的活化
20. 如何以非共價鍵方式來調節肝醣磷解酶的活性？
21. 請問為何異位酶 (allosteric enzyme) 的動力學作圖可得到一條 S 型曲線？並說明此 S 型曲線有何意義。
22. 許多生理反應都以梯瀑式 cascade 方式進行，請問會產生何種重大的效應？
23. 為何維持正確的酸鹼度 pH，對某些酵素的活性非常重要？有無酵素不受 pH 影響？

24. 請寫出四種以上的蛋白質性質差異，可利用來作為蛋白質純化的依據。

例如：分子量的大小不同

25. 抗體與其抗原極類似酵素及基質，有很強的專一性，但並無酵素的催化作用；而 catalytic antibody (或 abzyme) 為特別設計產生的抗體，可使抗體具有催化的性質。若有反應如： $A + B \rightarrow A-B$ ，而你要設計能催化此反應的抗體 (A 與 B 均為小分子)。

- a) 你將以何種分子為抗原？詳細說明原因。(hint: 為何酵素具有催化能力?)
- b) 在進行免疫時，應當注意那些事項？

26. 請判斷下列各題的真偽：(並說明原因)

- 1) 酵素都是由蛋白質所構成的。
- 2) 金屬離子在酵素分子中，只有幫助維持構形，不直接參與催化反應。
- 3)  $V_{max}$  大，表示此酵素與基質的親和力越大。
- 4) 酵素分子中的胺基酸，可直接參與催化反應的，都是一些極性不太強的胺基酸。
- 5)  $K_m$  的單位是 濃度/時間。
- 6) 抑制劑 (inhibitor) 與 負效應物 (negative effector) 都可影響酵素活性，其差別在於後者一定是細胞的代謝產物，前者不然。
- 7) 分析酵素活性時，基質濃度不能太高 (差不多是  $K_m$  的程度即可)，以免干擾反應。
- 8)  $k_3 = k_{cat} = \text{turnover number}$
- 9)  $K_m$  可看成 [ES] 的生成速率常數。
- 10) Ser proteases 都有由 Asp-His-Ser 組成的 triad，可產生一具高反應性的  $-O^-$  基。
- 11) 一般酵素的活性區與專一性辨認區都不在同一位置，以便增加專一性。
- 12) 兩個蛋白質間的專一性結合，其構形的互補是重要條件之一，乃因於凡得瓦爾力。
- 13) 酵素的活性區多為一凹陷口袋，是因為要隔離影響催化反應的干擾因子。
- 14) 酵素的抑制劑對人類都有害，在環境或醫藥使用上應完全避免之。
- 15) 與磷酸化一樣，AMP 對肝糖磷解酶的調控，也是改變該酵素的分子構形。
- 16) 蛋白質激酶 (protein kinase) 的催化反應本身都是可逆的，因此蛋白質的磷酸化可以其逆反應來去除之。
- 17) 酵素只能增加其催化反應的反應速率。
- 18) 多元體酵素的的存在是為了活性之調控。
- 19) 只要含有二十種基本胺基酸基團，蛋白質就可以完全發揮酵素的催化機制。
- 20) 酵素催化反應進行的過程中，酵素與基質或產物之間，都不能有共價鍵生成，這才能稱為催化。
- 21) 所有具有完整功能的酵素都是由一條完整蛋白質長鏈所構成的。

- 22) 若某酵素的動力學試驗得到一 S 型曲線，表示此酵素為多元體的四級構造。
- 23) 很多生物都含有血紅蛋白 (hemoglobin)，其胺基酸序列同質性很高，因此其構形相似，都保有相同的運氧功能。
- 24) 水溶性蛋白質的疏水性胺基酸大都在分子的裡面，故酵素分子內部不可以有親水性胺基酸，以防止分子變性。
- 25) 剛轉譯出來的完整 chymotrypsin，其催化活性很低，是因為無法穩定過渡狀態。
- 26) 蛋白酶催化過程中，所形成過渡狀態有過多正電荷，要用氧原子上的電子中和之。
- 27) 尿素 (urea) 可導致酵素變性的原因是破壞  $\alpha$  螺旋的氫鍵。
- 28) 基因的開關可以控制其蛋白質產物的表現，因此一旦某基因被大量轉錄成 mRNA 後，即可預測下游蛋白質將會大增。
- 29) 以下配對都是專一性吸引力所造成：酵素-基質、酵素-輔酶、荷爾蒙-受體。
- 30) RNA 可形成分子構形，而 DNA 則無；這是因為 DNA 為雙股螺旋所致。
- 31) RNA 可形成分子構形，而 DNA 則無；是因為 RNA 可形成 非 Watson-Crick 配對。
- 32) 為何酵素的反應速率要看  $k_3$ ？( $v_o = k_3 [ES]$ ) 是因為  $k_1$  太大、而  $k_2$  太小。
- 33) Steady state 理論是說，酵素在一定時間內會達到一平衡穩定的反應速率。
- 34) 青黴素是一種 serine protease 的抑制劑。
- 35) 磺胺藥是細菌代謝途徑的可逆型競爭性抑制劑，因此只能抑菌不能殺菌。
- 36) 電泳及離子交換法都是利用蛋白質分子極性的不同來進行分離純化的。
- 37) 葡萄糖要經磷酸化後才進入糖解代謝途，是因為要防止葡萄糖分子跑掉，因為磷酸化後的分子不易通過細胞膜。
- 38) 以誘生抗體所製備得的 abzyme，可催化所指定的反應，其效率更優於傳統酵素。
- 39) 同一 domain 可重複出現在不同酵素分子上，這是在基因層次已安排好的。
- 40) Carboxypeptidase A 是一種外切酶，可切除蛋白質 C-端的非極性胺基酸，它可以與  $\alpha$ -COOH 結合來辨識是否為 C-端。

27. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 酵素催化反應具有那些特性？

- 可降低反應的活化能    可以改變反應的平衡方向    反應前後酵素之化性沒有改變    其催化速率是可以被改變的

2) RNA 為何會有特定構形？

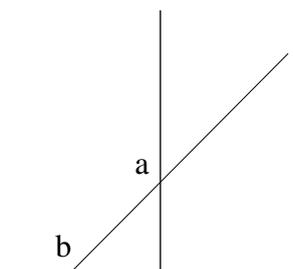
- RNA 為單股長鏈分子    RNA 有 Watson-Crick pairing    RNA 有非 W-C 的 pairing    氫鍵是主要貢獻力量    RNA 分子中有核糖的 2'-OH

3) 以下分子何者不是酵素？

- Insulin    Thrombin    Fibrin    Hemoglobin    Calmodulin

- 4) 有額外反應性基團的胺基酸：  
 Val  His  Glu  Pro
- 5) NADH 分子中含有那些構造？  
 去氧核糖  磷酸  Adenine  Hydride  Nicotinamide
- 6) 輔酶的作用或性質為：  
 穩定酵素構形  參與反應基團的轉移  很多含有去氧核糖核苷部份  
 可提供一強力反應基團
- 7) 有關  $K_m$  的敘述何者為真？  
  $K_m$  的單位是  $\text{mM}/\text{sec}$    $K_m = k_2 \div (k_1 + k_3)$    $K_m$  越大表示對基質結合力強  
  $K_m$  隨著酵素的濃度變化而變   $K_m$  與 ES 的生成無關
- 8) 有關  $k_{\text{cat}}$  的敘述何者為真？  
  $k_{\text{cat}}$  的單位是  $\text{sec}^{-1}$    $k_{\text{cat}}$  就是  $k_3$    $k_{\text{cat}}$  隨著酵素的濃度變化而變   $k_{\text{cat}}$  與 ES 的生成無關
- 9) 可構成兩個分子間的專一性吸引力的力量有那些：  
 氫鍵  疏水鍵  雙硫鍵  凡得瓦爾力  離子鍵  分子間構形互補
- 10) 何者為 Ser protease 家族？  
 Subtilisin  凝血因子 VIII  Acetylcholinesterase  Elastase  Thrombin
- 11) 何者為酵素的不可逆抑制劑？  
 Penicillin  PCMB  DFP  EDTA  磺胺藥  cAMP
- 12) 改變下列那個胺基酸後會影響 chymotrypsin 的活性：  
 Asp102  His57  Ser14  Ile16  C-terminal
- 13) 有關立體專一性何者為真？  
 碳原子的  $sp^3$  軌道是主因  自然界中多使用 L-胺基酸  單糖分子並無立體異構物  
 酵素可分辨基質立體異構物
- 14) 有關肝糖磷解酶的調節方式：  
 可經磷酸化使酵素活性上升  cAMP 是 (+) 異位調節因子  ATP 是其競爭性抑制劑  
 磷酸化會使其構形改變
- 15) 有關異位酶的作用方式：  
 可能受其上游代謝物所抑制  其動力學行為呈一 S 型曲線  其 effector 的作用區即活性區  
 異位酶不一定要有四級構造
28. 酵素動力學可以下式開始： $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$ ，請以公式或文字，說明由此式所衍生出來的四個基本觀察。
29. 胜肽鏈上可被 trypsin 專一性水解的胺基酸有哪兩種？

30. 請舉出六種以上可以使酵素失去活性的方法。
31. 請寫出蛋白質上可被磷酸化的胺基酸種類，及其被磷酸化位置。
32. 右圖為某酵素的雙倒數動力學作圖，請依指示回答問題：



- a) 請標示橫座標及縱座標及其單位。
- b) 標明圖中 a 及 b 點各為何？
- c) 若有一競爭性抑制劑 X，請在圖中畫出可能的抑制情形。

33. 依下列性質，請各至少出一種方法可以純化酵素：

- a) 依分子大小不同 \_\_\_\_\_
- b) 依分子電荷不同 \_\_\_\_\_
- c) 依分子極性不同 \_\_\_\_\_

34. 請簡單解釋以下名詞：Abzyme, Metabolomics, Ribozyme, Proteasome, Specific activity

35. 異位酶是否一定要具有四級構造？請詳細說明。

36. 為何輔酶多屬維生素？

37. 以人工定點突變可以改變酵素的重要胺基酸，進而改變酵素的催會特性，但是通常改變出來的新酵素，活性都較原來的酵素差，請問為何如此？若果真如此，則此種定點突變修改酵素的方法，有何實際用途？

38. 生物細胞中，許多生理功能有『放大 amplification』的作用，例如信息傳導中的關鍵酵素 (cyclase, kinase)，請再舉出數例。

39. 同上題，但並非屬生物細胞，而是人為的實驗方法中，有哪些是具有放大功能的？

40. 單醣分子可以說是一種多醇醛，在一條碳鏈上連接以醇基，並在一端接有一醛基 (如葡萄糖)。在生物細胞內，以此種分子作為能量的貯存與攜帶；而地球把更多的能量藏在如汽油等的飽和碳氫化合物內 (如己烷)。事實上後者含有更高的能量，是較好的能量貯藏分子。請問細胞為何使用糖類分子，而非飽和碳氫化合物？請以單醣的分子構造與特徵，說明其原因。