

國立清華大學化學系

碩士論文

立體電子效應對聚脯胺酸以及 β -hairpin 結構與穩定度之探討

Stereoelectronic effects on polyproline and β -hairpin

conformation and stability

指導教授：洪嘉呈 博士 (Dr. Jia-Cherng Horng)

研究生：姜怡君 (Yi-Chun Chiang)

學號：9623519

中華民國九十八年七月

國立清華大學碩士學位論文

指導教授推薦書

化學 學系 研究所 姜怡君 君所提之論文

立體電子效應對聚脯胺酸以及 β -hairpin 結構
與穩定度之探討 (題目)

經由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 洪嘉良 (簽章)

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 姜怡君 君所提之論文

立體電子效應對聚脯胺酸以及 β -hairpin 結構
與穩定度之探討 (題目)

經本委員會審查，符合碩士資格標準。

學位考試委員會 主持人 江明達 (簽章)

委員 洪嘉之
黃人則

中華民國 98 年 07 月 01 日

謝誌

能順利取得碩士學位，非常感謝我的指導教授洪嘉呈老師，在碩班的兩年間對我的指導以及各項的協助，雖然我們是第一屆的學生，在各項儀器的使用，以及研究的領域皆在摸索的階段，但因為有老師不厭其煩的講解、說明與帶領下，使我能逐漸適應研究生的生活與實驗。老師在我們心中不僅僅是指導教授，更像是學長一樣的親切好相處，讓我不僅在學術上獲得很多，也過得很開心。

同時，非常感謝我的論文口試委員：江昀緯老師以及黃人則老師對我的論文提供一些寶貴的意見與指導，使得本論文能更趨完善。

當然還得要感謝實驗室的各個成員：謝謝頤珊幫大家測量 NMR 光譜，以及課業上的討論指教；謝謝怡倫總是適時提醒我注意很多事情，帶我們吃遍台中的美食；謝謝統元，剛開始的唯一壯丁對我們的各種協助；謝謝學妹育如合成起始物以及衍生物，讓我的實驗內容更加豐富，並為實驗室帶來歡愉的氣氛；謝謝學妹佳青平日的幫忙；謝謝學弟時雨任勞任怨的供我們差遣，達到我們的各項要求；非常謝謝系女排的大家，六年系排生活，認識好多的人，到各地的征戰、遊玩，今年更拿下四冠王的榮耀。因為有你們，讓我的生活充滿很多美好的回憶。

最後非常感謝一路上支持我的家人，因為有爸媽在背後的支持，讓我可以選擇有興趣的事去做、嘗試，使我可以無後顧之憂地求學，並感謝我的大姊，不論是想法上或是各種協助與幫忙。

能夠完成這本論文，都是有大家的幫忙，由衷的說聲，謝謝你們。

中文摘要

聚脯胺酸可以形成PPI或是PPII結構， $n \rightarrow \pi^*$ 作用已經被提出在穩定PPII結構具有一個關鍵性的角色，並證實立體電子效應對於聚脯胺酸的結構具有一定程度的影響力。另一方面，研究指出可以利用立體電子效應對蛋白質的穩定度與結構性進行調控，但目前尚未有利用 β -hairpin為研究模型探討立體電子效應之報導，故本次研究特地選用一小段的 β -hairpin胜肽，HP7 為模型，以探討立體電子效應對 β -hairpin的影響。

本研究中，合成一系列脯胺酸衍生物（脯胺酸的C4 位置接上不同的拉電子基，OH、F、OCH₃基），藉由合成一系列host-guest胜肽，(Pro)₅-X-(Pro)₅-Gly-Tyr，當 X為脯胺酸以及脯胺酸衍生物（脯胺酸 C4 位置有不同的拉電子基），來探討立體電子效應對聚脯胺酸結構在PPI和PPII結構轉換間活化能的影響。利用圓二色光譜儀進行動力學研究，可得到聚脯胺酸轉換結構時的速率，結果顯示立體電子效應對於聚脯胺酸結構由PPII轉換到PPI時會產生明顯的影響。另一方面，在HP7胜肽中置入含有拉電子基的脯胺酸衍生物來探討立體電子效應對 β -hairpin的結構與穩定度的影響。結果顯示，立體電子效應造成的 preorganization並非是造成 HP7 系列胜肽穩定與否的主要原因，因為在此結構只有 Pro-aromatic作用力，且 Proline衍生物的支鏈與鄰近的 Trp3 與 Asn4 亦會產生立體阻礙而影響結構的穩定度，此外，因為 proline接上拉電子基後環上電子被部份拉離，也會與Trp3 形成 π -cation interaction而穩定結構，因此，這些作用力在探討此結構穩定

性時，都是必須考慮的。



Abstract

The $n \rightarrow \pi^*$ interactions have been suggested to play a critical role in stabilizing a PPII helix, and stereoelectronic effects can have a substantial impact on polyproline conformation. Thus, understanding of the basis of polyproline structures will be one aim in this proposal. Polyproline can form either type I (PPI) or type II (PPII) helices. Besides polyproline structure, stereoelectronic effects were found to be capable of tuning protein stability. However, no study of stereoelectronic effects on β -hairpin has been reported. We choose a small β -hairpin peptide (HP7) as our model to study stereoelectronic effects on β -hairpin structure.

In this work we have prepared a series of proline derivatives with an electron-withdrawing substituent on proline C4 position, such as $-\text{OH}$, $-\text{F}$ and $-\text{OCH}_3$ group. We have prepared a series of host-guest peptide, $(\text{Pro})_5\text{-X-(Pro)}_5\text{-Gly-Tyr}$, where $\text{X} = \text{proline}$, and proline derivatives to evaluate the stereoelectronic effects on the transition energy barrier of the conversion between PPI and PPII conformation. Time-dependent dichroism (CD) spectra have been used to measure the conversion rates. The results show that stereoelectronic effects have a significantly impact on the conversion rates from PPII to PPI. We have also incorporated those proline derivatives with an electron-withdrawing substituent on C4 position into the HP7 peptide to investigate stereoelectronic effects on β -hairpin. The data showed that C^γ

-ring pucker of proline does not significantly contribute to the β -hairpin structure stability. Other forces, such as steric repulsion, cation- π and proline-aromatic interactions, need to be considered in stabilizing the β -hairpin structure.



目錄

中文摘要	i
Abstract	iii
目錄	v
圖目錄	ix
表目錄	xii
第一章 緒論	1
1-1 蛋白質簡介	1
1-2 聚脯氨酸 (polyproline)介紹	2
1-3 立體電子效應 (stereoelectronic effect)	4
(1) 立體電子效應對脯氨酸衍生物的影響	7
(2) 立體電子效應對 polyproline 構形穩定度的影響	10
(3) 立體電子效應影響模擬膠原蛋白的穩定度	10
(4) 立體電子效應對彈性蛋白 (Elastin)的影響	12
(5) 利用立體電子效應調整 α -螺旋蛋白的結構與穩定度	14
1-4 HP7 介紹	16
1-5 固相胜肽合成 (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)介紹	18
1-6 圓二色光譜 (Circular dichroism spectroscopy, CD)	21
1-7 研究方向	23

第二章 實驗部分	24
2-1 儀器	24
2-2 藥品	25
2-3 化合物之合成與鑑定	28
2-3-1 Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-hydroxyproline (1a) (Boc-Hyp-OH)之合成	28
2-3-2 Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline (2a) (Boc-Mop-OH)之合成	29
2-3-3 Boc-(4 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline (2b) (Boc-mop-OH)之合成	30
2-3-4 Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline benzyl bromide (3a) (Boc-Mop-OBn)之合成	30
2-3-5 Boc-(4 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline benzyl bromide (3b) (Boc-mop-OBn)之合成	31
2-3-6 Fmoc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline benzyl bromide (4a) (Fmoc-Mop-OBn)之合成	32
2-3-7 Fmoc-(4 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline benzyl bromide (4a) (Fmoc-mop-OBn)之合成	32
2-3-8 Fmoc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline (5a) (Fmoc-Mop-OH)之合成	33
2-3-9 Fmoc-(4 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline (5b) (Fmoc-mop-OH)之合成	33
2-3-10 N-(2-Acetyl)- (4 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-4-methoxyproline methyl ester 之合成(6)	34
2-3-11 Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-hydroxyproline benzyl bromide (7) (Boc-Hyp-OBn)合成	35



2-3-12 Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-fluoroproline benzyl bromide(8) (Boc-flp-OBn)合成	35
2-3-13 Fmoc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-fluoroproline benzyl bromide(9)(Fmoc-flp-OBn)合成	36
2-3-14 Fmoc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-fluoroproline (10) (Fmoc-flp-OH)合成	36
2-4 胜肽合成、純化與鑑定	37
2-4-1 Host-Guest 聚脯胺酸系列胜肽	37
2-4-2 HP7 系列胜肽	39
2-5 CD 光譜測量	40
2-5-1 Host-Guest 聚脯胺酸系列胜肽	40
2-5-2 HP7 系列胜肽	41
2-6 2D-NMR 光譜測量	42
2-7 數據處理	42
2-7-1 Host-Guest 聚脯胺酸系列胜肽	42
2-7-2 HP7 系列胜肽	44
第三章 實驗結果與討論	46
第一部分 立體電子效應對聚脯胺酸構形轉化的活化能之影響	46
3-1 Host-Guest 胜肽的設計	46
3-2 探討立體電子效應對 mop 構形轉化的影響	46
3-3 Host-Guest polyproline 系列胜肽 CD 測量結果討論	48
3-3-1 水溶液中之 CD 光譜	48



3-3-2 <i>n</i> -propanol 溶液中之 CD 光譜	49
3-4 Host-Guest polyproline 系列胜肽之不同構形轉化速率與活化能比較	51
3-4-1 PPII→PPI 構形速率與活化能差比較	51
3-4-2 PPI→PPII 構形速率與活化能差比較	57
第二部份 立體電子效應對 β -hairpin 穩定度之影響	62
3-5 HP7 系列胜肽 CD 測量結果討論	62
3-5-1 Far-UV CD 光譜	62
3-5-2 Near-UV CD 光譜	64
3-6 HP7 系列胜肽螢光測量	65
3-7 HP7 系列胜肽穩定度的探討	66
3-8 HP7 系列胜肽 2D-NMR 探討	69
3-8-1 HP7 系列胜肽與 random coil 的比較	69
3-8-2 HP7 系列胜肽與 Wild Type 的比較	70
第四章 結論	74
附錄一	76
參考文獻 (References)	82



圖目錄

圖 1-1 (A) α -helix 結構示意圖(B)單個 β -strand 示意圖(C) β -sheet 氫鍵形成示意圖 (D) β -hairpin 的結構示意圖	1
圖 1-2 (A) PPI 模型結構(B) PPII 模型結構	3
圖 1-3 (A)膠原蛋白由三股聚脯胺酸結構互相纏繞所組成(B)膠原蛋白之間的氫鍵 形成示意圖	4
圖 1-4 N-formyl-L-proline methyl ester 化合物 <i>trans</i> ↔ <i>cis</i> 轉換	5
圖 1-5 $n \rightarrow \pi^*$ interaction 的示意圖	5
圖 1-6 可進行 $n \rightarrow \pi^*$ interaction 的 (ϕ, ψ) 角度範圍	6
圖 1-7 PPII 結構示意圖， $\delta_{BD} = 3.2 \text{ \AA}$ 以及 $\tau_{BD} = 103^\circ$	6
圖 1-8 Proline 可形成 C_γ - <i>exo</i> 與 C_γ - <i>endo</i> 構形	7
圖 1-9 (A) Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 化合物(B) Ac-L-Phe-hyp-NHMe 化合物	7
圖 1-10 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 的 pyrrolidine 構形	8
圖 1-11 Ac-L-Phe-hyp-NHMe 的 pyrrolidine 構形	9
圖 1-12 膠原蛋白中羧脯胺酸 (Hyp) 與水產生氫鍵的結晶示意圖	10
圖 1-13 Pro-Pro-Gly 三股螺旋中脯胺酸的結晶構形	11
圖 1-14 (A)彈力蛋白分子拉力與張力示意圖 (B)彈性蛋白分子序列示意圖	13
圖 1-15 彈性蛋白分子 DSC 測量得到 T_m 值	13
圖 1-16 Trp cage 迷你蛋白結構與序列示意圖	14

圖 1-17 脯氨酸 C4 位置上接上不同拉電子基的脯氨酸衍生物列表示意圖	14
圖 1-18 (A)Protein G B1 domain(PDB ID:1Q10) (B) GB1 p (residues 41-56)(PDB ID:1Q10) (C) trpzip 4 (PDB ID:1LE3) (D)HP7 (PDB ID: 2EVQ)之結構	17
圖 1-19 Fmoc-胺基酸碳端之羥基用 HBTU 活化成 Fmoc-amino acid HOBt ester	19
圖 1-20 Fmoc-amino acid HOBt ester 與去除 Fmoc 官能基之胜肽樹酯進行耦合反應	19
圖 1-21 胜肽合成儀將氨基酸經由活化、耦合、去保護基等過程得胜肽的示意圖	20
圖 1-22 各波長範圍可以分析不同結構的資訊	22
圖 1-23 圓二色光譜中蛋白質的二級結構資訊	22
圖 2-1 不同時間下所測得在 228 nm 的 CD 訊號變化圖	42
圖 2-2 PPII→PPI 轉換時的活化能差示意圖	43
圖 2-3 模擬膠原蛋白在最大吸收波長 225 nm 的 CD 訊號	44
圖 3-1 Ac-mop-OMe化合物測得 ¹ H-NMR光譜	47
圖 3-2 Host-Guest polyproline胜肽於水溶液中及 4 °C時所測得的 CD光譜	49
圖 3-3 Host-Guest polyproline胜肽於 <i>n</i> -propanol中及 4 °C時所測得的 CD光譜	50
圖 3-4 P11 在 95% <i>n</i> -propanol、4°C時，不同時間下所測得的CD光譜	52
圖 3-5 Host-Guest polyproline系列胜肽於 95 % <i>n</i> -propanol及 4 °C不同時間所測得的CD光譜	53
圖 3-6 P11 在 90% buffer、4 °C下，36 小時內CD訊號隨時間變化圖	58

圖 3-7 Host-Guest polyproline 系列胜肽在 90% buffer、4°C 下，不同時間之 CD 光譜圖	59
圖 3-8 HP7 系列胜肽在(A) 25 °C 及(B) 4 °C 下測得的Far UV CD光譜圖	63
圖 3-9 HP7 系列胜肽在(A) 25 °C 及(B) 4 °C 下測得的Near UV CD光譜圖	64
圖 3-10 HP7 系列胜肽螢光的測量結果圖	66
圖 3-11 HP7 系列胜肽在 1 M TMAO 水溶液，得到波長 228 nm 的 CD 訊號圖	68
圖 3-12 NMR 得到的 HP7 結構圖	69
圖 3-13 HP7 系列胜肽與random coil C ^α H化學位移差值變化圖	71
圖 3-14 HP7 系列胜肽與Wild type的C ^α H化學位移差所得的變化圖	72



表目錄

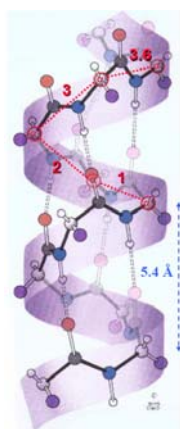
表 1-1 脯胺酸的 C4 位置 4 <i>R</i> 與 4 <i>S</i> 取代基對 <i>trans/cis</i> 平衡常數的影響	9
表 1-2 脯胺酸衍生物對膠原蛋白(XaaYaaGly) ₇ 構形穩定度的影響	12
表 1-3 Trp cage 胜肽的 CD Data (T_m 以及在 25°C 下所得的 Data)	15
表 1-4 GB1 p、 Trpzip4、HP7 的序列組成	17
Scheme 1: Boc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-hydroxyproline 化合物之合成流程	28
Scheme 2: Fmoc-(4 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline 與 Fmoc-(4 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-methoxyproline 化合物之合成流程	29
Scheme 3: Fmoc-(4 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-fluoroproline 化合物之合成流程	35
表 2-1 Host-Guest 聚脯胺酸系列胜肽的序列	38
表 2-2 HP7 系列胜肽的序列	40
表 3-1 4 <i>R</i> 以及 4 <i>S</i> 位置取代基對脯胺酸 $K_{trans/cis}$ 的影響	48
表 3-2 在 4 °C 環境中，聚脯胺酸系列胜肽所測得之 CD 相關參數	50
表 3-3 Host-Guest polyproline 系列胜肽 PPII→PPI 的轉換速率與活化能	55
表 3-4 Host-Guest polyproline 系列胜肽 PPI→PPII 的轉換速率與活化能	61
表 3-5 HP7 系列胜肽所測得之 CD 相關參數	65
表 3-6 為 HP7 系列中各氨基酸的 NH 與 C ^α H 化學位移值	73
附錄一	76

第一章 緒論

1-1 蛋白質簡介

蛋白質在生物體中是一種很重要的物質，扮演著關鍵性的角色，諸如細胞架構、酵素催化、訊息傳遞、物質傳輸、能量儲存等，蛋白質在其中皆是缺一不可。由於各個胺基酸間與其周遭環境間交互作用力，促使蛋白質摺疊成立體結構，其立體結構元素，稱為二級結構，主要有 α -helix 與 β -strand。 α -helix，顧名思義為螺旋狀（圖1-1(A)），每轉一圈需要 3.6個胺基酸，其第 i 個胺基酸的 C=O 會與第 $i+4$ 個胺基酸的 NH 會形成螺旋內氫鍵。 β -sheet 是由數個像彩帶狀的 β -長帶(β -strand)所組成(圖1-1(B))， β -strand 結構可分成 N端和 C端， β -strand 氫鍵的形成在於兩 strand 間(圖1-1(C))，一條 β -strand 的 C=O 與另一條 β -strand 的 NH 形成氫鍵，而數條 β -strand 結合在一起，就形成了 β sheet；又因為 C_{α} 原子會連續在 β sheet 平面的上下變化，所以 β sheet 會呈現一摺板狀(pleated)，其中又可分為平行與反平行 β -sheet。

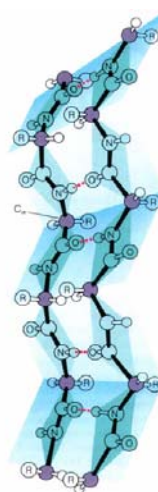
(A)



(B)



(C)



(D)



圖 1-1 (A) α -helix 結構示意圖(B)單個 β -strand 示意圖(C) β -sheet 氫鍵形成示意圖(D) β -hairpin 的結構示意圖

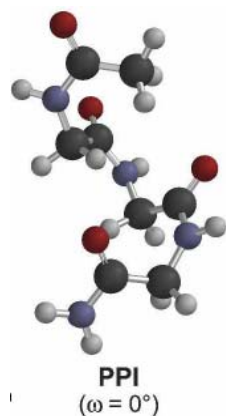
每兩個反平行 (antiparallel)的 β -strand可以組成一個 β -hairpin的結構 (圖 1-1(D))¹⁻³。近年來在阿茲海默症患者中發現有 amyloid的沉積，其為 β -sheet結構的聚集⁴；致病的 PrPsc是由 β sheet構造所組成，會引起狂牛病或是失眠症等疾病⁵。因此 β -sheet的結構及穩定性已成為重要研究課題之一。此外，短的胜肽已被廣泛且成功的應用在探討 α -helical和 β -turn結構的穩定性，所以利用一小段的 β -hairpin胜肽研究造成 β -hairpin結構穩定與否的因素，可以進一步對 β -sheet有更深的了解。



1-2 聚脯胺酸(polyproline) 介紹

聚脯胺酸 (polyproline)主要可以形成兩種構形- type I (PPI) 以及 type II (PPII)。PPI 屬於右螺旋且皆含有 *cis* 的胜肽鍵，骨架結構形成的 $(\phi, \psi, \omega) = (-75^\circ, 160^\circ, 0^\circ)$ ，圖 1-2(A)顯示 PPI 的簡單模型，PPI 的結構較為緊密，螺旋距為 $5.6\text{\AA}/\text{turn}$ ，每一個 turn 含有 3.3 個 residue；PPII 屬於左螺旋且皆含有 *trans* 的胜肽鍵，結構形成的 $(\phi, \psi, \omega) = (-75^\circ, 145^\circ, 180^\circ)$ ，圖 1-2(B)顯示 PPII 的簡單模型，PPII 的結構比 PPI 較為鬆散，螺旋距為 $9.3\text{\AA}/\text{turn}$ ，每一個 turn 含有 3 個 residue。

(A)



(B)

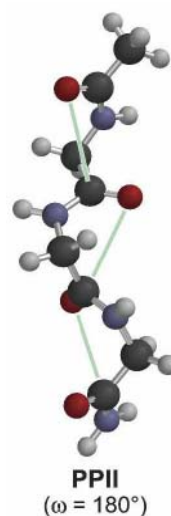


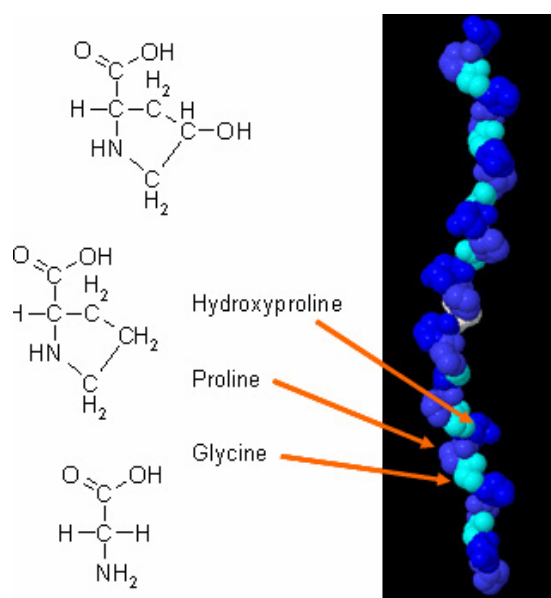
圖 1-2 (A) PPI 模型結構 (B) PPII 模型結構⁸

形成 PPI 或 PPII 結構主要取決於所處的溶劑環境，PPI 只存在於某些特定的有機溶劑中，例如 *n*-propanol、butanol；而 PPII 主要存在於水溶液中，跟 α -helix 與 β -strand 不一樣，PPI 或 PPII 結構主鏈 (main chain) 不具有氫鍵，所以很難利用直接利用 NMR 測量其結構⁶⁻⁸。

最近的研究發現，在折疊的蛋白質中 PPII 是常見的結構，且在生物活性中扮演一個重要的角色，例如訊息轉錄 (transcription)、免疫反應 (immune response) 等，此外，PPII 結構的穩定性與堅硬性 (rigidity) 有很多應用，可以使用 (Pro)_n 序列可以做為 spacer，polyproline-rod 可以分離蛋白質中具有生化活性的目標 (target)⁹⁻¹¹，最近更發現 C 端的聚脯胺酸可以抑制 polyglutamine 的聚集 (aggregation) 產生等¹²。此外，PPII 結構亦是膠原蛋白中重要的結構，亦是脊椎動物含量最豐富的蛋白質，它主要存在於結締組織中，具有很強的伸張能力，構

成膠原蛋白的氨基酸序列很特殊，主要是由甘胺酸（Glycine）及脯胺酸（Proline）組成，其一級結構上常以甘胺酸-脯胺酸-羧脯胺酸三聯交替出現的順序排列(如圖 1-3(A)所示)，因此使其空間結構上不會形成常見的 α -helix 及 β -sheet 的蛋白結構，而是形成三股螺旋結構，三股獨立的膠原蛋白胜肽先形成 PPII 結構，再依靠彼此甘胺酸之間的氫鍵而互相纏繞¹³(圖 1-3(B))。

(A)



(B)

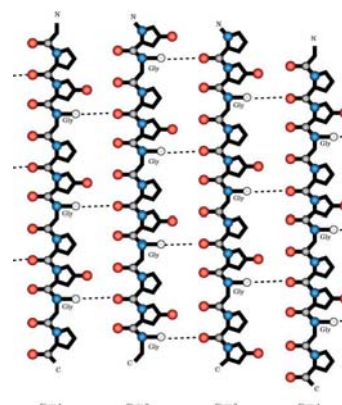


圖 1-3 (A)膠原蛋白由三股聚脯胺酸結構互相纏繞所組成 (B)膠原蛋白之間的氫鍵形成示意圖

1-3 立體電子效應(stereoelectronic effect)

在過去十幾年間，PPII 被廣泛的研究，但是對於穩定 PPII 結構的原因還不太了解，立體效應 (steric effect)是已知對分子結構的穩定造成顯著影響的原因之一，但是 Raines 團隊研究 N-formyl-L-proline methyl ester 化合物（如圖

1-4 所示)時發現，如果因為立體效應的影響，此化合物的 $K_{trans/cis}$ 應該小於 1，但是實驗結果證明 $K_{trans/cis} > 1$ ，顯示立體效應不是造成此化合物偏向形成 *trans* 構形的主要原因¹⁴。

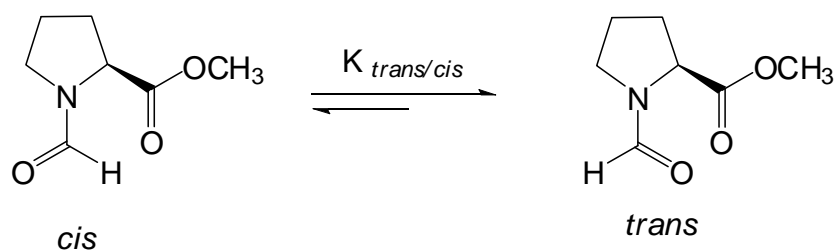


圖 1-4 N-formyl-L-proline methyl ester 化合物 *trans*、*cis* 轉換

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 $n \rightarrow \pi^*$ interaction 在穩定 PPII 結構中具有一個很重要的角色(如圖 1-5)。

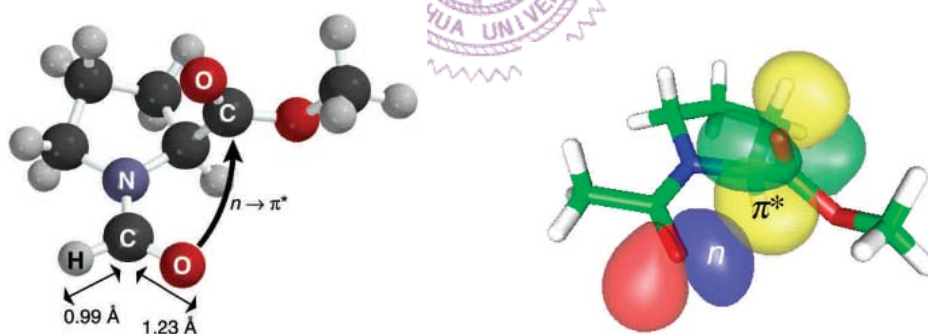


圖 1-5 $n \rightarrow \pi^*$ interaction 的示意圖

$n \rightarrow \pi^*$ interaction 是指 amide oxygen 的非鍵結電子對 (n) 與 ester 碳上的 π^* 軌域存在 hyperconjugative delocalization，根據先前的研究， $n \rightarrow \pi^*$ interaction 跟 $O_{i-1} \dots C'_i=O$ 的角度以及 $O_{i-1} \dots C'_i$ 之間的距離有關⁷，而最佳 $n \rightarrow \pi^*$

interaction 可落在 PPII、右螺旋 α -helix 以及左螺旋 α -helix 的 (ϕ, ψ) 角度範圍

裡，如圖 1-6 所示。

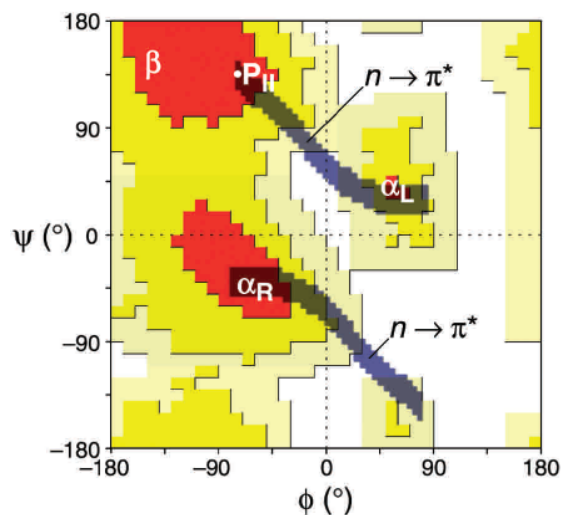


圖 1-6 可進行 $n \rightarrow \pi^*$ interaction 的 (ϕ, ψ) 角度範圍¹³

在 PPII 結構中， $\delta_{BD}=3.2 \text{ \AA}$ 以及 $\tau_{BD}=103^\circ$ ，可以形成 $n \rightarrow \pi^*$

interaction (如圖 1-6)，因此 $n \rightarrow \pi^*$ interaction 很可能是造成 PPII 穩定的原因，

其進一步的說明如以下幾點。

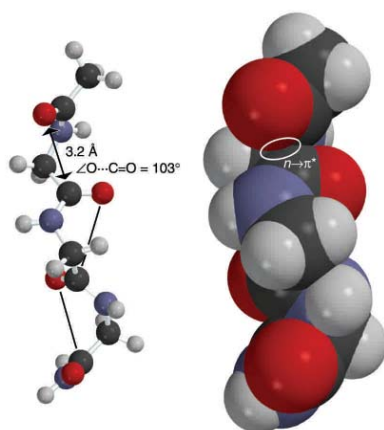


圖 1-7 PPII 結構示意圖， $\delta_{BD}=3.2 \text{ \AA}$ 以及 $\tau_{BD}=103^\circ$

(1) 立體電子效應對脯氨酸衍生物的影響

Proline 主要可以形成兩種構形，一種為 C_{γ} -*exo*，另一種為 C_{γ} -*endo* (如圖 1-8 所示)¹⁵。

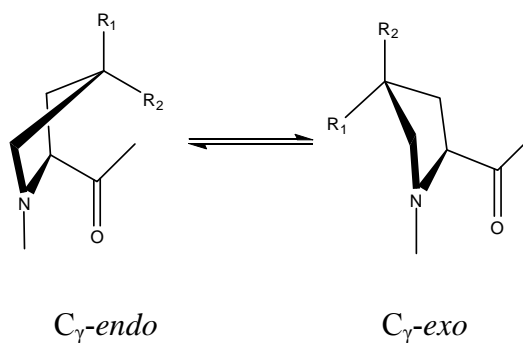
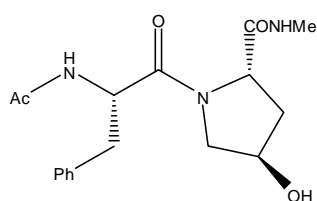


圖 1-8 Proline 可形成 C_{γ} -*exo* 與 C_{γ} -*endo* 構形

在 Proline 的 4 號 C 位置上，如果有拉電子基存在，會因為誘導效應 (inductive effect) 的影響，使 peptide bond 上的電子密度減少，並降低 C-N 鍵的鍵級 (bond order)，因此可以促進轉換成較低能量的 *cis* 或 *trans* 構形¹⁶⁻¹⁷。

以 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 為例 (如圖 1-9(A) 所示)，Hyp ((4*R*,2*S*)-4-hydroxyproline) 會傾向形成 C_{γ} -*exo* 構形¹⁸，其 peptide bond 較傾向形成 *trans* 構形。

(A)



(B)

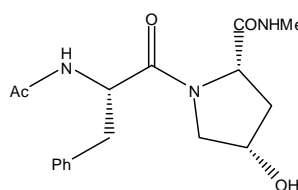


圖 1-9 (A) Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 化合物 (B) Ac-L-Phe-hyp-NHMe 化合物

造成此種結果的主要原因是因為形成 $C\gamma$ -*exo* 構形時，Hyp 上的 -OH 基與 pyrrodine 上的 N 有 gauche interaction 的穩定能¹⁹，並有 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ interaction 的 hyperconjugative interaction 穩定原因，並且在形成 *trans* 構形時，有 $n \rightarrow \pi^*$ interactions 穩定能（圖 1-10 所示），使得 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 中 Hyp 的 peptide bond 傾向形成 *trans* 的構形存在。

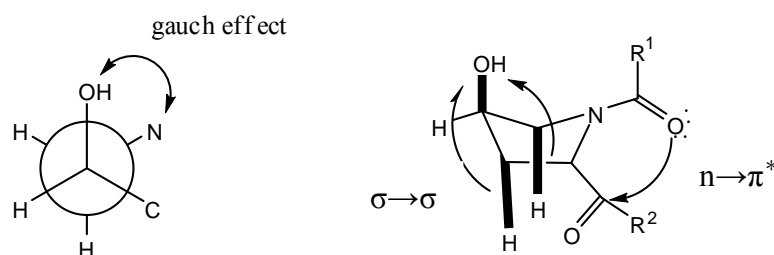


圖 1-10 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 的 pyrrolidine 構形

相對的，以 Ac-L-Phe-hyp-NHMe 為例（如圖 1-9(B)所示），hyp ((4*S*, 2*S*)-4-hydroxyproline) 會傾向形成 $C\gamma$ -*endo*²⁰，其 peptide bond 會較傾向形成 *cis* 構形。造成此種結果的主要原因是因為形成 $C\gamma$ -*endo* 構形時，hyp 上的 -OH 基與 pyrrodine 上的 N 會有 guche interaction 的穩定能，並且在形成 *cis* 構形時，有 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ interaction 等的 hyperconjugative interaction 穩定原因（如圖 1-11 所示），使得 Ac-L-Phe-Hyp-NHMe 中 hyp 的 peptide bond 傾向形成 *cis* 的構形存在²¹。

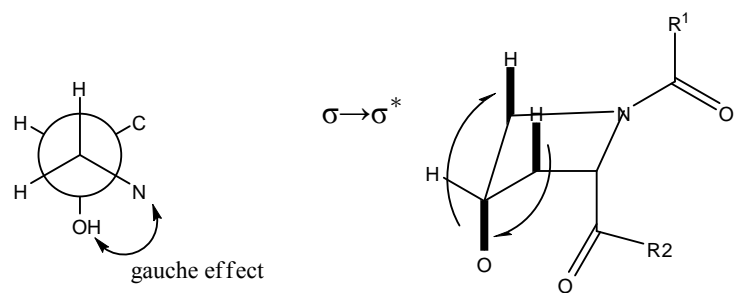


圖 1-11 Ac-L-Phe-hyp-NHMe 的 pyrrolidine 構形

因此，由於 $n \rightarrow \pi^*$ interactions 的影響，使得 Hyp、Flp 傾向形成 *trans* 構形，如表 1-1 所示²²。

表 1-1 脯氨酸的 C4 位置 4*R* 與 4*S* 取代基對 *trans/cis* 平衡常數的影響

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

(2) 立體電子效應對 polyproline 構形穩定度的影響

Raines 研究團隊利用一系列 oligopeptide (Pro)₁₀、(Hyp)₁₀、(Flp)₁₀、(flp)₁₀ 研究立體電子效應對 polyproline 構形穩定的影響，發現 (Hyp)₁₀、(Flp)₁₀ 可以形成很穩定的 PPII 構形，反之，(flp)₁₀ 可以形成穩定的 PPI 構形，顯示 $n \rightarrow \pi^*$ interaction 和立體電子效應在穩定 PPII 構形扮演一個很重要的角色⁸。

(3) 立體電子效應影響模擬膠原蛋白的穩定度

由於在膠原蛋白中發現羧脯胺酸 (Hyp) 與水會產生氫鍵^{2, 23} (如圖1-12所示)，所以在過去認為水合作用是造成膠原蛋白 (collagen) 穩定的主要原因，但是關於此論點有人提出不一樣的想法。Raines and coworkers 利用氟原子 (F) 代替氫氧原子 (OH) 做為取代基，因為接在 C 上之 F 不太可能與水分子形成氫鍵，又因為 F 的拉電子能力優於 O，提出立體電子效應是造成膠原蛋白穩定的主要原因之一。

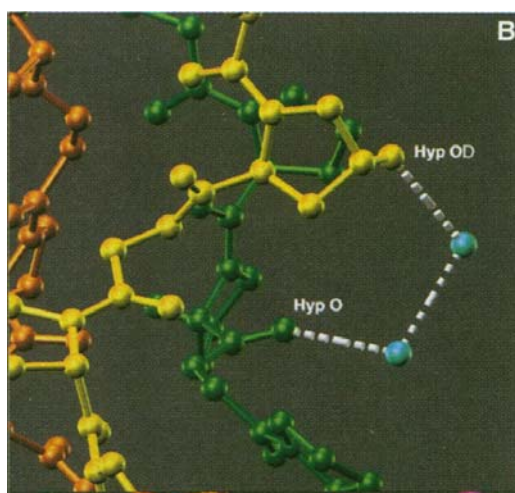


圖1-12 膠原蛋白中羧脯胺酸 (Hyp) 與水產生氫鍵的結晶示意圖

此外，研究膠原蛋白的結晶後發現 proline 在 X 位置是以 C_{γ} -endo (down) 存在，Y 位置是以 C_{γ} -exo (up) 存在 (圖 1-13 所示)²⁴，因為立體電子效應的影響，使得 Hyp、Flp 易以 C_{γ} -exo 構形存在，由表 1-2 的實驗結果顯示，根據 preorganization 理論，以 Hyp、Flp 替換在 Y 位置上正常 Pro 可以形成更穩定的膠原蛋白存在，另一方面，flp 易以 C_{γ} -endo 構形存在，因此 flp 替換在 X 位置上換正常 Pro 也可以形成更穩定的膠原蛋白²⁵。

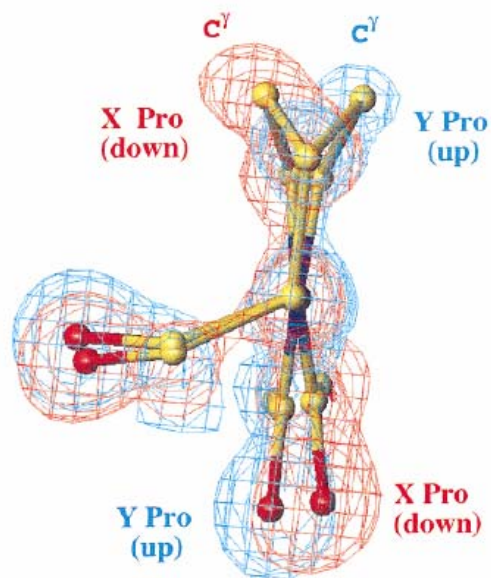


圖 1-13 Pro-Pro-Gly 三股螺旋中脯氨酸的結晶構形²⁴

表 1-2 脯胺酸衍生物對膠原蛋白(XaaYaaGly)₇ 構形穩定度的影響²⁵

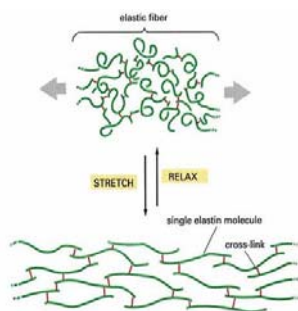
Xaa/Yaa	T _m (°C)	
	(XaaProGly) ₇	(ProYaaGly) ₇
Flp	No helix	45
Hyp	No helix	36
Pro	6-7	6-7
hyp	No helix	No helix
flp	33	No helix

(4) 立體電子效應對彈力蛋白(Elastin)的影響

彈性蛋白 (Elastin) 富含 Proline 以及 Glycine 等氨基酸，賦予組織彈性及抗張力，如圖 1-14(A)所示，彈性蛋白分子在外力的拉扯下會由 random coil 伸長、拉長，去除外力後又會利用 hydrophobic interaction 回復到 random coil 的狀態。

彈性蛋白分子中具有彈性的部分是由重複的 [VPGVG] 序列而來²⁶，當彈性蛋白分子在溫度超過聚集溫度時，其原有的二級結構會由 random coil 轉換形成較整齊的 type II β -turn²⁷，Conticello 的研究藉由利用替換不同 Pro 衍生物(圖 1-14 所示)，比較立體電子效應對模擬的彈性蛋白分子在自身聚集的影響²⁸。

(A)



(B)

Scheme 1^aA. Elastin-1: MGH₁₀S₂GHID₄KHM [(VPGVG)₄VPGLG]₁₆V

B.

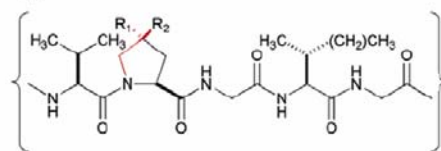
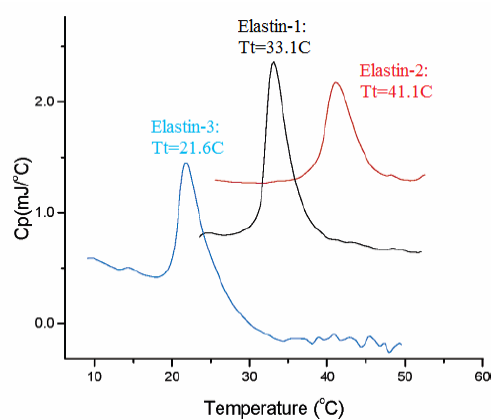
Elastin-1: R₁ = H, R₂ = H; Elastin-2: R₁ = H, R₂ = F; Elastin-3: R₁ = F; R₂ = H

圖 1-14 (A)彈力蛋白分子拉力與張力示意圖 (B)彈性蛋白分子序列示意圖

由實驗所得的結果（圖 1-15 所示），作者認為 Elastin-2 (在脯氨酸的 4S 接上 F 拉電子基)、Elastin-3 (在脯氨酸的 4R 接上 F 拉電子基)所造成的差異是因為立體電子效應對彈力蛋白分子的聚集造成的影響，因為 Elastin-3 所含有的 4R-Flp 會傾向形成 C_γ-exo 構形，符合形成 type II β-turn 的需求²⁹，所以可以以較低的溫度使彈性蛋白產生聚集，另一方面，因為立體電子效應的作用，使得 4S-flp 會傾向形成 C_γ-endo 構形，偏離形成 type II β-turn 的角度範圍，所以造成 Elastin-2 要提高溫度才能進行聚集³⁰⁻³¹。

圖 1-15 彈性蛋白分子 DSC 測量得到 T_m 值

(5) 利用立體電子效應調整 α -螺旋蛋白的結構與穩定度

Proline 缺乏 NH 基 (group)，並是唯一具有 aliphatic ring 的胺基酸，在結構上有較多的限制，因此具有特定結構的結色，例如大多在 turn、loop、secondary structure terminal 位置³²。

Zondlo 利用人造迷你蛋白-Trp Cage (如圖 1-16 所示) 為 model³² 來進行蛋白質設計與穩定性之探討。Trp cage 由 12 個氨基酸所構成 (序列如圖 1-16 所示)，一端是 polyproline helix 與另一端 α -helix 結構所組成的迷你小蛋白，其第 12 個位置為一脯胺酸 (P12)，利用一系列 Proline 衍生物 (如圖 1-17 所示)，探討立體電子效應對 Trp cage 蛋白在結構上與穩定度的影響。



圖 1-16 Trp cage 迷你蛋白結構與序列示意圖

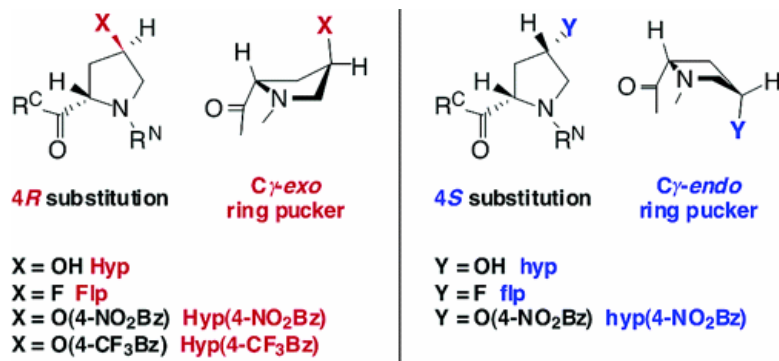


圖 1-17 脯胺酸 C4 位置上接上不同拉電子基的脯胺酸衍生物列表示意圖

在 Trp Cage 蛋白中，P12 為 C_{γ} -*exo* ring pucker 構形，由實驗結果顯示，因為立體電子效應的影響，以偏好形成 *exo* 構形的 proline 衍生物替換時，可以形成更多 α -helix 含量，並得到更穩定的結構，相對的，如果以偏好形成 *endo* 構形的 proline 衍生物替換時，會形成較少 α -helix 含量，並且得到更不穩定的結構(如表 1-3 所示)，顯示可以藉由立體電子效應來調控 Trp Cage 的穩定度與結構。

表 1-3 Trp cage 胜肽的 CD Data (T_m 以及在 25°C 下所得的 Data)³²

Residue 12 of	T_m	$[\theta]_{222}$	$[\theta]_{208}$	$[\theta]_{190}$	λ_{\max}	$[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$
Trp cage	(°C)				nm	
hyp	<0	-4370	-12780	-1490	186	0.34
hyp(4-NO ₂ Bz)	11	-7870	-13870	11250	189	0.57
flp	25	-10570	-15670	16870	190	0.67
Pro	37	-12030	-14110	20820	191	0.85
Hyp	40	-13150	-14160	22840	191	0.93
Flp	42	-15630	-15800	28320	192	0.99
Hyp(4-NO ₂ Bz)	50	-14020	-13250	23110	192	1.96
Hyp(4-CF ₃ Bz)	59	-17250	-14900	30340	192	1.16

1-4 HP7 介紹

由蛋白質 G (Protein G, 如圖 1-18(A)) C 端 B1 區域 (domain) 的 hairpin 序列中具有 hydrophobic interactions 的範圍 (residues 41-56)³³⁻³⁴, 得到 GB1 p 序列胜肽 (peptide), 如圖 1-18 (B)) 所示。對 GB1 p 蛋白來說, 其主要的穩定能 (stability) 是來自序列中 Valine 的 side chain 和 Trp (W)、Tyr (Y)、Phe (F) 的 aromatic ring 所形成的 hydrophobic cluster 有關。Cochran 準備一系列 trpzip³⁵, 可以形成更加穩定的 hairpin, 其中, trpzip 4 (如圖 1-18(C) 時所示) 是直接仿照 GB1 p 蛋白, 主要的改變是利用 Trp residue 去替換 hydrophobic 核心 (core) 中的 residue, 利用 W/W 作用 (interaction) 來增加 hairpin 的穩定度。為了增加 hairpin 的穩定度, 經過 loop 位置的設計, Andersen 利用統計 residue 出現的在 turn 的機率, 以及秉持正電 (positively charged)、中性 (neutral) side chain 與負電 (negatively charged) side chain 所形成 solubility consideration, 得到以 NPATGK 序列替代 DDATKT 序列, 可以形成更加穩定的 hairpin³⁶。HP7 (如圖 1-18(D)) 系列 peptide 的 loop 位置也是以相同的方式所設計出來³⁷。關於 GB1 p、Trpzip4 以及 HP7 的序列組成由表 1-4 所示。

HP7 是由 12 個 residues 所組成, 雖然組成的 residues 數目不多, 但是卻可以形成一個穩定的 hairpin 結構³⁷, 因為序列中具有 proline 胺基酸, 且目前尚未有人利用 β -hairpin 為研究對象來探討立體電子效應, 所以在這次的研究中, 特地選用 HP7 為 model, 藉以探討立體電子效應對 β -hairpin 的影響。

表 1-4 GB1 p、Trpzip4 以及 HP7 的序列組成³³⁻³⁷

Name	Sequence
GB1 p	GEWTY-DDATKT-FTVTE
Trpzip4	GEWTW-NPATGK-WTWQE
HP7	KTW-NPATGK-WTE

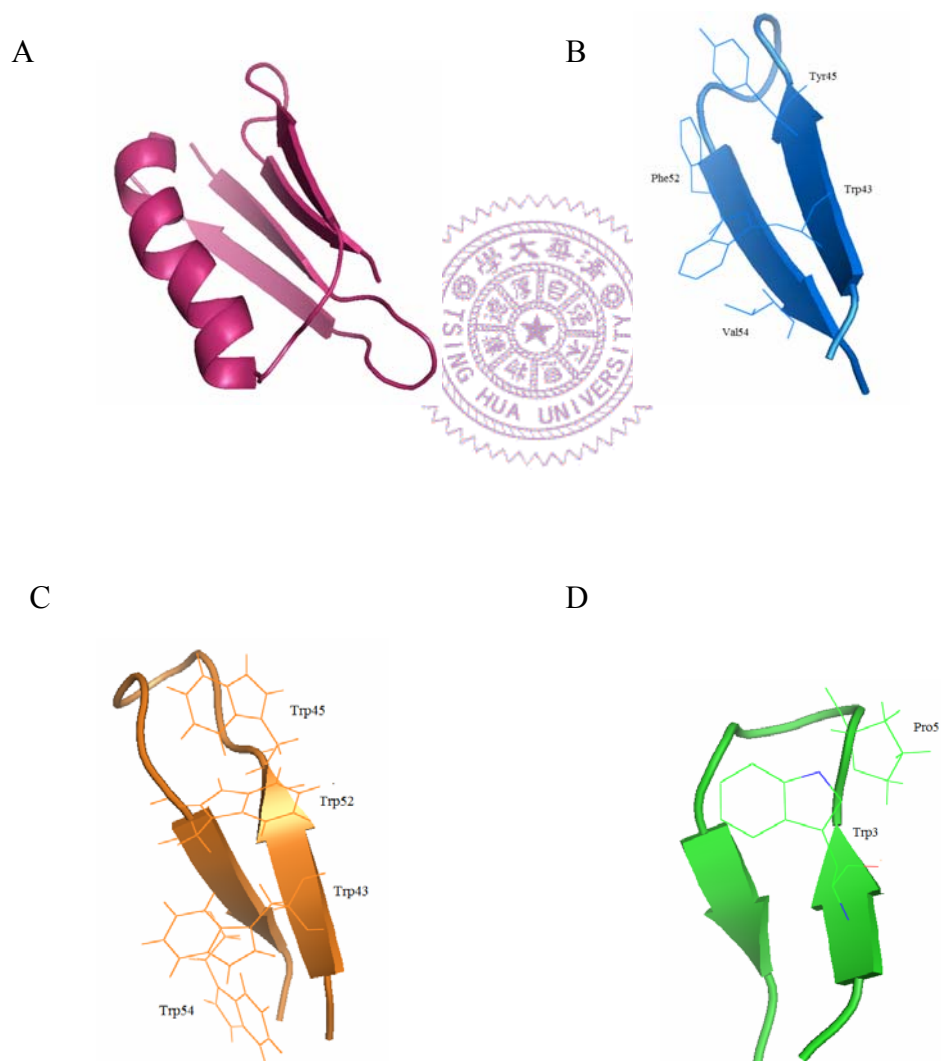


圖 1-18 (A)Protein G B1 domain(PDB ID:1Q10) (B) GB1 p (residues 41-56)(PDB ID: 1Q10) (C) trpzip 4 (PDB ID:1LE3) (D)HP7 (PDB ID: 2EVQ)之結構

1-5 固相胜肽合成(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)介紹

固相胜肽合成方法是將胺基酸的碳端 (C-terminus)連接到環境反應溶劑不會溶解的聚苯乙烯支持物上，裸露出的氨基酸氮端 (N-terminus)與另一氨基酸殘基的碳端耦合形成胜肽鍵 (peptide bond)，此反應程序可以經由聚苯乙烯支持物的過濾與溶劑清洗，簡化反應的分離與純化。

目前合成胜肽常用的方發有 FastMoc、Fmoc與 Boc等三種方式，依使用的活化因子與氨基酸的 N端保護基而分類，在 FastMoc化學方法所使用的活化因子為 HBTU (N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide)，胺基酸 N端的保護基為 Fmoc (fluorenyl- methoxycarbonyl)，Fmoc化學方法與 Boc (*t*-butoxycarbonyl) 化學方法使用的活化因子皆是為 HOBT (N-hydroxybenzotriazole)/ DCC (dicyclohexylcarbodiimide)，至於氨基酸 N端保護基方面，Fmoc方法與 Boc方法不同，Fmoc方法為 Fmoc官能基，而 Boc方法為 Boc官能基。側鏈保護基在去掉 α -氨基的保護基時需要穩定存在，但是在最後去除保護時又要可移除，所以通常側鏈保護基的性質和 α -氨基的保護基性質相反，Fmoc系列用 *tert*-butyl，Boc系列常用 benzyl，另外隨著側鏈的不同，適當的側鏈保護基也會跟著改變。

在最後移除側鏈保護基時 benzyl 使用 HF (氫氟酸)或是 TFMSA (trifluoromethanesulfonic acid) 移除，*tert*-butyl使用 TFA (trifluoroacetic acid) 移除，Boc保護基在酸性條件下移除，穩定於鹼性和氫化催化反應，酸性條件通常

用 TFA-CH₂Cl₂、HCl、HBr 或是其他酸。Fmoc 保護基在溫和鹼性環境下移除：

diluted liquid ammonia、ethanolamine、morpholine 或是 piperidine。

Fmoc-胺基酸碳端之羥基先用 DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) 去掉氫後，用 HBTU 活化成 Fmoc-amino acid HOBt ester (如圖 1-19)，通常在反應器中用 piperidine 將 Fmoc-peptide-resin 上的 Fmoc 官能基去除，接著將 Fmoc-amino acid HOBt ester 與已經去除 Fmoc 官能基之胜肽樹酯進行耦合反應 (如圖 1-20)。

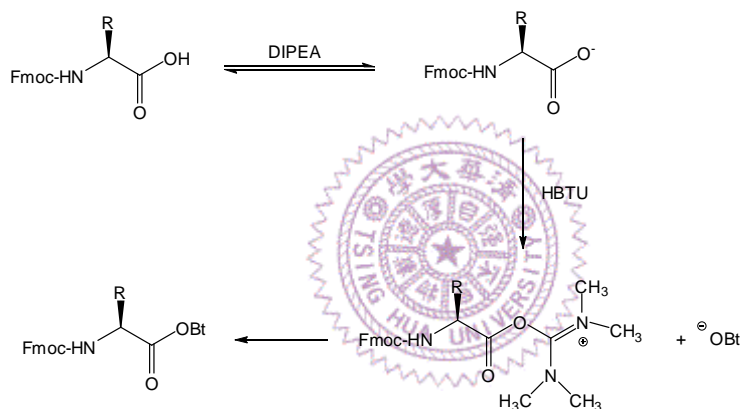


圖 1-19 Fmoc-胺基酸碳端之羥基用 HBTU 活化成 Fmoc-amino acid HOBt ester

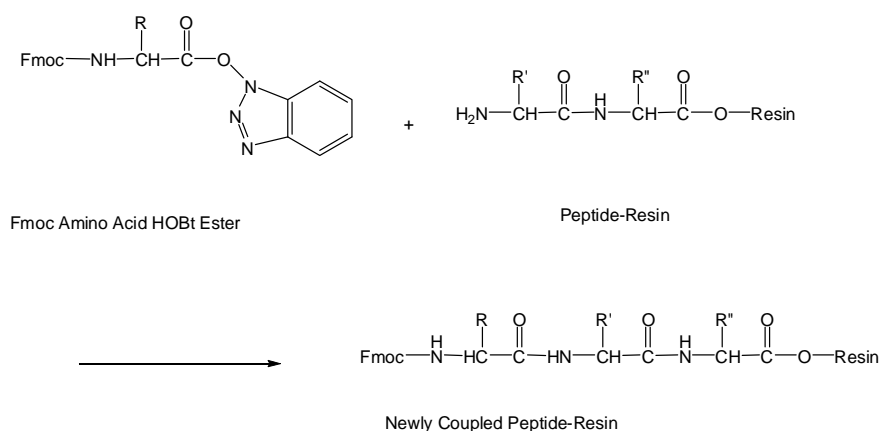


圖 1-20 Fmoc-amino acid HOBt ester 與去除 Fmoc 官能基之胜肽樹酯進行耦合反

應胜肽合成儀將含有保護基的氨基酸經由活化、耦合、去保護基等過程將接於固相樹脂上，其整個合成流程（如圖 1-21 所示）。

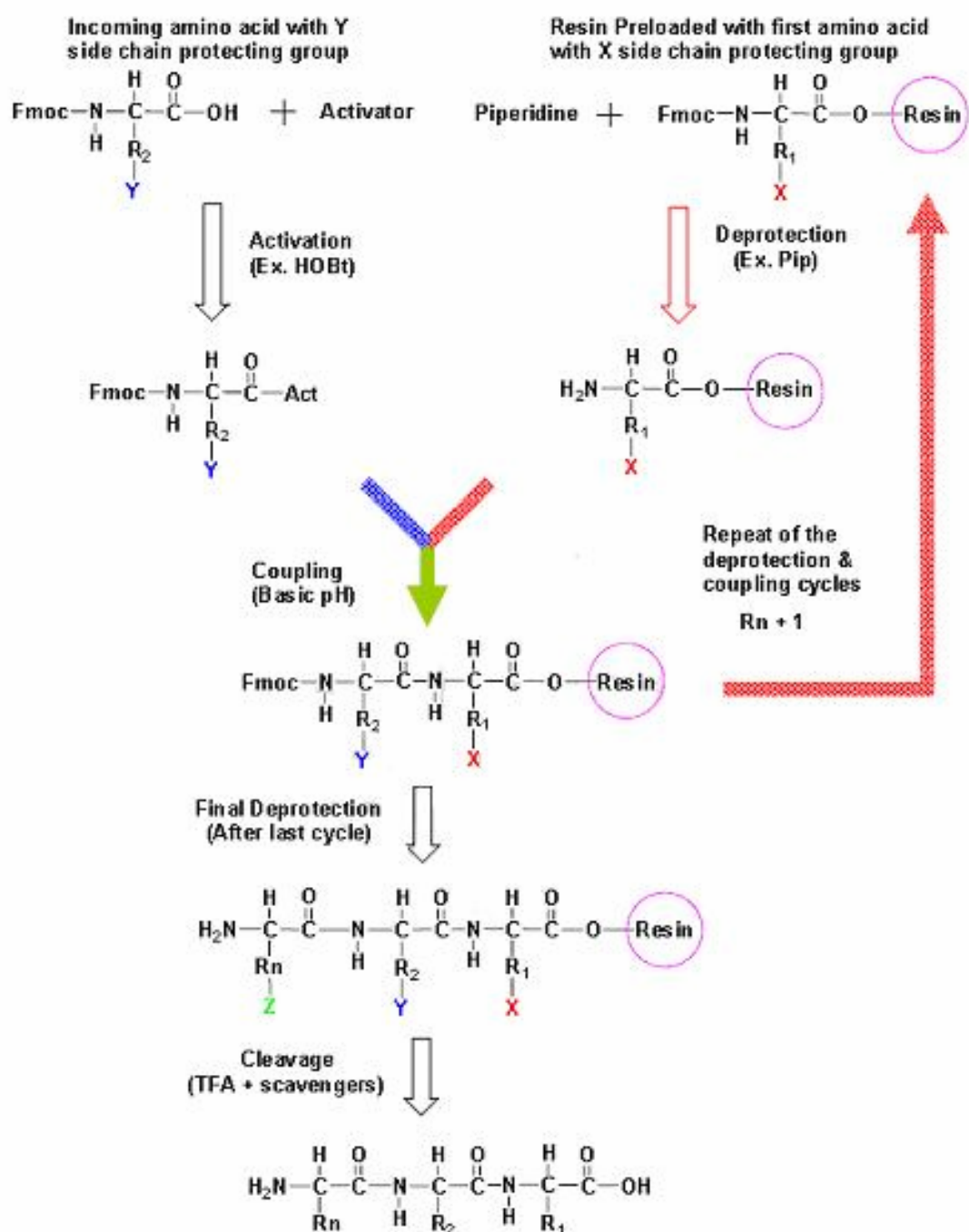


圖 1-21 胜肽合成儀將氨基酸經由活化、耦合、去保護基等過程得胜肽的示意圖

1-6 圓二色光譜(Circular dichroism spectroscopy, CD)

圓二色光譜是一個快速且簡易研究具有圓二色物質的結構變化的重要技術，常應用於鑑定蛋白質的結構與變化、判別藥物的鍵結性、探討醣類反應性等生物化學和結構生物的研究。

圓二色光譜測量具有光學活性 (optically active) 或對掌性 (chiral) 樣品對左旋 (left-) 與右旋 (right-circularly polarized light) 吸收度的差異，主要分為紫外光區 (190-300 nm, ECD) 的電子躍遷圓光色光譜與紅外光區 (400-4000 cm^{-1} , VCD) 的分子振動圓二色光譜。目前在生物分子結構的研究中，以電子躍遷圓二色光譜為主，特別是蛋白質、去氧核糖核酸等有機物質，其光學構形常隨環境的溫度、酸鹼值的不同而變化，研究圓二色光譜的變化，有機會觀察到光學構形改變的過程和特性。

圓二色光譜儀就是測量左、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。實驗室的圓二色光譜常以微度 (mdegrees) 或橢圓性 (θ) 表示訊號強度，對蛋白質而言，均殘基橢圓性 (mean residue ellipticity, MRW, 單位: $\text{degree}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$) 可由下面公示求得：

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \times 10}{C \times N \times l}$$

其中，C 代表肽的莫耳濃度 (M)，N 代表 residue 的數目，l 代表路徑長 (cm)。

化學分子電子躍遷所涵蓋的範圍很廣，主要包括近紫外光區 (Near UV, 250-300 nm)、遠紫外光區 (Far UV, 190-250 nm)，以及真空紫外光區 (Vacu UV,

(<190 nm)。如圖 1-22 所示，根據所看波長的範圍，可以分析不同結構的資訊，

以蛋白質為例，在 300 nm 以下為的胜肽鍵和側鏈芳香團的電子躍遷，以及在

300-700 nm 之間由蛋白質輔基等外在發光基團所誘發產生的訊號。

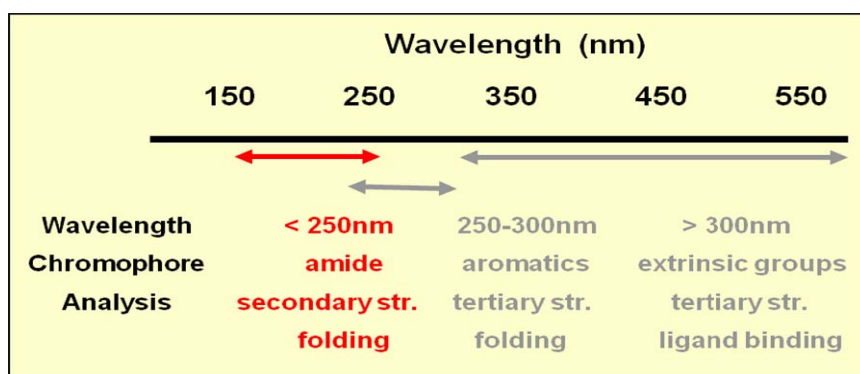


圖 1-22 各波長範圍可以分析不同結構的資訊

其中 250 nm 以下的圓二色光譜包含蛋白質的二級結構的詳細資訊，例如 α 螺旋結構在 222 和 208 nm 處有兩個負值譜帶， β -摺板的蛋白質在約 217 nm 有一個小且負值得譜帶，且於約 195 nm 附近有一個正值的吸收譜帶（如圖 1-23 所示）。

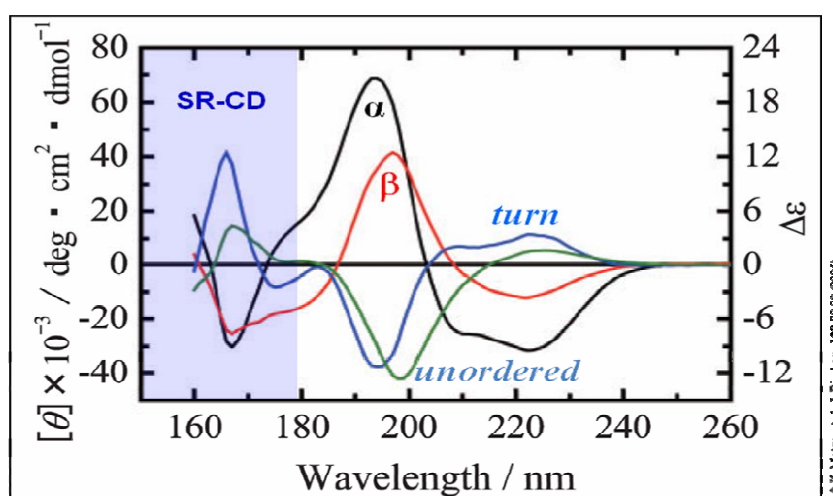


圖 1-23 圓二色光譜中蛋白質的二級結構資訊

1-7 研究方向

因為膠原蛋白是由三股 PPII 螺旋所組成，且在很多摺疊與未摺疊狀態的蛋白質中可發現 PPII 螺旋的存在，因此了解 polyproline 結構基礎在本實驗中是很重要的目標。在過去十幾年間，PPII 已經廣泛的被研究，但是造成 PPII 結構穩定的原因尚未清楚， $n \rightarrow \pi^*$ interactions 已被提出對於穩定 PPII 結構具有一個很重要的角色，此外，藉由研究小的胜肽 (peptide) 已經顯示立體電子效應對於 polyproline 結構會造成很大的影響，所以在本研究中，藉由準備 host-guest 胜肽，以定量的方式去探討立體電子效應對於 polyproline 在 PPI 與 PPII 結構轉換間活化能影響的差異。

另外，立體電子效應已被證實對很多蛋白質的結構與穩定性會造成影響，因此，本實驗的另一目的就是探討立體電子效應對於 β -hairpin 結構的蛋白質造成的影響，使我們對於此一效應在蛋白質結構中所扮演的角色有更進深一層的了解。

第二章 實驗部分

2-1 儀器

1. 圓二色光譜儀 Circular Dichroism (CD) AVIV Model 410 型:使用路徑長為 1mm、1cm 之 cuvette。

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: Termo BioBasic-18 (C₁₈)

3. 核磁共振光譜儀(NMR): Varian Inova 500 NMR Spectrometer，此部份之分析工作委託清華大學貴儀中心譚惠琪小姐代測。

4. 自動胜肽合成儀Automated Peptide Synthesizers PS-3 (Protein Technologies, Inc.)

5. 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，此部分之分析委託交通大學貴儀中心代測。

6. 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。

7. 離心機: Hsiangtai，型號為CN-2060。

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

9. 螢光光譜儀 (Fluorescence Spectrophotometer): HITACHI 的 F-4500 FL

10. 超高磁場核磁共振儀(600 MHz) : Bruker AVANCE NMR

11. 特高磁場核磁共振儀(700MHz) : VARIAN 700 NMR

2-2 藥品

H-Hyp-OH : Advanced ChemTech

Boc anhydride : Alfa Aesar

Potassium bisulfate (KHSO_4) : Riedel-de Haën

CsCO_3 : Alfa Aesar

Benzyl bromide : Alfa Aesar

Methanol (MeOH) : ECHO

Acetone : Fluka

CH_3I : Riedel-deHaen

Ag_2O : Alfa Aesar

Morph-DAST : Aldrich

4 N HCl/dioxane : Aldrich

FmocOSu : Novabiochem

Sodium bicarbonate (NaHCO_3) : Riedel-de Haën

Sodium chloride (NaCl) : A.R.grade

Magnesium sulfate anhydrous(MgSO_4) : Showa

Pd/C : Aldrich



Acetyl chloride : Alfa Aesar

Chloroform (CH₃Cl) : J. T. Baker

2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hezafluorophosphate (HBTU):

Advanced ChemTech

1H-hydroxybenzotriazol (HOBT) : Chem-Impex

Methyl tert-butyl ether : Mallinckrodt

Acetic anhydride: Sigma-Aldrich

Fmoc-Pro-OH : Fluka

Fmoc-Gly-OH : Fluka

Fmoc-Tyr(tBu)-OH : Fluka

Fmoc-Lys(Boc)-OH : Advanced ChemTech

Fmoc-Thr(But)-OH: Advanced ChemTech

Fmoc-Try-OH : Advanced ChemTech

Fmoc-Asn(Trt)-OH : Advanced ChemTech

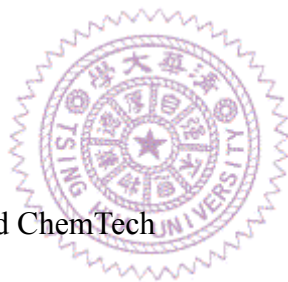
Fmoc-Hyp(tBu)-OH : Advanced ChemTech

Fmoc-Ala-OH : Advanced ChemTech

Fmoc-Glu(Obut)-OH : Advanced ChemTech

Wang resin with preloaded Tyr : Advanced ChemTech

Rink amide MBHA resin : Novabiochem



Piperidine : Aldrich

N,N-Dimethylformaamide (DMF) : Fisher

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

Triisopropylsilane 98 % : Alfa

Trifluoroacetic acid (TFA) : Alfa Aesar

Acetonitrile (ACN) : TEDIA

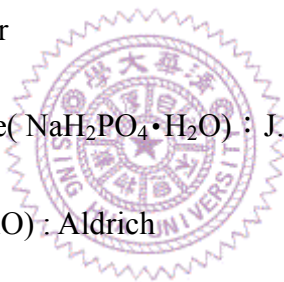
Formic acid (HCOOH) : J. T. Baker

Deuterium oxide (D₂O) : Aldrich

Hydrochloric (HCl) : J.T. Baker

Sodium phosphate monohydrate(NaH₂PO₄•H₂O) : J.T. Baker

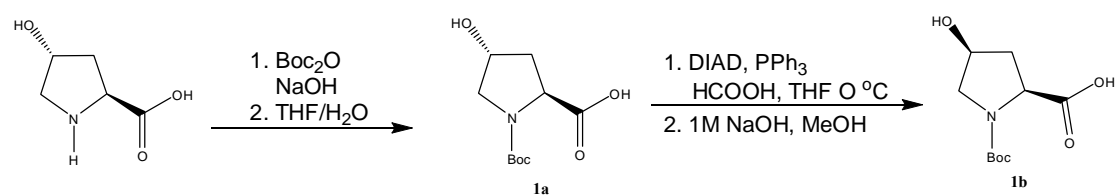
Trimethylamine N-oxide (TMAO) : Aldrich



2-3 化合物之合成與鑑定

本研究中利用一系列脯氨酸衍生物來合成胜肽進行實驗研究，除了 Fmoc-(4R,2S)-fluoroproline 與 Fmoc-(4R,2S)-tBu-hydroxyproline 化合物的獲得經由購買之外，其他的 Fmoc-proline 衍生物的取得皆由實驗室所合成。Boc-(4R,2S)-4-hydroxyproline、Boc-(4S,2S)-4-hydroxyproline 化合物（此部分由林育如同學進行）的合成藉由 **Scheme 1** 步驟來完成，Fmoc-(4R,2S)-methoxyproline、Fmoc-(4S,2S)-methoxyproline 化合物（經由 **Scheme 2** 步驟）來完成合成步驟，Fmoc-(4R,2S)-fluoroproline 化合物（經由 **Scheme 3** 步驟）來完成合成，此外，Fmoc-(4S,2S)-TBSMT-hydroxyproline 化合物是由實驗室林育如同學所合成。

Scheme 1



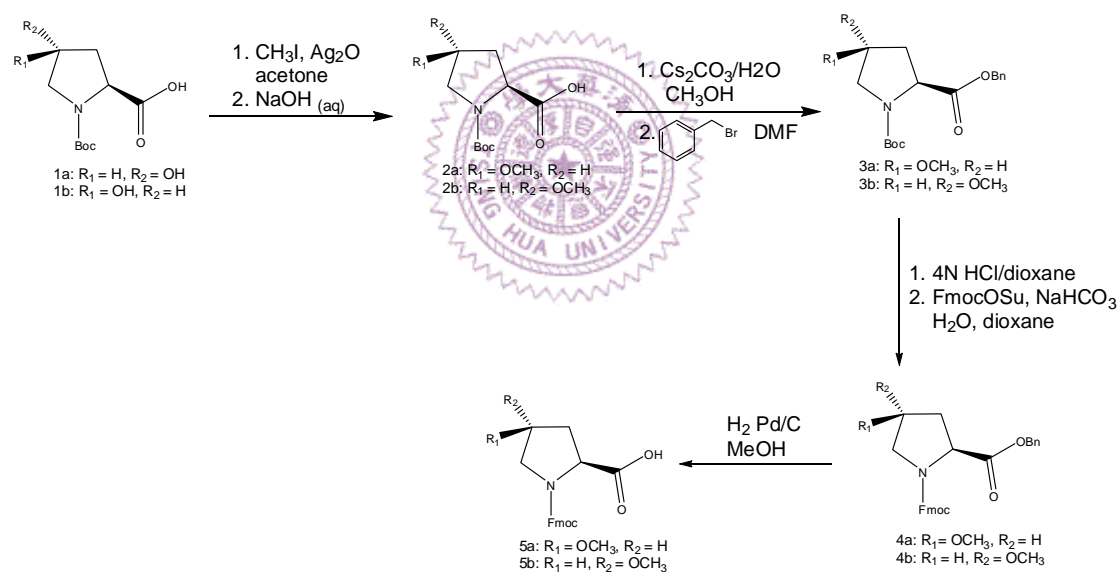
2-3-1 化合物 Boc-(4R,2S)-hydroxyproline (1a)(Boc-Hyp-OH)之合成

取起始物 H-Hyp-OH (5.0 g, 38.1 mmol) 溶於 60 mL 的 2:1 THF/ H_2O 中，再加入 40 mL 10% (w/v) 氫氧化鈉以及 Boc anhydride (10g, 45.72 mmol)，此反應溶液在室溫下攪拌 overnight。反應完成後利用迴轉濃縮儀將 THF 抽乾，得到殘留

的油狀物後，將其溶於 EtOAc 中，利用 10% (w/v) KHSO₄ 調整溶液的 pH 值到 pH = 2，利用 EtOAc 進行萃取 (3 × 50 mL)，收集有機層後，再利用水以及鹽水進行萃取，收集有機層後用無水硫酸鎂除水後過濾後濃縮，得到產物 Boc-Hyp-OH (產率 7.1 g, 80%)。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 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).

Scheme 2



2-3-2 化合物 Boc-(4R,2S)-methoxyproline (2a) (Boc-Mop-OH)之合成

將起始物 Boc-Hyp-OH (1a)與 CH₃I (3.8 mL, 60.6 mmol)以丙酮作為溶劑在圓底瓶中攪拌混合後，加入 Ag₂O 後在氮氣環境下反應攪拌兩天。反應完後將混合物過濾，將濾液濃縮去除溶劑後在真空環境下持續抽 1 小時，再將產物加入

NaOH (0.72 g)水溶液中，在室溫下攪拌 overnight。再利用 6 N HCl 將溶液調整至 pH = 1，利用 CH₂Cl₂ (3 × 50 mL)萃取後，收集有機層再以無水硫酸鎂除水後將濾液濃縮後，利用 silica gel 做管柱層析純化(以沖提液 CH₂Cl₂ : MeOH = 95 : 5)，得產物 Boc-Mop-OH (產率: 0.9 g, 21%)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 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).

2-3-3 化合物 Boc-(4S,2S)-methoxyproline (2b) (Boc-mop-OH)之合成

取起始物 Boc-hyp-OH，利用與化合物(2a)類似的方法進行，得到產物 Boc-mop-OH (產率: 1.0 g, 24%)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 4.40-4.33 (t, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.69 (s, 0.4H), 3.52-3.49 (m, 1.6H), 3.33 (s, 3H), 2.75-2.73 (m, 0.7H), 2.34-2.01 (m, 1.3H), 1.50-1.20 (m, 9H).

2-3-4 化合物 Boc-(4R,2S)-methoxyproline benzyl bromide (3a) (Boc-Mop-OBn)之合成

將 Boc-Mop-OH 與 MeOH 在冰浴環境下混合攪拌，另外取 Cs₂CO₃ 與水在

冰浴環境下混合後，加到起始物溶液中在室溫下混合攪拌五到十分鐘，濃縮去除水分。濃縮完後得到的油狀物在冰浴下加入 DMF，再通入氮氣，在氮氣與冰浴環境中加入 Benzyl bromide 後，於室溫下攪拌 overnight。隔天，將混合物過濾後收集濾液，濃縮濾液移除 DMF 後得到油狀物，再用 50 mL EtoAc 與其混合並以 H₂O 萃取 (3 × 50 mL)，收集有機層後以無水硫酸鎂除水後過濾，濃縮後得到產物 Boc-Mop-OBn (產率: 0.8 g, 67%)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.34 (m, 5H), 5.28-5.07 (m, 2H), 4.50 (s, 1H), 4.40-4.36 (t, 0.6H), 4.34-4.30 (t, 0.4H), 3.97-3.95 (m, 1H), 3.74 (m, 0.4H), 3.63-3.58 (m, 1H), 3.56-3.48 (m, 0.6H), 3.32 (s, 3H), 2.37-2.29 (m, 1H), 2.15-2.01 (m, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.43 (s, 6H).



2-3-5 化合物 Boc-(4S,2S)-methoxyproline benzyl bromide (3b) (Boc-mop-OBn)

之合成

利用與化合物(3a)類似的方法進行，得到產物 Boc-mop-OBn (產率: 0.8 g, 59 %)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃, two rotamers): δ 7.21-7.14 (m, 5H), 5.16-5.14 (m, 0.4H), 5.05-4.94 (m, 1.6H), 4.37-4.35 (m, 1.4H), 4.25-4.22 (m, 0.6H), 3.80-3.78 (m, 1H), 3.53-3.50 (m, 0.5H), 3.44-3.40 (m, 1.5H), 3.08 (s, 1.7H), 3.04 (s, 1.3H), 2.20-2.11 (m, 2H), 1.43 (s, 3H), 1.24 (s, 6H).

2-3-6 化合物 Fmoc-(4R,2S)-hydroxyproline benzyl ester (4a) (Fmoc-Mop-OBn)

之合成

先將起始物溶在 10 mL 的 Dioxane 中後通入氮氣，在氮氣環境中，再加入 20 mL 的 4 N HCl/dioxane 混和攪拌，反應約 1-1.5 小時後，利用迴轉濃縮儀移除 Dioxane 後，加入 Dioxane 與水混合後，再加入 FmocOSu (0.76 g, 2.24 mmol) 與 NaHCO₃ (0.38g, 4.48 mmol)，攪拌反應 overnight 後，利用迴轉濃縮儀濃縮後以 EtOAc 溶解，並以 H₂O 萃取 (3 × 50 mL)後，收集有機層並以無水硫酸鎂除水後過濾，收集濾液濃縮後，做 silica gel 管柱層析純化（以沖提液 EtOAc: Hexane = 1 : 1），得到產物 Fmoc-Mop-OBn（產率：0.6 g, 55%）。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.30 (m, 13H), 5.25-5.05 (m, 2H), 4.58-4.51 (m, 1H), 4.42-4.38 (m, 1H), 4.34-4.24 (m, 1H), 4.14-4.10 (m, 1H), 4.06-4.03 (m, 1H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.68-3.64 (m, 1H), 3.23 (s, 3H), 2.46-2.36 (m, 1H), 2.10-2.08 (m, 1H).

2-3-7 化合物 Fmoc-(4S,2S)-hydroxyproline benzyl ester (4b) (Fmoc-mop-OBn)

之合成

利用與化合物(4a)類似的方法進行，得到產物 Fmoc-mop-OBn（產率：0.6 g, 54%）。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃, two rotamers): δ 7.51-7.31 (m, 13H), 5.24-5.09 (m, 2H),

4.58-4.50 (m, 1.4H), 4.35-4.28 (m, 2.6H), 4.13-4.09 (m, 1H), 3.98-3.93 (m, 1H),
3.66-3.64 (m, 1H), 3.18 (s, 1.7H), 3.16 (s, 1.3H), 2.40-2.20 (m, 2H).

2-3-8 化合物 Fmoc-(4R,2S)-methoxyproline (5a) (Fmoc-Mop-OH) 之合成

將起始物 Fmoc-Mop-OBn (0.6 g, 1.28 mmol) 溶於約 30 mL 的 MeOH 中，通入氮氣，加入 Pd/C (0.06 g) 後，再通入 H₂，在室溫下反應約 3 小時後，利用 Celite 過濾，收集濾液後濃縮，進行管柱層析純化(以 EtOAc/CH₃OH/HCOOH (99:1:0.1) 為沖提液)，得到產物 Fmoc-Mop-OH(產率:0.4 g, 48%)。

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 390.12 ([M+Na⁺]); 390.4 ([M+Na⁺], calcd.).

2-3-9 化合物 Fmoc-(4S,2S)-methoxyproline (5b) (Fmoc-mop-OH) 之合成

利用與化合物(5a)類似的方法進行，得到產物 Fmoc-mop-OH (產率:0.4 g, 66 %)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.75-7.24 (m, 8H), 4.48-4.46 (m, 1.6H), 4.37-4.35 (m, 1.4H), 4.26-4.17 (m, 2H), 3.96 (s, 1H), 3.64-3.56 (m, 2H), 3.3-3.28 (m, 1H), 3.27 (m,

3H), 2.38-2.75 (m, 1H), 2.74-2.07 (m, 1H). ESI-MS: m/z 390.12 ($[M+Na^+]$); 390.4 ($[M+Na^+]$, calcd.).

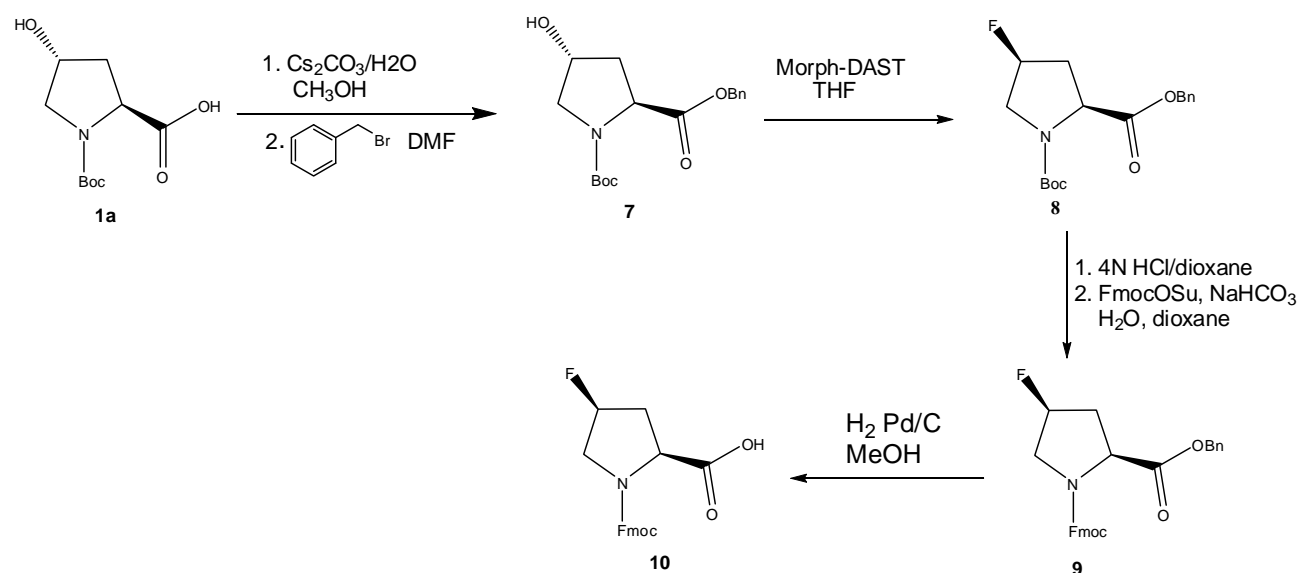
2-3-10 化合物 N-(2-Acetyl)-(2S,4R)-4-methoxyproline methyl ester

(2-Ac-mop-OMe) (6)之合成

將反應物 Boc-mop-OH (300 mg, 1.22 mmol)在冰浴的環境中加入 MeOH (37.5 mL)，再將 Acetyl chloride (37.5 mL)慢慢加入，在氮氣環境下，使反應溶液回復至室溫後，反應約 7 小時。反應後，利用迴轉濃縮儀移除溶劑，在真空環境下抽 1 小時。之後加入 60 mL 的 CH_2Cl_2 以及 N,N-Dimethylaminopyriden (1500 mg, 11.5 mmol)，並於混和液中再慢慢加入 acetyl chloride (1 mL)，在氮氣及室溫環境下，室溫反應約 24 小時。再加入 MeOH (15 mL) quench 反應，濃縮後溶解在 CH_2Cl_2 (50 mL)，並以 10% (w/v)檸檬酸萃取，收集的水層再以 CH_2Cl_2 萃取，收集有機層以無水硫酸鎂除水後濃縮，進行管柱層析時先以 EtOAc/ Hexane (1:1) 為沖提液將副產物移除，在以 EtOAc/MeOH (94 : 6)將產物分離出來，得到產物 Ac-mop-Ome (約 20 mg)。

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, two rotamers): δ 4.67-4.65 (t, 1H), 4.20(s, 0.7H), 4.66-4.14 (m, 0.3H), 3.79-3.78 (m, 1H), 3.76-3.74 (m, 2H), 3.59-3.55 (m, 1H), 3.28 (s, 2.1H), 3.26 (s, 0.9H), 2.43-2.34 (m, 2H), 2.14 (s, 2.2 H), 2.07 (s, 0.8H). ESI-MS: m/z 224.16 ($[M+Na^+]$); 224 ($[M+Na^+]$, calcd.).

Scheme 3



2-3-11 化合物 Boc-(4R,2S)-hydroxyproline benzyl bromide (7) (Boc-Hyp-OBn)之

合成

取起始物 Boc-Hyp-OH (4.0 g, 17.2 mmol) 利用與化合物 (3a) 類似的方法進行，得到產物 Boc-Hyp-OBn (產率: 5.3 g, 95%)。

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.37-7.35 (m, 5H), 5.25-5.14 (m, 2H), 4.50-4.41 (m, 2H), 3.62-3.56 (m, 1.3H), 3.45-3.43 (m, 0.7H), 2.32-2.23 (m, 1H), 2.08-2.03 (m, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.33 (s, 6H).

2-3-12 化合物 Boc-(4S,2S)-fluoroproline benzyl bromide (8) (Boc-flp-OBn)之合成

將起始物 Boc-Hyp-OBn (5.31 g, 16.49 mmol) 在氮氣環境中，以液態氮冰浴

至-78°C後溶在 120 mL 的 THF 中攪拌，之後，慢慢加入 Morph DAST (6.1 mL, 49.56 mmol)，溶液逐漸呈現淡黃色後，於氮氣環境下反應 overnight。反應一整天後，在 0°C 下加入 MeOH quench，再加入 10 mL 的飽和 NaHCO₃，產生劇烈冒泡後，再濃縮除去溶劑。加入 50 mL EtOAc 溶解後，以 50 mL 飽和 NaHCO₃ 與 50 mL H₂O 進行萃取，收集有機層後，以無水硫酸鎂除水後將濾液濃縮後，進行管柱層析純化(以 EtOAc:Hexane=1:1 為沖提液，R_f=0.8)，得到產物 Boc-flp-OBn (產率: 4.67 g, 87%)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ7.34-7.32 (m, 5H), 5.27-5.08 (m, 3H), 4.50-4.43 (s, 2H), 3.88-3.70 (s, 1H), 3.43-3.37 (s, 1H), 2.51-2.47 (s, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.34 (s, 6H).

2-3-13 化合物 Fmoc-(4S,2S)-fluoroproline benzyl bromide (9) (Fmoc-flp-OBn)之合成

將反應物 Boc-flp-OBn (4.67 g, 14.4 mmol) 利用與化合物(4a)類似的方法進行，得到產物 Fmoc-flp-OBn (產率: 3.2 g, 49%)。

¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ7.75-7.31 (m, 13H), 5.22-5.04 (m, 3H), 4.49-4.41 (m, 3H), 3.91-3.84 (m, 0.6H), 3.70-3.50 (m, 1.4H), 2.57-2.51 (m, 0.7H), 2.38-2.27 (m, 1.3H).

2-3-14 化合物 Fmoc-(4S,2S)-fluoroproline (10) (Fmoc-flp-OH)之合成

將反應物 Fmoc-flp-OBn (3.2 g, 7.18 mmol) 利用與化合物(**5a**)類似的方法進行，得到產物 Fmoc-flp-OH (產率: 1.6 g, 64%)。

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ 7.58-7.31 (m, 13H), 5.20-5.15 (m, 1H), 4.54-4.35 (m, 3H), 3.87-3.79 (m, 1H), 3.72-3.57 (m, 1H), 2.59-2.54 (m, 1H), 2.40-2.27 (m, 1H).

ESI-MS: m/z 378.09 ($[\text{M} + \text{Na}^+]$); 378.57 ($[\text{M} + \text{Na}^+]$, calcd.).

2-4 胜肽的合成、純化與鑑定

2-4-1 Host-Guest 聚脯氨酸系列胜肽

利用合成儀合成一系列 host-guest 胜肽 (如表 2-1 所示)，探討 polyproline 在 PPI 與 PPII 之間轉換的活化能差 (activation energy)。

實驗步驟為在反應瓶 (RV) 瓶內放入 0.05 mmole 已有接上 Tyr 的樹脂 (Wang resin)，先利用 DMF 沖洗、浸泡樹脂一小時後。反應瓶內放入 0.2 mmole 的 prolin 以及 proline 衍生物，再放入 0.02 mmole HBTU 和 0.02 mmole HOBt 活化劑，依 C 端往 N 端胺基酸序列排列在合成儀轉盤上。合成儀反應完成後，加入 95% TFA + 2.5% 去離子水 + 2.5 % triisopropyl silane 反應兩小時後，濾掉樹脂可除去樹脂和保護基，將冰的甲基第三丁基醚加入濾液會產生沉澱，利用離心沉澱固體後濾掉液體，重複三次，將大部分 TFA 洗淨後，用水幫浦抽乾醚即可得到模擬胜肽。

合成的胜肽進行純化，大約以每 10 毫克胜肽溶於一毫升去離子水，利用

HPLC 以半製備碳 18 (C₁₈)管柱，純化分離樣品，梯度設定為一小時內含 0.1 % TFA 的乙晴由 0 % 變化到 60 %，而 H₂O 由 100 %降到 40 %。收集純化液再濃縮除去乙晴，然後凍乾除去水分，再藉由質譜鑑定是否得到所要的胜肽。ESI-MS: P11 m/z 1306.9, calcd. 1305.5 ; Hyp-P11 m/z 1322.0, calcd. 1322.5 ; Flp-P11 m/z 1324.4, calcd. 1324.5 ; Mop-P11 m/z 1336.5, calcd. 1337.0 ; hyp-P11 m/z 1322, calcd. 1322.5 ; flp-P11 m/z 1; 1324.4, calcd.1324.5 ; mop-P11 m/z 1336.5, calcd. 1337.0 。

表 2-1 Host-Guest 聚脯胺酸系列胜肽的序列

胜肽(Peptide)	序列(Sequence)
P11	N ₂ H-(Pro) ₁₁ -Gly-Tyr-OH
Hyp-P11	N ₂ H-(Pro) ₅ -Hyp-(Pro) ₅ -Gly-Tyr-OH
Flp-P11	N ₂ H-(Pro) ₅ -Flp-(Pro) ₅ -Gly-Tyr-OH
Mop-P11	N ₂ H-(Pro) ₅ -Mop-(Pro) ₅ -Gly-Tyr-OH
hyp-P11	N ₂ H-(Pro) ₅ -hyp-(Pro) ₅ -Gly-Tyr-OH
flp-P11	N ₂ H-(Pro) ₅ -flp-(Pro) ₅ -Gly-Tyr-OH
mop-P11	N ₂ H-(Pro) ₅ -mop-(Pro) ₅ -Gly-Tyr-OH

2-4-2 HP7 系列胜肽

選用 HP7 為 model，以合成儀合成 HP7 系列胜肽，如表 2-2 所示，藉以探討立體電子效應對 β -hairpin 的影響。

實驗步驟為先在 RV 瓶內放入 0.1 mmole 樹脂 (Rink amide MBHA)，利用 DMF 或 NMP 沖洗、浸泡樹脂一小時。反應瓶內放入 0.4 mmole 的胺基酸，再放入 0.38 mmole HBTU 和 0.38 mmole HOBT 活化劑，依 C 端往 N 端胺基酸序列排列在合成儀轉盤上。為防止已去保護但沒有接上胺基酸的胜肽排序錯誤及增加產率，每五個反應瓶作一次 capping (乙醯化)，最後將 N 端用乙酐乙醯化。合成儀反應完成後，加入 95% TFA+2.5 % 去離子水+2.5 % triisopropyl silane 反應兩小時後，濾掉樹脂可除去樹脂和保護基，將冰的甲基第三丁基醚加入濾液會產生沉澱，離心固體沉澱後濾掉液體，重複三次，將大部分 TFA 洗淨，用水幫浦抽乾醚即可得到模擬胜肽。

合成的胜肽進行純化，大約以每 10 毫克胜肽溶於一毫升去離子水，利用 HPLC 以半製備碳 18(C_{18})管柱，純化分離樣品，梯度設定為一小時內含 0.1% TFA 的乙腈由 0 % 變化到 60 %，而 H_2O 由 100% 降到 40%。收集純化液再濃縮除去乙腈，然後凍乾除去水分，再藉由質譜鑑定是否得到所要的胜肽。ESI-MS: HP7 m/z 1458.6, calcd. 1459.7; Hyp-HP7 m/z 1475.6, calcd. 1475.9; Flp-HP7 m/z 1477.0, calcd. 1477.3; Mop-HP7 m/z 1489.7, calcd. 1489.7; hyp-HP7 m/z 1475.6, calcd. 1475.9; flp-HP7 m/z 1477.0, calcd. 1477.3; mop-HP7 m/z 1489.7, calcd. 1489.7。

表 2-2 HP7 系列胜肽的序列

胜肽	序列(Sequence)
HP7	Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-Pro-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH ₂
Hyp-HP7	Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-Hyp-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH ₂
Flp-HP7	Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-Flp-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH ₂
Mop-HP7	Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-Mop-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH ₂
hyp-HP7	Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-hyp-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH ₂
flp-HP7	Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-flp-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH ₂
mop-HP7	Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-mop-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH ₂

2-5 CD 光譜測量

2-5-1 Host-Guest 聚脯氨酸系列胜肽

首先進行樣品濃度的量測，將樣品溶於 100 % propanol 和 100 % sodium phosphate buffer pH7 後進行 UV 測量在 276 nm 的吸收值，利用 Tyr ($\epsilon = 1450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 的吸收測得樣品的濃度。

進行 CD 測量部分，取原先溶於 100 % 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液，pH 值為 7 的樣品 (PPII 結構) 溶在 95 % 的 propanol，pH 值為 7，濃度為 $100 \mu \text{M}$ ，在 4°C 冰箱冷藏 24 小時後量測 Far-UV CD 光譜，範圍為 195 nm~260 nm，每點偵測時間為 10 秒，在 1-20 天時間裡，每隔一段時間測一次全波長掃描，測量構

形轉換速率。

另一部分，取原先溶於 100 % propanol 的樣品 (呈現 PPI 結構)溶於 90 % 的 20 mM 磷酸鹽緩衝溶液，pH 值為 7，濃度為 60-100 μM ，在 4 °C 量測 Far-UV CD 光譜，範圍是 195 nm~260 nm，每點偵測時間為 10 秒。在 1.5 天時間裡，每隔 74 分鐘測一次 Far-UV CD 光譜，測量構形轉換速率。

2-5-2 HP7 系列胜肽

首先進行樣品濃度的量測，將樣品溶於 potassium phosphate buffer pH6 中進行 UV 測量在 280 nm 的吸收值後，利用 Trp ($\epsilon=5580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 的吸收測得樣品的濃度。

進行 CD 測量部分，配置樣品溶於 sodium phosphate buffer pH 6，在 Far UV (195 nm~260 nm)範圍內，樣品濃度為 30 μM ，在 4 °C、25 °C 下進行全波長掃描 (wavelength scans)，每點偵測時間為 10 秒。在 Near UV 範圍內 (250 nm~320 nm)，配置樣品濃度為 100 μM ，在 4 °C、25 °C 下進行全波長掃描，每點偵測時間為 10 秒。

另外，配置樣品濃度為 15 μM ，固定波長在訊號最強的波長 (通常是 228 nm)，在 2 到 98 °C 之間每 2 度測一次訊號，溫度平衡時間為 2 分鐘，每點偵測時間為 30 秒，測得 melting transitions 曲線。

2-6 2D-NMR 光譜測量

配 22 mM phosphate buffer pH 6 後，配一份溶液包含 90 % 的 22 mM phosphate buffer pH 6 以及 10 % D₂O 共 1mL 的溶液，取 2 mg HP7 系列胜肽加入 600 μL 的上述溶液，再加入 5 μL 的標準品 TSP，送測 600、700 (VARIAN VNMRS-700)，在室溫下測 NOESY 和 TOCSY 光譜，反應條件: NOESY 的 mixing time 為 250 ms，TOCSY 的 mixing time 為 75 ms。

2-7 數據分析

2-7-1 Host-Guest 聚脯胺酸系列胜肽

在 PPII→PPI 轉換實驗中，將不同時間下所測得在 228 nm 的 CD 訊號對時間作圖後可得到類似 exponential decay 的變化圖 (如圖 2-1 所示)，利用一級 exponential decay 公示：

$$\theta(t) = \theta_0 \exp(-kt) + b \quad (2-1)$$

fit 所得到的訊號變化圖，可得到 PPII→PPI 轉換速率。

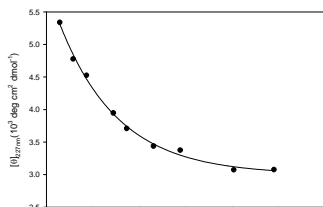


圖 2-1 不同時間下所測得在 228 nm 的 CD 訊號變化圖

其中 $\theta(t)$ 代表在 t 時間時的吸收訊號， θ_0 代表在 $t=0$ 時的 CD 訊號， k 代表 PPII→PPI 的轉換速率， b 為 baseline correction 項。

再進一步進行計算 PPII→PPI 轉換時的活化能差 (如圖 2-2 所示)，， ΔG^\ddagger 代表 PPII→PPI 間的活化能差， $R=8.314$ (J/mole-K)， T 為絕對溫度 (K)。以正常 P11 為基準，得到的 PPII→PPI 的轉換速率 (k_{WT})，與替換 proline 衍生物後的其他胜肽得到的 PPII→PPI 的轉換速率 (k_{mutant})，利用下列公示運算後可得到 mutant 與 wild type 對 PPII→PPI 轉換時的活化能差異 ($\Delta\Delta G^\ddagger$)， A 代表在 $t=0$ 時的速率。

$$k_{WT} = A \exp(-\Delta G_{WT}^\ddagger / RT)$$

$$k_{mutant} = A \exp(-\Delta G_{mutant}^\ddagger / RT)$$

$$\Delta G_{mutant}^\ddagger - \Delta G_{WT}^\ddagger (\Delta\Delta G^\ddagger) = -RT \ln (k_{mutant} / k_{WT}) \quad (2-2)$$

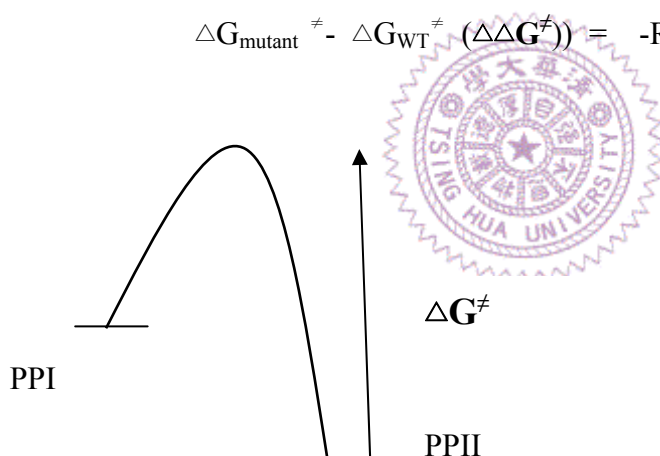


圖 2-2 PPII→PPI 轉換時的活化能差示意圖

同樣的，計算 PPI→PPII 轉換時的活化能，利用相似方法計算，可得到 mutant 與 wild type 對 PPI→PPII 轉換時的活化能差異($\Delta\Delta G^\ddagger$)，但在 PPI→PPII 轉換實驗中，我們是選擇在 214 nm 或是 213 nm 下之 CD 訊號對不同時間作圖，以求得轉換速率。

2-7-2 HP7 系列胜肽

對一個蛋白質而言，在最大值波長下，進行變溫實驗，量測不同溫度之 CD 訊號（圖 2-3 所示），低溫部分的曲線為折疊狀態（Folded State, F），高溫部分的曲線為未折疊狀態（Unfolded State, U）（圖 2-2 所示），在兩個狀態的切線中點和變溫曲線可找到一交界點（midpoint），此點的狀態為 50 % 摺疊狀態（F）和 50 % 未摺疊狀態（U），定義此點的溫度為熔點（melting temperature, T_m ）。

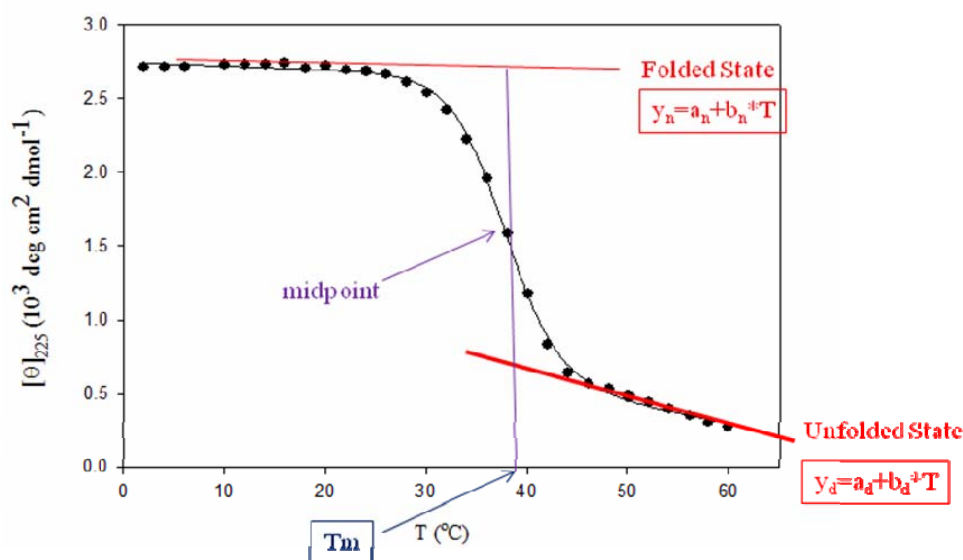


圖 2-3 模擬膠原蛋白在最大吸收波長 225 nm 的 CD 訊號

對一個 two-state folding 的蛋白質而言，熔點（melting temperature, T_m ）的值是可由最大值波長所測得的莫耳橢圓性（molar ellipticity）根據下列方程式所決定：

$$\theta = \frac{(a_n + b_n T)(a_d + b_d T) \exp \frac{(-\Delta G_U^o(T))}{RT}}{1 + \exp \frac{(-G_U^o(T))}{RT}} \quad (2-3)$$

其中蛋白質的穩定度 ΔG_U^o 與溫度之關係由以下之 Gibbs-Helmholtz 方程式所描述：

$$\Delta G_U^o(T) = \Delta H^o(T_m)(1 - T/T_m) - \Delta G_P^o[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad (2-4)$$

$\Delta G_U^o(T)$: 在溫度 T 下時之穩定度。

T_m : 折疊狀態 (F) 轉換到未摺疊狀態 (U) 的中點 (熔化溫度)。

ΔH^o : 在 T_m 時的熱焓變化

ΔC_p^o : 折疊狀態 (F) 和未折疊狀態 (U) 之間的熱含量變化，在決定此系列胜肽

之 T_m 值時，我們使用文獻所報導的 $\Delta C_p^o = 0.1$ 。

a_n 、 b_n : 用來定義折疊狀態 (F) 下訊號與溫度之關係。

a_d 、 b_d : 用來定義為未折疊狀態 (U) 下訊號與溫度之關係。

第三章 實驗結果與討論

第一部分 立體電子效應對聚脯胺酸構形轉換的活化能之影響

合成一系列 host-guest 胜肽， $(\text{Pro})_5\text{-X-(Pro)}_5\text{-Gly-Tyr}$ ，當 X 為脯胺酸以及脯胺酸衍生物（脯胺酸 C4 位置接上拉不同的電子基，OH、F、 OCH_3 基），見表 2-1 所示，探討立體電子效應對聚脯胺酸結構在 PPI 和 PPII 結構轉換間活化能的影響。

3-1 Host-Guest 胜肽的設計

在先前的研究中 $(\text{Pro})_{10}$ 、 $(\text{Hyp})_{10}$ 、 $(\text{Flp})_{10}$ 、 $(\text{flp})_{10}$ 胜肽探討立體電子效應對聚脯胺酸構形的影響，經由熱力學的實驗證明立體電子效應確實會大大影響 polyproline 構形的穩定度，而且 $(\text{Hyp})_{10}$ 和 $(\text{Flp})_{10}$ 在水溶液中可以形成穩定的 PPII 結構，但是在 *n*-propanol 中卻無法轉換成 PPI 結構，為了探討立體電子效應對 $\text{PPI} \leftrightarrow \text{PPII}$ 轉換的動力學實驗，我們設計了一系列 host-guest 胜肽（見表 2-1）。原先的設計是 C 端為 NH_2 且 N 端經過 capping，但因為在 *n*-propanol 無法轉換成 PPI 結構，所以合成具有 free 的 N 及 C 端胜肽，其中在 C 端加入 Gly-Tyr 的目的是為了量測樣品的濃度。

3-2 探討立體電子效應對 mop 構形的影響

一系列的 Ac-Xaa-OMe 分子，當 Xaa 為 Hyp、Flp、Mop、hyp、flp，在先

前的研究中已經被合成來探討立體電子效應對 prolyl 胜肽鍵的影響，所得到的 $K_{trans/cis}$ 比例值顯示於表 3-1，結果顯示在 4R 位置上有拉電子基的存在時會傾向形成 *trans* prolyl 胜肽鍵，但是在 4S 位置上有拉電子基時會傾向形成 *cis* prolyl 胜肽鍵，偏好形成 PPI 或是 PPII 結構與 $K_{trans/cis}$ 有相當大的關係。因目前尚未有 Ac-mop-OMe 的 $K_{trans/cis}$ 值之報導，在本研究中使用了 mop 來取代 Pro，故有此值做為參考是有必要的，所以在本實驗中我們合成 Ac-mop-OMe，並利用 $^1\text{H-NMR}$ 光譜（圖 3-1 所示），來決定 $K_{trans/cis}$ 值之大小。

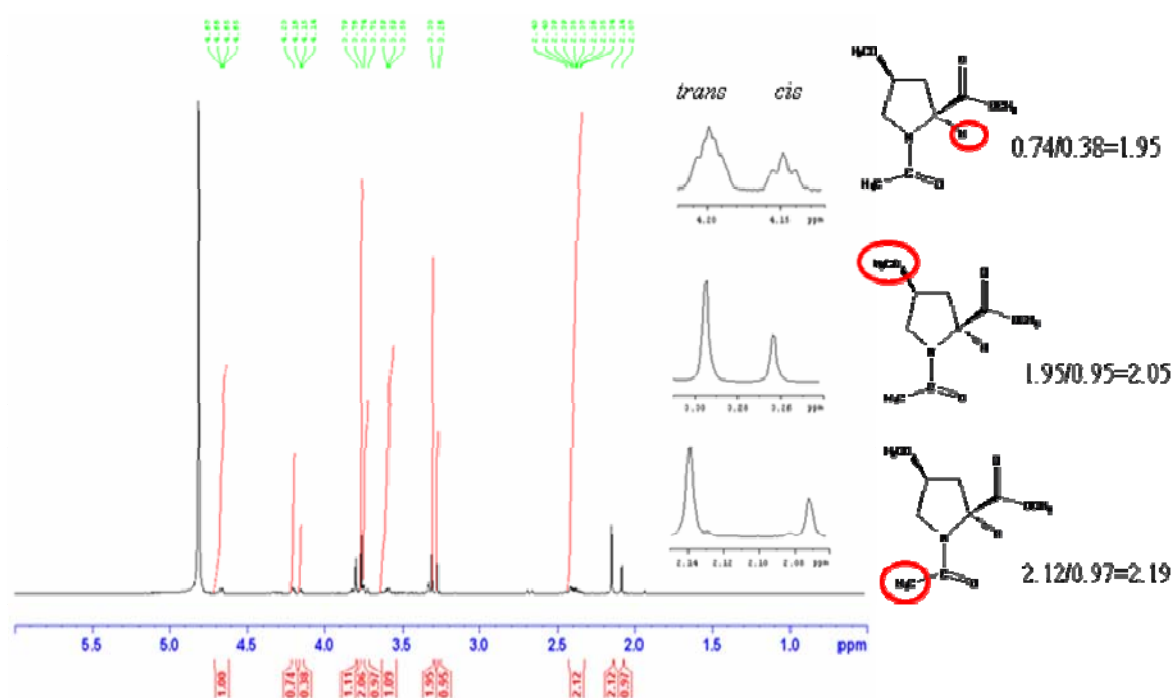


圖 3-1 Ac-mop-OMe 化合物測得 $^1\text{H-NMR}$ 光譜

利用 C^αH 、OMe 與 acetyl group 的 CH_3 的相對 peak 強度，得到 Ac-mop-OMe amide bond 的 *trans* 與 *cis* 比例 $K_{trans/cis}$ 之平均值為 2.1，與

Ac-Pro-OMe 相比 (4.6)得到較小的直，與預期相同，在 4S 位置上有拉電子基存在會因為立體電子效應造成 Ac-mop-OMe 傾向形成 *cis* amide bond。

表 3-1 4*R* 以及 4*S* 位置取代基對脯氨酸 $K_{\text{trans/cis}}$ 的影響^{21、38}

Xaa	$K_{\text{trans/cis}}$ in Ac-Xaa-OMe
Hyp	6.1
Flp	6.7
Mop	6.7
Pro	4.6
hyp	2.4
flp	2.5
mop	2.1



3-3 Host-Guest polyproline 系列胜肽 CD 測量結果討論：

3-3-1 水溶液中之 CD 光譜

將一系列 host-guest 胜肽溶於水溶液中，在 4 °C 環境，進行 Far UV 範圍的全波長測量，所有胜肽得到類似的 CD 光譜，即在 220 nm-230 nm 範圍內有一個正的最大 CD 訊號，並且在 200 nm-210 nm 範圍內有一個負的 CD 訊號存在（圖 3-2 所示），即為形成 PPII 結構的特徵 CD 訊號，證明 polyproline 系列

胜肽在水溶液中皆以 PPII 結構存在，與先前預測 PPII 結構大都存在於水溶液環境相似。polyproline 在水溶液中 CD 測量所得到的相關參數則列於表 3-2。

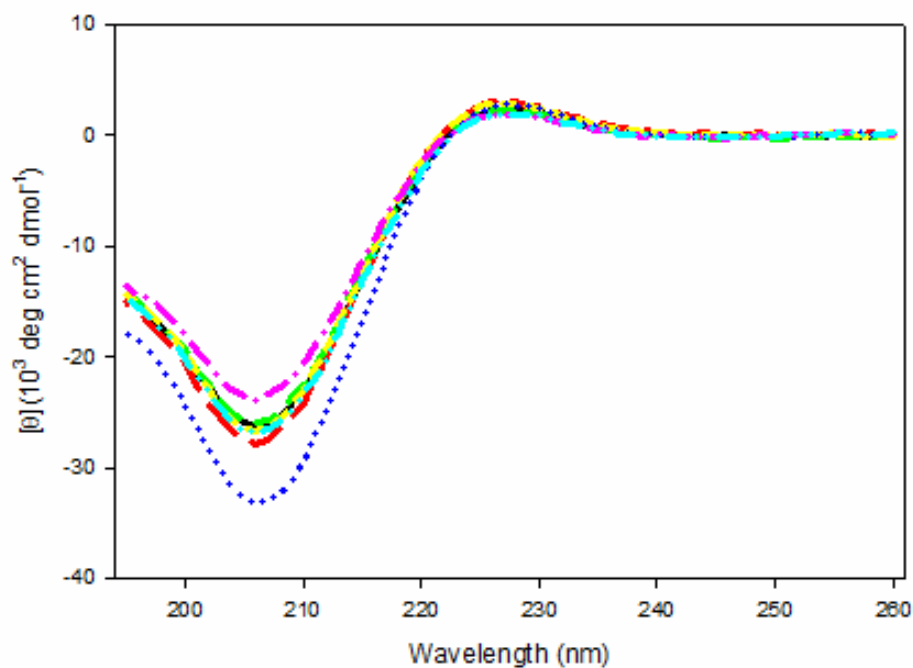


圖 3-2 Host-Guest polyproline 胜肽於水溶液中及 4 °C 時所測得的 CD 光譜，P11(——)，Hyp-P11(——)，Flp-P11(— · —)，Mop-P11(·····)，hyp-P11(·····)，flp-P11(— · —)，mop-P11(·····)。

3-3-2 *n*-propanol 溶液中之 CD 光譜

將一系列 host-guest 胜肽溶於 *n*-propanol 溶液中，在 4 °C 環境，進行 Far UV 範圍的全波長測量，所有胜肽得到一個類似的 CD 光譜，在 215 nm 附近有一個很強的 CD 訊號，並且在 230 nm 附近有一個較弱的負 CD 訊號，即為形成 PPI 結構的特徵 CD 訊號，證明 polyproline 系列胜肽在 *n*-propanol 環境中皆以 PPI

結構存在，與先前預測 PPI 結構會存在於 *n*-propanol 或 butanol 等溶劑環境中相

符。在 *n*-propanol 中所測得 CD 光譜之相關參數，請見表 3-2。

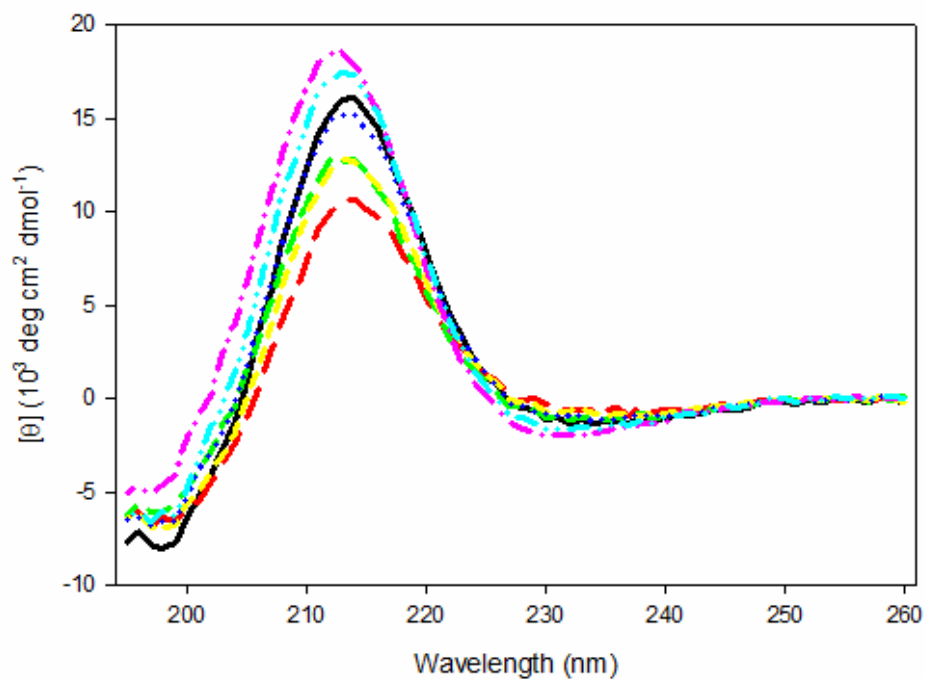


圖 3-3 Host-Guest polyproline 胜肽於 *n*-propanol 中及 4 °C 時所測得的 CD 光譜，

P11(——)，Hyp-P11(- - -)，Flp-P11(- · -)，Mop-P11(- - -)，

hyp-P11(·····)，flp-P11(- · - · -)，mop-P11(- · - · -)。

表 3-2 在 4 °C 環境中，聚脯胺酸系列胜肽所測得之 CD 相關參數

胜肽	buffer		<i>n</i> -propanol	
	λ_{\max}	$[\theta]_{\max}$	λ_{\max}	$[\theta]_{\max}$
		(10 ³ deg cm ² dmol ⁻¹)		(10 ³ deg cm ² dmol ⁻¹)
P11	227	2.37	214	16.1
Hyp-P11	227	3.13	214	10.7
Flp-P11	227	2.36	214	12.8
Mop-P11	227	2.88	213	12.8
hyp-P11	227	2.82	214	15.2
flp-P11	228	1.96	213	18.6
mop-P11	227	1.99	213	17.4

3-4 Host-Guest polyproline 系列胜肽之不同構形轉換速率與活化能比較：

3-4-1 PPII→PPI 轉換速率與活化能差比較

PPII 主要存在於大部分的溶劑系統，但是 PPI 只存在於某些溶劑環境，我們必須選擇一個溶劑系統可以測量 PPII→PPI 轉換，所以我們利用原先溶於 phosphate buffer 環境的胜肽（已形成 PPII 結構的胜肽），將其以 *n*-propanol 稀釋成 95 % (v/v) *n*-propanol 之溶劑系統，使 polyproline 的結構由 PPII 轉換成 PPI。在 18 天內於 4 °C 環境下，每隔一段時間量測 Far UV CD 光譜，利用 PPII

結構在 $\lambda_{\max} = 228 \text{ nm}$ 的特徵訊號變化情形，測量 polyproline 系列胜肽由 PPII 結構轉換形成 PPI 結構的速率。

圖 3-4 為 P11 從水溶液變成 95 % *n*-propanol 後，CD 訊號變化情形，由 CD 訊號變化情形可看到 P11 由原先 PPII 的結構逐漸緩慢的形成 PPI 結構，在 222 nm 位置有一 isobestic point，顯示在轉換的過程中除了 PPI 與 PPII 結構沒有其它結構的出現。將得到的 228 nm CD 訊號對時間做圖會得到一 exponential decay 之曲線 (如圖 3-4 內插圖)，利用公式 $\theta(t) = \theta_0 \exp(-kt) + b$ (2-1) 去 fit 曲線後，可以得到 P11 由 PPII 結構轉換成 PPI 結構的速率常數。

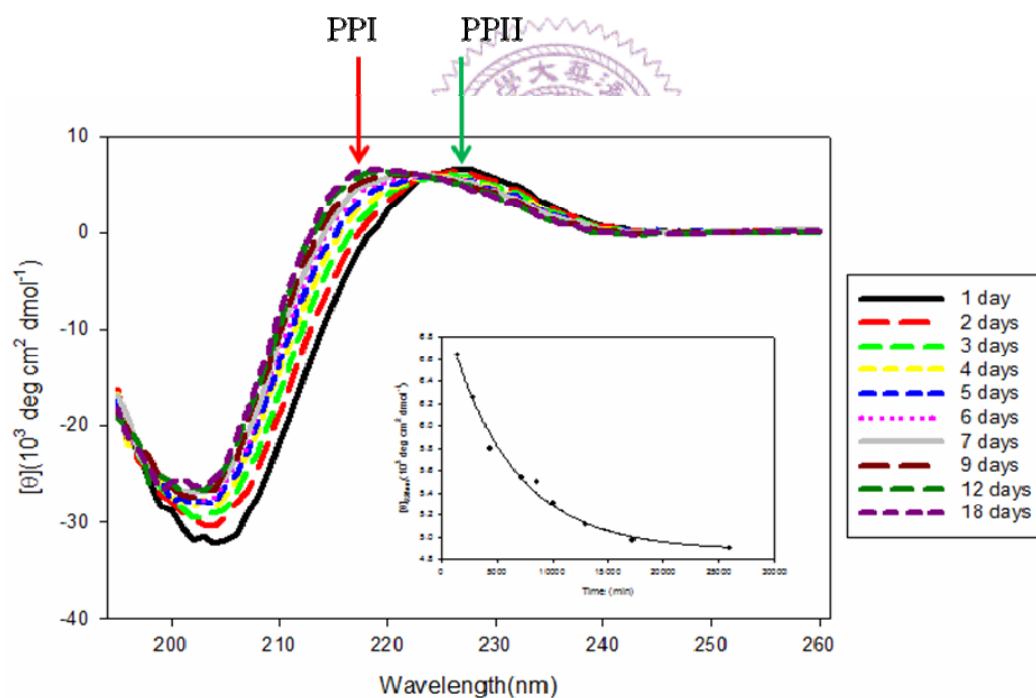
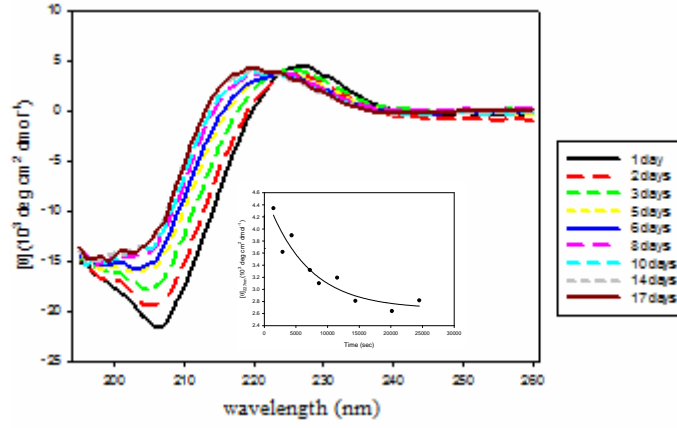


圖 3-4 P11 在 95% *n*-propanol、4°C 時，不同時間下所測得的 CD 光譜

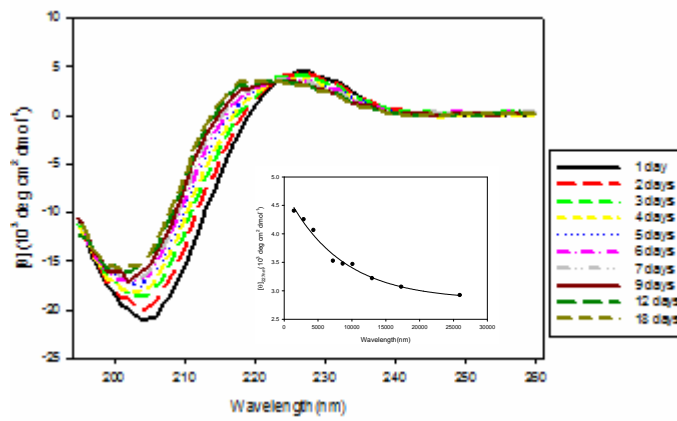
利用 proline 衍生物替換正常 proline 後得到的胜肽，也利用相同的實驗方式進行 CD 量測，得到結果如圖 3-5，其中圖 3-5 依序代表 Hyp-P11、Flp-P11、Mop-P11、hyp-P11、flp-P11、mop-P11 由原先 PPII 的結構逐漸緩慢的形成

PPI 結構的 CD 訊號變化，而內插圖為將得到的 228 nm CD 訊號對時間作圖。

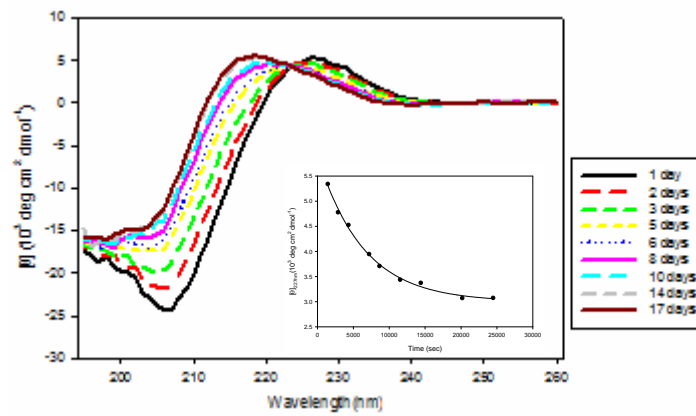
(A) Hyp-P11



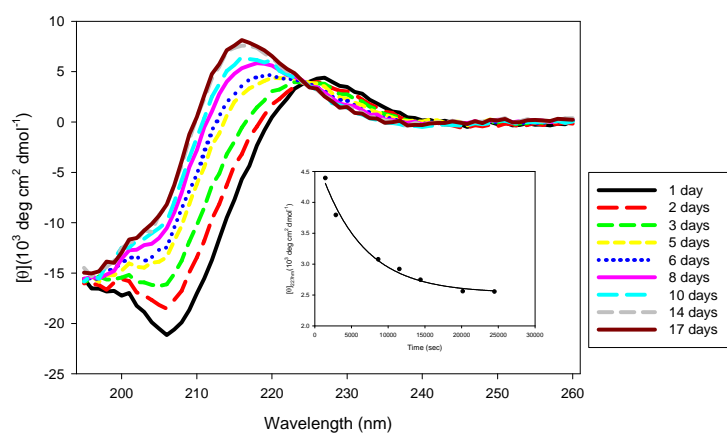
(B) Flp-P11



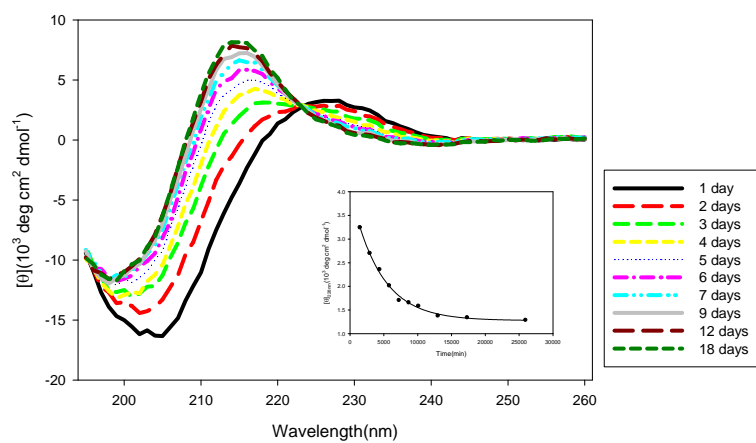
(C) Mop-P11



(D) hyp-P11



(E) flp-P11



(F) mop-P11

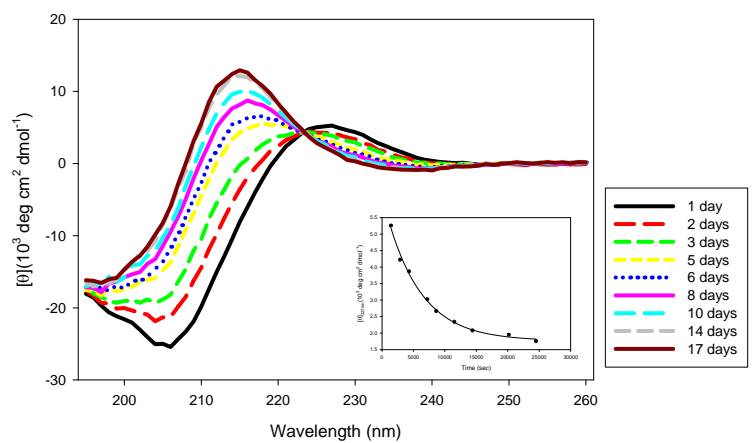


圖 3-5 Host-Guest polyproline 系列胜肽於 95 % *n*-propanol 及 4 °C 不同時間所測得的 CD 光譜

與 P11 所得到的 CD 訊號變化圖相似，host-guest polyproline 系列胜肽也會由原先 PPII 的結構逐漸緩慢的形成 PPI 結構，在 222 nm 位置附近出現也會有 isobestic point，顯示在轉換的過程中除了 PPI 與 PPII 結構沒有其它結構的出現。

利用 PPII 特徵 CD ($\lambda_{\max} = 228 \text{ nm}$) 的訊號隨時間變化曲線，可得到由 PPII 結構轉換形成 PPI 結構的轉換速率(如表 3-3 所示)。以正常的 P11 為基準，比較替換不同 proline 衍生物後，PPII 結構轉換成 PPI 結構時之活化能影響 ($\Delta\Delta G^\ddagger$) 的影響，(如表 3-3 所示)。

表 3-3 Host-Guest polyproline 系列胜肽 PPII→PPI 的轉換速率與活化能

胜肽(peptide)	PPII-PPI rate constant(s^{-1})	$\Delta\Delta G^\ddagger(\text{kJ/mol})$
P11	2.78×10^{-6}	--
Hyp-P11	2.57×10^{-6}	0.18
Flp-P11	2.05×10^{-6}	0.70
Mop-P11	2.63×10^{-6}	0.14
hyp-P11	2.83×10^{-6}	-0.04
flp-P11	3.83×10^{-6}	-0.74
mop-P11	3.0×10^{-6}	-0.18

由 CD 光譜的測量，顯示在 4S 位置上有拉電子基時，會明顯地促使 PPII 結構

轉換成 PPI 結構，反之，在 4R 位置上有拉電子基時，其 PPII 結構轉換成 PPI 結構之現象則較在 4S 位置取代之氨基酸來的不明顯。

實驗結果顯示，在 4R 位置上有拉電子基的氨基酸會比 P11 的轉換速率來的慢，反之，在 4S 位置上有拉電子基的氨基酸會比 P11 的轉換速率來的快，比較其 PPII→PPI 的轉換活化能 (ΔG^\ddagger)，Hyp-P11、Flp-P11、Mop-P11 比 P11 增加了轉化活化能 ($\Delta\Delta G^\ddagger > 0$)，而 hyp-P11、flp-P11、mop-P11 較 P11 的轉換活化能低 ($\Delta\Delta G^\ddagger < 0$)。由先前研究結果，顯示因為立體電子效應的影響 ($n \rightarrow \pi^*$ 作用)，使得 Hyp、Flp、Mop 會傾向形成 *trans* peptide bond，以正常 P11 為基準，由於 Hyp、Flp、Mop 會傾向形成 *trans* peptide bond，因此以 Hyp、Flp、Mop 替換 Pro 時，由於是以更喜歡形成 *trans* 結構的衍生物替換，且 PPII 結構的 peptide bond 皆以 *trans* 的形式存在，所以當替換溶劑使 polyproline 由 PPII 結構轉換成 PPI 時，以 Hyp、Flp、Mop 替換正常的 Pro 會增加 PPII 轉換成 PPI 的困難度，所以 $\Delta\Delta G^\ddagger$ 增加。

相對的，hyp、flp、mop 傾向形成 *cis* peptide bond，因此以 hyp、flp、mop 替換 Pro 時，由於是以更喜歡形成 *cis* 結構的衍生物替換，而 PPI 結構的 peptide bond 皆以 *cis* 的形式存在，所以當替換溶劑使 polyproline 由 PPII 結構轉換成 PPI 時，以 hyp、flp、mop 替換正常的 Pro 可以減少 PPII 轉換成 PPI 的困難，所以 $\Delta\Delta G^\ddagger$ 減少。

實驗以定量的方式進行，並藉由動力學實驗，結果清楚顯示在 4R 位置上

之拉電子基會增強 $n \rightarrow \pi^*$ 作用，而提高 PPII \rightarrow PPI 的轉換活化能，反之，在 4S 位置上有拉電子基時，會減弱 $n \rightarrow \pi^*$ 作用而降低 PPII \rightarrow PPI 的轉換活化能，而更傾向形成 PPI 結構。

3-4-2 PPI \rightarrow PPII 轉換速率與活化能比較

將原先溶於 *n*-propanol 環境中的胜肽（已形成 PPI 結構），利用改變溶劑環境，使 polyproline 的結構發生改變。實驗的進行是將溶於 *n*-propanol 之樣品以 phosphate buffer 稀釋成 90 % (v/v) 之水溶液(含有 10% propanol 與 90 % phosphate buffer)，並在 4 °C 環境中，每隔 74 分鐘進行 Far UV CD 掃描，利用 PPI 結構的特徵訊號 $\lambda_{\max} = 214 \text{ nm}$ 或 213 nm 的訊號隨時間變化情形，可得到 polyproline 系列胜肽由 PPI 結構轉換形成 PPII 結構的速率。

圖 3-6 為正常 polyproline 在溶劑變成 90 % phosphate buffer 後，在不同時間所測得之 CD 光譜，圖 3-6 顯示 CD 訊號變化情形，可看到 P11 由原先 PPI 的結構逐漸緩慢的變成 PPII 結構，在 222 nm 位置有一 isobestic point，顯示在轉換的過程中除了 PPI 與 PPII 結構沒有其它結構的出現。將 214 nm 訊號對時間作圖可得內插圖，將該 exponential decay 曲線利用公式 $\theta(t) = \theta_0 \exp(-kt) + b$ (2-1) 做迴歸後，可以得到 P11 由 PPI 結構轉換成 PPII 結構的速率。

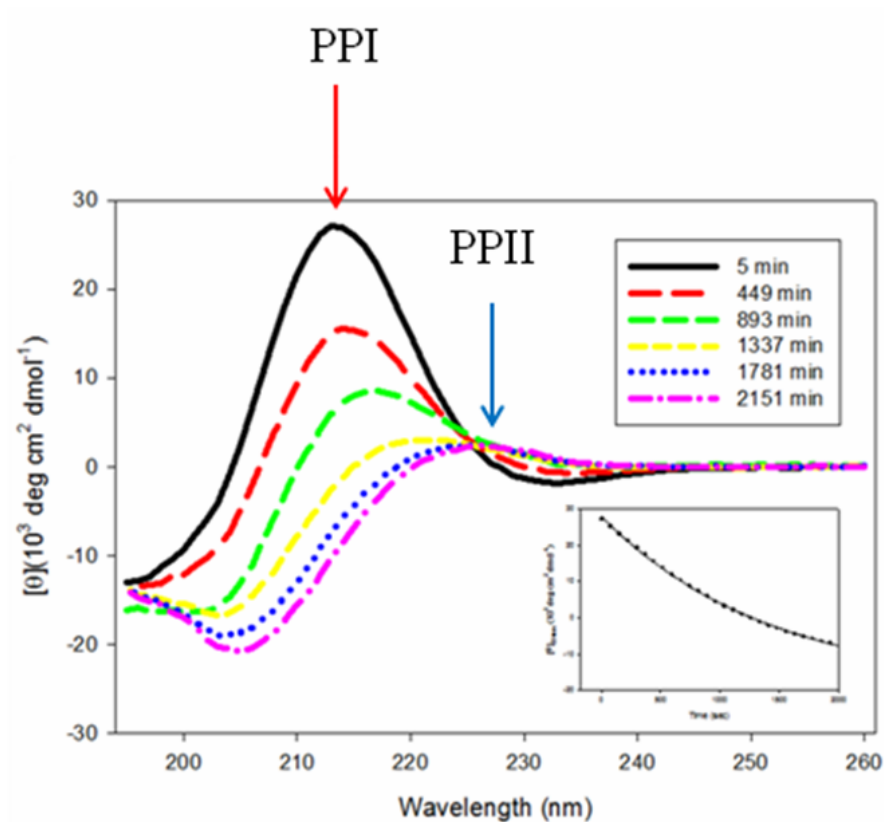
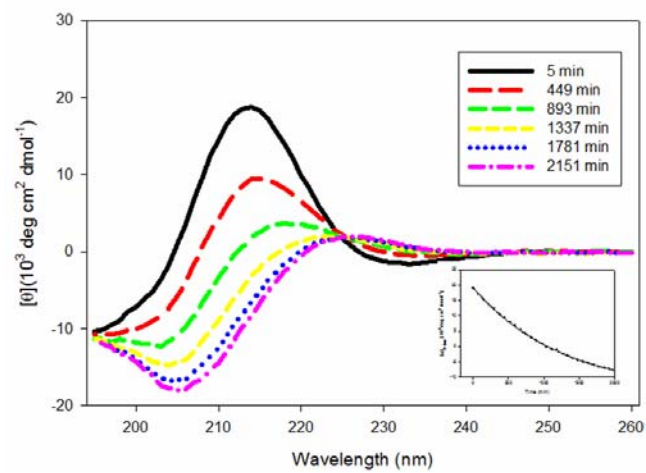


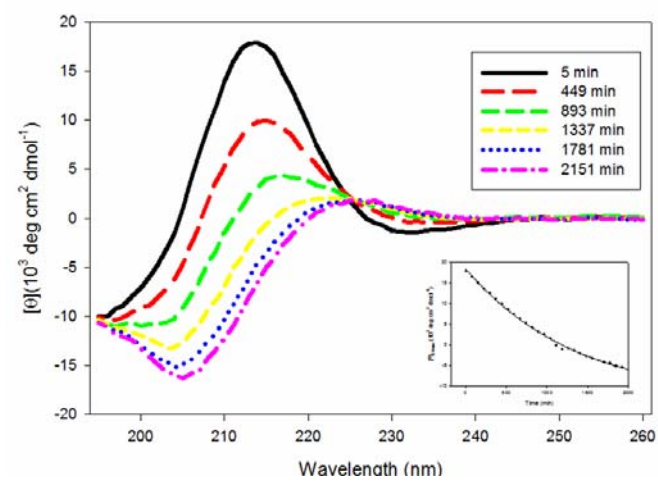
圖 3-6 P11 在 90% phosphate buffer、4 °C 下，36 小時內 CD 訊號隨時間變化圖

利用 proline 衍生物替換正常 proline 後得到的胜肽，也利用相同的實驗方式進行，得到圖 3-7 代表 Hyp-P11、Flp-P11、Mop-P11、hyp-P11、flp-P11、mop-P11 由原先 PPI 的結構逐漸轉換成 PPII 結構的 CD 光譜，而內插圖為將在 213 nm 或 214 nm CD 訊號對時間作圖所得之曲線。

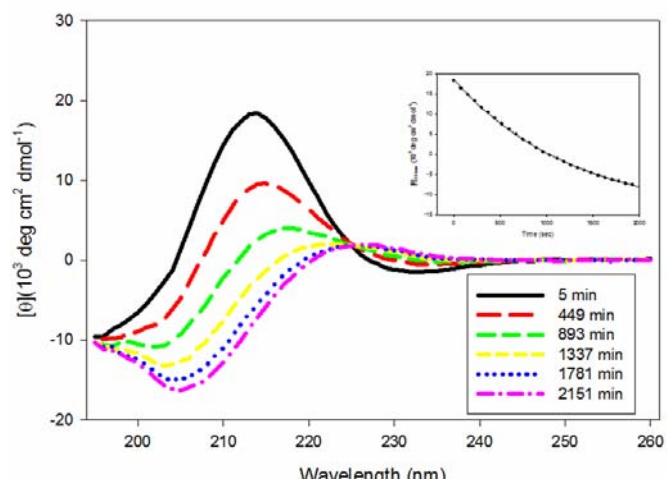
(A) Hyp-P11



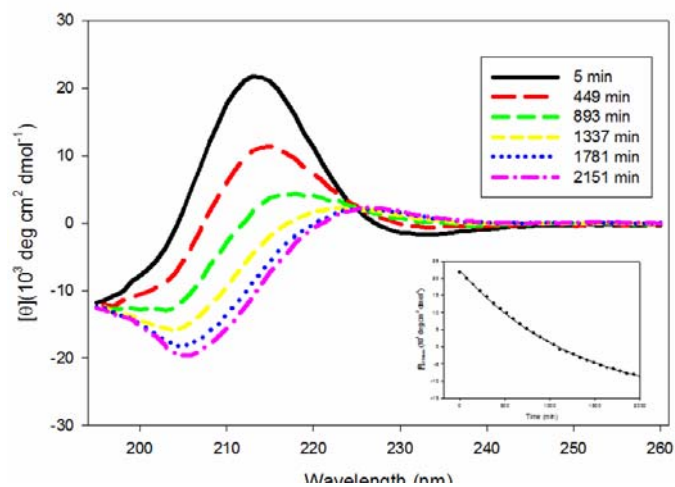
(B) Flp-P11



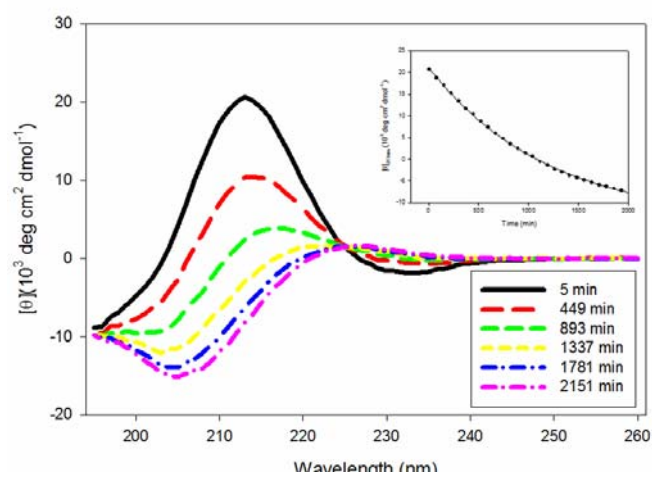
(C) Mop-P11



(D) hyp-P11



(E) flp-P11



(F) mop-P11

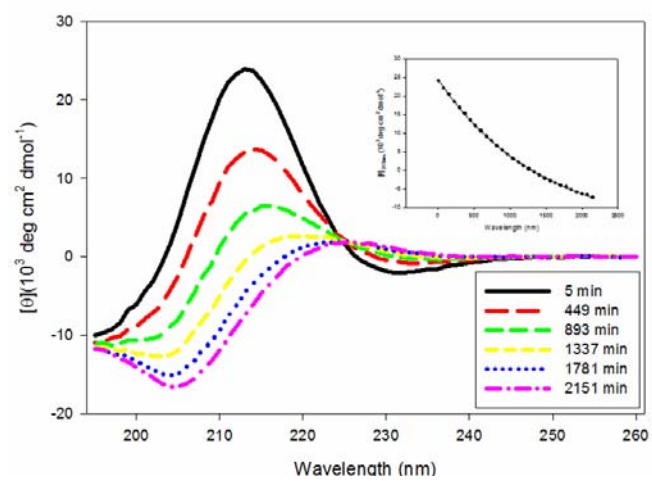


圖 3-7 Host-Guest polyproline 系列胜肽在 90% phosphate buffer、4°C 下，不同時間之 CD 光譜圖

對此一系列胜肽，將 PPI 特徵吸收值 ($\lambda_{\max}=214$ 或 213 nm) 的訊號與時間之變化曲線，利用公式 (2-1) fit 後可得到由 PPI 結構轉換形成 PPII 結構的轉換速率。並以正常的 P11 為基準，比較替換不同 proline 衍生物後，PPI 結構轉換成 PPII 結構時之活化能改變 ($\Delta\Delta G^\ddagger$) 的影響。以上這些相關結果列於表 3-4。

表 3-4 Host-Guest polyproline 系列胜肽 PPI→PPII 的轉換速率與活化能

胜肽(peptide)	PP2-PP1 rate constant(s^{-1})	$\Delta\Delta G^\ddagger(\text{kJ/mol})$
P11	1.18×10^{-5}	--
Hyp-P11	1.33×10^{-5}	-0.28
Flp-P11	1.24×10^{-5}	-0.11
Mop-P11	1.28×10^{-5}	-0.19
hyp-P11	1.28×10^{-5}	-0.19
flp-P11	1.40×10^{-5}	-0.40
mop-P11	1.17×10^{-5}	+0.02

由測量的結果發現，與 P11 胜肽比較，所有變異的胜肽除了 mop-P11 之

外，皆降低了 PPI→PPII 的轉換活化能 ($\Delta\Delta G^\ddagger$)，約 0.1-0.4 kJ/mol。動力學的結果顯示立體電子效應可能在 PPI 結構轉換成 PPII 結構間的活化能不是扮演一個重要的角色，因為 4*R* 位置之取代對 PPI→PPII 轉換活化能之影響並無明顯不同於在 4*S* 未置之取代。

第二部份 立體電子效應對 β -hairpin 穩定度之影響

已有研究顯示可以藉由立體電子效應對蛋白質的穩定度與結構性產生一定的影響，故本研究選用 HP7 為模型探討立體電子效應對 β -hairpin 穩定度的影響，HP7 序列: Ac-Lys-Thr-Trp-Asn-Pro-Ala-Thr-Gly-Lys-Trp-Thr-Glu-NH₂，利用置入含有拉電子基的脯氨酸衍生物替換正常 Pro，藉以探討立體電子效應對 β -hairpin 的結構與穩定度的影響。

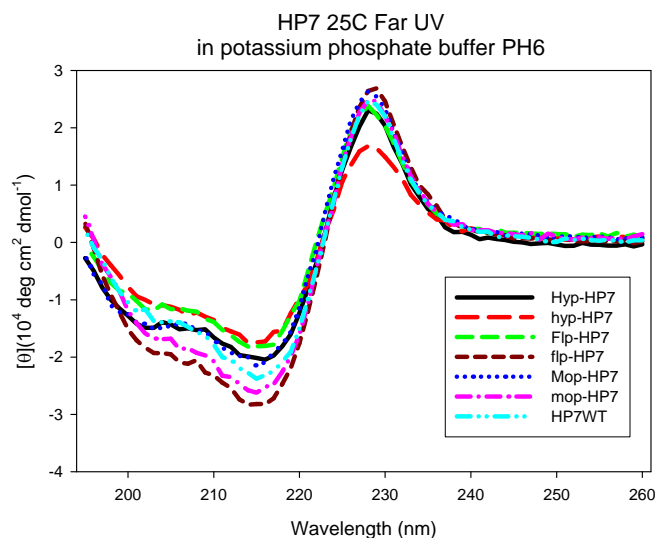
3-5 HP7 系列胜肽 CD 測量結果討論：

3-5-1 Far UV CD 光譜：

將一系列 Pro 衍生物置換 Pro 後所合成的胜肽溶於 buffer 中，在 25 °C (圖 3-8 (A))與 4 °C (圖 3-8 (B))下，進行 Far UV 的全波長測量，所有胜肽得到類似的 CD 光譜吸收訊號圖，在 225-230 nm 有一明顯的正 CD 訊號，並在 215 nm 附近有一明顯的負 CD 訊號出現，且在 204 nm 附近也有一個小的負 CD 訊號出現，與先前 trpzip4 得到相似的圖譜，顯示 HP7 系列胜肽形成相似的 β -hairpin 的結

構，此外在 225-230 nm 間及在 215 nm 附近的 CD 訊號，主要是由於芳香環發色團(aromatic chromophores)間的作用力所造成⁴⁰。表 3-5 為 HP7 系列胜肽的 CD 量測所得之相關參數。

(A)



(B)

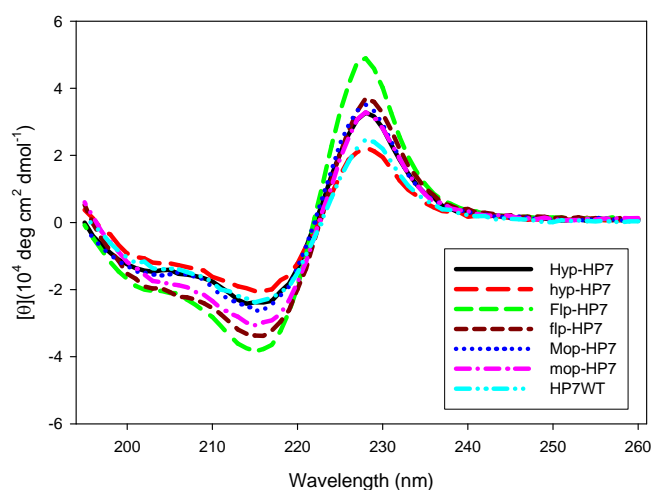
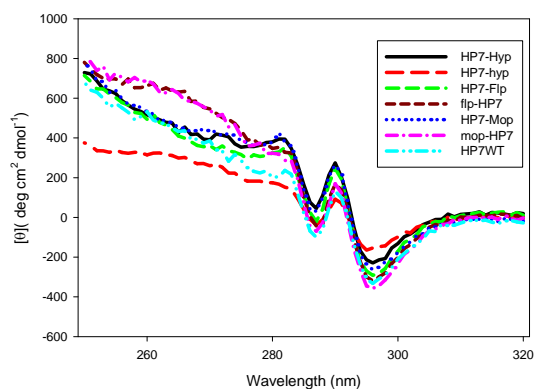


圖 3-8 HP7 系列胜肽在(A) 25 °C 及(B) 4 °C 下測得的 Far UV CD 光譜圖 (所有量測均於 pH 6 且含有磷酸鉀的緩衝溶液中進行)

3-5-2 Near UV CD 光譜

將此系列胜肽溶於 pH6 磷酸鉀緩衝溶液中，在 25 °C (圖 3-9(A))與 4 °C (圖 3-9(B))溫度下，進行 Near UV 的 CD 測量，所有胜肽得到類似的 CD 光譜圖，在 290-295 nm 有一明顯的負訊號出現，且在 285-288 nm 有一較弱的負訊號，在 Near UV 範圍內有 CD 訊號的出現，顯示 HP7 系列胜肽之芳香胺基酸均具有非對稱的作用。Near UV CD 的相關參數亦列於表 3-5。

(A)



(B)

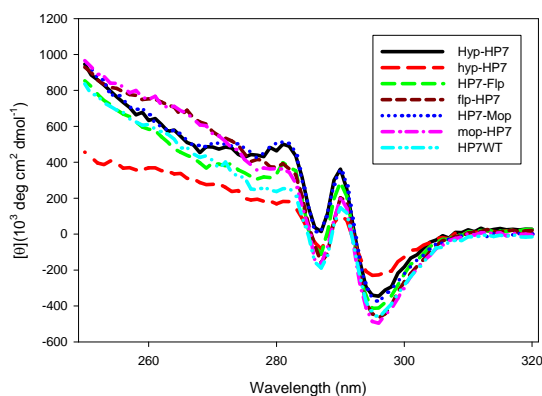


圖 3-9 HP7 系列胜肽在(A) 25 °C 及(B) 4 °C 下測得的 Near UV CD 光譜圖 (所有量測均於 pH6 且含有磷酸鉀的緩衝溶液中進行)

表 3-5 HP7 系列胜肽所測得之 CD 相關參數

胜肽	$\lambda_{228\text{nm}}$	$\lambda_{228\text{nm}}$	$\lambda_{296\text{nm}}$	$\lambda_{296\text{nm}}$	Tm(°C)
(peptide)	(25 °C)	(4 °C)	(25 °C)	(4 °C)	In 1M
					TMAO
HP7WT	2.47×10^3	2.47×10^3	-3.32×10^2	-4.66×10^2	45.0
Hyp-HP7	2.30×10^3	3.27×10^3	-2.28×10^2	-3.46×10^2	40.4
hyp-HP7	1.68×10^3	2.24×10^3	-1.53×10^2	-2.28×10^2	52.6
Flp-HP7	2.38×10^3	4.89×10^3	-2.92×10^2	-4.12×10^2	45.1
flp-HP7	2.64×10^3	3.69×10^3	-3.19×10^2	-4.65×10^2	48.3
Mop-HP7	2.63×10^3	3.51×10^3	-2.62×10^2	-3.81×10^2	42.0
mop-HP7	2.48×10^3	3.29×10^3	-3.57×10^2	-4.96×10^2	43.8

3-6 HP7 系列胜肽螢光測量：

將 HP7 系列胜肽以 280 nm (Trp) 的吸收波長進行激發，在 290-600 nm 進行螢光實驗，得到 HP7 系列胜肽皆在 350 nm 有很強的螢光訊號，且在 560 nm 有一個很弱的螢光訊號 (圖 3-10)，顯示換了這一系列的 proline 衍生物對 HP7 的三級結構不會造成太大的改變，且芳香胺基酸所處的環境類似，這也符合了 Near UV CD 所觀察的結果。

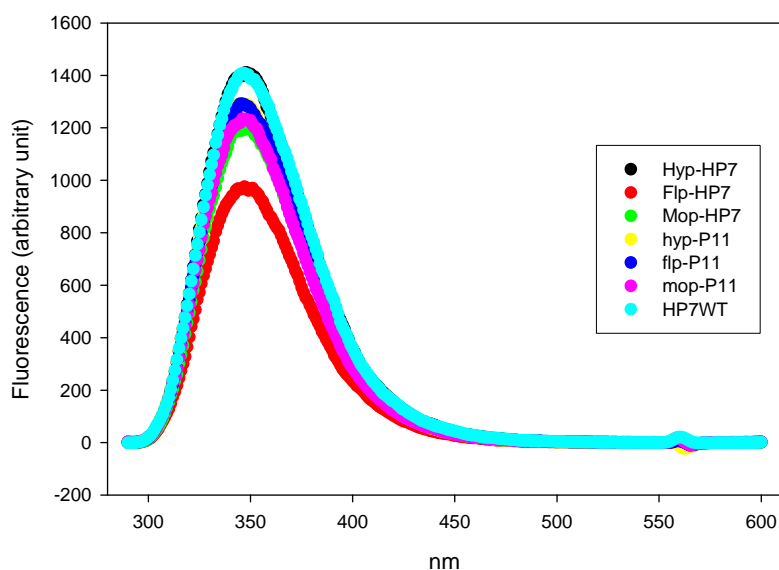


圖 3-10 HP7 系列胜肽螢光的測量結果圖

3-7 HP7 系列胜肽穩定度之探討：

由於 HP7 系列胜肽於 buffer 環境中測得的 transition 不太明顯，在決定 T_m 值時較不容易且誤差較大，藉由加入 TMAO (Trimethylamine N-oxide) 使這些胜肽形成較穩定的 β -hairpin 結構，得到比較明顯的 transition，使得到的 T_m 值有較小的誤差。TMAO 是一種可以促使蛋白質穩定作用的物質，也可以使蛋白質的熔化溫度提高，因為蛋白質的 backbone 不傾向與 TMAO 作用，所以 TMAO 的存在可以使蛋白質之間的作用更緊密且穩定性增加³⁹。

實驗的進行是利用一系列 proline 衍生物替換原先 Pro5 位置後，所合成的 HP7 系列加入溶有 1 M TMAO 的 sodium phosphate buffer，在 215 nm 處的 CD 訊號因為會有背景值訊號的干擾，所以在變溫過程中是偵測在 228 nm 的 CD 訊號。以固定波長 228 nm 方式去測量不同溫度下 CD 訊號，得圖 3-11，然後利用

方程式 (2-4)對訊號曲線做迴歸決定 T_m 值，所得到的結果列於表 3-6，

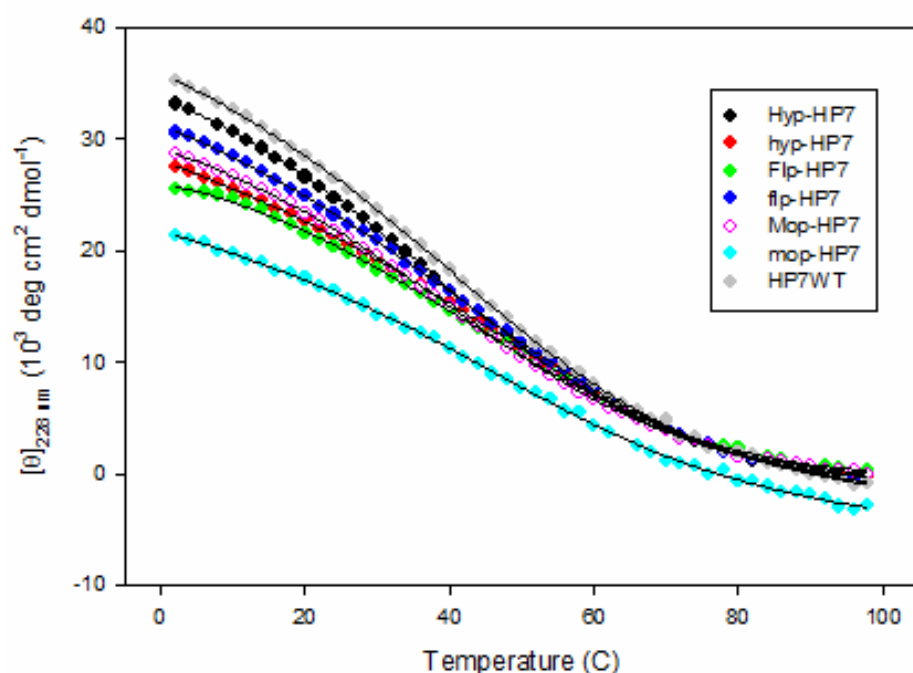


圖 3-11 HP7 系列胜肽在 1 M TMAO 水溶液，得到波長 228 nm 的 CD 訊號圖

經由 NMR 所決定的 HP7 結構中，Pro5 胺基酸是以 $C\gamma$ -*exo* 構形存在(圖 3-12)，且 Pro5 與 Trp3 間有 Pro-aromatic 作用力。當以 Hyp、Flp、Mop 等衍生物替換後，因為立體電子效應的影響 ($n \rightarrow \pi^*$ 作用)，此三個 proline 衍生物會傾向以 $C\gamma$ -*exo* 構形存在，但由圖 3-12 所示，當以 Hyp、Mop 衍生物替換時，Hyp、Mop 所呈現的 $C\gamma$ -*exo* 構形會因為多出的 OH 基與 OCH₃ 基與 Trp3 產生空間上的推擠，因為立體阻礙的影響，使得 Hyp-HP7、Mop-HP7 相較於 Wild type 變得更不穩定，此外，加入的 OH 基會破壞原先 Pro5 與 Trp3 存在 Pro-aromatic 作用力，因 OH 基溶液與水分子會進行水合作用，造成 Hyp-HP7 比 Mop-HP7 還

不穩定。至於 Flp-HP7，雖然 Flp-HP7 也傾向於形成 *C γ -exo* 構形且多了 F 原子在 4*R* 位置，但因 F 原子半徑較小，並且 F 原子的存在增加了 C-F 的 hydrophobicity，使得 Pro-Trp 間產生較強的 hydrophobic interaction 而彌補了 F 原子立體障礙所影響的穩定度，因此 Flp-HP7 得到與 Wild type 差不多的穩定度。

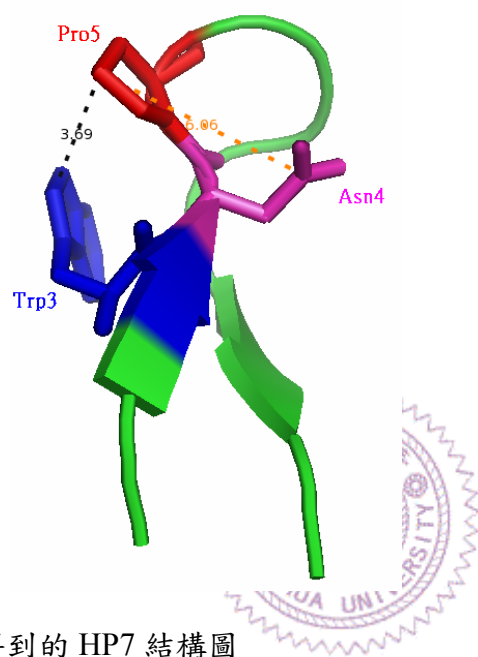


圖 3-12 NMR 得到的 HP7 結構圖

另一方面，當以 hyp、flp、mop 等衍生物替換時，因為立體電子效應的影響，使得此三個 proline 衍生物會傾向以 *C γ -endo* 構形存在，所以增加的取代基不會和 Trp3 發生空間推擠的作用。此外，因為有拉電子基的存在，電子被部分的拉離，使得 Pro 的五圓環帶有部份正電，與 Trp3 形成 π -cation 作用，增加了穩定的作用力，所以 hyp-HP7、flp-HP7 與 Wild type 相比變得更加穩定。但是，mop-HP7 因為取代基 OCH_3 的原子團較大，與 Asn4 位置產生空間上的推擠，因為立體阻礙而使得 mop-HP7 與 Wild type 相比，變得稍微不穩定，而這點亦可由

NMR 量測結果看出，故在 mop-HP7 胜肽中，Asn4 的 $C^{\alpha}H$ 化學位移與 Wild type 相差很多。(見 3-8 之討論)

由實驗的結果顯示，立體電子效應造成的 preorganization 並非是造成 HP7 系列胜肽穩定與否的主要原因，因為 Pro-aromatic 之作用力亦是必須考慮的因素之一，而 proline 衍生物與 Trp3 與 Asn4 氨基酸產生的立體阻礙也會影響結構，此外，因為 proline 接上拉電子基後電子被部份拉離，而與 Trp3 形成 π -cation interaction，也提供了此結構的穩定能量。

3-8 HP7 系列胜肽 2D-NMR 探討：

3-8-1 HP7 系列與 random coil 的比較

將 HP7 系列胜肽測量 2D-NMR (TOCSY 及 NOESY)，解得每一個氨基酸的 NH 與 $C^{\alpha}H$ 值後與 random coil 做比較，得圖 3-13。HP7 系列與 random coil 的 $C^{\alpha}H$ 相減後，可以得到一個變化差值，其差異相當大，顯示 HP7 系列不是形成 random coil 結構，此外，將 HP7WT 與 random coil 的 $C^{\alpha}H$ 相減後，也可以得到一個和 HP7 系列類似的變化圖(圖 3-13)，兩者的差異並不大，顯示置換後之 HP7 系列主要形成 β -hairpin 的結構，且與原本 Wide Type 形成類似的結構。表 3-6 為 HP7 系列中各氨基酸的 NH 與 $C^{\alpha}H$ 化學位移值。詳細的 HP7 系列 peptide 之 TOCSY 光譜列於附錄一。

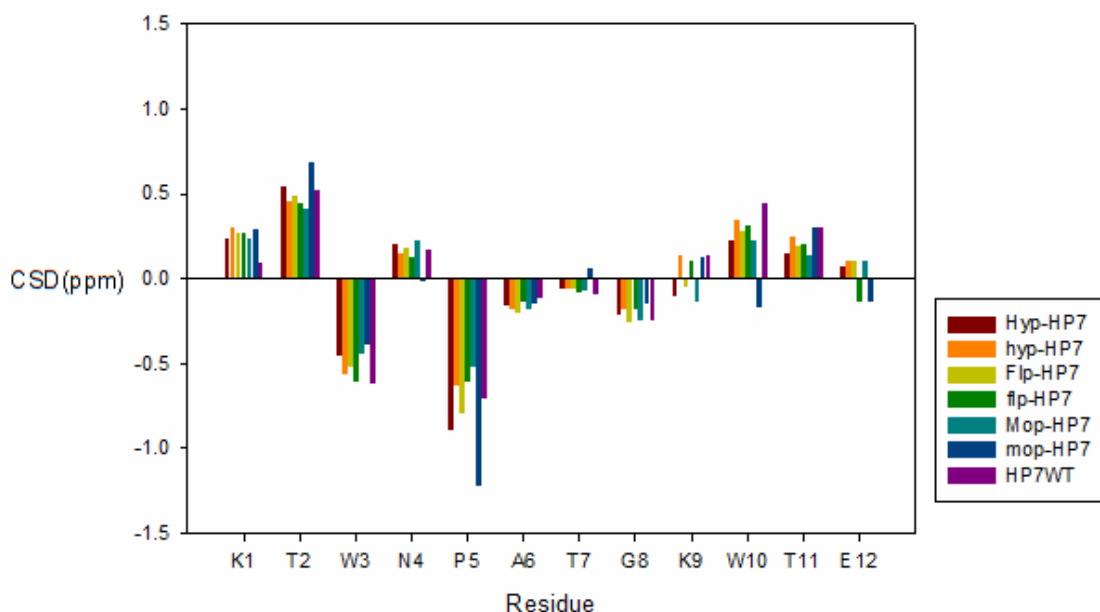


圖 3-13 HP7 系列胜肽與 random coil $C^{\alpha}H$ 化學位移差值變化圖

3-8-2 HP7 系列胜肽與 Wild Type 的比較

比較 HP7 系列胜肽與 Wild type 的 $C^{\alpha}H$ 化學位移(CSD)發現(如圖 3-14)，除了 Pro5 位置上的 CSD 值較大外，其他位置胺基酸的 CSD 值大致上變化不大，顯示將一系列的 proline 衍生物替換正常的 proline 對整體的二級結構改變不大，HP7 系列胜肽仍然保持 β -hairpin 的結構。此外，對 mop-HP7 胜肽而言，以 mop 替換正常 proline 後，對鄰近的 Asn4 的結構影響較大，所以 mop-HP7 的 $C^{\alpha}H$ 與 HP7WT 相比變化較大，也顯示 mop 的 OCH_3 基與 Asn4 在空間上的阻礙較大，這也可說明 mop-HP7 比 Wild type 還不穩定的原因。

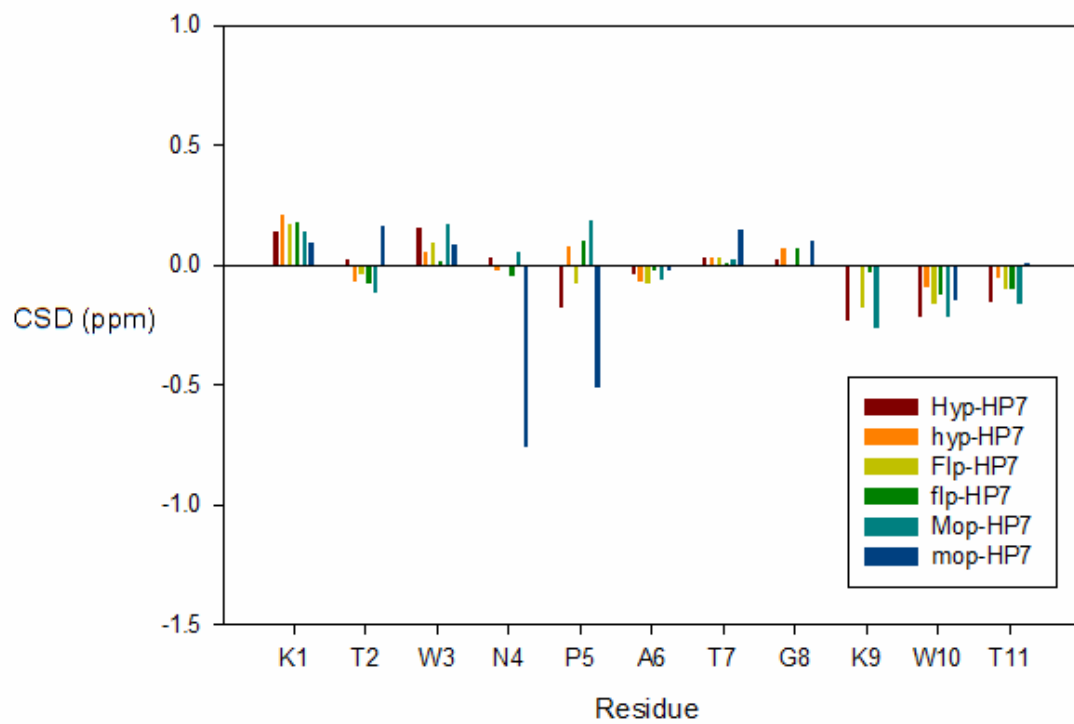


圖 3-14 HP7 系列胜肽與 Wild type 的 $C^{\alpha}H$ 化學位移差所得的變化圖



表 3-6 為 HP7 系列中各氨基酸的 NH 與 C^αH 化學位移值

peptide	Hyp-HP7		hyp-HP7		Flp-HP7	
Residue	δ (HN)	δ (C ^α H)	δ (HN)	δ (C ^α H)	δ (HN)	δ (C ^α H)
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Lys1	8.552	4.592	8.244	4.662	8.202	4.622
Thr2	8.643	4.892	8.792	4.798	8.719	4.834
Trp3	8.869	4.249	8.856	4.142	8.874	4.185
Asn4	7.627	4.951	7.607	4.894	7.582	4.921
Hyp5		3.559		3.812		3.654
Ala6	7.913	4.198	7.817	4.171	7.886	4.157
Thr7	7.136	4.293	7.021	4.292	7.061	4.294
Gly8	8.05	3.759 ,	7.994	3.801 ,	7.974	3.722 ,
		3.384		3.332		3.31
Lys9	6.813	4.262	6.848	4.496	6.657	4.320
Trp10	8.255	4.920	8.589	5.047	8.34	4.977
Thr11	8.985	4.493	9.151	4.594	9.107	4.540
Glu12	8.524	4.356	8.626	4.290	8.562	3.392

peptide	flp-HP7		Mop-HP7		mop-HP7	
Residue	δ (HN)	δ (C ^{α} H)	δ (HN)	δ (C ^{α} H)	δ (HN)	δ (C ^{α} H)
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Lsy1	8.235	4.627	8.214	4.588	8.497	4.541
Thr2	8.584	4.791	8.641	4.753	8.991	5.032
Trp3	8.736	4.105	8.824	4.259	8.75	4.172
Asn4	7.675	4.877	7.658	4.973	7.617	4.157
Hyp5		3.837		3.923 ,		3.224
				3.058		
Ala6	7.844	4.215	7.912	4.176	7.783	4.211
Thr7	6.946	4.270	7.156	4.286	6.873	4.411
Gly8	7.946	3.801	8.043	3.736	7.891	3.832
Lys9	6.916	4.462	6.828	4.231	6.552	4.484
Trp10	8.558	5.013	8.231	4.918	8.51	4.988
Thr11	9.06	4.544	8.949	4.479	8.667	4.703
Glu12	8.808	4.158	8.434	4.396	8.75	4.153

第四章 結論

先前的研究顯示在脯胺酸 C4 位置上有拉電子基的存在會大大影響聚脯胺酸的結構，造成的主要因素與立體化學結構有關， $n \rightarrow \pi^*$ 作用已經被提出在穩定 PPII 結構具有一個關鍵性的角色，並證實立體電子效應對於聚脯胺酸的結構具有一定程度的影響力，其得到的結論主要是藉由熱力學的方法獲得，因此本實驗利用 host-guest 方式以脯胺酸衍生物替換正常脯胺酸，藉由動力學的實驗方法去證明在 4R 或 4S 位置上的拉電子基對 PPII \rightarrow PPI 轉換速率有很大的影響，並以定量方式來研究立體電子效應對聚脯胺酸結構轉換間活化能的影響。

在這次的實驗結果證明 $n \rightarrow \pi^*$ 作用會增加 PPII \rightarrow PPI 轉換的活化能 ($\Delta \Delta G^\ddagger$)，並抑制 PPII 轉換成 PPI 結構，相對之下，減弱的 $n \rightarrow \pi^*$ 作用會降低 PPII \rightarrow PPI 的轉換能量 ($\Delta \Delta G^\ddagger$)，造成更傾向形成 PPI 結構。雖然先前的熱力學研究顯示，立體電子效應可以決定形成 PPI 或 PPII 結構，但我們藉由動力學的實驗，關於立體電子效應對 PPII 結構穩定度不同程度的影響提供另一個有效的數據，立體電子效應對聚脯胺酸結構的影響可能是來自於 PPII \rightarrow PPI 轉換時活化能的差異所造成的，因此，我們的實驗結果關於立體電子效應在動力學上如何影響聚脯胺酸結構，提供一個非常重要且深入的訊息，這是從未有人進行過的實驗。

此外，已有研究顯示可以利用立體電子效應對蛋白質的穩定度與結構性進行調控，但目前尚未利用 β -hairpin 為研究模型來探討立體電子效應，故本次研究中特地選用 HP7 為模型來探討立體電子效應對其穩定度的影響。

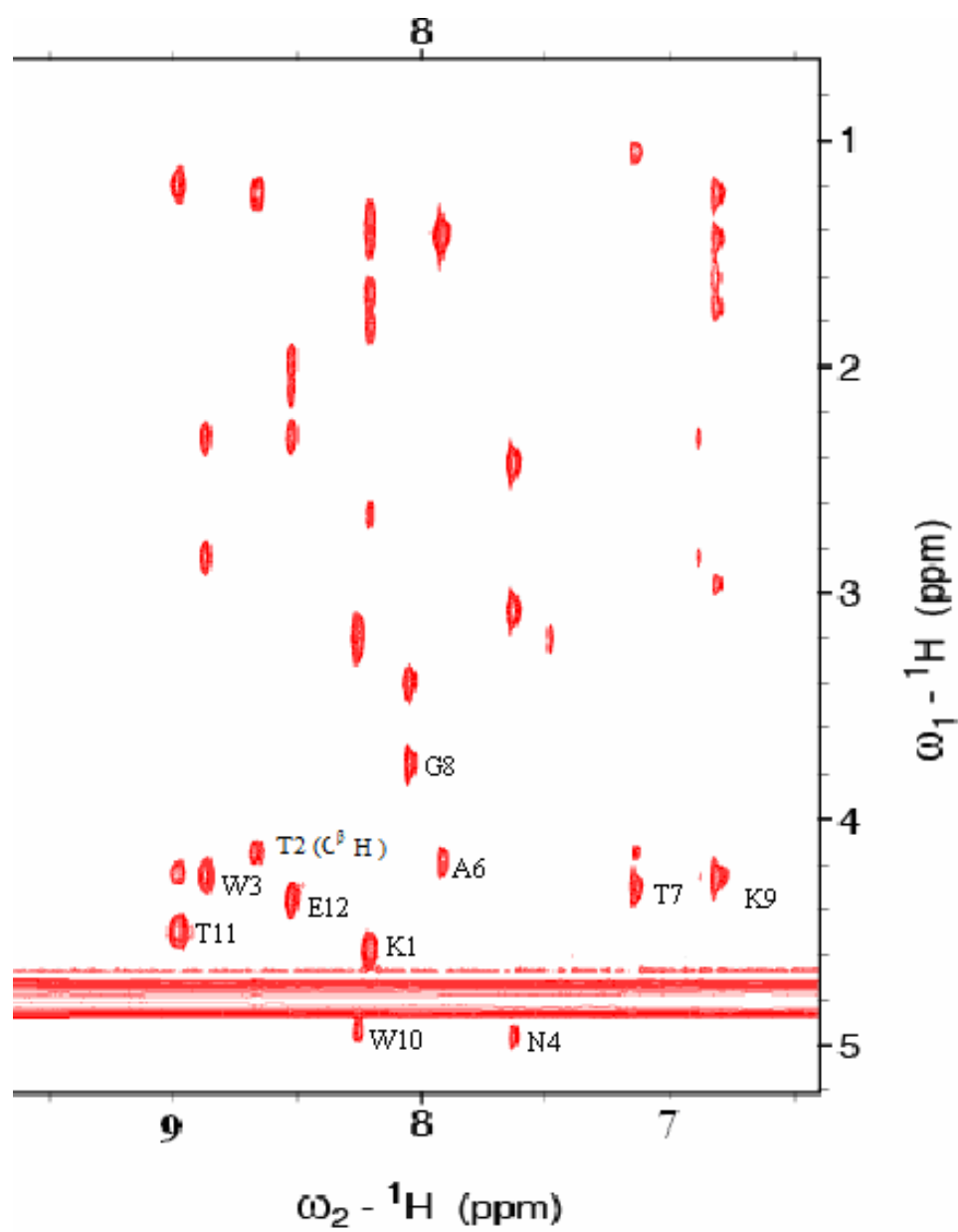
由實驗結果顯示，立體電子效應造成的 preorganization 並非是造成 HP7 系列胜肽穩定與否的主要原因，因為 proline 衍生物的之鏈與鄰近的 Trp3 與 Asn4 氨基酸產生的立體阻礙而影響結構的穩定度，且必須考慮 Pro-aromatic 作用力；此外，因為 proline 接上拉電子基後電子被部份拉離，而與 Trp3 形成 π -cation interaction 穩定能，可以增加 β -hairpin 結構的穩定度。因此，在對於 HP7 此一 β -hairpin 結構而言，並無法只藉由著 β -turn 上脯氨酸立體電子效應所造成的 Pro ring pucker 傾向來增加結構穩定性。



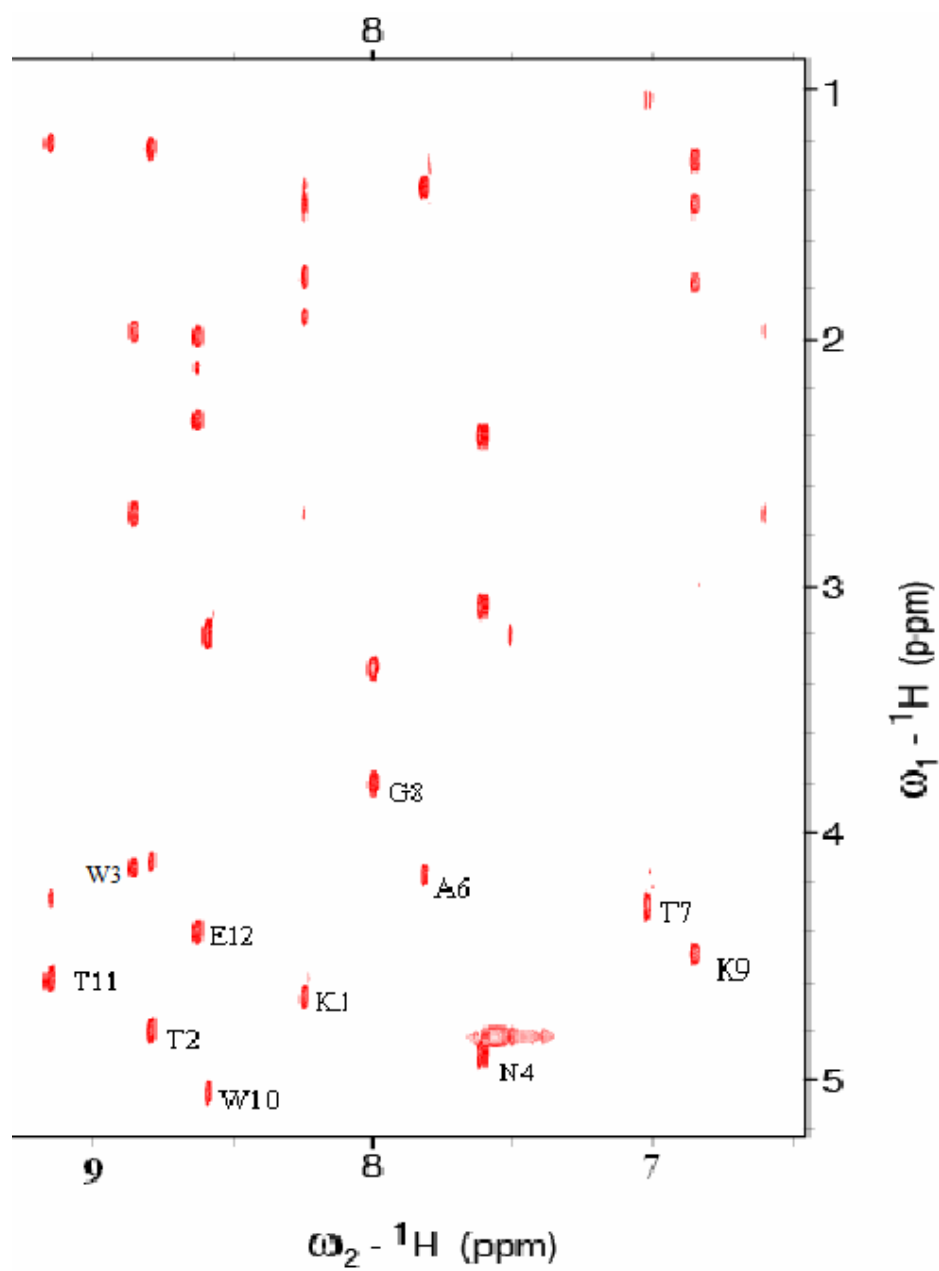
附錄一

HP7 系列 peptide 之 TOCSY 光譜圖

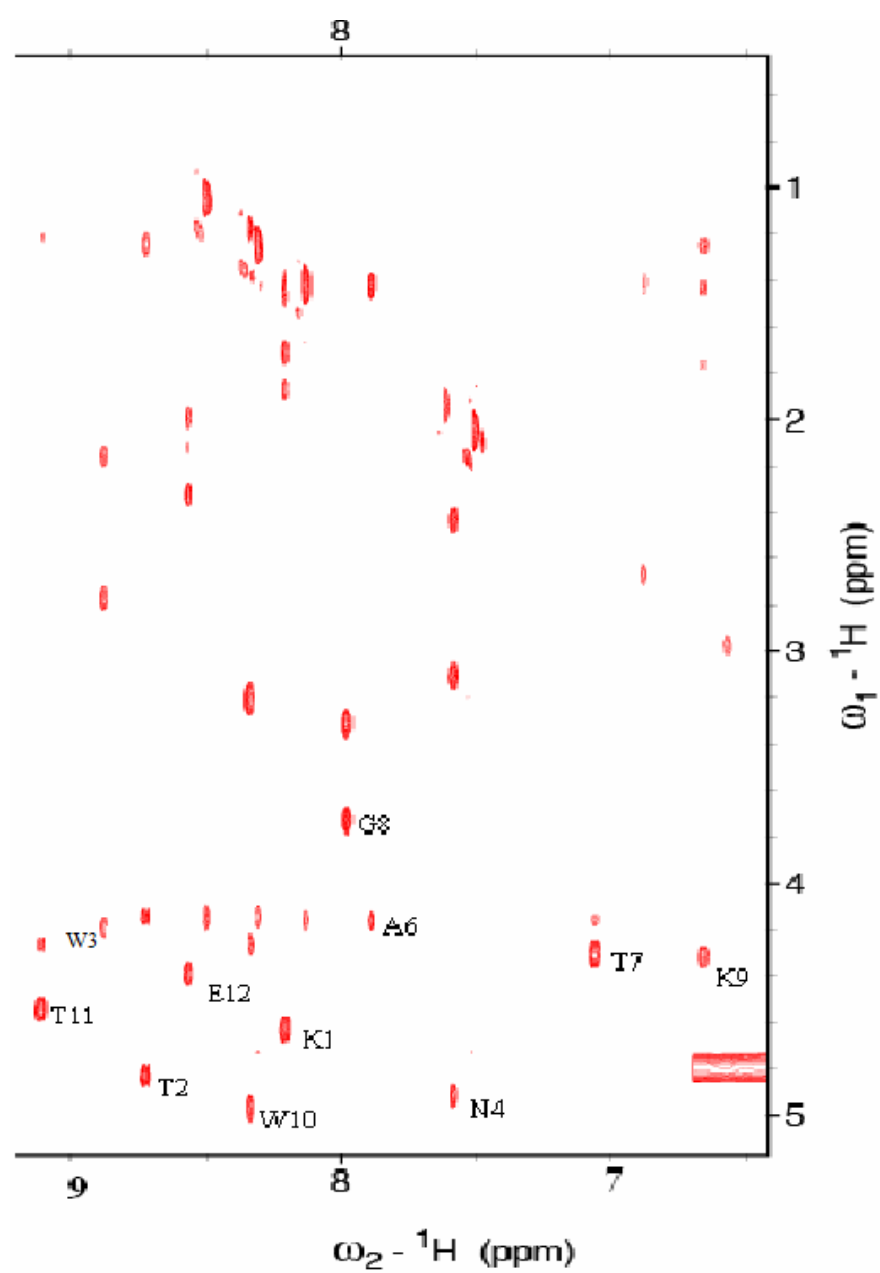
(A) Hyp-HP7



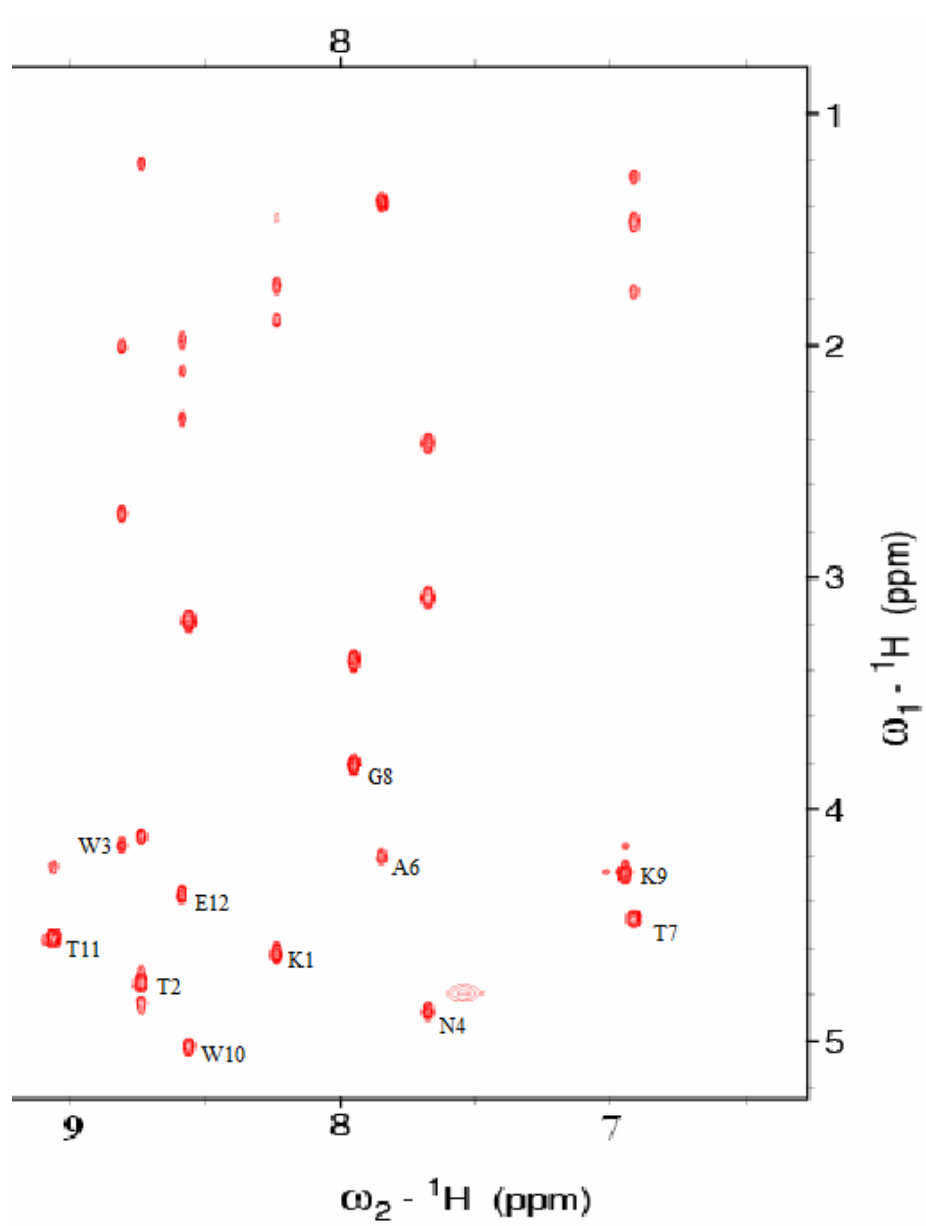
(B) hyp-HP7



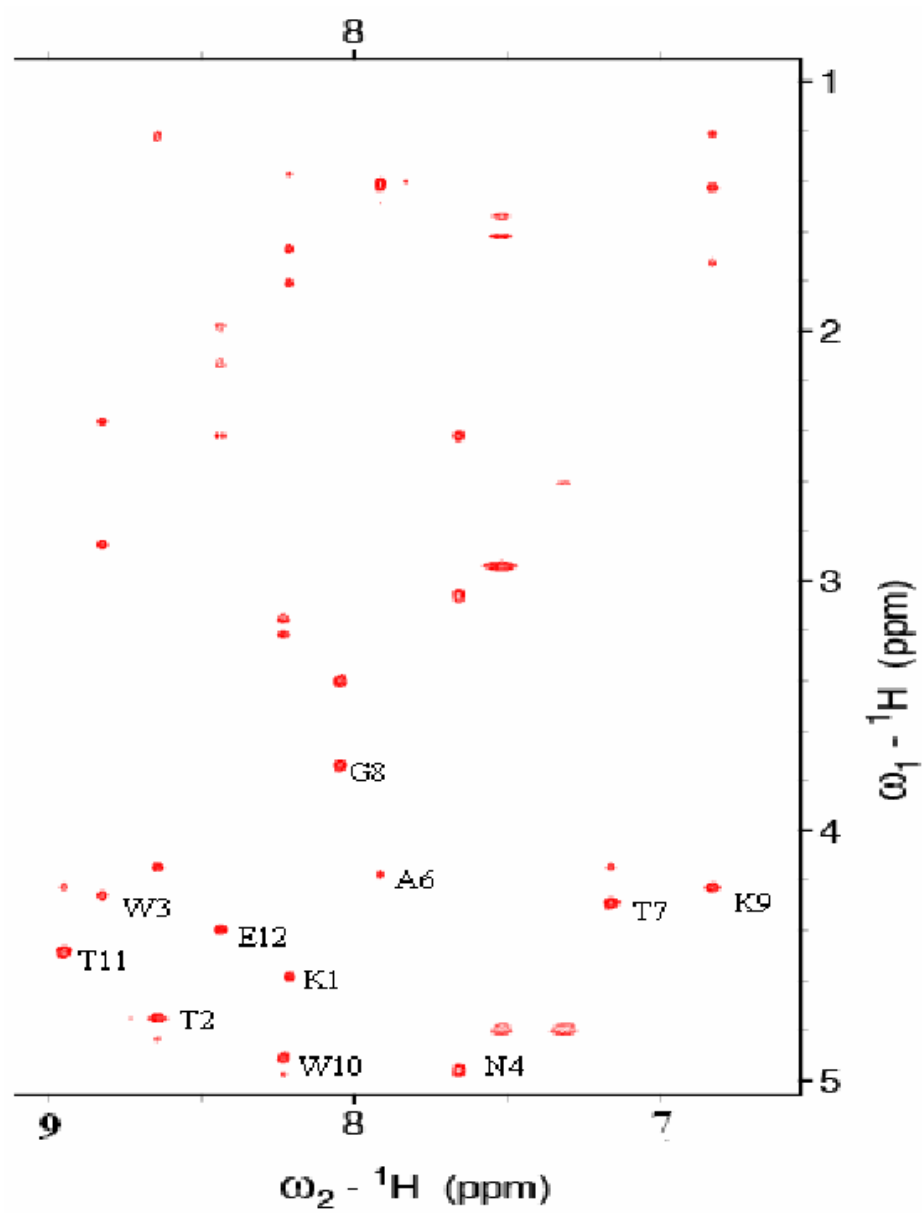
(C) Flp-HP7



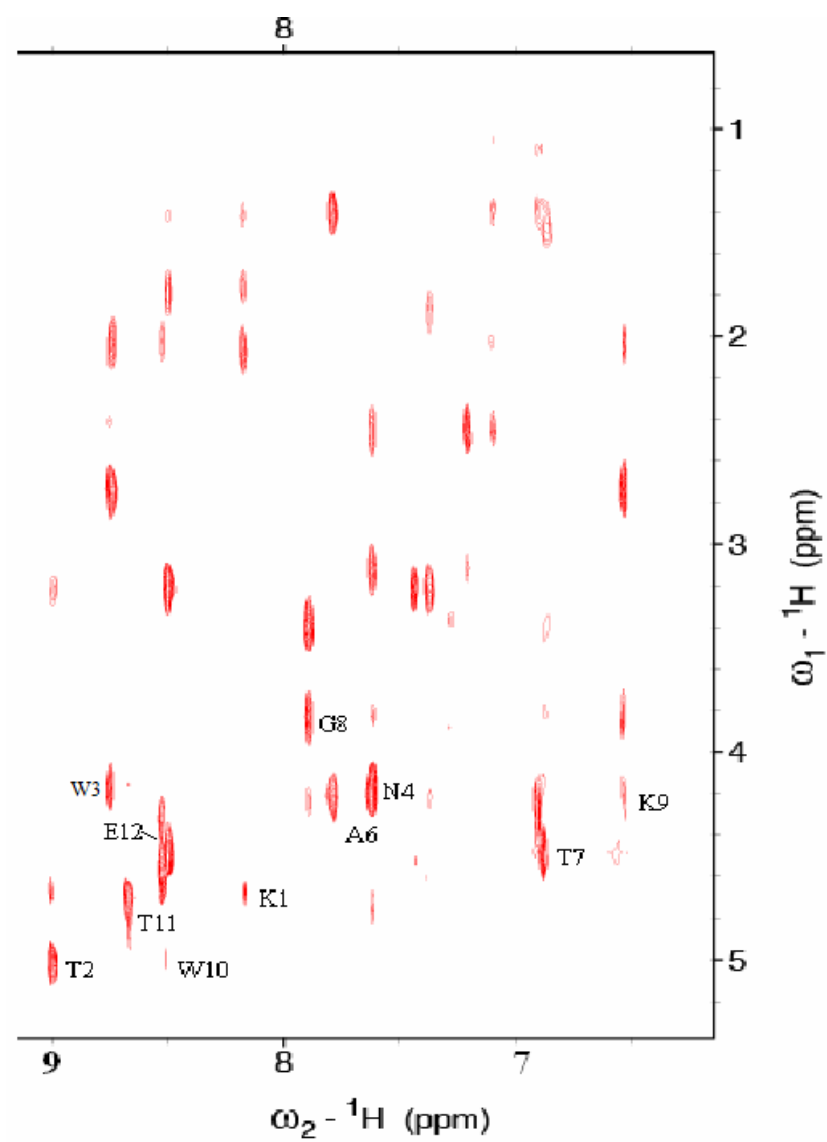
(D) flp-HP7



(E) Mop-HP7



(F) mop-HP7



參考文獻(References)

1. <http://www.excellence.fju.edu.tw/plan/2.1.1.c/content05/html/33.htm>
2. Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., Berman, H.M. *Science* **1994**, 266, 75-81.
3. www.answers.com/topic/beta-sheet
4. Mimna, R., Camus, M. S., Schmid, A., Tuchscherer, G., Lashuel, H. A., Mutter, M. *Angewandt*, **2007**, 46, 2681-2684.
5. http://mychannel.pchome.com.tw/channel/class/show_preview.php3/?d=2005-09-09&enname=s155131&t=.htm&fn=main&view=1
6. Kakinoki, S., Hirano, Y., Oka M. *Polym Bull.* 53, **2005**, 109-115.
7. Mutter, M., Wohr, T., Gioria, S., Keller, M. *Biopolymers* **51**, 121-128.
8. Horng, J. C., Raines R. T. *Protein Sci.* **2006**, 15, 74-83.
9. Adzhubei, A. A., Sternberg, MJE. *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 472-493.
10. Siligardi, G., Drake, AF. *Biopolymers* **1995**, 37, 281-292.
11. Sato, S., Kwon, Y., Kamishki, S., Srivastava, N., Mao, QA, Kawazoe, Y., Uesugi, M. *J. Am. Chem. Soc* **2007**, 129, 873-80.
12. Bhattacharyya, A., Thakur, A. K., Chellgre, V. M., Thiagarajan, G., Williams, A. D., Chellgren, B. W., Creamer, T. P., Wetzel, R. *J. Mol. Biol* **2006**, 355, 524-535.
13. Rich, A., Crick, F. H. C. *J Mol Biol.* **1961**, 3, 483-506.
14. Hinderaker, M. P., Raines R. T. *Protein Sci.* **2003**, 12, 1188-1194.

15. Giacobazzo, C., Monaco, H. L., Artioli, G., Viterbo, D., Ferraris, G., Gilli, G. Zanotti, G., Monaco, G., Catti, M. *Fundamentals of Crystallography* **2002**.
16. Panasik, N., Jr., Eberhardt, E. S., Edison, A. S., Powell, D. R., Raines, R. T. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1994**, 44, 262-269.
17. Eberhardt, E. S., Panasik, N., Jr., Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 12261-12266.
18. Benzi, C., Improta, R., Scalmani, G., Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2002**, 23, 341-350.
19. Wolfe, S. *Acc. Chem. Res.* **1972**, 5, 2-111.
20. Improta, R., Benzi, C., Barone, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12568-12577.
21. Taylor, C. M., Hardre R., Partrick J. B. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1306-1315.
22. Bretscher, L. E., Jenkins, C. L., Taylor, K. M., DeRider, M. L., Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 777-778.
23. Bella, J., Brodsky, B., Berman, H. M. *Structure* **1995**, 3, 893-906.
24. Vitagiano, L., Berisio R., Mazzarella L., Zagari A., *Biopolymers* **2001**, 36, 459-464.
25. Hodges, J. A., Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9262-9263.
26. Urry, D. W. *In Protein Based Materials*, McGrath, K. P., Kaplan, D., Eds., Birkhauser: Boston, **1997**, pp 133-177.

27. Reiersen, H., Clarke, A. R., Rees, A. R. *J. Mol. Biol.* **1998**, 283, 255-264.
28. Kim, W., McMillan, R. A., Snyder, J. P., Conticello, V. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18121-18132.
29. Cook, W. J., Einspahr, H., Trapane, T. L., Urry, D. W., Bugg, C.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 5502-5505.
30. DeRider, M. L., Wilkens, S. J., Waddell, M. J., Bretscher, L. E., Weinhold, F., Raiens, R. T., Markley, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2497-2505.
31. Eyles, S. J., Gierasch, L. M. *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 737-747.
32. Naduthambi, D., Zondlo, N. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12430-12431.
33. Kobayashi, N., Endo, S., Munekata, E. *Peptide Chem.* **1993**, 278-280.
34. Kobayashi, N., Honda, S., Yoshii, H., Uedaira, H., Munekata, E. *Biochemistry* **2000**, 39, 196-199.
35. Cochran, A. G., Skelton, N. J., Starovasnik, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 5578-5583.
36. Fesinmeyer, R. M., Hudson, F. M., Andersen, N. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7238-7243.
37. Andersen, N. H., Olsen, K. A., Fesinmeyer, R. M., Tan, X., Hudson, F. M., Eidenschink, L. A., Farazi, S. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6101-6110.
38. Kotch, F.W., Guzei, I.A., Raines, R.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2952-2953.

39. Mello, C. C., Barrick, D. *Protein Sci.* **2003**, 12, 1522-1529.
40. Cochran, A. G., Skelton, N. J., Starovasnik, M. A. *PNAS* **2001**, 98, 5578-5583.

