

Chapter 2 아미노산, 펩티드 및 단백질

(Amino acids, Peptides, and Proteins)

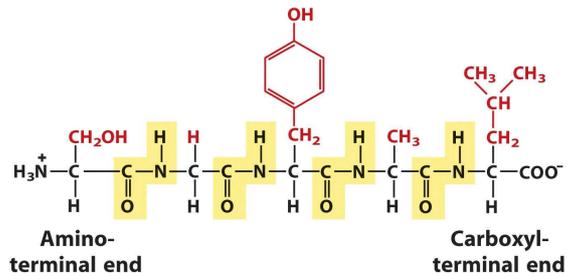
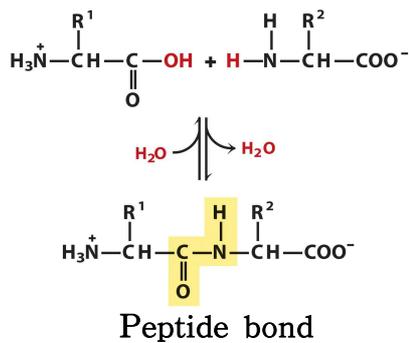
레닌즈 생화학

Amino acids and proteins	
Objective	<ul style="list-style-type: none"> - What are four levels of protein structure ? - What functions do proteins have in living organisms ? - What is protein denaturation and how does it occur ?
Key words	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zwitterion (쯔비트이온), 양극성이온 2. pI (등전점, isoelectric point) 3. Hemoglobin 과 myoglobin 기능 및 차이점 4. 마이오신과 액틴에 대한 설명 5. 난하이드린 반응(Ninhydrin reaction) 6. 단백질의 접힘(folding of protein) 7. Glutathione 과 vasopressin 의 구조 및 기능 8. 비대칭탄소(asymmetric carbon) 9. 단백질의 2차 구조 10. 협동적 결합(cooperating binding) 11. 황 함유 아미노산의 종류 및 disulfide bond 12. 단백질에서 발견되는 3 domain 13. 방향족 아미노산의 종류 및 특성 14. 효소(단백질) 정제과정 15. 사상단백질과 구상단백질의 특성 및 기능 16. 보아 효과(Bohr effects) 17. 케라틴과 콜라겐 (keratin and collagen) 18. 분자 샤페론(molecular chaperone) 19. 구조화되지 않은 단백질 (unstructure protein) 20. 단백질의 3차 구조를 안정화 시키는 작용

II. Peptides

: polymers of amino acids

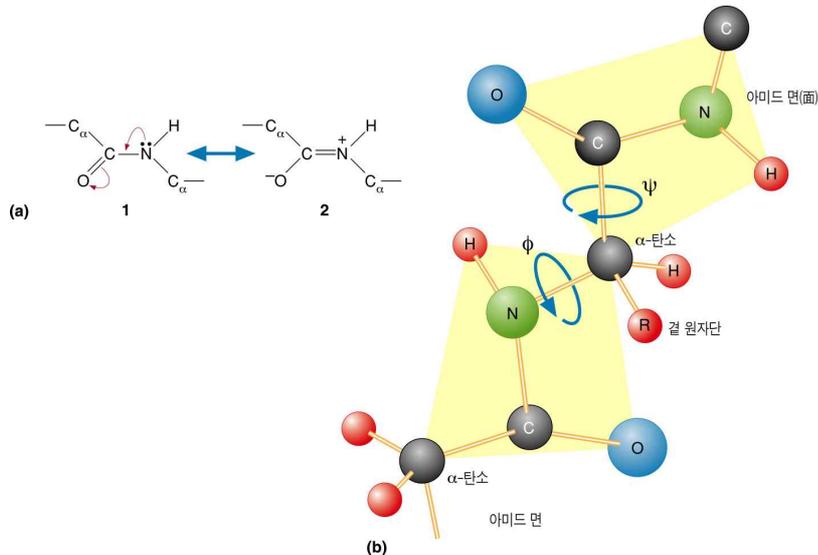
1. Peptide bond



N-terminal

C-terminal

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



2. Primary structure determination(1차 구조결정)

Polypeptide의 아미노산 순서(amino acid sequence) 결정

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

① Sanger's method (DNFB)

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

\downarrow hydrolysis (6NHCl)

Chromatography

② Dansyl chloride procedure (DNS -Cl)

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

\downarrow hydrolysis
Chromatography

※ Sanger' method 보다 100배 sensitive 하다.

③ **Edman degradation**

Peptide + phenylisothiocyanate (PITC)

\downarrow

Phenylthiocarbonyl (PTC) derivatives

\downarrow hydrolysis

\downarrow mild acid conditions (F_3CCOOH)

Phenylthiohydantion (PTH) + Intact polypeptide

(derivatives)

(원래보다 아미노산 1개가 적은 것)

2) C-terminal identification (C-말단결정법)

① Hydrazine 분해법 (Chemical method)

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

② 가수분해효소이용법(Exopeptidase를 이용)

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

③ Tritium 화법

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

3. 단백질의 3차 구조 파괴

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

1) **Disulfide bond (S-S)의 분해**

- cleaved oxidatively by **performic acid**
- cleaved reductively by **mercaptans (dithiothreitol, DTT)**

..... Cystine

\downarrow \leftarrow 2-mercaptoethanal

\downarrow \leftarrow Dithiothreitol (Cleland's reagent)

Free sulfhydryl group

\downarrow \leftarrow Iodoacetic acid 처리

Alkylation

- * **Alkylation** : ① O₂의 산화에 의한 disulfide bond의 형성을 저해
 ② 공기 중 peptide bond의 분해에도 안정

2) 단백질변성 (Protein denaturation) : 수소결합을 파괴

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

4. Specific peptide cleavage reaction : endopeptidase

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

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

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

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

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

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

- 1) **Glutathione (r-glutamyl cysteinyl glycine)** : 적혈구의 산화적 손상을 방지
 - 2 GSH + H₂O₂ → GSSG + H₂O

2) Vasopressin 과 Oxytocin : nanopeptide

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

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

* **Oxytocin** : 평활근의 수축, 수유시 젖의 분비를 증가

3) Insulin : peptide hormone (51 amino acid)

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

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

- 설탕보다 200배 더 달다

5) Gramicidin S : 10 amino acids

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

6. 아미노산분석(amino acid analysis)

1) 산 가수분해

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

2) 아미노산 분석기기 :

- 자동아미노산분석기(automatic amino acid analyzer)
- HPLC

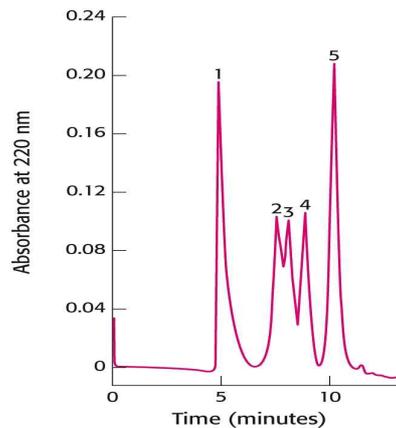


Fig. High-pressure liquid chromatography(HPLC)