

章節：CH6 Enzymes	
教師：簡昆鎰	日期：2014 / 5 / 6
撰稿組：琪婷、雯詠、允安、育柔	審稿組：嘉儀、麗衣、欣雅、怡寧

本章講解含氮化合物在生物體中的代謝，包括如何被合成、利用以及轉換。

• 氮循環

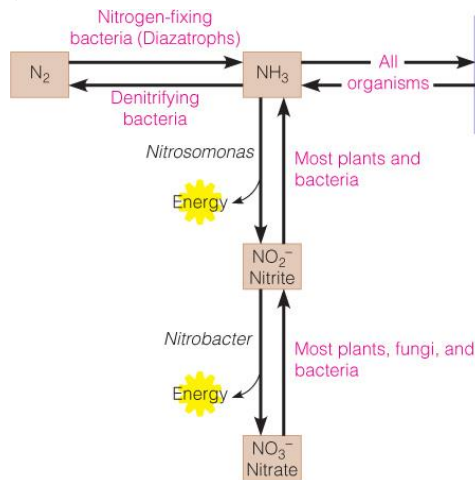


FIGURE 20.2

Relationships between inorganic and organic nitrogen metabolism. Inorganic nitrogen compounds are shown in brown and organic nitrogen compounds in purple. Interconversion of N_2 , nitrate, and ammonia is limited in the biosphere, but steady-state levels of these species are maintained. All organisms can use ammonia for biosynthesis, and it is a major metabolic end product.

Copyright © 2013 Pearson Canada Inc.

1. Biological Nitrogen Fixation (通過微生物將 N_2 轉為含氮化合物的過程)

因 $N \equiv N$ 三鍵鍵能高，故須**固氮酶(nitrogenase)**催化反應，降低活化能。

固氮細菌以 nitrogenase 催化 N_2 還原反應轉為 NH_3 (易溶於水)。

※molybdenum(Mo)-dependent nitrogenase：

為目前已知四種 nitrogenase 中最充足的一種，此種酶由兩種蛋白質組成：

Component I：MoFe protein \rightarrow dinitrogenase，催化 N_2 還原反應。

Component II：Fe protein \rightarrow dinitrogenase

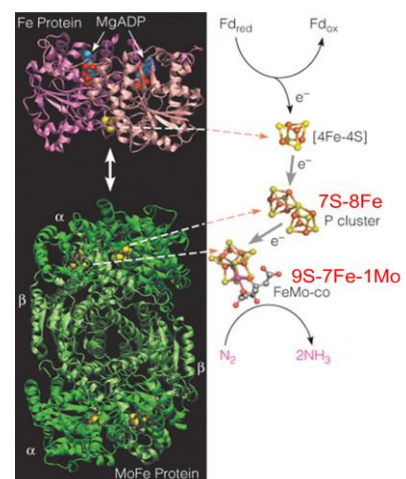
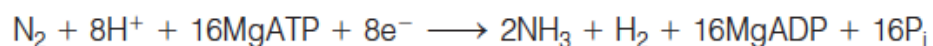
reductase，傳遞 e^- 和 H^+ 給 MoFe protein，過程中同時水解 MgATPs。

結構：

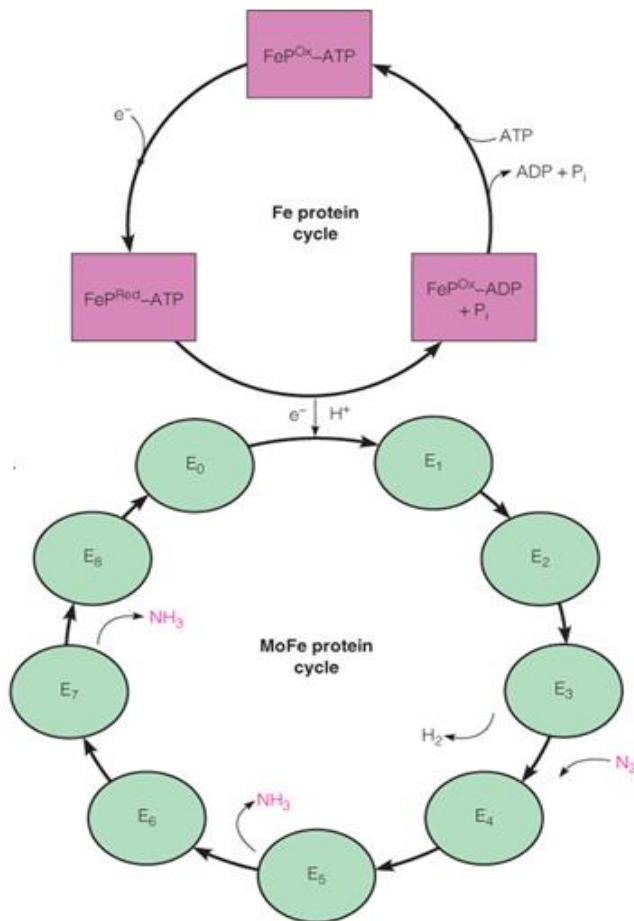
Fe protein：由 2 個相同亞基組成的二聚體。每分子二聚體中含有 4 克原子鐵和 4 克原子酸不穩定性硫，組成一個[4Fe-4S]的原子簇。

MoFe protein：由 2 個 α 亞基和 2 個 β 亞基組成的四聚體 ($\alpha_2\beta_2$)。其中也包含兩個 iron-sulfur complexes—the P cluster (7S-8Fe) 及 FeMo-co (9S-7Fe-1Mo)。

全反應式如下：



Mechanism of the two-component Mo-dependent nitrogenase reaction:



氧化態 Fe protein 接受 e^- 變成還原態 Fe protein，在 MgATP 協同作用下與 MoFe protein 結合形成複合體，傳遞 e^- 給 MoFe protein，同時伴隨 ATP 水解成 ADP+Pi，Fe protein 又恢復為氧化態。

Fe protein 和 MoFe protein 解離，如此循環 2 次後 N_2 取代 2H 結合到 MoFe protein 上，而釋放出 H_2 。再陸續接受 6 個電子後，經過形成 $E=N-NH_2$ 和 $E=M$ 中間物，最後釋放出 NH_3 。

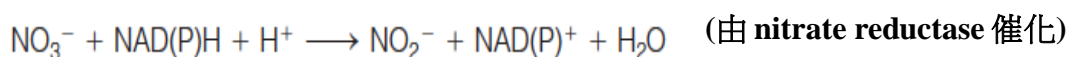
固氮必須在厭氧環境中進行。因為組成固氮酶的兩種蛋白質，MoFe protein 和 Fe protein 對氧極端敏感，一旦遇氧就很快導致固氮酶的失活，但多數的固氮菌都是好氧菌，它們要利用氧氣進行呼吸和產生能量。因此豆科植物與根瘤菌分別合成次單元再合併的 Leghemoglobin（豆血紅蛋白）可以在固氮作用進行時，攜帶大量氧氣供細胞行呼吸作用製造大量 ATP，使固氮作用順利進行。同時 Leghemoglobin 也可以降低根瘤內的氧氣濃度，以避免固氮作用受氧氣的抑制。

2. nitrate reduction

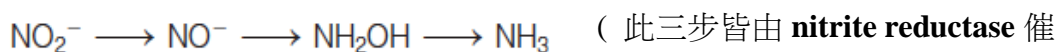
植物、真菌、細菌擁有將 NO_3^- 還原為 NH_3 的能力。

The eukaryotic enzyme contains bound FAD, molybdenum, and a cytochrome b5.

The enzyme carries out the overall reaction:



3. nitrite reduction



nitrite reductase 含有一個 Fe₄S₄ center 和一分子的 siroheme, a partially reduced iron porphyrin.

```
graph TD
    NH3[NH3] -- 1 --> AKG[α-Ketoglutarate]
    NH3 -- 2 --> Glutamate1[Glutamate]
    NH3 -- 3 --> Aspartate[Aspartate]
    NH3 -- 4 --> CO2[CO2, ATP]
    AKG --> Glutamate2[Glutamate]
    AKG --> Glutamine[Glutamine]
    Glutamate2 -- 5 --> Glutamine
    Glutamate2 --> OA[Other amino acids]
    Glutamine --> PNC[Purine nucleotides, cytidine nucleotides, amino sugars, tryptophan, histidine]
    Aspartate --> Asparagine[Asparagine]
    CO2 --> CP[Carbamoyl phosphate]
    CP --> ARG[Arginine, pyrimidines, urea]
```

1. Glutamate dehydrogenase
2. Glutamine synthetase
3. Asparagine synthetase
4. Carbamoyl phosphate synthetase
5. Glutamate synthase.

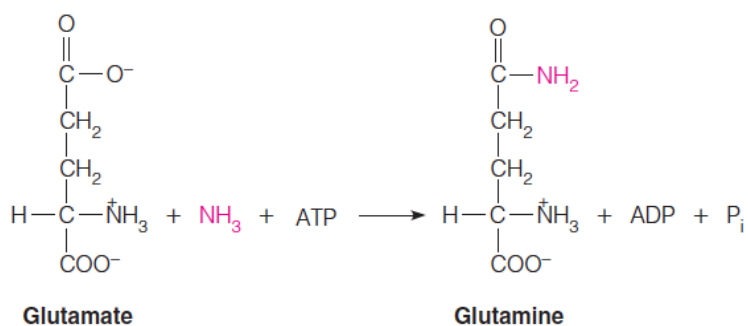
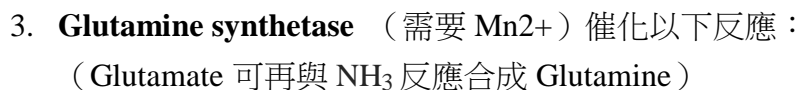
1. Glutamate dehydrogenase

$$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C=O} \\ | \\ \text{COO}^- \end{array} + \text{NH}_3 + \text{NAD(P)H} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ \text{COO}^- \end{array} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+$$

$K_M \sim 1 \text{ mM}$

α -Ketoglutarate
Glutamate

催化以下反應：



原核的 glutamine synthetase 受兩種機制控制：

(1) Cumulative feedback inhibition

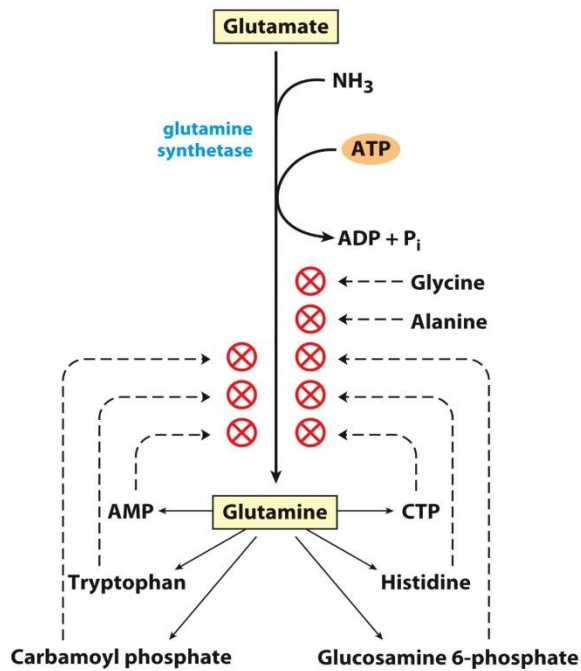
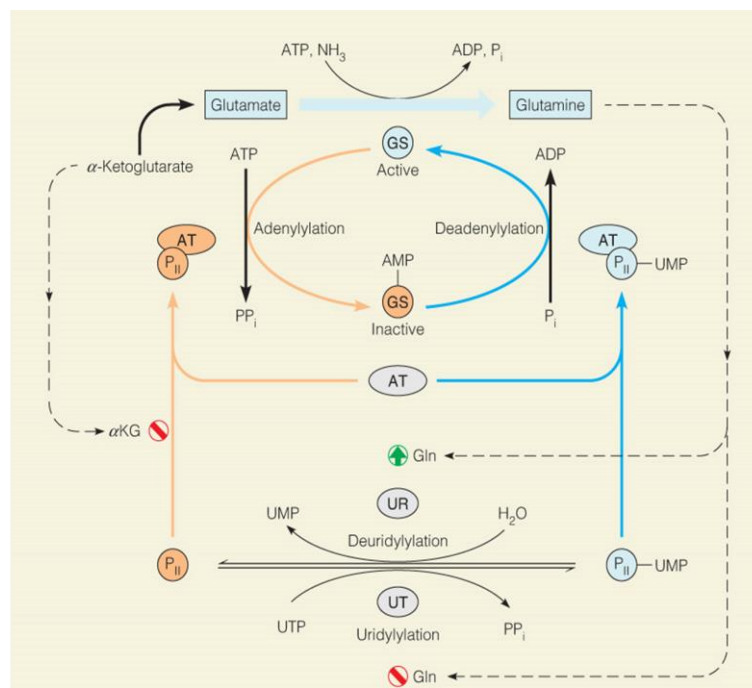


Figure 22-8
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

(2) Covalent modification



adenylyltransferase (AT)
uridylyltransferase (UT)
uridylyl-removing enzyme (UR)

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{O}^- \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ \text{COO}^- \end{array} + \text{ATP} + \text{NH}_3 (\text{Gln}) \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ \text{COO}^- \end{array} + \text{AMP} + \text{PPi} + (\text{Glu})$$
$$\text{NH}_3 + \text{HCO}_3^- + 2\text{ATP} \longrightarrow \text{carbamoyl phosphate} + 2\text{ADP} + \text{P}_i$$

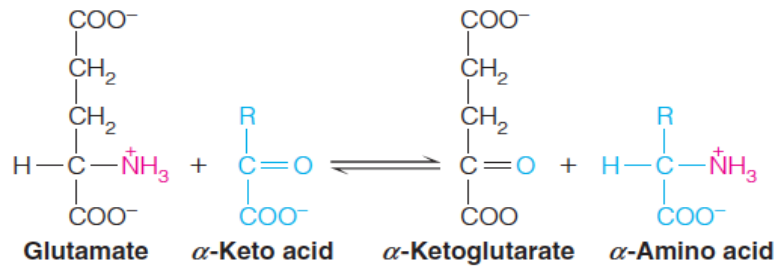
$$\text{Glutamine} + \text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^- + 2\text{ATP} \longrightarrow \text{carbamoyl phosphate} + 2\text{ADP} + \text{P}_i + \text{glutamate}$$

CPS2----位於 cytosol

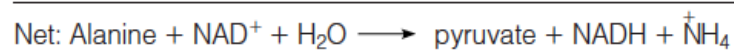
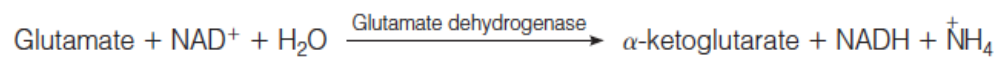
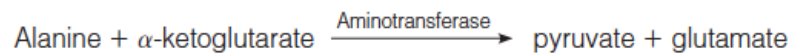
(3) 非必須胺基酸(nonessential a.a.)：可以自己合成足夠的量

註: Arg 和 Met 都會在體內少量合成，但用途非合成蛋白質，所以還是要靠食物攝取

(1) 氨基轉移：藉由 transaminases 催化，將氨基由 α -amino acid (通常是 Glutamate) 移到 α -keto acid (通常是 α -ketoglutarate) 上面(如下方的反應)，以合成其他氨基酸。

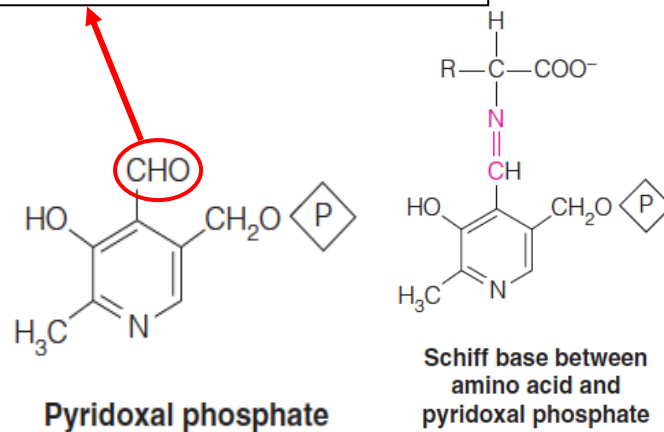


[註]此反應的平衡常數 $K=1$ ，所以正逆反應都會進行，端看反應物及產物的多寡來決定→表示 transamination 的功能不只是合成氨基酸，還能夠分解氨基酸。(如下列反應式)



- (2) 體內無法合成某些胺基酸，是因為無法合成相對應的 α -keto acid
- (3) Transamination 需要輔酶 Pyridoxal phosphate(來自 Vitamin B₆)

反應位，可和氨基酸的氨基形成 Schiff base



- (4) 臨床常用的反應式：



[註]SGOT 又稱作 AST(Aspartate aminotransferase)

SGPT 又稱作 ALT(Alanine aminotransferase)

• Protein Turnover

1. Quantitative Features of Protein Turnover

- (1) 蛋白質持續進行分解及合成的狀態，稱作 **Protein Turnover**
- (2) 蛋白質分解大多屬於一級反應
- (3) 有些蛋白分解速率快(快的 **Protein turnover**)，像是消化性酵素、激素、抗體，或是某個路徑(**pathway**)的速率決定步驟(**rate-determining step**)的酵素。
- (4) 有些蛋白分解速率慢(慢的 **Protein turnover**)，像是結構性蛋白(例：**histone H2A**)

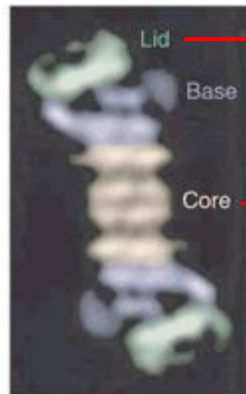
2. Biological Importance of Protein Turnover

- (1) 蛋白質分解，可提供合成其他蛋白質的原料(胺基酸)，或是其他路徑(**pathway**)的原料
- (2) 去除一些突變或是被破壞的蛋白質

3. Intracellular Proteases and Sites of Turnover

在真核生物中，有兩種蛋白水解酶，分別是：

- (1) **Calpains**：一群藉由鈣離子活化的水解酶
- (2) **Proteasome**：由數個次單元組成，需要耗 **ATP**(如下圖：**26S proteasome**)



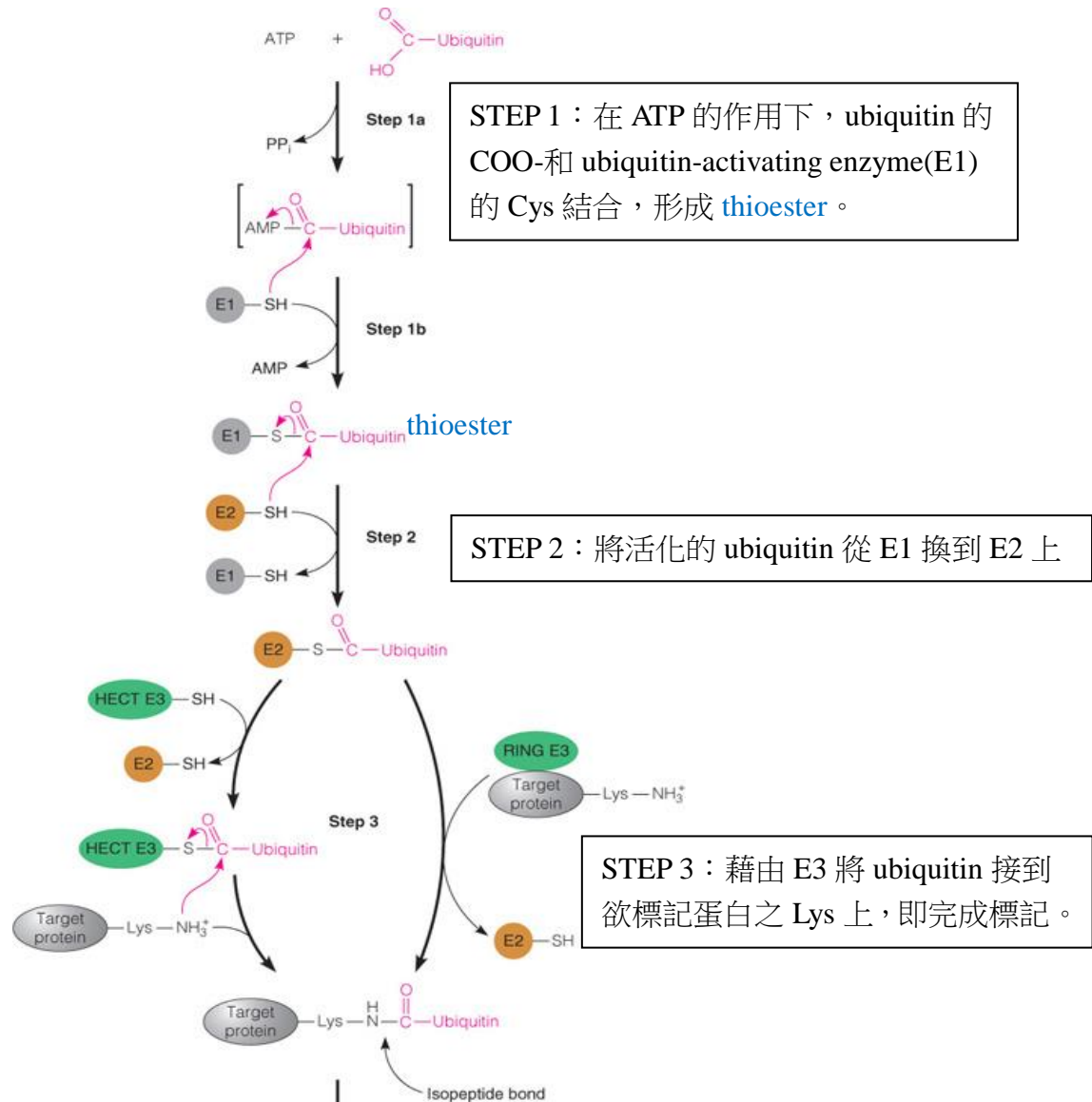
蓋子：可以將巨大的蛋白質重新摺疊，形成長條狀，較易進入

核心：可將蛋白質切割成 7-8 胺基酸的片段

4. Chemical Signals for Turnover (如何標記蛋白質，使之被送到 proteasome)

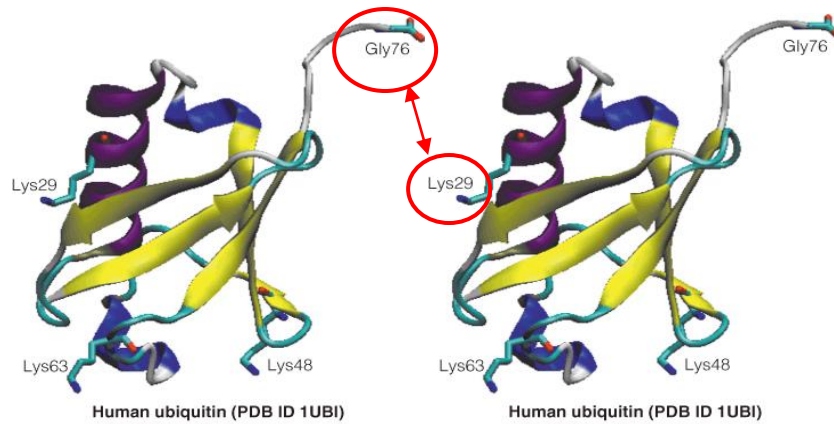
(1) Ubiquitination

Ubiquitin 是一種小型的蛋白質，利用其 C 端(Gly)的 COO⁻和欲標記之蛋白質的 Lys 形成 **isopeptide bond** 來完成標記的任務。其作用流程如下：



[註 1] E1 有兩種，E2 有 28 種，E3 有上千種，顯示出逐漸增加的專一性。另外，E3 有分成兩類，第一類是 HECT E3(上圖左方路徑)，辨識欲標記的蛋白，並由 E2 轉移活化的 ubiquitin。第二類是 RING E3(上圖右方路徑)，只辨識欲標記的蛋白，不轉移活化的 ubiquitin。

[註 2] ubiquitin 上也有 Lys，所以 ubiquitin 之間可以藉由 Gly 旁的 COO-以及 Lys 互相連接，形成 ubiquitin chain。(如下頁圖的连接法)



(2) PEST Sequences

富含 Proline(P)、Glutamate(E)、Serine(S)和 Threonine(T)的區域稱做 PEST 序列(PEST sequence)，若一蛋白質有一個或多個 PEST 序列，則它會較容易被 proteasome 分解，壽命就會比較短。所以，科學家將 PEST 序列視為蛋白質分解的標記。

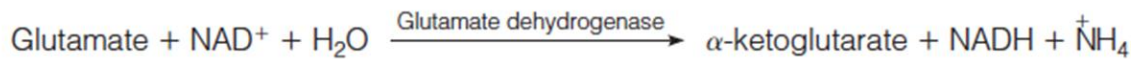
(3) N-Terminal Amino Acid Residue

若一蛋白質的其中一段胺基酸序列 N 端是 Phe、Leu、Tyr、Trp、Lys、Arg，則此蛋白質會有較短的壽命。

• Amino Acid Degradation and Metabolism of Nitrogenous End Products

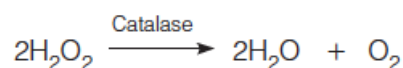
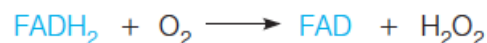
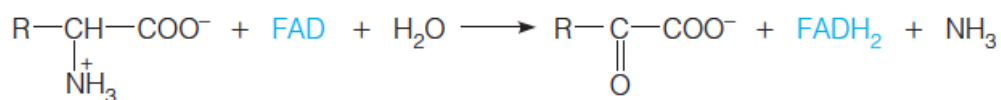
Common Feature Of Amino Acid Degradation Pathways

1. By transamination：去除 α -amino group，產生對應的 α -keto acid

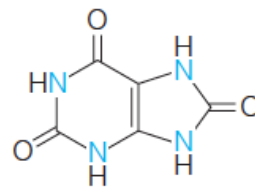


2. By oxidative deamination：由 L-amino acid oxidase(a flavoprotein enzyme found in kidney and liver)催化

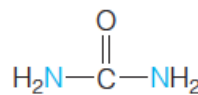
※Bacteria 細胞有 D-amino acid 的細胞壁，故有 D-amino acid oxidase



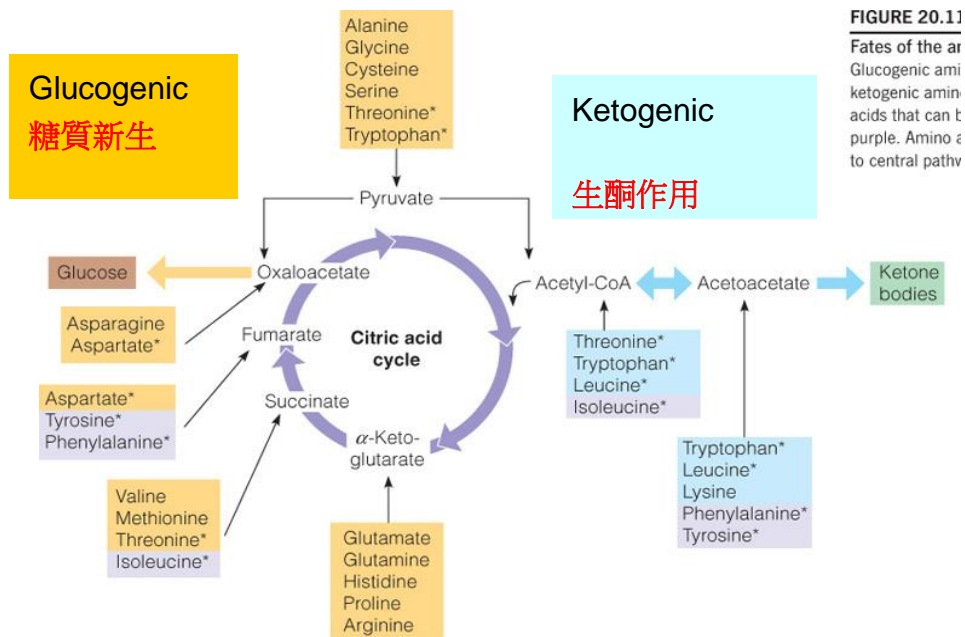
※Amino acid 去除氨之後剩下的 carbon skeleton 可以進入 TCA cycle 做進一步的氧化，或是被用來合成 carbohydrate



Uric acid



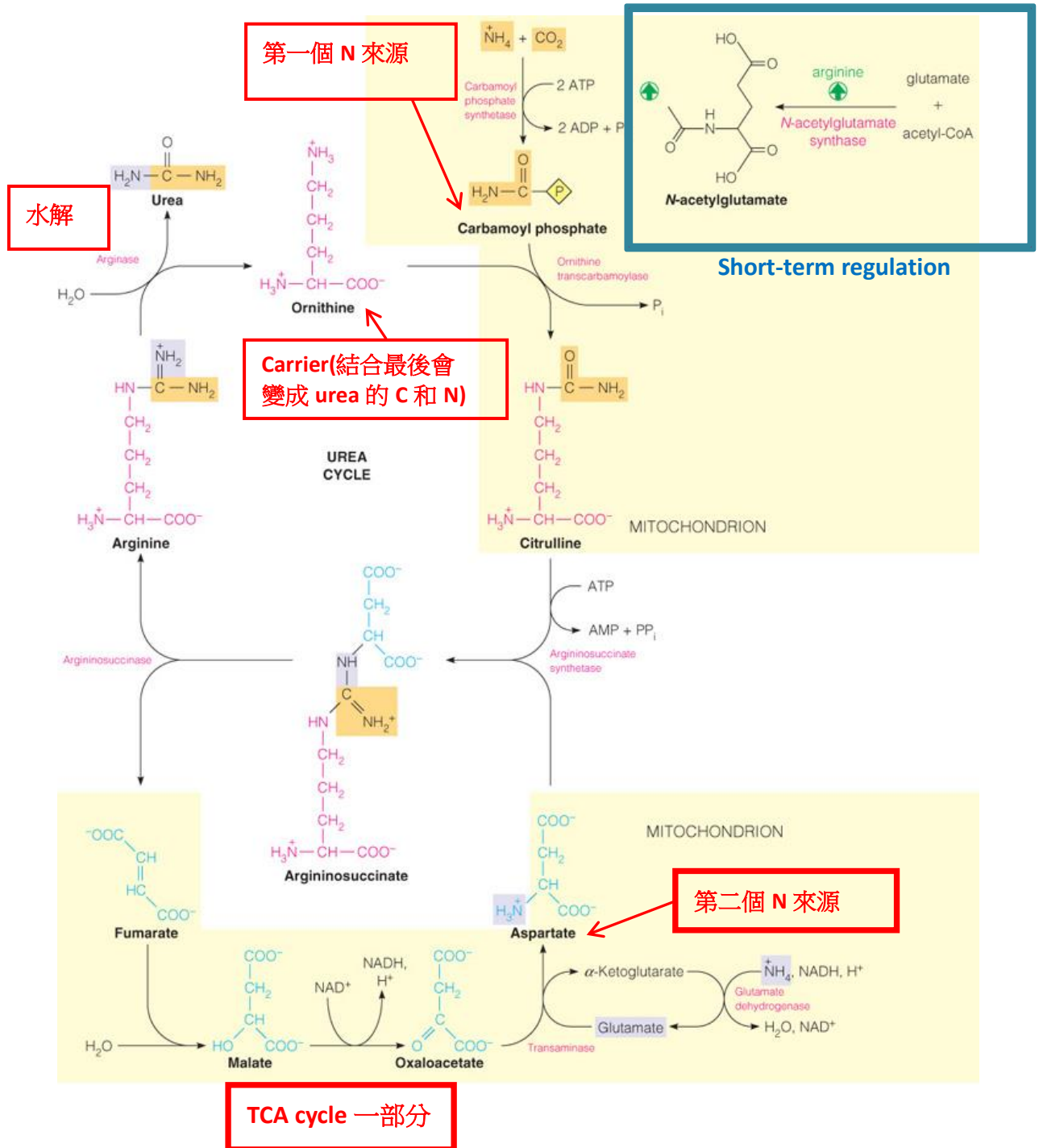
Urea



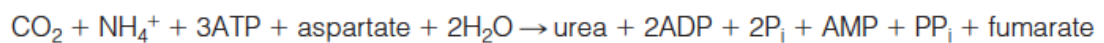
Detoxification And Excretion Of Ammonia

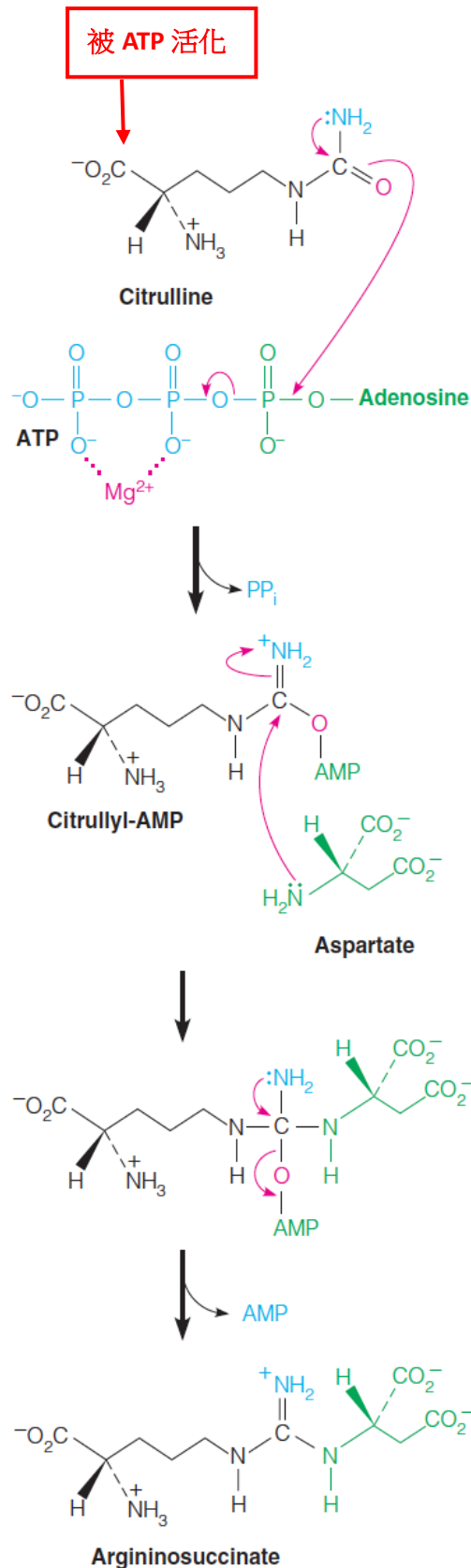
- 水生動物：直接擴散排出體外
- 陸生動物：轉換成其他型式以減少水分喪失
 - ✧ 鳥類、爬蟲類：Uric acid 尿酸(不溶於水，所以不需水分即可排除，也不會影響體內滲透壓)
 - ✧ 哺乳類：urea 尿素(溶於水。沒有離子性官能基，故累積的時候不會影響體內 Ph 值)

Kerb-Henseleit Urea Cycle



- 尿素在肝臟合成後，運送到腎臟排出體外
- Net reaction for one turn of the urea cycle





- 所有的生物都可以從 arginine 合成出 ornithine，但只有 ureotelic organisms(以尿素形式排除 N 的生物)擁有 Arginase

- Use of aspartate as a nitrogen donor(上圖下半部分的 cycle)

- ✧ Step 1 : argininosuccinate synthetase (詳細機制如左圖)

- Step 2 : argininosuccinase 催化，原來 aspartate 的 C 的部分脫離變成 fumarate

Regulation Of Urea Cycle

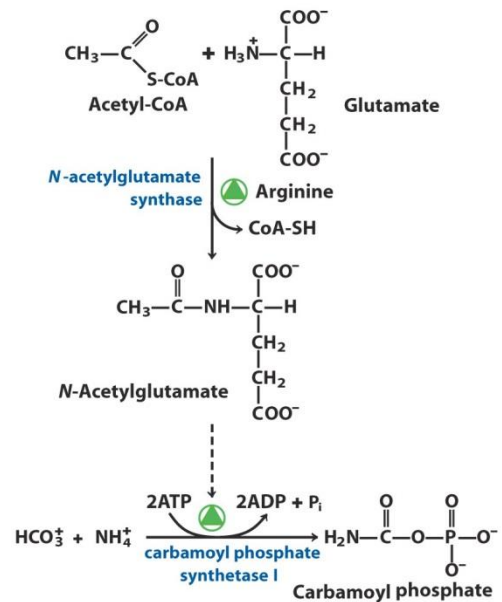
1. long-term : enzyme synthesis
2. short-term:

- **Allosteric regulation of CPS1**

- ✧ N-acetylglutamate 由 glutamate 和 acetyl-CoA 合成。
- ✧ 當 amino acid breakdown↑
 - glutamate level↑
 - N-acetylglutamate↑
 - 活化 CPS1 → 促進 urea cycle

- **Covalent modification—acetylation of CPS1**

- ✧ acetylation of specific lysine residues inactivate CPS1
- ✧ specific mitochondrial sirtuin (SIRT5) catalyze deacetylation of CPS1
- ✧ starvation(胺基酸當作能量來源)
 - NAD+↑
 - SIRT5 deacetylate (活化) CPS1
 - carbamoyl phosphate 合成↑
 - 促進 urea cycle

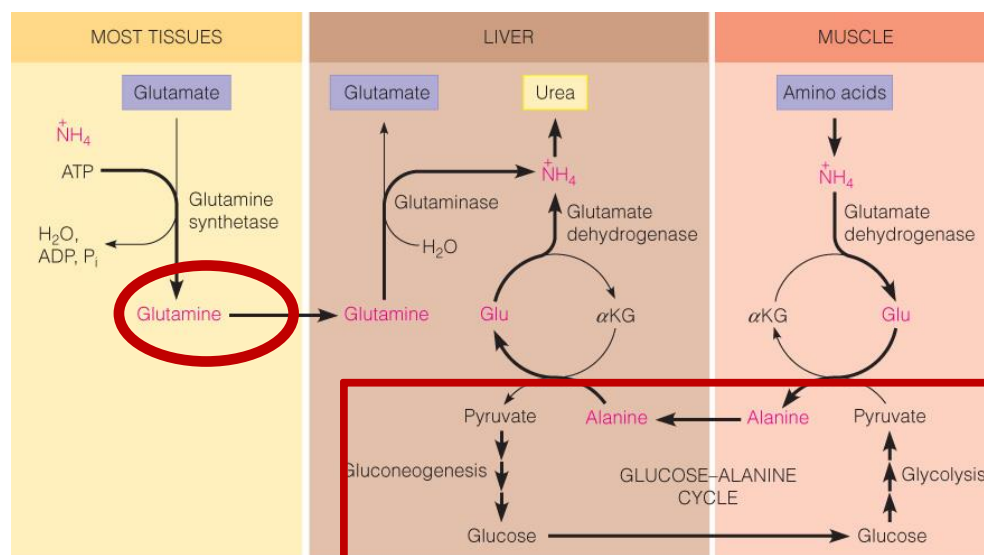


- **Urea cycle 中的酵素活性受到 3 種物質濃度高低影響**

1. Glutamate 2. Acetyl-coa 3. Arginine

- Ammonia 的毒性來自其對胺基酸和能量代謝的影響。Ammonia 的累積會使 glutamate dehydrogenase 反應不斷進行，大量消耗 TCA cycle 的中間產物和 NADH，並使 ATP 不足。
- 幾種遺傳性疾病，缺少 urea cycle 之中的酵素，會有 Hyperammonemia(高血氨症)的現象。

Transport Of Ammonia To The Liver For Urea Synthesis



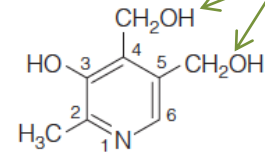
- 肌肉細胞：glucose-alanine cycle
- 其他組織：轉換成 Glutamine 運送(Glutamine synthetase & glutaminase)

Coenzymes Involved in Nitrogen Metabolism

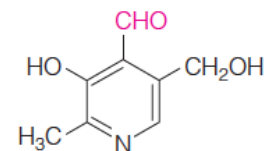
Pyridoxal Phosphate

- Vitamin B6 又稱 pyridoxine
- Pyridoxal phosphate (PLP) 是主要的 coenzyme 形式。但真正反應的並非 Pyridoxal phosphate 上的 CHO 官能基，而是 aldimine (和活化位上的 lysine residue，由 NaBH_4 還原形成不可逆的 bonding)
- 可構成穩定的 Schiff base 結構，催化多種反應。 H^+ 或是金屬離子 (例如 Al^{3+} , Cu^{2+}) 可以和 Pyridoxal Phosphate 的 pyridine ring 有電荷吸引力，穩定結構。

Hydroxymethyl group

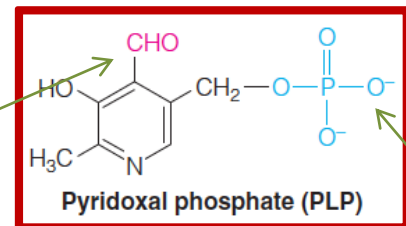


Pyridoxine



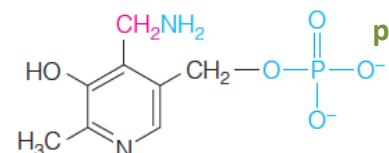
Pyridoxal

oxidized

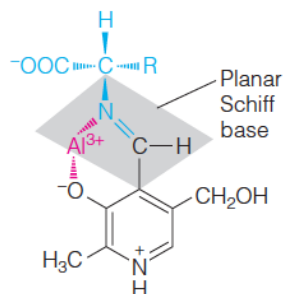


Pyridoxal phosphate (PLP)

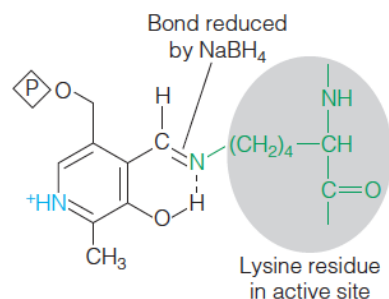
phosphorylated



Pyridoxamine phosphate (PMP)



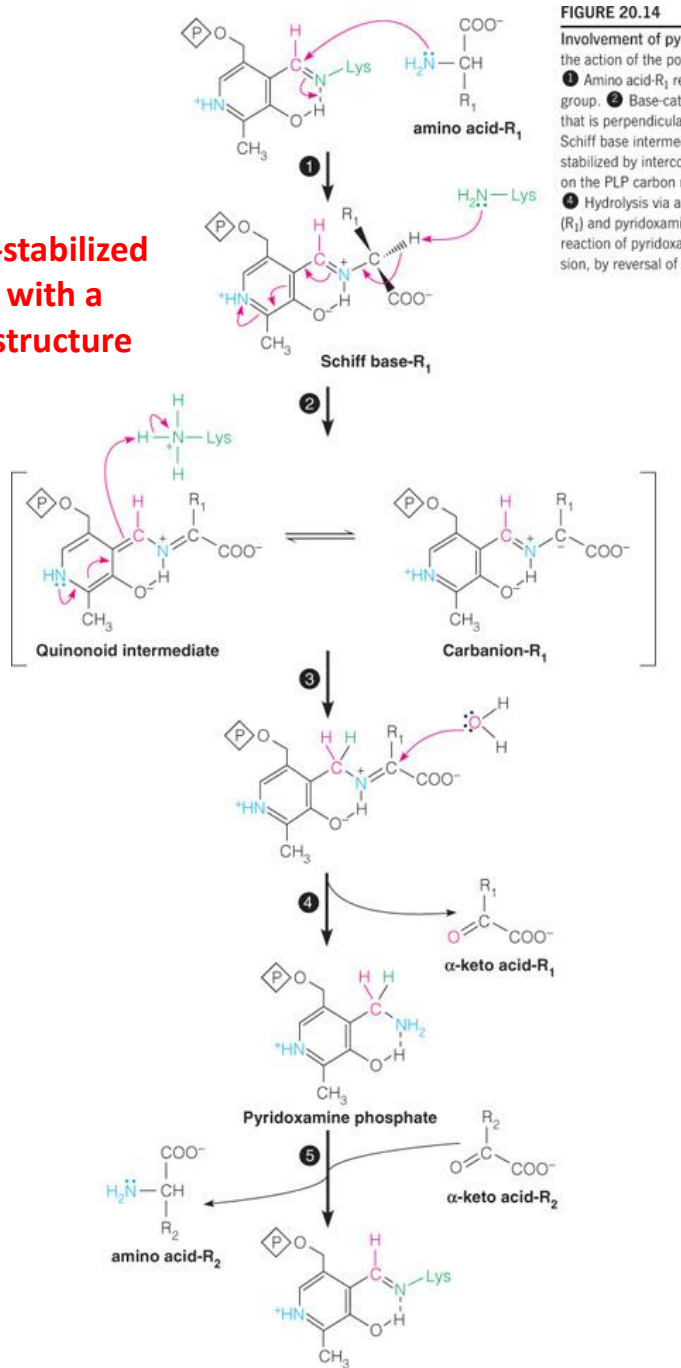
Aldimine



Enzyme-bound pyridoxal phosphate

- 所有的 PLP 催化反應都有相同的機制(下圖以 transamination 為例)

Resonance-stabilized
carbanion with a
quinonoid structure



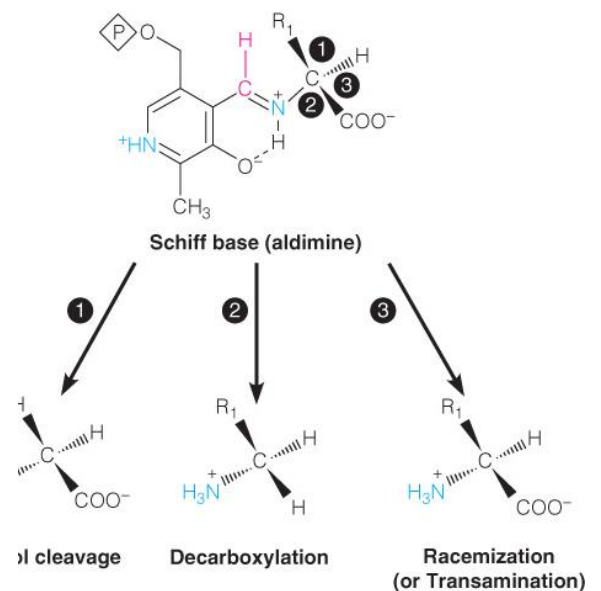
Amino acid-R1 取代 lysine
amino group

Base-catalyzed deprotonation → 共振

Amino acid-R1 取代 lysine
amino group

水解

Transamination complete

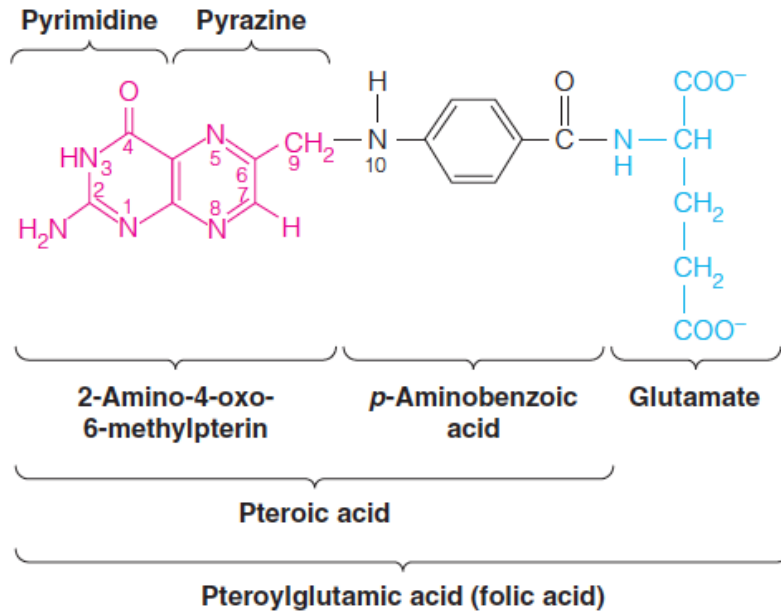


All three substituents at the α-carbon of the amino acid moiety can be labilized:

1. R-group : retro-aldol cleavage
2. Carboxyl group : decarboxylation.
3. Hydrogen : racemization or transamination.

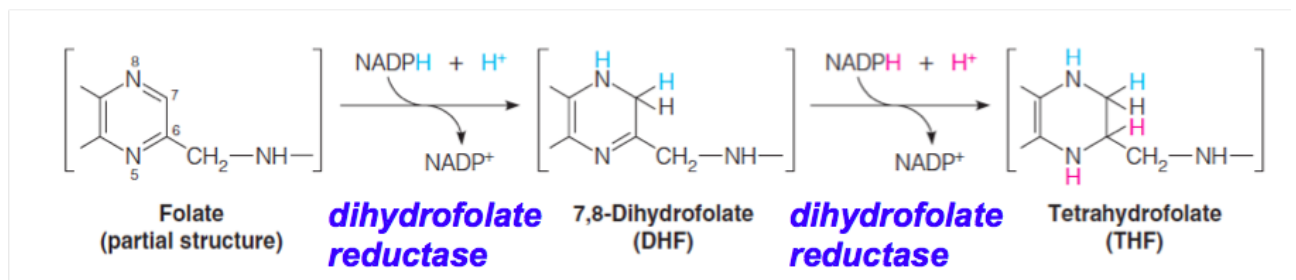
● Coenzymes Involved in Nitrogen Metabolism

Coenzyme: Folic acid



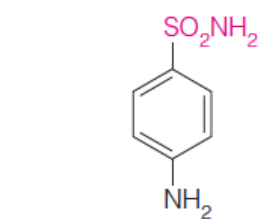
葉酸輔酶含有 poly- γ -glutamate chain。這些 poly- γ -glutamate chain 幫助葉酸輔酶被保留與細胞內，也與酵素更緊密地結合。

一旦在細胞內，葉酸會有兩個連續的 reductions of pyrazine part of the pteridine ring 被轉為活性形式。

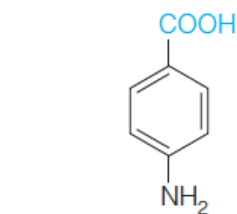


二氫葉酸還原酶是一些有效的抗癌，抗菌和抗寄生蟲藥物的目標。

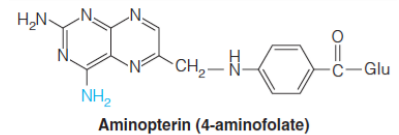
以下為抗身素，也可抑制葉酸的生物合成：



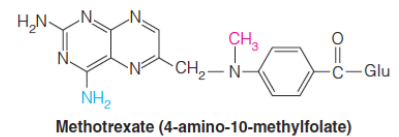
Sulfanilamide



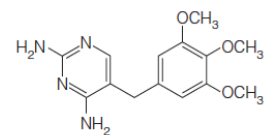
p-Aminobenzoic acid (PABA)



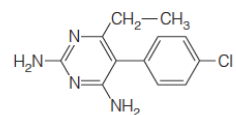
Aminopterin (4-aminofolate)



Methotrexate (4-amino-10-methylfolate)

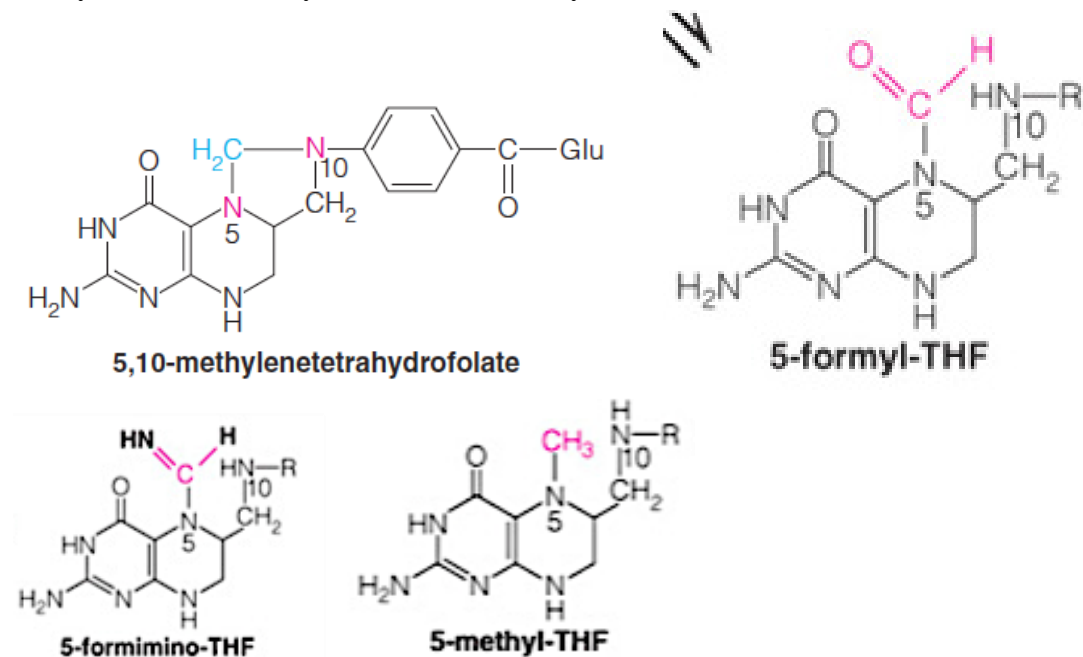


Trimethoprim



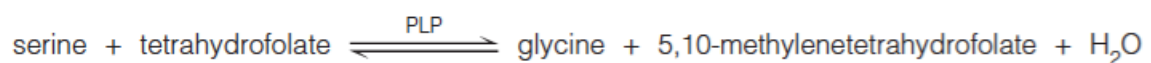
Pyrimethamine

四氫葉酸輔酶 (Tetrahydrofolate coenzymes) 轉移與互變成一碳單位的甲基 methyl，亞甲基 methylene，和醛基 formyl 的氧化水平。

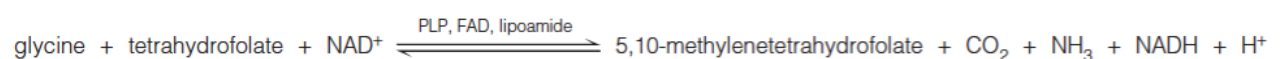


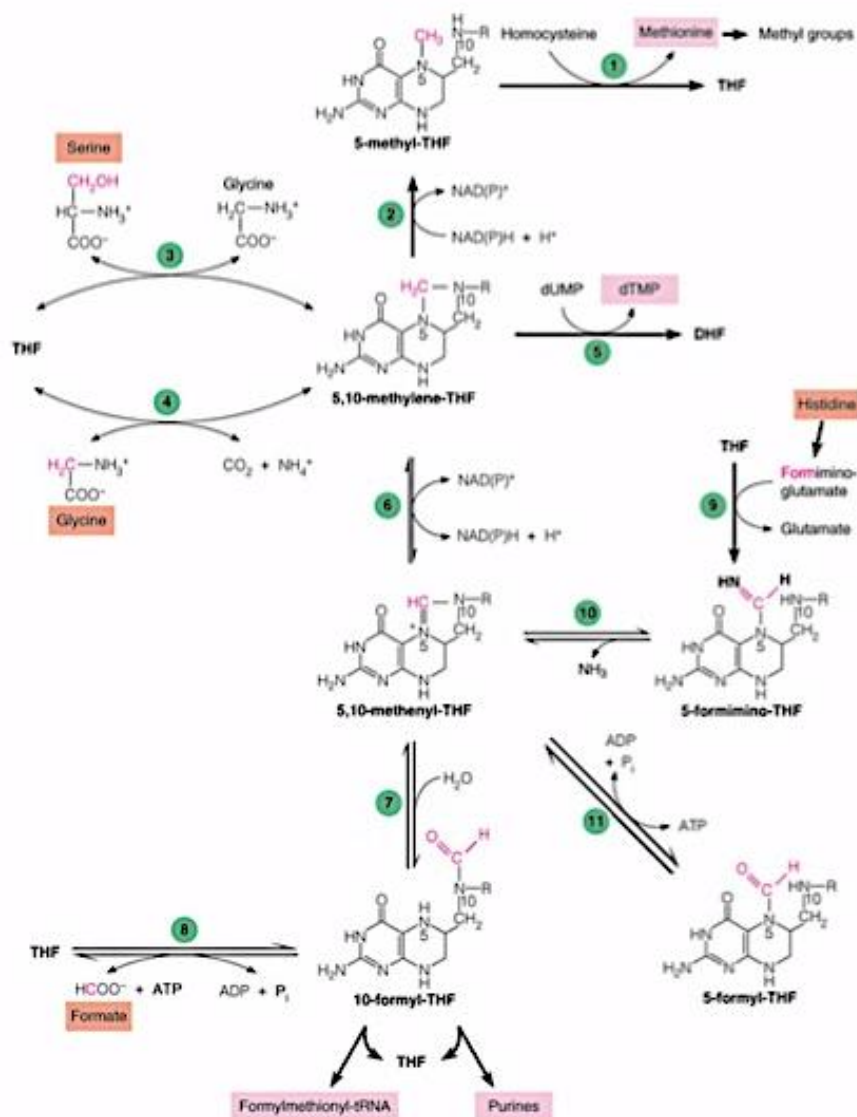
大多數生物體的 β -碳絲氨酸和甘氨酸的後續氧化獲取大部分激活的一碳單位的。

參與的酵素：絲氨酸羥甲基轉移酶 **serine hydroxymethyl- transferase**



Glycine 甘氨酸可通過甘氨酸裂解系統 **glycine cleavage system**，一個位於線粒體的多酶複合物，產生多一個 5,10-methylenetetrahydrofolate

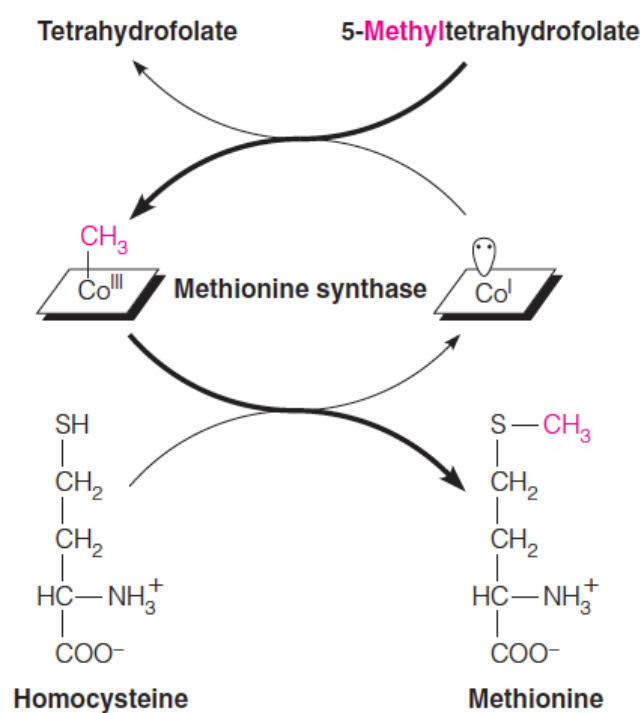




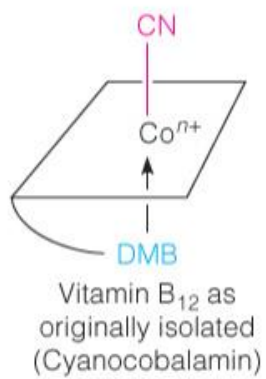
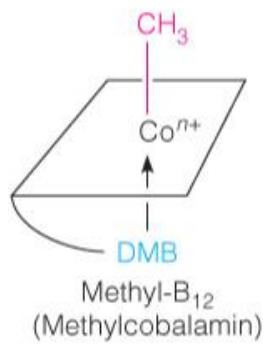
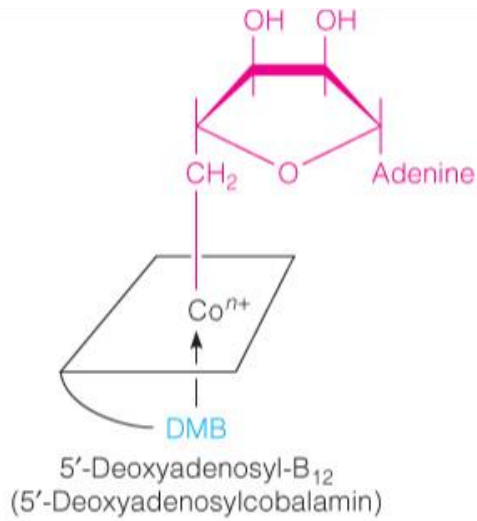
Metabolic reactions involving synthesis, interconversion, and utilization of one-carbon adducts of tetrahydrofolate

維生素 B12 的結構：

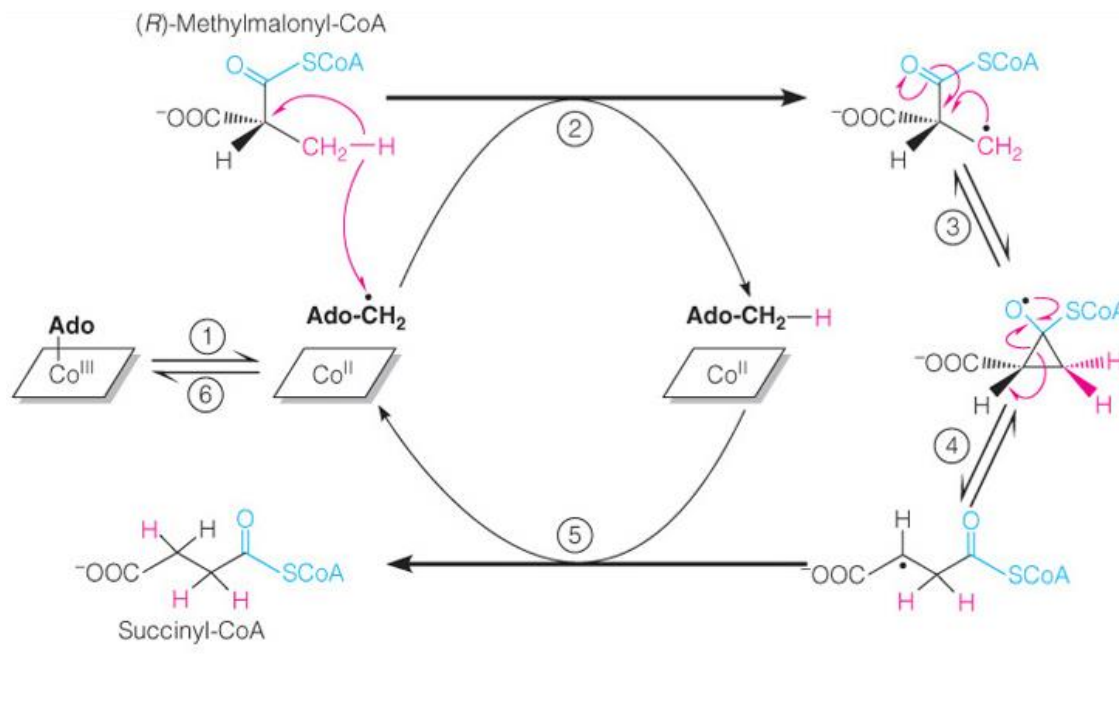
1. 此處的分子是含氰化物的形式的最初分離分子（cyanocobalamin 氰鈷胺素）。
2. 在細胞中，一個水分子或羥基會代替 CN， 形成維生素 B12 的輔酶形式。
3. 該咕啉環（corrin ring）以紅色顯示。
4. 與鈷連接的 5,6 - Dimethylbenzimidazole（DMB）以藍色顯示。



該咕啉環 **corrin ring**，在所有已知形式的維生素 B12 中都相同，Co 共同承擔一個正電荷（ $N = 1, 2$ ，或 3 ），而每個分子都不帶電荷。



• The intramolecular isomerization catalyzed by methylmalonyl-CoA mutase:



惡性貧血是一種糖蛋白 glycoprotein（內在因素）缺乏造成的。糖蛋白對腸道的維生素 B12 吸收很重要，因此惡性貧血會導致維生素 B12 輔酶在細胞內的缺陷。維生素 B12 的缺乏導致 5-methyltetrahydrofolate 的累積，與其他葉酸輔酶伴隨枯竭。葉酸缺乏可增加心血管病和 birth defects 的風險。該方案是基於表觀葉酸缺乏，可由通過甲硫氨酸合酶反應降低通量見於 B12 缺乏的早期階段。

