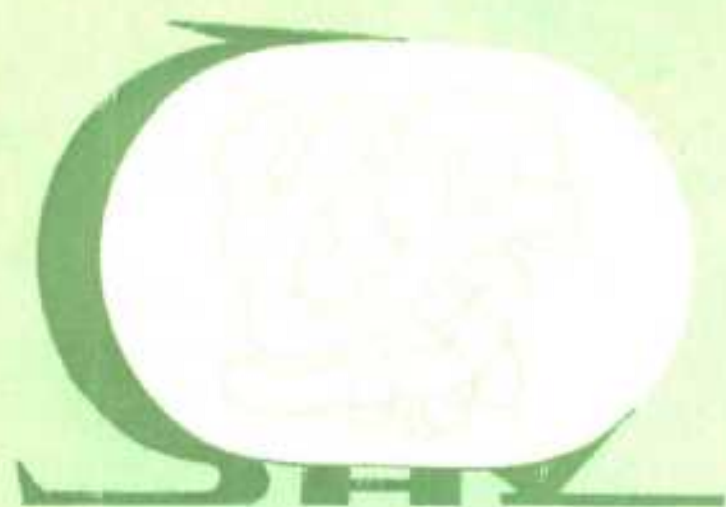




· 糖蛋白专辑 ·

SHENWUHUAXUEYICONG

生物化学译丛

第 6 辑

生物化学译丛(第六辑)

·糖蛋白专辑·

上海第一医学院生化教研室编

上海科学技术文献出版社出版

(上海市武康路2号)

新华书店、上海发行所发行

浙江洛舍印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 6 字数 149,000

1984年1月第1版 1984年1月第1次印刷

印数: 1~3,000

书号: 13192·48 定价: 0.77元

《科技新书目》60-265

前 言

糖蛋白(包括蛋白多糖)是广泛分布于自然界中的复杂的大分子化合物,它是由一种或多种糖、或糖的衍生物通过共价键与肽链上氨基酸残基结合而成的蛋白质。不同糖蛋白的含糖量差别很大。一般糖蛋白的糖链(或称糖单位)中不含糖醛酸;而蛋白多糖的糖链往往是结构很长的单链氨基多糖,并含有大量糖醛酸。

自然界的各种生物,如病毒、细菌、高等植物、单细胞原生动物、鱼类、禽类、哺乳动物乃至人体许多组织器官中,都含有糖蛋白。人体内的糖蛋白广泛存在于细胞外液、细胞内液和细胞膜上,甚至作为细胞器的成分。某些血浆蛋白、激素、粘液蛋白、胶原、蛋白多糖以及细胞质膜、微粒体膜、高尔基体复合体膜上的蛋白质,都属于糖蛋白。这些糖蛋白与各种重要而又复杂的生物学功能密切相关,如参与分子识别、免疫反应、激素控制、血液凝固、离子转运和酶促催化,并具有运输功能及润滑作用等。最近还发现细胞表面的蛋白多糖,在细胞的相互识别、发育、分化、衰老或癌变等过程中都起着非常重要的作用。

近年来,对各种糖蛋白的化学结构、生物合成和降解、结构与功能,以及糖蛋白与某些疾病的关系等方面的研究,都取得很大成就。随着各种新技术的应用与实验方法的不断改进,在糖蛋白的化学和分子生物学领域内的研究更加迅速发展,预期将会出现重大的进展。为了介绍国外关于糖蛋白的研究情况,本辑选译了六篇文章,供有关人员参考。

上海第一医学院生化教研室

1983年10月

目 录

糖蛋白	(1)
蛋白多糖的结构与功能	(44)
细胞的功能变化和蛋白多糖合成	(53)
粘多糖代谢异常病的酶异常	(67)
蛋白多糖和衰老	(80)
糖蛋白的糖链结构及其癌变	(86)

糖 蛋 白

Wagh, P. V. and Bahl, O. P.

一、引 言

近年来得知,大量蛋白质是通过共价键与糖相连。这种蛋白质,一般称为糖蛋白,是一组广泛分布于自然界中复杂的大分子化合物。它们实际上存在于所有生命形式即动物、植物和微生物中,并已证明它们存在于细胞外液、细胞内液、结缔组织和细胞膜上。令人感兴趣的主要是由于糖蛋白担负着各种各样的生物学功能,这些功能包括:免疫保护作用、酶催化作用、激素控制、激素储存、血液凝固、离子转运、润滑作用、表面保护作用、结构支持、细胞粘附和分子识别。众所周知的、功能明确的糖蛋白有:免疫球蛋白、促性腺激素、促甲状腺激素、核糖核酸酶、抗冷冻糖蛋白、粘糖蛋白、抗生物素蛋白、蛋白多糖、胶原和fibronectin(表1)。近年来,在了解关于糖蛋白的生物合成、降解、结构-功能关系,及其在几种疾病过程中所表现的症状方面,已获得明显进展,已有许多阐明糖蛋白各个方面的评论文章和专著。本文目的主要综述有关糖蛋白的结构和生物合成,并简单介绍蛋白多糖和胶原,以及糖在生物学过程中的作用。

表1 一些特性明确的糖蛋白的功能

糖 蛋 白	分离的来源	功 能
免疫球蛋白	脊椎动物血浆	免疫保护作用
绒毛膜促性腺激素	尿	激素
促卵泡激素	垂体,血清	激素
促黄体激素	血清,垂体	激素
促甲状腺激素	垂体	激素
核糖核酸酶	胰腺	酶
抗冷冻糖蛋白	血浆(南极的鱼)	冷冻点,抑制作用
粘糖蛋白	粘液分泌物	润滑作用,保护作用
抗生物素蛋白	鸡蛋	结合维生素
蛋白多糖	软骨	结构
胶 原	皮肤	结构
fibronectin	细胞表面	细胞粘附

蛋白质转变成糖蛋白的关键步骤,是在生物合成时肽链的糖基化作用。因此,糖蛋白的定义是由一种或多种糖类通过共价键连接在肽链上的一种蛋白质。尽管这个严格的定义包括蛋白多糖,但根据糖类单位的重复程度和糖类单位的多少或大小,可分别分类。糖蛋白的糖

本文正文和图中一些缩写的说明: Arab—阿拉伯糖, Dol—多萜醇, Fuc—岩藻糖, Gal—半乳糖, GalN—氨基半乳糖, Glc—葡萄糖, GlcN—氨基葡萄糖, GlcNAc—N-乙酰氨基葡萄糖, GlcUA—葡萄糖醛酸, hCG—人绒毛膜促性腺激素, Hyl—羟赖氨酸, LH—促黄体生成激素, Man—甘露糖, NANA—N-乙酰神经氨酸, SA—唾液酸, Xyl—木糖。

含量范围,为占分子的1%至80%左右。普遍发现的糖有三种类型:(1)中性糖,如D-半乳糖、D-甘露糖、D-葡萄糖和L-岩藻糖;(2)氨基糖,如N-乙酰氨基葡萄糖和N-乙酰氨基半乳糖;(3)酸性糖,如唾液酸。后者是神经氨酸的衍生物,其氨基常被乙酰基或羟乙酰基所取代,因此,它们被归类为N-乙酰-或N-羟乙酰神经氨酸。除N-乙酰基外,还发现唾液酸含有1~3个O-乙酰基。其他酸性糖,如D-葡萄糖醛酸和L-艾杜糖醛酸,是蛋白多糖的主要成分。最近关于糖蛋白中存在D-葡萄糖醛酸的报道,将使糖蛋白和蛋白多糖之间组成上的差别缩小。植物和微生物来源的糖蛋白,含有D-木糖、L-阿拉伯糖和L-鼠李糖。D-木糖也是蛋白多糖中的一种结合的糖。除硫酸蛋白多糖外,有几种糖蛋白(如来自粘液分泌物和脑的糖蛋白)含有硫酸糖残基。

鉴于糖蛋白中存在的糖含量和单糖类型的差异,当含有一个糖以上时,在理论上能预期到糖单位的结构类型可能有几种排列。可是,不同来源的糖蛋白的鉴别表明,糖单位的结构类型的变化只限于几种,从而认为生物合成途径也只是有限的几种。然而,在这些较少的结构类型中,分子大小和糖间键的结构差异存在较大的变化,是可能存在的。各种糖蛋白有不同数目的糖单位。例如牛核糖核酸酶、人绒毛膜促性腺激素和绵羊颌下腺粘蛋白,每分子糖蛋白分别含有1、8和800个糖单位。而且在多肽链上的糖单位,没有一致的分布和定位形式。从这些观察来看,按糖的组成和糖单位的数目给糖蛋白分类是行不通的。可是,仔细地比较糖单位的结构特征、糖和蛋白质之间结合的性质以及与此些键相连的糖,可在一定的程度上将糖蛋白分类。

二、糖与肽链的共价连接

连接糖与肽链的共价键性质,是糖蛋白的主要结构特性。多肽链内的氨基酸经糖基化作用而成为一种糖蛋白显然是不会随便发生的,因为已知糖基化作用是出现在蛋白质分子的特殊位置上。例如,人绒毛膜促性腺激素全部一级结构已清楚,其中糖连接的特殊位置是在 α 和 β 亚基内7个天冬酰胺残基中的4个(即 α -亚基中的52和78及 β -亚基中的13和30)以及 β -亚基内13个丝氨酸残基中的4个(即121、127、132和138)上面。

迄今研究过的糖蛋白中,已发现有三种糖肽键。根据一种特定的糖在一种氨基酸的特殊功能基上的连接方式,可严格地将它们区分。第一种,是糖与天冬酰胺的酰胺基连接,形成糖基胺或N-糖苷键。第二种,当糖与丝氨酸、苏氨酸、羟赖氨酸或羟脯氨酸的羟基连接时,则糖苷键就是O-糖苷形式。第三种,当糖与半胱氨酸的硫醇连接时,就生成S-糖苷键。在自然界中,前两种糖-肽连接形式占优势,只在少数情况下发现S-糖苷键。

(一)用N-糖苷键连接糖的糖蛋白

N-糖苷键或[2-乙酰胺基-1-(β -L-天冬酰胺)-1,2-二脱氧- β -D-葡萄糖](图1-A)对弱碱条件是稳定的,以此标准可把这种键和丝氨酸(苏氨酸)键的O-糖苷键相区别。N-糖苷键是糖蛋白中最常存在的键(表2)。最初是在分离卵清蛋白的N-乙酰氨基葡萄糖基天冬酰胺复合物时发现的。为确定这种键,需要借蛋白水解作用使多肽链降解,接着分离出糖肽,并用氨肽酶与羧肽酶和(或)化学上的Edman降解作用,从氨基和羧基端使其进一步裂解,通过这样处理后只留下结合的氨基酸(即天冬氨酸)。用类似的方法,通过适当的糖苷外

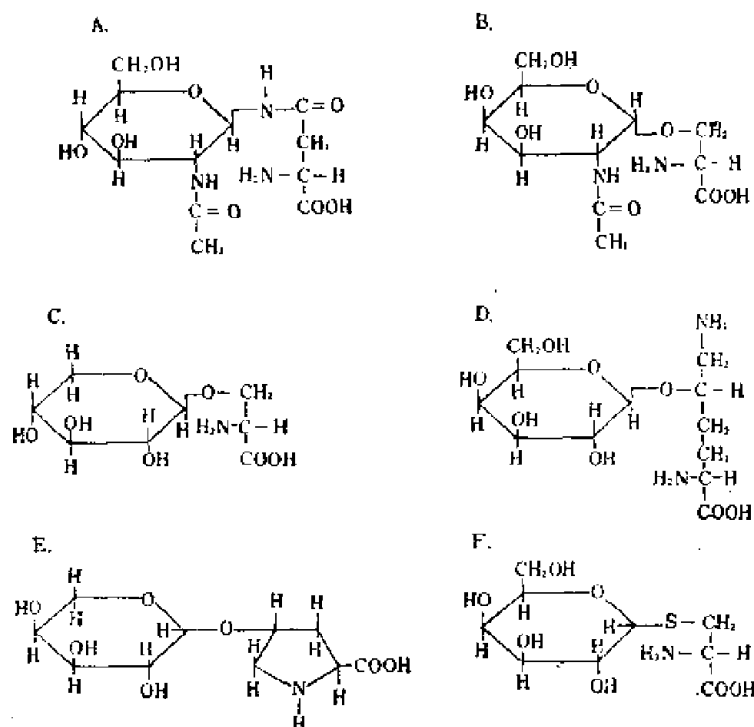


图1 糖-肽键的结构

(A) N-乙酰氨基葡萄糖基天冬酰胺; (B) N-乙酰氨基半乳糖基丝氨酸; (C) 木糖基丝氨酸;
(D) 半乳糖基赖氨酸; (E) 阿拉伯糖基天冬氨酸; (F) 半乳糖基半胱氨酸。

切酶和糖苷内切酶和(或)Smith 降解作用,能将蛋白-糖键中所有糖残基(除 N-乙酰氨基葡萄糖外)除去。有时糖肽的部分酸水解,可产生 N-乙酰氨基葡萄糖-天冬酰胺复合物,尽管其回收一般是很少。这种复合物可通过其化学组成和氨基酸分析器进行鉴定。涉及糖-蛋白键的氨基酸,也可通过蛋白质的氨基酸顺序分析进行鉴定。糖蛋白激素是众所周知的例子,其特异的天冬酰胺残基键,已经氨基酸顺序研究得到鉴定。

到目前为止,已知天冬酰胺糖肽有三种不同形式的结构类型:

1. 高甘露糖型,一般认为是“简单的”糖单位,只含有两种类型的单糖,即甘露糖和 N-乙酰氨基葡萄糖(可是,这些并不象它们的结构分析所证明的那样)。
2. 复合型,是杂糖,包含两种以上的糖类型。
3. 混合型,是那些具有高甘露糖(简单的)和复合型糖结构特征的糖单位。

已发现大多数天冬酰胺键糖的共同特征,是有一个 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3-(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 的内部核心。因而,糖结构类型的称号,是由附加在内部核心周围的糖的性质所限定。

高甘露糖型的天冬酰胺糖肽的内部核心周围区只含有甘露糖残基。这种甘露糖残基的数目由人 γ M 球蛋白、鸡卵清蛋白、米曲霉的 α -淀粉酶和牛核糖核酸酶 B 的 3 个糖单位(图 2—A),到酿酒酵母的甘露聚糖结合区的 9 个糖单位(图 2—B)。比较这两型结构发现,在两型结构内所有 6 个甘露糖残基的糖间键是完全相同的。而黄豆凝集素的糖肽结构(图 2—C)是特别的,其中甘露糖残基以 α -1,3 代替 α -1,6 键连接到用作分支点的 β 键甘露糖上。此外,所有末端甘露糖残基,都是 α -1,2 键。

表2 糖蛋白中的糖键

I. 在 N-乙酰氨基葡萄糖和天冬酰胺之间的 N-糖苷键

(一) 病毒、霉菌和植物

- | | |
|-------------------|------------------|
| 1. Sindbis 病毒和糖蛋白 | 4. 甘露聚糖-蛋白(酿酒酵母) |
| 2. 疱疹性口炎病毒(甘蛋白) | 5. 菠萝蛋白酶(菠萝的茎) |
| 3. Taka-淀粉酶(米曲霉) | 6. 黄豆凝集素 |

(二) 母鸡

- | | |
|-----------|-----------|
| 1. 卵清蛋白 | 4. 卵铁传递蛋白 |
| 2. 抗生物素蛋白 | 5. 卵类粘蛋白 |
| 3. 卵黄高磷蛋白 | |

(三) 猪

- | | |
|-----------|-------|
| 1. 核糖核酸酶 | 3. 脂酶 |
| 2. 甲状腺球蛋白 | |

(四) 牛

- | | |
|--------------|-------------------------|
| 1. 脱氧核糖核酸酶 A | 6. 免疫球蛋白 G |
| 2. 核糖核酸酶 B | 7. 视色素 |
| 3. 胎球蛋白 | 8. 促甲状腺激素(β -亚基) |
| 4. 甲状腺球蛋白 | 9. 角膜硫酸角质素 |
| 5. 肾小球基膜 | |

(五) 人

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| 1. α_1 -酸性糖蛋白 | 7. 乳铁传递蛋白 |
| 2. α_2 -巨球蛋白 | 8. 血浆铜蓝蛋白 |
| 3. 红细胞膜无唾液酸糖蛋白 | 9. 甲状腺球蛋白 |
| 4. 血型糖蛋白 | 10. 绒毛膜促性腺激素 |
| 5. 免疫球蛋白 M、G、E 和 A | 11. 促卵泡激素 |
| 6. 铁传递蛋白 | 12. 促甲状腺激素(β -亚基) |

II. 碱不稳定的 O-糖苷键

(一) 在 N-乙酰氨基半乳糖和丝氨酸或苏氨酸之间的 O-糖苷键

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1. 颌下腺糖蛋白 | (3) 牛 |
| (1) 猪 | (4) 绵羊 |
| (2) 犬 | |
| 2. 人唾液糖蛋白 | |
| 3. 其他 | |
| (1) 血型物质 | (6) 血型糖蛋白 |
| (2) 牛软骨硫酸角质素 | (7) 红细胞膜糖蛋白 |
| (3) 牛胎球蛋白 | (8) 绒毛膜促性腺激素(β -亚基) |
| (4) Epiglycanin(TA-3 细胞) | (9) 抗冷冻糖蛋白(南极的鱼) |
| (5) 人免疫球蛋白 A | |

(二) 在 N-乙酰氨基半乳糖以外的(R)糖和丝氨酸或苏氨酸之间的 O-糖苷键

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 1. R=木糖 | (3) 肝素 |
| (1) 硫酸软骨素 | |
| (2) 硫酸皮肤素 | |
| 2. R=甘露糖 | |
| (1) 葡糖淀粉酶(海枣曲霉) | (5) 菌葡聚糖酶(梅林青霉) |
| (2) 葡糖淀粉酶(黑曲霉) | (6) Baker 酵母细胞壁糖肽 |
| (3) 甘露聚糖-蛋白(酿酒酵母) | (7) 胶原(沙蚕属) |
| (4) 被膜蛋白(罗伦隐球酵母) | |
| 3. R=半乳糖 | |
| 护膜胶原(沙蚕属、蚯蚓) | |
| 4. R=L-岩藻糖 | |
| (1) 人尿的糖肽 | (2) 来自正常和瘤源性变形的哺乳类细胞系的糖蛋白 |

III. 碱稳定的 O-糖苷键和 S-糖苷键

(一) 在半乳糖和羟脯氨酸的 3-羟基之间 O-糖苷键

1. 胶原
 - (1) 脊椎动物组织
 - (2) 墨鱼
2. 肾小球基膜
 - (1) 牛
 - (2) 人
3. 牛晶体囊

(二) 在阿拉伯糖或半乳糖和羟脯氨酸的羟基之间的 O-糖苷键

1. 植物细胞壁
2. 衣滴虫属

(三) 在半乳糖或葡萄糖和半胱氨酸的硫醇基之间的 S-糖苷键

1. 人尿的糖肽
2. 人红细胞糖肽

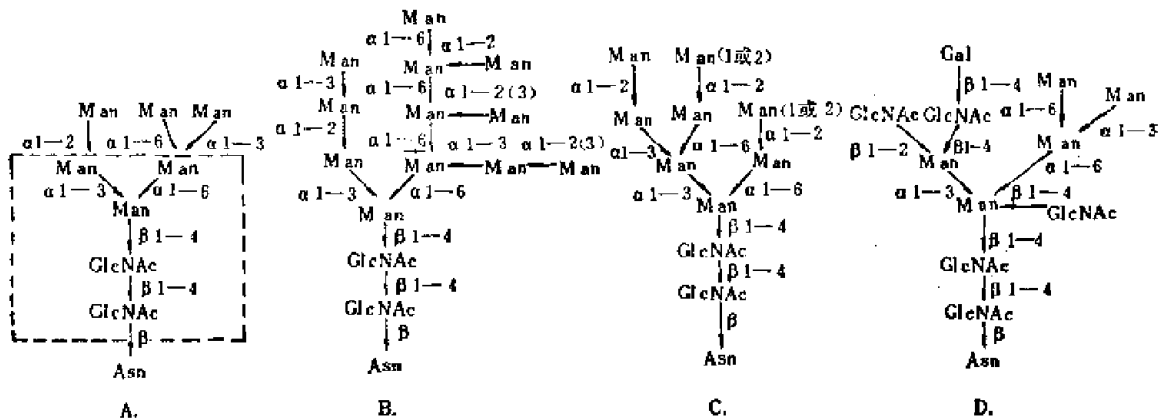


图2 “高甘露糖”和“混合”型糖肽的结构

(A) Taka-淀粉酶A糖肽(虚线内结构代表内部核心,与B、C和D结构的内部核心完全相同);

(B) 酿酒酵母的甘露聚糖-蛋白结合区; (C) 黄豆凝集素的糖肽; (D) 卵清蛋白糖肽。

复合型糖结构的特征,是在其周围区除有甘露糖外还有其他糖。这种糖一般存在于外部,其中包括:半乳糖、甘露糖、L-岩藻糖、N-乙酰氨基葡萄糖和唾液酸。根据最近阐明的各种糖蛋白中糖结构,复合型糖单位的共同结构可绘如图3。几乎任何复合型糖单位的结构,都可从这种复合的结构通过适当取代 $R_1 \sim R_7$ 而衍生出来。这种结构的显著特征,是在每个核心结构的两个外侧甘露糖残基上存在着1或2条寡糖链。因而,存在于糖结构中这样链的数目,可能是2、3或4条。每条链即A、B、C或D链有 $SA \xrightarrow{\alpha 2, 3} Gal \xrightarrow{\beta 1, 4} GlcNAc$

$\xrightarrow{\beta 1, 2}$ 顺序,其中的 $R_1 \sim R_7$ 取代基是唾液酸残基。有时候,这些链由于微观不均一性,缺乏唾液酸和(或)半乳糖。唾液酸与半乳糖是以 $\alpha 2-3$ 或 $\alpha 2-6$ 链相连。当岩藻糖存在时,总是通过 $\alpha 1-6$ 键与糖蛋白键中的 N-乙酰氨基葡萄糖连接;在 α_1 -酸性糖蛋白中也已发现它是通过 $\alpha 1-3$ 键与外侧链中的 N-乙酰氨基葡萄糖连接。比较图3的结构看出,最简单的结构是铁传递蛋白,它是其他糖蛋白即乳铁传递蛋白、Cl₂ 补体、免疫球蛋白、Sindbis 病毒和疱疹性口炎病毒 G 蛋白以及人绒毛膜促性腺激素所共有的。大多数糖蛋白中唾液酸是以 $\alpha 2-6$ 与半乳糖连接,病毒的糖蛋白中唾液酸是以 $\alpha 2-3$ 键与半乳糖连接除外;后者在人绒毛膜促性腺激素中也有发现。小牛血清胎球蛋白有 $\alpha 2-3$ 和 $\alpha 2-6$ 两种键的唾液酸残基。胎球蛋白含有3个分支,以 $\beta 1-2$ 、 $\beta 1-4$ 和 $\beta 1-6$ 键与核心甘露糖残基连接。 α_1 -酸性糖蛋白

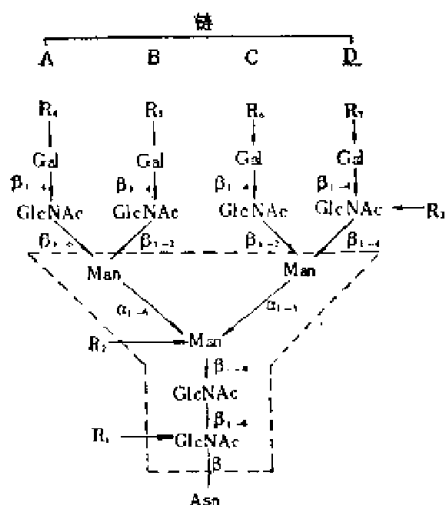


图3 某些“复合型”天冬氨酸键的糖肽结构

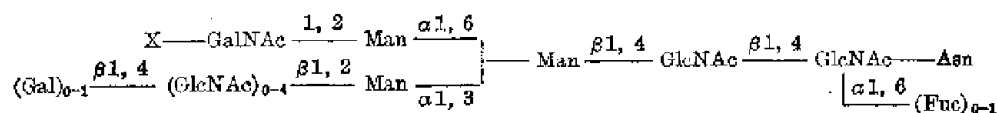
虚线内的糖表示核心区(除非另有注明, $R_1 \sim R_7 = H$): (1) α_1 -酸性糖蛋白 ($R_3 = \text{Fuc}\alpha 1, 3$); (2) 人甲状腺球蛋白 B 糖肽(没有 D 链, GlcNAc 与 B 链中甘露糖的连接键是 $\beta 1, 3$, R_1 和 $R_6 = \text{NANA}$); (3) 人铁传递蛋白(没有 A、D 链, R_5 和 $R_6 = \text{NANA}\alpha 2, 6$); (4) 人绒毛膜促性腺激素(没有 A、D 链, $R_1 = \text{Fuc}\alpha 1, 6$, R_5 和 $R_6 = \text{NANA}\alpha 2, 3$); (5) 人乳铁传递蛋白和人 Clq 补体(没有 A、D 链, $R_1 = \text{Fuc}\alpha 1, 6$, R_5 和 $R_6 = \text{NANA}\alpha 2, 6$); (6) 人 IgG、IgM 和 IgA(没有 A、D 链, $\pm$ 半乳糖, $R_1 = \text{Fuc}\alpha 1, 6$, R_5 和 $R_6 = \pm$ 唾液酸 $\alpha 2, 6$); (7) 人 IgA₁-H₁A₁(没有 A、D 链, $R_2 = \text{GlcNAc}\beta 1, 4$ 或 6, $R_6 =$ 唾液酸); (8) 人 IgG-HumB-3(没有 A、D 链, $R_1 = \text{Fuc}\alpha 1, 6$, $R_2 = \text{GlcNAc}\beta 1, 4$, R_5 和 $R_6 =$ 唾液酸 $\alpha 2, 6$); (9) 牛胎球蛋白(没有 A 链, D 链替代了 A 链, $R_5 = \text{NANA}\alpha 2, 6$, R_6 和 $R_7 = \text{NANA}\alpha 2, 3$); (10) Sindbis 病毒糖肽 S₁(没有 A、D 链, $R_1 = \text{Fuc}\alpha 1, 6$, R_5 和 $R_6 = \text{NANA}\alpha 2, 3$); (11) 疱疹性口炎病毒 G 蛋白(没有 A 链, D 链替代了 A 链, R_5 、 R_6 和 $R_7 = \text{NANA}\alpha 2, 3$)。

白也有这样 3 个分支, 还多含有 1 个 $1, 2-\beta$ -键的分支。胎球蛋白和甲状腺球蛋白糖肽 B 的糖单位结构, 除了后者外侧三个分支中有一个以 $\beta 1 \rightarrow 3$ 键与甘露糖连接外, 其余是十分相似的。

天冬酰胺酰糖单位中的第三种糖结构或混合型糖结构含有简单和复合两种糖单位的特征。例如, 卵清蛋白的一个糖单位, 含有大量的甘露糖以及半乳糖和 N-乙酰氨基葡萄糖的复合型分支。因此, 这种结构(图 2—D)是高甘露糖和复合型糖结构的混合型。

尽管大多数 N-糖苷的糖具有一般单糖的构型, 但也有一些例外。垂体的糖蛋白激素——促黄体激素, 促卵泡激素和促甲状腺激素, 是一种以 N-乙酰氨基半乳糖作为 N-糖苷的糖单位组成成分的例子。牛和绵羊的促黄体激素, 每分子含有 3 个 N-糖苷键的糖单位, 每个单位含有 1 个 N-乙酰氨基半乳糖的残基。N-乙酰氨基半乳糖的位置通过详细的酶学和化学法研究, 得到确定。发现 N-乙酰氨基半乳糖位于 1 个以 $1, 3$ -或 $1, 6$ -键连接在甘露糖残基上的外侧分支中。此外, 还注意到在 $O-4$ 位置上 N-乙酰氨基半乳糖被一个酸不稳定的基团所取代。提出的牛和绵羊促黄体激素的这种新颖的糖结构(见下面), 与所提出的人垂体糖激素 α -亚基的糖是不一致的。后者的 N-乙酰氨基半乳糖是位于 β -键的甘露糖和结合的 N-乙酰氨基葡萄糖之间的内部核心部位。

牛和绵羊 LH(促黄体生成激素)的糖结构如下:



(二) 用 O-糖苷键连接糖的糖蛋白

1. 在 N-乙酰氨基半乳糖和丝氨酸或苏氨酸之间碱不稳定的 O-糖苷键

N-乙酰氨基半乳糖基丝氨酸或苏氨酸的糖肽键(图 1—B)普遍存在于绵羊、牛、猪和犬的颌下腺糖蛋白, 人颌下腺分泌物的粘蛋白, 牛软骨硫酸角质素, 胎球蛋白, 抗冷冻糖蛋白, epiglycanin(TA-3 细胞), 免疫球蛋白 A, 血型糖蛋白和人绒毛膜促性腺激素的 β -亚基

(表 2)。这种键极易在碱条件下借 β -消除作用而断裂。糖蛋白的 β -消除反应的一般概况和反应产物见图 4。

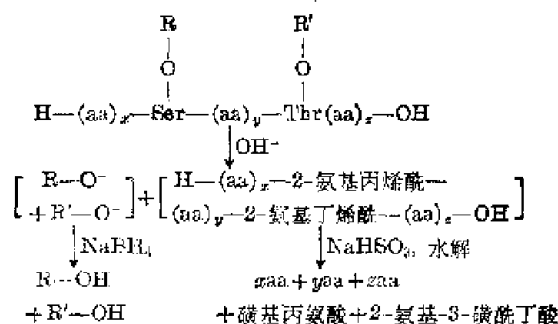


图 4 糖蛋白 β -消除反应的一般概况

R 和 R' 分别代表连接丝氨酸和苏氨酸的糖单位; aa—氨基酸。

β -消除产生含有还原性糖残基和肽链的完整糖单位,在肽链中结合的氨基酸即丝氨酸或苏氨酸分别转变为不饱和的 2-氨基丙烯酸(α -氨基丙烯酸)和 2-氨基-2-丁烯酸(α -氨基-2-丁烯酸)。 β -消除过程中生成的烯属氨基酸,在 240 毫微米处的克分子消光系数约为 6,000;所以,它们的生成可用分光光度计检查出来。此后,这些烯属氨基酸,在 100°C 3*N* HCl 中经 4 小时水解,很快地转变为 α -酮酸。分别来自丝氨酸和苏氨酸的丙酮酸和 α -酮丁酸,可用乳酸脱氢酶测定系统测出。此酶对两个底物有不同的 K_m ,即对丙酮酸为 $5 \times 10^{-5} M$ 和对 α -酮丁酸为 $8 \times 10^{-4} M$ 。因此,丙酮酸可被低水平的酶所还原,而对 α -酮丁酸的还原却需要 40 倍以上的酶。当将这种技术用于糖肽,可测出 β -羟氨基酸的减少与 α -酮酸的生成之间的定量关系。

如果在氢硼化钠中进行 β -消除反应,可以用糖醇鉴定结合的糖,不饱和氨基酸残基转变为其相当的饱和衍生物,即由丝氨酸和苏氨酸分别变为丙氨酸和 α -氨基丁酸。已确定在 β -消除过程中,为获得丙氨酸和 α -氨基丁酸的化学数量的产量,需要用一点氯化钯(一种氢化作用的催化剂)。没有催化剂时,失去的丝氨酸大约等于获得的丙氨酸;但是,从苏氨酸生成 α -氨基丁酸的量很少。在 β -消除过程中,反应混合物中含有亚硫酸氢钠时,导致磺基丙氨酸和 2-氨基-3-磺酰丁酸残基的生成。在水解时,用氨基酸分析器或气液色谱法,可将这些化合物以三甲基甲硅烷基衍生物形式定量地鉴定出来。发现用取代连接在丝氨酸或苏氨酸的氨基或羧基上的糖的典型化合物时, β -消除的速率增加。

虽然 β -消除的结果是使完整糖单位释放,但是如果不小心控制反应的条件,却可发生称为“脱皮反应”的现象。一般地说,没有氢硼化钠时, N-乙酰氨基己糖基羟氨基酸键的硷处理,可导致还原的 N-乙酰氨基己糖的生成。这种产物在硷环境中是不稳定的,易起另一个 β -消除反应而转变为呋喃糖基化合物。如果结合的 N-乙酰氨基己糖的碳-3 被取代,即使在低碱性和低温条件下,其转变为呋喃糖基衍生物的可能却大大增加。所以,含 O- β -(1 $\rightarrow$ 3)-键的 N-乙酰氨基己糖基单位的结构,是很容易产生这种反应。图 5 为在含有连接丝氨酸或苏氨酸的碳-3 取代的 N-乙酰氨基半乳糖糖单位的 β -消除过程中的脱皮反应的图解。在抗冷冻糖蛋白、人 Ig A₁、软骨硫酸角质素和 epiglycanin(TA-3 细胞)中,发现了 Gal $\xrightarrow{\beta 1 \rightarrow 3}$ GalNAc $\xrightarrow{\alpha}$ Ser(Thr)(I) 结构。 β -消除的结果,生成半乳糖基-N-乙酰氨基半乳糖(II)和 2-氨基丙基糖基衍生物(III)(或由苏氨酸来的 2-氨基-2-丁基衍生物)。糖

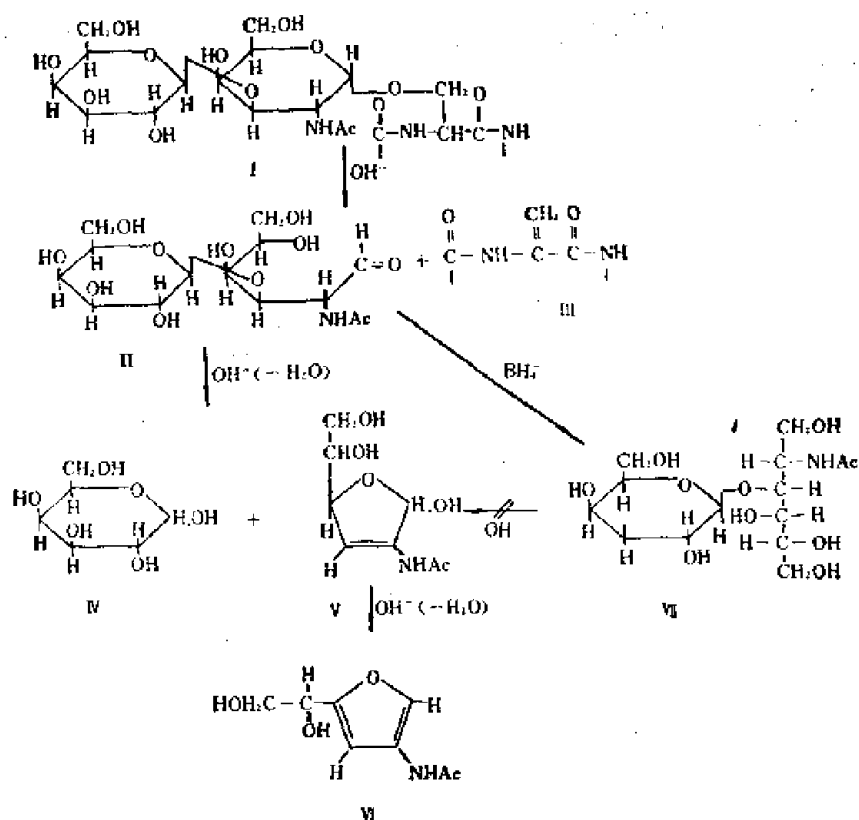


图5 在糖单位 β -消除时的脱皮反应

单位(II)在硷环境中是不稳定的,通过在N-乙酰氨基半乳糖的碳—2上释放一个质子,就会进行另一 β -消除。随后,半乳糖(IV)断裂和N-乙酰氨基半乳糖迅速地转变为Morgan-Elson 铬精(V和VI)。如果糖残基是1 $\rightarrow$ 3键,可从寡糖的非还原端迅速地进行这种脱皮反应(逐步的降解)。

一般地说,1 $\rightarrow$ 2键的糖是硷稳定的,而1 $\rightarrow$ 4和1 $\rightarrow$ 6键比1 $\rightarrow$ 3键不易断裂。因此,寡糖的逐步降解将继续进行直到产物呈硷稳定为止。降低硷浓度和在反应混合物中加入氢硼化钠,可使脱皮反应明显地减少。通过氢硼化钠还原作用,半乳糖基-N-乙酰氨基半乳糖(II)转变为半乳糖基-N-乙酰氨基半乳糖醇(VII)时,由于失去了N-乙酰氨基半乳糖的碳—1上的吸引电子的羰基功能,把硷稳定性传递给后者(VII)。

含有N-乙酰氨基半乳糖基丝氨酸或苏氨酸键的O-糖苷,其糖结构(图1—B)有三种类型(图6):

(1) 抗冷冻糖蛋白、epiglycanin(TA-3细胞)和免疫球蛋白IgA的糖单位,是由Gal $\xrightarrow{\beta 1,3}$ GalNAc所组成(图6—A)。由岩藻糖、半乳糖、唾液酸和N-乙酰氨基葡萄糖所组成的R₁、R₂和R₃被适当取代,如图6—A所示。二糖是人绒毛膜促性腺激素- β 、胎球蛋白、血型糖蛋白、颌下腺粘蛋白和人胃粘蛋白的糖结构的内部核心。

(2) 借 β -消除获得大鼠舌下腺糖蛋白的酸性寡糖,在其还原端含有GlcNAc $\xrightarrow{\beta 1,3}$ (NANA $\xrightarrow{\alpha 2,6}$) $\rightarrow$ GalNAc三糖的内部核心(图6—B)。具有2~4个重复的GlcNAc $\xrightarrow{1,3}$ (NANA $\xrightarrow{\alpha 2,6}$) $\rightarrow$ Gal $\xrightarrow{\beta 1,4}$ 三糖结构单位,连接到内部核心的N-乙酰氨基葡萄糖上,导致寡糖

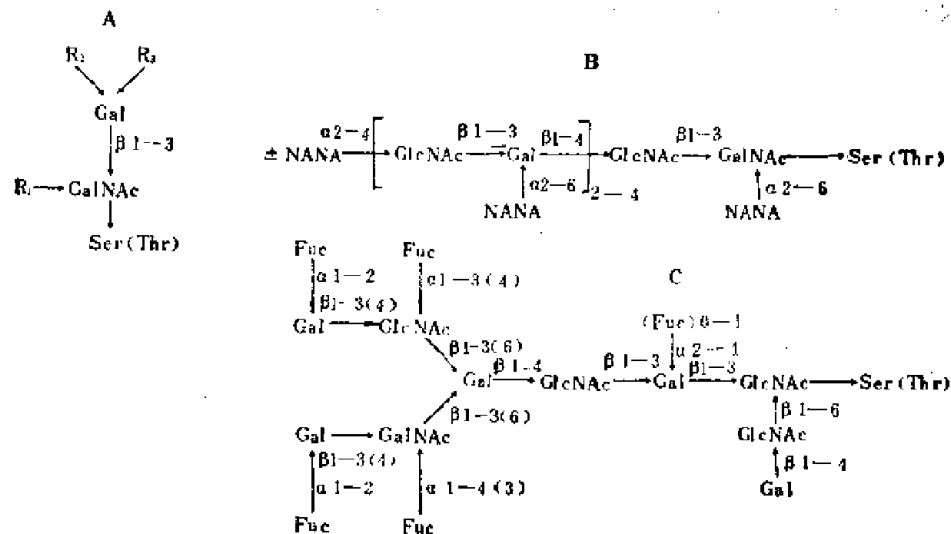


图6 N-乙酰氨基半乳糖和丝氨酸(苏氨酸)之间结合的糖肽结构

(A) 除另有注明外, R_1 、 R_2 和 $R_3 = H$: 1. 抗冷冻糖蛋白、人 Ig A₁、软骨硫酸角质素和 epiglycanin (TA-3 细胞) ($R_1 = R_2 = R_3 = H$); 2. 人绒毛膜促性腺激素 (β -亚基)、牛胎球蛋白和人红细胞膜 ($R_1 = NANA \alpha 2, 6$; $R_2 = NANA \alpha 2, 3$); 3. 大鼠下腺糖蛋白 ($R_1 = NANA \alpha 2, 6$); 4. 犬和猪的 A⁻ 和 A⁺ 下腺糖蛋白 ($R_1 = NANA \alpha 2, 6$; $R_2 = Fuc \alpha 1, 2$); 5. 猪下腺糖蛋白 A⁺ ($R_1 = NANA \alpha 2, 6$; $R_2 = Fuc \alpha 1, 2$; $R_3 = GalNAc \alpha 1, 3$); 6. 犬下腺糖蛋白 ($R_2 = \pm Fuc \alpha 1, 2$; $R_3 = Fuc \alpha 1, 2 Gal \beta GlcNAc, O_4 \beta 1, 6$); 7. 人胃的粘蛋白 ($R_1 = GalH, 4GlcNAc1, 6$; $R_2 = GalH, 3GlcNAc1, 3$).

(B) 大鼠舌下腺糖蛋白(酸性寡糖)。(C) 人唾液的糖蛋白(中性寡糖)。

分别带有 9、12 和 15 个糖残基长度的链。此外, 因为在非还原端的 N-乙酰氨基葡萄糖上存在唾液酸残基, 所以还发现了含 10 和 13 个糖的寡糖。

(3) 来源于人颌下腺分泌物的粘蛋白(图 6—C)和血型物质的结构, 组成含 GalNAc-Ser(Thr)键的第三型。虽然人分泌物中的粘蛋白和血型物质(图 7)的结构具有几个共同的特征, 但发现了一些明显的差别。例如, 人唾液的粘蛋白只有二取代的半乳糖残基而不是血型物质中的三取代残基。糖间键的差别可能是个体变异的结果, 因此可改变制备粘蛋白和血型物质的血型类型。

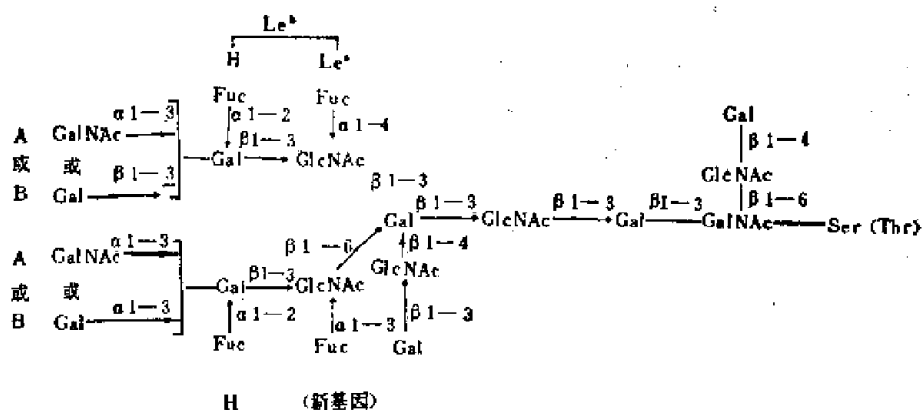


图7 组成血型物质的杂多糖结构

2. N-乙酰氨基半乳糖以外的糖和丝氨酸或苏氨酸之间碱不稳定的 O-糖苷键

大量糖蛋白含有通过木糖、甘露糖、半乳糖和岩藻糖与丝氨酸或苏氨酸连接的糖单位

(表2)。这种糖单位的结构见图8。象硫酸软骨素、硫酸皮肤素和肝素那样的蛋白多糖, 它们的糖-肽键是 $\text{Xyl} \xrightarrow{\beta} \text{Ser}$ (图1—O)。

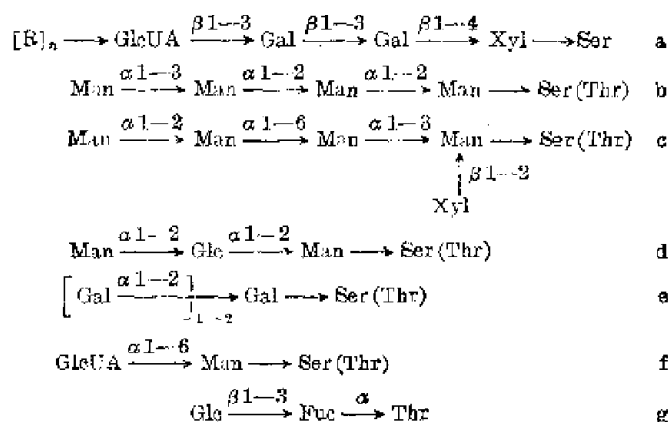


图8 N-乙酰氨基半乳糖以外的糖和丝氨酸(苏氨酸)之间结合的糖肽结构

(a) 硫酸软骨素、硫酸皮肤素和肝素; (b) 甘露聚糖蛋白(酿酒酵母); (c) 罗伦隐球酵母的被膜糖蛋白; (d) 菌葡聚糖酶(梅林青霉); (e) 护膜胶原(沙蚕属和蚯蚓); (f) 护膜胶原(沙蚕属); (g) 人尿的糖肽和哺乳类细胞系的糖蛋白。

在结合区的寡糖, 有以下结构: $\text{GlcUA} \xrightarrow{\beta 1, 3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1, 3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1, 4} \text{Xyl} \longrightarrow$, 结合的氨基酸总是丝氨酸(图8—a)。主要糖链是直链的聚合物, 由交替的氨基己糖和己糖醛酸残基的重复单位所组成。每个连在结合区的非还原端半乳糖上的糖残基是葡糖醛酸。实际上, 酿酒酵母的糖蛋白和罗伦隐球酵母的被膜糖蛋白是甘露聚糖蛋白, 它含有甘露糖与丝氨酸或苏氨酸相连接的直链(图8—b和8—c)。在罗伦隐球酵母的被膜糖蛋白中, 也发现有木糖与结合的甘露糖连接。通过 β -消除, 从梅林青霉的菌葡聚糖酶释放出的总糖链, 约一半含有甘露糖基丝氨酸(苏氨酸)键, 而另一半通过甘露糖基残基以 $\text{Man} \xrightarrow{\alpha 1, 2} \text{Glc} \xrightarrow{\alpha 1, 2} \text{Man} \longrightarrow \text{Ser(Thr)}$ 相连接(图8—d)。在来自 *Lumbricus terrestris* 和沙蚕属的护膜胶原中, 发现有半乳糖的二和三糖连接在丝氨酸或苏氨酸上(图8—e)。已报道通过碱-氢硼化物处理后, 将葡糖醛酸基甘露醇分离, 证明沙蚕属胶原中存在有葡糖醛酸(图8—f)。已证实了人尿的糖肽含有通过 α -L-岩藻糖残基与苏氨酸连接的糖(图8—g)。最近, 在各种正常和瘤变的哺乳细胞株的细胞糖蛋白中, 已鉴定出有 $\text{Fuc} \xrightarrow{\alpha} \text{Thr(Ser)}$ 糖肽键。提示含 Glc-Fuc-Thr 的糖蛋白水平, 随着遗传表型之表达功能而变化。

3. 涉及羟赖氨酸、羟脯氨酸和半胱氨酸的O-和S-糖苷键

半乳糖和羟赖氨酸之间的糖-肽键(图1—D), 已在各种胶原、基膜和晶体囊中找到。这些结构糖蛋白的糖单位, 含有与羟赖氨酸连接的 $\text{Glc} \xrightarrow{\alpha 1, 2} \text{Gal} \longrightarrow$ 和半乳糖。在这些糖蛋白中, 二糖和单糖单位之间糖的分布是不同的。在连接糖单位的全部羟赖氨酸中, 二糖单位在肾小球基膜和晶体囊的胶原内为94~97%, 在无脊椎动物的胶原内为86~90% 和脊椎动物的胶原内为54~83%。Butler 和 Cunningham 首先在豚鼠皮肤的原胶原中, 发现 β -半乳糖基羟赖氨酸键的存在。随后, 在牛的肾小球基膜和晶体囊中确定了它的存在。和具有丝氨酸(苏氨酸)键的糖肽不同, β -半乳糖基羟赖氨酸键在弱碱和强碱条件下是稳定的。实际上, 从完整的肾小球基膜及其经链霉蛋白酶处理过的糖肽, 通过在105°C 2N NaOH处理

24 小时,已分离到 Glu-Gal-Hyl。借氨基酸分析器已使糖-氨基酸复合物分开。

植物细胞壁含有结构糖蛋白,其糖-蛋白键是在 L-阿拉伯糖和羟脯氨酸之间(图 1-E)。有报道在绿藻衣滴虫属的糖蛋白中,含有半乳糖与羟脯氨酸的结合。带有羟脯氨酸的糖肽键,和 Gal-Hyl 键一样,对碱是稳定的。

已有报道在人尿的糖肽中,半乳糖和半胱氨酸之间存在着硫代糖苷的糖肽键(图 1-F)。在此糖肽中,一个半乳糖的二糖连接在半胱氨酸上。此外,曾有报道在人红细胞中存在着三葡萄糖基半胱氨酸糖肽,表明有葡萄糖和半胱氨酸之间的结合。

三、在糖单位周围的氨基酸顺序

在糖蛋白领域中,引人注意的问题之一,是关于决定糖专一地掺入蛋白质的因素的问题。弄清引导糖的掺入究竟是糖蛋白的全部构象,或是在结合的天冬酰胺酰残基周围的氨基酸顺序,或是两者,这是有趣的。随后进行研究,已阐明 N-糖基化天冬酰胺酰残基周围的直链氨基酸顺序。这些顺序已从研究大量糖蛋白的全部氨基酸顺序推断出来;这些糖蛋白包括核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、人绒毛膜促性腺激素、促黄体激素、促卵泡激素、促甲状腺激素、IgE(Eu)骨髓瘤免疫球蛋白、鸡卵抗生物素蛋白和人血浆 α_2 -酸性糖蛋白。这样的氨基酸顺序在各种各样糖蛋白分离出的糖肽中,也已被确定。观察各种糖蛋白(表 3)中天冬酰胺-键的糖周围已知的顺序,发现 Asn-X-Thr(Ser)顺序(X 代表不同氨基酸);在每个例子中是不变的。在天冬酰胺残基的 N 端,未发现特别类似的共同氨基酸顺序。

Jackson 和 Hirs 早就提出,在 Asn-X-Thr(Ser)中的氨基酸 X 性质究竟是极性还是非极性,是对连接到多肽链的糖单位类型的决定性因素。现已弄清这种假设是站不住脚的,因为在 X 和糖单位的性质之间没有一致的关系(表 3)。上述三肽顺序的存在,不需要包括天冬酰胺残基的专一的糖基化作用,因为含有这种顺序的不同蛋白质,存在于糖基化和非糖基化的两种类型中,或者在一个位置是糖基化而在另一个这样的位置是非糖基化。来自 266 种蛋白质的 111 个三肽顺序的数据已经过统计学上的分析。发现就原核生物的蛋白质而论,三肽顺序存在的频率是与统计学的预期相一致;而对真核生物的蛋白质,其存在的频率大约是预期值的 1/3。此外,在被检查的全部这样三肽顺序中,糖基化类型仅存在于真核生物的细胞外和膜结合的蛋白质中。有人认为,原核生物不含有天冬酰胺残基的糖基化所需要的糖基化酶;暗示天冬酰胺-键的糖蛋白,可能在真核生物从原核生物分出来以后才逐渐形成的。

可以想象 Asn-X-Thr(Ser)三肽顺序可能赋与某些特殊的性质,如对蛋白质的构象改变产生影响,从而促进在特殊位置的糖基化作用。Pless 和 Lennarz 在使用外源受体的研究中,证实了不折迭的蛋白质有利于糖基化作用。因此,含需要三肽顺序的卵清蛋白、 α -乳清蛋白和核糖核酸酶 A,是有效的受体蛋白。没有这种顺序的其他蛋白质,不能作为糖基化受体。另一方面,如含需要三肽顺序的脱氧核糖核酸酶、弹性蛋白酶、羧基肽酶 A 和乙醇脱氢酶的四种蛋白质变性后,就不能促进不折迭肽的糖基化作用。因此,仅仅 Asn-X-Thr(Ser)三肽的存在,还不能决定一种蛋白质可作为受体。因为外源性蛋白质的受体活性,只在通过亚硫酸降解或还原和烷化使其不折迭之后才能检测出来,这表明天冬酰胺周围的氨基酸的重要性。Kiely 等的发现——当卵清蛋白还是与 tRNA 连接时,就能发生糖基化作

表 8 在各个天冬酰胺-键的糖单位周围的氨基酸顺序

	糖 蛋 白 (来 源)	顺 序*
酶	菠萝蛋白酶(菠萝茎)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Pro-Arg-Asn-Asn-Glu-Ser-Ser} \end{array}$
	血浆铜蓝蛋白(人)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Ala-Ile-Tyr-Asn-Asp-Thr-Thr} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gln-Gln-Gln-Asn-Val-Ser-Asn} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Thr-Lys-Glu-Asn-Leu-Thr-Ala} \end{array}$
	脱氧核糖核酸酶 A, B, C, D(牛)	$\begin{array}{c} \text{OS} \\ \\ \text{Lys-Met-Ser-Asn-Ala-Thr-Leu} \end{array}$
	核糖核酸酶 B, C, D(牛)	$\begin{array}{c} \text{OS} \\ \\ \text{Lys-Ser-Arg-Asn-Leu-Thr-Lys} \end{array}$
	核糖核酸酶(猪)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Ser-Ser-Ser-Asn-Ser-Ser-Asn} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Tyr-Gln-Ser-Asn-Ser-Thr-Met} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{Ser-Arg-Arg-Asn-Met-Thr-Gly} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{Leu-Val-Ser-Asn-Tyr-Ser-Ile} \end{array}$
	Taka-淀粉酶(米曲霉)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Thr-Asn-Gly-Thr-Ile} \end{array}$
	脂酶 L _A 和 L _B (猪)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gly-His-Gly-Asn-Lys-Ser-Ser} \end{array}$
	磷脂酶 A ₂ (蜜蜂毒液)	
激素**	OG- α , LH- α , TSH- α	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Leu-Val-Gln-Asn-Val-Thr-Ser} \end{array}$
	FSH- α (人)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Lys-Val-Glx-Asn-His-Thr-Ala} \end{array}$
	LH- α (绵羊), TSH- α (牛)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Val-Pro-Lys-Asn-Ile-Thr-Ser} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Arg-Val-Glx-Asn-His-Thr-Glx} \end{array}$
	OG- β (人)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Arg-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Leu} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Ile-Thr-Val-Asn-Thr-Thr-Ile} \end{array}$
	LH- β (人)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Glx-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Val} \end{array}$

(续表)

	糖 蛋 白 (来 源)	顺 序*
激素**	LH- β (绵羊)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gln-Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Leu} \end{array}$
	FSH- β (人)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gln-Leu-Thr-Asn-Ile-Thr-Ile} \end{array}$
	TSH- β (人)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Ile-Ser-Ile-Asn-Thr-Thr} \end{array}$
	TSH- β (牛)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Leu-Thr-Ile-Asn-Thr-Thr-Ile} \end{array}$
免疫球蛋白	IgG, H 链(人骨髓瘤 En)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr} \end{array}$
	IgG, H 链(兔)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gln-Gln-Phe-Asn-Ser-Thr-Ile} \end{array}$
	IgG, L 链(小鼠浆细胞瘤)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Ser-Asn} \end{array}$
	IgM, H 链(人巨球蛋白 Ou)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Phe-Gln-Glx-Asn-Ala Ser Ser} \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{Leu-Tyr-Asn-Val-Ser-Leu} \end{array}$
其 他	α_1 -酸性糖蛋白(人)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Pro-Ile-Thr-Asn-Ala-Thr-Leu} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Glu-Glu-Tyr-Asn-Lys-Ser-Val} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Phe-Thr-Pro-Asn-Lys-Thr-Gln} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Oys-Ile-Tyr-Asn-Thr-Thr-Tyr} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gln-Arg-Glu-Asn-Gly-Thr-Ile} \end{array}$
		$\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{Leu-Gly-Ser-Asn-Met-Thr-Ile} \end{array}$
抗生物素蛋白(母鸡)		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Ala-Ser-Glx-Asn-Val-Ser-Asx} \end{array}$
	Pence-Jones 蛋白(人, K 链 HBJ-4)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Oys-Ser-Gly-Asn-Ser-Ser} \end{array}$
	Pence-Jones 蛋白(人, λ 链 Ful)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{Gln-Val-Glu-Asn-Lys-Thr-Ser} \end{array}$
	纤维蛋白原(人, γ 链)	