

生物化学的现状与展望

科学出版社

内 容 简 介

本书汇集第五次全国生化学术会议的综述报告和特约论文共十篇。这些论文既概括了当前国际上生化发展的动向,也介绍了我国生化科学工作者在有关领域中的贡献和成果。主要内容:蛋白质的结构、运动与功能;膜脂-膜蛋白的相互作用;叶绿体中电子传递与磷酸化;胰岛素分子结构与功能关系的复杂性;遗传工程用于细菌性腹泻疫苗的研究;血清脂蛋白和载脂蛋白的研究;癌基因与肿瘤酶学及癌变原理的研究;农业生化的研究进展等。

生物化学的现状与展望

邹承鲁 主编

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987 年 1 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16
1987 年 1 月第一次印刷 印张: 9 3/4
印数: 0001—4,000 字数: 225,000

统一书号: 13031·3380
本社书号: 4861·13-10

定价: 2.30 元

前 言

生物化学是当代各门学科中发展最为迅速的学科。首先从生物化学研究工作的工作量来看,根据美国出版的 *Science Citation Index* 统计,在世界各国出版的包括自然科学基础和应用各个领域的四千余种期刊中,无论以发表的论文篇数或者以被引用其文章的次数统计,生物化学方面的杂志都占领先地位。例如以被引用次数统计 *J. Biol. Chem.*, *Biochim. Biophys. Acta* 和 *Biochemistry* 分别占第一、五、十位,而且在前十名中的 *Nature*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 和 *Science* 三种综合性刊物中有关生物化学的论文也都占有极大的比重。其次再从生物化学一些重要发展的深远影响来看,五十年代以来由于在生物化学方面的贡献而获得诺贝尔奖金的占了生理及医学奖的一半以上,同时还占了化学奖的三分之一,这一比例已经远远超过在本世纪的上半世纪中由于核物理研究方面的贡献而得奖的比例。这些事实充分说明了生物化学在现代科学发展中的领先地位。

在我国,生物化学的发展有较长的历史,特别是解放以来取得了不少重要成果,发展尤为迅速。在《第五次全国生物化学学术会议论文摘要汇编》上发表的论文在数量及质量两方面都远远超过了过去的水平。这次大会所组织的综述报告也和过去不同,做到既概括了当前国际上生物化学发展的动向,又介绍了我国工作者在这些领域中的贡献。特别可喜的是,一些中年科学家也在大会作了重要的综述报告并受到普遍的欢迎。由于会议时间所限和其他原因,还有一些重要的综述未能在大会报告。因此我们将大会综述报告和一些特邀的综述论文收集在这本小册子中,供广大生物化学及有关学科特别是分子生物学和生物物理学的科研、教学和其他工作者参考。对于有关专业的研究生和大学高年级学生了解这一学科的动态也是十分有益的。

由于我们对于全国生物化学工作者的专业了解不够,特别是对近年来在国内外的工作中获得重要成果并充分掌握本专业动态的同志了解不够,这本小册子对于生物化学领域中一些极为重要的方面不免有所遗漏。我们希望以后每届全国生物化学学术会议上的综述报告和一些特邀的综述论文都能出版,这对于促进我国这一重要学科领域的发展并迅速赶上世界先进水平必将有所裨益。

邹承鲁

目 录

前言	(i)
蛋白质的结构、运动和功能	邹承鲁(1)
膜脂-膜蛋白的相互作用	杨福愉 黄 芬 王金凤(15)
叶绿体中电子传递与磷酸化	李有则(37)
胰岛素分子结构与功能关系的复杂性	王志珍 梁栋材(52)
遗传工程技术用于细菌性腹泻疫苗研究的评述	黄翠芬(68)
血清脂蛋白和载脂蛋白的结构、功能与代谢	王克勤(80)
癌基因与肿瘤酶学及癌变原理的研究	李士诤(109)
肿瘤同工酶研究进展	陈惠黎(119)
农业生物化学的研究进展	阎隆飞(137)
发展我国的生物工程	孙玉昆(145)

蛋白质的结构、运动和功能

邹 承 鲁

(中国科学院生物物理研究所)

- | | |
|------------------------|------------------|
| 一、蛋白质构象研究的重要性 | 1. 不同亚基不同功能 |
| 二、蛋白质的晶体结构 | 2. 相同亚基相同功能 |
| 1. α 螺旋蛋白 | 3. 相同亚基非对称排列 |
| 2. β 折叠蛋白 | 4. 相同亚基构象的微观不均一性 |
| 3. $\alpha + \beta$ 蛋白 | 五、蛋白质肽链的伸展与卷曲 |
| 4. α/β 蛋白 | 1. 伸展与卷曲过程 |
| 5. 无规卷曲(random coil)蛋白 | 2. 伸展与卷曲过程中的活性变化 |
| 三、蛋白质分子的运动性 | 六、结束语 |
| 四、寡聚蛋白亚基的微观不均一性 | |

一、蛋白质构象研究的重要性

分子生物学是通过对生命体的物质基础,特别是蛋白质、酶、核酸等生物大分子的结构和运动规律的研究揭示生命现象本质的科学,其核心是研究生物大分子结构、运动与功能的关系。有关生物大分子化学结构的研究,已经达到了相当高的水平,就蛋白质而言,已有上千种蛋白质的化学结构得到阐明,其中包括较大的分子,如 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)中的1,021个氨基酸的排列顺序^[1]。现在,核酸序列测定技术也取得了新的突破, λ 噬菌体DNA的全部核苷酸48,502个碱基对的排列顺序的测定则是这一领域中一个突出的成就^[2]。许多较大的蛋白质分子的氨基酸序列,现在可以更方便地通过它的基因DNA的序列来测定。

蛋白质分子结构的最重要的特点是它不仅有一定的化学结构,而且有特定的空间结构。这种复杂的空间结构使得不同的蛋白质各自具有各种专一的功能。

在漫长的生物进化历程中,细胞色素c分子的氨基酸序列发生了很大变化,种属相差越远,变化程度越大。人与酵母的细胞色素c分子的100多个氨基酸残基中,有40余个发生了变异。但是,所有真核生物细胞色素c的生物功能却始终保持不变。它们都能够与不同种属的细胞色素氧化酶交叉相互作用。与此同时,十分值得注意的是,已经测定过的几种真核生物细胞色素c的空间结构也是非常相似的,特别是与功能密切相关部分的空间结构更是完全相同。与一级结构相比,蛋白质分子的空间结构在进化过程中更为保守。这说明了空间结构是体现生物功能的决定因素。

致谢:姚启智、刘维帮助收集并整理资料,特此致谢。

脱氢酶与激酶都具有与核苷酸类辅基如 NAD、ATP 等相结合的功能,晶体结构测定结果表明,在这两类酶分子中,确都存在着一个空间结构十分相似的结构域,这种结构域的特征是以数个平行的 β 折叠片为核心,周围排列着 α 螺旋或其他松散结构^[3],如图 1 所示。近来还发现一些与 DNA 相结合的并与基因表达的调节控制有关的蛋白质,如 λ 噬菌体中的 λ 阻遏蛋白 (λ -repressor)、Cro 蛋白以及 *E. Coli* 中的 CAP 蛋白 (catabolite activator protein) 等,都是具有 α -helix- β -turn- α -helix 模式的结构域^[4]。这些事实都说明了蛋白质的空间结构与其生物功能的密切关系。可以说蛋白质的特定的生物功能寓于其复杂的空间结构之中。

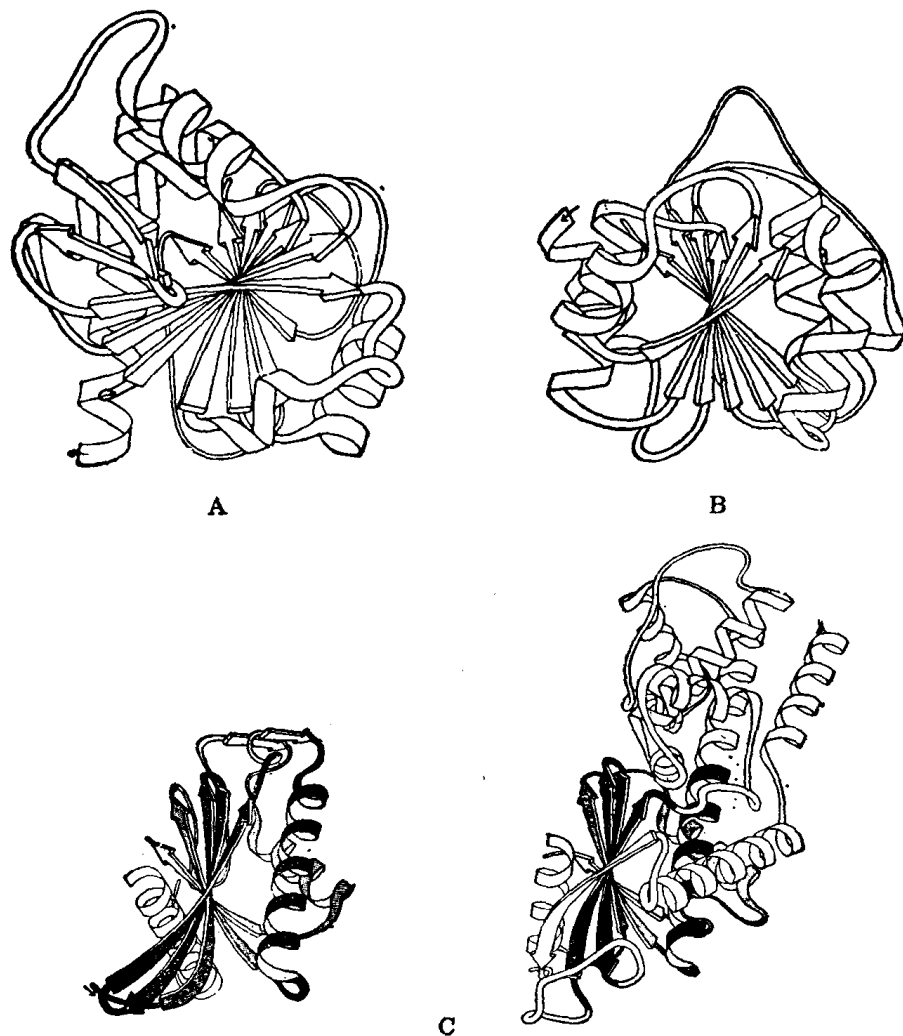


图 1 脱氢酶与激酶分子内与核酸类辅基相结合的结构域
A:磷酸甘油醛脱氢酶结构域 1; B:醇脱氢酶结构域 2; C:己糖激酶结构域 1 和 2

二、蛋白质的晶体结构

X 射线晶体衍射技术对蛋白质空间结构的研究做出了卓越的贡献。自六十年代以来,大约已有 250 个球蛋白的晶体结构在不同分辨率水平上得到了解决。根据现有的蛋白质晶体结构分析结果,可以将蛋白质按结构特点大致分为如下五种类型^[5,6]。

1. α 螺旋蛋白

这类蛋白质分子主要是由 α 螺旋结构构成。例如肌红蛋白(myoglobin)分子,是由 8 个 α 螺旋结合一个血红素分子构成。其 α 螺旋含量高达 79%。图 2 A 给出了蚯蚓肌红蛋白(myohemerythrin)的结构。

2. β 折叠蛋白

此种分子主要为平行或反平行的折叠片构成。 $\text{Cu}\cdot\text{Zn}$ 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)即是一个典型例子,它是由双层的反平行 β 折叠片组成。

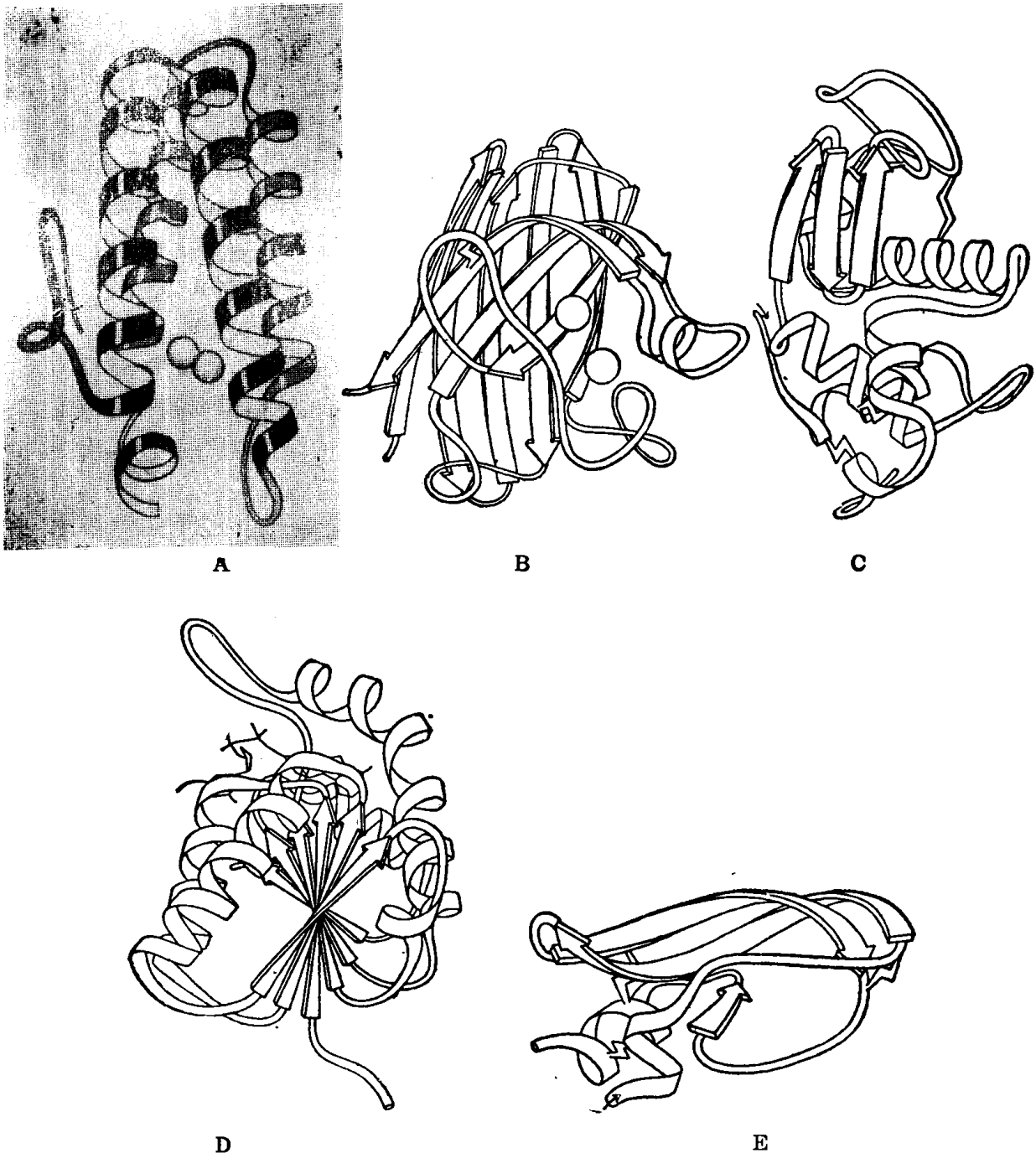


图 2 球蛋白晶体结构的五种类型

A: 全 α 结构, 蚯蚓肌红蛋白(myohemerythrin); B: 全 β 结构, $\text{Cu}\cdot\text{Zn}$ 超氧歧化酶;
C: $\alpha+\beta$ 结构, 溶菌酶; D: α/β 结构, 乳酸脱氢酶中与 NAD 结合的结构域;
E: 无规卷曲结构, 牛胰胰蛋白酶抑制剂

3. $\alpha + \beta$ 蛋白

在这种蛋白质分子内, α 螺旋与 β 折叠两种结构同时存在,但在空间位置上彼此分开,分别在分子的不同部位。溶菌酶(lysozyme)的结构就是这样。

4. α/β 蛋白

这类蛋白质分子中, α 螺旋与 β 折叠结构交替出现,前述脱氢酶、激酶都是这种类型。它们与核苷酸类辅基相结合的结构域可见图1。

5. 无规卷曲(random coil)蛋白

这往往是一类分子量较小的蛋白质,分子内只有有限的有序结构,一般含有较多的二硫键,如牛胰的胰蛋白酶抑制剂即属此类。

X射线晶体衍射方法不仅对于认识蛋白质的空间结构,而且对于阐明蛋白质的功能、酶的作用机制、蛋白质与DNA的相互作用等方面,也都起了极为重要的作用。但是,也必须看到,晶体结构分析目前还只能给出分子处于静止的晶体状态的空间结构。然而生物体内的蛋白质实际上是处于溶液状态,或者是处于与生物膜紧密结合的疏水环境,无论是哪种情况,又总是处于不断运动的状态之中。尽管根据一些酶在晶体状态与溶液状态时酶活力的定量比较,可以认为蛋白质在晶体状态的空间结构大体上与其溶液构象是一致的,但有时也还是存在着一定的差异,而这些差异对于蛋白质功能的表达可能正是至关重要的。因此X射线结晶学家也在努力寻找各种方法研究蛋白质的运动性,例如在 -50°C 左右的低温下去捕捉某些酶分子在催化过程中的不稳定的构象中间态等,但取得的结果仍然是相当有限的^[7]。随着对蛋白质结构与功能研究的深入,人们的注意力已经越来越转向生物大分子的溶液构象及它们的运动性的研究(注)。

许多波谱学的手段,象紫外、红外、荧光、激光拉曼、圆二色等光谱以及顺磁共振、核磁共振等技术的应用,使蛋白质的溶液构象及运动性问题的研究有了明显的进展。中子衍射与重氢交换相结合的方法也取得了某些有价值的结果^[8]。但是,这些手段毕竟只能给出有关构象的局部信息,还不能象X射线晶体衍射方法那样给出分子结构的全貌。很值得注意的是,近年来核磁共振技术的迅速发展,新建立的二维核磁共振分析很有可能会在不久的将来,给出一个不太大的蛋白质分子——胰蛋白酶抑制剂在水溶液中的全部空间结构^[9]。

三、蛋白质分子的运动性

蛋白质分子一方面有其特定的精确空间结构,但在另一方面它又不是绝对刚性的,而是相对柔性的,即它的空间结构在一定范围内是可变的。蛋白质分子的这种运动性不仅表现在分子的结构能够因环境因素如pH、温度、盐浓度、某些小分子配体物质的存在而改变,更重要的是,即使在环境因素不变的情况下,分子本身也是处于一种固有的不断运动的状态之中。这种运动包括整个分子在溶液中的运动,也包括分子内部结构的相对运动,诸如氨基酸侧链的摆动,脯氨酸的异构化,局部肽链的扭转移动,结构域间的相对运动,以及肽链的部分伸展与卷曲,等等。Careri^[10]等结合模型化合物的测定,给出了蛋白质分子内各种运动形式的时间(表1)。

蛋白质分子在执行其生物功能时,总是伴随着它的运动,特别是分子内的运动。这种

表 1 球蛋白与酶分子的运动时间

运 动 内 容	时 间 (秒)
有关蛋白质表面部分	
紧密结合的水分子的弛豫过程	10^{-9}
松散结合的水分子的弛豫过程	10^{-11}
侧链旋转相关过程	10^{-10}
侧链的质子转移过程	$10^{-7}-10^{-9}$
有关蛋白质构象部分	
局部运动	$10^{-8}-10^{-9}$
异构化过程	$10^{-2}-10^{-7}$
卷曲-伸展过程	$10^{+2}-1$
溶液中酶与底物复合物	
碰撞速率	(受扩散控制) $<10^{-10}$
共价反应过渡态的估计寿命	$10^{-6}-10^{-9}$
金属酶中金属离子配位范围的变化	10^{-9}
酶与底物共价中间物的寿命	$10^{-2}-10^{-4}$
酶与底物复合物构象异构化	$10^{-2}-10^{-4}$
酶与底物复合物的伸展过程	$10^{+2}-1$

分子内的运动表现为蛋白质分子的构象变化。而这种构象变化往往是由于蛋白质分子与小分子配体物质的相互作用而引起的,如血红蛋白与氧分子的结合以及其他别构蛋白与效应物,酶与底物,受体蛋白与小分子激素、药物、神经介质等的相互作用均能引起蛋白质分子的构象变化。酶与底物结合时引起酶分子构象变化,即是 Koshland 的著名的诱导契合理论。酶与底物相互作用引起构象变化所需的时间也列于表 1 中。蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与生物膜的相互作用,也都伴随着蛋白质的构象变化。因此可以认为生物体内的蛋白质是处于一种可以相互转变的多种构象的平衡态中。

在蛋白质分子内的多种运动形式中,结构域间的相对运动颇值得注意。结构域是蛋白质分子空间结构中不可忽视的层次。在由较长肽链组成的蛋白质分子内总是存在两个或多个结构域。每个结构域本身都是紧密装配的,结构域之间则是通过共价的但空间结构却是松散的肽链相联系。由于这种在化学上牢固而在空间结构上柔韧的连接方式,使得每一个结构域可作为一个整体,作较大幅度的相对运动。

现已知道,多结构域酶的活性部位大都是位于两个或多个结构域的界面之间。在催化作用进行的同时,必然伴随着这些结构域的相对运动。Anderson 和 Steitz^[11] 曾详细地比较了有无底物存在下己糖激酶(hexokinase)的晶体结构,发现它的活性部位是在两个结构域组成的铰链式结构(hinge structure)之中,辅基 ATP 结合于一个结构域,而底物糖分子则结合于另一个结构域。酶分子结合底物时,两个结构域会发生相对运动,V 字形的界面会闭合起来,一方面提供了 ATP 与糖分子之间转磷酸化反应所需要的空间距离和特定构

象,同时也排除了活性部位内水分子的干扰,防止 ATP 水解副反应的发生。这种机制不仅对其他激酶存在,而且在醇脱氢酶^[12]、柠檬酸合成酶^[12]等的催化过程中也可能同样存在。它很可能对于催化双分子反应的酶具有一定的普遍意义。

蛋白质分子内的各个结构域,可以是相同的,也可以是不同的。在血清白蛋白分子内有三个几乎完全相同的结构域,每个结构域内又有三个相似的亚结构域^[14]。这些内部结构的相似性,意味着血清白蛋白的基因是在进化过程中,由较小的基因经过基因重复,然后拼接复制而成的。前面提到的功能各不相同的各种脱氢酶与激酶的与核苷酸结合的结构域构象十分相似,表明这些结构域在进化上是同源的。其基因分别与其他基因拼接,再通过分化进化而形成现在的功能各不相同的各种脱氢酶与激酶的基因。各个结构域的基因,可以分别进行分化进化,然后进行交互拼接,从而形成多种多样、功能各异的蛋白质。真核生物 DNA 序列中的内隐子和外显子,很可能与蛋白质是由多结构域组成有关^[13,14]。

四、寡聚蛋白亚基的微观不均一性

在所有已知的蛋白质分子中,约 30%是以寡聚体形式存在的。绝大部分细胞内蛋白质也是寡聚蛋白。亚基间的缔合,减少了分子表面的疏水区域,从而使蛋白质分子更加稳定。多亚基也常常是体现多种生物功能的必要条件,某些复杂功能的体现,必须由多种结构不同、功能不同的亚基协同完成。

寡聚蛋白分子的亚基组成,大体有如下几种情形。

1. 不同亚基不同功能

相当多的多亚基蛋白质分子是由结构与功能都不相同的亚基所组成。例如天门冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase)分子由十二个亚基组成,其中六个是催化亚基,六个是调节亚基,这两种亚基的化学结构、空间结构和功能都不相同。ATCase 是一个别构酶,它的活性受 CTP 的抑制与 ATP 的激活。催化亚基单独存在时,仍然保持有催化活性,但不受 CTP 和 ATP 的调节,必须与调节亚基共同组成完整的酶分子时,ATCase 才具有完整的别构酶性质。功能比较复杂的酶,如质子泵 ATPase 和 RNA 多聚酶都是由几种不同的亚基组成的。

血红蛋白分子由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成,简称 $\alpha_2\beta_2$ 结构。 α 与 β 亚基的一级结构与空间结构虽大体相同,但略有差异。正是这种差异,使得血红蛋白与氧的结合有正协同性,它是高等动物血红蛋白正常行使其输送氧的功能的一个重要因素。

2. 相同亚基相同功能

乳酸脱氢酶的某些同工酶、醛缩酶等分子是由结构完全相同的亚基对称排列组成。这些亚基的功能也可能是完全相同的。

3. 相同亚基非对称排列

X 射线晶体衍射结果表明,某些多亚基蛋白分子虽然由相同亚基组成,但亚基是以非对称排列方式相缔合^[15,16]。这种非对称排列的功能意义,目前尚不十分清楚。

肌酸激酶是由两个相同或十分相似的亚基所组成^[18]。两个亚基上各有一个反应活性巯基,这两个巯基附近的氨基酸顺序也是相同的,说明两个巯基在一级结构中是处于相同的位置上^[17,18]。Degani 等^[19,20]用 2-硝基-5-巯基氰代苯甲酸 (NTCB) 修饰肌酸激酶时,酶分子中两个巯基分别为氰基及芳硫基所取代。但是如果用 5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 修饰时,先得到一个酶分子的两个巯基均为芳硫基所取代的产物,然后再以氰化钾进行快速氰解,如图 3 所示,也同样可以得到单氰基、单芳硫基的修饰酶。令人惊异的是,用这两种方法所得到的单氰基、单芳硫基修饰酶,虽然其化学结构相同,但前者完全无活性,后者却有相当于天然酶 75% 的活性。不仅如此,酶分子上的芳硫基被进一步氰解的速度也很不相同,前者氰解速度较后者快得多,最后都得到了具有 75% 酶活性的双氰基衍生物。

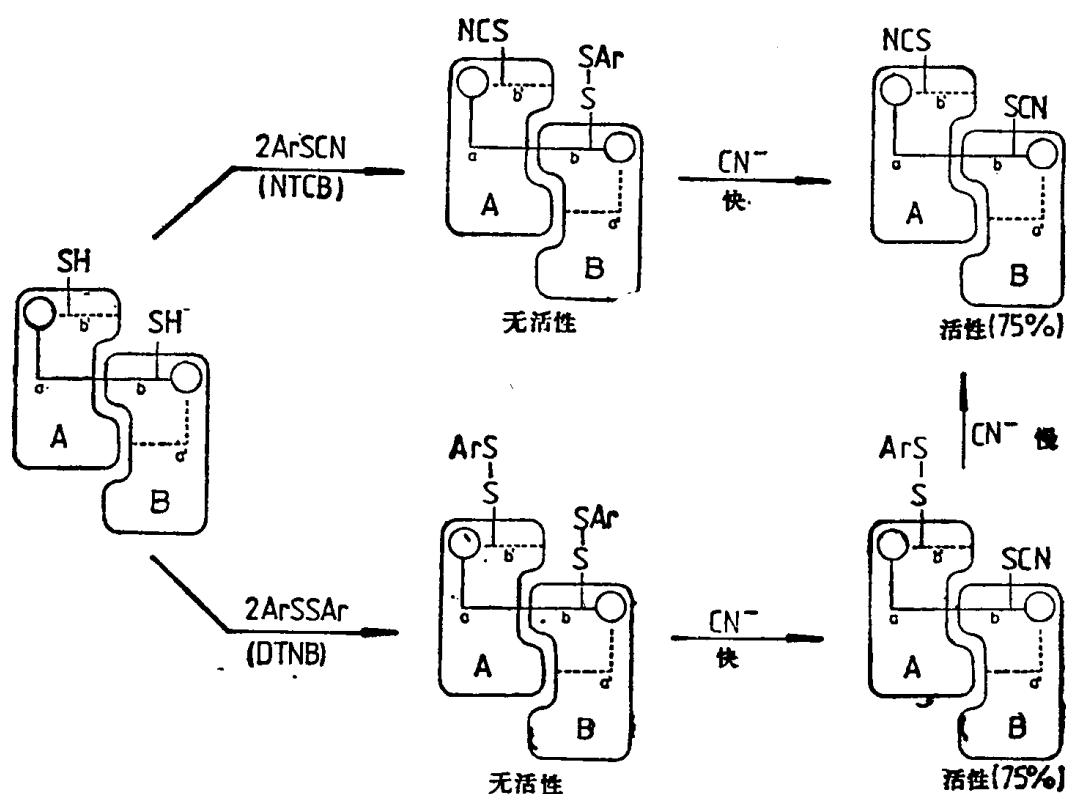


图 3 肌酸激酶在溶液中亚基非对称排列及两个亚基上活性巯基的非对称修饰机制示意图
图中 A、B 分别代表两个亚基。NTCB 为 2-硝基-5-巯基氰代苯甲酸。DTNB 为 5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)

以上事实说明,肌酸激酶分子内两个反应活性巯基,虽然处在一级结构相同的位置,但是反应性质不同,对酶活性的贡献也不相同,证明它们是处于不同的空间环境。Degani 等提出,肌酸激酶在溶液中两个亚基是非对称排列的^[21],两个亚基各自以不同的基团参与亚基间的相互作用,很可能也各自以不同的基团构成整个酶的活性部位。

4. 相同亚基构象的微观不均一性

肌酸激酶分子内两个亚基上的活性巯基的非对称修饰性质可以用相同亚基非对称排列来解释,所有别构蛋白所观察到的半位反应,也都可以用亚基排列的不对称性来解释。

但是,在由相同化学结构的亚基构成的寡聚蛋白分子中,亚基是否可以具有不同的构象,即所谓构象微观不均一性呢?

根据X晶体衍射分析结果来看,某些蛋白质晶体结构中,氨基酸序列相同的亚基尽管大体上是对称排列的,但在构象上仍然存在着一些细微差异,其中有些具有功能上的意义,有些则没有。例如三方二锌胰岛素晶体中组成二体的两个单体的空间结构略有不同^[22],但是,现在认为生理浓度的胰岛素是以单体形式行使生物功能的,因此晶体中两个单体构象的差异可能并没有确切的功能意义。

Bernhard^[23]曾提出,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的四个亚基虽然其化学结构相同,但是却存在着“预存不对称性”,即其不对称性是原有的,而不是由配体结合诱导产生的。这四个亚基由于构象上的差异,可区分为两组,即为 $\alpha_2\beta_2$ 结构,他称此为二体的二体。其主要实验根据是用底物类似物呋喃丙烯酰磷酸对酶进行酰化,此时酶的四个亚基中只有两个被酰化,即所谓半位反应。他再将其他两个亚基上的巯基用碘乙酸进行羧甲基化,再用砷酸盐经砷酸解,除去呋喃丙烯酰基后,得到含有两个原来能够进行酰化的活性巯基的酶分子,但是此时酶活性仅为原来的一半,并且在所释放出来的两个活性巯基中,也只有一个能够重新被酰化,所以他认为酶分子中四个亚基原来是以两种构象状态存在的。如图4所示,□及○分别代表这两种构象,其中□是有活性的能被酰化的构象。

在砷酸解过程中,经过一个亚基构象完全相同的阶段,然后再重排为亚基构象不同的两组亚基,其中一组为活性构象,另一组则是无活性的。因此所得到的砷酸解后酶活性为

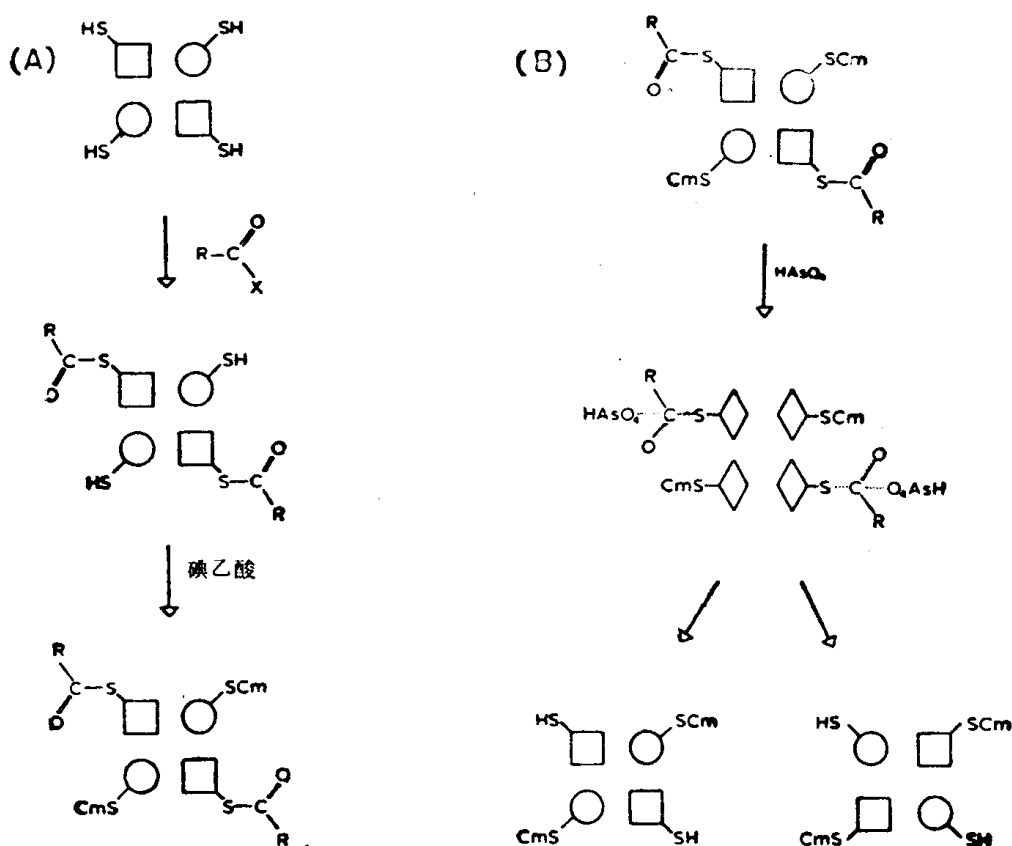


图4 甘油醛-3-磷酸脱氢酶四个亚基上活性巯基的非对称酰化、羧甲基化机制示意图
图中○与□分别代表相同亚基的两种不同构象状态

原来的一半,并且平均每一个分子中仅有一个巯基可被重新酰化。这一解释不能令人信服之处在于磷酸解过程中亚基重排的假定,这一重排本身很可能就是配体引起的亚基构象改变,因而也就可以用 Koshland 的序变模型加以解释。

Moras^[24] 小组对龙虾肌 GAPDH 的晶体结构进行分析的结果表明,这个酶不仅亚基的排列是不对称的,而且亚基的空间构象也存在着细微差异,他也称之为 $\alpha_2\beta_2$ 结构。但是 Rossman 等人的结果所反映的是晶体状态下的情况,其分辨率也仅为 3 Å,因而还不足以肯定的结论。

最近,我们的工作对于这个酶在溶液中亚基构象微观不均一性提供了进一步的证据。当这个酶活性部位巯基被羧甲基化之后,经紫外光照,可以形成与酶共价连接的 NAD 荧光衍生物^[25],并且进行脱羧^[26]。这两步光化学反应(图 5)都依赖于酶的构象完整性。经低浓度十二烷基硫酸钠轻度变性,这两步光化学反应即不再发生^[27]。肌肉酶即使被 NAD^+ 充分饱和后,在四个亚基中也仅能形成两个 NAD 荧光衍生物。特别值得注意的是酵母酶,在一定条件下,在四个亚基中仅能引进两个羧甲基,此时进行光照,虽然仍能形成两个 NAD 荧光衍生物,但是只有其中之一进行脱羧^[26]。这一事实是很难用 Koshland 的序变模型解释的。如果我们把这个酶四个亚基分别称之为 A, A', B, B' (图 6),假定在两个 A 亚基上进行羧甲基化并光照生成荧光衍生物。由于在 A 亚基上引入一个带负电荷的羧甲基时,并没有阻止在 A' 亚基也引入一个同样的带负电荷的基团,因此在 A 亚基除去一个带负电荷的羧基时,同样也不会由于空间阻碍或诱导产生构象变化等原因,阻止在 A' 亚基上脱去羧基。这个事实看来只能用 A 和 A' 亚基原来就有的细微构象差异来解释。由于酶在光照前就已经为 NAD^+ 所饱和,所以这一亚基构象的微观不均一性,也不是因为配体结合诱导产生的^[26,28]。

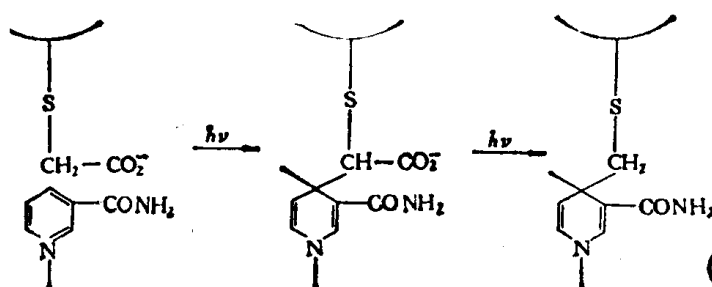


图 5 甘油醛-3-磷酸脱氢酶光化学反应过程

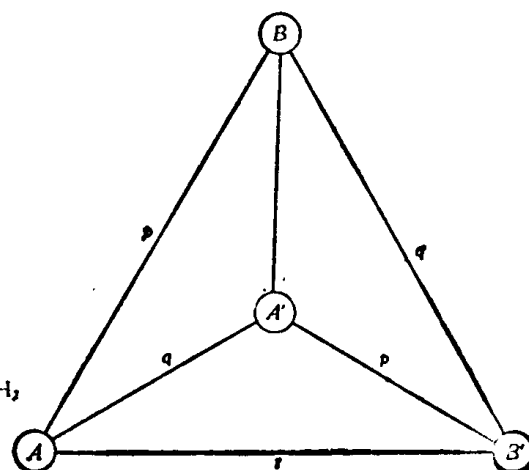


图 6 甘油醛-3-磷酸脱氢酶分子亚基排列的模型

寡聚蛋白的相同亚基或者以不对称方式排列,或者存在着构象上的微观不均一性,看来是比较常见的现象。今后在一些目前认为是以相同亚基、相同构象、对称排列的寡聚蛋白质中,还可能发现新的不对称性或者构象不均一的情况。

由于一级结构完全相同的亚基可以具有某些不同的空间结构,我们认为,对 Anfinsen^[29]在五十年代末期提出的蛋白质的高级结构完全由其一级结构决定的规律应该提出一点修正,即在寡聚蛋白分子中,一级结构完全相同的亚基有时可能会存在空间结

构上的差异。这种差异可能是使寡聚蛋白处于一个更稳定状态的要求所致,也可能有它功能上的意义。这一点尚待进一步研究。

五、蛋白质肽链的伸展与卷曲

所谓蛋白质肽链的伸展,就是在一定条件下,蛋白质分子从紧密有序的天然构象变为随机松散肽链的过程,而从这种无规卷曲态自发形成有序构象的过程就是蛋白质的再卷曲。蛋白质肽链伸展与再卷曲的研究是目前一个十分活跃的领域。这一研究工作的意义不仅在于探索蛋白质肽链伸展与卷曲的中间过程及其机制本身,更重要的是企图用它来作为研究蛋白质生物合成时空间结构形成的模型。但是生物体内蛋白质合成时,肽链是不断延伸的,这与体外变性蛋白分子即伸展了的完整的肽链的再卷曲情形毕竟不同。此外,研究蛋白质肽链伸展与再卷曲过程中生物功能的变化,也是研究蛋白质结构与功能关系的一个重要方面。

1. 伸展与卷曲过程

蛋白质肽链的伸展与再卷曲都是复杂的动力学过程。以核糖核酸酶 A(RNase A)为例,Baldwin^[30]等最早提出了存在着快速与慢速两种变性分子的机制:



其中 U_F 与 U_S 分子比为 20:80,它们都是肽链完全伸展的分子,因为 U_F 与 U_S 分子的比例不受温度和变性剂浓度影响。97%以上的酪氨酸残基的光吸收变化发生于快相, U_F 与 U_S 分子的酪氨酸吸收光谱几乎没有不同,这说明 $U_F \rightleftharpoons U_S$ 的转变不涉及酪氨酸残基微环境变化。Brandts^[31]等提出, U_F 与 U_S 两种变性分子之间的主要差别在于肽链中脯氨酸残基的顺反异构化的不同(图 7)。天然 RNase 分子中,四个脯氨酸残基中两个为顺式,Pro-93 和 Pro-114,两个为反式,Pro-42 和 Pro-117(图 8)。当肽链伸展时, $N \rightarrow U_F$ 的过程是肽链迅速随机松散过程,而 $U_F \rightleftharpoons U_S$ 的过程则是脯氨酸残基异构化的慢过程。

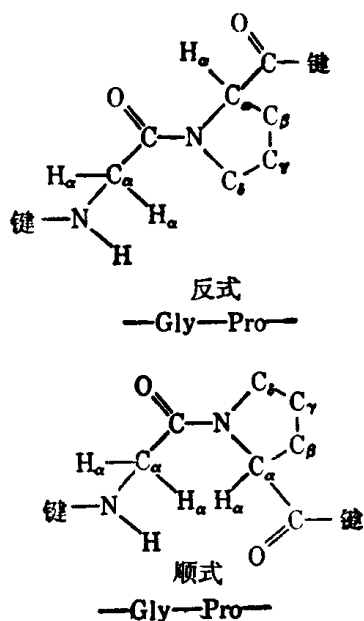


图 7 脯氨酸顺、反式结构图

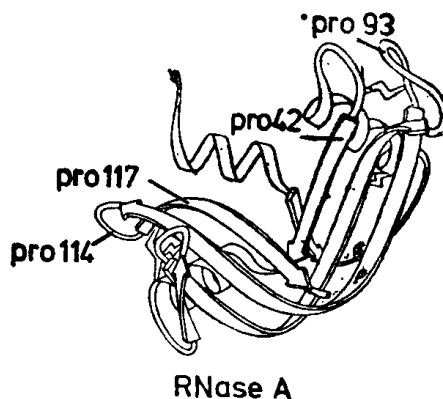


图 8 核糖核酸酶 A 分子中脯氨酸残基位置

Brandts^[32] 等用对反式脯氨酸肽键有特异性的酶解反应,证明了在生成 U_s 分子的慢过程中包括着 Pro-93 由顺式变为反式的异构化过程。对许多蛋白质的伸展与再卷曲机制的研究表明,类似的机制^[33,34] 是很普遍的。

RNase 的再卷曲同样也是两相过程,一相为快速过程($\tau = 50$ ms, 25℃),另一相为慢速过程($\tau = 20$ s, 25℃),如图 9 所示。它们分别反映 U_F 和 U_s 再卷曲生成天然 RNase 分子的过程。

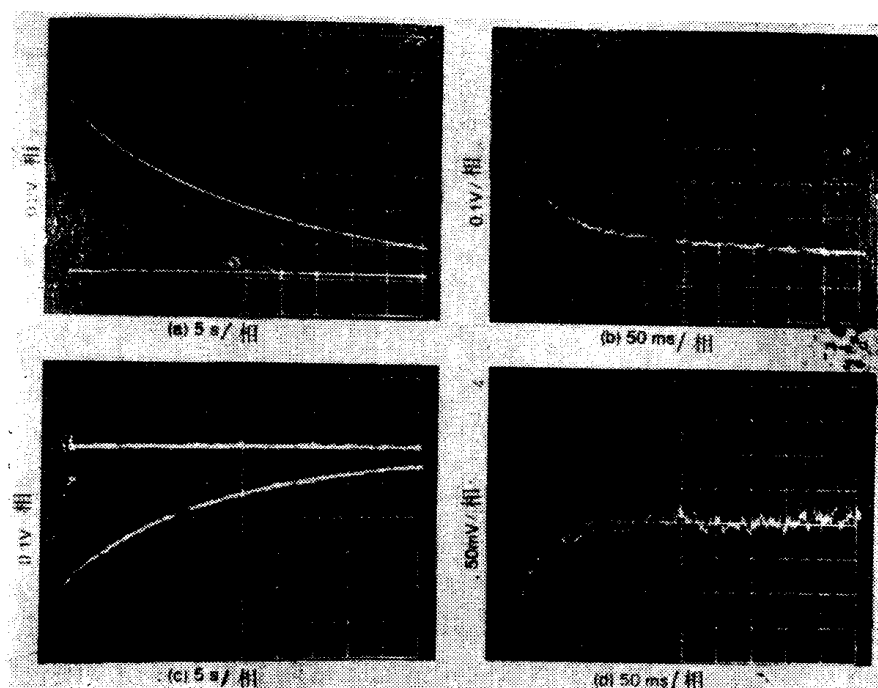


图 9 核糖核酸酶 A 分子再卷曲过程中的快慢两相过程

Baldwin^[35]等曾以 RNase 的特异性抑制剂 2'-CMP 与酶的结合为指标,测定再卷曲过程中酶活性部位的结合部位形成情况。酶与抑制剂的结合是异常迅速的过程,通常是在微秒时间范围内完成的,2'-CMP 在与酶结合前后,在 250 nm 的吸收有明显变化,可以用于酶分子卷曲过程中结合部位形成过程的动力学监测指标。实验结果表明,再卷曲过程中 2'-CMP 与酶结合情况的变化与酪氨酸吸收光谱的变化是一致的,这说明构象的恢复与酶和 2'-CMP 这样一个竞争性抑制剂结合能力的恢复是平行的。应该指出,抑制剂结合部位的形成与酶的催化活力的恢复可能是不同步的。因此,伸展与卷曲过程中,生物功能的变化与构象的变化的比较研究,才是更有意义的。

2. 伸展与卷曲过程中的活性变化

过去对蛋白质结构与功能关系的研究,主要用化学修饰、部分酶水解等方法,研究蛋白质化学结构的改变对其活力的影响。前已提到蛋白质空间构象的完整性,对于其生物活性的表现至为重要。近年来虽然对于一些蛋白质由于一些物理因素或化学变性剂引起的肽链伸展,以及去除这些因素后的再卷曲的中间过程及其机制,已经作了大量的研究,但是把上述伸展及再卷曲的过程与蛋白质生物活性的变化过程联系起来,研究其构象与活力关系的工作尚不多见。由于伸展以及再卷曲过程的起始部分常常是较快的,在几分钟内

即已完成,经典的终止反应取样测活的方法往往不能适用,必须设计全新的动力学方法,才能研究快速的失活与复活动力学过程。

我们过去在对酶的失活与复活过程中底物变化动力学进行理论上的探讨中^[36],曾提出在失活或复活的同时,在底物存在下监测产物生成的动力学方法,来测定失活或复活速度。这一方法最近已经得到实验上的验证^[37]。应用这一方法,我们进行了肌酸激酶在胍、脲变性过程中构象变化速度与酶失活速度的比较^[38-40],结果总结于表 2 中。

表 2 肌酸激酶在胍与脲溶液中变性速度与失活速度的比较

速度比较 变性剂 (mol/L)	变性速度常数 (秒 ⁻¹ ×10 ³)				失 活	
	紫外差吸收	荧 光	圆二色性	-SH 暴露速度	速度常数 (秒 ⁻¹ ×10 ³)	剩余活力 (%)
胍 0.5	4.3	3.6	0.77	1.4	3600	15
1.0	53	40	17	a	4300	0
脲 3.0	0.24	0.24	b	0.41	10000	14
4.0	0.32	0.60	b	3.83	13000	5
5.0	2.86	1.02	b	5.75	a	0

a: 未测。

b: 由于脲在 220 nm 的吸收无法测定远紫外的圆二色变化。

我们采用了紫外差吸收、荧光、圆二色光谱和测定内埋巯基的暴露四种手段,监测肌酸激酶分子肽链的伸展。其中紫外差吸收和荧光光谱的变化主要是反映色氨酸和酪氨酸残基周围微环境的变化,而圆二色性测定是代表分子内有序二级结构的变化。从表 2 可见,用上述各种手段测定构象变化速度,虽然各不相同,但大体上都在同一数量级范围内。但是与此形成鲜明对比的是,相同的变化条件下,失活速度却较构象变化速度约快 1,000 倍左右。胍与脲两种变性剂作用结果相似,在脲变性过程中,失活速度比胍变性时还要快。

前面曾提到,根据 Degani 等的实验结果,可以认为肌酸激酶必须以二体形式存在,才具有催化活性。因此对于变性过程中的快失活的一种可能解释是由于酶在变性时,酶的二体首先发生了快速解聚,从而造成了快速失活。但是我们过去的实验结果已经表明,变性肌酸激酶再卷曲时,无论是构象恢复速度,还是活性恢复速度,都在一定的范围内不受蛋白质浓度的影响^[41],表明酶分子的解离聚合可能与活性变化无关。

我们对快速失活的解释是该酶的活性部位处于一个空间结构脆弱的易为胍、脲这一类变性剂所破坏的部位。在活性部位中参与催化反应的各个基团间的完整的空间关系一旦发生变化,就可以引起酶活性的丧失。此时,整个酶分子的空间构象可能尚未发生明显的变化,而我们采用的各种监测构象变化的手段,主要反映的是整体酶分子的构象变化情况。肌酸激酶活性部位的脆弱性也许正是与酶分子的柔性(flexibility)或者运动性(mobility)有关。

酶分子在变性过程中,整个酶分子构象的缓慢变化伴随着活力迅速丧失的现象,究竟是肌酸激酶特有的呢?还是具有一定的普遍意义呢?为此,我们选择了单亚基、分子量较小

而空间结构又因含多个二硫键交联而比较稳定的胰凝乳蛋白酶和胰核糖核酸酶 A, 进行变性与失活的动力学比较研究。结果发现, 在胍、脲变性过程中, 失活速度仍然是明显快于整个分子构象变化速度, 与肌酸激酶的情形一致。

近年来, X 射线衍射晶体结构研究表明, 许多酶的活性部位接近于分子表面, 对于一些分子量较大的酶分子, 活性部位通常位于两个结构域之间的铰链部位, 催化作用常常必须依靠活性部位所具有的柔性或运动性。在胍、脲变性条件下, 首先发生的活性部位的轻微的构象变化, 已经足以导致酶分子的失活。还必须指出的是, 与催化活力相关的活性部位的运动性只能是相对的, 有一定限度的。已经知道在一些蛋白质分子的空间结构中, 存在着一些位于分子表面、空间结构松散或完全不含有序的二级结构肽段, 它们在溶液中有很大柔性或运动性。这些肽段恰恰是在进化中最易改变的, 而且对这些蛋白质的生物功能通常是非必需的。我们所说的活性部位的柔性或运动性与此不同, 它的有关肽段有精确的并且与催化功能密切相关的空间结构, 在进化上也是保守的。因此它的柔性或运动性必然是特定的、相对的、有一定限度的。

前已提到, 用已伸展的肽链的再卷曲作为研究蛋白质生物合成中肽链卷曲的模型是不适当的, 因为在生物合成过程中, 肽链是逐渐延伸的, 这和一条已经具有全部一级结构的肽链的再卷曲当然是不会相同的。当肽链不断延伸时, 二级、三级结构有可能随着肽链的延伸而逐渐形成, 而无需等待肽链全部合成之后再卷曲形成。当然这并不排除在肽链逐渐延伸的同时已经形成的高级结构不断进行调整。如果一个单肽链的酶的高级结构是在肽链生物合成过程中同时形成的, 那么它的酶活性的出现应该不迟于肽链合成的终止。用我们提出的动力学方法^[38], 追踪此类酶活力在肽链生物合成过程中的出现, 将可以对上述问题作出比较明确的答案。

六、结 束 语

多年来, 蛋白质结构与功能关系的研究一直是生物化学和分子生物学领域内一个主要课题。近年来的发展越来越使人们清楚地看到, 蛋白质分子在生物体内并不具有固定不变的或者说是绝对刚性的结构, 它在一定程度上是柔性的, 可变的, 并且处于一种不断运动的状态。蛋白质分子本身的运动造成蛋白质分子在溶液中处于一个多种构象状态的平衡态。这些不同构象状态在溶液中的相对丰度由各个构象状态的能级决定。而晶体结构则可能捕捉了其中一种能级较低、较为稳定、因而也是丰度最高的构象状态。在不同条件或不同配体分子存在下, 这些构象状态之间的相对丰度可以发生变化, 也可以有新的构象状态出现, 这就是蛋白质分子结构的柔性或可变性。换言之, 蛋白质分子的柔性或可变性的基础是蛋白质分子本身的运动。无论是柔性, 可变性或运动性都和蛋白质分子的生物功能密切相关。今天, 蛋白质结构与功能研究的正确提法, 应该是蛋白质的结构、运动与功能的关系。对于蛋白质的柔性或运动性的研究, 必将会对蛋白质的各种功能, 特别是酶的作用机制、肌肉收缩、能量转化、激素等物质与受体的相互作用以及基因调控等的研究起极大的推动作用, 使分子生物学与生物化学的发展达到一个新的水平。