

转铁蛋白结构域的研究及转铁蛋白的进化

侯宪玉 冯佑民

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

转铁蛋白是单一肽链糖蛋白,含有两个相似的结合铁的结构域,可能是在进化过程中基因发生过重复。转铁蛋白结构域的研究和基因结构分析为这种假说提供了证据。从尾索动物亚门的海鞘内分离到单结构域形式转铁蛋白,因此推测基因重复可能发生在五亿年前的尾索动物亚门内。结构域的研究工作说明现在的转铁蛋白结构域已不同于其原始形式,单独不能起作用,只有两结构域协同才能行使转铁的功能。

引 言

转铁蛋白 (Transferrin, Tf) 是脊椎动物铁的运输者,分子量约 80,000,一分子可以结合两个三价铁离子 (Fe^{3+})。近来发现 Tf 几乎是所有细胞体外培养时生长与分化的必要组分。1968 年 Green 等^[1]根据测定的 Tf 沉降系数,提出结合两个三价铁离子的 Tf 是一条肽链,并推测现在的 Tf 分子中结合 Fe^{3+} 的两个结构域

可能是原始单结构域 Tf 在进化过程中发生了基因重复。Brew 等^[2]在对人 Tf 一级结构分析的基础上提出了类似的观点。人乳转铁蛋白 3.2 Å 晶体结构分析也支持这种理论^[3]: 相应于氨基酸顺序相似的两肽段构成了两个结构域 (如图 1)。从已完成的人血清 Tf 和鸡卵白 Tf 的全部氨基酸顺序也看出残基 1—336 和 337—679^[4] 构成两个相似的结构域,每个结构域结合一个三价铁离子。关于这方面的内容已有很好

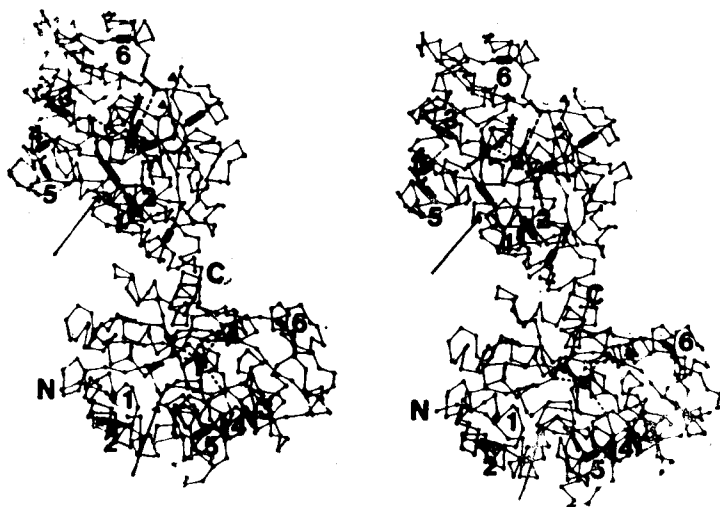


图 1 人乳转铁蛋白 3.2 Å X-射线晶体结构^[3]

的综述^[5,6]。最近关于 Tf 结构域的制备和功能的研究、Tf 基因组成分析和不同种属 Tf 基因比较的研究以及含单一铁结合部位 Tf 及其类似物的发现,为上述进化理论提供了有力的证据。本文拟就最近这一方面的工作作一简单综述。

一、结构域的制备与研究

自从发现 Tf 含有两个相似的结合铁的结

构域以来,其结构与功能的研究主要集中在两结构域的性质及其相互关系。为此,很多实验室通过不同途径分别得到了单个结构域,并研究了其结构与功能的关系。

1. 结构域的制备

制备结合一个铁(Fe³⁺)的 Tf 结构域一般用酶解法和化学裂解法,最常用的是酶解法,而胰蛋白酶用得最多(见表 1)。在所研究的血清和卵白 Tf 中,鸭血清 Tf(Fe)₂ 最易被酶解成两

表 1 已获得的 Tf 结构域片段

Tf	酶或化学试剂	结构域分子量	参考文献
牛血清 Tf(Fe) ₂	胰蛋白酶	38,500 (C) 32,000 (N)	Brock et al. ^[7]
牛血清 Tf(apo)	胰蛋白酶	38,500 (C)	
大鼠血清 Tf(Fe) ₂	胰蛋白酶	33,000 (C) 38,000 (N)	Бугланов и Садихов ^[8]
骆驼血清 Tf(Fe) ₂	胰蛋白酶	34,700 (N) 40,700 (N) 35,100 (C)	侯宪玉等(1988 年,待发表)
鸭血清 Tf(Fe) ₂	胰蛋白酶	33,200 (N) 34,900 (C)	侯宪玉等(1988 年,待发表)
猪血清 Tf(Fe) ₂	胰蛋白酶	33,000 (N) 37,000 (C)	冯佑民等(待发表)
人乳 Tf(Fe) ₂	胰蛋白酶	30,000 (N) 50,000 (C)	Legrand et al. ^[9]
人乳 30,000(N)		18,500 (N)	
人血清 (Fe)Tf	胰蛋白酶	36,000 (N)	Evans & Williams (1978) ^[1]
人血清 Tf(Fe)	胰蛋白酶	43,000 (C)	
兔血清 (Fe)Tf	α-胰凝乳蛋白酶	36,000 (N)	Heaphy & Williams (1982) ^[11]
兔血清 Tf(Fe)	α-胰凝乳蛋白酶	39,000 (C)	
鸡卵白 (Fe)Tf	胰蛋白酶	35,000 (N)	Williams ^[10]
鸡卵白 Tf(Fe)	胰蛋白酶	35,000 (C)	Williams ^[11]
人乳 Tf(Fe) ₂	胃蛋白酶	39,500 (C)	Line et al. (1976) ^[12]
鸡卵白 Tf(Fe) ₂	固相枯草杆菌蛋白酶	39,000 (N) 39,000 (C)	Keung et al. (1982) ^[13]
鸡卵白 Tf(Fe) ₂	CNBr	36,000 (C)	Tsao et al. (1974) ^[14]
人血清 Tf(Fe) ₂	嗜热菌蛋白酶	35,600 (N)	Lineback-Zins & Brew ^[15]
人血清 Tf(Fe) ₂	嗜热菌蛋白酶	42,000 (C)	Zak & Aisen (1983) ^[16]
兔血清 Tf(Fe) ₂	枯草杆菌蛋白酶	33,000 (N)	Heaphy & Williams (1982) ^[11]

注: Tf(Fe)₂, 铁饱和转铁蛋白; Tf(apo), 去铁转铁蛋白; (Fe)Tf, N-端结构域结合铁的转铁蛋白; Tf(Fe), C-端结构域结合铁的转铁蛋白;……(C), C-端结构域片段;……(N), N-端结构域片段。

结构域片段,酶解半小时就几乎全部变成了结构域片段,但这两种片段各自还以非共价键结合成聚合体。延长酶解时间,N-端结构域变为单体经 ConA-Sepharose-4B 柱亲和层析可分别获得 N-端结构域与 C-端结构域片段(侯宪玉等待发表结果)。猪(冯佑民等待发表结果)、牛^[7]、骆驼(侯宪玉等待发表结果)、大鼠^[8] Tf(Fe)₂ 也能被胰蛋白酶酶解成两结构域片段,但比鸭血清 Tf(Fe)₂ 困难,酶解 21 小时只有约三分之一 Tf(Fe)₂ 变成结构域片段。在乳 Tf 中,人乳 Tf(Fe)₂ 易被胰蛋白酶酶解成结构域片段^[9],温和条件下酶解得到分子量分别为 30,000 和 50,000 的两种片段,若把分子量 30,000N-端结构域继续用胰蛋白酶酶解能得到分子量 18,500 的结合铁片段,这是到目前为止得到的最小结合铁片段。

人血清与鸡卵白 Tf(Fe)₂ 不能直接用胰蛋白酶酶解成结构域片段,但可用间接方法分别得到两个结构域。Williams^[10,11]根据鸡卵白 Tf 两结构域结合铁的性质不同,控制 pH 条件,使其每次只有一个结构域结合铁,然后分别用胰蛋白酶酶解。酶解 (Fe)Tf 得 N-端结构域,酶解 Tf(Fe) 得 C-端结构域。同样办法也可以分别得到人血清 Tf 的 N-端结构域和 C-端结构域。

除胰蛋白酶外,还用枯草杆菌蛋白酶和嗜热菌蛋白酶等制备 Tf 结构域,人血清和兔血清 Tf 用这两种酶酶解得到了结构域片段。另外,Keung 等人用固相枯草杆菌蛋白酶酶解鸡卵白 Tf(Fe)₂ 同时获得了两结构域片段。

2. 性质

酶解制得的单结构域片段仍能可逆地结合铁;虽然两结构域之间无免疫交叉反应,但两结构域片段的混合物保留与完整 Tf 相似的免疫性;混合物的 ERS 光谱与可见光谱和完整 Tf 基本上一样^[5],这说明酶解过程中保持了结构域的完整,酶解基本上未改变结构域的构象。

3. 功能

结构域片段的构象与可逆结合铁的性质和原 Tf 上相应结构域基本相同。在此基础上,

比较研究 N-端和 C-端结构域片段及 Tf 与 Tf 受体结合以及转铁能力有利于了解 Tf 结构与功能的关系。

Espara 等人^[12]研究了酶解制备的牛 Tf 结构域片段向兔网织红细胞内转移铁的情况,得出的结论是:完整牛 Tf 对细胞转铁能力很强,C-端结构域片段只有微弱的转铁能力,N-端结构域片段几乎不对细胞转铁;温度降为 4℃ 时,Tf 和 C-端结构域片段均不再向细胞内转铁,与细胞的结合量也随之减少,而 N-端结构域片段与细胞的结合却不受温度影响;若细胞与 C-端结构域片段预保温,能使 Tf 对细胞的转铁受到部分抑制,与 N-端结构域片段预保温无此现象,这说明 C-端结构域片段能部分代替 Tf 对细胞的功能,N-端结构域片段却不能。由此他们提出了如下的机制:Tf 与细胞的作用是两步过程,分别由两个结构域来负责。N-端结构域片段与细胞结合不受温度影响,本身不具有供给细胞铁的能力,不抑制 Tf 向细胞供铁,可能是 Tf 与细胞作用的第一步相关结构域,这一步是通过 Tf 或其膜受体的变构作用完成的。第二步是需能释放铁的过程,因 C-端结构域片段还保留部分对细胞转铁能力,与细胞结合受温度影响,并能抑制 Tf 对细胞转铁,可能是 Tf 与细胞作用的第二步相关结构域。

Brown-Mason 和 Woodworth 利用⁵⁹Fe 和¹²⁵I 分别标记铁和蛋白本身,研究鸡卵白 Tf 及其结构域片段与鸡网织红细胞的作用,结果表明单个结构域与细胞结合是非专一性、非饱和性的,且几乎没有对细胞转铁能力。若把 N-端结构域片段与 C-端结构域片段混合起来,则与受体结合和对细胞转铁能力均大为提高,几乎达到了与完整分子相同的程度。在未标记 N-端结构域存在下 C-端结构域与细胞的结合量和在未标记 C-端结构域存在下 N-端结构域与细胞的结合量均接近完整 Tf,但其与受体的结合常数却远小于 Tf,在与未标记 Tf 竞争结合时,前两者竞争力也只有标记 Tf 的一半。另外,实验还发现在未标记 C-端结构域片段存在时 N-端结构域与细胞的结合能力比在未标记

N-端结构域存在时 C-端结构域与细胞的结合能力强,但对细胞转铁能力后者却强于前者。由此他们得出结论: Tf 与细胞作用是双价的,作用位点分布在两个结构域内,对细胞转铁也是两结构域分担,但 N-端结构域功能偏重于与细胞结合, C-端结构域的功能偏重于向细胞内转铁。

Esparza 和 Brock 研究了几种血清 Tf 分别经胰蛋白酶酶解后与兔网织红细胞的作用(在此过程中猪 Tf 被酶解成两结构域片段,人和兔血清 Tf 只被切出了一些切口,马血清 Tf 被酶解成了两结构域片段,但在无去垢剂存在时仍以非共价键力结合在一起),结果表明:若 Tf 已被酶解成了两结构域片段,则向细胞内转铁能力大为减弱,若酶解后片段仍以二硫键或非共价键结合在一起,则向细胞内转铁能力与完整 Tf 几乎一样。

Line 等人^[15]对人乳 Tf 的研究发现其向兔网织红细胞内转铁有两种速度,前十分钟转铁较快,称为“快速过程”,十分钟后速度减慢,称为“慢速过程”。制备的结构域片段只剩下向细胞内转铁的“慢速过程”,“快速过程”丢失了。

综上所述,两结构域的同时存在是 Tf 与受体作用向细胞内转铁十分重要的条件。在转铁蛋白与受体结合时 N-端结构域可能贡献较大,向细胞内释放铁时 C-端结构域贡献大。

二、Tf 的进化

Tf 的结构尤其是关于 Tf 结构域的研究有

力地支持了 Tf 是由含单铁结合部位的原始 Tf 分子进化而来的假说。Tf 基因结构的分析为这一进化过程提供了更直接的证据。

1. Tf 基因结构分析

Tf 的进化历史也就是其基因变化史。不同来源 Tf 结构与功能的相似性也一定是基于其基因的相似,若 Tf 进化过程中基因发生过重复,那么编码两结构域的基因外显子数应相同,对应外显子大小与顺序也应一致。Park 比较了人 Tf 基因和鸡卵白 Tf 基因,发现两种 Tf 基因的 17 个外显子中有 12 个大小与顺序类似;比较人 Tf 两结构域的基因结构,发现外显子数目一样,对应外显子的大小与碱基顺序类似,而且与内含子拼接方式相同,由此他们提出了如图 2 的 Tf 基因进化模式。即现在的 Tf 基因是两个原始 Tf 基因(含 10 个外显子,外显子 1 编码信号肽)间交叉连结(intragenic crossing-over)而成,在交叉过程中失掉一编码信号肽的外显子(外显子 1)和一 3' 端外显子(外显子 10)。在后来的进化过程中又发生了外显子 4 的缺失而成为今天的 Tf 基因。然后相互独立进化产生了不同内含子大小的卵白 Tf 和血清 Tf 及其它 Tf 家族成员。

2. Tf 基因进化的时间图

通常情况下讲的转铁蛋白包括存在于血清中的转铁蛋白,存在于哺乳动物乳汁中的乳转铁蛋白,和存在于鸟类卵白的转铁蛋白三类,这三类蛋白质性质相似但稍有不同,每一类的不同种属间差别不大,下面就分别以人血清 Tf、

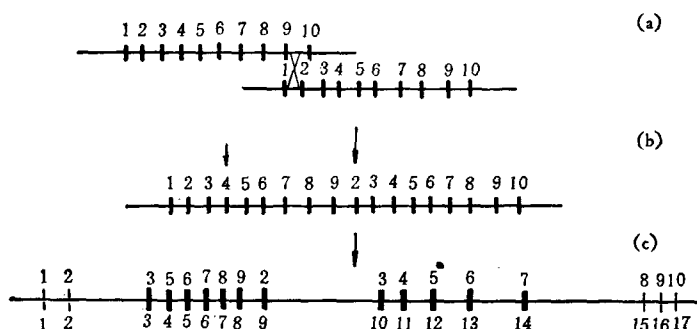


图 2 转铁蛋白基因进化模式图

C 中上面数字代表原始 Tf 基因中外显子号码,下面数字是现在 Tf 基因中外显子号码^[14]

人乳 Tf 和鸡卵白 Tf 做为三类的代表绘制其进化时间图(图 3)。

近来染色体上基因定位工作发现 Tf 与其受体基因均位于染色体 3 上^[17],且两者的氨基酸顺序也部分相似。另外,发现与 Tf 氨基酸顺序类似的蛋白质还有人黑素瘤细胞膜上的 P⁹⁷ 蛋白质和癌基因 chBlym-1 所编码的蛋白质^[5]。Tf 进化过程中发生过基因重复的观点提出后,很多人进行了寻找单结构域 Tf 的工作,在此过程中 Martin 等人^[18]从尾索动物亚门的海鞘中分离到一种分子量 40,000,只结合一个 Fe³⁺ 的转铁蛋白,它具有 Tf 的性质及其主要功能。不久 Funmei 等^[19]又分离到海鞘 Tf 基因,并与人 Tf 的 cDNA 进行了杂交,结果表明海鞘 Tf 基因与人 Tf 基因顺序十分相似,所不同者只是海鞘 Tf 基因比人 Tf 基因小许多。因此推测 Tf 基因重复大约发生在五亿年前的尾索动物亚门内。基于上述现象 Funmei 等人^[19]提出了如下的 Tf 进化时间图(图 3)。

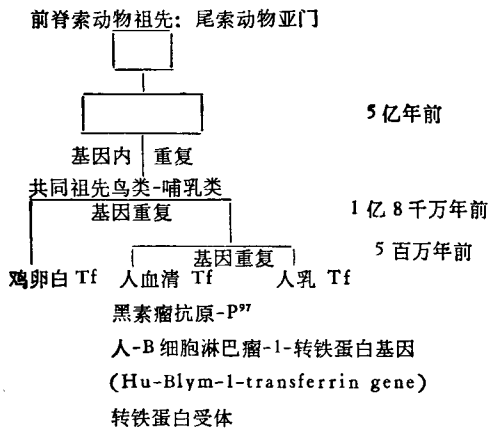


图 3 转铁蛋白家族进化时间图^[17]

3. Tf 类似物及单结构域 Tf 的可能存在形式

1982 年 Williams 等人曾做过这样一个实验:把酶解制备的鸡卵白 Tf 结构域片段注射进大白鼠体内,发现很快就被从肾脏排泄出来,而完整 Tf 能在体内保留相当长时间。Martin 等人^[18]从海鞘中分离的单结构域 Tf 静脉注射到大白鼠体内也很快通过肾脏被排泄掉,它之所以能存在于海鞘内是因这种生物还无肾排泄

系统。因此推测 Tf 从单结构域进化为双结构域可能是环境选择的结果,随生物进化逐渐出现了肾排泄系统,只有发生过基因重复的双结构域 Tf 保留下来,而原来的单结构域形式则较易通过肾脏被排泄掉,或只在避开肾排泄系统的组织中起作用。

近年来从一些非肾排泄系统的体系中发现的 Tf 类似物可以做为上述推测的证据。Brown 等人^[5]从人黑素瘤细胞膜上分离到一种膜蛋白 P⁹⁷,它与 Tf 有相似的 N-末端氨基酸顺序,且它们的变性蛋白间能产生免疫交叉反应。Murray 等人从猪子宫内分离到一种 Tf 类似物,它为胎猪转运铁,分子量 35,000,虽一分子可以结合两个铁,但这两个铁结合在同一部位,该蛋白主要存在于尿囊内,进入循环组织后就立即被排泄掉。另外,从蟹和蜘蛛中分离出的 Tf 或 Tf 类似物分子量比普通 Tf 大(分别为 150,000 和 100,000),蟹 Tf 约为脊椎动物 Tf 的两倍。由此我们推测,Tf 的进化路线可能还有另一种模式,基因重复发生在无脊椎动物蟹类附近,即原始单结构域 Tf 分子量仍为 80,000 左右,刚发生基因重复后的双结构域 Tf 分子量为 150,000 左右,如蟹 Tf,经进一步进化精简变成现在分子量 80,000 左右的双结构域 Tf。

结 束 语

综上,近来关于 Tf 基因结构分析和 Tf 结构域片段的制备以及 Tf 类似物的寻找大大促进了对 Tf 结构与功能及其进化的了解。

此外,近年来又发现 Tf 除运输铁的经典功能外还几乎是所有体外培养细胞的生长因子,并且 Tf 受体的表达和肿瘤发生、发展有着密切关系,这更加吸引了越来越多的人研究 Tf 及其受体,关于这方面的进展很快,由于篇幅所限本文不拟讨论。

张友尚教授指导了本文整理工作,并审阅了全文。

参 考 文 献

- [1] Green, F. C. and Feeney, R. E.: *Biochemistry*, 1963,

(下转第 283 页)

量或反应速度。以吸收值为纵坐标、DNA 浓度为横坐标,作酶促反应曲线。再分别做含棉酚 5 μ g 及 10 μ g 的酶促反应曲线,结果见图 4。

由图 4 可知,加入棉酚后,米氏常数 (K_m) 及最大反应速度 (V_{max}) 均减小,表明棉酚对 DNase 呈现出反竞争性抑制作用。

讨 论

实验表明棉酚不影响 DNase 分子的表面电荷量及其分子量。部分棉酚分子可能进入 DNase 分子内部疏水区域与色氨酸等芳香族氨基酸残基接近并发生相互作用,引起能量重新分布,从而导致 DNase 紫外吸收光谱的变化及产生荧光淬灭作用。

DNase 动力学实验表明棉酚对 DNase 呈现出反竞争性抑制作用,说明棉酚也可与酶-底物复合物结合,改变酶的空间构象,使酶活性下降。这与棉酚对 DNase 的吸收光谱及荧光光谱的影响相一致。

总之,棉酚能影响 DNase 分子的空间构象及抑制其活性。在体内, DNase 具有修补损

伤的 DNA 的作用。DNase 的活性受到抑制后,会影响 DNA 的正常代谢。所以服用棉酚后,除明显抑制睾丸精子形成及杀灭精子外,还会引起机体各器官细胞中 DNA 的代谢异常,产生广泛的毒副作用^[2]有一定相关性。因此,棉酚难于成为良好的男性口服节育药物。至于棉酚对 DNase 的作用所产生的特殊生理药理效应尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 翁元凯,李继珩:《生物物理学报》,1987,3(2),126。
- [2] 雷海鹏:《药学报》,1982,17(1),1。
- [3] 童建孙等:《生物化学与生物物理进展》,1986,(5),41。
- [4] 毕晓峰等:《中国药理学报》,1984,5(2),115。
- [5] 周兰芳等:《药学报》,1984,19(3),220。
- [6] Drerr, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 1971, 42, 96。
- [7] 翁元凯,李继珩:《药学报》,1986,21(1),65。
- [8] McDonald, MR.: *Methods in Enzymology*, 1955, 2, 437。
- [9] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》,人民教育出版社,1981,219 页。

[本文于 1987 年 8 月 3 日收到]

(上接第 274 页)

- 7, 1366。
- [2] Brew, K. et al.: *Protein of iron metabolism*, Acad. Press, London, 1977, 133—141。
- [3] Anderson, B. F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 1769。
- [4] Jeltsch, J. M. and Chambon, P.: *Eur. J. Biochem.*, 1982, 122, 291。
- [5] Brock, J. H.: *Metalloproteins*, Part 2, Macmillan Press, London, 1985, 183—262。
- [6] Huebers, H. A. and Finch, C. A.: *Physiological Reviews*, 1987, 67, 520。
- [7] Brock, J. H. et al.: *Biochem. J.*, 1978, 171, 73。
- [8] Бугланов, А. А. и Салихов, Т. А.: *Химия Природных Соединений* 1983, 6, 768。
- [9] Legrand, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 787, 90。
- [10] Williams, J.: *Biochem. J.*, 1974, 141, 745。

- [11] Williams, J.: *Biochem. J.*, 1975, 149, 237。
- [12] Esparza, I. and Brock, J. K.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, 624, 479。
- [13] Brown-Mason, A. and Woodworth, R. C.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 1866。
- [14] Esparza, I. and Brock, J. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 622, 279。
- [15] Line, W. F. et al.: *Int. J. Biochem.*, 1976, 7, 203。
- [16] Park, I. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 3149。
- [17] Enns, C. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 3241。
- [18] Martin, A. W. et al.: *Blood*, 1984, 64, 1047。
- [19] Funmei, Y. et al.: *Protides of the Biological Fluids*, Pergamon Ltd. Press, England, 1985, 33, 31—34。

[本文于 1987 年 7 月 21 日收到]