

综述与专论

ATP 合成酶的结合变化机制和旋转催化

1997 年诺贝尔化学奖的部分工作介绍

周筠梅

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 保罗·博耶 (P. D. Boyer) 教授为阐明 ATP 酶作用机制所提出的结合变化机制有两个基本要点: 一是 ATP 合成所需要的能量原则上是用于促进酶上紧密结合的 ATP 的释放和无机磷、ADP 的结合; 二是在净 ATP 形成过程中, 酶上的各催化部位是高度协同地顺序起作用的. γ 亚基在 F_1F_0 -ATP 酶中的旋转运动使三个催化部位构象不对称是实现结合变化的基础. 高分辨率牛心线粒体 F_1F_0 -ATP 酶的晶体结构发表以后, 出现了一些支持旋转催化机制的直接实验证据.

关键词 ATP 合成酶, 结合变化机制, 旋转催化

学科分类号 Q559

1997 年 10 月 16 日, 瑞典皇家科学院宣布本年度的诺贝尔化学奖授予美国科学院院士、加州大学的保罗·博耶教授 (P. D. Boyer), 英国学者约翰·沃克 (J. E. Walker) 和丹麦学者延斯·斯克 (J. C. Skou) 以表彰他们在酶学研究方面的杰出贡献. 可以看出今年的诺贝尔奖选择了与生命活动所需能量的产生和消耗密切相关的工作. 延斯·斯克享有奖金的一半, 因为他在 1957 年发现了现在称为 Na^+ , K^+ -ATP 酶的重要的离子通道蛋白, 该酶的功能是利用 ATP 储存的能量将 Na^+ 离子泵出、 K^+ 离子泵入细胞, 通过该酶的工作大约消耗体内合成的 ATP 总量的 1/3, 以保证 Na^+ , K^+ 离子在膜内外的穿梭, 离子在膜内外的这种穿梭运动是启动神经信号传导和其他生命过程的基本步骤. 至今已发现了百余种需要 ATP 能量的转移酶, 但这类消耗 ATP 的酶的作用机制尚待阐明. 博耶和沃克分享奖金的另一半, 是表彰他们在阐明生命活动中这个最重要的能量分子——腺苷三磷酸 (ATP) 的形成机制方面的杰出贡献. 博耶和沃克的获奖, 表明 ATP 酶的结合变化和旋转催化机制的确立.

但是 ATP 合成酶的结构与功能方面仍有许多问题需要解决, 他们的获奖必将掀起对 ATP 合成酶研究的新高潮.

腺苷三磷酸合成酶简称 ATP 合成酶 (F_1F_0 -ATPase) 是在线粒体、叶绿体和细菌中能量转化的核心酶. 它利用呼吸链电子传递产生的质子跨膜转运能以驱动从 ADP 和无机磷合成 ATP. ATP 是细胞进行各种生命活动的直接能源. 每天我们的细胞合成几公斤的 ATP 作为细胞的能量燃料驱动从触发神经细胞到肌肉收缩的一系列过程. 人们还常常将 ATP 比喻为生物体内的能量货币, 以形象地说明 ATP 在生命活动中的重要性. 如果将 ATP 喻为生物体内的能量货币, ATP 合成酶应比喻为制作货币的“印钞机”. 因为 ATP 的合成最终是在这里完成的. 在 Mitchell 的化学渗透学说中, 阐明了电子传递链中电子传递和 ADP 磷酸化的偶联是通过在膜内外造成了电化质子梯度进行的并因此而获得 1978 年诺贝尔化学奖^[1]. 但是, ATP 合成酶是如何利

收稿日期: 1997-12-02, 修回日期: 1997-12-28

用跨膜的质子梯度使 ADP 和无机磷间建立共价键而形成 ATP 的, 仍然是长期困扰人们的疑难问题.

ATP 合成酶是由多亚基装配形成的, 包括膜外可溶性的球形结构域 F_1 和膜内结构域 F_0 . 通过约 4.5 nm 细长的颈互相连接. F_1 是直径大约 9~10 nm 的球体, 由 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 五种肽链九个亚基组成, 其催化部位在 β 亚基上. 如此复杂的亚基装配, 它们在完成从 ADP 转化为 ATP 将能量储存起来的过程中到底起了什么作用, 这些亚基是如何协同作用来完成维持生命的这一最基本而伟大事件的? 一直是最具吸引力的研究课题之一, 无数科学家为此作出了贡献. 今天, 这个谜已逐渐解开. Noji 教授等的出色的工作, 将在 F_1 -ATP 酶水解 ATP 过程中, γ 亚基的旋转运动展现在我们面前, 使我们亲眼目睹这一可能是世界上最小的分子马达的转动^[2]. 为博耶教授提出的 ATP 酶的结合变化和旋转催化机制 (binding change mechanism and rotational catalysis) 提供了绝妙的实验证据. 本文仅对博耶教授在阐明 ATP 合成酶作用机制方面的杰出贡献和近年来支持博耶提出的旋转催化机制的最新实验证据作一扼要的介绍.

在 20 几年前, 博耶教授基于他实验室的实验结果曾预言, 质子的跨膜转运启动并驱动 ATP 合成酶的构象变化, 通过该酶的复杂结构将这种构象变化传导到 ATP 酶的催化部位, 导致催化部位对反应物 (ADP 和 P_i) 亲和性的改变以促进 ATP 的生成和释放, 这就是最早的关于 ATP 酶的“能量偶联的构象变化”的思想并发展成为结合变化机制 (binding change mechanism, BCM). BCM 有两个基本要点: 一是 ATP 合成所需要的能量原则上是用于促进酶上紧密结合的 ATP 的释放和无机磷、ADP 的结合; 二是在净 ATP 形成过程中, 酶上的各催化部位是高度协同地顺序起作用的. 博耶教授在 1993 年的综述中列表清楚地表明了支持这两个基本要点的实验证据^[3]. ATP 酶的催化具有协同性的第一个实验证据

是 1976 年 Adolfsen 等^[4] 通过分离的 F_1 -ATPase 作的实验, 证明 ATP 的加入和水解促进酶上紧密结合 ADP 的释放; ATP 合成过程中具有协同性是 Kayalar 等^[5] 1977 年的实验. 阐述 BCM 的第一篇文章是 1979 年发表在纪念 Efraim Racker 的论文集中^[6], 早期支持此观点的主要工作可参见 Cross 的综述^[7].

1 ATP 酶的构象变化和催化

按照 ATP 酶的结合变化机制, 在任一时刻, ATP 酶上的三个催化部位的构象总是不同的. 每个催化亚基与核苷酸的结合要顺序经过“open” (空的状态, 无核苷酸的结合), “loose” (松散结合状态) 和 “tight” (紧密结合状态) 三种构象状态的循环. 早期的一些实验观察到在 ATP 合成酶催化过程中确实伴随 F_1 部分的构象发生明显变化, 一些实验结果也初步证明了催化部位是顺序参加催化的. 如: 在非催化状态, DCCD 和 2-azido-ATP 可标记在 CF_1 -ATPase 不同的 β 亚基上, DCCD 的标记明显降低酶的活性但并不终止催化反应. 如果以 2-azido-ATP 为底物令 DCCD 标记的 CF_1 -ATPase 缓慢催化, 并在催化过程中光照, 使获得 azido-核苷酸共价结合的 β 亚基, 最后分析反应混合物, 结果得到了 DCCD 和 2-azido-核苷酸双标记的 β 亚基, 说明在催化过程中 β 亚基的构象发生了改变, 使预先标记了 DCCD 的 β 亚基也能结合 2-azido-ATP^[8]. 另外, 利用荧光能量转移的方法测定在 CF_1 上催化部位的配体与 α 亚基的荧光黄 (Lucifer yellow) 结合部位之间的能量转移^[9], 其结果表明在催化过程中, 紧密的催化部位与 α 亚基上荧光黄结合部位之间距离发生了变化. Capaldi 实验室为催化诱导的亚基间位置发生变化提供了重要的依据^[10], 他们通过低温电子显微镜观察与抗 α 和 ϵ 的单克隆抗体反应后的 *E. Coli* 酶的结构, 可以直接观察到 β 亚基相对于 ϵ 亚基位置的移动和代表 γ 亚基的中心电子密度变化. 在非催化状态, 电子密度是靠近三个不同的 β 亚基的, 但在 Mg^{2+} 离子存在下

水解 ATP 后, 有 2/3 图象显示其靠近 β 亚基的中心电子密度被 ϵ 亚基所覆盖, 说明在催化过程中, 酶分子的中心结构与包含 ϵ 亚基的结构域间发生了相对运动.

2 BCM 机制的发展和完善

二十多年来, 博耶教授的结合变化机制逐步的发展、完善. 早期的实验结果表明此酶可

能有两个催化部位, 所以在 1977 年发表了 ATP 酶上两个催化部位交替参加反应的机制如图 1a 所示^[11]. 在这个模型中, F_1 上有两个对称的催化部位, 第一部位紧密结合着 1 个已经合成的 ATP, 当第二部位结合上 ADP 和 P_i 时, 引起 F_1 构象发生变化, 导致第一部位与 ATP 的亲和力下降, ATP 被释放. 同时底物 ADP 和 P_i 在第二部位变成紧密结合, 转化成

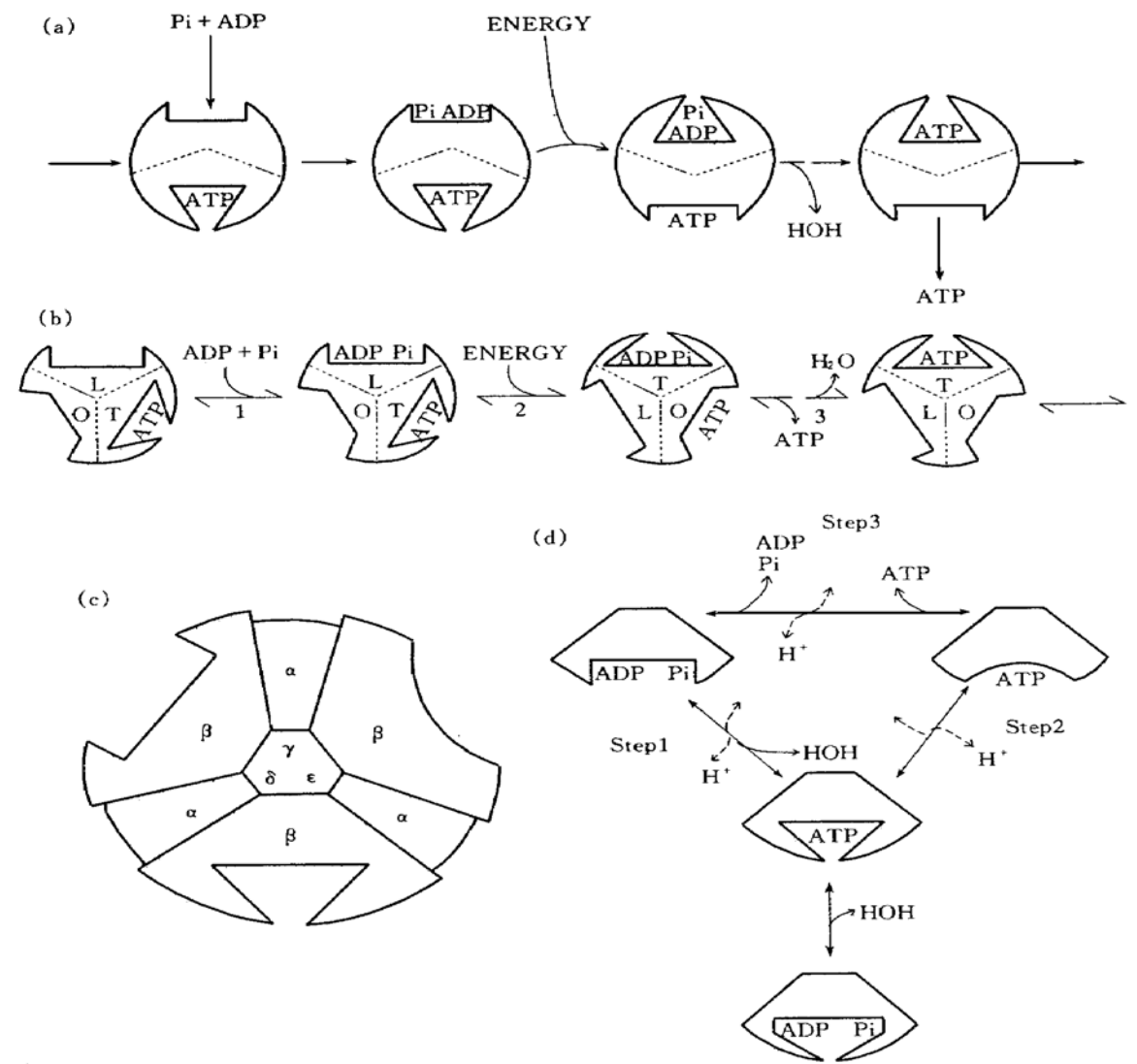


图 1 ATP 酶的结合变化机制的发展

(a) 早期的 ATP 酶上两个催化部位参与的结合变化机制; (b) 三个催化部位交替作用的结合变化机制. O: 代表没有结合核苷酸的空部位; T: 紧密结合部位; L: 松散结合部位; (c) 三个催化部位交替作用的结合变化机制, 强调 β 亚基构象变化的循环及 β 亚基与 α 亚基、单个小亚基之间的作用; (d) 催化 ATP 合成过程中, ATP 酶上一个 β 亚基经过的三种构象状态与质子跨膜转运之间的关系. $\leftarrow \cdots \rightarrow$: 表示质子跨膜转运.

ATP 并变成紧密结合状态. 两个催化部位如此交替反复进行. 在这个模型中强调 ADP 和 P_i 合成 ATP 的反应不需要能量, 而 F_1 的构象变化是需要能量的. 随实验的不断深入证明三个 β 亚基交替反应更加合理, 1981 年 Cross 报告了如图 1b 所示的三个催化部位顺序参加的 BCM 机制^[12], 这个机制已经载入了生物化学教科书. 在这个机制中仅表明了 β 亚基的变化. 考虑到 β 亚基之间的相互作用还涉及 α 亚基和那些单个小亚基 $\gamma\delta\epsilon$, 如果考虑 β 亚基与其他亚基之间的相互作用, 发展成为如图 1c 所示的模型^[13]. 但其核心仍是在一个催化循环中, 每一个 β 亚基要顺序经过三种构象状态, 即紧密结合态 (T 态)、松散结合态 (L 态) 和敞开的状态 (无底物或产物结合的 O 态). 图 1d 是最新的机制^[14], 在其中突出表现了 β 亚基构象的交替与底物结合和质子转运之间的关系. 在图 1d 中给出了一个 β 亚基的完整的循环. 与前三个机制的重要不同是证明了结合变化的同时伴随促进 ATP 生成的紧密结合的形成. 图 1d 中表示了在催化过程中一个 β 亚基顺序变化的情况. 在 ATP 合成过程中, 三个步骤的每一步都包括由质子转运能而驱动的结合变化. 在第一步, 结合变化导致松散结合的 ADP 和 P_i 转化成紧密结合的 ATP; 在第二步, 形成的 ATP 变成比较松散结合的, 随后是 ATP 的释放并且通过再一次的结合变化使其变成有利于 ADP 和 P_i 结合的状态. 整个 “binding change” 是连续的, 使得在某一时刻, 酶上的三个催化部位都是处于不同的构象状态, 并且仅有一个紧密结合部位发生共价的转化, 每一次相应的结合变化释放一个 ATP, 每一个催化部位经过三次结合变化最后合成一个 ATP 分子. 认识过程由图 1a~ 图 1d 的变化, 表明随着实验证据的不断增加, 对结合变化机制认识的不断加深的过程. 图 1d 比较满意地表示了结合变化与质子转运之间的关系.

3 旋转催化 (Rotational catalysis)

对于这样复杂的酶, 其 α , β 亚基可能是

交替排布的, 按照结合变化机制, 这三个催化部位又是顺序参与催化的. 因此, 催化事件应该是循环进行的, 设计成旋转催化是比较合理的. 如果催化事件是旋转进行的, 其最重要的问题是当催化进行时, 催化亚基与单个小亚基间的关系. 为解释这个酶的复杂催化过程, 博耶教授提出了旋转催化学说 (rotational catalysis, RC) 推测在催化过程中, 其内部的小亚基相对于外部的大亚基有个转动运动, 催化位点构象的变化由此转动运动所控制, 使得在催化进行时, β 亚基不断改变它与小亚基之间的相互作用, 导致催化部位性质的变化. 最早博耶教授提出 RC 机制, 是从 ^{18}O 交换实验得出的在 ATP 酶上各催化部位均等地参与催化的结果派生出来的. 由于缺乏其他相关的实验证据, 仅在文章中轻描淡写的提了一下^[15, 16]. 他认为这些催化部位表现出等同的催化性质, 就要求含有催化部位的 β 亚基能够直接或者间接地与 α 亚基、其他的 β 亚基或单个小亚基 $\gamma\delta\epsilon$, 甚至与 F_0 部分的亚基间有等同作用的机会, 而只有相对旋转运动才可能保证催化亚基具有这种特殊的等同性质. 尽管当时对 ATP 酶催化过程中各亚基是如何转动的尚没有明确的模式, 但是他确信只有 β 亚基与酶的其他部分相对转动才可能完成如此复杂的催化. 他把 ATP 合成酶想象成一个美丽的小分子机械 (It's a beautiful little molecular machine) 表现出一个杰出科学家的渊博的知识和丰富的想象力. 随后, Cox 等通过对于 *E. coli* 酶的 F_0 中 c 亚基的序列预测和突变研究, 阐述了 F_0 部分是如何参与转动催化的^[17]. 提出了在 F_0 中, c 亚基是绕 b 亚基双体的跨膜部分而排布成圆筒状. b 亚基的亲水部分卷曲成螺旋状态延伸进入 F_1 部分并与小亚基接触. a 亚基的五个跨膜螺旋可能和两个 b 亚基形成内核使质子由此穿过以驱动转动催化. Mitchell^[18] 也提出了与质子转运相关的转动模型. 他提出当 β 亚基绕中心 γ 亚基转动时, α 和 β 亚基形成 $\alpha\beta$ 对并连接成圆筒状, 因此, 虽然 γ 亚基与 α 亚基并不直接接触, γ 绕 β 转动的同时也间接

绕 α 亚基转动. 这个工作使转动催化的模式更加清晰了. 尽管还有一些研究从不同方面支持转动催化, 但旋转催化机制的真正阐明并被接受还是在获得该酶的晶体结构并设计了一些非常具有说服力的实验之后.

4 牛心线粒体 F_1 -ATP 酶的晶体结构

1994 年 Walker 的研究组^[19]发表了 0.28 nm 分辨率的牛心线粒体 F_1 -ATP 酶的晶体结构. 这是目前在原子分辨率解出的最大的具有不对称结构的蛋白质. 为证实博耶提出的 ATP 酶催化的结合变化和旋转催化机制起了关键的作用. 他也因此与博耶分享了今年的诺贝尔化学奖. 这是结构生物学发展的硕果、是在生命科学中结构指导功能研究的典型范例. 根据沃克等报道的 0.28 nm 分辨率的牛心线粒体 F_1 -ATP 酶的结构, 人们可以清楚的看到 F_1 -ATP 酶是象橘子一样的扁圆球体, 高 8 nm、宽 10 nm, α 和 β 亚基象橘子瓣一样的绕由 γ 亚基的 C 末端 (γ 209~272) 形成的 9 nm 长的中心 α 螺旋交替排布. γ 螺旋 C 末端残基在顶部的表面插入约 1.5 nm 的凹槽, 此螺旋的底部与 γ 1~45 形成的第二个螺旋形成左手反平行的螺旋结构, 此螺旋结构相对颈的底部突出大约 3 nm 是 ATP 合成酶的 4.5 nm 主茎的一部分. 从电子密度图看, δ 和 ϵ 亚基也可能是在颈部, 但尚未能很好的确定位置. 精细的晶体结构让我们清楚地观察到此酶的三个催化亚基 由于结合不同核苷酸底物构象明显不同, 有力地支持博耶提出的结合变化机制, 证明在催化循环的任一时刻三个催化亚基处于不同的构象, 不同构象之间的转化可能与 γ 亚基绕 $\alpha_3\beta_3$ 的转动运动相关, 为人们揭开迷雾起了关键的作用.

5 旋转催化机制实验证据的重大突破

F_1 -ATP 酶的高分辨率的晶体结构问世不久, Cross 实验组根据牛心线粒体 F_1 -ATP 酶的晶体结构设计了一个很有说服力的实验, 验证大肠杆菌 F_1 -ATP 酶上三个 β 亚基相对于 γ

亚基的转动运动^[20]. 从晶体结构可以看出, γ 亚基上的半胱氨酸 γ C87 与 β 亚基的 ³⁸⁰DELSEED³⁸⁶序列十分靠近. 他们用基因工程的方法在 β 亚基上靠近 γ 亚基的地方引入了一个半胱氨酸残基 (β D380C 突变), 使得单个 β 亚基与 γ 亚基间能够形成专一性的亚基间的

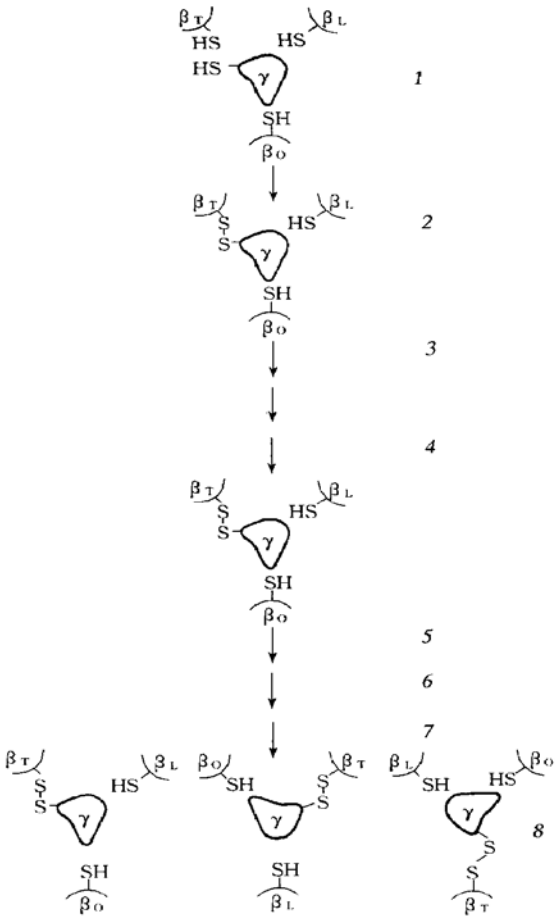


图 2 Dancan 等为证明旋转催化设计的实验的过程示意图

1: 制备 β D380C- F_1 ; 2: 形成 β - γ 间二硫键, 获得 β D380C/ γ 87S- F_1 ; 3: 亚基解离; 4: 与放射性标记的 β 亚基混合重组; 5: 还原 β - γ 间二硫键; 6: 加入 MgATP 使酶催化; 7: 再氧化使形成 β - γ 间二硫键; 8: 解离、分析 β - γ 中的放射性.

二硫键交联. 就象转动轴被焊接在引擎体上一样, 此交联完全终止了 F_1 -ATP 酶的催化能力, 若将此二硫键还原, 可以完全恢复酶的催化活性. 利用这个系统, Cross 等给出了 ATP

酶旋转催化的非常直接的实验证据。他们首先令此突变体酶形成 β D380C 和 γ C87 间专一交联的 F_1 ，将此复合物解离成单亚基，由于 β - γ 间已共价交联，解离后仍以 β - γ 交联的双体存在。然后，令此 β - γ 交联的双体与放射性标记的 β 单体重组形成 F_1 复合物，并还原已交联的二硫键以解除对酶的束缚，然后加入 ATP 使酶催化 ATP 水解一段时间后，再令此酶氧化形成 β - γ 间的二硫键，使 F_1 复合物再次解离，最后分析交联的 β - γ 对。结果表明，有些是放射性标记的、有些是非放射性的。这个结果定量的给出实验证据说明在催化过程中，所有的三个 β 亚基都有机会与 γ 亚基形成交联，即 β - γ 交联是随机的。图 2 示意了整个操作过程。尽管这个结果尚不能证明亚基间的转动是有序的，但它肯定地显示，在催化过程中 γ 亚基可以自由的与每个 β 亚基接触，这种交替接触正是博耶教授提出的旋转催化机制的核心。

Sabbert 等更进一步研究了具有催化活性的菠菜叶绿体 CF_1 亚基间的转动运动^[21]。他们首先制备了 γ 亚基 C 端被专一性荧光试剂 eosin 5-maleimide 共价标记的酶，然后将此标记酶固定在 Sephadex DEAE-A50 上，经荧光漂白 (photobleaching) 后跟踪荧光偏振吸收变化的弛豫过程，以检测 eosin 标记的 γ 亚基相对于固定化的 $(\alpha\beta)_3$ 间的很慢的转动。观察到 γ 相对于固定化的 $(\alpha\beta)_3$ 运动的时间常数是 100 ms，此速度与固定化的 F_1 水解 ATP 的速度相当。图 3 显示了直接反映生色团转动性能的偏振各向异性参数 r 随时间的变化关系。对于固定化的酶，只有在 MgATP 存在时，才能观察到 r 值随时间的变化。如果加入 AMP-PNP 代替 ATP，由于不能催化，就观察不到 r 值随时间的变化。如果 CF_1 在缓冲液中游离存在， r 值为零。这是第一次观察到的实时酶催化过程中，亚基间的相对运动过程。然而，所有的结果都无法让你亲眼目睹这种运动更令人信服。Noji 与其合作者的漂亮的工作折服了对 ATP 酶的旋转催化机制持怀疑态度的人^[1]。他们利用晶体结构的结果，精心设计

了一系列的标记、突变，并采用最新的荧光显微镜摄影技术，将 γ 亚基的转动运动展现在我们面前。

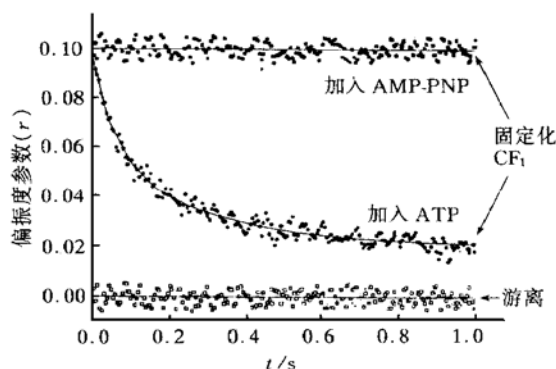


图 3 γ 亚基被 eosin 标记的 CF_1 ，经荧光漂白后，荧光偏振吸收变化的弛豫过程

从 F_1 -ATP 酶的晶体结构可以看出， γ 亚基的卷曲螺旋是穿过 $\alpha_3\beta_3$ 形成的圆桶的中心，伸展到颈部与膜内的 F_0 部分连接。而 β 亚基的 N 末端是在 γ 亚基的侧面。为了将 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 亚复合物固定在一个玻璃板上，他们首先通过基因工程的方法在嗜热菌的亚复合物中 β 亚基的 N 端连上了一个含 10 个组氨酸残基的尾巴 (histidin tags)，使 F_1 复合物能够通过此组氨酸尾巴立体专一地连接到一个镀 Ni^{2+} 的玻璃表面上。此突变体在 *E. coli* 中高效表达。将玻璃板用与 Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid 连接的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase) 包被，此板与组氨酸的尾巴有很高的亲和力，通过突变体酶上的组氨酸尾巴将亚复合物的 β 亚基固定在玻璃板上，获得了独立于膜一侧的亚复合物如图 4 所示。为了观察 γ 亚基的转动，通过定点突变技术将 γ 亚基颈部 107 位的丝氨酸替换成半胱氨酸 (γ S107C)；将 α 亚基中唯一的 193 位半胱氨酸用丝氨酸取代 (α C193S)，使此亚复合物中仅在 γ 亚基有一个半胱氨酸残基能够专一性地与生物素 (biotin) 结合。为了能观测 γ 亚基的运动，还需制作生物素结合的、荧光标记的肌动蛋白细丝，并将其与 γ 亚基连接起来。因为 Streptavidin 与 biotin 有四个接合部位，所以可通过 Streptavidin 将 γ 亚

基与荧光标记的肌动蛋白细丝连接起来. 通过这样的处理, 获得了在 γ 亚基上连接了荧光标记的肌动蛋白细丝的 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 亚复合物. 在倒置荧光显微镜连接的摄像系统 (epifluorescence microscope) 上观察, 当加入 2 mmol/L ATP 时, 在荧光屏上显示了转动的亮点, 肌动蛋白的细丝象鞭子一样甩动起来. 直接观察到多数转动的细丝是以细丝的一端为转动轴的, 也有一些象飞机的螺旋桨一样以细丝的中端为转动

中转动的. 跟踪单个肌动蛋白的细丝转动的的时间过程表明运动是单方向的、反时针的. 此反时针的转动使中心的 γ 亚基能够与三个 β 亚基按顺序由空部位, ADP 结合形式到 AMP-PNP 结合形式接触 (Walker 根据晶体结构结果给出的), 这个顺序正好与预言的 ATP 水解反应从 $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{空位点}$ 的转动顺序一致. 这个实验让我们清楚地看到 H^+ -ATP 酶确实是一个分子转动马达. 看到这个结果后, 我们怎能不振奋, 怎能不为这个绝妙的实验设计叫好! Noji 等不仅奉献给我们一个 $\text{F}_1\text{-ATP}$ 酶中 γ 亚基单方向转动的可观察的模型, 证明博耶教授旋转催化机制的正确性; 还展现了运动性分析的广阔前景, 是大分子机械 (如: myosin, kinesin, dynein, RNA polymerase 和细菌马达) 研究的一次革命, 通过充分利用最新发展的仪器设备将生物物理研究带上了单分子水平.

经过 20 多年的努力, 终于证实了博耶教授早期提出的设想^[22] (图5): 当质子跨膜转

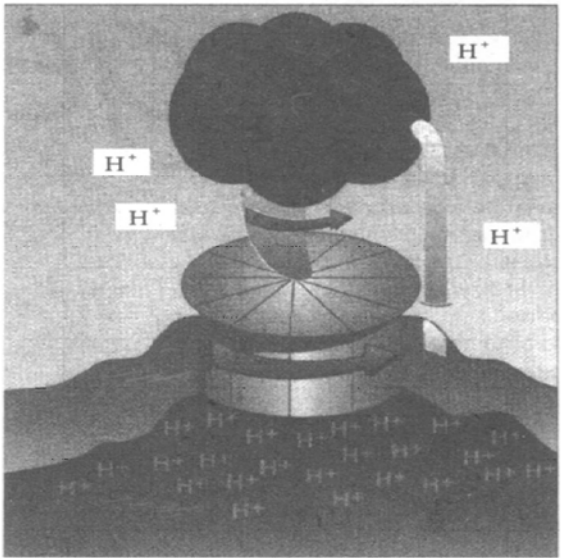


图5 ATP 酶——已发现的世界上最小的分子马达示意图

H^+ 流过细胞膜时, 使 ATP 酶的车轮结构和连接杆部分转动, 改变在一端的催化部位的构象使催化部位与底物和产物结合的亲和性发生变化, 完成从底物结合到产物释放的循环. 通过这种转动运动, 完成能量分子 ATP 的合成.

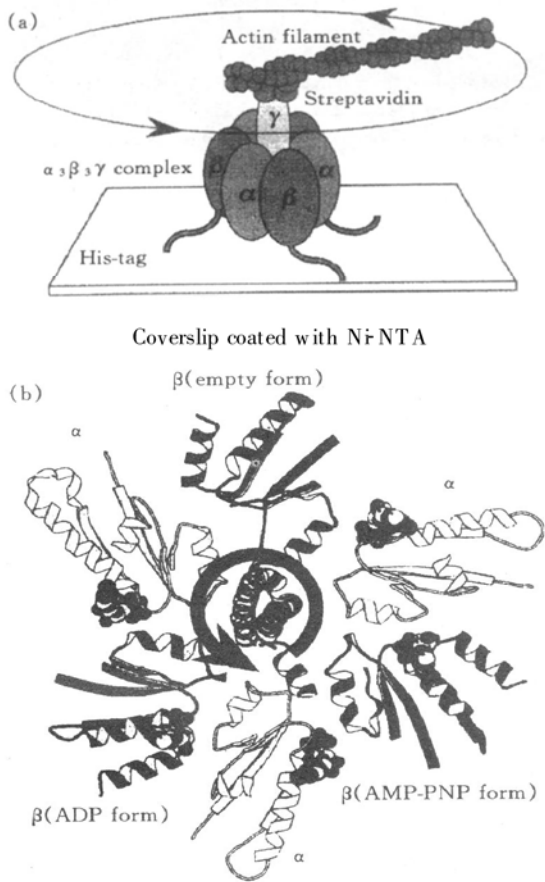


图4 (a) 观察 γ 亚基在 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 亚复合物中运动建立的体系示意图; (b) 对应的牛心线粒体 $\text{F}_1\text{-ATP}$ 酶从膜侧观察的仅含核苷酸结合部位的结构及转动方向的示意图

轴. 此运动可以持续至少 25 s. 由于 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 亚复合物是通过 3 个 β 亚基固定在玻璃板上的, 并且肌动蛋白细丝是连接在 γ 亚基上的, 这个结果清楚地表明, γ 亚基是在 $\alpha_3\beta_3$ 形成的圆筒

运时, 带动 ATP 酶的车轮结构和连接杆的转动, 就象流动的水带动水轮机转动一样, 引起其他部分的转动, 此转动会一定程度地改变酶上三个催化部位的构象以抓住底物 ADP 和 P_i 、合成 ATP 分子并将其释放。形象地刻画出 ATP 合成酶的催化循环就象转动的水轮机。现在水轮机部分的转动已经证实, 这无疑是认识 ATP 酶作用机制的重大突破, 但质子是如何跨膜的? 质子跨膜时 F_0 部分是如何运动的? F_0 部分是否有相应的转动运动等仍是人们关心, 而又更难解决的问题。预计下一个重大突破是 F_0 结构的解出。据悉现在许多实验室正在加紧工作, 我们盼望最终阐明 ATP 合成酶的作用机制的日子早日到来。

致谢 感谢杨福愉院士、林治焕、李生广研究员和本刊编辑部在此文准备过程中给予的帮助。

参 考 文 献

- Mitchell P. A chemiosmotic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatases. *FEBS Lett*, 1974, **43** (2): 189~ 194
- Noji H, Yasuda R, Yoshida M *et al.* Direct observation of the rotation of F_1F_0 -ATPase. *Nature*, 1997, **386**: 299~ 302
- Boyer P D. The binding change mechanism for ATP synthesis: some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1140** (3): 215~ 250
- Adolfson R, Moudrianakis E N. Hydrolysis of ATP by a bacterial F_1 ATPase promotes release of tightly bound ADP. *Arch Biochem Biophys*, 1976, **172**: 425~ 433
- Kagaya C, Rosing J, Boyer P D. An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions. *J Biol Chem*, 1977, **252** (8): 2486~ 2491
- Boyer P D. The binding - change mechanism of ATP synthesis. In: Lee C P eds. *Membrane Bioenergetics*. USA: Addison-Wesley, Reading, MA, 1979. 461~ 479
- Cross R L, Cunningham D, Tamura J K. Binding change mechanism for ATP synthesis by oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Current Topics in Cellular Regulation*, 1984, **24**: 335~ 344
- Melese T, Boyer P D. Derivatization of the catalytic subunits of the chloroplast ATPase by 2-azido-ATP and dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem*, 1985, **260** (29): 15398 ~ 15401
- Shapiro A B, McCarty R E. Substrate binding-induced alteration of nucleotide binding site properties of chloroplast coupling factor 1. *J Biol Chem*, 1990, **265** (8): 4340~ 4374
- Gogol E P, Johnson E, Aggeler F *et al.* Ligand dependent structure variations in *Escherichia Coli* F_1F_0 -ATPase revealed by cryoelectro microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (24): 9585~ 9589
- Boyer P D. Coupling mechanism in capture, transmission, and use of energy. *Ann Rev Biochem*, 1977, **46**: 957~ 966
- Cross R L. The mechanism and regulation of ATP synthesis by F_1F_0 -ATPases. *Ann Rev Biochem*, 1981, **50**: 681~ 714
- Melese T, Xue Z, Stemple H E *et al.* Catalytic properties of chloroplast F_1F_0 -ATPases modified at catalytic or noncatalytic sites by 2-azido adenine nucleotide. *J Biol Chem*, 1988, **263** (12): 5833~ 5840
- Zhou J M, Boyer P D. Evidence that energization of the chloroplast ATP synthase favors ATP formation at the tight binding catalytic site and increases the affinity for ADP at another catalytic site. *J Biol Chem*, 1993, **268** (3): 1531 ~ 1538
- Gresser M J, Myers J A, Boyer P D. Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F_1 adenosine triphosphate. *J Biol Chem*, 1982, **257** (20): 12030~ 12038
- Boyer P D, Kohlbrenner W E. The present status of the binding-change mechanism and its relation to ATP formation by chloroplasts, in *Energy Coupling in Photosynthesis*. In: Selman B eds. *Proceedings of the eleventh Harry Steenbock Symposium held 6-8 July 1981 at the University of Wisconsin Madison*, New York: Elsevier/North Holland, 1981. 231~ 240
- Cox G B, Jans D A, Fimmel A L *et al.* The mechanism of ATP synthase, conformational change by rotation of the b subunit. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **768** (3/4): 201~ 208
- Mitchell P. Molecular mechanics of proton motive F_0F_1 ATPases: rolling wheel and turnstile hypothesis. *FEBS Lett*, 1985, **181** (1): 1~ 7
- Abrahams J P, Leslie A G W, Lutter R *et al.* Structure at 2.8 Å resolution of F_1F_0 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 1994, **370**: 621~ 628
- Duncan T M, Bulygin V V, Zhou Y T *et al.* Rotation of subunits during catalysis by *E. Coli* F_1F_0 -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (24): 10964~ 10968
- Sabbert D, Engelbrecht S, Junge W. Intersubunit rotation in active F_1F_0 -ATPase. *Nature*, 1996, **381**: 623~ 625
- Seivice R F. Awards for high-energy molecules and cool atoms. *Science*, 1997, **278** (5338): 578~ 579

The Binding Change Mechanism and Rotational Catalysis of ATP Synthase. ZHOU Jun-mei (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract The binding change mechanism for the ATP synthase has two central features. One is that the principle use of energy required for ATP synthesis is to promote the release of tightly bound ATP and the binding of P_i and

ADP in a manner competent to form bound ATP. The second is that during net ATP formation multiple catalytic sites on the synthase participate in strongly cooperative sequence. Rotation of the γ subunit in F_1 is thought to deform the catalytic sites to give binding change. When

the crystal structure of the F_1 -ATPase was eventually solved, direct evidences for rotation of subunits during catalysis of F_1 -ATPase were provided.

Key words ATP synthase, binding change mechanism, rotational catalysis

转录因子与 DNA 识别的立体化学规律

杨岐生

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘要 转录因子-DNA 的识别包含普遍性的化学规律和特异性的立体化学规律. 转录因子的识别螺旋以特异性方式结合于 DNA, 位于一侧的大沟内. 识别螺旋的“残基连线”和碱基的“碱基连线”之间吻合使两者完全匹配. 它通常涉及最多 3 圈 α 螺旋和 3~5 bp. 决定氨基酸残基和碱基相互关系的结合几何图形表示为立体化学图, 它表明了识别的特异性. 在该基础上总结成转录因子识别 DNA 的立体化学规律.

关键词 转录因子, 识别螺旋-DNA 的相互关系, 立体化学图, 立体化学识别规律

学科分类号 Q523

认识转录因子与 DNA 的识别对研究基因表达和调控具有重要意义, 也是结构生物学的重要内容. 两者识别有什么规律? 研究这种规律使我们能够: a. 预期蛋白质-DNA 的相互作用; b. 改变已有转录因子或 DNA 序列的结合特异性; c. 设计结合于特定 DNA 序列的新的蛋白质分子, 因此具有重要的理论和实践意义.

蛋白质-DNA 识别主要由两类规律组成: 化学规律和立体化学规律, 化学规律是普遍性的, 立体化学规律则对各类 DNA 结合蛋白家族有特异性. 本文讨论 α 螺旋作为识别螺旋的情况. β 折叠的结构式样将另作讨论.

1 DNA 结合蛋白的结构域

识别螺旋可以分为 HTH、PH (probe 螺旋, 包括同源异形域和碱性拉链蛋白等家族)、锌指结构、C4 锌指蛋白 (包括甾体激素受体家族和 GATA 蛋白), 以及新的结构式样 Myb 等. 20 种氨基酸残基按其大小分为 4 类: 大、

中、小和芳香族残基. 残基的大小涉及到侧链与 DNA 接触和配合的能力.

原先以为蛋白质与 DNA 结合时, 蛋白质的柔性能使识别螺旋足够地变形, 以适应 DNA 的结构. 现在认为不是蛋白质, 而主要是 DNA 结构发生变化, DNA 柔性加强了蛋白质-DNA 的相互作用^[1]. 识别螺旋沿着 DNA 弯曲的大沟, 在大沟一侧接触到碱基, 但接触的碱基数目有限, 一般不超过 5 bp.

转录因子的识别螺旋长度只有几圈. 它的残基大致可分为 3 类: a. 同 DNA 碱基接触的残基; b. 同主链磷酸基团接触的残基; c. 同蛋白质其余部分接触的残基. 各种结构式样中这些类型的残基都有比较保守的位置. a 类大多是极性的, 也有酸性或碱性残基; b 类大多是碱性氨基酸; c 类往往以疏水性残基背向 DNA, 与蛋白质分子其余部分结合, 限制了