

Progress in Peptide α -Amidation. JIANG Zhi-hong, LI Bo-liang (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract α -Amidation is a critical post-translational processing of many bioactive peptides in the nervous and endocrine systems. PAM, a bifunctional enzyme, with two catalytic domains PHM and PAL, catalyzes the sequential two-

step conversion of glycine-extended peptides into COOH-terminal amidated peptides. Alternative splicing and tissue specific processing generate multiple forms of PAM. As a rate-limiting enzyme in biosynthetic pathway of peptides, levels of PAM are tissue specific and under the regulation of hormones and developmental cues.

Key words amidating peptides, amidating enzyme, bifunctional enzyme

X 射线衍射法在研究蛋白质动态过程中的应用

袁于人

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031)

夏宗芴

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 介绍了 X 射线衍射技术在研究蛋白质动态过程中的应用. 首先介绍了用常规 X 射线衍射法和劳埃 X 射线衍射法等数据采样法研究反应时间为几分钟的蛋白质催化反应. 然后介绍了通过选择不匹配底物, 不适宜酸度, 选择温度和酸度的跳跃, 金属和光化学瞬时激发达到反应的同步来研究反应时间为几秒钟的蛋白质催化反应.

关键词 蛋白质, 动态过程, X 射线衍射法, 同步反应

学科分类号 0721 Q51

1 蛋白质的动态过程

蛋白质是一个动态系统, 其动力学特点可以分为以下三类: 个别原子在平衡点位置的波动, 键与非键的统计学上的振动和配体诱导的蛋白质构象的改变. 前面两类是在平衡位置附近的波幅很小的变动, 这些构象上的改变, 其时间频率为每次 $10^{-13} \sim 10^{-9}$ s, 可以用波谱技术和分子动力学计算的方法来研究. 配体诱导的蛋白质构象变化的研究就比较困难, 分子动力学模拟技术只能研究在 10^{-15} s 发生的反应, 而配体诱导的蛋白质构象变化在 $10^{-6} \sim 10^0$ s 内发生, 况且, 这些构象变化的幅度如此之大, 已跨越了相对比较大的能量壁垒. 用波谱的方法不能对这些变化作比较细致的研究, 所得信息微乎其微.

X 射线衍射结晶学被认为是研究这些构象变化的最理想的选择, 因为 X 射线衍射法能达到的分辨率可达单个原子的水平, 另外, 它可以很清楚地描述配体存在与否对蛋白质的影响. 事实上, 对于一些特定的蛋白质, 如变构蛋白酶, X 射线衍射法被认为是非常有效的方法^[1].

对于大多数蛋白质来说, 由于底物的诱导, 必然引起构象向能态有利的构象改变, 从而催化底物的反应. 因此, 研究蛋白质的催化机理同研究反应的化学变化一样重要. 实际上, 许多蛋白质都具有相似的化学性质, 但不能催化相同的化学反应. 这就需要在研究蛋白质的催化反应中, 注意研究蛋白质的构象变化.

收稿日期: 1996-11-12, 修回日期: 1997-04-20

2 常规 X 射线衍射法的应用

一般认为, 酶的结晶状态可以比较真实地反映酶的溶液状态, 大多数酶在结晶状态时是具有酶活力的^[2], 大多数蛋白质晶体所含溶剂的量为 50% ~ 70%, 与蛋白质的溶液状态含 80% 溶剂相近似. 蛋白质晶体具有许多充满溶剂的通道, 便于底物的扩散. 蛋白质晶体的这些特性决定了它被作为研究蛋白质动态过程的很好材料. 当底物被扩散进入通道后, 马上和这些蛋白质结合, 诱导蛋白质的构象发生变化, 底物被催化生成产物, 整个过程需要几分钟.

对于大多数酶催化反应, 在 1 s 内可以发生 1 ~ 1 000 次. 这样就需要有一种方法能够在几毫秒到几秒的时间内收集到整套数据信息. 用常规的 X 射线衍射法采集数据需耗时几天. 衍射数据的采集十分耗时, 每个晶体需采集的衍射点数目是巨大的. 衍射点数与蛋白质的分子质量成正比与晶体的分辨率的立方成反比. 用常规 X 射线衍射法收集如此多的衍射数据是费时的.

晶体学家运用多种方法解决衍射数据在统计学上的时间平均性问题. 首先, 用酶/抑制剂代替酶/底物的方法来研究蛋白质的动态过程. 考虑到抑制剂不与酶反应, 一旦抑制剂结合到蛋白质上, 就能很清楚地研究酶的构象变化. 但引进抑制剂代替真正的底物必然带来了另外的问题, 有些酶只能与真正的底物相互作用, 并发生构象的变化, 产生一系列中间产物, 这些现象在抑制剂/酶复合物上不可能观察到.

晶体学家又发展了两种方法来研究酶/底物复合物的晶体学. 第一种方法是把蛋白质晶体置于低于零度的温度环境中, 母液改成在低温也能自由流动的溶液^[3], 底物在低温下扩散进入晶体. 对于大多数酶催化反应, 一旦反应温度从 20 °C 下降到 -100 °C, 整个反应速度会下降一百万倍, 此时用常规 X 射线衍射法就能很方便地跟踪酶反应的整个过程. 该方法

虽然取得了一些成功^[4], 但也存在了很多问题, 对于大多数蛋白质, 合适的过冷母液很难找, 而且有些蛋白质在特定的温度变化中, 构象会有改变, 还有, 低温 X 射线衍射设备和消耗十分昂贵, 所以, 该方法不能普遍使用.

运用高强度的单色 X 射线源, 如同步辐射, 用快速 Weissenberg 相机采集数据可以大大缩短测量衍射强度的时间, 使得收集每一底片衍射点的时间缩短到 30 s, 采集整套数据需要几十张底片, 因而整个采样时间会持续 20 min. Hajdu 等^[5]发展和完善了这种方法, 并用于一些蛋白质的动态研究中.

对于有特定中间产物产生的酶催化反应, 可以通过改变晶体中底物和产物的浓度, 使酶促反应停留在处于低能态的酶/中间物的复合物状态上. Yennawar 等^[6,7]在研究胰凝乳蛋白酶的催化反应时, 利用这种方法固定了酶/中间物的复合物结晶.

总之, 传统的结晶学方法不能很好地用于蛋白质的动态过程研究上. 必须找到一种方法, 使采样时间缩短到几秒钟, 可以自始至终地跟踪催化反应的整个过程. 新发展的劳埃衍射法可以使数据收集时间缩短到几秒钟.

3 劳埃衍射法的应用

劳埃衍射法与常规衍射法的一个主要区别在于用白光代替单色光. 该方法是由 von Laue 在 1912 年建立的, 近 50 年, 劳埃法并没有用于蛋白质的衍射测定中, 即使对小分子的测定, 也很少应用.

劳埃法运用的射线源是一束具有连续波长的白色光. 可以定义在这束光中, 波长最短的为 $\lambda_{\min}$, 波长最长的为 $\lambda_{\max}$, 只要 $\lambda_{\min}$ 和 $\lambda_{\max}$ 的间距足够大, 利用一次衍射实验, 就可能把大部分衍射点同时记录. 运用劳埃法可以在几秒钟内把晶体的衍射数据收集到.

Farber 等^[8]做了一些实验用来验证劳埃法在蛋白质结晶学中最常用的同晶置换法和分子置换法中应用的可行性. 首先, 他们以木糖异构酶为模型验证了劳埃法在同晶置换法中应用

的可行性. 比较了常规法和劳埃法两种不同数据收集方法, 结果得到了同样清晰, 可解的傅利叶差值图, 劳埃法所用时间是常规法的十万分之一.

同样, 用六方晶系的火鸡蛋清的溶菌酶晶体验证了劳埃法在分子置换法中的应用. 结果, 0.25 nm 火鸡蛋清溶菌酶晶体数据收集时间不到 6 s. 用分子置换法很快求得旋转函数和平移函数的解, 动力学修正后 R 值下降到 19%, 计算所得电子密度图与蛋白质结构完全吻合. Vellieux 等^[9]成功地用劳埃法测定了分辨率为 0.32 nm 的甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶 (*trypanosoma brucei*) 的三维结构. 用同步辐射源共收集了三颗晶体的衍射数据. 所用采样时间为 20.5 s, 数据完整度为 87%. 结构的解析是用分子置换法完成的, 经修正, R 值为 17.6%.

虽然劳埃法在测定蛋白质晶体结构中取得了成功, 但劳埃法本身也存在缺陷, 劳埃法收集数据的方法对晶体规整性的要求很高, 对晶体微小的无序十分敏感, 劳埃法收集到的衍射数据常常会不包含低分辨率的数据. 另外, 用连续光照射晶体时, 为了得到可解的劳埃衍射图, 需要大约 $10^{10} \sim 10^{13}$ 个 X 光量子, 大量的光量子照射晶体, 会使晶体升温, 有可能破坏晶体.

4 反应的同步性

运用劳埃法成功地解决了衍射数据在统计学上的时间平均问题, 但晶体学研究的结果是对整个晶体中所有晶胞的统计学结果, 这就是晶体学家用 X 射线衍射法研究蛋白质动态过程中需解决的衍射数据统计学上的空间平均性问题.

研究的反应是从底物开始扩散进入晶体的同时开始的, 接近晶体表面的蛋白质先与底物接触并生成产物, 那些位于晶体内部的蛋白质还未与底物接触, 此时晶体处在异相状态, 不能用来收集数据, 一旦底物的扩散结束, 大多数分子的反应已经结束, 这时也不可能跟踪反

应的全过程. 必须找到一个方法或者使底物的扩散速度快于反应速度或者使整个晶体中的蛋白质与底物的反应同步.

使用不匹配底物, 低温或经突变改造后的酶突变体可以使反应速度减慢; 金属离子, 温度和酸度的跳跃和光化学激活可控制反应的同步.

如果选择不匹配底物或非适宜酸度值还不能使酶催化反应的时间增加到比底物扩散时间更长, 只能使用低温或定位突变的方法, 不过, 低温法存在过冷母液难找, 设备和消耗昂贵等很多缺点. 基因突变的方法很容易把酶促反应速度降低几个数量级. 一旦确定突变后的酶催化机理与天然酶促反应机理一致, 就能用突变后的蛋白质代替天然酶, 研究蛋白质的动态过程^[10, 11].

酶反应的瞬间激发是解决反应同步性的一个好方法. 假定反应的激发需要一种特殊的快速可控制事件引发, 可以先把底物扩散进入晶体直至充满整个晶体, 然后反应的激发与数据收集同步进行, 跟踪整个反应的全过程.

温度和酸度的瞬间跳跃可以瞬间激发反应. 先把晶体置于酸度不适宜的环境, 氢离子在小于 1 s 的时间内, 扩散进入晶体; 把晶体置于合适的过冷环境中, 控制冷空气的流动, 使温度在 1 s 内改变 20 °C. Singer 等^[12]在用劳埃法研究胰蛋白酶的催化反应时, 就运用了酸度的瞬间改变来达到反应的同步, 所得的电子密度图很清楚地显示了参与酶反应的进攻水分子. 这些方法的缺点在于要求晶体在各种环境中都能保持活性, 而对于大多数晶体, 不可能在环境的剧烈变化中保持应有的活性.

另一种可行的方法是金属离子的诱导^[13]. 许多金属蛋白酶都需要一种以松散方式连接的金属参与 (通常是镁离子), 才具有活性. 具体操作为, 使底物完全扩散进入不含金属的蛋白酶前体中, 接着, 让金属离子扩散进入晶体, 金属的扩散需要几秒钟, 一旦金属与蛋白酶前体结合, 可瞬间诱导反应的进行.

用光化学诱导法瞬间激发酶催化反应也是

一个常用方法^[14]。底物或辅基被化学基团钝化后, 扩散进入晶体, 在强光诱导下, 这些化学基团脱落, 反应在几毫秒内开始。常用的方法是用光化学可降解的钝化的底物先抑制蛋白质的活性部位, 在强光的诱导作用下, 底物被光诱导降解, 催化反应开始。这些钝化的底物必须在水中的溶解度大于 10 mmol/L, 能被波长大于 300 nm 的光激发降解, 有高的量子效率, 光解后的产物仍然可溶, 光分解产物不破坏蛋白质。用酶与钝化的底物共结晶代替钝化底物的扩散, 可以降低所需底物的浓度, 是对上述方法的改进^[15]。

另外一种方法是在酶的活性部位接上可光解的钝化基团, 可以用化学试剂处理天然酶^[16], 也可以用基因工程的方法表达出活性部位带有光解基团的蛋白质。Mendel 等^[17]表达了一个在活性中心存在被 2-硝基苯甲酰基钝化的天冬氨酸残基的溶菌酶, 该酶在暗处不反应, 一旦光照, 就显示了高活性的催化活力。

5 小 结

蛋白质是一个动态系统, 其中配体诱导的蛋白质构象变化是蛋白质功能的体现, 值得深入研究。X 射线衍射法是研究这种动态过程最有力的工具。但 X 射线衍射法研究蛋白质的动态过程, 面临的两个问题是衍射数据在统计学上的时间平均性和空间平均性。本文介绍了晶体学家如何通过降低反应速度和减少数据采集时间来克服衍射数据的时间平均性问题; 通过实现反应的同步来克服衍射数据的空间平均性。

虽然, 这些方法还存在缺陷, 目前还处在探索阶段, 但这些方法的摸索使晶体学家从单纯研究蛋白质静态的三维构象过渡到了研究整个反应的动态过程的四维构象。我们期待这些方法的进一步研究有助于使晶体学的研究得到新的发展。

参 考 文 献

1 Kantrowitz E R, Lipscomb W N. *E. coli* aspartate trans-

carbamylase: the relation between structure and function. *Science*, 1988, **241** (4866): 669~ 674

- 2 Makinen M, Fink A L. Reactivity and cryoenzymology of enzymes in the crystalline state. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1977, **6**: 301~ 342
- 3 Douzou P, Petsko G A. Proteins at work: "Stopaction" pictures at sub-zero temperatures. *Adv Prot Chem*, 1984, **36**: 246~ 361
- 4 Alber T, Petsko G A, Tsernoglou D. Crystal structure of an elastase substrate complex at - 55 °C. *Nature*, 1976, **263** (5575): 297~ 300
- 5 Hajdu J, Andersson I. Fast Weissenberg data collection as an alternative to the Laue method in kinetic crystallography. In: Britton C ed. *Synchrotron Radiat Biosci*, Oxford: Oxford University Press, 1994. 110~ 116
- 6 Yennawar N H, Yennawar H P, Farber G K. X-ray crystal structure of γ -chymotrypsin in hexane. *Biochemistry*, 1994, **33** (23): 7326~ 7336
- 7 Yennawar H P, Yennawar N H, Farber G K. A structure explanation of enzyme memory in nonaqueous solvents. *J Am Chem Soc*, 1995, **117** (2): 577~ 585
- 8 Farber G K, Petsko G A, Ringe D. The 3.0 Å crystal structure of xylose isomerase from *Streptomyces olivochromogenes*. *Protein Engineering*, 1987, **1** (6): 459~ 466
- 9 Vellieux F M D, Hajdu J, Christophe L M J *et al.* Structure of glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (6): 2355~ 2359
- 10 Adachi H, Jensen S E, Johns K *et al.* Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature*, 1992, **359** (6397): 700~ 705
- 11 Bolduc J M, Dyer D H, Scott W G *et al.* Mutagenesis and Laue structures of enzyme intermediates: isocitrate dehydrogenase. *Science*, 1995, **268** (5215): 1312~ 1318
- 12 Singer P T, Smalas A, Carty R P *et al.* The hydrolytic water molecule in Trypsin, revealed by time-resolved Laue crystallography. *Science*, 1993, **259** (5095): 669~ 673
- 13 Neidhart D J, Powers V M, Kenyon G L *et al.* Preliminary X-ray data on crystals of mandelate racemase. *J Biol Chem*, 1988, **263** (19): 9268~ 9270
- 14 Adams S R, Tsien R Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu Rev Physiol*, 1993, **55**: 755~ 784
- 15 Schlichting I, Almo S C, Kapp G *et al.* Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in H-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature*, 1990, **345** (6273): 309~ 315
- 16 Stoddard B L, Koenigs P, Porter N *et al.* Observing of the light-triggered binding of pyrene to chymotrypsin by Laue X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (13): 5503~ 5507
- 17 Mendel D, Elman J A, Schultz P G. Construction of a light-activated protein by unnatural amino acid mutagenesis. *J Am Chem Soc*, 1991, **113** (7): 2758~ 2760

Using X-Ray Diffraction to Study the Dynamic Process of the Protein. YUAN Yu ren

(Shanghai Institute of Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China); XIA Zong-xiang (Shanghai Institute of Organic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China).

Abstract A brief introduction is given about the application of X-ray diffraction to the study of the dynamic process of the protein. Firstly, it gives some description about using traditional and Laue X-ray diffraction to study the dynamic process of a protein in a reaction taking place in a

few minutes. Secondly, it is about reaction synchronization used to study the dynamic process of a protein in a few seconds. By choosing unmatchable substrate and unsuitable pH value, by choosing temperature and pH value jumping and by choosing metal ion and photochemical induction, enzyme reaction can be activated instantaneously.

Key words protein, dynamic process, X-ray diffraction, reaction synchronization

肌腱蛋白 R (Tenascin-R) 研究进展

肖华胜 陈镔复

(第四军医大学全军神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 肌腱蛋白 R (tenascin-R, TN-R) 是一种重要的细胞外基质糖蛋白 (extracellular matrix, ECM). 分布于中枢神经系统, 主要在髓鞘形成早期的少突胶质细胞中表达, 成熟的胶质细胞及某些神经元 (如脊髓, 视网膜, 小脑和海马的中间神经元) 也有表达. TN-R 具有复杂的结构, 由三种不同的结构域组成, 从氨基端到羧基端依次为: 类似于表皮生长因子的重复片段, 类似于 III 型纤连蛋白重复片段, 类似 (血) 纤维蛋白原片段组成. TN-R 具有多种复杂的功能, 对神经元具有排斥作用, 促进或抑制神经元突起的生长, 诱导神经元形态的极化, 并和髓鞘的形成有关, TN-R 结构的复杂性和功能的多样性提示, TN-R 有多个受体存在, 已经发现的受体有 F3/F11, MAG, XL1, Xprocan 等.

关键词 肌腱蛋白 R, 结构, 功能, 受体

学科分类号 Q513.2

肌腱蛋白 R (tenascin-R, TN-R) 是一种重要的细胞外基质糖蛋白, 1985 年 Kruse 用 J1 抗体研究 Tenascin-C 时发现, 在星形胶质细胞和少突胶质细胞中存在两种蛋白质, 分子质量为 160 ku 和 180 ku, 同 J1 有特异性反应^[1]. 当时命名为 J1 160/180, 后又命名为 Janusin (在啮齿动物中), restrictin (鸡), 最近 Bristow 等^[2]又重新命名为 tenascin-R. TN-R 分布于中枢神经系统, 具有复杂的结构和多样生物学功能, 它通过作用于靶细胞上的受体而发挥其功能, TN-R 在神经系统的发育、再生中起着非常重要的作用. 本文就 TN-R 的分

布, 生物学功能和信号转导作一简要综述.

1 TN-R 的分布和结构特征

1.1 TN-R 的分布

原位杂交和免疫组织化学结果表明 TN-R 分布于中枢神经系统, 主要由髓鞘形成早期的少突胶质细胞分泌, 富集于郎飞氏节, 在髓鞘形成后期的少突胶质细胞中也有表达. 除少突胶质细胞外 TN-R 也分布于脊髓、视网膜、小脑海马的一些神经元和中间神经元. TN-R 在

收稿日期: 1996-12-10, 修回日期: 1997-03-27