

金属硫蛋白的结构模型

梅尚筠 严定友

(华中师范大学生物系,武昌)

金属硫蛋白是一种低分子量(6,000—10,000),富含半胱氨酸(25—35%),并能结合重金属如 Zn、Cd、Cu、Hg 或 Ag 的蛋白质。因其含硫及金属故称为金属硫蛋白(Metallothionein,简称 MT)。自 1957 年 Margashcs 和 Vallee 在马的肾脏皮质中第一次分离出含有镉的蛋白质以来^[1],在哺乳动物(包括人)、微生物、原核生物蓝绿藻^[2]及植物^[3]中已先后分离出金属硫蛋白。它是一种诱导性的蛋白质。在实验的动物和培养的细胞中(如 Hela 细胞、人的上皮细胞等)金属硫蛋白不仅被重金属离子^[4]而且也能被皮质激素^[5]诱导而合成。并已证明二者诱导 MT 的合成是受转录水平调节^[6,7]。

金属硫蛋白的生物功能虽然还未完全弄清楚,但它广泛存在于自然界,这意味着它有重要的生物学意义。它能与重金属离子结合,形成螯合物,因而可能作为重金属的去毒剂而发挥作用。如金属的诱导作用,使生物体迅速合成 MT,结果使重金属结合到蛋白质上的水平大为提高^[8]。锌和铜是细胞内很多酶的组成成份。MT 可能参与这两种金属的贮存、运转,以维持这些金属在体内的平衡。研究刚出生的幼鼠证实,MT 对能促进动物生长和发育所必需的锌起着贮存蛋白和调节蛋白的作用,以维持体内锌的平衡^[9]。MT 的合成也受环境刺激的影响,与某些疾病有关(如高锌血症等)。随着工业的发展,镉、汞等金属对环境的污染日益增加,危害生物及人类的健康,而金属硫蛋白对重金属有解毒作用,故研究它的生理、生化特性及其结构,将对一些病因及机体防御机制的探讨具有重要意义。

哺乳动物的金属硫蛋白每摩尔蛋白大约结合 7 克金属原子^[17]。人们还发现 20 个半胱氨酸

在一级结构中的位置是不变的。半胱氨酸侧链都和蛋白质上的七个金属离子配位。看来金属-硫醇盐复合物是 MT 的结构和功能的活性所必需的。MT 的金属螯合作用引起人们极大的兴趣。使用紫外吸收、圆二色光谱分析、层析等方法研究证明,金属离子是通过硫醇盐结合。在 MT 和脱辅基 MT 之间,MT 和不同金属组成之间存在着明显的结构差异,但由于金属-硫醇盐电荷转移跃迁的重叠,因此紫外吸收及圆二色光谱分析的研究不可能推断出金属的结合位点以及它们相互的空间关系。又因未获得此蛋白质的晶体,也就不可能用 X 射线衍射法研究其结构。Otvos 和 Armitage^[10,11]成功地在金属硫蛋白中用 ¹¹³Cd 核磁共振(NMR)作为金属复合物的结构探针。¹¹³Cd 的化学位移对配体环境的细微差异的敏感性,使得它有可能从七个金属结合位点中的每一个结合的 ¹¹³Cd²⁺ 中分辨出各个共振。他们观察到 ¹¹³Cd 共振为 ¹¹³Cd-¹¹³Cd 自旋偶合分裂成多重谱线。选择同核去偶合的多重谱线可以鉴别在同一多核簇中自旋偶合的 ¹¹³Cd 离子。应用 ¹¹³Cd NMR 技术研究了兔^[12]、人^[3]和小牛肝的 MT^[13],以及 *Scylla serrata* 肝胰腺的 MT^[14]。从这些资料的分析表明,共振是由两个不同的金属离子簇所引起。因而证明哺乳动物的金属硫蛋白中存在着分离的 3-金属簇和 4-金属簇,而 *Scylla serrata* 的 MT 中有两个 3-金属簇。最近报道,鼠肝 MT 通过蛋白水解酶(枯草杆菌蛋白酶)降解,得到了一个片段,其氨基酸残基组成为 30—61,并含有四个结合的 Cd²⁺ 离子,称其为 α -片段^[15]。这个研究结果与前面所提的 4-金属簇结构是一致的。

鼠 MT-I^[19,20]和人 MI-II^[21]的基因研究结果表明,金属硫蛋白的基因结构含有三个外显

子。在基因链上三个外显子分别相当于氨基酸残基 1—9, 10—31 和 32—61。特别是第三个外显子编码 C-末端片段的多肽结构和枯草杆菌蛋白酶降解所得的 α -片段相一致。和许多其它真核基因一样, 这个外显子在金属硫蛋白中代表一个功能区域, 即 4-金属簇。这些研究都有力地支持了 Armitage 及其同事的工作。他们综合有关研究提出了金属硫蛋白的三级结构模型^[46]。现简述如下。

一、氨基酸顺序

从哺乳动物到链孢霉, 它们的金属硫蛋白的氨基酸顺序具有高度同源性(见图 1)。哺乳动物 MT 含有 61 个氨基酸, 氨基末端都是乙酰蛋氨酸, 羧基末端都是丙氨酸。所有的 20 个半胱氨酸残基在多肽链中的相对位置不变, 而且有显著特点。其中有 10 个 Cys 是以五个 Cys-x-Cys 单位存在 (x 表示可变的氨基酸残基), 7 个 Cys 是在 Cys-Cys-x-Cys-Cys (氨基酸残基 33—37) 和 Cys-Cys-x-Cys (57—60) 的

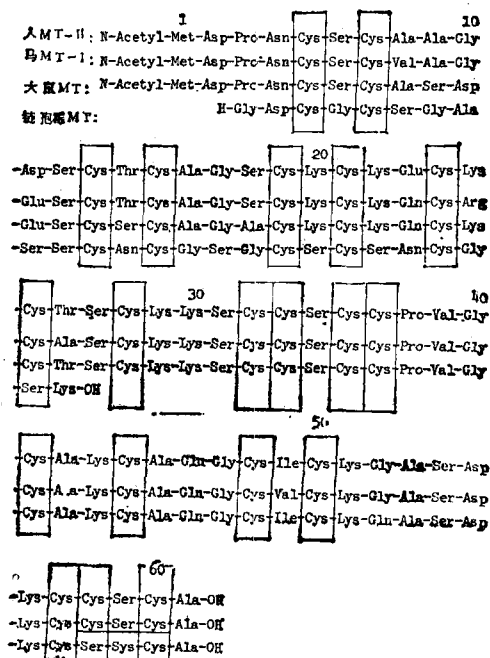


图 1 哺乳动物和链孢霉金属硫蛋白氨基酸顺序

两种形式中出现。全部的半胱氨酸巯基参与结合七分子的金属。蛋白质分子中没有二硫键和游离的硫氢基。金属硫蛋白组成的另一特点是含有较高的赖氨酸(6—8 个残基)及丝氨酸(7—10 个残基), 却缺乏芳香族氨基酸和组氨酸, 因而在 280 毫微米波长中没有蛋白质的典型吸收峰。

哺乳动物中金属硫蛋白存在两种异构体(MT-I 和 MT-II)。二者在氨基酸组成和总的电荷数上有差异。MT-II 含有异亮氨酸, MT-II 比 MT-I 含有较多的丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸和赖氨酸, 以及较少量的苏氨酸、甘氨酸和缬氨酸。巯基与金属的比值在两种异构体中为 3:1^[47]。

二、金属硫蛋白的分子模型

哺乳动物的金属硫蛋白是椭圆形, 紫外吸收及圆二色光谱分析表明, 该蛋白质几乎不含 α -螺旋及 β -折叠的二级结构。用 Chou-Fasman 预测二级结构的理论分析, 结果与圆二色分析相同, 预测蛋白质有 11 个 β -转折。蛋白质不结合金属时, 预测它形成大量的 β -转折。每一个 β -转折含有一或二个半胱氨酸残基。形成的这种二级结构有利于金属离子的结合。

根据对各种来源的金属硫蛋白的 ^{113}Cd NMR 的研究分析, 以及对用枯草杆菌蛋白酶水解所得 α -片段结构的 ^{113}Cd NMR 的研究分析^[18], 均证明 MT 是由两个结构区域构成, 一个为 4-金属簇(结合四个金属离子), 称为簇 A, 另一个为 3-金属簇(结合三个金属离子), 称为簇 B, 如图 2。簇 A 位于肽链的 C-末端, 即相当于 31—61 氨基酸部分。簇 B 位于肽链的 N-末端, 即 1—30 氨基酸部分。金属簇是由半胱氨酸以硫桥与金属连接所组成的四面体结构。20 个半胱氨酸残基全部参与金属的连接。11 个在簇 A, 9 个在簇 B。两个金属离子(编号 6 和 7)是以三个桥和一个非桥的硫配体配位。其余五个金属离子都是以两个桥和两个非桥的硫配体配位。肽链的 11 个 β -转折也在此模型中。

3-金属簇有 4 个 Cys-x-Cys 单位(氨基酸残基为 5—7, 13—15, 19—21 和 24—26)和一个单独的 Cys₂₉。三个金属和三个半胱氨酸的硫(S₂₉, S₅ 和 S₇)形成一环己烷状的六员环。在簇中,每个 Cys-x-Cys 单位和同一金属结合,因而半胱氨酸之间的距离就很短。五个 β -转折和连接的 H 键也易于在此区内形成。

4-金属簇有 Cys-Cys-x-Cys-Cys 单位(33—37), Cys-x-Cys-Cys 单位(57—60), Cys-x-Cys 单位(48—50)和两个 Cys(41 和 44)。相邻的半胱氨酸残基参与同一金属配位。在这个结构中,位于 33—37 和 41—50 的半胱氨酸残基,分别作为 Cd₁ 和 Cd₄ 的配体,而位于 57—60 的则作为 Cd₆ 和 Cd₇ 的配体。半胱氨酸硫桥又与第二个金属离子连接而形成簇。按 Chou-Fasman 法预测计算的六个 β -转折和连接的氢键在此结构区域。 α -片段的 ¹H NMR 谱研究,观察到六个慢交换酰胺共振与 Chou-Fasman 法计算的 α -片段有 6 个 β -转折相一致。此模型中,多肽链紧密绕着 4-金属簇,说明 4-金属簇较 3-金属簇稳定。

在整个分子中,负电荷残基(Asp、Glu 和末端 Ala)和正电荷残基(Lys、Arg)偶合。4-金属簇与 3-金属簇之间由 Lys30 与 Lys31 连接,而 Lys(30, 31) 所带的正电荷参与中和金属簇的负电荷。这样,通过盐桥使两个簇紧密结合在一起,以稳定分子的空间结构。

另外,用 ¹H-¹H NOE (Nuclear Overhauser enhancement) 研究 MT 的 α -片段,为 MT 的三级结构模型提供了新的证据。 α -片段中只含一个天门冬氨酸、缬氨酸和异亮氨酸,故易于识别其共振峰。因多肽链的卷曲,使一些质子的空间距离靠拢,它们的 ¹H-¹H NOE 联系可在其谱上得到反映。例如照射 Asp-55CH₂ 共振时,从 ¹H-¹H NOE 谱上能观察到半胱氨酸残基的 CH₂ 质子。依据 MT 的三级结构模型,配位于 Cd₁ 的一个半胱氨酸残基-Cys-44,是靠近 Asp-55 的,同样得出 Glu-46 和 Glu-52 都是与 Ile 靠近,Val-59 与 Ala-45 靠近。可见 NOE 的研究结果与提出的 MT 分子模型是一致的。

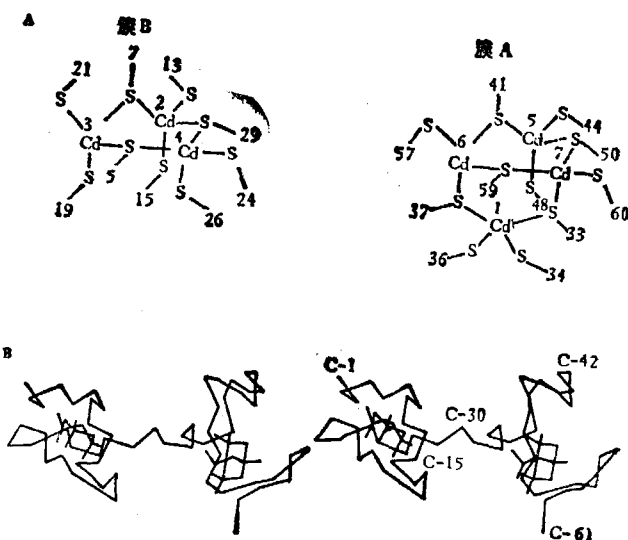


图 2 A. 哺乳动物 MT 金属簇结构模型 B. 哺乳动物 MT 分子模型,显示了肽链 α -碳和金属簇

三、金属硫蛋白中金属的结合顺序^[22]

脱辅基金属硫蛋白与金属重建后表现出与天然的蛋白质相同的性质。因此可用体外重建方法研究金属在 MT 中结合的顺序。天然的 Cd、Zn 金属硫蛋白能抗蛋白酶的水解,相反,脱辅基 MT 却能被水解成小的肽。但是两种异构形式的脱辅基 MT 与七个 Cd 离子重建,则又能抗蛋白酶的降解。由图 3 显示重建的 MT 和天然的 MT 具有相同的电泳迁移率,说明重建条件适合于 Cd 离子的结合,能恢复为天然状态。MT 的 α -片段也抗蛋白酶的降解,因此金属的结合增加了蛋白质的稳定性,即增强了抵抗蛋白酶的水解作用。脱辅基 MT 和 0—7Cd 离子/每分子重建过程中,如果每分子 MT 与 1—4 Cd²⁺ 结合时,经蛋白酶水解后再电泳,得到与 α -片段迁移率相同的带逐渐增加(α -片段是已知的 4-金属簇 A)。如果金属的结合沿着多肽链无规则地进行,则枯草杆菌蛋白酶水解时,随着 Cd 量的增加应该产生不同的肽,而 α -片段的增加,说明簇 A 先结合金属。当结合超过每分子 4 个 Cd 离子时,天然状态金属硫蛋白的量增加,即是 3-金属簇 B 也变饱和(如图 4)。这说

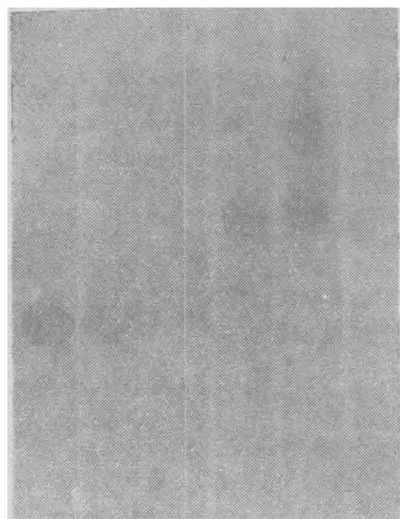


图3 天然MT和重建MT电泳图

天然 Cd、Zn-MT异构体 I 和 II(胶 A), Cd₇-重建 MT(胶 B)和脱辅基 MT(胶 C)经蛋白酶水解后,非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。(A)与(B)的迁移率相同

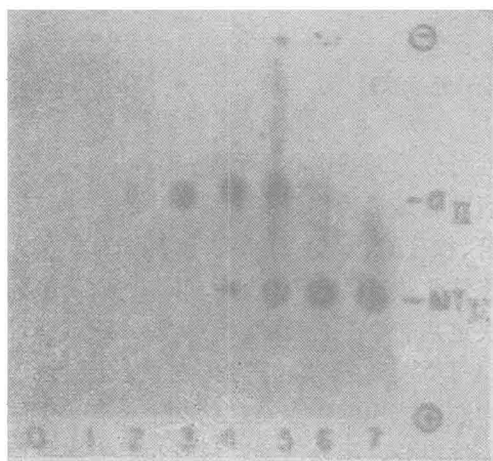


图4 脱辅基 MT-II 和 0-7 Cd 离子重建图^[1,23]
聚丙烯酰胺凝胶电泳图示重建过程中 α_{II} -片段和 MT-II 量随着 Cd 离子增加(0--7Cd²⁺/每分子)而变化

明金属的结合是有序的,首先结合于簇 A,待簇 A 完全饱和后,才与簇 B 结合。而且 Cd- α -片段是金属结合过程中的一种稳定中间产物。

每个簇的结合过程具有协同效应 (Cooperation)。当重建是在 1Cd²⁺/每分子脱辅基 MT

条件下进行时,产生约 25% 含 Cd,簇 A 的分子和 75% 未结合金属的分子,如在 5Cd²⁺/每分子脱辅基 MT 条件重建时,簇 A 全部饱和,30% 的分子中簇 B 饱和,换句话说,30% 的分子是 Cd₇ 金属硫蛋白,其余的为 Cd₄ α -片段。所以簇 B 也表现出类似的协同性。结合的协同性表现在每个区域中,但是在两个区域之间协同性并不明显。金属离子从 MT 中释放也是协同的。释放的顺序则是簇 B 先于簇 A,说明簇 A 较簇 B 稳定。3-金属簇或 4-金属簇离子的释放在金属硫蛋白的功能中可能具有重要作用。

两个区域在金属结合性质上看来有差异。在兔肝中,分离出用镉诱导的 MT, Zn²⁺ 主要结合在簇 B,这种分布可能是由于较高的结合亲和性在簇 A,以及镉和硫醇盐配体的结合常数较锌的高。在小牛肝的 MT 中发现三个 Cu⁺ 选择性地结合在簇 B,而 Zn 离子完全结合在簇 A。金属硫蛋白的簇 A 和簇 B 对不同金属离子的亲和性不同。此外,为了适合不同的金属离子,可能有不同构象的金属簇存在,如鼠肝,由铜诱导的 MT 每分子蛋白质能结合 9—11g Cu 原子。所以金属簇的结构差异,或是 Zn 与 Cu 在不同区域内的分布,都可引起金属硫蛋白的功能上变化。

综上所述,金属硫蛋白的结构特点是两个金属簇结合七个金属离子。所有的哺乳动物 MT 差不多都具有此结构特点。因为发现不同种类、不同组织来源的 MT,甚至不同异构形式的 MT,都具有广泛的顺序同源性。特别有意义的是在每个已测定的 MT 中,金属与半胱氨酸残基的配位位置是相同的。看来金属硫蛋白形成金属簇结构的能力是具有强大的进化基础,这种复合物无疑是蛋白质生理功能所必需的。

参 考 文 献

- [1] Margoshes, M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4813, 1957.
- [2] Olafson, R. W. et al.: *Biochem. Biophys. Res Comm.*, **85**, 36, 1979.

- [3] Rauser, W. E. et al.: *Nature*, 204, 563, 1980.
- [4] Rudd, C. J. et al.: *Toxico. Appl. Pharmacol.*, 47, 273, 1979.
- [5] Karin, M. et al.: *Science*, 204, 176, 1979.
- [6] Hager, L. J. et al.: *Nature*, 291, 340, 1981.
- [7] Hidebrand, C. E. et al.: *Biochemistry*, 19, 5850, 1980.
- [8] Squibb, K. S. et al.: *Biochem. J.*, 164, 223, 1977.
- [9] Bell, J. U.: *Toxico. Appl. Pharmacol.*, 50, 101, 1979.
- [10] Otvos, J. D. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 7734, 1979.
- [11] Otvos, J. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7094, 1980.
- [12] Boulanger, Y. et al.: *J. Inorg. Biochem.*, 17, 147, 1982.
- [13] Briggs, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 1259, 1982.
- [14] Otvos, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 2427, 1982.
- [15] Winge, D. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 3742, 1982.
- [16] Boulanger, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1501, 1983.
- [17] Tsunoo, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 253, 4172, 1978.
- [18] Boulanger, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 13717, 1982.
- [19] Durnam, D. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6511, 1980.
- [20] Glanville, N. et al.: *Nature (London)*, 292, 267, 1981.
- [21] Karin, M. et al.: *Nature (London)*, 299, 797, 1981.
- [22] Nielson, K. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 258, 13063, 1983.

[本文于 1984 年 8 月 13 日收到]

核 酸 抗 体

方福德 沈 岩

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

核酸抗体的研究始于五十年代中期。最初一些研究者试图用纯 DNA 免疫动物制备抗体, 均告失败。稍后, 人们才用 DNA 与载体蛋白组成复合物免疫动物, 获得了核酸抗体, 同时还发现既使用碱基、核苷、单核苷酸或寡核苷酸与牛血清清蛋白的复合物也能产生特异性抗体。至此人们开始认识到核酸物质具有抗原性。由于抗体-抗原反应的高度特异性, 核酸抗体的研究在核酸的检测、分离和提纯, 核酸结构与功能的研究及临床应用等方面都发挥着重要的作用。本文拟就核酸抗体的某些研究情况作一简要介绍。

一、核酸的抗原性

核酸由碱基、戊糖和磷酸组成。核酸的抗原性由碱基或戊糖-磷酸所决定, 因此核酸的抗

原性可分为碱基中心型和糖-磷酸中心型两类。前者即以碱基为抗原决定基的中心, 包括碱基、核苷、核苷酸、单链 DNA、单链 RNA 和大多数修饰化核酸的抗原性; 后者即以糖-磷酸为抗原决定基的中心, 包括双链 DNA、双链 RNA、RNA-DNA 杂交体和三链核酸的抗原性。碱基中心型抗原的特点是在结构上具有单链结构或修饰组分, 另外碱基、核苷也具有半抗原性质, 这些都说明碱基是作为抗原决定基的中心。糖-磷酸中心型抗原的特点是核酸必须具备严格的二级或高级结构, 特定的空间螺旋结构产生特定的抗体。证明这一点是比较容易的, 最简单的证据是热变性可使这类抗原的抗原性消失。此外, 具有相同的螺旋结构而其所含碱基种类不同的核酸具有共同的抗原性也是有力的证明。这类核酸的抗原性与碱基无关。除以上