

真菌蛋白毒素研究进展

詹金彪

(浙江医科大学生化教研室, 杭州 310006)

提 要

真菌蛋白毒素是从真菌中分离到的单链抗肿瘤毒蛋白。他们可以抑制真核甚至原核细胞的蛋白质合成, 具有强烈的细胞毒性。可被用来合成对肿瘤细胞具强大杀伤作用的导向药物——免疫毒素。

关键词 真菌/毒蛋白, 霉菌/毒蛋白, 免疫毒素

真菌蛋白毒素 (fungal protein toxins) 是由一组真菌产生的单链非糖蛋白类毒素。迄今只发现三种。1963 年, Olson 等^[1]发现土壤巨曲霉菌 (*Aspergillus giganteus*) 能产生一种抑制因子—— α -sarcin, 它可以抑制多种肿瘤细胞的生长, 而对细菌和真菌没有影响。后来从曲霉菌 *Aspergillus restrictus* 的培养液中陆续发现了另两种具相似抗肿瘤作用的蛋白毒素——restrictocin (简称 Res) 和 mitogillin (简称 Mit)^[2,3]。毒性作用的机理研究表明, 这三种毒蛋白与植物毒素类如蓖麻毒素 (ricin)、相思子毒素 (abrin) 和美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP) 等的作用机理相似, 都能强烈地抑制真核甚至原核细胞的蛋白质合成^[4,5]。近年来, 真菌毒素已被用来合成对肿瘤细胞具强大杀伤作用的导向药物——免疫毒素 (immunotoxin, 简称 IT)^[6]。本文就真菌蛋白毒素的结构与功能的研究进展作一扼要概述。

一、分子结构

1. α -sarcin 其一级结构测定已由 Sacco 等^[7]完成。其分子含 150 个氨基酸残基, 测得分子量为 16987Da, 与电泳法估测值 17400 接近。 α -sarcin 富含 Lys (20 个), Asn 和 Asp (22 个), 而 Ile (4 个), Val (3 个) 和 Trp (2

个) 的含量较少, 没有 Met 存在。分子内部的 6 位与 148 位及 76 位与 132 位的 Cys 残基间形成两个二硫键。

2. Res 和 Mit Res 和 Mit 是密切相关的蛋白质。它们都由同一种霉菌 *Aspergillus restrictus* 产生, 其分子量分别为 16836 和 16867Da, 都含有 149 个氨基酸残基^[8,9]。Res 和 Mit 的一级结构比较, 仅 25 位氨基酸不同, 在 Res 中是 Ser 而在 Mit 中是 Asp。它们的结构与 α -sarcin 相似, 其 N 端为 Ala, C 端为 His, 分子内亦有两个二硫键分别存在于 5, 147 和 75, 131 位 Cys 之间。Res 和 Mit 分子中富含 Asn 和 Asp (22 个), Gly (14 个) 和 Pro (12 个) 残基, 而 Lys (6 个), Val (3 个) 和 Trp (3 个) 的含量较少, 并有 Met (1 个) 存在。

Res, Mit 与 α -sarcin 的一级结构比较, 具有 86% 的同源性, 仅 21 和 20 个氨基酸不同, 他们大多位于分子链的 N 端和 C 端; 值得注意的是他们的分子中存在两个完全相同的区域 (28—57) 和 90—133 位) 和由 4 个 Cys 构成的两个相同的二硫键 (图 1)。圆二色谱 (circular dichroism) 和光谱分析表明, Res 和 Mit 的二级和三级结构与 α -sarcin 亦十分相似^[10]。免

疫学研究显示, Res 抗血清与 Mit 呈完全免疫交叉反应而与 α -sarcin 部分交叉^[11]. 结构上的相似性可能使他们具有共同的抗原决定簇, 可以解释他们的免疫交叉反应和圆二色谱的相似性。

另一有趣的发现是, 把 Res 和 α -sarcin 的一级结构与来自黑粉菌 *Ustilago spheerogena* 的核酸内切酶 RNase U2 相比较, 发现 RNase U₂ 有 37 个氨基酸残基与 Res 的相同, 38 个氨基酸与 α -sarcin 一致, 分别有 34.9% 和 35.8% 的同源性。RNase U2 酶的催化中心含有的 -Glu-Phe-Pro- 序列, 同样存在于 Res、Mit 和 α -sarcin 中(图 1)^[8]。结构的相似性决定了他们功能的相似性, 他们均具核酸酶的活性; 结构的差异, 又决定了他们具有不同的特异性。

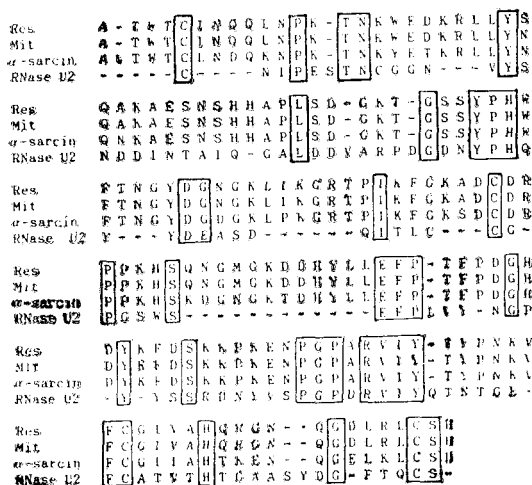


图 1 真菌毒素与 RNase U2 的一级结构^[8,9]

框架表示相同的序列

二、毒性作用的生化机理

1. α -sarcin α -sarcin 能中断麦胚、酵母和兔网织红细胞裂解体系的蛋白质的合成。其机理是抑制氨基酸-tRNA 与核糖体的结合, 但它对非酶促的氨基酸-tRNA 与核糖体的结合没有影响^[11,12]。尽管 α -sarcin 尚可抑制依赖 EF-1 和 EF-2 的 GTP 酶 (EF-1 and EF-2-dependent GTPase); 毒素与核糖体在前转位状态 (pretranslocated state) 下, 似乎不会起

结合作用。因此, 当兔网织红细胞裂解体系由 α -sarcin 中断后, 肽酰-tRNA 结合在“受位”且不与嘌呤霉素 (puromycin) 反应^[13]。业已证实 α -sarcin 具有核酸酶的特性^[14], 它可以催化水解核糖体 60S 亚基的 RNA 的 3' 一侧的单个磷酸酯键, 酶切部位是在鸟嘌呤 (G₄₃₂₅) 和腺嘌呤 (A₄₃₂₆) 核苷酸之间的磷酸酯键(图 2),

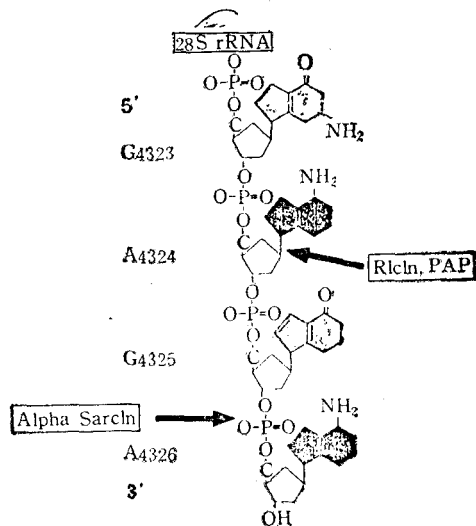


图 2 α -sarcin 的作用部位

它有 AGUACGAGAGGA^AC^A 序列。这个富含嘌呤碱基的 14 个核苷酸序列是高度保守的, 它亦存在于酵母 25S rRNA, 大肠杆菌 23S rRNA 和 *Zea mays* 叶绿体 23S rRNA, 可能保留在大鼠肝 28S rRNA, 中。这一 α -sarcin 的敏感压对核糖体的功能十分重要, 这一区域的一个磷酸酯键的断裂可导致整个核糖体失活。可能这一 α -sarcin 的作用部位参与氨基酸-tRNA 键合到核糖体上的作用。当 α -sarcin 从大亚基核糖体 RNA 的 3' 末端酶切下含 320 个残基的多核苷酸链后, α -sarcin 即催化失活酵母核糖体 60S 亚基^[15]。这种作用具强烈的特异性, 它可在酵母多核糖体、核糖体和 60S 亚基等实验体系中观察到^[11,15]。该毒素单独对大鼠肝多核糖体没有作用, 当加入 EDTA 后, 即可起失活作用, 在这种情况下, 开裂 3'-磷酸和 5'-羟基键, 切下约含 488 个核苷酸的多核苷酸链^[16]。当到达相当高的浓度时, α -sarcin

亦可把大肠杆菌 5S 亚基含有的长链 RNA 切断,切下含有 243 个核苷酸的多核苷酸链^[15]。有证据显示,在原始细菌 *Sulfolobus solfataricus* 的核糖体中也保留了相似的核苷酸序列,这种原始细菌的蛋白质合成机构对大多数已发现的干扰延长步骤的抑制剂不敏感,而对 α -sarcin 敏感^[17]。 α -sarcin 仅能酶切 7000 个磷酸二酯键中的 1 个,这种酶切特异性是由毒素和核糖体两者共同决定的。当仅以 28S rRNA 或其他 RNA 作底物时,它可以引起核酸的非特异性的水解。对 α -sarcin 的核酸酶的研究证明,它可以酶切 RNA 的单链或双链区的嘌呤核苷酸^[14]。

2. Res 和 Mit 这两种毒素与 α -sarcin 一样,酶切核糖体 60S 亚基 28S rRNA 的精确相同的部位^[11]。Res 和 Mit 不仅能抑制无细胞体系蛋白质的合成,还可以透过由微小 RNA 病毒感染的细胞的胞膜,从而强烈抑制细胞的蛋白质合成^[18]。尽管 Res 和 Mit 在化学结构和起源上与植物毒素及细菌毒素不同,但它们有相同的作用模式,它们都能使依赖 EF-1 因子的氨基酰-tRNA 失去结合活性^[4]。

三、抗肿瘤作用

真菌蛋白毒素都是高活性的抗肿瘤剂。据 Olson 等^[19]报道,每一小鼠每日注射 1.25 μ g 的 α -sarcin 即可抑制小鼠肉瘤 S-180 肿瘤的成长。当培养介质中的浓度达 5 μ g/ml 时,可抑制体外培养的 S-180 细胞生长。Roga 等^[3]亦证实 Res 和 Mit 对 S-180,腺癌 A-755 和白血病 L-1210 等肿瘤具有抑制活性。

近年来,单链核糖体抑制剂 (RIP) 已被广 (上接第 33 页)

泛用来合成对肿瘤细胞具有导向杀伤作用的免疫毒素。因为真菌蛋白毒素是一种低分子量 (<20000) 无糖链的 RIP,且体内外毒性小,易被细胞内化,可能是一种良好的免疫毒素合成材料。Orlandi 等^[6]把抗乳腺癌单抗 MBr1 与 Res 结合成免疫毒素,发现该结合物比游离的 Res 对靶细胞的杀伤作用增加 600—1500 倍,而对其他细胞无作用。在小鼠模型中,该免疫毒素可以抑制相应肿瘤的成长。存在的问题是,该免疫毒素的杀伤效率较差,其机理有待进一步探索。随着研究的不断深入,通过结构改造等途径,真菌毒蛋白可能成为合成免疫毒素的理想材料。

参 考 文 献

- Olson B H, Goerner G L. *Applied Micro*, 1965; 13: 314.
- Olson B H *et al.* *Applied Micro*, 1965; 13: 322.
- Roga V *et al.* *Cancer Chemother*, 1971; 55: 101.
- Jimenez A, Vazquez D. *Ann Rev Microbiol*, 1985; 39: 649.
- 詹金彪,周佩珩. *实用肿瘤杂志*, 1989; 4(1): 58
- Orlandi R *et al.* *Cancer Immunol Immunother*, 1988; 26: 114.
- Sacco G *et al.* *J Biol Chem*, 1983; 258: 5811.
- Lopez-Otin C *et al.* *Eur J Biochem*, 1984; 143: 621.
- Fernandez-Luna J L *et al.* *Biochemistry*, 1985; 24: 861.
- Gavilanes J G *et al.* *J Protein Chem*, 1983; 2: 251.
- Conde FP *et al.* *FEBS Microbiol Lett*, 1978; 4: 349.
- Fernandez-Puentes C, Vazquez D. *FEBS Lett*, 1977; 78: 143.
- Hobden A N, Cundliffe E. *Biochem J*, 1978; 170: 57.
- Endo Y *et al.* *J Biol Chem*, 1983; 258: 2662.
- Schindler D G & Davis J E. *Nucleic Acid Res*, 1974; 4: 1097.
- Endo Y & Wool I G. *J Biol Chem*, 1982; 257: 905.
- Sanz J L, Amils R. *FEBS Lett*, 1984; 171: 63.
- Fernandez-Puentes C, Carrasco L. *Cell*, 1980; 20: 769.
- 王庆诚,生命的化学, 1990; 10(3): 7
- Stanley A Viores. *Ann N Y ACAD SCI*, 1986; 486: 124
- Rakowicz-Szulczynska Ewa M. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 163(1): 649
- Jane Visvader. *PNAS*, 1988; 85: 9474
- Ito Etsuro. *Oncogene*, 1989; 4(10): 1193
- Rakowicz-Szulczynska Ewa M. *Mol Carcinog*, 1989; 2(1): 47
- Rausch D M. *J Neurosci Res*, 1989; 24: 49
- R Levi-Montalcini. *TINS*, 1986; 9(10): 473
- Christiansen-H. *Oncogene*, 1990; 5(3): 437
- Donohue-S J. *Hypertension*, 1989; 14(4): 421
- Koh-S. *Brain Res*, 1989; 498(2): 397

1284

2 Otten, Uwe. *PNAS*, 1989; 86(24): 100593 Eugene M Johnson. *TINS*, 1988; 11(7): 2994 David P Martin. *J Cell Biol*, 1988; 106: 8295 Paola Pezzati. *Brain Behavior and Immunity*, 1988; 2(4): 3116 Hernan E LARA. *J Cell Biol*, 1990, 126(1): 3577 Hernan E LARA. *J Cell Biol*, 1990, 126(1): 3648 Brue A Yanker. *Annu Rev Biochem*, 1982; 51: 8459 Clinzia Volonte. *J Cell Biol*, 1989; 109: 239510 Rolf Heuman. *Biochem Soc Trans*, 1987; 15: 131