

专 论 与 综 述

蛋白质结晶学在蛋白质工程设计中的重要作用

卢 光 莹

(北京大学生物系)

提 要

本文综述了近几年来蛋白质工程的成就和进展以及蛋白质 X-射线结晶学技术在蛋白质工程设计中所起的重要作用,并以酪氨酸-tRNA 合成酶、二氢叶酸还原酶、T₄ 溶菌酶、细胞色素 c、胰蛋白酶以及胰岛素原等几个实例说明如何利用蛋白质晶体结构资料进行蛋白质工程设计。

长期以来人们试图创造自然界不存在的蛋白质,并借以揭示蛋白质特别是酶的结构与功能的关系。为此,人们曾用化学修饰的方法或通过随机的基因突变或诱变种的筛选来获得新蛋白质。虽然取得了一些成功,但是受到许多限制,特别是要求改变蛋白质分子中的某一个特定的残基或区域是难以控制和实现的。而近几年发展起来的第二代遗传工程技术即蛋白质工程,则用定位突变基因的方法,直接修饰或人工合成基因,有目的地按照设计来改变蛋白质分子中任何一个氨基酸残基或结构区域,以达到改变其某些性质和功能的目的。

等应用研究。

根据生化知识进行设计的局限性

对于蛋白质工程来说,在定位突变和基因表达技术日趋成熟的今天,它的中心问题就是如何设计蛋白质分子的定位突变问题。在没有蛋白质详细的三维晶体结构资料的情况下,只能根据生物化学知识来进行设计。例如生物化学研究表明,抗青霉素细菌的 β -内酰胺酶(β -Lactamase)属于丝氨酸蛋白酶类,其活性中心位置为 Ser(70) 并可能涉及 Ser(70)-Thr(71) 残基对。美国科学家用定位突变技术将 Ser(70) 改成 Cys(70)^[1],或将 Ser(70)-Thr(71) 改为 Thr(70)-Ser(71)^[2] 来研究结构与功能的关系;美国另一组科学家对枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)也进行了类似的工作^[3]。枯草杆菌蛋白酶也是一个丝氨酸蛋白酶,而且从生化工作得知紧邻其活性中心 Ser(221) 的 Met(222) 是该酶氧化失活作用的主要位置。作者用定位突变方法来研究置换这个对氧化作用敏感而又对活性起关键作用的残基 Met(222) 后对保持酶活性的可能性。虽然此酶的晶体结构已经知道,但不能确定用何种残基置换 Met(222) 最为合

由于生物化学家、遗传工程学家、生物物理学家、X-射线结晶学家以及计算机图象专家的合作,蛋白质工程已取得了很大进展。改变的氨基酸残基数目从删除大约 30 个残基到只置换一个残基;设计水平从仅根据已知的生物化学知识到根据一个蛋白质的高分辨率的三维晶体结构详细资料;研究目标从对活性部位各个氨基酸残基所起的作用、各种氨基酸残基对蛋白质肽链折叠和亚基聚合的影响及蛋白质分子的稳定性和特异性等理论研究到探索提高某些药物对治疗疾病的能力和改进行业用酶的性能

述,因此作者采用盒式突变技术系统制备出 Met(222) 被其余所有 19 种氨基酸所取代的变种,一一进行活性测定,来探讨改进此酶氧化作用稳定性的可能性;另外,又例如法国科学家^[4]对 α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -antitrypsin) 抑制剂进行的定位突变实验,将可能导致此抑制剂氧化失活的残基 Met(358)改变成 Val(358)或 Arg(358)以探索治疗肺气肿和血栓的可能性等等。这些工作虽然也获得了一些很好的结果,但是仅根据生物化学资料提供的活性中心或其它部位某几个残基对结构和功能的影响的信息去进行设计有极大的局限性。

蛋白质晶体结构知识是设计的基础

X 射线衍射法是日前唯一能在原子水平上提供蛋白质工程所需要的三维结构资料的技术。虽然人们也在试图用其它一些技术或理论工作来为蛋白质分子提供三维结构资料,但是到目前为止还不很成功。例如核磁共振技术虽也能给出分子的三维坐标,但至今仅成功地应用到个别小肽或小蛋白质分子上。又例如理论工作者试图以蛋白质的氨基酸顺序来精确地预言该蛋白质的三维构象。同样地,虽然在计算某些小分子蛋白质的结构方面曾经取得了一些进展,但是这些理论还不能对新蛋白质的三维结构作出重要的预测。而且蛋白质二级结构预测的基本思想从根本上也是根据已知晶体结构统计出各种氨基酸残基在 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角以及无规卷曲等结构中出现的几率,推算未知结构中各肽段形成某种二级结构的可能性。只有随着晶体结构资料增多和精密度提高,二级结构预测的准确性才能大大提高。因此,X-射线衍射方法测定蛋白质晶体结构已成为今后蛋白质工程发展的中心环节。

到目前为止,X 射线衍射技术已解出了约 150 多种蛋白质的高分辨率三维结构,尽管与机体内存在的千百种蛋白质相比,这个数目太小了,但这些数据已成为蛋白质工程设计的基础。现将成功的几个例子简介如下,用以说明晶体结构知识在蛋白质工程设计中的重要作用。

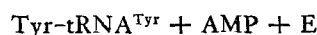
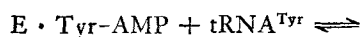
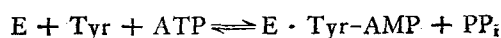
用。

蛋白质晶体结构知识在设计中的重要作用的几个实例

一、酪氨酰-tRNA 合成酶 (Tyrosyl-tRNA Synthetase) 的定位突变

这是根据详细的晶体三维结构进行蛋白质工程设计,并用定位突变方法获得成功的一个蛋白质^[5],也是迄今为止蛋白质工程研究最多的一个。

酪氨酰-tRNA 合成酶催化,tRNA^{Tyr} 分子特异地与酪氨酸进行氨酰化,反应分两步进行:



从嗜热脂肪芽孢杆菌中提取的这个酶的高分辨率 X 射线晶体结构分析已经完成^[6,7]。酶与反应中间物酪氨酰腺苷酸结合的复合物的晶体结构^[7,8]以及酶与中间物的类似物抑制剂如酪氨醇的腺苷酸酯(Tyrosinyl adenylate)等结合的复合物的晶体结构也已经测出^[9],因而底物的结合部位已被确定。

从 1982 年至 1985 年连续报道了美国学者的有关此酶的定位突变实验。实验的策略是改变腺苷酸结合位置处的氨基酸残基,而又不完

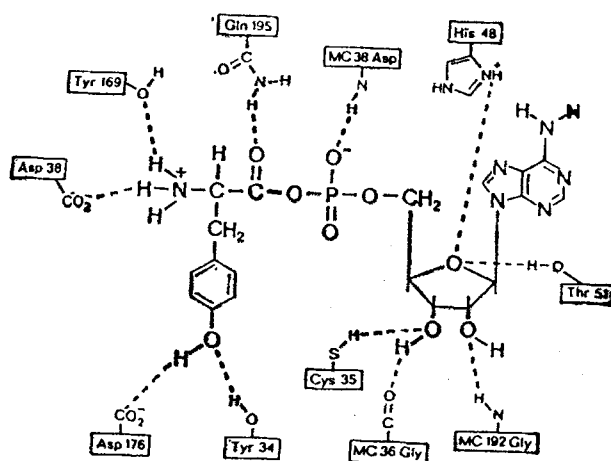


图 1 酪氨酰-tRNA 合成酶与反应中间物酪氨酰腺苷酸之间的 11 个氢键

MC 表示主链

全破坏酶的活性,以便用动力学的方法来测量变种酶的活性,从而研究酶-底物相互作用的微妙机理。晶体结构表明, Cys(35)、Thr(51)和 His(48)分别以氢键与 ATP 的核糖相连系(图 1),因而这几个残基就成为定位突变实验的靶子。

第一组实验对象是 Cys(35)^[5,10]。Cys(35)的-SH 基团与 ATP 的核糖上的 3'-OH 基以氢键相连系,而且它是此酶的一级结构中唯一保守的半胱氨酸残基。第一个实验是将 Cys(35)改成 Ser(35)^[9]。通常, Ser 的 -OH 基形成比 Cys 的 -SH 基强得多的氢键,因为最适的 O-H...O 氢键距离比相应的 S-H...O 氢键距离至少要短 0.04nm。因而似乎变种酶 Ser(35)应该比天然酶 Cys(35)与 ATP 结合更强。但是,由图 2 可见,由于 Ser 和 Cys 的几何学差别,在此酶 Cys(35)的-SH 基与核糖的 3'-OH 能形成很好的氢键的情况下, Ser(35)的-OH 基离氢键受体(核糖的 3'-OH)则稍远了一点,比最适距离至少要多 0.05nm,因而对结合能的贡献将很小,这将使得酶与 ATP 的结合较差因而催化活性较低。结果表明,正如

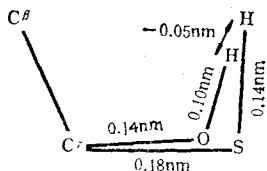


图 2 Ser 中的 C-O-H 键和 Cys 中的 C-S-H 键的几何图示

图中将两个氨基酸的 C_β 和 C_γ 原子相重叠,并将 H 原子放在最近的位置上

预期的那样,变种酶 Ser(35)的酶活性降低了。Cys(35)第二个定位突变实验是以 Gly(35)代替 Cys(35)^[10],完全去除氢键以便观察 Cys(35)的侧链对催化作用的结合能量的贡献。实验表明,变种酶 Gly(35)的酶活性确实小于野生型酶 Cys(35)。但是有趣的是,尽管变种酶 Ser(35)还有与 ATP 形成一个弱的氢键的可能性,然而测定结果却是变种酶 Ser(35)对 ATP 的亲性和还低于变种酶 Gly(35),作者认为这可能是由于 Ser(35)不得不失去在自由酶情

况下与一个结合水分子所形成的一个很好的氢键而去与 ATP 生成一个不好的氢键,形成了酶-基质复合物所致。由以上两个实验,作者推断野生型酶的 Cys(35)的侧链可能是被用来很好地稳定酶-基质中间物以利于进行焦磷酸交换和氨基酸酰化作用。

酪氨酰-tRNA 合成酶的第二组定位突变实验是对 Thr(51)进行的^[11]。第一个实验是将 Thr(51)改成 Ala(51)。由图 1 可见, Thr(51)的羟基与核糖的环氧形成一个长距离的氢键,作者根据上述第一组实验结果预料若去掉一个弱的不好的氢键有可能会稍许增加酶对底物的亲和性,因而设计将 Thr(51)改为 Ala(51)以去掉 -OH 基使氢键不能生成。实验正如所预期的那样,变种酶 Ala(51)与 ATP 相互作用的能量增加了。第二个实验是将 Thr(51)改成 Pro(51)。晶体结构表明,残基 47-61 肽段的构象角 ϕ 和 ψ 在 α 螺旋 (-57° , -48°) 所特有的范围之内。但是在此肽段的氨基端,螺旋稍许不规则,而且 Gly(47)的主链-C=O 与 Thr(51)的主链-NH 之间可能不形成氢键,又知在同源的大肠杆菌酪氨酰-tRNA 合成酶中,残基 51 是 Pro(51),这个氢键确实不可能存在,因为 N 在吡咯烷环中,这必然导致残基 47-51 附近局部的肽链骨架稍稍扭变。为了研究此扭变对酶与 ATP 亲和性的影响,作者将 Thr(51)改为 Pro(51)。结果变种酶 Pro(51)导致了动力学较大的变化,酶与 ATP 的相互作用增强了。

酪氨酰-tRNA 合成酶的第三组定位突变实验是试图分析氢键对酶与底物结合的能量及生物学特异性的影响^[12]。这个酶的晶体结构表明,在活性部位酶与底物可能形成 11 个氢键(图 1),其中 8 个是由氨基酸残基的侧链形成的(其余 3 个是由主链的肽键 C=O 或 NH 形成的)。作者系统地将这些残基进行定位突变实验(包括前述第一、二组实验在内),并分析了具有若干种不同类型氢键的一些变种酶的性质,包括决定了此酶对酪氨酸而不是对其它氨基酸如苯丙氨酸具有高度特异性的一些氢键如

Tyr(34)、与底物简单结合的一些氢键如 Cys(35)、His(48)、Thr(51)、Tyr(169), 以及与反应位置较近的氢键如 Gly(195), 这些氢键多数是在不带电荷的极性残基之间形成的, 另一些是酶或底物上一个带电荷基团形成的。作者将上述残基改成具有较小的侧链或是缺少或具有一个被修饰了的氢键供体或受体。具体改变如下:

野生型酶	变种酶	底物
Tyr(34) →	Phe(34)	Tyr
Cys(35) →	Gly(35)	ATP
Cys(35) →	Ser(35)	ATP
His(48) →	Asn(48)	ATP
His(48) →	Gly(48)	ATP
Thr(51) →	Ala(51)	ATP
Tyr(169) →	Phe(169)*	Tyr
Gln(195) →	Gly(195)	Tyr
Δ(321-419)	删除	tRNA 结合部位

* 在删除了残基 321—419 的酶上进行的

动力学测定结果表明, 侧链对结合能的贡献可以总结并归于下述几类: (1) 将与底物的不带电荷基团形成好的氢键的酶上的一个侧链去除, 结合能仅减小 0.5—1.5 Kcal mol⁻¹; (2) 将与底物的带电荷基团形成氢键的酶上的一个不带电荷的侧链去除, 结合能减小约 3.5—4.5 Kcal mol⁻¹ 或更多; (3) 将与底物形成一个太长距离氢键的酶上的一个基团去除, 实际上改进了结合。由这些结果也可以分析氢键与生物学特异性的关系: 传统的关于生物学特异性的看法是, 色散力和疏水效应提供了结合能, 而补充的氢键和盐桥决定了特异性。上述结果表明, 酶或底物上不带电荷的基团形成的氢键只能提供结合能 0.5—1.5 Kcal mol⁻¹, 即对特异性仅提供 2.5—15 的因子, 而酶或底物上一个带电荷基团形成的氢键能提供结合能约 4 Kcal mol⁻¹, 相当于特异性因子 1,000。因此, 虽然特异性在某种程度上是由氢键引起的, 但是最主要的是由带电荷的残基决定的。同时, 一般说来, 不利的空间相互作用也是一个重要的因素。图 3 可以说明为什么酪氨酰-tRNA 合成酶对酪氨酸而不是对其它氨基酸例如苯丙氨酸具有特异性作用。

二、二氢叶酸还原酶 (Dihydrofolate

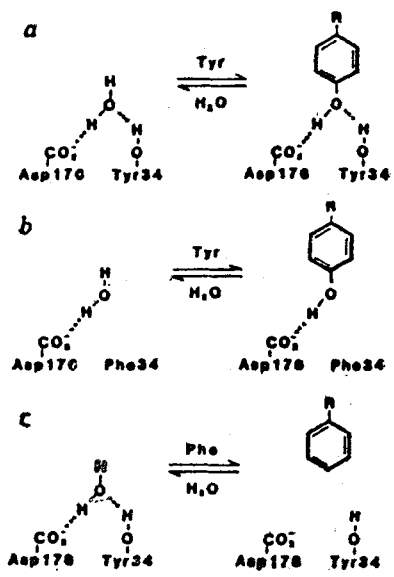
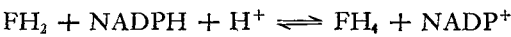


图 3 酪氨酸和苯丙氨酸与酪氨酰-tRNA 合成酶所形成的氢键示意图

- 野生型酶与酪氨酸形成两个氢键而使酶与水分子形成的两个氢键断裂。
- 变种酶 Phe(34) 与酪氨酸仅生成一个氢键, 但仅使变种酶与水分子形成的一个氢键断裂。
- 野生型酶与苯丙氨酸不形成氢键并失去了酶与水分子间的两个氢键而导致酶与底物之间存在部分去溶剂化了的电荷。

reductase) 的定位突变

此酶广泛存在于各种组织及微生物中, 它催化 7,8-二氢叶酸 (FH₂) 在第 5,6 位上加氢还原而成 5,6,7,8-四氢叶酸 (FH₄) 的反应, 此反应需 NADPH 参与 H 的传递:



四氢叶酸与机体代谢有广泛联系, 特别是在胸腺嘧啶核苷酸生物合成过程中, 四氢叶酸被氧化成二氢叶酸。因此, 如果在一个迅速增殖的细胞中, 阻断了二氢叶酸还原酶催化的二氢叶酸变回到四氢叶酸的还原反应, 那么就会导致四氢叶酸池的耗尽, 因而会使 DNA 合成停止并导致细胞死亡。二氢叶酸还原酶对各种合成的叶酸类似物所引起的抑制作用特别敏感。因此二氢叶酸还原酶已是许多药物作用的靶子。特别是白血病和其它癌症以及某些细菌和原生动物感染的疾病, 用叶酸类似物如氨甲蝶呤 (methotrexate)、三甲氧苄二氮嘧啶 (trimethoprim) 以及嘧啶甲胺 (pyrimethamine) 等

进行化疗是有效的。

二氢叶酸还原酶是一种小分子蛋白质，大肠杆菌、奶酪乳酸杆菌和鸡的二氢叶酸还原酶的X射线晶体结构测定表明^[13-16]，其氨基酸顺序仅有大约25%是相同的。但其肽链骨架的折叠方式是高度保守的，酶-底物作用的部位约有一半是保守的，还有几个不直接与底物或辅酶相互作用的残基也是保守的。为了弄清楚酶的作用机理及肽链折叠的问题，美国一组科学家进行了以下试验^[17]。

实验一是将 Asp(27) 改变成 Asn(27)。Asp(27) 存在于所有细菌的此酶中，而在脊椎动物的酶中此位置为 Glu。晶体结构表明(图4)，Asp(27) 埋藏在酶分子表面之下而与外部溶剂隔开，它与2,4-二氨基杂环类抑制剂例如氨甲蝶呤(因而也会与底物二氢叶酸的蝶啶环)形成一个盐键。所以 Asp(27) 的功能可能是

作为最终的质子供体并提供一个带负电荷的羧酸根反离子而与带正电荷的蝶啶环形成氢键以稳定过渡态。作者将 Asp(27) 改变成 Asn(27)，以除去 Asp 的作为可能的质子供体和带负电荷的反离子的侧链，而又不致于破坏催化中心的几何关系。实验结果表明，变种酶 Asn(27) 的比活性降低了。这强烈地支持了上述有关 Asn(27) 在催化过程中所起作用的假说，同时，尚保留了一些残余活性的事实表明了对于稳定过渡态和供给质子的作用来说，Asp(27) 不是唯一因素。

实验二是在分子中引入一个二硫键，而任何天然二氢叶酸还原酶分子内本不存在二硫键。由晶体结构(图4)可以断定 Pro(39) 是插入新的二硫桥的合适位置，它位于一个伸展的β链的起点而又正对着肽链另一片段的 Cys(85)，假若能将 Pro(39) 改变成 Cys(39)，那

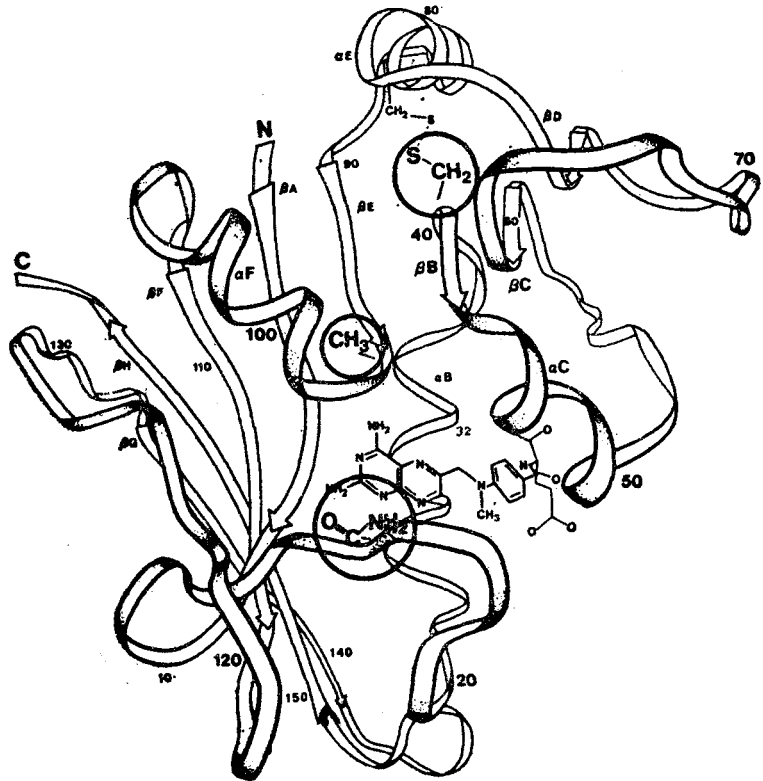


图4 大肠杆菌二氢叶酸还原酶分子结构示意图

图中标出了每隔10个残基的近似位置以及α螺旋和β链，抑制剂氨甲蝶呤分子结合在酶的活性位置中，辅酶NADPH未绘出。图中三个圆圈表明了三个变种酶的突变位置：顶部的为将Pro(39)改为Cys(39)，中部的为将Gly(95)改为Ala(95)，下部的为将Asp(27)改为Asn(27)。

么 Cys(39) 可以与 Cys(85) 氧化形成一个新的二硫键。而且这个残基离底物或辅酶结合位置都较远, 不会破坏酶的活性。作者先考察了蛋白质数据库中四个高度精修过的蛋白质结构中的 11 个二硫键, 并根据此数据建造了一个简单的模型。模型表明 Pro(39) 的 C_α 和 Cys(85) 的 C_α 之间的距离为 $6.0 \text{ \AA}$, 理论上这是可以形成二硫键的(二硫键的 $C_\alpha-C'_\alpha$ 平均距离为 $4.4-6.8 \text{ \AA}$), 而且在几何学上无论是右手型二硫键 ($C_\alpha-C'_\alpha$ 平均距离为 $5.2 \text{ \AA}$) 或左手型二硫键 ($C_\alpha-C'_\alpha$ 平均距离为 $6.1 \text{ \AA}$) 都是可能形成的。况且没有另一些基团与它们相近到足以干扰这样一个二硫桥的形成。实验结果表明, 在还原状态下即形成变种酶 Cys(39)-SH, 酶的活性似乎不受影响, 而在氧化状态下即形成了变种酶 Cys(39)-S-S-Cys(85), 酶活性则大大降低。对热稳定性影响的数据, 尚未见报道。

实验三是将 Gly(95) 改变成 Ala(95)。已知上述三种来源的二氢叶酸脱氢酶都含有 Gly(95)-Gly(96) 残基对, 二者之间以一个不常见的顺式肽键相连接而形成一个 β 凸起结构, 并形成一个十分短的环, 将两种不同构象的 β_E 与 α_F 连接起来(见图 4), 因而它们很可能是起某种类型的构象开关的作用的。作者预料, 假若这个特别小的局部几何关系被破坏的话, 则可能有碍分子的功能作用。而若将 Gly(95) 改成 Ala(95), 对整个肽段来说只会是一个小的变化, 不会改变肽段的几何学, 但会破坏 Gly(95)-Gly(96) 顺式肽的局部构象。实验结果表明, 正如预期那样, Ala(95) 代替 Gly(95) 使二氢叶酸还原酶完全失活。

三、T4 溶菌酶 (T4 lysozyme) 的定位突变

1984 年报道了将二硫键引入 T4 溶菌酶中, 提高了酶的热稳定性^[18]。目前理论上尚不清楚二硫键对于蛋白质天然结构的稳定性以及肽链折叠和去折叠方式的影响, 但是在球蛋白中, 除了其它影响构象变化的因素如疏水相互作用和氢键等以外, 二硫键提供了构象的稳定性是无疑的。T4 溶菌酶是大肠杆菌被噬菌

体感染后在大肠杆菌细胞中产生的, 它的功能是破坏细菌的细胞壁, 而将复制的噬菌体颗粒释放出来。T4 溶菌酶的分子量为 18,700, 由 164 个氨基酸残基组成, 其结构与蛋清溶菌酶具有同源性, 但 T4 溶菌酶中只有两个未生成二硫键的半胱氨酸残基即 Cys(54) 和 Cys(97), 而蛋清溶菌酶则含有 4 个二硫键。二者的晶体结构除了都折叠成两个结构域外, 几乎没有什么相似性^[19-22]。作者观察了在野生型 T4 溶菌酶在一级结构顺序中虽然分开但侧链的 C_β 在晶体结构中却十分靠近的(在 $5.5 \text{ \AA}$ 之内)氨基酸残基, 然后用计算机三维图象显示仪在屏幕上在这些残基处建造二硫键的模拟模型。有几个残基看来是特别符合标准的, 其中之一是在位置 3 和 97 处(图 5), 若各为一个半胱氨酸残基, 则模拟的二硫键的各项结构参数为: $\chi_1 = 117^\circ$; $\chi_2 = 25^\circ$; $\chi_3 = 134^\circ$; $\chi'_2 = 43^\circ$; $\chi'_1 = -162^\circ$; $C_\alpha-C'_\alpha = 5.71 \text{ \AA}$ 以及 $C_\beta-C'_\beta = 4.49 \text{ \AA}$, 完全可能形成一个 Cys(3)-Cys(97) 二硫键。由于野生型 T4 溶菌酶的残基 97 已是一个半胱氨酸, 所以只需将位置 3 处的 Ile(3) 用定位突变方法改成一个 Cys(3) 即可。实验结果表明, 无论是仅将 Ile(3) 改成 Cys(3), 但不与 Cys(97) 形成二硫键, 或是进一步使二者氧化形成 Cys(3)-Cys(97) 二硫键, 对酶的活性都无重大影响, 但是后者的热稳定性大大加强



图 5 在计算机三维图象显示仪上模拟的 T4 溶菌酶变种 Ile(3)→Cys(3) 的 C_α 骨架分子模型

N 和 C 分别表示肽链的氨基末端和羧基末端, 三个半胱氨酸表示为 $\bullet$, 活性中心表示为 $*$, Cys(3) 与 Cys(97) 之间模拟的二硫键以 $=$ 表示。

了,而前者与野生型酶基本相同。

以上实验表明,二硫键被引入到蛋白质中来,能保留活性而又加强了稳定性,这不仅对研究蛋白质折迭和结构与功能的关系具有重要意义,而且具有应用价值。

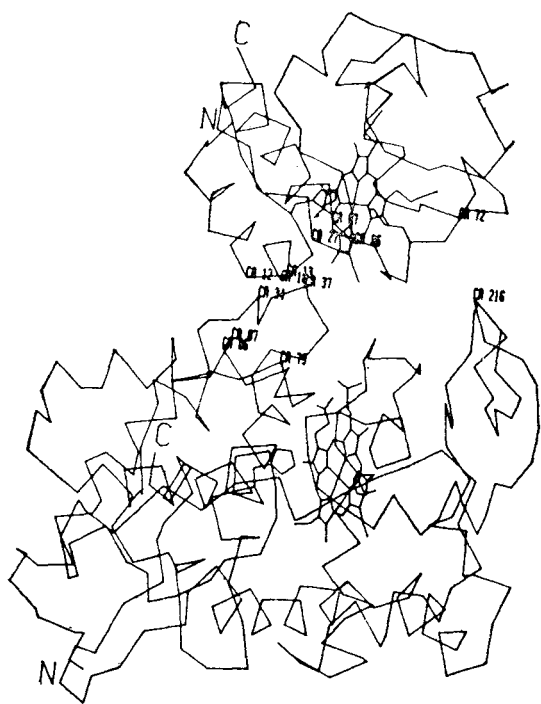
四、细胞色素 c(Cytochrome c) 的定位突变

1985 年报道了加拿大科学家对细胞色素 c 进行定位突变以研究某些氨基酸残基在电子传递中的作用^[23]。酵母 iso-1-细胞色素 c 的 Phe(87) (在马心和东方狐鲑的细胞色素 c 中为 Phe(82)) 在系统发生上是保守的而且靠近蛋白质的表面并以范德瓦力与血红素基团接触,因而可能参与了细胞色素 c 与细胞色素 c 过氧化物酶之间的电子传递及控制血红素周围环境的极性^[24,25](图 6)。由于 Phe 残基不易进行化学修饰,至今尚没有研究 Phe(87) 的功能

的直接方法,所以作者选择了 Phe(87) 作为定位突变的第一个靶子,将 Phe(87) 改成 Ser(87)、Tyr(87) 或 Gly(87)。实验结果表明,细胞色素 c 的三个变种 Ser(87)、Tyr(87) 及 Gly(87) 在细胞色素 c 过氧化物酶分析中还保留了野生型活性的 20—70%,而还原电位降低了 50mV。因此表明野生型的 Phe(87) 对于细胞色素 c 与细胞色素 c 过氧化物酶或细胞色素氧化酶之间的电子转移来说并不是绝对必需的。不过它与还原电位还是有关的。

五、胰蛋白酶 (Trypsin) 的定位突变

胰蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶类。X 射线晶体学分析表明丝氨酸蛋白酶家族中的各种酶具有相似的三维结构,特别是具有相同的催化机理,它们都有一个底物结合的活性口袋,其中 Ser, His 和 Asp 三个残基形成电荷传递系统。这个家族中的各种酶所呈现出的不同的酶活性和不同的底物特异性是由于在活性中心中用于结合底物的氨基酸残基不相同。1985 年报道了美国一组科学家对鼠胰蛋白酶进行的定位突变实验^[26]。虽然鼠胰蛋白酶的三维结构未测定,但它的一级结构与牛胰蛋白酶有 74% 相同,而后的晶体结构已经知道^[27]。对酶活性或特异性起关键作用的氨基酸残基即 His(57)、Asp(102) 和 Ser(195) 以及 Asp(189) 在鼠和牛的胰蛋白酶中都是保守的。在底物结合口袋底部的 Asp(189) 被认为是使胰蛋白酶对 Arg 和 Lys 具有特异性的氨基酸残基,即底物中 Arg 或 Lys 带正电荷的长侧链伸入口袋中与带负电荷的 Asp(189) 结合,而使底物中被水解的肽键以正确的取向对着酶的活性中心;在 216 和 226 位上的 Gly 也是保守的,它们使得胰蛋白酶能允许大的氨基酸侧链如 Arg 和 Lys 进入到口袋中,而在弹性蛋白酶结构中则为 Val(216) 和 Thr(226),因而限制了其底物特异性为小的疏水残基。因此作者选择了 Gly(216) 和 Gly(226) 作为定位突变实验的第一批靶子,来研究胰蛋白酶底物特异性的结构基础,并预言改变这些残基会使胰蛋白酶的结合作用发生变化。他们将 Gly(216) 改成 Ala(216); 将



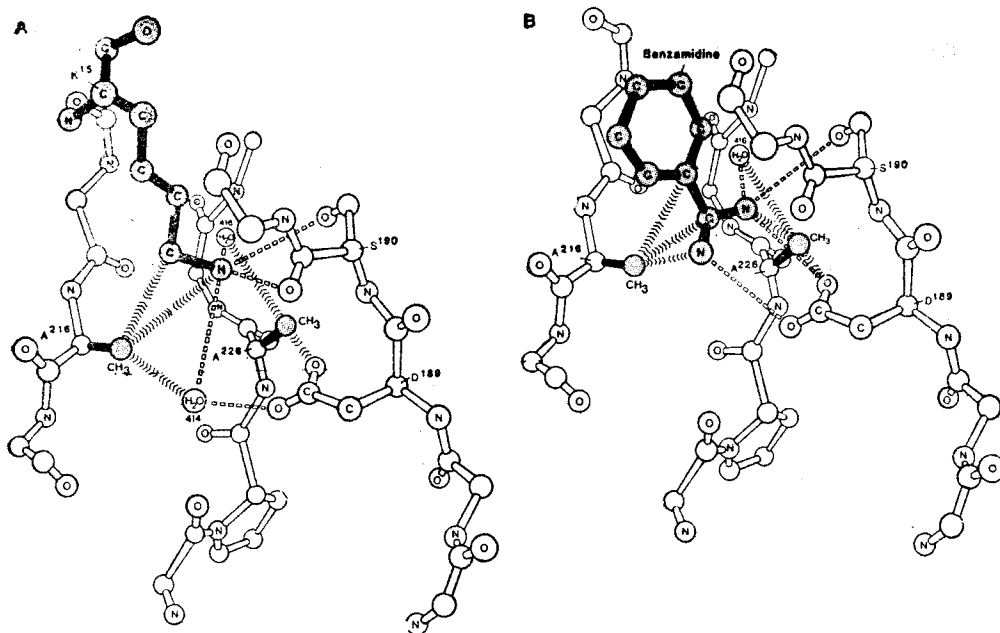


图7 变种胰蛋白酶的底物结合口袋

图中示出了残基 189—191,214—217 以及 224—227 三个肽段骨架,并以■表示 Ala(216)、Ala(226)以及抑制剂,□□□代表氢键,»»»代表选择的短距离 ($<3.8\text{\AA}$), A、D、S 和 K 分别为 Ala、Asp、Ser、和 Lys 的一字母符号。(A)胰脏胰蛋白酶抑制剂的 Lys-15 结合于胰蛋白酶的底物结合口袋中;(B)苯甲胺结合在底物结合口袋中。

Gly (226) 改成 Ala (226); 以及将 Gly (216) 和 Gly(226) 同时改变成 Ala, 即均以甲基取代 H, 并用牛胰蛋白酶与竞争性抑制剂胰脏胰蛋白酶抑制剂 (它的 Lys-15 残基伸入到胰蛋白酶的活性口袋中) 或苯甲胺 (它含有胍基, 是精氨酸的类似物) 的复合物晶体结构模型^[28,29] 分别作为鼠胰蛋白酶与特异性底物 Lys 和 Arg 形成的复合物模型 (图 7)。由模型可以看到用 Ala 取代 Gly 后, 在底物与酶的特异性口袋之间的界面处加进了一个甲基会引起酶与底物复合物的三级结构发生小的变化, 因而会引起活性和特异性发生变化。作者预言: ALa(216) 变种酶会对 Arg 的特异性大于对 lys 的, 因为 Ala(216) 的甲基会大大阻碍 Lys 底物的结合, 而 Arg 的结合所涉及的原子是不被这些加进的甲基所妨碍的, 而且被假定为 Ala(216) 所取代的水分子(414)是不直接参与 Arg 的结合的, 但水分子(414)被甲基置换后会引起 Lys 在口袋中的位置发生稍许扭变; 相反 Ala(226) 变种酶则会对 Lys 的特异性加强, 因为此情况下底物

Arg 在特异性口袋中会相当拥挤。

实验结果与预期的一致, 不过尽管上述两个变种酶分别对底物的亲和性增加了, 但催化活性是低的; 双突变的变种酶 Ala (216, 226) 也表现出对 Arg 的特异性大于对 Lys, 但实际上丧失了活性。作者将上述现象解释为: 底物相对于上述三个变种的催化部位来说改变了位置以致于易断裂的键不是最合适地排列着的, 而且可以推测, 在双突变的酶中比在单突变的酶中底物与催化位置的定向扭变更大。

六、胰岛素原 (Proinsulin) 的定位突变

1981 年报道了用人工合成的由 6 个残基组成的所谓“小 C 肽”取代人胰岛素原的由 35 个残基组成的正常 C 肽的定位突变实验^[30]。胰岛素在体内是首先以单条肽链的前体被合成的, 之后由特定的酶切除其 N-末端的信号肽, 产生胰岛素原。人的胰岛素原是由 N-末端 30 个残基的 B 链、C-末端 21 个残基的 A 链以及连接 B 链与 A 链的 35 个残基的 C 肽组成的。在酶的作用下, C 肽被切除, 生成有活性的具有

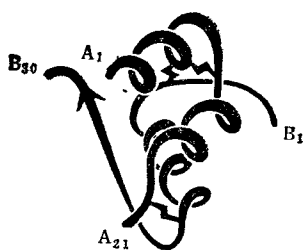


图 8 胰岛素的三维结构示意图

A 和 B 两条肽链的胰岛素，二链间以两个二硫键相连接。胰岛素的晶体结构^[31]表明，一个比 35 个残基短得多的小肽就可以将 B 链的 C 末端与 A 链的 N-末端连接起来，使肽链仍然有可能适当地折叠(图 8)。作者用化学方法合成了由 Arg-Arg-Gly-Ser-Lys-Arg 组成的小 C 肽，并用遗传工程的方法置换了正常 C 肽。在小 C 肽的两端分别设计为 Arg-Arg 和 Lys-Arg 是为了使小 C 肽可被酶切除。实验结果表明，含有小 C 肽的人胰岛素原具有与胰岛素原类似物相同的高压色层和放射免疫分析性质。

虽然小 C 肽胰岛素原并不一定是生产人胰岛素的有效方法，但它对于研究蛋白质的折叠和研究胰岛素原的结构与功能的关系以及可能还对于临床应用具有一定的价值。

结 束 语

上述近几年来蛋白质工程根据详细晶体结构资料进行设计而获得成功的例子已显示出蛋白质结晶学的重大作用。至于正在进行中的工作还有许多。如将很有前途的抗癌药物人白细胞间质素-2 (IL-2) 分子中的三个半胱氨酸 Cys(58), Cys(105) 及 Cys(125) 换成丝氨酸，防止形成二硫键以消除蛋白质聚合成较大单元的倾向，增加 IL-2 的生物活性来研究 IL-2 与获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 以及某些癌症作斗争的能力；将 β 干扰素 Cys(17) 改为 Ser(17)，以试验它的稳定性及对治疗疱疹病毒感染的有效性；将鼠羧肽酶 A 的 Tyr(248) 改为 Phe(248)；将二氢叶酸还原酶的 Glu(139) 改为 Lys(139)；将 λ 434 阻遏蛋白的 Tyr(85) 和 Tyr(88) 改为 Cys(85) 和

Cys(88)，产生二硫键连接的稳定二聚体，能与操纵子结合更为紧密；以及改变葡萄糖异构酶的 pH 稳定性等等。目前已有 150 多种蛋白质的详细晶体结构被测定，其中很多可作为蛋白质工程的对象。生物化学工作者可与蛋白质结晶学家密切合作，充分利用这些数据和知识，开展今后的工作，前景是很好的。

目前，我国已有条件并正在着手进行定位突变蛋白质工程研究，如胰岛素、胰蛋白酶、胰蛋白酶抑制剂以及 α -高温淀粉酶等项目都将开始。可以预期，在各学科的密切配合下，定能获得成功。

参 考 文 献

- [1] Sigal, I. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7157, 1982.
- [2] Dalbadie-McFarland, G. et al.: *ibid.*, **79**, 6409, 1982.
- [3] Estell, D. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 6518, 1985.
- [4] Courtney, M. et al.: *Nature*, **313**, 149, 1985.
- [5] Winter, G. et al.: *ibid.*, **299**, 756, 1982.
- [6] Irwin, M. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **105**, 577, 1976.
- [7] Bhat, T. N. et al.: *ibid.*, **158**, 699, 1982.
- [8] Rubin, J. et al.: *ibid.*, **145**, 489, 1981.
- [9] Monteilhet, C. et al.: *ibid.*, **122**, 407, 1978.
- [10] Wilkinson, A. J. et al.: *Biochemistry*, **22**, 3581, 1983.
- [11] Wilkinson, A. J. et al.: *Nature*, **307**, 187, 1984.
- [12] Fersht, A. R. et al.: *ibid.*, **314**, 235, 1985.
- [13] Matthews, D. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 4144, 1979.
- [14] Volz, K. W. et al.: *ibid.*, **257**, 2528, 1982.
- [15] Bolin, J. T. et al.: *ibid.*, **257**, 13650, 1982.
- [16] Filman, D. J. et al.: *ibid.*, **257**, 13663, 1982.
- [17] Villafranca, J. E. et al.: *Science*, **222**, 782, 1983.
- [18] Perry, L. J. et al.: *ibid.*, **226**, 555, 1984.
- [19] Matthews, B. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4178, 1974.
- [20] Rossmann, M. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, **105**, 75, 1976.
- [21] Remington, S. J. et al.: *ibid.*, **118**, 81, 1978.
- [22] Matthews, B. W. et al.: *ibid.*, **147**, 545, 1981.
- [23] Pielak, G. J. et al.: *Nature*, **313**, 152, 1985.
- [24] Takano, T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **153**, 79, 1981.
- [25] Poulos, T. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 10322, 1980.
- [26] Craik, C. S. et al.: *Science*, **228**, 291, 1985.
- [27] Stroud, R. M. et al.: *J. Mol. Biol.*, **83**, 185, 1974.
- [28] Bode, W. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **144**, 185, 1984.
- [29] Bode, W. et al.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 593, 1975.
- [30] Wetzel, R. et al.: *Gene*, **16**, 63, 1981.
- [31] Blundell, T. et al.: *Adv. Protein Chem.*, **26**, 279, 1972.

[本文于 1986 年 9 月 26 日收到]