

麦胚凝集素的结构及与专一性糖的相互作用

董素才 李建新 杨志铭

(第二军医大学生化教研室)

提 要

麦胚凝集素 (WGA) 分子由两个相同原体组成。WGA II 的原体为一条 171 个氨基酸残基的多肽链,肽链可分成四段,各段氨基酸顺序呈明显同系现象,折叠成形态相似的结构域。WGA 的高级结构有明显对称性。二原体交界处有两对糖结合部位,能借氢键和疏水相互作用特异地结合 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰神经氨酸及其衍生物和寡聚糖。WGA 与某些细胞上依赖糖的受体作用引起生物效应,其特殊的空间结构是重要的。

凝集素是一类能与专一性糖结合,促使细胞凝集的单一蛋白质或糖蛋白。麦胚凝集素 (WGA) 因来自麦胚得名。WGA 具有细胞毒性、抗微生物等多种生物效应,是当前研究最多,应用最广的凝集素之一。近年来,WGA 分子结构研究进展很快,不仅测定了它的一级结构,其空间结构及其专一性糖与糖结合部位结合的机理也得到了较深入的研究。

WGA 分子量均在 14,000—20,000^[2] 综合沉降分析和电泳数据,一般认为 WGA 在 pH < 2.2 时解离成两个相同原体 (亚基),其分子量是 16,000—18,000,在 pH 3.5—7.4 时两个原体聚合成完整的 WGA 分子,分子量为 31,400—36,800^[3,4,5]。

表 1 WGA 的氨基酸组成^[1]

氨基酸	WGA I*	WGA II*	WGA III*
天冬氨酸	14.9	15.1	15.1
苏氨酸	5.0	4.0	4.0
丝氨酸	13.7	13.5	13.5
谷氨酸	16.4	16.0	15.8
脯氨酸	5.2	6.2	6.0
甘氨酸	41.0	40.5	40.5
丙氨酸	10.1	9.4	9.8
半胱氨酸	37.7	36.6	38.8
缬氨酸	0.9	1.1	1.0
蛋氨酸	2.0	2.0	2.0
异亮氨酸	2.1	2.1	2.1
酪氨酸	8.0	7.4	7.6
苯丙氨酸	3.3	2.9	2.9
组氨酸	0.0	2.0	2.0
赖氨酸	6.8	7.4	7.4
精氨酸	4.0	3.4	4.0
色氨酸	3.2	2.9	3.0
亮氨酸	4.0	4.0	4.0

* 单位 Mol/Mol, WGA 分子量按 35000 计算。

一、WGA 的化学组成

从小麦胚芽可以分离到三种性质相近的凝集素成分,即同工麦胚凝集素 (WGA I WGA II 和 WGA III)。同工 WGA 的氨基酸组成相近^[1-3](表 1),分子中甘氨酸和半胱氨酸含量很高^[3],极性氨基酸的含量很低,不含糖。对-氯(高)汞苯甲酸酯测得 WGA 只有微量游离巯基。同工 WGA 化学组成的最大区别是 WGA I 没有组氨酸残基^[4]。

二、WGA 的分子量

沉降分析表明,在 pH 3.5—7.4 时 WGA 分子量范围为 31,400—36,800, pH < 2.2 分子量为 16,000—18,000。在 pH 7.0 的 6mol/L 盐酸胍溶液中无论是否有 0.1mol/L 巯基乙醇存在,

三、WGA 的一级结构

一般条件下, WGA 分子由二个相同原体组成。Wright 等用化学方法测定了 WGA II 原体的氨基酸序列^[6], 这是一条 171 个氨基酸残基的肽链。若将这条肽链分成四段 (A: 1—43 残基、B: 44—86 残基、C: 87—129 残基和 D: 130—171 残基), 各段间存在明显的同系现象 (图 1)。每段有八个半胱氨酸残基, A 段中, 3 和 18、12 和 24、17 和 31、35 和 40 位半胱氨酸共形成四条二硫键。其它各段二硫键的位置与 A 段相对应。WGA II 的两个组氨酸位于完

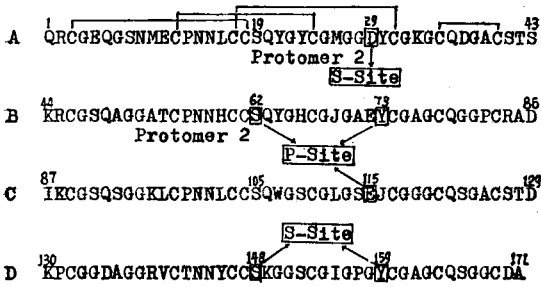


图 1 WGA II 的氨基酸序列^[8]

氨基酸用单字符表示, 序列分成四段 (ABCD), D 为 42 个残基, 其余均 43 个残基, 他们在空间结构上为四个结构域。“□”内是糖结合部位的氨基酸残基符号。“C—C”为二硫键。P-site (P 位) 为第一结合部位, S-Site (S 位) 为第二结合部位。

整肽链的 59 和 66 位, X-射线衍射结果表明 WGA I 的第 59 和 66 位分别可能是丝氨酸(或谷氨酰胺)和酪氨酸(或苯丙氨酸)^[7]。

四、WGA 的空间结构

WGA 原体肽链的四段各扭曲折叠成四个形态十分相似的结构域 (A B C D)^[8-10]。其中没有规则的 α -螺旋和 β -褶皱, 只有扭曲的 α -螺旋和靠三个相邻残基形成的发夹状结构。四条二硫键对所在结构域起维系作用。

WGA 两个原体接触面大, 互补性高, 结合十分紧密, 溶液中只有在极端条件下才解离。

完整的 WGA 分子可被划为二个结构单元, 每单元包括四个结构域 ($A_{II}B_{II}C_{II}D_{II}$) 和 ($A_I B_I C_I D_I$)。其中 $A_{II}B_{II}$ 对 $C_I D_I$ 或 $C_{II}D_{II}$ 对

$A_I B_I$ 以一个与 α -结晶轴平行的准 2-折 (2-fold) 轴呈准对称关系。 A_{II} 和 D_I 、 B_{II} 和 C_I 、 A_I 和 D_{II} 、 B_I 和 C_{II} 结构域接触处各有一个糖结合部位, 根据在晶体状态能否结合 NeuNAc 分为第一结合部位 (P 位) 和第二结合部位 (S 位) (见图 2)。P 位和 S 位彼此独立, 二者由亲水氨基酸残基隔开^[8]。

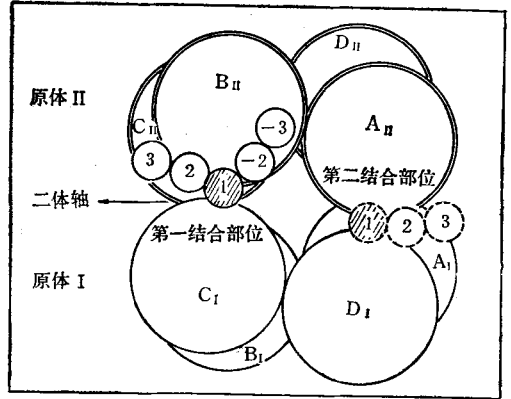


图 2 WGA 结构示意图^[10]

$A_I B_I C_I D_I$ 分别为原体 I 的四个结构域, $A_{II} B_{II} C_{II} D_{II}$ 分别为原体 II 的四个结构域。①②③④各表示一个结合亚位。第一结合部位 (P 位) 有 5 个亚位涉及 B 和 C 结构域, 第二结合部位 (S 位) 有三个亚位涉及 A 和 D 结构域。一个 WGA 分子有二个 P 位和二 S 位即四个结合部位。

在每个结构单元可观察到二种局部准对称性。1. 原体交接处 P 位周围的部分结构与 S 位周围部分结构的准对称性。如 P 位, B 结构域和另一原体 C 结构域的对位残基 Phe 69_{II} 和 Leu 112_I 靠主链氢键紧密结合, 对称于 S 位是 A 和 D 结构域相应残基 Met 26_{II} 和 Ile 155_I 的相互作用。2. 各糖结合部位在准 2-折轴周围的一些残基具有准对称性。如 P 位 Tyr 73_{II}、Glu 115_I、Ser 62_{II}、Tyr 64_{II} 和 His 66_{II} 以准 2-折轴对应于 Phe 116_I、Glu 72_{II}、Ser 105_I、Trp 107_I 和 Ser 109_I。S 位, Tyr 159_I、Asp 29_{II}、Ser 148_I 和 Ser 152_I 同样地以准 2-折轴与 Tyr 30_{II}、Gly 158_I、Ser 19_{II} 和 Tyr 23_{II} 对称 (图 3)。

五、WGA 结合糖的专一性

1. 种类 ①N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和

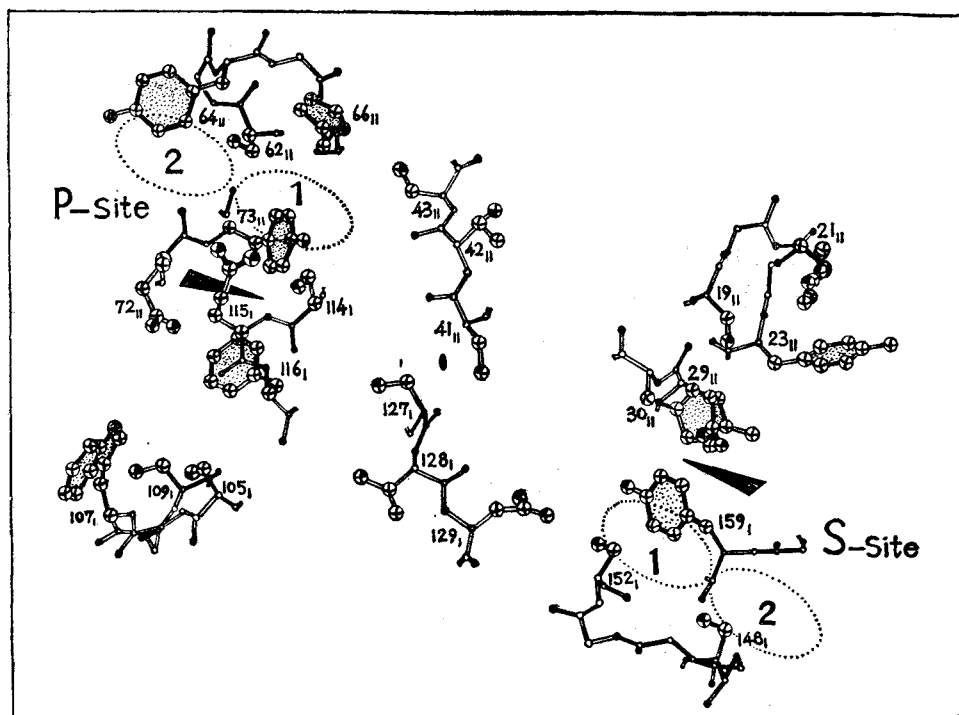


图3 原体相交处糖结合部分周围亲水和芳香氨基酸^[8]残基的分布。

图上表示联系 A₁₁B₁₁ 与 C₁D₁ 的 2-折轴以及联系 P 位和 S 位的 2-折轴。

⊗→C, ⊙→O, ⊗→N。数字如 43 表示残基所在完整肽链上的定位,角标 I 和 II 表示原体 I 和 II。虚线椭圆中的 1 和 2 代表糖结合部位的亚位。

N-乙酰神经氨酸 (NeuNAc)^[3]。②它们的某些衍生物如 GlcNAc 的甲苷和苯苷, NeuNAc 的甲酯等。③ GlcNAc 的低聚物如 NN'-二乙酰壳二糖、NN'-三乙酰壳三糖等^[11-13]。④非还原端是 NeuNAc 的寡糖如 NeuNAc 2 α →3 Gal 1 β →4 GlcNAc 等。

2. 苷键和配基 研究表明^[4]; GlcNAc 的 α 和 β 甲苷异构体对 WGA 的血凝抑制作用均为 GlcNAc 的三倍; α -D-乙酰葡萄糖胺的苯苷和甲苷的血凝抑制作用相同,所以, WGA 对糖结合无明显的苷键构型专一性,而且,配基专一性相对地也不重要。但例外的是 GlcNAc-Asn 对 WGA 的血凝活性没有抑制作用,这可能是由于 Asn 的氨基和羧基阻碍 WGA 和 GlcNAc 结合所致。

3. 糖的构型 WGA 要求非还原端糖基的 2 位(或 NeuNAc 的 5 位)必须是平展的非离子

基团如乙酰氨基,且构型与 D-葡萄糖 2 位羟基的构型一致;3 位(或 NeuNAc 的 4 位)为游离羟基。若被甲氧基或 1-羧乙氧基取代(如 $\alpha\beta$ -D-2-N-乙酰胞壁酸甲苷)则失去对 WGA 的血凝抑制作用;4、6 位羟基被甲氧基取代不影响其与 WGA 的结合,但 4 位构型必须与 D-葡萄糖 4 位羟基构型一致^[4]。N-乙酰神经氨酸与半乳糖以 $\alpha(2,3)$ 或 $\alpha(2,6)$ 苷键连接的二糖以及 GlcNAc 以 $\beta 1$ →4 形成的低聚糖均与 WGA 结合^[3]。

六、WGA 的糖结合部位及与专一性糖的结合

根据半抗原抑制实验结果,有人提出 WGA 的糖结合部位有亚位存在^[4]。NMR(核磁共振)和 X-射线衍射结果支持这个观点,并倾向把结合部位分成 5 个亚位^[8,10](图 4)。

非还原糖末端 GlcNAc 和 NeuNAc 结合在 P 位亚位 1, 其乙酰氨基与 B 和 C 结构域发生联系。乙酰氨基的 CH₃ 以范德华力与 73_{II} 酪氨酸相互作用, NH 朝向残基 Glu 115_I 的侧链羧基, 形成氢键。GlcNAc 的 3 位 (或 NeuNAc 的 4 位)^[4] 羟基与 73_{II} 酪氨酸侧链羟基亚位: -3 -2 1 2 3

GlcNAc1β→4GlcNAc1β→4GlcNAc
GlcNAc1β→4GlcNAc
Gal1β→6GlcNAc-p-NO₂ph
NAcGlc4←1βGal3←2αNeuNAc

图 4 几种糖在 P 位结合的示意图^[10]

二糖 Galβ1→6GlcNAc-p-NO₂ph, (GlcNAc)₂, 三糖 (GlcNAc)₃, NeuNAc2→3αGal1β→4GlcNAc。它们的 GlcNAc 或 NeuNAc 基与亚位 1 结合, 对 WGA 与低聚糖的结合起十分重要作用。2 和 3 亚位的作用较小。具有末端唾液酸的低聚糖在 1 亚位的结合与聚 N-乙酰葡萄糖胺结合的方向相反。(p-NO₂ph 为对硝基苯基)

基相距 2.62 Å, 形成氢键^[8,10], 这可能是 3 位羟基被甲氧基取代丧失抑制作用的原因之一, GlcNAc 的 4 位羟基不与氨基酸残基作用, 可以被其它基团, 甚至糖基取代, 但 C—O 键的取向很重要, 如果是半乳糖 4 位羟基构型, 在空间上与 66_{II} 组氨酸侧链拥挤, 将妨碍它们的结合。NeuNAc 不与 S 位结合, GlcNAc 结合在 S 位与 Tyr 159_I, Ser 148_I 和 Asp 29_{II} 发生联系, 其联系方式和 P 位相应残基的联系方式相似。另外, P 位 His 66_{II} 的咪唑环与 Tyr 64_{II} 侧链处于同一平面, 分别在亚位 1 和 2 与 (GlcNAc)₂ 吡喃环以范德华力相互作用。S 位上与之相应的残基是 Ser 152_I 和 Gly 150_{II}。Ser 152_I 与糖吡喃环相互联系, 但 Gly 150_{II} 不与配基作用^[8]。

WGA 与配基结合动力学支持关于存在多个结合亚位的观点^[14], 并提出 WGA 与配体结合符合连续模型(Series Model), 就是凝集素与配体呈双分子结合, 肽链发生构象变化引起单分子重排。WGA 与配体呈双分子结合后的单分子重排过程就是配体在结合亚位上的滑动。

NMR 和动力学结果表明在水溶液中 NeuNAc 可以与 P 和 S 两个结合部位结合^[14,15]。晶体学结果表明唾液酸甲酯可以结合 P 位和 S

位, 但唾液酸只结合 P 位。推测 WGA 晶体的 S 位的带电情况, 妨碍了 NeuNAc 的结合。

WGA 与某些细胞上的专一性糖(受体)结合能引起生物效应。例如, 其特异地结合绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 菌丝中隔区及顶端的壳多糖, 阻止³H-醋酸进入菌丝体, 抑制壳多糖的合成、菌丝伸长及芽孢发芽。WGA 在麦胚中含量较高, 推测在小麦种子吸水发芽以及籽苗早期, 抑制含壳多糖的植物病原菌的生长^[16]。在体外, WGA 与血小板上的专一性糖(受体)结合, 能引起血小板 20KDa 和 47KDa 多肽的 Ser 和 Thr 残基磷酸化, 导致血小板形态改变^[17]; 与红细胞膜血型糖蛋白 A 上 NeuNAc 和 GlcNAc 结合, 封闭并阻止恶性疟疾裂殖子的识别附着, 抑制其入侵红细胞^[18]。总之, WGA 分子由两个相同亚基组成, 每个亚基是一条肽链绕成的四个结构域。全部四个结合部位均位于亚基的交界处。在水溶液中这四个结合部位对专一性糖的结合是等同的。WGA 分子的局部准对称性与其一级结构的内部同系现象有关。WGA 特殊的空间结构是其结合专一性糖的基础, 也是其发挥生物效应的基础。

参 考 文 献

- [1] Robert, H. B. et al.: *Biochem.*, 14(18), 4093, 1975.
- [2] Ganguly, P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 759, 108, 1983.
- [3] Allen, A. K. et al.: *Biochem. J.*, 131, 155, 1973.
- [4] Wright, C. S.: *J. Mol. Biol.*, 139, 53, 1980.
- [5] Carver, J. P. et al.: *Biochem.*, 21(13), 3050, 1982.
- [6] Wright, C. S. et al.: *Biochem.*, 23, 280, 1984.
- [7] Wright, C. S.: *J. Mol. Biol.*, 145, 453, 1981.
- [8] Wright, C. S.: *J. Mol. Biol.*, 178, 91, 1984.
- [9] Wright, C. S. et al.: *J. Mol. Biol.*, 111, 439, 1977.
- [10] Wright, C. S.: *J. Mol. Biol.*, 141, 267, 1980.
- [11] Bhavanadan, V. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 4000, 1979.
- [12] Monsigny, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 104, 147, 1980.
- [13] Peters, B. P. et al.: *Biochem.*, 18, 5505, 1979.
- [14] Clegg, B. M. et al.: *Biochem.*, 22(20), 4797, 1983.
- [15] Kronis, K. B. et al.: *Biochem.*, 24(4), 826, 1985.
- [16] Mirelman, D. et al.: *Nature*, 256, 414, 1975.
- [17] Ganguly, C. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132(1), 313, 1985.
- [18] 李建新等: 《寄生虫学与寄生虫病杂志》, 4(2), 86, 1986.

[本文于 1987 年 2 月 2 日收到]