

丝氨酸酶类活性中心的结构及其催化机制 分子轨道理论的研究

吴加金

(军事医学科学院基础所)

催化蛋白质水解的酶类中,很重要一类是丝氨酸蛋白酶类。它具有“催化三价基”(Catalytic triad)或称“电荷中继三价基”的活性中心。这三价基由丝氨酸,组氨酸和天门冬氨酸的侧链组成。

丝氨酸酶类的一级结构差别很大,但三维结构和折褶的构象却类似。如牛胰蛋白酶和糜蛋白酶的氨基酸序列中的等效位置仅有40%的残基相同。而与猪的弹性蛋白酶相比较,其等同性只占24%。但它们的折褶构形大略相同^[1]

丝氨酸酶类的三维结构的类似性导致其水解活性部位与催化作用的功能团之间的几何排列也具有类似性。虽然构成催化作用的残基在不同酶中的序号不同(如胰蛋白酶的活性中心由Ser-195—His-59—Asp-102^[2]的侧链组成,枯草杆菌蛋白酶由Ser-221—His-64—Asp-32^[3]组成),但它们的氨基酸空间排列却类似。

一、丝氨酸酶类的活性部位的结构特点

建立在对丝氨酸酶类的X射线晶格分析结果的基础上,Blow^[2]等以 α -糜蛋白酶的三维结构为基础,提出丝氨酸酶类中的“电荷中继系统”的催化机理。此系统由Ser-195、His-57和Asp-102的侧链之间的氢键组成。图1是电荷中继系统中部分原子位置的立体图。在这个系统中可见到有关原子之间相互联系及相对距离。Asp-102的羧基受以下几个氢键的约束,即Asp-102的O^{a1}(以下原子标号请看图6)与

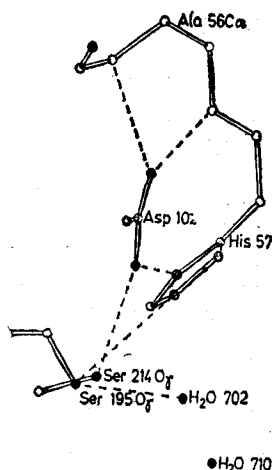


图1 电荷中继系统主要残基的排列^[4]

Ala-56的N(2.83 Å)和His-57的N(2.92 Å)构成氢键、Asp-102的O^{a2}和Ser-214的O^γ(2.82 Å)结成氢键。与His-57的N^{δ1}(2.90 Å)构成氢键,His-57的咪唑环的N^{δ2}与Ser-195的O^γ(3.16 Å)之间形成的氢键。在活性中心附近Ser-195的O^γ外有两个溶剂分子H₂O:一个为702H₂O,其OH距Ser-195的O^γ和His-57的N^{δ2}的距离分别为3.50 Å和4.05 Å。另一710H₂O其OH距702分子为4.42 Å。

酶的构象随pH值而改变。当它处在最大活性的pH值时,又很容易自身水解,为此常使酶与抑制剂结合,以减少自身分解。所以许多酶活性部位的X射线晶格图都是复合物,如DIP-Trypsin和BA-Trypsin等。

从图2可见,苯甲脒的阳离子和位于结合口袋底部的Asp-189的带负电的羧基相互作用,苯甲脒的N^[2]距羧基氧2.9 Å。苯甲脒被夹

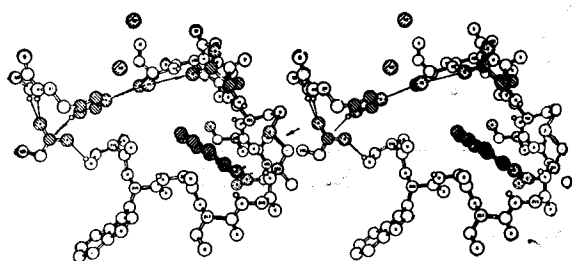


图2 在 Ba-Trypsin 中活性部位及结合口袋周围的结构^[1]

● 苯甲脒及溶剂水分子 ● 胰蛋白酶分子

在残基 190 和 191 及谷氨酰胺桥 191—220 之中,构成“夹心”(Sandwiching)效应。从图 2 还可明显看到丝氨酸活性部位的结构。

当双异丙基氟磷酸脂 (DFP) 和胰蛋白酶结合后 F 游离,形成 DIP-Trypsin 复合物,从其活性部位周围的结构 (图 3) 中可见,DFP 结合在 Ser-195 的 O^r 处。其中一个异丙基堵住了结合口袋的颈部,并伸向 Asp-189,相当于在图 2 的 C(3)-C(4)-C(5) 的位置。另一异丙基恰好贴在 Cys-42 侧链和 41—42 残基的肽链平面。此外还可看出 Ser-195 的 O^r 与乙酰糜蛋白酶中的位置相似,磷原子 P 处于设想中的四面体中间物结构的羧基碳的位置上。His-57 的 N^{δ1} 指向 Asp-102 带负电羧基的中心而不是其中一个氧原子。

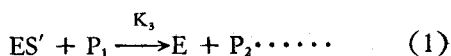
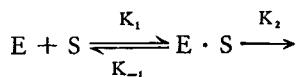
比较图 2 和图 3,发现基团的相对位置有些变化,如 Gln-192 侧链重新定位,在活性区 Asp-102, His-57 和 Ser-195 侧链位移及溶剂分子发生变化。详细的坐标变化可参阅文献[5]。

在 Ba-Trypsine 中,溶剂分子 W1 和 His-57 的 N^{δ2} 及 Gln-192 的酰胺的氢键结合,并处在

Ser-195 羟基的氢键区域内。另一溶剂分子 W2 位于 W1 上的 4.04 Å 处。但在图 3 根本看不到这些溶剂分子。

二、分子轨道理论对催化水解机制的解析

酶对底物水解催化反应过程如下:



式中 E · S 是米氏复合物,ES' 是乙酰化酶的中间体。(1)式说明乙酰化是通过四面体中间物进行。丝氨酸的羟基基团对底物的羰基碳的亲核加成是瞬态反应。按(1)式所示,底物首先非共价地与酶结合形成米氏复合物 E · S。此时底物敏感的肽链接近 Ser-195 羟基的亲核反应中心。然后 Ser-195 攻击多肽链的羰基碳形成四面体中间物。接着底物的游离基团被 His-57 质子化导致多肽链的断裂,产生乙酰化酶。

根据方程式(1),Blow^[2] 提出“电荷中继系统”的模型。从图 4 可看出组成“电荷中继系统”的 Ser-195, His-57 及 Asp-102 侧链的空间排列。其中 Ser-195 的 O^r 和组氨酸的咪唑环上的 N^{δ2} 的氢构成氢键。组氨酸咪唑环的 N^{δ1} 与天门冬氨酸的 O^{a2} 构成氢键。

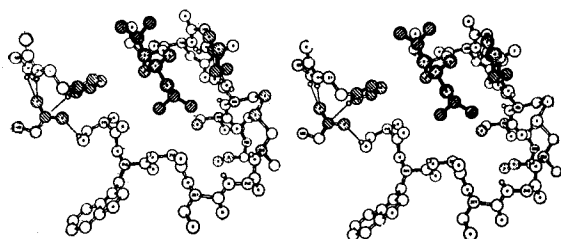


图3 DIP-Trypsin 活性部位周围的结构^[1]

● 结合到 Ser-195 的 DIP 基团 ● 胰蛋白酶分子

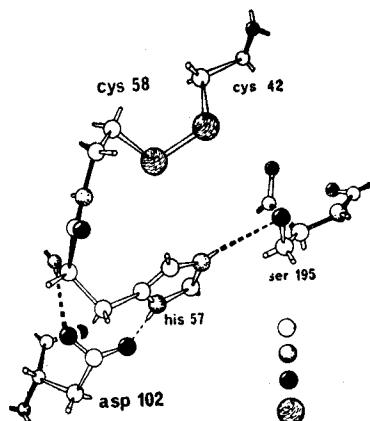


图4 α-糜蛋白酶活性部位几个氨基酸侧链的构形^[2]

—— 构成多肽链的骨架的键 ----- 氢键

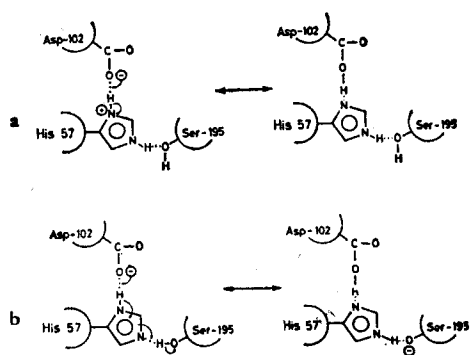


图5 活性中心的传统形式及质子转移过程^[2]

此外, Blow 还假设“电荷中继系统”在催化反应过程中的作用是通过质子转移过程来实现。(图 5b)。

结合在 Ser-195 O^r 上的质子转移到 His 咪唑环的 N⁶², 咪唑环上的 N⁶¹ 上的氢转移到 Asp 侧链的 O^{a2}。此时 Ser-195 侧链的氧原子具有强亲核性, 能对底物羰基上的碳原子进行亲核攻击。

从大量 X 射线晶格分析结果已证明, 电荷中继系统确实存在。但其作用过程是否如 Blow 所设想那样, 即是否可能构成 Ser-195 的 O^r 强亲核性的质子转移过程? 质子转移在什么时候发生? 质子怎样进行转移? 怎样发生亲核攻击?

量子化学观点认为催化作用主要是通过降低反应位垒实现。因此用分子轨道理论研究质子转移过程的方法, 一方面是研究质子转移过程中电荷中继系统的电荷分布的变化及氧原子的亲核性, 另一方面通过计算质子转移过程中各个阶段反应的能量位垒, 即比较复合物形成前后的能量的差值 δE , 以判断各种反应过程的可能性。

$$\delta E = E_{AB} - (E_A + E_B) \cdots \cdots (2)$$

上式中 E_A 、 E_B 分别为分子 A 与分子 B 系统的总能量, E_{AB} 为复合物 AB 系统的总能量。由于酶分子太大, 即使是对构成酶活性中心的“电荷中继系统”, 进行分子轨道理论计算, 其原子数仍然太多。必须简化系统, 即采用模拟系统(图 6)。

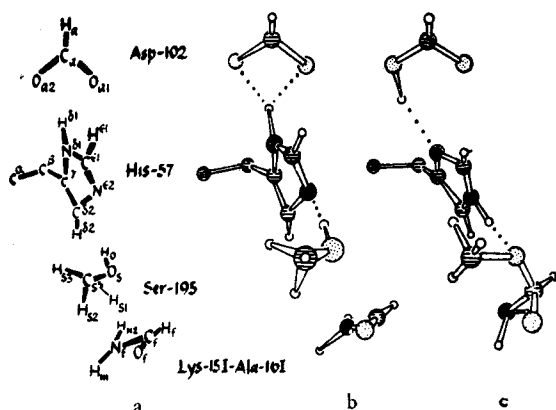


图6 模拟电荷中继系统的原子代号及排列^[10]

a. α 糜蛋白酶的活性部位的模拟系统与基质铵之间的空间关系 b. 处于“米氏”复合物的反应中间态的空间关系 c. 质子转移后的空间关系

由图 6 可见酶活性中心的氨基酸残基只取其侧链, 即以甲醇代表 Ser-195, 以咪唑环代表 His-57, 以甲酸代表 Asp-102 的阴离子部分, 被水解的底物分子用甲酸盐或脂代表。这些基团之间的坐标可参考文献[6], 但这几个侧链的单体的最佳几何学参数现已用 STO-3G 最佳化(图 7)^[7]。

按照图 6 的模拟系统, Umeyama 等^[6]使用

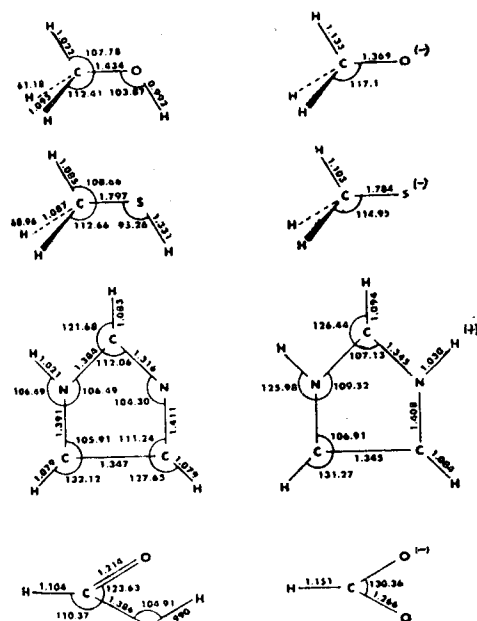


图7 STO-3G 几何优化的单体几何学^[7]

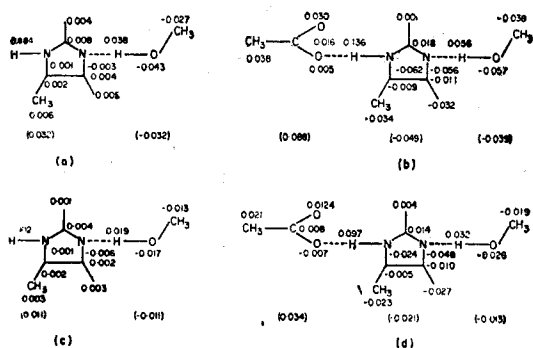


图 8 在甲醇-咪唑 (a, c) 和模拟电荷中继系统 (b, d) 的电荷重新分布^[8]

在 (a) (c) 图中 $R_{N-O} = 2.65 \text{ \AA}$, 和 $3.6 \text{ \AA}$, 在 (b) 和 (d) 中分别为 $R_1 = 2.5 \text{ \AA}$, $R_2 = 2.65 \text{ \AA}$ 和 $R_1 = 2.8 \text{ \AA}$ $R_2 = 3.0 \text{ \AA}$

CNDO/2 方法, 计算出当底物接近活性部位时, 发生质子转移导致的电荷中继系统总能量的改变为 2.02 eV 。当底物不接近活性部位时, 能量改变为 2.23 eV 。说明底物的接近降低了质子转移的位垒, 底物和酶最初阶段的相互作用对电荷中继系统的质子转移起到触发作用。

Amip^[8] 使用 CNDO/2 方法, 计算质子转移能和电荷重新分布状态。结果得出天门冬基团的存在, 降低了质子转移能。其电荷重新分布情况(两组不同分子间距)见图 8。将组氨酸和丝氨酸侧链组成的系统与组氨酸、丝氨酸及天门冬氨酸侧链组成的系统的电荷分布进行比较, 发现由于天门冬氨酸的加入使丝氨酸 O^r 的负电荷增加 0.01 左右, 即电荷中继系统使丝氨酸 O^r 的亲核性增加。

Scheiner 等^[9,10]使用 PRDOO 方法计算质子转移过程。首先确定模拟系统内部平衡构象, 即确定四个基团彼此之间相对位置及每个单体中某些键长及键角的优化值。并假设质子 H_0 从 O_s 转移到 $N^{\delta 2}$, 总位移为 $0.7 \text{ \AA}$; 质子 $H^{\delta 1}$ 从 $N^{\delta 1}$ 转移到 $N^{\delta 2}$ 总位移为 $1.0 \text{ \AA}$ 。为研究两个质子转移过程, 选参数 α 及 β 分别代表整个转移的部分数, 即 α 从 $0-1$, 当 $\alpha = 0$ 表示对应于 $H_2NCHO \cdot CH_3OH \cdot Im$ (咪唑环) $\cdot HCOO^-$ 的排列状态。 $\alpha = 1$ 表示 H_0 从 O_s 向 $N^{\delta 2}$ 移动 $0.7 \text{ \AA}$, 这时 H_0 已完成转移。 β 也类似, 如图 6。

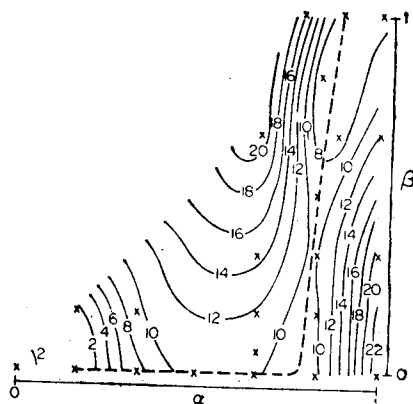


图 9 两个质子转移时模拟磷系统的位能表面^[9]
×.....× 最佳反应途径

按照以上规定进行质子转移的位能计算, 结果如图 9。可看出乙酰氧的亲核攻击在质子 H_0 转移即将完成时才开始, 即 $\alpha = 0.8$ 和 $\beta = 0$ 时, 乙酰氧开始攻击肽链, (途径见图 9 的虚线)。

他们还计算两个质子同时转移和分步转移的位垒。结果说明当两个质子同时转移时, 能量位垒为 100 Kcal/mol , 从能量角度证明它们是以分步方式转移的。

在质子转移过程中, 电荷中继系统又是如何与底物发生亲核加成反应的?

在反应的初态, 咪唑环的最优取向是 $N^{\delta 1}$ 和甲酸的两个氧几乎形成两叉式的氢键, 而甲醇围绕它的 $Cs-H_{s1}$ 键旋转到最有利的取向, 见图 6b。这种构象类似米氏复合物 $E \cdot S$ 。当四面体中间态时, 由于质子转移, 几何构象发生改变, 其中主要是 (1) 甲氧基围绕 $Cs-H_{s1}$ 键轴旋转 30° , 以攻击 C_t 。(2) C_t 移出羰基平面向 O_s 靠近形成四面体加成物。(3) 咪唑环向 O_s 旋转以保持 O_s 与 $N^{\delta 2}$ 之间氢键。改变后构象见图 6c。

由此可见, 电荷中继系统的优化构象正是发生反应的最有利构象。

乙酰化酶的去乙酰化过程是以水分子代替 Ser-195 作亲核中心。于是可按 X 射线晶格分析结果把水分子加入乙酰化酶的模拟系统中,

表 1 质子的亲和力 (kcal/mole)

种 类	实验值	PRDDO	4-31G
甲氧基阴离子	405	525	411
甲酸盐阴离子	342	473	358
氨	207	235	222
咪唑	—	260	—
吡啶	225	250	—

使它处于对脂键的羰基碳的最适合攻击位置。

上述工作虽已从各方面支持了电荷中继系统质子转移观点,但还存在一些问题,即阴离子氧的亲核性的计算值要比实验值高得多,(表 1)^[9]。追其原因是半经验分子轨道理论计算方法过高地估计阴离子的质子亲和力,而核磁共振研究又提示天门冬氨酸的羧基不能用作质子受体^[11,12]。这就对天门冬氨酸 Asp-102 的作用产生了疑问,即在电荷中继系统中,乙酰化质子转移是否确实是从 Ser-195 开始,经过咪唑环,最终达到天门冬氨酸的 O^{a2}?

Kollman^[7] 等使用 STO-3G 和 STO-4G 方法对电荷中继系统质子转移三种方式 (A) CH₃OH···Im···OOCH₃; (B) CH₃O⁻···ImH⁺···HCOO⁻及 (C) CH₃O⁻···Im···HCOOH 的总能量进行估算。STO-3G、CNDO/2 及 PRDDO 的计算结果类似,即三离子态结构比双质子转移结构的总能量高,或者说 (C) 方式比 (B) 方式稳定。但 (C) 方式也比 (A) 方式稳定,这是不合理的。并且 STO-3G 对质子亲和力估算误差较大。在采用 4-31G 基组计算时,质子亲和力的计算值更接近于实验值。而且得出 (B) 方式比 (C) 方式稳定,质子从 Ser-195-His-57 转移时,活化能的上限为 27Kcal/mol,由此说明质子只从 Ser 转移到 His 的咪唑环,而不再向天门冬的甲酸阴离子转移。支持这观点还可从以下二个方面考虑: (1) Ser 失去质子后就对 C=O 键进行攻击,它并不变成“裸”阴离子。(2)在酶的催化作用中,从 Ser 转移到 His 的质子还需要返回到底物,形成乙酰化酶并释放出基质胺。从电位梯度的角度考虑,蛋白质所建立的对质子从 Ser 到 His 转移

有利的电位,使质子在返回到胺时必须做部分功。然而质子从 O—H→N 即从 Ser→His 的转移本身就比从咪唑 H⁺→NR—C—O⁻ 转移困难。也就是说蛋白质的催化作用只是减慢了咪唑向底物的转移速度,而使 Ser→His 的转移步骤加速。

Umeyanra 等用 4-31G 方法^[13]研究木瓜酶活性部位的质子转移,首先计算 FO⁻—HN^{δ1}IMN^ε—HM₃ (即甲酸阴离子—咪唑—硫基甲烷)及 FO⁻—HN^{δ1}IM⁺N^{ε2}H—MS⁻ 两种状态的复合物的总能量,结果说明以甲酸阴离子—硫基、咪唑离子对形成的复合物 (FO⁻—HN^{δ1}IM⁺N^{ε2}H—MS⁻) 的能量比中性复合物稳定,其能量位垒高度近似 10.6Kcal/mol,由此说明硫基和咪唑之间质子转移比较容易。

对几种不同离子态的复合物总能量进行比较,得到的结果是 FO⁻—HN^{δ1}IMN^{ε2} 比 FOH—N^{δ1}IMN^ε 稳定,稳定能近似 17.5kcal/mol。如果有硫基甲烷存在时,在几何结构最佳化后,FO⁻—HN^{δ1}Im^ε—HMS 比 FOH—N^{δ1}Im^εN^{ε2}—HMS 稳定,稳定能为 17.3kcal/mol,而 FO⁻—HN^{δ1}Im⁺N^{ε2}H—MS⁻比 FOH—N^{δ1}ImN^{ε2}H—MS⁻ 稳定,稳定能为 2.5kcal/mol。可见在催化反应过程中,质子从丝氨酸转移到组氨酸的咪唑环后,不再进一步转移到天门冬氨酸,即咪唑环被质子化。另外由计算也可证明在模拟电荷中继系统中,甲酸对降低质子从硫基甲烷到咪唑环转移的位垒高度起重要作用。

上面这些计算只考虑到电荷中继系统本身,没有考虑到酶环境的作用。SIABO 等^[14]对于酶环境的影响作了估算,并指出环境的影响是显著的。由此可见,分子轨道理论从反应能量,分子系统的能量,电荷分布等几个方面说明电荷中继系统在催化过程中是存在的,并说明了催化过程。所使用分子轨道理论方法也从半经验方法发展到“从头算”方法。但目前它还限于简单模拟系统,因此结果未免带有误差和不全面。但是随着电子计算机技术的进展,分子轨道理论参与酶催化机制的研究,将越来越显示其作用。

参 考 文 献

- [1] Stroud, R. M. et al.: *J. Mol. Biol.*, **83**, 185, 1974.
- [2] Blow, D. M. et al.: *Nature*, **221**, 337, 1969.
- [3] Alden, R. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 337, 1971.
- [4] Bode, W. et al.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 693, 1975.
- [5] Krieger, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, **83**, 209, 1974.
- [6] Umeyama, H. et al.: *J. Theor. Biol.*, **41**, 485, 1973.
- [7] Kollman, P. A. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.* **103**, 2955, 1981.
- [8] Amidon, G. L.: *J. Theor. Biol.*, **46**, 101, 1974.
- [9] Scheiner, S. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 2606, 1975.
- [10] Scheiner, S. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 432, 1976.
- [11] Mankley, J. L. et al.: *Biochemistry*, **17**, 4627, 1978.
- [12] Bachorcin, W. W. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 8041, 1978.
- [13] Umeyama, H. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 918, 1981.
- [14] Szaao, G. Naray. et al.: *Inter J. Quant. Chem.*, **7**, 397, 1980.

【本文于1982年5月21日收到】

噪声暴露对诱发脑电图脉冲响应的影响

封根泉

(中国环境科学研究院)

吴景学

(中国科学院环境化学研究所)

宋子中

(铁道部劳动卫生研究所)

黄金英 方丹群

(北京市劳动保护研究所)

吴 坚

(中国民用航空总局卫生处)

一、引 言

通过电子计算机的方法研究脑电图诱发电位是近二十来年的事^[1]。二十年来,这方面的研究有许多新的发现,但多限于对各个波峰、波谷的潜伏期、振幅等与波形直接有关的参数的分析,而且只有极少数作者作了进一步的数学分析^[2,3]。

自动调整理论在生物学上的应用开始于四十年代末五十年代初^[4,5]。近年对脑电图也已有采用此理论的某些方法进行分析,但很少有人对脑电图诱发电位进行系统的分析研究。

我们(协作组)在前几年的工作中发现:多年职业性噪声(80分贝*以上)暴露的工人,神经衰弱症候群的出现率随着噪声强度的增大而升高^[6]。但是缺乏说明这种神经系统功能不良的客观的确切的神经生理学指标。以自动调整理论为指导,通过电子计算机方法寻求这种指

标,正是协作组从事制定我国噪声标准研究的课题之一。

二、方 法

一、实验分组

1、对照组 无强噪声暴露史,年龄 19—20 岁的正常年青人。只记录诱发脑电图,每人 1 次(每次记录 3 分钟,下同)。

2、短时间暴露组 无强噪声暴露史的正常青年人,年龄 19—20 岁。噪声暴露 2 小时,强度 75、80、85、90 分贝;每人各种强度各试验 1 次,每次暴露 120 分钟后记录诱发脑电图 1 次。

3、职业性暴露组 在噪声环境中工作十年以上的印刷工人,年龄 25—45 岁。每人上班前半小时左右及下班后半小时左右分别描记诱

* 本文所称分贝,均系分贝 A, 参考 0.00002 牛顿/米²。