

青霉素结合蛋白的结构、功能与 β -内酰胺抗 生素的作用机理研究进展

李在威 杨 频

(山西大学 分子研究所, 太原)

英国科学家 Fleming 1929 年发现青霉素并于 40 年代进入临床应用以来, 以其为代表的 β -内酰胺抗生素药物的发展, 在医药工业生产、

临床应用和科研方面一直占有重要地位。又由于它对细菌细胞壁具有特殊的选择性毒性^[1], 使得 β -内酰胺抗生素在具有副作用的其它药物

外, 通常只具中等程度的疏水氨基酸(表 1)^[1]。

3. 许多嵌入膜蛋白, 尤其是类 II, 既有亲水区又有疏水区, 所以它类似于去污剂的结构, 被 Sim 称为亲水脂蛋白质 (Amphiphathic proteins)^[1]。

4. 嵌入膜蛋白跨膜螺旋数越多和膜结合越牢固, 分离纯化也越难。除非疏水残基近 70% (如视紫质) 变成脂溶性分子, 纯化才变得较为容易。

5. 嵌入膜蛋白需用去污剂增溶; 一旦除去去污剂, 除少数将形成不溶性凝集物外, 大多数将形成具有一定大小的水溶性缔合物^[1]。

6. 凡属 N-外亚类的嵌入膜蛋白应无前导肽 (即著名的蛋白质越膜或入膜信号假说中所述之信号肽), N-内亚类则有^[7]。

参 考 文 献

- [1] Sim, E.: *Membrane Biochemistry*, pp. 43—54, Chapman and Hall, London New York, 1982.
- [2] Capaldi, R. A.: *Trends. in Biochem. Sci.*, 7, 292, 1982.
- [3] Steck, T. L. et al.: *Biochemistry*, 17, 1216, 1978.
- [4] Ramjeesingh, M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 729, 150, 1983.
- [5] Inouye, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 2396, 1974.
- [6] Braun, V. and Wolff, H.: *J. Bacteriol.*, 123, 387, 1975,

- [7] Engelman, D. M. and Steitz, T. A.: *Cell*, 23, 411, 1981.
- [8] Wickner W.: *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 23, 1979.
- [9] Brown, W. R. A. et al.: *Nature*, 289, 456, 1981.
- [10] Nathenson S. G. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 1025, 1981.
- [11] Katz, F. N. and Lodish, H. F.: *J Cell Biol.*, 80, 416, 1979.
- [12] Caroff, H. et al.: *Nature*, 288, 236, 1980.
- [13] Wilson, I. A. et al.: *ibid.*, 289, 366, 1981.
- [14] Rogers, J. et al.: *Cell*, 20, 303, 1980.
- [15] Brunner, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 1821, 1979.
- [16] Ott, P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 729, 193, 1983.
- [17] Von Jagow, G. and Sebld, W.: *Ann Rev. Biochem.*, 49, 281, 1980.
- [18] Sebld, W. and Wachter, E.: *FEBS Lett.*, 122, 307, 1980.
- [19] Ovchinnikov, Y. A. et al.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 11, 445, 1982.
- [20] Engelman, D. M. et al.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77, 2023, 1980.
- [21] Birge, R. R.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10, 315, 1981.
- [22] Anderson, S. et al.: *Nature*, 290, 457, 1981.
- [23] Capaldi, R. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 694, 290, 1982.
- [24] MacLennan, D. H. et al.: *Ann. NY Acad. Sci.*, 358, 138, 1980.
- [25] Inouye, M.: *Membrane* (Manson, L. A. ed.), Vol. 10, pp. 141—208, Plenum press, New York, London, 1979.

[本文于 1985 年 7 月 10 日收到]

大量被淘汰的今天,仍然居于领先地位。

当前,关于 β -内酰胺抗生素作用机理的分子和亚分子水平研究,使我们能深入地了解药物作用的本质,并关系到开发新的更有效的 β -内酰胺药物。

最新的研究表明, β -内酰胺抗生素的作用是一个多步骤而复杂的抑制机制^[2,3]。这方面的研究最近相当活跃,美国化学文摘几乎时有报道。本文着重于介绍 PBP 的结构和功能研究进展,并进而说明青霉素作用的机理。

一、PBP—— β -内酰胺抗生素的生化靶^[4]

最近十几年研究表明,青霉素分子穿过细菌的细胞壁粘肽层后,最终的靶子是位于胞浆膜上的一些膜蛋白,即 PBP 分子。可以用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离出 PBP,并能用放射自显影方法检出标记了的 PBP。

不同细菌的 PBP 类型不同,而每种细菌一般又可分离出多种 PBP。正是由于 PBP 的多样性和复杂性,导致了青霉素作用机制的复杂性。

这些 PBP 的分子量一般在 4 万到 14 万左右^[4]。大多数细菌细胞含有 1 千到 1 万个 PBP 分子。PBP 重量约占整个细胞膜的 1%。PBP 的含量不一定与其结合青霉素分子的能力成正比,例如嗜热芽孢杆菌仅含 15—20 个 PBP-5 分子,却具有 90% 的结合青霉素分子的能力。

细菌的 PBP 对各种 β -内酰胺抗生素的敏感度,可以大致分为两类:

1. 具有低分子量的 PBP (M_r : 40,000—50,000)。它们对许多青霉素敏感度稍差,但对大多数头孢菌素敏感。

2. 具有高分子量的 PBP (M_r : 60,000—140,000)。它们一般对青霉素和头孢菌素均敏感。

许多 PBP 是参与细菌细胞壁生物合成的酶,如转肽酶、羧肽酶和内肽酶。这些酶是能使细菌致死的青霉素靶酶,因而被称为青霉素敏感酶。大肠杆菌的 PBP-5 和 6 是羧肽酶,PBP-1 和 3 是转肽酶。某些 β -内酰胺药物可以引起

细菌细胞形态和变化,如大肠杆菌的 PBP-1b 使细胞变长,PBP-2 使细胞成为卵圆形,PBP-3 则引起细胞分裂。

在青霉素的致死靶酶中,最重要的是 D-丙氨酸羧肽酶。尽管在金葡菌中羧肽酶较少,但在杆菌中,羧肽酶常是主要的 PBP。它调节着肽多糖的交联程度,如大肠杆菌的 PBP-4、5、6 都是这一类。近期研究表明,大肠杆菌的羧肽酶和金葡菌的 PBP-4 可以起第二转肽酶的生物合成作用。因此,从羧肽酶的结构和功能入手研究青霉素作用机理是目前研究的重点。

二、PBP 的活性中心^[4,5]

(一)青霉素与 PBP 的共价结合——丝氨酸酶

由于青霉素分子在碱性溶液中不稳定,易变成青霉噻唑酸,故早就有人猜测青霉素可能被结合成一个酯。用放射性 ³⁵S 标记的青霉素分子与 PBP 结合后不会被洗掉,也不会与非标记的分子交换,从而证实结合是共价性的。通过核磁共振和弱碱作用研究表明,从变性的 PBP-青霉素络合物中释放出的是青霉噻唑酸,此时 β -内酰胺环已被打开(如图 1)。

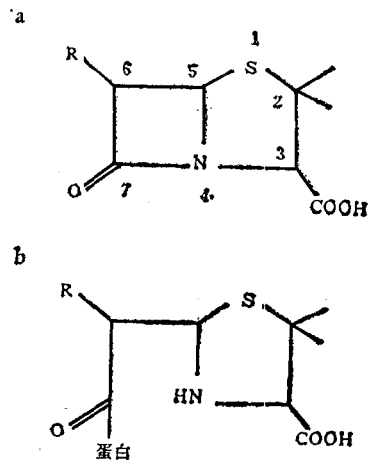


图 1 青霉素分子(a)和青霉噻唑蛋白(b)

为了更直接地证实青霉噻唑基-酶的连结方式,从放射性标记的青霉素 G 结合的链霉菌 R61 羧肽酶和枯草杆菌 PBP-5 的胨解产物中分

表1 几种 PBP 活性中心的氨基酸残基顺序^[4]

酶	微 组 织	活性中心氨基酸序列
羧肽酶	枯草杆菌	³¹ R-L-P-I-A--S--M-T-K-M-M-T ⁴²
	嗜热芽孢杆菌	V-L-G-I-A--S--M-T-K-M
	大肠杆菌	R-R-D-P-A--S--L-T-K-M-M-T
	金葡菌	³⁴ R-F-A-Y-A--S--T-S-K-A-I-N ⁴⁵
A 类 β -内酰胺酶	腊状芽孢杆菌	R-F-A-F-A--S--T-Y-K-A-L-A
	地衣芽孢杆菌	R-F-A-F-A--S--T-I-K-A-L-T
C 类 β -内酰胺酶	大肠杆菌	R-F-P-M-M--S--T-F-K-V-L-L
	大肠杆菌	¹⁷ L-F-E-L-G--S--V-S-K-T-F-T ⁸⁶
	绿浓杆菌	L-F-E-I-G--S--V-S-K
胞外羧肽酶	链霉菌 R61	-V-G--S
	放线菌 R39	-L-P-A--S--N-G-V

离出了青霉噻唑基肽。在两种情况下都发现青霉噻唑基确实同单配位的丝氨酸-氧残基结合在一起,完全肯定了早期的推测。通过两种芽孢杆菌提取的羧肽酶的青霉噻唑-肽衍生物的氨基酸序列分析,已辨认此修饰 β -内酰胺的丝氨酸是第36个残基(从蛋白的N端数起)。

用这种方法,目前已弄清了数种PBP的活性中心的情况,它们都是通过丝氨酸的羟基与青霉素共价结合的(如表1)。

(二) 半胱氨酸-巯基活性中心

有迹象表明,在PBP中可能存在着以半胱氨酸-巯基为活性中心的羧肽酶。1970年发现中性的羟氨、 H_2O_2 或含巯基试剂能够逆转青霉素同枯草杆菌PBP-5的结合^[6]。考虑到这样一个事实,即具有亲核进攻基团的氨基酸残基生成的丝氨酸酯、苏氨酸酯和赖氨酸酰胺在同样的条件下不易裂解,因而可以猜测在这种条件下,青霉素分子可能是经由一个硫酯键同活性中心的半胱氨酸连结。此外,从粪链球菌和芽孢杆菌中分离出来的羧肽酶,其活性和结合青霉素分子的能力可以被巯基试剂抑制。另一种情况是巯基试剂可以抑制酰化了的青霉噻唑-酶的脱酰而不影响PBP对青霉素的结合能力,例如大肠杆菌的PBP-5和6^[7]。这些都可用巯基活性中心或与其有关来解释,但还缺乏更直接的

证据。

(三) 含锌酶的结构^[8,9]

分子量为18,000的链霉菌白的G酶是最近发现的一种含锌DD-羧肽酶。与其它的PBP不同,G酶是一种胞外酶。从4.5 Å和2.5 Å分辨的X射线晶体结构分析可以清楚看到这个G酶外表象一个48 Å × 34 Å × 28 Å的椭圆球,一条很深的裂隙(20 Å × 6 Å × 6 Å)将整个酶分子分为两部分,锌离子即靠近这条裂隙的边缘并与3个组氨酸(His:152、193、196)配位。稳定常数约为 $2 \times 10^{14} M^{-1}$,接近锌和EDTA的结合常数。酶的N端区域有3个 α 螺旋,C端有3个 α 螺旋和5个 β 折迭,锌离子即位于C端区域的裂隙中(见图2和图3)。

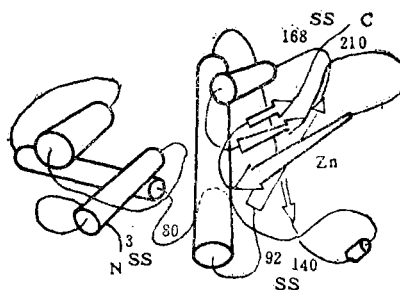
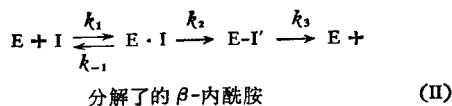


图2 从二级结构得出的G酶模式图

G酶的特点之一是N端区域(76个氨基酸残基)含有43%的 α 螺旋。C端(136个残基)



这里 $E \cdot I$ 是青霉素与 PBP 可逆结合的非共价络合物, $E-I'$ 是共价结合的青霉噻唑基-PBP 中间体。

方程(I)和(II)是类似的, 设 $K = \frac{k_{-1}}{k_1}$,

用动力学方法可测定 K 、 k_2 和 k_3 值。通过测定酰基-酶中间体 $E-P$ 或 $E-I'$ 的浓度变化可以清楚地了解 PBP 与肽底物或青霉素底物作用的详细过程。例如金葡菌羧肽酶 (PBP-4) 的酰化速度要比脱酰速度快得多^[11], 即 $k_2 \gg k_3$, 因而 $E-P$ 中间体可以积累起来并用快速的变性使之固定。但大肠杆菌 PBP-5 和 6 用同样的底物只能固定少量的 $E-P$ 中间体, 这表明 k_2 和 k_3 有相同的数量级。而用巯基试剂对氯汞苯甲酸处理这些 PBP 时, 脱酰速度减慢, $k_2 > k_3$, 使中间体积累下来^[7]。有 PBP-S 缺陷的大肠杆菌变种, 其中间体也积累下来。

对照研究同一种 PBP 与肽底物和 β -内酰胺抗生素分子底物的反应动力学得出了重要的结果。比利时列日大学学者们发现^[5,12], 分离出来的几种羧肽酶并不对 β -内酰胺分子有特殊的亲合力和选择性。就是说在反应的第一步, 非共价结合的离解常数对两类底物来说相差不大。然而为什么有效的 β -内酰胺抗生素特别能破坏这些羧肽酶呢? 这正是由后面的酰化反应及脱酰反应所决定的。 β -内酰胺抗生素分子之所以能与肽底物竞争, 主要靠后两步反应。而这两步反应中, 抗生素的分子结构特征起主要作用。

(二) PBP 与抗生素底物的反应性和抗生素结构的关系

1. β -内酰胺环的非平面性^[2]

β -内酰胺抗生素分子中的 β -内酰胺不是平面结构, 其氮原子伸出其三个取代碳原子所成的平面, 形成一个锥度。这种锥度是抗生素分子是否有活性的根本标志。事实上, 所有有活性的 β -内酰胺化合物都有一定的锥度, 反之

均无活性。在一定程度上, 锥度越大, 活性越大, 即与 PBP 反应的能力越大。这是青霉素反应性能胜过平面酰胺结构的肽底物的主要原因。

2. PBP 丝氨酸残基的酰化反应和青霉素 6β 侧链的结构

用链霉菌提取 PBP R61 酶的实验表明, 青霉素的 6β 取代侧链 R 的结构特征极大地影响酶的酰化反应速度(表 2)^[5]。

几种青霉素分子结构的差别仅在于 6β 侧链 R 的区别。这说明, 当非共价结合的酶-青霉素络合物过渡到丝氨酸的羟基直接进攻 β -内酰胺羰基时, 要求有一个合适的 6β 侧链基团。这个侧链可以诱导 PBP 构象发生变化, 通过与酶的特定基团作用, 反过来使 β -内酰胺羰基的亲电性大大增加, 并使空间排列上有利于与丝氨酸的反应。在酰化反应过程中酶的构象变化已被 X 射线研究和荧光及圆二色性研究所证实^[5,13]。

表 2 青霉素 6β 侧链对 R61 酶酰化速度的影响 (25℃)

PBP	青霉素	$K(M)$	$k_2(s^{-1})$
R61	6-APA	1	0.0002
	羧苄青霉素	0.11	0.09
	氨苄青霉素	7	0.8
	苄青霉素	13	180

在 6β 侧链与酶的特定部位相互作用的同时, 侧链本身的构象也发生改变。在绝大多数青霉素分子中, 6β 侧链是一个 6β -酰胺基侧链。结构分析和理论计算以及活性研究均表明^[14], 在 6β 酰胺基的构象变化中, 很可能正是这紧邻着 β -内酰胺的 6β 酰胺对 β -内酰胺的亲核反应产生一种邻近效应即催化作用, 导致丝氨酸亲核反应活化能大大降低。由此可见, 无论抗生素的有效性和选择性都与其分子的 6β 侧链的结构和构象密切相关。

3. 脱酰反应和噻唑烷环的结构

PBP 和肽底物的酰化中间体的脱酰反应是一个很快的反应, 而 PBP-青霉素酰化中间体的脱酰反应却是一个很慢的过程。正因为如此, β -内酰胺抗生素才表现为一个自杀性的底物。

β -内酰胺与PBP酰化后有两种途径：①E-I'遇外来亲核试剂(H_2O 或 NH_2R)进攻则正常脱酰；②E-I'中的已开环的 β -内酰胺分子缓慢地裂解(见图5)，这是在PBP催化进行的。

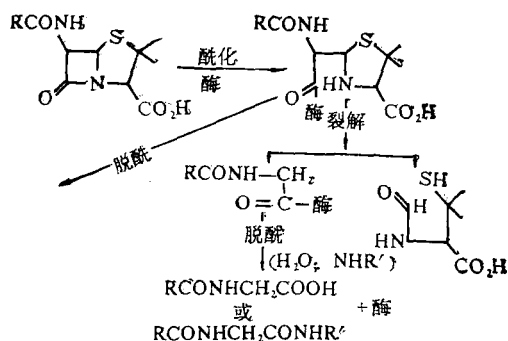


图5 青霉素-酶酰化中间体的脱酰和酶催化裂解^[5]

实验证实，一旦青霉素分子的 C_5-C_6 键断裂，马上发生脱酰反应^[11]。这说明青霉素分子的噻唑烷环对中间体E-I'的稳定起重要的作用。这使 k_3 值增大，酶不易再生，这正是药物要达到的目的。

(三) 青霉素分子与PBP作用模式^[12]

主要根据从动力学上对方程(II)的研究，

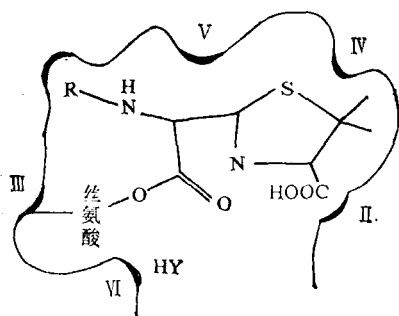


图6 青霉素分子与R61酶作用模式

酶的表面I图中未画出。酶的活化基团II，与青霉素 6β 侧链和羧基作用。酶的固定或酰化基团III，用丝氨酸进攻 β -内酰胺的羰基。稳定基团IV，同噻唑烷环作用。催化裂解 C_5-C_6 键的基团V。VI是催化丝氨酸-酯键开裂，用一个适当的亲核试剂HY进攻 C_5 原子释放基团。还不知道II-VI酶作用基团是从 β -内酰胺环的上方或下方(β 面或 α 面)作用的。

Ghuysen 等人提出一个链霉菌PBP R61与青霉素分子作用模式，也许这是目前为止提出的唯一模式(图6)。

由于青霉素 6β 侧链与肽底物的相应侧链在结构上毫无共同之处，以及PBP对 β -内酰胺敏感性和分解能力与羧肽酶和转肽酶的功能无关等事实，Ghuysen 等人认为PBP分子对于两类底物的活性中心可能不同，但也可能有重复的部位。其中一个活性中心的变化(如与 β -内酰胺的结合)可能导致另一个活性中心的钝化(如与肽底物结合)，他们认为这可能是 β -内酰胺分子杀菌的机理。

可以预料，随着PBP与 β -内酰胺抗生素作用的详细图象被揭示，大批强有力的抗耐药药的抗菌新药物将涌现出来。

参 考 文 献

- [1] 阿尔伯特, A. (曾衍霖等译):《药物的选择性作用》, 人民卫生出版社, 181页, 1965年。
- [2] 查永喜:《国外药学(抗生素分册)》, 3, 153, 1982。
- [3] 钱海伦:《国外药学(抗生素分册)》, 2, 40, 1985。
- [4] Waxman, D. J. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 825, 1983。
- [5] Charlier, P. et al.: *Recent Advance in The Chemistry of β -lactam Antibiotics* (Ed by Gregory, G. I.) London, p. 184, 1981。
- [6] Lawrence, P. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 245, 3653, 1970。
- [7] Curtis, S. J. et al.: *ibid.*, 253, 2584, 1978。
- [8] Dideberg O. et al.: *FEBS Lett.*, 117, 212, 1980。
- [9] Dideberg, O. et al.: *Nature*, 299, 469, 1982。
- [10] Strominger, J. L. et al.: *Am. J. Med.*, 39, 708, 1965。
- [11] Kozarin, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 253, 1272, 1978。
- [12] Ghuysen, J. M. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 73, 1979。
- [13] Nieto, H. R. et al.: *Biochem. J.*, 135, 493, 1973。
- [14] 李在威等:《中国药理学报》,待发表(1986)。
- [15] Geogopadokou, N. H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 124, 507, 1982。

[本文于1985年7月8日收到]