

专论与综述

丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构与功能

戚 正 武

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

本文介绍了三种丝氨酸蛋白酶抑制剂。绿豆胰蛋白酶抑制剂与慈菇蛋白酶抑制剂均为双头抑制剂,分别由 72 与 141 个氨基酸残基所组成。绿豆抑制剂能被胃蛋白酶降解为活性中心分别为 Lys 及 Arg 的两个活性碎片,其抑制剂本身及 Lys 碎片的晶体结构已阐明。慈菇抑制剂有 A、B 两个主要组份,两者对不同蛋白酶有不同抑制活性,是一种新类型的抑制剂。天花粉胰蛋白酶抑制剂是迄今已知的最小多肽抑制剂,共含 27 个氨基酸残基,用 2D-NMR 研究了它的构象。讨论了上述三种抑制剂的异同。

蛋白酶与蛋白酶抑制剂普遍存在于自然界动、植物及微生物中^[1]。它们相互制约,处于动态的平衡,从而起到生物调控的作用。其中尤以丝氨酸蛋白酶及其抑制剂在体内一些重要生理体系中起关键性的调控作用,例如凝血、纤溶及免疫补体中的联级反应,各种活性多肽或蛋白质的激活,细胞的融合、大分子装配、肿瘤细胞的转移与浸润等^[2,3]。一旦平衡失调即导致各种疾病,如体内抗凝血酶 III 或 α_1 -抗蛋白酶缺乏或缺陷,常分别伴随有复发性血栓或肺气肿。在某些病理情况下体内大量蛋白酶被激活(如急性胰腺炎),组织细胞或吞噬细胞内的溶酶体也会大量释放各种组织蛋白酶,过度激活血浆中各种联级反应,破坏血浆中各种重要因子或破坏正常组织,轻则引起休克(如败血症休克),重则死亡(如弥漫性内血管凝血)。因而近年来国际上对蛋白酶抑制剂进行了广泛而深入的研究,牛胰 Kunitz 抑制剂(商品名为 Aprotinin 或 Trasylol)早已在临床应用,有很好的疗效^[4]。目前正在寻找其它有临床应用前

景的专一抑制剂。

蛋白酶抑制剂由于分子量一般都较小,自然界含量丰富,容易提纯,作用机制清楚,又是研究蛋白质相互作用的合适材料,因而是研究蛋白质结构与功能的理想对象。在研究一级结构、溶液构象、晶体结构、作用机制、功能区域拆分、构象重组、基因结构及表达等方面都是属于蛋白质化学中的佼佼者。

蛋白酶抑制剂以丝氨酸蛋白酶抑制剂研究得最多也最清楚,其次是巯基蛋白酶抑制剂。从丝氨酸蛋白酶抑制剂的拓扑学结构来看,至少可分为 10 种以上的类型^[1],其中以牛胰 Kunitz 抑制剂(58 个氨基酸残基)及胰分泌型 Kazal 抑制剂(56 个氨基酸残基)这两种类型研究得最透彻。

从六十年代初我们即开始丝氨酸蛋白酶抑制剂的研究^[5-11];其中由于文化大革命中缀了 13 年,1978 年后重新恢复,对植物中三种不同类型的抑制剂,即绿豆胰蛋白酶抑制剂、慈菇蛋白酶抑制剂及天花粉胰蛋白酶抑制剂作了较深

人的研究,今分别叙述如下:

(一) 绿豆胰蛋白酶抑制剂

绿豆胰蛋白酶抑制剂是属于 Bowman-Birk 类抑制剂^[12],这一类抑制剂的特征是,分子量一般在 8000—9000 左右,含有七对二硫键,对酸、热稳定,有两个功能区域,可分别抑制两个相同或不同的蛋白酶^[12]。这类抑制剂几乎在所有豆科植物种子中都可找到。绿豆抑制剂对胰蛋白酶具有很强的抑制活力,当量抑制时抑制剂与酶的重量比为 1:6,由此计算抑制剂的分子量约 4000,但用各种物化方法测定,分

子量应在 8000 左右,这表明一分子抑制剂能结合二分子的胰蛋白酶。1965 年我们成功地获得绿豆抑制剂与胰蛋白酶以克分子比 1:1 或 1:2 相结合的复合物晶体,证明了该抑制剂含有两个功能区域^[9]。在当时这一类抑制剂的结构尚未阐明,对蛋白质功能区域的概念还很模糊的时候,这是很大的突破。此后在其它类抑制剂,如卵粘蛋白、 α -间胰蛋白酶抑制剂等也找到类似的现象^[11]。1981 年完成绿豆抑制剂一级结构的测定^[13],共有 72 个氨基酸残基组成,如图 1 所示。用胃蛋白酶限制性降解绿豆抑制剂时,自 N 端移去 7 肽, C 端移去 3 肽,并

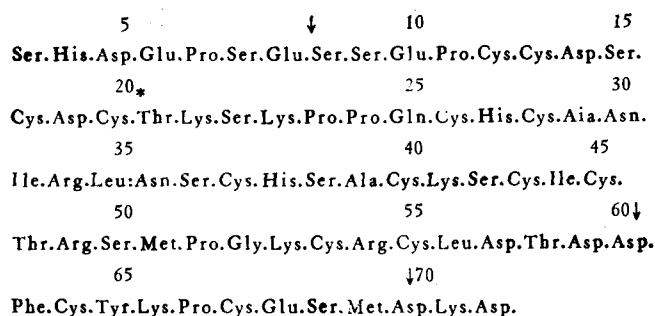


图 1 绿豆胰蛋白酶抑制剂的一级结构

* 活性中心 ↓ 胃蛋白酶解肽键

获得活性中心分别为 Lys-Ser 及 Arg-Ser 的两个活性碎片^[14],各含 35 及 27 个氨基酸残基,如图 2 所示。Lys 活性碎片由长短两条肽链通过两对分子间的二硫键连结而成,分别含 26 及 9 个氨基酸残基。用 DTT 还原,在酸性条件下经 Sephadex G-10 凝胶过滤,此长短两肽链可彼此分离。长链在低温、低浓度、pH 中性时在空气中自动氧化成单体或双体,单体中原两对分子间二硫键转变成一对分子内的二硫键^[15]。此两种氧化后产物都具有胰蛋白酶抑制剂的活力,但抑制的活力单体高于双体,表明在双体中尽管仍含有两功能区域,但其中之一并不具有抑制活性。这可能在形成双体时两对分子间的二硫键有多种形式存在,不能形成两个功能区域所必需的构象,同时说明 Lys 活性碎片中短肽链存在的必要性,它作为联结肽通过二硫键及肽键使两个功能区域连结在一起,并折叠成正确的构象,从而保证每一结构域的功能。从

拓朴学结构看新形成的单体与 Arg 碎片很类似,都具有三对二硫键,形成三个相互串联的硫硫环,表明双头抑制剂很可能在长期生物进化中经过基因剪裁与融合,由单头抑制剂演变为双头抑制剂。

绿豆抑制剂本身、抑制剂与胰蛋白酶克分子比 1:2 的复合物以及 Lys 活性碎片与胰蛋白酶的复合物均得到可供 X 衍射晶体结构分析用的单晶^[16-18]。分别测定了它们的晶胞参数与空间群,其中抑制剂酶复合物(有三方双锤及四方形两种晶形)的晶体结构,通过分子置换法,以已知结构的胰蛋白酶分子为坐标,解得 2.9 Å 分辨率的抑制剂晶体结构^[19]。以同样的方法解得 1.7 Å 分辨率 Lys 活性碎片的晶体结构^[20],如图 3 所示。整个抑制剂分子呈双锤形,无 α 螺旋及 β 折叠结构,主要通过多对二硫键,使分子的结构非常紧密。两个活性中心 Lys-Ser (20, 21) 及 Arg-Ser (47, 48) 分别位于分子的两端,

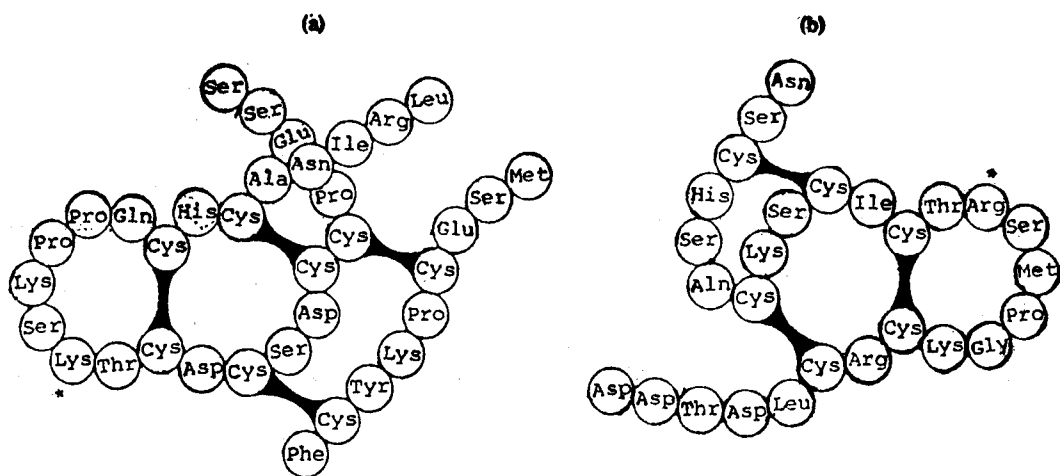


图2 绿豆抑制剂的 Arg 及 Lys 活性碎片

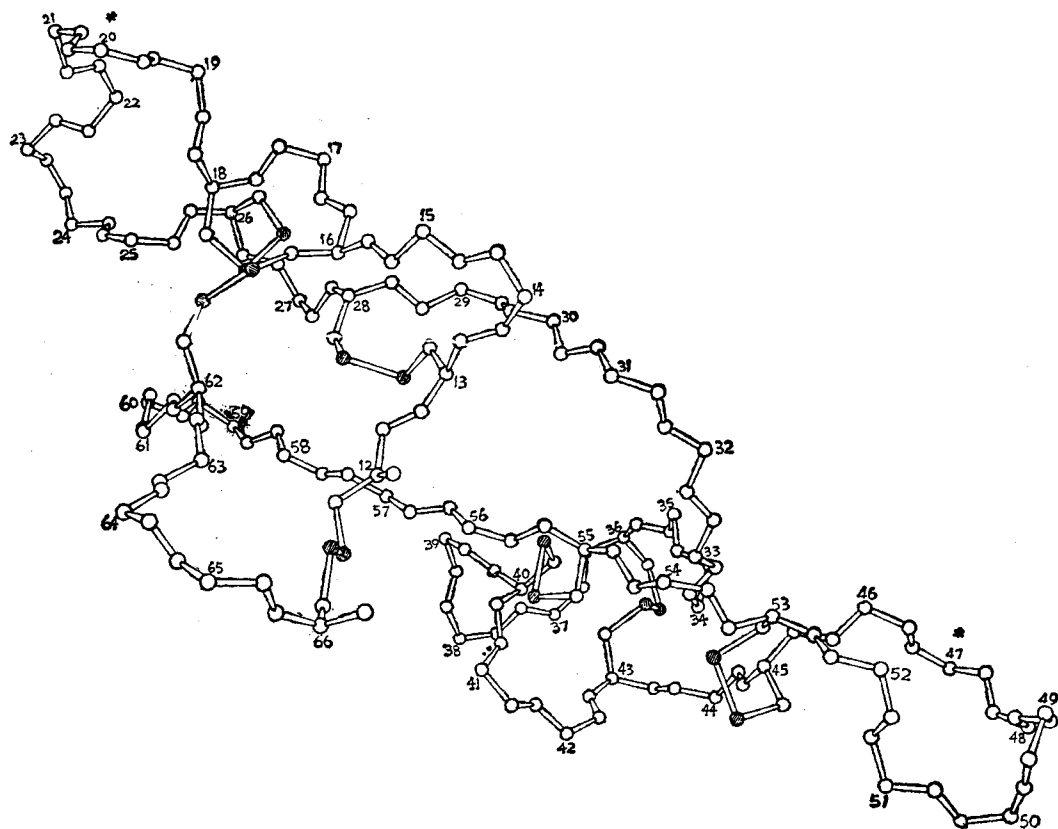


图3 绿豆胰蛋白酶抑制剂的肽链走向

* 活性中心的位点

它们的侧链各自深入到胰蛋白酶分子的底物结合口袋中,与残基 Asp (189) 以盐键的形式结合,从而决定了抑制剂的专一性,如图 4 所示。

与其它胰蛋白酶抑制剂类似,绿豆抑制剂的两个活性中心 Lys 与 Arg 除与酶结合口袋内 189 位的 Asp 结合外,还与 214 至 216 位的 Ser-

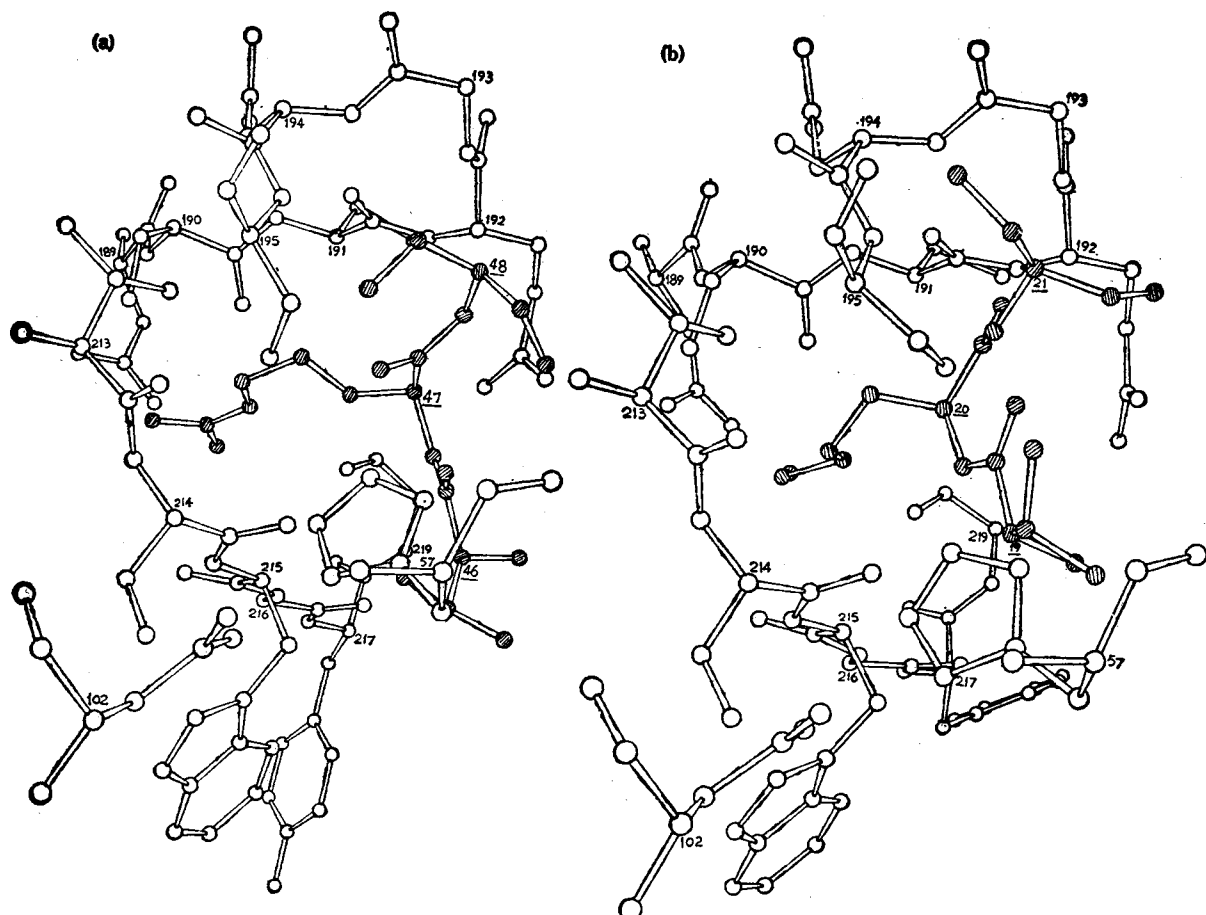


图4 绿豆抑制剂两活性中心与胰蛋白酶底物口袋的结合
(a) Arg 活性中心的结合位点, (b) Lys 活性中心的结合位点

Trp-Gly 以及 190 至 192 位的 Ser-Cys-Gln 相接触。此外抑制剂中两个 P_1' 残基 Ser 则与包括酶活性中心 195 位 Ser 在内的三个残基 Gly-Asp-Ser(193—195)相接触。抑制剂的每一功能区总共有 12 个残基而酶分子中有 17 个残基共同参与两分子间的结合, 从而形成非常紧密的酶与抑制剂的复合物。在单一复合物分子内两分子酶是通过抑制剂连在一起, 酶分子之间没有紧密联系, 仅有 3 个结合位点, 但复合物之间则是通过两邻近酶分子的 24 个结合位点而聚合在一起。

值得指出的是, 绿豆抑制剂与其它 Bowman-Birk 类抑制剂相比, 尽管活性中心相似, 但抑制活力却明显高于后者。例如大豆 Bowman-Birk D-II 抑制剂的两个活性中心虽都是 Arg,

与胰蛋白酶结合的克分子比却为 1:1.4 而不是 1:2^[21]。绿豆 Lys 活性碎片与胰蛋白酶复合物的单晶虽贮藏有三年之久仍完整无损, 没有出现所谓抑制剂的“暂时抑制”现象, 即复合物中抑制剂被酶逐步降解而丧失活力。今从晶体结构的分析来看就不难理解。绿豆抑制剂第一功能区的 P_2' 与第二功能区的 P_3' 都是 Lys, 它们在空间结构上都分别与活性中心 Lys 及 Arg 相接近。由于两个碱性氨基酸的协同作用, 从而大大加强了绿豆抑制剂对胰蛋白酶的抑制活性。此外此 P_2' 及 P_3' 残基又都与酶的催化中心 His₅₇ 相接触, 使酶的活性丧失。在大豆抑制剂中两个功能区的 P_2' 与 P_3' 都不是碱性氨基酸而分别是 Met 及 Gln, 对胰蛋白酶的抑制活力也就低于绿豆抑制剂。

由于 Arg 活性碎片分子量小,其相应的基因容易合成,它的空间构象实际已可从整个抑制剂的晶体结构中解得,从而具备了用蛋白质工程来研究结构与功能的条件。今已合成了 Arg 碎片的基因片段,正在寻找合适的表达体系,一旦表达成功,就可根据分子设计,将活性中心由 Arg 转变为 Ala 或 Val,同时适当改变其它残基,使 Arg 碎片由胰蛋白酶抑制剂转变为弹性蛋白酶抑制剂。由于其分子量小抗原性低,有可能应用于临床。

(二) 慈菇蛋白酶抑制剂

与豆科植物的种子一样,很多植物的块茎也都含有蛋白酶抑制剂,马铃薯蛋白酶抑制剂就是典型的代表,也是研究得最早的。我们从慈菇块茎中找到另一含量极丰富的蛋白酶抑制剂,提纯方法简便,容易结晶。从 10 公斤新鲜慈菇可得到 4 克左右重结晶的慈菇抑制剂,晶体有长方形和六角形两种晶形^[22]。慈菇抑制剂有两个主要组份 A 和 B,两者在结构上极类似,很难用一般的层析方法分离,但可用胰凝乳蛋白酶亲和和层析使两者分开。抑制剂 B 用 pH 5 的水溶液即可从亲和层析柱上洗脱下来,而抑制剂 A 需在 pH 2—3 条件下才能洗脱。由此提纯的抑制剂 A、B 经聚丙烯酰胺凝胶鉴定均呈匀一条带。

慈菇抑制剂 A、B 也是双头抑制剂,能抑制多种蛋白酶,两者在功能上有所不同,如图 5 所示,抑制剂 B 与绿豆抑制剂一样,当量抑制胰蛋白酶时其克分子比为 1:2,而抑制剂 A 则为 1:1.5。与此相反,抑制剂 A 对胰凝乳蛋白酶却有较强的抑制活力,克分子比为 1:1,而抑制剂 B 的活力却很低,抑制剂 A 能同时抑制 1 分子的胰蛋白酶和 1 分子的胰凝乳蛋白酶。除上述两蛋白酶外,抑制剂 A、B 还都能抑制猪胰激肽释放酶,其抑制活力约分别相当于各自抑制胰蛋白酶活力的 1/4 及 1/6。

用 Lys 及 Arg 的专一试剂甲基顺丁烯酞酰及环己二酮分别修饰慈菇抑制剂 A、B,并观察对各种蛋白酶抑制活力的影响。实验结果表

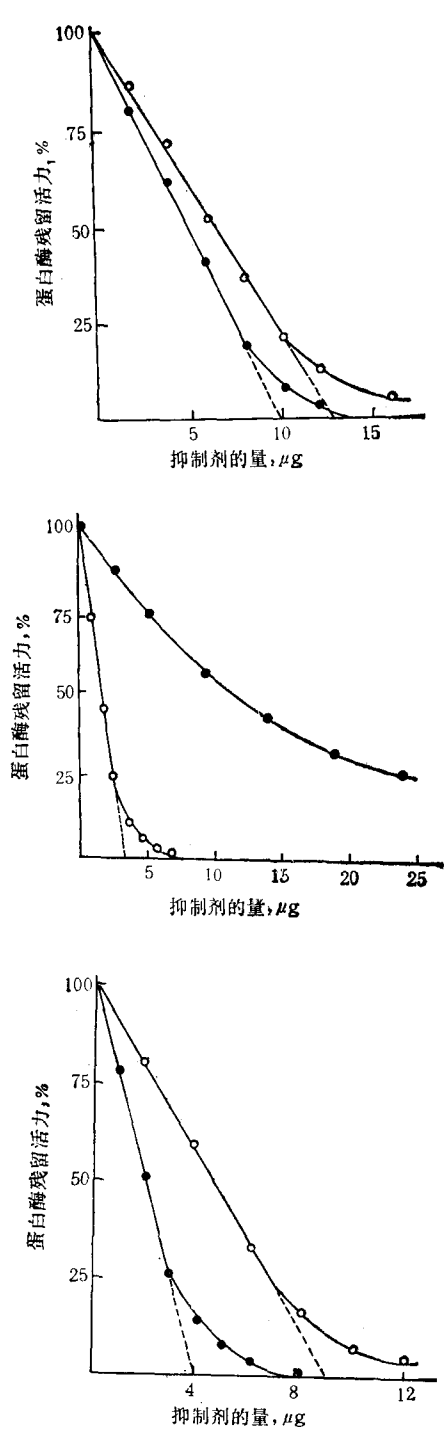


图 5 慈菇蛋白酶抑制剂对各蛋白酶的抑制曲线
(上)对胰蛋白酶的抑制曲线酶含量 30 μg, 底物为 BAPA
(中)对胰凝乳蛋白酶的抑制曲线酶含量 6 μg, 底物为 BTEE (下)对激肽释放酶的抑制曲线酶含量 4 μg, 底物为 BAEE

—○—○— 慈菇抑制剂 A
—●—●— 慈菇抑制剂 B

明, Lys 残基经修饰后抑制剂 A、B 抑制胰蛋白酶及猪胰激肽释放酶的活力都约丧失一半, 但抑制胰凝乳蛋白酶的活力均无影响。当 Arg 残基经化学修饰后抑制剂 A、B 对胰蛋白酶的抑制活力也都丧失一半左右, 对激肽释放酶不再有抑制活力, 但抑制剂 A 对胰凝乳蛋白酶的抑制活力并不丧失, 而抑制剂 B 的活力却大大降低。从上述结果可导出如下几点结论: 1) 残基 Lys 都是抑制剂 A、B 中的一个活性中心, 专一抑制胰蛋白酶, 并与抑制激肽释放酶的活性有关。2) Arg 残基也是抑制剂 A、B 抑制胰蛋白酶的活性中心, 在抑制剂 B 中抑制胰凝乳蛋白酶的活力由此残基贡献, 犹似大豆 Ku-

nitz 抑制剂中的活性中心 Arg, 除能抑制胰蛋白酶, 也能抑制胰凝乳蛋白酶。3) 抑制剂 A、B 中抑制激肽释放酶的活性中心主要是 Arg 残基, 但 Lys 残基也参与, 这符合激肽释放酶活性中心的规律, 即由 Arg(Lys)-X-Arg(Lys) 两个相隔的碱性氨基酸所组成。4) 在抑制剂 A 中抑制胰凝乳蛋白酶的活性中心不是 Arg 残基, 它可能是芳香族氨基酸或长链脂肪族氨基酸。因此在抑制剂 A 中实际上有三个活性中心, 其中两个与抑制剂 B 相似, 而另一则是独有的。

慈菇抑制剂 B 的一级结构已阐明 (图 6), 由 141 个氨基酸所组成, 含两对二硫键, 分子量

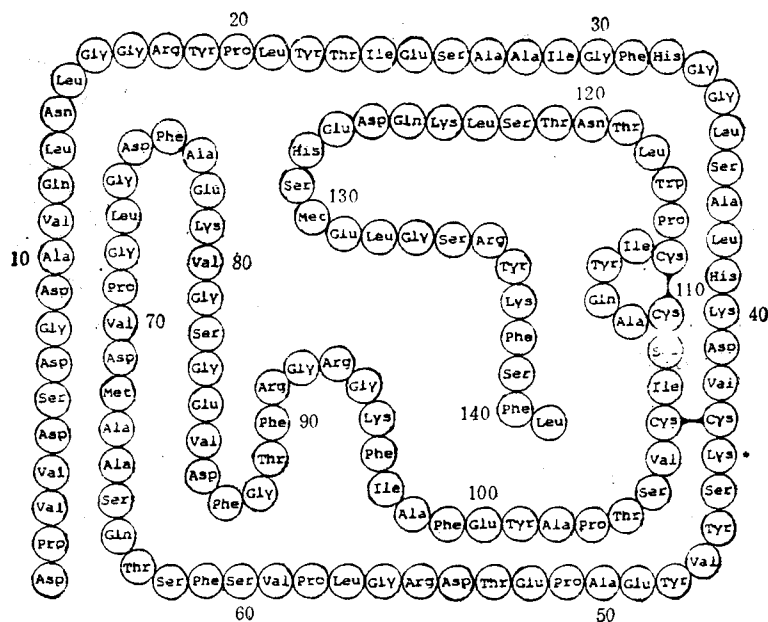


图 6 慈菇蛋白酶抑制剂的氨基酸顺序

约 15000^[23]。与其它已知的丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构相比较, 推测第 45、46 位的 Lys-Ser 很可能是抑制剂中的一个活性中心, 它与牛胰 Kunitz 或胰分泌型 Kazal 抑制剂的活性中心相似, 靠近胱氨酸残基, 其 P₂ 位置往往是芳香族氨基酸。另一活性中心很可能是第 93—95 位的 Arg-Gly-Lys, 这既符合激肽释放酶抑制剂的活性中心需包含两个相隔碱性氨基酸的规律, 也与大豆 Kunitz 抑制剂的活性中心 Arg-

Ile-Arg 相似, 其后的氨基酸顺序都是 phe-Ile-Ala, 大豆 Kunitz 抑制剂也能抑制血浆激肽释放酶。由此可见, 慈菇抑制剂 B 包含有两个不同抑制剂类型的活性中心, 这在蛋白酶抑制剂中是非常独特的, 从总的氨基酸顺序来看与其它抑制剂也无明显共同之处, 因而慈菇抑制剂应该属于新的一类蛋白酶抑制剂。慈菇抑制剂 A 的氨基酸顺序正在测定中。

(三) 天花粉胰蛋白酶抑制剂

天花粉是一中草药, 归属于葫芦科植物, 其根部也是块茎。我们从其块茎中找到了小分子量的胰蛋白酶抑制剂, 它有 4 个在结构上很相

似的组份, 对其中主要的组份 B 进行了氨基酸顺序测定^[24]。它实际上是一小肽, 由 27 个氨基酸残基所组成, 含三对二硫键, 其一级结构如图 7 所示。值得指出的是, 此抑制剂的活性中心肽键, 第 3、4 位的 Arg-Ile 在低 pH 下很容易

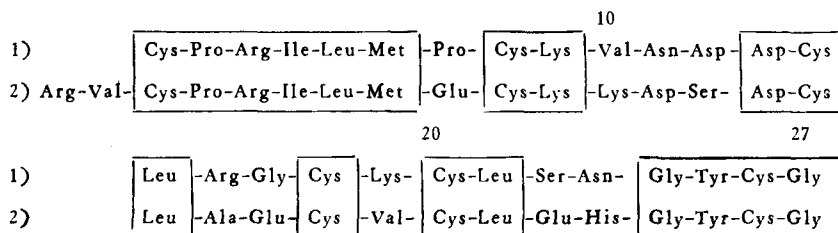


图 7 天花粉与黄瓜胰蛋白酶抑制剂氨基酸顺序的比较

(1) 天花粉抑制剂 (2) 黄瓜抑制剂

被胰蛋白酶所降解, 形成所谓“修饰的抑制剂”(Modified inhibitor)。在提纯过程中由于采用固相胰蛋白酶亲和层析, 在低 pH 下洗脱时尽管抑制剂在柱内的滞留时间很短, 已大多成为“修饰的抑制剂”, 此现象在其它抑制剂中是很少见的。此外由于天花粉抑制剂的 N 末端是半胱氨酸残基, 鉴定不出, 当 Edman 降解时首先出现的是 Ile 残基, 容易误判为 N 末端而造成假象。至今已知的小肽丝氨酸蛋白酶抑制剂除天花粉抑制剂外, 还有黄瓜胰蛋白酶抑制剂^[25], 两者的结构非常相似, 相似率达 67% (图 7), 特别是三对二硫键都保守。用环己二酮修饰天花粉抑制剂中的 Arg 残基, 也证实 Arg 为抑制剂的活性中心。

天花粉抑制剂由于分子量小是用二维核磁共振 (2D-NMR) 研究多肽构象的理想材料。根据核磁共振图谱分析了抑制剂中各残基侧链基团及肽链主骨架在空间的相对位置, 得到了如下信息: 1) 没有明显的 α -螺旋及 β -折叠结构, 2) 在残基 12—13, 16—17 及 22—24 处形成 β 转折, 3) 残基 Tyr(25) 与 N 端附近的 Pro 相接近。再根据 Chou-Fasman 二级结构预测程序和多肽构象最小能量计算程序, 初步预测了天花粉抑制剂的二级及三级结构, 如图 8 所示, 与上述 2D-NMR 的结果相吻合。根据预测的天花粉抑制剂的结构, 分子内的三对二硫

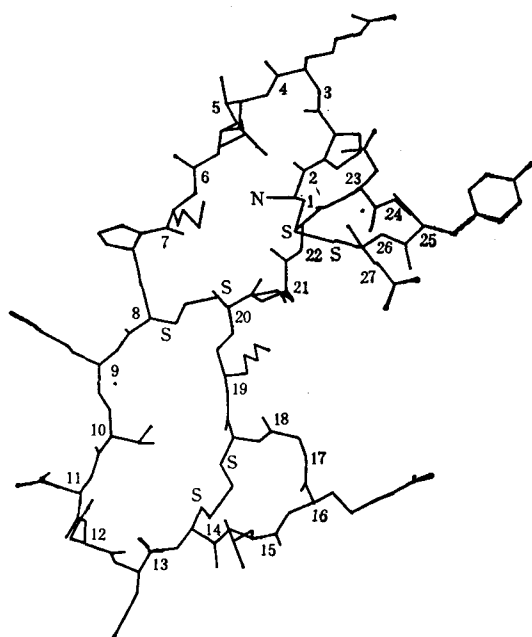


图 8 天花粉胰蛋白酶抑制剂构象的预测

键可能以残基 1-26、8-20 及 14-18 的形式连结。像绿豆 Arg 活性碎片一样, 由 3 个串联的硫硫环组成。

(四) 三类抑制剂的异同

上述提到的三种抑制剂是属于完全不同的类型, 在结构上彼此无共同之处。分子量从天

花粉抑制剂的 3000 到慈菇抑制剂的 15500; 等电点从低于 5 (慈菇抑制剂) 到高于 8 (天花粉抑制剂); 二硫键少的仅两对 (慈菇抑制剂), 多的达 7 对 (绿豆抑制剂); 有的是双头抑制剂, 有的是单头的; 有的是单功能的 (绿豆与天花粉抑制剂专一抑制胰蛋白酶), 有的却是多功能的 (慈菇抑制剂除能抑制胰蛋白酶外, 还能抑制胰凝乳蛋白酶和激肽释放酶); 天花粉抑制剂活性中心的肽键很易被专一的蛋白酶降解而成为“修饰的抑制剂”, 而慈菇抑制剂却很难被相应的蛋白酶所“修饰”; 绿豆与天花粉抑制剂的活性中心位于二硫环内, 而慈菇抑制剂的活性中心却不是, 凡此等等。

尽管在结构上有显著差异, 此三抑制剂也有它们的共同之处: 它们都能抑制胰蛋白酶, 因而活性中心不是 Lys 就是 Arg; 最小的抑制剂单元约由 27 个氨基酸所组成, 如天花粉抑制剂为 27 肽, 绿豆 Arg 活性碎片也是 27 肽, Lys 活性碎片的长肽链是 26 肽, 并都含有三对二硫键, 形成相互串联的硫硫环。

比较上述三种抑制剂的异同, 不难看出, 它们在总体上可有很大差别, 但在局部位置上的活性中心有一定共性。这是蛋白酶抑制剂与其它具有生物活性的蛋白质最大不同之处。抑制剂的专一性决定于活性中心的氨基酸残基, 而抑制剂与蛋白酶结合的区域主要局限于活性中心附近的残基。这可从绿豆抑制剂的晶体结构得到说明。两个功能区中 P_1 与 P_1' 两个活性中心残基参与酶抑制剂的接触 (包括氢键及范德瓦耳力) 占总结合位点的 50% 左右。这说明抑制剂从某种意义上讲可看作是酶的底物, 与酶的接触部位主要集中于底物中将被裂解的肽键两侧的氨基酸。与一般酶的底物不同, 抑制剂与酶结合后其活性中心的肽键并不裂解或裂解速度极慢。蛋白酶可作用于很多不同底物, 这就不难理解自然界中蛋白酶抑制剂也可有多种类型存在。因而从大自然中寻找更有效更专一的抑制剂, 或通过蛋白质工程加以改造, 使之能应用于临床, 这将是今后蛋白酶抑制剂的研究方向。

上述研究工作除主要由上海生化所完成外, 南京大学生化系参加绿豆与慈菇抑制剂的部分结构测定; 北京大学化学系参加绿豆 Lys 活性碎片与胰蛋白酶复合物的晶体结构分析及天花粉抑制剂构象的预测; 中国科大生物系参加天花粉抑制剂二维顺磁共振谱的研究, 因此这是集体的成果, 是社会主义大协作的胜利果实。

参 考 文 献

- [1] Laskowski, M. Jr. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1980, 49, 539.
- [2] Reich, E. et al.: *Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation*, 1975, Vol. 11, Cold Spring Harbor Laboratory.
- [3] Magnusson, S. et al.: *Proc. FEBS 11th Meeting*, Copenhagen, 1977, 47, Symposium A 6.
- [4] Fritz, H.: *Diba Foundation Symposium 75* (New series), 1980, 351, Excerpta Medica, Amsterdam.
- [5] Chi, Cheng-wu et al.: *Proteins in Biology and Medicine* (eds. Bradshaw, R. A. et al), 1982, 341, Academic Press.
- [6] Chu, Hsien-ming et al.: *Sci. Sin.*, 1965, 14, 1441.
- [7] Chu, Hsien-ming et al.: *Sci. Sin.*, 1965, 14, 1454.
- [8] Chou, Yuan-Cong et al.: *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 1965, 5, 199.
- [9] Chu, Hsien-ming et al.: *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 1965, 5, 519.
- [10] Wang, Ke-Yi et al.: *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 1965, 5, 509.
- [11] Chu, Hsien-ming et al.: *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 1966, 6, 22.
- [12] Birk, Y.: *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1975, 25, 113.
- [13] Zhang, Yao-shi et al.: *Sci. Sin.*, 1982, 25, 268.
- [14] Tang, Fu-long et al.: *Sci. Sin.*, 1982, 25, 160.
- [15] Tang, Fu-long et al.: *Sci. Sin.*, 1984, 27, 918.
- [16] Zhang, Rong-guang et al.: *Sci. Sin.*, 1985, 28, 952.
- [17] Zhang, Rong-guang et al.: *Sci. Sin.*, 1985, 28, 1163.
- [18] Lin, Guang-da et al.: *Sci. Sin.*, 1986, 29, 718.
- [19] Xuan, Jian-cheng et al.: *Doctor degrel thesis*, 1987.
- [20] Tan, You-qi et al.: *Acta Phys. Chim. Sin.*, 1986, 2, 197.
- [21] Odani, S. et al.: *J. Biochim.*, 1977, 82, 1513.
- [22] Zhang, Xian-yang et al.: *Sci. Sin.*, 1979, 22, 1443.
- [23] Chi, Cheng-wu et al.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1985, 366, 879.
- [24] Tang, Fu-long et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem.*, 1984, 365, 1211.
- [25] Wiluse T. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1983, 364, 93.

[本文于 1987 年 8 月 14 日收到]