

脯氨酰内肽酶研究进展

李 民 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 脯氨酰内肽酶 (prolyl endopeptidase, PEP) [EC3.4.21.26] 是一种能特异性水解多肽链中脯氨酸残基羧基端肽键的丝氨酸蛋白酶, 能降解许多多肽类神经递质和激素, 其活性的异常会引起精神、认知过程的障碍. 一些 PEP 的专一性抑制剂 (如 JTP-4819) 显示在莨菪碱引起的小鼠记忆障碍模型中有改善记忆的药理作用. 猪肌肉 PEP 晶体结构的解析推动了 PEP 的研究.

关键词 脯氨酰内肽酶, 丝氨酸蛋白酶, 抑制剂, 晶体结构

学科分类号 Q71

自然界中已知的丝氨酸蛋白酶家族主要包括胰蛋白酶 (trypsin), 枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin), 羧肽酶 Y (carboxypeptidase Y) 家族. 每个家族成员不仅一级结构同源性很高, 而且三维结构也十分相似. 近年来又发现了另一类蛋白酶家族, 能专一性水解多肽中脯氨酸残基的羧基端肽键, 它们都含有 G-X-S-X-G/A 丝氨酸蛋白酶家族典型的高度保守序列, 而且被 DFP 完全抑制, 但在一级结构上与已知的丝氨酸蛋白酶同源性不高, 而且不受 PMSF、PLCK、TPCK、trypsin inhibitor 等已知丝氨酸蛋白酶抑制剂的抑制, 这就是脯氨酰内肽酶家族 (prolyl endopeptidase).

1 PEP 的作用机理

PEP 最早由 Walter 等^[1]在人体子宫组织的匀浆中发现, 具有降解催产素的作用, 以后陆续从鼠、兔、牛、羊、人等的不同组织以及昆虫、植物、真菌、细菌和古细菌中都分离到了该类酶, 并克隆和表达了部分生物的 PEP 基因^[2~6]. 我们实验室也克隆和表达了 *Aeromonas punctata* subsp. *punctata* 来源的 PEP, 研究了重组 PEP 的性质.

PEP 的同源性大约在 40% ~ 50% 左右, C 端同源性较 N 端高, 而且在活性中心 Ser 周围的氨基酸序列高度保守. 不同来源的 PEP 还显示出明显的进化特征, 如猪脑和人淋巴细胞之间的同源性高达 97%^[7].

PEP 的分子质量在 70~ 80 ku, 大约由 700 个氨基酸组成. 各种来源的 PEP 理化性质基本相似, 但等电点和最适反应 pH 值有所差别. PEP 在同一生物体不同组织中的含量有明显差异, 如脑中含量

较高, 提示了 PEP 与特定组织的功能发挥有密切的联系.

对各种肽类激素和人工合成的多肽底物进行的降解实验表明各种来源的 PEP 均专一性水解肽链 Y-Pro-Y' 中顺式结构的 Pro-Y' 键, Y' 可以为氨基酸 (除脯氨酸)、多肽、酰胺、芳香胺或醇类化合物; 虽然 PEP 也能水解 Ala-Y' 键, 但速率只有前者的 1/100 左右.

PEP 的催化中心有 5 个底物结合位点: S3-S2-S1-S1'-S2', 其中 S1 结合 Pro, S2、S1 和 S1' 位点对底物具有高度的立体专一性, 用 D 型氨基酸取代后, 催化效率常数 K_{cat}/K_m 明显下降. 另外, 催化中心的结合位点有限制, 随着多肽链长度的增加 PEP 催化效率明显减弱, 只能有效降解 30 个左右氨基酸长度的多肽, 但古细菌^[8]和菠菜类囊体^[9]中的 PEP 能降解高分子质量蛋白质 (约 18 ku).

Polgar 等^[10]推测的 PEP 催化机制为: PEP 的活性中心被帽状的多肽链覆盖, 被催化的底物只有一部分残基能进入帽状多肽链形成的“tunnel”结构. 这一理论很好地解释了疏基阻断剂 PCMB 和碘乙酰胺对哺乳动物 PEP 的不同抑制效果, 它们与位于活性中心附近的半胱氨酸结合后, PCMB 由于整个分子结构较大而完全阻止了底物进入催化区, 小分子的碘乙酰胺则留下一定的空间让底物进入催化区, 只达到部分抑制的效果. 猪肌 PEP 的晶体结构基本上证实了这一假设.

Tel: (021) 64700892-306, E-mail: limin@server.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-04-12, 修回日期: 1999-09-20

2 PEP 的晶体结构

1998 年, 分辨率为 0.14 nm 的晶体 X 射线衍射分析报道了 PEP 的空间结构^[11,12], 猪肌 PEP 的第 1~72 位和 428~710 位氨基酸富含 α 螺旋结构, 组成 PEP 的催化区域, 呈现出典型的 α/β 水解酶特征; 73~427 位由多组的 β 片层组成非催化区, 集中在催化区的下部, 二者靠氢键、盐桥以及疏水作用而靠近。

PEP 特殊的催化机制使目光更多地投向了第 73~427 位非催化区形成的不同寻常的“ β -propeller”结构 (图 1, 见图版 I)。它由 7 部分呈放射状排列的反平行 β 片层组成, 类似 G 蛋白的 β 亚单位结构, 但 7 组 β 片层的组装不同, 前者看起来更松散和不规则。它具有两个关键因素控制着大分子底物的进入, 一是“ β -propeller”底部通向催化中心的中央通道十分狭窄, 并被柔性的氨基酸侧链部分覆盖; 二是“ β -propeller”结构中“velcro”没有闭紧形成一个整体, 即使其他侧链移动也不会使“ β -propeller”的通道扩张。这样大分子底物就会被排斥在外, 无法进入深藏在疏水口袋中的催化三联体 (图 2, 见图版 I)。

3 PEP 的生理作用

3.1 参与功能性多肽物质的代谢

PEP 参与神经递质和肽类激素的代谢, 加压素 (AVP)、P 物质、促甲状腺激素释放素 (TRH)、舒缓激肽、催产素等, 这些多肽可能是 PEP 的内源性底物。研究发现脑组织中这些活性多肽水平的降低与 PEP 活性的异常升高相关。一些 PEP 的专一性抑制剂能通过抑制 PEP 的活性而增加海马区和皮质区的 P 物质和 AVP 样免疫沉淀反应及海马区 TRH 样免疫沉淀反应, 并在莨菪胺引起的小鼠记忆障碍模型中有改善记忆的药理作用^[13]。PEP 正是通过调节这些活性多肽的代谢过程来进一步影响与之相关的记忆和认知功能的。因此 PEP 活性的异常与一些疾病的发生, 如老年性记忆障碍、抑郁症、精神分裂症等有密切的关系^[14]。

另外, PEP 还参与肾-血管紧张素系统 (RAS) 中 Angiotensin I 转化为 Angiotensin (1-7) (Angiotensin II 的活性形式) 的过程^[15]; 研究表明 PEP 在麻蝇的 imaginal disc 和鼠脑神经元分化过程^[16]以及小鼠肝细胞增殖和分化过程^[17]中起重要

的调节作用。

3.2 参与阿尔茨海默氏病的病理生理学

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease) 的特征性病变表现为出现脑部的细胞外淀粉样斑块、细胞内神经原纤维缠结、脑血管淀粉样病变等, 其中 β 淀粉样蛋白 (β A4) 的形成和沉积与该病的发生最密切相关^[18]。 β A4 由淀粉样蛋白前体 (amyloid precursor protein, APP) 被特定蛋白酶 (如 β -和 γ -secretase) 水解形成, APP 基因表达失控和异常剪切以及 β A4 的产生过程一直是人们研究的重点。

由 110~130 ku 的膜蛋白 APP 水解生成的 β A4 (1~42), 其 C 端为 Ala, 令人感兴趣的是 PEP 也能特异性水解多肽 Ala 羧基端的肽键, 而且 AD 病人脑部 PEP 的活性变化十分突出, 为正常人的两倍^[19]。Ishiura^[20]用 β A4 模拟肽的研究表明 PEP 是一种 β A4 的产生酶, 同时证明脑组织中 β A4 和 PEP 样免疫沉淀反应共存^[21]。PEP 的特异性抑制剂 JTP-4819^[22]和 S17092-1^[23]能抑制 β A4 蛋白的产生。这些实验结果都间接证明了 PEP 在 β A4 斑块形成中的重要作用。

APP 的生理代谢比较复杂, 其中 APP 可能的代谢途径之一是: APP 翻译合成后经高尔基体转运至细胞膜上, 由于 APP 胞质区 C 端有一个 GYENPTY 的分拣信号^[24], 该分拣信号被某种蛋白酶专一性地水解, 促使 APP 滞留在细胞膜上。虽然 PEP 只能水解较短的多肽, 但由于 APP 的胞质区部分只有 48 个氨基酸, 并且被固定在膜上影响了它的高级结构, 或者细胞膜上存在性质不同的 PEP, 不排除 PEP 水解 APP 分拣信号 GYENPTY 的可能性。另外, 滞留于膜上的 APP 经 secretase 水解产生 β A4 的 N 端, 再由另一种尚未鉴定的酶 (Ishiura^[20]认为 PEP 在此发挥作用) 水解形成 β A4 的 C 端, 从而产生分泌至胞外的完整 β A4。

4 PEP 及其抑制剂的应用

PEP 不仅具有水解作用, 同样也能以逆反应的形式合成肽键。在一定的条件下它可以将 C 端含有 Pro 的肽段和另一肽段或氨基酸连接起来, 末端修饰多肽的合成更显优势。可以利用 PEP 生产的活性肽包括 aspartocin, bermorphan, calcitonin, CGRP, CGRP II, crustacean erythrophore concentrating hormone, cockroach myoactive peptide I, colorchange hormone, glutitocin, granulin-R, isotocin, LH-RH, mesotocin, morphine modulating

neuropeptide, α -MSH, oxytocin, phenypression, SCP_A, SCP_B, valitocin, vasopression and vastocin 等, 其中 LH-RH 和 oxytocin 的转化效率分别达到 67% 和 55%, 而且没有副反应。

鉴于 PEP 在精神与认知中的作用, 其特异性抑制剂成为研究的热点, 期望从中找出治疗健忘、抑郁、痴呆、AD 等疾病的新途径。目前已经发现和研制了数十种具有特异性抑制 PEP 效果的抑制剂, 其中关于 JTP-4819^[13, 22] 和 Z-321^[25] 的研究最引人注目, 小鼠服用 JTP-4819 后能明显抑制 PEP 对大脑皮层和海马区 P 物质、AVP 的降解, 增加了神经递质的含量, 激活胆碱的转化, 促进了莨菪胺诱导的健忘症的恢复, 增强了动物的认知和记忆能力。药代动力学和安全性研究表明, 口服 JTP-4819 和 Z-321 后, 人体内的胆碱脂酶的水平超过正常值, 停药后恢复正常, 没有发现严重的不适症状, 这显示了 PEP 抑制剂在临床上良好的应用前景。

5 结束语

PEP 的研究虽已经历了近 30 年, 但对其生理作用仍然没有作出十分明确的阐述; PEP 是胞质酶还是膜蛋白还存在争议。从已有的报道来看, 神经突触膜上的确存在一种 PEP, 可能在神经递质失活过程中起重要作用, 但这方面的研究不够深入。尽管如此, PEP 在肽类激素工业及其抑制剂在治疗精神和认知相关疾病中所显示的巨大经济和社会效益, 将吸引更多的科学家投入到 PEP 的研究中去。

参 考 文 献

- Walter R, Shlank H, Glass J D, *et al.* Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science*, 1971, **173** (999): 827~ 829
- Yoshimoto T, Walter R, Tsuru D. Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*: purification and properties. *J Biol Chem*, 1980, **255** (10): 4786~ 4792
- Kabashima T, Fujii M, Meng Y, *et al.* Prolyl endopeptidase from *Sphingomonas capsulata*: isolation and characterization of the enzyme and nucleotide sequence of the gene. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **358** (1): 141~ 148
- Ishono T, Ohtsuki S, Homma K, *et al.* cDNA cloning of mouse prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells. *J Biochem*, 1998, **123** (3): 540~ 545
- Rennex D, Hemmings B A, Hofsteenge J, *et al.* cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue. *Biochemistry*, 1991, **30** (8): 2195~ 2203
- Shirasawa Y, Osawa T, Hirashima A. Molecular cloning and characterization of prolyl endopeptidase from human T cells. *J Biochem*, 1994, **115** (4): 724~ 729
- Harwood V J, Denson J D, Robinson-Bidle K A, *et al.* Over expression and characterization of a prolyl endopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol*, 1997, **179** (11): 3613~ 3618
- Kuwabara T. Characterization of a prolyl endopeptidase from spinach thylakoids. *FEBS Lett*, 1992, **300** (2): 127~ 130
- Polgar L. pH dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle. *Eur J Biochem*, 1991, **197** (2): 441~ 447
- Fulop V, Bocskei Z, Polgar. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell*, 1998, **94** (2): 161~ 170
- Medrano F J, Alonso J, Garcia J L, *et al.* Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. Citri: a prototype for the prolyl oligopeptidase family. *EMBO J*, 1998, **17** (1): 1~ 9
- Shinoda M, Matsuo A, Toide K. Pharmacological studies of a novel endopeptidase inhibitor, JTP-4819, in rats with middle cerebral artery occlusion. *Eur J Pharmacol*, 1996, **305** (1~ 3): 31~ 38
- Mantle D, Falkous C, Ishiura S, *et al.* Comparison of proline endopeptidase activity in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Chim Acta*, 1996, **249** (1~ 2): 129~ 139
- Welches W R, Brosnihan K B, Ferrario C M. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase. *Life Sci*, 1993, **52** (18): 1461~ 1480
- Ohtsuki S, Homma K, Kurata S, *et al.* A prolyl endopeptidase of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly): its purification and suggestion for its participation in the differentiation of the imaginal discs. *J Biochem*, 1994, **115** (3): 449~ 453
- Matsubara Y, Ono T, Tsubuki S, *et al.* Transient up regulation of a prolyl endopeptidase activity in the microsomal fraction of rat liver during postnatal development. *Eur J Biochem*, 1998, **252** (1): 178~ 183
- Storey E, Cappai R. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1999, **25** (2): 81~ 97
- Aoyagi T, Wada T, Nagai M, *et al.* Increased gamma-aminobutyrate aminotransferase activity in brain of patients with Alzheimer's disease. *Chem Pharm Bull*, 1990, **38** (6): 1748~ 1749
- Ishiura S, Tsukahara T, Tabira T, *et al.* Putative N-terminal splitting enzyme of amyloid A4 peptides, ingensin, which is widely distributed in mammalian cells. *FEBS Lett*, 1989, **257** (2): 388~ 392
- Fukunari A, Kato A, Sakai Y, *et al.* Colocalization of prolyl endopeptidase and amyloid beta-peptide in brains of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett*, 1994, **176** (2): 201~ 204
- Shinoda M, Toide K, Ohsawa I, *et al.* Specific inhibitor for prolyl endopeptidase suppresses the generation of amyloid beta protein in NG 108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **235** (3): 641~ 645
- Barelli H, Petit A, Hirsch E, *et al.* S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **257** (3): 657~ 661
- Lai A, Sisodia S S, Trowbridge I S. Characterization of sorting signals in the β -amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J*

Biol Chem, 1995, 270 (8): 3565~ 3573

- 25 Umemura K, Kondo K, Ikeda Y, *et al.* Pharmacokinetics and safety of Z-321, a novel specific orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in healthy male volunteers. J Clin Pharmacol, 1999, 39 (5): 462~ 470

Progress in the Studies of Prolyl Endopeptidase. LI Min, CHEN Chang-Qing (Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China).

Abstract Prolyl endopeptidase (PEP) [EC 3.4.21.26] is a new class of serine protease, which is capable of hydrolyzing a substrate on the carboxyl

site of proline residue located internally in a peptide. It can hydrolyse several peptide hormones and neurotransmitters, so abnormal raise and decrease of PEP activity would result in diseases related to memory and cognition. Specific inhibitor for example JTP-4819 shows a good pharmaceutical effect in reversing scopolamine-induced amnesia in rats. The analysis of crystal structure of PEP from porcine muscle has greatly promoted the research on PEP.

Key words prolyl endopeptidase, serine protease, inhibitor, crystal structure

短时程突触可塑性的功能意义*

贾 凡 周逸峰¹⁾

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026)

摘要 短时程的突触可塑性是突触可塑性的一种重要表现形式, 对实现神经系统的正常功能起着重要作用. 突触的短时程可塑性能够加强突触传递的确定性, 调节大脑皮层兴奋和抑制之间的平衡, 形成神经活动的时间、空间特性, 形成并调节皮层丘脑网络的同步振荡. 突触的短时程可塑性可能也参与了注意、启动效应、睡眠节律和学习记忆等神经系统高级功能的实现.

关键词 突触, 短时程可塑性, 易化, 压抑

学科分类号 Q426, Q424

由于在学习记忆和神经系统发育中的重要作用, 突触的长时程可塑性 (包括长时程增强, LTP 和长时程压抑, LTD) 近 30 年来^[1]一直倍受人们关注. 近年来, 另一种形式的突触可塑性——突触的短时程可塑性也越来越成为各国神经科学家们关注的焦点, 因为它与神经元的信息传递和信息处理等神经系统的基本特性有着密切的关系^[2,3]. 神经系统每时每刻都接受数以千计的来自外界的刺激. 如何从大量的感觉输入中提取有用的信息, 一直是一个令人迷惑的问题. 现在普遍认为突触的短时程可塑性在其中扮演了重要的角色. 本文将短时程突触可塑性的功能意义做一简要综述.

1 短时程突触可塑性的概述

神经系统中化学突触的传递效率并不是恒定的, 突触的活动历史会使突触后电位 (PSPs) 的幅度增强或减小^[3], 这就是突触的可塑性. 如果该可塑性发生在短时程内, 并且能迅速恢复则称为

短时程的突触可塑性. 短时程突触可塑性又分为短时程的增强和压抑作用.

1.1 突触的短时程增强作用

在一些突触中, 重复刺激下 PSPs 的大小会出现明显的增加甚至增加数倍, 这种现象称为突触的短时程增强作用 (short-term enhancement, STE). STE 包括许多成分: 如果 PSPs 的增强作用发生在 1 s 之内, 就称为突触的易化作用 (synaptic facilitation), 易化作用中很快衰减的成分称为 F1, 衰减较慢的成分称为 F2; 发生在短暂的数秒钟之内的突触传递的增强作用, 称为 AUG (augmentation); 如果 PSPs 逐渐增强的过程发生在几分钟之内, 就称为 potentiation. Potentiation 的衰减过程称为 PTP (post tetanic potentiation). 用药理学、

* 中国科学院生物与技术特别支持费资助.

¹⁾ 通讯联系人. 中国科学技术大学生命科学学院视觉研究实验室.

Tel: (0551) 3601436, E-mail: zhoubu@ustc.edu.cn

收稿日期: 1999-12-26, 修回日期: 2000-02-12

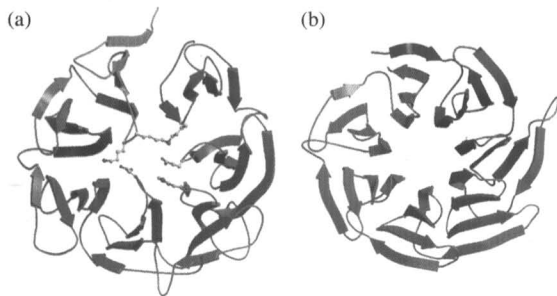


图 1 脯氨酰内肽酶的非催化区和典型的 β -propeller 结构的折叠比较^[12]

(a) PEP的 β -propeller结构。“velcro”结构仅靠第一（蓝色）和最后一条多肽片层（绿色）的疏水作用相互靠近但没有闭合。Lys82、Glu134、His180、Asp242、Lys389和Lys390（球棍示意图）使“propeller”的通道更加狭窄。

(b) G 蛋白 β 亚基结构。“velcro”结构依靠N端（蓝色）和C端的三条反平行 β 链（绿色）间的氢键作用而闭合。



图 2 脯氨酰内肽酶晶体结构示意图^[12]