

蛋白质空间结构的运动性与功能关系的研究

李家瑶

(中国科学院生物学部, 北京)

在大分子晶体学发展的初期, 人们基于对刚性分子的认识来讨论蛋白质的结构与功能的关系, 有关分子柔性的讨论在那时还很不时兴。七十年代中期以前, 关于大分子柔性的研究才逐渐兴起, 比如氨基质子交换的研究指出球蛋白分子具有柔性, 多肽骨架的片段和氨基酸侧链具有运动性。¹H NMR 研究观察到了芳香环的翻转运动。另一方面, 不同功能态的晶体结构研究也揭示了诸如血红蛋白等蛋白质亚基四级结构的运动(分子肺), 以及通过不同晶态条件下的分子构象的比较所获得的局部构象变化的信息。在这一阶段甚至通过荧光去极化实验还推断出免疫球蛋白结构域的运动性。七十年代中期以后, 这方面的研究大大增加了, 首先是发展了各种实验方法可以提供原子分辨率水平的蛋白质分子运动状态的详细信息, 如晶体学向高分辨率的发展, 结构的修正包含了温度因子参数, 它提供了原子的高频振动状态及分

子静态运动性的信息。中子衍射对质子、氘的快慢交换研究, NMR 对溶液中大分子构象的定量描述等等都达到了很高的水平。此外, 理论计算加上计算机模型显示系统, 已经可以把蛋白质分子在执行功能过程中的运动变化象放电影一样连续显示在电视屏幕上, 尽管这种分子的运动离真实情况还有一段距离。现在已经可以说, 大分子在执行其生物功能时, 整体分子是处于主动的不断运动之中, 这种运动在 10^{-12} 秒到 1 秒以上的一个很宽的时间范围内都有反映。所以, 只用柔性已不能完全说明这种主动运动性及其动力学性质了。因此, 当我们现在说‘蛋白质结构’时, 决不意味着这个结构只是一个具有一定三维坐标的静态原子排布, 而是包含了各原子在其平均位置上的不断振动, 以及局部或整体分子的不断运动。同时, 也可以肯定的说, 大分子的构象运动性对其功能的执行是本质性的, 虽然现在离定量描述它们之间

- 1981.
- [4] Carlin, R. K. et al.: *J. Cell Biol.* 89, 449, 1981.
- [5] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.* 98, 503, 1975.
- [6] Breathnach, R. et al.: *Nature*, 270, 314, 1977.
- [7] Alwine, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5350, 1977.
- [8] Towbin, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 100, 264, 1979.
- [9] Reinhart, M. P. et al.: *ibid.* 123, 229, 1982.
- [10] Gershoni, J. M. et al.: *ibid.* 131, 1, 1983.
- [11] Bittner, M. et al.: *ibid.*, 102, 459, 1980.
- [12] Nielsen, P. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 12316, 1982.
- [13] Gershoni, J. M. et al.: *J. Cell Biol.*, 95, 422a, 1982.
- [14] Peforoen, M. et al.: *FEBS Letters*, 145, 369, 1982.
- [15] Stellwang, E. J. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 8, 299, 1980.
- [16] Renart, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3116, 1979.
- [17] Clarke, L. et al.: *Methods in Enzymology*, 68, 436, 1979.
- [18] Taylor, G. R.: *Anal. Biochem.*, 148, 524, 1985.
- [19] Howe, J. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 12836, 1981.
- [20] Gibson, W.: *Anal. Biochem.*, 118, 1, 1981.
- [21] Erickson, P. F. et al.: *J. Immunol. Methods*, 51, 241, 1982.
- [22] Legocchi, R. P. et al.: *Anal. Biochem.*, 111, 385, 1981.
- [23] Denhardt, D. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 641, 1966.
- [24] Fisher, P. A. et al.: *J. Cell Biol.*, 92, 674, 1982.
- [25] Bartles, J. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 140, 284, 1984.
- [26] Hayman, E. G. et al.: *J. Cell Biol.*, 95, 20, 1982.
- [27] Gregory, A. et al.: *Anal. Biochem.* 148, 288, 1985.

[本文于 1985 年 12 月 30 日收到]

的关系还相去甚远。

大分子晶体学研究发现，蛋白质分子内部大范围的相对运动大致可分为三种类型。其中象免疫球蛋白一类蛋白质结构域之间的运动特点是：它的分子中各结构域之间由柔性单肽链连接，结构域之间的相互作用很少，柔性肽的构象可变性造成结构域的运动，使整个分子存在着多种构象态以适应该分子能结合多变的配体。还有一种类型，分子也是由刚性的球状结构域组成，并由柔性肽连接，但结构域之间有大范围的相互作用，所以结构域只能采取几种取向式的相对变化。属于这一类的蛋白质很多，最典型的是酵母己糖激酶，此外还有肝的乙醇脱氢酶，甘油醛-3-磷酸脱氢酶，门冬氨酸转氨甲酰酶等，我们在下面将取柠檬酸合成酶做为一个例子详细说明这一类运动性，并顺便介绍晶体学研究运动性的方法。再一种类型可以胰

蛋白酶原为例，它的分子中存在一个无序区，这个无序区与蛋白质主体部分相互作用很少，同时，它在某种条件下会变得高度有序，体现了酶从不活泼型向活泼型的转变包含了分子的运动。大分子晶体学过去一向被认为只能研究大分子静态的空间结构，现在看来，它完全能给出大分子空间结构的动态信息，而且随着方法的不断改进，它所提供的分子动态的信息仍然是大量的、本质的、有指导意义的，至少目前的情况是如此。因此，作者还将在本文中介绍应用温度因子研究蛋白质结构运动性的新例子，和运用X射线低温酶学的方法研究动力学的一个新例子。

柠檬酸合成酶

这个酶催化乙酰辅酶A和草酰乙酸缩合产生柠檬酸和辅酶A，它的分子由两个同样的

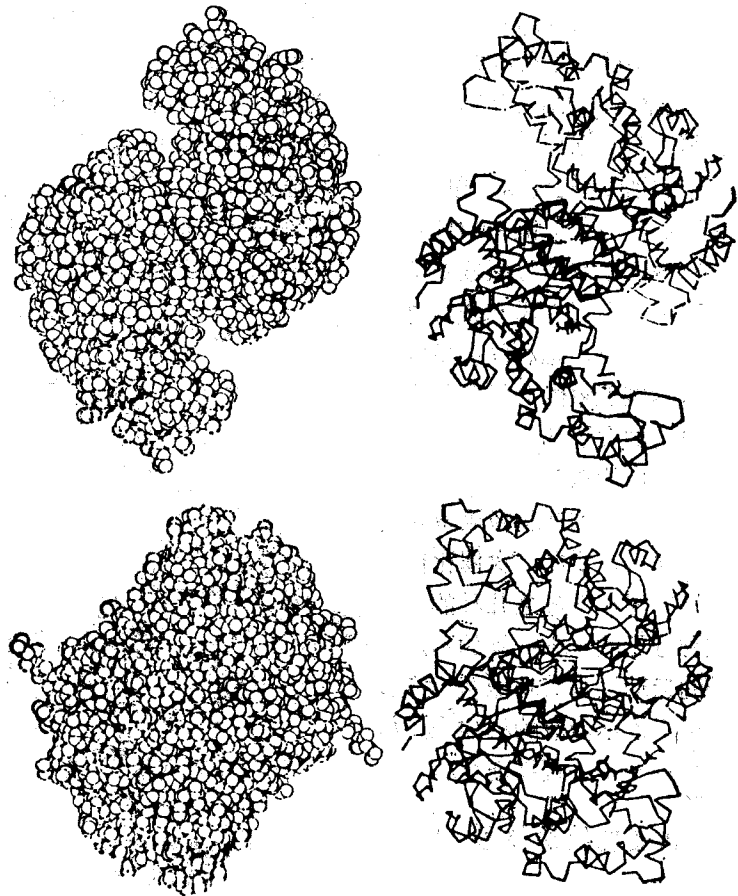


图1 柠檬酸合成酶的开放型和关闭型⁽¹⁾

亚单位组成, 每个亚单位含 437 个氨基酸。已经获得它的三种晶型的晶体结构, 虽然每个亚单位都是由相似的两个结构域构成 (一大一小), 但两个结构域的相互关系在三种晶型中可分为两种类型, 一为开放型, 一为关闭型 (图1)。有趣的是从这样两种构象类型可以推出结构域的运动表现在底物结合位上, 发生在催化循环过程中。

柠檬酸合成酶 P4 晶型是在柠檬酸条件下结晶的, 有草酰乙酸存在晶体解体, 是开放型。C2 晶型是在柠檬酸和 CoA-SH 共存条件下生长的, C4 晶型中含有草酰乙酸, 这两种晶型的构象是关闭型。开放型和关闭型的关系是前者的小结构域绕 274 位残基的一个轴转 18° 就变成了后者 (当忽略二者结构的细微差别时), 所以这是结构域的相对运动。晶体结构发现, C2 晶型中柠檬酸是结合在两个结构域所形成的一个缝中, 这个缝是一个极性口袋, 而 CoA-SH 结合到小结构域上, 它的半胱胺部分与成键的柠檬酸靠得很近, 同时辅酶 A 的结合还需要另一个亚单位的大结构域参与, 所以只有关闭型的酶构象可以提供较佳的辅酶结合位。在 C4 晶型中, 草酰乙酸的结合位与 C2 晶型的柠檬酸结合位一模一样, 它包含了四个组氨酸残基和三个带电的精氨酸残基, 所以在没有带负电的底物所提供的反电荷情况下, 这种关闭型的构象似乎是不利的。从这些现象的分析可以推测草酰乙酸的结合好像是触发了构象的改变, 并进而可以设想, 催化反应的构象型可能是关闭型, 反之, 开放型是底物结合和产物释放型。这样一来, 结构域的运动一定要在每次催化循环中重复出现, 也就是出现在千分之几秒的过程中。可以想象, 这种分子的一张一缩的不断运动充分体现了分子的运动性与其功能的关系, 在没有底物时, 分子采取不活泼的稳定构象。这一研究结果尚有待进一步去直接证实。

胰蛋白酶-胰蛋白酶原体系

胰蛋白酶原是胰蛋白酶的前体, 它不能和底物结合, 但可以 and 胰蛋白酶抑制剂 (PTI) 结

合, 尽管结合常数大大低于胰蛋白酶。另外, 酶原在被切掉 N 端的六个残基之后就出现了胰蛋白酶的全部活性。对于这个体系的晶体结构研究, 不但解释了上述的作用机理, 而且表现了构象的变化对功能的响应。图 2 是一个模式图, 图中 A 到 E 的晶体结构以及 PTI 的晶体结构分析都已完成, 其他结构是从这些已知结构中推测出来的。最有兴趣的是胰蛋白酶原结合抑制剂和异亮-缬氨酸二肽的活性区 (图中用矩齿形表示) 与胰蛋白酶相应区域构象变换的两种状态。在胰蛋白酶原中, 这个区域是无序的, 而在胰蛋白酶中这个区域是高度有序的。在什么条件下会触发这两种构象态的转化? 从胰蛋白酶原的晶体学实验可以推知, 当存在 PTI 时, 胰蛋白酶原与 PTI 的结合导致了结合区域由无序变为有序, 从而可以形成复合物 C, 并产生结合异亮-缬二肽的结合位, 进而可以获得三元络合物 D, D 的结构与 E 非常近似, 只差 N 端的一段柔性肽。所以说, 从能量的角度看, 结合能使结合 PTI 的活性位变得有序。这种由结合底物所调控的构象由无序变有序的过程对蛋白质与蛋白质的相互作用应该说是有利的。可以推测, 底物 (或抑制剂) 与一个刚性的、立体化学上互补的表面相结合 (通过非共价键相互作用) 要

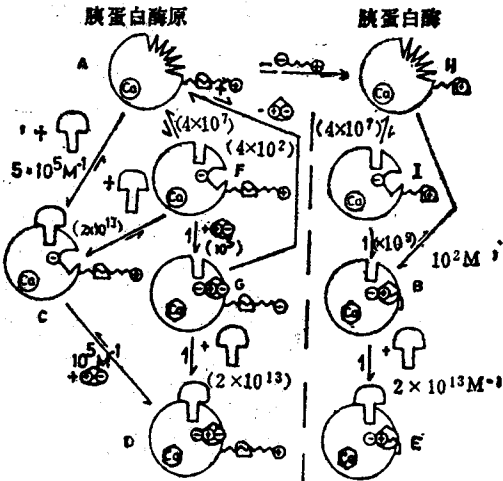


图 2 胰蛋白酶原-PTI-异亮-缬氨酸系统 (左半部) 和胰蛋白酶-PTI 系统 (右半部) 的结构模式图及其热力学参数^[3]

W 代表柔性区, (+)(-) 代表异亮-缬氨酸二肽。括号外数字为结合常数实验值, 括号内数字为假定值。

比结合到一个柔性区域好得多。在胰蛋白酶的条件下,由于去掉了酶原 N 端的六肽,从而暴露了异亮-缬氨酸,使它们变成了胰蛋白酶的 N 端,从而有可能形成类似于酶原中外源异亮-缬氨酸二肽那样的结合位,同时也引发了结合底物活性位的有序性。

在不同温度下(173°K、108°K、室温)所测定的酶原晶体结构可分辨出该酶是属于热振动无序还是存在一组构象亚态,因为后者应基本不依赖于温度。在低温状态下,上述活性区的大部分(除 N 端外)有序性并没有增加,这就说明活性区的无序反映了蛋白质这一部分的构象态在变化中,而热振动无序只出现在 N 端。有趣的是,使用其他方法已经发现了这些不同构象亚态之间构象的互相转变。

这种蛋白质结构无序有序之间的转换在 TMV 蛋白盘组装成螺旋体 TMV 中似曾见到,在 α -胰凝乳蛋白酶与胰凝乳蛋白酶原之间和其他一些酶的结构中也有类似的情况,不再赘述。

抗 肽 抗 体

实验证实,模拟蛋白质表面位点而制成的抗原(具有一定二、三级结构的小肽)完全有可能激发产生识别完整蛋白质的抗体,称为抗肽抗体。设计合成蛋白质表面位点的小肽需要大分子晶体学提供的信息,通过这种方法有可能制成真正安全的疫苗。

为了解释那些抗柔性短肽的抗体能与高度有序的蛋白质分子发生相互作用以及作用的微观机制, Lerner 等人设计了如下实验:

首先考察 22 种已经获得高分辨率并修正了的晶体结构。因为温度因子可以反映分子不同区域的相对构象的可变性,即不同部位的相对运动性的大小,从而想到了蛋白质表面特异运动性可能与抗体-抗原的识辨有关。为了验证这一想法,选择蚯蚓肌血红蛋白(Myohaemerythrin)做为深入研究的对象,因为对它的结构已经了解得很透。其特征是四个螺旋形成一个反平行捆绕着活性位上的两个铁原子, N 端、C

端以及螺旋之间成环区。两种晶型的结构(一个是单体,一个是八体)都进行了高分辨率的结构修正,所以可以从温度因子的比较扣除误差以及无序性等因素的影响,使温度因子更能反映表面区域的运动性。同时,已知这个蛋白质与兔子的蛋白质在结构上没有同源性,从而不会干扰在兔子身上做免疫反应实验。

选择这个蛋白质的 12 个表面区域的片段,将其合成,做为免疫抗原。它们由几肽到十几肽组成,总计包含了 118 个残基中的 83 个残基(有交叉),约占该蛋白质顺序的 70%,这些小肽有些是处于该蛋白质的运动区(热肽),有些是处于该蛋白质的高度有序区(冷肽),但是要求尽量减小小肽之间的每个残基的平均暴露区之间的差别,以及它们的疏水性之间的差别。

实验证明,这些小肽除一个以外,其他所有的都具有免疫抗原活性,这一情况与其运动性无关,但检测这些小肽的抗肽抗血清(含抗肽抗体)的免疫结合活性发现:所有由高度有序区所引发的抗血清与完整的蛋白质的反应都是负的或反应能力很低。相反,运动区小肽引发的抗血清与完整蛋白质的反应性都很强,并且与相应的小肽的免疫反应活性大小平行。同时,通过光谱学等其他方法研究证实,蛋白质的天然结构,特别是活性区的配位环境在此期间保持不变。通过在同源及异源肽存在下免疫沉淀研究又证实了运动区肽引发的抗肽抗血清的专一性,而那些冷肽引发的抗血清与蛋白质的反应性只是稍微受到同源肽的抑制,说明这种反应性可能是非专一性的。

根据上述的实验可以推测,抗体与其抗原在相互作用过程中,蛋白质的免疫活性位可能采取不同于蛋白质晶体学所给的那种平均结构的构象,当主动变化中的某一个构象态适于与抗体结合时,抗体就与抗原牢牢地结合在一块。在溶液中,这种运动性极有可能要比温度因子计算的位移要大(根据温度因子计算,主、侧链最大位移分别是 $\pm 0.7 \text{ \AA}$ 和 $\pm 0.9 \text{ \AA}$),但决不会大到分子局部构象解体(根据光谱研究)。所以,上述的实验说明了蛋白质主链的运动性在

抗体抗原结合上的重要性，而亲水性和局部的无序性则可能是微不足道的。众所周知，以前在预言抗原决定簇时皆以蛋白质表面的暴露程度或亲水性为依据，上述的观点显然与此不同。同时，这个实验也可能反映了蛋白质-蛋白质相互作用的一个微观机制。值得注意的是，有关的研究结果在其他蛋白质和病毒上也有明确的反映。

核糖核酸酶 A

运用 X 射线低温酶学的方法，已经测定了不同类型的核糖核酸酶 A 的原子分辨率水平的晶体结构。它们包括：天然的酶、在活性位上带硫酸根离子的酶、酶与二核苷酸的络合物、酶与环式磷酸中间态络合物、酶和过渡态的络合物、酶和产物的络合物。

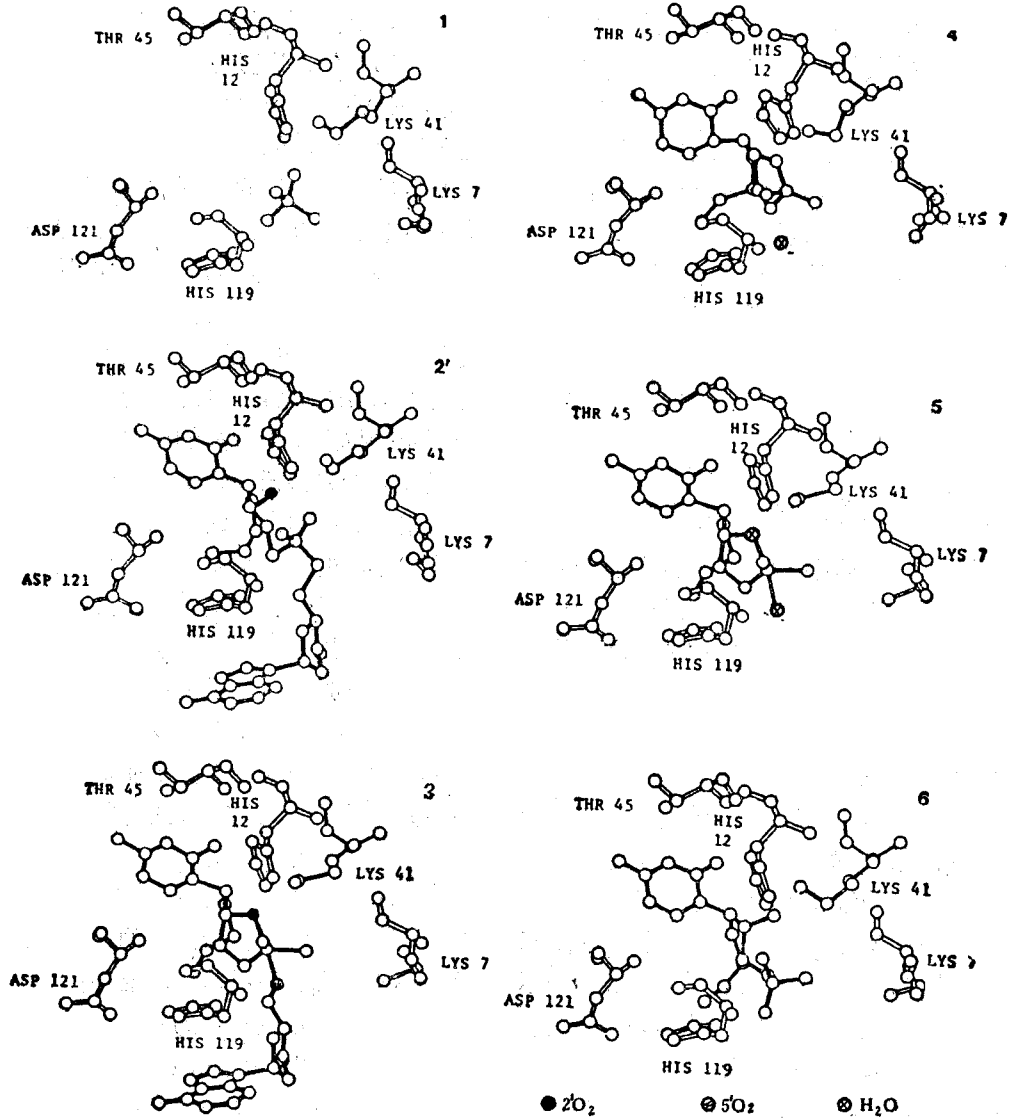


图3 核糖核酸酶A催化机制图^[4]

图中只表示主要的活性位残基和底物(底物键用实线表示)。1, 天然的酶, 注意硫酸根与活性位结合。2, 酶与底物络合物 (CpA)。注意通过 12 位组氨酸去质子的 2' 氧。3, 第一阶段过渡态, 磷酸根转换反应。4, 2', 3'-环式磷酸盐中间态, 此处水分子将做为亲核试剂起作用。5, 第二个过渡态, 用来水解环式磷酸盐中间态的。6, 酶-产物复合物。

原酶的晶体结构在 $+22^{\circ}\text{C}$ 到 -32°C 的温度范围内修正到了 $1.5\text{ \AA}$ 分辨率水平。该分子的特点是在活性位处有一个很深的缝，在提纯和结晶的过程中，活性位处总含有一个硫酸根离子，它和抑制剂与酶发生竞争结合。含嘧啶环的核苷酸抑制剂与酶的活性位结合，嘧啶环处于一个深的口袋里，核糖部分与蛋白质发生少数的相互作用，磷酸则处于酶表面的一个槽里，与许多带正电的侧链非常接近，它们包括 12 位和 119 位上的组氨酸，7 位和 41 位上的赖氨酸。在不含硫酸根离子的活性位上形成一个与水结合的氢键网络来占据抑制剂的位置。除此之外，活性位还含有 45 位的苏氨酸和 121 位的门冬氨酸，这六个氨基酸构成了核糖核酸酶 A 的催化机理的结构基础，X 射线低温酶学就是围绕这些残基的作用来研究的。

为了收集高分辨率的 X 射线衍射数据（在七到十天内），首先必须测定在这个阶段内稳定酶-底物络合物的最佳条件，诸如溶剂、pH、温度等等。还要证明，天然酶活性位各残基的位置和相对构象在不同温度下无明显改变。使用二脱氧核苷酸做为底物类似物得到了稳定的酶-底物络合物的大晶体，这是因为考虑到一条长的单股 RNA 太大，它不可能扩散到溶剂通道里面去，而核糖核酸酶也能水解 3' 碱基是嘧啶的那些三核苷酸或二核苷酸。同时，为了避免生成反应物就必须深度降温（ -10°C ），并去掉底物类似物糖环上的 2'-OH，以降低反应速度。

嘧啶核苷的 2', 3'-环式单磷酸是酶的一个化学上稳定的催化中间态化合物，它也是 RNA 水解过程中的酶反应后一步的底物，光谱实验证明，在 pH 5.5 和 -70°C 的条件下，这个样品可以浸泡到核糖核酸酶的晶体中，并形成在一段时间内具有一定稳定性的酶-中间态络合物以适用于 X 射线数据收集。具体做法是：天然酶晶体装在流动池中，冷到 -70°C ，流动池直接装到衍射仪上，一定浓度的胞嘧啶核苷 2', 3'-环单磷酸溶于母液中以 0.5（毫升/天）的速度流过晶体，选择几个对活性位上存在嘧啶敏感

的衍射点在 48 小时内重复测量，直到衍射强度不进一步发生变化为止，然后尽量快地收集一套 $1.9\text{ \AA}$ 分辨率的数据。

即便在极低的温度下，过渡态也是不可能稳定到足以完成 X 射线数据收集的，所以必须设计过渡态类似物。根据过渡态化合物与酶的结合要比底物和产物牢固得多这一原理，以及对核糖核酸酶的过渡态的立体化学和电荷构型的了解，选择尿核苷-钒酸盐络合物做为过渡态类似物，将它浸泡入晶体并在 -10°C 情况下收集到了 $1.5\text{ \AA}$ 分辨率的全套数据，同时还用一个晶体在 -18°C 以下收集到了另一套全套数据，减少了晶体间数据统一的误差。

通过以下三种方法获得了酶-产物络合物：将产物浸泡入晶体，酶与产物共晶，在一定温度下，将底物加入酶晶体中使其发生催化反应，最后形成酶和产物的络合物。然后迅速降温来限制反应逆转或继续进行。以上三种实验都做到了形成 3'-尿苷单磷酸产物与酶的复合物，其中共晶的一种得到了 -10°C 下的 $1.5\text{ \AA}$ 分辨率的修正结果。

图 3 示出了各类络合物活性位周围的情况，这是一个原子分辨率水平的图，可以说这就是核糖核酸酶 A 反应动态过程中的几个特写镜头。我们只介绍与酶动力学有关的一些结果。首先，天然的酶构象表现出 41 位赖氨酸是动力学无序的，它可能有几种构象态，而其中的一种是活性态。酶与二核苷酸底物结合时，后者处于拉紧的状态，通常的四面体磷酸二酯联结扭成了三角双锥体形，它的扭角也从反式、反式变成 *Gauche* 和反式的了，这种构型与磷酸二酯键水解的立体静电控制原则相一致。12 位和 119 位的组氨酸咪唑环的取向正如所料，是处于最佳底物结合状态的排布，并且在整个反应过程中不变。反应的后一步，水解前的环式磷酸中间态化合物也处于拉紧的状态，两个组氨酸与磷酸都是最佳接触。在酶与二核苷酸络合物、酶-中间态络合物中，41 位赖氨酸一直保持无序状态，但在酶与过渡态尿核苷-钒酸盐络合物中，该赖氨酸却变成有序的了。这是因为赖

闪光光解偏振法测膜蛋白旋转扩散运动

胡 坤 生

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

自 1970 年 Frye 和 Edidin 首先用细胞融合方法证实膜蛋白的扩散运动以来^[1], 有关测定膜蛋白侧向扩散运动和旋转扩散运动的各种技术已有详细报道^[2]。影响蛋白质在膜中运动的因素很多, 如: 温度、pH; 细胞膜内其它组分与蛋白质的相互作用; 细胞内的微丝、微管等。所有因这些影响而出现的运动都是蛋白质在膜中的自由扩散运动。另有一些现象则是受

氨基酸上的正电荷与五价磷上的处于赤道面上的氧的负电荷耦合的结果, 这一相互作用稳定了过渡态, 并使酶与过渡态的结合很强。所以, 41 位赖氨酸的运动性在核糖核酸酶有效催化过程中起了关键性的作用。同时发现, 底物磷原子在催化过程中也移动了几乎 2 Å, 这是在底物络合物和生成环式磷酸盐中间介质期间所观察到的最大变化。由于磷原子的移动, 造成了磷酸盐上的几个氧原子的移动, 从而得以通过两个组氨酸的微小的单键旋转来跟踪这种运动。酶-产物络合物的结构与酶-底物络合物的结构很相似, 特别有趣的是 41 位赖氨酸, 在这两个阶段之间有一个无序变有序再变成无序的过程。在整个反应期间, 7 位赖氨酸的位置始终未发生任何改变, 而且与底物原子保持在 6 Å 以上的距离, 所以排除了 7 位赖氨酸是活性位的可能。

总起来看, 在催化期间酶没有发生大的构象变化。下述的几个明显的步骤可以做为核糖核酸酶催化的特征: 酶与底物的一个拉紧构型紧密的专一结合, 由 12 位和 119 位组氨酸参与的一个普通的酸-碱催化, 一个由 41 位赖氨酸

新陈代谢影响的复杂过程(如带帽现象等)。

本文只讨论膜蛋白的旋转扩散运动的闪光光解偏振测定法。

一、测量方法和原理

闪光光解测量膜蛋白旋转扩散运动的装置示意图如图 1。

样品池中的样品由激光闪光偏振激发, 每参与的离子相互作用所提供的过渡态的最佳稳化。

众所周知, 早期的晶体学研究也揭示了诸如溶菌酶等各种酶的水解机理, 但那时只有酶和酶与产物类似物络合物的晶体学数据, 中间过程是通过模型法推出来的。上述的例子则不同, 每一步都有晶体学数据, 即人们在原子水平上直接观察到了酶的动力学过程。

参 考 文 献

- [1] Frauenfelder, H. et al.: *Nature*, 280, 558, 1979.
- [2] Tainer, J. A. et al.: *ibid.*, 312, 127, 1984.
- [3] Huber, R. et al.: *Biopolymers*, 22(1), 261, 1983.
- [4] Douzou, P. et al.: *Adv. Protein Chemistry*, 36, 246, 1984.
- [5] Noble, D. et al. (Editors): *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 42, 21, 1983.
- [6] Levitt, M.: *J. Mol. Biol.*, 168(3), 595, 1983.
- [7] Hélène, Claude (Editor): *Structure, Dynamics Interactions and Evolution of Biological Macromolecules*, 1982.
- [8] Huber, R. et al.: *CRC Critical Review in Biochemistry* 15(4), 291, 1984.
- [9] Wüthrich, K. and Gerhard Wagner: *Trends in Biochem. Sci.*, 9(4), 152, 1984.

[本文于 1985 年 11 月 30 日收到]