

专论与综述

蛋白质的脂化修饰

许 凤 浩

(同济医科大学分子生物学研究室, 武汉)

提 要

真核生物体内的一些蛋白质可以进行直接或间接脂化修饰。直接脂化修饰有两种,一是肉豆蔻酰化,另一是棕榈酰化;间接脂化修饰是通过肌醇磷酸复合物进行的,它们具有许多显著的特征,并且修饰后的蛋白质又发挥着一些重要的生理功能。

真核生物体内的许多蛋白质在翻译合成的同时或之后,常与脂类共价连接。其连接方式有的是直接的,有的是间接的;其存在部位有的是在细胞膜外表面,有的是在细胞膜内表面,还有的存在于细胞浆的可溶性区域中;其功能涉及蛋白质与膜的连接、生长调节、形态发生、受体表达、膜融合以及保护蛋白免受水解作用等。本文根据手头所有文献,简介如下。

一、直接脂化修饰

直接脂化修饰是指蛋白质分子上N端甘氨酸残基的氨基或靠近C端半胱氨酸残基的巯基通过酰胺键或硫酯键与脂肪酸连接。能与蛋白质直接相连的脂肪酸有两种,一种是肉豆蔻酸,另一种是棕榈酸^[1]。这两种脂肪酸修饰后的蛋白质常定位于细胞膜内表面或游离于细胞浆内。在小鼠研究中表明,这类修饰广泛存在于心、肝、肾中^[2]。与肉豆蔻酸相连的蛋白质,称为蛋白质的肉豆蔻酰化,同样,与棕榈酸相连的蛋白质,称为蛋白质的棕榈酰化,二者的特征颇有不同。

1. 蛋白质的肉豆蔻酰化

蛋白质的肉豆蔻酰化是在肉豆蔻酰转移酶作用下进行的。它把肉豆蔻酸的羧基与蛋白质N端甘氨酸残基的氨基相连。

肉豆蔻酰转移酶的专一性很强,其修饰的多肽链必定在其N端,而N端的第一个氨基酸又必需是甘氨酸。如果把N端的甘氨酸突变为其它氨基酸,如丙氨酸,虽然二者只差一个甲基,肉豆蔻酰化作用也即丧失^[3];另一方面,它对肉豆蔻酸的要求也很严格,除肉豆蔻酸外,对其它脂肪酸毫无作用。体外实验表明,把合成的N端具有甘氨酸残基的多肽放入从酵母中提取的肉豆蔻酰转移酶中,然后放入大于肉豆蔻酸的其它脂肪酸,结果未发现有脂化修饰产物^[4]。

肉豆蔻酰转移酶在被修饰蛋白正在翻译合成时就开始发挥作用了。实验表明,在蛋白质合成体系中,加入蛋白质合成抑制剂,蛋白质合成停止了,肉豆蔻酰化作用也即丧失了,这种现象常称为“共翻译”(Co-translation)作用^[5]。

合成蛋白质的核蛋白体有两种,一种游离于细胞浆内,一种附着在内质网膜上。由于能够进行肉豆蔻酰化的蛋白质是在游离的核蛋白体上合成的,因此,肉豆蔻酸的供体——肉豆蔻

酰辅酶 A 和催化其转移的肉豆蔻酰转移酶,二者都可能附着在游离的核蛋白体上。新合成蛋白质之所以能够被该酶所修饰,这说明其 N 端序列必然蕴藏着能够指导该酶发挥作用的信息。实验证明,病毒癌基因产物 P60^{v-src}, 其 N 端的 14 个氨基酸序列可以指导肉豆蔻酰化;合成多肽的 N 端的第二个氨基酸不同,对肉豆蔻酰化的影响程度也不同。

能够进行肉豆蔻酰化修饰的蛋白质尚有,癌基因产物 P56^{lck}, 鼠白血病病毒产物 P15^{gag}, 转化蛋白 P120^{gag-abl}、P85^{gag-cs}、P29^{gag-ras}, 胰岛素受体的 α 和 β 亚基^[7], cAMP 依赖性蛋白激酶的催化亚基, NADH-细胞色素 b₅ 还原酶等。

2. 蛋白质的棕榈酰化

蛋白质的棕榈酰化是在棕榈酰转移酶的作用下进行的,该酶将靠近蛋白质 C 端半胱氨酸的巯基与棕榈酸的羧基以硫酯键连接在一起。棕榈酰转移酶的专一性没有肉豆蔻酰转移酶的专一性高,其底物既可以是棕榈酸,也可以是棕榈酸之外的硬脂酸。

与肉豆蔻酰化作用不同,棕榈酰化发生在被修饰蛋白翻译合成之后。在病毒糖蛋白的棕榈酰化实验中,其时间大约是在新合成蛋白从多聚核蛋白体上释放后的 20 分钟内,可能是在该类蛋白质通过高尔基器的运输过程中。新合成的 P21^{ras} 蛋白没有棕榈酰化,只有加工后的蛋白质才有棕榈酸。棕榈酰化也可能发生在多肽链合成后的很长时间内,如运铁蛋白受体,锚蛋白 (Ankyrin) 等,即使在其合成后的数小时内,也容易观察到棕榈酰化。

棕榈酸的供体是棕榈酰辅酶 A, 其它脂肪酸的供体也是各自相应的辅酶 A 衍生物。在研究髓磷脂蛋白脂质蛋白 (Myelin Proteolipid Protein) 的酰化作用时发现,棕榈酰转移酶对棕榈酰辅酶 A 的表观 K_m 值是 $41\mu\text{m}$, 最大反应速度是每分钟每毫克蛋白 115pmol。对硬脂酰辅酶 A 和油酰辅酶 A 的动力学常数与上述类似,但对于肉豆蔻酰辅酶 A 的动力学常数却明显不同^[8]。

指导棕榈酰化修饰的确切氨基酸序列也不清楚。在 P21^{ras}^[9] 蛋白中,可被棕榈酰化的半胱氨酸定位在距蛋白质 C 端的第四个位置上,随后是两个脂肪族氨基酸。在酵母等的 ras 蛋白以及其它蛋白中也存在类似结构,大概这就是指导棕榈酰化的序列。

目前发现可被棕榈酰化的蛋白尚有疱疹炎病毒 G 糖蛋白, E₂ α 病毒糖蛋白, HA 流感病毒糖蛋白, F 副流感病毒糖蛋白, SV40 病毒大 T 抗原,哺乳动物运铁蛋白受体, HLA B 糖蛋白,载脂蛋白 A-I, 视紫红质,胰岛素受体的 β 亚基和酵母 RAS 蛋白^[10]等。

二、间接脂化修饰

蛋白质的间接脂化修饰是指蛋白质和脂肪酸之间并非直接相连,而是通过一个葡聚糖肌醇磷脂复合物介导连接的。其连接方式已在寄生性原生动物——鲍氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 表面糖蛋白的研究中弄清了。

引起嗜睡性疾病的鲍氏锥虫,其逃脱宿主免疫系统攻击的主要机制是通过膜表面糖蛋白抗原的连续变化,这些膜表面糖蛋白抗原即是间接脂化的糖蛋白,它通过葡聚糖磷酸肌醇锚定在细胞膜上。这种连接有四个基本的部分,(1) 蛋白质的 C 端通过酰胺键连接在乙醇胺上;(2) 乙醇胺通过磷酸与半乳糖和甘露糖的聚合物相连,其中半乳糖是变化的;(3) 后者通过甘露糖连接于葡萄糖胺,葡萄糖胺的氨基是游离的,并且不能用其它基团替代;(4) 然后,再通过氧苷键连接于磷酸肌醇,其中脂肪酸部分几乎完全是肉豆蔻酸,整个结构如图 1 所示^[11]。

在这个复合物中,用不同的化学试剂和酶类可将其不同部分水解下来,例如用亚硝酸可以将葡萄糖胺和磷酸肌醇之间的键打断,用蛋白酶可以将蛋白质部分水解下来,用肌醇磷酸专一性水解酶可以将 1, 2-二肉豆蔻酰甘油水解下来等,特别是后者,它是研究间接脂化修饰的一种有力工具。

除锥虫表面糖蛋白抗原依照此种方式连接

外，其它一些蛋白质也依照此种方式连接。Tse 等^[12]报道，用胰蛋白酶处理淋巴细胞表面抗原 Thy-1，释放的抗原的C端是通过半胱氨酸残基与乙醇胺、磷酸、甘露糖、葡萄糖胺、磷酸肌醇以及其它尚未证实的脂肪酸连接在一起的，其摩尔比率分别是2:2—3:1:1:1:1。Fute-

rman 等^[13]报道，从电鳐电器官分离的球形乙酰胆碱脂酶含有几乎等量的磷酸肌醇；Haas 等^[14]报道，从人红细胞分离的球形乙酰胆碱酯酶是大约含有 10 种脂肪酸的混合物，平均每摩尔酶大约含有一摩尔饱和的及一摩尔不饱和的脂肪酸。Davitz 等^[15]实验室报道，存在于细胞膜表

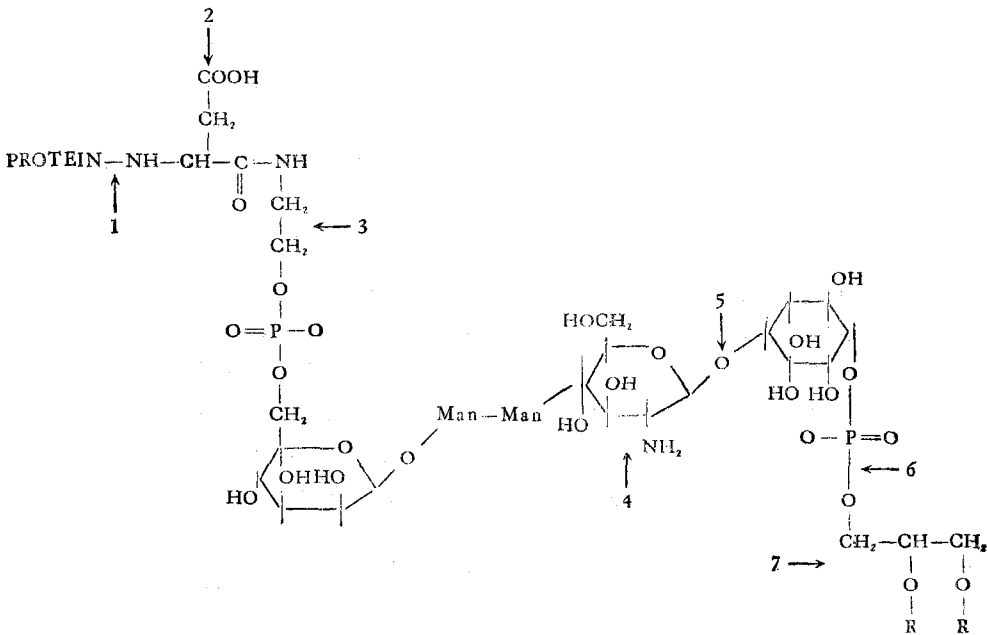


图1 间接脂化修饰的结构图

(1) 蛋白酶裂解处；(2) 天门冬氨酸残基；(3) 乙醇胺；(4) 葡萄糖胺；(5) 亚硝酸裂解处；(6) 肌醇磷酸专一性水解酶裂解处；(7) 二酰基甘油

面，能够结合 C_{3b} 或 C_{4b} 片段，从而抑制补体经典途径和替代途径的 C₃ 和 C₅ 转化酶，保护宿主细胞免受自身补体损伤的促衰变因子 (Decay Accelerating Factor 简称为 DAF)，也是以此种方式连接的。

间接脂化修饰是怎样进行的呢？cDNA 顺序分析表明，锥虫表面变化的糖蛋白不是直接合成的，它首先合成一个前体，在这个前体的C端有段疏水性区域，这个区域在糖蛋白的成熟过程中修剪除去，在修剪的同时暴露出可以进行间接脂化修饰的部位，在此部位上立即进行脂化修饰。另有证据表明，淋巴细胞表面抗原 Thy-1 基因所能够编码的产物也比实际出现在

该类细胞膜上的 Thy-1 抗原分子为大，显然，这些蛋白质在翻译后，很快酶解去除了C端 17—31 个氨基酸残基。

三种鸡胚神经细胞附着分子都是从单一基因经过 RNA 的不同剪切翻译而来的，其中两种是具有不同结构域的跨膜蛋白，而第三种则是间接脂化修饰的蛋白^[16]。指导间接脂化修饰的机制仍不清楚，尚未鉴定出能够指导间接脂化修饰的蛋白质的确切序列。不过，由于被修饰蛋白能够被肌醇专一性磷酸酶水解从完整细胞上释放，所以，间接脂化修饰蛋白定位于细胞膜外侧似乎是确定无疑的。直接脂化修饰和间接脂化修饰的亚细胞定位如图 2 所示。

除上述间接脂化修饰的蛋白外,目前发现的能够进行间接脂化修饰的蛋白还有5'核苷酸

酶,利什曼原虫表面蛋白酶,萤蜜糖酶,大鼠T细胞同种抗原,T细胞活化蛋白,以及草履虫表

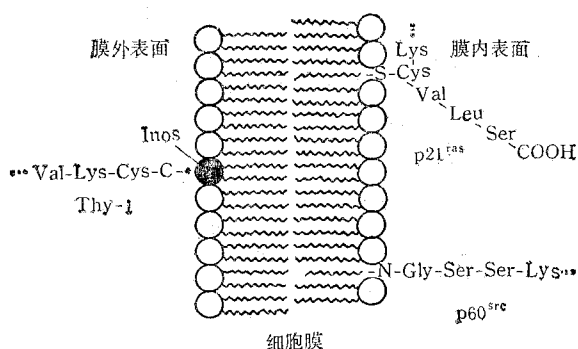


图2 脂化修饰亚细胞定位示意图

Thy-1 为间接脂化修饰的代表, Inos 表示磷酸肌醇复合物; P21^{ras} 是棕榈酰化修饰后膜附着结构的代表; P60^{src} 是肉豆蔻酰化修饰后膜附着结构的代表

面抗原等。

三、脂化修饰后的功能

蛋白质脂化修饰后的功能非常复杂,涉及面很广。病毒癌基因产物 P60^{src} 和 P65^{gag} 未肉豆蔻酰化时是可溶性的,肉豆蔻酰化后是附膜的,显然,肉豆蔻酰化部分在与细胞膜附着方面是重要的。不改变这种蛋白的其它结构活性,而只阻止其肉豆蔻酰化的保守性突变表明,不仅这种突变蛋白的附膜作用丧失,而且其转化活性也丧失^[3]。不过,并不是所有肉豆蔻酰化的蛋白都附着在细胞膜上,细胞内仍有许多肉豆蔻酰化的蛋白质游离于细胞浆内,其中较为突出的是 cAMP 依赖性蛋白激酶的催化亚基,当它不与调节亚基结合时就是可溶性的。因此,肉豆蔻酰化作用不仅是膜附着的条件,而且还能够提供其它必要的信息。

病毒癌基因产物 P21^{ras} 的棕榈酰化和阻止棕榈酰化后的效应与上述类似,也有膜附着和游离的两种形式。一些分泌性蛋白,比如载脂蛋白 A-I 就是棕榈酰化的。

定位于细胞膜上的泡状口炎病毒 G₂ 蛋白,既可以进行肉豆蔻酰化修饰,也可以进行棕榈酰化修饰,其修饰是依赖 ATP 的^[17]。

蛋白质的脂化修饰在信息传递方面也有作用。培养的人淋巴细胞的胰岛素的 α 受体只能

进行肉豆蔻酰化修饰,而其 β 亚基既能进行肉豆蔻酰化修饰,也能进行棕榈酰化修饰。这种脂化修饰后的胰岛素受体,在其内部化过程中必然具有重要的生理作用^[7]。间接脂化修饰的蛋白质是肌醇磷酸专一性水解酶的适宜底物,该酶可以将肌醇磷酸连接的蛋白(包括酶和受体)水解下来,使其产生活性或受体进行下降调节 (Down Regulation)。最近证实, Thy-1 抗原就是一种钙离子调节的信号^[18], 该酶水解的另一产物——二酰基甘油是蛋白激酶 C 的激活剂。二酰基甘油的效应,尚可以通过刺激细胞内磷脂酶的活性而放大。添加二酰基甘油可以增强细胞内磷脂酶对双层脂膜的水解,并且这种效应与酰基链的长短和饱和度成正比。

流感病毒的血细胞凝集素是脂化修饰的蛋白,脂化后的血细胞凝集素对被感染细胞有很强的融合能力,当用氢氧化铵去除脂化的脂肪酸时,其膜融合活性即丧失。实验证明,从鸡瘟病毒中分离的病毒颗粒含有非脂化的血细胞凝集素,这种病毒颗粒比含有脂化血细胞凝集素的病毒颗粒的活性明显为低^[19]。

从胆囊纤维变性病人消化道分离纯化的一组粘液糖蛋白,平均每毫克大约含有 12.2 nmol 的脂肪酸。其中每毫克大约含 33nmol 脂肪酸的粘液糖蛋白,在自然状态时不易被蛋白水解酶消化,但是,若用碱性试剂去除修饰的脂肪酸

时,就易被蛋白酶水解。这说明,脂化具有保护蛋白免遭水解的作用。这种保护性作用可能是该种疾病的原因。由于脂化干扰了蛋白酶对粘液糖蛋白的降解作用,使其在局部累积,可溶性降低,分泌腺阻塞,最后引起胆囊纤维变性^[20]。

用^[3H]标记的棕榈酸研究海胆的胚胎发育过程时发现,大约海胆胚胎的20多种蛋白质都可以进行脂化修饰。脂化修饰的水平随着胚胎发育而变化。在受精和原肠胚形成前期的这段时间内,棕榈酰化的蛋白质呈线型升高了5.5倍。在原肠胚发展期间又增加了25%,此后保持恒定,并持续到长腕幼虫期。酿酒酵母的ras蛋白的脂化,对其膜附着作用是绝对必需的,对其机能的维持也是非常重要的^[10]。

总之,随着研究的进展,对蛋白质脂化修饰的认识必然更加深入、系统和全面。

参 考 文 献

[1] Sefton, M. B. et al.: *J. Cell. Biol.*, 1987, 104, 1449.

[2] Riendeau, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 976.
[3] Rein, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, 83, 7246.
[4] Towler, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 1030.
[5] Olson, E. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 2458.
[6] Towler, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, 83, 2812.
[7] Hedo, J. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 954.
[8] Bizzozero, O. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 2138.
[9] Buss, J. E. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1986, 6, 116.
[10] Deschemes, R. J. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 2344.
[11] Gross, G. A. M.: *Cell*, 1987, 48, 179.
[12] Tse, A. G. D. et al.: *Science*, 1985, 230, 1003.
[13] Futerman, A. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 129, 312.
[14] Haas, R. et al.: *Biochemistry*, 1986, 25, 3098.
[15] Davitz, M. A. et al.: *J. Exp. Med.*, 1986, 163, 1150.
[16] Hemperly, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, 83, 9822.
[17] Mack, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 4297.
[18] Kroczeck, R. A. et al.: *Nature*, 1986, 322, 181.
[19] Lambrecht, B. et al.: *FEBS. Lett.*, 1986, 202, 127.
[20] Slomeary, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 8535.

[本文于1987年10月23日收到]

出售余刊启事

本部尚有少量《生物化学与生物物理进展》和《生物化学与生物物理学报》余刊,有购买者,请写明所需年、期及册数,并将款(包括寄费)汇至北京市中关村中国科学院生物物理研究所转《生物化学与生物物理进展》编辑部。款到后即按购刊者姓名和地址寄刊。

《生物化学与生物物理进展》:

年	期	单价(元)
1978	2,6	0.30
1979	2,4—6	0.45
1980	1,3	0.45
1981	3,4,6	0.50
1982	3—6	0.50
1983	2—6	0.50
1984	1—6	0.50
1985	1—6	0.81

1986	2—6	1.12
1987	1—6	1.12
1988	2—6	1.35
《生物化学与生物物理学报》:		
年	期	单价(元)
1975	2	1.00
1976	1	1.00
1977	1—3	1.00
1978	1,2,4	1.00
1979	1—4	1.00
1980	1,3	1.00
1982	1,2,4,5	1.00
1983,1985	1—6	1.00
1984	2—6	1.00
1986,1987	1—6	1.50

[本刊编辑部]