

# 蛋白质卷曲研究进展\* (下)

石颖 许根俊 鲁子贤

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

## 提 要

二硫键介导的多肽片段的稳定构象, Pro 的顺反异构体, 以及熔球态等, 都是蛋白质卷曲中间态存在的证据. 介绍了关于蛋白质卷曲途径的争论和蛋白质卷曲途径研究的新进展.

**关键词** 蛋白质卷曲, 卷曲中间态, 熔球态, 卷曲途径

最近, 卷曲中间态的研究获得可喜进展, 大大加深了人们对卷曲中间态的认识, 并由此建立许多模型、机制, 勾划出蛋白质卷曲的途径.

## 1 卷曲中间态研究进展

**1.1 与二硫键相关的卷曲中间态** 对于 BPTI 来说, 将它的三对二硫键还原即可得到一个伸展态, 然后, 通过控制氧化还原条件, 可使二硫键重新生成. 在这过程中使用恰当的中止反应试剂, 并避开二硫键互换, 采取合理的分离纯化方法, 就可以获得含单 S—S 键, 双 S—S 键的各种中间态.

将获得的中间态用化学方法将二硫键定位, 然后将中间态依次排列, 即可大致给出 BPTI 再卷曲的卷曲途径. 在动力学上 BPTI 的中间态可分为三类, 第一类是单 S—S 键中间态, 第二类是除 (30-51, 5-55) 而外的双 S—S 键中间态, 第三类是含 (30-51, 5-55) 双 S—S 键中间态. 它的生成是卷曲限速步骤.

考察 BPTI 的卷曲中间态, 有两点引起人们注意: 其一, 尽管在形成 S—S 键中间态时存在 15 种可能性, 但 30-51 二硫键中间态含量达 60%, 占绝对优势. 并且存在于以后的中间态中, 直到形成天然态结构, 这说明这个中间态的重要性. 其二, 在双 S—S 键中间态形成过程中, 存在一个重排过程才达到 (30-51, 5-55) 中间态.

近来利用定位突变的方法对 BPTI 的研究

表明, 将 Cys14 和 Cys38 (二者参与重排反应) 置换掉以后, 卷曲仍能正常进行. 这说明, 重排途径似乎并不是必不可少的. 进一步实验指出, 野生型的 BPTI 中的错配双 S—S 键中间态的形成速度比突变后的 BPTI 中正确的双 S—S 键中间态的形成速度快 5 000 倍. 所以, 在野生型 BPTI 中直接生成正确的双 S—S 键中间态是可能的, 但在动力学上要落后于错配的双 S—S 键中间态.

**1.2 Pro 的顺反异构体** 最早发现在 RNase A 的完全伸展态中存在两种形式. 称作  $U_f$  (fast-folding) 和  $U_s$  (slow-folding), 被认为是由于肽链中 Pro 的顺反异构体造成的. 这方面的研究进展有以下几个方面:

Schmid 等人已证明, Pro 异构化反应可以发生在中间态, 甚至发生在卷曲完成之后, 这对早些时候 Brandts 的统一模型所谈的  $U_f \rightarrow U_s$  反应只在伸展态进行是个挑战.

使用脯氨酸特异二肽酶研究 RNase A 的伸展态, 发现 Pro93 和 Pro114 在肽链伸展后并没有从顺式变为反式, 而以往正是用这个异构化反应来解释 RNase A 伸展态中的 “ $U_s$ ” 的存在.

比较不同种属的同源蛋白质的卷曲动力学, 以寻找慢卷曲步骤对相应的 Pro 残基的依

\*国家自然科学基金重大项目资助, 编号 9388006.

收稿日期: 1992-05-26 修回日期: 1992-10-29

赖关系. 用这种方法还确定了与 RNase A 中  $U_i \rightarrow U_i$  反应同步的内源荧光变化是来自 Tyr92, 与 Pro93 相邻, 因此推测 Pro93 与  $U_i$  密切相关.

引入定位突变的方法来研究 Pro 异构化问题. 将 RNase T 的顺式 Pro55 突变掉, 发现  $U_i$  增加而  $U_i$  消失. 在另一些例子中, 置换掉 Pro 后会影响到整个再卷曲反应. 例如, 用 Ala 置换掉硫氧还蛋白中的顺式 Pro76, 除了观察到卷曲慢反应消失外, 整个分子的卷曲动力学都发生变化.

肽酰脯氨酰顺反异构酶的使用. 发现这酶能催化某些蛋白质卷曲时的慢反应. 其中包括 S 蛋白 (RNase A 中的 21—124). 但它却不能催化 RNase A 的卷曲慢反应. S 蛋白包含了 RNase A 中全部 4 个 Pro 残基, 为什么 N 端 20 肽的有无会造成这样的差别, 尚有待进一步研究.

最近, 用 2D-NMR 方法检测了天然态蛋白质分子中的脯氨酸异构化. 对 SNase 和钙结合蛋白的研究显示, 脯氨酸异构化可以发生在天然态的分子中, 而且可以证实由 Pro 的顺反异构产生的两种肽链构象在稳定性方面很接近, 它们能可以在同一数量级的比例同时存在. 看来, Pro 异构化与卷曲动力学的关系仍不明朗.

**1.3 熔球态** 近来, 关于平衡中间态的研究主要集中在熔球态 (molten globule state) 上. 这个词最早由 Ohgushi 和 Wada 使用, 用来描述早期在  $\alpha$ -乳清蛋白 ( $\alpha$ -LA) 和碳酸酐酶 (CAB) 的卷曲研究中得到的一个平衡态中间态. 熔球态有以下一些特性<sup>[1]</sup>: 它具有天然态二级结构, 但三级结构不完整. 它比 N 态有较多的疏水暴露, 当熔球态加热变性到伸展态时, 温度变性跃迁消失, 等等.

获得熔球态的方法. 除了变化 pH 可以获得熔球态而外, 其它方法也可以获得熔球态. 例如在 2mol/L 盐酸胍中, 有 90% 的  $\alpha$ -LA 分子以中间态存在. 在高于室温且低离子强度的溶剂中, 除去结合  $Ca^{2+}$  离子的  $\alpha$ -LA 呈现熔球态. 用无机盐与加热变性均能获得熔球态. 将  $\alpha$ -LA

的 4 对二硫键还原, 在 pH2 的条件下, 它仍能形成熔球态, 但此时需要较强的离子强度支持, 用于弥补缺乏二硫键带来的不稳定性.

最近, Goto 等人发现, 在酸变性导致肽链完全伸展的情况下, 再进一步滴加 HCl 会使  $\beta$ -lactamase, cyt. c 和 apo-Mb 的空间结构趋向紧凑, 二级结构也得到较完全的恢复, 从而获得熔球态.

基于此, Jaenicke<sup>[2]</sup>认为, 迄今为止, 熔球态仍是一大类卷曲中间态的代名词. 它可以通过多种变性方法得到. 在酸性 pH 条件下, 分子内正电荷的排斥作用是形成熔球态的主要原因, 在不同溶剂条件下形成的熔球态, 参与稳定它的作用力可能不同.

我们采用 50% 乙醇溶剂系统, 获得了天花粉蛋白的一个熔球态 (石颖. 博士论文, 1992). 它的二级结构含量变化不大, 而三级结构变得较为松散, 分子内 Tyr $\rightarrow$ Trp 的能量转移率下降. 我们认为这个熔球态的生成是由于溶剂系统降低了分子内的疏水作用, 同时又保护了分子内二级结构的氢键而造成的.

某些定位突变能降低蛋白质 N 态稳定性, 使获得中间态的机会增加. 例如 40 位及 146 位进行突变的  $\beta$ -lactamase, 在能使它的野生型蛋白质正常卷曲的条件中呈现熔球态. 在去辅基肌红蛋白的螺旋配对位点进行突变, 降低了 N 态的稳定性, 捕获到熔球态. 有时将蛋白质切除一段序列, 可获得熔球态, 例如葡萄球菌核酸酶的大片段 (1—126) 在一定条件下形成了熔球态.

Ptitsyn 等人最近用 stopped-flow ANS 标记荧光法研究了 CAB,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG,  $\beta$ -lactamase, PGK 以及 rIL-1 $\beta$  等的再卷曲, 发现在 0.1—0.2s 内这些蛋白质都形成了熔球态中间态. 熔球态确是一类重要的卷曲中间态, 是真实地存在于卷曲途径中的<sup>[3]</sup>.

**1.4 其它的卷曲中间态** Roder 等人用 Trp 荧光淬灭实验揭示, cyt. c 分子在 N 端, C 端螺旋形成时就已具有相当紧凑的空间结构<sup>[4]</sup>.

对色氨酸合成酶 $\beta$ 亚基的研究表明, 它的一个天然态的抗原决定簇的 1/2 生成时间为 10s, 而完整三级结构的 1/2 生成时间约为 100s. 因此, 可以认为这个抗原决定簇是在熔球态阶段生成的.

Fersht 等人对 barnase 的研究证实, 全部 3 段螺旋和天然态的  $\beta$  折叠以及某些转折都在 2 个快反应阶段生成. 1/2 生成时间分别为  $< 30\text{ms}$  和  $100\text{ms}$ . 而与三级结构有关的一些 H 键的 1/2 生成时间约为  $140\text{ms}$ .

值得一提的是他们对一系列单点突变蛋白的卷曲动力学研究<sup>[5]</sup>. 这种方法能明确显示 barnase 中一段有 13 个残基的螺旋的 C 端与 N 端在卷曲过程中存在较大差别. 参与螺旋 C 端的特殊作用在早期的中间态中就已存在. 而参与 N 端的特殊作用只在卷曲终态才形成. 该实验还表明,  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠的疏水作用开始较早, 并随着卷曲进程逐渐加强.

将蛋白质工程方法用于蛋白质卷曲研究, 突出的优点是可以进行比较, 筛选出对稳定中间态有贡献的突变体, 以便于对中间态做详尽的研究, 对比 NMR 方法(主要给出二级结构定位, 形成时间等信息), 蛋白质工程方法能详细给出三级相互作用形成的时间, 含量和强度方面的信息. 还有蛋白质工程方法可用于较大蛋白的研究, 而这正是目前 NMR 方法最大的局限性所在. 毫无疑问, 这两种具有互补性的方法的综合运用, 会大大加速蛋白质卷曲中间态的研究.

总之, 现在已没有人怀疑卷曲中间态的存在. 但更深层次的疑问也接踵而来. 例如, 二级结构生成与疏水塌缩有什么关系? 稳定熔球态的作用力究竟是什么<sup>[6]</sup>? 随着这些问题的不断提出, 不断解决, 蛋白质卷曲的研究更加深入.

## 2 蛋白质卷曲途径

### 2.1 对蛋白质卷曲途径专一性的争论

现在议论较多的是蛋白质卷曲是经历单一途径还是同时有多种途径的问题.

**2.1.1 支持蛋白质卷曲按照单一循序方式进行的实验来自伸展态的酵母 iso-2 cyt. c 在碱性条件下的再卷曲.** 已知 pH 中性天然态的 cyt. c (N 态) 与碱性条件下 cyt. c (B 态) 明显不同. 当把用盐酸胍变性的 cyt. c 稀释到碱性环境进行再卷曲时, 这分子不是直接从 U 态进入 B 态, 而是首先形成 N 态 (或类似 N 态), 然后再进入 B 态, 尽管 B 态是此高 pH 体系中热力学上稳定的构象. 这个实验表明, 再卷曲的途径是较为严格的, 各卷曲中间态之间有确定的联系.

对下面问题的讨论会有助于对卷曲途径的理解. 这就是卷曲到底是热力学控制的还是动力学控制的问题. 如果是受热力学控制的, 天然态是热力学上最稳定的结构, 卷曲途径应保证使天然态生成; 如果是受动力学控制的, 卷曲终产物的构象是由卷曲动力学途径决定的, 这个途径是所有可能途径中最快的, 终产物构象不一定达到热力学上最稳定的构象, 它只要是局部能量最低就可以了.

体外卷曲实验证明蛋白质卷曲可以在肽链合成后以及没有任何辅助因子的协助下进行, 并且发现对同一蛋白质来说, 从不同方法获得的伸展态开始的再卷曲反应都具有相同的活化能. 由于过渡态到终态已无明显可分的卷曲步骤, 又考虑到蛋白质的稳定化能本来就不很高, 因此推断天然态蛋白质具有整体能量最低是合理的<sup>[2]</sup>.

用许多小蛋白做的二态平衡实验表明, 天然态确是热力学上最稳定的结构. 因此, 尽管仍有作者有异议, 卷曲终态的结构是由热力学决定的这一观点已为大多数人接受. 从这一观点出发, Baldwin 推论卷曲途径可能也是热力学控制的. 可以捕捉的途径由一系列稳定的中间态构成, 这种想法显然支持单一循序模型.

随着改造蛋白质一级结构的能力不断增强, 越来越多的定位突变结果显示, 某些残基对于稳定天然态结构是重要的, 某些残基却只对稳定卷曲中间态起作用, 而对天然态结构无任何影响, 这说明氨基酸序列不仅为天然态结

构编码,也为中间结构编码,从而为蛋白质卷曲途径编码,也就是说,野生型肽链只对应于一条能量优化的卷曲途径,因此,蛋白质卷曲应为单一循序途径。当然,这假设仍有待更多的点突变实验的检验。

**2.1.2 作为“多途径卷曲”假说的支持者,** Harrison 和 Durbin 提出了拼板模型(jigsaw puzzle),该模型认为卷曲没有固定的起始点,也没有单一的途径,卷曲在一定程度上是一个随机过程,类似拼板游戏中拼块的组装。因此,各中间态之间不一定有时间上的联系。该模型的依据是蛋白质分子具有较强的抗突变能力及抗环境变化的能力,也即蛋白质分子空间结构保守性。该作者认为,某个突变可能导致一条卷曲途径不畅通,但不可能同时导致所有的途径闭塞。因此,多途径卷曲就能保证正确的天然态分子的生成。这是分子进化的结果。

Scheraga 尽管同意 RNase A 的终态是热力学控制的,但他认为 RNase A 的卷曲途径是动力学控制的。由于存在动力学上的障碍,它的不同卷曲途径可以区分开来,Pro 顺反异构就是这样的动力学障碍。

Richards 在考查 BPTI 二硫键互变反应后,也认为卷曲是多途径的。他认为伸展的肽链有可能接受大量构象,所以单一途径卷曲是难以想象的。

**2.2 蛋白质卷曲途径研究进展** 最近, Wright 在总结起始点研究工作时,提出了一个模型,这是一个扩散-碰撞模型的深化。主要内容有:卷曲起始于伸展态肽链上的几个位点,这些位点上能生成二级结构因素或者疏水簇。这些结构不稳定,与伸展态进行快速互变,这些结构与用该片段观察到的构象很相似。它们的稳定性来自局部序列的近程或中程(3—4个残基)相互作用。这些局部结构因素以非特异的布朗运动方式扩散,碰撞,粘附导致大的结构生成,并因此增加了稳定性。这时的结构在序列上仍可能是高度区域化的并且仍是较不稳定的,容易与伸展态发生互变。随着卷曲进行,进一步碰撞形成了包含疏水核和二级结构的球

态。这可能是动力学上首先观察到的卷曲中间态。下一步是调整为致密的,但仍无活性的类似天然态结构。最后一步通常是限速的步骤,是将无活性的类天然态结构转变成为完整的有活力的天然态分子。这一步往往伴随着二硫键重排及 Pro 顺反异构化等过程。

Ptitsyn<sup>[3]</sup>在卷曲中间态研究(例如熔球态)获得较大进展后,阐述了支持他的框架模型的证据:a.在0.01s内,二级结构在伸展的肽链上迅速生成。b.在1s内,熔球态生成。c.在500—2500s内,天然态构象生成,活力恢复。对多数蛋白质来说,从熔球态到天然态是一步完成,这过程通常包括Pro的顺反异构化反应。这样,就从时间上将框架模型的三个步骤更具体化了。

Creighton<sup>[7]</sup>认为BPTI的卷曲途径有一定的代表性。当把完全伸展的肽链置入再卷曲体系时,伸展态将与少数几个有序结构进行可逆地、快速互变。这些有序结构对应于BPTI中的单、双二硫键中间态。早期的有序结构是随机产生的,其中一些可能比另外一些稳定,也有一些对进一步卷曲是重要的。但它们都处在亚稳态,因此能与伸展态可逆互变。分子在绝大部分再卷曲时间里都在进行构象互变。趋动伸展态变为有序结构的力是疏水作用,疏水作用能够加强肽链骨架氢键的稳定性,因此,二级结构通过相互作用而进一步稳定。在不断的构象互变中,有些具有了天然态样的构象,从而接近卷曲过渡态。如果过渡态有较高能障,则构象重组和类天然态构象的变异将会发生,但一般说来不会超过BPTI中二硫键的重排反应。一旦通过了过渡态,天然态构象的大部分都已生成,剩下的是构象微调。这一步类似于BPTI中最后的14-38二硫键的形成过程,速度将会很快。

## 参 考 文 献

- 1 Kuwajima K. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins*, 1989;6:87

- 2 Jaenicke R. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry*, 1991;**30**:3147
- 3 Ptitsyn O B. How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *FEBS*, 1991;**285**:176
- 4 Elove G A, Chaffotte A F, Roder H *et al.*, Early step in cytochrome c folding probed by time-resolved CD and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 1992;**31**:6876
- 5 Matouschek A, Kellis J T, Serrano L *et al.* Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature*, 1990;**346**:440
- 6 Baldwin R L. Pieces of the folding puzzle. *Nature*, 1990;**346**:409
- 7 Creighton T E. Protein folding. *Biochem J*, 1990;**270**:1

## 内皮素与肿瘤\*

于 昕 周爱儒

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

### 提 要

内皮素是一类具有广泛生物学作用的活性多肽。强烈缩血管和升血压作用是其主要的生理功能。内皮素还具有促进细胞增殖等生长因子样作用。近年来发现, 内皮素与肿瘤的发生发展有关。某些肿瘤细胞和肿瘤组织有内皮素基因的高表达, 并能通过旁分泌和自分泌方式促进肿瘤的生长。

**关键词** 内皮素, 肿瘤, 活性多肽, 细胞生长因子

内皮素 (endothelin, ET) 是一类具有强烈缩血管和升血压作用的活性多肽, 也是一类强大的平滑肌细胞的分裂剂和细胞生长因子。ET 首先由日本学者 Yanagisawa 等从猪的主动脉内皮细胞中分离得到<sup>[1]</sup>。人体内也存在 ET。近年来的研究表明, ET 不仅存在于内皮细胞中, 而且广泛分布在神经、血管平滑肌及巨噬细胞中。许多器官组织都有特异的 ET 受体, 如心、肺、脑、血管平滑肌、血管内皮、胃肠组织等。因此, ET 具有重要的生理和病理意义, 不仅参与调节心血管的功能, 还可以作为一种潜在的神经介质和细胞生长因子参与血压和中枢神经系统的调节。ET 在心肌梗塞、高血压、肾功能衰竭、休克、脑血管意外等疾病的发病中具有重要作用<sup>[2]</sup>。最近的研究表明, ET 与肿瘤的发展也有密切关系。

### 1 ET 的分子生物学概述

肽<sup>[3]</sup>, 即 ET-1 ET-2 和 ET-3, 它们分别来自三个不同的基因, 且分别定位于人的不同染色体上。三者在结构上具有同源性, 但生物活性不同, 以 ET-1 最强, 而 ET-3 最弱。有关 ET 基因表达的调控目前亦有报道。例如, ET-1 基因在细胞核内转录剪切形成前内皮素原-1 mRNA, 在细胞质中翻译出前内皮素原-1。该前体蛋白经特异蛋白酶作用, 形成由 38 个氨基酸残基组成的大 ET-1 (big ET-1), 后者再经另一酶作用, 生成由 21 个氨基酸残基组成的活性 ET-1。血浆中同时存在有大 ET-1 和 ET-1, 但前者活性仅为后者的 1/100—1/1000。因此, 大 ET-1 只有转变为 ET-1 才能发挥生理效应。生理情况下, 血中 ET 水平很低 (pg/ml), 主要通过旁分泌和/或自分泌方式起调节血管张力和器官血流量的作用<sup>[4]</sup>。

\*属国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1992-04-17 修回日期: 1992-06-15