

综述与专论

寡糖的构象分析*

来鲁华 杨昱婷

(北京大学化学系物理化学研究所, 北京 100871)

摘要 糖在生物体内具有极为重要的生物学功能, 其在细胞及分子识别等许多过程中的作用已日益得到重视, 糖的结构特征已成为研究识别过程的重要依据. 集中介绍了有关寡糖结构的基本概念、理论研究热点及现状, 并对有关研究方法进行了评述. 寡糖结构理论研究的发展方向之一是研究糖与蛋白质的相互作用以及糖蛋白中糖链的结构与功能.

关键词 寡糖, 寡糖结构, 构象研究, 理论计算

糖类在生物体系中含量丰富, 其作为生物有机体的结构组成(如植物体的纤维素, 动物体的几丁质等)以及重要的储能物质的功能早已为人们所熟知. 然而长期以来由于认为糖在生物有机体内的作用远在蛋白质及核酸之下, 其功能在很长时间内未得到应有的重视.

近年来发现生物体内绝大多数蛋白质表面都连有数目不等的寡糖链(一般将少于12个糖基的糖链称之为寡糖, 多于12个糖基的称之为多糖), 这些寡糖链在细胞识别中具有重要的作用, 如寡糖决定了受体与配体的识别、酶与底物的识别等, 引起了人们的极大兴趣. 有关糖的结构研究已成为结构化学和结构生物学的新兴领域^[1,2].

1 糖的结构分类及实验构象研究

由于糖的三维结构化学发展较晚, 因此延用了对于蛋白质及核酸的分析方法. 与组成蛋白质的20种氨基酸类似, 单糖为糖类的组成单元, 自然界中单糖主要为五碳和六碳糖. 单糖的种类很多, 其命名通常采用英文词头的前三个字母缩写形式, 如: Man (mannose, 甘露糖). 单糖间脱水形成糖苷键, 并以糖苷键线性或分枝连接为寡糖或多糖. 寡糖、多糖结构也

可以类似地划分为一级、二级和三级结构^[3].

1.1 一级结构

相对于蛋白质及核酸, 糖的一级结构非常复杂, 其中包括糖基组成及糖基的连接方式. 连接方式尤为重要, 因为糖环提供—OH形成糖苷键的可能性有多个, 以两个相同六碳糖的吡喃糖形成的二糖为例, 不同连接方式可达11种. 这一特点使得寡糖可以成为有效的信息载体^[3].

早期利用化学分析法进行糖的一级结构研究, 由于药品用量大、操作复杂已逐渐被仪器分析法所代替. 目前采用的方法主要是核磁共振与质谱分析^[4].

1.2 二级结构

糖苷键与肽键一样, 通常有两个可旋转的主链二面角: φ (H1-C1-O1-C糖配基)、 ψ (C1-O1-C糖配基-H糖配基). 两个单糖若为1→6连接, 则有三个可旋转的二面角, 除 φ 、 ψ 外还包括 ω (O6-C6-C5-O5). 解决寡糖构象的关键在于确定 φ 、 ψ 、 ω 的取值(图1).

* 攀登计划——“生命过程中的重要化学问题研究”项目资助.

收稿日期: 1994-07-07, 修回日期: 1995-01-15

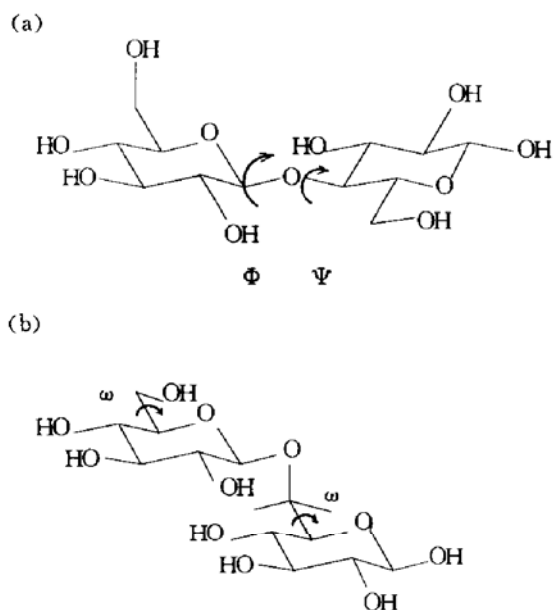


图1 寡糖的结构

(a) β -D 纤维二糖; (b) β -D 龙胆二糖.

2 有关寡糖构象的实验研究

研究寡糖三维结构对于了解生物分子的相互作用与识别具有极为深远的意义,但目前在实验技术方面仍存在一定困难.

经典的单晶 X 射线衍射法应用于寡糖结构测定有很多优点,高分辨的结构可以提供有价值的信息.目前,研究糖与蛋白质的相互作用主要依赖于对 X 射线衍射所提供的数据进行分析.当然 X 射线衍射方法用于寡糖构象研究存在许多局限性:寡糖结构柔性较大,难以结晶^[5],通常以微晶及粉末存在;寡糖结晶构象与溶液构象差异较大,结晶态难以反映生物体系的真实状态等.

研究寡糖构象也可利用红外,紫外,CD 谱等分子光谱学方法,这些方法可以部分解决结构测定问题.例如,CD 谱用于以单糖或二糖为结构单元的多聚糖体系,可以确定糖苷键的构象 (Φ 、 Ψ),如没有羰基或胺基等干扰,能够给出很好的结果^[6].

FET (荧光能量转移) 法可替代核磁共振 (NMR) 方法用于寡糖溶液构象的研究.目前,有关的实验数据正在积累. FET 的优势在于它可以直接分辨皮秒级的构象.因此,可以定量

研究不同构象间的转化,例如,可以比较溶液中寡糖分子伸展构象与折叠构象的比例.

目前研究寡糖构象最为有效的实验手段是 NMR 技术,常用的为二维核磁及 C^{13} 谱.糖的不同连接方式使得糖苷键两端氢原子的化学位移,偶合常数及 NOE 强度有一定的特征性.例如 NOE 强度可显示糖苷键两端氢原子的平均距离,其数值与氢原子间距的六次方成反比,而氢原子间距为二面角 φ 、 ψ 的函数,当一系列独立的 NOE 同时存在时即可确定 φ 、 ψ ^[6,7].

溶液中寡糖的优势构象并不是唯一的,有时差别较大的几种构象平衡共存,核磁共振只能给出平均结果;另外,通常由于谱峰重叠等原因, φ 、 ψ 角不易确定.因此目前更通用的方法是将现代核磁技术与理论计算相结合,通过一定的理论筛选决定寡糖的构象^[6,7].

3 寡糖构象的理论研究

3.1 研究对象

理论计算解决糖的三维结构已成为一种必要而可行的手段,可根据糖的不同大小针对不同的侧面进行研究.

对于单糖一般是研究环的类型,糖环类型可根据 Cremer-Pople (C-P) 体系进行划分^[8].五员环与六员环有不同的折叠方式,如五员环有 E (信封式) 与 T (扭曲式) 两种类型共十个构象;六员环种类很多,基本分为 4 类: C (椅式)、H (半椅式)、S (沙发式), SB (扭船式).另外对于己糖的六员环,由于存在末端 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基团,其 $-\text{OH}$ 相对于环上的基团 ($\text{O}5$ 及 $\text{C}4$ 原子) 有不同的取向,因此也是研究内容之一^[9].

对于二糖通常有两种研究方法:比较粗略的是只研究糖苷键二面角 φ 与 ψ 的变化,而将两边的糖环作为刚性结构,其构象采用常见的优势构象;另一种是综合考虑糖基外的糖苷键以及糖基内部结构,认为 φ 、 ψ 受糖环的折叠构象及末端 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 的影响^[9].

研究多糖构象,除各糖基的内部结构及糖苷键的 φ 、 ψ 之外,还需考虑整体构象.在结晶

态糖链通常可形成较完整的高级结构, 如: 近似的螺旋或伸展结构. 在溶液中, 糖有时以无规卷曲存在, 但可以在局域上保持某些固态特征. 描述多糖整体构象常引入 n, h 两个参数, 其中 n 为每一螺旋所含糖基的数目, h 为一个糖基沿螺旋轴前进的距离. n, h 的大小取决于 φ, ψ , 是 φ, ψ 的函数^[3].

3.2 研究方法

目前用于糖构象研究的理论算法很多, 主要可分为三类: 从头计算, 半经验计算及经验力场计算. 三种方法各有优缺点^[6,9].

从头计算^[6,9]方法在所有理论算法中所作假定最少, 因此可给出可信度最高的结果, 但由于计算量太大, 解决的实际体系较少, 通常仅限于对一个寡糖分子的某小段片段进行模型计算.

半经验计算^[6,9]方法通用的程序有 MINDO/3, MNDO, 以及在 MNDO 基础上改进的 AM1, PM3 程序, 另外还有 PCIO 等. 其中 MNDO 及 PCIO 用于寡糖结构计算有较好的结果.

从头计算与半经验算法由于起源于电子的几率分布, 因此可提供电荷方面的情况^[9], 这是以上两种算法的可取之处. 相比之下, 将体系进行很大简化的力场方法则不能提供这一方面的信息.

力场方法: 通常意义的经验力场方法实际上包括: 能量最小化计算, 分子动力学, Monte Carlo 方法等, 这些方法虽然根据不同的理论模型, 但共同之处都是建立在一定的力场之上^[6,9].

能量最小化计算的困难在于无法解决多重极小问题, 而分子动力学及 Monte Carlo 方法在一定条件下可近似在全空间范围内找出整体极小点.

分子动力学^[10]方法可以模拟分子中各原子在微观状态下的瞬时变化情况, 它的特点是可以考虑环境的作用, 即考虑溶剂效应对体系结构的影响. 在糖体系中的应用有很好的前途.

Monte Carlo (蒙特卡罗) 方法^[10]是一种随

机取样法, 随机变化构象使得能量发生相应变化, 能量低于起始构象的变化被接受, 能量高于起始构象的变化被部分接受, 其特点是通过以上方式体系可在较大范围内寻找整体极小, 适用于对于寡糖进行构象分析.

3.3 寡糖构象研究的经验力场方法

3.3.1 适用于寡糖构象研究的力场

寡糖的构象研究虽然方法众多, 但常用且较为方便的方法是力场方法, 简单的构象搜索、蒙特卡罗方法及分子动力学在寡糖构象研究方面均取得了有意义的结果, 并且与实验数据相符合.

将在蛋白质体系上发展起来的力场用于寡糖体系, 通常应进行适当的调整, 其中包括力常数, 以及力所作用的原子半径及其部分电荷等^[11], 从头计算及晶体结构数据表明, 糖的 α, β 异构体糖苷键附近的键长、键角有很大不同, 称之为糖的异头效应. 糖的力场也应引入相应描述, 即与糖的异头效应相一致.

计算寡糖化合物, 可供选择的力场较多, 如在经典的 MM 力场基础上改进的 MM-CARB^[11] 力场, 专门针对糖而发展的 HSEA^[12] 力场, 其它常用的力场如: ECEPP^[13], CHARMM^[14], AMBER^[15], GROMOS^[9] 等经改进后也可适用于寡糖体系.

A. J. Duben 等^[16]参照有关核磁数据, 将不同的力场, ECEPP2, ECEPP83, HSEA; MM2, MM2-CARB, PCIO 进行了比较, 所选择的体系是 β -D-XYL- (1 $\rightarrow$ 4) β -D-XYL, 其具体做法是应用每一种力场通过构象搜索找到最低势能构象, 再将由核磁 NOE 强度数据导出的原子间距与此构象中的氢原子间距对照, 从而对力场给予评价. 结果发现 ECEPP 力场给出的结构与实验数据最为接近.

3.3.2 寡糖构象的相关计算

目前的研究多是由寡糖的势能面入手^[1], 通常的研究对象是二糖, 采用的方法是格点搜索, 由势能面可以找出最低势能点. Monte Carlo^[17]方法也可用于寻找最低势能构象, 其结果与格点搜索一致. 对势能面的研究可与其它理

论方法配合, 从而对糖的结构进行系统研究.

J. W. Brady 等^[18]利用力场方法计算了麦芽糖 (maltose) 的溶液构象, 首先按照一定浓度加入水分子, 选择势能面上的两个极小点为初始构象, 其中之一可形成分子内氢键, 而另一构象则没有分子内氢键. 分子动力学模拟结果发现, 一般糖类分子在水中可形成大量氢键, 溶剂效应正是由特定氢键引起的, 分子内氢键与分子间氢键相抗衡. 每个 $-\text{OH}$ 如不参与分子内氢键的形成, 则可在环境水中形成三个氢键.

对于糖构象的研究主要集中于二糖, 但也有少量文献报道了高于二糖的寡糖构象的研究进展. A. Imberty 等^[19]对高甘露糖 N-连接型寡糖进行了系统研究, 并与核磁数据对照, 取得了较一致的结果. 他们采用系统搜索方法对四糖 $[\text{Man } \alpha (1 \rightarrow 3) \text{ Man } \beta (1 \rightarrow 6) \text{ Man } \beta (1 \rightarrow 4) \text{ GlcNAc } (\beta 1 \rightarrow \text{OCD}3)]$ 的三对 φ, ψ 同时进行系统搜索, 并引入构象熵. 研究发现, 二糖与三糖平均每个自由度构象熵变化不大, 但对于四糖每个自由度的构象熵降低了三分之一. 说明, 四糖末端糖基与内部有较强的作用, 从而大大缩小了构象空间.

3.3.3 糖与蛋白质复合物的相关计算

糖与蛋白质的相互作用对于生物分子履行各种功能具有十分重要的意义^[1]. 许多生物分子含有糖, 酶催化含糖分子的生物合成与生物降解具有很高的特异性, 如: 生物合成产物具有很精确的序列与空间结构, 糖基转移酶对底物有很高的选择性, 糖基水解酶可以高度选择断裂位点等. 此外, 与糖作用的分子不仅限于酶, 还包含许多蛋白质受体, 糖作为识别的基础, 具有非常复杂的结构, 包括游离糖, 由单糖到多糖; 结合糖, 如糖蛋白及糖脂等. 如何理解与描述识别过程, 首先应了解糖与蛋白质复合物的结构特征. 高分辨率糖与蛋白质复合物晶体结构数据已经出现, 对其构象特征的研究主要有以下两个方面: 首先由蛋白入手, 研究糖与蛋白结合的特异性. 豆科凝集素 (legume lectins) 家族的蛋白质有相似的三维

结构, 但可与不同的糖底物作用, 研究内容包括序列同源性分析, 蛋白质活性部位空间结构比较; 另一方面, 由糖入手, 研究复合物中糖的构象特征. 其中包括: 复合物中糖的构象在势能面的位置, 糖与复合物的氢键研究等. 研究发现, 蛋白表面形态对糖的构象有重要影响, 这种影响不仅限于结合位点与糖的作用, 而是一种沿蛋白质表面的综合作用结果, 包括氢键, 范德华力等. 糖与蛋白质复合物结构特征的研究对于认识糖与蛋白质的分子识别过程具有重要的意义, 在此基础上可以设计出与特定糖基专一性结合的分子, 也可以设计与特定蛋白专一性结合的糖或糖类似物等.

3.3.4 糖蛋白的相关计算

对于糖蛋白的研究通常是利用力场方法研究蛋白质与糖连接位点附近的形态. 研究发现, O-连接型糖蛋白连接位点附近的肽段多为 β -转角结构, N-连接型为 β -转角或伸展结构, 并且 N-连接型糖蛋白连接位点氨基酸序列的充分但不必要条件为 Asn-X-Ser (Thr). 对连接位点附近氨基酸序列的分析也表明 N-与 O-连接型肽段二级结构倾向于 β -转角结构^[16].

3.4 存在的问题及解决途径

对于糖构象的研究还远不充分, 其中重要的原因之一是可参照的实验数据量不足, 因此使得很多有意义的结果不能够与实验数据对照. 目前寡糖构象研究仍主要局限于理论阶段, 为数不多的核磁数据往往提供了理论研究一个很好的佐证. 核磁共振与理论计算相结合的研究工作尚缺乏系统性. 一般的研究过程是: 利用核磁共振数据提供的距离限制对初始构象进行优化, 最后选择一个较为合理的构象; 也可以首先进行理论预测, 再将计算结果与核磁数据对照.

实际上, 糖分子并不是孤立存在的, 无论是在晶体还是在溶液中都存在大量的分子, 不同的环境对糖的构象有不同的影响. 理论计算如能量最小化, 蒙特卡罗, 分子动力学分别设法考虑了溶剂效应^[20], 但这种模拟实际上是非常困难的, 因为糖在溶液中构象情况十分复杂,

作用力来源于很多方面: 糖分子内部 —OH 相互作用, 分子间相互作用, 以及糖分子与溶剂的作用等, 包括简单的氢键及氢键网络等许多复杂情况^[9].

分子动力学加水是目前探讨溶液体系寡糖构象的方便途径, 动力学还适用于较多环系如三糖、四糖的研究^[9].

另外, 发展力场也是十分重要的^[2], 它的前景在于能够将糖类、蛋白质及脂类物质的力场统一起来, 以适应于复杂生物体系的计算. 糖的研究中选择何种力场也是一个值得谨慎考虑的问题, 不同的力场条件, 计算结果很可能有差异^[5].

总之, 寡糖构象研究的重要性得到了越来越多的重视, 而且已取得了很多有意义的结果. 当然, 对于寡糖构象及其与功能关系的研究还远非完善, 许多工作还有待于进一步深入进行. 从目前的研究来看将实验结果与理论计算相配合是一个很有成效的研究方向. 核磁共振数据、晶体衍射数据的不断扩充将有利于有关寡糖构象理论研究的发展.

参 考 文 献

- 1 Imberty A, Bourne Y, Cambillau C *et al.* Adv Biophys Chem, 1993; **3**: 249
- 2 Bourne Y, Tilbeurgh H Y, Cambillau C. Curr Opin Stru Biol, 1993; **3**: 681
- 3 Kennedy J F, White C A. Bioactive carbohydrates. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1983; 36
- 4 Rice K G, Wu P G, Brand L *et al.* Curr Opin Stru Biol, 1993; **3**: 669
- 5 Perez S. Curr Opin Stru Biol, 1993; **3**: 675
- 6 Meyer B. Topics in Current Chemistry, 1990; **154**: 140
- 7 Jones C. Adv Carb Anal, 1991; **1**: 145
- 8 Shallenberger R S. Advanced sugar chemistry. Westport: Conn Avi, 1982; 122
- 9 French A D, Brady J W. Computer modeling of carbohydrate molecules. Washington: ACS Symposium Series 430, 1990; 20, 31, 69, 91, 191
- 10 来鲁华. 蛋白质的结构预测与分子设计. 北京: 北京大学

出版社, 1993; 75

- 11 Jeffery G A, Taylor R. J Comput Chem, 1980; **1**: 99
- 12 Lemieux R U, Bock K, Delbaere T J *et al.* Can J Chem, 1980; **58**: 631
- 13 Chuman H, Momany F A, Schafer L. Int J Peptide Protein Res, 1984; **24**: 233, 249
- 14 Ha S N, Giammona A, Field M *et al.* Carb Res, 1988; **180**: 207
- 15 Homans S W. A Biochemistry, 1990; **29**: 9110
- 16 Duben A J, Hricovini M, Tvaroska I. Carb Res, 1993; **247**: 71
- 17 Peters T, Meyer B, Stuike-Prill R *et al.* Carb Res, 1993; **238**: 49
- 18 Brady J W, Schmidt R K. J Phys Chem, 1993; **97**: 958
- 19 Imberty A, Perez S. Int J Biol Macromol, 1993; **15** (Feb): 17
- 20 Suggett A. J Solut Chem, 1976; **1**: 33

Conformational Analysis of Oligosaccharides.

Lai Luhua, Yang Yuting (*Institute of Physical Chemistry, Peking University, Beijing 100871, China*).

Abstract Carbohydrates have many important biological functions in organism. It has been demonstrated that structural characteristics of carbohydrates provide important clues for the understanding of cell and molecule recognition process where sugar is mainly involved in. It is concentrated on the concepts of oligosaccharide structure, the latest theoretical development of this subject, as well as some methods often used in this field. It is generally considered that one of the theoretical directions is to exhibit the interactions between oligosaccharides and proteins, and the structure and function of oligosaccharide in glycoprotein.

Key words oligosaccharide, oligosaccharide structure, conformational analysis, theoretical calculation