

微型述评

多肽酰胺化酶的结构与功能

刘深基 陈松森

(中国医学科学院 基础医学研究所, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 C端酰胺化是许多神经内分泌多肽重要的翻译后加工过程, 是在酰胺化酶的催化下分两步进行的, PHM和PAL分别催化这两步反应. PHM由两个结构相似的结构域组成, 每个结构域均为九链 β 折叠组成的三明治样结构, 分别由三个His或两个His和一个Met整合一个Cu组成活性中心. 在一个反应周期中, 两个Cu分别独立地与抗坏血酸和分子氧发生单电子传递的氧化还原反应, 最后完成多肽底物的 α -碳的羟化反应.

关键词 多肽酰胺化酶, 结构, 机制

学科分类号 Q51

1 多肽酰胺化的两步反应与双功能酶

在许多神经、内分泌系统中起调节作用的多肽, 无论高等动物还是低等动物, 通常都有一个共同的结构, 即C端酰胺化的氨基酸残基. 酰胺化的氨基酸残基对许多多肽的活性是必需的, C端氨基酸残基的酰胺化, 其作用可能是保护多肽免受酶的降解作用从而延长在体内的半寿期或增大多肽与受体的亲和力. 在体内生物合成过程中这些多肽都经过一C端多一个Gly的前体阶段, 同位素标记实验表明, 酰胺化的多肽中的 NH_2 基团是在酰胺化酶的催化下, Gly将氨基转移给多肽, 而自身以乙醛酸的形式释放. 多肽酰胺化是一个分两步进行的反应: 首先多肽在 α -羟化单氧酶 (peptidyl-glycine α -hydroxylating monooxygenase, PHM) 的作用下, 生成稳定的中间体多肽- α -羟基甘氨酸. 这一步反应是立体结构特异的, 并且需要铜离子、分子氧和抗坏血酸参与. 随后中间体在多肽- α -羟基甘氨酸裂解酶 (peptidyl- α -hydroxyglycine- α -amidating lyase, PAL或叫做peptidylamidoglycolate lyase, PGL) 的作用下, 发生脱羟 (dealkylation) 反应, 释放乙醛酸并生成C端酰胺化的活性多肽.

早期分离出的多肽酰胺化酶均同时具有PHM和PAL两个活性区域, 一个酶就能催化上述两步反应, 因而叫做双功能酰胺化酶. 双功能酰胺化酶两个活性区域间的连接区有一对碱性氨基酸, 在蛋白酶的作用下, 可裂解成两个分别具有PHM和

PAL活力的蛋白, 但在许多情况下, 该酶还有各种复杂的形式, 后来发现是基因选择性表达的结果, 主要机制可能涉及前体mRNA的选择性剪接和翻译后加工过程.

2 PHM的结构与功能

比较人、鼠、牛、蛙四个物种PAM中编码PHM的序列, 其中有10个保守的His残基, 用定点突变的方法证明了其中His (107, 108, 172, 242, 244) 5个氨基酸残基对于酶活力十分重要, 推测是作为Cu的配体, Tyr⁷⁹虽不是Cu的配体, 但其突变为Phe也会影响酶学性质, 可能很接近酶的催化中心, 参与底物的结合或有其他作用^[1]. PHM并非所有序列都是酶活力所必需, 缺失突变实验结果表明, N端缺失41个氨基酸残基, 不影响其活力, 甚至不影响其生物合成. C端缺失至Asp³⁵⁹甚至Val³⁵⁶仍具有全部酶活力, 而缺失至Thr³³⁵的蛋白则是无活力的不稳定的. 综合以上结果, 可认为42~356位间的序列为PHM的催化核心区 (PHMcc). 重组的PHMcc蛋白在非还原情况下, 可被CNBr和胃蛋白酶切开, 得到两个单独的结构域^[2]. PHMcc区的10个保守Cys形成五对二硫键, 其中三个 (47~186, 81~126, 114~131) 位于N端的结构域I, 两个 (227~334, 293~315) 位于C端的结构域II, 不存在结构域

间二硫键. 五个作为 Cu 配体的 His, 其中三个位于 N 端的结构域 I, 两个和一个 Met 位于 C 端的结构域 II, 分别与一个 Cu 以非共价形式结合, 之间由一段包括切割点 Lys²¹⁹在内的暴露的连接区将两个结构域连接, 这是从一级结构和功能分析中得到的结构模型^[3].

高级结构的研究也只支持以上结构模型, 并且为更深入理解酶的作用机制提供了基础. PHM_{cc} 是一个由两个立体结构相似的九链 β 三明治样结构域组成的 $5.5 \text{ nm} \times 4.5 \text{ nm} \times 2.5 \text{ nm}$ 的椭圆形, 每个结构域含有 150 个氨基酸残基组成的九链反平行果冻卷样单元, 各结合一个 Cu. 在每个结构域内部均为高度疏水的残基, 在两个环状连接链 (第 10, 12 链) 区, 两个结构域通过 50 nm^2 的疏水面紧密结合, 其余的界面均存在平均宽度为 0.8 nm 的域间空间, 可被溶剂进入. N 端结构域由两个反平行 β 折叠构成, 分别包含四条和五条链, 三对二硫键将环固定于该区而不把两个 β 折叠连在一起, 在域间界面的对面, 两个环组成一个短的 β 折叠. 结构域 II 包括一个四个链组成的反平行的 β 折叠和一个五条链组成的混合 β 折叠, 两个二硫键连接两个 β 折叠间的肽链. 此外, 本结构域还包括两个小的反平行 β 折叠各由两个肽链 (14~18, 12~20) 组成.

结构域 I 由位于 5 链首 (107, 108) 和 9 链尾 (172) 的三个 His 残基与一个活性 Cu (CuA) 结合, 三个 His 残基的 δ -氮以平伏键组成正金字塔形, 另外两个配位轨道空着. 结构域 II 通过位于 14 链尾的两个 His (242, 244) 和位于 21 链尾 Met (314) 及一个溶液成分 (H_2O 或分子氧) 与另一个活性 Cu (CuB) 结合, 呈四面体形, CuA 和 CuB 间的距离为 1.1 nm ^[4].

3 PHM 的催化机制

在 PHM 催化多肽酰胺化过程中, 伴随着 Cu 的氧化还原循环. 在氧化型的 PHM_{cc} 中, CuA 和 CuB 都是可接近溶液的, 它们可分别独立地由抗坏血酸通过单电子还原反应将 Cu (II) 还原为 Cu (I), 同时两个抗坏血酸分子分别氧化为半脱氢抗坏血酸. 分子氧可取代溶液配基可逆地结合于 CuB, 多肽底物也可与之发生可逆的结合. 与氧化型 PHM_{cc} 相比, 还原型 PHM_{cc} 硫配基向 CuB 发生位移, 原因可能是 Cu (I) 更有利于配基的配位结合. 多肽底物与酶的结合对 PHM_{cc} 的结构无

明显的影响, 不能引起两个结构域间距离的拉近. 多肽底物的结合带来的最大变化是 Asn³¹⁶和 Tyr³¹⁸的氢键断裂并与多肽底物骨架形成新的氢键, 除 Asn³¹⁶和 Tyr³¹⁸外, Arg²⁴⁰和结构中的水分子也与多肽底物的结合有关, 它们与多肽骨架形成氢键, 将其固定在结构域间的界面. 另外有几个疏水残基, 包括 CuB 的配基 Met³¹⁴与多肽底物广泛接触. 多肽底物与酶的复合物结构在几何学上允许多肽底物向 CuB 移近 0.04 nm . 在还原型 PHM_{cc} 中, 多肽底物和分子氧与 CuB 的距离很近, 只有在还原型酶的三元复合物中, 底物和氧才能发生羟化反应, 生成羟化产物、水和氧化的酶.

在三元复合物中, CuA 和 CuB 分别向 O_2 转移一个电子, 形成过氧化物结合于 CuB, 随后得到一个质子生成 H_2O_2 . PHM_{cc} 附近的残基不能提供质子, 在生理 pH 下, 可能由多肽底物的羧基提供. 羧基与 Arg²⁴⁰结合后能降低其酸性常数, 使之能将质子转向 Cu 结合的氧. 在多肽底物结合的 PHM_{cc} 中, 底物羧基氧与 CuB 的距离为 0.48 nm , 这是适合 Cu 结合的氧夺取质子的距离.

当 H_2O_2 形成后, 反应即可顺序进行, 包括 O—O 键的不均一断裂和从底物多肽的 Gly 残基夺取氢以形成甘氨酸自由基, 以及 Cu 结合氧自由基生成 Cu 结合氧化物并缓慢解离. 多肽底物与 PHM_{cc} 的结合的方式决定了羟化反应具有立体结构选择性. 酶与多肽的结合没有选择性, 所以该酶具有广泛的底物.

在许多铜蛋白中, 电子从不只一个 Cu 转移到分子氧, 氧分子象桥一样结合于两个铜离子间形成双核心中心, 或铜离子间的距离很近, 从而允许电子从一个离子转移到另一个离子. 在 PHM_{cc} 中, 不仅 CuA~CuB 间的距离较大, 而且铜周围的环境也不允许其直接接触, 因而每个铜离子分别转移一个电子. 两个结构域间的相互滑动使铜离子周围的残基接近, 从而使电子直接通过域间接触传递, 这种域间滑动只发生在还原型酶中. 在两个结构域间的溶液区, 电子还可通过水分子传递^[5].

由上述可知, 铜离子在 PHM_{cc} 的催化机制中起着十分重要的作用, 酶蛋白主要作用是提供一个铜的配位环境, 并将多肽底物通过氢键固定于结合部位.

参 考 文 献

- 1 Yonekura H, Anzai T, Kato I, *et al.* Identification of the five

- essential histidine residues for peptidylglycine monooxygenase. *Biochem Biophys Res Com*, 1996, **218** (2): 495~ 499
- 2 Eipper B A, Quon A S, Mains R E, *et al.* The catalytic core of peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase: Investigation by site directed mutagenesis, Cu X-ray absorption spectroscopy and electron paramagnetic resonance. *Biochemistry*, 1995, **34** (9): 2857~ 2865
 - 3 Boswell J S, Reedy B J, Kulathila R, *et al.* Structure investigations on the coordination environment of the active site copper centers of recombinant bifunctional peptidylglycine α -amidating enzyme. *Biochemistry*, 1996, **35** (38): 12241 ~ 12250
 - 4 Kolhekar A S, Keutmann H T, Mains R E, *et al.* Peptidylglycine α -amidating monooxygenase: Active site residues, disulfide linkages, and a two-domain model of the catalytic core. *Biochemistry*, 1997, **36** (36): 10901~ 10909
 - 5 Prigge S T, Kolhekar A S, Eipper B A, *et al.* Amidating of bioactive peptides: The structure of peptidylglycine α -amidating monooxygenase. *Science*, 1997, **278** (5342): 1300~ 1305

Function and Structure of Peptide α -Amidating Monooxygenase. LIU Sherr-Ji, CHEN Song-Sen
(*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union*

Medical College, Beijing 100005, China).

Abstract Carboxy-terminal amidation is an essential posttranslational modification for numerous neuronal and endocrine peptides. It is catalyzed by peptide α -amidating monooxygenase (PAM), in a two-step reaction. Peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase (PHM) and peptidylhydroxyglycine α -amidating lyase (PAL) act in one of the two steps. PHM catalytic core is composed of two nine-stranded β -sandwich domains similar in three-dimensional structure. Each domain contains an activity center with a copper coordinated by three conserved His or two His and a Met residues. In the reaction cycle of producing peptidyl α -hydroxyglycine, the two coppers are reduced independently by ascorbate, and they transfer one electron each to molecular oxygen.

Key words peptide α -amidating monooxygenase (PAM), structure, mechanism

神经细胞粘附分子与记忆*

胡家芬 隋南 匡培梓 管林初

(中国科学院心理研究所, 北京 100101)

摘要 记忆的形成阶段包含着神经元突触的可塑性变化过程. 近年来的研究表明, 神经细胞粘附分子可同时增进突触的可塑性和维持突触结构的稳定性. 许多研究证实神经细胞粘附分子对与学习和记忆相关的过程起着一定的调节作用.

关键词 神经细胞粘附分子, 突触可塑性, 记忆

学科分类号 Q27

神经细胞粘附分子 (neural cell adhesion molecules, NCAMs) 是细胞表面糖蛋白大家族的成员之一. 这些糖蛋白均在神经系统发育过程中表达并对轴突的生长起着重要的调节作用. 在学习记忆过程中, 神经元也经历了突触的可塑性变化过程, 有关实验表明 NCAMs 对长时记忆的保持有着重要的影响.

1 NCAMs 的结构

NCAMs 由一个含有 26 个外显子的单拷贝基因进行选择性地拼接, 产生出至少 20~ 30 个同位体. NCAMs 含有与免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig)

和纤连蛋白 III (fibronectin III, FN III) 决定簇相关的结构. NCAMs 可以按其所含有的每一种决定簇的数目进行分类. 比如 NCAM 有五个免疫球蛋白和两个 FN III 决定簇, 而 L1 糖蛋白含有六个免疫球蛋白和五个 FN III 决定簇. 在不同种系的动物中, NCAMs 之间有较高的同源性. 在果蝇中已鉴定出 NCAM 和 L1 的结构同源分子.

除了由选择性拼接而导致的结构上的变化外, NCAMs 还可经历了翻译后修饰过程, 比如糖基化

* 国家自然科学基金 (39570257), 中国科学院生物与技术特别支持资助项目.

收稿日期: 1998-07-13, 修回日期: 1998-12-28