

综述与专论

贝类生物矿化中的生物大分子与分子识别^{*}

何 艮 麦康森

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘要 综述了贝类生物矿化相关的生物大分子性质及其分子识别过程的最新研究进展。生物矿化原理为仿生材料科学和分子构造学提供了崭新的思路。贝类生物矿化过程是生物大分子指导无机晶体的晶核形成、定向及生长的过程, 是有机相-无机相、无机相-无机相界面分子识别的过程。

关键词 贝类, 生物矿化, 生物大分子, 分子识别

学科分类号 Q71

近年来, 在材料科学领域悄然兴起了一场革命: 在大多数化学家仍然执着于依赖原子间的共价结合进行化学合成的时候, 部分锐意创新者已开始把目光投向利用原子间的非共价作用(包括氢键、范德华氏力等)进行超分子系统(supramolecular systems)组装上, 构建类似于生物大分子(如DNA以氢键和碱基堆积力维持其空间构象)高度有序的新型材料。这类新材料将在传感器、电磁业、智能材料等方面有重要用途。目前研究如何控制分子有序组装已成为一门新兴的学科——分子构造学(molecular tectonics)^[1]。

单纯依靠化合物之间的相互作用很难进行有序构建而形成功能性材料。生物矿化材料(如牙齿、骨骼、贝壳等)在这方面为材料学家提供了很好的示范: 以少量有机大分子(蛋白质, 糖蛋白, 或多糖)为模板, 进行分子操作(molecular manipulation), 高度有序地组合成无机材料^[2]。在这些生物矿化材料里, 软体动物贝壳的形成又是受有机大分子控制最复杂、最有序的一个过程: 形成的贝壳是由碳酸钙晶体(主要包括方解石和文石)组成的高度有序的多重微层结构。并且这种高度有序的晶体复合体与一般的碳酸钙晶体相比有很多特殊的性质。例如它的强度比单一矿物晶体高3 000倍^[3]。这引起了材料学家的极大兴趣。研究贝壳矿物晶体的生物矿化原理对分子构造学的研究有重大指导意义。

在贝壳的形成过程中有机大分子(主要是蛋白质)和无机晶体的关系有点类似于“砖”和“灰

浆”的关系: 软体动物外套膜上皮细胞分泌出蛋白质, 形成外套膜蛋白层, 然后碳酸钙在上面沉积, 由蛋白质指导晶核形成、决定晶体空间取向及晶体类型^[4]。所以研究贝壳形成的中心问题就在于研究外套膜蛋白的结构与功能的关系以及蛋白质与无机晶体的相互作用。

1 外套膜蛋白的性质

到目前为止, 远未对参与贝壳生物矿化过程的蛋白质有一个清楚全面的认识, 其组成也是莫衷一是。只是根据其是否溶于水而分为两大类: 可溶性外套膜蛋白(soluble matrix protein, SM)和不溶性外套膜蛋白(insoluble matrix protein, IM)。

1.1 可溶性外套膜蛋白的性质

SM是多种小分子多肽的混合物, 相对分子质量从数千到数万。它的组成具有多态性: 不同种类动物、同一种类动物的不同生理状态、不同发育阶段、同一贝壳的不同晶层的SM都有很大的差别^[3, 5~7]。这使得不同文献之间很难进行比较。尽管如此, 但所有的SM都含有大量的天冬氨酸(Asp)和磷酸丝氨酸((p)Ser)。因此, 它是一类强酸性的蛋白质。另外, 大多数SM含有一定数目的糖链。SM的磷酸基和糖链可能和生物矿化过程都有密切关系^[8]。

SM一级结构的测定一直是近年来困扰贝类生物矿化研究的一个难题。研究发现其N端发生乙

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39770589)。

收稿日期: 1998-05-11, 修回日期: 1998-09-30

酰化, 因而无法直接用 Edman 降解法测定它的一级结构. 另外, 常用来产生肽谱的化学和酶试剂对它不易降解, 即使降解后由于其内部含有大量高度重复的多聚 Asp 序列和 (p) Ser 序列而缺乏重叠肽段都是难以研究其结构的原因^[9]. 最近, 有人利用分子生物学手段, 通过建立 cDNA 文库, 成功的测定了 SM 的一个组分——nacrein 的一级结构, 发现其内部含有 Gly-Xaa-Asn (Xaa= Asp, Asn 或 Glu) 多重序列, 并具有碳酸酐酶的活性. 前者应与结合 Ca^{2+} 有关; 后者可能与调节 CO_3^{2-} 浓度, 控制文石形成有关^[10].

正由于一级结构无法确定, 到目前为止对 SM 高级结构的研究仍然很少见. 但发现至少某些结构域应为 β 折叠片^[11]. 另外, 有人用原子力显微镜 (atomic force microscopy, AFM) 检测饱和 Ca^{2+} 溶液中的一种 SM, 发现为球蛋白. 但这并不一定表明它的原始构象为球状. 研究发现小鼠牙齿的磷蛋白在饱和 Ca^{2+} 溶液中由纤维状变为球状^[13].

目前还无法做到对 SM 进行基因定位. 但可以初步肯定它是由多个基因编码的. 证据来源于它的多态性, 特别是它随着发育阶段的不同组成发生变化: 从幼体到成鲍, 美洲红鲍 (*Haliotis rufescens*) SM 的 Asp 含量逐渐增加, 相应的贝壳逐渐更加坚硬. 这说明随着发育进程 SM 可能有一个基因表达转换的机制^[5].

1.2 不溶性外套膜蛋白的性质

IM 相对了解得很少. 现在比较一致的看法是它作为生物矿化的构架蛋白 (framework protein). 原来一直认为 IM 是 SM 在一定情况下相互交联的结果, 但最近通过对 IM 一级结构的研究发现, 这种结论似乎并不成立. 它含有大量的 poly (Ala) 和 poly (Gly) 序列, 二级结构主要为 β 折叠片. 另外, 在氨基和羧基端含有 poly (Asp) 序列, 这可能和结合 Ca^{2+} 有关^[14].

2 贝壳生物矿化的分子识别

贝壳生物矿化的中心问题在于有机大分子如何控制无机晶体的成核、生长、空间形态以及定位. 有机大分子指导晶核形成的过程类似于酶与底物之间的相互作用: 即有机大分子的作用是降低晶核形成的活化能 ($\Delta G^\ddagger$). 晶核的形成可以看作是由有机大分子的性质决定的多个晶面特异性活化能的集合^[15]. 在这个过程中, 有机大分子本身的结构是控制特定晶核形成的关键. 从贝壳文石晶层提取的

SM 在体外实验中指导形成文石; 从方解石晶层中提取的 SM 在体外实验中指导形成方解石^[16]. 蛋白质的空间构象也很可能是一个关键因素, 但在贝类生物矿化中尚无这方面的研究. 静电相互作用、氢键、晶格匹配、立体化学识别都是无机-有机相互识别的重要因素. 目前一致认为 SM 中富含的 Asp 是结合 Ca^{2+} , 控制晶体形成的关键因素. 另外, SM 中富含的磷酸基也同样具有结合 Ca^{2+} 的能力 (值得注意的是控制文石形成的 SM 中磷酸基含量要低于方解石 SM 中的磷酸基含量, 原因尚不清楚^[8]). 晶核的形成同样需要细胞代谢的调控. 如前所述, 外套膜上皮细胞分泌的 SM 和 IM 在不同生理状态、不同发育阶段、对于不同晶层, 所产生的蛋白质不同. 另外, 细胞也通过控制外套膜腔的 pH 值、离子浓度等来调节晶核的形成^[17]. 这种调节可能由激素引发, 也可能由分泌的蛋白质进行. 已发现有的 SM 有碳酸酐酶的活性, 通过调节 HCO_3^- 的浓度调节晶体形成^[10].

晶体的生长过程是一个游离的无机离子向晶体持续添加的动力学过程. 在这个过程中, 无机离子与晶面之间的电荷作用、立体化学识别都是控制添加的重要因素. 离子在某一晶面的选择性添加将导致晶体不对称以及稳定性改变. 细胞可能通过离子泵或其他方式调节外套膜腔的离子浓度来控制这个过程^[17]. 另外, 软体动物的外套膜蛋白同样控制着晶体的空间结构: 在体外实验中, 缺少 SM 的情况下合成的方解石为菱形, 而在有 SM 的情况下合成的方解石为球粒状^[3]. 其中的机制还不清楚.

晶核的形成和晶体的生长都需要首先形成一个高度组织的外套膜蛋白层. IM 的基本作用在于为 SM 以及晶核的形成提供框架. 最近通过对一种 IM 的一级结构测序发现, 它类似丝心蛋白 (silk fibroin)^[14]. 在体外实验中发现: 在缺乏丝心蛋白的情况下, SM 难以诱导文石晶核的产生. 这说明 IM 与晶核的产生密切相关. 目前对 SM 与 IM 之间的相互作用尚不清楚. 它们之间可能通过彼此氨基酸残基之间的静电相互作用及疏水作用结合在一起^[18]. 值得一提的是, 最近研究发现在形成的外套膜蛋白层上有一定大小的孔. 如鲍鱼外套膜蛋白层孔密度为 $100/\mu\text{m}^2$, 直径约为 43~49 nm. 这些孔可以保证无机离子和蛋白质顺利通过, 从而实现贝壳生长过程中蛋白质与无机离子的有效供给. 这些孔还可以使不同的微层之间晶体的生长不被打断, 从而在新的微层上无须重新形成晶核, 保证了

晶体生长的连续性^[19].

参 考 文 献

- Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature*, 1993, **365** (6446): 499~ 505
- Stupp S I, Braun P V. Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors. *Science*, 1997, **277** (5330): 1242~ 1248
- Belcher A M, Wu X H, Christensen R J, *et al.* Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature*, 1996, **381** (6577): 56~ 58
- Mann S. Crystallochemical strategies in biomineralization. In: Mann S, Webb J, Williams R J P, eds. *Biomaterialization: Chemical and Biochemical Perspectives*. New York: VCH, 1989. 35~ 62
- Cariolou M A, Morse D E. Purification and characterization of calcium-binding conchiolin shell peptides from the mollusc, *Haliotis rufescens*, as a function of development. *J Comp Physiol*, 1988, **157B** (6): 717~ 729
- Cuif J P, Dauphin Y. Occurrence of mineralization disturbances in nacreous layers of cultivated pearls produced by *Pinctada margaritifera* var. *cumingi* from French Polynesia. Comparison with reported shell alterations. *Aquat Living Resour*, 1996, **9** (2): 187~ 193
- Dauphin Y. The organic matrix of coleoid cephalopod shells: molecular weights and isoelectric properties of the matrix in relation to biomineralization processes. *Mar Biol*, 1996, **125** (4): 525~ 529
- Borbas J E, Wheeler A P, Sikes C S. Molluscan shell matrix phosphoproteins: correlation of degree of phosphorylation to shell mineral microstructure and to *in vitro* regulation of mineralization. *J Exp Zool*, 1991, **258** (1): 1~ 12
- Halloran B A, Donachy J E. Characterization of organic matrix macromolecules from the shells of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Comp Biochem Physiol*, 1995, **111B** (2): 221~ 231
- Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, *et al.* A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (24): 9657~ 9660
- Keith J, Stockwell S, Ball D, *et al.* Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp Biochem Physiol*, 1993, **105B** (3/4): 487~ 496
- Donachy J E, Drake B, Sikes C S. Sequence and atomic force microscopy analysis of a matrix protein from the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Biol*, 1992, **114** (3): 423~ 428
- Marsh M E. Self-association of calcium and magnesium complexes of dentin phosphoryn. *Biochemistry*, 1989, **28** (2): 339~ 345
- Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*, 1997, **387** (6634): 563~ 564
- Mann S, Douglas D, Archibald J M, *et al.* Crystallization at inorganic-organic interfaces: biominerals and biomimetic synthesis. *Science*, 1993, **261** (5126): 1286~ 1292
- Falini G, Albeck S, Weiner S, *et al.* Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 1996, **271** (5245): 67~ 69
- Weiner S, Addadi L. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. *Trends Biochem Sci*, 1991, **16** (2): 252~ 256
- Bowen C E, Tang H. Conchiolin protein in aragonite shells of mollusks. *Comp Biochem Physiol*, 1996, **115A** (4): 269~ 275
- Addadi L, Weiner S. A pavement of pearl. *Nature*, 1997, **389** (6653): 912~ 915

Biological Macromolecules and Molecular Recognition in Mollusk Biomineralization.

HE Gen, MAI Kang-Sen (College of Fisheries, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China).

Abstract A biomimetic synthesis based on biomineralization principles leads to the development of new strategies in material science and biotectonics. Mollusk biomineralization is a process of nucleation and growth of inorganic crystals controlled by biological macromolecules, also is a process of inorganic-organic and inorganic-inorganic molecular recognition. The latest progress in studies on the characteristics of macromolecules and molecular recognition involved in mollusk biomineralization is reviewed.

Key words mollusks, biomineralization, biological macromolecules, molecular recognition

反义技术及其在 G 蛋白研究中的应用

余方圆¹⁾ 周元国

(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042)

摘要 反义技术至少包括反义寡核苷酸技术、反义 RNA 技术和核酶技术。在 G 蛋白研究中, 反义技术在 G 蛋白

¹⁾ 现通讯地址: 解放军 254 医院骨科, 天津 300141。 收稿日期: 1998-04-06, 修回日期: 1998-07-27