



邹承鲁先生与中国蛋白质折叠研究

王志珍*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0054

邹承鲁先生是近代中国生物化学的奠基人之一, 一生致力于蛋白质结构与功能关系的研究, 在细胞色素与呼吸链酶系、人工合成胰岛素、酶活性不可逆抑制动力学、酶活性部位的柔性以及蛋白质折叠和分子伴侣等不同领域都做出了重大贡献。

1964年我从中国科学技术大学生物物理系毕业, 被分配到中国科学院生物物理研究所。后有幸在邹先生实验室工作近20年, 在邹先生的指导和帮助下, 对胰岛素A、B链相互作用、蛋白质折叠以及帮助蛋白质折叠的分子伴侣和折叠酶开展了一些研究工作。邹先生在科学研究和做人做事上的言传身教是我一生弥足珍贵的收获。时值邹先生百年诞辰, 希望用这篇短文回顾邹先生在蛋白质折叠领域的创新研究及一些后续工作, 以缅怀这位中国生物化学与生物物理学界德高望重的前辈。

1 人工全合成胰岛素中的蛋白质折叠问题

蛋白质正确的三维结构是其行使生物学功能的前提。如何从线性的多肽链形成复杂精巧的三维结构, 这就是蛋白质折叠问题。美国国立健康研究院(NIH)的Christian Anfinsen在上世纪五、六十年代, 系统研究了牛胰核糖核酸酶A的氨基酸序列与生物学活性构象之间的关系, 提出了著名的热力学假说“一个天然蛋白质在其生理环境中的三维结构是整个系统的吉布斯自由能最低的结构”, 也就是我们常说的“蛋白质一级结构决定高级结构”的原理^[1]。这一发现填补了分子生物学的中心法则中遗传信息从一维多肽链传递到三维蛋白质的空白, 开创了近代蛋白质折叠研究的时代。Anfinsen也因此获得了1972年的诺贝尔化学奖。

几乎同一时期(1958年), 包括邹承鲁先生在内的中国最优秀的生物化学家和有机化学家们, 提

出了向新中国国庆10周年献礼的项目“合成一个蛋白质”。胰岛素是当时唯一被测定氨基酸序列的蛋白质, 由分别含有21和30个氨基酸残基的A、B两条肽链组成, 链间由两个二硫键连接, A链还有一个链内二硫键。当时国际上已经有了合成不同长度肽段的经验, 但像胰岛素这样含有两条肽链和多个二硫键的蛋白质人工全合成还没有先例。这是一个从0到1的创举! 最为现实的合成路线可能是分别合成A链和B链, 然后通过巯基的氧化使两条链正确组合, 而这一方案中最为关键的问题是合成的A链和B链能否氧化而形成天然的胰岛素分子。当时35岁的邹先生, 带领杜雨苍、鲁子贤、张友尚、许根俊等几位大学毕业不久的年轻研究人员承担起“胰岛素拆合”工作: 把天然胰岛素分子拆分成A链和B链, 再把分开的A链和B链重组成为具有生物学活性的胰岛素分子。1959年, 邹先生小组就实现了胰岛素的成功拆合, 重组的胰岛素活力恢复到10%。由于当时的政治环境, 国内科技期刊普遍停刊, 同时德国和美国也在进行胰岛素合成的竞争, 邹先生小组的结果没有得到及时发表。而1960年Dixon和Wardlaw^[2]在《自然》(Nature)杂志上报道了还原的胰岛素A链和B链共同氧化得到1%~2%的胰岛素活力。1961年10月, 邹先生小组才在《中国科学》复刊后的第一期上发表了1959年就得到的结果^[3]。无论从时间上还是在质量上, 中国人进行的胰岛素A、B链重组都领先于世界。这一成果不但解决了胰岛素的合成路线问题, 也确保了人工合成的A链和B链能够以高产率重组成为活性胰岛素分子。

* 通讯联系人。

Tel: 010-64888500, E-mail: chihwang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2023-02-22, 接受日期: 2023-03-09

胰岛素 A、B 链拆合与 Anfinsen 的核糖核酸酶复性工作非常相似，也几乎是同时完成的。后者是将变性状态的 4 个二硫键全部还原的核糖核酸酶肽链重新氧化折叠恢复活力。核糖核酸酶只有 1 条肽链，其 4 个二硫键的所有组合方式有 105 种可能性；而胰岛素则是由 2 条肽链组成，2 条肽链可能以不同的比例与方式组合，其 6 个巯基所有的可能组合方式则是无穷多，其复性问题远远复杂得多。当时邹先生小组总结出“天然胰岛素的结构是所有 AB 异构物中最稳定的结构之一”的重要结论。但是由于此工作的任务导向性加上“文革”的种种干扰，他们未能有机会去提炼 A、B 链拆合成功所蕴含的蛋白质折叠问题。

20 世纪 70 年代末“科学的春天”到来，邹承鲁先生在中国科学院生物物理研究所重拾胰岛素 A、B 链重组的“老题”，新做其机制的研究。我从国外访学回国加入了邹先生领导的这一课题，作为 co-PI 争取到美国国立健康研究院的国际研究基金。在邹先生指导下，我们运用各种生物物理和生物化学方法研究胰岛素 A、B 链和各种化学修饰的 A、B 链在不同溶液条件下的相互作用，进一步总结出胰岛素分子折叠的观点：“胰岛素 A、B 链本身已经具有一定的结构，含有形成天然胰岛素正确结构的全部信息，能在溶液中相互识别和相互作用，从而导致 3 个二硫键（2 个链间二硫键和 1 个链内二硫键）正确配对，形成结构最稳定的天然胰岛素分子”^[4]，阐明从人工全合成的胰岛素 A 链和 B 链生成天然胰岛素分子的蛋白质折叠规律，揭示了人工合成胰岛素中 A、B 链成功重组的理论基础。

2 蛋白质折叠与分子伴侣

1991 年中国启动了国家基础性研究重大项目计划（“攀登计划”）。邹承鲁先生承担了首批 30 个项目中的“新生肽链及蛋白质折叠的研究”，下设“蛋白质折叠与去折叠的一般规律”（周海梦）、“酶活性部位柔性”（周筠梅）、“新生肽链折叠”（静国忠）、“蛋白质结构预测与分子设计”（王志新和潘宪明）、“帮助蛋白质折叠的生物大分子——分子伴侣和折叠酶”（王志珍）5 个子课题。这一项目取得了一批具有国际水平的研究成果，同时编写了《攀登计划普及丛书》中的“第二遗传密码？——新生肽链及蛋白质折叠的研究”，用通俗语言向社会大众讲述蛋白质折叠的科学问题。

当时主流的蛋白质折叠研究是用完全变性蛋白

质的完整肽链重新折叠进行的。邹先生很早就意识到细胞中新生肽链的折叠与蛋白质在体外试管里的折叠是不一样的。1988 年，他在《生物化学》（*Biochemistry*）杂志上发表文章^[5]，提出了新生肽折叠的一个假说：在细胞中，新生肽的卷曲折叠在其合成过程中就已经开始了，这些最初形成的结构随着肽链在核糖体上延伸的同时进行调整，可能与它在最终全长蛋白质中的天然构象并不一致，并在合成完成后经最终的修正而完成折叠。这就指出了—个非常重要的科学问题：细胞内的蛋白质是如何折叠的？

胰岛素拆合以及 Anfinsen 核糖核酸酶复性都是在体外较低的蛋白质浓度和较温和的氧化条件下实现的。细胞内新生肽链折叠和成熟是在相对高的温度、相当高的浓度而又十分拥挤的环境中以极快的速度和极高的保真度高效进行，往往需要分子伴侣和折叠酶两类作用机制不同的“帮助蛋白”保驾护航。折叠酶能够催化蛋白质折叠过程中二硫键形成、脯氨酸顺反异构等化学键变化；而分子伴侣是在 20 世纪 80 年代才发现的“一类具有相似功能的不同蛋白质，能帮助促进其他大分子（包括蛋白质、核酸）进行非共价的折叠、解折叠、组装、解组装，但并不是后者发挥正常生物学功能时的永久组成部分”，确切地说，分子伴侣是蛋白质一种新功能的定义。

在研究胰岛素 A、B 链重组机制的过程中，我们已经开始思考细胞内帮助胰岛素折叠的分子，并成功运用蛋白质二硫键异构酶（protein disulfide isomerase, PDI）获得高效的重组。在此基础上，根据对分子伴侣新概念的认识，提出了“PDI 既是酶又是分子伴侣”的假说，并为此假说提供了一系列的实验支持^[6]。我们用实验区分了 PDI 固有的且相互独立的异构酶和分子伴侣两种活力，揭示 PDI 帮助生理底物蛋白的折叠需要其异构酶和分子伴侣两种活力协同作用，缺一不可^[7]。原核生物大肠杆菌中的 DsbC 相应于真核生物的 PDI，我们也鉴定了 DsbC 的分子伴侣活力，这是在大肠杆菌周质腔内发现的首个分子伴侣^[8]。这些发现不仅仅是发现一个蛋白质新的活性，更重要的是打破了折叠酶和分子伴侣这两大类帮助蛋白的界限。PDI 也是分子伴侣的概念，已为国内外同行广泛接受，特别是分子伴侣概念的提出者 John Ellis 在其综述文章中肯定了 PDI 的分子伴侣特性^[9]，他曾一度断言“PDI 不是分子伴侣”。

通过与结构生物学家合作, 我们最终解析了人源PDI氧化态和还原态的晶体结构^[10], 直接展示了PDI氧化还原调控的构象变化及其结合底物的不同模式, 总结出PDI家族蛋白行使分子伴侣活力所需要的结构特征。我们进一步发现, 在细胞应激条件下PDI发生磷酸化, 实现其异构酶和分子伴侣活力两种功能间的切换^[11]。

30年来, 我们课题组新一代研究人员广泛运用新知识和新技术, 深入研究了PDI及其家族成员帮助蛋白质氧化折叠的分子机制和生物学功能, 重构以PDI与其上游氧化酶Ero1 α 为中枢、多种过氧化物酶并行参与的内质网蛋白质氧化折叠网络, 发现了关键酶的翻译后修饰对调节内质网蛋白质氧化折叠和氧化还原稳态的全新方式和一系列新的认识。通过细胞和模式生物的研究, 将内质网蛋白质氧化折叠和氧化还原稳态调节与衰老、肿瘤、心血管病等发病机制紧密联系起来, 为这些疾病的干预或治疗提供新的策略。2022年王磊研究员和我应邀在《*Trends in Biochemical Sciences*》期刊发表综述文章, 全面总结了酵母、植物、哺乳动物的蛋白质氧化折叠机制, 深入讨论了蛋白质氧化折叠在不同生理和病理过程中的作用^[12]。

3 推动学界认识中国科学家对蛋白质折叠早期研究的巨大贡献

对蛋白质分子结构的认识最早来自于蛋白质变性的研究, 蛋白质变性成为蛋白质折叠问题研究的前奏和基础。20世纪20年代中国杰出生物化学家吴宪教授基于其在北平协和医学院生化系开展的蛋白质变性实验的研究工作, 提出了世界上第一个“蛋白质变性”理论: 天然可溶性蛋白质的长肽链一定是由氨基酸的各种极性基团被分子内的某种次级键按一定方式连接而形成有规律的折叠, 使蛋白质分子具有一种紧密的构型(即今天的“conformation(构象)”)概念。蛋白质的这种次级键一旦被物理、化学的力破坏, 构型就被打开, 肽链则由有规律的折叠而变为无序、松散的形式, 即发生了变性。1929年他在第13届国际生理学大会上系统阐述了这一理论, 随后于1931年以英文发表在《*Chinese Journal of Physiology*》杂志上^[13]。然而这一重要发现在当时并没有得到广泛的关注。学界更为人知的反倒是5年后Mirsky和诺奖获得者Pauling共同发表的非常类似的蛋白质变性理论的工作^[14]。

邹承鲁先生很早就关注到吴宪教授“蛋白质变性”理论的学术贡献, 他认为中国大多数生物化学工作者也许知道吴宪的名字, 但并不熟悉吴宪对世界生物化学作出的重大贡献, 没有充分认识吴宪在世界生物化学发展史上所占有的地位, 必须大力宣传中国科学家的科研成就, 弘扬他们的科学精神。1993年吴宪教授诞辰100周年, 时任中国生物化学与分子生物学会理事长的邹先生就在第七届全国生化大会上, 专门组织了“纪念吴宪的蛋白质变性理论”的专题讨论会。邹先生邀请了吴宪教授之子、美国康奈尔大学的吴瑞教授介绍吴宪教授一生主要的科学发现, 他本人则详细介绍了吴宪教授在蛋白质变性领域所做的开创性贡献。

1995年, 蛋白质研究的前辈、著名生物化学家哈佛大学John Edsall教授把吴宪教授1931年发表在《*Chinese Journal of Physiology*》杂志上的文章重新全文印发在《*Advances in Protein Chemistry*》上, 并配发他亲自撰写的评论“吴宪与第一个蛋白质变性理论(1931)”^[15], 确定了吴宪是认识到蛋白质分子天然状态和变性状态之间关系的第一人, 他的理论是该领域的里程碑, 在国际生化界还原历史的本来面目。我看到Edsall的这篇文章十分激动, 随即与邹先生一起写了一篇评述文章《立足国内 走向世界——从吴宪教授六十四年前一篇论文的重新发表谈起》^[16], 进一步介绍了中国科学家在蛋白质折叠研究中作出的国际公认的巨大贡献以及对此的思考。邹先生强调了吴宪十余年的研究积累都是在中国的实验室里完成的, 在发表了12篇论文后才提出一个理论, 体现了研究成果严谨和扎实。邹先生特别指出吴宪的工作尽管是用英文发表, 没有得到应有的关注; 这一点他自己也深有体会, 胰岛素重组的工作同样是用英文发表, 也没有及时在国际上得到应有的肯定。邹先生30年前呼吁中国的科学必须“冲出亚洲, 走向世界”, 在今天仍然具有极大的重要性和现实意义。科学研究必须坚持开放, 把大门开得更大, 把科学和人才的国际交流做得更有创新性、更加活跃。

4 展 望

随着AlphaFold的横空出世^[17], 科学家已经能够依据一级序列相当准确地计算预测出几乎所有蛋白质的三维结构, 甚至有人认为人工智能已经解决了蛋白质折叠问题。三维结构只是蛋白质折叠在热力学上的终点, 姑且不谈蛋白质折叠是否只有唯一

的终点, 邹承鲁先生早在1988年提出新生肽折叠模型时就指出, 多肽链折叠是一个不断变化的动态过程, 蛋白质折叠更重要的是从不断延伸的新生肽链起点到天然构象终点间的过程, 也就是蛋白质折叠的动力学问题。这也许是当前AlphaFold应当努力的方向之一^[18]。细胞内新生肽链成为有活性的功能成熟蛋白质过程, 则是更为复杂的广义的蛋白质折叠问题。核糖体孔道对正在翻译的新生肽链形成初始结构非常重要。在翻译进行的同时或翻译完成后, 新生肽链往往还需经历如二硫键形成、N-糖基化、蛋白酶剪切等各种修饰加工, 这些修饰与肽链的折叠也密切相关。新生肽链还需要被转运到特定亚细胞结构定位包括分泌到胞外, 才能发挥特定的生物功能。这些过程往往要经历跨膜甚至是多次的跨膜, 一般来说蛋白质需要解折叠才能跨膜, 跨膜后的蛋白质又需要重折叠。错误折叠的蛋白质需要被及时清除。细胞内蛋白质的折叠在各个步骤都涉及与其他生物大分子特别是分子伴侣的相互作用。任何一个环节出问题都会引起蛋白质折叠的错误和病变的风险。未来将发展更高分辨率、更快速的成像技术, 拍摄在细胞内蛋白质折叠更加精准精细的动态电影, 从而揭开蛋白质折叠的真实面目。

参 考 文 献

- [1] Anfinsen C B, Haber E, Sela M, *et al.* The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1961, **47**(9): 1309-1314
- [2] Dixon G H, Wardlaw A C. Regeneration of insulin activity from the separated and inactive A and B chains. *Nature*, 1960, **188**: 721-724
- [3] Tsou C L, Du Y C, Xu G J. The reduction of insulin and its benzyl derivatives by sodium in liquid ammonia and the regeneration of activity from the reduced products. *Sci Sin*, 1961, **10**: 332-343
- [4] Wang C C, Tsou C L. The insulin A and B chains contain sufficient structural information to form the native molecule. *Trends Biochem Sci*, 1991, **16**(8): 279-281
- [5] Tsou C L. Folding of the nascent peptide chain into a biologically active protein. *Biochemistry*, 1988, **27**(6): 1809-1812
- [6] Cai H, Wang C C, Tsou C L. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem*, 1994, **269**(40): 24550-24552
- [7] Yao Y, Zhou Y, Wang C. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. *EMBO J*, 1997, **16**(3): 651-658
- [8] Chen J, Song J L, Zhang S, *et al.* Chaperone activity of DsbC. *J Biol Chem*, 1999, **274**(28): 19601-19605
- [9] Ellis R J. Assembly chaperones: a perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, **368**(1617): 20110398
- [10] Wang C, Li W, Ren J, *et al.* Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. *Antioxid Redox Signal*, 2013, **19**(1): 36-45
- [11] Yu J, Li T, Liu Y, *et al.* Phosphorylation switches protein disulfide isomerase activity to maintain proteostasis and attenuate ER stress. *EMBO J*, 2020, **39**(10): e103841
- [12] Wang L, Wang C C. Oxidative protein folding fidelity and redox-taxis in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 2023, **48**(1): 40-52
- [13] Wu H. Studies on denaturation of proteins. XIII. A theory of denaturation. *Chinese J Physiol*, 1931, **5**: 321-344
- [14] Mirsky A E, Pauling L. On the structure of native, denatured, and coagulated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1936, **22**(7): 439-447
- [15] Edsall J. Hsien Wu and the first Theory of Protein Denaturation (1931). *Adv Protein Chem*, 1995, **46**: 1-5
- [16] 邹承鲁, 王志珍. 立足国内 走向世界——从吴宪教授六十四年前一篇论文的重新发表谈起. *生理科学进展*, 1996, **27**(1): 5-6
Tsou C L, Wang C C. *Prog Physiol Sci*, 1996, **27**(1): 5-6
- [17] Jumper J, Evans R, Pritzel A, *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, **596**(7873): 583-589
- [18] Lutomski C A, El-Baba T J, Robinson C V, *et al.* The next decade of protein structure. *Cell*, 2022, **185**(15): 2617-2620