

酶 的 结 构 与 功 能

袁 静 明

(山西大学生物系)

酶是生物体组织或细胞内具有特殊催化活性的蛋白质,亦称生物催化剂。

自然界中一切生命现象都与酶有关,生物体的新陈代谢过程都在酶的催化作用下进行,并受酶的控制和调节。如果离开了酶,新陈代谢就不能进行,生命也就停止。因此,酶学的研究有着极其重大的理论和实践意义。近年来,分子生物学领域内,在不断涌现的新方法和新技术的推动下,使酶的结构与功能的关系愈加清晰了。

一、酶分子的结构与功能的关系

酶具有惊人的催化效率,通常比一般催化剂高 10^7 — 10^{13} 倍。以过氧化氢酶(E. C. 1. 11. 1. 6)为例,它的催化效率比铁离子高约 10^7 倍(以分子比为为基础)。酶不仅催化效率高,而且还有高度专一性,一个酶只能催化一种或一类底物分子反应。如 β -葡萄糖苷酶(E. C. 3. 2. 1. 21)只能催化 β -葡萄糖苷水解,而不能催化 β -甘露糖苷的水解,尽管两者仅在一个羟基上有差异。此外, β -葡萄糖苷酶只能作用于 β -构型的葡萄糖苷,不能水解 α -构型的葡萄糖苷。诚然,并非所有的酶都具有如此高度的专一性,有些酶仅具有相对专一性,如胰蛋白酶(E. C. 3. 4. 4. 4)只作用于一端为碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)的肽键或酯键。总之,研究酶的结构与功能,就是要回答酶为什么具有催化高效性和高度专一性。

酶是蛋白质,因此还得从蛋白质的共性探索酶的个性。蛋白质是由20种氨基酸按不同顺序排列组合而成具有一定空间构型的多肽链,各种氨基酸还具有不同的侧链,各种侧链又有不同的化学反应性。从表1看出,有些是脂肪族侧链,有些是芳香族侧链。侧链的基因亦各不相同,有羟基、羧基、氨基、咪唑基、巯基……等,这些基因在维系蛋白质构型和酶的生物活性方面起着极其重要的作用。它们相互可形成各种化学键,如离子键、氢键、疏水键等。因此,酶分子的某一区域有可能形成高度极性的微环境,而在另一区域却是由非极性键构成的疏水微环境。酶分子的这种特异性结构有利于亲核反应、氢键形成和酸碱催化;一句话,有利于酶的催化反应。

除了酶分子的基本组成单位——氨基酸决定酶的

催化性质外,有些酶还包含辅酶或金属离子,它们对于酶的催化反应同样起着十分重要的作用。在辅酶中,如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)能进行氢转移,黄素二核苷酸(FAD)参与电子转移反应,吡哆醛参与各种脱氨和转氨反应,维生素 B_{12} 衍生物参与甲基转移,而硫胺素焦磷酸参与糖代谢中一些转化反应。酶分子所需的金属离子主要有 Fe^{++} , Zn^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Fe^{+++} , Mo^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Cu^+ , Ca^{++} 等。它们可与氨基酸侧链基团结合。若按它们的结合方式,可能有四种不同的功能:(1)与酶分子本身的配位基结合,以便保持酶活性所必要的空间构型;(2)协调酶分子和底物(或辅酶)的反应,同时结合底物(或辅酶)和酶,起一种架桥的作用;(3)可能作为一种Lewis酸,参与催化过程;(4)作为辅酶和辅基的一个组成部分。

酶分子的特定化学结构反映了一定的催化功能。根据蛋白质分子的组成和盘曲折叠的方式,可分为一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。

一级结构 指蛋白质分子中肽链的氨基酸残基的排列顺序。由于半胱氨酸侧链的巯基经氧化后,能形成—S—S—键,因此,在蛋白质分子的链内或链间都有可能形成二硫桥键。

二级结构 指蛋白质分子的肽链本身三维空间的规律性。主要由肽链骨架之间羰基和亚氨基间形成的氢键($>NH\cdots O=C<$)来维系。近年的研究表明,链内键形成螺旋结构(α -螺旋),而链间键形成片状结构(β -折叠)。一些酶同时包含一定的螺旋区和片状结构区。 α -螺旋结构是一种较稳定的结构,即每隔3.6氨基酸残基肽链向上旋转一圈,二圈间的距离为5.4埃,但由于分子中的二硫桥和个别氨基酸(如脯氨酸)的存在,以及一些其它原因,可使螺旋中断。在一般球蛋白中 α -螺旋约占整个肽链的20—50%。

三级结构 蛋白质分子的二级结构又可按照一定方式再盘曲折叠,为三级结构,主要由盐键、氢键和疏水键等所维系。这样折叠后,蛋白质的肽链虽很长,由于二、三级结构的存在,多数蛋白质在空间构型上却是紧密的球状分子。

四级结构 在某些情况下,个别蛋白质的亚基可结合成有限数目的多聚体。在一个多聚蛋白分子中,有的每一个亚基的一、二、三级结构都彼此相同,如烟

NH₂
|
R—CH—COOH

表 1 氨基酸侧链基团在酶分子中的可能功能 (R—CH—COOH)

氨基酸	侧链基团 (R)	功 能
甘氨酸 (Gly)	—H	无侧链, 可允许肽链折叠的可变性, 亦能形成氢键
丙氨酸 (Ala)	—CH ₃	起疏水作用, 决定位置和构象的特异性; 如丙氨酸有利于 α -螺旋, 而缬氨酸、异亮氨酸的侧链有限止一定结构特征的趋势
缬氨酸 (Val)	—CH(CH ₃) ₂	
亮氨酸 (Leu)	—CH ₂ CH(CH ₃) ₂	
异亮氨酸 (Ile)	—CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	
苯丙氨酸 (Phe)	—CH ₂ C ₆ H ₅	
丝氨酸 (Ser)	—CH ₂ OH	形成氢键, 具有亲核性质, 可共价结合形成酯
苏氨酸 (Thr)	—CH(CH ₃)OH	
半胱氨酸 (CysH)	—CH ₂ SH	具有亲核性质, 是乙酰基的受体, 可形成氢键, 与金属离子配位
甲硫氨酸 (Met)	—CH ₂ CH ₂ SCH ₃	具疏水性, 能进行亲核反应, 与金属离子配位
酪氨酸 (Tyr)	—CH ₂ C ₆ H ₄ OH	具疏水性, 能形成氢键, 进行质子转移, 在高 pH 时能形成离子键, 与金属离子配位
谷氨酸 (Glu)	—CH ₂ CH ₂ COOH	有亲水性, 形成离子键, 质子转移, 和金属离子配位, 经 ω -羧基共价结合成酯或胺
门冬氨酸 (Asp)	—CH ₂ COOH	
谷氨酰胺 (Gln)	—CH ₂ CH ₂ CONH ₂	有亲水性, 形成氢键
门冬酰胺 (Asn)	—CH ₂ CONH ₂	
赖氨酸 (Lys)	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	有亲水性, 形成离子键, 与辅基结合形成锡夫碱, 与金属离子配位
组氨酸 (His)	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—C=CH} \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{N} \quad \text{NH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \quad \quad \text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$	亲水或疏水(按离子化情况), 静电相互作用, 质子转移, 与金属离子配位, 形成氢键, 在转移反应中作为受体
色氨酸 (Try)		疏水性, 形成氢键
脯氨酸 (Pro)	$\left(\begin{array}{cc} \text{H}_2\text{C} & \text{—} & \text{CH}_2 \\ & \diagdown & \diagup \\ & \text{HN} & \text{CH}_2 \\ & \diagup & \diagdown \\ & \text{C} & \text{—COOH} \\ & \quad \quad & \text{H} \end{array} \right)$	疏水性, 使 α -螺旋或 β -折叠中断, 从而出现不规则的构型

草花叶病毒的外壳蛋白; 有的则是由少数几种不同亚基组成的, 如门冬酰胺转氨甲酰胺酶 (E. C. 2. 1. 3. 2)。亚基之间主要由各自表面暴露的侧链形成的键 (如疏水键) 所维系。

由此可知, 酶蛋白的一级结构是基础, 但必须具有一定空间构型 (一般指二、三级结构) 时才呈现活性。高级结构的松散, 伴随着酶活性的丧失。近年的研究表明, 高级结构是由一级结构所决定。在一定条件下, 蛋白质分子总是按自由能最低的状态自动折叠成高级结构。核糖核酸酶 A (RNase, E. C. 2. 7. 7. 16) 的人工合成和重组的研究是一级结构决定高级结构的最有力证据。RNase 有 4 对 —S—S—键 [26*—84

(I), 40—95(II), 58—110(III), 65—72(IV)], 经还原后可出现 8 个 —SH, 导致酶活力完全丧失。如果进行重氧化, 按化学反应的随机原则, 可能有 105 种含有不同 —S—S—对的分子。实验表明, 在一定条件下重氧化的结果, 酶分子不仅能重新折叠盘曲, 而且只选择上述 105 种中能量最低的一种方式, 经重氧化的酶在活力和空间结构上都类同于天然酶。

若用枯草杆菌蛋白酶 (E. C. 3. 4. 4. 16) 水解 RNase 分子中的丙₂₀-丝₂₁肽键, 其作用产物仍具有酶活性, 常称 RNase S。作用产物可分离成含 20 个残基

* 数字表示自氨基末端数起的残基顺序, 下同

的 S-肽和 104 个残基的 S-蛋白,二个碎片都是无活性的,但只要按 1:1 克分子混合,就能呈现全部酶活力,重组的酶称 RNase S'。这一结果表明,二个碎片都包含对酶活力所必需的部分,也就是在重组过程中重新形成了酶的活性中心构型。用化学修饰法研究指出, S-肽中组₁₂对酶活性是必需的;用人工合成的 S-肽碎片重组获得了同样的结果。

链球菌核酸酶 (E. C. 3. 1. 4. 7) 是由 149 个氨基酸组成。若经酶解、分离可得 1—6, 7—48 和 49—149 三个碎片。重组研究表明,只要将后两个碎片组合即可呈现酶的全部活力。显然,1—6 肽为酶分子维持其三级结构的非必需部分,所以不影响酶活力。虽然,一级结构决定高级结构的证据,目前仅限于少数酶,但利用近代特殊的快速反应技术,曾测定了链球菌核酸酶重组的中间过程。结果表明,肽链自行折叠成高级结构的过程可分二个阶段,第一阶段为 55 毫秒,第二阶段为 350 毫秒。因此,认为蛋白质分子的折叠过程是先形成一个核,称“核化作用”,时间短暂,然后由此核再诱导整个蛋白质分子的折叠,所需时间比“核化”长。

实际上,蛋白质生物合成的研究结果也提供了有力的证据。在蛋白质生物合成过程中,多肽链合成一经完成,即自行盘曲折叠成具有生物活性的空间结构。迄今为止,没有发现在任何系统中需要其他因子参与。这种过程完全是一种不消耗能量的自发过程。

X 光衍射法在阐明酶的结构与功能的关系方面具有特殊的贡献。到目前为止,已有 40 多种蛋白质的空间构型已经确定或正在研究,其中绝大多数为酶(表 2)。显然,研究得比较清楚的为一些单链的水解酶,如胰凝乳蛋白酶、羧肽酶等。由这些酶所得出的结论是否适用于多亚基蛋白质,尚需进一步探讨,或许有可能出现新的概念。

值得注意的是: X 光衍射法与侧链化学修饰法所得的结果基本一致,这一点至少说明酶在晶体状态和溶液状态相似。如上所述,酶蛋白分子内折叠通常仅占 30% 左右,并且活性中心部位一般都在酶分子表面的凹穴中,因而不至于引起阻碍小分子底物或抑制剂等与酶活性中心结合。酶活性部位空间结构的细微改变,对酶活性有很大影响。最有趣的例子是 α -胰凝乳蛋白酶原和 α -胰凝乳蛋白酶,两者活性中心功能团完全一样,但前者是无活性的,后者却是活化的。X 光衍射结果表明,两者的差别主要在于酶分子 214—216 位残基的空间结构不同,而且胰凝乳蛋白酶活性中心组氨酸约有 15—20 度的偏角,有利于底物络合。

虽然, X 光衍射研究的结果比较满意地解释了酶的结构与功能,但仍然有一定局限性。单从酶活性比较,差异有时极为显著。不少酶在晶体态时的活性远比溶液态低,也就是在晶体态时酶活性部位的空间结

表 2 已经用 X 光晶体衍射法进行高级结构研究的蛋白质

蛋 白 质		分辨率水平(埃)
呼 吸 蛋 白 和 氧 化 还 原 蛋 白	马血红蛋白	2.8
	八目鳗和血蠕虫血红蛋白	分别为 2.0 和 2.8
	昆虫血红蛋白	2.5
	肌红蛋白	1.4
	人碳酸酐酶	2.0
	细胞色素丙	氧化型 2.8, 还原型 2.45
	细胞色素 b ₅	2.0
	rubredoxin	1.5
	高效铁蛋白	2.0
	铁氧还蛋白	正在研究
水 解 酶 类	羧肽酶	2.0
	α -胰凝乳蛋白酶	2.0
	γ -胰凝乳蛋白酶	2.8
	胰凝乳蛋白酶原	2.5
	弹性蛋白酶	2.8
	胰蛋白酶	2.8
	胰脏胰蛋白酶抑制剂	2.5
	枯草杆菌蛋白酶 BPN	2.5
	枯草杆菌蛋白酶 NOVO	2.8
	木瓜蛋白酶	2.8
酵 解 和 中 间 代 谢 的 酶	好热蛋白酶	2.3
	溶菌酶	2.0
	链球菌核酸酶	2.0
	乳酸脱氢酶	2.5
	醇脱氢酶	正在研究
	苹果酸脱氢酶	3.0 (正继续研究)
	α -酮戊二酸脱氢酶	(开始结晶)
	门冬酰胺转氨甲酰酶	5.5 (正继续研究)
	丙糖磷酸异构酶	6.0
	谷氨酸合成酶	正在研究
醛缩酶	(开始结晶)	
磷酸甘油激酶	(开始结晶)	
大 结 合 分 子 蛋 白	刀豆球蛋白	4.0
	rG-免疫球蛋白	6.0
	本周氏蛋白	重原子标记
	鲸肌钙结合蛋白	(正在研究)
激 素	胰岛素	1.8 (我国最新结果)

构可能与溶液态稍有不同。羧肽酶 A (E. C. 3. 4. 2. 1) 晶体态的酶活性比溶液态低 300 倍,醇脱氢酶 (E. C. 1. 1. 1. 1) 在晶体态时只有溶液态活性的千分之一。有时不同晶体状态亦呈现不同的酶活力,这些都值得引起注意。不过一般认为从现有结果看来,虽在酶活性上有显著差异,但催化本质是相同的。

二、酶的活性中心

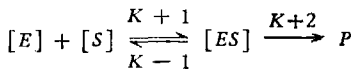
酶是一类高分子物质,它的作用底物一般为小分

子物质,有时可能是大分子底物。不论哪一种底物,在酶促反应时,只与酶分子的部分基团作用。我们把酶分子与底物接触或非常邻近底物的部分叫做酶的活性部位,直接与酶的催化有关的部分则称为活性中心。活性中心实际上包括两部分,与底物结合的部分称结合中心,而参与催化的部分称催化中心,两者对酶活力都是必需的,前者决定酶的专一性,后者决定酶的催化能力。酶分子的催化中心一般只由 2—3 个氨基酸残基组成,而结合中心的残基数却因不同的酶而有所不同,可能是一个,也可能是数个。虽然,活性中心的氨基酸残基在一级结构上相距可以甚远,但在空间构型上却是十分邻近的。某些酶的活性中心见表 3。

表 3 某些酶的活性中心残基数

酶	总氨基酸残基	活性中心残基
牛胰核糖核酸酶 A	124	组 ₁₂ , 组 ₁₁₉ , 赖 ₄₁
溶菌酶	129	门 ₅₂ , 谷 ₃₅
牛胰凝乳蛋白酶	245	组 ₅₇ , 门 ₁₀₂ , 丝 ₁₉₅
牛胰蛋白酶	238	组 ₄₆ , 门 ₉₀ , 丝 ₁₈₃
木瓜蛋白酶	212	半胱 ₂₅ , 组 ₁₅₉
弹性蛋白酶	240	组 ₄₅ , 门 ₉₃ , 丝 ₁₈₈
枯草杆菌蛋白酶	275	组 ₆₄ , 丝 ₂₂₁
碳酸酐酶	258	组 ₉₃ —Zn—组 ₉₅ ↓ 组 ₁₁₇
羧肽酶	307	谷 ₂₇₀ , 酪 ₂₄₅ , 组 ₁₉₆ —Zn—组 ₆₉ ↓ 谷 ₇₂

酶反应的一般催化特征可以简单表示为:



酶 [E] 首先与底物 [S] 形成中间物 [ES], 这一阶段是可逆的。酶与底物的络合一般是离子键或是非极性力的非共价结合, 这种结合不是一种固定的络合, 而是一种动态络合。也就是在底物络合过程中伴随着酶分子的构型变化。这种构型变化是酶的一种普遍性质。Koshland 提出了“诱导契合”假设, 以说明酶的作用机制: 酶活性中心的结构有一种可适应性, 当底物(或其它小分子配基——活化剂或抑制剂)与酶分子结合时, 酶蛋白即发生一定的构型改变, 使反应所需的催化和结合基团正确地排列和定向, 使之与底物契合, 易进行反应。图 1 即为这种假设的模式图。“诱导契合”机制比较满意地说明了酶的作用方式, 并得到一些酶(如羧肽酶、溶菌酶等)的 X 光衍射分析结果的支持。

活性中心的判断与确定主要来自三方面的结果:

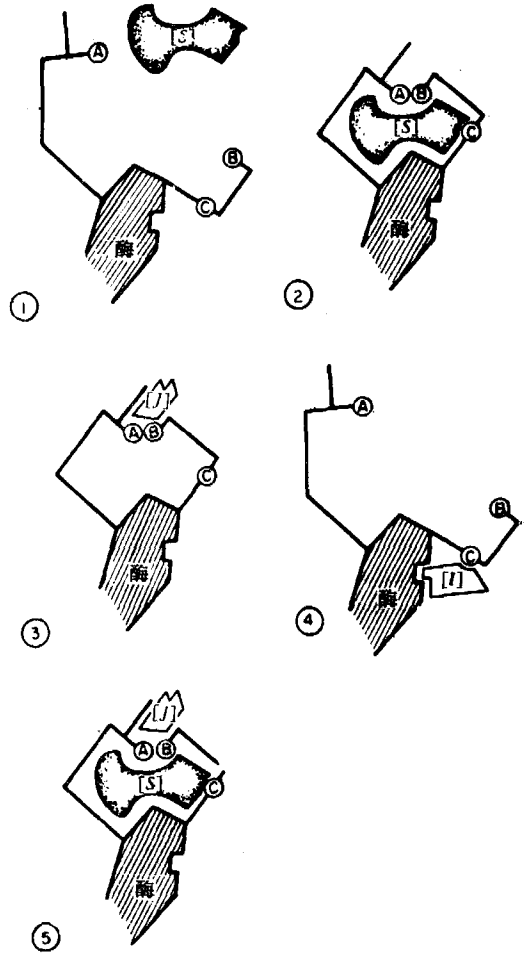


图 1 “诱导契合”的模式图

- (1) 酶蛋白活性中心的原有构型和底物;
 - (2) 底物引入后, 酶蛋白构型改变, 使催化基团 A ② 并列, 有利于底物络合;
 - (3) [J] 引起酶分子构型改变, 使 A ② 并列;
 - (4) [I] 引起酶分子构型改变, 使 A ② 固定, 底物失去 A ② 的协调而不能络合, 酶即失活;
 - (5) 最有效的构型改变, 酶与底物的络合自由能更低, 因此催化效率最高;
- ①②——催化基团; ③——作用基团; [S]——底物;
[J]——活化剂; [I]——抑制剂

酶分子侧链基团的化学修饰, X 光衍射法研究酶与底物的结合, 酶动力学的研究。

化学改变酶的侧链基团, 可使酶部分或全部失去活性, 但单从改变的部位来推断酶的活性中心, 有一定缺陷。因为化学修饰有可能使某个氨基酸残基的侧链改变后影响酶分子的正常空间结构, 因而导致酶活性的丧失。为了排除这种可能性, 常常比较在底物或竞争性抑制剂 [I] 存在及不存在时进行化学修饰所得的结果。如果 [S] 或 [I] 的存在保护了某一试剂所导致的酶无活性, 则一般可以认为该试剂是作用于活性中

心;但是在一些特定情况下,也有可能是作用于邻近活性中心的一个对维持酶的空间构型所必需的氨基酸残基。若只是对底物的络合是必需的基团,那经改变后酶不一定全部失去活性,也许只影响酶与底物络合的解离常数(K_s),而在高底物浓度时,并不影响最大反应速度(V_m);若确实是活性中心所在,则改变后应全部丧失活力。酶分子中能用来进行化学修饰的侧链基团甚多,诸如巯基、羟基、咪唑基、氨基……。到目前为止,用于修饰侧链基团的化学试剂约有70种左右,但真正能专一地标记酶结合中心的试剂,则比较少见。

x光衍射法的成就为确定酶的活性中心提供了更确切的证据。实验表明,大多数酶分子的极大部分非极性侧链汇集三维结构的“骨架”,而大部分极性侧链位于酶分子表面,这样对于酶的催化反应是有利的。令人满意的是x光衍射所得结果与侧链化学修饰基本上是一致的。

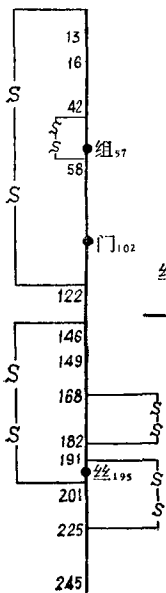
动力学研究主要从酶的反应速度常数和其他各种动力学参数,来判断酶的活性中心和作用机制。

为了更好地从酶的活性中心说明其结构与功能的关系,这里扼要地讨论几个近年来研究得比较清楚的酶。

1. α -胰凝乳蛋白酶(E. C. 3. 4. 4. 5)

α -胰凝乳蛋白酶的前体(酶原)是由245个氨基酸残基组成的一个无活性的单链酶蛋白,由五对二硫键维系。酶原经胰蛋白酶活化后,失去两个肽段(丝₁₄·精₁₅和苏₁₄₇·门氨₁₄₈),形成由三条链组成的 α -胰凝乳蛋白酶,同时二对二硫键转变成链间二硫桥键(图2)。无活性的酶原转变成活化态酶的过程中,酶分子的构

胰凝乳蛋白酶原



α -胰凝乳蛋白酶

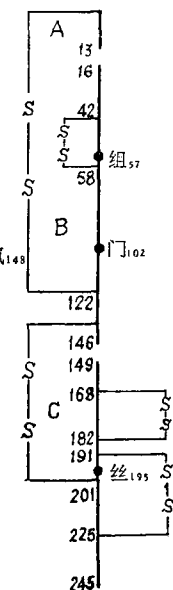
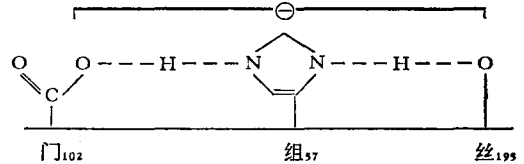


图2 α -胰凝乳蛋白酶的激活

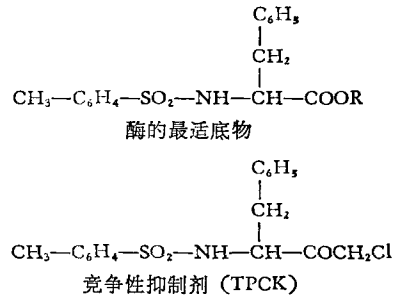
型发生相应的变化。正如前述,从酶原和酶的x光晶体衍射结果的比较,可以看到在活化过程中酶活性中心的细微结构起了一定改变,从而增强了与底物络合的能力。

α -胰凝乳蛋白酶是活性中心化学修饰法与x光衍射法所得结果比较一致的酶。此酶分子表面有极性区与非极性区两部分。极性区是由丝₁₉₅、组₅₇和门₁₀₂组成的所谓“电荷接力系统”,即



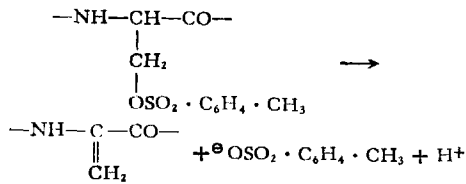
非极性区主要位于隐藏且非离子化的门₁₀₂周围,可与底物分子的芳香环(酶的最适底物为芳香氨基酸酯)形成疏水键,有利于底物分子的定向。活性中心任一氨基酸残基的化学修饰,都将导致酶的失活。此外,酶分子中维持构型的其他残基(如异白₁₆,蛋₁₉₂)的修饰亦引起酶部分或全部失活。

组₅₇为酶的催化中心。最有力的实验证据来自底物类似物对甲苯磺酰苯丙氨酸氯乙酮(简称TPCK)与酶反应的结果。TPCK是一个最典型的竞争性抑制剂,结构如下:



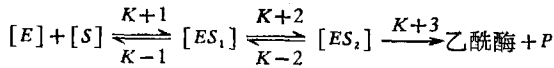
当组₅₇被TPCK烷化后,酶即全部失去活性,但异构体D-TPCK却无抑制作用。此外,该酶抑制剂 β -苯基丙酸盐和苯甲酰胺的存在或蛋₁₉₂的烷化,都阻止TPCK和酶反应,这说明TPCK只能与酶活性中心部位反应。

丝₁₉₅为底物结合中心。现在已能分离并鉴定该酶的中间物。常用的方法之一是将酶磷酸化,即用二异丙磷酰氟(DFP)与酶反应;并将磷酸化酶水解、分离,同时鉴定被磷酸化的肽碎片。结果表明,磷酸化位置只占整个酶分子中29个丝氨酸的一个,即丝₁₉₅。类似的实验取得了同样的结果,在酸性条件下,酶与对硝基酚乙酸酯反应,其酰化中间物的位置也是丝₁₉₅。若将乙酰酶分别与水或羟胺反应,可生成相应的乙酸及游离酶或乙酰羟胺酸及游离酶。如果将丝₁₉₅的羟基磺化,然后脱去磺酸基,使丝₁₉₅转变成成为脱氢丙氨酸残基,如下列反应:



则不但引起酶失活,且酶不再与TPCK反应。很明显,在通常情况下,羟基的酰化反应是极其困难的,但在酶分子中作为侧链的羟基却极易反应,其原因在于酶分子的构型使侧链基团之间有相互协调作用,即与组,和门₁₀₂形成的“电荷接力系统”有关。

α -胰凝乳蛋白酶的催化反应包括乙酰化和脱酰两个阶段。最近研究表明,乙酰化阶段至少包含两个(或三个)中间物,即



第一个中间物为非共价米氏络合物,第二个为酶-底物中间物(形成一种四面体结构),第三个为酰化中间物。整个反应过程可用图3表示。游离酶(1)的活性中

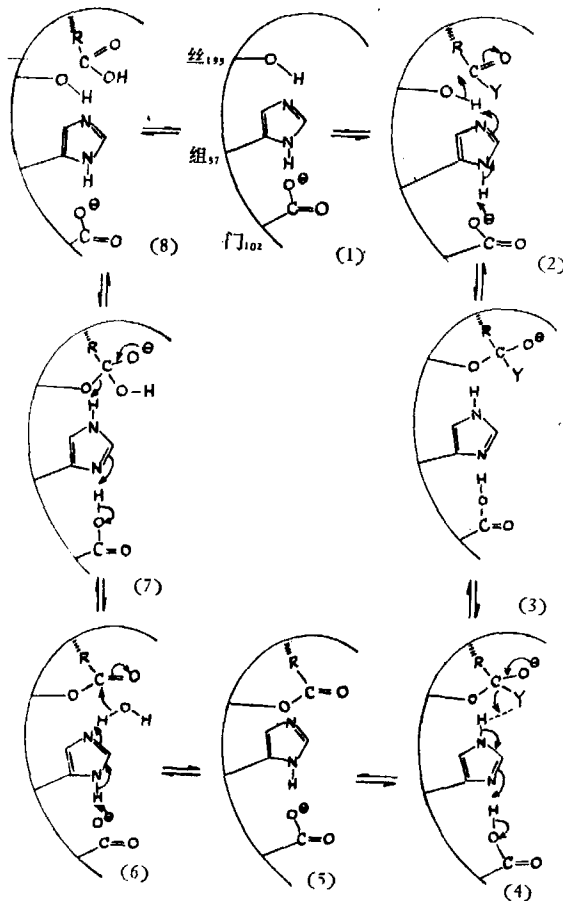


图3 α -胰凝乳蛋白酶催化酯或酰胺(R·Co·Y)水解的机制

心残基相互按一定位置排列,当底物邻近时,在“电荷接力系统”的影响下,使丝₁₉₉羟基的氧进行亲核攻击(2),并形成四面体结构(3),这是乙酰化反应的限速步骤。咪唑-羧酸络合物(4)作为酸性催化剂协调Y基的脱离,并形成乙酰酶(5)。脱酰化过程类似于乙酰化,由咪唑-羧酸络合物协调水进行亲核攻击(6),使四面体中间物(7)中丝₁₉₉的羟基脱离,最后形成的非共价酸性络合物(8)经解离而形成产物与游离酶。

2. 羧肽酶A(E. C. 3. 4. 2. 1)

羧肽酶A也是胰脏酶,它的生物学功能是水解蛋白质肽链的羧端氨基酸,属外肽酶。无活性的前体由胰蛋白酶激活。羧肽酶A是由307个氨基酸组成的单一肽链,分子量为34,600,酶分子含有一原子锌(Zn),而且对活力是必需的。如果在低pH透析或于中性pH加入整合剂(如邻二氮菲)透析除去Zn⁺⁺,则Zn⁺⁺的透出量与酶活力降低成比例。可是,从旋光度或沉降常数分析,酶蛋白的高级结构几乎未发生变化。若酶液中重新加入Zn⁺⁺,只要达到1:1克分子浓度时,酶活力即全部恢复。因此,作为需金属离子的水解酶,羧肽酶A具有一定典型性。

自1960年以来,许多研究工作者对羧肽酶分子中Zn⁺⁺的功能发生了极大的兴趣,相继提出了各种推论。约经十年之久,X光衍射法确定了此酶的三维空间结构之后,才对Zn⁺⁺的功能有了一个比较一致的结论。

当初,普遍认为Zn⁺⁺最可能与半胱氨酸的—SH形成配位体。用巯基试剂(对氯汞苯甲酸及银离子)测定酶分子的—SH,从未发现有游离巯基存在。但用整合剂透析除去Zn⁺⁺后,每分子酶可测到一个—SH;若重新加入Zn⁺⁺后,—SH复又消失,而且Zn⁺⁺的加入量小于1原子时,则—SH数与Zn⁺⁺的总和恰等于1.0。此外,从酶原与金属络合的络合常数估计,似乎也说明Zn⁺⁺与双功能基的N—S配位体结合,因而认为Zn⁺⁺至少通过二个(可能是三个)配位体与酶原结合,其中之一是硫原子,第二个为氮原子,第三个可能是氧原子,即所谓S—N—O系统。然而存在着一些矛盾。用另一些巯基试剂,如碘代或溴代乙酸、碘代乙酰胺以及N-乙基顺丁稀抱亚胺等,这些试剂既不和全酶反应,也不与酶原作用。可是,从组成分析结果表明,每分子酶确含二个半胱氨酸残基,如果其中之一已与Zn⁺⁺配位,那么为什么不能测到另外一个巯基呢?同时,若用8M脲素或去垢剂使酶变性后,—SH就不复存在,只有经还原后才重新出现二个半胱氨酸残基。这些矛盾随着羧肽酶空间构型的确定,取得了令人满意的答案。

晶体态的羧肽酶也是有活性的,因此X光衍射分析结果更有利于解释它的结构与功能的关系。实验表明,酶分子中二个半胱氨酸残基实质上是十分远离

Zn^{++} 的一对二硫桥, Zn^{++} 的配位基是二个组氨酸的咪唑基 (N-1 位) 和谷氨酸的羧基“氧”, 在全酶中形成四面体结构, 第四个配位基为水分子。因此, Zn^{++} 在酶分子中的配位体不是 S—N—O 系统, 而是 N—N—O 系统。以前所用的银离子或汞化物之类的巯基试剂, 由于试剂本身不专一, 因而出现了上述矛盾的结果。

从酶的专一性, 联系它的空间构型, 取得了有关酶活性中心和作用机制的一些知识。它的最适底物是羧基末端为带有中性芳香基或较大脂肪族侧链的氨基酸的肽。因此, 在酶蛋白的活性中心必须有一个相应的正电荷, 以便与底物的羧基互补; 为了协调底物的侧链, 必须有一个适当的非极性区。从酶的空间构型表明, 活性中心伸展到 18 埃以上, 可见是一个很大的区域, 有利于肽或蛋白质的水解。此外, 底物的羧基与精₁₄₅侧链的胍基形成离子对, 从而形成一个非极性的凹穴, 以便使底物的侧链吻合于穴内, 这个凹穴大到可以适应比较大的底物。酶作用于底物时, Zn^{++} 的第四个配位基就是底物被拆开肽键的羧基(游离酶的配位基为水分子)。这说明 Zn^{++} 除了维系酶分子的三级结构以外, 还参与催化反应, 具有极化羧基的作用。从空间构型的结果还指出, 二肽底物与酶络合时, 引起酶分子构型显著的变化, 精氨酸侧链约移动 2 埃, 而酪₂₄₈的侧链移动约 14 埃, 这种改变使活性中心更紧密地与底物结合。拆开羧基氧主要由谷₂₇₀控制, 所以催化反应包括谷₂₇₀, 酪₂₄₈和水分子的邻近有关。当 pH 偏碱性时, 谷₂₇₀带负电, 酪₂₄₈是中性的, 因此质子供体是酪₂₄₈或水分子, 而亲核攻击为谷₂₇₀或水分子。羧肽酶 A 的作用机制可用图 4 表示。

3. 核糖核酸酶 (E. C. 2. 7. 7. 16)

牛胰核糖核酸酶 A (RNase) 是迄今研究得比任何酶都更广泛而深入的酶, 不但化学结构和空间构型都已搞清楚, 而且还是第一个被人工合成并具有一定活力的酶。它的生物学功能是催化核糖核酸的降解。按其作用方式, 第一步为多核苷酸链中一个核苷酸的 5'-磷酸基, 转移至相邻那个核苷酸的核糖 2'-羟基, 形成 2', 3'-环磷酸基, 第二步才水解生成 3'-磷酸单酯(主要作用于嘧啶核苷酸), 如图 6 所示。因此, 该酶按分类系统归入转移酶类, 而不是水解酶。RNase 是 124 个氨基酸组成的单链蛋白质, 分子量为 13,800, 由四对二硫桥键维系酶的构型, 对酶活力是必需的。

从侧链化学结构的改变, X 光衍射分析

和动力学的研究表明, RNase 的活性中心由组₁₂ (N₃-) 和组₁₁, (N₁-) 以及赖₄₁组成, 与底物分子形成一个五轴中间物, 如图 5 所示。组氨酸为催化中心, 协调酸碱催化, 其 pK_a 值分别为 5.22 和 6.78。赖₄₁的 ϵ -氨基可能与负电性的磷酸基形成盐键有关。早在空间构型确定之前, 化学修饰的研究已得到了上述结论。曾用烷化剂——碘代乙酸使组氨酸羧甲基化, 所得产物仅含一个羧甲基, 即组₁₂和组₁₁, 不能同时羧甲基化, 且碘代乙酰胺不能代替碘代乙酸, 不能使酶烷化。结合空间构型的研究表明: ① 酶分子中活性中心的组氨酸具

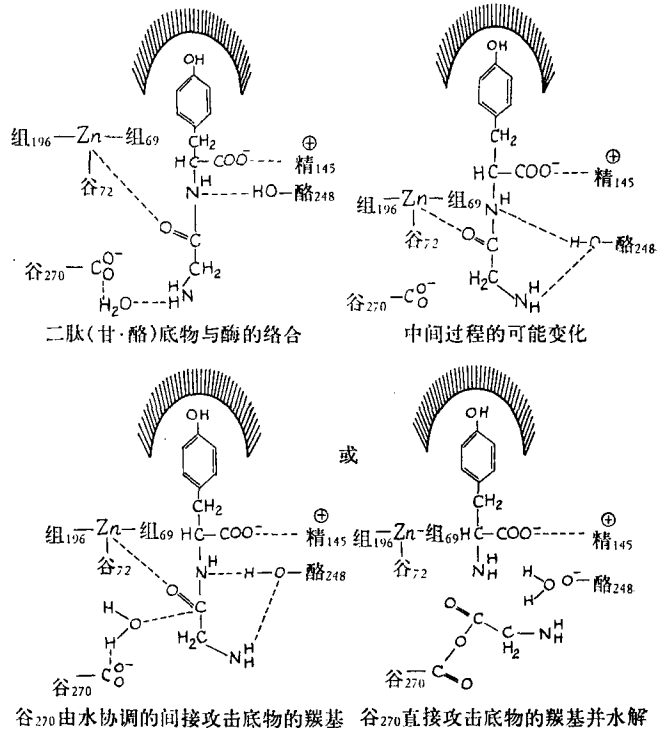


图 4 羧肽酶 A 的作用机制

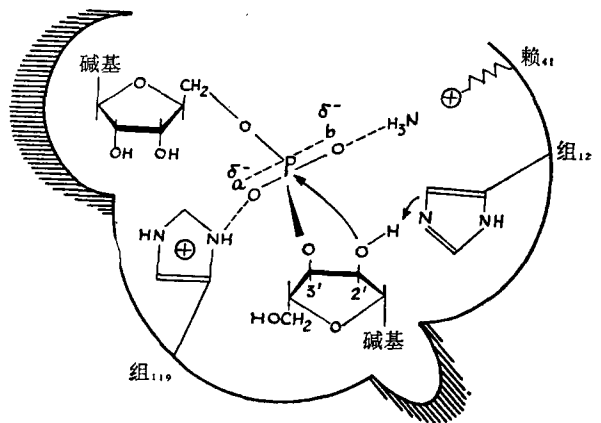


图 5 核糖核酸酶活性中心氨基酸残基的功能

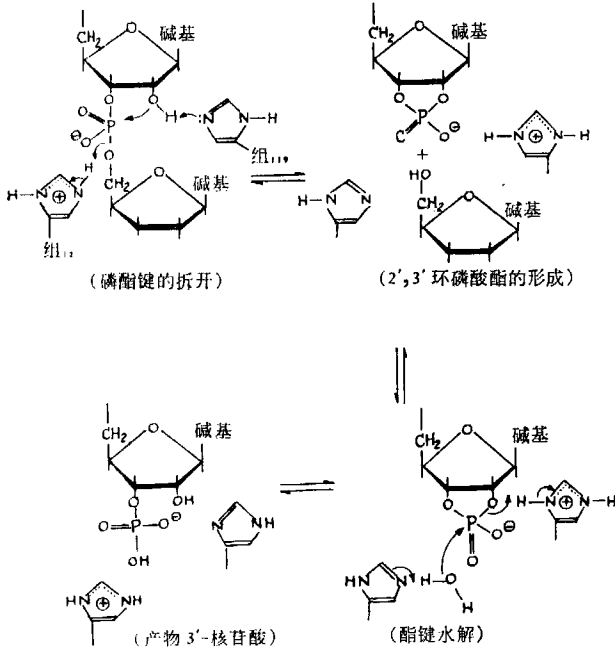
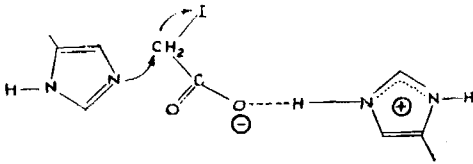


图 6 核糖核酸酶 A 的作用机制

有独特的微环境，这两个组氨酸虽在一级结构上相距甚远，但在空间构型上却十分邻近，二个咪唑基之间相距约 5 埃；② 二个咪唑基有协调作用，其中一个的羧甲基化阻止了另一个的作用；③ 碘代乙酸的羧基是必要的，可能与一个咪唑基的质子化有关，如下式：



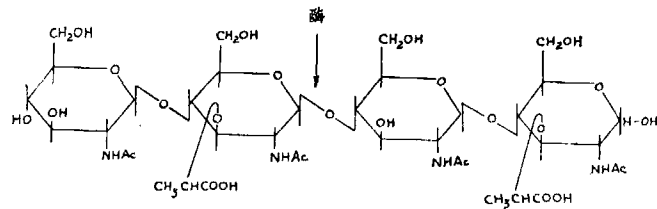
至于赖₁₁的功能，早期曾将酶分子中的 ϵ -氨基胍化，随之酶失去活性。结果表明，失活只与酶分子中 10 个赖氨酸中的一个慢反应赖氨酸(其他 9 个均为快反应的)有关，即赖₁₁。这一结果与 2,4-二硝基氟苯 (FDNB) 反应是一致的。竞争性抑制剂既阻止 ϵ -氨基反应，又能保护酶的失活。因此，赖₁₁很可能是一个阴离子结合位置。通常赖氨酸的 pK 为 10.1，而酶分子中赖₁₁的 pK 为 8.9，这种差别主要在于酶分子的微环境效应，即邻近某些正电荷的影响。最近利用 ϵ -41-DNP-RNase S 的晶体 X 光衍射分析表明，赖₁₁在于稳定酶反应中所形成的一个五轴过渡态中间物。综上所述，RNase 的作用机制可能如图 6 所示。

前已叙述了酶分子中—S—S—键的重要性，以及 S-肽和 S-蛋白的相关性。在 RNase 的结构与功能的研究方面曾作了不少工作。有人曾人工合成了 S-肽

碎片和一些不完整的 S-肽碎片，并和 S-蛋白进行重组。实验表明，人工合成的 S-肽与天然 S-肽一样，只要按 1:1 克分子与 S-蛋白重组，可完全恢复酶活力。若用 1—14 肽与 S-蛋白重组，亦获得了同样的结果。从而说明，15—20 的氨基酸残基无论对维持空间构型还是对酶的催化反应，都不是必需的。空间构型的研究确证了第 15—20 以及第 21 残基都与酶分子的活性无关。尤其是 20—21 肽以松散形式分布于酶分子的顶端，易被肽酶作用。实际上，枯草杆菌蛋白酶 A 并非专一地水解 20—21 之间的键，邻近肽键亦可能不匀一地被水解，从而解释了上述结果。曾用 3-邻(二)氮(杂)茂丙氨酸替代 S-肽中的组氨酸，这个杂环在形状和大小上均类似于咪唑基，但化学性质不同。当用此改变的 S-肽与 S-蛋白重组时，不但不呈现酶活力，而且还是一个竞争性抑制剂。此外，酶分子中谷₂、蛋₁₃、门₁₄和门₁₁₁等残基对于维系酶的结构都是重要的。

4. 溶菌酶 (E. C. 3. 2. 1. 17)

溶菌酶是唯一先从 X 光衍射分析解释结构与功能的酶。它是由 129 个氨基酸组成的单链蛋白质，含四对—S—S—键以维系酶的构型，对活力是必需的。溶菌酶可使某些细菌的细胞壁溶解，天然底物为一类多糖物质，水解产物含有 N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 和 N-乙酰粘质酸 (NAM)，酶的作用点如下式：



(NAG) (NAM) (NAG) (NAM)

晶态的溶菌酶仍是有活性的。从酶分子的构型看来，结构不太紧密，大多数极性残基分布于表面，便于与溶剂(水)结合；而非极性残基隐藏于内部，整个分子形成一个狭长的凹穴，一些疏水基分布于凹穴的表面，如色_{62, 63, 108, 9}，异白_{92, 2}，缬_{109, 9}。它的最适小分子底物为由 NAG 和 NAM 交替构成的六糖，晶体衍射结果说明此六糖与酶结合时正好与酶分子的长形凹穴嵌合，为使酶与底物充分络合，第四个糖 (D 环) 必须扭曲成半椅式构型，使 C₁ 形成阳碳离子，如图 7。溶菌酶的活性中心为谷₃₅和门₅₂，谷₃₅处于非极性区，即使在较高 pH，仍然是非离子化的，它起一般酸碱催化作用。门₅₂在极性区，在通常 pH 值都是离子化的，它有稳定 D 环阳碳离子的作用，协调 C₁—O 键的拆开。所以酶作用的第

三、结 语

本文试图从分子水平扼要地阐述酶的结构与功能的关系。以研究得较为清楚而典型的酶为例，从酶活性与其一级结构中氨基酸残基之间的规律，x光衍射所确定的空间构型，并联系它们的作用机制等方面，来说明酶为什么具有如此高度专一性和催化效率。

酶的结构与功能是酶学领域中最基本的课题，无论对于探索生命奥秘的理论研究，还是对于人类的实际生活，都有着十分密切的关系。诸如模拟酶催化来替代在高温高压下进行的化学反应；扩大和发展工业发酵的品种和产量，改革生产工艺；疾病的诊断与治疗；以及其他有关的工农业部门都与酶学有关。可以预期，通过人们的辛勤劳动，在从必然王国走向自由王国的征途上，酶学和其他学科一样，将会作出有益的贡献。

主要参考资料

- [1] Gray, C. J.: *Enzyme-catalysed Reaction*, 1971.
- [2] Lipscombe, W. W.: *Chem. Soc. Rev.*, 1, 80, 1972.
- [3] Freedman, R.: *New. scit.*, 58, 560, 1973.
- [4] Dickerson, Richard. D.: *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 815, 1972.
- [5] Matheza, J. & Degens, E. T.: *Advan. in Enzymol.*, 34, 1, 1971.
- [6] Smellie, R. M. S.: *Biochem. soc. sym.* 31, "Chemical Reactivity and Biological Role of Functional groups in Enzymes" Acad. Press U.S.A. 1970.
- [7] Boyer, P. D.: "The Enzyme" Vol. 1, Third Ed. Acad. Pres, 1970.
- [8] Allewell N. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 248, 5291, 1973.
- [9] Lehninger, A. L.: "Biochemistry" Publ. by Worthpublisher, 1972.

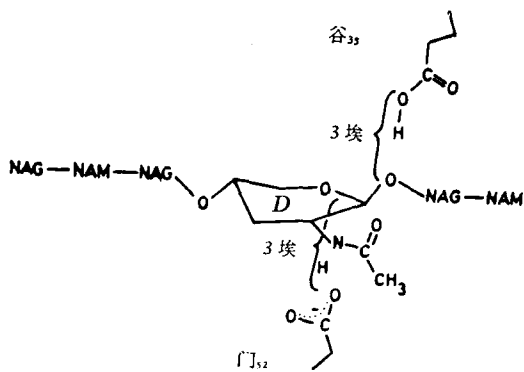


图7 “D”环的半椅式构型

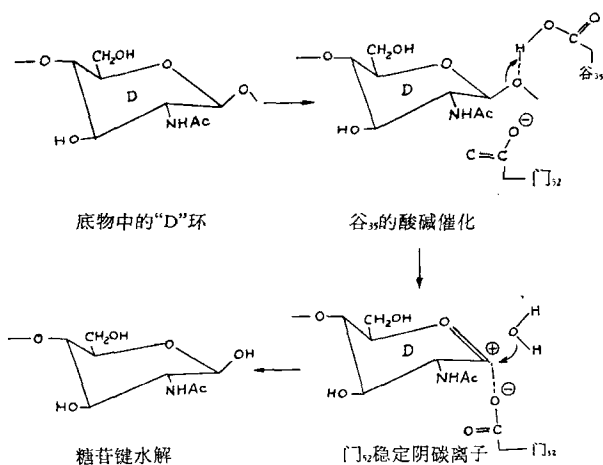


图8 溶菌酶的作用机制

一步是先拆开 DE 环之间的糖苷键。按 D 环 C₁ 形成阳碳离子的机制，其作用方式如图 8。

(上接第 46 页)如根据是否导致细胞转化来分类，Visna 病毒原来是不属于癌肿病毒的，但是由于以下三件事，就把它分类归属于癌肿病毒。第一，它有 RDDP；第二，它在羊身上虽不引起癌肿，但是它能将正常小鼠细胞转化为癌肿细胞；第三，它对放线菌素 D 敏感。这三点都与 RNA 癌肿病毒相似。

四、结 语

发现反向转录酶至今已四年多。在它被发现及以后的研究过程中，充满了矛盾。

1962 年，生物遗传信息从 RNA 传递到 DNA 这一前病毒设想发表时，由于分子生物学研究中所谓“中心法则”的影响和束缚，没有立即为人们所接受和重视。实践的需要推动科研工作向前发展，这是现代各门科学蓬勃发展的普遍规律。由于防治癌肿的实践需要，通过科学实验，生物遗传信息反向转录现象的被证实，

又一次说明了实践与认识的辩证关系。认识源于实践。人们在实践中对于真理的认识永远没有完结。在学术问题上，我们不应该因循守旧，而应该用发展的眼光辩证地对待。“通过实践而发现真理，又通过实践而证实真理和发展真理。”“停止的论点，悲观的论点，无所作为和骄傲自满的论点，都是错误的。”

关于生物遗传信息反向转录问题的研究，具有一定的理论意义和实践意义，是近年来生物学方面极为重要的动态之一。现有的研究资料虽然阐明了一些问题，但许多论述仍属于设想或假说，有些假说甚至还是相互矛盾的，有待于继续研究。“只要自然科学在思维着，它的发展形式就是假说。”(恩格斯：《自然辩证法》)可以预期，通过进一步的科学实验，人们的认识必将不断深化，去粗取精，去伪存真，“使这些假说纯化，取消一些，修正一些，直到最后纯粹地构成定律”。(恩格斯：《自然辩证法》)