



三维水平的蛋白质结构—功能关系

王 大 成

(中国科学院生物物理研究所)

在有关蛋白质的研究中,结构—功能的关系是居于中心地位的课题。蛋白质的功能尽管纷繁复杂,但作为一类物质,它发挥功能具有一些共同的作用方式。这些作用方式的一个突出特点,就是它们都要求有特定的三维结构。所以,在三维水平上了解蛋白质结构—功能的关系,是阐明有关蛋白质生物学问题的重要环节。

前文(《蛋白质的三维结构研究》,见本刊1980年第5期)已经介绍,由于X射线单晶结构分析技术成功地应用于蛋白质结构测定,已积累了大量蛋白质的三维结构知识。这使得在三维水平了解蛋白质结构—功能关系有了现实的可能。近年来,努力阐释蛋白质结构的生物学含义,在三维水平使蛋白质结构与功能研究紧密配合,受到越来越大的重视。这方面的成效已使生物学家长期殷切期望的生物结构与生物功能的直接关联和统一,在一定程度和有限范围得以实现。已阐明的蛋白质结构一方面以多样的方式与一些生物学问题发生联系,提供信息;另一方面,它们以三维的直观性作为基本特征,直接揭示蛋白质一些重要作用方式的具体过程和特点。本文将介绍已经了解的在三维水平的蛋白质结构—功能关系中具有代表性的四个方面,即变构作用,诱导配合,抗体—抗原作用和自组装。

变构作用机理

——血红蛋白呼吸功能的阐明

变构是蛋白质的一种重要作用方式。了解具有变构效应的蛋白质的反应和作用的分子机

理十分重要。血红蛋白是所知最早、研究最多的变构蛋白,在各方面大量知识积累的基础上,最终由于三维结构的测定,使血红蛋白的呼吸功能在分子水平得到阐明,并首次完整地了解一个蛋白质的变构机理。

血红蛋白是执行呼吸功能的关键分子。血红蛋白从肺中携带 O_2 经由动脉血输送给组织,又帮助携带 CO_2 经由静脉血返回肺,排出体外。所以,它像心脏一样,是维持生命所必不可少的。同时,长时间来就了解,血红蛋白是通过分处于其四个亚基中的血红素基团与 O_2 作用,它结合 O_2 的能力受它已结合 O_2 的数量的影响,具有协同效应,例如,有二个血红蛋白分子A和B, A已结合三个 O_2 , B尚未与 O_2 结合,此时谁更易再结合 O_2 呢? 研究表明, A继续结合 O_2 的趋势大70倍。相反,如A已结合四个 O_2 , B仅结合一个 O_2 , 这时B失去 O_2 的可能性大于A70倍。真像是俗话说:“愈是有钱愈一毫不舍,愈是贫穷愈慷慨疏财”。从变构来说,这就是血红蛋白的同种变构效应。此外,血红蛋白对 O_2 的亲合力还受一些与 O_2 无关因素的影响。红细胞中的 H^+ 浓度以及2,3-二磷酸甘油酸(DPG)都可以降低血红蛋白对 O_2 的亲合力,这就是血红蛋白的异种变构效应。变构效应使血红蛋白在呼吸循环中具有在中途自行改变与 O_2 的化学亲和力的神妙能力,其重要的生理意义在于保证对 O_2 和 CO_2 的“满装快卸”,使呼吸功能高效进行。如果血红蛋白没有这种变构效应,那么在一切都正常的情况下,我们也会经常处于供 O_2 不足的憋气状态中。由于血红蛋白功能的重要性和奇妙性,长期来它就是生

理和生化研究的一个重要课题。

英国剑桥 Perutz 小组在 1960、1968、1970 年先后测定了氧合以及脱 O₂ 血红蛋白的三维结构,最后分辨率达到 2.8 埃(Å),得到了原子水平的结构模型。首先,通过氧合与脱 O₂ 两种状态血红蛋白结构的比较,发现从结合 O₂ 到失去 O₂,血红蛋白的四级结构有显著的变化。 α 亚基旋转 9.4°, β 亚基旋转 7.4°, 血红素有几度倾斜,螺旋彼此移动 2—3 Å。总体看来,失去 O₂ 后血红蛋白的亚基间距离增大,而结合 O₂ 后这一距离缩小。这与我们肺的呼吸何其相似!只是把张、合的方向反过来就是了。由此发现,血红蛋白是一个分子肺,而不是氧气瓶。它随 O₂ 的得、失产生不同的结构状态,所以它结合 O₂ 并非一静力学过程,而具有动力学机理。

一个血红蛋白分子有 1 万多个原子,把它比作一头大象的话,一个 O₂ 犹如一只跳蚤。那么一只跳蚤何以能推动一头大象? 这样一种空间结构的变化为何能赋予血红蛋白以魔法使其自行改变对 O₂ 的化学亲和力? 进一步的精细研究回答了这些机理性问题。在高分辨率查明的血红蛋白中负责结合 O₂ 的血红素的结构示于图 1,处于卟啉环中央的 Fe⁺⁺ 具有六个配位,四个是血红素中的 N,第五个是蛋白部分 F8 组氨酸侧链的三位 N,第六个就是 O₂ 结合的位

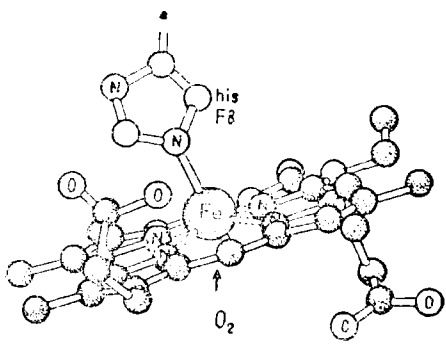


图 1 血红蛋白中血红素的原子结构

置。在未结合 O₂ 时,Fe⁺⁺ 的六个价电子中的二个占有朝向化学键方向的轨道,使它比较“肥大”,因而突出在血红素的卟啉环平面之外。当结合 O₂ 时,Fe⁺⁺ 的外层电子发生重排,引起键间轨道打开,效果就像 Fe⁺⁺ 变小了,于是溶入

卟啉环平面内,移动约 0.9 Å,情况如图 2 所示。这一变化通过 F8 组氨酸残基,牵动与之相联的蛋白质部分发生显著移动,作为一个分子触发器,引发整个血红蛋白分子发生构象重排。这一重排逐次解脱血红蛋白亚基间的四对盐键,导致末端肽链松弛,产生一种新的构象状态。所

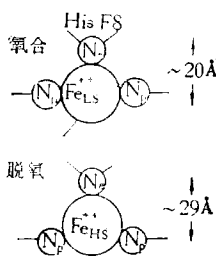


图 2 氧合与脱氧时铁原子相对于卟啉环的位置

以,血红蛋白有两种构象状态,一种相应于失去 O₂ 的情况,它受亚基间的多对盐键和其它作用所制约,就像钳子一样钳制亚基,使其对抗与 O₂ 的结合,这相当于 Monod 变相模型中的绷紧态(T),称为血红蛋白的静脉型。另一种构象状态中,盐键被解脱,钳制松开,它有利于同 O₂ 结合而对抗失去 O₂,相当于 Monod 模型的松弛态(R),称为动脉型血红蛋白。在大量存在的血红蛋白分子中,静脉型与动脉型间存在平衡。上述情况以简化模式示意于图 3。在缺 O₂ 情况下,几乎所有血红蛋白都是静脉型,制约使其易于脱 O₂。随着 O₂ 开始结合(如在肺中),越来越多的分子触发成动脉型,平衡比例随之发生改变。如结合二个 O₂ 的血红蛋白,会有一半是静脉型一半是动脉型;而当有三个 O₂ 被占有时,则有十分之九是动脉型,十分之一是静脉型。因而,随着这种未被制约的对 O₂ 有

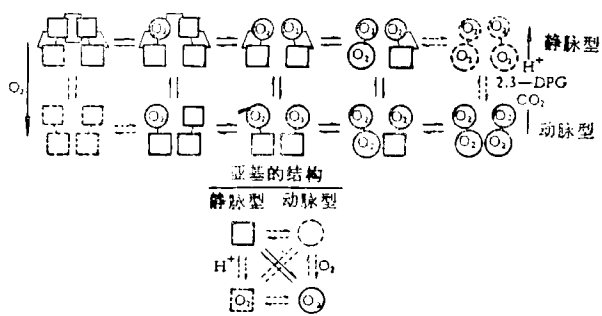


图 3 血红蛋白变构机理示意

高亲和力的动脉型分子比例提高,对 O_2 的亲合力也升高。血红蛋白对 O_2 的协同效应由此得到阐明。

在静脉型中,DPG 嵌合在亚基的中央,与两条 β 链的四个正电性基团结合,形成一静电钳。当 O_2 结合开始,血红蛋白转变成动脉型时,跃迁后的构象状态使亚基间的空间变小,上述互补性丧失,DPG 就被排挤出来。这说明,DPG 的异种变构作用是由于在静脉型中除盐键外又多了一静电钳来稳固静脉型构象,从而使血红蛋白易于失去 O_2 而不易与 O_2 结合。

H^+ 的作用与 DPG 类似,主要是以强化盐键从而稳定静脉型的方式,降低血红蛋白对 O_2 的亲合力。参加作用的主要基团有 α 亚基的 N 端氨基,His(β 146)—Asp(β 94)以及 His(α 122)。

由此,血红蛋白的呼吸功能在分子水平得到阐明,一个既包含同种效应又包含异种效应的蛋白质变构作用的完整过程也得到详细了解。

诱导配合

——一些酶作用机理的了解

诱导配合是酶—底物作用的一种普遍方式。在生命系统中,几乎所有化学反应都有酶参与。关于酶发挥催化作用的方式,本世纪初就有 L. Michaelis 和 M. Menton 提出酶—底物复合物理理论:酶分子的多肽链以非常专一的方式折叠以提供一特殊的空间位置(活性中心),底物分子在这里专一结合,然后酶分子中的催化基团促进需要进行的化学反应。因此,酶稳定一个过渡态,起着可逆的能量贮存作用。这构成以后关于酶活性的所有看法的基础。自从1965年第一个酶(溶菌酶)的晶体结构测定成功以来,在过去十几年里,已在高分辨率测定了四十多个酶的三维结构,其中,溶菌酶的作用机理已得到详细阐明,以胰凝乳蛋白酶为代表的丝氨酸属水解酶、核糖核酸酶、羧肽酶、乙醇脱氢酶等一些酶作用的基本特征也已了解。所有这些结果都直接证实了上述理论,同时明确显示出酶与底物的作用并非静态的锁—钥匙嵌合

过程,而是两者相互诱导产生适应性变化的动态过程。在这一过程里,酶分子本身以及底物常常都要发生相当明显的构象变化,形成过渡态互补;在有些情况下,催化基团的空间位置可以有很大的移动,如羧肽酶中的 Tyr-248 竟可移动 14 埃($\text{\AA}$)。这种构象变化的作用,是导致空间和电的张力状态,产生最佳的熵因素(如反应物的接近),从而使整个体系趋向反应的过渡态。所以严格说来,酶并非与底物而是与底物的过渡态互补。

酶的晶体结构表明,酶分子的活性位置都有严格的原子基团排布;酶的专一性是与酶分子的总体构象所决定的活性位置的立体化学直接相关。在不同酶里,活性位置的情况很不一样。如在溶菌酶里,活性位置是一很确定的沟;而在胰凝乳蛋白酶里,它是酶表面一个较深的隐窝。一个确定的沟的好处在于,它可以产生较强的结合力和较高的专一性,但如果底物是一种较大分子的话,则必须发生一些构象变化以与活性位置严格的立体几何相配合后,方能结合。一个类似隐窝的活性位置,对作用在一个自然分子上可能是更加有利的。酶与底物通过相互诱导的适应性构象变化,多点挂钩,柔顺契合。通过三维结构的阐明可以了解,酶怎样与底物结合就会有利于过渡态的构象或空间排布。在 RNase 中发现,两个组氨酸靠近,它们的精细取向使其在水解核苷酸的磷酸酯键时,一个起酸的作用,一个起碱的作用。在胰凝乳蛋白酶及其相关的酶中,通过与一般催化相结合的亲核攻击,产生水解。在这里,有一“电荷转接系统”导致电张力和底物变形,以趋向反应的过渡态。在乙醇脱氢酶中,通过由活性位置 Zn 调节的亲电子催化引起反应,在这里结合水的 Zn 起着关键作用。

上述情况在溶菌酶中表现得十分典型,这是至今作用机理了解得最清楚的一个酶。溶菌酶可以导致细菌细胞壁解体,广泛存在于人体各组织中。细菌胞壁的主要成分是由两类氨基糖分子交替排列组成的多糖链,一类是 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG),一类是 N-乙酰胞壁酸

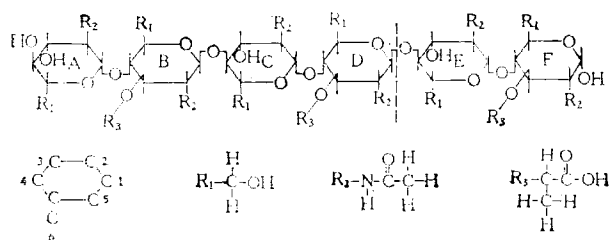


图 4 溶菌酶的作用底物

(NAM), 酶的作用底物是六个这样的单位(图 4)。已经知道, 溶菌酶只断裂 NAM 的 C1 与 NAG 的 C4 之间的键, 而不裂解其它键。美国牛津的 Phillips 小组在高分辨率测定了鸡蛋白溶菌酶及其与一系列抑制剂复合物的晶体结

构, 已经查明它导致细胞壁的裂解大致分以下三步: (1) 一个溶菌酶分子附着在细胞壁上, 与六个暴露的氨基糖残基相作用。在这一过程里, 酶本身轻微扭动, 主要是分子左侧变形, 使活性深沟更紧一些; 与此同时, 底物糖残基 D 偏离正常的稳定(椅式)构象, 如图 5 所示。这种相互诱导的适应性变化, 使酶与底物发生诱导配合, 形成过渡态结构。(2) 在非极性环境中的催化基团 Glu-35 把它的末端氢以 H^+ 的方式转移给糖苷键的氧, 从而引起氧与糖残基 D 的 C1 间的键裂解, 产生一荷正电的 C^+ 离子。(3) 在极性环境中的催化基团 Asp-52 总处于解离状态, 因而它与 C^+ 相互作用, 使其稳定, 直

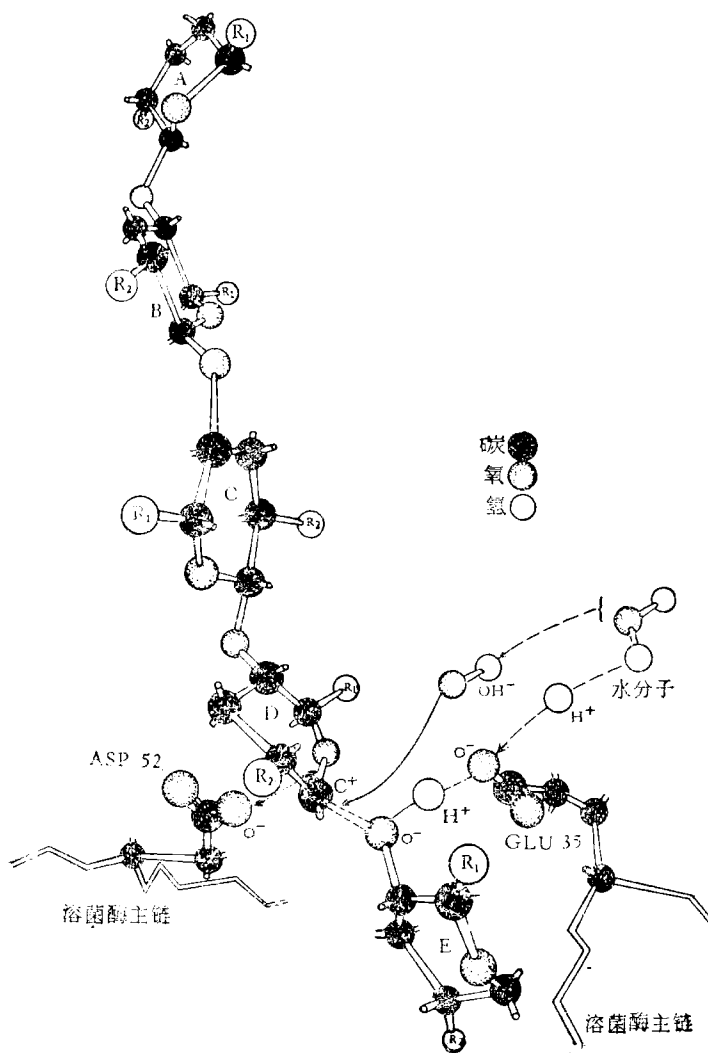


图 5 溶菌酶与其底物的诱导配合

注意在 D 处底物必须发生构象变化方能与酶契合。

到有羟基离子从周围的水中扩散到这里，产生 R-OH，反应完成。然后，溶菌酶脱下，产生一个穿了孔的细胞壁。图 6 是这一过程的示意图。

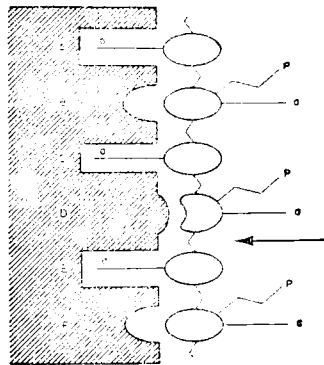


图 6 溶菌酶对底物的作用机理示意

过渡态的自由能既依赖于熵因素，也依赖于系统中的张力因素，以贡献热焓。酶的三维结构知识告诉我们，无论是酶的总体构象决定的活性位置的专一性，还是诱导构象变化的能力，对于反应物和催化基团的恰当的位置和取向，以及对于达到“电的”或“空间的”张力状态，都是至关重要的。

抗体—抗原作用

——免疫反应结构基础的建立

免疫反应是与一系列生物学和医学实践紧密相关的重要生命现象。脊椎动物的免疫系统，由它被抗原引起的合成体液抗体的能力来表征，通过抗体—抗原专一性结构相互作用发挥功能。抗体分子与抗原结合，或通过交联格子的形成与多价抗原形成沉淀。在体内，对细胞的和体液的反应变化，抗体也可以起到关键作用。由于抗体的不均一性，所以至今用于大多数结构研究的都是从肿瘤细胞来的多发性骨髓瘤免疫球蛋白(Ig)。现在有相当的证据表明，这类蛋白中的一些，无论在免疫的、化学的和物理的方面，都与天然抗体很少差别。很长时间，免疫的结构基础知识多出自推测，自免疫球蛋白的晶体结构研究取得成效以来，才有可

能在三维水平上讨论抗体—抗原的相互作用，使结构免疫学有了真实的基础。

免疫球蛋白由两条轻链和两条重链(L和H)组成，链间通过二硫键和非共价作用相联接。每条轻链和重链都可以分成一个可变区(V_L和V_H)，一个不变区(C_L和C_H)。(Ig)分子可被确定的酶裂解成两种不同的片段：(1) Fab 片段，它含有抗原结合位置，包含全部轻、重链的氨端一半；(2) Fc 片段，包含重链的C端一半(图 7)。整个分子分成 12 个域区，轻链各 2 个，重链各 4 个(图 7)。

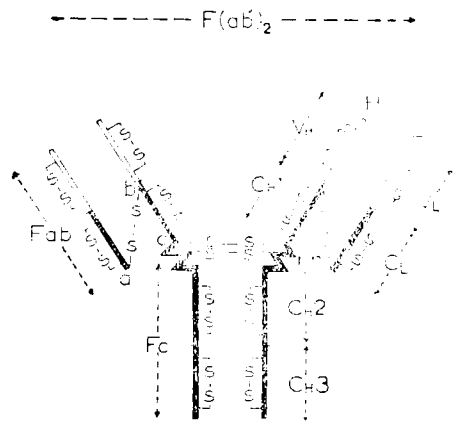


图 7 免疫球蛋白的化学结构

1973 年以来，一系列免疫球蛋白的片段已在高分辨率测定结构，包括：(1) IgG “New” 的 Fab 片段；(2) 小白鼠 IgA(K) McPC 603 的 Fab 片段；(3) Meg Bence-Jones 蛋白；(4) Bence-Jones 蛋白 REI。此外，1976 年已得到一个完整的免疫球蛋白分子(IgG1)5 埃分辨率的结构。从这些阐明的结构发现，免疫球蛋白的域区具有基本相同的三维结构，图 8 示出了 V 域和 C 域的结构模式。在免疫球蛋白的结构域中，肽链都折叠成两个粗略平行的平面(图中画双线的箭头)，它们彼此通过一不变的二硫键(黑短粗矩形线)连在一起。两个 β 层之间的空间被疏水氨基酸充满(图中未画出)，将水分子从域的内部排除出去。V 域和 C 域结构上的区别出现在高变区，在 E 中，V 域比 C 域有一额外的序列。结合不同抗原的专一性来自轻、重链 V 域中三个所谓的高变区，它们与图中的 b₂、E

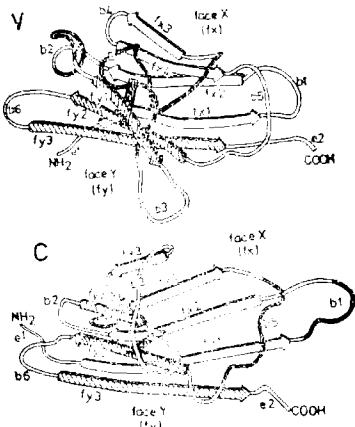


图8 免疫球蛋白V域和C域的肽链折叠

和 b_6 各段有关。 V_L 和 V_H 以它们的Y面靠在一起,因而在高变区形成一沟,抗原就在这里结合。这一高变区的三维结构在不同片段里也具有可变性和多样性,这就解释了免疫系统中的专一性有相当大的可变范围这一现象。根据这些知识,已经可以建立一个完整的免疫球蛋白分子模型,在三维结构水平研究抗体—抗原作用的可能机理。

比较小白鼠和人免疫球蛋白的 V_L 域还发现,它们间结构上的同源性比之小白鼠自身 V_H 与 V_L 间的同源性更紧密,表明 V_L 与 V_H 区的分离比啮齿类与灵长类的分离更早。

通过一系列免疫球蛋白片段三维结构的阐明,免疫反应的结构基础,抗体—抗原结合位置,以及在较小分子内达到专一性多样化的方式,都已得到了了解。这些研究的进一步发展,很可能促成晶体学对医学作出极大贡献。

自 组 装

——TMV 的组装模型

在有机体内,许多重要的生命现象都离不开复杂的分子体系;这种复杂的分子,一般都由不同种类的生物大分子(蛋白质、核酸、多糖、脂类)结合而成。多酶复合体,简单的病毒、核蛋白体,可看作这种超分子体系的不同层次;再往上,是构成细胞的细胞器,诸如细胞核、线粒体、叶绿体等;最后,是细胞以及细胞集合形成分化的组织。这些超分子体系是如何形成的?蛋白

质如何与其它大分子相互作用形成复杂的分子组织?这是更高水平的蛋白质作用的一个重要方面。

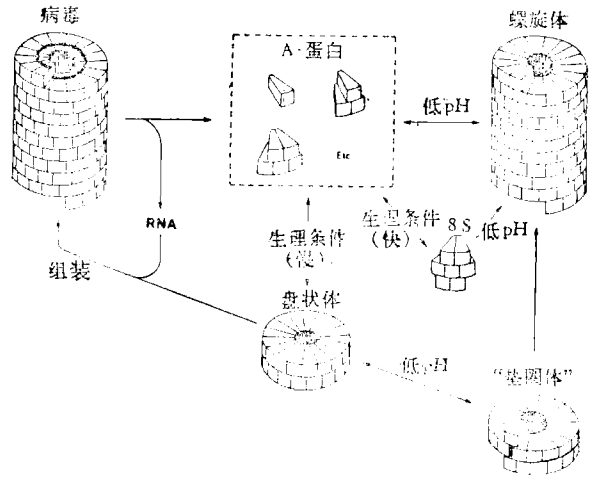


图9 TMV 外壳蛋白的各种聚合体

基于对烟草花叶病毒(TMV),噬菌体以及细菌鞭毛体外组装的研究,提出了超分子的生物结构基本上是以自组装的方式进行的。所谓自组装(Self-assembly),是指生物结构从较小的聚合体通过其组成分子自身的相互作用的控制生长为较大的聚合体,而无需外加的调节机构。这种作用方式的基本点在于:一个结构的组装方案可以通过其各组成部分的专一结合特性来决定;包含在调节过程中的蛋白质分子必然存在一种以上的构象状态,构象跃迁就是控制开关,它通过专一的分子间相互作用触发。由于测定了 TMV 及其外壳蛋白的三维结构,已经可以提出一个 TMV 自组装的模型。

TMV 由一条单链 RNA 以一种比较开放的方式嵌在外壳蛋白的各圈螺旋之间构成。已经证明,从分离的 RNA 和外壳蛋白可以重组感染 TMV,其最佳条件是 pH 7.25 和 0.1 以上的离子强度。在这一条件下,外壳蛋白的主要存在形式是盘状聚合体(蛋白盘)它由 34 个亚基聚合成完全重叠的两圈组成,每圈 17 个亚基。图 9 示出了 TMV 的解离聚合情况。蛋白盘可以结晶。已在 5 埃和 2.8 埃分辨率测定了它的晶体结构,其一个亚基的肽链走向和沿轴向截面的实体模型示于图 10 中。从晶体结构

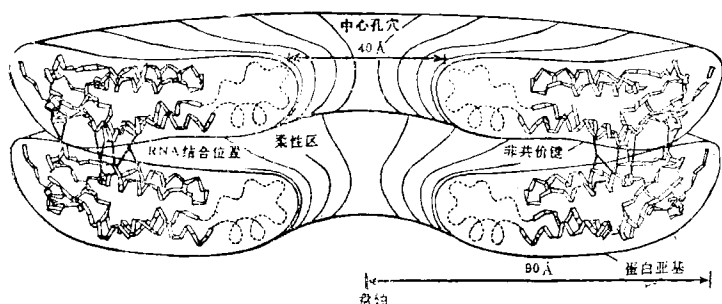


图 10 TMV 蛋白盘的结构：一个纵向截面模型

显示出蛋白质盘有两个重要特征：(1) 尽管已经知道在 TMV 内蛋白质的范围可达到 20 埃半径以内，但晶体结构测定的电子密度在 40 埃以内几乎完全没有，表明在蛋白与 RNA 相结合的位置，外壳蛋白的构象有相当的挠性；(2) 在较小的半径范围，亚基的环之间在竖直方向上分离开来，因此，虽然在环的外侧亚基接触紧密，但在 40 埃径向处，环间在竖直方向上有相当的空间，犹如蛋白部分向内形成一对钳子，很容易夹持进到这里来的 RNA。

将所得的蛋白盘的结构与 TMV 整体的低分辨率结构比较发现，从盘状结构转化为 TMV 外壳螺旋后，亚基堆积更加紧密，亚基层间像钳子样的竖向孔隙合拢(收紧约 7 埃)，进入 RNA 结合半径以内的蛋白质部分也变得坚实起来，使整个蛋白质结构明显地拉紧。这意味着，由 RNA 结合所诱发的这些变化，使得卷进了 RNA 的外壳蛋白本身排布和构象都更致密了。

根据这些知识，英国剑桥 Butler 小组提出了一个以蛋白盘作为基本组件，包含一成核过程的 TMV 组装模型，如图 11 所示。在这一

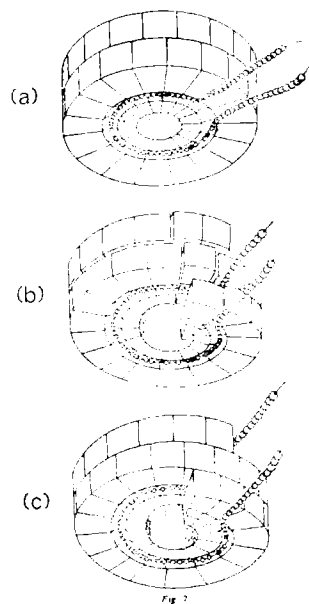


图 11 TMV 的组装模型

模型中，RNA 作为一个发夹环首先插入盘状体的中心孔隙，再借助处于这个区域的蛋白质的挠性，达到张开口“外壳钳”的结合位置。这种原初性结合触发蛋白盘转化为螺旋，把 RNA 嵌进原始螺旋体。然后，这种核化的螺旋区伸长，直到全部 RNA 被包裹起来，给出一个完整的 TMV。当然，这一模型尚有待证实，它的许多细节也都还不清楚。

三维结构知识的积累，使我们对蛋白质结构—功能关系的了解深度，达到了一个全新的阶段。上面介绍的并非目前所知的全部，只是稍有代表性的四个方面的概况。随着蛋白质结构研究的不断深入，对我们了解蛋白质的生物学作用和意义，认识生命何以选择蛋白质作为其主要物质基础之一，势必产生重要的影响。

[本文于 1979 年 9 月 26 日收到]

科技消息

以“癌”治癌的新疗法

在七十年代，英国两名科学家发现 β 淋巴细胞的表面有抗体分子。这些抗体分子的尾部象爪子一样裸露在细胞表面，它一旦与抗原结合， β 细胞就象触电一样活动起来，进行活跃的分裂，并产生大量抗体(与抗原相对应的专一性抗体)。

人造癌“hybridomas”是用一个 myeloma 细胞和一个激活了的 β 淋巴细胞融合而成(激活就是预先把 β 淋巴浸泡在少量聚乙烯醇中)。融合的结果，形成一个大细胞。它既具有无限生长特性(来自 myeloma 细胞)，又具有活跃地生产抗体的能力(来自 β 淋巴)。这个杂交细胞是单克隆抗体

(mono-clonal antibody)，它好似内源的抗体生产工厂。

斯坦福大学研究小组用这种抗白血病单-克隆抗体，对六只人工诱发白血病小鼠进行治疗，其中四只小鼠在 45 天后，白血病就消失了。

当然，这种单克隆血清疗法(mono-clonal serotherapy)用于人类还为时过早，因为这种人造癌带来的后果与大量的外源抗体所产生的后果尚不清楚。但这个方法不仅在治疗癌症问题上值得研究，而且在异体器官移植方面也是有前途的。

(摘自“科学 89”卷 1, 6 期, 第 62 页)