

生物无机化学的新动向

黄仲贤

(复旦大学化学系,上海 200433)

提 要

介绍了近几年生物无机化学发展的新动向,特别是各种与DNA, RNA相结合金属调节蛋白,在核酸基因表达及调控中的作用。金属蛋白与金属酶的研究,由于基因工程、金属络合物探针和肽链的人工合成等各种新思想、新方法的引入,并且把各种金属蛋白反应作为生物体中的一类反应进行研究(例如:生物体的电子传递反应,金属离子在生物分子间的转移反应,小分子加合反应等等),使研究进入一个新的台阶。

关键词 生物无机化学,无机生物化学,金属离子与生物分子的相互作用,无机药物

作为生命化学的重要组成部分,无机化学的前沿领域,生物无机化学近年来迅猛地发展,新的研究领域和研究方法层出不穷,正进入它蓬勃发展的时期。这可以从1989年7月23日—28日在美国波士顿的麻省理工学院召开的第四届国际生物无机化学会议上,得到很好的反映。与会者有来自世界各国的六百多位科

学家,包括生物化学、光谱学、结晶学、分子生物学、临床医学和化学等各个领域的科学工作者。会议有四百多篇论文,包括了生物无机化学的各个方面。由于各种新思想、新方法和新技术的应用,将生物无机化学的研究推向了一个新的台阶。下面我们就生物无机化学近期的一些新发展和新动向作一简单介绍和评论。

损伤。从血库贮藏不同时间的红细胞中分离出的收缩蛋白也显示出其结合肌动蛋白的能力呈梯度下降。收缩蛋白的氧化也会使红细胞产生囊泡,即膜表面积部分丧失。对此,已有人用添加二硫苏糖醇使之还原而恢复正常。

- 8 Fowler V M. *J Biol Chem*, 1987; 262: 12792
- 9 Gardner K Bennett V. *J Biol Chem*, 1986; 261: 1339
- 10 Shiffer K et al. *Biochim Biophys Acta*, 1988; 937: 269
- 11 Blanchard D et al. *J Biol Chem*, 1987; 262: 5808
- 12 Anderson R A, Marchesi V T. *Nature*, 1985; 318: 295
- 13 Low P S. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 145: 167
- 14 范培昌等. 生物化学杂志, 1985; 1(1): 37
- 15 范培昌等. 生物化学与生物物理学报, 1987; 19(6): 493
- 16 Tanner M J A et al. *Biochem J*, 1988; 256: 703
- 17 范培昌等. 实验生物学报, 1987; 20(2): 225
- 18 范培昌等. 生物化学与生物物理学报, 1986; 18(4): 349
- 19 Stromgwist M et al. *Biochemistry*, 1988; 27: 1104
- 20 Conboy J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 9512
- 21 Takakuwa Y et al. *J Clin Invest*, 1986; 78: 80
- 22 范培昌编著. 生物大分子印渍技术与应用. 上海: 上海科技文献出版社, 1989; 1—286
- 23 Chilcote R et al. *Blood*, 1987; 69: 156

参 考 文 献

- 1 Carraway K L, Carraway C A C. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 988: 147
- 2 Goldstein J L et al. *Annu Rev Cell Biol*, 1985; 1: 1
- 3 Claque M J et al. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 981: 43
- 4 范培昌. 生物化学与生物物理进展, 1985; (2): 23
- 5 Bennett V. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 988: 107
- 6 Shen B W et al. *J Cell Biol*, 1986; 102: 997
- 7 Mlak A et al. *Biochim Biophys Acta*, 1987; 912: 157

[本文于1990年6月12日收到,9月17日修回]

金属离子与核酸

正如作者在 1988 年的自然科学年鉴的化学进展中所提及的,金属离子在核酸生物化学中的一个十分关键的问题是,金属离子是如何参与核酸的代谢过程和发挥功能的^[1]。而今,这个问题已成为生物无机化学研究的前沿和热点,突出地表现在下述三个方面。一是基因表达的金属调节蛋白 merR (metalloregulatory protein) 这种蛋白是细菌对重金属抗衡体系的中心环节。当各种重金属包括汞(II)(以及有机汞),砷(III, V),铋(III)和镉(II)等进入细菌时,细菌质粒(bacterial plasmid)存在着一种特定的防御体系,抵抗这些重金属的侵入。例如,汞的防御体系通常有六组基因,由它们决定结合 DNA 的调节蛋白(DNA-binding regulatory protein, merR)的组成。而汞的运送体系可以产生两种基因产物,即 merT 和 merP,以及高汞还原酶(mercuric reductase) merA, (是一种含 FAD 的依赖于 NADPH 的酶)。有时它还包括有机汞的解合酶(organomercurial lyase) merB^[2]。由 144 个氨基酸组成的 merR 蛋白,以双聚分子的形式键合于 DNA 的某一特定部位,从而激活(当有汞(II)离子存在时)或阻遏(当不存在汞(II)离子时)细菌的汞解毒体系(mer TPCAD)。因此 merR 调节金属蛋白是生物体抗衡汞离子的基因开关的主要组分。T. V. O'Halloran 等发现,这种重金属的受体蛋白之所以具有如

此高的灵敏度和选择性,在于汞(II)在该蛋白中特异的配位构型(配位数为 3 或 4)。这种相互作用,导致 DNA 局部构型的改变,从而启动 RNA 聚合酶进行基因转录的特定部位。氨基酸定点突变(site-directed mutagenesis, Cys→Ala)研究表明,转录活性的物种(transcriptionally active species)是由两个亚基中 Cys-126 通过金属桥联而形成的二聚体^[3]。涉及到核酸生化过程中的含锌的金属蛋白,至少有三类,即由多个亚基组成的 RNA 聚合酶,在 DNA 复制过程中的 ssDNA 结合蛋白和真核细胞的锌指蛋白(Zinc Finger)类的转录因子。近年来,后二种锌蛋白的研究尤为引人注目。锌指蛋白是一类与核酸作用的金属蛋白。它们经常存在于病毒和细菌的 DNA 键合蛋白中,如转录因子 TFIIIA 蛋白(transcription factor A 蛋白)^[4]。这些蛋白往往含有好几个结构相类似的肽段,在这些肽段中,通过肽段两端的永不变更的半胱氨酸和组氨酸的残基与锌配位,使肽段的其余部分形成指状伸向外侧(图 1)。据称,正是这些外伸的指段结合于 DNA 的特定部位,而不同的锌指蛋白,不同的构象就会引起 DNA 不同的转录效应。与锌指蛋白相类似的是从啤酒酵母中提取的 GAL4 转录因子,在它的 1—74 位的肽段中,它同样包含一个类锌指的鞘(motif)。在 *E. coli* 的 GAL4 转录因子的 1—149 肽段中,也含有类锌指的结构,它结合 1—1.5 个锌离子,这个结构域主要结合在 17bp 的 UAS_G 片断上,除去锌离子,则丧失此种能力。如果加入 Zn(II)或者 Cd(II)、Co(II)到 Apo-GAL4(149*)则可以重组它对 DNA 特定部位的键合能力^[5]。此外,还有巨噬细菌 T4 的基因 32 蛋白(Gene 32 Protein)^[6]。它含有一个锌离子,据报道,它被 Cys-77, His-81, Cys-87 和 Cys-90 所配位,处于一个歪斜的四面体构型之中。当 T4DNA 进行复制和修复过程时,它结合于 DNA 的单股键上。还有一类与核酸有关的重要的调制金属蛋白是 FUR (ferric uptake regulator),它在 *E. coli* 中是某些高亲和铁输送

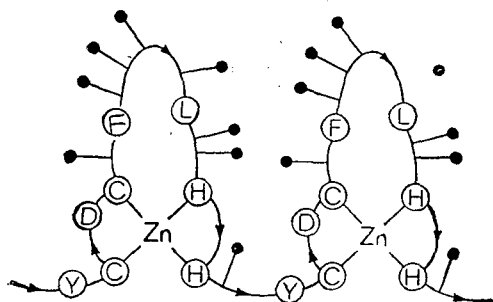


图 1 锌指蛋白指结构域示意图

(圆圈为不变氨基酸,黑点为可能与 DNA 结合之残基)

金属蛋白与金属酶

体系的负反馈调节子,它很可能是通过控制细胞内铁库中高价铁与低价铁的比例,来实现这种调节作用的^[7]。*E. coli*有二种超氧化物歧化酶,一种是 Mn-SOD,它是由 SOD A 基因所编码的。另一种是 Fe-SOD 编码基因是 SOD B。有证据表明,脱金属的 FUR 蛋白是 SOD B 转录作用的激活子,而含金属的 FUR 蛋白是作为 SOD A 转录作用的阻遏子。

金属络合物在核酸研究中另外一个重要作用,就是可以识别和反应于核酸特定部位,即用于分子设计^[8,9]。它是基于络合物与 DNA 局部构象、形状和对称性匹配作用所产生的选择性,即所谓的形状选择性(shape-selection)。这些金属络合物有 $\text{Ru}(\text{TMP})_3^{2+}$ 和 $\text{Rh}(\text{Phen})_2\text{Phi}^{3+}$ (其中 TMP 为 3, 4, 7, 8-四甲基 1, 10-邻菲罗啉, Phen 为邻菲罗啉, Phi 为非醌二亚胺(phenanthrenequinone diimine)它们分别识别 DNA 的 A 型螺旋的小沟表面(shallow minor groove surface)和大沟中 5'-嘧啶-嘌呤-3' 的位置,特别是 5'-CCAG-3' 位置上^[10]。在 1000W Hg/Xe 灯辐射下(310—356nm),它们能在这些特定部位断裂 DNA 链。因此,这些络合物就成了核酸局部二级和三级结构的探针,它可以检测这些地方任何构象的细微变化,而这些区域往往是 DNA 结合蛋白的键合部位。除此以外,加州理工学院的 Dervan 还用 $[\text{FeEDTA}]^{-1}$ 结合在肽段或者人工合成的蛋白上,以探测 Hin 重组酶(Hin recombinase, 含 53 个氨基酸)和 $\gamma\delta$ 解裂酶(resolvase 44 个氨基酸)在 DNA 上结合的部位^[11], 邻菲罗啉铜可以亲和裂解铁蛋白的 mRNA^[12]。Mn·(TMPyP)·(OAc), 对核酸有很高的亲和力,对 poly d(A-T) 的亲合常数(affinity constant)达到 $2.3 \times 10^9(\text{mol/L})^{-1}$, 是 DNA 氧化裂解的有效试剂。除了上述的定量亲和的 DNA 和 RNA 的裂解络合物以外,还有研究^[13]利用 $[\text{FeEDTA}]^{-2}$ 和 H_2O_2 的 Fenton 反应所产生的·OH 自由基和博莱霉素过渡元素络合物非选择性地裂解 DNA 的骨架链,也提供了许多结构信息。

金属蛋白与金属酶仍然是生物无机化学研究的主要领域,然而由于新方法(主要是基因工程的定点突变法,金属络合物探针及蛋白肽链的修饰和人工合成)和新技术(主要是各种能谱与光谱,例如二维核磁共振、电子自旋回旋共振 Electron Spin Echo, EXAFS 和 XAS 等的应用),人们把注意力更多地放在直接研究这些含金属的生物分子本身。固氮酶的研究表明,有三类固氮酶,在 ATP 水解反应中,它们都以铁蛋白作为电子载体,把电子传递给 MoFe 蛋白、VFe 蛋白或 FeFe 蛋白。MoFe 蛋白是 $\alpha_2\beta_2$ 亚基结构,而 VFe 和 FeFe 蛋白具有 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 的四级结构,在这些蛋白中,VFe, MoFe 和 FeFe 金属簇辅因子都是底物还原的部位。卢嘉锡等发现在 MoFe 蛋白中的 $[\text{Mo}_3\text{S}_3]$, 形成三个三中心二电子的 Mo—S—Mo 键,表现类芳香性(quasi-aromaticity)性质,它可能是 MoFe 蛋白具有反应调节性的原因之一^[14,15]。

金属硫蛋白(metallothioneins, MT)的研究仍然广泛受到人们的注意。MT 具有多种异构形式,也表现不同的反应活性,有研究表明,它们主要差异是在 β -结构域(即包含三金属的 B 簇)^[16], 而许多金属置换的 MT (如 Fe(II)-MT Co(II)-MT, Cu(II)-MT 等)为研究 MT 提供了许多重要的信息。MT 在生物体内 Zn 和 Cu 等微量元素代谢中的作用一直是人们关注的一个问题^[17]。有研究表明,低分子量的生物配体并不影响 MT 向各种含锌酶提供锌^[18]。而在铜的代谢过程中,铜在进入细胞后,首先为谷胱甘肽所络合,然后转移到 MT, 贮藏起来。细胞内 70% 的铜是在 MT 中。由于新方法的应用,细胞色素蛋白重新又进入生物体内电子传递反应研究的中心舞台。美国加州理工学院的 H. Gray 利用定点突变法和蛋白肽链的半合成技术,先后修饰了细胞色素 c 的 Met-80 (\rightarrow His, Asp, Leu), Asp-62 (\rightarrow His) 等重要氨基酸。他们发现,细胞色素氧化还原能力随着这些基因的性质、疏水性

和因此而产生的蛋白肽链构象的改变而极大地改变^[19]。利用 a_4LRu^{3+} (其中 a 为 NH_3 , L 为吡啶等)的金属络合物探针,对锌或其它金属替代的细胞色素 c 的光诱导长程电子传递的反应及其机制,进行了深入研究,提出了各种可能的电子传递途径的分子机制。美国西北大学的 B. M. Hoffman 用金属置换的细胞色素过氧化物酶和细胞色素 c (生理上的氧化还原对子),研究了两蛋白结合面构象变化所起的调制作用 (gating),特别是 82 位的氨基酸 (正常细胞色素 c 是 Phe-82) 所处的中心位置^[20]。而混合金属 (主要是 Zn 和 Mg) 的血红蛋白 (Hemoglobin) 研究提供了电子传递机制、能量变化及途径的强有力的探针^[21]。应该提及另外两个研究:一是细胞色素(铁氧化还原蛋白)和质体蓝素 (plastocyanin; 铜氧化还原蛋白) 生成 1:1 稳定的共价复合物。研究表明,在这个双蛋白复合物中,蛋白内和蛋白间的电子传递反应中,都需要结合面的构象重排 (docking)。二是 Conrad 等提出的用碳化二亚胺法 (carbodiimide-based procedure) 使 CO (diAMsar)⁺ 与细胞色素表面的酸性残基 (谷氨酸和天冬氨酸残基) 共价结合。这对于研究蛋白分子内的长程电子传递又提供了一个极佳探针。在金属蛋白和金属酶中一个新涌现的研究课题是含镍金属酶。自从发现许多细菌中的氢化酶 (hydrogenase) 和一氧化碳脱氢酶 (CO -dehydrogenase) 的氧化还原的活化中心是镍离子后,人们怀着极大的兴趣去研究这些镍酶的结构、性质和功能。镍在酶中有两种价态 $Ni(III)/Ni(I)$ 它除了为半胱氨酸的巯基配位外,还与组氨酸的咪唑氮原子配位。有大量证据表明,镍离子也是酶催化的活化中心,它在两种配位构型间可逆地转型,可以激活或失活这些氢化酶。只有在还原态时,酶才表现反应活性,这意味着在 $Ni(III)$ 时,酶的活性部位处于一种封闭的构象之中。有的镍氢化酶由镍中心和两个 $[4Fe-4S]$, 一个 $[3Fe-4S]$ 铁簇所组成,有的氢化酶是由 Ni , Fe 和 Se 组成,它只有两个 $[4Fe-4S]$ 铁簇,而镍是与硒相配位。在

这里,铁簇是承担了将镍中心送过来的电子,传递给下续的氧化还原反应中心的任务,很可能它还同硒一样,承担着反应的调节作用。

无机药物

抗癌的无机药物研究仍然占据着无机药物最重要的位置。在铂抗肿瘤化合物中,有三类新的铂化合物是引人注目的。①以 $cis-[Pt(NH_3)_2(Am)Cl]^+$ 形式的二胺合铂化合物,其中 Am 是吡啶、嘧啶和嘌呤类化合物。②铂-膦羧酸类化合物 (platinum-phosphaonocarboxylate complexes), 它们的分子式是 $cis-Na[Pt(RNH_2)_2(O_3PC(R')(R'')COO)]$ 。其中 R' , R'' 可以是烷基、苯基或羧酸取代基。③二聚铂-膦酸络合物。三胺类铂络合物也同样能抑制 Hela 细胞的 DNA 合成、SV40 病毒的复制及 DNA 聚合酶的活性。另外,双核铂络合物,如 $Cl_2(NH_3)Pt-NH_2-(NH_2)_n-NH_2Pt(NH_3)Cl_2$, 对那些抗顺铂活性的肿瘤有特殊的抑制作用,它们的细胞毒性的作用机制也与顺铂不同^[22]。金与膦基络合物表现了有趣的抗肿瘤谱的活性^[23]。含有肿的金络合物也具有一定的抗肿瘤活性。与有机锡的化合物一样,人们正在探索和寻找这方面更有效、具有应用前景的化合物。西德的 P. Köpf-maier 及其合作者发现,过渡金属二茂络合物也具有很好的抗肿瘤活性,这些化合物化学上与顺铂毫不相同。有人称为第三代药物^[24,25]。其中二氯茂钛对某些顺铂治疗效果不大的某些肠胃区域肿瘤有较好的效果,肾毒性小,但对肝细胞有短期伤害。它们的分子作用机制,仍然是有待于人们去认识的问题。

无机化合物不但在抗肿瘤上取得卓著的成效,在抗病毒上也在显现它的威力。法国抗 HIV-1 药剂——HPA-23 就是一个含铋的钨的杂多酸,化学式为 $[NaSbW_{21}O_{86}]^{18-}$ 。它们的结构与构效关系也被深入地研究。现已确定,这些杂多酸是通过抑制可逆转录酶活性和细胞的融合来影响 HIV-1 病毒的。锂现在已被确认为生命必需元素,它在医药上主要用于压抑忧郁精神病的治疗、抗病毒、增强免疫和造血功

杆状病毒表达载体系统

张 力 侯 纬 敏

(北京医科大学生化教研室,北京 100083)

提 要

杆状病毒表达载体系统是近年来发展起来的较高效的表达外源基因系统。由于多角体病毒中多角体蛋白基因的非必需性、高表达性、重组病毒的易鉴定等特性,以及多角体蛋白基因的强启动子使其特别适于基因工程中作为表达载体,借助于转移载体可将外源目的基因转移到野生型 AcMNPV 中,在一个被转移载体和野生型 AcMNPV 共转染的细胞内,可以通过同源重组完成目的基因的转移。应用不同的转移载体可表达出融合及非融合蛋白质。经该系统表达的重组蛋白质具有生物学活性,其中大部分进行翻译后剪接产生与天然蛋白质相似的重组蛋白质。这些产物的抗原性,免疫原性和功能都与天然蛋白质非常相似。目前,应用该系统已成功地表达了许多酶、生长因子、病毒抗原包括病毒的外壳蛋白等有生物活性的蛋白质。本文对如何最大限度表达外源基因及该表达系统的发展前景作了讨论。

关键词 核多角体病毒 (AcMNPV), 多角体蛋白, 转移载体

能。它的化疗作用很可能主要是影响各种酶的金属辅因子,特别是 Mg(II) 离子^[26]。人们目前还致力于寻找适宜的络合物(例如离子载体),把锂送到药物的作用部位,从而避免锂的过量吸收而引起的毒副作用。

除了上面重点介绍的几个方面以外,近年来在硫的生物循环、生物氧利用过程中的金属蛋白和酶、Vitamin B₁₂ 化学的研究、生物矿化以及众多的各具匠心的模型化合物的设计和研究都有长足的进展,本文就不一一赘述。

参 考 文 献

- 1 黄仲贤等. 自然科学年鉴. 上海: 上海翻译出版公司, 1988: 341
- 2 Silver S, Misra T K. *Annu Rev Microbiol*, 1988; 42: 717.
- 3 Shewchuk L M *et al. Biochemistry*, 1989; 28: 2331
- 4 Klug A, Rhoades D. *Trends Biochem Sci*, 1987; 12: 464
- 5 Pan T, Coleman J E. *J Inorg Biochem*, 1989; 36: 343
- 6 Giedroc D P *et al. Biochemistry*, 1989; 28: 2410
- 7 Matzanke B F *et al. Biochemistry*, 1989; 36: 341

- 8 Barton J K. *Science*, 1986; 233: 727
- 9 Dervan P. *Science*, 1987; 238: 645
- 10 Barton J K *et al. J Amer Chem Soc*, 1989; 111: 4520
- 11 Dervan P B. *J Inorg Biochem*, 1989; 36: 272
- 12 Theil E C. *Adv Enzymol Mol Biol*, 1989; 63: 483
- 13 Tullius T D. *Trends Biochem Sci*, 1987; 12: 297
- 14 Huang J Q *et al. 结构化学*, 1987; 6: 219
- 15 Huang J Q *et al. Pure and Appl Chem*, 1988; 60: 1185
- 16 Schaffer A *et al. Biochemistry*, 1989; 27: 8509
- 17 Cousius R J. *Physiology Rev.* 1985; 65(2): 2381
- 18 Huang Z X *et al. Abstract on international conference on applied bioinorganic chemistry*. Wuhan: Huazhong Univ of Sci and Tech Press, 1990: 19
- 19 Meade T J, Gray H B. *J Inorg Biochem*. 1989; 36: 209
- 20 Hoffman B M, Ratner M A G. *J Amer Chem Soc*, 1987; 109: 6237
- 21 Stemp E D A *et al. J Inorg Biochem*, 1989; 36: 212
- 22 Farrell N P *et al. J Amer Chem Soc*, 1988; 110: 518.
- 23 Price S J B, Sadler P J. *Structure and Bonding*, 1988; 70: 27
- 24 Kopf-Maier P, Kopf H. *Chem Rev*, 1987; 87: 1137
- 25 Basolo F (美)著, 高忆慈等译. 无机化学前沿. 兰州: 兰州大学出版社, 1988
- 26 Bach R O. *Medical hypotheses*, 1988; 23: 157

[本文于1990年5月23日收到, 8月18日修回]