

蛋白质分子识别新认识

方锐 齐杰 周慧 李惟 沈家骢¹⁾

(吉林大学分子生物学系, 长春 130023)

摘要 近几年, 国际上肽库技术得到了迅速的发展, 在抗原决定簇的定位及分子识别方面积累了大量的数据. 就近 3 年来蛋白质分子识别方面的观念和认识上的深化进行了综述: a. 蛋白质间的相互作用是少数几个关键残基的弱相互作用提供了大部分结合能; b. 这种相互作用可以用小肽来模拟. 因此通过研究小肽片段的特异性相互作用, 可以揭示蛋白质间相互作用的本质, 为小肽分子药物和疫苗的设计, 乃至复杂超分子体系的研究提供了理论基础和实验依据.

关键词 分子识别, 抗原决定簇, 肽库

长久以来, 在广大从事分子生物学研究的工作者头脑中一直存在着这种印象: 酶-底物及其抑制剂、抗原-抗体、激素-受体等蛋白质复合体的形成, 是相互作用的两个分子间整个互补界面的相互作用, 是整体空间构象的识别和契合. 也就是说: 两者的结合涉及较大的一块空间; 参与结合的氨基酸残基必然不是线性肽段, 而是在一级结构相距较远, 但又共同构成一个适合于结合的立体结构. 上述认识在众多的蛋白质复合体中得以证实. 但是目前来看, 上述认识并不完全. 在 1986 年, Geysen^[1] 根据自己的研究结果提出了这样一个观点: a. 结合的两个分子间少数几个关键基团的弱相互作用提供了结合能的绝大部分; b. 含有与结合有关的几个关键基团的线性短肽可以模拟蛋白质上折叠的抗原决定簇. Geysen 的工作使我们对蛋白质间分子识别有了新的认识, 并且为基因工程肽库和有机合成肽库的构建和应用奠定了基础. 而肽库技术的发展和运用提供了越来越多的实验事实证实了他的观点.

Geysen 等^[1] 用包含部分肽序列的合成肽库筛选到了与抗 A10 型口蹄疫病毒颗粒抗体有高效价的六肽: WQMGHS, WQM (β) A (β) AGHS 有更高的活性, 最后将该决定簇定位在衣壳蛋白 VP1 的 His29-Thr30, Met54-Gln55, Trp88.

自 1990 年构建了第一个基因工程肽库以来, 肽库技术已成功地应用于疫苗设计、小分子肽类药物设计、分子识别等多方面领域^[2,3]. 已有多种抗原决定簇得到了定位, 其中大部分是连续的, 长度在 6~8 氨基酸之间 (表 1). 在用抗体筛选到的亲和性肽段序列分析中发现, 即便在 6~8 个氨基酸残基中也只有 2~3 个氨基酸残基对抗体的识别是至关重要的, 其他残基可被性质类似的残基取代.

表 1 几种已经精确定位的抗原决定簇

抗原	抗原决定簇
p-糖蛋白 ^[4]	E108 D101 T112 Y114 R741 E743 N746 T747 R749
β -内啡肽 ^[5]	YGGF
p-糖蛋白 ^[6]	T750RIDDPET757
腺病毒 ^[7]	KRPRP
肌红蛋白 ^[8]	DRLEKI

Blake^[9] 用抗 FMRP 酰胺抗体与肽库作用发现, 在长达 28 个氨基酸残基的半抗原中抗原决定簇定位在 PQAGID, 其中对 Q、G、D 的选择性最高, 几乎存在于所有筛选到的肽序列中, 而 P、A、I 甚至可被性质极不相同的氨基酸残基置换, 如 R 取代 P, H 取代 I 等

¹⁾ 吉林大学化学系.

收稿日期: 1995-07-26, 修回日期: 1995-09-25

(表 2). 另外, 筛选到的六肽 PQVGHD 比原半抗原对抗体具有更高的亲和性.

表 2 合成小肽抑制抗体与半抗原结合的能力

肽序列 ¹⁾						C _{1/2} ²⁾
R	Q	V	G	H	D	1.2
	Q	V	G	H	D	>750
R	Q	V	G	H	D	128
E	Q	V	G	H	D	14
P	Q	V	G	H	D	0.08
R	Q	A	G	H	D	4.0
R	Q	V	G	I	D	17
P	Q	A	G	I	D	2.8

¹⁾所有合成肽的 C 端为酰胺, ²⁾当 ELISA 信号强度减到一半时肽的浓度 (mg/L).

Boettger 等^[10]用抗角蛋白 8 抗体 LE41 在六肽库中筛得保守序列: S (X) LNP, 将该决定簇定位在角蛋白 8 H1 亚结构域上: SLLNP. 进一步研究发现, 虽然所有的 II 型角蛋白都含有 SLL (X) P 序列, 但在与 LE41 免疫杂交实验中, 只有当 X 为 Asn、Ser 时抗体 LE41 与角蛋白 8 特异性结合, 而 X 为 Asn 时结合力最强, 即一个氨基酸残基决定了抗体

结合的专一性 (表 3).

表 3 噬菌体六肽序列与 II 型角蛋白保守序列的比较

噬菌体保守序列	SXLNP
噬菌体序列 A	SLLNPP
噬菌体序列 B	KSLLNP
噬菌体序列 C	FXLLNP
噬菌体序列 D	LSILNP
噬菌体序列 E	GSILNP
噬菌体序列 F	SMLNP
人角蛋白 1	TINQSLLQPNVEI
人角蛋白 2	TTNQSLLQPLKVET
人角蛋白 3	TTNQSLLQPLKVET
人角蛋白 4	SLNQSLLTPLHVEI
人角蛋白 5	TVNQSLLTPLNLQI
人角蛋白 6	TVNQSLLTPLNLQI
人角蛋白 7	TINQSLLAPLRLDA
人角蛋白 8	TVNQSLLSPLVLEV
鼠角蛋白 8	TVNQSLLSPLKLEV
兔角蛋白 8	TVNQSLLNPLKLEV

在研究主要组织相容性复合体对小肽的选择性^[11]时发现, 小肽的 N 端都含有芳香族氨基酸残基 (Trp、Phe、Tyr), 其后第三个氨基酸残基是 Met 或 Leu, 且都不含酸性氨基酸残基 (图 1).

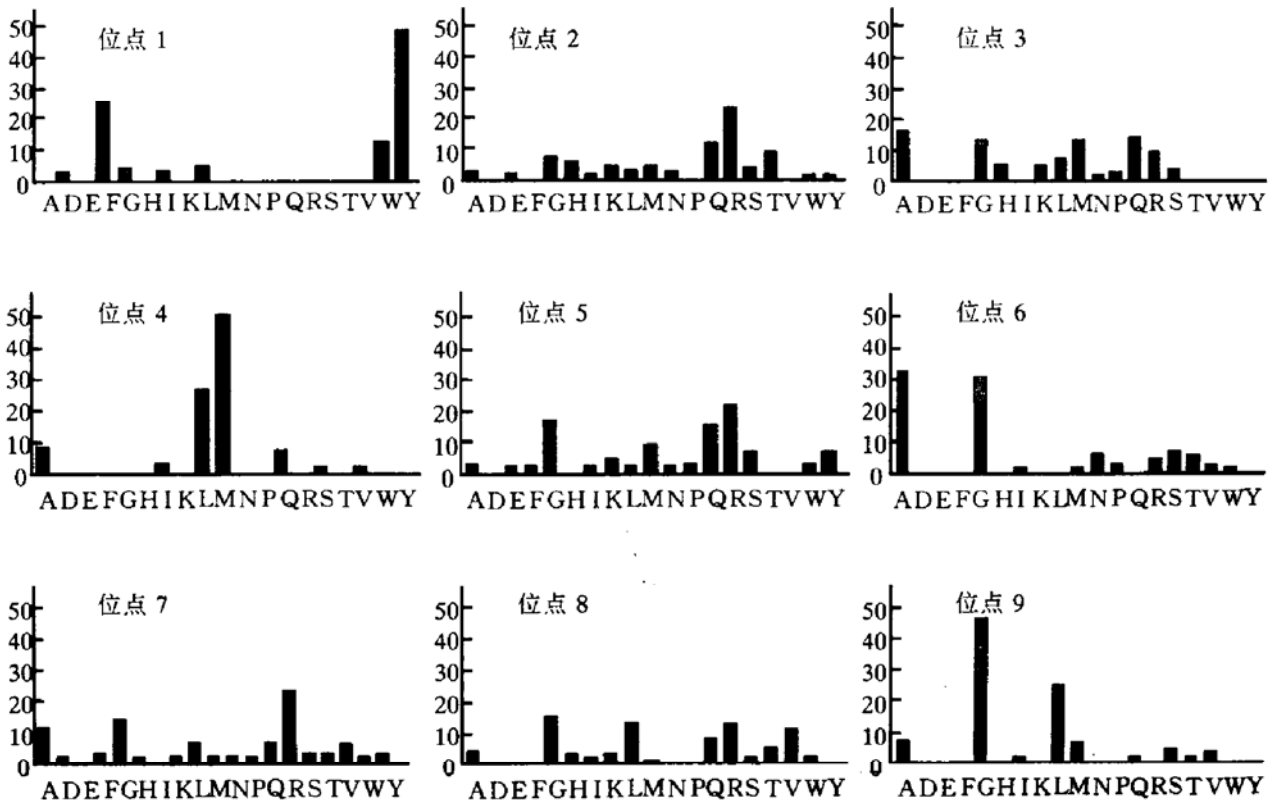


图 1 与 DR1 结合的小肽序列中各位置氨基酸组成
浅色部分代表手臂 Gly 残基

应用肽库技术, 人们还成功地筛选到其他种类蛋白质大分子的小肽配体. 如: HIV 蛋白酶抑制剂^[12]、血小板凝血酶受体的激动剂和抑制剂^[13]等.

最近, 本实验室利用六肽 (Asp-Gly-Gly-Ser-Ala-β-Ala) 模拟胰酶的活性部位, 成功地筛选到了胰酶的抑制剂 (尚待发表). 六肽的设计是根据胰酶的催化机制, 用 Gly 连接与底物直接作用的两个基团: Asp、Ser, 使之具有较大的柔性, 从而可模拟胰酶与底物的结合部位, 再以该短肽在噬菌体六肽库中筛选其亲和性配体, 测定亲和性噬菌体对胰酶活性的影响筛选胰酶抑制剂, 最后经 DNA 序列分析, 得到胰酶抑制剂的肽序列. 这种方法与直接用胰酶进行筛选比较, 筛选到的噬菌体克隆中无活性的克隆要少得多, 因而具有更好的目的性. 这项研究成功地用两个小肽 (模型六肽和重组噬菌体插入六肽系列) 模拟了胰酶和胰酶抑制剂两个大分子间的相互识别和相互作用, 不仅有力地证明了蛋白质这样的大分子之间的相互作用主要局限在几个关键基团的相互作用, 而且由此可以设想通过研究小肽间的相互作用来研究分子识别乃至复杂的超分子体系的自组装问题.

参 考 文 献

- 1 Geysen H M, Rodda S J, Mason T J. *Mol Immunol*, 1986; **23**: 709
- 2 Medynski D. *Bio/Technology*, 1994; **12**: 709
- 3 Scott J K. *TIBS*, 1992; **17**: 241
- 4 Georges E, Tsuruo T, Ling V. *J Biol Chem*, 1993; **268** (3): 1792
- 5 Lam K S, Salmon S E, Hersh E M *et al.* *Nature*, 1991; **354** (7): 82
- 6 Cianfriglia M, Willingham M C, Tembesi M *et al.* *Int J Cancer*, 1994; **56**: 153

- 7 Arsenault H, Weber J M. *FEMS Microbiology Letters*, 1993; **114**: 37
- 8 Fieser T M, Tainer J A, Geysen H M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**: 8568
- 9 Blake J, Leonora L-D. *Bioconjugate Chem*, 1992; **3**: 510
- 10 Boettger V, Lane E B. *J Mol Biol*, 1994; **235** (1): 61
- 11 Juergen H, Bela T, Francesco S. *J Exp Med*, 1992; **176**: 1007
- 12 Owens R A, Gesellchen P D, Houchins B J *et al.* *Biochem Biophys Res Comm*, 1991; **181** (1): 402
- 13 Doorbar J, Winter G. *J Mol Biol*, 1994; **244**: 361

A Further Realization on the Recognition of Proteins. Fang Rui, Qi Jie, Zhou Hui, Li Wei, Shen Jiacong¹⁾ (*Department of Molecular Biology*; ¹⁾*Department of Chemistry, Jilin University, Changchun 130023, China*).

Abstract The newly developed techniques of peptide libraries have drawn great interest in ligands selection, and also have provided us numerous facts in the fields of molecular recognition. Basing on these results, two new opinions on molecular recognition between macromolecules have been reviewed. First, non-covalent bonds formed between a few residues of two bonded macromolecules may make a major contribution to the total energy of binding. Second, short peptides bearing these critical residues can mimic the interaction of large proteins. Thus, by studying specific interactions of short peptides, some details of interaction of proteins may be discovered, and also some theoretical and experimental bases to the design of peptide medicines and vaccines, that may promote the study of supramolecular systems.

Key words molecular recognition, antigen determinants, peptide library