

University, Hangzhou 310027, China).

Abstract SRY is the only gene currently known to be involved in the process of sex determination. A number of cloned genes probably participate in gonadal development: the MIS (also called AMH), the SOX9, the SF1, the DAX1, the WT1 and the DSS etc. Some gene model for mammalian sex determination such as Z-gene model and DSS-gene model etc. have recently been proposed. Those models provide a rational explanation not only for the cases of XX

and XY sex reversal currently known to occur in humans and other mammals, but also for molecular mechanism of sex determination. Many questions of mammalian sex determination still remain unresolved. The identification and functional analysis of other genes in the mammalian sex determining cascade will determine the validity of this hypothesis.

Key words sex determination, sex reversal, SRY/Sry, Z-gene model, DSS-gene model

肽的 α -酰胺化研究进展*

江智红 李伯良

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 α -酰胺化是神经和内分泌系统中许多生物活性肽重要的翻译后加工过程, 由酰胺化酶 PAM 催化完成. PAM 是一个双功能酶, 含有两个催化结构域: PHM 和 PAL, 顺序催化酰胺化两步反应. PAM 的 mRNA 和蛋白质具有多样性. 作为活性肽生物合成途径中的限速酶, PAM 的表达及活力水平具组织特异性, 受激素及发育中的相关因素的调节.

关键词 酰胺化肽, 酰胺化酶, 双功能酶

学科分类号 Q516

1 α -酰胺化是重要的翻译后加工过程

酰胺化的肽广泛存在于脊椎动物、无脊椎动物, 甚至植物中. 其中许多都是生物体内非常重要的激素、神经递质、毒素和营养因子, 有着很重要的生理功能. 在神经和内分泌系统中发现的生物活性肽, 50% 以上都有酰胺化修饰. 这些肽中许多还具有很重要的药用价值. 如降钙素, 它目前是治疗骨质疏松、Paget's 症、老年性骨痛等非常有效的药品, 具有很可观的应用前景.

α -酰胺化是生物活性肽重要的翻译后加工过程. 大多数活性肽首先翻译成的都是大的非活性形式的前体 (前肽原); 切除信号肽后,

肽原还要经过特殊的内源性蛋白酶的裂解作用, 通常在双碱性氨基酸处, 有时也在单个 Arg 残基处; 内源性蛋白酶裂解后, 碱性氨基酸残基被羧肽酶 E 移去; 所形成的甘氨酸 (—X—Gly), 最后在 α -酰胺化酶的作用下转为酰胺化产物 (—X—NH₂).

C 末端 α -酰胺基团的存在对许多活性肽的生物活性是极为重要的. 一系列实验结果显示, 这种修饰作用与保护肽免受酶的降解和增加其与受体的亲和力直接相关. Tatamoto 等^[1]通过鉴定 α -酰胺结构, 成功地确定了几种新的生物活性肽, α -酰胺结构已经逐渐成为人

* 国家“863”资助项目 (863-102-11-03-02).

收稿日期: 1996-11-12, 修回日期: 1997-03-13

们寻觅活性肽的一种标志.

2 酰胺化酶

酰胺化酶的全称为甘氨酸酰化单氧酶 (peptidylglycine α -amidating monooxygenase, PAM, EC1.14.17.3), 最早是由 Bradbury 等^[2] 1982 年在猪垂体中发现并纯化, 且首先建立起酰胺化酶测活系统. 以后又陆续从牛神经间质垂体、蛙皮、大鼠髓样甲状腺瘤、鼠脑、猪心房、大鼠心房和马血清^[3~9] 等组织中纯化到 PAM. 不同组织来源的 PAM, 分子质量有着很大的差异, 这与该酶的糖基化程度、该酶在组织中特异加工形式以及纯化方式都有关系.

Murthy 等^[10] 利用从牛提取的 PAM 进行催化反应时发现, PAM 的活力依赖于铜离子、分子氧和抗坏血酸. 这与将多巴胺转为去甲肾上腺素的多巴胺 β 单氧酶 (DBM, EC1.14.17.1) 极为相似.

对于酰胺化反应, 肽底物的 C 末端 Gly 残基是必需的, 以其他氨基酸结尾的肽不会被酰胺化. 倒数第二位的残基, 对酰胺化反应效率影响很大. 象 Phe 或 Val 这样的中性疏水性氨基酸, 是较好的底物, 而象 Asp 或 Arg 这样带电的氨基酸, 反应就要差得多. PAM 还能催化多种非肽类底物^[11], 一般为乙醛酸衍生物, 马尿酸是目前所发现的 PAM 的最小底物.

3 酰胺化酶 PAM 的结构与功能特征

PAM cDNA 的获得是建立在 PAM 的纯化基础上的. Eipper 等^[12] 首先利用纯化的牛 PAM-A 和 PAM-B 两个酶片段制得了抗体, 然后将牛垂体来源的 RNA 建立表达库, 用 PAM 的抗体来筛选, 获得编码牛 PAM 的 cDNA; 蛙皮中也获得两种 PAM cDNA: AE-I、AE-II^[13]; 从大鼠的心房和垂体前叶中获得了大鼠 PAM 的七种 cDNAs^[14, 15]; 1990 年, Glauder 等^[16] 从人甲状腺瘤中也分离到编码人 PAM 的 cDNA 序列, PAM-A 和 PAM-

B. 这些 cDNA (图 1) 在哺乳动物系统中均得以表达出具酰胺化活性的产物, 从而确证了它们都编码酰胺化酶.

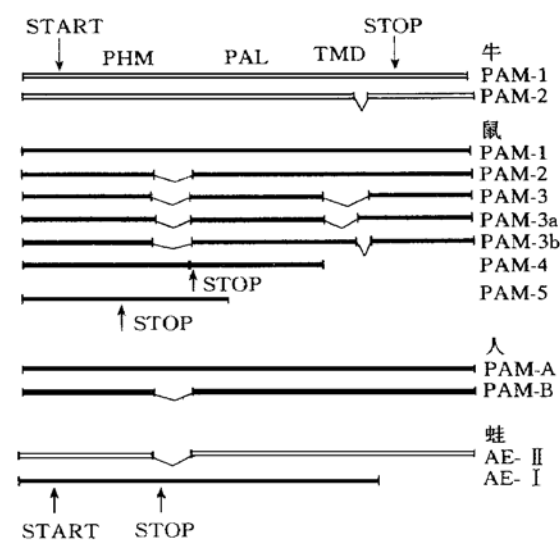
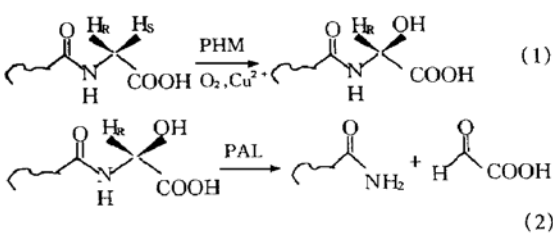


图 1 不同组织来源的 PAM cDNA

根据克隆的 cDNA 序列, 可推测 PAM 氨基酸的组成以及其功能结构. 大鼠 PAM 最长的形式为 rPAM-1, 由 25 个氨基酸的信号肽、10 个氨基酸的前导肽、24 个氨基酸的跨膜区、86 个氨基酸的 C 端胞质区和 831 个氨基酸的催化结构域组成. 将各种属来源的 cDNA 所编码的 PAM 作一个比较, 可发现, 它们在蛋白质结构上有很大的同源性^[17]. 在 PAM 中, 有不少与蛋白质修饰及功能结构形成紧密相关的氨基酸残基, 也是极为保守的. 大鼠 PAM-1 中有 8 对双碱性氨基酸, 是内源性蛋白酶作用位点, 它与 PAM 的组织特异性加工有关. PHM 催化结构域的三个 His 簇, 在大鼠、牛、蛙皮 PAM 中, 均保持一致. 点突变实验揭示, 大鼠 PAM 中, His107、His108、His172、His242、His244 可能是铜离子配位点, 它们跟 PAM 活力密切相关. PAM 催化结构域中有 14 个 Cys, 在三个物种中也是完全保守的. 大鼠 PAM-1 还有两个潜在的 N-糖基化位点, 一个位于 Exon A 区, 一个位于 PAL 的 C 末端, 但据研究, PAM 的糖基化并不影响其动力学

参数. PAM 的 C 端胞质区 (CD) 是 PAM 蛋白的重要调控区, 其主要对膜整合形式的 PAM 进入受调控的分泌途径、胞内运输和从细胞表面内在化等起信号及调控功能作用^[18].

在考察从组织中纯化的或重组表达的 PAM 反应特性时, 发现在将甘氨酸底物转化为酰胺化产物的过程中, 在起始步骤中有 Gly 的 α -C 上的羟化, 且有一个相对稳定的肽酰 α -羟化甘氨酸中间产物存在. 而此中间产物在加碱的情况下可自发转为产物, 但在生理条件下是稳定的. 那么在肽的 α -酰胺化反应中需要另一酶的参与. 后来研究发现 PAM 含有两个催化结构域: 肽酰甘氨酸 α -羟化单氧酶 (peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase, PHM) 和肽酰 α -羟化甘氨酸 α -酰胺化裂解酶 (peptidyl- α -hydroxyglycine α -amidating lyase, PAL), 分别顺序催化酰胺化的两步反应:



多功能酶在氨基酸及核酸生物合成中还是比较多见的, 但在多肽生物合成中, PAM 是第一个被发现的多功能酶, 其两个催化结构域的功能完全是独立的.

4 PAM mRNA 和蛋白的多样性

DNA 印迹分析一致显示, 牛及大鼠的 PAM 都是由单个基因编码的, 非洲爪蟾中至少有两个基因编码 PAM. 大鼠 PAM 基因至少含有 27 个外显子, 基因组 DNA 约为 160 kb^[19] (图 2). PAM 基因在 PHM 区域通

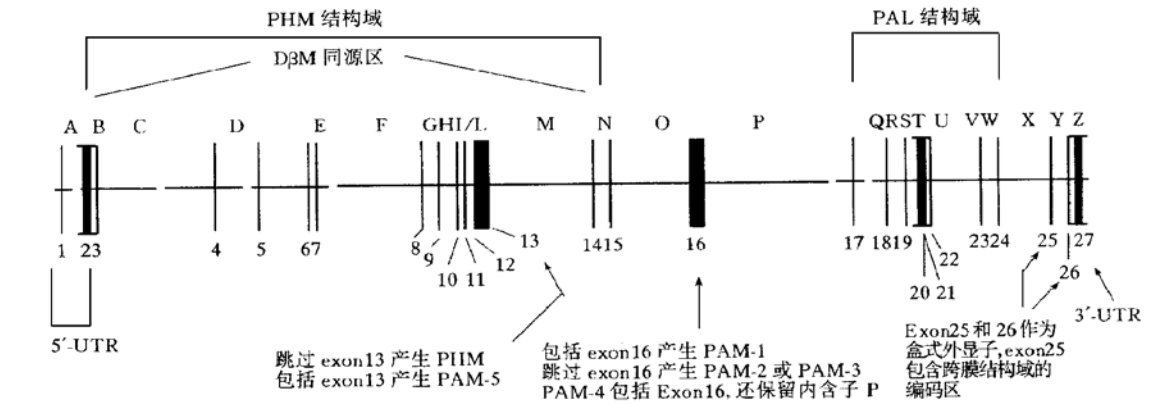


图 2 大鼠 PAM 的基因组 DNA 结构

外显子用竖线表示, 下面标明其编号; 内含子用横线上的字母表示.

常有許多比較大的内含子, 由 12 个外显子编码, PAL 编码基因就相对紧凑些, 仅由 8 个外显子组成, 且其间的内含子也比较小. 与 PAM 多种形式的功能性剪接密切相关是 Exon16、Exon25 和 Exon26. Exon16 编码 PHM 和 PAL 之间的 ExonA 区; Exon25 含跨膜区的编码区, Exon25 和 Exon26 组成 ExonB. 要形成活性 PHM 蛋白, Exon13 必须

跳过去.

从 PAM cDNA 的多种形式 (图 1), 可以看到其 mRNA 的多样性, 这是 mRNA 的不同剪切产生的结果. PAM mRNA 的多样性, 使编码的 PAM 蛋白也呈多种形式. 大鼠七种 PAM 蛋白前体形式, 分子质量从 35~ 108 ku. rPAM-1, 2, 3b 编码膜整合蛋白, 而 rPAM-3, 3a, 4, 5 编码可溶性蛋白. 而 PAM 蛋白

的组织特异性翻译后加工, 使其蛋白质形式更多样化. 从心房及大鼠髓样甲状腺瘤来源的 PAM、PHM 和 PAL 结构域是连在一起的, 牛垂体及蛙皮来源的 PAM, 发现其 PHM 和 PAL 结构域是被内源性蛋白酶分开的. 正是 PAM 前体中的一系列双碱性氨基酸, 提供了蛋白质加工的基础. Exon A 中的一对双碱性氨基酸负责将 PHM 和 PAL 分成两个独立的催化结构域, 而 C 末端的双碱性氨基酸则起到了使膜整合 PAM 成为可溶性蛋白.

5 酰胺化是活性肽加工中的限速步骤

末端的 Gly 的肽及其相应的酰胺化肽, 往往以一定的比例在组织中共存, 且在不同的组织中, 比例会有很大的变化. 大鼠心室、腹前腺体含有的促甲状腺素释放激素 (TRH) -Gly 超过 TRH 100 倍; 中枢神经系统中刺激蛋白 (SP) -Gly 为 SP 的 2% ~ 3%; 胃泌素-Gly 与 gastrin 比较, 发现前者在胃窦中有更为重要的含量, 而血浆中则为近视平衡的水平. 随着对这种共存关系的研究, 人们开始把甘氨酸不仅仅作为酰胺化产物的前体形式, 而认为两者可能同样有着非常重要的生物学功能. 最近发现 gastrin-Gly 和 gastrin 同样都能刺激大鼠胰腺肿瘤细胞 AR4-2J 的生长和繁殖, 对其深入研究揭示, 两者是通过激活不同的受体来发挥作用的^[20, 21]. Gastrin 可诱导 AR4-2J 细胞中的 Ca^{2+} 动员、抑制 cAMP 的产生、诱导 MAPK 的激活、刺激 c-fos 和 c-Jun 基因的表达, 它是通过 gastrin/CCKB 受体、MAPK 途径, 诱导早期基因表达来传递信息、促进细胞的生长. 而 gastrin-Gly 对 cAMP 的产生、 Ca^{2+} 动员、早期基因的表达、MAPK 的激活都没有效应, 但却是 H^+ 、 K^+ -ATPase α 亚基基因表达强有力的诱导者, 而且它能诱导 JNK (Jun nuclear kinase) 活性. 其促生长效应是通过激活另一个不同于 gastrin/CCKB 的受体, 参与不依赖于 Ca^{2+} 动员的信号传导途径, 刺激 JNK 来翻译后水平激活 c-Jun, 促进负责产生 H^+ 的基因的表达. 由此可见, 甘氨酸底物与其酰胺化产

物在体内可能通过激活不同的受体, 而发挥生物学功能. 那么酰胺化作用在多肽合成中就成为一步很关键的限速步骤, 它控制了组织中肽的存在形式, 由此引发细胞内不同的信号传导途径, 带来不同的生物效应.

PAM 的表达和活力分布具有组织特异性. 心房、垂体腺、唾液腺和下丘脑是 PAM 活力最高的组织, 其他组织中要低 10~1000 倍. 中枢神经系统中, 酰胺化活力水平和 PAM mRNA 水平最高的都是下丘脑. 亚细胞组分研究一致揭示, 酰胺化活力是与突触和神经分泌小泡组分相结合的. 许多表达 PAM 的组织都合成酰胺化肽, 但心房和唾液腺虽有很高的 PAM 活性, 却不合成已知的酰胺化肽. 这其中的奥妙还不清楚. 另外研究中还发现, 随着老年性痴呆病 (Alzheimer's disease) 病情的发展, 病人脑脊液中 PAM 活力每年大约递减 16%. 在许多神经内分泌型肿瘤如小细胞型肺癌中, 发现肿瘤细胞 PAM 活性增高, 并分泌高水平的具有生物活性的酰胺化肽类激素, 后者有强烈的刺激肿瘤生长作用.

作为生物合成支路上的限速酶, PAM 的水平是受调控的. 用 cAMP 或 CRH 刺激时, AtT-20 细胞表达的 PAM mRNA 水平会提高; 而用地塞米松时会被抑制. Grino 等运用组织化学作原位杂交, 揭示在作了肾上腺摘除术后, 在旁室核的某些神经元的 PAM mRNA 水平会提高. PAM 的表达也受甲状腺激素的影响. 成年雄性大鼠在经历甲状腺摘除术后, 垂体前叶的 PAM mRNA 水平会提高几倍. 甲状腺机能减退后, 好几种 α -酰胺化的肽 (NPY, SP, VIP) 的水平都会提高. 在新生鼠的发育过程中, 对 gastrin 和 gastrin-Gly 进行定量分析, 发现断奶带来的皮质类固醇的高峰, 增加了 gastrin 的 α -酰胺化, 饮食的变化也刺激 gastrin 的合成. 许多实验也揭示了发育中下丘脑中 PAM mRNA 活力和 α -酰胺化肽的变化. 发育中的相关因素是如何调控 PAM 表达的变化, 哪一些发育过程依赖于 α -酰胺化肽的时程表达, 这些都是尚未找到答案的问题.

6 展 望

对肽的酰胺化作用机理,到今天人们已有了相当深入的了解,特别是酰胺化酶 PAM 基因的克隆及其结构功能分析,使酰胺化研究工作进入了一个新的领域。作为多肽生物合成中的第一个双功能酶,其在基因进化理论和酶学理论方面的研究意义是很大的;而作为许多神经肽生物合成中的限速因素,对其表达调控的深入探索,将会使人们对神经系统信号传递的图景有更清晰的认识。同时,由于许多生物活性肽的药用价值,酰胺化酶在医药生产方面也具有非常大的应用前景。

目前对酰胺化研究较为前沿的几个实验室,主要集中于美国和日本,特别是美国约翰·霍普金斯大学 Eipper 实验室,他们对 PAM 的结构与功能已有相当深入的研究,处于世界领先地位;而日本在 PAM 的基因工程表达和开发利用,以及酰胺化分析方面很有优势。我国在这方面的研究却相当薄弱,可以说才刚刚起步。对 PAM 的功能结构、催化作用机理及表达调控还有许多未知值得深入探索的问题。技术方面急需建立简便的肽的 C 末端酰胺化分析方法,这将会大大促进酰胺化研究进程。

参 考 文 献

- 1 Tatemoto K, Efendic S, Mutt V *et al.* Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*, 1976, **234** (5821): 476~ 478
- 2 Bradbury A F, Finnie M D A, Smyth D G *et al.* Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature*, 1982, **298** (5875): 686~ 688
- 3 Murthy A S N, Mains R E, Eipper B A *et al.* Purification and characterization of peptidylglycine α -amidating monooxygenase from bovine neurointermediate pituitary. *J Biol Chem*, 1986, **261** (4): 1815~ 1822
- 4 Mizuno K, Sakata J, Kojima *et al.* Peptide C-terminal α -amidating enzyme purified to homogeneity from xenopus laevis skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, **137** (3): 984~ 991
- 5 Mehta N M, Gilligan J P, Jones B N *et al.* Purification of peptidylglycine α -amidating enzyme from transplantable rat medullary thyroid carcinomas. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **261** (1): 44~ 54
- 6 Noguchi M, Takahashi K, Okamoto H *et al.* The relation between activities at neutral and alkaline pH values. *Arch Biochem Biophys*, 1989, **275** (2): 505~ 513
- 7 Kojima M, Mizuno K, Kangawa K *et al.* Purification and characterization of a peptide C-terminal α -amidating enzyme from porcine atrium. *J Biochem*, 1989, **105** (3): 440~ 443
- 8 Perkins S N, Husten E J, Mains R E *et al.* PH-dependent stimulation of peptidylglycine α -amidating monooxygenase activity by a granule associated factor. *Endocrinology*, 1990, **127** (6): 2771~ 2778
- 9 Tajima M, Iida T, Yoshida S *et al.* The reaction product of peptidylglycine α -amidating enzyme is a hydroxyl derivative at α -carbon of the carboxyl-terminal glycine. *J Biol Chem*, 1990, **265** (17): 9602~ 9605
- 10 Murthy A S N, Keutmann H T, Eipper B A *et al.* Further characterization of peptidylglycine α -amidating monooxygenase from bovine neurointermediate pituitary. *Mol Endocrinol*, 1987, **1** (1): 290~ 299
- 11 Bradbury A F, Smyth D G. Enzyme catalysed peptide amidation: isolation of a stable intermediate formed by reaction of the amidating enzyme with an imino acid. *Eur J Biochem*, 1987, **169** (3): 579~ 584
- 12 Eipper B A, Park L P, Dickerson I M *et al.* Structure of the precursor to an enzyme mediating COOH-terminal amidation in peptide biosynthesis. *Mol Endocrinol*, 1987, **1** (3): 777 ~ 790
- 13 Mizuno K, Ohsuye K, Wada Y *et al.* Cloning and sequence of cDNA encoding a peptide C-terminal α -amidating enzyme from xenopus laevis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, **148** (2): 546~ 552
- 14 Stoffers D A, Green C B R, Eipper B A. Alternative mRNA splicing generates multiple forms of peptidylglycine α -amidating monooxygenase in rat atrium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** (1): 735~ 739
- 15 Stoffers D A, Ouafik L H, Eipper B A. Characterization of novel mRNAs encoding enzymes involved in peptide α -amidation. *J Biol Chem*, 1991, **266** (3): 1701~ 1707
- 16 Glauder J, Ragg H, Rauch J *et al.* Human peptidylglycine α -amidating monooxygenase: cDNA, cloning and functional expression of a truncated form in COS cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **169** (2): 551~ 558
- 17 Eipper B A, Stoffers D A, Mains R E. The biosynthesis of neuropeptides: peptide α -amidation. *Annu Rev Neurosci*, 1992, **15**: 57~ 85
- 18 Yun H Y, Milgram S L, Keutmann H T *et al.* Phosphorylation of the cytosolic domain of peptidylglycine α -amidating monooxygenase. *J Biol Chem*, 1995, **270** (50): 30075~ 30083
- 19 Ouafik L H, Stoffers D A, Campbell T A *et al.* The multifunctional peptidylglycine α -amidating monooxygenase gene: exon/intron organization of catalytic, processing and routing domains. *Mol Endocrinol*, 1992, **6** (10): 1571~ 1584
- 20 Seva C, Dickinson C J, Yamada T. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin. *Science*, 1994, **265** (5170): 410~ 412
- 21 Todisco A, Takeuchi Y, Seva C *et al.* Somatostatin inhibits AP-1 function via multiple protein phosphatases. *Am J Physiol*, 1995, **269** (1 Pt1): G160~ G166

Progress in Peptide α -Amidation. JIANG Zhi-hong, LI Bo-liang (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract α -Amidation is a critical post-translational processing of many bioactive peptides in the nervous and endocrine systems. PAM, a bifunctional enzyme, with two catalytic domains PHM and PAL, catalyzes the sequential two-

step conversion of glycine-extended peptides into COOH-terminal amidated peptides. Alternative splicing and tissue specific processing generate multiple forms of PAM. As a rate-limiting enzyme in biosynthetic pathway of peptides, levels of PAM are tissue specific and under the regulation of hormones and developmental cues.

Key words amidating peptides, amidating enzyme, bifunctional enzyme

X 射线衍射法在研究蛋白质动态过程中的应用

袁于人

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031)

夏宗芴

(中国科学院上海有机化学研究所, 上海 200032)

摘要 介绍了 X 射线衍射技术在研究蛋白质动态过程中的应用. 首先介绍了用常规 X 射线衍射法和劳埃 X 射线衍射法等数据采样法研究反应时间为几分钟的蛋白质催化反应. 然后介绍了通过选择不匹配底物, 不适宜酸度, 选择温度和酸度的跳跃, 金属和光化学瞬时激发达到反应的同步来研究反应时间为几秒钟的蛋白质催化反应.

关键词 蛋白质, 动态过程, X 射线衍射法, 同步反应

学科分类号 0721 Q51

1 蛋白质的动态过程

蛋白质是一个动态系统, 其动力学特点可以分为以下三类: 个别原子在平衡点位置的波动, 键与非键的统计学上的振动和配体诱导的蛋白质构象的改变. 前面两类是在平衡位置附近的波幅很小的变动, 这些构象上的改变, 其时间频率为每次 $10^{-13} \sim 10^{-9}$ s, 可以用波谱技术和分子动力学计算的方法来研究. 配体诱导的蛋白质构象变化的研究就比较困难, 分子动力学模拟技术只能研究在 10^{-15} s 发生的反应, 而配体诱导的蛋白质构象变化在 $10^{-6} \sim 10^0$ s 内发生, 况且, 这些构象变化的幅度如此之大, 已跨越了相对比较大的能量壁垒. 用波谱的方法不能对这些变化作比较细致的研究, 所得信息微乎其微.

X 射线衍射结晶学被认为是研究这些构象变化的最理想的选择, 因为 X 射线衍射法能达到的分辨率可达单个原子的水平, 另外, 它可以很清楚地描述配体存在与否对蛋白质的影响. 事实上, 对于一些特定的蛋白质, 如变构蛋白酶, X 射线衍射法被认为是非常有效的方法^[1].

对于大多数蛋白质来说, 由于底物的诱导, 必然引起构象向能态有利的构象改变, 从而催化底物的反应. 因此, 研究蛋白质的催化机理同研究反应的化学变化一样重要. 实际上, 许多蛋白质都具有相似的化学性质, 但不能催化相同的化学反应. 这就需要在研究蛋白质的催化反应中, 注意研究蛋白质的构象变化.

收稿日期: 1996-11-12, 修回日期: 1997-04-20