

- ble contribution to neurotoxicity mediated by calcium channel antagonists. *Brain Res*, 1992, **587** (2): 233~ 240
- 10 Loo D T, Copani A, Pike C J *et al.* Apoptosis is induced by  $\beta$ -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (17): 7951~ 7955
- 11 Gschwind M, Huber G. Apoptotic cell death induced by  $\beta$ -amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J Neurochem*, 1995, **65** (1): 292~ 300
- 12 Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Meth*, 1989, **119** (2): 203~ 210
- 13 Benowitz L I, Perrone-Bizzozero N I, Neve R L *et al.* GAP-43 as a marker for structural plasticity in the mature CNS. *Prog Brain Res*, 1990, **86**: 309~ 320
- 14 Keilhoff G, Wolf G. Comparison of double fluorescence staining and LDH-test for monitoring cell viability *in vitro*. *Neuroreport*, 1993, **5**: 129~ 132
- 15 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selection procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem*, 1994, **218** (2): 314~ 319
- 16 Rosl F. A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (19): 5243 ~ 5244
- 17 Huang P, Plunkett W. A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells. *Anal Biochem*, 1992, **207** (1): 163~ 167
- 18 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-sasson S A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear

- DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992, **119** (3): 493~ 501
- 19 Huschtscha L I, Jeitner T M, Andersson C E *et al.* Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cell by flow cytometry. *Exp Cell Res*, 1994, **212**: 161~ 165

***In Vitro* Models of Neuronal Apoptosis and the Detective Methods.** ZHANG Ning-yuan, ZHU Li, GAO Jing (*School of Medicine Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

**Abstract** Recently, attention has been focused on the association between neuronal apoptosis and neurodegenerative diseases during the deep-going study of apoptotic cells. Many *in vitro* models of neuronal apoptosis have been developed, such as induced by nutrition deprivation, free radicals, glutamic acid,  $Ca^{2+}$ ,  $\beta$ -amyloid peptide etc. The detective technology of neuronal apoptosis is composed of testing the changes in enzymes and proteins which reflected neuronal damage, simultaneous morphological observation, and finally DNA electrophoresis etc, which could confirm the apoptosis.

**Key words** cultured neurons, apoptosis, *in vitro* model, detection

## 蛋白酶体结构和功能研究进展

彭睿 秦浚川

(南京大学生物化学系, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

宋晓龄

(美国 Texas 大学西南医学中心)

**摘要** 蛋白酶体是真核细胞内依赖 ATP 的蛋白质水解途径的重要成分, 负责大多数细胞内蛋白质的降解. 20 S 蛋白酶体有多种肽酶活性, 其活性位点为 Thr. 19 S 复合物与 20 S 蛋白酶体结合成为 26 S 复合物, 能降解泛素化蛋白. 近几年来, 蛋白酶体的分子组成、亚基、生化机理、胞内功能等方面的研究取得了明显进展.

**关键词** 蛋白酶体, 结构, 功能, 蛋白酶体活化因子

**学科分类号** Q71

蛋白酶体是一个 700 ku 的多亚基蛋白酶复合体。在真核细胞中，它分布于细胞质与细胞核内，有些与内质网和细胞骨架相结合，是哺乳动物细胞中主要的中性蛋白水解酶，可占细胞蛋白质总量的 1%。在真核生物进化中，蛋白酶体高度保守，其简单形式甚至存在于古细菌和真细菌中。1979 年，Goldberg 等首先报道了在大鼠肝脏和网织红细胞中存在一种分子质量为 700 ku 的受 ATP 激活的中性蛋白酶。此后，一些在形态、功能及免疫学特征上与之相同的颗粒通过不同途径被分离出来，它们被命名为蛋白酶体 (proteasome)<sup>[1]</sup>。蛋白酶体包括两种形式：20 S (或 700 ku) 复合物和 26 S (或 2 000 ku) 复合物。26 S 复合物由 20 S 复合物与 19 S 复合物 (又称 PA700) 组成，主要负责依赖泛素的蛋白质降解途径。

蛋白酶体作为依赖 ATP 的蛋白质水解途径的重要组成成分，参与了许多由蛋白质水解调控的生理过程，包括催化许多限速酶 (如鸟氨酸脱羧酶)、转录因子 (如 IκB)、重要的调节蛋白 (如细胞周期蛋白) 的快速降解，结构异常的蛋白质的迅速消除，许多胞内蛋白和结构蛋白的组成型更新，加速病理状态下肌肉蛋白质的降解等。此外，它还在转录因子 NFκB 的激活与抗原提呈过程中起着重要作用。

### 1 蛋白酶体的结构和功能

在高等真核生物中，蛋白酶体的亚基组成比较复杂，包括至少 14 个基因的产物，可分为 α 类和 β 类。在电镜下，不同种族、不同组织来源的 20 S 蛋白酶体具有相当一致的结构：它是一个由四个圆环叠成的圆筒状颗粒，每个圆环包含 7 个亚基，依次为 α<sub>7</sub>β<sub>7</sub>β<sub>7</sub>α<sub>7</sub><sup>[2]</sup>。

X 射线分析<sup>[3]</sup>证实了古细菌中的 20 S 蛋白酶体是一个直径 11.3 nm，长 14.8 nm 的圆筒状结构，中央为贯穿整个颗粒的孔道，颗粒内部有三个大的空腔 (图 1)，中间较大的腔是水解反应发生的场所。腔的入口位于各圆环中心，这些孔很狭窄，一方面能控制蛋白质的进入，另一方面又能阻止部分水解的底物从活

性位点释放。α 与 β 亚基的三级结构非常相似，每一亚基都是由 5 个反平行 β 折叠片形成的多层结构，顶部与底部为 α 螺旋所环绕。

不论在种间或种内，α 类亚基均比 β 类亚基保守。α 亚基既可以自身装配成环，也为 β 环装配所必需，并提供了蛋白酶体活化因子 PA700 和 PA28 的结合位点。与 α 类亚基不同，β 类亚基表现出较大的序列多样性。几乎所有 β 亚基都含有一个 N 端前导序列 (N-terminal prosequence)，这个保守性不高的肽段在 20 S 的装配过程中被切除，但对引导真核生物 20 S β 亚基的正确折叠及 β 与 α 亚基的组装有重要作用<sup>[1]</sup>。

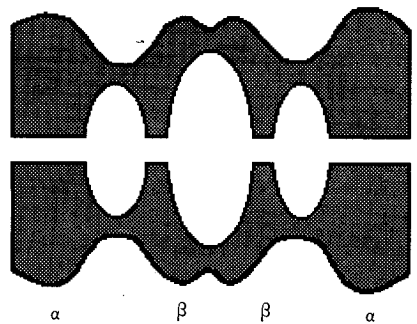


图 1 20 S 蛋白酶体结构示意图

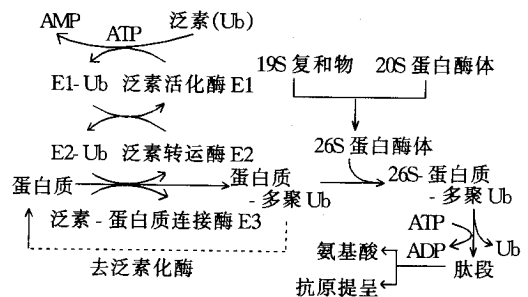


图 2 依赖泛素的蛋白质水解途径示意图

### 2 20 S 蛋白酶体的酶活性与作用机理

蛋白酶体是一种多催化活性蛋白酶，它的作用机理与其他蛋白酶不同，活性位点是 β 亚基 N 端的保守残基 Thr<sup>[4]</sup>。当 β 亚基的 N 端前导序列被切除后，这个 Thr 就被暴露出来。它模拟了丝氨酸蛋白酶的催化过渡态：β 亚基 N

端的折叠方式允许 Thr 的  $-OH$  对底物发动亲核攻击, 形成半缩醛, 这时, Thr 的  $\alpha-NH_2$  代替丝氨酸蛋白酶中 His 的咪唑基作为质子受体. 此外, 活性位点附近的一个 Lys 残基也像在特定的丝氨酸蛋白酶中一样, 起着碱催化剂的作用. 在围成中央大腔的 14 个  $\beta$  亚基上各有一个活性位点, 虽然各亚基的活性位点都是 Thr 残基, 但是不同的  $\beta$  亚基其催化活性各不相同, 因此蛋白酶体具有多种水解活性.

已发现 20 S 蛋白酶体有三种明显的酶活性: a. 类似胰凝乳蛋白酶 (chymotryptic-like) 的活性, 在大的疏水性氨基酸残基后水解肽键; b. 类似胰蛋白酶的 (tryptic-like) 活性, 在碱性氨基酸残基后水解肽键; c. 谷氨酰后水解活性 (postglutamyl hydrolase), 在酸性氨基酸残基后水解肽键<sup>[5]</sup>. 当加入 3, 4-二氟异香豆素 (DCI) 时, 这三种活性受到抑制, 另两种活性则增强了: 一种是在带分枝侧链的氨基酸残基后优先水解肽键的活性 (BrAAP 活性); 另一种是在小的中性氨基酸残基后水解肽键的活性 (SNAAP 活性). Mykles 等<sup>[6]</sup> 认为 BrAAP 活性主要负责蛋白质的降解, 而其他几种酶活性则主要负责将蛋白质片段进一步降解成小肽片段.

### 3 20 S 蛋白酶体的调节

蛋白酶体对蛋白质的降解具有高选择性, 受到精确的调节, 以避免水解扩大化引起的细胞损伤<sup>[1]</sup>. 这种调节分为三个方面: a. 20 S 自身的结构, 即中央腔内孤立的活性中心和  $\alpha$  环的狭窄入口, 只允许完全伸展或线性化的蛋白质进入并降解, 有效地减少了胞内成分的非特异性降解; b. 在真核生物中, 19 S 复合物 (PA700) 及底物泛素化保证了多肽入口的高选择性; c. 蛋白酶体自身所固有的调节性质及各种细胞抑制因子可使它维持无活力状态.

蛋白酶体有两种重要的调节因子: 活化因子 PA28 和 PA700.

PA28 又叫 11 S 调节因子, 它不影响 20 S 降解蛋白质的速率, 但可以增大与多种底物肽

的结合能力, 提高最大反应速度. 在电镜下, PA28 是一个环状颗粒, 无 ATP 存在时即可与 20 S 结合, 形成 PA28-20 S 复合物. PA28 由两种亚基组成: PA28 $\alpha$  和 PA28 $\beta$ , 最新研究认为它是 PA28 $\alpha$  和 PA28 $\beta$  相间排列形成的六聚体. PA28 $\alpha$  亚基 C 端的 Tyr 对其活性影响巨大. 在  $\alpha$  链中部有一个独特的 “KEKE” motif, 可能是  $Ca^{2+}$  结合位点, 与 PA28 对 20S 的活化有关<sup>[2]</sup>.

PA700 又称 19 S 复合物, 在 ATP 存在下, 它与 20 S 紧密结合, 形成所谓的 26 S 复合物 (26 S 蛋白酶体), 表现出很强的蛋白水解活性, 能降解泛素化的蛋白质. 在电镜下, 26 S 复合物呈现旋转对称的哑铃状结构, PA700 (包括一个大的粗糙的 V 形 “口袋”, 可能是底物入口) 结合在 20 S 两端. PA700 也可只与 20 S 的一端结合形成不对称的 “蘑菇状” 复合物.

PA700 是一个较大的复合物, 由至少 18 个蛋白质组成. 这些不同的亚基功能各异, 包含多种 ATP 酶及结合蛋白底物所必需的成分, 在泛素化蛋白质的选择性降解中起着重要作用.

近年发现了 26 S 蛋白酶体重要的部分水解功能<sup>[7]</sup>: a. 26 S 蛋白酶体可以切割大分子无活性蛋白前体, 使之转变为活性形式. 例如转录因子 NF $\kappa$ B 的一个亚基 P50, 它的前体 P105 蛋白 C 端部分被 26 S 蛋白酶体降解后, 残余的 N 端部分即成为有活性的 P50; b. 在抗原提呈过程中, 抗原分子被蛋白酶体降解为小的肽段, 而后转运到内质网上与 MHC I 型分子结合.  $\gamma$ -IFN 能诱导这一功能的出现. 这也许是  $\gamma$ -IFN 能有效提高机体免疫监督能力的原因.

蛋白酶体与许多生理功能有着密切联系, 它的结构与功能的阐明将有助于今后的研究.

### 参 考 文 献

- 1 Coux O, Tanaka K, Goldberg A L. Structure and functions of the 20 S and 26 S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 801~ 847

- 2 Xiaoling S, Joni D M, Jan von K *et al.* A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA28. *J Biol Chem*, 1996, **271** (42): 26410~26417
- 3 Löwe J, Stock D, Jap B *et al.* Crystal structure of the 20 S proteasome. *Science*, 1995, **268** (5210): 533~539
- 4 Seemuller E, Lupas A, Stock D *et al.* Proteasome from thermoplasma acidophilum: a threonine protease. *Science*, 1995, **268** (5210): 579~582
- 5 Rivett A J. The multicatalytic proteinase. *J Biol Chem*, 1989, **264** (21): 12215~12219
- 6 Mykles D L, Haire M F. Branched-chain-amino-acid-prefering peptidase activity of the lobster mul-ticatalytic proteinase (proteasome) and the degradation of myofibrillar proteins. *Biochem J*, 1995, **306** (1): 285~291
- 7 Palombella V J, Rando O J, Goldberg A L *et al.* The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell*, 1994, **78** (5): 773~785

**Recent Advances in the Structure and Functions of the Proteasome.** PENG Rui, QIN Jun-chuan (*Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093,*

China); SONG Xiao-ling (*The University of Texas, Southwestern Medical Center, USA*).  
**Abstract** The proteasome is an essential component of the ATP-dependent proteolytic pathway in eukaryotic cells and is responsible for the degradation of most cellular proteins. The 20 S proteasome whose active site is a threonine, contains multiple peptidase activities. PA700 capps the 20 S proteasome to form the 26 S complex, by which ubiquitinated proteins are degraded. Advances have been achieved recently in the research about the molecular organization of the 20 S and 26 S particles, their subunits, their intracellular functions and biochemical mechanisms.

**Key words** proteasome, structure, function, activators of proteasome

## 头孢菌素酰化酶\*

李勇 王恩多

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

**摘要** 7-氨基头孢烷酸 (7-amino cephalosporanic acid, 7-ACA) 是医药工业合成大多数头孢菌素的重要原料。头孢菌素酰化酶 (cephalosporin acylase, CA) 催化头孢菌素 C (CPC) 和戊二酰-7-氨基头孢烷酸 (GL-7ACA) 的水解反应, 生成 7-ACA。根据 CA 催化底物的不同, 可将其划分为两类: CPC 酰化酶和 GL-7ACA 酰化酶。由 CA 的同源性、分子质量大小和基因结构, 可以把头孢菌素酰化酶划分为五种; 讨论了酶的基本性质。通过 CA 与 N 端亲核水解酶 (Ntn 水解酶) 的比较, 推测 CA 属于 Ntn 水解酶, 并由此可以进一步理解它们的生理功能。

**关键词** 头孢菌素酰化酶, 7-氨基头孢烷酸, N 端亲核水解酶

**学科分类号** Q556

7-氨基头孢烷酸 (7-amino cephalosporanic acid, 7-ACA) 是医药工业合成大多数头孢菌素的起始原料。7-ACA 可以通过发酵产物头孢菌素 C (cephalosporin C, CPC) 化学脱氨酰化得到。由于化学方法诸如亚胺醚和亚硝酰氯法需经多个造价昂贵和有害环境的步骤, 所以人

们一直试图探索用酶法解决问题<sup>[1]</sup>。目前已经发现两类头孢菌素酰化酶 (cephalosporin acylase, CA), 分别为戊二酰-7-氨基头孢烷酸酰化酶 (glutaryl 7-ACA acylase, GL-7ACA 酰化

\* 国家“863”计划资助项目。

收稿日期: 1997-03-27, 修回日期: 1997-09-05