

- 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- κ B₁ precursor protein and the activation of NF- κ 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^[1]。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

酶)和头孢菌素 C 酰化酶 (cephalosporin C acylase, CPC 酰化酶), 它们分别催化 GL-7ACA 和 CPC 的水解反应, 又因为 CPC 可以在 D-氨基酸氧化酶 (D-AAO) 催化下很容易地生成 GL-7ACA^[2], 所以 GL-7ACA 酰化酶和 CPC 酰化酶一样, 在酶法合成 7-ACA 上具有重要的应用价值 (图 1)。

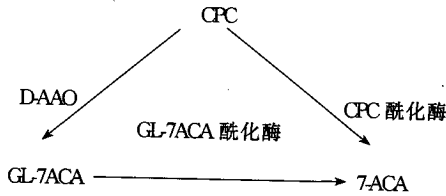


图 1 GL-7ACA 酰化酶和 CPC 酰化酶所催化的反应

1 头孢菌素酰化酶的种类

根据已有的报道, 现已有 10 个头孢菌素酰化酶的基因被克隆 (表 1)。由它们的基因结构、同源性、分子质量大小, 我们把头孢菌素酰化酶划定为五种。同一种酶的基因都有 95% 的同源性, 且酶学性质几乎完全相同。

头孢菌素酰化酶的开放阅读框并非都像大肠杆菌青霉素酰化酶的那样, 由前导肽、 α 亚基、连接肽、 β 亚基四部分组成^[11]。第 I 种由前导肽、 α 亚基、连接肽、 β 亚基组成; 第 II 种没有前导肽, 且 α 亚基比 β 亚基大; 第 II 种和第 III 种是否有连接肽尚不清楚; 第 IV 种既没有前导肽, 也没有连接肽; 第 V 种最为特殊, 仅由单肽链组成。

表 1 GL-7ACA 酰化酶和 CPC 酰化酶

编号	前体	前导肽	α 亚基	连接肽	β 亚基	菌株	文献
I	70	29aa	16	nd	54	<i>Pseudomonas sp.</i> GK16	[3]
	70	nd	16	nd	54	<i>Pseudomonas sp.</i> 130	[4]
	70	27aa	16	8aa	54	<i>Pseudomonas sp.</i> C427	[5]
II	64	—	40	nd	22	<i>Pseudomonas sp.</i> SE83 [Acy I]	[6, 7]
	64	—	40	nd	22	<i>Pseudomonas sp.</i> V22	[8]
III	89	29aa	28	nd	61	<i>Pseudomonas sp.</i> A14	[9]
IV	80	—	22	nd	58	<i>Pseudomonas sp.</i> SE83 [Acy II]	[6, 7]
	80	—	22	—	58	<i>Pseudomonas diminuta</i> N176	[9]
	80	—	22	nd	58	<i>Pseudomonas diminuta</i> V22	[9]
V	70	27aa		70		<i>Bacillus laterosporus</i> J1	[10]

注: 前体、 α 亚基、 β 亚基的分子质量用 ku 表示; 前导肽、连接肽大小用数字加氨基酸 (aa) 表示; “nd” 表示尚不清楚; “—” 表示无; 同一种的不同基因用菌株的编号表示, 如 GK16 酰化酶基因、SE83 [Acy I] 酰化酶基因。

2 基本酶学性质

第 I 种酶中 GK16 酰化酶基因最先被克隆, 并且已经申请了专利^[12]。这种酶最引人注目的特点是在很宽的 pH 值范围内 (pH 6.5~9.0) 对 GL-7ACA 都有很高的水解活力; 这一点在工业生产上是十分有利的, 因为 GL-7ACA 水解过程中生成戊二酸, 反应液的 pH 值变化很大。

第 II 种酶最显著的特点是具有 γ -谷氨酰转氨酶 (GGT) 活力, 其氨基酸序列与大肠杆菌和假单胞菌的 GGT 具有 30% 以上的同源性^[8]。它水解 GL-7ACA 和 L- γ -glutamyl-p-nitroanilide (GlupNA) 的 K_m 值分别为 6.1 mmol/L 和 3.8 mmol/L, 从这个意义上讲, 此酶也可以称为 γ -谷氨酰转氨酶。

第 III 种酶目前只有一个酶的基因被克隆, 该酶的 pI 值比其他四种都高。

第IV种酶与其他四种不同, 它们既可以水解 GL-7ACA, 又可以水解 CPC. N176 酶经 Ishii 等^[13] 蛋白质工程改造, 水解 GL-7ACA 的活力已达 100 U/mg, 水解 CPC 的活力也提高了 1.5 倍. 第 269 位氨基酸 Met 变为 Tyr 的变种酶已经成为由 CPC 一步酶法生产 7-ACA 的最佳候选者. 但此种酶的一个缺点是仅在 pH9 时活力最高, pH 值升高或降低, 酶活力都会急剧下降.

第 V 种酶仅由单亚基组成, 它的发现改变

了先前的普遍看法, 即认为头孢菌素酰化酶象革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的青霉素酰化酶那样, 都是由两个不同的亚基组成. Aramori 等^[10] 认为该酶与具有两个相同的亚基的氨苄青霉素酰化酶 (来源于 *Pseudomonas melanogenum*) 和 α -氨基酸水解酶 (来源于 *Xanthomonascitris*) 可能有某种联系, 但后两个酶的基因序列还不清楚, 因此无法比较其同源性. 上述五种酶的基本酶学性质总结在表 2 内.

表 2 头孢菌素酰化酶的基本酶学性质

编号	K_m (GL-7ACA)	K_m (CPC)	K_m (GlupNA)	pI	最适 pH	宽范围 pH	最适温度 ($^{\circ}C$)	热稳定
I	0.46	—	—	3.5	8.7	+	37	+
II	6.1	—	3.8	4.6	9	—	nd	nd
III	2.1	—	—	> 6.5	9~10	—	48	+
IV	2.6	4.8	—	4.5	9	—	45~50	+
V	3.2	—	—	4.7	8	—	40	+

注: K_m 的单位为 mmol/L, 由于 K_m 并非相同条件下测得, 所以仅供参考; “—” 表示没有此活力或不具有此特性; “nd” 表示不清楚. 热稳定指在 37 $^{\circ}C$ 下 30 min 内酶活力丧失小于 20%.

3 N 端亲核水解酶族

Brannigan 等^[14] 根据青霉素酰化酶 (PA)、蛋白体 (proteasome, PRO)、谷氨酰胺磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶 (glutamine PRPP amidotransferase, GAT) 的 X 射线晶体结构, 提出了 N 端亲核水解酶 (N-terminal nucleophile hydrolase, Ntn hydrolase) 的概念,

这三个酰胺酶在催化过程中均用 N 端残基的侧链亲核进攻底物的碳原子, N 端残基分别为丝氨酸 (Ser), 苏氨酸 (Thr) 和半胱氨酸 (Cys). Brannigan 等还认为 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT)、天冬氨基葡萄糖基氨基酶 (aspartyl-glycosylaminase, AGA) 也属于 Ntn 水解酶. 表 3 给出了我们总结的一些 Ntn 水解酶及其与头孢菌素酰化酶的比较.

表 3 N 端亲核水解酶

亲核残基	酶	N 端序列	来源	文献
Ser	PA	SNMWVIG	<i>E. coli</i>	[11]
	CA I	SNSWAVA	<i>Pseudomonas</i>	[3~5]
	CA III	SNNWVIS	<i>Pseudomonas</i>	[9]
	CA IV	SNNWAVA	<i>Pseudomonas</i>	[6, 7, 9]
Thr	PRO	TTTVGIT	<i>Archaeon T.</i>	[15]
	AGA	TIGMVVI	人类白细胞	[16]
	GGT	TTHYSIV	<i>E. coli</i>	[17]
	CA II	TTHVTVA	<i>Pseudomonas</i>	[6~8]
Cys	GAT	CGVFGCI	人类	[18]

注: 表中对于 PA、PRO、AGA、GGT 和 GAT 仅列出一个物种的序列; 其他物种的序列请参阅文献 [11, 15~19] 及其中的文献.

由于头孢菌素酰化酶属于 PA 酶类, 具有 PA 活力, 其 β 亚基的 N 端有 Ntn 水解酶族的特点. 从表 3 可以看出, PA 与 I、III、IV 种 CA 在 β 亚基的 N 端为 Ser 残基; 而 II 种 CA 与 PRO、AGA、GGT 具有相同的 Thr 残基 (表 3), II 类 CA 具有 GGT 活力, 从而更加紧密地把 PA (CA) 和 GGT 联系起来; V 种 CA 虽然仅有单肽链组成, 但酶分子从 153 位氨基酸开始的序列为: 153 SNPAEEV, 与 PA 和 I、III、IV 种 CA 的 β 亚基 N 端具有较强的同源性, 可能也属于 Ntn 水解酶族.

由于 Ntn 水解酶族的发现, 使得我们可以从进化角度来考虑头孢菌素酰化酶在生物体内的功能问题. PA 酶类的研究者一直认为 PA 降解苯乙酰化合物而生成苯乙酸, 从而推测 PA 在体内的功能是促进芳香类化合物的降解, 为细胞提供碳源. GAT 的研究者发现 GAT 不仅可以以谷氨酰胺作为氮源, 而且可以以 NH_3 作为氮源^[19]. 我们认为 Ntn 水解酶族在进化早期的生理功能主要是为机体提供碳源或氮源, 逐渐进化有其他高级功能: 如至今仍没有发现 PA 和 CA 的其他生理功能, 它们只存在于低级生物 (大肠杆菌、假单胞菌、侧单胞菌和酵母等) 中; 而 PRO、AGA、GGT 和 GAT 则分别具有较高级的功能, 并存在于从原核生物到高等生物乃至人体中. 如 PRO 和 AGA 被广泛认为是溶酶体和蛋白体中降解蛋白质的关键酶^[15, 16]; GAT 则执行十多种催化和调节功能, 其中包括嘌呤生物合成的别构调节^[19]; GGT 的生理功能还有争议, 但它可以把谷氨酰胺转移到许多分子上^[17], 这种催化作用可能在体内具有重要意义.

参 考 文 献

- Vandamme E J, Voets J P. Microbial penicillin acylase. *Adv Appl Microbiol*, 1974, **17**: 311~ 369
- Isogai T, Ono H, Ishitani Y *et al.* Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*. *J Biochem*, 1990, **108** (6): 1063~ 1069
- Matsuda A, Komatsu K I. Molecular cloning and structure of the gene for 7 β - (4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase from a *Pseudomonas* strain. *J Bacteriol*, 1985, **163** (3): 1222~ 1228
- Yang Y, Yun D, Guan Y *et al.* Cloning of GL-7-ACA acylase gene from *pseudomonas* sp. 130 and its expression in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 1991, **7** (2): 99~ 107
- Ishii Y, Saito Y, Fujimura T *et al.* A novel 7 β - (4-carboxybutanamido) -cephalosporanic acid acylase isolated from *Pseudomonas* strain C427 and its high-level production in *Escherichia coli*. *J Ferment Bioeng*, 1994, **77** (6): 591~ 597
- Matsuda A, Matsuyama K, Yamamoto K *et al.* Cloning and characterization of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J Bacteriol*, 1987, **169** (12): 5815~ 5820
- Matsuda A, Toma K, Komatsu K. Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J Bacteriol*, 1987, **169** (12): 5821~ 5826
- Ishiy M, Niwa M. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the cephalosporin acylase gene of a *Pseudomonas* strain. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1132** (3): 233~ 239
- Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M *et al.* Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strain. *J Ferment bioeng*, 1991, **72** (4): 232~ 243
- Aramori I, Fukagawa M, Tsumura M *et al.* Cloning and nucleotide sequencing of a novel 7 β - (4-carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase gene of *Bacillus laterosporus* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1991, **173** (24): 7848~ 7855
- Schumacher G, Sizmman D, Haug H *et al.* Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation. *Nucl Acids Res*, 1986, **14** (14): 5713~ 5727
- Tsuzuki K, Komatsu K-I, Ichikawa S *et al.* Enzymatic synthesis of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). *Nippon Nougai Kagaku Kaishi* (in Japanese), 1989, **63**: 1847~ 1853
- Ishii Y, Saito Y, Fujimura T *et al.* High-level production, chemical modification and site-directed mutagenesis of a cephalosporin C acylase from *Pseudomonas* strain N176. *Eur J Biochem*, 1995, **230** (2): 773~ 778
- Brannigan J, Dodson G, Duggleby H *et al.* A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, 1995, **378** (6555): 416~ 419
- Lowe J, Stock D, Bing J *et al.* Crystal structure of the 20S proteasome from the Archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 1995, **268** (5210): 533~ 539
- Kaartinen V, Williams J C, Tomich J *et al.* Glycosyltransferase from human leukocytes: inactivation and covalent modification with diazo oxonorvaline. *J Biol Chem*, 1991, **266** (9): 5860~ 5869
- Suzuki H, Kumagai H, Echigo T *et al.* DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12v-glutamyltranspeptidase gene, ggt. *J Bacteriol*, 1989, **171** (9): 5196~ 5172
- Brayton K A, Chen Z, Zhou G *et al.* Two genes for de

*nov*o purine nucleotide synthesis on human chromosome 4 are closely linked and divergently transcribed. *J Biol Chem*, 1994, **269** (7): 5313~ 5321

19 Smith J L, Zaluzec E J, Wery J-P *et al.* Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science*, 1994, **264** (5164): 1427~ 1433

Cephalosporin Acylases. LI Yong, WANG Er-duo (*State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract Cephalosporin acylases (CA) are enzymes that catalyze hydrolysis of the acyl side chain of cephalosporin C (CPC) or glutaryl 7- cephalosporanic acid (GL-7ACA) to yield 7- aminocephalosporanic acid (7-ACA), the most

important compound in the production of many semisynthetic cephalosporin antibiotics. According to their substrates, cephalosporin acylases can be classified into two classes: CPC acylase and GL-7ACA acylase. CA was divided into five types on the basis of their homologies and mass of molecules, and the structures of their genes; some properties of these enzymes were discussed. Comparison of N-terminal nucleophile hydrolases and CA shows that CA may belong to N-terminal nucleophile hydrolases family. Thus it makes easy to understand further their physiological roles.

Key words cephalosporin acylases, 7- aminocephalosporinic acid, N-terminal nucleophile hydrolases

癌症治疗的目标

——抑制端粒酶的策略*

郑晓飞 王升启 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 端粒酶与癌症密切相关, 抑制端粒酶的活性可以抑制癌细胞的生长. 反义核酸、核酶、细胞分化剂、逆转录酶抑制剂和鸟嘌呤四联体等都可以在不同程度上抑制端粒酶活性. 在癌症治疗中具有很大应用潜力.

关键词 端粒酶, 癌症, 抑制剂

学科分类号 R733

端粒是真核细胞染色体末端的重复 DNA 序列, 其生物学功能是防止染色体 DNA 降解、末端融合、非正常重组和染色体的缺失^[1]. 端粒由端粒酶合成. 近来的研究表明在 85% ~ 95% 的人肿瘤细胞中可以检测到端粒酶的活性^[2,3], 而在正常体细胞中除生殖细胞和造血干细胞等极少数细胞中存在端粒酶活性外, 均检测不到端粒酶活性, 这表明端粒酶

在维持肿瘤细胞的增殖中起着重要作用. 抑制端粒酶的活性有可能抑制肿瘤的生长, 因而端粒酶被认为是潜在的肿瘤治疗靶点. 本文针对端粒酶 RNA 组分的反义核酸抑制剂、核酶、小分子化合物抑制剂以及诱导细胞分化影响端粒酶表达的药物加以介绍.

* 中国博士后科学基金资助项目 (962004).

收稿日期: 1997-04-01, 修回日期: 1997-07-23