

中国酶学基础研究四十年回顾

王志新*

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要 20 世纪 70 年代以来, 我国学者做出了许多出色的、有关酶学的基础研究工作. 在纪念《生物化学与生物物理进展》创刊 40 周年之际, 作者选择性介绍了我国科学家在酶学领域所取得部分有代表性、系统性的研究成果.

关键词 酶, 活性部位, 动力学, 分子伴侣, 酶工程

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00278

《生物化学与生物物理进展》(下称《进展》)创刊于 1974 年, 至今已经 40 年了. 在纪念《进展》创刊 40 周年之际, 应编辑部的邀请, 我将对与之相平行的这 40 年中我国酶学基础研究的主要成果作一简略的介绍.

1 蛋白质功能基团的化学修饰与其生物活性间的定量关系

蛋白质的生物活性决定于其特定的化学结构, 蛋白质的化学结构发生改变, 可以导致蛋白质生物功能的改变. 例如, 化学修饰试剂与酶的某些必需基团发生化学反应, 有时可以造成酶活性的丧失. 在相当长的历史时期中, 化学修饰曾经是研究蛋白质结构与功能关系的唯一手段, 在蛋白质(特别是酶)的结构与功能研究中, 发挥了十分重要的作用. 20 世纪 60 年代以前, 科学家们用化学修饰方法就蛋白质结构与功能的关系做了大量研究, 积累了大量数据, 但整体上仍局限于定性描述. 主要原因是构成蛋白质的常见氨基酸有 20 种, 每种蛋白质分子又由成百上千个氨基酸组成, 而当时所使用的化学修饰剂专一性不够, 常常能和不止一类基团发生作用, 并能同时和一个蛋白质分子上多个同类基团发生作用. 因此, 在进行化学修饰实验之后, 通常无法确定究竟是哪种基团或哪几个基团上发生的修饰导致了该蛋白质的生物活性变化.

20 世纪 60 年代初期, 相继发表的两篇论文基

本解决了这一难题, 一篇是 Ray 和 Koshland^[1]发表的动力学方法, 另一篇是邹承鲁^[2]发表的基于统计学的方法. Ray 和 Koshland 的动力学方法基于对化学修饰反应和酶活性丧失反应的动力学分析, 比较两者的一级反应速度常数, 可以对活性必需基团的性质和数目作出判断. 然而, 这一方法的应用有一定局限性, 在反应很快、速度不易测定, 或反应复杂不属一级反应时都无法应用. 邹承鲁基于统计学的方法则根据对基团化学修饰程度和活性丧失程度的比较, 基本原理如下: 如果在修饰反应中同时包括 i 个必需基团, 在修饰过程中保留活性的分子只能是那些所有必需基团都未遭破坏的分子, 因此活性剩余分数应为必需基团剩余分数的 i 次方. 在此基础上, 邹承鲁根据在蛋白质化学修饰反应中常见的一些情况, 提出了必需基团修饰与酶活性丧失的定量关系式, 并由此得出一系列作图法, 用于判断必需基团的性质和个数. 其后, 邹承鲁和许根俊、周海梦等对该方法进行了一系列实验验证^[3-6]; 1991 年, 王志新^[7]用概率论的方法, 给出了邹承鲁作图法严格的理论证明. 20 世纪 70 年代以后, 邹承鲁提出的方法逐渐得到国际上广泛采用. 1979 年, Dixon 和 Webb^[8]在其著名的酶学教科书《酶》第

* 通讯联系人.

Tel: 010-62785505, E-mail: zhixinwang@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2014-09-30, 接受日期: 2014-10-08

三版中, 详细介绍了邹承鲁的方法, 并将这一方法称为“邹氏作图法”。1980年, 英国著名酶动力学专家 Cornish-Bowden 在其专著《酶动力学基础》一书中, 也专门介绍了邹氏作图法, 并且在2012年该书的第四版中依然保留了这一内容, 并对邹承鲁做了一个简短的介绍: “他在《中国科学》上发表的论文是一个范例——一个不能与外界交流的科研工作者是如何在资源匮乏的条件下, 运用自己的聪明才智取得成就”^[9]。1987年, 邹承鲁、许根俊、孙玉琨、杜雨苍、赵康源、周海梦合作完成的“蛋白质功能基团的修饰及其生物活性之间的定量关系”研究荣获国家自然科学奖一等奖。

2 酶活性不可逆改变的动力学理论研究

酶活性抑制动力学的研究不仅对于阐明酶的作用机制、代谢途径的调节等生命科学的基础理论问题, 而且在应用领域, 如药理毒理学方面都具有重要意义, 但大多数教科书中介绍的都是可逆抑制动力学, 而对于不可逆抑制动力学则很少提及。1965年, 邹承鲁^[10-11]首先对单底物酶的不可逆抑制动力学进行了系统的理论研究, 提出了底物和抑制剂竞争的概念不但适用于可逆抑制动力学, 而且也可用于不可逆抑制动力学, 并且建立了定量的判据来区别不可逆抑制剂的类型。根据邹承鲁导出的抑制剂存在下的底物反应动力学方程, 仅由一次实验即可得到酶活性不可逆抑制的表观动力学常数。由于该理论是以中文在《生物化学与生物物理学报》上发表, 加之其他种种因素的影响, 论文发表后并未引起国内外同行的重视。“文化大革命”结束后, 邹承鲁开始了对该动力学理论的实验验证工作。1982年, 邹承鲁和他的研究生田维熙首次将这一理论的实验验证结果发表在美国的 *Biochemistry* 杂志上, 很快就引起了国外同行的重视^[12]。迄今为止, 该论文已经被引用了几百次, 该理论也被广泛地应用于酶作用机制的研究。20世纪80、90年代, 邹承鲁领导的研究组对酶活性不可逆抑制动力学的理论和实验进行了深入研究, 包括双底物酶反应系统的不可逆抑制动力学、乙酰胆碱脂酶的不可逆抑制及其重活化动力学、胰蛋白酶不可逆和慢可逆抑制动力学、变性剂对酶的失活和复活动力学的影响等^[13-29]。近年来, 国内一些研究组还把这一方法推广到酶原激活、酶的磷酸化和去磷酸化以及慢紧密结合抑制剂筛选的研究中^[30-36]。经过邹承鲁研究组以及国内外同行的共同努力, 酶活性不可逆抑制动力学已经形

成了一个完整的理论体系。在近年来出版的许多酶学教科书中, 都开始以较大的篇幅介绍这一理论成果。

3 酶活性部位的柔性

作为一种重要的生物大分子, 酶最大的特点是具有催化活性, 参与各种生理过程中的生化反应, 因此对酶作用机制的研究具有非常重要的理论意义和应用价值。酶通常以蛋白质为基元(核酶除外), 而蛋白质大都具有特定三维结构, 该空间结构中结合底物并发挥催化活性的部位就是酶的活性部位。对酶活性部位的柔性研究始于20世纪80年代初期, 有关研究工作最初的设想是通过比较在变性过程中酶分子的空间结构和催化活性的变化, 探讨酶的结构和功能之间的关系^[37]。此后10多年的研究结果显示, 在较低浓度的变性剂作用下, 很多酶分子的整体结构并无明显变化, 但已丧失了生物活性, 而酶分子发生整体结构变化所需的变性剂浓度通常更高。也就是说, 酶分子活性的丧失早于其空间结构的去折叠, 即酶分子活性部位的结构变化早于分子整体的结构变化。在此基础上, 邹承鲁等^[38-40]率先提出了“酶活性部位的柔性”假说, 认为酶分子活性部位的结构与其整体结构相比具有更大的柔性。大量的研究显示, 酶活性部位虽然具有特定的结构, 但也必须具备一定的柔性, 才能充分发挥其催化活性。蛋白质的特定空间结构可以为酶活性部位关键氨基酸残基提供支持, 使这些残基具有特定的空间位置、分布和排列。此外, 由于蛋白质本身并非一成不变, 具有一定可运动性, 为酶活性部位具有柔性提供了良好的结构基础^[41]。最近, 赫荣乔等^[48]发现, 能够与多种底物反应的蚯蚓蛋白酶和枯草杆菌酶, 在与其底物作用时, 底物诱导形成的适合底物结合的酶构象具有相对稳定性, 从而降低了这些酶对其他底物的识别和反应速度。

4 分子伴侣和折叠酶

20世纪80年代后期, 英国华威大学的 John Ellis 教授拓展了“分子伴侣”这一概念, 将能够辅助大分子复合物在翻译后正确组装的一些蛋白质统称为分子伴侣, 使人们对蛋白质折叠的认识发生了巨大转变。生物体内还有一类通过催化特定异构反应而辅助蛋白质正确折叠的酶, 称为折叠酶。当时, 折叠酶和分子伴侣被认为是两种机制不同的帮助蛋白。1994年, 邹承鲁和王志珍^[49]在研究蛋白

质二硫键异构酶催化胰岛素的 A、B 链生成天然胰岛素的基础上, 率先提出了“蛋白质二硫键异构酶既是酶也是分子伴侣”的假说. 由于二硫键的形成与肽链的折叠是两个密切关联又互相影响的过程, 要证明 PDI 固有的分子伴侣活性, 首先必需把它与其二硫键异构酶活力区分开来. 为此王志珍等^[50]选用了不含二硫键的蛋白作为靶蛋白, 研究了 PDI 对盐酸胍完全变性的靶蛋白复性过程和复性效率的影响, 首次用实验验证了 PDI 的确具有与其二硫键异构酶活力相独立的、固有的分子伴侣功能. 王志珍等^[51-60]还采用化学修饰的方法, 制备了丧失二硫键异构酶活力的 PDI, 通过对含有二硫键的“生理靶蛋白”的研究, 巧妙地区分了蛋白质二硫键异构酶的分子伴侣和二硫键异构酶两种活性, 最终得到“蛋白质二硫键异构酶的折叠酶活性是由异构酶和分子伴侣两种活性共同组成的, 只有两种活性的协同作用才使它发挥折叠酶的作用, 帮助肽链折叠和催化二硫键形成”的结论. John Ellis^[61]在 1997 年发表的综述中把蛋白质二硫键异构酶列入了分子伴侣的名单. 蛋白质二硫键异构酶具有分子伴侣活性已为国际同行所接受, 王志珍组在 20 世纪 90 年代发表的几篇为蛋白质二硫键异构酶的分子伴侣活性奠定基础的论文至今依然被国内外同行引用. 近年来, 蛋白质二硫键异构酶作为分子伴侣在许多的生理和病理过程中发挥重要作用, 如内质网中以 PDI 和它的氧化酶 Ero1 为核心的蛋白质氧化折叠网络, Erp44 等 PDI 家族蛋白及过氧化酶 Prx4、Gpx7/8 等在蛋白质平衡与糖尿病、衰老等生命活动密切相关.

5 糖代谢关键酶的研究

果糖 -1, 6- 二磷酸酯酶是糖代谢过程中的关键酶. 自 20 世纪 80 年代, 许根俊领导的研究小组对果糖 -1, 6- 二磷酸酯酶的动力学、作用机制、别构调节机理和构象的动态变化与活性的关系进行了系统的研究, 发现了该酶在逆反应中存在磷酸化的中间物, 说明该酶的催化机制遵循乒乓机制; 通过动力学研究, 提出了能合理解释所有动力学数据的酶双循环催化机制; 发现了别构部位和催化部位信息传递的分子基础, 提出了在天然状态下, 该酶的活性部位是不完善的观点; 发现了 AMP 对酶活性的双重调节, 即在碱性 pH 时的激活作用和中性 pH 时的抑制作用. 此外, 许根俊等^[62-64]还克隆了蛇肌果糖 -1, 6- 二磷酸酯酶的基因, 并解析了该酶的晶

体结构, 研究了其结构和功能的关系、催化机制及调节机制. 这是当时国内对一个多亚基酶进行的最为系统、完整的研究.

20 世纪 80 年代初发现的集两个酶活性于一体的双功能酶——6- 磷酸果糖 -2- 激酶 / 果糖 -2, 6- 二磷酸酯酶. 果糖 -6- 磷酸和果糖 -1, 6- 二磷酸之间反应在糖代谢中起重要作用, 和 II 型糖尿病的治疗有关. 反应的底物有一个循环变化的过程, 被称为底物循环. 果糖 -2, 6- 二磷酸是这个循环的重要调节物, 它的合成与分解依赖果糖 -6- 磷酸 -2- 激酶 / 果糖 -2, 6- 二磷酸酯酶的调控. 许根俊等^[65-68]通过动力学和位点定向诱变的方法对不同种系的果糖 -6- 磷酸 -2- 激酶 / 果糖 -2, 6- 二磷酸酯酶进行了结构与功能研究, 发现了该酶在催化过程中有一个非必需的活化基团在起作用, 确定了精氨酸是底物结合的必需基团, 镁离子有调节作用, 以及两个催化过程都遵循双底物双产物有序机制.

许根俊和李林等发现, 6- 磷酸果糖 -2- 激酶 / 果糖 -2, 6- 二磷酸酯酶的磷酸化与去磷酸化的形式分别表现出磷酸酯酶和激酶的活性, 在酶学研究中尚属首次. 该酶存在多种同工酶形式, 其中肝脏型和心肌型酶存在一个磷酸化位点, 属于一个磷酸化部位调节多个功能部位的模式, 而且两种形式酶由于磷酸化位点分别位于 N 端和 C 端, 调节性质截然相反. 李林等对该双功能酶的催化、调节机理进行了一系列研究, 发现 C 端 25 个残基对酯酶活性有显著的抑制效应, 并阐明了该 C 端肽段在两个结构域(N 端激酶结构域和 C 端酯酶结构域)相互作用关系中的重要功能; 通过定点突变与配基结合实验, 揭示了鸡肝双功能酶中的激酶的 ATP 激活机制或 ATP 结合的负协同机制及其结构基础^[69-71].

6 氨基酰-tRNA 合成酶及其与相关 tRNA 相互作用的研究

在蛋白质生物合成过程中, 涉及到许多不同的蛋白质、核酸大分子之间的相互作用, 其中氨基酰 -tRNA 合成酶与相关 tRNA 之间的精确识别和相互作用, 是蛋白质合成过程的第一步, 也是最重要的一步. 氨基酰 -tRNA 合成酶催化产物氨基酰 -tRNA 是蛋白质合成的原料, 涉及到由 mRNA 翻译为蛋白质的忠实性, 对合成的蛋白质进行质量控制. 1984 年, 王应睐等^[72]以大肠杆菌亮氨酰 -tRNA 合成酶和精氨酰 -tRNA 合成酶为靶标, 开始了“酶与核酸相互作用”研究. 王应睐和王恩多系统

地研究了精氨酰-tRNA合成酶的酶动力学性质, 重要氨基酸残基对该酶功能的影响, 以及酵母与大肠杆菌精氨酰-tRNA合成酶对tRNA^{Arg}的交叉识别和结晶的菌本参数. 他们还首次报道大肠杆菌亮氨酰-tRNA合成酶的CP1结构域为酶编校结构域, 鉴定了与编校功能有关的关键氨基酸残基, 阐明了该酶删除错误的氨酰-tRNA的编校机制^[73-74].

2000年以来, 王恩多领导的研究组^[75-84]对其他来源的氨酰-tRNA合成酶与tRNA的相互作用进行了深入研究, 取得了一系列重要发现, 包括: a. 发现tRNA^{Leu}高级结构“拐角”区域D环和TΨC环间的三级碱基对相互识别的重要作用, 而tRNA^{Leu}的3' CCA端在亮氨酰-tRNA合成酶分子内的摆动平衡酶的氨酰化和编校活力; b. 研究了来自嗜嗜热菌(*Aquifex aeolicus*)唯一的异源二聚体αβ亮氨酰-tRNA合成酶, 发现β亚基与tRNA结合, 酶的CP1结构域肽段编校误氨酰化的tRNA和小螺旋, 鉴定了*Aat*tRNA^{Leu}在酶的氨酰化和编校过程中起关键作用的碱基; c. 阐明了无编校结构域运动型支原体亮氨酰-tRNA合成酶的催化和编校机理; d. 发现了亮氨酰-tRNA合成酶编校非对应氨基酸的模块式途径, 揭示了不同亮氨酰-tRNA合成酶的CP1结构域行使编校功能的结构基础; e. 发现人胞质亮氨酰-tRNA合成酶的N端延伸结构域与精氨酰-tRNA合成酶的C端延伸结构域相互作用, 这种相互作用应该是形成多合成酶复合体的结构基础; f. 揭示了精氨酰-tRNA合成酶结合血红素并抑制其催化活力的机理; g. 研究了人细胞质类脯氨酰-tRNA合成酶编校结构域的ProX对氨酰-tRNA的质量控制; h. 在体内鉴定了酵母氨酰-tRNA合成酶与tRNA^{Leu}相互作用的关键氨基酸残基和核苷酸残基, 这些关键残基的突变由于影响到酶的合成和编校活力而导致酵母生长变慢或死亡.

7 分子酶学工程

吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室是教育部首批确认的重点实验室之一, 经过近30年的发展, 已成为我国分子酶学工程研究的重要基地. 所取得的主要成果包括: a. 张今等^[85-89]提出了“酶突变库”的思想, 建立了酶法体外随机-定位诱变的方法, 对L-天冬氨酸酶、α-天冬氨酰二肽酶、大肠杆菌操纵子otsBA的定向进化取得了明显结果, 发现天然核酶可以转换为脱氧核酶和肽酶, 为

脱氧核酶和肽酶的分子设计提供了新途径; b. 罗贵民等^[90-93]首先利用环糊精的疏水腔为底物结合部位, 硒巯基为底物催化基团, 制备出系列双硒桥联环糊精, 其过氧化物酶活性为当时国际上公认最好的模拟物活性的4.3倍, 利用组合化学-肽库、蛋白质工程、生物印迹等获得了多种活性超过天然酶的模拟酶, 通过半抗原过渡态诱导技术制备出两种含有铁卟啉辅基的抗体酶, 具有辣根过氧化物酶和Cyt P450催化活力; c. 程玉华、曹淑桂等^[94-95]系统地考察了溶剂等微环境因素对酶结构和活性的影响; d. 冯雁等^[96-97]从极端环境微生物中克隆和表达了多种水解酶(肽酶、脂肪酶、酯酶、纤维素酶等), 系统地研究酶分子的结构域功能关系, 探讨了酶分子催化、稳定化与进化机制; e. 李正强等^[98]首创了一种新型酶分子组装新技术——“Fish-in-net”酶固定化技术, 构建了高效的生物催化反应器, 极大地提高了酶的催化活力和稳定性.

本文主要介绍了20世纪70年代以来我国科学家在酶学领域所取得几个有代表性的、系统性的研究成果. 在这40年间, 国内还有许多出色的、有关酶学的基础研究成果, 由于篇幅有限, 不能在此一一介绍.

参 考 文 献

- [1] Ray W J Jr, Koshland D E Jr. A method for characterizing the type and numbers of groups involved in enzyme action. *The Journal of Biological Chemistry*, 1961, **236**: 1973-1979
- [2] Tsou C L. Relation between modification of functional groups of proteins and their biological activity. I. A graphical method for the determination of the number and type of essential groups. *Scientia Sinica*, 1962, **11**: 1535-1558
- [3] Xu G J, Tsou C L. Relation between modification of functional groups of protein and their biological activity. II. The number of essential disulfide linkages in trypsin. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1963, **3**: 162-167
- [4] Tsou C L, Sun Y K, Xue G J, *et al.* Relation between modification of functional groups of proteins and their biological activity. Iii. Effect of P-Nitrophenacylbromide on the Activity of Certain Proteins. *Scientia Sinica*, 1963, **12**: 1333-1340
- [5] Zhou H M, Tsou C L. An essential tryptophan residue for rabbit muscle creatine kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, **830**(1): 59-63
- [6] Wang H R, Bai J H, Zheng S Y, *et al.* Ascertaining the number of essential thiol groups for the folding of creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**(1): 174-180
- [7] Wang Z X. Theoretical consideration of the Tsou plot. *J Theor Biol*, 1991, **150**: 437-450
- [8] Dixon M, Webb E C. *Enzymes* 3rd Ed. New York: Academic Press Inc, 1979

- [9] Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. 4th Ed. Wiley-Blackwell, Singapore, 2012: 179–183
- [10] Tsou C L. Kinetics of irreversible modification of enzyme activity. 1. The effect of substrate on the rate of binding between an enzyme and a modifier. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1965, **5**: 398–408
- [11] Tsou C L. Kinetics of irreversible modification of enzyme activity. 2. The substrate reaction during the course of modification. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1965, **5**: 409–417
- [12] Tian W X, Tsou C L. Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. *Biochemistry*, 1982, **21**(5): 1028–1032
- [13] Liu W, Zhao K Y, Tsou C L. Reactivation kinetics of diethylphosphoryl acetylcholine esterase. *Eur J Biochem*, 1985, **151**(3): 525–529
- [14] Liu W, Tsou C L. Determination of rate constants for the irreversible inhibition of acetylcholine esterase by continuously monitoring the substrate reaction in the presence of the inhibitor. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **870**(2): 185–190
- [15] Wang Z X, Tsou C L. Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity for enzymes involving two substrates. *J Theor Biol*, 1987, **127**(3): 253–270
- [16] Tsou C L. Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1988, **61**: 381–436
- [17] Zhou J M, Liu C, Tsou C L. Kinetics of trypsin inhibition by its specific inhibitors. *Biochemistry*, 1989, **28**(3): 1070–1076
- [18] Wang Z X, Tsou C L. An alternative method for determining inhibition rate constants by following the substrate reaction. *J Theor Biol*, 1990, **142**(4): 531–549
- [19] Wang Z X. Two theoretical problems concerning the irreversible modification kinetics of enzyme activity. *J Theor Biol*, 1990, **142**(4): 551–563
- [20] Wang Z X, Wu H B, Wang X C, *et al.* Kinetics of the course of inactivation of aminoacylase by 1,10-phenanthroline. *Biochem J*, 1992, **281** (Pt 1): 285–290
- [21] Wang Z X. A simple method for determining kinetic constants of slow, tight-binding inhibition. *Analy Biochem*, 1993, **213**(2): 370–377
- [22] Wang Z X, Wang H R, Zhou H M. Kinetics of inactivation of aminoacylase by 2-chloromercuri-4-nitrophenol: a new type of complexing inhibitor. *Biochemistry*, 1995, **34**(20): 6863–6868
- [23] Wu J W, Wang Z X. Activation mechanism and modification kinetics of Chinese hamster dihydrofolate reductase by p-chloromercuribenzoate. *Biochem J*, 1998, **335**(Pt 1): 181–189
- [24] Wu J W, Wang Z X, Zhou J M. Inactivation kinetics of dihydrofolate reductase from Chinese hamster during urea denaturation. *Biochem J*, 1997, **324**(Pt 2): 395–401
- [25] Wang M H, Wang Z X, Zhao K Y. Kinetics of inactivation of bovine pancreatic ribonuclease A by bromopyruvic acid. *Biochem J*, 1996, **320**(Pt 1): 187–192
- [26] Wu Y, Wang Z X. Comparison of conformational changes and inactivation of soybean lipoxygenase-I during urea denaturation. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1388**(2): 325–336
- [27] Wang Z X, Wu J W, Tsou C L. The inactivation kinetics of papain by guanidine hydrochloride: a re-analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1388**(1): 84–92
- [28] Wu J W, Wang Z X, Zhou J M. Three-state kinetic analysis of Chinese hamster dihydrofolate reductase unfolding by guanidine hydrochloride. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1343**(1): 107–116
- [29] Jiang R F, Wang Z X, Xu G J. Substrate induced reactivation of spinach ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase denatured by low concentrations of guanidine hydrochloride. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1343**(1): 95–101
- [30] Chen Y, Wu J W, Xu G J, *et al.* Inactivation kinetics of the reduced spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by subtilisin. *Eur J Biochem*, 1997, **248**(3): 925–929
- [31] Wang Z X. Influence of substrates on *in vitro* dephosphorylation of glycogen phosphorylase a by protein phosphatase-1. *Biochem J*, 1999, **341** (Pt 3): 545–554
- [32] Wang Z X, Zhou B, Wang Q M, *et al.* A kinetic approach for the study of protein phosphatase-catalyzed regulation of protein kinase activity. *Biochemistry*, 2002, **41**(24): 7849–7857
- [33] Wu H, Wang Z X. The mechanism of p21-activated kinase 2 autoactivation. *J Biol Chem*, 2003, **278**(43): 41768–41778
- [34] Wang J, Wu J W, Wang Z X. Mechanistic studies of the autoactivation of PAK2: a two-step model of cis initiation followed by trans amplification. *J Biol Chem*, 2011, **286**(4): 2689–2695
- [35] Zhao P L, Wang L, Zhu X L, *et al.* Subnanomolar inhibitor of cytochrome bc1 complex designed by optimizing interaction with conformationally flexible residues. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(1): 185–194
- [36] Hao G F, Wang F, Li H, *et al.* Computational discovery of picomolar Q(o) site inhibitors of cytochrome bc1 complex. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(27): 11168–11176
- [37] Yao Q Z, Tian M, Tsou C L. Comparison of the rates of inactivation and conformational changes of creatine kinase during urea denaturation. *Biochemistry*, 1984, **23**(12): 2740–2744
- [38] Zhou H M, Tsou C L. Comparison of activity and conformation changes during refolding of urea-denatured creatine kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **869**(1): 69–74
- [39] Tsou C L. Location of the active-sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions. *Trends Biochem Sci*, 1986, **11**: 427–429
- [40] Xie G F, Tsou C L. Conformational and activity changes during guanidine denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **911**(1): 19–24
- [41] Liu W, Tsou C L. Activity change during unfolding of bovine pancreatic ribonuclease A in guanidine. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **916**(3): 455–464
- [42] Liu W, Tsou C L. Kinetics of reactivation during refolding of guanidine-denatured pancreatic ribonuclease A. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **916**(3): 465–473
- [43] Lin Y Z, Liang S J, Zhou J M, *et al.* Comparison of inactivation and conformational changes of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase during thermal denaturation. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1038**(2): 247–252
- [44] Ma Y Z, Tsou C L. Comparison of the activity and conformation changes of lactate dehydrogenase H4 during denaturation by guanidinium chloride. *Biochem J*, 1991, **277**(Pt 1): 207–211
- [45] Zhou H M, Zhang X H, Yin Y, *et al.* Conformational changes at the

- active site of creatine kinase at low concentrations of guanidinium chloride. *Biochem J*, 1993, **291**(Pt 1): 103–107
- [46] Tsou C L. Conformational flexibility of enzyme active sites. *Science*, 1993, **262**(5132): 380–381
- [47] 邹承鲁, 周筠梅, 周海梦. 酶活性部位的柔性. 山东科学技术出版社, 2004
- [48] Pan R, Zhang X J, Zhang Z J, *et al.* Substrate-induced changes in protease active site conformation impact on subsequent reactions with substrates. *J Biol Chem*, 2010, **285**(30): 22950–22956
- [49] Wang C C, Tsou C L. Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1993, **7**(15): 1515–1517
- [50] Cai H, Wang C C, Tsou C L. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem*, 1994, **269**(40): 24550–24552
- [51] Quan H, Fan G, Wang C C. Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site. *J Biol Chem*, 1995, **270**(29): 17078–17080
- [52] Song J L, Wang C C. Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese. *Eur J Biochem*, 1995, **231**(2): 312–316
- [53] Yao Y, Zhou Y, Wang C. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. *EMBO J*, 1997, **16**(3): 651–658
- [54] Chen J, Song J L, Zhang S, *et al.* Chaperone activity of DsbC. *J Biol Chem*, 1999, **274**(28): 19601–19605
- [55] Li S J, Hong X G, Shi Y Y, *et al.* Annular arrangement and collaborative actions of four domains of protein-disulfide isomerase: a small angle X-ray scattering study in solution. *J Biol Chem*, 2006, **281**(10): 6581–6588
- [56] Wang L, Wang L, Vavassori S, *et al.* Crystal structure of human ERp44 shows a dynamic functional modulation by its carboxy-terminal tail. *EMBO Reports*, 2008, **9**(7): 642–647
- [57] Wang L, Li S J, Sidku A, *et al.* Reconstitution of human Ero1- α /protein-disulfide isomerase oxidative folding pathway *in vitro*. Position-dependent differences in role between the α and α' domains of protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 2009, **284**(1): 199–206
- [58] Wang C, Yu J, Huo L, *et al.* Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain α' . *J Biol Chem*, 2012, **287**(2): 1139–1149
- [59] Wang, C, Li W, Ren J, *et al.* Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. *Antioxid Redox Signal*, 2013, **19**(1): 36–45
- [60] Wang L, Zhang L, Niu Y, *et al.* Glutathione peroxidase 7 utilizes hydrogen peroxide generated by Ero1 α to promote oxidative protein folding. *Antioxid Redox Signal*, 2014, **20**(4): 545–556
- [61] Ellis R J. Do molecular chaperones have to be proteins?. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238**(3): 687–692
- [62] Xu G J, Yu Z B, Hu G F, *et al.* Localization of the potassium ion activation site in human liver fructose 1, 6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **194**(3): 1483–1490
- [63] Zhao F K, Xu S Q, Xu G J. AMP activation of snake muscle fructose 1,6-bisphosphatase at alkaline pH. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **244**(3): 928–932
- [64] Zhang F W, Zhao F K, Xu G J. Molecular cloning, expression and purification of muscle fructose-1,6-bisphosphatase from *Zoocys dhumnades*: the role of the N-terminal sequence in AMP activation at alkaline pH. *Biol Chem*, 2000, **381**(7): 561–566
- [65] Li L, Xu G J. Purification and kinetics of mouse liver fructose 6-phosphate, 2-kinase. *Sci Sin B*, 1988, **31**(11): 1307–1314
- [66] Li L, Pan L, Xu G J. Properties of chicken liver phosphofructokinase-2. *Sci China B*, 1991, **34**(8): 916–922
- [67] Li L, Yao W Z, Lange A J, *et al.* Expression of chicken liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **209**(3): 883–893
- [68] Li L, Ling S, Wu C, *et al.* Separate bisphosphatase domain of chicken liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: the role of the C-terminal tail in modulating enzyme activity. *Biochem J*, 1997, **328**(Pt 3): 751–756
- [69] Zhu Z, Ling S, Yang Q, *et al.* The difference in the carboxy-terminal sequence is responsible for the difference in the activity of chicken and rat liver fructose-2, 6-bisphosphatase. *Biol Chem*, 2000, **381**(12): 1195–1202
- [70] Yang Q H, Zhu Z, Dong M Q, *et al.* Binding of ATP to the fructose-2,6-bisphosphatase domain of chicken liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase leads to activation of its 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(27): 24608–24613
- [71] Zhu Z, Ling S, Yang Q H, *et al.* Involvement of the chicken liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase sequence His444-Arg-Glu-Arg in modulation of the bisphosphatase activity by its kinase domain. *Biochem J*, 2001, **357**(Pt 2): 513–520
- [72] Lin S X, Wang Q, Wang Y L. Interactions between *Escherichia coli* arginyl-tRNA synthetase and its substrates. *Biochemistry*, 1988, **27**(17): 6348–6353
- [73] Li T, Li Y, Guo N, *et al.* Discrimination of tRNA^{Leu} isoacceptors by the insertion mutant of *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 1999, **38**(28): 9084–9088
- [74] Chen J F, Guo N N, Li T, *et al.* CP1 domain in *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase is crucial for its editing function. *Biochemistry*, 2000, **39**(22): 6726–6731
- [75] Du X, Wang E D. Tertiary structure base pairs between D- and TpsiC-loops of *Escherichia coli* tRNA(Leu) play important roles in both aminoacylation and editing. *Nucl Acids Res*, 2003, **31**(11): 2865–2872
- [76] Tan M, Wang M, Zhou X L, *et al.* The Yin and Yang of tRNA: proper binding of acceptor end determines the catalytic balance of editing and aminoacylation. *Nucl Acids Res*, 2013, **41**(10): 5513–5523
- [77] Xu M G, Chen J F, Martin F, *et al.* Leucyl-tRNA synthetase consisting of two subunits from hyperthermophilic bacteria *Aquifex aeolicus*. *J Biol Chem*, 2002, **277**(44): 41590–41596
- [78] Zhao M W, Zhu B, Hao R, *et al.* Leucyl-tRNA synthetase from the ancestral bacterium *Aquifex aeolicus* contains relics of synthetase evolution. *EMBO J*, 2005, **24**(7): 1430–1439
- [79] Zhu B, Zhao M W, Eriani G, *et al.* A present-day aminoacyl-tRNA

- synthetase with ancestral editing properties. *RNA*, 2007, **13** (1): 15–21
- [80] Yao P, Zhu B, Jaeger S, *et al.* Recognition of tRNA^{Leu} by Aquifex aeolicus leucyl-tRNA synthetase during the aminoacylation and editing steps. *Nucl Acids Res*, 2008, **36**(8): 2728–2738
- [81] Chen X, Ma J J, Tan M, *et al.* Modular pathways for editing non-cognate amino acids by human cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase. *Nucl Acids Res*, 2011, **39**(1): 235–247
- [82] Zhou X L, Du D H, Tan M, *et al.* Role of tRNA amino acid-accepting end in aminoacylation and its quality control. *Nucl Acids Res*, 2011, **39**(20): 8857–8868
- [83] Yao P, Zhou X L, He R, *et al.* Unique residues crucial for optimal editing in yeast cytoplasmic Leucyl-tRNA synthetase are revealed by using a novel knockout yeast strain. *J Biol Chem*, 2008, **283**(33): 22591–22600
- [84] Huang Q, Yao P, Eriani G, *et al.* *In vivo* identification of essential nucleotides in tRNA^{Leu} to its functions by using a constructed yeast tRNA^{Leu} knockout strain. *Nucl Acids Res*, 2012, **40** (20): 10463–10477
- [85] Zhang H Y, Zhang J, Lin L, *et al.* Enhancement of the stability and activity of aspartase by random and site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **192**(1): 15–21
- [86] Wang L J, Kong X D, Zhang H Y, *et al.* Enhancement of the activity of L-aspartase from *Escherichia coli* W by directed evolution. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **276**(1): 346–349
- [87] Kong X, Liu Y, Gou X, *et al.* Directed evolution of alpha-aspartyl dipeptidase from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **289**(1): 137–142
- [88] Sheng Y, Li S, Gou X, *et al.* The hybrid enzymes from alpha-aspartyl dipeptidase and L-aspartase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **331**(1): 107–112
- [89] Sheng Y, Zeng Z, Peng W, *et al.* Design and switch of catalytic activity with the DNAzyme-RNAzyme combination. *FEBS Lett*, 2007, **581**(9): 1763–1768
- [90] Luo G M, Ren X J, Liu J Q, *et al.* Towards more efficient glutathione peroxidase mimics: substrate recognition and catalytic group assembly. *Curr Med Chem*, 2003, **10**(13): 1151–1183
- [91] Sun Y, Li T, Chen H, *et al.* Selenium-containing 15-mer peptides with high glutathione peroxidase-like activity. *J Biol Chem*, 2004, **279**(36): 37235–37240
- [92] Ren X, Xue Y, Liu J, *et al.* A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity. *Chembiochem: A European J Chem Biol*, 2002, **3**(4): 356–363
- [93] You D, Ren X, Xue Y, *et al.* A selenium-containing single-chain abzyme with potent antioxidant activity. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(21): 4326–4331
- [94] Cao S G, Feng Y, Ma L, *et al.* A Study on increasing enzymatic stability and activity in organic-solvents. *Anna N Y Acad Sci*, 1992, **672**: 152–157
- [95] Yang H, Gao S G, Ma L, *et al.* A new kind of immobilized lipase in organic solvent and its structure model. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **200**(1): 83–88
- [96] Wang Q, Yang G, Liu Y, *et al.* Discrimination of esterase and peptidase activities of acylaminoacyl peptidase from hyperthermophilic *Aeropyrum pernix* K1 by a single mutation. *J Biol Chem*, 2006, **281**(27): 18618–18625
- [97] Zhang Z, Zheng B, Wang Y, *et al.* The conserved N-terminal helix of acylpeptide hydrolase from archaeon *Aeropyrum pernix* K1 is important for its hyperthermophilic activity. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1784**(9): 1176–1183
- [98] Yang X Y, Li Z Q, Liu B, *et al.* "Fish-in-net" encapsulation of enzymes in macroporous cages for stable, reusable, and active heterogeneous biocatalysts. *Adv Mater*, 2006, **18**(4): 410–414

A Recollection of Forty Years of Enzymology Research in China

WANG Zhi-Xin*

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Since 1970s', Chinese enzymologists have obtained a lot of distinguished achievements on the basic research on enzymes. At the celebration of the 40th anniversary of *Progress in Biochemistry and Biophysics*, this paper is attempted to review the selected achievements from the systematically enzymic research in China.

Key words enzyme, active site, dynamics, molecular chaperones, enzyme engineering

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00278

*Corresponding author.

Tel: 86-10-62785505, E-mail: zhixinwang@mail.tsinghua.edu.cn

Received: September 30, 2014 Accepted: October 8, 2014