

含脂蛋白的结构与功能

潘华珍

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 最近发现有些膜蛋白共价与脂肪酸或糖磷酸肌醇结合, 并以它们插入脂双层膜. 这些膜蛋白广泛存在于各种细胞的细胞膜上, 功能涉及免疫和信息传递, 文章讨论这些膜蛋白的结构、生物合成及功能.

关键词 含脂蛋白, 豆蔻酸, 棕榈酸, 糖磷酸肌醇, 结构, 生物合成, 功能

含脂膜蛋白 (lipid-containing membrane proteins) 是近几年新认识的一类膜蛋白, 与通常镶嵌于脂双层内的膜蛋白不同, 它们依赖所含的脂肪酸插入脂双层. 目前已知有 3 种: a. 与棕榈酸 (PA, 16:0) 结合的膜蛋白; b. 与豆蔻酸 (MA, 14:0) 结合的膜蛋白; c. 与糖肌醇磷脂 (glycophosphatidylinositol) 结合的膜蛋白. 1988 年以来相继从锥虫、细菌、病毒及哺乳动物组织中提纯, 并进行了结构分析及功能的研究, 由于它们的功能涉及面很广, 发展很快, 1990 年及 1991 年分别在荷兰及巴西召开了国际专题讨论会. 现将含脂膜蛋白的结构与功能介绍如下.

1 棕榈酸结合蛋白

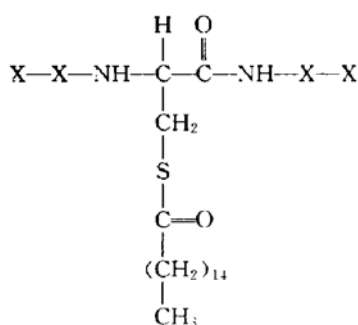
1.1 棕榈酸结构与生物合成

棕榈酸结合蛋白 (palmitoylated proteins) 是指一组膜蛋白, 它们都与棕榈酸共价结合. 其特点是棕榈酸与蛋白的联结很弱, 易被弱碱 (或 1mol/L 羟胺) 水解. Towler 用 A₄₃₁ 细胞株研究了这种蛋白合成的全过程, 证明是通过半胱氨酸的巯基与棕榈酸形成硫酯 (thiol ester). 其结构见图 1. 但也有极少数的蛋白是通过酰胺键的, 它不易被弱碱水解, 如烟酸乙酰胆碱受体.

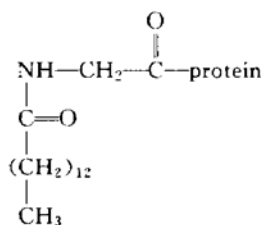
棕榈酸结合蛋白在膜内的形式有两种: 一种是棕榈酸直接插入脂双层, 蛋白质在脂双层的内侧, 不镶嵌在膜内. 另一种原是糖蛋白, 经

酰化结合棕榈酸之后, 形成含脂糖蛋白, 这种膜蛋白镶嵌在膜内, 如转铁蛋白受体 (transferrin receptor) 及载脂蛋白 A-1. 以上两种膜蛋白在生物合成中不完全相同, 第一类蛋白在游离的多核糖体内合成, 新合成的蛋白经棕榈酸酰基转移酶进行酰化, 然后运转到质膜的表面. 用红细胞膜的锚蛋白 (ankyrin) 它也是棕榈酸结合蛋白, 存于成熟的红细胞, 在成熟的红细胞内无细胞核, 不能合成蛋白, 当加入 ³H-棕榈酸仍可与锚蛋白结合, 说明蛋白质合成后才酰化, 酰化是蛋白翻译后的修饰. 第二类蛋白, 本身是糖蛋白再酰化. Schmidt 等用 VSV (vesicular stomatitis virus) 感染成纤维细胞, 研究糖蛋白如何酰化. 他发现糖蛋白在内质网合成后, 在高尔基氏体 (cis-Golgi) 内, 在棕榈酸酰基转移酶存在下, 进行酰化. Omary 等^[1]用 ³H-棕榈酸标记转铁蛋白受体, 研究转铁蛋白受体的酰化, 他认为蛋白的合成与酰化是两个独立的步骤, 酰化及脱酰化是可逆的循环过程, 而脂的转换率比蛋白质快 4 倍. 更有趣的是他发现受体的循环 (recycling), 指受体在膜上及胞浆内的循环, 与受体的酰化与脱酰化是同步的, 说明受体的酰化是进入膜内所必需的, 脱酰化之后受体即从膜内脱落, 进入胞浆. 在体外无细胞的体系中, 将提纯的蛋白质 (如 VSV-G-蛋白, 一种糖蛋白), 在 ATP 及棕榈酸-CoA 存在下, 蛋

白质可酰化, 和体内不同的是, 只需给予任何一种脂肪酸-CoA 都可酰化, 从这个事实可推测, 体内有特异的脂肪酸转移酶, 人们企图提纯棕榈酸转移酶, 但至今尚未成功.



棕榈酸结合蛋白



豆蔻酸结合蛋白

图 1 脂肪酸结合蛋白结构示意图

1.2 棕榈酸结合蛋白的功能

Petri^[2]用提纯的 VSV-G-蛋白标记荧光, 重组入二棕榈酸磷脂酰胆碱脂质体, 测定蛋白的运动, 他发现与蛋白质共价结合的脂肪酸和周围的脂双层反应很强, 使蛋白质周围的磷脂分相 (phase transition), 说明脂肪酸直接与脂双层结合. Willumsen 将 P21^{ras}蛋白的 C 末端 186 半胱氨酸残基处用其他残基替代, 由于这个位置是脂肪酸结合点, 所以 P21^{ras}蛋白不能与棕榈酸结合, 结果这种非酰化的蛋白虽然仍可与 GTP 反应, 但失去细胞内信息传递的作用.

Slomiany^[3]用提纯的人胃粘糖蛋白 (gastric mucous glycoprotein) 观察了共价结合棕榈酸的功能. 纯的胃粘糖蛋白对链霉菌蛋白酶 (pronase) 作用不敏感, 不易被它水解, 当用羟氨去除棕榈酸之后, 变得非常易被酶水解. 从以上实验分析, 棕榈酸可能起着保护蛋白不被酶水解的作用.

O' Dowd 报道 β -肾上腺素能受体酰化在其 C 末端半胱氨酸残基部位, 如将半胱氨酸改成其他氨基酸, 受体不能酰化, 同时, 细胞内反应, 对腺苷环化酶的激活也降低, 说明酰化后的受体才能与膜内蛋白发生作用, 脂肪酸的部分对跨膜信息有重要的作用.

从以上的一些实验看来, 棕榈酸结合蛋白在膜内促进蛋白-蛋白之间的作用, 特别是跨膜信息, 如受体、蛋白激酶等起着重要的作用.

2 豆蔻酸结合蛋白

2.1 豆蔻酸结合蛋白结构与生物合成

豆蔻酸结合蛋白与棕榈酸结合蛋白相似, 豆蔻酸与膜蛋白共价结合, 所不同在于其蛋白质都以酰胺键 (amide linkages) 相联 (图 1), 并且与豆蔻酸结合的氨基酸必需是甘氨酸. Towler^[4]在体外合成许多种多肽, 试与豆蔻酸结合, 如多肽链 N 末端是甘氨酸, 与它相邻的 Asn, Glu, Ser, Val (或 Leu) 是可以酰化的, 如改变为 Asp, Phe 或 Tyr 即不能酰化. 说明豆蔻酸的结合要求很严格, 不仅 N 末端必需是甘氨酸, 相邻的氨基酸也高度选择. Towler 后期的实验才发现高度的选择是由于豆蔻酸酰基转移酶的特性决定的.

豆蔻酸结合蛋白的合成与棕榈酸结合蛋白不十分相同. Handerson 等人报道多肽的合成与酰化几乎是同时的. 当多核糖体合成多肽时, 大约延伸 30—40 个氨基酸时, 氨基肽酶将其第一个氨基酸 (甲硫氨酸) 切去, 暴露出第二个氨基酸 (甘氨酸), 一旦出现甘氨酸, N-豆蔻酰基转移酶 (N-myristoyl acyltransferase, NMT) 立刻酰化多肽链, 所以新合成的蛋白质已是酰化的蛋白. 另外, 有个别的蛋白质甘氨酸不在第二位, 而是在多肽链的任何部位, 只需有酶将甘氨酸暴露, 即可酰化.

2.2 豆蔻酸结合蛋白的生物合成

Levinson 证明 P60^{src} 当蛋白合成后 5—10min, N 末端进行豆蔻酸酰化, 然后从胞浆转移到膜内, 如 N 末端进行点突变, Src 不能酰化, 合成后的蛋白不能进入膜内, 更有趣的是

这种变异蛋白具有酪氨酸激酶的活性, 但无转化作用. 一般有酪氨酸激酶活性的膜蛋白或受体蛋白 (如胰岛素受体) 结构特点是这一段多肽链伸向胞浆, 说明伸向胞浆面结构的片断与酰化无关, 酰化的 N 末端与信息传递有关, 不能将信息传递到胞内, 因而不能引起转化作用. Kamps^[5]报道了相似的现象, P60^{src}可作为蛋白激酶 C 的磷酸化底物, 当它变异成非酰化蛋白后, 即不能被蛋白激酶 C 磷酸化. 这些结果说明豆蔻酸酰化对膜内蛋白-蛋白之间反应起着重要作用.

3 糖肌醇磷脂结合蛋白

3.1 糖肌醇磷脂结合蛋白 (GPI-Pr) 结构

糖肌醇磷脂结合蛋白与以上两种含脂蛋白不同, 蛋白质的 C 末端与糖脂相联, 糖脂中的磷脂是肌醇磷脂, 以肌醇磷脂中的两个脂肪酸作为“锚”(anchor), 插入脂双层, 所以把糖肌醇磷脂又称“锚”. 这种蛋白又称糖肌醇磷脂锚固蛋白. 最初从锥虫的膜上发现它, 近年来从哺乳动物及人的一些细胞膜上也找到这类蛋白, 并提纯鉴定, 现已知至少有 60—70 种之多.

GPI-Pr 可分两类: 一类以锥虫的膜蛋白为代表 (图 2a). 肌醇磷脂的两个脂肪酸都是豆蔻酸, 以这两个脂肪酸插入脂双层. 肌醇磷脂与氨基葡萄糖相联, 再结合 3 个甘露糖, 最后一个甘露糖与乙醇胺相联, 通过乙醇胺的—NH₂ 与蛋白质羧基相联. 最近又发现在第一个甘露糖处又缀一个以 4 个半乳糖组成的“天线”(antenna), “天线”不是在内质网组装, 而是 GPI 锚装好后再结合的. 另一类是哺乳动物的 GPI-Pr, 它们的结构与第一类有 3 点不同: a. 肌醇分子的第二位羟基上多结合一个棕榈酸, 它也插入脂双层. 第一类蛋白可被肌醇磷脂酶 C (PIPLC) 水解, 由于多了一个脂肪酸, 只有先用羟氨将此脂肪酸水解之后, PIPLC 才可水解; b. 没有半乳糖组成的“天线”, 代之以 3 个六碳糖, 六碳糖的组成依蛋白不同而异, 一般是 3 个甘露糖; c. 肌醇磷脂的两个脂肪酸不一样, 一个是饱和的, 另一个是

不饱和的 (图 2b).

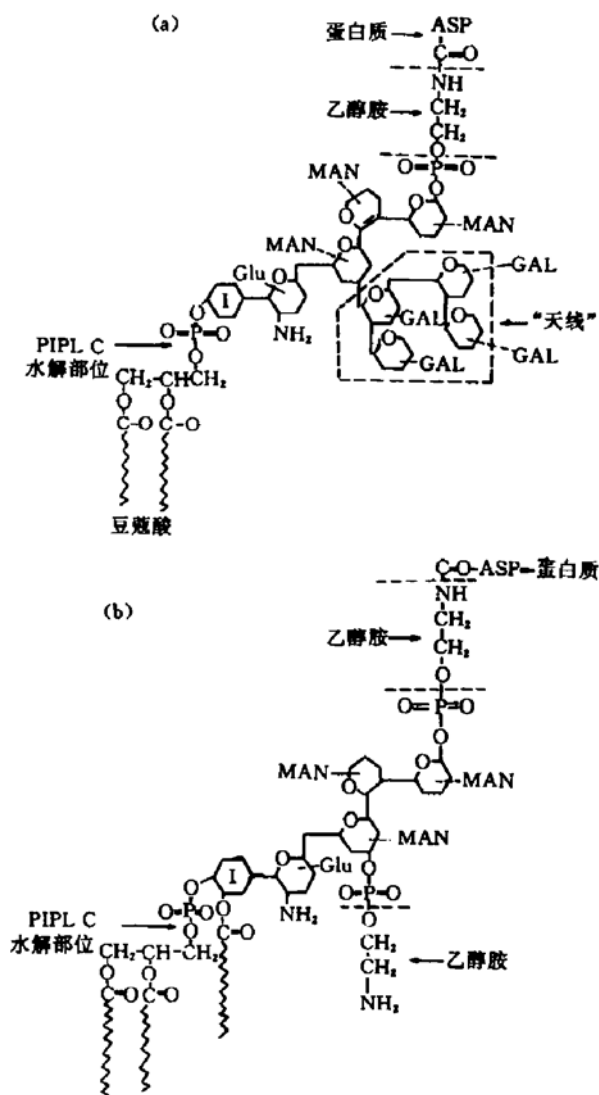


图 2 GPI-Pr 结构示意图

3.2 GPI-Pr 的生物合成

GPI-Pr 的生物合成研究可分两个步骤: 首先蛋白质在内质网合成, 合成后的蛋白质, 蛋白水解酶从 C 末端切下一段小肽. GPI 锚也在内质网合成, 切下 C 末端以后的蛋白质再与 GPI 结合, 形成 GPI-Pr. Caras^[6]对此步骤, 以加速衰变因子 (decay accelerating factor DAF) 为模型作了详细的研究. 他应用基因修饰技术 (gene manipulation techniques), 将 DAF 中 cDNA C 末端的 37 个氨基酸剪切下来, 结合到一个已知结构的分泌型蛋白 gD-1 上, 这个 gD-1 蛋白也预先从 C 末端剪切下一段氨基酸, 保

留 N 末端的信号肽, 共 300 个氨基酸. 两个修饰后的蛋白结合后, 得到 gD-1-DAF 融合的蛋白 (见图 3). gD-1 分泌蛋白结合了 37 个 DAF 的 37 个氨基酸的多肽之后, 即形成膜结合型蛋白, 说明这 37 个氨基酸对 GPI 结合很重要. 在 37 个氨基酸中, 只有 17 个是疏水区, 另外 20 个氨基酸起什么作用? Caras 试将 DAF C 末端的 17 个氨基酸 (指疏水区) 转移到 gD-1 蛋白上, 结果 GPI 不能与之结合, 说明仅 17 个氨基酸的多肽不足为联结 GPI 的信号, 因此他依 17 到 37 个氨基酸的顺序, 逐个接到 17 个氨基酸的多肽上, 以便了解知道什么地方是确切的切点, 是联结 GPI 所必需的位点. 他找到第 28 个氨基酸处切断, 暴露出丝氨酸 (即第 29 位) 才能与 GPI 联结. Moran 报道^[7], 除丝氨酸外, 只有甘氨酸、丙氨酸及天门冬氨酸 (或天门冬酰胺) 可以与 GPI 结合, 其他氨基酸都无此作用. 从以上一系列的实验得知 GPI-Pr 合成时要有两个重要因素: a. 需有一个疏水的 C 末端; b. 有一个合适的切点, 暴露出特异的氨基酸, 缺一不可. 不同的 GPI-Pr 有不同的结构, 但这两个基本原则不变.

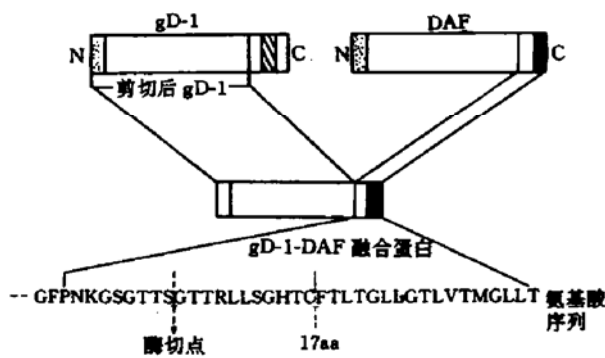


图 3 GD-1 跨膜蛋白与 DAF 蛋白融合示意图

以上实验都是在体外用人工合成的方法作的, 必须指出在合成过程中还有许多没有解决的问题. 如什么酶将 C 末端水解, 出现合适的切点, 可能有许多种羧基肽酶, 目前还没有提纯; C 末端的疏水区有什么功能, 只是为酶的识别? GPI 如何与蛋白结合? 是否还需 GPI 转移

酶参与? GPI 转移酶目前尚未提取出来, 这些问题还都有待解决.

3.3 GPI-Pr 的生物功能

GPI-Pr 的特点是通过 GPI 将蛋白插入膜, 有些可溶性蛋白经 GPI 组装后变成膜结合蛋白, 促进膜内蛋白与蛋白之间的反应. 另外 GPI-Pr 的蛋白质部分不受脂双层及骨架蛋白的约束, 侧向运动很快, 如 DAF 的扩散指数可达 $1 \times 5 \times 10^{-9} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 一般内在蛋白扩散指数 $< 10^{-10} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 侧向运动加速有利于膜蛋白施展更大的效应.

近 5 年来发现一些激素激活细胞后, 有 GPI 类似物产生. 早在 1974 年 Larner 提出胰岛素为什么有多种生理功能, 可能在反应过程中产生一个介导体, 可介导一系列反应. 后经鉴定这介导体可被 PIPLC 水解, 可能是 GPI 类化合物. 继此之后又有许多报道激素激活 PI-PLC, 当 PIPLC 激活之后, 应作用于磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP_2), 产生甘油二磷酸 (DG) 及三磷酸肌醇 (IP_3), 但当胰岛素 (或甲状腺激素) 激活后, 甘油二磷酸升高, 而三磷酸肌醇无改变, 他提出 PIPLC 可能还有其他底物, 认为 PI-PLC 作用于 GPI-Pr. 现已知 GPI 是一个非常活跃的物质, 与许多酶和代谢有关, 表 1 说明 GPI 的功能.

表 1 GPI 的生物效应

无细胞体系		整细胞体系	
酶	效应	细胞	效应
丙酮酸脱氢酶 (PDH)	活化	大鼠脂肪细胞	激活丙酮酸脱氢酶
腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase)	活化	大鼠脂肪细胞	抑制糖元磷酸化酶
cAMP-蛋白激酶	抑制	大鼠脂肪细胞	抑制丙酮酸激酶
cAMP 磷酸二酯酶	活化	大鼠脂肪细胞	激活脂质合成
乙酰 CoA 羧化酶	活化	大鼠脂肪细胞	激活葡萄糖氧化
葡萄糖-6-磷酸酶	抑制	大鼠脂肪细胞	激活葡萄糖摄取
		大鼠脂肪细胞	激活氨基酸运转
		大鼠脂肪细胞	激活细胞增殖

GPI 如何引起细胞内反应, 它与第二信使有什么联系? 是一个饶有兴趣; 但又没有完全解决的问题. Romero^[8]根据自己的实验提出一个假说: 胰岛素作用于其受体之后可能有两途径, 一方面可以激活 G-蛋白, 使 PIPLC 活化, PIPLC 水解 GPI-Pr, 将 DG 切下, DG 进一步激活蛋白激酶 C; 另一方面, 胰岛素受体有酪氨酸酶活性, 它可使某些蛋白水解酶活化, 活化的蛋白水解酶, 将 GPI-Pr 的蛋白部分水解, 形成 GPI, GPI 被切下之后, 存在膜外, 由膜内的 GPI 载体 (transporter) 把它带入胞内, 再引起一系列胞内的反应 (见图 4). 虽然这是一个假说, 有不少实验支持他的假说, 例如加水解酶抑制剂, 抑制水解酶, 当胰岛素激活后没有 GPI 形成, 胰岛素因而也失去其生理功能. 自从报道胰岛素作用与 GPI 有关之后, 又发现许多生长因子及细胞因子 (cytokines) 与 GPI 有关.

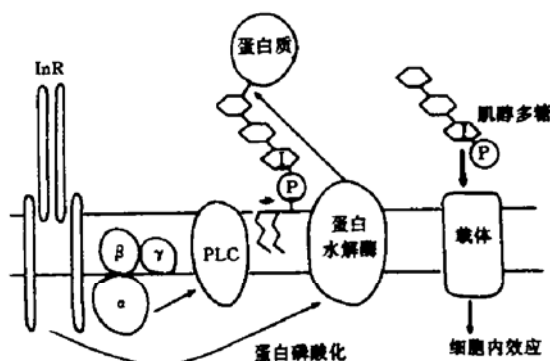


图 4 胰岛素与 GPI-Pr 的关系示意图

除了激素的作用与 GPI 有关外, 淋巴细胞表面也有不少蛋白是属于 GPI-Pr. 特别是小鼠 T 淋巴细胞 Thy-1 抗原, 当 Thy-1 抗原与抗体结合后, 可使细胞内产生淋巴因子及细胞分裂. Robinson^[9]提出抗体激活 Thy-1 抗原引起细胞内反应的机理是由于抗体结合后, 促使细胞膜内的 Thy-1 抗原聚集成簇, 然后引起细胞内

吞, 将 Thy-1 分子吞入细胞内, 胞内 PIPLC 及蛋白水解将 Thy-1 水解成 3 个部分 (蛋白, DGPI, 肌醇多糖), 蛋白质随细胞外吞到胞外, DG 激活 PKC, PKC 又可引起细胞内白介素 2 的分泌, 因而产生一系列生理反应. 不仅是 Thy-1 可引起 T 细胞活化, 从大鼠、荷兰猪等都发现了一些 GPI-Pr 可活化 T 细胞, 有增殖效应.

总之, GPI-Pr 的功能很多, 涉及面很广, 如信息传递、免疫系统反应, 细胞粘附等, 更重要的功能还有待发掘. 文献中已报道^[10]阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 的血细胞 (包括红细胞、血小板、淋巴细胞等), 缺乏多种 GPI-Pr, 如乙酰胆碱酯酶, 碱性磷酸酶. 补体衰变加速因子 (DAF)、反应溶血的膜抑制剂 (MIRL) 及补体 8 (C8) 结合蛋白 (C₈bP). 后三者是抑制补体激活使细胞破溶的调节因子, 它们缺失导致对补体敏感产生溶血. 这些研究仅仅是开始, 许多机制仍不清楚. 相信不久的将来, 在生物化学、分子生物学、细胞生物学多学科的配合下, 对 GPI-Pr 的功能及对某些疾病的发病机制将会有新的认识.

参 考 文 献

- 1 Omary M B, Trowbridge I S. J Biol Chem, 1981; **256**: 4715
- 2 Petri W A, Pal R. J Biol Chem, 1981; **256**: 2625
- 3 Slomiany A, Lian Y H. J Biol Chem, 1983; **258**: 8535
- 4 Towler D, Glaser L. Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **83**: 2812
- 5 Kamps M P. Cell, 1986; **45**: 105
- 6 Caras I W. Cell Biology International Reports, 1991; **15**: 827
- 7 Moran P, Rab M. J Biol Chem, 1991; **266**: 1250
- 8 Romero G. Cell Biology International Reports, 1991; **15**: 827
- 9 Robinson P J. Immunology Today, 1991; **12**: 35
- 10 Mahoney J F, Rosse W F. Blood, 1992; **79**: 1400

(China). 1994; 21 (1): 27

As a family of multifunctional cell-proliferation regulating factor, TGF- β has great potential in clinical application. Both naturally secreted and recombinantly expressed TGF- β are existed in the inactive form of latent complex. Activation of latent TGF- β complex is an important pathway of modulating the biological function of TGF- β . This review concerns on the molecular structure of both natural and recombinant latent TGF- β complexes, and their possible activation mechanisms under physiological conditions.

Key words transforming growth factor- β , latent complex, activation mechanism

Lipid Containing Protein. Pan Huazhen. (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 31

Proteins anchored in membrane by fatty acids or glycosylphosphatidylinositol have been found in a wide variety of cells. Recent evidence shows that the function of these proteins widely related with immunology and signal transduction. This review summarizes the progress in the past few years concerning the structure, biosynthesis and functions of these proteins.

Key words lipid containing protein, palmitic acid myristic acid, glycosylphosphatidylinositol, structure, biosynthesis, function

Progress in the Studies on Gene Mutations of Factor VIII. Geng Jieping, Qi Zhengwu, Chen Zhu. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 36
Human factor VIII is an important cofactor in the intrinsic blood coagulation. Hemophilia A

is the most common severe inherited bleeding disease due to the deficiency or abnormality of factor VIII. Factor VIII gene has been successfully cloned and expressed in eukaryotic cells that promotes the studies on the gene mutations of factor VIII widely and thoroughly. This article introduces the recent progress about this field, and new techniques used in researches. The study on gene abnormalities of factor VIII can be regarded as an excellent example both in depth and width for researches of the congenital diseases.

Key words coagulation factor VIII, hemophilia A, gene mutations

Gene Expression Specifically in Mammary Glands of Transgenic Animals. Chen Ruihuan. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 42

Heterogeneous genes express specifically in mammary glands of transgenic animals is established recently in gene engineering. The milk protein genes and their fusion fashions with heterogenous genes, the necessary elements and the possible factors which effect the expression of the recombinant genes in transgenic animals are introduced.

Key words milk protein genes, transgenic animals, mammary-gland-specific gene expression

Progression in p53 and Rb Gene Methylation. Yang Heping, Zhou Airu, Tang Jian. (*Department of Cardiopulmonary Endocrine, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 48
Progress in p53 and retinoblastoma (Rb) gene methylation is introduced. CpG dinucleotides are the hot spots of DNA methylation and mu-