

可能发展成为蛋白质工程的一种辅助工程而受到重视。

此外,适于有机相酶催化的固定化载体和固定化方法的开发与研究;生物反应器的设计;产物分离与分析技术的建立;用于不同催化反应的脂肪酶酶源(特别是微生物)的开发,必将促进对脂肪酶的研究和利用。

参 考 文 献

- 1 岩井美枝子. 油脂, 1989; 42 (3): 84
- 2 岩井美枝子. 油脂, 1989; 42 (4): 89
- 3 Okumura S, Iwai M, Tujisaka Y. Biochim Biophys Acta, 1979; 575: 156
- 4 Gao Shugui, Feng Y, Liu Z B *et al.* Appl Biochem Biotechnol, 1992; 32: 7
- 5 高橋稷二. Bio Industry, 1990; 7 (7): 407
- 6 Matsushima A, Kadera Y, Takahashi K *et al.* Biotechnol Lett, 1986; 8: 73
- 7 山根恒夫, 星野保. Bio Industry, 1990; 7 (7): 477
- 8 Okada K, Takahashi K, Hatano M *et al.* J Jpn Oil Chem Soc (YUKAGAKU), 1990; 39: 50
- 9 Dordick J S. Enzyme Microb Technol, 1989; 11: 194
- 10 Klivanov A M. Acc Chem Res, 1990; 23: 114
- 11 Makita A, Nihira T, Yamada Y *et al.* Tetrahedron Lett, 1987; 28: 805
- 12 Gutman A L, Zuobi K, Bravdo T *et al.* J Org Chem, 1990; 55: 3546
- 13 Guo Z W, Sih C J. J Am Chem Soc, 1988; 110: 1999
- 14 Margolin A L, Crenne J Y, Klivanov A M *et al.* Tetrahe-

dron Lett, 1987; 28: 1607

- 15 Therisod M, Klivanov A M. J Am Chem Soc, 1987; 109: 3977
- 16 Margolin A, Klivanov A M. J Am Chem Soc, 1987; 109: 3802

The Substrate Specificity of Lipase and Its Application Potentiality. Cao Shugui (*The State Key Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023, China*).

Abstract Lipases from different resources exhibit three specificities for substrate glyceride: The acyl chain specificity for chain length, unsaturation degree, and positions of double bonds in glyceride; The positional specificity for the position of Sn-1 (3) and Sn-2 ester bonds in glyceride; and The stereospecificity for enantiomorphous 1-and 3-ester bond of glyceride. Lipase catalyzes ester hydrolysis and esterification (or transesterification) to prepare monoglyceride, polyunsaturated fatty acid and its ester, and optically active organic compounds, thus it has great potential in fatty oil processing and organic synthesis.

Key words lipase, substrate specificity, fatty oil processing, organic synthesis

蛋白质-DNA 相互作用与真核基因转录

李明义 贾弘提

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

摘要 结合最近几年对真核转录调节因子和 DNA 的结构与机能研究, 概述了蛋白质-蛋白质及蛋白质-DNA 相互作用方式以及介导相互作用的分子结构基础, 论述了转录因子之间、转录因子与 DNA 之间相互作用过程中的协同与拮抗作用、发生机制及其在真核基因转录调节中的普遍性和重要意义。

关键词 蛋白质-蛋白质相互作用, 蛋白质-DNA 相互作用, 真核基因转录调节

真核基因转录的启动始于前起始复合物的形成^[1], 并受转录调节因子与顺式作用元件相互作用, 即蛋白质-DNA 相互作用 (protein-DNA interaction) 调节^[2,3]. 基因启动子中的顺式作用元件排列、组合方式不同, 转录激活模式也不尽相同; 真核转录因子种类繁多, 在蛋白质-DNA 相互作用中, 不同的转录因子可与同一 DNA 序列竞争结合, 产生各不相同的转录激活方式; 结合 DNA 前, 结构相近、机能相关的同一家族或超家族成员常常形成同源或异源二聚体, 即蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction). 不同形式的二聚体结合 DNA 和激活转录能力是不同的, 从而使转录激活方式变得愈加复杂化和多样化^[4]. 因此, 蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA 相互作用在真核基因转录激活过程中起着重要调节作用.

1 蛋白质-蛋白质相互作用的结构基础

真核基因转录激活过程中, 发生在转录因子的蛋白质-蛋白质相互作用除酶-作用物 (如 TFII H 催化 RNA 聚合酶 II 大亚基 C 端磷酸化反应)、受体-配体 (见于核受体超家族中的某些成员) 等形式外, 蛋白质-蛋白质复合物的形成与解聚也是参与很多细胞过程的重要调节形式. 戊二醛交联试验证明 SP1 单体之间可相互作用形成 SP1-SP1 二聚体, 调节启动子活性^[5]. 后来发现很多转录因子都是以多蛋白体复合物 (multiple protein complex) 形式与 DNA 结合, 调节转录激活. 多蛋白体复合物中以二聚体最多见^[2,6]. 因此, 二聚化 (dimerization) 是转录因子最常见、最重要的蛋白质-蛋白质相互作用形式之一.

近年在转录调节因子中已鉴定出几种介导二聚化的结构. a. 亮氨酸拉链 (leucine zipper, LZ): 最早发现于 CCAAT 增强子结合蛋白 (CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP) 的近 N 端, 其氨基酸序列与 Jun, Fos 和 Myc 转化蛋白相关序列类似, 即在由 30 个氨基酸组成的 α 螺旋中, 每 7 个氨基酸残基即重复出现一个亮氨酸残基, 故称亮氨酸拉链. 拉链的

N 端尚有一个富含碱性氨基酸伸展, 因此又称碱性拉链 (basic zipper, bZIP)^[2-4]. 通过两性 α 螺旋中的亮氨酸残基疏水表面可形成二聚体, 而碱性区则与 DNA 结合有关. b. 螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH): 该结构最先由 Baltimore 及其同事提出, 其分子内含有一个螺旋-环-螺旋结构, 见于 E12, E47, Myc 和 MyoD^[6-8] 等. 因大多数 HLH 转录因子 N 端有一碱性区, 故又称 bHLH (basic helix-loop-helix). 突变研究证明, 两性 α 螺旋介导二聚体形成, 而碱性区则与 DNA 结合. 某些蛋白因子, 如 Id 不含碱性区, 因而不能与 DNA 结合, 在转录调控中起负性调控作用^[9]. c. 同形序列 (homeodomain, HD) 或译为同源异形域: 见于果蝇机体发育调节因子, Pit-1、OCT、Unc86、tw-POU 及 I-POU 等 POU 家族蛋白, 结构与原核 HTH (helix-turn-helix) 相似. 化学交联结合突变研究证明其螺旋-1, -2 与二聚体形成有关^[10]. d. 两性 α 螺旋: 见于 AP-2 的 HSP (helix-span-helix) 结构及某些核受体的二聚化结构. 此外, 尚有一些转录因子如 SRF (serum response factor) 和 NF κ B 等也可进行二聚化反应, 但其结构既非属上述类型, 彼此也无相似之处^[6]. 可见, 介导二聚化反应的结构类型至少在 5、6 种以上.

有些蛋白因子, 如 Myc、Max、Mad、USF 和 AP4 等既含 bHLH, 又含 LZ, 称 bHLH/Z 结构^[11], 其转录调控活性依赖于上述全部结构.

2 蛋白质-蛋白质相互作用 (二聚化) 方式

真核转录因子多以二聚体形式结合 DNA. 根据 λ 噬菌体基因开启机制, Ptashne^[12] 证明转录因子识别的 DNA 序列呈双倍旋转对称 (twofold rotationally symmetric). 真核转录因子结合 DNA 位点也遵循这一规律, 即双重对称 (图 1). 转录因子二聚体复合物中每个单体 DNA 结合表面 (碱性区) 分别与半个双重对称结构接触, 形成二聚体-DNA 复合物 (图 2).

GTGTAGGTCAC GTGACCTACAC
CACATCCAGTG CACTGGATGTG

图1 DNA序列的双重对称结构

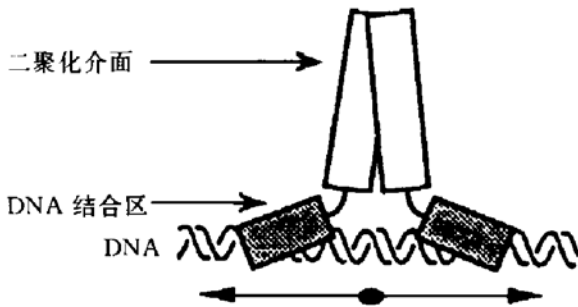


图2 二聚体结合DNA模式

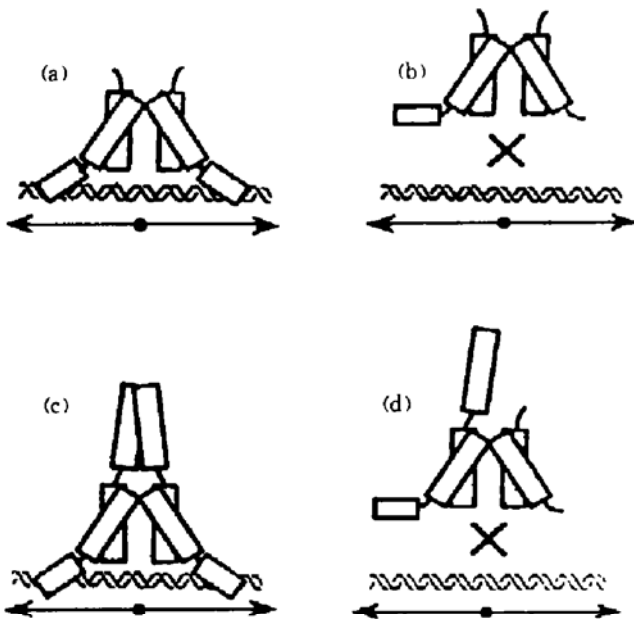


图3 异源二聚体对DNA结合活性的调节

(a) HLH同源二聚体, (b) HLH-Id异源二聚体,
(c) HLH-ZIP同源二聚体, (d) HLH-ZIP/Id异源二聚体。

各种转录因子可借其二聚化介面形成同源或异源二聚体。根据形成异源二聚体的能力,常可将含相同二聚化介面的蛋白因子分为不同亚族。例如,含LZ的C/EBP (C/EBP α 、 β 、 γ 和 δ), Fos-Jun (c-Fos、FosB、Fra及c-Jun、JunB、JunD)和ATF-CREB (ATF1-8, CRE-BP1, CREB-341, CREB-120k, TREB和HB16)亚族就是这样划分的^[6]。同一亚族成员彼此之间可形成异源二聚体,抑或不同亚族成员间,如Jun与ATF-CREB成员也可交叉聚合。有些蛋白因子含有一种以上的二聚化介面,如

Myc、Max、Mad和AP4等既含有bHLH,又含有LZ,从而使它们表现与MyoD1家族及C/EBP家族相似的二聚化反应,这不仅拓宽了二聚化反应范畴,使细胞内反应更加复杂,其更重要的意义还在于提高了同一族内二聚化反应的差异水平,使转录调节更加精细。不同的异源二聚体结合DNA的特性不同,例如,有的因子具有碱性区结构,有的则否,因而它们结合DNA的能力不同;含碱性区的不同因子结合DNA的能力也有一定差异。与同源二聚体相比,当具有不同DNA结合特性的两种单体形成异源二聚体后可能会增加或消除其结合DNA的能力(图3),这对转录激活调节具有特殊意义。

3 蛋白质-DNA相互作用

大多数b/HLH/Z转录因子特异识别DNA的序列为CANNTG,即所谓“E”盒子。其中一组b/HLH/Z因子识别序列为CAGCTG(A组);另一组识别CACGTG(B组)^[11]。个别b/HLH/Z转录因子具有独特的DNA结合序列,如SREBP-1识别ATCACC-CCAC中的两个CAC^[13]。

Max是一种b/HLH/Z蛋白,自身可形成同源二聚体,也可与Myc形成异源二聚体。Max同源二聚体特异识别CACGTG序列。Burley及其同事最近利用X射线结晶衍射分析了(Max)₂-DNA复合物三维结构,发现Max二聚体呈一平行的左手四螺旋束结构,从螺旋束突出的两个 α 螺旋及两个碱性区伸展指向DNA,并进入DNA双螺旋大沟(图4)^[11]。B式DNA螺旋平均旋转33.5°,螺距10.7bp,每个bp平均升高3.32Å。Wechsler和Fisher两研究室^[14,15]分别报告Max和有关蛋白结合的DNA链有50°—80°折角,然而Burley等未观察到DNA的净折角。这种差别可能系结晶包装效应(crystal packing effect)所致。(Max)₂-DNA相互作用时联接反应发生于Max 22-113的三个不同肽段^[11]: a. 碱性 α 螺旋区与DNA的CACGTG序列形成4个特殊

联接——His28 的 N ϵ 2 对 DNA G3' 的 N7 (3.9 Å), Glu32 的 O ϵ 1 对 C3 的 N4 (2.8 Å), O ϵ 2 对 A2 的 N6 (3.3 Å), Arg36 的 N η 对 G1' 的 N7 (2.8 Å). 此外, 碱性区某些残基如 Lys24 的 N ϵ 等与识别序列及相邻碳链骨架的磷酸基相互吸引、形成盐键联系. b. 环(loop)结构中的 Lys57 横越相邻的小沟稳定环的迂回曲折, 并使 Lys 侧链分枝伸进小沟、与相对的 DNA 碳链骨架磷酸基形成盐键. 这种迂回结构不仅可使环与毗邻的小沟、甚至大沟联系, 并为因子在 CACGTG 核心序列以外选择性地结合 DNA 提供可能性. c. 螺旋 2 (H2) 起始处的 Arg60 侧链与 C3 磷酸基接触、而主链酰胺基与 T4 磷酸基相联 (图 5).

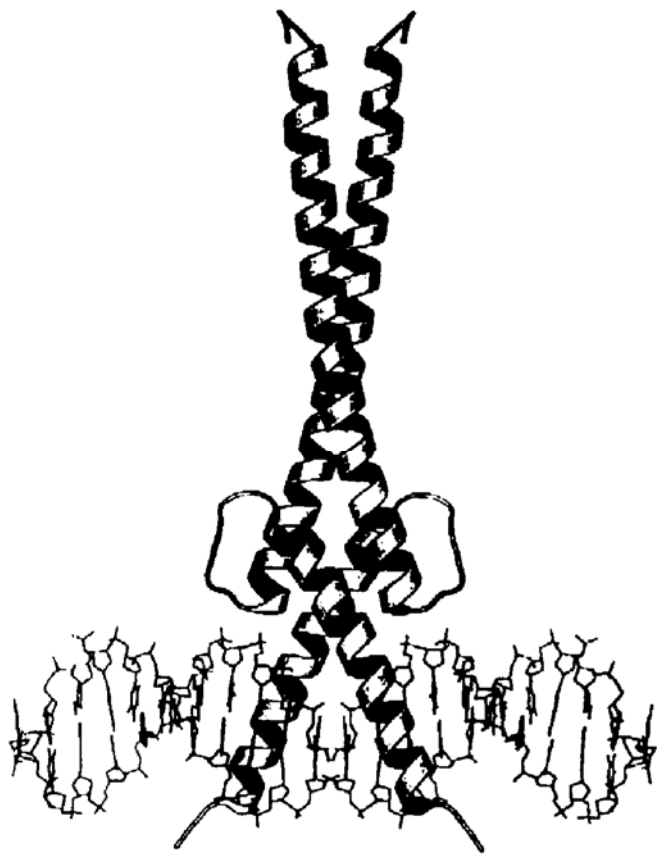


图 4 (Max)₂-DNA 复合物模式

定点突变证明, bHLH 和 b/HLH/Z 转录因子在 DNA 结合反应中均涉及碱性区的保守残基^[6-8]. 只是因子不同, 个别氨基酸残基也略有差异, 它们似与特异 DNA 序列的识别有关. 例如, 结合 CACGTG 的 Max 蛋白其 36 位

残基为 Arg, 而识别 CAGCTG 的因子其 36 位为极性或非极性残基^[16]; 酵母 HLH 蛋白 Pho4 碱性区含一 Glu 残基, 若将其置换突变也会使 Pho4 丧失其 DNA 结合活性, 说明保守的 Glu 残基是结合 DNA 活性必不可少的^[17].

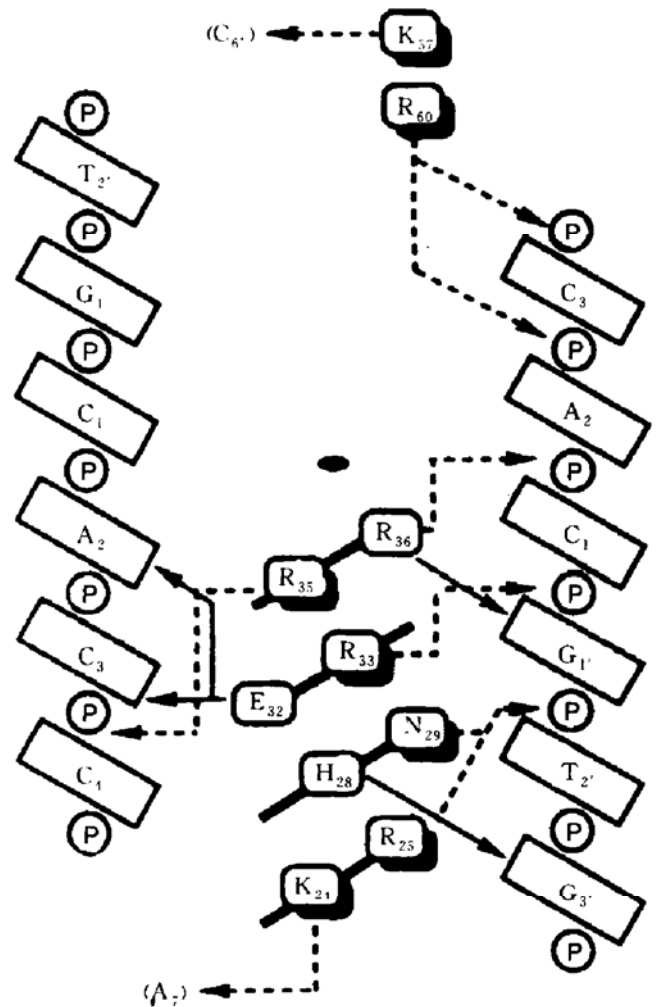


图 5 Max 22-113 与 DNA 的联接

4 蛋白质-蛋白质/蛋白质-DNA 相互作用对转录激活的调节

各族转录因子不同成员间二聚化反应的多样性为真核基因转录调控提供了巨大潜力. 不同形式的二聚体具有独特的调节能力和功能特性, 异源二聚体 DNA 结合效率明显高于同源二聚体. 如 Jun-Fos 二聚体对 AP1 识别位点的亲和力要较 Jun 同源二聚体为高; MyoD 与 E12 或 E47 形成的异源二聚体较 MyoD, E12 或 E47 同源二聚体能更好地结合免疫球蛋白 k

链增强子的 kE2 结合位点. 二聚化可能还与 DNA 结合特异性有关. 例如, Jun A 蛋白既可与 Fos 形成二聚体, 也可与 ATF/CREB 蛋白家族某些成员有效地二聚化, 但 Jun/Fos 二聚体识别 AP-1 位点优先于 CRE 识别元件, 而 Jun/CREB 复合物识别靶位点的作用却恰好相反^[4]. 由此可见, 二聚化配体的选择可影响 DNA 结合的特异性.

最近的研究表明^[18], 二聚化作用在调节 Myc 蛋白生物活性过程中起重要作用. Myc 是一种重要的转录调节因子, 与肿瘤发生、生长及分化有关. Myc 蛋白在生理水平很少同源二聚化, 也很少结合 DNA. 标记研究发现细胞中大部分新合成的 Myc 与 Max 形成复合物, 提示 Myc 转录调节作用的发挥大多需通过与 Max 蛋白相互作用、形成二聚体而介导. 前已述及, Max 可形成同源二聚体, 也可与 Myc 形成异源二聚体. 两种二聚体均可识别同一 DNA 序列 (CACGTG), 但 Myc-Max 异源二聚体的 DNA 结合能力较 Max 同源二聚体强^[19]. Myc-Max 异源二聚体和 Max 同源二聚体的相对量也可影响基因的转录活性^[20]. 靶基因转录激活受 Myc 过量表达刺激, 而受 Max 过量表达抑制; Myc 的过量表达可减弱 Max 引起的抑制效应. 这一事实提示: 通过变化相关转录因子的表达水平、实现 Max 同源二聚化向 Myc-Max 异源二聚化反应的过渡, 引起抑制效应向激活效应的转变, 使靶基因转录激活. Myc 调节过程说明竞争机制不仅存在于二聚体与 DNA 的结合过程, 也存在于转录因子单体的二聚化过程. 竞争结合产生负性调控作用的例子是 Id. Id 可通过其 HLH 结构与 MyoD1 竞争结合 E 蛋白, 使 E-MyoD1 二聚体形成减少或阻断, 从而抑制依赖 MyoD1 的靶基因转录激活^[9] (图 6). Id 通过上述机制调节 MyoD1 等调节因子的活性很有意义. Benezra 等证明, 肌细胞分化时 Id 水平明显降低, 这个发现能合理解释为什么生肌细胞和肌细胞中 MyoD1、E12/E47 蛋白水平一样, 然而肌酸激酶表达却仅限于分化细胞.

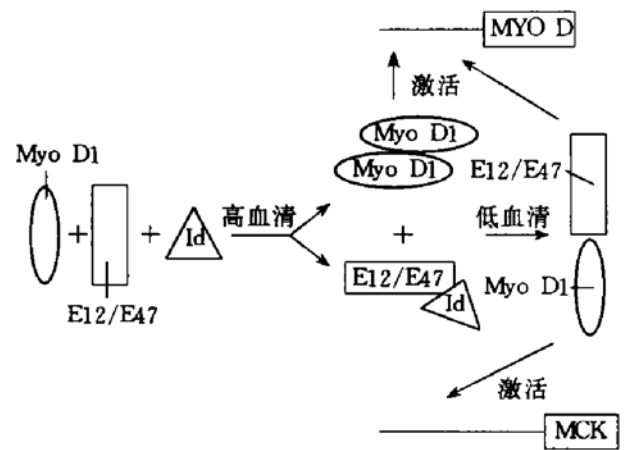


图 6 Id 对 MyoD1 靶基因的负性调控
MCK: 肌肉肌酸激酶基因; MYO D: MyoD1 基因.

Cf1-a 可形成同源二聚体, 结合 DNA 后可激活多巴脱羧酶基因转录活性. Treacy^[10]发现, 当 Cf1-a 与另一种核蛋白 I-POU 形成异源二聚体后, 可阻断 Cf1-a 与 DNA 的结合, 抑制多巴脱羧酶基因的活化 (图 7). 类似的例子见于果蝇外周神经发育调节因子——*emc* 和 *h* 基因产物对 AS-C 和 *da* 调节因子活性的拮抗作用, 上述事实说明家族成员间竞争相互作用在真核基因转录调节中具有普遍意义.

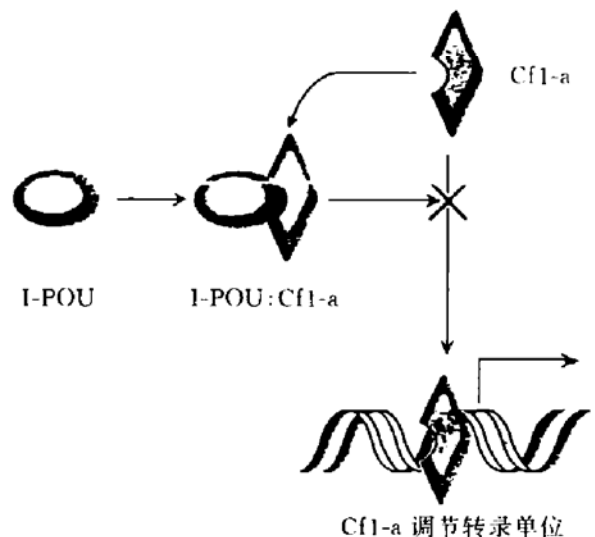


图 7 I-POU 对 Cf1-a 的拮抗作用

参 考 文 献

- 1 王 军, 贾弘提. 生物化学与生物物理进展, 1993; 20 (5): 329

- 2 Michell P J, Tjian R. *Science*, 1989; **245**: 371
- 3 Jones N. *Cell*, 1990; **61**: 9
- 4 贾弘提. 生理科学进展, 1993; **24** (4): 298
- 5 Courey A J, Holtzman D A, Jackson S P *et al.* *Cell*, 1989; **59**: 827
- 6 Lamb P, McKnight S L. *TIBS*, 1991; **16**: 417
- 7 Olson E N. *Genes Dev*, 1990; **4**: 1454
- 8 Davis R L, Cheng P F, Lassar A B *et al.* *Cell*, 1990; **60**: 733
- 9 Benezra R, Davis R L, Lockshon D *et al.* *Cell*, 1990; **61**: 49
- 10 Treacy M N, Neilson L I, Turner E E *et al.* *Cell*, 1992; **68**: 491
- 11 Ferre-D' Amare A R, Prendergast G C, Ziff E B *et al.* *Nature*, 1993; **363**: 38
- 12 Ptashne M. *A genetic switch*. Cambridge, Massachusetts: Blackwell Scientific Publications & Cell Press, 1986: 33
- 13 Yokoyama C, Wang X, Briggs M R *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 187
- 14 Wechsler D S, Dang C V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 7635
- 15 Fisher D E, Parent L A, Sharp P A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 11779
- 16 Dang C V, Dolde C, Gillison M L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; **89**: 599
- 17 Fisher F, Goding C R. *EMBO J*, 1992; **11**: 4103
- 18 Ayer D E, Kretzner L, Eisenman R N. *Cell*, 1993; **72**: 211

- 19 Blackwood E M, Eisenman R N. *Science*, 1991; **251**: 1211
- 20 Kretzner L, Blackwood E M, Eisenman R N. *Nature*, 1992; **359**: 426

Protein-Protein and Protein-DNA Interactions in the Regulation of Eukaryotic Transcription. Li Mingyi, Jia Hongti (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Protein-protein and protein-DNA interactions and interaction-mediating structure of both protein and DNA molecules were summarized by combination of structure-function studies on eukaryotic transcription factors and DNA. Coordinate or antagonistic activities occur after protein-protein interactions and DNA binding reactions. Dimerization and competition in these interactions are of an universal importance in the regulation of eukaryotic transcriptions.

Key words protein-protein interaction, protein-DNA interaction, regulation of eukaryotic transcription

线粒体 DNA 和疾病

蒋秉坤

(蚌埠医学院临床生物化学教研室, 蚌埠 233003)

摘要 人线粒体 DNA 是含有 16569 bp 的闭环双链分子. 它为 13 种氧化磷酸作用酶的亚单位、结构 rRNAs 和 tRNAs 编码. 近年来很多引起人类疾病的线粒体 DNA 突变已被确定, 如眼盲、耳聋、心力衰竭和人类退行性疾病等. 线粒体 DNA 疾病可能比先前想象的多.

关键词 线粒体 DNA, 基因突变, OXPHOS 疾病

线粒体 (mitochondrial, mt) 是高等动物细胞内含有 DNA 的细胞器. 植物和某些单细胞真核生物除线粒体外可能还有叶绿体. 线粒体呈卵圆形, 大小为 $0.5\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ — $0.5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. 在结构上有外膜、高度折叠的内膜和基

质, 是进行氧化磷酸化反应的部位和为细胞提供能量的主要场所. 食物中有机分子通过三羧酸循环一系列化学反应降解产生 CO_2 和 H_2O ,

收稿日期: 1994-01-22, 修回日期: 1994-05-23