

Advance of Pyrophosphate: Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase. Li Ji, Zhang Hongyuan (*Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064, China*).

Abstract Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) catalyzes the reversible conversion of fructose-6-phosphate and fructose-1, 6-bisphosphate. The

enzyme generally exists in kinds of higher plants and some of microorganisms. Some advance in the research of PFP after 1990 was reviewed. It contains the types and the constitution of subunits, the active center, the substrate specificity, the regulation of activity and the function of PFP.

Key words PFP, fructose-6-phosphate, fructose-1, 6-bisphosphate, glycolysis, glycogenesis

蛋白质特异性断裂试剂研究进展*

孙自勇 周 颂 胡建中** 朱德煦

(南京大学生物化学系生物医学国家重点实验室, 南京 210093)

陈晓华 朱龙根

(南京大学化学系配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 蛋白质特异性断裂试剂是近年来发展起来的一些具有特异性断裂肽键功能的化学工具。这些断裂试剂可分为两类,一类通过氧化断裂机制实现蛋白空间结构特异性切割,另一类通过水解断裂机制实现序列特异性切割。蛋白质特异性断裂试剂在蛋白质序列测定,蛋白质的结构与功能研究,蛋白质与核酸相互作用研究以及新型化学治疗药物的合成等方面有着广阔的应用前景。

关键词 蛋白质特异性断裂,氧化断裂,水解断裂

蛋白质水解酶以及某些化学试剂如溴化氰、羟胺等具有专一性水解肽键的能力。这极大地方便了蛋白质的序列测定及其结构与功能研究。然而,与数目庞大的特异性核酸酶相比,蛋白质水解酶类的数量甚少,远远不能满足科研及应用开发的需要,因此人工蛋白质特异性断裂试剂的研究近年来正受到日益密切的关注。蛋白质特异性断裂试剂与蛋白质以化学剂量进行肽键断裂反应,因而它并不是酶。但它却具有酶催化反应的高度专一性,通过将参与断裂反应的活性基团与蛋白质的底物、受体或配体相连,就可以实现对该蛋白特定位点的切割。这与化学合成的DNA断裂试剂对DNA特

定位点进行切割的原理是完全类似的^[1,2]。此外,在蛋白质断裂试剂中另一种常用的方法是将金属配合物与蛋白质侧链上特定基团直接相连,以实现邻近肽键的断裂。蛋白质的断裂机理主要有水解断裂与氧化断裂两种。以下我们将分别予以讨论。

1 氧化断裂

1.1 断裂机理

蛋白质的氧化断裂主要通过局部产生的一

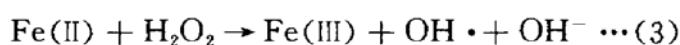
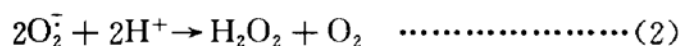
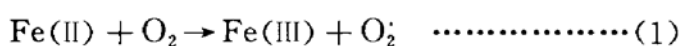
*国家自然科学基金资助项目。

**通讯联系人。

收稿日期: 1994-07-13, 修回日期: 1995-04-10

类含氧的高反应活性物质进攻并断裂肽键. 产生这一类物质的氧化断裂体系包括: a. 过渡金属离子或它们的配合物. 这些金属离子必须具有氧化还原性, 能在高低氧化价态间发生转化. 目前常用的有 Cu (II)、Fe (III) 及其配合物如 Fe (II) · EDTA 等. b. 还原剂, 用于还原在反应中被氧化的金属离子. 抗坏血酸和二硫苏糖醇 (DTT) 是最常用的还原物质. c. 分子氧, 作为氧化剂^[3].

Orr 等人认为 Cu²⁺ 和抗坏血酸对过氧化氢酶的降解作用是通过自由基 OH· 或 O₂⁻ 实现的, 这一类含氧自由基通过 Fenton 反应产生 (以过渡金属铁为例): 首先是氧分子氧化二价铁, 并产生超氧化物负离子自由基 (式 1), 再经历一个歧化反应 (式 2), 产生了 H₂O₂, H₂O₂ 可将 Fe (II) 氧化并产生氢氧自由基 OH· (式 3)^[4,5]. 由 OH· 自由基进攻邻近的肽键, 使之断裂, 同时附近氨基酸残基的侧链会产生氧化修饰反应^[6].



Kim 等^[4]的实验有力地支持了 Fenton 机理, 他们用 DTT-Fe²⁺ 体系切割酵母谷氨酰胺合成酶 (GS), GS 被降解为片段, 同时还有肽链交联产生的大分子物质. 如在体系中加入过氧化氢酶或超氧化物歧化酶则能保护 GS 免受降解, 这与 H₂O₂ 及 O₂⁻ 是 OH· 产生的中间体的假设是一致的. 但 K. Kim 等同时发现, 自由基清除剂对 GS 保护效应很小, 他们认为自由基只产生于蛋白质的特定位点, 在它们向外扩散遇到清除剂之前, 就已经与邻近氨基酸的肽键发生反应. 自由基的产生不会造成蛋白质的大范围降解, 原因也在于此.

但 Rush 和 Koppenol^[3]认为自由基清除剂之所以不能有效抑制氧化断裂作用, 并不是因为在特定位点形成了所谓“隐”氢氧自由基, 真正引起氧化降解作用的是一种四价铁的中间产物 (图 1), 这是一种很强的氧化剂, 能对肽键产生强烈的破坏作用. 不过这种机制并未得到

广泛的接受.

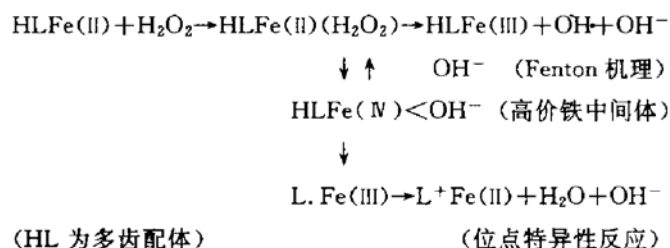


图 1 氧化断裂的四价中间体机制

目前用 Fenton 机理可以解释绝大部分肽键的氧化断裂现象. 但并不是所有的断裂都是通过中间产物 OH· 进行. Rana 和 Meares^[6]在分析用铁配合物断裂碳酸酐酶的实验结果时, 提出断裂反应是通过另一种高度亲核性的含氧化合物中间体介导的. 在此中间体中, 过氧化氢与铁通过配位键相连. 因此, 氧化断裂的普遍机理应认为是通过一类含氧的高反应活性物质进行的.

1.2 蛋白质断裂的特异性

氧化断裂反应中 OH· 的局部反应性为蛋白质的特异性断裂提供了前提. 为了达到特异性断裂, 首先要将金属或金属配合物断裂体系运送到蛋白质的特定位点上. Tabor 等人^[5]的实验很具有代表性: T7DNA 聚合酶的外切酶和聚合酶活性存在于两个不同的结构域中, 其中外切酶结构域含有金属离子结合位点, 在 Fe²⁺, O₂ 和还原剂的存在下, 外切酶结构域受到氧化降解而使其核酸外切酶活性完全丧失. 而聚合酶活性却变化不大, 产生只具有聚合酶活性的修饰 T7DNA 聚合酶. 目前达到断裂特异性的途径主要有两条:

1.2.1 通过能与蛋白质特异性亲和的载体: 与 DNA 特异性亲和载体相比, 能与蛋白质特异性结合的物质种类要少得多, 一般采用蛋白特异结合性小分子物质, 如某些配体或酶的底物都是潜在的连接载体. Schepartz 和 Cuenoud^[7]将 EDTA-Fe (II) 连接在三氟甲哌丙嗪 (trifluoperazine) 上, 利用钙调蛋白能与之特异性结合的性质, 将实现了对钙调蛋白的位点特异性切割.

而 Hoyer 等^[8]则将生物素与 EDTA-Cu (II) 或 Fe (II) 相连接, 这种复合物能与抗生蛋白链菌素 (streptavidin) 中的生物素结合, 并在该位点附近断裂肽键。

1.2.2 通过侧链氨基酸残基的特定基团与蛋白质相连: 利用金属配合物与氨基酸侧链上杂原子的配位作用而使之标记在蛋白质上, 最常用的配位基团是 Met 或 Cys 上的硫原子. Rana 和 Meares^[9]合成了一种 Cys 亲和试剂 1-(对溴乙酰氨基苯)-EDTA, 它能与小牛血清白蛋白 (BSA) 上仅有的 Cys34 自由巯基配位, 经 Fe、H₂O₂ 和抗坏血酸处理, 产生三个肽段. 断裂发生在 Ala150 与 Pro151 以及 Ser190 与 Ser191 之间. 用同样的试剂处理含有 Cys212 的碳酸酐酶, 在 Leu189 和 Asp190 之间也产生断裂^[6], Ermácora 等^[10]将葡萄球菌核酸酶基因突变以产生 Cys28 残基, 并将另一种 Cys 特异亲和试剂 (EDTA-2-氨基乙基)-2-吡啶二硫化物 (EPD) 与 Cys28 相连, 加入 Fe (II) 与抗坏血酸后, 在 Lys71-Ile72, Lys78-Gly79, Gln80-Arg81 以及 Lys84-Tyr85 之间都产生了断裂. 直接连接是蛋白质特异性断裂所特有的方法, 利用不同氨基酸残基性质的差异, 我们就能将断裂试剂特异性连接到所需的基团上。

1.3 蛋白质氧化断裂的空间结构专一性

蛋白质在氧化断裂过程中大都表现出对蛋白质三维结构的依赖性, 许多蛋白质只有在天然状态下才能被断裂, 在 Rana 和 Meares^[9]的实验中, BSA 经 SDS 处理变性后, 断裂作用几乎丧失. 对与钙调蛋白来说, 只有在处于钙结合构象时, 它才能被三氟甲哌丙噻-EDTA-Fe (II) 复合物断裂, 一旦失去 Ca²⁺, 这种断裂作用就不存在了^[7]. Ermácora 等^[10]的结果则表明, 葡萄球菌核酸酶经 SDS 处理变性后, 断裂方式发生变化, 原有断裂位点不再受到攻击, 断裂反应仅发生在与 Cys28 一级结构邻近处. 这些都说明了蛋白质三维结构对氧化断裂的影响是很大的。

进一步的研究表明, 肽键氧化断裂反应是定向的, 只有在空间上与切割试剂相邻近的肽

键才能受到攻击并被断裂. 在葡萄球菌核酸酶的断裂反应中, Cys28 位于蛋白质表面的 β 转角中, 所有断裂位点都与这个 β 转角相邻, 也就是断裂反应发生在与断裂试剂结合位点空间邻近处. BSA 及碳酸酐酶的定点断裂表明: 除了邻近作用以外, 被断裂肽键的取向对断裂作用也有影响^[11]. 在碳酸酐酶的三维结构中, 与 Cys212 相邻的残基有 Gly145、Leu189, 但在 Cys212 上连上断裂试剂后, 只有 Leu189 与 Asp190 之间的肽键发生断裂, Ile144 和 Gly145 或 Gly145 与 Val146 之间的肽键都没有断裂. 这是因为在空间结构上 189~190 肽键与 Cys212 平行, 而 145~146 肽键却和 Cys212 指向相背. 反应中配位的氧对羰基的进攻受肽键取向的影响, 在取向平行的状态下肽键易受攻击, 因而只有 189~190 肽键被断裂。

1.4 蛋白质氧化降解的应用

蛋白质特异性断裂试剂具有空间结构专一性. 这种断裂三维空间相邻近肽键的性质使它们在蛋白质序列测定、蛋白质多结构域之间或蛋白质多亚基之间的空间相互作用研究中有着重要的价值. 不仅如此, 潜在的应用还包括蛋白之间以及蛋白质与核酸相互作用的研究, 以及对于处于部分解折叠状态蛋白质的构象分析. 此外, 氧化断裂试剂在医学上也有其用途. Ettner 等^[12]用 Fe²⁺ 代替四环素上结合的镁, 并用氧化断裂的方法测定出了革兰氏阴性菌四环素抑制蛋白的四环素结合位点. 进一步的设想在于利用氧化断裂机制合成具有特定靶目标的治疗药剂。

2 水解断裂

蛋白质的水解断裂, 主要利用一些金属配合物加速特定肽键的水解, 以达到专一性断裂的目的. Chin^[13]曾提出过酯、酰胺、磷酸二酯等物质的共同催化水解机制, 有三条不同的路线 (图 2)。

蛋白质的水解断裂一般都沿着与上述三条路线的某一条类似的途径进行. 其特点是将过渡金属配合物连接在肽键特定的氨基酸残基

上, 以达到特异性切割的目的. Sutton 等^[14]与 N 端相连接的 Co (III) 配合物能特异性催化肽链 N 端酰胺键的水解. 反应通过五员螯合物中间体进行, 由于 Co (III) 只能特异地连接于肽链 N 端氨基上, 因此它的作用只类似于氨肽酶, 应用价值不大.

2.1 水解断裂的分子机理

被切割酰胺键与水解断裂试剂的相互作用具有双重性, 一方面, 肽键上的氮原子与金属原子的配位稳定了相应的酰胺键, 从而抑制了它的断裂 (图3a), 另一方面, 金属配合物与羟基的相互作用通过两种机制引起肽键断裂. 第一种机制称为外部进攻机制, 金属原子与羰基碳原子形成螯合物, 极化了碳氧键, 使溶剂水易于从外部攻击酰胺键, 切断肽键 (图3b). 第二种机制称为内部传递机制, 一个与金属原子相连的配体被从内部传递到羰基碳原子, 经过一个瞬时的环化中间态, 通过分子内反应水解酰胺键^[16] (图3c). 这两种机制分别对应于前述的 Lewis 酸机制与金属氢氧化物机制, 而它们之间的差别在于水分子是来自于溶剂还是来自于金属配合物. 至于采取哪一种机制, 主要取决于金属原子相连的氨基酸侧链状况. 如图3中 X=1 时, 能形成较稳定的六员螯合环, 这时将采用外部进攻机制, 而当侧链状况允许金属-水复合物与切割位点相接近时内部传递机制可能更起作用. 图3中当 X=2 时如采用外部进攻机制将产生七员螯合环, 这对过渡态的稳定性是不利的, 而较长的链便于金属-配体与切割位点接近, 此时内部传递机制将被采用^[16].

图2 J. Chin 所提出的肽键催化水解机制

M 代表金属离子. (a) Lewis 酸途径: 金属离子与底物形成 Lewis 酸, 受到溶剂水的进攻; (b) 金属氢氧化物途径: 由与金属配位的水进攻肽键; (c) 这条途径中金属兼有以上两种机制中的作用.

朱龙根、Kostic^[15~17]采用 Pt (II)、Pd (II) 等过渡金属配合物进行了特异性内切研究. Pd (II)、Pt (II) 配合物能与 Cys、Met、His 及其它氨基酸衍生物中的硫原子或氮原子特异性配位, 并促进与金属配合物相连的氨基酸的羧基参与形成的肽键的水解. 最近他们^[18]用 *cis*-[Pd (en) (H₂O)₂]²⁺ 成功地将马心细胞色素 c 中的 His18-Thr19 肽键断裂, 产率达到了 60%.

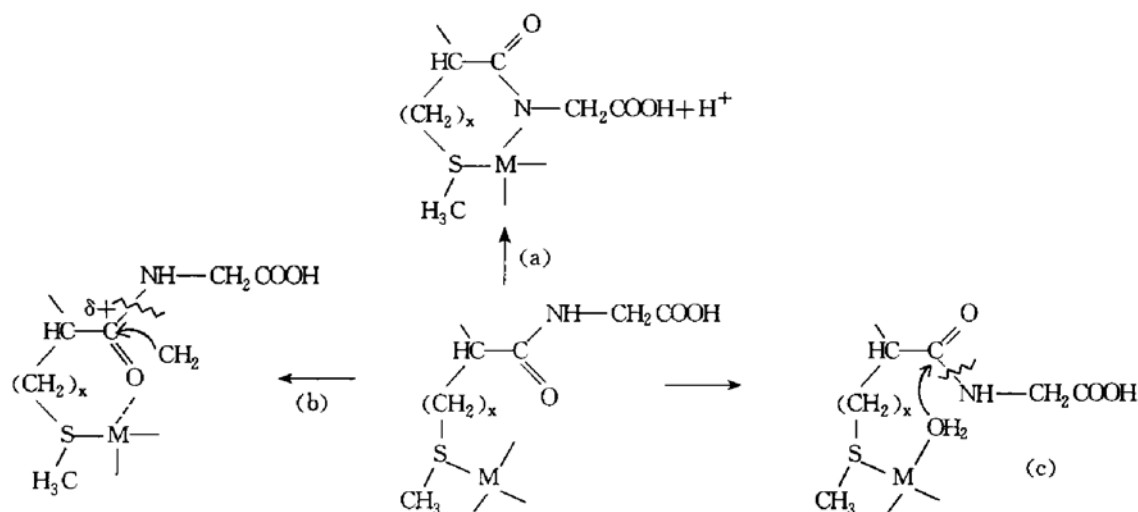


图3 Pd (II), Pt (II) 催化肽键水解的反应机理

通过¹H-NMR 谱等研究表明 Pd (II) -H₂O 配体与底物形成的有水解活性的配合物是双核

的 (图4). 在此配合物中配位水与底物分子顺式配置. 水分子能被传递到切割位点而配体水

与硫醚键呈反式配置, 因此 Pd—O 键特别脆弱, 配合物的这种立体化学和动力学特性, 使双核配合物能比单核配合物更有效地促进水解^[16,17].

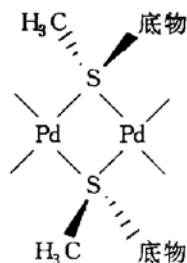


图4 双核配合物结构示意图

2.2 肽键水解的影响因素

肽键的水解断裂反应受到许多因素的影响: 首先是肽键的水解具有立体选择性, 只有与水解断裂试剂相连的 Met 或 Cys 基团羧基端的肽键才被水解, 而氨基端的肽键不被降解. 其次, 与被切割肽键邻近的氨基酸残基对断裂反应速度有很大影响, 作为离去基团的氨基酸对被切割肽键有屏蔽作用, 能阻止金属配合物的接近. 氨基酸空间体积越大, 屏蔽效应就越强烈, 水解效率也越低. 第三, pH 值对切割反应也有影响, 当酸度下降时, 水解速度也随之降低. 实际上 pH 值上升引起的水解速度常数的降低是由于形成了羟基桥连配合物, 从而失去了促使肽键水解的功能. 第四, 对一些双核配合物断裂试剂而言, Cl^- 在很大程度上抑制肽键水解反应. 这是因为 Cl^- 的存在可使这些双核配合物分解, 从而降低了水解活性. 此外含硫化合物也能通过与氨基酸侧链竞争金属配合物而抑制对肽键的水解作用^[16,17].

2.3 水解断裂的特异性

Pt (II)、Pd (II) 配合物断裂肽键的特异性来自于它们与氨基酸侧链硫原子的特异亲和力, 这些配合物连接到 Met 或 Cys 等氨基酸残基上, 就能特异性切割它们羧基参与形成的肽键. 如果氨基酸侧链缺乏与金属原子配位的基团, 则不能形成稳定的螯合物, 因而不能被促进水解, 但如果形成的螯合物过于稳定的话, 则

同样不利于水解. 此外, 前面提到水解速率常数受到被切割肽键所连接的氨基酸残基侧链空间位阻的影响, 这些都可用于发展序列特异性的金属肽酶.

与氧化断裂法相比, 水解断裂法有其优点, 主要在于水解过程中不发生氧化修饰反应, 断裂后产生的末端仍能通过肽键连接起来, 而且断裂体系比氧化断裂简单. 但这种断裂方法尚处于探索过程中, 在许多方面还很不完善. 如以上所述实验是在酸性条件下进行的, 如何不断提高 pH 值, 使切割能在中性条件下进行以及如何克服蛋白的空间位阻对断裂试剂肽键水解影响等都是尚待解决的问题.

综上所述, 蛋白质特异性断裂试剂的研究工作目前受到了广泛的关注. 对于氧化断裂试剂来说, 发展的关键在于扩大载体的范围, 使蛋白质能在所需的任何位点断裂, 而对于水解断裂试剂来说, 目前主要应改善水解的 pH 条件, 同时解决空间位阻对水解效率的影响. 并进一步增加肽键特异性水解试剂的种类. 蛋白质特异性断裂试剂的发展, 必将能弥补特异性蛋白水解酶的缺乏, 促进化学及其相关学科的研究.

参 考 文 献

- 1 沈先荣, 韩 玲. 生物化学与生物物理进展, 1993; **20**: 342
- 2 Ebright R H, Ebright Y W, Shannon P P. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87**: 2882
- 3 Rush J D, Koppenol W H. J Am Chem Soc, 1988; **110**: 4957
- 4 Kim K. J Biol Chem, 1985; **260**: 15934
- 5 Tabor S, Richardson C C. J Biol Chem, 1987; **262**: 15530
- 6 Rana T M, Meares C F. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 10578
- 7 Schpartz A, Cuenoud B. J Am Chem Soc, 1990; **112**: 3247
- 8 Hoyer D, Cho H, Schultz P G. J Am Chem Soc, 1990; **112**: 3249
- 9 Rana T M, Meares C F. J Am Chem Soc, 1990; **112**: 2457
- 10 Ermacora M R, Delfino J M, Bernard C *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 6383
- 11 Rana T M, Meares C F. J Am Chem Soc, 1991; **113**:

1859

12 Ettner N, Hillen W. J Am Chem Soc, 1993; **115**: 254613 Chin J. Acc Chem Res, 1991; **24**: 14514 Sutton P A, Buckingham D A. Acc Chem Res, 1987; **20**: 35715 Burgeson I E, Kostic N M. Inorg Chem, 1991; **30**: 429816 Zhu L G, Kostic N M. Inorg Chem, 1992; **31**: 399417 Zhu L G, Kostic N M. J Am Chem Soc, 1993; **115**: 456618 Zhu L G, Lin Q, Kostic N M. J Am Chem Soc, 1994; **116**: 5218

Research on Protein Specific-Cleavage Reagents. Sun Ziyong, Zhou Song, Hu Jianzhong, Zhu Dexu (*Biochemistry Department, Nanjing University, Nanjing 210093, China*); Chen Xiaohua, Zhu Longgeng (*Cooperation Chemistry Institute, Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

Abstract Protein specific-cleavage reagents refer to those chemical tools which can cut off peptide-bonds specifically. These reagents can

be divided into two classes. The first is called oxidative cleavage reagents. Oxidative cleavage has the property of stereo-specificity. Only the peptide bonds which close to cleavage system in tertiary structure are cleaved. The second is called hydrolytic cleavage reagents. These complexes can catalyze the hydrolysis of specific peptide bonds directed by protein sequence specificity. Protein specific-cleavage reagents are useful for protein sequence analysis, for studies on the relationship between structure and function of protein and for synthesis of new chemical therapy drugs. The development of these reagents will improve the studies on protein chemistry and other relative subjects.

Key words protein specific-cleavage, oxidative cleavage, hydrolytic cleavage

电子通讯与生物大分子序列分析

王槐春

(军事医学科学院医学情报研究所, 北京 100850)

摘要 交互网络 (Internet) 的发展为联网的计算机用户之间进行信息交流提供了有效途径. 就分子生物学家而言, 他们不仅可以利用电子邮件系统发送和接收信息, 而且更重要的是能够存取大量的分子生物学数据库和软件. 利用 Internet 可以开展多种序列分析作业, 包括序列数据库的类似性检索、基因编码区鉴定和蛋白质二级结构分析等. 一个数据库, 例如 GenBank, 可以通过多种方式来存取: a. 电子邮件文件服务器, b. 文件传送协议 (FTP), c. Gopher, WAIS 或 WWW 等服务器-客户机 (Server-Client) 系统. 专为分子生物学家设计的 BIOSCI 电子公告牌为研究人员开展学术讨论、寻求别人帮助和与数据库人员交流提供了极大的方便.

关键词 电子通讯, 交互网络, 序列分析, 数据库

随着核酸和蛋白质序列数据的急剧增加和分子生物学家对最新序列数据的需要, 用磁带、磁盘甚至光盘已不能满足大量数据的存贮和数据库迅速更新的要求, 另一方面长期维持订购一套 (或几套) 核酸和蛋白质数据库、购买不

断涌现的新的序列分析软件也是一项巨大的开支^[1]. 近年来, 随着全球性信息高速公路的建设, 越来越多的分子生物学数据库和软件与国际计算机网络系统连结, 任何一台与之连网的