

第三章 蛋白质的功能及其与结构之间的关系

蛋白质是生物体各项功能的主要执行者。然而,任何一种蛋白质的功能都与其独特的结构密不可分,特别是三级结构。揭示蛋白质结构与功能的关系是当今蛋白质研究领域最重要的内容之一,而根据一级结构的信息预测一种多肽或蛋白质的三级结构,并进而对其功能进行预测一直是生物化学家的终极目标。

本章首先会简单地总结一下蛋白质在机体内行使的主要功能,然后将重点介绍蛋白质的功能及其与结构之间的关系,以及几种重要的蛋白质的结构与功能。

第一节 蛋白质的功能

在某种意义上,每一种蛋白质都可视为一种独特的生物功能试剂,因为生物体内的每一项功能几乎都涉及一种或几种甚至多种特定的蛋白质。对一种蛋白质功能的生物学定义可以从不同的角度来理解。

对于生物化学家来说,一种蛋白质的功能意味着其在机体内承担的生化角色。如果是酶,其功能就是催化反应。如果是信号分子或运输蛋白,其功能就是在信号转导或运输过程中与其他分子之间发生相互作用。对于遗传学家或细胞生物学家来说,蛋白质的功能不仅包括其生化功能,还包括它的细胞学功能,例如它作用的途径,它的缺失或突变引起的表型变化;对于生理学家或发育生物学家来说,蛋白质功能的定义则更为广泛。

这里只集中讨论蛋白质的生化功能,它们主要包括:

- (1) 充当生物催化剂 即酶,催化机体内的各种生化反应(参见第八章“酶学概论”)。
- (2) 调节其他蛋白质行使特定的生理功能或者调节基因的表达 例如,周期蛋白(cyclin)调节依赖于周期蛋白的蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinase, CDK)的活性,阻遏蛋白(repressor)和激活蛋白(activator)分别抑制和激活特定基因的表达。
- (3) 运输 例如,血红蛋白运输氧气,转铁蛋白(transferrin)运输 Fe^{3+} ,清蛋白运输脂肪酸,载脂蛋白运输脂肪和胆固醇,玉米脂质转移蛋白(lipid-transfer protein)运输油酸。
- (4) 贮存 例如,铁蛋白(ferritin)为细胞贮存铁,肌红蛋白为肌细胞贮存氧气。
- (5) 运动 例如,鞭毛蛋白(flagellin)参与细菌和古菌基于鞭毛的运动,肌动蛋白(actin)和肌球蛋白(myosin)的相互滑动导致肌细胞收缩或松弛。
- (6) 为细胞和机体提供结构支持 例如,胶原蛋白在动物的结缔组织中主要起结构支持的作用;许多古菌的细胞壁的主要成分是蛋白质。
- (7) 信号转导 例如,胰岛素及其受体的相互作用导致血糖浓度的下降(参见第十七章“激素及其受体介导的信号转导”)。
- (8) 免疫 例如,抗体参与体液免疫,T细胞受体参与细胞免疫。
- (9) 产生特定的毒性 例如,霍乱毒素(cholera toxin)作用高等动物小肠细胞内的 G_s 蛋白,使其丧失 GTP 酶活性,从而导致霍乱的发生;蓖麻毒素(ricin)作用真核细胞的核糖体,致使真核细胞的蛋白质合成受到强烈的抑制。
- (10) 具有一些奇异的功能 这些蛋白质仅存在于某种或者某些特别的生物体内。例如,来自维

多利水母体内的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 受紫外线的激发, 可发出绿色的荧光, 一种植物的乐果甜蛋白 (monellin) 具有极高的甜度, 是一种天然的甜味剂, 来自南极鱼体内的抗冷冻蛋白可帮助南极鱼抵御严寒; 来自某些节肢动物的弹性蛋白 (resilin) 具有超常的弹性, 由某些海洋动物 (如贻贝) 分泌的胶原蛋白具有超强的黏性。

然而, 并不是一种蛋白质只能行使一种功能。近来发现了一些蛋白质虽然只有一种结构, 但却能行使几种甚至多种不同的功能。这些兼有其他功能的蛋白质被称为兼职蛋白 (moonlighting protein)。例如, 许多动物体内的磷酸己糖异构酶除了在细胞内参与糖酵解以外, 还能由 T 淋巴细胞分泌到胞外充当一种神经白介素 (neuroleukin), 促进胚胎内某些神经元的存活, 以及促进 B 淋巴细胞的成熟。此外, 它还是一种自分泌运动因子 (autocrine motility factor), 在由某些癌细胞分泌以后, 可刺激癌细胞的迁移和扩散; 再如, 人体内参与糖酵解的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 以四聚体的形式存在于细胞质基质, 而当以单体的形式存在于细胞核的时候, 它却是一种尿嘧啶-DNA 糖苷酶 (uracil-DNA glycosylase), 参与 DNA 的碱基切除修复 (参见第三十四章“DNA 损伤、修复和突变”); 还有大肠杆菌的生物素合成酶兼做其生物素操纵子的阻遏蛋白, 对自身的基因表达进行负调控。这些兼职蛋白一开始可能只有一项功能, 但进化使其获得了新的功能。

一种兼职蛋白在体内究竟行使何种功能, 取决于它的亚细胞定位、表达于何种细胞、以单体还是多聚体形式存在、与其他蛋白质或大分子的相互作用、与其结合的配体 (ligand) 分子在细胞内的浓度等因素。

以大肠杆菌的兼职蛋白 PutA 为例: 在缺乏 Pro 时, 它在细胞质基质中作为阻遏蛋白与大肠杆菌基因组上特定的碱基序列结合, 而阻止 *put* 操纵子的基因表达。*put* 操纵子控制 2 个结构基因的表达: 一个编码的是脯氨酸透过酶 (proline permease), 促进脯氨酸进入细胞, 一个编码的就是 PutA; 在有 Pro 时, Pro 可与其结合, 诱导它的构象发生变化。PutA 在构象变化后可以与质膜结合, 然后作为脯氨酸脱氢酶 (proline dehydrogenase) 和吡咯-5-羧酸脱氢酶 (pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase) 催化 Pro 的降解。这样可以让大肠杆菌以外源的 Pro 作为碳源和氮源。再如, 在许多真核细胞内, 有一种称为顺乌头酸酶的兼职蛋白, 它在线粒体内参与三羧酸循环的第二步反应, 催化柠檬酸和异柠檬酸之间的相互转变。但在细胞质基质中, 它则作为一种铁感应蛋白, 有助于细胞内铁离子水平的稳定。

想认识更多的兼职蛋白, 可访问下面的网址, 即 <http://moonlightingproteins.org>。

蛋白质在行使功能时, 通常都会涉及与配体的结合, 因此可根据配体的性质, 来对蛋白质的功能进行分类。与蛋白质结合的配体可以简单地分为两类: 第一类是配体在结合以后, 化学结构会发生变化, 变成了另外一种配体。例如, 酶在催化反应的时候, 作为底物的配体在与酶结合以后, 受到酶的催化, 变成了另一种配体——产物; 第二类是配体在结合前后并没有发生化学变化。例如, 氧气和血红蛋白的结合以及激素与受体的结合。

第二节 蛋白质结构与功能之间的关系

蛋白质的结构与功能之间的关系, 一直是生物化学家和分子生物学家最关注的问题之一。在经过对多种蛋白质的结构与功能关系的研究, 科学家已总结出了其中的一些基本规则, 它们包括:

1. 蛋白质的一级结构决定其三维结构, 而三维结构直接决定蛋白质的功能。
2. 大多数蛋白质一旦合成后, 就会折叠成特定的三维结构, 并开始行使特定的生物学功能。一旦三维结构被破坏, 蛋白质的功能随之丧失。少数蛋白质在体内可暂时处于天然无折叠状态, 但在需要的时候可迅速折叠并行使它们的功能 (参见本章第三节中“天然无折叠蛋白质的结构与功能”)。
3. 蛋白质在行使功能的时候一般需要三维结构或构象的变化。这种构象的变化可能是剧烈的,

Quiz1 你认为有什么好的方法可以用来发现新的兼职蛋白?

也可能是细微的。

4. 结构相似的蛋白质一般具有相似的功能。反过来,功能相似的蛋白质通常具有相似的结构,特别是三维结构。

这项规则,有时对于预测一个序列已知的蛋白质的功能往往很有用。例如,假定有一天你在某一种生物体内发现一种新的蛋白质,并获得了它的一级结构,这时你可以在蛋白质序列数据库(GenBank、PIR 和 Swiss-PROT)里进行查询和比对,看数据库里面有无功能已知的蛋白质跟你研究的这种蛋白质序列相似。如果有,那么你正在研究的这种蛋白质的功能很可能与数据库中这种已知功能的蛋白质相似,甚至相同。序列相似度越高,可能性越大。若是要利用 GenBank 中的序列数据,可利用其网页上的在线程序 BLAST(basic local alignment search tool)下属的 Protein BLAST 来进行。该子程序可将数据库中所有与你研究的蛋白质序列具有相似性的蛋白质搜索出来,这时你可以把序列相似度超过 30% 的所有蛋白质序列下载到你的计算机的一个指定目录下。然后,将这些蛋白质以及你研究的蛋白质的序列交给专门的多重序列比对软件(如 ClustalW 或 POA)进行比对分析。最后,还需要将比对的结果交给专门的进化树绘制软件(如 MEGA 或 PHYLIP)来绘制进化树。你研究的蛋白质与进化树中靠得最近的蛋白质在功能上应该最有可能相似或相同。当然,通过这种方法预测出来的蛋白质功能最终还需要通过设计的实验来进行验证。

5. 在不同物种体内功能相同的蛋白质具有相同或基本相同的三维结构,但一级结构是否有差异以及差异的程度往往取决于物种之间在进化上的亲缘关系。

以组成有氧生物呼吸链的关键成分——细胞色素 c 为例,这种蛋白质存在于所有的有氧生物体内,与原核生物的质膜和真核生物的线粒体内膜相联系,其功能是作为一种流动的电子传递体,往返于呼吸链的复合体 III 和 IV,进行电子的传递(参见第二十章“生物氧化”),但真正传递电子的是与细胞色素 c 共价结合的血红素辅基上的铁离子。在对多种不同来源的细胞色素 c 的晶体结构进行研究后发现,它们在三维结构上都惊人地相似。而在对 40 种不同的真核生物的细胞色素 c 的一级结构进行比较分析后还发现,在构成细胞色素 c 的 110 个左右的氨基酸残基中,28 个残基始终不变,这意味着这 28 个氨基酸残基是细胞色素 c 形成稳定的三维结构,或者行使正确的功能所必需的。进一步的研究结果还表明,在这 28 个高度保守的氨基酸中,有 3 个 Gly、2 个 Cys、1 个 His 和 1 个 Lys。其中的 3 个 Gly 在所有的细胞色素 c 分子中都是绝对保守的;而 2 个 Cys 和 1 个 His 关系到血红素辅基与细胞色素 c 的共价及配位结合,因此也是不可变更的;至于这个 Lys 残基,有关细胞色素 c 与膜的结合,因而也是高度保守的。从二级结构的层次来看,保守的氨基酸多分布在无规卷曲中,还有 5 段 β 突起高度保守。这与无规卷曲通常与蛋白质的功能关系密切,以及 β 突起通过细调肽链的走向而影响细胞色素 c 最终三维结构的形成是一致的。

根据两种有氧生物在细胞色素 c 一级结构上的差异程度,可以判断它们之间的亲缘关系。例如,人与黑猩猩没有差别,而人与绵羊相差 10 个,与鲫鱼相差 18 个,与酵母相差 44 个(图 3-1)。这清楚地表明,亲缘关系越近,氨基酸的差异就越少。根据不同种属之间氨基酸残基差异的多少和替换速率,可基本了解生物的进化过程,并描绘出系统分子进化树。

	黑猩猩	绵羊	响尾蛇	鲫鱼	蜗牛	烟草小菜蛾	面包酵母	花椰菜	欧防风
人	0	10	14	18	29	31	44	44	43
黑猩猩	10	14	18	29	31	44	44	43	
绵羊		20	11	24	27	44	46	46	
响尾蛇			26	28	33	47	45	43	
鲫鱼				26	26	44	47	46	
蜗牛					28	48	51	50	
烟草小菜蛾						44	44	41	
面包酵母							47	47	
花椰菜								13	

图 3-1 不同物种的细胞色素 c 一级结构的比较

Quiz2 与其他氨基酸残基相比,Gly 在所有的蛋白质进化过程中是最保守的,为什么?

Quiz3 你认为人与黑猩猩编码细胞色素 c 的基因的一级结构一定相同吗?

6. 一级结构相似的蛋白质往往具有共同的起源,但不是一定具有共同的起源。

很多人喜欢根据蛋白质一级结构的相似性来研究生物进化。一般说来,两种生物的亲缘关系越近,它们的基因和蛋白质的一级结构就越相似。

在蛋白质的进化过程中,一般有两种情形可产

生结构相似、功能相似的蛋白质。一是类似物(analog),另一是同源物(homolog)。

(1) 类似物 专指具有相同的功能,但起源于不同的祖先基因的蛋白质,它们是基因趋同进化的产物(convergent evolution)。例如,鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)和牛都合成一种酪氨酸磷酸酶(tyrosine phosphatase)。这两种生物产生的同一种酶在活性中心的三维结构十分相似,活性也相似,但一级结构差别很大,显然它们是从完全不一样的祖先基因进化而来的。再如,枯草杆菌合成的枯草杆菌蛋白酶与哺乳动物消化道分泌的胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶都属于丝氨酸蛋白酶,虽然它们的活性中心都含有由 Ser、His 和 Asp 组成的催化三元体(参见第十章“酶的催化机制”),但是在一级结构和三维结构上差别很大,因此它们也来自不同的祖先基因。

(2) 同源物 专指存在于不同生物或者同种生物,来源于某一共同祖先基因的蛋白质(图 3-2),可进一步分为种间同源物(ortholog)和种内同源物(paralog)。种间同源物也称为直向同源物或直系同源物,专指来自于不同物种的由垂直家系(物种形成)进化而来的蛋白质,它们通常保留与原始蛋白相同的功能,但也不尽然。例如,小鼠、蛙和鸡各自的 α 珠蛋白或 β 珠蛋白。种内同源物也称为旁系同源物,专指同一物种内由于基因复制、分离产生的同源物。例如,小鼠 α 珠蛋白和 β 珠蛋白,蛙的 α 珠蛋白和 β 珠蛋白,鸡的 α 珠蛋白和 β 珠蛋白。通过进化,这一类种内的同源物可能会获得新的功能,但这种新功能多多少少会与原来的功能有一定的关系。

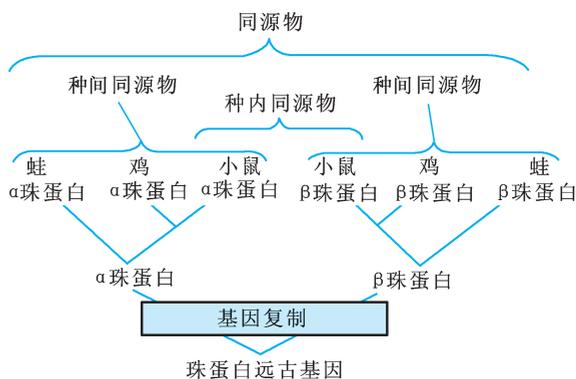


图 3-2 同源物、种间同源物和种内同源物之间的关系

同源蛋白具有相似的三维结构,这是同源建模获得蛋白质三维结构的理论基础。现有多种专业软件可对以上情形进行分析,如 ClustalX,还有许多网站提供在线分析服务,如欧洲生物信息学中心(European Bioinformatics Institute, EBI)提供的 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>,这为在分子水平上研究进化提供了便利。

7. 许多疾病都是体内重要的蛋白质结构异常引起的(参见第二章“蛋白质的结构”)。

第三节 几种重要的蛋白质的结构与功能

生物体内的蛋白质多种多样,它们在体内折叠成不同的结构,从而执行着不同的功能。按照分子形状、溶解性质以及是否与膜结合,蛋白质一般可分为纤维状蛋白质(fibrous protein)、球状蛋白质(globular protein)和膜蛋白(membrane protein)三大类(图 3-3)。不管是哪一类,有的结构与功能关系研究得已经十分清楚,有的则不然。下面将以几种研究的比较清楚的蛋白质为例,详细介绍它们的结构与功能,特别是结构与功能之间的关系。

一、纤维状蛋白质的结构与功能

纤维状蛋白质结构伸展,呈纤维状,长/宽 >10 ,一般不溶于水,机械强度高,化学反应性较差,在生物体内的主要功能是表现在结构或机械支持上,为机体提供支持和保护,例如 α 角蛋白、 β 角蛋白和胶原蛋白。纤维状蛋白质之所以能折叠成有规则的纤维状结构,是因为它们的一级结构具有高度的规律性——氨基酸残基的种类有限,但序列通常以重复单元的形式出现。

Quiz4 你认为纤维状蛋白质通常缺乏何种二级结构?

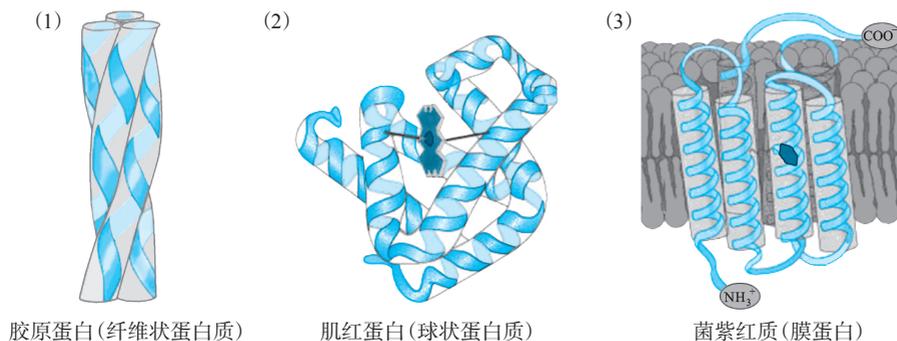


图 3-3 根据分子形状和溶解性质对蛋白质进行的分类

(一) α 角蛋白

α 角蛋白因二级结构主要是 α 螺旋而得名。它广泛存在于动物的毛发、角、鸟喙和爪子中,可分为不同的亚型,如 I 型和 II 型。其一级结构由 311~314 个氨基酸残基组成。每一个 α 角蛋白分子在肽链的中央形成典型的 α 螺旋,而两端为非螺旋区。

螺旋区由七肽重复序列 $(-a-b-c-d-e-f-g-)_n$ 组成, a 位和 d 位刚好为疏水氨基酸。这样的分布让两个 α 角蛋白分子可通过 a 位和 d 位的疏水 R 基团结合,并相互缠绕形成一种双股的左手超螺旋,即卷曲螺旋。卷曲螺旋大大地提高了 α 螺旋的稳定性。此外,在链间还有二硫键,这种共价交联可进一步提高 α 角蛋白的强度。指甲的强度比毛发高是因为含有更多的 Cys 残基,能形成更多的二硫键。 α 角蛋白分子还可以在双股的卷曲螺旋的基础上,先形成原纤维,然后再由原纤维组装成纤维(图 3-4)。

在美发过程中,无论是卷发还是直发,原理都一样:先用巯基类化合物(如巯基乙酸铵或半胱氨酸)破坏二硫键(大约 45% 的二硫键被切断),使之被还原成游离的巯基,易于变形;再用发夹和发卷将头发塑成一定的形状(卷发让头发成为波状,直发则将头发拉直);最后用氧化剂重建二硫键,使发型固定下来。

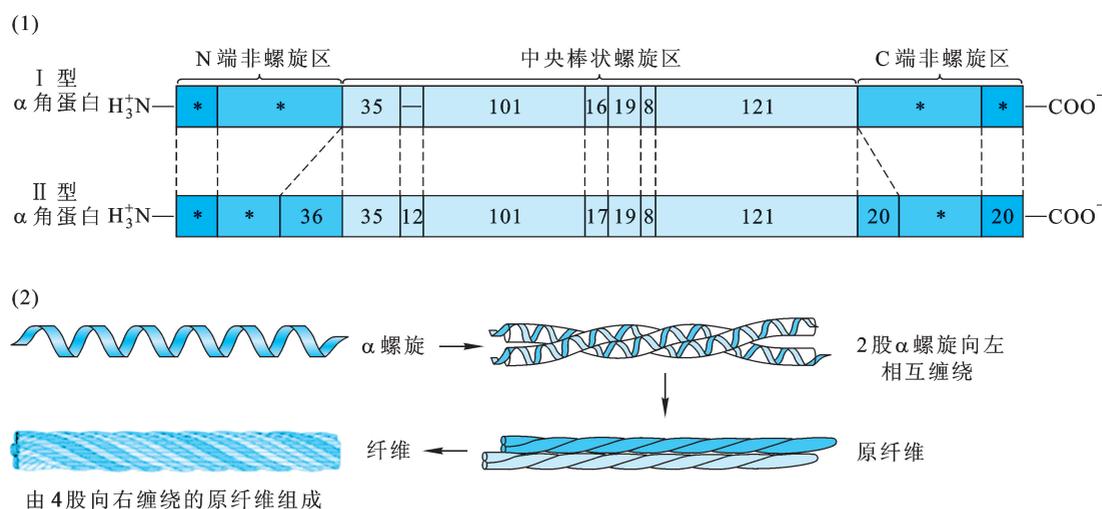


图 3-4 α 角蛋白的结构层次 (Garrett 等, 2010)

在机体内,除了 α 角蛋白分子之间可以形成卷曲螺旋这样稳定的超螺旋结构以外,还有其他的一些蛋白质,它们都属于卷曲螺旋蛋白超家族的一员。例如,人体属于这一超家族的蛋白质约有 60 种,它们包括构成细胞骨架(cytoskeleton)的中间纤维(intermediate filament)以及肌球蛋白(myosin)和原肌球蛋白(tropomyosin)等。

(二) β 角蛋白

β 角蛋白则因二级结构主要是 β 折叠而得名,大量存在于蚕丝和蜘蛛丝之中。其一级结构富含 Ala 和 Gly,具有重复序列 Gly-Ala/Ser-Gly-Ala/Ser;它的二级结构主要是有序的反平行 β 折叠,还有一些环绕在 β 折叠周围的无规卷曲和 α 螺旋(图 3-5)。有序的反平行 β 折叠构成丝的微晶(crystallite)区,由于 Gly 和 Ala/Ser 分别分布于折叠片层的两侧,相邻的 β 股能更加紧密地堆积形成网状结构(图 3-6),从而赋予丝较高的抗张性。而无序的 α 螺旋和无规卷曲构成无定形区,又使丝具有一定的弹性。

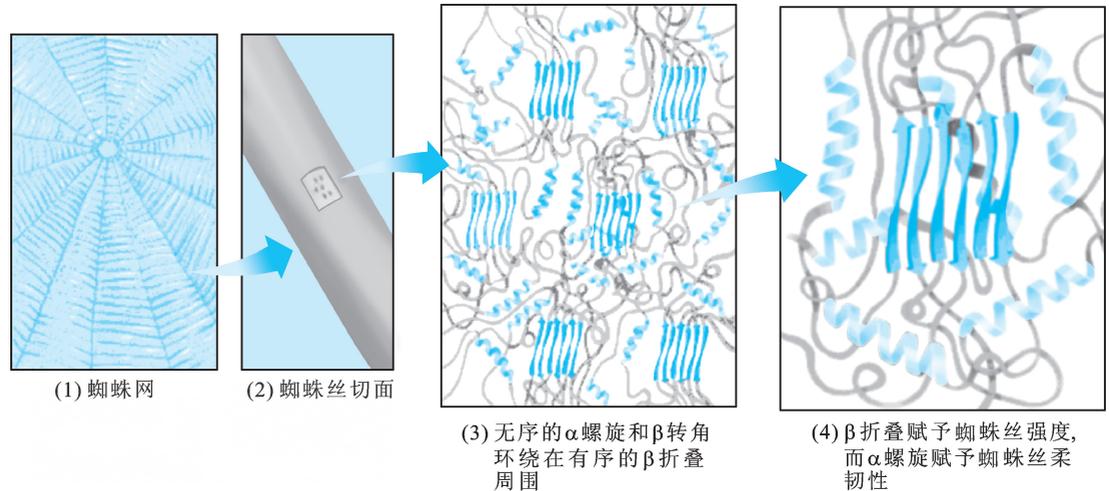


图 3-5 蜘蛛丝中的丝心蛋白的结构层次

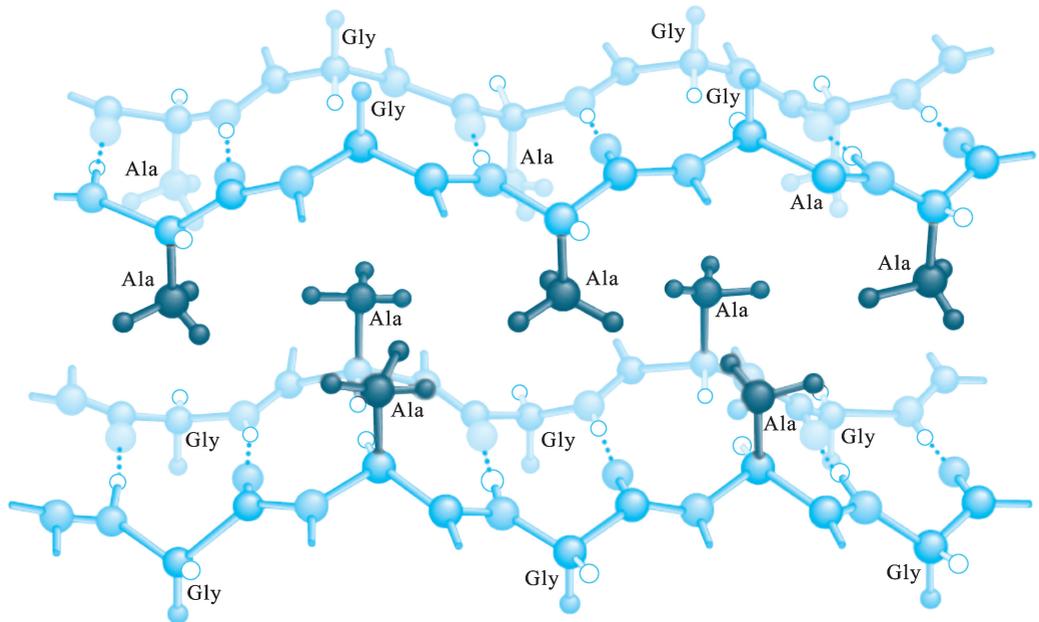


图 3-6 β 角蛋白中的 β 折叠 (Garrett 等, 2010)

(三) 胶原蛋白

胶原蛋白作为动物细胞外基质内的一种主要结构蛋白,广泛存在于动物的结缔组织和其他纤维样组织中,如肌腱、韧带、骨骼、基底膜(basement membrane)和血管壁等,是哺乳动物体内含量最丰富的蛋白质。在食品工业上经常使用的明胶(gelatin)就是动物胶原蛋白经酸或碱部分水解的产物。

胶原蛋白的基本组成单位是由 3 条 α 链组成的原胶原(tropocollagen)。其中有两条相同的 α_1 链,第三条链为 α_2 。 α_2 在组成上与 α_1 有所差别。不同类型的原胶原由于 α 链的氨基酸组成及含糖量不同,因而性能也不同。在人体内已发现的近 29 种不同类型的胶原蛋白中, I 型胶原最多,占 90% 以上。

框 3-1 生化应用——蜘蛛丝 / 蚕丝复合纤维的制备及其应用价值

作为一种天然的生物材料,蚕丝纤维除了作为伤口缝线以外,还可以用在伤口绷带、人工肌腱、组织骨架和微胶囊上。但同样是丝,蜘蛛丝的强度和弹性要明显高于蚕丝。有实验显示,一束由蜘蛛丝组成的绳子比同样粗细的不锈钢钢筋能多承受 5 倍的重量! 这相当于是一根铅笔粗细的蛛丝能阻止一架波音 747 飞机的飞行! 蜘蛛丝纤维具有如此好的机械性能,使其更适合作为精细的缝线,用于眼部、神经和美容等手术。

不过,蚕丝很容易通过养蚕业大量得到,但蜘蛛这种动物的领域性和同类相食的特性使得“养蛛业”行不通,因此难以大量制备蜘蛛丝。这就促使人们尝试使用廉价、方便、可靠的生物技术途径,去大规模生产出蜘蛛丝。

沿着这个方向,很快有人获得了一大突破,就是金丝蜘蛛 (*Nephila clavipes*) 蛛丝蛋白的 cDNA 被克隆了,包括壶腹状的丝心蛋白 1、丝心蛋白 2 以及长丝状的丝蛋白。当得到这些基因以后,人们立刻想到利用多种外源蛋白质表达系统,如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、植物细胞和哺乳动物细胞表达系统,去大量表达这些基因,但却遇到一个难以克服的问题,就是表达出来的蛋白质虽多,却很难像在蜘蛛丝腺内一样,绕成蜘蛛丝纤维。这就使得人工大规模制备蜘蛛丝纤维的想法一直难以实现。

然而,就在 2012 年新年伊始,根据 *PNAS* 上一篇题为“Silkworms transformed with chimeric silkworm/spidersilk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties”的论文,这个问题似乎终于有了突破。来自美国圣母大学、怀俄明大学和我国浙江大学的研究人员研究出了一种方法,得到了一种蜘蛛丝 / 蚕丝的复合纤维,其机械性能与天然的蜘蛛丝差不多。他们的基本思路是,使用一种特殊的载体,将编码蜘蛛丝蛋白的基因导入到家蚕的体内,培育出转基因家蚕,并使蜘蛛丝蛋白的基因受蚕丝腺特异性启动子的驱动,在蚕丝腺内表达。表达出来的蜘蛛丝蛋白能与蚕丝腺内原来表达的蚕丝蛋白一起,共同组装成蚕丝 / 蜘蛛丝复合纤维。根据测定,这种复合丝纤维比蚕丝强,与蜘蛛丝不相上下。这种转基因蚕的问世,使得大规模制备具有原始蜘蛛丝特性的生物材料的梦想成为现实。

原胶原的一级结构的主要特征是:约 1/3 是 Gly (约 33%),Pro 含量也很高(约 12%),但 Tyr 含量少,Trp 和 Cys 缺乏;具有 3 种修饰的氨基酸,即 4- 羟脯氨酸(Hyp)、3- 羟脯氨酸(约 9%)和 5- 羟赖氨酸(Hyl);每一条肽链都具有重复的 Gly-X-Y 三联体序列,重复次数约 200。X 和 Y 通常是 Pro,也可能是 Lys。Y 位置上的 Pro 经常被羟基化为 4- 羟脯氨酸,Lys 也常被羟基化成 5- 羟赖氨酸。

胶原蛋白富含 Gly 和 Pro 的性质使得它难以形成 α 螺旋和 β 折叠,但有规律的三联体重复序列却有利于 3 条 α 链相互“抱成一团”,形成另外一种螺旋,即三股螺旋(triple helix)(图 3-7)。三股螺旋为原胶原特有的二级结构,其二面角(Φ, ψ)为($-51^\circ, 153^\circ$),由三股以左手螺旋存在的 α 链组成,这三股 α 链以氢键相连,并相互缠绕形成右手超螺旋。在螺旋中,体积最小的 Gly 正好位于螺旋的内部,构成紧密的疏水核心,而 Pro 和 Hyp 的侧链位于三股螺旋的表面,面向外,以尽量减少空间位阻。每一个 Gly 残基的氨基 H 与 X 残基的羰基 O 形成氢键,一个三联体序列大约形成一个氢键。三股螺旋比 α 螺旋更为伸展,每一个氨基酸残基上升 0.29 nm,一圈有 3.3 个氨基酸残基。

Pro 残基缺乏氢键供体,因此单凭三条肽链主链之间形成的氢键,还不足以稳定三股螺旋结构。这时就需要通过特殊的化学修饰在肽链上引入额外的氢键供体。这种化学修饰就是发生在 Pro 残基上的羟基化反应。其中催化羟化反应的羟化酶(hydroxylase)需要 O_2 、 Fe^{2+} 、 α - 酮戊二酸和维生素 C。 Fe^{2+} 包埋在羟化酶的活性中心,所起的作用是活化充当底物的 O_2 ,但它很容易被氧化成无活性的 Fe^{3+} 。维生素 C 所起的作用是作为抗氧化剂,可防止 Fe^{2+} 的氧化。故维生素 C 的缺乏会导致胶原的羟化反应不能充分进行,也就影响到正常胶原纤维的形成。那些非羟化的前 α 链在细胞内很容易降解,从而导致牙龈出血、创伤不易愈合等病变,严重可导致坏血病(scurvy)。

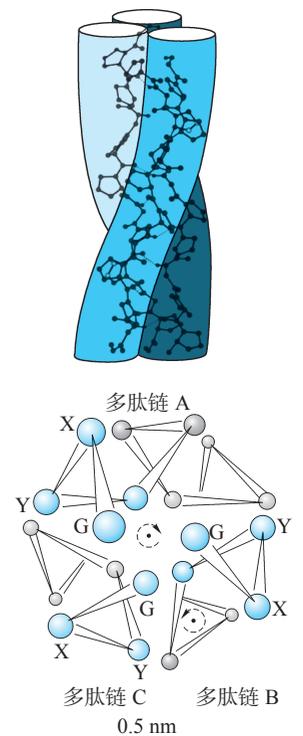


图 3-7 胶原蛋白的三股螺旋

Quiz5 你认为多聚 Gly 和多聚 Pro 能形成三股螺旋吗? 为什么?

胶原蛋白主要由成纤维细胞 (fibroblast) 合成。刚刚翻译出的多肽链被称为前 α 链, 其两端各有一段不含 Gly-X-Y 重复序列的前肽, 但却含有 Cys。3 条前 α 链的 C 端前肽借助 Cys 残基之间的二硫键形成链间交联, 使得三条前 α 链“对齐”排列, 然后从 C 端向 N 端形成三股螺旋。前肽部分呈非螺旋卷曲, 形成球状结构域。带有前肽的三股螺旋胶原分子被称为前胶原 (procollagen)。前 α 链在细胞内合成后还要进行糖基化 (glycosylation) 修饰, 才能自组装成三股螺旋。

前胶原分泌到胞外以后, 在前胶原肽酶 (procollagenpeptidase) 的催化下, 两端的前肽序列被水解后成为原胶原。胶原变性后不能自然复性重新形成三股螺旋结构, 是因为成熟胶原分子的肽链不含前肽, 故不能再进行“对齐”排列。

在胞外基质内, 4 个原胶原分子以平行交错的方式聚合成胶原原纤维, 再进一步包装成胶原纤维。原胶原分子内部和原胶原单位之间会逐步形成特殊的共价交联, 进一步稳定和加强胶原结构。其中最常见的一种共价交联的形成需要胞外基质中的赖氨酰氧化酶 (lysyl oxidase)。在此酶的催化下, 原胶原上的 Lys 残基被氧化成醛赖氨酸 (allysine)。而醛赖氨酸上的醛基可以与邻近肽链上的 Lys 氨基或 Hyl 的羟基缩合, 由此形成共价交联。共价交联的形成是一个缓慢的过程, 可持续一生, 故交联的程度随着年龄的增加而加深。引入共价交联能提高组织强度, 但同时也降低了组织的弹性和柔韧性。

胶原肽链之间除了有上述这种常见的共价交联以外, 科学家已在 IV 型胶原分子之间发现了一种新的共价交联——硫亚胺键 (sulfilimine bond) (图 3-8), 它是在一个 Met 残基和一个 Hyl 残基的侧链之间形成的。该结构就像“挂钩”一样, 可将 IV 型胶原分子连接在一起, 为细胞提供了很好的支架。2012 年, G. Bhave 等发现几乎所有动物都存在的一种过氧蛋白 (peroxidase) 催化了硫亚胺键的形成。2014 年, Bhave G. 等又发现溴元素以 HOBr 的形式作为过氧蛋白的辅因子, 参与了硫亚胺键的形成。这项成果直接让溴成为一种新的生命元素。

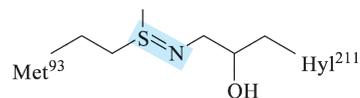


图 3-8 硫亚胺键的结构

营养不良或者基因缺陷可导致许多与胶原相关的疾病, 如成骨不全 (osteogenesis imperfecta)。成骨不全又称脆骨病 (brittle bone disease), 其典型症状为骨骼脆性增加。在患者体内, 编码组成 I 型胶原 α 链的基因有缺陷, 而导致肽链上的某些 Gly 被侧链较大的氨基酸残基取代。较大的侧链基团容易产生空间位阻, 这使得三股螺旋出现突起, 破坏了螺旋的稳定性, 导致胶原蛋白不能正常地行使功能。另外, IV 型胶原之间的硫亚胺键异常, 可引发一种罕见的自身免疫疾病肺出血肾炎综合征。例如, 机体内过氧蛋白酶过度活化, 有可能导致了 IV 型胶原过度沉积, 引起基底膜增厚, 进而损害肾功能。

框 3-2 生化新发现——溴也成为生命元素啦

长期以来, 人们认为元素周期表中只有 27 种化学元素对生命至关重要。从来没有想过, 在常态下具有腐蚀性并且有毒的溴 (Bromine, Br) 会成为第 28 种新的生命元素。原教科书中有关生命元素的内容需要改写了。

根据发表于 2014 年 6 月 5 日 *Cell* 上的一篇题为“Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture”研究论文, 来自美国 Vanderbilt 大学的 Billy Hudson 等率先确定在宇宙 92 种自然化学元素中, Br 是对从原始海洋生物到人类所有动物组织发育至关重要的第 28 种元素。Hudson 教授说: “没有 Br, 地球上就不会出现动物”。

Hudson 等证实, 从饮食中除去溴离子, 可导致果蝇死亡, 恢复供给果蝇则可存活。这一研究发现对于理解一些人类疾病具有重要意义。论文的第一作者 A. Scott Mccall 认为, 许多疾病患者缺乏 Br。补充 Br 有可能改善透析带来的副作用, 促进全胃肠外营养患者的健康。这一论文属于该研究小组系列研究论文中最新的一篇, 有助于阐明 IV 型胶原支架如何支持组织基底膜, 例如肾小球过滤单元等。

Hudson 表示,这一关于 Br 的研究发现其基础可以追溯至 30 多年前他还在 Kansas 大学医学院时。在 20 世纪 80 年代,由于对两种罕见的肾病感到好奇,促使他发现了两种从前未知的蛋白质,它们参与 IV 型胶原分子在基底膜中形成就像支撑桥梁的缆索一样的结构。当这些缆索发生缺陷或受损就会导致肾脏疾病发生。

2002 年,Hudson 来到 Vanderbilt 大学。2009 年 9 月 4 日,Roberto Vanacore 等在 *Science* 上发表了一篇题为“A sulfilimine bond identified in collagen IV”的论文,发现硫原子和氮原子之间存在一种新型硫亚胺键(sulfilimine bond),该结构就像“挂钩”一样将 IV 型胶原分子连接在一起,为细胞形成了一种支架。硫亚胺键缺陷会引发罕见自身免疫疾病肺出血肾炎综合征。这一疾病是以 Vanderbilt 大学的已故病理学家、前任医学院院长、著名疫苗学家 Ernest Goodpasture 命名。这一研究发现引出一个简单问题:这种键是如何形成的?

2012 年,Gautam Bhawe、Christopher F. Cummings 和 Vanacore 等对此进行了研究,发现几乎所有动物都存在的一种过氧蛋白(peroxidasin)可能在该疾病中发挥了关键作用。该酶过度活化有可能导致了 IV 型胶原过度沉积,引起基底膜增厚,损害肾功能,这一研究成果在线发表在 2012 年 7 月 29 日 *Nature Chemical Biology* 上。

但是,因为研究者只是在果蝇体内做了这样一个实验,如果要上升到所有动物,包括人,还需要进行进一步的实验,因为果蝇只是一种昆虫,和高等动物还有很大差别。如果研究者在小鼠这样的哺乳动物身上也得出同样的结论,那么,基本上就可以如研究者所说的那样:如果没有溴,也就没有了动物。另外,溴即使是构成所有生命的必需元素,其量也要控制在一定范围内,如果吸收过量,那肯定会引起中毒反应。

二、球状蛋白质的结构与功能

球状蛋白质结构紧密,呈球状,长/宽 $\leq 3\sim 4$,溶于水,如血红蛋白和胰蛋白酶等。生物体的主要功能是依赖球状蛋白质来完成。机体内有各种各样的球状蛋白质,这里只选择两类与人体健康有密切关系的蛋白质——珠蛋白家族(globin family)和免疫球蛋白为例,详细分析它们的结构与功能之间的关系。

(一) 珠蛋白家族

光合有机体在地球上的诞生为大气带来了氧气,而氧气的出现大大地推动了地球上生物的进化,因为富能生物分子通过有氧代谢可释放出更多的能量,产生更多的 ATP。例如,1 分子葡萄糖在无氧条件下分解,只能为细胞产生 2 个 ATP,但在有氧条件下彻底分解,可为细胞产生至少 30 个 ATP。然而,生物在利用氧气的时候,会遇到一个麻烦,就是氧气的水溶性比较差。为了解决这个问题,生物在进化过程中,需要借助于一类特殊的蛋白质来运输或贮存氧气,而珠蛋白家族就是这一类蛋白质。这一家族的蛋白质都含有血红素辅基,都能够可逆地结合氧气,都含有珠蛋白折叠这样的结构模体。属于这一类家族的蛋白质有:肌红蛋白(myoglobin, Mb)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、神经珠蛋白(neuroglobin, Ngb)、细胞珠蛋白(cytoglobin, Cygb)、雄珠蛋白(androglobin)和豆血红蛋白(leghaemoglobin, legHb)等,其中肌红蛋白和血红蛋白最为重要,存在于绝大多数脊椎动物体内,只有一些生活在南极水域的冰鱼(icefish)缺乏这两种蛋白质。至于 legHb,仅存在于豆科植物的根瘤中,它与氧气结合以后可为固氮菌细胞内的固氮酶创造无氧的环境,因为固氮酶只有在无氧的条件下才能催化反应。

下面重点介绍肌红蛋白、血红蛋白及其突变体的结构与功能。

1. 肌红蛋白

Mb 只存在于肌细胞中,心肌含量特别丰富。其功能是作为氧气的贮存者,专门为动物的肌肉组织储备氧气,因为肌肉组织对氧气的需求比较大,特别是在做激烈运动的时候。水生哺乳动物(如鲸鱼)体内的 Mb 含量尤其丰富,因此它们可以在水下长时间憋气。

Quiz6 你认为冰鱼为什么可以不需要肌红蛋白和血红蛋白?

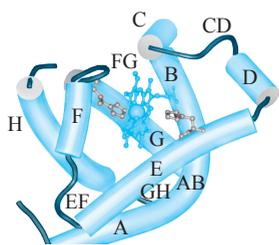


图 3-9 Mb 的三维结构以及其中各个螺旋的编号

Mb 的一级结构特征包括:由一条肽链组成,含有 153 个氨基酸残基;紧密结合 1 个血红素辅基 (heme)。血红素由原卟啉 (protophyrin) 和 Fe^{2+} 组成。

Mb 的二级结构特征包括:共有 8 段 α 螺旋,它们约占全部序列的 75%,按照 N 端到 C 端的次序,被依次编号为 A、B、C、D、E、F、G、H。螺旋之间是短的 β 转角或小环(CD 表示 C、D 螺旋之间转角或环,以此类推)(图 3-9)。有 4 个螺旋终止于 Pro 残基。

Mb 是第一个获得完整三维结构的蛋白质。1959 年,John Kendrew 和 Max Perutz 使用 X 射线晶体衍射的方法,成功获得抹香鲸肌红蛋白的三维结构。1962 年,Kendrew 和 Perutz 因此而荣获诺贝尔化学奖。

Mb 整条肽链与血红蛋白的每一条肽链一样,折叠成紧密的球状结构,疏水侧链大都在分子内部,极性、带电荷的侧链则暴露在分子表面,因此水溶性好。其分子表面有一个深的疏水口袋,口袋的侧面由 E 螺旋和 F 螺旋组成,底部由 G 螺旋和 H 螺旋组成。血红素“藏”在袋中,与周围氨基酸残基形成次级键,而 Fe^{2+} 与 F 螺旋 8 号位的 His 残基 (HisF8) 形成配位键(图 3-10)。该口袋既可以让 O_2 进入与 Fe^{2+} 结合,又可防止 Fe^{2+} 被氧化成 Fe^{3+} ,但阻止 H_2O 的进入。 Fe^{2+} 一共可以形成 6 个配位键,在结合氧气之前,它已形成了 5 个配位键——4 个与原卟啉吡咯环上的 N 原子,1 个与 HisF8 的咪唑基。HisF8 被称为近端组氨酸 (proximal histidine)。显然第 6 个配位键是专门为 O_2 预备的, O_2 可以通过这个配位键可逆地与 Fe^{2+} 结合。但如果 Fe^{2+} 被氧化成 Fe^{3+} ,水分子就会立刻占据第 6 个配位键,而导致氧气无法结合。CO 与 O_2 差不多大,因此也能与血红素结合。CO 的毒性主要是因为它与血红素的亲和力更强,从而阻止了 O_2 与血红素的结合。

游离的血红素也能够与氧气结合,但它们在溶液中很容易相互靠近,在有氧的情况下,所有的铁都会被氧化成高价态。而“高铁”是不能结合氧气的,因此生物没有选择用游离的血红素分子来运输或者贮存氧气。如果血红素结合在 Mb 或者 Hb 的疏水口袋之中,血红素分子之间等于被安全隔离起来,其中的铁也就难以氧化了。因此,Mb 的作用实际上是用疏水口袋保护血红素的二价铁,防止它被氧化。然而,尽管 Mb 和 Hb 本身已为上面的 Fe^{2+} 提供了很好的保护,但是细胞内的各种氧化剂仍有可能对其进行氧化,从而导致体内出现少量无功能的高铁血红蛋白 (methemoglobin, met-Hb) 和高铁肌红蛋白 (metmyoglobin, met-Mb)。幸好正常人的体内还有一种保护机制,这种机制主要依赖细胞色素 b_5 还原酶 (cytochrome b_5 -reductase)。该酶也被称为 NADH- 高铁血红蛋白还原酶 (NADH-methemoglobin reductase),能够利用细胞内的还原性辅酶 I (NADH/H^+),将被氧化的铁还原成低价态。此外,有一种次要的 NADPH- 高铁血红蛋白还原酶也具有类似的功能。如果一个人缺乏有功能的细胞色素 b_5 还原酶,那体内的 met-Hb 水平就可能异常的高,从而得高铁血红蛋白症 (methemoglobinemia)。高铁血红蛋白症患者由于大量 met-Hb 的存在,而降低了红细胞的携氧能力,令他们的血液颜色比正常人更深,皮肤的颜色也因此可能呈现为罕见的蓝色。

将血红素放到 Mb 和 Hb 上还有一个好处,就是降低血红素与 CO 的亲和力。根据测定,游离血红素与 CO 的亲和力是与 O_2 亲和力的 25 000 倍! 而 Mb 和 Hb 分子上的血红素辅基与 CO 的亲和力仅是与 O_2 亲和力的 200 倍。Mb 和 Hb 分子上的血红素辅基对 CO 亲和力的急剧下降与 E 螺旋 7 号位 His 残基 (HisE7) 有关。如图 3-11 所示,HisE7 位于血红素平面的另一侧,与近端组氨酸 (HisF8) 隔环相望,因此也称为远端组氨酸 (distal histidine)。远端组氨酸和近端组氨酸一样,对珠蛋白家族的所

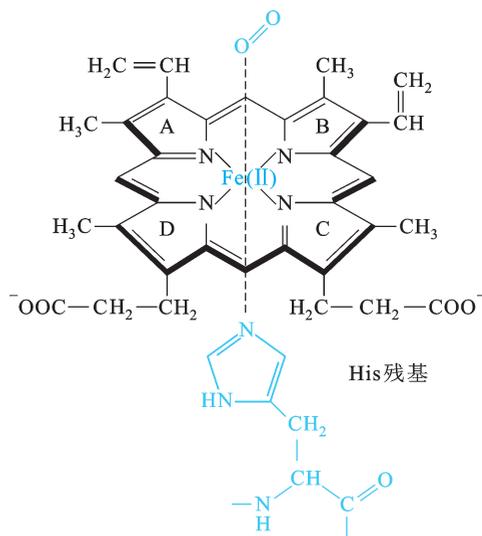


图 3-10 Mb 的血红素辅基

Quiz7 有报道,一个小女孩吃了路边误加过量亚硝酸盐的炸鸡腿而发生中毒死亡。对此,你认为导致她中毒死亡的原因是什么?

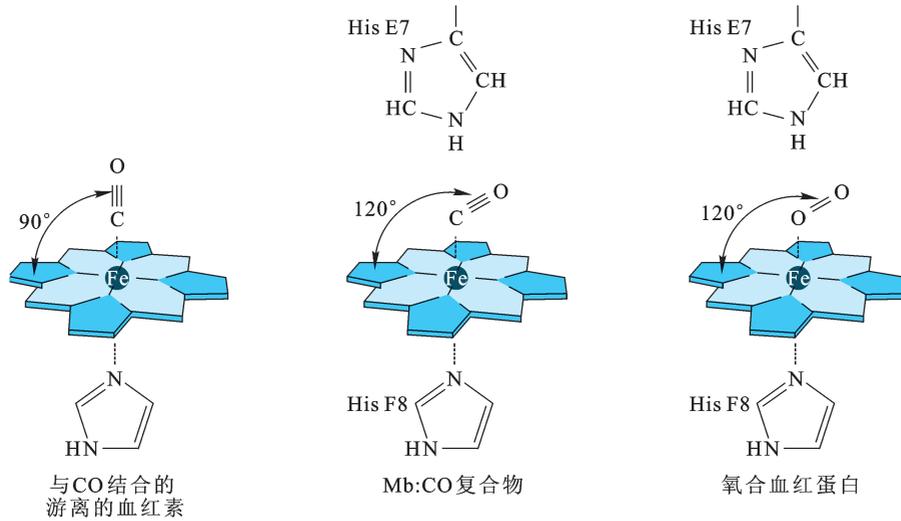


图 3-11 血红素辅基与 CO 或 O₂ 的结合 (Campbell 等, 2009)

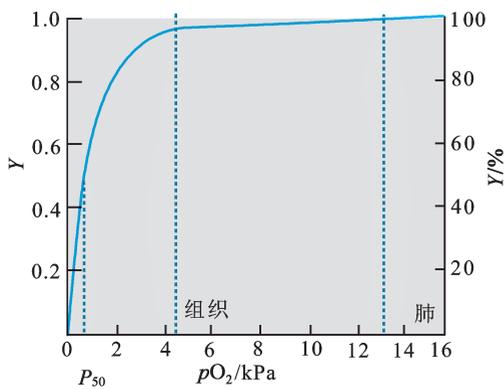


图 3-12 Mb 的氧合曲线

有成员来说都是不可缺少的。远端组氨酸有两个重要的功能：一是保护血红素的二价铁，阻止细胞内任何可能的氧化剂对铁的氧化；二是为 CO 与血红素的结合制造障碍。因为对于 CO 而言，它与血红素铁结合的“舒适”角度是垂直于血红素平面，即 90°，而 HisE7 的出现使得 CO 只能与 120° 的角度结合，因此 CO 与血红素结合的亲和力就下降了。而对于 O₂ 来说，它与血红素铁结合的“舒适”角度就是 120°，故有无 HisE7 对血红素结合 O₂ 没有影响。

Mb 结合 O₂ 的特征可以用氧合曲线来描述，为双曲线的一支(图 3-12)。

Mb 的氧合反应可写成： $\text{Mb} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{MbO}_2$ 。反应的解离常数 $K_d = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]}$

假定 Y 或 θ 为氧分数饱和度 (fractional saturation)，则：

$$Y = \frac{\text{被 O}_2 \text{ 结合的位点}}{\text{总的 O}_2 \text{ 结合位点}} = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]} = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{K_d[\text{Mb}] + [\text{Mb}][\text{O}_2]} = \frac{[\text{O}_2]}{K_d + [\text{O}_2]}$$

由于溶解在液体内的气体浓度与液体上面的气体分压成正比，因此可用氧分压 ($p\text{O}_2$) 代替氧气浓度。于是， $Y = \frac{p\text{O}_2}{K_d + p\text{O}_2}$ 。根据测定，在 $Y=1$ 时，所有 Mb 上的氧气结合位点都被 O₂ 占据。如果 $Y=0.5$ ，则：

$$0.5 = \frac{P_{50}}{K_d + P_{50}}, \text{ 即 } K_d = P_{50}。$$

从图 3-12 中可以看出，Mb 倾向于结合氧气而不愿意放出氧气，因此它的功能是贮存氧气，只有在 $p\text{O}_2$ 极低的时候，如肌肉因剧烈运动而缺氧，它才释放出氧气。

Mb 在肌肉组织中的重要生理功能似乎表明它是动物不可缺少的蛋白质。然而，有人使用基因敲除 (gene knockout) 技术，培育出了缺失 Mb 的小鼠。结果发现，这些小鼠不仅能生存，还能正常地运动和生育，对缺氧 (hypoxia) 也有正常的通气反应 (ventilatory response)。尽管这些小鼠的心肌和比目鱼肌没有正常肌肉的颜色，但功能仍显示正常。缺失 Mb 的小鼠能够正常地生存，可能是因为机体为此做出各种代偿性反应，如 Hb 浓度、血流量和毛细血管密度都有所提高。

2. 血红蛋白

Hb 主要存在于红细胞,其主要功能是作为氧气的运输者,为整个机体运输氧气。除了红细胞以外,机体内还有一些细胞可以表达少量的 Hb,例如黑质(substantia nigra)内的 A9 多巴胺能(dopaminergic)神经元、巨噬细胞(macrophage)、肺泡细胞(alveolar cell)和肾的血管系膜细胞(mesangial cell)等。这些组织细胞表达的 Hb 的功能显然与运输氧气无关,而是作为一种抗氧化剂以及调节细胞内铁的代谢。

Quiz8 研究发现,与 Mb 相比,单独的 α 亚基或 β 亚基的疏水氨基酸残基的含量增加? 对此你如何解释? 你认为多出的疏水残基是分布在两种亚基的表面,还是在内部?

Hb 由 4 个亚基组成,因而有四级结构。每一个亚基称为珠蛋白,单个亚基的一级结构与 Mb 差别较大,只有 27 个位置的氨基酸残基与 Mb 相同,但二级和三级结构却与 Mb 十分相似(表 3-1 和图 3-13)。

► 表 3-1 肌红蛋白和血红蛋白的比较

类别	肌红蛋白(Mb)	血红蛋白(Hb)
来源	肌细胞	红细胞
种类	1 种	3 种:HbA ₁ (成人 98%)、HbA ₂ (成人 2%)和 HbF(胎儿)
一级结构	单条肽链,153 个 aa(氨基酸残基)	4 条肽链, α 亚基约 141 个 aa, β 亚基约含有 146 个 aa,两者低于半数的氨基酸残基是相同的; α 、 β 和 Mb 只有 27 个位置的氨基酸残基是相同的;HbA ₁ : $\alpha_2\beta_2$; HbA ₂ : $\alpha_2\delta_2$;HbF: $\alpha_2\gamma_2$
二级结构	75% 为 α 螺旋,有 A、B、C、D、E、F、G 和 H 共 8 段螺旋,中间由无小环和 β 转角来连接	每条链同 Mb,但 D 螺旋极短
三级结构	典型的球蛋白,内部含有珠蛋白折叠模体,分子表面有一个疏水口袋,血红素藏在其中	每条链同 Mb
四级结构	无	4 个亚基占据着四面体的 4 个角,链间以盐键结合,一条 α 链与一条 β 链形成二聚体,Hb 可以看成是由 2 个二聚体组成的($\alpha\beta$) ₂ ,在二聚体内结合紧密,在二聚体之间结合疏松
辅基	血红素(Fe ²⁺),结合氧气	每个亚基结合 1 分子血红素(Fe ²⁺),1 分子血红蛋白最多可结合 4 分子氧气
协同效应	无	正协同效应
Hill 系数(h)	1	2.8
氧合曲线	双曲线	S 形曲线
2,3-BPG	很难结合	两条 β 链之间可结合 1 分子 BPG
Bohr 效应	无	有
功能	在肌细胞中贮存氧气	将氧气从肺部运输到外周组织

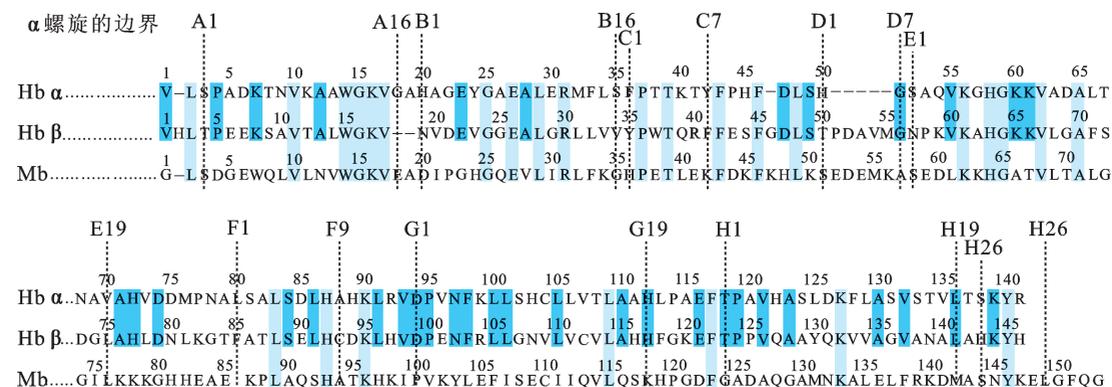


图 3-13 Mb 与 Hb 在一级结构上的比较(Nelson 等,2008)

与 Mb 相比,Hb 之所以更适合充当氧气的运输者,主要的原因是因为它具有四级结构。而具有四级结构的特征使得它在结合氧气的时候,具有 3 个重要的效应——正协同效应(positive cooperativity)、波尔效应(Bohr effect)和别构效应(allosteric effect)。这 3 个效应都有利于 Hb 更适合充当氧气运输者

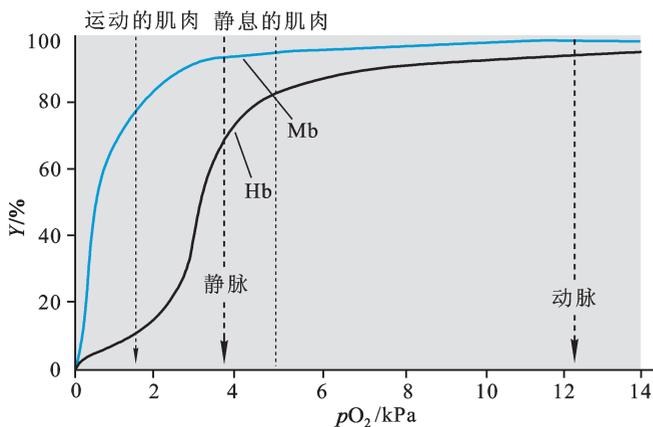


图 3-14 Mb 与 Hb 的氧合曲线

一个亚基结合 O_2 后,其构象会发生变化,使得其他亚基对 O_2 的亲和力突然增强。协同效应可使用齐变或序变模型来解释(参见第十二章“酶活性的调节”)。两种模型都假定血红蛋白存在两种构象,即紧张态(tense state, T 态)和松弛态(relaxed state, R 态)。在没有结合氧气时,Hb 的 4 条链之间结合紧密,此时 Hb 主要以 T 态存在。这种紧密结合是由盐键以及结合在 2 条 β 链之间缝隙中的 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-bisphosphoglycerate, 2,3-BPG)造成的,它们屏蔽了分子表面疏水的空穴,使得 Hb 结合 O_2 的能力降低(单独的 α 链和 β 链结合氧气的的能力与 Mb 相同)。

在脱氧状态下,Hb 上的 Fe^{2+} 由于邻近 His 残基和吡咯环 N 原子之间的空间位阻,而略偏离血红素平面(0.04 nm)。然而,一旦氧合, Fe^{2+} 就移向卟啉环,致使 O_2 能更好地结合。 Fe^{2+} 的移位将近端 His 拉向血红素,近端 His 的移动又带动 F 螺旋也随之移动,而 F 螺旋的移动势必影响到它与相邻亚基的 C 螺旋之间的相互作用,最终导致相邻亚基的构象发生改变。这真可谓“牵一发而动全身”!于是,相邻肽链之间的盐键遭到破坏,Hb 的四级结构也随之改变。这时 2 个二聚体($\alpha\beta$)之间发生滑动,移动 15° ,将 BPG 挤出。随后,四级结构发生进一步的变化,每条肽链表面疏水的空穴都暴露在外,这时的 Hb 主要以 R 态存在,于是它结合 O_2 的能力变强了(图 3-15 和图 3-16)。

为了对 Hb 的正协同效应进行量化评估,需要在 Hb 的 O_2 分数饱和度方程中引入所谓的 Hill 系数(Hill coefficient, h) (参见第九章“酶动力学”)。于是:

$$Y = \frac{[HbO_2]^h}{[Hb]^h + [HbO_2]^h} = \frac{(pO_2)^h}{(P_{50})^h + (pO_2)^h}$$

如果 $h=1$,上面的方程实际上就是 Mb 的氧合方程,因此无协同效应;如果 $h>1$,就有正协同效应;

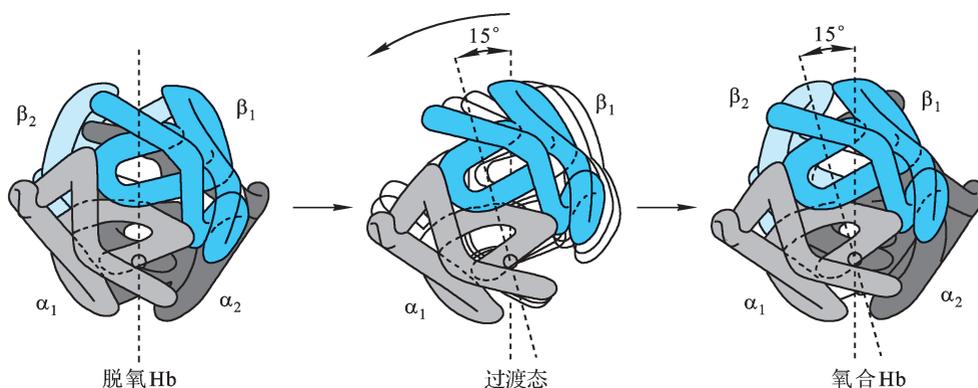


图 3-15 血红蛋白与氧气结合前后的构象变化

的角色。

(1) 正协同效应 Hb 氧合曲线为 S 形曲线(图 3-14)。这意味着,只有在 pO_2 很高的情况下(在肺部或鳃),Hb 才能更好地结合氧气,而 pO_2 一旦降低(在外周血管中),它就开始释放 O_2 ,而此时的 Mb 却没有反应。就结合 O_2 的亲和力而言,4 价的 Hb 还不如 1 价的 Mb。Hb 的氧合曲线之所以呈现为 S 形,是因为 Hb 与 O_2 的结合具有正协同效应。

Hb 的正协同效应是指 Hb 分子有

Quiz9 如果 Hb 被解离成单体,其氧合曲线还是 S 形吗?为什么?

如果 $h < 1$, 就有负协同效应。上面的方程可转换成: $\frac{Y}{1-Y} = \left(\frac{pO_2}{P_{50}}\right)^h$

再进行线性化处理得: $\lg \frac{Y}{1-Y} = h \lg pO_2 - h \lg P_{50}$

如果以 $\lg [Y/(1-Y)]$ 为纵坐标, $\lg pO_2$ 为横坐标作图, 这就是 Hill 作图。

根据测定, 第一个亚基与 O_2 结合的 $P_{50} = 4 \text{ kPa}$, 最后一个亚基的 $P_{50} = 0.04 \text{ kPa}$ 。由此可见, 正协同效应导致 Hb 的最后一个亚基对 O_2 的亲合力增加了 100 倍!

(2) 波尔效应 波尔效应是指 H^+ 和 CO_2 促进 Hb 释放 O_2 的现象(图 3-17), 由丹麦生理学家 Christian Bohr 于 1904 年发现。波尔效应也有助于解释 Hb 为什么在肺中吸氧排 CO_2 , 而其他地方(如肌肉组织)吸 CO_2 排氧。产生波尔效应的原因是 H^+ 和 CO_2 能够与 Hb 特定位点结合, 而促进 Hb 从 R 态转变为 T 态。与 H^+ 引发的波尔效应相关的基团有: α 亚基的 N 端氨基、 α 亚基的 His122 咪唑基以及 β 亚基的 His146 咪唑基。这 3 个基团在 Hb 处于 T 态的时候都是高度质子化的, 而当 O_2 与 Hb 结合以后, 质子即发生解离。如果溶液中的 pH 降低, 将有利于这 3 个基团处于质子化状态, 从而稳定 T 态, 抑制氧气的结合。用反应式来表示, 即为: $Hb + 4O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_4 + nH^+$ 。显然 pH 下降, 即 H^+ 浓度升高, 会使反应平衡向左移动, 这时有利于 Hb 释放结合的 O_2 。

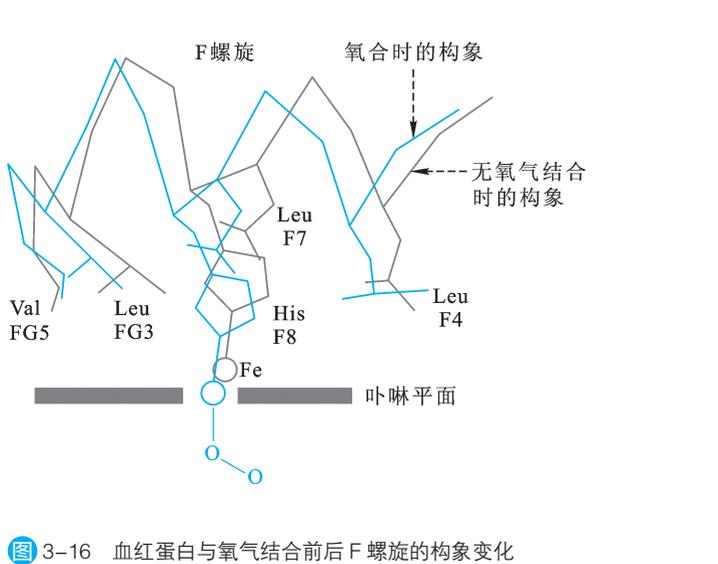


图 3-16 血红蛋白与氧气结合前后 F 螺旋的构象变化

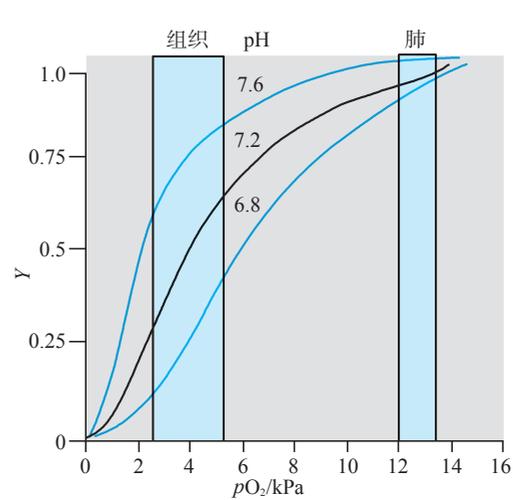


图 3-17 质子浓度对 Hb 与 O_2 亲和力的影响

CO_2 可通过两种途径产生波尔效应。这两种途径不仅有助于 CO_2 进入肺部呼出体外, 而且也能够促进 O_2 的释放。第一种是在碳酸酐酶 (carbonic anhydrase) 的催化下, 红细胞内的 CO_2 发生反应: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ 。此反应释放出质子而产生波尔效应, 同时产生的 HCO_3^- 进入血浆, 随循环到达肺部; 第二种是 CO_2 与 Hb 的 N 端氨基可逆的反应: $CO_2 + Hb-NH_2 \rightleftharpoons H^+ + Hb-NH-COO^-$, 形成氨基甲酸血红蛋白 (carbaminohemoglobin), 也释放出质子, 这对波尔效应也有贡献。但更重要的是, 此反应可导致在 α 和 β 亚基之间形成新的盐键, 而有助于 Hb 处于 T 态, 使其更容易将结合的 O_2 释放出来。

CO_2 主要通过这两种途径进入肺, 分别占 85% 和 15%, 只有 5% 的 CO_2 以溶解的形式随循环进入肺。在肺部, 较高的氧分压使得 Hb 能够有效地结合 O_2 , 而正协同效应使得 Hb 从 T 态变成 R 态, 并释放出质子。同时, 与 Hb 氨基端结合的 CO_2 也被释放出来。释放出的 H^+ 与随血液循环到达肺部的 HCO_3^- 在碳酸酐酶的催化下, 发生逆反应, 产生 CO_2 和 H_2O 。 CO_2 随后通过呼气排出体外。

(3) 别构效应 别构效应是指除 O_2 以外的各种配体在血红素铁以外的位点与 Hb 结合, 导致 Hb 的构象发生变化, 进而影响到 Hb 氧合能力的现象。哺乳动物体内能与 Hb 结合的配体有 H^+ 、 CO_2 、2,3-BPG 和 NO, 它们统称为别构效应物 (allosteric effector)。 H^+ 和 CO_2 产生的效应就是波尔效应。

2,3-BPG 产生的效应也是增强 Hb 在外周组织释放氧气的能力。

2,3-BPG 作为糖酵解的副产物广泛存在于红细胞(参见第二十二章“糖酵解”),其浓度与 Hb 不相上下,约为 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2,3-BPG 只能与脱氧 Hb 内位于两条 β 亚基之间带正电荷的空穴(1.1 nm)结合,稳定 T 态,显著降低 Hb 与 O_2 的亲合力,促进 Hb 在组织中释放 O_2 (图 3-18 和图 3-19)。氧合 Hb 位于两条 β 亚基之间的空穴已经显著变小,只有 0.5 nm,容纳不下 0.9 nm 大小的 BPG 了。

Quiz10 CO 与 Hb 的结合是否属于别构效应? 为什么?

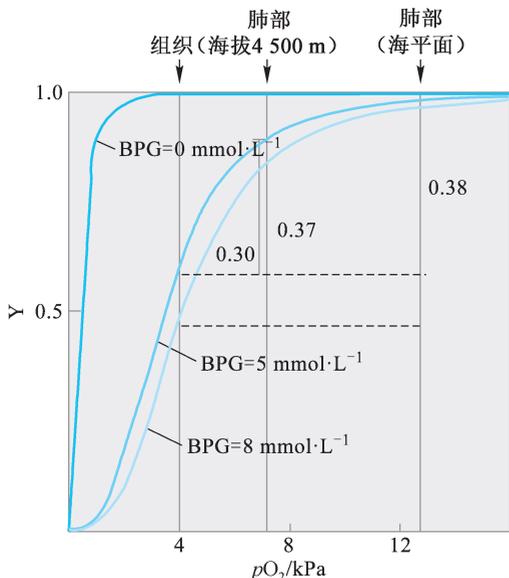


图 3-18 2,3-BPG 对血红蛋白与 O_2 亲和力的影响

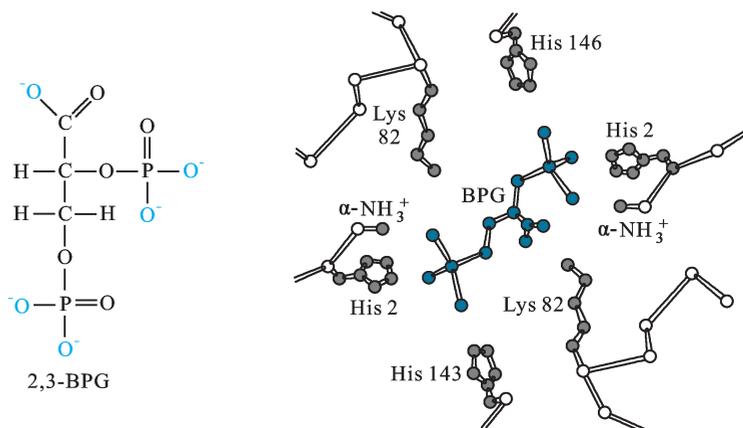


图 3-19 BPG 的化学结构及其与两条 β 链之间的结合

生活在高海拔地区可诱导红细胞内的 BPG 水平的上升,这显然是生物对缺氧环境的一种适应。在高海拔地区,大气中的氧气较为稀薄,将氧气有效地释放到外周组织变得困难。为了适应这种环境,体内红细胞的数目会增加,同时机体开始加速合成 2,3-BPG(参见第二十二章“糖酵解”)。大概 24 h 以后,体内的 2,3-BPG 水平便开始持续上升。除此以外,贫血、肺功能衰弱和长期吸烟也可导致体内 BPG 水平上升。

胎儿血红蛋白 HbF($\alpha_2\gamma_2$)与 O_2 的亲合力明显高于成人的 HbA,这显然有利于胎儿通过胎盘(氧分压大大低于肺)从母亲那里获取 O_2 。HbF 与 O_2 亲合力之所以高于 HbA,是因为与 α 亚基结合的 γ 亚基不能结合 BPG。由此可见,无私的母爱在分子水平上已经开始了!

不是所有的动物都使用 2,3-BPG 来降低 Hb 与 O_2 的亲合力。例如,鱼类使用 ATP 和 GTP 来结合 Hb,以稳定它的 T 态构象,从而降低它与 O_2 的亲合力。但在缺氧的条件下,鱼类红细胞内的 ATP 和 GTP 水平下降,这又提高了 Hb 与 O_2 的亲合力。

至于 NO 对 Hb 结构与功能的影响,有研究表明:Hb 在氧合状态下,NO 可与其特定位置的 Cys 残基侧链上的巯基结合,形成 S-亚硝基硫醇(S-nitrosothiol)。而一旦 Hb 释放氧气,NO 就立刻解离到外周组织,通过扩张血管,有助于氧气在局部的运输。

3. 血红蛋白的突变体

迄今为止,已发现了 Hb 的多种突变体。根据表型,突变体可分为 4 类:①Hb 聚合成纤维状,致使红细胞成镰刀形;②改变与 O_2 的结合性质;③血红素辅基丢失;④四聚体解聚。

第一种突变体最为常见,它直接导致镰状细胞贫血症(sicklelemlia)。这种贫血患者的 Hb 简称为 HbS。HbS 与 Hb 在结合 O_2 的能力方面并没有什么差别,它们的区别在于 HbS 能造成红细胞溶血,致使患者体内的红细胞数量减少,通常只有正常人的 1/2。溶血后的 Hb 不能像红细胞中的 Hb 一样正常运输 O_2 。患者表现为乏力,剧烈运动可导致死亡。HbS 导致溶血的原因在于,其 β 亚基的 6 号位残基

Quiz11 试预测生活在高海拔的鸟类和低海拔的鸟类在 Hb 的结构与功能上会有何不同?

e3-1 Hb 突变体的结构及其功能异常

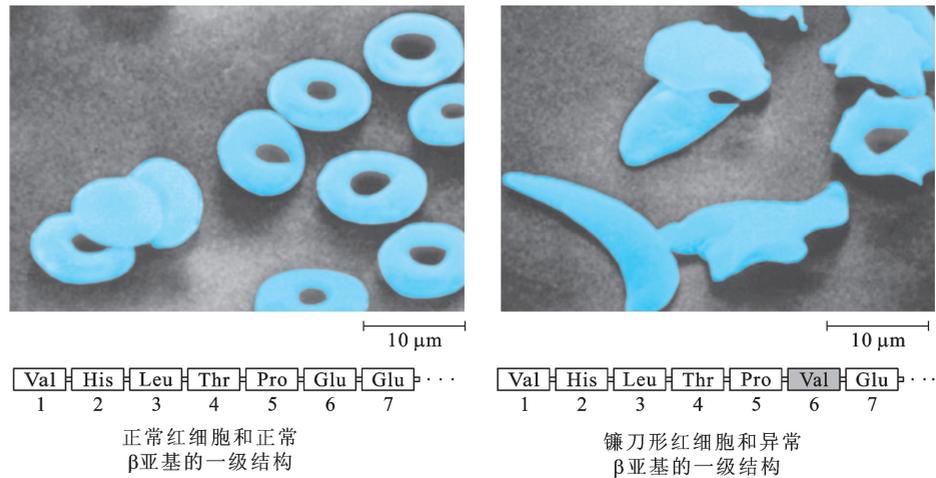


图 3-20 正常红细胞和镰刀形红细胞的外形比较以及 HbS 在一级结构上的变化

Quiz12 若 $\beta\text{Glu6} \rightarrow \text{Asp6}$ 或 Leu6 或 Ala , 则变体的表型如何?

从正常的 Glu 突变成 Val(图 3-20)。这种异常的 HbS 在脱氧状态下, 相互间很容易通过一个 β 亚基在表面由 Val6 侧链形成的疏水突起, 与另一个 β 亚基在表面的疏水口袋之间的疏水作用而聚集成纤维(图 3-21), 导致细胞膜变形直至破裂。

Ngb 和 Cygb 是近几年来才发现的属于珠蛋白家族的两个新成员, 与 Hb 和 Mb 一样也能结合 O_2 。其中, Ngb 主要在脊椎动物的大脑和视网膜细胞中表达, 而 Cygb 几乎在脊椎动物所有的细胞中都能表达。

e3-2 Ngb 和 Cygb 的结构与功能

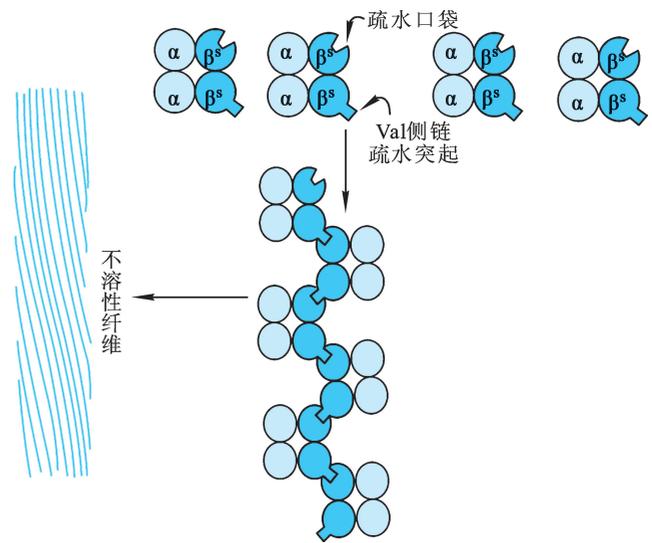


图 3-21 在脱氧状态下 HbS 之间的自组装反应 (Baker, 2001)

框 3-3 生化医药——丁酸的妙用

丁酸是一种常见的羧酸, 现在人们发现它承载着有效治疗两种古老的人类遗传性疾病——镰状细胞贫血和 β -地中海贫血的希望。镰状细胞贫血是 β 珠蛋白发生一个点突变引起的, 而 β -地中海贫血的病因却是 β 珠蛋白不能正常表达。然而, 这两种遗传性疾病并不影响胎儿, 因为出生前和出生后几个星期, 机体主要表达没有 β 珠蛋白的 HbF, 而不是 HbA。HbF 对 O_2 的亲合力高于 HbA, 这样可确保胎儿能通过胎盘从母亲的血液中获得足够的 O_2 。

想到用丁酸来治疗这两种遗传性疾病的灵感来自两个偶然发现的交汇: 一是有医生发现一些镰状细胞贫血患者只有轻微症状, 原因是他们体内能继续产生高水平的 HbF; 二是一些糖尿病母亲所生的婴儿在出生后很长时间内, 继续产生大量的 HbF。巧合的是, 在这些婴儿的血液中, 发现有高水平的氨基丁酸。这两个发现让美国奥克兰研究中心的 Susan Perrine 有了灵感, 想到了通过“唤醒”在基因表达上处于“休眠状态”的胎儿珠蛋白基因来治疗镰状细胞贫血。于是, 她和她的同事向 3 个镰状细胞贫血患者和 3 个 β -地中海贫血患者注入了丁酸钠溶液。经过约 3 周的实验性治疗, 这些患者体内的 HbF 水平上升高达 45%。其中一个地中海贫血患者, 所有的症状被完全逆转。而且, 这种治疗方法的不良副作用很小。当然这种疗法只有在对大量患者进行治疗并证明有效后才可以宣布完全成功。

(二) 免疫球蛋白

免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 即抗体, 是一类由 B 淋巴细胞分泌出的糖蛋白, 可以与特异的抗原结合从而激发特定的体液免疫反应。

三、膜蛋白的结构与功能

细胞内有 1/3~1/2 的蛋白质与膜结合或镶嵌在膜内, 这些蛋白质统称为膜蛋白。生物膜的各项功能主要是由各种结构不同的膜蛋白完成的。根据与脂双层膜联系的方式, 膜蛋白可分为外在蛋白、内在蛋白和脂锚定蛋白。其中外在蛋白也称为外周蛋白, 它们仅与膜的表面保持接触, 是可溶性的, 与球状蛋白质非常相似, 如细胞色素 c; 内在蛋白则镶嵌在膜上, 与膜融为一体, 其结构比较复杂; 脂锚定蛋白通过与其共价连接的疏水基团锚定在膜上 (参见第十六章“脂质与生物膜”)。

膜内在蛋白镶嵌于膜脂的特性, 使这一类蛋白质经常位于细胞与外部环境的交界处, 介导细胞与外界之间的信号转导, 并执行很多重要的细胞功能。例如, 它们作为各种神经递质、水溶性激素和其他配体的受体, 构成各种跨膜的离子通道及转运蛋白等。但是, 膜内在蛋白的疏水特性使其需要与生物膜共同形成稳定的天然构象, 这大大增加了研究的难度。

与研究球状蛋白一样, 要真正地理解膜蛋白的功能, 首先需要确定它们的三维结构。然而, 研究膜内在蛋白的三维结构并非易事, 其困难集中反映在以下 3 个方面:

(1) 含量低 例如一些跨膜受体蛋白的含量为微克级, 而应用基因工程方法大量表达膜内在蛋白也存在着很大的困难。因此, 迄今为止其精细结构已被解析的主要是天然含量本来就高的膜内在蛋白, 如牛心线粒体细胞色素 c 氧化酶、细胞色素 bc_1 复合体、植物光合作用的聚光复合体、紫色细菌光合反应中心、嗜盐古菌菌紫红质和细菌膜孔蛋白等。

(2) 分离、纯化比较困难 只有用较剧烈的条件 (如去垢剂、有机溶剂和超声波) 才能将它们溶解下来, 而分离后一旦除去去垢剂或有机溶剂, 它们很容易聚合为不溶物。

(3) 结晶困难 这就限制了使用 X 射线晶体衍射对其结构的解析。

对于膜内在蛋白难以结晶的难题, 德国生物化学家 Hartmut Michel 在研究中巧妙应用可透析的两性小分子去垢剂给予解决了。其原理是: 当小分子的去垢剂达到一定浓度时形成微团, 可将膜蛋白的疏水区屏蔽起来, 这使膜内在蛋白在水中呈溶解状态。在去垢剂微团的极性表面之间的相互作用下, 膜内在蛋白有可能形成结晶 (图 3-22)。1977 年, Michel 正是利用这种方法得到菌紫红质的晶体。次年, Michel 偶然发现, 当把这种物质放在冰箱中时, 可形成固态的玻璃状聚集体, 由此他相信有可能获得三维晶体。幸运的是, 很快他便获得了成功。

1981 年, Michel 利用分子筛层析技术首次得到了光合反应中心的晶体。他把这一研究成果投稿给 *Nature*, 但最后被拒稿。后转投 *The Journal of Molecular Biology*, 才得以发表。1982 年, Michel 在 Robert Huber 领导的当时世界上最先进的 X 射线衍射实验室做报告时, 引起了 Huber 的兴趣, 二人选定 Johann Deisenhofer 完成紫色细菌光合反应中心的 X 射线晶体衍射分析。1985 年, Deisenhofer 完成了整个光合反应中心结构的测定。1988 年, 这三位德国生物化学家共享了诺贝尔化学奖。

另外, 随着冷冻电镜技术的发展, 现在对于膜内在蛋白的研究可以说多了一种十分重要的工具, 使用这项技术, 一大批以前难以研究的膜蛋白的三维结构被解析出来, 例如人细胞的葡萄糖转运蛋白和钾离子通道等。

对已获得三维结构的各种膜内在蛋白的研究表明, 它们与非膜蛋白一样, 含有相同的二级结构元件, 但它们几乎完全存在于疏水环境之中, 这种疏水环境是由膜脂上的疏水尾形成的。因此, 对于膜内在蛋白来说, 需要解决肽键的亲水性质造成的将一条多肽链插入或贯穿在一个脂双层膜上能量不利的问题。

要解决多肽链通过脂双层膜能量不利的问题, 最简单的方法是形成疏水 α 螺旋, 因为 α 螺旋满足

了主链原子形成氢键的倾向,并使疏水 R 基团面向脂环境。既然 α 螺旋的每一个残基延伸 0.15 nm, 那么一个跨膜 α 螺旋约含 20 个氨基酸残基, 这相当于脂双层疏水部分的平均厚度, 即 2.5~3 nm (图 3-23)。因此, 一段由 20 个疏水氨基酸残基组成的 α 螺旋就足以横跨生物膜, 此数据实际上已成为鉴别一种蛋白质是不是膜内在蛋白的一个重要标志。

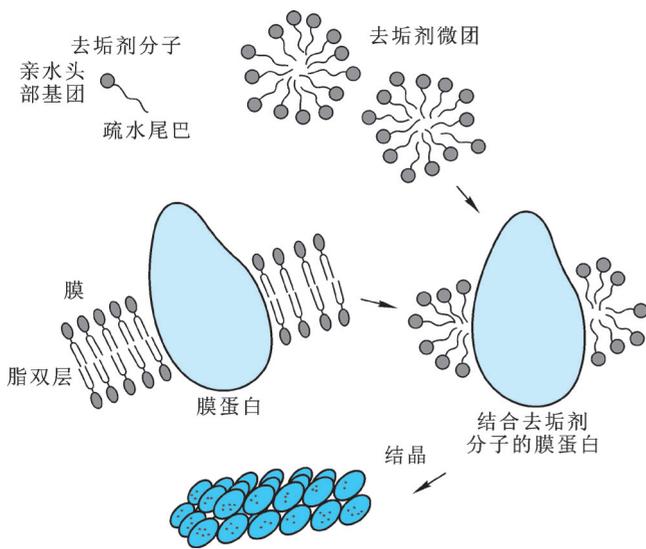


图 3-22 使用小分子去垢剂获得膜蛋白结晶的原理和流程

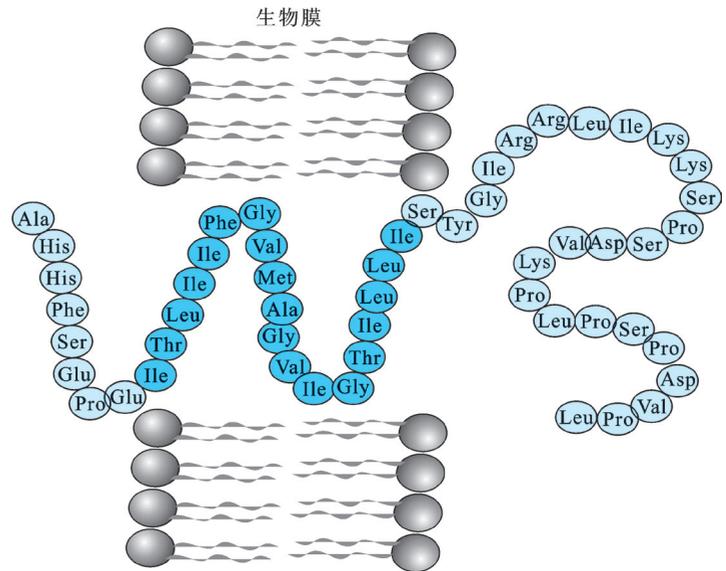


图 3-23 膜蛋白的跨膜 α 螺旋的氨基酸组成

疏水作图 (hydropathy plot) 对于发现一个膜内在蛋白的跨膜螺旋十分有用, 因为跨膜螺旋的疏水性一般要比通常的螺旋高得多。例如, 在对羧酸转运感应蛋白 (carboxylic acid transport sensor) 进行疏水作图以后, 预测其有 2 个跨膜螺旋, 而结果果真如此 (图 3-24)。

菌紫红质是一种典型的膜内在蛋白。疏水作图表明, 其含有 7 个跨膜螺旋, 螺旋之间是相当短的小环 (图 3-25)。其功能是作为一种受光子驱动的质子通道。受光子的激活, 结合在菌紫红质核心的视黄醛从全反式异构成 13-顺式。如此构型的变化会影响到一个氨基酸残基侧链的 pK_a , 从而导致 1 个质子从膜的一侧转运到另外一侧。

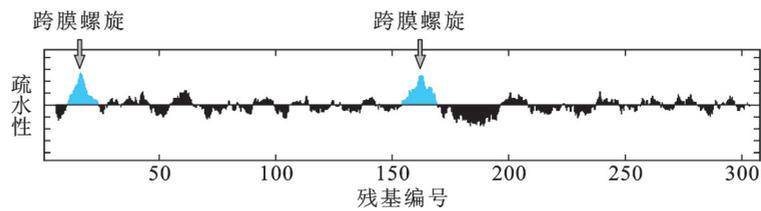


图 3-24 羧酸转运感受蛋白的疏水性作图

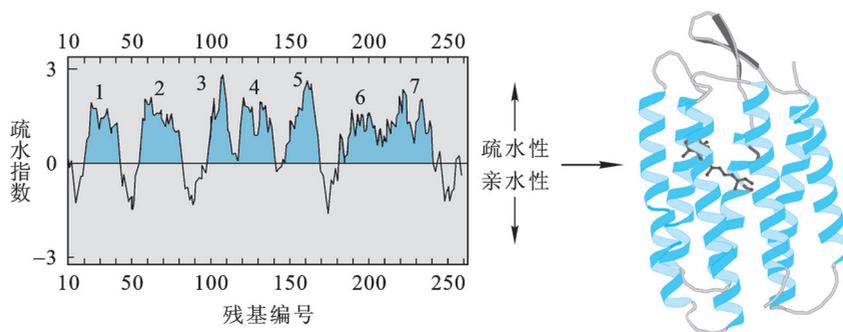


图 3-25 菌紫红质的疏水性作图结果以及实际的三维结构模型

还有一种方法,可以解决多肽链通过脂双层膜遇到的能量不利的问题,那就是形成 β 折叠。然而,膜蛋白上的 β 折叠单凭序列是难以确定其存在的,原因是一个跨膜的 β 股只需要8~9个氨基酸残基就够了,但折叠一般由亲水氨基酸和疏水氨基酸残基交替组成。到目前为止,发现的全 β 折叠膜蛋白具有反平行的 β 折叠桶结构,例如孔蛋白。联系相邻 β 股的是短的亲水性转角。

孔蛋白主要存在于革兰阴性菌、线粒体和叶绿体的外膜上,其中央是一个由 β 折叠桶构成的孔洞(参见第二章“图2-17”),允许小分子和水被动扩散进入周质。孔洞的两侧分布着带正电荷和带负电荷的残基,以创造跨膜的电场,使不同的孔蛋白对离子具有不同的选择性。

细菌的孔蛋白都是三聚体。它有很大的表面区域被包埋在亚基之间,这与球状蛋白亚基之间被包埋的表面并无两样。面向脂双层的表面高度疏水,比蛋白质的内部和亚基之间界面上的疏水性要高得多。

于是,多肽链总是通过形成特殊的二级结构或三级结构来避免肽键与疏水的脂环境接触,以便插入到脂双层结构之中。实际上,疏水环境更有利于二级结构的形成,这是因为在疏水环境中没有水分子的竞争干扰,肽链内的氢键更容易形成。

就氨基酸分布而言,膜内在蛋白暴露在水相中的表面性质实际上与一般的球状蛋白相同,它们的差别主要在于与脂双层作用的氨基酸的性质和分布。如果不考虑与脂双层相互作用的表面,膜内在蛋白的内部与绝大多数球状蛋白差不多,但那些参与信号转导的离子通道或参与物质跨膜转运的孔蛋白除外。

四、天然无折叠蛋白质的结构与功能

前面所述的各种蛋白质,无论是纤维状蛋白,还是球状蛋白或膜蛋白,由于具有特定的三维结构,才具有特定的生物学功能。一旦失去了特定的结构,成为松散无折叠状态,就立刻丧失功能。然而,自20世纪90年代初以来,人们开始发现越来越多的蛋白质,在生理条件下,尽管缺乏特定的二级结构和三级结构,处于完全无折叠或部分无折叠状态,但仍然具有功能。这类蛋白质现在统称为天然无折叠蛋白质(NUP),或固有无序结构蛋白质(intrinsically unstructured protein, IUP),或固有无序化蛋白质(intrinsically disordered protein)。

迄今为止,已发现的NUP约占蛋白质总数的30%。NUP一般可分为两类(图3-26):一类是完全

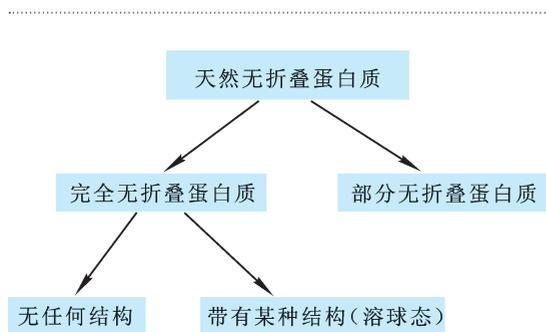
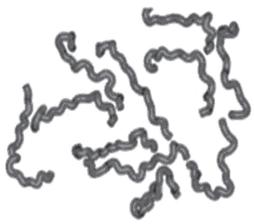


图3-26 天然无折叠蛋白质的分类

无折叠蛋白质(fully unfolded protein),约占10%;另外一类是部分无折叠蛋白质(partially unfolded protein),一般含有一段由>50个氨基酸残基组成的无折叠区域。完全无折叠蛋白质还可以进一步分为两个亚类:第一亚类无任何二级结构,第二亚类无三级结构,与天然折叠蛋白质在折叠过程中形成的“溶球态”中间体相似。显然,天然无折叠蛋白质的发现是对传统的蛋白质结构与功能关系基本法则的挑战。

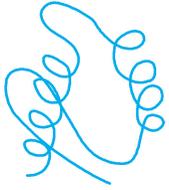
在天然无折叠蛋白质中,有些必须处在无折叠状态才具有一定的功能,有些需要跟特定的配体(经常是DNA)结合,进而发生折叠,再行使功能。例如,淋巴类增强子结合因子1(lymphoid enhancer-binding factor-1, LEF-1)就属于后一类,它在B细胞前体和T细胞中表达,定位在细胞核,与DNA分子上的T细胞受体 $-\alpha$ 增强子(T-cell receptor-alpha enhancer)结合以后发生折叠,然后刺激相关基因的表达。再如,真核细胞中有两种转录因子,一是CREB结合蛋白(CREB-binding protein),它有一个结构域称为细胞核辅助激活蛋白结合结构域(nuclear co-activator binding domain, NCB),该结构域最初为溶球态;另一个是甲状腺素和视黄酸受体的辅助激活蛋白(co-activator for thyroid hormone and retinoid

Quiz13 蛋白质也使用 β 折叠横跨脂双层膜,然而,一个单一的 β 股从来不能单独跨膜,为什么?



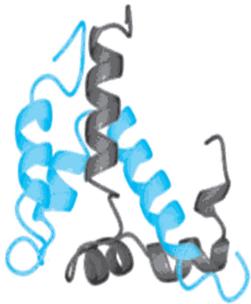
无任何结构的ACTR蛋白

+



溶球态的NCBD

↓
相遇结合
发生折叠



ACTR-NCBD复合物

图 3-27 两种 NUP 的相互作用导致各自发生折叠

Quiz 14 为什么 NUP 中侧链较大的疏水氨基酸残基含量少?

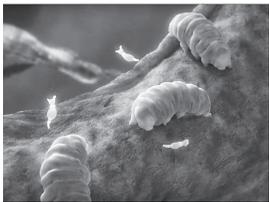


图 3-28 生活在青苔表面的三条水熊虫

receptors, ACTR), 它带有一个完全无序的激活结构域。研究表明,一旦这两个转录因子的这两个结构域结合,则立刻折叠(图 3-27)。

NUP 的主要功能是参与信号转导、细胞周期调控和基因表达调控,此外,它与翻译后加工也有关系,还经常充当 RNA 和蛋白质的分子伴侣。在信号转导过程中,经常涉及可逆的蛋白质磷酸化(reversible protein phosphorylation),这种磷酸化和脱磷酸化修饰是真核细胞调节蛋白质或酶活性的主要手段之一(参见第十七章“激素及其受体介导的信号转导”)。人们还发现,磷酸化位点周围的氨基酸组成、序列复杂性、疏水性、电荷和其他序列特征与 NUP 十分相似。因此,有人认为蛋白质磷酸化位点主要发生在无折叠区域。

NUP 一级结构的特征是含有较多的 Gln、Ser、Pro、Glu 和 Lys,而侧链较大的疏水氨基酸很少,如 Val、Leu、Ile、Met、Phe、Trp、Tyr,因此可以利用上述性质来鉴别或预测一种蛋白质是不是无折叠蛋白。现在有专门的网站,在线提供预测天然无折叠蛋白质的服务,如 <http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex>。NUP 为什么不能折叠或者只能部分折叠? 主要原因是疏水氨基酸含量少,而疏水作用是驱动蛋白质折叠的主要动力。

框 3-4 生化新发现——天然无折叠蛋白的新功能

有一类称为缓步动物(Tardigrade)或水熊虫(water bear)的显微生物,其生存能力超强,从高山到深海,几乎无处不在(图 3-28)。虽然它们在适宜的环境下平均寿命仅有几个星期到几个月,但在干燥缺水的环境下却可以生存好多年,甚至长达一个世纪。对此,生物学家一直在试图揭示水熊虫顽强生存的秘密,尤其是它们的“泡发”过程:在极端干旱的条件下,水熊虫身体开始皱缩,进入干化(desiccation)状态,这时细胞几乎完全脱水,体内的代谢下降到正常水平的 0.01%。在此阶段,水熊虫几乎“无所事事”,仅仅是活着,但却还能抵抗真空、高压和高温的折磨。然而,一旦接触到水,水熊虫就像重新浸湿的海绵一样,其生命活动又会完全恢复,好像什么都没有发生过。

在学习蛋白质折叠机制的时候,我们曾遇到过一类有悖“Anfinsen 法则”的蛋白质,称为天然无折叠蛋白或内在无序蛋白(intrinsically disordered protein, IDP),它们在细胞内合成后并没有在疏水作用力的驱动下进行折叠。虽然有一些 IDP 在遇到合适的配体以后,受到诱导,会迅速折叠并行使它们的功能,但也有 IDP 似乎永不折叠,对于这些蛋白质究竟在体内能行使何种功能一直不很清楚。

现在有人在水熊虫体内,发现一类 IDP 似乎赋予了这类生物超强的抗旱能力。根据美国北卡罗来纳大学 T. C. Boothby 等 2017 年 2 月 18 日发表在 *Molecular Cell* 上题为“Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation”的研究论文,在脱水状态下,水熊虫细胞开始上调水熊虫特有的内在无序蛋白(tardigrade-specific intrinsically disordered proteins, TDP)的表达,这样可以给胞内其他重要的生物分子,比如其他蛋白质,筑起一层玻璃状的保护壳,直至脱水状态解除。

这些 TDP 在缺水的条件下更难折叠,但却充当了“金钟罩”,保护着水熊虫细胞。其他生物可使用海藻糖(trehalose)来对付干旱,即大量合成这种寡糖来取代细胞的内容物,并严格限制细胞残留的水分子,阻止它们快速膨胀而丧失。多年来,研究者以为水熊虫也是这样。然而,许多水熊虫只合成少量海藻糖。因此,这些水熊虫很有可能通过 TDP 起作用,达到海藻糖同样的效果。为了证明这一点,Boothby 及其同事使用了干扰 RNA 技术,将编码 TDP 的基因进行了敲减,结果发现,水熊虫在干旱脱水环境下的生存能力明显下降。TDP 可能单独作用,也可能和体内少量的海藻糖一起,在干燥的细胞体内形成非晶态固体(non-crystalline amorphous solid),即玻璃体。这个玻璃金钟罩将一些重要生物分子,比如其他蛋白质包裹住,防止它们变性和分解。因此,在水熊虫干燥的进程中,TDP 充当了一种“功能性调节物”,帮助水熊虫细胞在玻璃化状态和遇水复苏状态间切换。

为了测试水熊虫的 TDP 在其他生物中的表现,他们将一种 TDP 基因导入到细菌和酵母,让它们也表

达水熊虫这种 TDP。结果显示,细菌和酵母的抗干旱能力都大大提高,其中的一些酶也更耐旱了。这证明了水熊虫抗干旱的“家传秘方”也可以被其他生物“借用”。因此,将来完全有可能借助于 TDP 来提高其他生物的抗干旱能力,还可以实现对植物和动物进行安全的脱水处理。

NUP 虽然处于完全无折叠或部分无折叠状态,但并不比处于折叠状态的蛋白质更容易水解,这主要是因为 NUP 主要分布在细胞核和无蛋白酶的细胞器,远离有蛋白酶的区域,而且多数 NUP 在遇到合适的配体以后也会发生折叠。

从生物进化学的角度看,NUP 似乎具有很多好处,可能包括:①不需要经过折叠就能起作用;②可以结合几种不同的配体,而表现多种功能;③拥有较大的分子之间相互作用的界面,有利于分子识别;④有利于细胞信号转导过程中开与关的切换。这些好处对于复杂的生物来说更有用,因此 NUP 的分布与生物复杂性正相关,即生物越复杂,NUP 越多。NUP 在真核生物中比较普遍,在原核生物中则少见。

第四节 蛋白质功能预测

就目前的研究水平,蛋白质的生化功能一般很容易从它的序列和结构推导出来,有时还可能走得更远。在当今基因组学和后基因组学时代,功能通常凭经验,再综合各种不同的技术得到。尽管预测一种蛋白质功能最好的方法是先得到它的三维结构,但也可以单独进行功能预测或者与结构预测结合起来。

目前经常使用的功能预测法主要包括:

1. 基于序列的途径(sequence-based approach)

如果蛋白质 A 有功能 X,而蛋白质 B 是蛋白质 A 的同源物,B 就很可能有功能 X。

序列比对是检测同源基因的强有力工具,但限于亲缘关系不太远的基因组。

2. 基于结构的途径(structure-based approach)

假定蛋白质 A 有功能 X,而且具有某种结构特征,那么 A 的功能位点便具有某种结构特征。如果蛋白质 B 具有这种结构特征,蛋白质 B 就可能具有功能 X。

这种基于结构的方法可能检测出基于序列途径不能确定的遥远的同源物。

3. 结构与序列比对法

除了使用序列信息以外,还使用结构信息。

蛋白质结构预测线索法(protein threading)是一种很流行的方法。这种方法首先假设多肽的构象,然后根据得到的结构计算出其能量。通过计算各种已知结构的能量,可以得出与给定蛋白质序列最符合的构象。由于该结构是假设的而不是计算出来的,线索法有时指的就是“反向蛋白质折叠”。

SCOP (<http://scop.berkeley.edu/>) 是一个在线的蛋白质分类数据库,它根据蛋白质的结构和功能的相似性,将蛋白质分成若干个等级,按照从低到高的排列依次是:家族(family)、超家族(superfamily)、栏(fold)和类(class)。其中类是最高级水平,共分为 11 类,包括全 α 蛋白(all-alpha protein)、膜蛋白(membrane protein)、 $\alpha\beta$ 蛋白(alpha-beta protein)、卷曲螺旋蛋白(coiled-coil protein)等;栏为第二级水平,共有 800 个栏;超家族位于第三级,共有 1 294 个超家族;家族处于第四级,共有 2 327 个家族。

使用序列-结构比对法,可以预测一种蛋白质属于哪一个家族、超家族或栏。被预测的处于同一个 SCOP 家族的蛋白质被认为是直向同源物;处于同一个 SCOP 超家族的蛋白质被认为是同源物;处

于同一栏的蛋白质被认为是类似物。

通过这种方法,还可以对一种蛋白质的配体结合位点或大分子结合位点进行预测:已知约 85% 的配体结合位点是最大的裂缝,还有约 10% 的配体结合位点是第二大裂缝;大分子结合位点(蛋白质、DNA 和 RNA)和无序区域之间有密切的关系,而蛋白质序列中属于无序区的残基可通过计算的方法预测出来。

4. 基于模体的方法 (motif-based approaches)

假定一组蛋白质有功能 X,并且它们都有模体 Y,而蛋白质 A 具有模体 Y,那么蛋白质 A 的功能就可能与 X 有关。这种方法依赖于已鉴别的序列模体。Prosite (<http://expasy.org/prosite>) 含有一千个以上的蛋白质家族特异性的序列模体。而 ScanProsite 允许扫描一个蛋白质序列,从而发现存储在 Prosite 中的模体和资料 (profiles)。

Prosite 数据库是第一个蛋白质序列二次数据库,90 年代初期开始构建,现由瑞士生物信息学研究所 SIB 维护。Prosite 数据库是基于对蛋白质家族中同源序列多重序列比对得到的保守性区域,这样的区域通常与生物学功能有关,例如酶的活性位点、配体或金属结合位点等。因此,Prosite 数据库实际上是蛋白质序列功能位点数据库。通过对 Prosite 数据库的搜索,可判断该序列包含什么样的功能位点,从而推测其可能属于哪一个蛋白质家族。

5. 基于“连坐” (guilt-by-association) 的功能预测

假定蛋白质 A 有功能 X,蛋白质 B 经常与蛋白质 A 相联系,那 B 的功能就可能与 X 相关。基于连坐的功能预测是一种非同源性途径。

科学故事——一种多功能蛋白质的发现

以前分子生物学里有一个基本观点,就是一个基因决定一条多肽链,而一条多肽链只具有一种特殊的功能。但随着分子克隆技术的发展,越来越多已知活性的基因被克隆、测序和比对,在对其结构进行详细分析后发现,蛋白质结构与活性之间已不再是单纯的一对一的关系了。1987 年,芬兰 Oulu 大学的 Taina Pihlajaniemi 在研究人体胶原蛋白的时候,就发现了这样的例外。

胶原蛋白是人体中含量最多的蛋白质,其二级结构是由三条相同的多肽链互相缠绕而形成的三股螺旋,每条肽链上含有多个 Gly-X-Y 重复序列,其中 X 位置主要是 Pro, Y 位置主要是羟脯氨酸 (Hyp)。

胶原蛋白三股螺旋结构的稳定性与 Y 位置上有多少脯氨酸被羟基化有关,因此,催化 Pro 羟基化的脯氨酸羟化酶 (prolyl-4 hydroxylase) 是决定胶原蛋白稳定性的一个十分重要的酶。脊椎动物的这种酶是由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基组成。 α 亚基和 β 亚基分别由不同的基因编码。不论 α 或 β 亚基,单独都没有活性,但 β 亚基的单克隆抗体能使整个酶失去活性,而只有 α 和 β 亚基同时存在的时候,酶才能与它的辅因子——抗坏血酸结合,这说明 β 亚基的确是表现酶活性的重要组成部分。但奇怪的是, α 及 β 亚基在细胞内的表达并不一致。 β 亚基的数量远远高于 α 亚基,因此, α 亚基合成后立刻会与 β 亚基结合,形成有活性的脯氨酸羟化酶,而留下许多单独存在的 β 亚基。那么单独的 β 亚基会有其他的功能吗?

既然蛋白质的一级结构决定蛋白质的三维结构,而蛋白质的三维结构又决定它的功能,那么如果知道了一种蛋白质的一级结构,就不仅可以预测和解释这种蛋白质的三维结构和功能,同时还可以将这种蛋白与其他已知功能的蛋白质进行序列比对,从而有可能发现新的功能。Pihlajaniemi 在得到脯氨酸羟化酶 β 亚基的一级结构以后,便将它的氨基酸序列输入计算机,在互联网上和其他已知蛋白质的氨基酸序列进行比对。出乎意料的是,她发现人类脯氨酸羟化酶 β 亚基的氨基酸序列有 94% 与小鼠的蛋白质二硫化物异构酶 (PDI) 相同。她用纯化的 β 亚基也检测到它的确有 PDI 的酶活性,再用克隆的 β 亚基的 cDNA 作探针,发现人类细胞中只有一个基因具有类似的碱基序列。因此 PDI 很可能就是单独的脯氨酸羟化酶的 β 亚基。换句话说,一个基因表达出来的蛋白质在不同的条件下可以同时具有两种完全不同的酶活性。



Taina Pihlajaniemi

PDI 早在 1963 年就在鼠肝和胰腺组织中发现,其主要功能是催化蛋白质上二硫键的交换反应,具有较广的底物特异性。PDI 在体外能够促进被变性和还原的含有二硫键的蛋白质重获活性。当一个蛋白质的天然构象遭尿素破坏,而其二硫键也被还原剂打破以后,若要恢复这个蛋白质原来正确的构象,不仅要除去尿素,同时还要让二硫键重新形成,并恢复到原来正确的连接,PDI 就可以加速这个“尝试错误、发现正确”的过程。但 PDI 在体内是否也扮演同样的角色则仍是未知数。有了这个后知之明,再去看 PDI 在体内分布的情形,发现 PDI 的活性主要集中在内质网,这很容易让人们想起它可能在分泌蛋白折叠过程中起作用,因为许多分泌蛋白都含有二硫键。而后来的许多研究证明,PDI 的确就具有这种功能。

那么, β 亚基的功能是不是就到此为止了呢? 1991 年,J. R. Wetteran 等使用氨基酸序列分析和免疫化学分析,发现了一种由大小两个亚基组成的微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)的小亚基与脯氨酸羟化酶的 β 亚基一模一样。但 MTP 的 PDI 酶活性仅是自由 PDI 的十分之一。后来又有人发现,单独的 β 亚基在细胞内还充当甲状腺素结合蛋白(thyroid hormone binding protein, THP)。

迄今为止,已经发现了许多多功能蛋白,像哺乳动物的脂肪酸合酶居然具有 7 种酶活性,外加一种酰基载体蛋白的功能。多功能蛋白质的存在不仅可以提高基因的编码功能,还可能有利于对蛋白质的活性进行调控。

网上更多资源……

 授课视频

 授课音频

 教学课件

 本章小结填空看

 推荐网址

 参考文献