

金属离子对蛋白质的折叠、识别、 自组装及功能的影响³

蒋 明 沈 涛 徐辉碧 刘长林^{3 3}
(华中科技大学化学系 武汉 430074)

摘 要 金属离子不仅影响金属蛋白的空间结构, 还与生物大分子的识别、自组装等性质和生物功能密切相关。在很多蛋白质中, 金属离子及其配合物可以诱导周围的肽段折叠成正确的结构, 我们将其称为金属结合部位作为模板诱导的结构基序(template-mediated structural motif, TMSM)。深入研究金属离子在蛋白质-核酸自组装体系中和生物大分子交联及聚集体中的作用, 对理解生命的无机化学基础具有重要意义。

关键词 金属离子 TMSM 折叠 识别 自组装

中图分类号: O 614; Q 51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-2281X (2002) 04-2026-3210

The Influences of Metal Ions on Protein Folding, Recognition, Self-Assembly and Biological Functions

Jiang Ming Shen Tao Xu Huibi Liu Changlin^{3 3}

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Metal ions and their complexes can exert influences on not only three-dimensional structures of proteins, but also biomacromolecular recognition, self-assembly and functions. The metal ions or their complexes can act as templates that mediate the peptide chains around to fold them into correct structures, which is designated as template-mediated structural motif (TMSM). It is of great significance for the bioinorganic chemists to understand the roles of metal ions in the self-assembly of protein-DNA/RNA and biomacromolecular cross-linking and aggregation states.

Key words metal ions; TMSM; protein folding; recognition; self-assembly

在所有已发现的蛋白质中, 有三分之一以上必须以金属离子或金属结合部位作为辅因子。金属蛋白和金属酶的生物功能包括: 结构支持、双氧结合、存储和转运金属离子、电子转移、分子识别和催化、信号转导、基因表达调控等。金属离子通过与内源配体(氨基酸侧链基团)和外源配体(如水分子、卟啉环、有机小分子等)配位, 结合到蛋白质分子中, 形成金属活性部位^[1, 2], 从而影响蛋白质结构和赋予蛋白质功能。如铁卟啉使血红蛋白具有载氧功能, 铁-硫原子簇使硫氧还蛋白进行电子转移, 锌指结构域使锌指蛋白识别DNA。由于与金属结合的配体和其它

氨基酸侧链间存在着各种弱相互作用, 如疏水、氢键、静电作用和 van der Waals 力等, 因此金属部位对蛋白质的折叠具有显著影响。如血红素不仅是细胞色素 c 的氧化还原中心, 而且对保持其天然构象至关重要^[3], 如脱除血红素将破坏蛋白质的大部分螺旋结构^[4]。血红素与周围肽链间存在的广泛相互作用, 是稳定血红素蛋白天然构象的决定因素^[5, 6]。除了轴向配位外, 血红素还通过丙酮基与附近的极性残基侧链形成氢键, 通过卟啉环与非极性残基侧链产生 van der Waals 接触。又如 Cu²⁺ 配位能够引起半乳糖氧化酶前体显著变构, 从而使之成为有活

³ 国家自然科学基金资助项目 (29871011)

^{3 3} 通讯联系人 e-mail: liuchl@mail.hust.edu.cn

性的成熟酶^[7]。分析和比对各种金属蛋白的结构发现,金属结合部位及其附近肽链均具有规则的结构^[2],如 α 型核酸内切酶中, Mg^{2+} 结合区域都是由5股B折叠和2股A螺旋形成的共同核心模体(common core motif),其肽链走向和拓扑结构均十分相似^[8,9]。因此,研究金属离子对蛋白质结构和功能的影响,对认识蛋白质的折叠方式、探讨结构与功能的关系,进而理解金属离子在蛋白质核酸识别及自组装中的作用都具有重要意义。

一、金属蛋白正确折叠和结构稳定化

金属蛋白作为生物体系中一类特殊生物大分子,其结构和功能必然受到各种物理和化学因素的制约。具有一定配位构型的金属结合部位是金属蛋白空间结构的决定因素之一。

1.1 蛋白质构象角(torsion angle)与金属蛋白高级结构

分子中的单键旋转可使原子和基团的相对距离发生变化。只有分子内存在某些特定的相互作用时,原子和基团的相对位置才得以固定,分子才呈现某种稳定的构象。蛋白质的肽链由常见的20种氨基酸组成,在生物体系中不能以伸展的长链形式存在。通过A碳原子和肽平面间的单键旋转,肽链折叠成特定的构象,同时大量基团间的相互作用使蛋白质内能降低,并使该构象得到稳定。单键的旋转可用构象角来度量,肽链的构象角包括主链肽平面间的 ϕ 角、 ψ 角和各氨基酸侧链原子间的 χ_i ($i=1, 2, \dots$)^[10,11],因此构象角及其在各种条件下的变化是肽链高级结构的基础。肽链中一组连续氨基酸的 ϕ 角、 ψ 角决定了该肽段的二级结构,如标准右手A螺旋的残基 ϕ 均为 -57° ; ψ 均为 -47° ;标准反平行B折叠片层 ϕ 均为 -119° ; ψ 均为 $+113^\circ$ 。

利用蛋白质数据库PDB (protein data bank)^[12]及相关软件分析金属蛋白的结构,发现金属离子与氨基酸侧链配位,能够引起蛋白质构象角变化^[2]。侧链 χ 角的变化造成蛋白质侧链基团相对位置的改变,故它们之间的弱相互作用(如氢键和疏水作用等)也随之改变,赖以稳定的三级和四级结构将受到影响。如果金属离子的配位作用足以破坏邻近多个残基羰基氧和亚胺基之间的氢键,则主链 ϕ 角和 ψ 角也将改变,相对刚性的二级结构将遭到破坏。通常,金属配位作用的键能为 $40\text{--}120\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,介于经典的共价键和其它弱相互作用之间,比氢键大一个数量级。因此,金属配位有时可导致蛋白质结构

重组(reorganization)。

尽管多数蛋白质的构象角容易受到金属配位作用的影响,但是也有不少蛋白质的构象角在金属离子配位前后没有显著变化,这可能是肽链构象的刚性造成的。由于组成肽链的氨基酸性质不同,肽链构象表现为刚性或柔性。如果肽链侧链上的芳香环或其它大基团较多,则它们之间的位阻较为明显^[11-14],单键旋转需要越过较高的能垒,故该肽链体现出较显著的构象刚性。只有当金属配位作用提供的能量足以克服基团间位阻时才能改变肽链的构象角,进而获得配体场稳定化能,形成稳定的金属蛋白结构。否则,金属离子只能以静电作用结合于蛋白质分子中,并赋予蛋白质一定的生物功能,这种蛋白质一般称为金属活化蛋白质。如 Mg^{2+} 活化的限制性内切酶特异地和DNA结合生成 Mg^{2+} -EcoRV DNA复合物,在完成切割DNA反应后该复合物即自行分解^[15]。因此在折叠过程中,肽链通过自身构象刚性和柔性来选择配位能力不同的金属离子,满足进一步折叠和实现不同生物功能的需要。

2.1 蛋白质折叠对金属离子的依赖性

在许多天然和设计的金属蛋白中,配位作用能改变金属结合部位周围的肽链构象。如 Cu^{2+} 与半乳糖氧化酶前体结合导致肽链变构,从而产生成熟酶^[7]。FeMo辅因子($Mo_2Fe_2S_7$ 簇)的插入使固氮酶MoFe蛋白的构象发生根本重排,并形成含FeMo辅因子的核心模体。该核心模体由4股B折叠组成,两侧是A螺旋和B折叠,固氮酶的所有结构域均围绕该核心模体组建而成^[16,17]。人工设计的含 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 的胰蛋白酶,也分别具有不同的空间结构^[18]。另一方面,金属离子存在时许多金属蛋白可以体外折叠成具有天然构象的全功能蛋白,而不需要催化剂和折叠伴侣^[19]。金属结合部位周围的肽链构象的保守性是金属蛋白的最重要结构特征之一^[2]。如调节基因表达的蛋白质家族的大多数成员含有“锌指结构域(zinc finger)”,它是 Zn^{2+} 离子结合的超二级结构(BBA),是组成核酸结合域的重要基序(motif)。又如钙结合蛋白中,与 Ca^{2+} 离子结合的肽段都具有规则的螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)结构,通常称为EF-hand。不管是“锌指”,还是“EF-hand”,在脱去金属离子之后都会失去原有的规则结构^[10]。通常,不同蛋白质结合相同的金属或不同的金属配位到相同的蛋白质中均引起肽链不同程度的变构,这主要表现在下述几个方面。

(1) 破坏蛋白质二级结构

胰岛素通常以二锌胰岛素六聚体(图1)的形式存储在胰岛细胞内。每三个单体通过B10His(His, 组氨酸)共同结合一个锌离子, 从而形成稳定的结构^[20]。其中每个单体含有三个螺旋, 它们是B12B19、A12A8和A13A19, 其余为伸展的肽链、U形回折和杆环(loop)结构^[21](图2A)。胰岛素的这种二级结构具有较高的稳定性, 解离的A、B链在很大程度上仍然保持了完整分子的构象。但是一旦锌离子被脱去, 蛋白质构象即发生较大变化, 单体的二级结构遭到破坏, 主链的构象角发生较大的变化, B12B9的螺旋也变成伸展的构象(图2B)^[22]。当 Zn^{2+} 再与B10His中的N原子配位时, 引起与之相邻的单键旋转, 使主链的极性基团(羰基、亚胺基)形成规则的排列, 从而形成有序的氢键网络, 再形成规则的螺旋结构。因此, 金属配位与其它稳定蛋白质结构的弱相互作用协同作用, 能够导致肽链发生显著的变构。很多与神经退行性疾病有关的蛋白质的二级结构也受到金属离子配位作用的显著影响。各种结构数据显示, 疯牛病蛋白(PrP)^[23]与 Cu^{2+} 结合后, 二级结构发生根本改变, 其中A螺旋可能转变为B折叠^[24, 25], 而与其它二价金属离子配位时变构程度则较低。又如, 与老年性痴呆病有关的B淀粉样蛋白(AB)与 Cu^{2+} 结合时, 也可能发生同样的变构^[23]。不过这些观测结果有待于进一步证实。

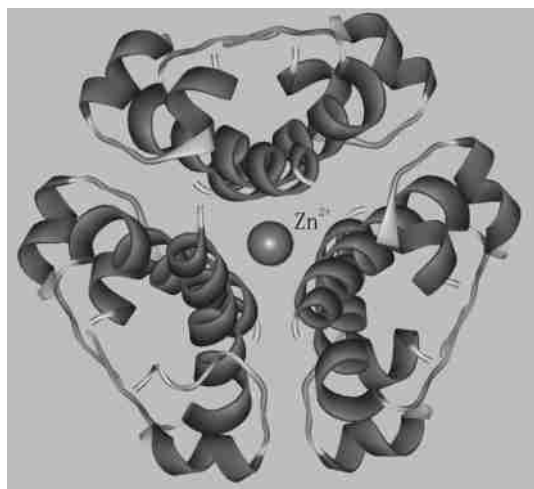


图1 二锌胰岛素六聚体晶体结构(PDB code: 1EVR)
(每三个单体通过其B10His结合一个 Zn^{2+} , 使其具有高度对称的四级结构。)

(2) 影响蛋白质三级结构

乳铁蛋白(lactoferrin)是哺乳动物体内的铁传递蛋白。 Fe^{3+} 的插入不会引起蛋白质两端离铁结合部位较远的结构域显著变构, 处于两结构域之间的

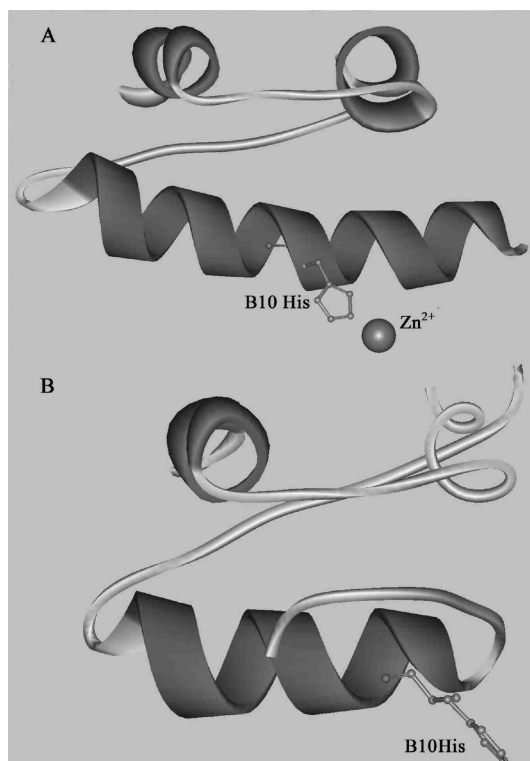


图2 金属离子影响蛋白质二级结构
(A: 与锌配位的胰岛素单体 Zn^{2+} 结合使其具有规则的二级结构, B12B9为螺旋结构(PDB code: 1EVR)。B: 脱辅基胰岛素单体 失去 Zn^{2+} 使蛋白质二级结构剧烈变化, B12B9变为伸展的构象(PDB code: 1APH)。)

二级结构单元也没有显著变化^[26—28], 只是它们的相对定位、距离和取向有所改变。但是, 铁离子的引入能显著影响乳铁蛋白的三级结构(图3)。计算位于两结构域之间的肽链构象角表明, 构象角变化在 30° 以上的残基约占四分之一, 它们分布在不同的肽段中, 因此不会对二级结构产生显著影响。Ramachandran构象图中, 金属离子的结合使第一和第二象限中的点发生显著变化。在这种情况下, 金属离子只显著影响侧链 χ 角, 使侧链上的疏水基团移动, 导致蛋白质的疏水口袋发生变化, 进而影响三级结构。

(3) 影响蛋白质氨基酸侧链

对于胰蛋白酶^[2, 29]和天青素^[30, 31], 虽然金属的结合并没有明显改变蛋白质的空间结构, 但与金属离子直接配位及其它附近残基的位置和取向均有所改变。这类金属蛋白质的 χ 角的变化很小, 一般在 10° 以内。为了获得理想的配位构型, 金属离子可能迫使各配位基团排布更为紧密, 从而获得较高的配体场稳定化能。

(4) 影响蛋白质四级结构

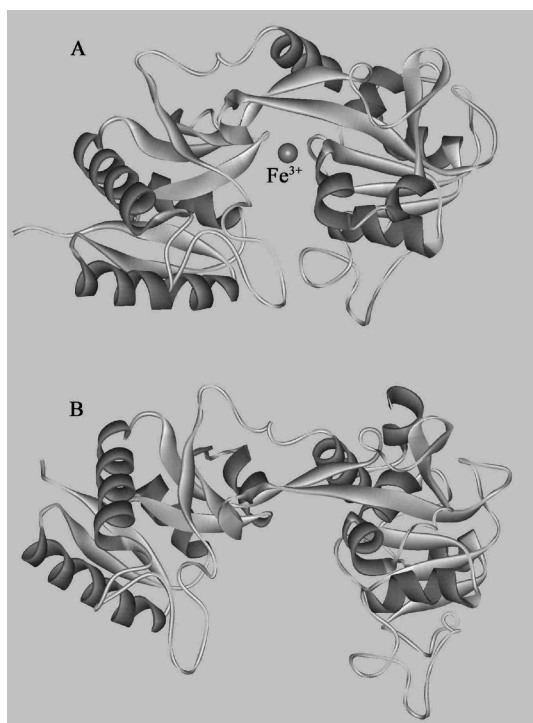


图 3 金属离子影响蛋白质三级结构

(A: 含铁乳铁蛋白 两端的结构域距离较近将 Fe^{3+} 包裹在蛋白质中(PDB code: 1LFG)。B: 脱辅基乳铁蛋白失去 Fe^{3+} 使两端的结构域偏移, 使其距离相距较远且方向改变, 但结构域本身无变化(PDB code: 1LFH)。)

如前所述, Zn^{2+} 不但改变胰岛素的二级结构, 而且影响其四级结构^[21, 22]。类似的蛋白质还有天冬氨酸甲酰基转移酶(ATCase)^[10]。该酶共含有 12 个亚基, 其中 6 个为催化亚基, 6 个为调节亚基。它们以两种形式的四级结构存在即较为紧密的 T 态(tense state)和较为松弛的 R 态(relaxed state)。锌离子与羧基末端的 4 个 Cys 配位, 它们在这个蛋白质四级结构的转变中具有十分重要的作用^[10]。还有些多聚体蛋白, 如焦磷酸酶在除去金属离子后, 多聚体解离成活性较小的单体, 即该类多聚体蛋白四级结构形成和稳定必须要有金属离子参与^[32]。另外, 铜能稳定铜伴侣蛋白与其靶 SOD 酶形成的异源二聚体^[33]。

(5) 基本不影响蛋白质结构

一些金属蛋白的结构在脱去金属离子之后并未受到明显的影响, 如质体蓝素^[8]和假天青兰素^[34]。这类蛋白质的成熟过程可能需要金属离子参与, 其天然构象和特定金属离子结合口袋的形成依赖于金属的配位构型。该类金属部位成熟后, 肽链形成一个刚性的弱相互作用网络, 因此外界因素不易扰动金属部位的稳定性, 配位金属的离去不会造成其构象

明显变化。Gray 等^[35]认为, 配位层外的氢键网络导致体外蓝铜蛋白的金属结合部位具有刚性, 使肽链构象在铜配位前后基本不变。这种氢键网络对 Cu^+ 部位的约束大于 Cu^{2+} 部位。我们则发现大多数金属结合部位处于氢键网络或其它非共价相互作用的中心^[2]。因此, 我们认为金属配位对蛋白质结构产生组建作用, 并促使配位层外氢键等弱相互作用网络的形成。事实上, 对于多数配合物来说, 第二配位层的形成是由第一配位层决定的。弱相互作用网络形成后, 便反作用于金属部位, 使其构象得到进一步强化。

31 金属结合部位作为模板诱导的结构基序(TM SM)

由于每一种金属离子都具有一定的配位构型, 如 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 倾向于八面体配位, Zn^{2+} 四面体, Cu^{2+} 以平面四方配位为主, Hg^{2+} 一般为直线型配位, 而 Cd^{2+} 则四面体和八面体配位的可能性均很大。配位原子的空间排布只有基本上满足这种构型的要求, 才能与金属离子形成稳定的配合物^[36]。大量结构数据表明, 金属离子与肽链相互作用形成金属蛋白是相互协同和相互制约的过程: (1) 提供配体的肽链可能预折叠成一定的空间结构, 形成一个容纳某种金属离子的配位口袋。当金属离子的半径、配位构型及其它配位性质与这个口袋相匹配时, 则形成稳定的金属结合部位。这种金属蛋白在脱去金属辅基后基本上仍维持原有的构象, 如蓝铜蛋白^[34]。(2) 金属离子在肽链折叠的过程中结合到肽链上, 迫使配位原子形成特定的空间排布, 然后再由位阻、疏水作用及氢键等弱相互作用促使肽链进一步折叠形成成熟的构象。这种蛋白质肽链较为柔软, Gly、Ala 等残基的含量较高, 在脱去金属辅基后便会失去原有的构象。大多数金属蛋白属于这一类, 如胰岛素^[21, 22]、乳铁蛋白^[26, 27]。因此, 不管金属离子何时进入蛋白质分子, 金属部位的空间结构均是直接或间接由金属离子的配位构型决定。我们曾经提出, 金属结合部位是蛋白质正确折叠成天然结构的刚性模板^[2]。这种模板包含金属离子和与之配位的内源、外源配体, 它是一个规则的结构单元, 如单、双核金属配位单元、铁卟啉及 Fe_nS_n ($n = 2, 3, 4$ 等)^[2]。它们通过配位作用或共价键与蛋白质主链相连, 周围的肽链通过各种弱相互作用围绕这个刚性模板进一步折叠, 形成特定的空间结构。通常一种模板可以诱导肽链形成一种或几种具有一定空间结构特征的结构单元, 我们将其称为模板诱导的结构基序(template

plate-mediated structural motif, TM SM)。图 4 是具有代表性的一例^[12]。铁卟啉是最为常见的金属模板之一,它广泛存在于各种电子载体和氧载体等血红蛋白中,这些蛋白质的氨基酸序列和功能都具有很大的差异,然而它们的空间结构却只有有限的几种,当它们失去铁卟啉后便会失去其天然构象^[37, 38]。在结合和传输重金属的蛋白质中,存在金属结合序列(metal binding sequence, MBS),所有 MBS 的结构均为 BABAB 折叠^[39]。

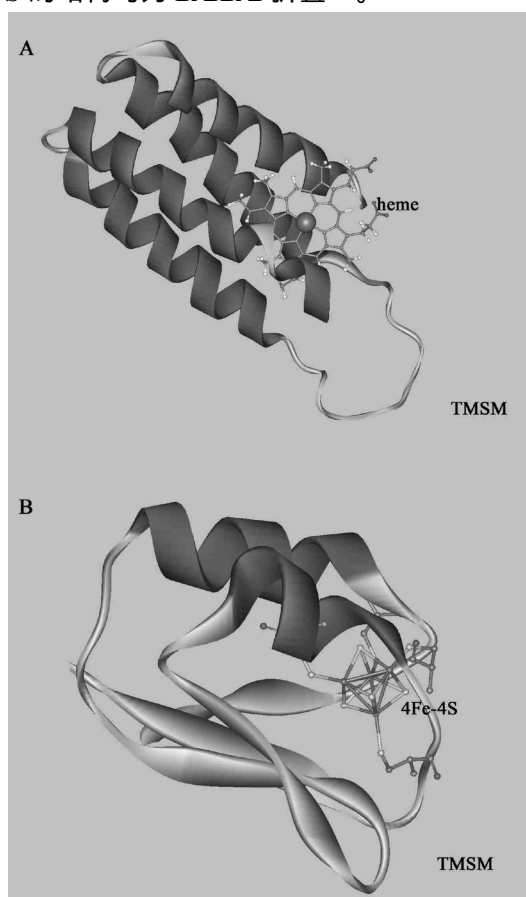


图 4 金属离子与外源、内源配体形成模板,并由模板诱导蛋白质肽链进一步折叠形成 TM SM。

(A: 以铁卟啉(血红素)作为模板诱导的四螺旋束(PDB code: IQPU)。B: 以铁硫原子簇 4Fe-4S 作为模板诱导的铁硫蛋白(PDB code: 1FXR)。)

结构保守而功能各异的蛋白质结构模体在生物体系中十分常见。金属蛋白中的结构保守来源于模体内部各种相似的弱相互作用,尤其是配位作用;而功能的差异来源于模体表面性质各异的基团。TM SM 可能是各种金属蛋白和金属酶实现其生物功能的自组装或自组建平台(self-assembly or self-organization platform)^[40],一方面为底物进入和产物离去或电子转移提供空间互补的骨架结构,另一

方面是蛋白质表面性质不同的残基彼此接近、相互作用的前提。TM SM 的保守性还为金属蛋白间的同源性和分子进化提供了可靠的依据,因为进化过程中的基因突变、缺失和融合不能轻易改变蛋白的高级结构和拓扑结构^[40—43]。TM SM 的这种同源性可能体现在 mRNA 二级结构和基因表达的调节序列上,因此我们推测可以从 mRNA 的二级结构和调节序列入手,探讨它们与 TM SM 间的相互关系,进而为发现新的金属蛋白和预测金属蛋白的结构和功能提供一种新途径。此外,详细探讨对 TM SM 的构型和功能有决定性影响的因素,对于将金属结合部位引入已知结构的蛋白质中和从头设计全新的金属蛋白具有重要指导作用^[44—46]。

二、金属离子与蛋白质-DNA (RNA) 识别和自组装

DNA 复制、转录、翻译和表达调控等复杂生物过程中,几乎每一步均依赖于含金属的或金属活化的酶和蛋白质等生物大分子与 DNA 或 RNA 的特异性相互作用,及两者复合物的自组装。如在一定浓度的 Mg^{2+} 存在下,核糖体的大亚基和小亚基自组装成全核糖体;若溶液中不存在 Mg^{2+} ,核糖体则自动解离成 50S 和 30S 两个亚单位(图 5)^[47]。在核糖

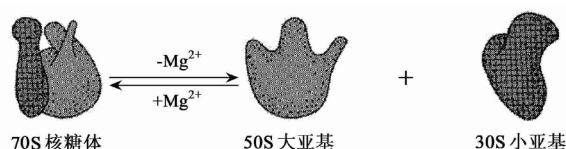


图 5 在 Mg^{2+} 存在下核糖体以 70S 复合体形式存在,去除 Mg^{2+} 则解离为 50S 和 30S 两个亚单位

体中 Mg^{2+} 的作用是介导 mRNA 16S、rRNA 的 C518 和 rps12(ribosomal protein S12)的 Pro44 之间的相互作用^[48]。用结合有遍在蛋白的组蛋白 H2A (ubiquitinated H2A) 重构寡核小体,当寡核小体缔合及折叠时,也依赖于 Mg^{2+} ^[49]。再如在铜传输的调控过程中,转录因子 Mac1p 与 DNA 的结合也取决于 Cu^{+} 的配位^[50]。典型的金属蛋白-DNA 或 RNA 复合物如表 1 所示。虽然目前人们对锌指蛋白和限制性内切酶与 DNA 的相互作用有较多的研究,但对金属离子在这些金属蛋白-DNA 或 RNA 复合物自组装过程中的作用及化学本质还了解得不够。不过较为明确的几点是:(1)金属离子通过直接或由水分子介导的弱相互作用与蛋白质和核酸结合,从而克服两者间的静电排斥等非共价相互作用,

表 1 某些含金属离子的蛋白质-DNA-RNA 复合物

蛋白质-DNA-RNA 复合物	金属离子-金属蛋白	功能	参考文献
核糖体小亚基 30S	Zn ²⁺ 或锌指蛋白,	解码 mRNA	51
	Zn 模体 (zinc module)		
核糖体小亚基 30S-2抗体	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ 或	解码 mRNA	52
	Zn 模体 (zinc module)		
核糖体小亚基 30S-2	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ 或	识别同源 tRNA	53
mRNA-2tRNA-2PMM ^a	Zn 模体 (zinc module)	解码 mRNA	
核糖体 70S-2mRNA-2tRNA	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ 或锌指蛋白等	合成蛋白质	54, 55
核糖体大亚基 50S	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ 或锌指蛋白等	催化肽链形成	56
核糖体小亚基 30S-2起始因子	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ 或锌指蛋白	解码 mRNA	57
S16, S6, S18-2rRNA	Mg ²⁺ 等	组装核糖体 30S 小亚基	58
RNA 聚合酶 ^o	Zn ²⁺ 或锌指蛋白, Mg ²⁺ , Mn ²⁺	转录	59, 60, 61
RNA 聚合酶 ^o -2延长因子-DNA	Zn ²⁺ 或锌指蛋白, Mg ²⁺ , Mn ²⁺	转录	62
RNA 聚合酶 ^o -2Amanitin	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ 或锌指蛋白	DNA 转录	63
MreII ^b -DNA	2 个 Mn ²⁺	DNA 双链断裂修复	64
PcrA ^c -DNA-2AMPNP ^d	Mg ²⁺		65
AML1 ^e -CBF ^o -DNA	Zn ²⁺ 或锌指蛋白	调节真核基因转录	66
HOGG1-DNA ^f	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	识别和修复 8-oxoG	67
(Tet R ^D) ₂ -2tetO1 ^g	Mg ²⁺	生物开关	68, 69
PA P ^h -2poly(A)	Mn ²⁺	Poly(A) 合成	70
DNA 复制复合物	Zn ²⁺ 或锌 Ribbon 蛋白	DNA 复制	71

a: PMM = paromomycin, b: MreII 复合物= MreII 核酸酶+ Rad50A TP 酶, c: PcrA 蜗牛酶 (helicase), d: AMPNP = 5'-adenylylimidodiphosphate, e: 真核转录因子 AML1 (Runx1) Runt 结构域, f: HOGG1 = 8-oxoG DNA glycosylase, g: 操纵子 DNA tetO1 ((Tet R^D)₂ = 同源二聚四环素阻遏物), h: PAP = poly(A) polymerase

诱导蛋白质和DNA 的构象变化^[68]及重组^[72], 稳定核酸的弯曲和打结构象^[67]; (2) 这些体系中的金属离子可交换, 其定位方式符合底物结合的空间要求, 底物易于从一侧接近^[59, 60]; (3) 稳定 RNA 聚合物 II 的钳形结构 (clamp), 这种结构用于结合 DNA^[56]; (4) 稳定磷酸二酯键形成过程中的过渡态^[54]; (5) 在核糖体小亚基中稳定大沟中的 P-2 部位密码子及其它区域等^[51, 52]; (6) 金属-配体相互作用直接促进 DNA 修复化学, 而且配位残基之间存在化学交流^[73]。

蛋白质以“直接读出 (direct readout)”^[74] 机制识别 DNA 序列可能包括以下几个步骤: (1) 蛋白质肽链折叠形成特定的构象, 如锌指结构、拉链结构、螺旋-2-转折-2-螺旋结构 (helix-2-turn-helix, HTH) 及螺旋-2-环-2-螺旋结构 (HLH) 等^[75]。(2) 通过碱性氨基酸带正电的侧链与带负电的 DNA 磷酸骨架全面接触形成氢键, 这种普遍性结合没有特异性。(3) 迫使 DNA 的特定序列显著变形, 从而使深藏于大小沟内的识别信息暴露于外。(4) 利用具有特定空间排布的极性残基族读取识别信息, 并与特定的碱基形成氢键。(5) 通过局部变构等方式传递信号, 利用金属离子稳定形成的自组装复合物。核酸酶的“间接读

出 (indirect readout)”^[74] 机制则仅仅通过空间互补的结构来识别 RNA 的整体构象。这两种识别机制都需要金属离子及其配合物作为模板来使蛋白质形成特定的构象。

如前所述, 金属离子诱导肽链形成的 TM-SM 也是很多核酸结合蛋白的重要组成部分。锌指结构作为各种锌转录因子超级家族的折叠构建单元频繁出现^[76], 如在脊椎动物中发现的 6 种转录因子的每一种均含有高度保守的 DNA 结合结构域, 它由两个锌指基序 (Cys2-X₂-Cys2-X₁₇-Cys2-X₂-Cys) 组成, 该基序 *f* 直接结合的核苷酸序列为 (A/T)GA TA (A/G)^[77]。锌指蛋白与 DNA 相互作用时, 位于 B 折叠中的碱性氨基酸与磷酸骨架上的羧基氧广泛地形成氢键, 而 A-螺旋中的极性氨基酸则整齐地排列在一侧, 形成极性残基族。螺旋进入 DNA 大沟后, 这些具有特定空间结构的极性氨基酸作为氢供体或氢受体读出其中的识别信息 (图 6)。当碱基与残基结构互补, 并处于适当距离内时, 便形成氢键, 从而达到相互接触和特异结合。可见, 金属离子的配位部位为蛋白质与 DNA 的相互作用提供结构基础。除锌指结构之外, 参与 DNA-RNA 识别的含锌 TM-SM 还有锌钮 (zinc twist)、锌带 (zinc ribbon)、锌簇 (zinc

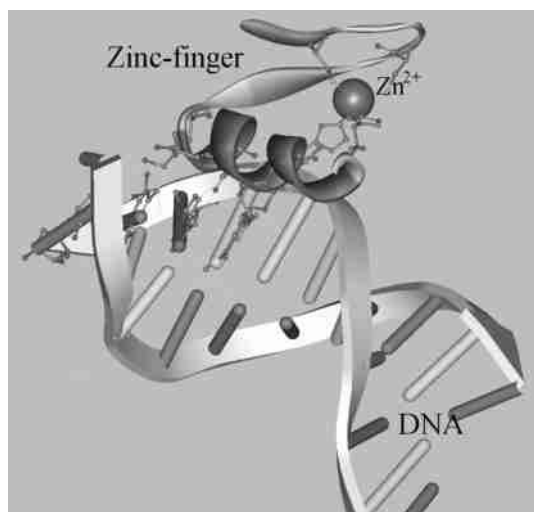


图6 锌指蛋白识别DNA

(Zn^{2+} 诱导肽链形成锌指结构, 其中 α 螺旋深入 DNA 的大沟, 并以排列在一侧的极性氨基酸残基族识别碱基序列, 与之形成氢键(PDB code: 1A1F).)

cluster)^[78]、锌环(zinc ring)等^[75, 79]。

型核酸内切酶能够识别由4—8个碱基组成的回文结构, 通过切割相邻或远处的磷酸二酯键使多核苷酸链水解断裂, 并产生粘性末端^[80]。许多脱金属辅基的核酸内切酶虽然和DNA形成复合物, 但是这种结合完全丧失了特异性, 也不具备切割能力^[80—82]。在内切酶-DNA复合物的结构中, Mg^{2+} 均处于磷酸骨架附近, 与水分子和羧基配位, 故没有直接参与识别信息的读取(图7)。内切酶的极性残基进入DNA大沟, 与特定碱基形成氢键, 并引起内

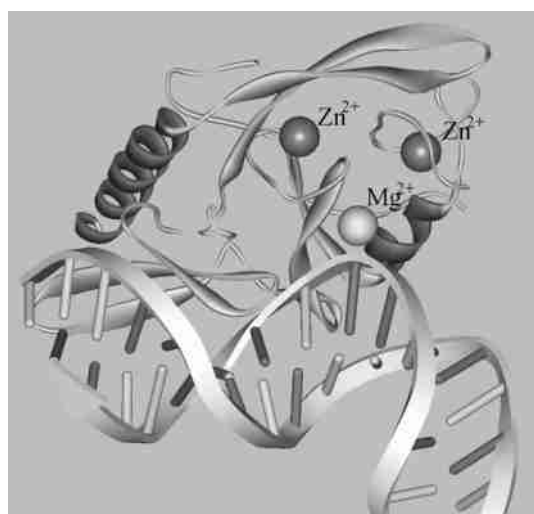


图7 两种金属离子在核酸酶中的作用

(具有强配位能力的过渡金属 Zn^{2+} 诱导蛋白质折叠成识别DNA所需的结构, 而 Mg^{2+} 则与磷酸骨架上的羧基结合达到稳定自组装体系的目的(PDB code: 1CYQ).)

切酶发生局部变构, 从而形成 Mg^{2+} 配位口袋。由于 Mg^{2+} 带有正电荷, 故可中和羧基、羟基等基团的负电荷, 从而使特异结合的内切酶-DNA- Mg^{2+} 自组装体系得到稳定。同时非特异结合的蛋白质-DNA复合物不能形成特定的 Mg^{2+} 配位口袋, 金属不能结合到该复合物中, 故其结构不稳定, 随即发生解离。这里, 金属离子由直接或间接方式同时与氨基酸和核苷酸结合, 故可将其看成一个“门闩”, 将内切酶和DNA牢固地拴在一起。用配位构型相同的 Ca^{2+} ^[83] 或 Mn^{2+} ^[84] 替代 Mg^{2+} , 同样可以获得稳定的自组装体。天然内切酶选择 Mg^{2+} 作为金属辅基, 是因为 Mg^{2+} 的 Pauling 电负性为 1.12, 既有利于自组装体系的形成, 又有利于反应产物的释放。综上所述, 天然核酸酶中的金属离子的作用为: (1) 作为结构模板引导肽链折叠, 提供与DNA空间互补的结构单元, 以读取识别信息; (2) 稳定自组装体系并参与催化切割反应。探讨金属离子在蛋白质-DNA-RNA复合物自组装过程的作用及其化学、结构基础对于设计人工核酸酶^[85, 86]和基因表达的人工金属调控蛋白具有重要的指导意义^[87]。当前人工核酸酶的设计过于强调金属活性部位的功能, 而忽视了蛋白质的作用, 故无法获得天然酶的特异性。

三、金属离子与生物大分子的聚集

金属离子与多种神经退行性疾病, 如老年性痴呆症(A lzheimer disease, AD)、肌萎性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、疯牛病或克雅氏症、Parkinson 病(PD), 以及糖尿病的发病机制密切相关, 因此金属离子在重大疾病的致病机理中的作用越来越引起人们的关注^[23]。目前流行的理论认为, 导致这些疾病的原因是有关的蛋白质发生了畸变, 并聚集在一起, 从而破坏健康细胞中的生物大分子^[88]。在蛋白质畸变和聚集过程中, 金属离子可能具有关键作用。由金属离子氧化还原反应导致的活性氧物种损伤生物大分子, 破坏蛋白质的天然构象, 使蛋白质交联、缔合、聚集、甚至淀粉样化。在ALS发病过程中, 误折叠超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)变体聚集成不溶的高分子量蛋白质复合物^[89]。我们在工作中发现缺锌SOD在铜离子存在下发生聚集, 可能是由铜离子与SOD表面组氨酸和/或半胱氨酸残基配位导致的, 这种聚集的缺锌SOD对SOD蛋白质自身及DNA均有显著的氧化损伤作用。将缺锌SOD的聚集作用与其氧化

毒性相联系,对理解 SOD 突变体的氧化毒性与神经退行性疾病(如 AD、ALS、衰老及白内障等)之间的相互关系具有指导作用,也为我们今后探讨金属结合蛋白及其变体与神经退行性疾病之间的关系打下了较好的基础。B 淀粉样蛋白(A β)是 AD 病脑中淀粉样斑的主要成分,可能含有两个 Zn^{2+} 的结合部位,即使是生理浓度的 Zn^{2+} 也可使 A β 二级结构发生变化,聚集并产生沉淀。 Cu^{2+} 的强配体可使沉淀在 AD 病人脑样品中 A β 重新溶解。Prusiner 用 *E. coli* 表达的一种疯牛病蛋白(shaPrP292231)与 Cu^{2+} 结合后,蛋白中的 A 螺旋减少,部分失去折叠和聚合。如果 Cu^{2+} 浓度过高,二级结构 A 螺旋很容易转变为 B 折叠并聚合,最终沉淀,从而引发病症^[25]。模拟两个 8 肽结合一个 Cu^{2+} 的结构,发现与 Cu^{2+} 配位的是两个组氨酸和两个甘氨酸的基团,构型为平面四方形。另一方面,PD 病涉及到 A α synuclein 聚集形成纤维,这在黑质的多巴神经元中是胞内蛋白质包结物(Lewy 体和 Lewy 轴突)的主要成分。流行病学研究表明,从事的职业如经常与锰、铜、铅、铁、汞、铝和锌接触则患 PD 病的风险因素更大,在 PD 病人的黑质中,这些金属的水平大大提高。这些二价和三价金属均大大加速 A α synuclein 纤维形成的速率,以 Al^{3+} 最有效,其次是 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{3+} 和 Mn^{2+} 。这种有效性与离子电荷密度有关,但在刺激纤维化和诱导构象变化并导致部分折叠的中间产物形成两者的效率之间并没有发现关联。配体桥联多价金属离子的能力在金属诱导 A α synuclein 构象变化中可能是一个重要因素,但即使是低浓度的金属离子也能直接诱导 A α synuclein 纤维形成^[90]。这些疾病的发病过程有两个共同的特点:(1)在金属离子参与下,蛋白质发生交联聚集和淀粉样化;(2)由氧化还原活性的金属离子(Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 等)导致的活性氧物种造成蛋白质氧化变性和沉淀,从而引起病变。

在上述金属导致的蛋白质聚集体中是否存在因金属结合而导致的共同结构模体还有待进一步探讨。如果能够获得这些聚集体的空间结构并搜索出其中含金属的共同结构模体,对于推动人们认识金属导致重大疾病的分子机理,并设计有效的治疗药物具有重要意义。

四、金属离子在核酸酶催化切割

DNA 中的作用

限制性内切酶切割的 DNA 片段均带有 5' 磷

酸基,其立体化学性质(旋光性)在切割前后发生明显变化,羟基取代到磷原子上,说明核酸酶水解断裂 DNA 是一个 $\text{S}_{\text{N}}2$ 亲核取代过程^[5, 91, 92]。反应必需三种基团:(1)活化亲核水分子的广义碱;(2)稳定五价过渡态磷原子负电荷的路易斯酸,一般为二价金属离子;(3)为 3' 羟基离去提供质子的广义酸。金属离子不仅因其强烈的电子受体特性成为很好的路易斯酸,它还通过配位作用影响周围的分子。

用 Ca^{2+} 取代 EcoR V 中的 Mg^{2+} 而提出的三金属反应模型如图 8(A)^[93]。E 位 Ca^{2+} 与 Asp74 的侧链、Ile91 的羧基及三个水分子结合,° 位 Ca^{2+} 与 Glu45、Asp74 的侧链及两个水分子结合;°, 位 Ca^{2+} 与 Asp90 的侧链、切割部位磷酸基氧及一个水分子结合。结合在 E 位的水分子作为亲核试剂轴向进攻磷原子,金属离子和 Lys92 共同定位与活化该水分子。°, 位 Ca^{2+} 作为路易斯酸中和过剩的负电荷以稳定过渡态磷原子,并强烈极化水分子,使离去基团获得质子,从而推动反应进行。° 位金属离子被

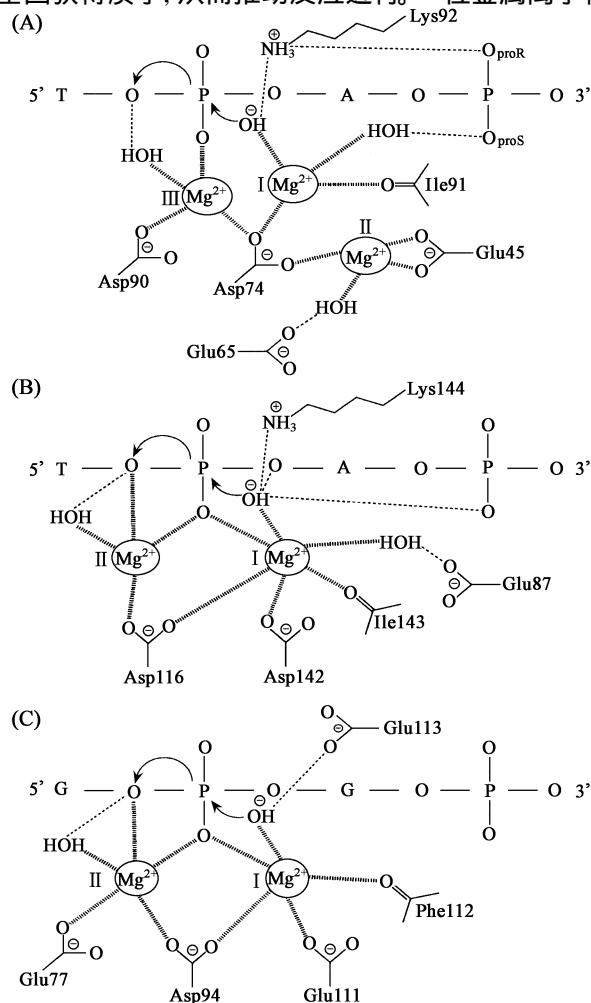


图 8 核酸酶的水解切割机理

认为具有结构功能,协助A_{sp}74与另外两个金属离子作用。

内切酶Bgl I的双金属反应模型如图8(B)^[94]: É位金属离子与A_{sp}116 A_{sp}142的侧链及Ile143的羰基氧结合,通过氢键活化亲核进攻的水分子。°位金属离子与A_{sp}116结合,作为广义酸使离去基团质子化。É、°位的两个金属离子共同稳定过渡态磷原子。

内切酶BamH I的双金属反应模型中(图8C)^[95]: É位金属结合Glu111和A_{sp}94侧链及Phe112的羰基,以活化亲核剂水分子。°位金属离子与A_{sp}94、Glu77配位,以中和转移到离去基团的负电荷。

综上所述,金属离子不仅影响金属蛋白的空间结构,还与生物大分子识别、自组装等性质和生物功能密切相关。因此,深入研究金属离子在蛋白质2核酸自组装体系和生物大分子交联及聚集体中的作用,对理解生命的无机化学基础具有重要意义。

参考文献

- [1] Holm R H, Kennepohl P, Solomon E I. *Chem. Rev.*, 1996, 96: 2239—2314
- [2] Liu C, Xu H. *J. Inorg. Biochem.*, 2002, 88: 77—86
- [3] Wain R, Pertinhez T A, Tomlinson E J, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 45813—45817
- [4] Kang X, Carey J. *Biochemistry*, 1999, 38: 15944—15951
- [5] Hamada D, Kuroda Y, Kataoka M, et al. *J. Mol. Biol.*, 1996, 256: 172—186
- [6] Steensma E, Gordon E, Linda M, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 5846—5855
- [7] Furbank S J, Rogers M S, Wilmot C M, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 12932—12937
- [8] Korall R A, Matthews B W. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, (3): 578—583
- [9] Vendovas C, Timinskas A, Siksny V, et al. *Proteins*, 1994, 20: 279—282
- [10] Lippard S J, Berg J M. *Principles of Bioinorganic Chemistry* (中译本, 席振锋, 姚光庆, 项斯芬译). 北京: 北京大学出版社, 2000. 120—131
- [11] Chakrabarti P, Pal D. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2001, 76: 1—102
- [12] Beman H M, Westbrook J, Feng Z, et al. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28: 235—242
- [13] Altom C, Sundaralingam M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94: 8205—8212
- [14] Detar D L F, Luthra N P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99: 1232—1244
- [15] Kostrewa D, Winkler F K. *Biochemistry*, 1995, 34: 683—696
- [16] Schmid B, Ribbe M W, Einsle O, et al. *Science*, 2002, 296: 352—356
- [17] Rees D C, Howard J B. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, 4: 559—566
- [18] Merchant S, Dreyfuss B W. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, 49: 25—51
- [19] Brinen L S, Willett W S, Craik C S, et al. *Biochemistry*, 1998, 49: 25—51
- [20] Derewenda U, Derewenda Z, Dodson E J, et al. *Nature*, 1989, 338: 594—596
- [21] Smith G D, Ciszak E, Magrum L A, et al. *Acta Crystallogr., Sect. D*, 2000, 56: 1541—1548
- [22] Gursky O, Badger J, Li Y, et al. *Biophys. J.*, 1992, 63: 1210—1220
- [23] Bush A I. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, (4): 184—191
- [24] Knaus K J, Morillas M, Swietnicki W, et al. *Nat. Struct. Biol.*, 2001, 8: 770—774
- [25] Lehmann S. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, 6: 187—192
- [26] Norris G E, Anderson B F, Baker E N. *Acta Crystallogr. B*, 1991, 47: 998—1004
- [27] Shama A K, Rajashankar K R, Yadav M P, et al. *Acta Crystallogr. D, Biol. Crystallogr.*, 1999, 55: 1152—1157
- [28] Anderson B F, Baker H M, Norris G E, et al. *Nature*, 1990, 344: 784—787
- [29] Brinen L S, Willett W S, Craik C S, et al. *Biochemistry*, 1996, 35: 5999—6009
- [30] Nar H, Messerschmidt A, Huber R, et al. *FEBS Lett.*, 1992, 306: 119—124
- [31] Nar H, Messerschmidt A, Huber R, et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, 221: 765—772
- [32] Parfenyev A N, Salminen A, Halonen P, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 24511—24518
- [33] Torres A S, Petri V, Rae T D, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 38410—38416
- [34] Vakoufari E, Wilson K S, Petratos K, et al. *FEBS Lett.*, 1994, 347: 203—206
- [35] Machaynski M C, Gray H B, Richards J H, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2002, 88: 375—380
- [36] Rulík L, Vondráček J. *J. Inorg. Biochem.*, 1998, 71: 115—127
- [37] Feng Y, Sligar S G, Wand A J, et al. *Nat. Struct. Biol.*, 1994, 1: 30—35
- [38] Falzone C J, Mayer M R, Whiteman E L, et al. *Biochemistry*, 1996, 35: 6519—6526
- [39] Opella S J, DeSilva T M, Veglia G. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, 6: 217—223
- [40] Paoletti M. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2001, 76: 103—130
- [41] Hardison R. *American Scientist*, 1999, 87: 83—93
- [42] Holde K E, Miller K I, Decker H, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 15563—15566
- [43] Makarova K S, Grishin N V. *J. Mol. Biol.*, 1999, 292: 11—17
- [44] Lu Y, Berry S M, Pfister T D, et al. *Chem. Rev.*, 2001, 101: 3047—3080

- [45] Lombardi A, Nastri F, Pavone V, et al Chem. Rev., 2001, 101: 3165—3189
- [46] Venkatraman J, Shankaramma S C, Balaran P, et al Chem. Rev., 2001, 101: 3131—3152
- [47] Weaver R F. Molecular Biology. McGraw-Hill Companies, Inc. Authorized reprinting by China Science Press, 2000 53—57
- [48] Stahl G, McCarty G P, Farabaugh P J. Trends Biochem. Sci., 2002, 27: 178—183
- [49] Jason L J, Moore S C, Ausio J, et al J. Biol. Chem., 2001, 276: 14597—14601
- [50] Heredia J, Crooks M, Zhu Z, et al J. Biol. Chem., 2001, 276: 8793—8797
- [51] Wimberly B T, Brodersen D E, Clemons W M Jr, et al Nature, 2000, 407: 327—339
- [52] Carter A P, Clemons W M, Brodersen D E, et al Nature, 2000, 407: 340—348
- [53] Ogle J M, Brodersen D E, Clemons W M Jr, et al Science, 2001, 292: 897—902
- [54] Yusupov M M, Yusupova G Z, Baucom A, et al Science, 2001, 292: 883—896
- [55] Nissen P, Hansen J, Ban N, et al Science, 2000, 289: 920—930
- [56] Ban N, Nissen P, Hansen J, et al Science, 2000, 289: 905—920
- [57] Carter A P, Clemons W M Jr, Brodersen D E, et al Science, 2001, 291: 498—501
- [58] Agalarov S C, Prasad G S, Funke P M, et al Science, 2000, 288: 107—113
- [59] Cramer P. Curr. Opin. Chem. Biol., 2002, 12: 89—97
- [60] Cramer P, Bushnell D A, Kornberg R D, et al Science, 2001, 292: 1863—1876
- [61] Cramer P, Bushnell D A, Fu J, et al Science, 2000, 288: 640—649
- [62] Gnat A L, Cramer P, Fu J, et al Science, 2001, 292: 1876—1882
- [63] Bushnell D A, Cramer P, Kornberg R D, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 1218—1222
- [64] Hopfner K P, Putnam C D, Tainer J A, et al Curr. Opin. Struc. Biol., 2002, 12: 115—122
- [65] Caruthers J M, McKay D B. Curr. Opin. Struc. Biol., 2002, 12: 123—133
- [66] Warren A J. Curr. Opin. Struc. Biol., 2002, 12: 107—114
- [67] Bruner S D, Nomman D P G, Verdine G L, et al Nature, 2000, 403: 859—866
- [68] Saenger W, Orth P, Kisker C, et al Angew. Chem. Int. Ed., 2000, 39: 2042—2052
- [69] Huffman J L, Brennan R G. Curr. Opin. Chem. Biol., 2002, 12: 98—106
- [70] Hall T M T. Curr. Opin. Struc. Biol., 2002, 12: 82—88
- [71] Valentine A M, Ishmael F T, Shier V K, et al Biochemistry, 2001, 40: 15074—15085
- [72] Kentsis A, Gordon R E, Borden K L B, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 667—672
- [73] Sun L J, Yin C K, Verdine G L, et al Biochemistry, 2001, 40: 11596—11603
- [74] 张庆硕(Zhang Q S), 王恩多(Wang E D). 生物化学与生物物理进展(Prog. Biochem. Biophys.), 1999, 26: 121—125
- [75] 王锐(Wang R), 胡晓愚(Hu X Y). 化学进展(Progress in Chemistry), 1995, 7: 277—286
- [76] Lu Y, Berry S M, Pfister T D, et al Chem. Rev., 2001, 101: 3047—3080
- [77] Molkenin J D. J. Biol. Chem., 2000, 275: 38949—38952
- [78] Swaminathan K, Flynn P, Reece R J, et al Nat. Struct. Biol., 1997, 4: 751—759
- [79] Cowan J A. Chem. Rev., 1998, 98: 1067—1087
- [80] Winkler F K, Banner D W, Oefner C, et al EMBO J., 1993, 12: 1781—1795
- [81] Jeltsch A, Maschke H, Selent U, et al Biochemistry, 1995, 34: 6239—6246
- [82] Riddihough G. Nature, 1994, 370(6484): 78—82
- [83] Vipond I B, Halford S E. Biochemistry, 1995, 34: 1113—1119
- [84] Cao W, Mayer A N, Barany F, et al Biochemistry, 1995, 34: 2276—2283
- [85] Copeland K D, Fitzsimons M P, Houser R P, et al Biochemistry, 2002, 41: 343—356
- [86] Liu C, Yu S, Li D, et al Inorg. Chem., 2002, 41: 913—922
- [87] Pabo C O, Peisach E, Grant R A, et al Annu. Rev. Biochem., 2001, 70: 313—340
- [88] Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, et al Nature, 2002, 416: 507—511
- [89] Julien J P. Cell, 2001, 104: 581—591
- [90] Uversky V N, Li J, Fink A L, et al J. Biol. Chem., 2001, 276: 44284—44296
- [91] Connolly B A, Eckstein F, Pingoud A, et al J. Biol. Chem., 1994, 269: 10760—10763
- [92] Grasby J A, Connolly B A. Biochemistry, 1992, 31: 7855—7861
- [93] Horton N C, Newberry K J, Perona J J, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 13489—13494
- [94] Newman M, Lunnen K, Wilson G, et al EMBO J., 1998, 17: 5466—5476
- [95] Viadiu H, Aggarwal A K. Nat. Struct. Biol., 1998, 5: 910—916