

## 第三章 蛋白质的结构与功能

在第二章,我们介绍了蛋白质的氨基酸组成以及一级结构和一级结构测定。蛋白质的一级结构即氨基酸顺序是由编码蛋白质的基因的核苷酸顺序决定的。但是,具有生物活性的蛋白质具有更高水平的结构组织形式。

首先让我们来看一看图 3-1 所示的结构,这是肌红蛋白的三维折叠结构。肌红蛋白是一种在结构上研究得很详细的蛋白质。我们可以看出,肌红蛋白多肽链表现出两级水平的折叠方式。首先它的多肽链局部盘绕成螺旋结构区,这种局部的有规则的折叠叫做蛋白质的二级结构(secondary structure)。从整个多肽链看,这些螺旋卷曲的区域又折叠成一种特别紧密的结构,我们又把这种结构叫做蛋白质的三级结构(tertiary structure)。在本章的后面,我们会看到一些蛋白质由多条肽链组成,以规则的方式排列,我们把它叫做蛋白质的四级结构(quaternary structure)。每一种蛋白质都有其特殊的三维结构即空间结构(spacial structure),这种特定的空间结构由它的一级结构决定,而每种蛋白质的生物学功能就是由它的特定的空间结构决定的。

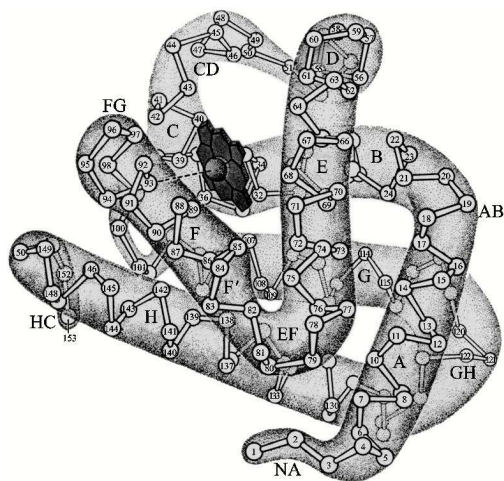


图 3-1 肌红蛋白的三维折叠

### 第一节 研究蛋白质空间结构的方法

#### 一、X 射线晶体衍射法是研究蛋白质空间结构的主要方法

20 世纪 30 年代末, L. Pauling 和 R. Corey 开始了氨基酸和肽的 X 射线晶体的精细结构研究。当时,他们的主要目的是为了获得这些构件单元的标准键距和键角,然后用得到的数据去预测蛋白质的构象。自那时以来,X 射线晶体衍射法一直是测定蛋白质晶体结构的主要方法。蛋白质分子中原子间的距离是很小的,不能用光学显微镜去观察蛋白质分子的细微结构。可见光的波长太长,最小波长都达到 400 nm,不能用来放大蛋白质分子,必须用波长很短的射线才能进行放大。X 射线的波长大约为 0.15 nm,可以与共价键的键长相比较。X 射线放大蛋白质的第一步同光学显微镜的第一步相类似。当用一束 X 射线照射蛋白质晶体时,X 射线是通过绕不同原子中心聚集的电子进行衍射的,即 X 射线排他地与物质的电子相互作用。在进行 X 射线衍射时,由于没有收集和重新结合衍射的 X 射线的反射镜和透镜系统,因而不能产生有意义的图像,但是,却允许衍射的 X 射线打在能感光的胶片上,可以在胶片上产生一系列的斑点,斑点的强度

是由蛋白质分子中的原子的排列决定的。由于 X 射线是与电子作用产生的衍射,因此用 X 射线衍射所获得的结构图是一种电子密度图(图 3-2)。对 X 射线从不同角度穿透蛋白质晶体产生大量不同的斑点图案进行复杂的计算,并结合蛋白质氨基酸顺序的知识,分析、综合而得到蛋白质分子的三维结构信息。利用 X 射线晶体衍射的方法首先测定了  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠片等蛋白质二级结构的基本要素。1959 年, J. Kendrew 首次测定了分辨率为 0.2 nm 的抹香鲸肌红蛋白的空间结构。不久,他的同事 M. Perutz 又获得了血红蛋白空间结构的信息。他们因此而获得了 1962 年诺贝尔奖。自那以后,一些蛋白质的空间结构通过 X 射线晶体衍射方法而相继得到分析。

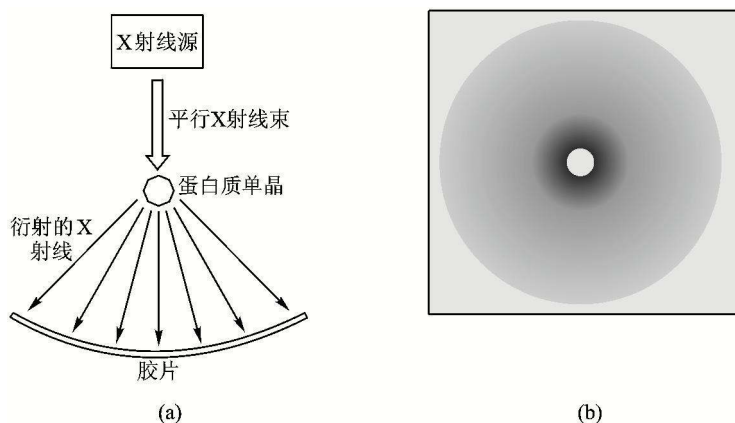


图 3-2 X 射线晶体衍射示意图

(a) 晶体的 X 射线衍射原理; (b) 晶体样品的电子密度图

迄今, X 射线晶体学仍然是生物大分子精细结构测定的主要方法。但是, 这种方法的成功运用的前提条件是必须有足够大的优质单晶体。蛋白质晶体可以在适当条件下获得, 特别是晶体生长的条件必须小心控制, 以便形成理想的结晶。在这样的结晶中, 所有单个蛋白质分子都有相同的三维构象, 并且每一个分子都有相同的定向。这种品质的晶体只有从高度纯净的蛋白质才能得到。对于一般的光源, 高分辨率的结构分析要求有接近 mm 量级的晶体。近年来, 先进的同步辐射装置所发出的 X 射线具有极高的亮度和极精细的聚焦性能, 因此只需要较小的优质晶体 (0.02~0.04 mm) 即可获得高分辨率的结构。膜蛋白菌紫红质的结构分析就是一个很能说明问题的例子。在现代同步辐射光源运用之前, 该蛋白质结构测定一直未取得结果。主要原因是晶体太小或者晶形质量不太理想。由于运用了第三代同步辐射光源, 仅用 0.02 mm × 0.04 mm 的六方晶体, 于 1997 年获得高分辨率 (0.25 nm) 的精细结构。通常的 X 射线光源可以测定直径为 7.5 nm 左右的蛋白质原子水平的结构, 但对于比这大得多的极大分子组装体蛋白质的精细结构测定就十分困难。主要问题是, 这些大分子组装体内含有数目大得多的原子, 经 X 光照射后产生的衍射点也就更多。使用普通 X 射线, 这些衍射点经常发生重叠, 或者产生的衍射点强度较弱。这都会对有效的分辨造成影响。先进的同步辐射装置发出的 X 射线使那些大分子组装体的精细结构的测定成为可能。因为这种光源的高亮度和极细的聚焦性能可以解决或改善这些问题。蓝舌病毒 (bluetongue virus) 结构的测定就是一个明显的例子。该病毒外壳大约由 1 000 个蛋白质亚基组成, 其晶胞大约为 110 nm × 160 nm。与此同时, 核小体核心颗粒 (由组蛋白和一段

DNA 序列装配而成)高分辨率(0.28 nm)的结构也已被测定。此外,还有一些重要的生物大分子复合物已经或正在被测定。生物大分子复合物的精细结构测定具有极其重要的生物学意义。几乎所有重要的生物功能都是通过多种生物大分子的相互作用实现的。因此,生物大分子复合物,特别是它们的高级组织形式亚细胞器和细胞器的原子水平的精细结构的测定无疑是结构生物学的重要目标。

## 二、核磁共振光谱法研究液态蛋白质的构象

与 X 射线晶体衍射不同,核磁共振(NMR)光谱可以用来研究处在溶液状态的生物大分子的结构,不需要将蛋白质等生物大分子制备成适当的晶体。NMR 光谱法是一门利用磁场中电磁辐射被分子吸收而发生的频率改变来测定某原子核的自旋状态的技术。在蛋白质结构研究中,NMR 通常用来测定氢原子的自旋。特定的 NMR 技术可以记录彼此接近的氢原子间的相互关系。把 NMR 所得的信息与蛋白质氨基酸顺序的信息结合起来,即可测定蛋白质的空间构象。近年来,NMR 光谱技术已从二维(2D)发展到三维(3D)和四维(4D)。多维 NMR 光谱技术目前可以用来测定相对分子质量达  $4.0 \times 10^4$  的蛋白质结构,其分辨率已接近 0.3 nm。NMR 光谱技术除用于测定生物大分子的空间结构以外,还可用来测定生物大分子的动力学性质,跟踪蛋白质的折叠过程和捕获折叠过程中的瞬间中间物。

## 第二节 蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构是指多肽链的主链(backbone)有规则的折叠方式,实际上是指多肽链主链上的原子在空间上的排列。这种排列不涉及侧链上的原子。在讨论二级结构的基本特征之前,先了解有关肽基(peptide groups)的几何学特性,因为这是认识含有肽基的任何一种结构的基础。

### 一、肽基的结构

L. Pauling 等人测定了一些氨基酸和小肽的 X 射线晶体结构,力图阐述多肽链构象的结构限制因素。研究表明,肽链上的亚氨基(酰胺,—NH)、羰基(—CO)和两端的  $\alpha$ -碳原子( $C_\alpha$ )构成了一个肽基。肽基又称为肽平面(peptide plane)或酰胺平面,是一种刚性的(rigid)平面结构(图 3-3),是共振作用的结果。这种共振作用使得肽键具有部分双键的特点。因为在这种结构中,肽键(C—N)比 N— $C_\alpha$  单键短 0.014 nm,它的 C=O 键比醛基或酮基的 C=O 键长 0.002 nm。当肽基是平面时,由于在这种构象中  $\pi$  电子轨道重叠,并覆盖 O—C—N,因而肽键的共振能达到最大值,约为  $85 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。然而,当肽键离开平面向外转动  $90^\circ$  时,这种重叠降低到零,从而解释了平面肽基的刚性。

肽基一般呈反式构象。在这种构象中,相邻的  $C_\alpha$  原子处于刚性平面的相反两侧,避免了与两个  $C_\alpha$  原子相连接的侧链基团的空间干扰(图 3-3(d)),如果肽基呈顺式构象,则由于侧链基团的空间干扰,比反式构象的稳定性低。但是,如果脯氨酸残基接在肽键的后面(即 X—Pro),则顺式构象是有利的。

### 二、多肽链主链的构象可以用它们的扭角来描述

上面关于肽基性质的描述是重要的,因为一种蛋白质的主链是刚性平面的肽基的连续排列

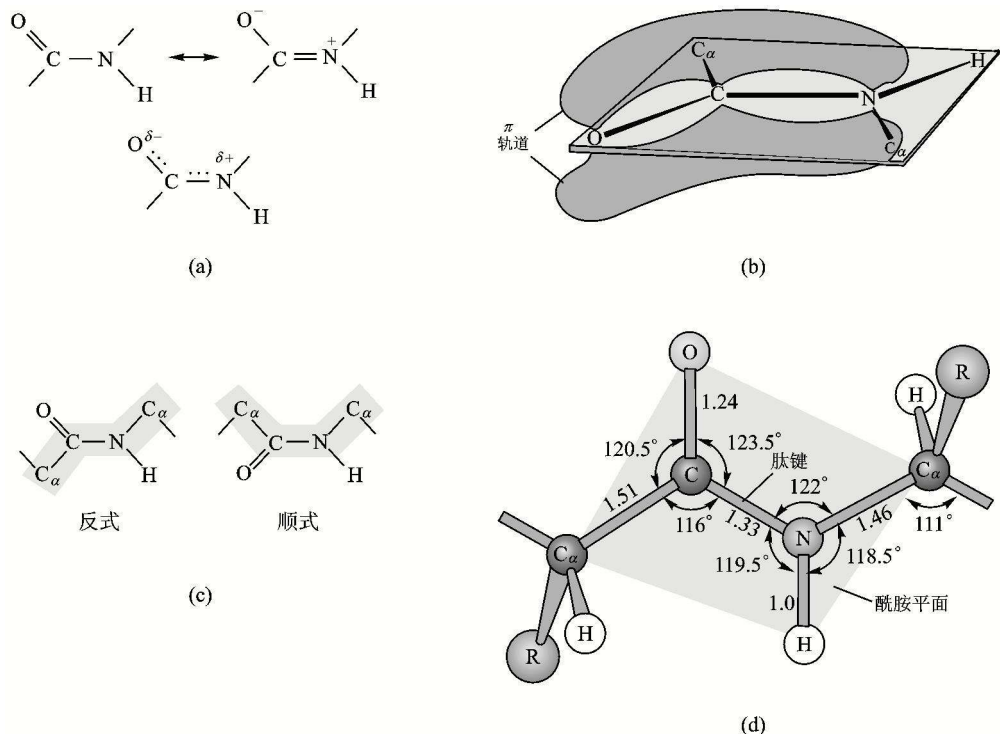


图 3-3 肽键部分双键的性质(a)和  $\pi$  电子轨道复盖 O—C—N,对部分双键的性质(b)做出了解释;  
(c) 肽键的两种可能的构象;(d) (反式)肽基上的键距(nm)和键角

(图 3-4),或可看做是由重复的—N— $\text{C}_\alpha$ —C—单位经肽键连接而成的线性结构。由于肽键具有部分双键的性质,不能自由旋转,这对于多肽链主链的构象有极大的限制。但是,肽键两侧的  $\text{C}_\alpha$ —N 键和  $\text{C}_\alpha$ —C 键则是纯粹的单键,它们具有较大的旋转自由,其旋转角分别用  $\phi$  和  $\psi$  表示。

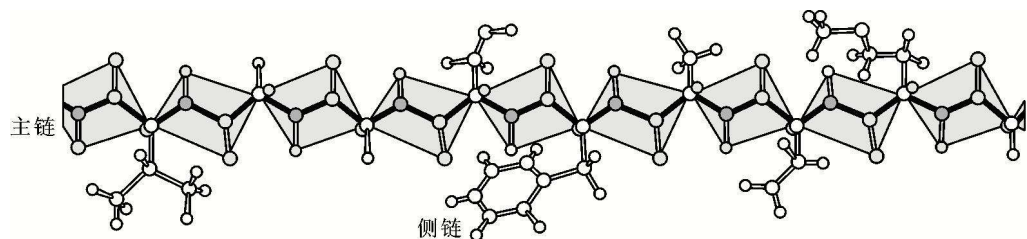


图 3-4 多肽链伸展状态的构象和主链结构

原则上,这两个单键的旋转角可以在  $-180^\circ$  和  $+180^\circ$  之间任取一数值。然而,实际上这两个单键的旋转也会受到主链上酰胺氢和羰基氧以及  $\alpha$ -碳原子上的侧链基团大小和性质的限制。由于  $\alpha$ -碳原子实际上处在两个刚性平面的交线上,而多肽链中所有肽基基本上都有相同的键距和键角(图 3-3(d)),每个  $\alpha$ -碳原子都是一个正四面体结构,所以由  $\alpha$ -碳原子参与形成的两个旋转角(即扭角, torsion angle)  $\phi$  和  $\psi$  就决定了相邻两个肽基的相对位置(图 3-5)。由于多肽主链可以描绘成许多刚性的平面肽基的连续排列(图 3-4),因此多肽链主链的构象可以用每个

$\alpha$ -碳原子的一对扭角来描述。在多肽链中,任何一对扭角如果发生变化,则多肽链主链的构象必然发生相应的变化。如果所有与 $\alpha$ -碳原子相连的这一对扭角都分别相等,则多肽链主链呈现为有规律的构象。当多肽链处在完全伸展状态时, $\phi$ 角和 $\psi$ 角规定为 $180^\circ$ 。从 $C_\alpha$ 观察时,这两个单键均呈顺时针方向旋转(图3-5左)。

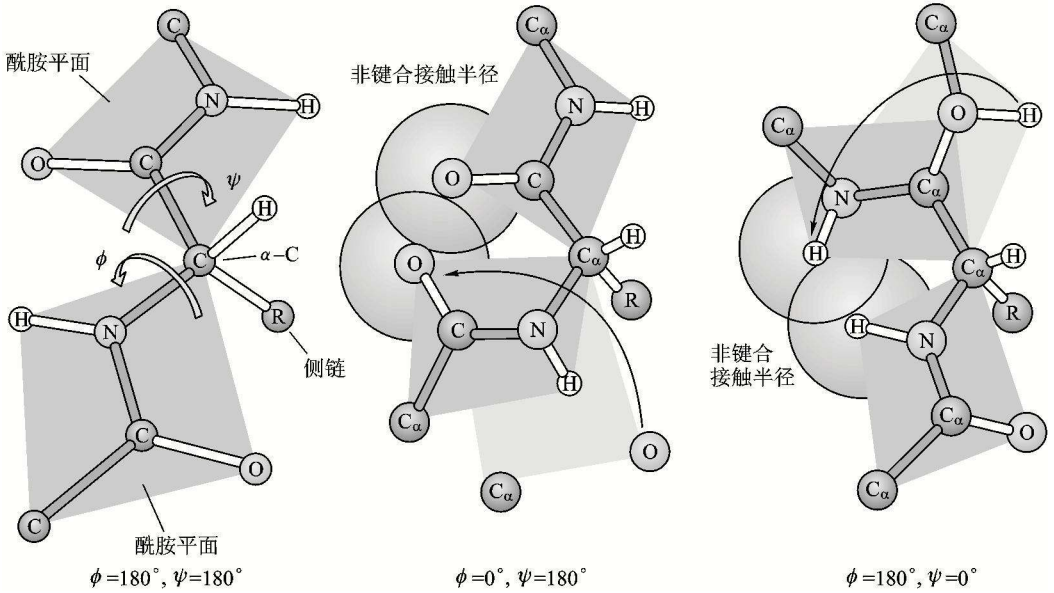


图3-5 扭角决定相邻肽基的几何位置

### 三、多肽允许的构象可以用拉氏图预测

构象研究表明,只有当那些非键合原子之间保持适当的距离时,单键旋转所造成的构象才是允许的。为了确定一条多肽主链因单键旋转所产生的扭角( $\phi$ 和 $\psi$ )对主链构象的影响,就必须确定非键合原子之间的距离不应小于它相应的范德华距离(即两个原子的范德华半径之和),于是可以根据非键合原子间允许的距离所对应的空间上允许的任何一对 $\phi$ 和 $\psi$ 值来确定一条多肽的任何一个氨基酸残基的主链构象或 $C_\alpha$ 原子所连接的两个肽平面的构象。

空间上允许的 $\phi$ 和 $\psi$ 值是可以计算的。对于一个三肽来说,当中心肽基处在所有 $\phi$ 角和 $\psi$ 角值时计算非键合原子间的允许距离,把得到的信息绘制成的图叫做构象图或Ramachandran图,简称拉氏图(图3-6),图上的任何一点都对应于任何一对 $\phi$ 和 $\psi$ 值。拉氏图能让人们很方便地知道哪些构象是空间上允许的,哪些则是不允许的。空间上不允许的构象是那些任何非键合原子的距离小于它的相应的范德华距离的构象。

图3-6所示的拉氏图的大部分区域( $\phi$ 和 $\psi$ 的大多数组合)在构象上对一条多肽链来说是达不到的,或者说不允许的。构象上允许的 $\phi$ 和 $\psi$ 的组合在拉氏图上只局限于三个较小的区域内。不过,我们看到在蛋白质中所有能找到的有规则的二级结构都进入到拉氏图的允许范围内。实际上,大多数已经测定过结构的蛋白质的非甘氨酸残基的构象角都位于那些允许区内。

大多数落入非允许区的点位于它的两个完全允许区之间。但是,如果绕肽键只旋转几度,那

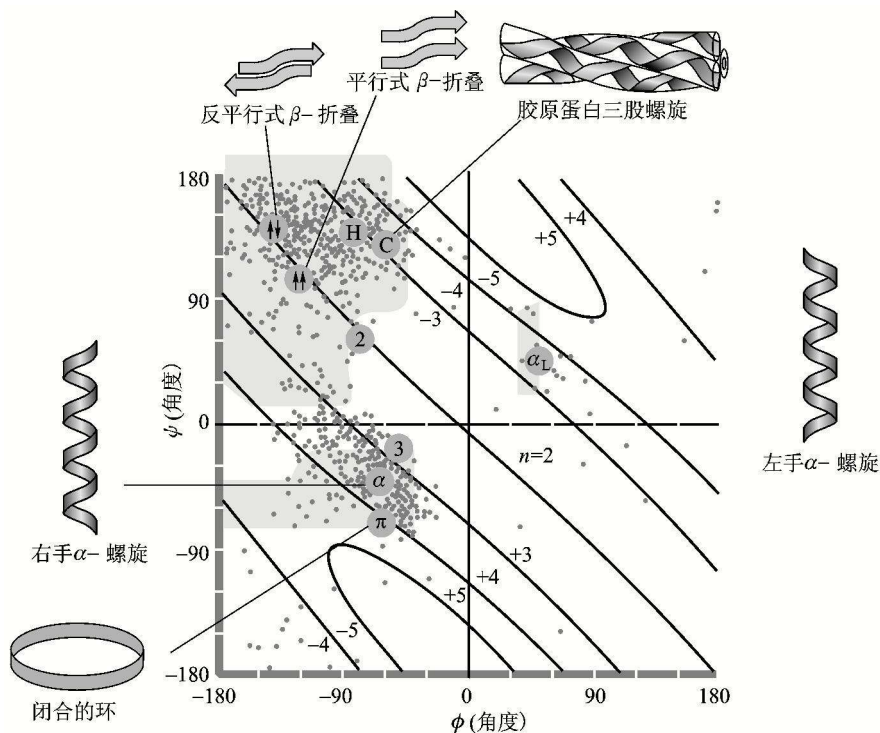


图 3-6 拉氏图(阴影覆盖的部位表示立体上允许的  $\phi$  角和  $\psi$  角)

么这些“非允许”构象则是允许的,这不无道理,因为肽键对平面微小的变形几乎不产生阻力。

图 3-6 是根据三个连续的丙氨酸残基的计算绘制的。其他较大的、在  $C_{\beta}$  位上无分支的残基(例如苯丙氨酸)的拉氏图几乎与丙氨酸相同。在  $C_{\beta}$  位上有分支的残基(例如苏氨酸)的拉氏图,允许区稍微比丙氨酸的小些。脯氨酸的环状侧链使它的  $\phi$  值限制在  $-60^{\circ} \pm 25^{\circ}$  范围内,成为构象上最受限制的氨基酸残基。甘氨酸是唯一没有  $C_{\beta}$  的残基,它比其他氨基酸具有小得多的空间障碍,因而允许它有较多的构象。事实上,甘氨酸往往占据多肽主链发生转角的部位。在这样的部位上,其他氨基酸都会受到空间干扰的限制。链的长度超过三个残基的多肽的构象比拉氏图指出的甚至更受限制,因为一条多肽链不可能呈现超出它本身的构象。尽管肽键平面和侧链的大小对安排一条多肽链的构象有很大的限制,但是每一种特定的一级结构都有相应的特定的三维构象。

#### 四、 $\alpha$ - 螺旋是有规律的主链构象

螺旋结构是蛋白质二级结构最突出的要素。如果一条多肽链绕它的每个  $C_{\alpha}$  原子以相同的角度旋转,那么该多肽就会以某种螺旋构象存在。因为对扭角  $\phi$  和  $\psi$  的选择不同,所以每种螺旋都有它的构象特征,这种特征可以用每轮螺旋的残基数和它的螺距等参数来描述。

$\alpha$  - 螺旋( $\alpha$  - helix)是一种既有允许的构象角又有最能有效形成氢键的多肽主链构象(图 3-7),是多肽链的一种特殊的刚性结构。 $\alpha$  - 螺旋结构模型是由 Pauling 于 1951 年提出的,该模型的提出被视为结构生化的里程碑之一。

对于由 L -  $\alpha$  - 氨基酸残基构成的多肽来说, $\alpha$  - 螺旋是一种扭角  $\phi = -57^{\circ}$  和  $\psi = -47^{\circ}$ 、每

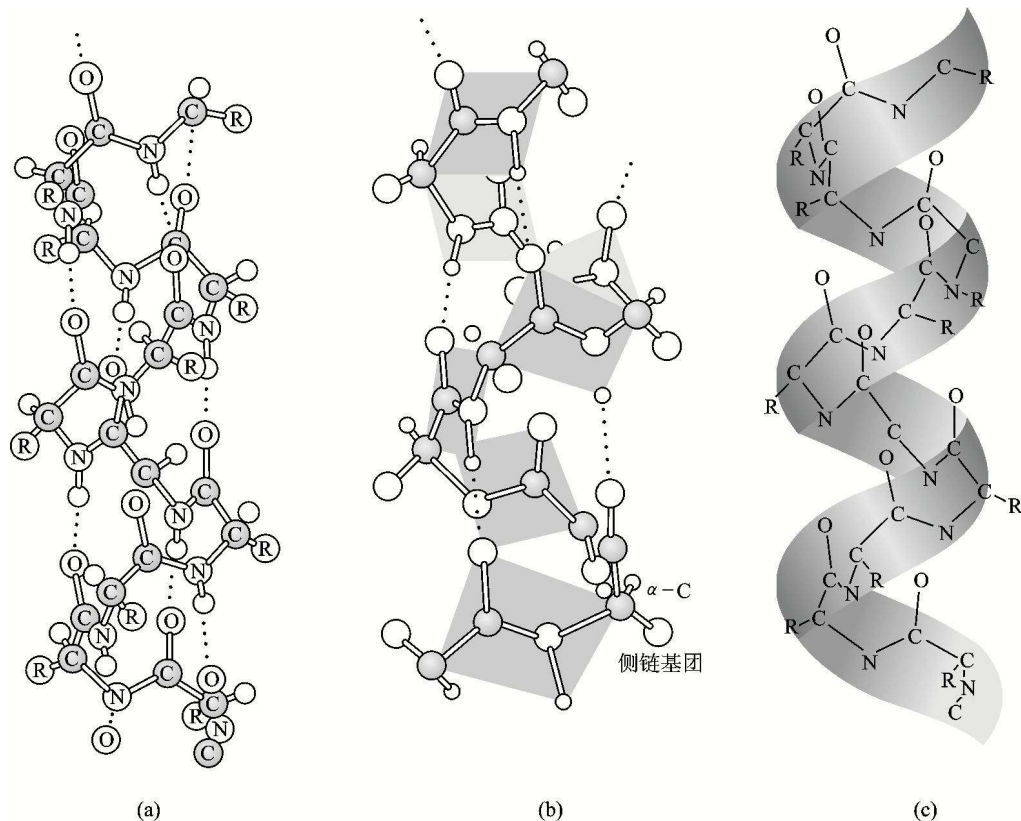


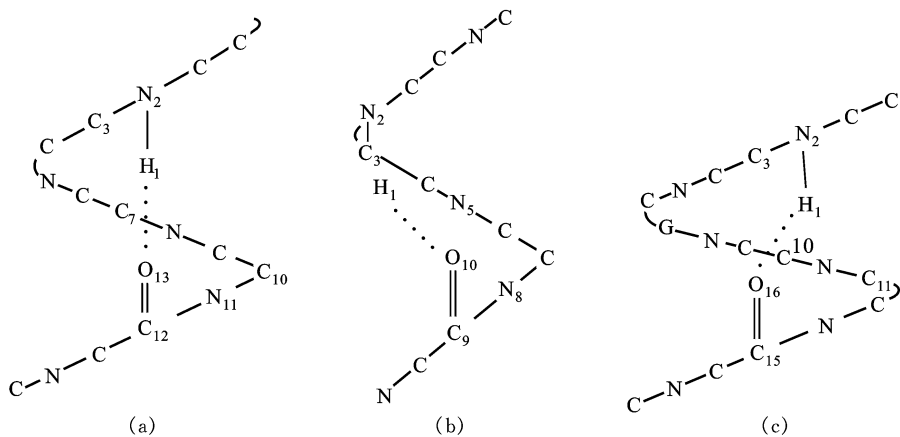
图 3-7  $\alpha$ -螺旋的 3 种不同的图解形式

个氢键封闭 3.6 个氨基酸残基、螺距为 0.54 nm 的右手螺旋(D-氨基酸残基的  $\alpha$ -螺旋是 L-氨基酸残基的  $\alpha$ -螺旋的对映体,它是左手螺旋;L-氨基酸残基也能形成左手螺旋,但它不是右手螺旋的对映体)。在这种结构中,每个残基绕螺旋轴旋转  $100^\circ$ ,沿轴上升 0.15 nm。从图 3-7 可以看出,多肽主链上的第  $n$  个残基的羰基与沿螺旋指向的第  $n+4$  个残基的酰胺基都形成了氢键。在  $\alpha$ -螺旋中,氢键处在最适距离(0.28 nm),所以这是一种强有力的氢键。侧链基团(R)的位置完全不是按拉氏图处理,而是全部从螺旋中突出,以避免同主链以及侧链间的空间干扰。左手  $\alpha$ -螺旋(它的螺旋参数只是中度不适)由于它的侧链太接近主链,(这是由于蛋白质中的氨基酸都是 L-型的结果),因而在天然蛋白质的构象中是不存在的。

根据氢键封闭环内的原子数, $\alpha$ -螺旋是  $3.6_{13}$  螺旋。正位上的数字是指每轮螺旋残基数,右下角小写数字表示氢键封闭环中的原子数。除了  $\alpha$ -螺旋外, $3_{10}$ 螺旋和  $4.4_{16}$ 螺旋( $\pi$ -螺旋)在某些蛋白质分子结构中也可以观察到(图 3-8)。 $3_{10}$ 螺旋的扭角位于拉氏图的中度不允许区,十分靠近  $\alpha$ -螺旋的扭角部位,但它的侧链受到空间干扰。这就解释了  $3_{10}$ 螺旋在蛋白质中只是偶尔观察到的原因。这种螺旋常作为  $\alpha$ -螺旋的末端和肽链下一部分之间的过渡。

$\pi$ -螺旋也是一种中度不允许的构象,也只是在少数  $\alpha$ -螺旋的末端观察到。这可能是因为它较宽和较平的构象产生了一轴洞。该轴洞太小,以致不能容纳水分子;并且太宽则不允许跨螺旋的范德华结合,这样就大大降低了它的稳定性。

$\alpha$ -螺旋是纤维状蛋白质和球状蛋白质的一种普遍存在的二级结构形式。

图 3-8 3.6<sub>13</sub>螺旋、3.1<sub>10</sub>螺旋和 4.4<sub>16</sub>螺旋的结构

## 五、β - 结构

β - 结构(Beta structure)也是 Pauling 提出的一种二级结构。β - 结构也叫 β - 折叠或 β - 折

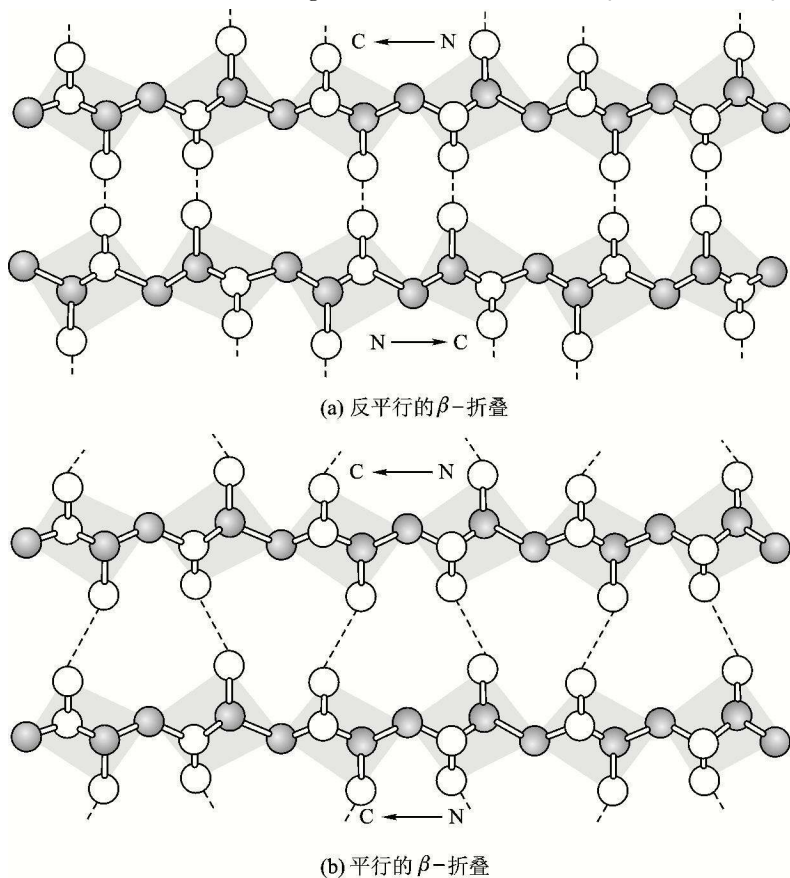


图 3-9 反平行式(a)和平行式(b)两种β - 折叠

叠片( $\beta$ -pleated sheet),与 $\alpha$ -螺旋一样,它的构象角也位于拉氏图的允许区内,也能利用多肽主链的全部氢键。但是,在 $\beta$ -折叠中,氢键出现在相邻多肽链之间或相邻肽段之间,而不是像 $\alpha$ -螺旋那样出现在直向的同一条链中。

有两种不同的 $\beta$ -折叠,一种是反平行的(antiparallel) $\beta$ -折叠,其 $\phi$ 角和 $\psi$ 角分别是 $-140^\circ$ 和 $+135^\circ$ 。在这种结构中,相邻形成氢键的多肽链以相反方向排列(图3-9(a))。另一种是平行的(parallel) $\beta$ -折叠,其 $\phi$ 角和 $\psi$ 角分别是 $-119^\circ$ 和 $+113^\circ$ 。在这种结构中,氢键结合的链是以相同的方向伸展(图3-9(b))。在这两种最适氢键结合的构象中,它们与完全伸展的多肽构象( $\phi = \psi = \pm 180^\circ$ )有所不同,因为它们呈现一种波纹状或折叠状的外观(图3-10)。在 $\beta$ -折叠片中,多肽链的侧链向折叠片的相反两侧伸出,重复单位含两个残基,重复距离为0.7 nm(反平行式)或0.65 nm(平行式)。

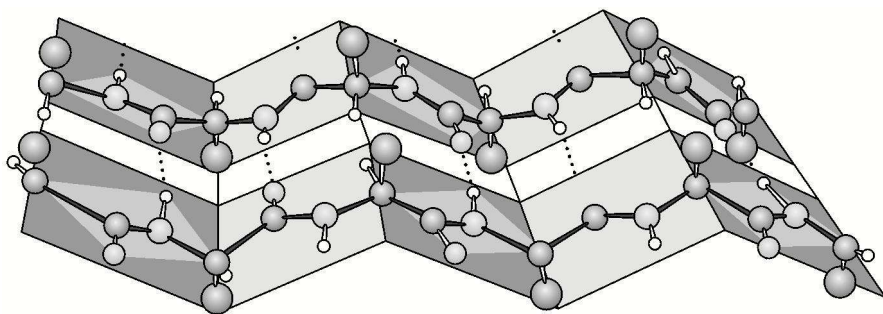


图3-10 反平行的 $\beta$ -折叠片

$\beta$ -折叠是蛋白质中普遍存在的结构型式。在球状蛋白质中,它们由两条或多条肽段构成,平均为6条肽段,平均宽度为2.5 nm。 $\beta$ -折叠片的肽段长度可达15个残基,平均为6个残基。少于5条肽段平行式的 $\beta$ -折叠是很少见的,这提示平行的 $\beta$ -折叠没有反平行的 $\beta$ -折叠稳定。混合式的平行-反平行的 $\beta$ -折叠则比较普遍。

球状蛋白质中的 $\beta$ -折叠片当沿着它们的肽链方向观察时,总是呈明显的右手扭曲。这种扭曲的 $\beta$ -折叠是球状蛋白质的重要的结构特征,因为 $\beta$ -折叠往往形成中央核心(图3-11)。构象能计算表明, $\beta$ -折叠的右手扭曲是片状伸展的多肽链中的手性L-氨基酸残基之间非键合相互作用的结果。这些相互作用趋于使多肽链产生轻微的右手扭曲,这种扭曲使 $\beta$ -折叠变歪,从而使 $\beta$ -折叠的链间氢键变弱。因此,一种特定的 $\beta$ -折叠的几何学结构是它的多肽链最佳的构象能和保护它的氢键之间相互妥协的结果。

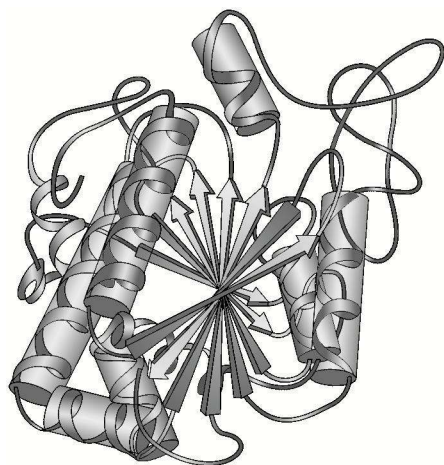


图3-11 球状蛋白质中的 $\beta$ -折叠右手扭曲

## 六、非重复结构

在球状蛋白质中,除有规则的二级结构(螺旋和

$\beta$ -折叠)外,其余的多肽片段可以说是一种卷曲或环形结构。但是,这并不是说这些非重复的二级结构比螺旋或 $\beta$ -折叠结构有序性低些,它们只是更难以描述。因此,我们不应该把卷曲与随机卷曲相混淆。随机卷曲是变性蛋白质和其他聚合体在溶液中的完全无序的和快速波动的一组构象。

### (一) $\beta$ -转角

大多数蛋白质都是球状的。因此,多肽链必须具有弯曲、转角和自我改变方向的能力,以便产生紧凑的球状结构。在许多蛋白质中都可以观察到一种叫做 $\beta$ -转角( $\beta$ -turn 或  $\beta$ -bend)的结构(图 3-12),它由四个连续的氨基酸残基组成。之所以称为 $\beta$ -转角是因为它们往往连接相邻的反平行的 $\beta$ -折叠。 $\beta$ -转角都是通过一个残基上的羰基氧与肽链下游的第三位残基的酰胺氢形成氢键,以此稳定这种结构。有两种类型的 $\beta$ -转角,其区别是连接残基 2 和残基 3 的肽单位(即肽基)翻转  $180^\circ$  的方向不同(图 3-12)。由于 $\beta$ -转角的存在,就允许蛋白质倒转它的肽链方向。脯氨酸(往往出现在 $\beta$ -转角的残基 2 的位置)和甘氨酸是频繁出现在 $\beta$ -转角中的残基。 $\beta$ -转角几乎总是出现在蛋白质的表面。实际上,它们部分地规定了蛋白质的表面。

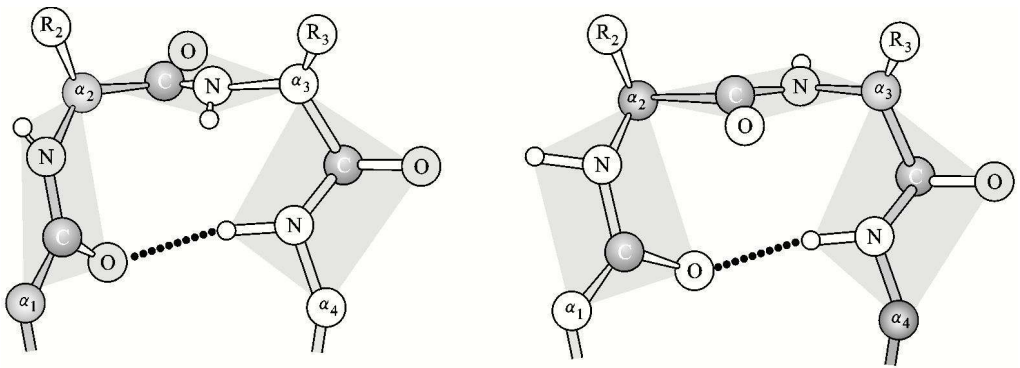


图 3-12 球状蛋白质中的 $\beta$ -转角的两种形式

### (二) 环形构象

几乎所有大于 60 个残基的蛋白质都含有一个或几个 6~16 个残基的环形结构。它既不是一种螺旋结构,也不是一种 $\beta$ -折叠。环形结构的首尾距离小于 1.0 nm。这种 $\Omega$ 环形结构使紧密的球状蛋白质成为统一体,因为它们的侧链可以填入到内部的空洞中。之所以称为 $\Omega$ 环,是因为它的形状像希腊字母“Omega”。由于 $\Omega$ 环几乎总是位于蛋白质的表面,因而它们可能在生物信息识别过程中起某种作用。

### (三) 无序结构

许多蛋白质确实存在无序结构区。伸出表面的带电荷基团如赖氨酸侧链或多肽链的 N-末端以及 C-末端就是很好的例证。它们往往在溶液中波动,因为几乎没有什么作用力使它们保持在某一个固定位置。有时整个片段是无序的,这样的片段也许有功能上的作用,例如结合特定的分子。这样的片段当蛋白质处在某种状态时(缺乏特定分子)是无序的,而当蛋白质处在另一种状态时(结合特定的分子)是有序的。这样就使蛋白质在履行功能时可以灵活地与另一分子相互作用。

### 第三节 纤维状蛋白质——细胞和组织的结构物质

纤维状蛋白质是高度伸展的分子,二级结构是它们的主要结构形式。许多纤维状蛋白质(例如皮肤、腱和骨中的蛋白质)行使结构物质的功能,它们具有保护、结缔或支撑的作用。其他的纤维状蛋白质,例如肌肉和睫状体蛋白具有运动的功能。这里我们简要介绍角蛋白(keratin)、丝纤维蛋白(silk fibroin)和胶原蛋白的结构与功能的关系。这些蛋白质相对于球状蛋白质来说,其结构比较简单,但这种简单的结构也是与它们的生物功能相适应的。

纤维状蛋白质分子难以结晶,因而通常不服从单晶 X 射线结构分析测定。与其说是结晶,不如说它们像纤维那样结合,因为它们的长长分子轴或多或少与纤维轴平行,而在其他方位上缺乏特有的定向。这种纤维的 X 射线衍射图含有很少的信息,因此,纤维状蛋白质的结构了解得并不很详细。然而,蛋白质最早的 X 射线研究是在 20 世纪 30 年代用很容易获得的羊毛等蛋白纤维完成的,由于直到 20 世纪 50 年代才第一次测定了蛋白质的 X 射线晶体结构。所以这些研究构成了指导阐述蛋白质结构原理的最初尝试和提出  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -结构模型的大量的实验依据。

#### 一、 $\alpha$ -角蛋白——螺旋的螺旋

角蛋白是一种存在于高等脊椎动物中的、机械上耐用的和化学上不活泼的蛋白质。它是高等脊椎动物坚硬的外表皮层以及毛发、角、指甲和羽毛的主要成分。角蛋白可以分为  $\alpha$ -角蛋白和  $\beta$ -角蛋白。前者出现在哺乳动物中,后者存在于鸟类和爬行动物中。

电子显微镜研究表明,毛发主要由  $\alpha$ -角蛋白按一定结构等级构成(图 3-13)。典型的毛发直径约 20  $\mu\text{m}$ ,是由死细胞(dead cell)构筑而成。每个死细胞含包裹着的大原纤维(macrofibril),其直径为 200 nm。大原纤维由微原纤维(microfibril,其直径为 8 nm)构成。微原纤维本身又由初原纤维(protofibril,其直径为 2 nm)构成。初原纤维由原丝(protofilament)二聚化构成;而原丝由两条螺旋链卷曲构成(图 3-13)。

$\alpha$ -角蛋白的 X 射线衍射照片显示其结构类似 Pauling 提出的  $\alpha$ -螺旋结构。但是  $\alpha$ -角蛋白呈现 0.51 nm 的间隔而不是  $\alpha$ -螺旋 0.54 nm 的螺距。这是因为构成原丝的卷曲的二体螺旋中的每根  $\alpha$ -螺旋正常的 0.54 nm 的重复距离向原丝轴(左手)倾斜(图 3-13),因而产生了只有 0.51 nm 的间隔。这种装配称之为卷曲的螺旋(coiled coil)结构。

$\alpha$ -角蛋白卷曲的螺旋构象是由它的一级结构决定的。它含有 7 残基 a-b-c-d-e-f-g 的假重复(pseudorepeat),在位置 a 和 d 以非极性残基占优势。由于  $\alpha$ -螺旋每一轮有 3.6 个残基,因此  $\alpha$ -角蛋白的 a 和 d 残基排列在  $\alpha$ -螺旋的同一侧,形成一条疏水带,该疏水带促使它与另一条  $\alpha$ -螺旋同样的疏水带纵向结合(图 3-

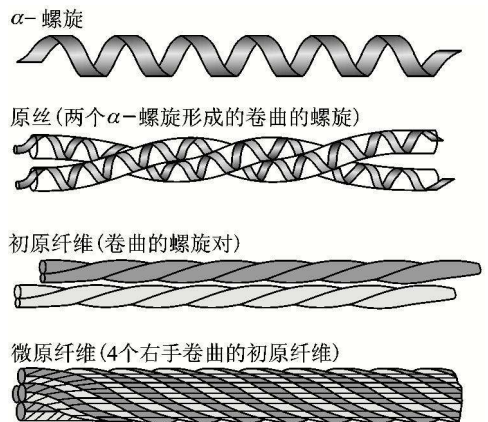


图 3-13 毛发  $\alpha$ -角蛋白的组成

13)

14)。实际上,正常的 $\alpha$ -螺旋每轮3.6个残基和 $\alpha$ -角蛋白的疏水带的约3.5个残基的微小差别是与卷曲的螺旋的有关的。彼此相关的 $\alpha$ -螺旋产生 $18^\circ$ 的倾斜角,允许它们的侧链有效地交错穿插,从而大大地增加了 $\alpha$ -螺旋之间的相互作用。

$\alpha$ -角蛋白富含半胱氨酸残基,它使相邻的多肽链发生交联。这就解释了角蛋白的两个最重要的生物学特性:不溶性和对伸展的抗性。二硫键可以被硫醇类物质还原而被打断,若头发用这类物质处理,然后用氧化剂使其在新的部位恢复二硫键,则可以建立“永久性波浪”。烫发就是利用这一生化原理。虽然 $\alpha$ -角蛋白的不溶性阻止大多数动物消化它,但蛀虫幼体消化管里含有高浓度的硫醇类物质,因而它们会使毛料衣物的拥有者非常苦恼。

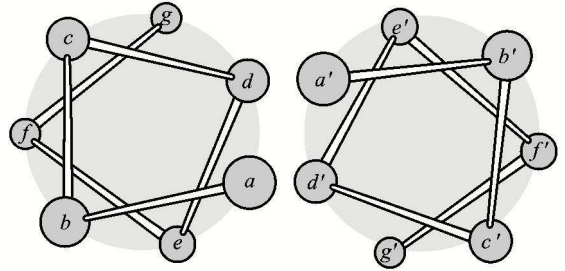


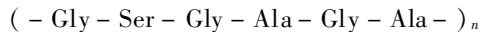
图 3-14 两条 $\alpha$ -螺旋疏水带的结合

头发和羊毛纤维的弹性是卷曲的螺旋在外力作用下拉伸、外力释放后又恢复到原来卷曲的螺旋的结果。当用湿热法使它的某些二硫键断裂时, $\alpha$ -角蛋白可以伸展到原初长度的两倍。X射线分析表明,此时 $\alpha$ -螺旋伸展并伴随氢键的重新排列,形成 $\beta$ -折叠结构。例如,羽毛 $\beta$ -角蛋白,其天然状态呈现一种类似 $\beta$ -折叠的X衍射图案。

## 二、丝心蛋白

蚕能将吐出的丝制成茧(cocoon),茧是由纤维状的丝心蛋白(fibroin)和一种粘性无定形的丝胶蛋白(sericin)构成。丝胶蛋白使丝心蛋白纤维胶合在一起。成熟的蛾分泌一种叫做蚕酶(cocoonase)的蛋白酶,这种酶能使丝胶蛋白降解,从而使蛾能从茧内钻出。在用蚕丝制作衣物之前,需用煮沸的肥皂水处理,除去丝胶蛋白。

蚕丝心蛋白的X射线衍射图案表明,它的多肽链形成反平行的 $\beta$ -折叠片。在这种结构中,肽链沿纤维轴平行伸展。序列分析表明, $\beta$ -折叠区几乎全由下面的重复顺序构成:



从上面的序列可以看出,几乎每隔一个残基就是甘氨酸,并且甘氨酸总是位于丙氨酸或丝氨酸残基之间。这种交替的排列允许甘氨酸残基的侧链与丙氨酸和丝氨酸残基的侧链分别伸向片层的相反两侧,从而允许 $\beta$ -折叠片堆积在一起形成微晶(microcrystalline)排列。这样就使得相邻片层间连接甘氨酸残基侧链的片层与连接丙氨酸或丝氨酸残基侧链的片层相互交替(图3-15)。这种结构部分地解释了丝的机械性能。丝纤维有强度但伸展性差,这是因为共价键合的肽链几乎达到最大可能的伸展长度;而这种纤维是很柔软的,因为相邻片层间只有较弱的范德华力。

丝心蛋白还含有少量的其他侧链较大的氨基酸残基,例如,缬氨酸和酪氨酸。它们不适合这种 $\beta$ -结构,因而会出现 $\beta$ -折叠结构周期性中断。所以丝纤维是由微晶区和无定形区交替构成的。无定形区主要与丝纤维的伸展性有关。不同种类的丝纤维含有不同比例的较大侧链残基,因而也有不同的机械性能。丝心蛋白较大侧链的残基比例越大,它的弹性(抗变形能力以及当变形力除去时恢复它原初形状的能力)就越低,而它的伸展性就越大。因此,丝心蛋白的机械

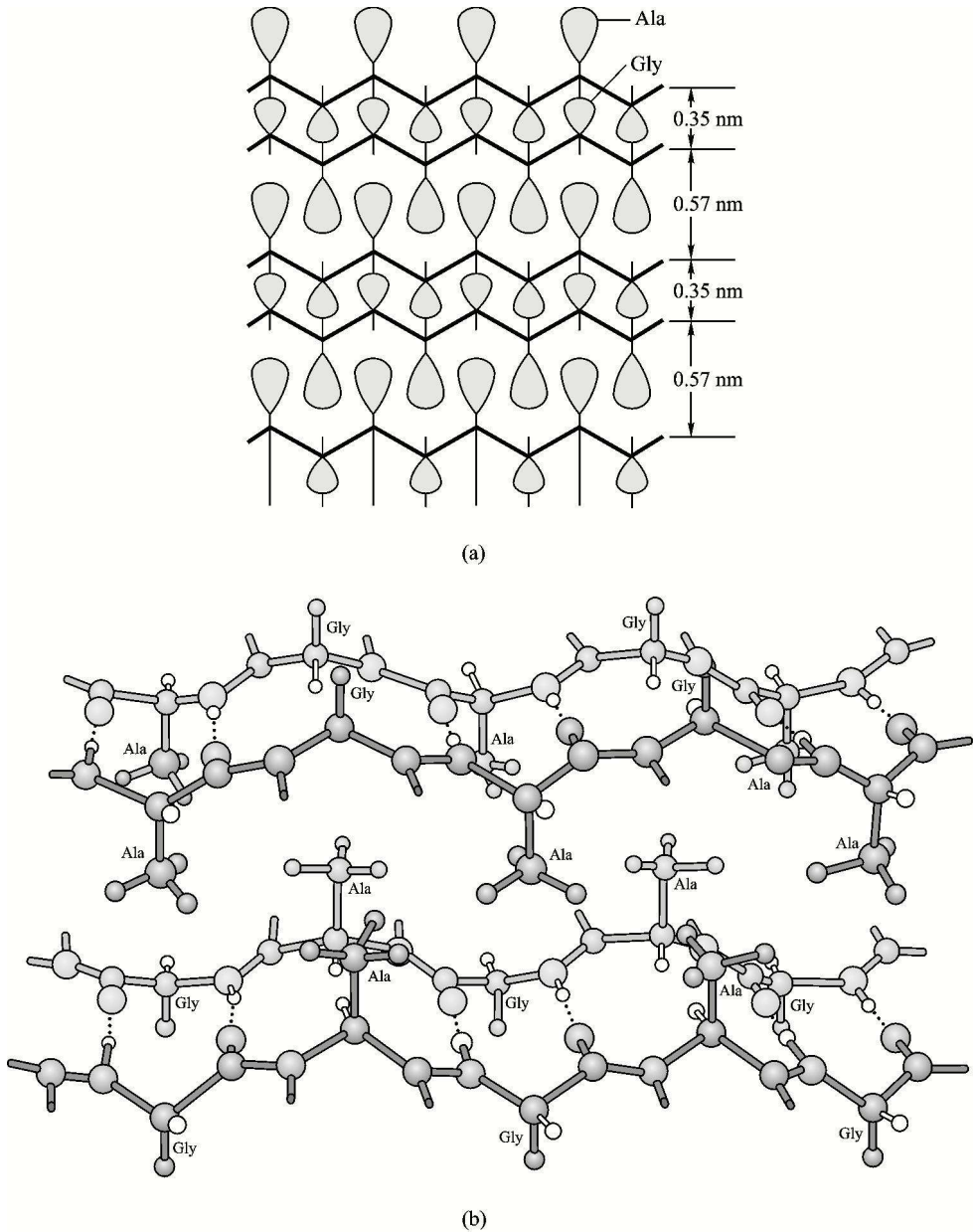


图 3-15 丝心蛋白的结构

(a) 堆积的  $\beta$ -折叠片的三维结构; (b) 交替片层中的丙氨酸(或丝氨酸)侧链与甘氨酸侧链的交错对插

性能可以根据它的结构来了解,而它的结构本身又取决于它的氨基酸序列。

### 三、胶原蛋白

胶原蛋白(collagen)是脊椎动物中的最丰富的蛋白质。它是一种细胞外蛋白质,可以组织成具有极大伸展性的不溶性纤维。这是与它作为结缔组织(例如骨、牙齿、软骨、韧带以及皮肤和血管的纤维基质)结构蛋白质所承担的生物学作用一致的。胶原蛋白实际上存在于每一种组织中。

胶原蛋白具有特有的氨基酸组成,大约有三分之一的残基是甘氨酸,大约 15%~30% 的残基是脯氨酸和 4-羟脯氨酸(Hyp)。3-羟脯氨酸和 5-羟赖氨酸(Hyl)也存在于胶原蛋白中,但含量较少。放射性同位素标记实验证明羟化的残基是在蛋白质合成之后才出现的。羟脯氨酸是在脯氨酸羟化酶催化下由脯氨酸残基经羟化产生的。

4-羟脯氨酸在维持胶原蛋白的稳定性方面起着关键作用。这可能是通过分子内的氢键实现的。氢键的形成可能需要 H<sub>2</sub>O 分子起桥联作用。如果胶原蛋白在使羟化酶失活的条件下合成,那么在温度达到 24℃时就失去它的天然构象,而正常的胶原蛋白则需要 39℃下才变性(变性后的胶原蛋白叫做白明胶)。脯氨酸羟化酶需要抗坏血酸(维生素 c)才能维持它的酶促活性。在维生素 c 缺乏症(坏血病)中,合成的胶原蛋白不能形成适当的纤维,导致皮肤损害,血管脆弱,伤口难以愈合。

胶原蛋白的基本组成单位是原胶原蛋白(tropocollagen)分子,是由三条多肽链构成的三股螺旋。在哺乳动物体内至少存在 17 种在遗传上不同的多肽链,构成 10 种胶原蛋白变体,存在于同一个体的不同组织中。典型的胶原蛋白多肽链的氨基酸顺序由单调重复的三联体序列 Gly-X-Y 构成。这里 X 往往是脯氨酸, Y 常常是羟脯氨酸。使羟脯氨酸限于 Y 的位置源于脯氨酸羟化酶的专一性。5-羟赖氨酸有时也出现在 Y 的位置。

胶原蛋白甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸含量高提示它的多肽主链不可能形成类似  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠片的构象。X 射线衍射和模型研究指出,胶原蛋白的每条多肽链具有类似多聚脯氨酸的左手螺旋。多聚脯氨酸在适当的条件下能形成螺距为 0.94 nm、含三个残基的左手螺旋。三条这样的多肽链平行地彼此绕在一起,像缆绳那样轻度扭曲成右手旋转的三股螺旋结构(图 3-16)。模型研究揭示,每条多肽链的第三个残基位于三股螺旋的中心。该中心很窄,只有甘氨酸的侧链才适合。这就解释了为什么胶原蛋白多肽链的每第三个残基必须是甘氨酸的原因。胶原蛋白的这种结构还需要它的三条多肽链错开,以便使三条链的 Gly、X 和 Y 残基绕同一个轴出现在同样的水平上。使错开的肽基定向,便于每个 Gly 的酰胺基与相邻肽链的 X 残基的羰基形成强有力的氢键(图 3-17)。

胶原蛋白装配好的、刚性的三股螺旋结构与它的特殊的张力强度有关。因为组成它的多肽链以相反的方向绞合在一起(图 3-16),螺旋的这种卷曲在张力下是不能散开的。

胶原蛋白的基本单位(原胶原蛋白)在胶原纤维中以一种很特殊的方式组织在一起。每个胶原分子头-尾相连,交错排列,形成特征性的带状胶原蛋白纤维束(图 3-16)。

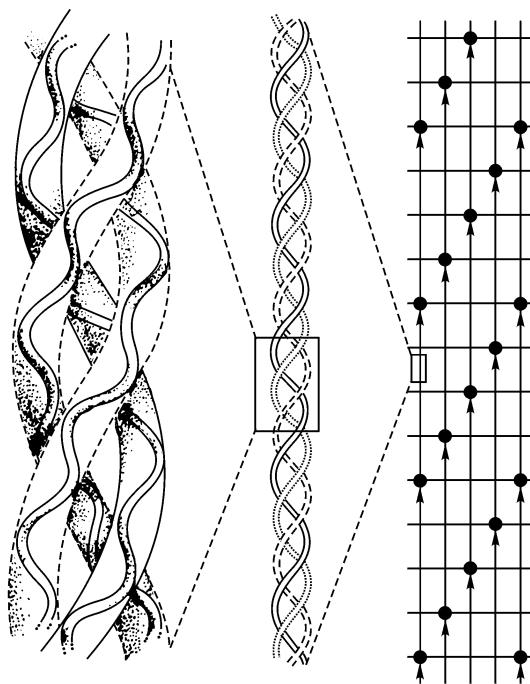


图 3-16 胶原蛋白的三股螺旋  
每条肽链呈左手螺旋,彼此绕在一起,形成一个三股右手螺旋结构

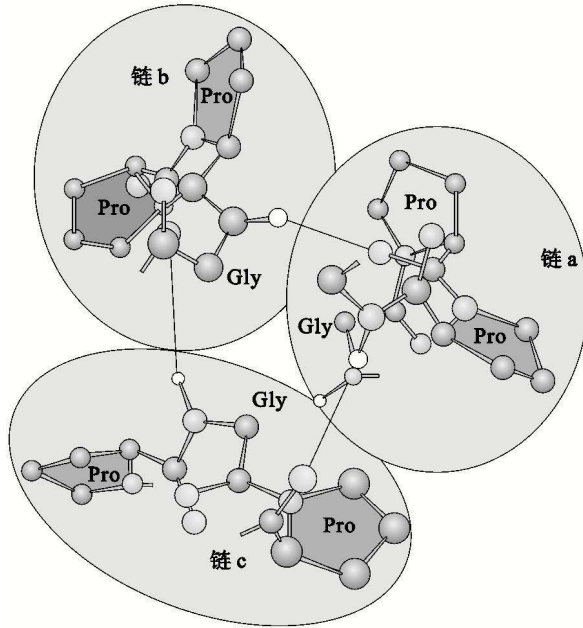


图 3-17 胶原蛋白三股螺旋结构中的氢键

胶原蛋白含有共价结合的糖类,约占总重量的 0.4%~12%,取决于胶原蛋白的组织来源。糖类大多数由葡萄糖、半乳糖和它们的二糖构成:由专一性的酶使其共价地连接到胶原蛋白的 5-羟赖氨酸残基上。糖类存在的意义尚不清楚,可能在指导纤维的装配方面发挥作用。

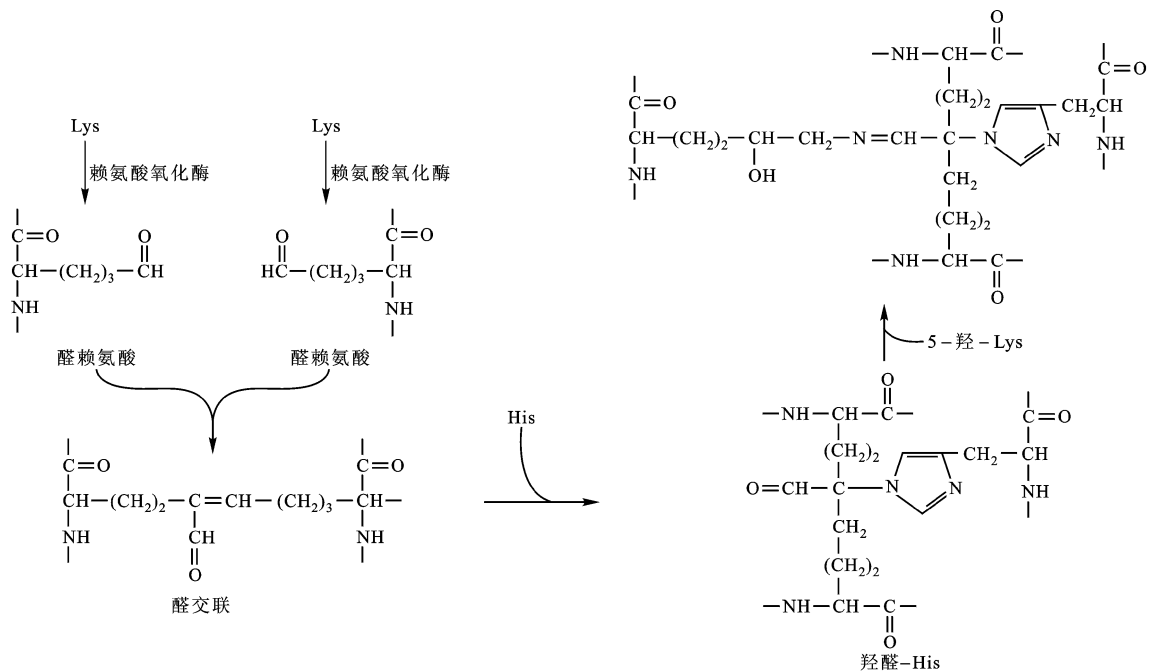


图 3-18 胶原蛋白赖氨酸和组氨酸残基侧链的共价交联

在胶原蛋白分子中,除氢键外,分子内(在原胶原蛋白分子范围内)或分子间(在原纤维的原胶原蛋白分子间)的共价交联也是使胶原分子稳定的重要因素。由于胶原蛋白几乎不含半胱氨酸,因此共价交联不是二硫键,而是由赖氨酸和组氨酸残基的侧链在反应过程中形成的(图 3-18)。赖氨酰氧化酶是一种含铜(Cu)的酶,它将赖氨酸转变成  $\epsilon$ -醛赖氨酸。该酶是唯一在交联过程中牵涉到的酶。原胶原蛋白分子的共价交联并不是随机形成的,它趋向形成于靠近胶原蛋白分子的 N-末端和 C-末端。

胶原蛋白的交联程度随动物的年龄增加而增加。这就是为什么动物越老,肉越嚼不动的原因。事实上,胶原蛋白的单个分子(原胶原蛋白)只能从幼龄的动物组织中抽提。但是,胶原蛋白的交联不是动物老化的原因。

## 第四节 球状蛋白质和三级结构

球状蛋白质构成蛋白质种类的大多数。在天然状态,它们都以紧密的球形分子形式存在。细胞内的大多数生物化学过程都是由它们完成的。这类蛋白质比纤维状蛋白要复杂得多,这是与它们作为生物活性物质的功能密切相关的。蛋白质的三级结构和四级结构通常是针对球状蛋白质而言的。蛋白质的三级结构是指蛋白质分子中的所有原子的三维空间排列,包括它的二级结构要素(如  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠片)和它的侧链在空间上的相互关系。

### 一、三级结构的某些特征

20 世纪 50 年代后期 J. Kendrew 及其同事用 X 射线晶体衍射技术首次测定了鲸肌红蛋白质的空间结构(图 3-1)以来,已研究了几百种以上蛋白质的 X 射线晶体结构。虽然每一种球状蛋白质都是一种特殊的复杂的实体,但是它们的三级结构都有下面一些突出的特点:

(一) 球状蛋白质通常含有  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠两种结构要素

二级结构的基本要素  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠通常出现在蛋白质中,但是两者的比例和组合随蛋白质的不同而有变化。某些蛋白质,例如血红蛋白的  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基,主要是由  $\alpha$ -螺旋构成,螺旋与螺旋之间仅由短的具卷曲构象的片段连接(图 3-19(a))。某些蛋白质,例如伴刀豆球蛋白

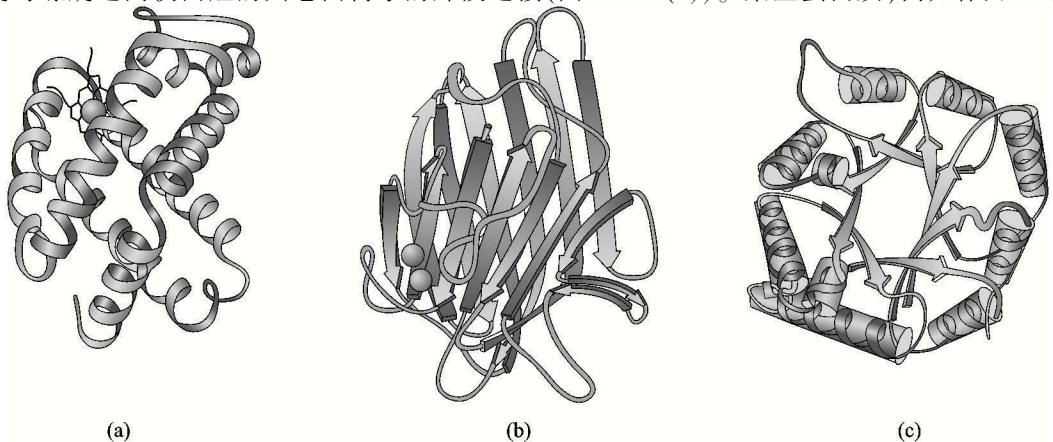


图 3-19 球状蛋白质空间结构示例

(a) 血红蛋白的亚基; (b) 伴刀豆蛋白; (c) 磷酸丙糖异构酶

白(concanavalin)含高比例的 $\beta$ -折叠,但缺乏 $\alpha$ -螺旋(图3-19(b))。在大多数蛋白质中,这两种类型的二级结构占有相当的数量,按平均计, $\alpha$ -螺旋约占31%, $\beta$ -折叠约占28%,磷酸丙糖异构酶(图3-19(c))是这类蛋白质的例子。

#### (二) 侧链基团的定位随它们的极性而变化

球状蛋白质的一级结构一般都缺乏重复顺序或拟重复顺序,这样的顺序与纤维状蛋白质的有规则的构象有关。球状蛋白质中的氨基酸侧链根据它们的极性来安排其空间位置。

1. 非极性残基 Val、Leu、Ile、Met 和 Phe,在大多数情况下,出现在球状蛋白质分子的内部,避开与水分子的接触。这种疏水的相互作用对于维持天然蛋白质的三维结构起着重要的作用。

2. 带电荷的极性残基 Arg、Lys、His、Asp 和 Glu 大多数都是位于球状蛋白质分子的外部,与水溶剂接触。因为这些残基浸没在蛋白质(实际上的)非水内部在能量上是不利的。在极性残基出现在蛋白质分子的内部的情况下,它们通常有特定的化学功能,例如参与催化反应或参与金属离子的结合。

3. 不带电荷的极性残基 Ser、Thr、Asn、Gln 和 Tyr 等通常位于蛋白质分子的表面,但常常也出现在分子的内部。出现在分子的内部时,这些残基几乎总是彼此形成氢键。实际上所有被包埋起来的这些氢键供体都与被包埋起来的氢键受体形成氢键。在某种意义上,氢键的形成“中和了”氢键基团的极性。

#### (三) 球状蛋白质具有紧密堆砌的核心

球状蛋白质是十分紧密的,在它们的内部只有很小很小的空间,以至于连水分子都难以容纳。球状蛋白的这种堆砌比处在晶体中的小分子有机物更有效。它们的侧链像胶束(micelle-like)样排列(极性基团在外侧,非极性基团在内侧)。球状蛋白分子内部的堆砌密度(packing density)(堆砌密度是指在某一区域内的原子被范德华包层所封闭的体积与该区域总体积的比值)平均为0.75,与小分子有机物的分子晶体的堆砌密度处在同一范围内。比较起来,大小相同、密闭堆砌的球体的密度大约为0.74,而有机液体(油滴)的堆砌密度在0.60~0.70之间,因而蛋白质分子内部更像一种分子晶体而不像油滴,即它是被有效堆砌的。

#### (四) 超二级结构

在许多蛋白质中常观察到二级结构要素的某些组合,即超二级结构(supersecondary structure)或者叫做基元(motif)。这些组合包括 $\beta\alpha\beta$ 、 $\alpha\alpha$ 和 $\beta\beta\beta$ 。

1.  $\beta\alpha\beta$ 组合是超二级结构最普遍存在的形式。在这种组合中,两个平行的 $\beta$ -折叠由一个 $\alpha$ -螺旋右手交连(图3-20(a))。

2.  $\alpha\alpha$ 组合由一个环连结两个连续的反平行的 $\alpha$ -螺旋构成(图3-20(b)),因此又称螺旋-环-螺旋基元。这种组合在能量上有利于两个被连接螺旋的侧链之间的接触。该组合出现在多种钙离子结合蛋白中,环中的Glu和Asp残基提供了钙离子结合部位。在某些DNA结合蛋白中,这种结构叫做螺旋-转角-螺旋,因为环只由几个残基组成。

3. 反平行的 $\beta\beta\beta$ 结合是一种 $\beta$ -回纹波形( $\beta$ -meander)或 $\beta$ -发夹( $\beta$ -hairpin)基元。由一条多肽链顺序形成反平行的 $\beta$ -折叠片构成(图3-20(c))。

4. 持续的 $\beta$ -折叠片往往卷成 $\beta$ -桶状(barrel)形式。三种不同的桶式结构于图3-20(d)所示。

超二级结构的存在也许有结构上的和功能上的意义,例如, M. Rossmann 在许多能结合辅酶二核苷酸的蛋白质中观察到 $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ 的组合,这种组合是二核苷酸(如 $\text{NAD}^+$ )的结合部位。

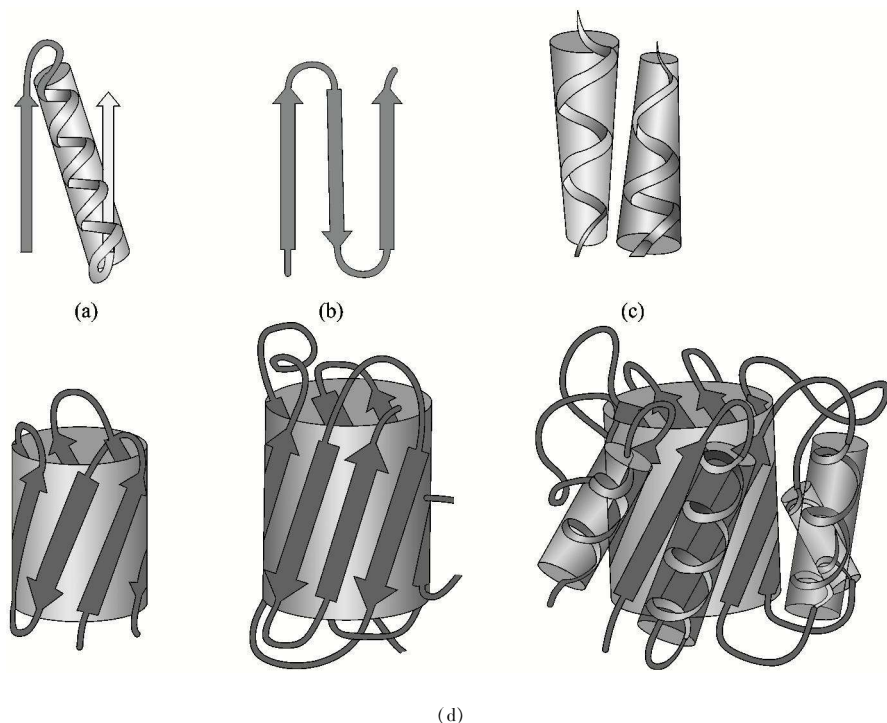
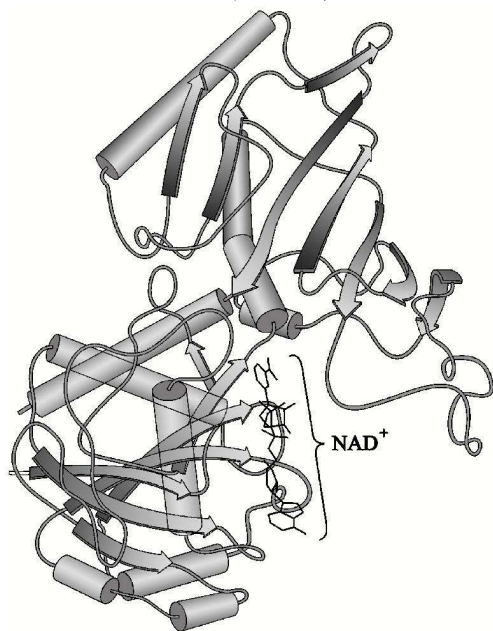


图 3-20 蛋白质超二级结构的几种形式

### (五) 域结构

分子较大的多肽常折叠成两个或多个球状簇,这种球状簇叫做域(domain)。大多数域结构由 100~ 200 个氨基酸残基构成,平均直径约 2.5 nm。例如,甘油醛-3-磷酸脱氢酶的每个亚基有两个不同的域(图 3-21)。一条多肽链在一个域范围内来回折叠,相邻的域常被一个或多个多肽片段连结。因而域在结构上是独立的、具有小分子球状蛋白质特性的单位。一个含有多个域结构的蛋白质在控制水解的条件下往往释放出它的某个域而不会极大地改变它的结构。不过,一个蛋白质的域结构并不总是明显的,因为它的几个域可能彼此广泛地接触而使得该蛋白质看来像是一个单一的实体。

域结构往往有特殊的功能,例如结合小分子。在图 3-21 所示的例子中,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\text{NAD}^+$ )结合到甘油醛-3-磷酸脱氢酶的一个域上。在多域蛋白质中,小分子结合部位往往出现在两个域之间的裂缝处。这就是说,小分子被两个域之间的有关基团结合。出现这种结合方式的部分原因是该蛋白质和小分子之间

图 3-21 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的结构  
(两个不同的结构域清晰可见)

灵活的相互作用的需要。

## 二、蛋白质空间结构稳定的因素

蛋白质多肽链在生理条件下折叠成特定的构象显然是热力学上的一种有利的过程。这告诉我们,在折叠中,总的自由能变化必定是负的。自由能变化的公式是:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

这里,  $\Delta H$  是焓的变化,它大致相当于各种键能之差,  $\Delta S$  是熵的变化,它是系统有序的量度。对于某一给定的转变来说,负的  $\Delta H$  表明,系统从较弱键合到较强键合作用的转变。正的  $\Delta S$  表明,系统从较有序到较无序状态的转变。但是,蛋白质折叠过程涉及从无序到有序的状态转变,因此,该过程必然涉及到混乱度的降低和熵的减少。自由能变化的公式表明,  $\Delta S$  的负值将会产生正的  $\Delta G$ 。构象熵的变化必定对折叠做功。因此,为了解释蛋白质折叠过程总的  $\Delta G$  是一个负值,我们必须探索折叠过程中产生负  $\Delta H$  值的过程或熵值增加的额外原因。

在讨论蛋白质的折叠时,我们不能忽视水的作用,因为讨论蛋白质折叠所涉及的物理化学因素时,必须考虑多肽链与水的相互作用。此外,水溶液中的其他因素,例如小分子的阴离子和阳离子,在决定蛋白质结构的稳定性方面也能起重要的作用。实际上,一个蛋白质折叠所成的特定的结构是各种作用力相互抵消、精巧平衡的结果。这里,我们讨论这些作用力的性质以及对  $\Delta G$  的负值的贡献。

### (一) 静电相互作用

分子是带电颗粒的聚合体,因而可以认为它们的相互作用服从经典的静电学法则。把两个相距  $R$  的电荷  $Q_1$  和  $Q_2$  分开至无限距离所需的功可用下式表示:

$$W = \frac{k \cdot Q_1 \cdot Q_2}{\epsilon \cdot R}$$

这里  $k = 9.0 \times 10^9 \text{ J} \cdot \text{m} \cdot \text{C}^{-2}$ ,  $\epsilon$  是介质的介电常数(在真空下,  $\epsilon = 1$ ; 在大多数情况下,  $\epsilon$  随介质的极性增大)。对于蛋白质分子内部来说,介电常数通常在 2~5 范围,与极性相似的物质如苯和二甲醚的介电常数相似。不同类型的静电相互作用(电荷与电荷、电荷与偶极、偶极与偶极)表现出对两个作用基团间的距离的函数依赖关系。

#### 1. 离子相互作用

蛋白质分子的相反电荷基团的结合称之为盐键、离子键或离子对(图 3-22)。根据前面介绍的方程,典型离子对(例如谷氨酸的侧链羧基和赖氨酸的侧链氨基)当它们的电荷中心处在介电常数为 4 的介质中,被分开 0.4 nm 时的能量大约是  $-86 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。但是,两个被分开离子的溶剂化的自由能(自由离子在水溶液中是高度溶剂化的)与它们的非溶剂化(处在蛋白质分子内部)离子对形成的能量是相等的。因此,尽管离子对形成的自由能比较高,但它们对蛋白质天然结构的稳定性贡献不大。这就解释了这样一种事实,即在蛋白质的疏水的内部很少存在非溶剂化的离子对。然而,由于水分子的偶极性质,暴露在水溶剂中的电荷离子与水分子的相互作用对蛋白质的结构起着稳定的作用。

#### 2. 偶极与偶极间的相互作用

在电中性分子之间的非共价结合统称为范德华力。这种力产生于永久的或诱导的偶极之间的静电相互作用。这些力与那些在非键合的邻近原子间的各种相互作用有关(氢键是一种特殊

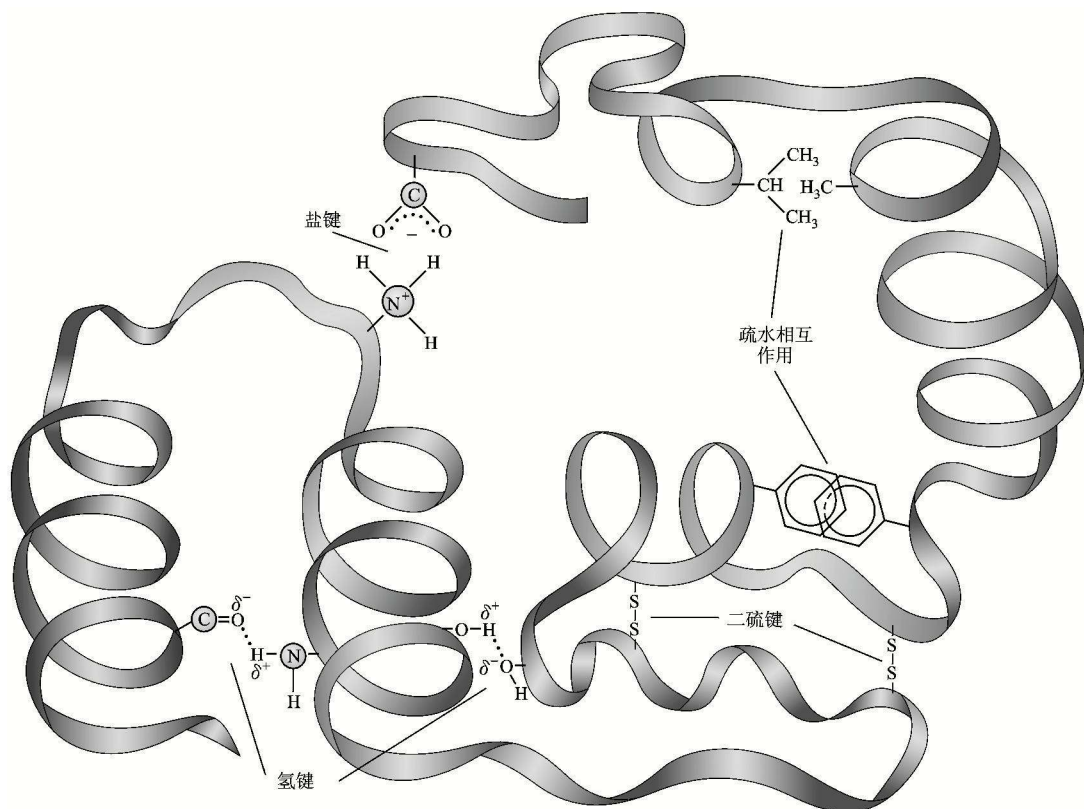


图 3-22 维持蛋白质空间结构稳定的作用力:盐键、氢键、疏水作用和二硫键

的偶极相互作用,我们将分开来讨论)。

永久偶极间的相互作用是蛋白质结构稳定的重要因素。因为许多基团,例如肽主链上的羰基和酰胺基,有永久的偶极矩。这些相互作用比离子对间电荷的相互作用弱得多。但是,在 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠中,多肽主链上的羰基和酰胺基都指向同一方向(图 3-23(a)),所以,它们的相互作用是可以联合和相加的。(当然,这些基团也能形成氢键,但这里我们只涉及它们的剩余电场)。在蛋白质低介电常数的核心中,偶极与偶极的相互作用极大地影响蛋白质的折叠。

永久偶极可以诱导邻近基团的瞬时偶极,结果产生相互间的吸引(图 3-23(b))。这种偶极-诱导偶极间的相互作用一般比永久偶极间的相互作用弱。

虽然非极性分子在任何距离上都几乎是电中性的,但是,由于它们电子的快速波动,使它们可以产生小的瞬时偶极。短暂的瞬时偶极使邻近基团的电子极化,因而也产生一种瞬时偶极,结果使得那些接近范德华接触距离的基团彼此吸引(图 3-23(c))。这种范德华力称为 London 分散力。London 分散力很弱,但是在蛋白质分子中,众多原子间的接触就使得这种分散力在决定蛋白质构象中成为一种主要的影响因素。

范德华力实际上包含静电吸引和排斥两种相反的作用力。上面介绍的偶极间的相互作用是静电吸引。但是,当非键合原子间彼此太接近时,就会产生排斥力。这种排斥作用是原子间电子云重叠的结果。如果两个非键合原子或分子只由范德华力维持,那么它们的平均间距则由范德华引力和斥力间的平衡来决定。这种间隔距离称作范德华间距(Van der Waals separation)或范

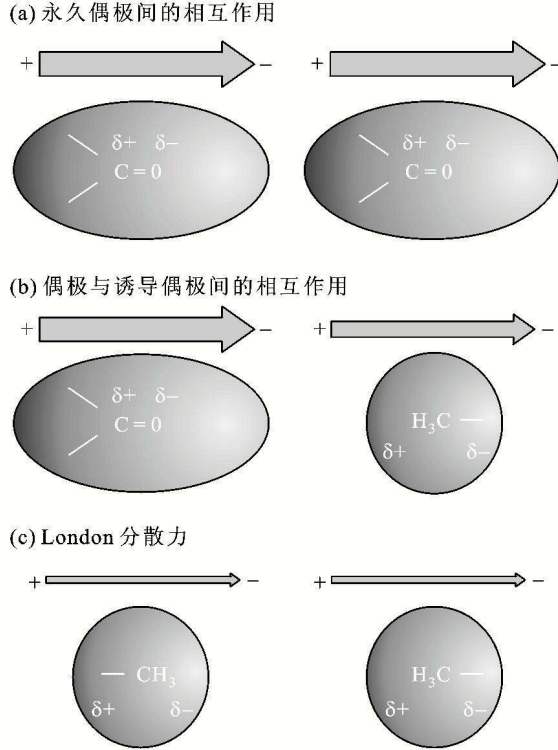


图 3-23 偶极-偶极间的相互作用

德华接触距离 (Van der Waals contact distance)。两个非键合原子间的范德华间距由它们各自的范德华半径共同决定。

(二) 氢键

氢键 (D—H...A) 是一种由弱酸性的供体基团 (D—H) 和一个具独对电子的原子 (A) 之间形成的最显著的静电作用力 (图 3-22)。在生物学系统中, D 和 A 两者都是高电负性的 N 和 O 以及 S 原子。氢键的结合能大约是  $-12 \sim -30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 与范德华力相比, 它有较强的方向性。D...A 间的距离正常情况下为  $0.27 \sim 0.31 \text{ nm}$ 。氢键由于供体 D—H 键沿受体独对电子轨道指向而趋于直线。蛋白质具有众多的供体和受体, 包括主链的羰基和酰胺基以及极性侧链基团。

由于蛋白质分子内部的氢键结合基团几乎都有可能形成氢键, 显然氢键对蛋白质的结构有很大的影响。但是, 处在未折叠状态的蛋白质, 它的所有能形成氢键的基团都与水形成了氢键。内部氢键授予天然蛋白质稳定的自由能是与天然蛋白质和未折叠蛋白质之间氢键自由能之差相等。由于这里所讨论的氢键大体上都有相同的自由能, 因此内部氢键不可能有效地使天然蛋白质的结构相对于它的未折叠的状态更稳定。但是, 蛋白质的内部氢键为它的天然折叠格局提供了结构基础。如果蛋白质以阻止它的某些内部氢键形成的方式折叠, 那么就会损失一部分自由能, 这种构象就会比所有氢键完全形成时的构象的稳定性低得多。

在很多情况下, 多肽链的极性基团与水分子之间形成的氢键和静电作用力产生有利蛋白质结构稳定的焓 (负值)。焓系统在获得有利于水化作用的总的自由能方面通常比熵更重要。

(三) 疏水作用

疏水作用是因非极性物质减少它们与水的接触以及双性分子 (例如肥皂和去垢剂) 在水溶液

中形成胶束的作用而得名。由于天然蛋白质形成一种分子内的胶束,在这种结构中,大多数非极性侧链不与水溶剂接触,因此非极性基团的疏水相互作用必定是蛋白质结构重要的决定因素。

有两种很重要的熵,一种涉及多肽链,另一种涉及水。

疏水作用源于水作为溶剂的特殊性质。表 3-1 的热力学数据为疏水作用的产生提供了重要的依据,因为碳氢化合物从水中转移到非极性溶剂中与非极性侧链从处在水溶液中的蛋白质外部转移到内部是相似的。碳氢化合物从水溶液中转移到非极性溶剂中的自由能的变化( $\Delta G$ )是负值。这种变化表明,这样的转移过程是一个自发的过程(油和水是不会混合的)。脂肪族化合物的转移过程是吸热的,即 $\Delta H$ 为正值,但是 $\Delta G$ 是负值。表明这种转移过程是熵增所推动的。同样,可以认为蛋白质的非极性基团从水溶液环境中转移到蛋白质非极性内部也是熵增所推动的。

表 3-1 碳氢化合物从水转入到非极性溶剂中的热力学变化(25 °C)

过 程	$\Delta H$ /kJ·mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ /kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ /kJ·mol <sup>-1</sup>
CH <sub>4</sub> 从水转移到苯中	11.7	-22.6	-10.9
CH <sub>4</sub> 从水转移到四氯化碳中	10.5	-22.6	-12.1
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> 从水转移到苯中	9.2	-25.1	-15.9
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> 从水转移到苯中	6.7	-18.8	-12.1
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 从水转移到苯中	0.8	-8.8	-8.0
水中的苯转变成液态苯(18°C)	0	-17.2	-17.2
水中的甲苯转变成液态甲苯(18°C)	0	-20.0	-20.0

熵是一系统有序的量度,它随有序度的增加而减少。当非极性分子或非极性侧链被水溶剂化时,熵就会减少,因为非极性物质与水接触引起水分子在它们周围形成像笼状的结构(图 3-24),这种有序化使该系统的混乱度降低,并伴随熵的减少。

蛋白质通常含有相当数量的疏水侧链基团(例如 Leu、Ile、Phe 等的侧链)。当多肽处在未折叠状态时,这些疏水基团与水接触,极性的水分子诱导非极性基团产生偶极,可以与水分子产生静电相互作用,引起周围水的结构有序化。但是疏水侧链具有避开水的倾向,当它们减少与水接触时,就会从水中转入到蛋白质分子内部。这时,疏水基团周围氢键结合的水分子就会从有序状态释放出来,变成自由水分子,从而导致熵的增加。这样,疏水基团内聚化能够增加

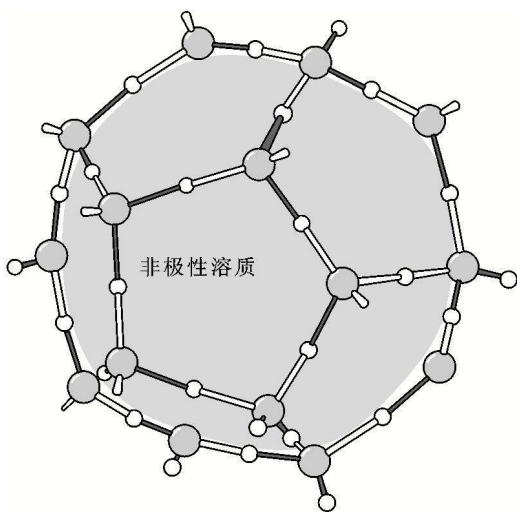


图 3-24 在非极性分子周围由水分子形成的笼状结构

整个系统(蛋白质和水)的混乱度,因而导致折叠时的熵增,这给折叠过程的自由能变化贡献负

值,增加蛋白质的稳定性。

在蛋白质的折叠过程中,既涉及多肽链从无序到有序的转变,也涉及水从有序到无序的变化。从整个(而不是单指非极性基团的内聚化)折叠过程而言,总熵的变化是于折叠不利的(较小的负值)。但是整个折叠过程中焓的变化却是有利的(负值),尽管非极性基团的内聚导致焓的增加(正值)。有利焓变的产生主要是蛋白质分子极性侧链基团与水分子之间形成的氢键及各种静电作用的结果。总的自由能的变化对折叠有利( $\Delta G$  为负值)是因为有利的焓系统超过了不利的熵系统(图 3-25)。

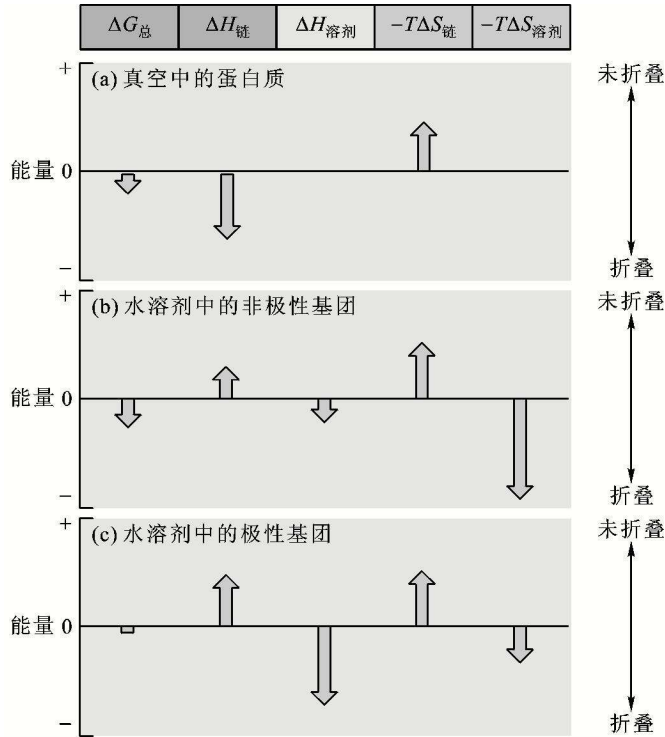


图 3-25 蛋白质折叠时多肽链和溶剂(水)的焓变( $\Delta H_{\text{链}}$ 和 $\Delta H_{\text{溶剂}}$ )和熵变( $\Delta S_{\text{链}}$ 和 $\Delta S_{\text{溶剂}}$ )

根据对天然蛋白质空间构象中的单个侧链基团定位的详细分析,表明它们都是定位在预期会对天然结构的稳定性作出贡献的部位,非极性侧链基团被包埋在蛋白质结构的内部,而极性侧链基团则位于蛋白质结构的表面,并和环境水分子结合。当极性基团,尤其是主链上的羰基和酰胺基不与水结合时,它们总是强烈地彼此结合,其结果往往产生连续的重复结构,如 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -结构。

#### (四) 二硫键

二硫键也是维持某些蛋白质空间结构稳定的重要因素,它是由两个半胱氨酸的侧链—SH 氧化形成的(图 3-22)。但是,相对还原的细胞质特性会极大地降低细胞内二硫键的稳定性。事实上,几乎所有含有二硫键的蛋白质(例如核糖核酸酶 A 和胰岛素)都分泌到比较氧化的细胞外的特定部位。在那样的部位中,蛋白质的二硫键才能有效地发挥稳定其结构的作用。显然,对蛋白质相对“敌意”的细胞外环境(例如非控制的温度和 pH)需要由二硫键授予额外的结构稳定

性。细胞内的环境趋于使巯基保持还原状态。这可能是细胞内的蛋白质很少含二硫键的原因。

核糖核酸酶 A 的变性和复性实验证明,二硫键是在蛋白质折叠成它的天然结构后形成的。这就是说,二硫键的形成不是任意的,只有那些因肽链折叠而处在特定部位的半胱氨酸的侧链巯基才能形成有效的二硫键(图 3-26)。

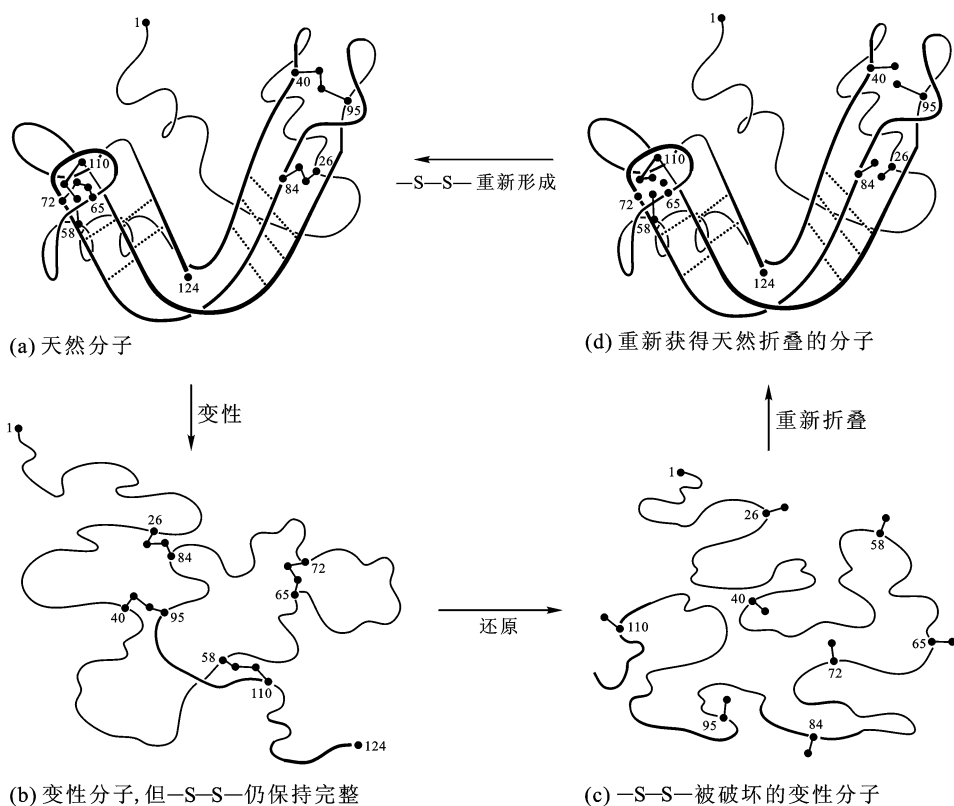


图 3-26 核糖核酸酶 A 的正确折叠与二硫键的形成

在体内,虽然二硫键能自发形成(可能涉及与氧化型谷胱甘肽二硫键的交换反应),但蛋白质二硫键异构酶(rotein disulfide isomerase)能通过交换反应催化二硫键的正确形成。

此外,某些含金属离子的蛋白质,例如含锌指(Zinc finger)基元的蛋白质,在它们的分子结构中含有一个或两个被 Cys、His 四面体协同结合的  $Zn^{2+}$  (图 3-27)。由于  $Zn^{2+}$  的存在,能与来自 Cys 和 His 上的 S、N 等原子产生强的相互作用,使锌指结构变得稳定。

### 三、蛋白质的变性与复性

#### (一) 蛋白质的变性导致空间构象的破坏

蛋白质的热力学研究表明,在生理条件下,天然蛋白质构象上的低稳定性很容易因改变维持天然构象稳定的非共价力的平衡而遭受变性(denaturation)。当溶液中蛋白质加热变性时,它的构象上的敏感特征,如比旋度、粘度和紫外吸收在一个很窄的温度范围内急剧变化。这样一种变化表明,天然蛋白质的结构以一种协同的(即几乎同时的)方式被破坏:即蛋白质的结构只要有任

有趣的是,某些适温细菌(它们生长在接近 100 °C 的温泉中)的热稳定蛋白的 X 射线分析表明,这些蛋白质的结构与它们正常稳定的同类蛋白质的结构没有明显差别。这是结构生物化学家感兴趣的课题。

除高温外,其他许多物理或化学的因素都可以引起蛋白质的变性。pH 的变化会改变氨基酸残基侧链的离子化状态,从而影响蛋白质的电荷分布和氢键的稳定性。去垢剂(detergents),例如十二烷基硫酸钠(SDS),由于能与蛋白质的非极性侧链相互作用而破坏稳定天然蛋白质结构的疏水相互作用。如果去垢剂还带有电荷,那么它们也能破坏蛋白质分子内的氢键。其他试剂如尿素和胍离子能与蛋白质的氢键基团形成更强的氢键,从而破坏蛋白质分子内原有的氢键。这两种试剂也能破坏蛋白质分子内原有的疏水相互作用。这可能是由于它们的高度水溶性,当与蛋白质结合后增大了非极性侧链在水中的溶解度。

盐类对蛋白质结构稳定性的影响是不同的。某些盐,例如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  能稳定核糖核酸酶 A 的蛋白质结构(即增强其热稳定性);某些盐,(例如  $\text{KCl}$  和  $\text{NaCl}$ )对该酶影响不大;还有的盐,如  $\text{KSCN}$  和  $\text{LiBr}$  则使该蛋白质结构变得不稳定。不同离子对蛋白质稳定性的影响与它们盐析蛋白质的能力相平行。趋于使蛋白质变性的离子( $\text{I}^-$ 、 $\text{ClO}_4^-$ 、 $\text{SCN}^-$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Ba}^{2+}$ )叫做离液序列(chaatropic)离子,上面提到的胍离子( $\text{Gu}^+$ )和无离子的尿素也应包括在其中。各种离子对蛋白质的影响主要是积累性的。硫氰酸胍( $\text{GuSCN}$ )与常使用的盐酸胍( $\text{GuCl}$ )相比是更强烈的变性剂,而硫酸胍( $\text{GuSO}_4$ )则有利于蛋白质结构的稳定。

离液试剂能增大非极性物质在水中的溶解度,因此它们作为变性剂的作用是由于它们破坏蛋白质分子内部的疏水相互作用的能力。但这类试剂引起变性的主要原因仍然不清楚。

### (二) 蛋白质的复性实验

正如前面所讨论的,当改变蛋白质天然构象存在的条件,蛋白质特有的天然构象就会遭受破坏,生物活性以及天然蛋白质所具有的性质就会失去。虽然早就认识到在大多数情况下,除去变性因素后,蛋白质天然折叠结构应该是可以恢复的(即复性,renaturation),但是直到 1975 年 C. Anfinsen 完成了核糖核酸酶 A 的复性实验才真正搞清楚蛋白质复性的原因。

核糖核酸酶 A(RNase A)是由 124 个氨基酸残基构成的单链蛋白。在它的天然结构中,存在四个二硫键(26 和 84、40 和 95、58 和 110、65 和 72)(图 3-26)。假定这个酶在变性条件下(含有巯基乙醇的  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素中)使其成为随机卷曲的状态,除去还原剂后二硫键可以重新形成。但所得到的酶活性只有天然酶活性的约 1%。只有当除去巯基乙醇和尿素后,酶的活性才能完全恢复。这是因为按照概率的计算,核糖核酸酶 A 分子中的八个半胱氨酸残基的侧链巯基之间可以有 105 种配对方式(第一个巯基可以有 7 次机会挑选配对者,第二个巯基有 5 次,第三个巯基有 3 次,第四个巯基有 1 次,即  $7 \times 5 \times 3 \times 1 = 105$ )。但只有其中一种才是正确的配对方式,即只有约 1% 的机会才重新折叠成天然的构象。Anfinsen 证明变性的核糖核酸酶 A 只有当它处在

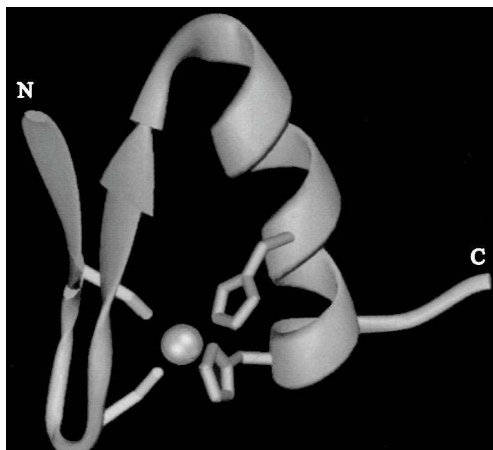


图 3-27 金属离子参与蛋白质结构稳定  
(此处示出的是锌指基元)

天然构象稳定的条件下才能重新形成它的正确的二硫键,并恢复酶的活性。这只有当该酶重新把—SH 安置在正确的配对位置才能予以解释(图 3-26)。这意味着—S—S—不是正确折叠所必须的。这个实验充分证明了蛋白质特定的空间构象是由它的一级结构即氨基酸顺序决定的。

在蛋白质合成后的加工中,二硫键的形成可以使它们保持有活性的天然状态。例如有活性的胰岛素(insulin)是由 A 链和 B 链构成的蛋白质激素。这两条肽链由两个二硫键结合在一起(A 链第 7 位及 20 位的 Cys 残基和 B 链第 7 位及 19 位的 Cys 残基分别形成两个二硫键)。在体外,试图从 A 链和 B 链出发重新构成有活性的胰岛素,却很难得到具有正确巯基配对的分子。但是它的前体——胰岛素原(proinsulin)却可以折叠产生有利于巯基正确配对的构象。胰岛素原是由 84 个氨基酸残基组成的单链分子(图 3-28),与胰岛素相比较,即可看出前体分子在 A 链和 B 链之间有一段连接肽(C 肽)。这表明这个连接肽含有胰岛素分子正确折叠所必需的信息,也表明胰岛素天然构象中二硫键的连接部位是在被修饰前就已经安置好了。有活性的胰岛素是由它的前体切除连接肽后转变而来的。

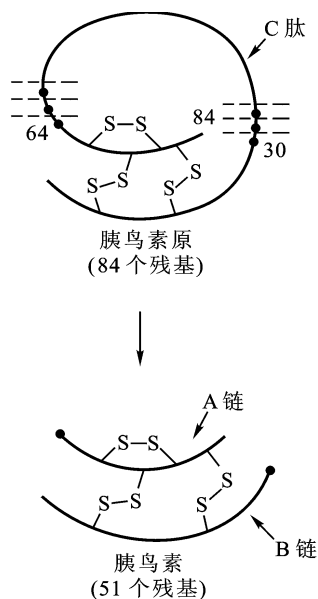


图 3-28 胰岛素原和胰岛素的一级结构示意图

#### 四、蛋白质折叠途径

##### (一) 多肽链的折叠是一个有序的过程

任何一种蛋白质都有它特定的天然折叠结构。最初认为可能存在指导蛋白质折叠的“模板”,但即使有这样的模板存在,也难以解释蛋白质折叠的多样性。事实上,蛋白质在生理条件下能自发地折叠成它们的天然构象,即决定蛋白质三维空间结构的信息存在于它们特定的氨基酸序列中,不需要模板去指导它们的形成。

蛋白质究竟是怎样折叠成它的天然构象?人们猜测这可能是一个随机的过程,即在各种可能的构象中摸索,最终形成该蛋白质的天然构象。但这显然是不可能的。根据保守计算,一个由 100 个残基构成的蛋白质以随机的方式去探索其可能达到的构象大约至少需  $10^{87}$  s。实际上,许多蛋白质只需几秒钟甚至不到 1 s 即可折叠成它们的天然构象。因此,它们必定通过某种有序的途径到达构象上稳定的天然状态。

通过对一些蛋白质例如牛胰蛋白酶抑制剂和核糖核酸酶折叠过程的研究,对于蛋白质折叠过程有了较多的认识。目前认为折叠过程包括下面几个阶段(图 3-29):

① 随机卷曲的多肽链首先折叠形成小段  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠。这些小段的二级结构起着晶核的作用。这是一个快速而可逆的过程,可在千分之一秒内完成。

② 由于蛋白质多肽链的疏水侧链具有避开水的倾向,因而产生一种叫做疏水折叠(hydrophobic collapse)的推动力,从而形成疏水核。这种折叠状态称为“熔融小球”(molten globule),它是一种折叠的、构象上可变的、多肽链折叠的中间状态。在这种“熔融小球”中,存在天然蛋白质的二级结构,但基本上缺少三级结构。

③ 大约经过千分之几秒钟后,二级结构变得稳定,三级结构开始形成。在这一阶段中,二级

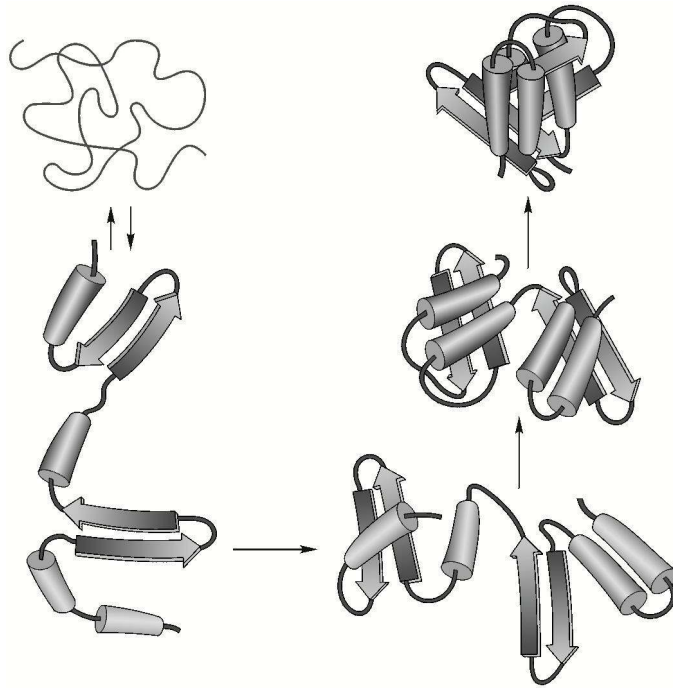


图 3 - 29 蛋白质折叠模型

结构要素形成亚域结构(subdomain)。此时域结构尚未完全形成。

④ 对单域(single - domain)的小分子蛋白质来说,折叠的后期阶段只需几秒钟。蛋白质经受一系列包括构象调整在内的复杂运动,当把剩余的水分子从疏水核心排除出去后,便有利于相对刚性的内部侧链的包装和氢键的形成。至此,单域蛋白质的折叠即告完成。

在多域和多亚基蛋白质中,各个域结构以类似单域小分子蛋白质折叠的方式装配。在经过小的构象调整后,便形成天然蛋白质的三级结构或者四级结构。

### (二) 分子伴侣

在体内,当蛋白质开始合成时,折叠即开始,因此,体外变性蛋白的复性过程也许不同于体内蛋白质的折叠过程。体内蛋白质的折叠是在高浓度其他蛋白质存在下发生的,蛋白质分子彼此间可能发生重要的相互作用(例如多肽链的聚集),并且可能对折叠产生不利的影响。

分子伴侣(molecular chaperones)对体内某些蛋白质的正确折叠可能是不可缺少的。分子伴侣是一类蛋白质,其中许多分子伴侣最初叫做热激蛋白(heat shock protein,简称为HSP),因为升高温度能提高它们合成的速度。在原核和真核生物中,有两个主要类别的分子伴侣:相对分子质量为  $70 \times 10^3$  的HSP70家族和由较大的多亚基构成的伴侣蛋白(chaperonins)。分子伴侣能与部分折叠的多肽链有效地结合。这些折叠的中间状态与天然折叠的蛋白质相比是不紧密的,它们含有大量的二级结构甚至某些三级结构,但它们经受着相对较大的构象波动。伴侣分子能识别它们靶蛋白暴露的二级结构要素,阻止疏水性片段的不适当的结合(即非天然的折叠以及多肽的聚集与沉淀)。这种性质对于多域蛋白或多亚基蛋白特别重要,因为它们的各成员必须在它们能彼此适当结合之前完全折叠。分子伴侣也允许能使错误折叠的蛋白质重新折叠成它们的天然构象。

## 五、蛋白质结构预测

由于蛋白质的一级结构规定它的空间结构,因此至少在原则上,从蛋白质的氨基酸序列预测它的天然结构是可能的。运用理论或经验方法也可以对蛋白质的结构进行预测。理论方法是运用物理化学原理,测定蛋白质的最低能量构象,这需进行十分复杂的数学运算。

经验方法通常比理论方法容易使用,并且也相当成功。这个方法是由 P. Chou 和 G. Fasman 提出的,并且为这个方法的运用作了两个规定。一是某给定氨基酸残基在一组蛋白质结构的  $\alpha$ -螺旋中出现的频率 (frequency), 以  $f_\alpha$  表示:

$$f_\alpha = n_\alpha / n$$

这里,  $n_\alpha$  代表出现在  $\alpha$ -螺旋中的某给定氨基酸残基数,  $n$  代表在这组蛋白质中的总的残基数。另一个规定是某特定氨基酸出现在  $\alpha$ -螺旋中的概率 (probability), 用  $P_\alpha$  表示:

$$P_\alpha = f_\alpha / \langle f_\alpha \rangle$$

这里,  $\langle f_\alpha \rangle$  是全部 20 种氨基酸残基  $f_\alpha$  的平均值。因此,  $P_\alpha$  值  $>1$  表明一个残基以比平均频率大的概率出现在  $\alpha$ -螺旋中。一个残基出现在  $\beta$ -折叠中的概率 ( $P_\beta$ ) 的规定与  $P_\alpha$  相似。表 3-2 列出了氨基酸残基在不同球状蛋白质中出现的相对概率。根据一个残基出现的概率,可以把这个残基归类为二级结构的强形成者(H)、形成者(h)、弱形成者(I)、中立者(i)、弱破坏者(b)或强破坏者(B)。

表 3-2 氨基酸残基在不同球状蛋白质中出现的相对概率

氨基酸	$\alpha$ -螺旋 ( $P_\alpha$ )	$\beta$ -折叠 ( $P_\beta$ )	$\beta$ -转角 ( $P_t$ )
Ala	1.29	0.9	0.78
Cys	1.11	0.74	0.80
Leu	1.30	1.02	0.59
Met	1.47	0.97	0.39
Glu	1.44	0.75	1.0
Gln	1.27	0.80	0.97
His	1.22	1.08	0.69
Lys	1.23	0.77	0.96
Val	0.91	1.49	0.47
Ile	0.97	1.45	0.51
Phe	1.07	1.32	0.58
Tyr	0.72	1.25	1.05
Trp	0.99	1.14	0.75
Thr	0.82	1.21	1.03
Gly	0.56	0.92	1.64
Ser	0.82	0.95	1.33
Asp	1.04	0.72	1.41
Asn	0.90	0.76	1.23
Pro	0.52	0.64	1.91
Arg	0.96	0.99	0.88

根据表 3-2 列出数据可以归纳出预测蛋白质二级结构的一般规则:

① 任何一段六个或更多残基的片段,如果 $\langle P_\alpha \rangle \geq 1.03$ ,或者 $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$ 即可预测该片段是 $\alpha$ -螺旋。但这不包括脯氨酸,它只能出现在 $\alpha$ -螺旋的 N-末端。

② 任何一段五个或更多残基的片段,如果 $\langle P_\beta \rangle \geq 1.05$ ,或者 $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$ ,即可预测该片段呈 $\beta$ -折叠。

③ 检查一个连续的四肽,如果 $\langle P_\alpha \rangle < 0.9$ , $\langle P_i \rangle > \langle P_\beta \rangle$ ,则有形成 $\beta$ -转角的机会。对于 $\beta$ -转角的预测比较复杂,但在大多数情况下也是可以做到的。

从表 3-2 可以看出,Leu、Met、Glu 和 Ala 都是 $\alpha$ -螺旋的强形成者;Ile、Val、Phe 和 Try 是 $\beta$ -折叠的强形成者;Pro 和 Gly 是 $\alpha$ -螺旋的强破坏者,Pro 也不适合于 $\beta$ -折叠中。Pro 和 Gly 往往出现在 $\beta$ -转角中,而 Val 则不会出现。此外,在 $C_\beta$ 位有分支的残基(例如 Ile 和 Thr)连续出现则使 $\alpha$ -螺旋去稳定。除对少数氨基酸残基出现的部位能做出结构上的解释外,大多数氨基酸残基为什么会出现在这种或那种二级结构中仍不能做出明确的解释。

关于蛋白质三级结构的预测目前很少获得成功。这可能是因为蛋白质高度有序的折叠太关键性地取决于特定的侧链基团的相互作用,而这些相互作用在蛋白质的顺序中往往来自远距离的彼此运动。目前所知的是,如果两种蛋白质氨基酸序列是相似的,那么两者的三级结构也可能是相似的。

## 第五节 寡聚体蛋白质和四级结构

生物体内的许多蛋白质都含有两个或多个折叠的多肽链,它们彼此聚集,构成一个完整的、有功能的实体。这种蛋白质称为寡聚体蛋白质(oligomeric protein)。在寡聚体蛋白质中,每一个折叠的多肽链称为亚基(subunit)。亚基可以相同,也可以不相同,这取决于寡聚体蛋白质的亚基组成。

### 一、四级结构研究的内容

由于寡聚体蛋白质是由多个亚基组成的,而每个亚基有它本身的折叠结构(三级结构),那么研究寡聚体蛋白质中亚基的数目和亚基间的相互关系(即它们的空间位置)就构成了寡聚体蛋白质四级结构研究的主要内容。

在寡聚蛋白质中,稳定亚基间相互关系的作用力与维持蛋白质的三级结构的作用力相同,在某些情况下也许还涉及到链间的二硫键。亚基间的接触部位非常类似单亚基蛋白质的内部。

在研究寡聚体蛋白质的结构中,有时使用原体(protoimer)这一名称。原体可由一条肽链(一个亚基)构成,也可以由几条不同的肽链(几个不同的亚基)构成。例如血红蛋白是由两个 $\alpha$ -亚基和两个 $\beta$ -亚基构成的四聚体( $\alpha_2\beta_2$ )。在血红蛋白中,一个 $\alpha$ -亚基和一个 $\beta$ -亚基组合成一个原体。在这个意义上说,血红蛋白是由两个原体构成的一种二聚体。

### 二、寡聚体蛋白质亚基的对称性

在寡聚体蛋白质中,虽然每个亚基本身是不对称的,但是,整个寡聚体的四级结构却是对称的,即原体(或亚基)在几何学上占据寡聚体对等的位置。但是,蛋白质不可能倒置或镜像对称,因为这样一种对称结合把手性 L-残基转变成 D-残基。因此,蛋白质只有旋转对称(rotational

symmetry) 这样一种类型的对称方式。

### (一) 环状对称

环状对称(cyclic symmetry)是一种最简单的旋转对称。在这种对称方式中,亚基(或原体)绕单一的旋转轴排列(图 3-30)。如果有两个亚基(或原体),则这个轴即称为二重旋转轴,把四级结构绕这个轴旋转  $180^\circ$  即可产生与原初结构相同的结构;如果有三个亚基绕三重旋转轴排列,只需绕这个轴旋转  $120^\circ$ ,即可得到相同的结构。具有 2、3、4……或  $n$  重旋转轴的物体可以说分别有  $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ ……或  $C_n$  对称。一个具有  $C_n$  对称的寡聚体由  $n$  个原体(或亚基)组成,每个原体绕  $360^\circ/n$  旋转即可重合。

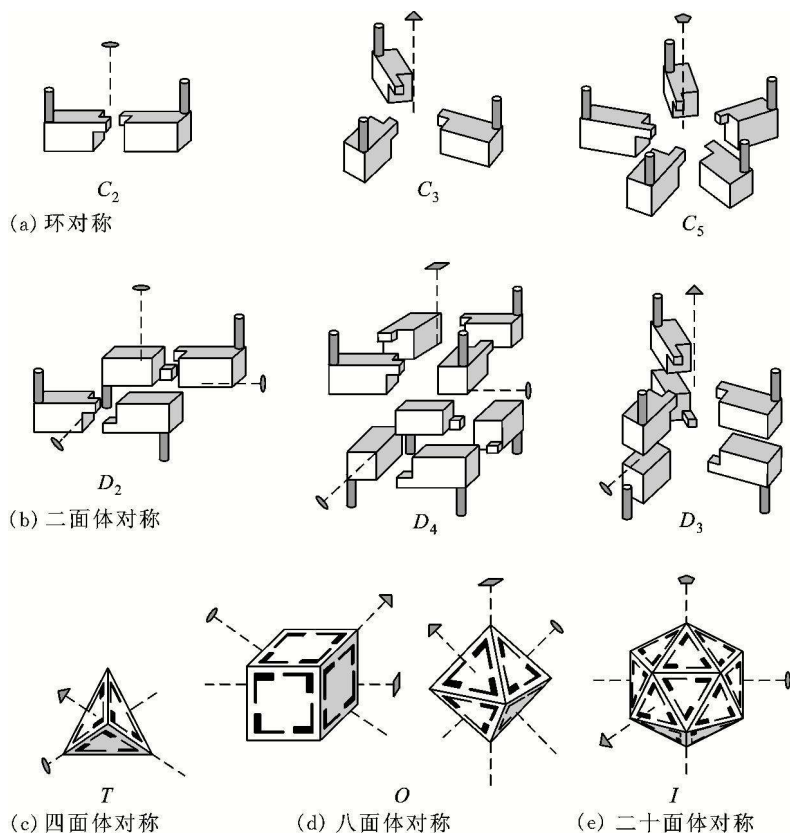


图 3-30 寡聚体蛋白质的对称类型

$C_2$  对称在蛋白质中是最普遍的对称。在这种对称中,每个原体相对于另一个原体绕  $180^\circ$  即可重合。设想在每个原体中有 A 和 B 两个相互作用的基团,例如 A 可能是氢键供体,B 可能是氢键受体。在这种情况下,二重对称意味着两者相互作用的出现,即绕二重旋转轴安排它们的位置。这种相互关系叫做同构异素(isologous)。每当二重旋转轴存在时,这种情况就会出现。二聚体是所有四级结构中最普遍的,并且它们几乎总是以这种方式结合在一起。

### (二) 二面体对称

二面体对称(dihedral symmetry,  $D_n$ )是一种比较复杂的旋转对称。当一种结构至少具有一个  $n$  重旋转轴和一个二重旋转轴并以直角横切时即可产生二面体对称(图 2-30(b))。一个具

有  $D_n$  对称的寡聚体由  $2n$  个原体组成。 $D_2$  对称在蛋白质中是一种最普遍的二面体对称。在适当的条件下,许多具有  $D_n$  对称的寡聚体将解离成两个具有  $C_n$  对称的寡聚体,并且在  $D_n$  寡聚体中绕二重轴即可重合。这些已解离的寡聚体在更严格的条件下又可解离成原体。

### (三) 其他类型的旋转对称

除上述旋转对称外,还有四面体(T)、八面体(O)和二十面体(I)旋转对称,它们分别有 12 个、24 个和 60 个对等的位置(图 3-30(c)、(d)、(e))。在球状病毒(spherical viruses)的蛋白质外壳中,亚基的排列就是以二十面体对称为基础的。

## 三、亚基组成的测定

在一个寡聚体蛋白质中,不同亚基的数目可以用末端分析而获得。理论上,一个蛋白质亚基的组成也可以通过将它的相对分子质量同它的亚基的相对分子质量进行比较来确定。但是,在实际操作中存在实验上的困难,例如,完整的蛋白质可能部分解离或者相对分子质量测定不准确。这些都会导致产生错误信息。下面的方法可以比较有效地用来测定寡聚体蛋白质的亚基组成。

### (一) 杂交法提供四级结构的信息

对于在一级结构上存在微小差别来自不同生物的某种蛋白质,或者来自同一种生物的某种蛋白质的不同变体,可以采用杂交的方法来测定它的亚基组成。把两种已分离纯化的寡聚体蛋白质混合在一起,在温和的条件下变性(例如改变 pH 或加入尿素),使其解离成亚基,然后去除变性因素使它们重新装配(组合)。如果天然蛋白质是  $n$ -聚体( $S_n$  和  $S_{n'}$ ),那么用这种方法将产生  $(n+1)$  个由混合亚基组成的杂交分子( $S_n$ 、 $S_{n-1}S_1$ 、 $S_{n-2}S_2$ 、 $\dots$ 、 $S_{n'}$ ),用电泳的方法对它们进行分析。

利用杂交法提供蛋白质四级结构信息的例子是脊椎动物乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。将 LDH 的两种变体 M 型(在肌肉组织中占优势)和 H 型(在心肌中占优势)采用反复冻融的方法使其杂交,产生 LDH 的五种同工酶,它们分别具有  $M_4$ 、 $M_3H$ 、 $M_2H_2$ 、 $MH_3$  和  $H_4$  的亚基组成,从而证明 LDH 是一种四聚体(见第四章第六节)。

### (二) 交联法

对于那些亚基易于解离的寡聚体蛋白质来说,分析四级结构的一种很有用的方法是交联法(cross-linking)。戊二醛(glutaraldehyde)是一种常使用的交联剂。如果在排除分子间反应的有效低浓度下进行,那么交联反应则只是使分子内的亚基发生共价结合,不再发生亚基解离,进而采用末端分析法测定亚基的数目。

## 四、寡聚体蛋白质存在的意义

### (一) 提高蛋白质的稳定性

亚基结合的一个普遍性的好处是有利于减少蛋白质表面积( $S$ )/体积比( $V$ )。表面积/体积比越小,那么一个物体的半径就越大。因为对于球形物体来说,表面积是半径平方的函数,体积是半径立方的函数:表面积  $S = 4\pi r^2$ ; 体积  $V = 4/3\pi r^3$ ;  $S/V = 3/r$ 。由于在一个蛋白质范围内的相互作用通常在能量上是有利于蛋白质的稳定,由于蛋白质表面与溶剂水的相互作用在能量上是不利于的,因此在通常的情况下,减少表面积/体积的比例将会使蛋白质变得更加稳定。

## (二) 遗传上的经济性和有效性

蛋白质单体的寡聚结合对一种生物来说,在遗传上是经济的。编码一个能装配成同聚多体的单体所需要的 DNA 片段比编码一条与该同聚多肽具同样相对分子质量的多肽所需的 DNA 片段小许多。实际上,决定寡聚体的装配以及亚基-亚基的相互作用的全部信息都包含在编码单体所需的遗传物质中。例如 HIV(人类免疫缺陷性病毒)蛋白酶是由相同亚基构成的一种二聚体蛋白质,它履行与同源细胞的酶相似的功能(即都能催化蛋白质的水解),但是 HIV 蛋白酶亚基的相对分子质量只是那些由单一肽链构成的酶的一半。因此,所需的 DNA 片段就小。

## (三) 亚基汇聚形成酶的活性部位

许多酶的催化效力来自单个亚基的寡聚结合。单体也许不能构成完整的活性部位,寡聚体的形成可能使所有必需的催化基团汇聚形成酶的活性部位。例如,细菌谷氨酰胺合成酶的活性部位就是由相邻亚基对构成的,解离的单体是无活性的。

寡聚体酶的不同亚基也许执行不同但相关连的反应。例如,色氨酸合酶是一种由两种亚基构成的四聚体蛋白( $\alpha_2\beta_2$ ),纯化的 $\alpha$ -亚基催化下面的反应:



而纯化的 $\beta$ -亚基催化的反应是:



吲哚既是 $\alpha$ -亚基的产物,又是 $\beta$ -亚基的底物,它直接从 $\alpha$ -亚基进入到 $\beta$ -亚基,当它作为一个游离的中间物是不可能检测到的。

## (四) 协同性

这是寡聚体蛋白(包括寡聚体酶)的一个重要的性质。相关内容在后续有关章节中将会涉及到。

# 第六节 蛋白质空间结构与功能的关系

关于蛋白质的结构,我们在前面作了比较全面的讨论。人们了解蛋白质的结构为的是在微观水平上认识结构与功能的关系。在这一节中,我们主要讨论血红蛋白结构与功能间的关系。

血红蛋白(hemoglobin, Hb)是所有蛋白质中结构与功能的关系研究得最为清楚的蛋白质之一。在研究血红蛋白的结构与功能的关系中所揭示出来的一些重要的现象和结论对于研究其他许多蛋白质(包括酶)的结构与功能的关系有很大的指导和推动作用,例如蛋白质与配体的关系、别构效应以及氨基酸的替换对结构与功能的影响等。

讨论血红蛋白的结构与功能的关系时,将血红蛋白与肌红蛋白进行比较,有助于我们对蛋白质结构与功能关系的认识。

## 一、血红蛋白与肌红蛋白的生理作用

血红蛋白与肌红蛋白都是结合氧的蛋白质。血红蛋白是血液红细胞中的主要蛋白质,它的主要作用是通过动脉和静脉循环着的血液在肺部和毛细血管之间转运  $O_2$  和  $CO_2$ 。高等动物不能像很小的动物(几毫米小的)那样通过主动扩散即可满足身体对氧的需要,因为氧的长距离扩散速度太慢(而且氧在血液中溶解度很低),不能满足机体各组织对氧的需要。因此,生物在进化过程中发展了一种循环着的运输系统,红细胞中的血红蛋白就是这种进化上的需要。

肌红蛋白存在于肌肉等组织中。当  $O_2$  从毛细血管中扩散进入到组织,就被组织中的肌红蛋白结合。肌红蛋白是组织中的氧贮存蛋白。氧同肌红蛋白结合后增大了它的溶解度,因此,在活跃呼吸的组织中,肌红蛋白能刺激  $O_2$  迅速扩散,以满足组织对氧的需要。血红蛋白和肌红蛋白在转运氧的过程中的关系如图 3-31 所示。

氧通过血红蛋白从肺部转运到组织毛细血管,然后从毛细血管中扩散到组织中并被肌红蛋白结合,供组织呼吸利用。氧化过程中产生的  $CO_2$  通过该转运系统从肺部排出。

## 二、肌红蛋白和血红蛋白的结构

虽然血红蛋白与肌红蛋白都是氧结合蛋白,但是由于它们的结构以及所处生理环境的不同,它们对氧的亲合力以及氧合(氧结合)曲线也是不相同的。这里我们首先考察它们的结构差别,然后分析它们的氧合曲线。

### (一) 肌红蛋白的结构

肌红蛋白是由 153 个氨基酸残基组成的单链蛋白。多肽链的大部分形成了 8 个  $\alpha$ -螺旋区,整个分子包装成一个严密的实体。肌红蛋白含有一个血红素(heme)辅基,它被包裹在 F 螺旋和 E 螺旋之间的疏水孔穴内(图 3-1)。血红素是含铁的原卟啉(图 3-32)。卟啉环中结合的 Fe 离子正常情况下保持亚铁离子状态,不论是否与氧结合。铁离子可形成六个配位键,其中四个是与卟啉环上的四个 N 原子配位,

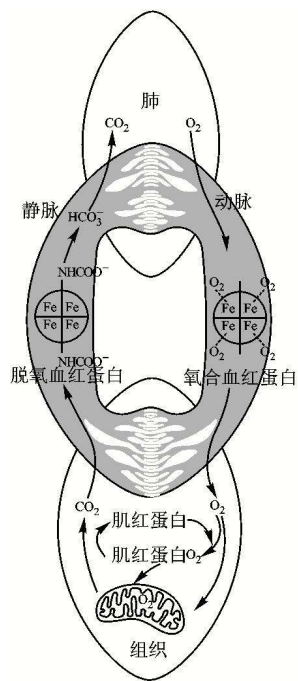


图 3-31 血红蛋白和肌红蛋白在转运氧过程中的关系

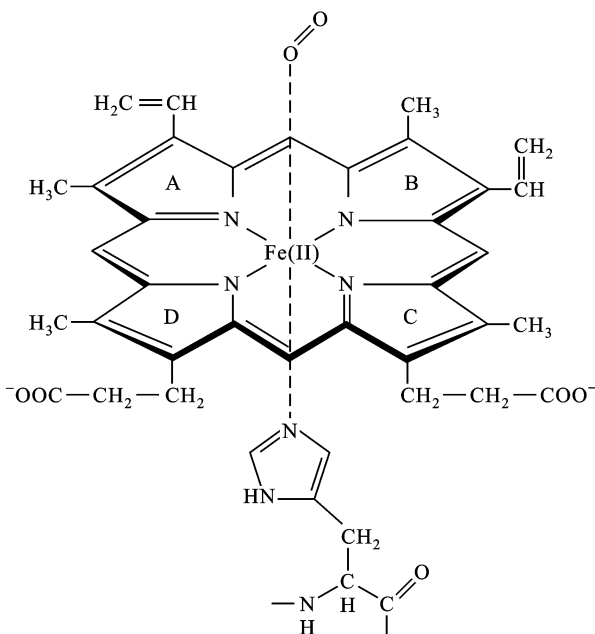


图 3-32 血红素的结构(示铁离子与 His 和  $O_2$  的配位结合)

第五个是与位于 F 螺旋区的组氨酸残基(His93)配位,第六个是与氧配位。某些小分子例如 CO、NO 和 H<sub>2</sub>S 亦可以代替 O<sub>2</sub> 与血红素的 Fe 离子配位,其亲和力比 O<sub>2</sub> 大,这样就解释了这些小分子的毒性作用。当血红素的亚铁离子氧化成正铁离子(Fe<sup>3+</sup>)时不能同 O<sub>2</sub> 结合,因为它的第六个配位已被 H<sub>2</sub>O 占据。

## (二) 血红蛋白的结构

血红蛋白是由两个  $\alpha$  - 亚基和两个  $\beta$  - 亚基组成的四聚体(亦可视为原体  $\alpha\beta$  的二聚体)。 $\alpha$  - 亚基和  $\beta$  - 亚基在结构上和进化上彼此相关,也与肌红蛋白相关。 $\alpha$  - 亚基由 141 个残基组成, $\beta$  - 亚基有 146 个残基。比较它们与肌红蛋白的一级结构,就会很容易发现它们有部分的同源序列(图 2-35)。这就是说,它们有一部分相应的氨基酸残基处在相同的位置。在三级结构上血红蛋白的每个亚基与肌红蛋白十分相似(图 3-33),而且它们含有相同的血红素辅基。血红蛋白四聚体是一个 6.4 nm× 5.5 nm× 5.0 nm 的三维球形分子(图 3-34),它的两个  $\alpha\beta$  原体呈二重旋转对称(图 3-35)。

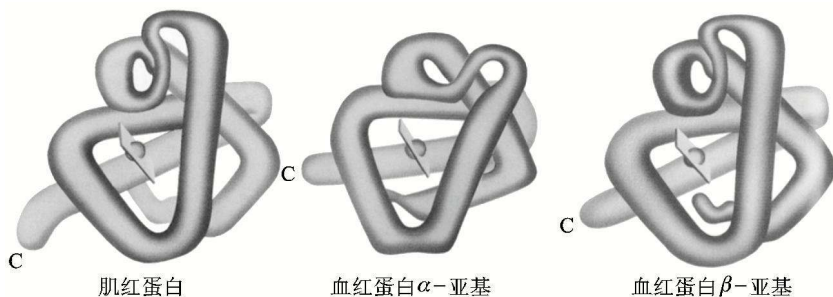


图 3-33 肌红蛋白、血红蛋白  $\alpha$  - 亚基和  $\beta$  - 亚基的构象素描

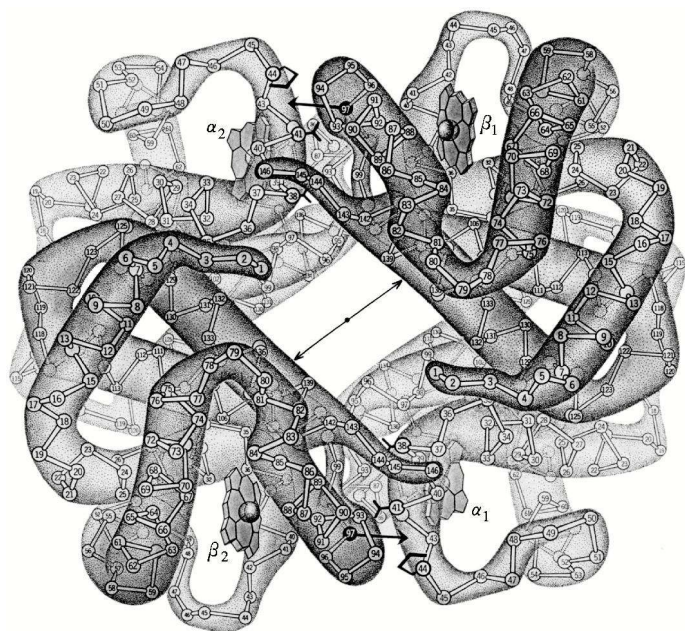


图 3-34 (脱氧)血红蛋白的空间结构

血红蛋白亚基的排列使得不同的亚基间有着广泛的相互作用。 $\alpha_1\beta_1$  (和  $\alpha_2\beta_2$ ) 界面涉及 35 个残基,而  $\alpha_1\beta_2$  (和  $\alpha_2\beta_1$ ) 界面涉及 19 个残基。这些残基间的相互作用以疏水作用为主,也涉及氢键和盐桥(离子对)。相反,相同亚基  $\alpha_1\alpha_2$  以及  $\beta_1\beta_2$  之间的接触很少,而且极性基团占优势。相同亚基彼此面对,中间被一个直径为 2.0 nm 的充塞溶剂的通道隔开(图 3-35)。

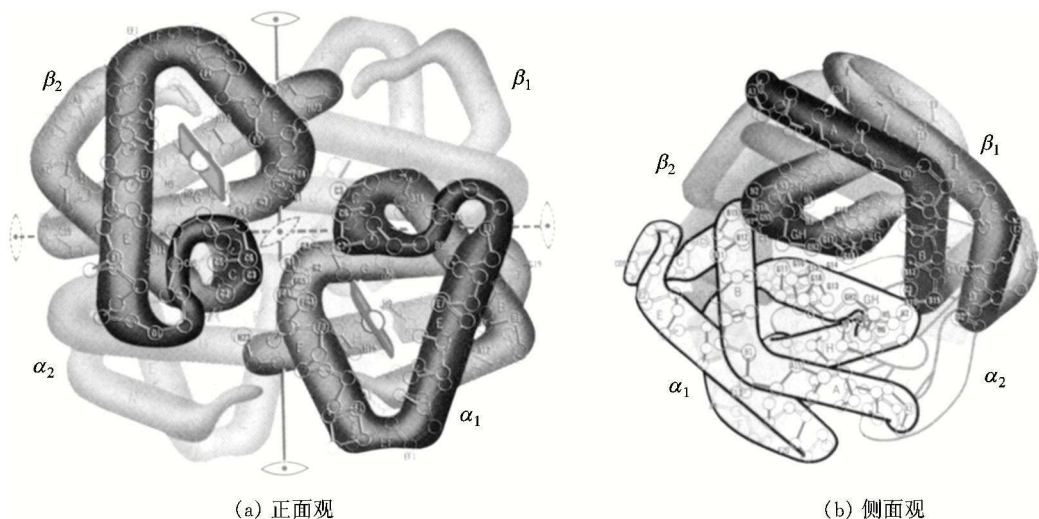


图 3-35 马高铁血红蛋白的亚基排列

### 三、血红蛋白与肌红蛋白的氧合曲线

#### (一) 氧合曲线的比较

肌红蛋白与血红蛋白的氧合曲线(图 3-36)很不相同,前者呈双曲线形,后者呈 S 形。我们首先比较它们的氧合曲线方程,然后分析氧合曲线差别的意义。

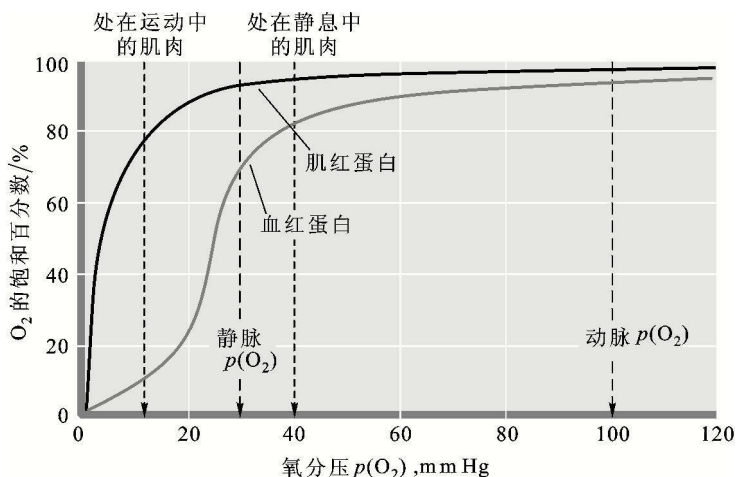
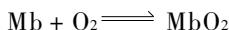


图 3-36 肌红蛋白与血红蛋白的氧合曲线

肌红蛋白同氧分子的结合呈简单的平衡反应：



该反应的解离平衡常数为：

$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]} \quad (1)$$

肌红蛋白的氧结合能力可以用它的饱和分数(或饱和百分数)来描述,其定义为  $\text{O}_2$  结合部位被  $\text{O}_2$  占据的分数：

$$Y(\text{O}_2) = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]} = \frac{[\text{O}_2]}{K + [\text{O}_2]} \quad (2)$$

这里,  $Y(\text{O}_2)$  为饱和分数。由于  $\text{O}_2$  是气体,习惯上用它的分压  $p(\text{O}_2)$  (氧分压)来表达,因而方程②可变为：

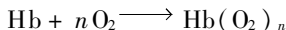
$$Y(\text{O}_2) = \frac{p(\text{O}_2)}{K + p(\text{O}_2)} \quad (3)$$

当  $Y(\text{O}_2) = 0.50$  时,其  $p(\text{O}_2)$  值规定为  $P_{50}$ , 即当氧结合部位有一半被占据时的氧分压。那么方程③表明  $K = P_{50}$ 。因此关于肌红蛋白的饱和分数的最终表达可变成：

$$Y(\text{O}_2) = \frac{p(\text{O}_2)}{P_{50} + p(\text{O}_2)} \quad (4)$$

肌红蛋白的氧结合曲线(图 3-36)服从方程④所描述的双曲线,它的  $P_{50} = 2.8$  托 [(torr, 气体压强单位,  $1 \text{ torr} = 1 \text{ mmHg}$  (在  $0^\circ\text{C}$ )  $= 0.133 \text{ kPa}$ , Pa 是国际单位;  $760 \text{ torr} = 1 \text{ atm}$  (大气压))。因此,肌红蛋白在一个相当广泛的  $p(\text{O}_2)$  范围内只释放出少量所结合的氧,例如在  $P_{50} = 100 \text{ torr}$  时,它的  $Y(\text{O}_2) = 0.97$ ; 在  $P_{50} = 20 \text{ torr}$  时,它的  $Y(\text{O}_2) = 0.88$ 。

血红蛋白的氧合曲线(图 3-36)呈 S 形,不能用方程④来描述。S 形的结合曲线是一种蛋白质的小分子结合部位之间协同作用的标志。这就是说,一个小分子的结合影响其余小分子的结合。血红蛋白是一种四聚体分子,每个亚基都能同  $\text{O}_2$  分子结合。这与肌红蛋白分子只有一个氧结合部位不同,因此很可能当一个亚基的氧结合部位同氧结合后就影响其他亚基对氧结合的亲和力。早在 1910 年, A. Hill 就尝试分析了血红蛋白的 S 形氧合曲线。他假定,血红蛋白(Hb)以一种简单的步骤结合几个氧分子：



就是说,这一反应具非限制性(即所有的氧结合部位或是全被氧占据或是全未被结合)。以类似方程③的方式推导出血红蛋白氧合曲线的方程：

$$Y(\text{O}_2) = \frac{[p(\text{O}_2)]^n}{K + (P_{50})^n} \quad (5)$$

如同方程④那样,我们规定  $Y(\text{O}_2) = 0.5$  时的  $p(\text{O}_2)$  值为  $P_{50}$ 。那么,将该值代入方程⑤：

$$0.5 = \frac{(P_{50})^n}{K + (P_{50})^n}$$

那么

$$K = (P_{50})^n \quad (6)$$

把这个结果再代入方程⑤:

$$Y(O_2) = \frac{[p(O_2)]^n}{(P_{50})^n + [p(O_2)]^n} \quad (7)$$

这是 Hill 方程,它描述血红蛋白的氧结合度与  $p(O_2)$  的函数关系。非限制的氧(配体)结合的协同性在物理上是不可能的,然而可以把  $n$  看做是与血红蛋白相互作用的亚基间的协同程度有关的非整数参数,而不是当作一步反应中结合氧的亚基数。于是, Hill 方程就变成了有用的、经验上与曲线相适应的方程,而不是配体结合的特定模式的标志。

方程中的  $n$  (Hill 系数)随反应协同程度而增大,如果  $n = 1$ ,方程⑦描述的是如同描述肌红蛋白的方程③和④所获得的双曲线,配体的结合反应是非协同的。如果  $n > 1$ ,反应描述的是正协同性,因为氧的结合增大了血红蛋白进一步结合氧的亲合力[在  $n = 4$  (血红蛋白的亚基数)时,协同性是非限制的]。相反,如果  $n < 1$ ,反应具有负协同性,即与一个氧分子的结合减少了血红蛋白与其他氧分子结合的亲合力。

Hill 系数  $n$  和  $P_{50}$  能很好地描述血红蛋白的饱和曲线,这两个数据可通过方程⑦改写(重排)后用作图法求得:

$$\frac{Y(O_2)}{1 - Y(O_2)} = \frac{[p(O_2)]^n}{(P_{50})^n} \quad (8)$$

两边取对数后即得到直线方程:

$$\lg \frac{Y(O_2)}{1 - Y(O_2)} = n \lg p(O_2) - n \lg P_{50} \quad (9)$$

$\lg \frac{Y(O_2)}{1 - Y(O_2)}$  对  $\lg p(O_2)$  的直线标绘图(即 Hill 图)的斜率为  $n$ ,在  $\lg p(O_2)$  轴上的截距是  $\lg P_{50}$ 。

图 3-37 示出了肌红蛋白和血红蛋白的 Hill 图。如所预期的,肌红蛋白 Hill 图是一条直线,其斜率 = 1。虽然血红蛋白不是像推导 Hill 方程所假设的那样以一种简单的步骤同氧结合,但是它的 Hill 图在  $Y(O_2)$  值为 0.1~0.9 之间时基本上是一条直线。它的最大斜率接近出现在  $p(O_2) = P_{50}$ , [ $Y(O_2)/(1 - Y(O_2)) = 1$ ],通常可把它当作 Hill 系数。对于正常人的血红蛋白来说,Hill 系数是在 2.8~3.0 之间,这就是说,血红蛋白与氧的结合是高度协同的(但不是非无限的)。许多不正常的血红蛋白呈现较小的 Hill 系数,表明它们在与氧结合时比正常者的协同程度低。

在  $Y(O_2)$  值接近 0,当少数血红蛋白分子平均结合一分子的氧时,血红蛋白的 Hill 图的斜率为 1(图 3-37 下面的渐近线),因为血红蛋白的亚基独自竞争氧,就像肌红蛋白分子那样;在  $Y(O_2)$  值接近 1,当每个血红蛋白的四个氧结合部位至少三个被占据时,Hill 图的斜率也为 1(图 3-37 上面的渐近线),因为少数尚未占据的部位是在不同的分子上,各自单独结合氧。

根据方程⑨,外推下面的渐近线与横轴相交(图 3-37),表明第一个氧分子结合到血红蛋白上的  $P_{50}$  是 30 torr。同样地,外推上面的渐近线,得到第四个氧分子结合到血红蛋白上的  $P_{50}$  是 0.3 torr。第四个氧分子同血红蛋白结合的亲合力比第一个氧分子结合的亲合力高出 100 倍。

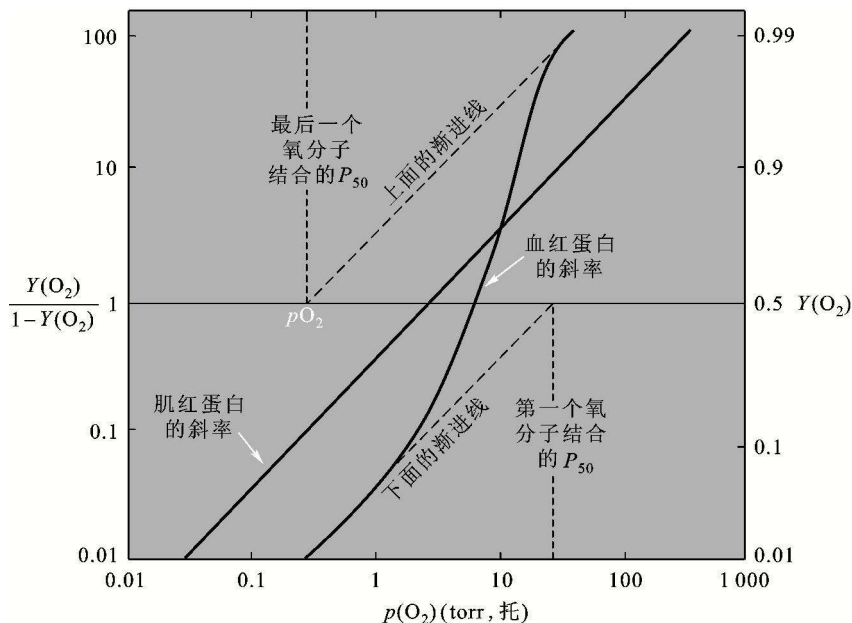


图 3-37 血红蛋白和肌红蛋白的 Hill 图

## (二) 氧合曲线的不同反映出生理环境的差异

正如图 3-36 所描述的,肌红蛋白的  $P_{50}$  很低,大约只有 2.8 torr,即是说,它对氧有很高的亲和力。这种情形适合于必须从血液中接收氧的蛋白质。在毛细血管的氧浓度 [ $p(\text{O}_2)$  大约 30 torr] 的情况下,邻近组织中的肌红蛋白会很快被饱和。当细胞代谢活跃时,它们内部的  $p(\text{O}_2)$  降低到很低的水平,在这样的条件下,肌红蛋白将释放它结合的氧。因此,肌红蛋白分子不仅必须为氧的可逆结合提供一种环境,而且也要保证对氧的亲和力处在适当的高度,因此,可以说肌红蛋白的氧结合是它所处组织环境的反映。

然而,由于肺部和组织中不同的环境,氧运输蛋白必须在氧分压为 100 torr(肺)时有效地接收氧,然后在氧分压为 30 torr 左右的组织毛细血管中能有效地释放出氧。换句话说,一种理想的氧运输蛋白在氧分压为 100 torr 时几乎被饱和,而在 20~40 torr 时又能释放出它运载的大约一半的氧。如果该运载蛋白具有像肌红蛋白的双曲线形氧合曲线,那么要实现这一目的是不可能的。氧运载蛋白的进化解决了这个问题。血红蛋白的 S 形氧合曲线允许它在肺几乎完全被饱和,同时又允许它在组织毛细血管中能有效地释放出氧。这必定意味着在血红蛋白的氧结合部位存在协同相互作用。结合部位之间的这种协同作用只有在血红蛋白这类多亚基蛋白中才是可能的。

## 四、协同效应的机制

### (一) 氧合和脱氧血红蛋白有不同的四级结构

氧合作用对血红蛋白的四级结构产生广泛的影响,即氧合和脱氧血红蛋白有不同的结构形式。蛋白质在表达功能的过程中,其构象发生变化的现象叫做别构作用或变构作用 (allosteric effect)。别构效应是寡聚体蛋白质在行使功能时的一个共同的特征。血红蛋白与氧结合时的协同效应是别构效应的结果。

血红蛋白发生四级结构变化时仍维持它的二重对称关系,这种变化只发生在它的 $\alpha_1\beta_2$  (和 $\alpha_2\beta_1$ )的界面上。 $\alpha_1\beta_1$  (和 $\alpha_2\beta_2$ )的接触没有发生变化,这可能是由于它们之间的更广泛的密切接触的结果。这种接触提供了一种便于参照的构架,即氧合和脱氧的构象可以进行比较。氧合作用使 $\alpha_1\beta_1$ 二聚体相对于 $\alpha_2\beta_2$ 转动了 $15^\circ$ (图3-38),结果在 $\alpha_1\beta_2$ 界面上的某些原子彼此移动了0.6 nm。

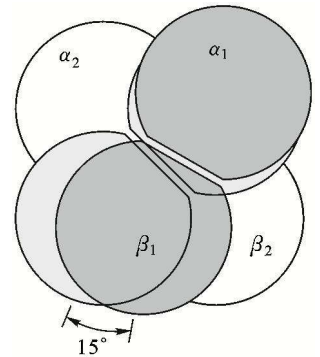


图3-38 当血红蛋白从脱氧向氧合化形式变化时, $\alpha_1\beta_1$  相对于 $\alpha_2\beta_2$  旋转了 $15^\circ$

我们把脱氧血红蛋白的构象叫做 T 态 (tense state, 紧张状态), 氧合血红蛋白的构象叫做 R 态 (relaxed state, 松弛状态)。

(二) 协同效应的机制

氧同血红蛋白结合的正协同效应产生于一个血红素的配体结合状态对另一血红素配体结合亲和力的影响。然而,血红蛋白分子内的血红素间的距离大约是 2.5~3.7 nm,这对于血红素与血红素的静电相互作用来说距离太大。因此,更确切说,这种影响通过蛋白质的物理转动实现的。

X 射线晶体结构分析虽然没有指出血红蛋白如何改变它的结构状态,但提供了配体结合过程中不同阶段的 R 态和 T 态的信息。根据血红蛋白大量的 X 射线结构分析,Perutz 提出了血红蛋白氧合作用的机制:

1.  $Fe^{2+}$  移入到卟啉环平面内触发了 T 态向 R 态构象的转变

在 T 态时, $Fe^{2+}$  位于邻近组氨酸一侧的血红蛋白平面外约 0.06 nm 的位置。由于卟啉骨架的塔顶以及由于  $Fe-N_{\text{卟啉}}$  键太长,不允许  $Fe^{2+}$  位于卟啉环平面中心(图3-39)。但是,血红素结合氧时的静电状态的变化,引起塔顶下降,并且  $Fe-N_{\text{卟啉}}$  键缩短 0.01 nm。因此,当 T 态向 R 态转变时, $Fe^{2+}$  移入到血红蛋白平面中心(图3-39)。 $Fe^{2+}$  的移动拖着邻近的与它配位连接的组氨酸残基一起移动,从而导致组氨酸残基所在的 F 螺旋倾斜,并使它向血红素平面横向移动

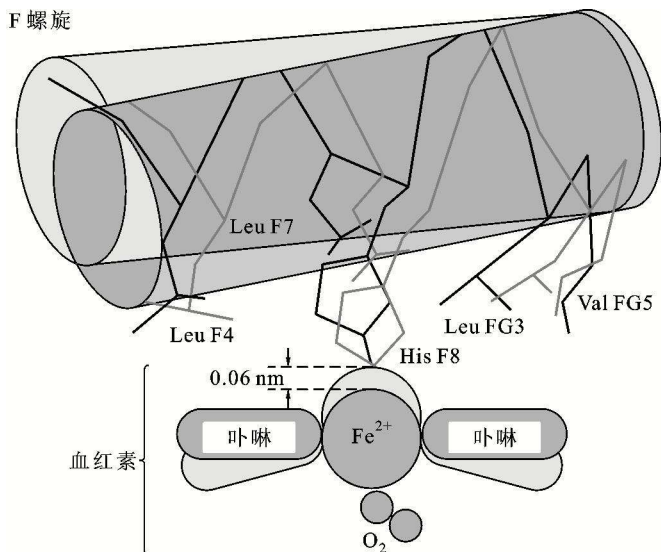


图3-39 当血红蛋白从 T 态向 R 态的转换时,血红素和 F 螺旋的位置变化

约 0.1 nm 的距离(图 3-39)。在  $\beta$  亚基中, E11 Val 部分地堵塞了氧结合部位, 因此, 在  $\beta$  亚基结合氧之前, 这种障碍必须解除。

上述一个亚基因氧合所引起的三级结构的变化将会导致亚基界面上的变化(即血红蛋白四级结构上的变化)。正如上面已经讨论过的, 血红蛋白 T 态和 R 态构象之间的差别主要出现在  $\alpha_1\beta_2$ (和  $\alpha_2\beta_1$ ) 的界面上。界面由  $\alpha_1$  的 C 螺旋和 FG 转角以及  $\beta_2$  的 FG 转角和 C 螺旋组成, 并且彼此接触。四级结构的变化导致在  $\alpha_1$ C -  $\beta_2$ FG 界面相对移动 0.6 nm。在 T 态,  $\beta$  亚基的 FG4(97)(连接螺旋 F 和 G 的片段的第 4 位残基, 即整个多肽链的第 97 位残基)位的组氨酸与  $\alpha$  亚基 C6(41)位的苏氨酸接触(图 3-40(a)); 而在 R 态时, 它是与  $\alpha$  亚基的 C3(38)位的苏氨酸接触(图 3-40(b))。

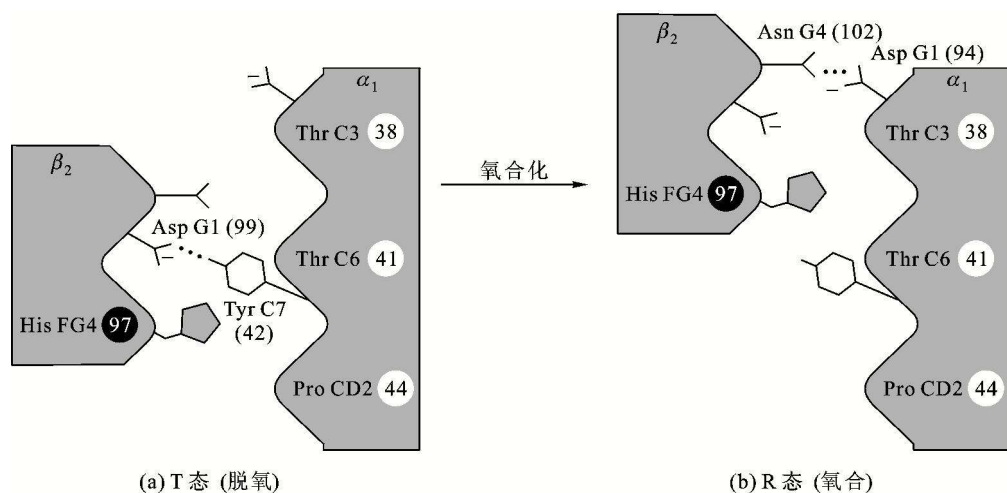


图 3-40 血红蛋白从 T 态向 R 态的转换时  $\alpha_1\beta_2$  界面的变化

在这两种构象中, 一个亚基的“球形突出物”与另一亚基的“槽”完全齿合。这两种齿合状接触(它们都是通过一组不同的、但等量的氢键网织在一起)起着双开关的作用, 即允许在氧合和脱氧时两种构象状态迅速转换。与上面的情况相反, 四级结构上的变化在  $\alpha_1$ FG -  $\beta_2$ C 间的接触只发生 0.1 nm 的移动, 因此它的侧链在整个变化中保持相同的结合。这些侧链在四级结构变化时围绕  $\alpha_1$  和  $\beta_2$  亚基转动起着灵活的接合作用。由于整个血红蛋白分子的二重对称性, 因此, 在  $\alpha_2\beta_1$  界面上也同样发生相应的变化。

## 2. T 态由盐键和氢键网稳定, 必须打断才能形成 R 态

R 态因配体的结合而稳定, 但在配体的缺乏下, T 态为什么比 R 态稳定? 血红蛋白的 R 态 X 射线衍射提示每个亚基的 C-末端( $\alpha$  链的 141 位的精氨酸和  $\beta$  链的 146 位的组氨酸)处在自由状态。但是, T 态图表明这些残基被亚基内和亚基间的盐键和氢键牢固地固定住, 使 T 态稳定(图 3-41(a))。伴随着 T $\rightarrow$ R 转换的结构变化, 这些盐键和氢键受到破坏。这种转换涉及一个关键的氢键, 这是由处在特定部位的( $\alpha$  和  $\beta$  亚基倒数第 2 个残基) Tyr 的酚羟基与脱氧血红蛋白的主链 FG 转角( $\alpha$  亚基 93 位和  $\beta$  亚基 98 位) Val 的羰基(C=O)之间形成的(图 3-41b,c)。氧化化的 F 螺旋的移动导致 Tyr 和 Val 之间的氢键断开, 连接四个亚基的盐键在这种变化中受到破坏。在脱氧状态下, 所有四个亚基的 C-末端都被这些键(图 3-41(a))束缚住, 这就是 T

态;在氧合状态,所有 C-末端都几乎处于可以旋转的状态,即 R 态。R 态对配体(或底物)具有更大的亲和力。

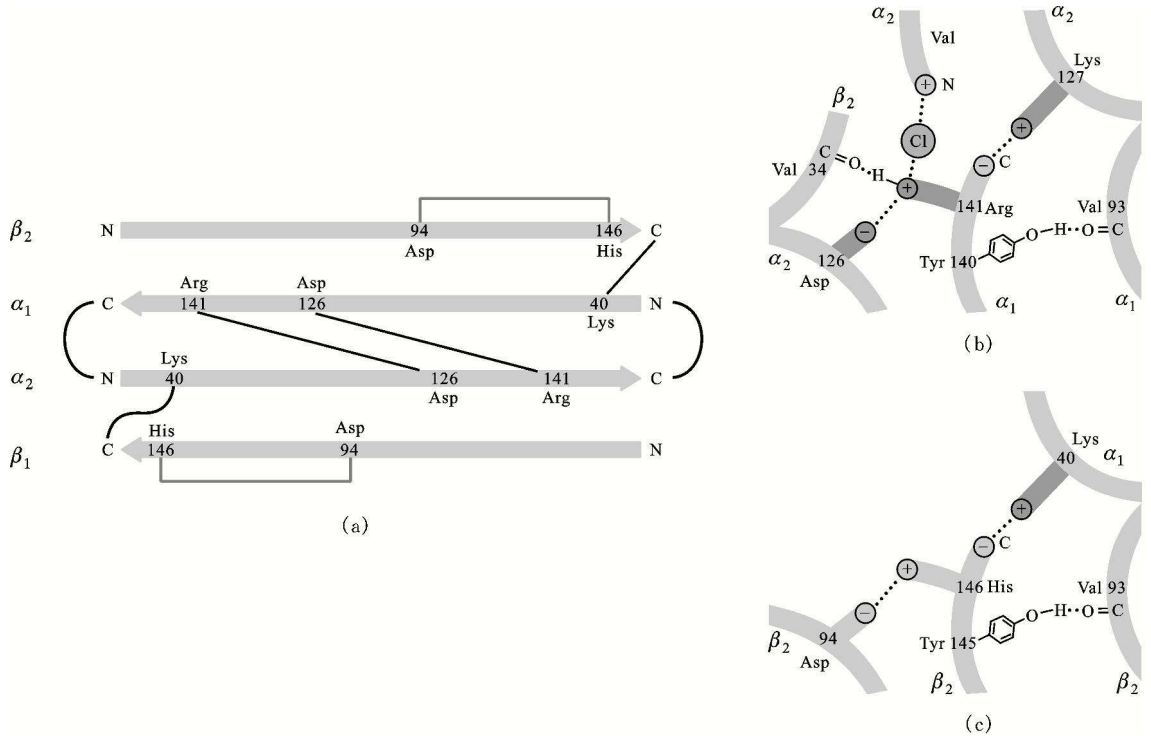


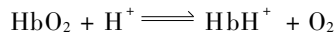
图 3-41 脱氧血红蛋白亚基间的盐键(a); $\alpha$  链的 N-末端和 C-末端的盐键和氢键(b);  
 $\beta$  链 C-末端的盐键和氢键(c);(所有这些结合在由 T 态向 R 态转换时都将被破坏)

### 3. T→R 的转换是由形成 Fe—O<sub>2</sub> 键的能量推动的

T→R 的转换体现了亚基间的一种通讯关系,即把一个亚基同配体结合后所导致的亚基内的三级结构的变化信息传给其余的亚基,使亚基间的相互关系(即四级结构)发生改变,促进其余的亚基同配体的结合。血红蛋白的 T 态构象向 R 态构象的转变体现出一种正协同性。

## 五、H<sup>+</sup> 和 CO<sub>2</sub> 能促进血红蛋白与氧的解离

脱氧血红蛋白与氧合血红蛋白相比,对 H<sup>+</sup> 具有较高的亲和力。因此,当 pH 降低时,能促进氧合血红蛋白释放出所结合的 O<sub>2</sub>。如果不考虑 O<sub>2</sub> 和 H<sup>+</sup> 的化学计量,那么 H<sup>+</sup> 促进氧合血红蛋白的解离可用下式表示:



这表明,H<sup>+</sup> 对抗血红蛋白同 O<sub>2</sub> 的结合。当酸度增高时,使血红蛋白对氧的饱和曲线向右移(图 3-42)。这种现象叫做波尔效应(Bohr effect),是由 C. Bohr 于 1904 年首先观察到的。

### (一) 波尔效应促进氧的转运

当呼吸作用每消耗 1 分子氧时,就会产生 0.8 分子的 CO<sub>2</sub>,并通过扩散从组织进入毛细血管。当 CO<sub>2</sub> 在血液中溶解时,在碳酸酐酶(carbonic anhydrase)的催化下,能加速形成碳酸氢盐:

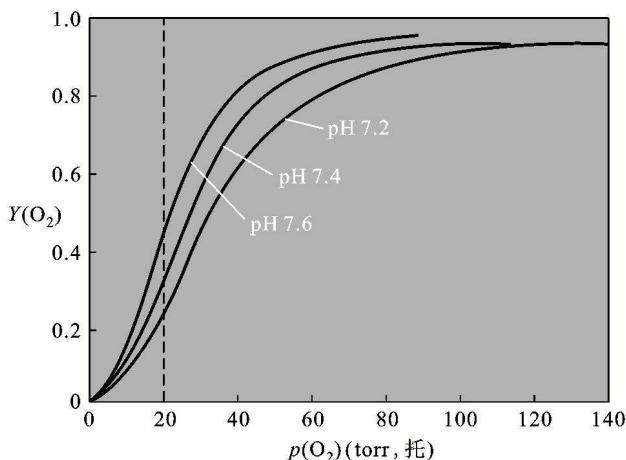
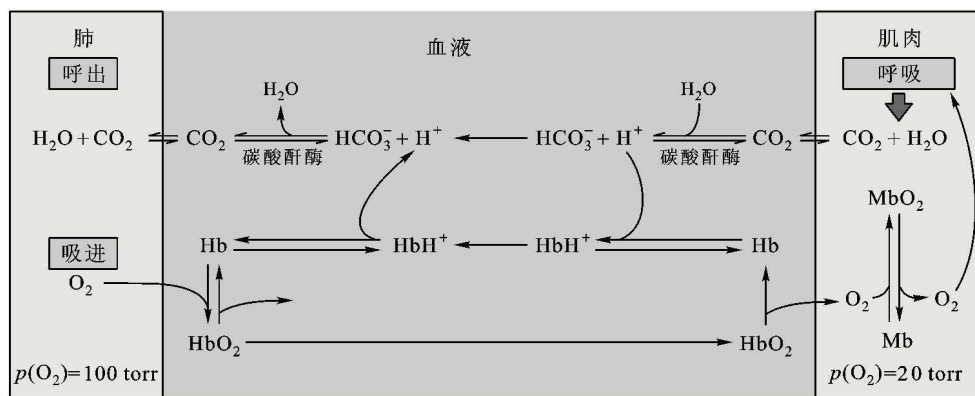


图 3-42 波尔效应



因此,血液中的大多数  $\text{CO}_2$  是以碳酸氢盐的形式转运的。

在毛细血管中,  $p(\text{O}_2)$  很低,由碳酸氢盐的形成产生的  $\text{H}^+$  被血红蛋白接收,从而诱导它释放所结合的  $\text{O}_2$ 。而且这种  $\text{H}^+$  的接收因刺激碳酸氢盐的形成而促进  $\text{CO}_2$  的转运。相反,在肺部  $p(\text{O}_2)$  高,氧被血红蛋白结合而释放出波尔质子,使反应向左进行,有利于  $\text{CO}_2$  的排出。上述两个反应紧密配合,使血液 pH 只发生很小的变化(图 3-43)。

图 3-43 血红蛋白和肌红蛋白经循环着的血液转运  $\text{O}_2$  和  $\text{CO}_2$  的机制

波尔效应提供了一种机制,靠这种机制能够为高度活跃的肌肉提供更多的  $\text{O}_2$ 。活跃的肌肉组织产生酸(见糖代谢有关章节),使流经肌肉组织毛细血管中的血液的 pH 从 7.4 降低到 7.2,血红蛋白在  $p(\text{O}_2)$  小于 20 torr 的肌肉组织中比在 pH 7.4 时多释放约 10% 的氧(图 3-42)。

## (二) 波尔效应产生的原因

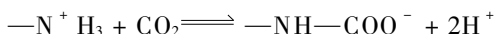
在血红蛋白分子中存在某些质子结合基团,脱氧血红蛋白比氧合血红蛋白对质子有更高的亲和力。在参与质子结合的氨基酸残基中,两个  $\beta$  亚基 C-末端的 His146 残基起着主要的作

用。实验表明除去 C-末端的 His 残基时,波尔效应减少 40%。在脱氧血红蛋白中,His146 的咪唑基质子化,并与同一肽链的 Asp94 的侧链羧基形成盐键。在组织的毛细血管中,由于  $p(\text{O}_2)$  低,促使氧合血红蛋白释放  $\text{O}_2$ ,同时由于组织呼吸代谢产生酸,以及  $\text{CO}_2$  水化时释放的  $\text{H}^+$  (即 pH 降低),当 His146 结合  $\text{H}^+$  后,进一步促使血红蛋白由 R→T 的转换。结果是,高浓度的质子也有利于血红蛋白的脱氧形式,从而促进氧的释放。

在波尔效应中,也涉及其他一些残基,包括  $\alpha$  亚基的 N-末端氨基。当  $\alpha$  亚基的 N-末端残基与氰酸盐反应后,导致末端氨基甲酰化。当这种氨基甲酰化的  $\alpha$  亚基与正常的  $\beta$  亚基混合,所得到的重构血红蛋白丢失了 20%~30% 的正常的波尔效应。有证据表明, $\alpha$  亚基的 122 位的 His、 $\beta$  亚基的 143 位的 His 和 82 位的 Lys 在波尔效应中也起作用。

### (三) $\text{CO}_2$ 影响血红蛋白对氧亲和力的机制

当  $\text{CO}_2$  从呼吸组织中释放出来时,它以两种方式降低血红蛋白对氧亲和力。第一种方式是, $\text{CO}_2$  水化成  $\text{HCO}_3^-$  时释放  $\text{H}^+$ ,  $\text{H}^+$  影响波尔效应。第二种方式是, $\text{CO}_2$  本身能与血红蛋白肽链的 N-末端氨基直接反应,形成氨基甲酸(carbamate):

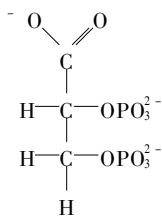


这种氨基甲酸化反应促进血红蛋白从组织转运  $\text{CO}_2$  到肺部。此外,该反应还产生两个额外的效应:①释放出的  $\text{H}^+$  贡献给波尔效应;②带负电荷基团引入到链的 N-末端有利于稳定  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基间形成的盐键(这是脱氧血红蛋白的一个特征)。当  $\text{CO}_2$  浓度升高时,这两种效应同时促进血红蛋白释放  $\text{O}_2$ 。在肺部发生的逆反应是同样重要的。在肺部,高浓度的  $\text{O}_2$  有利于血红蛋白氧合作用。当这种转换发生时,氨基甲酸化的 N-末端稳定性降低, $\text{CO}_2$  从 N-末端释放并通过肺部呼出。

总的来说,在肺部, $p(\text{O}_2)$  高,氧合作用有利于血红蛋白的 R 态构象,促进  $\text{CO}_2$  的释放。当氧合的血红蛋白经动脉血从肺部到达组织毛细血管时,由于 pH 降低和  $\text{CO}_2$  浓度升高,有利于血红蛋白的 T 态构象的形成而推动  $\text{O}_2$  的释放。 $\text{HCO}_3^-$  的形成和  $\text{CO}_2$  与 N-末端的甲酸化反应释放出更多的  $\text{H}^+$ ,从而进一步推动  $\text{O}_2$  的释放以及与  $\text{CO}_2$  的结合(图 3-43)。

## 六、二磷酸甘油酸对血红蛋白与 $\text{O}_2$ 结合的影响

哺乳动物纯化的血红蛋白比全血中的血红蛋白对氧有更大的亲和力。这一观察导致另一种效应物——2,3-二磷酸甘油酸(D-2,3-bisphosphoglycerate, BPG)的发现。



D-2,3-二磷酸甘油酸(BPG)

BPG 能够以 1:1 的比例同脱氧血红蛋白紧密结合,因而它的存在降低血红蛋白对氧的亲和力,并使其保持在脱氧的构象状态。六磷酸肌醇(IHP)和 ATP 也有这种作用,事实上,它们在鸟类和鱼类及两栖动物中代替了 BPG 的功能。

在动脉血液中,  $p(\text{O}_2)$  大约是 100 torr, 血红蛋白氧饱和度约达 95%; 但在静脉血中,  $p(\text{O}_2)$  大约只有 30 torr, 血红蛋白氧饱和度大约是 55%。因此, 当血液流经毛细血管时, 血红蛋白将卸下约 40% 的氧。在 BPG 的缺乏下, 因为血红蛋白的  $\text{O}_2$  亲和力增高, 血红蛋白结合的氧很少释放出来, 从而使它的  $\text{O}_2$  解离曲线移向更低的  $p(\text{O}_2)$ 。因此 BPG 一种不可缺少的生理功能就是, 在高空时, 由于红细胞中的 BPG 迅速升高, 而 BPG 不能透过细胞膜, 结果降低了血红蛋白对  $\text{O}_2$  的亲和力, 在毛细血管中使血红蛋白增大  $\text{O}_2$  的释放量。

胎儿是从母亲循环的血液经胎盘获得氧的。胎儿血红蛋白( $\alpha_2\gamma_2$ , 以 HbF 表示)比母亲的血红蛋白(HbA, 即正常的血红蛋白)对氧有更高的亲和力。在两者的红细胞中, BPG 的浓度大致相同, 但它同脱氧 HbA 的结合力比它同脱氧 HbF 的大。这就解释了 HbF 对氧亲和力高的原因。

生理上带负电荷的 BPG 同脱氧血红蛋白的结合可被高浓度的盐减弱, 提示这种结合是离子型的。BPG-脱氧血红蛋白的 X 射线结构研究表明, BPG 结合在脱氧血红蛋白的中心孔穴内(图3-44)。BPG 的阴离子基团处在与两个  $\beta$  亚基的 Lys82、His143、His2 和 N-末端氨基的阳

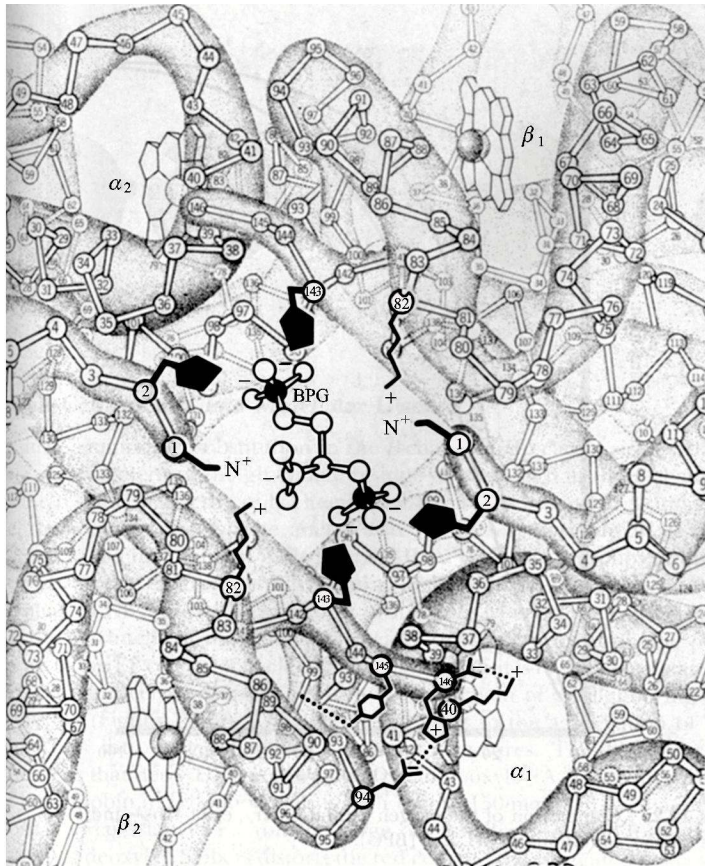


图3-44 BPG 同脱氧血红蛋白的结合

离子形成氢键和盐键的距离范围内。T $\rightarrow$ R 的转换引起两个  $\beta$  亚基的 H 螺旋靠近, 造成中央孔洞不能容纳 BPG 而使它排出。构象的转换也加大了  $\beta$  亚基 N-末端氨基的距离(1.6 nm $\rightarrow$ 2.0 nm), 阻止它们与 BPG 的磷酸基形成氢键。因此, BPG 通过两个  $\beta$  亚基的交联使血红蛋白的 T

态构象稳定,这就使  $T \rightleftharpoons R$  的平衡趋向 T 态,从而降低血红蛋白对氧亲和力。

BPG - 血红蛋白复合物的结构研究也表明,胎儿血红蛋白的  $\gamma$  亚基与正常成年人的  $\beta$  亚基的一个不同之点是 Ser 残基代替了 143 位的 His 残基。由于 Ser 残基不带电荷,消除了一对稳定 BPG - 脱氧血红蛋白复合物的离子相互作用,这必然导致胎儿血红蛋白对 BPG 的亲和力相对降低。