

蛋白质工程及其展望

邹承鲁 雷克健

(中国科学院生物物理研究所)

一、蛋白质工程的产生及主要内容

人们在研究蛋白质结构与功能关系时,通常通过造成结构上的改变然后观测相应功能的改变,以弄清某一功能的结构基础,从而达到创造具有某些有经济效益的新性质的蛋白质。过去用的诱导变异或从自然界筛选出各种具有不同性质的突变体,但是否能获得我们预期性质的突变体以及一种有利性质的突变是否会损害另一优良性能人们都无力干预,只有等待自然的恩赐。蛋白质化学修饰在一定程度上可以按照我们的意愿改变蛋白质分子的局部结构,但化学修饰反应常常不够专一,同时对分子内部一些疏水氨基酸的侧链也无法予以修饰。化学全合成虽然可以按照人们要求制造那些分子量不大的蛋白质和肽,但对分子量大于10K的蛋白质从经济上看也不能将此作为工业用酶或蛋白质的来源,因此人们期望有一种新的、能改造蛋白质分子的手段以满足蛋白质结构与功能理论研究以及改善工业及医用蛋白质二方面的需要。70年代遗传工程的兴起给蛋白质研究以巨大的冲击,但同时促进了这二个领域的有机融合,在此同时汇入蛋白质晶体学和计算机技术在80年代初新兴了一个新的研究领域蛋白质工程。它是指在蛋白质空间结构和结构与功能研究基础上,借助计算机图象显示和分子辅助设计提出对某一蛋白质分子的改造方案。蛋白质的空间结构信息隐含在它的氨基酸排列顺序中,而氨基酸的排列顺序又是由这个蛋白质编码基因的核苷酸序列所决定。因此按预定改造方案通过对编码该蛋白质基因的修饰和遗传工程途径就可以获得新型的蛋白质分子。图一给出蛋白质工程的流程。

遗传工程使人类可以在控制条件下生产任何自然界中存在的蛋白质以满足人类各方面的需要,蛋白质工程的出现则使人类可以生产,制造那些自然界中所不存在的,具有人们所期望性质的新型蛋白质分子,因此被誉为第二代遗传工程。

二、蛋白质工程的四个基础学科

蛋白质工程是在四个基础领域上产生的,它们是蛋白质化学、分子遗传学、蛋白质晶体学和蛋白质动力学。我们都清楚,离开蛋白质的分离纯化、序列分析、结构与功能研究,表达产物的分离纯化等有关蛋白质化学基础知识与技术的积累与发展,蛋白质工程将如无根之木,无源之水。而蛋白质工程的兴起又反过来促进蛋白质化学的发展进入一个新的阶段。目前在国际上称之为蛋白质研究的“文艺复兴”时期。由于蛋白质化学的基础地位是显而易见的,在这一部份我们仅想简单介绍其他三个基础领域。

1. 分子遗传学: 蛋白质工程的前提条件之一是要具有克隆化的欲改造蛋白质的基

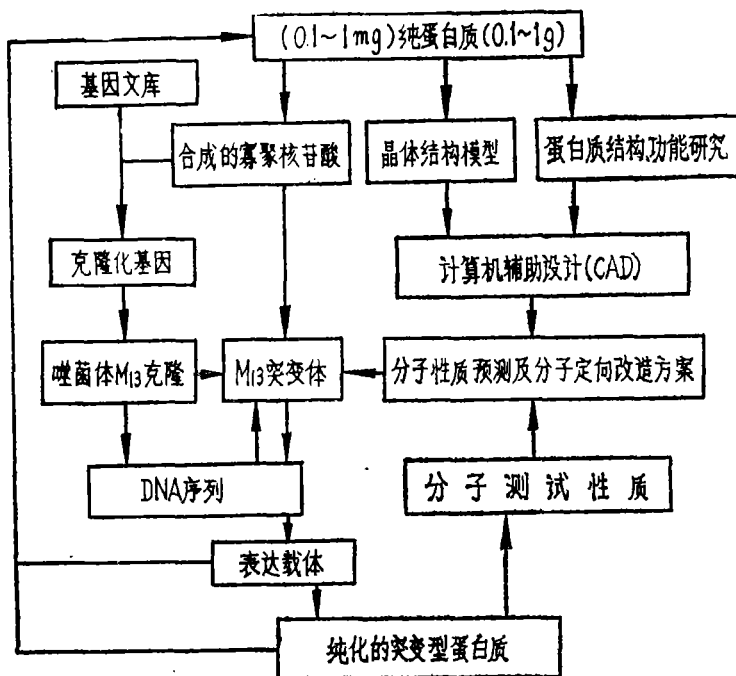


图1. 蛋白质工程的程序

分离纯化0.1—1.0mg目的蛋白质，并解析其部份肽段的一级结构。据此及编码原则设计并合成相应同位素标记寡核苷酸片段，以此从基因文库中分离编码该蛋白质的克隆化基因。转入噬菌体M₁₃系统，用双脱氧链终止法完成其DNA序列分析，通过表达载体获得较多量(0.1—1.0g)该蛋白质。从晶体结构模型及结构与功能研究出发，借助计算机辅助分子设计，提出分子预期性质及改造方案。通过合成寡核苷酸—M₁₃系统定位突变，并分离其突变体，引入表达载体生产并纯化多量突变型蛋白，分析并测试其性质，再指导进一步分子设计以最终获得所预期性质的分子。

因、基因定位修饰技术以及改造后基因的高效表达。这些是分子遗传学研究的主要内容。由于限制性内切酶、DNA聚合酶、末端转移酶、DNA连接酶等工具酶以及各种运载体的发现，使我们在原则上可以克隆自然界所发现的任何一个已知蛋白质的基因。近年来由于各项技术的改进表达产量已由最初0.1mg/L提高到1—2mg/L，个别已超过10g/L。寡聚核苷酸合成技术的快速发展以及自动合成仪的商品出现使寡聚核苷酸片段在一般实验室可以很易得到。在这基础上提出了二项行之有效的基因定位修饰技术。一为定位突变(site-directed mutagenesis)^[1,2]，它是借助含克隆基因的单链载体，在一段含一个或几个错配碱基的寡核苷酸引物存在下合成双链闭环DNA分子。通过转化细胞，二条链在寄主细胞内分别合成各自互补链，从而得到野生型和突变型二种感染细胞，经筛选可从大量野生型背景中分离出突变型基因，当引入表达载体则可创造突变型蛋白质。另一称盒式突变(Cassette mutagenesis)。它是一年前由wells提出^{3,4}，与前者不同处是利用合成的互补双链寡核苷酸混合物作为插入盒，插入经位点突变改造

的基因适当部位,从而一次可产生数种突变体分子。这一方法可以对某些功能重要残基实施“饱和性”分析^[1],大大缩短了寻找有利突变的周期。基因修饰技术为我们提供了无限可能性来改更蛋白质分子中任意一个氨基酸残基为另一个氨基酸残基,同时造成几个氨基酸的替换,删除或增加某些氨基酸残基以造成分子的某些新的性质。这二项技术为蛋白质工程的确立奠定了基础。随分子遗传学的发展,新的,更强有力的基因修饰技术,克隆方法以及表达系统将会大大推进蛋白质工程的进展。

2.蛋白质晶体学:蛋白质工程不同于一般基因改造在于:它是在蛋白质空间结构及结构与功能研究成果的指导下,利用分子设计对分子实施定向改造。二十多年来随蛋白质晶体学的发展已有上百种蛋白质结构获得高分辨率的解析。它使我们认识到蛋白质结构的高度复杂性以及功能对精细三维结构的依赖关系。另一方面也为我们积累了大量的蛋白质结构的基本参数如组成蛋白质二十种氨基酸的键长、键角;肽键的平面性;肽链双面角 ϕ , ψ 的取值范围;二硫键的左、右手型二种可能取向等。同时也揭示了蛋白质结构的规律性如蛋白质三维结构是由一些基本构件如 α -螺旋, β -折叠, U型(β)转角,无规卷曲等所组成。以及由这些组件所组成的三维结构按拓扑学可以被归纳为 α 、 β 、 $\alpha + \beta$ 、 α / β 四大类等,过去认为无序结构目前看也不是可以取任意构象状态而只有少数几种构象在蛋白质中经常出现。这些都为分子设计提供了依据。另一方面突变体蛋白质功能改变的结构基础也依赖于X-射线结晶学的研究结果。在揭示分子三维结构方面二维核磁共振技术最近显示了它的巨大潜力,但是X-射线结构解析,至今仍是人类所掌握的精确测定蛋白质三维空间结构的最主要的工具。

3.蛋白质动力学:蛋白质晶体学只能提供结晶态蛋白质在静态的结构,更重要的问题是一维的多肽键在水溶液中是如何折叠成三维蛋白质的,以及蛋白质在与其作用对象相互作用时,它的三维结构又是经历什么样的历程以发挥其活性的,这些是蛋白质动力学的重要研究课题。只有深刻了解这些问题才能预测基因水平的改造最终会对蛋白质结构与功能产生什么后果。这个领域我们目前所知甚少,但是从理论上的计算机模拟,以及实验上的X-射线晶体结构的温度系数,核磁,和其他物理方法,已经开始取得了一系列有意义的结果,将来对蛋白质工程的发展无疑是十分重要的基础^[5]。

三、蛋白质工程所取得的成就:

短短几年蛋白质工程已取得一批鼓舞人心的成果,大大加深了人们对许多理论问题的认识,同时也为工业或医药用酶或蛋白质开拓了崭新的前景。

1.在基础研究方面:酪氨酰tRNA合成酶(TyrTs)是目前用蛋白质工程研究得最彻底的酶之一。这个酶催化在ATP存在下酪氨酸的活化和转移活化的酪氨酰到tRNA^{Tyr}的3'末端。从嗜热芽孢杆菌来源的TyrTs的空间结构已解析到3.1Å°,它与底物酪氨酰腺苷复合体的空间结构也已测定。这些研究揭示酶与底物之间可能形成11对氢键(图2)其中8对来自氨基酸侧链。

从82年起英国Fersht等人^(2,6-8)对这8个侧链残基利用蛋白质工程进行系统突变以期揭示氢键在决定与底物结合专一性以及参与催化过程中作用。从酶反应动力学数据计算出各突变体的结合能的改变列于表1

长期以来人们相信酶能利用它与底物的结合能来提高催化反应的速率,它源于未反

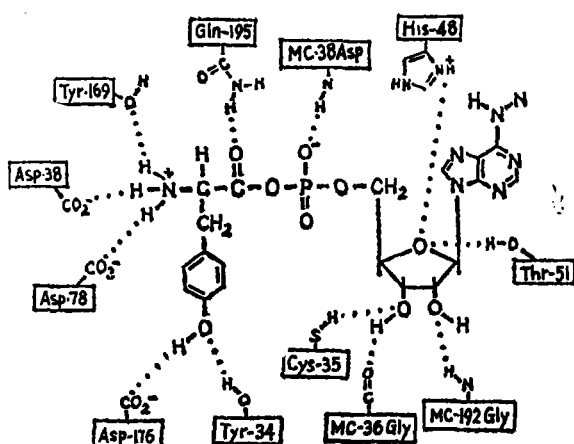


图2 嗜热芽胞杆菌酪氨酰tRNA合成酶和酪氨酰腺苷间可能形成的氢键。MC表示主链氢键

表1 野生型与突变型TyrTS与底物结合能的比较

野生型	突变型	底物	ΔG (Kcalmol ⁻¹)
Tyr ³⁴	Phe ³⁴	Tyr	0.52
Cys ³⁵	Gly ³⁵	ATP	1.14
Cys ³⁵	Ser ²⁵	ATP	1.18
His ⁴⁸	Gly ⁴⁸	ATP	0.96
Thr ⁵¹	Ala ⁵¹	ATP	-0.44
Tyr ¹⁶⁹⁺	Phe ¹⁶⁹⁺	Tyr	3.72
Glu ¹⁹⁵	Gly ¹⁹⁵	Tyr	4.49

+ 在删除321—419位残基后的酶上进行

应底物在与酶结合后，底物在酶—底物复合物中发生扭曲所产生的“张力”。对TyrTS突变体的快速动力学研究^[8]使我们产生了新的认识。酶催化酪氨酸 (T) 与ATP (A) 生成酶酪氨酰腺苷—磷酸中间体 (E·T—A) 的反应动力学方程如下：

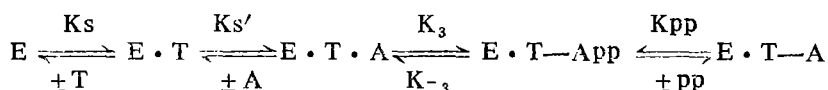


图3示Cys³⁵→Gly野生型酶(虚线)与突变酶(实线)形成酪氨酰腺苷复合物(E—T—A)时的吉布斯自由能改变。

结果清楚表明 Cys³⁵→Gly并不显著影响酶与未反应底物的结合 (K_s , K_s')，但显著提高了酶与过渡态底物结合反应活化能从而减低了酶催化速率。从而揭示过渡态结合能主

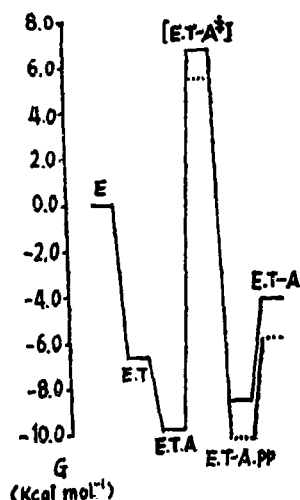


图3 酪氨酰tRNA合成酶形成酪氨酰腺苷复合物 (E·T—A) 时吉布斯自由能图
(实线: Cys→Gly突变体酶; 虚线: 野生型酶)

要用于降低化学反应的表现活化能, 而不是增进与底物的结合。酶的高催化速率原因之一是酶与过渡态分子有更好的结合, 这种结合能被用于加速酶促反应的速率。

2. 实际应用方面: 至今人们已经发现并鉴定了数千种酶, 但真正有商业价值, 一年销售额超过一千万美元的不超过十种。造成这种情况的原因一方面来自酶的生产成本。这个问题在遗传工程迅猛发展的今天已不难解决, 另一方面则来自自然界来源酶或蛋白质的性质并不尽随人意。这方面Hartley^[9, 10]有二篇极好评述。他将蛋白质工程的商业目标及可能改造的方案归纳于表2。

通过对这些性质的改造, 我们将大大提高现有酶的工业实用性并将产生巨大经济效益。表3列举了用蛋白质工程在这方面已取得的成功实例。

四、问题与展望

蛋白质工程集中了当代分子生物学一些前沿领域的最新成就, 它把核酸研究与蛋白质研究结合起来。把基础研究与应用研究结合起来把认识生命与改造生命结合起来。但是它的发展受到几个因素的制约, 其主要限制因素是:

1. 构象的快速测定手段: 以分子定向改造为目标的蛋白质工程必须借助于精确分子三维结构的信息, 而目前唯一能满足这一要求的X—射线单晶结构分析又受到单晶培养的严重制约, 它成为许多工作的限速因素。正在发展中的电子衍射三维重组、二维核磁共振以及分子动力学研究可望弥补这一缺陷, 成为构象研究的重要手段。

2. 基因高效表达及有效后处理(下游)技术, 是蛋白质工程的另一重要限速因素。欲用尽可能小的工作量得到尽可能多的突变体蛋白质以开展其结构以及性质测试, 从而尽快提出预期性质与测试性质差异并寻求其结构上的原因, 为制定新的改造方案提供反馈信息均有赖于产物的高效表达和分离。高效表达载体、分泌性寄主系统以及各种高效、批量分离技术无疑将是今后主要探索目标。

表2 蛋白质工程的目标

目 标	可采取的措施	实 例
改进热稳定性	分子内或表面引入二硫键 构建分子内氢键 改进分子内疏水相互作用 增加表面盐键	T ₄ 溶菌酶
增强对氧的稳定性	转换Cys到Ala或Ser 转换Met到Gln、Val、Ile或Leu 转换Trp到phe或Tyr	枯草杆菌蛋白酶
增强对重金属的稳定性	转换Cys到Ala或Ser 转换Met到Gln、Val、Ile或Leu 改变分子表面羧基	
PH稳定性	改变分子内部电荷基因 置换分子内部His、Cys或Tyr 置换分子内部离子对	葡萄糖异构酶
改进酶学性质	改变专一性 增加转换数 改变最适pH值	酪氨酸t-RNA合成酶 α -抗胰蛋白酶 胰蛋白酶

蛋白质工程的现状是：坚冰已经打破，航道业已开辟，一批注目的成果已经取得。一批具有潜在经济意义的蛋白质已被列入蛋白质工程的候选名单^[18]。提高植物光合作用效率将直接影响农业的增产以及全球范围内人类对太阳能的贮藏和利用。我们知道植物在通过光合作用利用太阳能固定二氧化碳同时又通过光呼吸部份消耗了所固定的太阳能，这个过程已知是由核酮糖—1.5—二磷酸羧化酶所控制的，如能通过蛋白质工程消除或减少这个酶的活力无疑等于提高光合作用效率。即使按10%计也是一笔无法估量的财富。

在医药方面有可能通过某些单克隆抗体免疫球蛋白基因与毒素肽基因融合起来创造“生物导弹”药物，用于肿瘤及其他疾病的治疗。可以预期随蛋白质工程的发展，一批优良性能的新一代蛋白质制剂将会出现在工业、农业、医药等各方面。同时蛋白质结构与功能，从一级结构预测高级结构以及折叠、去折叠的规律性等理论研究也将借助蛋白质工程技术得以解决。

在这样一个将给国民经济带来重要影响的崭新学科领域我们起步尚不为晚，我们认为看准势头、组织力量给予尽可能的支持在现在无疑是适时的。

参 考 文 献

1. M.J.Zoller, et al.; Method in enzymology vol.100, ed.by Wu R.Academic

表3 蛋白质工程已取得成果实例

诱变蛋白质 (酶)	氨基酸突变	目 标	实 际 结 果	文献
T ₄ 溶菌酶	ILu ³ →Cys	构建工程二硫键增加分子热稳定性	成功: 还原酶67℃半生存期由11分提高到6小时	11
枯草杆菌蛋白酶	Met ²²² Ala →Ser ¹⁶⁶ →Leu Gly ¹⁶⁶ →Lys	提高酶抗氧化性能, 用以制备含漂白剂的添酶洗涤剂。 展宽酶作用的底物范围	成功: 突变体保留50%原酶活力, 但在1mol/L H ₂ O ₂ 存在下一小时不丢失酶活力 成功: 突变酶对原标准底物活力不变, 但对以L-Glu代替L-phe所形成肽键水解速率提高500倍。	3 12
α—抗凝酶	Met ³⁵⁸ →Val →Arg	提高酶的抗氧化性能	成功: 突变蛋白质产生抗中性弹性蛋白酶抑制活力和强抗氧化性产生不需肝素活化的抗凝血酶Ⅲ的活力, 有希望用于血栓病治疗	13
胰蛋白酶	Gly ²¹⁶ →Ala Gly ²²⁶ →Ala	提高酶对精氨酸肽键的水解专一性 底物专一性影响	成功: 突变酶Arg/Lys水解速率由原11.4±0.9提高到28.9±6.1。Arg/Lys水解速率由11.4±0.9降低为0.57±0.12, 突变酶对Lys肽链表现更好水解活力。	14
二氢叶酸还原酶	Asp ²⁷ →Asn	证明酶活性中心含 Asp	成功: 突变酶完全失活	16
β—内酰胺酶	Ser ⁷⁰ →Cys { Ser ⁷⁰ →Thr Thr ⁷¹ →Ser	证明Ser对酶活力的重要性	Ser ⁷⁰ 突变酶失活	4 15
β—干扰素	Cys ¹⁷ →Ser	增加产物的稳定性	成功: 突变体表现更好稳定性。	17
人白细胞间质素—2 (1 L—2)	Cys ⁵⁸ →Ser Cys ¹⁰⁵ →Ser Cys ¹⁵² →Ser	提高稳定性	不成功: 产物活力下降 产物活力不变	17

Press Inc. N.Y. 1983, 468—500

2. J. Winter, et al.: Nature 299, 1982, 756—758
3. J.A. Wells et al.: Gene 34, 1985, 315—323
4. S.C. Schultz, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1986 1538—1592
5. K. Wüthrich and G. Wagner TIBS 9, 1984, 1984
6. A.J. Wilkinson, et al.: Nature 307, 1984, 187—188
7. Tim N.C. wells, et al.: Nature 316, 1985, 656—657
8. A.R. Fersht, et al.: TIBS 11, 1986, 321—325
9. B.G. Hartley: Presented at BIOTECH 86': Online publication, Pinner, UK. 1986.
10. B.S. Hartley: Trans. R. Soc. Lond. A 317, 1986, 321—331
11. L.J. Perry, et al.: Science 226, 1984, 555—557
12. D.A. Estell, et al.: Science 233, 1986, 659—663
13. M. Courtney, et al.: Nature 313 1985, 149—151
14. C.S. Craik, et al.: Science 228, 1985, 291—297
15. G. Dalbadie-Mcfarland, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1982, 6409—6413; Biochemistry 25, 1986, 332—338
16. J.E. Villafranca, et al.: Science 222, 1983, 782—788
17. 仲如: 生命的化学 6, 1986, 13—14
18. K.M. Ulmer: Science 219, 1983, 666—671



谈谈在我国开展蛋白质 工程研究的一些看法

雷克健

(中国科学院生物物理研究所)

蛋白质工程已日益受到科学家和舆论的重视, 关于它产生的历史和学科背景以及成就和展望, 本刊已有另文介绍。本文拟就当前在我国开展蛋白质工程研究谈谈个人的浅见。

1. 蛋白质化学是蛋白质工程的基础学科: 蛋白质研究经过了二十多年的蓬勃发展, 人们发现了数千种不同功能和来源的蛋白质, 其中有上千种的氨基酸排列顺序已被测定, 上百种已获得高分辨率分子结构的解析。在这些成就面前, 蛋白质化学家感到除累