

成果与应用**分子生物学领域的重要成果****——蛋白质功能基团的修饰与其生物活力之间的定量关系****赵 康 源**

(生物物理研究所)

蛋白质(包括酶)分子结构与功能的关系一直是分子生物学的核心问题之一。用各种方法改变蛋白质分子中侧链基团的性质,观察对其生物活力的影响,是研究这一问题的主要方法。60年代初,邹承鲁教授在研究蛋白质分子侧链基团的化学修饰时发现,自20年代末到60年代初的30余年内,这一研究一直停留在定性的描述阶段,对于大量的实验结果没有人进行定量的数据处理。因为在蛋白质分子中某类侧链基团在功能上虽然有必需与非必需之分,但是它们在与某一试剂起反应上往往是相同的,即它们都能与某一试剂起反应。所以,虽然从实验上可以测得随侧链基团的被修饰导致其生物活力下降的关系,但是在所测得的基团中,既有必需的,也有非必需的。由于长期以来人们没有找到蛋白质分子的生物活力与必需基团之间的定量关系,也就无法从实验数据中确定必需基团的性质及其数目,有的学者甚至作出了错误的定量结论。当时邹承鲁教授认为,妨碍这一领域深入研究的主要障碍是蛋白质分子的生物活力与必需基团之间的定量关系,这个问题不解决,实验资料积累再多,也不可能从中得到更多更有价值的信息。当时美国科学家 Ray 和 Koshland 用动力学方法确定必需基团的性质和数目的文章还未发表。他总结和分析了当时已积累的大量实验结果,将蛋白质分子活力与必需基团之间的定量关系概括为下述6种情况:

(1) 试剂仅作用于蛋白质分子中同种侧链基团,其中必需与非必需基团与试剂的作用速度相同。

(2) 蛋白质分子的同种侧链基团中,按其于试剂作用速度的不同可分为三类,其中一类中含有必需基团。三类基团与试剂作用的速度相差很大,第一类基团与试剂反应完毕后,第二类才开始反应;第二类基团与试剂反应完毕后,第三类才开始反应或根本不反应。

(3) 蛋白质分子的同种侧链基团中,可分为与试剂作用速度不同而又相差不太大的两类,其中之一类含有必需基团。

(4) 必需基团已被全部修饰的蛋白质分子仍有部分剩余活力。

(5) 同类必需基团中,任余其中之一,蛋白质分子即保留全部活力。

(6) 试剂同时作用于蛋白质分子中两种不同的侧链基团,二者中均含有必需基团。

邹承鲁教授对上述6种情况,用统计学方法分别给出了确定必需基团性质和数目的定量公式,并根据这些公式建立了所谓邹氏作图法。

在邹承鲁教授进行研究他的统计学方法的同时, Ray 和 Koshland 于1961年发表了他们的动力学方法。但是这一方法是建立在测定修饰反应的一级动力学的基础上,用比较侧链基团

被修饰的一级动力学常数和失活的一级动力学常数来确定必需基团的性质和数目,对于那些反应速度极快和不满足一级动力学反应条件的修饰作用无法应用,因而在普遍应用的意义上存在着很大的局限性。而邹承鲁教授1962年发表的统计学方法不受上述条件的限制,因此在国际上已得到广泛的承认和大量应用。它已被收编入国外不少教科书和专著中。1979年出版的英国著名Dixon和Webb酶学教科书中,曾分别以同样的篇幅介绍Ray-Koshland方法和邹承鲁方法。但是在以后出版的教科书和专著中则主要介绍邹承鲁方法。这说明这一方法是当前研究蛋白质侧链基团化学修饰和生物活力变化之间的定量关系的主要方法,在教科书和引用文献中被称之为邹氏方法、邹氏公式和邹氏作图法。1984年英国Brocckhurst提出,邹氏作图法可以作为判别酶特征的一种重要手段,并据此得出木瓜凝乳蛋白酶A(Chymopapain A)即是木瓜凝乳蛋白酶S(Chymopapain S)的结论。此外,国内外不少作者对邹氏作图法作了进一步的理论探讨。近些年来,邹承鲁教授领导他的实验室对这一方法也作了进一步的理论研究。不仅将邹氏公式推广到多亚基的别构蛋白和半位反应,而且也对邹氏作图法的可靠性给予了严格的证明。理论运算的结果表明,剩余活力偏离理论线十万分之一的可能性仅有万分之一,因而这一方法到目前为止在理论和应用上都已达到了完善和成熟的地步。

邹承鲁教授在提出这一方法的同时,对当时文献中已有的大量实验数据进行了定量处理,又提出在蛋白质分子中为其生物活力所必需的侧链基团通常只是其中的极少数。这一结论已为20多年来国内外大量实验结果所证实。国外实验室广泛应用这一方法已对几十种蛋白质的必需基团给出了定量的结果。在邹承鲁教授所领导的实验室里对一些蛋白质的必需基团也给出了定量的结果。胰岛素和胰蛋白酶分别有2和3对二硫键,木瓜蛋白酶有必需组氨酸和色氨酸各一个,肌酸激酶则有必需巯基和色氨酸各一个等。

邹氏方法确立的意义首先在于它把蛋白化学修饰研究本身由定性描述转入定量研究提供了理论依据和计算方法。众所周知,蛋白质(包括酶)是构成生物体的一类最重要的含氮有机化合物。生命的本质——新陈代谢所包括的千变万化的化学反应都是在具有生物活力的特殊

蛋白质——酶的催化下进行的,它的组成单位是氨基酸,其通式是 $\text{NH}_2-\overset{\text{R}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{COOH}$ 。组成蛋白质的氨基酸共有20种,不同种氨基酸仅表现在它们的侧链基团R的差异上。多种氨基酸通过肽键连接起来形成多肽链。多肽链在经过卷曲、折叠最后形成具有空间结构的蛋白质分子,这时它才具有生物活力。在所有的侧链基团中,有极少数是蛋白质分子表现其生物活力所必需的,它们被称之为必需基团。当这些侧链基团(或功能基团)通过化学作用而改变其原有性质时,被称之为侧链基团(或功能基团)的化学修饰。蛋白质分子中如果有一个必需基团被破坏,它的生物活力立即丧失。因而确定蛋白质分子中必需基团的性质和数目成为研究蛋白质结构与功能的关系的核心问题之一。但是,正如前面已提到的,在蛋白质的生物活力与必需基团之间的定量关系确立之前,是无法用实验直接测定必需基团的性质和数目。而用邹氏方法则很容易解决这一问题。如对于胰蛋白酶化学修饰的研究,用邹氏方法处理,就很容易得到在它的4个羧基中,有1个快反应非必需基团,3个慢反应基团,其中有两个慢反应基团是其表现生物活力所必需的。因此这一定量关系的发现和据此建立的作图法把化学修饰研究推向一个新的定量研究阶段。

其次,这一方法也是蛋白质工程设计的必要前提和手段之一。蛋白质工程研究的目的是在

于将天然的蛋白质分子改造成为人们所预想的在结构和功能上更适合于人类需要的新的蛋白质分子。例如,人们如果用蛋白质工程的方法将天然的酶根据需要改造成结构更稳定、具有更高的催化活性,并且在工业生产中能长期反复使用而不变性,那么可以预言,这一工程的实现将引起化工生产的大变革。但是进行蛋白质工程的研究有两个重要的前提条件,其一是首先要弄清楚蛋白质分子的结构与其功能的关系;其二是要有成熟的基团技术作为基础。而化学修饰的研究正是为蛋白质工程创造第一个前提条件的主要方法之一,因而用简便而成熟的邹氏方法首先确定蛋白质分子中必需基团的数目和性质,也正是为蛋白质工程的设计者有目的有选择性地改变蛋白质分子中某些氨基酸进而获得一种人们所预想的新的蛋白质提供必要的前提和手段。

这一成果的获得,从1962年文章的发表到1987年获得国家自然科学基金一等奖和1989年获陈嘉庚生命科学奖,经历了国内外同行从理论到实验上的长期考验。文章首先是在国内的《生物化学和生物物理学报》上发表的,由于后来又在《中国科学》外文版上发表,又经历了将近十年之久才逐渐得到各国学者的了解和重视,以至于后来被大量应用并证明是迄今为止研究蛋白质生物活力的变化与必需基团之间的定量关系的最好方法。邹承鲁教授的另一项关于酶作用不可逆抑制动力学的工作,1965年在国内以中文发表后在国际上几乎无人知道,直到1982年在美国权威杂志上以附录形式重新发表后,立即引起国外同行的重视,在短短的7年中已经在国际上的有关文献中被大量引证和应用。

以上事实说明,一项科研成果的被肯定当然首先是它本身的科学价值,但是如果它不能及时地被人们了解并用来推进科学事业的发展,即使是一颗珍珠也会失去它的光彩。所以从科学管理的角度上看,鼓励科学工作者将他们的研究成果特别是基础研究的成果,在国外杂志上发表是十分重要的。因为科学是没有国界的,科学上的任何一项重要的发现都必须在世界范围内接受检验和最后被认可。由于某种特定的原因,当然有些发明、专利等,在一定时期内会受到一个国家的保密限制。此外,值得提出的另一个更为重要的问题是,让科学家特别是从事基础学科研究的科学工作者有自由选题的自主权是繁荣和发展科学事业必不可少的条件之一。前面已经提到,这一成果的选题是邹承鲁教授分析了当时这一领域研究进展的状况自行决定的。当时我国正处于三年经济困难时期,也正因为如此我国的各项政策进行了相应的调整,纠正了一些左的错误作法,给科技工作者创造了比1958年前后较好一些的工作环境,为这一科研成果的诞生创造了条件。一项科研成果的出现,科学工作者自身的素质固然起到关键的作用,但是为科学工作者充分发挥聪明才智的客观环境也是成功的必要条件之一。