

α -突触核蛋白异常积聚的分子机理

胡红雨 林晓静

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031. E-mail: hyhu@sibs.ac.cn)

摘要 α -突触核蛋白(α -Syn)的异常积聚与帕金森综合征的发生密切相关, 但是它的致病机理尚没有明确的定论. 本文介绍有关 α -Syn 异常积聚的分子机理研究的最新进展, 着重从积聚核心序列、抑制剂、结构转换和纤维形态 4 个方面加以讨论. 探索 α -Syn 积聚的分子机理对于了解这类疾病的致病原因, 开发新的预防和治疗手段具有重要意义.

关键词 α -突触核蛋白 积聚 分子机理 GAV 模体

α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)是由 140 个氨基酸残基组成的可溶性小分子蛋白, 主要在脑部神经细胞表达, 定位于突触前神经末梢^[1]. 它最早是在鉴定阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)中的淀粉样斑时发现的. 当时先发现其NAC片段(non-amyloid component), 从而找到了其前体蛋白NACP^[2], 后来被命名为 α -突触核蛋白^[3]. 已经鉴定出A30P和A53T两个错义突变可以导致某些家族性遗传帕金森病(Parkinson's disease)的早期发作^[4,5], 但这不是惟一的致病原因.

尽管 α -Syn的功能还未得到充分认识, 但随后的免疫组织化学实验发现, 该蛋白质在帕金森症等患者的脑组织中形成了大量不溶性包涵体^[6], 并且在体外, 通过原子力显微镜和电子显微镜观察, 这一蛋白质及两个突变体都能够积聚成淀粉样纤维^[7]. 这都预示着 α -Syn的异常积聚(aggregation)或淀粉样化(amyloidogenesis)与神经退行性疾病的致病机理密切相关. 实际上, 目前的研究证实包括 α -Syn在内的许多蛋白质的异常积聚与多种神经退行性疾病有关^[8]. 在我们以前的综述文献^[9]中, 已经对蛋白质的异常积聚进行了讨论. 尽管到目前为止帕金森症真正的致病机理还没有明确的定论, 也没有找到有效的治疗手段, 但越来越多的研究表明, 研究蛋白质异常积聚的分子机理对于深入探索神经退行性疾病的发病机理有着积极的意义. 本文结合我们近年来的研究成果, 将着重从积聚核心序列、抑制剂、结构转换和纤维形态 4 个方面就 α -Syn异常积聚的分子机理进行

讨论.

1 引起 α -Syn 积聚的核心序列

α -Syn在溶液状态下以无规卷曲的形式存在. 其氨基酸序列的N 端为两亲区域, 中间区域(61 ~ 95)也称为NAC片段, 由许多疏水性氨基酸残基组成, C 端为酸性氨基酸区域(图 1). 体外合成的NAC多肽在保温条件下很容易自主积聚, 形成淀粉样纤维, 能对神经细胞产生毒性^[10], 并能抵抗蛋白酶水解, 表明 α -Syn的NAC区域对于它的异常积聚以及某些神经退行性疾病的发生密切相关. 远紫外圆二色谱的结果也显示, 在不同浓度的三氟乙醇诱导下, 含有NAC序列的片段 α -Syn₁₋₁₀₀ 可以转换成 β -折叠片层的二级结构中间态, 从而加速了积聚的发生; 反之缺失NAC的 α -Syn₁₋₆₀ 片段则不能形成 β -折叠中间体, 也不能发生积聚^[11]. 这也说明NAC片段对于 α -Syn积聚确实是非常重要的.

对NAC片段的进一步研究发现, 它的N-端 18 肽(相当于 α -Syn的 61~78 序列)经过体外保温后容易形成纤维, 而C-端 17 肽(79 ~ 95)则仍在溶液中, 说明N-端序列对NAC多肽片段的自主积聚更为重要^[12]. 这也表明在 α -Syn的NAC区域中还应该存在一个更为核心的序列, 决定其纤维化进程. 比较突触核蛋白家族中的同源蛋白 α -Syn, β -Syn和 γ -Syn的一级序列发现, α -Syn中的序列 72 ~ 84 在 β -Syn中缺失, 且在 γ -Syn中也不完整, 导致后两种蛋白质不容易发生积聚, 从而推测这段序列对 α -Syn的纤维组装是重要的^[13]

2006-07-24 收稿, 2006-12-14 接受

国家自然科学基金(批准号: 39990600, 30570377)、中国科学院留学经费择优支持回国工作基金(批准号: STZ97-2-02)、中国科学院知识创新工程(批准号: KSCX2-SW-209)和上海市科委(批准号: 98QA14017, 03JC14081)资助项目

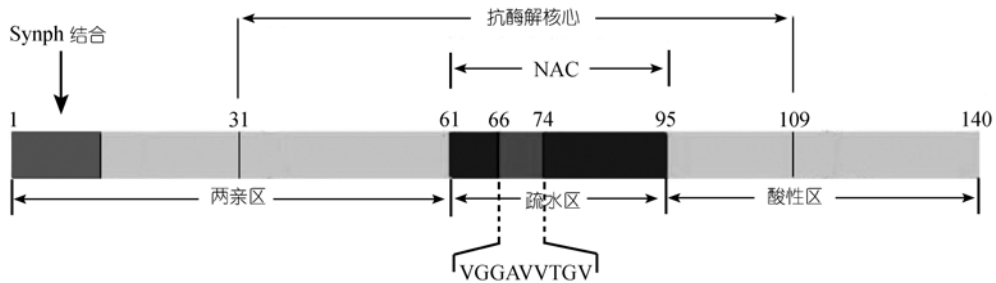


图1 α -Syn 的序列特征

α -Syn 序列分为3个区域: N-端的两亲区(1~60), 中间疏水的 NAC 片段(61~95)和 C-端的酸性氨基酸区域(96~140)。NAC 片段中的 VGGAVVTGV 肽段(66~74)是 α -Syn 的积聚核心, 而中间的 31~109 肽段是抗蛋白酶核心

通过序列比对显示, α -Syn, A β 肽(β -amyloid peptide)和普利朊(prion, PrP)等容易发生淀粉样化的蛋白质中均含有一段较为疏水的同源序列VGGAVVAGV, 命名为GAV模体(GAV motif)^[9](图2)。对 α -Syn蛋白的中部区域⁶⁶VGGAVVTGV⁷⁴进行详细的研究, 结果表明, α -Syn蛋白中的66~74序列对其积聚起着关键性作用^[14]。这一片段的缺失不仅能够阻止它的纤维化过程, 并且能够抑制对PC12细胞的毒性作用。有关A β 肽中的GAV序列对于纤维化和神经细胞毒性的重要性也有报道^[15]。在 α -Syn蛋白中, 正是这段GAV序列在起作用; 更为重要的是, 这段同源序列都位于淀粉样化蛋白的非折叠区域, 这一共同点就促使我们思考是否这也是引起蛋白质纤维化的一个原因。我们采取将目标多肽序列引入到不同结构宿主蛋白的方法, 结果表明, 把GAV序列插入到松散的 α -Syn和 γ -Syn时, 可以引起宿主蛋白的积聚, 而对于具有稳定结构的宿主蛋白质硫氧化还原蛋白(thioredoxin)和蛋白质G IgG结合结构域(Protein G IgG-binding B1 domain), 则不能使其从可溶状态转

源序列为VGGAVVAGV, 命名为GAV模体^[9]

变为纤维化积聚物, 说明积聚的发生与GAV序列所处的宿主蛋白质结构有关, 具有松散结构的宿主蛋白容易引起积聚^[16]。

至此, 我们可以认为GAV序列对 α -Syn的积聚和细胞毒性是至关重要的。有关其他淀粉样蛋白质中的GAV同源序列(图2)对积聚、纤维形成和细胞毒性的影响有待进一步研究。

2 对 α -Syn 积聚的促进或抑制作用

由于 α -Syn的异常积聚, 在患者体内形成了大量不溶性的路易氏体(Lewy bodies)和路易氏神经突(Lewy neurite)^[6], 这些积聚物对多巴胺能神经细胞(dopaminergic neuron)具有细胞毒性, 会导致细胞程序性死亡^[17]。因此, 寻找淀粉样化蛋白质积聚的抑制剂和研究抑制剂的作用机理将对疾病的治疗具有重要的意义。

我们通过筛选发现, 多巴胺(dopamine, DA)及其一些类似物对 α -Syn的积聚有潜在的抑制作用。这些化合物为多酚类物质, 它们的抑制作用不是由于其抗氧化性, 也不是通过酚环与蛋白质的结合作用。实验结果证实, 这主要是多酚氧化为醌, 与 α -Syn侧链赖氨酸残基的 ϵ -氨基反应生成仲胺, 从而抑制蛋白质的纤维化。同时细胞毒性实验显示, 由于多巴胺抑制蛋白质纤维的形成, 使得寡聚体的累积, 寡聚体对细胞毒性增大^[18]。有研究认为, 单体的 α -Syn对神经细胞没有毒性, 成熟纤维的毒性也较小, 而寡聚体或原纤维毒性才是最大的, 它才是致病的关键^[19]。我们的研究也证实, 加入多巴胺后, 虽然抑制了 α -Syn成熟纤维的生成, 但由于寡聚体的大量累积, 反而对神经细胞的毒性更强。这也可以解释, 为什么L-多巴作为

A β (AD)	29~36	-GATIGLMV
	36~44	VGGVVIATV
	38~46	GVVIATVIV
PrP(PrPD)	112~120	MAGAAAAGA
	117~125	AAGAVVGG
	122~130	VGGLGGYML
α -Syn(PD)	63~71	VTNVGGAVV
	66~74	VGGAVVTGV
	70~78	VVTGVTAVA
同源序列	GAV模体	VGGAVVAGV

图2 淀粉样蛋白质 A β , PrP 和 α -Syn 中的 GAV 同源序列 这些序列具备无规卷曲的结构方式, 存在于A β 中的29~46位(已发现有A β ₁₋₄₆肽的剪切方式), PrP中的112~130位和 α -Syn中的63~78位。这些序列的共同特点是富含Gly, Ala和Val及其他疏水残基, 其同

帕金森症一种辅助治疗药物,在早期可以减弱病症,而长时间治疗后反会导致病症的加重。

因此,从抑制蛋白质积聚物对神经细胞毒性的角度出发,筛选有治疗价值的抑制剂应从两条思路考虑:一条就是抑制蛋白质的纤维化,但不能稳定寡聚体的生成;如果不能达到效果,那应该考虑另一条思路,就是加速蛋白质的积聚过程,使其生成稳定的成熟纤维。我们之前也尝试用点突变的方法在蛋白质的核心序列中引入带电荷氨基酸残基(V66R, G68R, G68E, V74R, V70RV71R),以抑制蛋白质的纤维化,虽然效果很明显,但都伴随着大量寡聚体的生成^[14]。El-Agnaf等人^[20]从抑制蛋白质积聚的角度出发,找到了 α -Syn的68~72位序列(GAVVT)。通过在肽段两头分别引入亲水性残基Arg的方法,合成不同长度的肽段,希望能找出抑制效果更好、长度最短的肽段。最后他们发现了AVVT,即RGAVVTGR-NH₂最符合要求。我们合成了之前在研究淀粉样化蛋白质中发现的GAV同源序列短肽(VGGAVVAGV-NH₂, VGG-AVVTGV-NH₂)。实验结果表明,这些短肽可以和 α -Syn中的核心区域发生相互作用,对 α -Syn及其突变体(G68R, G68E)的积聚有明显的促进作用^[21];而带电的短肽(VGGARRAGV-NH₂)对 α -Syn的积聚有一定程度的抑制作用。这一发现为利用多肽类似物作为治疗药物,特别是将有毒性的寡聚体和原纤维转变为成熟纤维这一思路提供了新的线索。

3 用固相圆二色性法研究 α -Syn 积聚过程中的结构转换

有人提出假设,认为蛋白质发生纤维化过程中,多肽链先从有序折叠的结构转变成部分折叠状态,再进一步寡聚化,最终组装成成熟的纤维或者是无定形沉淀^[8]。目前,监测蛋白质结构变化的广泛和便利的方法是圆二色性光谱(circular dichroism, CD),它的远紫外光谱可以提供蛋白质中 α -螺旋和 β -折叠等二级结构含量的变化。利用固相CD的方法来研究蛋白质积聚物,可以更加直观地检测蛋白质在纤维化过程中二级结构的变化。该方法是将一定浓度的蛋白质溶液或悬浊液置于石英片的表面,待液体挥发干燥后形成一层蛋白质表面薄膜,然后直接在圆二色谱仪器上测定远紫外图谱^[22]。我们已经通过CD的方法,测定了 α -Syn在液相和固相中二级结构的转换,发现它从液相中的无规卷曲结构转变成固相中

的 β -折叠为主的结构^[22],提示 β -折叠的形成可能在蛋白质积聚过程中起着重要作用。由于测定固相CD时无法确定蛋白质的浓度和光径,就很难精确测量蛋白质的摩尔椭圆度,因此只能定性分析蛋白质的结构含量和类型。McPhie^[23]提出,应用g-因子(g-factor)的概念解决这一问题。g-因子是物质在一定波长的椭圆度和吸光度的比值,它是物质的固有参数,只与物质类型有关,而与物质浓度和测量光径无关。因此,通过测定蛋白质的远紫外g-因子图谱,根据标准二级结构的g-因子谱就能够计算出蛋白质在固体状态下的二级结构含量^[24]。利用g-因子图谱的方法,我们测定出 α -Syn及各种不同长度片段在固相时的二级结构含量,进一步证实其中间的GAV序列(66~74)为一段疏水核心区域,易形成 β -折叠结构,这对蛋白质的纤维化是非常必要的^[25]。

从我们之前的实验结果来看, α -Syn的纤维化过程中发生 β -折叠的转变是非常重要的。这是由于 β -折叠的形成容易产生一个疏水的环境,因而比其他的二级结构更容易发生积聚。这可以用ANS与蛋白质的疏水界面结合后测定其荧光强度的方法得到验证^[11]。随着大量 β -折叠结构的出现,通过疏水作用,这些结构转换产物又进一步组装成淀粉样纤维或者无定形沉淀。除了 α -Syn外,其他与神经退行性疾病相关的蛋白质,如A β 肽也容易发生向 β -折叠结构的转变,从而加速肽链自主积聚的过程,最终在病人脑内形成不溶性的淀粉样斑;而PrP蛋白从良性的PrP^C变成致病性的PrP^{Sc}时,也伴随着从富含 α -螺旋向以 β -折叠为主结构的转变过程。总之,蛋白质在发生异常积聚过程中,结构上的转变特别是 β -折叠的形成是非常重要的^[9]。

4 α -Syn 积聚物的形态

研究蛋白质积聚物的微观形态,对于深入了解纤维的自组装机制和积聚形成的分子机理有着积极的意义。但由于这些积聚物的不可溶性,不能结晶,并且分子量很大,用常规的技术手段如NMR和X-射线晶体衍射来研究其结构非常困难。近几年发展起来的固相CD,傅里叶红外(FTIR),原子力显微镜(AFM),低温电子显微镜(Cryo-EM),固相NMR(solid-state NMR)和氘气交换技术可以提供更加精确的纤维结构。但到目前为止, α -Syn淀粉样纤维的自组装机制及其纤维内部微观结构信息仍然是一个未解之谜。

研究发现, α -Syn 的积聚过程符合成核机制, 它在细胞内的模型也显示积聚是从生成寡聚体开始, 再逐渐延伸成原纤维, 最后长成成熟的纤维^[26]。我们用光化学交联的方法, 对 α -Syn的早期积聚形态进行了研究。该蛋白在溶液中是以一种单体和二体的混合形式存在, 也有少量的三体形式; 它的积聚行为很可能是从这些二体和三体的形式开始的, 并且我们还发现该蛋白的N-端区域对于寡聚体的形成非常重要^[27]。最近, 有研究认为, α -Syn形成的寡聚体含有47%的 α -螺旋, 29%的 β -折叠, 而在形成了原纤维之后则变成了37%的 α -螺旋和54%的 β -折叠, 在长成成熟的纤维之后 β -折叠占主要成分, 约为66%^[28], 说明 α -Syn的N-端两亲性区域容易导致其早期寡聚体的形成, 使得它的二级结构成分中含有许多 α -螺旋。用内源色氨酸荧光标记的方法也发现在 α -Syn纤维化的过程中出现了寡聚体的中间态^[29]。FTIR结果也显示, 积聚后的蛋白质在 1625 cm^{-1} 处有吸收峰, 说明有 β -折叠结构的生成^[25]。X-射线纤维衍射实验的结果证实, α -Syn组装成的纤维不溶物具有交叉 β -折叠结构。纤维的水平方向显示 0.47 nm 反射斑, 垂直方向 $1.0\sim 1.1\text{ nm}$ 反射斑^[30]。通过AFM成像技术, 我们观察到, 成熟的 α -Syn纤维的平均高度为 $6.6\text{ nm}\pm 0.5\text{ nm}$, 而截短的各种蛋白质片段所形成的纤维通常变细, 约为 $3\sim 5\text{ nm}$, 说明 α -Syn形成的纤维直径与其肽链的长短呈正相关(结果未显示)。根据以前的报道, α -Syn纤维存在一个能抵抗蛋白酶解的核心, 氨基酸序列为 $31\sim 109$ 位^[31](图1)。我们用蛋白酶水解成熟的 α -Syn纤维, 并用AFM进行原位观察, 确实发现随着时间的延长, 纤维的直径明显降低, 但长度没有发生变化。用变性剂(尿素、盐酸胍)处理组装好的纤维时发现, 长纤维被解聚成短纤维, 而纤维小颗粒的直径并没有发生改变; 而当用稀释方法也可以使成熟 α -Syn纤维逐步发生解聚作用^[32]。由此可见, α -Syn纤维确实形成了交叉 β -折叠结构, 即纤维的生长方向垂直于 β -折叠片层, 但有关纤维组装的模型还需要进一步的实验加以证实。

5 总结

我们针对 α -Syn异常积聚的分子机理, 从积聚的核心序列、结构转换、促进或抑制作用、积聚物形态4个方面进行了较详细的研究。有关积聚物的微观形态结构及与细胞毒性的关系是今后需要着重探讨的

问题。从已有的报道来看, 神经退行性疾病的发生与脑内淀粉样蛋白质的异常积聚或纤维化是密切相关的。这些关键蛋白质序列中有的含有GAV模体(图2), 有的则含有多聚谷氨酰胺(如多种Ataxin蛋白)。因此, 研究淀粉样蛋白的异常积聚的分子机理将为认识这类疾病的病理发生和设计药物提供理论依据。

致谢 感谢所有参加过该项目工作的研究人员和研究生。

参 考 文 献

- 1 Maroteaux L, Campanelli J T, Scheller R H. Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, 1988, 8: 2804—2815
- 2 Ueda K, Fukushima H, Masliah E, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11282—11286[DOI]
- 3 Jakes R, Spillantini M G, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*, 1994, 345: 27—32[DOI]
- 4 Polymeropoulos M H, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997, 276: 2045—2047[DOI]
- 5 Kruger R, Kuhn W, Muller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, 1998, 18: 106—108[DOI]
- 6 Spillantini M G, Schmidt M L, Lee V M, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997, 388: 839—840[DOI]
- 7 Conway K A, Harper J D, Lansbury P T Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 2000, 39: 2552—2563[DOI]
- 8 Uversky V N, Fink A L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: The importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1698: 131—153
- 9 胡红雨. 异常蛋白质积聚与神经退行性疾病. *科学通报*, 2000, 45: 1905—1908
- 10 El-Agnaf O M A, Jakes R, Curran M D, et al. Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett*, 1998, 440: 71—75[DOI]
- 11 Li H T, Du H N, Tang L, et al. Structural transformation and aggregation of human alpha-synuclein in trifluoroethanol: NAC sequence is essential and beta-sheet formation is prerequisite to aggregation. *Biopolymers*, 2002, 64: 221—226[DOI]
- 12 El-Agnaf O M A, Bodles A M, Guthrie D J S, et al. The N-terminal region of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is responsible for its tendency to assume beta-sheet and aggregate to form fibrils. *Eur J Biochem*, 1998, 258: 157—163[DOI]
- 13 Biere A L, Wood S J, Wypych J, et al. Parkinson's disease-associated alpha-synuclein is more fibrillogenic than beta- and gamma-synuclein and cannot cross-seed its homologs. *J Biol Chem*,

- 2000, 275: 34574—34579[DOI]
- 14 Du H N, Tang L, Luo X Y, et al. A peptide motif consisting of glycine, alanine and valine is required for fibrillization and cytotoxicity of human α -synuclein. *Biochemistry*, 2003, 42: 8870—8878[DOI]
- 15 Harper J D, Lansbury P T Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 385—407[DOI]
- 16 Ji L N, Du H N, Zhang F, et al. An Unstructured Region Is Required by GAV Homologue for the Fibrillization of Host Proteins. *Protein J*, 2005, 24: 209—218[DOI]
- 17 Kirik D, Rosenblad C, Burger C, et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*, 2002, 22: 2780—2791
- 18 Li H T, Lin D H, Luo X Y, et al. Inhibition of α -synuclein fibrillization by dopamine analogs via reaction with the amino groups of α -synuclein: Implication for dopaminergic neurodegeneration. *FEBS J*, 2005, 272: 3661—3672[DOI]
- 19 Goldberg M S, Lansbury P T Jr. Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol*, 2000, 2: E115—E119
- 20 El-Agnaf O M A, Paleologou K E, Greer B, et al. A strategy for designing inhibitors of alpha-synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's disease and related disorders. *FASEB J*, 2004, 18: 1315—1318
- 21 Du H N, Li H T, Zhang, F, et al. Acceleration of α -synuclein aggregation by homologous peptides. *FEBS Lett*, 2006, 580: 3657—3664
- 22 Hu H Y, Li Q, Cheng H Q, et al. β -sheet structure formation of proteins in solid state as revealed by circular dichroism spectroscopy. *Biopolymers*, 2001, 62: 15—21
- 23 McPhie P. Circular dichroism studies on proteins in films and in solution: Estimation of secondary structure by g-factor analysis. *Anal Biochem*, 2001, 293: 109—119
- 24 McPhie P. CD studies on films of amyloid proteins and polypeptides: Quantitative g-factor analysis indicates a common folding motif. *Biopolymers*, 2004, 75: 140—147
- 25 Lin X J, Zhang F, Xie Y Y, et al. Secondary structural formation of α -synuclein amyloids as revealed by g-factor of solid-state circular dichroism. *Biopolymers*, 2006, 83: 226—232
- 26 Lee H J, Lee S J. Characterization of cytoplasmic alpha-synuclein aggregates. Fibril formation is tightly linked to the inclusion-forming process in cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 48976—48983
- 27 Li H T, Lin X J, Xie Y Y. The early events of α -synuclein oligomerization revealed by photo-induced cross-linking. *Protein Pept Lett*, 2006, 13: 385—390
- 28 Apetri M M, Maiti N C, Zagorski M G, et al. Secondary structure of alpha-synuclein oligomers: characterization by raman and atomic force microscopy. *J Mol Biol*, 2006, 355: 63—71
- 29 Dusa A, Kaylor J, Edridge S, et al. Characterization of oligomers during alpha-synuclein aggregation using intrinsic tryptophan fluorescence. *Biochemistry*, 2006, 45: 2752—2760
- 30 Makin O S, Serpell L C. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J*, 2005, 272: 5950—5961
- 31 Miake H, Mizusawa H, Iwatsubo T, Hasegawa M. Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments. *J Biol Chem*, 2002, 277: 19213—19219
- 32 Tang L, Li H T, Du H N, et al. Study of the disassembly-assembly process of α -synuclein fibrils by in situ atomic force microscopy. *Micron*, 2006, 37: 675—679