科学通报
第41卷 第17期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年9月

尿胰蛋白酶抑制剂的空间结构预测

姚志萍* 朱德煦
(南京大学生物化学系,南京 210093)

毕汝昌
(中国科学院生物物理研究所,北京 100101)

关键词 胰蛋白酶抑制剂 蛋白质结构预测 蛋白质结构域

尿中的胰蛋白酶抑制剂(urinary trypsin inhibitor,简称 UTI)[1]是丝氨酸蛋白酶抑制剂的一种,存在于人类的尿液中,可抑制胰蛋白酶、弹性蛋白酶等多种蛋白酶的活性,是治疗急性胰腺炎的特效药. 迄今为止,UTI 的三维结构仍属未知. 它是一种糖蛋白,含糖量高达 50%,同时,它也是一种双结构域蛋白,它的结构信息对于我们研究蛋白质结构域间的相互作用也极有益. 鉴于 UTI 重要的生物学功能以及特殊的结构意义,我们对 UTI 的空间结构进行了预测,所用的方法是已被众多结构生物学家认可的同源结构预测法[2],它的基本思想是:蛋白质的空间结构比一级序列更为保守.

1 材料与方法

同源结构预测法的首要步骤是寻找与所研究的蛋白质序列同源且空间结构已知的蛋白质. 采用 FASTA 软件[3]在 PDB 数据库中搜寻的结果是:牛胰蛋白酶抑制剂(bovine pancreatic trypsino inhibitor, BPTI)[4]与 UTI 同源,它与 U1, U2 的氨基酸序列相同度分别为 39.3%和 37.5%,且在半胱氨酸处全保守(图 1). 同时发现,二者残基的疏水性及二级结构倾向性[5]具有较高的相似性. 基于以上的比较,我们认为,U1, U2 和 BPTI 具有类似的主链构象.

```
UTI N-端     A V L P Q E E E G S G G G Q L V T E V TK---
             ↑                              ↑  ↑ ↑↑ ↑

U1           KEDSCQLGYS.AGPCMGMTSR.YFYNGTSMAC.ETFQYGGCMG.MGNNFVTEKE.CLQTCR
               : :       :::     : ::::     :   : ::::     :::       :  ::
BPTI         RPDFCLEPPW.TGPCKARIIR.YFYNAKAGLC.QYFVYGGCRA.KRNNFKSAED.CMRTCGGA
                 :  :    ::: : :       :  : :   : ::::     : : :    :   ::
U2           TVAACNLPVI.RGPCRAFIQL.WAFDAVKGKC.VLFPYGGCQG.NGNKFYSQKE.CREYCGVP

UTI C-端     --V P G D E D E E L L
                    ↑  ↑↑↑
```

图 1 UTI 和 BPTI 的氨基酸序列比较
":"处为二者氨基酸序列相同处,"↑"处为酶切位置

1995-08-15 收稿

* 现在单位:中国科学院生物物理研究所,北京 100101

模型的构建和优化采用 BIOSYM[1)] 和 QUANTA[2)] 软件包在 SGI 工作站上完成. U1 和 U2 的主链初始坐标取自 BPTI,侧链则采用该种氨基酸残基的最常见构象[5]. 在相应号残基处也与 BPTI 相同地引入 3 对二硫键,人工粗调后进行 500 轮最速下降法能量优化.

在进行两个结构域连接时,以 U2 的 1-4 残基为构象柔性较大的连接肽,使 U1 末端与 U2N 端第 5 号残基的距离不应超过 1.432 nm. 同时考虑:(A)疏水面作用;(B)立体几何互补性;(C)两结构域连接后应可同时与两种酶而不产生空间位阻[1];(D)结构域相互作用能应尽量低. 寻找到两结构域的相对取向后,以连接肽前后各 1 个残基的构象为限制条件,在 PDB 数据库中搜寻与其有着最好连接且中间为四肽的肽段,以这样的四肽的构象为连接肽的初始构象将 U1,U2 两个结构域相接,即完成了 UTI 的整体模型的初步构建. 对连接肽以及其前后两残基进行 100 轮最速下降法的能量极小化,然后对 UTI 模型整体进行 500 轮最速下降法能量优化,此时能量各项均已收敛,即得到了 UTI 的结构模型.

2 结果和讨论

从原子间的堆积来看,U1 和 U2 堆积得都较紧密,内部无大的空洞. 这一点可以从它们的体积看出:U1 和 U2 的体积分别为 10 978.7 和 11 988.6,而 BPTI 则为 12 220.5. 观察 U1 和 U2 的剖面图还可发现,U1 和 U2 均各有一疏水的内核,U1 的疏水内核主要由 22 号 Phe 和 33 号 Phe 组成,在 U2 则为 9 号 Val,20 号 Leu 和 33 号 Phe,这也与蛋白质的一般结构规律相符. 比较 BPTI 和 U2 的抑制作用位点处空间结构,发现二者几乎完全重合. 由于 BPTI 和 U2 均为胰蛋白酶抑制剂,其活性部位结构的相似性即支持了 U2 结构的合理性. 另外,BPTI 中和 U2 相同的残基,如 12～14,16,18,33,35～38 号等,在空间上都集中到了作用位点附近的关键部位. U1 情况与此相似.

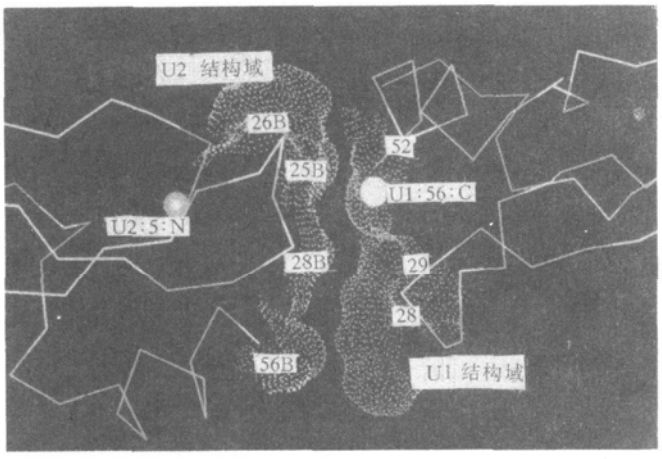


图 2 UTI 两个结构域的相对位置

U1 连接 U2 后,通过图象检查有如下特征:一些疏水性残基包埋于接触面之内,例如 U1 上的 52 号 Leu 与 U2 上 25 号的 Ala,26 号的 Val 以及 28 号的 Gly 相接触,而且结合面其他方面互补性也较合理. U1,U2 连接后,有 5.26 nm^2 的溶剂可及表面积被包埋起来,其中疏水的为 3.52 nm^2,占大部分,也就是说,两个结构域之间大部分为疏水性的表面;同时它们在空间上凸凹相对(图 2);并可与胰蛋白酶和弹性蛋白酶同时作用(图 3),表明此种结合是合理的.

UTI 糖结合位点 45 号的 Asn 位于模型表面,与糖结合位点位于分子表面的一般规律相符. 此残基因位于二级结构折叠结束处,可结合大量的糖链而不至于显著影响局部结构的稳定

1) Insight II User Guide. Version 2.2.0. San Diego: Biosym Technologies, 1993

2) QUANTA Reference. Version 2.1. Waltham: Polygen Corporation, 1989

性,同时它远离抑制作用位点,从而也不会因糖链的切除或存在而影响 UTI 功能的发挥.

在模型构建工作即将结束的时候,我们得知有一种与 BPTI 同源的蛋白质-AAPI, Alzheimer's amyloid β-protein precusor 的蛋白酶抑制剂结构域的晶体结构被测定出来了[6],它与 BPTI 的序列同源性为 44.8%,二者 CA 的 RMS 偏差仅为 0.0887 nm. 由于 AAPI 的晶体结构是已知的,为了考察我们预测的 U1 和 U2 结构的精确度,这里采用完全相同的方法对 AAPI 进行了预测. 结果是:AAPI 模型与晶体 56 个 CA 原子的 RMS 偏差 0.094 1 nm,所有 434 个重原子的偏差为 0.211 8 nm,都比较小,且主要发生在表面残基的侧链中. 这样,AAPI 的预测结构是基本可靠的,也即可旁推对 UTI 的所作结构预测也是基本可靠的.

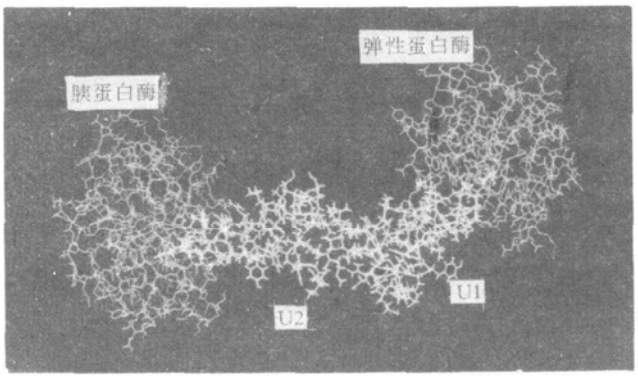


图 3　UTI 与胰蛋白酶和弹性蛋白酶的复合物

以 AAPI, BPTI 的晶体结构为基准,我们比较了 AAPI, U1, U2 模型的各项参数(表 1),如能量、氢键数、溶剂可及表面以及体积等,发现模型和晶体结构的这些参数都是接近的,故可导出结构预测方法是可行的结论.

表 1　AAPI 模型与晶体结构 AATI, BPTI 及 U1, U2 模型各项参数的比较

	AAPI 模型	AATI 晶体结构	BPTI 晶体结构	U1 模型	U2 模型
总能量	−1 555.72	−1 603.08	−1 293.86	−1 726.95	−1 451.92
氢键总数	42	49	45	42	40
亲水面积	1 904	1 926	1 665	1 247	1 319
疏水面积	1 980	2 007	2 311	2 532	2 568
总溶剂可及表面	3 883	3 933	3 975	3 778	3 871
体积	11 055.3	11 090.7	12 220.5	10 978.7	11 988.6
总原子数	434	434	445	424	432

参　考　文　献

1　Gebhard W, Hochstrasser K. Proteinase Inhibitors. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1986. 389～401

2　Browne W J, North A C T, Philips D C. A possible three-dimensional structure of biovine α-lactalbumin based on that of hen's egg-white lysozyme. J Mol Biol, 1969 42: 65～86

3　Pearson W R, Lipman D J. Improved tools for biological sequence analysis. PNAS, 1988, 85: 2 444～2 448

4　Deisenhofer J, Steigemann W. Crystallographic refinement of the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 1.5Å resolution. Acta Cryst, 1975, B 31:238～150

5　Poder J W, Richards F M. Tertiay templates for proteins. J Mol Biol, 1987, 193: 775～791

6　Hynes T R, Randal M, Kennedy L A *et al*. X-ray crystal structure of the protease inhibitor domain of Alzheimer's amyloid β-protein precursor. Biochemistry, 1990, 29: 10 018～10 022