<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1996-41-17-1605>

模型的构建和优化采用 BIOSYM¹⁾ 和 QUANTA²⁾ 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 nm² 的溶剂可及表面积被包埋起来, 其中疏水的为 3.52 nm², 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 precursor 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。

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

图 3 UTI 与胰蛋白酶和弹性蛋白酶的复合物

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 bovine 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 Ponder J W, Richards F M. Tertiary 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