

两类脂肪酸合酶中酮酰还原酶的结构、功能和药物开发前景

吴晓东, 程 晴, 杜亚涛, 田维熙

(中国科学院研究生院 北京 100049)

〔摘要〕 自然界中脂肪酸合酶(FAS)以 FAS I 和 FAS II 两种形式存在。存在于动物中的 FAS I 是由多活性中心构成的复合酶,存在于植物和细菌中的 FAS II 则是由多个独立蛋白构成的酶体系。FAS I 和 FAS II 中催化酮酰基团还原的酶有一定同源性,酶催化动力学和酶抑制动力学的性质相似,因分子量过大,目前尚无详细的 FAS I 空间结构信息。通过比较两种类型 FAS 中酮酰还原酶结构与功能的异同,进一步了解 FAS I 的结构与功能。对两种不同进化程度和存在形式的同源酶进行比较研究,将有利于揭示复合酶的结构与功能,并利于寻找新型特异性蛋白抑制剂,为新药开发提供先导化合物,具有十分重要的理论意义和应用价值。

〔关键词〕 脂肪酸合酶, 酮酰还原酶, 结构与功能

〔中图分类号〕 Q554+.9

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 1000-7857(2005)05-0018-04

STRUCTURE, FUNCTION AND DRUG DEVELOPMENT OF KETOACETYL REDUCTASE OF TWO KINDS OF FATTY ACID SYNTHASE

WU Xiao-dong, CHENG Qing, DU Ya-tao, TIAN Wei-xi

(Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Natural Fatty Acid Synthase (FAS) exists in two different forms as FAS I and FAS II. The animal FAS I is a multifunctional enzyme consisting of seven active domains, and FAS II existing in plants and bacteria is an enzymatic system comprising seven independent proteins. FAS I and FAS II exhibit homological characters in the enzyme catalyzing ketoacyl reduction, and they show similar enzyme catalyzing and information is not clear. The goal of this project is to compare the similarity and difference between the structure and function of two kinds of ketoacyl reductase, thereby understanding the structure and function of FAS I. The comparison studies of these two homological enzymes will help to elucidate the structure and function of multifunctional enzyme and may be beneficial to exploring new-type inhibitors with specialty, which shows great theoretic meaning and practical value in exploring leading chemicals for drug development.

Key Words: fatty acid synthase, ketoacyl reductase, structure and function

CLC Number: Q554+.9

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)05-0018-04

自然界中脂肪酸合酶 (Fatty Acid Synthase, FAS, E.C. 2.3.1.85) 以 FAS I 和 FAS II 两种形式存在。FAS I 存在于动物中, 是一种复合酶, 单一肽链上包含 6 个不同的催化活性结构域和 1 个酰基携带蛋白 (ACP), 并共价连接 1 个磷酸泛酰巯基乙胺辅基, 它在催化反应中携带中间产物。FAS I 在细胞中利用 NADPH 催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A, 还原合成长链脂肪酸的一系列反应^[1]。该酶的双亚基反平行相接的构架已基本清楚, 单亚基分子量约 273KD。但由于该酶分子量大, 又尚未结晶, 精确的空间结构至今未明^[2]。FAS II 存在于细菌与植物中, 是由 7 个不同的酶和 1 个 ACP 构成的酶系, 每一个酶催化脂肪酸合成过程中的一步反应, ACP 在催化反应中携带中间产物。在功能上, FAS II 中的乙酰转酰酶和丙二酰转酰酶, 同 FAS I 中乙酰丙二酰转酰酶 (MAT) 这一个活性中心相对应, 其余的酶和 FAS I

中的另外 5 个活性中心一一对应, 并且在序列上有一定的同源性^[3]。过去 40 年间, 有关 FAS II 各个组成酶的生物学、遗传学及结构生物学研究都取得了显著的成果。

1 FAS I 的结构和功能

FAS I 在禽类中主要存在于肝脏, 而在哺乳动物中则主要分布在肝脏和脂肪组织中, 在大脑、肾脏、肺也有分布。动物 FAS 含有 2 个相同亚基, 分子量约为 540KD。每个亚基都含有 6 个不同的活性中心和 1 个 ACP-4-PP 活臂 (rotating arm)^[4]。这 6 个活性中心分别是丙二酰/乙酰转酰酶 (MAT)、 β -酮酰合成酶 (KS)、 β -酮酰还原酶 (KR)、 β -羟脂酰脱水酶 (DH)、烯酰还原酶 (ER) 和长链脂肪酸硫酯酶 (TE)。生成软脂酸整个反应过程需要 7 次循环, 每一次循环中, 缩合反应都

收稿日期: 2005-01-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30440038), 中国科学院研究生院院长基金资助项目 (yzjj200304)

作者简介: 吴晓东, 北京市玉泉路甲 19 号中国科学院研究生院, 副教授, 主要研究方向为细胞分子生物学; E-mail: wuxd@gscas.ac.cn

生成 1 个 β -酮酰部分, 而这一部分在经历了酮酰还原、脱水、烯酰还原后, 生成了 2 个碳原子的饱和酰基部分, 经过 7 次延长和还原, 最终生成软脂酸^[4]。

通过蛋白水解图谱可确定亚基中各活性部位的排列。动物 FAS 2 个相同亚基是按照头尾相接、反平行的并列方式排列, 每个亚基由 3 个主要结构域(I、II、III)和大约 650 个氨基酸残基的连接结构域组成^[4]。

通过对 FAS I 用定点突变方法研究表明: Cys¹⁶¹、Lys³²⁶、Ser⁵⁸¹、Arg⁶⁰⁶、His⁸⁷⁸、Ser²¹⁵¹、Ser²³⁰² 等氨基酸残基是酶的必需基团, 通过化学修饰等办法发现 Arg 为 β 酮酰还原酶、烯酰还原酶的必需基团^[4]。 β 酮酰还原酶和烯酰还原酶分别包含着 2 个富甘氨酸核苷酸结合的活性区: Gly¹⁶⁷⁰-Ser-Gly-Gly-Val-Gly 和 Gly¹⁸⁸⁶-Leu-Gly-Gly-Ph-Gly, 而每一个结构区都被认为具有二级结构在 α -螺旋和 β -折叠间变化的特性。

2 FAS I 的调控

FAS I 所涉及的调控分为两种: ① 短期调控, 涉及变构、代谢物调控、酶的共价修饰; ② 长期或适应性调控, 涉及酶合成和降解速度引起酶量的改变^[4]。

关于动物 FAS 短期调控了解得不多。研究表明, 果糖-1,6-二磷酸可刺激 FAS I, 而软脂酰 CoA 则可抑制 FAS^[4]。NADPH 可以激活活着的 FAS I, 而 NADP⁺是 FAS I 的抑制剂。另外, 有研究表明, FAS I 中的 4'-PP 的更新速度可能与 FAS I 活力改变有关, 酶的磷酸化也可能引起活性的改变。

关于动物 FAS I 长期调控的研究结果则积累较多。研究表明, 营养、激素以及发育阶段都对 FAS I 有调控作用。动物在禁食一段时间以后, 喂以含高碳水化合物、无脂肪的食物, 肝脏、脂肪组织的脂肪酸合成增加。脂肪酸合成的增加则是因为 FAS I 活性的增加。碳水化合物的这种诱导作用涉及它对基因转录、mRNA 加工和稳定性改变的调控。在不同组织中, FAS I 的调控机制不同。

3 FAS I 与癌症和减肥药物开发

研究表明, 癌细胞中反常地高表达 FAS II, FAS II 很可能是癌变的一个有效标记分子和新的癌症治疗靶点。

Kuhajda 等证实, 人类乳腺癌中呈现高水平的 FAS II 表达和活性, 并提出 FAS I 可能是一个新的抗肿瘤靶点^[5], 之后的陆续报道表明在许多癌细胞中都有异乎寻常的 FAS II 高表达。经过近年来的临床及基础研究, 发现癌细胞可以不依赖于正常细胞中脂肪酸合成的调节信号而合成自身所需的脂肪酸。在哺乳动物中, FAS I 只在脂肪组织、肝脏、脑和肺等少数组织中表达, 这为它作为治疗癌症的新靶点提供了条件。正常细胞和癌细胞表达 FAS I 的差异性, 以及 FAS I 抑制剂对癌细胞选择性杀伤作用都表明, FAS I 是一个潜在的癌症化疗靶点^[6]。动物 FAS I 独特的复合酶结构和表现酶活性的方式也为药物开发提供了广阔的平台, 不仅它的 7 个酶活性中心的任何一个被抑制都会影响到整个酶的活性, 而且它们相对位置的变化、活臂运动规律的破坏以及双亚基解聚等特定的变化都会造成失活, 这些都使得 FAS I 可能成为治疗癌症的一个好的新靶点。以此为基础, 可能开发出全新的癌症化疗方法和预防方法。

高等动物的体脂一方面靠直接摄入, 另一方面则是由体内自身合成^[1]。通过对能量物质体内生化代谢途径进行的

分析可以发现, 主要能量物质碳水化合物、油脂以及部分氨基酸的初级代谢终点都是乙酰辅酶 A。其进一步的代谢进入三羧酸循环完全氧化, 这是生物细胞获得能量的主要来源。同时乙酰辅酶 A 也是合成脂肪的起点, 第一步是先被 ACC 羧化为丙二酰辅酶 A, 再由 FAS I 催化, 进行一系列的反应后合成为脂肪酸, 完成合成脂肪的主要工作。从这个角度看, 乙酰辅酶 A 是个能量汇集点, 能量物质摄入体内后被氧化产生能量, 还是合成脂肪, 由乙酰辅酶 A 这个“关节点”进行分配。该分配的比率取决于这两大通路的通畅程度, 任一通路的被阻滞或去阻滞都会影响生能和生脂的分配。所以, 抑制 FAS I 的活性, 既能够阻滞生脂通路, 减少脂肪的合成, 又能够造成丙二酰辅酶 A 浓度的升高, 抑制中枢系统调控饮食的神经肽, 从而达到降低食欲的目的, 具有一举两得的作用。而且 FAS I 是一个很大的多功能复合酶^[1], 对它进行活性调控可有多位点, 因而较容易实现。因此 FAS I 很可能是体内调节能量消耗和储存的重要位点之一, 也是一个很好的调节靶位。合适的 FAS I 抑制剂既能调节脂肪的代谢和储存, 又能降低食欲减少食物摄入, 特别是其作用并不依赖于特定的基因缺陷, 使得此项研究具有广泛而深远的意义, 已引起有关学者的极大关注。

近年来, 作为减肥和抗癌的双重靶点, FAS I 正成为生物医学研究领域的热点, 其抑制剂的筛选和研究也成为新药开发的新途径^[6, 7]。

4 FAS II 的结构和功能

FAS II 系统是由一系列单独基因编码的独立蛋白构成, 见表 1。由 FAS II 催化进行的脂肪酸合成的途径见图 1。

表 1 FAS II 各个酶及其对应的基因

Gene	Enzyme activity
<i>accABCD</i>	Acetyl-CoA carboxylase
<i>accA</i>	Carboxyltransferase subunit
<i>accB</i>	Biotin carboxy carrier protein
<i>accC</i>	Biotin carboxylase
<i>accD</i>	Carboxyltransferase subunit
<i>acpP</i>	Acyl carrier protein (ACP)
<i>fabA</i>	β -Hydroxydecanoyl-ACP dehydratase
<i>fabB</i>	β -Ketoacyl-ACP synthase I
<i>fabD</i>	Malonyl-CoA:ACP transacylase
<i>fabF</i>	β -Ketoacyl-ACP synthase II
<i>fabG</i>	β -Ketoacyl-ACP reductase
<i>fabH</i>	β -Ketoacyl-ACP synthase III
<i>fabI</i>	Enoyl-ACP reductase I
<i>fabK</i>	Enoyl-ACP reductase II
<i>fabL</i>	Enoyl-ACP reductase III
<i>fabZ</i>	β -Hydroxyacyl-ACP dehydratase II
<i>fadR</i>	Transcriptional activator/repressor
<i>farR</i>	Transcriptional activator/repressor
<i>fabR</i>	Transcriptional activator/repressor

整个催化反应的中心环节是一个小分子量的蛋白, 即酰基携带蛋白。ACP 通过形成硫脂键和脂肪酸合成过程中的各个中间物结合, 这种 ACP 硫脂是 FAS II 系统中各个组成酶的底物, 不同物种的 ACP 可以互换。

5 FAS II 的调控

科学家们曾试图阐明 II 型脂肪酸的合成是如何调控, 以及它和其它大分子的合成之间是如何协调的。该领域的一个关键性实验是在大肠杆菌中过表达酰基 ACP 硫脂酶并导致脂肪酸合成的加速及不受限制^[8]。正常情况下, 脂肪酸合成达到一定的水平将停止, 但是当有高水平的硫酯酶

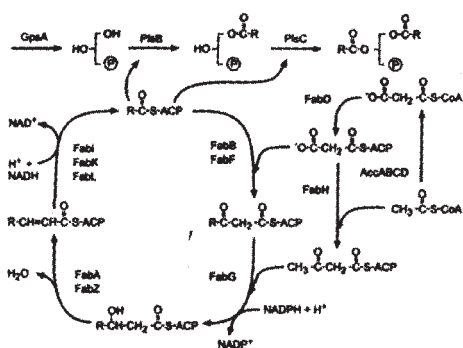


图1 FAS II催化的脂肪酸合成途径

存在的情况下,细胞将持续产生脂肪酸并被排出菌体外。对这一现象最直接的解释是长链酰基 ACP 是整个脂肪酸合成途径中一些关键酶的反馈抑制剂。当长链酰基 ACP 被硫酯酶降解后,这些关键酶的抑制被解除,并最终导致脂肪酸合成的不受控制。相应地,有 3 个酶受到酰基-ACP 的调控:首先是乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC 催化的反应受长链酰基 ACP 的抑制,这导致脂肪酸链延长需要的丙二酰基团的供给受到限制;其次是 FabH 催化的脂肪酸延长的起始步骤,同样它的活性也受到酰基 ACP 的抑制,在这一位置的调控也将导致脂肪酸的合成,而且,这种抑制作用在酰基 ACP 的脂肪酸链长度增加时显得更加明显;最后, FabI 也受到酰基 ACP 的抑制。事实上,酰基 ACP 是 FabI 的产物,所以这也很可能是所谓的产物抑制,正是由于 FabI 在完成脂肪酸合成循环过程中起到了决定性作用,该酶的抑制将直接影响脂肪酸合成的速率。

尽管有关酰基 ACP 在 II 型脂肪酸合成过程中的调控还有许多内容需要研究,但毋庸置疑,酰基 ACP 是大肠杆菌控制脂肪酸合成的中心环节^[9]。

6 FAS II 与抗菌药物开发

近些年来,FAS II 研究领域里的重要进展就是以 II 型脂肪酸合成途径为靶点进行抗菌药物的研发。由于病原体抗菌性越来越广泛,人对细菌的抵抗能力也相应越来越弱,因此具有新型作用机制的抗菌药物是目前急需的。脂肪酸合成是细菌的重要生理过程,通过对一系列在脂肪酸合成途径中相关的酶的突变体的研究,显示抑制这些酶将直接导致细菌的死亡,因此也就证实,它们适合作为药物开发的靶点^[10]。

了解分支杆菌(*Mycobacteria*)的脂类代谢对于治疗肺结核是十分重要的,最近的研究证明,阻断脂类代谢是抗分支杆菌治疗的关键。异烟肼(isoniazid)可通过抑制 II 型脂肪酸合成从而抗结核病。它很可能是抑制了烯酰还原酶的活性,也可能是抑制了缩合酶的活性从而起到抗菌作用^[10]。

随着后基因组时代的来临,关于 FAS II 的知识已经远远超越原来对模式生物大肠杆菌 FAS II 的了解,目前已有的一些针对 FAS II 的药物正在研发之中^[11]。

7 展望

在脂肪酸合成过程中,催化酮酰基团还原的酶称为酮酰还原酶。在 FAS I 中,从第 1 870 位到 2 100 位约 230 个氨基酸的序列即为酮酰还原酶结构域^[12]。在大肠杆菌的 FAS II 中,独立存在的 beta-酮酰-[酰基携带蛋白]还原酶

(FabG) 具有相同功能。尽管 FabG 具有广泛表达、重要结构的高度保守及其重要催化作用等作为广谱抗菌药物研发的良好特征,但迄今关于 FabG 的抑制剂的报道还不多^[13]。目前国际上报道的若干 FAS I 抑制剂中,只有本实验室于 2001 年报道的绿茶中的主要成分没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)可以抑制 FAS I 的 KR 活性^[14]。

在两类 FAS 的 6 个对应酶中,KR 和 FabG 具有较高的同源性。针对两者之间的比较研究,目前国际上还未见详细报道。对两者之间的共同点和不同点的研究,有利于了解酶的进化特点及复合酶的结构与功能的关系,也有利于新型 FAS 抑制剂的筛选。另外,由于 FAS I 过大的分子量,使目前的技术还不能有效地解析其空间结构,对其中一个结构域的研究也将为 FAS I 结构研究提供重要的信息和新的思路。

蛋白质的空间结构测定技术主要是 X 光晶体衍射和多维核磁共振(NMR),两者在测定蛋白质结构上各有优缺点。X 光晶体衍射测定蛋白质结构的局限在于必须得到蛋白质结晶,此外,晶体状态的蛋白质分子和生理状态下的蛋白质分子可能会有一定的差异;NMR 可以测定蛋白质在溶液中的构象,不需要结晶,这可能也更接近于生理状态。NMR 方法的局限在于只能准确测定分子量小于 35KD 蛋白质的结构,新的横向弛豫优化光谱技术的发明,使得 NMR 能够测定某些大到 100KD 的蛋白质^[15]。FabG 和 KR 结构域均是分子量约 25KD 的蛋白质,并且前期实验证明 FabG 的稳定性很好,符合 NMR 对被测蛋白样品在稳定性和大小方面的要求。此外,NMR 也是研究蛋白和小分子相互作用的理想工具,我们实验室的前期工作已经发现并报道了一些全新的 FAS 抑制剂^[16],通过 NMR,有可能从更深的层次了解这些抑制剂作用于 FAS 的机制。

作为大分子量多功能的典型复合酶,FAS I 在基础研究方面相对滞后,有巨大应用前景的 FAS 抑制剂目前还极少。由于结晶不成功和分子量过大,FAS I 空间结构至今不清。在作用机理方面,复合酶的研究一直处于比较落后的状态,例如其中起关键作用的携带中间产物的“活臂”作用机理,其 4 级结构中各活性部位结构域相互作用、对活性和稳定性的影响等研究都还是空白。动物中的 FAS I 是由非复合酶状的原核生物 FAS II 进化而来的,其进化的意义何在?而向植物进化时为何又保持了 FAS II 的状态?近年来发现在部分癌细胞中 FAS I 的异常高表达和在向动物进化中 FAS 起的作用有无关系?这些问题是否可从深入了解 FAS I 结构中得到答案?上述问题的回答可能和了解 FAS I 的结构与功能密切相关。

两类催化作用相似、但结构差异巨大的 FAS 酶体系为我们研究进化中的酶提供了极好的材料,也为研究 FAS I 的结构与功能提供了路线,即对 FAS I 和 FAS II 中相对应的结构域与独立酶做比较研究。通过现代分子生物学的技术,我们有可能将 FAS I 的酮酰还原酶结构域作为独立 KR 蛋白进行表达;在应用上,本研究可能指导开发新的 FAS I 及 FabG 的抑制剂,而对复合酶的结构与功能的了解还可能衍生出在仿生学和酶工程等方面的应用。

参考文献(References)

- [1] Smith S. The animal fatty acid synthase; one gene, one polypeptide, seven enzymes[J]. *FASEB*. 1994, 8 (15):1 248~1 259

基于复杂网络的疾病传播

王 旻, 郑应平

(同济大学控制科学与工程系 上海 200092)

〔摘要〕 疾病传播问题的研究,一直是科学家所关注的焦点。近几年兴起研究的复杂网络,真实地反映出现实中系统的某些重要特性,成为研究现实网络的有效手段。在介绍复杂网络的基础上,着重阐述了复杂网络描述疾病传播的研究工作及成果,特别指出其应用于 SARS 病毒传播研究得到的一些有意义的结论,从而为控制病毒的传播提供了一种重要的参考依据。

〔关键词〕 复杂网络, 疾病传播, 小世界, 无标度, SARS

〔中图分类号〕 N94 R18

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 1000-7857(2005)05-0021-04

EPIDEMIC SPREADING IN COMPLEX NETWORKS

WANG Min, ZHENG Ying-ping

(Department of Control Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The problem of epidemic spreading has always been concerned by many scientists. Recently, complex networks that properly reflect some important features in actual system become an effective method to research real networks.. Concept of complex networks is introduced, the research work and results of epidemic spreading in complex networks are expounded. In particular, the application of complex networks to SARS spreading research was pointed out. Some significant conclusions were found, which provides an important guide for epidemic control.

Key Words: complex networks, epidemic spreading, small-world, scale-free, SARS

CLC Numbers: N94 R18

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)05-0021-04

收稿日期: 2005-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(60343002)

作者简介: 王旻, 上海市四平路 1239 号同济大学控制科学与工程系硕士生, 主要研究方向为复杂系统、复杂网络; E-mail: zdhwm@yahoo.com.cn

- [2] Smith S, Witkowski A, Joshi A K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase [J]. *Prog Lipid Res.* 2003, 42 (4):289~317
- [3] Rock C O, Cronan J E. Escherichia coli as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1 302 (1):1~16
- [4] Wakil S J, Stoops J K, Joshi V C. Fatty acid synthesis and its regulation[J]. *Ann Rev Biochem*, 1983, 52 : 537~579
- [5] Kuhajda F P, Jenner K, Wood F D, Hennigar R A, Jacobs H B, Dick J D, Pasternack G R. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 6 379~6 383
- [6] Kuhajda F P. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology [J]. *Nutrition*, 2000, 16 (3): 202~8
- [7] Loftus T M, Jaworsky D E, Frehywot G L, Townsend C A, Ronnett G V, Lane M D, Kuhajda F P. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors[J]. *Science*, 2000, (288): 2 379~2 381
- [8] Voelker T A, Davies H M. Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acyl-acyl carrier protein thioesterase[J]. *Bacteriol*, 1994, (176): 7 320~7 327
- [9] Heath R J, Rock C O. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli* [J]. *Biol Chem*, 1996, (271): 1 833~1 836
- [10] Heath R J, White S W, Rock C O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents[J]. *Prog. Lipid Res*, 2001, (40): 467~497
- [11] Rock C O, Jackowski S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292 (5): 1 155~1 166
- [12] Jayakumar A, Tai M H, Huang W Y, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil S J. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92 (19):8 695~8 699
- [13] Zhang Yong-Mei, Rock Charles. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty acid synthase [J]. *Biological. Chemistry*, 2004, 279(30):30 994~31 001
- [14] Wang X, Tian W. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288 (5): 1 200~1 206
- [15] Pervushin K. Impact of transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) on NMR as a technique in structural biology [J]. *Q Rev Biophys*, 2000, 33 (2): 161~197
- [16] Li B H, Tian W X. Presence of fatty acid synthase inhibitors in the rhizome of *Alpinia officinarum hance* [J]. *Enzyme Inhib Med Chem*, 2003,18 (4): 349~356

(责任编辑 李慧政)