

细胞内的大分子拥挤环境*

李 剑 王志珍**

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 所有的细胞中都存在着大量的蛋白质、核酸、多糖等各种生物大分子, 它们大约占用细胞容积的 20% ~ 30%, 总浓度高达 80 ~ 200 g/L, 因此任何一种大分子都处于一个充满其他大分子的拥挤环境中. 对源于排斥容积效应的拥挤理论分析表明它对所有大分子之间的反应在热力学和动力学上都有很大的影响. 可是以往人们在体外研究生物大分子的性质和相互作用时几乎都忽略了这样一个细胞大分子拥挤的实际环境. 最近几年建议把大分子拥挤与 pH、离子强度和溶液组成等一样作为常规因素来研究生物大分子的呼声很高, 在体系中添加大分子拥挤试剂以在体外模拟细胞内环境研究蛋白质折叠已有一些实验报道.

关键词 细胞内大分子拥挤环境, 排斥容积效应, 蛋白质折叠, 拥挤试剂

学科分类号 Q71

对生命现象本质的认识多为生命科学家在研究试管中的生物大分子相互作用规律中得到的. 蛋白质折叠是分子生物学中心法则中至今尚未解决的一个重大生物学问题. 对还原变性牛胰核糖核酸酶在试管中特定条件下的完全恢复活性的研究^[1], 使得 Anfinsen 提出了“蛋白质一级结构决定空间结构”的著名论断而荣获诺贝尔奖, 为蛋白质折叠的研究开创了一个新的时代. 近几十年来蛋白质折叠的研究成果已经为认识新生肽链的折叠和解决重组蛋白包含体 (inclusion body) 的复性提供了大量的信息. 可以说, 至今为止, 体外实验仍然是生物化学和分子生物学研究的主体, 我们仍然可以从体外实验结果获取和抽提大量的有关生物大分子结构、性质、功能和相互作用的重要信息. 但是, 由于研究细胞内新生肽折叠的固有困难尚未解决, 今天还不能进行细胞内蛋白质折叠的实时研究, 因此设计模拟细胞内的条件尽可能地在接近细胞的环境中进行研究还是应该提倡的. 从蛋白质折叠来说, 首先需要考虑的细胞和试管最主要的差别就是所谓的细胞内大分子拥挤问题. 细胞中存在着成千上万种生物大分子, 细胞质内所有大分子的浓度估计高达 80 ~ 200 g/L^[2]. 依赖生长期的不同, 大肠杆菌细胞质中蛋白质和 RNA 的总浓度约在 300 ~ 400 g/L 范围^[3]. 红细胞中单血红蛋白的浓度就约有 350 g/L^[4]. 因此细胞容积的 20% ~ 30% 都被大分子占用. 由于大分子的不可穿透性使得任何一个大分子的实际可及空间大大减少, 这样的生物大分子

活动环境被称为“大分子拥挤环境” (macromolecular crowding), 它对生物大分子行为的影响用比较准确的术语描述就是“排斥容积效应” (excluded volume effect). 可以看出这里强调的是源于空间排斥的纯物理的非特异性效应, 因此把所研究的靶分子以外的其他大分子称为背景大分子 (background macromolecules). 在细胞外介质中有高浓度的多糖, 血液中含有约 80 g/L 的蛋白质^[4], 因此大分子拥挤环境在细胞外也是存在的.

大分子拥挤最早是在理论上进行研究的. 美国国立健康研究院 (NIH) 的 Minton^[5,6] 从 1983 年就开始研究大分子拥挤现象, 从理论上预测这样一个大分子拥挤环境对所有大分子之间的反应都有很大的影响, 不仅影响反应的速率而且影响反应的平衡. 近 20 年来, 他在大分子拥挤的研究中一直非常活跃^[7,8]. 最近, 提出“分子伴侣”概念的英国 Warwick 大学的 Ellis 教授指出, 如此重要的大分子拥挤问题至今却仍被大多数人忽略, 呼吁生物学家们在研究体系中一定要加入细胞内相应浓度的“拥挤试剂” (crowding agent) 以模拟细胞内的大分子拥挤环境; 一定要把大分子拥挤与 pH、离子强度和溶液组成等一样视作常规因素考虑在蛋白质折叠的研究中^[4]. 体外实验往往需要简化实验的条

*国家科技部 973 项目 (G1999075608) 和国家自然科学基金重大项目 (39990600).

**通讯联系人.

Tel: 010-64888502, E-mail: chihwang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-04-25, 修回日期: 2001-06-28

件, 譬如为了避免聚合, 蛋白质折叠研究通常是在相当低的蛋白质浓度和低的温度下进行. 也许因为绝大多数科学家都喜欢用尽可能简单的体系和方法而获取尽可能多的信息; 也许简单的体外体系给予了人们太多的恩惠反而培养了科学家们采用体外简单体系的习惯. 不管怎样, 现在也许是认真考虑细胞内大分子拥挤环境的时候了. 本文简要介绍了在生命科学研究中引进大分子拥挤概念这一学术动向, 概述大分子拥挤对生化反应影响的理论预测, 以及近年来一些研究大分子拥挤对蛋白质折叠影响的实验, 但是这方面的实验实在还进行得不多.

1 大分子拥挤效应的理论分析

1.1 热力学分析

在大分子拥挤环境中, 分子体积越大, 浓度越高, 分子的无序性就相应越小. 溶液中大分子的总浓度增加时, 每一种分子的构型熵 (configurational entropy) 都会变小, 溶液总的自由能将相应变大, 最终导致细胞内各种分子之间相互作用的结合常数要比在稀溶液中大 2~3 个数量级, 这样便能造成产物最小体积, 从而最大程度地降低溶液的自由能^[6]. 所有能导致体积改变的过程, 如大分子的组装、聚集、新生肽链的疏水坍塌、折叠及应激导致的蛋白质去折叠等等都适合这个规律.

在大分子拥挤环境中, 各种大分子的实际可及空间比表观容积小得多, 所以其热力学活度或有效浓度会增加几个数量级. 热力学活度与浓度的比值——活度系数与分子质量的关系是非线性的指数增长关系^[5], 当分子质量大于 10^3 时, 活度系数随分子质量增加而显著增加, 所以大分子拥挤环境主要对生物大分子而言, 例如大肠杆菌细胞质中一个半径为 30 nm 的球形分子的活度系数在 $10^2 \sim 10^3$ 之间^[3]. 活度系数与体系中大分子总浓度的关系也是以非线性的指数增长, 如大分子总浓度为 340 g/L 时的活度系数比浓度为 100 g/L 时的大 27 倍^[5], 因此 100 g/L 的浓度似乎很高, 但用于模拟细胞内大分子拥挤环境还略嫌不够. 此外, 背景大分子的体积越大, 活度系数的变化也越显著, 因此实验选用的拥挤试剂要与体内大分子的分子质量相近.

大分子拥挤环境只会增强大分子固有的聚集倾向, 但不会“制造”大分子的聚集, 否则细胞内的大分子最终都会因相互结合而变成固体了. 目前对细胞质的存在形式还存在争议, 但若考虑大分子拥挤效应, 那么它应当处于一种类似凝胶的状态^[4].

1.2 动力学分析

在大分子拥挤环境中, 大分子的扩散系数 (D) 可降低 10 倍, 因为一个分子移动一定距离所需的平均时间与 D^2 成反比, 所以它可能增加到原先的 100 倍^[4]. 这个效应无论对小分子还是大分子都是存在的. 分子质量越大的分子, 其扩散系数所受的影响越大. 理论计算证明背景分子对分子质量大于它的分子的扩散系数起更强的降低作用^[6].

对一个二聚体蛋白质分子的折叠, 如图 1 所示. 如果单体的二聚化是整个过程的限速步骤, 该过程称为扩散限制性过程, “拥挤”使反应分子扩散变慢, 反应的速度降低. 若 D^* 到 N 的构象调整是整个过程的限速步骤, 该过程称为暂态限制性过程. 折叠过程中的构象调整一般是使结构从松散到紧密, 是体积变小的过程, 在拥挤环境中是有利的, 加上此时 M 二聚化形成 D^* 这一步可认为处于平衡状态, 排斥容积效应通过对活度的影响增加二聚化的程度, 使平衡向右移动, 最终加速整个过程. 但是从理论上说, 当体系中拥挤试剂的浓度足够高的时候, 两个单体相遇的速率有可能降低直至成为整个过程的限速步骤. 大分子拥挤对反应速率的影响实际上是比理论预测更复杂的, 在很大程度上取决于反应的本质和拥挤试剂的浓度.

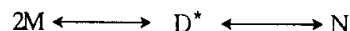


Fig. 1 Folding pathway of dimeric proteins

图 1 二聚体蛋白质分子的折叠途径

M : 单位亚基; D^* : 二聚化的折叠中间体; N : 天然二聚体分子.

2 大分子拥挤环境与分子伴侣

20 世纪 80 年代后期, Ellis^[9] 提出分子伴侣 (molecular chaperone) 的概念, 改变了蛋白质自折叠的经典概念, 也就是说, 细胞内蛋白质的折叠和组装往往不能自发进行而需要分子伴侣和折叠酶的帮助才能完成. 分子伴侣实际上正是生物克服细胞内大分子拥挤对蛋白质生物合成影响的进化产物. 细胞中存在着多种分子伴侣, 以分子质量的差异可简单地分为小分子伴侣和大分子伴侣. 大肠杆菌中核糖体的浓度约为 30 $\mu\text{mol/L}$, 绝大多数核糖体同时处于工作状态, 因而新生肽链的浓度也约为 30 $\mu\text{mol/L}$, 拥挤效应会使其有效浓度增高到 3~30 mmol/L ^[10]. 小分子伴侣 DnaJ (热休克蛋白 40) 和 DnaK (热休克蛋白 70) 以单体形式与在核糖体上延伸中的新生肽链上的疏水氨基酸短序列相接

合,防止新生肽链未完成合成之前的错误折叠,抑制相邻肽链的疏水氨基酸残基间相互作用而发生的聚集.当一个结构域的多肽链合成完全,便与小分子伴侣解离而折叠成为结构域.

一般来说,大多数折叠好的结构域不会有太多引起聚集的疏水表面暴露,但也有一些蛋白质的结构域折叠缓慢,当后续肽链仍在合成时常以部分折叠中间体的形式存在,这时可能有大量的疏水表面暴露,在拥挤环境中聚集的风险大为增加.小分子伴侣不足以阻止这种聚集,此时就需要大分子伴侣 GroEL/GroES 体系的帮助. GroEL 是单体分子质量为 57 ku 的同源十四聚体蛋白,由两个七元环背对背叠加而成,每个环有一个中心空腔,用于容纳底物蛋白质折叠中间体,环的顶部是识别和结合中间体的部位; GroES 是单体分子质量为 10 ku 的同源七聚体蛋白,组成了一个七元环,协同 GroEL 将折叠中间体释放入 GroEL 的中心空腔中,避开拥挤环境而进行折叠^[11],从而抑制翻译后折叠过程中的聚集.

3 大分子拥挤效应的实验

3.1 扩散速率

在真核生物的细胞质内,不论大分子还是小分子,扩散速率都比稀溶液中慢 3~4 倍,如绿色荧光蛋白在中华仓鼠卵细胞的细胞质中的扩散系数只有在水中的 31%^[12];而在大肠杆菌细胞质中的扩散速率比在水中的要小 11 倍^[12].当然,细胞内分子的运动行为不仅仅受拥挤的影响,还受其他因素如细胞骨架的影响.

3.2 蛋白质聚合

Rivas 等^[13]通过示踪沉降平衡法 (tracer sedimentation equilibrium) 监测拥挤环境中蛋白质的聚合行为,发现 ¹²⁵I 或异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate) 标记的纤维蛋白原在稀溶液中为单体分子,但在高浓度牛血清白蛋白存在下会形成同源二聚体;同样若丹明 (rhodamine) 标记的微管蛋白的聚合程度会随外加的合成试剂葡聚糖 (dextran) 浓度的增加而增加.最近他们又根据大分子拥挤增强细菌分裂蛋白 FtsZ 单体自聚合的现象得出了排斥容积效应的硬球模型 (hard sphere model)^[18].

3.3 蛋白质折叠

理论预测,拥挤效应促使新生肽链从松散构象向天然蛋白的紧密构象转变,同时增强蛋白质的多

聚化和聚集趋势,从而影响蛋白质的折叠. van den Berg 等^[14,15]用葡聚糖 (Dextran 70) 和聚蔗糖 (Ficoll 70) 及天然蛋白 (牛血清白蛋白和卵清白蛋白) 作为拥挤试剂,发现变性的氧化态溶菌酶能迅速而完全复性,大分子拥挤对它不起作用^[14];而还原变性溶菌酶的复性缓慢且伴随聚集,在含有 200 g/L 的拥挤试剂的溶液中因更强烈的聚集而无法复性^[14],但折叠速率比稀溶液中增加了 5 倍^[15].

Galán 等^[16]研究大分子拥挤对变性 GroEL 复性的影响,发现大分子拥挤从两个不同的方面调控 GroEL 复性时单体的多聚化行为:热力学上,单体正确自聚合成为天然的十四体 GroEL 分子和错误聚集的趋势都被增强了;动力学上,这两个相互竞争的反应速率同时受到调节. ATP 的存在使正确折叠的产率大大提高. Burston 等^[17]及 Martin 和 Hartl^[18]的实验表明大分子拥挤并不明显降低硫氰酸酶和苹果酸脱氢酶的复性产率.

我们选择同源二聚体的蛋白质二硫键异构酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) 作为靶蛋白,使用多种常用的拥挤试剂,研究大分子拥挤对这两个蛋白质复性的影响来进一步验证排斥容积效应理论.这两个蛋白质在实验条件下都不能完全复性但只检测到少量大的聚集体,后发现原来是形成了大量分子质量大于 10^6 的可溶性多聚体,说明在这两种蛋白质的复性中也存在聚集与正确折叠的竞争.但是它们的复性产率在含有浓度高达 200 g/L 的拥挤试剂的体系中仍维持不变.大分子拥挤对这两种蛋白质的正确二聚化与错误聚集都是有利的,由于复性过程中的聚集不是很强烈,所以正反两方面共同作用的结果使复性产率不变.但是折叠的动力学还是发生了很大的改变,蛋白质二硫键异构酶的折叠速率明显减慢,而 G6PDH 则由在稀溶液中的单相一级反应变为两相一级反应,而且随拥挤试剂浓度增加至 200 g/L,两相速率都降低,慢相所占比例明显增加.对此如图 2 所示,我们提出,二聚体中间体的构象调整是整个折叠过程的限速步骤,而且此限速步骤是从一个较紧密的暂态 (D_1^*) 变为一个较松散的暂态 (D_2^*),这样在拥挤环境中折叠速率随拥挤试剂浓度的增加而降低;而且,还出现一条新的折叠途径,其中 D_1^{**} 应比 D_1^* 紧密,所以新折叠途径的速率较慢,但在拥挤环境中此折叠途径更易被采纳.

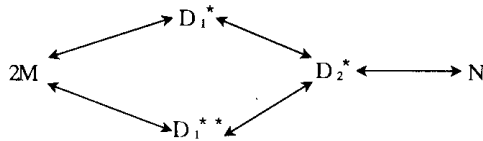


Fig. 2 Bifurcated correct folding pathways of G6PDH in crowded environment

图2 在拥挤环境中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶增加一条新的折叠途径

另外，我们在实验中还发现大分子拥挤环境中分子伴侣 GroEL 能大大加快 G6PDH 的折叠速率，抵消拥挤环境造成的折叠缓慢；而且使在拥挤环境中两相的自折叠动力学逆转为单相折叠动力学。另外，大分子拥挤也使分子伴侣蛋白质二硫键异构酶帮助还原变性溶菌酶复性的分子伴侣活性更加明显^[14]。所以可以说，因大分子拥挤而应运而生的分子伴侣的功能在拥挤环境中得到进一步锻炼而提高。

研究大分子拥挤现象对蛋白质折叠影响的实验报道到目前为止还很少，结果也不一致。我们认为大分子拥挤对蛋白质折叠的影响是极为复杂的，它与所研究的蛋白质自身的折叠性质以及所使用的拥挤试剂的性质都有关，因此大分子拥挤理论正确性的检验和对大分子拥挤规律性的认识还需要大量的实验。

4 展 望

1987 年 Ellis 提出的分子伴侣概念迅速地得到广泛接受，如今蛋白质折叠已和分子伴侣很自然地联系在一起。近年来 Ellis 又大声疾呼不要再忽视细胞内的大分子拥挤现象，希望大家“常规”地往体系中加入拥挤试剂以模拟细胞内的拥挤环境，使得体内生物反应能够在体外被更真实地加以研究^[4]。目前，已经认识到 DNA 的复制和转录必须在加入拥挤试剂的系统中研究才能得到较真实的信息。相信将来会有越来越多的生物学家考虑细胞拥挤效应的重要性，对大分子拥挤效应的实验研究也将成为新的热点。不过，笔者对于不时听到的笼统地一概贬低体外实验或试管反应的说法还得加上一句，如果 Anfinsen 一开始就在“细胞内”的条件下做他的牛胰核糖核酸酶的复性实验，那我们今天就不会有 Anfinsen 原理，蛋白质折叠研究也不会有今天的成就，而蛋白质结构预测更不可能进行。因为 Anfinsen 恰恰是在室温（约 23 ~ 24 °C）而不

是体温、且胰核糖核酸酶浓度为只有 0.35 g/L 的条件下才观察到还原变性胰核糖核酸酶的完全自复性^[11]。

参 考 文 献

- 1 Anfinsen C B, Haber E. Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem*, 1961, **236** (5): 1361 ~ 1363
- 2 Swaminathan R, Hwang C P, Verkman A S. Photobleaching and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solutions and cells: cytoplasmic viscosity probed by GFP translational and rotational diffusion. *Biophys J*, 1997, **72** (4): 1900 ~ 1907
- 3 Zimmerman S B, Trach S O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1991, **222** (3): 599 ~ 620
- 4 Ellis R J. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11** (1): 114 ~ 119
- 5 Minton A P. The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol Cell Biochem*, 1983, **55** (1): 119 ~ 140
- 6 Zimmerman S B, Minton A P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1993, **22**: 27 ~ 65
- 7 Minton A P. Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, **10** (1): 34 ~ 39
- 8 Riva G, Fernández J A, Minton A P. Direct observation of the enhancement of noncooperative protein self-assembly by macromolecular crowding: indefinite linear self-association of bacterial cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (6): 3150 ~ 3155
- 9 Ellis R J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 1987, **328** (7): 378 ~ 379
- 10 Ellis R J. Molecular chaperones: Avoiding the crowd. *Curr Biol*, 1997, **7** (9): R531 ~ R533
- 11 Xu Z, Horwich A L, Sigler P B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, 1997, **388** (6644): 741 ~ 750
- 12 Elowitz M B, Surette M G, Wolf P E, *et al.* Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, **181** (1): 197 ~ 203
- 13 Rivas G, Fernández J A, Minton A P. Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium: theory, experiment and biological significance. *Biochemistry*, 1999, **38** (29): 9379 ~ 9388
- 14 van den Berg B, Ellis R J, Dobson C M. Effect of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J*, 1999, **18** (24): 6927 ~ 6933
- 15 van den Berg B, Wain R, Dobson C M, *et al.* Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. *EMBO J*, 2000, **19** (15): 3870 ~ 3875
- 16 Galán A, Sot B, Llorca O, *et al.* Excluded volume effects on the refolding and assembly of an oligomeric protein: GroEL, a case study. *J Biol Chem*, 2001, **276** (2): 957 ~ 964
- 17 Burston S G, Weissman J S, Farr G W, *et al.* Release of both native and non-native proteins from a cis-only GroEL ternary complex. *Nature*, 1996, **383** (6595): 96 ~ 99
- 18 Martin J, Hartl F-U. The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (4): 1107 ~ 1112

Intracellular Macromolecular Crowding*

LI Jian, WANG Zhi-Zhen**

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract There are hundreds and thousands kinds of biomacromolecules within cells, proteins, nucleic acids, polysaccharides and so on, and the total concentration of those macromolecules could be high up to 80 ~ 200 g/L. In general, cellular interiors are 20% ~ 30% volume-occupied physically by macromolecules, and such an intracellular environment has been termed as "macromolecular crowding" or "the excluded volume effect" more precisely. The biophysical theory has predicted significant effects of macromolecular crowding on biochemical reactions thermodynamically and kinetically, however, the important aspect of the intracellular environment is largely neglected. It has been strongly suggested that addition of crowding agents at biologically relevant concentrations to working system should become a routine variable just like pH and ionic strength to make the study under more physiologically relevant conditions.

Key words intracellular macromolecular crowding, excluded volume effect, protein folding, crowding agent

*This work was supported by grants from 973 Project of the Chinese Ministry of Science and Technology (G1999075608) and the China Natural Science Foundation (39990600).

**Corresponding author. Tel: 86-10-64888502, E-mail: chihwang@sun5.ibp.ac.cn

Received: April 25, 2001 Accepted: June 28, 2001

《生物工程进展》

欢迎订阅 欢迎刊登广告

国际标准刊号 ISSN 1003-3505 邮发代号 82-673

《生物工程进展》是国家一级学会——中国生物工程学会会刊，由中国科学院文献情报中心和国家科技部中国生物工程开发中心共同主办。《生物工程进展》设有生物技术研究进展、学术论文、专题论述、技术与方法、评论、新闻报导、知识产权研究、市场与商情、最新项目成果、会议消息、学会动态等栏目，还以《生物工程进展》专集、增刊等形式出版生物工程专题文集。

《生物工程进展》创刊于1976年，是我国第一家中央级综合性生物工程专业刊物，发行面覆盖全国各省、自治区、直辖市、香港、台湾有关大学、研究机构、图书馆也有大量的订户，和海外建立有广泛的刊物交换联系。我国生物工程领域有关院士、专家和广大中国生物工程学会会员及生物工程研究开发、生产经营、管理决策等领域的支持是《生物工程进展》不断发展的巨大动力。

《生物工程进展》设有广告专版，可刊登生命科学领域产品、技术、信息、服务等广告。

《生物工程进展》编辑部以中国生物工程学会强大的信息与专家网络为依托，可为生物工程项目、技术、投资提供咨询服务。

《生物工程进展》为双月刊，大16开，96页，每期订价15元，全年订费90元，邮发代号：82-673，全国各地邮局发行，也可直接向编辑部订阅（免邮寄费）。

本刊地址：北京市中关村科学院南路8号（100080）

编辑部负责人：张宏翔

电话：62534585，62562548（传真）

电子邮件：biotech@mail.las.ac.cn