



中山大學
SUN YAT-SEN UNIVERSITY

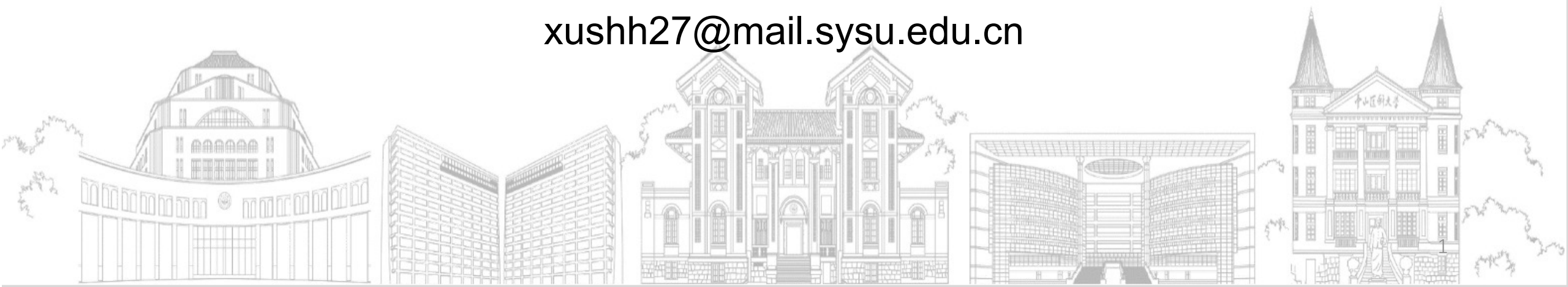
酶的催化机制和活性调节

The catalytic mechanism and activity regulation of enzymes

徐绍华

中山大学生态学院

xushh27@mail.sysu.edu.cn



课程目录

1. 酶的活性中心及特点

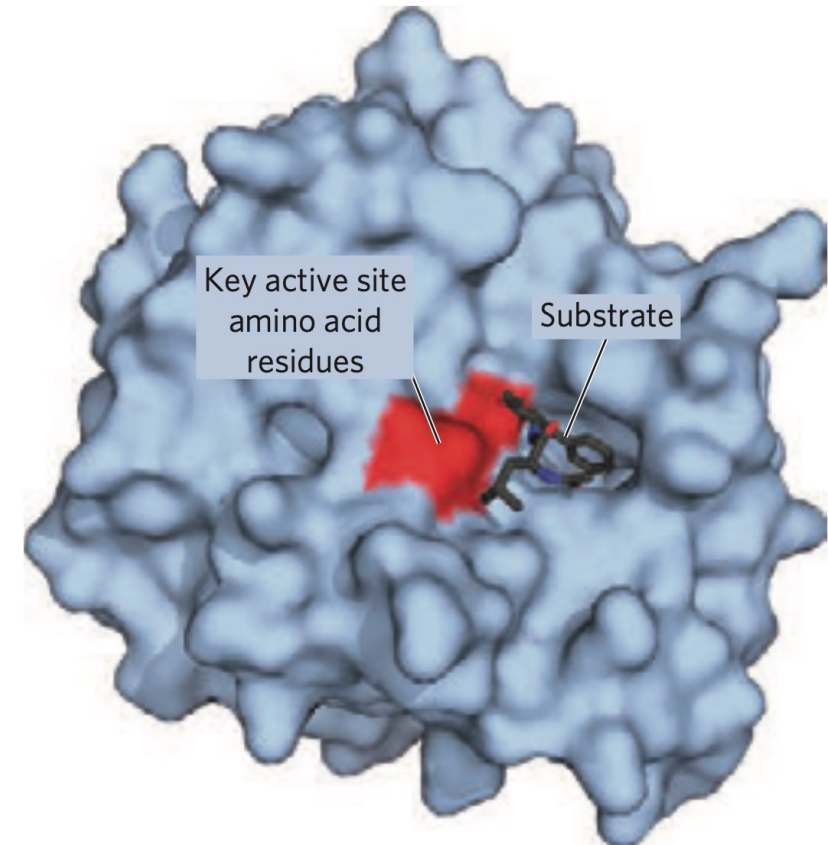
2. 酶促反应机制

(1) 酸碱催化

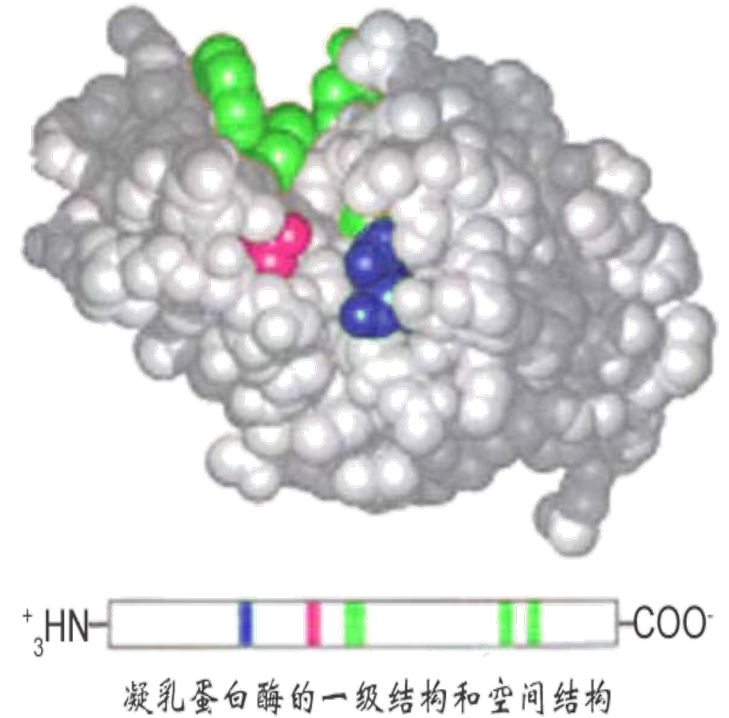
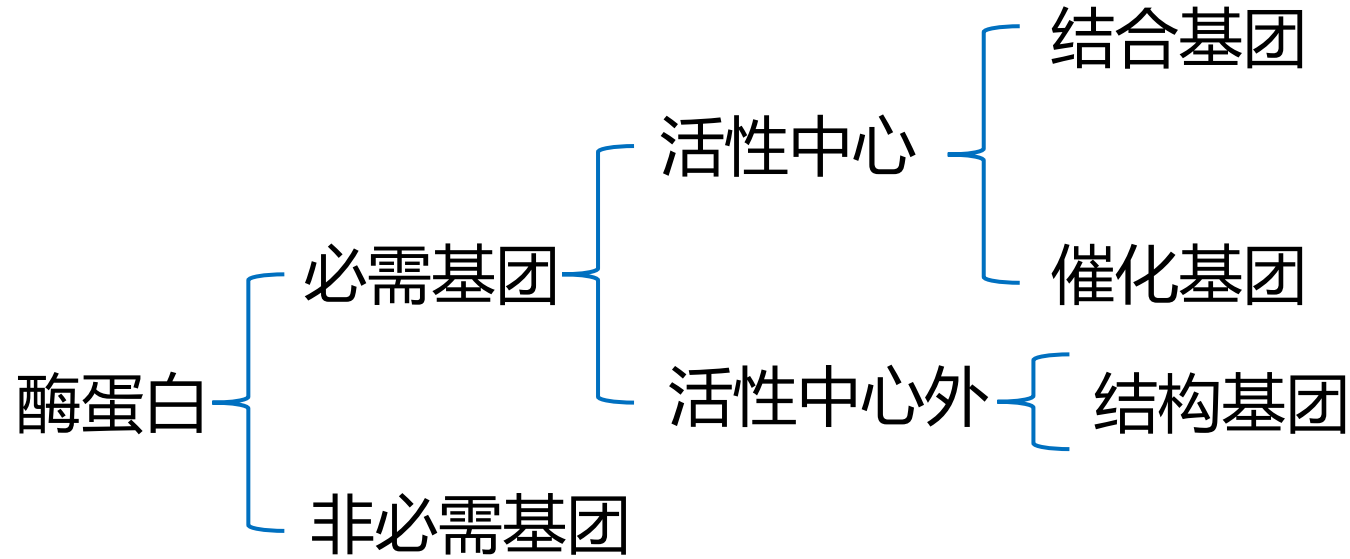
(2) 共价催化

(3) 金属离子催化

3. 酶高催化能力的原因



酶催化活性有关的基团

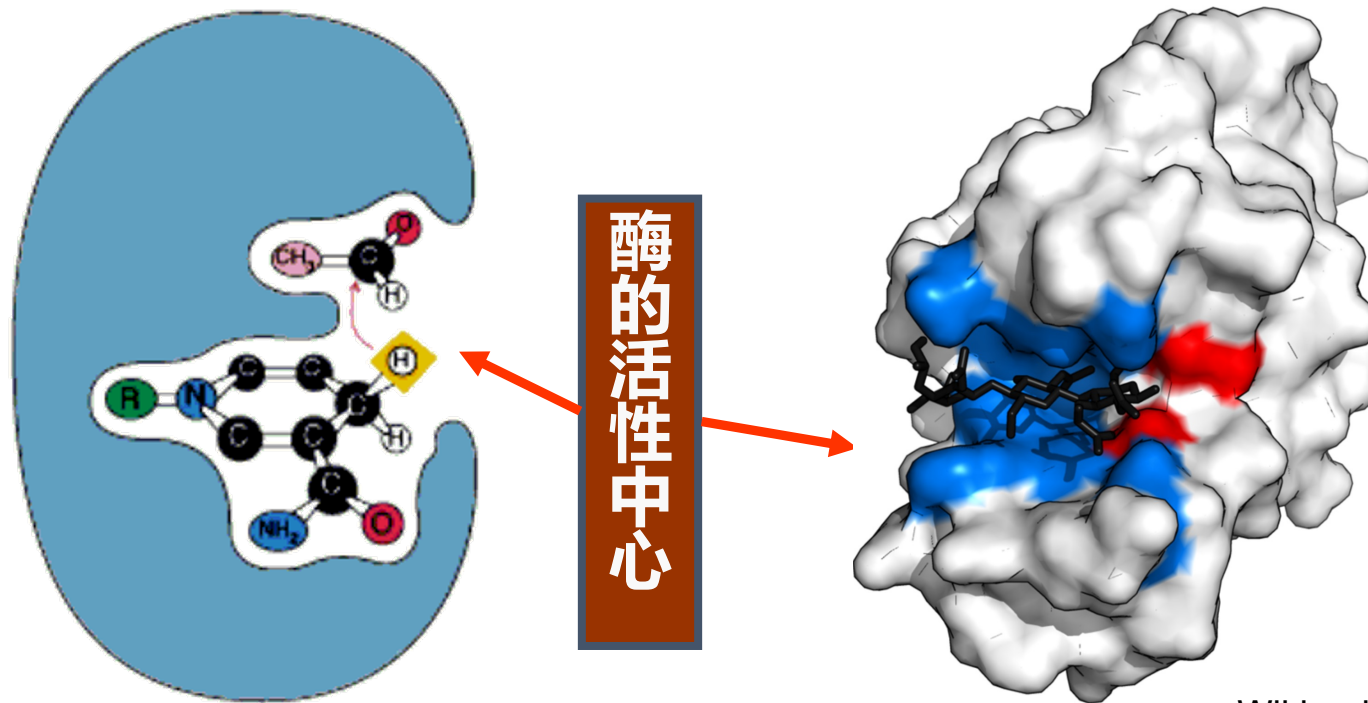


必需基团 (essential group) : 酶分子中氨基酸残基侧链的化学基团中，一些与酶活性密切相关的化学基团。

- **结合基团 (binding group):** 与底物相结合，决定酶的**专一性**
- **催化基团 (catalytic group):** 催化底物转变成产物，决定酶的**催化能力**
- **活性中心外的必需基团:** 维持酶活性中心的空间构象

酶的活性中心 (active center)

- 或称活性部位 (active site)
- 酶分子中只有**少数特异的氨基酸残基**参与底物结合及催化
- 这些氨基酸形成特定的空间结构，即与酶活力直接相关的区域



酶活性中心的特点

- ① 活性中心是一个三维实体
- ② 活性中心为酶分子表面的裂缝或口袋

- 常位于**酶蛋白分子表面**，含有较多疏水氨基酸残基，形成了利于酶促反应发生的疏水环境
- 也有极性氨基酸，与**底物结合发生催化作用**。

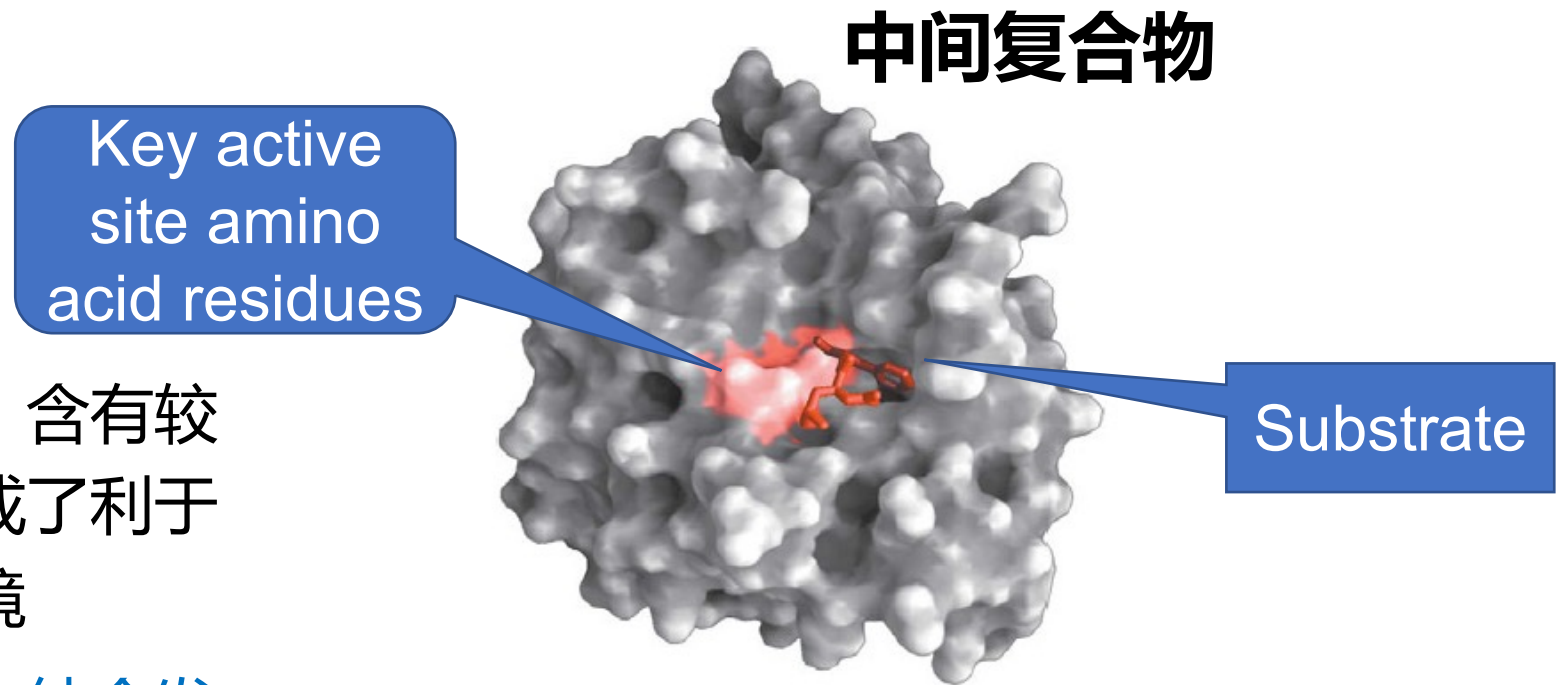


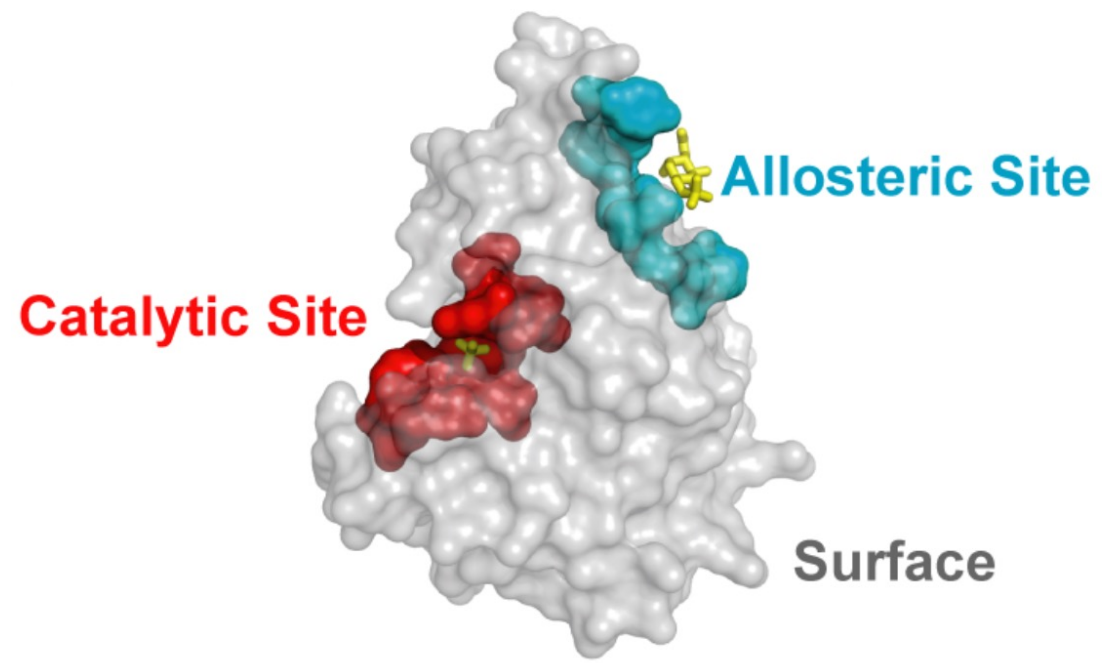
FIGURE 6-1 Binding of a substrate to an enzyme at the active site. The enzyme chymotrypsin, with bound substrate in red (PDB ID 7GCH). Some key active-site amino acid residues appear as a red splotch on the enzyme surface.



酶活性中心的特点

- ③ 活性中心在酶分子内只占相当小一部分
- ④ 活性中心的氨基酸序列有高度保守性

Yang et al. 2012

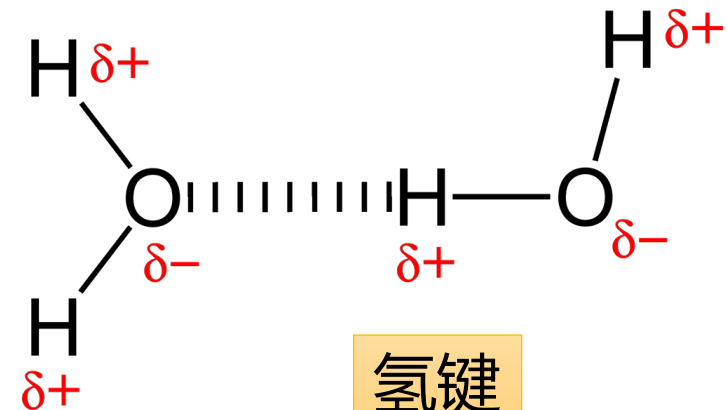
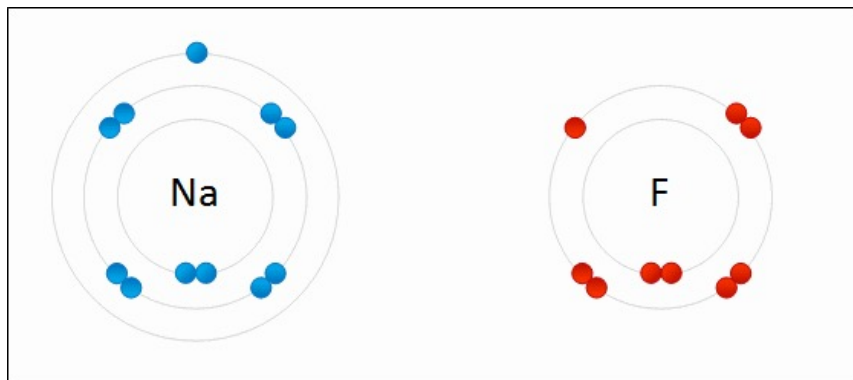


	Surface		Allosteric Site				Catalytic Site						
Sequence 1	E	H	A	K	Y	V	V	L	M	D	P	L	D
Sequence 2	K	R	G	K	Y	V	V	C	F	D	P	L	D
Sequence 3	P	L	G	K	Y	L	L	V	F	D	P	L	D
Sequence 4	K	R	G	K	Y	V	V	C	F	D	P	L	D
Sequence 5	N	T	G	S	Y	A	V	C	C	D	P	I	D
...													
Sequence n	R	D	A	H	F	V	M	L	M	D	P	L	D
	P	S	G	D	F	L	L	L	F	D	P	L	D
Conservation Score	0.1	0.0		0.2	0.4		...			1.0		0.7	1.0

酶活性中心的特点

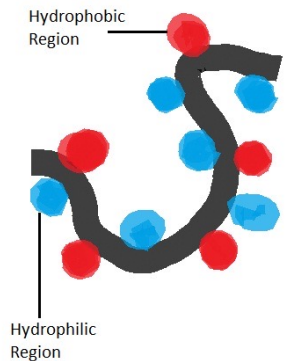
⑤ 底物通过多种非共价相互作用（次级键）结合到酶上

离子键

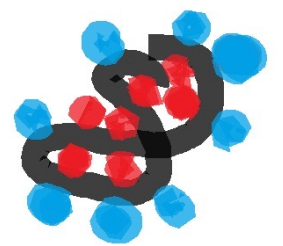


氢键

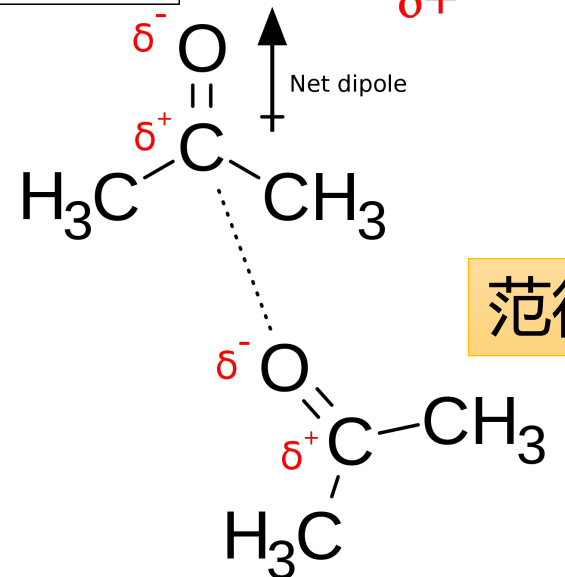
输水相互作用



Isolated Protein



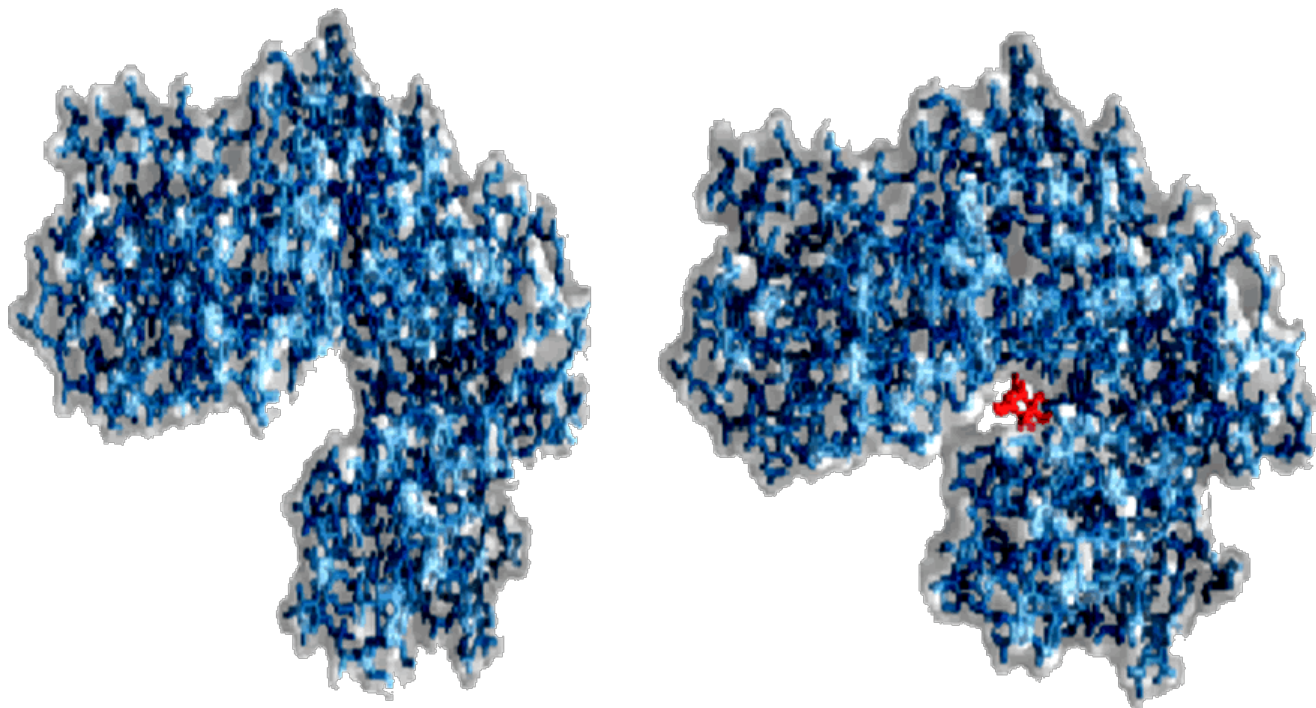
Protein in aqueous solution



范德华力

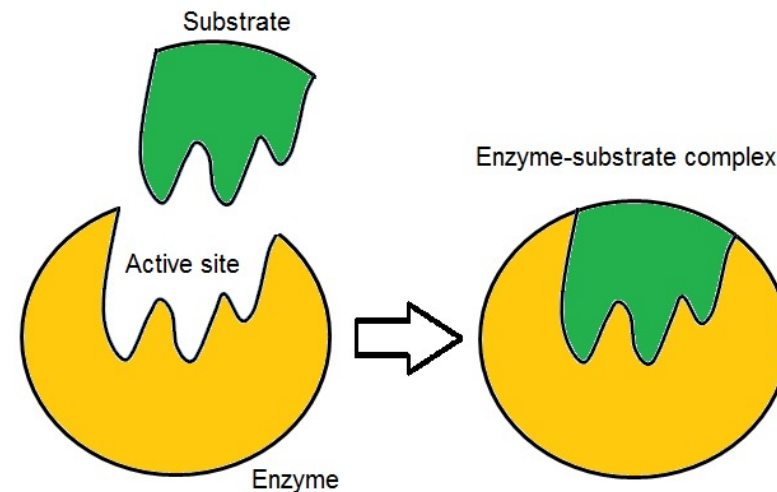
酶活性中心的特点

- ⑥ 结构性互补，**诱导契合**
- ⑦ 活性中心的构象具有一定柔性

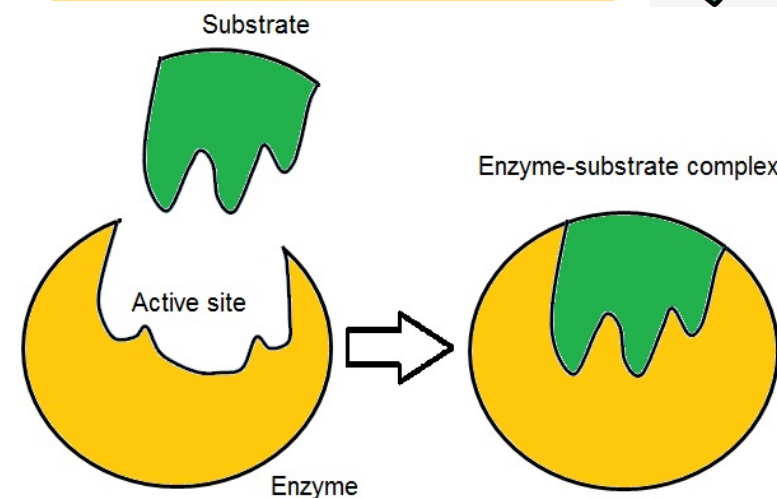


Induced fit of hexokinase (己糖激酶)

Lock and key hypothesis

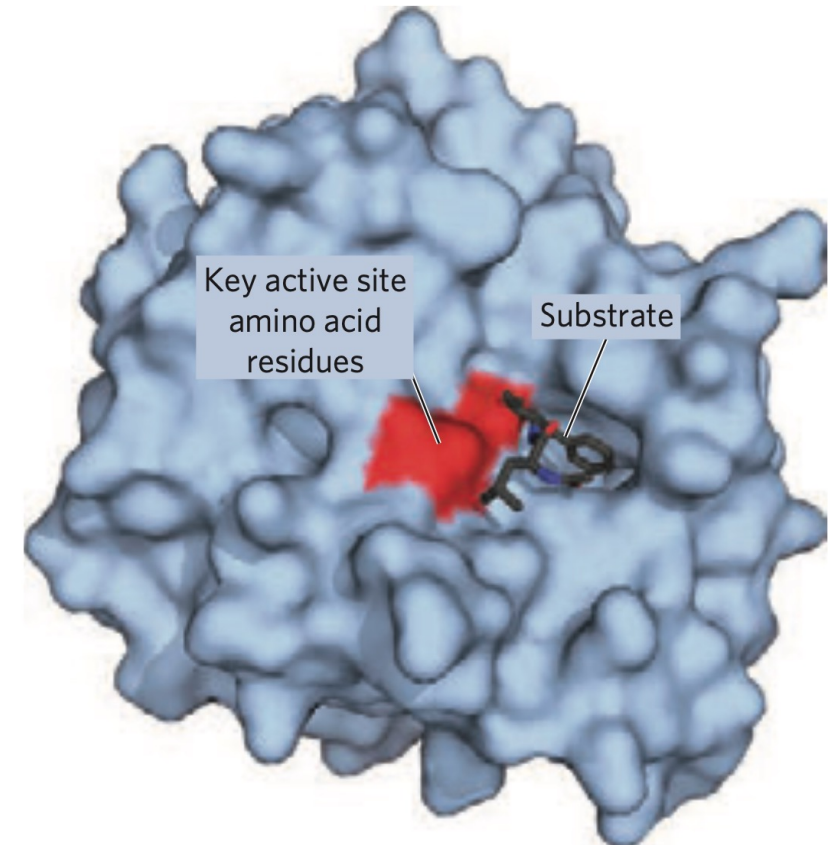


Induced fit hypothesis



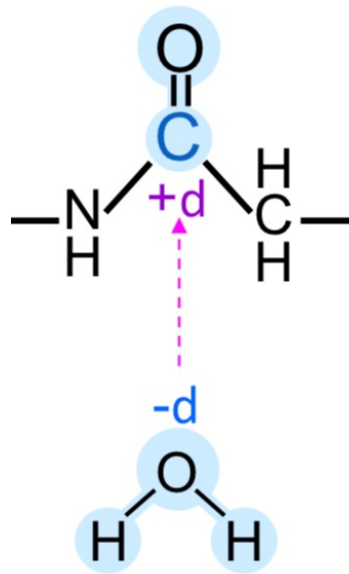
课程目录

1. 酶的活性中心及特点
- 2. 酶促反应机制**
 - (1) 酸碱催化
 - (2) 共价催化
 - (3) 金属离子催化
3. 酶高催化能力的原因

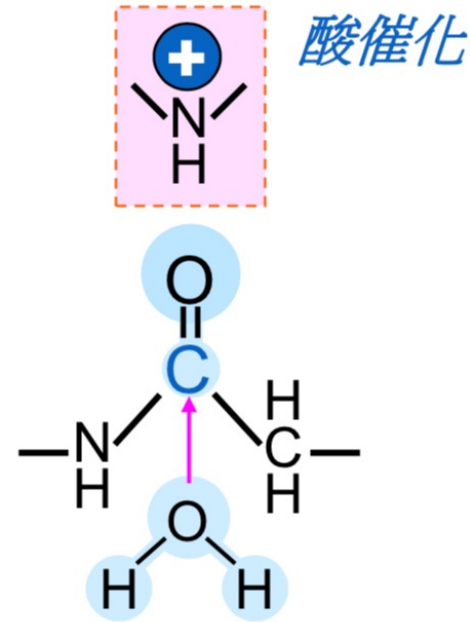


(1) 酸碱催化 (acid-base catalysis)

- 通过瞬时的向反应物提供质子或从反应物接受质子以稳定过渡态，加速反应的催化机制

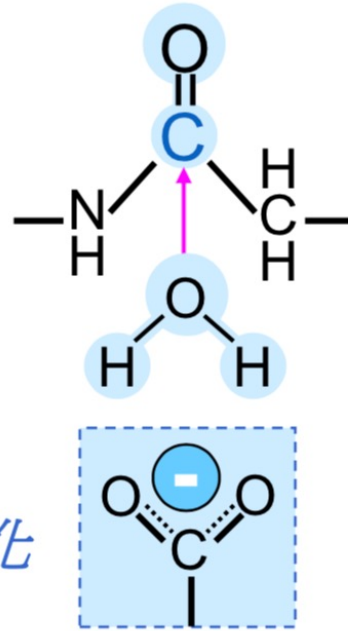


Slow

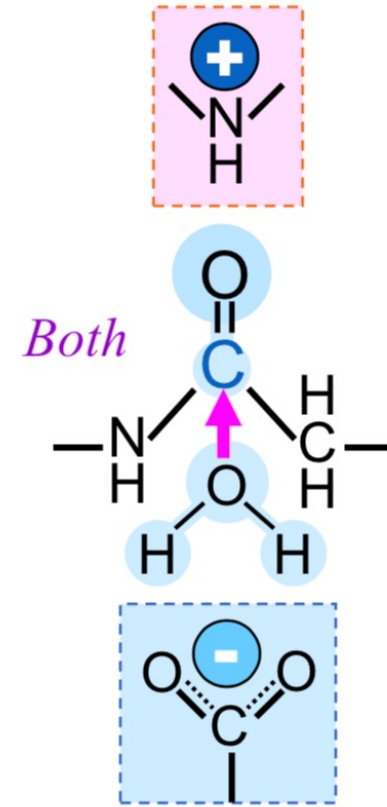


Fast

碱催化



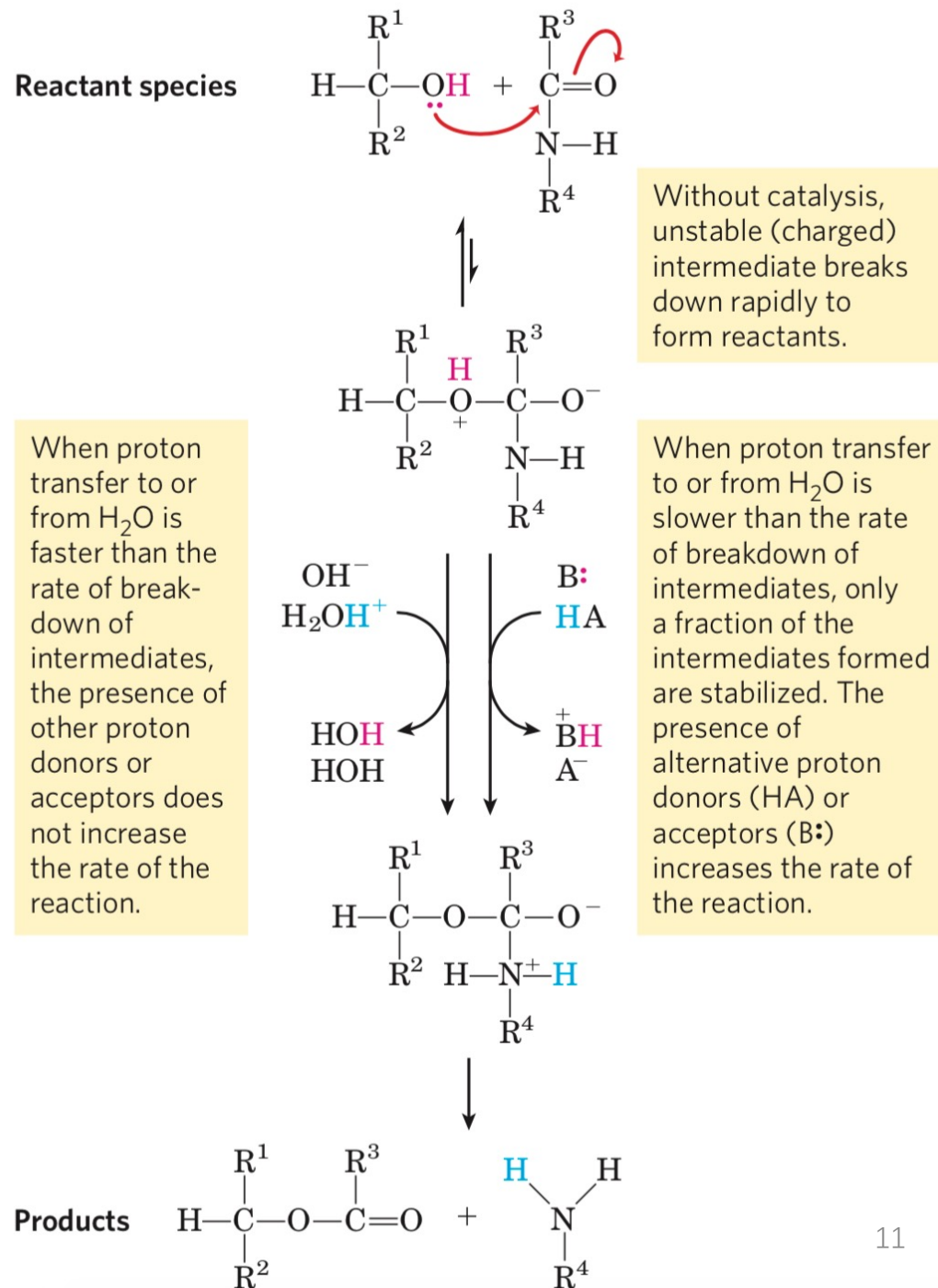
Fast



Very Fast

典型的酸碱催化反应

- 催化剂如何稳定酰胺裂解过程中的**带电中间体**
- 与糜蛋白酶和其他蛋白酶催化的酰胺键水解反应类似
- 带电不利于稳定，可以通过 H_3O^+ （**狭义酸催化**）或 HA （**广义酸催化**）提供质子来规避
- 类似地，可以通过 OH^- （**狭义碱催化**）或 $\text{B}:$ （**广义碱催化**）提取质子来中和电荷



- **专一**的酸碱催化：通过 H^+ 和 OH^- 进行的催化
- **广义**的酸碱催化：通过 H^+ 和 OH^- 以及**能提供 H^+ 和 OH^- 的供体**催化

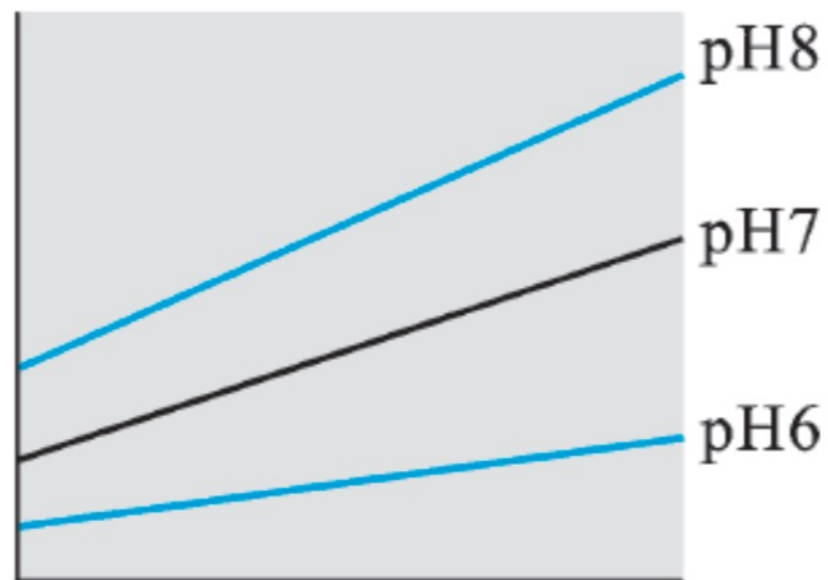
专一的酸碱催化



缓冲溶液浓度

催化速率仅依赖于溶液pH

广义酸碱催化

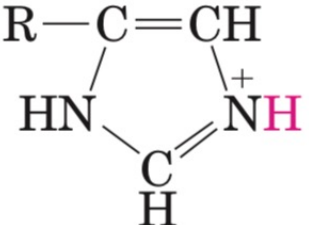
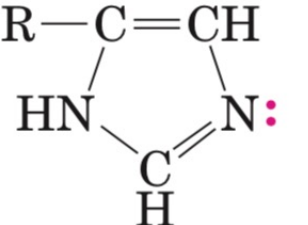
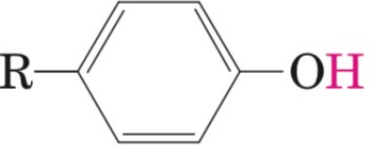
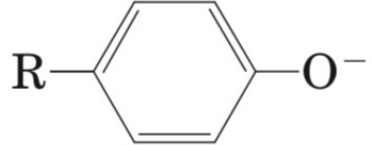


缓冲溶液浓度

催化速率还与缓冲液的浓度成正比

广义酸碱催化

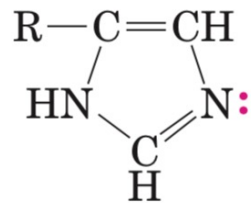
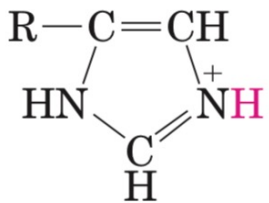
- 参与酸碱催化的功能基：氨基，羧基，巯基，羟基，酚羟基，咪唑基
- 可提高反应速率 10^2-10^5 倍

Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp 谷氨酸 天冬氨酸	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg 赖氨酸 精氨酸	$R-\overset{H}{\overset{+}{N}}H$	$R-\overset{\cdot\cdot}{N}H_2$
Cys 半胱氨酸	$R-SH$	$R-S^-$
His 组氨酸		
Ser 丝氨酸	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr 酪氨酸		

很多酶的活性中心均有His残基

- 酶蛋白分子中组氨酸 (His) 的侧链咪唑基pK值为5.6-7.0，在生理条件下，一半解离，一半不解离；
- 既可以作为质子供体，又可以作为质子受体，既是酸，又是碱，可以作为广义酸碱共同催化反应，因此常参与构成酶的活性中心。

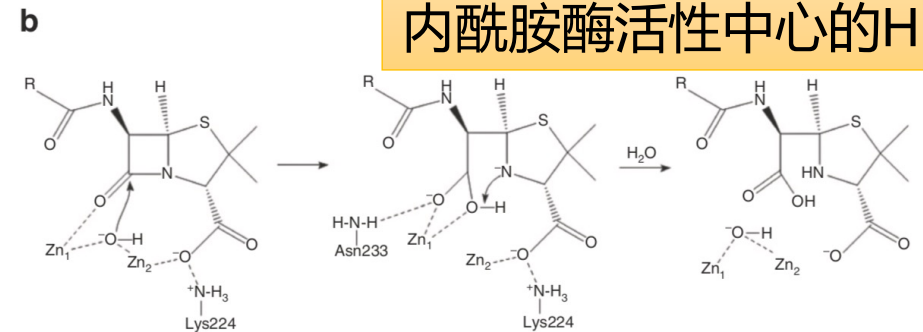
组氨酸 His



a

	61	62	63	64	65	67	68	69	84	87	116	117	118	120	121	194	195	196	197	198	199	220	221	224	225	228	232	233	236	262	263
B1 NDM-1	M	P	G	F	G	V	A	S	D	W	H	A	H	D	K	P	G	H	T	S	D	G	C	K	D	A	G	N	D	S	H
BcII	F	N	G	-	E	V	P	S	D	W	H	A	H	D	R	K	G	H	T	E	D	G	C	K	S	A	G	N	D	G	H
IMP-1	V	N	G	W	G	V	P	K	D	F	H	F	H	D	S	P	G	H	T	P	D	G	C	K	P	G	G	N	D	S	H
CcrA	I	E	G	W	G	V	P	S	D	I	H	W	H	D	C	G	G	H	A	T	D	G	C	K	D	A	G	N	D	G	H
VIM-2	F	D	G	-	A	Y	P	S	D	W	H	F	H	D	R	A	A	H	S	T	D	G	C	Y	E	R	G	N	D	G	H
B2 CphA	-	-	-	-	-	V	Q	E	G	W	N	Y	H	D	R	P	A	H	T	P	D	N	C	K	E	-	G	N	F	G	H
ImiS	-	-	-	-	-	V	Q	E	G	W	N	Y	H	D	R	P	A	H	S	P	D	N	C	K	E	-	G	N	F	G	H
Sfh-1	-	-	-	-	-	V	Q	E	G	W	N	Y	H	D	R	E	A	H	T	K	D	N	C	K	E	-	G	N	F	G	H
B3 FEZ-1	-	-	-	-	-	E	D	L	D	M	H	A	H	D	H	A	G	H	T	P	G	D	S	-	S	G	Q	G	R	P	H
L1	-	-	-	-	-	D	D	L	N	L	H	A	H	D	H	P	G	H	T	R	G	G	S	G	V	G	V	D	T	S	H

内酰胺酶活性中心的His

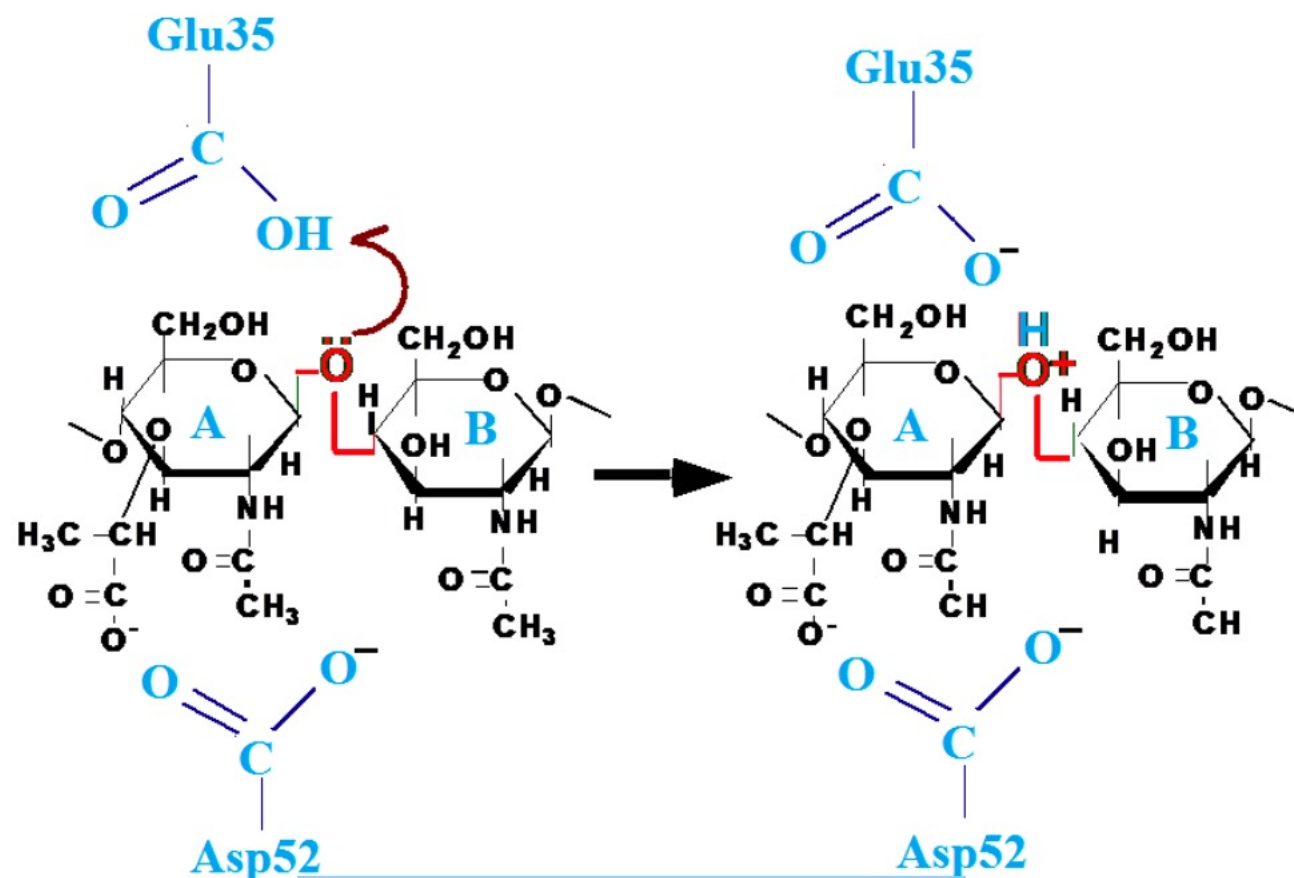


Sun et al. 2018



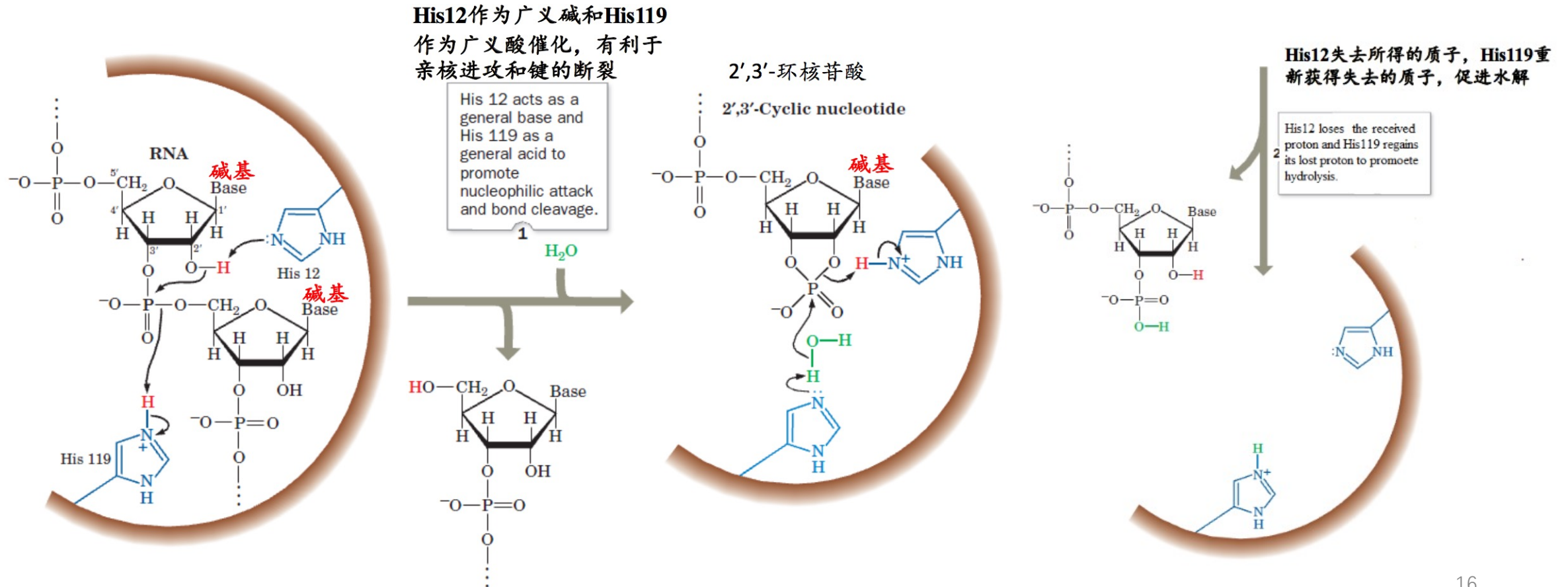
广义酸催化：溶菌酶Glu35

- 第35位的谷氨酸 (Glu35) 的-COOH 提供一个 H^+ 到糖苷键O原子上，断开糖苷键



广义酸碱催化：核糖核酸酶

- 核糖核酸酶活性中心的His₁₂作为广义碱，His₁₁₉作为广义酸

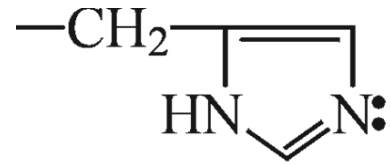


(2) 共价催化 (covalent catalysis)

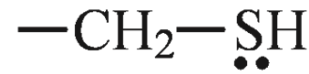
- 又称亲核催化 (nucleophilic catalysis) 或亲电子催化 (electrophilic catalysis)
- 亲核催化剂或亲电子催化剂能分别放出电子或汲取电子并作用于底物的缺电子中心或负电中心，迅速形成不稳定的共价中间复合物，降低反应活化能，反应加速
- 亲核基团：丝氨酸羟基，半胱氨酸巯基，组氨酸咪唑基
- 亲电基团：磷酸基，酰基，糖基
- 进行共价催化的酶大多数有乒乓动力学机制

共价催化

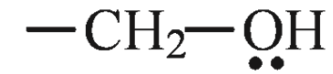
亲核催化



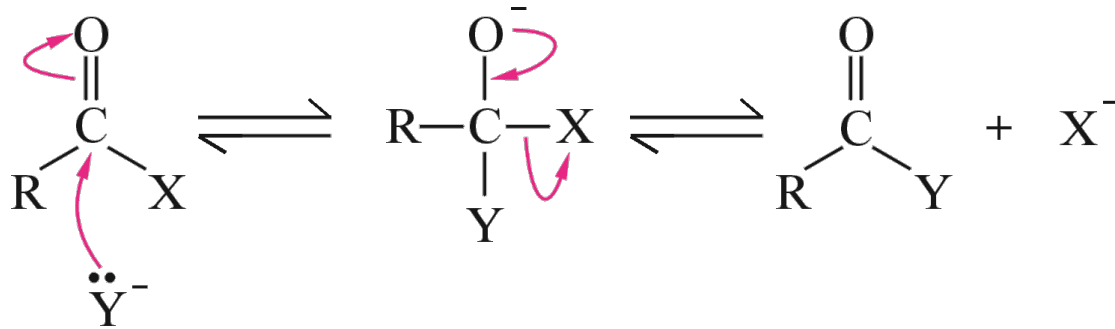
His的咪唑基



Cys的巯基



Ser或Thr的羟基



亲核攻击

过渡态中间物

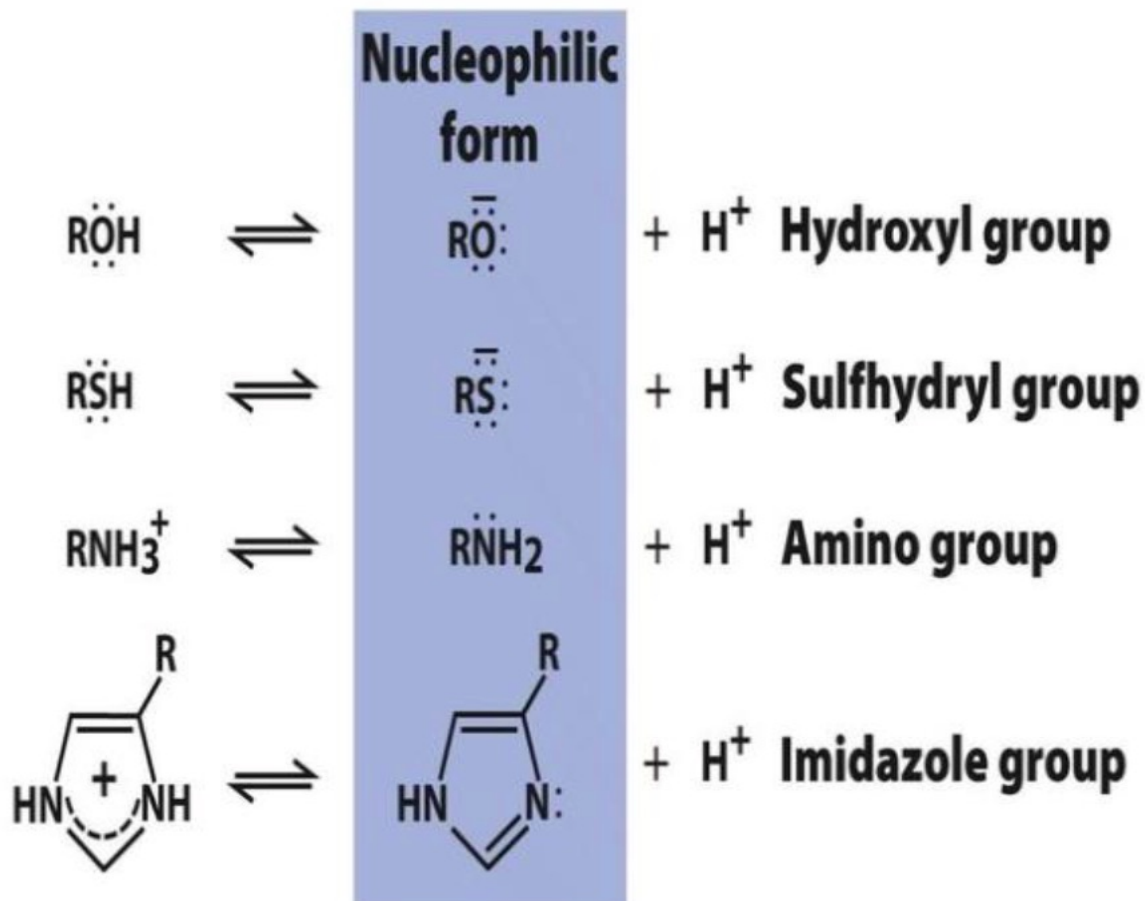
产物

亲电催化

金属离子、辅酶等也可与底物中的亲核原子形成暂时的共价中间物，发挥亲电催化作用。

亲核基团和亲电基团

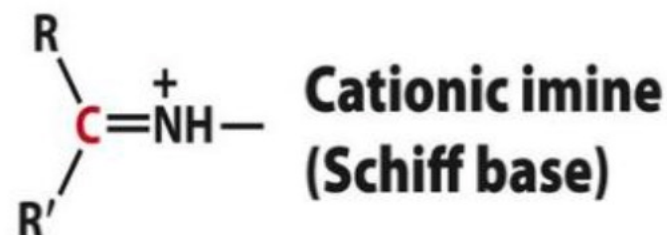
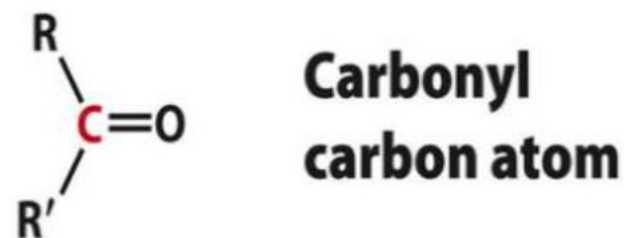
Nucleophiles 亲核基团



Electrophiles 亲电基团

H^+ **Protons**

M^{n+} **Metal ions**



(3) 金属离子催化 (metal ion catalysis)

金属酶(紧密, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+})

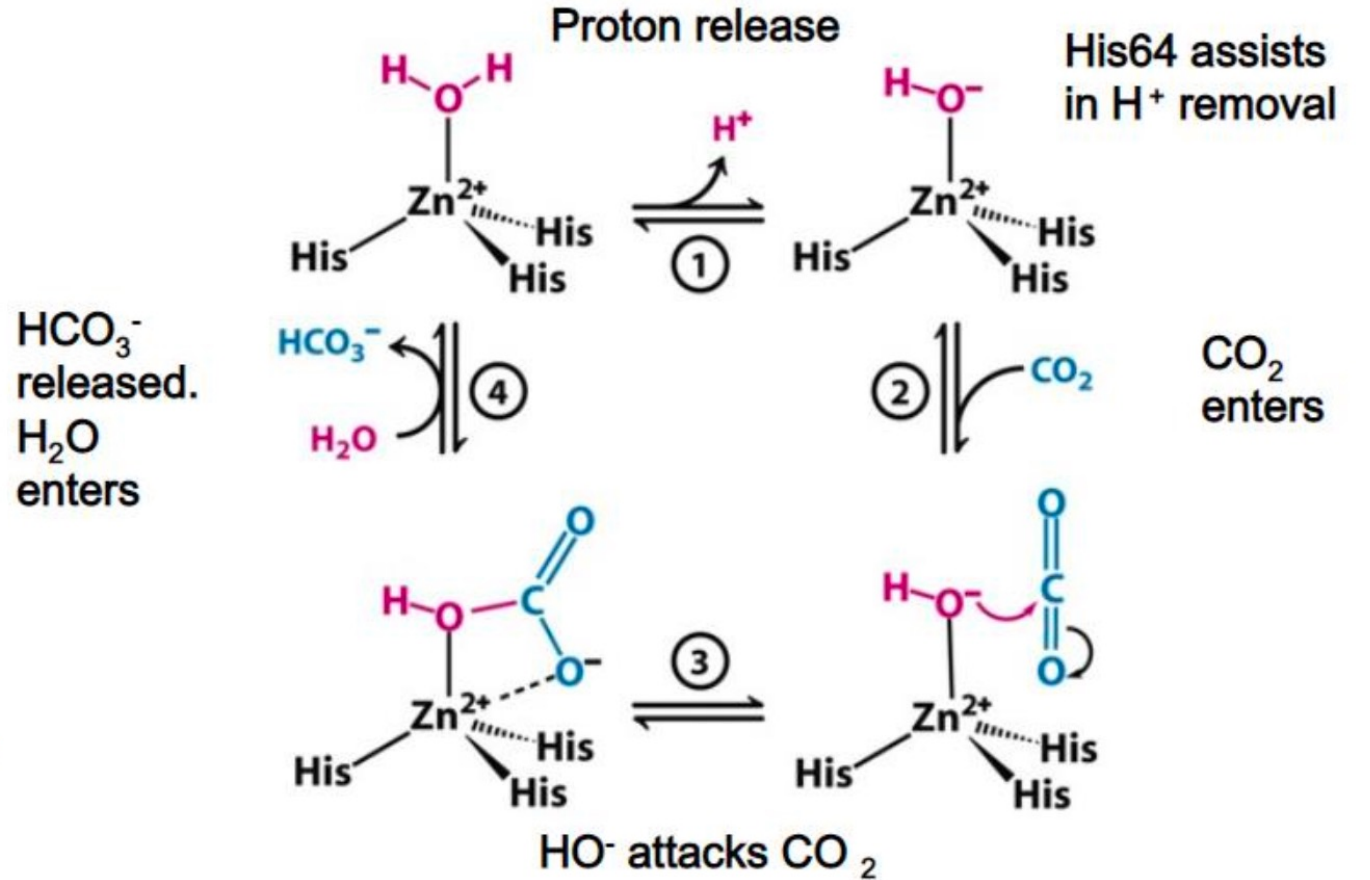
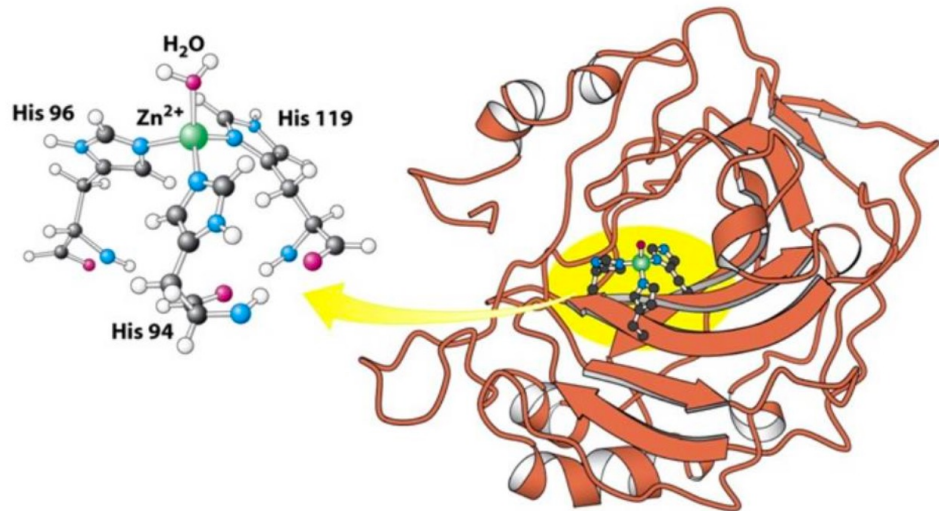
金属激活酶(松散, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+})

- 结合底物为反应定向
- 可逆的改变金属离子的氧化态调节氧化还原反应
- 静电稳定或屏蔽负电荷

**1/3的酶催化
需要金属离子**

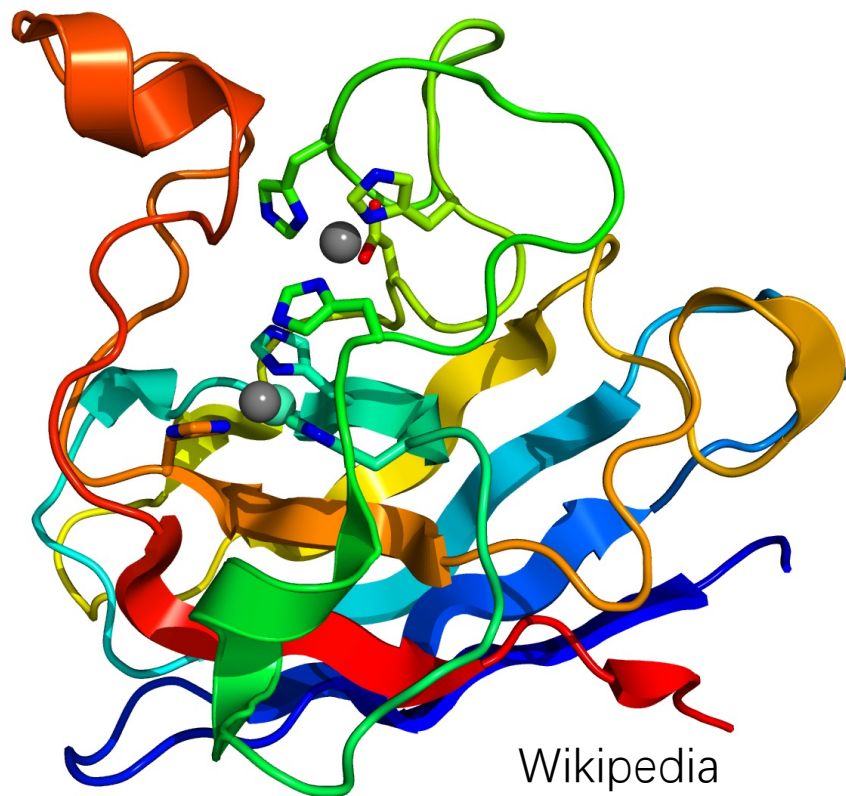
碳酸酐酶的锌离子

- 水分子结合锌离子促进质子释放，形成的锌-结合羟离子(OH⁻)是强的亲核剂，比水更容易攻击CO₂
- 将水分子定位于紧邻的反应物
- 有助于形成过渡态

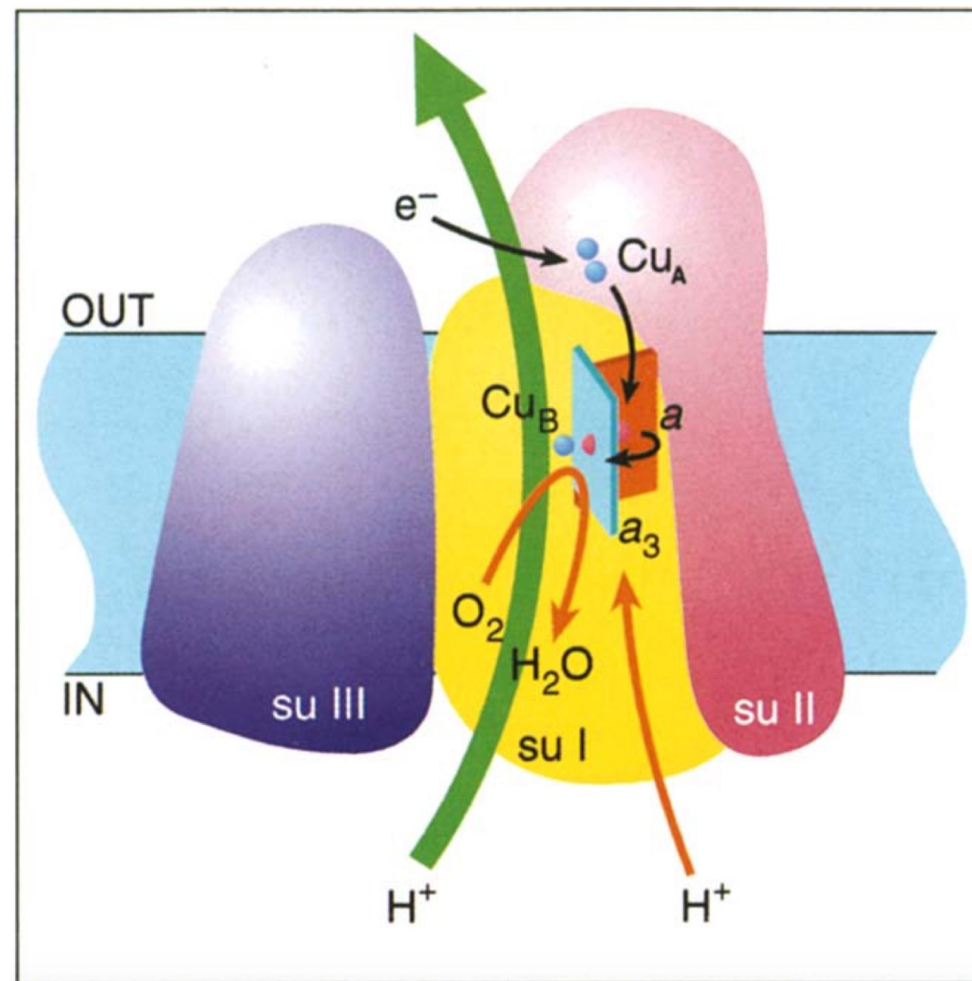


金属离子作为交换剂参与氧化还原反应

Scott 1995

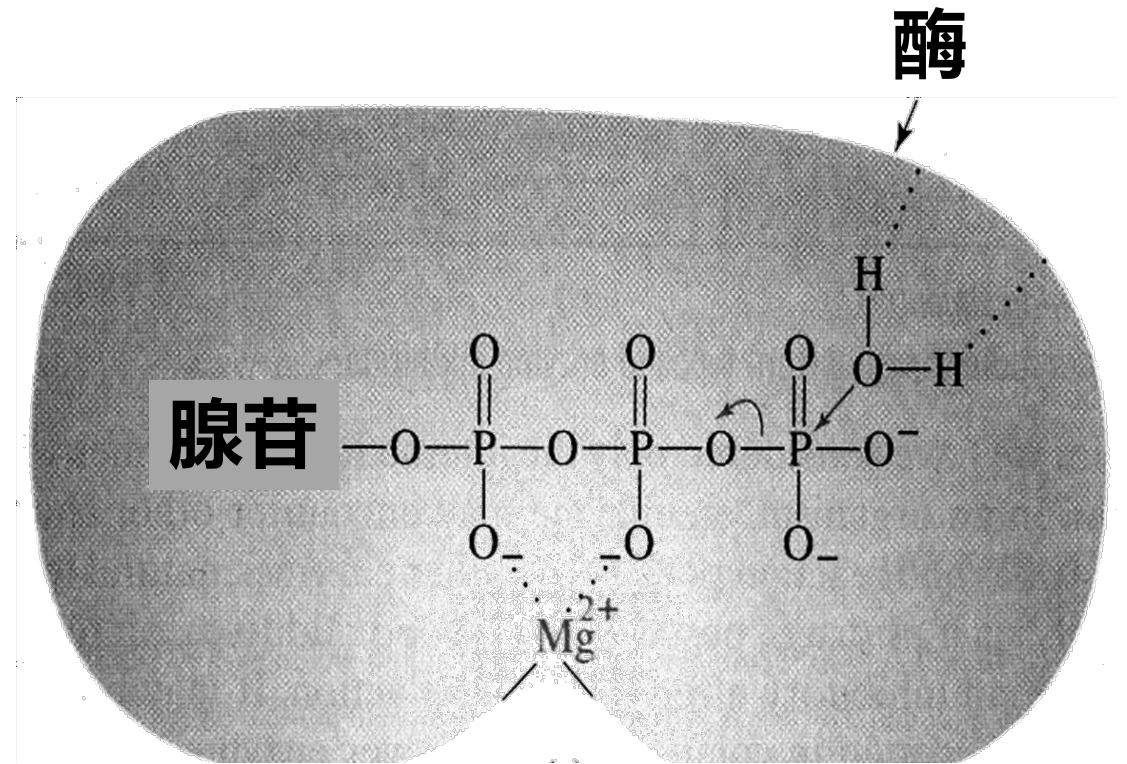
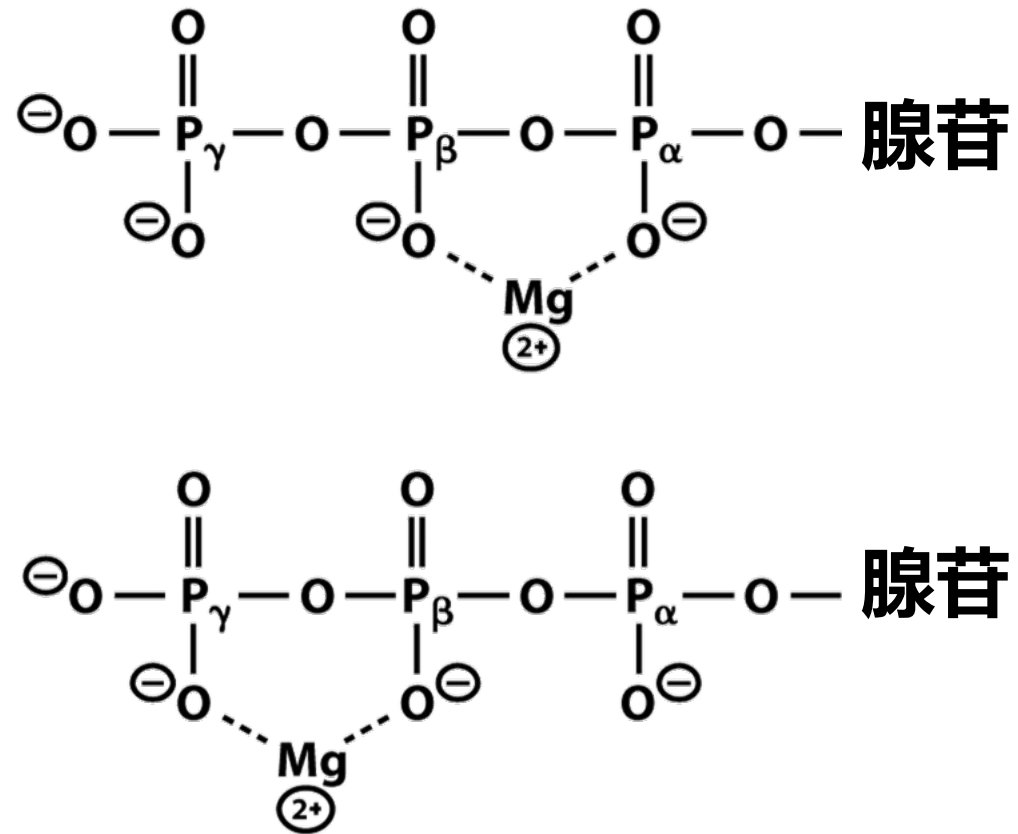


- 超氧化物歧化酶 (SOD)含有铜离子 Cu^{2+}
- 清除超氧化物时需要活性位点 Cu^{2+} 的还原和再氧化



- 细胞色素C氧化酶的电子传递需要 Cu^{2+} , Fe^{2+} 的氧化还原

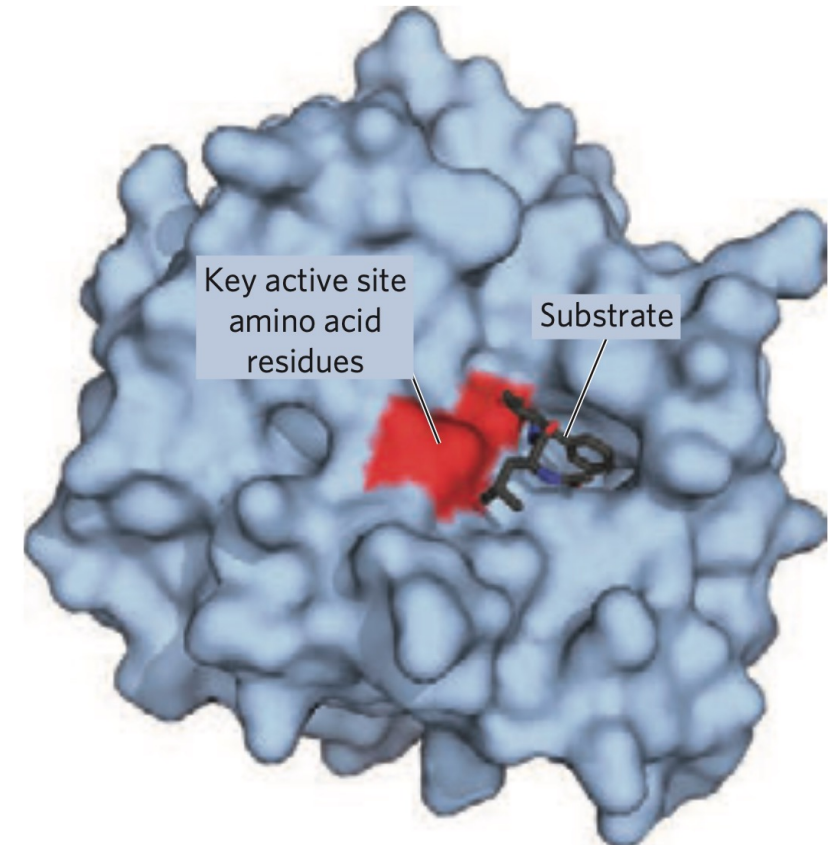
金属离子的电荷屏蔽作用



Mg^{2+} 除了定向效应，还对磷酸基团的负电荷起静电屏蔽作用，防止其排斥亲核攻击的电子对

课程目录

1. 酶的活性中心及特点
2. 酶促反应机制
 - (1) 酸碱催化
 - (2) 共价催化
 - (3) 金属离子催化
- 3. 酶高催化能力的原因**

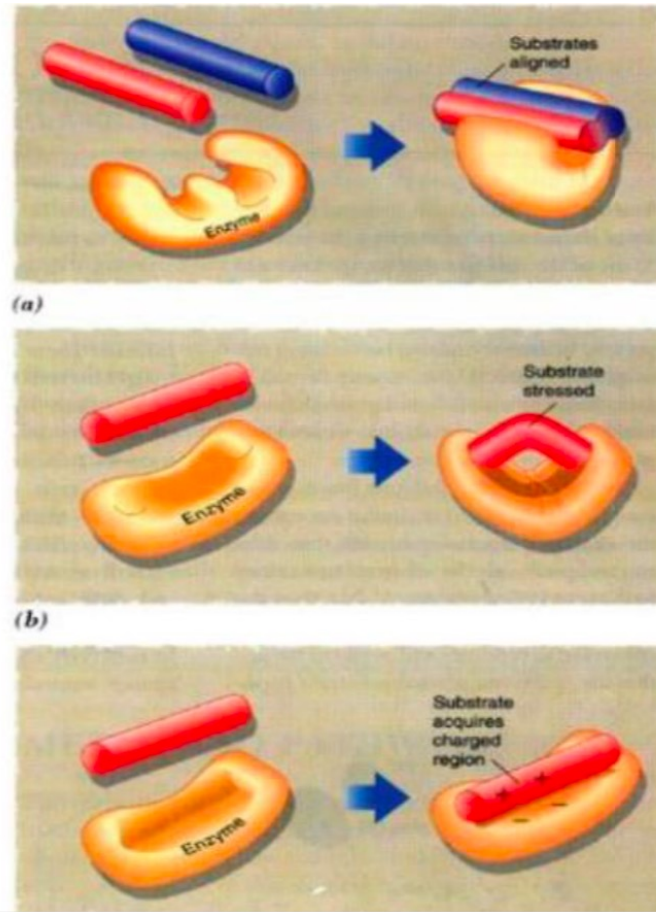


酶具有高催化能力的原因

- 降低活化自由能加速反应
- 所需能量主要来自酶与底物之间的非共价相互作用
- 来自酶-底物相互作用的自由能称为结合能 (binding energy, ΔG_b)
- 降低活化自由能的因素：
 - ① 邻近效应和定向效应
 - ② 底物形变和诱导契合
 - ③ 多元催化和协同效应
 - ④ 活性部分微环境

① 邻近效应和定向效应

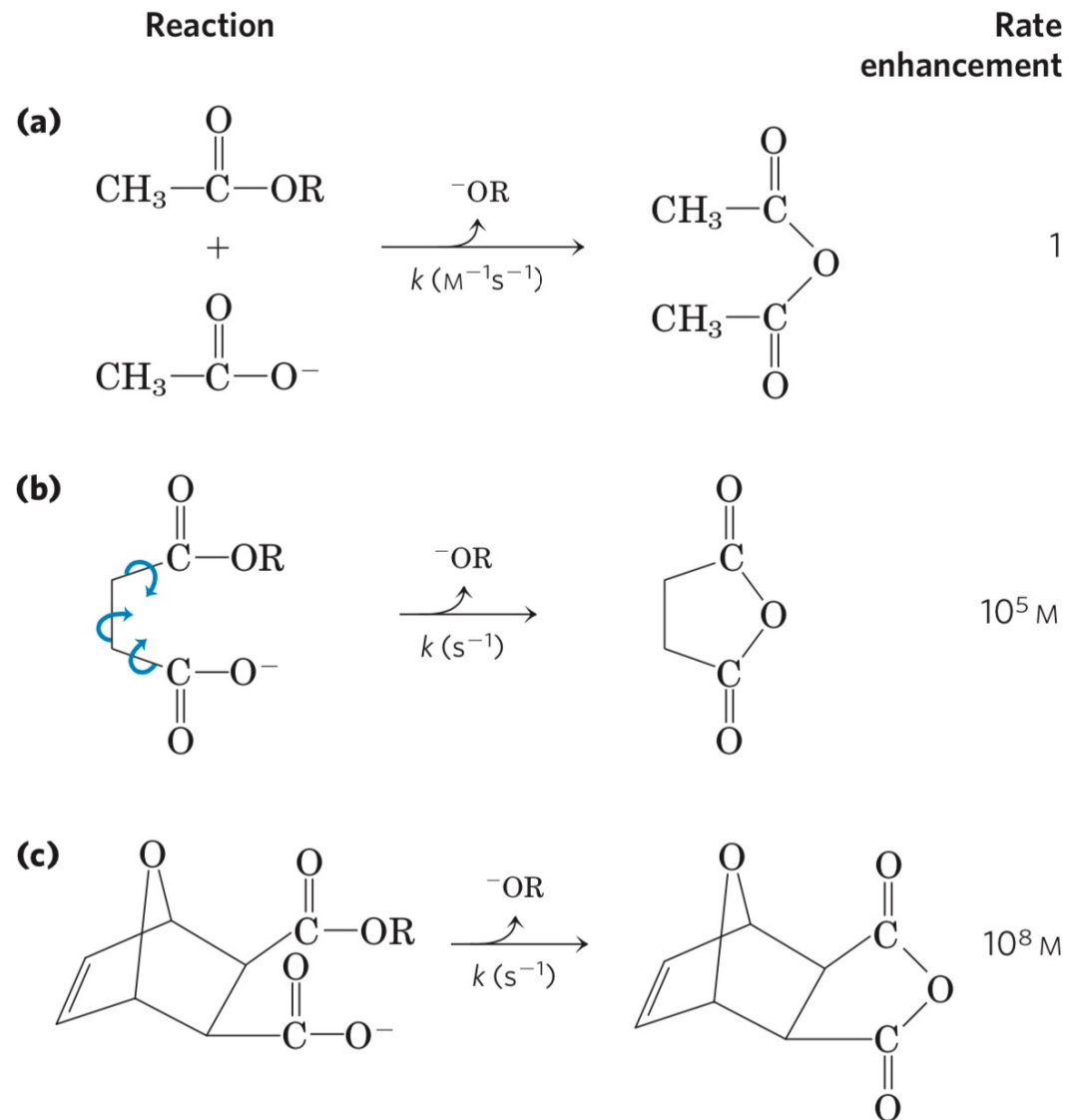
指两种或两种以上的底物（特别是双底物）同时结合在酶活性中心上，相互靠近（**邻近**），并采取正确的空间取向（**定向**），提高底物的有效浓度，使分子间反应**近似分子内反应**从而加快了反应速度。



- 使底物靠拢
- 使底物分子产生应力
- 使底物分子电荷变化

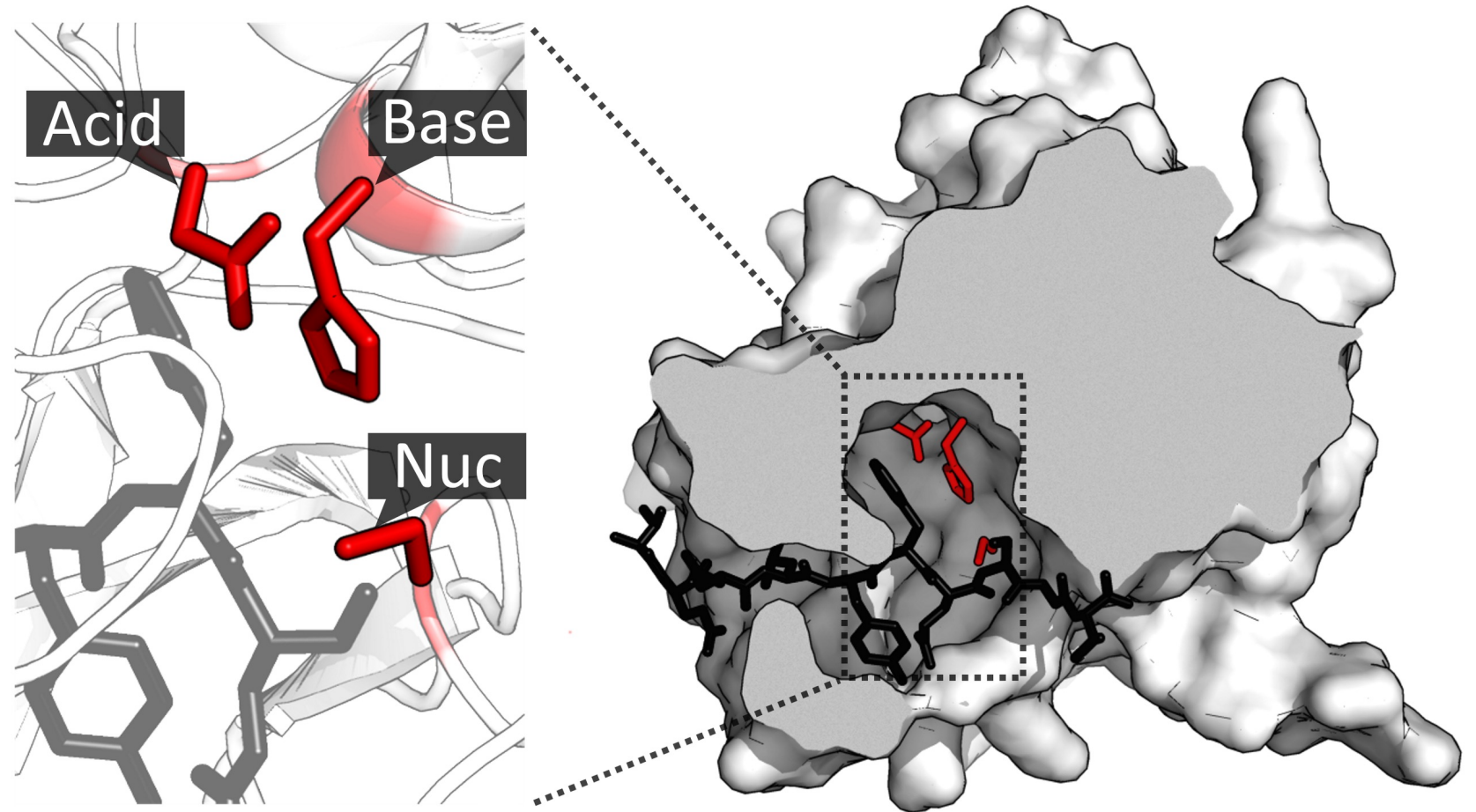
邻近效应和定向效应：羧基和酯的反应速率

- 双分子反应速率很低
- 分子内反应，速率增加
- 分子内反应，基团间更好地定向速率进一步增加



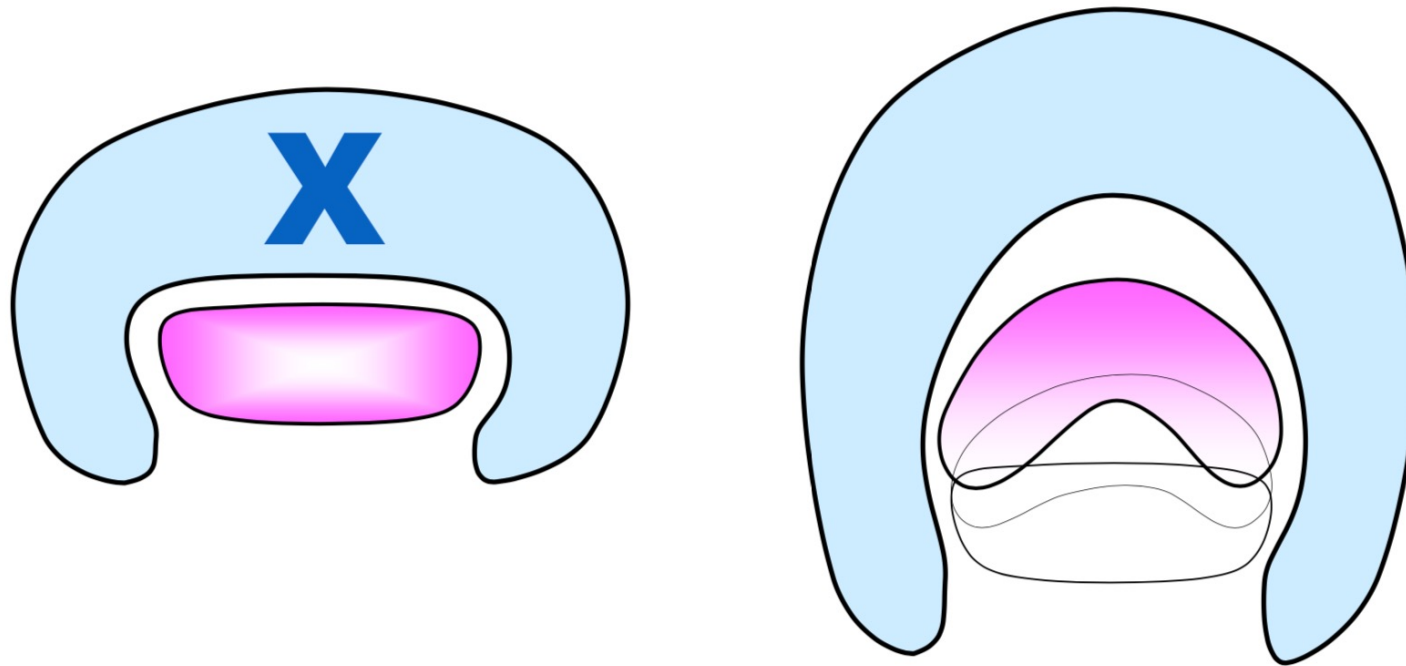
结合底物为反应定向

- TEV 蛋白酶的催化位点包含三个起催化作用的氨基酸残基（红色）
- 底物（黑色）通过与活性中心的位点结合来靠近三个催化残基。

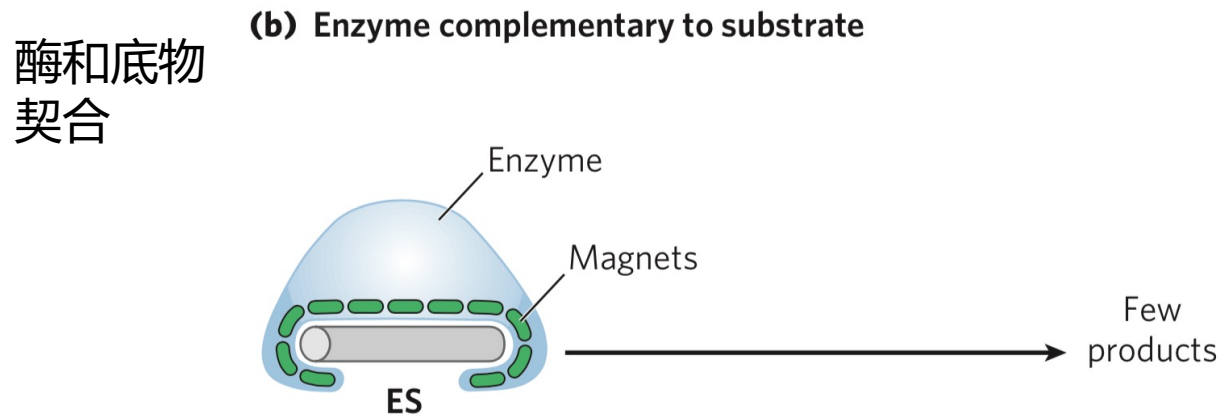
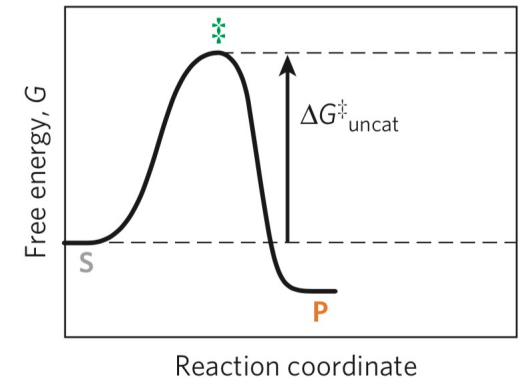
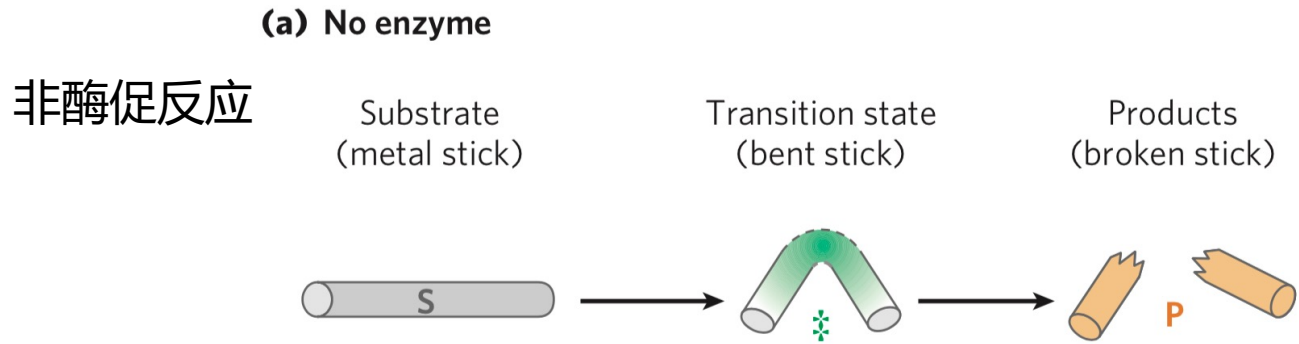


② 底物形变和诱导契合

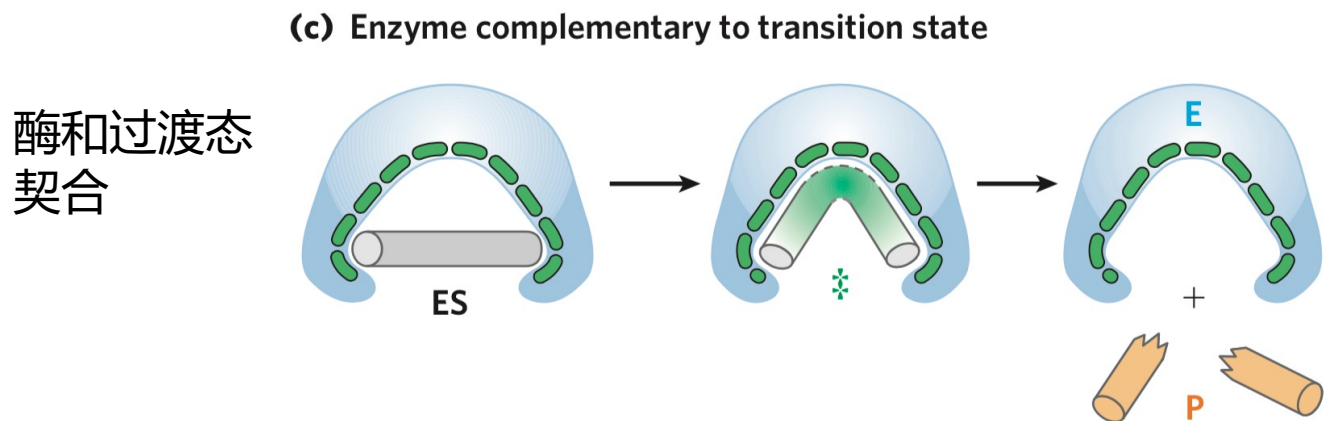
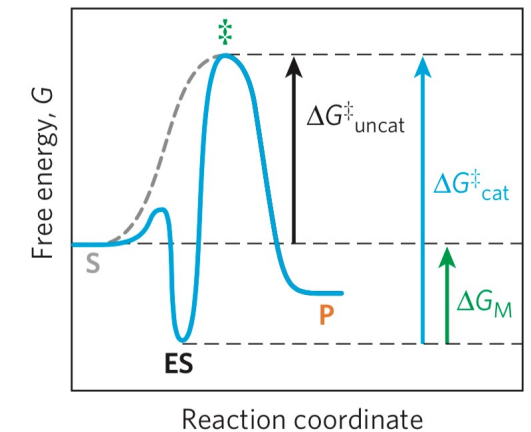
- 遇到专一性底物时，酶中某些基团或离子使底物分子内敏感键中某些基团的电子云密度增高或降低，产生电子张力，使敏感键的一端更加敏感，底物分子发生形变，更加接近过渡态，降低反应的活化能



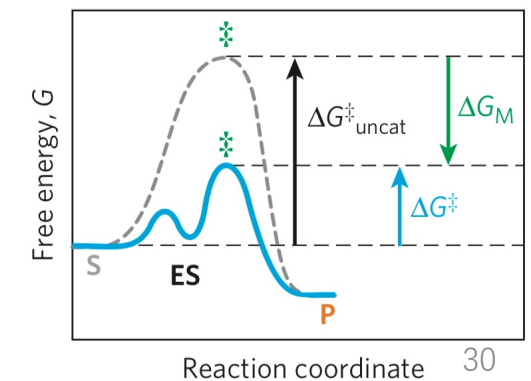
酶和底物之间的弱结合相互作用为酶的催化提供了很大的动力



✘ ES复合物比产物更稳定，不易产生产物

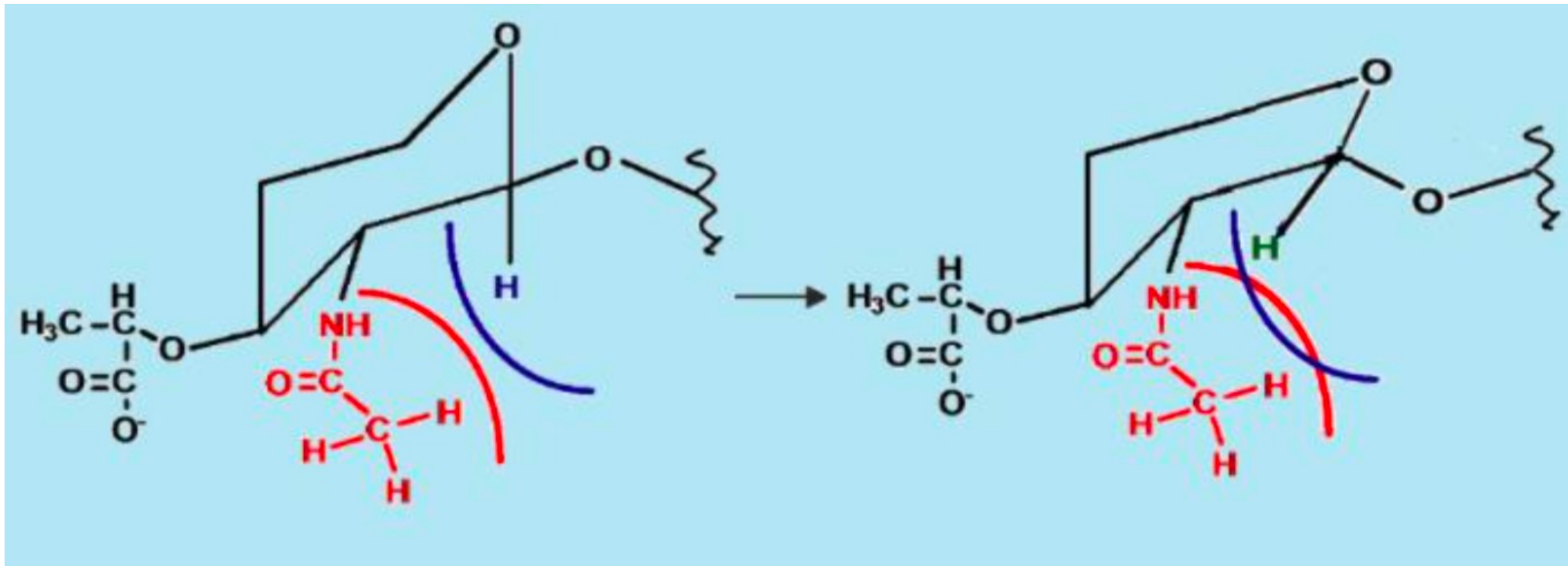


E和S结合时释放的结合自由能提供了到达过渡态所需的能量



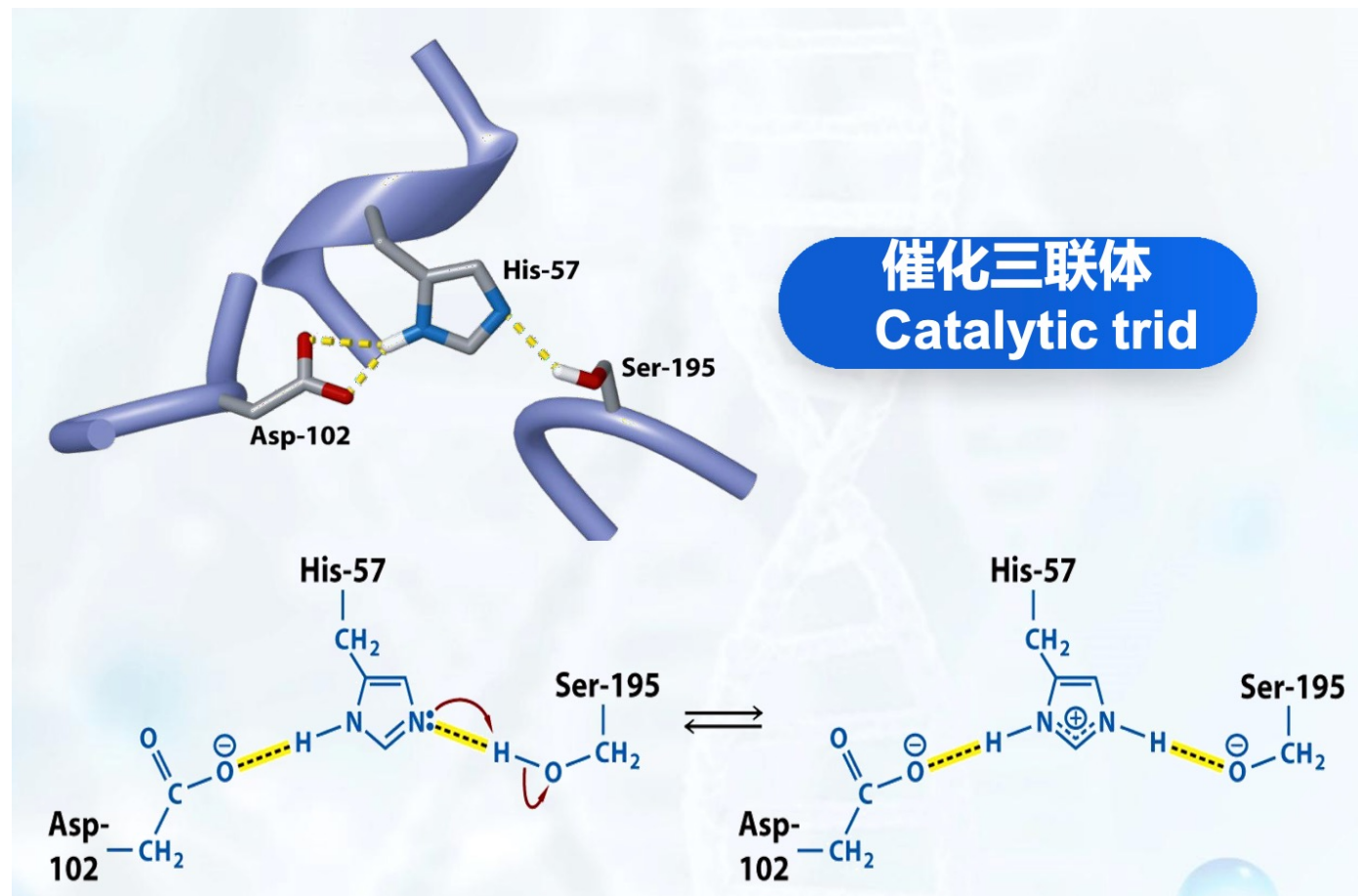
底物形变和诱导契合

- 与溶菌酶活性中心结合的6碳糖在溶菌酶的诱导下，从椅式构象变成半椅式构象而发生形变，周围的糖苷键更容易发生断裂。



③ 多元催化和协同效应

- 胰凝乳蛋白酶的His₅₇ , Ser₁₉₅和Asp₁₀₂形成**催化三联体**
- Ser₁₉₅起**共价催化作用** , 对底物进行亲核攻击
- His₅₇起**广义酸碱催化作用** , 从Ser₁₉₅接受一个质子
- Asp₁₀₂的羧基稳定过渡态中His₅₇的正电荷形式



共价催化和酸碱催化共同作用

④ 活性部位微环境的影响

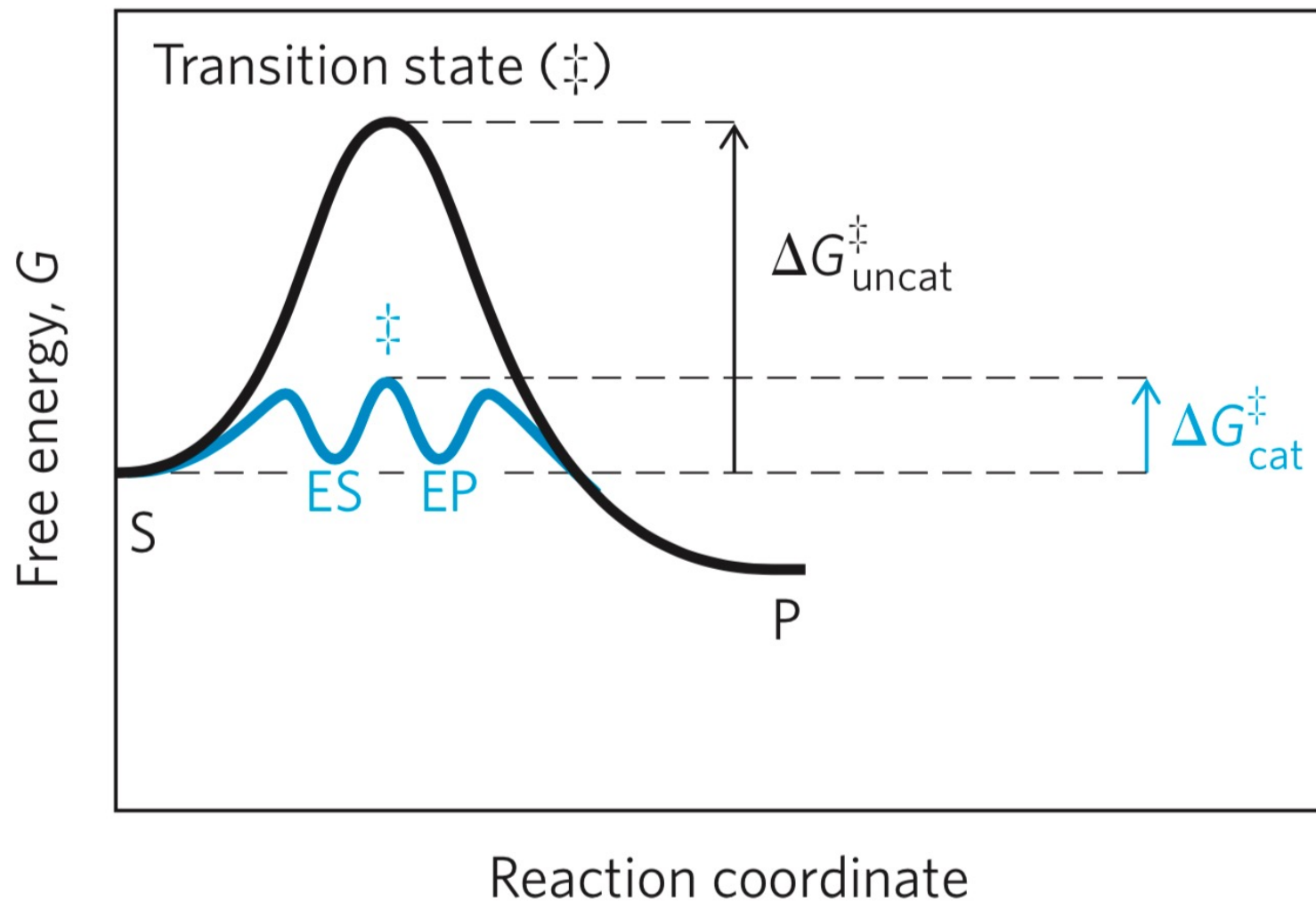
$$F = K \frac{q_1 q_2}{\epsilon r^2}$$

- 活性部位位于疏水环境裂缝中
- 低介电区域
- 静电作用显著增强
- 疏水微环境有利于酶催化作用

溶剂	介电常数 ϵ
水	78.5
甲醇	32.6
乙醇	24.3
丙酮	20.7
乙酸	6.2
氯仿	5.0
苯	2.0

水溶液可以极大减小
电荷之间的相互作用。

通过上述机制降低反应活化能



课程总结

- 酶促反应在酶的活性中心发生
- 酶通过基元催化反应促进反应的发生包括
 - 酸碱催化
 - 共价催化
 - 金属离子催化
- 酶通过以下方式降低活化自由能，加快反应速率：
 - 邻近和定向效应
 - 底物形变和诱导契合
 - 多元催化和协同效应
 - 活性中心微环境的影响