

N-磷酸化氨基酸在溶液中的定向成肽反应

陈忠周^① 童宇峰^② 陈水冰^① 李艳梅^{①*} 陈 益^① 赵玉芬^① 王金凤^②

(^①清华大学生命科学与工程学院, 化学系生命有机磷化学教育部重点实验室, 北京 100084; ^②中国科学院生物物理研究所, 分子生物学中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101. * 联系人, E-mail: liym@mail.tsinghua.edu.cn)

摘要 N-磷酸化氨基酸在没有缩合试剂的水溶液中能够与氨基酸发生成肽反应. 利用葡聚糖凝胶柱分离, 用电喷雾二级质谱(ESIMS/MS)对产物进行鉴定和分析. 结果表明, 所有反应体系中均有磷酸化二肽生成, 且成肽反应具有方向性: 成肽产物的 N 端氨基酸来自 N-磷酸化氨基酸, 成肽反应发生在其 C 端. 另外, 成肽产物中只有 α -羧基参与形成的磷酸化二肽, 这表明 N-磷酸化对氨基酸羧基的成肽反应具有显著的选择性. 量化计算表明室温下溶液中 N-磷酸化氨基酸成肽的反应是可行的. 溶液中 N-磷酸化氨基酸的成肽反应规律对蛋白质起源和生物合成的研究具有启发意义.

关键词 N-磷酸化氨基酸 定向成肽 溶液 磷酸化二肽

多肽和蛋白质的前生物合成和生物合成是目前非常令人关注的重要问题. 自然界为什么选择 α -氨基酸作为蛋白质的骨架? 为什么蛋白质在生物合成中肽链的延伸方向是从 N 端到 C 端? 为什么蛋白质的生物合成需要磷的参与? 磷在蛋白质的生物合成中起什么作用? 这些都是值得深入探讨的问题. 我们实验室以前的研究发现 N-磷酸化氨基酸在没有任何其他催化剂、脱水剂和能量给体(如 ATP)的情况下能自身活化成肽^[1~3], 也可以与核苷反应生成核苷酸^[4]. 对其中间体类似物的近期研究表明, 在活化试剂存在下成肽反应具有非常明显的选择性: N-磷酸化- α -氨基酸能够发生成肽反应, 而 N-磷酸化- β -氨基酸却不能^[5]. 因而, 对 N-磷酸化氨基酸的系统研究将有助于探讨磷在生命起源及生物化学过程中的作用^[6]. 本文研究了 N-磷酸化极性氨基酸在溶液中与氨基酸的成肽反应, 并用质谱和核磁共振仪对产物进行分析和鉴定, 旨在通过研究其成肽反应的定向效应, 为研究磷酸基在蛋白质的起源和蛋白质的生物合成中可能起的作用提供一定的实验线索.

1 实验部分

(i) 试剂及仪器. 丝组、组丝二肽等标准品购于 Sigma 公司; L-丝氨酸, L-丙氨酸, L-组氨酸, L-天冬氨酸及其他化学药品和溶剂均为分析纯. 丙丝、丝丙二肽采用 DCC 法^[7]合成.

ESIMS 质谱在 Bruker ESQUIRE-LCTM ESI 离子阱质谱仪上进行. ³¹P NMR 在 Bruker ACP 200 核磁共振仪上进行, 以 85%磷酸($\delta = 0.0$)为外标. DIPP-Asp-

Ala-OEt 的一维 ¹H, ¹³C-NMR 谱及二维 COSY, HMBC 谱图在 Bruker Avance DMX600 核磁共振仪上获得, ¹H 化学位移相对于内标 DSS(2,2-二甲基-2-硅戊烷-5-磺酸, $\delta = 0.0$)确定, ¹³C 化学位移由相对频率因子 ε 间接标定^[8].

(ii) N-(O,O-二异丙基)磷酸化-氨基酸(DIPP-Xaa)或二肽的合成: 用二异丙基亚磷酸酯磷酸化氨基酸或二肽, 制备 N-(O,O-二异丙基)磷酸化-氨基酸或二肽^[9].

(iii) 溶液中成肽通法. 100 mg N-(O,O-二异丙基)磷酸化氨基酸和 100 mg 另一种氨基酸在水溶液(pH 8.0, 37℃)中保温反应 2 h. 用 ³¹P NMR 跟踪反应, ³¹P NMR 发现生成二肽的产率约 5%~6%. 反应完成后浓缩, 以甲醇为溶剂用 Sephadex LH-20 葡聚糖色谱分离, 合并浓缩后直接在 ESI 质谱以正离子和负离子方式对产物进行分析.

DIPP-Asp 和 HCl · Ala-OEt 在 CHCl₃ 中的成肽反应: 1.00 g DIPP-Asp 溶于 16 mL CHCl₃ 中, 加入 0.40 g 三乙胺和 0.57 g HCl · Ala-OEt, 在 40℃ 下反应 1 h. 得到的产物经过乙酸乙酯洗涤后, 用 1 mol/L HCl 调至 pH = 3.0, $v(\text{乙酸乙酯}) : v(\text{叔丁醇}) = 3 : 2$ 萃取后浓缩, 经硅胶柱(氯仿和甲醇的混合溶剂洗脱)分离纯化, 产率约 5%.

2 结果与讨论

丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸经常出现在生物体内大多数酶的活性中心^[10], 对酶的功能发挥关键作用. 我们实验室以前发现丝组二肽及相关的小肽可以切

割 DNA, RNA 和蛋白质^[11], 这对核酸切割的机理、定点切割试剂以及疾病的基因治疗等研究有重要的意义. 由于经典方法合成丝组二肽需要多步保护和脱保护^[12], 这些合成步骤繁杂且要经过严格的分离才能得到纯度较好的二肽. 我们实验室发现磷酸化氨基酸在有机溶剂中及活化试剂存在下能够生成一个多肽库^[5]. 在利用组合化学合成肽库的研究中, 研究肽库的组成和合成方法很重要. 因此探索 *N*-磷酸化氨基酸的成肽规律不仅对常规二肽的合成, 而且对多肽的组合化学库合成有很大的意义.

对水溶液中磷酸化丝氨酸和组氨酸反应生成的产物用正离子和负离子 ESIMS 质谱检测(图 1). 正离子质谱(图 1(a))因被检测物容易形成一些簇离子而使谱图变得复杂些, 如生成簇离子(DIPP-Ser)₂ + Na⁺ (*m/z*: 561)和 DIPP-Ser + His + H⁺ (*m/z*: 425). 而被检测物负离子的 ESI 质谱(图 1(b))由于不能形成簇离子却相对较简单. 从正离子和负离子的 ESIMS 质谱图可以发现: 产物含有两个磷酸化二肽, 一个是磷酸化丝氨酸自身活化形成的 DIPP-Ser-Ser 二肽(*M_w* = 356); 另外一个为组氨酸对磷酸化丝氨酸进攻形成的磷酸化二肽(*M_w* = 406). 后者可通过多级质谱产生的子离子来指认二肽序列. 其正离子二级质谱可以产生[His + H]⁺峰(*m/z*: 156, *y*₁ 离子, 其定义见文献[13], 图 2(a)和表 1)和[DIPP-Ser+H]⁺离子(*m/z*: 270, *b*₁+H₂O^[13], 图 2(a)和表 1), 负离子三级质谱可以产生[His-H]⁻ (*y*₁ 离子, *m/z*: 154)峰, 因此这个磷酸化二肽就被指认为 DIPP-Ser-His. 用 ESI 质谱分析水溶液中磷酸化组氨酸和丝氨酸的反应产物, 发现产物也有两个磷酸化二肽(表 1), 一个是 DIPP-His-His 二肽(*M_w* = 456), 另一个是丝氨酸和磷酸化组氨酸形成的磷酸化二肽(*M_w* = 406). 后者经过 ESIMS 二级质谱分析(图 2(b), 表 1)被指认为 DIPP-His-Ser 二肽, 因为其正离子二级质谱可产生 *a*₁ 离子(*m/z*: 274, 图 2(b)), 负离子二级质谱可产生 DIPP-His 负离子(*m/z*: 318, *b*₁+H₂O), 这些离子的产生及机理参见文献[14]. 把上述磷酸化丝氨酸和组氨酸二肽产物的质谱断裂规律与由购买的 Ser-His, His-Ser 制备的磷酸化二肽的谱图相比较, 结果是一致的. 用 ESI 质谱分析磷酸化组氨酸和丙氨酸的反应产物(表 1), 产物同样含有两个磷酸化二肽, 一个是 DIPP-His-His 二肽(*M_w*=456), 另一个是 DIPP-His-Ala 二肽(*M_w*=390), 它们的正离子二级质谱同样可产生 *a*₁ 离子(*m/z*: 274)^[13].

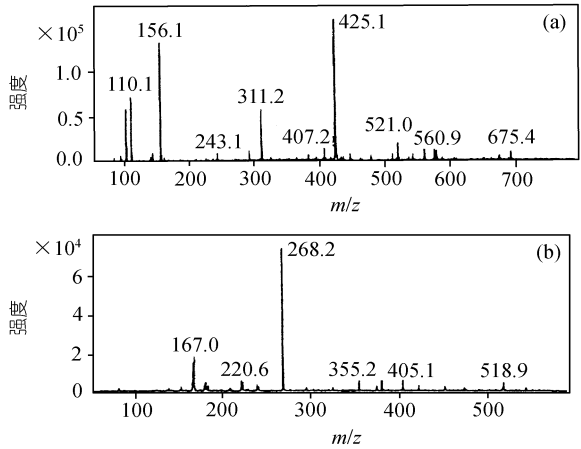


图 1 水溶液中 DIPP-Ser 和 His 反应产物的正离子(a)和负离子(b)的 ESIMS 质谱图

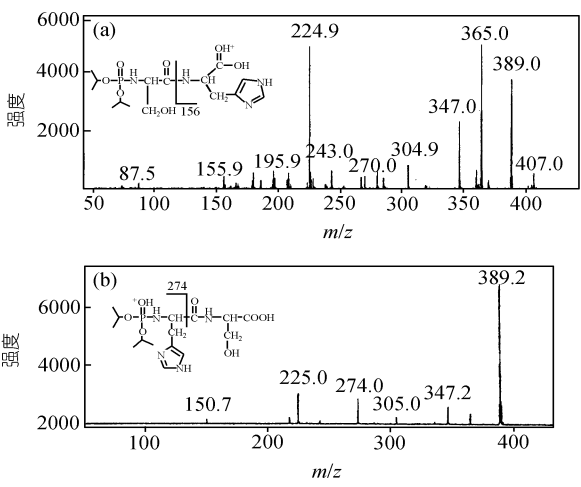


图 2 反应生成的 DIPP-Ser-His 正离子(a)和反应生成的 DIPP-His-Ser 正离子(b)的 ESIMS/MS 图

对水溶液中磷酸化丝氨酸和丙氨酸的成肽产物用 ESI 质谱分析, 发现产物也含有两个磷酸化二肽, 一个是磷酸化丝氨酸自身活化形成的 DIPP-Ser-Ser 二肽(*M_w* = 356); 另外一个为丙氨酸对磷酸化丝氨酸进攻形成的 DIPP-Ser-Ala 二肽(*M_w* = 339), 这个指认是因为其负离子二级质谱中观察到一个重排峰 (*Pr*ⁱO)₂P(O)O⁻^[15] (*m/z*: 181, 图 3(a), 表 1). 而用 ESI 质谱分析磷酸化丙氨酸和丝氨酸的反应产物, 发现也生成两个二肽, 一个是 DIPP-Ala-Ala 二肽(*M_w* = 321), 另一个被指认为 DIPP-Ala-Ser 二肽(*M_w* = 339), 因为这个磷酸化丙丝二肽在负离子二级质谱中没有重排峰(*Pr*ⁱO)₂P(O)O⁻(图 3(b)和表 1), 且正负离子二

表 1 水溶液中 *N*-磷酸化氨基酸与氨基酸反应生成的 *N*-磷酸化二肽的 ESIMS/MS 数据

反应	化合物	母离子	碎片离子峰及相对强度/%
DIPPSer + His	DIPP-Ser-His ($M_w = 406$)	[M+H] ⁺	389(84) ^{a)} , 365(100) ^{b)} , 347(60), 305(20),280(19), 270(18), 243(20), 225(95), 208(18), 196(19), 180(19), 156(17)
		[M-H] ⁻	375(100) ^{c)}
	DIPP-Ser-Ser ($M_w = 356$)	[M+Na] ⁺	361(50) ^{a)} , 337(42) ^{b)} , 319(8), 265(6), 295(9), 292(7), 277(9), 197(100), 163(22)
		[M-H] ⁻	325(100) ^{c)} , 295(31), 268(17), 265(6), 251(3), 238(6), 235(8), 181(7) ^{d)} , 173(7), 139(4)
DIPPHis + Ser	DIPP-His-Ser ($M_w = 406$)	[M+H] ⁺	389(100) ^{a)} , 365(8) ^{b)} , 347(12), 305(5), 274(18), 225(21)
		[M-H] ⁻	387(9) ^{a)} , 375(75) ^{c)} , 345(5), 318(100), 316(20), 303(60), 260(6)
	DIPP-His-His ($M_w = 456$)	[M+H] ⁺	439(35) ^{a)} , 415(32) ^{b)} , 411(27), 373(6),320(27),293(7), 275(100), 274(12), 258(30), 247(7), 156(18)
		[M-H] ⁻	413(16) ^{b)} , 395(100), 357(10), 353(30),335(10),333(7), 309(9), 291(39), 273(8), 256(27), 230(13), 212(14), 176(18), 154(42)
DIPPSer + Ala	DIPP-Ser-Ala ($M_w = 340$)	[M+H] ⁺	323(34) ^{a)} , 305(14), 299(100) ^{b)} , 281(10), 257(21), 239(8),159(50)
		[M-H] ⁻	309(100) ^{c)} , 279(10), 249(5), 181(10) ^{d)} , 157(4), 139(3)
DIPPSer + Gly	DIPP-Ser-Gly ($M_w = 326$)	[M+H] ⁺	309(3) ^{a)} , 285(100) ^{b)} , 243(21), 145(39)
		[M-H] ⁻	295(100) ^{c)} , 265(35), 235(7), 181(9) ^{d)} , 139(2)
DIPPAla + Ser	DIPP-Ala-Ser ($M_w = 340$)	[M+Na] ⁺	345(100) ^{a)} , 321(53) ^{b)} , 303(5), 279(6), 276(6), 199(8), 181(47), 163(73), 138(8)
		[M-H] ⁻	321(30) ^{a)} , 309(100) ^{c)} , 297(4) ^{b)} , 279(17), 261(13), 252(40), 249(82), 192(7)
DIPPHis + Ala	DIPP-His-Ala ($M_w = 390$)	[M+H] ⁺	373(51) ^{a)} , 349(70) ^{b)} , 331(21), 307(21), 274(26), 227(44), 209(100), 110(22)
		[M-H] ⁻	329(37), 306(100), 302(5), 300(7), 272(4), 269(5), 251(8), 225(5), 93(19)
DIPPAsp + His	DIPP-Asp-His ($M_w = 434$)	[M+H] ⁺	417(100) ^{a)} , 393(30) ^{b)} , 375(21), 351(10), 274(26), 295(10), 253(35), 156(12)
		[M-H] ⁻	415(100) ^{a)} , 399(20), 372(8), 278(7),198(10)

DIPP——*N*-二异丙基磷酰基. a) 脱去一分子水; b) 脱去一分子丙烯; c) 脱去一分子 CH₂O; d) 重排特征峰($\text{Pr}^i\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{O}^-$

级质谱都有一个 $b_1 + \text{H}_2\text{O}$ 的特征峰(分别是 m/z 276 加钠峰和 252, 表 1). 磷酸化丝丙和丙丝二肽在质谱上的裂解规律与以前发现的只有近距离的侧链羟基或游离的羧基^[15]才能产生重排峰($\text{Pr}^i\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{O}^-$ 的结论是一致的.

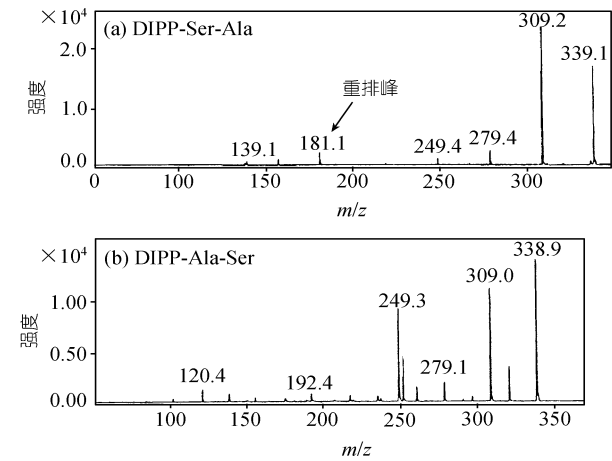


图 3 反应生成的 DIPP-Ser-Ala 负离子(a)和反应生成的 DIPP-Ala-Ser 负离子(b)的 ESIMS/MS 图

对磷酸化天冬氨酸与另一氨基酸的水溶液, 如 DIPP-Asp 和 His 的反应, 同样也能产生磷酸化杂肽. 由于其二级质谱能够断裂出组氨酸正离子 $[\text{His}+\text{H}]^+(m/z: 156)$ 峰(表 1), 因此这个磷酸化二肽产物就是 DIPP-Asp-His 二肽. 然而由于磷酸化天冬氨酸同时含有 $\alpha\text{-COOH}$ 和 $\beta\text{-COOH}$ 两个羧基, 因此这个杂肽既可能是磷酸化 α -二肽, 也可能是磷酸化 β -二肽, 或者是两者混合物. 为了进一步探讨磷酸化天冬氨酸与氨基酸反应产物的确切结构, 我们将产物进行分离, 并用二维核磁共振技术进行结构研究.

为了提高产率和便于分离, 磷酸化天冬氨酸在氯仿中与丙氨酸乙酯反应. 反应后的产物经过硅胶柱分离, 得到所要的磷酸化二肽 DIPP-Asp-Ala-OEt ($M_w = 396$). 在 600 MHz 核磁共振仪上对产物进行二维同核 COSY 谱, 一维 ^1H 谱, ^{13}C 谱和二维异核 HMBC 谱分析¹⁾. 通过 COSY 谱和一维 ^{13}C 谱的指认, 发现磷酸化二肽的 α -碳基被 ^{31}P 裂分为两重峰, 其 ^{13}C 化学位移是 171.91 与 171.99(图 4(a)). 而 β -碳基是单峰, 其 ^{13}C 化学位移是 175.1. 与磷酸化天冬氨酸相

1) Chen Z Z, Tong Y F, Tan B, et al. Comparing the activities of $\alpha\text{-COOH}$ and $\beta\text{-COOH}$ in *N*-phosphoryl aspartic acids by NMR and theoretical study. Angew Chem Int End (待发表)

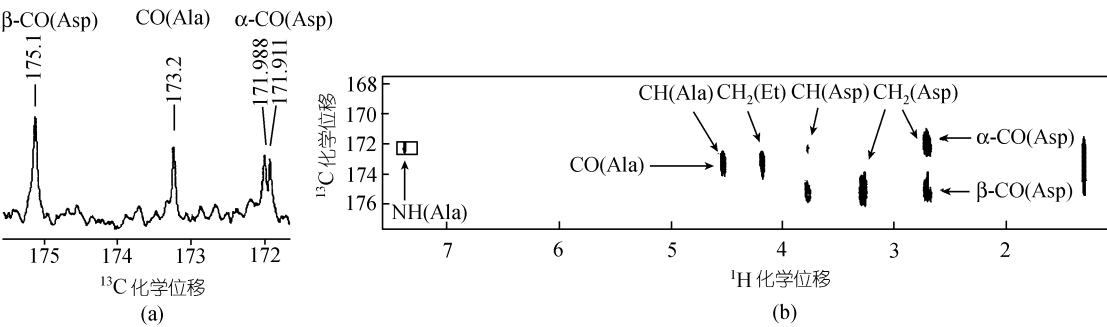


图 4 (a) 生成的 DIPP-Asp-Ala-Oet 羰基区域的 ¹³C 碳谱放大图. (b) 羰基区域的二维-HMBC 谱, α-CO(Asp) 与 NH(Ala) 的交叉峰用矩形标出

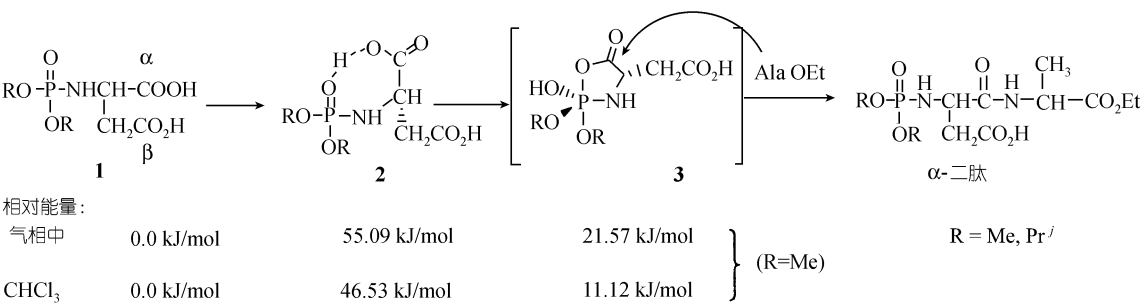


图 5 提出的 N-磷酸化氨基酸成肽机理, 以及计算得到中间体和过渡态的相对能量
图中的能量数值在 B3LYP/6-31G**水平并校正零点能

比, α-羰基的化学位移向高场方向偏移了很多. 而且在 HMBC 图上, 在 α-羰基和 NH(Ala) 的交叉位置出现一个峰, 而在 β-羰基处没有(图 4(b)), 说明 α-羰基和 NH(Ala) 相连. 因此生成的磷酸化二肽是 DIPP-Asp-(α)-Ala-OEt, 而不是 DIPP-Asp-(β)-Ala-OEt. 这说明只有 α-COOH 参与成肽反应, 这与我们实验室以前发现含有游离 α-COOH 的磷酸化氨基酸才能发生磷上酯交换和成酯反应的现象^[16]是一致的.

磷酸化氨基酸与氨基酸的成肽反应机理被认为是: 磷酸化氨基酸形成一个分子内磷酸-羧酸混酐五配位磷中间体(3), 另一氨基酸分子的氨基进攻五配位磷中间体的羰基碳原子而形成肽键^[17~19]. 成肽反应的过程如图 5 示. 为了减少计算量, 密度泛函计算过程中把异丙基替换甲基, 理论计算表明 α-COOH 参与成肽反应的过渡态是含氢桥键的结构(2)^[20], 其能量在 B3LYP/6-31G**水平上仅比反应物(1)高 55.09 kJ/mol, 而生成的分子内磷酸-羧酸混酐五配位磷中

间体(3)的相对能量为 21.57 kJ/mol. 考虑到反应是在氯仿中进行, 则校正溶剂化效应后的相对能量更低, 2 和 3 的相对能量分别为 46.53 和 11.12 kJ/mol(图 5). 由于磷酸化氨基酸形成分子内磷酸-羧酸混酐五配位磷中间体的活化能较低, 且中间体的能量很低. 因此磷酸化氨基酸成肽反应的机理应该是正确的, 而且在室温下是可以进行的.

3 结论

正离子和负离子 ESI 质谱数据表明, N-磷酸化氨基酸在没有活化剂、缩合剂的水溶液中能够发生成肽反应, 且生成的磷酸化二肽具有方向性: 成肽产物的 N 端氨基酸来自 N-磷酸化氨基酸, 成肽反应发生在其 C 端. 这与我们实验室以前所发现的其他氨基酸的成肽规律是一致的^[21]. 而且对于同时含有 α-COOH 和 β-COOH 两个羧基的磷酸化天冬氨酸的反应, 形成的产物只有磷酸化-α-二肽, 没有磷酸化-β-二肽. 这

些实验结果对于自然界为什么选择 α -氨基酸作为蛋白质的骨架, 蛋白质的生物合成方向等方面的研究很有帮助.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 20072023, 20175026)、教育部高等学校优秀青年教师教学和科研奖励基金资助项目.

参 考 文 献

1 Li Y M, Yin Y W, Zhao Y F. Phosphoryl group participation leads to peptide formation from *N*-phosphoryl amino acids. *Int J Pept Protein Res*, 1992, 39: 375~381

2 Ju Y, Zhao Y F, Sha Y W, et al. Phosphoryl promotion and differentiation effect on amino acids and prebiotic synthesis of protein. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem*, 1995, 101: 117~123

3 Zhao Y F, Ju Y, Li Y M, et al. Self-activation of *N*-phosphoamino acids and *N*-phosphodipeptides in oligopeptide formation. *Int J Pept Protein Res*, 1995, 45: 514~518

4 Zhou W H, Ju Y, Zhao Y F, et al. Simultaneous formation of peptides and nucleotides from *N*-phosphothreonine. *Orig Life Evol Biosph*, 1996, 26: 547~560

5 Fu H, Li Z L, Zhao Y F, et al. Oligomerization of *N*,*O*-bis(trimethylsilyl)- α -amino acids into peptides mediated by *o*-phenylene phosphorochloridate. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 291~295

6 Zhao Y F, Cao P S. Phosphoryl amino-acids-common origin for nucleic-acids and protein. *J Biol Phys*, 1994, 20: 283~287

7 Bodanszky M, Bodanszky A. Protecting Groups and Activation and Coupling: in *The Practice of Peptide Synthesis*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 18~110

8 Markley J L, Bax A, Arata Y, et al. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *Pure Appl Chem*, 1998, 70: 117~142

9 Ji G J, Xue C B, Zeng J N, et al. Synthesis of *N*,*O*,*O*-diisopropyl phosphoryl amino acids and dipeptides. *Synthesis*, 1988: 444~448

10 Nardini M, Dijkstra B W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struc Biol*, 1999, 9: 732~737

11 Li Y S, Zhao Y F, Hatfield S, et al. Dipeptide seryl-histidine and

related oligopeptides cleave DNA, protein, and a carboxyl ester. *Bioorg Med Chem*, 2000, 8: 2675~2680

12 Okawa K. Studies on serine peptides. III. Synthesis of L-seryl-L-histidine, L-seryl-L-histidine-L-leucine and carbobenzyloxy-glycyl-o-benzyle-DL-serine ethyl ester. *Bull Chem Soc Jpn*, 1957, 30: 976~978

13 Johnson R S, Martin S A, Biemann K, et al. Fragmentation of protonated peptides: surface-induced dissociation in conjunction with a quantum mechanical approach. *Anal Chem*, 1987, 59: 2621~2625

14 Sadagopan N, Watson J T. Mass spectrometric evidence for mechanisms of fragmentation of charge-derivatized peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2001, 12: 399~409

15 Chen Z Z, Chen S B, Chen Y, et al. Negative-ion electrospray ionization tandem mass spectrometry of *N*-phosphoryl amino acids and dipeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16(8): 790~796

16 Li Y M, Zhang D Q, Zhang H W, et al. β -Carboxyl catalytic effect of *N*-phosphoryl aspartic acid. *Bioorg Chem*, 1992, 20: 285~295

17 Chen Z Z, Tan B, Li Y M, et al. Differentiation of α -COOH from β -COOH in aspartic acids by *N*-phosphorylation. *I J Quan Chem*, 2001, 83: 41~51.

18 钟儒刚, 赵玉芬, 戴乾圜. *N*-磷酰化氨基酸生成分子内磷酸羧酸混酐反应机理的 MNDO 研究. *科学通报*, 1998, 43(7): 725~729

19 Chen Z Z, Tan B, Li Y M, et al. Differentiation of α -COOH from γ -COOH in glutamic acid by *N*-phosphorylation. *J Mol Struc-Theochem*, 2001, 574: 163~175

20 Chen Z Z, Tan B, Li Y M, et al. Theoretical study on the activity of α -COOH and β -COOH of *N*-phosphoryl aspartic acids. *Chinese Chem Lett*, 2001, 12: 1093~1096

21 Jiang Y, Fu H, Xu L, et al. Identification of self-assembly products from *N*-phosphoamino acids by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14: 1491~1493

(2002-01-04 收稿, 2002-05-13 收修改稿)