

蛇肌果糖 1,6-二磷酸酯酶的限制性酶解

赵辅昆 施建平 许根俊

(中国科学院上海生物化学研究所)

摘 要

蛇肌果糖 1,6-二磷酸酯酶被枯草杆菌蛋白酶或胰蛋白酶限制性酶解,可分别产生 29000 和 7000 或 32000 和 4000 的肽段。酶解产物在 pH7.5 和 pH9.2 分别有 2 倍和 4—5 倍的激活, pH7.5 的激活作用,仅可用无机磷测活法观察到。5' AMP 对该产物的别构抑制作用部分或全部丧失。本文与文献[1]的结果使我们提出了天然状态的蛇肌酶的催化部位的结构是不完善的看法。被限制性酶解的蛇肌酶受 6-磷酸果糖激活,同时又受 6-磷酸葡萄糖, 6-磷酸葡萄糖和还原型辅酶 II 的抑制。因此限制性酶解作用可能在蛇肌中有一定生理功能。

蛇肌果糖 1,6-二磷酸酯酶(简称 FruP₂ase, Ec. 3. 1. 3. 11)是一个 4 个亚基的别构酶,其亚基分子量为 36000。最适 pH 在中性范围,是糖的异生作用中的一个关键酶^[1,2]。

Traniello 等及 Zalitis 等分别用枯草杆菌蛋白酶处理兔肝^[3]和羊肝^[4]的 FruP₂ase 发现,被蛋白水解酶限制性酶解的 FruP₂ase 仍然保持 4 个亚基的缔合形式,在非解离的条件下分子量也不变。被修饰的酶 pH7.5 的活力也不发生变化,但 pH9.2 的活力增加 5 倍左右。同时别构抑制剂 AMP 对它的抑制作用却大大地减弱。FruP₂ase 的这些性质上的变化,是由于蛋白水解酶把 36000 的亚基水解成为 29000 的 S-蛋白和 7000 左右的 S-肽而造成的。它可以用 SDS 凝胶电泳观察到^[3,4]。

Macgregor^[5] 等用枯草杆菌蛋白酶处理兔肌的 FruP₂ase, 也观察到亚基分子量的变化和 pH9.2 活力的增加,但是对于别构抑制剂 MAP 的抑制作用影响很小。

我们用枯草杆菌蛋白酶和羊胰蛋白酶对蛇肌 FruP₂ase 进行限制性酶解,发现蛋白水解酶作用后的蛇肌 FruP₂ase 对 AMP 抑制作用的敏感性发生了很大的变化,同时也观察到修饰过的蛇肌 FruP₂ase pH7.5 的活性也增加一倍左右,这些结果和本实验室以前的工作一起,使我们提出了天然状态的 FruP₂ase 的活性部位是不完善的看法。

一、材料和方法

1. 材料

蛇肌 FruP₂ase 按本实验室的方法从乌梢蛇的肌肉中制备^[6]。蛋白浓度按每毫克每毫升的溶液在 280nm 的光吸收为 0.72 计算。羊胰蛋白酶由屈贤铭同志赠予。腺苷-磷酸(5'AMP)层析纯,葡萄糖 6-磷酸(G6P)钼盐,层析纯,均系本所产品。枯草杆菌蛋白酶, 6-磷酸葡萄糖

本文 1983 年 11 月 23 日收到。

酸钠盐 (6PG), 果糖 1,6-二磷酸钠盐 (FruP_2) 含量 98% 以上, 辅酶 II(NADP^+), 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (GPDH), 磷酸葡萄糖异构酶 (PGI), 均系 Sigma 产品。果糖 6-磷酸 (F6P) 层析纯, Brehminger 产品。十二烷基磺酸钠 (SDS), 德国 E. Merck 产品。还原辅酶 II(NADPH) 中国科学院生物物理研究所邹承鲁教授赠予。牛血清白蛋白、肌红蛋白、细胞色素 c 均系 Serva 产品。兔肌醛缩酶、牛胰凝乳蛋白酶元均系本实验室制备。其余均系国产分析纯试剂。

二、试验方法

1. 酶活性测定

(1) 化学法 在 35°C 20mM TEA-DEA; 1mM EDTA; 10mM MgSO_4 pH7.5 或 pH9.2 缓冲液中, 含 0.2mM 或 0.1mM FruP_2 , 1—3 μg FruP_2ase 或蛋白水解酶处理的 FruP_2ase , 测定无机磷的释放量^[2]。

(2) 酶偶联法^[7] 在室温与化学法相同的缓冲液中含有 0.1mM FruP_2 ; 5 μg PGI; 5 μg GPDH; 0.2mM NADP^+ ; 0.5—1.5 μg FruP_2ase 或被限制性酶解的 FruP_2ase , 在 340nm 测定 NADPH 的增加。

2. 限制性酶解

(1) 枯草杆菌蛋白酶限制性酶解 在 pH6.5 含有 2.1mg 蛇肌 FruP_2ase , 1mM FruP_2 的缓冲液中, 加入 3 μg 枯草杆菌蛋白酶 (FruP_2ase : 枯草杆菌蛋白酶 = 700:1(W/W))后, 于不同时间取出样品用化学法和酶偶联法在 pH7.5 或 pH9.2 及 pH7.5 含有 6 μM 5'AMP 等三种缓冲液中检测酶活力变化。同时取 50—100 μl 反应酶溶液加到等体积 10% TCA 中止反应, 离心收集沉淀, 用等体无水丙酮洗沉淀, 离心收集沉淀, 沉淀再用等体积 (50—100 μl) 丙酮洗 1 次, 离心收集沉淀, 将沉淀 $70^\circ\text{—}80^\circ\text{C}$ 烘干, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检查。

(2) 胰蛋白酶限制性酶解 除 FruP_2ase ; 羊胰蛋白酶 (W/W) = 670:1, 在 0.1M 硼酸 0.1mM EDTA pH7.8 缓冲液中反应外, 其余反应条件, 活性测定和产物的凝胶电泳鉴定均与枯草杆菌蛋白酶酶解所述的条件相同。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 按 Douglas 等人方法^[8] 15% 丙烯酰胺; $13 \times 17\text{cm}$ 每孔 10—15 μg 左右的蛋白样品, 总电流为 5—10mA, 电泳 18—24h, 电泳后 10% TCA 浸泡 20min, 用 0.1% 考马斯亮蓝染色 1—2h, 再用 7% 醋酸脱色。用牛血清白蛋白 (亚基分子量 67000)、兔肌醛缩酶 (亚基分子量为 40000)、胰凝乳蛋白酶原 (25000)、肌红蛋白 (17800) 细胞色素 c (12400) 作为标准蛋白, 根据电泳迁移率计算蛋白水解酶限制性酶解 FruP_2ase 产物的分子量。

三、结 果

1. 枯草杆菌蛋白酶对蛇肌 FruP_2ase 的作用

枯草杆菌蛋白酶作用于蛇肌 FruP_2ase , 用酶偶联法监测蛋白水解过程中 FruP_2ase 活性的变化其结果如图 1a。枯草杆菌蛋白水解酶对蛇肌 FruP_2ase 的限制性酶解的结果表明, pH7.5

本文采用如下简称:

EDTA: 乙二胺四乙酸二钠; TEA: 三乙醇胺; DEA: 二乙醇胺; NaAC: 醋酸钠; HAC: 醋酸; TCA: 三氯醋酸。本文采用 S-蛋白和 S-肽系指可溶性蛋白和可溶性肽。

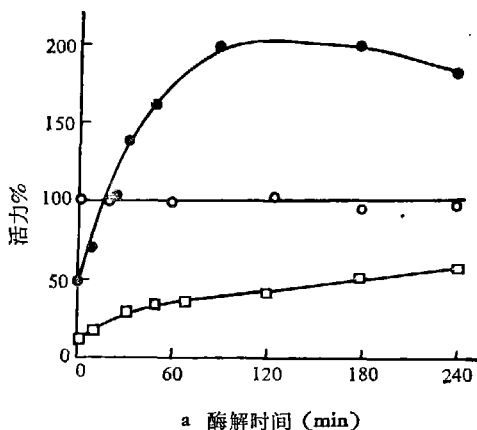


图 1a 枯草杆菌蛋白酶处理蛇肌 $\text{FruP}_{2\text{ase}}$ 过程中活力的时间曲线(偶联法)

(在 11°C 每毫升 0.1M NaAC-HAC pH 6.5 含有 2.1mg 蛇肌 $\text{FruP}_{2\text{ase}}$, 0.1M KCl , 1.0mM FruP_2 的缓冲液中,加入 $3\mu\text{g}$ 枯草杆菌蛋白酶开始反应;以不加枯草杆菌蛋白酶的相同组成的溶液作对照。

○ 为被修饰的酶在 pH7.5 的活力; ● 为被修饰的酶在 pH9.2 的活力; □ 为被修饰的酶在 pH7.5 含有 $6\mu\text{M}$ AMP 的测活系统中的活力。对照酶在 pH7.5 的活力为 100%)

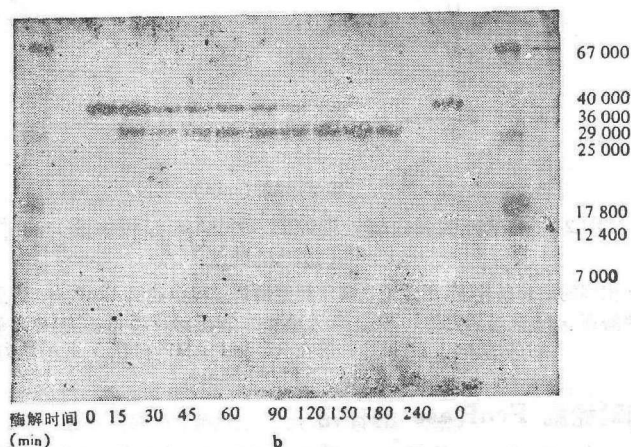


图 1b 枯草杆菌蛋白酶对蛇肌 $\text{FruP}_{2\text{ase}}$ 限制性酶解的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

(在图 1a 实验条件下,在限制性酶解的 0,15,30,45,60,90,120,180,240min 取 $50-100\mu\text{l}$ 酶解液,加到等体积 10% TCA 中止反应。按方法所述条件处理,然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,不加枯草杆菌蛋白酶的 $\text{FruP}_{2\text{ase}}$ 作为 0 时;电泳条件见方法部分)

的活力在 4h 内基本保持不变, pH9.2 的活力增加 4 倍左右,活力方面的变化与 Traniello 和 Zalitis 等报道的兔肝和羊肝 $\text{FruP}_{2\text{ase}}$ 经枯草杆菌蛋白水解酶作用后的结果相同。与兔肌的 $\text{FruP}_{2\text{ase}}$ 不同在于蛇酶被修饰后对于 AMP 的抑制的敏感性大大地减弱。天然的蛇肌 $\text{FruP}_{2\text{ase}}$, 当 AMP 的浓度为 $6\mu\text{M}$ 时,可使在 pH7.5 的活力 90% 以上受到抑制,而被修饰的酶则只能被抑制 50% 左右(见图 1a)。

枯草杆菌蛋白酶酶解过程不同时间取出样品用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定结果见图 1b.

从图谱上可以看出 FruP₂ase 的亚基逐渐地由分子量 36000 转变为 29000 的 S-蛋白和分子量为 7000 的 S-肽, 240min 时 pH9.2 的活性稍有下降, 这一点和分子量 29000 的部分相对量略有减少是一致的 (见图 1b).

用无机磷测定法监测 FruP₂ase 被蛋白水解过程的活力变化, 我们同样可以看到经蛋白水解酶修饰过的 FruP₂ase 的 pH9.2 活力增加和它对于 AMP 抑制敏感性减弱. 值得注意的是用测定无机磷方法监测修饰过程时, 发现 pH7.5 的活力也同时增加, 最后达到和 pH9.2 活性相同的水平 (图 2).

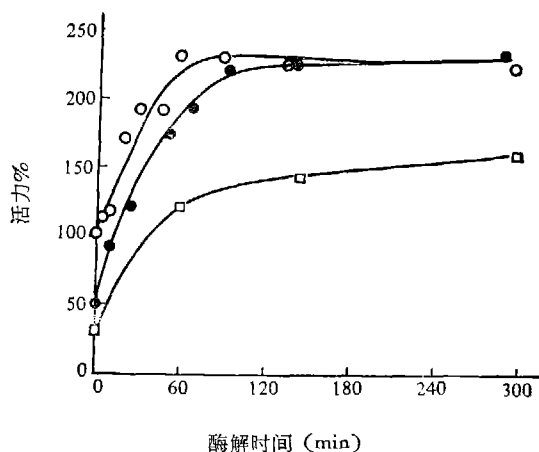


图 2 枯草杆菌蛋白酶处理蛇肌 FruP₂ase 过程中活力的时间曲线
(定无机磷法)

(与图 1a 相同的酶解条件下, 用定无机磷法测定酶解过程中蛇肌 FruP₂ase 的活力. 对照酶同图 1a, 对照酶在 pH7.5 的活力为 100%. ○ 为被修饰酶在 pH7.5 的活力; ● 为被修饰酶在 pH9.2 时的活力; □ 为被修饰酶在含 6 μM AMP pH7.5 时的活力)

2. 胰蛋白酶对蛇肌 FruP₂ase 的作用

胰蛋白酶对蛇肌 FruP₂ase 的限制性酶解过程中, 活力的变化见图 3a.

图 3a 表明当用酶偶联法监测 FruP₂ase 活力变化时, 只观察到 pH9.2 的活性开始有一个增加, 120min 后逐渐下降, 但是在 pH7.5 的活力没有明显的变化, 70min 以后 pH7.5 的活力和 pH9.2 的活力都有下降的趋势. 6 μM AMP 对被修饰酶不起抑制作用. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果表明, 胰蛋白酶酶解蛇肌 FruP₂ase 产生 32K 的 S-蛋白和 1 个 4K 的 S-肽 (图 3b), 其亚基被胰蛋白酶作用的过程中除去 32K 的 S-蛋白以外, 还有少量的 22K 和 10K 的蛋白.

当蛇肌 FruP₂ase 在被胰蛋白酶修饰的过程中用测定无机磷方法监测酶活力的变化时再一次证实, 蛇肌 FruP₂ase 被枯草杆菌蛋白酶作用后, 除 pH9.2 的活力增加 4—5 倍以外, pH7.5 的活力也增加一倍左右的结果. 和枯草杆菌蛋白酶作用的结果不同, 胰蛋白酶作用后得到的产物完全丧失了对 AMP 的抑制的敏感性 (见图 4 和图 3a).

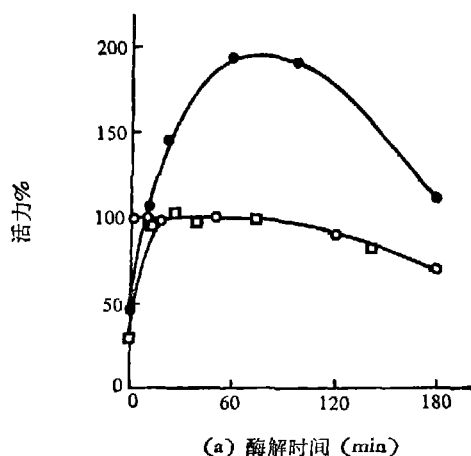


图 3(a) 胰蛋白酶处理蛇肌 FruP₂ase 过程中活力的时间曲线(偶联法)

[在 11°C 0.1M 硼酸 0.1mM EDTA pH7.8 缓冲液中, 含有 3.0mg 蛇肌 FruP₂ase; 4.5μg 羊胰蛋白酶(现用现配在 10⁻³N 盐酸中) 1mM FruP₂; 0.1MKCl; 以不加胰蛋白酶上述混合液为对照酶, 对照酶在 pH7.5 时的活力为 100%。

○ 为被修饰的酶在 pH7.5 时的活力; ● 为被修饰的酶在 pH9.2 时的活力; □ 为被修饰的酶在 pH7.5 含有 6μM AMP 测活系统中的活力]

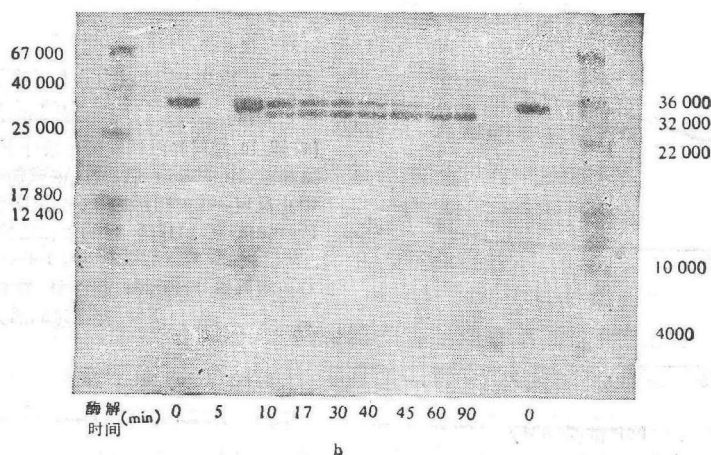


图 3(b) 羊胰蛋白酶对蛇肌 FruP₂ase 限制性酶解的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
(在图 3a 实验条件下, 在限制性酶解的 5, 10, 17, 30, 40, 45, 60, 90min, 取 50μl 的修饰酶与等体积 10% TCA 混合, 按材料和方法所述条件处理, 并进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。不加胰蛋白酶的对照酶为 0 时, 电泳条件见方法)

3. 用酶偶联法和测定无机磷法得到不同结果的原因

对于限制性酶解的蛇肌 FruP₂ase pH7.5 的活力, 用偶联法和用测定无机磷方法测定得到不同的结果, 这种不一致的现象主要在于前者是测定 NADP⁺ 被还原成 NADPH, 由于偶联法的最终产物是 NADPH 和 6PG, 并且可能存在 G6P 中间物。而后者是直接测定 FruP₂ 水解的产物无机磷, 该系统除底物和无机磷外, 只存在 F6P。

我们发现在测活系统中如果加入 F6P, 可以观察到 F6P 对被枯草杆菌蛋白酶作用过的蛇肌 FruP₂ase 有激活作用, 对于天然的蛇肌 FruP₂ase F6P 的浓度在 120μM 以下则没有影响(图 5)。

而酶偶联法的最终产物 NADPH, 6PG 和中间产物对被枯草杆菌蛋白酶修饰过的蛇肌 FruP₂ase, 则有不同的抑制作用(见图 6)。

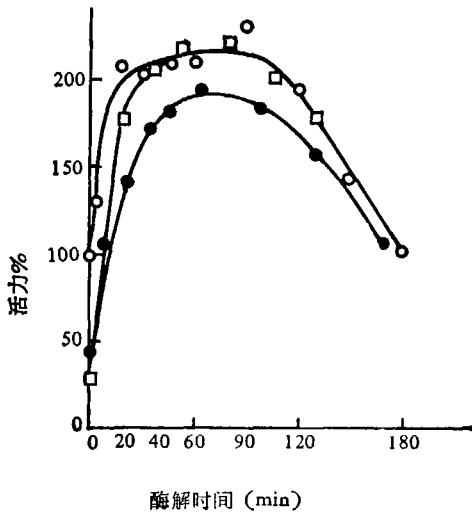


图4 胰蛋白酶处理蛇肌 FruP₂ase 过程中活力的时间曲线(定无机磷法)

(在同图 3a 相同条件下,以不加胰蛋白酶相同混合液为对照酶,对照酶在 pH7.5, pH9.2 和受 5'AMP 抑制等性质均不发生变化,对照酶在 pH7.5 时活力为 100%.)

○为被修饰酶在 pH7.5 时活力;●为被修饰酶在 pH9.2 时的活力;□为被修饰酶在 pH7.5、含有 6μM AMP 的测活系统中的活力)

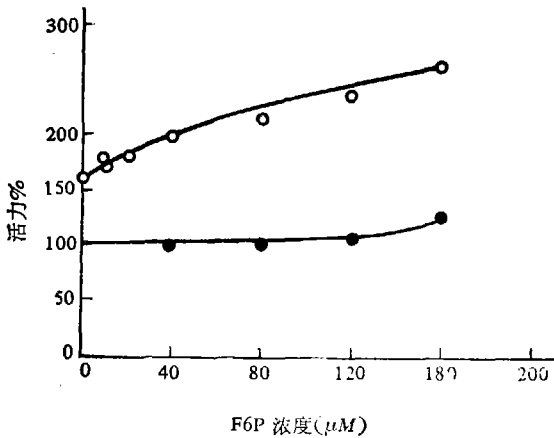


图5 F6P 对被蛋白水解酶限制性酶解 FruP₂ase 活力的影响

[在图 1a 相同的限制性酶解条件下, FruP₂ase 枯草杆菌蛋白酶保温 1h 30min 后,置冰浴或加 PSMF (最终浓度为 2mM) 中止反应,在如图示的 F6P 浓度存在时,用化学法测定修饰 FruP₂ase 在 pH7.5 时的催化活性.对照酶在 pH7.5 的活力为 100%.]

○为被修饰 FruP₂ase 在 F6P 存在时的活力;●为对照酶在 F6P 存在时的活力]

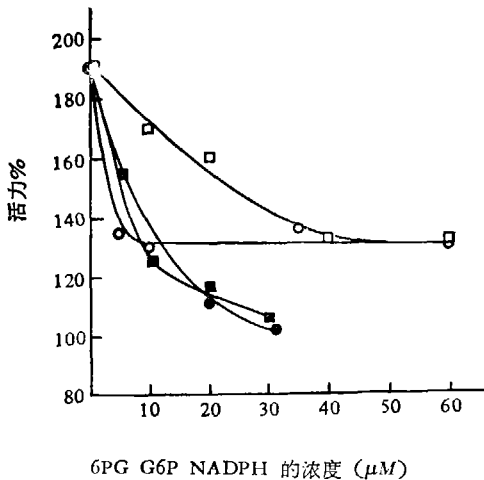


图6 6PG, G6P, NADPH 对被蛋白水解酶限制性酶解的 FruP₂ase 活力的影响

[在图 1a 相同的限制性酶解条件下, FruP₂ase 与枯草杆菌蛋白酶保温 1h 30 min 后,放入冰浴或加 PSMF (最终浓度为 2mM) 中止反应,在如图示的 G6P, 6PG, NADPH 或 NADPH 和 6PG 等分子比混合的浓度下,用化学法测定修饰的 FruP₂ase 在 pH7.5 时的活力;□为不同浓度 6PG 存在时,被修饰酶的活力;

■为不同浓度 G6P 存在时,被修饰酶的活力;●为等分子比混合的 6PG 和 NADPH 共存时,被修饰酶的活力;○为不同浓度 NADPH 存在时,被修饰酶的活力(注:在 160 μM G6P, 6PG NADPH 存在时对天然 FruP₂ase 活力无影响)]

因此结合 F6P 对被修饰酶的激活作用和 NADPH, 6PG 和 G6P 对修饰的酶的抑制作用可以能够很好地解释为什么用酶偶联法不能观察到 pH7.5 活力增加的原因。

四、讨 论

我们曾经报道过兔肝的 FruP₂ase 的催化部位处于从 C 端开始计算的第 54 个氨基酸残基的位置^[9],它的别构部位处于从 N 端开始计算的第 137 和 138 个氨基酸残基的位置^[10].因此二个部位从一级结构来看相距大约有 150 个氨基酸残基.枯草杆菌蛋白酶处理后得到的蛇肌的 FruP₂ase S-肽和 S-蛋白的分子量大小以及 S-肽的部分顺序分析来看,兔肌酶和蛇肌酶还是比较接近的^[10],因此枯草杆菌蛋白酶限制性酶解作用后的兔肌酶和蛇肌酶所产生的对别构抑制剂 AMP 的敏感性的差别,也可能是由于别构部位的一级结构的细微差别或者别构部位空间结构上的不同.

胰蛋白酶作用后的蛇肌 FruP₂ase 产生了 32K 的 S-蛋白和 4K 的 S-肽完全丧失了对 AMP 的敏感性.目前我们还不知道切点是靠近 N-端还是靠近 C 端,如果是靠近 C 端,那么 C 端对别构部位会有一定的贡献,这将是一个很有趣的问题;如果切点是靠近 N-端,那么则表明 S-肽本身的空间结构是构成别构部位的一部分,因为胰蛋白酶的 S-肽分子量较小,所以空间结构可能会有较大的不同,这样影响了别构部位的完整性,从而影响了 AMP 对修饰的酶的抑制作用.因此 S-肽部分对别构部位的贡献这也是很有趣的.虽然我们还没有足够的数据对二种可能作出判断,但是我们比较倾向于后一种看法,因为如果假设蛇肌酶的别构部位和催化部位的相对位置是和兔肝酶大体相似的话,那么胰蛋白酶的限制性酶解的切点如果是靠近 C 端,那么它距 FruP₂ase 的活性部位大约只有 15 个氨基酸残基,而限制性酶解的结果不影响催化活性只改变别构部位的活性,应该是一种非常特殊的情况.

用测定无机磷的方法可以观察到 FruP₂ase 在 pH7.5 的活力被激活一倍左右, pH7.5 的活力数据达到和 pH9.2 的活力水平相近.用酶偶联法就观察不到这种情况.分析各种产物对 pH7.5 活力的影响发现对于蛇肌 FruP₂ase 来说这种不一致的情况主要是由于用定磷法测定活力其体系除底物外还存在无机磷和 F6P.但是用酶偶联法测定酶活力系统中除底物外还存在最终产物 6PG 和 NADPH 以及中间产物 G6P 和 F6P 与无机磷.我们研究了各种产物和中间物对被修饰的蛇肌 FruP₂ase pH7.5 的活力的影响,发现 F6P 对天然酶 pH7.5 活力没有影响,但对被修饰的酶有一定的激活作用,而 G6P, 6PG 和 NADPH 对于被修饰的酶来说都有明显的抑制作用,而 NADPH 在低浓度时有较强的抑制作用,因此用定无机磷测活方法可以观察到 pH7.5 活力的增加,而用酶偶联法观察不到.在测活系统中 FruP₂ 的浓度为 0.2mM,如果以 5% 的底物水解的速度为初速度计算,那么 F6P 浓度为 10 μ M,它激活的贡献大约占 20%,而 6PG 和 NADPH 的浓度分别大约为 10 μ M 的抑制贡献大约占 40% 左右,这样也不足以使 pH7.5 的活力升高一倍,再者从图 5 可见外延到 F6P 的浓度为 0 时,被修饰的酶的活力大约激活了 60%,以及在酶偶联法测活中 F6P 和 G6P 的浓度都应该很低,这时应该主要观察到 6PG 和 NADPH 的抑制效应,而在 pH7.5 的活力基本维持不变,这些结果都表明在没有这些产物存在下的被修饰酶的 pH7.5 活力也是高于天然状态酶的 pH7.5 活力.联系到前文中该酶的巯基被修饰后 pH7.5 的活力也可以激活一倍左右^[11].因此我们认为蛇肌 FruP₂ase 的活性部位在天然状态是不完善的.

由于蛋白水解酶限制性酶解的生理功能还不清楚,由于肌肉可能存在类似胰蛋白酶专一性的活力的酶,我们在该酶提纯过程中有时也曾发现有限制性酶解的现象,以及有报道兔子在

饥饿时,也会产生中性酶向碱性酶的转化^[11],同时经过限制性酶解的蛇肌 FruP₂ase pH7.5 的活力和 pH9.2 的活力同时升高,而且其活力可以受到许多代谢中间产物的调节,因此我们设想限制性的酶解至少在蛇肌的酶中可能具有一定的生理功能。

至于兔肌 FruP₂ase 是否和蛇肌 FruP₂ase 情况相同将有待于进一步的工作。

本工作蒙徐松琴、丁建芳同志帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 赵辅昆等,生物化学与生物物理学报, **16**(1984), 6.
- [2] 施建平等,生物化学与生物物理学报, **13**(1981), 83.
- [3] Tranillo, S. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**(1972), 222.
- [4] Zalitis, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**(1976), 323.
- [5] Macgregor, J. S. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**(1982), 652.
- [6] Xu, Gen-jun. et al., *Methods in enzymol.*, **90**(1982), 349.
- [7] Traniello, S. and Pontremoli, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**(1971), 161.
- [8] Douglas, M. et al., *Methods in enzymol.*, **56**(1979), 61.
- [9] Xu, Gen-jun, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**(1982), 688.
- [10] Suda, H. et al., *ibid.*, **217**(1982), 10.
- [11] Pontremoli, S. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**(1973), 3674.