

Mg²⁺ 通过膜脂影响重建 H⁺-ATP 酶的构象*

张先锋 卢景芬 杨福愉

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

摘 要

本文用马来酰亚胺系列(MSL)及溴乙酰胺自旋标记物为探针, 分别研究了透析液中 1mmol/L 浓度的 Mg²⁺ 对重建脂酶体上猪心线粒体 H⁺-ATP 酶构象的影响. 发现 Mg²⁺ 可以显著提高经标记后重建的 H⁺-ATP 酶——L·(F₀·F₁) 的 ESR 图谱中的强弱固定化比值(S/W). 用胰蛋白酶加尿素切下经 MSL 标记的 L·(F₀·F₁) 中的 F₁ 部分, 剩留的 L·(F₀) 部分的 S/W 值仍是有 Mg²⁺ 的比无 Mg²⁺ 的高. 单独提纯的 F₁ 经 MSL 标记后在无 Mg²⁺、有 Mg²⁺ 透析 20 h, 二者 ESR 图谱无明显差异. 上述结果支持我们前曾提出的模型, 即 Mg²⁺ 通过与磷脂相互作用, 改变其物理状态, 引起 H⁺-ATP 酶复合体中 F₀ 部分的构象首先发生变化, 然后这一变化再传递至复合体中活性中心所在的 F₁ 部分.

关键词: Mg²⁺, H⁺-ATP 酶, 自旋标记, 酶的构象

线粒体 H⁺-ATP 酶是线粒体合成 ATP 的关键装置. 它利用呼吸链上进行电子传递产生的质子电化学位梯度合成 ATP^[1]. 它存在于线粒体内膜上, 可以分为 F₁ 及 F₀ 两部分. 催化 ATP 合成的反应中心是在 F₁ 上, 已知它是由五种亚基组成 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ 及 ϵ), 亚基数目的比例可能是 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. 对 F₀ 部分的了解比对 F₁ 差得多, 不同的实验室报道的亚基数目不一致, 数目在 6—10 个不等. 现比较公认的有这些亚基: DCCD-结合蛋白、寡霉素敏感性赋与蛋白 (OSCP), F_B, F_c 等. F₀ 部分起着质子通道的作用, F₀ 与 F₁ 可能通过 OSCP 等相连接^[2-4].

通过对生物膜中膜脂-膜蛋白相互作用的研究, 已知膜脂的化学组成及物理状态可能对膜蛋白的结构与功能发生明显的影响. Laird 等人将纯化的牛心线粒体 H⁺-ATP 酶重建在不同磷脂所形成的脂质体上, 发现脂的种类不同可以影响酶对 ATP 的亲合性及 β 亚基的构象^[5]. Lenaz 等人及本实验室周立莘发现亚线粒体上的 H⁺-ATP 酶及重建在脂质体上的 H⁺-ATP 酶水解 ATP 的 Arrhenius 图上出现的折点温度受脂的物理状态的影响^[6,7].

近年来我们实验室通过对 Mg²⁺ 可显著提高重建在脂质体上的线粒体 H⁺-ATP 酶活性的机理的研究, 提出了 Mg²⁺ 可能是通过影响脂的物理状态 (如流动性、表面电荷密度等) 从而

1989 年 6 月 28 日收到修改稿.

* 国家自然科学基金资助项目.

影响同脂紧密接触的 F_0 部分的构象,这一构象变化再传递至 F_1 上,造成 F_1 的构象发生相应变化,因而提高了重建酶的活性^[8-11]。本文用马来酰亚胺系列及溴乙酰胺自旋标记物分别标记线粒体 H^+ -ATP 酶后再重组,研究并比较有 Mg^{2+} 及无 Mg^{2+} 条件下重建酶($F_0 \cdot F_1$)及其 F_0 或 F_1 的构象差异。实验结果进一步支持我们前曾提出有关 Mg^{2+} 调节 H^+ -ATP 酶活性的假设模型: Mg^{2+} 通过改变膜脂的物理状态来影响 H^+ -ATP 酶的构象从而提高其活性。

一、材料及方法

1. 实验材料

猪心线粒体 H^+ -ATP 酶及此酶 F_1 部分分别按文献[12]及文献[13]的方法制备。大豆磷脂购自北京南苑植物油厂,按文献[8]的方法进行提纯。马来酰亚胺系列自旋标记物购自 Aldrich, 溴乙酰胺自旋标记物购自 Synvar。胰蛋白酶及抑制剂为 Sigma 产品。其余所用试剂均为分析纯。溶液用全玻璃重蒸水配制。

2. 实验方法

蛋白按 Lowry 法测定。自旋标记的 H^+ -ATP 酶按文献[8]的方法重建在大豆磷脂脂质体上。

自旋标记 向溶于 0.14 ml 含 5 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.1 mmol/L, EDTA, 0.32 mmol/L DTT, 0.5 mol/L Sucrose 中的 5 mg 线粒体 H^+ -ATP 酶,加入 0.14 ml TS (10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.5mol/L Sucrose),再加 0.03 ml 10 mmol/L MSL (甲醇溶液)或溴乙酰胺(甲醇溶液)自旋标记物,混匀后,对 MSL 在 8—10℃冰箱中放置 16 h,对溴乙酰胺标记物,放置约 72 h。在冰浴中加入 22.5 ml TS,搅拌数分钟后加入 22.5 ml 饱和硫酸铵,再搅拌数分钟后在 20000 g 离心 20 min。沉淀同上再处理 1 次,最后溶解在 0.1 ml TS 之中。

胰蛋白酶处理 0.4ml 重建脂酶体,加入 0.5 ml 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 0.2 mmol/L EDTA, 105000 g 离心 20 min,沉淀溶于 0.2 ml 上述溶液中。加入 0.1 ml (6 mg/ml) 胰蛋白酶,30℃保温 35 min,加入 1 ml 胰蛋白酶抑制剂 (0.6 mg/ml),加入 0.4 ml 8 mol/L 尿素,在 0℃放置 1 h,105000 g 离心 20 min,沉淀加入 6.1 ml 0.25 mol/L Sucrose 洗涤 1 次,105000 g 离心 20 min,沉淀溶于 0.1 ml 相应的透析液中。

电子自旋共振测定 测定在 Varian-109 电子自旋共振波谱仪上进行,使用内径约为 1 mm 的石英玻璃管装样,样品高度 3 cm,蛋白浓度控制在 10 mg/ml 左右。用液氮制冷的氮气循环装置控制温度,仪器参数选择为:中心磁场 3250×10^{-4} T,微波功率 5mW,其余条件见图注。

二、结果及讨论

采用了可对巯基共价修饰的马来酰亚胺系列标记物及溴乙酰胺自旋标记物,结构式见图 1。这些标记物曾被用于研究许多水溶性蛋白及少数膜蛋白的构象变化^[14,15],对我们这个酶,尚未见报道。

线粒体 H^+ -ATP 酶的 F_1 及 F_0 上均有巯基存在。Knowleg 及 Penefsky 根据 DTNB

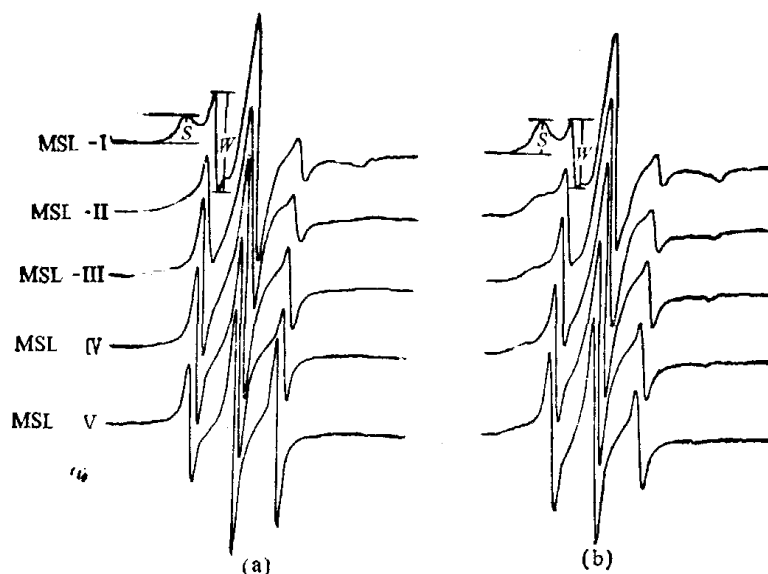


图 1 用 MSL(I)–(V) 分别标记后重建形成的 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{-Mg^{2+}}$ (a) 与 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{+Mg^{2+}}$ (b) 的 ESR 图谱

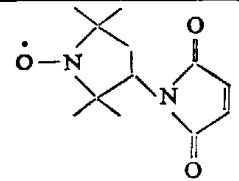
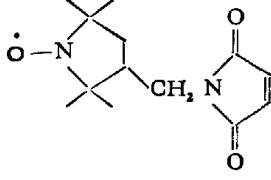
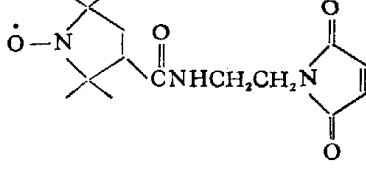
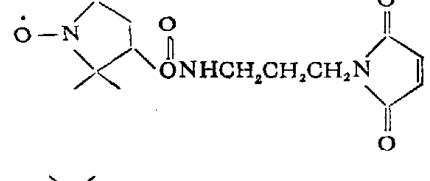
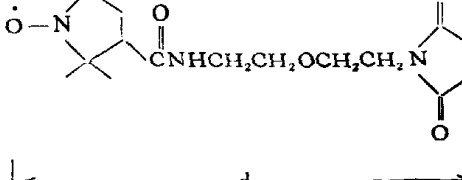
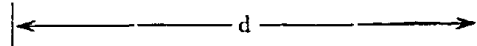
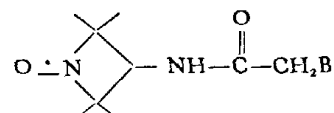
(调制 $3.2 \times 10^{-4} T$, 时间常数 1s, 扫描时间 8 min., $30^\circ C$ (3 次实验平均))

测定的结果得出牛心线粒体 F_1 上有 12 个半胱氨酸残基, Senior 则指出这 12 个半胱氨酸残基中有 4 个是形成 2 个二硫键^[26], Walker 等人根据序列分析的结果指出牛心线粒体 F_1 上共有 8 个半胱氨酸残基, 其中每个 α 亚基 2 个, γ 及 ϵ 亚基各 1 个^[17]. Senior 的实验表明牛心线粒体 F_1 的活性基本不受巯基修饰剂如 NEM, DTNB 的影响, 说明巯基不为 F_1 的活性中心所必需. F_1 上含有多少个巯基尚不知道, 但肯定有巯基存在^[18]. 我们用过量的标记物对猪心线粒体 H^+ -ATP 酶进行标记, 经洗涤及硫酸铵沉淀除去未反应的标记物, 再将其在无 Mg^{2+} 及有 Mg^{2+} 条件下重建在大豆磷脂脂质体上. 为了确定标记物一定是共价结合在酶分子上, 先用 NEM 对酶进行共价修饰之后再行标记, 此时发现标记物已不再结合至酶分子上, 因此经洗涤后酶的沉淀部分就没有标记物的自由基信号出现.

若自旋标记化合物溶在非粘性介质中, 由于分子的无规快速运动, 平均了 g 张量和 A 张量的各向异性成分, 其 ESR 波谱表现为等强度等间隔的三重峰. 随着介质粘度的增加, 标记物分子的运动速度变慢, 逐渐显示出 g 和 A 的各向异性, 从而 3 条谱线出现不等性加宽. 共价结合在蛋白分子上的标记物, 既随蛋白分子一起运动, 同时其含自由基的 Proxyl 环本身也作相对的转动及摆动, 和蛋白分子一起的运动较慢, 而本身的转动及摆动较快, 对 g 张量及 A 张量的各向异性平均化的主要贡献是来自于后者, 而后者则显然受标记位点附近蛋白分子空间结构的影响.

图 1 是用五种不同臂长的马来酰亚胺标记物所得的结果. 从图谱上可看出, 标记物的臂长不同, 低场峰中代表所谓探针强固定化成分的峰高与代表弱固定化成分的峰高比值显著不同, 臂长越短, 比值越高. 这可以解释为臂长越短, 探针分子的 Proxyl 环越深地插入蛋白分子内部, 故运动受限制程度越高. 对无 Mg^{2+} 的脂酶体, 用 MSL(IV) 标记, 强固定化成分已极少, 到 MSL(V), 则完全没有了, 这说明 H^+ -ATP 酶上可与马来酰亚胺反应的巯基距蛋白分子表面的深度最深的不超过 $15.3 \text{ \AA}$. 另外可看出, 有 Mg^{2+} 条件下重建的含 H^+ -ATP 酶的脂酶体的强弱固定化成分的比值 (S/W) 比无 Mg^{2+} 的要高, 当用 MSL(I) 或 MSL(II)

表 1 所用自旋标记物的化学结构

标 记 物	结 构	d(Å)
MSL(I)		6.8
(II)		7.9
(III)		11.6
(IV)		12.9
(V)		15.3
		
BrSL		

标记时这一差异非常明显,如果以 MSL(III)、MSL(IV) 或 MSL(V) 标记,也能看出这一趋势,这说明在有 Mg^{2+} 条件下重建的脂酶体中, H^+ -ATP 酶的构象可能发生了这样一种变化,使它具有的巯基比无 Mg^{2+} 时埋得更深(见图 1)。

图 2 是在不同温度下比较了用 MSL(I) 标记的有 Mg^{2+} 及无 Mg^{2+} 重建的样品,可以看出在这一温度范围内,有 Mg^{2+} 的比无 Mg^{2+} 的 S/W 值均要高(图 3)。

Marsh 曾指出,用碘代乙酰胺的自旋标记物比用马来酰亚胺的标记物能更好地探测蛋白分子的构象变化,并解释这可能是由于探针分子本身柔性较大之故^[15]。我们也用了溴乙酰亚胺的自旋标记物进行测试,得到了与马来酰亚胺一致的结果(图 4)。这些均表明加 Mg^{2+} 与无 Mg^{2+} 条件下重建于大豆磷脂脂质体的 H^+ -ATP 酶构象确有明显差异。

上述是嵌有整个 H^+ -ATP 酶复合体 ($F_0 \cdot F_1$) 的脂酶体的测试结果。由于 F_1 及 F_0 上

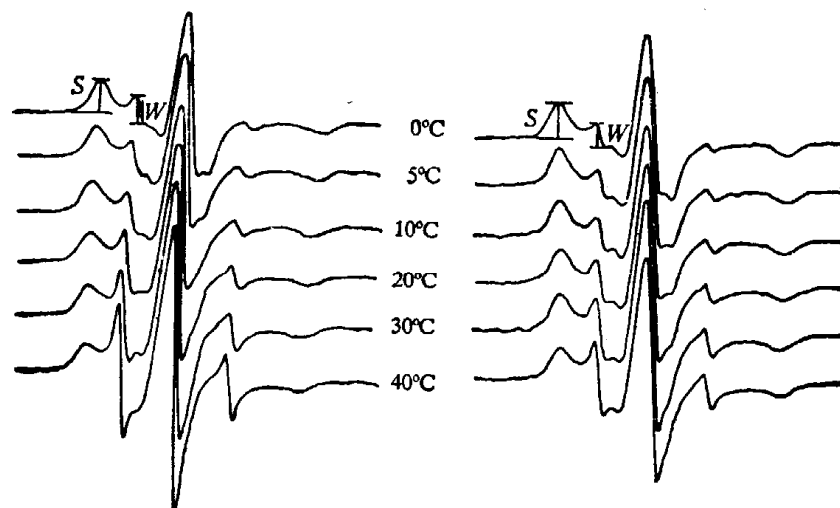


图 2 用 MSL(I) 标记后重建形成的 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{-Mg^{2+}}$ 和 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{+Mg^{2+}}$ 在不同温度下的图谱

(调制 $3.2 \times 10^{-4}T$, 时间常数 0.5 s, 扫描时间 4 min (3 次实验平均))

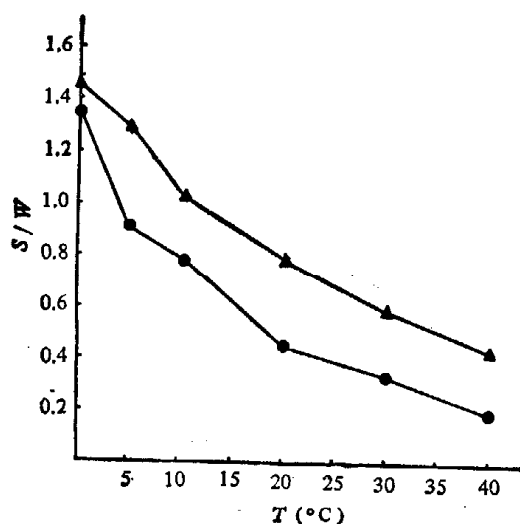


图 3 图 2 中的 S/W 值对温度的作图
(—●—示 $-Mg^{2+}$, —▲—示 $+Mg^{2+}$ (3 次实验平均))

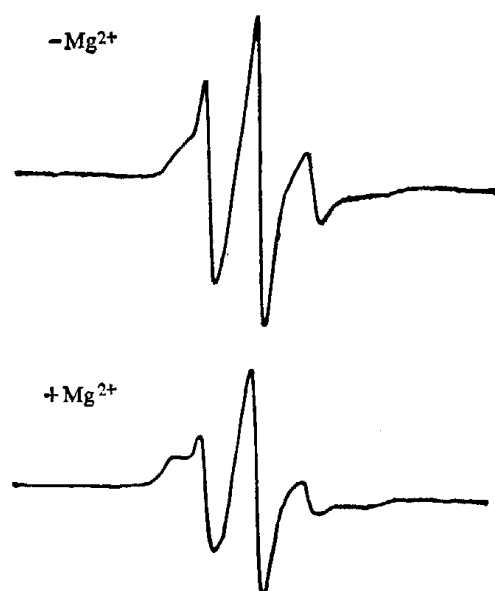


图 4 用 BrSL 标记后形成的 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{-Mg^{2+}}$ 和 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{+Mg^{2+}}$ 的 ESR 图谱

(调制 $2.5 \times 10^{-4}T$, 时间常数 0.5 s, 扫描时间 4 min, 20°C (3 次实验平均))

均有巯基存在, 故 F_1 和 F_0 均可能被标记。那么前述的构象变化究竟发生在哪一部分? 是 F_1 或 F_0 , 还是两者兼而有之? 结合我们实验室前曾报道的结果, 如重建时 Mg^{2+} 存在可大大提高 H^+ -ATP 酶的活力, 提高 V_{max} , 这些都提示 F_1 上发生了构象变化。但重建时 Mg^{2+} 的作用仍然存在着两种可能性: 一是 Mg^{2+} 直接作用于暴露在水相的 H^+ -ATP 酶的催化部分 F_1 , 二是 Mg^{2+} 通过影响膜脂物理状态来影响 F_0 , 之后再传递至 F_1 。为了澄清这两种可能性, 我们又进行了下述两方面实验: 一是用胰蛋白酶加尿素处理, 分别将无 Mg^{2+} 、加 Mg^{2+} 条件下重建的经 MSL(I) 标记的 H^+ -ATP 酶移去 F_1 部分, 然后比较剩留的 F_0 部

分的 ESR 谱。二是用单独提纯的 F_1 经 MSL(I) 标记后在室温于无 Mg^{2+} 或加 Mg^{2+} 条件下透析 20 h (与 H^+ -ATP 酶重建在脂质体上的条件相同), 然后比较两者的 ESR 图谱是否有差异。

实验结果表明, 将无 Mg^{2+} 、加 Mg^{2+} 条件下重建的嵌有经 MSL(I) 标记的 H^+ -ATP 酶脂酶体用胰蛋白酶加尿素处理以移去 F_1 部分后, 剩余的 F_0 部分仍保留有 1/3 自由基信号, 换言之, 原有自由基信号的 2/3 系来自 H^+ -ATP 酶的 F_1 部分。因此, 对 H^+ -ATP 酶复合体探测到的构象变化可能来自 F_0 及 F_1 两个部分。

从图 5 可以看出, 有 Mg^{2+} 条件下重建的 H^+ -ATP 酶经去 F_1 后剩留的 F_0 部分的 S/W 值较无 Mg^{2+} 的高。这提示, Mg^{2+} 通过影响膜脂物理状态而使 H^+ -ATP 酶的 F_0 构象发生明显变化。至于切下的 F_1 部分的自由基信号基本上呈现出各向同性运动, 说明 F_1 已被胰蛋白酶分解成碎片。

对单独提纯的 F_1 经 MSL(I) 标记后再在有 Mg^{2+} 及无 Mg^{2+} 条件下于室温分别透析 20 h, 可看出两者的 ESR 图谱没有什么明显差异(图 6)。

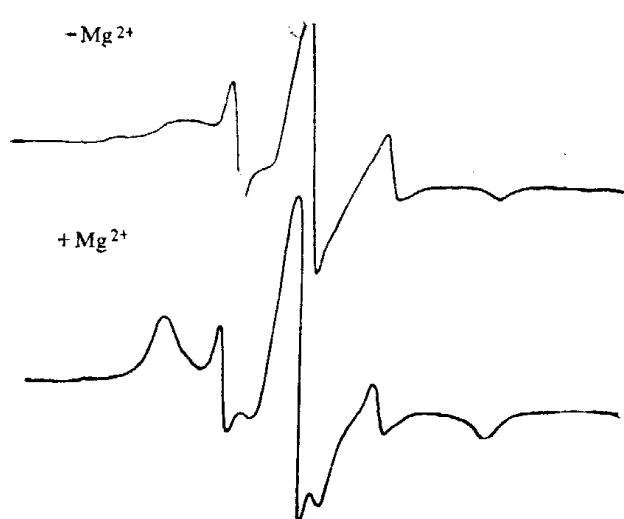


图 5 用 MSL(I) 标记后重建形成的 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{-Mg^{2+}}$ 及 $L \cdot (H^+-ATP \text{ 酶})_{+Mg^{2+}}$ 经胰蛋白酶加尿素切去 F_1 所留下的 $L \cdot (F_0)_{-Mg^{2+}}$, $L \cdot (F_0)_{+Mg^{2+}}$ 的 ESR 图谱
(调制 $2.5 \times 10^{-4} T$, 时间常数 0.5 s, 扫描时间 8 min, $18^\circ C$ (3 次实验平均))

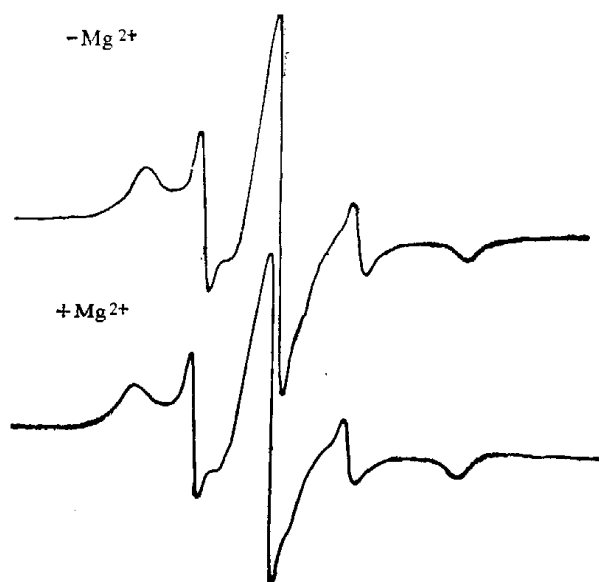


图 6 用 MSL(I) 标记的 F_1 经无 Mg^{2+} 和有 Mg^{2+} 透析 20 h 的 ESR 图谱
(调制 $2.5 \times 10^{-4} T$, 时间常数 0.5 s, 扫描时间 8 min, $18^\circ C$ (三次实验平均))

综合上述结果, 我们认为 Mg^{2+} 提高重建 H^+ -ATP 酶活性是由于 Mg^{2+} 的存在改变了酶的构象, 而这种构象改变是这样发生的, 即 Mg^{2+} 首先与脂酶体中的酸性磷脂相作用^[9], 这时脂的流动性降低^[8], 膜表面电荷密度下降^[10], 当然也可能还有其它未检测的变化发生(如可能造成脂的侧向相分离, 影响酶分子周围的界面脂的组成, 影响脂双层的厚度等等)。这种脂的物理状态的变化使与之紧密接触的 H^+ -ATP 酶的 F_0 构象首先发生变化, 接着再通过 OSCP 等传递至 F_1 , 使 F_1 的构象也发生相应变化, 结果使催化反应的部分呈现一个合适的构象, 从而表现出较高的酶活性。

参 考 文 献

- [1] Mitchell, P., *Nature*, **191**(1961), 144—148.
- [2] Pedersen, P. L., *TIBS*, **12**(1987), 146—150.
- [3] Kagawa, Y., *Bioenergetics*, Elsevier Science Publishers B. V., the Netherlands, 1984, 149—186.
- [4] Amzel, L. M. & Pedersen, P. L., *Ann. Rev. Biochem.*, **52**(1983), 801—824.
- [5] Laird, D. M. et al., *J. Biol. Chem.*, **261**(1986), 14851—14856.
- [6] Lenaz, G. et al., *H^+ -ATPase (ATP Synthase): Structure, Function, Biogenesis, the $F_0 F_1$ Complex of Coupling Membranes*, ICSU Press, Italy, 1984, 325—326.
- [7] 周立莘、杨福愉, 生物化学与生物物理学报, **19**(1987), 57—63.
- [8] Yang, F. Y. et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **724**(1983), 104—110.
- [9] Yang, F. Y. & Zhang, X. F., *FEBS Lett.*, **182**(1985), 31—33.
- [10] 彭华、杨福愉, 生物物理学报, **3**(1987), 19—24.
- [11] Zhang, X. F. & Yang, F. Y., *Asia Pacific Communications in Biochemistry*, **1**(1987), 61—64.
- [12] Kagawa, Y. & Racker, E., *J. Biol. Chem.*, **246**(1971), 5477—5487.
- [13] 林治焕等, 生物化学与生物物理进展, **5**(1981), 53—56.
- [14] Likhtenshtein, G. L., *Spin Labelling Methods in Molecular Biology*, Wiley-Interscience, 1976, 104—124.
- [15] Marsh, D., *Membrane Spectroscopy*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, 51—142.
- [16] Senior, A. E., *Biochemistry*, **12** (1973), 3622—3626.
- [17] Walker, J. E. et al., *J. Mol. Biol.*, **184**(1985), 677—701.
- [18] Guerrieri, F. & Papa, S., *Eur. J. Biochem.*, **128**(1982), 9—13.