

噻吩甲酰三氟丙酮(TTFA)抑制琥珀酸泛醌还原酶的双位点性质*

徐建兴

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

摘 要

Dixon 作图法和双倒数作图法都表明 TTFA 有两个抑制位点. 低浓度下 ($0-20 \mu\text{mol/L}$) 的高亲和位点对 Q_2 呈非竞争性, 高浓度下 ($20 \mu\text{mol/L}$ 以上) 的低亲和位点呈竞争性. 由此得出结论: 泛醌还原的两步反应均被 TTFA 抑制, 低浓度时只抑制后半步从半醌还原成氢醌的反应, 高浓度时对从泛醌到半醌以及半醌到氢醌两个半反应都抑制.

关键词: 琥珀酸泛醌还原酶, 抑制剂, 噻吩甲酰三氟丙酮

泛醌在生物能量转换过程中的作用已受到广泛的重视. Michell^[1] 提出的 Q-cycle 理论强调在泛醌细胞色素 c 还原酶中有两个泛醌反应中心 Center o 和 Center i, 它们分别处在膜的内外两侧, 泛醌在传递电子的同时转移质子跨膜, 是能量偶联的关键环节. 泛醌结合蛋白理论的提出是这一领域研究的又一重要进展, 它强调了泛醌与蛋白结合而起作用的概念, 并预言了与泛醌反应有关的酶复合体还原辅酶 I 泛醌还原酶、琥珀酸泛醌还原酶和泛醌细胞色素 c 还原酶中存在不同的泛醌结合蛋白 Qp-n, Qp-s 和 Qp-c^[2]. Yu 等^[3] 分离了泛醌结合蛋白 Qp-s 并证明它能与琥珀酸脱氢酶重组使对 TTFA 不敏感的琥珀酸脱氢酶转变成对 TTFA 敏感的能还原泛醌的琥珀酸泛醌还原酶, 这一结果说明 TTFA 的抑制位点恰恰在催化泛醌还原的泛醌结合蛋白 Qp-s 上. 泛醌的还原是一个以半醌为中间体的两步反应过程, 因而 TTFA 的抑制作用是发生在泛醌的两步反应上还是仅仅在其中之一? 有关这一判断对研究泛醌还原机制是个非常重要的问题, 对于这一点文献中有一些矛盾的结果. 1977 年 Mowery 等^[4] 用 Dixon 作图法证明 TTFA 是单位点抑制剂. 两年后 Trumpower 重申了这一结论, 并提出 TTFA 只抑制泛醌还原的后半步从半醌到氢醌的反应的论断^[5]. 值得注意的是, 两位作者都主张 TTFA 是单

本文 1990 年 6 月 14 日收到, 1990 年 10 月 29 日收到修改稿.

* 国家自然科学基金资助项目.

缩写词: TTFA —— 噻吩甲酰三氟丙酮, DCIP —— 2,6-二氯酚吡啶酚, Q —— Ubiquinone, QH₂ —— reduced Q, QH[•] —— Ubisemiquinone, HMP —— Heart Muscle Preparation (心肌制剂), SCR —— Succinate-Cytochrome c Reductase (琥珀酸细胞色素 C 还原酶), SQR —— Succinate-Ubiquinone Reductase (琥珀酸泛醌还原酶).

位点抑制剂,但他们得到的抑制常数 K_i 值却相差甚远. Mowery 测得是 $1.6\mu\text{mol/L}$,而 Trumpower 测得是 $14\mu\text{mol/L}$,二者竟相差十几倍. 关于 TTFA 与 Q_2 的竞争性问题文献中也出现完全相反的结果, Yu 等认为有竞争性^[3],而 Vinogradov 小组的 Tushurashvil 等则确定是非竞争的^[6]. 比较文献的数据发现这些矛盾的结果与作者实验时使用的 TTFA 浓度不同有关,如 Mowery 使用的 TTFA 浓度很低,在 $0-4\mu\text{mol/L}$ 范围内,而 Trumpower 用的浓度又很高,在 $0-500\mu\text{mol/L}$. 很可能他们各自观察的是两个不同的抑制位点. 我们在 TTFA 浓度为 $0-50\mu\text{mol/L}$ 范围内重新检查了这些实验,用不同的酶制剂(包括心肌制剂、纯化的琥珀酸细胞色素 C 还原酶和琥珀酸泛醌还原酶)检测 DCIP 被琥珀酸还原的速度与抑制剂浓度的关系, Dixon 作图表明在所有情况下都是折线,浓度在 $0-20\mu\text{mol/L}$ 是一直线, $20\mu\text{mol/L}$ 以上是斜率较低的另一直线. 超过 $50\mu\text{mol/L}$ 实验点开始偏离,这种偏离可能是半醌歧化反应的表现^[5]. 由此结果,我们认为 TTFA 是一双位点抑制剂,它们分别抑制泛醌的两步还原反应.

一、材料和方法

心肌制剂^[7], 琥珀酸细胞色素 C 还原酶^[8] 和琥珀酸泛醌还原酶^[9] 均按文献方法用牛心肌肉制备. 酶活性测定是在 Carry-14 紫外分光光度计上于 25°C 条件下进行, 反应系统含: 50mmol/L 磷酸缓冲液 $\text{pH}7.4$; 20mmol/L 琥珀酸钠; 0.3mmol/L EDTA; 0.1% Triton-X100; 0.053mmol/L DCIP, 反应体积 1ml . $10\mu\text{l}$ 含指定量 TTFA 的乙醇溶液加入反应液后再加酶启动反应, 并监测 600nm 光吸收的变化速度. 酶活力单位表示为 $\mu\text{mole DCIP 还原}/\text{min. mg.}$. 在测心肌制剂活力时, 反应体系中加入 1mmol/L KCN 抑制末端氧化酶.

差光谱测定是在 DW-2 双波长双光束分光光度计上用隔板比色杯进行的. Q_2 按 Shunk 等人的方法合成^[10], 细胞色素 C 购自 Sigma 公司, TTFA 购自 Aldrich 公司, 其他试剂均为市场购入之分析纯产品.

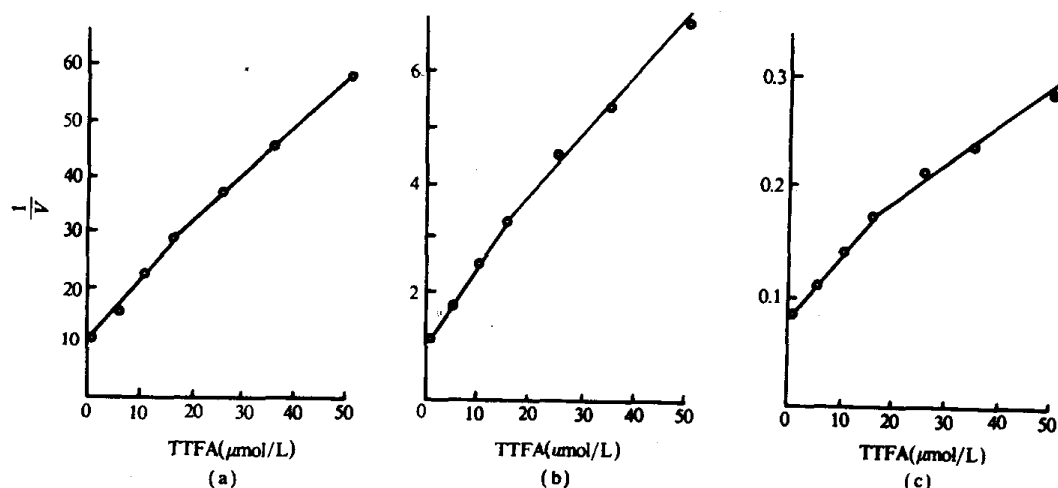


图 1 酶活力倒数对抑制剂浓度的Dixon 作图

((a) 心肌制剂, (b) 琥珀酸细胞色素 c 还原酶, (c) 琥珀酸泛醌还原酶. 1ml 反应液中含: $\text{pH}7.4$ 磷酸缓

冲液 50mmol/L , 琥珀酸 20mmol/L , EDTA 0.3mmol/L , TritonX-100 0.1% 和 DCIP 0.053mmol/L ; 在(a) 心肌制剂反应液中另加 1mmol/L KCN 抑制末端氧化酶. $10\mu\text{l}$ 含指定量抑制剂的乙醇溶液在酶启动反应之前加入反应液)

二、结 果

1. TTFA 抑制琥珀酸泛醌还原酶活力的双位点性:

图 1(a)、(b)和(c)分别显示用心肌制剂、琥珀酸细胞色素 C 还原酶和琥珀酸泛醌还原酶 3 种酶制剂测定的反应速度与 TTFA 浓度关系的 Dixon 作图. 三者的一个共同特征是反应速度的倒数 $1/V$ 对 TTFA 浓度呈折线关系, 第一相直线在 $0 - 20 \mu\text{mol/L}$ TTFA 范围内发生, 第二相在 $20 - 50 \mu\text{mol/L}$ 内发生, 斜率变低. 这一结果与 Mowery 和 Trumpower 的结果并不矛盾, Mowery 在 $0 - 4 \mu\text{mol/L}$ TTFA 范围得到的直线与我们的第一段直线一致, Trumpower 在 $0 - 500 \mu\text{mol/L}$ TTFA 范围得到的直线与我们的第二段直线相符合, 虽然 Trumpower 应当得到两相直线, 但是由于他用的浓度范围太高, 使第一相实际上很难观察到. 我们第二相直线测得 K_i 值是 $16 \pm 2 \mu\text{mol/L}$ (表 1) 和 Trumpower 的数值 $14 \pm 2 \mu\text{mol/L}$ 很一致, 所以 Mowery 和 Trumpower 各自观察到的是两个不同的抑制位点. 我们发现这两个抑制位点对电子受体 Q_2 的竞争性是不同的.

表 1 不同酶制剂的(TTFA)抑制常数

酶制剂	$K_i(1) \mu\text{mol/L}$	$K_i(2) \mu\text{mol/L}$
HMP	8.5 ± 0.5	19.5 ± 1.5
SCR	7.6 ± 1.0	20.4 ± 3.4
SQR	16.0 ± 3.0	16.0 ± 2.0

2. TTFA 与 Q_2 的竞争性

Yu 等发现 TTFA 与 Q_2 呈竞争性关系^[3], 但是 Vinogradov 小组发现 TTFA 与 Q_2 呈非竞争性^[6]. 这一矛盾的结论显然与 TTFA 有两个抑制位点有关, 那么这两个位点哪一个与 Q_2 是竞争性哪一个是非竞争性呢? 我们用提纯的琥珀酸泛醌还原酶测定的结果表明第一相(TTFA $< 20 \mu\text{mol/L}$ 的高亲和位点)与 Q_2 呈非竞争关系, 第二相(TTFA $> 20 \mu\text{mol/L}$

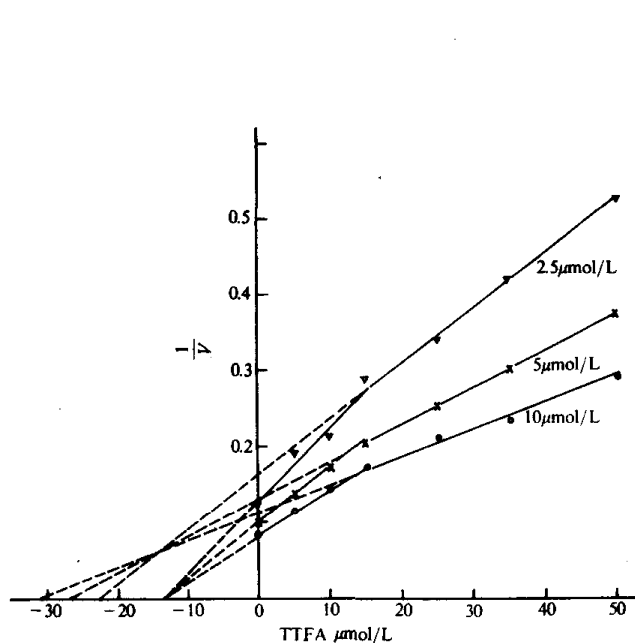


图 2 在不同泛醌(Q_2)浓度下, 酶活力倒数对抑制剂浓度的 Dixon 作图

(用提纯的琥珀酸泛醌还原酶进行活力测定, 反应体系及测定方法同图 1)

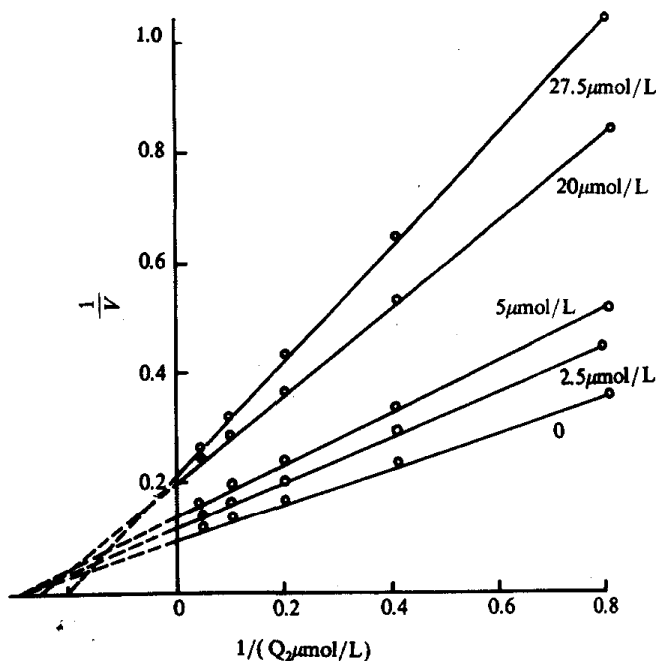


图 3 在不同抑制剂浓度下酶活力对 Q_2 浓度的双倒数作图

(用提纯的琥珀酸泛醌还原酶测定, 反应体系同图 1, 抑制剂浓度依次为 0, 2.5, 5, 20 和 $27.5 \mu\text{mol/L}$)

的低亲和位点)与 Q_2 呈竞争性关系,用 Dixon 作图法(图 2)和双倒数作图法(图 3)得到的结论相同. 显然 Vinogradov 小组观察的是高亲和位点, Yu 观察的是低亲和位点.

3. 关于 TTFA 的抑制常数 K_i

表 1 给出了用三种不同的酶制剂所测得的 TTFA 的抑制常数, $K_i(1)$ 代表第一相高亲和位点的常数, $K_i(2)$ 代表第二相低亲和位点的常数. 三种酶制剂得到的 $K_i(2)$ 值很接近, 而且与 Trumpower 的值相当. $K_i(1)$ 值在心肌剂和琥珀酸细胞色素 c 还原酶中的结果一致, 而且与 Vinogradov 小组的数值 $8\mu\text{mol/L}$ 相同^[6], 但是 Mowery 的数值偏低, 我们尚不能解释这一差别. 提纯的琥珀酸泛醌还原酶的 $K_i(1)$ 值明显地比心肌剂和琥珀酸细胞色素 c 还原酶的高, 而且实际上与 $K_i(2)$ 值相同. $K_i(1)$ 值与制剂相关这一性质可以说明琥珀酸泛醌还原酶中的泛醌结合蛋白 Qp-s 与泛醌细胞色素 c 还原酶中的细胞色素 b 或 c_1 之间存在相互作用, 因为心肌剂和琥珀酸细胞色素 c 还原酶中都有细胞色素 bc_1 , 而纯化的琥珀酸泛醌还原酶已经去除了细胞色素 bc_1 . 显然细胞色素 bc_1 的脱离使琥珀酸泛醌还原酶的泛醌结合蛋白发生了构象上的变化, 以致使 TTFA 的高亲和位点抑制常数改变了. 如果这一判断正确, 那么 TTFA 应能引起琥珀酸细胞色素 c 还原酶中细胞色素 b 的某些变化.

4. TTFA 对细胞色素 b 和 c_1 光谱性质的影响

图 4 和 5 是一组差光谱数据, 保险粉可以还原琥珀酸细胞色素 C 还原酶中所有的细胞色素 b 和 c_1 , 而抗坏血酸只还原细胞色素 c_1 , 两者的差光谱即纯粹的细胞色素 b 还原

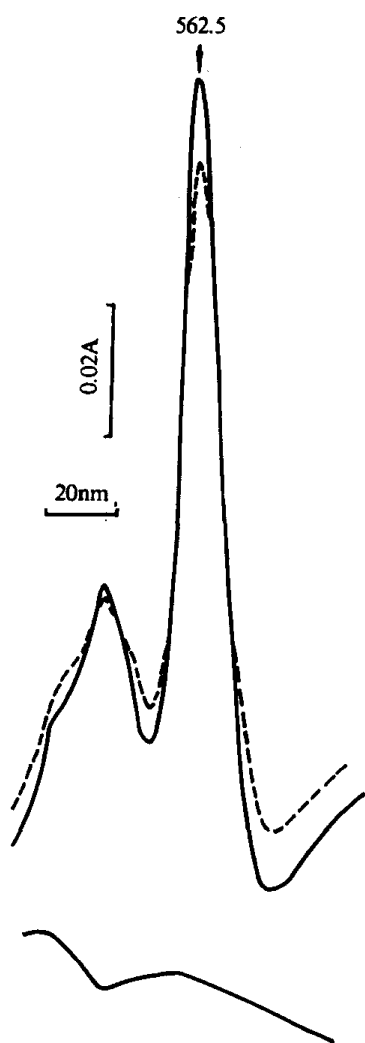


图 4 细胞色素 b 光谱测定

(用稀释的琥珀酸细胞色素 c 还原酶 (1.6 mg/ml) 在 DW-2 紫外分光光度计上测定保险粉还原减抗坏血酸还原差光谱. 虚线表示测定时有抑制剂存在, 实线表示无抑制剂存在)

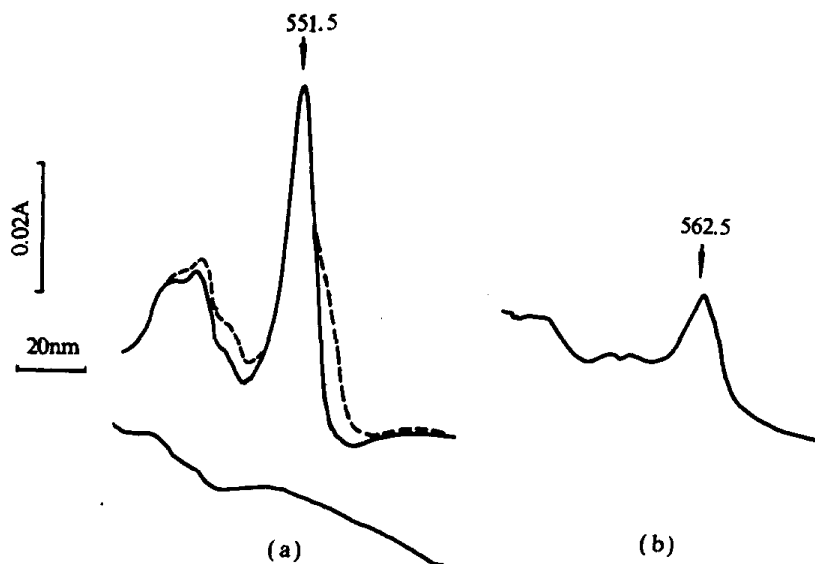


图 5 细胞色素 c_1 光谱测定

(用 (1.6 mg/ml) 的琥珀酸细胞色素 c 还原酶在 DW-2 紫外分光光度计上测定抗坏血酸还原减对照样品差光谱. (a) 还原光谱在 560 nm 附近出现的吸收肩, (b) 吸收肩的位置在 562 nm. 虚线表示测定时有抑制剂存在, 实线表示无抑制剂存在)

光谱. 图 4 是在有 TTFA(虚线)和无 TTFA(实线)条件下得到的细胞色素 b 的还原光谱, 吸收峰位置没有变, 但是绝对值在有 TTFA 时降低了. 这一降低可能是样品池中细胞色素 b 还原的减少或对照池中 b 还原的增加, 对照池中细胞色素 b 还原增加的唯一可能性是部分细胞色素 b 也被抗坏血酸还原了. 为此我们进一步检查了在有 TTFA 情况下细胞色素 c_1 的差光谱, 如图 5(a), (b) 所示, TTFA 的存在使细胞色素 c_1 的还原光谱在 560nm 附近出现了吸收肩(图 5(a)), 这个吸收肩的位置在 562nm(图 5(b)), 恰恰是细胞色素 b 的吸收峰位置. 这说明 TTFA 一定程度上影响了细胞色素 b 的氧化还原电位, 致使部分细胞色素 b 也被抗坏血酸还原.

三、讨 论

由于 TTFA 抑制位点在琥珀酸泛醌还原酶的泛醌结合蛋白 Qp-s 上, 它直接抑制泛醌的还原. 泛醌的还原是以半醌为中间体的两步还原反应, 那么 TTFA 作用在哪一步反应呢? 这个问题与 TTFA 是单位点抑制剂还是双位点抑制剂有重要关系. Mowery^[4] 和 Trumpower^[5] 都认为 TTFA 是单位点抑制剂, 而且 Trumpower 认为 TTFA 只抑制泛醌还原的后半步从半醌到氢醌的反应^[5], 但是这样解释与 Xu 等的顺磁实验结果有矛盾, Xu 等发现 TTFA 引起重组琥珀酸泛醌还原酶中已形成的半醌 EPR 信号的消失^[11], 如果按照 Trumpower 的解释 TTFA 只抑制泛醌还原的后半步反应, 那么 TTFA 的存在并不影响半醌的生成而是阻止半醌的消失, 所以半醌 EPR 信号不应当消失而应当增强才对.

我们的结果证明 TTFA 有两个抑制位点, 高亲和位点与 Q_2 非竞争, 低亲和位点与 Q_2 竞争. 联系到泛醌还原的两步反应 $Q \rightarrow QH \cdot \rightarrow QH_2$, 可以判断与 Q_2 呈竞争性作用的低亲和位点作用在前半步 $Q \rightarrow QH \cdot$ 反应上, 而与 Q_2 非竞争的高亲和位点作用在后半步 $QH \cdot \rightarrow QH_2$ 反应上. 这样 TTFA 引起半醌 EPR 信号消失就可以理解, Trumpower 的解释遇到的困难也就没有了.

除了琥珀酸泛醌还原酶催化泛醌还原外, 按照 P. Michell 的 Q-cycle 理论^[1] 细胞色素 b_{562} 参与的 center i 也催化泛醌的还原, 那么这两个还原反应是彼此无关地进行的呢, 还是相互协同进行的. 从 TTFA 影响细胞色素 b 氧化还原电位和细胞色素 b 影响 TTFA 的 $K_i(1)$ 值这一结果看, 似乎泛醌细胞色素 c 还原酶中的细胞色素 b 和琥珀酸泛醌还原酶中的泛醌结合蛋白 Qp-s 之间存在某种结构上的相互作用, 这种相互作用说明它们在泛醌的第二步还原 $QH \cdot \rightarrow QH_2$ 反应上有某种协同作用, 这是否是泛醌反应的一种调节机制? 是个值得探讨的问题.

作者感谢张崑同志在绘图方面给予的热情帮助.

参 考 文 献

- [1] Michell, P., *J. Theor. Biol.*, **62**(1976), 327.
- [2] Tsao, E. King, *Ubiquinone proteins*, in *Coenzyme Q* (Ed. Lenaz, G.), John Wiley & Sons Ltd, 1985, 391 — 408.
- [3] Yu, C. A. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**(1977), 939.
- [4] Mowery, P. C. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **178**(1977), 495.
- [5] Trumpower, B. L. & Zachary Simmons, *J. Biol. Chem.*, **254**(1979), 4608.

-
- [6] Tushurashvil, P. R. et al., *Biochem. Biophys. Acta.*, **809**(1985), 145.
 - [7] King, T. E., *Method in Enzymology* (Eds. Estabrook, R. W. & Pullman, M. E.), Academic press, New York, X, 1976, 202.
 - [8] Yu, C. A. et al., *J. Biol. Chem.*, **249**(1974), 4905.
 - [9] Yu, L. & Yu, C. A., *J. Biol. Chem.*, **257**(1982), 2016.
 - [10] Shunk, C. H. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**(1958), 4753.
 - [11] Xu, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**(1987), 315.