

# 鸡肝果糖-2, 6-二磷酸酯酶结构域的初步 晶体学研究\*

包素锦 万柱礼 常文瑞 桂璐璐 梁栋材\*\*

(生物大分子国家重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

凌 嵩 李 林 许根俊

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

Simon J. Pilgis

(Department of Biochemistry, University of Minnesota, Minneapolis, MN55455)

**摘要** 从鸡肝 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2, 6-二磷酸酯酶分离的果糖-2, 6-二磷酸酯酶结构域(残基 245 ~ 468)已在 *E. coli* 中获得高效表达, 并经分离得到纯化。使用悬滴气相扩散法成功地培养出该果糖-2, 6-二磷酸酯酶结构域单晶。该酶晶体属于四方晶系, 空间群为  $P4_12_12$  或  $P4_32_12$ 。晶胞参数为:  $a=b=10.02\text{ nm}$ ,  $c=13.98\text{ nm}$ ,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。晶胞内每个结晶学不对称单位含有 2 个果糖-2, 6-二磷酸酯酶分子。利用日本 Photon Factory 同步辐射光源收集了分辨率为  $0.32\text{ nm}$  的母体衍射据。

**关键词** 鸡肝 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2, 6-二磷酸酯酶 鸡肝果糖-2, 6-二磷酸酯酶结构域 结晶

鸡肝果糖-2, 6-二磷酸酯酶(F-2, 6- $P_2$ ase)是鸡肝双功能酶 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2, 6-二磷酸酯酶(6-PF-2-K/F-2, 6- $P_2$ ase)的 1 个结构域。6-PF-2-K/F-2, 6- $P_2$ ase 催化果糖-2, 6-二磷酸(F-2, 6- $P_2$ )的合成与水解<sup>[1, 2]</sup>。由于果糖-6-磷酸(F-6-P)对 6-磷酸果糖-1-激酶(6-PF-1-K)的强烈的底物抑制作用, 在生理条件下, 如果没有 F-2, 6- $P_2$ 的存在, 酵解途径的关键酶 6-PF-1-K 就不能表现其生物活性; 另一方面, F-2, 6- $P_2$  又是糖异生过程的关键酶果糖-1, 6-二磷酸酯酶(F-1, 6- $P_2$ ase)的强有力的抑制剂, 它和 F-2, 6- $P_2$ ase 的别构抑制剂腺苷酸(AMP)协同地抑制 F-1, 6- $P_2$ ase 从而对糖的流向进行有效的调节。F-2, 6- $P_2$  可被水解成 F-6-P 和无机磷酸(Pi), 控制这步反应的酶就是 F-2, 6- $P_2$ ase。1982 年, Pilgis 研究组发现鼠肝 F-2, 6- $P_2$ ase 与 6-PF-2-K 存在于同 1 个酶上, 它们组成了 1 个既有激酶活性又有酯酶活性的双功能酶<sup>[3]</sup>。进一步的研究表明, 激酶结构域位于 N 端(残基 1~249)而酯酶结构位于 C 端(残基 250 ~ 470)<sup>[4]</sup>。最近, Lee 等报道了切去 C 末端 30 个氨基酸残基的鼠肝 F-2, 6- $P_2$ ase 结构域(残

1995-01-17 收稿, 1995-05-03 收修改稿

\* 中国科学院“八五”重大项目(KZ85-04)、国家攀登计划项目和国家自然科学基金重大项目基金资助

\*\* 联系人

基 251 ~ 440) 的初步晶体学结果<sup>[5]</sup>. 近期的研究表明<sup>[6]</sup>, C 末端的 30 个氨基酸残基对调控 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 活性具有重要作用, 并且影响了依赖环化腺苷酸 (cAMP) 蛋白激酶催化的磷酸化对双功能酶中 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 的作用. 因此, 尝试对完整的鸡肝 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 结构域的结晶是重要的. 在利用基因重组技术得到完整鸡肝 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 的基础上, 我们对该酶进行了晶体生长条件的摸索. 本文主要报道鸡肝 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 的初步晶体学结果.

## 1 实验和结果

鸡肝 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase (残基 245 ~ 468) 是利用基因重组技术, 在 *E. coli* 中表达, 经分离纯化得到的<sup>[7]</sup>. 该酶保存在 0.02 mol/L Tris-HCl, 0.05 mol/L KCl, pH8.0 的缓冲液体系中, 酶浓度经超滤控制在 15 mg/mL. 晶体生长使用悬滴气相扩散法. 扩散液组成为: 0.12 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12% (质量与体积分数比) PEG6000, 0.02 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L KCl, pH8.0. 晶体生长的具体操作是: 15  $\mu$ L 的 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 溶液与 15  $\mu$ L 的扩散液混合后置于硅化了的玻璃片上作为悬滴与 1 mL 的扩散液进行气相扩散. 在 4  $^{\circ}$ C 培养箱中放置约 1 个月, 可得到尺寸约 0.4 mm  $\times$  0.4 mm  $\times$  0.5 mm 的单晶. 晶体的外形呈四方双锥, 如图 1.

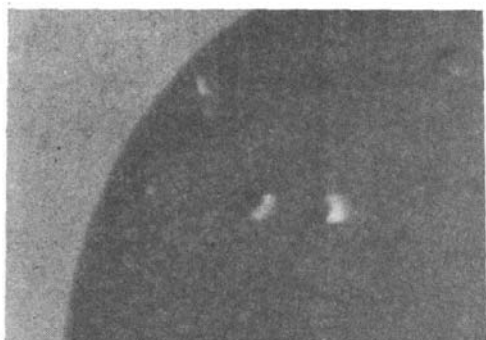


图 1 鸡肝 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 的单晶

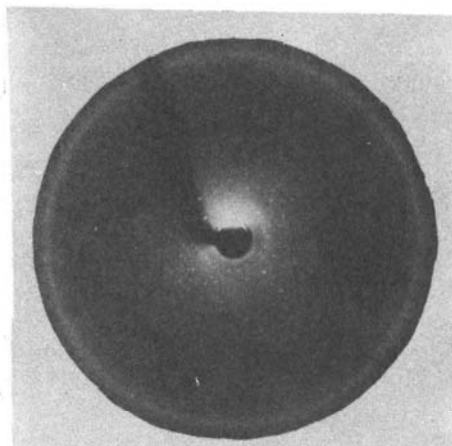


图 2 沿 [010] 方向的徕循照相结果

经 Mark II 徕循相机照相鉴定, 该晶体属于四方晶系, 空间群为  $P4_12_12$  或  $P4_32_12$ , 晶胞参数为:  $a=b=10.02$  nm,  $c=13.98$  nm,  $\alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$ . 图 2 给出了沿  $2_1$  轴展开的衍射特征. 在日本筑波高能物理国家重点实验室的 Weissenberg 相机上利用 Photon Factory 同步辐射光源收集了 1 套母体衍射数据, 分辨率达到 0.32 nm.

用溴代苯及 *p*-二甲苯为体系制成密度梯度柱并以此测得晶体密度为 1.27. F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 的分子量约为 32 ku (电泳结果)<sup>[7]</sup>. 由此推算, 1 个晶胞具有 16 个 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 分子, 每 1 个结晶学不对称单位内有 2 个 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 分子, 溶剂含量约为 52%.

## 2 讨论

实验中发现获得适合 X 光衍射分析用的鸡肝 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 单晶是比较困难的. Pilkis 研究小组在得到去 C 端 30 个氨基酸残基的鼠肝 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 结构域晶体时也指出“至今对 F-2, 6-P<sub>2</sub>ase 的结晶是不成功的”<sup>[4]</sup>. 我们参照 50 个结晶配方<sup>[7]</sup>, 在 0.02 mol/L Tris-HCl, pH8.0 体系

中,用盐(如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , NaCl等)和有机小分子(如2, 5-己二醇, 异丙醇, N, N-二甲基甲酰胺, PEG400等)都易产生无定形沉淀. 用大分子量的PEG(如PEG2 000, PEG4 000, PEG6 000, PEG8 000等)也是如此. 通过反复变换缓冲体系, pH值, 沉淀剂以及蛋白浓度等条件, 最终从600多个条件中找到了适合酯酶晶体生长的Tris-HCl缓冲体系与PEG6 000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 复合沉淀剂. 另外, F-2, 6- $\text{P}_2$ ase在常温下不稳定, 结晶过程必须在低温下进行. 实验发现, 结晶的最适温度是4℃, 在高于6℃时, 晶体易溶解.

在溶液中, 鸡肝双功能酶是以二体形式存在而F-2, 6- $\text{P}_2$ ase却以单体存在. 实验证明, 双功能酶稳定性较好. 另外, Tominaga等<sup>[9]</sup>证明N端肽段对维持F-2, 6- $\text{P}_2$ ase构象的稳定起着重要的作用. 显然, 去除激酶结构域(N端残基1~244), 仅表达酯酶活性的鸡肝F-2, 6- $\text{P}_2$ ase结构域(残基245~468)失去了与N端肽段的相互作用, 在溶液中的构象稳定性差, 这很可能是造成F-2, 6- $\text{P}_2$ ase结晶困难的主要原因.

Kurland等<sup>[6]</sup>曾指出, 在pH7.5时, 去掉N端22个氨基酸残基后鼠肝双功能酶的酯酶活性得到提高. Tominaga等<sup>[8]</sup>也证实在pH7.0条件下, 去掉N端1~24或1~30个氨基酸残基会提高小鼠睾丸双功能酶中酯酶的活性. 最近, Lin等报道<sup>[9]</sup>, C端30个氨基酸残基可以通过cAMP磷酸化作用调控N端激酶结构域的活性. 看起来, 激酶和酯酶两个结构域有着相互作用起着调节酶活性的机制. 但是, 究竟有多少氨基酸残基参与了N端与C端之间的调控作用以及如何调控, 从而影响各个结构域的催化部位与底物结合、反应等一系列问题还有待进一步研究. F-2, 6- $\text{P}_2$ ase, 6-PF-2-K结构域以及全酶6-PF-2-K/F-2, 6- $\text{P}_2$ ase晶体结构的阐明将有助于这些问题的解决.

## 参 考 文 献

- 1 Hers H G, Van Schaftingen E. Fructose-2, 6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J*, 1982, 206: 1~12
- 2 Pilkis S J, El-Maghrabi M R, Claus T H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57: 755~783
- 3 El-Maghrabi M R, Claus T H, Pilkis J *et al.* Regulation of rat liver fructose-2, 6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1982, 257: 7603~7607
- 4 El-Maghrabi M R, Pilkis S J. Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: a review of relationships between the two activities of the enzyme. *J Cell biochem*, 1984, 26: 1~17
- 5 Lee Y, Lin K, Okar D *et al.* Preliminary X-ray analysis of a truncated form of recombinant fructose-2, 6-bisphosphatase. *J Mol Biol*, 1994, 235: 1147~1151
- 6 Kurland I J, Li L, Lange A J *et al.* Regulation of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1993, 268: 14056~14064
- 7 Jancarik J, Kim S. Sparse matrix sampling: screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst*, 1991, 24: 409~411
- 8 Tominaga N, Minami Y, Sakakibara R *et al.* Significance of the amino terminus of rat testis 6-phosphofructo-2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1993, 268: 15951~15957
- 9 Lin K, Kurland I J, Li L *et al.* Evidence for  $\text{NH}_2$ - and  $\text{COOH}$ -terminal interactions in rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1994, 269: 16953~16960