用酵母双杂交系统检测菠菜叶绿体 ATP 合酶 CF₁ 各亚基间的相互作用*

石晓冰 魏家绵 沈允钢**

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 将菠菜叶绿体 ATP 合酶 CF_1 的 5 种亚基基因分别插入到质粒 pGBT9 和 pGAD424,双转化入酵母菌株,用酵母双杂交系统检测菠菜叶绿体 CF_1 各亚基间的相 互作用. 结果显示 CF_1 的 5 种亚基中, γ 与ε亚基有较强的相互作用; α 与 β , α 与 β , α 与 β 。 β 与 α 与 β 。 α 中亚基间在酵母双杂交系统中没有相互作用。这些结果有助于研究 ATP 合酶在催化过程中的结构变化和亚基间的相互关系。

关键词 ATP 合酶 亚基相互作用 酵母双杂交系统

ATP 合酶广泛存在于线粒体、叶绿体、原核藻、异养菌和光合细菌中,是能量代谢的关键酶,参与氧化磷酸化与光合磷酸化反应,在跨膜质子动力势的推动下催化合成 ATP^[1]. ATP 合酶由嵌于膜内的 F_0 和突出于膜外的 F_1 两部分组成. F_0 是一个疏水蛋白复合体,形成一个跨膜质子通道. F_1 有 6 个核苷酸结合位点,其中 3 个为催化位点,催化 ATP 的合成或水解^[2]. Boyer 的结合改变机理(binding change mechanism)认为,ATP 的合成过程中质子动力势驱动酶的构象发生改变^[3]. 很多实验也证实,ATP 合酶在合成或水解 ATP 的过程中, F_1 的 γ 亚基和 ϵ 亚基在 3 个 ϵ 亚基和 3 个 ϵ 亚基形成的橘瓣状的结构中不停地旋转^[4,5]. ATP 合酶的催化是一个动态过程,在这个过程中,亚基间的相互作用起着重要的作用.

酵母双杂交系统是近几年建立起来的在体内研究蛋白质间相互作用的遗传学方法^[6]. 双杂交系统不仅灵敏度高,而且对于在该系统中具备相互作用的蛋白质,还可以在删除其编码基因的某些序列后重新形成融合蛋白,来进一步确定蛋白质的功能片段. Moritani 等人^[7]曾用酵母双杂交系统检测到细菌 ATP 合酶 F_1 的 5 种亚基间有不同强度的相互作用. 虽然不同来源的 ATP 合酶的结构和功能大体相似,但在亚基组成以及酶的活力调节等方面仍有许多不同之处. 例如: 在大肠杆菌中,内膜的 ATP 合酶能够催化 ATP 的快速水解;而叶绿体 CF₁ 只是一个潜在的 ATPase,需要加以活化才能表现出较高的水解 ATP 活力^[8]. 因此,研究高等植物 ATP 合酶各亚基间的相互作用对验证和完善结合改变机理有着重要的意义. 本研究用酵母双杂交系统检测到菠菜叶绿体 ATP 合酶 CF₁的 γ 与 ε 亚基有较强的相互作用; α 与 β , α 与 ε , β 与 ε , β 与 δ

¹⁹⁹⁹⁻⁰⁴⁻²¹ 收稿, 1999-07-19 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 39730040)和国家重点基础研究专项经费资助项目(批准号: G1998010100)

^{**} 联系人(E-mail: ygshen@iris.sipp.ac.cn)

亚基间也有稳定的相互作用; 而 γ 与 δ , δ 与 ϵ 亚基间有微弱的或短暂的相互作用, 这与 Moritani 等人报告的细菌 ATPase F_1 5 种亚基在酵母双杂交系统中的相互作用有一些不同. 实验结果有助于研究 ATP 合酶在催化过程中结构的变化, 以及高等植物叶绿体 ATP 合酶与细菌 ATP 合酶在结构等方面的差异.

1 材料和方法

1.1 试剂、菌株和质粒

限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自 Pharmacia 公司; Klenow 聚合酶购自 Promega 公司; ONPG 购自 Sigma 公司; 其他为国产分析纯试剂.

E.coli DH5α (supE44, Δ lacU169 (φ 80, lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyra96, thi-1, relA), JM83 (ara, rpmsL, Δ lac-proAB (φ 80, lacZ Δ M15)), 酵母 SFY526 (MATa, gal4-542, gal80-538, URA3::GAL1-lacZ can^r, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112). 质粒 pJLA502-pchlα, pJLA503-pchl β , pJLA502-pchl γ , pJLA502-pchl δ , pJLA503-pchl ϵ 分别含菠菜叶 绿体 ATP 合酶的 α , β , γ , δ 和 ϵ 5 种亚基的基因[9], 由德国 Osnabrueck 大学 S. Engelbrecht 博士赠送; 双杂交质粒 pGBT9, pGAD424 及阳性对照质粒 pVA3, pTD1, pLAM5', pCL1[6,10] 由中国科学院上海生物化学研究所闻宏博士赠送.

1.2 DNA 操作

质粒抽提, 转化, 酶切反应, 电泳鉴定, DNA 回收及连接反应等参照文献[11].

1.3 酵母双转化

插入 ATP 合酶 5 种亚基基因的质粒 pGBT9 和 pGAD424 按照表 1 组合用 LiAc 法⁶双转化酵母 SFY526. 在选择性培养基 SD(-L, -W)上 30℃选择培养 4~5 d, 长出菌株为双转化酵母.

1.4 酵母双转化的b-半乳糖苷酶活力测定

双转化酵母在液体 SD(-L, -W)培养基里培养过夜,第 2 天转接生长到对数期,用 Z buffer 洗涤、悬浮后冻融,加入反应底物硝基苯半乳糖苷(o-nitrophenylgalactoside, ONPG)后在 30% 保温数小时,显色后用 Na₂CO₃终止反应.离心去沉淀,取上清在 420 nm 波长测 A 值. β-半乳糖苷酶活性以 Miller 单位显示 $^{[12]}$.

2 结果

2.1 质粒载体的构建

含有菠菜叶绿体 ATP 合酶 α , β , γ , δ 和 ϵ 5 种亚基基因的质粒 pJLA502-pchl α , pJLA503-pchl β , pJLA502-pchl γ , pJLA502-pchl δ , pJLA503-pchl ϵ 分别用 Nco Γ 或 Nde Γ 酶切后,DNA 聚合酶 Klenow 片段补平末端,再用 BamH Γ 或 Sal Γ 酶切回收.回收的片段插入经 Sma Γ BamH Γ 或 Sma Γ Sal Γ 酶切的质粒 pGBT9 和 pGAD424(图 1),片段与质粒的接合经酶切或序列测定证实插入的基因与质粒形成的融合蛋白可读框正确.

2.2 CF₁ a与b亚基在酵母双杂交系统中的相互作用

穿梭质粒 pGBT9 和 pGAD424 分别含有 GAL4 基因的 DNA 结合结构域(DNA-binding domain)和 DNA 转录激活结构域(transcription-activating domain). 将叶绿体 ATP 合酶 CF₁ 的α 和β亚基的基因分别克隆进质粒 pGBT9 和 pGAD424, 形成可表达α或β亚基与 GAL4 DNA 结

合结构域或 GAL4 转录激活结构域融合蛋白的质粒 pGBT9-α, pGBT9-β和 pGAD424-α, pGAD424-β, pGAD424-β, pGAD424-β或 pGBT9-α/pGAD424-β或 pGBT9-β/pGAD424-α双转化酵母菌株 SFY526 后, 激活报告基因β-半乳糖苷酶的表达,结果如表 2 所示. 在以硝基苯半乳糖苷为底物测定β-半乳糖苷酶活性的体系中,只有同时转入含有α亚基融合蛋白基因的质粒和含有β亚基融合蛋白基因的质粒,才可以在酵母中检测到报告基因的显著表达,而单转入α亚基融合蛋白基因或单转入β亚基融合蛋白基因均不能显著激活β-半乳糖苷酶基因的表达. 这表明在酵母双杂交系统中,ATP 合酶的α和β亚基是可以相互作用的.

融合蛋白	β-半乳糖苷酶活性/U
GAL4 bd-α + GAL4 ad-β	2.4 ± 0.3
GAL4 bd- β + GAL4 ad- α	2.2 ± 0.2
GAL4 bd- α + GAL4 ad- γ	0
GAL4 bd- γ + GAL4 ad- α	0
GAL4 bd- α + GAL4 ad- δ	0
*GAL4 bd- δ + GAL4 ad- α	19.4 ± 2
GAL4 bd- α + GAL4 ad- ϵ	1.9 ± 0.2
GAL4 bd- ε + GAL4 ad- α	0
GAL4 bd- β + GAL4 ad- γ	0
GAL4 bd- γ + GAL4 ad- β	0
GAL4 bd- β + GAL4 ad- δ	1.8 ± 0.2
*GAL4 bd- δ + GAL4 ad- β	20.8 ± 2
GAL4 bd- β + GAL4 ad- ϵ	2.3 ± 0.3
GAL4 bd- ε + GAL4 ad- β	0
GAL4 bd- γ + GAL4 ad- δ	0.6 ± 0.3
*GAL4 bd- δ + GAL4 ad - γ	23.0 ± 2
GAL4 bd- γ + GAL4 ad- ϵ	2.9 ± 0.2
GAL4 bd- ε + GAL4 ad- γ	0.5 ± 0.2
*GAL4 bd- δ + GAL4 ad- ϵ	25.2 ± 3
GAL4 bd- ε + GAL4 ad- δ	1.0 ± 0.2
*GAL4 bd- δ + GAL4 ad	25.8 ± 2
*GAL4 bd-δ	24.0 ± 2

表 1 菠菜叶绿体 ATP 合酶 CF₁ 各亚基在酵母双杂交系统中的相互作用 a)

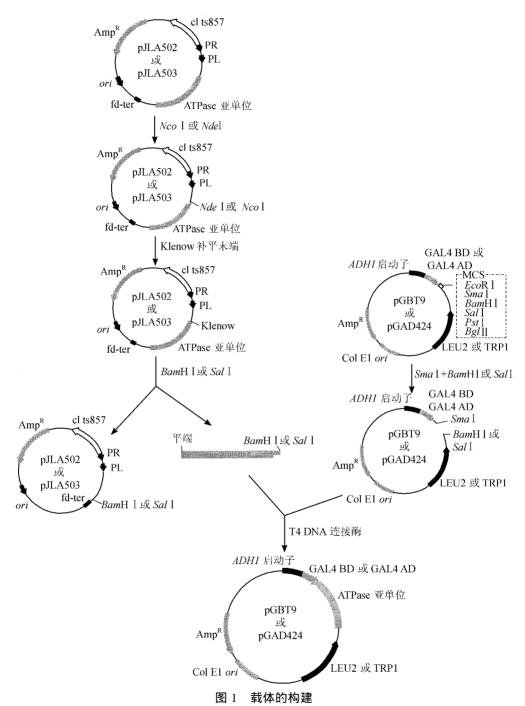
a) bd 为 GAL4 DNA 结合结构域; ad 为 GAL4 转录激活结构域. δ 亚基与 GAL4 转录激活结构域、 γ 或 ϵ 亚基与 GAL4 DNA 结合结构域或 GAL4转录激活结构域形成的融合蛋白单独诱导的 β -半乳糖苷酶活性与表 2 相近; * 示 δ 亚基与 GAL4 DNA 结合结构域的融合蛋白可单独诱导 β -半乳糖苷酶的活性

0.1

2.3 ATP 合酶 CF, 各亚基在酵母双杂交系统中的相互作用

GAL4 bd + GAL4 ad

ATP 合酶α, β, γ, δ和ε 5 种亚基分别与 GAL4 DNA 结合结构域和 GAL4 转录激活结构域融合,融合质粒双转化酵母 SFY526,每一组双转化均按照表 2 的组合方式做正负对照,检测报告基因β-半乳糖苷酶的表达,结果见表 1. 除α与β亚基外,在酵母双杂交系统中还检测到γ与ε,α与ε,β与ε,β与δ,γ与δ,δ与ε 等亚基间的相互作用.其中,α和β亚基在交换它们与 GAL4 DNA 结合结构域和 GAL4 转录激活结构域形成的融合蛋白后仍能诱导报告基因显著表达,而其他几个能够在酵母双杂交系统中相互作用的亚基,在交换它们与 GAL4 DNA 结合结构域和 GAL4 转录激活结构域形成的融合蛋白后没有检测到报告基因显著表达。在 ATP 合酶的 5 种亚基中,γ与ε亚基形成的双转化所诱导的β-半乳糖苷酶活性最强; α与β,β与ε, α与ε,β与δ次之;



质粒 pJLA502-pch1α, pJLA503-pch1β, pJLA502-pch1γ, pJLA502-pch1δ, pJLA503-pch1ε分别含菠菜叶绿体 ATP 合酶的, β, γ, δ 和ε 5个亚基的基因. 将质粒 pJLA502-pch1α, pJLA502-pch1γ, pJLA502-pch1δ分别用 Nco I 酶切, pJLA503-pch1β, pJLA503-pch1ε用 Nde I 酶切后, 用 Klenow 片段补平末端, pJLA502-pch1α, pJLA503-pch1β, pJLA502-pch1δ 用 Sal I 酶切, pJLA502-pch1γ, pJLA503-pch1ε用BamH I 酶切, 琼脂糖电泳回收. 回收的片段分别装入经 Sma I/BamH I 或 Sma I/Sal I 酶切的穿梭质粒 pGBT9 和 pGAD424

融合蛋白	β-半乳糖苷酶活性/U	
GAL4 bd-α + GAL4 ad-β	2.4 ± 0.3	·
$GAL4 bd-\alpha + GAL4 ad$	0.2	
GAL4 bd $+$ GAL4 ad- β	0	
GAL4 bd- β + GAL4 ad- α	2.2 ± 0.2	
$GAL4 bd-\beta + GAL4 ad$	0.2	
GAL4 bd $+$ GAL4 ad- α	0	
GAL4 bd + GAL4 ad	0	

表 2 菠菜叶绿体 $CF_1\alpha$ 和 β 亚基在酵母双杂交系统中的相互作用 α

a) bd 为 GAL4 DNA 结合结构域; ad 为 GAL4 转录激活结构域

而δ与ε, γ 与δ亚基的双转化报告基因的表达最弱. δ亚基与 GAL4 DNA 结合结构域的融合蛋白可单独诱导 β -半乳糖苷酶活性(表 1 中*号所示), 因此无法用双杂交系统来检测δ亚基与 GAL4 DNA 结合结构域的融合蛋白与其他亚基与 GAL4 转录激活结构域的融合蛋白间的相互作用.

3 讨论

在 ATP 合酶的研究中,一般是用化学交联(cross-linking)的方法来检测亚基间的相互作用 $\Pi^{[13,14]}$. 交联是用化学试剂对蛋白质进行修饰,难免会影响蛋白质的空间结构,而且由于作用 环境与体内差异太大,这种在体外检测到的相互作用在体内并不一定发生. 在体外不加任何修饰,ATP 合酶 F_1 的 5 种亚基中只有 γ 与 ϵ 亚基能够形成稳定的蛋白复合物 $\Pi^{[15]}$. 用酵母双杂交系统研究蛋白质相互作用是在酵母细胞内进行的,蛋白质有可能保持天然的折叠状态,因此它所证实的蛋白质相互作用更接近于体内的真实情况. 双杂交系统灵敏度高,报告基因在表达过程的多级放大,使许多用免疫共沉淀等体外方法检测不到的、微弱的、短暂的蛋白质相互作用在这个系统中也可以反映出来. 另外,双杂交系统的作用信号是在融合基因表达后在细胞内重建转录因子的作用而给出的,省去了蛋白质抽提纯化等许多繁琐的步骤 $\Pi^{[6,10]}$.

我们应用酵母双杂交系统探讨高等植物叶绿体 ATP 合酶 CF_1 各亚基间的相互作用,检测到菠菜 CF_1 的 α 与 β , α 与 ϵ , β 与 ϵ , β 与 δ , γ 与 δ , γ 与 ϵ , δ 与 ϵ 等亚基间有不同程度的相互作用,而交联实验的结果显示,所有的 CF_1 亚基间均可以产生交联^[13, 14]. 在双杂交系统中有相互作用的亚基所诱导的报告基因的表达水平也不一样. γ 与 ϵ 亚基诱导的 β -半乳糖苷酶活性最强,这表明在 CF_1 的 δ 种亚基中, γ 与 ϵ 亚基间的相互作用最强. 这与 Dunn 等人^[15]的实验相符合,他们将纯化的 ϵ 亚基分别与 γ , α 和 β 亚基过凝胶阻逆层析柱,只有 ϵ 和 γ 亚基可以形成稳定的复合物. 在双杂交系统中, α 与 β , α 与 ϵ , β 与 ϵ , β 与 δ 等亚基间也有稳定的相互作用;而 γ 与 δ , δ 与 ϵ 亚基虽也可诱导报告基因的表达,但 β -半乳糖苷酶活性非常弱,而且表达也不够稳定,这表明有可能在体内 γ 与 δ , δ 与 ϵ 间的相互作用是微弱的,甚至是瞬时的.

ATP 合酶的 F_1 和 F_0 之间的亚基形成两个颈部结构, δ亚基和 b_2 组成 "定子",将突出在 膜外的 $\alpha_3\beta_3$ 与膜内的 F_0 连接起来,γ和ε亚基组成 "转子",在 F_1 和 F_0 之间不停地旋转,调节β 亚基上的核苷酸结合催化位点的结构变化 $^{[16,17]}$. 一般认为,"转子"在跨膜质子动力势的推动下旋转,γ亚基和ε亚基均参与调节α和β亚基上的核苷酸结合位点的构象变化 $^{[16,17]}$. 我们的结果显示:ε亚基与α,β亚基均有相互作用,而γ亚基与α和β亚基没有作用. Moritani 在细菌的 ATP 合酶中也得到了相似的结果 $^{[7]}$. 从这些结果来看,有可能在 $^{[7]}$ 中分子量最小的ε亚基在调节 ATP 合酶的核苷酸结合位点的构象变化中起着更重要的作用.

致谢 感谢德国 Osnabrueck 大学 S. Engelbrecht 博士赠送菠菜叶绿体 ATP 合酶 CF₁ 亚基基因,中国科学院上海生物化学研究所闻宏博士赠送酵母双杂交系统.

参 考 文 献

- 1 Nicholls D G, Ferguson S J. Bioenergetics II. London: Academic Press, 1992
- 2 Cruz J A, Harfe B, Badkowski C A, et al. Molecular dissection of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase of spinach. Plant Physiol, 1995, 109(4): 1 379~1 388
- 3 Boyer P D. The binding change mechanism for ATP synthase—some probabilities and possibilities. Biochim Biophys Acta, 1993, 1 140: 215~250
- 4 Noji H, Yasuda R, Yashida M, et al. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. Nature, 1997, 386: 299~302
- 5 Sabbert D, Engelbrecht S, Junge W. Intersubunit rotation in active F-ATPase. Nature, 1996, 381: 623~625
- 6 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature, 1989, 340: 245~247
- 7 Moritani C, Sawada K, Takemoto K, et al. Interactions of the F₁-ATPase subunits from *Escherichia coli* detected by the yeast two-hybrid system. Biochim Biophys Acta, 1996, 1 274: 67~72
- 8 Richter M L, Gao F. The chloroplast ATP synthase: structural changes during catalysis. J Bioener Biomem, 1996, 28(5): 443~449
- 9 Lill H, Burkovski A, Altendorf K, et al. Complementation of Escherichia coli unc mutant strains by chloroplast and cyanobacterial F₁-ATPase subunits. Biochim Biophys Acta, 1993, 1 144: 278~284
- 10 Bartel P L, Chien C T, Sternglanz R, et al. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. Biotechniques. 1993, 14: 920~924
- 11 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatist T. Molecular Cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989
- 12 Miller J. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor, 1972
- 13 Aris J P, Simoni R D. Cross-linking and labeling of the Escherichia coli F₁F₀-ATP synthase reveal a compact hydrophilic portion of F₀ close to an F₁ catalytic subunit. J Biol Chem, 1983, 258: 14 599~14 609
- 14 Aggeler R, Chicas-Cruz K, Cai S X, et al. Introduction of reactive cysteine residues in the epsilon subunit of Escherichia coli F₁ ATPase, modification of these sites with tetrafluorophenyl azide-maleimides, and examination of changes in the binding of the epsilon subunit when different nucleotides are in catalytic sites. Biochemistry, 1992, 31: 2 956-2 961
- 15 Dunn S D, Futai M. The isolated γ subunit of *Escherichia coli* F-ATPase binds the ε subunit. J Biol Chem, 1980, 257: 7 354~ 7 359
- 16 Wilkens S, Capaldi R A. Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. Biochim Biophys Acta, 1998, 1 365: 93~97
- 17 Junge W, Lill H, Engelbrecht S. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotary mechanics. TIBS, 1997, 22: 420~423