

钙调素及其结合蛋白 BP-10 对类囊体膜蛋白磷酸化的作用*

李翠凤 向左云 凌启闯 尚克进

(南开大学生物化学及分子生物学系, 天津 300071)

摘要 报道光诱导的内源类囊体膜蛋白的磷酸化可被一种新的植物钙调素 (Calmodulin, CaM) 结合蛋白 BP-10 (CaMBP-10) 显著抑制, 并且抑制作用能被外加 CaM 消除. 同时, 此磷酸化反应也可被 EGTA 和 CaM 拮抗剂 TFP (trifluoperazine) 及 W-7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene sulfonamide) 抑制. 提示: (1) Ca^{2+} 和 CaM 可能参与并调节植物光合作用; (2) 催化类囊体膜蛋白磷酸化的激酶可能受 Ca^{2+} 和 CaM 调控. 进一步实验表明 BP-10 对类囊体膜蛋白的脱磷酸化作用无任何影响.

关键词 钙调素 CaM BP-10 类囊体蛋白激酶 磷酸化作用

自 Bennett^[1]首次报道多种叶绿体蛋白可被光和化学还原剂激活的激酶磷酸化以来, 类囊体蛋白的磷酸化及其对光合作用的调节受到极大关注. 80 年代中期研究热点主要集中在光系统 II (PS II) 外周天线蛋白 LHC II (light-harvesting complex II) 的磷酸化机制及在能量重新分配中的调节作用, 并对此提出各种模式和假说^[2]. 对于其它类囊体蛋白如 CP43, D1, D2, PsbH 等磷酸化的生理意义虽然至今尚未最终确定, 但它们的磷酸化与脱磷酸化调节无疑对植物光合作用有着重要影响^[3].

钙作为植物体内的重要信使分子与 CaM 共同参与和调节着众多生理过程, 而且研究证明 CaM 的诸多调节功能常受其内源性结合蛋白的进一步调控, 故 CaM 内源结合蛋白的发现及生理生化性质的研究, 对最终阐明 CaM 参与的复杂调控机制具有重要意义. 但目前有关植物组织中 CaM 结合蛋白的信息极为有限, CaM 及其结合蛋白对类囊体蛋白磷酸化的影响更未曾见过报道. 本实验室分离得到一种新的植物 CaM 结合蛋白 BP-10^[4], 研究发现 BP-10 通过与 CaM 的特异结合抑制 CaM 对靶酶磷酸二酯酶^[4]和 NAD 激酶^[5]的激活, 而且对植物生长素诱导的细胞伸长和介质酸化均有明显抑制效应^[6], 显然 BP-10 参与了植物 Ca^{2+} /CaM 信号系统的调节. 为了进一步查明 CaM 对光合作用的调节机理, 我们研究了 BP-10 对类囊体蛋白磷酸化和脱磷酸化的影响. 实验表明 BP-10 不但可抑制膜蛋白的磷酸化, 而且这种抑制作用可被外加 CaM 消除. 这一结果对于阐明 Ca^{2+} /CaM 信号系统在光合作用中的调节机制具有重

要意义.

1 材料和方法

1.1 材料

市售豌豆种子, DCMU(3-(3', 4'-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea), PMSF, TFP 及 W-7 均为 Sigma 产品, 低分子量标准蛋白由 GIBCO BRL 提供, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 购自北京福瑞公司.

1.2 方法

1.2.1 CaM 以疏水柱层析法制备 制备方法参考文献[7].

1.2.2 CaM BP-10 自中国大白菜中分离纯化 分离纯化方法参考文献[4].

1.2.3 类囊体膜的制备 采用经修改的 Allen^[8]等人方法, 避光采摘生长 12~14 d 的豌豆叶 37 g 于 4 倍体积的缓冲液 A(50 mmol/L Tris pH7.8 含 0.33mol/L 蔗糖, 5 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L PMSF)中低速捣碎 10 s, 经 4 层纱布过滤后, $1\,000\times g$ 下离心 10 min, 收集叶绿体并于缓冲液 B(10 mmol/L Tris pH7.8 含 5 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L PMSF)中低速破膜, 然后 $3\,000\times g$ 下离心 10 min, 收集类囊体膜沉淀溶于少量缓冲液 C 中(50 mmol/L Tris pH7.8, 82.5 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L PMSF)中, 使叶绿素浓度为 1.4 mg/mL, 低温保存备用.

1.2.4 叶绿素含量测定 采用 Arnon 法^[9]测定并计算叶绿素含量.

1.2.5 类囊体膜蛋白的磷酸化反应 类囊体膜蛋白在内源类囊体蛋白激酶作用下进行磷酸化反应. 反应体系中含 50 mmol/L Tris pH7.0, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L KCl, 100 mmol/L 蔗糖. 根据实验要求加入适量 BP-10 和 CaM, 膜用量以叶绿素含量计 0.4 mg/mL. 视不同需要确定反应体积(30~300 μL). 反应管首先在暗处放置 30 min, 使膜蛋白脱去在体内和制膜过程中已掺入的磷酸基团, 而后加入 NaF, 使浓度为 10 mmol/L, 抑制内源磷酸酶活性, 再加入 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (50~100 $\text{min}^{-1}\cdot\text{pmol}^{-1}$)使浓度为 0.1 mmol/L, 立即取样为对照, 然后将反应管迅速转移至光下进行磷酸化反应(200W 钨灯作为光源), 不同时间取样用滤纸法^[10]于液闪计数器测定放射强度或以样品缓冲液终止反应进行 SDS-PAGE. 干胶后用放射自显影的方法检测磷酸化进程.

1.2.6 类囊体膜蛋白的脱磷酸化反应 在不含 NaF 的体系中进行磷酸化反应 15 min 后加入 DCMU 使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 阻断电子传递终止磷酸化反应. 随之加入适量 BP-10(对照管不加), 并立即将反应管转移至暗处, 在内源磷酸酶的作用下进行脱磷酸化反应, 于不同时间取样测定.

1.2.7 SDS-PAGE 和放射自显影 SDS-PAGE 按 Laemmli 法^[11]进行, 采用梯度凝胶电泳(12%~20%), 将脱色后的电泳凝胶置于滤纸上干燥, 用 Kodak XR-5 胶片于 -40°C 下放射自显影.

2 实验结果

2.1 内源激酶对类囊体膜蛋白的磷酸化

光照条件下, 类囊体膜蛋白可被内源激酶磷酸化(图 1), 磷酸化水平在 10~15 min 达最高. 当反应体系中存在 Ca^{2+} 时, 对膜蛋白磷酸化无明显影响, 当存在 EGTA 时磷酸化程度显

著降低,提示内源蛋白激酶的活性不但可被光激活而且依赖于 Ca^{2+} ,样品中的内源性 Ca^{2+} 可使其充分激活,然而当体系中加入 EGTA 除去内源 Ca^{2+} 时,磷酸化作用受到明显抑制. 在本实验条件下 EGTA 小于 0.5 mmol/L 时抑制不明显,当 EGTA 浓度在 1~5 mmol/L 时,抑制逐渐增强并达最大(图 2).

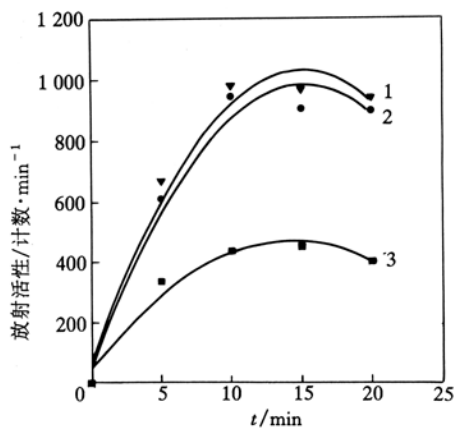


图 1 类囊体膜蛋白磷酸化时间曲线

1 为对照, 2 为 +0.5 mmol/L Ca^{2+} , 3 为 +5 mmol/L EGTA

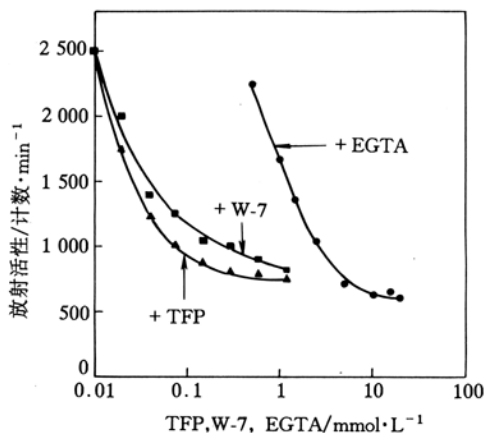


图 2 TEP, W-7, EGTA 对类囊体膜蛋白磷酸化的影响

2.2 CaM 拮抗剂 TFP, W-7 对类囊体膜蛋白磷酸化的抑制

当反应体系中存在 20~300 $\mu\text{mol/L}$ TFP 或 W-7 时,膜蛋白磷酸化程度显著降低(图 2),初步显示类囊体蛋白激酶不仅依赖于 Ca^{2+} ,而且它的活性与内源 CaM 密切相关.

2.3 CaM BP-10 对磷酸化的抑制作用

由图 3 和 4 可知 CaM BP-10 对膜蛋白磷酸化的抑制作用十分明显. 其抑制程度与 BP-10 的用量呈正相关,进一步证明此膜制备物中确实含有可与 BP-10 相互作用的 CaM,而且这种作用直接影响着磷酸化活性,为了排除抑制的非特异性,反应体系中加入较高浓度 BSA(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),结果显示对磷酸化无任何影响(图 3),证明了 BP-10 抑制作用的特异性. 另在本实验条件下,16ku 膜蛋白显示出较强的磷酸化(图 3(b)),其原因尚待查明.

2.4 外源 CaM 对 BP-10 抑制作用的消除

将外源 CaM 加至含有 BP-10 的反应体系中,结果(图 3(b)、图 4(b)、图 5)表明外加 CaM 可以消除 BP-10 的抑制作用,恢复磷酸化活性,并且恢复的程度随 CaM 用量的增加而增加,极好地证明 BP-10 对类囊体蛋白磷酸化的抑制作用是由 CaM 所介导,揭示这一内源激酶活性的 Ca^{2+} 和 CaM 依赖性.

2.5 BP-10 对类囊体膜蛋白脱磷酸化的影响

在脱磷酸化反应体系中加入 BP-10,由图 6 可知 BP-10 对膜蛋白的脱磷酸化作用无任何影响. 在有或无 BP-10 存在的情况下,2 条脱磷酸化反应曲线极好地重合,总体半数脱磷酸化时间超过 1 h. 膜蛋白缓慢的脱磷酸化作用必有其特殊的生理意义.

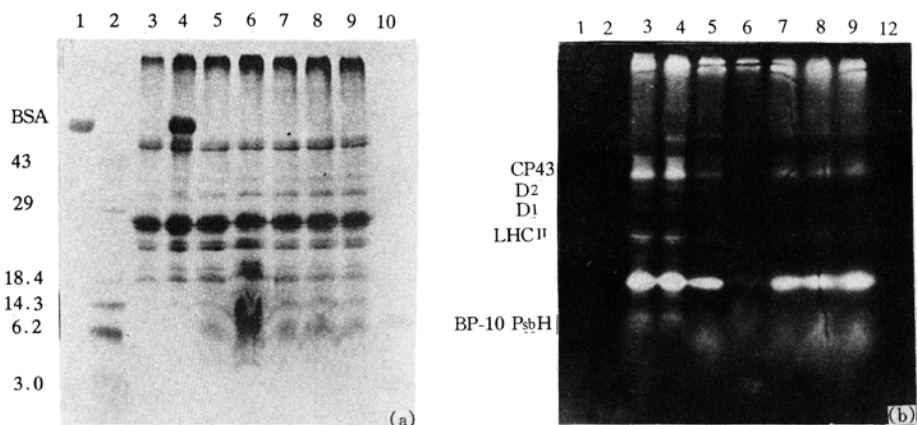


图 3 类囊体膜蛋白的磷酸化作用

(a) SDS-PAGE (12% ~ 20%), (b) 放射自显影. 1 为 BSA (20 μg), 2 为标准分子量, 3 为膜 (21 μg, 以叶绿素含量计), 4 为膜 + BSA (1 μg/μL), 5 为膜 + BP-10 (1 μg/μL), 6 为膜 + BP-10 (2 μg/μL), 7 为膜 + BP-10 (1 μg/μL) + Ca²⁺ (0.5 mmol/L), 8 为膜 + BP-10 (1 μg/μL) + EGTA (0.1 mmol/L), 9 为膜 + BP-10 (1 μg/μL) + CaM (0.1 μg/μL), 10 为 BP-10 (20 μg)

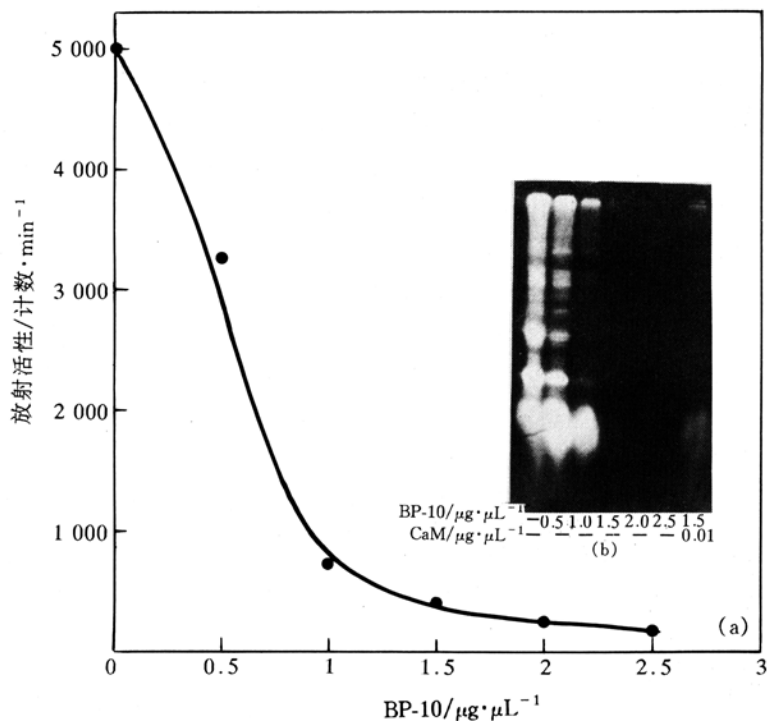


图 4 CaM BP-10 对类囊体膜蛋白磷酸化的抑制效应

(a) 抑制曲线, (b) 放射自显影图谱

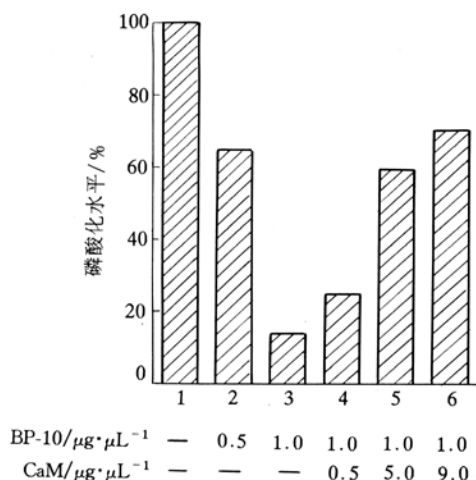


图5 CaM对BP-10抑制作用的消除

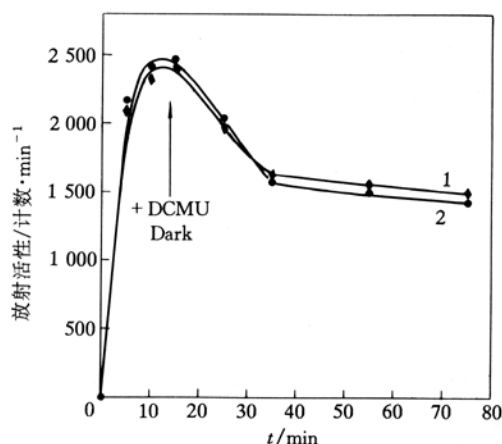


图6 CaM BP-10对类囊体膜蛋白脱磷酸化作用的影响

1为BP-10, 2为对照

3 讨论

Coughlan 等人^[12]从豌豆叶中分离了类囊体蛋白激酶, 并发现包括 LHC II 在内的所有可被磷酸化的类囊体蛋白均为此 64 ku 激酶的底物。激酶的抗体可抑制全部蛋白的磷酸化作用, 由此推论膜上仅存在一种受氧化还原控制的激酶。最近 Silverstein 等^[13,14]的研究也证明膜上 13 种蛋白的磷酸化均为一种内源激酶所催化。我们在研究中发现无论是 EGTA, TFP, W-7 还是 BP-10 对类囊体蛋白磷酸化作用的抑制均无任何选择性。从图 4 可以清楚地看到随着 BP-10 浓度增加, 全部蛋白的磷酸化水平逐步减弱, 各条区带的磷酸化作用受到均等抑制, 从这一有趣的结果可以推测受 Ca^{2+} 和 CaM 调节的激酶可磷酸化所有膜蛋白, 为证明类囊体膜上仅存在一种内源激酶提供又一有力证据。

关于类囊体膜蛋白激酶受光诱导的氧化还原控制, 其活性可被电子传递阻断剂 DCMU 等抑制的报道很多^[1,2], 但至今未见有人报道 Ca^{2+} , CaM 对此激酶的调节。以 Ca^{2+} 络合剂 EGTA 和 CaM 拮抗剂 TFP, W-7 作为探针对这一问题进行探讨得知 EGTA, TFP, W-7 均可抑制类囊体蛋白的磷酸化(图 2), 初步说明 Ca^{2+} , CaM 可能参与类囊体激酶的调节。特别是 CaM 内源性结合蛋白 BP-10 对磷酸化的抑制以及外加 CaM 对抑制的克服(图 5)更有力、更直接地证明类囊体激酶活性受 Ca^{2+} 和 CaM 的调节。根据这一实验结果, 可得到 2 点推论: (1) CaM 可能参与并调节着光激活的电子传递。所以对 CaM 的抑制阻断电子传递, 使还原质醌水平降低而抑制激酶活性。(2) 类囊体激酶不仅可被还原质醌激活^[8], 同时具有 Ca^{2+} , CaM 依赖性。光照条件下, Ca^{2+} 浓度升高, 激活 CaM, 活化的 CaM 又激活激酶, BP-10 则通过与 CaM 的特异相互作用拮抗了 CaM 对激酶的激活, 从而使膜蛋白的磷酸化受到抑制。

关于类囊体膜蛋白脱磷酸化作用的报道有限。Cheng 等^[15]最新研究表明膜上存在几种不受氧化还原控制的磷酸酶, 而且膜蛋白的脱磷酸化反应速度较慢。我们研究 BP-10 对类囊体蛋白脱磷酸化影响时发现类囊体膜的总体磷酸酶活性较低, 半数脱磷酸化时间超过 1 h, 与

Cheng 的报道相一致。同时分析表明 Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} 等金属离子对磷酸酶均无任何激活作用。值得注意的是 BP-10 对脱磷酸化作用亦无任何影响(图 6), 充分体现出类囊体蛋白磷酸化与脱磷酸化之间存在着不同的调节机制。

光合作用的调节极其复杂, 本研究证明 Ca^{2+} , CaM 通过对类囊体蛋白磷酸化的影响而最终参与光合作用的调节, 有关调节的细节以及其他可能的调节途径尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Bennett J. Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature*, 1977, 269: 344~346
- 2 Bennett J. Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochem J*, 1983, 212: 1~13
- 3 Allen J F. Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control of multiple level of gene expression. *Physiologia Plantarum*, 1995, 93: 196~205
- 4 尚克进, 凌启阁, 李翠凤, 等. 一种新的植物钙调素结合蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1991, 23(5): 416~422
- 5 凌启阁, 李翠凤, 尚克进, 等. CaM BP-10 对 NAD 激酶的影响. *生物化学杂志*, 1996, 12(4): 436~439
- 6 凌启阁, 李翠凤, 尚克进, 等. CaM BP-10 对生长激素诱导的小麦芽鞘伸长及介质酸化的抑制作用. *科学通报*, 1993, 38(21): 2 005~2 008
- 7 凌启阁, 李翠凤, 尚克进. 钙调蛋白分离纯化的吸附层析法. *离子交换与吸附*, 1986, 2(3): 42~46
- 8 Allen J F, Bennett J, Steinback K E, et al. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, 1981, 291: 25~29
- 9 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1~15
- 10 李翠凤, Wang J H. 受磷蛋白磷酸化和脱磷酸化机制研究. *生物化学与生物物理学报*, 1993, 25(3): 239~246
- 11 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680~685
- 12 Coughlan S, Hind G. Phosphorylation of thylakoid proteins by a purified kinase. *J Biol Chem*, 1987, 262: 8 402~8 408
- 13 Silverstein T, Cheng L, Allen J F. Redox titration of multiple protein phosphorylation in pea chloroplast thylakoids. *Biochem Biophys Acta*, 1993, 1 183: 215~220
- 14 Silverstein T, Cheng L, Allen J F. Redox titration of chloroplast thylakoid protein phosphorylation: evidence for a single redox-controlled kinase and a redox-independent phosphatase. *Biophysical J*, 1994, 66: A114
- 15 Cheng L, Stys D. Effects of synthetic peptides on thylakoid phosphoprotein phosphatase reactions. *Physiologia Plantarum*, 1995, 93: 173~178