

酪氨酸蛋白激酶的分离、鉴定及基本特性

姚文兵 胡卓逸

(中国药科大学生化研究室 南京)

提 要

自 1979 年发现动物细胞内存在有能使酪氨酸磷酸化的蛋白激酶以来,对酪氨酸蛋白激酶的研究工作有了很大进展,特别是发现癌细胞的增殖与酪氨酸蛋白激酶有关。本文对该蛋白激酶的分离、鉴定及基本特性作一综述。

蛋白激酶是指能使蛋白质磷酸化的酶,过去普遍认为蛋白激酶仅催化靶蛋白分子上丝氨酸 (Ser) 和苏氨酸 (Thr) 的磷酸化,直到 1979 年才第一次从病毒癌基因转化蛋白的水解产物中检出磷酸酪氨酸 (Phos-Tyr)^[1],接着又发现所有的动物细胞蛋白质均含有少量的 Phos-Tyr。Phos-Tyr 作为蛋白质稳定可逆的修饰方式而出现,表明确实存在一种或多种使 Tyr 磷酸化的蛋白激酶。迄今对酪氨酸蛋白激酶(即依赖于酪氨酸的蛋白激酶、酪氨酸型蛋白激酶,下简称 TPK)的研究工作有了很大进展。

一、TPK 的分类

据报道,至少有三种类型的 TPK 存在。第一种是指来源于病毒及正常细胞的 TPK^[2]。已发现至少有七种逆转录病毒癌基因和其相应的细胞原癌基因能编码具有 TPK 活性的蛋白质(表 1)。第二种类型与细胞中某些生长因子受体有关,至少有四种这种类型的 TPK。第三种是属于其他类型的 TPK,如 P56^{lstra} 已从正常组织器官中获得。另外,从大鼠肝脏中得到一种分子量为 75kD 的 TPK,称之为 P75,亦属此类。

表 1 TPK 的分类^[2]

基 因	蛋白质	在细胞中存在的部位
1. 来源于病毒及正常细胞的 TPK		
c-src	PP60 ^{c-src}	细胞膜
c-yes	—	—
c-fgr	—	—
c-fps	P98 ^{c-fps}	细胞可溶部分
c-fes	P92 ^{c-fes}	—
c-abl	P150 ^{c-abl}	细胞浆
c-ros	—	—
v-src	PP60 ^{v-src}	细胞膜/细胞骨架
v-yes	P90 ^{gag-yes}	细胞膜
v-fgr	P70 ^{gag-fgr}	细胞浆
v-fps	P140 ^{gag-fps}	细胞膜/细胞可溶部分
v-fes	P85 ^{gag-fes}	细胞浆
v-abl	P120 ^{gag-abl}	细胞膜
v-ros	P68 ^{gag-ros}	细胞膜
2. 与生长因子受体有关的 TPK		
c-erb-B	EGF 受体	原生质膜
—	PDGF 受体	原生质膜
—	胰岛素受体	原生质膜
—	IGF-1 受体	原生质膜
3. 其他类型 TPK		
—	P56 ^{lstra}	细胞浆
—	P75	细胞浆

注: EGF: 上皮细胞生长因子, PDGF: 血小板生长因子, IGF: 类胰岛素生长因子。

二、TPK 的分离、鉴定

TPK 分离的方法大体上分为两类。一类为免疫复合物法(或称免疫标记法),通过形成免疫沉淀复合物的方式,TPK 能使结合的 IgG 重链磷酸化,从而分离和鉴定 TPK。最初就是采用这种方法来鉴定存在于不同组织细胞中的 TPK 或某些具有类似于某种 TPK 作用的磷酸化蛋白质。但该法用于研究正常细胞中的 TPK 和测定 TPK 类物质的催化活性则受到某些限制。另一类化学法是通过凝胶过滤、吸附、聚丙烯酰胺凝胶电泳,亲和层析等手段来研究正常细胞中存在的 TPK 类物质,并以一些肽类物质为底物在体外测定 TPK 的催化活性。

Hunter 等^[4]首先用免疫复合物法分离 Rous 肉瘤病毒(RSV)的 src 基因在鸡细胞中的转化产物 PP60^{src},并测定了其对蛋白质中氨基酸的磷酸化作用。实验表明,经水解免疫复合物后得到的 IgG 的重链,分析其氨基酸组成,发现具有放射活性的磷酸氨基酸中 95% 以上是 Phos-Tyr,从而推断 PP60^{src}是具有 TPK 活性的蛋白激酶。这也就是最初通过检测 Phos-Tyr 而确定 TPK 的方法。

Astrid^[5]用以 RSV 诱导的肿瘤细胞免疫家兔得到的血清(TBR 血清)分离、鉴定了存在于人血清和血细胞中的 PP60^{src} 激酶。实验表明,免疫沉淀复合物经标记后,掺入到 IgG 重链中的放射活性的强弱取决于抗血清的量并与抗原物质(即血清及血细胞中的 PP60^{src} 激酶)呈线性关系。这种检测方法即所谓固相法测定蛋白激酶活性。

Wang 等^[6]首先用化学法分离、纯化了存在于大鼠肝脏亚细胞结构中的一种分子量为 75kD 的 TPK,并以血管紧张素 II 为底物测定了其催化活性。Anna^[7]和 Ferguson^[8]也用化学法分别从大鼠脾脏和 Abelson 鼠的 v-abl 基因在大肠杆菌的表达产物中分离了几种 TPK。其分离的手段与 Wang 氏的方法相似,所不同的是 Anna 是用人工合成的肽类底物 Ala-Glu-Tyr-Ala-Ala-Arg-Arg-Arg-Gly (简称

D₁₀G₁)来测定 TPK 的催化活性。Ferguson 则以酪蛋白为底物测定 TPK 的催化活性。Schmitz^[9]则采用化学法与免疫复合物法相结合的方式分离猫肉瘤病毒 fes 基因转化的磷酸化蛋白质 PP85^{gag-fes},同样得到了比较满意的效果。

近来,Wang 等^[10]将牛脾脏经匀浆,离心后取上清液通过 DEAE-Sephrose 柱层析;聚氨基酸(poly amino acid)亲和层析;羟基磷灰石柱层析和 Sepharose S-200 分子筛层析纯化了一种 TPK,仍以血管紧张素 II 为底物测定该 TPK 的催化活性,发现经纯化后的 TPK 活性增加了近 3000 倍。

三、TPK 的基本特性

TPK 类具有许多共同的特性,当用人工合成的肽类底物与其作用时,发现它们对 Tyr 有很强的选择性磷酸化作用,而对 Ser、Thr 和羟脯氨酸(Hyp)则无作用^[11]。许多 TPK 在催化肽或蛋白类底物磷酸化时,一般需要 Mn²⁺作为辅助因子,主要因为 Mn²⁺能抑制磷酸酯酶。PP60^{src}等也可选择 Co²⁺、Zn²⁺、Ca²⁺等^[12]。ATP 是 TPK 的主要核苷酸辅助因子。有人推测,除了 TPK 外,细胞内还存在丝氨酸蛋白激酶,而所有的 TPK 均可被至少一种丝氨酸蛋白激酶所修饰,TPK 上 Ser 残基的磷酸化对 TPK 的活性起正或负的调节作用^[3],除生长因子外,TPK 与钙调蛋白(Calmodulin)有密切关系。钙调蛋白能促进大鼠脑细胞膜中蛋白质 Tyr 残基的磷酸化作用^[13],而钙调蛋白本身也可被两种 TPK 即 PP60^{src}和胰岛素受体激酶磷酸化,而依赖钙调蛋白的磷酸酯酶(Calcineurin)则能催化 Phos-Tyr 蛋白质的脱磷酸化,因此认为,钙调蛋白调节系统能修饰 TPK 的某些作用。

多数 TPK 分布在细胞浆中,有些则分布在细胞膜、原生质膜或细胞骨架上。有一些 TPK 是内膜蛋白,还有一些是可溶性的^[14]。TPK 所分布的这些亚细胞部位,对不同的 TPK 与对应的底物作用起着支配作用。

目前对 TPK 与天然底物作用的动力学研究做得较少,但已清楚 TPK 烯醇化酶作用的 K_m 值为 1mmol/L 。EGF 受体 TPK 的两种底物的 K_m 值均为 100mmol/L ^[15],其中一个底物为黄体酮受体,另一个是从胎盘中分离得到的分子量为 94kD 的蛋白质。

已知 TPK 的抑制剂如 ATP 类似物氟代硫酸苯甲酰-5'-腺嘌呤核苷 (FSBA),由于它能共价修饰 TPK 上的 ATP 结合位点,所以是一个不可逆抑制剂^[16]。一些卤代甲基酮类包括甲苯磺酰-赖氨酸氯甲基酮 (TLCK) 也是一个不可逆但非专一性的抑制剂。栲皮酮、利尿药氨氯吡咪 (Amiloride) 和有规则的四肽聚合物 Tyr-Glu-Ala-Gly 都是许多 TPK 的抑制剂,调节剂分子 2(5'-腺苷)寡核苷酸 (AP4A) 是 PP60^{src} 的一个强有力的抑制剂。人工合成的肽类物质如二肽 Tyr-Arg 是 EGF 受体激酶的抑制剂^[17]。而异黄酮对 EGF 受体激酶和 PP60^{src} 均有抑制作用^[18]。

TPK 与细胞正常发育、分化和恶性转化的关系。RSV 的转化基因产物 PP60^{src} 是一个与病毒癌基因有关的 TPK 的代表。PP60^{src} 由 526 个氨基酸组成,是一个分子量为 60kD 的蛋白质。TPK 首先存在于 PP60^{src} 本身(自我磷酸化)^[4],而 PP60^{src} 也能使一些外源性蛋白质底物仅在 Tyr 残基上磷酸化。此后发现在已知十八个逆转录病毒的癌基因中就有七个具有 TPK 活性,其相应细胞原癌基因也具有 TPK 活性。Habib 等^[19]证实,许多病毒中的 TPK 能导致原癌基因的转变,某些能插入到病毒癌基因组中的原癌基因,其产物分子大小和化学性质与某些 TPK 类似,并具有 TPK 活性。实验表明,与十八个逆转录病毒癌基因转化产物相应的细胞原癌基因产物是细胞中某些和生长、增殖及分化相关的蛋白质。Dioniso 等^[21]还发现,在人的结肠癌基因中有一段互补 DNA 片段是由一种 TPK 的基因序列和原肌球蛋白的基因序列融合而形成的。

真核细胞中的 EGF、PDGF 和 IGF-1 等生长因子受体与 TPK 活性有关或本身就具有

TPK 活性^[22]。最初在 A431 细胞膜上检测到 EGF 能使 TPK 酶活性增加 2—4 倍,而经过对 EGF 受体的 cDNA 的克隆后发现,它的部分碱基顺序与其他 TPK 的催化活性部位的基因具有同源序列。胰岛素和胰岛素受体结合后能激活 TPK。近来的研究表明,胰岛素受体的 β 亚基本身就是一个 TPK。胰岛素受体 TPK 活性的增加与胰岛素的作用有密切的关系^[23]。但并不是所有的生长因子受体都具有 TPK 活性,白细胞介素 (IL-2) 和神经生长因子受体不具有 TPK 活性。还有许多生长因子受体是否具有 TPK 活性有待于进一步研究。

PP60^{src} 和 P68^{gag-ros} 两种 TPK 还可促进甘油、磷脂酰肌醇和 4-磷酸化磷脂酰肌醇等脂类的磷酸化作用^[24],特别是 TPK 对 4-磷酸化磷脂酰肌醇的作用能产生甘油二酯和甘油三酯,该两种物质分别能激活 C-激酶和动员细胞内 Ca^{2+} 贮存,故推测 TPK 对脂类的磷酸化作用在脂类的更新及调节体内生理反应、生长控制及病毒癌基因转化等过程中起着重要作用。

人们对 TPK 的研究虽然还不到十年的时间,但研究发展的速度却是非常快的。目前许多研究人员正致力于克隆化 TPK 的基因,这将有助于扩大分析和研究 TPK 的催化和调节作用机理的范围,并对 TPK 是否是调节癌细胞增殖的调节蛋白,癌细胞中具有 TPK 活性的物质增加,是否与癌细胞失控及形态变化有关及 TPK 对 Tyr 的磷酸化作用是否在细胞生理学上起着核心作用等问题提供满意的答案。

参 考 文 献

- [1] Eckhart, W. et al.: *Cell.*, 1979, 18, 925.
- [2] Bishop, J. M. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, 52, 301.
- [3] Hunter, T. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, 54, 897.
- [4] Hunter, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 1311.
- [5] Astrid, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 135(2), 426.
- [6] Wang, T. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 2529.
- [7] Anna, M. B. et al.: *FEBS Letters.*, 1985, 188(2), 321.

(下转第 358 页)

高温(室温)时,在铽(III)[或铕(III)]离子激发态寿命期间,生物大分子经过了许多构象亚态变化,尽管该离子所处的环境是不均匀的,但由于晶体场的时间有效平均,所测出的铽(III)[或铕(III)]荧光寿命只有一个值。在低温(如液氮温度)时,由于生物大分子已被冻结,结合在不同构象生物大分子上的铽(III)[或铕(III)]处于不同的晶体场,这时构象弛豫时间大于铽(III)[或铕(III)]的荧光寿命,所测出的铽(III)[或铕(III)]荧光发射寿命与生物大分子的构象分布一样呈几率分布。Austin等^[20]使用铽(III)为探针研究了钙调蛋白的构象动力学。

六、结 束 语

稀土荧光探针技术是研究溶液中生物大分子的一种强有力的手段,尤其是作为钙(II)等离子的替换物可获得许多有关生物大分子中钙(II)结合部位的信息。Eisinger^[1]曾经在能量转移已成为科学的五十周年就预言,这一技术“可能会重新引起人们对能量转移的应用发生兴趣。假若能证明这种方法确实是有用的话,那么能量转移将会提供一种实验技术,补偿X-射线只能对晶体研究之不足,从而扩大到可对溶液中生物大分子进行研究”。由近年来的研

究结果可看出,对一些距离的测定结果与X-射线衍射结果相吻合。

参 考 文 献

- [1] 程极济:《蛋白质及核酸的激发态与能量转移译文集》,第一版,科学出版社,北京,1981,79—103页。
- [2] 张若桦:《稀土元素化学》,第一版,天津科学技术出版社,天津,1987,45—52页;191—201页。
- [3] Brittain, H. G. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98, 8255.
- [4] Mulqueen, P. et al.: *Biochemistry*, 1985, 24, 6639.
- [5] Horrocks, W. D. Jr. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2856.
- [6] De Jersey, J. et al.: *Arch. Biochim. Biophys.*, 1980, 205, 536.
- [7] Cannada, R. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 887, 29.
- [8] Gafni, A. et al.: *Biochemistry*, 1974, 13, 800.
- [9] Horrock, W. D. Jr. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 334.
- [10] Dale, R. E. et al.: *Biophys. J.*, 1979, 26, 161.
- [11] Horrock, W. D. Jr. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 100, 111.
- [12] Horrock, W. D. Jr. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 4764.
- [13] Epstein, M. et al.: *Biochemistry*, 1974, 13, 1777.
- [14] Breen, P. T. et al.: *Biochemistry*, 1985, 24, 4991.
- [15] Ronjat, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(7), 3146.
- [16] Wensel, T. G. et al.: *Biochemistry*, 1985, 24, 3060.
- [17] Mani, R. S. et al.: *Biochem. J.*, 1987, 244, 559.
- [18] O'Neil, J. D. et al.: *Biochem. J.*, 1987, 243, 611.
- [19] Chiba, K. et al.: *Biochemistry*, 1987, 26, 711.
- [20] Austin, R. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 1541.

[本文于1988年3月29日收到]

(上接第353页)

- [8] Ferguson, B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 3652.
- [9] Schmitz, M. et al.: *Virology*, 1986, 148, 23.
- [10] Wang, T. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 2597.
- [11] Hunter, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 4843.
- [12] Wang, T. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 8505.
- [13] Dennis, F. M. et al.: *FEBS Letters*, 1985, 190, 11.
- [14] Young, J. C. et al.: *J. Virol.*, 1984, 52, 913.
- [15] Ghosh, D. P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 1654.
- [16] Kamps, M. P. et al.: *Nature*, 1984, 310, 589.
- [17] Braun, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 2504.

- [18] Tetsu, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 5592.
- [19] Habib, M. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 2804.
- [20] 陈燕:《生物化学与生物物理进展》,1987,(5),17.
- [21] Dionisio, M. Z. et al.: *Nature*, 1986, 319, 743.
- [22] Ranachandran, J. et al.: *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1987, 8(1), 28.
- [23] Kasuga, M. et al.: *Jikkoku. Igaku*, 1986, 4(9), 785.
- [24] Sngimoto, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 2117.

[本文于1988年4月1日收到]