

果糖-2, 6-二磷酸和它的生物学作用

张 楚 富

(武汉大学生物系)

一、前 言

果糖-2, 6-二磷酸(Fru-2, 6-P₂)对许多人来说, 还是一个很生疏的物质。它的发现、分离、鉴定及其生物学研究只不过是近五、六年的事情^[1]。果糖-1, 6-二磷酸 (Fru-1, 6-P₂) 则是

大家所熟悉的, 它是糖酵解过程中的一种中间场, 也是磷酸果糖激酶(PFK)的产物。而 Fru-2, 6-P₂ 却不是 PFK 的产物, 而是该酶的一种最有效的激活剂, 在哺乳动物的糖酵解和糖异生过程中起很重要的调节作用^[1,2]。

rova 等^[6]通过把原生质体处于高强度的电场脉冲把苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的 pUB 110 质粒 (抗卡那霉素) 转化为枯草杆菌 (*B. cereus*), 转化率近似增加一个数量级, 枯草杆菌转化体是稳定的而且 pUB 110 能够在染色体外保留下来。Neumann 等利用电场把疱疹胸腺激酶 (TK) 基因转移到缺 TK 的老鼠 L 细胞。TK 基因被携带到重组的质粒 pAGO 上, 这时线型质粒和环型质粒被应用而且线型质粒在产生 TK-显性 L 细胞方面更为有效。作者指出, 电场诱导基因转移的最适条件将会随着细胞的大小和类型的改变而改变。因此, 具体对于每一种情况来说都应该作出新的测定。Potter 等证明了人的免疫球蛋白 (Ig) 基因的组织特异性表达。这些学者采用电场把小鼠-B 淋巴细胞和小鼠成纤维细胞与人的 Ig 基因转染 (transfection)。结果人的 Ig 基因被小鼠-B 淋巴细胞复制而小鼠成纤维细胞却不能。

外, Zimmermann 细胞融合系统还具有其它方法所没有的调控和再生性优点, 电融合方法在生物学研究中的应用将展示出广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Zimmermann, U.: *Biochem. Biophys. Acta*, 694, 227, 1982.
- [2] Kao, K. N. et al.: *Planta*, 115, 335, 1974.
- [3] Toister, Z. et al.: *Bio. Chem.*, 248, 422, 1973.
- [4] Zimmermann, U. et al.: *J. Membrane Biology*, 67, 165, 1982.
- [5] Kuta, A. E. et al.: *American Biotechnology Laboratory*, May/June, 31, 1985.
- [6] Teissie, J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 775, 446, 1984.
- [7] Zimmermann, U. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 641, 160, 1981.
- [8] Shivarova, N. et al.: *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 11, 181, 1983.
- [9] Schnettler, R. et al.: *FEMS Microbiology Letters*, in press.
- [10] Zachrisson, A., et al.: *Physiol. Plant*, 61, 314, 1984.
- [11] Bates, G. W. et al.: *Plant Physiol.*, 72, 1110, 1983.
- [12] Finaz, C. et al.: *Exp. Cell Res.*, 150, 477, 1984.
- [13] Podesta, E. J. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 145(2), 329, 1984.
- [14] Kohler, G. et al.: *Nature*, 256, 495, 1975.
- [15] Lo, M. S. et al.: *Nature*, 310, 792, 1984.
- [16] Shivarova, N. et al.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, 23, 595, 1983.

结 语

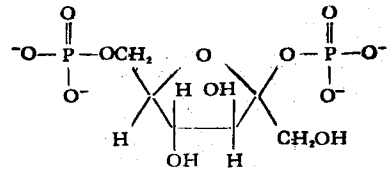
细胞电融合方法为细胞的融合、转染和大分子的摄入 (uptake) 提供了一种有效的方法。使用这一方法除了不需要加入外源化学试剂之

[本文于 1985 年 11 月 19 日收到]

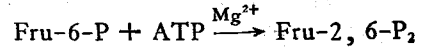
二、果糖-2, 6-二磷酸的发现

PFK 是糖酵解途径中最关键的一种别构调节酶。对 PFK 的调节动力学研究证实, ATP、柠檬酸以及磷酸丙糖等是该酶的抑制剂, 而果糖-6-磷酸 (Fru-6-P) 和 AMP 则是该酶的重要激活剂。但是, 在近乎体内生理条件下(包括 pH、盐浓度和 3 mM 的 ATP), 测得纯化的 PFK 对 Fru-6-P 的 K_m 是 6mM^[3,4]。Fru-6-P 的生理浓度则大大低于这个数值(约为 30—140 μ M)。这样高的 K_m 值表明, PFK 在体内应是无活性的。可是, 在肝脏中, 酵解作用至少以 0.6—0.9 μ mol/分/克肝的速度进行。表明在肝脏中, 20—50% 的 PFK 一定是活泼的。

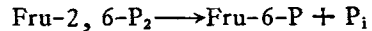
通过激素对糖酵解影响的研究发现, 胰高血糖素在 PFK 的反应步骤上抑制酵解作用。Kagimoto 和 Uyeda 认为胰高血糖素能通过依赖于环腺苷酸 (cAMP) 的蛋白激酶使 PFK 磷酸化。PFK 磷酸化便降低了对底物 Fru-6-P 的亲合力, 并加强了 ATP 对该酶的抑制作用。后来证实磷酸化的 PFK 在部分纯化之后, 对 ATP 的抑制作用更加敏感。通过 ATP 对不同纯化程度的 PFK 的抑制作用的变化, 发现 ATP 的抑制作用随 PFK 的纯度增高而加强^[5]。这些研究结果表明, 有某种激活因子可能同 PFK 结合在一起, 降低 ATP 对它的抑制, 而这种因子在纯化过程中被除去。为了研究这种可能存在的激活因子, 从鼠肝中提取出 PFK 的粗制品, 然后用凝胶柱层析进行纯化。纯化后的 PFK 比粗制品对 ATP 的抑制作用更加敏感。但把凝胶柱层析 PFK 峰之后的组分洗脱下来加回到纯化的 PFK 中, 则可观察到 PFK 的激活, 并且它的 ATP 抑制曲线与凝胶过滤之前相同。这些结果进一步证明确有某种与 PFK 结合的激活因子, 它能解除 ATP 对 PFK 的抑制^[9]。这种激活因子在其他几个实验室中也被发现了^[6,7]。PFK 的这个激活因子很快就被分离、鉴定出来, 它被叫做 β -D-果糖-2, 6-二磷酸, 其结构式是:



有人观察到鼠肝抽提物或部分纯化的制品能使 Fru-6-P 和 ATP 合成 Fru-2, 6-P₂。后来分离出了能催化这一反应的酶, 该酶称为果糖-6-磷酸-2-激酶 (PFK2)^[8,9]。



1982 年他们又从鼠肝分离出了果糖-2, 6-二磷酸酶 (FBPase2), 它能催化 Fru-2, 6-P₂ 降解^[10,11]。



后来报道 PFK2 和 FBPase2 是具有两种酶活性的同一种酶蛋白, 即这种蛋白质是一种双功能酶, 它具有催化 Fru-2, 6-P₂ 合成与降解的能力^[12]。

三、果糖-2, 6-二磷酸合成与降解的调节

Fru-2, 6-P₂ 在鼠的肝脏、骨骼肌、心肌以及脑等组织中的浓度是在微克分子范围内。在喂饲很好的大鼠肝脏中, 它的浓度在 10—20 μ M 之间变化。而在长时间饥饿和糖尿病的情况下, 其浓度会降得很低。Fru-2, 6-P₂ 的浓度取决于: ① Fru-6-P 和 ATP 的浓度; ② PFK2 和 FBPase2 的活性; ③ PFK2 和 FBPase2 的效应物的浓度^[13]。

当分离的肝细胞与葡萄糖一起温育时, 能增高 Fru-2, 6-P₂ 的浓度^[7,14,15]。因为加入葡萄糖后可以增高 Fru-6-P 的浓度。PFK2 对 Fru-6-P 的 K_m 大约是 25 μ M^[16], 肝脏中该物质的水平大约在 20—100 μ M 之间变化, 而 Fru-6-P 则是 FBPase2 的有效抑制剂^[11]。因此, 有理由认为 PFK2 的活性随 Fru-6-P 浓度的变化而改变。但是, 业已报道, 在体内葡萄糖既不增高己糖-6-磷酸的浓度, 亦不改变 PFK2 活性状态的比例, 3-磷酸甘油酸和磷酸烯醇式丙酮酸(它们是 PFK2 的抑制剂)在给与葡萄糖后, 其浓度增高了。因此, 只能推测在给体内注射

葡萄糖后, Fru-2, 6-P₂ 浓度增高的原因,或是由于 FBPase2 的活性变化,或是由于迄今未知的 PFK2 和 FBPase2 的效应物浓度的变化^[17]。

Fru-2, 6-P₂ 的浓度也受激素的调节。胰高血糖素可以减少肝脏 Fru-2, 6-P₂ 的浓度。Fru-2, 6-P₂ 水平的降低是由于 PFK2 和 FBPase2 被磷酸化的结果。前者磷酸化后失去活性, 后者磷酸化则被激活。这两种酶的磷酸化是激素刺激依赖于 cAMP 的蛋白激酶或磷酸化酶作用的结果^[2]。

生理浓度下的 Pi 和 AMP 能增高 PFK2 催化反应的速度。Pi 的主要作用是降低 PFK2 对 Fru-6-P 的 K_m^[9] (从 0.4mM 降到 0.05mM)。

由于 Fru-6-P 在肝脏中的浓度刚好在这个范围内,从而可以想象 Pi 在 Fru-2, 6-P₂ 的合成中起调节作用。但是, Pi 并不影响 FBPase2 对 ATP 的 K_m^[19], FBPase2 的活性可被三磷酸核苷酸、磷酸甘油以及磷酸二羟丙酮促进^[11]。柠檬酸和磷酸烯醇式丙酮酸能作为非竞争性抑制剂抑制 PFK2 的活性。此外,亦有 Fru-2, 6-P₂ 本身能抑制 PFK2 活性的报道。

综上所述, Fru-2, 6-P₂ 的浓度受到多种因素的调节,但最终受到 PFK2 和 FBPase2 这两种酶活性的控制。因此,在 Fru-6-P 和 Fru-2, 6-P₂ 之间出现了一个类似葡萄糖与葡萄糖-6-磷酸、Fru-6-P 和 Fru-1, 6-P₂、丙酮酸与

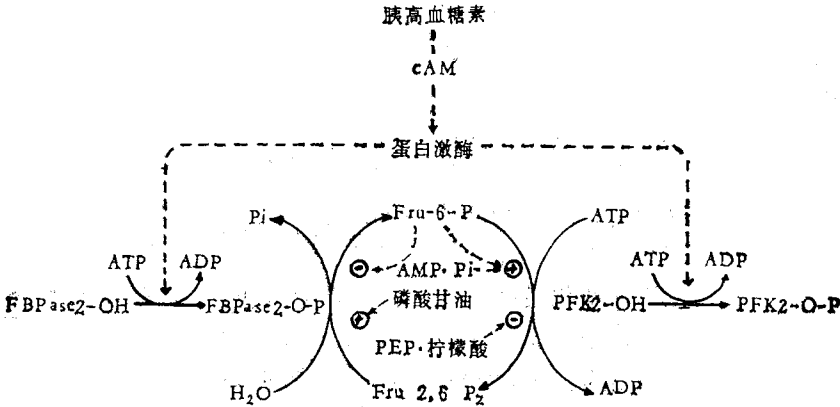


图 1 果糖-2, 6-二磷酸合成与降解^[11]

磷酸烯醇式丙酮酸之间的循环 (图 1)。

四、果糖-2, 6-二磷酸的生物学作用

在糖酵解途径中,有三种酶的催化反应被认为是不可逆的。第一种是葡萄糖激酶,它催化葡萄糖的磷酸化反应,生成葡萄糖-6-磷酸。后者必须经过葡萄糖-6-磷酸酶催化才能重新转变成葡萄糖。第二种是 PFK,该酶催化果糖-6-磷酸进一步磷酸化,生成 Fru-1, 6-P₂。但其逆反应是果糖-1, 6-二磷酸酶催化的。第三种是丙酮酸激酶,它催化磷酸烯醇式丙酮酸转变成丙酮酸,并伴随着 ATP 的生成。其逆反应是由丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶催化的。

在这三种不可逆反应中, PFK 是酵解途径

中最关键的酶。PFK 是一种典型的多因素调节酶。它的活性受它的底物 Fru-6-P 和 ATP 以及它的产物 Fru-1, 6-P₂ 和其他多种效应物的调节。实验证明, Fru-2, 6-P₂ 是 PFK 的最重

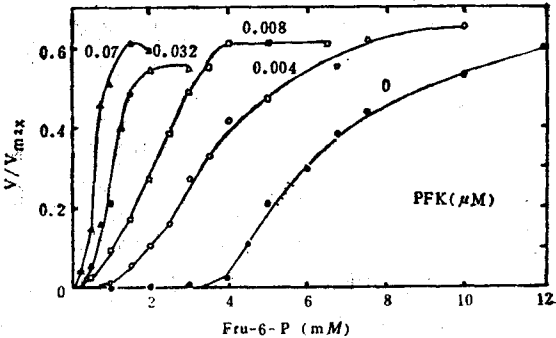
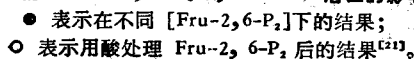
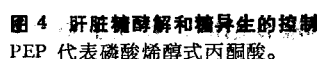


图 2 Fru-2, 6-P₂ 对肝脏 PFK 活性的影响^[4]
曲线中的数字表示不同浓度的 Fru-2, 6-P₂

更有意义的是, Fru-2, 6-P₂ 能使 PFK 对 AMP 的 K_m 大大降低, 0.016 mM Fru-2, 6-P₂ 就能使肝脏 PFK 对 AMP 的 K_m 降低 15 倍以上。这清楚地说明 Fru-2, 6-P₂ 和 AMP 能协同激活肝脏 PFK。在接近 ATP 生理的浓度下 (3mM), 处于生理浓度的 Fru-2, 6-P₂ 和 AMP 两者合并起来能把 PFK 对 Fru-6-P 的 K_m 值减小到比该底物 (Fru-6-P) 的生理浓度更低的水平 (0.01—0.1mM)^[4]。因此, 这两种激活剂的协同作用可以作为解释 PFK 在体内有较高活性的原因。



也是果糖-1, 6-二磷酸酶(FBPase)的竞争性抑制剂。随着 Fru-2, 6-P₂ 水平的升高而抑制作用加强^[21], 但抑制作用是不完全的。只要 Fru-2, 6-P₂ 的浓度达到 1 μM, 即可造成对 FBPase 活性最大的半抑制作用(图 3)。而且 Fru-2, 6-P₂ 同 AMP 协同作用增强对 FBPase 的抑制^[21]。由于 PFK 和 FBPase 催化 Fru-1, 6-P₂ 的合成与降解, 控制着 Fru-6-P/Fru-1, 6-P₂ 的循环, 因此, Fru-2, 6-P₂ 通过控制 PFK 和 FBPase 的活性, 对糖酵解和糖异生起着十分重要的调节作用^[22](图 4)。



• 37 •

活性的作用。因此,FBPase 比 PFK 活性高^[17],其结果有利于糖异生或出现无效循环。

与糖代谢关系密切的胰高血糖素和肾上腺素等激素对糖代谢的调节也与 Fru-2, 6-P₂ 有密切关系。这些激素对糖代谢的影响一般认为都是通过依赖于 cAMP 的蛋白激酶的作用和调节酶的磷酸化来调节的^[22]。

众所周知,胰高血糖素或肾上腺素能促进肝糖元的降解。但糖元的降解总伴随着己糖-6-磷酸水平的升高,并引起葡萄糖-6-磷酸水解速度相应地提高。由于 Fru-6-P 具有激活 PFK 的性质,并具有形成 Fru-2, 6-P₂ 的能力,所以可以预期,继糖元分解之后,会增高酵解的速度^[16]。但是,与此相反,胰高血糖素却具有抑制酵解的作用。这种抑制作用是双重的^[2]。一方面胰高血糖素刺激 PFK 磷酸化。磷酸化的 PFK 对果糖-2, 6-二磷酸的亲和力降低。另一方面,胰高血糖素降低了 Fru-2, 6-P₂ 的水平。这种降低是通过 PFK2 的磷酸化而失活和 FBPase2 的磷酸化而激活实现的^[2,10,16,18]。况且,业已证明 PFK2 和 FBPase2 是具有两种不同活性的同一种酶蛋白^[12,23],那么这种共价修饰对于糖代谢的调节就具有更重要的意义。胰高血糖素的这些综合影响,导致了对 PFK 的强烈抑制^[2],从而有利于葡萄糖-6-磷酸水解转变成葡萄糖。同样地,当饥饿时或急需葡萄糖时,胰高血糖素刺激肝脏糖的异生。激素通过依赖于 cAMP 的蛋白激酶的作用,使糖元的降解和酵解以及糖异生等作用协调进行,从而维持血糖的相对稳定。

Fru-2, 6-P₂ 除在肝脏中存在外,在其他许多组织中也存在。Fru-2, 6-P₂ 在不同组织中所起的作用不同,而且组织中的 PFK 的含量或所预期的酵解活性同它们的 Fru-2, 6-P₂ 的含量之间并不存在对应关系。例如,在骨骼肌中,PFK 和酵解活性都比心肌高,但它的 Fru-2, 6-P₂ 的水平却比心肌低几倍^[2]。

在酵母和植物组织中亦发现了 Fru-2, 6-P₂ 的存在^[1,24]。Fru-2, 6-P₂ 在这些生物中所起的作用也因不同生物而异。

五、结 语

Fru-2, 6-P₂ 象 cAMP 一样,都是调节分子,在许多细胞类型中都有发现。所不同的是,cAMP 被视为一种“饥饿信号”,意味着葡萄糖缺乏;而 Fru-2, 6-P₂ 则是在葡萄糖很丰富的情况下形成的,它的出现表示葡萄糖很充足和能自由地利用,并阻止糖异生。所以两者在糖代谢中的作用是相拮抗的。Fru-2, 6-P₂ 作为一种整合剂起作用,它集合了来自激素以及 Fru-6-P/Fru-1, 6-P₂ 相互转化的代谢起因的信息。相反,cAMP 扩大了对糖元合成和降解、Fru-2, 6-P₂ 以及丙酮酸激酶等三个作用点的激素信息^[22]。

果糖-2, 6-二磷酸作为一种调节分子,是在一个很复杂的系统中起作用,所以决不能孤立地讨论它对代谢途径的调节作用。

本文承蒙朱汝璿教授审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Hers, H. G. et al.: *Biochem. J.*, 206, 1—12, 1982.
- [2] Uyeda, K. et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, 48, 97—120, 1982.
- [3] Reinhart, G. D. et al.: *Biochemistry*, 19, 1477—1484, 1980.
- [4] Uyeda, K. et al.: *J. Biol. Chem.* 256, 8394—8399, 1981.
- [5] Furuya, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5861—5864, 1980.
- [6] Claus, T. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6501—6505, 1980.
- [7] Van Schaftingen, E. et al.: *Biochem. J.*, 192, 887—895, 1980.
- [8] Van Schaftingen, E. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 1078—1084, 1981.
- [9] Furuya, E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 7109—7112, 1981.
- [10] Furuya, E. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105, 264—270, 1982.
- [11] Van Schaftingen, E. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 124, 143—149, 1982.
- [12] El-Maghrabi, M. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 7603—7607, 1982.
- [13] Hue, L.: *Biochem. J.*, 206, 359—365, 1982.
- [14] Hue, L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 8900—8903, 1981.
- [15] Richards, C. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97, 1535—1540, 1980.
- [16] Furuya, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79,

(下转第 18 页)

动^[9], 激发波长 585 nm, 测量 445 nm 的吸收变化, 没有观察到各向异性衰减, 表明细胞色素氧化酶在膜中不可能存在旋转运动, 或血红素 a_3 的排列是平行于膜的平面。后来 Erecinska 等人证实血红素 a_3 平面与膜的平面垂直, 所以唯一可能是细胞色素氧化酶在膜中不能运动。重组于脂质囊泡中的细胞色素氧化酶的旋转扩散运动测量结果与菌紫质分子的结果十分相似。 r_{∞}/r_0 的实验结果为 0.28 ± 0.02 , 与理论值 (0.25) 十分符合。在脂质与蛋白高比例的情况下, 重组系统中的细胞色素氧化酶分子在 2 毫秒时间范围内作自由旋转扩散运动。当脂质与蛋白的比例下降时, 观察到细胞色素氧化酶的凝聚作用, 旋转扩散运动减慢及多种不同大小的凝聚体的产生, 旋转扩散运动存在不同扩散时间常数。

六、一些其它膜蛋白质的旋转扩散运动的测量

蛋白质分子在膜中的旋转扩散运动的首次测量是 Cone 在分离盘膜视杆外段中的视紫红质分子上进行的, 偏振光激发生色团视黄醛后立即测量平行和垂直于偏振激发方向上的吸收变化, 通过计算得到了弛豫时间为 20 微秒, 测量温度为 20°C ^[10]。

LO 等人用标记的方法测量了电鳐 (Torpedo) 电器官膜乙酰胆碱受体的旋转扩散运动, 通过磷光去偏振测量, 证明膜中蛋白与蛋白分子之间有强烈作用, 受体蛋白在膜中不能进行旋转扩散运动^[11]。

辅酶 A 结合到 Friend 细胞上, 用四溴荧光素标记, 再进行磷光发射的各向异性衰减的测量, 测量范围从 1 微秒到 4 毫秒, 观察到了快

速的旋转扩散运动。

Wagner 等人用四溴荧光素标记耦合因子 CF_1 , 再重组到没有 CF_1 的叶绿体上, 进行瞬间二向色性的测量, 照射并加入 ADP 与无机磷时, CF_1 的旋转扩散运动就增加^[12]。

Stranbini 等人测量了水溶性蛋白白色氨酸残基的磷光去偏振, 并可应用到重组系统的选择膜蛋白的旋转扩散运动测量中^[13]。

如果能够把三重态探针的旋转扩散运动测量与时间分辨的荧光去偏振结合起来^[14], 就可测量从微微秒到毫秒范围里的旋转扩散运动, 从中可得到给定系统中各种不同运动的综合图形。

参 考 文 献

- [1] Frye, L. D. and Edidin, M.: *J. cell. Sci.*, 7, 319, 1970.
- [2] Cherry, R. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 559, 289, 1979.
- [3] Cherry, R. J., et al.: *J. Mol. Biol.*, 121, 283, 1978.
- [4] Cherry, R. J., et al.: *FEBS Letters*, 80, 465, 1977.
- [5] Hu kun-sheng, et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 816, 358, 1985.
- [6] Nigg, E. A., and Cherry, R. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4702, 1980.
- [7] Bürkli, A., and Cherry, R. J.: *Biochemistry*, 20, 138, 1981.
- [8] Hoffman, W., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3860, 1979.
- [9] Junge, W., and Devault, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 408, 200, 1975.
- [10] Cone, R. A.: *Nat. New Biol.*, 236, 39, 1972.
- [11] Lo, M. M. S. et al.: *FEBS Letters*, 111, 407, 1980.
- [12] Wagner, T., and Junge, W.: *FEBS Letters*, 114, 327, 1980.
- [13] Strambini, G. B., and Galley, W. C.: *Biopolymers*, 19, 383, 1980.
- [14] Cherry, R. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5899, 1980.

[本文于 1985 年 9 月 18 日收到]

(上接第 38 页)
325—329, 1982.

- [17] Hue, L.: *Biochem. J.*, 224, 779—786, 1984.
- [18] El-Maghrabi, M. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 315—319, 1982.
- [19] LaLoux, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 148, 155—159, 1985.
- [20] Van Schaftingen, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3483—3486, 1981.
- [21] Pilakis, S. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 3619—

3622, 1981.

- [22] Hers, H. G. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 617—653, 1983.
- [23] Pilakis, S. J. et al.: *J. Biol. Chem.* 259, 949—958, 1984.
- [24] Cseke, C. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 9, 533—535, 1984.

[本文于 1985 年 11 月 16 日收到]