

研究工作

胎羊 $3\beta, 20\alpha$ -羟类甾醇氧化还原酶活性位点的 组氨酸残基的鉴定

陈 清 轩 FREDERICK SWEET*

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

提 要

为进一步研究胎羊 $3\beta, 20\alpha$ -羟类甾醇氧化还原酶活性中心的特性, 我们合成了放射性的 16α -溴乙酸基孕酮和 5α -二氢睾酮-17-溴乙酸酯作为亲和标记试剂。二者都是以不可逆的方式, 活性位点定向地竞争性抑制酶的活性。当酶的浓度为 $1\mu\text{mol/L}$, 抑制剂的浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 时, 使酶失去一半活性所需时间 ($t_{0.5}$) 分别为 75 min (16α -BAP) 和 480 min (5α -DTB)。当在反应混合液中有底物孕酮或 5α -二氢睾酮存在时, 可降低抑制剂对酶活性的抑制速度。把标记的酶用盐酸水解, 用氨基酸分析仪进行分析, 最后确定, 位于酶的活性中心的被标记氨基酸为组氨酸, 它可能在氧化还原反应过程中发挥着重要作用。

关键词 $3\beta, 20\alpha$ -羟类甾醇氧化还原酶, 亲和标记, 16α -[2'- ^{14}C] 溴乙酸孕酮, 5α -二氢睾酮 17-[2'- ^{14}C] 溴乙酸酯, 组氨酸

我们于 1987 年从胎羊血中纯化得到 $3\beta, 20\alpha$ -羟类甾醇氧化还原酶 ($3\beta, 20\alpha$ -HSD)^[1], 并对其动力学性质作了初步研究, 证明了该酶以 NADPH 为辅酶, 有两种底物。把孕酮还原成 4-孕甾烯- 20α -羟-3-酮 ($K_m = 30.8\mu\text{mol/L}$), 把 5α -二氢睾酮还原成 5α -雄甾烷- $3\beta, 17\beta$ -二醇 ($K_m = 74.0\mu\text{mol/L}$)。底物的竞争性抑制实验表明 3β 和 20α 还原活性源于同一活性位点。类似的结果以前已有过多次报道^[2-4], 他们都是用底物的类似物作为亲和标记试剂对酶的活性位点进行研究的。我们最近合成的 $3\beta, 20\alpha$ -HSD 的底物类似物 16α -[2'- ^{14}C] 溴乙酸基孕酮 (16α -[2'- ^{14}C]BAP) 和 5α -二氢睾酮 17-[2'- ^{14}C] 溴乙酸酯 (5α -[2'- ^{14}C]DTB) 作为亲和标记试剂, 分别标记 $3\beta, 20\alpha$ -HSD, 通过研究它们对酶活性抑制作用的特点和对标记

氨基酸的鉴定, 以了解酶活性位点的有关性质。

材 料 和 方 法

一、材料

孕酮, 5α -二氢睾酮, 16α -羟孕酮, 购自 Steraloids 公司; [2'- ^{14}C] 溴乙酸 (17 mCi/mmol) 购自 Pathfinder Laboratories; 有机溶剂及试剂购自 Fisher Scientific 公司; 三种羧甲基组氨酸的合成根据 Crestfield 等人的方法^[5]; [4- ^{14}C]-孕酮 (50 mCi/mmol) 和 5α -[4- ^{14}C]-二氢睾酮 (58 mCi/mmol) 购自 New England Nuclear 公司。

二、亲和标记试剂的合成

* Washington University School of Medicine, St. Louis, USA.

(1), 16α -[2'- ^{14}C]BAP 的合成^[6] 把含 3 mg 16α -羟孕酮的 3 ml 二氯甲烷冷却至 0°C , 然后加入 1.0 ml 含有 25.0 mg 溴乙酸和 5 mCi 的 [2- ^{14}C] 溴乙酸; 再加入 1.0 ml 含有 51.5 mg 二环乙基碳二亚胺 (DCC) 的二氯甲烷和 0.01 ml 的无水吡啶。在 0°C 条件下搅拌 1 h, 然后在室温再搅拌 1 h。在反应过程中有晶体形成, 同时以薄层层析监测反应进程。当反应物剩下很少时, 加入乙酸 0.16 mmol, 继续搅拌 20 min, 在氮气流中蒸发有机溶剂, 干后, 加入丙酮 2 ml, 同样在氮气流中蒸干, 直至除去所有的二氯甲烷。最后加入 3 ml 丙酮, 过滤后, 在冰浴上冷却; 再加入 0.5 ml 水, 过滤后, 收集粗产品, 并重结晶纯化。用红外和紫外光

谱对产品进行鉴定。产品的最后收率为 73%, 比放射活性为 22 mCi/mmol。

(2) 5α -[2'- ^{14}C]DTB 的合成方法基本同上。 5α -二氢睾酮和溴乙酸或 [2- ^{14}C] 溴乙酸在含有二环乙基碳二亚胺的二氯甲烷中反应生成 5α -[2'- ^{14}C]DTB。最后收率为 60%, 比放射活性为 16 mCi/mmol。

合成以上两种亲和标记试剂的化学反应式见图 1。

三、酶的制备和活性测定

参照 Chen 的方法^[1], 经高效液相层析 (FPLC) 纯化的酶经浓缩后分装在小试管中, 贮于 -20°C 冰箱备用。酶的比活为 9.6 U/mg。

蛋白质的测定参照 Lowry 等人的方法^[7]。

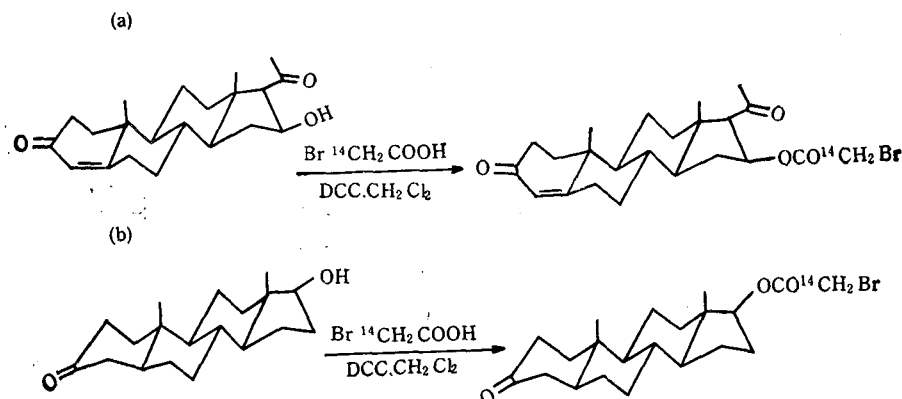


图 1 16α -[2'- ^{14}C] 溴乙酸基孕酮和 5α -二氢睾酮 17-[2'- ^{14}C] 溴乙酸酯的合成

Fig. 1 Synthesis of 16α -[2'- ^{14}C] BAP and 5α -[2'- ^{14}C] DTB

- (a): 16α -羟孕酮和 [2- ^{14}C] 溴乙酸反应生成 16α -[2'- ^{14}C] 溴乙酸基孕酮 (16α -[2'- ^{14}C] BAP)
 (b): 5α -二氢睾酮和 [2- ^{14}C] 溴乙酸反应生成 5α -二氢睾酮 17-[2'- ^{14}C] 溴乙酸酯 (5α -[2'- ^{14}C] DTB)

DCC: 二环乙基碳化二亚胺

(a) The reaction of 16α -Hydroxyprogesterone with [2- ^{14}C] bromoacetic acid produces 16α -bromo [2'- ^{14}C] acetoxyprogesterone (16α -[2'- ^{14}C]BAP)

(b) The reaction of 5α -dihydrotestosterone with [2- ^{14}C] bromoacetic acid produces 5α -dihydrotestosterone 17-[2'- ^{14}C]bromoacetate (5α -[2'- ^{14}C]DTB)

DCC: dicyclohexylcarbodiimide

四、酶的亲和标记及对酶活性的抑制

用 16α -[2'- ^{14}C]BAP 或用 5α -[2'- ^{14}C]DTB 对酶亲和标记的条件完全相同。酶 1 $\mu\text{mol/L}$, 亲和标记试剂 100 $\mu\text{mol/L}$, 在 0.05 mol/L 的磷酸钾缓冲液中含有 5% 的乙醇, pH7.0, 反应液共 6 ml, 在室温下进行反应; 每隔半小时取出 0.1 ml 反应液测定酶的活性, 直至酶失去 70% 以上的活性, 加入 50 倍的 2-巯基乙醇停

止反应。作同样的实验, 在反应液中加入 30 $\mu\text{mol/L}$ 的孕酮或 5α -二氢睾酮时, 比较对酶活性的抑制反应有什么不同。把标记的酶对浓度为 0.1 mol/L, pH 8.0 的 NH_4HCO_3 缓冲液透析, 更换透析液 3 次以上, 直至透析液的放射活性和本底相同。最后进行冰冻干燥。

五、标记氨基酸的鉴定

把已冰冻干燥的标记样品, 用 3 ml 等沸点

盐酸溶解,转移到专用于消化的试管中,在真空条件下封管,110℃水解24 h,经除酸处理后,用 Beckman Model 118 C 型氨基酸分析仪进行分析,收集洗脱组分,每管 0.4 ml,加入 5 ml 闪烁液,用 Packer Tri-Carb Model 330 计数器进行计数,找出放射性峰,绘制洗脱曲线。

在完全相同的条件下,对含有 1, 3-羧甲基组氨酸 (1,3-CM-His), 1-羧甲基组氨酸 (1-CM-His) 和 3-羧甲基组氨酸 (3-CM-His) 的混和液进行层析,绘制洗脱曲线,作为标准曲线。和标记的酶的水解产物氨基酸分析洗脱曲线相比较,以确定被标记的氨基酸。

结 果

一、对酶活性的抑制实验(图 2)

用 16α -[2'- ^{14}C]BAP 做抑制剂时,使酶失去一半活性所需时间为 $t_{0.5} = 75 \text{ min}$; 以 5α -[2'- ^{14}C]DTB 为抑制剂时, $t_{0.5} = 480 \text{ min}$ 。在

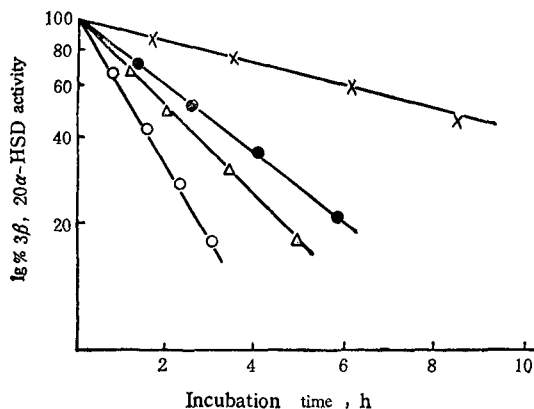


图 2 酶的活性抑制实验

Fig. 2 The inactivation experiment of the enzyme

$3\beta, 20\alpha$ -HSD 和抑制剂 16α -[2'- ^{14}C]BAP(—○—) 或和抑制剂 5α -[2'- ^{14}C]DTB(—×—) 一起保温。在反应液中,当底物孕酮 ($30\mu\text{mol/L}$) 存在时, 16α -[2'- ^{14}C]BAP 的抑制曲线为—●—,底物 5α -二氢睾酮 ($30\mu\text{mol/L}$) 存在时, 16α -[2'- ^{14}C]BAP 的抑制曲线为—△—

Incubation of $3\beta, 20\alpha$ -HSD with inhibitor 16α -[2'- ^{14}C]BAP(—○—) or with inhibitor 5α -[2'- ^{14}C]DTB(—×—). When substrate progesterone ($30\mu\text{mol/L}$) or 5α -dihydrotestosterone ($30\mu\text{mol/L}$) is present in the reactive mixture of $3\beta, 20\alpha$ -HSD and 16α -[2'- ^{14}C]BAP, the tracing provided is —●— or —△— respectively

反应液中,当有底物孕酮 $30\mu\text{mol/L}$ 存在时, 16α -[2'- ^{14}C]BAP 对酶的抑制速度减慢, $t_{0.5}$ 增大到 155 min; 而当 5α -二氢睾酮存在时, 16α -[2'- ^{14}C]BAP 的 $t_{0.5}$ 增大到 115 min。

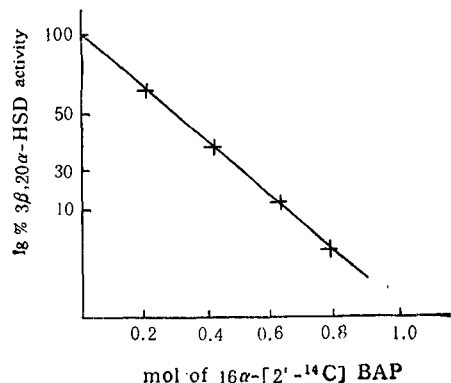


图 3 16α -[2'- ^{14}C]BAP 对胎羊 $3\beta, 20\alpha$ -HSD 活性抑制作用的化学计量学

Fig. 3 Stoichiometry of enzyme inactivation with 16α -[2'- ^{14}C]BAP and fetal lamb $3\beta, 20\alpha$ -HSD

酶活性对结合上的 ^{14}C 放射活性曲线表明: 1 mol 的 16α -[2'- ^{14}C]BAP 完全抑制了 1 mol 的 $3\beta, 20\alpha$ -HSD 的活性

A plot of enzyme activity versus incorporation of ^{14}C radioactivity provided the tracing which showed that 1 mol of 16α -[2'- ^{14}C]BAP completely inactivated 1 mol of $3\beta, 20\alpha$ -HSD

我们也实验了这两种底物分别对 5α -[2'- ^{14}C]DTB 抑制酶活性的影响, 同样发现, 底物降低了对酶活性的抑制速度, 增大了 $t_{0.5}$ 的值。实验结果未在图 2 表示出来。

二、 16α -[2'- ^{14}C]BAP 对胎羊 $3\beta, 20\alpha$ -HSD 活性抑制的化学计量学

在酶的标记实验过程中, 每隔半小时取出 0.1 ml 反应酶, 立即加入过量的 2-巯基乙醇以停止反应, 测定酶的活性; 把测定过活性的样品对水透析三次, 使透析液的放射性计数接近于本底, 然后测定结合在酶上的 ^{14}C 放射性计数。以酶所剩活性百分数的对数对结合在酶分子上的 ^{14}C 的克分子数 (mol) 作图。结果表明 1 mol 的 16α -[2'- ^{14}C]BAP 可完全抑制 1 mol 的 $3\beta, 20\alpha$ -HSD 的活性(见图 3)。

三、被标记氨基酸的鉴定

图4所示,被标记的 3β , 20α -HSD的水解产物的氨基酸层析图谱的放射性活性峰和标准品混合液洗脱曲线的1-羧甲基组氨酸峰相对应,因此被标记的氨基酸为组氨酸。

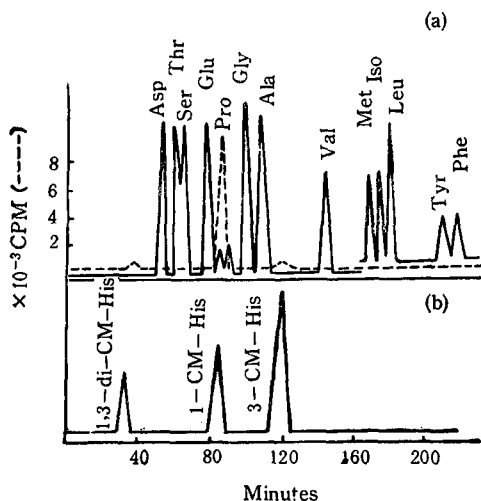


图 4
Fig. 4

(a) 用 16α -[2'- ^{14}C]BAP或 5α -[2'- ^{14}C]DTB抑制活性的 3β , 20α -HSD水解产物的氨基酸分析洗脱图谱
(b) 含有1, 3-羧甲基组氨酸, 1-羧甲基组氨酸和3-羧甲基组氨酸混合物的分析洗脱图谱

(a), Elution patterns from amino acid analysis of hydrolysis products from the inactivation with 16α -[2'- ^{14}C]BAP or 5α -[2'- ^{14}C]DTB of 3β , 20α -HSD

(b), Elution patterns from analysis of a mixture containing 1,3-di-CM-His, 1-CM-His and 3-CM-His

讨 论

尽管 16α -[2'- ^{14}C]BAP和 5α -[2'- ^{14}C]DTB都能抑制酶的活性,但从它们的 $t_{0.5}$ 值可知 16α -[2'- ^{14}C]BAP是更有效的抑制剂;底物孕酮和 5α -二氢睾酮都能减弱抑制剂对酶活性的抑制作用,但孕酮抵制抑制的作用更强。这个实验结果可从底物的 K_m 值得到解释。因为孕酮 K_m 值小于 5α -二氢睾酮的 K_m 值,也就是孕酮对酶的亲和力大于 5α -二氢睾酮,所以孕酮能更有效地降低抑制剂对酶活性的抑制速度。

从以上的实验结果可以得出以下结论:(1)底物和抑制剂竞争的是酶的同一部位,即酶的活性位点;(2)这一活性位点是 3β 和 20α 还原活性所共有的,也就是该酶只能有一个活性中心;(3)抑制剂 16α -[2'- ^{14}C]BAP和 5α -[2'- ^{14}C]DTB与酶共价结合的部位是酶的活性中心;因此被标记的氨基酸位于酶的活性中心;(4)被标记的氨基酸经鉴定为组氨酸。

由于组氨酸分子结构的特殊性,即分子中有一个咪唑基团,所以位于酶活性中心的组氨酸可能对类甾醇的氧化还原反应具有特殊意义。Pons等人认为酶的活性部位和类甾醇结合的位点处仅有一个组氨酸残基存在^[8],他们推测这个组氨酸在反应中要接近类甾醇的A环。有关对2-羟酸脱氢酶晶体学的研究表明,活性位点的转化态是通过组氨酸残基上的咪唑环和结合在底物上的氢所诱导的。对乳酸脱氢酶^[9],甘油醛-3-磷酸脱氢酶^[10]和线粒体的苹果酸脱氢酶^[11]的研究,以及最近对木糖异构酶的研究^[12]都发现酶的活性部位组氨酸的存在。我们的实验结果不仅证实了胎羊 3β , 20α -羟类甾醇氧化还原酶活性部位组氨酸的存在,也支持了关于组氨酸可能直接参与氧化还原反应的设想。

参 考 文 献

- 1 Chen Q *et al.* *Steroids*, 1987; 49: 447
- 2 Sweet F, Samant B R. *Biochemistry*, 1980; 19: 978
- 3 Thomas J L *et al.* *Biochemistry*, 1985; 24: 5367
- 4 Onada M *et al.* *Biochemistry*, 1987; 26: 675
- 5 Crestfield A M *et al.* *J Biol Chem*, 1963; 238: 2413
- 6 Sweet F *et al.* *J Biol Chem*, 1972; 247: 3424
- 7 Lowry O H *et al.* *J Biol Chem*, 1951; 193: 265
- 8 Pons M *et al.* *J Steroid Biochem*, 1977; 8: 345
- 9 Parker D M, Holbrook J J. In: Sund H ed. *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenase*, New York: Springer-Verlag, 1977: 484—501
- 10 Buehner M *et al.* *J Mol Biol* 1974; 90: 25
- 11 Birktoft J J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 6166
- 12 Vangrype W *et al.* *Biochem J*, 1989; 263: 195

[本文于1990年2月6日收到,3月14日修回]

IDENTIFICATION OF HISTIDINE RESIDUE IN THE ACTIVE SITE OF FETAL LAMB 3β , 20α -HYDROXYSTEROID OXIDOREDUCTASE

Chen Qingxuan Frederick Sweet

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080)

ABSTRACT

In order to further characterize the active site of fetal lamb 3β , 20α -Hydroxysteroid Oxidoreductase, we have synthesized the radioactive 16α -bromoacetoxyprogesterone and 5α -dihydrotestosterone 17-bromoacetate as affinity labeling reagents. Both of them are the irreversible, active-site-directed and competitive inhibitors of the enzyme. When the concentration of the enzyme is $1\text{ }\mu\text{mol/L}$, inhibitor is $100\text{ }\mu\text{mol/L}$, the inactivation reaction followed pseudo-first-order kinetics with a $t_{0.5} = 75\text{ min}$ (16α -BAP) and $t_{0.5} = 480\text{ min}$ (5α -DTB). When substrate progesterone or 5α -dihydrotestosterone was present in the incubation mixture, the speed of inactivation of the enzyme was slowed down. The labeled enzyme was hydrolyzed by hydrochloric acid, through amino acid analysis, the labeled histidine was identified. The histidine at active site may play important role in the oxidoreductive reaction.

Key Words 3β , 20α -Hydroxysteroid Oxidoreductase, Affinity Labeling, 16α -(bromo[2'- ^{14}C]acetoxy) progesterone, 5α -dihydrotestosterone 17-[2'- ^{14}C]bromoacetate, Histidine

(上接第 90 页)

从医用水蛭头部的 cDNA 库中筛选水蛭素基因已成功,并在大肠杆菌中得到表达^[15]。Harvey 等人以克隆的 cDNA 为探针,测定了天然水蛭体内的 mRNA 和 DNA 的分布情况。Northern 分析结果表明,水蛭中存在着三种为水蛭素编码的 mRNA,这也可能是一个单一的基因被转录后,在不同组织中经过不同的剪接而产生的。Southern 分析结果显示出水蛭中存在着几种水蛭素基因,当然这并不排除假基因存在的可能性。总之,水蛭素基因是相当复杂的。关于水蛭素基因表达调控的研究,有待于基因组结构的阐明,这也是今后研究的重要方向之一。

参 考 文 献

- 1 Markwardt F. *Methods in enzymology*, 1970; 19: 924
- 2 Dodt J *et al.* *FEBS letter*, 1984; 165: 180
- 3 Markwardt F. *Folia Haematol, Leipzig*, 1988; 115: 10
- 4 Dodt J *et al.* *Biol Chem Hoppe-seyler*, 1985; 366: 379
- 5 Konno S *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1988; 267: 158
- 6 Clore G M *et al.* *EMBO J*, 1987; 6: 529
- 7 Mao S J T *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 8170
- 8 Chang J-Y. *FEBS letter*, 1983; 164: 307
- 9 Dodt J *et al.* *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1987; 368: 1447
- 10 Braun P J *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 6517
- 11 Dodt J *et al.* *FEBS letter*, 1988; 229: 87
- 12 Dodt J *et al.* *FEBS Letter*, 1986; 202: 373
- 13 Fortkamp E *et al.* *DNA*, 1986; 5: 511
- 14 Loison G *et al.* *Bio/Technology*, 1988; 6: 72
- 15 Harvey R P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 1084

[本文于1989年12月31日收到,1990年4月25日修回]。