

细胞内物质转运调节分子 ARFGAP3 的克隆表达及生化活性*

刘晓勤^{1, 2)} 张成岗¹⁾ 邢桂春¹⁾ 陈清棠²⁾ 贺福初¹⁾**

(¹⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850; ²⁾北京医科大学第一医院神经内科, 北京 100034)

摘要 ADP 核糖基化因子-GTP 酶活化蛋白 (ARF GAP) 是重要的细胞内物质转运调节分子。在 22 周孕龄人胎肝 cDNA 文库中发现一种新基因, 其编码的氨基酸序列与小鼠 ARF1 GAP 有 32% 同源性。将这种新基因命名为“ARFGAP3”, 对其进行功能研究, 利用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR), 从人胎盘总 RNA 中扩增 ARFGAP3 全长 cDNA 序列, 并将其亚克隆到 pGEM-T 载体; 采用 RNA 印迹法和斑点杂交法, 检测其组织表达谱, 发现在多种腺体和睾丸中有很高水平 ARFGAP3 基因转录, 并且只有一种约 2.7 kb 的转录本。利用基因重组技术, 构建表达质粒 pBAD/Thio-ARFGAP3, 在大肠杆菌中表达, 采用亲和层析法纯化表达产物, 利用肠激酶切除重组融合蛋白 N 端引导序列。检测重组 ARFGAP3 的生化活性, 证实 ARFGAP3 对 ARF1 具有 GAP 活性, 促进 ARF1 结合的 GTP 水解为 GDP, 磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 增强其 GAP 活性, 而磷脂酰胆碱 (PC) 抑制其 GAP 活性。

关键词 ARFGAP3, 细胞内物质转运, ADP 核糖基化因子, GTP 酶活化蛋白, 生化活性

学科分类号 Q73

细胞内物质转运是细胞膜、溶酶体和胞内体的形成、细胞分泌蛋白质、激素和神经递质、以及通过入胞作用摄取外源分子所必需的^[1, 2]。真核细胞的物质转运由转运囊泡介导, 囊泡转运受多种调节分子控制^[3~6]。ADP 核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 是 Ras 超家族的成员, 控制囊泡的形成, 是囊泡转运途径的关键成分^[7]。象 Ras 蛋白一样, ARF 与 GTP 结合的形式是有活性的, 而其活性持续的时间由 GTP 酶活化蛋白 (GTPase activating protein, GAP) 控制^[8]。近年来, 人们已经确认几种具有 ARF GAP 活性的蛋白质^[9~12]。但尚未在人体组织发现具有 ARF GAP 活性的蛋白质。

最近, 我们在 22 周孕龄人胎肝 cDNA 文库中发现一种新基因, 编码含 516 个氨基酸的蛋白质, 其氨基酸序列与小鼠的 ARF1 GAP 有 32% 同源性, 将其命名为“ARFGAP3”^[13]。本文对这种新基因进行功能研究, 首次克隆了 ARFGAP3 cDNA; 检测 ARFGAP3 的组织表达谱; 构建 ARFGAP3 表达载体, 在大肠杆菌中表达, 检测其表达产物的体外生化活性, 证实 ARFGAP3 促进与 ARF1 结合的 GTP 水解。初步确认 ARFGAP3 具有 ARF GAP 活性, 有助于进一步揭示其生物学意义和作用机制, 推动对人类细胞内物质转运调节机制的认识。

1 材料和方法

1.1 材料

人胎盘总 RNA、多组织 mRNA 印迹杂交膜和斑点杂交膜购自美国 Clontech 公司。M-MLV 反转录酶购自美国 Life Technologies 公司。pGEM-T 载体、随机引物标记试剂盒和各种限制性内切酶购自美国 Promega 公司。pBAD/TOPO 融合表达试剂盒、重组蛋白纯化试剂盒、EK-away 试剂盒、肠激酶和小鼠 Anti-His (C-term)-HRP 单克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP 购自北京福瑞公司。聚乙烯亚胺硅胶层析板购自 Sigma 公司。重组豆蔻酰基化 ARF1: 共表达 ARF1 和 N-豆蔻酰基转移酶的菌株 (BL21) 由以色列海法技术研究所生物研究室 Cassel 教授惠赠^[14], 按照 Kahn 的方法表达纯化^[15]。

1.2 引物设计

根据 ARFGAP3 cDNA 序列^[13] (GenBank 注册号 AF111847) 设计一组引物。P_L1: 5'-TTTTCGTCGACTCTTACCGGTTGGCT-3', P_R1:

* 国家自然科学基金资助项目 (39730310, 30070386)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2000-07-27, 接受日期: 2000-09-28

5' - CTGCTGCAAGTGTCTATTCTATTTAG - 3' , 用于扩增 ARFGAP3 cDNA 全长序列; P_L2: 5' - ATGGGGGACCCCAGCAAGCAGGAC - 3' , P_R2: 5' - TTAAGAACCGTAGCGATCCTGAAT - 3' , 用于扩增 ARFGAP3 cDNA 片段(77~ 1 616 bp), 作为制备探针的模板; P_L3: 5' - GGGATCC CGATGGGGGACCCCAGC - 3' , P_R3: 5' - CTCGAG AGAACCGTAGCGATCCTG - 3' , 在 5' 端引物加入 *Bam*H I 酶切位点, 为使 ARFGAP3 与融合蛋白 Thiorodoxin 的读码框架一致, 在酶切位点后加上两个碱基 CG; 在 3' 端引物加入 *Xho*I 酶切位点, 用于扩增 ARFGAP3 cDNA 编码区 (66~ 1616), 构建原核表达质粒。

1.3 ARFGAP3 原核表达质粒的构建

以人胎盘总 RNA 为模板, 经 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链, 采用 Advantage GC genomic PCR 试剂盒扩增 ARFGAP3 全长 cDNA 序列. 94 °C, 1 min, 56 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 共 30 次循环后, 于 72 °C 延伸 5 min. 按 pGEM-T 载体操作手册, 将 ARFGAP3 全长 cDNA 序列克隆至 pGEM-T 载体, 获得重组质粒 pGEM-T-ARFGAP3 (图 1a)。

以 pGEM-T-ARFGAP3 为模板, PCR 扩增 1.5 kb 的 ARFGAP3 cDNA 编码区序列, 94 °C, 1 min, 60 °C, 1 min, 72 °C, 2 min, 共 30 次循环后, 于 72 °C 延伸 5 min. 凝胶电泳回收, 将其克隆至 pBAD/Thio-TOPO 载体, 转化感受态大肠杆菌 TOP10, 筛选重组子, 制备质粒 DNA, 酶切鉴定有无插入片段, 并进行确证性 DNA 序列分析, 构建原核表达质粒 pBAD/Thio-ARFGAP3 (图 1b)。

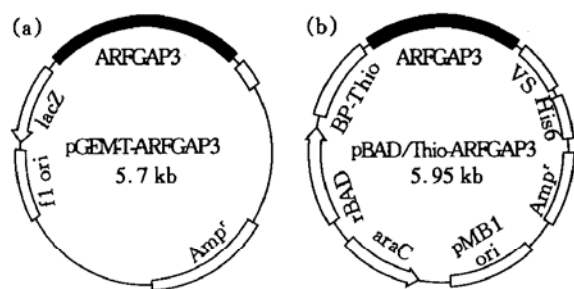


Fig. 1 The recombinant plasmids

(a) pGEM-T-ARFGAP3; (b) pBAD/Thio-ARFGAP3.

1.4 RNA 印迹法和斑点杂交法

以 pGEM-T-ARFGAP3 为模板, PCR 扩增 ARFGAP3 cDNA 片段, 94 °C, 1 min, 60 °C, 1 min,

72 °C, 2 min, 共 30 次循环后 72 °C 延伸 5 min, 产物经凝胶电泳回收作为制备探针的模板. 采用随机引物标记法, 以 [α -³²P] dCTP 为底物制备 DNA 探针. 采用 Sephadex G-50 凝胶过滤柱纯化探针. 采用预制的分别含有 4 种人胎儿组织和 7 种肿瘤细胞系 mRNA 的印迹杂交膜和含有 50 种人体和胎儿组织 mRNA 的斑点杂交膜, 按照说明书进行杂交反应, 放射自显影检测. 采用图像分析仪对不同组织 ARFGAP3 基因转录水平进行定量分析. 分别采用 PD-Quest 和 Quantity One 软件检测 RNA 斑点杂交和印迹分析阳性信号的吸光度 (A). 用一个点或条带的 A 值对总 A 值的百分比来表示其对应组织 ARFGAP3 转录的相对量。

1.5 重组 ARFGAP3 的表达及产物的分离

pBAD/Thio-ARFGAP3 菌株在含有 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养 12 h 后, 按 1: 50 放大培养至 A₆₀₀ 为 0.5, 加入阿拉伯糖至终浓度 0.02%, 37 °C 继续培养 4 h; 离心收集菌体, 用含 8 mol/L 尿素的 PBS 重悬菌体, 超声破碎细菌. 用 Xpress 蛋白纯化试剂盒纯化重组融合蛋白. 然后用肠激酶切除其 N 端引导序列-硫氧还蛋白, 用 EKaway 试剂盒去除肠激酶. 最后再用 Xpress 蛋白纯化试剂盒分离融合部分, 得到纯化的目的蛋白 ARFGAP3, 用 Ultrafree-15 超滤装置浓缩. 按试剂盒说明书操作。

1.6 SDS-PAGE 和免疫印迹法鉴定重组 ARFGAP3

15% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对表达细菌的全菌体、纯化的融合蛋白、经酶切的融合蛋白及目的蛋白等成分进行鉴定, 薄层扫描进行含量与纯度分析。

免疫印迹法: 利用 ARFGAP3 重组蛋白 C 端的 6 个连续的组氨酸抗原表位, 采用小鼠 Anti-His (C-term) -HRP 单克隆抗体进行免疫印迹鉴定表达及纯化产物 ARFGAP3^[16]。

1.7 重组 ARFGAP3 生化活性鉴定

通过测定单一循环 GTP 酶反应 GTP 水解的量, 确定 ARFGAP3 能否刺激 ARF1 的 GTP 酶活性^[14]. 首先, 使 ARF1 与 [α -³²P] GTP 结合; 结合反应混合液含有: ARF1 (0.5 g/L), [α -³²P] GTP (0.64 × 10¹⁰ Bq/L, 0.25 mmol/L), 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L ATP, ATP/GTP 再生系统 (5 mmol/L 磷酸肌酸和 50 mg/L 肌酸磷酸激酶), 25 mmol/L 3-(N-吗啉代) 丙磺酸

(MOPS) 缓冲液 pH 7.5、150 mmol/L KCl、3 mmol/L 双豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 和 1 g/L 胆酸钠。30℃ 反应 90 min。过滤结合检测显示 40% [α - 32 P] GTP 与 ARF1 结合。随后, 进行 ARF GAP 活性反应, 即将 GTP 水解为 GDP; 10 μ l 反应体系中含有: 5 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L DTT、1 mmol/L ATP、上述 ATP/GTP 再生系统、25 mmol/L MOPS 缓冲液 pH 7.5、0.5 mmol/L GTP、0.1 U/ml 鸟苷酸激酶、1 μ l 与 ARF1 结合的 [α - 32 P] GTP 及系列稀释的 ARFGAP3。30℃ 孵育 30 min 后, 煮沸 1 min 使与 ARF1 结合的核苷酸释放出来。然后, 用聚乙烯亚胺硅胶层析板进行薄层层析, 分离 [α - 32 P] GTP 和 [α - 32 P] GDP, 1 mol/L 甲酸、1 mol/L 氯化锂作展层液。最后, 放射自显影测定生成的 [α - 32 P] GDP, 采用图像分析仪和 PD-Quest 软件进行定量分析, 结果用与 ARF1 结合的 [α - 32 P] GTP 转化为 [α - 32 P] GDP 的百分比来表示。

2 结 果

2.1 RT-PCR 反应扩增 ARFGAP3 全长 cDNA 序列

PCR 产物电泳显示约在 2.7 kb 处出现特异条带。将其克隆至 pGEM-T 载体, 获得质粒 pGEM-T-ARFGAP3。Nco I 和 Pst I 酶切鉴定重组子有约 2.7 kb 的插入片段。DNA 序列分析结果表明, 重组质粒中插入的 ARFGAP3 cDNA 序列完全正确。

2.2 RNA 印迹法和斑点杂交法

多组织 RNA 印迹分析表明, ARFGAP3 在人胎脑、肺、肝和心脏以及各种肿瘤细胞系中只存在一种 2.7 kb 的转录本 (图 2)。胎肝和胎肾转录水平相近, 比胎脑和胎肺高 3 倍。在 7 种被检测的肿瘤细胞系中, 不同肿瘤细胞系转录水平明显不同。

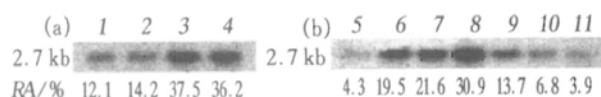


Fig. 2 Multiple tissue Northern blot analysis of ARFGAP3 transcription in four human fetal tissues (a) and in seven cancer cell lines (b)

1: fetal brain; 2: fetal lung; 3: fetal liver; 4: fetal heart; 5: HL-60; 6: S3; 7: K-562; 8: MOLT-4; 9: SW480; 10: A549; 11: G-361.

多种人体组织 mRNA 斑点杂交定量分析 (表 1) 显示, 在所检测的组织中均有不同程度的 ARFGAP3 基因转录, 其中, 在各种腺体 (包括胰腺、肾上腺、垂体腺、唾液腺、前列腺) 和睾丸中

有很高水平的基因转录; 在胎盘、气管、胎肝、肺、肝脏、胎肾和肾脏中也有较丰富的转录。

Table 1 Quantitative analysis of expression level of ARFGAP3 gene in 50 human tissues

Tissue	Relative amounts/ %	Tissue	Relative amounts/ %
Pancreas	7.07	Heart	1.38
Testis	5.39	Appendix	1.26
Adrenal gland	5.39	Medulla oblongata	1.21
Pituitary gland	5.01	Amygdala	1.18
Salivary gland	4.83	Substantia nigra	1.16
Prostate	4.37	Fetal brain	1.14
Placenta	4.33	Cerebellum	1.13
Trachea	4.13	Peripheral leukocyte	1.00
Fetal liver	4.08	Putamen	0.98
Lung	3.90	Uterus	0.96
Liver	3.35	Lymph node	0.95
Fetal kidney	2.59	Bone marrow	0.95
Kidney	2.35	Fetal thymus	0.95
Stomach	2.30	Caudate nucleus	0.91
Thyroid gland	2.16	Ovary	0.86
Fetal heart	2.13	Occipital lobe	0.81
Fetal lung	2.03	Temporal lobe	0.77
Aorta	1.96	Spinal cord	0.69
Small intestine	1.90	Subthalamic nucleus	0.61
Fetal spleen	1.85	Thalamus	0.58
Hippocampus	1.64	Skeletal muscle	0.57
Mammary gland	1.51	Colon	0.45
Spleen	1.42	Bladder	0.44
Whole brain	1.40	Cerebral cortex	0.33
Thymus	1.40	Frontal lobe	0.28

另外, 我们还比较了 7 种成人组织和对应的胎儿组织之间 ARFGAP3 的转录水平 (图 3)。观察

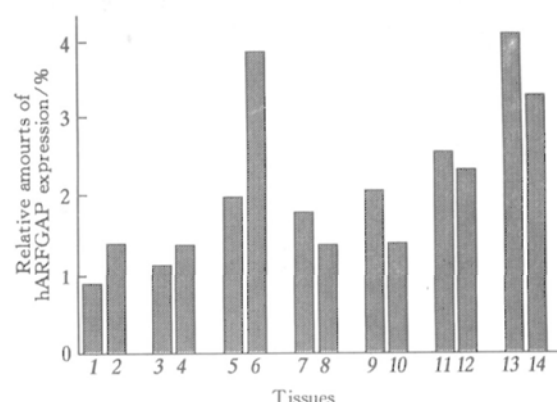


Fig. 3 Comparison of ARFGAP3 transcription in seven tissues between adult and fetal states

1: thymus (fetal); 2: thymus (adult); 3: brain (fetal); 4: brain (adult); 5: lung (fetal); 6: lung (adult); 7: spleen (fetal); 8: spleen (adult); 9: heart (fetal); 10: heart (adult); 11: kidney (fetal); 12: kidney (adult); 13: liver (fetal); 14: liver (adult).

到在胸腺、脑和肺中, 成人期转录水平高于胎儿期, 而在脾、心、肾脏和肝脏中, 成人期转录水平低于胎儿期. 值得注意的是, 在成人肺中表达水平高于胎儿肺中的 2 倍.

2.3 原核表达质粒 pBAD/Thio-ARFGAP3 的构建

以 pGEM-T-ARFGAP3 为模板, PCR 扩增 ARFGAP3 cDNA 编码区序列, 产物约 1.5 kb. 将其克隆至 pBAD/Thio-TOPO, 构建表达质粒 pBAD/Thio-ARFGAP3, 酶切证实有约 1.5 kb 插入片段, DNA 序列分析表明插入片段 DNA 序列及读码框架完全正确.

2.4 原核表达产物的分析和鉴定

SDS-PAGE (图 4) 表明, 含 pBAD/Thio-ARFGAP3 的菌株经阿拉伯糖诱导后, 约在 73 ku

处有一特异条带, 而 pBAD/Thio 约在 16 ku 处有一特异条带. 采用亲和层析法, 纯化重组融合蛋白, 用肠激酶切除重组融合蛋白的 N 端引导序列, 再用亲和层析法去除切下的融合部分, 获得目的蛋白, 在 60 ku 处显带. 在实验中, 我们采用 100 ml 菌液进行发酵, 经含 8 mol/L 尿素的 PBS 溶解得到菌体总蛋白约 20 g (10 ml, 2 g/ml), 凝胶薄层扫描分析表明其中重组 ARFGAP3 约占 10% 左右, 经纯化、透析、酶切、再纯化及浓缩, 最后得到纯度约为 90% 的重组 ARFGAP3 约 200 mg (500 μ l, 400 g/L).

免疫印迹分析显示 (图 4b), 重组融合蛋白条带位于约 73 ku 处, 酶切后的目的蛋白 ARFGAP3 的条带在约 60 ku 处, 证明重组蛋白的特异性.

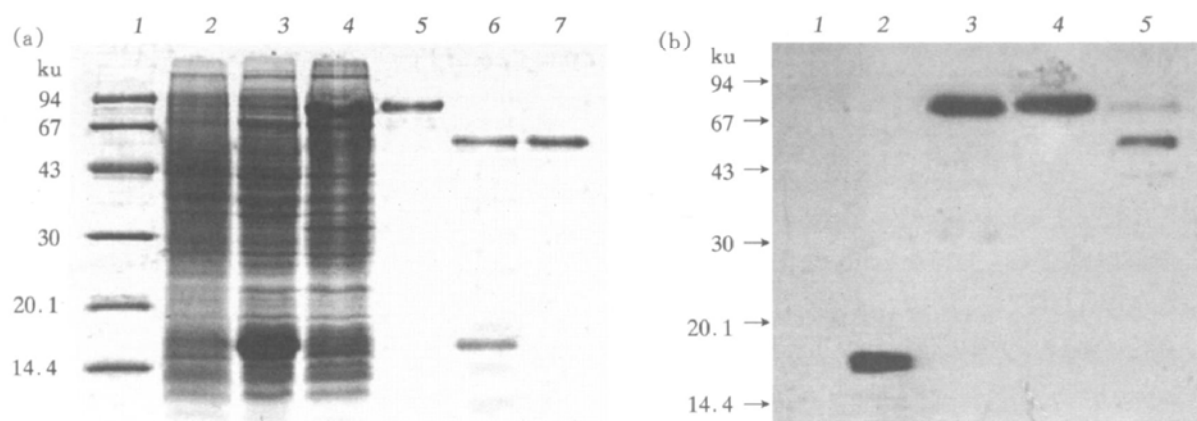


Fig. 4 SDS PAGE and Western blotting analysis of recombinant ARFGAP3

(a) SDS-PAGE of recombinant ARFGAP3. 1: molecular mass markers; 2: total proteins of TOP10 cell; 3: total proteins of induced TOP10 cell containing pBAD-Thio; 4: total proteins of induced TOP10 cell containing pBAD/Thio-ARFGAP3; 5: purified fusion protein Thio-ARFGAP3; 6: fusion protein digested by 0.1 U/20 μ g EKMaxTM; 7: purified ARFGAP3 after removal of Thiorodoxin. (b) Western blotting analysis of recombinant ARFGAP3. 1: total proteins of TOP10 (negative control); 2: total proteins of induced TOP10 carrying pBAD-Thio (positive control); 3: total proteins of induced TOP10 carrying pBAD/Thio-ARFGAP3; 4: purified fusion protein Thio-ARFGAP3; 5: ARFGAP3 purified again after cleaved by EKMaxTM.

2.5 重组 ARFGAP3 的生化活性

采用 50 mg/L 重组 ARF1, 反应时间 30 min 测定 ARFGAP3 的 GAP 活性. 结果显示重组 ARFGAP3 能刺激 ARF1 的 GTP 酶活性, 促进与 ARF1 结合的 [α -³²P] GTP 水解为 [α -³²P] GDP, 当 ARFGAP3 为 0.35 μ g 时, 可使 50% 与 ARF1 结合的 [α -³²P] GTP 水解为 [α -³²P] GDP (图 5a). 同时检测了脂质对其 GAP 活性的影响 (图 5a),

表明磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) (100 μ mol/L) 可提高 ARFGAP3 的 GAP 活性, 而磷脂酰胆碱 (PC) (1.3 mmol/L) 抑制其 GAP 活性.

采用 5 mg/L 重组 ARF1 和 0.4 μ g 重组 ARFGAP3, 测定结合的 [α -³²P] GTP 水解的时效关系, 结果显示在 15 min GTP 水解量达到高峰, 增加反应时间 GTP 水解量不再增加 (图 5b).

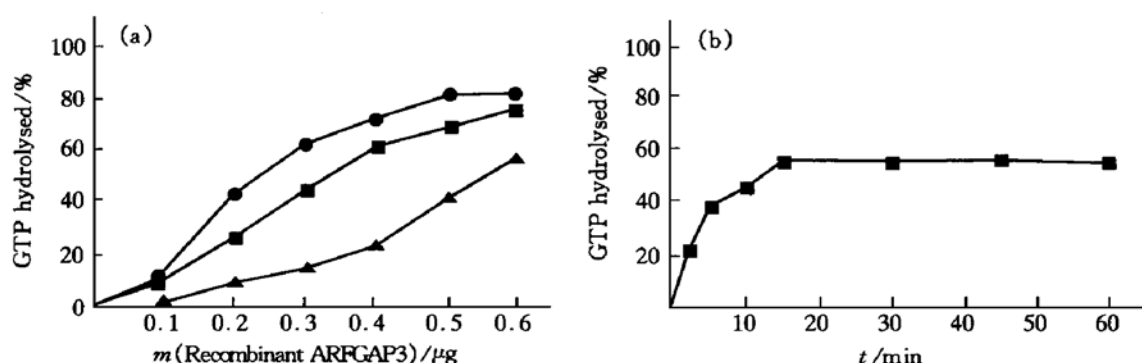


Fig. 5 The GAP activity of ARFGAP3

(a) ARFGAP3-stimulated GTPase activity of ARF1 and effect of lipids on GAP activity of ARFGAP3: The GAP activity of ARFGAP3 was determined with 50 mg/L recombinant ARF1 and 30 min of the reaction time and in the presence or absence of 100 μmol/L PIP2 and 1.3 mmol/L PC. (b) Time course of effect of recombinant ARFGAP3 on hydrolysis of [α - 32 P]GTP bound to ARF1. Hydrolysis of bound [α - 32 P]GTP were determined with 5 mg/L recombinant ARF1 and 0.4 μg recombinant ARFGAP3. The data in figure were average of twice experiment. ■—■: ARFGAP3; ●—●: ARFGAP3+ PIP2; ▲—▲: ARFGAP3+ PC.

3 讨 论

3.1 ARFGAP3 cDNA 克隆与序列分析

ARF 是 Ras GTP 酶超家族的成员,是真核细胞囊泡转运途径的关键调节因子^[1]。象其他 GTP 结合蛋白一样,ARF 依靠其 GTP 酶循环发挥其功能^[3]。在其 GTP 结合形式,ARF1 激发包被蛋白与高尔基膜的结合,启动囊泡的形成。随后发生的 ARF1 结合的 GTP 水解是包被蛋白解离所必需的^[17],而包被蛋白解离是转运囊泡与目的细胞器膜或细胞膜融合的先决条件。但是纯化的 ARF 不能水解 GTP^[18],提示 ARF GAP 的存在。ARF GAP 很可能在囊泡与目的细胞器膜的融合中发挥功能。近年来,国外陆续报道在酵母^[9]、小鼠胚胎和脑^[10]、大鼠肝脏^[8]、脑^[11]和垂体^[12]中发现了具有 ARF GAP 活性的蛋白质,含有 ARF GAP 功能域,其中包含保守的锌指结构,在体外能激活与 ARF 结合的 GTP 水解;并发现酸性磷脂和磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 是 ARF GAP 刺激 ARF-GTP 水解所必需的辅助因子。

最近,我们在 22 周孕龄人胎肝 cDNA 文库中发现 ARFGAP3^[13],其长度为 2 768 bp,其中编码区为 1 551 bp (66~1 616),编码的蛋白质产物含 516 个氨基酸,预测分子质量为 57 ku。此蛋白质与大鼠的 ARF1 GAP 有 32% 的同源性,在靠近氨基端的 120 个氨基酸中含有一个典型的 ARFGAP 功能域,其中含有保守的锌指模体 (CX₂CX₁₆CX₂C),可能是其催化活性所必需的区域。在本研究中我们首次成功地从人体组织中克隆

ARFGAP3 cDNA 全长序列,为进一步的表达和活性研究奠定了基础。

3.2 ARFGAP3 的转录本及组织表达谱

在本研究中,我们采用 RNA 印迹法确定在人体组织和肿瘤细胞系中 ARFGAP3 只有一个转录本,大小约为 2.7 kb;同时采用多种人体组织 mRNA 斑点杂交检测其在人体组织的转录水平,结果显示在所有检测的组织中均有不同水平的 ARFGAP3 基因转录,尤其是在各种腺体和睾丸中有很高水平 ARFGAP3 基因转录,表明 ARFGAP3 是一种在体内广泛发挥功能的基因,但可能主要是在腺体的分泌功能中起作用,支持我们的推论:ARFGAP3 是 ARF GAP 家族的新成员,可能参与腺体细胞内囊泡物质转运和激素的分泌。

通过比较成人组织和对应的胎儿组织之间 ARFGAP3 转录水平的差异发现成人期胸腺、脑和肺中 ARFGAP3 的转录水平较高,胎儿期脾、心、肾脏和肝脏中 ARFGAP3 的转录水平较高;在成人肺中 ARFGAP3 表达水平高于胎儿肺中的 2 倍。此结果提示 ARFGAP3 在成人组织和对应的胎儿组织之间表达的差异可能与不同发育时期组织分泌的功能变化有关。

3.3 ARFGAP3 基因的原核表达及纯化

在本研究中,我们选用硫氧还蛋白融合表达质粒 pBAD/Thio-TOPO,经阿拉伯糖诱导,获得 ARFGAP3 在大肠杆菌的表达,融合蛋白表达量占菌体总蛋白 10% 左右。并发现,ARFGAP3 融合蛋白既存在于可溶性蛋白成分中,也形成不溶性的包涵体,主要以包涵体形式存在。我们用 8 mol/L 尿

素溶解包涵体, 然后利用重组蛋白 C 端 6 个连续的组氨酸, 采用金属螯合亲和层析纯化重组融合蛋白, 经透析去除尿素, 再用肠激酶切除重组融合蛋白的 N 端引导序列硫氧还蛋白, 再经亲和层析, 去除融合部分, 得到纯化的目的蛋白。

3.4 重组 ARFGAP3 的生化活性

我们通过测定单一 GTP 酶反应循环中 GTP 水解的量, 鉴定重组 ARFGAP3 是否具有 ARF GAP 活性。结果显示从大肠杆菌得到的重组 ARFGAP3 对重组豆蔻酰基化 ARF1 有极强的 GAP 活性; 并且 ARFGAP3 的 GAP 活性可被 PIP2 激活, 被 PC 抑制, 与以前发现的具有 ARF GAP 活性的蛋白质实验结果相似^[8~12]。通过上述实验证实 ARFGAP3 具有 ARF GAP 活性。对第一个在人类发现的细胞内物质转运调节分子 ARF GAP 家族成员 ARFGAP3 的确认及其生物活性的研究, 必将推进对细胞内物质转运调节及其分子机制的理解。

参 考 文 献

- 1 Rothman J E. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 1994, **372** (6502): 55~ 63
- 2 Schekman R, Orci L. Coat proteins and vesicle budding. *Science*, 1996, **271** (5251): 1526~ 1533
- 3 Ohashi M K, Jan de Vries R, Frank R, *et al.* A role for phosphatidylinositol transfer protein in secretory vesicle formation. *Nature*, 1995, **377** (6558): 544~ 547
- 4 De Camilli P, Emr S D, McPherson P S, *et al.* Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*, 1996, **271** (5251): 1533~ 1539
- 5 Exton J H. New developments in phospholipase D. *J Biol Chem*, 1997, **272** (24): 15579~ 15582
- 6 Goda Y, Sudhof T C. Calcium regulation of neurotransmitter release: reliably unreliable?. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9** (3): 513~ 518
- 7 Moss J, Vaughan M. Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem*, 1995, **270** (23): 12327~ 12330
- 8 Cukierman E, Huber I, Rotman M, *et al.* The ARF1 GTPase activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*, 1995, **270** (5244): 1999~ 2002
- 9 Poon P P, Wang X, Rotman M, *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Gcs1 is an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (19): 10074~ 10077
- 10 Brown M T, Andrade J, Radhakrishna H, *et al.* ASAP1, a phospholipid dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (12): 7038~ 7051
- 11 Premont R T, Claing A, Vitale N, *et al.* β 2-adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **95** (24): 14082~ 14087
- 12 Andreev J, Simon J-P, Sabatini D D, *et al.* Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (3): 2338~ 2350
- 13 Zhang C G, Yu Y T, Zhang S W, *et al.* Characterization, chromosomal assignment, and tissue expression of a novel human gene belong to ARF GAP family. *Genomics*, 2000, **63** (3): 400 ~ 408
- 14 Makler V, Cukierman E, Rotman M, *et al.* ADP-ribosylation factor directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization. *J Biol Chem*, 1995, **270** (10): 5232~ 5237
- 15 Weiss O, Holden J, Rulka C, *et al.* Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem*, 1989, **264** (30): 21066~ 21072
- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880~ 897
- 17 Teal S B, Hsu V W, Peters J P, *et al.* An activating mutation in ARF1 stabilizes coatamer binding to Golgi membranes. *J Biol Chem*, 1994, **269** (6): 3135~ 3138
- 18 Kahn R A, Gilman A G. The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem*, 1986, **261** (17): 7906~ 7911

Cloning, Expression and Biochemical Activity of ARFGAP3, a Regulator of Intracellular Transport*

LIU Xiao-Qin^{1,2)}, ZHANG Cheng-Gang¹⁾, XING Gu-Chun¹⁾, CHEN Qing-Tang²⁾, HE Fu-Chu^{1)**}

(¹⁾ Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²⁾ Department of Neurology, The First Teaching Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China)

Abstract ARF GAP is a kind of important regulator of intracellular transport. Recently, a novel human gene has been found from a cDNA library of second trimester human fetal liver. The amino acid sequence encoded by the novel gene has 32% similarity to rat ARF1 GAP, was thus termed as ARFGAP3. Functional studies of the new gene were performed. The full-length cDNA of ARFGAP3 was amplified from the human total placenta RNA by RT-PCR technique, then subcloned into pGEM-T vector and sequenced. The RNA Master blot and multiple tissue Northern blot analysis were used to define the expression profile and the transcript size of ARFGAP3 in human tissues. It was shown that ARFGAP3 was strongly expressed in glands and testis and that ARFGAP3 mRNA existed as only one kind of transcript of 2.7 kb in various human tissues. Then, the expression and purification of the recombinant human ARFGAP3 (rhARFGAP3) were performed. It was demonstrated that rhARFGAP3 exhibited strong GTPase-activating protein (GAP) activity towards the recombinant ARF1 *in vitro* by an assay of a single round of GTP hydrolysis on recombinant ARF1, and that GAP activity of ARFGAP3 was stimulated by PIP2 and inhibited by PC.

Key words ARFGAP3, intracellular transport, ADP-ribosylation factor (ARF), GTPase activating protein (GAP), biochemical activity

* This work was supported by a grant from the Chinese National Natural Sciences Foundation Key Project (39730310) and General Project (30070386).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931246, E-mail: hefc@nic.bmi.ac.cn

Received: July 27, 2000 Accepted: September 28, 2000