

乙酰胆碱酯酶与拟胆碱酯酶

董 之 海

(防化研究院,北京)

提 要

胆碱酯酶分为乙酰胆碱酯酶和拟胆碱酯酶两类,这两类酶的分子类型十分相似。许多学者在催化性质、热稳定性及免疫学性质等方面对它们进行了大量的平行性研究,进而对二者的相互关系及拟胆碱酯酶的生理学作用从分子生物学的角度进行了有益的探讨。本文着重叙述了近年来这几个方面主要的研究进展。

胆碱酯酶 (ChE) 分为两类: 一类是真性胆碱酯酶,即乙酰胆碱酯酶 (AChE, EC 3.1.1.7.); 另一类是拟胆碱酯酶 (ϕ ChE), 主要指丁酰胆碱酯酶 (BuchE, EC 3.1.1.8.)。

一、胆碱酯酶的分子类型

按照目前公认的说法,不论是 AChE 还是 BuchE, 都是以六种不同大小的异构体而存在的^[1-4]。每种酶既有不同数量的球型催化亚基组成的分子类型,又有与胶原样尾 (Collagen-

like tail) 结合而构成的不对称形的分子形态,即 ChE 分子类型。一般认为分子类型应是分子大小、形状及表面电荷不同的稳定实体^[1,3]。由于 ChE 分子类型是以相同类型的四级结构为基础对其大分子特征进行比较的,因此, Bon, S. 等^[5]提出,球型的用 “G” (Globular forms) 表示,又可分为 G_1, G_2, G_4 , 尾型的用: “A” (Asymmetric forms) 表示,又可分为 A_4, A_8, A_{12} 。下角的数字表示催化亚基的数目,例如球型单体是 G_1 , 四聚体是 G_4 , 而尾型的三个四聚

复合物,特别是当蛋白质结合到滤膜上后,还可能影响 DNA-蛋白质的相互作用。凝胶阻滞法的应用,消除了这些缺点。然而, Crothers 等的一些实验指出,低离子强度的天然凝胶中,凝胶基质保护了复合物,使复合物增加了稳定性,影响动力学分析结果。所以,这种笼效应是否存在,是否存在复合物同凝胶基质之间的相互作用,还需要进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 林克椿等:《生物物理学报》, 1987, 3(4), 429.
- [2] Garner, M. M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9 (13), 3047.
- [3] Fried, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1981, 9(23), 6505.
- [4] Garner, M. M. et al.: *Trends in Biochem. Sci.*, 1986, 11(10), 395.

- [5] Crothers, D. M.: *Nature*, 1987, 325(29), 464.
- [6] Wijnen, A. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15 (4), 1679.
- [7] Revzin, A. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, 153 (1), 172.
- [8] Beckman, L. D. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1976, 3 (7), 1727.
- [9] Stark, M. J. R. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1984, 178(2), 303.
- [10] Jones, O. W. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1966, 22(1), 199.
- [11] Schneider, R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14(3), 1303.
- [12] Maxwell, A. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, 259 (23), 14472.
- [13] Yuen, L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84(17), 6069.
- [14] Sandeen, G. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1980, 8(17), 3757.
- [15] Fried, M. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1984, 172(3), 263.
- [16] Liu-Johnson, H-N. et al.: *Cell*, 1986, 47(6), 995.
- [17] Hatfull, G. F. et al.: *Cell*, 1987, 49(1), 103.
- [18] Stenzel, T. T. et al.: *Cell*, 1987, 49(5), 709.

[本文于 1988 年 2 月 4 日收到]

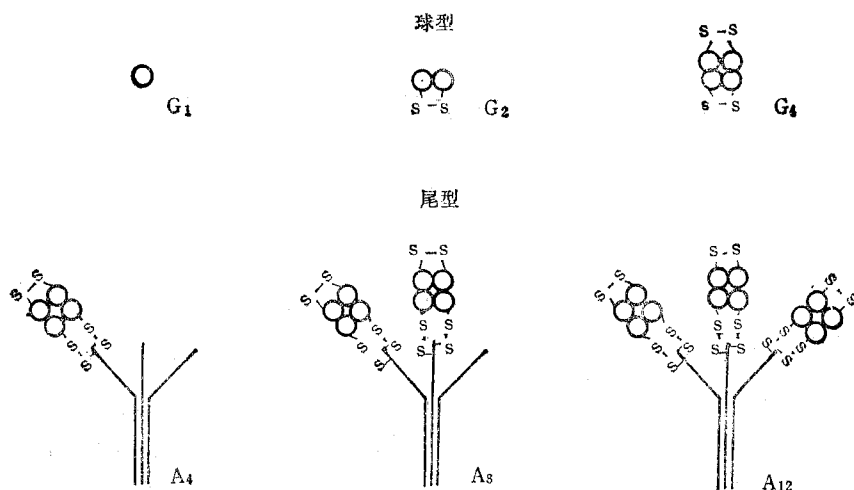


图1 AChE 六种主要分子类型的四级结构

体是 A_{12} ，见图1。AChE G_1 是分子量大约 80000 道尔顿的球型单体^[5,6]，它是构成该酶结构的基础材料。单体通过二硫键聚合成二聚体^[7]，在范德瓦耳斯力 (Van der Waals forces) 作用下，两个二聚体可以形成四聚体。四聚体连接到能在电子显微镜下观察到的三股长约 500 Å、宽约 20 Å 的棒状尾上^[7]，用二硫键的方式，棒状尾直接与四聚体顶端的一个二聚体相连，每个棒状尾都可以进行这样的连接^[6]，以分别形成 A_4 、 A_8 、 A_{12} 分子型。尾状物有助于把酶固定在突触和神经肌肉接合处的膜上^[8]。

不同种属动物的 AChE 分子类型之间的沉降系数有一定的差异。哺乳动物 A_{12} AChE 沉降系数约 16—17S，电鳗 (Eleuthrophorus) 的是 18.4S，而鸡的则是 20S。但是，对所有哺乳动物来说， G_1 的沉降系数约为 4S， G_4 约 10S， A_{12} 约 16S。鸟胆碱酯酶的沉降速度稍快于哺乳动物相应的分子类型。这一差异可能是因为亚基上通过胰蛋白酶敏感键 (trypsin sensitive bonds) 共价地连接上了一个 40000 道尔顿的无催化活性的肽所造成的^[2]。但是，这一组分的功能目前尚不清楚。

拟胆碱酯酶的分子类型和 AChE 相同，具有惊人的平行现象^[1,2,4]，即每一个 AChE 型都有一个 ϕ ChE 的相对物。但在已知的种属动物中，AChE 和 ϕ ChE 分子类型的沉降系数

一般都有轻微的不同。Vigny, M. 等^[4]报道，从颈上神经节 (superior cervical ganglion, SCG) 和肌肉提取物的 AChE 与 BuChE 活性的沉降图形来看，SCG 提取物 AChE 三个主要峰 3.6S、6.3S、10S 分子类型与 BuChE 的三个主要峰约相差 0.5S。哺乳动物 ϕ ChE 单体的分子量约 85000 道尔顿，即稍大于哺乳动物 AChE G_1 ，由此而叠加聚合成 G_2 和 G_4 。而且， ϕ ChE 也具有棒状尾^[4]。综上所述，可以看出，这两类酶之间存在着非常密切的对应关系，从而引起了关于它们之间关系的各种推测。

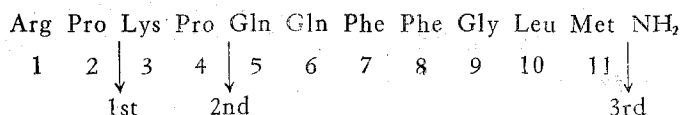
二、胆碱酯酶的催化性质

通过对各种动物 ChE 动力学的研究证明，ChE 每个亚基上都含有一个活性部位，并且酶的每个活性部位的催化活性都是相等的^[4,9,10]。此外，多亚基聚合体的催化部位是互无关系的，而且对亚基间的相互作用不敏感。对聚合体而言，各种底物的水解 K_m 值和相对速率是完全相同的；对于亚基来说，在 K_m 值和对过量底物抑制作用的灵敏度方面与酶的聚合体没有显著的不同^[9]。

AChE 和 ϕ ChE 催化胆碱酯类底物的水解反应速率是不同的^[8]。一般来说，AChE 催化胆碱酯速度顺序是，乙酰胆碱 > 丙酰胆碱 > 丁酰胆碱，并能专一地催化水解 β -甲基乙酰胆

碱。而拟胆碱酯酶催化胆碱酯的速度顺序则与 AChE 相反,它却能专一地催化水解苯酰胆碱。似乎 BuChE 水解丁酰胆碱的速率至少与水解乙酰胆碱的速率相似,而 AChE 则不水解或很少水解这一底物。也就是说,不同种属动物的“非特异性”胆碱酯酶在底物专一性方面有一定的差别。

先前对 AChE 和 BuChE 底物专一性的研究主要集中在上述几种底物上。但是,近几



第一个作用点在 Pro² 和 Lys³, 下面作用在 Pro⁴ 和 Gln⁵ 之间, 然后在 C-末端脱氨。而 AChE 则主要作用于 Leu¹⁰ 和 Met¹¹ 之间, 以及 Phe⁷ 和 Phe⁸、Phe⁸ 和 Gly⁹、Arg¹ 和 Pro²、Gly⁹ 和 Leu¹⁰ 之间。因此, BuChE 和 AChE 对 P-物质的降解有着完全不同的特异性。上述事实说明, 它们不仅能催化胆碱酯类及其它一些酯类的水解反应, 而且又可能是水解象脑啡肽和 P-物质这样的神经肽的一个重要的酶, 因此, AChE 和 BuChE 并非是底物特异性很强的酯酶。

三、胆碱酯酶的热稳定性^[4,13,14]

经过对 AChE 和 BuChE 热失活作用的系统比较表明, 除了 G₁ 之外, 所有 AChE 型的热稳定性都是相似的^[13]。但是, AChE G₁ 比二聚体或寡聚体对加热更为敏感, 51℃ 加热 10—15 分钟会引起 AChE G₁ 95% 的失活, 而对其他分子类型的影响很小。对 ϕ ChE 分子类型也是类似的情况。另外, 人工离解的 ϕ ChE 与天然的单体有相同的热稳定性。造成胆碱酯酶分子类型热稳定性方面的差异可能有三种情况: 亚基间二硫键(二聚体和更大的分子类型); 二聚体间疏水或离子相互作用(二聚体和更大的分子类型); 与胶原共价连接(不对称型)。所有这些特征在单体中均不存在, 然而, 已知单体和多聚体不同的热稳定性又并非一级结构差异的缘故, 因此, 最大的可能性就是, 亚

年的工作表明^[11,12], AChE 和 BuChE 都能够降解 P-物质。它们具有能被 5-羟色胺 (serotonin) 所抑制的酰胺酶和芳香基酰基酰胺酶 (aryl acylamidase) 活性, 都有水解神经肽 P-物质肽键的能力。AChE 水解脑啡肽 (enkephalin), 使之失去其氨基和羧基末端的氨基酸。但是它们对 P-物质所作用的位置完全不同。BuChE 在三个位置上作用于 P-物质:

基间二硫键的存在是使 AChE 和 ϕ ChE 的二聚体及更大分子类型热稳定性高的主要原因。

AChE 和 ϕ ChE 热失活的情况较为复杂。Edwards, J. A. 和 Brimijoin, S.^[13] 把鼠血清在不同温度下加热 45 分钟后, 测定 AChE 和 BuChE 活性发现, 从 45℃ 尤其到 51℃ 以后, BuChE 活性显著减少, 直到在 54—57℃ 保温期间全部失活。而 AChE 热失活较复杂, 它的失活分为二个阶段 (45—48℃ 和 54—60℃), 而中间 (48—54℃) 出现了一个稳定时期, 对鼠肌肉提取物 AChE 和 BuChE 所得结果是一样的。鼠 SCG 提取物 AChE 和 ϕ ChE 热失活速率不同, 但与上述情况又有区别。然而, 最使人感兴趣的是, 在无 Mg²⁺ 存在的情况下, ϕ ChE 的热失活速度要比 AChE 快得多, 而在有镁离子存在时, 这种热失活作用则完全相反。Koelle, G. B. 等^[14] 用鼠 SCG 匀浆验证了 Vigny, M. 的实验, 结果完全相同。但是, 他们把猫 SCG 和 StG (星状神经节) 在一起匀浆, 55℃ 加热, 发现无二价阳离子时, ϕ ChE 比 AChE 稳定, 这与上述情况截然不同。在有二价阳离子存在时, 结果与前面的情况一致。似乎二价阳离子起到了使 AChE 失活加速而使 ϕ ChE 稳定的作用。但是, 有报道镁和其它二价阳离子能阻止 ChE 低分子量自发地向高分子量转变, 这与上述结果又是矛盾的。它们不按一级动力学规律失活, 很可能与酶分子的不均一性有关。

四、AChE 与 ϕ ChE 的关系

就我们目前对 AChE 和 ϕ ChE 的了解要想完全说明它们之间的关系是比较困难的。不过,这两类酶分子类型之间存在着非常显著的平行现象,尤其在较高级的脊椎动物中已得到了证明^[4,2,4],从而引起了人们的关注。鉴于所有分子类型的每个活性部位的催化活性都是相同的^[4,9,10],是否可以认为胆碱酯酶分子类型的多样性具有结构上的意义而无特殊的催化学上的意义。这两类酶分布广泛,并且经常可以在同一细胞里发现^[1],即使在以前认为仅含有 AChE 的神经细胞里也发现了 ϕ ChE,对于它们的生理作用,已确认 AChE 在胆碱能传递和运动神经末梢水解 ACh、维持正常的神经活动及机体运动功能中起重要作用。Graybiel,

A. M. 和 Rogsdale, C. W. Jr.^[15] 用组织化学研究后提出, ϕ ChE 也具有神经功能。前已叙及,不论是 AChE 还是 ϕ ChE 都具有能降解神经肽的肽酶活性^[11,12],能分解不同的肽键和酰胺键。由于在脑和 SCG 同时存在着 AChE 和 ϕ ChE,这可能说明,它们除了具有胆碱能传递功能之外,这些酶还可能参与神经肽的生理调节作用。

为了更好地解释 ϕ ChE 的生理功能, Koele 等^[16,17]提出了 ϕ ChE 是 AChE 前体的假

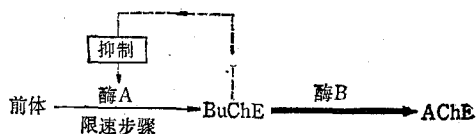


图 2

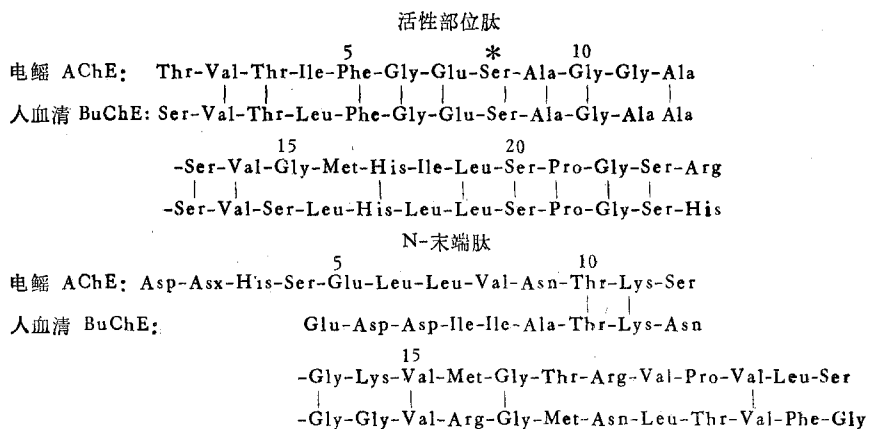


图 3 电鳗 AChE 和人血清 BuChE 活性部位及 N-末端区域的氨基酸序列的比较

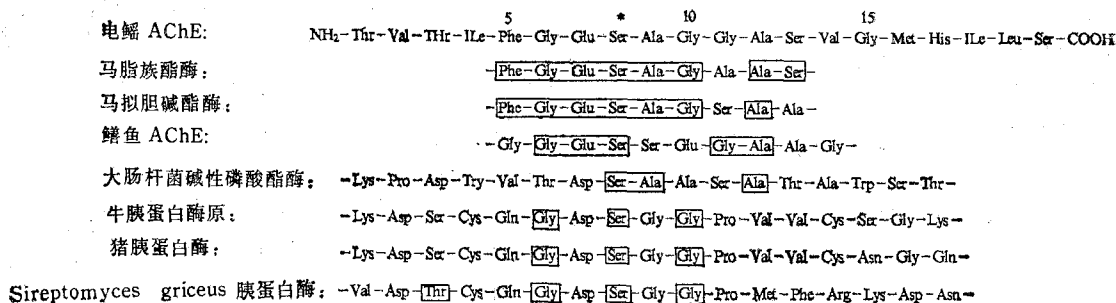


图 4 胆碱酯酶活性部位区域氨基酸序列与其它丝氨酸蛋白酶和酯酶的比较。

*为 [³H]-异丙基磷酰基标记的活性部位丝氨酸;框内残基与电鳗 AChE 序列相同。

说,如图 2 所示。

这令人满意地结束了有关 ϕ ChE 生理作用

的争议。但是,应用免疫化学的方法研究表明, AChE 和 ϕ ChE 结构之间的差异是相当大的。

例如,鼠脑 AChE 的多克隆抗体与牛 SCG 和猫 SCG 的 AChE 具有交叉免疫反应,而与这些动物的 ϕ ChE 甚至与鼠本身的 ϕ ChE 没有交叉免疫反应^[1,4]。并且,它们在热稳定性方面存在着显著的差异。因此许多研究者认为, AChE 和 ϕ ChE 是不同基因编码的不同的分子实体^[1,2,4],而且它们是受共同的机制控制而又以相互协调的方式进行调节的。比如,在发育和成熟时期,两类酶的变化是平行调节的^[18],也有的呈相互变化,如鸟营养不良时,对 AChE 和 ϕ ChE 的分子类型也有类似的影响。尽管如此,还是很难看出这两类酶之间存在着必然的相互依赖调节的普遍趋势。Edwards, J. A. 和 Brimijoin, S.^[19] 用鼠做了一个垂体切除实验,发现雄性鼠垂体切除引起血清中 BuChE (300%) 和肝中 BuChE (43%) 活性增高;而雌性鼠中则引起这两个组织的 BuChE 活性分别降低 25% 和 30%。就是说,垂体切除对雄性和雌性动物是以根本不同的方式影响着这两类酶的变化,同时说明激素也参与了胆碱酯酶的调节作用。

对于它们二者之间的关系,尽管有些研究结果并不支持上述的前体假说,也未能完全确认拟胆碱酯酶在维持机体的代谢过程中的作用,但近年有关研究已经注意到^[20],人血清 ChE 和电鳗 AChE 活性部位的氨基酸序列具有很高的同源性。尤其含丝氨酸的活性中心的 Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly 六个氨基酸序列完全一致地保留了下来,见图 3。但它们的 N-末端区域的氨基酸序列,以及胆碱酯酶活性部位与其它某些丝氨酸蛋白酶和酯酶比较,同源性就很低,见图 3,4。由于活性部位氨基酸序列直接关系到酶的催化活性,由此可以想象,这一序列在生物进化过程中是遭受了极大的压力才被保留

下来,以保证满足其生理功能的需要。显然,没有更多的理由对其 N-末端的变异也进行同样的限制。这些研究为进一步确认 ϕ ChE 的生理作用和探究这两种酶是否起源于同一祖先具有一定意义。

我们相信,随着分子生物学及基因工程等学科的深入研究,它们之间关系的谜底是一定会揭开的。

参 考 文 献

- [1] Toutant, J. P. et al.: *J. Neurochem.*, 1985, **44**, 580.
- [2] Allemand, P. et al.: *J. Neurochem.*, 1981, **36**, 860.
- [3] Massonlié, J. & Bon, S.: *Ann. Rev. Neurosci.*, 1982, **5**, 57.
- [4] Vigny, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 2588.
- [5] Bon, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 2546.
- [6] Rosenberry, T. L. & Richardson, J. M.: *Biochemistry*, 1977, **16**, 3550.
- [7] Dudai, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 2473.
- [8] 孙曼霁、周延冲:《生物化学与生物物理进展》,1981,**3**, 1。
- [9] Vigny, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1978, **85**, 317.
- [10] Viratelle, O. M. & Bernhard, S. A.: *Biochemistry*, 1980, **19**, 4999.
- [11] Lockridge, O.: *J. Neurochem.*, 1982, **39**, 106.
- [12] Chubb, I. W. et al.: *Neuroscience*, 1983, **10**, 1369.
- [13] Edwards, J. A. & Brimijoin, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **742**, 509.
- [14] Koelle, G. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, 6012.
- [15] Graybiel, A. M. & Rogsdale, C. W. Jr.: *Nature, Lond.*, 1982, **299**, 439.
- [16] Koelle, W. A. et al.: *J. Neurochem.*, 1977, **28**, 307.
- [17] Koelle, G. B. et al.: *J. Neurochem.*, 1977, **28**, 513.
- [18] Silman, I. et al.: *Nature, Lond.*, 1979, **280**, 160.
- [19] Edwards, J. A. & Brimijoin, S.: *Biochem. Pharmacol.*, 1983, **32**, 1183.
- [20] MacPhee-Quigley, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 12185.

【本文于1988年1月29日收到】