

酪氨酸蛋白磷酸酶

王玉环 吴国利

(北京师范大学分子生物学及生物化学研究室, 北京 100875)

提 要

本文介绍了酪氨酸蛋白磷酸酶的研究现状。对各种组织中纯化的多种酪氨酸蛋白磷酸酶的性质研究,发现在大多数组织和细胞中存在多种形式的该酶,它们可分成三大类,但各种形式的酶之间的相互关系尚不清楚。酪氨酸蛋白磷酸酶在细胞的生长、分化、转化及信号传递过程中可能起重要作用。

关键词 酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPP),酪氨酸蛋白激酶(TPK),蛋白质磷酸化

蛋白质的可逆的磷酸化修饰是细胞重要的调节机制之一。通常磷酸化主要修饰丝氨酸和苏氨酸残基,酪氨酸残基的磷酸化相对很少。1980年 Hunter 等人^[1]发现致癌的劳氏肉瘤病毒(RSV)的 src 基因产物——pp60^{v-src}——能使鸡细胞中分子量为 5000 D 的蛋白质酪氨酸残基磷酸化水平提高 8 倍。从而提出:酪氨酸残基磷酸化水平的提高可能是细胞发生转化的关键步骤。经过十多年的研究,对使酪氨酸残基磷酸化的酶——酪氨酸蛋白激酶(TPK)——已有了比较深入的了解,并且已有详细的综述,而对使磷酸酪氨酸残基脱磷酸化的酶——酪氨酸蛋白磷酸酶(PTPP)——的研究却不及 TPK 那么深入。由于蛋白质的磷酸化是一种可逆的调节方式,酪氨酸残基的磷酸化水平,一方面取决于 TPK 的活力,另一方面与 PTPP 的活力密切相关,因此,要想全面理解酪氨酸残基磷酸化的意义,还须对 PTPP 的性质和特点有清楚的认识。本文对 PTPP 的研究现状进行综述讨论。

一、PTPP 的分布

1980年在 A 431 细胞中首次测定了 PTPP 活力,之后的研究表明,PTPP 活力在许多生

物种属中都存在,从细菌(如: *E. coli*)到动物(如: 鸡、鼠、兔、牛等)以及人的各种组织和细胞中都测得有 PTPP 活力。兔的肝脏、脑、心脏、肺、肾和骨骼肌均有 PTPP 活力,其中肾脏的 PTPP 活力最高,其次是肝脏。

PTPP 在细胞内的分布也很广泛,胞浆和颗粒部分都有。使用不同的底物测定,这两部分的 PTPP 活力分布有所差异,这可能是由于细胞中存在多种不同形式的 PTPP 的缘故。

二、PTPP 的纯化

1982年 Swarup 等人^[2]最早尝试从 TCRC-2 细胞膜组分分离 PTPP,之后陆续报导了其它组织中 PTPP 的分离纯化工作(如: 兔肾、鼠脾、牛脾、鸡脑、人的红细胞等等)。大多数组织或细胞中都存在多种形式的 PTPP,它们之间的关系尚不清楚。由于 DEAE 纤维素柱层析在近中性条件下能有效地分离 PTPP,大多纯化工作中都采用了这一步骤。有些研究者使用了 Zn²⁺-IDA-agarose 金属离子亲和层析(已知 Zn²⁺ 是多种 PTPP 的可逆抑制剂)和底物亲和层析,也取得了较好的分离效果。目前报导过的纯化工作中, Tonks 等人^[3]对胎盘中 35 kD PTPP 的纯化非常成功,其纯化过程

包括七步柱层析:两次 DEAE 纤维素柱层析, Sephacryl-S 200 凝胶过滤,蓝色亲和胶 (Affinity Blue) 柱层析,多聚赖氨酸琼脂糖亲和层析,快速蛋白质液相色谱凝胶过滤 (FPLC-gel filtration) 和底物 (人工化学修饰的溶菌酶 RCM-lysozyme) 亲和层析。纯化结果将 35kD PTPP 提纯了 23000 倍,电泳鉴定一条带,提纯产率 10%。

PTPP 的分离纯化是件不容易的工作,一方面缺乏高效率的纯化方法,另一方面 PTPP 在纯化过程中不太稳定,尤其经过亲和层析后得到的较纯的酶制剂非常容易失活。目前有关 PTPP 纯化工作的报导还不够多,只有提纯到足够的纯酶,才有可能进一步探讨各种形式的 PTPP 之间的相互关系。

三、各类 PTPP 的特点

PTPP 迄今尚无系统的分类方法,本文将其分为三类即 I、II、III 来介绍。

I. 与酸性磷酸酶相关的 PTPP 这类酶在各组织和细胞中所占比例很大,几乎所有的酸性磷酸酶都具有 PTPP 活力,在某些组织中(如:人胎盘^[3]、人前列腺^[4]、鼠脑^[5]、人红细胞^[6]),这类酶承担了主要的 PTPP 活力。

II. 与碱性磷酸酶相关的 PTPP 1981 年 Swarup 等人^[7]测定了不同来源的碱性磷酸酶的 PTPP 活力,发现它们对膜蛋白底物有较高的亲和力。由于许多碱性磷酸酶是膜结合的糖蛋白,很可能它代表了膜上的一组 PTPP。

III. 特异的 PTPP 在已有的文献报导中,与酸、碱性磷酸酶无关的特异的 PTPP 所占比例不高,已知的有大鼠脾的 65 kD、30 kD、50kD 三种 PTPP,牛脾中的 50 kD PTPP,鸡胚成纤维细胞中的 55 kD、50 kD、95 kD 以及鸡脑中的 43 kD、95 kD 的 PTPP。各类 PTPP 的分子量差别很大,各种 PTPP 之间的关系尚不明确。

另外 Chernoff 报导了钙调神经磷酸酶 (calcineurin) 具有 PTPP 活力^[8],但由于它对磷酸丝氨酸残基也有很强的脱磷酸化作用,

所以有人认为它不是特异的 PTPP 酶。

四、PTPP 的调节因子

大多数组织和细胞中存在多种形式的 PTPP,综合各种 PTPP 的性质发现: Zn^{2+} 对大多数 PTPP 有较强的抑制作用, VO_3^- 也有不同程度的抑制作用。EDTA 对某些 PTPP 有激活作用。 F^- 被认为是丝氨酸蛋白磷酸酶的特异抑制剂,但对大部分 PTPP 不抑制。

1987 年 Rotenberg 等人^[9]发现,兔肾细胞膜的 PTPP 被蛋白水解酶作用后受到激活,并释放出该酶的可溶性形式。这个实验提示:可能有 PTPP 的蛋白抑制因子存在。但是上述结论只是间接的推测,尚须有直接的实验证据才能证明是否有这种蛋白抑制因子。

五、PTPP 潜在的生理意义

1. 调节 TPK 的活力

在所有 TPK 中,除了已知激素受体 TPK 的活力受激素调节外,其它 TPK 的活力调节方式还不清楚。但是 TPK 都有一个共同的特点:它们都有自身磷酸化反应,大多数 TPK 自身磷酸化后被激活。Srivastava 等人^[10]发现纯化的大鼠肺 TPK 发生自身磷酸化后,其活力提高约 15 倍;如用 PTPP 处理 TPK 使其脱磷酸化,则 TPK 活力 80% 受到抑制。结果提示 PTPP 在控制 TPK 活力方面可能具有重要作用。

2. 对细胞生长、分化及转化的调节

自从 80 年发现细胞转化与蛋白质酪氨酸残基磷酸化具有密切关系以来,人们更多地注意了 TPK 对调节细胞蛋白质酪氨酸磷酸化水平的重要作用,现在越来越多的实验提示 PTPP 具有同样重要的调节作用。在被 RSV 转化的鸡胚成纤维细胞中,可溶性 PTPP 活力提高 30—50%^[11];而良性增殖的细胞生长过程伴随有 TPK 和 PTPP 活力的同时提高^[12]。这种协调效应说明:两种酶 (TPK 和 PTPP) 对于酪氨酸磷酸化的正常调节和细胞增殖的调节都是必要的。对 HL-60 细胞的分化过程的研究

究^[13,15]表明: HL-60 细胞向粒细胞表型分化的过程中, 伴有细胞蛋白质酪氨酸磷酸化水平的降低, 其 TPK 活力提高 3 倍, 而 PTPP 活力提高 7 倍。酪氨酸残基磷酸化水平的降低主要是由 PTPP 活力的大幅度提高引起的。

Klarlund^[14] 用 Na_3VO_4 诱导了 NRK-1 细胞发生了转化, 同时伴有蛋白质酪氨酸磷酸化水平的升高。 Na_3VO_4 是某些 PTPP 的抑制剂, PTPP 活力降低而导致细胞蛋白质酪氨酸磷酸化水平的升高可能是细胞转化的另一方面的因素。支持这一观点的实验是: 生长激素释放抑制因子及其几种八肽同系物能激活胰腺癌细胞 (Mia PaCa-2) 的 PTPP 活力, 并且抑制癌细胞的生长, 其抑制程度与其激活 PTPP 的程度呈正相关性。

3. PTPP 的跨膜信号传递模型

Charbonneau 等人^[16]的研究发现, 人胎盘主要的 PTPP (1 B, 35 kD) 与大鼠白细胞共同

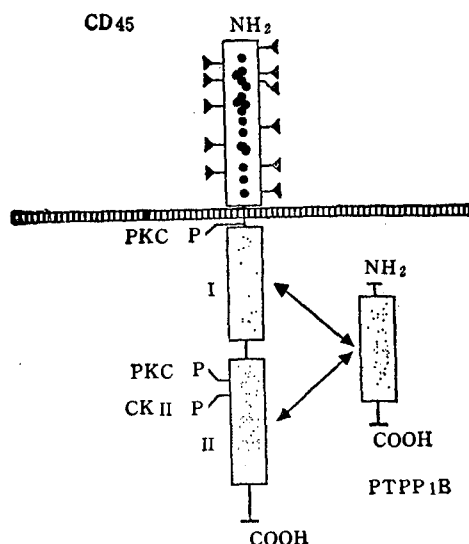


图 1 CD 45 的结构组织与 PTPP1B 同源的结构域定位

抗原 CD 45 分子的胞浆侧结构域 I 和 II 分别有 40% 和 30% 的同源性。CD 45 是一个高分子量的糖蛋白家族, 它们横跨白细胞质膜, 功能不详。CD 45 的分子组织结构与受体非常相似, 受此启发, Charbonneau 等人提出一个新的信号传递模型:

蛋白激酶的生理底物受与受体相联的

PTPP 调节。

CD 45 和 EGF 受体在整个分子的组成方式上是很相似的, 其内部亚基可被 PKC (蛋白激酶 C) 磷酸化, 另外由于 CD 45 在结构域 II 中有个插入序列, 它可被酪蛋白激酶 II (CK II) 磷酸化。可以想象有两种不同的机制调节 PTPP 活力。

以上所述模型尚处在假说阶段, 只有了解了 CD 45 的生理功能和作用机制后才能对模型的正确与否给以判定。

结语 目前我们对 PTPP 的了解还很全面, 有待研究的课题很多, 例如: PTPP 的纯化方法有待突破; PTPP 的内源性底物有待探索; 对于 PTPP 的调节因子的研究也刚开头, 是否存在 PTPP 的蛋白质类抑制因子尚无直接证据; PTPP 活力变化的原因是在基因水平、转录水平、翻译水平还是酶自身的活力调节水平? 各种类 PTPP 间的关系也有待今后的工作去探讨研究。

参 考 文 献

- 1 Hunter T, Sefton B M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 1311
- 2 Swarup G, Speeg K V, Cohen S et al. *J Biol Chem*, 1982; 257: 7298
- 3 Tonks N K, Diltz C D, Fischer E H. *J Biol Chem*, 1988; 263: 6722
- 4 Lin M-F, Clinton G M. *Biochem J*, 1986; 235: 351
- 5 Okada M. et al., *Biochem J*, 1986; 239: 155
- 6 Boivin P, Galand C. *Biochem Biophys Res Comm*, 1986; 134: 557
- 7 Swarup G, Cohen S, Garbers D L. *J Biol Chem*, 1981; 256: 8197
- 8 Chernoff J, Sells M A, Li H-C. *Biochem Biophys Res Comm*, 1986; 121: 141
- 9 Rotenberg S A. et al. *Biochem J*, 1987; 243: 747.
- 10 Srivastava A K et al. *FEBS Lett*, 1988; 238: 156
- 11 Nelson R L et al. *Mol Cell Biol*, 1984; 4: 1003
- 12 Gentleman S, Martensen T M, Digiovanna J J et al. *Biochim Biophys Acta*, 1984; 798: 53
- 13 Frank D A, Sartorelli A C. *Biochem Biophys Res Comm*, 1986; 140: 440
- 14 Klarlund J K. *Cell* (Cambridge, Mass.), 1985; 41: 707
- 15 Liebow C, Reilly C, Serrano M et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 2003
- 16 Charbonneau H, Tonks N K, Walsh K A et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 7182

[本文于1989年12月26日收到, 1990年4月3日修回]