

乙酰胆碱酯酶的结构与功能研究进展

朱 美 财

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提 要

乙酰胆碱酯酶是多分子型复杂蛋白质, 广泛分布于各种组织, 其主要功能是催化水解神经递质乙酰胆碱, 近年来发现其有非胆碱能活性。同一组织不同分子型乙酰胆碱酯酶其催化机制及 K_m 具有相似性, 但其一级结构不同。乙酰胆碱酯酶催化效率很高, 其催化机制包括靠近、定向、一般酸碱催化及电荷接力系统等过程。乙酰胆碱酯酶在粗面内质网内合成, 其代谢过程受某些因素的调节, 在某些病理状态下酶活性发生改变。

关键词 乙酰胆碱酯酶, 分子型, 一级结构, 活性中心, 催化机制

乙酰胆碱酯酶 (AChE, EC 3.1.1.7) 是一种多分子型复杂蛋白质, 在中枢及外周神经系统与乙酰胆碱 (ACh) 受体一起参与完成神经—神经及神经肌肉突触之间动作电位的传递, 其主要生理功能是催化水解阳离子性神经递质 ACh。AChE 除存在于神经肌肉组织中外, 还分布于其他组织如人红细胞膜、血小板、巨核细胞及人血清中^[1]。这提示 AChE 除水解 ACh 之外, 还可能有其他功能。最近的研究表明: AChE 具有自身催化作用, 其自身水解肽片能催化水解脑啡肽等神经肽, 并发现 AChE 有细胞生长调节作用。现在, 一些种类 AChE 的一级结构已由其 cDNA 序列推导出来^[2-4], 不同分子型 AChE 的结构差异已从分子基因水平上阐明了。AChE 结晶已获成功^[5], 并分析了其三维空间结构。通过化学修饰、X 光衍射及各种底物同 AChE 反应动力学分析等方法建立了 AChE 活性中心结构及催化机制模型。AChE 的代谢及病理状态下 AChE 的改变也开始引起人们的注意。

1 AChE 的分子型

AChE 是一分子糖蛋白, 糖基约占总重

量的 15%。AChE 按其分子特征可分为球型 (对称型) 及尾型 (不对称型)。球型单体 (G_1) 分子量约 70—80kD, 单体通过单一的链间二硫键装配成二聚体 (G_2), 两个二聚体通过范德华氏力结合为四聚体 (G_4)。球型四聚体通过加入三股胶原样尾而成为尾型四聚体 (A_4)。胶原性尾可通过二硫键直接与四聚体中的二聚体相连。每一个尾有三个联接点, 可分别形成尾型八聚体 (A_8) 及十二聚体 (A_{12}) (图 1)。

球型 AChE 又可分为两个亚类, 即与膜结

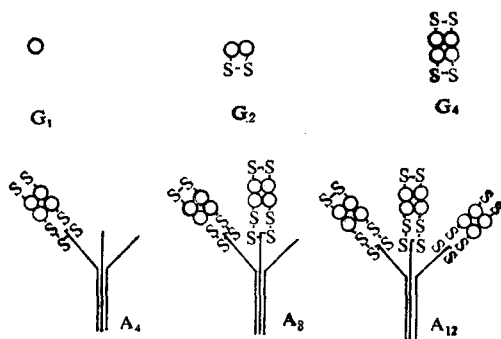


图 1 AChE 的分子型^[6]

合在一起需要去污剂溶脱的疏水性或两亲性蛋白及不与去污剂结合的可溶性蛋白。后者由神经细胞分泌,也可由尾型或疏水性球型分子在体外以蛋白酶水解而得到。疏水性球型通过糖磷脂共价结合于细胞表面,尾型以其尾非共价键锚于细胞膜基底层。不同分子型 AChE 具有相同的催化活性及 K_m ,但电泳迁移率、肽图及氨基酸组成有微小差别。采用不同的提取方法可将不同分子型 AChE 从组织中提取出来,用低盐含 TritonX-100 液可将球型 AChE 提取出来,而高盐缓冲液或胶原酶能将尾型 AChE 提取出来。

2 AChE 的分布

2.1 神经肌肉组织 神经组织中的 AChE 主要是球型。哺乳动物脑中 G_4 占全部 AChE 的 80%—90%,其余大部分为 G_1 ^[6]。但也有例外,如人脑迈内特 (Meynert) 核中含相当量的 G_1 及 G_2 AChE^[7]。人脑 AChE 活性分布由高到低的顺序分别是尾状核、迈内特核、黑质、小脑、海马、颞皮质、顶皮质及穹隆部。大鼠小脑含等量的 G_1 及 G_4 AChE。大鼠脑干含相当量的 G_2 AChE。哺乳动物中枢神经系统尾型 AChE 占全部 AChE 的 0.02%,而爬行类、两栖类及鱼类动物脑中尾型 AChE 占总量的 15%。鸟类脑中尾型 AChE 占总量的 1%—7%。在外周神经及自主神经系统中主要为 G_4 型。鸟类交感神经节中 A_{12} AChE 占总量的 10%,哺乳动物交感神经节也有相当量的 A_{12} AChE 存在。AChE 的亚细胞分布研究显示 G_1 及 G_2 AChE 主要分布于细胞内,其中有至少三分之二的酶结合于细胞内膜上。 G_4 型 AChE 主要分布于细胞外膜。 A_{12} AChE 主要分布于细胞外膜,也有细胞内含少量 A_{12} AChE 的报道。

电鳗肌肉中的 AChE 几乎全部为 A_{12} 型。哺乳动物肌肉 AChE 呈多型性,主要为 A_{12} AChE,也含有其他分子型 AChE。快、慢反应肌细胞之间 AChE 某些分子型分布差异较大。慢反应肌细胞 AChE 含量比快反应肌细胞低。

另外,慢反应肌细胞与快反应肌细胞相比含 A_4 少含 A_8 多。不对称型 AChE 主要分布于肌细胞外表面,而在肌细胞内也有少量分布。

2.2 其他组织 AChE 还分布于非胆碱能组织如红细胞膜、血小板、巨核细胞及血清,它们的功能仍不清楚。用 AChE 抑制剂可促进巨核细胞分化增殖,推测 AChE 具有细胞生长调节作用。人红细胞膜 AChE 为疏水性球型二聚体,两个聚合体之间由一个二硫键联结,还原后成为 75kD 的单体。人血清中含两种 AChE,沉降系数分别为 7.6S 及 10.9S。前者可能为 G_2 ,来源于红细胞膜 AChE 的蛋白水解产物、后者可能为四聚体,起源于神经细胞,由 A_4 经蛋白酶水解或 G_4 转化而来。

3 AChE 的一级结构及二级结构

加利福尼亚及 marmorata 电鳗 AChE^[2,3]、果蝇 AChE^[4] 的氨基酸序列已由其 cDNA 序列推导出来。加利福尼亚电鳗电鳗器官 AChE 的一级结构有下列特点。在氨基末端有 21 个氨基酸组成的先导肽,富含疏水性氨基酸。成熟的天然 AChE 含 575 个氨基酸,由前体经酶切割去先导肽衍生而来,计算分子量为 65612D。由于天然催化亚基含 7%—8% 的糖基,因此电泳测定分子量为 70—80kD。第 200 位丝氨酸为活性中心丝氨酸。AChE 含三对链内二硫键,其位置位于^[8] Cys 67-Cys 94、Cys 254-Cys 265 及 Cys 402-Cys 521 之间,形成三个二硫键环。Cys 572 参与链间二硫键的形成。根据 Asn-X-Ser/Thr 糖基化原则,第 59、416、457 及 523 位 Asn 可能为糖基化部位。几种 AChE 及 Ser 蛋白酶活性中心 Ser 周围的氨基酸序列比较(图 2)显示 AChE 活性中心 Ser 周围序列具有极大的保守性,与马脂族酯酶及人假性胆碱酯酶有很大的相似性,而与其他 Ser 蛋白酶差异较大。

Marmorata 电鳗 AChE 的先导肽由 24 个氨基酸组成。成熟的 marmorata AChE 亦由 575 个氨基酸组成,全序列中仅有 13 个氨基酸序列与加利福尼亚电鳗 AChE 不同。果蝇

↓

T. Californica AChE	H ₂ N-T-V-T-I-F-G-E-S-A-G-A-S-V-G-M-H-I-L-S-COOH
T. marmorata AChE	-L- - - - -
Drosophila AChE	-W-M- -L- - - - -S-S- -N-A-Q-L-M- -
Electrophorus electricus AChE	-G- - - -S-E- - -A-G-
equine aliesterase	- - - - -A- - -
human serum BuChE	-S- - -L- - - - -A- - -S-L- -L- - -
bovine trypsinogen	-L-D-S-C-Q- -D- -G- -P-V-V-C-S-G-L-
porcine trypsin	-L-D-S-C-Q- -D- -G- -P-V-V-C-N-G-Q-
bovine milk LpL	-I-G-I-H-W- -G- -P-N-Q-L-N-G-A-V-P- -N-

图2 AChE 及其他丝氨酸酶活性中心氨基酸序列比较

↓示活性中心丝氨酸,在加州电鳗 AChE 为第 200 位氨基酸 ●示氨基酸残基与加州电鳗 AChE 相同
BuChE,假性胆碱酯酶; LPL, 脂蛋白酯酶

AChE 先异肽由 41 个氨基酸组成,成熟 AChE 由 610 个氨基酸组成,氨基酸序列除活性中心 Ser 周围外与电鳗 AChE 有较大差异。比较加利福尼亚电鳗 AChE 与甲状腺球蛋白的一级结构显示全部 AChE 序列中 28% 的氨基酸残基与甲状腺球蛋白的羧基端区域序列相同。果蝇 AChE 579—598 位氨基酸残基之间序列与猪胰蛋白酶活性中心 Ser 周围 171—189 位氨基酸残基之间序列有较大的同源性^[9],电鳗 AChE 25kD 片段 N 端氨基酸序列及电鳗 AChE 391—409 位氨基酸残基之间序列与牛胰蛋白酶原及大鼠胰蛋白酶原 I, II, IV 端氨基酸序列有较大的同源性^[10],推测 AChE 的胰蛋白酶样活性有其结构基础。

AChE 是多分子型复杂蛋白质,不同种属 AChE 其一级结构差异较大。电鳗电器官 AChE 与人红细胞膜 AChE 氨基酸组成有较大差异,显示其一级结构的不同。同一种属、同一组织不同分子型 AChE 之间流体力学特征及细胞定位不同。按其结构差异可将多型性种类分为两类:一类为由多个催化亚基组成有胶原蛋白尾连结并定位于基底层尾型(A型);另一类为由均一亚基组成的寡聚体,包括可溶性的及膜结合的 AChE。后者含一疏水性二聚体(H型),由糖磷脂以酰胺键与蛋白质的羧基末端相连,并定位于细胞外膜^[11]。加利福尼亚电鳗 AChE 的 A 型及 H 型催化亚单位的前 535 个氨基酸序列是一致的,其余的氨基酸序列不同。H 型 AChE 专一的羧基端含二肽

Ala-Cys, 为糖磷脂吸附位点^[12]。A 型 AChE 催化亚基的多型性羧基端由 40 个氨基酸组成。电鳗 AChE A 型及 H 型均来源于单一的基因,但 mRNA 拼接不同^[13]。每一蛋白由三个外显子编码,外显子 1 及外显子 2 编码两个分子型共同的序列^[14],外显子 3A 及 3H 分别编码 A 及 H 型催化亚基专有的羧基端序列。外显子 1 编码先导肽及第 1 至 480 位氨基酸之间的序列,外显子 2 编码第 481—535 位氨基酸之间的序列。H 型 AChE 外显子 3H 编码的 30 个氨基酸是糖磷脂附着的信号,其中有 28 个氨基酸在添加糖磷脂时被切掉。

尾型 AChE 的胶原蛋白尾是由富含甘氨酸、羟脯氨酸及羟赖氨酸多肽组成的三股螺旋。每一多肽链含一短的非胶原蛋白肽(8kD)与每一球型亚基形成两个二硫键。电鳗 AChE (11S) CD 光谱显示其含 33% α 螺旋、23% β 片层(14% 反平行及 9% 平行)、17% 转角及 26% 其它结构。晶体结构分析显示电鳗 AChE 单体含 12 股 β 片层及环绕其周围的 14 个 α 螺旋。

4 活性中心结构及催化机制

立体结构分析显示 AChE 最突出的特征是含一深而窄的狭口, AChE 催化活性基团位于此狭口中。按功能分 AChE 活性中心由三个主要区域组成^[15]。a. 酯解部位,含活性中心丝氨酸,在电鳗 AChE 为第 200 位 Ser,还包括第 440 位组氨酸咪唑基功能基团^[1]。组氨酸

有一固有的 pK_a 为 6.3。在立体结构上 His440 与 Ser 200 相距很近, Glu 327 与 His 440 也相距很近。Glu 327 可能代替 Asp 参与电荷接力系统。b. 季铵基团结合部位, 由于 ACh 含季铵阳离子部分, 推测 AChE 活性中心含阴离子部位与之结合。起电盘 AChE 之 ACh 结合部位含 6—9 个负电荷, 而电鳗 AChE 立体结构分析显示其活性中心周围含相当少的负电荷, 但有许多芳香族氨基酸残基分布在催化三联体附近。由此推论胆碱的季铵部分主要通过活性中心芳香族氨基酸残基基团的 π 电子起反应而与 AChE 结合。氨基酸序列分析显示此结合部位含有四肽 Gly-Ser-X-Phe, X 在电鳗 AChE 为 Phe, 果蝇 AChE 为 Trp^[3]。c. 疏水性区域, 与酯解或季铵基团结合部位连接或在其附近, 在与芳香基底物结合中起重要作用。活性中心疏水性区域含色氨酸或酪氨酸等芳香族氨基酸。AChE 的第四个活性部位为外周结合部位, 能结合 ACh 及其他阳离子配体如三碘季铵酚、 α -管箭毒碱及溴化十甲鎗等。此部位在电鳗 AChE 含第 151—264 及 270—278 位残基之间的两段序列。在立体结构上这两段序列位于活性中心狭口表面边缘。外周结合部位被配体占领后往往导致活性中心构象的改变。

Peter 等^[46]比较了各种季铵盐复合物对 AChE 催化水解 ACh 或硫代乙酰胆碱的抑制作用, 发现底物疏水性在与 AChE 结合过程中起重要作用。ACh 通过静电及疏水性反应与 AChE 酯解部位以外区域结合。ACh 的酰基具有反应性而不为结合所需要。含阳离子头的 ACh 在外周结合部位被捕获, 通过扩散到达酶的活性中心。ACh 两个亚甲基的疏水性反应使亲合力增加约 10 倍, ACh 在季铵结合部位及疏水性区域的结合使其成直线并置于适合的位置以利于活性中心 Ser 羟基氧对 ACh 酰基上的碳发生亲核攻击。活性中心 His 咪唑基接受继而释放质子使 AChE 与底物先形成四面中间体继而转化为乙酰化酶并释放出第一个水解产物胆碱。活性中心 Glu 的羧基吸引

His 咪唑基一个 N 上的质子促进四面中间体的形成。继而, His 咪唑基吸引水分子中的质子产生羟基离子攻击乙酰化酶形成另一种四面中间体并水解为乙酸及游离的 AChE (图 3)。

ACh 的季铵基团使其对亲核攻击的敏感性增加。AChE 被乙酰化后产生的带负电荷的胆碱阳离子氧与疏水性腔之间的排斥作用协助酶解产物的排出。乙酰化酶水解快速, 半衰期小于 0.1ms。AChE 催化过程中表现出构象变化, AChE 活性中心构象变化是其催化诱导契合模型的固有特征。AChE 具有很高的催化能, 是已报道酶促反应中最高者之一, 对生理性底物 ACh K_E 大于 $10^8 M^{-1} S^{-1}$, 因此 ACh 向活性中心的扩散可能是催化速度决定性因素。AChE 是一广谱催化剂, 有广泛的底物, 可以催化芳香酯类、酰基苯胺类、酰氨类、硫代酯类、硒代酯类等 ACh 类似物的反应。对 AChE 特异性最高的底物是 ACh、硫代乙酰胆碱及硒代乙酰胆碱。AChE 催化反应最适 pH 略有差异, 电鳗 AChE 的最适 pH 在 7.5—8.0 之间, 人脑及人红细胞膜 AChE 为 7.4。电鳗 AChE 同人红细胞膜 AChE 反应动力学相似。

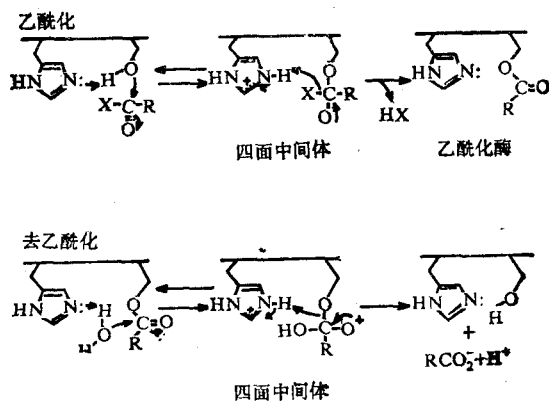


图 3 AChE 的催化机制

5 AChE 的代谢

AChE 是多分子型蛋白质, 电鳗 AChE 的多分子型产生于单一的基因及不同的 mRNA 拼接。鸡肌肉或神经元多分子型 AChE 也来自单一基因但由不同的 mRNA 拼接或不同的启动子产生^[47]。通过测定天冬酰胺连结的寡糖

发现鸟类肌肉培养组织中 7S 及 11.4S 分子型 AChE 在粗面内质网于 5min 内合成,在高尔基体内装配或糖基化再需要 45—60min. 11.4S AChE 于粗面内质网出现 90—120 min 后 19S (A_{12}) AChE 在高尔基体远侧池内装配完毕. 一般来讲, G_1 AChE 是起始翻译物,所有大的催化单位由单体组成或伴有小的修饰如某些短疏水性肽的插入或缺失. G_4 由两个 G_2 装配而成,而尾型可能是由胶原蛋白样尾连续地加入一、二或三个 G_4 而成.

AChE 是第一个被证实在神经轴突内双向快速转运的蛋白质. 狗坐骨神经中, 10% AChE 被运向神经末梢, 5% AChE 返回细胞体, 向末梢及细胞体运动的速度分别为 400 及 260 mm/d. 向外周神经末梢转移的酶中 G_4 占 80%—85%. 鸡坐骨神经中, AChE 向末梢及细胞体运动的速度分别为 400 及 145—175 mm/d, 几乎所有的 A_{12} 为快速轴浆运输而 G_1 及 G_2 为慢速轴浆运输. AChE 分为泌型蛋白质. 神经及肌肉组织释放的 AChE 主要为 G_4 , 少数为 G_1 及 G_2 . 转运至神经末梢的 AChE 在局部积累形成池, 通过刺激诱导使之释放. AChE 耗竭后再经轴浆运输补充至原来水平. Rotundo 等^[17]认为 AChE 释放与 ACh 受体有相同的通道及机制, 此机制依赖于膜的流动性, 通过氧化磷酸化供能并需要糖基化及微管的参入. 组织培养的肌肉 AChE 以两种速度降解, 细胞内 AChE 转化的半衰期为 1.5h, 而细胞表面膜或基底层连的 AChE 转化半衰期为 40—50 h. 培养的神经肌肉细胞的 AChE 释放受多种因素调节, 神经生长因子使大鼠 PC₁₂ 成神经细胞瘤细胞 mRNA 合成增加, 从而显著增加 AChE 的分泌, 主要为 G_4 AChE. 微管抑制剂阻止细胞内转运从而抑制 AChE 释放. 蛋白糖基化抑制剂可能通过增加 AChE 降解而降低 AChE 释放. 二氢吡啶类钙通道拮抗剂通过抑制 AChE 的生物合成而降低 AChE 分泌^[18].

6 病理状态下 AChE 的变化

去神经大鼠膈肌 G_1 AChE 活性在 24h 内

下降, 主要发生于非终板区, 而终板特异性尾型 AChE 在 24h 后才突然下降. 小鼠肌肉营养不良骨骼肌中 G_4 AChE 降低或缺乏. 鸡肌肉营养不良却表现为 AChE 活性增加. Alzheimer 型早老性痴呆患者大脑皮层的 AChE 活性显著下降^[19], 主要由神经元变性及 AChE 合成减少所致. 此型病人脑脊液 AChE 活性随病情发展而下降, AChE 活性的降低可作为脑萎缩过程中中枢胆碱能神经异常的指征. 先天性巨结肠病人直肠组织中 AChE 活性明显增加, 以 G_4 AChE 最显著. 先天性神经管缺损胎儿羊水中 AChE 活性明显高于正常组^[20], 增加的 AChE 主要为 10.5 S, 可能来自暴露的胎儿神经元. 羊水中 AChE 活性增高可作为先天性神经管缺损产前诊断的一个重要指标.

结 语

经过数十年的研究, 目前在 AChE 分子型、分布、一级结构及基因结构分析方面已取得了相当大的进展, 电鳗 AChE 的结晶已成功并进行了 X 线衍射分析, 建立了其立体结构及催化机制模型. 但 AChE 是多分子型复杂蛋白质, 而且某些组织 AChE 纯化相当困难, 要从基因及空间结构方面完全弄清 AChE 的结构及催化机制还需要一段时间才能完成. 在 AChE 领域仍需进一步证实的方面包括: a. 不同组织不同分子型 AChE 多型性的分子基础; b. AChE 在细胞中生物合成及装配的机制及调节因素; c. AChE 的催化机制; d. AChE 的非胆碱能功能. AChE 结构与功能研究的进展必将对神经生理学、药理学、毒理学及生物化学等领域起推动作用.

本文承蒙孙曼霁教授审阅, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Small D H. *TIBS*, 1990; 15: 213
- 2 Schumacher M C, Camp S, Mautlet Y *et al.* *Fed Proc*, 1986; 45: 2976
- 3 Sikorav J L, Krejci E, Massoulie J. *EMBO J.* 1987; 6: 1865
- 4 Hall LMC, Spierer P. *EMBO J.* 1986; 5: 2949

(下转 356 页)

确不同于一般 DNA。

总之,我们建立的水稻染色体 DNA PFGE 方法,为获得大量纯化的大片段植物 DNA,构建 YAC (yeast artificial chromosome) 文库,以及限制酶分析等提供了方便。另外,实验中发现的“240 kb 单位”DNA 现象可能为进一步分析植物染色体 DNA 的结构提供重要的线索。

参 考 文 献

- 1 Carle G F *et al. Nucleic Acids Res*, 1984; 12: 5647
- 2 Schwartz D C *et al. Cell*, 1984; 37: 67
- 3 Carle G F *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3756
- 4 Barlow D A, Lehrach H. *Trends Genet*, 1987; 3: 167
- 5 Brown WRA, Bird A P. *Nature*, 1986; 322: 477
- 6 Collins F S *et al. Science*, 1987; 235: 1046
- 7 Raymond A J. *Plant Mol Biol*, 1989; 12: 341
- 8 刘良式等. 植物遗传操作技术. 北京: 科学出版社, 1988: 223
- 9 Ahmed El-metainy *et al. Mutation Res*, 1971; 13: 337
- 10 Szabados L *et al. Planta*, 1981; 151: 141
- 11 朱圣庚,黄仪秀. 生物化学与生物物理进展, 1987;(5): 67
- 12 Kenwrick S *et al. Cell*, 1987; 48: 351
- 13 Stoilov L M *et al. J Cell Sci*, 1988; 88: 243

ANALYSIS OF CHROMOSOME DNA OF RICE USING PFGE TECHNIQUE

Zhong Ling Li Wenzhe Liu Liangshi

(Zhongshan University, Biotechnology Research Center, Guangzhou 510275)

ABSTRACT

Plant chromosome DNAs released from intact nuclei were analysed in PFGE and it showed that rice chromosome DNAs existed in a form of “240kb-like units” in a releasing condition of this experiments. These units with restriction enzyme digestion were shown to be chromosome-size DNAs up to 1500kb. The possibility of these “240kb-like units” as fundamental organization units of chromosome DNAs was discussed. This technique has been established for a basis of isolating and purifying large DNA fragments, constructing YAC library and restriction enzyme analyzing.

Key words PFGE(pulse field gradient gel electrophoresis), rice, chromosome DNA

(上接 342 页)

- 5 Sussman J L, Harel M, Frolov F *et al. Science*, 1991; 253: 872
- 6 Brimijoin S. *Progress I Neurobiol*, 1983; 21: 291
- 7 Attack J R, Perry E K, Bonham J R *et al. J Neurochem*, 1986; 47: 263
- 8 Taylor P, Cchumacher M, Macphee-Quigley K *et al. Trend I Neurosci*, 1987; 10: 93
- 9 Small D H. *Neurosci Lett*, 1988; 94: 237
- 10 Small D H, Simpson J. *Neurosci Lett*, 1988; 89: 223
- 11 Roberts W L, Santikarn S, Reinhold V N *et al. J Biol Chem*, 1988; 263: 18776
- 12 Gibney G, Macphee-Quigley K, Thompson B *et al. J Biol Chem*, 1988; 263: 1140
- 13 Sikorav J L, Duval N, Anselmet A *et al. EMBO J*, 1988; 7: 2983
- 14 Maulet Y, Camp S, Gibney G *et al. Neuron*, 1990; 4: 289
- 15 Quinn D M. *Chem Rev*, 1987; 87: 955
- 16 Peter T W, Waser P G. *Eur J Pharmacol*, 1989; 172: 165
- 17 Rotundo R L, Gomey A M, Fernandez V C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 7805
- 18 Decker M M, Berman H A. *J Biol Chem*, 1990; 265: 11796
- 19 Hammond P, Brimijoin S. *J Neurochem*, 1988; 50: 1111
- 20 Kasmusser A G, Sorensen K, Selmer J *et al. Clin Chim Acta*, 1987; 166: 17