

- 1987; 84(1): 294
- 5 Williams A F, Barclay A N. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol*, 1988; 6: 381
  - 6 Lubin D M. Requirements for the attachment of a glycopospholipid membrane anchor to decay accelerating factor (DAF). *Complement and Inflammation*, 1989; 6 (5): 363
  - 7 Asch A S, Kinoshita T, Jaffe E A *et al.* Decay accelerating factor is present on cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Exp Med*, 1986; 163(1): 221
  - 8 Low M G, Saltiel A R. Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Science*, 1988; 239: 268
  - 9 Hynes R O. Integrins A family of cell surface receptors. *Cell*, 1987; 48(4): 549
  - 10 Akiyama S K, Yamada S S, Chen W T *et al.*: Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly and cytoskeletal organization. *J Cell Biol*, 1989; 109(2): 863
  - 11 Picaud J P, Carpentier, Schifferli J A. Difference in the clustering of complement receptor type 1(CR<sub>1</sub>) on polymorphonuclear leukocytes and erythrocytes: effect on immune adherence. *Eur J Immunol*, 1990; 20(2): 283
  - 12 朱大翔. 红细胞免疫的分子生物学研究. *中国免疫学杂志*, 1991; 7(增刊): 4
  - 13 Sewell W A, Brown M H, Clipstone N A *et al.* The T lymphocyte CD2 antigen-genetic and functional studies. *Transplantation Proceedings*, 1989; 21(1): 41
  - 14 朱大翔. 免疫球蛋白多基因家族及其在免疫学的研究进展. *免疫学杂志*, 1991; 7(2): 125
  - 15 Haynes B F, Telen M J, Hale L P *et al.* CD44—a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology Today*, 1989; 10(12): 423
  - 16 Larner J, Cheng K, Schwartz C *et al.* Chemical mechanism of insulin action via proecolytic formation of mediator peptides. *Mol Cell Biochem*, 1981; 40(3): 155
  - 17 Gaulton G N, Kelly K L, Pawlowski J *et al.* Regulation and function of an insulin-sensitive glycosylphosphatidylinositol during T lymphocyte activation. *Cell*, 1988; 53: 963
  - 18 Flamigni F, Rossoni C, Stefanelli C *et al.* Polyamine metabolism and function in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1986; 18: 3

## 空泡膜类型 H<sup>+</sup>-ATPase 的研究进展\*

王延枝 许献忠

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

### 提 要

真核细胞内空泡细胞器, 如高尔基体、内质网、溶酶体等, 膜上存在的质子泵 ATPase 与线粒体类型的质子泵 ATPase 类似。近几年对该类型 H<sup>+</sup>-ATPase 的结构、作用机制进行了深入的研究, 证明这是一类新型质子泵, 在进化的过程中与线粒体类型的 H<sup>+</sup>-ATPase 有密切的亲缘关系。

**关键词** 液泡膜, V-ATPase, H<sup>+</sup>-ATPase

现已知的膜质子泵 ATPase 有 3 种: a. 质膜 E<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 类型的 P-ATPase; b. 线粒体(或称真细菌) F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> 类型的 F-ATPase, 即 ATP 合成酶; c. 空泡膜类型的 V-ATPase, 该类型 ATPase 广泛地存在于真核细胞的高尔基体、

内质网、溶酶体、嗜铬颗粒、笼蛋白衣被小泡 (clathrin-coated vesicle) 以及植物和酵母的液泡膜上, 是近年来研究较多的一类新型质子

\* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1991-11-24 修回日期: 1992-03-30

泵 ATPase<sup>[1]</sup>。F-和 V-ATPase 在结构和生化性质方面有许多相似之处，但有充分的证据说明，这是两种不同类型的质子泵 ATPase<sup>[2]</sup>。在真核细胞中，两者最根本的区别在于酶复合物中各种亚基的基因分布，V-ATPase 所有亚基的基因都分布在核 DNA 中，F-ATPase 亚基的基因，有些在核 DNA 而另一些在细胞器 DNA 中<sup>[3]</sup>。本文简要叙述近几年来 V-ATPase 的结构与功能的研究进展。

### 1 V-ATPase 的结构与功能

植物液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 与所有的 V-ATPase 有类似的结构，最近 J. M. Ward 和 H. Sze 的工作证明了这一点。他们采用 Sephacryl S-400 凝胶过滤和 Q-Sepharose 离子交换的方法纯化燕麦根液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase，经 SDS-PAGE 9%—15% 的梯度分离，结果表明这个分子量为 650kD 的 ATPase，由 10 种多肽组成，用 KI 和 Mg<sup>2+</sup>-ATP 溶液处理液泡膜微囊，释放出 70, 60, 44, 42, 36 和 29kD 的多肽，留在膜上的多肽并无水解 ATP 和泵质子的活性，这说明释放出的多肽为膜的外周蛋白。图 1 是 J. M. Ward 和 H. Sze 提出的燕麦根液泡膜的结构模式图<sup>[3]</sup>。70kD 的多肽

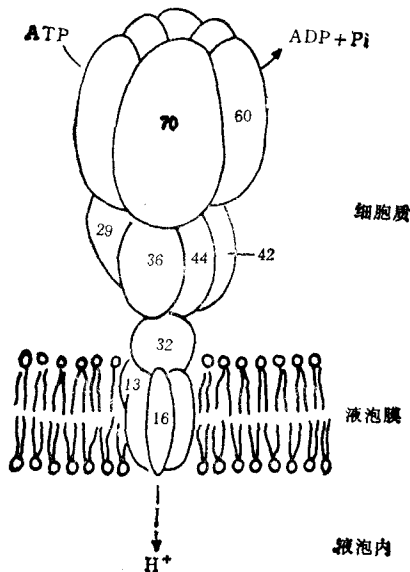


图 1 燕麦根液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 的结构

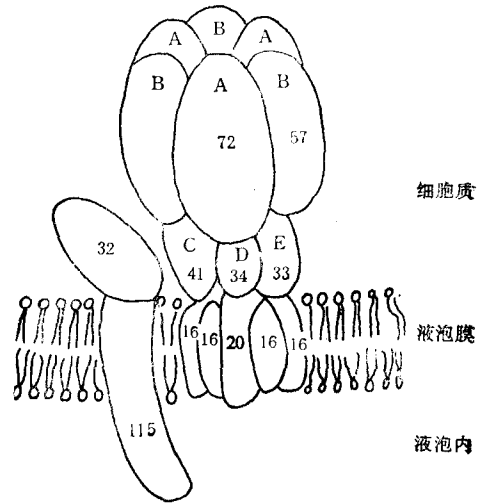


图 2 嗜铬颗粒膜 H<sup>+</sup>-ATPase 的结构

为酶的催化部位，60kD 的多肽为底物结合部位，16 和 13kD 的两条多肽与膜脂结合形成脂蛋白，16kD 的多肽可与 DCCD (二环己基碳二亚胺) 结合，可能参与质子通道的形式。图 2 为嗜铬颗粒膜 H<sup>+</sup>-ATPase 的结构模式图。它与溶酶体膜 H<sup>+</sup>-ATPase 有类似的亚基结构。水溶性部分有 A, B, C, D 和 E 五种多肽，脂溶性部分有 16 和 20kD 两条多肽与膜结合形成脂蛋白，39 和 115kD 的两条多肽为附属亚基 (accessory subunit)，溶酶体丰富的细胞含有大量可翻译为 39kD 多肽的 mRNA，对编码这条多肽的基因已进行了克隆和序列分析<sup>[4]</sup>。图 2 中所标的 32kD 的多肽就是指这条 39kD 的多肽。根据 SDS-PAGE 测定这条多肽的分子量为 39kD，但是按照编码这条多肽的 cDNA 序列推算这条多肽的分子量应为 32kD<sup>[5]</sup>。目前在溶酶体膜 H<sup>+</sup>-ATPase 中尚未找到 115kD 的多肽，是否所有的 V-ATPase 分子中都含有这种高分子量的附属亚基，迄今尚未定论。去年 M. S. Perin 等人提出，高分子量的附属多肽应是各种来源的 V-ATPase 的共同成分。他们从笼蛋白衣被小泡 H<sup>+</sup>-ATPase 中分离出包括 116 和 38kD 在内的 9 条多肽。确定 116kD 的多肽由 838 个氨基酸残基组成，全肽分为两部分，氨基端一半含亲水氨基酸残基多，这段疏水肽段多次跨膜折叠，根据疏水度推断跨膜片

段的氨基酸序列和残基数<sup>[6]</sup>。

## 2 液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 的性质和催化机理

液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 最明显的特征是被硝酸盐抑制和阴离子激活,对于燕麦根液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 来说,各种单价阴离子激活的顺序为: Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 对叠氮盐和钒酸

盐不敏感<sup>[2]</sup>。

液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 的催化机理,根据 E. Uchida 等用酵母在稳态和非稳态两种条件下所作的研究结果,可用图 3 表示<sup>[7]</sup>。稳态条件下,反应混合液中有过量的 ATP 存在,酶催化 ATP 的水解采取多向循环路线 (multi-cycle)。非稳态条件下,反应液中仅有少量的 ATP<sup>32</sup>, ATP 的水解路线为单向循环 (single-

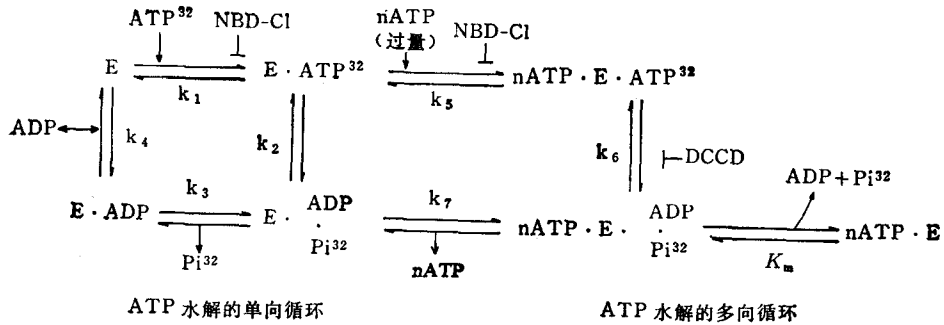


图 3 液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 的催化机理

图中 NBD-Cl (7-氯-4-硝基苯并咪唑)和 DCCD 的抑制部位用上符号表示。K<sub>m</sub> 为米氏常数, K<sub>i-7</sub> 为每步反应的平衡常数。

cycle)。

ATP 首先与对 NBD-Cl 敏感的催化部位结合形成酶-ATP 复合物,水解 ATP 生成的 ADP 和 Pi 先后从酶分子上释放出来。如果有过量的 ATP 存在,ATP 作为正效应物激活催化部位,进行多向循环路线形成 nATP · E<sub>ATP</sub><sup>32</sup> 复合物,既可以先释放出 nATP,也可以先释放出 ADP 和 Pi<sup>32</sup>。在两种情况下,NBD-Cl 都有抑制作用,它的作用是使催化部位失活,阻止酶-ATP 复合物的形成。只有在 ATP 过量时,DCCD 才有抑制作用,DCCD 不影响酶与 ATP 的结合。这种催化机理模式与线粒体 H<sup>+</sup>-ATPase 的催化机理类似<sup>[8,9]</sup>。

为了说明液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 分子中与膜脂结合的小分子多肽在水解 ATP 中的作用,R. Hirata 等采用放射性失活分析法 (radiation inactivation analysis),把液泡膜微囊置于 Co<sup>60</sup> γ 射线照射,两种 ATP 水解路线都受到抑制,对射线照射的敏感性,单向循环比多向循环多 4 倍。采取靶理论 (target theory) 的

方法,测定参与单、多向循环的多肽,其分子量分别为 0.9—1.1 × 10<sup>5</sup> 和 4.1—5.3 × 10<sup>5</sup>D。这说明在单向循环中只需要 V-ATPase 的 A 和 B 两个亚基参加,在多向循环中,V-ATPase 必需有适当的寡聚结构,即 (A,B)<sub>m</sub>C<sub>n</sub>, C 代表与膜结合的多肽组分,其中 m 不小于 3,在这种情况下,ATP 水解与泵质子过程偶联,受 DCCD 的抑制<sup>[10]</sup>。

## 3 V-ATPase 的分子遗传学

V-ATPase 的各亚基因克隆和序列分析是近几年才开始进行的工作。萝卜、脉孢杆菌和酵母液泡膜 ATPase 的 A, B 亚基基因的序列分析已经完成<sup>[11-14]</sup>,各种 V-ATPase A, B 亚基的氨基酸序列测定有许多报道。结果表明,不同来源的 V-ATPase 亚基之间表现出极大范围的同源性<sup>[13,14]</sup>。表 1 列出了 F-ATPase 的 α, β 亚基与各种 V-ATPase 的 A, B 亚基之间,相同氨基酸序列所占的百分比。可以清楚地看出,高等植物与真菌 V-ATPase 的亚基之

表1 V-ATPase 与 F-ATPase 亚基间相同氨基酸序列的比例

酶和亚基	相同氨基酸序列的百分比(%)
<b>V-ATPase</b>	
A亚基 脉孢杆菌与萝卜	62
脉孢杆菌与硫化叶菌	50
B亚基 拟南芥与脉孢杆菌	76
拟南芥与硫化叶菌	53
<b>V-和 F-ATPase</b>	
A与B亚基	22—26
A与α亚基	18—23
A与β亚基	23—30
B与α亚基	24—28
B与β亚基	24—28
α与β亚基	22—26

间,相同的氨基酸序列占整个亚基总氨基酸的60%左右, B亚基更保守约占70%,古细菌和真菌、高等植物的 V-ATPase A,B亚基之间的相同氨基酸序列约占50%。F-与 V-ATPase 之间的同源性表明, A与β, B与α之间有较密切的关系<sup>[14]</sup>。

亚基的进化过程。70kD的祖先H<sup>+</sup>-ATPase基因中含有编码ATP结合位点的GXXGXGKT氨基酸序列,这段序列在V-和F-ATPase的A亚基和B亚基中都可找到,其中X代表可变氨基酸。

V-ATPase的催化组分中,仅对E亚基进行了序列测定,它与F-ATPase的γ,δ和ε亚基均无相同的氨基酸序列,即无同源性。这说明γ,δ和ε是ATP合成酶所必需的功能肽, V-ATPase的D和E亚基是细胞器内酸化所必需的功能肽,这些亚基都是进化过程中后来加上去的<sup>[17]</sup>。

编码牛嗜铬颗粒膜和酵母液泡膜V-ATPase的脂蛋白基因已经克隆,并进行了序列测定<sup>[18]</sup>。在具有ATP合成酶功能的F-ATPase和古细菌的V-ATPase分子中,都有8kD的祖先脂蛋白基因产物。真核细胞中V-ATPase的16kD的脂蛋白是ATP合成酶演变为具有质子泵功能,不再具有ATP合成酶功能的重要标志<sup>[17]</sup>。

最近K. Puopolo等人使用各种技术对笼蛋白衣被小泡H<sup>+</sup>-ATPase进行结构分析,结果发现V-和F-ATPase的拓扑结构非常类似,在ATP或Mg<sup>2+</sup>-ATP存在的情况下,用促溶剂(如KI、KNO<sub>3</sub>等)处理这两种酶,可溶性多肽从膜上离解下来,从V-ATPase上下来的多肽有73,58,40,34和33kD,被称之为V<sub>1</sub>,留在膜上的100,38,19和17kD的多肽,被称之为V<sub>0</sub>,两者的差别是: F<sub>1</sub>具有水解ATP的活性, V<sub>1</sub>则丧失了这种活性<sup>[19]</sup>。

深入的分子遗传学研究仍在进行。对于在植物细胞内离子平衡起中心调节作用的液泡来说,液泡膜H<sup>+</sup>-ATPase起着关键作用。日本学者Y. Ohya等人研究酵母的Ca<sup>2+</sup>敏感cis系列突变体时发现,不能利用甘油、乳酸、琥珀酸等作碳源的pet<sup>-</sup>表现型,细胞内维持Ca<sup>2+</sup>平衡的系统受到破坏,分子遗传学和生物化学的研究证明, pet<sup>-</sup>表现型是由于液泡膜H<sup>+</sup>-ATPase的各亚基有不同程度的损伤,丧失了酸化液泡内环境的能力,导致Ca<sup>2+</sup>转运受阻<sup>[20]</sup>。

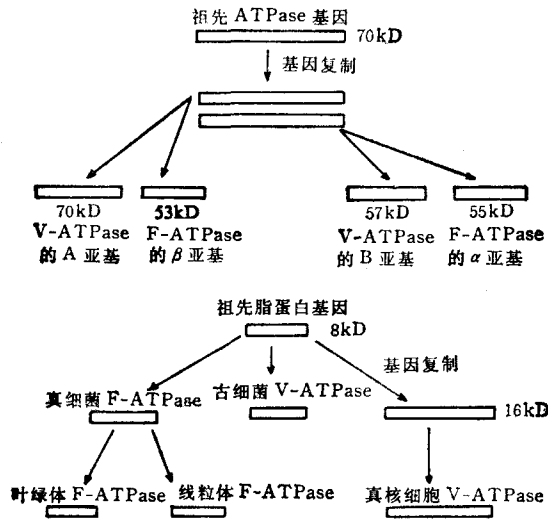


图4 H<sup>+</sup>-ATPase的原始催化组分和与膜结合组分的进行示意图

根据分子遗传学的研究,普遍认为F-和V-ATPase在进化上有密切的亲缘关系.图4所示是F-和V-ATPase两个大亚基和膜脂蛋白的进化过程<sup>[11,15,16]</sup>。

图4中显示了F-和V-ATPase中两个大

V-ATPase 在酸化细胞内各种细胞器内环境的过程中起重要作用, 这种酸化作用为细胞内各种生理生化反应提供了必要的条件。因此 V-ATPase 的深入研究对于医学和农业生产具有重要的理论和实际意义。

### 参 考 文 献

- 1 Nelson N J, Structure, molecular genetics and evolution of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Bioenerg Biomembr*, 1989; 21 (5): 553
- 2 Wang Y, Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase of oat roots. *J Biol Chem*, 1985; 260: 10434
- 3 Ward J M, Sze H. The structure of tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase in oat roots. *Plant Physiol*, 1992a; 99: 170—179
- 4 Moriyama Y, Nelson N. The purified ATPase from chromaffin granule membrane is an anion-dependent proton pump. *J Biol Chem*, 1987; 262: 9175
- 5 Wang S Y, Moriyama Y, Mandel M *et al.* Cloning of cDNA encoding a 32-kDa protein. *J Biol Chem*, 1988; 263: 17638
- 6 Perin S M, Fried A V, Stone K D *et al.* Structure of the 116-kDa polypeptide of the clathrin-coated vesicle/synaptic vesicle proton pump. *J Biol Chem*, 1991; 266: 3877
- 7 Anraku Y, Umemoto N, Hirata R *et al.* Structure and function of the yeast vacuolar membrane proton ATPase. *Bioenerg Biomembr*, 1989; 21(5): 589
- 8 Grubmeyer C, Cross R L, Penefsky H S. Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. *J Biol Chem*, 1982; 257: 12092
- 9 Futai M, Noumi T, Maeda M. Molecular genetics of Fr-ATPase from *E. coli*. *J Bioenerg Biomembr*, 1988; 20:41
- 10 Hirata R, Chsumi Y, Anraku Y. Functional molecular masses of vacuolar membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *seccharomyces cerevisiae* as studied by radiation inactivation analysis. *FEBS Lett*, 1989; 244: 397
- 11 Zimniak L, Ditttrich P, Gogarten J P *et al.* The cDNA sequence of the 69-kDa subunit of carrot vacuolar H<sup>+</sup> ATPase. *J Biol Chem*, 1988; 263: 9102
- 12 Bowmam E J, Tenney K, Bowman B J. Isolation of genes encoding the *neurospora* vacuolar ATPase I. *J Biol Chem*. 1988a; 263: 13994
- 13 Bowmam B J, Allen R, Wechsler M A *et al.* Isolation of genes encoding the *neurospora* vacuolar ATPase II. *J Biol Chem*, 1988b; 263: 14002
- 14 Nelson N, Taiz L. Structure function and evolution of vacuolar ATPase. *Trends Biochem Sci*. 1989; 14: 113
- 15 Mandel M, Moriyama Y, Hulmes J D *et al.* cDNA sequence encoding the 16-kDa protolipid of chromaffin granules implies gene duplication the evolution of H<sup>+</sup> ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 5521
- 16 Nelson H, Nelson N. The progenitor of ATP synthases was closely related to the current vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Lett*, 1989; 247: 147
- 17 Hirsch S. Isolation and sequence of cDNA clone encoding the 31-kDa subunit of kidney vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 3004
- 18 Richard V P. Purification and properties of vanadate and N-ethylmaleimide sensitive ATPase from chromaffin granule membrane. *J Biol Chem*, 1988; 263: 8521
- 19 Pupolo K, Forgas M. Functional ressembly of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem*, 1990; 265: 14836
- 20 Ohya Y, Umemoto N, Tanida I. Calcium-sensitive cis mutants of *seccharomyces cerevisiae* showing a pet<sup>-</sup> phenotype are ascribable to defects of vacuolar membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *J Biol Chem*, 1991; 266: 13971

## 9101-B-1 型多功能生化反应杂交仪简介

多功能生化反应杂交仪是具有翻转、旋转、滚动三种主要功能的生化反应仪器。滚动式反应筒主要用于固相分子杂交; 翻转式反应盘可进行多个杂交袋在反应盒内进行杂交反应; 旋转混匀盘是为了满足许多实验中常有的长时间恒温、颠倒式轻微振荡步骤的需要设计的, 可用于亲和层析基质的制备、蛋白质与配体分子的偶联反应、抗体抗原结合反应、固相、液相吸附反应及生物样品提取过程等。

经多年努力, 已使多功能反应杂交仪能够在生物

化学, 分子生物学、免疫学、分子遗传学等基础医学研究及临床有关实验中得到广泛应用。经中日友好医院、四川华西医科大学、北京市肿瘤防治研究所、北京农业大学、北京大学生物系等单位使用, 获得好评及充分认可, 成为现代基础医学研究中不可缺少的仪器。

[北京协海医学科技开发公司 100094 北京市海淀区西北旺药植所内 电话: 2582347, 2581114—56]