

V 型 H^+ -ATPase 结构和调控机制的研究现状*

祝雄伟 王延枝¹⁾ 王 欢

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 V-ATPase 存在于所有已知的真核生物中, 有极为重要的生理作用. 近几年来, 对 V-ATPase 的结构、功能和调控机制的研究进展很快, 对复合体的组装有了进一步的认识. 对 V-ATPase 的主要亚基已经完成序列测定及分析, 对各亚基生理功能也进行了较为深入的研究. 生物化学及分子生物学工作揭示: 生物体内以多种方式对编码 V-ATPase 主要亚基的基因表达和该酶的活力进行调控.

关键词 V-ATPase, 结构, 调控

学科分类号 Q946.56

1997 年诺贝尔化学奖授予了三位从事 ATPase 研究的科学家, 这既是对他们杰出工作的肯定, 也是 ATPase 研究所具有的重大意义的体现.

80 年代初在真核细胞空泡膜 (vacuoles) 系统上发现了一类新型 ATPase, 因而命名为 V 型 ATPase^[1]. 现已证明, V-ATPase 存在于所有已知的真核细胞中, 是空泡膜系统中最重要致电性质子泵. 最近在细菌和真核细胞质膜上也发现了 V-ATPase 的存在, 最令人惊讶的是前者的偶联离子是 Na^+ 而非 H^+ ^[2]. Wicczorek 等^[3]在对后者进行深入研究的基础上, 提出了“Wicczorek 模式”, 解释上皮细胞质膜的能化机制. 近几年里, 对 V-ATPase 的结构和功能以及调控机制的研究取得很大进展, 下面我们将主要介绍这一方面的成果.

1 V 型 H^+ -ATPase 的结构、组成和组装

V 型 H^+ -ATPase 是一种多亚基的寡聚酶, 其分子量约为 560~740 ku (图 1). 与 F 型 H^+ -ATPase 相似, V 型 H^+ -ATPase 也呈现“球茎”结构: 突出膜外的亲水头部和柄部, 合称为 V_1 , 直径为 9~10 nm; 膜内部分则称为 V_0 . V_1 部分可以像 F_1 一样在促溶剂的作用下从膜上脱落下来, 最近发现完整的 V_1 具有 Ca^{2+} 激活的 ATPase 活性, 在甲醇存在时也具有 Mg^{2+} 激活的 ATPase 活性, 所以也被称为 V_1 -ATPase^[4]. 人们普遍认为 V_0 与 V_1 分离后不具备质子转运活性, 但后来发现经过酸处理活化后, V_0 也能够象 F_0 一样被动转运质子.

虽然促溶性阴离子或者冷刺激能使 V_1 从膜上脱落, 给 V_1 和 V_0 亚基组成的研究提供了方便,

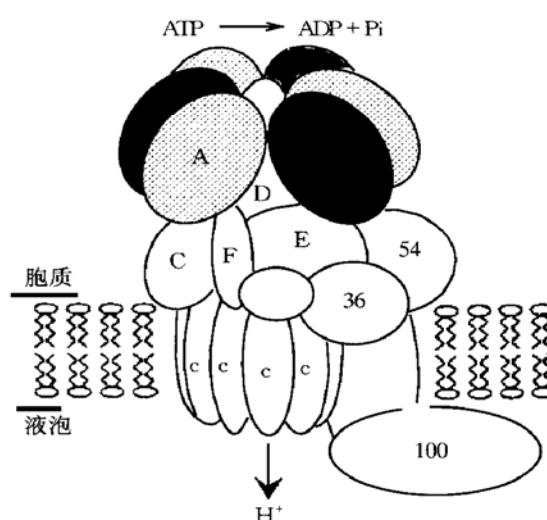


图 1 酵母 V-ATPase 的结构模型^[5]

但是较长时间里对 V 型 H^+ -ATPase 到底由多少种亚基组成一直存在着很大争论. 哺乳动物材料来源的 V-ATPase 似乎明显要复杂得多, 确认的亚基多达 8~10 种; 而植物和酵母材料来源的 V-ATPase 则仅有 3~4 种亚基. 随着分离纯化方法的改进, 人们发现这种组成上的差异明显缩小 (表 1), 最近逐渐达成共识: 无论是动物、植物, 还是酵母材料来源的 V-ATPase 都由 8~11 种亚基组成^[5]. 其中 V_1 部分约由 5~7 种亚基组成, 习惯上这些亚基根据分子量从大到小的顺序分别以 A~G 命名; V_0 部分则由大约 3 种亚基组成.

对 V-ATPase 亚基的化学计量比例研究得最清

* 国家自然科学基金资助项目 (39570434).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-05-07, 修回日期: 1999-11-09

楚的是衣被小泡, 其化学计量比为: (116)₁: (73)₃: (58)₃: (40)₁: (38)₁: (34)₁: (33)₁: (19)₁: (16)₆ 最近又发现了一种分子质量为 12 ku 的亚基, 命名为 G, 每个酶分子中有三个拷贝. 其他来源的 V-ATPase 亚基的化学计量关系与此相似. 这种计量关系与 F-ATPase 类似, 尤其是几个主要亚基与 F-ATPase 的计量完全相同, 考虑到两种 ATPase 之间的同源性, 这极可能提示 V-ATPase 在空间结构上与 F-ATPase 存在很大的相似性, 所以 F₁ 结构的解析对 V-ATPase 的研究有很大的借鉴作用.

现在已经清楚 V₀ 部分的亚基独立于 V₁ 在内质网上进行组装, 然后运送到细胞内其他位置; 得

不到正确组装, V₀ 在内质网水平上即被降解^[6]. c 亚基在 V-ATPase 的组装中起中心作用, 缺少它, V₀ 的其他亚基不能组装^[6]; 100~ 116 ku 亚基起稳定作用^[5]. 对 V₁ 部分组装的研究显示, A、B 和 E 三种亚基可以在胞浆中形成稳定的复合体, 还可再与 D 亚基组装, 其比例为 A₃B₃E₁D₁, 代表了 V₁ 的核心复合体^[7]; 总的来说, V₁ 的大部分亚基对 V₀ 的正确组装和定位及寻靶并无影响, 但一个稳定的 V₀ 却是 V₁ 结合于膜上所必需的^[5]. V₀ 和 V₁ 的组装还需要另外几种膜内在蛋白的帮助, 但这几种蛋白质都不是 V-ATPase 的组成部分, 它们的缺陷都会导致膜上 V-ATPase 水平的下降^[6].

表 1 不同材料来源 V-ATPase 的组成^[5]

来源/亚基	V ₁ 部分								V ₀ 部分			
	A	B	C	D	E	F	G		c		a	
酵母	69	60	54	42	32	27	14	13	16	100	36	
衣被小泡	73	58	50	40	34	33			17	116	38	19
甜菜液泡	67	55	52	44	32	29			16	100	42	
嗜铬颗粒	72	57		41	34	33			16	115	39	
肾微粒体	70	56		45	33	31	14	12	14	116	38	
F-ATPase 类似物	β	α	ε	γ	γ		b		c	a		

2 V₁ 部分的亚基

2.1 A 亚基

A 亚基是一个非常保守的亚基. 其分子质量因种属不同在 67~ 73 ku 之间变动, 这种差异主要是因为不同种属 A 亚基的 N 端存在较大差异. A 亚基是催化亚基, 具有催化 ATP 水解的活性位点, N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 与 NBD-Cl 即结合于 A 亚基上起抑制作用. A 亚基的主要特征是具有一段“P-loop”序列: GXXXXGKT, 这一序列是公认的核苷酸结合序列. GKT 后紧跟着一个 Cys 残基, 它并非活性位点的关键组分, 但正是它导致了 A 亚基对 NEM 的敏感性; A 亚基上另外两个保守 Cys 残基才是酶活性所必需的.

2.2 B 亚基

B 亚基的分子质量约为 55~ 60 ku, 也是一个相当保守的亚基. 它是调节亚基, 也具有一段核苷酸结合序列. 哺乳动物细胞中由一个基因家族编码 B 亚基, 该家族内各基因表达的不同, 会产生具有组织特异性和不同催化调节性质的同工酶.

Newman 等^[8]的研究表明, B 亚基不仅包含有调节位点, 而且参与催化位点的形成, 并在其中起重要作用.

2.3 C 亚基

C 亚基为亲水性亚基, 分子质量为 40 ku. 它参与 V₁ 的组装, 但对 V₀ 的组装并无影响.

2.4 D 亚基

D 亚基是 V₁ 的组装和正常行使功能所必需的亚基. 值得注意的是: 酵母 D 亚基与一种硫化叶菌 F-ATPase 的 γ 亚基具有 18% 的同源性, 在靠近 N 端和 C 端的区域同源性非常明显. 在 F₁ 中, 正是 γ 亚基的这两个末端区域形成的卷曲螺旋结构与 α、β 亚基的内表面交替接触, 从而起到了转轴的作用. D 亚基与 γ 亚基的这种同源性表明 D 亚基可能在 V₁ 的结构和功能上起类似 γ 亚基的作用^[7].

2.5 E 亚基

E 亚基是一个具有丰富带电残基的亲水性蛋白. E 亚基在得到完整 V₁ 的最后组装步骤中起关键作用^[6]; 该亚基具有一段富含 Lys 残基的花式结构 (motif), 提示 E 亚基对酶与阳离子的接近起调

节作用; 基于结构预测的结果, Bowman 等认为是 E 亚基在 V-ATPase 中起类似 γ 亚基的作用; 但是 E 亚基与 γ 亚基之间完全不具有同源性, 所以最近 Tomashek 等^[7]提出是 D 亚基与 E 亚基的功能性结合体在 V-ATPase 中起类似 γ 亚基的作用。

2.6 F 亚基

与 V-ATPase 的其他单拷贝亚基不同, 不同种属来源的 F 亚基之间同源性高达 50%。它居于 V_1 的内部, 对于 V_1 的组装非常重要, 也是 V_0 的组装所必需的唯一一个 V_1 部分的亚基^[6], 因此人们认为 F 亚基可能参与稳定 V_1 与 V_0 之间的联结, 起类似于 F-ATPase 中具调节作用的 ϵ 亚基的作用^[5]。

2.7 G 亚基

G 亚基既与 V_1 又与 V_0 相连, 对于 V_1 部分组装到膜上非常重要。G 亚基是 F-ATPase 中 F_0 部分 b 亚基的类似物, 但却与 V_1 的结合更为牢固, 普遍认为该亚基属于 V_1 部分。但也有人认为该亚基为 V_0 部分的亚基^[6]。

另外在不同种属细胞中还发现了其他一些亚基, 尚不清楚它们是否普遍存在。

3 V_0 部分的亚基

3.1 c 亚基

V_0 部分的 c 亚基为疏水亚基, 参与质子通道的形成。其分子质量约为 16~17 ku, 是目前研究得最广泛的亚基。该蛋白质可能是已知的最保守的脂蛋白, 其不同种属间的同源性大大超过 65%。

c 亚基中 2/3 的氨基酸残基构成 4 个跨膜 α 螺旋, 这些螺旋为突出膜外的亲水环状区带所分隔, 其 1~2 和 3~4 α 螺旋之间的亲水环状区带暴露于胞浆侧面。六个 c 亚基对称排列, 形成 V_0 的核心; 该六聚体中央存在一个直径为 1.5~2 nm 的通道, 其大小远远大于转运质子所需空间, 能允许大分子渗透, 已经证明它并非质子跨膜通道, 而更象细胞间的间隙联结。在 V-ATPase 复合体中, 该通道被 D 亚基堵塞^[5]。c 亚基如何参与质子通道的形成尚不清楚, 但人们普遍认为 V_0 的 c 亚基的第四个跨膜 α 螺旋上一个高度保守的 Glu 残基是质子结合位点, 也是 DCCD 的作用位点^[9], 对质子转运起非常关键的作用。

除此之外, c 亚基还是细胞通讯中间隙联结的组分, 也是神经递质释放介导体的组分以及某种罕见的病毒癌基因产物的靶蛋白。依据 c 亚基的多功

能性, 人们预测应该存在一个多基因家族负责编码其同工酶^[5], 但迄今为止, 仅在高等植物上发现了编码 c 亚基的基因家族。从 c 亚基在 V-ATPase 及其他膜蛋白中的不同功能来看, 它在膜上明显存在着两种定位方式, 这两种定位方式可能决定了 c 亚基是参与形成 V-ATPase 还是其他膜蛋白。深入的研究显示细胞中还存在着一些与 c 亚基相关联的蛋白质^[5], 其功能尚不清楚。

3.2 100~116 ku 亚基

最初人们认为 100~116 ku 亚基具有种属特异性, 但随着分离纯化方法的改进, 人们逐渐认为它是一种普遍存在的亚基^[5]。对于该亚基的作用尚存在较大争议: 有人认为该亚基可能参与 ATP 水解和质子转运之间的偶联, 甚至直接参与了质子转运, 是 F-ATPase 中 a 亚基的功能类似物^[9]; 也有人认为该亚基的缺失对酶活性并无太大影响。Bafilomycin 已被确认为 V-ATPase 的特异性抑制剂, 其作用位点就在 116 ku 亚基上。

3.3 39 ku “辅助” 亚基

39 ku 亚基并非内在蛋白。该亚基与 V_0 内在蛋白部分的紧密联结为 V-ATPase 活性所必需, 它既参与稳定 V_0 的组装, 也参与 V_0 与 V_1 之间的连接。

4 V 型 H^+ -ATPase 的调控

由于 V-ATPase 分布的广泛性、结构的异多聚性以及细胞生理的重要性, 人们很自然地认为该酶必然在不同的水平上受到严密的调控。实验已经证实在该酶基因的表达以及活力的调控上存在着多种方式。

V-ATPase 存在着转录水平的调控。一般认为, 由于其生理重要性, V-ATPase 应该作为看家基因的产物连续表达; 酵母中的实验结果支持这一推测^[10]: 编码 A、B 和 c 亚基的 *Vma1*、2、3 基因均具有类似于哺乳动物看家基因的一些共同特征; 一些其他材料来源的编码 V-ATPase 重要亚基的基因 (如人的 A 亚基) 也被确认为看家基因。但我们也知道, 很多情况下根据细胞特异性的要求需要对 V-ATPase 的表达进行调控。在烟草天蛾幼虫杯状细胞顶膜 V-ATPase 的 B 亚基基因中发现了不同于上述看家基因的特征, 该基因的结构与已知的编码诱导性或组织特异性蛋白的基因上游区有共同的特征, 提示 V-ATPase 基因的表达存在转录水平的调控。已经证实单核白细胞向巨噬细胞分化时, V-

ATPase 总量的增加即源于转录调控^[11].

mRNA 的稳定性可能代表基因表达调控的一种方式^[12]. 在编码 V-ATPase 的 mRNAs 中发现了一些 polyA 化信号, 并且在 *Manduca sexta* 的 B 亚基中发现有两种 polyA 化的转录产物存在, 其中有些产物多出了两个富 AU 区, 它可能参与了 mRNA 不同稳定性的调控^[12]. 另外还有一种可能受反义 RNA 表达介导的后转录调控方式, 可能是由于反义 RNA 与 mRNA 形成双链杂合体从而被 dsRNAase 降解. 反义 RNA 可能参与了对 *Manduca sexta* 40 ku 亚基的后转录调控^[12].

较早时人们已经发现衣被小泡上约有一半的 V_0 未与 V_1 结合而单独存在于膜上, 不泵质子; 在牛肾细胞系中发现存在一个无酶活的完全组装的 V_1 池 (V_1 pool). 体外实验中早已观察到 V_1 从 V_0 上解离下来失去活性, 而重新组装又导致活性恢复. 这一切似乎提示 V_1 和 V_0 的可逆性解离是 V-ATPase 活性调控的一种重要机制^[12]. 该机制首先在蛻皮 *Manduca sexta* 中肠组织中被证实; 接着在酵母中也发现了类似现象. 在进化上如此远源两种生物中发现此种相似现象表明: V_1 和 V_0 的可逆性解离是 V-ATPase 活性调控的一种普遍机制.

V-ATPase 的一些重要亚基上存在 Cys 残基, 其中一些 Cys 残基的可逆性氧化也是酶活性调控的一种重要机制^[12, 13]. A 亚基有三个保守的 Cys 残基: 第一个位于富 Gly 残基的核苷酸结合区, 第三个在 C 端附近; 这两个 Cys 残基可以可逆地形成亚基内二硫键. 已发现衣被小泡中近一半 V-ATPase 均处于这种可逆的无活性的二硫键状态, 与有活性的还原态 V-ATPase 形成动态平衡. 除 A 亚基外, B 亚基的一个保守 Cys 残基和 40 ku 亚基的三个保守 Cys 残基可能也有类似的调控作用, 它们的氧化还原状态直接决定全酶中 V_1 和 V_0 之间联结的稳定性.

V-ATPase 活性也受到一些特异性激活蛋白和抑制蛋白相互作用的调控^[12]. 已经分离得到了一些激活蛋白和抑制蛋白, 但调控蛋白如何影响 V-ATPase 活性尚不清楚.

靶膜对 V-ATPase 的分拣有助于调控膜上 V-ATPase 的密度从而调控膜的质子转运能力^[12, 13], 它包括三方面的分拣作用: 质膜对含有 V-ATPase 的胞内囊泡的分拣, 特定靶膜对 V-ATPase 不同亚基异构体的分拣以及靶膜连接蛋白对 V-ATPase 的识别作用等.

此外还发现一些信号分子 (如 PKC、G 蛋白等) 对 V-ATPase 的活性也有调控作用, 但是这些调控因子对 V-ATPase 的作用位点和作用方式都还很不清楚^[12].

迄今为止, 已经通过生物化学和分子生物学的手段确认了 V-ATPase 的多种调控机制, 而要确定这些调控机制的生理作用则是我们面临的新的挑战之一.

参 考 文 献

- 1 王延枝, 许献忠 (Wang Y Z, Xu X Z). 空泡膜类型 H^+ -ATPase 的研究进展. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1993, **20** (1): 19~ 23
- 2 Takase K, Kakinuma S, Yamato I, *et al.* Sequencing and characterization of the NTP gene cluster for vacuolar-type Na^+ -translocating ATPase of *E. hirae*. J Biol Chem, 1994, **269** (15): 11037~ 11044
- 3 Dow J A, Davies S A, Guo Y, *et al.* Molecular genetic analysis of V-ATPase function in *Drosophila Melanogaster*. J Exp Biol, 1997, **200** (2): 237~ 245
- 4 Graf R, Harvey W R, Wieczorek H. Purification and properties of a cytosolic V_1 -ATPase. J Biol Chem, 1996, **271** (34): 20908~ 20913
- 5 Finbow M E, Harrison M A. The vacuolar H^+ -ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. Biochem J, 1997, **324** (3): 697~ 712
- 6 Nelson N, Klinsky D J. Vacuolar H^+ -ATPase: From mammals to yeast and back. Experientia, 1996, **52** (5): 1101~ 1110
- 7 Tomashek J J, Sonnenburg J L, Artimovich J M, *et al.* Resolution of subunit interactions and cytoplasmic subcomplexes of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. J Biol Chem, 1996, **271** (17): 10397~ 10404
- 8 Liu Q, Kane P M, Newman P R, *et al.* Site-directed mutagenesis of the yeast V-ATPase B subunit ($Vma2p$). J Biol Chem, 1996, **271** (33): 2018~ 2022
- 9 Fillingame R H. Membrane sectors of F- and V- type H^+ -translocating ATPase. Curr Opin Struct Biol, 1996, (6): 491~ 498
- 10 Wechsler M A, Bowman B J. Regulation of the expression of three house-keeping genes encoding subunits of the *Neurospora crassa* V-ATPase. Mole gen Genet, 1995, **249** (3): 317~ 327
- 11 Lee B S, Underhill D M, Crane M K, *et al.* Transcriptional regulation of the vacuolar H^+ -ATPase B2 subunit gene in differentiating THP-1 cells. J Biol Chem, 1995, **270** (13): 7320~ 7329
- 12 Merzendorfer H, Graf R, Huss M, *et al.* Regulation of proton-translocating V-ATPases. J Exp Biol, 1997, **200** (2): 225~ 235
- 13 Harvey W R, Wieczorek H. Animal plasma energized by chemiosmotic H^+ V-ATPase. J Exp Biol, 1997, **200** (2): 203~ 216

Progress on the Structure and Regulation of V-ATPase. ZHU Xiong-Wei, WANG Yan-Zhi, WANG Huan (College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract V-ATPase is present in every known eukaryotic cell and plays a vital role. The study on the structure, function, assembly and the regulation of V-ATPase has achieved much progress recently. All the core subunits of V-ATPase have now been sequenced and most of their functions have been

assigned to some extent. Membrane biochemistry and molecular biology studies discovered that the gene expression and the activity of V-ATPase are regulated in various ways.

Key words V-ATPase, structure, regulation

TNF 受体家族介导的细胞凋亡信号转导*

萨其拉 刘孟珉 贺福初

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 肿瘤坏死因子 (TNF) 家族是一类多功能的细胞因子, 具有诱导细胞凋亡、抗病毒、免疫调节等多种生物学活性。其中一些成员可以通过和细胞膜上相应受体 (即 TNF 受体家族成员) 结合, 启动细胞内的凋亡机制, 而诱导细胞凋亡。一些蛋白质 (如 TRADD、FADD、RIP、RAIDD 等) 参与这些信号传递过程。越来越多的 TNF 家族成员、TNF 受体以及与细胞凋亡相关的 Caspase 蛋白酶家族成员被人们发现。

关键词 TNF, 细胞凋亡, 信号转导

学科分类号 Q26

细胞凋亡 (apoptosis) 或程序性死亡 (programmed cell death) 是自然发生的细胞死亡过程, 受基因调控, 在多细胞动物的发育过程中起重要作用。细胞凋亡的形态学特征是细胞核和细胞质发生浓缩, 染色质发生断裂。许多分子能够诱导细胞凋亡, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 是其中的一种。TNF 是一类主要由激活的巨噬细胞产生的细胞因子, 能够通过激活 Caspase 蛋白酶、转录因子 NF- κ B、有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等途径, 实现其细胞毒性、抗病毒、免疫调节及转录调节等多种生物学活性。本文着重介绍 TNF 诱导细胞凋亡的信号转导途径。

1 TNF 配体家族

到目前为止, 发现的 TNF 家族成员有: TNF- α 、LT- α 、LT- β 、FasL、CD40L、CD30L、CD27L、4-1BBL、OX40L、以及 TRAIL、TRANCE 等。这些蛋白质为 II 型膜蛋白, C 端 (胞外区) 之间具有很高的同源性, 胞内区各不相同。其中 TRAIL、TRANCE 为最近克隆。

TRAIL 又称 Apo-2L, 与 Fas/Apo1 很相似, 含有 281 个氨基酸, C 端也可以形成三聚体。TRAIL 的胞外区能够介导淋巴细胞和多种肿瘤细

胞系凋亡^[1,2]。

TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) 是 1997 年由 Wong 等克隆, 由 316 个氨基酸组成, 分子质量 35 ku。其细胞外区和 TRAIL、FasL 及 TNF 相似。TRANCE 受 T 细胞及 Ca^{2+} 调节的转录因子的调控, 在淋巴器官的 T 细胞中表达水平最高。人的 TRANCE 基因定位于 13q14 上。TRANCE 的胞外区能够诱导 T 细胞中 c-Jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 途径的激活, 而不能激活 B 细胞中的 JNK, 表明 TRANCE 在 T 细胞依赖的免疫反应中起作用^[3]。

2 TNF 受体超家族

TNF 配体家族的成员是通过与细胞膜上的相应受体结合, 激活受体, 而启动细胞内诱导细胞凋亡机制的。目前发现的 TNF 受体家族成员有: TNFR1、TNFR2、Fas、CD40、NGF-R、CD30、TNF-RP、PV-T2、PV-A53R、4-1BB、OX40、CD27、DR3、CAR1、DR4、DR5、TRID 等。除了个别成员外, TNF 受体超家族的成员都属 I 型膜蛋白, 由 4 个部分组成: 信号肽、富含半胱氨酸

* 国家自然科学基金重点项目 (39730270) 和国家自然科学基金面上项目 (39800026) 资助。

收稿日期: 1998-05-18, 修回日期: 1998-08-03