

Ca^{2+} 、CaM 及 CaM 拮抗剂 对粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶活性的影响

林玲¹, 袁生², 陆玲², 幸定坤², 戴传超²

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 经差速离心, 酸处理, 蔗糖密度梯度离心制备粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)质膜 H^{+} -ATP 酶, 以研究 Ca^{2+} 、CaM 以及 CaM 拮抗剂对纯化的质膜 H^{+} -ATP 酶活性的影响。结果表明 Ca^{2+} 强烈的抑制该酶的活性, 而 CaM 对该酶的活性没有影响, 但 TFP 与 Compound R24571 这两类 CaM 拮抗剂又都能强烈地抑制该酶的活性。推测 TFP 等抑制该酶的活性不是通过与 CaM 结合作为 CaM 的拮抗剂竞争性抑制该酶的活性, 而是直接对该酶发生作用或者通过磷脂或其它的 CaM 依赖性的膜蛋白间接对该酶产生作用。

[关键词] 粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶, Ca^{2+} , CaM, CaM 拮抗剂

[中图分类号] Q936 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0091-04

Effects of Ca^{2+} , CaM and CaM Inhibitors on Activity of *Schizosaccharomyces pombe* Plasma Membrane H^{+} -ATPase

Lin Ling¹, Yuan Sheng², Lu Ling², Xing Dingkun², Dai Chuanchao²

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

(2. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The *Schizosaccharomyces pombe* plasma membrane H^{+} -ATPases are obtained by differential centrifugation, acid treatment and isopycnic centrifugation in a discontinuous sucrose gradient to study the effects of Ca^{2+} , CaM and CaM inhibitors on activity of purified plasma membrane H^{+} -ATPase. The results show that Ca^{2+} strongly inhibit the enzyme activity while CaM has no effect on it, and that both the CaM inhibitor TFP and Compound R24571 strongly inhibit the enzyme activity. It is inferred that TFP and Compound R24571's inhibition of H^{+} -ATPases enzyme activity is not made by combining TFP with CaM to form CaM inhibitors, but through direct interaction, or mediated by phospholipids and other CaM-dependent membrane protein.

Key words: *Schizosaccharomyces pombe* plasma membrane H^{+} -ATPase, Ca^{2+} , CaM, CaM inhibitors

0 引言

细胞质膜 H^{+} -ATP 酶是一种生电质子泵, 是质膜的标记酶^[1], 它能够产生质子电化学梯度, 具有维持胞内 pH 值, 积累营养和其它重要的生理功能^[2,3]。酵母细胞具有易于培养, 遗传系统相对简单而且清楚等许多优点是研究真核生物调控的模式生物。现有的关于酵母质膜 H^{+} -ATP 酶调控的研究都是以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为材料, 对粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)质膜 H^{+} -ATP 酶的调控则无人研究。而粟酒裂殖酵母与酿酒酵母相比, 其基因顺序与哺乳动物之间有着更大的相似性^[4], 对其进行研究就显得更加有意义。根据对酿酒酵母的研究发现: 编码质膜 H^{+} -ATP 酶的基因同时也编码位于高尔基体

收稿日期: 2005-09-22。

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK95071301)。

作者简介: 林玲, 女, 1973—, 助理研究员, 主要从事植物病理学的研究。E-mail: linling@jaas.ac.cn

通讯联系人: 袁生, 1956—, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物生长代谢调控和酶工程研究。E-mail: shengyan@njnu.edu.cn

上的 Ca^{2+} -ATP 酶^[5]. 这是否意味着质膜 H^{+} -ATP 酶的活性受到 Ca^{2+} - CaM 途径的调控? 本文为此报道 Ca^{2+} 、钙调素(calmodulin, CaM)以及 CaM 拮抗剂对粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶活性的影响.

1 材料与方法

1.1 试剂

酵母抽提物(yeast extract)购自 Oxiod 公司, ATPNa_2 、MES、三氟拉嗪(trifluoperazine hydrochloride, TFP)、混合物 R24571(Compound R24571)、EGTA 购自 Sigma 公司,考马斯亮蓝 G-250 为 Fluka 公司进口分装,牛血清白蛋白为 Serva 公司进口分装,粟酒裂殖酵母 CaM 由本实验室制备^[6],其余所用试剂均为国产分析纯.

1.2 细胞培养

粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe* Lindn AKU 4220)菌种购自中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC). 斜面固体培养基采用 YPD 培养基(2% 葡萄糖,2% 蛋白胨,1% 酵母抽提物,pH6.0)^[7]. 为制备质膜 H^{+} -ATP 酶采用 2% 酵母抽提物,5.8% 葡萄糖,pH4.5 的液体培养基^[8]. 斜面菌种首先接种于液体培养基中,30℃,200 r/min 振荡培养 24 h,用血球计数板计数,接入上述液体培养基中使起始接种密度为 1×10^6 cells/mL,同上条件培 15 h,此时酵母细胞处于对数生长期,5 000 r/min 离心 15 min 后收集菌体.

1.3 质膜 H^{+} -ATP 酶的制备

将离心所得到的菌体用冷的提取介质(0.25 mol/L 蔗糖,1 mmol/L MgCl_2 ,10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5)洗 1 次,再用 bead-beater 方法,用直径为 0.5 mm 的小玻璃珠破碎细胞,破碎时间为 3 min,分 9 次进行,每次 20 s,中间间隔 3 min. 用纱布过滤,去除玻璃珠后将所得到的匀浆液经差速离心,酸处理,不连续蔗糖密度梯度离心,制备出质膜 H^{+} -ATP 酶. 这个过程参照 Dufour(1978)的方法^[9]. 最后加入 8 mL 1 mmol/L ATPNa_2 、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris- CH_3COOH pH 7.5 的缓冲液,用 Glass-Teflon 匀浆器混匀,分装于 Eppendorf 管中,置于液氮中保存,供酶活性测定用. 以上操作均在 4℃ 下进行.

1.4 质膜 H^{+} -ATP 酶活性的测定

通过测定 ATP 水解释放的无机磷来测定质膜 H^{+} -ATP 酶的活性. 在总体积为 0.5 mL 的反应介质中含有:50 mmol/L MES-Tris pH6.3,12 mmol/L MgCl_2 ,6 mmol/L ATPNa_2 ,5 mmol/L NaN_3 以抑制线粒体 ATP 酶,0.2 mmol/L 钼酸铵以抑制酸性磷酸酶,50 mmol/L NaNO_3 以抑制液泡 ATP 酶^[1],30℃ 水浴保温 10 min 后加入 10 μg 质膜蛋白,与反应介质共保温 10 min. 以 ATPNa_2 的加入起始反应,30℃ 水浴反应 10 min 后,加入 125 μL 2.5 mol/L 的高氯酸终止反应^[7]. 无机磷的测定参照 Lanzetta(1979)的方法^[10],酶的活性单位为 $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$.

1.5 蛋白含量的测定

参照考马斯亮蓝 G-250 法^[11],以牛血清白蛋白作为标准物.

2 结果与分析

2.1 粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶纯度的鉴定

由于在真菌中有多种分解 ATP 的酶,为了鉴别我们所制备的质膜 H^{+} -ATP 酶是否还混杂有线粒体来源的 ATP 酶,液泡来源的 ATP 酶或酸性磷酸酶,我们在测定反应介质中加入 5 mmol/L NaN_3 抑制线粒体 ATP

表 1 粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶纯度的鉴定

| 组别 | H^{+} -ATP 酶活性/ $[\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})]$ |
|---------|---|
| 不加任何抑制剂 | 4.80 (100%) |
| 加入三种抑制剂 | 4.62 (96.2%) |

酶,0.2 mmol/L 钼酸铵抑制酸性磷酸酶,50 mmol/L NaNO_3 以抑制液泡 ATP 酶,再测定质膜 H^{+} -ATP 酶的活性,结果如表 1 所示. 加入这些抑制剂后与没有加入的情况相比,所制备的粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶的活性下降小于 5%. 说明我们所制备的质膜 H^{+} -ATP 酶较纯,基本不混杂有其它种分解 ATP 的酶.

2.2 Ca^{2+} 对粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶活性的影响

在测定反应介质中加入不同浓度的 CaCl_2 ,然后测定粟酒裂殖酵母质膜 H^{+} -ATP 酶的活性,结果如图 1 所示. 发现 Ca^{2+} 明显的抑制该酶的活性,并随着 Ca^{2+} 浓度的增加,其抑制率也增大,最大可抑制该酶活

性的 75%。

2.3 CaM 对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响

将粟酒裂殖酵母 CaM 加入到测定反应介质中来观察 CaM 对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响,结果如表 2 所示。以 20 mmol/L Tris-HCl (pH6.0) 作为对照组,发现 CaM 对该酶的活性没有影响。用 1 mmol/L EGTA 螯合 Ca²⁺ 是常用的消除内源 CaM 的方法,当我们加入 1 mmol/L EGTA 后再加入 CaM,发现 CaM 对酶的活性仍然没有影响。

2.4 CaM 拮抗剂对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响

TFP 是一类 CaM 拮抗剂,在测定反应介质中加入 0.1 mmol/L CaCl₂ 后,再加入不同浓度的 TFP,测定粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶的活性,结果如图 2 所示。发现 TFP 可抑制该酶的活性,并且当 TFP 的浓度小于 50 μmol/L 时,对酶的活性几乎没有影响,只有当 TFP 的浓度大于 50 μmol/L 时,对该酶的活性才产生强烈的抑制作用,甚至能完全抑制该酶的活性。

表 2 CaM 对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响

| 对照(100%) | 10 μg/mL | 40 μg/mL |
|--|-----------------|-----------------|
| 20 mmol/L Tris-HCl (100 ± 3.6) % | (100 ± 6.3) % | (109.1 ± 4.1) % |
| 20 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EGTA (100 ± 6) % | (104.9 ± 4.6) % | (103.1 ± 2.9) % |

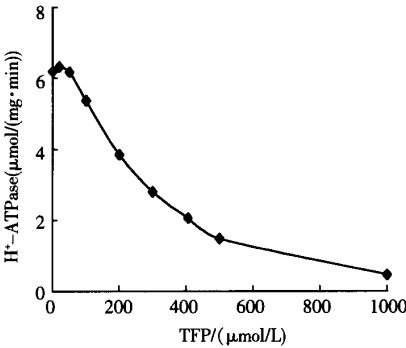


图 2 TFP 对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响

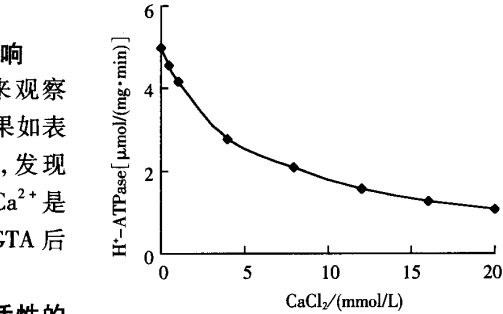


图 1 Ca²⁺对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响

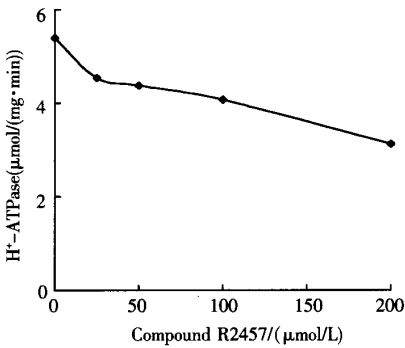


图 3 Compound R24571 对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响

Compound R24571 是另一类 CaM 拮抗剂,在测定反应介质中加入 0.1 mmol/L CaCl₂ 后,再加入不同浓度的 Compound R24571,测定粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶的活性,结果如图 3 所示。发现 Compound R24571 也能抑制该酶的活性,并且 Compound R24571 与 TFP 不同,它在很低的浓度小于 50 μmol/L 时就能抑制该酶的活性。Compound R24571 溶于甲醇中,对照组中也加入甲醇,甲醇的加入量小于 4% (v/v)^[2]。

3 讨论

Ca²⁺ 作为胞内第二信使调控许多重要的生理功能。本文首次报道了 Ca²⁺、CaM 以及 CaM 拮抗剂对粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性的影响,实验结果表明 Ca²⁺ 可抑制粟酒裂殖酵母质膜 H⁺-ATP 酶的活性,而 CaM 对该酶活性没有影响,CaM 拮抗剂 TFP、Compound R24571 却又都能抑制该酶的活性。

1983 年 Serrano 就认为真菌质膜上的 H⁺-ATP 酶对二价阳离子的需求性为只需要 Mg²⁺ 而不需要 Ca²⁺^[12]。我们所得到的结果是不但不需要 Ca²⁺ 而且 Ca²⁺ 还强烈的抑制其活性。有关 CaM 以及 CaM 拮抗剂对酿酒酵母质膜 H⁺-ATP 酶活性影响研究已有一些。1997 年 Romero 发现 CaM 对酿酒酵母质膜 H⁺-ATP 酶的活性没有影响^[2],他解释为可能由于 CaM 不能直接作用于酿酒酵母质膜 H⁺-ATP 酶,或者 CaM 在体内激活该酶所必需的胞浆内因子在纯化质膜时丢失,或者有大剂量的 CaM 很牢的结合在质膜上,而且在质膜纯化的过程中不溶解下来,完全溶解内源 CaM 可能需要剧烈的处理,那将会损伤 H⁺-ATP 酶的

活性。但是 Romero 没有考虑 Ca^{2+} 这个因素,而我们的实验结果显示 Ca^{2+} 抑制粟酒裂殖酵母质膜 H^+ -ATP 酶的活性,所以排除 CaM 直接作用于该酶的可能性。1984 年, Eilam 报道 TFP 强烈抑制酿酒酵母质膜 H^+ -ATP 酶^[13]。1997 年, Romero 进一步研究发现除了 TFP 外, Compound R24571 (又称为 calmidazolium) 等其它类型的 CaM 拮抗剂也抑制酿酒酵母质膜 H^+ -ATP 酶,他认为 TFP 等 CaM 拮抗剂对酿酒酵母质膜 H^+ -ATP 酶的抑制作用不是通过 CaM 依赖性的蛋白激酶来起作用的,也不是通过磷脂来起作用的,而是通过一种目前还不清楚的 CaM 依赖性膜蛋白来起作用的^[2]。我们对粟酒裂殖酵母质膜 H^+ -ATP 酶活性的研究同样得到 TFP 与 Compound R24571 起抑制酶活作用的结果,虽然 Compound R24571 在小于 $50 \mu\text{mol/L}$ 时也能抑制该酶的活性,但是低浓度的 TFP ($< 50 \mu\text{mol/L}$) 对该酶的活性几乎没有影响,这一现象与 Eilam、Romero 所报道的在酿酒酵母中的情况不同,TFP 在这样的低浓度下同样强烈的抑制酿酒酵母的质膜 H^+ -ATP 酶。Meissner 等^[14]认为许多 CaM 拮抗剂或多或少是非特异性的,它们能在高浓度的情况下 ($50 \sim 75 \mu\text{mol/L}$) 直接或通过磷脂介导间接对酶产生作用。Compound R24571 是钙调素特异性拮抗剂,而 TFP 是蛋白激酶 C 特异性拮抗剂,特异性没有 Compound R24571 强。所以不能排除 CaM 拮抗剂直接或通过磷脂介导间接对酶产生作用的可能性。因此我们认为 TFP 与 Compound R24571 的这种抑制作用不是通过与 CaM 结合作为 CaM 的拮抗剂竞争性地抑制该酶的活性来进行的,而是直接对该酶发生作用或者通过磷脂或其它的 CaM 依赖性的膜蛋白间接对该酶产生作用。

[参考文献]

- [1] Okorkov L A, Kuranov A J, Kuranova E V, et al. Ca^{2+} -transporting ATPase(s) of the reticulum type in intracellular membranes of *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical identification[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 146(1): 39-46.
- [2] Romero I, Maldonado A M, Eraso P. Glucose-independent inhibition of yeast plasma-membrane H^+ -ATPase by calmodulin antagonists[J]. Biochem J, 1997, 322(3): 823-828.
- [3] 林玲,袁生,幸定坤,等. 粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)质膜 ATP 酶的制备及活性测定[J]. 南京师大学报:自然科学版, 1999, 22(2): 83-87.
- [4] 林玲,袁生. 酵母细胞周期调控的研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 1999, 21(1): 6-13.
- [5] Sorin A, Rosas G, Rao R. PMR1, a Ca^{2+} -ATPase in yeast golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps[J]. J Biol Chem, 1997, 272(15): 9895-9901.
- [6] 尹丽红,袁生,鲁仲谋. 粟酒裂殖酵母钙调素基因在大肠杆菌中的表达及表达产物的分离纯化[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(1): 10-13.
- [7] Brock T D, Madigan M T, Martinko J M. Growth and Its Control. Biology of Microorganisms[M]. 7th ed. New Jersey: Prentice-all, Inc., Englewood Cliffs, 1994: 321-360.
- [8] Delhez J, Dufour J P, Thines D, et al. Comparison of the properties of plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPases in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Eur J Biochem, 1977, 79(1): 319-328.
- [9] Dufour J P, Goffeu A. Solubilization by lysollecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. J Biol Chem, 1978, 253(19): 7026-7032.
- [10] Lanzetta P A, Alvarez L J, Reinach P S, et al. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate[J]. Anal Biochem, 1979, 100(1): 95-97.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1975, 72: 248-254.
- [12] Serroano R. Purification and reconstitution of the proton-pumping ATPase of fungal and plant plasma membranes[J]. Arch Biochem Biophys, 1983, 227(1): 1-8.
- [13] Eilam Y. Effects of phenothiazines on inhibition of plasma membrane ATPase and hyperpolarization of cell membranes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochem Biophys Acta, 1984, 769(3): 601-610.
- [14] Meissner G. Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum[J]. Biochemistry, 1986, 25: 244-251.

[责任编辑:孙德泉]