

二价金属离子对酪蛋白激酶 II 活性 及专一性的调节作用

沈 辉 (中国无锡轻工大学食品学院, 无锡, 214036)

Thierry Chardot (法国国家农业科学院生物技术中心)

J. C. Meunier (法国国立农业大学食品及生物技术系)

摘要 研究了二价金属离子(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+})对来源于酵母"*Y. Lipolytica*"(wild W-29)的一种蛋白质激酶——酪蛋白激酶 II (CK-II)活性的影响。发现,CK-II 的催化活性依赖于 Mg^{2+} 的作用,而不受 Ca^{2+} 的调节; Zn^{2+} 是 CK-II 的抑制剂 ($I_{0.5} \approx 250 \mu\text{mol/L}$)。若反应中存在饱和浓度的 Mg^{2+} (10 mmol/L), Mn^{2+} ($< 50 \mu\text{mol/L}$) 既对 CK-II 有激活作用,又有抑制作用;而且,若 Mg^{2+} 不存在, Mn^{2+} 则是 CK-II 的激活剂。尤其是,发现 Mg^{2+} , Mn^{2+} 对 CK-II 活性的调节作用不同,CK-II 对底物中靶氨基酸的磷酸化作用就不同。当反应中存在 Mg^{2+} (10 mmol/L) 而无 Mn^{2+} 时,靶氨基酸主要是丝氨酸(Serine)和苏氨酸(Threonine),其各占被磷酸化总量的 61% 和 32%,且只有极微量的酪氨酸(Tyrosines)被磷酸化;当反应中仅存在 Mn^{2+} (10 mmol/L) 而无 Mg^{2+} 时,靶氨基酸主要是丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸,其各占被磷酸化总量的 42%, 41% 和 15%。还发现 CK-II 能对合成的“聚 Glu-Tyr”磷酸化。这是在 CK-II 研究史上首次发现酪氨酸也是 CK-II 的靶氨基酸,而且 CK-II 具有显著的酪氨酸激酶活性。

关键词 酪蛋白激酶 II; 二价金属离子; 调节; 磷酸化; 丝氨酸; 苏氨酸; 酪氨酸
中图分类号 TS201.3/TS201.25

0 前 言

酪蛋白激酶 II (CK-II) 是一种多功能、既不受钙又不受环状 AMP 调节的蛋白质激酶,它能专一地对蛋白质中的含有羟基的丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)进行磷酸化^[1,2]。Hataway 等 1884 年指出,酪蛋白激酶 II 依赖于二价金属阳离子,它对蛋白质的磷酸化作用必须由二价金属离子来调节^[3]。这也是酶的活性结构中必须存在二价金属离子的原因。缺少某些二价金属阳离子,CK-II 的活性或是很低或是根本无活性,而且某些二价金属阳离子对 CK-II 的活性还有抑制作用^[4]。1984 年 Swarup 等认为二价金属离子除了能调节蛋白激酶的活性外,

还能改变它对其底物氨基酸的磷酸化作用^[5]。

CK-II 能显著改善食用蛋白质的功能性质,使其质量得到提高。此外,纯的 CK-II 还被广泛应用于医药等行业。这种酶存在于大部分的动、植物和微生物中。Hataway 等 1979 年首先从兔子血液中提取了它^[6]; Mitev 等 1994 年从牛脑中制取了 CK-II^[7]。还有的科学家从大麦、豌豆、果蝇等生物中制取了 CK-II^[8~10]。

纯的 CK-II 的分子结构是一个四聚体,由 $\alpha\beta$ 或 $\alpha\alpha'$ 两种(4 个 $\alpha\beta$ 或 $\alpha\alpha'$) 亚基组成^[11]。其亚基 α 或 α' 的分子量为 36~44kD,亚基 β 的分子量约为 41kD;整个分子的分子量是 120~160kD^[11]。CK-II 在对其底物的催化反应中,亚基 $\alpha\alpha'$ 起催化作用,亚基 β 起调节作用^[11];使底物蛋白质一级结构序列"Ser/Thr-X-X-Asp/Glu"中的 Ser 和 Thr 磷酸化^[12]。

酵母是单细胞微生物,含有多种酶、蛋白质、维生素和其它营养物质。自然界中酵母的种类很多,其中许多能被应用于食品、医药、农业等领域。*Y. Lipolytica* 是一种酵母,其名称由 Van der Walt 等命名,已被批准应用于食品工业。这种菌株,经过法国国家农业科学院生物工程技术中心的遗传变异选育,能高产 CK-II 和磷酸酶^[4]。

1 实验方法与材料

1.1 酵母菌种的培育

酵母菌种 *Y. Lipolytica* (souch W-29), 由法国国家农业科学院生物工程技术中心微生物及遗传实验室提供。首先将菌种接种到固体培养基上,在 28℃ 条件下培养数个小时;然后将其接种到液体培养基上,在 28℃ 恒温振荡条件下培养。

1.2 CK-II 的制取

在低温(液体二氧化碳)条件下,超高速振荡破碎酵母细胞。然后,离心并用柱层析(3×60cm, Phospho-cellulose)分离 CK-II。最后采用高效液相色谱仪(PHARMACIA),使用"Hi-T rap Heparine"柱及"Superdex-200"柱,纯化 CK-II。

1.3 CK-II 的活力测定和对蛋白质的磷酸化

由于这一实验使用放射性同位素 ^{32}P 作标记,故在防辐射实验室内进行。

CK-II 以经过酶促脱磷酸的牛酪蛋白(SIGMA),大豆球蛋白(7S 或 11S),ATP 及具有放射性的 ATP(^{32}P)为底物,在温度 20℃,pH8 的缓冲液中催化蛋白质磷酸化。示踪物——放射性同位素 ^{32}P 由闪烁测定仪(KONTROL)测定,放射量的大小以"CPM"表示。

CK-II 的活力,是以单位时间内、催化单位数量(pmol.)ATP 的磷酸基,结合到单位质量(μg)牛酪蛋白质上来定义的。CK-II 活力的大小与"CPM"的量成正比。

CK-II 的一个活力单位 U 为:1min 内、催化 1pmol ATP 的磷酸基结合到 25 μg 牛酪蛋白质(0.5mg/ml)上所需酶的量。

1.4 CK-II 纯度、分子结构及分子量的确定

采用“SDS-聚丙烯酰胺凝胶(簿板)电泳”SDS-PAGE,NOVEX Pre-Cast,gradient 4%~20% polyacrylamide)测定 CK-II 分子结构,蓝色指示剂为 0.2kD,标准蛋白混合溶液为:Phosphorylase b 94kD;Bovin Serum Albumin 67kD;Ovalbumine 43kD;Carbonic Anhydrase 30kD;Soy Trypsin Inhibitor 20kD;a-Lactalbumine 14.4kD。

用高效液相色谱法测定 CK-II 的分子量^[4]。标准蛋白为:Apoferritin 433kD, β -Amylase 200kD,Albumin 43kD,Carbonic Anhydrase 29kD

1.5 纤维素薄膜双向电泳- 磷酸化氨基酸的指纹图谱

纤维素薄膜(20×20cm, Cellulose 300 80361)来源于 SERLABO; CK-II 的底物为酶促脱磷酸的牛酪蛋白(SIGMA), 大豆球蛋白(7S); 标准磷酸化的氨基酸(O-Phospho-L-Serine, O-Phospho-L-Threonine, O-Phospho-L-Tyrosine)来源于 SIGMA.

被磷酸化底物蛋白的水解采用 Duclos 等的方法。

被磷酸化氨基酸的纤维素薄膜双向电泳采用 Eckhart 等和 Hunter 等的方法^[13, 14]。

1.6 单克隆抗体免疫法鉴定磷酸化酪氨酸(O-P-Tyr)

硝酸纤维素膜来源于 SCHLEICHER AND SCHUELL; 合成多肽 Glu-Tyr(80/20)和抗 Glu-O-P-Tyr 抗体(兔体产生)来源于 SIGMA; Glu-O-P-Tyr 的抗体(大白鼠产生)自制^[4]。

1.7 Mg^{2+} , Mn^{2+} 分别对 CK-II 催化专一性调节的差异性计算

采用计算机"SLIDE WRITE PLUS 5.0" 软件程序, 对于 Mg^{2+} , Mn^{2+} 分别对 CK-II 催化专一性调节的差异性进行计算(t -test, $P=0.01$)。

2 结果与讨论

2.1 制取、纯化的 CK-II 的纯度及分子特性

CK-II 经过浓缩、分离、纯化, 再经测定, 其相对活力达到 1085U/mg; 与酵母的破碎离心液相比, 其相对活力提高了 960 倍。经计算, 用以上方法, 2.8g 酵母蛋白质可产出 1 μ g 的 CK-II, CK-II 总活力的得率是 58%。

使用“SDS-聚丙烯酰胺凝胶(簿板)电泳”和高效液相色谱(HPLC)法, 对制取、纯化的 CK-II 的纯度及分子特性进行了测定、研究, 结果见图 1 和图 2。

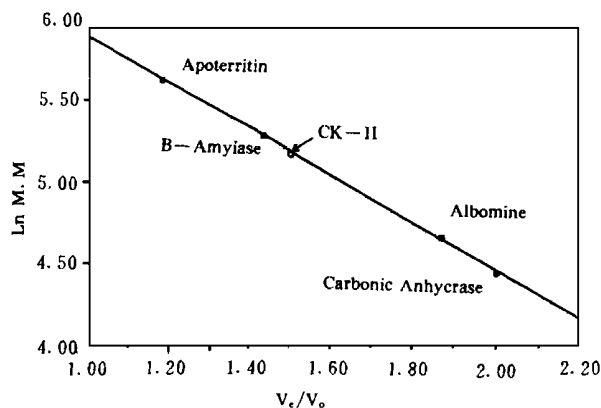
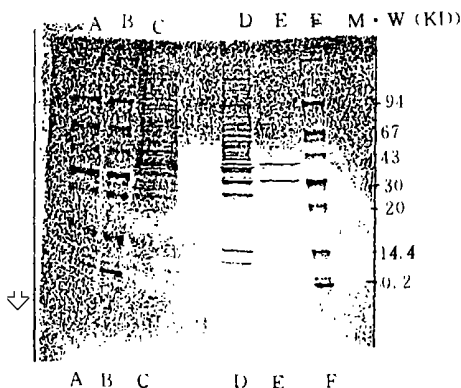


图 1 SDS-PAGE: CK-II 的纯度及分子结构

A, B, F: 标准蛋白混合溶液及指示剂

C: 经磷酸纤维素层析的 CK-II 样液

D: 经 HPLC "Heparine-Sepharose" 层析柱层析的 CK-II 样液

E: 经 HPLC "Superdex-200" 层析柱层析的 CK-II 样液

图 2 HPLC: CK-II 分子量

高效液相色谱法对分离纯化的 CK-II 进行分子量测定

V_e 保留体积

V_o 死体积

由图 1 和图 2 可知, CK-II 已被纯化均为一体; 这种酶是一个四聚体 $\alpha\beta$, 由 $\alpha\beta$ 两种(4 个)亚基组成, 其中亚基 α 的分子量约是 40kD, β 的约是 30kD, 整个 CK-II 的分子量为 158kD。

2.2 二价金属离子对 CK-II 活性的影响

CK-II(4μg/ml), 放射性 ATP(10μmol/L) 分别与底物酪蛋白(0. 5mg/ml) 或大豆球蛋白(7S, 0. 5mg/ml) 在缓冲液(TEA 50 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, pH 7. 75) 中, 分别加入含有二价金属离子(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) 的可溶性盐($MgCl_2$, $MnCl_2$), 在 20℃条件下反应 30min. 取样, 测定底物被磷酸化的程度。结果见图 3, 图 4, 图 5, 图 6。

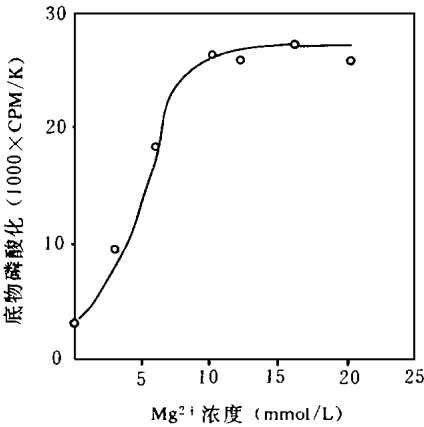


图 3 Mg^{2+} 对 CK-II 活性的调节

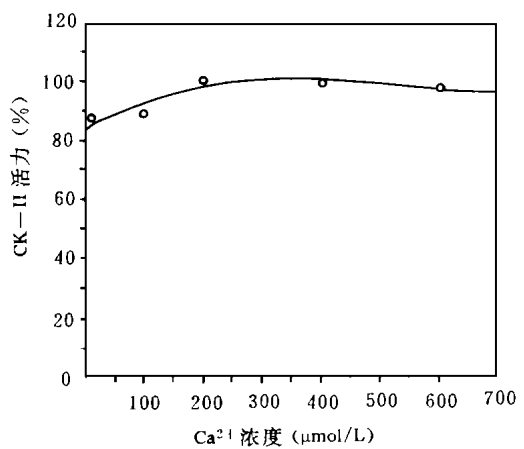


图 4 Ca^{2+} 对 CK-II 活性的影响

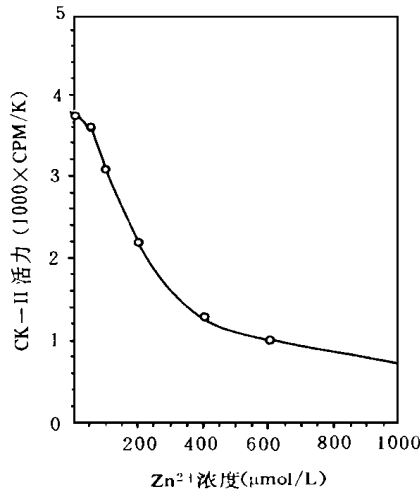


图 5 Zn^{2+} 对 CK-II 活性的抑制

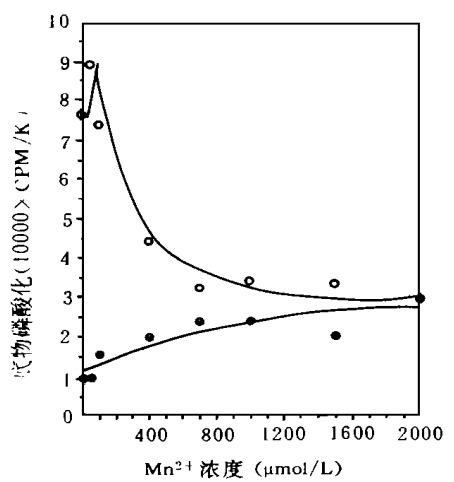


图 6 Mn^{2+} 对 CK-II 活性的双重调节

由图 3 可知, CK-II 的催化活性依赖于 Mg^{2+} 的存在, 是一个正协调性反应。当 Mg^{2+} 浓度从 0~10mmol/L 时, CK-II 对底物蛋白质的磷酸化反应呈上升趋势, 并当 Mg^{2+} 浓度为 10mmol/L 时达到最大反应速度; 当 Mg^{2+} 浓度大于 10mmol/L 时, 反应速度不再增加。1994 年, Mitev 等在研究中发现, 牛心肌 CK-II 的催化活性也依赖于 Mg^{2+} 的存在^[7]。Zhang 等 1993 年对豌豆中 CK-II 的研究^[15], 及 Glover 等 1983 年对来源于一种果蝇的 CK-II 的研究^[10], 也都表明 CK-II 对 Mg^{2+} 的依赖性。

而当 Ca^{2+} 的浓度在 0~600μmol/L (Mg^{2+} 10mmol/L) 范围内, CK-II 对底物蛋白质的磷酸化反应速度基本无变化(见图 4); 当 Mg^{2+} 不存在 Ca^{2+} 存在时, CK-II 与依赖于 Ca^{2+} 的蛋白激酶相比活性很低^[6]。正如预测, 虽然某些蛋白激酶的催化活性依赖于 Ca^{2+} 的存在^[6], 但

是 Ca^{2+} 对来源于食用酵母 *Y. Lipolytica* 的 CK-II 的催化反应基本无影响, Ca^{2+} 对 CK-II 的催化活性基本无调节作用, 即 CK-II 的催化活性不依赖于 Ca^{2+} 的存在。

据图 5, 当 Zn^{2+} 的浓度从 0 逐渐增加到 $1000\mu\text{mol/L}$ 时(Mg^{2+} 不存在), CK-II 对底物磷酸化的活性随着 Zn^{2+} 浓度的增加而大幅度下降(降低约 75%)。所以, Zn^{2+} 是 CK-II 的抑制剂($I_{0.5} \approx 250\mu\text{mol/L}$), 不能替代 Mg^{2+} 的作用。Mitev 等 1994 年对来源于牛脑中的 CK-II 进行了相似的研究, 也发现了 Zn^{2+} 对 CK-II 的抑制作用及对 Mg^{2+} 的不能替代性。

相比之下, Mn^{2+} 对 CK-II 的双重调节作用显得很有意义(见图 6):

1) 若反应中存在饱和浓度的 Mg^{2+} (10mmol/L), CK-II 的催化活性不依赖于 Mn^{2+} 的存在, CK-II 对底物蛋白质的磷酸化反应基本是一个负协调性反应。当 Mn^{2+} 的浓度为 $0 \sim 50\mu\text{mol/L}$ 时, 它对 CK-II 有激活作用(磷酸化反应速度达到最大); 当 Mn^{2+} 的浓度为 $50 \sim 2000\mu\text{mol/L}$ 时, 它对 CK-II 有抑制作用(磷酸化反应速度逐渐降低, 直到最小)。

2) 当 Mg^{2+} 不存在时, CK-II 对底物蛋白质的磷酸化反应基本是一个正协调性反应。当 Mn^{2+} 的浓度从 0 增加到 $2000\mu\text{mol/L}$ 时, CK-II 对底物蛋白的磷酸化反应速度逐渐增大。因此, Mn^{2+} 又是 CK-II 的激活剂, 可以代替 Mg^{2+} 的作用。

Mitev 等 1994 年对来源于牛脑中的 CK-II 进行了类似的研究, 也发现了 Mn^{2+} 对 CK-II 的双重调节作用, 并认为 CK-II 的亚基 β 的自身磷酸化过程, 选择 Mn^{2+} 而非 Mg^{2+} 。这与下述研究结果密切相关。

2.3 Mn^{2+} 对 CK-II 专一性的调节作用

将 CK-II($4\mu\text{g/ml}$), 放射性 ATP($10\mu\text{mol/L}$) 分别与底物酪蛋白(0.5mg/ml) 或大豆球蛋白(7S , 0.5mg/ml) 在缓冲液($\text{TEA } 50\text{mmol/L}$, $\text{NaCl } 100\text{mmol/L}$, $\text{pH } 7.75$) 中, 分别加入含有二价金属离子 Mg^{2+} , Mn^{2+} 的可溶性盐 MgCl_2 (10mmol/L) 或 MnCl_2 (10mmol/L), 在 20°C 条件下反应 30min 。取样, 加入 6mol/L HCl , 在 110°C 水解 $1 \sim 2\text{h}$ 后, 采用“纤维素薄膜双向电泳”方法, 做出“放射性 ^{32}P -磷酸化氨基酸(O-P-氨基酸)的指纹图谱”, 定性磷酸化氨基酸的种类。然后, 指纹图谱上 ^{32}P -磷酸化氨基酸的数量大小, 用“闪烁测定仪”定量测定。为了进一步证实上述方法所得结果的可信性, 再采用“单克隆抗体免疫法”鉴定被 CK-II 磷酸化了的酪氨酸(O-P-Tyr)的存在。结果见图 7, 图 8, 图 9。

由实验结果可知, 底物蛋白中三种氨基酸即丝氨酸(Ser), 苏氨酸(Thr) 和酪氨酸(Tyr) 被 CK-II 磷酸化成了含有磷酸基的氨基酸(图 7) 即 O-P-Ser, O-P-Thr, O-P-Tyr。而且, 由于 Mg^{2+} , Mn^{2+} 对 CK-II 活性的调节作用不同(图 6 和图 3), CK-II 对底物中靶氨基酸的磷酸化作用就不同(图 8)。当反应中存在 Mg^{2+} (10mmol/L) 而无 Mn^{2+} 时, 靶氨基酸主要是 Ser 和 Thr, 其各占被磷酸化总量的 61% 和 32%, 而且只有极微量的 Tyr 被磷酸化了(图 8 A); 当反应中仅存在 Mn^{2+} (10mmol/L) 而无 Mg^{2+} 时, 靶氨基酸则主要是 Ser, Thr 和 Tyr, 其各

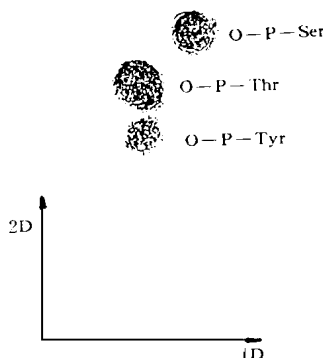


图 7 磷酸化氨基酸(O-P-氨基酸)的指纹图谱

1D: 第一电泳方向

2D: 第二电泳方向

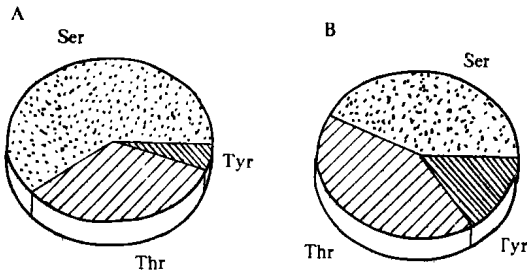


图 8 磷酸化氨基酸(O-P-氨基酸)的定量

A: Mg^{2+} (10mmol/L) 参与的
蛋白(氨基酸)磷酸化
B: Mn^{2+} (10mmol/L) 参与的
蛋白(氨基酸)磷酸化

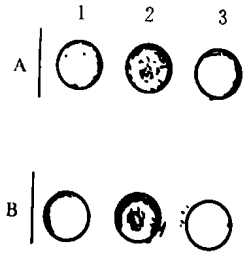


图 9 磷酸化酪氨酸(O-P-Tyr)的免疫法鉴定

A 行: Mg^{2+} (10mmol/L) 参与的聚 Glu-Tyr 磷酸化
B 行: Mn^{2+} (10mmol/L) 参与的聚 Glu-Tyr 磷酸化
1 列: 磷酸化时聚 Glu-Tyr 存在, CK-II 不存在, 无 O-P-Tyr 产物
2 列: 磷酸化时聚 Glu-Tyr 存在, CK-II 也存在, 有 O-P-Tyr 产物
3 列: 磷酸化时聚 Glu-Tyr 不存在, CK-II 存在, 无 O-P-Tyr 产物

占被磷酸化总量的 42%, 41% 和 15% (图 8 B). 采用计算机, 对于 Mg^{2+} , Mn^{2+} 分别对 CK-II 催化专一性调节的差异进行计算(t -test, $P=0.01$), 发现差异性显著, 而且 Mn^{2+} 对 CK-II 催化专一性具有显著调节作用。

此外, CK-II 还能对合成的“聚 Glu-Tyr”磷酸化(实际上是对 Tyr 磷酸化), 见图 9. 值得一提的是, 这是在 CK-II 研究史上首次发现酪氨酸(Tyr)也是 CK-II 的靶氨基酸, 而且 CK-II 具有显著的酪氨酸激酶活性。Bollen 等也指出, Mn^{2+} 对 CK-II 的底物具有专一的调节作用^[17]。Yuan 等 1993 年也发现了 Mn^{2+} 对酪氨酸激酶活性的必要性^[18]。

参 考 文 献

- Pinna L A. Casein kinase 2: an eminence gris in cellular regulation? Biochim. Biophys. Acta. 1990, 1054: 267~284
- Tuazon P T, Traugh J A. Casein kinase I and II-multipotential serine protein kinase: structure, function and regulation, Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. 1991, 23: 123~164
- Hataway G M, Traugh J A. Interaction of polyamines and magnesium with Casein Kinases II, Archs biochem. Biochem. Biophys. 1984, 233: 133~138
- Shen Hui. Thesis of Doctorat of Pierre & Marie Curie University (Paris VI), 1994
- Swarup G, Dasgupta J D, Garbers D L. Adv. Enzyme Regul. 1984, 22: 267~288
- Hataway G M, Traugh J A. Cyclic Nucleotide-independent Protein Kinases from Rabbit Reticulocytes: Purification of Casein Kinase, J. Biol. Chem. 1979, 254: 762~768
- Mitev V, Pauloin A, Houdebine L-M. Purification and Characterization of Two Casein Kinase Type II Isozymes from Bovine Brain Gray Matter, Journal of Neurochemistry 1994, 63(2)
- Pereverzeva I N, Selivankina S Y. Calcium-Dependent and Phospholipid-Dependent Protein Kinase from Barley Leaves-Isolation, Cross-Reactivity, and Properties, Russian Journal of Plant Physiology, 1994, 41: 3
- Li H, Roux S J. Purification and characterization of a casein kinase II type protein kinase from pea nuclei, Plant Physiology, 1992, 99: 686~692
- Glover C V C, Shelton E R, Brutlag D L. Purification and characterization of a type II casein kinase from Drosophila melanogaster, J. Biol. Chem. 1983, 258: 3258~3265
- Lin W-J, Tuazon P T, Traugh J A. Characterization of the catalytic subunit of casein kinase II expressed in Es-

- cherichia coli and regulation of activity, J. Biol. Chem. 1991, 266: 5664~5669
- 12 Meggio F, Pinna L A. Subunit structure and autophosphorylation mechanism of casein kinase-TS (type-2) from rat liver cytosol, Eur. J. Biochem. 1984, 145: 593~599
 - 13 Eckhart M A, Hutchinson, Hunter T. Cell (Cambridge, Mass) 1979, 18, 925
 - 14 Hunter T, Sefton B M. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1980, 77: 1311
 - 15 Zhang Shuqun, Jin C D, Roux S J. Casein Kinase II-Type Protein Kinase from Pea Cytoplasm and Its Inactivation by Alkaline Phosphatase in Vitro, Plant Physiol. 1993, 103: 955~9621
 - 16 Kilmczak Leszek J, Hind Geoffrey. Biochemical Similarities between Soluble and Membrane-Bound Calcium-Dependent Protein Kinases of Barley, Plant Physiol. 1990, 92: 919~923
 - 17 Bollen M, Kee S M, Graves D J, et al. Arch. Biochem. Biophys. 1987, 254: 437~447
 - 18 Yuan Chiun-Jye, Chi-Ying F, Huang, et al. Phosphorylase Kinase, a Metal Ion-dependent Dual Specificity Kinase, The Journal of Biological Chemistry, 1993, 286(24): 17683~17686

The Effect of Divalent Metals on the Activity and Specificity of the Casein Kinase (CK-II)

Shen Hui (School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Thierry Chardot (Institut National De La Recherche Agronomique)

J. C. Meunier (Institut National Agronomique Paris-Grignon)

Abstract The effect of divalent metals (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) on the activity of the casein kinase (CK-II) from the yeast *Yarrowia, Lipolytica* (wild W-29) has been studied. The activity of CK-II depends on the presence of Mg^{2+} , but it is not regulated by Ca^{2+} even if a little of activation is observed. Zn^{2+} is an inhibitor of the CK-II ($I_{0.5} \approx 250 \mu M$). If the reaction is performed in the presence of saturating Mg^{2+} concentration (10mmol/L), Mn^{2+} exhibits a dual behaviour: It is an activator of the reaction at low Mn^{2+} concentrations (< 50 $\mu mol/L$), and an inhibitor of the reaction at higher concentration. If the reaction is performed in the absence of Mg^{2+} , Mn^{2+} is an activator of the reaction. When the phosphorylation is performed in the presence of Mg^{2+} , the Serines (61%) and the Threonines (32%) of the substrate are the major targets of the CK-II, a slight amount of radioactivity being found in the Phospho-tyrosines (< 5%). Furthermore in the presence of Mn^{2+} alone, CK-II phosphorylates Serines covering (42%), threonines (41%) and Tyrosines (15%) respectively of the total phosphorylation. We have also found CK-II from *Yarrowia. Lipolytica* is able to phosphorylate the synthetic substrate of poly Glu-Tyr, in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} . To our knowledge, it is the first time that CK-II is shown to exhibit a significant Tyrosine kinase activity. CK-II is well known as an ubiquitous enzyme, and now it is proposed a dual specific protein kinase in vitro by our results.

Key-words casein kinase II; divalent metals; modification; phosphorylation; serine; threonine; tyrosine