

生物学研究概说

酶活性的控制

[英] P. 科恩 著

• 生物学研究概说 •

酶活性的控制

〔英〕 P. 科恩 著

罗 兰 译

金有豫 校

科学出版社

1982

内 容 简 介

本书是J.M.阿什沃恩主编的《生物研究概说》丛书之一。书中引用原核生物和真核生物的各种例子来说明酶活性控制的基本原理。主要阐述细菌的生物合成途径的调节、酶激活作用、凝血机理、补体系统、糖原代谢的调节、激素作用的分子基础和酶活性的共价修饰调节等等。可供生物化学、生理学等领域的科技工作者、大专院校有关专业师生和研究生参考。

P. Cohen

Outline Studies in Biology

CONTROL OF ENZYME ACTIVITY

Chapman and Hall 1976

• 生物研究概说 •

酶活性的控制

〔英〕P. 科恩 著

罗 兰 译

金有豫 校

责任编辑 赵甘泉

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1982年11月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1982年11月第一次印刷 印张：5 1/2

印数：0001—5,700 字数：78,000

统一书号：13031·2039

本社书号：2788·13-10

定价：0.58 元

目 录

第一章	绪言	1
第二章	终产物的抑制作用对细菌氨基酸和核苷酸 生物合成的调节	3
第三章	限制性蛋白水解对生物学功能的起始作用	25
第四章	糖原代谢的调节及激素作用的分子学基础	48
第五章	限制性蛋白水解或磷酸化作用以外的共价 修饰对酶活性的控制	84
第六章	变构转变的性质	102

第一章 绪 言

“研究细胞或组织中酶活性调节的主要目标，就是阐明代谢与机能相联系的机理”^{〔1〕}。

悬挂在生物化学实验室墙上的那些代谢图表，给人们留下一个在活细胞中所发生的酶促反应数目非常之多的印象。这些图表还提示了一个很重要的问题，即有机体如何利用各种途径，将代谢物以适当的量、适当的时间、消耗最小的能量而递送到适当的地方。现在已经清楚，对代谢的关键地方，赋与某些具有特殊性质的酶，是完成这种调节的主要方式。

很显然，形成代谢途径最终产物的速度，只能通过改变代谢途径中限速酶的活性来控制。这可以通过增加和减少酶分子数量（诱导和阻遏），或是改变原先存在的酶分子的活性来达到。本书仅讨论后一种作用方式。

研究酶调节的主要目标有两个：

（a）鉴定在代谢途径中将反应速度限制于某一特定代谢活性状态的酶。

（b）确定调节体内限速酶活性的机理，并搞清这种控制如何与细胞整合代谢相关联。

本书主要讨论的是上述目标的第二项内容。这套丛书的另一册，将更详细地论述鉴定限速步骤所用的方法^{〔2〕}。

就本论题的实质而言，酶活性控制的内容，应包括在整个生物化学中。因此必须先有一个前提，即本书的读者对各种代谢途径及它们相互间是什么关系，有广泛的了解，并且

对蛋白质化学和酶动力学的基本概念，也有所了解。

本书讨论这个论题所采用的酶系统，是从广泛的生物系统中挑选出来的。试图在一定的深度来讨论这些问题，同时也对一些近代所用的研究技术的限度及今后继续进行研究可能采用的方法作了简述。读者可能从第一次阅读中感到最突出的特点是，有机体选择用以控制酶活性的机理是各式各样的。还好随着书中内容的进展，将会展现一些更为总括性的论题，并在每章末尾作一些简短摘要，以使读者对该问题的现状有一个总括的轮廓。

参 考 文 献

- [1] Helmreich, E. and Cori, C.F. (1966), *Adv. Enz. Reg.*, 3, 91-107,
- [2] Denton, R. and Pogson, C.I. (1976), *Metabolic Regulation*, Chapman and Hall, London.

第二章 终产物的抑制作用对细菌氨基酸和核苷酸生物合成的调节

象大肠杆菌这样的细菌，只给含有碳、氢、氮、氧和硫的最低生长条件的培养基，就能合成多种多样的代谢物，其中包括制造蛋白质所需要的全部20种氨基酸及用于合成RNA和DNA的各种核苷酸。相反，高等生物（如哺乳动物）缺乏很多种催化这些反应的酶，而这些化合物却常是人们饮食中的必需营养物。人们认为，由于需要消耗大量的碳、氮和能量去合成氨基酸、核苷酸以及这些生物合成反应所需的全部酶（仅氨基酸的生物合成就有100多种），细菌的这种极端多样性，起到了平衡的作用。所以毫不奇怪，当五十年代中期基本弄清有关代谢途径后，人们就把注意力集中到这些反应究竟是如何调节而得以能最有效地应用可利用的营养物方面。确实，用以阐明这些代谢途径的一系列的同位素和突变种的研究，本身就提供了关于这些调节究竟是怎样产生的最初的一些线索。

在这样的一组实验中⁽¹⁾，将在葡萄糖-盐培养基中指数生长的大肠杆菌培养物离心，再悬浮于同样的培养基中，不过用放射性¹⁴C-葡萄糖代替培养基中未标记的葡萄糖。然后继续保温培育一小时，在这段时间里细菌的数量大约增加了一倍。在对数生长的情况下，细菌活跃地合成蛋白质，并含有整套合成每种氨基酸的酶。这时如果分析一下细菌蛋白质，那么正如所料，每种氨基酸结合的放射性约等于总细菌蛋白质的相对含量。然而，如果再改用非标记的氨基酸（例如用

L-异亮氨酸) 去补充培养基, 那么掺入蛋白质异亮氨酸残基的放射性将下降95%以上, 用其它氨基酸实验, 也得到类似的结果。这个实验表明, 加入的氨基酸被优先利用了, 还说明, 加入的氨基酸以某种方式抑制了蛋白质从前体分子的合成。

2.1 L-异亮氨酸生物合成的控制

图2.1列出了 L-异亮氨酸的代谢途径, 列举了在结构上与 L-异亮氨酸有关的氨基酸——L-缬氨酸的合成路线。上面介绍的实验表明, 在生长培养基中有 L-异亮氨酸存在时, 阻止了细胞内 L-异亮氨酸的形成。而且如果将异亮氨酸加到不能独自制造 L-苏氨酸的细菌突变种的培养基中, 就会减少为达到最适生长速度所需要的 L-苏氨酸的量⁽³⁾。这表明 L-异亮氨酸的生物合成, 不仅需要 L-苏氨酸, 而且 L-异亮氨酸还以某种方式降低了一种或多种可将 L-苏氨酸转化为 L-异亮氨酸的酶活力。因为在这个顺序中被苏氨酸脱氨酶催化的第一步是不可逆的 (图2.1), 所以 L-异亮氨酸不

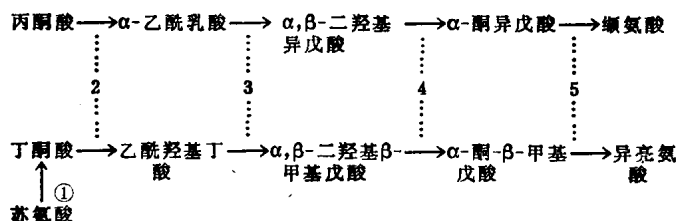


图2.1 形成 L-异亮氨酸和 L-缬氨酸的生物合成途径。酶:

1——苏氨酸脱氨酶; 2——乙酰羟酸合成酶; 3——乙酰羟酸异构体还原酶; 4——二羟酸脱水酶; 5——转氨酶B以及只催化缬氨酸代谢途径的缬氨酸-丙氨酸氨基丁酸转氨酶⁽²⁾。

可能使代谢途径逆转，而发生从 L-异亮氨酸再返回到 L-苏氨酸的作用。

在体外 L-异亮氨酸可抑制苏氨酸脱氨酶^[4]，这一发现是搞清酶控制机理的一个重要标志。这个抑制作用是非常专一的，如 L-亮氨酸的抑制作用比L-异亮氨酸要小100倍，而 L-缬氨酸和 D-异亮氨酸则什么抑制作用都没有。此外，在体外代谢途径中的其它酶，都不被 L-异亮氨酸抑制。人们不必过多地化费精力，就能立即提出一个非常简明但又有吸引力的、用以解释 L-异亮氨酸和其它氨基酸是怎样调节它们自身生物合成的作用机理。如果这种机理发生在完整细胞中，那么增加 L-异亮氨酸的浓度，会抑制代谢途径中的第一个酶——苏氨酸脱氨酶，而且由于阻遏了整个代谢途径的代谢流程，就减少了新的L-异亮氨酸的生物合成。反过来，如果 L-异亮氨酸的水平下降了，那么因为作用完全是可逆的，它从L-苏氨酸产生的量将自动地增加。

人们发现，L-异亮氨酸对苏氨酸脱氨酶的抑制是竞争性的，在这方面为了达到半最大激活作用，必须增加 L-苏氨酸的浓度，不过这个作用的动力学是复杂的。如果以 L-苏氨酸脱氨作用的初速度对没有 L-异亮氨酸存在时的 L-苏氨酸浓度作图，得到的是一条 S 形的曲线，而不是一个简单的双曲线函数^[5]。如果再以L-苏氨酸脱氨作用对在固定L-苏氨酸浓度时的L-异亮氨酸浓度作图，也得到类似的结果（图2.2）。在明显的抑制作用发生前，L-异亮氨酸必须增加到某一阈限水平以上。这种异常的动力学行为是怎样产生的，将在第六章中加以讨论，但在这里已充分地注意到，曲线的形状显示出酶活性对终产物的抑制作用更加敏感，并已超过那种如果酶只显示出简单的米-曼氏动力学抑制作用所应有的 L-异亮氨酸的特殊范围。这就提出，在体外观察到的

苏氨酸脱氨酶复杂的动力学，可能有生理学上的重要性，这

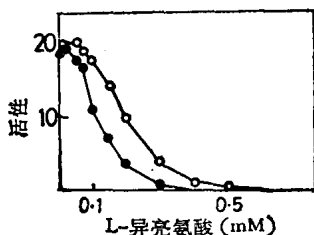


图2.2 大肠杆菌K12的粗提取物中，L-异亮氨酸对L-苏氨酸脱氨酶活性的影响。测定中 L-苏氨酸的浓度为0.02M(●)或0.04M(○) (5)。

种反应动力学使得代谢途径中 L-苏氨酸和 L-异亮氨酸浓度波动的调节更加敏感。

2.2 苏氨酸脱氨酶对L-异亮氨酸的脱敏作用；变构理论

把苏氨酸脱氨酶加热后，虽然在没有 L-异亮氨酸时所测得的活力仍是一样的，但已失去了它对 L-异亮氨酸抑制的敏感性 (图2.3)。苏氨酸脱氨酶这种脱敏作用是一个重要的发现，因为它暗示着 L-

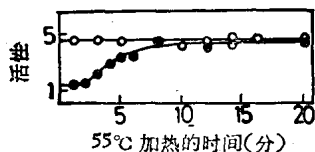


图2.3 加热而致的苏氨酸脱氨酶的脱敏作用。酶的活性是在有 (●) 或没有 (○) 0.01M L-异亮氨酸时，用 0.02M L-苏氨酸测定的。

L-异亮氨酸和 L-苏氨酸必定是与酶的不同部位结合的。因此 L-异亮氨酸可能只是间接地影响了 L-苏氨酸与酶的结合。

在经典的综述中，Monod、Changeux和 Jacob^[6]描述的苏氨酸脱氨酶及其它酶受到代谢性控制这个熟知的特点时，引

用了变构效应物这个术语来描述象 L-异亮氨酸这样的调节分子，它能抑制或激活某一种酶。下面这一段是从他们文章中摘录的一节，它精辟地论述了变构效应物的完整概念。“变构效应物能与变构部位发生专一性地和可逆性地结合。酶变构效应物复合物的形成，并不激活涉及效应物本身的反应，但据认为可以引起蛋白质分子结构断然不同的可逆的交变作用，即变构转变，这种交变作用改变了活性部位的性质，从而改变了一种或几种蛋白质生物活性所特有的动力学参数。在此描述中暗示的一个最基本的然而否定的假定是由于变构效应物的结合部位完全不同于活性部位，并且由于它不参与任一阶段的蛋白质激活反应，所以变构效应物不要求与任何一种底物本身有什么特殊的化学上的或代谢上的关系。因此任何变构效应的专一性和它的实际表现，只是由于蛋白质分子本身的特殊结构所造成的，从而使得它经历由变构效应物的结合而触发的独特的可逆的构象变化。底物与变构效应物之间这种没有任何固有的专一性的化学类似性或反应性要求，似乎是生物学上极为重要的事实。”

2.3 体内L-苏氨酸脱氨酶活性的调节

根据体外观察的 L-异亮氨酸对 L-苏氨酸脱氨酶的专一性抑制作用，可以提出但不能证明，当把 L-异亮氨酸加入培养基后，它是怎样进一步阻止 L-异亮氨酸生物合成的。在体内这种作用的重要性最令人信服的证据，是来自对细菌突变种行为的研究，这种突变种的行为是可以合成一种改变了的苏氨酸脱氨酶，它对 L-异亮氨酸的抑制作用失去敏感性。以致这些细菌产生过量的 L-异亮氨酸，这种氨基酸可大量地排到培养基中^[7]。

虽然 L-缬氨酸不抑制苏氨酸脱氨酶，但后来证明，在 L-苏氨酸浓度低时，由于苏氨酸脱氨酶活力失去了与 L-苏氨酸浓度的 S 形曲线的关系，所以 L-缬氨酸也可以激活苏氨酸脱氨酶^[7,8]（图2.4）。图2.1有关部分可以说明这种效应的可能作用。在 L-异亮氨酸和 L-缬氨酸生物合成途径中共同涉及到的三种酶，其相互关系是非常密切的。因此，在 L-苏氨酸浓度受到限制的情况下，通过 L-缬氨酸的激活作用，会增加 L-异亮氨酸的合成，从而有助于平衡 L-缬氨酸和 L-异亮氨酸的生物合成。然而在体内是否有这样的平行途径的刺激作用，尚未得到证实。

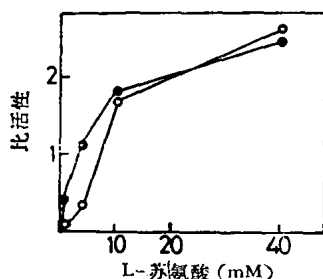


图2.4 存在 (●) 或不存在 (○) 5.0mM L-缬氨酸时，以苏氨酸脱氨酶的活性对苏氨酸的浓度所作的图⁽⁸⁾。

2.4 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸生物合成的控制

一看图2.5就知道，从 L-苏氨酸生物合成 L-异亮氨酸的途径，相对来讲是简单的。虽然直到现在人们仍把它作为一个独立的代谢通路来考虑，但事实上它只不过是更为广阔的合成途径的一个分支，它终止于 4 种氨基酸——L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸（它们共同的前身为

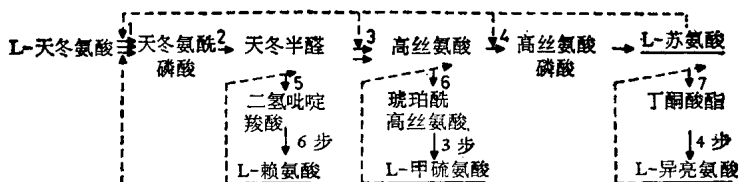


图2.5 从L-天冬氨酸生物合成的 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸和 L-异亮氨酸。虚线表示终产物的抑制作用。多箭头表示同功酶。1——天冬氨酸激酶；2——天冬半醛脱氢酶；3——高丝氨酸脱氢酶；4——高丝氨酸激酶；5——二氢吡啶羧酸合成酶；6——琥珀酰高丝氨酸合成酶；7——苏氨酸脱氨酶。

L-天冬氨酸)的合成。这种情况就提出了更加复杂的代谢控制的问题。例如，如果途径中最初的一个酶，象天冬氨酸激酶，恰好被4种氨基酸的终产物之一有效地抑制了，那么，供给合成其它三种基本代谢物的中间体也将匮乏，这对于细菌就引起了严重的问题。因此，代谢途径的结构本身就启示我们，似乎必需有一个更加合理的控制机理。

2.5 大肠杆菌 K12中不同调节特性的天冬氨酸激酶的同功酶

先前介绍的苏氨酸脱氨酶的一个类似实验揭示出，L-赖氨酸和 L-苏氨酸是仅有的可以明显抑制细菌提取物中天冬氨酸激酶活性的两种氨基酸。然而，无论其中哪一种氨基酸，它们的抑制作用都决不超过40—50%，但是抑制效应是有相加性的，因此当两种氨基酸都过量存在时，抑制作用便几乎是完全的(图2.6)。用标准蛋白纯化技术把天冬氨酸激酶的活性分成两个组份后，这个难以理解的现象就得到了

解释。第一种组份能被 L-苏氨酸完全抑制，但不受 L-赖氨酸的影响；而第二种组份能被 L-赖氨酸完全抑制，却又不受 L-苏氨酸的影响^[9]。

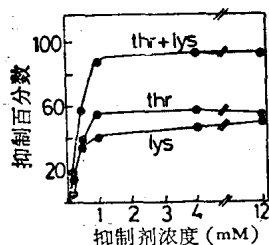


图2.6 L-苏氨酸 (thr)和 L-赖氨酸(lys)对大肠杆菌 K12提取物中的天冬氨酸激酶活性的影响^[9]。

在 L-赖氨酸过量存在时，可减少天冬氨酰磷酸的产生，但还不致减少到不能生物合成 L-苏氨酸的地步，反之亦然。不过为了使控制有效，无疑地需要以相加性的方法，来保证在 L-赖氨酸过量存在时，已减少了的天冬氨酰磷酸被导向产生 L-苏氨酸，也保证当 L-苏氨酸过量存在时，减少了的天冬氨酰磷酸被导向产生 L-赖氨酸。这就导致发现，在代谢分支上使之产生 L-赖氨酸的第一个酶——二氢吡啶羧酸合成酶，可专一性地被 L-赖氨酸抑制^[10]，而在代谢分支上使之产生 L-苏氨酸的第一个酶——高丝氨酸脱氢酶，可专一性地被 L-苏氨酸抑制^[11]。这两种继发性控制，应保证或是 L-赖氨酸或是 L-苏氨酸过量存在时，减少了的天冬氨酰磷酸都可被引向 L-赖氨酸或是 L-苏氨酸 (图2.5)。

高丝氨酸是 L-甲硫氨酸以及 L-苏氨酸生物合成的中间体 (图2.5)。如果仅仅存在高丝氨酸脱氢酶这一种酶的话，当 L-苏氨酸过量时，它可被完全抑制，L-甲硫氨酸也应该被完全抑制，除非另有其它的控制机制。这就使以后发现，大肠杆菌 K12还存在着第三种天冬氨酸激酶及第二种高丝氨酸脱氢酶。这两种酶活性都不会被 L-赖氨酸、L-苏氨酸或 L-甲硫氨酸抑制，尽管它们的合成可受到 L-甲硫氨酸的强力阻遏。诚然，这就需要在限制 L-甲硫氨酸的条件下进行

研究, 这种限制 L-甲硫氨酸的条件, 可以用一些 突变种获得, 此突变种在上述两种酶活性被抑制到很容易测定出来之前, 本身不能生成 L-甲硫氨酸^[12]。当L-赖氨酸和 L-苏氨酸过量存在时; 这两种酶活性就可以使 L- 甲硫氨酸的生物合成继续进行。

因而既然存在两种高丝氨酸脱氢酶, 就意味着还需要另外一种作用机理, 来保证在 L-苏氨酸过量时, 减少了的高丝氨酸被导向产生 L-甲硫氨酸, 而不产生 L-苏氨酸, 反之亦然。通过L-苏氨酸对高丝氨酸激酶的抑制作用^[13], 及通过 L-甲硫氨酸对 O-琥珀酰高丝氨酸合成酶的抑制作用^[14], 就可以达到这一点, 这些都在体外得到证实。

在体内的这些控制作用中, 其中一部分控制作用 (不是全部) 的重要性, 已通过利用细菌突变种, 采用类似前面曾介绍的对苏氨酸脱氢酶所用的方法(见2.3节) 得到了证实。

大肠杆菌以共同的前体 DAHP 生物合成三种芳族氨基酸, 似乎都是通过极类似的方式调节的 (图 2.7)。有三种

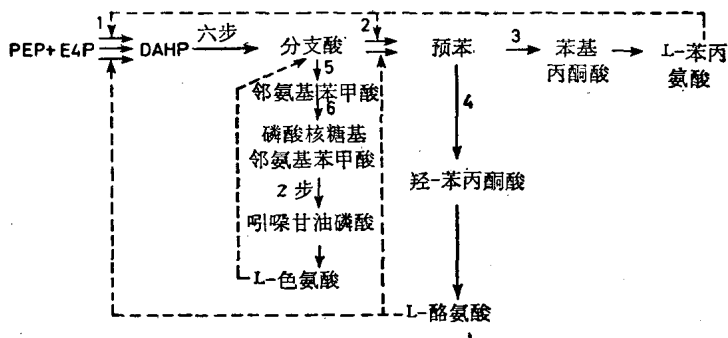


图2.7 芳族氨基酸的生物合成。虚线表示终产物的抑制作用。多箭头表示同功酶。1——3, 脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸 (DAHP) 合成酶; 2——分支酸变位酶; 3——预苯脱水酶; 4——预苯脱氢酶; 5——邻苯氨基苯甲酸合成酶; 6——邻苯氨基苯甲酸-5-磷酸核糖基焦磷酸 (PRPP) 转磷酸核糖基酶。PEP——磷酸烯醇丙酮酸; E4P——赤藓糖-4-磷酸。

DAHP 合成酶：一种可被L-苯丙氨酸抑制；一种可被 L-酪氨酸抑制；第三种不受反馈抑制，但其合成可被 L-色氨酸抑制^[15]。在色氨酸合成途径分支以后的合成顺序中，有两个分支酸变位酶，一个可被 L-苯丙氨酸抑制（分支酸变位酶P），另一个可被L-酪氨酸抑制（分支酸变位酶T）^[16]。这些例子表明，用两种或多种酶催化同一生化反应（称作同功酶），是细菌调节分支代谢途径的共同方式。

2.6 双功能性的天冬氨酸激酶-高丝氨酸脱氢酶；多功能性酶和多酶复合体

对能将大量 L-苏氨酸排入生长培养基的细菌突变种进行分析后，出乎意外的发现，对苏氨酸敏感的天冬氨酸激酶和对苏氨酸敏感的高丝氨酸脱氢酶，都对 L-苏氨酸的抑制作用部分和完全失去敏感^[11]。单一种的突变性变化，却以同样方式影响了两种酶的活性，这就有力地表明，这两种酶至少是共享有一条多肽链。这个设想由动力学研究作了补充，动力学研究表明，在体外，天冬氨酸激酶的底物 L-天冬氨酸和ATP，能抑制高丝氨酸脱氢酶的活性，而高丝氨酸脱氢酶反应的产物NADP和高丝氨酸，又抑制天冬氨酸激酶的活性。另外，高丝氨酸脱氢酶的底物 NADPH，可保护对苏氨酸敏感的天冬氨酸激酶免受热变性作用，但对赖氨酸敏感的天冬氨酸激酶的热变性作用则否。通过若干纯化步骤以共纯这两种酶，其最后产物被认为是一种称作天冬氨酸激酶 I - 高丝氨酸脱氢酶 I 的均一蛋白质，这就最终证明：这两种酶含有同样的蛋白质。现已发现，这个分子量为 340,000 道尔顿的蛋白质，是由 4 个相同的亚基以非共价键力结合而成的^[17]。所以产生这种同一性的原因，必定是因为两种不同

的催化活性是在同一条多肽链上的缘故。

有一个类似的分析表明,由于 L-甲硫氨酸的增加而遏制了天冬氨酸激酶和高丝氨酸脱氢酶的活性,这些活性也是在单条的称作天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 的蛋白质上呈现出来的。对赖氨酸敏感的天冬氨酸激酶,可称作天冬氨酸激酶 II^[11]。

当将天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 与胰凝乳蛋白酶保温培育时,天冬氨酸激酶的活性遭到破坏,而高丝氨酸脱氢酶的活性则不受 L-苏氨酸的抑制。已分离得到一个分子量为 55,000 道尔顿的片段,此片段含有脱敏化的高丝氨酸脱氢酶的活性,用末端基团分析表明,此片段相当于多肽链的 C-末端部分。以后又得到另一个天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 的突变种,这个突变种具有对 L-苏氨酸抑制作用敏感的正常的天冬氨酸激酶活性,但却没有高丝氨酸脱氢酶的活性。后来分离出来这种突变种蛋白质,并表明它的分子量为 47,000 道尔顿,相当于肽链的 N 末端部分。这种突变属于“赭石”型突变,未成熟的链端,负有缩短了的多肽链^[18,19]。对这些片段的分离和分析证明,这两种酶活性是在单条多肽链的不同区段上(图 2.8)。因为这两个片段仍保留

NH₂-甲硫氨酸-精氨酸 AK 86000 HD 甘氨酸-缬氨酸-COOH (1)

NH₂-甲硫氨酸-精氨酸 47000 AK (2)

55000 HD 甘氨酸-缬氨酸-COOH (3)

图 2.8 大肠杆菌 K12 的天冬氨酸激酶 I-高丝氨酸脱氢酶 I 的结构。1——天然酶; 2——具有天冬氨酸激酶(AK)活性的“赭石”突变种的 N-末端片段; 3——具有高丝氨酸脱氢酶(HD)活性的、胰凝乳蛋白酶消化形成的 C-末端片段。