

林生山豌豆谷氨酸脱羧酶的性质及其比较研究^①

穆小民^② 杨晓贺 吴显荣 沈黎明

(中国农业大学生物学院)

摘要 林生山豌豆谷氨酸脱羧酶的亚基分子量为 70 kD,天然分子量为 140 kD,是 2 个相同亚基组成的二聚体。N-末端氨基酸为丙氨酸。圆二色谱分析表明,该酶在 207.5 nm 和 215 nm 有一平缓的负峰,二级结构中 α -螺旋占 34.28%, β -折叠占 33.24%,无规则卷曲占 32.28%,紫外吸收表现一般蛋白质的特征吸收光谱,在 278 nm 处有最大吸收。酶最适 pH5.4,对谷氨酸的 K_m 值为 $1.62 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,最适温度 40℃,酶特异性地使谷氨酸脱羧,不能使门冬氨酸等其他氨基酸脱羧。比较结果说明该酶在已知结构和性质上与人及大鼠脑的谷氨酸脱羧酶接近,但和已知的几种植物的酶相差较远。

关键词 林生山豌豆;谷氨酸脱羧酶;性质;比较研究

分类号 Q557.2

Comparative Study on the Properties of Glutamic Acid Decarboxylase from Flat Pea

Mu Xiaomin Yang Xiaohe Wu Xianrong Shen Liming

(College of Biology,CAU)

Abstract Glutamic acid decarboxylase(GAD) from *Lathyrus sylvestris* L. (flat pea) was a dimer of 140 kD by sephacryl S200 gel filtration and subunits were identical with molecular weight 70 kD by SDS-PAGE. Determination of N-terminal amino acid by DNS method and polyamide thin-layer chromatography technique revealed only one α -dansyl amino acid: alanine. Amino acid composition of GAD from flat pea was also determined. The percentage of α -helix, β -sheet and random coil of the enzyme examined by circular dichroism(CD) spectrum analysis were 34.48%, 33.24%, 32.28%, respectively, indicating typical feature of globulin. It was showed that the maximum ultraviolet absorbance was at 278 nm. The GAD from flat pea was specific for L-glutamate and could not decarboxylate other amino acids tested, such as Asp. The optimum pH value of the enzyme was 5.4, which was lower than those from other sources. The optimum temperature was 40℃ which was much higher than other GADs. K_m value of the enzyme for L-glutamate was $1.62 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which was similar to those of GAD from human and rat brain, and was quite lower than those from other plant species. Flat pea GAD was similar to those from human and rat brain but quite different from GADs of other plant species. GAD from flat pea might be in an evolution position which is less advanced than animal GADs but more advanced than other plant GADs.

Key words flat pea (*Lathyrus sylvestris* L.); glutamic acid decarboxylase; property; comparison

收稿日期: 1997-04-07

①国家自然科学基金资助项目 39270711

②穆小民,中科院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室,北京 100091

谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)广泛分布于生物体内,催化谷氨酸脱羧生成 γ -氨基丁酸。 γ -氨基丁酸是脊椎动物中枢神经系统内的一种极其重要的神经递质。在高等植物, γ -氨基丁酸可能参与植物的逆境胁迫反应^[1],GAD的活力与植物种子的活力、出苗率和田间长势密切相关^[2]。目前,国内外对人和动物的GAD已有大量研究,对其性质有了较为详细的了解^[3],而对于高等植物的GAD研究却很少。目前只知道胡萝卜、大麦和向日葵等少数几种植物GAD的部分酶学性质^[4,5],只有马铃薯的GAD得到纯化^[6]。我们从美国引种了林生山豆(*Lathyrus sylvestris* L. flat pea)。数年的栽培试验表明其耐干旱,耐贫瘠,适于在我国北方推广^[7]。我们在其体内检测到了很高的GAD活性^[8],这种高活性与林生山豆的抗逆能力可能有一定关系。关于林生山豆GAD纯化已另文报道^[9]。本文报道了林生山豆GAD的性质及与其他来源的GAD性质的研究结果。

1 材料与方 法

材料 林生山豆叶片采自中国农业大学科学园内引种栽培的2年龄林生山豆。LKB Bromma 连续紫外监测仪、蠕动泵、部分收集器和冰柜、Pharmacia 500 FPLC 系统、Shimadzu UV-240 分光光度计、JASCO J500 圆二色谱仪、日立 835-50 氨基酸自动分析仪。试剂有 DEAE-Sephacryl S300 凝胶、Mono Q 预装柱(Pharmacia 产品)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、TEMED、丹磺酰氯、磷酸吡哆醛和谷氨酸(Sigma 产品),其他试剂为国产分析纯。

分子量测定 以 SDS-PAGE^[10]测定 GAD 的亚基分子量,分离胶浓度 10%,银染色。Sephacryl S200 凝胶过滤法,应用有效分配系数(K_{av}),测定 GAD 的天然分子量^[10]。

N-末端测定 以丹磺酰氯法聚酰胺薄膜层析技术^[11]测定 GAD 的 N-末端。将 350 μ L 纯化的 GAD 溶液($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)加入等量浓盐酸后 150 $^{\circ}\text{C}$ 水解 4 h,加入 700 μ L 重蒸水稀释,取 600 μ L 上氨基酸自动分析仪分析氨基酸组成。

光谱学分析 将纯化的 GAD 溶液[$0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}$ 溶于 Tris-HCl(pH7.0)]在圆二色谱仪上测定 200~300 nm 的紫外吸收 CD 谱,样品池光径 1 mm,容量 800 μ L,根据 Chen 等^[12]方法,从圆二色谱图上计算酶分子中 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲所占的百分比,在紫外分光光度计上扫描,以相同缓冲液做空白对照,测定波长范围 200~350 nm。

酶活力测定 GAD 酶活力测定以谷氨酸为底物,加入磷酸吡哆醛(PLP)为辅助因子,用氨基酸自动分析仪或丹磺酰氯法聚酰胺薄膜层析技术^[11]分析产物 γ -氨基丁酸的含量。标准 GAP 酶活力测定体系体积为 1 mL,包括下列成分: $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 5.8), $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Glu}$, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PLP}$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT), $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酶蛋白,反应温度 37 $^{\circ}\text{C}$,反应时间 30 min。酶的其他性质测定均按文献^[13]方法进行。

2 结果

2.1 分子量

根据图 1 SDS-PAGE 的结果,以分子量对数对电泳相对迁移率作图,测得林生山豆 GAD 的亚基分子量为 70 kD。经 Sephacryl S200 凝胶过滤,通过有效分配系数,计算出其分子量为 140 kD(图 2)。表明该酶是由 2 个相同亚基构成的二聚体蛋白,分子量和人及大鼠脑 GAD 的分子量接近,而与其他来源 GAD 的相差较远。

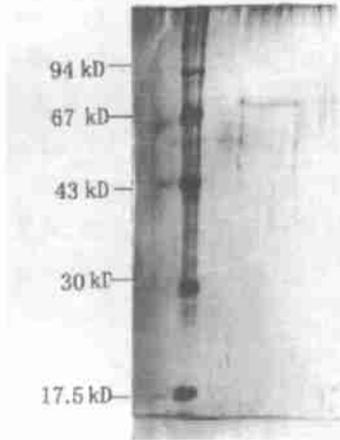


图 1 林生山黑豆谷氨酸脱羧酶的 SDS-PAGE 电泳图(银染)
A. 标准分子量蛋白 B. 谷氨酸脱羧酶

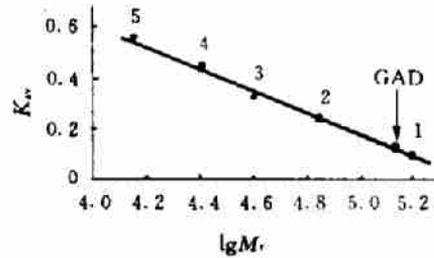


图 2 Sephacryl S200 凝胶过滤法测定林生山黑豆 GAD 的分子量(kD)
1. 蔗糖酶(160 000); 2. 牛血清白蛋白(67 000); 3. 卵清蛋白(43 000); 4. 胰凝乳蛋白酶原 A(25 000); 5. 核糖核酸酶(13 700)。

2.2 N-末端测定

将纯化的 GAD 丹磺酰氯化, 水解, 聚酰胺薄膜层析, 表明其 N-末端氨基酸为丙氨酸, 与人脑和鼠脑的 GAD 一致。

2.3 氨基酸组成

将纯化的 GAD 水解后用氨基酸自动分析仪测定氨基酸组成(表 1)。比较结果说明林生山黑豆 GAD 的大多数氨基酸的百分含量与人和大鼠脑的很接近, 只有精氨酸、甲硫氨酸和酪氨酸的含量较低。由于未见植物 GAD 氨基酸组成的报道, 故无法与其比较。

表 1 林生山黑豆及人和大鼠脑谷氨酸脱羧酶的氨基酸组成

氨基酸 残基 ^①	林生山黑豆		人 ⁽²⁾		大鼠 ⁽³⁾	
	每分子中 残基数	占总残基数%	每分子中 残基数	占总残基数%	每分子中 残基数	占总残基数%
Asp+Asn	104	8.5	118	10.5	103	9.5
Thr	60	4.8	78	6.9	52	4.8
Ser	92	7.5	82	7.3	74	6.8
Glu+Gln	168	13.8	138	12.3	91	8.4
Pro	80	6.7	34	3.0	56	5.2
Gly	180	14.7	90	8.0	86	7.9
Ala	106	8.7	93	8.3	55	5.1
Cys	22	1.7	19	1.7	23	2.1
Val	128	10.5	68	6.0	73	6.7
Met	2	0.2	8	0.7	14	1.3
Ile	56	4.7	68	6.0	66	6.1
Leu	124	10.2	109	9.7	109	10.1
Tyr	12	1.1	29	2.6	25	2.3
Phe	32	2.7	52	4.6	39	3.6
Lys	36	3.1	68	6.0	86	7.9
His	12	1.0	12	1.0	55	5.0
Arg	4	0.33	56	4.9	77	7.1
Total	1 218	100	1 122	100	1 083	100

①色氨酸 Trp 未测定

2.4 光谱学性质

从林生山黧豆 GAD 的远紫外区圆二色谱(图 3)可知林生山黧豆的 GAD 在 207.5 nm 和 215 nm 有一个平缓的负峰,呈现出球蛋白的特征。根据 Chen-Yang^[12]的方法,经微机计算,林生山黧豆 GAD 二级结构中 α -螺旋占 34.48%, β -折叠占 33.24%, 无规则卷曲占 32.28%。我们未见到其他来源的 GAD 的圆二色谱分析图谱,故无法比较。

将纯化的林生山黧豆 GAD 溶液于 200~350 nm 范围内进行紫外扫描。结果表明,林生山黧豆的 GAD 具有典型的蛋白质紫外吸收光谱,在 280 nm 处有明显吸收,其最大吸收波长为 278 nm。

2.5 最适 pH 值和最适温度

在材料与方法中叙述的标准反应条件下,在 pH3~8 范围内,改变反应体系的 pH 值,以氨基酸自动分析仪分析产物 γ -氨基丁酸的生成量,结果测得最适 pH 值为 5.4,稍低于其他已知的几种植物和动物的酶的最适 pH 值(表 2)。

表 2 不同来源谷氨酸脱羧酶的性质比较

材料来源	分子量 kD		N-末端 氨基酸	最适 pH	对谷氨酸 的 K_m 值	最适 pH 值	参考文献
	天然	亚基					
<i>Escherichia coli</i>	300	5	—	3.8	0.54	—	[14]
<i>Clostridium perfringens</i>	290	—	—	4.5	—	—	[6]
人脑	140	67	Ala	0.8	1.28	—	[3]
<i>Claviceps purpurea</i>	—	—	—	5.3	17.4	—	[6]
大鼠脑	140	67	Ala	7.0	1.10	—	[3]
大麦胚	260	—	—	6.2	22.0	30	[4]
大麦根	310	—	—	6.2	3.1	30	[4]
向日葵子叶	—	—	—	5.7	9.1	30	[5]
马铃薯块薯	91	43	—	5.8	5.6	37	[6]
林生山黧豆	140	70	Ala	5.4	1.62	40	Present work

在前述标准反应条件下,改变反应温度,用丹磺酰氯法和聚酰胺薄膜层析技术测定相对活力,求得在本实验条件下,该酶反应的最适温度为 40℃,比报道的其他植物 GAD 的最适温度稍高(表 2)。

2.6 热稳定性

取一定量酶液,在不同反应温度下分别保温一定时间,到时迅速冷却,然后再调至 37℃。按标准方法进行酶活力测定反应。结果表明,林生山黧豆的 GAD 50℃ 保存 1 h,酶活力明显下降,60℃ 保存 1 h,酶活力完全丧失,和大麦 GAD 的热稳定性相近^[4]。

2.7 酶的 K_m 值

改变底物浓度,按酶活力测定标准方法进行酶促反应,用氨基酸自动分析仪分析产物 γ -氨基丁酸的生成量,将测定结果按 Lineweaver-Burk 作图法,求得该酶作用于谷氨酸的 K_m 值为 $1.62 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4)。该数值比已知大麦、向日葵和马铃薯等植物 GAD 的 K_m 值(表 1)低,和人及鼠脑 GAD 的 K_m 值接近。

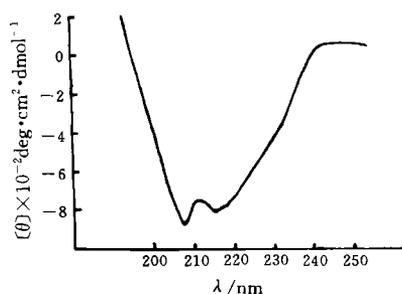


图 3 林生山藜豆谷氨酸脱羧酶的圆二色谱图

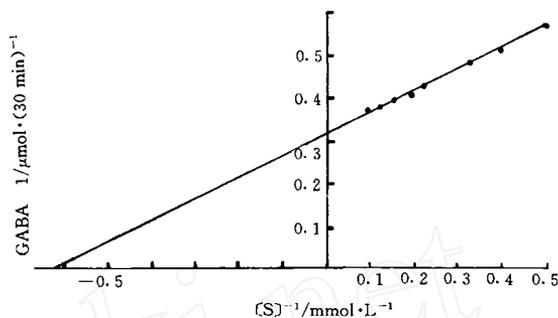


图 4 谷氨酸浓度对反应速度的 Lineweaver-Burk 双倒数图

2.8 底物特异性和抑制剂对酶活力的影响

林生山藜豆 GAD 特异性地催化谷氨酸的脱羧, 在本实验的检测水平上, 没有发现能催化天门冬氨酸等, 缬氨酸, 谷氨酰胺和 2,4-二氨基丁酸的脱羧。加入抑制剂进行标准反应, 用丹磺酰氯法和聚酰胺薄膜层析法检测产物 γ -氨基丁酸, 结果氨基脲 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、羟胺 ($0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和氰化物 ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 产生 80%~100% 的酶活性抑制, 与文献报道的其他来源的 GAD 一致。碘代乙酰胺 ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 二氨基丁酸 ($12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 天门冬氨酸 ($8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 巯基乙醇 [0.2% (体积分数)] 对林生山藜豆 GAD 的活性没有影响。

3 讨论

从表 3 可看出林生山藜豆 GAD 的分子量和马铃薯 GAD 的分子量^[6]差别较大, 和大麦胚和根的 GAD 的分子量^[4]差别也很大, 而和人脑及大鼠脑的分子量基本相同。

从氨基酸组成分析来看, 林生山藜豆 GAD 的氨基酸组成中大多数氨基酸的含量和人脑及大鼠脑的 GAD 的很接近(表 1)。林生山藜豆 GAD 的 N-末端氨基酸残基为丙氨酸, 与人脑和大鼠脑的一致^[3]。从酶的动力学性质来看, 林生山藜豆 GAD 的 K_m 值比已知的马铃薯、大麦和向日葵的 GAD 的 K_m 值低, 而与人脑和大鼠脑 GAD 的 K_m 值(表 3)相近。

以上分析表明, 林生山藜豆的 GAD 在一些结构和性质上和人脑及大鼠脑的 GAD 近。而与已知的植物 GAD 差别较大, 从文献报道看, GAD 的进化属于歧异进化。各种不同来源的 GAD 最早是属于同一种酶, 通过不同方向的进化, 其结构和性质逐渐发生了改变, 形成动物、植物和微生物等不同来源的 GAD 结构及性质上的差异^[3,6,15]。哺乳动物在进化上处于较高的层次, 其体内的 GAD 是重要的抑制性神经递质 γ -氨基丁酸的合成酶, 具有重要的生理作用。所以人脑和大鼠脑的 GAD 的进化程度应该是非常高的。林生山藜豆 GAD 的结构和性质和人及鼠脑的谷氨酸脱羧酶相近, 说明林生山藜豆的 GAD 在长期的自然选择中, 得到了较高度度的进化。

林生山藜豆 GAD 的最适 pH 值为 5.4, 稍低于已知的其他植物的 GAD 的最适 pH 值, 而且林生山藜豆 GAD 的 K_m 值明显地低于已知的其他植物 GAD 的 K_m 值, 其最适温度高于已知的其他植物 GAD 的最适温度。这就意味着林生山藜豆的 GAD 和其他植物的 GAD 相比, 在较低的 pH 值条件下, 较低的底物浓度条件下, 和较高的温度条件下, 仍能发挥很强的作

用。

关于从植物来源的其他谷氨酸脱羧酶的氨基酸组成、N-末端测定、圆二色谱等光谱学分析方面还未见报道。所以我们测定的林生山豆根谷氨酸脱羧酶的这些性质无法和其他植物的比较。预计今后这方面会有更多的研究。

参 考 文 献

- 1 穆小民, 吴显荣. 高等植物的 γ -氨基丁酸及其代谢的酶学研究. 生命的化学, 1995, 15(5): 21~24
- 2 Steiner J, Grabe D F, Tulo M. Seed physiology, production, & technology. Single and multiple Vigor tests for Predicting Seedling emergence of wheat. Crop Sci, 1989, 4: 782~786
- 3 Maitre M, Blindermann J M, Ossola L, et al. Comparison of the structure of L-glutamate decarboxylases from human and rat brains. Biochem Biophys Commun, 1978, 85: 883~890
- 4 Inatomi K, Slaughter J C. The role of glutamate decarboxylase and γ -aminobutyric acid in germinating barley. J Exp Bot, 1971, 22: 561~571
- 5 Smith J E, Waygood E R. Resolution of the apoenzyme and coenzyme of L-glutamic acid decarboxylase from sunflower cotyledones. Can J Biochem Physiol, 1961, 39: 1055~1059
- 6 Satya Narayan V, Nair P M. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Solanum tuberosum*. Eur J Biochem, 1985, 150: 53~60
- 7 穆小民, 吴显荣, 沈黎明. 林生山豆根引种栽培试验初报. 草业科学, 1995, 12(4): 21~22
- 8 沈黎明, 霍长河, 穆小民等. 测定林生山豆根体内谷氨酸脱羧酶活性的薄膜层析荧光定量法. 植物生理学通讯, 32(2): 135~137
- 9 穆小民, 沈黎明, 吴显荣. 林生山豆根谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分性质研究. 生物化学杂志, 1997
- 10 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680~685
- 11 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1981
- 12 Chen Y H, Yang J T, Chen H K. Determination of the helix β -form proteins in aqueous solution by circular dichroism. Biochemistry, 1974, 13: 2253~3359
- 13 沈黎明, 穆小民, 赵革. 丹磺酰氯法和聚酰胺薄膜层析法检测 2,4-二氨基丁酸和 γ -氨基丁酸. 植物生理学通讯, 1996, 32(1): 35~38
- 14 Strausbauch P H, Fischer E H. Chemical and physical properties of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. Biochemistry, 1970, 9: 226~232
- 15 Wu J Y, Matsuda T, Roberts E. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain. J Biol Chem, 248: 3029~3034