

大豆下胚轴可溶性蛋白中钙激活的蛋白激酶*

郑朝军 余叔文

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要

大豆(*Glycine max* L.) 下胚轴可溶性蛋白提取液进行自磷酸化, 以 SDS-PAGE 电泳分析其标记产物时发现, 当有较高浓度的 Ca^{2+} 存在于反应液中时, 有一条 18 kD 蛋白带被高强度标记, 同时也可观察到另一条标记强度不高的 67 kD 蛋白带。当反应时间延长到 15 或 30 min 时, 它们的标记强度都逐渐减弱, 最终从放射自显影底片上消失; 在反应液中加入钙螯合剂 EGTA 时, 则只有 67 kD 被高强度标记; 在磷酸化反应过程中加入非标记 ATP, 蛋白中的 ^{32}P 逐渐被非标记磷取代, 表明反应体系处于磷酸化-脱磷酸化的平衡过程中, 并有结果显示这一过程是钙依赖性的。组蛋白 H1 可以使反应进程加快, 表明提取液中的蛋白激酶可以利用它作为底物。综合结果表明, 18 kD 和 67 kD 蛋白可能是具有自磷酸化能力且对 Ca^{2+} 敏感的蛋白激酶, 它们对 Ca^{2+} 的不同反应, 使得钙信号的传递更具可控性。

关键词 蛋白激酶; 磷酸化-脱磷酸化; 大豆; 下胚轴

Ca^{2+} ACTIVATED PROTEIN KINASES IN HYPOCOTYL OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX* L.)

Zheng Chao-jun and Yu Shu-wen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract

The soluble protein extract of soybean hypocotyl was autophosphorylated, the labeling products were analyzed by SDS-PAGE. A 18 kD protein band was intensely labeled when a relatively high concentration of calcium was present, meanwhile a weakly labeled 67 kD pro-

收稿日期:1994-07-12 接受日期:1994-10-07

* 国家自然科学基金资助课题。

tein band was also observed. When the reaction time was prolonged to 15 or 30 min, the labeling intensity of them was weakened gradually and the labeled bands disappeared eventually from the autoradiograph. If the calcium chelater EGTA was added into the reaction system, only 67 kD was phosphorylated with high intensity. When non-labeled ATP was added during the reaction process, ^{32}P in the labeled proteins could be substituted gradually by Pi. This indicated that the reaction system was in a dynamic equilibrium of phosphorylation-dephosphorylation. There were also data inferred that it was a calcium dependent process. Histon H1 could speed up the phosphorylation, suggesting that it was a suitable substrate for protein kinases in the extract. Findings support that 18 kD and 67 kD protein may be Ca^{2+} sensitive protein kinases that can be autophosphorylated. Their different responses to Ca^{2+} may make the calcium signal transduction controllable.

Key words Protein kinase; Phosphorylation-dephosphorylation; Soybean; Hypocotyl

对细胞调节刺激-反应偶联的研究是细胞生物学基础的重要课题。有关细胞受到外界刺激后胞内钙浓度的变化^[1,2]和与钙有关的蛋白激酶的研究文献正迅速增加^[3],研究内容涉及许多外源刺激,如重力^[4]、低温^[5]、盐胁迫^[6]等。有关植物个体水平的信号传递工作还处在起步阶段^[1],国内研究报道则更少^[7]。植物细胞钙依赖性蛋白激酶可以“感觉”胞内钙浓度变化,并将这一变化通过共价修饰某些蛋白而将外界信号传递到生理途径中去。钙依赖性蛋白激酶主要有两种:钙/钙调蛋白依赖型和钙/磷脂依赖型^[8]。而植物体内存在着另一种既不依赖钙调蛋白^[9]也不依赖磷脂的单纯钙激活的蛋白激酶^[10]。这意味着蛋白激酶自身具备了钙调蛋白的调节特性,它的类似于钙调蛋白的调节区域可以调节其自身激酶活性^[11]。这些工作还不能明确阐述这些蛋白激酶是如何“感觉”和区别浓度的变化,植物接受刺激后钙离子的来源及其穿膜机理尚不十分清楚^[2]。研究工作进展缓慢的原因在于信号传递系统的复杂性。作为信号系统必须具备如下特点:1. 灵敏地接受外源信号;2. 清楚地辨别信号来源;3. 修饰并传递收到的信号;4. 具有生化反应的可逆性。即,既要能够放大、传递信号,又要能够及时终止信号传递,具有“降调节”(down regulation)能力。本文工作以大豆下胚轴为材料,研究了可溶性蛋白中钙依赖的蛋白磷酸化,推测其中可能存在两个对钙浓度变化有不同反应的蛋白激酶。

1 材料和方法

1.1 大豆幼苗培养

大豆(*Glycine max* L.)品种“白芒节”采自上海金山。种子用1% NaOCl 消毒 5 min,流水冲洗 20 min 后播种于底部透水的沙盒中,25 °C 无光照培养 7 d。

1.2 可溶性蛋白的提取

剪取大豆幼苗下胚轴,立即浸入研磨缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、5 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L DTT 和 0.2 mmol/L EGTA)中。剪碎,在冰浴中迅速研磨。将研磨液用 4 层纱布过滤后在 4 °C 下 40000×g 离心 15 min,上清液用于下述反应。

1.3 蛋白浓度测定

按照 Bradford^[12]的方法以 BSA 的方法为标准测定。

1.4 体外蛋白磷酸化反应

蛋白激酶的酶活性测定反应液组成为 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA 或 1 mmol/L CaCl₂ 和酶液。加入 10 μCi[γ-³²P]ATP (5000 Ci/mmol, 北京市福瑞生物工程公司产品)启动反应。按一定时间间隔从酶反应混合物中取 25 μL 滴加到一张用 50% TCA 和 1% NaPPi 浸过的 Φ25 微孔滤膜(上海新亚净化器件厂产品)上,略干燥后,滤膜用含 1% NaPPi 的 5% TCA 洗两次,置红外灯下烘干。干燥的滤膜浸入闪烁液(10% Triton X-100)中以液闪记数仪(Beckman)测定蛋白质中结合的³²P。数据取 3 次平均值。绝对误差小于 8%。

1.5 酶反应的可逆性

磷酸化反应进行一定时间(1 min)时取出一定量反应混合物,加入终浓度为 1 mmol/L 的非标记 ATP,然后按上述方法测定 TCA 沉淀蛋白中³²P 的结合量。

1.6 ³²P 标记后 SDS-PAGE 及放射自显影

酶促反应结束时在酶反应液中直接加入 SDS 电泳上样缓冲液^[22]中止反应,然后上样电泳。电泳方法按 Laemmli^[13]或 BioRad Instruction Manual 采用 12% 分离胶电泳。电泳后的聚丙烯酰胺凝胶在固定、银染并拍照后用保鲜膜(上海长江塑料制品厂出品)包好,置暗盒中-20 °C 对 X 光胶片曝光。

2 结果和讨论

大豆下胚轴可溶性蛋白提取液(下称提取液)自磷酸化后电泳凝胶的放射自显影结果

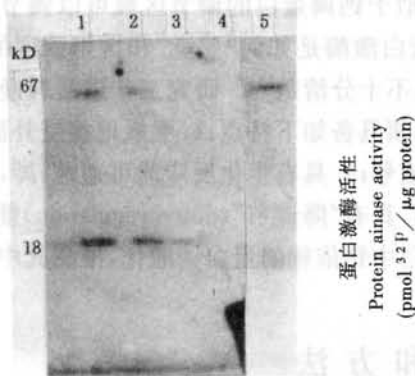


图 1 提取蛋白自磷酸化标记后电泳的放射自显影图

1~4. 有 Ca²⁺ 时标记 2、5、15、30 min
5. 加入 EGTA 后标记 2 min

Fig. 1 SDS-PAGE autoradiograph of extracted protein after autophosphorylation

Lane 1 to 4 were labeled for 2, 5, 15, 30 min respectively when Ca²⁺ was present; lane 5 was labeled for 2 min after EGTA was added

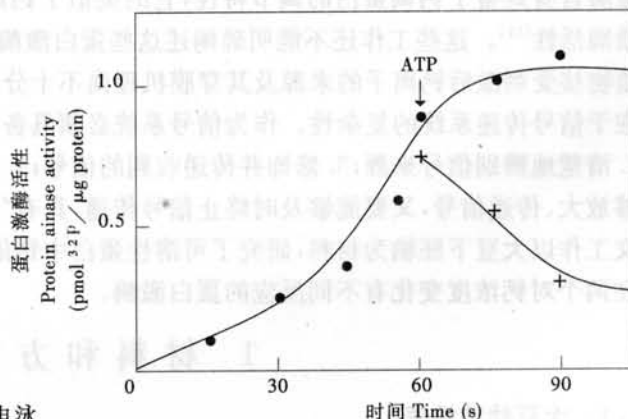


图 2 ATP 对 TCA 沉淀中³²P 标记量的影响

●—● 不加非标记 ATP

+—+ 加入 1 mmol/L 的非标记 ATP

Fig. 2 ³²P content in TCA precipitated protein in presence (+—+) or absence

(●—●) of non-labeling ATP

如图 1 所示, 分子量为 18 kD 的蛋白带被专一性高强度地磷酸化标记; 67 kD 也被标记, 但强度明显弱。延长反应时间, 两个区带越来越弱; 直至标记时间延长到 30 min 时, 18 kD 自显影带几乎从底片上消失(反应时间为 15 min 时 67 kD 已经消失)。当反应进行到一定时间(3 min)时加入外源无标记 ATP(1 mmol/L)时, 也出现同样结果(见下文); 在反应混合物中加入 EGTA 以螯合溶液中的 Ca^{2+} 时, 18 kD 区带消失, 伴之以分子量为 67 kD 的蛋白被高强度地标记。因此, 可以认为, 1. 在提取液中未加入外源底物进行磷酸化反应时, 产生了被专一标记的蛋白质条带 18 kD 蛋白(图 1-1, 有 Ca^{2+} 时)和 67 kD (图 1-5, 无自由 Ca^{2+}), 显示出蛋白激酶活性。也可解释为它们是一被磷酸化的蛋白^[14]。Moisyadi^[14]以甘蔗为材料所作的工作中, 显示了相似的结果。在他的试验中, 当甘蔗细胞悬浮液的粗提液进行自磷酸化反应时, pp18 被唯一地标记, 用双向电泳技术确认它是一种能发生自磷酸化反应的蛋白激酶。这提示我们在磷酸化反应中被 ^{32}P 标记的蛋白质可能即为蛋白激酶本身; 2. 当延长标记时间时, 标记强度降低, 意味着磷酸酶或其自身脱磷酸化反应活性超过了蛋白激酶活性, 已被 ^{32}P 标记的蛋白质又被脱磷酸化; 3. 从第 2 项的分析中不难看出, 被标记在蛋白质上的 ^{32}P 是可脱落的, 磷蛋白处在磷酸化-脱磷酸化的动态平衡中(从下文的分析可以证实, 磷酸化和脱磷酸化是同时进行的)。4. 反应混合物中加入 EGTA 后, 18 kD 蛋白带消失和 67 kD 区带的加强, 可以认为它们是与 Ca^{2+} 有关并由其激活的蛋白激酶。而 67 kD 的加强, 能否推测它是一被较高浓度 Ca^{2+} 或能被 EGTA 螯合的其它双价离子所抑制的蛋白激酶, 或者它是作为另一种具有该属性的蛋白激酶的底物? 这样细胞内钙浓度提高后对细胞刺激反应的调节就更具可控性。

图 2 说明了蛋白激酶磷酸化反应的可逆进程。当磷酸化反应进行到箭头所示的时间点取出一部分反应混合物, 加入终浓度为 1 mmol/L 的非标记 ATP。在其后的各时间点取

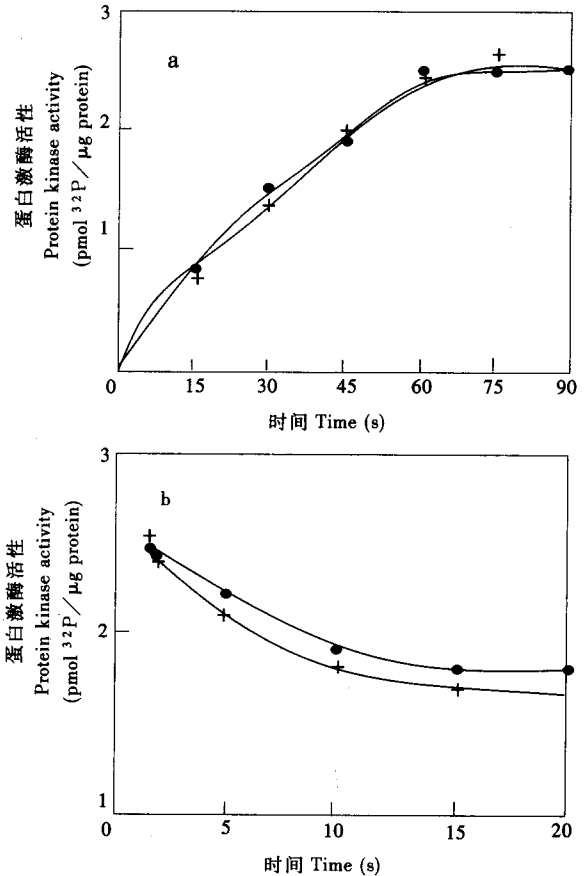


图 3 提取蛋白自磷酸化反应在有 Ca^{2+} (+—+) 和无 Ca^{2+} (●—●) 情况下的时间进程
a 和 b 分别为标记 90 s 和 20 min 时沉淀蛋白 ^{32}P 含量曲线
Fig. 3 Time courses of autophosphorylation of the extracted protein in the presence (+—+) or absence (●—●) of Ca^{2+} curves a and b show the labeling process in 90 s and 20 min respectively

出的样品测定 TCA 沉淀蛋白中 ^{32}P 量, 结果指出, 加入 ATP 后, ^{32}P 结合量几乎呈直线下降。可以认为, 这是由于磷酸酶脱磷酸化反应的参与才使得 TCA 沉淀蛋白中 ^{32}P 在磷酸化-脱磷酸化过程中不断地被非标记磷所替代, 即使在仅仅延长标记时间的反应进程中也有相似现象(图 3)。同时也存在这样的可能性: 蛋白激酶本身或许就具有磷酸酶的活性, 本文研究的蛋白激酶未经纯化, 只用了粗提取液, 不能排斥其中含有磷酸酶, 因此还很难作此推论, 要证明这一点还必需把该蛋白纯化。

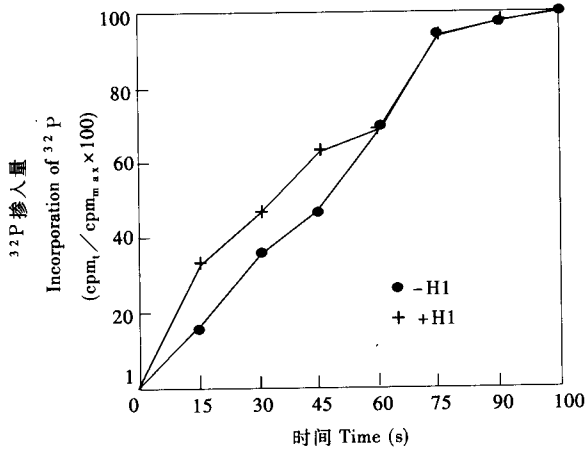


图 4 组蛋白 H1 对标记进程的影响

●—● 对照; +—+ 加入组蛋白 H1

Fig. 4 Effect of histone H1 on the labeling process

●—● Control; (+—+) Histone H1 added

酶能独自地或在受 Ca^{2+} 激活的蛋白磷酸酶配合下完成蛋白磷酸化和脱磷化的全过程。

当在反应混合液中加入组蛋白 H1 (Sigma 产品) 作为反应底物时, 蛋白结合 ^{32}P 量未见明显增加, 但反应初期蛋白磷酸化速度加快(图 4), 加入组蛋白 H1 的反应组合体系在最初 1 min 内, 蛋白被标记的 ^{32}P 量明显高于未加组蛋白的反应组合, 但在以后的时间里两者逐渐接近。这反映出组蛋白可以作为该激酶较理想的反应底物。它与 DasGupta^[15]从落花生中分离出的蛋白质丝氨酸/酪氨酸残基蛋白激酶(GnCDPK)有所不同, 即 GnCDPK 不能以组蛋白或酪蛋白为反应底物。而较多的植物蛋白激酶能够以组蛋白为底物^[14,16]。

综上所述, 可以初步得出结论, 大豆下胚轴可溶性蛋白提取液中 18 kD 和 67 kD 两蛋白是对 Ca^{2+} 灵敏的蛋白激酶, 它们表现出磷酸化反应的可逆性, 并且组蛋白可以作为它们的反应底物。如果认为细胞在对外界刺激信号作出反应之前, 伴随着细胞 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$)的提高和(组)蛋白磷酸化, 那么持续地增高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, 不断地使底物磷酸化(信号放大)则细胞就会“玩火自焚”^[2]。从文本结果可以推论, 蛋白磷酸化的可逆性即“降调节”功能, 正是细胞“玩火”而“不怕”“自焚”的部分原因。图 1 的结果还显示, 细胞内存在着不同的调节途径, 提高或降低 Ca^{2+} (如加入 EGTA 后 18 kD 蛋白带的消失和 67 kD 蛋白的出现)时, 有不同的蛋白激酶参与反应, 或是以不同的蛋白作为磷酸化反应的底物, 据推测细胞正是在这一过程中辨别 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 提高的原因(如 ABA 或 GA)而作出不同的反应, 如

图 3 结果表明, 外源 Ca^{2+} 对反应过程没有明显的促进作用, 也许是由于这样样品中存在的 Ca^{2+} 或容器(如反应应用试管)的 Ca^{2+} 污染已足以激活蛋白激酶, 因为加入 EGTA 时会明显降低 ^{32}P 结合量(图 1)。但外源 Ca^{2+} 却加速了脱磷酸化反应。即当延长反应体系的保温时间时, TCA 沉淀蛋白中 ^{32}P 标记量不断减少, 这与加入外源 ATP 的效果是相同的, 进一步证实了酶反应的可逆性。当在反应混合物中加入 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA, 大大地降低反应产物中蛋白质的 ^{32}P 掺入量, 展示出蛋白激酶对 Ca^{2+} 离子的依赖性。通过以上分析可以得出结论: 提取液中的钙依赖性蛋白激酶

气孔开关^[17]或影响细胞分泌某些物质^[18]。

参 考 文 献

- 1 Trewavas A. Gilroy S. Signal transduction in plant cells. *TIG November/December*. 1991. 7: 356~361
- 2 Bush D S. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol*. 1993. 103: 7~13
- 3 Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell*. 1987. 50: 823~829
- 4 Friedmann M. Poovaiah B W. Calcium and protein phosphorylation in the transduction of gravity signal in corn roots. *Plant Cell Physiol*. 1991. 32: 299~302
- 5 Monroy A F. Sarhan F. Dhindsa R S. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression, evidence for a role of calcium. *Plant Physiol*. 1993. 102: 1227~1235
- 6 Yupsanis T. Moustakas M. Eleftheriou P *et al.* Protein phosphorylation-dephosphorylation in alfalfa seeds germinating under salt stress. *J Plant Physiol*. 1994. 143: 234~240
- 7 郭艳林. Roux R J. 绿藻 *Dunaliella salina* 钙依赖蛋白激酶的特征(英文). 植物生理学报. 1992. 18: 300~308
- 8 Nishizuka Y. The Molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*. 1988. 334: 661~665
- 9 Stull J T. Nunnally M H. Michnoff C H. Calmodulin-dependent protein kinase. In: Boyer P D. Krebs E G eds., The enzymes: Control by Phosphorylation. Vol X VII. New York: Academic Press, 1986. 113~116
- 10 Battey H N. Venis M A. Calcium-dependent protein kinase from apple fruit membranes is calmodulin-independent but has calmodulin-like properties. *Planta*. 1988. 176: 91~97
- 11 Harper J F. Sussman M R. Schaller G E *et al.* A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science*. 1991. 252: 951~954
- 12 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976. 72: 248~254
- 13 laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of phage T4 head. *Nature*. 1970. 227: 680~685
- 14 Moisyadi S. Dharmasiri H. Harrington M *et al.* Characterization of a low molecular mass autophosphorylating protein in cultured sugarcane cells and its identification as a nucleoside diphosphate kinase. *Plant Physiol*. 1994. 104: 1401~1409
- 15 DasGupta M. Characterization of a calcium-dependent protein kinase from *Arachis hypogea* (groundnut) seeds. *Plant Physiol*. 1994. 104: 961~969
- 16 Verhey S O. Gaiser J C. Lomax T L. Protein kinases in zucchini. *Plant Physiol*. 1993. 103: 413~419
- 17 Anderson B E. Ward J M. Schroeder J I. Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina guard cells*. *Plant Physiol*. 1994. 104: 1177~1183
- 18 Gilroy S. Jones R L. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89: 3591~3595