

甘油代谢中甘油激酶的研究进展*

郭雪娜 诸葛斌 诸葛健**

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)

Research Progress on The Glycerol Kinase

Guo Xuena Zhuge Bin Zhuge Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education Southern Yangtzes University, Wuxi 214036, China)

关键词:甘油激酶(GK), 1,6-二磷酸果糖(FBP), 磷酸携带蛋白 IIA^{Glc}, 腺苷核苷
中图分类号:Q814 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)04-0510-04

甘油作为重要的化工原料,其生产一直受到国内外的广泛关注。发酵法生产甘油是除皂化法和化学合成法外生产甘油的第三条途径。江南大学(原无锡轻工大学)在90年代已成功地应用产甘油假丝酵母实现了工业化生产甘油。经江南大学研究人员多年不断努力,产甘油假丝酵母WL-2002-5发酵甘油可达12%以上,总糖转化率超过51%,产率 $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,发酵时间在72~96h。迄今为止,该菌株及专利技术已被多家企业运用于实际生产中^[1,2]。研究人员继续进行了多方面的研究,如运用穿梭载体建立产甘油假丝酵母质粒基因文库^[3]、高渗透压与该菌株高产甘油的关系^[4]、深入研究了该酵母的甘油合成酶。目前已克隆出产甘油假丝酵母甘油合成途径中的关键酶——胞浆3-磷酸甘油脱氢酶的编码基因,并将其在酿酒酵母中高效表达,使胞内3-磷酸甘油脱氢酶酶活水平提高,提高甘油产量^[5];还研究了产甘油假丝酵母3-磷酸甘油酯酶的性质^[5,6]。在更深入地研究中,发现当发酵液中的葡萄糖含量低于2%时,细胞内利用甘油的酶活力旺盛,导致其同化甘油,使继续发酵时发酵液中甘油含量下降。若提前结束发酵,会造成甘油转化率下降,同时对甘油后提取不利。因此,了解甘油分解代谢中的一些酶的结构及其作用、调控机理对提高甘油产率和转化率很有现实意义。本文介绍甘油分解酶中的甘油激酶。

1 甘油的代谢途径

一般认为在耐高渗酵母菌中甘油的代谢大体如(图1)^[7-9]。

甘油到磷酸二羟丙酮的分解代谢包括两步酶促反应。在甘油激酶(GK)的催化下,甘油被磷酸化形成3-磷酸甘油,3-磷酸甘油在3-磷酸甘油脱氢酶(mtGPD)的催化下氧化成磷酸二羟丙酮,进一步返回至糖酵解途径。此外,甘油还可以在甘油氧化酶的作用下生成D-甘油醛,后进一步生成D-甘油酸(乙醛(AND⁺)脱氢酶)和3-磷酸甘油醛(丙糖激酶);也可以在甘油脱水酶的作用下,单向地生成2-羟基丙醛。

GK是利用甘油的限速酶,它催化甘油磷酸化反应生成3-磷酸甘油^[10],反应中要有Mg²⁺和ATP的参与,1,6-二磷酸果糖(FBP)抑制该酶的活性。当培养基中葡萄糖的浓度较高时,代谢中间产物FBP也相

* 国家“九五”攻关项目(96-C03-03-03)资助

** 为责任作者

作者简介:郭雪娜(1976-),女,江南大学生物工程学院99级硕士研究生,主要从事工业微生物方向的研究。

收稿日期:2001-09-10,修回日期:2001-12-22

应较高 ,GK 的酶活表现的不明显 ,当培养基中葡萄糖消耗殆尽 ,FBP 对 GK 的酶活抑制不再明显 ,使甘油作为碳源得到利用。

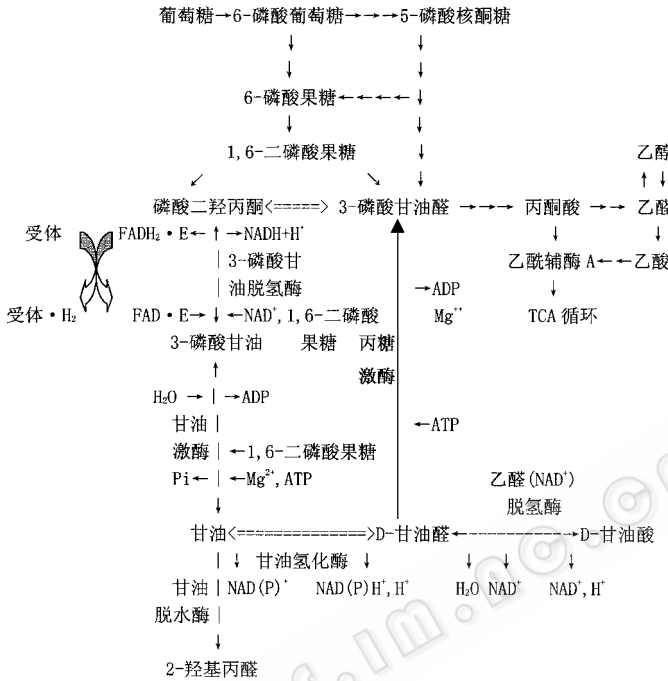


图 1 甘油代谢途径

2 甘油激酶的结构

据报道 ,GK 属于 ATP 酶系(该酶系具有相似的空间结构,即重复的 $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ 折叠),目前国外已经克隆出大肠杆菌野生型基因,并且已将其测序,该基因编码形成含有 501 个氨基酸的蛋白质(分子质量为 56 099)^[10]。甘油激酶在溶液中通常存在着三种形式:活性二聚体、活性四聚体(四聚体 II)和钝化四聚体(四聚体 I)。这三种形式之间存在着平衡^[11]。非对称的二聚体代表了 GK 的活性形式^[12],即活性二聚体;四聚体 II 与 FBP 的抑制作用有关,而四聚体 I 可能是结晶化时的人工产物^[11]。

目前,普遍认为 GK 具有一个高活性位点,它是一个开放式游离配体结构,此结构能够以充分闭合形式连接甘油。GK 的活性位点位于域 I 和域 II 之间的裂缝中^[12,13]。

如图 2^[10]所示,在 GK 中,亚域 IB、IIB、IC 是围绕着公开的核区组成的,而亚域 IIC 是多肽链的碳端延伸组成的。每一个亚域在酶的结构和功能上都有其独特的作用。亚域 IIB 和 IIC 组成了二聚体一个界面,亚域 IA 和 IC 组成了四聚体另一个界面。IC 组成了正磷酸根的结合位点,IIAGlc(IIAGlc 是磷酸烯醇式丙酮酸:葡萄糖磷酸转移酶体系的中心调控单元)的结合位点是 IIC 亚域的一部分。亚域 IB 组成了甘油结合的部分位点,亚域 IIB 形成了 GK 功能性二聚体界面。亚域 IC 和 IIC 形成了调控结合位点。亚域 IC 和 IIC 连接到 ATPase 的核心区,即将 ATPase 中的 β 折线分别连接到亚域 IA 和 IIA 中心的 β 折叠上。这个结构说明在调控结合位点和活性位点间存在着长距离的信息传递^[10]。

3 甘油激酶的调控

GK 的催化作用是通过明显的结构上的改变来完成的,这种结构改变与其中间区域的变化有关^[11]。GK 受到三个物质的构象调控:1. 6-二磷酸果糖(由 FBP)磷酸携带蛋白 IIAGlc 和腺苷核苷^[10],它们的作用

机理各不相同。GK 的活性还受翻译水平的调节,3-磷酸甘油是诱导物,IIAGlc 蛋白则是抑制剂^[11]。

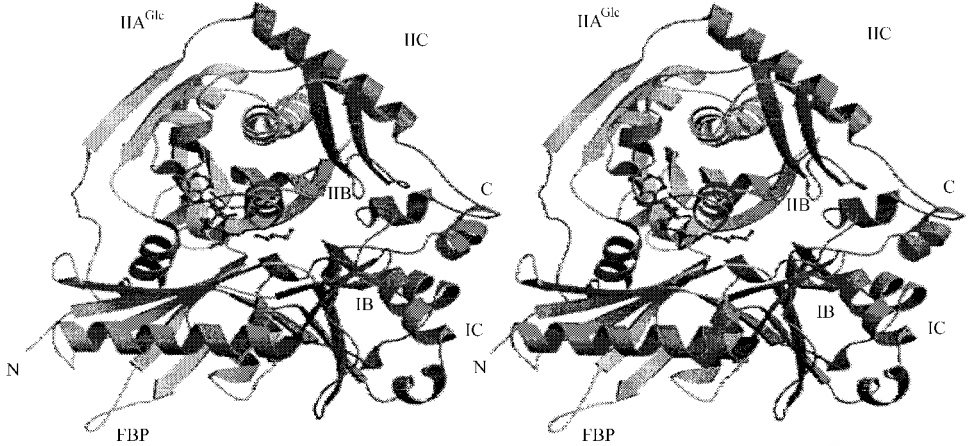


图2 GK 结构模型图^[10]

3.1 FBP 的调控机理

FBP 的结合位点位于两个暴露的环状结构之间。其结合位点由每个单体的 233 位甘氨酸,234 位甘氨酸和 236 位精氨酸组成,每个四聚体中存在着两个 FBP 结合位点^[11]。现在,已经分析确定了 FBP 结合环的序列(IGGKGGTP;15)这可能是一种 Walker-type (GxxGxGKT/S)核苷酸盐结合环,这种环状结构在许多 ATP 结合的蛋白质结构中可以看到(例如在酵母丙酮酸激酶的结构中也发现了类似的 FBP 结合环状结构^[10])所以这个环状结构可能是 FBP 对酶活性调节的一个共有特性。然而,GK 的环状结构只识别 FBP 上的磷酸盐^[11]。

FBP 可以增加 GK 表现二聚体-四聚体的聚合常数,从而使 GK 的钝化四聚体形式更稳定。GK 四聚体稳定的机制在于 FBP 与 236 位精氨酸间的离子作用力和主链上的氨基化合物与 FBP 链上磷酸根间的氢键作用力^[10](一个链上的精氨酸 236 桥连了 FBP 上的 1 位和 6 位上的磷酸根,另一个链上的精氨酸 236 让 6 位的磷酸根连接到 2 折轴上^[11]);五环糖的环提供了磷酸根适宜的间距;此外,将 236 位精氨酸与其对应配对的磷酸根间的静电排斥力中和,也是 FBP 抑制 GK 活性的一个重要方面^[11]。

目前,对 FBP 的结合位点还不是很清楚,尽管早期的分析说 GK 存在着钝化四聚体和活性四聚体间的平衡,FBP 使酶的钝化四聚体形式稳定,但是还没有大量的证据证明 GK 存在着活性四聚体形式。因此,可以认为还有可能是四聚物的结合使酶钝化。在所有描述的四聚体 II 结构中,都包含有一个限制性抑制剂(FBP,磷酸或硫酸),其活性结合位点正好对着四聚体的中心。如果开放式-闭合式构象的变化对酶的催化反应循环来说是一个最为本质的方面的话,酶还有可能由于二聚体-二聚体的作用,阻止了酶的开放式-闭合式构象的变化而受到抑制^[11]。

FBP 和甘油都是 GK 的非竞争性抑制剂,只有当甘油连接到 GK 上,FBP 才会连接到 GK 上。因此,FBP 的作用可以看作是“锁入”到酶的钝化构象中。因此,相对于 FBP 的结合对酶的活性位点结构的直接调节,仅仅是四聚体的聚合反应对于钝化酶的活性是否是足够的,这一点还有待于进一步的确定^[11]。

在实际中还观察到“半位点”反应和对 ATP 浓度的负向协同性,FBP 的抑制作用可能与 ATP 的连接相偶联。因此,我们不能排除 FBP 结合位点和酶的活性位点间存在着直接的信息传递^[11]。

3.2 IIAGlc 的调控

IIAGlc 抑制都通过一些与 FBP 相似的机制与酶的活性位点相作用,不考虑机制的细节,IIAGlc 和 FBP 的结合似乎都会使酶出现同一种钝化构造。然而,IIAGlc 的抑制并不包含二聚体-四聚体的聚合,它们的结合位点和抑制模式也截然不同。IIAGlc 的结合位点在 GK 的 472-480 位残基上,这正好在与 FBP

结合位点相对的单体上。当 GK-IIAGlc 复合时,复合物中原 FBP 的连接环即残基 230 ~ 236,已经变的无序了,因此在 GK-IIAGlc 复合物中已经观察不到这段环。这说明两种抑制都能够使 GK 的低活性或钝化形式稳定,但它们的作用途径是互相独立的^[11]。

此外,IIAGlc 对 GK 的抑制包括抑制剂的结合位点和酶的活性位点间很长范围的信息传递^[10]。将 IIAGlc 连接位点的这段残基突变,会影响酶的催化活性,而 IIAGlc 的结合既不会导致也不依赖酶的四级结构的变化,这也就是说,IIAGlc 的抑制与酶的浓度无关^[11]。

3.3 核苷的调控

GK 相对于核苷浓度来说,还存在着同向的变构调节,对 ATP、ADP 和甘油表现出“半位点的结合”(例如,一个活性二聚体对底物存在高亲和和低亲和活性位点)^[10]。

还有报道说 GK 还被细胞膜上的甘油促进子所激活,这说明 GK 还存在着另一水平的变构调节。胞外甘油进入胞内代谢时涉及两种蛋白质:甘油促进子和甘油激酶。甘油促进子在细胞质膜中作为携带子或形成一个选择性的孔,同时激酶吸引胞内的甘油生成 3-磷酸甘油。研究人员们发现在促进子缺陷型菌株中甘油吸收动力学与野生菌株甘油吸收动力学完全不同。在野生细胞的运输甘油分子过程中观察不到游离态的甘油,在促进子缺陷型菌株中甘油通过细胞质膜的扩散过程并不是磷酸化的限速步骤。因此,促进蛋白的存在和缺失其甘油磷酸化动力学是不同的。我们可以推断在甘油促进子和甘油激酶之间存在着一种相互作用刺激了激酶的活性^[10]。

总之,GK 对甘油代谢的调节是很复杂的。它受 GK 在溶液中存在平衡的影响,即二聚体-四聚体的平衡。GK 受 FBP 的调控,FBP 只能作用于 GK 的四聚体形式^[10,11],已探明 FBP 促进二聚体-四聚体的聚合,抑制四聚体的集合^[12];FBP 对 GK 与甘油的结合有反竞争性抑制,对 GK 与 ATP 的结合存在着非竞争性抑制^[11],GK 的活性二聚体对 ATP、ADP 和甘油表现出“半位点的结合”,即存在高亲和和低亲和活性位点^[10];ATP 对它有负向协同作用^[10]。当溶液中以葡萄糖为主要碳源时,代谢中间产物 FBP 浓度较高,抑制了 GK,同时糖酵解产生的 ATP 对 GK 的负向协同作用,都使反应以 3-磷酸甘油→甘油的方向进行,溶液中葡萄糖的浓度逐渐降低,甘油浓度升高,FBP 对 GK 的抑制作用逐渐减弱,反应以甘油→3-磷酸甘油的方向进行,进入糖酵解途径。

参 考 文 献

- [1] Wang Z Y, Zhuge J, Fang H Y, et al. *Biotechnology Advances*, 2001, **19**(3) 201 ~ 223.
- [2] Zhuge J, Fang H Y, Wang Z X, et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **55**(6) 686 ~ 692.
- [3] 王正祥, 诸葛健. *生物技术*, 1998, **8**(2) 9 ~ 11.
- [4] 王正祥, 方惠英, 诸葛健. *微生物学通报*, 1999, **26**(1) 24 ~ 26.
- [5] 王正祥, 诸葛健. *微生物学报*, 1999, **39**(4) 321 ~ 325.
- [6] 王正祥, 诸葛健, 曹钰, 等. *微生物学报*, 2000, **40**(2) 180 ~ 187.
- [7] 大连轻工业学院主编. *生物化学*. 北京:中国轻工业出版社, 1995. 213.
- [8] 诸葛健, 王正祥. *微生物学报*, 1999, **39**(1) 91 ~ 93.
- [9] Gerhard M. *Biochemical Pathways*. 3rd ed. Germany:Boehringer Mannheim Press, 1996.
- [10] Feese M D, Faber H R, Bystron C E, et al. *Structure*, 1998, **6**:1407 ~ 1418.
- [11] Mats O, Bystrom C E, Remington S J. *Biochemistry*, 1998, **37**(47):16565 ~ 16572.
- [12] Bystrom C E, Pettigrew D W, Branchaud B P, et al. *Biochemistry*, 1999, **38**(12) 3508 ~ 3518.
- [13] Lester L M, Rusch L A, Robinson G J, et al. *Biochemistry*, 1998, **37**(16) 5349 ~ 4355.