兔肌肌酸激酶的初步晶体学研究*

桂璐璐　毕汝昌　王　强　侯立向　林政炯

（中国科学院生物物理研究所，北京）

在脊椎动物骨骼肌、心脏和脑等组织的能量代谢中，肌酸激酶起着重要作用，它催化由磷酸肌酸和 ADP 再生成 ATP 的可逆反应。该酶由两个亚基构成，每个亚基的分子量约为 41000。肌酸激酶的重要生理功能，临床诊断中的应用价值及其结构的某些特点，使它，特别是兔肌肌酸激酶得到了广泛研究。这些研究为了解该酶的结构与生物活性的关系提供了基础[1]。然而，还有很多涉及该酶作用机理的问题尚需进一步研究，而这些问题的解决急需较完整的结构资料。近年来已相继发表了用 cDNA 克隆方法测定的，包括兔肌在内的不同来源的肌酸激酶的一级结构[2~4]。但在测定该酶空间结构方面，至今未获得明显进展。早在十多年前就发表了对兔肌肌酸激酶结晶及 X 射线衍射实验的结果[5]，但一直没有进一步的报道**，直到 1983年另一实验室才以短讯形式宣称得到适合 X 射线衍射分析用的牛心肌酸激酶的单晶体[6]。本文报道我们对兔肌肌酸激酶的结晶和晶体学研究的初步结果。

用于结晶的酶制剂是按姚启智等人的方法[7]制备的。采用悬滴汽相扩散法培养该酶的晶体。约 10μl 的蛋白质溶液悬滴，与置于 16 穴组织培养板小穴中的 50—55% 2-甲基-2,4戊二醇（MPD）进行汽相扩散平衡。蛋白质溶液由 0.05mol Tris-乙酸盐缓冲，并含有 38% MPD。结晶可在室温下进行，一般一个月内一些悬滴里可出现片状或长条状晶体(图 1a)。为增大生长晶体的母液体积，把这样的晶体培养实验稍加改动，用没有平衡液的座滴法能获得较大晶体。我们还尝试了其他缓冲体系，其中有磷酸盐、Tris-磷酸盐和 Tris-琥珀酸盐等缓冲液。用这些缓冲液均能培养出形状相异的蛋白质晶体(图 1)。合适的蛋白质浓度皆在 5mg/ml 左右，但这些缓冲液的 pH 值却可在 6.6 到 8.5 范围内变动。含有磷酸盐的缓冲液生长出的肌酸激酶晶体较厚实，但孪晶现象明显(图 1b、c)。

在旋转阳极 X 光机上，对获得的晶体(有的达 0.8 × 0.3 × 0.1mm³) 进行了衍射实验。从 Tris-乙酸盐缓冲液生长的晶体(以下称 A 晶型)，能产生高达 2.4Å 分辨率的反射。徘循照像实验表明，该晶型属于单斜晶系，但具有非晶体学对称性。若以 b 轴为唯一轴，则在 $h0l$ 衍射照片上呈现近似的 mm 对称性，几乎相互垂直的两个镜面分别通过 a^*、b^* 轴。用在 Tris-磷酸盐缓冲液里长出的晶体做类似实验，得到的衍射花样与 A 晶型的相似，但其非晶体学对称性更明显。在 Philips PW 1100 四圆衍射仪上，对 A 晶型测定的晶胞参数为 $a = 140.9$Å，$b = 108.1$Å，$c = 51.7$Å，$\beta = 91.6°$。仔细检查 $0k0$ 反射，k 为奇数者系统消光，因此 b 轴是二重螺旋轴。这样，该晶型与 Mc Pherson 获得的 $P2_1$ 晶型 ($a = 54$Å，$b = 114$Å，$c = 145$Å，$\beta = 91°$)

本文 1986 年 4 月 9 日收到。

* 中国科学院科学基金资助的课题。

** 投稿期间，我们看到了 Hershenson 等人发表的文章[12]，他们已收集了兔肌肌酸激酶晶体的4Å分辨率衍射数据。

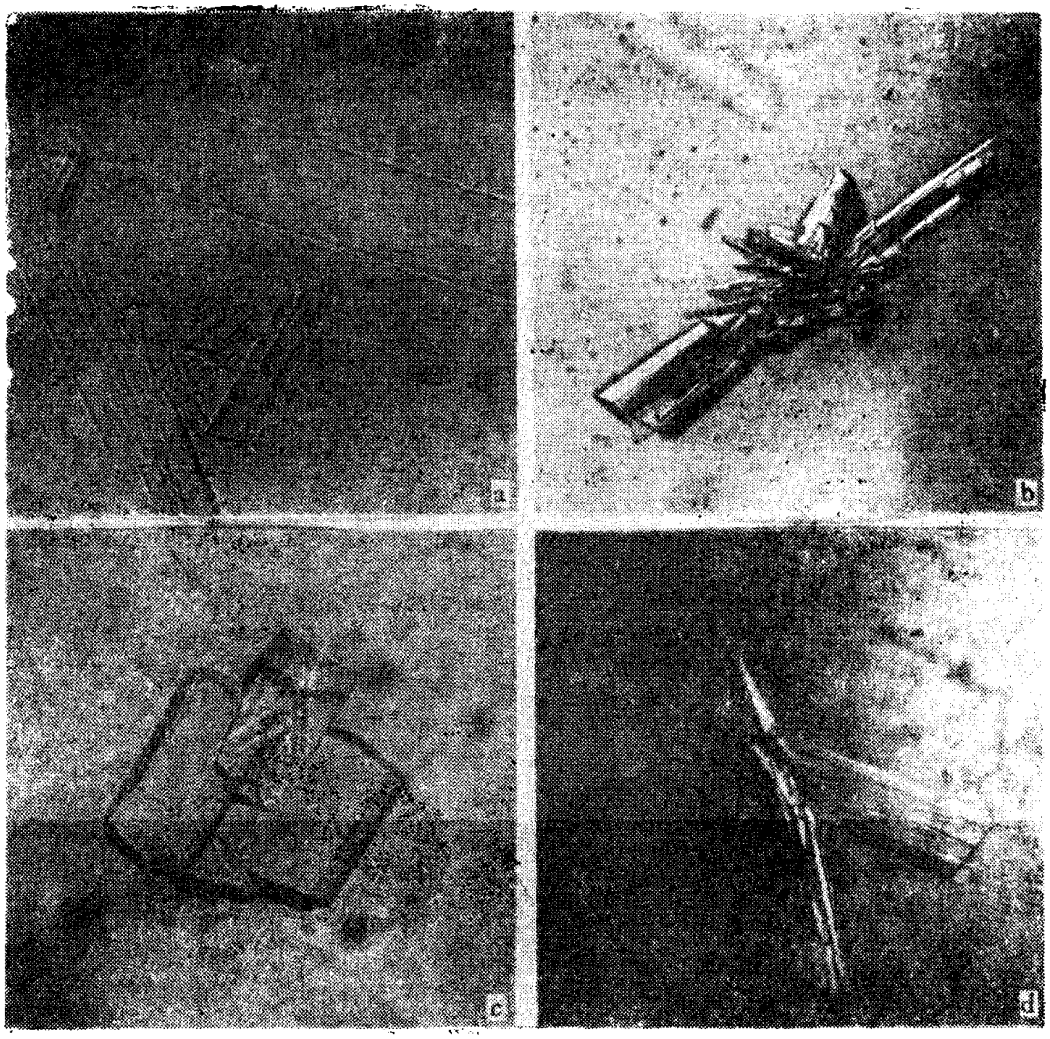


图 1　兔肌肌酸激酶晶体

a、b、c、d 分别用 Tris-乙酸盐、磷酸盐、Tris-磷酸盐和 Tris-琥珀酸盐缓冲液获得

相类似，这种晶胞的不对称单位含有两个肌酸激酶分子[5]. 用 CuK_α 辐射，在四圆衍射仪上试收了 A 晶型的 6Å 分辨率的独立反射强度. 经 L_P 和吸收较正，共得 5156 反射数据. 用此数据做了初步的旋转函数分析. 使用 Crowther 快速旋转函数程序[8]算得的自身旋转函数图，证实了衍射照片所显示的非晶体学对称性：除原点峰外，这种非晶体学对称性引起的两个峰[其球极角度(对称轴与 b 和 c 的相关角度和绕对称轴的转角 χ)分别为 (90°, 0°, 180°) 和 (90°, 90°, 180°)] 是全图中最高的峰. 另外，图中其他较突出的峰也大都具有 $\chi = 180°$.

综上所述，鉴于非晶体学对称性的存在以及 β 角接近 90°，A 晶型的晶胞可能为膺正交的，一个近似的不对称单位只含有一个分子或两个亚基. 虽然目前还不能确定亚基间的相对取向关系，但 χ 角的数值提示了亚基配置的可能方式. 结合已经获得的肌酸激酶的其他晶型[6]，分子两个亚基的配置最可能类似于猪胰岛素二聚体方式[9]. 在后者情形中，两个单体以近似的二重轴相关，由于空间障碍等因素，单体间缔合面上的某些残基不能对称地排布. 在特定的条件下，正如粘盲鳗胰岛素四方晶胞里那样[10]，在牛心肌酸激酶的四方晶胞[6]里，分子的两个亚基则可以严格的二重轴相关联. 肌酸激酶能在不同结晶条件下生长出有差异或不同的晶体，也说明该酶具有一定的构象柔性. 如前所述，从 Tris-磷酸盐缓冲液培养出的晶体，具有更明显的非晶体学对称性，这意味着随 pH、离子种类和强度的改变，分子的局部构象发生了

变化．这一推论同肌酸激酶的变性研究结果[11]是一致的，指出该酶的某些局部构象是容易变动的。

致谢：感谢邹承鲁教授对本项研究工作的关心和支持。

参 考 文 献

[1] Kenyon, G. L. and Reed, G. H., *Advances in Enzymology* (Ed. Meister, A.), **54**(1983), 367.
[2] Putney, S. et al., *J. Biol. Chem.*, **259**(1984), 14317.
[3] West, B. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**(1984), 7007.
[4] Benfield, P. A. et al., *Gene*, **39**(1985), 263.
[5] McPherson, A. Jr., *J. Mol. Biol.*, **81**(1973), 83.
[6] Gilliland, G. L. et al., *J. Mol. Biol.*, **170**(1983), 791.
[7] Yao, Q. et al., *Sci. Sin.*, **25**(1982), 1186.
[8] Crowther, R. A., in *The Molecular Replacement Method*, (Ed. Rossmann, M. G.), Gordon and Breach, New York, 1972, 174.
[9] The Peking Insulin Structure Research Group, *Sci. Sin.*, **17**(1974), 752.
[10] Cutfield, J. F. et al., *J. Mol. Biol.*, **87**(1974), 23.
[11] Yao, Q. et al., *Biochemistry*, **23**(1984), 2740.
[12] Hershenson, S. et al., *J. Biol. Chem.*, **261**(1986), 3732.