

分子马达肌球蛋白 VI 研究进展

李晨璞 展 永 韩英荣 卓益忠

生命体的一切活动,从肌肉收缩、细胞内部的运输、遗传物质(DNA)的复制、一直到细胞的分裂等等,追踪到分子水平,都是源于具有马达功能的蛋白质大分子做功的结果,它们称为分子马达(molecular motor)。具体到细胞内的物质运输,生物体主要依靠两种细胞骨架系统——微管和微丝,以及与之相关的马达蛋白。微管、微丝和马达蛋白组成的系统就好比细胞内的交通网络,不断进行着货物的运输,动力由三磷酸腺苷(ATP)水解所产生的能量来提供,其运转效率比一般的马达高得多,有的甚至接近100%。长距离的胞内运输主要是由沿微管运动的驱动蛋白(kinesin)和动力蛋白(dynein)承担,而短距离的运输可能需要在微丝上运动的肌球蛋白(myosin)。

目前,肌球蛋白马达依据其蛋白氨基酸序列的不同分成18个不同种类,就好像人与人之间总体相似但又各具特点。在此重点介绍的是肌球蛋白VI,它相对于家族内其他成员有着不同的结构,导致它具有不同的胞内功能。例如肌球蛋白VI的头部区域有两个特别的插入体,并且它相对于其他肌球蛋白马达是向微丝的负端移动,这就解释了胞内双向的物质运输。一些实验还表明,肌球蛋白VI与耳聋现象、微绒毛结构的形成、囊泡的运输等相关,由于它特殊的结构和功能而引起人们的研究兴趣。

一、微丝

肌球蛋白VI是肌球蛋白家族的成员,和其他肌球蛋白马达一样也是以微丝为运动轨道的,既然肌球蛋白马达都以微丝为运动轨道,那么就有必要先了解一些关于微丝的知识。

微丝、微管和中间纤维是组成细胞骨架的主要成分。微丝是由球形肌动蛋白(globular actin)单体以较弱的非共价键结合,构成纤维型多聚体,单体可以进行组装和去组装,这正是实现其功能所必需的。微丝(microfilament, MF)是由肌动蛋白(actin)组成的直径约7nm的骨架纤维,又称肌动蛋白纤维(actin filament)。微丝与其结合蛋白以及肌球蛋白三者构成化学机械系统,利用化学能产生机械运动。微丝确定细胞表面特征,使细胞能够运动和收缩。微丝的形状像双线捻成的绳子,是由两条线性排列的

肌动蛋白链形成的螺旋(图1)。肌动蛋白在进化上相当保守,所谓保守就是进化相对较慢,如酵母和兔子肌动蛋白有88%的同源性。以下从自组装机制、微丝的极性、微丝的特异性药物三个方面介绍微丝。



图1 微丝纤维的螺旋模型

微丝的自组装机制(也称踏车现象) 在适宜的温度和存在ATP、 K^+ 、 Mg^{2+} 离子的条件下,肌动蛋白单体可自组装为纤维。结合ATP的肌动蛋白对微丝纤维末端的亲和力高,而结合二磷酸腺苷(ADP)的肌动蛋白对纤维末端的亲和力低,容易脱落。当溶液中结合ATP的肌动蛋白浓度高时,微丝快速生长,从而在微丝纤维的两端形成ATP“帽子”,这样的微丝有较高的稳定性。伴随着ATP水解,与微丝结合的ATP就变成了ADP,当ADP暴露出来后,微丝就开始去组装而变短。微丝具有极性,肌动蛋白单体加到正端的速度要比加到负端的速度快5~10倍。溶液中结合ATP的肌动蛋白浓度也影响组装的速度。当处于临界浓度时,球形肌动蛋白可能继续在正极端添加、而在负极端开始分离,表现出一种“踏车”现象(图2)。

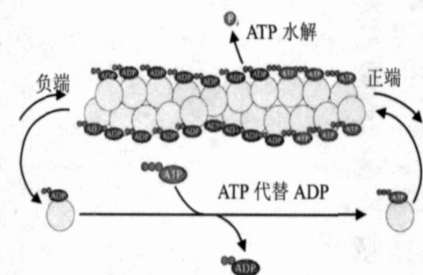


图2 肌动蛋白的踏车现象

微丝的极性 微丝的极性对于研究分子马达很重要。因为肌球蛋白家族中的分子马达,绝大部分都朝微丝的正极(plus end)运动,而肌球蛋白VI是向负极(minus end)运动的。在研究肌球蛋白性质的实验中,辨别微丝的极性是一个重要环节。微丝的极性源于其单体球形肌动蛋白(图3A)的极性。球形肌动蛋白的正极和容纳ATP分子的隙口(cleft)端相反,另一端则为负极。整个标有极性的微丝如图3B、C。

微丝的特异性药物 细胞中微丝参与形成的结
现代物理知识

构除肌原纤维、微绒毛等属于稳定结构外,其他大都处于动态的组装和去组装过程,并通过这种方式实现其功能。细胞松弛素(cytochalasin)可切断微丝纤维,并结合在微丝末端抑制肌动蛋白结合到微丝纤维上,特异性地抑制微丝生长。鬼笔环肽(phalloidin)与微丝能够特异性地结合,使微丝纤维稳定而抑制其功能。这些特异性药物对微丝抑制和稳定的作用在实验中经常用到。如用荧光标记的鬼笔环肽作用到微丝上,这时就可以用电镜观察微丝。通过特异性药物对微丝的作用,我们可以得到想要的微丝长度,使其更利于研究。

二、肌球蛋白 VI

下面将对肌球蛋白 VI 作较全面的介绍。所有的肌球蛋白都有两条重链,每条重链包括一个 N 端马达区域和一个颈部区域(它把轻链钙调蛋白和一个高度可变的尾部区域连接起来)。肌球蛋白 VI 也不例外,但它与其他大部分肌球蛋白马达不同,它与肌球蛋白 IX 打破了肌球蛋白马达向微丝正端运动这条规则,而是向微丝的负端移动。

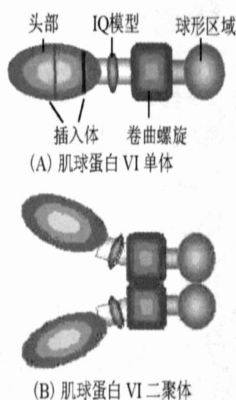


图 4

肌球蛋白 VI 的结构 图 4A 是肌球蛋白 VI 分子马达的单体结构示意图,首先是一个大的平放椭球,它是肌球蛋白 VI 的头部(head domain),头部区域有两个插入体(insertions,两个竖直细长的长方形);接着是一个小的竖放椭球,它叫 IQ 模体,可以结合钙调蛋白,对分子马达的运动活性起一定的调

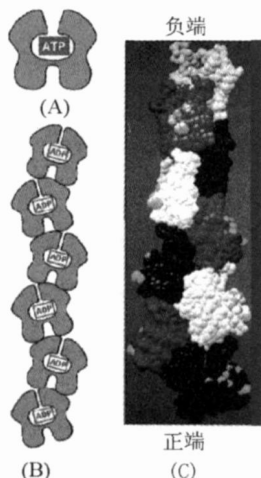


图 3 球形肌动蛋白及其多聚态

节作用;大的正方形代表马达的卷曲螺旋(coiled coils)域,这部分有可能使分子马达产生二聚化;右边最末端的球形是肌球蛋白 VI 的 C 末端区域,在马达沿微丝运动时,这个区域主要负责携带货物(胞外或胞内所需的物质)。图 4B 是肌球蛋白 VI 二聚体的结构示意图。

头部区域:对于肌球蛋白 VI,此区域相对其他部分来说分子量很大,结构也相对复杂,就像人的大脑是马达结构的中枢,它包括马达的所有核心功能:连接微丝并使马达沿微丝移动,且结合并水解 ATP 获得运动的能量。两个插入体是肌球蛋白 VI 区别于其他马达的一大特征。

IQ 模体:IQ 模体是连接肌球蛋白轻链的部位。对于大多数的肌球蛋白来说,这些轻链是钙调蛋白(calmodulin 或钙调素)分子。IQ 模体是一个碱性的两性分子螺旋,通常马达含有 1~7 个这样的拷贝,对于肌球蛋白 VI 来说,只有一个 IQ 模体。这些 IQ 模体组成了肌球蛋白的调节区域,起调节作用,也可稳定螺旋,并有可能形成一个刚硬的杆臂(lever arm),这个杆臂可以扩大头部区域的构象变化。从这些作用来看,“IQ 模体”的命名也是贴切的。

卷曲螺旋区域:螺旋的卷曲螺旋是在很多蛋白中都可找到的一种结构模体。卷曲螺旋由两个长的螺旋组成,每个螺旋都包含重复的疏水侧链,这些侧链由于疏水作用互锁而形成超螺旋结构。卷曲螺旋区域最重要的功能就是使肌球蛋白单倍体产生二聚化。

C 端尾部区域:这个区域主要负责携带货物,并且包含肌球蛋白目标信息。

反转齿轮(Reverse gear)区域(图 4A 中后边的插入体):这个区域只能在肌球蛋白 VI 中找到,位于头部区域和 IQ 模体之间。通过和目前研究过的所有肌球蛋白比较,这个区域被一些研究者看作使肌球蛋白 VI 产生向微丝负端运动的核心部位。

肌球蛋白 VI 中两个插入体的作用 前边已提到肌球蛋白 VI 与家族中其他成员的很大不同就是在其头部区域存在两个插入体(插入体 1、插入体 2),如图 5 所示,这两个插入体的作用不容忽视。

插入体 1 调节核苷的连接与释放:第一个插入体与核苷连接位点相邻近,对应的残基位置为 Cys278 - Ala303,可以改变核苷的连接和释放速率。对于肌球蛋白 VI 来说,相对于连接 ADP 的速率,马

达连接 ATP 的速率很慢。插入体 1 不会影响马达的方向性,然而它可以通过减慢 ADP 的释放和产生一个长时间的刚硬 (rigor) 态,影响马达的动力学性质,因此插入体 1 对于马达的连续性和马达的锚定作用很重要。

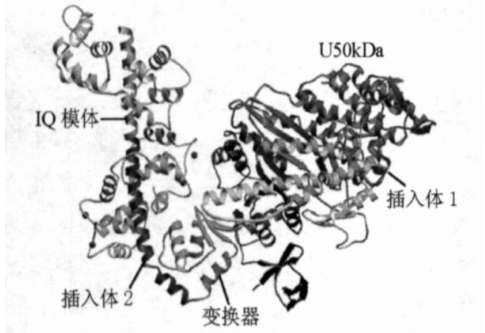


图 5 肌球蛋白 VI 的晶体结构

插入体 2 改变杆臂的运动方向:此插入体位于变换器 (converter) 和 IQ 模体之间,对应的残基位置为 Pro774 - Tyr812。此插入体的邻近尾域 (the proximal part, 对应残基 Pro774 - Trp787) 围裹在变换器周围,而不像一个直的螺旋从变换器突出,插入体的末端尾域 (the distal part, 对应残基 Trp787 - Tyr812) 形成一个以前看不到的与钙调蛋白相连的模体。此插入体和它所连接的钙调蛋白分子一起与变换器有特殊的相互作用,它们净的相互作用使肌球蛋白 VI 的 IQ 螺旋相对于其他肌球蛋白马达对应 IQ 螺旋所在的位置有近 120° 变化,从而使它们指向了微丝的负端。这确实是肌球蛋白 VI 结构方面最让人兴奋的,因为有望真正搞清肌动球蛋白 VI 的负向移动机理。

肌球蛋白 VI 的胞内功能 肌球蛋白 VI 的胞内功能吸引着众多科研工作者的目光。由于它是一个向微丝负端运动的马达,所以期望它在胞内的功能与其他肌球蛋白马达不同。因为在胞内,很多情况下可能需要一个向微丝负端运动的马达,这样就可能涉及到肌球蛋白 VI。

参与褶皱的扩展:肌球蛋白 VI 定位在运动细胞主要的边缘处,伸长的神经圆锥细胞的外围。如图 6,在褶皱的扩展实验中,一定数量的肌球蛋白 VI 马达分子被固定到细胞的支持点 (adhesions),然后马达分子和微丝相互作用,明显显示出微丝正端的移动方向,那么这些肌球蛋白 VI 马达分子将趋向于推动微丝向外扩展。所以肌球蛋白 VI 可能在褶皱的突出 (lamellae protrusion) 中执行一定功能。

图 6 中,质膜(粗线框)被支持点复合体连接到玻璃板上(下边的水平细线)。肌球蛋白 VI 也连接到支持点,并在微丝上移动,由于它们向微丝负端靠近,结果使微丝正端向左边移动,这样细胞就向前突出。

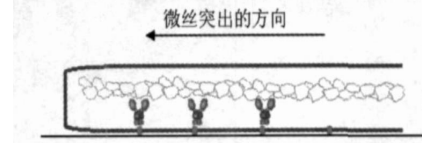


图 6 从左向右扩展的褶皱的示意图

参与细胞内吞作用:当微丝被连接到质膜时,微丝的正端和细胞的皮层 (cell cortex) 相连,因此向微丝负端移动的肌球蛋白 VI 被包括在内吞 (细胞膜内陷形成囊泡,将外界物质裹进并输入细胞的过程) 作用过程中似乎是理想的。虽然肌球蛋白 VI 可定位囊泡 (vesicles) 和质膜,但也存在一些对肌球蛋白 VI 在细胞内吞 (如图 7) 过程中发挥作用的支持,如肌球蛋白 VI 突变体可以引起动物耳聋,因为在耳聋时通常内吞作用进行的效率很差。

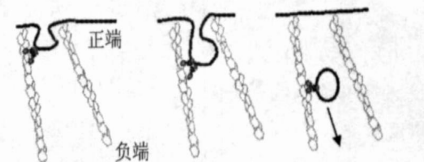


图 7 参与细胞的内吞作用

形成微绒毛的结构:肌球蛋白 VI 与耳聋相联系,这些蛋白定位在表皮的外表组织上。在毛发细胞 (the hair cell) 中的肌球蛋白 VI 的功能似乎已了解清楚了,当这种功能性蛋白不存在时,质膜就不能被拉下到这些单个的微绒毛之间 (如图 8) 而与正常的毛发细胞不同,导致一些功能的缺失。肌球蛋白 VI 也被包括在肠内和肾内刷状缘 (renal brush border) 的维持中,在这些组织中马达也执行着相同功能。

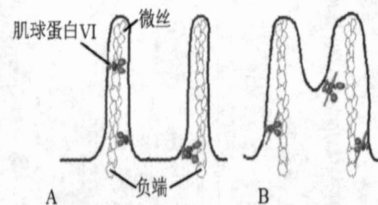


图 8 肌球蛋白 VI 维持微绒毛结构的功能

对肌球蛋白 VI 的调节 生命体的有趣之处就是能对错综复杂的生命活动网络进行有条不紊的调节,生命之美就在于不对称中的和谐。肌球蛋白 VI 受到的调节有两种机制,第一种是用丝氨酸/ 苏氨酸蛋白激酶 (p21 the Rac - activate Ser/ Thr kinase) 对分子进行磷酸化:用丝氨酸/ 苏氨酸蛋白激酶 3

把肌球蛋白 VI 重链上的 406 位苏氨酸磷酸化。第二种清晰的调节机制是通过钙离子对钙调蛋白轻链的调节。简单地说:对肌球蛋白 VI 的 406 位苏氨酸的磷酸化主要是激活分子马达的运动性,而钙离子则是抑制它的运动性。

磷酸化对肌球蛋白 VI 的调节:通过对肌球蛋白 VI 和肌球蛋白 I 的同源性进行比较,发现肌球蛋白 VI 的功能也可被磷酸化调节。因为肌球蛋白 VI 头部顶端附近的小环包含一个可能的磷酸化位点,此位点和阿米巴虫(amoeba)肌球蛋白 I 上的磷酸化位点处在同源位置。由于使阿米巴虫肌球蛋白 I 重链上的此位点磷酸化对由肌动蛋白激活的 ATP 酶活性和马达运动活性是必需的,因此产生这样的假设:对于肌球蛋白 VI,蛋白激酶在同样位点的磷酸化可能会调节肌球蛋白 VI 的功能。

通过研究得到:肌球蛋白 VI 的磷酸化对肌球蛋白 VI 分子马达运动活性的激活的确是必需的。得出这个结论是基于下边两个原因。一是,在伴有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3 的肌球蛋白 VI 的潜伏期(incubation),可以运动的微丝数量明显增加。并且同时伴有马达在 406 位苏氨酸的磷酸化。二是,一种蛋白激酶抑制剂——星形孢菌素(staurosporine,蛋白激酶 C 的抑制剂)很明显地减少了可以滑动微丝的数量,并且这也和马达在 406 位苏氨酸的磷酸化减弱相联系。

钙离子对肌球蛋白 VI 的调节:传统观点认为,当钙离子浓度高时,由于钙离子与钙调蛋白轻链的结合,使钙调蛋白从分子马达上脱落而抑制马达的活性。然而,最近在肌球蛋白 I、肌球蛋白 V 的实验中发现,当马达的活性被抑制时没有观察到钙调蛋白的脱落。这表明,钙离子连接可引起钙调蛋白的结构改变,但不是物理性的脱落。

对肌球蛋白 VI 来说,钙离子浓度的升高可以完全抑制肌球蛋白 VI 分子马达的移动活性,但活性受到抑制并不是由于肌球蛋白 VI 性质的改变,因为当钙离子浓度降低时,其活性完全恢复。并且实验表明,钙离子浓度的升高也不能引起钙调蛋白从马达上脱落。那么马达活性为何受到抑制呢?检查各种外加钙调蛋白浓度对马达的作用,马达移动活性的损失并不是由于被束缚的钙调蛋白没有达到饱和。最近的研究表明,抑制并不需要钙调蛋白的脱落,而是钙离子和钙调蛋白上有高亲和力位点的

结合诱发了抑制,抑制的产生是由于钙调蛋白的一个大的结构改变。

肌球蛋白 VI 的几种行进机制 人们谈到现实生活中的马达都会说到它的做功运动方式,而这些肉眼看不见的“马达”也有它们的做功机制,要不怎么称得上“马达”呢。对分子马达理论研究的传统机制有布朗模型和化学动力学模型。布朗模型不考虑马达分子的微观结构把马达分子的运动看作粒子在各种噪声下的布朗运动,效率和实验结果相差很大。而化学动力学模型把马达的运动过程看作经历几个不同的化学态来研究,也没有就马达的微观结构对其机制的影响作具体讨论。由于肌球蛋白 VI 在微丝上的行进机制尚未完全确定,所以下文只简单介绍几种已提出的模型。

传统解释肌球蛋白行进步伐大小的机制是杆臂机制(lever arm mechanism),就是步伐的大小和 IQ 模体的数量成正比,即模体数量越多,其步伐越大,反之则越小。肌球蛋白 VI 只有一个 IQ 模体,但其步伐和有 6 个模体的肌球蛋白 V 的行进步伐大小相近,都为 36nm 左右,这与传统机制相矛盾,使人们有兴趣对其机制进行研究。

“热位点(hot spot)”模型:由于在与肌球蛋白 VI 连接处微丝结构的改变,肌球蛋白 VI 头部上与微丝连接的地方可以在微丝上激发出“热位点”,这些热位点间的距离是 36nm。图 9 为肌球蛋白 VI 的“热位点”行进步伐模型。

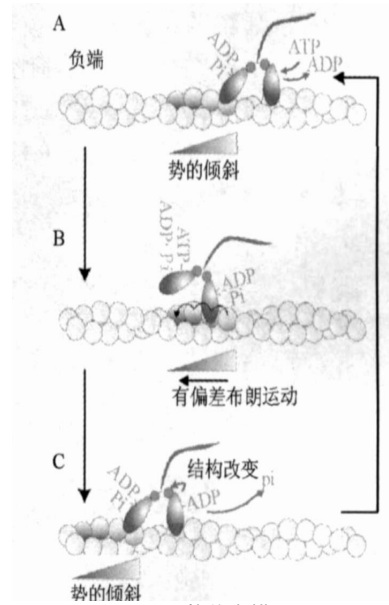


图 9 热位点模型

A. 肌球蛋白 VI 的头部和微丝的连接引起微丝部分

不能扭动,同时微丝暴露出原微丝间的疏水(hydrophobic)区域,并且产生一个势的倾斜(potential slope,如图9A)。

B. 由于有偏差的布朗运动(Brownian motion)的作用使另一个头部沿着势的倾斜移动,最后被引导到相距一个螺距长的节点处。

C. 当这个头部到达倾斜的最小处后就停止运动,而另一头部上由于有ATP水解的磷酸盐(Pi)的释放,紧接着就是颈区结构的改变,这时势的倾斜又在下一个螺距中产生,如此反复运动。

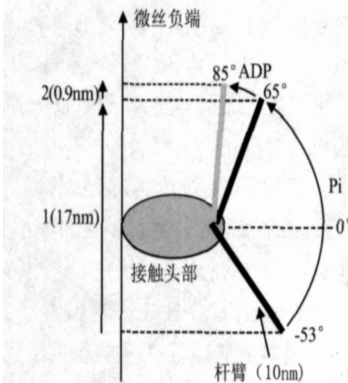


图10 杆臂旋转模型

带有方向性的定长杆臂旋转模型:在此模型中,肌球蛋白VI的行进可以用图10的简单几何模型来反映,在这个图中杆臂的长度、方向和旋转的角度决定着它行进步伐的大小。研究发现核苷是ADP时,杆臂以大约65°指向微丝负端(图中竖直大的箭头方向),而僵直的时候指向负端的角度更大,大约是85°。所以设想出图10的肌球蛋白VI模型:假设杆臂长10nm,这与电镜下看到的广泛认同杆臂长度相一致。10nm长的杆臂也可与被测到的两个小步17nm、1nm相匹配,同时也与被报道的在核苷是ADP时杆臂为65°、在僵硬(rigor)时为85°相一致。为了使杆臂在核苷是ADP时产生17nm步长,计算出来一个-53°方向的前功冲击(prepower stroke)。杆臂从含ADP的65°方向到僵硬态的85°方向的运动步长计算出来是0.9nm,行进步伐=杆臂长度[sin(最终角度)-sin(初始角度)]。

带有可变区域(Flexible domain)的模型:步伐大小的可变性说明,在进行时,肌球蛋白VI比其他肌球蛋白需要更广泛的搜寻(diffusive search)。所以就肌球蛋白VI短的杆臂而言,为了使其头部进行广泛搜寻,它应该有一个可变的元素。实际上,紧接着IQ模体的区域大约含80个氨基酸残基的部分

有一个形成较低稳定螺旋的可能,此区域可能就是可变元素。非常突出的例子就是黑腹果蝇(D. melanogaster)的肌球蛋白VI,在邻近尾域和末端尾域交界处螺旋的稳定性有一个很明显地改变。此外,邻近尾域不是一个刚硬的杆臂结构,而是可变的,这有利于头部在微丝上广泛地搜寻。

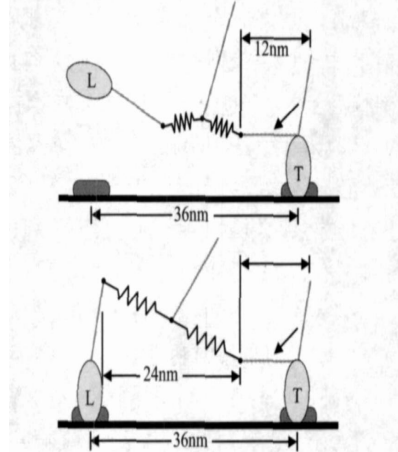


图11 含可变区域模型

图11是肌球蛋白VI分子含有可变区域的模型化描述,这个分子有一头部已连接到微丝上,而另一头部是自由的,但是因受可变邻近尾域的限制,它要经历一个广泛搜寻进行36nm的步伐。

一个单一的邻近尾域大约含有80个残基,如果此尾域是一个任意螺旋,可以用蠕虫链(WLC)模型描述它的弹性性质: $F(x) = (K_B T / L_p) [0.25(1 - x/L)^{-2} - 0.25 + x/L]$, x 是伸长量、 L 是结构的长度、 $K_B T$ 是热能、 L_p 是固有长度。

在此模型中,一个头部匹配一个杆臂,通过蠕虫链弹性元件将邻近尾域与末端尾域相连,由于有开始的12nm工作行程,这个邻近尾域需要再延长达到大约24nm才能使两个头部相距36nm。

交替(Hand-over-hand)扩散模型:国内肌球蛋白VI马达的研究工作做得也很好,通过对实验数据的分析并与肌球蛋白V和驱动蛋白对比发现:首先,马达在各核苷态时颈区相对马达头部的方向对肌球蛋白VI的运动机制起着重要作用;其次,由于肌球蛋白VI的颈部区域相对较短不可能跨越36nm的长度,所以肌球蛋白VI在运动期间就像人在跑步,两个头部会同时离开微丝,而不是完全类似于肌球蛋白V和驱动蛋白。图12是这种模型的图示,其中I、II、III是马达连接位点。

以上只简单介绍了四种模型,大部分模型都是

依据实验数据和观察到的现象提出的设想,随着研究的不断深入,还会不断提出很多其他模型。

三、研究现状

本文概述了肌球蛋白 VI 的一些基本知识。目

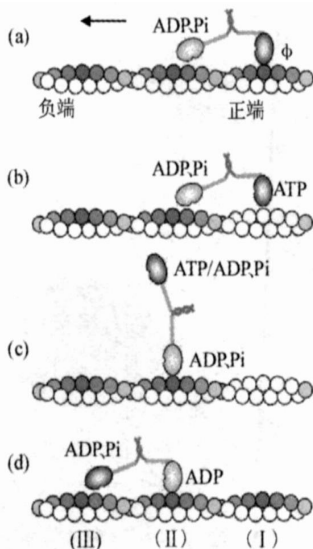


图 12 交臂扩散模型

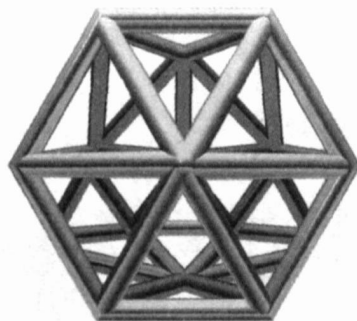
前尽管肌动蛋白 VI 理论和实验的研究工作取得了一些成果,但由于肌球蛋白 VI 相对于其他肌球蛋白分子马达(如肌球蛋白 II、肌球蛋白 V 研究得较晚),很多方面都处在激烈争论之中,像我们在文中给出的肌球蛋白 VI 几种不同的行进机制的简述,这几种机制相互间就存在着不同观点,因此对它的一些理论和实验研究,尤其是它的运动机制,还有许多工作要做。目前,对肌球蛋白 VI 分子马达的研究主要集中在以下几个方面:一是,肌球蛋白 VI 在胞内到底是单体还是二聚体(很多文献中所介绍的实验中的肌球蛋白 VI 二聚体都是通过一定方法合成的);二是,肌球蛋白 VI 是如何以很短的颈长行进很大的步伐的;三是,肌球蛋白 VI 在胞内行使功能是如何调节的等。由于肌球蛋白 VI 胞内的特殊作用和潜在的学术价值,它必将受到研究者的关注。

(李晨璞、展永、韩英荣,天津市河北工业大学生物物理研究所 300130;卓益忠,北京市中国原子能科学研究院 102413)

科苑快讯

碳富勒烯的金属版本 ——黄金“巴基球”

科学家首次发现的、能够稳定存在、由元素原子形成的笼状结构就是“巴基球(buckyball)”,以前除了碳元素之外,还没有发现其他元素的原子能形成这种结构。美国内布拉斯加大学(University of Nebraska)、华盛顿州立大学(Washington State University)和太平洋西北国家实验室(Pacific Northwest National Laboratory, PNNL)在实验和理论上证实了完全由金原子构成的笼状结构,他们称其为“巴基金(bucky gold)”。



金原子簇——首次发现的金属原子笼状结构,与碳富勒烯(巴基球)结构近似

发现于 20 世纪 80 年代的碳巴基球,亦称富勒烯(fullerene),是由 60 个碳原子构成的笼状结构。

现在,美国科学家似乎首次做出它的金属版本。这种结构含 16~18 个原子,由很多三角形构成,看起来更像钻石,而不像足球。它们的平均直径大于 5.5 Å(1 Å = 10⁻¹⁰ m),中空的内部可以容纳外来原子,不过研究者还没有做这方面的实验。“巴基金”说明在原子尺度上,金具有很高活性,而且是性能优良的催化剂。

(高凌云编译)

双脉冲星又一次验证了广义相对论的正确性

通过测量 2000 光年外的一个双脉冲星系统,爱因斯坦的广义相对论再次得到确证,这次测量比以往更为精确,误差在 0.05% 以内。这次测量活动由曼彻斯特大学焦德雷尔班克天文台(Jodrell Bank Observatory)的迈克尔·克莱默(Michael Kramer)领导,他们整个小组在 2004 年发现双脉冲星系统 PSR J0737 - 3039A/B 后就开始对其进行两年多的观测,并在此基础上完成了测量。

这项工作将最早的单脉冲星测量进一步发展为双脉冲星无线电导航台的测量,提供了更为详细的数据。这些数据在引力场较强的区域(这个区域内脉冲星的半径只有 20 千米,但质量却比太阳大得多)没有超出广义相对论。

(高凌云编译)