

分子马达肌球蛋白动力冲程研究进展

王志坚

生命在于运动,机体的一切活动,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推动的结果,因此它们称为分子马达或马达蛋白。到目前为止,已有上百种的分子马达被确定,它们在生物有机体内执行着各种各样的生物功能。分子马达都是沿着相应的蛋白丝运动,这些蛋白丝起着轨道的作用。对于真核细胞,最常见的为肌球蛋白马达(Myosin),驱动蛋白马达(Kinesin)和动力蛋白马达(Dynein)三大家族系。肌球蛋白和肌动蛋白结合称为肌动球蛋白(acto-myosin)。当肌肉收缩时,肌球蛋白沿肌动蛋白丝(actin filament)滑动。而驱动蛋白和动力蛋白都沿着微管(microtubule)运载囊泡(vesicles)和细胞器(organelles)等运动。

1. 肌球蛋白的结构

肌球蛋白是长形不对称分子,形状如“Y”字,长约160nm。电子显微镜下观察到它含有两条完全相同的长肽链和两对短肽链,组成两个球状头部和一个长杆状尾部。肌球蛋白分子量约460kD,长肽链的分子量约240kD,称重链;短链称轻链。将肌肉肌球蛋白用5, 5'-二硫双(α -硝基苯甲酸, DTNB)处理后放出的一对轻链,称为DTNB链,分子量约18kD;另两条轻链只有在酸碱度(pH=11.4)的条件下才能分离出来,称碱性轻链,分子量分别为25kD和16kD。非肌细胞如黏菌的肌球蛋白的形状和结构与肌细胞的肌球蛋白非常相似,但它不存在DTNB链,两对不同的轻链称必需轻链(essential light chain)和调节轻链(regulatory light chain),分子量分别为16kD和18kD。

在肌球蛋白超家族中,不管其来源如何,其头部区域都有相当高的同源性,特别是ATP和肌动蛋白的结合位点非常保守。两条重链的氨基末端分别与两对轻链结合,形成两个球状的头部和颈部调节结构域,称为S1(subfragment 1),余下重链部分组成肌球蛋白长杆状的尾部(图1)。在一定条件下,胰凝乳蛋白酶能把肌球蛋白切为两部分,带有两个头部的部分称为重酶解肌球蛋白(heavy meromyosin,

HMM),另一部分叫轻酶解肌球蛋白(light meromyosin, LMM)。重酶解肌球蛋白的尾部称为S2(subfragment 2)。肌球蛋白N末端的头部S1为马达功能区,在离体条件下,单独的S1就能依赖其ATP酶活性产生力,从而驱使肌动蛋白丝运动,只是滑动速度比全长的肌球蛋白慢,可见肌球蛋白表现最佳马达活性需要S2。肌球蛋白的尾部是超螺旋结构,其氨基酸序列由典型的卷曲的卷曲型 α 螺旋(coiled-coiled α -helix)组成。所有肌球蛋白在轻链结合下方都有一个脯氨酸残基,根据其保守性和结构特性,此脯氨酸残基被定义为头部和尾部连接点(head/tail junction)。肌球蛋白以聚合形式参与细胞生理过程,单个的肌球蛋白分子没有功能。肌球蛋白通过组装域自我组装成具有双极性的粗丝(thick filament),对其实现合适的功能至关重要。1993年,Rayment等通过甲基化修饰肌球蛋白S1的赖氨酸残基获得了高质量S1的晶体,在2.8Å高分辨率下解析了鸡胸肌肌球蛋白三维空间结构,后来又结晶了盘基网柄菌肌球蛋白S1,并证明S1的ATP结合袋(ATP binding pocket)水解ATP时,有较大的构象变化,它为设计突变体提供了极有价值的理论依据,是肌球蛋白研究史上的新突破。

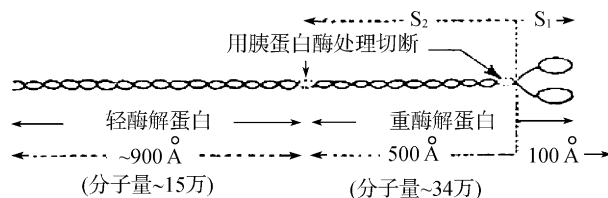


图1 肌球蛋白分子的结构模式图

2. 肌球蛋白的性质

肌球蛋白属球蛋白类,不溶于水而溶于0.6mol/ml的KCl或NaCl溶液。它具有酶活性,通过与肌动蛋白相互作用,水解ATP的末端磷酸基团,同时也能水解GTP、CTP等,将化学能转化为机械能,从而产生各种形式的运动。物理化学研究表明,肌球蛋白溶液加入ATP后,其黏度和流动双折射显著下降。后来证实这是由于肌动蛋白与肌球蛋白复合物的分解,形成两种轴比较小的蛋白质分

子而引起。因此,加入 ATP 前后的黏度变化是鉴定肌球蛋白制备物中是否存在肌动蛋白最简单可行的方法。骨骼肌肌球蛋白 ATP 酶在 Mg^{2+} 存在时活性很低,但在 K^+ 及 EDTA 或 Ca^{2+} 存在时活性可增加 10 倍以上。

近年来应用分子生物学技术,首先证明了编码盘基网柄菌肌球蛋白重链的基因属于单拷贝,紧接着将盘基网柄菌肌球蛋白重链基因克隆测序,推导出其重链共有 2133 个氨基酸残基,然后将重链基因封闭,不让其在细胞内表达,同时建立了重组肌球蛋白重链基因在盘基网柄菌内的表达体系和相应突变体的生化分离、体外定性的方法,而且已找到多个因肌球蛋白分子的改变而造成体内功能缺陷的盘基网柄菌突变体。研究还表明,非肌细胞肌球蛋白时刻处在聚合与解聚的动态变化中,它在细胞内的定位具有受严格的时间和空间调节的显著特征。已经证实,盘基网柄菌肌球蛋白在细胞分裂的后、末期移向或平行排列到分裂沟,当分裂沟完成后消失,这个动态特征是体内功能的关键。这些工作为研究肌球蛋白的结构和功能等提供了直接的分子遗传学证据,使肌球蛋白研究有了突破性进展。

3. 肌球蛋白的功能

肌球蛋白作为细胞骨架的分子马达,其主要功能是为肌肉收缩提供力。骨骼肌(skeletal muscle)由数百万肌纤维构成,每一肌纤维是直径约 10—100 μm 的细胞。在肌纤维膜内部纵向排列着直径约 1 μm 的肌原纤维(myofibril)。而肌原纤维是由一千或更多粗蛋白丝(肌球蛋白 myosin)和细蛋白丝(肌动蛋白 actin)交错对插组成,如图 1。粗丝和细丝间可相对滑动,因此肌肉的长度可以变化。这是肌肉收缩的滑行学说。在显微镜下观察,横纹肌纤维(striated muscle fibres)和肌原纤维呈周期性结构,每一周期叫做肌节(sarcomere)。肌节的长度和整个肌纤维的长度无关,一般是恒定的,约为 2.5 μm 。电子显微镜和 X 射线衍射表明,粗丝和细丝都是螺旋结构。细丝(thin filament)直径约为 70 $\text{\AA}$,长度为 1 μm ,它是由两根纤维肌动蛋白(F-actin)组合在一起构成的,而纤维状肌动蛋白又是由 200 个分子量为 42KDa 的被称为球状肌动蛋白(G-actin)的蛋白质(直径 55 $\text{\AA}$)聚合而成的。细丝的螺距为 385 $\text{\AA}$,含 7 个 G-actin 分子。粗丝的直径约为 150 $\text{\AA}$,长度为 1.65 μm ,由 200 个分子量为

520KDa 的肌球蛋白(myosin)构成。

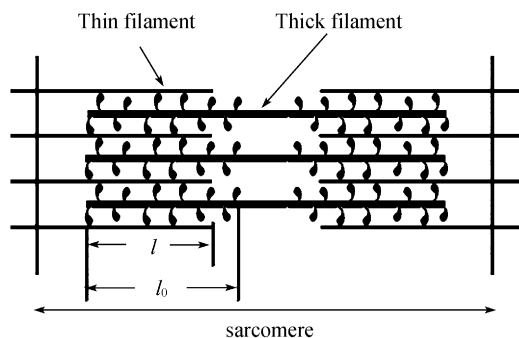


图 2 肌原纤维的纵截面图

4. 由肌动蛋白激活的肌球蛋白水解 ATP 循环

1994 年,Spudich 综合分析了关于肌肉的离体运动分析、分子遗传学及结构生物学三方面的研究结果,提出了由肌动蛋白激活的肌球蛋白水解 ATP 循环过程的机械化学偶联如图 3。根据这个假说,肌球蛋白同肌动蛋白强结合时存在两个态:动力冲程(power stroke)前态和动力冲程后态。这一冲程使得肌动蛋白丝相对肌球蛋白滑动了 10nm。图 3 中步骤 1: ATP 结合到肌球蛋白的球状头部,引起的构象变化使得肌球蛋白与肌动蛋白丝迅速分离。步骤 2: ATP 迅速水解为 ADP 和 P_i ,肌球蛋白、ADP 和 P_i 以强结合状态存在,表示为 $myosin \cdot ADP \cdot P_i$ 。 $myosin \cdot ADP \cdot P_i$ 同肌动蛋白弱结合,表示为 $actin \cdot myosin \cdot ADP \cdot P_i$ 。步骤 3 是一个慢跃迁过程,由弱结合态过渡到强结合态,表示为 $actin \cdot *myosin \cdot ADP \cdot P_i$ 。整个循环时间 t_c 决定于步骤 3 所需时间。步骤 3 引起肌球蛋白的构象变化,构象变化触发了步骤 4,即 P_i 的释放。 P_i 的释放又触发了大的构象变化(步骤 5),肌球蛋白杆状部分的摆动,使得肌动蛋白丝相对肌球蛋白滑动。这一大的构象变化之后 ADP 得以释放。步骤 4 和 5 被认为是强结合态时间 t_s , t_s 大约 2ms。ADP 的释放使得 ATP 又可以迅速结合,以此循环下去。

在我国有人提出肌球蛋白工作循环的一个新模型,如图 4。图中步骤 1,ATP 结合到肌球蛋白的球状头部,引起肌球蛋白的肌动蛋白结合部位的构象变化,使得肌球蛋白同肌动蛋白迅速分离。ATP 被水解为 ADP 和 P_i ,ADP 和 P_i 同肌球蛋白处于结合态,表示为 $myosin \cdot ADP \cdot P_i$ 。水解过程引起肌球蛋白头部的构象变化,ATP 水解的化学能转化为肌球蛋白的构象能。此时肌球蛋白头部的杆状部分(也称

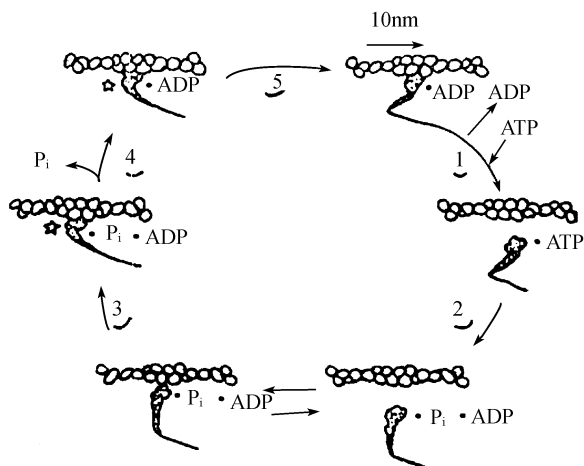


图3 肌球蛋白工作循环中的机械化学偶联

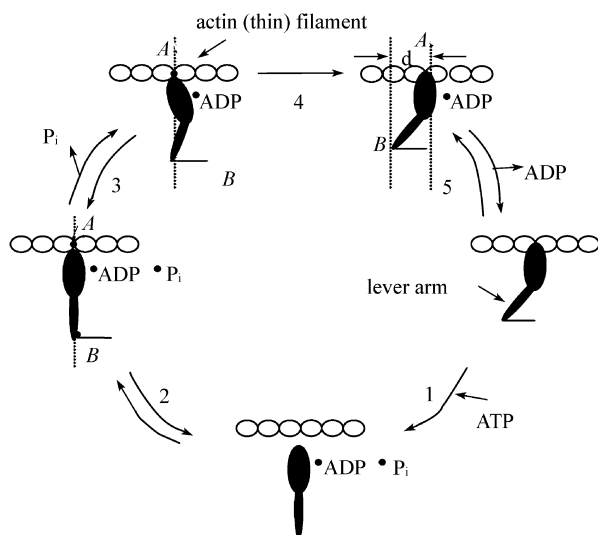


图4 由肌动蛋白激活的肌球蛋白水解 ATP 工作循环的机械化学偶联图解

为杠杆臂)所处的状态称为过渡态(transition state)。步骤2, $\text{myosin} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$ 和肌动蛋白形成弱结合态, 表示为 $\text{actin} \cdot \text{myosin} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$ 。步骤3为 P_i 的释放。 P_i 的释放触发了肌球蛋白头部的杆状部分发生约 60° 角的摆动。图中 A 点表示肌球蛋白与肌动蛋白的结合位点, B 点表示肌球蛋白杠杆臂末端。由于肌肉负载的阻碍作用, 弱结合态时杠杆臂的摆动没有引起杆臂末端 B 相对结合位点 A 的滑动, 而是肌球蛋白绕结合位点 A 有一转动。杠杆臂摆动的同时肌球蛋白的肌动蛋白结合部位的构象也发生相应的变化, 变化后的构象适宜与肌动蛋白形成强结合态。步骤4, 从弱结合态过渡到强结合态, 此时杠杆臂所处的状态称为近僵直态(near rigor state)。B 点相对 A 点移动 $d \approx 10\text{nm}$ 。这一步可看作动力冲程(power stroke)。动力冲程发生在强结合态的形成

过程。肌动球蛋白的构象能转化为机械能。步骤5, 强结合态形成以后, ADP 得以释放。ADP 的释放使得 ATP 又可以迅速结合, 以此循环下去。

从上述的讨论可以看到, 分子马达将化学能转化为机械能的过程是: ATP 水解的化学能 $\rightarrow$ 马达分子的构象能 $\rightarrow$ 机械能, 并且将动力冲程视为 10nm 。

5. 肌球蛋白动力冲程的研究现状

肌球蛋白分子一个动力冲程是多少, 实验和理论研究结果各不相同, 对其大小存在争议。是否存在动力冲程, 亦持怀疑。为此, 本文对目前比较普遍关注的几类肌球蛋白沿肌动蛋白丝滑行的动力冲程作了简述, 特别是对肌球蛋白 II (肌肉收缩的关键成分) 动力冲程的研究作了简单的介绍, 对后期的工作做了展望。

肌球蛋白 IV 沿肌动蛋白丝运动存在两个动力冲程, 其大小呈现一个均值 72nm 和另一个均值为 36nm 的高斯分布。肌球蛋白 V 分子可沿肌动蛋白丝移动, 传输细胞器, 负责细胞内黑色素和有被小波等微粒的输运, 其动力冲程呈现均值约为 36nm 的高斯分布。河北工业大学的展永等对肌球蛋白 V 随步长分布的动力学作了理论研究, 结果与实验基本吻合。Spudich 等人对肌球蛋白 VI 单分子的动力冲程作了实验研究, 发现动力冲程大小与肌球蛋白和肌动蛋白的结合几率, 呈均值为 35nm 的高斯分布, 同时发现单分子的动力冲程大小与肌球蛋白杠杆臂的长度和旋转有关。

Myosin II 的晶体结构表明, 消耗一个 ATP 分子, 在不加负载下的动力冲程为 $10\text{--}12\text{nm}$, 这个值得到 X 射线衍射实验的证明。Finer 等做了肌球蛋白 II 的单分子实验, 发现一个肌球蛋白分子产生的力为 $3\text{--}4\text{pN}$, 消耗一个 ATP, 只有一个动力冲程, 动力冲程大小为 11nm 。Molloy 做了类似的实验, 所不同的是使一个头部的肌球蛋白与肌动蛋白相互作用, 发现消耗一个 ATP, 产生的力为 1.7pN , 也只有一个动力冲程, 动力冲程大小为 4nm 。Kitamyra 等人截去肌球蛋白的一个头部, 使另一个头部与肌动蛋白发生作用, 发现消耗一个 ATP, 肌球蛋白可沿肌动蛋白移动 $1\text{--}5$ 步, 每个动力冲程为 5nm 。Tauaka 等人将一个头部的肌球蛋白置于与肌动蛋白丝平行, 发现消耗一个 ATP 产生的动力冲程大小为 17nm 。Sleep 等人假设动力冲程之后伴随着无机磷酸盐 P_i 和 ADP 的释放, 理论结果表明, 其动力冲

程比人们普遍公认的 10nm 小,并且依赖于动力冲程过程的平衡速率常数及动力冲程前态的分离速率常数。Kagawa 认为骨骼肌肌球蛋白运动步长(动力冲程)不是固定的,研究了一个肌球蛋白分子沿肌动蛋白运动时驱动系统中涨落对动力冲程的影响。

在我国,从事分子马达研究的人员很少,中国原子能科学研究所的卓益忠和河北工业大学的展永等人对驱动蛋白的动力学特性做了大量的研究:他们提出了具有关联噪声涨落的势垒闪烁模型、闪烁关联噪声模型、有限阻尼条件下的势垒闪烁模型以及一种二维模型。事实上,驱动蛋白的两个头部与微管结合的部位相差约 5nm,但它每一步能迈出 8nm,恰好与构成微管重复单元的 $\alpha\beta$ 二聚体的长度相等,并且每一个 ATP 分子水解是否与行走一步 1:1 对应,这都是人们所面临的问题。

对肌球蛋白理论研究的一个趋势是借助化学动力学方法和生化热力学原理,研究 ATP 水解时,多个化学态的构象变化过程中力学过程与化学过程的耦合。人们估计起码要 4—6 个化学态才能较好地反映分子马达这一化学循环。我们正在尝试这种方法并已取得初步的成果。我们曾以肌球蛋白 II 为研究对象,建立了“肌球蛋白工作循环的四态模型”,在不考虑负载的情况下,计算了动力冲程的大小,发

现动力冲程的大小不仅依赖于动力冲程过程的反应平衡常数,还与肌球蛋白横桥的弹性系数有关,研究了肌肉收缩及自发振动的动力学特性,并对肌肉收缩的化学动力学及肌球蛋白集体协同工作效率,做了初步的探讨。然而多态模型没有考虑在消耗一个 ATP 产生一个化学循环时,其一个化学周期与一个力学周期是否一一对应,所显现出的问题之一是动力冲程的大小不确定,这是一个非常具有挑战性的问题,有待理论和实验的进一步研究。

6. 展望

总之,肌球蛋白动力冲程问题研究也许是一个涉及生物、化学、物理学等多学科的重要课题。近几年来,这一课题的研究得到了多学科的普遍重视,研究工作非常活跃,并已取得初步成果。今后的工作中,在理论上应当从一维运动推向多维,既要考虑横向运动、纵向运动、转动以及它们之间电荷相互耦合作用,同时还要将生物科学的研究与统计物理学、热力学,电磁学、化学等多学科相结合,建立一个比较合理的理论模型,全面了解肌动蛋白和肌球蛋白的动力学行为及其生物学意义,使我们的理论研究与实验结果达到较好的吻合,才会对生物物理学这一交叉学科的研究领域起到一定的促进作用。

(天水师范学院物理与信息科学学院 741001)

科苑快讯

番茄能成为口服疫苗的载体吗

韩国生命工学院

(Korea Research Institute of

Bioscience and Biotechnology, KRIBB)的金贤淳(HyunSoon Kim 音译)和数字生物技术公司(Digital Biotech Inc.)、圆光大学(Wonkwang University)的同仁经研究后提出,番茄非常适于作阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)口服疫苗的载体。尽管他们的研究尚处于早期阶段,但是毕竟在寻找神经退行性疾病(neurodegenerative disease)口服疫苗的道路上迈出了富有希望的第一步。

阿尔茨海默氏病是痴呆症的普遍原因,而且病程漫长。目前大多认为是大脑中一种有毒不溶性纤维蛋白(β -淀粉样蛋白)的积聚造成神经元坏死所致。减少 β -淀粉样蛋白的积聚有助于改善神经系统的退行进程,从而防止或延缓阿尔茨海默氏病的发生。其中一条途径是刺激免疫系统尽量清除 β -淀粉

样蛋白,金贤淳和同仁的目标就是研发一种对抗阿尔茨海默氏病的植物疫苗,因为 β -淀粉样蛋白对动物细胞有毒。

番茄是比较好的疫苗载体,可以生吃、不用加热,降低了外源蛋白免疫刺激蛋白遭到破坏的风险。研究者将 β -淀粉样蛋白插入番茄的基因组,检验一组 15 个月大的小鼠在喂食转基因番茄后,对这些番茄来源毒性蛋白产生的免疫反应。血液分析表明,小鼠体内发生了强烈的免疫反应,并产生了人类外源蛋白的抗体。

研究者认为:“虽然我们未能揭示番茄来源 β -淀粉样蛋白减小了小鼠大脑业已存在的病变斑块……研究说明,以转基因植物表达 β -淀粉样蛋白是一条生产疫苗的独特途径。”目前,该小组正在寻求强化番茄疫苗效力的策略,因为番茄的蛋白含量仅为 0.7%,外源蛋白的含量甚至更低。

(高凌云编译自 2008 年 7 月 9 日 Science Daily 新闻)