

# 肌球蛋白的结构及工作机制

周中英, 倪坤, 吕功煊<sup>1)</sup>

(中国科学院兰州化学物理研究所 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

关键词: 肌球蛋白; 线性分子马达; 水解; ATP

中图分类号: O629.73 文献标识码: A

在生物界中, 化学能转化成定向的机械能的分子机理是一个基本问题. 有一类能利用化学能/化学势进行机械做功的生物大分子, 称为分子马达. 分子马达依据其作用的方式可分为线性分子马达与旋转式分子马达两大类. 线性分子马达是一类将化学能转化为机械能, 并沿着一个线性轨道运动的生物分子. 旋转式分子马达作用时是做类似定子与转子间的旋转运动. 肌球蛋白作为一种线性分子马达蛋白而备受关注, 它是由 Kuehne 在 1864 年发现并命名的<sup>[1]</sup>. 肌球蛋白参与了包括肌肉收缩、趋化性、胞质分裂、胞饮作用、靶向小包运输及信号传导等内在的多种细胞活动, 是生物体内很重要的一大类蛋白.

肌球蛋白是一种超级大家族的蛋白质. 目前发现的肌球蛋白已经有 24 类<sup>[2]</sup>, 它们的结构和功能各有不同: 如肌球蛋白 I 在生物体内的作用是细胞运动, 胞饮作用和泡液收缩<sup>[3, 4]</sup>, 骨骼肌肌球蛋白 II 的作用是使骨骼肌肌肉收缩, 肌球蛋白 V 主要功能是靶向小包运输和信使 RNA 的靶向运输<sup>[3, 4, 6~8]</sup>. 而依据来源不同可以分为传统的肌球蛋白和非传统的肌球蛋白<sup>[9]</sup>. 传统的肌球蛋白是指构成肌肉的肌球蛋白, 即肌球蛋白 II, 但是非肌肉细胞也存在肌球蛋白 II, 称为非肌肉肌球蛋白 II; 非传统的肌球蛋白是指肌肉中不含有的肌球蛋白, 如肌球蛋白 I、III、IV、V, 只存在于非肌肉细胞之中; 肌球蛋白 VIII, XI 和 XIII 只存在于植物当中<sup>[8]</sup>. 目前研究比较多的是肌球蛋白 II、肌球蛋白 V 和肌球蛋白 VI, 其中以肌球蛋白 II 为最. 肌球蛋白 II 最早发现于动物细胞的肌肉组织和细胞质中,

它可分为骨骼肌肌球蛋白 II、平滑肌肌球蛋白 II、心肌肌球蛋白 II、非肌肉肌球蛋白 IIa、非肌肉肌球蛋白 IIb<sup>[4, 8]</sup> 等并广泛存在于肌细胞和非肌细胞中. 前三种肌球蛋白 II 的主要功能是为肌肉收缩提供驱动力, 它能够把 ATP 水解释放出来的化学能转化为驱动肌肉收缩的机械能. 研究肌球蛋白的工作机理, 可以为人们设计人工分子马达、纳米器件提供有利的理论依据及模型. 正因如此, 人们对于肌球蛋白 II 给予了更多的关注. 我们根据肌球蛋白的研究动态及成果对其结构及工作机制作一综述.

## 1 肌球蛋白的结构

肌球蛋白 I 只有一条重链, 尾部较短<sup>[6~8]</sup>. 肌球蛋白 II 形状如“Y”字, 有两条完全相同的重链, 每条重链的颈部也有一条调解轻链, 一条必需轻链, 但是重链的尾部较长<sup>[7, 8]</sup>. 肌球蛋白 V 形状也如“Y”字, 有两条完全相同的重链, 但颈部较长, 每条重链的颈部有三条调解轻链, 三条必需轻链, 尾部较短, 尾部顶端有和运输物质相结合的位点<sup>[3, 4, 6~8]</sup>. 通过对不同肌球蛋白的结构总结得出: 不管肌球蛋白的来源如何, 其基本结构<sup>[5]</sup>是(图 1), 由一条或两条重链和几条轻链组成, 而根据重链在细胞内所起的作用, 按照结构和功能不同可划分三个区域: ①位于重链的 N 末端形成一个球状的头, 含有一个肌动蛋白结合位点和 ATP 结合位点的催化区域, 负责释放化学能. ②重链的 C 末端则形成一个细长的  $\alpha$ -螺旋状的尾部, 尾部结构区域含有决定尾部是同膜结合还是同其它的尾部结合的位点. ③连接头尾的是  $\alpha$ -螺旋状的颈部, 其与必需轻

收稿日期: 2006-11-02; 修回日期: 2007-01-05.

作者简介: 周中英, 女, 生于 1983 年, 硕士研究生.

1) 通讯联系人, Tel / Fax: 0931—4968178; E-Mail: gxlu@lzb.ac.cn.

链、调钙素或类似钙调素的调节轻链相连,颈部还是起到水平臂作用的区域.在这个区域中通过ATP水解将产生动力冲程,从而实现将化学能转化为机械能.其中由两个球状的头部和颈部形成的调节结构区域,称为S1(subfragment 1).

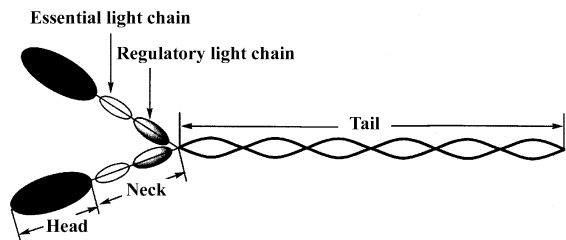


图1 肌球蛋白分子结构

Fig. 1 The structure of myosin

## 2 肌球蛋白的功能

肌球蛋白是一种多功能的蛋白,其主要功能就是为肌肉收缩提供力.肌丝滑动学说(sliding filament theory)认为肌肉细丝和肌肉粗丝相互交叠在一起,肌肉收缩是由于肌肉细丝(肌动蛋白)与肌肉粗丝(肌球蛋白)发生相对滑动的结果.在肌肉收缩过程中,粗丝和细丝本身的长度都不发生改变,收缩只是由于细肌丝与粗肌丝的重叠区域增加了<sup>[10, 11]</sup>,肌丝滑动的能量由ATP提供.

经过近半个世纪的研究,关于肌丝滑动的分子机理先后提出了两个不同的模型:其中最早的,也是影响最大的模型是Huxley在1969年提出的经典摆动横桥模型(Classic swinging cross bridge model).摆动横桥模型强调肌丝滑动时肌球蛋白头部首先以约90度角与肌动蛋白丝结合,当ATP水解时肌球蛋白头部与颈部相对位置没有改变,但是肌球蛋白头部与肌动蛋白结合角度倾斜了约45度,使肌肉细丝产生一定的移动,然后头部与肌动蛋白脱离,分子回到原来状态,从而形成循环过程<sup>[12]</sup>.随着研究方法的不断更新,研究人员对肌球蛋白各个部位的结构越来越清楚,当经典的横桥模型解释不了肌球蛋白头部在肌动蛋白上怎么运动等其他现象时,就会产生新的模型,摆动杆臂模型(Swinging lever arm model)就是其中之一.摆动杆臂模型认为肌丝滑动时肌球蛋白头部首先以固定的几何结构与肌动蛋白结合,肌丝滑动时,肌球蛋白头部与颈部的相对位置发生一定的改变,但头部与肌动蛋白的结合角不变,颈部相当一根杠杆(lever),通过分子屈伸使肌动蛋白丝移动.这个模型可以解释为什么在

实际过程中横桥倾斜度改变不大,并没有达到摆动横桥模型所认为的45度,因为肌球蛋白头部只有一小部分参与了肌肉收缩过程<sup>[13]</sup>.1986年Spudich实验室首次建立了体外模拟滑动体系<sup>[14]</sup>,测试肌球蛋白与肌动蛋白相互滑动产生的力.在1994年Finer等人成功地用双光钳进行单分子运动测试<sup>[15]</sup>,这样人们就可以在单分子水平上进行肌丝滑动研究以及测试其产生力的大小,从而把肌球蛋白的研究提高到一个新的台阶.

最近关于肌球蛋白运动方式的研究表明,肌球蛋白V与肌球蛋白VI的运动方式与其它肌球蛋白有点不同,前者是连续运动的,即任意时刻总有一个头部与肌动蛋白接触,而不是以跳跃的方式前进的<sup>[16]</sup>;后者则可以逆肌动蛋白丝运动<sup>[17]</sup>.肌球蛋白VI运动分子是研究人员特别感兴趣的,因为它与肌球蛋白超级家族的多数其他成员向相反方向运动:它朝肌动蛋白细丝的尖端运动,而远离有刺的一端(或称“正”的一端)<sup>[18, 19]</sup>.研究人员已经以2.4埃的分辨率确定了一种被截短了的肌球蛋白VI的结构.这个分子中的杠杆臂重新取向的原子尺度的细节显示了两个独特的插入物,它们是其反方向运动的关键<sup>[20]</sup>.

## 3 肌球蛋白 S-1 重链的氨基酸序列

为了在分子水平上更好地探测肌球蛋白的功能性质,测出肌球蛋白各个部分的氨基酸序列是必要的,而肌球蛋白的S-1部分在ATP水解过程中起到关键的作用,因为其含有一个肌动蛋白结合位点和一个ATP结合位点的催化区域.因此S-1部分的氨基酸残基早在1977年Marshall Elzinga<sup>[21]</sup>和他的同事就开始研究了,到目前为止,S-1的氨基酸残基序列基本上得以测定.下面以兔子的骨骼肌肉肌球蛋白为例分别介绍肌球蛋白S-1重链中23KDa、50KDa、20KDa三个碎片的氨基酸残基序列.

### 3.1 S-1 重链中 23KDa 碎片的氨基酸残基序列

这个片段含有氮末端1-204个肌球蛋白重链的氨基酸残基(Ser1-Lys204),其中63个残基含有疏水的副链,29个残基含有带正电的副链(Lys、His、Arg、TML、MML),以及24个残基含有带负电的副链(Asp、Glu)<sup>[22, 23]</sup>,且此碎片位于肌球蛋白头部中心.在中性条件下,这段序列中Tyr109-Tyr142除TML129外是都没有带电的副链,且十分疏水,它能在S-1表面形成一个疏水性的腔,是因为它含有

9个芳香物族氨基酸残基和9个带有长脂肪副链的氨基酸残基. 因此这段序列为ATP的腺嘌呤部分结合提供了一个疏水性的腔和一个与ATP中的磷酸相互作用的带正电氨基酸残基(即TML)<sup>[22]</sup>.

### 3.2 S-1重链中50KDa碎片的氨基酸残基序列

在这段序列中含有205-636氨基酸残基(Lys205-Lys636), 其特点在氨基酸残基623-634(Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Lys-Gly-Gly-Lys-Lys-Lys-Gly)<sup>[24]</sup>. 且此碎片位于肌球蛋白头部的末梢处即肌球蛋白头部与杆连接处的对立处.

### 3.3 S-1重链中20KDa碎片的氨基酸残基序列

这段序列中含有637-809残基(Lys637-Arg809): SH-1(Cys707), SH-2(Cys697)以及一个N-methylhistidine<sup>[21]</sup>, 且此碎片位于离S-1头部末梢的10mm处.

在肌球蛋白S-1中有四个甲基化氨基酸残基: N<sup>ε</sup>-methyllysine34, N<sup>ε</sup>-trimethyllysine 129, N<sup>ε</sup>-trimethyllysine 551, and N<sup>ε</sup>-methylhistidine 755<sup>[24]</sup>. 甲基化基团的结构效果是在生理pH值条件且含有一正电荷时增加其疏水性, 赖氨酸副链氨基酸残基的三甲甲基化产生一个和四个碳原子相连的氨基, 且在任何pH值下都带正电荷, 由于细胞内的pH值变化不充分, 所以对带电荷的三甲甲基氨基在生物体内的功能还不是特别清楚. 所有的脊椎动物的肌球蛋白都含有相同数目的甲基化赖氨酸, 而甲基化的组氨酸只存在于成形了的骨骼肌肌球蛋白中<sup>[24, 25]</sup>.

微不均匀性: 在氨基酸残基序列中相同位点被等数量的两个不同的氨基酸残基占据, 这种情况经常称之为微不均匀性, 在1973年Starr和Offer就报道过肌球蛋白的微不均匀性. 在肌球蛋白S-1的三个主要碎片中都存在微不均匀性, 且在微不均匀位点上存在的两个氨基酸残基的比率大概都在50:50到70:30之间. 其中23KDa碎片中还存在电荷上的微不均匀性(Ala/Glu)<sup>[26]</sup>.

虽然在上世纪九十年代之前就得出肌球蛋白的一、二级结构, 但是要对肌球蛋白对ATP水解的作用及其在水解ATP时的构象变化有比较清楚的认识, 就需要测出肌球蛋白的三级结构. 直到上世纪九十年代中前期, 随着肌球蛋白单晶的得到, 肌球蛋白的三维结构就可由X射线晶体衍射法测出<sup>[27~29]</sup>. 1993年, Rayment等人通过甲基化修饰肌球蛋白S-1的赖氨酸残基获得了高质量肌球蛋白S-1的晶体, 通过X射线晶体衍射, 在2.8埃高分辨

率下解析了鸡胸肌肌球蛋白三维空间结构<sup>[29]</sup>. 但是在ATP类似物的存在下无化学修饰并且在更大范围内对其晶体进行衍射分析, 肌球蛋白头部的结构会更接近实际结构. 磷酸的类似物有钒酸盐、氟化硼、氟化铝, 这些类似物是在ATP水解后得到的ADP/Pi亚稳态的类似物<sup>[30]</sup>. 由于氟化硼、氟化铝稳定, 所以研究人员通常用它们来作为磷酸的类似物<sup>[31]</sup>. 1995年Fisher等在氟化硼、氟化铝存在的状态下, 且在2.0埃和2.6埃的高分辨下解析了盘基网柄菌肌球蛋白II<sup>[32]</sup>(体积小, 易于得到单晶)催化部位的MgADP的结构, 结果表明MgADP·BeF<sub>x</sub>与蛋白质的复合物的四面体结构和鸡骨髁肌肌球蛋白S-1的三维结构一致. 而MgADP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>复合物存在较大的区域移动, 故可以推测MgADP·BeF<sub>x</sub>复合物可以模拟肌球蛋白刚结合ATP的初始状态和MgADP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>复合物是ATP水解过渡态的类似物. 在MgADP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>复合物观察到的区域变动暗示了肌球蛋白在ATP水解过程中发生了构象变化<sup>[33]</sup>. 且Fisher等和Smith等都证明盘基网柄菌S1的ATP结合腔(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<sup>[33, 34]</sup>. 1995年, Yasunobu Sugimoto等人还用X射线溶液散射(使用小角散射仪)的方法<sup>[35]</sup>, 在溶液中观察到了平滑肌肌球蛋白头部区域在没有核苷酸时和加入核苷酸变为活性态时的构象变化, 肌球蛋白头部和头颈连接部分别有10度和20度的弯曲. 这些都为以后研究肌球蛋白如何催化ATP水解提供有力的实验依据.

## 4 肌球蛋白与ATP的作用

肌球蛋白能够把ATP水解释放出来的化学能转化为促进肌动蛋白移动的机械能, 且它能催化ATP水解. 故研究肌球蛋白与ATP的作用使得肌球蛋白在生物体内作为一种线性分子马达的机理更加清晰, 为以后设计人工分子马达提供了理论依据.

### 4.1 肌球蛋白水解ATP过程的概述

一般认为, 肌球蛋白水解ATP过程分为以下几个步骤<sup>[36, 37]</sup>: ATTACHED-肌球蛋白水解ATP循环的开始, 没有结合ATP的肌球蛋白紧紧地, 以一种僵直的状态(生物体死后的状态)和肌动蛋白结合在一起. 在活体生命中, 这种状态极其的短暂, 其很快就会因为结合ATP而终止.

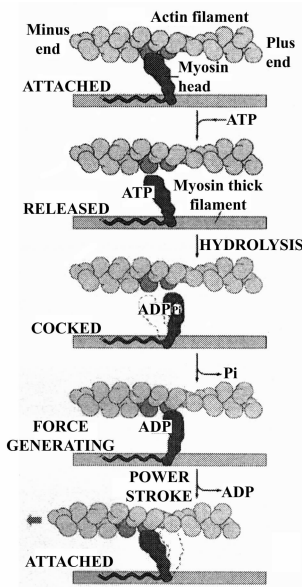
图2 肌球蛋白的工循环<sup>[37]</sup>

Fig. 2 The mechanochemical mechanism cycle for ATP hydrolysis by myosin

RELEASED- ATP 进入肌球蛋白头部的裂缝(结合位点),肌球蛋白的肌动蛋白结合位点的构象立刻产生微小变化,肌球蛋白和肌动蛋白的结合力减弱(图2所示距离变大是为说明结合力减弱,实际上肌球蛋白和肌动蛋白还是紧贴在一起)。

COCKED-裂缝像贝壳一样关闭,触发肌球蛋白头部的巨大变化,肌球蛋白的头部在肌动蛋白上移动5nm,ATP水解,但ADP和Pi并没脱离肌球蛋白,肌球蛋白和肌动蛋白的细丝在新的位置产生弱的结合。

FORCE-GENERATING-接着肌球蛋白和肌动蛋白的细丝在新的位置产生弱的结合导致Pi的释放。这个释放同时引发一个动力冲程,这个力使肌球蛋白的形状复原,同时释放出ADP。

ATTACHED-再循环结束时,肌球蛋白与肌动蛋白强结合,开始新的循环。

#### 4.2 肌球蛋白 ATP 结合位点的基本结构

肌球蛋白的头部有一个ATP的结合腔,且它能催化ATP水解。研究肌球蛋白中ATP结合腔的构成及其由哪些氨基酸组成,有利于研究肌球蛋白催化ATP水解机理。研究表明肌球蛋白ATP的结合腔由三个loop形成<sup>[38]</sup>(如图3):磷酸结合(phosphate-binding)loop简称为P-loop, Switch-I loop,和 Switch-2 loop。Switch I和 Switch II上的某些氨基酸残基是ATP水解的关键,如 Switch I中的 Arg238, Switch II的 Glu459(盘基网柄菌肌球蛋白II)。

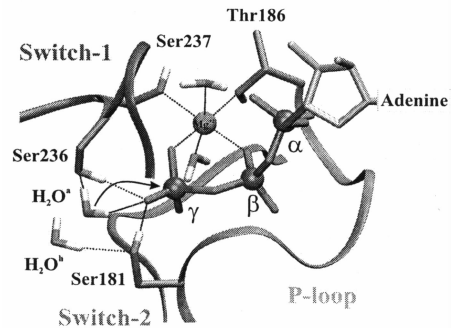
图3 肌球蛋白的ATP结合腔<sup>[38]</sup>

Fig. 3 The ATP-binding pocket in myosin

#### 4.3 ATP 结合位点的氨基酸残基及其作用

通过 X-ray 晶体衍射观测 ATP 类似物(如  $MgADPBeF_x$ )和盘基网柄菌肌球蛋白 II 结合后的晶体的三维结构<sup>[29, 33, 34]</sup>,发现 ATP 与肌球蛋白结合位点的氨基酸残基大多数位于 23KDa 和 50KDa 段。可能与 ATP 结合的氨基酸残基是 Ser181, Gly182, Ala183, Gly184, Lys185, Thr186, Glu187, Asn188, Arg238, Ser237, Ser236, Asn235, Asn233, Asn127 等,以及形成对 ATP 的水解起关键作用的 Cleft 氨基酸残基 Arg238 和 Glu459。[在肌球蛋白 S-1 中存在一个对 ATP 水解起到很重要作用的裂缝(Cleft),它存在于 ATP 结合位点与肌动蛋白结合位点间,该裂缝不但沟通了两个活性位点,且还可能在机械做功时的构型改变过程中起关键作用]。

在 X-ray 晶体衍射的结果的基础上,研究人员通过量子化学和反应动力学计算得出<sup>[39]</sup>, Lys185 与 ATP 的  $\beta$  和  $\gamma$  的磷酸通过氢键结合,维持 ATP 的空间构象; Thr186 和 Ser237 与  $Mg^{2+}$  离子配位,  $Mg^{2+}$  离子与 ATP 的  $\beta$  和  $\gamma$  磷酸相互作用,对 ATP 的结构起稳定的作用。Arg238 和 Glu459 组成 ATP 水解腔的门,其使水分子在恰当的位置和 ATP 作用发生水解。

Shimada 等人<sup>[40]</sup>用基因诱变<sup>[41]</sup>的方法,使盘基网柄菌(Dictyostelium discoideum)肌球蛋白 II 的“switch I” loop 区域的 233-240 的氨基酸残基(NX-NSSRFG)发生诱变。除 234 之外,每个氨基酸残基分别用 Ala(A)替换。结果表明, N233 和 S237 对 ATP 水解起基本作用, R238 起着至关重要的作用。N233A 和 S237A 肌球蛋白并没有连接 mant-deoxy-ADP(ADP 的荧光类似物),并且肌球蛋白失去了运动能力,ATPase 的活性降得很低。而 R238A 肌球蛋白则是紧紧地 and mant-deoxyADP 连在一起,同样肌球蛋白也失去了运动能力,ATPase 的活性降得

极低. N235A, S236A, F239A, and G240A 肌球蛋白尽管 ATPase 的活性也发生各种变化, 但活性还是和没有诱变的肌球蛋白在同一水平. Xiang-dong Li 等人<sup>[42]</sup>也用基因诱变<sup>[43]</sup>的方法对盘基网柄菌肌球蛋白 II 进行了研究, 他们发现 S236T 肌球蛋白失去活性和在肌动蛋白上的运动能力, 而 S236A 肌球蛋白则没有. R238I 肌球蛋白和 ATP 结合后, 观察到其也失去活性和在肌动蛋白上的运动能力. 令人惊奇的是 R238K 肌球蛋白和 ATP 结合后, 其活性和运动能力都很好. K185Q 肌球蛋白在 ATP 存在下不能和肌动蛋白分离, 结果表明, K185Q 抑制了 ATP 的水解. S181A, S181T, 和 N235I 肌球蛋白的活性与未诱变的肌球蛋白在同一水平.

结合 Takashi Shimada 和 Xiang-dong Li 等人<sup>[40, 43]</sup>的结论, 通过比较 Ser, Ala, Thr 的结构, 可以推测在盘基网柄菌肌球蛋白 II 中, 236 位置上的氨基酸残基是否带有羟基对肌球蛋白的活性影响不大, 反而是氨基酸残基的体积大小对肌球蛋白的活性产生重要影响(Thr 比 Ser 和 Ala 多出一个甲基); 比较 Arg, Lys, Ala, Ile 的结构, 可以推测 238 位置上的氨基酸残基的 R 链上是否带有氨基对肌球蛋白的活性产生重要影响. Arg238 和 Glu459 组成 ATP 水解腔的门<sup>[29, 33, 34, 39]</sup>, 说明 238 残基的 R 链上只需一个氨基也可以和 Glu459 的 R 链上的羧基作用, 形成 ATP 水解腔的门.

#### 4.4 肌球蛋白 ATP 结合位在水解过程中的变化

虽然蛋白质的氨基酸残基序列在不同的生物体内是不同的, 但是异体同形允许从一个物种到另一个物种间的转录, 如在平滑肌肌球蛋白中氨基酸残基的序列为: Arg247, Gly468, Glu470 以及 Trp512 等残基, 在盘基网柄菌肌球蛋白 II 中对应为 Arg238, Gly457, Glu459 和 Trp501 等残基.

Fisher 等人<sup>[33]</sup>通过对盘基网柄菌肌球蛋白晶体衍射研究表明①Ser237、Ser236、Ser181、Glu459 等氨基酸残基都不能作为催化基态, 且在 ATP 的  $P_{\gamma}$ -O- $P_{\beta}$  桥连接处的 5.5 埃范围内无质子接受体, 就推测 ATP 水解基态必须要有水分子(W)的加入, 水分子作为亲核试剂去攻击  $\gamma$  磷酸, 从而诱导 ATP 水解. ②观察到因 ATP 的结合而使肌球蛋白头部中一个色氨酸残基的荧光性增加是 Trp501, (Werber 等人<sup>[44]</sup>通过 DHNBS [dimethyl (2-hydroxy-5-nitrobenzyl) sulfonium bromide] 修饰盘基网柄菌肌球蛋白 S-1 中的 Trp 后也观察到荧光性增加的氨基酸残

基是 Trp501). 在其他肌球蛋白中也观察到因 ATP 的结合产生头部一个色氨酸残基的荧光性增加. 如: 在鸡骨骼肌肌球蛋白中是 Trp510, 在平滑肌肌球蛋白中是 Trp512<sup>[42, 43]</sup>, 通过晶体研究证明 Trp512 结合在 50 KDa 碎片的末端且通过一僵直股连接在可变形的三组分 Ile466-Ala467-Gly468 上, 这三组分的转动可改变其荧光性<sup>[34, 46]</sup>, 故 Trp512 可作为肌球蛋白在 ATP 水解过程中构象变化的荧光探针<sup>[47-50]</sup>. Rayment 等人<sup>[34]</sup>对平滑肌肌球蛋白研究得出 Glu470 与 Arg247 形成了盐桥, 即 Glu470 主链中的羧基氧与 Arg247 的胍基的氮形成盐桥. 此盐桥对肌球蛋白水解 ATP 起到关键的作用. 为了更深入了解这两个氨基酸残基的性质, Onishi 等人<sup>[51]</sup>可以通过诱变的方法来研究它们, Glu470 突变成 Arg 和 Arg247 突变成 Glu 的实验结果表明盐桥以原来相反的顺序形成, 但是 Trp512 的荧光性没有增加; 如果是单个突变即 Glu470 突变成 Arg 或 Arg247 突变成 Glu 的实验结果表明没有无机磷酸的释放, 荧光性没有提高; 若 Glu470 突变成 Ala 后消除了构成盐桥形成的两个电荷的其中一个使得盐桥信息减弱, 从而阻止水解, 但是对 Trp512 的荧光性没有影响; Arg247 突变成 Ala 后没有磷酸的释放以及 Trp512 的荧光性也没有增加<sup>[52]</sup>. 结合以上内容可以推出在 Arg247 与结合三磷酸部分的电子效应有助于 Cleft 的闭合和转递信号到与 Cleft 相距较远的 Trp512 使其荧光性增加; 另一方面 Glu470 的存在对 ATP 的水解有着重要的作用<sup>[51, 53]</sup>.

Onishi 等人<sup>[53]</sup>根据 Rayment 等人<sup>[19]</sup>的实验结果对肌球蛋白催化 ATP 水解的机理提出了假设. 在 ATP 水解之前它的结构是: ATP 中的  $\gamma$  磷酸中的三个氧原子分别与  $Mg^{2+}$ 、Switch I 的 Asn242 和 Ser245 的副链、P-loop 的 Lys183 结合配位. 一个水分子  $W_1$  中的氧与 Arg247 的胍基结合, 两个氢分别与 Switch I 的 Ser246 主链羧基氧和结合的  $\gamma$  磷酸部分的氧相互作用. Onishi 等人<sup>[51]</sup>通过诱变实验得出在 247 的位置存在 Arg 与底物结合在活性态的速度有很好的关系, 且推测由于 Arg247 的电子效应, Arg247 能间接地通过  $W_1$  与  $\gamma$  磷酸作用<sup>[53]</sup>, 这正说明了为什么带正电的残基能对底物结合在活性态起到重要的作用.

前面提到 Cleft 的闭合对肌球蛋白催化 ATP 水解起到关键作用, 故研究 Cleft 的闭合过程以及引起其闭合的原因是很重要的(Cleft 闭合过程如图 4

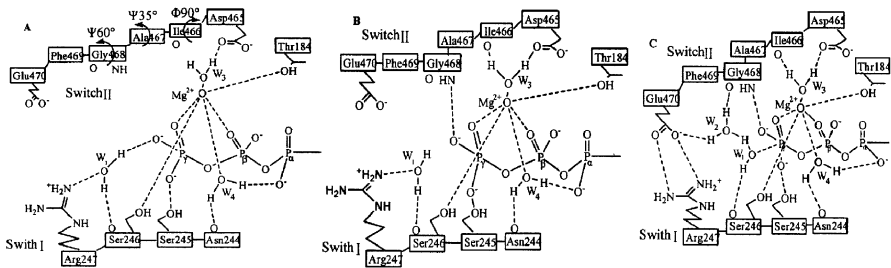


图4 核苷结合 Cleft 的闭合过程<sup>[53]</sup>

Fig. 4 The closing process of the nucleotide-binding cleft. A, the early stage; B, the intermediate stage; and C, the final stage

Covalent bonds are shown as solid lines and hydrogen bonds and ionic interactions in dashed lines

所示)。人们通过研究发现在 Cleft 闭合过程中结构发生大的变化是在 Switch II, 而在 Switch I 只发生微小的变化; 同时发现由于 Arg247 通过  $W_1$  间接地与  $\gamma$  磷酸相互作用以及在其过渡态中  $W_3$  插入  $Mg^{2+}$  和 Asp465 羧基氧之间, 同时引起了 Switch II 的几个氨基酸残基发生了结构的变化: Ile466 的 Ramachandran 角度发生改变使其主链羧基基团的氧原子靠近  $W_3$  分子并与  $W_3$  的另一个氢原子形成氢键, Ala467 与 Gly468 的构象发生变化使得 Gly468 的主链的氢易与结合氨基的  $\gamma$  磷酸部分相互作用, 这样就引发了 Cleft 的闭合<sup>[53]</sup>。而且 Cleft 的闭合过程中 Gly468 与  $\gamma$  磷酸的氧原子形成氢键和 Arg247 与 Glu470 的副链形成盐桥对肌球蛋白的催化作用起到关键性的作用。

ATP 水解过渡态: Cleft 闭合后有两个水分子包含在  $\gamma$  磷酸之中, 假设 Glu470 的运动允许它的盐桥向 Arg247 的胍基移动, 同时 Arg247 释放  $W_1$ ,  $W_1$  就变成了溶解水, 这个水分子的一个氢原子仍然与 Ser246 主链的氧原子作用, 另一个氢原子由起初与  $\gamma$  磷酸的氧作用转变成与另一个水分子  $W_2$  中的氧作用,  $W_1$  中的氧原子从原来无配位状态转变成与  $\gamma$  磷酸作用,  $W_1$  在  $\gamma$  磷酸上变成一个亲核的分子, 这时  $W_1$  的构象达到最佳状态, 但是  $W_1$  周围的氢键可能在过渡态能稳定  $\gamma$  磷酸的三角双锥结构, 所以它的最终位置是由  $\gamma$  磷酸的结构由四面体向三角双锥转变时决定的。  $W_2$  的两个氢原子分别向 Glu470 的羧基和 Gly468 的主链羧基氧方向移动的,  $W_2$  就变成了质子接受体, 从而诱导了 ATP 水解<sup>[51, 53-54]</sup>。从而得出平滑肌肌球蛋白 II, 中 Arg247 - Glu470 对 ATP 水解起着重要的作用, 人们通过对其它各种肌球蛋白, 各种驱动蛋白和各种 GTPase 的核苷酸结合区域研究发现对 ATP 水解起关键作用的是离 ATP 比较近的一个谷氨酸残基和一个精氨酸残基。

如: 盘基网柄菌肌球蛋白 II, Arg238 - Glu459; ; 蝇驱动蛋白, Arg210 - Glu243; 老鼠的驱动蛋白 Arg204 - Glu237; 人类的驱动蛋白 Arg203 - Glu236; *Saccharomyces cerevisiae* Kar3, Arg598 - Glu631, 表明这些蛋白可能来自共同的祖先<sup>[55-57]</sup>。另外, 在  $F_1F_0$ -ATP 合酶中对 ATP 水解起关键作用的氨基酸残基是  $\alpha$ Arg376,  $\beta$ Arg182<sup>[58]</sup>, 说明精氨酸残基在 ATP 水解过程中的作用不可忽视。

#### 4.5 肌球蛋白水解 ATP 途径的假说

关于以肌球蛋白水解 ATP 的途径, 在过去提出过一系列的假说。

Fisher<sup>[33]</sup> 和 Rayment<sup>[59]</sup> 提出两个假说: 假说 1, direct path, 水分子中的一个氢原子和  $\gamma$  磷酸上的氧结合, 而它的氧进攻  $\gamma$  磷酸,  $\gamma$  磷酸形成五角双锥结构, 然后高能磷酸键断裂。假说 2, Ser236 path (盘基网柄菌肌球蛋白 II), Ser236 的羧基上的氢原子与  $\gamma$  磷酸上的氧结合, 水分子中的一个氢原子和 Ser236 的羧基上的氧原子结合, 水分子中的氧进攻  $\gamma$  磷酸,  $\gamma$  磷酸形成五角双锥结构, 然后高能磷酸键断裂。但是根据定点突变的研究结果, Ser236<sup>[40]</sup> 用谷氨酸代替, 并不能使水解终止, 说明假说 2 为非必要途径, 或者该途径不存在。

Kagawa 等人<sup>[60]</sup> 也提出了两个假说: 假说 3, Ser181 path (盘基网柄菌肌球蛋白 II), Ser181 的羧基上的氢与  $\gamma$  磷酸上的氧结合, 水分子的一个氢原子和 Ser181 羧基上的氧结合, 水分子的氧与另一个水分子中的一个氢原子相结合, 另一个水分子中的氧进攻  $\gamma$  磷酸,  $\gamma$  磷酸形成五角双锥结构, 然后高能磷酸键断裂。但是根据定点突变的研究结果, Ser181<sup>[43]</sup> 用谷氨酸代替, 并不能使水解终止, 说明假说 3 为非必要途径, 或者该途径不存在。假说 4, Lys185 path (盘基网柄菌肌球蛋白 II), 该假说认为, Lys185 在反应中作为一个一般性的基础, 从进

攻的水分子上提取一个质子。

Minehardt 等人<sup>[61]</sup>提出了假说 5, 他们同样认为 Lys185(盘基网柄菌肌球蛋白 II)在反应中作为一个一般性的基础, 但是并不是从进攻的水分子上提取一个质子, 而是作为酸, 去质子化  $\gamma$  磷酸。

Onishi 等人<sup>[51]</sup>提出了假说 6, 两个水分子的假说: 有两个水分子参与了催化过程, 一个溶解水  $W_1$ , 另一个为质子受体  $W_2$ .  $W_1$  与 Ser246(平滑肌肌球蛋白)主链羧基氧和  $\gamma$  磷酸中的一个氧形成氢键, 且能与 Arg247 的胍基基团作用. 当 Cleft 闭合后 Glu470 向 Arg247 移动形成盐桥, 然后从 Arg247 上释放出  $W_1$ , 它的两个氢原子分别与  $W_2$  的氧原子、Ser246 主链羧基氧键合. 构型的改变使  $W_1$  作为亲核试剂去攻击  $\gamma$  磷酸,  $W_1$  中的羟基与  $\gamma$  磷酸结合从而形成无机磷酸, 剩下的氢离子与  $W_2$  结合形成水合离子,  $W_1$  从而转变成溶解水,  $W_2$  则成为质子受体.  $W_2$  带的正电荷被 Glu470 的羧基和 Gly468 主链羧基氧所带的负电荷中和以达到稳定, 释放无机磷酸之后, ADP 所带的负电荷被 Asn242 的副链和 Gly180 主链氮带的正电荷中和, 这一模型可以通过晶体构象观察得到证实<sup>[51, 53]</sup>.

## 5 最新研究成果及展望

最新研究从三维结构等角度以及结构调节的结构区域方面全新破译了肌球蛋白的活性机制. 这一机制的进一步破译, 使人类进一步了解肌肉的力量来源. 最新研究揭示了肌球蛋白 V 活性的调节机制<sup>[62, 63]</sup>: 由于肌球蛋白 V 在体内的重要作用(V 型结合在膜上与膜泡运输有关<sup>[64]</sup>, 神经细胞富含肌球蛋白 V), 人们也对其进行了深入研究. 研究人员用低温电子 X 断层摄影法测出肌球蛋白 V 在非活性态的三维结构, 在这个结构中肌球蛋白 V 在头部和 S2 的连接处发生弯曲使得物质结合区接近催化区域的 ATP 结合腔指出 ATP 酶失去活性可能是由于核苷交换速率的降低引起的, 且在物质传递之后催化循环作用可能通过活性的起调节作用的肌动蛋白来传递而不是通过扩散. 根据肌球蛋白 II 和肌球蛋白 V 非活性态的构象结构和性质可以提出一个独特的催化循环工作机理: 肌球蛋白运输物资就像附着在一个连续循环的带子上的自动电梯来回运输包裹一样, 物质运输到肌动蛋白(+)末端时通过抑制 ATP 翻转的构象而不是通过肌动蛋白的结合来促进肌球蛋白停留在肌动蛋白上, 在肌动蛋白上

像踏车一样的旋转过程把肌球蛋白传递到肌动蛋白(-)末端, 新的物质结合在肌球蛋白上且使其活化, 开始新的催化循环<sup>[62, 63]</sup>.

肌球蛋白是生物体内的一大类蛋白, 且在生物体内起着举足轻重的作用. 如果对肌球蛋白的工作机理研究十分成熟, 这不但可以使人们更加了解生命体是如何将化学能转化为机械能的, 同时可以给人们设计分子机械提供很好的借鉴. 如: 随着对肌球蛋白 II 研究的深入, 可以从机理上解释心肌梗大等疾病, 并通过基因的手段治疗这类疾病; 对肌球蛋白 V 和 VI 研究的深入, 可以仿照其设计微型的分子传送机.

### 参考文献:

- [1] Sellers J R, et al. *J. Muscle Res. Cell Motil.* [J], 1996, **17**: 7 ~ 22
- [2] Bernardo J F, Marc C G, Dominique S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 2006, **103**: 3 681 ~ 3 686
- [3] Cope M, Jamie T V, Whisstock J, et al. *Structure* [J], 1996, **4**: 969 ~ 987
- [4] Hodge T, Cope M J T V. *J. Cell. Sci.* [J], 2000, **113**: 3 353 ~ 3 354
- [5] Mihalyi E, Szent-Gyorgyi A G. *J. Biol. Chem.* [J], 1953, **201**: 189
- [6] Mooseker M S, Cheney R E. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* [J], 1995, **11**: 633 ~ 675
- [7] Kreis T and Vale R (Eds). *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Second Edition. Oxford University Press Inc, New York. [M], 1999, ISBN 0 19 859956 0
- [8] Sellers J R. *Biochimica et Biophysica Acta.* [J], 2000, **1496**: 3 ~ 22
- [9] Clark M, et al. *Mol. Biol.* [J], 1974, **86**: 209 ~ 222
- [10] William F H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 1971, **68**: 685 ~ 689
- [11] Huxley A F, Niederke R. *Nature* [J], 1954, **173**: 971
- [12] Mary C R. *J. Cell Sci.* [J], 2000, **113**: 3 551 ~ 3 562
- [13] Holmes K C. *The limits of Reductionism in Biology*. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 213) [R], 1998, 76 ~ 92
- [14] Kron S J, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 1986, **83**: 6 272 ~ 6 276
- [15] Finer J T, et al. *Nature* [J], 1994, **368**: 113 ~ 119
- [16] Mehta A D, Rock R S, Rief M, et al. *Nature* [J], 1999, **400**: 590 ~ 593
- [17] Wells A L, Abel L W, Chen Li-Qiong, et al. *Nature* [J], 1999, **401**: 505 ~ 508

- [18] Ida L, Stephan S, Matthew W, *et al.* *The EMBO Journal* [J], 2004, **23**: 1 729 ~ 1 738
- [19] Uchida G, Chinzei T, Matsuura H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* [J], 1999, **257**: 223 ~ 227
- [20] Julie Menetrey, Amel Bahloul, Amber L Wells, *et al.* *Nature*[J], 2005, **435**: 779 ~ 785
- [21] Elzinga M, Collins J H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 1977, **74**: 4 281 ~ 4 284
- [22] Tong S W, ELzinga M. *J. Biol. Chem.* [J], 1983, **258**: 13 100 ~ 13 110
- [23] Elzinea M, Trus B. *J. Chromatography A* [J], 1980, **202**: 511
- [24] Tong S W, ELzinga M. *J. Biol. Chem.* [J], 1990, **265**: 4 893 ~ 4 901
- [25] Huszar G. *J. Biol. Chem.* [J], 1972, **247**: 4 057 ~ 4 062
- [26] Starr R, Offer G. *J. Mol. Biol.* [J], 1973, **81**: 17 ~ 31
- [27] Holmes K C, Popp D, Gebhard W, *et al.* *Nature*[J], 1990, **347**: 44 ~ 49
- [28] Kabsch W, Mannherz H G, Suck D, *et al.* *Nature*[J], 1990, **347**: 37 ~ 44
- [29] Rayment I, Rypniewski W R, Schmidt-Base K, *et al.* *Science*[J], 1993b, **261**: 50 ~ 58
- [30] Phan B C, Faller L D, Reisler E. *Biochemistry*[J], 1993, **32**: 7 712 ~ 7 719
- [31] Mamta S, Henry G D, Sykes B D, *et al.* *J. Biol. Chem.* [J], 1993, **268**: 7 093 ~ 7 100
- [32] Uyeda T Q P, *et al.* *Mat. Sci. Eng.* [J], 1994, **C2**: 1 ~ 11
- [33] Fisher A J, Smith C A, Thoden J B, *et al.* *Biochemistry* [J], 1995, **34**: 8 960 ~ 8 972
- [34] Smith C A, Rayment I. *Biochemistry*[J], 1996, **35**: 5 404 ~ 5 417
- [35] Yasunobu S, Makio T, Yasunori T, *et al.* *Biophys. J.* [J], 1995, **68**: 29s ~ 34s
- [36] Spudich J A. *Nature*[J], 1994, **372**: 515 ~ 518
- [37] Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. *Myosin and Actin Model.* Published by Garland Publishing, a member of the Taylor & Francis Group. [M], 1998
- [38] Sonja M S, Jeremy C S, Stefan F. *Biochemistry*[J], 2006, **45**: 5 830 ~ 5 847
- [39] Noriaki O, Kazunori Y, Junko U, *et al.* *Biophys. J.* [J], 2001, **81**: 2 786 ~ 2 794
- [40] Takashi S, Naoya S, Reiko O, *et al.* *Biochemistry*[J], 1997, **36**: 14 037 ~ 14 043
- [41] Kunkel T A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 1985, **82**: 488 ~ 492
- [42] Malnasi-Csizmadia A, Pearson D S, Kova cs M, *et al.* *Biochemistry*[J], 2001, **40**: 12 727 ~ 12 737
- [43] Li Xiang-dong, Troy E R, Reiko I, *et al.* *J. Biol. Chem.* [J], 1998, **42**: 27 404 ~ 27 411
- [44] Werber M M, Peyser Y M, Muhrad A. *Biochemistry* [J], 1987, **26**: 2 903 ~ 2 909
- [45] Johnson W C, Bivin J, Ue D B, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 1991, **88**: 9 748 ~ 9 750
- [46] Hiratsuka T. *J. Biol. Chem.* [J], 1992, **267**: 14 949 ~ 14 954
- [47] Yengo C M, Chrin L R, Rovner A S, *et al.* *J. Biol. Chem.* [J], 2000, **275**: 25 481 ~ 25 487
- [48] Park S, Burghardt T P. *Biochemistry* [J], 2002, **41**: 1 436 ~ 1 444
- [49] Onishi H, Konishi K, Fujiwara K, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 2000, **97**: 11 203 ~ 11 208
- [50] Malnasi-Csizmadia A, Woolley R J, Bagshaw C R. *Biochemistry*[J], 2000, **39**: 16 135 ~ 16 146
- [51] Onishi H, Ohki T, Mochizuki N, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 2002, **99**: 5 339 ~ 5 344
- [52] Hirofumi O, Shin-Ichiro K, Kzauo K, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* [J], 1998, **95**: 6 653 ~ 6 658
- [53] Onishi H, Ohki N, Morales M F. *Biochemistry* [J], 2004, **43**: 3 757 ~ 3 763
- [54] Webb M R, Trentham R D. *J. Biol. Chem.* [J], 1981, **10**: 10 910 ~ 10 916
- [55] Kull F J, Sablin E P, Lau R, *et al.* *Nature*[J], 1996, **380**: 550 ~ 555
- [56] Sablin E P, Kull F J, Cooke R, *et al.* *Nature*[J], 1996, **380**: 555 ~ 559
- [57] Smith C A, Rayment I. *Biophys. J.* [J], 1996, **70**: 1 590 ~ 1 602
- [58] Lü Gong-xuan (吕功煊). *J. Mol. Catal.* (分子催化) [J], 2006, **20**: 435 ~ 437
- [59] Rayment I. *J. Biol. Chem.* [J], 1996, **271**: 15 850 ~ 15 853
- [60] Kagawa H, Mori K. *J. Phys. Chem. B* [J], 1999, **103**: 7 346 ~ 7 352
- [61] Minehardt T J, Marzari N, Cooke R, *et al.* *Biophys. J.* [J], 2002, **82**: 660 ~ 675
- [62] Jun Liu, Dianne W T, Elena B K, *et al.* *Nature*[J], 2006, **442**: 208 ~ 211
- [63] Kavitha T, Takeshi S, John A H, *et al.* *Nature*[J], 2006, **442**: 212 ~ 215
- [64] Sellers J R, Veigel C. *Cell Biol.* [J], 2006, **18**: 68 ~ 73