

肌浆网钙泵蛋白的结构和功能及其蛋白单体的特性

陈 曦

(中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037)

提 要

肌浆网是细胞钙平衡的主要调节单位之一, 是胞浆钙离子浓度异常的重要研究对象。肌浆网结构组成简单, 便于分离纯化, 是理想的生物膜研究模型。本文介绍了肌浆网钙泵蛋白的分子结构、钙转运分子机制和钙泵蛋白的聚集状态及磷脂结构与钙转运的关系。

关键词 肌浆网; 钙泵蛋白; Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase; 溶性酶单体

肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 是指肌细胞中的滑面内质网, 主要生理功能为调节细胞内的 Ca^{2+} 浓度, 从而控制肌肉的收缩与舒张^[1,2]。SR 是细胞钙平衡、胞浆 Ca^{2+} 浓度异常的重要研究对象。肌浆网是一囊腔状膜性结构, 由于其结构组成简单, 尤其是骨骼肌肌浆网, 便于分离纯化, 所以它是除红细胞以外的另一个理想的生物膜研究模型。

一、肌浆网钙泵蛋白的分子结构

肌浆网包绕在肌原纤维细丝的周围, 分为纵行管和终池 (图 1)。纵行管主要负责钙摄取, 终池有钙释放功能^[2]。从分子结构看, SR 由蛋白和脂质组成, 前者占干重的 60%, 后者占 40%。蛋白中 70—90% 为 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, 即钙泵蛋白 (MW 约 100000), 它与蛋白磷脂 (proteolipid, MW6000 或 12000) 一起构成 SR 膜的内在蛋白。终池内还有肌钙钙蛋白 (calsequestrin, MW 67000—65000) 和钙结合蛋白 (MW55000) 等^[1,2]。SR 脂质中 80—90% 为磷脂, 其中绝大部分为胆碱磷脂 (PC) 和乙醇胺磷脂 (PE), 另外还有丝氨酸磷脂、肌醇磷脂、鞘磷脂和心磷脂等; 除磷脂外, 还含有中性脂 (占 10—20%), 胆固醇、甘油三脂和游离脂肪酸

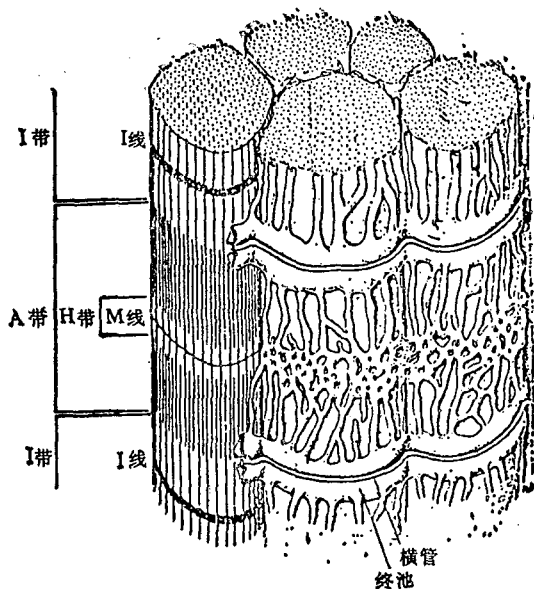


图 1 哺乳动物横纹肌纤维的 SR 结构

- (1) 横管 (transverse tubule) 由质膜凹陷形成;
- (2) 与纵行管相联的两个 SR 的终池 (terminal cisternae) 在横管处“接头”;
- (3) 两个终池与横管构成三联体;
- (4) SR-横管形成网状结构围绕每个肌原纤维并紧靠肌节

等^[1,2]。

钙泵蛋白 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) 通常以寡聚体形式存在 (二聚体居多)。电镜、X-光小角衍射技术研究表明 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 是两亲

性蛋白,其非极性部分插入脂双层、极性部分外露于介质中。冰冻蚀刻技术表明,蛋白颗粒在膜内呈不对称分布^[1]。

1970年 MacLennan 用脱氧胆酸盐和盐沉淀方法首次获得纯化的 $\text{SR Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 。Allen 用酶法和溴化氰法测出 $\text{SR Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 的氨基酸组成和 80% 的氨基酸序列(疏水结构无法测定)。1985年 MacLennan 用 cDNA 克隆方法获得全部氨基酸序列,并根据此一级结构和 X-光中子衍射图谱等提出该酶的空间结构模型(图 2)^[3]。此模型表示,钙泵蛋白为一跨膜蛋白,其疏水跨膜部分由 10 个 α -螺旋结构组成,露于膜外胞浆中是反平行的 β -折迭结构或 α -螺旋与 β -折迭交替连接的三个相对独立的区域,它们分别为转导区、磷酸化区和核苷酸结合区,三者成三角形排布。上述三个区域通过 5 个 α -螺旋与疏水跨膜区肽段相联。此 α -螺旋区为 Ca^{2+} 结合区。该区域中负电性氨基酸较多,可能与钙结合和钙转运有关^[3,4]。

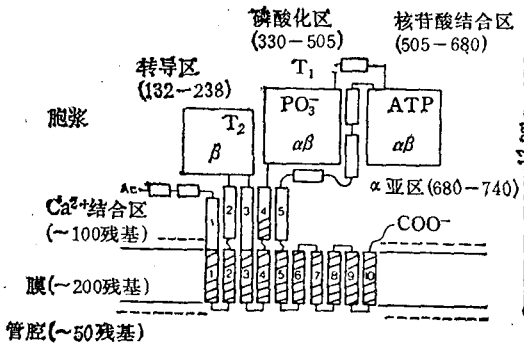


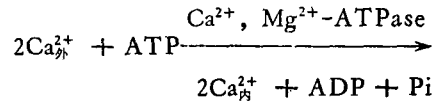
图 2 SR 钙泵蛋白的空间结构模型

SR 钙泵蛋白每个单肽链分子约含 1000 个氨基酸,其中 13 个为色氨酸 (Trp)。SR 内源荧光淬灭实验表明,大部分 Trp 位于膜水界面附近的疏水环境中,而且各 Trp 残基周围的疏水程度极为相近。外源荧光探针标记实验^[5]发现 $\text{SR Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 存在两种蛋白构象。一种为 E_1 构象,对 Ca^{2+} 亲和力高;另一种为 E_2 构象,对 Ca^{2+} 亲和力低。两种构象中 α -螺旋含量不同。两种亲和力的钙结合位点互相

有协同作用^[1]。 $\text{SR Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 的 ATP 结合位点也有两类,其高亲和力的结合部位是酶的催化部位。另外还有等量的低亲和力结合部位^[1,6],其功能是调节作用还是非特异性结合尚不清楚。荧光探针异硫氰荧光素 (FITC) 可特异结合于 ATP 高亲和力部位,此部位距脂双层表面 80 Å。另一种荧光探针 N-环己基-N'-(4-二甲氨基- α -萘基)-碳二亚胺 (NCD-4) 可特异结合于 Ca^{2+} 结合区, Ca^{2+} 结合部位距脂双层表面 20 Å。 Ca^{2+} 结合部位与 ATP 结合部位相距 30 Å 以上^[5,7]。

二、钙转运的分子机制

SR 主要的生理功能是 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 水解 ATP 并偶联钙转运。ATP 水解和钙转运的化学计量比为 1:2,即水解 1 分子 ATP,2 个 Ca^{2+} 跨膜转运^[1]



近 20 年来,人们对 $\text{SR Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 的催化反应机制进行了广泛的研究,相继提出多种反应循环模式图。从 Carvalho^[8]提出的模式图(图 3)可见,首先 Ca^{2+} 结合于酶,使酶活化;ATP 结合于酶,ATP 被水解,其末端磷酸被转移到酶上,形成磷酸化中间物 (EP);EP 构象发生变化,酶对钙的亲和力从高转至低,同时发生自由能的转化; Ca^{2+} 转位进入 SR 膜内;磷酸从 EP 解离,酶回复至原始状态。

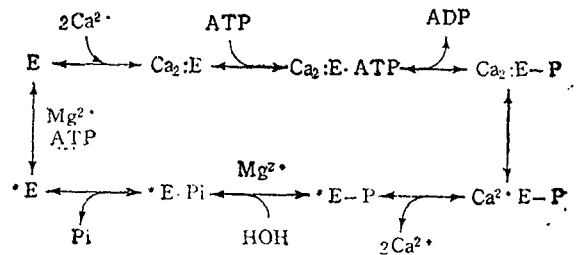


图 3 酶反应循环模式图

E: 酶具有高钙亲和部位,并向外取向的构象
*E: 酶具有低钙亲和部位,并向内取向的构象

随着研究的深入,人们对 $\text{SR Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 催化反应机制有了更详细的了解。

1. Ca 结合

Ca^{2+} 结合于 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 是酶激活所必需的, 激活常数约 $1\mu\text{mol/L}$, Ca^{2+} 的最适浓度为 $44\mu\text{mol/L}$, 高于 $200\mu\text{mol/L}$ 将抑制酶活力。 Ca^{2+} 的结合将伴有构象变化, 而且这种变化与酶活力的变化密切相关。 钙结合常数测定和快速动力学研究表明, 钙诱导的蛋白构象变化是在钙结合部位表观亲和力改变之后发生的, 即钙结合在先, 构象变化在后^[9]。 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 有许多钙结合位点, 它们对 Ca^{2+} 的亲和力不同, 最高者 $K_d = 1 \times 10^{-6}\text{mol/L}$, 相当于 $8-9\text{nmol Ca/mg}$ 蛋白。 无 ATP 存在的钙结合表现出正协同效应, 并且此效应随 pH 降低而减弱, 推测 H^+ 竞争性地结合于酶的 Ca^{2+} 结合部位^[1]。

2. 核苷酸的结合

SR Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 的 ATP 高亲和部位是酶的催化部位, 其 $K_d = 10^{-5}-10^{-6}\text{mol/L}$ (相当于 4nmol ATP/mg 蛋白), 酶反应与 ATP 浓度的关系存在两个 ATP 浓度范围, 分别为 $2-50$ 和 $100\mu\text{mol/L MgATP}$ 。 在低浓度 ATP 范围内, 酶活力随 ATP 浓度升高而升高, 但不符合简单的米-孟方程^[1]。 除 ATP 外, 其它核苷酸如 ITP, CTP, GTP, UTP, pNPP (p-Nitrophenyl phosphate) 等也可作为底物与酶结合, 它们都可通过与酶形成磷酸化中间物而得到利用, 但 ATP 是酶的最适底物, 反应速率高^[1]。

3. ATP 的水解和酶的磷酸化

ATP 水解使 ^{35}S Asp (351 位的门冬氨酸) 磷酸化 (速度常数为 100s^{-1})。 动力学研究表明, 此磷酸化的酶 (EP) 是 ATP 反应的中间物, 随后发生构象变化 (10s^{-1})。 此构象转变是钙转运的基础^[1]。 EP 中氨基酸特异性点突变研究^[10]发现, ^{233}Gly (甘氨酸) 是 SR 酶由 E_1 向 E_2 转变的关键氨基酸, 它被 Val (缬氨酸) 或 Arg (精氨酸) 置换后, SR 完全丧失钙转运功能。 ^{233}Gly 附近的其它 7 个氨基酸被置换后, 对 SR 功能无影响。 酶的磷酸化区 (见图 2) 中的氨基酸被侧链结构差异较小的氨基酸置换 (如异亮氨酸被亮氨酸置换) 仍可进行磷酸化和钙转运;

但若被侧链结构差异较大的氨基酸置换 (如异亮氨酸被苏氨酸置换), 钙转运功能损伤很大。

4. 钙转运和无机磷 (Pi) 的释放

酶磷酸化以后, 蛋白构象发生转变, 钙结合部位从面向外转为面向内, 同时钙亲和力降低, Ca^{2+} 进入 SR 囊腔内。 随后 Pi 从 EP 中释放出来, 酶恢复到原始状态, 开始新的催化反应循环。 有研究表明, EP 的脱磷酸化是由 ATP 调节的 (不是 MgATP 或 ADP), 而且此“调节作用”的 ATP 结合部位与酶的催化部位是同一部位, 即同一个 ATP 结合位点, 通过构象变化交替表现出催化部位和调节部位的功能。 很可能是酶磷酸化后, ATP 结合于 EP, 从而进入钙转运循环中^[11]。

钙释放并不是在酶磷酸化后立刻进行的, 而是先维持在一种特殊的排斥状态, 它与膜两侧均不靠近。 钙释放时, 伴有 Pi 的产生, 即 EP 水解。 释放钙的持续时间依赖于 ATP 浓度, ATP 耗尽后, 钙又连接到酶上, 这可能与酶的磷酸化和去磷酸化引起钙结合部位亲和力改变有关。

5. 钙泵的逆转和 ATP 的合成

在有钙负载的 SR 囊泡中加入 ADP 和 Pi , 可导致钙外流和 ATP 合成。 与钙泵的正反应类似, 中间产物为 EP, 但磷酸化的供体是 Pi , 此磷酸化过程不需 Ca^{2+} 浓度梯度, 只需在乏钙条件下进行^[12], 磷酸化中间物处于两种状态的平衡之间, 一是高势能的高钙亲和力的状态 ($E' \sim \text{Pi} \cdot \text{Ca}$) 它对 ADP 敏感, 另一是低势能的低钙亲和力的状态 ($E-P$), 它对 ADP 不敏感^[1,2]。

6. 膜脂的作用

SR Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 是一膜性酶, 将酶脱脂后, 酶活性完全丧失, 而再加回磷脂或用非离子去污剂替换磷脂, 酶活性完全恢复^[1]。 SR Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 的重组实验表明, 酶活力对磷脂的结构有明显的依赖关系^[13]。 在碳链长度方面以 C_{18} -PC 重组体的酶活力最高, 12 个碳原子烷基链长是维持酶活力所必需的, 磷脂碳链的长度与结合 Ca^{2+} 的数目有关^[14]。 碳链头

部基团与酶活力的关系,以 PC 最佳,其它头部基团和脂肪酸产生的活力均较低。比起酶活性,钙转运功能对磷脂结构的依赖性更强。乙醇胺磷脂 (PE) 对脂酶重组体具有钙转运功能是必需的,而乙酰-乙醇胺磷脂重组体的钙转运功能消失;若加入适量的硬脂胺或油胺,钙转运功能可以得到恢复。PE 的氨基被甲基化、糖基化或被大分子封闭,钙转运功能均受到抑制。二油酰乙醇胺磷脂 (DOPE) 和二油酰胆碱磷脂 (DOPC) 混合脂重组体的钙转运功能随 DOPE/DOPC 的比例上升而增强,下降而减弱^[15]。SR 钙泵功能与 SR 膜两侧的钙浓度梯差有关,而此梯差可能通过对膜脂的作用来调节钙泵蛋白的功能^[16]。

7. 钙的释放

SR 除有蓄积钙的功能外,还有释放钙的功能。所谓钙释放是指蓄积在 SR 终池中的钙释放到 SR 囊泡外部,即释放到胞浆中,从而引起肌肉收缩。然而这一领域中尚有大量问题有待研究。近几年对于钙释放的研究报道大大增加。目前人们认为钙释放通道位于 SR 终池膜上。终池的局部 Ca^{2+} 浓度在静息时达 $5 \times 10^{-2} \text{mol/L}$, 受强直性刺激后,降至 $3 \times 10^{-2} \text{mol/L}$, 有 $2 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ Ca^{2+} 释放到胞浆中。用快速光谱和单通道记录仪等手段测出钙释放通道是依赖于 Ca^{2+} 的, ATP、咖啡因、pH 改变等是其激动剂, Mg^{2+} 、钆红等是其抑制剂。用放射标记的 ryanodine (已知它在终池膜上有受体) 研究钙释放通道的结构特征,是目前采用较多的方法。现已分离纯化出 ryanodine 的受体,它具有钙释放通道活性,并具有与天然 SR 膜极为相似的性质^[17]。

关于钙释放的作用机制,有报道提出 T-SR 突触 (synapse) 假说,即随着 T 系统膜的离子通道被激活,在 T 膜和终池膜之间形成梁柱 (pillar) 样结构,兴奋期间开放此通道,允许 SR 膜去极化,引起钙释放,而 T 系统通过 T-SR 突触影响终池,其信号递质除了电闸门依赖性的膜内电荷粒子外,还有化学递质 Ca^{2+} 等^[18]。

三、肌浆网酶单体的性质

肌浆网钙泵蛋白主要以二聚体形式存在,还有四聚体和单体形式。SR Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 水解 ATP 作用和所偶联的 Ca^{2+} 跨膜转运是在二聚体上进行还是在单体上完成,尚不清楚。用 C_{12}E_8 (octa ethyleneglycol monododecyl ester) 和 Triton X-100 等非离子去污剂处理 SR, 获得溶性酶单体 (solubilized monomer), 或用 FITC 封阻 SR 双体中一个单体的 ATP 结合位点, 得到 SR 功能性单体 (functional unit), 即解除亚基间 ATP 结合位点的相互作用, 在这些条件下, 可观察 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 单体在催化循环各步骤中的性质变化。

溶性酶单体仍具有水解 ATP 的能力, 甚至 Ca^{2+} 依赖的 ATPase 活力升高, 然而 Mg^{2+} 依赖的 ATPase 活力降低。溶性酶的钙转运功能完全丧失, 即使在 SR 膜未完全溶解时, 其钙转运功能已明显降低, 甚至完全丧失, 这可能与膜的通透性增加有关^[19]。

溶性酶与天然的膜性酶一样具有高钙亲和力, 并且存在钙的协同效应 ($n = 1.8$), 推测 SR 蛋白双体中每一个单体上有一个钙结合位点, 但二者协同性不受脂质作用的影响。另一种可能是两种钙结合部位在同一单肽链上, 并且含有磷酸化部位, 即存在分子内部的协同^[19]。

在 ATP 存在下, 溶性酶也能形成磷酸化中间物并能使结合于 EP 上的钙释放出来, 也就是说导致 EP 对钙的亲和力降低^[20]。蛋白构象变化研究表明 ATP 诱导的钙释放与低钙亲和力的 E_2P 浓度成二倍的线性关系, 即转变出一个 E_2P , 便有 2 个 Ca^{2+} 释放, 说明单体 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 即可完成 ATP 水解、磷酸化中间物的形成和其构象的转变^[19,20]。

FITC 处理的 SR 功能性单体, 其酶活力对 ATP 浓度的依赖关系同于天然酶。酶完全失活所需的 FITC 量在溶性酶和膜性酶间亦无差别。

从钙泵逆转角度研究溶性酶单体的特性, 发现溶性酶在二甲亚砜 (对溶性酶单体有稳定

作用)存在下,可以通过 Pi 使酶磷酸化,并且在有 Ca^{2+} 的条件下,可进一步催化 80% 的磷酸基转移到 ADP 上,合成 ATP^[12]。

尽管溶性酶能像膜性酶一样能形成磷酸化中间物,并产生构象变化,也能完成钙泵逆转,但溶性酶 EP 的稳定性明显低于膜性酶,尤其在低钙浓度环境中。 Ca^{2+} 和磷脂有稳定溶性酶的作用^[19]。另据报道,SR 溶性酶中加 Ca^{2+} 时酶为双体,无 Ca^{2+} 时酶为单体,说明酶的稳定性与膜内蛋白聚体状况及相邻基团疏水性有关^[21]。有研究发现, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 与过量磷脂重组,其蛋白以单体形式存在,但该重组体仍有钙转运功能^[22]。

总之,多数研究者认为 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性对肽链的多聚态是非依赖性的,每一条单肽链能够经历酶循环反应中复杂的构象变化。溶性酶和膜性酶的主要差别在于第一,前者丧失钙转运功能;第二,无钙时溶性酶 EP 的稳定性降低。

关于肌浆网钙泵蛋白的分子结构、尤其是空间构象、活性中心的必需氨基酸、更精细的钙转运机制、膜脂的作用,脂和蛋白的相互作用及 SR 的钙释放机制等还有许多不清楚的问题,有待于人们去认识,去研究。

参 考 文 献

1 Inesi G, Kurzmack M. In: Champan D ed, *Biomembrane*

Structure and function, London: Macmillan Press, 1983: 355

2 陈兰英. 生命的化学, 1987; (1): 5

3 MacLennan D H et al. *Nature*, 1985; 316: 696

4 Clarke D M et al. *J Biol Chem*, 1989; 264(19): 11246

5 Pick U. In: Berman M C ed, *Membranes and Muscle*, Oxford: IRL Press, 1985: 175

6 Suzuki H et al. *Biochemistry*, 1990; 29(30): 7040

7 Mata A M et al. *Biochem Soc Trans*, 1989; 17(6): 1105

8 Carvalho M et al. *J Biol Chem*, 1976; 251: 3629

9 Dupont Y, Leigh J. *Nature*, 1978; 273: 396

10 Andersen J P et al. *J Biol Chem*, 1989; 264(35): 21018

11 Guillian F et al. In Stein W D ed, *Ion pumps: structure, function and regulation*, New York: Alan R Liss Inc, 1988: 183

12 McIntosh D B, Ross D C. *J Biol Chem*, 1988; 263: 12220

13 Fround R J et al. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 860: 354

14 Michelangeli F et al. *Biochemistry*, 1990; 29(36): 8307

15 Navarro J et al. *Biochemistry*, 1984; 23: 130

16 汪弋, 杨福愉. 生物物理学报, 1988; 4: 110

17 Cheisi M et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 154: 1

18 Rüegg J C. *Calcium in muscle activation: a comparative approach*, Berlin: Springer-Verlag, 1986: 36—45

19 Andersen J P et al. *J Biol Chem*, 1982; 257: 8300

20 Andersen J P et al. *J Biol Chem*, 1985; 260: 371

21 Welte W et al. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 984(2): 193

22 Heegaard C W et al. *J Biol Chem*, 1990; 265(20): 12020

[本文于1990年8月27日收到, 1991年1月24日修回]

灾区生产自救新技术——催长丰产素

该产品系最新研制而成, 属农作物生长激素。广泛施用于水稻、棉花、蔬菜及果树等, 每亩用量 2kg, 净重增产 10—20%, 每公斤成本 1.2 元, 参考售价 2 元。因丰产素是农用微肥的新一代产品, 市场前景广阔, 能有效地弥补国内农用微肥紧缺不足。适合小型化肥厂、乡镇企业接产。实施该项目需

要厂房 100 平方米, 设备投资: 5 千元, 主要设备: 粉碎机, 原料易购, 建厂月余即可生产, 且无环境污染。函授 100 元, 面授 400 元, 帮助建厂 5000 元。

[北京市星火技术研究所, 100024 北京 867 信箱 20816 组, 李群]