

- Sciences, 1997, **28** (1): 1~5
- 8 Artola R L, Conde C B, Bagatolli L, *et al.* High density lipoprotein from hypercholesterolemic animals has peroxidized lipid and oligomeric apolipoprotein AI: its putative role in atherogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **239** (2): 570~574
 - 9 Nakajima T, Sakagishi Y, Katahira T. Characterization of specific monoclonal antibody 9F 5-3a and the development of assay system for oxidized HDL. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **217** (2): 407~411
 - 10 Acton S, Rigotti A, Landschulz K T, *et al.* Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996, **271** (2): 518~520
 - 11 Fluiter K, Vietsch H, Biessen E A. Increased selective uptake *in vivo* and *in vitro* of oxidized cholesterol esters from high density lipoprotein by rat liver parenchymal cells. *Biochem J*, 1996, **319** (pt2): 471~476
 - 12 吴满平, 成安, 陈佩芳, 等. 高密度脂蛋白氧化修饰对大鼠巨噬细胞胆固醇流出的影响及其机制. *上海医科大学学报*, 1997, **24** (5): 335~338
Wu M P, Cheng A, Chen P F, *et al.* *Acta Academiae Medicine Shanghai*, 1997, **24** (5): 335~338
 - 13 Kamiyama S, Yamato T, Furukawa Y. Inhibition effects of lipid oxidation on the activity of plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, **62** (5): 941~946
 - 14 Mackness M I, Durrington P N. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 1995, **115** (2): 243~253
 - 15 Takahashi Y, Chiba H, Matsuno K. Native lipoproteins inhibit platelet activation induced by oxidized lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **222** (2): 453~459
 - 16 Hurtado I, Fiol C, Gracia V. *In vitro* oxidized HDL exerts a cytotoxic effect on macrophages. *Atherosclerosis*, 1996, **125** (1): 39~46
 - 17 Girona J, La-Ville A E, Heras M. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF- α secretion by THP-1 human macrophages. *Free Radic Biol Med*, 1997, **23** (4): 658~667
 - 18 Cominacini L, Garbin U, Pastorino A M, *et al.* Effects of troglitazone on *in vitro* oxidation of LDL and HDL induced by copper and endothelial cells. *Diabetologia*, 1997, **40** (2): 165~172
 - 19 Laureaux C, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, *et al.* Alpha-tocopherol enrichment of high density lipoproteins: stabilization of hydroperoxides produced during copper oxidation. *Free Radic Biol Med*, 1997, **22** (1~2): 185~194

Progress of Oxidative High Density Lipoprotein Research. FU Qiang, LIU Bing-Wen (*Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*).

Abstract Plasma high density lipoprotein (HDL) can be oxidized *in vitro* and *in vivo* as can low density lipoprotein (LDL), which causes many changes in HDL properties, such as peroxidation of polyunsaturated fatty acids, hydrolysis of phosphatidylcholine, apolipoprotein aggregation or degradation. HDL oxidative modification *in vivo* might be induced by arterial endothelial cells, macrophages and blood polymorphonuclears, monocytes. Ox-HDL might metabolize through scavenger receptors but not normal HDL receptors. Ox-HDL has many atherogenic roles. Vitamin E, C supplementation can inhibit HDL oxidation and may prevent the atherosclerosis.

Key words high density lipoprotein, oxidatively modification, atherosclerosis, reverse cholesterol transport, antioxidants

分子发动机研究进展

王宏斌 王金发

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 分子发动机是利用化学能/化学势进行机械做功的生物大分子, 包括线性分子发动机与旋转式分子发动机两大类. 它们参与了胞质运输、DNA 复制、基因转录、ATP 合成/水解等一系列重要生命活动过程. 目前对于各种分子发动机的结构及作用机制的研究取得了一些重要进展.

关键词 分子发动机, 线性分子发动机, 旋转式分子发动机

学科分类号 Q771

在生物界中有一类能利用化学能/化学势进行机械做功的生物大分子, 称为分子发动机. 近 10 年来通过晶体结构探测、单分子研究技术的运用并结合遗传学分析, 对于分子发动机的研究取得了一

些重要进展. 分子发动机依据其作用的方式可分为线性分子发动机与旋转式分子发动机两大类. 分子

Tel: (021) 84039179, E-mail: ls19@zsu.edu.cn

收稿日期: 1999-06-16, 修回日期: 1999-10-18

发动机在生命活动中具有重要作用, 引起了科学家们极大的兴趣, 并正努力探寻其作用机制.

1 线性分子发动机

线性分子发动机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. 主要包括肌球蛋白、驱动蛋白、DNA 解旋酶和 RNA 聚合酶等.

1.1 肌球蛋白 (myosin)

目前发现至少存在 15 种肌球蛋白, 它们参与了包括肌肉收缩、趋化性、胞质分裂、胞饮作用、靶向小泡运输 (targeted vesicle transport) 及信号传导等在内的细胞活动. 其中肌肉肌球蛋白是研究得较为深入的一类肌球蛋白, 它以肌动蛋白 (actin) 为线性轨道, 其运动过程与 ATP 水解相偶联. 肌肉肌球蛋白是一个高度不对称的蛋白质, 包括两个称为 S1 (subfragment-1) 的球状头部和一个 α 螺旋卷曲螺旋尾部 (α -helical coiled-coil tail), S1 作为动力作用的核心, 具有一个含 ATP 结合位点及肌动蛋白结合位点的“催化区”. 催化区通过两条 α 螺旋结构的轻链组成的“颈部”与尾部连接. 通过 X 晶体衍射结构分析发现, S1 中的 ATP 结合位点与肌动蛋白结合位点间存在一个“裂缝 (cleft)”^[1], 这个裂缝不但沟通了两个活性位点, 而且还可能在机械做功中的构型改变过程中起关键作用. 有研究表明, 在 ATP 水解过程中, S1 区域确实发生了明显的构型改变^[2].

肌球蛋白在肌肉收缩过程中可能的作用机制是: 在肌肉放松时, 肌球蛋白的 S1 与肌动蛋白分离; 在肌肉收缩时, S1 则与肌动蛋白结合, 这一结合同时诱导了 S1 “催化区”的活性. 当 ATP 水解后产生的 P_i 从 S1 内的活性位点释放时, 肌球蛋白与肌动蛋白的亲和力增加, 同时将产生的应力通过一个支点 (可能是 Cys-707 残基) 传递至“颈部”, 颈部便向着肌动蛋白的有钩末端倾斜从而带动尾部的滑动. 这时, ADP 同时释放出来, 而 ATP 的重新结合则导致了肌球蛋白与肌动蛋白的分离. 在这里颈部被认为是充当了一个杠杆, 将 S1 活性位点上的亚纳米级的结构变化放大为颈部与尾部结合处的几个纳米级的运动^[3].

ATP 水解循环与机械作用的偶联方式仍不清楚. 现在的推测是, ATP 在 S1 催化位点上水解后, 肌球蛋白才与肌动蛋白相结合, 这一结合导致了“cleft”区域的构型改变, 并在产生动力的同时

释放 P_i ^[3].

1.2 驱动蛋白 (kinesin)

在真核生物中, 驱动蛋白是一类以微管蛋白为轨道, 沿微管的负极向正极运动并由此完成各种细胞内外运输活动的分子发动机. 驱动蛋白包括两个球状头部、一个颈部和一个扇状尾部, 其中作为动力区的两个球状头部同时具有酶学和动力学活性.

目前对驱动蛋白的运动机制提出了一个“hand-over-hand”模型^[4], 推测它以步行的方式沿微管运动, 其中驱动蛋白的两个头部交替与微管结合, 由此保证了任何时候都至少有一个头部与微管结合 (图 1). 实验表明, 当与微管结合时, 驱动蛋白两个头部活性亚基的 ATP 结合活性与 ATP 水解活性是不对称的, 即一个表现出 ATP 水解活性而另一个表现出 ATP 结合活性^[5]. 这一结果支持了“hand over hand”模型, 表明了 ATP 的结合/水解驱动了驱动蛋白亚基沿微管的持续运动. 对于 ATP 水解与机械运动之间的化学机械偶联, 目前还很不清楚. 而对于机械步行运动的具体方式也没有一个广为接受的模型. 另外, 最新研究发现, 驱动蛋白超家族中一类单头 (single-headed) 蛋白 KIF1A 也能沿微管作持续性运动, 可见步行假说还有待进一步研究^[6].

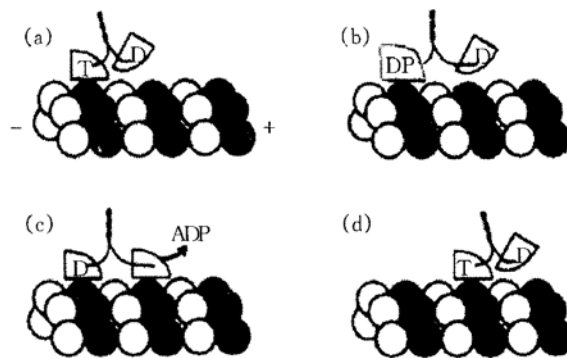


图 1 驱动蛋白的“hand over hand”模型

T: ATP; D: ADP; DP: ADP- P_i .

驱动蛋白沿微管运动的步幅是一定的, 为 8 nm, 因为驱动蛋白仅与微管的 β 亚基结合 (微管由 α 和 β 亚基组成), 而每两个 β 亚基间的间隔为 8 nm. 可是驱动蛋白的两个头部呈旋转对称 (约 120°), 它们的微管结合位点间的距离为 5.5 nm, 小于驱动蛋白运动的步幅^[7]. 这个矛盾目前仍无法解释. 但值得注意的是: 在驱动蛋白中, 通过一个卷曲螺旋结构的颈部连接两个活性头

部, 其中的连接区域是一个保守的序列. 这个区域内有可能存在着某些功能位点, 起到协调作用, 或者通过卷曲螺旋结构的解旋来解决这一问题^[8].

1.3 动力蛋白 (dynein)

动力蛋白与驱动蛋白一样, 是通过与 ATP 水解相偶联机制沿着微管运动的分子发动机. 动力蛋白大家族中包括了鞭毛动力蛋白、胞质动力蛋白等亚类, 是细胞中一类重要的蛋白质, 并且也是最早被发现的一类分子发动机蛋白.

动力蛋白是一个多亚基复合物, 由两条重链、三条中间链和四条轻链组成. 重链的 COO⁻ 末端形成球状头部, 能与微管相互作用, 可能是其动力作用的核心^[9]. 重链区有四个 P 环基元 (P-loop motif), 形成核苷酸结合位点. 研究发现, 紧靠这四个 P 环的下游区域参与形成了微管结合部位, 并且在与微管的结合过程中至少有四个不同的位点协同作用, 表明动力蛋白与微管间的作用相当复杂^[10]. 研究发现胞质动力蛋白参与细胞内运输作用时还会与一类动力蛋白激活蛋白复合物相结合, 二者协同作用完成运输功能^[9].

尽管动力蛋白是最早发现的一类分子发动机蛋白, 但由于其结构复杂, 对其研究远不如驱动蛋白与肌球蛋白深入, 直到最近才由 Samsó 等^[11]首次对胞质动力蛋白的头部动力区作了三维结构分析. 但对于动力蛋白的作用机制, 尚不清楚. 有推测认为动力蛋白具有与驱动蛋白和肌球蛋白类似的颈部区域, 在动力蛋白的运动过程中起重要作用.

1.4 DNA 解旋酶 (DNA helicase)

DNA 解旋酶作为线性的分子发动机, 以 DNA 分子作为轨道, 与核苷三磷酸水解所释放的能量相偶联, 在释放 NDP 与 Pi 的同时将 DNA 双链分开成两条互补单链. DNA 解旋酶与驱动蛋白超家族的成员一样, 能够沿着聚合轨道移动一定的距离而不发生脱离 (即持续性运动), 以此保证 DNA 复制得以迅速进行. 这里, DNA 解旋酶利用辅助分子形成一个“滑动夹 (sliding clamp)”将 DNA 套住, 从而保证其作用的持续性.

目前对 *E. coli* 中的 DNA 解旋酶 Rep 研究得较多. 实验表明, Rep 在没有与 DNA 结合时为单体, 一旦与 DNA 结合则立即二聚化, 二聚体中的两个亚基均可与 DNA 单/双链结合. 核苷酸的结合调控了二聚体与 DNA 的结合状态: a. 当没有核苷酸结合时, 二聚体中只有一个亚基与单链 DNA (ss-DNA) 结合, 另一个亚基则为自由状态 (称为 P₂S

二聚体). b. 在结合 ADP 时, 两个亚基均与单链 DNA 结合 (称为 P₂S₂ 二聚体). c. 当二聚体与 ATP 结合时, 两个亚基分别与单链 DNA 和双链 DNA 结合 (称为 P₂SD 二聚体). 据此 Lohman^[12]提出了一个“激活滚动模型” (active rolling model) (图 2), 推测了 DNA 解旋酶的作用机制.

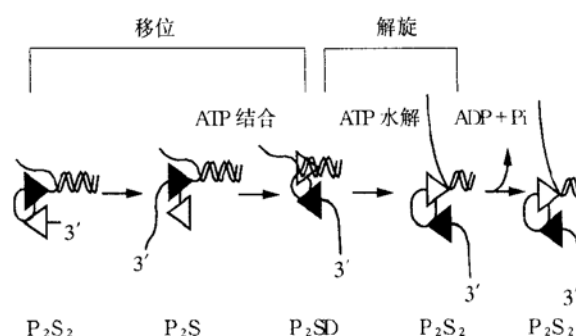


图 2 DNA 解旋酶的“激活滚动模型”

1.5 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP)

在 DNA 转录的过程中, RNAP 沿 DNA 模板迅速移动, 其消耗的能量来自核苷酸的聚合及 RNA 的折叠反应. 此化学机械过程与肌球蛋白、驱动蛋白等的运动相类似, 因此 RNAP 也被认为是一类分子发动机. 但是由于 RNAP 在转录过程中表现出了不同的运动方式, 同时作为基因表达的最主要的调控目标, 它表现出更大的化学复杂性, 因此其机械过程也更为复杂.

RNAP 参与的转录包括了一系列的复杂过程: 在转录起始前, RNAP 与 DNA 结合并在 DNA 双链上随机滑动直至遇到启动子位置, 此时需要起始因子的作用启动转录; 转录开始后又会伴随着起始因子的释放; 在转录延伸过程中 RNAP 在 DNA 上移位; 最终由 DNA 序列的终止信号引发转录的终止. 目前所知, RNAP 为多亚基酶, 并且具有强制的持续性, 其所产生的 RNA 链最长可达 10⁶ nt, 而且一个 RNAP 分子所释放的 RNA 链不会被其他的 RNAP 分子所延伸. RNA 链延伸的催化循环过程至少包括: a. 核糖核苷三磷酸 (NTP) 分子的结合; b. RNA 3' 羟基替换 NTP 的焦磷酸; c. PPi 分子释放; d. 新的 RNA 3' 核苷移位以空出 NTP 结合位点^[13].

由于作用的复杂性, 生化研究所获得的数据十分有限, 至今对于 RNAP 在转录中的化学机械过程了解得很少. 最近, 人们才对其进行了初步的动力学研究^[14, 15].

2 旋转式分子发动机

旋转式分子发动机是一类将化学能/化学势转化为机械做功的生物大分子,这类分子作用时并不是沿着一个线性轨道作相对运动,而是作类似定子与转子间的旋转运动,相比之下,其作用方式更像是人类社会中所使用的发动机.细菌鞭毛发动机与 F_1F_0 ATP酶是这类分子发动机的代表.

2.1 细菌鞭毛发动机 (bacterial flagellar motor)

细菌鞭毛发动机作为一种特殊的分子发动机,其能量来源并非 ATP 水解,而是质子或 Na^+ 穿过细胞膜所产生的电动势.

细菌鞭毛结构很复杂(图3),目前已发现了三类基因与鞭毛运动有关: *fla*、*mot* 和 *che*. 在它们所编码的蛋白质中, FliG、FliM、FliN、MotA 和 MotB 可能是发动机的重要组成部分. FliG、FliM 和 FliN 都是胞质蛋白,三者共同组成一个开关复合物,这个复合物有两个稳定构象,通过两个稳定的构象间变换,从而导致了鞭毛转动方向的逆转. 基因突变的研究表明^[16],在这三个蛋白质中, FliN 可能起稳定结构的作用; FliM 对于构象间的变换十分重要;而 FliG 则直接参与了力矩的产生,也可能协同 FliM 参与构象间的变换. MotA 通过四次跨膜形成一个质子通道,它可能具有传递质子跨膜及利用质子产生力矩的作用. MotB 同样也是一个跨膜蛋白,但仅跨膜一次,它的作用可能是将发动机部分锚定于肽聚糖上,同时协同 MotA 形成质子通道. 在这里, MotB 和 MotA 可能组成了定子, FliG 则作为转子的组成部分. 有人认为在质子跨膜流动时, MotA 与 C 环间的相互作用产生了

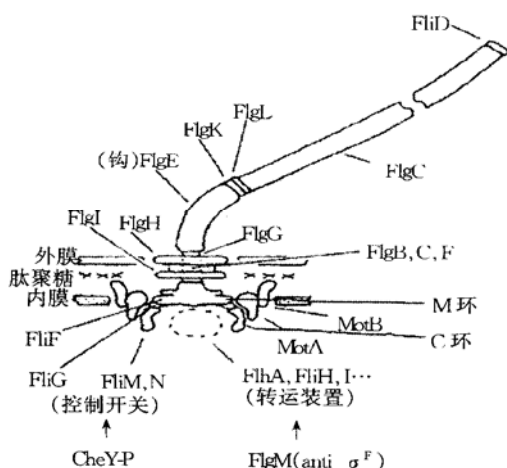


图3 细菌鞭毛的结构图^[17]

力矩^[17]. 现在已证明 MotA 与 FliG 中的某些带电残基对于发动机分子的旋转运动至关重要,并由此推测可能在定子-转子间存在着一定的静电作用^[18]. Lloyd 等^[19]最近对 FliG 的 C 端作了晶体结构研究,并对定子-转子间的相互作用进行了探讨.

2.2 F_1F_0 ATP酶 (F_1F_0 ATPase)

ATP 合成酶是由嵌于线粒体内膜上的 F_0 和突出于膜外的 F_1 两部分组成,当质子通过 F_0 流入线粒体时, F_1 中便合成了 ATP, 这个合成过程是完全可逆的,通常将 F_1 部分称为 F_1F_0 ATP酶. 质子流经 F_0 部分与在 F_1 部分中 ATP 的合成/水解这两个过程可能是通过 F_0 与 F_1 间共轴旋转相偶联.

现在对于 ATP 合成酶的结构已经比较清楚, F_1 部分由 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 亚基组成,其中 $\alpha_3\beta_3$ 亚基围成一圈,而 γ 亚基则位于中央,类似一个中轴. F_0 部分则由 ab_2c_9-12 亚基组成,作为质子通道. Timothy 等提出了一个 ATP 合成酶中能量转化过程的模型(图4),他们认为由 $ab\alpha_3\beta_3\delta$ 组成了“定子(stator)”, $c\gamma\epsilon$ 则形成“转子(rotor)”. 当质子穿过 a 和 c 之间的通道时产生了力矩,从而推动了转子与定子间的相对转动,在 F_1 中合成了 ATP^[20]. 晶体结构研究表明,三个 β 亚基上各有一个催化位点,它们的性质各不相同. 如果从 F_0 的方向看去,在顺时针方向上三个 β 亚基依次是: 结合 AMP-PNP (一个 ATP 类似物)、结合 ADP、空载 (不结合任何物质)^[21]. 因此有可能 γ 亚基上的活性位点与 β 亚基上的不同催化位点间的移动导致了 ATP 的水解/合成.

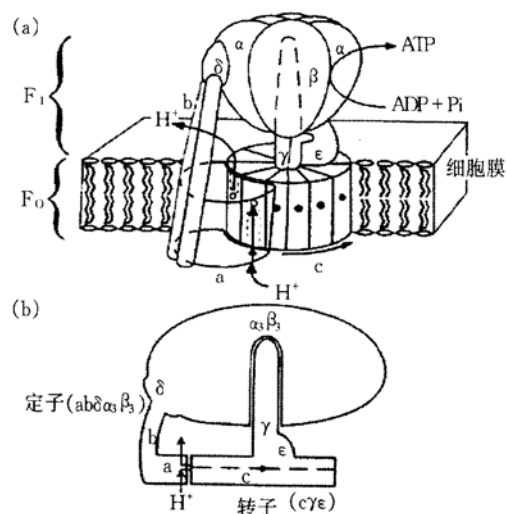


图4 F_0F_1 ATP 合成酶结构示意图

目前已经可以在光学显微镜下观察到 F_1 中 γ 亚基的旋转运动, 但现在还没有直接的证据显示在 F_0 中有亚基作旋转运动。

3 结 语

分子发动机作为一类生物大分子, 在生物体内起着举足轻重的作用。但到目前为止, 对于分子发动机的研究还十分有限, 分子机理仍不清楚, 其中包括化学机械偶联是如何进行的, 如何将化学变化/反应产生的能量转变为机械运动等等。虽然现有的模型也很多, 但都有待从结构学、生物化学和生物物理学等各方面着手进行深入研究。近些年来, 单分子技术与光捕获技术的结合运用, 为分子发动机的研究提供了很好的实验手段^[22]。

另外一个值得注意的问题是: 各种分子发动机之间的关系如何, 是否有某种内在联系? 现有的研究表明, 在已知的分子发动机中, 除了细菌鞭毛发动机外, 其余均由核苷酸驱动, 而且在它们的核苷酸结合位点附近存在着共同的修饰结构。因此有观点认为: 在分子发动机蛋白质家族中, 可能存在一个普遍的作用机理, 而发动机分子与轨道分子 (在旋转式分子发动机中也可将定子看作轨道, 而转子在这一轨道上作循环运动) 的结合与发动机分子本身构型的改变之间的关系可能正是了解这一作用机制的关键^[23]。

参 考 文 献

- 1 Rayment I, Rypniewski W R, Schmidt-Base K, *et al.* Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*, 1993, **261** (5117): 50~58
- 2 Sugimoto Y, Tokunaga M, Takezawa Y, *et al.* Conformational changes of the myosin heads during hydrolysis of ATP as analyzed by X-ray solution scattering. *Biophys J*, 1995, **68** (4 Suppl): 29s~34s
- 3 Goldman Y E. Wag the tail: structural dynamics of actomyosin. *Cell*, 1998, **93** (1): 1~4
- 4 Hackney D D. Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (15): 6865~6869
- 5 Ma Y Z, Taylor E W. Interacting head mechanism of microtubule-kinesin ATPase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (2): 724~730
- 6 Okada Y, Hirokawa N. A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science*, 1999, **283** (5405): 1152~1157
- 7 Kozielski F, Sack S, Marx A, *et al.* The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, 1997, **91** (7): 985~994
- 8 Lohman T M, Thorn K, Vale R D. Staying on track: common features of DNA helicases and microtubule motors. *Cell*, 1998, **93** (1): 9~12
- 9 Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 1998, **279** (5350): 519~527
- 10 Koonce M P. Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J Biol Chem*, 1997, **272** (32): 19714~19718
- 11 Samsó M, Radermacher M, Frank J, *et al.* Structural characterization of a dynein motor domain. *J Mol Biol*, 1998, **276** (5): 927~937
- 12 Moore K J M, Lohman T M. Helicase-catalyzed DNA unwinding: energy coupling by DNA motor proteins. *Biophys J*, 1995, **68** (4 Suppl): 180s~185s
- 13 Gelles J, Landick R. RNA polymerase as a molecular motor. *Cell*, 1998, **93** (1): 13~16
- 14 Wang M D, Schnitzer M J, Yin H, *et al.* Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, 1998, **282** (5390): 902~907
- 15 Wang H Y, Elston T, Mogilner A, *et al.* Force generation in RNA polymerase. *Biophys J*, 1998, **74** (3): 1186~1202
- 16 Lloyd S A, Tang H, Wang X, *et al.* Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J Bacteriol*, 1996, **178** (1): 223~231
- 17 Berg H C. Torque generation by the flagellar rotary motor. *Biophys J*, 1995, **68** (4 Suppl): 163s~167s
- 18 Lloyd S A, Whitby F G, Blair D F, *et al.* Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature*, 1999, **400** (6743): 472~475
- 19 Zhou J, Lloyd S A, Blair D F. Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (11): 6436~6441
- 20 Elston T, Wang H Y, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, 1998, **391** (6666): 510~513
- 21 Abrahams J P, Leslie A G, Lutter R, *et al.* Structure at 2.8 Å resolution of F_1 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 1994, **370** (6491): 621~628
- 22 Mehta A D, Rief M, Spudis J A, *et al.* Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science*, 1999, **283** (5408): 1689~1695
- 23 Oplatka A. Are rotors at the heart of all biological motors? *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **246** (2): 301~306

Advances in the Studies of the Molecular Motor.

WANG Hong-Bin, WANG Jir-Fa (School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China).

Abstract Molecular motors are the proteins that translate the free energy/electrochemical gradient into mechanical work. They are generally divided into two classes: one is linear motor, including myosin, kinesin, dynein, RNA polymerase and DNA helicase, the other is rotary motor, such as F_1 -ATPase and the bacterial flagellar motor. The molecular motors play an important role in the cell transport, DNA replication, transcription, and ATP synthesis.

Key words molecular motor, linear motor, rotary motor