

肌酸激酶研究进展

徐 堤

(中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037)

提 要

本文旨在介绍近年来肌酸激酶研究的进展。内容主要包括: 该酶一级结构特点, 同源性比较以及由此推出的可能进化途径; 该酶基因的结构、定位和表达调节等。

关键词 肌酸激酶, 一级结构, 进化途径, 基因结构和表达

肌酸激酶 (E.C. 2.7.3.2) 全名为 ATP: 肌酸磷酸转移酶, 简称 CK (creatine kinase), 它通过催化反应 $\text{ATP} + \text{肌酸} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{磷酸肌酸}$ 而参与细胞内的能量转运活动——磷酸肌酸穿梭^[1](图 1)。

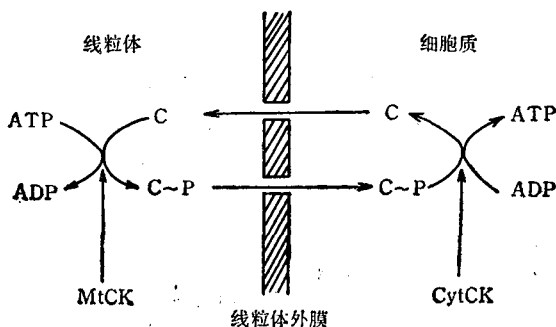


图 1 磷酸肌酸穿梭示意图

C: 肌酸 C~P: 磷酸肌酸 (~表示高能键)

由于磷酸肌酸分子比 ATP 小得多, 容易通过线粒体外膜, 也容易在胞浆内扩散, 因此磷酸肌酸穿梭尤其适用于能量代谢旺盛的组织 and 细胞, 这也说明了为什么 CK 会大量存在于骨骼肌、心肌、脑、视网膜、精液等处。其它类型的组织细胞中也存在少量 CK, 因此有人提出细胞内有两条能量运输途径, 一条是在能量代谢旺盛时才启用的磷酸肌酸穿梭, 另一条是在一般情况下使用的腺苷酸穿梭。

由图 1 可见, 要完成磷酸肌酸穿梭需要位

于线粒体外的胞浆 CK (CytCK) 和位于线粒体内的线粒体 CK (MtCK) 共同参加。

CytCK 为二聚体, 广泛存在于各种亚细胞结构上, 并通过与它们的 ATPase 在功能上相偶联而使磷酸肌酸在转换成 ATP 后能够直接供能。至少已发现 CytCK 与肌细胞 M 带的结合是可逆的, 而且这种可逆结合还能调节能量的利用, 因此这可能是 CytCK 调节细胞能量分布和利用的普遍方式。

MtCK 有二聚体和八聚体两种形式, 它们之间可以相互转变。八聚体 MtCK 位于线粒体内膜的外表面, 与 ATP:ADP 移位酶 (ANT) 在结构和功能上相偶联, 把 ANT 产生的 ATP 转变成磷酸肌酸, 同时, 还与线粒体外膜作用, 将产生的磷酸肌酸运出线粒体。二聚体 MtCK 存在于线粒体内外膜之间的介质中, 不参与这一转运活动。多种因素可以改变二、八聚体间的动态平衡, 并由此调节能量的产生和运输。

CytCK 和 MtCK 都有同工酶, 它们的分布有明显的组织和发育阶段的特异性, 这反映了 CK 基因表达的特异性调节。CytCK 有三种同工酶, 分别由 B、M 亚基两两组合而成。BB 型存在于胚胎细胞中, 也存在于成年动物的各种细胞中, 其中以在脑中的含量为最多; BM 型主要存在于心肌中; MM 型主要存在于成年动物骨骼肌和心肌中。B、M 亚基分别由 b-cytc

和 α -cytck 两基因编码。

现已知道, MtCK 也有脑型和肌型两种同工酶^[2], 分别由不同的基因编码^[3], 其中编码脑型 MtCK 的基因可在多种细胞中表达, 而编码肌型的却只在肌肉中表达。

由上可见, CK 不但可用于细胞能量代谢的研究, 还可用于基因表达调节的研究。近年来分子克隆技术的应用使 CK 的研究取得了较大进展, 下面将有关内容分别予以介绍。

CK 一级结构的研究

一、一般情况

到目前为止, 用直接测定蛋白质顺序的方法只测出了少数 CK 的部分顺序, 而自 1984 年开始采用分子克隆技术研究 CK 以来, 由 cDNA 顺序推出了完整氨基酸顺序的 CK 就有: 鸡、大鼠、小鼠、兔、狗和人 CytCK 的 M 亚基; 鸡、大鼠、兔、狗和人 CytCK 的 B 亚基; 鸡和人 MtCK 的 M 亚基; 人 MtCK 的 B 亚基; 两种鳐鱼电器官的 CK。其中一种鳐鱼的 CK 还得到了在 *E. Coli* 中的表达产物。

从它们的一级结构可以看出, 所有的 CytCK 均有 381 个氨基酸, 而 MtCK 的氨基酸数目因亚基不同而不同, 人 MtCK B 亚基为 378 个, M 亚基为 380 个, 鸡 MtCK M 亚基也为 380 个。MtCK 信号肽的氨基酸数也不相同, 人 MtCK B 亚基为 38 个, M 亚基为 39 个, 鸡 MtCK M 亚基只得到部分顺序, 但它们都有线粒体间质蛋白信号肽所共同具备的特点。

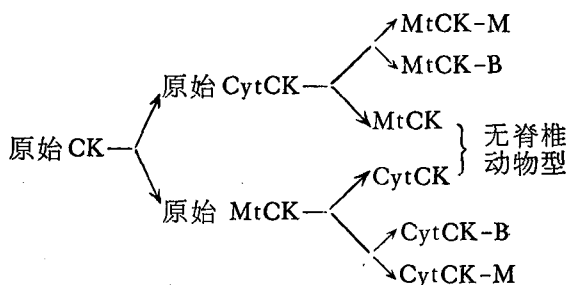
二、同源性及其意义

比较一级结构同源性后发现 CK 同工酶家族在进化上高度保守, 如以 381 个氨基酸计算, 在所有已知的 CK 亚基中完全相同的就有 201 个^[4], 同源性高达 52.8%。

另外, 同一种属内 CytCK 的 B 亚基和 M 亚基的同源性大于它们分别与 MtCK 的同源性^[5,6], MtCK 的 B、M 两亚基同源性也比它们与 CytCK 的同源性大, 说明 CytCK 与 MtCK 之间的分化先于 CytCK B、M 两亚基和 MtCK B、M 两亚基之间的分化。据计算^[7], CytCK 两

亚基分化的时间大约在脊椎动物出现前后, 这就提示原始的甚至现存的无脊椎动物体内均有 CK, 这与传统的观点相反, 但实际上的确如此, 因为最近有人在无脊椎动物海胆的细胞内发现有 CK 存在, 并得到了 cDNA 克隆。不过与脊椎动物不同, 它的 CytCK 为单体, 比脊椎动物的 CytCK 亚基大两倍, 有分别与 B、M 两亚基同源的区域, 表明它可能未经 B 型和 M 型的分化。其 MtCK 为多聚体, 详细情况不得而知。

根据以上分析, 我们在此提出 CK 同工酶的可能进化途径如下:



三、功能的定位

(1) ATP 结合部位 根据同源性比较, 推断 289—295 这段区域可能是 ATP 结合部位^[7], 因为它位于活性 Cys-283 附近, 其顺序在所有 CK 中高度保守, 含有被认为有核苷酸结合功能的顺序 LGXGXGXGV。

(2) MtCK 的线粒体结合部位 用化学修饰的方法发现兔 MtCK N 端的 Arg-19 和 Lys-20 能与心磷脂的静电作用而使 MtCK 与线粒体内膜外表面结合^[7]。从一级结构上分析, MtCK 在这两个位点高度保守而 CytCK 却不然, 说明这种结合机制可能也存在于其它生物中。由于 ANT 也能与心磷脂静电结合, 因此有人推测 MtCK 与 ANT 的结构偶联是通过心磷脂完成的。

(3) CytCK M 亚基与 M 带的结合部位 用 DNA 重组技术发现只有含 CytCK M 亚基 C 端部分的嵌合 CK 才能与鸡肌细胞 M 带相结合^[8], 说明其结合部位在 C 端。据报道 CytCK M 亚基实际上参与了 M 带的组成。

CK 基因的结构和表达

一、CK 基因的特点

迄今为止已克隆到人^[9]、大鼠^[10]、小鼠^[11]的 CytCK M 亚基,人^[12]、大鼠^[10] CytCK B 亚基以及人 MtCK B 亚基^[4]的基因。CytCK 之间或 MtCK 之间都有许多共同的结构特点,分别用人 CytCK M 和 MtCK B 亚基的编码基因表示如下(图 2)。

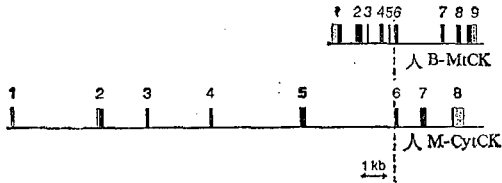


图 2 CK 基因结构示意图^[7]

由上图可见,CytCK 基因有 8 个外显子和 7 个内含子,第一、第二和第八外显子内部有非转译顺序,各 CytCK 基因之间只有内含子大小和非转译区长短的不同。对 CytCK M 亚基的基因而言,它还有一个许多肌专一性基因都具有的特点,那就是有一个很长的第一内含子。

MtCK 基因有 9 个外显子和 8 个内含子,非转译区位于第一和第九外显子中。MtCK 和 CytCK 基因之间只有第六外显子在长短、编码顺序在整个分子中的位置等特点上完全相同^[4]。

人的 CK 基因都已在染色体上定位^[13],CytCK B、M 亚基和 MtCK B、M 亚基的编码基因分别位于第 14、19、15 和 17 号染色体上,另外在 16 号染色体上也有 CytCK B 亚基基因的同源顺序。

二、CK 基因的表达

1. 转录水平的调节

(1) 调节顺序

CytCK B 的基因有两个相互重叠的启动子^[10,12],每个启动子包括 CAAT box 和 TATA box 各一个。人 CytCK B 基因除此之外还有三个 Sp1 结合位点^[12]。

CytCK M 的基因只有一个启动子,人和小鼠的还有两个 CArG box^[9,11],小鼠 CytCK M 基因的 5' 侧区和第一内含子中都有一个肌专一性增强子^[14]。转基因动物实验发现前者在骨骼肌和心肌中都起作用,后者只在骨骼肌中起作用^[15],这种差异很可能是由调节因子引起。

人 MtCK B 基因没有 CAAT box 和 TATA box,只有两个 GC box^[4]。

(2) 调节蛋白

CK 基因的表达与许多调节蛋白有关,其中研究得比较多的是:大鼠 CytCK B 基因上游 TATA box 结合因子 TARP (TA-rich recognition protein)^[16],肌专一性增强子结合因子 MEF₁ 和 MEF₂ (myocyte-specific enhancer-binding factor)^[17,18],成肌细胞专一性增强子结合因子 MBF₁ (myoblast-specific enhancer-binding factor)^[18]。

TARP 可能是通过与上游 TATA box 结合而使转录因子 TFIID 只能与下游 TATA box 结合,结果转录由此启动。

MEF₁ 是在培养的肌细胞中发现的,竞争实验表明它能与小鼠 CytCK M 基因 5' 侧的和第一内含子中的增强子结合,进一步的研究发现它很可能就是新近发现的肌肉分化因子 Myo D^[19],因为它们不论免疫特性还是识别的 DNA 顺序都相同。但 MEF₁ 存在于肌细胞中而 Myo D 却表达于成肌细胞中,因此前者可能是后者的活化形式。Myo D 只在骨骼肌中表达,这可能与前面述及的 CytCK M 基因两增强子在转基因动物中的不同表现有关。

Myo D 不但调节 CK 基因的表达,还调节包括自身基因在内的许多肌专一性基因的表达,其直接与调节顺序相结合的是一个碱性区和一个 myc 同源区,它们广泛存在于许多转录调节蛋白中,根据其结构特点,将它们统称为 helix-loop-helix 调节蛋白家族。现在又发现该家族的另一成员 myogenin 也能直接或间接以二聚体的形式与 CytCK M 基因上的 Myo D 识别位点相结合,调节蛋白 E12 和 Myo D 形成的异二聚体也有此功能,提示 Myo D 能与

该家族的其它蛋白共同调节不同情况下肌专一基因(包括 CK 基因)的表达。

MEF₂也是在培养的肌细胞中发现的,但不同于 MEF₁的是它并非由非活化的形式转变而来,而是在去除培养基中生长因子后经蛋白质合成而产生。比较人、大鼠和小鼠 CytCK M 基因的 MEF₂ 识别顺序发现 $\begin{smallmatrix} C \\ T \end{smallmatrix} TAAAAATA-AC \begin{smallmatrix} C & C & C \\ T & T & T \end{smallmatrix}$ 这样一个富含 AT 的核心区。体外实验还发现,MEF₂ 的识别顺序只有在多拷贝时才有强的增强子活性,其在体内的作用机制还有待深入研究。

MBF₁只存在于成肌细胞中,识别位点和 MEF₂完全相同,据认为它可能是一个负调节因子。

虽然未曾发现与 CytCK M 基因的 CA₂G box 相结合的蛋白,但已经证实 CBF 和 MAPF₂这两种调节因子能竞争性地与 actin 基因的 CA₂G box 结合,不过 MAPF₂只存在于肌细胞中。CBF 原来就是血浆应答因子 (serum response factor, SRF),它能使所结合的 DNA 发生弯曲。

2. 其它水平的调节

人 MtCK M 亚基的 mRNA 和 c-myc, hsp 70 的 mRNA 一样都有很长的 5' 非转录区^[3],有可能也同这些基因一样受控于转录弱化调节。鸡 CytCK B 亚基的 mRNA 可通过选择性拼接机制产生亚型^[20],本来选择性拼接是肌专一性蛋白的 mRNA 产生亚型的普遍机制,M型 CK 是否如此还不清楚。蛋白质加工也参与了 CK 的转译后调节,因为直接测定氨基酸顺序发现有的 CK 的 N 末端并非都是甲硫氨酸^[6]。是否还有其它的调节机制尚有待进

一步的研究。

本文承蒙医学院心血管病所陈兰英老师和基础所琦祖和老师审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Bessman S P, Carpenter C L. *Annu Rev Biochem*, 1985; 54: 831
- 2 Schlegel J, Wyss M, Schiirch U *et al*. *J Biol Chem* 1988; 263(32): 16963
- 3 Hass R C, Struss A W. In Press
- 4 Hass R C, Korenfeld C, Zhang Z *et al*. *J Biol Chem*, 1989; 264(5): 2890
- 5 Buskin J N, Jaynes J B, Chamberlain S D *et al*. *J Mol Evol*, 1985; 22: 334
- 6 Babbitt P C, Kenyon G L, Kuntz I D *et al*. *J Protein Chem*, 1986; 5(1): 1
- 7 Cheneval D, Carafoli E. *Eur J Biochem*, 1988; 171 (1/2): 1
- 8 Schafer B W, Perriard J C. *J Cell Biol*, 1988; 106: 1161
- 9 Trask R R V, Strauss A W, Billadello J J. *J Biol Chem*, 1988; 263(32): 17142
- 10 Benfield P A, Graf D, Kotolkoff P N *et al*. *Gene*, 1988; 63: 227
- 11 Jaynes J B, Chamberlain J S, Buskin J N *et al*. *Mol Cell Biol*, 1986; 6(8): 2855
- 12 Daouk G H, Kaddurah-Daouk R, Putney S *et al*. *J Biol Chem*, 1988; 263(5): 2442
- 13 Stallings R L, Olson E, Struss A W *et al*. *Am J Hum Gen*, 1988; 43: 144
- 14 Sternberg E A, Spizz G, Perry W M *et al*. *Mol Cell Biol*, 1988; 8(7): 2896
- 15 Johnson J E, Wold B J, Hauschka S D. *Mol Cell Biol*, 1989; 9(8): 3393
- 16 Hobson G M, Mitchell M T, Molloy G R *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(18): 8925
- 17 Buskin J N, Hauschka S D. *Mol Cell Biol*, 1989; 9 (6): 2627
- 18 Gossett L A, Kelvin D J, Sternberg E A *et al*. *Mol Cell Biol*, 1989; 9(11): 5022
- 19 Lassar A B, Buskin J N, Lockshon D *et al*. *Cell*, 1989; 58: 823
- 20 Perriard J C, Hossle J P, Schafer B W *et al*. *Cellular and molecular biology of muscle development*. New York: Alan R Liss Inc, 1989: 545

[本文于1989年11月11日收到,1990年5月10日修回]