

# 枯草杆菌蛋白酶与蛋白质工程

毕汝昌 储乃明

(中国科学院生物物理研究所,北京 100080)

## 提 要

在以蛋白质三维结构及其与功能关系为基础的蛋白质工程的兴起中,枯草杆菌蛋白酶的定位诱变起了重要作用。以该酶为代表的蛋白质的工程研究,反映了这种生物技术所取得的进展和存在的主要问题。虽然,为了达到工程改造蛋白质的目标仍需要做大量基础性研究,但目前取得的成果足以说明蛋白质工程发展的光明前景。

**关键词** 枯草杆菌蛋白酶,蛋白质工程,蛋白质,定位诱变

## 一、引 言

近几年,作为研究和改造蛋白质的一门技术,蛋白质工程获得了迅速发展。在这一研究领域里,酶是进行工程研究的最佳对象,因为对这类蛋白质的结构与功能关系了解得较清楚,而且酶具有最广泛的实际应用。枯草杆菌蛋白酶的工程则是开展得最早和最多的一项研究。该种酶是由芽孢杆菌分泌出来的一类丝氨酸蛋白质水解酶,分子量为27—29kD。枯草杆菌蛋白酶 BPN' (简称 BPN' 酶) 产生于解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*), 将它选为蛋白质工程的研究对象,是由于它具有一系列优越条件: 已知包括同源酶在内的各种状态的三维结构,且结构测定精度相当高;对该酶的活性部位及作用机制了解较好;有克隆化基因,并能高效表达。此外,该酶也便于动力学研究。另一方面,枯草杆菌蛋白酶是一种重要的工业用酶,特别是大量用作合成洗涤剂中降解蛋白质的组分,1983年世界年产量已达几百吨。因此,国际上许多学术单位或公司的实验室争相对枯草杆菌蛋白酶进行了多方面的工程研究<sup>[1]</sup>。这些研究为蛋白质工程提供的范例,不但为该酶的性能改造开辟了途径,而且更重要

是为蛋白质工程的发展做出了重要的贡献。

本文将以枯草杆菌蛋白酶工程为主要例子,介绍蛋白质工程研究的基础、进展、问题和前景。

## 二、三 维 结 构

蛋白质的生物功能与其分子的三维结构密切相关,改造分子的工程设计应该以结构与功能关系的知识为基础。因此,天然和修饰后的蛋白质的结构测定或预测是进行蛋白质工程所必需的,而且为了预测其性能的变化一般需要高精度的结构数据。在测定蛋白质三维结构方面,虽然二维核磁共振已能测定100多个氨基酸的小蛋白质的溶液构象,X射线单晶衍射方法仍是最重要的手段。据统计,用该方法已测定了50多个不同状态枯草杆菌蛋白酶的三维结构,其中包括来源于不同芽孢杆菌的BPN'酶和Carlsberg酶(来自地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis*) 及其与底物类似物或抑制剂的复合物以及许多BPN'酶的突变体<sup>[2-6]</sup>。最近还发表了由真菌产生的两个枯草杆菌蛋白酶类蛋白酶的高分辨率结构<sup>[7]</sup>,它们具有较高的热稳定性。

从获得能结晶的蛋白质制剂到结构精确化,单晶衍射法的研究周期较长。在未测得结

构之前，用理论或半经验方法预测蛋白质的三维结构是有益的。要预测由成千上万个原子构成的蛋白质分子的三维结构，目前只有基于已知结构知识的模型构建方法<sup>[6]</sup>是现实的和比较有成效的，用比较方法构建同源蛋白质结构的方法已获得了较广泛的应用。在同源性足够高的情况，应用这种方法获得的诸如酶的活性中心等重要部位的结构特征能用于研究与配体的相互作用。显然，这类方法从构建初始结构模型到模型优化，尽可能多地利用同类已知结构的规律性知识是有利的。我们对从枯草杆菌 (*B. Subtilis*) 分离出来的枯草杆菌蛋白酶E的结构预测作了尝试，并在能量优化中首次使用了原子平均温度因子制约模型的能量修正。

已知结构的比较表明，不同来源或不同状态的枯草杆菌蛋白酶的结构非常相似，由氨基酸序列或结晶环境的差异引起的结构变化基本上都发生在分子表面区域，特别是在构象柔性较大的环区。该类酶的外形近似呈心脏状，分子由一条肽键折叠而成，属  $\alpha/\beta$  型蛋白质。接近分子中央处有一高度扭曲的多股  $\beta$  折叠层，至少八段  $\alpha$  螺旋成逆平行堆积在该  $\beta$  层的两边。在分子表面，除了有许多水分子的结合位点外，还有几个钙离子的结合部位。虽然该酶与胰蛋白酶类蛋白水解酶的三维结构完全不同，但处于分子表面一浅槽里的活性残基的几何配置却惊人的相似，由残基 Ser221, His64 和 Asp32 构成丝氨酸蛋白酶的催化三联体。

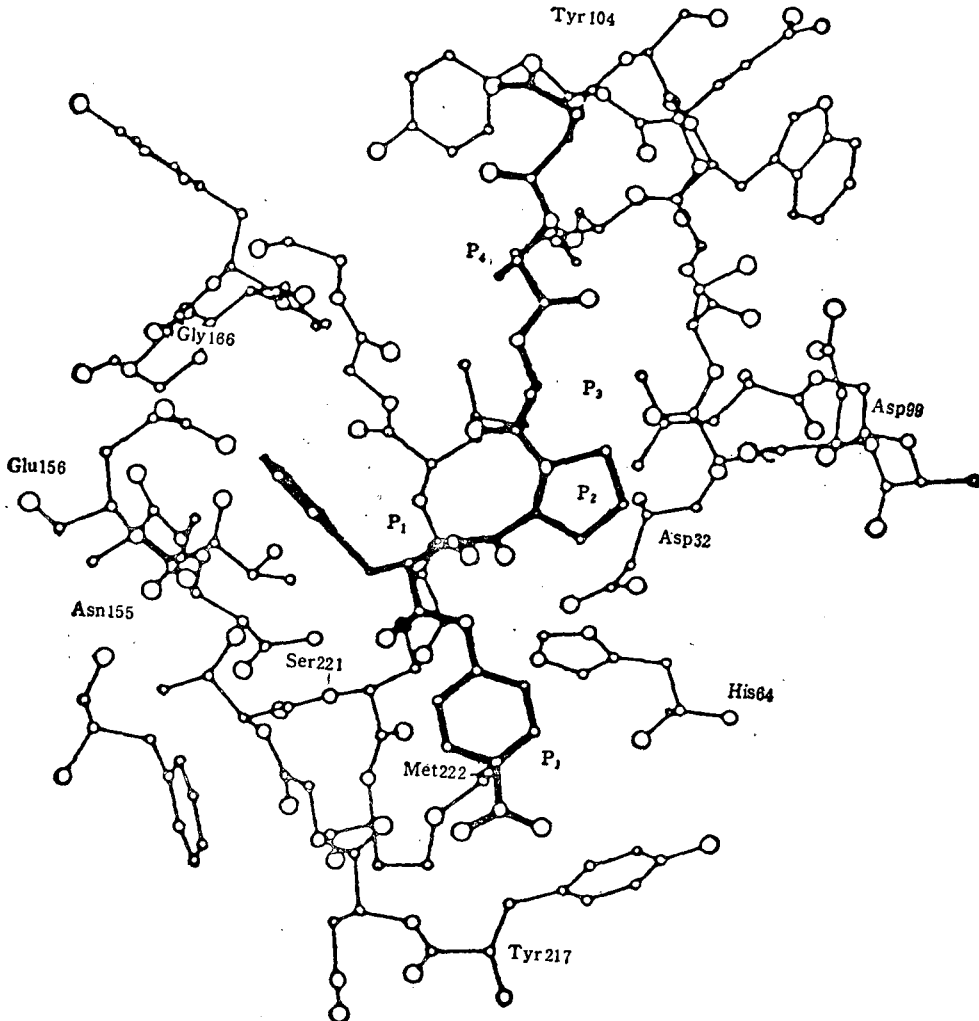


图1 枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的活性部位及与其结合的一模型底物(粗线)<sup>[6]</sup>

酶与某些抑制剂复合物的结构测定结果<sup>[2,4]</sup>指出, 抑制剂或底物与酶的相互作用主要局限于裂解肽键两边的少数 P<sub>1</sub> 残基和酶表面相应的 S<sub>1</sub> 亚结合部位(见图 1), 其中以 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 残基与其相应的 S<sub>1</sub> 和 S<sub>2</sub> 结合口袋接触最多。

以上述方法获得的结构知识为基础, 并考虑其他结构和功能研究所得的信息, 可以根据研究目的设计定位诱变方案, 进而应用基因工程技术获得突变体。图 2 给出蛋白质工程研究周期所包括的主要步骤。

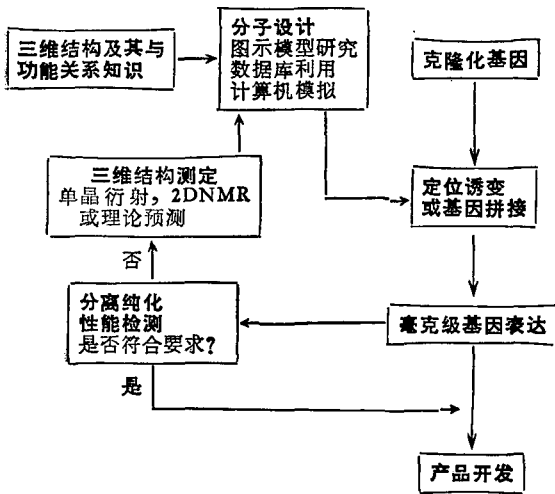


图 2 蛋白质工程周期

### 三、进展和成就

蛋白质工程的目标是改造蛋白质或创造新型蛋白质, 使之具有天然蛋白质所没有的性能, 以满足人类的需要。然而, 在对蛋白质结构与功能关系缺乏深入理解的情况下, 蛋白质工程更重要的作用在于它是能动地研究蛋白质结构与功能关系的有力手段, 它较化学修饰或半合成方法具有更多的优点。目前蛋白质工程已取得的成就也主要体现在这一基础理论研究领域内的进展。从研究的广度和深度来讲, 枯草杆菌蛋白酶的工程研究能提供最好的例证。下边分几个方面介绍已取得的成果和进展。下文中介绍的绝大多数工程实验都是用 BPN' 酶完成的, 未作特别说明的均指该酶。

#### 酶的专一性和催化机理

按照酶的催化理论, 底物与酶形成复合物,

然后底物被活化而形成过渡态, 进而经过中间态最后导致脱离酶的产物。对于酰化为限速步骤的肽键水解的酶促反应, 米氏常数  $K_m$  可衡量酶-底物复合物的解离常数, 而该复合物到过渡态的转换速度可用转换数  $k_{cat}$  来表达, 一般用  $k_{cat}/K_m$  来表示催化效率或专一性。Fersht 以 Tyr-tRNA 合成酶为模型, 运用基因定位诱变技术, 通过测量野生型酶及其突变体动力学参数, 研究了催化过程中自由能的变化<sup>[9]</sup>。酶催化过渡态理论认为, 反应速度的提高归于过渡态稳定化, Fersht 的系统研究为此提供了直接证据, 而且表明底物和酶的运动能使两者在过渡态中的结合更紧密。更多酶的蛋白质工程研究, 不但使一些残基在催化中的作用明确化, 而且对深化有关底物专一性和某些酶的催化机制的认识做出了重要贡献。

残基 Glu156 和 Gly166 位于枯草杆菌蛋白酶 S<sub>1</sub> 结合口袋。当借助定位诱变赋予位于口袋底部的 Gly166 残基不同的侧链体积和疏水性, 或与第 156 位残基一起赋予不同荷电性质时, 对具有不同 P<sub>1</sub> 残基的底物的专一性产生的影响<sup>[1,10]</sup>, 充分显示了立体的、疏水和静电作用的互补性对底物结合专一性的重要性。更有趣的是能把 BPN' 酶的专一性转化为类似于 Carlsberg 酶的专一性, 只要将其与底物残基侧链关系密切的三个残基逐步改换成后者的残基<sup>[1]</sup>。对位于活性部位的 Ser221, His64, Asn155 等残基也做了替换, 这些直接或间接对稳定过渡态有重要贡献的残基的改变都会使  $k_{cat}$  大大降低<sup>[1,10]</sup>, 而枯草杆菌蛋白酶 E 中看来与过渡态无多大关系的 Ile31 换成 Val31 却可使  $k_{cat}$  提高几倍<sup>[11]</sup>。突变体 His64Ala 能够按照模型预测那样进行底物辅助催化, 而且可使对 HisP<sub>2</sub> 底物催化专一性相对提高 800 倍以上。若再将能提高野生型酶活性的三个突变加进去, 那么可使突变体对于特殊底物的  $k_{cat}/K_m$  提高近 20 倍<sup>[12]</sup>。

20 多年以前, Blow 基于胰凝乳蛋白酶三维结构提出了电荷转接系统, 以此描述丝氨酸蛋白酶的催化机制, 这一常被称为催化三联体

中 Ser 和 His 分别起着亲核催化剂和一般酸碱催化作用,而对 Asp 的具体作用则认识不一。Craik 及其同事用工程手段对鼠胰蛋白酶三联体的 Asp 变为 Asn 的研究<sup>[43]</sup>表明,内埋的 Asp 残基的重要作用在于使 His 正确定位和提供静电稳定作用。这样,更准确地讲,催化三联体可能像一个电荷稳定系统行使催化功能。枯草杆菌蛋白酶的工程结果指出,三联体中一个换成 Ala 与三个同时换成 Ala 的后果相类似,都使  $k_{cat}$  降低几个数量级<sup>[4]</sup>。丝氨酸蛋白酶的活性对 pH 的依赖性与其活性残基 His 的  $pK_a$  值相关。用工程手段改变酶活性对 pH 依赖性,首先是在枯草杆菌蛋白酶上实现的。该酶分子表面残基 Asp99 和 Glu156 都距活性残基 His64 达  $10 \text{ \AA}$  以上,分别用 Lys 替换得到的双突变体在低离子强度下可使其  $pK_a$  值下移一个 pH 单位<sup>[44]</sup>,而对底物结合有贡献的 Tyr104 用 Phe 取代却能使 pH 活性范围向碱性方向扩展。

### 稳定性

蛋白质的稳定性是蛋白质正常发挥生物活性的重要前提,因而对稳定性的研究具有广泛的兴趣,改善稳定性是蛋白质工程的重要目标之一。Matthews 及同事对 T<sub>4</sub> 溶菌酶的许多突变体做了较系统的分析,较具体地展示了蛋白质结构的稳定因素<sup>[45]</sup>,并成功地用工程手段获得了稳定的变异体。引入工程二硫桥能够使 T<sub>4</sub> 溶菌酶和某些蛋白质的热稳定性提高,但在枯草杆菌蛋白酶上的尝试却有不完全相同的报道结果<sup>[4]</sup>,这也与该酶自溶等复杂行为干扰热力学检测密切相关。另外,不难理解,工程二硫桥的设计应遵循严格的几何要求,任何原存在的有利作用的破坏或应变的产生都会使稳定效果减弱,甚至导致的总效果是降低的热稳定性。

一些酶常因被氧化或其他对残基的修饰作用而丧失活性。枯草杆菌蛋白酶就是这样的酶,其原因是靠近活性残基 Ser221 的地方有一可被氧化的甲硫氨酸 Met222,该残基氧化后增大的体积不利于酶与底物的作用。因此,很自然地将抗氧化选为枯草杆菌蛋白酶工程的

一个目标。已用盒式突变技术获得 BPN' 酶的抗氧化突变体(如 Met222Ala 和 Met222Ser 等),使其在延长的时间内可抗  $1 \text{ mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,但其催化活性明显降低<sup>[4]</sup>。王培之等人用定位诱变方法制备的枯草杆菌蛋白酶 E 的类似突变体,也具有相当强的抗氧化能力。如果能将这类突变体用于含漂白剂(一种氧化剂)的洗涤剂,则可以获得较好的经济效益。

已用不同方法辨认出枯草杆菌蛋白酶里 20 多个起稳定作用的氨基酸替换。从 X 射线晶体结构分析结果得出,该酶结构中存在  $\text{Ca}^{2+}$  的结合部位,而  $\text{Ca}^{2+}$  结合得多少可影响热失活速度。根据这样的思想,用定位诱变手段增强了该酶的热稳定性。在蛋白质改造未能达到真正工程化以前,与表型筛选相结合的体外随机突变已被证明不失为达到改造目的的有效办法。例如,用该办法获得了热稳定的突变体 Asn218Ser,随后的 X 射线结构分析揭示出,该位残基侧链与相邻主链构成的一氢键有所改进<sup>[4]</sup>。鉴于蛋白质折叠状态相对于其伸展状态的稳定自由能相当小 ( $21-63 \text{ kJ/mol}$ ),局部个别作用的优化就可能使稳定性明显改善。通过量热学测量得知,枯草杆菌蛋白酶里一些稳定氨基酸替换各增加伸展自由能  $1.3-5.4 \text{ kJ/mol}$ ,而且在它们的组合变异体里各自的贡献是可相互加和的<sup>[46]</sup>。根据此思想,用逐步定位诱变的方法创造了极为稳定的多突变体,其半衰期为野生型的 1000 倍。

### 作用力和性能预测

应用蛋白质工程手段,能够按意愿改换蛋白质中相互作用的残基,因而为定量地评估各种作用力提供了机会;另一方面,越来越多系统变化的突变体及其性能测定也为检验各种概念或表达式准备了实验基础。因此,蛋白质工程也能够为理解和预测蛋白质的结构和性能变化做出重要贡献。

Fersht 等人用蛋白质工程较系统地研究了 Tyr-tRNA 合成酶催化反应中氢键的作用,推算出非荷电基团间氢键的贡献为  $2.1-6.3 \text{ kJ/mol}$ ,而成键基团中有一个是荷电基团的氢键

能为 13—21kJ/mol<sup>[9]</sup>。这种定量的测量表明,对于生物专一性非荷电氢键不是重要的决定因素,而复合物上的未水合荷电氢键受体或给体基团则是一个更重要的因素。氢键能够通过稳定过渡态而明显降低活化能,进而改变  $k_{cat}$ 。曾用 Thr 替换枯草杆菌蛋白酶里的 Asn155,因而除去了过渡态复合物中 Asn155 与四面体的负氧离子形成的氢键,使得过渡态稳定自由能升高 19.6kJ/mol,这时  $k_{cat}$  缩小 2500 倍。

精确地模拟静电作用对理解蛋白质的结构和功能至关重要。枯草杆菌蛋白酶工程为检验静电作用的各种计算模型提供了丰富实验数据。它的活性残基 His64 与荷电残基的相互作用最先被选为分析的对象。将处于水环境的蛋白质处理为低介电常数连续介质由高介电常数连续介质围绕着的非均一系统,并在数值计算上克服了蛋白质与水的复杂边界问题,从而计算了一些残基突变引起的电荷变化对 His64 所产生的静电势差,并由此推出其  $pK_a$  的变化。其结果是令人鼓舞的,计算值与实验得到的  $pK_a$  移动符合较好<sup>[17]</sup>。这说明长程静电作用对某些残基  $pK_a$  的影响是可以预测的。这些计算还表明,蛋白质的电荷间长程相互作用能够用简单的库仑定律来估算,只是需要将其中的介电常数用有效介电常数来替换。更出乎意料的是,在绝大多数情形中有效介电常数取值 30 到 60 之间。这一发现突出了蛋白质本身含有强极性组分的事实。在用定位诱变技术改变枯草杆菌蛋白酶对  $Ca^{2+}$  的亲合性实验中,基于库仑定律估算的金属离子结合常数变化与观测值吻合较好。

自由能的计算是蛋白质突变体性能预测的关键环节,近几年的一重大突破是用自由能微扰方法计算相对的自由能差值,进而定量预测突变对酶动力学的影响。这一计算机模拟方法的应用也首先在枯草杆菌蛋白酶上获得成功<sup>[18]</sup>。基于该酶 1.8 埃分辨率结构,用该方法和分子动力学计算了三肽底物被天然酶及其突变体 (Asn155Ala) 催化时的结合及活化自由能的差值。计算结果表明这一突变导致的活化

自由能变化较结合自由能的变化大一个数量级,而且很接近后来知道的实验确定的能量值。

#### 四、问题和前景

按分子手术类型可将目前从事的蛋白质工程分为三种:一种是用基因定位诱变技术改变天然蛋白质的性能,上面介绍的枯草杆菌蛋白酶的工程就属于这一类;第二种是用基因拼接或融合技术组合不同蛋白质或功能结构域,使重组的分子具有新的复合性能。在这类工程当中,抗体工程已取得重要进展<sup>[19]</sup>。独特的结合专一性使抗体或其结合结构域与诸如酶、毒素等分子可组成具有新的效应功能的联合体,例如具有抗癌细胞专一性的免疫毒素。最后,蛋白质工程可用于创造自然界不存在的全新蛋白质。这种利用蛋白质结构规律从头设计的工程也已迈出了重要的一步,按设计要求已合成了具有所愿望肽链折叠方式的多肽链<sup>[20]</sup>。目前蛋白质工程所取得的成就足以表明该技术的可行性及巨大的发展潜力。

然而,目前蛋白质工程仍处于总结经验、打基础和发方法技术的阶段。做为第二代遗传工程,蛋白质工程远比基因工程复杂得多,因为它必须根据所要求的性能,对决定性能的分子结构进行工程设计。正确的分子设计应该能使基因工程产生的多肽链折叠成具有所愿望性能的三维结构,这依赖于对肽链折叠规律以及结构与性能关系了解的深度。然而,以往用定位诱变或分子剪裁获得的许多变异体的性能出乎设计者的预料。根据 1988 年的报道,至少已制备 400 多个部位专一的枯草杆菌蛋白酶的突变体。其中,以上述可预测性能变化方向的突变体为代表的一些突变体可在某种程度上给出预期效果,但是许多定位诱变产生了大大出乎预料的效应,而且即使测得了它们的高分辨率结构,多数情形里也难以用现有的性能预测方法获得满意的解释。前面提到的分别用 19 种氨基酸每一个替换第 222 位 Met 的诱变就是一个很好例子,由此而产生的不同突变效应是出乎预料的。较高分辨率结构测定表明,与野

生型的结构相比较,单个残基的替换所引起的结构变化都很细小,一般都高度局限于替换残基周围较小的区域里,而且仅表现为高于整体均方根偏离十分之几埃的结构扰动。这样小的结构变化却可导致显著的效应差异,这就为有关科学家提出了挑战性难题。看来,需要在总结这类结构变化规律的基础上,发展精确的结构与功能关系预测方法和技术。这也要求改进包括溶剂分子在内的整个蛋白质体系里原子相互作用的描述精度。显然,结构和性能预测问题的精确化将会对计算技术的发展提出新的要求。另外,鉴于蛋白质三维结构知识对蛋白质工程设计的重要性,进一步提高三维结构测定的速度和精度是必要的,完善和发展测定方法和技术,特别是改善其薄弱环节应该受到相应的重视。随着基础知识的增加和研究技术的进展,蛋白质工程将成为改造蛋白质的有力手段。

现在,蛋白质工程一方面用已知结构的模型蛋白做为对象,广泛研究稳定性、催化机理、别构效应、折叠规律、基因调控和蛋白质跨膜运输等当代分子生物学中重要的结构和功能问题,另一方面以具有重要应用价值的酶和蛋白质为对象探索改进其性能的途径。枯草杆菌蛋白酶的工程研究,已为改进该酶的性能指明了路径,实际上有的突变体已被宣布为获得或申请专利的第一批蛋白质工程成果。该酶的研究结果还具有更重要的另一方面意义,即与其他一些酶或蛋白质的工程研究结果一起,说明蛋白质工程能够被用于改造酶和蛋白质的活性、结合专一性、最适 pH 值和稳定性等涉及实际应用的性能,而且由于在许多情形里突变效应能相互叠加,因而可以用工程手段优化酶或蛋白质的性能,使其具有符合实际需要的多方面的优点。自然界存在的种类繁多的蛋白质具有各种各样的性质和精巧的功能。在人类活动中,从大量食物蛋白质到小量医用蛋白质,从工业用酶到农业用蛋白质(如蛋白质杀虫剂),几乎到处都能找到蛋白质的用途。众多事实也说明,大自然赋予蛋白质的性能是在自然条件下被优化

的,但对于人类生产和生活实际中的应用却有不足之处。第一代遗传工程产物在应用中的副作用就是明显的例证。因此,按意愿改造蛋白质,使其更符合人类需要,这在高技术发展的时代是势在必行。人类基因组图谱制作计划已付诸实行,随着数万个人基因的 DNA 序列的不断被阐明,可以发现越来越多的基因表达产物可以做为治疗药物。在目前已测序的 500 多种人蛋白质中,至少十多种具有医疗意义的蛋白质的三维结构已被测定。其中一些蛋白质已被选为工程改造的对象,胰岛素就是一个很好的例子,已获得具有明显快速或长效作用的胰岛素突变体,这对于众多糖尿病患者无疑是一个福音。如果将蛋白质工程与酶工艺学或与微生物和植物的基因工程相结合,将有希望给用酶工业、农业化学部门带来一场革命。例如,可用蛋白质工程手段提高抗昆虫蛋白质的抗虫广谱性或效力,若把编码这种改性蛋白质的基因引入庄稼将能带来很大的经济效益。正因为蛋白质工程具有这样广阔的应用前景,世界各发达国家的政府和许多公司先后高强度投资这类研究,各种形式的联合研究和开发会更快地使蛋白质工程技术转化为巨大的生产力。

## 参 考 文 献

- 1 Wells J A, Estell D A. *TIBS*, 1988; 13(8): 291
- 2 Wright C S *et al.* *Nature*, 1969; 221: 235
- 3 Bode W *et al.* *Eur J Biochem*, 1987; 166: 673
- 4 Mcphalen C A *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 6582
- 5 Bryan P N *et al.* *Proteins: Struct Funct Genet*, 1986; 1: 326
- 6 Bott R *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263(16): 7895
- 7 Betzel Ch. *Protein Engineering*, 1990; 3(3): 161
- 8 Blundell T *et al.* *Eur J Biochem*. 1988; 172: 513
- 9 Ward W H, Fersht A R. In: Benner S A ed, *Radesigning the molecules of life*, Berlin: Springer-Vellag, 1988; 59
- 10 Bryan P N *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 3743
- 11 Hiroshi Takagi *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 19592
- 12 Carter Paul *et al.* *Proteins: Struct Funct Genet*, 1989; 6: 240
- 13 Craik C S *et al.* *Science*, 1987; 237: 909
- 14 Russell A J, Fersht A R. *Nature*, 1987; 328: 496
- 15 Bell J A *et al.* In: Laver W G *et al.* eds, *Use of X-ray crystallography in the design of antiviral agents*. Academic Press Inc, 1990: 233

# 红细胞膜骨骼蛋白\*

范培昌

(华东师范大学生物学系,上海 200062)

## 提 要

哺乳动物红细胞质膜内侧紧贴着一层至少由8种蛋白质所组成、具有五或六边形网格的网状结构-膜骨骼。它使红细胞既经受住主动脉和心脏中的高切力,又有可塑性而畅通于直径比它小1/3的微脉管与脾小孔。它还可能是细胞内、外信息连通的“导线”。在应用方面:可由带4.1蛋白b型转化为a型来判别红细胞老化;已知遗传性球形和椭圆形红细胞增多症分别起因于患者部分缺失收缩蛋白 $\alpha$ -亚单位和带4.1蛋白。后者已有用外源性带4.1蛋白重组技术使病人康复的实例。

**关键词** 膜骨骼,膜蛋白,红细胞膜

生命科学中重要的问题之一,在于阐明细胞是怎样应答其所处的周围微环境,怎样把它们转化为信息,指令细胞活化、生长或不生长、分化、恶性转化等等。显然,使细胞内、外有别的质膜是关键,因此有人把它比拟为“传感器”<sup>[1]</sup>;质膜组分之一的糖脂,以及质膜中的嵌入膜蛋白(尤其是糖蛋白类)露于质膜外的部分,被比拟为“接收天线”;当信号传入胞内时,细胞骨骼又比拟为连接各“电子元件(大如细胞器;小如生化代谢物)”的“导线”。虽说这种比拟形象生动,但忽视了生命活动中最关键的“动”字。例如,现代认为,跨膜信号的发出以及影响由受体调控的胞吞作用,常取决于受体蛋白的群集(clustering)等<sup>[2]</sup>。现在认为这类运动的原因之一,在于嵌入膜蛋白和膜骨骼组分相互作用而发生跨膜连锁(transmembrane linkage)的结果<sup>[3]</sup>。本文即试图阐述组成这类“能动导线”的膜骨骼之分子基础,及其在连接细胞

内、外信息中的作用。

## 一、红细胞膜骨骼的近代概念

首先要说明的是,细胞骨骼(cytoskeleton)<sup>[1]</sup>和膜骨骼(membrane skeleton)<sup>[4,5]</sup>是两个既不同义又有联系的术语。所指细胞骨骼,其定义为:“分布于细胞质内具有纤丝状网结构物”<sup>[1]</sup>。现已确认,细胞骨骼至少由三类分子组成:由寡聚态肌动蛋白组成的微丝(microfilament);由 $\alpha$ -和 $\beta$ -微管蛋白异质二聚体组成的微管(microtubule),以及在不同细胞中由不同蛋白质组成的中间丝(intermediate filament)。如象间质细胞的中间丝由vimentin组成;肌原细胞中由desmin组成;上皮细胞中由细胞角蛋白类组成等等。所指膜

\* 本文中有关作者的研究得到国家自然科学基金资助。本文系作者在第四届全国生物膜学术讨论会作中心发言的整理稿。

16 Pantoliano M W *et al. Biochemistry*, 1989; 28: 7205  
17 Sternberg M J E *et al. Nature*, 1987; 330: 86  
18 Rao S N *et al. Nature*, 1987; 328: 551  
19 Winter G P. *Phil Trans R Soc Lond*, 1989; B324: 537

20 Richardson J S, Richardson D C. *TIBS*, 1989; 14(7): 304

[本文于1990年7月16日收到,12月24日修回]