

膜锚蛋白结构与功能及其调控机制

朱 大 棚

(浙江省海宁市肿瘤防治研究所,海宁 314400)

提 要

最近发现一些膜蛋白不是通过疏水的穿膜结构固定于膜上,而是通过与糖链结合直接连接到糖基磷脂酰肌醇(GPI)上,成为一种蛋白质在膜上锚着的新方式。这些膜锚蛋白包括:粘附分子;受体蛋白;酶蛋白等。这些生物活性分子由于在膜上的运动性增大,可产生继发的生物效应。膜锚蛋白有膜结合型和溶于体液的可溶性型,通过蛋白与GPI的结合和脱离,可调控其生物活性;产生的GPI本身亦可作信使物质,调控细胞分裂与分化等。

关键词 膜锚蛋白,糖基磷脂酰肌醇(GPI),细胞膜,锚着

细胞膜是细胞内外环境的屏障,以进行物质交换、信息传递及细胞间相互作用等。细胞表面糖基的改变,影响细胞间的交联及信息传递^[1]。膜外表面的一些蛋白,如膜的表面抗原、各种受体、某些酶等通常多是糖蛋白;它们接受来自环境的各种刺激因素,通过膜系统影响或调节整个细胞的活动。膜表面结构直接参与细胞的代谢、识别、运动,以及细胞的分裂、分化等活动的调节。以前认为,膜上的这些糖蛋白通常由约20个疏水氨基酸残基组成的穿膜结构与胞内的残基一起固定于膜上。最近陆续发现,不少膜蛋白是通过与糖链共价结合直接连接到糖基磷脂酰肌醇(GPI)上,这样形成了一种完全新型的“蛋白-糖-脂肪酸复合物”,也是一种完全新型的蛋白质在膜上锚着的方式。

膜锚蛋白包括细胞粘附分子、免疫球蛋白超家族成员(如CD2、LFA-3, CD3, CD4, CD8等)、受体(如CR1)、酶(如AchE, ODC)等。它们仅存在于胞外,无胞内部分,锚着于膜成分之一的磷酸肌醇,因而可使它们在膜上的运动性增大,从而使膜上有限的蛋白分子可接触大量的配体,以发挥生物效应。

细胞粘附分子中第一个分离得到的是神经

元粘附分子(NCAM)。对NCAM单一基因的分子遗传学研究显示,NCAM的3种主要多肽形式的差异在羧基末端区,这种特异性是由NCAM的mRNA以不同形式剪接使不同的外显子特异结合造成的^[2]。3种多肽链从氨基末端到它们与细胞膜连接的区域之间的序列完全相同;其中2个较大的多肽是细胞膜整合蛋白,含细胞质结构域;最小的多肽是小表面结构多肽(small surface domain polypeptide, ssd),缺乏跨膜结构域,靠磷脂酰肌醇与细胞膜相连,类似于其他细胞表面分子,推测NCAM的ssd链很可能在特异的磷脂酶C作用下从细胞膜释放^[3]。所有这3种NCAM,氨基端完全相同,包括结合部位、和多聚唾液酸附着位点,还含5个各由100个氨基酸组成的同源环状结构,与Ig超家族成员相应区域同源^[4]。NCAM和Thy-1都在神经系统表达^[5],基因都位于11号染色体q23带上,且NCAM和Thy-1都是通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚着在细胞膜上的膜锚蛋白。

1 膜锚蛋白的结构

膜锚蛋白的共同结构特点是，C 端氨基酸残基的游离羧基与乙醇胺 (Etn) 的氨基缩合，而乙醇胺的羟基通过磷酸二酯键与糖链的非还原端相接，而糖链的还原端和磷酸肌醇的肌醇 6 位羟基生成糖苷键(图 1)。不同来源的 GPI 蛋白糖链的组成和结构均有差别、多数的结构是 2—3 个甘露糖 (Man) 和一个 N-氨基葡萄糖

糖 (GlcN); 有的则还有多个半乳糖 (Gal); 而 Thy-1 则还存在有另一个乙醇胺。磷脂酰部分的脂肪酸结构，也因膜锚蛋白的来源不同而有所差别。补体的衰变加速因子 (DAF) 能促进 C3, C5 转化酶的衰变, 该蛋白的羧基端氨基酸具有磷脂锚结合蛋白信号, 并发现这种信号存在于羧基端的最后 8 个氨基酸中^[6]。DAF 的膜锚结构中含乙醇胺、葡萄糖胺、肌醇、饱和及非饱和脂肪酸等, 与其他膜锚蛋白如 CR1, AchE

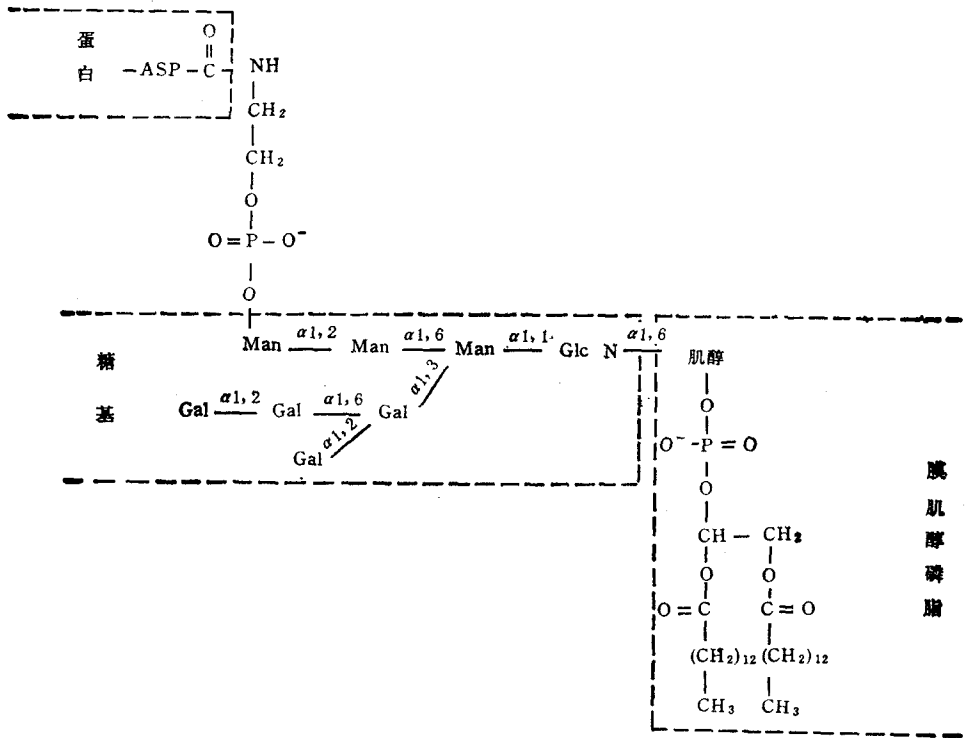


图 1 膜蛋白结构示意图

Man: 甘露糖; GlcN: N-氨基葡萄糖; Gal: 半乳糖; Asp: 天冬氨酸; Inositol: 肌醇

等结构相似。

膜锚蛋白除与 GPI 连接, 成为膜结合型外, 还存在可溶性型, 蛋白溶解于体液中。例如 DAF 通常存在于补体接触的细胞膜外表面, 调节所在细胞膜上 C3, C5 转化酶活性, 此外还以可溶性形式存在于尿液、唾液等体液中。用 PI-PLC 与红细胞温育, 检测到膜上能释放 20% 的 DAF。从红细胞中游离出来的 DAF, 能重新嵌入红细胞膜, 并能保留其功能活性^[7]。DAF 是共价结合在磷脂酰肌醇上, 其他膜锚蛋

白亦相似, 故膜锚蛋白本身也可作为细胞膜释放活性蛋白因子的媒介, 并与胞内信息传递也有一定关系^[8]。细胞表面蛋白 (cell surface protein, CSP) 是存在于细胞表面、胞外基质和细胞外液的一种糖蛋白, 又名纤粘素 (fibronectin, Fn), 它在细胞的粘附、分化、增殖和形态等方面起重要作用。粘着分子如 LFA-3、硫酸类肝素蛋白聚糖等都是带有 GPI 的蛋白。纤粘素 (Fn) 分子由亚单位在肽链 C 端形成二硫交联键; 各亚单位由相似的数个结构域构成:

1—2 个细胞结合部位；2 个与肝素结合部位；3 个与纤维蛋白及 1 个与胶原的结合部位；共约 2500 个氨基酸组成的 Fn 分子中结合细胞的只有 4 个氨基酸(Arg-Gly-Asp-Ser, RGDS)序列后来又发现,仅 RGD 三肽序列,即可发生与细胞作用。Fn 通过分子中特定功能域与细胞表面专一受体识别并相互作用,调节细胞的生长和分化,其中三肽序列 RDG 为必需。不同类型细胞产生的 Fn,其糖基化程度及糖链类型不尽相同。用不同方法从不同细胞分离结合 RDG 三肽序列的受体不但分子量不同,且选择性的宽窄也不一样。RDG 是当前研究的热点之一。Fn 可与之结合的物质不下 25 种,包括各种细胞外基质大分子如 I-V 型胶原、透明质酸、乙酸乙酰肝素等蛋白多糖、玻璃粘连蛋白(vitronectin)、细胞表面受体、肌动蛋白、肌球蛋白、纽带蛋白、C 反应蛋白、凝血因子 XIII_a、补体 C19、IgG、转化因子、不对称乙酰胆碱酯酶等。转化细胞可利用 Fn 作粘着因子而锚着(anchoring)。近年来由于各种粘着蛋白共有的氨基酸识别序列——RGD 三肽序列的发现,以及识别这个序列的各种受体分离,发现了整合蛋白家族^[9]。有人认为,Fn 可能就是很晚期抗原-5(very late antigen, VLA-5)。Fn 受体在细胞粘着和移动中起枢纽作用^[10]。因此,可利用 RDG 多肽抑制粘附,抑制癌细胞的粘附和转移等,具有重要的实用价值。

2 膜锚蛋白的功能

膜锚蛋白的蛋白部分在一定条件下很容易被内吞,进入细胞后蛋白部分被降解。膜锚蛋白(受体、酶、表面抗原等)内吞的结果是减少了膜表面的相关蛋白,这本身可认为是调节细胞膜表面有生物活性的蛋白分子数量的一种方式。进入细胞后,蛋白分子被降解的同时,磷脂酰肌醇(PI)被特异的磷脂酶 C(PLC)降解,生成第二信使物质(DG,IP₃,Ca²⁺),进而使细胞产生生物效应。

膜蛋白由于用疏水肽段抛锚在膜上,且有膜内侧肽段,并与细胞骨架蛋白相互作用,因而

限制了膜蛋白的运动性。膜锚蛋白与膜蛋白不同,通过与 GPI 直接连接而锚着在膜上,没有胞内肽段,因而其活动度大、流动性强,易于在膜上成簇,可继而引起不同的生物效应。例如采用折痕-标记免疫电镜观察红细胞膜上的 CR1 和中性粒细胞(PMN)膜上的 CR1 形态,每个红细胞约含 200—1000 个 CR1,而每个 PMN 含 2500—6000 个 CR1;但 CR1 在红细胞膜上呈簇集(cluster)分布,几乎 50% CR1 呈 ≥ 3 单位簇形式,而在 PMN 上则不到 15% 呈簇集分布。尽管 PMN 上有较多的 CR1,但由于 CR1 处于非聚集状态,对 C_{3b} 结合免疫复合物(IC)的亲和力低,在清除循环免疫复合物中作用不大,好像对 IC“视而不见”。而红细胞膜上的 CR1 呈簇集分布,这样数个 C_{3b} 分子与之相互连接,使结合免疫复合物能力增强,免疫粘附后把 IC 带给肝脾巨噬细胞加以清除,成为机体清除抗原异物的“清道夫”^[11],发挥特异的“红细胞免疫”功能^[12]。

膜锚蛋白由于有膜结合型和可溶性型,因此膜锚的本身 GPI 也可作为细胞膜释放或结合蛋白活性因子的媒介,并与胞内信息传递也有一定关系。例如淋巴细胞功能相关抗原 3(LFA-3),为 CD2 配体,属细胞表面糖蛋白,广泛分布于造血细胞、内皮细胞和上皮细胞上。LFA-3 有二种形式:一种含有一个跨膜区域和一个较短由 12 个氨基酸组成的细胞质结构域;另一种则没有跨膜区和胞内部分,通过磷脂酰肌醇直接与细胞膜连接^[13]。CD2 在 T 细胞粘附和活化中起功能性作用。红细胞膜上的膜锚蛋白 LFA-3 通过与 CD2 结合,激活 B 细胞、T 细胞、自然杀伤(NK)细胞等,进而促使它们分泌免疫活性因子(抗体、淋巴因子等),进一步调控机体的免疫应答反应^[12]。LFA-3 通过膜上 GPI 的结合与解离,使保持稳定的水平;如果游离的 LFA-3 过多进入体液,红细胞膜上的 GPI 与之结合,降低血清中 LFA-3 水平,进而调控机体的免疫应答水平。

LFA-3 与 CD2 均含有免疫球蛋白(Ig)样结构域,长度为 185 个氨基酸,具明显的序列

相似性。除 CD2, LFA-3, 最近发现了越来越多的 Ig 同源结构分子, 组成了一个免疫球蛋白的超家族^[4]。这些分子结构上具有极大的相似性: 均含有 Ig 的 V 区、C 区的同源结构域; 功能上均通过 Ig 相关分子间的同种亲和或异种亲和相互作用而介导细胞间识别及相互作用。CD2 和 LFA-3 基因位于相同的染色体带上, 这二个相关基因可能由编码胞外结构域一个共同前体衍生而来。CD2 较长的胞内结构域可能不存在于共同前体中, 基因复制后 CD2 获得了该区域, 而 LFA-3 则没有。白细胞分化抗原 CD44 是血型抗原 (In^a 和 In^b) 的骨架分子, 在红细胞膜上 CD44 与 LFA-3 分子在空间上极为接近, 可能调节 CD2-LFA-3 的相互作用, 是体内“LFA-3-CD2 粘附通路导致细胞粘附”的调节系统^[5]。

3 第二信使

在受体的信号转导机制研究中, 过去一向认为主要有二个第二信使系统: 环式核苷酸 (cAMP, cGMP, cCMP); 磷酸肌醇系统 (DG, IP₃, Ca²⁺)。目前又提出了 GPI 作第二信使的可能。在研究胰岛素与受体结合导致膜外侧蛋白水解时, 发现产生的二个寡糖肽具有细胞内效应; 实验证明这些寡糖肽均能模拟胰岛素生理功能, 提示它们作为胰岛素第二信使^[6]。后来发现, 胰岛素能诱导糖基化磷脂酰肌醇(GPI)合成增加; 磷脂酰肌醇 (PI) 被特异的 PI-PLC 分解为甘油二酯 (DG) 和磷酸肌醇葡聚糖(IP-gly)。IP-gly 能抑制 A-激酶活性模拟胰岛素功能, 故认为 IP-gly 就是胰岛素的第二信使^[7], 而先前提到的寡糖肽实际上是第二信使 IP-gly 的前体。实验发现, 抗原或分裂因子激活 T 淋巴细胞后, 胰岛素诱导糖基化磷脂酰肌醇 (GPI) 合成增加, 且 GPI 与胰岛素受体的出现相平行。进一步分析发现, T 细胞活化蛋白 Thy-1 含有标记的 GPI, 证明抗原活化的 T 细胞有 GPI 合成。GPI 不仅参与胰岛素的信息传递, 而且是几种 T 细胞生长调控中起重要作用的膜锚蛋白 (如 Thy-1, 鸟氨酸脱羧酶

等)的锚链。Thy-1 为表面抗原, 分子量 18—25 kD, T 细胞的膜表面糖蛋白, 易从脑及胸腺中分离得到; 这是一种受体样蛋白 (receptor-like protein), 可通过 GPI 结构锚着于膜上。鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 作用于鸟氨酸后形成腐胺。腐胺转丙胺基后生成精脞, 继而生成精胺。腐胺、精脞、精胺这三种成分统称多胺。多胺能通过离子键、氢键与核酸 (DNA, RNA)、蛋白、及含负电基团的磷脂等物质结合, 调节它们的生物活性和功能, 控制细胞的生长、增殖、分裂、分化^[8]。胰岛素受体产生的 GPI 增加, 通过结合 Thy-1, ODC 等可引起后继的生物效应 (图 2)。

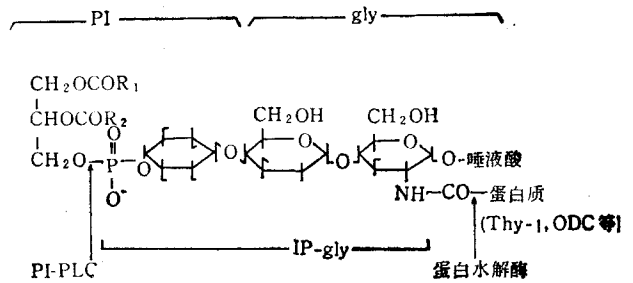


图 2 糖基化 (gly)-磷脂酰肌醇(PI)及膜锚蛋白的可能结构及有关酶作用点的示意图

总之, GPI 在跨膜信息传递中有重要作用, 其前体含 GPI 的膜锚蛋白参与信息传递的早期事件; 而 GPI 本身则参与后期信息的传递。

参 考 文 献

- 1 朱大翔. 细胞表面糖基与癌症诊断研究进展. 当代世界医学. 1988版, 北京: 人民卫生出版社, 1989: 86—88
- 2 Murray B A, Hemperly J J, Prediger E A *et al.* Alternatively spliced messenger RNA species code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 1986; 102(1): 189
- 3 Hemperly J J, Edelman G M, Cunningham B A. Complementary DNA clones of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83(24): 9822
- 4 Owens G C, Edelman G M, Cunningham B A. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) genes: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 1987; 84(1): 294
- 5 Williams A F, Barclay A N. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol*, 1988; 6: 381
 - 6 Lubin D M. Requirements for the attachment of a glycopospholipid membrane anchor to decay accelerating factor (DAF). *Complement and Inflammation*, 1989; 6 (5): 363
 - 7 Asch A S, Kinoshita T, Jaffe E A *et al.* Decay accelerating factor is present on cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Exp Med*, 1986; 163(1): 221
 - 8 Low M G, Saltiel A R. Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Science*, 1988; 239: 268
 - 9 Hynes R O. Integrins A family of cell surface receptors. *Cell*, 1987; 48(4): 549
 - 10 Akiyama S K, Yamada S S, Chen W T *et al.*: Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly and cytoskeletal organization. *J Cell Biol*, 1989; 109(2): 863
 - 11 Picaud J P, Carpentier, Schifferli J A. Difference in the clustering of complement receptor type 1(CR₁) on polymorphonuclear leukocytes and erythrocytes: effect on immune adherence. *Eur J Immunol*, 1990; 20(2): 283
 - 12 朱大栩. 红细胞免疫的分子生物学研究. *中国免疫学杂志*, 1991; 7(增刊): 4
 - 13 Sewell W A, Brown M H, Clipstone N A *et al.* The T lymphocyte CD2 antigen-genetic and functional studies. *Transplantation Proceedings*, 1989; 21(1): 41
 - 14 朱大栩. 免疫球蛋白多基因家族及其在免疫学的研究进展. *免疫学杂志*, 1991; 7(2): 125
 - 15 Haynes B F, Telen M J, Hale L P *et al.* CD44—a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology Today*, 1989; 10(12): 423
 - 16 Larner J, Cheng K, Schwartz C *et al.* Chemical mechanism of insulin action via proecolytic formation of mediator peptides. *Mol Cell Biochem*, 1981; 40(3): 155
 - 17 Gaulton G N, Kelly K L, Pawlowski J *et al.* Regulation and function of an insulin-sensitive glycosylphosphatidylinositol during T lymphocyte activation. *Cell*, 1988; 53: 963
 - 18 Flamigni F, Rossoni C, Stefanelli C *et al.* Polyamine metabolism and function in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1986; 18: 3

空泡膜类型 H⁺-ATPase 的研究进展*

王延枝 许献忠

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

提 要

真核细胞内空泡细胞器, 如高尔基体、内质网、溶酶体等, 膜上存在的质子泵 ATPase 与线粒体类型的质子泵 ATPase 类似。近几年对该类型 H⁺-ATPase 的结构、作用机制进行了深入的研究, 证明这是一类新型质子泵, 在进化的过程中与线粒体类型的 H⁺-ATPase 有密切的亲缘关系。

关键词 液泡膜, V-ATPase, H⁺-ATPase

现已知的膜质子泵 ATPase 有 3 种: a. 质膜 E₁E₂ 类型的 P-ATPase; b. 线粒体(或称真细菌) F₁F₀ 类型的 F-ATPase, 即 ATP 合成酶; c. 空泡膜类型的 V-ATPase, 该类型 ATPase 广泛地存在于真核细胞的高尔基体、

内质网、溶酶体、嗜铬颗粒、笼蛋白衣被小泡 (clathrin-coated vesicle) 以及植物和酵母的液泡膜上, 是近年来研究较多的一类新型质子

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1991-11-24 修回日期: 1992-03-30