

甲壳动物横纹肌的收缩蛋白质与调节机制*

陈 明 钟咏梅**

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 甲壳动物横纹肌肌原纤维的肌丝陈列, 收缩蛋白质和收缩的 Ca^{2+} 依赖性调节机制与脊椎动物横纹肌有不少差异. 脊椎动物横纹肌、甲壳动物快肌与慢肌的粗丝与细丝的数量比依次为 1:2, 1:3 和 1:6, 肌丝阵列各异. 甲壳动物粗肌丝由肌球蛋白和副肌球蛋白组成, 其分子装配与脊椎动物不同. 细肌丝含有肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白, 肌钙蛋白-T 分子量较高, 肌钙蛋白-C 仅 1 个 Ca^{2+} 结合位点. 甲壳动物横纹肌兼有细肌丝调节与粗肌丝调节.

关键词 横纹肌, 肌丝阵列, 收缩蛋白质, 粗丝调节, 细丝调节

肌肉收缩与舒张是肌原纤维粗肌丝和细肌丝相互滑行的结果, 粗肌丝中的肌球蛋白头部与细肌丝中的肌动蛋白之间形成横桥, 而肌球蛋白水解 ATP 所释放的能量, 驱动粗、细肌丝的彼此滑动, 产生收缩. 肌肉收缩体系的活动是通过位于细肌丝上的肌钙蛋白-原肌球蛋白来调节的^[1-3]. 然而, 在生物进化过程中, 从简单的类肌细胞运动到高度特化的肌原纤维的收缩活动, 收缩体系的结构与调节方式显示了多样性^[4]. 脊椎动物横纹肌肌丝滑行模型和调节机制是否完全适用于无脊椎动物呢? 一些实验资料表明, 甲壳动物横纹肌肌原纤维的肌丝阵列、收缩蛋白质以及收缩的 Ca^{2+} 依赖性调节机制等与脊椎动物骨骼肌有不少差异. 甲壳动物是一类古老的生物群体, 最早出现于古生代寒武纪, 现存约有 27 000 种, 与人类生活有着密切关系. 对于甲壳动物横纹肌的精细结构、收缩蛋白质和调节机制的研究会有助于进一步深入认识肌肉收缩的分子机制. 本文简要地综述有关这方面的研究进展.

1 甲壳动物横纹肌的肌丝阵列

近年来, 我们曾对甲壳动物横纹肌进行了一系列的研究, 观察到对虾腹屈肌肌原纤维 A 带的宽度随着肌小节长度的改变而变化; 分离

的肌原纤维粗肌丝, 其长度不同; 粗肌丝除含有肌球蛋白外, 还含有副肌球蛋白. 这些特性与脊椎动物骨骼肌肌原纤维的特性是十分不同的. 根据其生理特性, 甲壳动物横纹肌可以分为位相性纤维 (phasic fiber, 又称快肌纤维) 和紧张性纤维 (tonic fiber, 又称慢肌纤维). 位相性纤维随每一运动神经冲动的到达而迅速收缩; 但紧张性纤维并不随每一运动神经冲动的到达而发生明显的张力变化, 只有在一系列运动神经冲动刺激下才能产生缓慢的收缩. 甲壳动物快肌纤维和慢肌纤维不仅在生理特性上有差异, 在结构上也显著不同, 且均与脊椎动物骨骼肌存在差别. 利用电子显微镜观察到螯虾浅层腹屈肌 (慢肌) 肌原纤维直径较大, 肌小节较长 (5—10 μm), 每根粗肌丝周围有 12 根细肌丝环绕, 细肌丝与粗肌丝的数量比约为 6:1; 深层腹屈肌 (快肌) 肌原纤维直径较小, 肌小节较短 (3—4.5 μm), 每根粗肌丝周围有 6 根细肌丝环绕, 细肌丝与粗肌丝的数量比约为 3:1, 而脊椎动物骨骼肌细肌丝与粗肌丝数量比为 2:1^[5]. 在肌原纤维横切面上, 甲壳动物快肌、慢肌和脊椎动物横纹肌的粗肌丝和细肌

* 国家自然科学基金资助项目.

** 现通讯地址: 云南师范大学生物系, 昆明 650092.

收稿日期: 1993-02-08, 修回日期: 1993-05-10

丝的排列呈现 3 种不同类型^[4]。

2 甲壳动物肌原纤维的收缩蛋白质

横纹肌肌原纤维由粗肌丝和细肌丝有规律地排列形成。根据肌原纤维蛋白质的选择性提取,免疫细胞化学以及分离肌丝的蛋白质分析,已经知道粗肌丝和细肌丝的主要蛋白质组成。表 1 是甲壳动物横纹肌和脊椎动物骨骼肌的肌原纤维蛋白质的分子量比较。

表 1 甲壳动物横纹肌和脊椎动物骨骼肌收缩蛋白质的分子量比较

		甲壳动物 横纹肌	脊椎动物 骨骼肌
粗肌丝	肌球蛋白重链(HC)	200 000	200 000
	肌球蛋白轻链(LC)1	—	25 000
	肌球蛋白轻链(LC)2	18 000	18 000
	肌球蛋白轻链(LC)3	16 000	16 000
	副肌球蛋白	110 000	—
细肌丝	肌动蛋白	42 000	42 000
	原肌球蛋白	40 000	35 000
	肌钙蛋白-T	54 000	37 000
	肌钙蛋白-i	29 000	24 000
	肌钙蛋白-C	16 000	18 000
Z 盘	α -辅肌动蛋白	95 000	95 000
细胞骨架	肌联蛋白	1200 000	3000 000

脊椎动物肌肉粗肌丝主要由肌球蛋白(myosin, M_r 为 480 000)组成,尚有少量 myomesin (M_r 为 185 000), M-蛋白(M_r 为 165 000), C-蛋白(M_r 为 135 000), H-蛋白(M_r 为 86 000)等^[6]。然而,无脊椎动物粗肌丝则主要由肌球蛋白和副肌球蛋白(paramyosin)所构成^[4,7]。

肌球蛋白是由 2 条重链和 4 条轻链所构成的六聚体。脊椎动物骨骼肌肌球蛋白含有 3 种轻链,其分子量分别为 25 000, 18 000 和 16 000。而甲壳动物肌球蛋白仅有 2 种轻链,分子量分别为 18 000 和 16 000。肌球蛋白重链由梨形头部和杆状尾部构成,分子总长度为

160nm,宽度为 2nm。肌球蛋白分子能聚合成丝,具有肌动蛋白结合位点和 ATP 酶活性。与脊椎动物骨骼肌比较,甲壳动物肌肉肌球蛋白 ATP 酶活力较低^[8]。

副肌球蛋白为杆状分子,由双股 α 螺旋卷曲而成,其分子直径为 2nm,长 130nm。在低离子强度溶液($\mu < 0.3$), pH 6.0 时,可形成针状类晶体,具有 14.5 和 72.5nm 特征性轴向周期^[9]。在无脊椎动物肌肉中,副肌球蛋白有较为广泛的免疫交叉反应^[10]。在相当长的时期中,曾认为它是软体动物主要收缩蛋白,与闭锁肌(catch muscle)的持续收缩性相关。以后发现它普遍存在于无脊椎动物平滑肌与横纹肌中,是组成其粗肌丝内芯的蛋白质。

我们曾从甲壳动物肌原纤维分离出天然粗肌丝,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,表明它由肌球蛋白和副肌球蛋白所构成,并从甲壳动物横纹肌中获得副肌球蛋白类晶体,免疫化学研究指示副肌球蛋白定位于肌原纤维 A 带。因此,在甲壳动物中,肌球蛋白和副肌球蛋白如何装配成粗肌丝?它们各自在粗肌丝中的功能及其相互作用怎样?在粗肌丝中是否还存在其它收缩蛋白质?这是进一步认识粗肌丝亚结构和收缩机制的重要基础,无脊椎动物横纹肌粗肌丝与脊椎动物骨骼肌粗肌丝的蛋白质组成和分子装配上是不同的,脊椎动物骨骼肌由 3 根亚丝组成,而甲壳动物快肌粗肌丝由副肌球蛋白内芯和肌球蛋白外套构成,外套为 6 对 12 根亚丝组成^[11]。利用蛋白质化学、免疫细胞化学、电子显微镜、三维重构和 X 射线衍射等方法可以深入研究肌原纤维中的肌丝阵列、蛋白质定位以及粗肌丝的装配规律。

不同横纹肌中粗肌丝的组成成分和亚结构呈现多态性,而细肌丝的结构与成分则是相似的。与脊椎动物骨骼肌一样,甲壳动物横纹肌含有肌动蛋白,原肌球蛋白和肌钙蛋白。

肌动蛋白是高度保守的蛋白质,为单一多肽链的球状蛋白,由 375 个氨基酸组成,分子量为 42 000,包含有 33 000 和 9000 两个功能域。

原肌球蛋白 α 螺旋量高. 甲壳动物原肌球蛋白有较宽的盐析范围 (35%—60%饱和硫酸铵). 与副肌球蛋白盐析范围接近. 利用含 2% 饱和硫酸铵 (pH 5.1) 进行透析, 可以得到原肌球蛋白晶体, 其周期为 40nm^[9]. 有关资料表明, 甲壳动物原肌球蛋白不含半胱氨酸, 而脊椎动物骨骼肌原肌球蛋白至少含有 1 个巯基, 软体动物原肌球蛋白含有 1 个二硫键^[12].

肌钙蛋白曾在昆虫、螯虾、龙虾和鲎肌肉中发现, 均由 3 个亚基组成. 甲壳动物肌钙蛋白-T、肌钙蛋白-I 和肌钙蛋白-C 的分子量依次为 54 000, 29 000 和 16 000. 其特点是肌钙蛋白-T 的分子量大于脊椎动物肌钙蛋白-T 的分子量; 肌钙蛋白-C 仅含有 1 个结合位点, 而脊椎动物肌钙蛋白-C 则含有 4 个 Ca^{2+} 结合位点^[13,14]. Shinoda 等报导螯虾肌原纤维肌钙蛋白-I 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上呈现双带^[15]而不是单带^[13]. 在甲壳动物肌肉中因动物种类、发育阶段或者生理条件的不同而显示出同功蛋白质^[16].

肌联蛋白 (connectin, titin, projectin)^[17] 是长而富有弹性的纤维状蛋白质, 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中, 分子量高, 为 600 000—3 000 000. 它将粗肌丝与 Z 线相连, 使粗肌丝固定于肌小节中央, 具有类似弹簧的功能, 另外, 肌联蛋白分子具有蛋白质激酶类催化结构域 (catalytic-like domain, 约 200 个氨基酸残基), 其生理功能尚待进一步阐明.

3 甲壳动物横纹肌收缩的调节机制

肌肉收缩受肌浆 Ca^{2+} 浓度所控制. 对于去膜肌肉和单肌纤维的研究, 显示导致肌肉收缩的钙瞬变发生于 10^{-7} — 10^{-5} mol/L 范围内. 游离 Ca^{2+} 是细胞内的重要信使, 检测肌浆内 Ca^{2+} 浓度变化的传感器是钙结合蛋白质 (肌钙蛋白-C, 钙调蛋白、肌球蛋白轻链等). 根据 Ca^{2+} 的作用位点, 肌肉收缩的调节分为细肌丝调节和粗肌丝调节.

脊椎动物骨骼肌和心肌的收缩是细肌丝调节. 当肌浆游离 Ca^{2+} 浓度上升至 10^{-5} mol/L

时, Ca^{2+} 通过肌钙蛋白-原肌球蛋白体系的构象变化引起肌肉收缩. 根据骨骼肌的 X 射线衍射和电镜照片的三维重构研究曾经提出“空间位阻模型” (steric blocking model), 即在低 Ca^{2+} 时, 细肌丝上的原肌球蛋白分子位于 F-肌动蛋白双股螺旋沟槽外缘, 阻碍了肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用, 肌肉舒张. 随着游离 Ca^{2+} 浓度的升高, Ca^{2+} 与肌钙蛋白-C 相结合, 钙调节系统的激活促使原肌球蛋白移位于 F-肌动蛋白螺旋沟槽中央, 消除了原肌球蛋白对肌动蛋白-肌球蛋白作用的阻挠, 肌球蛋白与肌动蛋白的互补结合位点暴露, 可引发肌肉收缩. 然而, 近年来许多实验证据与空间位阻模型不一致, 继而又提出了“多成分调节模型” (multi-component regulatory model)^[18].

脊椎动物平滑肌的收缩为粗肌丝调节. 肌浆游离 Ca^{2+} 浓度升高, 即与钙调蛋白结合, 促使肌球蛋白轻链激酶活化, 催化调节轻链丝氨酸-19 的磷酸化, 肌球蛋白 ATP 酶活力上升, 导致肌肉收缩. 当 Ca^{2+} 浓度降低, 肌球蛋白轻链磷酸酯酶使磷酸化的轻链重新去磷酸化, 引起肌肉舒张^[19].

在软体动物中, 肌肉收缩的 Ca^{2+} 调节是直接作用于粗肌丝肌球蛋白分子的. 在舒张肌肉中, 调节轻链抑制肌球蛋白头部与肌动蛋白的结合. 肌肉接受刺激发生兴奋, 肌浆游离 Ca^{2+} 升高, Ca^{2+} 即与肌球蛋白分子的特异性位点结合, 解除了调节轻链的抑制作用, 肌肉发生收缩. 最近, 我们从扇贝平滑闭壳肌中分离了肌钙蛋白, 利用去敏肌球蛋白 B 的超沉淀反应, 发现细肌丝调节与粗肌丝调节的共同存在^[4].

甲壳动物横纹肌的收缩也受肌浆 Ca^{2+} 浓度的调节^[20]. Lehman 和 Szent-Gyorgyi (1975 年) 曾经利用竞争性激活实验分析了甲壳动物横纹肌的调节类型, 发现其兼有细肌丝调节和粗肌丝调节. Shinoda 等^[15] 从甲壳动物腹肌中分离出了肌钙蛋白, 表明这类肌肉包含有细肌丝调节. Lehman 认为甲壳动物肌肉具有双重调节, 龙虾肌动蛋白的 Mg^{2+} -ATP 酶被 Ca^{2+} 的加入而激活, 即使在加入过量的脊椎动物骨

骨骼肌肌动蛋白后, 这种 Ca^{2+} 依赖性仍然存在. 这说明甲壳动物肌肉除存在细肌丝调节外, 还应含有粗肌丝调节. 但是 Ko 等 (1979 年) 和 Watanabe 等^[8] 的实验结果提示甲壳动物横纹肌中仅有细肌丝调节. 此外, 在甲壳动物肌肉中又曾分离到肌球蛋白轻链激酶. 因此, 肌球蛋白的磷酸化作用和去磷酸化作用以及它们在甲壳动物肌肉收缩中的调节作用如何? 尚待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Huxley A F. Ann Rev Physiol, 1988; **50**: 1
- 2 Huxley H E. J Exp Biol, 1985; **115**: 17
- 3 Ebashi S. Ann Rev Physiol, 1991; **53**: 1
- 4 陈 明, 李爱媛. 生理科学进展, 1991; **24**: 6
- 5 钟咏梅, 黄世楷, 陈 明. 实验生物学报, 1991; **24**: 229
- 6 Saad A D, Dennis J E, Tan I P *et al.* J Muscle Res Cell Motil, 1991; **12**: 225
- 7 周念辉, 王宝华, 陈 明. 昆虫学报, 1985; **31**: 201
- 8 Watanabe K, Kitaura T, Yamaguchi M. J Biochem, 1982; **92**: 1635
- 9 陈 明, 韩永根, 李爱媛等. 动物学报, 1985; **31**: 201
- 10 Chen M, Zhou N H. In: Li Z P *et al.* eds. Retrospect and prospect of protein research. Singapore: World Scientific, 1991: 56
- 11 陈 明. 复旦神经生物学讲座, 1993; **IX**: 71
- 12 Miegel A, Kobayashi T, Maeda Y. J Muscle Res Cell Motil, 1992; **13**: 608
- 13 Wnuk W, Schaechlin M, Stein E A. J Biol Chem, 1984; **259**: 9017
- 14 Herzberg O, Moulton J, James M N G. J Biol Chem, 1986; **261**: 2638
- 15 Shinoda S, Yamada A, Yagi K. J Biochem, 1988; **103**: 636
- 16 Silverman H, Costello W J, Mykles D L. Amer Zool, 1987; **27**: 1011
- 17 Trinick J. FEBS Lett, 1992; **307**: 44
- 18 Payne M R, Rudnick S E. TIBS, 1989; **14**: 357
- 19 Walsh M P. Biochem Cell Biol, 1991; **69**: 771
- 20 Brule G, Haudecoeur G, Guilbault P. Comp Biochem Physiol, 1987; **86A**: 581

植物肌动蛋白研究的过去及现状*

刘 雄 阎隆飞

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 肌动蛋白作为一种骨架蛋白广泛存在于植物细胞, 有重要的生理功能. 综述了植物肌动蛋白的发现及研究现状, 着重介绍了植物肌动蛋白的性质、结构和生理功能.

关键词 植物肌动蛋白, 微丝, 植物细胞胞内运动

1 植物肌动蛋白的发现

肌动蛋白最初是 1941 年在脊椎动物骨骼肌细胞中发现并加以命名的. 在肌肉细胞中, 肌动蛋白聚合成丝状, 组成肌肉的细丝, 与由肌球蛋白形成的粗丝相互滑动, 产生宏观的肌肉收缩现象. 1952 年, Loewy 从粘菌 (*Physarum polycephalum*) 提取一种溶液, 加入 ATP 后其粘度显著下降, 并出现 ATP 水解^[1]. 他认

为这类似于肌肉收缩时 ATP 的水解, 提出粘菌细胞中也存在肌动球蛋白. 这是从非肌细胞中分离到的第一种肌动球蛋白, 直到 1966 年这种观点才得到证实. Hatano 和 Oosawa 从粘菌中分离出肌动蛋白, 并证明这种肌动蛋白的物理化学性质和生物学特性与肌肉肌动蛋白相似, 由此开辟了非肌细胞肌动蛋白的研究领

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1993-03-19, 修回日期: 1993-08-24

Current Researches on Recombinant Fusion Proteins Comprising Dimeric Cytokines. Liu Jie, Ma Dalong. (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 194

Cytokines play an important role in the immune regulation. Among the different cytokines, there can be either synergy or suppression effects. Based on the network effects of the cytokines, researchers have designed and constructed by genetic engineering and protein engineering techniques some novel cytokines comprising dimeric cytokine proteins, which exhibited multiple bioactivities. Such molecules could be used for the researches on the immune regulation as well as the clinical applications.

Key words cytokine, protein engineering, fusion protein

The Structure and Function of vWF. Gong Qian Liqing, Guosheng, Wu Shengmei. (*Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai 200092*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 196

von Willebrand factor (vWF) is a high molecular weight multimeric glycoprotein and is absent or abnormal in von Willebrand disease (vWD). The essential information for its function resides in the monomer. vWF participates in thrombosis and haemostasis through interacting with Gp I b, Gp II b-III a, collagen, FVIII and heparin.

Key words vWF, function, domain

The Contractile Proteins and Regulatory Mechanism of the Crustacean Striated Muscle. Chen Ming, Zhong Yongmei. (*Shanghai Insti-*

tute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 200

Myofilament arrangement, contractile proteins, and Ca^{2+} -dependent regulatory mechanisms between the crustacean and vertebrate striated muscles are different. The ratios of the thick to thin myofilament of vertebrate striated, crustacean fast and slow muscles are 1 : 2, 1 : 3 and 1 : 6 respectively, as well as the myofilament arrangement also differ from one another. The molecular assembly of the crustacean thick myofilament composes of myosin and paramyosin are different from that of the vertebrate striated muscle. The thin myofilament comprises actin, tropomyosin, and troponin. The molecular weight of troponin T is relatively high, and troponin C has only single Ca^{2+} -binding site. The thin and thick myofilament regulatory mechanisms coexist in the crustacean striated muscle.

Key words striated muscle, myofilament arrangement, contractile proteins, thick myofilament regulation, thin myofilament regulation

The Past and Present of Investigation on Plant Actins. Liu Xiong, Yan Longfei. (*College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 203

Actin widely occurs in plant cells as an important cytoskeleton element. It is involved in many key cellular activities. The structure, function and properties of plant actin are described here.

Key words actin, plant microfilament, intracellular movement

Crystal Growth of Membrane Proteins. Zou