

肌球蛋白轻链激酶非激酶活性调节磷酸化 肌球蛋白 ATP 酶活性及肌丝运动*

梁明丽¹⁾ 崔颖²⁾ 吕广艳²⁾ 高颖^{1,2)**}¹⁾大连医科大学生物化学与分子生物学教研室, 大连 116027; ²⁾大连医科大学辽宁省医学细胞分子生物学重点实验室, 大连 116027)

摘要 肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)具有激酶和非激酶活性,在平滑肌收缩过程中起着关键酶调控的作用。为进一步阐明 MLCK 非激酶活性在平滑肌收缩过程中的调节作用,利用已删除部分激酶区域的 MLCK 重组体(pGEX-F6.5)在大肠杆菌中进行表达,采用亲和层析技术纯化表达的 MLCK 片段,应用 EnzChek 磷分析试剂盒检测 MLCK 片段对磷酸化肌球蛋白、水解重酶解肌球蛋白(heavy meromyosin, HMM)及肌球蛋白亚片段 1(subfragment1, S1)ATP 酶活性的影响,体外检测 MLCK 片段对肌动蛋白肌丝运动的调节。研究结果显示, pGEX-F6.5 重组表达载体在大肠杆菌中以可溶性 GST 融合蛋白的形式表达。该融合蛋白经 Glutathione-Sepharose 4B 纯化、SDS-PAGE 鉴定得到较纯的单一表达条带。纯化的 MLCK 片段对磷酸化肌球蛋白、HMM 和 S1 的 ATP 酶活性均有明显激活作用。MLCK 片段激活磷酸化肌球蛋白 ATP 酶活性为: $V_{\max} = (19.426 \pm 1.669)$ 倍; $K_m = (0.486 \pm 0.106) \mu\text{mol/L}$, MLCK 片段对磷酸化 HMM 和 S1 的 ATP 酶活性也有相似的刺激作用。体外肌丝运动研究表明,随着 MLCK 片段浓度的增加,磷酸化肌球蛋白与肌动蛋白结合的数量不断增加,肌丝运动的速度也随之增加。上述结果表明, MLCK 的 C 端非激酶活性具有调节磷酸化的肌球蛋白 ATP 酶活性及肌丝运动的作用。

关键词 平滑肌收缩, 肌球蛋白, 肌球蛋白轻链激酶(MLCK), 肌球蛋白 Mg^{2+} -ATP 酶活性, 体外肌丝运动

学科分类号 Q71, R331.3

肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)是平滑肌细胞收缩关键的调节蛋白^[1]。MLCK 结构组成包括 N 端肌动蛋白结合区、中心激酶区、钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合区及 C 端的肌球蛋白结合区^[2]。通常认为 Ca^{2+} 与钙调蛋白结合后激活 MLCK, 进而 MLCK 使肌球蛋白轻链(myosin light chain 20, MLC20)上第 19 位的丝氨酸磷酸化, 导致激活肌球蛋白头部的 Mg^{2+} -ATP 酶(简称 ATP 酶), 该酶水解 ATP 产生能量使肌球蛋白与肌动蛋白相互作用(肌丝滑动), 从而引发肌肉收缩。MLCK 在这一途径中发挥作用的区域位于中心激酶区, 其中 Ca^{2+} 、MLC20 磷酸化是该途径引发肌肉收缩的必要条件。然而, 一些研究显示, 细胞内 Ca^{2+} 的变化和 MLC20 磷酸化并不是平滑肌收缩的唯一途径。Weber 等^[3]在 1999 年发现非钙依赖性的磷酸化调节作用。Karaki 曾报道 phorbol ester 能引起大动脉平滑肌的收缩, 在平滑肌收缩过程中未检测到 MLC20 的磷酸化^[4]。Kohama 等的研究也发现了 MLCK 的非激酶调节作用^[5~9]。我们曾经构建删除

MLCK 激酶活性区的 MLCK 片段(F6.5), 证明该片段可以通过与肌球蛋白的头部相互作用而激活非磷酸化肌球蛋白 ATP 酶的活性^[10]。然而, MLCK 的非激酶作用能否激活磷酸化的肌球蛋白 ATP 酶活性, 是否影响磷酸化肌球蛋白与肌动蛋白的结合及肌丝运动尚不清楚。本研究拟通过 MLCK 片段, 研究其对磷酸化肌球蛋白 ATP 酶活性的作用, 体外研究 MLCK 片段对磷酸化肌球蛋白与肌动蛋白相互作用及肌丝运动变化的影响, 进一步证明 MLCK 的非激酶活性调节平滑肌收缩的分子机制, 为阐明平滑肌收缩的多种调节机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株. pGEX-F6.5 重组质粒及大肠杆菌 DH5 α 、BL21 由辽宁省医学细胞分子生物学重

* 国家自然科学基金资助项目(30470394)。

** 通讯联系人。

Tel: 0411-84721571, E-mail: gaoying822@hotmail.com

收稿日期: 2007-06-05, 接受日期: 2007-08-08

点实验室保存.

1.1.2 仪器与试剂. D-2000 型高效液相色谱仪(日本日立公司); CC-100型低温离心浓缩机(日本TOMY公司); 荧光显微镜(ZEISS公司); 金葡菌蛋白酶V₈(Sigma公司); 蛋白质检测液(Bio-Rad公司); EnzChek 磷酸检测试剂盒(Molecular Probes公司).

1.2 方法

1.2.1 MLCK 片段的表达及纯化. 利用本实验室

保存的pGEX-F6.5载体将MLCK基因转至大肠杆菌BL21细胞中. 37℃培养至吸光度 A_{600} 为0.3~0.4, 加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG, 在28℃下诱导GST融合蛋白表达. 20 h后收获菌液, 经离心、超声破碎细胞, 用Glutathione-Sepharose 4B亲和层析柱分离纯化谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)融合蛋白-MLCK片段(图1).

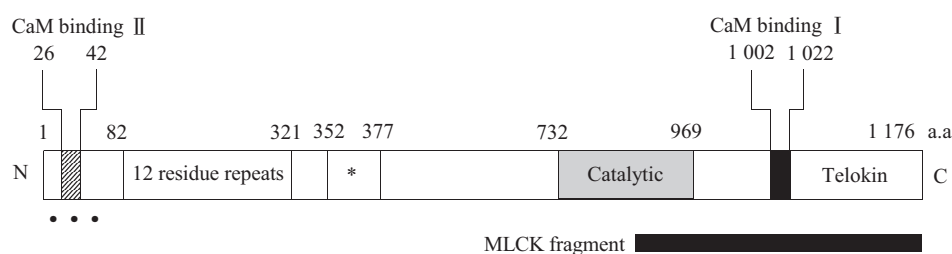


Fig. 1 Domain structure of MLCK ^[14]

The number corresponds to the amino acid number of the primary structure on translation of the full-length cDNA of bovine stomach MLCK ^[11]. The location of the recombinant proteins used in this study (MLCK fragment is indicated by bar). CaM binding I is calmodulin-binding site for regulating kinase activity of MLCK ^[12]. CaM binding II is the calmodulin-binding site for regulating actin-binding activity of MLCK ^[8]. The dots (•) indicate actin-binding (DFRXXL) motifs ^[13]. The asterisk (*) indicates an additional actin-binding site that is not regulated by the regulatory II domain ^[14].

1.2.2 蛋白质的提取及鉴定. 取新鲜鸡胗提取肌球蛋白^[11], 同源性分析表明, 鸡胗与牛胃平滑肌肌球蛋白的同源性为58%. 纯化的肌球蛋白进行磷酸化实验以检测其活性, 并行甘油-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测磷酸化程度^[15]. 钙调蛋白来源于鸡胗的重组蛋白. 同源性分析表明, 鸡胗钙调蛋白与牛胃钙调蛋白高度同源(100%). 采用 Spudich 等^[16]和 Kohama^[17]方法提取肌动蛋白.

1.2.3 磷酸化肌球蛋白的制备. 反应体系的组成如下: 1 mmol/L DTT、3 μmol/L 肌球蛋白、0.15 μmol/L MLCK、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、60 mmol/L KCl、0.1 mmol/L CaCl₂、5 mmol/L MgCl₂、0.3 μmol/L CaM、0.5 mmol/L ATP-γ-S. 25℃水浴25 min, 加0.2 mol/L EGTA终止反应. 将上述反应液经终浓度为15 mmol/L MgCl₂缓冲液中透析2 h以上, 使磷酸化的肌球蛋白充分沉淀. 40 000 g离心30 min, 弃上清, 用0.6 mol/L KCl、1 mmol/L DTT、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液充分溶解沉淀, 即获得磷酸化的肌球蛋白. 利用V8蛋白酶水解磷酸化的肌球蛋白, 经Superose TM6 100/300 GL (Amersham Pharmacia Biotech)凝胶过滤分别获得磷酸化的HMM和S1片段^[18].

1.2.4 肌球蛋白 ATP 酶活性检测. 采用 Molecular

Probes公司的 EnzChek 磷酸检测试剂盒(E6646). 反应体系成分如下: 1 mmol/L DTT、60 mmol/L KCl、5 mmol/L MgCl₂、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、0.2 mmol/L EGTA、1/1000U的PNP、0.05 μmol/L磷酸化的肌球蛋白、5 μmol/L肌动蛋白、不同浓度MLCK片段. 加入终浓度为0.5 mmol/L ATP, 记录 A_{360} 值. 每隔1 min记录一次 A_{360} 值, 共记录5 min. 逐渐增加MLCK片段的浓度, 记录方法同上. GST对照组在完全相同的条件下进行. 反应在25℃条件下进行, 以10 min每分子ATP酶催化ATP分解产生无机磷的量表示酶活性. 以不加MLCK片段时测得ATP酶活性为1, 不同浓度MLCK存在时测得的ATP酶活性与它的比值为相对ATP酶活性.

1.2.5 体外肌丝运动检测. 用 Rhodamine Phalloidin 标记终浓度为3 μmol/L的肌动蛋白, 0.05%的collodin包被盖玻片, 160℃避光干燥2 h. 利用载玻片制成流动小室. 用包被缓冲液(50 mmol/L KCl、30 mmol/L 咪唑 pH 7.5、5 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L DTT) 稀释磷酸化的肌球蛋白, 灌注流动小室. 静置5 min, 用包被缓冲液冲洗掉未结合的肌球蛋白. 0.5% BSA封闭, 灌注含有 Rhodamine Phalloidin标记的 3×10^{-3} μmol/L肌动蛋白的缓冲液

(50 mmol/L KCl、30 mmol/L 咪唑 pH 7.6、2 mmol/L $MgCl_2$ 、1 mmol/L ATP、10U 葡萄糖氧化酶、10U 过氧化氢酶、10U 葡萄糖). 荧光显微镜下观察肌动蛋白的运动变化, 选择肌动蛋白运动速度均匀的视野, 记录多组动态图像. 实验在25℃条件下进行^[19,20].

1.2.6 蛋白质定量. 采用 Bio-Rad 蛋白质检测液进行蛋白质定量, 按说明书操作. BSA为标准蛋白, 根据BSA标准曲线分别计算待测蛋白质浓度.

1.2.7 统计学分析. 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析. 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行组间方差分析

(ANOVA), $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结 果

2.1 MLCK片段的表达及纯化

MLCK片段在*E.coli* BL21 中经 IPTG 诱导, 以融合蛋白的形式表达. 菌体经超声破碎及离心后获取上清及沉淀. 表达的 MLCK 片段经 Glutathione Sepharose 4B亲和层析分离纯化后, 收集的各管洗脱液, 12%SDS-PAGE检测其纯度, 得到分子质量约为62 ku的蛋白质条带(图2).

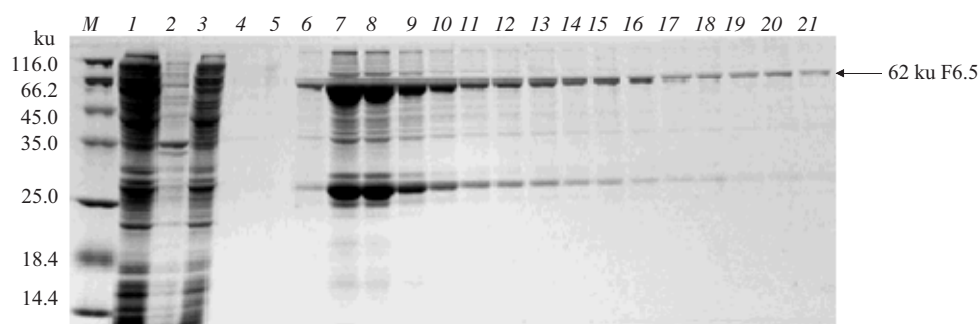


Fig. 2 Expressed and purified the MLCK fragment by 12% SDS-PAGE

M: Protein molecular mass Marker; 1, 2: The supernatant and precipitate of the MLCK fragment expressed in *E.coli* BL21 with IPTG induced; 3: The flow-through fraction of the MLCK fragment; 4~21: The elution fractions of the MLCK fragment (The arrow shows the purified MLCK-GST fusion fragment).

2.2 肌球蛋白的磷酸化

取纯化的肌球蛋白进行磷酸化反应, 以检测肌球蛋白活性及MLCK片段的激酶活性. 应用尿素终止肌球蛋白磷酸化反应, 行10%甘油-聚丙烯酰胺凝胶电泳(图3). 结果显示, 纯化的肌球蛋白20 ku

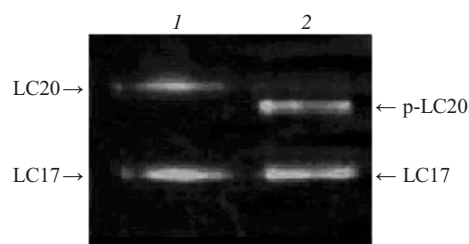


Fig. 3 Phosphorylated myosin 20 ku light chain by MLCK

Unphosphorylated myosin was incubated with the MLCK fragment and subjected to a 10% Glycerol-PAGE. 1: 0.01 $\mu\text{mol/L}$ MLCK fragment were added to unphosphorylated myosin. 2: 0.01 $\mu\text{mol/L}$ full-length MLCK were added to unphosphorylated myosin. 4 $\mu\text{mol/L}$ myosin and 5 μg calmodulin were used for lane 1 and 2 at 25℃ for 20 min in the incubation. The LC20 represented unphosphorylated 20 ku myosin light chain; p-LC20 represented monophosphorylated 20 ku myosin light chain; LC17 represented 17 ku myosin essential light chain.

调节轻链可被完整MLCK磷酸化(p-LC20), 而MLCK片段不能使肌球蛋白20 ku调节轻链磷酸化(LC20). 17 ku的基本轻链则不能被完整MLCK及MLCK片段磷酸化(LC17). 表明纯化的肌球蛋白具有生物活性, 构建的MLCK片段已去除了激酶的活性.

2.3 MLCK片段对磷酸化肌球蛋白、HMM 和S1 ATP酶活性的影响

MLCK片段对磷酸化肌球蛋白、HMM 和S1 ATP酶活性具有明显的激活作用. 随着MLCK片段浓度的增加, 酶的活性也逐渐增大. 不同浓度的MLCK片段对磷酸化肌球蛋白、HMM 和S1 相对酶活性曲线(图4). 实验中分别以GST、反应体系缓冲液和MLCK激酶特异抑制剂(ML-9)做对照, 研究其对磷酸化的肌球蛋白ATP酶活性的影响. 结果均无明显刺激作用(未显示结果).

采用多组数据以双倒数法作图得到酶促动力学最大反应速度 $V_{\max}$ (用增强倍数表示) 及 K_m 值(表1).

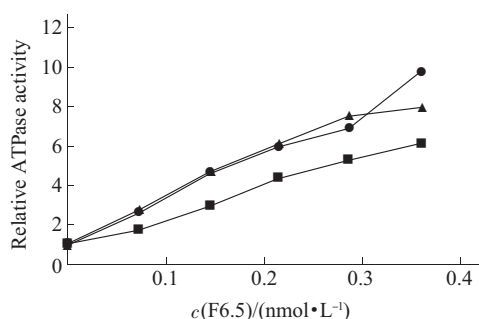


Fig. 4 Effect of the MLCK fragment on phosphorylated myosin, HMM and S1 ATPase activity

The ATPase activities of phosphorylated myosin, HMM and S1 were measured in the presence of various concentrations of the MLCK fragment and in the absence of Ca^{2+} and CaM. The relative values of the activity (ordinates) were plotted against the concentration of the MLCK fragment (abscissa). ●—●: p-myosin; ▲—▲: p-HMM; ■—■: p-S1.

Table 1 Effect of the MLCK fragment on phosphorylated myosin, HMM and S1 ATPase activity

	$V_{\max}$ (-fold)	$K_m/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
Phosphorylated myosin	19.426 ± 1.669 (3)	0.486 ± 0.106 (3)
Phosphorylated HMM	15.681 ± 2.903 (3)	0.333 ± 0.056 (3)
Phosphorylated S1	42.893 ± 17.908 (3)	2.347 ± 1.187 (3)

The numbers in parentheses refer to the number of experiments; $P < 0.01$.

2.4 MLCK片段对体外肌丝运动的影响

2.4.1 MLCK 片段对肌动蛋白肌丝与肌球蛋白结合的影响. 体外肌动蛋白肌丝运动实验显示, 随着 MLCK 片段浓度的增加(0.3~300 nmol/L), 荧光显微镜下观察到与肌球蛋白结合的肌动蛋白肌丝数量增多, 肌丝长度增加. 随机挑选多个显微视野, 计数与肌球蛋白结合的肌动蛋白肌丝数量, 比较加入 MLCK 片段前后肌动蛋白肌丝数量的差异, 结果表明: 当 MLCK 片段浓度增至 3 nmol/L 时, 肌动蛋白肌丝数量明显增加(图5). 统计学分析显示有显著性差异($P < 0.05$) (表 2).

2.4.2 MLCK 片段对肌动蛋白肌丝运动速度的影响. 荧光显微镜下选择肌动蛋白运动数目大于 80% 的视野, 利用 IMAGEPRO PLUS 软件挑选这些视野中平滑运动的肌动蛋白肌丝(连续运动大于 4S), 计算肌丝运动速度. MLCK 片段在低浓度 (≤ 30 nmol/L) 时, 肌动蛋白肌丝运动速度变化无统计学意义 ($P > 0.05$). MLCK 片段在高浓度 (≥ 100 nmol/L) 时, 肌动蛋白肌丝运动速度明显增加, 统计学分析有显著差异($P < 0.05$) (表 3).

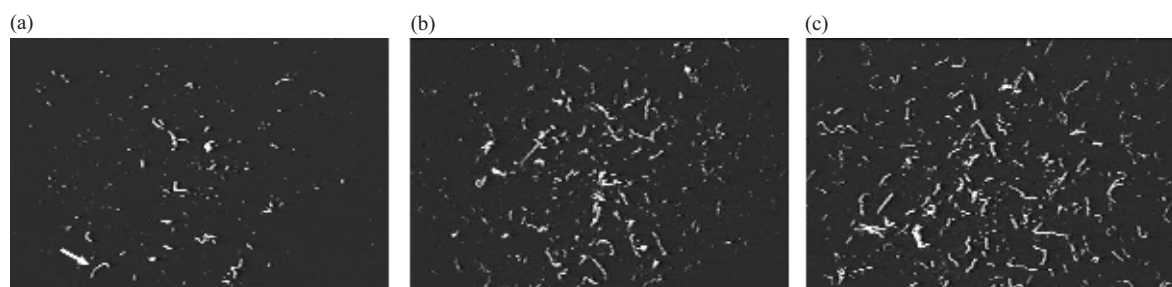


Fig. 5 Effect of the MLCK fragment on actin filaments *in vitro* motility assay by fluorescence microscopy ($\times 100$)

Phosphorylated myosin was diluted with buffer containing 50 mmol/L KCl, 30 mmol/L imidazole (pH 7.5), 5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT; actin filaments were labeled with Rhodamine-Phalloidin. Fluorescence micrographs of actin filaments moving on phosphorylated myosin in the absence MLCK fragment(a) or in the presence of 3 nmol/L and 30 nmol/L MLCK fragment (b and c).

Table 2 Number of actin filaments binding to smooth muscle myosin with the MLCK fragment

MLCK fragment/(nmol·L ⁻¹)	Number($\bar{x}\pm s$)	$P(\alpha=0.05)$
0	$1\ 696\pm 295$ (6)	
0.3	$1\ 789\pm 422$ (3)	0.377
3	$4\ 239\pm 1193$ (4)	0.011
30	$5\ 397\pm 535$ (4)	0.000
100	$5\ 142\pm 620$ (3)	0.003

The numbers in parentheses refer to the number of experiments.

Table 3 Velocity of actin filaments on smooth muscle myosin surface with the MLCK fragment

MLCK fragment/(nmol·L ⁻¹)	Velocity($\bar{x}\pm s$)	$P(\alpha=0.05)$
0	0.803 ± 0.018 (4)	
0.3	0.827 ± 0.028 (4)	0.534
6	0.864 ± 0.049 (5)	0.100
30	0.867 ± 0.049 (5)	0.085
100	0.877 ± 0.046 (5)	0.048
300	0.926 ± 0.036 (4)	0.003

The numbers in parentheses refer to the number of experiments.

3 讨 论

MLCK调节平滑肌收缩的模式已得到深入研究. 然而生理条件下, 平滑肌细胞在 Ca^{2+} 浓度下降后仍维持一定程度张力, 这种现象用MLCK激酶调节机制难以解释. 以往的研究显示, MLCK片段可通过与肌球蛋白的头部相互作用而激活非磷酸化的肌球蛋白ATP酶活性^[10], 证明MLCK除了具有激酶活性外, 还具有非激酶活性. 本实验中, 我们在缺乏 Ca^{2+} 和钙调蛋白条件下, 用EnzChek 磷酸检测方法研究MLCK片段对磷酸化的肌球蛋白、磷酸化的HMM 和S1 ATP酶活性的影响, 结果显示, MLCK片段对磷酸化肌球蛋白、HMM 和S1的ATP酶活性均有明显激活作用, 且激活作用随着MLCK片段浓度的增加而增大, 呈正相关. 本研究中由于MLCK片段删除了部分激酶催化区域, 因此, MLCK片段对磷酸化肌球蛋白、磷酸化的HMM及S1的ATP酶活性的激活作用是通过非激酶途径实现的.

在肌球蛋白包被的玻璃片上, 利用纯化的肌动蛋白和肌球蛋白相互作用来研究肌丝运动的特性, 是迄今为止最简单、最直接的方法. 实验中所用肌动蛋白虽然来自鸡骨骼肌, 但有研究表明肌动蛋白肌丝的运动速度是由肌球蛋白类型决定, 与肌动蛋白的类型关系不大^[21]. 另外, 现已发现, 肌球蛋白轻链存在至少2个磷酸化位点, 本研究中肌球蛋白只有一个磷酸化位点被磷酸化, 推测为MLC20的19位丝氨酸. 有研究表明, 肌丝运动速度不受肌球蛋白多重磷酸化影响^[20], 因此, 实验中肌丝运动速度的增加与肌球蛋白轻链磷酸化的程度影响不大. 本研究还发现, 随着MLCK片段浓度的增加, 与肌球蛋白结合的肌动蛋白肌丝数目及长度都有不同程度的增加, 且肌动蛋白肌丝运动速度也不断增加, 这些进一步证明MLCK片段对磷酸化肌球蛋白ATP酶活性有激活作用, 从而推断MLCK可能在平滑肌张力的维持中起一定的作用.

MLCK的C端是平滑肌细胞内独立于MLCK表达的基因产物, 称为telokin, telokin可以参与装配粗肌丝. 有研究显示, 用电镜和X射线衍射等方法观察肌球蛋白在体外组装粗肌丝时, 当粗肌丝的浓度超过 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时, 其两端出现对称性变细的形态, 该变细部分的粗肌丝表面无横桥, 称为裸缘(bare edge). 除裸缘外, 粗肌丝的其他部分表面都有横桥出现^[22]. 本实验中也观察到, 随着MLCK片段浓度的增加, 与肌球蛋白结合的肌动蛋白肌丝成

束状分布, 推测肌丝的这种分布可能与telokin组装肌球蛋白成粗肌丝有关.

本研究通过MLCK片段对磷酸化肌球蛋白ATP酶活性的测定和体外肌动蛋白肌丝运动实验进一步证实, MLCK可以通过非激酶途径参与调节平滑肌的收缩. 然而, MLCK片段能否在无 Ca^{2+} 存在的条件下使肌球蛋白轻链磷酸化, 有待进一步深入探讨. 本研究在分子水平为研究平滑肌收缩的非激酶途径提供了实验依据, 并为进一步阐明平滑肌收缩机制提供了理论基础.

致谢 本研究得到日本群馬大学医学部小滨一弘教授的支持与帮助, 在此深表感谢.

参 考 文 献

- 1 Michael B. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. 1st London: Academic Press, INC. 1995. 37~46
- 2 Olson N J, Pearson R B, Needleman D S, *et al.* Regulatory and structural motifs of chicken gizzard myosin light chain kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (6): 2284~2288
- 3 Weber L P, Van Lierop J E, Walsh M P. Ca^{2+} -independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J Physiol*, 1999, **516** (pt3): 805~824
- 4 Sato K, Hori M, Ozake H, *et al.* Myosin phosphorylation-independent contraction induced by phorbol ester in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, **261** (2): 497~505
- 5 Kishi H, Mikawa T, Seto M, *et al.* Stable transfectants of smooth muscle cell line lacking the expression of myosin light chain kinase and their characterization with respect to the actomyosin system. *J Biol Chem*, 2000, **275** (2): 1414~1420
- 6 Ye L H, Kishi H, Nakamura A, *et al.* Myosin light chain kinase of smooth muscle stimulates myosin ATPase activity without phosphorylating myosin light chain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (12): 6666~6671
- 7 Bao J, Oishi K, Yamada T, *et al.* Role of the short isoform of myosin light chain kinase in the contraction of cultured smooth muscle cells as examined by its down-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (14): 9556~9561
- 8 Ye L H, Hayakawa K, Kishi H, *et al.* The structure and function of the actin-binding domain of myosin light chain kinase of smooth muscle. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 32182~32189
- 9 Gao Y, Ye L H, Kohama K. Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB Life*, 2001, **51** (6): 337~344
- 10 Gao Y, Kawano K, Yoshiyama S, *et al.* Myosin light chain kinase stimulates smooth muscle myosin ATPase activity by binding to the myosin heads without phosphorylating the myosin light chain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **305** (1): 16~21
- 11 Ebashi S. A simple method of preparing actin-free myosin from smooth muscle. *J Biochem*, 1976, **79** (1): 229~231
- 12 Shirinsky V P, Vorotnikov A V, Birukov K G, *et al.* A kinase-related protein stabilizes unphosphorylated smooth muscle myosin minifilaments in the presence of ATP. *J Biol Chem*, 1993, **268** (22):

- 16578~16583
- 13 Smith L, Su X, Lin P J, *et al.* Identification of a novel actin binding motif in smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biochem Chem*, 1999, **274** (41): 29433~29438
 - 14 Hayakawa K, Okagaki T, Ye L H, *et al.* Characterization of the myosin light chain kinase from smooth muscle as an actin-binding protein that assembles actin filaments *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1450** (1): 12~24
 - 15 Li S, Tanaka H, Wang H H. Intracellular signal transduction for migration and actin remodeling in vascular smooth muscle cells after sphingosylphosphorylcholine stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **291** (3): 1262~1272
 - 16 Spudich J A, Watt S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*, 1971, **246** (15): 4866~4871
 - 17 Kohama K. Heterogeneity of amino acid incorporation rate in adult skeletal muscle actin. *J Biochem*, 1980, **87** (3): 997~999
 - 18 Ikebe M, Hartshorne D J. Proteolysis of smooth muscle myosin by *Staphylococcus aureus* protease: preparation of heavy mero-myosin and subfragment 1 with intact 20 000-dalton light chains. *Biochemistry*, 1985, **24** (9): 2380~2387
 - 19 Warshaw D M. Lever arms and necks: a common mechanistic theme across the myosin superfamily. *J Muscle Res Cell Motil*, 2004, **25** (6): 467~474
 - 20 Okagaki T, Higashi-Fujime S, Ishikawa R, *et al.* *In vitro* movement of actin filaments on gizzard smooth muscle myosin: requirement of phosphorylation of myosin light chain and effects of tropomyosin and caldesmon. *J Biochem*, 1991, **109** (6): 858~866
 - 21 Kron S J, Spudich J A. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83** (17): 6272~6276
 - 22 温进坤, 韩梅. 血管平滑肌细胞. 北京: 科学出版社, 2005. 31~38
Wen J K, Han M. Vascular Smooth Muscle Cell. Beijing: Science Press, 2005. 31~38

MLCK With Its Non-kinase Activity Regulates Phosphorylated Myosin ATPase Activity and Velocity of Actin Filaments *In vitro* Motility Assay*

LIANG Ming-Li¹⁾, CUI Ying²⁾, LÜ Guang-Yan²⁾, GAO Ying^{1,2)**}

¹⁾The Department of Biochemistry & Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

²⁾Key Laboratory of Medical Cellular and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract Myosin light chain kinase (MLCK) is a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction, which includes an N-terminal actin-binding domain, central catalytic domain, calmodulin-binding domain, and a C-terminal myosin-binding domain. Myosin phosphorylated by the catalytic domain of MLCK is in an active form and interacts with the actin filament to contract smooth muscle. This mode of phosphorylation is widely accepted as the regulatory mechanism for actin-myosin interaction. However, there are a number of observations that are not explained by this mechanism. An MLCK C-terminal fragment (MLCK fragment) containing the myosin-binding domain have been previously engineered but devoid of a catalytic domain, which has confirmed how myosin is stimulated by this non-kinase pathway. A recombinant GST-fusion protein of the MLCK fragment was expressed in *E. coli* and detected by SDS-PAGE. Through Glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography, a single pure band of the MLCK fragment was obtained. The phosphorylated myosin ATPase activities of the MLCK fragment, as well as its proteolytic fragment HMM and S1 were measured with the EnzChek Phosphate Assay Kit. The MLCK fragment stimulated phosphorylated myosin ATPase activity ($V_{\max} = (19.426 \pm 1.669)\text{-fold}$, $K_m = (0.486 \pm 0.106)\mu\text{mol/L}$). Similar stimulation figures were obtained by measuring the ATPase activity of phosphorylated HMM and S1. The data suggests that MLCK could activate phosphorylated myosin, HMM and S1. In addition, *in vitro* motility assays demonstrated that increasing amounts of the MLCK fragment increased actin-myosin interaction and sliding. Also, the velocity of actin filaments could be enhanced on a gizzard smooth muscle myosin surface with the MLCK fragment. It is conclude that the non-kinase C-terminal domain of MLCK is independent of the phosphorylating mode for activation of myosin.

Key words smooth muscle contraction, myosin, myosin light chain kinase(MLCK), myosin Mg^{2+} -ATPase activity, *In vitro* motility assay

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30470394).

**Corresponding authors. Tel: 86-411-84721571, E-mail: gaoying822@hotmail.com

Received: June 5, 2007 Accepted: August 8, 2007