

Ryanodine 受体和内源性调节蛋白的相互作用

韩红梅* 尹长城

(北京大学医学部基础医学院生物物理学系 北京 100083)

摘要 Ryanodine 受体(RyR)是细胞内分子量最大的离子通道,在调节各种细胞内钙信号转导方面扮演着重要的角色。在骨骼肌中,RyR 和双氢吡啶受体共同参与肌细胞的兴奋-收缩偶联。同时,一些内源性蛋白(包括 FK 结合蛋白、钙调素、钙结合蛋白、junctin 和 triadin 等)通过不同的方式,在不同的阶段与 RyR 结合,形成一个复杂的调控网络,协助 RyR 发挥正常生理功能,实现结构与功能的统一。

Ryanodine 受体(RyR)是细胞内的钙离子通道之一,在调节各种细胞内钙信号转导方面扮演着重要的角色。例如,RyR 在骨骼肌的兴奋-收缩偶联(excitation-contraction coupling, EC 偶联)中,介导了肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)内 Ca^{2+} 的快速释放,故又称为钙释放通道(calcium release channel)。RyR 蛋白具有两大特征:其一是与一种植物碱——ryanodine 的高亲和力结合,两者结合的摩尔比例是 1/1,故得名 Ryanodine 受体;其二是相对分子质量高,该蛋白质是由相对分子质量为 560kDa 的相同亚单位组成的四聚体,整个蛋白质的相对分子质量超过 2000kDa,使之成为目前最大的离子通道蛋白^[1]。

在 1989 年, Takeshima 等人克隆并测序了 RyR 蛋白^[2]。从不同的组织中分离出 3 种不同类型的 RyR: RyR1 即骨骼肌型; RyR2 即心肌型; 而 RyR3 又称为脑型。这种命名方式基于 RyR 最初纯化的时间和组织来源,但是进一步的研究表明三种类型的 RyR 并非完全是组织特异性表达的^[3]。RyR1 和 RyR2 在非肌肉组织中(包括中枢神经系统)也有表达; 而 RyR3 则更多的表达在平滑肌和各种非兴奋组织(包括淋巴组织)^[3]。比较 RyR 在同一种属的 3 种类型,发现 RyR1 和 RyR2、RyR1 和 RyR3、RyR2 和 RyR3 之间的同源性分别是 67%、67% 和 70%。

高分辨冷冻电子显微镜的研究表明: RyR 蛋白的结构类似于蘑菇状,由一个正方形帽子($27 \times 27 \times 11 \text{ nm}$)和根部($12 \times 12 \times 6.5 \text{ nm}$)组成。根部是 RyR 蛋白的疏水性区域所形成的跨膜孔道,将 RyR

固定于 SR 膜上;帽子结构连接 RyR 蛋白与细胞膜,并与二氢吡啶受体(Dihydropyridine receptor, DHPR)相互作用^[4,5]。RyR 蛋白上存在许多结合位点,可以与不同的蛋白质和通道调节因素(如: Ca^{2+})相互作用,共同调节通道的活性。因而,在生物膜上的 RyR 是与各种相关蛋白质共同组成一个庞大的蛋白质复合体^[4,6,7]。

在过去的 10 年内,对于 RyR 各个方面的研究和综述是数不胜数的。我们重点讲述 RyR 和一些相关的内源性调节蛋白的相互作用,如 DHPR、FK 结合蛋白(FK506 binding protein, FKBP)、钙调蛋白(Calmodulin, CaM)、钙结合蛋白(Calsequestrin, CSQ)、junctin 和 triadin 等,包括它们各自的主要特性及其相互调节的机制。

一、二氢吡啶受体

DHPR 是位于细胞膜上的电压感受型 Ca^{2+} 释放通道(L 型钙通道),它存在于多种组织中,但在骨骼肌、心肌和脑中含量最高。骨骼肌中的 DHPR 蛋白由若干个不同的亚单位组成: $\alpha 1$; $\alpha 2/\delta$; β 和 γ 。 $\alpha 1$ 亚单位含有二氢吡啶的结合位点,构成通道的中心孔径,在 EC 偶联中是控制通道开放的电压感受器。 β 亚单位使 DHPR 蛋白固定于 T-管的质膜上,其他亚单位负责调控 Ca^{2+} 电流和 EC 偶联的特性。在人类基因中,至少有 10 个不同的基因编码 DHPR

* 通讯作者。E-mail: hmhan@bjmu.edu.cn

的 $\alpha 1$ 亚单位,其相对分子质量是190–250kDa,由4个同源重复序列构成(I–IV),每个序列又包含6个 α 螺旋跨膜结构,序列的相似性大于80%^[8]。

在功能和结构上,DHPR和RyR之间存在着复杂的、多样的相互作用,并与肌肉组织中的EC偶联密切相关^[9]。在心肌细胞产生动作电位时,DHPR介导少量细胞外 Ca^{2+} 内流,诱发SR膜上的RyR2大量开放,从而引起细胞内 Ca^{2+} 的浓度快速升高。这种由 Ca^{2+} 内流而活化附近SR钙释放通道的方式被称为钙致钙释放(calcium-induced-calcium-release,CICR)。因此,在心肌组织中参与SR Ca^{2+} 信号释放的调控机制主要以化学信号作用为主(图1F)^[10]。

与心肌细胞不同,骨骼肌的收缩不需要DHPR

介导的细胞外 Ca^{2+} 内流参与,甚至可以在完全没有细胞外 Ca^{2+} 时仍处于收缩状态^[9]。实验证明骨骼肌细胞膜上的电压敏感性DHPR是通过蛋白质间的直接相互作用,使SR膜上的RyR1开放。研究表明1分子RyR1蛋白与4分子DHPR结合(称作tetrad,图1C),且RyR1的每个单体分别与DHPR的 $\alpha 1$ 亚单位相互作用(图1E)。显然,在骨骼肌细胞的EC偶联过程中,DHPR作为电压感受器,通过天然的直接作用,把肌纤维膜的去极化和SR内 Ca^{2+} 的释放偶联起来。因此,触发骨骼肌细胞EC偶联的机制在本质上主要是机械性的物理作用(图1E)^[10]。

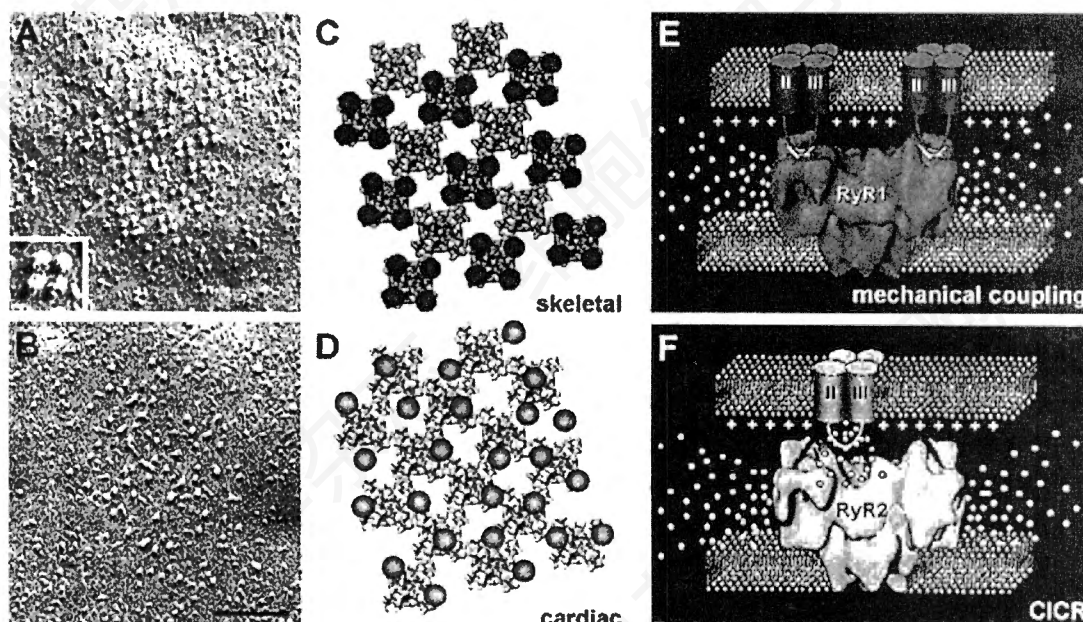


图1 DHPR与RyR的结构-功能联系方式(引自文献10)

A和B显示DHPRs在骨骼肌和心肌细胞膜上的聚集状态;C和D显示RyR1和RyR2形成的规则排列及DHPR的相对位置;E和F显示DHPR和RyR之间相互作用的两种方式,E是骨骼肌细胞的机械偶联模式,F是心肌细胞的CICR模式。

尽管在过去10年内,研究DHPR和RyR相互作用的分子本质有了很大的进展;但目前对于两种蛋白质之间的直接相互作用及其复杂性的理解,仍仅仅是冰山上的角。因而,通过X射线-晶体学或电子显微学来获取DHPR/RyR复合体的高分辨三维结构,是揭示两者间物理性相互作用的必然途径,并为全面解释结构与功能之间的调节机制奠定基础^[11]。

二、FK506-结合蛋白

FKBP是Marks等人在1989年得到的一种与

RyR共同纯化的蛋白质,其相对分子质量为12kDa,是一种顺反式肽基脯氨酰异构酶^[12]。该蛋白质最初被称为KC7肽,后发现免疫抑制药物FK506和雷伯霉素在细胞内的受体即是该蛋白质,故命名为FKBP12。FKBP12和其同源蛋白质FKBP12.6都属于亲免疫素(immunophilin)家族成员,两者分别在骨骼肌和心肌组织中表达^[13]。

RyR蛋白的4个亚单位之间通过疏水性区域相互联系,同时还需要借助FKBP12的存在。冷冻电子显微镜的研究显示一分子RyR1和4分子FKBP12结合,且FKBP12分别结合在RyR4个单体胞浆侧的边缘(图2)^[4,14]。FKBP除了稳定单个

RyR 蛋白之外,还参与 RyR 蛋白之间的开放偶联,即两个或更多相连的 RyR 通道同时开放^[15]。开放偶联是 EC 偶联过程中已活化的和未活化的 RyR 通道间的发生协同作用的一种机制。

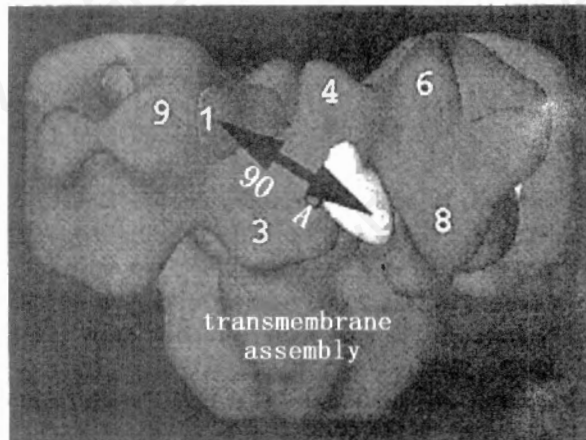


图2 RyR1 三维结构的侧面观(引自文献4)
1和2分别显示FKBP12和CaM与RyR1的结合位点;3、4、6、8和9显示RyR1的其他结构域。

FKBP对RyR的调控还表现在对通道的整流作用。双层脂膜单通道纪录的研究表明,RyR1-FKBP在复合体状态下的通道电流表现为单向的由SR腔向胞质传导特性,而反向电流将很快失活。并且,FKBP对RyR1的整流作用还与细胞膜电位有关。这些研究提示,FKBP可能通过改变钙释放通道各亚基构象实现对通道的整流的调控,这种整流特性能有效地防止骨骼肌肌浆网系快速释放钙过程中的反向电流^[16]。FKBP12和FKBP12.6对RyR的调节功能可以被免疫抑制剂FK506和雷伯霉素阻断,并可使FKBP从RyR上解离下来,从而影响RyR的生物学特征。在没有FKBP12/12.6时,RyR1/RyR2通道只能部分开放,并处于低电导水平,不能实现开放偶联。

三、钙调蛋白

CaM是在细胞内广泛表达的一种钙结合蛋白,分子量是17 kDa,它属于EF-hand钙结合蛋白家族^[17]。CaM形似哑铃状,由三部分区域组成:N-端、C-端和两者之间的8个 α -螺旋。在N-端和C-端区域上分别含有两个 Ca^{2+} 结合位点。 Ca^{2+} 与CaM的结合使后者发生构象变化,暴露出其疏水性区域而和其他蛋白质进行结合。CaM能够调节DHPR、RyR1和RyR2的功能,因而在骨骼肌和心肌的EC偶联中扮演重要的角色。

利用冷冻电镜技术和单粒子的三维重构原理,美国Wagenknecht所在实验室研究了骨骼肌的RyR与配体的结合位点。结果发现CaM和FKBP12都结合在RyR的胞浆区域,分别距离通道入口处的10和12nm。FKBP12的结合位点在靠近RyR与肌质膜T型管相互作用的部位,而CaM则结合于RyR胞浆区域的侧面(图2)。两种蛋白质与RyR发生结合时,可以调控通道的开放与关闭^[4]。

CaM对RyR的调节作用取决于 Ca^{2+} 的浓度。在低浓度 Ca^{2+} (nmol/L)存在时,至少有4分子的CaM与RyR的每个亚单位结合;同时,提高RyR1(而不是RyR2)从SR中释放 Ca^{2+} 的速度和增强 Ca^{2+} 对它活化的敏感性。相反,在高浓度 Ca^{2+} (μ mol/L)存在时,只有1分子的CaM与RyR的每个亚单位结合,并且抑制通道的活性。此外,CaM还可能通过调节CaM依赖激酶和磷酸酯酶而调节RyR^[18]。

四、Triadin和Junctin

Triadin和Junctin都是位于SR膜上的蛋白质,且都与RyR和钙结合蛋白(Calsequestrin, CSQ)相互结合,共同组成一个复合体。Triadin最初在骨骼肌组织中分离得到的,相对分子质量为95kDa。Junctin首先在心肌中发现,相对分子质量是26kDa,后来在骨骼肌中也发现有该蛋白质。Triadin和Junctin在结构上具有相似性,在序列上具有明显的同源性。利用特殊的抗体和蛋白酶对Triadin的一级序列进行分析,认为Triadin由3部分组成:一段小的胞浆区(1-47aa),一段单一的跨膜区和一段大的SR室内区(即C末端)。室内区富含多簇赖氨酸和谷氨酸残基交替出现的区域,被称为KEKE motif^[18,19]。

体外实验证明Triadin和RyR存在着直接相互作用。一方面,Triadin的SR室内区在调节胞浆区抑制效应方面起着关键作用;另一方面,室内区在联系SR内 Ca^{2+} 浓度和RyR活性方面起着桥梁作用^[19]。因此,Triadin不仅通过SR内的 Ca^{2+} ,而且利用胞浆内的因素来调控RyR的通道活性。当细胞处于静息状态时, Ca^{2+} 的浓度有助于RyR-Triadin复合体的稳定存在;当细胞受到刺激活化时,胞浆内 Ca^{2+} 浓度达到使RyR开放, Ca^{2+} 的浓度抑制两种蛋白质的结合。由此可见,胞浆内 Ca^{2+} 浓度的高低,可以通过改变RyR-Triadin的相互作用,进而调控RyR的开放和关闭。所以,利用结构生物学的技术

和方法,进一步确定 RyR-Triadin 在胞浆侧的结合位点,将有利于深入了解两者之间的作用机制。

有学者研究在骨骼肌细胞和心肌细胞内, Triadin 和 Junctin 均与 SR 内的 CSQ 结合,将后者与 RyR 偶联起来成为一个连接复合体,并且调节它们的功能。这些蛋白质间的相互作用具有 Ca^{2+} 敏感性,即当肌质网释放 Ca^{2+} 致 SR 中 Ca^{2+} 下降时, CSQ 与 Triadin 和 Junctin 的结合力加强,使 Ca^{2+} 从 CSQ 上解离下来。

五、钙结合蛋白

CSQ 是位于 SR 内的酸性糖蛋白,其相对分子质量约 40kDa。CSQ 具有很强的亲水性,许多正电荷和负电荷聚集的区域贯穿在整个序列中。CSQ 是 Ca^{2+} 的结合和存储蛋白,具有低亲和性和高容量性,每摩尔的 CSQ 可以结合 40 - 50 摩尔的 Ca^{2+} 。在肌肉每一次收缩和松弛的过程中,CSQ 都能够释放足够的 Ca^{2+} 。

CSQ 的 354 - 367 氨基酸残基片段靠近 CSQ 的 C-末端,富含天门冬氨酸,认为是与 Triadin 的 C-末端结合的位点。在靠近 C-末端的另一区域,认为是与 Junctin 结合的位点^[22]。尽管实验表明 CSQ 与 RyR 的偶联离不开 Triadin 和 Junctin 的作用,但最近的实验也显示 RyR1 自身能够与 CSQ 结合,并具有高亲和性。

目前的研究显示,CSQ 不仅能够储存 Ca^{2+} ,而且能够调控 SR 膜上的 RyR 通道。在肌肉处于静息状态时,大多数 CSQ 被 SR 内的 Ca^{2+} 占据,形成单体或多聚体;同时, Triadin 与 RyR 结合,并抑制通道的活性。当 DHPR 将兴奋信号传递给 RyR 时,引起后者的开放和 SR 内 Ca^{2+} 浓度的短暂降低。SR 内的 Ca^{2+} 浓度降低,促使 CSQ 与 Triadin 的联合,使后者与 RyR 分离。一方面, Triadin 对 RyR 的抑

制作用得到部分去除;另一方面, CSQ 进入释放 Ca^{2+} 的活化状态。这是进一步释放 Ca^{2+} 进入肌浆内的正反馈调节机制^[20,21]。研究还发现去磷酸化的 CSQ 可以活化 RyR, 1% 的 CSQ 去磷酸化即可活化半数的 RyR。因此, CSQ 的磷酸化和去磷酸化对于调节 RyR 通道的活性也十分重要^[22]。

参 考 文 献

- [1] Coronado, R. et al., 1994, *Am J Physiol.*, **266**:C1485 - C1504.
- [2] Takeshima, H. et al., 1989, *Nature.*, **339**:439 - 445.
- [3] Protasi, F. et al., 2000, *Biophys. J.*, **79**:2494 - 2508.
- [4] Wagenknecht, T. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:32463 - 32471.
- [5] Sorrentino V. and Reggiani C., 1999, *Trends Cardiovasc. Med.*, **9**:54 - 61.
- [6] Zhang, L. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:23389 - 23397.
- [7] Beard, N.A. et al., 2002, *Biophys. J.*, **82**:310 - 320.
- [8] Sipos, I. et al., 2000, *P. ugers Archiv.*, **439**:691 - 699.
- [9] Robert T. Dirksen, 2002, *Front Biosci.*, **7**: d659 - 670.
- [10] Feliciano Protasi, 2002, *Front Biosci.*, **7**:d650 - 658.
- [11] Dulhuntya, A. F. et al., 2002, *Prog Biophys & Mol Bio.*, **79**: 45 - 75.
- [12] Marks, A. R. et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **86**:8683 - 8687.
- [13] Marks, A. R., 1996, *Physiol Rev.*, **76**:631 - 649.
- [14] Samso, M. et al., 1997, *Biophys J.*, **72**:169.
- [15] Marx, S. O. et al., 2001a, *Circ Res.*, **88**:1151 - 1158.
- [16] Mackrill J., 1999, *Biochem J.*, **337**:345 - 361.
- [17] Tang, W. et al., 2002, *Front Biosci.*, **7**:d1583 - 1589.
- [18] Yasuo, O. et al., 1999, *Adv Biophys.*, **36**:27 - 66.
- [19] Groh, S. et al., 1999, *J Biol Chem.*, **274**(18):12278 - 12283
- [20] Rubtsov A. M., 2001, *Biochemistry (Moscow).*, **10**: 1132 - 1143.
- [21] Marks, A. R. et al., 2002, *Trends Cardiovascular Med.*, **12**:166 - 170.
- [22] Shin, D. W. et al., 2000, *FEBS Letters.*, **486**:178 - 182.

C 反应蛋白——天然防御蛋白研究进展

陈 杭 杨 洁*

(浙江大学生命科学学院 杭州 310027)

摘 要 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是急性时相蛋白中最突出的代表,在机体遭受损伤后,它在体内会急速上升,因而被认为是感染和炎症的早期指示灯。CRP 是属于古老并高

* 通讯作者。E-mail: yjy619@hotmail.com