

ADF/cofilin 分子家族的研究进展

杨 军 胡 忠 郑国铝

(兰州大学细胞生物学研究所 兰州 730000)

细胞骨架中的肌动蛋白参与了一系列重要生理活动,如肌肉收缩、胞质环流、细胞运动、胞质分裂等。这些过程的发生除了需要肌动蛋白以外,还需要一些与之结合的调节蛋白参与,现在已经发现了 100 多种肌动蛋白结合蛋白^[1],其中有一类分子量为 15 - 20KD 的蛋白,如肌动蛋白解聚因子(actin depolymerizing factor, ADF)、cofilin、profilin、actophorin、depactin、destrin、UNC-60 等,在一定条件下可以使肌动蛋白微丝解聚,统称为 ADF/cofilin 分子家族^[1-3]。

一、ADF/cofilin 分子家族的分布

ADF/cofilin 分子家族在哺乳类、鸟类、两栖类、昆虫、棘皮动物、原生动物和植物等生物的细胞内广泛存在,其中 cofilin 广泛分布于从酵母到哺乳类的生物体内,而 destrin 主要集中分布在鸟类和哺乳类的个体中^[4-10]。

ADF/cofilin 分子家族的存在是与其功能密切相关的,每一种分子根据其功能的需要,在个体的不同组织、细胞以及细胞内部不同部位的分布都有一定程度的差异。ADF 位于许多脊椎动物组织中,在神经元细胞中尤为丰富^[11]。在百合和油菜的花丝中检测到特异表达的 ADF(分别称为 LMP131A 和 BMP1),而在花瓣、心皮、花芽、叶片和根中则检测不到^[9]。变形虫中的 actophorin 与肌动蛋白一起主要分布于胞质皮层中,特别是在运动细胞的前缘^[8]。

ADF/cofilin 分子家族在生物个体的不同发育阶段,其分布和含量也有一定的差异。鸟类的 ADF,亦存在于鸡胚和绝大多数成熟组织中,占总蛋白的 0.1% - 0.4%,而成熟心脏和

骨骼肌中含量不到 0.02%,当受精卵发育到 11 天时,骨骼肌中 ADF 的量达到最大值,孵出 14 天后降低到成年水平^[12]。玉米中的 ADF 分子 ZmABP1 和 ZmABP2 在花粉粒和萌发的花粉管中特异表达,而 ZmABP3 在这个时期检测不到,可能在这一特定的发育阶段,ZmABP1 和 ZmABP2 受到某种信号的调节而表达^[13]。但在大鼠小脑的整个发育过程中,ADF 的量始终保持恒定,且主要位于 Purkinje 细胞中^[14]。

二、ADF/cofilin 分子家族对肌动蛋白的作用及其调节

1. ADF/cofilin 分子家族对肌动蛋白的作用

ADF/cofilin 分子家族在一定条件下可以与 G-actin、F-actin 相结合,形成 1:1 的 ADF-actin 复合物,但对结合了 ATP、ADP、AMPPNP 等核苷酸的 G-actin 和 F-actin 的亲和力不同。其中人的 ADF 与 G-actin 结合形成的复合物的解离常数为 $0.2\mu\text{mol/L}$ ^[11],源于鸡胚胎细胞中的 ADF 在体外与 G-actin-ATP 和 G-actin-AMPPNP 结合形成的复合物的解离常数是 $0.1 - 0.2\mu\text{mol/L}$,而与 G-actin-ADP 结合形成的复合物的解离常数为 $1.3\mu\text{mol/L}$ ^[15]。在生理离子条件和 pH7.8 时,拟南芥 ADF1 结合 G-actin-ADP 或 F-actin 的量是 ATP 或 ADP-Pi 结合形式的两倍^[16],表明 ADF 能够优先与 actin-ADP 相结合。变形虫的 actophorin 与变形虫和兔骨骼肌的 G-actin 的亲和力相同,但对兔 F-actin 的亲和力是对变形虫 F-actin 的亲力的

本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号:39870373)。

10倍^[17]。1997年 Jiang 等用玉米 ZmADF3 的两个突变体进行实验, ZmADF3-1 为分别用 Phe 和 Gly 替换 ADF3 中 Tyr103 和 Ala104 的突变体, 结果与 G-actin 和 F-actin 的结合能力均减弱; ZmADF3-2 为用 Phe 替换 ADF3 中 Tyr67 和 Tyr70 的突变体, 结果对 G-actin 的亲合力与 ADF3 相似, 但不与 F-actin 相结合, 表明 ADF 与 G-actin 和 F-actin 的结合部位不同^[18]。

在一定条件下, ADF/cofilin 可以促使肌动蛋白微丝解聚。例如人的 ADF、鸟的 ADF、cofilin、猪的 destrin、变形虫的 actophorin 以及棘皮动物的 depactin 等在较高的 pH 值条件下, 都可以促使微丝解聚^[5,8,11]。但是, 不同来源的 ADF/cofilin 和肌动蛋白之间的作用也不相同。如尽管秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的肌动蛋白和兔骨骼肌的肌动蛋白的生化特性相同, UNC-60 对 *C. elegans* 的微丝具有明显的解聚活性, 而对兔骨骼肌的微丝无明显作用^[19]。有人认为 ADF/cofilin 是通过隔离肌动蛋白单体促使微丝解聚的, Charlier 等则认为通过改变 G-actin 的临界浓度来实现的^[16], 而 McGough 等的研究证明 cofilin 可能是通过增加微丝之间的扭曲程度, 从而促使微丝解聚的^[20], 这方面的机理还有待进一步的深入探讨。另外值得一提的是, ADF/cofilin 不只具有结合肌动蛋白和解聚微丝的活性, 改变条件, 它们也能促使微丝聚合^[1]。

2. 影响 ADF/cofilin 分子家族对肌动蛋白作用的因素

ADF/cofilin 对肌动蛋白的作用受多方面因素影响的, 但通常它们都受 pH 的调节。人的 ADF 在 pH < 7.0 时, 与 F-actin 结合, 在 pH > 7.5 时, 仅与 G-actin 结合^[11]。鸡的 ADF 在 pH 6.5-7.1 时与 F-actin 共沉淀, 仅有微弱的解聚活性; 在 pH 7.1-7.9 时解聚活性增强, 而结合 F-actin 的活性减弱; 在 pH 8.0 时以化学计量的方式解聚微丝, 形成 1:1 的 ADF-G-actin 复合物^[15], 此时 ADF 也可以隔离 G-

actin, 阻止肌动蛋白的聚合。pH 对该类分子的影响表现为低 pH 值时与 F-actin 结合, pH 值升高, 解聚活性增强, 与 F-actin 的结合能力减弱, 而与 G-actin 的结合能力增强。但变形虫的 actophorin 对肌动蛋白的作用却不受 pH 值的影响, 它在各种 pH 条件下与鸡的 ADF 在 pH 6.5 时结合 F-actin 的形式相似^[15]。

ADF/cofilin 的活性还受细胞内外信号分子以及自身磷酸化的调节。ADF 有两种形式, 磷酸化的 ADF (pADF) 不结合 G-actin, 也不使微丝解聚, 在体外用碱性磷酸酶去除磷酸基团可以恢复它的解聚活性^[21]。在 HeLa 细胞中导入 ADF 的突变体 cDNA, 使 Thr25、Ser24 突变或被替换, ADF 表达且能被磷酸化; 而 Ser3 被剔除或是被 Ala 或 Glu 替换, ADF 表达但不能被磷酸化, 表明 Ser3 (成熟肽的 Ser2) 为 HeLa 细胞的 ADF 分子中唯一的磷酸化位点^[21]。Smertonko 等用同样的方法证明 Ser6 为玉米中 ZmADF 唯一的磷酸化位点^[22]。Morgan 等在体外实验中, 用任选的 4 种蛋白激酶—依赖于 Ca^{2+} /CaM 的蛋白激酶 II (CaM kinase II)、蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC) 和肌球蛋白轻链激酶 (MLCK)—对源于鸡胚胎的 ADF 进行磷酸化实验, 发现 CaM kinase II 具有微弱的磷酸化活性, 而 PKA、PKC 和 MLCK 都不能使 ADF 磷酸化, 推测体内有更加特异的蛋白激酶的作用^[23]。在 HT4 和皮层神经元细胞中 Ca^{2+} 浓度和 cAMP 浓度的升高可以使 pADF 快速去磷酸化, Ca^{2+} 是通过激活蛋白磷脂酶 2B (PP2B) 使 pADF 去磷酸化的; cAMP 则通过激活蛋白磷脂酶 1 (PPI) 来实现^[24]。用 cAMP 处理培养的星形胶质细胞, 15 分钟后引起肌动蛋白骨架的破裂^[25]。表皮生长因子 (NGF)、胰岛素、促肾上腺素 (TSH) 等也能导致 pADF 的快速去磷酸化, 生长因子对 ADF/cofilin 分子具有磷酸化和去磷酸化的双重作用^[24]。10% 的 DMSO、dBcAMP、ML-9 等处理也可以降低 ADF 的磷酸化水平, 引起微丝的重排^[26,27]。所有这些因子可能都是通过细胞内的信号途

径,即信号分子通过细胞内部的第二信使,调节蛋白激酶/磷脂酶的活性,使 ADF 磷酸化或 pADF 去磷酸化,实现对细胞内肌动蛋白骨架的精细调节。

一些位于较高等生物体内的 ADF/cofilin 分子,如脊椎动物的 ADF、cofilin、destrin、玉米的 ADF3、棘皮动物的 depactin 等,含有类似 SV-40 大 T 抗原的兼性结构(KKRKK),在受到细胞内外信号刺激时,可以与肌动蛋白一起从细胞质转入细胞核中^[8,28,29]。用热激或 DMSO 处理培养的细胞,ADF 和 cofilin 便与肌动蛋白一起从胞质转移到核中,形成棒状结构^[27,30]。热激和 DMSO 处理可能触发了 ADF 与肌动蛋白的反应,肌球蛋白可能也参与这一过程。由于热激或 DMSO 处理能够引起动植物细胞的凋亡^[31],推测细胞内的 ADF/cofilin 分子家族也参与了细胞的凋亡过程。而在一些较低等生物的 ADF/cofilin 分子中,如变形虫的 actophorin、弓形虫的 ADF 等,却不具有这一核定位结构^[8,32]。

3. ADF/cofilin 分子家族对肌动蛋白作用的协同性

ADF/cofilin 分子对肌动蛋白的作用还表现为一定的协同性。如脊椎动物的 ADF 和变形虫的 actophorin 能够协同结合 F-actin^[33]。实验证明,profilin 与 ADF 协同作用可以促使微丝踏车(tread milling)的速度比在纯肌动蛋白溶液中高 125 倍^[34],profilin 和 ADF 可能是在微丝纤丝的两端以互补的方式促进这一踏车过程的。在 pH6.0-8.0 时,UNC-60A 可以解聚微丝,但不再与 F-actin 结合;而 UNC-60B 可以结合 F-actin,但却不能使微丝解聚,表现为相互补充的效应^[3]。但是,变形虫中的 actophorin 与来源于兔骨骼肌的 F-actin 之间结合表现为协同性,而与自身来源的 F-actin 之间的结合和分离表现为简单的双分子反应^[17]。此外,ADF/cofilin 分子家族对肌动蛋白的作用也可以被另外一些肌动蛋白的结合蛋白所调节,如原肌球蛋白结合 F-actin 以后可以防止微丝

被 ADF 解聚^[24];在 25℃ 时,以 8.4/1.0 的摩尔比结合形成的肌动蛋白-肌球蛋白复合物,可以保护 58% 的微丝在 3 小时内不被过量的 ADF 解聚^[12]。这将有利于有机体细胞在一定条件下,保持相对的平衡和稳定。

三、ADF/cofilin 分子家族的序列保守性

ADF/cofilin 家族的各个分子的大小和氨基酸序列虽然不尽相同,但却具有很大程度的相似性。

人类 ADF 分子的 cDNA 有 1452bp,编码的 ADF 分子具有 165 个氨基酸残基,分子量为 19KD,该分子 100% 同源于猪的 destrin,95% 同源于鸡的 ADF,70% 同源于猪和鼠的 cofilin,但与 actophorin 仅有 28% 的序列相似^[10]。鸡胚 ADF 具有 165 个氨基酸残基,70% 同源于鸡和哺乳类的 cofilin^[29];鸡胚 cofilin 具有 166 个氨基酸残基,80% 同源于猪脑的 cofilin^[29]。蟾蜍的 ADF 具有 168 个氨基酸残基,分别与鸡的 ADF 和 cofilin 有 66%、77% 的序列同源性^[6]。玉米中的 ZmABP3 分子量为 17KD,与 ZmABP1 和 ZmABP2 分别有 56% 和 58% 的同源性^[35]。而弓形虫的 ADF 仅有 118 个氨基酸残基,分子量为 13.4KD,仅由单一拷贝基因编码^[25]。

在 ADF/cofilin 分子家族的 N 端和 C 端具有与肌动蛋白结合的部位。在 N 端,人 ADF、鸡 ADF、猪 destrin 中为 M¹A²S³G⁴V⁵Q⁶V⁷A⁸D⁹,在鸡 cofilin 中为 M¹A²S³G⁴V⁵T⁶V⁷N⁸D⁹,酵母的 cofilin 为 M¹S²R³S⁴G⁵V⁶A⁷V⁸A⁹D¹⁰;在 C 端,人 ADF 和猪 destrin 为 W¹⁰⁴A¹⁰⁵P¹⁰⁶E¹⁰⁷L¹⁰⁸A¹⁰⁹P¹¹⁰L¹¹¹K¹¹²S¹¹³K¹¹⁴M¹¹⁵,酵母的 cofilin 为 W¹⁰⁴S¹⁰⁵P¹⁰⁶D¹⁰⁷T¹⁰⁸A¹⁰⁹P¹¹⁰V¹¹¹R¹¹²S¹¹³K¹¹⁴M¹¹⁵,棘皮动物的 depactin 为 W¹⁰⁴S¹⁰⁵M¹⁰⁶E¹⁰⁷T¹⁰⁸A¹⁰⁹N¹¹⁰I¹¹¹K¹¹²L¹¹³K¹¹⁴M¹¹⁵^[10,22,36,37]。Yonezawa 等用模拟 cofilin C 端结合肌动蛋白位点的人工合成十二肽实验,发现它可以抑制肌动蛋白与 cofilin 的结合^[36],进一步证明这一

序列为 ADF/cofilin 与肌动蛋白结合和促使微丝解聚的必需序列。可以看出无论是与肌动蛋白的结合部位还是分子的全序列,都是高度保守的,这种保守性表现为物种间的亲缘关系越近,分子间的相似程度越高。正是这种结构上的保守性,保证 ADF 分子对肌动蛋白的调节功能。

四、ADF/cofilin 分子家族对生物体生命活动的影响

由于肌动蛋白骨架参与了细胞内一系列的生理活动,而 ADF/cofilin 分子家族可以直接作用于肌动蛋白,必然对这些生理活动也有重要影响。

1. 细胞的移动

粘菌中 cofilin 过量表达至正常细胞水平的两倍,在细胞内形成肌动蛋白网,细胞皱褶明显,细胞移动的速度也相应增加两倍。这与离体条件下,在稀释的血小板抽提物中加入过量的 ADF1 后,引起微丝踏车速度加快的结果相似^[38]。

2. 胞质环流

将在细菌中表达重组的玉米 ZmADF1 注入鸭跖草雄蕊毛细胞中,起初细胞内所有的胞质环流均停止,中心横越液泡的微丝束被破坏,20-45 分钟后,环流恢复,但在胞质皮层中呈明显的横向流动,用荧光标记的罗丹明检测,发现纵向的肌动蛋白网已被横向的射线所替代,这与新的环流方式相一致^[39]。

3. 神经元的生长

将³⁵S 标记的 Met 注入鸡腰椎脊髓的坐骨神经中,间隔 20 天检测,发现肌动蛋白与其结合蛋白 ADF、cofilin、profilin 一起沿着轴突转移,且转移的速度相同,其方式可能是 ADF、cofilin、profilin 与肌动蛋白结合形成复合物一起缓慢移动。在这个过程中,ADF 和 pADF 的活性没有明显的变化,可能在整个过程中,失活与再激活的 ADF 连续存在,以促使 G-actin 与 F-actin 的交换^[40,41]。

4. 花粉管的萌发

在花粉进入休眠和花粉管萌发的激活过程中,均需要肌动蛋白骨架的重排。玉米基因 ZmABP1 和 ZmABP2 在花粉粒及萌发的花粉管中特异表达,但是 ZmABP3 在这个时期检测不到^[22],可能在这一特定的发育阶段,ZmABP1 和 ZmABP2 受到特定信号的刺激而表达,并进一步参与调节肌动蛋白的重排过程^[13]。

5. 胞质分裂

cofilin 位于许多哺乳动物细胞和早期爪蟾胚的卵裂沟中。无论抑制肌动蛋白聚合或是抑制肌动蛋白解聚的试剂均可阻断胞质分裂。在爪蟾二细胞胚阶段,在其中一个细胞中注入 XAC (Xenopus ADF/cofilin) 抗体,可以抑制 XAC 的活性,该细胞的胞质分裂就被阻断,而核分裂照常进行;注入含 XAC 不能被磷酸化的融合蛋白,也可以抑制胞质分裂^[6],因此在早期胚胎卵裂过程中,XAC 的活性及其调节具有重要意义。与此相似,果蝇 cofilin 在幼虫的胞质分裂过程中亦具有重要作用^[7]。

6. 疾病的发生与治疗

出生后骨骼肌的发育过程中,cofilin 的表达是负调节的,在正常成鸡的胸肌和正常老鼠的大腿肌中,仅检测到低水平的 cofilin,而 ADF 在成熟骨骼肌中检测不到,但在营养不良症状比较明显的骨骼肌中,cofilin 的含量明显增加。推测营养不良可能刺激 cofilin 的过量表达,进而破坏肌细胞中的肌动蛋白骨架^[42]。用药物治疗血吸虫病,发现药物导致病原体幼虫细胞表面变化,典型的特征就是细胞表面的针状突起消失,检测发现近膜的肌动蛋白骨架遭到破坏^[13],因而设想可以从分子途径上找到治疗血吸虫病的方法。

另外,由于 ADF/cofilin 分子在生物体的不同发育阶段,其分布和含量也有变化,也会影响生物个体的发育^[6,12]。

经过近 20 年的研究,ADF/cofilin 分子家族的结构、分布、作用机理以及生物学效应等方

面,取得了重大进展。但是依然存在许多问题,如 ADF 促使微丝解聚的机理,细胞在受到刺激后 ADF 与肌动蛋白一起从细胞质向核内转移的机理及其意义,以及 ADF 对核内骨架的调节等都有待进一步的深入探讨。且大多数的研究都集中在动物细胞,而对植物材料研究的报道还比较少。这些问题的解决,不仅对研究细胞骨架动力学方面具有重要的理论意义,而且还可能为人类疾病的研究和治疗提供一些新的思路。

参 考 文 献

- [1] Theriot, J. A. et al., 1993, *Cell*, **75**(5):835-838.
- [2] Theriot, J. A., 1997, *J. Cell Biol.*, **136**(6):1165-1168.
- [3] Ono, S. and Benian, G. M., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**(6):3778-3783.
- [4] Moriyama, K. et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**:5768-5773.
- [5] Giuliano, K. A. et al., 1988, *Biochemistry*, **27**(25):8931-8938.
- [6] Abe, H. et al., 1996, *J. Cell Biol.*, **132**(5):871-885.
- [7] Gunsalus, K. C. et al., 1995, *J. Cell Biol.*, **131**:1243-1257.
- [8] Quirk, S. et al., 1993, *Biochemistry*, **32**(33):8525-8533.
- [9] Kim, S. R. et al., 1993, *Plant Mol. Biol.*, **21**(1):39-45.
- [10] Guillen, N. et al., 1998, *Parasite*, **5**(2):107-117.
- [11] Hawkins, M. et al., 1993, *Biochemistry*, **32**(38):9985-9993.
- [12] Berstein, B. W. and Bamberg, J. R., 1982, *Cell Motil.*, **2**(1):1-8.
- [13] Lopez, I. et al., 1996, *Proc. Natul. Acad. Sci.*, **93**(14):7415-7420.
- [14] Lena, J. Y. et al., 1991, *J. Neurosci. Res.*, **30**(1):18-27.
- [15] Hayden, S. M. et al., 1993, *Biochemistry*, **32**(38):9994-10004.
- [16] Carlier, M. F. et al., 1997, *J. Cell Biol.*, **136**(6):1307-1322.
- [17] Blanchoin, L. and Pllard, T. D., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**(22):15538-15546.
- [18] Jiang, C. J. et al., 1997, *Proc. Natul. Acad. Sci.*, **94**(18):9973-9978.
- [19] Ono, S. 1999, *Cell Motil. Cytoskelton*, **43**(2):128-136.
- [20] McGough, A. and Chiu, W., 1999, *J. Mol. Biol.*, **291**(3):513-519.
- [21] Agnew, B. J. et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, **270**(29):17582-17587.
- [22] Smertonko, A. P. et al., 1998, *Plant J.*, **14**(2):187-193.
- [23] Morgen, T. E. et al., 1993, *J. Cell Biol.*, **122**(3):623-633.
- [24] Meberg, R. G. et al., 1998, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **39**(2):172-190.
- [25] Padmanabhan, J. and Skelanski, M. L., 1998, *Neurochem. Res.*, **23**(3):377-384.
- [26] Baorto, D. M. and Mellado, M. L., 1992, *J. Cell Biol.*, **117**(2):357-367.
- [27] Saito, T. et al., 1994, *Exp. Cell Res.*, **212**(1):49-61.
- [28] Adams, M. E. et al., 1990, *Biochemistry*, **29**(32):7414-7420.
- [29] Abe, H. et al., 1990, *Biochemistry*, **29**(32):7420-7425.
- [30] Ono, S. et al., 1996, *Cell Struct. Funct.*, **21**(6):491-499.
- [31] 陈浩明等, 1999, 科学通报, **44**(2):196-200.
- [32] Allen, M. E. et al., 1997, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **88**(1-2):43-52.
- [33] Maciver, S. K. et al., 1998, *Eur. J. Biochem.*, **256**(2):388-397.
- [34] Didry, D. et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**(40):25602-25611.
- [35] Jiang, C. J., 1997, *Plant J.*, **12**(5):1035-1043.
- [36] Yonezawa, N. et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, **266**(16):10485-10489.
- [37] Moon, A. L. et al., 1993, *J. Cell Biol.*, **120**(2):423-435.
- [38] Aizawa, H. et al., 1996, *J. Cell Biol.*, **132**:325-344.
- [39] Husey, P. J. et al., 1998, *Plant J.*, **14**(3):353-357.
- [40] Mills R. G. et al., 1996, *J. Neurochem.*, **67**(3):1225-1234.
- [41] Bray, J. J. et al., 1992, *J. Neurochem.*, **58**(6):2081-2087.
- [42] Ayakawa, K. et al., 1993, *J. Biochem. (Tokyo)*, **114**(4):582-587.