

鈣離子引發的分子變化

鈣離子在心肌與橫紋肌收縮舒張所扮演的角色

以及對 *Troponin-Tropomyosin* 錯合物所誘導的結構變化

藥四：莊鳳至 譯
藥四：秦 玲

一、肌肉收縮的生理機能

今天在生化上最令人感興趣，且最具挑戰性的問題之一，即是一由鈣離子引發分子反應，而導致肌肉收縮的機制。現在，讓我們來考慮肌肉構造上的一些基本概念。圖一¹，乃有關橫紋肌的概要圖表。肌肉由肌細胞組成，因肌細胞極細長，所以稱之為肌纖維，其藉着肌腱附着在作用處的骨骼上。肌纖維又由肌原纖維組成，呈現規則而重複之交叉條紋模式，這些重複的單位稱為肌片（Sarcomeres）。肌原纖維則再由肌絲組成，分為：(i)粗絲（thick filaments）——直徑約 150\AA ，長約 $1.5\sim 1.6\mu$ ，由肌凝蛋白（myosin）排列而成。(ii)細絲（thin filaments）——直徑約 60\AA ，其主要的蛋白質為肌動蛋白（actin）。粗絲與細絲僅在肌片的中央部份（或稱為 A band）重疊，在電子顯微鏡下可看出，這重疊的區域，由粗絲向細絲伸展開的所謂 cross-bridges。肌肉的收縮作用即肌絲間相對的移動，而肌絲本身的長度則沒有改變。此種相對的移動，乃 cross-bridges 形成與瓦解的結果。

上述變化發生的訊息，係因神經衝動抵達肌肉，使鈣離子部份游離而產生。而這種訊息又由組成細絲的兩種蛋

白質分子——tropomyosin 及 troponin 所偵測而引發作用。此兩種蛋白質的正確位置可由圖二得知：主要的蛋白質 fibrous actin（簡稱 F-actin）由兩束珍珠串（每一珍珠代表一分子 globular actin 或簡稱 G-actin）而彼此互相盤繞着。Tropomyosin 為棒狀分子，一個接一個地嵌在二股肌動蛋白間的溝中，每條分子的長度和 7 個肌動蛋白單體的長度差不多。細絲每間隔 400\AA 即存在一 troponin 複合體，此又由三部份組成：Ca²⁺-binding Subunit（TN-C），Inhibitory member（TN-I），和 Troponin-binding subunit（TN-T）。TN-I 可以抑制 actomyosin 之 Mg²⁺ activated ATPase 的活性，而抑制了肌肉的收縮。TN-C 乃一種可與鈣離子結合的蛋白質，能使之為 TN-I 所抑制的肌肉收縮作用恢復過來。至於 TN-T 則可使 troponin 複合體結合在 tropomyosin 上。

現在，我們來討論有關肌肉收縮及鬆弛的問題。鈣離子的濃度在休息態的肌肉時，低於 10^{-7}M ；而 tropomyosin-troponin 系統之各成分協調作用的結果，抑制了肌原纖維之 Mg²⁺-stimulated ATPase 的活性，而神經衝動所引發的肌肉膜毀極化現象，使鈣離子釋出而使肌肉收縮。釋出的鈣離子則緣自肌漿網的膜部位（肌漿網即 Sarcoplasmic reticulum，簡稱 SR），這時候鈣離子在肌漿中的濃度提升到 $10^{-5}\sim 10^{-6}\text{M}$ 左右，在這種濃度下，鈣離子將結合在

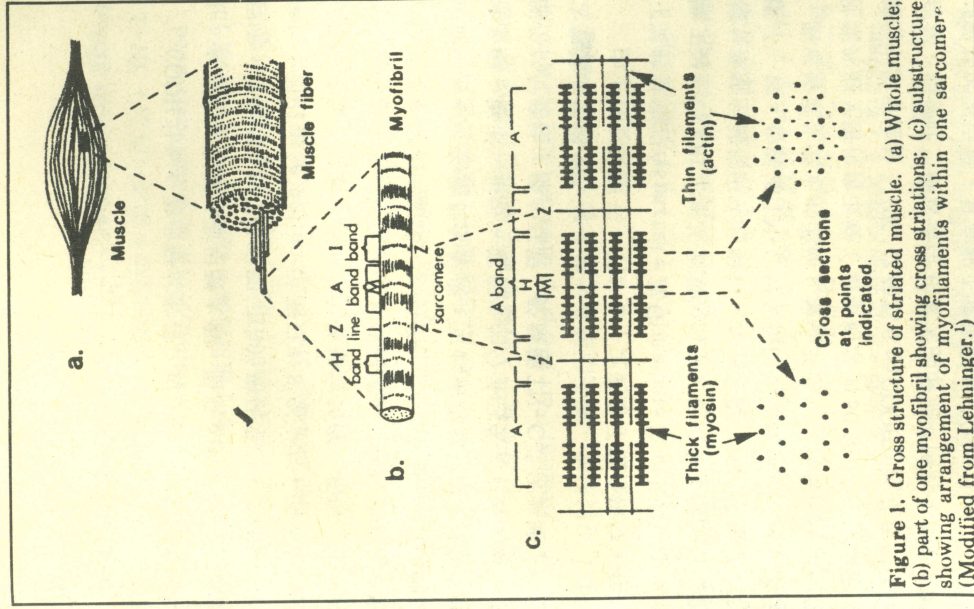


Figure 1. Gross structure of striated muscle. (a) Whole muscle; (b) part of one myofibril showing cross striations; (c) substructure showing arrangement of myofilaments within one sarcomere. (Modified from Lehninger.)

tropomyosin 複合體之 TN-C 部分。而 Fibrillar ATPase 不再被抑制，因而 ATP 水解加速，引起收縮作用。一旦刺激終止，鈣離子將又被肌漿網回收，而恢復靜止狀態的濃度；而由於鈣離子與 troponin 複合體分開，引起蛋白質調節系統的抑制作用，所以肌肉鬆弛了。

由圖三⁸⁻¹⁰可知，在鬆弛狀態，TN-T 單體結合在 tropomyosin 上，而 TN-I 則結合在肌動蛋白 (actin) 上；此時，tropomyosin 有阻止肌凝蛋白與肌動蛋白結合

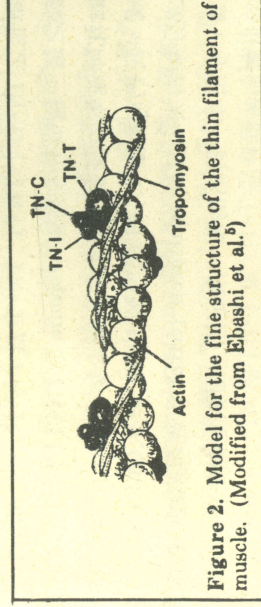


Figure 2. Model for the fine structure of the thin filament of muscle. (Modified from Ebashi et al.)

的作用。一旦鈣離子自肌漿網釋出，並與 TN-C 結合，TN-I 與肌動蛋白結合處便斷裂了，此時 TN-I 自肌動蛋白處移開，或轉移到肌動蛋白另一位置，以便使 tropomyosin 可由肌動蛋白上的阻斷位置，移到一更接近兩束肌動蛋白之螺旋間溝處，這也就是所謂「開」的位置，因而肌凝蛋白結合在肌動蛋白上，肌肉於是乎收縮了。而鈣離子自 TN-C 移走，由肌漿網回收，則發生鬆弛的現象。

回述上步驟可推得，Tropomyosin 再度阻斷了肌凝蛋白與肌動蛋白的相互作用，並抑制了 actomyosin 之 ATPase 的活性，這亦即「關」的位置，以便再進行「收縮-鬆弛」之循環。

由氨基酸之次序可得知 TN-C 多肽鏈的分子量，為 17,840，它是一種酸性蛋白質，其等電點為 4.1~4.3，分子中不含有 tryptophan，但含有二分子 tyrosine，其 phenyl amine 與 tyrosine 的比值為 5:1，明顯地由於

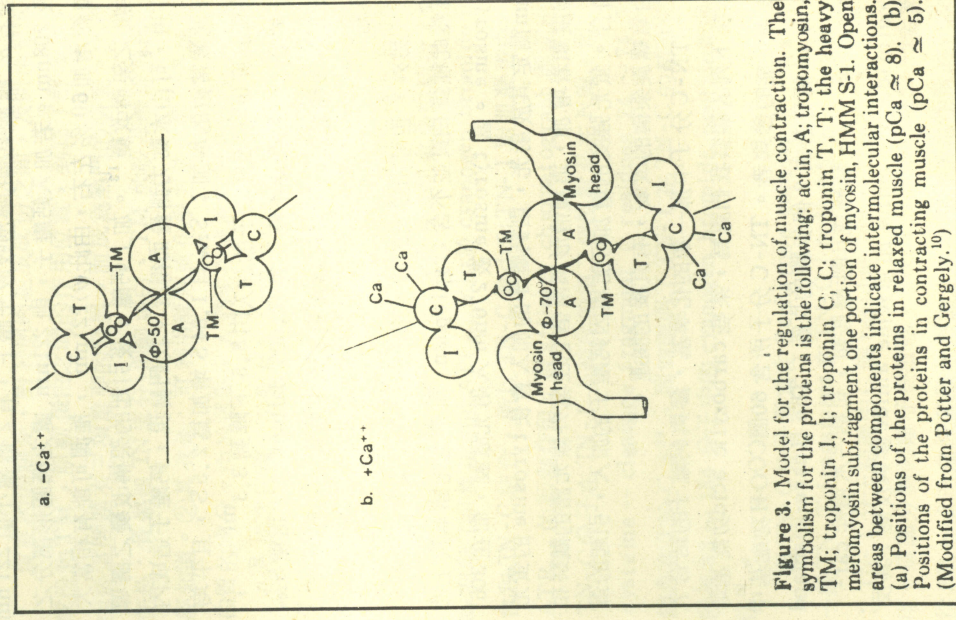


Figure 3. Model for the regulation of muscle contraction. The symbolism for the proteins is the following: actin, A; tropomyosin, TM; troponin I, I; troponin C, C; troponin T, T; the heavy meromyosin subfragment one portion of myosin, HMM S-1. Open areas between components indicate intermolecular interactions. (a) Positions of the proteins in relaxed muscle ($pCa \approx 8$). (b) Positions of the proteins in contracting muscle ($pCa \approx 5$). (Modified from Potter and Gergely.)

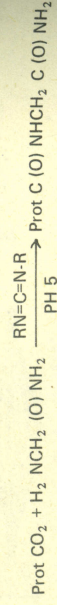
phenylamine 的關係，吸收光譜顯示出 5 個吸收值，用平衡透析法得知 TN-C 有二個結合位置與鈣離子有高度親和力，這兩個位置也能與鎂離子結合 ($K_{Ca} = 2.1 \times 10^{-7} M^{-1}$, $K_{Mg} = 5.0 \times 10^3 M^{-1}$)，另有二個結合部位則只能和鈣離子結合 ($K_{Ca} = 3.2 \times 10^5 M^{-1}$)¹²；此外並發現，當 TN-C 和 TN-I 互相作用，或者直接以完整的 troponin 分子（不將次單元分開）做鈣離子結合力測定時，TN-C 四個結合位置和鈣離子的親和力約增加 10 倍左右。

二、鈣離子在 TN-C 誘導的結構變化

用 TN-C 變向色性波紫外線光譜 (far-uv circular dichroism spectrum, 簡稱 CD) 來偵測，顯示鈣離子濃度對蛋白質構造的變化，有很大的影響。蛋白質顯示出，含有 α -螺旋架構的典型吸收光譜上，有 2 個極小值 221 nm 及 208 nm。若加入鈣離子，則 221 nm 處之橢圓形部分之值約增加 60% 左右，由此 (0)221 nm，推測可能有相當大程度之架構改變¹³。加上鈣離子後引起的架構改變之誘導作用，可由水動力測量而得證。我們發現，鈣離子造成內部沈澱常數的增加； S_{20w} 自 1.84 S 增加為 2.5 S，且平均內部黏度 (η)，因鈣離子的加入由 8.5 下降到 3.3 ml/g，至於分子量則保持不變（為 18,000 daltons）。這種 S_{20w} 及 η 的改變意味着，分子變得更緊密，結構更有層次而不紊亂。

另外，也可用螢光的測定來追蹤 TN-C 架構的改變。既然此種蛋白質並不含有 tryptophan，則螢光光譜本質上乃 tyrosine。當 tyrosine 被 276 nm 入射光激發，而在 306 nm 測定其放射光，則鈣離子的加入會使 tyrosine 的螢光強度顯著增加，這種情形與兩個色性紫外線光譜的觀察相符合。螢光強度的增加可能與因鈣離子的加入，引起的蛋白質螺旋架構的改變，有直接的關連。¹⁵⁻¹⁶

TN-C 分子中那一類的化學基，參與鈣離子的結合？依據下列的觀察我們認為，某些 carboxylic acid 功能基是最有可能的參與者。TN-C 分子所含 60 個 COOH 功能基中，有 40 個可經由 2 個步驟的反應 (The Hoare-koshland reaction)，轉變成中性醯胺類，包括一水溶性 carboximidamide 及一 amine 如 glycine amide 參與反應；其反應式：



COOH 功能基被改變的數目，可由氨基酸的分析而得知。其做法是將蛋白質用酸水解，而測 glycine 數量增加的程度。這些衍生的 TN-C 即可由光譜研究之，其因鈣離子的加入而引起 (0)221 nm 改變只有 8% 左右，而未經處理的 TN-C 加上鈣離子所引起的改變為 60%。相對的，在沒有鈣離子存在下，衍生物之基準線值約 3000'，較原態 TN-C 之值更低，很明顯地，在分子上加入 40 個 glycinamide，而失去 40 個陰電荷的結果，可以誘導如鈣離子所致的架構改變。更進一步說，這衍生的分子已失去它對鈣離子大部份的反應性；換句話說，較原態 TN-C 之因鈣離子引起的架構改變為小¹⁴。

由上述結果顯示，TN-C 上之鈣離子結合部位，包括了某些重要的 Aspartate 或 Glutamate 之 COOH 功能基。關於這些 COOH 功能基周圍的情形，可由發生酸鹼度而影響本系統的結構研究而得知。我們發現， H_3O^+ 離子和鈣離子一樣，會誘導 TN-C 發生相同的架構改變。換句話說，兩者皆產生螢光的改變（增強 30%），同樣的，兩向色性紫外線光譜也會改變（負值約增加 50%）¹⁷。從滴定曲線的中點可推論：PK_a 之值為 6 的 COOH 功能基與質子結合後，將使此二變數產生相當大的增加。因許多含 COOH 功能基的蛋白質，具有較正常為高的 PK 值（大於 6）¹⁸，所以這種高的 PK 值並非不尋常的，而高 PK 值的羧酸鹽，乃因多個相同的功能基聚在一起而形成，特別是當周圍環境為疏水性時！

三、TN-C 被誘導的結構改變經由鬆弛系統而增殖

我們已描繪了因加入鈣離子使 TN-C 分子誘導了一個大而有趣的結構改變，如果這種改變必須有生理上的關連，那就必須證明：雖然它是起源，然須由完整的肌肉鬆弛系統來傳導。Potter²⁰ 指出，由肌絲的研究可知，troponin 單位之 TN-C : TN-I : TN-T 為 1 : 1 : 1，可知等莫耳數之這三種成分來重組 troponin (TN-I(T))，進一步說沈澱速率的測量可用來證明錯合物 (complex) 的形成。我們可觀察 TN-I(T) 的 Slow = 3.05 S，較單一各成分來得大，且其 schlieren pattern 經超速離心機的觀察，可由單一對稱的峯，來定性；而其並無任何緩慢移動的波峯而證明²¹。

同樣的用 troponin complex 之不同成員來做 ATP_{ase} 的測定可做為 complex 形成的指示。如表一所示，TN-I 抑制了合成的 actomyosin 的分析系統中 Mg⁺⁺-activated ATP_{ase} 作用，與鈣離子濃度無關，既然 TN-I 不與鈣離子結合，則鈣離子對此抑制作用將不敏感。即使缺乏鈣離子，TN-C 的加入仍會使 TN-I 的抑制作用逆轉，這暗示著 TN-C 存在時，TN-I 與 actin-TM 的結合將會改變，因為即使缺乏鈣離子，myosin 和 actin 的聯結（亦可能伴隨着 TM 分子的轉位）仍是可發生的。^{22, 23}

除了沈降速度和 ATP_{ase} 的測量外，還有其他的方法可以用來證明鬆弛系統中，各種組成成份間的特異作用。舉例來說：Head 和 Perry 用 poly urea gel 來證明 TN-C 和 TN-I 可以形成一種強烈結合的錯合物，但必須有鈣離子的存在方可²⁴。

我們用心肌的 TN-I，TN-T 以 1:1 的比例混合，用雙向色性長波和短波紫外線光譜來測量，把觀察到的光譜和理論值加以比較。假設它們都是等莫耳數，且不會互相作用。結果這二光譜相差 500° 多，這證明 TN-I，TN-T 之間的作用，會形成一錯合物，而引起其中之一或二者蛋白質二級構造的改變。在這特別的情況下，在 220nm，測得 1000° C 的 negative ellipticity 會增加；證明了 TN-T，TN-I 之間的作用。同樣的，用雙向色性短波紫外線光譜可以證明錯合物中一些 tyrosines 發生了環境的變化。²⁵ 早期曾研究過骨骼肌中 troponin 的 Cross-linking，發現 TN-T 和 TN-I 是利用 dimethyl imidoesters 來結合，而形成 TN-T-TN-I 錯合物²⁶。

值得注意的是，當心肌 TN-I 組成成份中 2 個氫硫基沒有維持在還原態的話，雙向色性紫外線光譜便無法證明 TN-T，TN-I 之間的作用。Horwitz et al 觀察到骨骼肌的 TN-T-TN-I 之間的作用有類似的現象發生²⁷。當企圖後各次單位體 (Subunits) 重新構成另一錯合物，或處理 native troponin 時，troponin complex 中的各成員就會形成非生理性的雙硫鍵 (分子內的結合)，但氫硫基必須加以保護才行。像這種錯誤組成的錯合物，可能具有某種程度的硬度，而無法和鈣離子正常地結合。

共同沈澱法 (Co-Sedimentation) 的研究，是另外一種證明複合 (complexation) 情形的有效方法。還有另外一種方法可以用來顯示 TM, TN-I 及 TM, TN-T 分子間的作用，方法是：TM 和 TN-I 或 TN-T 混合在 0.5MKCl

Table I
ATPase Measurements of Synthetic Actomyosin^a

	ATPase activity, μmol of PO ₄ s ⁻¹ g of actomyosin ⁻¹	EGTA	Ca(II)
no troponin	8.3		8.1
troponin I	5.3		5.4
troponin I + C	8.1		8.2
troponin C + T	8.0		8.1
troponin I + C + T	2.0		8.4

^a These measurements were made as described in ref 21. All assay systems contained: myosin, 0.60 mg; actin, 0.15 mg; tropomyosin, 0.04 mg; and troponin (TN-I, 0.06 mg; TN-IC, 0.11 mg; TN-CT, 0.14 mg; TN-ICT, 0.48 mg) in 10 mL of reaction mixture.

，然後稀釋至 0.1 MKCl，這稀釋液中會有部分的蛋白質沈澱，此沈澱用此便可以證明蛋白質之間的作用²⁸。

四、Troponin 次單元體間作用點的化學性質

現在的問題是：對於肌肉組成成份之間，及肌肉組成成份和 TM，肌動蛋白之間的作用位置，到底了解多少。由於這問題有三項重要的發展，而成爲熱門的研究。①首先是：骨骼肌 TN 成分、肌動蛋白、TM 的胺基酸排列都已經知道。②其次是：可利用酵素或化學方法來消化各種蛋白質的成分。由於這點，人們現在或許能製造這些分子中，化學構造已確定的斷片 (fragments)。③第三則是：使用 affinity chromatograph)，利用某一蛋白質成分和 Sepharose 的親和力，來識別一些和 Sepharose-P protein 結合的 troponin complex 中的各種斷片。用這種方法證明出：TN-I 之 cyanogen bromide 斷片和肌動蛋白結合，同時抑制了肌凝蛋白的 ATP_{ase}，由於 cyanogen bromide 也會和 TN-C 結合，所以 TN-C 會中和 TN-I 對肌凝蛋白 ATP_{ase} 的抑制作用。用 affinity chromatograph 證明出 TN-C 分子在 TN-I 上結合的第二個位置是在 N 端，而 cysteine - cleavage fragment (residues 24 ~ 74) 結合在 TN-C 上²⁹，同時證明了 TN-I 在 TN-C 的結合位置被 83 ~ 134 分子中的 cyanogen bromide peptide 牽連住³⁰。

把 TN-C 分子固定在 Sepharose column 上，來研究一些 TN-T fragment 在 TN-C 上的結合情形，結果顯示：TN-T 分子結構中 C 端 residue 159 ~ 259 與 TN-C 作用，這部分對鈣離子很敏感。TN-T 分子中 C 端的一段，從 221 ~ 259 之胺基酸，再加上帶有混合價電性質的一段

TN-C 上的鈣離子結合位置那個比較規則。用肌纖維作實驗顯示出：激活 ATP_{ase} 所需鈣離子濃度和鎂離子濃度無關，而且當 4 個鈣離子結合位置都結合時，鈣離子濃度為最大。因此，只有鈣離子特異結合位置是規則的。我們在試管中觀察 TN-C 的構造變化，究竟指的是什麼？很清楚的，當細胞內鈣離子和鎂離子位置，即使是在肌肉鬆弛時也是一樣的。也就是說：即使是在肌肉鬆弛時，我們用螢光或雙向色性紫外線光譜也可以觀察到大部份的構造變化。當鈣離子結合在鈣離子特異的規則結合位置時，雙向色性紫外線光譜和 tyrosine 螢光會有稍微的增加，這也能代表生理上重要的變化。

Potter 的研究一直支持者這項觀點，他用一個對鈣離子特異規則位置具有特異的結構性探針，骨骼肌中 TN-C 在靠近 Site I 的 methioine-25 上用 dansylaziridine 來標示。用 fluorescent reporter 觀察：當鈣離子可能會加到作用位置時之任何構造上的變化³⁶，結果發現，當鈣離子和鈣離子特異位置結合時，dansylaziridine 的螢光強度大約會增強 2 倍左右，而且伴有 10nm 偏向藍光。並且發現，標示處的 TN-C 構造並沒有什麼改變，它仍能結合 4 莫耳鈣離子，它會引起複相的紫外線光譜構造的改變。螢光增加的轉移中點，發生在 $KCa(II) = 4 \times 10^5 l / M$ 時，表示它調整了低親和力鈣離子結合位置。Potter 利用 dansylaziridine 衍生物來測量發生在鈣離子特異位置的構造變化速率。他用 stopped-flow fluorimetry，在 2.4ms 混合時間內，證明鈣離子在這兩種結合位置上，構造和螢光的變化情形。鈣離子從這些結合位置移開的速率都是不同的，鈣離子從高親和力位置移開的速率很慢 ($t_{1/2} = 700ms$)，螢光約增加 10% 左右。然而鈣離子從鈣離子特異位置移開的速率較快 ($t_{1/2} = 2 \sim 3ms$)，它們移開的過程中，螢光的變化是減低的。因為這過程的時間很短，所以快速橫紋肌的收縮、鬆弛差不多需 50ms，顯然的，鈣離子從高親和力位置移開的速率及引起在體內的構造變化是很迅速的，所以低親和力結合位置實際是規則的，這結論似乎很合理的。高親和力結合位置可能被鈣離子或鎂離子所佔據以穩定蛋白質的構造，如此一來，鈣離子特異結合位置上，鈣離子的交換即能規則化³⁷。

五、TN-C 中高和低親和力鈣離子的結合位置

在早期實驗中，用牛心的 troponin 作實驗，研究它的組成成分，及它們之間的作用³⁸⁻⁴¹，因而推測出：心肌收縮的調整和骨骼肌系統的作用模式差不多，但還是有某種程度上的差異，最值得注意的便是：心臟 TN-C 分子只有三個鈣離子結合位置，它們缺乏一個低親和力結合位置，也就是在骨骼肌 TN-C 的 Site I。有更進一步的實驗證明：這二系統的調節方式是類似的，實驗是用骨骼肌和心臟 troponin 的 hybrid complex 作材料，檢視他們的雙向色性和生物活性可以發現，任何三元錯合物，在 220nm 時的 ellipticity 比理論值大，如果再加入鈣離子之間的作用，同樣的，加入鈣離子會使 TN-C 發生構造上的變化，

TN-C 在整個 troponin complex 上傳動，不管在心臟或骨骼肌的三元錯合物上的觀察都是一樣的⁴²。生物學的鑑定研究顯示：在骨骼肌和心臟之肌動、肌凝蛋白系統中的 TN-I 都具有抑制的活性。同時可發現這二者注意的是：心臟中合成的肌動、肌凝蛋白系統的 TN-I 是較弱的抑制者，要比骨骼肌中 Parent actomyosin system 的 TN-I 活性弱。心臟 TN-I 抑制心臟之肌動、肌凝蛋白的 ATP_{ase} 的作用很弱，發現有生理上的關連，因為心肌必須不停工作，從沒有休息和恢復的機會。

八、橫紋肌和心肌中肌凝蛋白的磷酸化

目前為止，對於這方面的討論，針對脊椎動物橫紋肌和心肌，這兩處的調節都是以細絲蛋白質為標準。相對的，平滑肌的調節和粗絲上肌凝蛋白前頭的特異的輕鏈有關，在平滑肌其肌動—肌凝蛋白之間的作用，似乎是由特異的多鍵激酶 (high chain kinase) 引起肌凝蛋白中依靠鈣離子的 20,000 道耳頓輕鏈的磷酸化⁴³。去磷酸化是透過磷酸酶作用而發生的，磷酸酶對鈣不敏感，它的濃度與激酶差不多。依靠鈣離子的磷酸化作用，可以激活平滑肌的 actomyosin ATP_{ase}。橫紋肌與心肌不同於平滑肌^{44/45}，它們只有 calcium-sensitive light chain kinase，骨骼肌和心肌的 myosin 磷酸化和 actin-activated ATP_{ase} 之間並沒有關連。

六、生理的暗示

我們對鈣離子所引發的 TN-C 構造的變化，及整個鬆弛系統到肌肉收縮的調節有了顯著的觀察。顯然的，這些觀察尚不完全，而且還有些重要的問題存在，例如：TM

MCBP (18-29)	AB: cys lys ala asp ser phe asp	his lys ala phe
(50-63)	CD: ile ASP gln ASP lys ser GLY pbs ile glu glu asp GLU leu	
(69-101)	EF: gly ASP ser ASP gly asp GLY lys ile gly val asp GLU phe	
TN-C (28-39)	I: phe (ASP) ala (ASP) gly (GLY) asp (ILE) ser val lys (GLU) leu	
(62-75)	II: val (ASP) glu (ASP) gly (GLY) thr (LE) asp phe glu (GLU) phe	
(101-114)	III: phe (ASP) arg asp asp (GLY) gly ser (LE) asp phe glu (GLU) leu	
(137-150)	IV: gly (ASP) lys ASP aan (GLY) arg (LE) asp phe asp (GLU) phe	

Figure 4. Sequences of rabbit TN-C and carp component 3 MCBP (parvalbumin) in the segments corresponding to the Ca(II)-binding sites of MCBP. Residues (in CD and EF) that are involved in Ca(II) binding are underlined. Residues identical in five or more regions are capitalized. The circles correspond to amino acid identities in sites I and II of TN-C while the squares refer to amino acid identities in sites III and IV. (Modified from Collins et al.¹¹)

(159 ~ 220 之胺基酸)，這些部分具有相當高的鹼性。同樣的，TN-TM 之間的作用，TN-T 分子和 TM 分子中 residue 71 ~ 151 部分結合，TN-T 結合的這部份為螺旋狀構造³¹，作用的時候，二分子間可能會有 multi- α -helix complex 產生，glutamic acid 和 aspartic acid 的 C 端鏈，越過了 TM 雙股螺旋分子中的表面。關於這點，發現到 TN-T 分子顯然是從 hydrodynamic data 而延長的分子。³² TN-T 分子不對稱的性質和 TM 分子類似，由於這個性質，TN-T 才具有它的功用。無疑的，也才能和 TM 分子結合。

七、心肌的調節系統

Collins 建立了 TN-C 的初級結構，他排列了 TN-C 的四個斷片，它們的次序與已知的 protein - parvalbumin 分子之鈣離子結合位置很類似，這是根據 X-ray 結晶論得來的³³。TN-C 分子這部份和 parvalbumin 很類似，相似處包括了：鈣離子結合處的胺基酸，及鄰近分子的胺基酸，TN-C 分子的這四部份也可能就是鈣離子結合的部位，亦可能是這四部分具有類似 parvalbumin。EF 和 CD hand 的三級結構。也有人推測，TN-C 分子的這四部份，可能是由 EF hand 的基因複製而來的。EF hand 或 helix-loop-helix 構造，可能是原始的基因，由這基因再來複製許多次，而形成相同的複製品，但有時會有突變的情形發生。

我們檢查 TN-C 分子這四個假設的鈣離子結合位置，可以發現 Site I 和 Site II 很類似，而 Site II 則和 Site IV 很類似。Site I 與 Site II 有 6 個相同的胺基酸，包括 2 個或更多的 glycines。Site III 和 Site IV 也有 6 個胺基酸相同，到底那個位置的親和力最大？那個位置的親和力最

小？最近由於研究 TN-C 斷片的鈣離子結合位置的性質，對這四部份的性質已有了明確的結果。Leavis et al 利用胰蛋自酶、凝血酵素和 cyanogen bromide，在 TN-C 的不同位置，將它連著的肽鏈一一分開³⁴。這些被分開的段落包含了那四個結合部位 (I to IV)，他們利用雙向色性紫外線光譜和螢光來研究，顯示出最大變化的段落就是包含 Site III 和 Site IV 的段落，引起這光譜的變化，最主要還是因 Site III 之故。由此可知 Site III 之親和力最大，含有 Site I、Site II 的段落，其鈣離子結合處並沒有光譜的變化，這些位置的親和力就很小。含有鈣離子—鎂離子結合位置的段落對鈣離子有很大的親和力，它們也能結合鎂離子。如果把肽鏈分開，使 Site III 和 Site IV 位在不同的段落上改變了具有高度親和力位置的性質，如此它們結合鈣離子的能力就降低了，而且不能和鎂離子結合。可見 TN-C 的三級結構（同一分子內不同部位之間的關係）對定義整個結合位置性質的重要性。在 TN-C 分子上的鈣離子位置對鈣離子的親和力有高有低，如果能用肉眼的技術把這二種結合的位置分辨出來，那將是很有趣的。

我們是否能根據它們之間構造的變化，來分別這二種位置？爲了回答這個問題，可以利用雙向色性紫外線光譜，鈣離子之滴定來檢查橫紋肌中之 TN-C，PH 值須調至 7；我們若以鈣離子所引起的構造變化比上游離鈣離子濃度的負對數值，可以繪成一個圖。由電腦程式來分析這些資料，可以使原有的假設更單純化，原有的假設是說：任何一種的結合位置都是相等的，獨立的，由於不會互作用，而顯示出另外二種結合位置，結果發現大約有 75% 的構造變化，是由高親和力的鈣離子結合位置所產生的 $K \approx 10^7 M^{-1}$ ，25% 是由低親和力的鈣離子結合位置所產生的 ($K \approx 10^{-5} M^{-1}$)。Johnson 和 Potter 做了類似的實驗，他們檢查 tyrosine 的螢光及雙向色性紫外線光譜的變化發現，在這些 parameters 中有複相的反應 (biphasic response)，這種情形大部份是由於高親和力鈣離子—鎂離子結合位置而來，少部份是因低親和力鈣離子特異結合位置而來的³⁵。

八、總結

爲了對鈣離子如何結合在 TN-C 上而對 troponin complex 和 TM 產生抑制效果有更深的了解，我們必須知道

分子是如何活化而移至肌動蛋白之溝中，是否只是由於 troponin restraint 的釋出，或者還是 T M 分子本身構造上的變化。F - actin polymer 是否只是一個構造上非活性的化合物，或是由於 Ca (II) - troponin 之間的作用而發生構造上精巧的變化，在體內的 troponin complex 究竟是什麼樣的形狀，用 Preliminary hydrodynamic measure - ment 測定 TN 分子，可以推測出 TN 不是球形分子，而比較像一個“長形”或“多節”的分子⁴⁶。對於高、低親和力鈣離子結合分子及金屬離子的特異性，究竟有那些標準的要求？一種非常有趣而且唯一解決這個問題的方法是用化學的方法來合成鈣離子作用位置 Site II，及它的相似體，我們可以比較出這成分子物質的結合性質⁴⁷。

我們對於各個 tropinin 次單位體及天然錯合物的結晶方法必須加以發展及改進。X - ray 可以提供當 TN - C 分子和鈣離子結合時，多蛋白錯合物的基本構造及 allosteric-type 的作用情形。無疑的，NMR 可以提供更複雜的方法，將注意力集中在接觸的蛋白質錯合物上，較少注意到分離的次單位體上。最近 NMR 的研究工作上有兩項令人興奮的發展，我們的同伴觀察到：含有高親和力結合位置 Site III 的 TN - C 斷片和 Parvalbumin 分子，在 H' NMR 光譜上可以發現引人注目的移轉，我們可以用具有順磁性的 lanthanide ions, Pr (III) (praseodymium) 與 Yb (III) (ytterbium) 當作鈣離子的相似體⁴⁸，他們抽出圍繞在金屬離子結合位置的胺基酸的三度空間構造，做成溶液，研究它在 NMR 的移轉及移轉共振的鬆弛時間。

對於鈣離子調節所擔任的角色說明，期待更多的進展。例如：對於下述假說的探究：Protein Parvabumin (在較高等動物的骨骼肌內發現) 的作用，是以 TN - C 當作可溶的鬆弛因子。總之，我們在對多蛋白質錯合物的構造一作用之間的關係已有令人興奮的發展。

參考資料

- (1) A. L. Lehninger, "Biochemistry", Worth Publishers Inc., New York, 1970.
- (2) S. Ebashi and M. Endo, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 123 (1968).
- (3) A. Weber and J. W. Murray, *Physiol. Rev.*, **53** (1973).
- (4) S. Ebashi, *Essays Biochem.*, **10**, 1-36 (1974).
- (5) S. Ebashi, M. Endo, and I. Ohisuki, *Q. Rev. Biophys.*, **2**, 351 (1969).
- (6) J. Hanson and J. Lowey, *J. Mol. Biol.*, **6**, 48 (1963).
- (7) W. Hasselbach, *Prog. Biophys. Biophys. Chem.*, **14**, 167 (1964).
- (8) H. E. Huxley, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 361 (1972).
- (9) D. A. D. Parry and M. M. Squire, *J. Mol. Biol.*, **75**, 33 (1973).

- (10) J. D. Potter and J. Gergely, *Biochemistry*, **13**, 2697 (1974).
- (11) J. H. Collins, J. D. Potter, M. J. Horn, G. Wilshire, and N. Jackman, *FEBS Lett.*, **36**, 268 (1973).
- (12) J. D. Potter and J. Gergely, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4628 (1975).
- (13) A. C. Murray and C. M. Kay, *Biochemistry*, **11**, 2622 (1972).
- (14) W. D. McCubbin and C. M. Kay, *Biochemistry*, **12**, 4228 (1973).
- (15) Y. Kawasaki and J. P. van Eerd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 898 (1972).
- (16) M. T. Hincke, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *Can. J. Biochem.*, **56**, 384 (1978).
- (17) S. S. Lehrer and P. C. Leavis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 159 (1974).
- (18) Y. Nozaki, L. C. Bunville, and C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5523 (1959).
- (19) Review of G. Weber and F. W. J. Teale, "The Proteins", 1975, Academic Press, New York, Chapter 17, p. 3.
- (20) J. D. Potter, *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 436 (1974).
- (21) R. S. Mani, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *Biochemistry*, **13**, 5903 (1974).
- (22) W. D. McCubbin, R. S. Mani, and C. M. Kay, *Biochemistry*, **13**, 2689 (1974).
- (23) R. S. Mani, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *FEBS Lett.*, **52**, 127 (1975).
- (24) J. F. Head and S. V. Perry, *Biochem. J.*, **137**, 145 (1974).
- (25) M. T. Hincke, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *Can. J. Biochem.*, **57**, 768 (1979).
- (26) S. E. Hitchcock, *Biochemistry*, **14**, 5162 (1975).
- (27) J. Horwitz, R. Bullard, and D. Mercola, *J. Biol. Chem.*, **254**, 350 (1979).
- (28) R. Dabrowski, Z. Podlubnaya, E. Nowak, and W. Drabikowski, *J. Biochem.*, **80**, 89 (1976).
- (29) H. Syska, J. M. Wilkinson, R. J. A. Grand, and S. V. Perry, *Biochem. J.*, **153**, 375 (1976).
- (30) R. A. Weeks and S. V. Perry, *Biochem. J.*, **173**, 449 (1978).
- (31) J. R. Pearlstone and L. B. Smilhe, *Can. J. Biochem.*, **56**, 521 (1978).
- (32) F. G. Prendergast and J. D. Potter, *Biophys. J.*, **25**, 250a (1979).
- (33) R. H. Kretsinger and C. E. Nockolds, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313 (1973).
- (34) P. C. Leavis, S. S. Rosenfeld, J. Gergely, Z. Graberck, and W. Drabikowski, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5452 (1978).
- (35) J. D. Johnson and J. D. Potter, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3775 (1978).
- (36) J. D. Johnson, J. H. Collins, and J. D. Potter, *J. Biol. Chem.*, **253**, 6451 (1978).
- (37) J. D. Johnson, S. C. Charlton, and J. D. Potter, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3497 (1979).
- (38) L. D. Burtinick, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *Can. J. Biochem.*, **53**, 15 (1975).
- (39) L. D. Burtinick, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *Can. J. Biochem.*, **53**, 1207 (1975).
- (40) L. D. Burtinick, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *Can. J. Biochem.*, **54**, 546 (1976).
- (41) L. D. Burtinick and C. M. Kay, *FEBS Lett.*, **65**, 234 (1976).
- (42) M. T. Hincke, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *FEBS Lett.*, **83**, 131 (1977).
- (43) J. V. Small and A. Sobieszek, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 521 (1977).
- (44) W. T. Perrie, L. B. Smilhe, and S. V. Perry, *Biochem. J.*, **135**, 151 (1973).
- (45) N. Frearson, B. W. W. Focant, and S. V. Perry, *FEBS Lett.*, **63**, 27 (1976).
- (46) D. M. Byers, W. D. McCubbin, and C. M. Kay, *FEBS Lett.*, **104**, 106 (1979).
- (47) R. E. Reid and R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.*, in press.
- (48) L. Lee, B. D. Sykes, and E. R. Birnbaum, *FEBS Lett.*, **98**, 169 (1979).