

钙调蛋白研究的新进展

徐友涵 张遂坡

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

提 要

最近对钙调蛋白 (CaM) 的研究, 揭示了它的三维结构及其两个结构域的功能。肯定了 CaM 的 III、IV 位是 Ca^{2+} 结合的高亲和位, 并据此提出了 CaM 活化靶酶的新模型。发现神经钙蛋白 (CaN) 为一种依赖 CaM 的磷酸酶和两种最强的 CaM 拮抗剂多肽 Mastoparan 和药物 EBB。证明一些疾病同 Ca^{2+} 、CaM 有关。

钙调蛋白 (CaM) 作为一种多功能的调节蛋白引起人们广泛的兴趣, 对它的结构及功能表达的研究仍方兴未艾, 前文我们曾综述该领域在 1983 年以前的研究概况^[1]。鉴于它日新月异的进展, 结合笔者参加今年 5 月在北京举办的国际酶学讨论会上的所见所闻, 现就几个方面的进展论述如下。

1. CaM 的三维结构

1985 年 5 月 Nature 发表了分辨率 3 Å 的 CaM 三维晶体结构^[2]。分子长度 65 Å, 类似于一个哑铃, 柄是一个长 α 螺旋, 每个铃 (球区) 大约 $25 \times 20 \times 20$ Å, 两铃间无直接接触, 一个铃上含 2 个 Ca^{2+} 结合位, 2 个 Ca^{2+} 间距 11.3 Å

(图 1)。 Ca^{2+} 与主链氧原子和酸性胺基侧链氧原子配位, 目前还不清楚在 Ca^{2+} 配位环中是否有水分子存在, 每一个铃中二个 Ca^{2+} 结合环之间有氢键相互作用, 如 Gly25—Asp64, Ile27—Thr62, Ile100—Val136 之间。

CaM 共含七个 α -螺旋, 7—19, 29—39, 46—55, 65—92, 102—112, 119—128, 138—148, 共 94 个残基处于 α 螺旋中, 占残基总数 63%, 其中哑铃的柄系一个长 α 螺旋: (65—92 (中心螺旋) 大部分暴露于溶剂中, 与分子其它部分很少接触。在无 Ca^{2+} 时该螺旋似乎被包埋着, 而结合 Ca^{2+} 后螺旋暴露。中心螺旋似乎在 CaM 与靶酶、CaM 与拮抗剂相互作用中起重要作用。同时由于它为钙结合区 II、III 共享的 α 螺旋, 在 Ca^{2+} 协同结合方面可能起某种作用。

小角 X 射线散射实验测定 CaM 分子大小与晶体测定结果一致, 表明无论在水溶液还是晶体状态下分子都呈哑铃型。在无 Ca^{2+} 情况下分子似乎较紧缩, 回转半径 20.6 Å, 长 58 Å。结合 Ca^{2+} 后 CaM 构象变化, 分子长度增加至 62 Å, 回转半径增加至 21.5 Å^[3], 提示分子在结合 Ca^{2+} 后二个铃相距更远些。从沉降速度研究分子的 Stokes 半径, 从 21.4 Å 降低至 20.9 Å。矛盾的原因尚不清楚, 可能因两种技术有不同

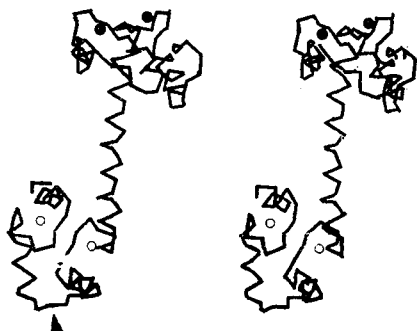


图 1 CaM 主肽链的立体结构^[2]
圆圈代表 4 个 Ca^{2+}

的水合效应造成。

2. CaM 活化靶酶的分子模型

2.1. CaM 的两个结构域

胰蛋白酶可将 Ca^{2+} -CaM 水解成两个主片段: F_{12} (Ala1—Lys75) 和 F_{34} (Asp75—Lys148)。Ikura 等比较了 F_{12} , F_{34} 和完整 CaM 分子的 ^1H -NMR 谱^[4], 表明 F_{34} 的 Tyr138、His107 的化学位移等同于完整 CaM 中该残基的位移。 F_{12} 和 F_{34} 的共振谱的简单叠加近乎等同于完整 CaM 的共振谱, 提示 CaM 酶切后的片段 $\text{F}_{12}\text{F}_{34}$ 仍保留原来在完整 CaM 中 N 结构域、C 结构域的三级结构 (tertiary structure) (图 2)。这从 CaM 分子具有哑铃型, 两个球型的铃具有相对的独立性可以得到解释。

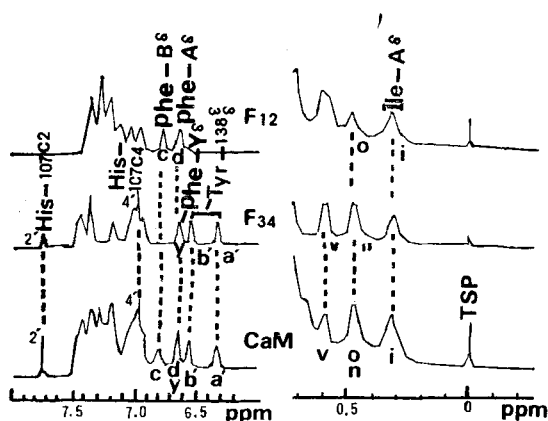


图 2 完整 CaM 分子与其水解片段 F_{12} , F_{34} 的 ^1H -NMR(400MHz) 谱的比较^[4]

左边: 芳香区 右边: 高场甲基区

F_{12} , F_{34} 浓度为 3.0mmol/L, pH5.4

CaM 浓度为 1.5 mmol/L, pH8.3

测试温度 22℃, 含 6—8mmol/L CaCl_2

注意: ① Tyr138, His107 在 F_{34} 与完整 CaM 中有相同的化学位移, ②完整 CaM 高场 Phe 峰 (6.67ppm) 是由两个 Phe 贡献的, 一是 F_{12} 的 Phe-A 的 δ 质子二是 F_{34} 的 Phe-Y, ③ F_{12} 在 6.82ppm 位置上的 Phe 峰 (Phe-B 的 δ 质子) 也出现在完整 CaM 的同一谱线位置上。

上述看法从 F_{12} , F_{34} 及完整 CaM 的圆二色谱测量中也得到证实。

用流动透析和平衡透析研究 F_{12} , F_{34} 与完整 CaM 对 Ca^{2+} 结合, 表明 F_{34} 、 F_{12} 分别含二个 Ca^{2+} 结合位, 它们的半饱和浓度分别为 3.2 $\mu\text{mol/L}$, 11.0 $\mu\text{mol/L}$, 结合 Ca^{2+} 的协同系

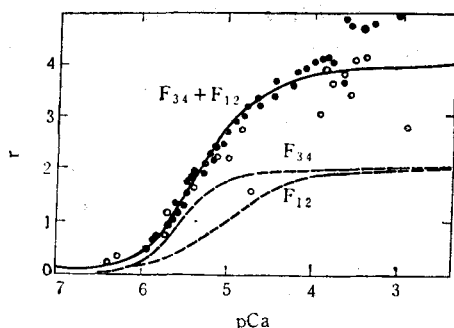


图 3 完整 CaM 分子与其水解片段 F_{12} , F_{34} 结合 Ca^{2+} 的比较^[5]

r 代表每一个蛋白分子结合的 Ca^{2+} 的数量, pCa 为游离 Ca^{2+} 浓度的负对数。

●, ○ 分别代表流动透析与平衡透析实验结果, 二条虚线分别代表 F_{12} , F_{34} 的 Ca^{2+} 结合曲线, 实线代表二条虚线之和。 F_{12} , F_{34} 的 Ca^{2+} 结合曲线滴定中点分别为 10.7 $\mu\text{mol/L}$, 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

数 (Hill 系数) 为 1.84, 1.14, 提示 F_{34} 为高亲和 Ca^{2+} 结合位, F_{12} 为低亲和 Ca^{2+} 结合位, F_{34} 结合 Ca^{2+} 显示很强的正协同性^[5]。另一方面, F_{12} , F_{34} 的 Ca^{2+} 结合滴定曲线的叠加很好地与完整 CaM 结合 Ca^{2+} 的曲线吻合 (图 3), 也说明 F_{12} , F_{34} 仍保持 CaM 结合 Ca^{2+} 的性质, 同时提出在完整 CaM 中, N 结构域, C 结构域在结合 Ca^{2+} 方面是相对独立的。

2.2. 两个结构域可能的功能

从各种来源 (脊椎、无脊椎动物) 的 CaM 一级结构分析表明, 所有 CaM 从 N 端乙酰 Ala 到 69 位 Leu 的氨基酸顺序都完全相同, 说明 N 结构域进化上最保守, 可能反映低亲和位的区域对 CaM 功能有重要意义。

F_{12} , F_{34} 滴定 Ca^{2+} 的 NMR 谱表明, 含低亲和 Ca^{2+} 结合位的 F_{12} 结合 Ca^{2+} 发生的构象跃迁 ($>300\text{s}^{-1}$) 比 F_{34} 快得多 ($<50\text{s}^{-1}$)。提示在完整 CaM 中 N 结构域 Ca^{2+} 交换速率比 C 结构域快得多, 因此 N 结构域对 Ca^{2+} 浓度的变化能显示快速的反应性。Yagi 等认为 C 结构域参与和靶蛋白的结合, 而 N 结构域则对信使 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的变化起反应, 因此只有完整的 CaM 结构才能表达生理功能。以往曾报道 CaM 的胰蛋白酶片段在 100—3000 倍浓度下能活化磷酸二酯酶 (PDE) 等, 这可能是污染微量 CaM 的结

果。利用反相 HPLC 纯化 F_{12} 、 F_{34} ，表明浓度高达 $10\mu\text{mol/L}$ 时仍不能活化 PDE，从实验上证实 CaM 的结构完整性对其功能是必要的。

与 PDE 相反，其它一些靶酶如 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 磷酸化酶激酶，肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 能与 CaM 的某些片段有一定程度的结合，有的甚之可以受到这些片段的活化，如 F_{34} 可结合并活化 Ca^{2+} -ATPase 与磷酸化酶激酶。它也能与 MLCK 结合，不能使之活化。 F_{12} 能与钙泵蛋白结合，但这种结合不足以引起酶的活化^[6]。这些结果表明，CaM 片段对靶酶活化的能力随靶酶的种类而异，提示 CaM 有不同的识别位点与不同的靶酶相互作用。

2.3. CaM 的高、低亲和位

关于 CaM 的高、低亲和位的鉴定一直有许多矛盾的说法。Kilhoffer 等用镧系元素 Tb^{3+} 作为 Ca^{2+} 的探针，认为高亲和位点在 N 结构域。相反，Seamon 用 $^1\text{H-NMR}$ 证明 C 结构域含二个高亲和 Ca^{2+} 结合位^[1]。最近对这个争论有了清楚的解答：Wang, C. L. 利用停流装置的动力学研究表明 Ca^{2+} 、 Tb^{3+} 在 CaM 上有不同的结合顺序^[7]，当 Tb^{3+} 与 2Ca^{2+} -CaM 迅速混合时，只产生很小的快速的 Tyr 荧光变化，而没有 Tb^{3+} 荧光的增加，表明 Tb^{3+} 结合在 I、II 位上。当 2 个 Tb^{3+} 与 2Dy (镝)-CaM 迅速混合时， Tb^{3+} 荧光迅速增加，提示这时 Tb^{3+} 定位 III、IV 位上，表明镧系元素 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 先结合在 I、II 位上，而 Ca^{2+} 则首先结合在 III、IV 位上。因此镧系元素虽然在离子半径、配位化学性质上与 Ca^{2+} 相似，但它作为 Ca^{2+} 探针使用时仍是有条件的。其它作者用 ESR (Mn^{2+}) $^{13}\text{C-NMR}$ ， $^{43}\text{Ca-NMR}$ ， $^{113}\text{Cd-NMR}$ 也都肯定了高亲和 Ca^{2+} 结合位在 C 结构域的 III、IV 位上。

综上所述，CaM 介导跨膜的 Ca^{2+} 的信息，活化靶蛋白的分子模式可以包括以下几步：

(1) 首先 Ca^{2+} 高亲和协同地结合在 CaM 的 C 结构域上 (III、IV Ca^{2+} 结合位)，提高了它对靶酶的亲和性。

表 1 CaM 调节的生理过程及有关的酶

生理过程	蛋 白
环核苷酸代谢	腺苷酸环化酶 鸟苷酸环化酶 环核苷酸磷酸二酯酶
细胞 Ca^{2+} 代谢	质膜 Ca^{2+} -ATPase 受磷酸蛋白激酶 (phospholambda kinase) 其它肌浆网膜蛋白激酶
收缩, 运动、细胞骨架系统	肌球蛋白轻链激酶 力蛋白 管蛋白 τ 蛋白 Fodrin (一种脑 CaM 结合蛋白), 收缩蛋白 Fodrin 激酶 Caldesmon
神经功能	管蛋白激酶 酪氨酸羟甲基化酶激酶 色氨酸羟甲基化酶激酶 脑蛋白激酶 突触蛋白 I 激酶 神经钙蛋白磷酸酶
糖元代谢	磷酸化酶激酶 糖元合成酶激酶
其 它	NAD - 激酶 葡萄糖 1,6 二磷酸化酶

(2) C 结构域结合到酶一定位点上。

(3) CaM 分子经旋转，N 结构域靠近酶，使 N 结构域上 Ca^{2+} 结合位 (I、IV 位) 对 Ca^{2+} 的亲合力增加。

(4) N 结构域被 Ca^{2+} 饱和，与酶的调节部位相互作用。

(5) 酶跃迁到活化构象，被活化。

3. CaM 调节的体系

表 1 归纳了目前已确认的 CaM 参与调节的生理过程及有关的酶^[8]。

目前还发现许多蛋白依赖 Ca^{2+} ，并能与 CaM 进行可逆结合，但其生理功能尚不清楚，预料它参与更加广泛的生理活动。

绝大多数组织含 $\mu\text{mol/L}$ 级以上的 CaM，而 apo-CaM 与靶酶的解离常数通常高于 10^{-6}mol/L ，因此在休止状态下靶酶不结合 CaM，处

于低活性构象。相反, Ca^{2+} 结合到 CaM 后, 能使 CaM 与靶酶的亲和力提高 1—10 万倍 ($k_d \ll 10^{-9} \text{mol/L}$), 这种 Ca^{2+} 触发蛋白—蛋白的可逆结合调节酶的活化有许多优点, 如区域化调节酶的活性。

依赖 CaM 的酶有许多是靠负价键修饰影响活性, 如 CaM 活化的蛋白激酶, 依靠磷酸化底物蛋白调节各种细胞功能。最近又发现 CaM 参与某些磷蛋白的去磷酸化的调节, 其中有一种在神经组织中含量丰富并依赖 CaM 的磷酸酶, 被定名为神经钙蛋白 (Calcineurin, CaN) 也引起了人们广泛的兴趣。纯化后证明它含两个亚基: $\alpha(60\text{K})$ 和 $\beta(20\text{K})$, α 亚基是催化亚基, 并结合 CaM, 该亚基与 Mn^{2+} , Ni^{2+} 结合可大大增强其催化活性, β 亚基结合 Ca^{2+} (4 个), 其 N 端甘氨酸挂一个长链棕榈酸, 使蛋白显示强疏水性, 长期以来该蛋白的生理功能不清楚, 只简单称为 CBP₈₀ (即分子量为 80K 的 CaM 结合蛋白), Stewart 首先证明它具有磷蛋白磷酸酶的活性^[9], 催化各种丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸蛋白的去磷酸化。如肌球蛋白轻链, 依赖 cAMP 蛋白激酶 R 亚基, 脑蛋白突触 I, 磷酸酪蛋白, 磷酸组蛋白等。胰岛素受体, 表皮生长因子, 血小板来源的生长因子受体具有配体活化的酪氨酸蛋白激酶的活性, 催化受体自身在 Tyr 位的磷酸化, 对细胞调节有重要的作用, 最近证明, CaN 催化酪氨酸磷蛋白的去磷酸化。

CaN 除催化许多磷蛋白去磷酸化外, 还催化某些非蛋白底物的去磷酸化, 如对硝基苯磷酸酯 (pNpp), 这提供了很大的研究上的方便。有趣的是 CaN 强烈被 Mn^{2+} , Ni^{2+} 等二价阳离子活化, 似乎显示广泛的生理调节作用。

4. CaM 拮抗剂研究的新进展

CaM 拮抗剂是研究 CaM 生理功能的一种主要的药理学工具, 但它在抑制 CaM 活性的浓度范围内往往显示其它的生物活性 (药物的非专一性), Gietzen 认为选用膜酶 (如 ATPase) 作为 CaM 的靶酶比可溶酶 (如 PDE) 容易评价拮抗剂的非专一性^[10]。因为拮抗剂作用于脂

双层造成的非专一性作用容易在膜酶上反映出来。

在探索新的 CaM 拮抗剂方面, 我们首先证明植物粉防己根中提取的粉防己碱 (属双苄基异喹啉类) 是 CaM 的一种新的拮抗剂, 它抑制依赖 CaM 的 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase, IC_{50} 值为 $40 \mu\text{M}$ ^[11], 荧光光谱证明它与 CaM 结合成为复合物^[12], 并对双苄基异喹啉所属的各种生物碱拮抗 CaM 的能力进行系统结构与功能相关性的研究, 表明除药物疏水性外, 拮抗剂分子的空间排布也是影响其拮抗能力的重要因素^[13]。其中一种衍生物 (0-4-乙氧基-丁基-小檗胺) (EBB) 被证明是一种新的强 CaM 拮抗剂, 它拮抗 CaM 的 IC_{50} 值比粉防己碱提高 100 倍以上 (IC_{50} 值 $0.35 \mu\text{M}$), CaM 分子具有二个依赖 Ca^{2+} 的结合 EBB 的位点^[14], 该位点似乎不同于 TFP 与 CaM 的结合位点。

许多活性多肽拮抗 CaM, 除早先发现的蜂毒素 (Melittin) 外, 最近从牛精子分离的一种碱性精蛋白 (Seminalplasmin) 被证明是一种内源性 CaM 拮抗多肽^[15], IC_{50} 值为 $0.1 \mu\text{M}$, 并具有良好的专一性, 不影响酶的基本活性。至今报道拮抗 CaM 最强的多肽是从胡蜂, 大黄蜂中分离的一种碱性多肽 (14 肽) (Mastoparan), 它与 CaM 解离常数在 0.3 — 3.0nM , 每个 CaM 分子含一个结合该肽的高亲和位点, 这些小肽与 CaM 结合后 α -螺旋含量大大增加^[16]。

在无机拮抗剂方面, Al^{3+} 首先被证明它抑制 CaM 活化的 PDE 和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase^[17]。荧光光谱, ESR, CD 谱及平衡透析等方法研究 Al^{3+} 与 CaM 的相互作用, 表明它与 CaM 的亲合性比 Ca^{2+} 还高一个数量级 (K_d 值在 0.1 — $0.4 \mu\text{M}$)。 Ca^{2+} 使 CaM 的肽链构象变得致密, 而 Al^{3+} 则相反, 它使 CaM 分子变得松散, 无序, α -螺旋减少, 疏水表面增加等。 Al^{3+} 与 CaM 的化学定量结合关系 (3 个 Al^{3+} /CaM) 表明其结合位点是专一的, 可能不同 Ca^{2+} 的专一结合位, 尽管 Al^{3+} 在 CaM 分子上的确切位点尚未得到阐明。

Al^{3+} 与 CaM 的结合导致 CaM 调节活性的

丧失,这提供了在分子水平上解释 Al^{3+} 的中毒机制。脑组织细胞对 Al^{3+} 中毒最敏感,以前发现早老性痴呆 (Alzheimer 症),神经纤维退化与 Al^{3+} 积累有关,但其机理始终不清楚,最近观察到脑中 Al^{3+} 的增加可使组织内 Ca^{2+} 积累升高几百倍,导致功能的紊乱。我们证明 Al^{3+} 抑制质膜依赖 CaM 的 Ca^{2+} 泵的活性可以解释这个现象^[17]。

5. Ca^{2+} , CaM 与疾病

鉴于 CaM 对多种生理功能所具有的广泛的调节作用,其结构或功能表达上的不正常很可能是病理的重要因素。囊纤维化病人 (Cystic fibrosis) 红细胞与成纤维细胞质膜 Ca^{2+} 泵活力下降,胞内 Ca^{2+} 提高。Gnegy 报道病人的皮肤成纤维细胞中 CaM 浓度提高^[18]。在转化细胞,肿瘤肝细胞,再生肝细胞中发现 CaM 水平大大增加,从 Ca^{2+} , CaM 参与调节细胞增殖的角度来看,这是有趣的研究对象。另外在实验性糖尿病中也发现 CaM 的不正常,这种变化的生理意义还不清楚。

除上述疾病中发现 CaM 的含量不正常外,在另外一些疾病中则发现胞内 Ca^{2+} 的反常:肌营养不良症胞内 Ca^{2+} 的增加可能与该病的病理有关,钙阻断剂异搏定有可能用于该病的治疗。

最近人们认为,高血压病可能是一种膜缺陷疾病,原发性高血压病人细胞膜结合的 Ca^{2+} 减少,而胞内 Ca^{2+} 增加,这是胞外因素影响 Na^+ 泵的结果还是膜本身的不正常尚不清楚。苏联学者最近报道原发性高血压病人体内 CaM 活化 Ca^{2+} 泵的能力偏低, Ca^{2+} 泵对 Ca^{2+} 的亲合力也低,而 CaM 在胞内的分布与正常人无大差

异,似乎高血压病人 Ca^{2+} 泵活力的变化是由于 CaM- Ca^{2+} 泵相互作用不正常引起的^[19]。

肾衰病人的尿毒症,显示有许多依赖 Ca^{2+} 的不正常代谢,可能与 CaM 不正常调节有关。由于 CaM 能调节神经递质的合成与释放,尿毒症引起的昏迷可能得到解释^[20]。

由于目前对许多 CaM 结合蛋白的生理功能尚不很清楚,这些内原性的调节 CaM 功能的蛋白的反常也可能是分子医学研究的一个重要领域。

参 考 文 献

- [1] 徐友涵:《生物化学与生物物理进展》, 1, 22, 1985; 2, 17, 1985。
 - [2] Babu, Y. S. et al.: *Nature*, **315**, 37, 1985。
 - [3] Seaton, B. A. et al.: *Biochemistry*, **24**, 6740, 1985。
 - [4] Ikura, M. et al.: *Biochemistry*, **22**, 2573, 1983。
 - [5] Minowa, O. et al.: *J. Biochem.*, **96**, 1175, 1984。
 - [6] Szyja, W. et al.: *Cell Calcium*, **7**, 73, 1986。
 - [7] Wang, C. L. et al.: *Biochemistry*, **23**, 4610, 1984。
 - [8] Wang, J. H.: *Current Topics in Cell Regulation*, Vol. **27**, 419, 1985。
 - [9] Stewart, A. A. et al.: *FEBS Lett.*, **137**, 80, 1982。
 - [10] Gietzen, K. et al.: *Calmodulin Antagonists and Cellular Physiology*, 347, 1985。
 - [11] 徐友涵等:《科学通报》, 17, 1368, 1985。
 - [12] 徐友涵等:《生物物理学报》, **2**, 1, 1986。
 - [13] 张遂坡等:《生物化学与生物物理学报》, (待发表)。
 - [14] Xu Y. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 461, 1986。
 - [15] Gietzen, K. et al.: *Biochem. J.*, **230**, 277, 1985。
 - [16] Malencik, D. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 50, 1983。
 - [17] 徐友涵:《生物化学与生物物理学报》, **18**, 367, 1986。
 - [18] Gnegy, M. E. et al.: *Biochemical Medicine*, **26**, 294, 1981。
 - [19] Postnov, Y. V. et al.: *Clin. Science*, **66**, 459, 1984。
 - [20] Ritz, E.: *Kidney International*, Vol. **24**, Suppl. 16, s-161, 1983。
- [本文于 1986 年 10 月 20 日收到]
- ~~~~~
- (上接第30页)
- 82, 2310, 1985。
- [9] Benfield, P. A. et al.: *Biol. Chem.*, **259**, 14979, 1984。
 - [10] Grace, A. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **123**, 59, 1982。
 - [11] Nealon, D. A. et al.: *Clin. Chem.*, **27**, 402, 1981。
 - [12] 耿建国等:《上海医科大学学报》, 待发表。
 - [13] Vaidya, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **790**, 230, 1984。
 - [14] Morelli, R. et al.: *Circulation*, **67**, 1283, 1983。
 - [15] Boone, D. J. et al.: *Clin. Chem.*, **30**, 33, 1984。
 - [16] Jackson, A. P. et al.: *Clin. Chem.*, **30**, 1157, 1984。
 - [17] Urdal, P. et al.: *Clin. Chem.*, **27**, 83, 1981。
- [本文于 1986 年 10 月 3 日收到]