

钙依赖的磷脂结合蛋白——钙结合蛋白中的一个新家族

郭 艳 林

(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

提 要

钙依赖的磷脂结合蛋白是 70 年代末发现的一类新的钙结合蛋白, 它们不同于钙调素等具有“EF”手结构的钙结合蛋白, 其特点是它们与 Ca^{2+} 结合后可以进一步与膜磷脂结合。这类蛋白质广泛存在于动物细胞, 常常与质膜或内膜系统相联系。免疫化学证据和对其氨基酸顺序、cDNA 序列分析表明, 这是钙结合蛋白中一个包括多个成员、结构与功能相关的新家族。

关键词 钙结合蛋白, 钙调素, 钙依赖磷脂结合蛋白

Ca^{2+} 作为胞内信使参与许多细胞生理过程, 在这些过程中, Ca^{2+} 作用的第一步常常是在胞内与其具有高亲和力的钙结合蛋白结合, 然后激发一系列生化反应, 最后导致一定的生理效应。在这些钙结合蛋白中, 结构与功能研究的最清楚的莫过于钙调素 (calmodulin, CaM)^[1,2]。钙结合蛋白是一个大的家族, 其成员包括 CaM、肌钙蛋白 C (troponin C)、小清蛋白 (parvalbumin) 等具有“EF”手 (EF-hand) 结构的钙结合蛋白。70 年代末又相继发现了一类新的钙结合蛋白, 其特点是它们与 Ca^{2+} 结合后可以进一步与磷脂结合, 因而称之为钙依赖(调节)磷脂(膜)结合蛋白 (Ca^{2+} -dependent-(regulated)-phospholipid (membrane)-binding proteins)^[3-5]。这类蛋白质广泛存在于各种动物细胞内, 由于这个家族包括多种成员, 发现者通常根据其特点或组织细胞的来源加以命名, 因此很混乱, 常常是同种蛋白质具有多个名称。随着人们对这类蛋白质的理化性质深入研究, 特别是对它们的氨基酸顺序和 cDNA 序列的分析结果表明, 这些蛋白质不论在结构与功能上都表现出很大的相似性, 现在把这类钙结合蛋

白统称为“Annexin”, 它们构成了钙结合蛋白中一个新的家族——Annexin 家族 (Annexin family)。

1 Annexin 家族的一般特征

Annexin 的共同特点是它们在 $\mu\text{mol/L}$ 数量级浓度 Ca^{2+} 存在时可以和磷脂或质膜结合, 而且与 Ca^{2+} 和磷脂结合都表现出很高的特异性, 结合的磷脂一般是酸性的, 如磷脂酰丝氨酸 (phosphatidyl-serine, PS) 和磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 等。这些酸性磷脂常常分布在质膜的内表面。即使在很高浓度的 Ca^{2+} (mmol/L 数量级) 存在时, 它们也不与由磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 形成的脂质体结合, 而且 Annexin 的各个成员对其结合的磷脂种类也表现出不同的要求。它们与 Ca^{2+} 及磷脂结合时除了具有高度的特异性外, 还表现出相辅相成的协同效应, 即在有磷脂存在的情况下它们与 Ca^{2+} 的亲合力大大提高^[3]。但与另一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白——蛋

白激酶 C 不同,二酰甘油 (diacylglycerol, DG) 并不能使 Annexin 与 Ca^{2+} 和磷脂的亲合力增高。Annexin 在有 Ca^{2+} 存在时,除了可以与磷脂结合,还可以促进自然质膜或人工膜的融合,这是 Annexin 家族的一个突出特征。

大部分 Annexin 在细胞中的分布都直接或间接与质膜或内膜系统有关。如 Calpactin 主要分布在质膜内侧并与细胞骨架相连^[6,7], P^{70} , Endonexin 部分与质膜和内质网相连^[6,9], Calclectrin 主要存在于神经细胞内膜系统并集中在突触小泡膜的外表面,即与细胞质接触的一面^[3]。特别有趣的是, Ca^{2+} 不但是 Annexin 与磷脂结合的必要条件,而且还可能影响它们在细胞内的分布,正如蛋白激酶 C 那样,细胞质中

的 Annexin 与 Ca^{2+} 结合后可向细胞膜方向移动,在细胞内进行重新分布。

2 Annexin 家族成员及其基本特征

Annexin 家族的多种成员已从不同的动物组织细胞中分离纯化出来,表 1 总结了这些蛋白质及其一些基本特征。从表中可以看出,其中许多具有不同的别名,有些成员在分子量和等电点等方面也有细微的差异。造成这种现象的主要原因是同种蛋白质被不同的发现者冠以不同的名称,理化性质上微小的差异则是由于某些蛋白质的组织特异性或是采用不同的测定方法造成的。

表 1 Annexin 家族的成员及特征

名 称	别 名	结 构	亚基分子量	磷脂特异性 ¹⁾	Ca^{2+} 亲和力 ²⁾ ($\mu\text{mol/L}$)	等电点
Calpactin I	P^{35} , Lipocortin II, Chromobindin 8, Lymphocyte P^{33} , Protein I	异四聚体	36+11	PS, PI	0.01, 5	7.5
Calpactin II	P^{33} , Lipocortin I, Chromobindin 9, Lipomodulin	单链	39, 35	PS		6.5, 6.8
Calelectrin		单链	34—36	PS	5	5.6
Calcimedins		单链	30, 33, 36, 57			
Endonexin	Protein II, P^{28} , Lymphocyte	单链	32, 34	PI, PE, PA	5.5	5.6
Synexin I	Chromobindin VI	—	47	PS		6.1, 6.9
Synexin II	Chromobindin XVII	—	56, 57	PS		5.7
P^{70}	P^{68} , Protein III, Chromobindin 20, Synhibin	单链	67—73	PI, PA, PE	2.6	5.7, 5.9

1) PS: 磷脂酰丝氨酸, PI: 磷脂酰肌醇, PE: 磷脂酰乙醇胺, PA: 磷脂酸

2) 与质膜或脂质体结合所需最高 Ca^{2+} 浓度的一半

Calpactin 是这类蛋白质中研究的比较清楚的一个。最初 Calpactin I 是从猪的小肠上皮细胞中分离得到^[10], Calpactin II 则是从牛肺细胞分离获得^[11]。它们除了具有 Annexin 的一般特征外,还因其可以依赖 Ca^{2+} 的方式与细胞骨架中的肌动蛋白 (actin) 结合而得名 (calcium-dependent-phospholipid-actin-binding protein, CALPACTIN)^[4]。Lipocortin 最初是做为一种磷脂酶 A_2 的抑制物被分离获得,后来免疫学证据和氨基酸顺序分析结果都表明它与 Calpactin 属于同种蛋白。Calelectrin 首先从电鱼 (*Torpedo marmorata*) 的放电器官

分离纯化而得名^[12]。Calcimedins 则是由 Moore 和 Dedman 在纯化钙调素时被发现^[13]。他们在用吩噻嗪 (phenothiazine) 亲和层析柱分离钙调素时发现,在介质中有 Ca^{2+} 存在的情况下,除了钙调素与柱子结合外,其他几种蛋白质(分子量分别为 67, 35, 33 和 30kD) 的层析行为与钙调素极为相似,即它们与 Ca^{2+} 结合后分子上的疏水结构暴露出来,然后通过疏水作用与柱子结合,在介质中有 EGTA 时则被洗脱下来。后来进一步证明它们是不同于钙调素的另一类钙结合蛋白,因为这几种蛋白质具有极其相似的理化性质,常常在分离纯化时同时获得。

因而 Dedman 等人把这几种蛋白质统称为 Calcimedins。它们属于 Annexin 家族的证据主要来自免疫化学检查结果,即它们与 Annexin 家族其它成员的抗体有免疫交叉反应。Annexin 家族的其它成员 Endonexin^[9,14] 和 Synexin^[15] 等的分离鉴定和命名都有类似的经历。

Annexin 家族各成员的同源性的证据首先是来自于它们之间的免疫交叉反应,后来氨基酸顺序和 cDNA 序列分析结果表明,它们是属于同一家族但又有所区别的一类蛋白质^[5]。每种蛋白质都包括大约有 70 个氨基酸残基组成的内部重复结构单位,这些结构单位在各个成员之间表现出明显的相似性,说明它们在进化上的相互联系。从分子量上看,Annexin 可以分成两类,即约 35kD 和 70kD,前者各成员中肽链的结构中包括 4 个重复结构单位,后者包括 8 个,因而推测 70kD 的 Annexin 是在进化过程中由 35kD 重复加倍的产物。Annexin 家族各成员中在氨基酸顺序和组成上的差别主要表现在重复结构以外的部分,特别是 N-末端,推测 N-末端的变化区可能是赋予该家族各成员不同生理功能的结构区域。这些蛋白质被修饰的位点(如被磷酸化的氨基酸残基)常常位于该区域,说明与它们的功能调节有关。

每种 Annexin 都有一个或几个 Ca^{2+} 结合位点,推测这些结合位点是在它们的内部重复结构区域中。这些结构域中的氨基酸顺序与具有“EF”手结构的钙结合蛋白并不相同,但对 35kD 的 Annexin 三级结构分析发现,它们的 Ca^{2+} 结合位点的三级结构与“EF”手类钙结合蛋白的极为相似。并且发现 Annexin 中的有些成员如 Calcimedins 等与 Ca^{2+} 结合后表现出构象上的变化,即其疏水性增高,这是钙调素等具有“EF”手结构的钙结合蛋白的典型特征之一。与“EF”手家族的钙结合蛋白不同,Annexin 与 Ca^{2+} 的结合还有磷脂参与,磷脂的结合位置可能位于 Ca^{2+} 结合区域中或其附近。有证据表明磷脂与 Annexin 的结合是通过亲水的头部而不是疏水的脂肪酸尾部,

磷脂的结合导致其分子上 Ca^{2+} 结合位点构象的变化,结果增加了与 Ca^{2+} 的亲合力^[3],因而 Annexin 与 Ca^{2+} 和磷脂的结合表现出相辅相成的协同效应。

3 Annexin 的生理功能

和钙调素一样,尽管对其理化性质了解的比较清楚,但对它的生理功能却处于推测阶段,体外实验结果在体内是否具有同样作用,多数情况下尚难以证实。对 Annexin 生理功能的研究也有同样问题,而且远不如对钙调素了解的深入。现有的实验证据表明它们可能参与以下细胞生理过程。

3.1 胞吐作用和分泌作用

Annexin 参与这些过程的主要证据是,它们都可以在有 Ca^{2+} 存在时使分泌颗粒或人工脂质体聚合和融合,Geisow 和 Burgoyne 等^[16] 最初发现几种 Annexin 可以在有 Ca^{2+} 时与嗜铬性颗粒(chromaffin granules)结合,而把它们称之为 Chromobindins Greutz 等人^[17] 发现 Synexin 参与嗜铬性细胞以胞吐的方式进行分泌时,第一步是 Ca^{2+} 与 Synexin 结合使它们的单体聚合成圆筒状结构,然后插入分泌颗粒的膜内,在膜之间形成疏水性“桥梁”而使膜互相融合成较大的分泌颗粒。特别有趣的是, Synexin 以依赖 Ca^{2+} 的方式与嗜铬细胞质膜的内表面结合而不与外表面结合,而与分泌颗粒膜结合时则相反,即它们只与分泌颗粒膜靠近细胞质的一面结合^[18]。这不仅暗示着在分泌细胞的分泌过程中 Synexin 参与分泌颗粒的集合、融合并介导它们与细胞质膜的接触,同时也说明 Synexin 是通过膜结构中的酸性磷脂而起作用,因为研究表明,酸性磷脂主要分布在质膜和分泌颗粒膜靠近细胞质的一面,而 PC 则分布在相反的一面。Annexin 家族中 Calpactin 也可能是胞吐作用的直接参与者,因为它能在接近细胞内 Ca^{2+} 的生理浓度($1.8\mu\text{mol/L}$),并在有花生四烯酸存在时引起分泌颗粒的聚合和融合^[19],而已知花生四烯酸或其代谢物能引起细胞的分泌。

3.2 对磷脂酶 A₂ 的抑制作用

磷脂酶 A₂ 作用于磷脂的甘油骨架第二位碳原子上羟基与脂肪酸(常常是花生四烯酸)形成的酯键。花生四烯酸及其代谢物能作为生理活性物质引起许多细胞反应。Lipocortin 可以抑制磷脂酶 A₂ 的活性^[20], 但机理尚不十分清楚, Davidson 等人^[21]的工作表明, Lipocortin 的抑制效应不是直接作用于酶本身, 而是由于其与磷脂的结合造成磷脂与磷脂酶 A₂ 处于分离状态的结果。令人感兴趣的是 Lipocortin 被磷酸化后则失去抑制能力, 因此不论抑制方式如何, Lipocortin 参与花生四烯酸这一重要生物活性物质的代谢调节, 可能具有不可忽视的生理意义。

3.3 参与细胞骨架的活动

Calpactin 在有 Ca²⁺ 的存在下可以与细胞骨架中的肌动蛋白结合, 虽然在体外实验中, 这种结合需要较高浓度的 Ca²⁺ (mmol/L 数量级), 使人们对这种现象在生理条件下的功能提出了质疑^[4], 但它们在细胞中的分布, 即广泛存在于质膜内面与细胞质之间, 这种与细胞骨架在结构上的密切联系, 暗示着它们在功能上的相关性, 很可能在维持细胞形状和细胞运动中具有重要作用。

3.4 Annexin 的磷酸化与膜受体功能的调节

Annexin 的有些成员可被蛋白激酶磷酸化。Calpactin I 重链和轻链的聚合决定区在重链 N-末端的 29 个氨基酸残基中, 该区段中的丝氨酸可被蛋白激酶 C 磷酸化, 结果使重链和轻链的聚合被抑制, 而此区域中的酪氨酸被磷酸化后对亚基的聚合无影响, 但可降低 Calpactin I 与脂质体的结合能力^[4]。还发现, Calpactin 被具有受体功能的酪氨酸蛋白激酶磷酸化后则失去对磷脂酶 A₂ 的抑制功能。

许多生长因子的受体本身具有酪氨酸蛋白激酶活性, 其中表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 就是一个典型代表, Calpactin II 可被它磷酸化, 而 Calpactin I 则不能^[22]。两种结构非常相似的蛋白质

对同种蛋白激酶表现出不同的敏感性, 暗示着它们在功能上的差异。推测 Calpactin II 的这种磷酸化作用与 EGFR 的内在化 (internalization) 有关, 内在化是膜受体功能调节的重要方式之一。Annexin 还有参与膜受体功能调节的其它证据, Fishman 等^[4]发现, 肝细胞中 P⁷⁰ 在有 Ca²⁺ 的情况下与膜结合后, 使后叶加压素 (vaspressin) 和血管紧张素 II (angiotensin II) 受体与它们的配体结合能力减弱, 他们认为 P⁷⁰ 对这些受体的作用是直接或间接通过细胞骨架而实现的。

4 植物体内类似 Annexin 的钙结合蛋白

在植物细胞内似乎也有类似 Annexin 的钙结合蛋白。Dauwalder 和 Roux 等人^[23]用免疫化学方法发现, 在豌豆幼苗中有能与动物细胞 Calcimedins 抗体起交叉反应的蛋白质。该实验室的 Clark 最近用磷脂酰丝氨酸制备的亲体和层析柱从同样的材料中纯化了一种 35kD 的 Ca²⁺ 依赖磷脂结合蛋白, 它不仅与动物的 Calpactin II 的抗体起交叉反应, 并发现它在豌豆根冠的分泌细胞中含量最高 (个人通讯), 不论在理化性质还是在细胞中的分布都与 Calpactin 极为相似。植物细胞中这类蛋白质存在的更直接的证据来自 Boustead 等人^[24]的工作, 他们在番茄的悬浮培养细胞中用分离动物 Annexin 的方法获得了分子量分别为 33 和 55kD 的两种蛋白质, 它们都可以依赖 Ca²⁺ 的方式与磷脂酰丝氨酸和磷脂酰胆碱共同形成的脂质体结合, 但不与由磷脂酰胆碱单独形成的脂质体结合, 等电点分别为 5.7 (33kD) 和 5.6 (35kD)。这些都是 Annexin 家族最典型的特征。更重要的是 35kD 蛋白质可与牛的 P⁶⁸ 和 P^{32/34} Annexin 的抗血清有交叉反应, 而 33kD 蛋白质则与 Callectrin 的抗血清反应。因此他们认为这两种蛋白质是植物细胞中类似于动物细胞的 Annexin。

Ca²⁺ 作为细胞信使参与众多生理过程已是众所周知, 钙调素的发现为阐明 Ca²⁺ 的作用机

理揭开了崭新的一页,二十年来,在这一研究领域取得了许多突破性进展,同时许多事实表明,与其它信号系统(如 cAMP 第二信使系统)相比, Ca^{2+} 信使的作用机理更为复杂,参与的生理过程更为广泛。在这样一个复杂的信号系统中,不难想象, Ca^{2+} 信使的作用方式也会多种多样。除了通过钙调素以外, Annexin 很可能做为 Ca^{2+} 的靶蛋白以另外的方式介导 Ca^{2+} 的信号效应,它们不仅本身是钙结合蛋白,同时能和质膜这一细胞感受外界信号的最初的部位密切相关,在细胞信号传递中必然有其特殊的生理意义。在现有的对 Annexin 理化性质了解的基础上,今后几年对其生理功能的研究,对进一步阐明 Ca^{2+} 信使作用机理将会有极大的帮助。

关于 Annexin 就我们所知,国内还没人提出相应的中文名称。“钙依赖磷脂结合蛋白 Ca^{2+} -dependent-phospholipid-binding proteins”或“钙调磷脂结合蛋白 Ca^{2+} -regulated-phospholipid-binding proteins”虽然表明了这类蛋白质的基本特性,但却只是 Annexin 的意译,“Annex”字面的意思是“吞并”、“合并”,因此,Annexin 的意思应为:“具有促进(分泌泡)融合作用的蛋白质”。是否有必要提出一个与 Annexin 字义相同又能简练地表明这类蛋白质特点的中文名称,正在考虑并与国外有关专家讨论之中,希望国内同行和专家们提出建议和指正。

Calmodulin 最初曾译为“钙调蛋白”,后易名为“钙调素”。而“钙调蛋白”则用来泛指其它钙结合蛋白。我们自己的看法是暂把 Annexin

这类新的蛋白质意译为“钙调磷脂结合蛋白”以供讨论。

本文承蒙孙大业教授审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 孙大业. 植物生理通讯, 1984; 6: 13
- 2 Cheung W Y. *Science*, 1980; 207: 19
- 3 Geisow M J, Walker J H, Boustead C *et al. Bioscience Reports*, 1987; 7(4): 289
- 4 Klee C B. *Biochemistry*, 1988; 27: 6645
- 5 Burgoyne R D, Geisow M J. *Cell Calcium*, 1989; 10: 1
- 6 Greenberg M E, Edelman G M. *Cell*, 1983; 33: 767
- 7 Lehto V P, Virtanen I, Passivuo R *et al. EMBO*, 1982; 2: 1701
- 8 Owens R J, Gallagher C J, Crumpton M J. *EMBO*, 1984; 3: 945
- 9 Geisow M J, Childs J, Harris A *et al. EMBO*, 1984; 3: 2969
- 10 Gerke V, Weber K. *EMBO*, 1984; 3: 227
- 11 Glenney J R. *J Cell Biol*, 1987; 104: 503
- 12 Walker J H. *J Neurochem*, 1982; 39: 851
- 13 Moore P B, Dedman J R. *J Biol Chem*, 1982; 257: 6993
- 14 Shadle P J, Gerke V, Weber K. *J Biol Chem*, 1985; 260: 16354
- 15 Creutz C E, Pazoles C J, Pollard H B. *J Biol Chem*, 1978; 253: 2858
- 16 Geisow M J, Bergoyne R D. *J Neuro Chem* 1982; 38: 1735
- 17 Creutz C E, Pazoles C J, Pollard H B. *J Biol Chem*. 1979; 254: 553
- 18 Pollard H B, Burns A L, Rojas E. *J Membrane Biol*, 1990; 117: 101
- 19 Drusi D S, Creutz C E. *Nature*, 1988; 331: 88
- 20 Huang K S, Wallner BP, Mataalano R G *et al. Cell*, 1986; 46: 191
- 21 Davidson F F, Danis E A, Powell M *et al. J Biol Chem*, 1987; 262: 1698
- 22 Fava R A, Cohen S. *J Biol Chem*, 1984; 259: 2636
- 23 Dauwalder M, Roux S, Hardison L K *et al. J Cell Biol*, 1986; 103: 453a
- 24 Boustead C M, Sallwood M, Small H *et al. FEBS Lett*, 1989; 244(2): 456