

钙不依赖性钙调素结合蛋白的研究进展*

韦慧彦^{1,2)} 郭振清^{1)**} 崔素娟^{1)***}

¹⁾河北师范大学生命科学学院分子细胞生物学实验室, 石家庄 050016;

²⁾焦作师范高等专科学校理化生系, 焦作 454000)

摘要 钙调素是普遍存在于真核生物细胞中、发挥多种生物学调控作用的信号组分. 钙调素不仅在有 Ca^{2+} 情况下通过与钙依赖性钙调素结合蛋白作用而传递信号, 也能在相对无 Ca^{2+} 条件下直接结合钙不依赖性钙调素结合蛋白而传递信号. 综述了无钙离子结合钙调素及钙不依赖性钙调素结合蛋白的结构特性、钙不依赖性钙调素结合蛋白的种类及其可能的生物学作用, 这将有助于我们深入认识钙调素介导信号途径的特异性、复杂性和多样性.

关键词 钙调素, 无钙离子结合钙调素, 钙不依赖性钙调素结合蛋白, 钙调素结合结构域

学科分类号 Q291

钙离子(Ca^{2+}) 作为动植物细胞内重要的第二信使参与了胞内众多的生理反应. Ca^{2+} 作为简单的离子信号分子, 要将信号传递下去并调节多种生化 and 细胞反应, 其下游感受器, 即钙离子受体蛋白是非常重要的^[1]. 钙调素(calmodulin, CaM)是真核细胞内广泛存在的、高度保守的、最重要的一类钙离子受体蛋白^[1]. CaM 属于 EF 手型家族钙结合蛋白, 具有 4 个 EF 结构域, 可以结合 4 个钙离子, 结合钙离子的 CaM 为 Ca^{2+} -CaM, 而没有钙离子结合的 CaM 为 ApoCaM.

CaM 自身无任何酶活性, 但具有与靶蛋白相互作用并调节靶蛋白活性的能力. 因此, CaM 介导的信号传递只有通过与其下游的靶蛋白——钙调素结合蛋白(calmodulin-binding proteins, CaMBPs)作用才能调节细胞的生理功能. 在某一细胞或组织中 CaM 的功能取决于其中的 CaMBPs 存在状况. CaM 不仅在有 Ca^{2+} 情况下, 通过 Ca^{2+} -CaM 与 CaMBPs 作用而传递信号, 也能在低浓度或无 Ca^{2+} 条件下, 作为 ApoCaM 通过与钙不依赖性 CaMBPs 结合而传递信号^[2]. 越来越多的研究表明, 对钙不依赖性 CaMBPs 的鉴定与分析将有助于阐明 CaM 信号转导途径的特异性、复杂性和多样性.

1 ApoCaM 的结构

晶体解析表明, Ca^{2+} -CaM 的三维结构呈哑铃形(图 1)^[2]. 每个哑铃球上有 2 个 Ca^{2+} 结合位点, 长

的中心螺旋形成哑铃柄, 两个哑铃球之间靠它相连. 无 Ca^{2+} 结合时, 两个球部沿着中心螺旋折叠并将后者掩盖, 结合 Ca^{2+} 后, 中心螺旋暴露出来并在 CaM 与 CaMBP 的相互作用中起重要作用. 近年来, 随着研究的深入, 人们认识到 Ca^{2+} -CaM 的三维结构更像一个带有 2 个长把汤勺形末端的哑铃: 每个长把勺末端的圆形凹陷部分形成一个疏水穴, 彼此靠一根弹性索链而非哑铃柄相连^[2].

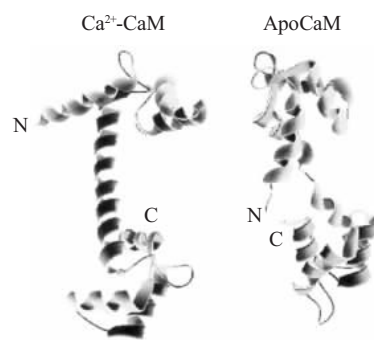


Fig. 1 Tertiary structure of Ca^{2+} -CaM and ApoCaM

图 1 Ca^{2+} -CaM 与 ApoCaM 的三维结构比较

*国家自然科学基金资助项目(30470889, 90208004), 河北省自然科学基金资助项目(C2004000152)和河北师范大学博士基金资助项目(L2004B11).

** 现工作单位: 河北科技师范学院生命科学系, 秦皇岛 066000.

*** 通讯联系人. Tel: 0311-86269144, E-mail: cuisujuan@263.net

收稿日期: 2006-08-21, 接受日期: 2006-09-30

无 Ca^{2+} 离子结合的 ApoCaM 三维结构与 Ca^{2+} -CaM 相比, 差异非常明显(图 1). 从整体上看, ApoCaM 的结构更紧凑、封闭, Ca^{2+} -CaM 的结构则较松弛、开放. 球部 α 螺旋区中的疏水氨基酸残基所处位置在两者间有着明显差异. ApoCaM 中, 疏水氨基酸残基大多聚集在每个球部的 α 螺旋片段之间, 并在结构内部形成一个疏水核心, 而在 Ca^{2+} -CaM 中, 这些疏水残基从 α 螺旋片段之间伸展出去, 在每个长把勺末端形成一个面朝外的疏水穴. 与 Ca^{2+} -CaM 相比, ApoCaM 的两个哑铃球彼此缠绕 180° , 例如在 Ca^{2+} -CaM 中, 处于不同球形末端的 Gly-40 和 Leu-112, 位置大约相距 180° , 而在 ApoCaM 中, Gly-40 和 Leu-112 却位于 CaM 分子同侧. 在 ApoCaM 中, N 端第一个 α 螺旋和 C 端最后一个 α 螺旋中, 各有 8 或 7 个氨基酸残基(8~14 和 140~146 氨基酸)与中心螺旋大致平行, 形成了第二个哑铃柄. 中心螺旋的中央(Ser81 处)被一非螺旋区打断, 呈弯曲状. 而在 Ca^{2+} -CaM 中, 这些末端小肽从中心螺旋伸展出去, 中心螺旋并不弯曲, 可以直达每个长把勺末端的疏水穴^[2].

2 钙不依赖性钙调素结合蛋白

Ca^{2+} 、ApoCaM、 Ca^{2+} -CaM 和 CaMBPs 之间的结合反应存在着动态平衡, 其中 $K_1K_2=K_3K_4$ (K 是解离常数), 这个等式意味着各种结合之间彼此关联(图 2). CaM 介导的信号转导可应答从 $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$ 不同的 Ca^{2+} 浓度变化, 这是由 CaM 对 Ca^{2+} 的亲和力及 CaM 对其靶蛋白的亲和力两方面因素共同决定的^[2]. 钙不依赖性 CaMBPs 在细胞中通常以三种状态存在: 无活性的 CaM 非结合态(a)、有活性的 ApoCaM 结合态(b), 以及某些条件下活性更高的 Ca^{2+} -CaM 结合态(c)(图 2).

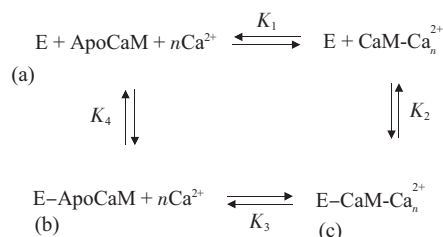


Fig. 2 Kinetic equilibrium among Ca^{2+} , CaM and CaMBP (E) ^[2]

图 2 Ca^{2+} 、CaM 和 CaMBP (E) 间的动态平衡 ^[2]

当细胞处于静息(非激活)状态时, 钙不依赖性 CaMBPs 可以与 ApoCaM 结合, 形成有活性的复合物, 行使某些重要功能; 当细胞受刺激时, 随着胞质 Ca^{2+} 浓度的增加, 这种钙不依赖性的 ApoCaM 结合态, 可能转化成钙依赖性的 Ca^{2+} -CaM 结合态, 执行另外一些重要功能. 钙不依赖性 CaMBP 与 Ca^{2+} -CaM 的结合类似于钙依赖性 CaMBPs 与 Ca^{2+} -CaM 的结合, 这里不再赘述. 本文关注的重点是钙不依赖性 CaMBPs 与 ApoCaM 的结合.

3 钙不依赖性钙调素结合结构域

CaMBPs 通过其钙调素结合结构域(CaM-binding domain, CaMBD)与 CaM 结合. CaMBD 在氨基酸序列上无同源性或同源性很低, 但具有相似的结构特征, 一般由 16~35 个氨基酸残基组成带有正电荷的两亲性结构, 具有形成 α 螺旋的倾向, α 螺旋轮状映射图中一半多为带正电荷的氨基酸残基, 另一半多为疏水性氨基酸残基^[3].

目前已知的钙不依赖性 CaMBPs 的 CaMBD 可以分成三类: 存在于肌球蛋白(myosin)、神经调制蛋白(neuromodulin)及神经颗粒蛋白(neurogranin)等蛋白质中的 IQ 基序; 存在于糖原磷酸化酶 b 激酶(PhK)的催化亚基 γ 和某些细菌毒素中的协同结合基序; 不同于前两者的其他类型结合模式^[4].

3.1 IQ 基序

IQ 基序是第一个被发现的 Ca^{2+} 不依赖性 CaMBD. 完整 IQ 基序的氨基酸序列为 IQXXRGXXR. 通常第 1 位的 Ile 是可变的, 还可能是 Leu, Val 或 Met, 第 6 位和 11 位的 Arg 还可能是 Lys 或 His, 第 7 位的 Gly 也缺乏保守性^[5]. 含有 IQ 基序的蛋白质, 包括 myosin 家族、CAMTA 家族和 CNGC 家族等, 还有植物特有的 IQD 家族^[6]. 各家族成员含有的 IQ 基序数量、间距以及基因外显子-内含子的组合方式存在明显不同(图 3).

研究表明, IQ 基序可表现出不同程度的 Ca^{2+} 依赖性. 例如 IQ-GAP2 蛋白和 Myr-4 myosin 既可以结合 ApoCaM 又可以结合 Ca^{2+} -CaM, 同一蛋白中两个结合位点相邻^[7]. 而 Ras GRF1 等蛋白质的 IQ 基序同时也符合 Ca^{2+} 依赖的 1-5-8-14 基序^[7]. 显然, IQ 基序与 CaM 结合的 Ca^{2+} 依赖性高度变异的. 此外, IQ 基序有时与磷酸化位点相邻或相互重叠, 体外实验证明: 磷酸化能抑制 CaM 的结合^[8].

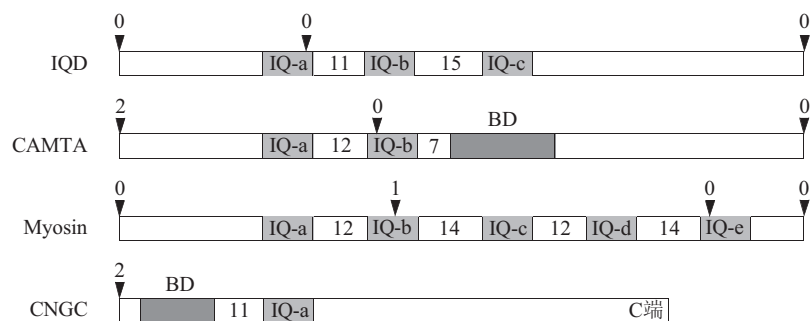


Fig. 3 Structure of CaM-binding proteins with IQ domain ^[6]

图 3 具有 IQ 基序的钙调素结合蛋白结构域模式 ^[6]

a、b、c、d、e 表示 IQ 基序的数目；相邻 IQ 基序之间的数字表示间隔的氨基酸残基数；黑三角及其上的数字分别表示保守内含子的位置和类型；BD 代表被实验证实的 CaMBD。

3.2 非邻近序列的协同结合

PhK和 ApoCaM 的结合为另一种类型的 Ca^{2+} 不依赖性的 CaMBD. PhK 全酶由 α 、 β 、 γ 及 δ 4 个亚基组成, δ 亚基为 CaM. 即使在螯合剂 EDTA 存在下, CaM 也与 γ 亚基紧密结合, 并且需要强烈的变性条件才能被除去^[9], 表明这是一种 Ca^{2+} 非依赖的紧密结合. γ 亚基的 C 端有一个调节区域(氨

基酸残基 276~386), 调节区域中 2 个非邻近小肽 PhK5(342~366)和 PhK13(302~326)是 CaM 的结合位点(表 1). 研究表明, 虽然 PhK5 和 PhK13 各自与 ApoCaM 的亲和力很低, 但二者同时结合 ApoCaM 产生的增效作用, 能使 γ 亚基与 CaM 的结合不再依赖于 Ca^{2+} 的变化^[10].

Table 1 Types and sequences of Ca^{2+} -independent CaM-binding domains

表 1 钙不依赖性钙调素结合结构域的类型及序列比较

Ca ²⁺ 非依赖的 IQ 基序	
神经调制蛋白 (31~58)	AHKAATKIQASFRGHITRKKLKGEKKGD ++ +* A+ +* +++++ -++ -
神经颗粒蛋白 (24~51)	ANAAAAKIQASFRGHMARKKIKSGERGR +* A+ ++++++ -+ +
Myr4-1 (700~721)	RVVLFLQKVWRGTLARMRYKRT +***A**A+ * ++A++
Ca ²⁺ 非依赖的协同基序	
PhK5 (342~366)	LRRLIDAYAFRIYGHVKKGQQQNR *+***- A A+A +A+++ +
PhK13 (302~326)	GKFKVICLTVLASVRIYYQYRRVKP +A*** * ** **AA A++++
INOS (503~534)	RRREIRFRVLVKVVFASMLMRKVMASRVR +++* +A++++*AA ***** +++
未知类型	
家兔 α_1 -Syn-1 (106~126)	RENKMPILISKIFKGLAADQT +- +* *** +A+ * -
家兔 α_1 -Syn-2 (1~38)	MASGRRAPRTGLLELRAGTGAGGGERWQRVLVSLAED * ++ + **~*+ -+A ***** --

*、+、-和 A 分别表示脂肪族疏水、碱性、酸性和芳香族疏水氨基酸. Myr4, 大鼠肌球蛋白 4; PhK, 糖原磷酸化酶激酶; iNOS 诱导型一氧化氮合酶; Syn, 肌球蛋白结合蛋白.

3.3 其他类型的结合模式

IQ 基序和非邻近序列的协同结合模式代表了两类已知的 Ca^{2+} 不依赖性 CaMBD，研究表明，还存在一些 CaMBPs，其与 ApoCaM 的结合并没有可识别的已知 CaMBD^[4]，这预示着钙不依赖性钙调素结合域的多样性。

肌养蛋白结合蛋白(syntrophin, Syn)是一种组成型膜复合体蛋白，它的缺失会导致各种形式的肌肉营养不良. 可分为 α_1 、 β_1 和 β_2 3 种类型. Syn C 端含有一个自身特有的，高度保守的 SU 结构域. Newbell 等^[4]发现，Syn 在有或无 Ca^{2+} 条件下都能结合 CaM，一个结合位点在 α_1 -Syn 的 SU 结构域内，属于 Ca^{2+} 依赖的结合，另一个结合位点在 4~174 部位，与 Ca^{2+} -CaM 或 ApoCaM 均可结合. Iwata 等^[11]则在 1~38 和 106~126 部位各发现一个 Ca^{2+} -CaM 结合位点(表 1)，未发现 SU 结构域与 CaM 结合的证据. 对这种差异的解释之一是：SU 结构域在纯化过程中极易被蛋白酶降解^[2]. Syn 1~38 和 106~126 这两个 CaMBD 序列较短，含脯氨

酸、芳香族氨基酸数目少，这与 IQ 基序和依赖 Ca^{2+} 的 CaMBD 有着明显的不同(表 1).

4 钙不依赖性钙调素结合蛋白种类及其参与的生物学反应

目前已发现的钙不依赖性 CaMBPs 至少可归为 4 大类(表 2)：细胞骨架相关蛋白类、代谢酶类、离子通道类以及转录调控因子等，它们参与了众多的生物学反应^[2,7].

4.1 细胞骨架的调节

CaM 能通过与 IQ 基序的相互作用，调节细胞骨架相关的膜运输、细胞运动、有丝分裂等生物学过程. CaM 还可调节某些微管依赖的分子马达、动力蛋白和驱动蛋白的活性^[7].

非常规 myosin 是一类肌动蛋白依赖的马达分子，能利用 ATP 分解释放的能量产生沿肌纤丝运动的机械力. 其颈部调节区域包含 1~6 个串联排列的 IQ 基序，能结合 1~6 个调节轻链或 CaM. IQ 基序及其结合的轻链构成了一个能充当机械杠杆的刚

Table 2 Types and functions of Ca^{2+} -independent CaM-binding proteins ^[2,7]
表 2 钙不依赖性钙调素结合蛋白的种类及功能 ^[2,7]

种类	蛋白质名称	参与功能
细胞骨架 相关蛋白	刷状缘肌球蛋白 I (Brush-border myosin I)	肌动蛋白激活的 ATPase，与微绒毛运动有关
	大鼠肌球蛋白 4 (Myr4)	依赖 ATP 结合纤维状肌动蛋白
	鸡脑肌球蛋白 V (P190)	肌动蛋白激活的 ATPase
	神经调制蛋白 (Neuromodulin)	可逆的 CaM 贮存库，调节磷脂酰肌醇代谢
	神经颗粒蛋白 (Neurogranin)	未知
	神经特异蛋白 (PEP19)	未知
	果蝇神经调制蛋白相关蛋白 (Igloo)	未知
	肌养蛋白结合蛋白 (Syntrophin)	与 Na^+ 通道有关
	粒周蛋白 B (Kendrin)	有丝分裂
	粒周蛋白 (Pericentrin)	有丝分裂
	果蝇非正常纺锤体蛋白 ASP	有丝分裂
生长代谢相关蛋白	具有 IQ 基序的 GAP 蛋白 (IQGAP)	脚手架蛋白
	磷酸化酶 b 激酶(pkK)	调节糖原代谢
	腺苷酸环化酶(AC)	生成 cAMP
	诱导型一氧化氮合酶(iNOS 或 NOS II)	合成一氧化氮
	谷氨酸脱羧酶(GAD)	合成 γ -氨基丁酸
	cGMP 依赖的蛋白激酶	cGMP 和 cAMP 依赖的磷酸化作用
离子通道	AtBAG6	诱导细胞凋亡
	肌醇三磷酸(IP_3)受体	结合 IP_3
	肌质网(SR) Ca^{2+} 释放通道	从肌质网(SR)释放 Ca^{2+}
转录调控因子	结合 CaM 的转录激活子(CAMTA)	转录调控
	具有 IQ67 结构域(IQD)的蛋白	转录调控

性结构. Ca^{2+} 浓度的升高会抑制非常规 myosin 的运动功能^[7].

小肠刷状缘 myosin I (BBMI) 在无 Ca^{2+} 条件下能结合 3~4 个 CaM 分子, CaM 在无 actin 下能激活 BBMI 的 Mg^{2+} -ATPase 活性并抑制其体外的运动功能, Ca^{2+} 能降低 CaM 对 BBMI 的亲和力^[12].

某些有丝分裂蛋白中存在 Ca^{2+} 依赖和 Ca^{2+} 非依赖的 CaM 结合位点, 说明细胞分裂可能允许特异的双重信号转导. 粒周蛋白 B (kendrin) 为人 Spc110p 的定向同源蛋白, 连接 γ -微管蛋白复合体和酵母纺锤极体. 它有两个 IQ 基序和一个位于 C 端、类似于 1-5-8-14 基序的 Ca^{2+} -CaM 结合位点. 高度有丝分裂的乳腺癌细胞中, kendrin 和粒周蛋白(pericentrin)限定在有丝分裂的纺锤体中心, 调节纺锤微管^[7]. 果蝇的非正常纺锤体蛋白(ASP)与一个结构相关的小鼠蛋白(SHA1)都含有 4~5 个 IQ 基序, 能结合到有丝分裂纺锤体的极区, 说明 CaM 能控制有丝分裂过程中微管的活动^[7].

IQGAP 蛋白为一种脚手架蛋白, 可与多种信号组分或细胞骨架蛋白结合, 具有 4 个串联排列的 IQ 基序, 一个 Gap 结构域(结合 Rho 家族成员——Cdc42 和 Rac1), 一个 calponin 同源结构域(结合 actin), 一个 WW 结构域(结合多聚脯氨酸)和一个 C 端结构域(结合 β -catenin). IQGAP1 与 ApoCaM 的亲和力是与 Ca^{2+} -CaM 结合的 5~20 倍, IQGAP1 与 ApoCaM 的结合能被 Ca^{2+} 浓度负调节^[13]. ApoCaM 与 IQGAP1 的结合能阻碍后者与 cadherin-catenin 复合体的相互作用, 该复合体能促进 E-cadherin 介导的细胞粘附作用^[7].

4.2 生长发育的调节

除 myosin 外, 神经特异的膜蛋白 neuromodulin 和 neurogranin 是最早被鉴定的、通过 IQ 基序与 CaM 结合的蛋白质, 它们与 ApoCaM 的亲和力至少是与 Ca^{2+} -CaM 亲和力的 10 倍. 两者的 IQ 基序高度同源, N 端(IQASFR-)的 Ser 是蛋白激酶 C(PKC)的磷酸化位点, 磷酸化会显著降低它们与 CaM 的亲和力^[8]. 在神经系统发育中, neuromodulin 和 neurogranin 可能通过结合 ApoCaM 而在细胞内特异位点形成 CaM 贮存库, 当胞内 Ca^{2+} 浓度升高或受到 PKC 的磷酸化作用时释放 CaM^[2]. 目前认为, neuromodulin 参与神经元轴突的伸长生长, neurogranin 参与神经元树突的出芽生长^[7].

最近, Kang 等^[14]利用辣根过氧化物酶 HRP 标记

的 AtCaM2, 筛选热激处理的拟南芥 cDNA 表达文库, 得到 AtBAG6, 分析表明该蛋白质中部含有 BCL-2 相关结构域(BAG)和 IQ 基序. 实验表明, 重组 AtBAG6 可通过其 IQ 基序与 ApoCaM 形成稳定的复合物, 在酵母和植物细胞中, 胁迫可使 AtBAG6 表达增加, 超表达包括 BAG 及 IQ 在内的 134 个氨基酸即可诱导细胞凋亡.

4.3 代谢及信号组分调节

已有文献报道, 参与代谢调节的钙不依赖性 CaMBPs 包括各种酶类, 如 PhK、iNOS、谷氨酸脱羧酶(GAD)及 cGMP 依赖的蛋白激酶(PKG)等.

PhK 以 CaM 作为亚基, 在糖原代谢中起关键的调节作用^[15].

巨噬细胞内诱导型一氧化氮合成酶(iNOS 或 NOS II)也是一种 Ca^{2+} 非依赖性的 CaMBP. 在 EGTA 存在时, 纯化的 iNOS 与 CaM 紧密结合. 体外实验表明, 当环境中 Ca^{2+} 浓度为 0.1 nmol/L 时, iNOS 活性最高^[16]. 因此推测在静息细胞的低 Ca^{2+} 浓度下, iNOS 与 ApoCaM 结合被活化, 引发 NO 介导的信号传递. Censarek 等^[17]发现, 虽然 NOS II 与 ApoCaM 亲和力很高, 但若在其 CaMBD 处用带电荷氨基酸替换疏水氨基酸, 则亲和力显著降低.

Baum 等^[18]用 ^{35}S -CaM 作探针从植物中筛选 CaMBPs, 在矮牵牛中发现了一个与 *E.coli* 的谷氨酸脱羧酶(GAD)高度同源的蛋白质. 重组矮牵牛 GAD 的 C 端有 CaMBD, 在有无 Ca^{2+} 条件下都能结合 CaM, 而且 CaM 与 GAD 的交联不依赖于 Ca^{2+} . 矮牵牛 GAD 可催化谷氨酸转变成 γ -氨基丁酸, 因此胞内 Ca^{2+} 的水平可通过 CaM 调节植物 γ -氨基丁酸的合成.

研究表明, 在无 Ca^{2+} 条件下, CaM 与 PKG 能最大程度地结合, 而不改变 PKG 结合 ATP 的米氏常数, 此时该酶可被低浓度的 cGMP 特异激活. 可见, ApoCaM 在调节环核苷酸信号途径中发挥作用^[19].

4.4 离子通道的调节

细胞内多种离子通道的调控是通过直接结合 CaM 实现的.

IP_3 受体 (IP_3R) 和 ryanodine 受体(RyR)为配体依赖性 Ca^{2+} 通道, 它们可与 ApoCaM 结合, 并且钙通道活性可被 ApoCaM 调节^[1,20]. IP_3R 有两类多个 CaM 结合位点: 一类只结合 Ca^{2+} -CaM; 另一类结合 ApoCaM 或 Ca^{2+} -CaM. 在无 Ca^{2+} 条件下, ^{125}I -CaM 与小脑 IP_3R 特异而可逆地结合^[20]. 进一步

实验发现: 在有无 Ca^{2+} 条件下, CaM 都抑制 IP_3 的结合及 IP_3 诱导 Ca^{2+} 的释放^[20], 说明 IP_3R 能感知 CaM 水平, 调节小脑内 Ca^{2+} 的活动。

在 EGTA 存在时, CaM 能结合骨骼肌肌质网 (SR) Ca^{2+} 释放通道^[21]。Tripathy 等^[22]对 ^{125}I -CaM 与 SRCa^{2+} 通道结合的研究发现: 在静息骨骼肌细胞内, SRCa^{2+} 通道的每个亚基结合 4 个 ApoCaM, 增加了通道对 Ca^{2+} 释放的敏感性; 当肌肉收缩时, 3~4 个 CaM 开始与通道解离, 余下的一个 CaM 结合 Ca^{2+} 进而抑制 Ca^{2+} 的释放。

CaM 也可作为某些离子通道的结构组分起作用。例如 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道 (SK 通道) 由 α -亚基和 CaM 组成。 α -亚基的 CaMBD 位于胞内, 在有无 Ca^{2+} 条件下都与 CaM 的 C 端结合, 当 Ca^{2+} 与 CaM 的 N 端结合后, SK 通道开放^[23]。另外, 具有 IQ 基序的 Na^+ 通道也是以 CaM 作为组分并受其调节的^[24]。

4.5 转录调控

环境刺激及信号分子通过信号转导途径, 最终导致细胞核内基因转录模式的改变。在细胞核内已鉴定了多种具有转录活性调节特性的 CaMBPs。

Reddy 等^[25]从经乙烯处理的拟南芥幼苗中筛选到一种含 IQ 基序的蛋白质, 其具有典型的转录因子特征, 推测它可能参与乙烯反应基因的调控。

Bouché 等^[26]以 ^{35}S -CaM 作探针, 筛选经干旱处理的植物 cDNA 表达文库, 得到了一类含有 IQ 基序、DNA 结合结构域和转录激活结构域的 CaMBP, 定名为 CAMTA (calmodulin-binding transcription activator) 家族。CAMTA 包含了一类在多细胞真核生物中保守的转录因子, 并且可能通过直接与 CaM 结合产生反应^[26]。

Abel 等^[6]借助生物信息学方法, 利用 IQ 基序搜索模式植物拟南芥和水稻基因组, 得到一类具有 IQ67 结构域 (即由 67 个氨基酸残基组成的含有 IQ 基序的结构域) 的可能的 CaMBP, 命名为 IQD (IQ67 domain) 家族。该 IQD 包含 3 个 Ca^{2+} 不依赖的 IQ 基序, 每个 IQ 基序又同时与 Ca^{2+} 依赖的 1-5-10 基序和 1-8-14 基序部分重叠。分析表明: IQD 中具有多个 Ca^{2+} 依赖的和 Ca^{2+} 不依赖的 CaMBD, 大多 IQD 蛋白都具有碱性等电点, 富含 Ser 且多数定位于细胞核内。因此推测 IQD 蛋白参与并协调了与 CaM 及其同源蛋白的相互作用, 在转录及转录后水平调节基因表达^[6]。体外实验证明: IQD20 在 Ca^{2+} 或 EGTA 存在时都能与 CaM 结合, 而 IQD1 只在

Ca^{2+} 存在时与 CaM 结合, IQD1 参与促进植物体内芥子油苷积累, 与防御反应相关^[27]。在对 IQD26 的研究中, 我们的研究结果也表明, IQD26 存在不依赖于 Ca^{2+} 的 CaM 结合特性。绿色荧光蛋白 (GFP) 融合基因表达观察表明, IQD26 也存在于细胞核中, 有可能参与防御反应基因的表达调控 (待发表)。

5 展 望

CaMBPs 的研究是揭示 CaM 作用机制的关键, 钙依赖性 CaMBPs 在真核细胞中发挥着重要功能。然而, CaMBPs 与 Ca^{2+} 的结合并不总是必需的, 钙不依赖性 CaMBPs 在细胞内具有另外一些重要作用。虽然在真核细胞中已经检测、克隆和鉴定了许多钙不依赖性 CaMBPs, 但仍有许多待解决的问题。首先, 由于真核生物复杂的内环境, 钙不依赖性 CaMBPs 只是一个相对的、动态的概念, 所以钙不依赖性 CaMBPs 的鉴定缺乏严格的标准。其次, 除了用传统的体外方法检测和鉴定 CaMBPs 外, 更重要的是进一步验证 CaM 与 CaMBPs 在体内的相互作用, 以确定 CaM 与 CaMBPs 在时间和空间上的结合特性, 从而为研究 CaMBPs 的体内功能奠定基础。再次, 钙不依赖性 CaMBPs 的研究与钙依赖性 CaMBPs 的研究同等重要却远远滞后, 因此, 加强钙不依赖性 CaMBPs 的研究, 有助于探明 Ca^{2+} -CaM 信号转导途径的复杂性和多样性, 有助于阐明 CaMBPs 在生物生长发育中的作用。

参 考 文 献

- 1 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 等. 细胞信号转导. 第三版. 北京: 科学出版社, 2001. 92~118
Sun D Y, Guo Y L, Ma L G, *et al.* Cell Signal Transduction. 3th. Beijing: Science Press, 2001. 92~118
- 2 Jurado L A, Chockalingam P S, Jarrett H W. Apocalmodulin. Physiological Reviews, 1999, **79** (3): 661~682
- 3 James P, Vorherr T, Carafoli E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted. Trends Biol Sci, 1995, **20** (1): 38~42
- 4 Newbell B J, Anderson J T, Jarrett H W. Ca^{2+} -calmodulin binding to mouse $\alpha 1$ syntrophin: syntrophin is also a Ca^{2+} -binding protein. Biochemistry, 1997, **36** (6): 1295~1305
- 5 Rhoads A R, Friedberg F. Sequence motifs for calmodulin recognition. FASEB J, 1997, **11** (5): 331~340
- 6 Abel S, Savchenko T, Levy M. Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. BMC Evol Biol, 2005, **5**: 72
- 7 Bahler M, Rhoads A. Minireview: Calmodulin signaling via the IQ motif. FEBS Letters, 2002, **513** (1): 107~113
- 8 Apel E D, Byford M F, Au D, *et al.* Identification of the protein

- kinase C phosphorylation site in neuromodulin. *Biochemistry*, 1990, **29** (9): 2330~2335
- 9 Piction C, Klee C B, Cohen P. Phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle: identification of the calmodulin-binding subunits. *Eur J Biochem*, 1980, **111** (2): 553~561
- 10 Dasgupta M, Honeycutt T, Blumenthal D K. The γ -subunit of skeletal muscle phosphorylase kinase contains two noncontiguous domains that act in concert to bind calmodulin. *J Biol Chem*, 1989, **264** (29): 17156~17163
- 11 Iwata Y, Pan Y, Yoshida T, *et al.* α_1 -Syntrophin has distinct binding sites for actin and calmodulin. *FEBS Lett*, 1998, **423** (2): 173~177
- 12 Swanljung-Collins H, Collins J H. Phosphorylation of brush border myosin I by protein kinase C is regulated by Ca^{2+} -stimulated binding of myosin I to phosphatidylserine concerted with calmodulin dissociation. *J Biol Chem*, 1992, **267** (5): 3445~3454
- 13 Li Q W, Edward L. Stuenkel calcium negatively modulates calmodulin interaction with IQGAP1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **317** (3): 787~795
- 14 Kang C H, Jung W Y, Kang Y H, *et al.* AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. *Cell Death Differentiation*, 2006, **13** (1): 84~95
- 15 Cohen P, Burchell A, Foulkes J G, *et al.* Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS Lett*, 1978, **92** (2): 287~293
- 16 Ruan J, Xie Q, Hutchinson N, *et al.* Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca^{2+} . *J Biol Chem*, 1996, **271** (37): 22679~22686
- 17 Censarek P, Beyermann M, Koch K W. Thermodynamics of apocalmodulin and nitric oxide synthase II peptide interaction. *FEBS Lett*, 2004, **577** (3): 465~468
- 18 Baum G, Chen Y, Arazi T, *et al.* A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. *J Biol Chem*, 1993, **268** (26): 19610~19617
- 19 Yamaki T, Hidaka H. Ca^{2+} -independent stimulation of cyclic GMP-dependent protein kinase by calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, **94** (2): 727~733
- 20 Patel S, Morris S A, Adkins C E, *et al.* Ca^{2+} -independent inhibition of inositol trisphosphate receptors by calmodulin: Redistribution of calmodulin as a possible means of regulating Ca^{2+} mobilization. *PNAS*, 1997, **94** (21): 11627~11632
- 21 Yang H, Reedy M M, Burke C L, *et al.* Calmodulin interaction with the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium channel protein. *Biochemistry*, 1994, **33** (2): 518~525
- 22 Tripathy A, Xu L, Mann G, *et al.* Calmodulin activation of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor). *Biophys J*, 1995, **69** (1): 106~119
- 23 Schumacher M A, Crum M, Miller M C. Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex. *Structure*, 2004, **12** (5): 849~860
- 24 Mori M, Konno T, Morri T, *et al.* Regulatory interaction of sodium channel IQ-motif with calmodulin C-terminal lobe. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **307** (2): 290~296
- 25 Reddy A S N, Reddy V S, Golovkin M. A calmodulin binding protein from *Arabidopsis* is induced by ethylene and contains a DNA-binding motif. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **279** (3): 762~769
- 26 Bouché N, Scharlat A, Snedden W, *et al.* A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol Chem*, 2002, **277** (24): 21851~21861
- 27 Levy M, Wang Q, Kaspi R, *et al.* Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant J*, 2005, **43** (1): 79~96

ApoCalmodulin and Ca²⁺-independent Calmodulin-binding Proteins*

WEI Hui-Yan^{1,2)}, GUO Zhen-Qing^{1,3)**}, CUI Su-Juan^{1)***}

¹⁾*Institute of Molecular Cell Biology, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;*

²⁾*Department of Physics, Chemistry and Biology, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo 454000, China)*

Abstract Calmodulin (CaM) is ubiquitous, multifunctional calcium (Ca²⁺) sensor that exists in all eukaryotes. As it has no enzymatic activity, CaM transmits the Ca²⁺ signal by interacting with CaM-binding proteins (CaMBPs) to function in cellular regulation. In recent years, it has been found that CaM not only signals in the presence of Ca²⁺, it can also directly bind to target proteins as ApoCaM. Ca²⁺-independent CaM-binding proteins (ApoCaMBPs) is also an important way to elucidate the mechanism of CaM functions. Recent progresses in studies on animal and plant ApoCaMBPs were summarized. ApoCaM differs from Ca²⁺-CaM in its tertiary structure. It binds target proteins differently, utilizing different binding motifs such as the IQ motif, noncontiguous binding sites and others. The ApoCaMBPs are a diverse group of proteins including enzymes, transcription activators, as well as cytoskeletal and other membrane proteins, including receptors and ion channels. The overall picture that emerges is that CaM cycles between its Ca²⁺-bound and Ca²⁺-free states and in each state binds to different proteins and performs essential functions. Although much of the research focus has been on the roles of Ca²⁺-CaM binding proteins, the roles of ApoCaMBPs are equally vital but less well understood. Researches on ApoCaM and its binding proteins will make us understand the variety of CaM signaling pathway.

Key words calmodulin, ApoCaM, Ca²⁺-independent calmodulin-binding proteins, calmodulin-binding domain

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (90208004, 30470889), The Natural Science Foundation of Hebei Province (C2004000152) and Specialized Research Fund for The Doctoral Program of Hebei Normal University (L2004B11).

**Current address: Department of Life Science, Hebei University of Science & Technology, Qinhuangdao 066000.

***Corresponding author . Tel: 86-311-86269144, E-mail: cuisujuan@263.net

Received: August 21, 2006 Accepted: September 30, 2006