

钙调神经磷酸酶

魏 群 吴国利

(北京师范大学分子生物学及生物化学研究室)

提 要

钙调神经磷酸酶是 70 年代末 80 年代初发现的一种直接依赖于钙和钙调素的磷蛋白磷酸酶。它大量存在于脑内,分子量 80k,由催化亚基 A 和调节亚基 B 1:1 组成。钙调神经磷酸酶是个多底物的磷蛋白磷酸酶,它的活性还受 Mn^{2+} , Ni^{2+} 等多种金属离子的调节。

钙调神经磷酸酶 (Calcineurin) 是 70 年代后期由加拿大籍华人王学荆教授、美国生物化学家 C. B. Klee 教授和美籍华人张槐耀教授的实验室分别独立发现^[1-3],最初作为环核苷酸磷酸二酯酶的热不稳定抑制剂从脑中提取出来的。由于它结合钙的性质及在脑中大量存在的事实,被命名为 Calcineurin^[4]。80 年代前期,它又被发现和证实是一种起脱磷酸作用的磷蛋白磷酸酶^[5]。因此我们把它翻译成钙调神经磷酸酶。

一、分 布

钙调神经磷酸酶最初发现大量存在于脑及

神经组织中,后来报道它也少量存在于心肌,肝脏,肺脏,脾脏,骨骼肌,胎盘等其他组织中^[5-7]。在脑内,它们大部分存在于新纹状体(包括尾状核和豆状核外侧的壳)中^[8]。神经节的免疫化学表明钙调神经磷酸酶存在于突触密度区和树突微管区,并和突触的形成有密切关系。最近人们用单克隆抗体进行了钙调神经磷酸酶在脑内及多种组织内的进一步定位^[9]。

二、纯 化

钙调神经磷酸酶已从脑、骨骼肌、心肌等组织得到纯化。在纯化过程中通常用两种方法进行检测,一种是测酶活的方法,测定从适当的底

是,同一种 K^+ 通道 (S-通道) 的活性,是受到两种完全不同的、功能相反的第二信使系统 (cAMP 系统和花生酸系统) 共同控制的, cAMP 系统控制其关闭,花生酸系统控制其开放。

花生四烯酸或 FMRF 酰胺的作用范围不会仅限于海兔感觉神经元。应用脂氧合酶和环氧化酶抑制剂进行研究,将会很快发现更多使用花生酸作为第二信使的生物系统。

参 考 文 献

- [1] Rall, W., Sutherland, R. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 3608.
- [2] Altman, J.: *Nature*, 1987, **325**, 111.

- [3] Yatani, A. et al.: *Science*, 1987, **235**, 207.
- [4] Piomelli, D. et al.: *Nature*, 1987, **328**, 38.
- [5] Shuster, M. J. et al.: *Nature*, 1985, **313**, 392.
- [6] Belardetti, F. et al.: *Nature*, 1987, **325**, 153.
- [7] Bevan, S. et al.: *Nature*, 1987, **328**, 20.
- [8] Piomelli, D. et al.: *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1986, **12**, 1340.
- [9] Flower, R. et al.: *Br. med. Bull.*, 1983, **39**, 260.
- [10] Shen, T. Y. et al.: *Adv. Drug. Res.*, 1977, **56**, 665.
- [11] Egan, R. W. et al.: *Prostaglandins, Leukotrienes and Lipoxins* (ed. Bailey, J. M.), Plenum, New York, 1984, 593—607.
- [12] Needleman, P. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, **55**, 69.
- [13] Bliss, T. V. P. et al.: *J. Physiol.*, 1986, **377**, 391.
- [14] Smith, S. J.: *Trends Neurosci.*, 1987, **10**, 142.

[本文于 1988 年 6 月 15 日收到]

物如肌球蛋白轻链,依赖于 cAMP 的磷酸化酶激酶,抑制因子 I,磷酸酪氨酸等中 P^{32} 或 P 的释放,通过分别测定在 Ca^{2+} , 钙调素存在或 EGTA 存在时活性的变化,和其他磷蛋白磷酸酶进行鉴别区分,非蛋白合成化合物 PNPP 也可作为此酶的底物,从而使检测方法大大简化^[10]。另一种是用电泳后转移到硝基纤维素膜上,用 I^{125} -钙调素或抗体识别的方法直接检测 A、B 二亚基的存在。

纯化过程除了用离子交换,凝胶过滤,蓝琼脂糖层析柱外,非常关键的步骤是钙调素亲和层析柱。在 Ca^{2+} 存在的情况下使酶结合到亲和柱上,然后用 EGTA 代替 Ca^{2+} 溶液而将酶洗脱下来,从 100 克牛脑中可以得到 0.3—1.0 毫克钙调神经磷酸酶,提取中的酶非常不稳定,特别是在 Ca^{2+} 的存在下。

三、亚基结构

钙调神经磷酸酶是由不同种亚基组成的。大亚基 A (分子量为 61k) 和疏水的小亚基 B (从顺序测定得到分子量为 19.2k, 从 SDS 电泳得到分子量约为 15—16k), 通过沉降分析认为它是由 A 和 B 1:1 组成的,复合物分子量为 80 k 左右^[11]。从脑得到的全酶比吸光系数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为 9.6 (278 nm)。

A 亚基可能是酶的催化和调节核心,它包含有催化位点,对 B 亚基、钙调素和一些金属离子的结合位点等。催化位点在 A 亚基上的最有力证据是将亚基分离后, A 亚基在受 Ca^{2+} , 钙调素和金属离子 Mn^{2+} 激活后表现出它的磷蛋白磷酸酶的活性。A 亚基在单由 Ca^{2+} , 钙调素结合时并不表现出它的活性,和钙调素, Mn^{2+} 离子结合后酶的活性比单独结合 Mn^{2+} 时要大^[12]。另外据报道,胰蛋白酶能使 A 亚基解离成分子量为 45k 的片断和导致 B 亚基的破坏,但酶解后的钙调神经磷酸酶仍然保持磷酸酶的活性,这进一步表明了催化位点是在 A 亚基上。

B 亚基的一级结构已被测定^[11]。它由 168 个氨基酸组成,比吸光系数 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为 3.1 (277 nm)。富含酪氨酸,缺少胱氨酸和苏氨酸。和

依赖于 cAMP 的蛋白激酶相似,在肽链的 N 末端是十四烷酸基团。B 亚基的一级结构和钙调素及肌钙蛋白 C 极为相似,并都具有四个和钙结合的区域,即 EF 手结构等。

最近,许多重要实验室^[13-15]对钙调素和钙调神经磷酸酶的分子定位问题进行了研究,结果表明钙调素氨基酸顺序中的赖氨酸 75 区域是和钙调神经磷酸酶的结合部位。作者(魏群)在国外实验室进行的定位实验表明,除钙调素赖氨酸 75 区域为结合位点外,钙调素中的赖氨酸 21 和 148 区域也因为和钙调神经磷酸酶结合而使微环境受到严重干扰^[15],此结果比较符合钙调素的立体结构事实,也更相似于另一个和钙调素相结合的酶^[16]。

四、底物专一性

钙调神经磷酸酶的底物专一性由于酶受二价金属离子活化形成复合物而大大复杂化了。首先它的 B 亚基需要和 Ca^{2+} 结合,并进一步和钙调素结合才能刺激酶的活性,而 A 亚基本身又直接受 Mn^{2+} , Ni^{2+} 等二价金属离子的活化。金属离子活化的程度随着酶制备过程中的纯度和状态,底物的性质(特别是小分子化合物底物)和测定时所用的 pH 等的不同而变化。以至于使不同的实验室得到的数据无法进行比较,另外在提取中被其他磷蛋白磷酸酶污染有时也是个问题。

钙调神经磷酸酶是一个多底物的磷蛋白磷酸酶。它的专一性底物是:磷酸化酶激酶 α 亚基^[7,9];抑制因子 I 和 II;平滑肌肌球蛋白轻链;依赖于 cAMP 蛋白激酶 II 的调节亚基^[17];蛋白质中的磷酸酪氨酸和一些脑内蛋白质质 K-F, DARPP-32^[19] 和 G 底物等。有趣的是 G 底物, DARPP-32, 抑制因子 I 三者的物理化学性质很相似,它们都可以作为磷蛋白磷酸酶的抑制因子,它们都是在苏氨酸残基上被磷酸化,并且在磷酸化位点周围氨基酸顺序很相似,此酶对底物突触素 I, 组蛋白, 磷酸化酶 σ 和磷酸化酶激酶的 β 亚基 ($\alpha/\beta \approx 100$) 的活性很低。钙调神经磷酸酶的这些底物专一性暗

示着它和神经系统、肿瘤组织等有关的生理功能。

钙调神经磷酸酶还能作用于小分子磷酸酯,象 PNPP, β 磷酸萘酚, α 磷酸萘酚, 磷酸 DL 酪氨酸等。作用在这些底物的专一活性和作用在磷酸蛋白上的专一活性是同一数量级的。

磷酸丝氨酸的脱磷酸化是在当磷酸丝氨酸, NADP, 葡萄糖-6-磷酸, AMP, IMP, GMP 及 ATP 不存在时以很低的速度进行的。

五、调节亚基和金属离子的作用^[18]

钙调神经磷酸酶在它的 B 亚基上以比较低的亲和力,每克分子结合 4 克分子的钙,这种结合刺激酶到它最大活性的 5%。钙调素和酶形成 1:1 的复合物,它们具有非常低的解离常数。这个结合对 K_m 只有很小的影响,但大大增加了 V_{max} ,象其他依赖于钙调素的酶一样,限制性蛋白水解活化了钙调神经磷酸酶,并把它转变成对 Ca^{2+} 和钙调素不敏感的形式,这种处理使 K_m 减少,但使 V_{max} 增加。在用酪蛋白作底物的时候,虽然这个被修饰的酶不再结合钙调素,并显示了在调节蛋白缺少下最大的活性,但它仍然可以被 Ca^{2+} 活化,因为 B 亚基仍然存在,然而当加 $1m\text{ mol/L}$ Mn^{2+} 引起进一步活化时毫克浓度的 Ca^{2+} 是抑制剂。用胰蛋白酶对全酶进行水解时,在缺少 Mn^{2+} , Ni^{2+} 等金属离子的情况下,全酶还能保持有一些活性,而自由 A 亚基的胰蛋白酶水解,要使 A 亚基保持活性却一定需要 Mn^{2+} 的存在。

所有的研究者都认为,由于有不同的构象存在而使酶表现出不同的活性,活性的层次起码可以表现为以下六种:自然的 A、B 二亚基共聚体(全酶)在缺少 Ca^{2+} 的时候,处于无活性状态;当 B 亚基与 Ca^{2+} 饱和时,全酶具有一定的活性;钙调素又可以使它的活性大大增加;而这三种状态中的任何一种都可以通过 A 亚基上结合金属离子,特别是 Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} 等金属离子,从而分别刺激和增加各自的活性。

J. H. Wang 的实验室根据金属离子对酶活性的影响,把它们分为四类^[20]。第一类象

Ni^{2+} , Mn^{2+} 等,它们在钙调素缺乏下也能活化酶,并通过钙调素更进一步刺激酶的活性,第二类是象 Ca^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} 等,它们只能在钙调素的存在下刺激酶的活性,第三类如 Be^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} 等,无论钙调素存在与否都不影响酶活性,第四类如 Zn^{2+} ,它们能抑制由第一、二类金属离子激活起来的酶活性。各金属离子对酶影响的强弱不是绝对的。如在用组蛋白 H_1 作底物时, Ni^{2+} /钙调素存在时的酶活性比 Mn^{2+} /钙调素的酶活性要强 5 倍,比 Ca^{2+} /钙调素的酶活性强 8 倍,但在用髓磷脂基本蛋白作底物时 Ni^{2+} /钙调素的活性只有 Mn^{2+} /钙调素的五分之一。

大部分研究者认为 Mg^{2+} 对酶活性没有影响,但 H. C. Li 的实验室认为 Mg^{2+} 强烈地影响酶活,特别是在用小分子量的底物时,在 pH7.4 的条件下,金属离子对酶的影响顺序是 $Ni^{2+} > Mn^{2+} > Mg^{2+} \gg Co^{2+}$,而在 pH 8.6 的条件下, Mg^{2+} 对酶的影响和 Ni^{2+} 相同,甚至更强。当然在高 pH 下可能存在被碱性磷酸酶污染的问题。

最近作者(魏群)在国外实验室第一次用顺磁共振(ESR)对钙调神经磷酸酶和其 B 亚基中的金属离子结合位点进行了研究^[21],用 Vo^{2+} 试验表明 Vo^{2+} 能和酶以及单独的 B 亚基结合形成复合物。 Vo^{2+} 和酶起码有二个或二个以上的结合位点,其中二个是在 B 亚基上,且 Vo^{2+} 和酶的结合呈化学计量关系。

六、酶的活化和失活机制

钙调神经磷酸酶被金属离子 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 活化的机制是非常复杂的^[22],活化进程是缓慢的,并且似乎是经过了许多步。起码有二种形式的 Ni^{2+} 活化酶存在。第一种对螯合剂很敏感,而第二种在预先经过一段时间的培育后,它对螯合剂是抵制的。这种行为可归结为酶和金属离子结合牢固程度的变化。酶和 Mn^{2+} 的结合也有相似现象。这说明不活化的第一种形式的催化亚基可能是通过二步被 Mn^{2+} 或 Ni^{2+} 活

(下转第 368 页)

$\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}_2 + \text{H}^+$,而在膜内侧界面上,由于铁氰化钾易还原为亚铁氰化钾,又使 CuL_2 中铜的价态从 I 价变为 II 价: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + \text{Cu}^{\text{I}}\text{L}_2 \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} + \text{Cu}^{\text{II}}\text{L}_2$

为了进一步证实 CuL_2 -BLM 具有类似于金属电极的性质,又做了另外两个实验,即当膜内侧溶液中含有 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 时,分别将 KI 或 I_2 -KI 放入膜外侧溶液中,在相同的扫描条件下,亦能得到相应的循环伏安图。一般而言, I^- 和 I_3^- 的氧化还原电位是相同的,对这两个体系而言,理应获得大致相同的图谱,但因碘本身极易渗入脂膜中,它是一个典型的修饰物^[6],在膜外侧溶液中含有 I_2 -KI 的情况下,双层脂膜实际上受到 CuL_2 和 I_2 的修饰,导致所得到的循环伏安图有所不同(图 3)。

综上所述,双层脂膜经 CuL_2 修饰以后,当脂膜两侧溶液中存在着合适的氧化还原物质时,在膜的界面上会发生氧化还原的偶联反应,导致了膜电阻的降低,并产生跨膜的电子传递。故当这类对革蓝氏阴性菌有抗菌能力的配合物与细菌接触时,由于 CuL_2 的脂溶性,较易进入细胞膜,改变了它的电学性质,从而扰乱或阻碍了细菌细胞膜的正常功能,特别是那些与电子

传递密切相关的生化过程。

参 考 文 献

- [1] Bathistochi, C. et al.: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1971, 33, 3815.
- [2] Ali, M. A. et al.: *Inorg. Chim. Acta*, 1971, 5, 493.
- [3] В. П. Лигвинов, др.: *Изв. А. Н. СССР. Сер. Хим.*, 1980, 8, 1774.
- [4] Saxena, A. K. et al.: *Synth. React. Inorg. Met-Org. Chem.*, 1980, 10, 117.
- [5] Dashora, R. et al.: *Synth. React. Inorg. Met-Org. Chem.*, 1983, 13, 209.
- [6] Tien, H. Ti.: *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1974, 672.
- [7] Ivanov, I.: *Thin Liquid Films*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1986, 285—287.
- [8] Kutnik, J. et al.: *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1985, 11, 317.
- [9] Tien, H. Ti.: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1985, 13, 299.
- [10] Tien, H. Ti.: *J. Phys. Chem.*, 1984, 88, 3172.
- [11] Tien, H. Ti. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 119, 372.
- [12] Sandstrom, J.: *Acta Chim. Scand.*, 1963, 17, 937.
- [13] Yokoi, H. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1968, 41, 2835.
- [14] Tien, H. Ti. et al.: *Photobiochem. Photobiophys.*, 1986, 7, 319.

[本文于1988年7月26日收到]

(上接第 346 页)

化,第一种可以被螯合剂逆转,第二种不能。

Mn^{2+} 是和 Ni^{2+} 竞争地结合在钙调神经磷酸酶的相同位点上,一种金属离子结合上去后,另一种就不能再结合了。这可能是由于一种离子的结合使酶变成和那种离子具有高亲和的形式,也可能是因为每一种阳离子专一性地诱导了不同的构象状态。这种假说最令人信服的证据是运用了对 B 亚基专一性的单克隆抗体^[20]。这种单克隆抗体能抑制 Ni^{2+} 激活酶,但不能抑制 Mn^{2+} 激活酶,这也进一步说明了 B 亚基在酶的 Ni^{2+} 诱导活性表达中是起了关键作用的。

参 考 文 献

- [1] Wang, J. H. et al.: *J. B. C.*, 1977, 252, 4175.
- [2] Klee, C. B. et al.: *Biochemistry*, 1978, 17, 120.

- [3] Cheung, W. Y. et al.: *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1978, 9, 233.
- [4] Klee, C. B. et al.: *PNAS*, 1979, 76, 6270.
- [5] Stewart, A. A. et al.: *FEBS Letters*, 1982, 137, 80.
- [6] Ingebritsen, T. S. et al.: *EJB*, 1983, 132, 263.
- [7] Wolf, J. H. et al.: *PNAS*, 1980, 77, 5852.
- [8] Tallant, E. A. et al.: *Biochemistry*, 1983, 22, 3630.
- [9] Matsui, H. et al.: *Brain Research*, 1987, 402, 193.
- [10] Pallen, C. J. et al.: *J. B. C.*, 1983, 258, 8550.
- [11] Aitken, A. et al.: *EJB*, 1984, 139, 663.
- [12] Gupta, R. C. et al.: *Can. J. Pharmacol.*, 1985, 6.
- [13] Manalan, A. S. et al.: *Biochemistry*, 1987, 26, 1382.
- [14] Winkler, M. A. et al.: *J. B. C.*, 1987, 262, 15466.
- [15] Wei, Q. et al.: *J. B. C.*, 1988, 263, 19541.
- [16] Jackson, A. E. et al.: *J. B. C.*, 1986, 261, 12232.
- [17] Blumenthal, D. K. et al.: *J. B. C.*, 1986, 261, 8140.
- [18] Aswad, D. W. et al.: *J. B. C.*, 1981, 256, 3487.
- [19] Walans, S. I. et al.: *J. Neurosci.*, 1984, 4, 84.
- [20] Pallen, C. J. et al.: *J. B. C.*, 1984, 259, 6134.
- [21] Wei, Q. et al.: in press.
- [22] Matsui, H. et al.: *J. B. C.*, 1985, 260, 4174.

[本文于1988年6月23日收到]