

钙离子激活的中性蛋白酶

许凤浩 夏庆苏

(同济医科大学分子生物学研究室, 武汉)

提 要

钙离子激活的中性蛋白酶由 80kD 的催化亚基和 30kD 的调节亚基组成。二者都以无活性的前体存在。受外源刺激信号及升高的钙离子作用, 自身首先活化, 然后激活蛋白激酶 C, 二者都能水解各种蛋白底物, 调节细胞的形态和功能, 自身并受内源性抑制因子的调节。

钙离子激活的中性蛋白酶 (Calcium Activated Neutral Protease 简称 CANP), 也称作钙离子依赖性蛋白酶 (Calcium-dependent Proteases 或 Calpains)。该酶广泛而大量地存在于脊椎动物的各种组织和细胞中, 是一种典型的细胞内半胱氨酸蛋白酶, 其活性绝对需要钙离子; 在中性 pH 值并有还原剂 (如二巯基乙醇) 存在的条件下, 其活性最高, 而在巯基修饰剂和 Ca^{2+} 螯合剂 (如 EDTA) 存在时, 活性降低或丧失^[1]。其功能涉及蛋白激酶 C 的活化, 细胞骨架蛋白的水解, 其它蛋白激酶的磷酸化, 微管蛋白的聚合和解聚等。本文对这方面的研究进展扼要介绍如下:

一、CANP 的分子结构^[2]与活化

CANP 有两种同工酶, 根据其对 Ca^{2+} 的

敏感性差异, 分别称为 μ -CANP 和 m-CANP。前者在微摩尔的 Ca^{2+} 浓度中就能激活, 而后者则需在毫摩尔的 Ca^{2+} 浓度中激活。若以 50% 酶活性所需的 Ca^{2+} 浓度计算, μ -CANP 需要 2—75 $\mu\text{mol/L}$, 而 m-CANP 则需要 0.2—0.8 mmol/L 。通过 cDNA 核苷酸序列分析法已分别检测了鸡、兔、猪和人的 CANP 分子结构。结果表明, 两种同工酶都由大小不同的两个亚基组成。较小的亚基分子量为 30kD, 结构和功能完全相同, 为调节亚基; 较大的亚基分子量为 80kD, 功能相同但结构略有差异, 为催化亚基。

催化亚基由 700 个氨基酸残基组成, 有四个结构域, 从 N 端开始分别命名为结构域 I, 结构域 II, 结构域 III 和结构域 IV。调节亚基由 270 个氨基酸残基组成, 有二个结构域, 也从 N

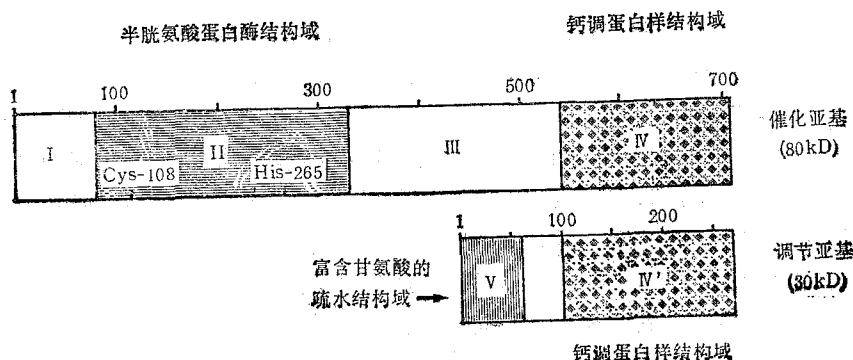


图 1 CANP 的分子结构^[2]

端开始命名, 由于小亚基N端开始的第一个结构域与前述四者不同, 则依次命名为结构域 V, 而第二个结构域其功能和结构都与前述的结构域 IV 相似, 故仍命名为结构域 IV, 但需在 IV 的右上角加一撇以示区别, 即为结构域 IV'。整个分子的结构如图 1 所示^[2]。

结构域 I 既是两种同功酶区别的主要所在, 也是两个大亚基区别的主要所在。在鸡的 CANP 分子中, 它由第 1 位到第 81 位氨基酸残基组成, 具有调节自身酶活性的作用。在未活化的 CANP 分子中, 它遮盖着分子自身酶活性部位的半胱氨酸残基, 而当 CANP 活化时它则被分子自身的酶水解除去。结构域 II, 由第 81 位到第 330 位氨基酸残基组成, 具有半胱氨酸蛋白酶活性, 其第 108 位的半胱氨酸残基和第 256 位的组氨酸残基是该酶的活性残基。结构域 III 由第 331 位到第 560 位残基组成, 功能不清。结构域 IV 由第 561 位到第 705 位残基组成, 内含约由 30 个氨基酸残基组成的 4 个“螺旋-环-螺旋”(Helix-Loop-Helix) 结构, 类似于钙调蛋白, Ca^{2+} 就结合在这种结构的环状区上, 调节着结构域 II 的酶活性^[3]。在人类的 CANP 中, 结构域 V 由小亚基第 1 位到第 70 位氨基酸残基组成, 为一富含甘氨酸的疏水性结构域, 其甘氨酸含量约为 60%, 此外的氨基酸绝大多数也是疏水性的, 能够与磷脂相互反应, 并参予膜附着。结构域 IV' 由小亚基第 99 位到第 268 位残基组成, 结构与功能均类似于大亚基的结构域 IV, 二者序列相关同源性约为 50%。

在细胞生理 Ca^{2+} 浓度下, CANP 的大小亚基在各自 C 端的钙调蛋白样结构域之间, 通过次级键结合在一起, 游离于胞浆内。

在外源刺激信号作用下, 膜磷脂水解, 细胞浆内 Ca^{2+} 浓度升高, 升高的 Ca^{2+} 即与 CANP 的钙调蛋白样结构域结合。 Ca^{2+} 与大亚基钙调蛋白样结构域的结合, 使分子构象发生变化, 酶活性中心暴露, 解除了分子自身对酶活性的抑制, 并水解去除 N 端 20 个氨基酸残基, 使整个分子呈活化状态, 此时的大亚基不需或只需很

少的 Ca^{2+} 即能维持活性; 而 Ca^{2+} 与小亚基钙调蛋白样结构域的结合, 导致分子构象变化, 使其 N 端富含甘氨酸的疏水性结构域与磷酸肌醇的反应性增强, 整个分子附着于细胞膜上, 而后仍在自身的酶活性作用下, 水解去除小亚基的整个结构域 V, 再使活化的 CANP 呈游离状态(图 2)。

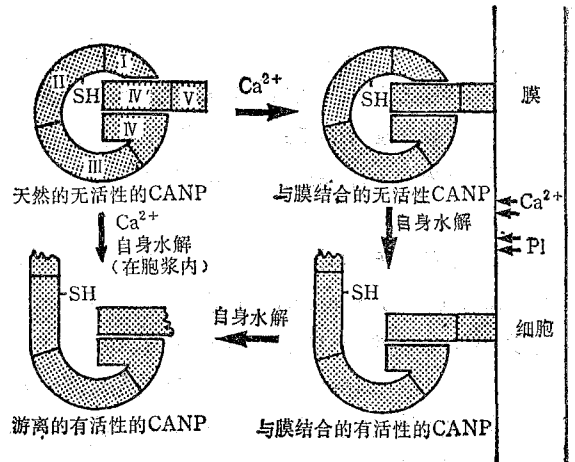


图 2 CANP 的激活模式

二、CANP 的生物学功能

1. 激活蛋白激酶 C

蛋白激酶 C (Protein Kinase C, PKC), 分子量 80kD, 为一传递跨膜信号的关键酶, 它以可溶性的无活性形式存在于细胞浆中, 当有 Ca^{2+} 动员时即转位到细胞膜上。在胞膜上与 Ca^{2+} 、膜相关磷脂、二酰基甘油或其它类似物组成四重复合体而激活。结构研究表明^[4], PKC 可以水解为两段。其 C 端的大片段约为 50kD, 称为 PKM, 该结构域具有蛋白激酶 C 的催化活性; N 端的小片段约为 35 kD, 为调节结构域, 含有二酰基甘油、 Ca^{2+} 和磷脂等辅助因子结合的位点, 它抑制着催化结构域的活性。当调节结构域与辅助因子结合时, 分子空间构象变化, 自身激活, 其活化方式类似于 CANP。由于 CANP 与 PKC 存在于同一部位^[5], 因此活化的 CANP 能够在 PKC 的催化结构域和调节结构域的连接处将其水解, 产生不依赖于辅助因子并具有酶活性的催化结构域——PKM

和能够结合辅助因子的调节结构域,前者从细胞膜上释放,使胞内的蛋白底物磷酸化;后者具有富含半胱氨酸的重复结构,既能保留在细胞膜上,也能与具有同样重复序列的受体或 DNA 结合蛋白相互作用,调节着细胞的生理功能。

2. 参与 CAMP 和肌球蛋白的代谢

CAMP 的代谢途径有二条,一是与蛋白激酶的调节亚基结合,使其与催化亚基分离而发挥生物学效应;二是被磷酸二酯酶水解而失活。活化的 CANP 既能水解蛋白激酶的调节亚基发挥催化亚基的活性,也能够水解磷酸二酯酶。水解后的调节亚基仍能结合 CAMP^[6],水解后的磷酸二酯酶活性增高,不再依赖于 Ca^{2+} ^[7]。

肌球蛋白由二条重链和四条轻链组成,为一长而具有球形头部的不对称分子。其体部由两条重链螺旋组成,头部由两条延伸的重链和四条轻链组成;体部易为蛋白酶水解,头部在肌肉收缩时,其轻链即在肌球蛋白轻链激酶作用下发生磷酸化,为肌肉收缩提供能量。在 Ca^{2+} 及 Ca^{2+} 调蛋白复合物存在下, CANP 能将鸡砂囊内催化肌球蛋白轻链磷酸化的肌球蛋白轻链激酶水解为 62kD 的片段,它能够结合 Ca^{2+} , 具有酶活性;在无 Ca^{2+} 及钙调蛋白复合物存在时,水解产生的片段主要为 60kD,不具有酶活性^[7]。

此外,在肌原纤维结构的代谢转换期间, CANP 能降解肌原纤维蛋白,使其三维结构解聚。在子宫退化期间能参与子宫肌细胞内外蛋白的降解和吸收;在患有萎缩性肌病的肌细胞中, CANP 含量和活性升高。

3. 调节血液细胞的形态、功能和代谢

红细胞中的 CANP 能够水解红细胞膜骨架蛋白和跨膜蛋白以改变细胞自身形态,促进红细胞膜融合,并能够降解血红蛋白 α 链和 β 链以避免剩余蛋白沉积,还能够改变衰老红细胞膜表面抗原性使之易为免疫系统清除,对抗氧化剂的作用,保证红细胞正常功能等等。患有 6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏的蚕豆病患者^[8],其红细胞中 CANP 减少,活性也低,并易于水

解失活等。

血小板中的 CANP 在血小板活化时,能够水解连接两段 F 肌动蛋白链的微丝蛋白,解除它对肌动球蛋白复合物 ATP 酶活性的抑制,使得细胞骨架系统收缩,调节血小板运动^[9,10]。活化血小板的 CANP 还能够水解活化 XIII 因子,启动凝血系统^[11];在血小板活化期间, CANP 被活化并分泌到血小板外表面^[12]。

中性粒细胞中的 CANP 也能够选择性地降解膜蛋白或细胞骨架蛋白,活化 PKC,使一系列底物磷酸化,从而使中性粒细胞脱颗粒,运动性增强等。

4. 水解组蛋白,甲状腺球蛋白及参与神经系统的功能

在高浓度 Ca^{2+} 存在下, CANP 能够水解小牛胸腺的组蛋白,它对 H_2B 最敏感, H_2A 次之, H_3 最差^[13]。

CANP 还能将甲状腺球蛋白先降解成 67 kD 和 46 kD 的片段,然后再进一步水解为 40 kD 的片段^[14]。

存在于髓磷脂鞘^[15]和神经细胞浆内的 CANP,在神经递质作用下,能够选择性地降解与津状纤维 (Fodrin) 蛋白相连的细胞骨架,使突触后膜发生持续的化学及超微结构变化,导致谷氨酸受体的表达;并能对微丝蛋白进行翻译后修饰;在轴突中调节神经纤维的移动和微丝——细胞膜的相互作用。在生理状况下, CANP 还能对神经肽进行剪切加工,并能与钙调蛋白相互作用,协调钙调蛋白的功能。当突触前膜谷氨酸释放过多,突触后膜 Ca^{2+} 通道持续开放时,会引起 CANP 持续激活,造成突触内蛋白的广泛降解,导致兴奋性中毒 (Excitotoxicity)。

此外,晶状体中的 CANP 在晶状体内皮细胞分化期间能够降解中间微丝蛋白、纽带蛋白以及 α 晶蛋白的 A 链和 B 链,其活性过高时与白内障的形成有关。视网膜中的 CANP 也能够降解微管蛋白,参与微管蛋白周期性地聚合与解聚。人类的 CANP 还能与低分子量和高分子量的激肽原相互作用^[16]等。

三、CANP 抑制因子^[17]

CANP 抑制因子,简称 CANPI,又称 CDPI (Calcium-dependent protease inhibitor) 或称 Calpastatin,是 CANP 专一的內源性抑制因子。该因子或游离于胞浆内,或附着于肌浆网膜上。其分子量因所在组织不同而异。存在于红细胞中的抑制因子分子量较小(70kD),存在于肝、心及其他组织中的则分子量较大(110 kD)。两类抑制因子功能无明显差异,只是抑制 CANP 的数量多少不同。

在 Ca^{2+} 存在下, CANPI 对 CANP 两种同功酶的抑制功能基本相同,但存在于不同部位的 CANPI,其抑制 CANP 活化的方式和环节则稍有差异。

胞浆内游离的 CANPI 能够抑制 CANP 的活化,并抑制已活化的 CANP 与胞膜的附着,促进附膜的 CANP 与膜解离等等。而存在于犬和牛心肌组织中的 CANPI 则主要附着于肌浆网膜上,一部分游离于肌浆内。当细胞内 Ca^{2+} 升高时,肌浆网膜上的 CANPI 可与一个以上的 CANP 结合,结合后的 CANPI-CANP 复合物能够使该复合物中的 CANPI 裂解,并与 CANP 一起从膜上脱落;而当细胞内 Ca^{2+} 降低时,脱落的 CANPI-CANP 复合物则解离为 CANPI 碎片和无活性的酶。整个过程如图 3 所示。这样在 Ca^{2+} 短暂升高时, CANPI 既能对抗 CANP 对膜蛋白底物的不适宜水解,又能与 CANP 结合从膜上解离,使以后附膜 CANP 的活化加速。因此, Mellgren RL^[18] 把 CANPI 的这种双重作用称为缓冲作用。

CANPI 与其他已知的蛋白酶抑制因子无明显的同源性。它不能抑制与 CANP 结构同源的其它半胱氨酸蛋白酶的活性;同样, CANP 也不能被典型的半胱氨酸蛋白酶抑制因子所抑制;它可能是一种新型的蛋白酶內源性抑制因子。

总之,脊椎动物中的 CANP 研究进展很大,对其存在,结构和功能的关系,对其在信息传递方面的作用,都将随着研究的深入而不断获得新的认识。

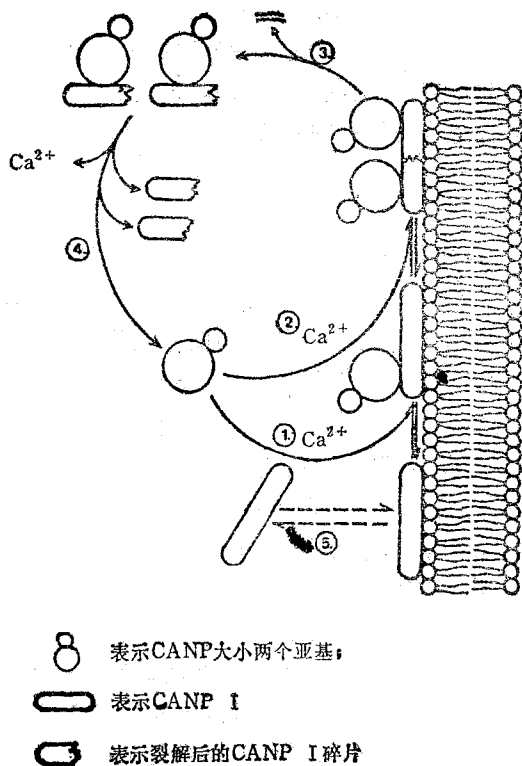


图 3 附膜 CANPI 的作用模式图^[14]

参 考 文 献

- [1] DiCola, D. et al.: *FEBS Lett.*, 1987, 210(1), 81.
- [2] Suzuki, K.: *TIBS*, 1987, 12(3), 103.
- [3] Minami, Y. et al.: *J. Biochem.*, 1987, 101(4), 889.
- [4] Ohno, S. et al.: *Nature*, 1987, 325(6100), 161.
- [5] Savart, M. et al.: *FEBS Lett.*, 1987, 216(1), 22.
- [6] Blumenthal, E. J. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, 258(1), 19.
- [7] Ito, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 145(3), 1321.
- [8] Morelli, A. et al.: *Blood*, 1987, 69(9), 1753.
- [9] Malik, M. N. et al.: *Life Sci.*, 1987, 40(6), 593.
- [10] Onji, T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1987, 912(2), 283.
- [11] Ando, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 144(1), 484.
- [12] Samis, J. A. et al.: *Biochem. J.*, 1987, 246(2), 481.
- [13] Sakai, K. et al.: *J. Biochem.*, 1987, 101(4), 911.
- [14] Haraguchi, K. et al.: *Endocrinol. Jpn.*, 1987, 34(1), 1.
- [15] Banik, N. L. et al.: *Life Sci.*, 1987, 41(9), 1089.
- [16] Ishiguro, H. et al.: *Biochemistry*, 1987, 26(10), 2863.
- [17] Suzuki, K. et al.: *FEBS Lett.*, 1987, 220(2), 271.
- [18] Mellgren, R.L.: *FASEB J.*, 1987, 1, 110.

[本文于1988年3月29日收到]