

综述与专论

原核生物中的类钙调蛋白

张蔚文

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要 钙是重要的生命元素之一, 真核生物中普遍存在介导钙信号的钙调蛋白已有深入的研究, 证明钙调蛋白是细胞复杂调控系统中的一个重要成员, 但是在原核生物中是否也存在类似的蛋白因子却一直说法不一. 自 80 年代初在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中首次发现类钙调蛋白 (calmodulin-like-protein) 以来, 已在多种原核生物中陆续发现了类钙调蛋白的存在, 证明其可能参与了原核生物的孢子形成, 细胞分裂, 生物固氮, 异型胞形成和兰细菌光合作用等多种调控功能. 文章综述了近年来这一领域的部分研究成果.

关键词 原核生物, 类钙调蛋白, 生理功能

1 前言

细胞存在介导钙信号的钙结合蛋白的概念首先由 Ebashi 等^[1]在 1965 年提出, 随后, Cheung 等^[2]发现了一类能结合钙离子的磷酸二酯酶激活蛋白, 进一步的研究发现这类蛋白还有激活牛脑腺苷环化酶, Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶和蛋白激酶等多种功能, 而且普遍存在于所有真核生物中. 1978 年 Cheung 等将这类蛋白因子命名为“钙调蛋白”(calmodulin). 目前认为钙调蛋白是细胞复杂调控系统中的一个中心成分, 对细胞的多种生理代谢功能有调节作用(表 1).

表 1 真核生物中 Ca^{2+} /钙调蛋白的生理作用

细胞运动	细胞伸长
环状核苷代谢	细胞分裂
Ca^{2+} 运输	胞质环流
蛋白磷酸化	胞外酶分泌
免疫反应	神经递质释放
微管解聚	RNA 转录
酶活性调节	膨压调节

钙调蛋白是一类热稳定, 单亚基的球形蛋白, 具有 4 个功能决定簇, 分子量为 15 000—22 000 不等, 本身无任何催化功能. 钙调蛋白激活多种酶活性的能力在于它结合钙离子后, 因发生构象变化而使蛋白疏水区域暴露在外, 这时再和靶酶结合, 将导致靶酶的构象也发生改变, 影响酶的活力. 此外, 不同来源的钙调蛋白编码基因有很好的保守性^[3].

2 原核生物中的类钙调蛋白

2.1 真细菌的类钙调蛋白

尽管钙调蛋白普遍存在于真核生物中早已得到广泛的认同, 但关于其在原核细胞中的存在却一直比较矛盾. 首例在原核生物中发现类钙调蛋白的报导是 1981 年日本学者 Iwasa 等^[4]从大肠杆菌 (*E. coli*) 中分离到一个热稳定性蛋白因子, 它能 Ca^{2+} 依赖性地激活牛脑环状核苷磷酸二酯酶, 人红细胞膜的 (Ca^{2+} , Mg^{2+})ATP 酶及兔肌球蛋白轻链激酶, 但该蛋白对 *E. coli* 的磷酸二酯酶活性无影响. 然而, 深入的分析发现 Iwasa 等培养 *E. coli* 所用的

营养肉汁培养基既使在灭菌之后,仍有可能含有钙调蛋白活性^[5],这降低了该实验的说服力. Harmon 等^[6]从 *E. coli* 中分离到 3 个分子量分别为 23 000、47 000 和 60 000 的热稳定性蛋白,这类蛋白在含微量 Ca^{2+} 和生理盐浓度的缓冲液中能优先结合 $^{45}\text{Ca}^{2+}$,它不能激活钙调蛋白依赖性的 NAD 激酶,但放射免疫分析发现该蛋白具有钙调蛋白的抗原性. 利用鳗鲡钙调蛋白基因作为探针, Harmon 等^[6]对八种原核生物(*E. coli*, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus cereus*, 黄色粘球菌 *Myxococcus xanthus*, 恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*, 鱼腥藻 *Anabaena species*, 巴氏甲烷八叠球菌 *Methanosarcina barkeri*, 脱硫弧菌 *Dseulfovibrio vulgaris* 和乙酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus*) 的染色体 DNA 限制性酶切片段进行 Southern 杂交,结果均发现有明显的互补序列. 证明原核生物中确有可能存在类钙调蛋白.

M. xanthus 在营养缺乏时形成子实体伴随着发育特异性蛋白 S 的诱导和大量积累,蛋白 S 在 Ca^{2+} 存在时可组集在粘孢子表面. Inouye 等^[7]克隆了蛋白 S 的编码基因,序列测定后推导出氨基酸序列,发现它和真核生物的钙调蛋白有明显的相似性. 蛋白 S 有四个功能决定簇,其中决定簇 1 和 3,决定簇 2 和 4 具有很高的序列相似性,其中决定簇 1 和 3 上的一段 9 个氨基酸序列

Glu (或 Asp) -Asn-Asn-Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Lys,
和牛脑钙调蛋白决定簇上的 Ca^{2+} 结合序列
Asp*-Gly-Asn*-Gly-Thr*-Ile-Thr*-Thr-Lys*
(星号表示推测的 Ca^{2+} 结合残基)

有高度的相似性. 蛋白 S 在等电点,热稳定性,疏水性氨基酸的比例和 Ca^{2+} 结合位点的高级结构均和钙调蛋白相似. 但目前还不知道蛋白 S 是否具有激活钙调蛋白依赖性酶的能力.

Leadlay 等^[8]在红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 中偶然发现一个分子量为 21 000 的蛋白具有钙调蛋白的一些性质,对 ^{45}Ca 有很高的亲和力. 在进一步的研究中, Swan 等^[9]通过克隆该类钙调蛋白基因,并借助

计算机分析了其氨基酸分布的规律性. 在其 N 端发现四段 12 个氨基酸片段的顺序和人钙调蛋白的钙结合位点氨基酸顺序极为相似. 真核生物钙调蛋白具有特征性的螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix) 二级结构,即所谓的 EF 臂. 对来自 *S. erythraea* 类钙调蛋白二级结构的预测也发现上述四段 12 氨基酸序列亦呈现 EF 臂结构. 对于这个类钙调蛋白的功能尚不清楚.

1986 年 Fry 等^[5]利用分离真核钙调蛋白的方法,从革兰氏阳性菌 *Bacillus subtilis* 孢子萌发培养物中分离到一个分子量为 23 000—25 000 的热稳定性蛋白,该蛋白能和牛钙调蛋白抗体交叉反应,在 Ca^{2+} 存在时能够激活牛磷酸二酯酶,这种激活作用能够被钙调蛋白拮抗剂所抑制. 进一步研究发现该蛋白还能够激活豌豆 NAD 激酶,但它的总氨基酸组成,最大吸收光谱等性质和钙调蛋白显著不同. Shyu 等^[10]也报道从 *B. cereus* T 的休眠孢子中纯化得到一个性质类似的热稳定性类钙调蛋白.

Falah 等^[11]在耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* ATTC 14468) 和牛分枝杆菌 (*M. bovis* BCG 1400401) 中检测到一个热稳定性蛋白,它能和钙调蛋白发生交叉反应. 含有该蛋白的无细胞粗提液对 cAMP 磷酸二酯酶无作用,研究者推测可能是存在抑制因子. 用硫酸铵分级沉淀除去蛋白质性质的抑制因子后,该蛋白能够激活 cAMP 磷酸二酯酶. 这一实验中发现的类钙调蛋白抑制因子很有意义,这可能有助于重新校正过去许多对类钙调蛋白的研究,它们往往被发现不具有任何激活功能.

2.2 兰细菌的类钙调蛋白

Kerson 等^[12]首先在研究沼泽颤藻 (*Oscillatoria limnetica*) 磷摄入中发现有类钙调蛋白的活性,实验发现低浓度的 Ca^{2+} ($2\mu\text{mol/L}$) 能促进磷的吸收,促进作用能被钙调蛋白拮抗剂所抑制,放射免疫分析发现 *O. limnetica* 的无细胞粗提液能和鼠钙调蛋白抗体交叉反应. Pettersson 等^[13]报道三株 *Anabaena* 的无细胞粗提液经煮沸后仍能激活黄瓜 NAD 激酶,激

活作用能被 EGTA 和钙调蛋白拮抗剂所抑制. 利用菠菜钙调蛋白抗体进行的 Western 杂交发现一个 17 000 的蛋白. Pettersson 等^[13]的另一重要发现是利用免疫电泳对类钙调蛋白进行了胞内定位, 发现在多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) 营养细胞和异型胞中都有类钙调蛋白, 这是第一次在原核细胞中直接观察到类钙调蛋白, 充分证明了原核生物中确实存在类钙调蛋白. 利用鸡钙调蛋白基因为探针, 对念珠藻 (*Nostoc* PCC6720) 和蛋囊藻 (*Anacystis nidulans*) 总 DNA 的酶切片段进行 Southern 杂交, 发现了明显的互补带^[12,14].

Bianchini 等^[15]从一株 *Anabaena* 中部分纯化得到三个分子量为 58 000, 40 000 和 16 000

的多肽, 它们都具有热稳定性以及 Ca^{2+} 依赖性地激活磷酸二酯酶和 *Anabaena* 腺苷环化酶的能力. Onek 等^[3]在 *Nostoc* PCC6720, McColl 等^[16]在聚球藻 (*Synechococcus* sp. PCC7942) 中纯化得到类钙调蛋白.

表 2 中列举了目前在原核生物中已知的类钙调蛋白的部分性质. 可以看出, 原核生物中类钙调蛋白无一能真正属于钙调蛋白的范畴, 它们和真核生物钙调蛋白的相似性主要表现在部分物化性质上. 但是, 尽管我们对这类蛋白的研究还远不够深入和全面, 现有证据仍表明在原核生物中存在着一套类似真核生物的钙信号传递系统, 而类钙调蛋白即为此系统中一个重要的组成成分.

表 2 原核生物中的类钙蛋白

多肽 (Mr)	钙结合性质	酶活性	免疫交叉反应	其它性质	生物
58 000—60 000	+ ¹⁾	— ²⁾	N ³⁾		<i>E. coli</i>
	+	N	—		<i>Synechococcus</i>
	N	N	N		<i>Anabaena</i>
40 000—47 000	+	—	—		<i>E. coli</i>
	N	+	N		<i>Anabaena</i>
33 000	+	N	N		<i>E. coli</i>
	+	N	+		<i>Nostoc</i>
20 000—25 000	N	+	+		<i>B. subtilis</i>
	+	+	+	1 ⁴⁾	<i>Nostoc</i>
	+	—	—		<i>S. erythraea</i>
	+	N	N		<i>B. cereus</i>
16 000—18 000	+	N	—		<i>Synechococcus</i>
	+	+	+		<i>Nostoc</i>
	N	N	+		<i>Anabaena</i>
	N	+	N		<i>Anabaena</i>
N	N	+	+		<i>Mycobacterium smegmatis</i>
					<i>M. bovis</i>

1) + 正反应; 2) — 负反应; 3) N 无报导; 4) 1 含有 Ca^{2+} 结合序列.

3 类钙调蛋白的潜在功能

目前已知的类钙调蛋白可能参与的生理功能主要有:

3.1 孢子形成 Fry 等^[5]在对 *B. subtilis* 类钙调蛋白的研究中发现孢子形成和类钙调蛋白活性有相关性, 钙调蛋白拮抗剂能够抑制孢子形

成, 此外, 伴随孢子形成过程发生的胞内蛋白质水解也可能需要类钙调蛋白的参与.

3.2 细胞分裂 对 *E. coli* 的研究发现在细胞分裂过程中, 胞内 Ca^{2+} 的浓度能增加至少 4 倍, 从这样明显的浓度改变完全有理由推测 Ca^{2+} 以及类钙调蛋白在细胞分裂中可能起着重要和多样性的调控作用. Falah 等^[11]对 *M.*

smegmatis 和 *M. bovis* 的研究发现有类调蛋白活性出现在细菌生长的对数早期, 这个时期的细菌细胞正处于活性分裂阶段, 作者推测类钙调蛋白可能有诱导细胞增殖的作用. 类钙调蛋白可能参与了真核生物 DNA 复制过程的错配修复早有猜测, 在原核生物中是否亦有类似功能也值得研究. 最近, 从 *E. coli* 中分离到一个可能涉及到染色体复制启动的蛋白, 由蛋白编码基因推导出的氨基酸序列展现了四个和真核生物钙调蛋白类似的钙结合位点^[17]. 在 *E. coli* 中, 已发现至少 130 种不同的磷酸化蛋白, 其中之一, 热稳定蛋白 Dnak 蛋白, 在加入 Ca^{2+} 之后, 具有体外自磷酸化, 使活性上升 10 倍的能力, Dnak 蛋白和真核生物热休克蛋白 Hsp70 有高度的同源性, 同源性区段包括了 21 个氨基酸的保守序列, 这段序列在真核生物中已证实具有结合钙调蛋白的能力, 更具有意义的是, Dnak 蛋白在 *E. coli* 中涉及到染色体和质粒的复制. 在真核生物中, 肌球蛋白和蛋白激酶 C 活性均受到 Ca^{2+} 的调节, 并且在细胞分裂中起着重要的作用, 最近利用单克隆抗体技术在 *E. coli* 和 *B. subtilis* 中均检测到具有相同免疫原性的蛋白质存在^[17,18], 但这类蛋白质是否具有肌球蛋白和蛋白激酶 C 的功能尚有待证实.

3.3 异型胞形成 异型胞形成必须有钙的参与, 同时还伴随着胞内蛋白的水解, 这个过程和孢子形成类似. 在 *Nostoc* PCC6720 中, 异型胞的比例和胞内钙浓度有一定的相关性^[19], 虽然加入钙调蛋白抑制剂未对异型胞比例发生任何影响, 但加入钙结合物以改变胞内钙浓度却能明显改变异型胞的比例, 推测在细胞内可能也存在介导 Ca^{2+} 信号的类钙调蛋白.

3.4 兰细菌的固氮作用 Ca^{2+} 被认为可能参与固氮酶的防氧机制. Onck 等^[3]发现钙调蛋白拮抗物在氧存在时可以抑制固氮酶的活力, 同时, 还能降低被氧压抑制的固氮酶恢复活力的能力.

3.5 兰细菌的光合作用 兰细菌的两套光合系统 (PS I 和 PS II) 均需要 Ca^{2+} 的参与才能实

现其功能. England 等^[20]发现 PS II 活力和胞内钙浓度有相关性. 最近, Tranmontini 等^[3]发现豚鼠钙调蛋白抗体可以抑制 PS II 的钙依赖性活力, 暗示着在 PS II 激活系统中可能有钙调蛋白的参与. 在高等植物中早已发现钙调蛋白对叶绿体光合作用中有调节作用, 根据叶绿体的内共生假说, 叶绿体源于古兰细菌, 因此, 完全有理由推测兰细菌光合作用亦会受到类钙调蛋白的调节.

3.6 对酶活的激活 至今为止, 已发现磷酸二酯酶, NAD 激酶和腺苷环化酶能被类钙调蛋白激活, 在百日咳博特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 和炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 中, 类钙调蛋白依赖性的酶活力还和细菌致病性密切相关.

此外, 可能涉及类钙调蛋白活力的生理活动还有: 兰细菌的无机磷摄入以及 *B. subtilis* 的化学趋向性. 钙作为一种重要的生命元素, 在原核生物的多种代谢活动中起着调控作用, 如趋化性, 孢子形成, 致病性, 糖和蛋白的跨膜运输, 蛋白磷酸化, DNA 复制的启动和稳定拟核及外膜等^[17], 但目前对这些调控作用的细节尚不清楚, 对类钙调蛋白的可能功能大都建筑在一些间接证据, 如 Ca^{2+} 浓度和生理作用的相关性, 钙调蛋白抗体的拮抗作用等, 要完成建立类钙调蛋白的信号传递机制尚需进一步的研究. 最近, 从蛋白质氨基酸序列数据库中又发现热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的分泌蛋白, 纤维素酶 A, *E. coli* 的溶血素, 延长因子 EFts, 转录中止因子 rho 以及质粒 R6K 的复制启动蛋白有钙结合蛋白位点的典型高级结构^[17], 这类蛋白是否能结合钙并受钙调控尚有待证实, 但这一结果至少可以说明类钙调蛋白的存在和作用可能远较我们了解的为多, 它可能涉及到细胞更多的生理活动.

致谢 本文承蒙导师焦瑞身教授的审阅, 特致谢意.

参 考 文 献

- 2 Cheung W Y. Biochem Biophys Res Comm, 1970; **38**: 533
- 3 Onek L A, Smith R J. J Gen Microbiol, 1992; **138**: 1039
- 4 Iwasa Y, Yonemitsu K, Matsui K *et al.* Biochem Biophys Res Comm, 1981; **98**: 658
- 5 Fry I J, Villa L, Kuehn G D *et al.* Biochem Biophys Res Comm, 1986; **134**: 212
- 6 Harmon A C, Prasher D, Cormier M J. Biochem Biophys Res Comm, 1985; **127**: 31
- 7 Inouye S, Francheschini T, Inouye M. Proc Natl Acad Sci USA, 1983; **80**: 6829
- 8 Leadlay P F, Roberts G, Walker J E. FEMS Lett, 1984; **178**: 157
- 9 Swan D G, Cortes J, Hale R S *et al.* Nature (London), 1987; **329**: 84
- 10 Shyu Y T, Foegeding P M. J Gen Microbiol, 1991; **137**: 1619
- 11 Falah A M S, Bhatnagar R, Bhatnagar N *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1988; **56**: 89
- 12 Kerson G W, Miernyk J A, Budd K. Plant Physiol, 1984; **75**: 222
- 13 Petterson A, Bergman B. FEMS Microbiol Lett, 1990; **60**: 95
- 14 Putkey J A, Vi T S, Tanaka K F *et al.* J Biol Chem, 1983; **258**: 11864
- 15 Bianchini G M, Pastini A C, Muschietti J P *et al.* Biochem Biophys Res Comm, 1990; **1055**: 75
- 16 McColl S M, Evans E H. In: Marsac T D eds. Proceeding of the first european workshop on the molecular biology of cyanobacteria. France: Dourdan, 1990; 60—61
- 17 Norris V, Goldberg C M, Voskuil J *et al.* Mol Microbiol, 1991; **5**: 775
- 18 Caregola S. Mol Microbiol, 1990; **4**: 505

- 19 Smith R J, Hobson S, Ellis I. New Phytologist, 1987; **105**: 531
- 20 England R R, Evans H. Biochem J, 1983; **210**: 473

Calmodulin-Like-Protein in Prokaryotes.

Zhang Weiwen (Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032, China).

Abstract Calmodulin is currently regarded as a central component in a complex regulatory system in the eukaryotic cell and imposes control upon many of the essential metabolic and physiological functions of the cells. But the attempts to find such calmodulin-like-protein in prokaryotes always gave controversial conclusion before. Since the first calmodulin-like-protein was found in *E. coli* in the early 1980s, the protein factors have been detected in many kinds of prokaryotes, and their regulatory functions have been found in sporulation, cell fission of bacteria, heterocyst cyto-differentiation, N_2 fixation and photosynthesis in cyanobacteria etc. The recent research progress in the field was reviewed.

Key words prokaryotes, calmodulin-like-protein, physiological function

细胞周期和调控因子

徐晋麟

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

徐沁

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 近期对细胞周期调控的研究获得了突破性进展。人们深入地研究了周期蛋白家族和 pp^{34} 蛋白家族在周期调控中的作用及二者之间的相互关系, 同时还发现了很多与之相关的调控因子, 它们彼此相互作用, 形成了极为复杂的级联调控网络。

关键词 细胞周期, MPF, 周期蛋白, CDKs, 生长因子