

的关系目前文献报道甚少,随液晶生物学的发展将逐步会得到阐明。

膜整合蛋白同质膜下方的微管—微丝系统连接,然而这一系统在生理温度下是液晶态^[9],那么它是否偶联细胞膜热致相变,共同调节膜功能蛋白活性?等等,诸此之类的生物液晶相变问题有待我们努力去探索和研究。

参 考 文 献

- [1] Mints, R. I. et al.: *Arkh Patol*, 43 (7), 3—12, 1981.
- [2] Larsson, K. et al.: *Lyotropic liquid Crystals and Structure of biomembranes* Advances in Chemistry Series 152, 43—68, American Chemical Society, Washington, D. C. 1976.
- [3] Bouligand, Y.: *Liquid crystalline Order in poly-*

mers, 262—294, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.

- [4] Thompson, T. E. et al.: *Membrane Physiology*, 27—44, Plenum Medical, New York and London Book Company, 1980.
- [5] Lee, A. G.: *Prog. Biophys. mol. Biol.*, Vol. 29, (1), 3—56, 1975.
- [6] Grant, C. W. M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 71, 4653, 1974.
- [7] Mouslay, M. D. et al.: *Dynamic of biological membranes-influence on synthesis structure and function*, 98—116, 1982.
- [8] Johansson, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 1643—1650, 1981.
- [9] Ambrose, E. J.: *Lyotropic Liquid Crystals and structure of biomembranes*, Advances in Chemistry Series 152, 142—151, American Chemical Society, Washington, D. C. 1976.

[本文于1984年3月19日收到]

钙调蛋白的结构与功能(上)

徐 友 涵

(南开大学分子生物学研究所,天津)

一、细胞第二信使体系

在一切生命现象中存在的物质代谢、能量转换与信息传递三种过程,彼此间紧密关连。信息传递对于协调单个细胞之间或胞内各细胞器间的活动是必需的。细胞表面受体与信使分子相互作用,活化或抑制代谢链中的限速步骤的生化反应以协调细胞的活动。至今人们发现的信使包括激素、神经递质、介体(Mediator)及胞内信使(环苷酸、 Ca^{2+})。前者主要传递细胞间的信息,后者负责胞内通讯。自从发现cAMP作为胞内生化过程的调节剂以及 Sutherland 于1962年提出第二信使学说以来,cAMP作用的分子机制得到详细的阐明:激素(β 受体激动剂)作用于细胞膜外侧的受体,活化膜上的环化酶,催化合成cAMP;后者结合到蛋白激酶(R·K)的调节亚基(R)上,使之与催化亚基K解离,

从而活化了蛋白激酶,它又催化一系列蛋白在Ser、Thr残基位上磷酸化,改变其构象,影响其生物活性,修饰各种生化反应。另一方面人们早已注意到 Ca^{2+} 在细胞调节中的多方面功能。这可追溯到100年前,英国生理学家 Ringer 发现离体蛙心只有在循环溶液中含有 Ca^{2+} 时才能继续搏动。以后几十年中人们不断发现许多生理过程,如细胞收缩、胞吐、胞饮、糖元代谢、神经递质释放、DNA合成、细胞分裂、染色体运动,乃至细胞死亡等都与 Ca^{2+} 有关。Rasunussen 于1970年提出一个假设: Ca^{2+} 也作为第二信使媒介各种细胞反应,并认为第二信使体系的重要特点是 Ca^{2+} 与cAMP的协调作用。至于 Ca^{2+} 作用的分子机制则一直是个谜。直到后来人们发现各种钙合蛋白,特别是钙调蛋白(Calmodulin,简称CaM)后才得到阐明。现已弄清它作为胞内 Ca^{2+} 的受体蛋白,协调细胞各种依

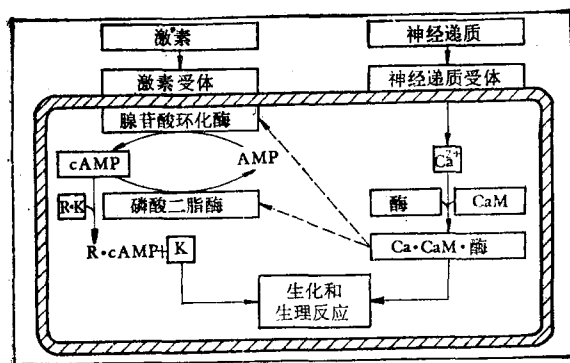


图1 第二信使假说

细胞质膜外侧激素受体接受第一信使—激素的信息,通过第二信使—cAMP 影响蛋白激酶 (R·K) 的活性(催化亚基 K;调节亚基 R),从而调控一系列生化反应。神经递质作用于受体,导致细胞内 Ca^{2+} 浓度一阵性提高,通过钙调蛋白 (CaM),也修饰一系列生化反应^[1]。

赖 Ca^{2+} 的生理过程^[1,2](图1)。

二、钙调蛋白的生理功能

至今已发现 CaM 调控许多重要生理功能的酶,协调许多细胞的活动。

1. 调节环核苷酸的代谢 CaM 对磷酸二脂酶(PDE)与腺苷酸环化酶(ACase)的调控。

胞内水解 cAMP、cGMP 的磷酸二脂酶具有多种类型,其中被 CaM 活化的 PDE 最近已被纯化,证实它是含有 2 个亚基的酶(分子量 11.6 万)。每个亚基可结合一个 Ca^{2+} ·CaM,生成活性的全酶,它是至今为止研究最详尽的一个 CaM 调控的酶。

依赖 CaM 的腺苷酸环化酶已从脑神经胶质瘤等细胞中分离纯化,其催化亚基与调节亚基的分子量分别为 20 万与 4.2 万,CaM 对 PDE、ACase 的影响主要是增加最大反应速度而较少影响 K_m 值。

一个有趣的问题是如何解释作为第二信使的 cAMP,其合成与分解反应都受 CaM 激活?一种解释是当细胞受到刺激, Ca^{2+} 穿过膜流入胞内的过程中首先活化膜上环化酶,催化 cAMP 合成,而当 Ca^{2+} 扩散到胞质后才活化 PDE,导致 cAMP 分解,这种顺序活化产生了 cAMP 短时间的积累,另一种解释是胞内 PDE 就分解 cAMP 与 cGMP 而言,对后者有较高的分解速

度,因此 PDE、ACase 同时活化会导致 cAMP/cGMP 的比例增加,而第二信使体系的作用主要取决于这个比例,而不是单个环核苷酸的浓度^[3]。

2. 调节 Ca^{2+} 的代谢 CaM 活化膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase

一般来讲细胞在非兴奋状态下 Ca^{2+} 水平大约在 10^{-8} — $10^{-7}M$ (取决于细胞种类),而胞外 Ca^{2+} 浓度一般在 $10^{-3}M$ 。维持这个跨膜浓度梯度的一个重要因子是质膜上的 Ca^{2+} -ATPase。1977 年人们证明 CaM 可活化该酶的活性,于是 CaM 的作用不仅是将 Ca^{2+} 信息传递给不同的酶,同时也通过它对 Ca^{2+} -ATPase 活性的控制来调节胞内 Ca^{2+} 浓度。在胞内极低的 Ca^{2+} 浓度下,CaM 主要以无 Ca^{2+} 的非活性状态存在,不能激活 Ca^{2+} -ATPase,酶对 Ca^{2+} 亲和力也很低($K_d \sim 10\mu M$)。当细胞受激素或神经冲动刺激后,质膜上 Ca^{2+} 离子通道被打开,或 Ca^{2+} 同时也从胞内 Ca^{2+} 储库(如线粒体或网膜系统)中释放出,导致胞内 Ca^{2+} 浓度瞬间提高到 10^{-6} — $10^{-5}M$,于是形成 Ca^{2+} ·CaM 复合物,它可与膜 Ca^{2+} -ATPase 结合,提高它对 Ca^{2+} 的亲和力($K_d \sim 0.5\mu M$),同时酶活力提高 6—7 倍,活性运转 Ca^{2+} 能力也大大增强,从而使胞内 Ca^{2+} 迅速恢复到兴奋前的稳态水平。

在内翻外脂囊泡或纯 Ca^{2+} -ATPase 重组的脂囊泡实验中,CaM 也显示增加 Ca^{2+} 泵对 Ca^{2+} 的亲和力及 Ca^{2+} 的吸收速率。

心肌肌质内质网膜系统(SR)上的 Ca^{2+} -ATPase 也受 CaM 调节,机制似乎更复杂些。1978 年 Katg 发现 CaM 活化的膜合蛋白激酶,磷酸化一种分子量为 2.2 万、含 2 个亚基的膜蛋白——受磷酸蛋白的亚基 I,后者构象的变化改变了邻近与之结合的 Ca^{2+} -ATPase 的微环境,从而影响 Ca^{2+} 泵的活性^[4]。另一方面,依赖 cAMP 的蛋白激酶磷酸化“受磷酸蛋白”亚基 II,它不直接导致刺激 Ca^{2+} 的吸收,只起加强依赖 CaM 的 Ca^{2+} 吸收作用。

3. 细胞运动、收缩体系与细胞形状

肌动蛋白与肌球蛋白是广泛分布,与细胞

运动收缩有关的蛋白。受 CaM 调节的肌球蛋白的可逆磷酸化影响平滑肌与非肌细胞如血小板、巨噬细胞的收缩。现已明确 CaM 作为 Ca^{2+} 的受体蛋白,活化肌球蛋白轻链激酶 (MLCK),后者磷酸化肌球蛋白头部分子量为 2 万的轻链 (LC_{20}),使之构变,才能与肌动蛋白相互作用,刺激产生 ATPase 活性,ATP 水解又提供收缩必需的能量。现已证明,轻链磷酸化的程度与 ATPase 活性直接有关,也与张力直接成正比,而磷酸酶催化的轻链脱磷酸化程度则与弛豫成正比^[5]。另一方面,依赖 cAMP 的蛋白激酶也可磷酸化轻链激酶,降低酶活,因此 Ca^{2+} , cAMP 在影响细胞收缩过程中显示拮抗效应。

4. 糖元的代谢

CaM 不仅调节细胞收缩成份,也调节收缩时必需的能量供应,使产能过程与机械收缩相协调。细胞兴奋时,胞内 Ca^{2+} 瞬间提高,触发收缩的同时, $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 也活化磷酸化酶激酶与糖元合成酶激酶,前者磷酸化磷酸化酶 b,使之成为活性形式,催化糖元解聚,后者磷酸化糖元合成酶,使之钝化,抑制糖元的合成。这种双重调节作用,使糖元迅速分解成葡萄糖,为进一步氧化提供收缩的能量。

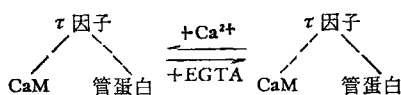
磷酸化酶激酶含四种不同的亚基—— α 、 β 、 γ 、 δ 。其中 γ 是催化亚基; α 、 β 是调节亚基,可被依赖 cAMP 蛋白激酶磷酸化,影响酶的构象; δ 亚基就是 CaM,它与其他亚基的结合不依赖 Ca^{2+} 。而另一分子 CaM,则以依赖 Ca^{2+} 的形式结合在 α 、 β 亚基上,提高酶活 5 倍。

5. 细胞分裂与核酸代谢

(1) CaM 对细胞周期的影响 CaM 参与细胞分裂调控的一个重要证据是它在细胞周期中的含量不是恒定的。中国大鼠卵细胞在早 G_1 期, CaM 浓度约 $25\text{mg}/10^6 \cdot \text{细胞}$,在晚 G_1 期,该值增加约一倍,而在其他各期 (S 、 G_2 、 M), CaM 浓度不变,说明 CaM 合成是在 G_1 晚期。线性迴归分析表明, CaM 水平与 G_1 期长短及进入 S 期细胞的百分数有直接的相关性,因此 CaM 水平对 G_1 期转化成 S 期起关键作用,抑制 CaM 可使细胞生长阻断在 G_1 - S 期转换上。有人发

现病毒、激素或化学致癌源诱发的转化细胞中, CaM 含量都增高 2 至 3 倍,且 G_1 期大大缩短,这可能是转化细胞比正常细胞增殖快得多的原因。

(2) 有丝分裂与微管解聚 间接免疫荧光实验证明在细胞分裂间期, CaM 在细胞质中的分布是均匀的,主要与含肌动蛋白的微丝束结合,而进入有丝分裂期后, CaM 浓聚在极粒与染色体之间的半纺锤体上,促使微管解聚,这对分裂后期染色体运动是必需的。CaM 可通过翻转机制 (flip-flop), 调节微管解聚: 在 Ca^{2+} 存在下, CaM 与微管 τ 因子 (分子量为 55 至 62K 的蛋白) 结合,使管蛋白失去聚合能力;在无 Ca^{2+} 时, τ 因子不结合 CaM,而与管蛋白结合,使管蛋白二聚体聚合成微管结构。简单表达如下:



上述翻转机制可能是 CaM 调节细胞骨骼、收缩成份的一般机制^[6]。CaM 抗体或拮抗药物如 W_{13} , 长春花碱 (抗肿瘤药物) 阻断 CaM 对微管的解聚作用,影响染色体运动、干扰有丝分裂。

(3) CaM 与核酸合成 细胞进入 DNA 合成期时必需有足够量的 CaM,暗示它可能影响 DNA 合成。鼠肝上皮细胞组织培养液中 Ca^{2+} 低浓度 ($20\mu\text{M}$) 时, DNA 合成受阻,约 40% 细胞阻断在晚 G_1 期, Ca^{2+} 提高到 1.25mM , 经过 1—2 小时后,又起动 DNA 合成,这过程受 CaM 调节。另一方面, Ca^{2+} 刺激某些细胞 RNA 合成,可能是 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合物活化核内依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶,磷酸化核内特异性非组蛋白,导致基因组的解抑。但这一方面尚无统一的意见,有待进一步研究。

(4) 受精过程 精子进入卵细胞后引起的第一个反应是卵内 Ca^{2+} 浓度瞬间提高。Ridgway 用水母钙敏蛋白注入卵细胞质,发现受精后,蛋白发光增强 1500 倍。利用人工 Ca^{2+} 离子通道 A_{23187} (一种亲脂性抗菌素) 处理卵细胞,也会导

致卵活化。精子头部(顶体)富含含有 CaM (占可溶蛋白的 12%), 受精卵内 Ca^{2+} 与 CaM 的合作对下一步细胞发育是必需的。 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 活化 NAD 激酶, 催化 NADP 合成, 后者是合成糖、固醇、脂肪酸、核苷酸等反应的辅酶, $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 通过 NAD 激酶活化一系列合成反应, 为触发受精卵分裂, 胚胎发育提供了物质基础。

6. 神经递质的合成与释放

与儿茶酚胺合成有关的酪氨酸-3-单加氧酶以及与 5-羟色胺合成有关的色氨酸-5-单加氧酶都是合成反应的限速酶, 被依赖 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 的蛋白激酶催化的磷酸化而得到活化。

神经、分泌组织中 CaM 含量往往很高, 兴奋引起膜去极化, 通过电压敏感的 Ca^{2+} 通道, Ca^{2+} 内流, 由依赖 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 的蛋白激酶磷酸化突触体膜、突触后膜, 囊泡膜上两个专一蛋白 (I_A 、 I_B), 刺激神经递质的释放^[7]。

其他胞吐过程如胰岛素分泌, 肠上皮氯离子分泌, 巨大细胞组胺分泌, 多型核白细胞中蛋白分泌, 血小板 5-羟色胺分泌等也受 CaM 的影响。分泌颗粒朝向质膜运动的动力由微丝提供, CaM 通过影响微管的解聚调节分泌颗粒的运动。

7. 前列腺素与磷脂代谢

(1) 前列腺素的合成与分解 前列腺素在细胞间通讯中有重要意义, 它的代谢受 CaM 的调节: 磷脂酶 A_2 催化磷脂在 2 位裂解生成溶血磷脂与花生四烯酸, 后者是前列腺素合成的前体, 也是限速因子。在血小板中, CaM 刺激磷脂酶 A_2 的活性, 也调节内过氧化物和血栓素 A_2 的代谢, 导致血小板聚集, 血管收缩。另一方面, 前列腺素降解的第一步反应的酶: 15-羟基前列腺素脱氢酶也受 CaM 调节, 它是至今发现的唯一的活力被 CaM 抑制的酶。

(2) 磷脂甲基化的调节 在盘基网柄菌中, CaM 调节甲基转移酶催化的膜磷脂酰乙醇胺的甲基化, 生成磷脂酰胆碱。甲基化改变膜的结构, 影响菌的趋化性, 因此, $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 很可能是该菌趋化性信息链上的一个重要成份。

8. 调节植物细胞的代谢

光照通过膜上植物色素, 可使叶绿体内游离 Ca^{2+} 水平提高到 10^{-5}M 以上, 活化依赖 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 的 NAD 激酶, 合成 NADP, 增加光合成的速率和细胞代谢, NADP/NAD 的比例决定丙糖磷酸脱氢酶催化的糖代谢的方向: 在卡尔文循环中, 丙糖磷酸脱氢酶要求 NADPH, 在糖酵解途径中, 进行逆反应, 则要求 NAD。最近还报道在光合反应中, CaM 参与控制叶绿体光系统 II 的电子传递^[8]。此外, 植物对生长素、赤霉素、细胞分裂素的反应, 也通过 Ca^{2+} 媒介。这些反应中 CaM 的作用尚有待研究。

9. CaM 是细胞代谢调节的综合剂

如上所述, 目前已知至少有 15 种代谢上重要的酶受 CaM 调节。其中特别重要的是它对不同代谢调节剂如激素、神经递质、前列腺素、胞内第二信使 (Ca^{2+} 、环苷酸) 都有直接或间接的调控作用。这几种代谢调节剂在时间、空间上有互补作用, 如激素、前列腺素负责胞间通讯, 而 Ca^{2+} 、cAMP 则为胞内信使。从时间上看, 激素作用时间在分、小时范围, 乃至天计。环苷酸在秒、分的范围。由于 Ca^{2+} 无需重新合成, 适于快速反应, 反应时间在毫秒级。鉴于 CaM 对这些代谢调节剂所起的修饰作用, 有人称它为细胞代谢调节的综合剂。特别是它作为胞内 Ca^{2+} 受体, 即媒介 Ca^{2+} 功能又调节胞内 Ca^{2+} 本身的浓度, 同时调节第二信使 cAMP 的合成分解, 因此在第二信使调节体系中, CaM 处于中心的地位。

三、 CaM 的物理化学性质

1. 一级结构的特点

牛脑 CaM 是一条由 148 个氨基酸组成的多肽链, 分子量 16700。一级结构已得到阐明(图 2)。氨基酸成分有以下特点: (1) CaM 是酸性蛋白, 等电点 4.0, 将近 1/3 的氨基酸是酸性的 Glu、Asp。(2) 不含有易氧化的 Try、Cys。因此分子相当稳定, 特别耐热, 90°C 下可保留完全的活性。(3) 缺乏二硫桥与羟脯氨酸, 使分子在结构上有极大的挠性, 这对 CaM 多功能提

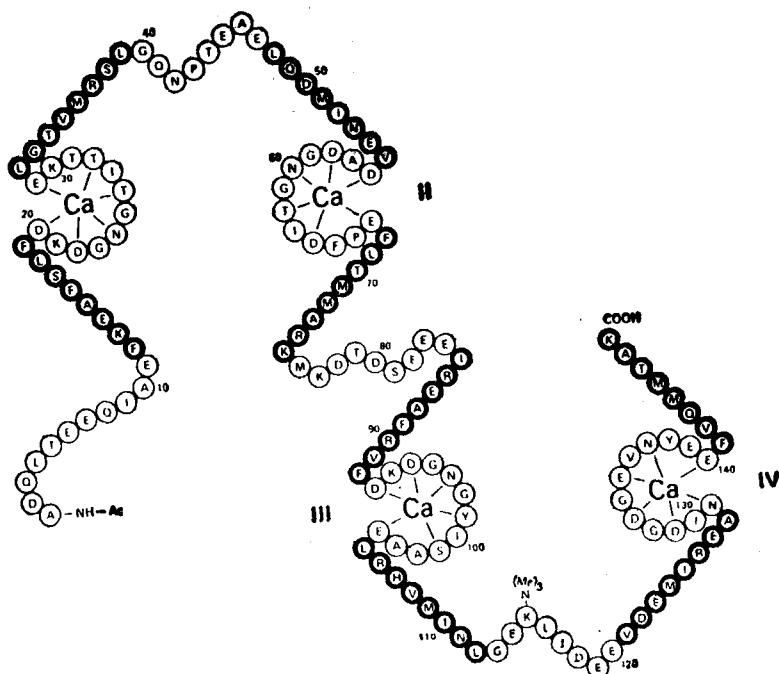


图2 牛脑 CaM 的一级结构(氨基酸残基用单字母码表示)

含有 4 个 Ca^{2+} 合结构域。 α -螺旋结构用粗圆圈表示。注意结构域 I 与 III, II 与 IV 之间的相似性。

供了结构基础。(4) 脊椎动物 CaM 在 115 位含一个三甲基赖氨酸, 它是翻译以后进行修饰的产物, 其生理意义还有待阐明。它可能起增加 CaM 与靶酶亲和力的作用。(5) CaM 缺乏 Trp, 具有高 Phe/Tyr 比 (8:2), 反映在 CaM 紫外吸收谱上具有 5 条峰的精细结构, 其中 253、259、265、269 nm 吸收相应于 Phe, 277 nm 处的吸收峰与肩峰 (282 nm) 相应于 Tyr 吸收; 吸收系数 $\epsilon_{277\text{nm}}^{\text{mg/ml}} = 0.18$, 可用于 CaM 浓度的光谱测定。无脊椎动物 CaM 只有一个 Tyr138, 相应的吸收系数就小。(6) CaM 分子内部四个结构域 (每个含一个 Ca^{2+} 合位) 之间有很大的结构类似性, 特别是结构域 I 与 III, II 与 IV 之间。

CaM 一级结构在进化上呈现很强的保守性。不同真核生物的 CaM 显示免疫交叉反应, 原生动物的如梨形四叶虫 CaM 与脊椎动物的相比, 也只有 11 个残基被取代, 1 个缺失。这种在漫长进化中表现的惊人的保守性仅在核组蛋白中见过。这可由 CaM 具有多方面的重要的生物功能加以解释: 可以设想, CaM 结构上的

突变很容易是致死的, 因而在进化中它始终保持着结构的保守性。

2. CaM 二级结构

CaM 二级结构显示含有高度的 α 螺旋, 在无金属离子时约有 40% α 螺旋, 结合 Ca^{2+} 后增加到 50%。 Ca^{2+} 合位是 12 个残基组成的腔式结构, 半径约 $1 \text{ \AA}$, 两旁接着两条互相垂直的 8 个残基组成的 α 螺旋。Kresinger 称这类 Ca^{2+} 合结构为“EF”手: 两条 α 螺旋和其间的 Ca^{2+} 合环分别相应于右手伸展的食指、拇指和握紧的中指。 Ca^{2+} 合环中 Asp、Glu 羧基上的氧原子与肽链羰基上的氧原子, 靠部分或完全的负电荷, 在腔中选择性结合一个 Ca^{2+} (其结晶半径 $0.99 \text{ \AA}$)。实验表明, 离子半径是 CaM 选择结合二价阳离子的重要因素。

3. 分子形状与晶体结构

Laporte 用荧光性磺胺酸衍生物标记 CaM, 测定其旋转扩散^[9], 证明在水溶液中 CaM 分子形状接近长扁椭圆型, 分子斯托克半径 $23.2 \text{ \AA}$, 摩擦比 1.4。Cook 等首先在 $5\text{mM } \text{Ca}^{2+}$ 存在下

从 2-甲基 2,4-戊二醇中结晶出 CaM, 结晶属三斜晶系, 空间群 P1, $a = 29.79 \text{ \AA}$, $b = 53.74 \text{ \AA}$, $c = 24.78 \text{ \AA}$; α 、 β 、 γ 分别为 93.46° , 96.98° ,

89.05° ; 每个晶胞含一个 CaM 分子, X 射线衍射分辨率超过 $2.5 \text{ \AA}^{[10]}$ 。

[待续]

环糊精在生化研究、农业、药物及食品加工中的应用

芮海凤

(中国科学院环境化学研究所, 北京)

鉴于环糊精 (Cyclodextrin, CD) 的特殊结构(图 1) 和性质^[1], CD 应用范围日益广泛。现就它在生化研究、农业、药物、食品方面的应用, 介绍如下。

一、CD 在模拟酶方面的应用

1. CD 自身的酶学性质

α -CD 可模拟水解酶催化水解三氟乙酰替苯胺^[2], 是经 CD 的二级氢氧离子(O^-)亲核进攻包接在 CD 腔内的 C_1 原子, 产生一个四面体中间物, 再经乙酰化和脱乙酰化而完成。

以 β -CD 为合成酶模型, 包接 2-甲基萘氢醌已合成了维生素 K 类似物^[4]。反应过程是把烯丙基溴加到包接物溶液中, 同时加入极少量的氧气, 使自发地烯丙基化, 随后控制氧化即可(反应式 1)。

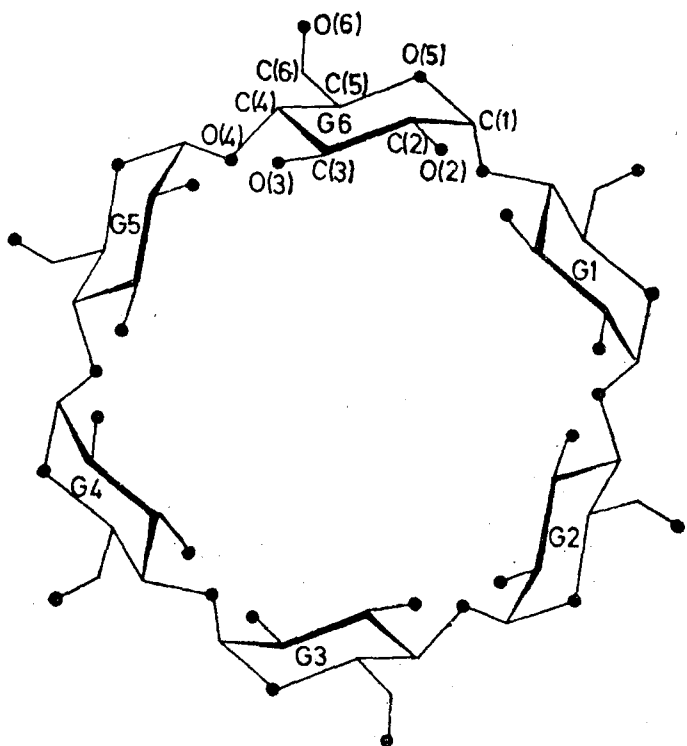
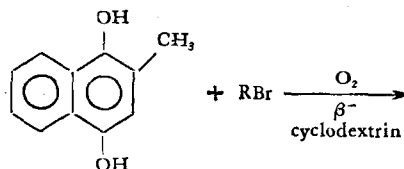


图 1 α -CD 的化学结构^[2]